(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2023 년 4 월 20 일 (20.04.2023)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2023/063617 A1

(51) 국제특허분류:
C12N 5/077 (2010.01) *C12N 5/071* (2010.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2022/014253

(22) 국제출원일: 2022 년 9 월 23 일 (23.09.2022)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2021-0135405 2021 년 10 월 13 일 (13.10.2021) KR

(71) 출원인: 고려대학교 산학협력단 (**KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION**) [KR/KR]; 02841 서울특별시 성북구 안암로 145, Seoul (KR).

(72) 발명자: 임도선 (**LIM, Do-Sun**); 06281 서울특별시 강남구 선릉로 206, 101동 204호, Seoul (KR). 송명화 (**SONG, Myeong-Hwa**); 02853 서울특별시 성북구 고려대로12길 7-3, 102호, Seoul (KR). 노지민 (**NOH, Ji-Min**); 41161 대구광역시 동구 화랑로73길 4, 3층, Daegu (KR). 최승철 (**CHOI, Seung-Cheol**); 04607 서울특별시 중구 동호로 14길 11-11, 202호, Seoul (KR).

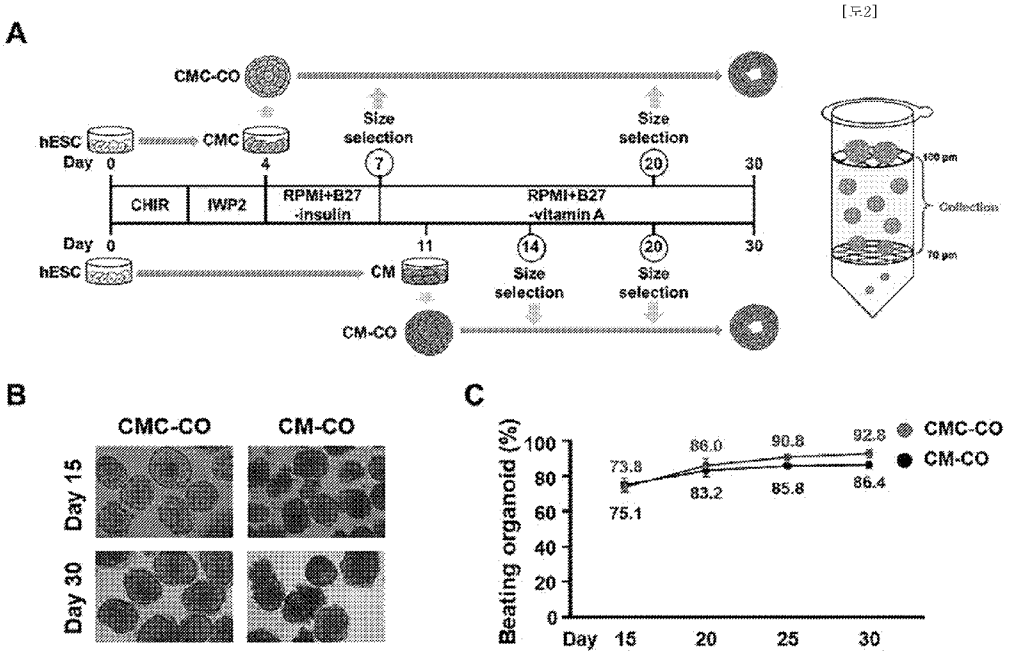
(74) 대리인: 위병갑 (**WIE, Byoung-Gap**); 06141 서울특별시 강남구 테헤란로33길7, 대영빌딩 7층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,

(54) Title: CARDIAC MESODERM CELL-BASED MATURE VENTRICULAR TYPE CARDIAC ORGANOID

(54) 발명의 명칭: 심장 중배엽 세포 기반 성숙 심실 타입 심장 오가노이드

[도2]



(57) **Abstract:** The present invention relates to a mature ventricular type cardiac organoid derived from cardiac mesoderm cells and a method for preparing same, wherein a cardiac organoid derived from cardiac mesoderm cells prepared by the method of the present invention is a mature ventricular type cardiac organoid in which formation and arrangement of sarcomeres are superior to existing reported human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes, T-tubules are well formed and thus structurally mature, and the beating characteristics of cardiomyocytes are more uniformly synchronized, and the cardiac organoid can accordingly replace existing animal experiments and solve ethical problems, and has the advantage of being usable as a three-dimensional heart tissue mimetic capable of reducing a difference in reactivity to drugs between different species.

WO 2023/063617 A1

[다음 쪽 계속]

SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) **지정국** (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

규칙 4.17에 의한 선언서:

— 신규성을 해치지 아니하는 개시 또는 신규성 상실의 예외에 관한 선언 (규칙 4.17(v))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

(57) 요약서: 본 발명은 심장 중배엽 세포 유래 성숙한 심실타입의 심장 오가노이드 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명의 방법으로 제조된 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드는 성숙한 심실타입의 심장 오가노이드이며, 기존의 보고된 인간 다능성 줄기세포 유래 심근세포보다 근절의 형성 및 배열이 잘 형성되어 있으며, T-세관의 형성이 잘 이루어져 있어 구조적 성숙화를 가지며, 심근세포들의 박동 특성이 보다 균일한 동기화된 특성을 가지므로, 기존의 동물 실험을 대체할 수 있어 윤리적 문제를 해결하고, 이종 간의 약물에 대한 반응성의 차이를 줄일 수 있는 3차원 심장조직 모사체로 이용할 수 있는 효과가 있다.

명세서

발명의 명칭: 심장 중배엽 세포 기반 성숙 심실 타입 심장 오가노이드

기술분야

[1] 본 발명은 심장 중배엽 세포 유래 성숙한 심실타입의 심장 오가노이드 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 허혈성 심장질환은 전세계적으로 매우 높은 유병률을 보이고 있으며, 단일질환 전체 사망원인 중 1위를 차지하고 있다. 한국 역시 사회·경제적인 발전과 서구화된 생활습관으로 인하여 허혈성 심장질환 환자들이 급증하고 있다. 더욱이 중증의 말기 심부전 환자의 경우, 심장이식술이나 기계적 좌심실 보조장치 이외에는 완치법이 없는 실정이다. 하지만 공여장기의 부족, 장기확보의 어려움, 높은 사망률 및 고가의 치료비용 등의 문제점을 가지고 있다.

[3] 한편, 인체의 손상된 조직을 재건하기 위한 이식방법에는 이종이식, 동종이식, 자가이식이 있다. 이종이식은 면역 부적합성 및 레트로바이러스를 포함하는 인수공통 병원체 전달의 문제를 갖는다. 또한, 동종이식은 제공자의 면역거부 및 이용불가능성의 문제를 가지며, 자가이식은 필요한 양만큼의 적절한 조직을 얻기 어려우며 환자에 대한 외상의 증가의 문제를 가진다. 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 인공 대체물이나 세포를 배양하여 조직화시킨 것을 그대로 이식하려고 하는 기술이 주목받고 있다. 2004년 순수한 세포 자체를 이용하여 제작한 셀 시트(cell sheet)를 이용한 망막 재생에 관한 연구가 New England journal of Medicine에 발표된 뒤 조직공학 분야에서 세포만을 이용한 3차원 인공조직에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 생체 재료는 질병의 치료 및 재생의 수단으로 생체조직에 직접적으로 접촉하는 소재를 말하며 특히 손상되었거나 기능을 상실한 인체조직 및 기관을 대체하여 사용되는 인공장기 및 조직의 기본 재료이다. 인공 조직은 관절, 뼈, 피부 심장, 혈관 등이 있으며 그 적용 범위는 매우 다양하다. 조직공학기술을 이용하면 부족한 공여자의 문제를 해결할 수 있을 뿐만 아니라 면역반응 또는 암 등을 유발하지 않고 인체의 모든 조직 및 장기를 재생할 수 있다. 현재까지 이식을 위한 인공 조직에 있어 요구되는 특성 중에서 필수 불가결한 특성은 '생체적합성'이다. 이와 같은 조직공학 분야에서 최근 인공 조직보다 주목받고 있는 것이 인공 장기 또는 미니 장기라고 불리는 오가노이드(organoid)이다. 현재 생체 내 여러 장기의 줄기세포에서 유래하는 다양한 종류의 오가노이드 모델이 구축되어 있으며, 재생의학이나 세포치료제로써 오가노이드에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 오가노이드는 줄기세포로부터 발생 및 분화를 통하여 형성된 3차원 세포

구조체로서, 해당 장기의 구조적, 기능적 특성을 재현하는 소형 장기 모사체이다. 오가노이드는 생체 조직의 환경을 모사할 수 있으며, 동물실험을 대체할 수 있는 모델로 사용될 수 있고, 신약 개발, 질병 모델링, 재생 치료 등 다양한 응용 연구 분야에 활용될 수 있다. 그러나, 인간 다능성 줄기세포로부터 분화된 심근세포의 대부분은 배아기나 태아 시기의 심근세포와 유사한 특성을 나타내는 미성숙 심근세포 특성을 가지고 있다. 인간 다능성 줄기세포 유래 미성숙 심근세포의 구조적 특징은 근절의 형성 및 배열이 불완전하고 T-세관의 형성 또한 불완전하다. 또한, 미토콘드리아가 작고 불규칙하게 분포되어 있으며 크리스타가 성숙 심근세포보다 저밀도를 차지한다는 점들이다. 전기생리 및 박동 특성은 동기화되어 있지 않고, 이온 채널의 형성과 약물에 대한 반응성이 불완전하다고 보고되어 있다. 최근 인간 만능 줄기세포에서 유래된 심근세포의 성숙화 정도가 부정맥 발생 및 심장독성 평가시 약물의 반응성을 결정짓는 중요한 지표임이 보고되고 있다. 심장 오가노이드는 미성숙한 심근세포의 성숙화를 유도하는 방법이 보고되고 있지만, 낮은 박동 심장 오가노이드 수와 성숙도를 가지는 문제점이 있어왔다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[4] 본 발명에서는 종래의 인간 다능성 줄기세포로부터 분화된 심근세포들이 구조적, 기능적으로 배아기 심근세포 또는 미성숙 심근세포의 특성을 나타내며, 보고된 심장 오가노이드들은 낮은 성숙화 및 박동 특성을 나타내어 질병모델링 및 약물독성평가에 적합하지 않은 문제점을 해결하기 위해, 인간 다능성 줄기세포로부터 심근세포로의 분화 유도 단계 중 심장 중배엽 세포를 이용하여 보다 높은 박동 심장 오가노이드 수와 성숙도를 가지는 오가노이드를 제조하는 방법 및 심장 오가노이드 성숙 유도용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

[5] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드를 제조하는 방법을 제공한다.

[6] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드를 제공한다.

[7] 또한, 본 발명은 심장 오가노이드 성숙 유도용 조성물을 제공한다.

[8] 또한, 본 발명은 3차원 심장조직 모사체로 사용하기 위한, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드의 용도를 제공한다.

[9] 또한, 본 발명은 본 발명의 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드를 허혈성 심장질환에 걸린 개체에 이식하는 단계를 포함하는, 허혈성 심장질환의 치료 방법을 제공한다.

[10] 아울러, 본 발명은 LEFTY 또는 이의 발현 촉진제의 심장 오가노이드 성숙 유도 용도를 제공한다.

발명의 효과

[11] 본 발명의 방법으로 제조된 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드는 성숙한 심실타입의 심장 오가노이드이며, 기존의 보고된 인간 다능성 줄기세포 유래 심근세포보다 근절의 형성 및 배열이 잘 형성되어 있으며, T-세관의 형성이 잘 이루어져 있어 구조적 성숙화를 가지며, 심근세포들의 박동 특성이 보다 균일한 동기화된 특성을 가지므로, 기존의 동물 실험을 대체할 수 있어 윤리적 문제를 해결하고, 이종 간의 약물에 대한 반응성의 차이를 줄일 수 있는 3차원 심장조직 모사체로 이용할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[12] 도 1은 인간 다능성 줄기세포로부터 심장 중배엽 세포(cardiac mesoderm cell, CMCs) 및 심근 세포(cardiomyocytes, CMs)로의 분화를 각각 유도하고, 이들의 특성을 분석한 도이다.

[13] 도 2는 인간 다능성 줄기세포로부터 분화 유도된 심장 중배엽 세포와 심근 세포를 이용한 오가노이드를 제작하고, 이의 특성을 확인한 도이다.

[14] 도 3은 오가노이드 제작시 단일세포로 분리한 CMC의 최적 분주 세포수를 확인한 도이다.

[15] 도 4는 2 X 10^6 세포를 접종하였을 때 형성되는 오가노이드의 크기 (A) 및 박동하는 오가노이드의 크기 (B)가 차지하는 비율을 나타낸 도이다.

[16] 도 5는 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 심장 오가노이드의 심근 세포 타입 분화를 확인한 도이다.

[17] 도 6은 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심장 오가노이드의 박동하는 오가노이드의 백분율 및 박동 특성을 확인한 도이다.

[18] 도 7은 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드의 활동전위를 분석한 도이다.

[19] 도 8은 박동하는 오가노이드에서의 세포 사이의 접합을 분석한 도이다.

[20] 도 9는 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드에서의 심근 세포의 초미세 구조(ultrastructure) (A 및 B), 근절의 길이와 Z-선의 넓이 (C 및 D) 및 T-세관 (도 E 내지 H)을 분석한 도이다:

[21] DJ: desmosomal junction;

[22] GJ: gap junction;

[23] AJ: adherens junction; 및

[24] Z: Z-line.

[25] 도 10은 심실에서 보여지는 형태적인 특징인 심실 내강(ventricular cavity)과 유사한 내강(cavity)의 형태 및 이의 면적을 확인한 도이다:

[26] H: H-band;

[27] LD: lipid droplet;

[28] Mt: mitochondria;

[29] T-T: T-tubule; 및

[30] Z: Z-line.

[31] 도 11은 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드의 대사적 성숙도를 미토콘드리아의 구조 및 대사 마커 분석을 통해 확인한 도이다.

[32] 도 12는 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드의 대사적 성숙도를 산소호흡에 의한 대사 분석을 통해 확인한 도이다.

[33] 도 13은 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드의 심장 구성 세포 종류 및 이들의 구성 비율을 확인한 도이다.

[34] 도 14는 심장 오가노이드의 특성 및 성숙화와 관련된 신호 기전을 차세대염기서열분석 (RNA-Seq)을 통해 확인하고 유전자 온톨로지(Gene ontology, GO)를 통해 조절된 유전자 목록을 확인한 도이다.

[35] 도 15는 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드의 성숙에 영향을 미치는 신호 기전을 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 분석을 통해 확인한 도이다.

[36] 도 16은 차세대염기서열분석에서 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 발현이 증가하는 것으로 나타난 세포외기질-인테그린 상호작용, 국소접착 및 LEFTY 신호전달과 관련된 분자들의 유전자 발현 및 단백질 발현을 실험적으로 확인한 도이다.

[37] 도 17은 LEFTY가 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드의 성숙 기전에 미치는 영향을 확인한 도이다.

[38] 도 18은 유도 만능 줄기세포 유래 오가노이드의 CMC-CO 및 CM-CO의 특성을 확인한 도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[39] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[40] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때,

이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[41] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

[42] 일 측면에서, 본 발명은 a) 인간 다능성 줄기세포를 심장 중배엽 세포로 분화하는 단계; b) 심장 중배엽 세포를 단일세포로 분리하여 분주하는 단계; c) RPMI1640, B27 및 인슐린을 포함하는 배양액에서 배양하는 단계; 및 d) RPMI1640, B27 및 비타민 A를 포함하는 배양액에서 배양하는 단계를 포함하는 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드를 제조하는 방법에 관한 것이다.

[43] 일 구현예에서, 인간 다능성 줄기세포는: i) 인간 다능성 줄기세포를 단일 세포로 분리하는 단계; ii) Rho kinase 억제제가 포함된 E8 배지에 분주하여 배양하는 단계; iii) GSK-3 억제제 포함된 RPMI1640, B27 및 인슐린을 포함하는 배양액에서 배양하는 단계; iv) IWP2 처리하고 배양하는 단계를 포함하는 방법으로 심장 중배엽 세포로 분화될 수 있다.

[44] 일 구현예에서, 단계 a)는 4일 동안 수행될 수 있다.

[45] 일 구현예에서, 단계 b)에서 심장 중배엽 세포는 2 X 10^5 세포/cm^2의 밀도로 분주될 수 있다.

[46] 일 구현예에서, 단계 c)는 3일 동안 수행될 수 있으며, 전체 기간 중 분화 7일차까지 배양될 수 있다.

[47] 일 구현예에서, 단계 c)는 23일 동안 수행될 수 있으며, 전체 기간 중 분화 30일차까지 배양될 수 있다.

[48] 본 발명에 따르면, 상기 4일, 전체 기간 중 분화 7일차 및 30일차는 다능성 줄기세포를 단일 세포로 분리하여 Rho kinase 억제제가 포함된 E8 배지에 분주하여 배양하는 일자로부터의 4일 동안, Rho kinase 억제제가 포함된 E8 배지에 분주하여 배양하는 일자로부터의 7일차 및 30일차를 의미할 수 있다 (도 2A 참조).

[49] 일 구현예에서, 상기 방법에 70 내지 100 μm의 오가노이드를 선별하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 단계 c)와 d) 사이 및 단계 d) 중에 수행될 수 있으며, 전체 기간 중 분화 7일차 및 20일차에 수행될 수 있다.

[50] 본 명세서에 기재된 "만능 줄기세포(pluripotent stem cell, PSC)"는 몸을 구성하는 어떠한 형태의 세포로도 유도 분화가 가능한 줄기세포를 의미하며, 만능 줄기세포에는 배아줄기세포(embryonic stem cells, ESCs)와 유도 만능 줄기세포 (induced pluripotent stem cells, iPSCs, 역분화 줄기세포)가 포함된다.

[51] 구체적으로, 배아 줄기세포는 착상 이전 단계에 배반포(blastocyst)의 내부 세포 덩어리(inner cell mass)로부터 유도된다. 유도된 세포는 특정한 환경에서

유지되며, 무제한적인 배양 및 다능성 분화가 가능하다. 나아가, 유도 만능 줄기세포는 신체 체세포로부터 역분화되어 만들어지는 다능성 분화 세포를 의미할 수 있으며, 세포 융합, 핵 치환, 다분화성 조절 인자의 과발현과 같은 재프로그래밍(reprograming)이라는 과정을 통해 체세포를 배아 줄기세포와 매우 유사한 상태로 만들어줌으로써 형성된다. 나아가, 만능 줄기세포는 배아 줄기세포 및 유도 만능 줄기세포에 제한되는 것은 아니며, 분화 다능성 및 자기 복제능을 겸비한 세포를 모두포함할 수 있다. 그러나, 바람직하게 만능 줄기세포는 포유동물의 세포, 더욱 바람직하게는 인간 유래의 만능 줄기세포일 수 있다.

[52] 본 명세서에 기재된 "오가노이드 (organoid)"는 줄기세포를 이용해 최소 기능을 할 수 있도록 만든 '미니 유사 장기'로서, 3차원 구조로 만들어져 실험실에서도 실제 신체 기관과 비슷한 환경을 만들 수 있는 것이 특징이다. 즉, "오가노이드(organoid)"는 3D 입체구조를 가지는 세포를 의미하며, 동물 등에서 수집, 취득하지 않은 인공적인 배양 과정을 통하여 제조한 신경, 장 등의 장기와 유사한 모델을 의미한다. 이를 구성하는 세포의 유래는 제한되지 않는다. 상기 오가노이드 (organoid)는 세포의 성장 과정에서 주변 환경과 상호 작용하도록 허용되는 환경을 가질 수 있다. 2D 배양과는 달리, 3D 세포 배양은 체외에서 세포가 모든 방향으로 성장할 수 있다. 이에 따라 본 발명에서 3D 오가노이드는 실제로 생체 내에서 상호 작용을 하고 있는 장기를 거의 완벽히 모사하여, 질병의 치료제 개발 및 등을 관찰할 수 있는 훌륭한 모델이 될 수 있다.

[53] 본 발명에서 용어, "분화"는 세포가 분열하여 증식하며 전체 개체가 성장하는 동안에 세포의 구조나 기능이 특수화되는 현상을 의미한다. 즉, 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어지는 역할을 수행하기 위해 적합한 형태 및 기능으로 변하는 과정을 말하며, 예를 들어, 만능 줄기세포가 외배엽, 중배엽 및 내배엽 세포로 변하는 과정뿐 아니라 전구세포가 특정 분화형질을 발현하게 되는 것도 모두 분화에 포함될 수 있다.

[54] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 방법으로 제조된 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에 관한 것이다.

[55] 일 구현예에서, 상기 심장 오가노이드는 심실 타입(Ventricular-like)일 수 있다.

[56] 일 구현예에서, 본 발명의 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드는 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 ITGA5, ITGA7 ITGB1, ITGB3, COL4A1, LAMB1, LAMC1, FN1, LAMA2, NODAL, LEFTY1, LEFTY2 또는 PITX2의 유전자 발현이 증가할 수 있으며, LIMK, SMAD4, COL1A, ITGA5, ITGAV, ITGB1, ITGB3, ITGB4, LEFTY, NODAL 또는 PITX2의 단백질 발현이 증가할 수 있고, FAK, ROCK1, ROCK2, MLC2, RAC, LIMK, SMAD2 또는 SMAD3의 인산화가 증가할 수 있다.

[57] 일 측면에서, 본 발명은 LEFTY 또는 이의 발현 촉진제를 유효성분으로 포함하는 심장 오가노이드 성숙 유도용 조성물에 관한 것이다.

[58] 본 발명에서 LEFTY의 발현 촉진제는 LEFTY의 발현을 촉진하거나 과발현을 유도하는 물질일 수 있다.

[59] 일 측면에서, 본 발명은 LEFTY를 암호화한 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 유효성분으로 포함하는 심장 오가노이드 성숙 유도용 조성물에 관한 것이다.

[60] 본 발명에 기재된 LEFTY-PITX2 신호 전달 기전은 포유류의 심장 발달 동안 좌우 비대칭에 관여하며, LEFTY는 또한 줄기세포의 자가 재생 유지에 중요하다고 알려져 있다. 또한, 심장근육이 발달하는 동안 태아 심장 세포외기질 성분인 피브로넥틴(fibronectin), 콜라겐 타입 V 및 피브릴린(fibrillin)은 성인 심장 세포외기질 성분인 콜라겐 타입 I으로 대체된다. 콜라겐 타입 I은 마우스 및 hiPSC 유래 심근세포의 성숙을 도와준다고 보고되었다. 또한, PITX2는 콜라겐 생합성의 조절을 통하여 갑상선 기능 저하증을 가지는 난소에서 ECM 분해를 조절한다고 보고되어 있다. ECM 활성화 인테그린은 국소접착 복합체 형성, 액틴 중합 및 액틴 마이오신 스트레스 섬유 형성 및 FAK의 인산화를 유도하여 하위 신호 캐스케이드(cascade)를 추가로 유도한다. FAK 활성화는 또한 액틴 세포골격 조직에 영향을 미칠 수 있는 Rho-family GTPase의 활성에 영향을 미친다. 또한 인테그린 β1 및 α5 유전자 발현이 성숙 과정에서 유도되며, hPSC유래 심근세포에서 성숙을 위해서는 FAK 활성이 필요하다고 보고되어있다. ROCK1은 MLC2 인산화 조절을 통해 액틴 세포골격의 불안정화를 매개하는 반면 ROCK2는 cofilin을 통한 액틴 세포골격을 안정화시키는 역할을 한다고 보고되어 있다. ROCK은 LIM kinase를 인산화 및 활성화 하여 ADF/Cofilin을 인산화하여 액틴 해중합 활성을 비활성화한다.

[61] 본 발명의 일 실시예에서 줄기세포를 심근세포로 분화시키는 단계에서 3차원 구상체를 형성하여 심근세포로의 성숙도가 증가한 것을 확인하고, 또한, 이 과정에서 LEFTY가 작용한 것을 확인하기 위하여 LEFTY의 기능 저하를 통하여 성숙도를 분석하였으며, 단층 배양 조건으로부터 심근세포까지 분화 후 삼차원 배양한 오가노이드 대조군에 비하여 심장 중배엽 세포까지 분화 후 삼차원 배양한 오가노이드에서 성숙 심근세포로의 분화 및 심실 타입 심근세포로의 분화가 증진되는 것을 확인하였다.

[62] 본 발명의 일 실시예에서는, 심장 중배엽 세포 유래 오가노이드에서 심근세포 유래 오가노이드에 비해 심근세포의 형성 및 배열이 잘 배열되어 있으며, 미토콘드리아의 크기가 크며 크리스타가 고밀도로 형성되어 있음을 확인하였으며, 심근세포의 박동이 동기화됨과 심실타입 심근세포와 유사한 박동을 보임을 확인하였다.

[63] 본 발명의 일 실시예에서 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 LEFTY siRNA의 처리를 통한 기능저하를 통하여 COL1A, ITGB1 및 ITGB3의 단백질 발현 수준이 현저히 감소됨을 확인하였으며, LEFTY siRNA 처리를 통하여 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드의 생성 동안 pLIMK, LIMK, ROCK1 및

ROCK2의 활성화가 억제되는 것을 확인하였다. 또한, MLC2v 및 CAV3의 mRNA 및 단백질 발현은 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 생성 동안 LEFTY siRNA에 의한 기능 저하에 의해 유의하게 감소되었다. 또한, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 LEFTY siRNA의 처리는 FAK의 인산화를 감소시켜, LEFTY-PITX2가 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드의 생성 동안 세포외기질-인테그린-국소접착 신호전달 경로를 조절할 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드의 성숙에 관여하는 세포외기질-인테그린-FAK의 하위 신호를 추가적으로 조사한 결과, LIMK1과 pLIMK1은 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 심근세포 유래 오가노이드에 비해 증가하였으며, 인테그린에 의해 활성화된다고 알려진 하위 신호인 ROCK1 및 ROCK2 단백질은 심근세포 유래 오가노이드에 비해 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 현저하게 증가하였다. 이에, 세포외기질-인테그린 활성화에 의해 ROCK1이 주로 pMLC2의 활성화를 유도하여 심근세포의 성숙을 유도한다고 추론할 수 있다.

[64] 본 발명의 일 실시예에서 세포외기질-인테그린 상호작용 및 국소접착 신호전달 인자를 코딩하는 유전자가 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 상향조절되고 FAK의 인산화가 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 증가되는 것을 확인하였다.

[65] 본 발명에서는 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드가 심근세포 유래 오가노이드에 비해 심근세포의 구조적, 대사적, 기능적 및 분자적 성숙도가 향상되고, 심장 성숙 및 심실 타입 심근세포과 관련된 유전자가 상향 조절되었음을 확인하였다.

[66] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드와 약물을 반응시키는 단계; 약물 반응이 끝난 심장 오가노이드를 세척하는 단계; 세척된 심장 오가노이드를 배양하는 단계; 반응, 세척 및 배양하는 단계를 영상으로 촬영하는 단계; 촬영된 영상을 수득하는 단계; 및 수득된 영상을 분석하는 단계를 포함하는, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드를 이용한 약물 독성 평가 방법에 관한 것이다.

[67] 일 측면에서, 본 발명은 3차원 심장조직 모사체로 사용하기 위한, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드의 용도에 관한 것이다.

[68] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드를 허혈성 심장질환에 걸린 개체에 이식하는 단계를 포함하는, 허혈성 심장질환의 치료 방법에 관한 것이다.

[69] 일 측면에서, 본 발명은 LEFTY 또는 이의 발현 촉진제의 심장 오가노이드 성숙 유도 용도에 관한 것이다.

발명의 실시를 위한 형태

[70] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기

실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[71] **실시예 1. 줄기세포로부터 분화된 심장 중배엽 세포 및 심근 세포의 특성 확인**

[72] 인간 다능성 줄기세포로부터 심장 중배엽 세포(cardiac mesoderm cell, CMCs) 및 심근 세포(cardiomyocytes, CMs)로의 분화를 각각 유도하고, 이들의 특성을 분석하였다. 구체적으로, 인간 배아 줄기세포인 H9 hESC 세포주를 아큐테이즈(Accutase)를 사용해 단일 세포로 분리한 뒤 2 μM의 Thiazovivin (Rho kinase 억제제)이 포함된 E8 배지 (STEMCELL Technologies)를 이용하여 마트리젤(Matrigel)이 코팅된 6-웰 배양접시에 2 x 10^6 cells (2 x 10^5 cells/cm^2의 밀도)로 분주하였다. 그 후, 1일 동안 배양하여 세포가 6-웰을 가득 채우면 RPMI1640+B27-인슐린 배지에 6 μM의 농도의 GSK-3 억제제인 CHIR99021 (Sigma-Aldrich)을 첨가한 후 48시간 동안 배양하고, 분화 2일째에 2 μM IWP2를 배지에 추가하여 2일 동안 배양하였다. 분화 4일째에 RPMI1640+B27-인슐린 배지로 교체하여 배양하고, 분화 7일째에 RPMI1640+B27-비타민 A 배지로 교환해주면서 분화 11일까지 배양하였다 (도 1A). 각 세포 특이적 마커의 발현을 확인하기 위해, 각 분화일별로 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 구체적으로, TRIzol을 이용하여 전체 RNA를 추출하고, RNA의 농도와 순도를 Nanodrop 흡광기기로 측정하였다. 추출한 전체 RNA를 M-MLV 역전사 효소를 이용하여 37 ℃에서 50분 동안 20 μL의 양으로 반응시켜 cDNA를 생성하고, iQTM SYBR Green supermix를 이용하여 중합효소연쇄반응을 수행하고, 결과는 MYIQ2 Detection System을 이용하여 기록하였다. Ct 값을 기반으로 정량화하여 유전자 발현 수준을 비교하였으며, 참조 유전자로는 GAPDH 또는 마이토콘드리아의 DNA의 비율을 확인할 때는 핵 DNA를 이용하여 표준화하였다. 지놈 DNA의 증폭을 피하기 위하여, intron-spanning 프라이머를 ProbeFinder software을 이용하여 디자인하였다. 아울러, 마커의 발현을 형광염색법으로 확인하기 위해 형광염색을 수행하였다. 구체적으로, 분화 4 내지 5일차의 심장 중배엽 세포(CMC) 및 분화 11일차의 심근 세포(CM)를 PBS를 이용하여 2번 세척한 후 4% 파라포름알데하이드(PFA)를 이용하여 20분 동안 고정하였다. 고정된 세포를 0.25%의 Triton X-100을 이용하여 30분 동안 투과시켰으며, 5% 일반 염소 혈청(NGS)를 이용하여 상온에서 1시간 동안 블록킹하였다. 그 후 세포를 각 마커에 대한 1차 항체인 항-T (1:400), 항-VEGFR2 (1:400), 항-NESTIN (1:400), 항-FOXA2 (1:400), 항-cardiac troponin T (cTnT, 1:400) 및 항-Myosin light chain 2a (MLC2a, 1:400) 항체와 각각 4 ℃에서 밤새 반응시켰다. 각 세포를 PBS에 0.1%의 Tween 20이 함유된 PBST로 3번 세척한 후, 상온에서 2시간 동안 2차 항체인 Alexa Fluor 488 chicken 항-rabbit IgG (1:1000), Alexa Fluor 594 goat 항-mouse IgG (1:1000) 및 Alexa Fluor 594 goat 항-rabbit IgG (1:1000) 항체와 반응시켰으며, 핵은 1 μg/mL의 DAPI로 염색하였다. 형광 이미지는 형광 현미경과 공초점 형광 현미경을 이용하여 얻었다.

[73] 그 결과, 분화 1-2일에 중내배엽 세포 마커인 MIXL1 및 T가 증가하였으며, 분화 4-5일에서 심장 중배엽 세포 마커인 MESP1 및 VEGFR2가 증가하는 것으로 나타났다 (도 1B). 또한, 형광염색법으로 확인한 결과에서도 중내배엽 세포 마커인 T 및 심장 중배엽 세포 마커인 VEGFR2가 발현되는 것을 확인하였으며, 외배엽 마커인 NESTIN 및 내배엽 마커인 FOXA2의 발현은 관찰할 수 없었다 (도 1C). 또한, 분화 11일에 심근 세포 마커인 cTnT 및 심방 타입 심근 세포 마커인 MLC2a가 증가되는 것으로 나타났다 (도 1B). 아울러, 분화 11일의 세포에서 형광염색법으로 심근 세포의 마커 발현을 확인한 결과, 심근 세포 마커인 cTnT 및 심방 타입 심근 세포 마커인 MLC2a가 발현되는 것을 확인할 수 있었다 (도 1D).

[74] **실시예 2. 배아 줄기세포 유래 오가노이드 제작**

[75] 인간 다능성 줄기세포로부터 분화 유도된 심장 중배엽 세포와 심근 세포를 이용한 오가노이드의 특성을 비교하기 위해 (도 2A), 인간 배아 줄기세포 (H9 hESCs)를 심근 세포로 분화시키는 단계에서 분화 4일차의 심장 중배엽 세포 및 분화 11일차의 심근 세포를 각각 Poly-HEMA가 코팅된 6-웰 배양 접시에 아큐테이즈를 사용하여 단일세포로 분리하여 분주하였다. 이 때, 세포의 최적의 수를 결정하기 위하여 다양한 세포 수를 접종하여 응집체를 비교한 결과, 가장 적절한 세포의 수는 2 X 10^6 개(2 X 10^5 세포/cm^2의 밀도 혹은 6-웰 배양접시의 한 웰 당 2 X 10^6 개)로 관찰되어 (도 3), 이후 실험에서는 2 X 10^5 세포/cm^2의 밀도로 세포를 분주하였다. 심장 중배엽 세포는 RPMI1640+B27-인슐린 배양액에서 분화 7일째까지 배양 후 RPMI1640+B27-비타민 A 배양액으로 교체하여 분화 30일까지 배양하였다. 심근 세포는 RPMI1640+B27-비타민 A 배양액에서 분화 11일부터 분화 30일까지 배양하였다 (도 2A). 또한, 단일 세포로 분리하여 심장 오가노이드로 형성을 유도하고 (CMC의 경우 분화 4일차/CM의 경우 분화 11일차) 3일 후, 균일한 크기의 오가노이드를 선정하기 위하여, 70 내지 100 μm의 세포 스트레이너(strainer)를 이용하여 심장 오가노이드를 분리하였다. 분화 20일차에는 오가노이드 사이의 자가 응집된 심장 오가노이드를 제거하기 위하여 100 μm 세포 스트레이너를 이용하여 분리하였다. 이후, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드(CMC-CO) 및 심근세포 유래 오가노이드(CM-CO)는 RPMI/B27-Vitamin A에서 유지되었으며, 2일마다 배지를 교체하였다 (도 2A). 분화 15일 이후 CMC 또는 CM 유래의 세포 응집체, 즉 오가노이드들이 형성된 것을 확인하였으며 (도 2B), 형성된 오가노이드의 크기를 확인한 결과, 2 X 10^5 세포/cm^2의 밀도로 세포를 분주하였을 때, 많은 수의 오가노이드가 70 내지 100 μm의 크기를 나타냈으며 (도 4A), 70 내지 100 μm의 오가노이드를 선발하였다. 또한, 크기를 균일화한 오가노이드에서 오가노이드의 박동을 분석하기 위해, 현미경 (4x, 초당 50 프레임)을 이용하여 동영상 촬영한 뒤, NIS를 이용하여 15초간 선택된 영역에서의 빛의 세기를 분석하여 분석하였다. 선택된 영역의 박동 역학 및 규칙성은 심장 오가노이드의 동기화를 통하여 보여진 것이라

가정하였다. 그 결과, 분화 15일에 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드에서 각 73.8% 및 75.1%로 나타났으며, 분화 20일에 각 86.0% 및 83.2%, 분화 25일에 각 90.8% 및 85.8%, 및 분화 30일에 각 92.8% 및 86.4%를 차지하는 것으로 나타났다 (도 2C).

[76] **실시예 3. 심장 오가노이드의 심근 세포 타입 확인**

[77] 상기 실시예 2에서 제작한 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 심장 오가노이드의 심근 세포 타입 분화를 확인하기 위해, 각 심장 오가노이드의 분화 30일차에 심근 세포 특이적 마커인 cTnT, 심방 타입 심근 세포 마커인 MLC2a, 심실 타입 심근 세포 마커인 MLC2v 및 결절(nodal) 타입 심근 세포 마커인 TBX18에 대한 프라이머를 사용하여 중합효소연쇄반응, 형광염색, 유세포 분석 및 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. 중합효소연쇄반응은 실시예 1과 동일하게 수행하였으며, 형광염색법은 항-cardiac troponin T (cTnT, 1:400), 항-Myosin light chain 2a (MLC2a, 1:400), 항-Myosin light chain 2v (MLC2v, 1:400) 및 항-TBX18 (1:400) 항체를 이용하여 실시예 1과 동일하게 수행하였다. 구체적으로, 유세포 분석을 위해, 심장 중배엽 세포 및 심근세포 유래 오가노이드를 각각 아큐테이즈를 이용하여 단일세포로 해리한 뒤, 4% PFA를 이용하여 20분간 고정한 후, PBS+2% FBS로 세척하였다. 세포를 얼음처럼 차가운 100% 메탄올로 20분간 얼음 위에서 투과하고 45분 동안 상온에서 1차 항체로 cTnT (1:100), MLC2a (1:100), MLC2v (1:100) 및 TBX18 (1:100) 항체와 각각 반응시켰다. 이후 2차 항체로 goat 항-mouse IgG1 Alexa 488, goat 항-rabbit IgG Alexa 594 및 goat 항-rabbit IgG Alexa 647 항체와 상온에서 각각 20분간 반응시키고 BD FACSCanto™II 유세포 분석기로 분석하고, FlowJo 소프트웨어를 이용하여 데이터 분석하였다. 또한, 웨스턴 블롯 분석을 위해, 심장 중배엽 세포 및 심근세포 유래 오가노이드를 각각 PBS에서 세척한 후, 1 mM의 phenylmethylsulfonyl fluoriderk 함유된 1X 세포 용해 버퍼로 용해하였다. Bradford 분석을 통해 단백질의 농도를 측정한 뒤, 15 μg의 단백질을 1X 로딩 염색제와 섞은 후 8분간 끓였다. 이 후, 각 단백질 시료를 10%의 SDS 아크릴아마이드 젤에서 전기영동으로 분리한 뒤 polyvinylidene fluoride 멤브레인으로 옮겼다. 상온에서 1시간 동안 멤브레인을 5%의 탈지분유 또는 BSA를 포함하는 TBST에서 블록킹하였다. 블록킹한 멤브레인을 항-cTnT (1:1000), 항-MLC2a (1:1000), 항-MLC2v (1:1000) 및 항-TBX18 (1:1000)의 1차 항체와 4 ℃에서 밤새 반응시켰다. 그 뒤, 멤브레인을 TBST로 3번 세척하고 horseradish peroxidase가 컨쥬게이트된 2차 항체와 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 단백질 밴드는 ECL을 이용하여 시각화하였으며, X선 필름과 ChemiDoc 이미징 시스템을 이용하여 얻었다.

[78] 중합효소연쇄반응 결과, cTnT, MLC2a 및 MLC2v의 유전자 발현이 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 유의적으로 증가한 반면, TBX18의 발현은 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 유의적으로 감소되는 것을 확인할 수

있었다 (도 5A). 또한, 형광염색법 분석 결과, 중합효소연쇄반응과 유사하게 cTnT, MLC2a 및 MLC2v의 발현은 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 증가한 반면, TBX18의 발현은 심장 중배엽 세포 유래 및 심근 세포 유래 오가노이드 거의 발현하지 않는 것으로 나타났다 (도 5B 내지 D). 또한, 유세포 분석 결과, cTnT 양성인 세포가 심장 중배엽 세포 유래 및 심근 세포 유래 오가노이드에서 각각 76.6% 및 54.5%, MLC2v 양성인 세포가 각각 53.6% 및 28.9%, MLC2a 양성인 세포가 각각 10.6% 및 7.30%, 및 TBX18 양성인 세포가 각각 1.65% 및 3.55%로 나타나, cTnT, MLC2a 및 MLC2v 양성 세포가 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 더 많이 존재하는 것을 확인할 수 있었다 (도 5E). 아울러, 웨스턴 블롯 분석 결과, 유전자 발현뿐만 아니라 단백질 발현도 cTnT, MLC2a 및 MLC2v가 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 증가되는 것을 확인할 수 있었다 (도 5F).

[79] **실시예 4. 심장 오가노이드의 박동 분석**

[80] 상기 실시예 2에서와 같이 동영상을 이용하여 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심장 오가노이드의 박동하는 오가노이드의 백분율 및 박동 특성을 확인하였다. 박동 특성은 동영상에서 박동하는 심장 오가노이드에서 일정한 크기의 면적을 갖는 5개 지역의 스팟(spot)을 설정하여 그 면적 내에서의 분당 박동 횟수(Beat per minute) 및 박동 간격(Peak to Peak)을 측정한 후 그래프로 나타내어 확인하였다. 또한, 세포 내 Ca^{2+} transient 분석을 위해, 각각의 심장 오가노이드를 4 μg/mL의 Fluo-4 AM와 45분간 37 ℃에서 반응시켜 세포 내의 칼슘을 표지하고, 공초점 형광현미경으로 형광을 관찰한 뒤, Image J 소프트웨어로 강도를 측정하여 그래프로 정량화하였다.

[81] 그 결과, 박동하는 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드의 백분율은 유의적 차이가 없는 것으로 나타났으나 (도 2C 및 6A), 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드는 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 심근 세포의 분당 박동 횟수는 더 적으며, 박동 간격은 더 넓고 균일화된 것을 정량적인 분석을 통해 확인하였다 (도 6B 및 6C). 아울러, Fluo 4-AM의 강도는 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (도 6D 및 E).

[82] **실시예 5. 심장 오가노이드의 활동전위 분석**

[83] 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드의 활동전위를 분석하기 위해, 패치 클램프 실험을 수행하였다. 구체적으로, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드 각각을 마트리젤이 코팅된 35 mm 배양접시에 분주하였다. 활동전위 측정은 전체 세포 구성으로 측정하였으며, 패치클램프 실험은 Axopatch 200B amplifier를 이용하여 상온에서 진행하였다. 심장 오가노이드는 도립현미경에 장착된 챔버에 넣고 NaCl 143 mM, KCl 5.4 mM, HEPES 5 mM, NaH_2PO_4 0.33 mM, glucose 5.5 mM, $CaCl_2$ 1.8 mM, 및 $MgCl_2$ 0.5 mM (pH 7.4)가 함유된 타이로드 용액을 연속적으로

제공하였다. 패치 파이펫 용액에는 KCl 140 mM, EGTA 5 mM, glucose 5 mM, HEPES 5 mM, Mg-ATP 5 mM, 및 $MgCl_2$ 1 mM (pH 7.2)가 함유되었다. 활동전위는 자발적으로 박동하는 세포에서 5분 동안 갭 없는 모드의 전류 클램프로 기록되었다. 활동전위 진폭, 최대 상향 스트로크 속도 및 50% 및 90%에서 활동전위 기간의 재분극은 소프트웨어 pClamp 10.7을 사용하여 5개의 연속 활동전위를 분석하였다. 패치 파이펫은 P-97 Flaming/Brown Micropipette Puller를 이용하여 얇은 모세관으로 뽑았고, 유리 미세 전극을 당겨 파이펫에 채워지는 용액이 4-6 MΩ의 팁 저항이 되도록 설정하여 생성하였다. 전류 클램프 기록은 10kHz, 4-pole Bessel 유형 low-pass filter에서 디지털 방식으로 필터링 되었으며 25kHz의 속도로 샘플링되었다. 데이터 수집 및 분석은 디지타이저 (DigiData 1550B) 및 분석 소프트웨어 pClamp 10.7 (Molecular Devices)을 사용하여 수행되었다.

[84] 심장 중배엽 세포 및 심근 세포 유래 오가노이드에서 심방 타입(Atrial-like) 심근 세포의 활동전위/심실 타입(Ventricular-like) 심근 세포의 활동전위를 가지는 오가노이드의 비율을 확인한 결과, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드는 심방 타입 심근 세포의 활동전위를 가지는 오가노이드가 약 33.3% 및 심실 타입 심근 세포의 활동전위를 가지는 오가노이드가 약 66.7%를 차지하고, 심근 세포 유래 오가노이드는 심방 타입 심근 세포의 활동전위를 가지는 오가노이드가 약 66.7% 및 심실 타입 심근 세포의 활동전위를 가지는 오가노이드가 약 33.3%를 차지하는 것으로 나타났다 (도 7B). 또한, 심근 세포의 성숙도를 확인하기 위하여 휴지막 전위를 확인한 결과, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 유의적으로 더 낮은 휴지막 전위를 가짐을 관찰하였다 (도 7C). 또한, 수축 빈도수(contraction frequency)는 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드에서 유의한 차이는 없었지만, 활동전위 기간(action potential duration)은 50% (APD 50) 및 90% (APD 90) 모두 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 유의하게 더 길어진 것을 확인하였다 (도 7D 내지 7F). 이와 같이, 활동전위 기간이 길어지는 것은 심실 타입 심근 세포의 특징이므로, 이를 결정하는 칼륨 이온 채널의 유전자 발현을 중합효소연쇄반응으로 확인한 결과, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 관련 유전자 발현이 유의하게 증가됨을 관찰하였다 (도 7G).

[85] **실시예 6. 심장 오가노이드의 세포 사이 접합부 분석**

[86] 박동하는 오가노이드에서의 세포 사이의 접합을 분석하기 위하여 투과전자현미경 사진을 이용하여 세포 사이의 접합부를 확인하였다. 구체적으로, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근세포 유래 오가노이드를 각각 2% PFA/2.5% 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)를 이용하여 4 ℃에서 밤새 고정시켰다. 그 후 1% 오스뮴 테트록사이드(osmium tetroxide)로 후고정하고, 탈수한 뒤, Eponate-12 레진(resin)으로 감쌌다. 1 μm

두께의 섹션을 Reichert-Jung Ultracut E ultramicrotome을 이용하여 얻어, 톨루이딘 블루(toluidine blue)로 염색하여 Carl Zeiss Axio 현미경으로 이미지를 얻었다. 그 후, 블록당 60 nm 두께의 섹션을 Formvar 코팅된 슬롯 그리드(slot grids)에서 골라 우라닐 아세테이트/시트르산 납으로 염색하고 샘플을 TEM에 기록하였다. TEM 이미지는 Image J 이미지 가공 소프트웨어를 이용하여 분석하였으며, 통계는 Prism 소프트웨어를 이용하여 means ± standard deviation (SD)로 나타내었다.

[87] 그 결과, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드 모두에서 개재판(intercalated disc)에 속하는 접착반 결합(desmosomal junction) 및 부착연접(adherens junction)는 관찰되었으나, 간극연접(gap junction)은 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서만 관찰되었다 (도 8A). 또한, 간극연접 관련 유전자 발현 및 단백질 발현을 확인하기 위해, 중합효소연쇄반응, 웨스턴 블롯 분석 (항-Cx43 (1:1000) 및 항-ZO-1 (1:1000)) 및 형광염색법 (항-Connexin 43 (Cx43, 1:400) 및 항-ZO-1 (1:400))을 이용하여 간극연접 마커인 Cx43 및 부착연접을 도와준다고 알려진 ZO-1의 발현을 확인하였다. 중합효소연쇄반응 및 웨스턴 블롯 분석 결과, Cx43 및 ZO-1의 유전자 발현 및 단백질 발현은 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 유의하게 증가되는 것으로 나타났으며 (도 8B 및 C), 형광염색 결과, Cx43의 발현이 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 세포 사이의 접합부에서 균일하게 나타났다 (도 8D).

[88] **실시예 7. 심장 오가노이드의 구조적 성숙도 분석**

[89] 7-1. 심근 세포의 미세구조 확인

[90] 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드에서의 심근 세포의 초미세 구조(ultrastructure)을 분석하기 위하여 투과전자현미경 사진을 이용하여 심근 세포의 미세구조를 확인하였다. 그 결과, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서는 잘 배열되고 긴 근절과 근절을 따라 배열된 미토콘드리아가 관찰되었으며, 근절에서는 Z-선(Z-line)뿐만 아니라 H-밴드(H-band)도 확인되었다 (도 9A). 반면, 심근 세포 유래 오가노이드에서는 불규칙적으로 배열된 짧은 근절과 배열되어 있지 않은 미토콘드리아가 발견되었으며, 근절에서는 Z-선만 관찰되었다 (도 9B).

[91] 7-2. 근절의 길이 및 Z-선 넓이 확인

[92] 근절의 길이와 Z-선의 넓이가 심근 세포의 성숙도의 지표가 될 수 있으므로, 근절의 길이 및 Z-선의 넓이를 정량화하여 그래프로 나타낸 결과, 근절의 길이는 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 약 1.8 μm로 나타났으며, 심근 세포 유래 오가노이드에서는 약 1.6 μm로 나타났다 (도 9C). Z-선의 넓이 또한 심장 중배엽 세포 유래 오가노이에서 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 더 넓게 나타남을 발견하였다 (도 9D).

[93] 7-3. T-세관(T-tubule) 확인

[94] 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 성숙한 심근 세포에서 발견되는

T-세관(T-tubule)이 관찰되었으므로 (도 9A), 중합효소연쇄반응, 웨스턴 블롯 분석 및 형광 염색법을 통해 T-세관 마커인 CAV3, JPH2 및 BIN1의 유전자 발현 및 단백질의 발현을 확인하였다.

[95] 그 결과, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 CAV3, JPH2 및 BIN1의 유전자 발현이 증가되는 것으로 나타났으며 (도 9E), CAV3 및 JPH2가 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 균일하게 관찰되었다 (도 9F 내지 9G). 이러한 결과와 유사하게 단백질 발현에서도 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 CAV3 및 JPH2가 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 발현이 증가되는 것으로 나타났다 (도 9H).

[96] 7-4. 내강 면적 비교

[97] 심실에서 보여지는 형태적인 특징인 심실 내강(ventricular cavity)과 유사한 내강(cavity)의 형태가 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드에서 관찰되었으며 (도 10A), 내강이 생긴 오가노이드의 수와 하나의 오가노이드에서 내강이 차지하는 면적을 비교하여 그래프로 나타낸 결과, 내강이 생긴 오가노이드의 수는 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드가 더 많은 것으로 나타났고, 하나의 오가노이드에서 내강이 차지하는 면적 또한 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 더 큰 것으로 나타났다 (도 10B 및 10C).

[98] **실시예 8. 심장 오가노이드의 대사적 성숙도 분석**

[99] 미토콘드리아가 성숙될수록 미토콘드리아의 크리스타의 밀도가 높아지며, 미토콘드리아의 넓이 또한 넓어져 복잡한 구조를 가진다고 보고된 바 있으므로, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드의 대사적 성숙도를 분석하기 위해, 투과전자현미경 사진을 통하여 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드의 미토콘드리아를 비교하여 (도 11A) 그래프화 함으로써 미토콘드리아의 성숙을 비교하였다. 또한, 미토콘드리아는 심장 대사에 관여하므로, 중합효소연쇄반응 및 웨스턴 블롯 분석을 통해 심장 대사에 관련된 마커인 SIRT1, PGC1α, TFAM 및 CPT1β의 유전자 및 단백질 발현을 확인하였다. 아울러, 심장 오가노이드의 대사적 성숙도를 비교하기 위해, 산소호흡에 의한 대사를 Mitochondrial Stress Test Complete Assay Kit를 이용한 산소소비율 분석을 통해 확인하였다. 구체적으로, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드를 각각 96웰 플레이트에 분주하고, 1 μM의 올리고마이신, 2.5 μM의 FCCP(carbonyl cyanide-4-phenylhydrazone) 및 1 μM의 안티마이신 A를 포함하는 배지를 각 웰에 첨가하고 extracellular O2 probe를 각 웰에 첨가하였다. 그 후, 심장 오가노이드를 예열된 HS 미네랄오일로 감싸고 SpectraMax®i3x microplate reader을 이용하여 여기(excitation) 및 방출(emission)을 340 nm와 655 nm 파장에서 확인함으로써 형광을 측정하였다.

[100] 그 결과, 미토콘드리아의 크리스타 구조의 밀도가 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 조밀하게 형성되어 있었으며 (도 11B), 미토콘드리아의 넓이는 심장 중배엽 유래 오가노이드가 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 더 넓은 것으로 확인되었다 (도 11C). 또한, 심장 대사 관련 마커인 SIRT1, PGC1α, TFAM 및 CPT1β의 유전자 발현이 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 유의적으로 증가하였으며 (도 11D), PGC1α, TFAM 및 CPT1β의 단백질 발현이 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 증가된 것으로 나타났다 (도 11E). 아울러, 산소호흡에 의한 대사를 확인한 결과, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 최대 호흡 비율이 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다 (도 12).

[101] **실시예 9. 심장 오가노이드의 세포 구성 확인**

[102] 9-1. 세포 구성 성분 확인

[103] 심장에는 심근 세포 뿐만 아니라 혈관세포, 평활근세포, 섬유아세포 등이 존재하므로, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드의 심장 구성 세포를 중합효소연쇄반응 및 형광염색법을 통해 혈관세포 마커 CD31, 평활근세포 마커 α-SMA 및 섬유아세포 마커 FSP1에 대한 분석을 수행하였다.

[104] 그 결과, 항-CD31 (1:400) 및 항-SMA(α-smooth muscle actin) (1:400)의 1차 항체를 이용한 형광염색에서 α-SMA의 발현은 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드 사이에서 큰 차이를 보이지 않았지만, CD31은 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 발현되는 것으로 나타났다 (도 13A). 또한, 중합효소연쇄반응 결과, α-SMA 및 FSP1은 두 그룹에서 큰 차이를 보이지 않았으나, CD31의 유전자 발현은 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 유의하게 증가된 것으로 나타났다 (도 13B). 이에, 혈관세포의 하위 타입을 확인하기 위해 동맥(arterial) 혈관 세포 마커인 CXCR4 및 EFNB2, 정맥(venous) 혈관 세포 마커인 NRF2, 및 림프(Lymphatic) 혈관 세포 마커인 PROX1에 대한 프라이머를 이용하여 중합효소연쇄반응을 수행하였다. 그 결과, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 상기 혈관 세포 마커들 모두가 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 유전자 발현이 유의하게 증가된 것을 확인하였다 (도 13C 내지 13E).

[105] 9-2. 세포 구성 비율 확인

[106] 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드의 심장 구성 세포의 비율을 α-SMA (1:100), CD31 (1:100) 및 FSP1 (1:100)의 1차 항체를 이용하여 유세포 분석을 통해 확인한 결과, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드에서 CD31 양성인 세포가 각 4.19% 및 0.54%, α-SMA 양성인 세포가 각 8.01% 및 7.44%, 및 FSP1 양성인 세포가 각

10.6% 및 9.37%를 차지하는 것으로 나타났다 (도 13F).

[107] **실시예 10. 심장 오가노이드의 특성 및 성숙화 관련 신호 기전 확인**

[108] 10-1. 차세대염기서열분석

[109] 심장 오가노이드의 특성 및 성숙화와 관련된 신호 기전을 조사하기 위해서, 분화 15일차 및 분화 20일차의 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드를 이용하여 차세대염기서열분석 (RNA-Seq)을 수행하였다 (도 14A). 구체적으로, 심장 오가노이드의 전체 RNA를 TRIzol을 이용하여 추출하고, 전체 RNA의 농도는 NanoDrop을 이용하여 측정되었으며, RNA의 순도는 RNA 6000 Nano Chip로 Agilent 2100 bioanalyzer를 이용하여 측정하였다. 차세대염기서열 분석을 위한 라이브러리를 준비하기 위하여 QuantSeq Library Prep kit를 이용하였으며, NextSeq 500를 이용하여 고처리량 시퀀싱을 수행하였다. 전체 전사체를 비교하고 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 심근세포 유래 오가노이드에 비해 2배 이상 발현 변화를 나타내는 DEGs(differentially expressed genes)를 확인하였다. DEG는 ExDEGA 소프트웨어를 이용하여 분석되었으며, 유전자 분석은 DAVID (http://david.abcc.ncifcrf.gov/), Medline databases (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), Gene Ontology (https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway (http://www.genome.jp/kegg/tool/map_pathway2.html), STRING (http://www.string-db.org/), 및 R studio (https://rstudio.com/)를 사용하여 수행하였다. 총 25,737개의 유전자를 이용하여 벤다이어그램 분석을 수행하였으며, 분화 15일차에서만 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드가 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 증가된 유전자의 수는 62개였고 감소된 유전자는 26개였다. 또한, 분화 20일차에만 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드가 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 증가된 유전자는 745개였고, 감소된 유전자는 251개로 나타났다. 또한, 15일차 및 20일차에 공통으로 증가된 유전자는 117개, 감소된 유전자는 10개로 나타났다 (도 14B). 또한, 장기별 유전자의 발현을 조사하기 위하여 히트맵(Heatmap) 분석을 수행한 결과, 심장과 관련된 유전자들이 15일차 및 20일차의 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드에서 증가되는 것을 확인할 수 있었다 (도 14B). 아울러, 산점도(Scatter plot)를 통해 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 증가된 유전자를 확인해본 결과, 심장과 관련된 유전자의 발현이 증가됨을 관찰하였으며, 15일차보다 20일차에 조절되는 유전자들이 더 많이 나타나는 것을 확인하였다 (도 14C).

[110] 10-2. 유전자 온톨로지 분석

[111] 유전자 온톨로지(Gene ontology, GO)를 통하여 조절된 유전자의 목록을 조사한 결과, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 증가된 유전자의 목록은 근육 수축(Muscle contraction), 근육 세포 발달(Muscle cell development), 혈액 순환의 조절(Regulation of blood circulation),

근절 조직화(Sarcomere organization), 양이온 막횡단 수송 조절(Regulation of cation transmembrane transport), 심실 심장근육 조직 발달(Ventricular cardiac muscle tissue development), 근소포체에 축적된 칼슘 이온이 세포질로의 방출 조절(Regulation of release of sequestered Ca2+ into cytosol by Sarcoplasmic reticulum (SR)), 전구체 대사산물 및 에너지 생성(Generation of precursor metabolites and energy), SA 노드 세포에서 심방 심장근육 세포 소통(SA node cell to atrial cardiac muscle cell communication) 및 간극연접(Gap junction)으로 나타났다 (도 14D). 반면, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 감소된 유전자의 목록은 신경계 발달(Nervous system development), 머리 발달(Head development), 세포 주기(Cell cycle), 세포 증식(Cell proliferation), 뇌 발달(Brain development), 세포 분열(Cell division), 폐 발달(Lung development), 세포예정사(Programmed cell death), 신장 시스템 발달(Renal system development) 및 신장 발달(Kidney development)로 나타났다 (도 14E).

[112] **실시예 11. 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드의 성숙에 특이적인 신호 기전 분석**

[113] 차세대 염기서열 검정 분석을 바탕으로 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드의 성숙에 영향을 미치는 신호 기전을 분석하기 위하여, KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 분석을 통해 증가되는 신호 기전을 확인하였다. 그 결과, 심장근육 수축(Cardiac muscle contraction), 칼슘 이온 신호 기전(Ca2+ signaling pathway), 국소접착(Focal adhesion), 액틴 세포골격 조절(Regulation of actin cytoskeleton), 접착 접합(adherens junction), TGFβ신호 기전(TGFβsignaling pathway), 밀착 연접(Tight junction) 및 세포외기질-수용체 상호작용(Extracellular matrix (ECM)-receptor interaction)이 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 증가되는 것으로 나타났다 (도 15A). 이에, 히트맵 분석을 통해 각 심장 관련 유전자 (심실 타입 심근 세포(Ventricular CM), 심방 타입 심근 세포(Atrial CM), 결절 타입 심근 세포(Nodal CM), 심장 구조적 성숙(Cardiac structural maturation), 간극연접(Gap junction), 심장 대사적 성숙(Cardiac metabolic maturation), 심장 수축(Cardiac contraction) 및 칼슘 이온 채널 활성(Ca2+ channel activity)) 및 신호 기전 (LEFTY 신호전달(LEFTY signaling), 국소접착 및 세포외기질-인테그린 상호작용(ECM-Integrin interaction))에 속하는 유전자의 발현을 비교하였다.

[114] 그 결과, 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드가, 분화 15일차에 비해 20일차에 대부분의 유전자 발현이 더욱 증가되는 것으로 나타났으며, 인간 성인 심근 세포와 심장 관련 유전자를 비교하였을 때, 20일의 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드가 인간 성인 심근 세포와 가장 유사한 것으로 확인되었다 (도 15B 및 C). 아울러, 이러한 유전자의 단백질-단백질 상호작용에 대해 네트워크 분석한 결과, 세포외기질-인테그린 상호작용, 국소접착, LEFTY 신호전달, 심장 성숙, 심장

수축 및 심장 대사와 관련된 단백질들이 모두 서로 상호작용하는 것으로 확인되었다 (도 15D).

[115] **실시예 12. LEFTY가 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드의 성숙도에 미치는 영향 확인**

[116] 12-1. 유전자 및 단백질 발현 비교

[117] 상기 실시예 11에서 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 세포외기질-인테그린 상호작용, 국소접착 및 LEFTY 신호전달과 관련된 유전자들의 발현이 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 증가되었으므로 실험적으로 타당성 검증하기 위하여 중합효소연쇄반응 및 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[118] 그 결과, 세포외기질인 FN1 및 LAMA2의 유전자 발현이 분화 15일차 및 20일차의 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 유의하게 증가하였으며, COL4A1, LAMB1 및 LAMC1의 유전자 발현은 분화 15일차의 심장 중배엽 세포 및 심근 세포 유래 오가노이드 사이에서 큰 차이가 없었으나, 분화 20일차의 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 유의하게 증가하였다 (도 16A). 인테그린인 ITGA1은 분화 15일차 및 20일차의 심장 중배엽 세포와 심근 세포 유래 오가노이드 사이에서 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. ITGA5, ITGA7 ITGB1 및 ITGB3는 분화 15일차의 심장 중배엽 세포 및 심근 세포 유래 오가노이드 간에 큰 차이가 없었으나, 분화 20일차의 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 유의하게 증가하였다 (도 16A). COL1A, ITGA5, ITGAV, ITGB1 및 ITGB3의 단백질 발현은 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 증가하였으며, 분화 15일차보다 20일차에 더욱 증가되는 것으로 나타났다 (도 16B). ITGB4의 단백질 발현은 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 증가되었으며, 분화 15일차 및 20일차 간에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다 (도 16B). FN1은 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 증가하였지만, 분화 15일차에 비해 20일차에서 감소되는 것으로 나타났다 (도 16B). ITGAV 및 ITGB5는 분화 15일차 및 20일차의 심장 중배엽 세포 및 심근 세포 유래 오가노이드 간에 큰 차이가 없는 것으로 확인되었다 (도 16B).

[119] 12-2. 단백질 인산화 비교

[120] 세포외기질-인테그린의 하류 신호 기전이라 알려진 국소접착과 관련된 단백질의 발현 및 인산화를 웨스턴 블롯 분석으로 확인한 결과, FAK의 인산화가 분화 15일차 및 20일차에 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 증가하였으며, LIMK의 발현, LIMK의 인산화, RAC의 인산화, 및 ROCK1, ROCK2 및 MLC2의 인산화가 분화 15일차 및 20일차에 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 심근 세포 유래 오가노이드에 비해

증가되는 것으로 나타났다 (도 16C). 반면, Cofilin의 인산화는 분화 15일차 및 20일차에 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드 간에 큰 차이가 없음을 확인하였다 (도 16C).

[121] 12-3. LEFTY 신호 기전과 관련된 유전자 발현 및 단백질 발현 비교

[122] LEFTY 신호 기전과 관련된 유전자 발현 및 단백질 발현을 웨스턴 블롯 분석으로 확인한 결과, LEFTY1, LEFTY2 및 PITX2의 유전자 발현이 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 유의하게 증가되는 것을 확인하였으며, 분화 15일차에 비해 20일차에 더욱 증가되는 것으로 나타났다 (도 16A). NODAL의 유전자 발현은 분화 15일차에는 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 및 심근 세포 유래 오가노이드 사이에 큰 차이가 없었지만, 분화 20일차에는 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 유의하게 발현이 증가되는 것을 확인하였다 (도 16A). 이와 유사하게 LEFTY, NODAL 및 PITX2의 단백질 발현이 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 증가하였다 (도 16D). 아울러, LEFTY가 TGF의 수퍼패밀리(superfamily)이기 때문에 SMAD의 발현 및 인산화를 확인한 결과, SMAD1/5의 발현은 나타나지 않는 것으로 확인되었으며, SMAD2 및 SMAD3의 인산화, 및 SMAD4의 발현이 분화 20일차의 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 증가되는 것으로 나타났다 (도 16D).

[123] **실시예 13. LEFTY가 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드의 성숙 기전에 미치는 영향 확인**

[124] 13-1. LEFTY-PITX2 신호전달 기전 확인

[125] 상기 실시예 12에서 LEFTY의 발현이 분화 15일차 및 20일차의 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에서 현저히 증가되는 것을 확인하였으므로, LEFTY가 성숙도에 미치는 영향에 대해 조사하기 위해 LEFTY의 siRNA을 이용하여 낙다운을 유도하였다. 구체적으로, 분화 15일차의 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드에 Lipofectamine RNAiMax을 이용하여 음성 대조군 siRNA (nc siRNA) (서열은 sense 5'-UUCUCCGAACGUGUCACG-3' 및 antisense 5'-ACGUGACACGUUCGGAGA-3') 및 LEFTY siRNA (sense 5'-CGUCCAUCACCCAUCCUAA-3' 및 antisense 5'-UUAGGAUGGGUGAUGGACG-3')을 트랜스펙션하였다. 트랜스펙션된 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드는 분화 30일차에 중합효소연쇄반응 및 웨스턴 블롯으로 LEFTY1, LEFTY2, NODAL 및 PITX2의 유전자 발현 및 단백질 발현 정도를 확인하였다.

[126] 그 결과, LEFTY siRNA 처리군에서 LEFTY1 및 LEFTY2의 유전자 발현이 감소됨을 발견하였으며, LEFTY의 단백질 발현 또한 감소되었으며, NODAL 및 PITX2의 유전자 발현 및 단백질 발현이 감소되는 것을 확인하였다 (도 17A 및 17B).

[127] 13-2. 세포외기질-인테그린-pFAK-pLIMK-ROCK 신호전달 기전 확인

[128] PITX2는 콜라겐의 합성을 조절한다고 보고되어 있으므로, 세포외기질-인테그린과 관련된 유전자 및 단백질 발현을 확인한 결과, ITGA7의 유전자 발현이 LEFTY siRNA 처리군에서 감소됨을 발견하였으며, COL4A1의 유전자 발현은 큰 차이가 없는 것으로 나타났고 (도 17C), COL1A, ITGB1 및 ITGB3의 단백질 발현은 LEFTY siRNA 처리군에서 감소되었으며, FN1 및 ITGA5는 큰 차이 없는 것으로 나타났다 (도 17D). 또한, 국소접착과 관련된 단백질 발현을 확인한 결과, FAK 및 LIMK1의 인산화가 LEFTY siRNA 처리군에서 감소되었으며, LIMK1, ROCK1 및 ROCK2의 단백질 발현 또한 LEFTY siRNA 처리군에서 감소되는 것으로 확인되었다 (도 17E).

[129] 13-3. LEFTY가 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드의 성숙에 미치는 영향 확인

[130] LEFTY가 심근 세포 및 성숙에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 심근 세포 마커인 cTnT, 심방 타입 심근 세포의 마커인 MLC2a, 심실 타입 심근 세포의 마커인 MLC2v 및 T-세관 마커인 CAV3의 유전자 및 단백질 발현을 확인한 결과, cTnT 및 MLC2a의 경우, 큰 차이가 없었으나, MLC2v 및 CAV3의 발현은 LEFTY siRNA 처리군에서 감소되는 것으로 나타났다 (도 17F 및 17G).

[131] **실시예 14. 유도 만능 줄기세포 유래 오가노이드 제작**

[132] 상기 실시예 2에서 인간 배아 줄기세포(hESC)에서 파생된 CMC-CO에서 관찰된 것과 유사하게 인간 유도 만능 줄기세포(human induced pluripotent stem cells, hiPSC)에서 파생된 CMC-CO도 CM-CO에 비해 더 성숙하고 심실 타입 CM을 생성하는지 확인하기 위해, TMOi001-A episomal hiPSC 세포주를 3 x 10^5 cells/cm^2의 밀도로 분주것을 제외하고 동일한 방법으로 hiPSC에서 파생된 CMC CO 및 CM-CO를 제작하고 이의 특성을 상기 실시예들에서와 같이 확인하였다.

[133] qRT-PCR 결과, 총 CM 마커 (cTnT), 동맥 CM 마커 (MLC2a) 및 심실 CM 마커 (MLC2v)의 발현이 CMC-COs에서 CM-COs에 비해 현저히 증가한 것으로 나타났으며, 반면 결절 CM 마커 (TBX18)는 두 오가노이드 사이에 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다 (도 18A). 또한, 상기 마커들의 단백질 수준을 웨스턴 블롯 분석으로 확인한 결과, CMC-COs에서 cTnT 및 MLC2v 단백질의 발현 수준이 CM-COs에 비해 현저히 높은 것으로 나타났다 (도 18B). 또한, 면역염색을 통해 CMC-COs 및 CM-COs에서 $MLC2a^+$ CMs 및 $MLC2v^+$ CMs의 비율을 확인한 결과, $MLC2a^+$ CMs 및 $MLC2v^+$ CMs의 비율이 CM-COs에 비해 CMC-COs에서 풍부하게 검출되었다 (도 18C). 또한, CMs의 기능적 및 대사적 성숙의 주요 지표의 발현을 qRT-PCR 및 웨스턴 블롯 분석으로 확인한 결과, K^+ 채널 유전자들 (KCNA4, KCNH2 및 KCNJ2)의 mRNA 발현이 CMC-COs에서 CM-COs에 비해 현저히 증가되어 있는 것으로 나타났으며 (도 18D), 성숙한 심장 마커 (cTnI), t-세관 마커 (CAV3, JPH2 및 BIN1), 및 심장 대사 마커들 (PGC1 α, TFAM 및 CPT1β의 mRNA 발현이 CMC-COs에서 CM-COs에 비해 현저히

증가되어 있는 것으로 나타났고 (도 18E 및 F), cTnI, CAV3 및 JPH2의 단백질 수준 또한 CMC-COs에서 CM-COs에 비해 현저히 증가되어 있었다 (도 18G). 또한, Cx43 (간극연접 마커) 및 ZO-1 (부착연접 마커의 mRNA 발현 수준이 CMC-COs에서 CM-COs에 비해 현저히 증가되어있었으며 (도 18H), 이들의 단백질 발현 또한 CMC-COs에서 CM-COs에 비해 현저히 증가되어 있는 것을 분화 30일차에 확인되었다 (도 18I).

[134] 이를 통해, hESC와 hiPSC 모두에서 자가 조직화 능력을 갖는 심장 중배엽 세포를 사용하여 성숙한 심실타입의 심장 오가노이드를 생성하였으며, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드가 심근세포 유래 오가노이드에 비해 심근세포의 구조적, 대사적, 기능적 및 분자적 성숙도가 향상되었고, 심장 성숙 및 심실 타입 심근세포과 관련된 유전자가 상향 조절되었음을 확인하였다. 구체적으로, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드는 1. 보다 조직화된 근절 구조 2. 더 조직화된 마이토콘드리아 3. 잘 배열된 T-세관 구조 4. 보다 조직적이고 고르게 분포된 개재원판이 나타났으며; 5. 심실 타입 심근세포 마커, 6. 심장 대사 마커, 7. T-세관 형성 마커, 8. 칼륨 이온 채널 마커, 9. 세포 접합부 마커, 10. 혈관세포 마커의 유전자 발현이 증가되었고; 11. 더 빠른 움직임 벡터 속도, 12. 감소된 분당 박동 속도, 13. 증가된 Peak-to-Peak 지속기간, 14. 연장된 활동전위 기간, 및 15. 심실타입 심근세포와 유사한 활동전위를 가지는 오가노이드의 높은 비율과 같은 기능적 성숙을 나타냈다.

[135] 여기에서 LEFTY-PITX2 신호 전달 경로가 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드 생성 동안 심근세포 성숙 및 심실 타입 심근세포에 중요한 역할을 하는 것을 밝혔으며, 심장 중배엽 세포의 높은 자가 조직화 능력이 성숙 및 심실 심장 오가노이드의 생성에 중요함을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 성숙한 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드는 심장 분야에서 약물 스크리닝 및 질병 모델링에 유용하게 활용될 수 있다.

청구범위

[청구항 1] a) 인간 다능성 줄기세포를 심장 중배엽 세포로 분화하는 단계;
b) 심장 중배엽 세포를 단일세포로 분리하여 분주하는 단계;
c) RPMI1640, B27 및 인슐린을 포함하는 배양액에서 배양하는 단계; 및
d) RPMI1640, B27 및 비타민 A를 포함하는 배양액에서 배양하는 단계를 포함하는 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드를 제조하는 방법.

[청구항 2] 제 1항에 있어서, 인간 다능성 줄기세포는:
i) 인간 다능성 줄기세포를 단일 세포로 분리하는 단계;
ii) Rho kinase 억제제가 포함된 E8 배지에 분주하여 배양하는 단계;
iii) GSK-3 억제제 포함된 RPMI1640, B27 및 인슐린을 포함하는 배양액에서 배양하는 단계;
iv) IWP2 처리하고 배양하는 단계를 포함하는 방법으로 심장 중배엽 세포로 분화되는, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드를 제조하는 방법.

[청구항 3] 제 1항에 있어서, 단계 a)는 4일 동안 수행되는, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드를 제조하는 방법.

[청구항 4] 제 1항에 있어서, 단계 b)에서 2 X 10^5 세포/cm^2의 밀도로 분주되는, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드를 제조하는 방법.

[청구항 5] 제 1항에 있어서, 단계 c)는 3일 동안 수행되는, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드를 제조하는 방법.

[청구항 6] 제 1항에 있어서, 단계 c)는 23일 동안 수행되는, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드를 제조하는 방법.

[청구항 7] 제 1항에 있어서, 70 내지 100 μm의 오가노이드를 선별하는 단계를 추가로 포함하는, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드를 제조하는 방법.

[청구항 8] 제 7항에 있어서, 오가노이드 선별은 단계 c)와 d) 사이에 이루어지는, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드를 제조하는 방법.

[청구항 9] 제 7항에 있어서, 오가노이드 선별은 단계 d) 중에 이루어지는, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드를 제조하는 방법.

[청구항 10] 제 1항의 방법으로 제조된 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드.

[청구항 11] 제 10항에 있어서, 심실 타입(Ventricular-like)인 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드.

[청구항 12] 제 10항에 있어서, 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 ITGA5, ITGA7 ITGB1, ITGB3, COL4A1, LAMB1, LAMC1, FN1, LAMA2, NODAL, LEFTY1, LEFTY2 또는 PITX2의 유전자 발현이 증가한, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드.

[청구항 13] 제 10항에 있어서, 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 LIMK, SMAD4,

COL1A, ITGA5, ITGAV, ITGB1, ITGB3, ITGB4, LEFTY, NODAL 또는 PITX2의 단백질 발현이 증가한, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드.

[청구항 14] 제 10항에 있어서, 심근 세포 유래 오가노이드에 비해 FAK, ROCK1, ROCK2, MLC2, RAC, LIMK, SMAD2 또는 SMAD3의 인산화가 증가한, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드.

[청구항 15] LEFTY 또는 이의 발현 촉진제를 유효성분으로 포함하는 심장 오가노이드 성숙 유도용 조성물.

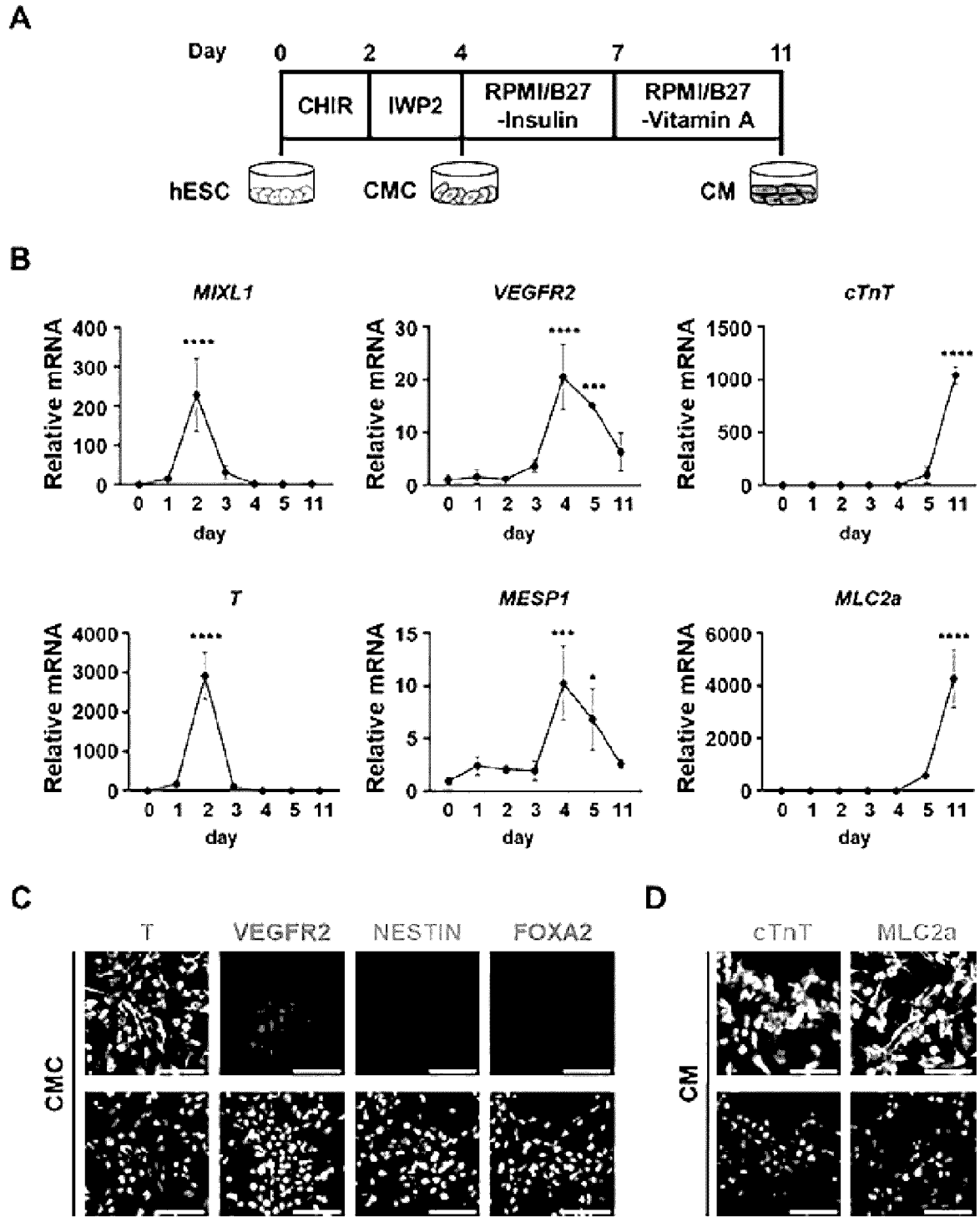
[청구항 16] LEFTY를 암호화한 폴리뉴클레오티드, 또는 상기 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 유효성분으로 포함하는 심장 오가노이드 성숙 유도용 조성물.

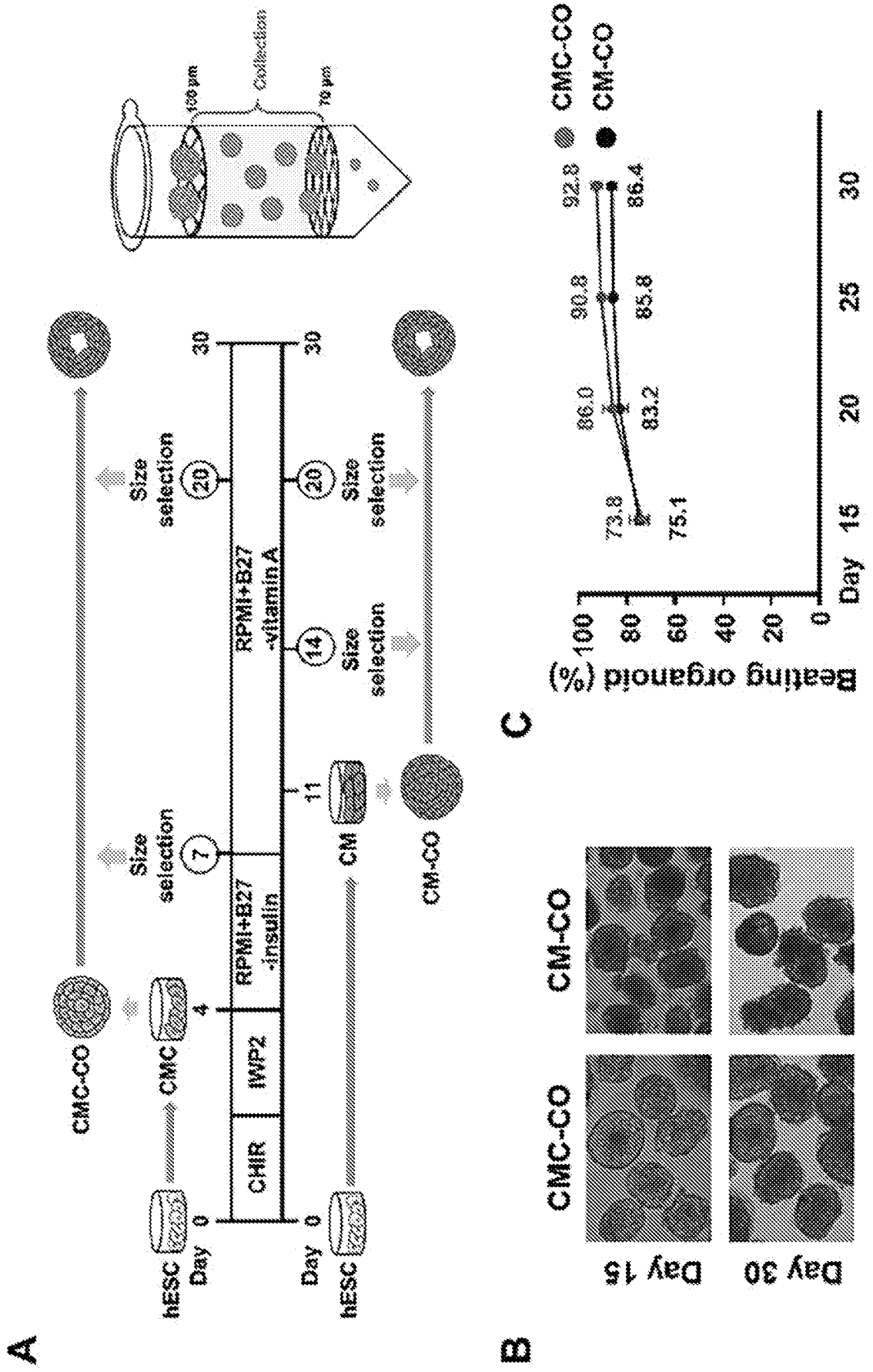
[청구항 17] 3차원 심장조직 모사체로 사용하기 위한, 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드의 용도.

[청구항 18] 제 10항의 심장 중배엽 세포 유래 심장 오가노이드를 허혈성 심장질환에 걸린 개체에 이식하는 단계를 포함하는, 허혈성 심장질환의 치료 방법.

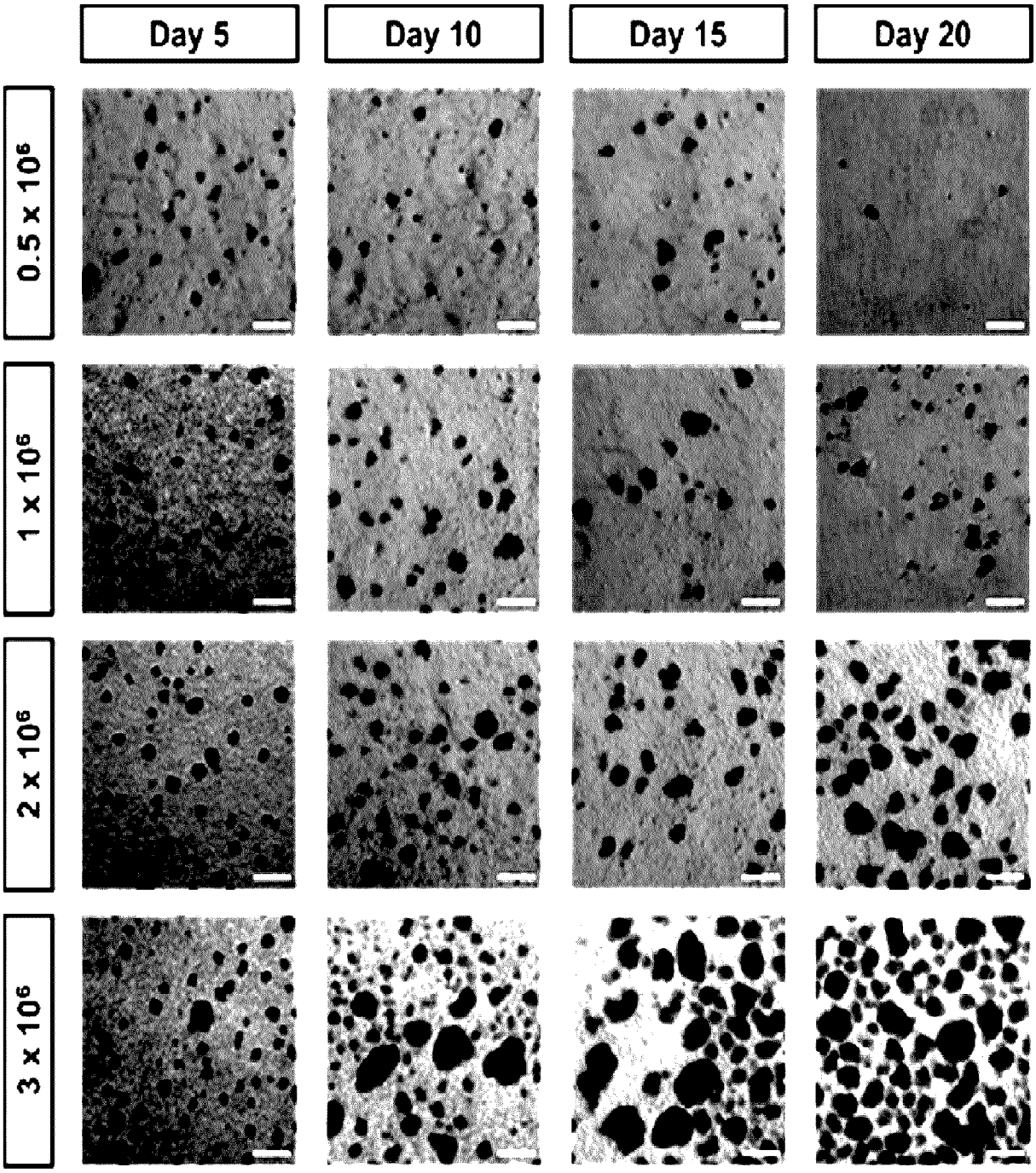
[청구항 19] LEFTY 또는 이의 발현 촉진제의 심장 오가노이드 성숙 유도 용도.

[도1]

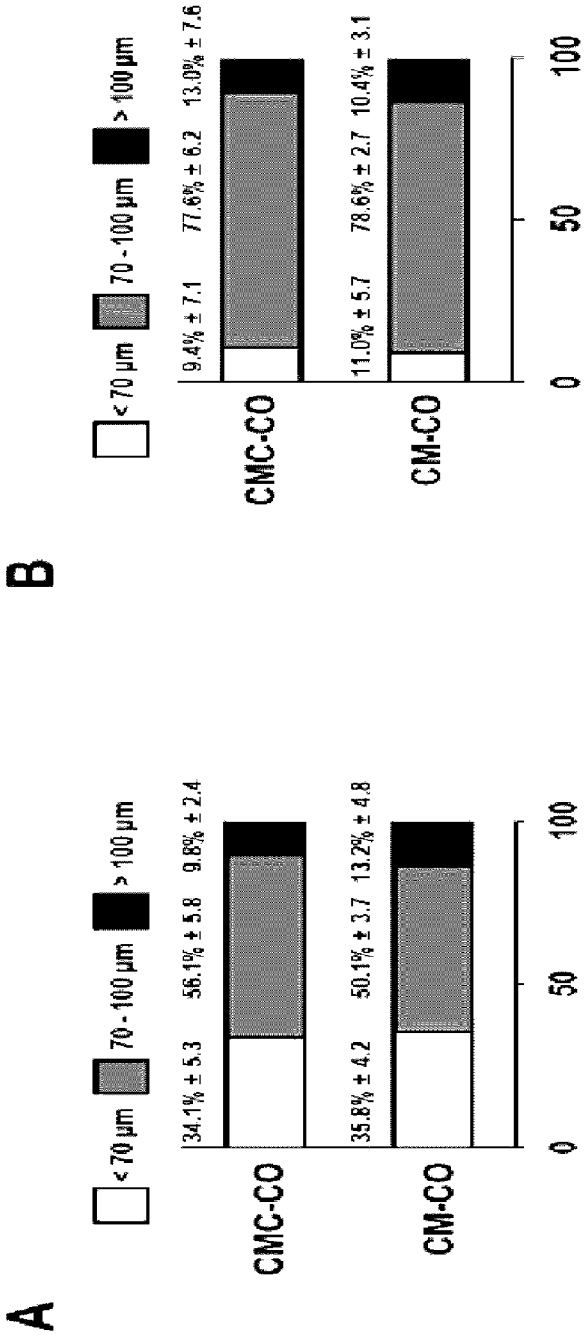

A
Day
0
2
4
7
11
CHIR
IWP2
RPMI/B27 -Insulin
RPMI/B27 -Vitamin A
hESC
CMC
CM
B
MIXL1
VEGFR2
cTnT
T
MESP1
MLC2a
Relative mRNA
day
C
T
VEGFR2
NESTIN
FOXA2
CMC
D
cTnT
MLC2a
CM


A
hESC
Day 0
CHIR
IWP2
4
CMC
CMC-CO
Size selection
7
RPMI+B27 -insulin
11
CM
CM-CO
RPMI+B27 -vitamin A
14
20
30
Collection
100 μm
70 μm
B
CMC-CO
CM-CO
Day 15
Day 30
C
CMC-CO
CM-CO
Beating organoid (%)
Day
86.0
90.8
92.8
73.8
83.2
85.8
86.4
75.1

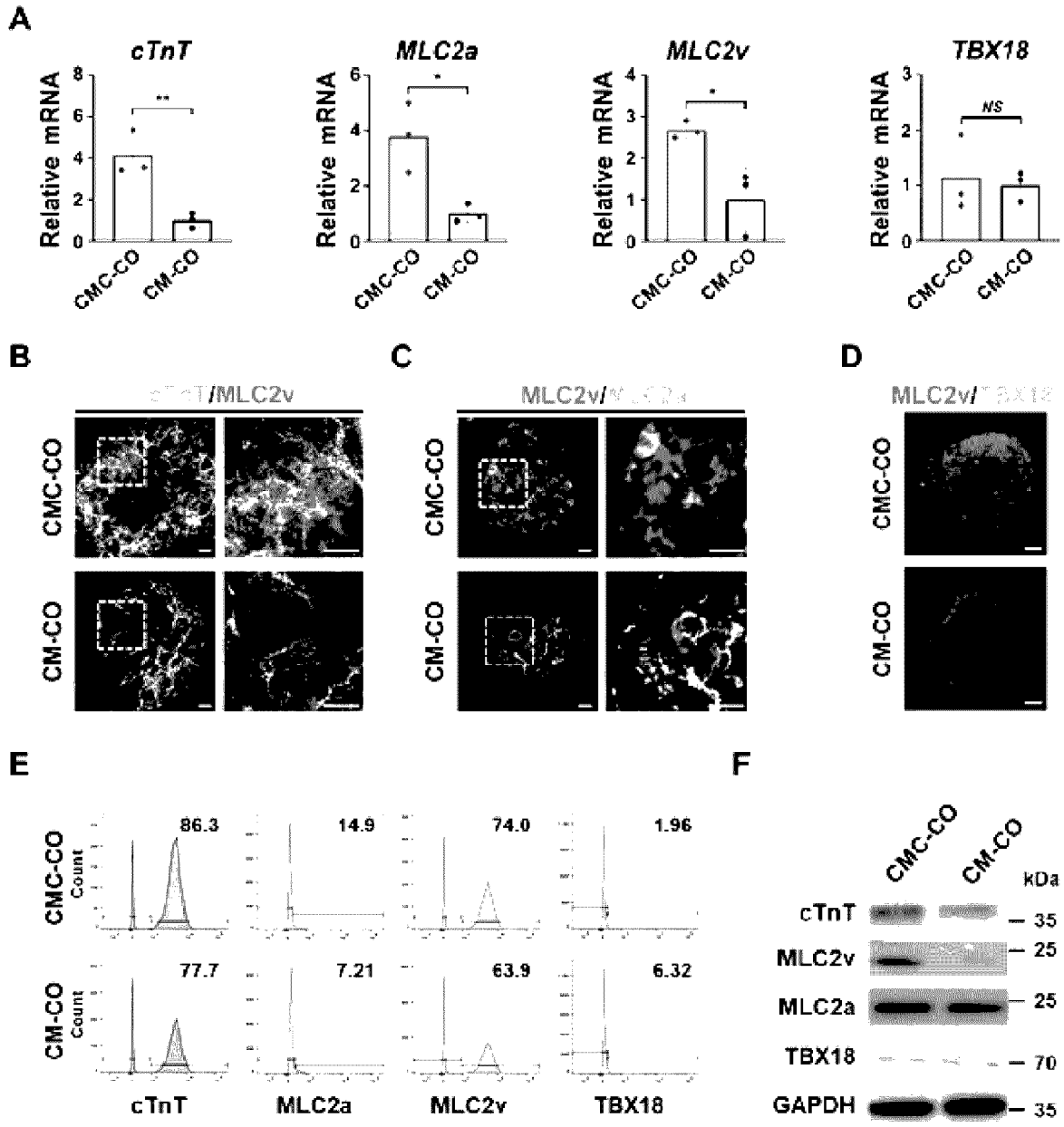
[도3]



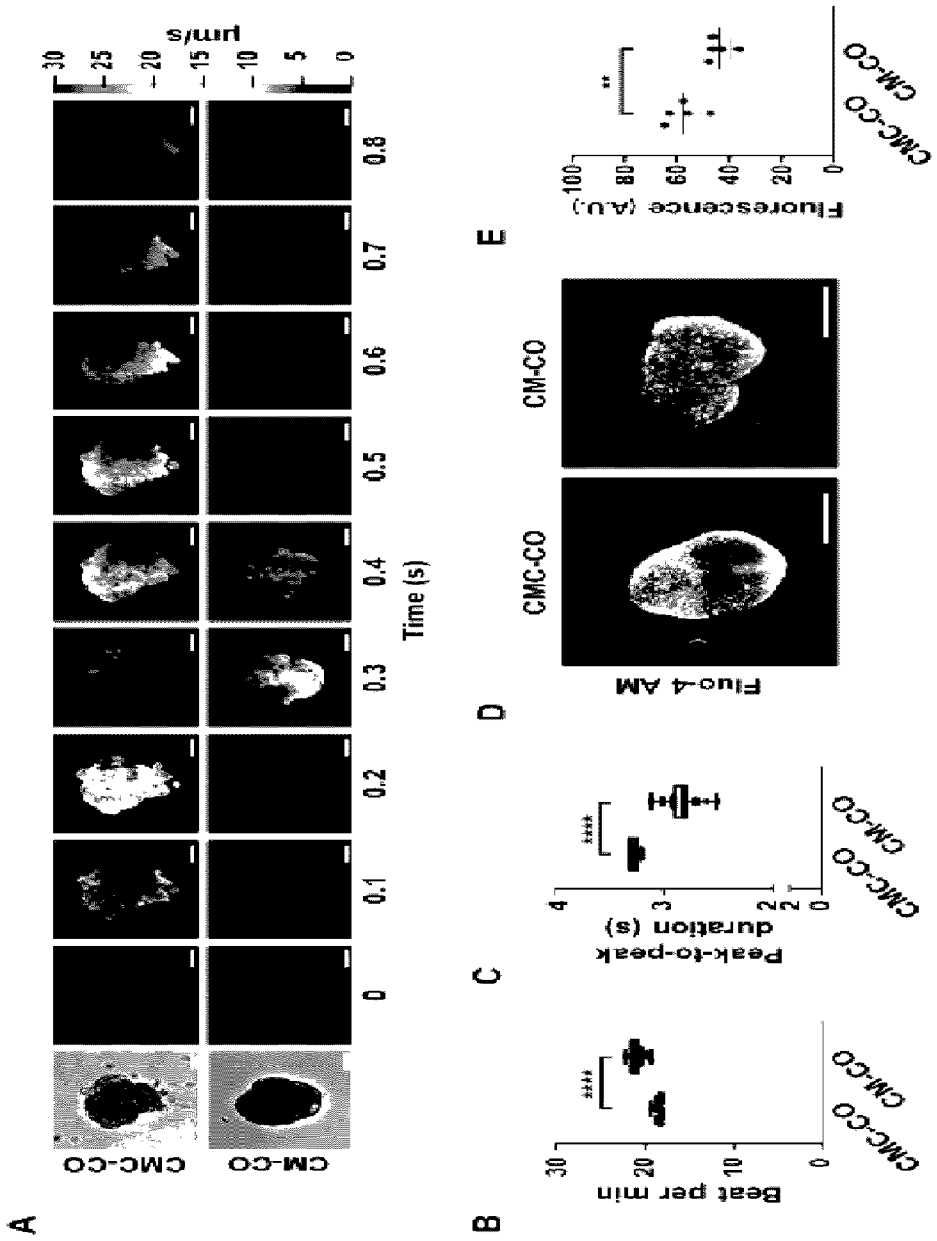
[도4]


A
< 70 µm
70 - 100 µm
> 100 µm
34.1% ± 5.3
56.1% ± 5.8
9.8% ± 2.4
35.8% ± 4.2
50.1% ± 3.7
13.2% ± 4.8
CMC-CO
CM-CO
0
50
100
B
< 70 µm
70 - 100 µm
> 100 µm
9.4% ± 7.1
77.6% ± 6.2
13.0% ± 7.6
11.0% ± 5.7
78.6% ± 2.7
10.4% ± 3.1
CMC-CO
CM-CO
0
50
100

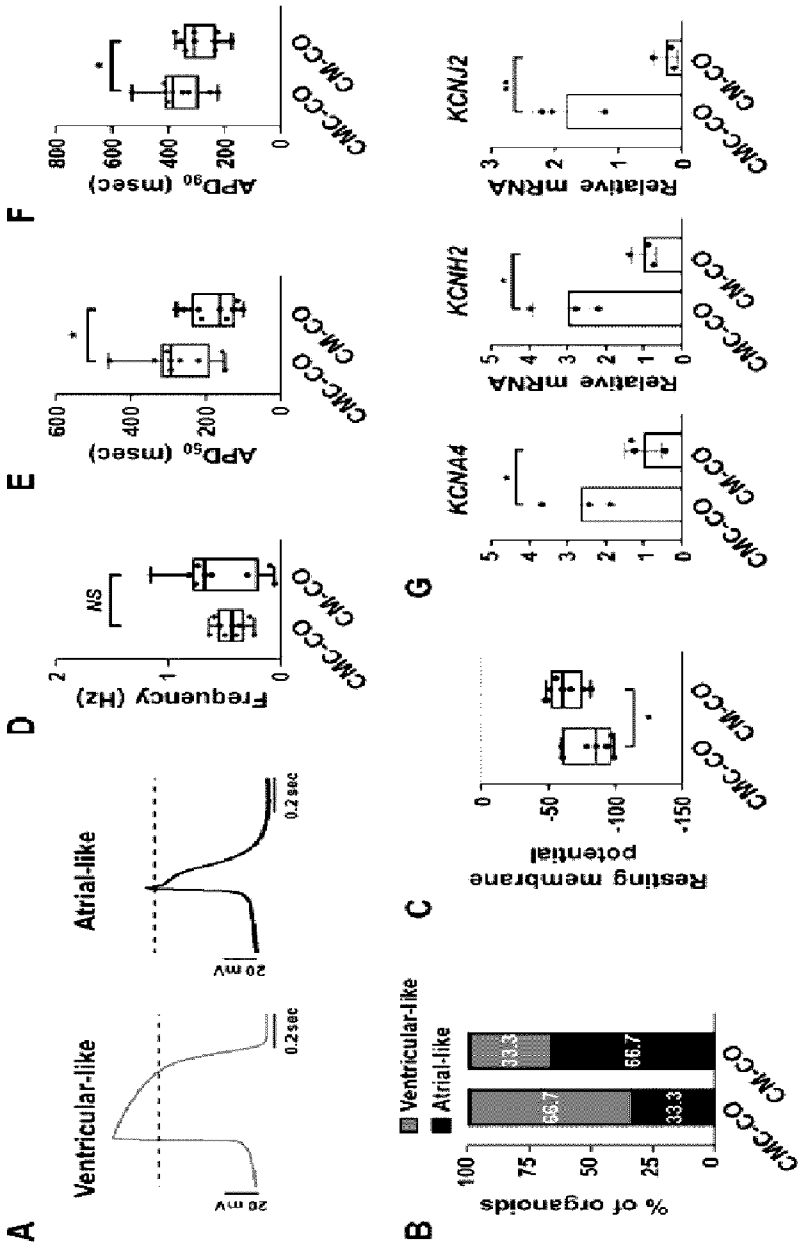
[도5]


A
cTnT
MLC2a
MLC2v
TBX18
Relative mRNA
CMC-CO
CM-CO
**
*
*
NS
B
cTnT/MLC2v
C
MLC2v/MLC2a
D
MLC2v/TBX18
E
86.3
14.9
74.0
1.96
77.7
7.21
63.9
6.32
Count
cTnT
MLC2a
MLC2v
TBX18
F
kDa
cTnT
MLC2v
MLC2a
TBX18
GAPDH
35
25
25
70
35

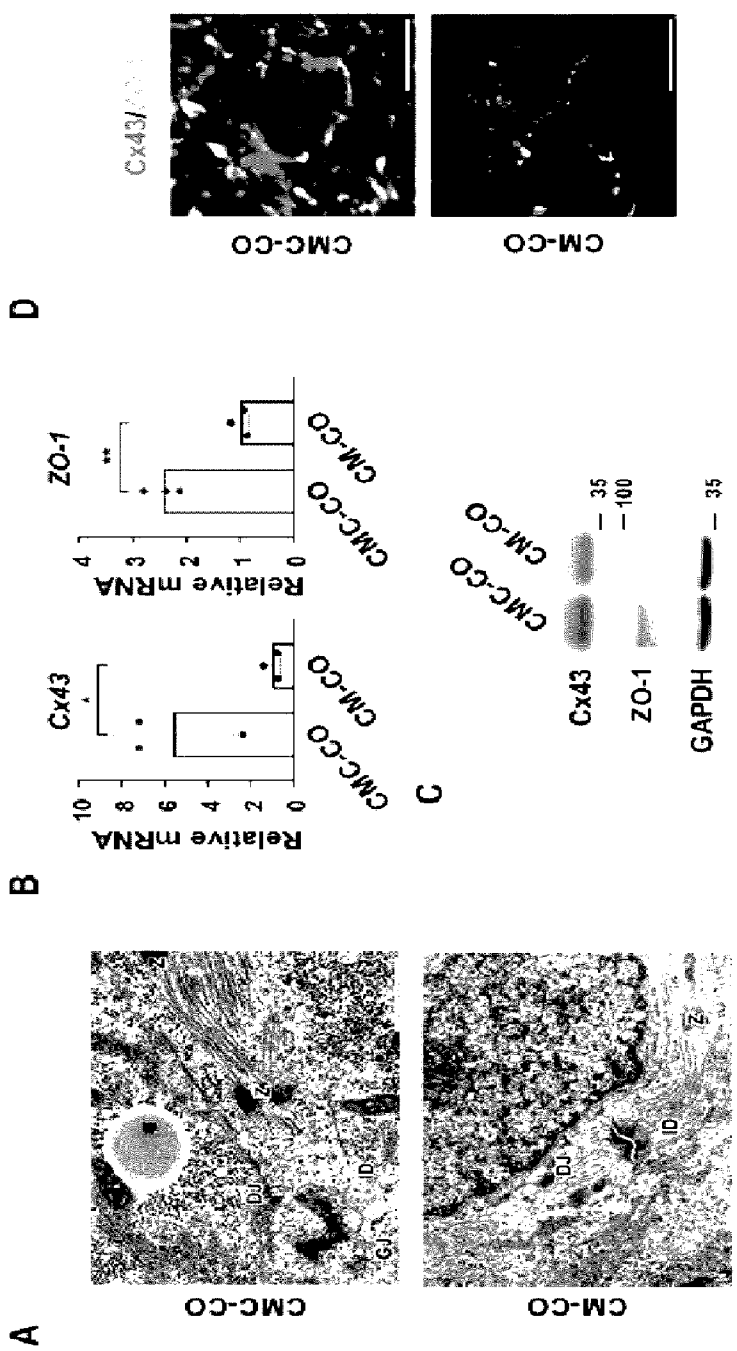
[도6]


A
CMC-CO
CM-CO
μm/s
30
25
20
15
10
5
0
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
Time (s)
B
Beat per min
****
CMC-CO
CM-CO
C
Peak-to-peak duration (s)
****
CMC-CO
CM-CO
D
Fluo-4 AM
CMC-CO
CM-CO
E
Fluorescence (A.U.)
**
CMC-CO
CM-CO

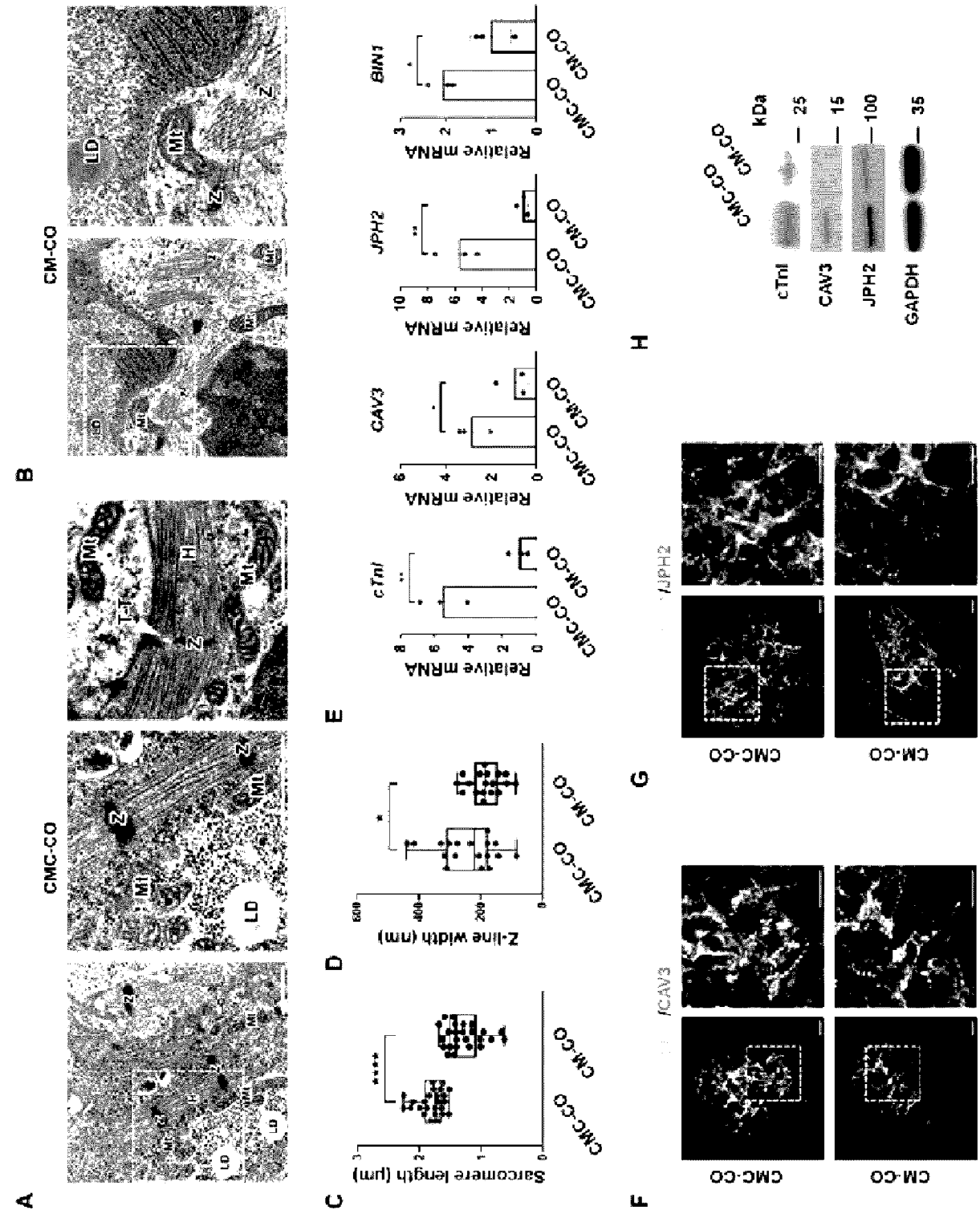
[도7]


A
Ventricular-like
Atrial-like
20 mV
0.2 sec
B
Ventricular-like
Atrial-like
% of organoids
66.7
33.3
33.3
66.7
CMC-CO
CM-CO
C
Resting membrane potential
D
Frequency (Hz)
NS
E
APD50 (msec)
F
APD90 (msec)
G
KCNA4
KCNH2
KCNJ2
Relative mRNA

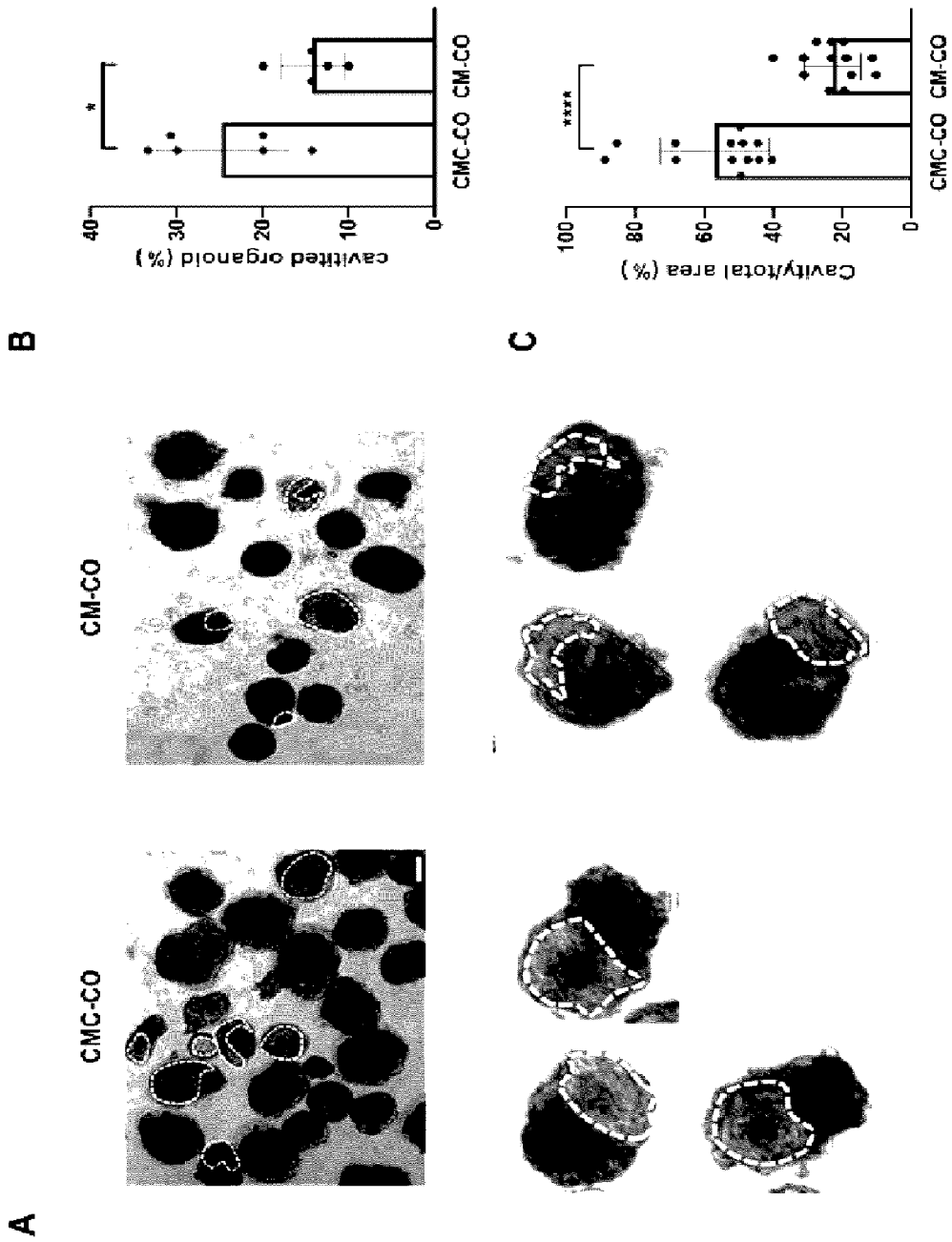
[도8]


A
CMC-CO
CM-CO
Z
DJ
ID
GJ
B
Relative mRNA
Cx43
ZO-1
CMC-CO
CM-CO
C
CMC-CO
CM-CO
Cx43
ZO-1
GAPDH
35
100
35
D
CMC-CO
CM-CO

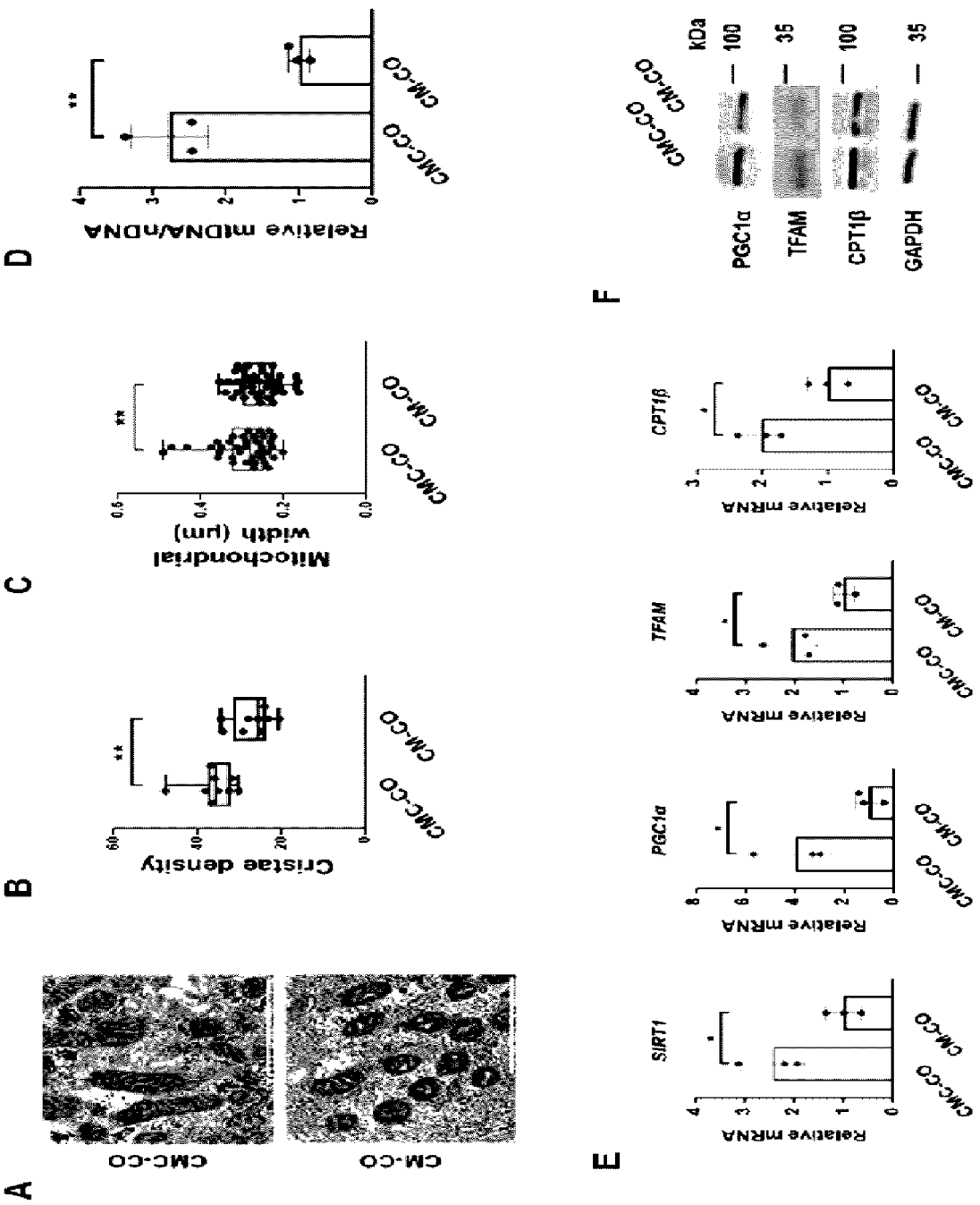
[도9]


A
CMC-CO
B
CM-CO
C
Sarcomere length (μm)
D
Z-line width (nm)
E
cTnI
CAV3
JPH2
BIN1
Relative mRNA
F
CMC-CO
CM-CO
fCAV3
G
CMC-CO
CM-CO
fJPH2
H
CMC-CO
CM-CO
kDa
cTnI
CAV3
JPH2
GAPDH
25
15
100
35

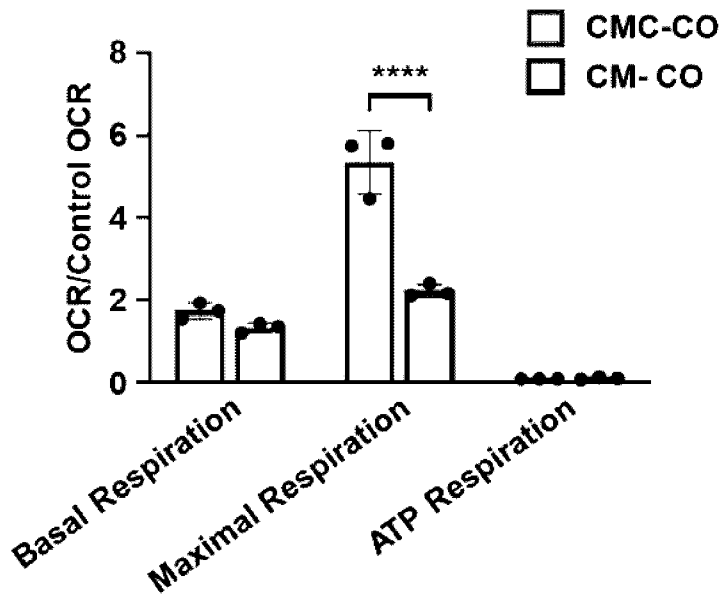
[도10]


A
CMC-CO
CM-CO
B
cavitted organoid (%)
CMC-CO CM-CO
*
C
Cavity/total area (%)
CMC-CO CM-CO
****

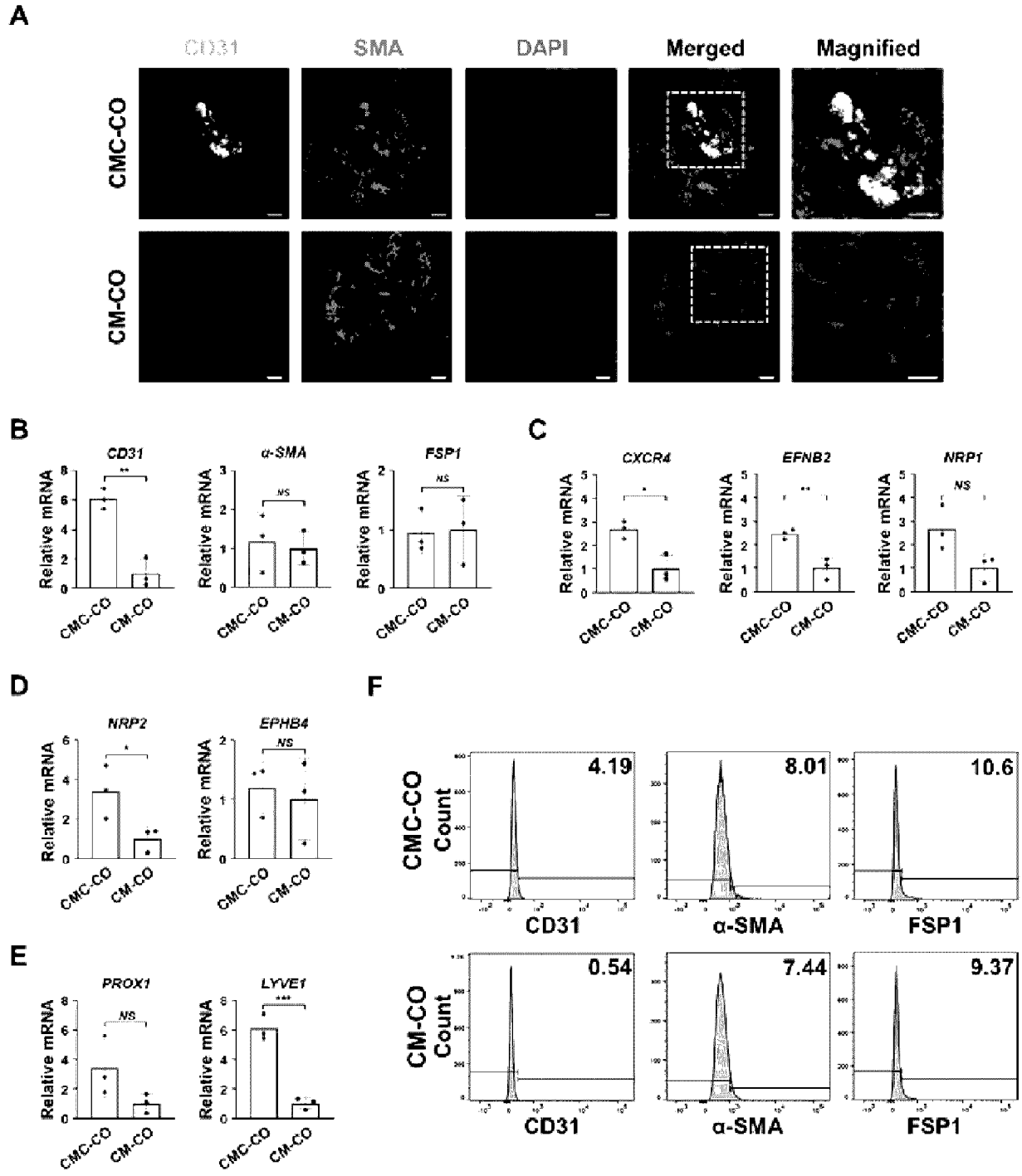
[도11]


A
CM-CO
CMC-CO
B
Cristae density
C
Mitochondrial width (μm)
D
Relative mtDNA/nDNA
E
SIRT1
PGC1α
TFAM
CPT1β
Relative mRNA
F
KDa
PGC1α
TFAM
CPT1β
GAPDH
100
35
100
35

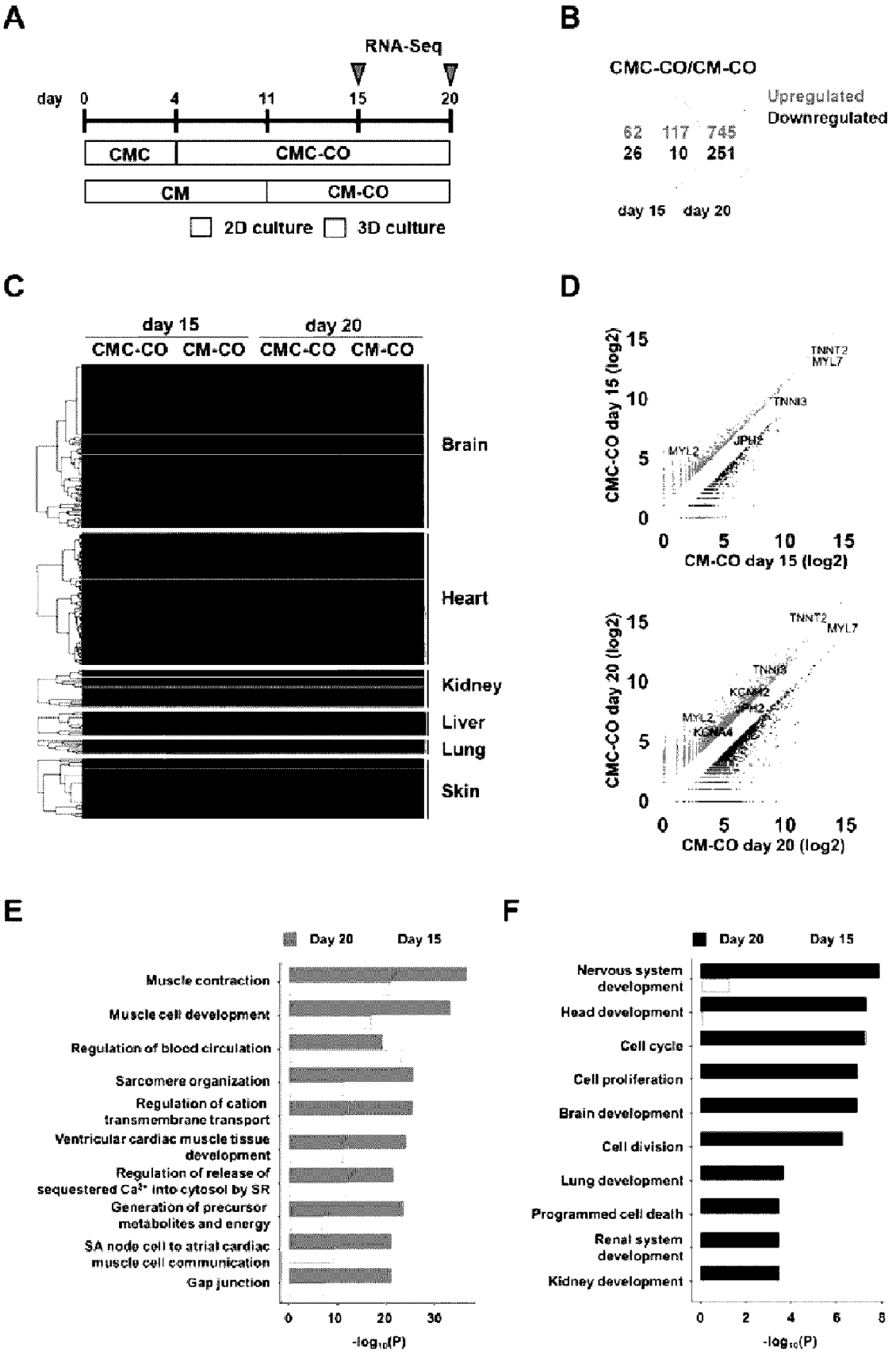
[도12]

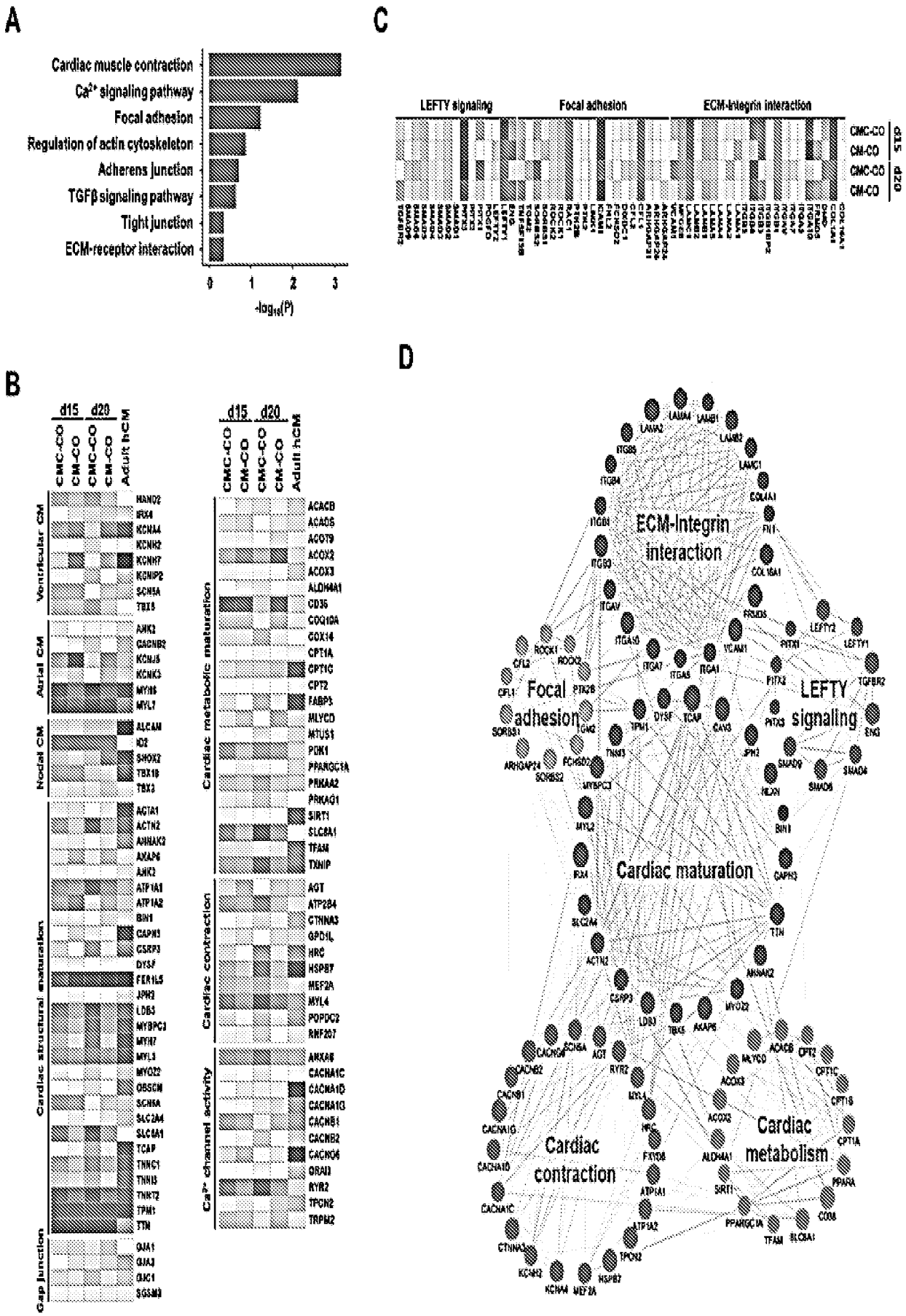

CMC-CO
CM- CO
****
OCR/Control OCR
8
6
4
2
0
Basal Respiration
Maximal Respiration
ATP Respiration

[도13]

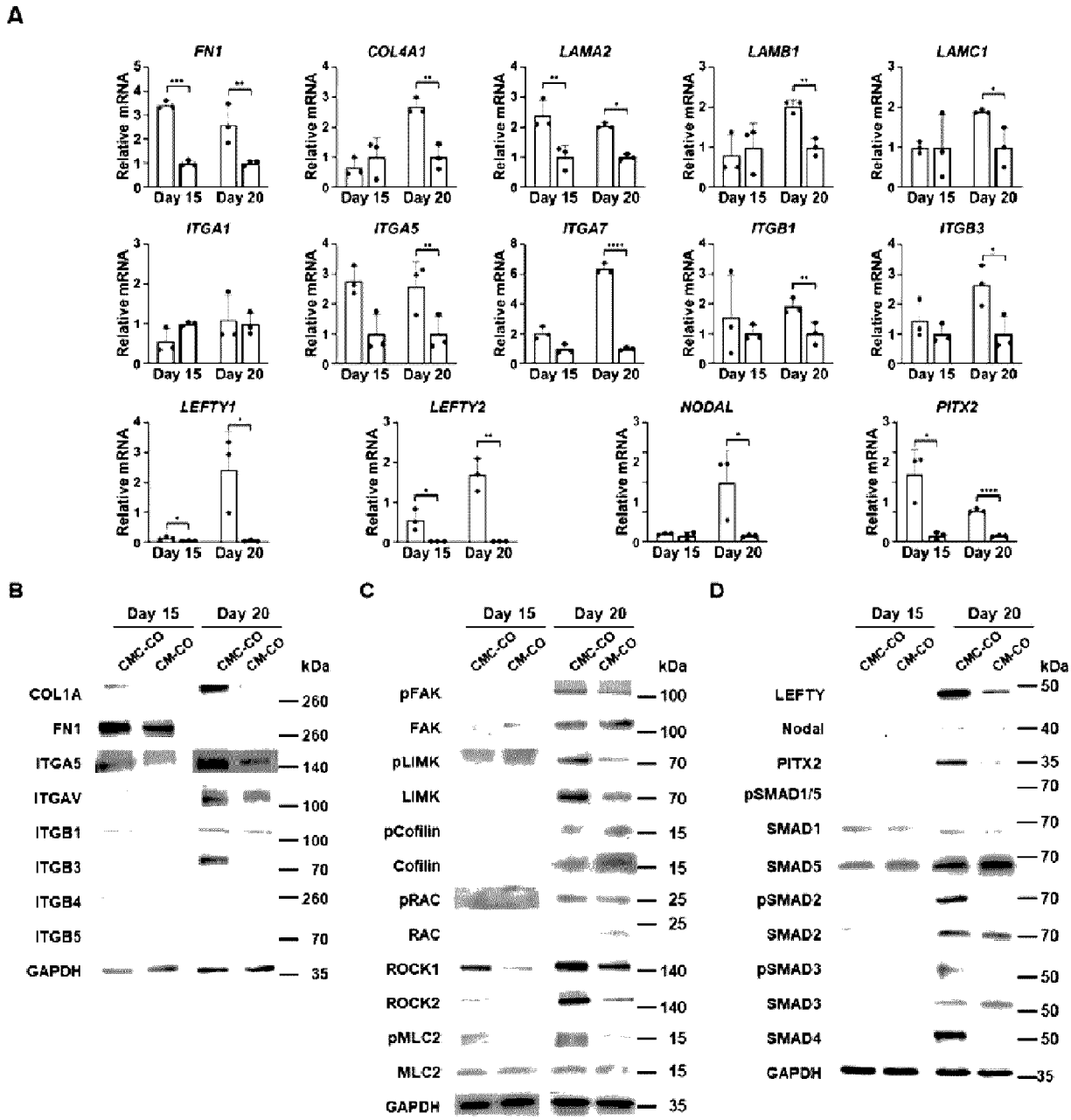

A
CD31
SMA
DAPI
Merged
Magnified
CMC-CO
CM-CO
B
CD31
α-SMA
FSP1
Relative mRNA
C
CXCR4
EFNB2
NRP1
D
NRP2
EPHB4
E
PROX1
LYVE1
F
4.19
8.01
10.6
0.54
7.44
9.37
Count

[도14]

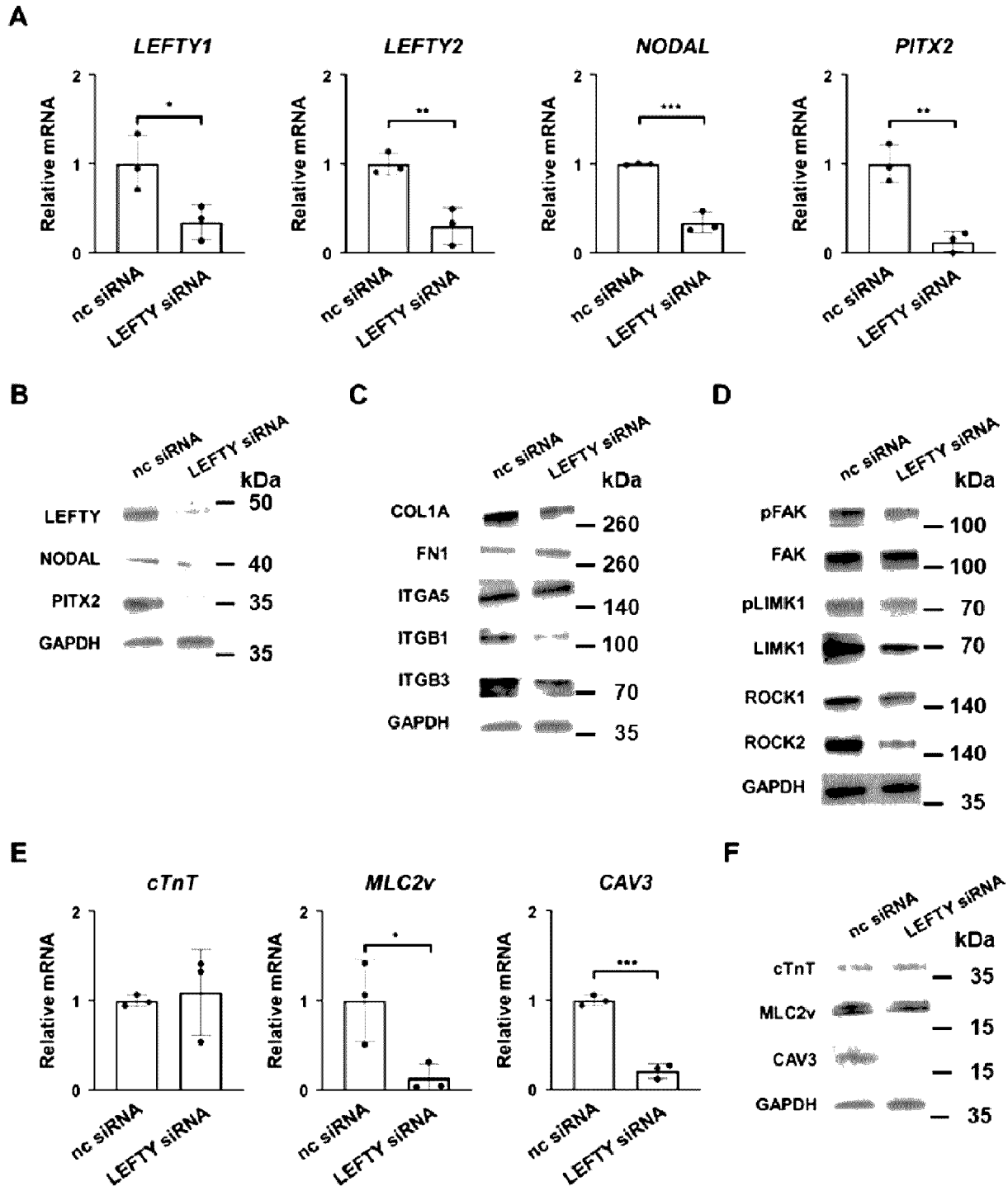

A
RNA-Seq
day 0 4 11 15 20
CMC
CMC-CO
CM
CM-CO
2D culture
3D culture
B
CMC-CO/CM-CO
Upregulated
Downregulated
62 117 745
26 10 251
day 15 day 20
C
day 15
day 20
CMC-CO CM-CO CMC-CO CM-CO
Brain
Heart
Kidney
Liver
Lung
Skin
D
CMC-CO day 15 (log2)
CM-CO day 15 (log2)
TNNT2
MYL7
TNNI3
MYL2
JPH2
CMC-CO day 20 (log2)
CM-CO day 20 (log2)
KCNA2
KCNA4
E
Day 20
Day 15
Muscle contraction
Muscle cell development
Regulation of blood circulation
Sarcomere organization
Regulation of cation transmembrane transport
Ventricular cardiac muscle tissue development
Regulation of release of sequestered Ca2+ into cytosol by SR
Generation of precursor metabolites and energy
SA node cell to atrial cardiac muscle cell communication
Gap junction
-log10(P)
F
Day 20
Day 15
Nervous system development
Head development
Cell cycle
Cell proliferation
Brain development
Cell division
Lung development
Programmed cell death
Renal system development
Kidney development
-log10(P)


A
Cardiac muscle contraction
Ca2+ signaling pathway
Focal adhesion
Regulation of actin cytoskeleton
Adherens junction
TGFβ signaling pathway
Tight junction
ECM-receptor interaction
0 1 2 3
-log10(P)
C
LEFTY signaling
Focal adhesion
ECM-Integrin interaction
CMC-CO
CM-CO
CMC-CO
CM-CO
d15
d20
B
d15 d20
CMC-CO CM-CO CMC-CO CM-CO Adult hCM
Ventricular CM
Atrial CM
Nodal CM
Cardiac structural maturation
Gap junction
Cardiac metabolic maturation
Cardiac contraction
Ca2+ channel activity
D
ECM-Integrin interaction
Focal adhesion
LEFTY signaling
Cardiac maturation
Cardiac contraction
Cardiac metabolism

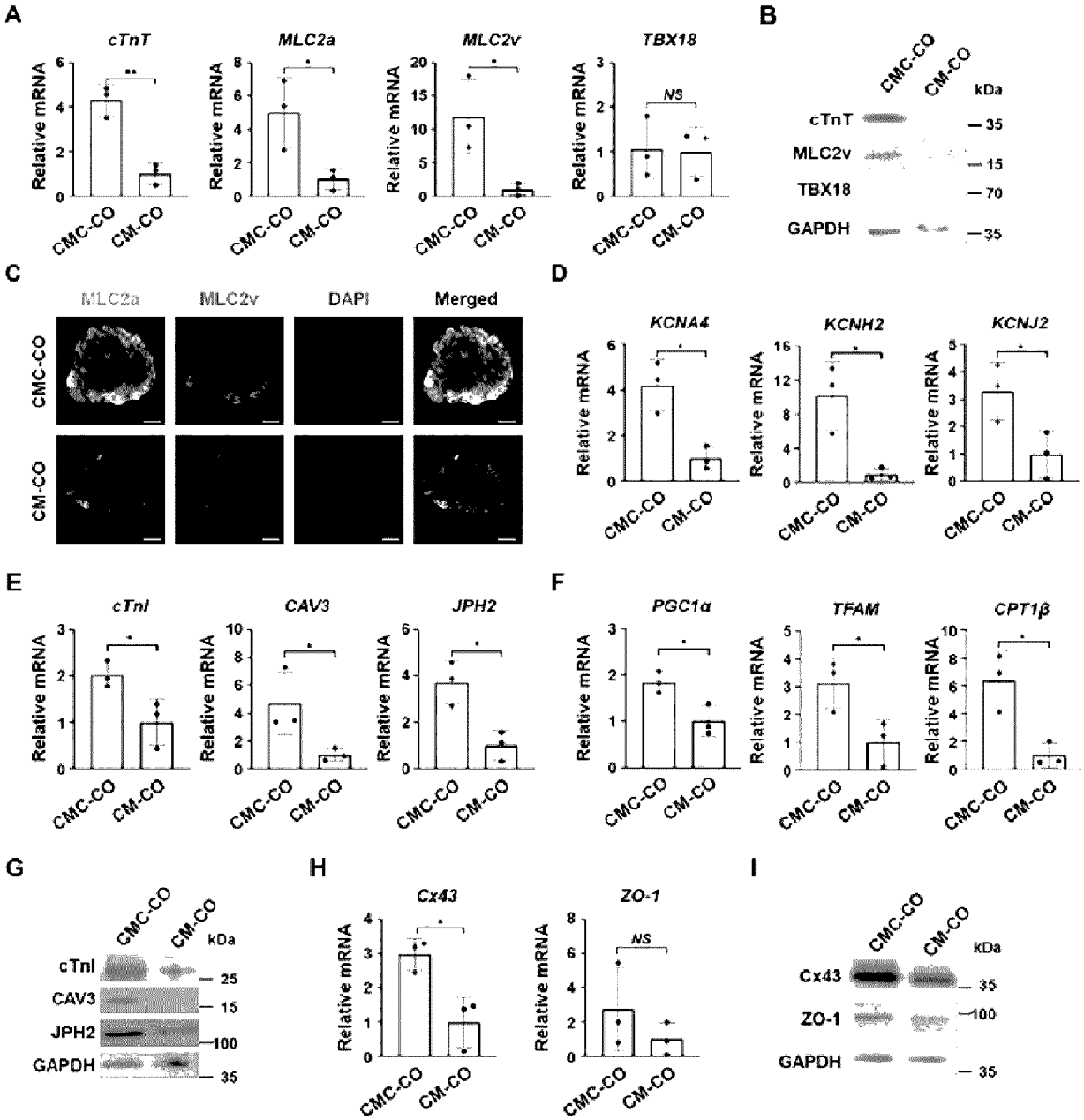
[도16]


A
FN1
COL4A1
LAMA2
LAMB1
LAMC1
ITGA1
ITGA5
ITGA7
ITGB1
ITGB3
LEFTY1
LEFTY2
NODAL
PITX2
Relative mRNA
Day 15
Day 20
B
Day 15
Day 20
CMC-CO
CM-CO
kDa
COL1A
FN1
ITGA5
ITGAV
ITGB1
ITGB3
ITGB4
ITGB5
GAPDH
260
260
140
100
100
70
260
70
35
C
pFAK
FAK
pLIMK
LIMK
pCofilin
Cofilin
pRAC
RAC
ROCK1
ROCK2
pMLC2
MLC2
GAPDH
100
100
70
70
15
15
25
25
140
140
15
15
35
D
LEFTY
Nodal
PITX2
pSMAD1/5
SMAD1
SMAD5
pSMAD2
SMAD2
pSMAD3
SMAD3
SMAD4
GAPDH
50
40
35
70
70
70
70
70
50
50
50
35

[도17]


A
LEFTY1
LEFTY2
NODAL
PITX2
Relative mRNA
nc siRNA
LEFTY siRNA
B
C
D
kDa
LEFTY
NODAL
PITX2
GAPDH
COL1A
FN1
ITGA5
ITGB1
ITGB3
pFAK
FAK
pLIMK1
LIMK1
ROCK1
ROCK2
E
cTnT
MLC2v
CAV3
F

[도18]


A
cTnT
MLC2a
MLC2v
TBX18
Relative mRNA
CMC-CO
CM-CO
NS
B
CMC-CO
CM-CO
kDa
cTnT
MLC2v
TBX18
GAPDH
35
15
70
35
C
MLC2a
MLC2v
DAPI
Merged
CMC-CO
CM-CO
D
KCNA4
KCNH2
KCNJ2
E
cTnI
CAV3
JPH2
F
PGC1α
TFAM
CPT1β
G
cTnI
CAV3
JPH2
GAPDH
25
15
100
35
H
Cx43
ZO-1
I
Cx43
ZO-1
GAPDH
35
100
35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2022/014253

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 5/077(2010.01)i; **C12N 5/071**(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N 5/077(2010.01); G01N 33/50(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 줄기세포(stem cells), 심장 중배엽 세포(cardiac mesoderm cells), LEFTY, 심장 오가노이드(cardiac organoid), 배양(culturing)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2020-0102329 A (KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION) 31 August 2020 (2020-08-31) See abstract; claims 1-12; paragraphs [0005], [0042] and [0082]; and figure 8.	15-17,19
A		1-14
Y	ZABALA, M. et al. LEFTY1 Is a Dual-SMAD Inhibitor that Promotes Mammary Progenitor Growth and Tumorigenesis. Cell Stem Cell. 2020, vol. 27, pp. 284-299. See page 288, left column; and figure 2.	15-17,19
X	LEWIS-ISRAELI, Y. R. et al. Heart Organoids and Engineered Heart Tissues: Novel Tools for Modeling Human Cardiac Biology and Disease. Biomolecules. 26 August 2021, vol. 11, thesis no. 1277, pp. 1-14. See abstract; pages 8-9; and figure 1.	17
A	KR 10-2291265 B1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 18 August 2021 (2021-08-18) See abstract; and claims 1 and 3-4.	1-17,19

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 January 2023	**18 January 2023**

Name and mailing address of the ISA/KR	Authorized officer
Korean Intellectual Property Office **Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon 35208**	
Facsimile No. **+82-42-481-8578**	Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-1994035 B1 (NEXEL CO., LTD.) 27 June 2019 (2019-06-27) See claims 1-10.	1-17,19
X	SONG, M.-H. et al. LEFTY-PITX2 signaling pathway is critical for generation of mature and ventricular cardiac organoids in human pluripotent stem cell-derived cardiac mesoderm cells. Biomaterials. electronic publication 21 September 2021, vol. 278, thesis no. 121133, pp. 1-19. See entire document. ※ This document is a known document declaring exceptions to lack of novelty by the applicant.	1-17,19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2022/014253

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☑ Claims Nos.: **18**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 18 pertains to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2022/014253

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2020-0102329 A	31 August 2020	WO 2020-171345 A1	27 August 2020
KR 10-2291265 B1	18 August 2021	KR 10-2291271 B1	18 August 2021
		WO 2021-187758 A1	23 September 2021
KR 10-1994035 B1	27 June 2019	WO 2019-160193 A1	22 August 2019

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2022/014253

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

C12N 5/077(2010.01)i; **C12N 5/071**(2010.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

C12N 5/077(2010.01); G01N 33/50(2006.01)

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 줄기세포(stem cells), 심장 중배엽 세포(cardiac mesoderm cells), LEFTY, 심장 오가노이드(cardiac organoid), 배양(culturing)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2020-0102329 A (고려대학교 산학협력단) 2020.08.31 요약; 청구항 1-12; 단락 [0005], [0042], [0082]; 도면 8	15-17,19
A		1-14
Y	ZABALA, M. 등, `LEFTY1 Is a Dual-SMAD Inhibitor that Promotes Mammary Progenitor Growth and Tumorigenesis', Cell Stem Cell, 2020, 27권, 페이지 284-299 페이지 288, 좌칼럼; 도면 2	15-17,19
X	LEWIS-ISRAELI, Y. R. 등, 'Heart Organoids and Engineered Heart Tissues: Novel Tools for Modeling Human Cardiac Biology and Disease', Biomolecules, 2021.08.26, 11권, 논문번호 1277, 페이지 1-14 초록; 페이지 8-9; 도면 1	17
A	KR 10-2291265 B1 (연세대학교 산학협력단) 2021.08.18 요약; 청구항 1, 3-4	1-17,19
A	KR 10-1994035 B1 ((주) 넥셀) 2019.06.27 청구항 1-10	1-17,19

☑ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☑ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2023년01월17일(17.01.2023)	**2023년01월18일(18.01.2023)**

ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관
대한민국 특허청 **(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)**	**허주형**
팩스 번호 **+82-42-481-8578**	전화번호 **+82-42-481-5373**

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2022/014253

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	SONG, M.-H. 등, `LEFTY-PITX2 signaling pathway is critical for generation of mature and ventricular cardiac organoids in human pluripotent stem cell-derived cardiac mesoderm cells', Biomaterials, 전자공개 2021.09.21, 278권, 논문번호 121133, 페이지 1-19 전체 문헌 ※위 문헌은 출원인이 신규성 상실의 예외로서 선언한 공지문헌임	1-17,19

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2022/014253

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☑ 청구항: **18**
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,

청구항 18은 수술 또는 치료에 의한 사람의 치료방법에 관한 것이므로 PCT 조약 제 17조(2)(a)(i) 및 조약규칙 39.1(iv)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제 조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.

2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국 제 조 사 보 고 서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2022/014253

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2020-0102329 A	2020/08/31	WO 2020-171345 A1	2020/08/27
KR 10-2291265 B1	2021/08/18	KR 10-2291271 B1	2021/08/18
		WO 2021-187758 A1	2021/09/23
KR 10-1994035 B1	2019/06/27	WO 2019-160193 A1	2019/08/22