



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0106279
(43) 공개일자 2019년09월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/079 (2010.01) C12N 5/0793 (2010.01)
G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0618 (2013.01)
C12N 5/0619 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0027529
(22) 출원일자 2018년03월08일
심사청구일자 2018년03월08일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
선웅
서울특별시 노원구 덕릉로73길 28, 205동 1501호
(중계동, 양지대림2차아파트)
(74) 대리인
특허법인 무한

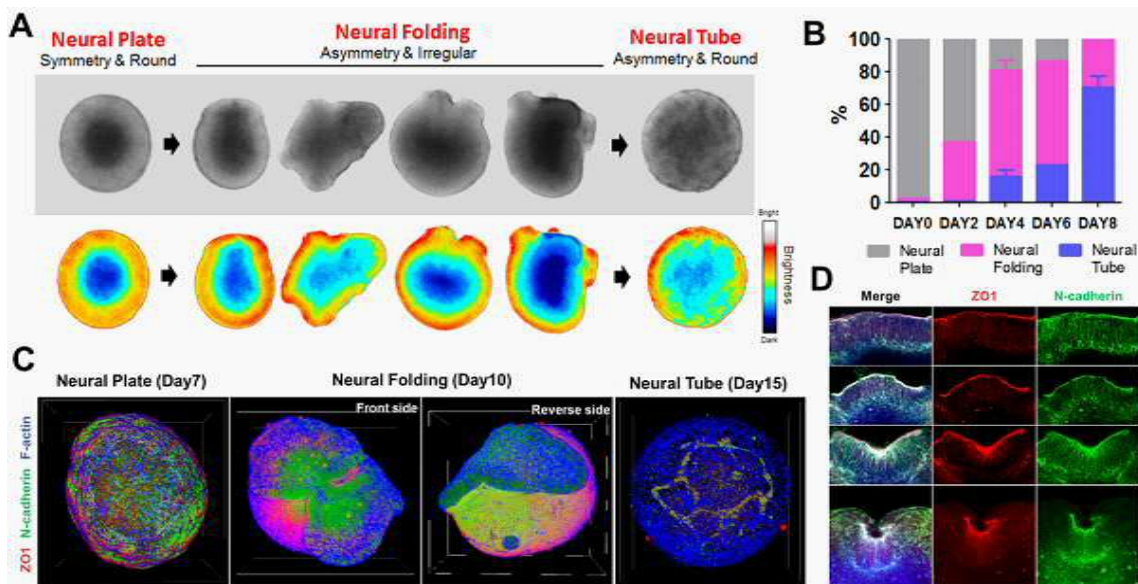
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 신경조직 오가노이드의 제조방법, 이를 이용한 신경조직 형성 억제 물질의 스크리닝 방법 및 운동신경세포의 제조방법

(57) 요약

본 발명의 일 실시예에 따르면, (a) 배아줄기세포 또는 유도만능줄기세포를 2차원 배양하여 신경중배엽 유래 신경줄기세포로 분화시키는 단계; (b) 상기 신경줄기세포를 3차원 배양하여 신경관 형성을 유도하는 단계; 및 (c) 상기 신경관으로부터 신경관 형성을 유도하는 단계;를 포함하는, 신경조직 오가노이드의 제조방법이 제공된다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

G01N 33/5058 (2013.01)

C12N 2500/38 (2013.01)

C12N 2501/115 (2013.01)

C12N 2501/15 (2013.01)

C12N 2501/41 (2013.01)

C12N 2501/415 (2013.01)

C12N 2506/08 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 배아줄기세포 또는 유도만능줄기세포를 2차원 배양하여 신경중배엽 유래 신경줄기세포로 분화시키는 단계;
- (b) 상기 신경줄기세포를 3차원 배양하여 신경관 형성을 유도하는 단계; 및
- (c) 상기 신경관으로부터 신경관 형성을 유도하는 단계;를 포함하는, 신경조직 오가노이드의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (a) 단계에서 TGF- β 신호조절인자, Wnt 신호조절인자, FGF 신호조절인자 중 하나 이상의 첨가제를 처리하는, 신경조직 오가노이드의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 섬유아세포 증식인자(bFGF)를 처리하는, 신경조직 오가노이드의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

신경관 형성은 섬유아세포 증식인자 처리 후 4일 내지 8일 내에 이루어지는, 신경조직 오가노이드의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 (c) 단계에서 비타민 A계 물질을 처리하는, 신경조직 오가노이드의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 비타민 A계 물질은 레티놀산인, 신경조직 오가노이드의 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 신경관 형성은 상기 비타민 A계 물질 처리 후 4일 내지 10일 내에 이루어지는, 신경조직 오가노이드의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 신경조직은 척수(spinal cord) 및 뇌(Brain)인, 신경조직 오가노이드의 제조방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 제조방법 각 단계를 포함하고,

(d) 상기 (b) 또는 (c) 단계 중 하나 이상의 단계에 신경조직 발생조절 후보 물질을 처리하는 단계; 및

(e) 신경조직 형성 여부를 확인하는 단계;를 더 포함하는, 신경조직 발생조절 후보 물질의 스크리닝 방법.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 제조방법 각 단계를 포함하고,

상기 (c) 단계에서 레티놀산(retinoic acid) 및 SHH(sonic hedgehog) 신호 촉진제를 처리하는, 운동신경세포의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신경조직 오가노이드의 제조방법, 이를 이용한 신경조직 발생조절 후보 물질의 스크리닝 방법 및 운동신경세포의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 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 있다.

[0004] 현재 다양한 인체 장기를 모사하는 오가노이드가 개발되고 있으며, 인간 대뇌, 중뇌, 소뇌를 모사하는 오가노이드 역시 개발되었으나, 척수의 경우 아직까지는 개발이 이루어지지 못하였다. 척수는 뇌와 상이한 초기발달 경로를 거치기 때문에 기존과 상이한 접근법이 필요하다.

[0005] 특히, 척수는 다른 뇌 부위와는 달리 신경관 모양의 형태형성 과정 상에서 장애가 매우 중요한 질환 관련성을 보이기 때문에, 척수 오가노이드의 경우 그 발생학적 형태형성 과정을 모사하는 것이 중요하다.

[0006] 기존의 오가노이드 제작 방법은 3차원 세포집단에 특정 약물을 처리하여 줄기세포가 가진 자기조직화 과정을 유도하는 방식으로 이루어진다. 이 때, 자기조직화를 이루는 형성자(organizer)의 위치 결정이 무작위적으로 이루어지기 때문에, 발생학적 형태형성 과정이 모사되기 보다는 발생 패턴을 보이는 다양한 부위가 섞여 있는 구조체로 발생한다. 이러한 구조적 무작위성은 오가노이드를 이용한 정량적 분석에 큰 장애요인으로 작용한다.

[0007] 척수 발생 과정 중 형태형성에 이상이 생기는 경우, 척수이형증(spina bifida) 등 다양한 장애가 발생한다. 또한 척수 손상에 따른 재생 모델, 운동신경세포 사멸에 의한 근위축성 측삭경화증 등이 척수에서 발생하는 대표적인 질환들이며, 이들 질병의 발병 기전에 대한 이해를 바탕으로 하는 조기 진단 및 치료법의 개발을 위해 적절한 인간 척수 모사 모델이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 전술한 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로, 본 발명의 목적은 신경조직, 특히 인간 척수에 대한 오가노이드의 제조방법 및 이를 이용한 신경조직 발생조절 후보 물질의 스크리닝 방법 및 운동신경세포의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 본 발명의 일 실시예에 따르면, (a) 배아줄기세포 또는 유도만능줄기세포를 2차원 배양하여 신경중배엽 유래 신경줄기세포로 분화시키는 단계; (b) 상기 신경줄기세포를 3차원 배양하여 신경관 형성을 유도하는 단계; 및 (c) 상기 신경관으로부터 신경관 형성을 유도하는 단계;를 포함하는, 신경조직 오가노이드의 제조방법이 제공된다.
- [0013] 일 측에 따르면, 상기 (a) 단계에서 TGF- β 신호조절인자, Wnt 신호조절인자, FGF 신호조절인자 중 하나 이상의 첨가제를 처리할 수 있다.
- [0014] 일 측에 따르면, 상기 (b) 단계에서 섬유아세포 증식인자(bFGF)를 처리할 수 있다.
- [0015] 일 측에 따르면, 신경관 형성은 섬유아세포 증식인자 처리 후 4일 내지 8일 내에 이루어질 수 있다.
- [0016] 일 측에 따르면, 상기 (c) 단계에서 비타민 A계 물질을 처리할 수 있다.
- [0017] 일 측에 따르면, 상기 비타민 A계 물질은 레티놀산일 수 있다.
- [0018] 일 측에 따르면, 상기 신경관 형성은 상기 비타민 A계 물질 처리 후 4일 내지 10일 내에 이루어질 수 있다.
- [0019] 일 측에 따르면, 상기 신경조직은 척수(spinal cord) 및 뇌(brain)일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 상기 제조방법 각 단계를 포함하고, (d) 상기 (b) 또는 (c) 단계 중 하나 이상의 단계에 신경조직 발생조절 후보 물질을 처리하는 단계; 및 (e) 신경조직 형성 여부를 확인하는 단계;를 더 포함하는, 신경조직 발생조절 후보 물질의 스크리닝 방법이 제공된다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 제조방법 각 단계를 포함하고, 상기 (c) 단계에서 레티놀산(retinoic acid) 및 SHH(sonic hedgehog) 신호 촉진제를 처리하는, 운동신경세포의 제조방법이 제공된다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명의 제조방법은 줄기세포를 2차원 배양에서 3차원 배양으로 전환한 뒤, 신경관 형성을 유도함으로써 우수한 재현성으로 신경조직 오가노이드를 제조할 수 있다. 이러한 오가노이드는 척수와 같은 신경조직이 손상된 환자에 이식될 수 있다.
- [0024] 또한, 상기 제조방법은 신경조직 오가노이드의 제조 단계에서 특정 물질을 처리함에 따른 영향을 확인하는 신경조직 발생조절 후보 물질의 스크리닝 방법에 응용될 수 있다. 이러한 스크리닝 방법은 척수이형증과 같은 기형 유발가능성이 있는 의약품 후보물질을 사전에 확인할 수 있으므로, 약물의 독성성분 분석으로 활용될 수 있다.
- [0025] 나아가, 상기 제조방법은 신경조직 오가노이드 제조 단계에서 특정 물질을 처리하여 운동신경세포로의 분화를 유도함으로써 운동신경세포 제조방법에 응용될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

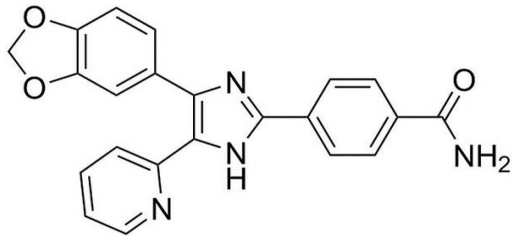
도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 2차원 배양을 통한 신경중배엽 유래 신경줄기세포 분화 유도 과정 및 유도 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 3차원 배양을 통한 신경관 형성 유도 과정 및 유도 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 신경관 형성 유도 과정 및 유도 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 신경조직 형성 억제 물질의 스크리닝 과정 및 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 발프로산 처리에 의한 신경관 형성장애 유도 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 운동신경세포의 제조 과정 및 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

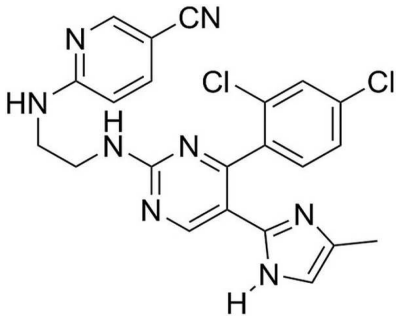
- [0029] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 각 도면에 제시된 동일한 참조 부호는 동일한 부재를 나타낸다.
- [0030] 아래 설명하는 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있다. 아래 설명하는 실시예들은 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 이들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0031] 실시예에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 실시예를 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성 요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0032] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0033] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조 부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0035] 본 발명의 일 실시예에 따르면, (a) 배아줄기세포 또는 유도만능줄기세포를 2차원 배양하여 신경중배엽 유래 신경줄기세포로 분화시키는 단계; (b) 상기 신경줄기세포를 3차원 배양하여 신경관 형성을 유도하는 단계; 및 (c) 상기 신경관으로부터 신경관 형성을 유도하는 단계;를 포함하는, 신경조직 오가노이드의 제조방법이 제공된다.
- [0036] 신경조직, 특히 척수는 신경외배엽이 아닌 신경중배엽 유래 신경줄기세포가 형성된 뒤, 이 줄기세포의 형태형성 과정을 통해 형성된다. 따라서, 상기 (a) 단계에서는 배아줄기세포 또는 유도만능줄기세포로부터 신경외배엽 줄기세포로의 분화가 아닌, 신경중배엽 줄기세포로의 분화를 유도할 수 있다.
- [0037] 이 때, 상기 신경중배엽 줄기세포로의 분화 과정은 적절한 유도인자, 예를 들어 SB-431542 및 CHIR99021 중 하나 이상의 첨가제, 바람직하게는 이들의 혼합물을 처리하여 배양함으로써 분화 유도를 더욱 활발하게 할 수 있다.
- [0038] 구체적으로, 상기 SB-431542는 하기 화학식 1의 구조를 가지고, 상기 CHIR99021는 화학식 2의 구조를 가진다.

[0040] [화학식 1]



[0041]

[0043] [화학식 2]



[0044]

[0046] 2차원 세포 배양의 경우, 세포의 안쪽과 바깥 쪽에 분포하는 세포들은 서로 상이한 세포 간 결합 강도를 보이기 때문에 미세한 수준의 상태 차이를 일으키고, 이에 따라 줄기세포의 분화 과정이 패턴화되므로, 이를 통해 줄기세포의 분화를 적절하게 제어할 수 있다.

[0047] 상기 (b) 단계에서는 신경줄기세포의 3차원화 과정을 거친 뒤에 신경관 형성 유도 물질을 포함하는 배지에서 배양할 수 있다. 구체적으로, 신경줄기세포를 2차원 배양계로부터 분리한 후 일정 기간 방치하여 자발적으로 세포 덩어리로 뭉치게 할 수 있다.

[0048] 이와 같이 3차원화된 콜로니를 섬유아세포 증식인자(bFGF)가 처리된 배양계에서 배양시킴으로써 신경관 형성을 유도할 수 있고, 처리 후 4일 내지 8일 내에 신경관 형성이 이루어질 수 있다.

[0049] 상기 (c) 단계에서는 배아의 표면에 위치하는 신경관이 내부로 함입되면서 일어나는 신경관 형성 과정을 유도할 수 있다. 이 과정은 비타민 A계 물질의 처리에 의해 매개될 수 있으며, 비타민 A계 물질은 레티놀(retinol), 레티날(retinal), 레티놀산(retinoic acid), 레티닐 아세테이트, 레티닐 팔미테이트, 알파 카로틴, 베타 카로틴, 감마 카로틴 등의 카로틴, 베타 크립토잔틴, 레티노이드 유도체, 비타민A 유사체(analog)를 포함할 수 있고, 바람직하게는 레티놀산이다. 비타민 A계 물질을 처리하는 경우 섬유아세포 증식인자(bFGF)를 제거하여 신경관의 길이성장 및 증식을 억제하면서 진행하는 경우 신경관 유도 효율을 향상시킬 수 있다.

[0050] 이와 같은 신경관 형성 과정은 레티놀산 처리 후 2일 내지 4일 내에 신경관 접합 과정을 거친 뒤, 6일 내지 10일 내에 대부분의 신경관 형성이 이루어질 수 있다.

[0051] 상기와 같은 단계를 거쳐 최종적으로 신경조직 오가노이드, 구체적으로 척수(spinal cord) 오가노이드를 제조할 수 있다. 이러한 방법은 2차원 배양계에서 줄기세포의 분화를 위치적으로 제어하고, 이를 3차원 배양으로 전환하는 방법을 통해 극성을 가진 오가노이드를 제조할 수 있으며, 이를 통해 종래 방법으로는 제조할 수 없었던 척수 오가노이드를 제조할 수 있다.

[0052] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 상기 제조방법 각 단계를 포함하고, (d) 상기 (b) 또는 (c) 단계 중 하나 이상의 단계에 신경조직 발생조절 후보 물질을 처리하는 단계; 및 (e) 신경조직 형성 여부를 확인하는 단계;를 더 포함하는, 신경조직 형성 억제 물질의 스크리닝 방법이 제공된다.

[0053] 상기 신경조직 오가노이드의 제조방법은 이의 형성 과정 중 억제 효과를 나타내는 물질, 약물 등 신경조직의 발생을 조절하는 효과를 검증하는데 응용될 수 있다. 예를 들어, 상기 (c) 단계에서 신경관 형성 억제 물질인 발프로산(valproic acid) 처리를 통해 신경관 접합 과정이 억제될 수 있으며, 이로부터 특정 물질이 신경조직을

어떠한 방식으로 억제하는지 확인할 수 있다. 신경조직 생성을 억제하는 물질은 특정 치료 효과를 가지는 약물일 수 있으므로, 상기 스크리닝 방법을 통해 이러한 약물의 효능 내지 부작용 등을 확인할 수 있다.

[0054] 본 발명의 또 다른 일 실시예에 따르면, 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 따른 제조방법 각 단계를 포함하고, 상기 (c) 단계에서 레티놀산(retinoic acid) 및 SHH(sonic hedgehog) 신호 촉진제를 처리하는, 운동신경세포의 제조방법이 제공된다.

[0055] 신경조직 오가노이드의 형성 과정에서 운동신경세포와 감각신경세포가 존재하며, 이 중 상기 (c) 단계에서 처리하는 물질의 종류를 달리함으로써 운동신경세포의 비율을 높일 수 있다.

[0056] 구체적으로, 상기 (c) 단계에서 레티놀산만을 처리하는 경우 운동신경세포와 감각신경세포가 적절한 비율로 존재하는 신경조직 오가노이드가 형성되는 반면, 레티놀산과 함께 SHH 신호 촉진제를 함께 처리하는 경우 운동신경세포의 분화 비율을 향상시킬 수 있다. 이와 같이, 상기 신경조직 오가노이드의 제조방법을 응용하여 운동신경세포를 제조할 수 있다.

[0058] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하기로 한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 목적으로 기술된 것으로서, 본 발명의 범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 실시예 1: 신경조직 오가노이드 제조

[0061] (1) 2차원 배양을 통한 신경중배엽 유래 신경줄기세포 분화

[0062] 도 1A는 2차원 배양을 통한 신경중배엽 유래 신경줄기세포 분화 프로토콜을 나타낸 것이다. 도 1A에 도시된 것과 같이, 정상인의 섬유아세포로부터 제작한 유도만능줄기세포를 마트리젤(Matrigel) 코팅된 배양 접시에서 배양하여 100~500개의 세포로 이루어진 콜로니를 구성하였다. 이 상태에서 신경중배엽 줄기세포 분화 유도 인자 SB431542(10 μ M)와 CHIR99021(3 μ M)을 처리하였다.

[0063] 분화 유도 인자 처리기간에 따른 유전자 발현 수준 측정을 위하여, 디스파아제(disase) 처리를 통해 35mm배양 접시에서 배양된 세포를 획득하였다. Trizol을 이용하여 샘플로부터 RNA를 추출하고 MMLV 역전사효소 증합효소연쇄반응을 수행하여 cDNA를 합성한 뒤, 이를 통해 유전자 발현량을 확인하였다.

[0064] 처리 1일차에 신경중배엽 세포 표지자인 BraT(Brachyury T)와 Nkx1.2유전자의 발현이 급격히 증가하였으며, 신경줄기세포의 표지자인 Sox2의 발현이 증가하였다. 이러한 발현 증가는 처리 3일차까지 유지되었으며, 4일차부터는 신경줄기세포 표지자인 Sox2의 발현만이 유지되고 BraT 및 Nkx1.2의 발현은 감소하였다(도 1B). 반면, 동일한 기간 동안 배아줄기세포 표지자인 Oct4, Nanog, 중-내배엽 표지자인 Mixl1, Foxa2, 외배엽 표지자인 Sox1, Pax6의 발현 증가는 관찰되지 않았다(도 1C). 이는 신경중배엽의 분화를 거쳐 배아줄기세포가 신경줄기세포로 전환되었다는 것을 의미한다.

[0065] 각 표지자의 공간적 발현 양상을 면역세포염색법으로 조사한 결과, 처리 1일차에 모든 세포에서 BraT의 발현 증대를 관찰할 수 있었으나, 2일차에 이르면서 콜로니의 바깥쪽에서 상대적으로 높은 BraT의 발현이 나타났으며, 안쪽에서는 BraT의 발현이 감소하였다(도 1D).

[0066] 또한, 콜로니의 크기와 무관하게 콜로니의 바깥에서부터 일정한 거리까지 BraT가 강하게 발현하는 세포층이 형성되고, 유도인자 처리 3~4일차에 이르면서 BraT발현 세포층이 점점 줄어드는 반면, 콜로니 중심 층으로는 신경줄기세포의 표지자인 N-cadherin의 발현이 높아진 것을 확인하였다(도 1E 및 1F). 이는 신경중배엽 세포에서 신경줄기세포로의 분화 과정이 콜로니의 외부에서 내부 쪽으로 패턴화 됨을 의미한다.

[0068] (2) 3차원 배양을 통한 신경관 형성 유도

[0069] 도 2A는 3차원 배양을 통한 신경중배엽 줄기세포 유래 신경줄기세포의 신경관 분화 프로토콜을 나타낸 것이다. 도 2A에 도시된 것과 같이, 2차원 배양을 통해 분화된 신경줄기세포를 처리 3~4일차에 디스파아제(Disase)를 사용하여 배양 접시에서 부드럽게 떼어낸 후, 자발적으로 세포덩어리로 뭉치도록 하였다. 3~5시간 이내에 콜로니의 3차원화가 이루어졌고(도 2B), 여기에 섬유아세포 증식인자(bFGF)를 처리하여 3차원 배양하였다.

[0070] 신경중배엽성 신경줄기세포의 특성 연구를 위해, 신경성 세포에 특이적으로 발현하는 부착단백질 N-cadherin을

이용하여 면역염색을 수행한 결과, 표면이 신경판(neural plate)과 같은 거짓중층상피 세포배열의 특성이 관찰되었고, 섬유아세포 증식인자(bFGF) 처리 기간에 따라 각 세포의 길이가 계속 길어지는 것을 확인하였다(도 2C 및 2D).

[0071] 추가적으로 유사분열기 표지자인 Phosphorylated Histone 3는 신경판의 표면에서만 관찰되었으며, apical 표지자인 ZO-1, Phospho-Myosin Light Chain등을 이용하여 신경판의 극성화를 확인하였다(도 2E). 이는 정상 배발생 중 관찰되는 방향성과 같이, 오가노이드의 표면과 기저층을 따라서 신경줄기세포가 극성화되어 있음을 의미한다.

[0072] 3차원 신경줄기세포구의 ZO-1 극성화는 신경판 형태형성과정에 필수적인 것으로, 이는 2차원 배양계부터 존재하는 세포-세포간 결합의 손실을 최소화하여 3차원 배양계로 전환하는 조건에서 가장 효과적으로 형성된다.

[0073] 섬유아세포 증식인자(bFGF)를 처리하지 않는 경우 신경줄기세포구의 분열이 정상적으로 진행되지 않아 일부분에서만 ZO-1 극성화가 관찰된다. 세포 외 기질 성분으로 구성된 Matrigel의 사용, ROCK 신호 억제제를 수행한 모든 경우 ZO-1의 극성화는 형성되지 않으며, 추후 신경판 형태형성과정이 발생 효율이 감소하는 것을 확인하였다(도 2F). 이는 2차원 배양계서 유도되는 세포-세포간 결합 정보가 3차원 형태형성과정 수행에 중요한 요소라는 것을 의미한다.

[0075] (3) 신경판 형태형성 유도

[0076] 신경판 형성이 완료된 후, 섬유아세포 증식인자(bFGF)를 제거하여 신경판의 길이성장을 억제한 상태에서 레티놀산($0.1\mu\text{M}$)을 처리한 결과, 구형이던 오가노이드의 형태가 처리 6일 이내에 80% 이상이 부정형으로 바뀌었고, 부정형 오가노이드의 대부분은 처리 8일 이내에 다시 구형으로 전환되는 것을 확인하였다.

[0077] 구체적으로, 척수 신경판 오가노이드의 시간에 따른 형태형성 과정 진행도를 명시야 현미경을 이용하여 관찰한 결과, 신경판 단계에서 방사형으로 정교하게 배열되어 있는 거짓중층상피 세포배열과 중심부 무작위한 세포배열의 빛 투과도 차이로 방사대칭형의 밝기강도 분포 양상이 관찰되었다. 신경판 접합과정이 유도되면서 방사대칭 구조가 깨지고 표면부에서 생체 내 신경고랑(Neural groove) 유사 구조가 관찰되었고, 원형이 아닌 불규칙적인 형태가 나타났다. 최종적으로 신경판 합입이 종결되어 구형의 척수 오가노이드가 형성되었지만, 신경판의 거짓중층상피 세포배열이 존재하지 않고 내부에 신경판이 존재하므로 신경판 단계와 다른 무작위적인 밝기 분포양상이 관찰되었다(도 3A).

[0078] 그 과정에서 밝기강도 분포 양상 및 오가노이드 형태 분석을 이용하여 신경판 형성 과정의 3단계를 단순하고 정확하게 분류, 관찰할 수 있는 분석 시스템을 확립하였다.

[0079] 이를 통해 (1) 신경판, (2) 신경판 접합, (3) 신경판의 형태형성 진행비율을 시간에 따라 정량 분석하였다. 신경판 형성 유도인자(레티놀산)를 처리하여 8일간 신경판 형성을 관찰하였다. 오가노이드 개체 간 다양성이 존재하나, 유도 4-6일차에 대부분의 오가노이드에서 신경판 접합이 관찰되고, 유도 8일차에 약 80%의 오가노이드가 1차 신경판 형태형성 과정을 마치고 신경판을 형성하는 것을 확인하였다(도 3B).

[0080] 레티놀산 처리 시간에 따라 3차원 면역염색을 수행한 결과, 오가노이드에서 신경판 형태형성 과정과 유사한 과정이 발생함을 관찰하였다. 표면에 존재하던 신경판은 접합과정이 발생하고, 이는 순차적으로 합입되는 것으로 나타났다.

[0081] 오가노이드 내에 형성된 신경판에 대한 동정을 위해 apical 표지자인 N-cadherin, ZO-1을 이용하였다. 표면에 존재하던 신경판이 합입되어 생성된 신경판은 대체적으로 척수와 같은 긴 특성을 보인 반면, 외부에 신경판이 그대로 존재하는 오가노이드는 내부에 신경판을 형성되지 않은 것으로 관찰되었다(도 3C).

[0082] 내부에 형성된 신경판의 특성 조사를 위해 면역 염색을 수행한 결과, 신경판은 신경줄기세포로 구성되어 있으며 유사분열은 신경판 안쪽에서만 특이적으로 일어나는 것을 확인하였다. 또한, 신경줄기세포로부터 분화되는 신경세포는 신경판을 따라 방사형으로 존재함을 확인하였다. 이러한 결과들은 신경판 합입으로 형성된 오가노이드 내의 신경판이 생체 신경판과 유사한 특성을 가진다는 것을 의미한다.

[0084] 실시예 2: 신경조직 형성 억제 물질 스크리닝

- [0085] 상기 실시예 1에 따라 제조된 오가노이드의 신경관 형성 모델로서의 기능성을 확인하기 위해, 기존에 알려진 다수의 신경관 형성 장애 유도 약물을 처리하였다. 신경관 형성 유도 8일차에 본 연구진이 확립한 신경관 형성 과정 3단계 분류법을 이용하여 신경관 형성 비율을 정량 분석하였다(도 4 A).
- [0086] Apical 표지자인 N-cadherin 면역염색을 수행하여 대조군과 약물 처리군의 신경관 접합과정 및 형성 결과를 관찰한 결과, 대조군은 신경 접합과정이 정상적으로 발생하여 N-cadherin발현이 신경관 내부에 강하게 관찰되었다. 반면, SHH 신호 촉진제인 Purmorphamine 처리 실험군에서는 부분적으로 약하게 신경관 접합과정이 발생하여, 온전한 신경관 형성 실패로 N-cadherin의 극성화가 관찰되지 않았다. 정량분석에 따르면 Rho 신호 억제제인 EHT1864를 처리한 경우 신경관 형성과정은 정상적으로 진행되지만, 면역염색 수행결과 내부에 존재하는 신경관이 잘게 부서진 형태를 보였다. ROCK 신호 억제제인 Y27632 를 처리한 실험군에서는 신경관 접합과정이 소단위로 관찰되었고, 표면의 N-cadherin 발현을 통해 신경관 접합과정의 정지를 확인하였다(도 4B).
- [0087] 이에 따라 척수 오가노이드의 신경관 형태형성과정은 기존 생체 내 신경관 발달과정을 모사하는 시험관 내 모델로써 적용 가능성을 시사한다.
- [0089] 기존에 신경관 형성 장애 유도 약물로 알려진 발프로산을 신경관 형성 초기 단계부터 처리하여 오가노이드의 형태 분석을 진행한 결과, 신경관 접합 과정이 발생하지 않고 신경관 형태가 유지되는 것을 확인하였다. 또한, 신경관 접합 과정 진행중인 오가노이드에 발프로산을 처리한 경우, 신경관 접합과정이 그대로 정지되어 신경관 형성이 일어나지 않음을 관찰하였다(도 5A).
- [0090] 발프로산 처리에 의한 유전자 발현양상을 확인하기 위하여, 마이크로어레이 분석을 수행한 결과, 점착성 접합, 밀착연접, 간극연접과 같은 세포-세포간 결합관련 유전자의 발현이 유의하게 변화함을 확인하였다(도 5B 및 5C).
- [0091] 면역염색을 통하여 밀착연접 관련 유전자 Occludin의 발현패턴을 관찰한 결과, 대조군에서는 발현하지 않는 반면 실험군에서는 신경관 apical을 따라 강하게 발현하는것을 확인하였다. 미오신 미세섬유의 경우 대조군에서 apical 표면에 강하게 극성화되어 발현하지만, 발프로산 처리 실험군에서는 극성화가 손상되어 신경관 내부에서의 발현이 증가함을 보였다(도 5D).
- [0092] 발프로산에 의한 생쥐 배아의 신경관 형성장애를 유도하여 세포-세포간 결합관련 단백질의 발현패턴을 관찰하였다. 그 결과 오가노이드 모델과 유사하게 신경관의 apical 극성화가 손상되는 것을 확인할 수 있었다(도 5E).
- [0093] 이에 따라 상기 실시예 1의 척수 신경 오가노이드는 인간 척수 발생과정을 이해하고 관련된 발달장애를 개선할 수 있는 약물 개발, 약물 독성실험 분석법으로 활용 가능한 것으로 분석된다.
- [0095] **실시예 3: 운동신경세포 유도**
- [0096] 발달중인 배아 척수의 등배측을 따라 위치 특이적으로 운동신경세포와 감각신경세포들이 존재한다. 이에 따라, 상기 실시예 1의 척수 오가노이드 내 등배측 형성 및 분화능 확인을 위해, 운동신경세포 표지자인 Islet1/2와 감각신경세포 표지자인 Brn3a를 이용하여 3차원 면역염색을 수행하였다.
- [0097] 신경관을 기준으로 운동신경세포와 감각신경세포의 위치를 3차원으로 재구성한 결과, 레티놀산 처리 7일차 신경관을 기준으로 오가노이드 표면 구심점이 등배측 형성과 유사함을 관찰하였다. 운동신경세포는 신경관을 기준으로 하여 오가노이드 내부에, 감각신경세포는 바깥방향에 분포하는 경향성이 높게 나타났다. 이는 척수 오가노이드 내 신경관의 신경줄기세포가 자가조직능력을 유지하며, 조직화된 분화가 진행되고 있음을 시사한다. 이러한 변화는 오가노이드 중심부에, 척수의 배측 형성의 핵심 인자인 SHH(Sonic hedgehog)를 발현하는 세포가 생성되기 때문인 것으로 분석된다(도 6A).
- [0098] 중추신경계를 구성하는 운동신경세포는 전후축을 따라 두 가지 종류로 구분할 수 있다. 이에 따라, 상기 실시예 1의 척수 오가노이드 내에 존재하는 운동신경세포의 특성을 확인하기 위해, 뇌신경운동세포 특이적 유전자 PHOX2B, TBX20과 척수신경운동세포 특이적 유전자 FOXP1의 발현을 확인하였다(도 6B).
- [0099] FOXP1의 특이적 발현을 통해 척수에 존재하는 운동신경세포로 분화됨을 확인하였고, 성숙한 운동신경세포 표지자인 ChaT(Choline acetyltransferase)의 발현을 관찰하였다. 정량적인 분석 결과, 오가노이드의 중심부에 분포하는 뉴런 중 약 20%가 운동신경세포로 분화되었으며, 배측 형성을 유도하는 SHH 신호의 촉진제인

Purmorphamine(1 μ M)을 레티놀산과 함께 처리한 결과(RAPM), 처리 8일차에 약 50%의 뉴런이 운동신경세포로 분화되는 것이 확인되었다(도 6C 및 6D).

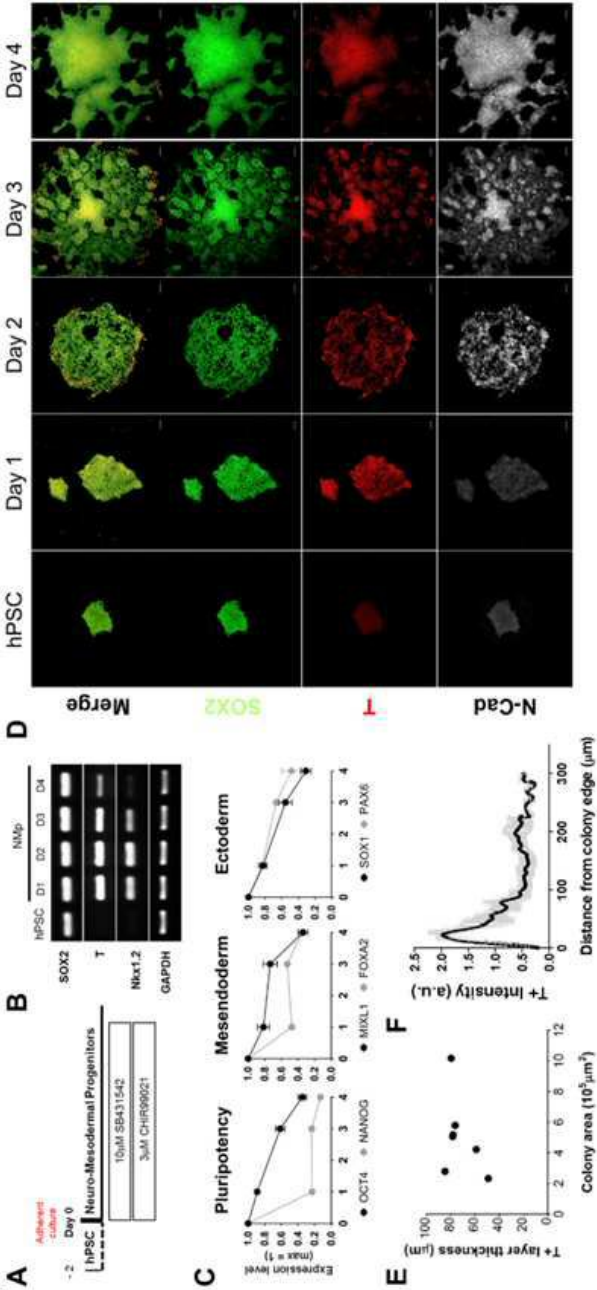
[0100] 현재까지 보고된 운동신경세포 분화 프로토콜은 모두 신경중배엽 과정을 거치지 않고 신경외배엽으로부터 직접 분화시키도록 디자인 되어 있다. 이 경우 그 효율은 10-30%에 지나지 않으며, ChaT을 발현하는 단계에 다르는데 3-4주의 기간이 소요된다. 반면 상기 실시예 1에 따른 방법을 응용하면 15일 이내에 50%의 운동신경세포를 유도할 수 있다.

[0102] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 실시예와 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기의 기재로부터 다양한 수정 및 변형이 가능하다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.

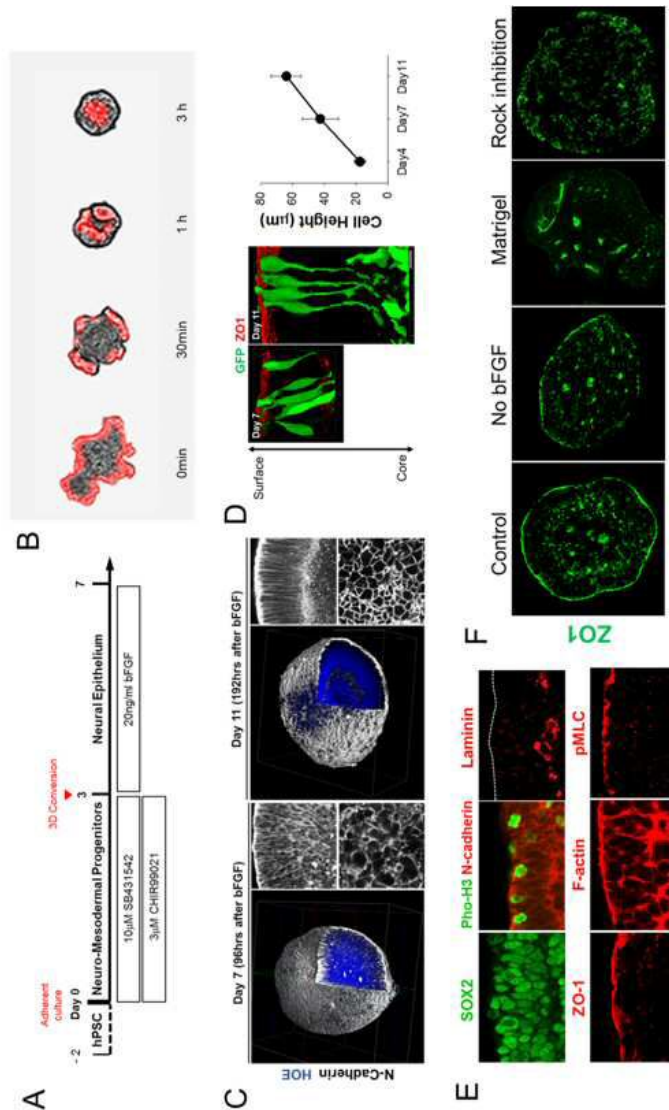
[0103] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

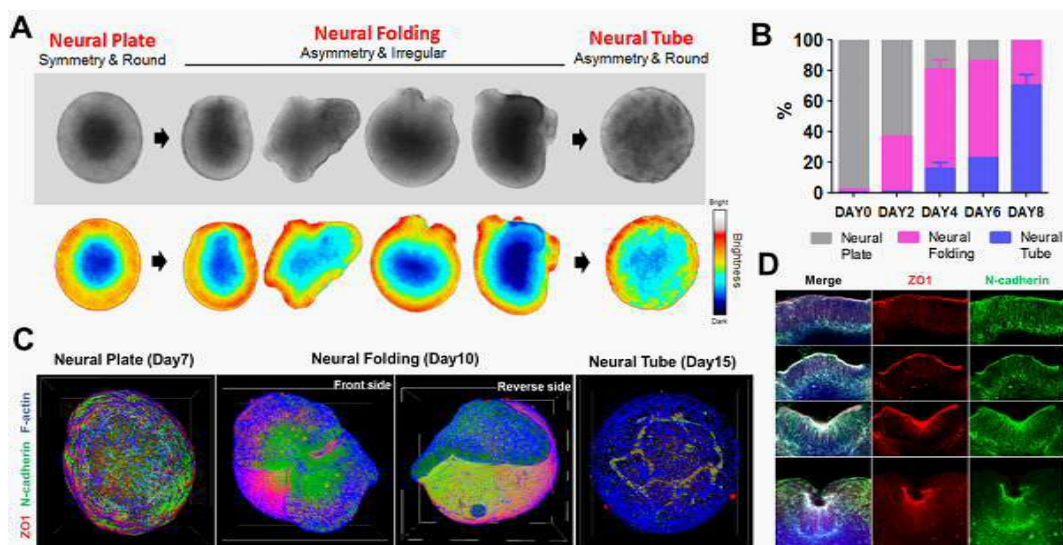
도면1



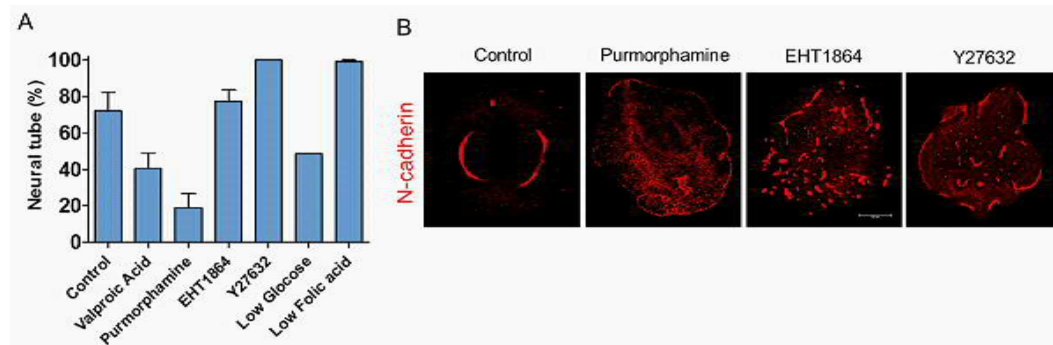
도면2



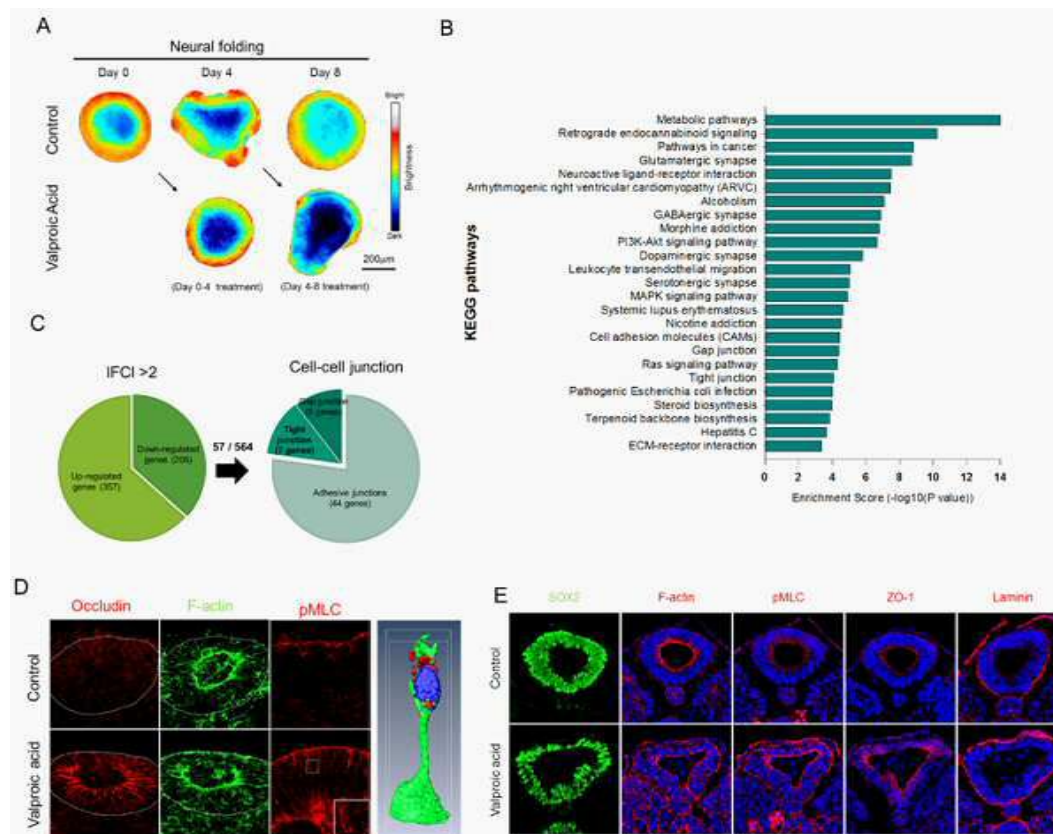
도면3



도면4



도면5



도면6

