(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0067388
(43) 공개일자 2022년05월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0793 (2010.01) *C12M 3/00* (2006.01)
C12N 5/071 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0619 (2013.01)
C12M 21/08 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0154027
(22) 출원일자 2020년11월17일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
최정우
서울특별시 용산구 서빙고로 35, 103동 603호
박수정
서울특별시 서대문구 성산로24길 1-14, 201호
손주형
경기도 고양시 일산서구 강선로 187, 1003동 402호
(74) 대리인
윤대웅

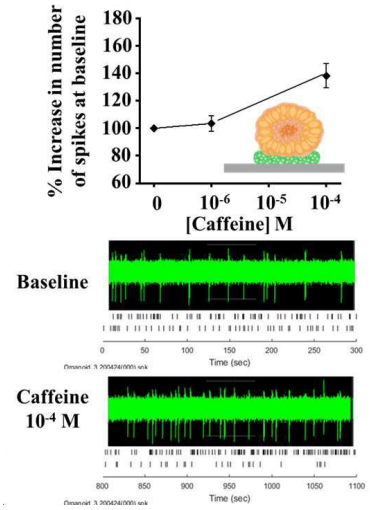
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **대뇌 오가노이드-모터뉴런 스페로이드 구조체 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 대뇌 오가노이드-모터뉴런 스페로이드 구조체 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 대뇌 오가노이드와 모터뉴런 스페로이드를 독립적으로 적절한 배양액에 접촉되도록 설계된 공배양 칩에서 공배양함으로써 상기 구조체를 제조할 수 있고, 이로부터 대뇌를 자극하는 특정 물질에 따른 모터뉴런의 전기신호 변화를 관찰할 수 있으므로, 이를 효과적으로 운동 장애를 유발하는 뇌질환의 예방 또는 치료를 위한 약물 스크리닝 또는 독성 테스트에 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도4c



(52) CPC특허분류
C12N 5/0697 (2013.01)
C12N 2502/081 (2013.01)
C12N 2503/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711108724
과제번호 2019R1A2C3002300
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명 뇌어셈블로이드 기반 생명체 모방 센싱 기능 바이오하이브리드 로봇
기 여 율 35/100
과제수행기관명 서강대학교 산학협력단
연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345312114
과제번호 2016R1A6A1A03012845
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)
연구과제명 뇌질환 약물 평가 기능 나노바이오칩 개발
기 여 율 35/100
과제수행기관명 서강대학교 산학협력단
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345316658
과제번호 2017R1D1A1B03031639
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명 유사장기체(Organoid) 기반 체외 통증모델을 이용한 통증 약물 스크리닝 기술 개발
기 여 율 30/100
과제수행기관명 서강대학교 산학협력단
연구기간 2019.03.01 ~ 2020.11.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

뇌 오가노이드 및 뉴런 스페로이드를 공배양하는 공배양 단계를 포함하는 뇌 오가노이드-뉴런 스페로이드 구조체의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 뇌 오가노이드는 대뇌 오가노이드인 것인, 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 뉴런 스페로이드는 모터뉴런 스페로이드인 것인, 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 공배양 단계는 공배양 칩에서 수행되고, 상기 공배양 칩은

공배양 챔버;

공배양 챔버에 독립적인 채널로 연결된 뇌 오가노이드 배양액 저장소; 및

공배양 챔버에 독립적인 채널로 연결된 뉴런 스페로이드 배양액 저장소;

를 포함하는 것인, 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 공배양 단계는 공배양 챔버에 뉴런 스페로이드를 1개 이상 배치한 후 뇌 오가노이드를 투입하여 수행되는 것인, 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서, 뇌 오가노이드 배양액 저장소의 채널은 뉴런 스페로이드 배양액 저장소의 채널보다 공배양 챔버에 연결된 위치가 높은 것인, 제조방법.

청구항 7

뇌 오가노이드, 및 뇌 오가노이드 하단에 결합된 1개 이상의 뉴런 스페로이드를 포함하는 뇌 오가노이드-뉴런 스페로이드 구조체.

청구항 8

제7항에 있어서, 뇌 오가노이드는 대뇌 오가노이드인 것인, 구조체.

청구항 9

제7항에 있어서, 뉴런 스페로이드는 모터뉴런 스페로이드인 것인, 구조체.

청구항 10

뇌 오가노이드, 및 뇌 오가노이드 하단에 결합된 1개 이상의 뉴런 스페로이드를 포함하는 뇌 오가노이드-뉴런 스페로이드 구조체에 대상 약물을 처리하는 단계를 포함하는 약물 스크리닝 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 뇌 오가노이드는 대뇌 오가노이드인 것인, 스크리닝 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 뉴런 스페로이드는 모터뉴런 스페로이드인 것인, 스크리닝 방법.

청구항 13

제10항에 있어서, 대상 약물은 파킨슨병 또는 헌팅턴병을 포함하는 운동장애를 유발하는 뇌질환의 예방 또는 치료를 위한 후보물질인 것인, 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 대뇌 오가노이드-모터뉴런 스페로이드 구조체 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 대뇌 오가노이드와 모터뉴런 스페로이드를 독립적으로 적절한 배양액에 접촉되도록 설계된 공배양 칩에서 공배양함으로써 대뇌 오가노이드-모터뉴런 스페로이드 구조체를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 실험동물 질환 모델은 인간과 여러가지 면에서 차이가 존재하기 때문에, 이를 이용한 질환 기전 연구나 신약 개발에는 명확한 한계가 존재한다. 세계적으로 실험동물을 이용한 연구에 제한이 있어, 최근에는 인간 장기를 모사하는 오가노이드가 대안으로 제시되고 있으며, 현재 다양한 인체 장기를 모사하는 오가노이드가 개발되고 있다.

[0003] 2013년 영국 연구진에 의해 대뇌와 기능 및 조직이 유사한 대뇌 오가노이드가 제작되었다. 이러한 대뇌 오가노이드는 제작 과정에서 특정 영역으로의 분화 과정 없이 일반적인 뇌와 유사한 특성을 지닌 조직 유사체로 조직화되었으며, 이후 많은 연구진들이 다양한 영역의 뇌 오가노이드를 제작하고 발표하였다. 그러나 이들은 뇌의 특정 영역과 유사한 개별 오가노이드로 생체의 뇌와 같은 복잡하고 유기적인 기능 구현이 불가능하여, 오가노이드 간의 결합을 통한 뇌 구조 및 기능의 구현이 필요하다.

[0004] 조직 특이적 오가노이드 배양 기술은 현재 줄기세포 연구에서 가장 각광을 받고 있는 최첨단 분야로서 난치성 질환 모델, 환자 맞춤형 약물 스크리닝 플랫폼, 신약 개발을 위한 체외 모델 등 재생의학 및 신약 연구 분야에서 활용성이 무한하게 확장될 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명자들은 대뇌 오가노이드-모터뉴런 스페로이드 결합을 통한 구조체를 제작하여 생체 전기신호 변화를 측정한 결과, 뇌신경 자극 물질로 알려진 카페인에 의하여 전기신호가 증폭됨을 확인하였다.

[0006] 이에, 본 발명의 목적은 뇌 오가노이드 및 뉴런 스페로이드를 공배양하는 공배양 단계를 포함하는 뇌 오가노이드-뉴런 스페로이드 구조체의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 뇌 오가노이드, 및 뇌 오가노이드 하단에 결합된 1개 이상의 뉴런 스페로이드를 포함하는 뇌 오가노이드-뉴런 스페로이드 구조체를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 뇌 오가노이드, 및 뇌 오가노이드 하단에 결합된 1개 이상의 뉴런 스페로이드를 포함하는 뇌 오가노이드-뉴런 스페로이드 구조체에 대상 약물을 처리하는 단계를 포함하는 약물 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 뇌 오가노이드-뉴런 스페로이드 구조체의 약물 스크리닝 용도에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 대뇌 오가노이드-모터뉴런 스페로이드(Spheroid) 구조체 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 대뇌 오가노이드-모터뉴런 스페로이드 구조체는 뇌신경 자극 물질로 알려진 카페인에 의하여 전기신호가 증폭됨을 나타낸다.

[0011] 본 발명자들은 이러한 대뇌 오가노이드-모터뉴런 스페로이드 구조체를 제조하기 위하여 대뇌 오가노이드 및 모터뉴런 스페로이드의 각각의 배양액이 독립적으로 공급될 수 있는 공배양 칩을 제조하였고, 이를 이용하여 구조체를 제조하였다.

[0012] 이하 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0013] 본 발명의 일 양태는 뇌 오가노이드 및 뉴런 스페로이드를 공배양하는 공배양 단계를 포함하는 뇌 오가노이드-뉴런 스페로이드 구조체의 제조방법이다.

[0014] 본 명세서상의 용어 "오가노이드"는 유사장기체라고도 불리며, 줄기세포나 장기에서 분리한 세포를 3차원 배양을 통해 재응집/재조합하여 실제 장기와 유사한 조직화와 생체 장기의 기능 재현이 가능하여 발달 및 질병 등 다양한 연구에 모델로 활용 가능하다.

[0015] 본 명세서상의 용어 "스페로이드"는 세포의 3차원 집합체로, 자연 분화를 방지하고 원하는 계열의 분화를 용이하도록 한다. 특히 3차원상에서 신경세포로의 분화유도가 용이하여 많은 연구에서 스페로이드를 이용한 신경분화를 진행하고 있다.

[0016] 본 발명에 있어서 뇌 오가노이드는 대뇌 오가노이드, 시상 오가노이드, 소뇌 오가노이드 및 중뇌 오가노이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 대뇌 오가노이드인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 운동 관련 신호의 전달에 관여하는 뇌의 영역을 모사한 오가노이드의 경우, 상기 뇌 오가노이드로서 적용할 수 있다.

[0017] 본 발명에 있어서 뉴런 스페로이드는 모터뉴런 스페로이드인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 목적에 따라 모터뉴런 이외에 다른 신경세포로 분화한 스페로이드 또한 적용할 수 있다.

[0018] 본 발명에 있어서 공배양 단계는 공배양 칩에서 수행되고, 상기 공배양 칩은공배양 챔버; 공배양 챔버에 독립적인 채널로 연결된 뇌 오가노이드 배양액 저장소; 및 공배양 챔버에 독립적인 채널로 연결된 뉴런 스페로이드 배양액 저장소;를 포함하는 것일 수 있다.

[0019] 상기 공배양 단계는 공배양 챔버에 뉴런 스페로이드를 1개 이상 배치한 후 뇌 오가노이드를 투입하여 수행되는 것일 수 있다.

[0020] 상기 뇌 오가노이드 배양액 저장소에 연결된 채널은 뉴런 스페로이드 배양액 저장소에 연결된 채널보다 공배양 챔버에 연결된 위치가 높은 것일 수 있다.

[0021] 상기 뇌 오가노이드의 배양액은, 예를 들어, DMEM-F12와 Neurobasal medium을 혼합한 배지에 N2 서플리먼트(supplement), 인슐린(insulin) 1X GlutaMAX 서플리먼트, 0.5X MEM-NEAA, 1X 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin) 2-머캅토에탄올(2-mercaptoethanol) 및 비타민 A(vitamin A) 포함 1X B27 서플리먼트가 포함된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 상기 뉴런 스페로이드의 배양액은 StemPro hESC 배지에 뇌유래신경성장인자(Brain-derived neurotrophic factor; BDNF) 및 교세포 신경성장인자(Glial cell-Derived Neurotrophic Factor; GDNF)가 첨가된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명의 일 구현예에서, 뉴런 스페로이드를 공배양 챔버에 배치하고 그 위에 뇌 오가노이드를 투입하였을 때 뉴런 스페로이드 배양액 저장소로부터 배양액이 유입되는 채널의 공배양 챔버 연결 위치는 뇌 오가노이드보다 아래에 위치한다. 이에 따라, 뉴런 스페로이드 배양액은 뇌 오가노이드의 아래에 있는 뉴런 스페로이드의 배양에 사용된다. 이 때 뇌 오가노이드 배양액 저장소로부터 배양액이 유입되는 채널의 공배양 챔버 연결 위치는 뇌 오가노이드보다 위에 위치한다. 이에 따라, 뇌 오가노이드 배양액은 뇌 오가노이드의 배양에 사용되며 뇌 오가노이드의 아래에 있는 뉴런 스페로이드의 배양에 사용되지 않는다.

[0024] 상기와 같은 원리로 공배양 챔버를 이용하여 공배양 단계를 수행하면, 두 가지 종류의 오가노이드 및 스페로이드를 배양하면서 각각의 배양에 적합한 배양액을 독립적으로 사용하면서도 결합된 구조체를 제조할 수 있다.

[0025] 본 발명에 있어서 제조방법은 인간 유도만능 줄기세포(human induced Pluripotent Stem Cells, hiPSC)를 뇌 오가노이드로 분화시키는 뇌 오가노이드 분화 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[0026] 본 명세서상의 용어 "인간 유도만능 줄기세포"는 분화가 끝난 성체의 체세포에 역분화를 일으키는 4가지 특정 유전자(Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc)를 도입하여 배아줄기세포와 같은 만능분화능(Pluripotancy)을 갖도록 한 줄

기세포이다. 유도만능줄기세포는 윤리적인 문제와 면역거부반응 등의 문제에서 자유로우며, 다양한 조직으로의 분화가 가능하여 발생학을 비롯한 다양한 질병 및 치료제 연구에 활용되는 세포이다.

[0027] 상기 뇌 오가노이드 분화 단계는, 신경 유도 배지에서 배양된 세포 중 배엽층(Germ layer)이 형성된 스페로이드를 마트리겔(MatriGel)로 포매하는 신경분화 유도 단계, 포매된 스페로이드로부터 신경 분화를 위하여 뇌 오가노이드 분화 배지에서 배양하는 패턴화 단계, 및 신경상피배(Neuroepithelial bud)가 형성되면 뇌 조직의 최종 분화를 유도함으로써 뇌 오가노이드를 제조하는 뇌 조직 최종 분화 단계로 이루어진 것일 수 있다.

[0028] 본 발명에 있어서 제조방법은 인간 신경줄기세포(human neural stem cells)를 뉴런 스페로이드로 분화시키는 뉴런 스페로이드 분화 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다.

[0029] 본 발명의 다른 양태는 뇌 오가노이드, 및 뇌 오가노이드 하단에 결합된 1개 이상의 뉴런 스페로이드를 포함하는 뇌 오가노이드-뉴런 스페로이드 구조체이다.

[0030] 본 발명에 있어서 뇌 오가노이드는 대뇌 오가노이드, 시상 오가노이드, 소뇌 오가노이드 및 중뇌 오가노이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 대뇌 오가노이드인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 운동 관련 신호의 전달에 관여하는 뇌의 영역을 모사한 오가노이드의 경우, 상기 뇌 오가노이드로서 적용할 수 있다.

[0031] 본 발명에 있어서 뉴런 스페로이드는 모터뉴런 스페로이드인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 목적에 따라 모터뉴런 이외에 다른 신경세포로 분화한 스페로이드 또한 적용할 수 있다.

[0032] 본 발명의 또 다른 양태는 뇌 오가노이드, 및 뇌 오가노이드 하단에 결합된 1개 이상의 뉴런 스페로이드를 포함하는 뇌 오가노이드-뉴런 스페로이드 구조체에 대상 약물을 처리하는 단계를 포함하는 약물 스크리닝 방법이다.

[0033] 본 발명에 있어서 뇌 오가노이드는 대뇌 오가노이드, 시상 오가노이드, 소뇌 오가노이드 및 중뇌 오가노이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상인 것일 수 있고, 예를 들어, 대뇌 오가노이드인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 운동 관련 신호의 전달에 관여하는 뇌의 영역을 모사한 오가노이드의 경우, 상기 뇌 오가노이드로서 적용할 수 있다.

[0034] 본 발명에 있어서 뉴런 스페로이드는 모터뉴런 스페로이드인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 목적에 따라 모터뉴런 이외에 다른 신경세포로 분화한 스페로이드 또한 적용할 수 있다.

[0035] 본 발명에 있어서 대상 약물은 파킨슨병 또는 헌팅턴병을 포함하는 운동장애를 유발하는 뇌질환 및 다양한 뇌신경계 질환의 예방 또는 치료를 위한 후보물질인 것일 수 있다.

[0036] 본 발명에 있어서 약물 스크리닝 방법은 대상 약물의 처리 후 뇌 오가노이드-뉴런 스페로이드 구조체에 대하여 다채널전극배열 시스템(Multielectrode Array (MEA) System)을 이용한 분석 결과를 도출하는 것으로 수행될 수 있다.

[0037] 본 명세서상의 용어 “다채널전극배열 시스템”은 여러 개의 전극이 신경세포의 활동전위를 동시에 측정하는 장비로 뇌 오가노이드의 활동전위의 변화를 측정함으로써 전기생리학적 변이 분석, 신경세포의 이온채널의 변화, 신호전달 속도, 신경세포간의 신호전달 검출 등의 분석에 활용 가능하다.

[0038] 본 발명에 있어서 약물 스크리닝 방법은 대상 약물의 독성을 테스트하는 용도로 실시될 수 있다.

발명의 효과

[0039] 본 발명은 대뇌 오가노이드-모터뉴런 스페로이드 구조체 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 대뇌 오가노이드와 모터뉴런 스페로이드를 독립적으로 적절한 배양액에 접촉되도록 설계된 공배양 칩에서 공배양함으로써 상기 구조체를 제조할 수 있고, 이로부터 대뇌를 자극하는 특정 물질에 따른 모터뉴런의 전기신호 변화를 관찰할 수 있으므로, 이를 효과적으로 운동 장애를 유발하는 뇌질환의 예방 또는 치료를 위한 약물 스크리닝 또는 독성 테스트에 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1a는 본 발명의 실시예에 따른 대뇌 오가노이드의 분화 과정을 나타낸 모식도이다.

도 1b는 본 발명의 실시예에 따른 대뇌 오가노이드의 분화 진행에 따른 조직 변화를 나타낸 사진이다.

도 1c는 본 발명의 실시예에 따른 대뇌 오가노이드의 분화 결과를 형광면역염색 방법으로 확인한 사진이다.

도 1d는 본 발명의 실시예에 따른 대뇌 오가노이드의 분화 결과를 3차원 형광면역염색 방법으로 확인한 사진이다.

도 2a는 본 발명의 실시예에 따른 모터뉴런 스페로이드의 분화 과정을 나타낸 모식도이다.

도 2b는 본 발명의 실시예에 따른 모터뉴런 스페로이드의 분화 결과를 형광면역염색 방법으로 확인한 사진이다.

도 2c는 본 발명의 실시예에 따른 모터뉴런 스페로이드의 분화 결과 중합효소연쇄반응(PCR)을 수행하여 유전자 발현량을 확인한 사진이다.

도 3a는 대뇌 오가노이드와 모터뉴런 스페로이드를 결합하기 위해 제작한 공배양 칩의 제조 과정 및 활용예의 모식도이다.

도 3b는 대뇌 오가노이드와 모터뉴런 스페로이드를 결합하기 위해 제작한 공배양 칩의 실시 사진이다.

도 4a는 다중 전극 어레이(Microelectrode array; MEA) 기판에 부착한 대뇌 오가노이드에 카페인을 처리한 결과 나타나는 신호 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4b는 MEA 기판에 부착한 모터뉴런 스페로이드에 카페인을 처리한 결과 나타나는 신호 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4c는 MEA 기판에 부착한 대뇌 오가노이드-모터뉴런 스페로이드 구조체에 카페인을 처리한 결과 나타나는 신호 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0042] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 "%"는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량)%, 고체/액체는 (중량/부피)%, 그리고 액체/액체는 (부피/부피)%이다.

[0044] **실시예 1: 인간 유도만능줄기세포로부터 대뇌 오가노이드 제작**

[0045] 도 1a 및 1b와 같이, 인간 유도만능 줄기세포(human induced Pluripotent Stem Cells, hiPSC)를 라미닌(Laminin)계열의 iMatrix-511(NIP, Cat #. T311)로 코팅된 배양 용기에 StemFit Basic002(Ajinomoto) 배지를 이용하여 배양하였다. (hiPSC: NCRM5AS1-iCAGcGFP.c9; 질병관리본부 국립줄기세포재생센터 분양, 1382D2; RIKEN BioResource Research Center 구입, 201B7; ATCC 구입)

[0046] 세포가 배양 용기의 70~80%로 자라면 TrypLE Select(Gibco™Cat #. 12563-011)를 처리하여 단일 세포로 분리하였다. 분리한 세포는 원심분리 후 재부유시키고, Ultra-low attachment 96 웰 플레이트(well plate)(Corning® Cat #. CLS7007)에 100,000 cells/well 로 분주하여 스페로이드를 제작하였다.

[0047] 제작한 스페로이드는 지름이 500 내지 600 μm 정도일 때, DMEM-F12에 1XN2 서플리먼트, 1X GlutaMAX 서플리먼트, 1X MEM-NEAA와 1 μg/ml heparin 이 포함된 신경 유도 배지(neural induction medium)에서 4~5일 간 배양하였다. 배엽층(Germ layer)이 형성된 스페로이드를 마트리겔(MatriGel)로 포매하여 신경분화를 유도하였다.

[0048] 이후 포매된 스페로이드를 DMEM-F12와 Neurobasal medium을 1:1로 혼합한 배지에 0.5X N2 서플리먼트, 62.5 μl의 인슐린(insulin) 1X GlutaMAX 서플리먼트, 0.5X MEM-NEAA, 1X 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin) 10 μM 2-머캅토에탄올(2-mercaptoethanol) 및 비타민 A가 제거된 1X B27 서플리먼트가 첨가된 대뇌 오가노이드 분화 배지(Cerebral organoid differentiation medium)에서 약 5일간 배양하여 패턴화하였다.

[0049] 신경상피배(Neuroepithelial bud)가 형성되면 대뇌 오가노이드 분화 배지에서 1X B27 서플리먼트를 비타민 A가 포함된 것으로 교체하여 약 15일간 분화를 유도하여 대뇌 조직을 성장시키고 최종 분화시켜 대뇌 오가노이드를 완성하였다.

[0051] **실시예 2: 대뇌 오가노이드의 분화 확인**

[0052] 제작한 대뇌 오가노이드의 특이적 마커 발현을 확인하기 위해 형광면역염색을 진행하였다.

[0053] 구체적으로, 분화가 끝난 대뇌 오가노이드는 4% 파라포름알데하이드로 24시간 이상 고정하고, 0.2% Triton X 100이 포함된 PBS(phosphate-buffered saline)로 3차례 세척하였다. 이후 소혈청알부민(Bovine serum albumin; BSA)이 포함된 PBS로 블로킹(blocking)하여 항체의 비특이적 결합을 방지하였다. 대뇌 오가노이드의 마커인 FOXG1과 PROX1, 신경세포 마커인 TUJ1, 줄기세포 마커인 SOX2 등의 항체를 각각 1:100의 농도로 처리하여 4℃에서 24시간 이상 유지하였다.

[0054] 이를 0.2% Triton X 100이 포함된 PBS로 세척 후, BSA가 포함된 PBS로 형광염료를 포함한 2차 항체의 비특이적 결합을 방지하였고, 2차 항체를 1:100의 농도로 처리하여 4℃에서 2시간 이상 유지한 후, 세척하여 핵 염색을 위한 Hochest를 처리하고 공초점 현미경을 이용하여 형광을 관찰하였다.

[0055] 도 1c 및 1d에서 확인할 수 있듯이, 대뇌 오가노이드의 마커인 FOXG1과 PROX1, 신경세포 마커인 TUJ1, 줄기세포 마커인 SOX2 등으로 염색하고 공초점 현미경(Confocal microscope)으로 형광을 관찰하였고, 대뇌 오가노이드가 잘 형성되었음을 확인하였다.

[0057] **실시예 3: 인간 신경줄기세포로부터 모터뉴런 스페로이드 제작**

[0058] 모터뉴런 스페로이드의 제조 과정은 도 2a와 같다. 모터뉴런 스페로이드는 인간 신경줄기세포(human neural stem cells)를 ultra-low attachment 96 well U-bottom plate(Corning®Cat #. CLS7007)에 5.0 X 10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후, StemPro hESC 배지(Gibco, Cat #. A1000701)에 레티노산(Retinoic Acid; RA) 50 μM, 분비성 신호인자(sonic hedgehog) 200 ng/ml, 섬유아세포 성장인자(basic fibroblast growth factor; bFGF) 8 ng/ml 및 액티빈(activin) A 10 ng/ml가 포함된 모터뉴런 분화용 배지를 웰 당 100 μl씩 교체하였다.

[0059] 20일 이후에는, StemPro hESC medium에 뇌유래신경성장인자(Brain-derived neurotrophic factor; BDNF) 10 ng/ml 및 교세포 신경성장인자(Glial cell-Derived Neurotrophic Factor; GDNF) 10 ng/ml가 포함된 모터뉴런 배양용 배지에서 모터뉴런의 숙성화를 위해 7~8일간 배양하였다.

[0061] **실시예 4: 모터뉴런 스페로이드의 분화 확인**

[0062] 제작한 모터뉴런 스페로이드의 특이적 마커 발현을 확인하기 위하여 형광면역염색을 진행하였다. 실시예 2의 방법과 동일하게 수행하되, 신경세포 마커인 TUJ1과 모터뉴런 마커인 islet1의 항체를 각각 1:100의 비율로 사용하였다.

[0063] 이어서 모터뉴런 스페로이드의 분화를 확인하기 위하여 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription PCR)을 진행하였다. 신경줄기세포와 분화유도한 모터뉴런 스페로이드를 TRIzol 용액으로 처리하여 RNA를 분리하였다. Superscript III kit을 이용하여 cDNA를 합성하고 FlexCycler2 system 기기를 이용하여 PCR을 진행하였다. 미분화상태의 마커로 PAX6와 SOX1, 모터뉴런 분화 마커로 ChAT, HB9과 islet1을, 초기 cDNA양을 확인하기 위해 GAPDH의 프라이머(primer)를 이용하여 PCR을 수행하였다.

[0064] 도 2b 및 2c에서 확인할 수 있듯이, 모터뉴런 스페로이드의 특이적 마커의 발현을 확인함으로써 모터뉴런 스페로이드가 잘 형성되었음을 확인하였다.

[0066] **실시예 5: 대뇌 오가노이드-모터뉴런 스페로이드 결합 유도**

[0067] 제작한 대뇌 오가노이드와 모터뉴런 스페로이드를 결합하여 구조체를 제작하였고, 이를 배양하기 위한 2개의 배양액 저장소와 공배양 챔버를 포함하는 공배양 칩(3D engineered nervous system, 3D-ENS)을 제조하였다. 상기 공배양 칩은 3D 프린팅 기술을 이용하여 형성된 상판과 하판을 조립하여 제조하였다.

[0068] 도 3a에서 확인할 수 있듯이, 공배양 칩은 각각의 조직을 배양하는 배지가 상이하여 결합 유도시 상대 조직에 가해질 자극을 최소화하기 위한 목적으로 제조하였으며, 이러한 목적을 달성하기 위하여 대뇌 오가노이드 배양

액 저장소가 공배양 챔버에 연결되는 높이는 모터뉴런 스페로이드 배양액 저장소가 공배양 챔버에 연결되는 높이보다 높게 설계되었다.

[0069] 이러한 설계에 따라 제조된 공배양 칩을 이용함으로써, 각각의 조직이 특이적인 개별 배양 배지에 노출되도록 배양하여 결합을 유도하였다. 구체적으로, 상기 공배양 칩을 이용한 대뇌 오가노이드 및 모터뉴런 스페로이드의 결합을 수행함에 있어서, 먼저 공배양 챔버의 하판에 모터뉴런 스페로이드를 배치하고 뇌 오가노이드를 투입하였다.

[0070] 대뇌 오가노이드 배양액 저장소로부터 채널을 통하여 공배양 챔버로 유입되는 배양액으로는 실시예 1에서 신경 상피배 형성 후 대뇌 오가노이드 분화 배지에서 1X B27 서플리먼트를 비타민 A가 포함된 것으로 교체한 것과 같은 배지를 사용하였고, 모터뉴런 스페로이드 배양액 저장소로부터 채널을 통하여 공배양 챔버로 유입되는 배양액으로는 실시예 3에서 모터뉴런의 숙성화에 사용된 모터뉴런 배양용 배지를 사용하였다.

[0071] 도 3b에서 확인할 수 있듯이, 공배양 챔버에 모터뉴런 스페로이드를 적절히 배치 후 뇌 오가노이드를 투입하여 7일 동안 배양한 결과 대뇌 오가노이드-모터뉴런 스페로이드 구조체를 형성하였다.

[0073] **실시예 6: 대뇌 오가노이드-모터뉴런 스페로이드 구조체의 생체 전기신호 변화의 확인**

[0074] 대뇌 오가노이드-모터뉴런 스페로이드 결합을 통한 구조체 제작 후, 다중 전극 어레이(Microelectrode array; MEA)를 통해 각각의 전기신호를 확인하였다. MEA 기판은 폴리이미드(Polyimide; PI)로 코팅 후, 라미닌으로 재코팅하여 구조체를 올리고 신호를 측정하였다. 특히 대뇌 오가노이드-모터뉴런 스페로이드 구조체는 모터뉴런 스페로이드를 MEA 기판과 접하게 배치하고, 대뇌 오가노이드에 가한 자극에 따른 모터뉴런 스페로이드의 신호 변화를 관찰하였다.

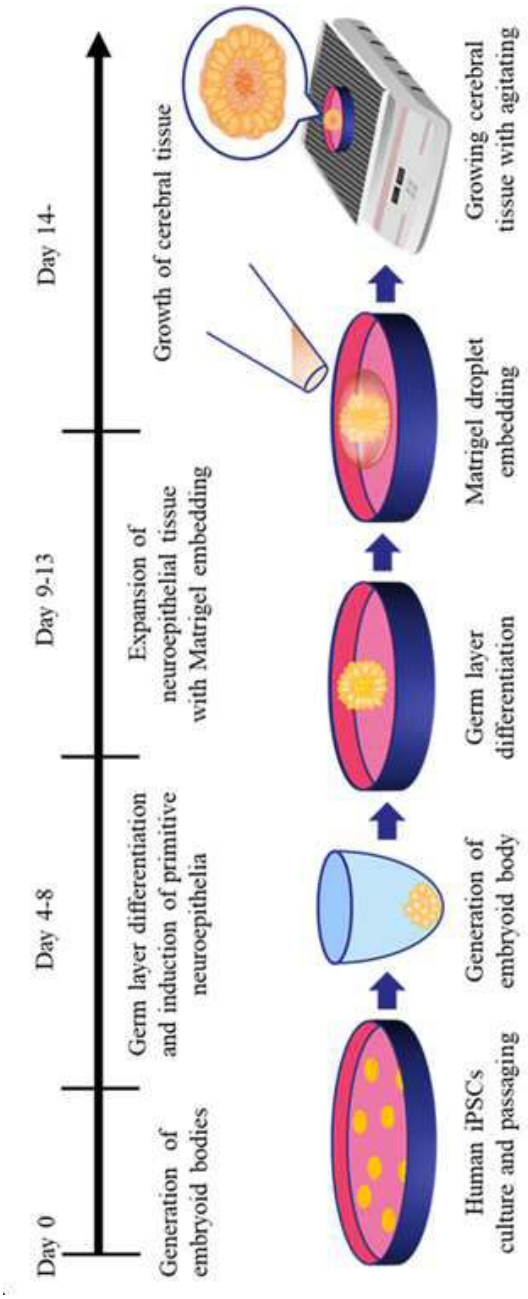
[0075] 또한 뇌신경 자극 물질로 알려진 카페인을 대뇌 오가노이드, 모터뉴런, 대뇌 오가노이드-모터뉴런 스페로이드 구조체에 각각 처리하여 카페인에 의한 전기신호 변화를 관찰하였다.

[0076] 도 4a 및 4b에서 확인할 수 있듯이, 대뇌 오가노이드는 카페인에 의해 전기 신호가 증폭되었으나 모터뉴런 스페로이드는 변화가 없었다.

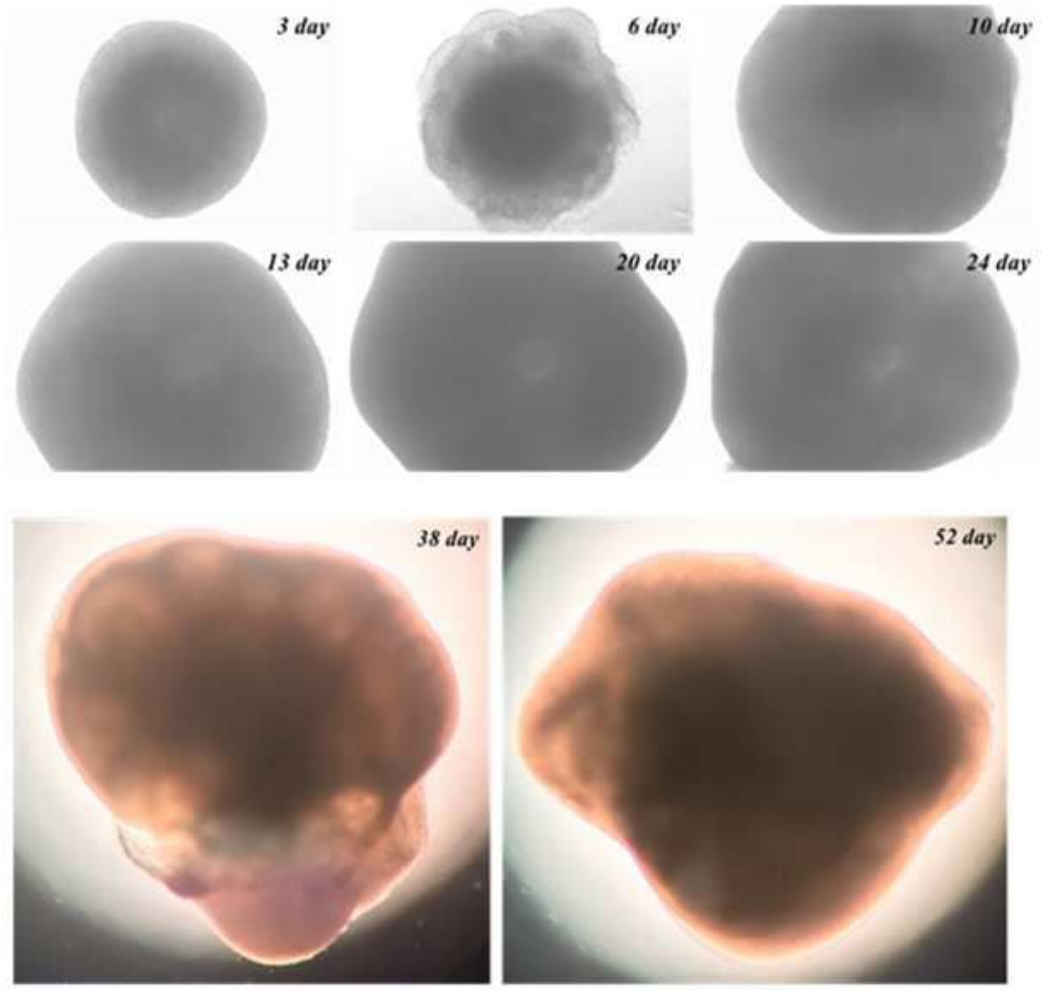
[0077] 도 4c에서 확인할 수 있듯이, 대뇌 오가노이드-모터뉴런 스페로이드 구조체에 카페인을 처리했을 때, 기판에 접한 모터뉴런 스페로이드에서 측정되는 전기 신호 증폭은 두 조직간 신경망이 연결되어 대뇌 오가노이드의 흥분에 의한 신호가 전달되므로 모터뉴런 스페로이드의 전기신호를 증폭시킨 것으로 나타났다.

도면

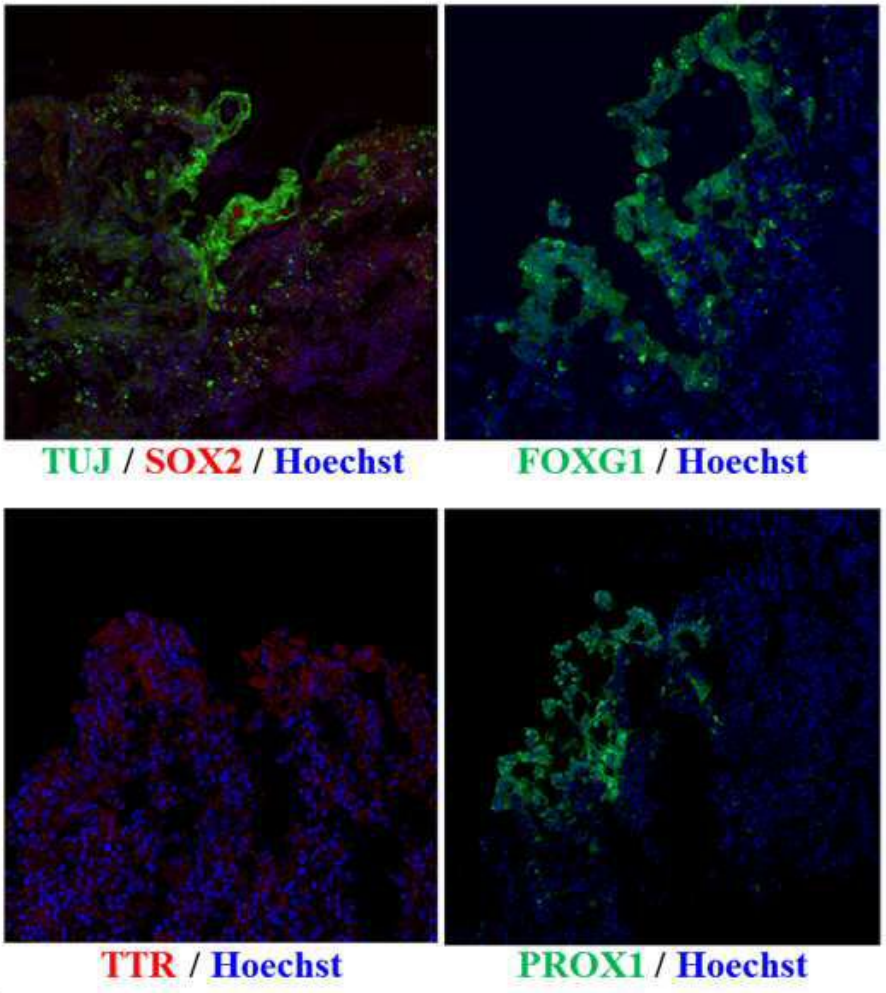
도면1a


Day 0
Day 4-8
Day 9-13
Day 14-
Generation of embryoid bodies
Germ layer differentiation and induction of primitive neuroepithelia
Expansion of neuroepithelial tissue with Matrigel embedding
Growth of cerebral tissue
Human iPSCs culture and passaging
Generation of embryoid body
Germ layer differentiation
Matrigel droplet embedding
Growing cerebral tissue with agitating

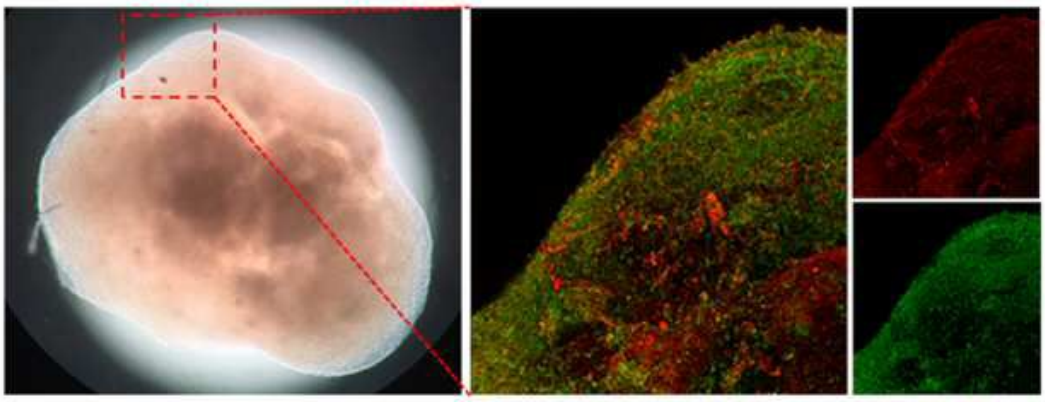
도면1b



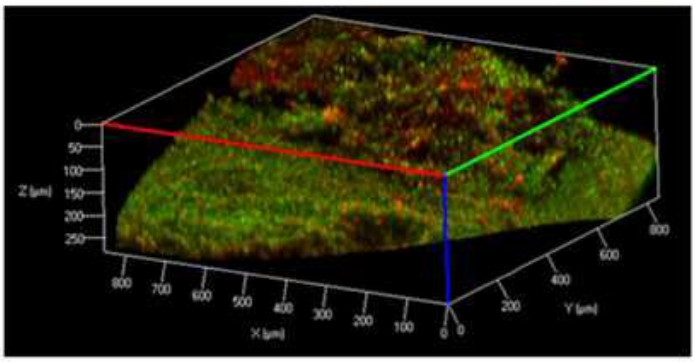
도면1c



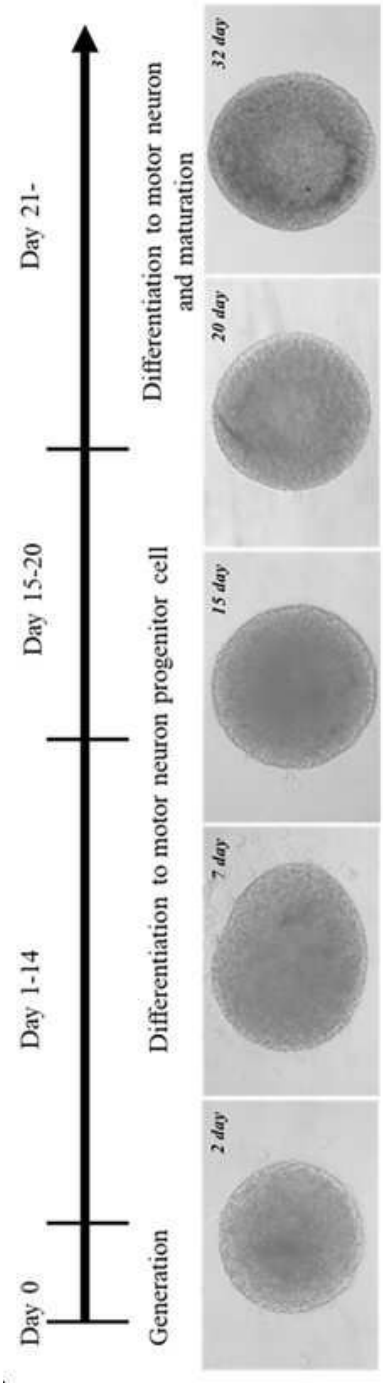
도면1d



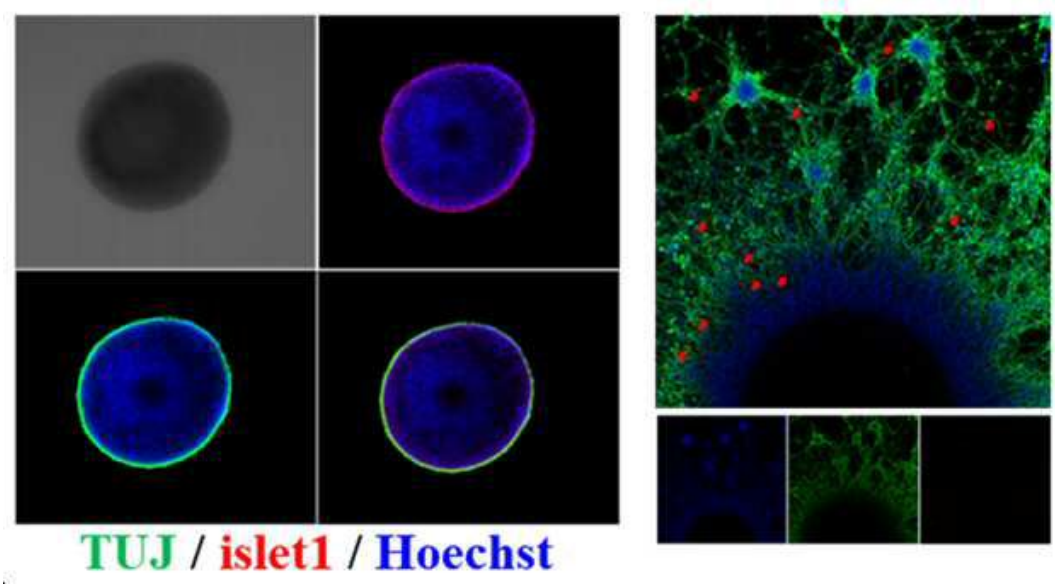
TUJ / SOX2 / Hoechst



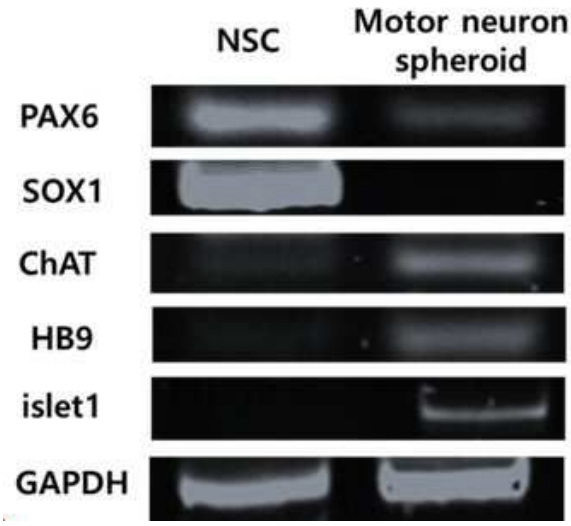
도면2a


Day 0
Day 1-14
Day 15-20
Day 21-
Generation
Differentiation to motor neuron progenitor cell
Differentiation to motor neuron and maturation
2 day
7 day
15 day
20 day
32 day

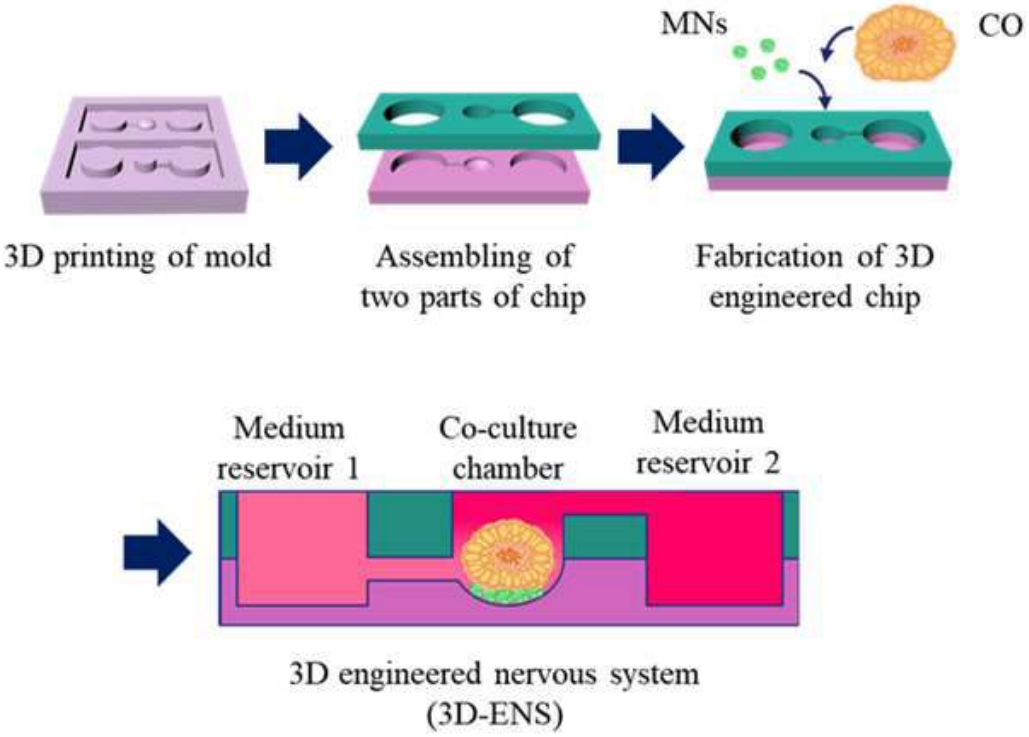
도면2b


TUJ / islet1 / Hoechst

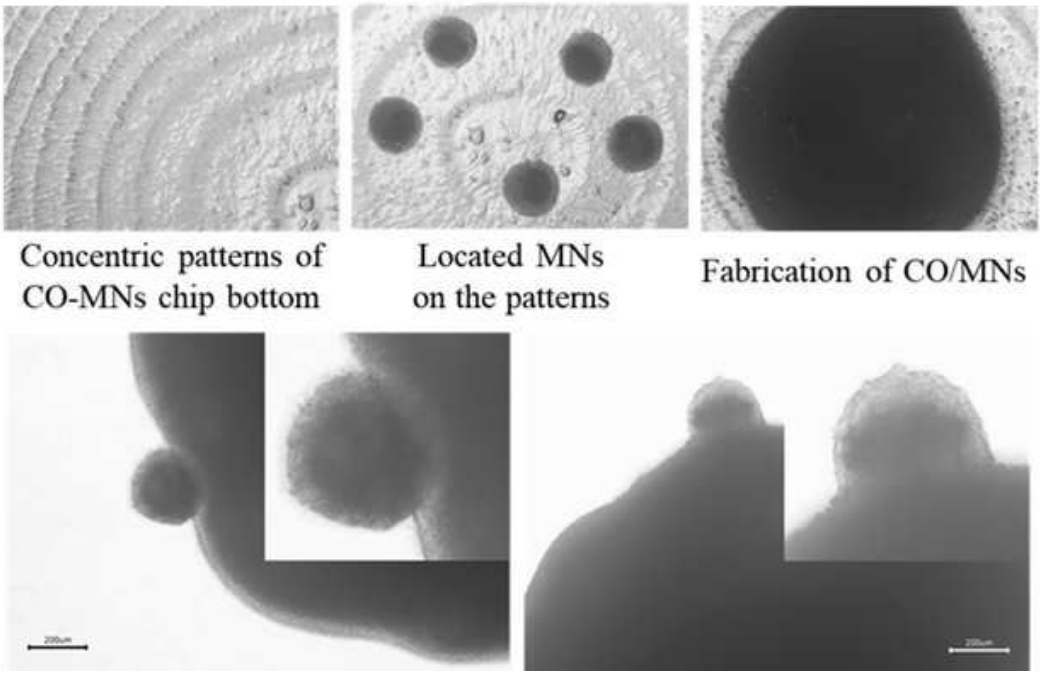
도면2c


NSC
Motor neuron spheroid
PAX6
SOX1
ChAT
HB9
islet1
GAPDH

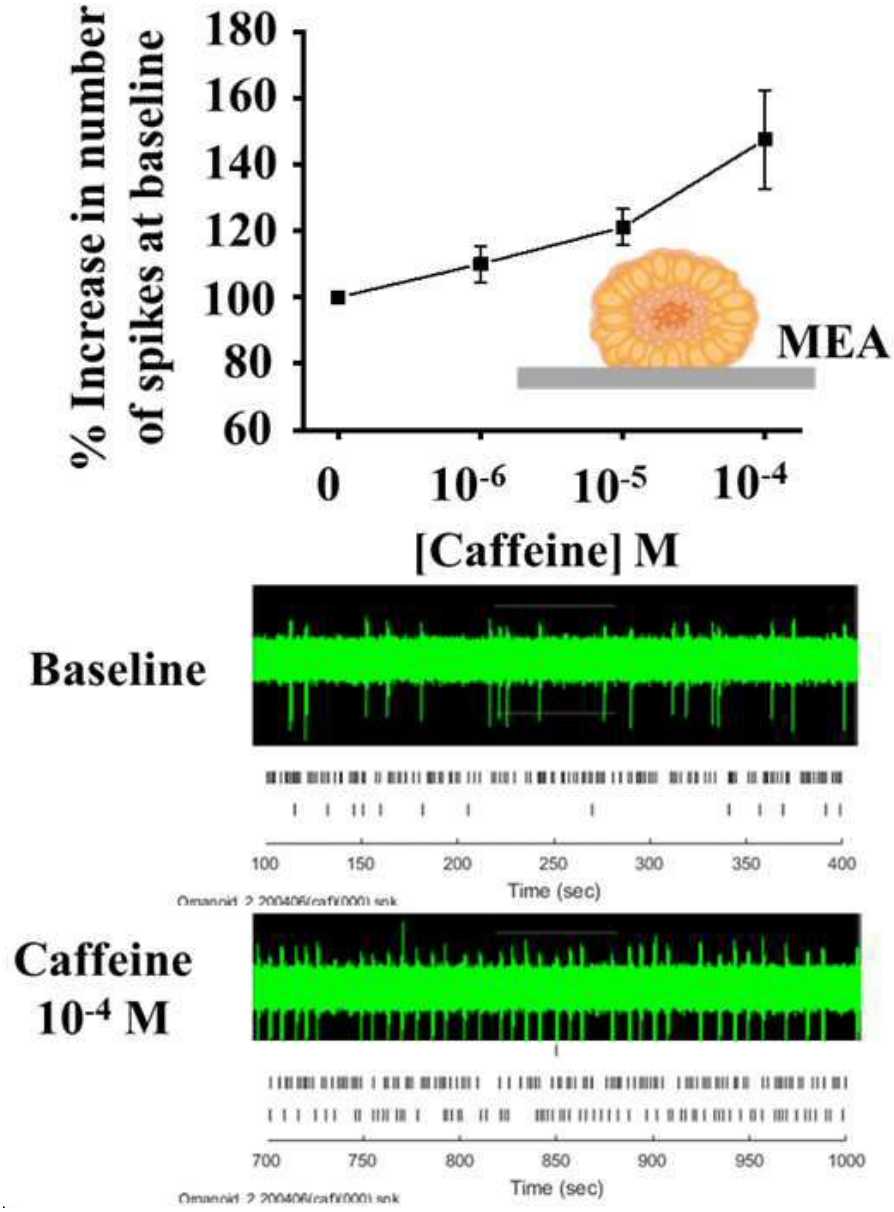
도면3a


MNs
CO
3D printing of mold
Assembling of two parts of chip
Fabrication of 3D engineered chip
Medium reservoir 1
Co-culture chamber
Medium reservoir 2
3D engineered nervous system (3D-ENS)

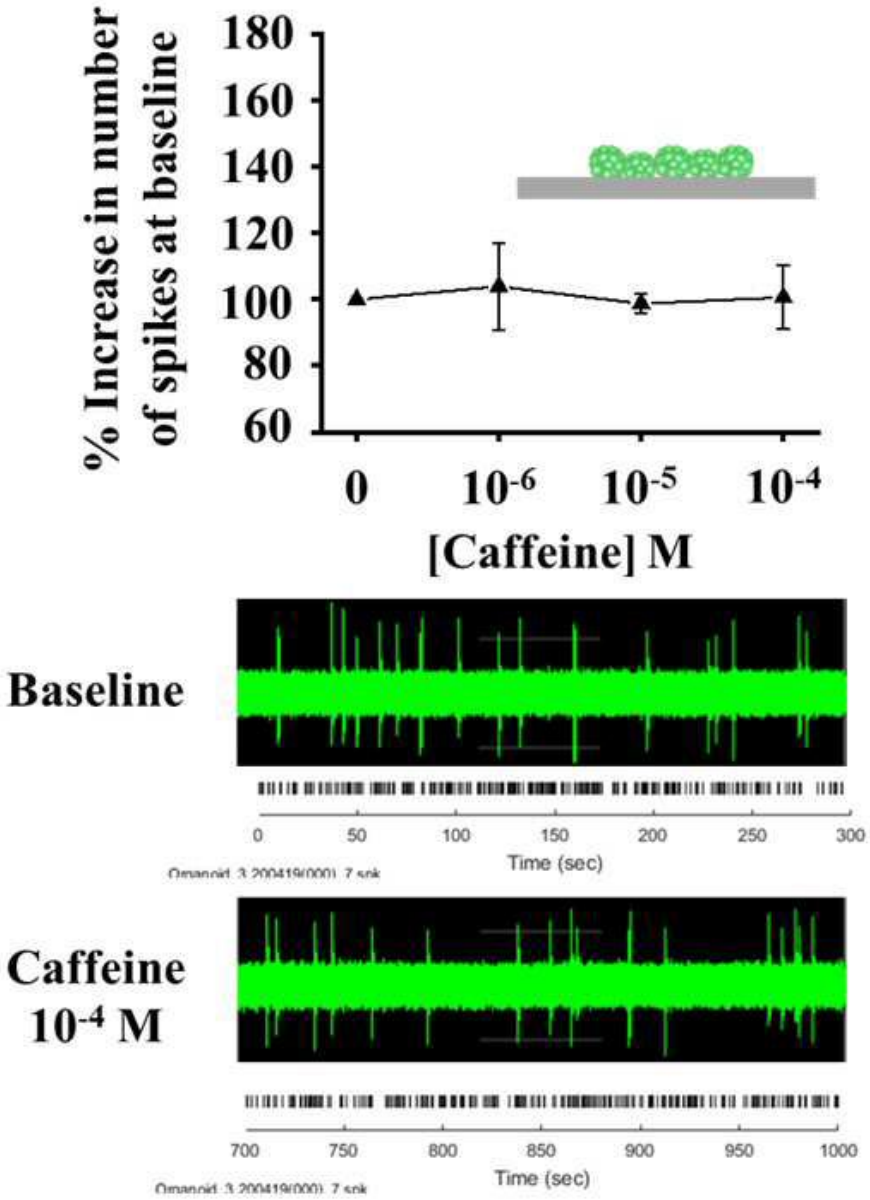
도면3b


Concentric patterns of CO-MNs chip bottom
Located MNs on the patterns
Fabrication of CO/MNs

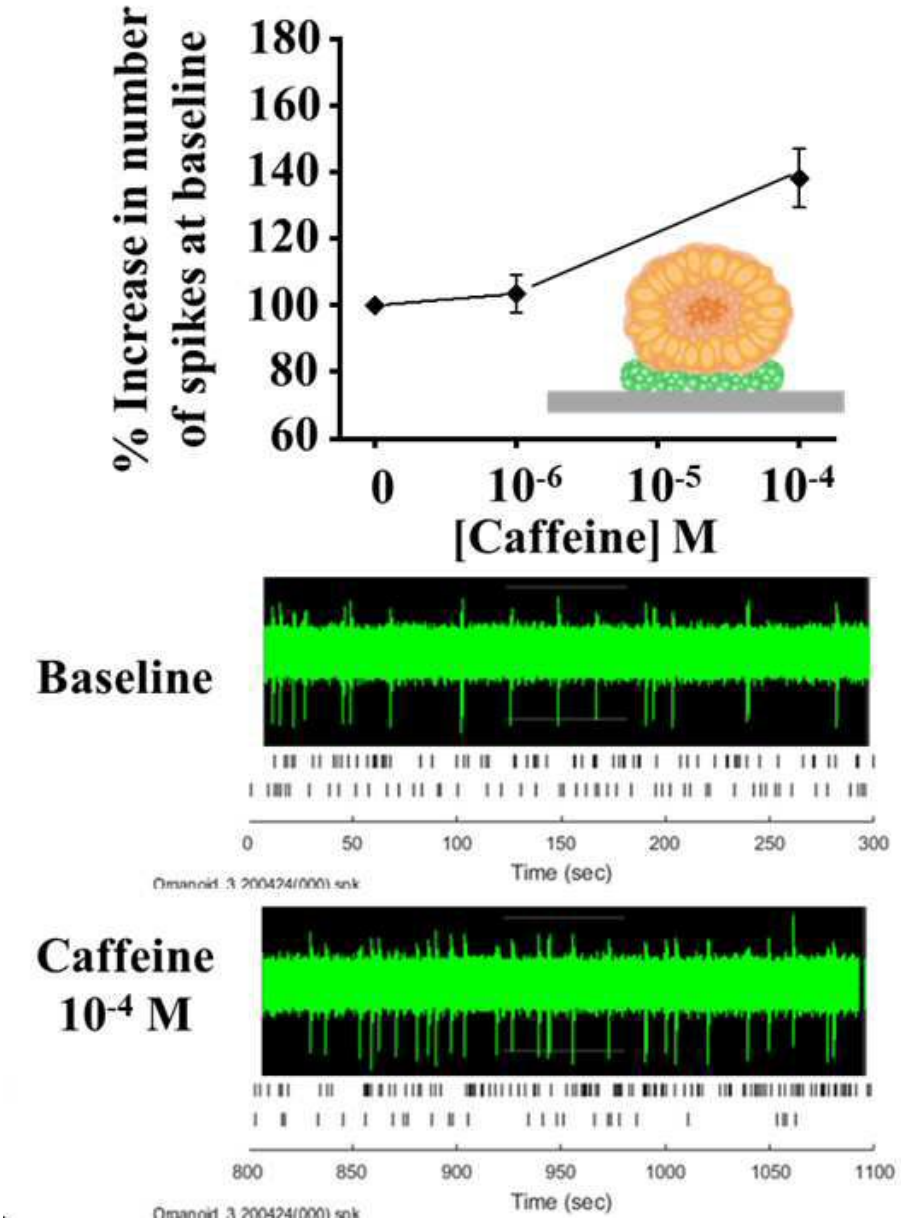
도면4a


% Increase in number of spikes at baseline
180
160
140
120
100
80
60
0
10-6
10-5
10-4
[Caffeine] M
MEA
Baseline
100
150
200
250
300
350
400
Time (sec)
Caffeine 10-4 M
700
750
800
850
900
950
1000
Time (sec)

도면4b


% Increase in number of spikes at baseline
180
160
140
120
100
80
60
0
10-6
10-5
10-4
[Caffeine] M
Baseline
0
50
100
150
200
250
300
Time (sec)
Caffeine 10-4 M
700
750
800
850
900
950
1000
Time (sec)

도면4c


% Increase in number of spikes at baseline
180
160
140
120
100
80
60
0
10-6
10-5
10-4
[Caffeine] M
Baseline
0
50
100
150
200
250
300
Time (sec)
Caffeine 10-4 M
800
850
900
950
1000
1050
1100
Time (sec)