



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0114397
(43) 공개일자 2024년07월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0697 (2013.01)
C12N 5/0688 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0006467
(22) 출원일자 2023년01월17일
심사청구일자 2023년01월17일

(71) 출원인
대한민국(질병관리청 국립보건연구원장)
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187
한국화학연구원
대전광역시 유성구 가정로 141 (장동)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김은미
대전광역시 유성구 가정로 141
송창화
대전광역시 중구 충무로107번길 100, 107동 1401호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인정진

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 항결핵제 효능 평가를 위한 인간 3D 폐 오가노이드 기반 결핵균 감염모델 제작 방법

(57) 요약

본 발명은 항결핵제 효능 평가용 3D 폐 오가노이드에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 상기 3D 폐 오가노이드를 이용한 결핵균 감염모델 제조 방법; 및 제조된 결핵균 감염모델의 용도;에 관한 것이다. 본 발명에 따른 3D 폐 오가노이드를 이용한 결핵균 감염모델은 생리학적 특성 반영이 가능할 뿐만 아니라 종래 감염모델에 비해 장기 배양이 가능하다는 장점이 있다. 따라서 본 발명의 결핵균 감염 모델은 결핵 치료제 스크리닝, 효능 평가 등의 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/5088 (2013.01)

C12N 2506/02 (2013.01)

C12N 2506/45 (2013.01)

C12N 2513/00 (2013.01)

(72) 발명자

김승연

대전광역시 유성구 가정로 141

최세리

대전광역시 유성구 가정로 141

최지애

대전광역시 중구 오류로 79, 502호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465035414

과제번호 2021-ER2001-01

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 질병관리청

연구사업명 감염병관리기술개발연구

연구과제명 폐 오가노이드를 이용한 결핵 치료제 평가모델 개발

기 여 율 1/1

과제수행기관명 한국화학연구원부설안전성평가연구소

연구기간 2021.03.16 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

폐 오가노이드에 대식세포 및 결핵균을 미세주입하는 단계;를 포함하는 결핵균 감염모델 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 폐 오가노이드는 배아줄기세포(embryonic stem cell), 역분화 줄기세포(induced pluripotent stem cell) 및 성체 줄기세포(adult stem cell)로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상의 세포를 배양하여 제조된 것인, 결핵균 감염모델 제조 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 폐 오가노이드는 WA01(H1), WA09(H9) 및 인간 폐 조직 유래 줄기세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 세포를 배양하여 제조된 것인, 결핵균 감염모델 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 폐 오가노이드는 드롭렛(droplet) 배양 방법으로 세포를 배양하여 제조된 것인, 결핵균 감염모델 제조 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 대식세포는 THP-1 세포(Human acute monocytic leukemia cell)로부터 분화된 대식세포, 인간 혈액세포로부터 분화한 대식세포 (Monocyte-derived macrophages;MDM), 인간 유래 대식세포주 및 인간 전분화능 줄기세포 유래 대식세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 결핵균 감염모델 제조 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 결핵균은 마이코박테리움 튜버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 또는 비결핵 항산균(Nontuberculous mycobacteria : NTM)인, 결핵균 감염모델 제조 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 대식세포 및 결핵균은 MOI(Multiplicity Of Infection) 0.1 내지 10으로 미세주입하는 것인, 결핵균 감염

모델 제조 방법.

청구항 8

제1항의 제조 방법으로 제조된 결핵균 감염모델.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 결핵균 감염모델은 폐포 내강에 대식세포 및 결핵균이 존재하는 것인, 결핵균 감염모델.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 결핵균 감염모델은 장기 배양이 가능한 것인, 결핵균 감염모델.

청구항 11

제8항의 결핵균 감염모델에 항결핵제 후보물질을 처리하는 단계;를 포함하는 항결핵제 스크리닝 방법.

청구항 12

제8항의 결핵균 감염모델에 항결핵제를 처리하는 단계;를 포함하는 항결핵제 효능 평가 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항결핵제 효능 평가용 3D 폐 오가노이드에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 상기 3D 폐 오가노이드를 이용한 결핵균 감염모델 제조 방법; 및 제조된 결핵균 감염모델의 용도;에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 약제내성 결핵 치료에 대한 꾸준한 연구를 통해 숙주 기반의 치료 및 새로운 항결핵 후보물질에 대한 발굴은 이루어지고 있으나, 이를 평가할 인체 적용 모델이 확립되어 있지 않아 새로운 항결핵제 개발에 어려움이 있다. 현재 항결핵 약물 스크리닝과 효능평가법은 마우스 대식세포를 이용한 2D 세포배양에 의존적이며, 사람 결핵균에 대한 감수성이 다르고, 육아종(granuloma) 형성의 어려움으로 평가 결과의 신뢰도가 낮다. 또한 난치성 결핵 치료에 대한 새로운 약물 스크리닝과 평가는 오랜 연구 기간이 필요하여 임상 연구로의 진입에 어려움이 있다.

[0003] 현재, 항결핵제 약물 효능 평가 방법은 대부분 동물모델에 의존하여 이루어지고 있으나, 인간과 동물 간의 종간 차이로 인한 약물의 효능 결과가 상이하게 나타나는 경우가 있다. 특히 괴사성 육아종(granuloma) 형성은 대표적인 결핵의 증상으로써 여러 종류의 면역세포가 모여 생긴 병변이다. 동물모델, 특히 마우스 모델에서는 결핵균 감염에 의하여 T 세포가 매개하는 육아종 모양의 병변이 형성되기는 하나, 인간에서 형성되는 괴사성 육아종과는 매우 다른 병변을 보임으로써 약물의 투과성, 면역반응 등의 차이를 나타낸다. 이러한 이유로 마우스 모델에서 효과가 있었던 약물들도 실제 사람에게 적용 시 효과가 떨어지는 경우도 있다.

[0004] 또한, 최근 전 세계적으로 실험동물 사용규제가 점차 강화되고 있어, 의약품 개발을 위한 대체 모델 개발이 필요한 실정이다. 의약품 약물 효능 평가모델을 위해 인간의 폐 세척액 및 폐 조직 등 인체 유래물을 이용하여 연구하는 것이 가장 이상적이지만, 샘플 확보 및 대량 배양에 어려움이 있다. 이에, 인간의 불멸화된 세포주가 활

용되고 있지만, 불멸화된 세포주의 경우 정상의 핵형을 유지하는 비율이 현저히 낮을 뿐 아니라, 생리학적 특성을 반영하는 데 한계가 있다. 따라서, 효과적인 항결핵제 약물 효능 평가를 위해서는 새로운 모델이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) KR 공개특허공보 제10-2020-0077460호 인간 줄기세포 유래 폐포 대식세포를 포함하는 3차원 폐 오가노이드의 제조방법

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 이에 본 발명자들은 항결핵제 약물 효능 평가를 위한 결핵균 감염모델을 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0007] 따라서 본 발명의 목적은, 폐 오가노이드에 대식세포 및 결핵균을 미세주입하는 단계;를 포함하는 결핵균 감염 모델 제조 방법; 및 상기 방법으로 제조된 결핵균 감염모델;을 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은, 상기 결핵균 감염모델에 항결핵제 후보물질을 처리하는 단계;를 포함하는 항결핵제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 결핵균 감염모델에 항결핵제를 처리하는 단계;를 포함하는 항결핵제 효능 평가 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 폐 오가노이드에 대식세포 및 결핵균을 미세주입하는 단계;를 포함하는 결핵균 감염모델 제조 방법을 제공한다.
- [0011] 또한 본 발명은 상기 제조 방법으로 제조된 결핵균 감염모델을 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 상기 결핵균 감염모델에 항결핵제 후보물질을 처리하는 단계;를 포함하는 항결핵제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0013] 또한 본 발명은 상기 결핵균 감염모델에 항결핵제를 처리하는 단계;를 포함하는 항결핵제 효능 평가 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명에 따른 3D 폐 오가노이드를 이용한 결핵균 감염모델은 생리학적 특성 반영이 가능할 뿐만 아니라 종래 감염모델에 비해 장기 배양이 가능하다는 장점이 있다. 따라서 본 발명의 결핵균 감염모델은 결핵 치료제 스크리닝, 효능 평가 등의 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 본 발명에 따른 결핵균 감염모델의 제작 방법을 나타낸 도이다.
- 도 2는 폐 오가노이드 제작을 위한 내배엽 분화 과정을 나타낸 도이다.
- 도 3은 유세포 분석을 통해 내배엽 마커(EpCAM, CXCR4, c-kit, SOX17)의 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 qPCR을 통해 내배엽 마커(CXCR4, CER, SOX17)의 유전자 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 내배엽 세포로부터 폐 오가노이드로의 분화 과정을 나타낸 도이다.
- 도 6은 세포의 기질을 활용한 드롭렛 배양 방법을 접목하여 제작된 폐 오가노이드를 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 7은 qPCR을 통해 분화 기간에 따른 폐 세포 특이적 마커(NKX2.1, SFTPC, SOX9)의 유전자 발현을 분석한 결과

를 나타낸 도이다.

도 8은 면역형광염색을 통해 분화 기간에 따른 폐 세포 특이적 마커(NKX2.1, Pro-SFTPC/ SFTPC, SCGB3A2)의 단백질 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 단핵구인 THP-1 세포로부터 대식세포로의 분화를 유도한 후 대식세포 마커인 CD68의 발현을 면역형광염색을 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 RFP 형광 유전자를 보유한 H37Rv-RFP 결핵균의 확인 및 배양을 나타낸 도이다.

도 11은 3종의 결핵균 감염 방법(메트리젤 드롭릿 형성 시 감염시키는 방법, 배양 배지에 감염시키는 방법 및 미세주입 방법)을 간략히 나타낸 도이다.

도 12A는 메트리젤 드롭릿 형성 시 감염시키는 방법으로 감염된 폐 오가노이드 내 결핵균을 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 12B는 메트리젤 드롭릿 형성 시 감염시키는 방법으로 감염된 폐 오가노이드 내 대식세포의 마커 CD68 발현 및 결핵균 RFP 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 13A는 배양 배지에 감염시키는 방법으로 감염된 폐 오가노이드 내 결핵균을 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 13B는 배양 배지에 감염시키는 방법으로 감염된 폐 오가노이드 내 대식세포의 마커 CD68 발현 및 결핵균 RFP 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 14는 미세주입을 통해 감염시키는 방법으로 감염된 폐 오가노이드를 공초점 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 15A는 대식세포 및 결핵균이 비율에 따라 미세주입된 폐 오가노이드를 공초점 현미경으로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 15B는 대식세포 및 결핵균이 비율에 따라 미세주입된 폐 오가노이드의 염증성 사이토카인(IL-6, IL-10, TNF- α)의 유전자 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 16A는 폐 오가노이드 기반 결핵균 감염모델에 항결핵제 Rifampicin(RIF)을 처리하는 과정을 나타낸 도이다.

도 16B는 대식세포 및 결핵균의 미세주입과 항결핵제 (RIF) 처리 전후의 폐 오가노이드를 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 도이다.

도 17은 RIF가 처리된 폐 오가노이드 기반 결핵균 감염모델의 염증성 사이토카인(IL-6, IL-10, TNF- α)의 유전자 발현을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 18은 RIF가 처리된 폐 오가노이드 기반 결핵균 감염모델 내 결핵균의 생존을 CFU assay를 통해 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 19A는 폐 오가노이드 기반 결핵균 감염모델의 장기 배양 기법의 프로토콜을 나타낸 도이다.

도 19B는 대식세포 및 결핵균이 미세주입된 폐 오가노이드의 계대배양에 따른 폐 오가노이드 내 결핵균 수를 측정한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0017] 본 발명의 양태에 따르면, 본 발명은 폐 오가노이드에 대식세포 및 결핵균을 미세주입하는 단계;를 포함하는 결핵균 감염모델 제조 방법; 및 상기 제조 방법으로 제조된 결핵균 감염모델;을 제공한다.

[0018] 본 발명에 있어서, 오가노이드(organoid)는 줄기세포를 3차원적으로 배양하거나 응집 또는 재조합하여 만든 장기 특이적 세포 집합체로, 자기 재생(self-renewal)이 가능하며, ‘미니 장기’ 또는 ‘유사 장기’ 라고도 불린다. 실제 장기와 유사한 형태로 분자 신호 조절 등과 같은 동물 모델에서는 구현하기 힘든 연구를 in vitro 상에서 구현할 수 있다. 이에, 기초 연구에 매우 유용함은 물론, 인간의 발생과정, 질환 모델 확립, 의약품 유효성 평가 스크리닝, 의약품 독성 평가 플랫폼 개발, 세포치료제 개발 등 다양한 분야에 매우 유용하게 사용될 수 있는 기술이다.

- [0019] 본 발명에 있어서, 미세주입(microinjection)은 핵산, 단백질, 화합물 등을 세포 내에 도입하는 방법을 의미한다. 현미경 하에서 각개 세포에 주입용 피펫을 질러 넣고 기계적으로 화합물을 도입한다. 외래 유전자의 세포 내에서의 발현양식과 유전자 산물의 작용을 알기 위해 흔히 쓰인다. 본 발명에서는 폐 오가노이드 내에 대식세포 및 결핵균을 도입하기 위하여 미세주입 방법을 활용했다.
- [0020] 상기 대식세포 및 결핵균의 미세주입은 동시에 또는 이시에 수행될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 구체예에서, 상기 폐 오가노이드는 배아줄기세포(embryonic stem cell), 역분화 줄기세포(induced pluripotent stem cell) 및 성체 줄기세포(adult stem cell)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 세포를 배양하여 제조된 것이 바람직하고, 더 바람직하게는 배아줄기세포일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 폐 오가노이드는 WA01(H1), WA09(H9) 및 인간 폐 조직 유래 줄기세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 세포를 배양하여 제조된 것이 바람직하나, 이에 본 발명의 범위가 제한되지 않는다.
- [0023] 본 발명의 구체예에서, 상기 폐 오가노이드는 드롭렛(droplet) 배양 방법으로 세포를 배양하여 제조된 것이 바람직하며, 폐 오가노이드를 제조할 수 있는 방법이라면 어떠한 방법도 적용 가능하다.
- [0024] 본 발명의 구체예에서, 상기 대식세포는 THP-1 세포(Human acute monocytic leukemia cell)로부터 분화된 대식세포, 인간 혈액세포로부터 분화된 대식세포 (Monocyte-derived macrophages;MDM), 인간 유래 대식세포주 및 인간 전분화능 줄기세포 유래 대식세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 THP-1 세포로부터 분화된 대식세포일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 구체예에서, 상기 결핵균은 마이코박테리움 튜버쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*) 또는 비결핵 항산균(Nontuberculous mycobacteria : NTM)인 것이 바람직하다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 비결핵 항산균은 항산균 중 결핵균 및 나병균을 제외한 것을 의미한다. 다시 말해, 상기 비결핵 항산균은 결핵균은 아니지만, 결핵균처럼 항산성을 띤 균이다. 결핵균이 인체에서만 생존하고, 사람 간 전파를 통해 전염되는 것과 달리, 비결핵 항산균은 토양이나 물과 같은 자연환경에 널리 분포하고 주로 호흡을 통해 폐로 감염된다. 또한 호흡을 통해 감염된 비결핵 항산균은 만체내에서 만성폐렴을 일으키며, 사람 간 전파는 되지 않는다고 알려져 있다. 상기 비결핵 항산균의 예로는 마이코박테리움 보비스(*M. bovis*), 마이코박테리움 아프리카눔(*M. africanum*), 마이코박테리움 카네티(*M. canetti*), 마이코박테리움 카프래(*M. caprae*), 마이코박테리움 미크로티(*M. microti*), 마이코박테리움 명지(*M. mungi*), 마이코박테리움 오리기스(*M. orygis*), 마이코박테리움 피니페딜(*M. pinnipedil*) 및 마이코박테리움 수리카타(*M. suricattae*) 등이 있다.
- [0027] 상기 결핵균은 형광물질로 표지된 것일 수 있다. 형광물질로는 여기 상태에서 발광하는 분자, 금속 이온, 착화합물, 유기염료, 도체, 반도체, 부도체, 양자점(quantum dot), 양자선(quantum wire) 등이 있다. 또한 상기 형광물질의 예로서, EGFP(enhanced green fluorescent protein), ECFP(enhanced cyan fluorescent protein), EBFP(enhanced blue fluorescent protein), EYFP(enhanced yellow fluorescent protein) 및 RFP(red fluorescent protein) 등의 형광단백질이 있다.
- [0028] 일례로, 상기 결핵균은 형광 단백질을 암호화하는 유전자를 보유한 것일 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 적색 형광을 발현하는 RFP 유전자를 보유한 결핵균 H37Rv-RFP를 사용하였다.
- [0029] 본 발명의 구체예에서, 상기 대식세포 및 결핵균은 MOI(Multiplicity Of Infection) 0.1 내지 10으로 미세주입하는 것이 바람직하고, 더 바람직하게는 MOI 0.3 내지 7, 더욱 바람직하게는 MOI 0.5 내지 5, 가장 바람직하게는 MOI 1로 미세주입하는 것이 바람직하다.
- [0030] 본 발명의 제조 방법으로 제작된 결핵균 감염모델은 하기와 같은 특징이 있다.
- [0031] (i) 본 발명의 방법으로 제작된 결핵균 감염모델은 종래 in vivo 동물모델과 달리 인간의 생리학적 특성이 반영되어 있다.
- [0032] (ii) 본 발명의 방법으로 제작된 결핵균 감염모델은 폐포 내강에 대식세포 및 결핵균이 존재한다. 이와 같은 특성에 따라, 본 발명의 결핵균 감염모델은 실제 생체 감염모델과 매우 유사하다. 또한 본 특징은 종래 2D 결핵균 감염모델인 마우스 유래 대식세포주와 다른 특성이다.
- [0033] (iii) 본 발명의 방법으로 제조된 결핵균 감염모델은 최소 3주 이상 장기배양이 가능하다. 이와 달리, 종래 결핵균 감염모델은 결핵균 감염 후 최대 3일 이상 배양이 어려워 항결핵제 스크리닝에 한계가 있는데, 본 발명은

위의 한계를 해결하였다.

- [0034] 위와 같은 특성을 갖는 본 발명의 방법으로 제조된 결핵균 감염모델은 결핵 치료제 스크리닝, 효능 평가 등의 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 결핵균 감염모델에 항결핵제 후보물질을 처리하는 단계;를 포함하는 항결핵제 스크리닝 방법을 제공한다. 또한 본 발명은 상기 결핵균 감염모델에 항결핵제를 처리하는 단계;를 포함하는 항결핵제 효능 평가 방법을 제공한다.
- [0036] 본 발명에 따른 항결핵제 스크리닝 방법 및 항결핵제 효능 평가 방법은 본 발명의 결핵균 감염모델에 항결핵제 또는 이의 후보물질을 처리한다. 이에 따라 결핵균 감염모델 내 결핵균 수의 변화 관찰을 통해 스크리닝 또는 효능 평가를 할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 구체예에서, 상기 항결핵제 스크리닝 방법은 본 발명의 결핵균 감염모델에 항결핵제 후보물질 처리에 따라 결핵균 감염모델 내 결핵균 수가 감소될 경우, 처리된 항결핵제 후보물질을 결핵의 치료제(즉, 항결핵제)로 판단하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 구체예에서, 상기 항결핵제 효능 평가 방법은 본 발명의 결핵균 감염모델에 항결핵제를 처리함에 따라 결핵균 감염모델 내 결핵균 수가 증가 또는 감소될 경우, 처리된 항결핵제의 결핵 치료 효능을 판단하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0040] 중복되는 내용은 본 명세서의 복잡성을 고려하여 생략하며, 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.
- [0042] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0044] **[실험예]**
- [0045] 후술되는 실험과정(인간 폐 오가노이드로의 분화, 결핵균 감염모델 및 항결핵제 평가모델 제작 및 항결핵제 유효성 평가)은 도 1에 간략히 나타내었다.
- [0047] **실험예 1. 항결핵제 평가용 폐 오가노이드 제작 프로토콜 최적화**
- [0048] **1) 폐 오가노이드 제작 프로토콜 구축**
- [0049] **가. 내배엽으로의 분화**
- [0050] 항결핵제 평가용 폐 오가노이드의 제작을 위하여 최적화된 프로토콜을 구축하고자 세포외 기질 위에서 mTeSR™-1 완전배지를 이용하여 배양하고 있는 인간 전분화능 줄기세포(H1, H9)를 EDTA를 이용하여 단일세포로 회수한 후, 매트릭젤로 코팅된 12-well 배양 용기에 분주하였다.
- [0051] 이후, 내배엽 분화 배지를 이용해 4일간 배양하여 내배엽 세포로 분화시켰으며, 분화 4일째에 세포를 회수하여 RNA를 추출한 다음 qPCR을 통해 내배엽 마커(CXCR4, CER, SOX17)의 발현을 분석하였다. 또한, 일부 세포는 항체 염색을 하여 유세포 분석을 통해 내배엽 마커(EpCAM, CXCR4, c-kit, SOX17)의 발현을 분석하였다.
- [0053] **나. 내배엽 세포로부터 폐 오가노이드로의 분화**
- [0054] 폐 오가노이드를 제작하기 위해, TrypLE를 이용하여 내배엽 세포를 single cell로 회수 후, 24-well 배양 용기에 세포 수별로($2-3 \times 10^5$) 분주하였다. 세포를 분주한 날부터 2일간 SB431542와 Noggin, 또는 IWP-4가 포함된 배지에 배양하여 anterior foregut으로 분화시켰다. 이때, 배양 배지는 24시간마다 웰 당 500 μ L씩 새로 갈아주

었다. 이후, FGF10, KGF, BMP4, CHIR99021, All-trans retinoic acid(ATRA)를 포함하는 폐 오가노이드 배양 배지를 이용하여 분화 12~15일까지 배양하였다. 이때, 배양 배지는 1~3일마다 웰 당 500 μ L씩 새로 갈아주었다.

[0056] 분화 12~15일째부터는 세포의 기질을 활용한 드롭릿(droplet) 배양 방법을 접목하여 3D 폐 오가노이드를 제작하였으며, 세포의 기질로는 GFR 매트리지젤(Growth Factor Reduced Matrigel)을 사용하였다. 분화 12~15일째의 2D로 배양하고 있던 세포를 부드럽게 파이프팅하여 잘게 부수었다. 부수어준 세포들을 60% GFR 매트리지젤에 희석하여 24-well 배양 용기에 웰 당 50~100 μ L씩 드롭릿 형태로 넣고 37° C, 5% CO₂ 배양기에서 약 30분간 굳혔으며, 이후 폐 오가노이드 배양 배지를 웰 당 750 μ L씩 넣어주었다. 이때, 3일마다 새로운 폐 오가노이드 배양 배지로 갈아주면서 현미경을 통해 폐 오가노이드의 형태를 관찰하였다. 또한, 오가노이드의 성장과 원활한 영양 공급을 위하여 7~10일마다 계대배양을 수행하였으며, 기존에 오가노이드를 둘러싸고 있는 GFR 매트리지젤을 제거하고 새로운 GFR 매트리지젤 안에 오가노이드를 넣어주어 드롭릿 형태로 배양하였다.

[0058] 다. 폐 오가노이드로의 분화 기간 최적화 조건 확립

[0059] 분화 기간 최적화를 위한 조건을 확립하기 위하여 폐 오가노이드를 분화 30일, 40일, 50일, 60일까지 배양 후 각 기간별로 세포를 회수하여 폐 세포 특이적 마커 (NKX2.1, Pro-surfactant protein C; Pro-SFTPC/ SFTPC, SCGB3A2) 발현을 분석하였다.

[0061] 실험예 2. 폐 오가노이드를 이용한 결핵균 감염모델 확립

[0062] 1) 폐 오가노이드와의 공동배양에 필요한 대식세포의 준비

[0063] 3D 폐 오가노이드 기반 결핵균 감염모델 제작을 위해 3D 폐 오가노이드와 인간 대식세포의 최적화된 공동배양 방법을 확립하고자 하였다. 인간 대식세포로는 단핵구인 THP-1을 American Type Culture Collection(ATCC, USA)에서 구입하여 사용하였다.

[0064] 단핵구 상태의 THP-1 세포를 대식세포로 분화시키기 위하여 Cell Activation Cocktail(Biolegend, CA)을 배양 배지에 1:500으로 희석하여 37° C, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 이상 배양함으로써 THP-1 세포로부터 분화된 대식세포를 준비하였다. 이후, 면역형광염색을 통해 대식세포 마커인 CD68의 발현을 분석하였다.

[0066] 2) 3D 폐 오가노이드 감염을 위한 결핵균 확보

[0067] 적색 형광을 발현하는 RFP 유전자를 보유한 H37Rv-RFP 결핵균을 오가와(ogawa) 배지에서 배양 후 콜로니를 채취하여 kanamycin(20 μ g/mL)이 포함된 Middlebrook 7H9 배양 배지(10% oleic albumin dextrose catalase, 5% glycerol)에서 양을 늘려가며 shaking incubator에서 배양하였다. 최종 500mL bottle로 옮겨 배양하기 시작한 후 OD 값이 1에 가까운 배양일 약 19일에 수집하여 1×10^8 /mL로 균 액을 준비하였다.

[0069] 3) 3D 폐 오가노이드에 결핵균 감염 조건 확립 및 유사 육아종 형성 조건 검토

[0070] 가. 결핵균 감염률을 높이기 위한 감염 방법 확립

[0071] 감염 방법 1: 매트리지젤 드롭릿 형성 시 감염시키는 방법

[0072] - 폐 오가노이드를 파이프팅을 통해 부순 후 회수하여 웰 당 2.5×10^3 개씩 ultra low attached round bottom 96-well 배양 용기에 분주하였다. 대식세포를 Cardiomyocyte Dissociation Medium을 이용하여 회수한 다음 웰 당 5 μ L의 60% GFR 매트리지젤에 5×10^2 개씩 세포가 들어가도록 하여 폐 오가노이드 세포와 5:1의 비율로 되도록 드롭릿 형태로 올려주었다. 이후, RFP가 표지된 결핵균은 대식세포 수에 대비하여 MOI 10으로 희석하여 원심분리 후, 상층의 DPBS를 제거하고 5 μ L의 60% GFR 매트리지젤과 섞어 드롭릿 형태로 올려주었다.

[0074] **감염 방법 2: 배양 배지에 감염시키는 방법**

[0075] - 본 방법은 “감염 방법 1”에서 준비한 폐 오가노이드와 대식세포의 공동배양 형태와 동일하게 진행하였다. 이후, 결핵균을 DPBS에 대식세포 수에 대비하여 MOI 10으로 희석하여 배양 배지에 직접 넣어주는 방법으로 감염시켰다. 감염 후, 메트리젤 드롭렛 방식과 비교하기 위해 별도의 세척 과정 없이 진행하였다.

[0077] **감염 방법 3: 미세주입을 통해 감염시키는 방법**

[0078] - 본 방법은 결핵균을 폐 오가노이드 내부에 직접 주입하여 감염시키는 방법이다. 폐 오가노이드와 대식세포를 10:1 비율로 하여 DPBS에 MOI 10-20으로 희석된 결핵균과 함께 미세주입을 통해 공동배양 모델을 제작하였다.

[0080] **나. 결핵균 감염 최적화를 위한 조건 설정 및 결핵균의 감염 여부 관찰**

[0081] 감염된 폐 오가노이드 내의 결핵균 생존 및 증식 여부를 관찰하기 위하여 형광 이미지 분석을 통해 감염 1일 차 및 4일 차에 결핵균의 RFP와 대식세포의 CellTracker(Green 혹은 Deep Red) 형광을 확인하였다.

[0082] 이후 결핵균 감염 기간에 따른 유사 육아종 형성 조건을 검토하기 위하여 감염 3일, 7일, 10일, 14일째에 각각 오가노이드를 회수하여 메트리젤을 제거 후, 4% 포름알데히드 고정액을 이용해 상온에서 하루 배양함으로써 결핵균의 불활성화 및 오가노이드를 고정하였다. 약 16시간 후, DPBS로 오가노이드를 2회 세척 후, 면역형광염색을 통해 대식세포 마커인 CD68의 발현 및 결핵균의 RFP를 형광현미경을 통해 관찰하고자 하였다.

[0084] **다. 면역형광염색을 통한 유사 육아종 형성 여부 관찰**

[0085] 폐 오가노이드와 대식세포가 5:1의 비율로 존재하는 공동배양 모델을 이용하여 H37Rv-RFP 균을 대식세포 수 대비 MOI 10 조건에서 감염시켰다. 이후, 결핵균이 포함되지 않은 새 배양 배지로 3일마다 교체하였다. 이때, 감염 3일, 7일, 10일, 14일째에 각각 오가노이드를 회수하여 메트리젤을 제거 후, 4% 포름알데히드를 이용하여, 결핵균의 불활성화 및 오가노이드를 고정하였다. 약 16시간 후, DPBS로 오가노이드를 2회 세척하였고, 면역형광염색을 통해 대식세포 마커인 CD68의 발현 및 결핵균의 RFP를 형광현미경을 통해 관찰하고자 하였다.

[0087] **실험예 3. 폐 오가노이드를 이용한 항결핵제 유효성 평가법 구축**

[0088] **1) 폐 오가노이드 기반 항결핵제 처리용 결핵균 감염모델 확립**

[0089] 폐 오가노이드 seeding 후 6일째에 결핵균 H37Rv-RFP와 THP-1 세포로부터 분화된 대식세포를 1:1(MOI 1)의 비율로 혼합하여 미세주입 방법으로 감염시킨 후, 결핵균의 증식 및 유사 육아종 형태가 관찰된 최적의 시간대인 감염 6시간 후에 항결핵제 RIF(Rifampicin, 20 µg/ml)을 처리하였다. 이때, 항결핵제 처리 방법은 메트리젤 드롭렛 배양 배지에 직접 투여하는 방법으로 진행하였다.

[0091] **2) 염증성 사이토카인(IL-6, IL-10, TNF-α)의 유전자 발현 및 단백질 분비량 측정**

[0092] 각 웰에서 오가노이드를 회수하여, total RNA를 추출하여 염증성 사이토카인 (IL-6, IL-10, TNF-α)의 유전자 발현을 분석하였다.

[0094] **3) 세포 내 결핵균 생존 측정(CFU assay)**

[0095] 항결핵제 처리 48시간 후, 상층액을 제거하고 멸균 증류수 300 µl로 5분 이상 반응시켜 세포를 터뜨려 세포 내 생존하는 결핵균을 수집하고 10% OADC(Oleic Albumin Dextrose Catalase), 5% glycerol, ampicillin(25 µg/ml)이 포함된 7H10 고체 배지에 접종하여 37°C에서 약 2~3주간 배양시킨 후 집락 수를 관찰하여 세포 내 결핵균의 생존을 측정하였다.

[0097] **실험예 4. 폐 오가노이드를 이용한 계대배양 및 장기배양이 가능한 결핵균 감염모델 확립**

[0098] 앞서 구축한 방법에 따라 폐 오가노이드 기반 결핵균 감염모델을 제작하였으며, 결핵균 감염 3일째에 첫 계대배양을 수행하였다. 우선 메트리젤 제거를 위해 오가노이드를 회수한 다음, 4℃에 10분간 방치하여 메트리젤이 액체화되도록 하였다. 이후 회수한 오가노이드를 1,500rpm 조건에서 3분간 원심분리하여 상층액을 제거하였으며, DPBS를 이용하여 세척하는 과정을 2회 반복하였다. 메트리젤이 제거된 상태의 오가노이드에 DMEM/F12 배양 배지를 첨가하여 파이펫을 이용해 물리적으로 오가노이드를 부수어준 다음, 원심분리를 통해 상층액을 제거하고 처음 오가노이드가 들어있던 웰 당 1:6 비율로 계대배양되도록 하여 60% 메트리젤(오가노이드 배양 배지에 희석)을 첨가하여 오가노이드와 균일하게 섞이도록 파이펫팅 후, 24웰 배양 용기에 웰 당 50 μ L의 메트리젤 드롭릿을 형성하였다. 최종적으로 배양 용기를 37℃, 5% CO₂ 배양기에 넣고 30분간 방치하여 gelation한 다음 오가노이드 배양 배지를 웰 당 700 μ L씩 첨가하였다. 이후 7일마다 계대배양을 수행하면서 CFU assay를 통해 폐 오가노이드 내 결핵균의 수를 측정하였다.

[0100] **[실시예]**

[0101] **실시예 1. 항결핵제 평가용 폐 오가노이드 제작 프로토콜 최적화**

[0102] **1) 폐 오가노이드 제작 프로토콜 구축**

[0103] **가. 내배엽으로의 분화**

[0104] 항결핵제 평가용 폐 오가노이드 제작을 위하여 최적화된 프로토콜을 구축하기 위하여, 내배엽(definitive endoderm) 분화 배지를 이용하여 4일간 배양하여 내배엽 세포로 분화시켰다. 구체적인 내배엽으로의 분화 스케줄은 도 2에 나타내었다.

[0106] **나. 내배엽 마커 발현 비교 및 분석**

[0107] 줄기세포주의 종류에 따른 내배엽 마커(EpCAM, CXCR4, c-kit, SOX17) 발현을 확인하기 위하여, 분화 4일째에 세포를 회수하여 유세포 분석을 수행하였다. 유세포 분석 결과는 도 3에 나타내었다.

[0108] 도 3에 나타난 바와 같이, H1 세포의 경우 EpCAM+CXCR4+ 세포는 96.99%, EpCAM+c-kit+ 세포는 95.97%, SOX17+ 세포는 44.79%임을 확인하였다. H9 세포의 경우에는 EpCAM+CXCR4+ 세포는 87.2%, EpCAM+c-kit+ 세포는 95.1%, SOX17+ 세포는 92%임을 확인하였다. 특히, H1 세포로 분화된 내배엽 세포는 SOX17+PDGFR α 세포가 18.98%임에 비해, H9 세포 유래 내배엽 세포는 SOX17+PDGFR α 세포가 92%로 현저히 높음을 확인하였다.

[0110] 또한, qPCR을 통해 내배엽 마커(CXCR4, CER, SOX17)의 유전자 발현을 분석하였다. qPCR 분석 결과는 도 4에 나타내었다.

[0111] 도 4에 나타난 바와 같이, 세 유전자 모두 H1 혹은 H9 세포를 이용하였을 때 미분화단계인 Day 0에 비하여 유의하게 유전자 발현이 증가하였다. CXCR4의 경우에는 H1 세포에서 발현이 더 높았으나, CER 및 SOX17의 경우에는 H9 세포에서 발현이 현저하게 높음을 확인하였다.

[0112] 따라서, H1 세포와 비교하여 H9 세포가 내배엽으로의 분화 효율이 높은 것을 확인하였으며, 위의 결과들을 근거로 폐 오가노이드 제작을 위한 배아줄기 세포주를 H9으로 선정하였다.

[0114] **다. 내배엽 세포로부터 폐 오가노이드로의 분화**

[0115] 내배엽 세포로부터 폐 오가노이드로 분화 과정은 도 5와 같이 수행하였다. 구체적으로, 폐 오가노이드를 제작하기 위해, 우선 H9 줄기세포주를 이용하여 내배엽 세포로 분화시킨 후, (i) SB431542와 (ii) Noggin 또는 IWP-4가 포함된 배지에 배양하여 anterior foregut으로 분화시켰으며, 이후 FGF10, KGF, BMP4, CHIR99021, All-trans retinoic acid(ATRA)가 포함된 폐 오가노이드 배양 배지에 배양하여 폐 오가노이드로 분화시켰다.

- [0117] 분화 12-15일부터는 세포외 기질을 활용한 드롭렛 배양 방법을 접목하여 3D 폐 오가노이드를 제작하였으며, 3일 마다 새로운 폐 오가노이드 배양 배지로 갈아주면서 현미경을 통해 폐 오가노이드의 형태를 관찰하였다. 현미경 관찰 결과는 도 6에 나타내었다.
- [0118] 도 6에 나타낸 바와 같이, 분화 12-15일째부터 버딩(budding)하는 형태가 관찰되기 시작하였다. 또한 메트리젤-드롭렛 안에서 분화되어감에 따라 분화 30일 이후부터 air-sac 형태의 오가노이드가 관찰되기 시작하였다. 이러한 형태학적 변화를 통해, 세기관지(bronchiole)에서 폐포(alveoli)로 이어지듯, 버딩하는 branching 형태의 오가노이드에서 점차 내강이 비어있는 air-sac 형태의 폐 오가노이드로 분화되는 것을 확인하였다.
- [0120] **라. 폐 오가노이드로의 분화 기간 최적화 조건 확립**
- [0121] 분화 기간 최적화를 위한 조건을 확립하기 위하여, 분화기간(30, 40, 50, 60일)에 따라 세포를 회수하여 qPCR을 통해 유전자(NKX2.1, SFTPC, SOX9)의 발현을 분석하였다. qPCR 결과는 도 7에 나타내었다.
- [0122] 도 7에 나타낸 바와 같이, 미분화된 세포에 비해 NKX2.1은 30일째에 가장 높게 발현되었고, 이후에는 점차 감소하는 경향을 보였으며, SFTPC는 분화 60일 이후에 많이 발현함을 확인하였다. SOX9은 분화 30일째에 가장 많이 발현하였으며, 40일 이후에도 미분화된 세포에 비하여 유의적인 발현 차이가 있는 것을 확인하였다. 즉, 폐 오가노이드로 분화되어감에 따라 폐 전구세포 마커인 NKX2.1의 발현은 감소하고, 타입 2 폐 상피세포 마커인 SFTPC 및 distal lung 마커인 SOX9의 발현이 높게 유지되는 것을 확인하였다.
- [0123] 또한, 미분화 상태의 세포 혹은 폐암 세포주인 A549의 유전자 발현 수준과 비교했을 때, 분화 60일까지도 오가노이드가 폐 세포 특이적 마커를 비슷하거나 높은 수준으로 발현하고 있음을 확인하였다.
- [0125] 면역형광염색을 통해 폐 세포 특이적 마커(NKX2.1, Pro-SFTPC/ SFTPC, SCGB3A2)의 단백질 발현을 분석하였으며, 그 결과는 도 8에 나타내었다.
- [0126] 도 8에 나타낸 바와 같이, 본 실시예에서 제작한 폐 오가노이드는 언급한 폐 세포 특이적 마커(NKX2.1, Pro-SFTPC/ SFTPC, SCGB3A2)를 발현하고 있음을 확인하였다. 특히, 2형 폐 상피세포 마커(SFTPC)가 분화 40일부터 높게 발현된다는 점을 통해 폐포 오가노이드(Alveolar organoid)로 분화되어감을 알 수 있다.
- [0127] 따라서 위의 결과들을 근거로 하여, 형태학적으로 air-sac 구조를 띠면서 폐포 상피세포 마커인 SFTPC 마커를 많이 발현하고 있는 분화 60일 이후의 폐 오가노이드를 결핵균 감염모델로 사용하였다.
- [0129] **실시예 2. 폐 오가노이드를 이용한 결핵균 감염모델 확립**
- [0130] **1) 폐 오가노이드와의 공동배양에 필요한 대식세포의 준비**
- [0131] 호흡기로 들어온 결핵균이 폐포의 대식세포에 의해 탐식이 된다고 알려져 있다. 이에 폐 오가노이드와 공동배양용 대식세포 확보를 위해 단핵구인 THP-1 세포로부터 대식세포로의 분화를 유도한 후, 대식세포 마커인 CD68의 발현을 분석하고자 면역형광염색을 수행하였다. 면역형광염색 결과는 도 9에 나타내었다.
- [0132] 도 9에 나타낸 바와 같이, 분화된 세포에서 CD68을 발현하고 있음을 확인하였으며, 이러한 결과는 단핵구인 THP-1 세포가 대식세포로 잘 분화되었다는 것을 의미한다.
- [0134] **2) 폐 오가노이드 기반 결핵균 감염모델 구축에 필요한 결핵균 확보**
- [0135] 대식세포와 공동배양 중인 폐 오가노이드를 감염시키기 위해 적색 형광을 발현하는 RFP 유전자를 보유한 H37Rv-RFP 결핵균을 확보하였다. RFP 유전자를 보유한 H37Rv-RFP 결핵균의 형광 관찰 결과는 도 10에 나타내었다.
- [0136] 도 10에 나타낸 바와 같이, H37Rv-RFP 결핵균은 적색 형광을 발현하는 RFP 유전자를 보유하고 있다. 이에 결핵균 감염 시 형광 현미경을 통해 결핵균을 용이하게 관찰할 수 있다.
- [0138] **3) 3D 폐 오가노이드 기반 결핵균 감염모델 구축을 위한 효과적 감염 방법 확립**

- [0139] 폐 오가노이드를 이용한 결핵균 감염모델 확립을 위하여, 결핵균 감염을 진행하였다. 결핵균 감염 방법은 메트리젤 드롭릿 형성 시 감염시키는 방법, 배양 배지에 감염시키는 방법 및 미세주입 방법을 통해 감염시키는 방법이다. 상기 3종의 결핵균 감염 방법은 도 11에 나타내었다.
- [0141] **감염 방법 1: 메트리젤 드롭릿 형성 시 감염시키는 방법**
- [0142] 폐 오가노이드가 존재하고 있는 메트리젤 드롭릿 위에 대식세포를 메트리젤 드롭릿 형태로 올려 공동배양을 수행하였다. 이후, 결핵균을 60% GFR 메트리젤에 MOI 10으로 섞어주어 드롭릿 형태로 감염시켰다. 형광의 증감 관찰 및 결핵균의 감염 여부를 형광 현미경으로 분석하였다. 상기 형광 증감 관찰 및 결핵균 감염 여부를 확인한 결과는 도 12A에 나타내었다.
- [0143] 도 12A에 나타난 바와 같이, 감염 1일째 및 4일째에 결핵균의 RFP와 대식세포의 CellTracker(Deep Red) 형광을 확인했으나, 폐 오가노이드 내부에서는 형광이 확인되지 않았다.
- [0144] 최적의 결핵균 감염 시간 및 유사 육아종 형성 여부를 관찰하기 위해 결핵균 감염 3일, 7일, 10일, 14일째에 각각 오가노이드를 회수하여 대식세포의 마커인 CD68 발현과 결핵균의 RFP 발현을 형광 현미경을 통해 분석하였다. 최적 결핵균 감염 시간 및 유사 육아종 형성 여부를 관찰하였으며, 그 결과는 도 12B에 나타내었다.
- [0145] 도 12B에 나타난 바와 같이, 폐 오가노이드 내부에서 CD68 발현과 결핵균의 RFP 발현이 확인되지 않았다. 또한 대식세포와 결핵균이 메트리젤을 통과하여 폐 오가노이드 내부로 들어가는 것에는 한계가 있어, 1번 방법인 메트리젤 드롭릿 형성 시 감염시키는 방법은 부적합으로 판단하였다.
- [0147] **감염 방법 2: 배양 배지에 감염시키는 방법**
- [0148] 폐 오가노이드가 존재하고 있는 메트리젤 드롭릿 위에 대식세포를 메트리젤 드롭릿 형태로 올려 공동배양을 수행하였다. 이후, 결핵균을 DPBS에 MOI 10으로 희석하여 배양 배지에 넣어주는 방법으로 감염시켰다. 형광 표지된 결핵균의 감염 여부 및 형광의 증감 관찰을 위해 형광 현미경을 통해 분석했다. 형광 현미경 분석 결과는 도 13A에 나타내었다.
- [0149] 도 13A에 나타난 바와 같이, 감염 1일 차 및 4일 차에 결핵균의 RFP와 대식세포의 CellTracker(Deep Red) 형광을 확인했으나, 폐 오가노이드 내부에서는 형광이 확인되지 않았다.
- [0150] 최적의 결핵균 감염 시간 및 유사 육아종 형성 여부를 관찰하기 위해, 감염 후 3일, 7일, 10일, 14일째에 오가노이드를 회수하여 면역형광염색을 통해 대식세포 마커인 CD68의 발현을 분석하였으며 결핵균의 RFP 발현을 분석하였다. 마커 발현 분석 결과는 도 13B에 나타내었다.
- [0151] 도 13B에 나타난 바와 같이, 폐 오가노이드 내부에서 RFP 및 CD68의 발현이 확인되었다.
- [0152] 따라서 배양 배지에 감염시키는 방법 또한 대식세포와 결핵균이 메트리젤을 통과하여 폐 오가노이드 내부로 들어가는 것에는 한계가 있다는 결론을 얻었다.
- [0154] **감염 방법 3: 미세주입을 통해 감염시키는 방법**
- [0155] 위의 두 가지 방법으로는 이용한 결핵균 감염모델 확립에 어려움이 있어, 미세주입을 통한 감염 방법을 수행하였다. 이때, 위의 실험 결과들을 토대로 폐 오가노이드 세포와 대식세포의 비율은 10:1로 하여 미세주입 방법을 통해 공동 배양하였고, 결핵균은 MOI 10-20 조건 및 미세주입 방법을 통해 감염시켰다. 즉, 폐 오가노이드에 대식세포 및 결핵균을 모두 미세주입하였다. 감염 약 6시간 후 고정하였으며, 공초점 현미경으로 형광을 분석하였다. 공초점 현미경 분석 결과는 도 14에 나타내었다.
- [0156] 도 14에 나타난 바와 같이, 폐 오가노이드 내강에 대식세포와 결핵균이 존재하는 것을 형광을 통해 확인했으며, 일부에서는 결핵균 주위로 대식세포가 둘러싸고 있는 유사 육아종 형태가 관찰되었을 뿐 아니라, 대식세포의 결핵균 탐식작용 또한 관찰되었다.
- [0157] 세 가지 공동배양 방법을 비교해 본 결과, 미세주입 방법의 경우에는 오가노이드가 air-sac 구조를 형성할 때가

지 기다릴 필요가 없으므로 대식세포와의 공동배양 기간을 단축할 수 있었다. 또한, 결핵균에 표지된 RFP 형광이 확인되었으며 감염 후 6시간까지도 오가노이드의 구조가 파괴되는 현상이 관찰되지 않았다. 따라서, 폐 오가노이드와 대식세포의 공동배양 및 결핵균 감염 방법으로 미세주입 방법이 적합하다는 결론을 얻었다.

4) 폐 오가노이드 기반 결핵균 감염모델 구축을 위한 감염 조건 최적화

본 실시예에서는 항결핵제 처리용 폐 오가노이드 기반 결핵균 감염모델 구축을 위한 최적화된 조건을 확립하였다. 이때 폐 오가노이드와 대식세포의 적절한 비율을 선정하고자 1:0.5, 1:1 또는 1:2의 비율로 미세주입하였고, 결핵균은 MOI 1로 감염시켰다. 결핵균 감염 6시간 후, 세포를 고정하여 공초점 현미경 분석; 및 염증성 사이토카인(IL-6, IL-10, TNF- α)의 유전자 발현 분석을 수행하였다. 공초점 현미경 분석 결과는 도 15A에 나타내었고, 염증성 사이토카인의 mRNA 발현 분석 결과는 도 15B에 나타내었다.

도 15A에 나타낸 바와 같이, 폐 오가노이드 내강에 녹색 형광이 표지된 대식세포와 RFP가 표지된 결핵균이 모두 존재하는 것을 확인하였으며, 유사 육아종 형태가 형성되었음을 확인하였다. 또한, 대식세포의 비율이 증가할수록 미세주입된 대식세포의 수가 증가함을 형광을 통해 관찰하였다.

도 15B에 나타낸 바와 같이, 염증성 사이토카인(IL-6, IL-10, TNF- α)의 유전자 발현을 분석한 결과, 결핵균에 감염되지 않은 그룹에 비하여 감염된 그룹에서 발현이 유의하게 증가된 것을 확인하였다. 또한 대식세포의 비율이 증가할수록 사이토카인 발현이 증가하였으며, 이러한 결과는 결핵균에 대한 대식세포의 면역반응이 증가하여 관련 사이토카인의 발현이 높게 나타났음을 의미한다.

따라서 미세주입 시 세포 밀도를 최소화하면서 염증성 사이토카인 발현에 변화를 보이는 조건인 1:1 비율을 최적의 조건으로 선정하였다.

상기 결과로부터 폐 오가노이드 및 대식세포가 결핵균에 감염되었으며, 폐 오가노이드 내에서 결핵균에 대한 대식세포의 면역반응이 나타났음을 알 수 있다. 이는 폐 오가노이드 기반 결핵균 감염 모델이 성공적으로 구축되었음을 의미한다.

실시예 3. 폐 오가노이드를 이용한 결핵균 감염모델을 활용한 항결핵제 유효성 평가법 구축

1) 폐 오가노이드 기반 항결핵제 평가모델 확립

▶ Rifampicin(RIF) :1-50 μ g/mL 농도 범위

폐 오가노이드 seeding 후 6일째에 결핵균과 대식세포를 1:1의 비율(MOI 1)로 혼합하여 미세주입 방법으로 감염시킨 후, 결핵균의 증식 및 유사 육아종 형태가 관찰된 최적의 시간대인 감염 최소 6시간 후에 항결핵제인 RIF(Rifampicin; 1-50 μ g/mL)를 48시간동안 처리하였다. 또한, 결핵균에 감염된 폐 오가노이드의 형태를 현미경을 통해 관찰하였다. 실험 과정은 도 16A에 나타내었고, 현미경 관찰 결과는 도 16B에 나타내었다.

도 16B에 나타낸 바와 같이, 폐 오가노이드 내에 미세주입된 대식세포 및 결핵균이 존재함을 확인하였다.

폐 오가노이드 기반 결핵균 감염모델에 항결핵제 RIF 처리 후 염증성 사이토카인 변화 측정하였다. 구체적으로, 결핵균을 감염시키지 않은 대조군을 Negative control로 설정하고, 결핵균을 감염시킨 후 항결핵제를 처리하지 않은 대조군을 Positive control로 설정하였으며, 항결핵제 RIF(1-50 μ g/mL) 처리 48시간 후 각 그룹의 세포 및 배양 배지에서의 염증성 사이토카인(IL-6, IL-10, TNF- α)의 유전자 발현을 분석하였다. 염증성 사이토카인의 유전자 발현을 확인한 결과는 도 17에 나타내었다.

도 17에 나타낸 바와 같이, qPCR을 통해 염증성 사이토카인(IL-6, IL-10, TNF- α)의 유전자 발현을 분석한 결과, IL-6, IL-10, TNF- α 의 유전자 발현이 Negative control에 비해 결핵균 감염그룹인 Positive control에서 유의하게 증가된 것을 확인하였다. 또한, 항결핵제 RIF(1-50 μ g/mL) 처리에 의해 대조군 대비 염증성 사이토카인 유전자 발현이 유의미하게 감소하였다.

폐 오가노이드 기반 결핵균 감염모델에 항결핵제 처리 후 폐 오가노이드 내 결핵균 생존을 측정하였다. 구체적

으로, 폐 오가노이드에 대식세포와 결핵균을 미세주입 후 항결핵제 RIF(1-50 $\mu\text{g/mL}$)를 48시간 처리하였을 때, 오가노이드 내 결핵균의 생존을 측정하였으며, 그 결과는 도 18에 나타내었다.

[0176] 도 18에 나타낸 바와 같이, 폐 오가노이드 내 결핵균이 생존하고 있으며 결핵균 단독 감염그룹 대비 RIF 처리에 의해 폐 오가노이드 내 결핵균의 수가 현저하게 감소된 것을 확인하였다. 상기 결과는 결핵균에 감염된 인간 폐 오가노이드 모델에 RIF(1-50 $\mu\text{g/mL}$) 처리 시 결핵균을 효과적으로 감소시킬 수 있음을 시사한다.

[0178] 실시예 4. 폐 오가노이드를 이용한 계대배양 및 장기배양이 가능한 결핵균 감염모델 확립

[0179] 기존 결핵균 감염모델의 한계점인 배양 기간을 극복하고자, 본 발명자들은 폐 오가노이드 기반 결핵균 감염모델의 장기배양 기법을 확립하였다(도 19A). 앞서 구축한 방법에 따라 폐 오가노이드 기반 결핵균 감염모델을 제작하였으며, 결핵균 감염 3일째에 첫 계대배양을 수행하였으며, 이후 7일마다 계대배양을 수행하면서 CFU assay를 통해 폐 오가노이드 내 결핵균의 수를 측정하였다. CFU assay 결과는 도 19B에 나타내었다.

[0180] 도 19B에 나타낸 바와 같이, 첫번째 CFU assay 뿐만 아니라, 3번의 계대배양을 거쳐 수행한 4번째 CFU assay에서도 결핵균의 생존이 가능한 것을 확인하였다. 즉, 계대배양을 진행할수록 폐 오가노이드 내 결핵균 수가 증가되는 것을 확인하였다. 상기 결과는 최소 3주간 폐 오가노이드 내 결핵균이 생존 가능하다는 것을 의미한다.

[0181] 실제 결핵 환자의 항결핵제 복용 기간은 수주~수개월인 반면, 현재 사용되고 있는 결핵균 감염모델들은 대부분 수일 내에 사멸한다는 한계점이 존재한다. 따라서 본 연구팀이 확립한 계대배양 및 장기배양이 가능한 결핵균 감염모델은 in vitro 3D 폐 오가노이드 기반 결핵균 감염모델의 장기배양 실현 가능성을 보여주는 결과이다.

[0182] 위의 결과들을 바탕으로, 본 발명자들은 인간 줄기세포 유래 3D 폐 오가노이드 기반 결핵균 감염모델을 성공적으로 확립하였다. 또한 확립된 3D 폐 오가노이드를 활용한 항결핵제 처리를 통해 염증성 사이트카인 발현 감소; 및 결핵균 수 감소;를 확인함으로써, 최초의 인간 줄기세포 유래 폐 오가노이드 모델 기반 항결핵제 효능평가법을 구축하였다. 따라서 본 발명의 3D 폐 오가노이드는 결핵 치료제 스크리닝, 효능 평가 등의 연구개발 분야에 다양하게 활용될 수 있다.

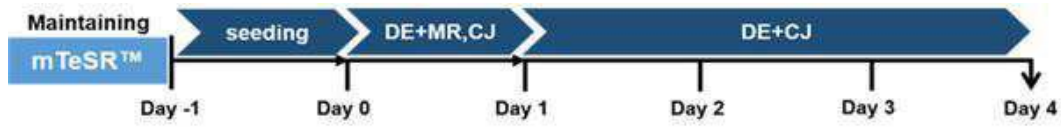
[0184] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

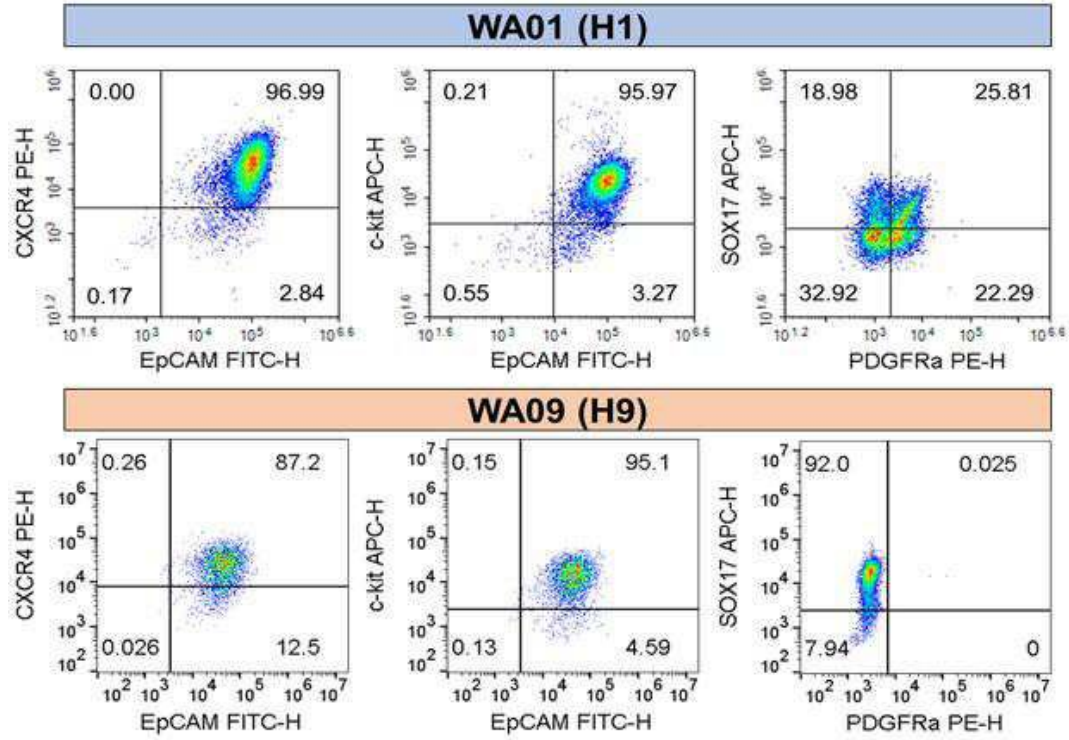
도면1



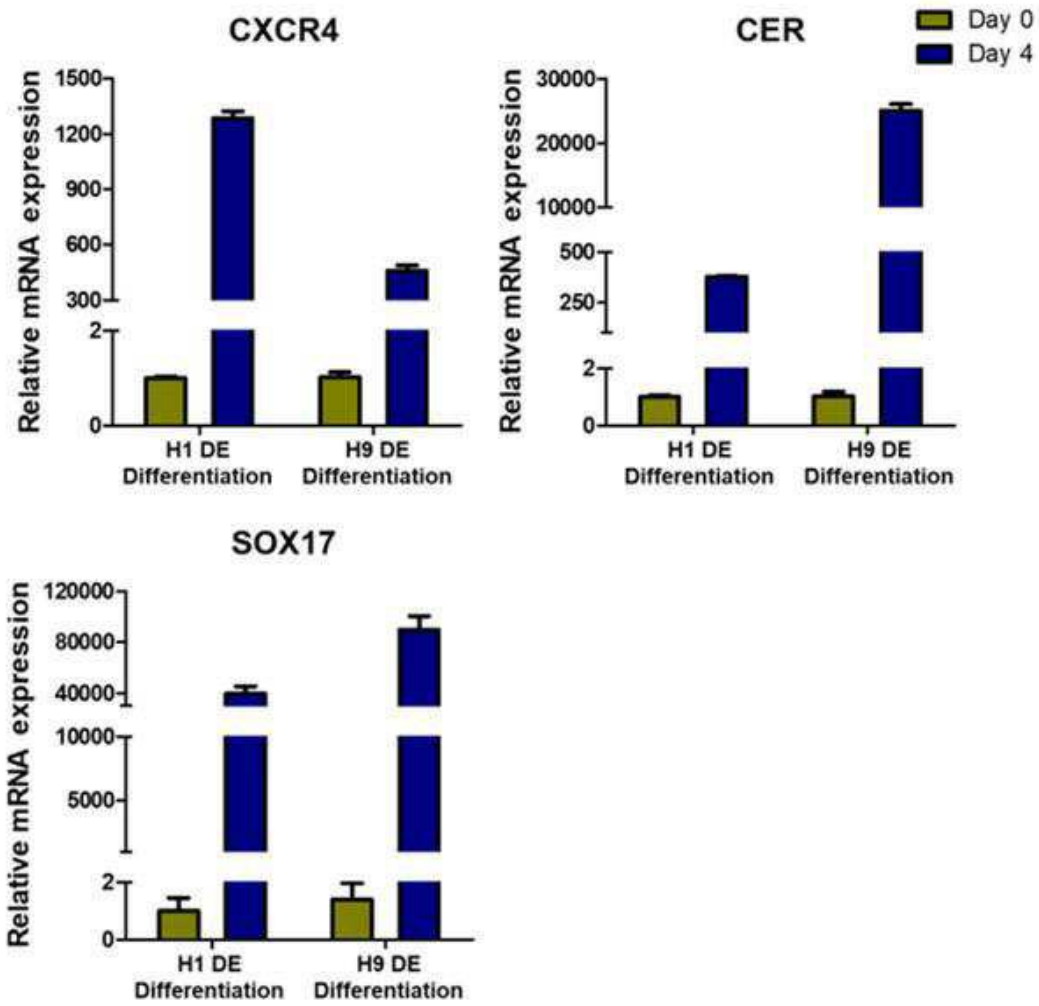
도면2



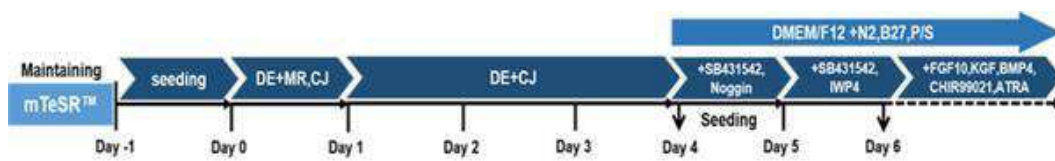
도면3



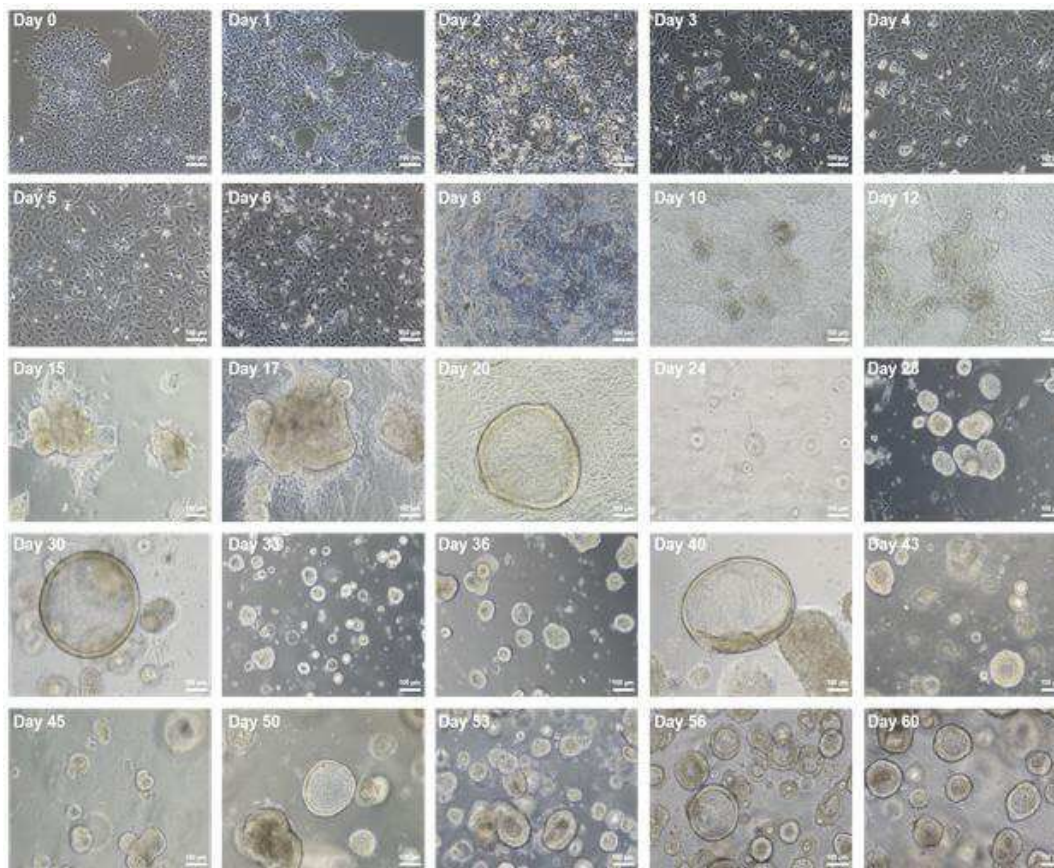
도면4



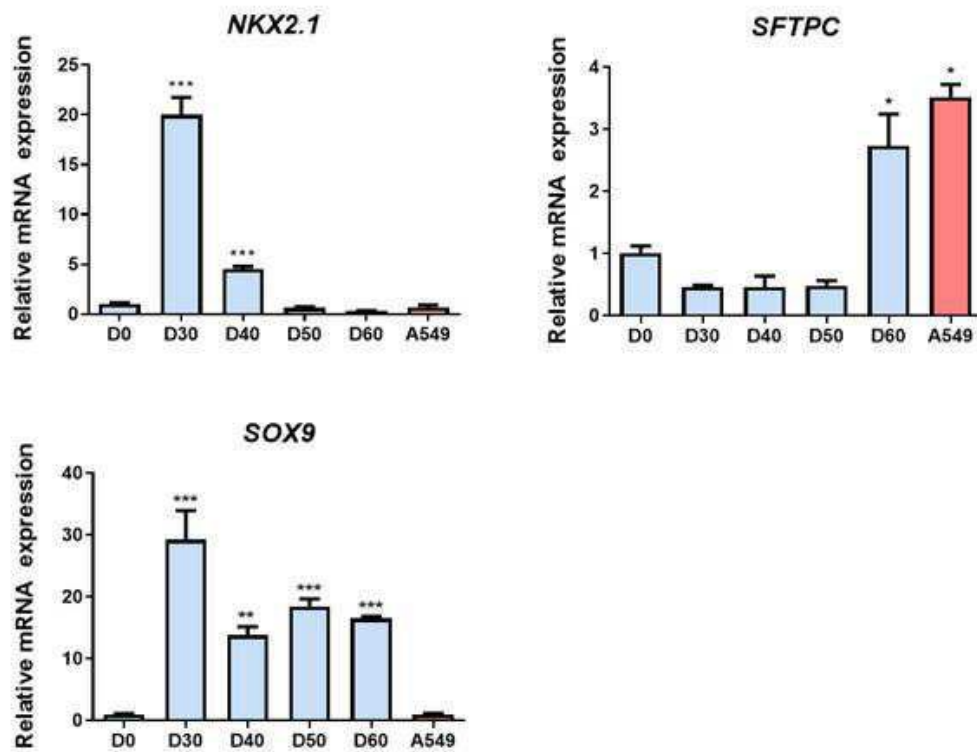
도면5



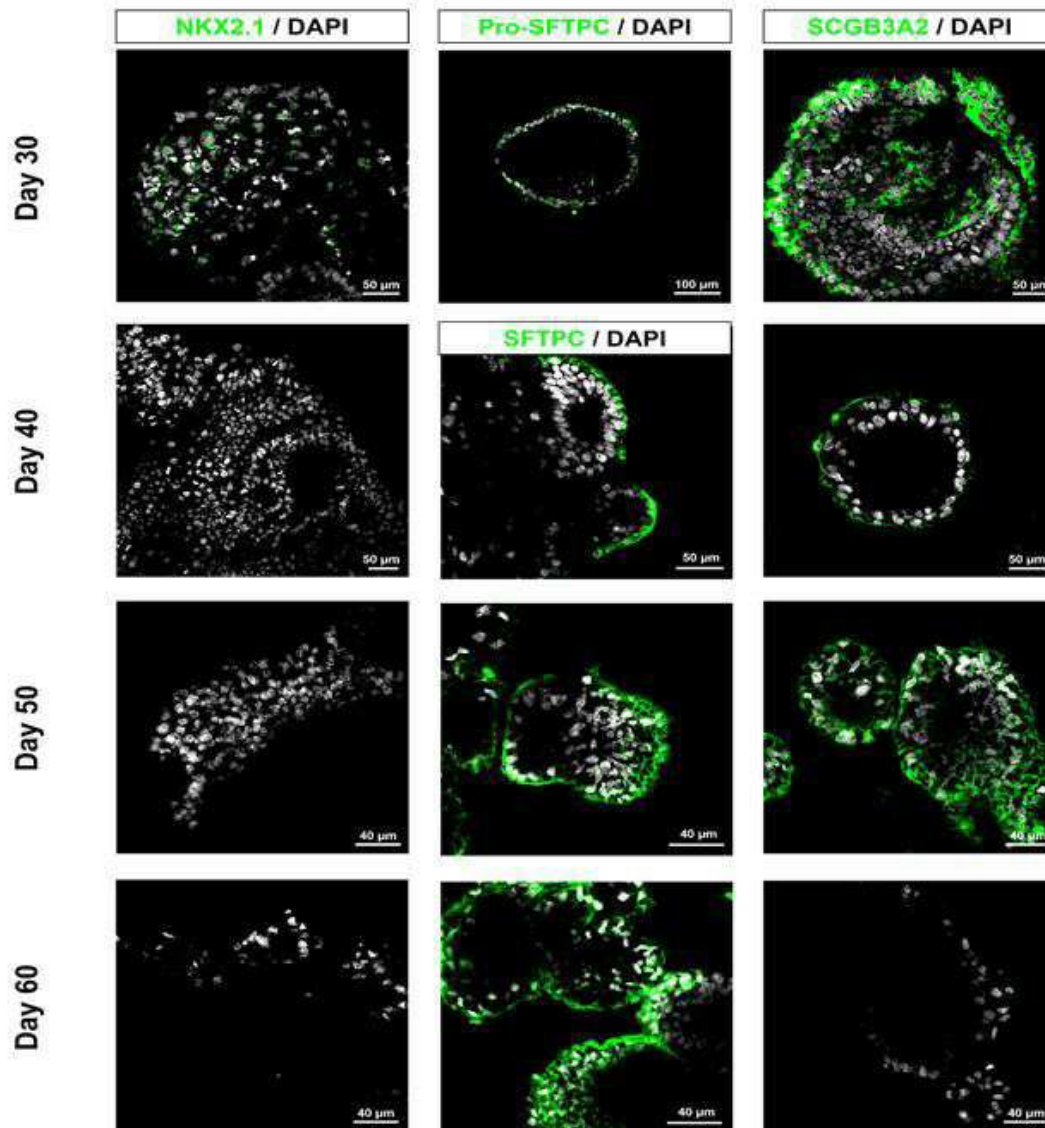
도면6



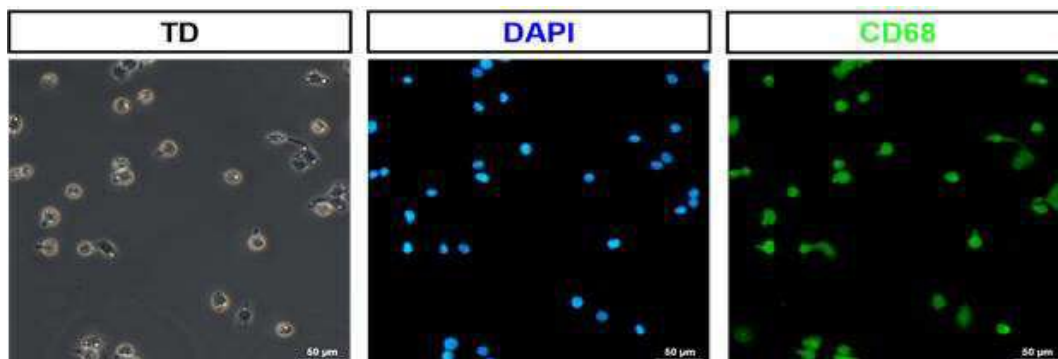
도면7



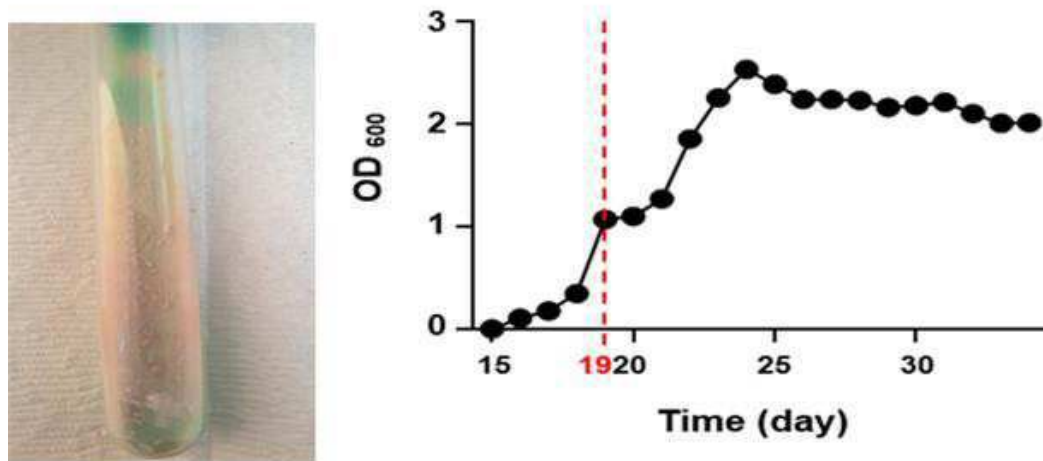
도면8



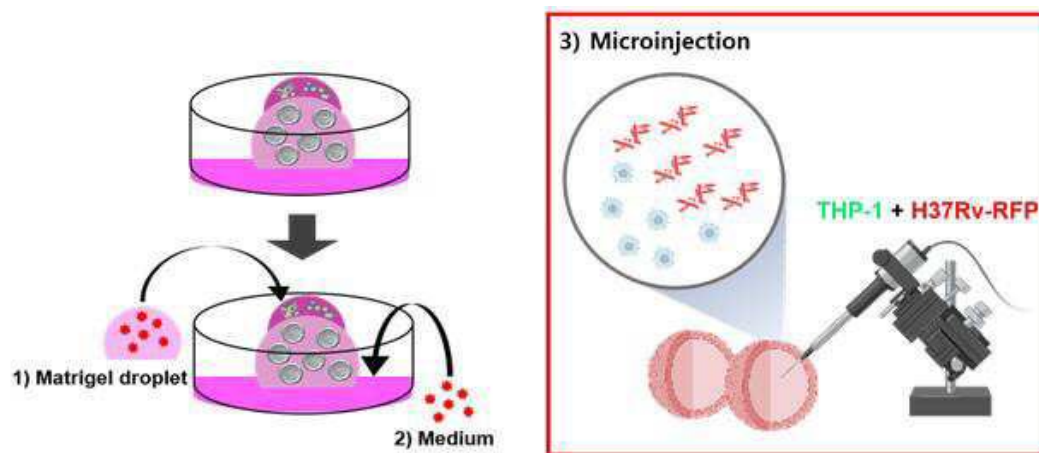
도면9



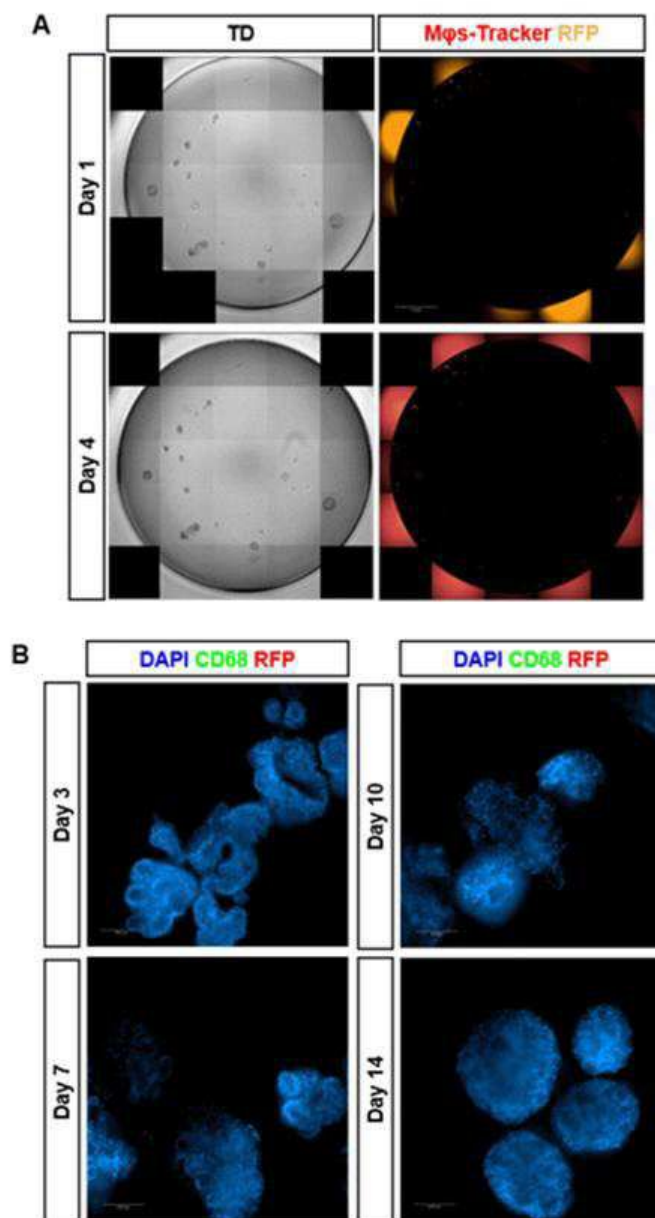
도면10



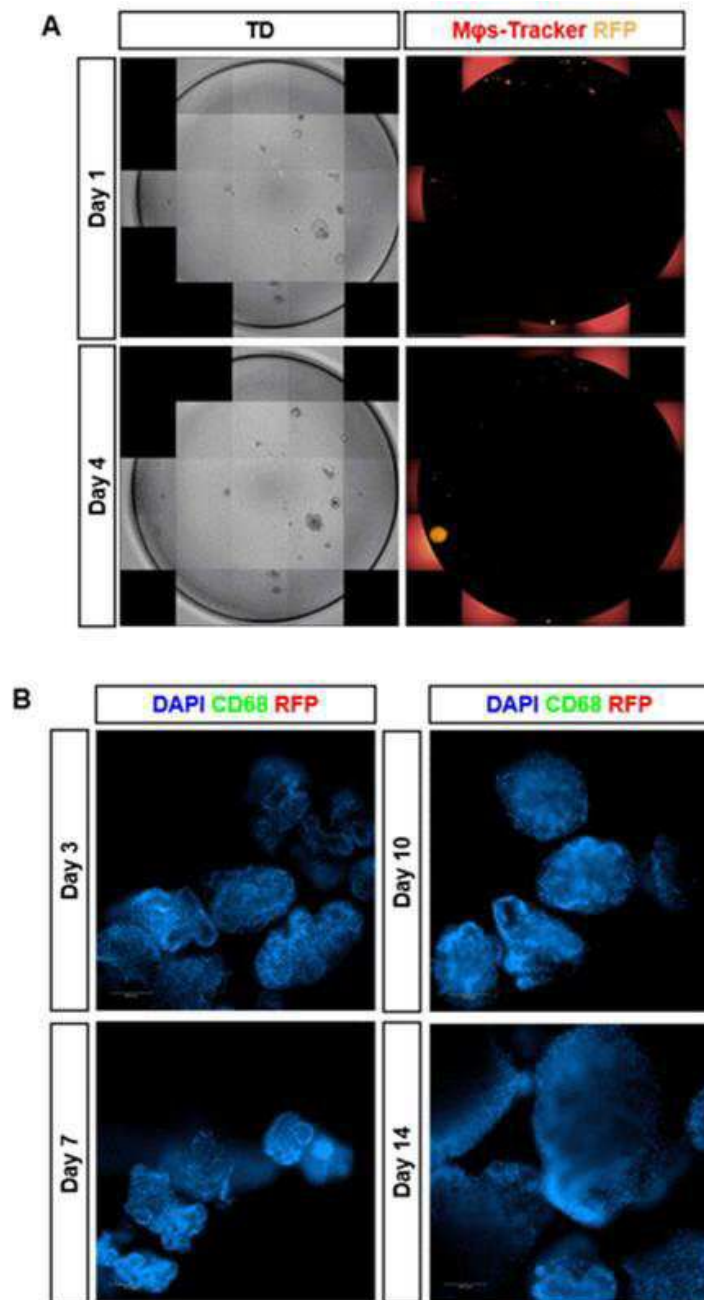
도면11



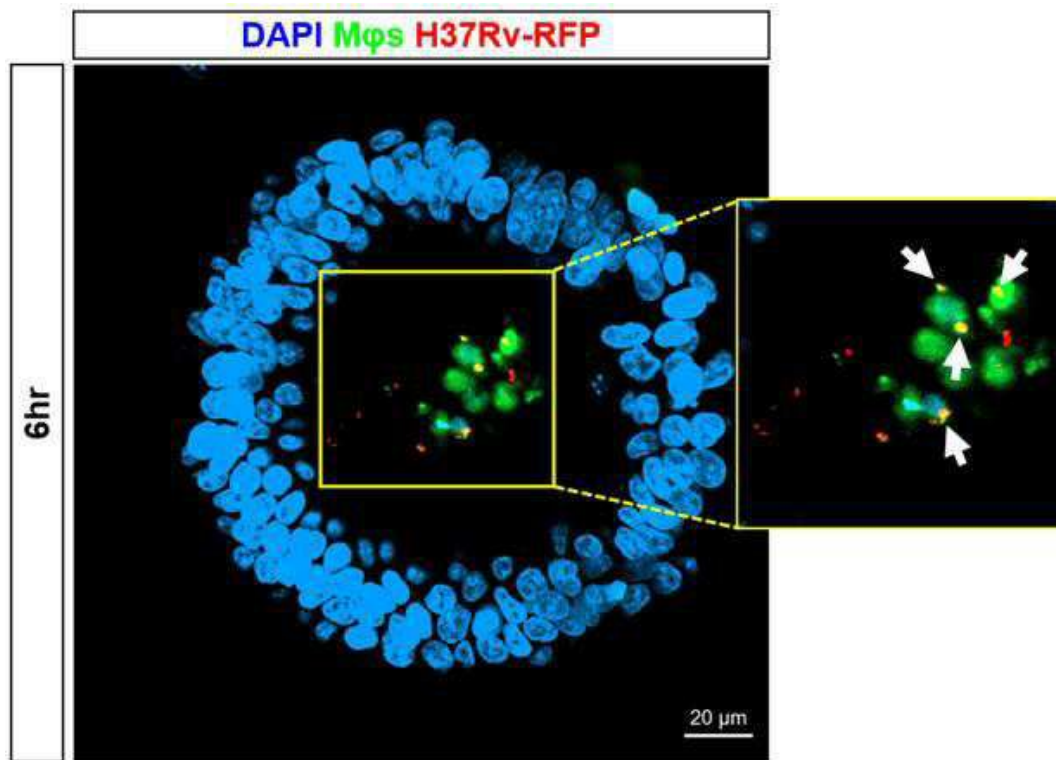
도면12



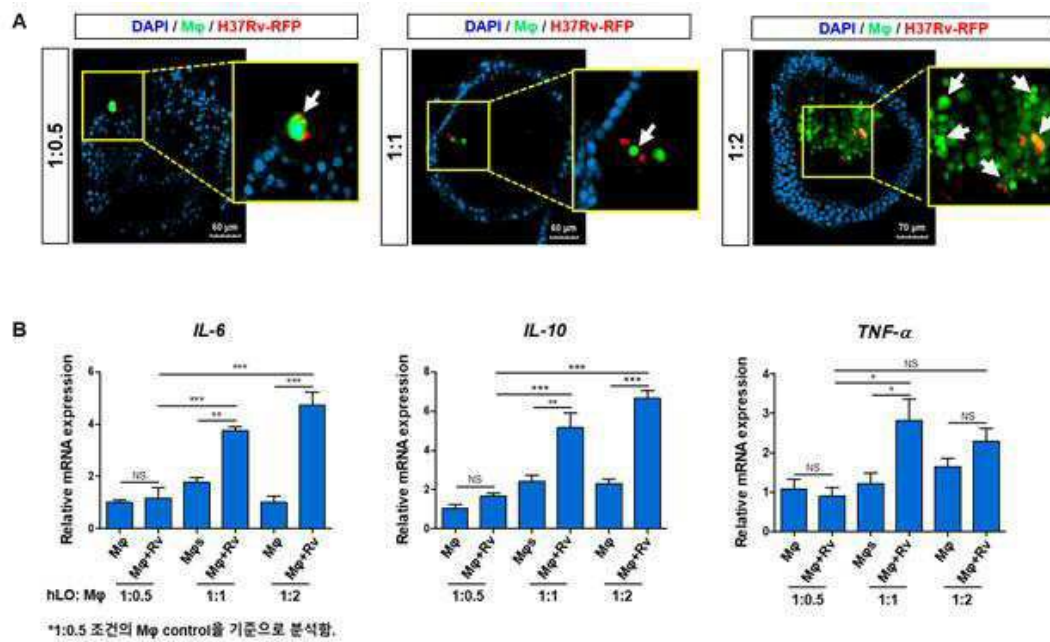
도면13



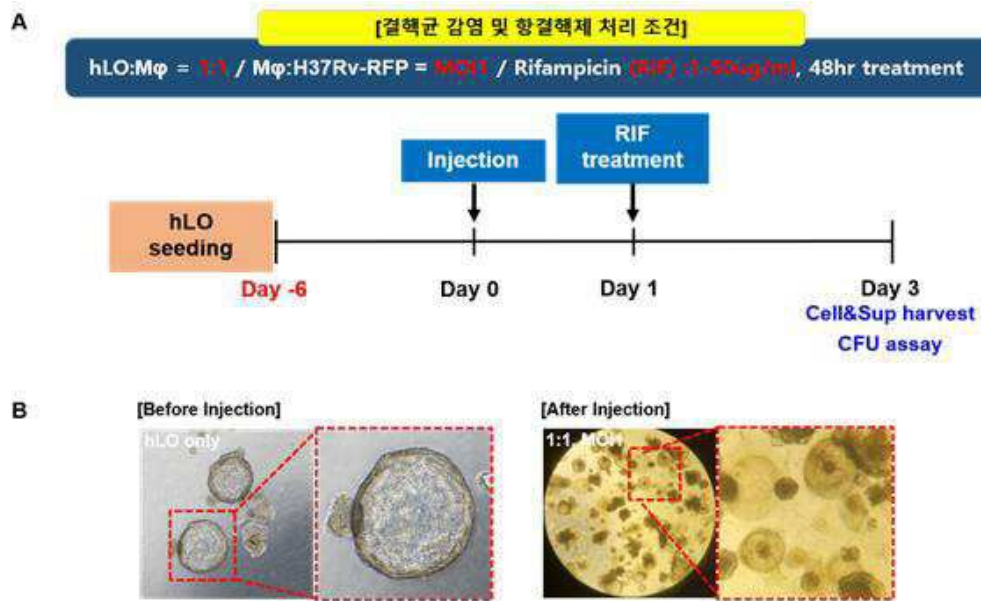
도면14



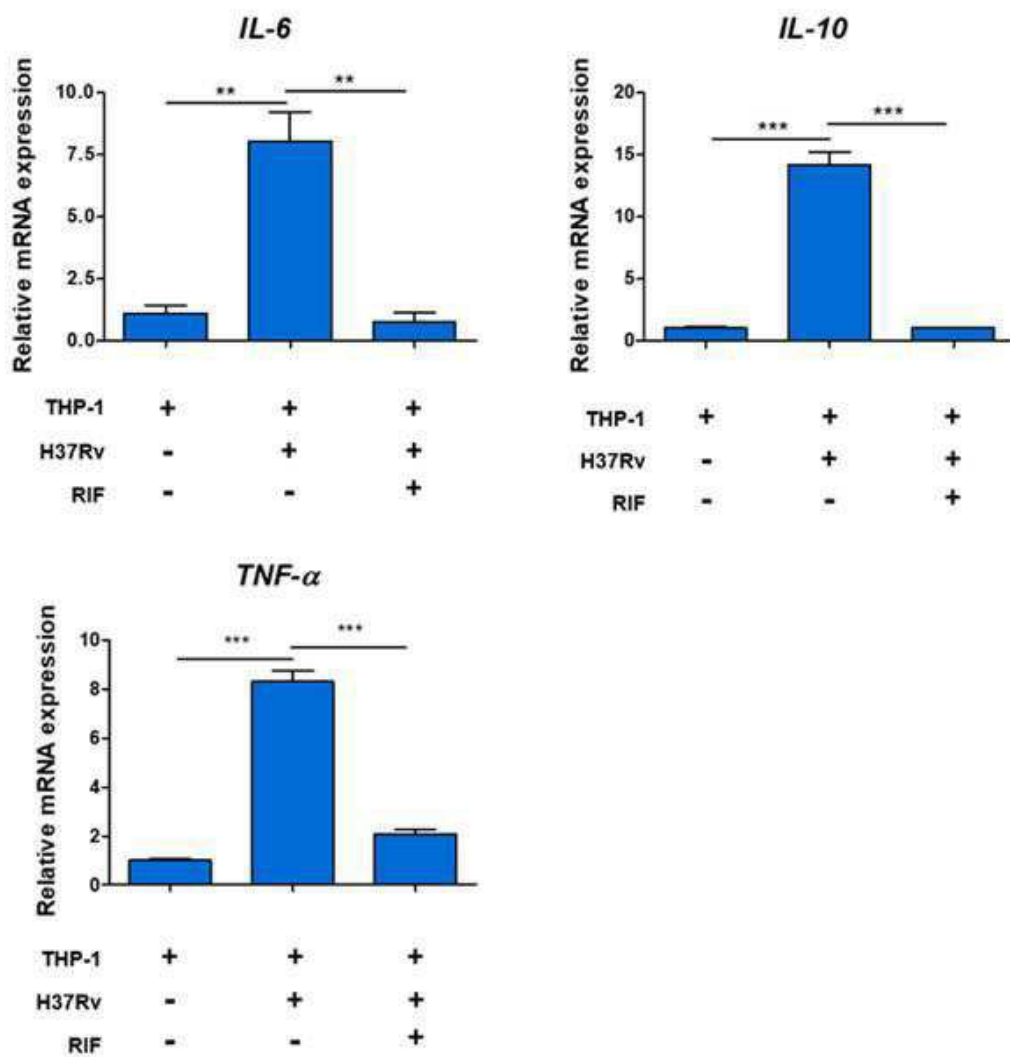
도면15



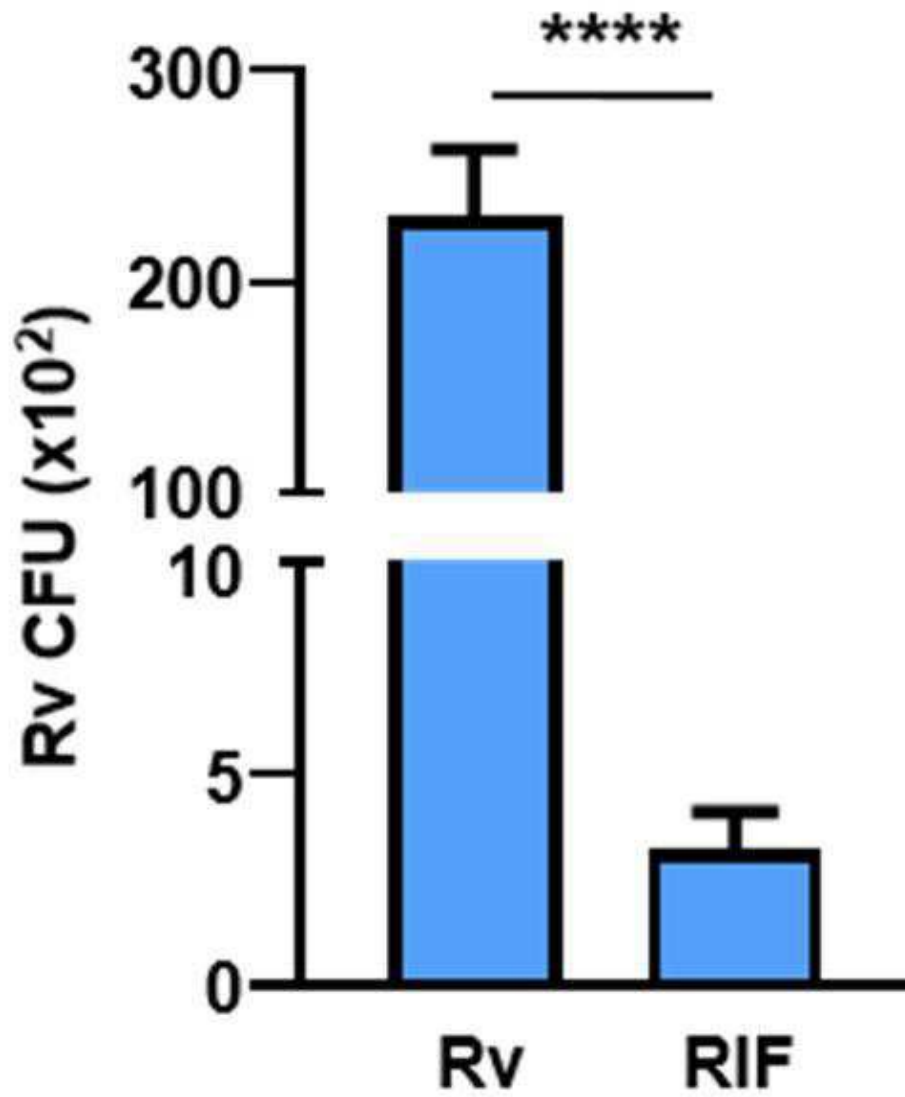
도면16



도면17



도면18



도면19

