(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0116158
(43) 공개일자 2024년07월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0793 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/062 (2013.01)
C12N 2501/105 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0008738
(22) 출원일자 2023년01월20일
심사청구일자 2023년01월20일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
정용택
서울특별시 서대문구 가재울미래로 2 DMC파크뷰자이아파트 118동 3202호
이민경
서울특별시 성북구 개운사2길 14, 202호
(74) 대리인
특허법인(유)화우

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **혀 전방부 상피세포를 이용한 미뢰 오가노이드 제조방법**

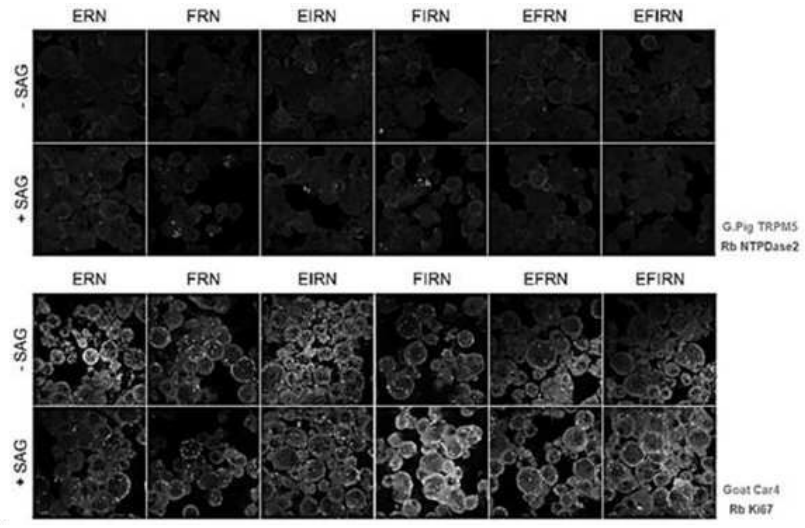
(57) 요 약

본 발명은 혀 전방부 상피 유래의 미뢰 오가노이드 분화 유도용 배지 조성물, 미뢰 오가노이드 제조방법, 혀 전방부 상피 유래의 미뢰 오가노이드 및 이를 이용한 미각 자극물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 혀 전방부 상피 유래의 미뢰 오가노이드 분화 유도용 배지 조성물 및 이를 이용한 미뢰 오가노이드 제조방법은 혀 상피 조직으로부터 효율적으로 미뢰 오가노이드를 형성할 수 있고, 특정 유형의 미각세포로 분화를 조절할 수 있다.

또한, 본 발명의 제조방법에 의해 형성된 혀 전방부 상피 유래 미뢰 오가노이드는 각종 미뢰 및 미뢰 구성 세포의 표지자들의 발현이 극대화되어, 짠맛 감지 단백질이 발현될 수 있는바, 세포 센서, 맛 자극물질 스크리닝 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12N 2501/115 (2013.01)
C12N 2501/155 (2013.01)
C12N 2501/415 (2013.01)
C12N 2501/727 (2013.01)
C12N 2501/999 (2013.01)
C12N 2513/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465037970
과제번호 21C0712L1-12
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 (재단)범부처재생의료기술개발사업단
연구사업명 범부처재생의료기술개발사업
연구과제명 항암 화학 요법 및 방사선 요법에 의한 구강점막 괴사질환과 미각소실을 극복할 수 있는 오가노이드 기반 세포치료제 개발
기 여 율 1/1
과제수행기관명 고려대학교 산학협력단
연구기간 2021.08.01 ~ 2024.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

R-스폰딘 1(R-spondin 1), 노긴(Noggin), FGF2, IGF1, SAG(Smoothened agonist) 및 Y-27632를 포함하는, 혀 전방부 상피 유래의 미뢰 오가노이드(taste bud organoid) 분화 유도용 배지 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 Y-27632를 제외하고 CHIR99021를 더 포함하는, 배지 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

SU5402를 더 포함하는, 배지 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 CHIR99021는 0.1 내지 10 μM로 포함되는 것인, 배지 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 SU5402는 0.1 내지 20 μM로 포함되는 것인, 배지 조성물.

청구항 6

(a) 마우스 혀 조직의 상피층판으로부터 세포를 추출하는 단계;

(b) 추출한 세포를 제1 배지 조성물에서 배양하는 단계; 및

(c) 상기 제1 배지 조성물을 제2 배지 조성물로 교체 후, 제2 배지 조성물에서 배양하는 단계;를 포함하는 혀 전방부 상피 유래의 미뢰 오가노이드(taste bud organoid) 제조방법으로서,

상기 제1 배지 조성물은 R-스폰딘 1, 노긴(Noggin), FGF2, IGF1, SAG(Smoothened agonist) 및 Y-27632를 포함하고,

상기 제2 배지 조성물은 R-스폰딘 1, 노긴(Noggin), FGF2, IGF1, SAG(Smoothened agonist), CHIR99021 및 SU5402를 포함하는 것인, 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 (a)단계의 세포를 추출하는 단계는 마우스 혀 조직에 디스파제(dispase) 효소를 처리하여 상피층판을 분리하고, 이로부터 세포를 추출하는 것인, 혀 전방부 상피 유래의 미뢰 오가노이드(taste bud organoid) 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 (b)단계의 추출한 세포는 세포 외 기질에 포매되어 배양되는 것인, 혀 전방부 상피 유래의 미뢰 오가노이드(taste bud organoid) 제조방법.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 배양된 세포에서 미뢰 세포의 표지인자 발현을 확인하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 (b)단계는 제1 배지 조성물에서 2일 내지 5일 배양하는 것인, 제조방법.

청구항 11

제6항에 있어서,

상기 (c)단계는 제2 배지 조성물에서 7일 내지 15일 배양하는 것인, 제조방법.

청구항 12

제6항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 방법으로 제조된, 혀 전방부 상피 유래의 미뢰 오가노이드.

청구항 13

제12항에 따른 미뢰 오가노이드에 대상물질을 처리하는 단계; 및

상기 대상물질이 미각자극물질인지 판단하는 단계;를 포함하는, 미각 자극물질의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 혀 전방부 상피세포를 이용한 미뢰 오가노이드 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 미뢰는 맛자극에 대한 감각정보를 최초로 형성하는 일차 미각 기관으로 구강 내부의 혀 표면, 연구개, 인-후두부에 위치한다. 그 중 혀 후방부에 위치한 설유두인 성곽유두와 이와 유사한 엽상유두에 미뢰가 수십~수백개의 미뢰가 분포하고, 혀 전방부에 위치한 설유두인 용상유두의 경우 1~2개의 미뢰가 존재한다. 따라서 성곽유두 및 엽상유두는 미각 정보를 강하게 발생시킬 수 있는 반면, 용상유두에서는 맛자극에 대한 반응양상이 더 다채롭게

일어나므로 다양한 질의 미각정보를 형성한다. 미뢰는 수십 개의 세포로 이루어져 있으며, 유전자 발현, 맛자극 발현, 형태학적인 분류에 따라 제1형, 제2형, 제3형, 제4형 미각세포로 구분할 수 있다.

[0004] 다능성줄기세포 및 성체줄기세포를 세포외기질 유사 매트릭스에 포매하여 3차원으로 배양함으로써 생성할 수 있는 오가노이드는 줄기세포의 분화능을 인공적으로 조작함으로써 모사하고자하는 장기의 세포, 장기의 특이 구조 및 기능 등을 갖는 세포의 집합체이다. 오가노이드 배양법을 활용해 미뢰 주변에 존재하는 미뢰 줄기세포를 배양함으로써 미뢰 오가노이드를 형성하는 방법이 소개되었으며, 미뢰 내 구성세포인 제 1형, 제 2형, 제 3형, 제 4형 미각세포로 분화시킬 수 있다.

[0005] 현재 보고된 미뢰 오가노이드 배양방법은 대부분 미뢰 및 미뢰 줄기세포를 충분히 확보할 수 있는 성곽유두 및 엽상유두의 조직 및 세포를 이용하는 경우로서, 성곽유두 및 엽상유두는 일부 맛자극(짠맛)에 대해 반응하는 세포군이 결핍되어 상기 조직으로부터 제작한 미뢰 세포 및 이를 포함하는 미뢰 오가노이드는 일부 맛자극에 대해 반응을 보이지 않을 가능성이 높다. 다만, 아직까지는 미뢰 및 용상유두가 존재하는 혀 전방부 상피세포 및 조직으로부터 미뢰 오가노이드를 형성한 사례는 보고된바 없다.

[0006] 이러한 배경하에, 본 발명자들은 미뢰 및 미뢰 줄기세포가 희박하게 존재하는 혀 상피세포로부터 미뢰 및 미뢰 구성세포로 분화를 유도하고, 효율적인 수율로 미뢰 오가노이드를 형성할 수 있는 배양 방법을 확립하고, 이러한 방법으로부터 형성한 혀 전방부 상피 유래 미뢰 오가노이드가 미뢰 표지자의 발현이 극대화됨을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-2334245호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 전술한 문제 및 이와 연관된 다른 문제를 해결하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명의 일 예시적 목적은 혀 전방부 상피 유래의 미뢰 오가노이드(taste bud organoid) 분화 유도용 배지 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 예시적 목적은 혀 전방부 상피 유래의 미뢰 오가노이드 제조방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은 상기 제조방법으로 제조된 혀 전방부 상피 유래의 미뢰 오가노이드를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 예시적 목적은 상기 미뢰 오가노이드에 대상물질을 처리하는 단계; 및

[0014] 상기 대상물질이 미각자극물질인지 판단하는 단계;를 포함하는, 미각 자극물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 명세서에 개시된 발명의 기술적 사상에 따라 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 문제점을 해결하기 위한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제는 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 출원에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 출원에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 출원의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0018] 상기 목적을 달성하기 위한 일 양태로서, 본 발명은 혀 전방부 상피 유래의 미뢰 오가노이드(taste bud organoid) 분화 유도용 배지 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명의 혀 전방부 상피 유래의 미뢰 오가노이드 분화 유도용 배지 조성물(이하, 분화 배양액 1)은 R-스폰딘 1(R-spondin 1), 노긴(Noggin), FGF2, IGF1, SAG(Smoothened agonist) 및 Y-27632을 포함한다.

[0020] 상기 R-스폰딘 1은 Wnt 아고니스트로 알려져 있는 분비 단백질로서, 조건화 배지 또는 재조합 단백질의 형태로 배지 조성물에 포함될 수 있는 것으로, 배지 조성물 내 R-스폰딘 1의 농도는 각 종형의 미각 세포 조성을 조절하기 위해 적절히 선택될 수 있다.

[0021] 일 예시로 R-스폰딘 1을 안정적으로 발현하는 세포주의 조건화 배지(conditioned media)가 배지 조성물 전체 부피의 2 내지 50% 수준으로 포함될 수 있고, 구체적으로는 2 내지 20% 또는 10 내지 30%, 보다 바람직하게는 10 내지 20% 수준으로 포함될 수 있다. 또한, R-스폰딘 1이 재조합 단백질 형태로 배지 조성물에 첨가되는 경우에는, 구체적으로 10 내지 1000ng/ml의 농도로 포함될 수 있고, 보다 바람직하게는 10 내지 500ng/ml, 25 내지 500ng/ml, 10 내지 300ng/ml 또는 10 내지 100ng/ml 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 또한, 본 발명의 배지 조성물 내 R-스폰딘 1은 R-스폰딘 패밀리에 속하는 R-스폰딘 2, R-스폰딘 3, R-스폰딘 4 등으로 대체하여 배지 조성물에 포함될 수 있다.

[0023] 상기 노긴(Noggin)은 신경 조직, 근육 및 뼈를 포함한 많은 신체 조직의 발달에 관여하는 단백질로서, 조건화 배지 또는 재조합 단백질의 형태로 배지 조성물에 포함될 수 있는 것으로, 배지 조성물 내 노긴의 농도는 각 종형의 미각 세포 조성을 조절하기 위해 적절히 선택될 수 있다.

[0024] 일 예시로 노긴을 안정적으로 발현하는 세포주의 조건화 배지(conditioned media)가 배지 조성물 전체 부피의 1 내지 20% 수준으로 포함될 수 있고, 구체적으로는 2 내지 10% 또는 5 내지 20%, 보다 바람직하게는 5 내지 15% 수준으로 포함될 수 있다. 또한, 노긴이 재조합 단백질 형태로 배지 조성물에 첨가되는 경우에는, 구체적으로 10 내지 200ng/ml의 농도로 포함될 수 있고, 보다 바람직하게는 10 내지 150ng/ml, 50 내지 150ng/ml 또는 50 내지 100ng/ml 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 또한, 본 발명의 배지 조성물 내 노긴은 BMP 수용체의 억제제로 사용된 것으로, 해당 기술분야에 공지된 BMP 수용체의 억제제인 도소모르핀(dorsomorphin), Smad6, Smad7, 코르딘(Chordin), 그렘린(Gremlin). Sog (short gastrulation), 폴리스타틴(Follistatin), DAN(differential screening-selected gene aberrant in neuroblastoma), 세프베루스(Cerberus), 단테(Dante) 등으로 대체하여 배지 조성물에 포함될 수 있다.

[0026] 상기 FGF2(Fibroblast growth factor 2) 및 IGF1(Insulin-like growth factor 1)는 세포의 성장, 증식, 분화를 조절하는 단백질로서, 배지 조성물 내 FGF2 및 IGF1의 농도는 세포의 성장, 증식, 분화를 조절하기 위해 적절히 선택될 수 있다.

[0027] 일 예시로 FGF2 및 IGF1의 농도는 10 내지 200ng/ml의 농도로 포함될 수 있고, 보다 바람직하게는 10 내지 100ng/ml, 20 내지 100ng/ml 또는 50 내지 100ng/ml 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0028] 또한, 본 발명의 배지 조성물 내 FGF2는 FGF1, FGF3, FGF4, FGF5, GF6, FGF7, FGF8, FGF9, FGF10 등 또는 FGF2의 유사체로 대체하여 배지 조성물에 포함될 수 있고, IGF1도 IGF2 또는 IGF1의 유사체로 대체하여 배지 조성물에 포함될 수 있다.

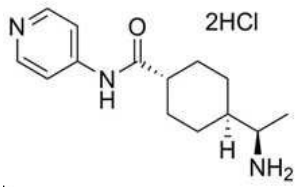
[0029] 상기 SAG(Smoothened agonist)은 소닉 헤지호그 시그널 전달 경로 활성 물질로서, 배지 조성물 내 SAG의 농도는 관련 신호 전달 경로를 조절하기 위해 적절히 선택될 수 있다.

[0030] 일 예시로 SAG의 농도는 0.1 내지 20 μM의 농도로 포함될 수 있고, 보다 바람직하게는 0.5 내지 10 μM, 1 내지 10 μM 또는 0.5 내지 5 μM 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 또한, 본 발명의 배지 조성물 내 SAG는 헤지호그 신호경로를 자극하기 위해 첨가한 것으로, 해당 기술분야에 동일한 작용기전을 갖는다고 알려진 SAG의 유사체인 SAG HCl, 푸르모르파민(Purmorphamine) 등으로 대체하여 배지 조성물에 포함될 수 있다.

[0032] 상기 Y-27632(디하이드로클로라이드)는 Rho/Rock 신호 경로를 억제하는 화합물로서 하기 화학식 1의 구조를 가지며, 배지 조성물 내 Y-27632의 농도는 미뢰 구성 세포를 효율적으로 증식, 분화시키기 위해 적절히 선택될 수 있다.

[0033] [화학식 1]



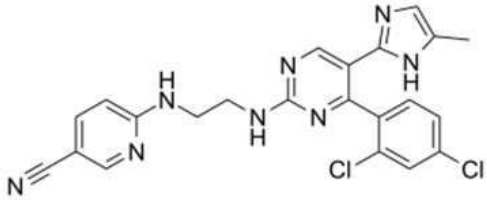
[0034]

[0035] 일 예시로 Y-27632의 농도는 0.1 내지 20 μM의 농도로 포함될 수 있고, 보다 바람직하게는 0.5 내지 20 μM, 1 내지 10 μM 또는 5 내지 10 μM 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명의 다른 혀 전방부 상피 유래의 미뢰 오가노이드 분화 유도용 배지 조성물(이하, 분화 배양액 2)은 R-스폰딘 1(R-spondin 1), 노긴(Noggin), FGF2, IGF1, SAG(Smoothened agonist) 및 CHIR99021를 포함한다.

[0037] 상기 CHIR99021(라두발루십)은 GSK-3α/β 억제하고, Wnt/β-카테닌 신호 전달 경로를 활성화시키는 화합물로서, 하기 화학식 2의 구조를 가지며, 배지 조성물 내 CHIR99021의 농도는 Wnt/β-카테닌 신호 전달 경로를 효율적으로 활성화시키기 위해 적절히 선택될 수 있다.

[0038] [화학식 2]



[0039]

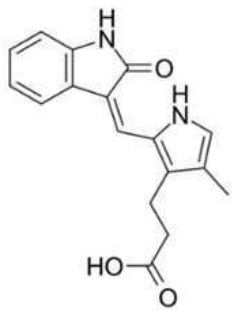
[0040] 일 예시로 CHIR99021의 농도는 0.1 내지 20 μM의 농도로 포함될 수 있고, 보다 바람직하게는 0.5 내지 20 μM, 1 내지 10 μM 또는 1 내지 5 μM 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 또한, 본 발명의 배지 조성물 내 CHIR99021는 윈트-베타카테닌 신호경로를 자극하기 위해 첨가한 것으로, 해당 기술분야에 동일한 작용기전을 갖는다고 알려진 Wnt 단백질 (Wnt1, Wnt2, Wnt3, Wnt4, Wnt5, Wnt6, Wnt7, Wnt8, Wnt9, Wnt10, Wnt11, Wnt12) 및 LiCl 등으로 대체하여 배지 조성물에 포함될 수 있다. 상기 CHIR99021 대신에 WNT 단백질을 포함시킬 경우에는 Wnt 단백질을 안정적으로 발현하는 세포주의 조건화 배지(conditioned media)가 배지 조성물 전체 부피의 2 내지 50% 수준으로 포함될 수 있고, 구체적으로는 2 내지 20% 또는 10 내지 50%, 보다 바람직하게는 10 내지 30% 수준으로 포함될 수 있다. 또한, LiCl이 배지 조성물에 첨가되는 경우에는, 구체적으로 1 내지 10 mM의 농도로 포함될 수 있고, 보다 바람직하게는 1 내지 5 mM 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 상기 분화 배양액 2는 SU5402를 더 포함할 수 있다.

[0043] 상기 SU5402(라두발루십)은 VEGFR2, FGFR1,PDGFRβ 등을 표적으로 하는 다중 표적 수용체 티로신 키나제 억제제 화합물로서, 하기 화학식 3의 구조를 가지며, 배지 조성물 내 SU5402의 농도는 FGF수용체 신호경로를 효율적으로 억제하기 위해 적절히 선택될 수 있다.

[0044] [화학식 3]



[0045]

[0046] 일 예시로 SU5402의 농도는 0.1 내지 20 μM의 농도로 포함될 수 있고, 보다 바람직하게는 0.5 내지 20 μM, 1 내지 10 μM 또는 5 내지 10 μM 농도로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 또한, 본 발명의 배지 조성물 내 SU5402는 FGF수용체 신호경로를 억제하기 위해 첨가한 것으로, 해당 기술분야에 공지된 FGF 수용체 선택적 억제제인 세디라닙(Cediranib), FIIN1 염산염(FIIN1 hydrochloride), 닌테다닙(Nintedanib), PD161570, PD166285 dihydrochloride(PD166285 디히드로클로라이드), PD173074, SU6668 등으로 대체하여 배지 조성물에 포함될 수 있다.

[0048] 본 발명의 용어 "미뢰(taste bud)"는 혀 또는 연구개 등의 구강에 분포하는 세포로, 음식과 접촉하여 맛을 느끼는 역할을 수행할 수 있고, 구체적으로는 단맛, 쓴맛, 짠맛, 신맛 및 감칠맛을 느낄 수 있는 것으로 알려져 있다.

[0049] 본 발명의 용어 "오가노이드(organoid)"는 1차 조직(primary tissue), 조직 하위단위 또는 단일세포(예를 들어 줄기세포)로 구성된 생체 외 3차원 세포 집합체(3D cellular cluster)를 의미한다. 오가노이드는 자가재생(self-renewal) 및 자가조직화(self-organization)가 가능한 특징을 가지며, 본래 조직과 유사한 표현형 및 기능을 구현할 수 있으므로, '소형 유사 장기' 또는 '장기 유사체'로도 명명될 수 있다.

[0050] 상기 목적을 달성하기 위한 다른 양태로서, 본 발명은 (a) 마우스 혀 조직의 상피층판으로부터 세포를 추출하는 단계; (b) 추출한 세포를 제1 배지 조성물에서 배양하는 단계; 및 (c) 상기 제1 배지 조성물 교체 후, 제2 배지 조성물에서 배양하는 단계;를 포함하는 혀 전방부 상피 유래의 미뢰 오가노이드(taste bud organoid) 제조방법을 제공한다.

[0051] 상기 제1 배지 조성물은 R-스폰딘 1, 노긴(Noggin), FGF2, IGF1, SAG(Smoothened agonist) 및 Y-27632를 포함하고, 상기 제2 배지 조성물은 R-스폰딘 1, 노긴(Noggin), FGF2, IGF1, SAG(Smoothened agonist), CHIR99021 및 SU5402를 포함한다.

[0052] 'R-스폰딘 1', '노긴', 'FGF2', 'IGF1', 'SAG', 'Y-27632', 'CHIR99021', 'SU5402', '미뢰', '오가노이드'는 상기 전술한 바와 같다.

[0053] 본 발명의 용어 "배양"은 생체로부터 분리된 세포, 이들의 2차원 또는 3차원적 집합체, 조직 또는 조직의 일부를 체외에서 증식, 성장, 유지 및 분화시키는 것을 의미한다. 이에, 용어 “배양”은 출발 물질(세포, 조직 또는 조직 유사체)을 이용하여 인공적인 환경 하에서 목적 물질을 수득하는 전 과정을 포괄하는 의미이며, 이에 “배양용 조성물”은 “증식용 조성물”, “성장용 조성물”, “유지용 조성물” 및 “분화 유도용 조성물”을 모두 포함하는 개념이다.

[0054] 상기 (a)단계의 마우스 혀 조직에 디스파제(dispase) 효소를 처리하여 상피층판을 분리하는 과정은 혀 조직으로부터 혀 상피세포를 효과적으로 분리하기 위하여 디스파제(dispase) II 효소를 처리하거나, 이를 조직 내 주입하여 수행되는 것일 수 있다. 일 예로, 본 발명의 실시예 1.1에 따르면, 마우스 혀의 상피와 상피 하 결합조직의 사이 공간에 dispase II 효소(2mg/mL)를 주입하여 37℃에서 30분 이상 반응시켜 상피 하 결합 조직으로부터 상피층을 박리하여 상피층판을 분리하였다.

[0055] 상기 (a)단계의 세포를 추출하는 과정은 분리한 상피층판을 구성하는 단일 세포로 분리시키는 과정으로, 일 예로, 본 발명의 실시예 1.1에 따르면, 분리한 상피층판을 가위, 칼 등의 도구를 이용하여 최대한 작은 면적으로 잘게 자른 후, trypsin/EDTA 용액 37℃에서 30분 이상 반응시키고, 피펫팅으로 압력을 가하여 조직으로부터 세포를 추출하였다.

[0056] 상기 (b)단계의 추출한 세포는 해당 분야에 공지된 오가노이드 배양 방법으로 배양될 수 있는 것으로, 일 예로, 본 발명의 실시예 1.1에 따르면, 추출한 세포 또는 추출한 세포를 포함한 단일세포 현탁액의 원심분리 후 세포 펠렛을 마트리젤과 같은 세포 외 기질에 포매하여 배양하였다.

[0057] 본 발명의 미뢰 오가노이드 제조방법은 혀 전방부 상피조직에서 분리한 세포에서 미뢰 세포의 표지인자 발현을 확인하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0058] 상기 미뢰 세포의 표지인자는 혀 상피조직 유래 세포가 미뢰 세포로 분화하여, 미뢰의 기능을 수행할 수 있는지 여부를 확인할 수 있는 표지인자로서, 예를 들면 TRPM5, Car4, NTPdase, PLCβ2, GNAT3, NCAM, SNAP25 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0059] 상기 (b) 단계 또는 (c) 단계에서의 배양 기간은 각 종형의 미각세포의 조성을 조절하기 위해 적절히 선택될 수

있는 것으로, 구체적으로는 상기 (b) 단계의 배양은 제1배지 조성물에서 2일 이상 배양되는 것 일 수 있으며, 구체적으로는 2일 내지 10일, 보다 바람직하게는 2일 내지 5일 배양되는 것일 수 있고, 상기 (c) 단계의 배양은 제2배지 조성물에서 5일 이상 배양되는 것 일 수 있으며, 구체적으로는 5일 내지 15일, 보다 바람직하게는 7일 내지 15일 배양되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0060] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명의 제조방법으로 제조된 혀 전방부 상피 유래의 미뢰 오가노이드를 제공한다.

[0061] 상기 목적을 달성하기 위한 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 미뢰 오가노이드에 대상물질을 처리하는 단계; 및 상기 대상물질이 미각자극물질인지 판단하는 단계;를 포함하는, 미각 자극물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0062] 본 발명의 미뢰 오가노이드는 짠맛에 대해 반응하는 세포군이 포함된 혀 전방부 상피(용상유두 포함)로부터 형성된 것이고, 상기 세포군이 결핍된 혀 후방부(성곽유두 및 엽상유두 포함)로부터 형성된 것이 아니므로, 짠맛을 감지할 수 있는 단백질이 발현되어 있는 미뢰 세포를 포함하고 있다. 따라서, 본 발명의 미뢰 오가노이드를 세포 센서로 이용할 경우, 짠맛을 포함한 다양한 맛 자극물질에 대한 스크리닝이 가능하다.

[0063] 본 발명에 있어서, 상기 미뢰 오가노이드를 처리한 대상물질의 맛 감지 단백질 발현량의 변화를 측정하여 상기 대상물질이 미각자극물질인지 판단할 수 있다.

[0064] 본 발명의 일 구현예에서, 대상물질에 대한 상기 미뢰 오가노이드의 반응을 전기생리기법(예를 들어 패치클램프), 칼슘 이미징 등을 활용한 세포활성도 변화에 의해 측정함으로써 상기 대상물질이 미각자극물질인지 판단할 수 있다.

발명의 효과

[0066] 본 발명에 따른 혀 전방부 상피 유래의 미뢰 오가노이드 분화 유도용 배지 조성물 및 이를 이용한 미뢰 오가노이드 제조방법은 미뢰 및 미뢰 줄기세 포가 희박한 혀 상피세포로부터 미뢰 및 미뢰 구성세포로 분화를 유도할 수 있다.

[0067] 또한, 본 발명의 미뢰 오가노이드 제조방법은 한정된 수의 성곽유두 및 엽상유두로부터 얻는 미뢰 오가노이드에 대비하여 상대적으로 적은 조직으로부터 효율적인 수율로 미뢰 오가노이드를 형성할 수 있고, 특정 유형의 미각 세포로 분화를 조절할 수 있다.

[0068] 본 발명의 제조방법에 의해 형성된 혀 전방부 상피 유래 미뢰 오가노이드는 각종 미뢰 및 미뢰 구성 세포의 표지자들의 발현이 극대화되어, 짠맛 감지 단백질이 발현될 수 있는바, 세포 센서, 맛 물질 탐색 등의 분야에서 다양하게 활용될 수 있다.

[0069] 다만, 본 명세서에 개시된 기술의 일 실시예에 따른 효과는 이상에서 언급한 것들로 제한되지 않으며, 언급하지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0071] 본 명세서에서 인용되는 도면을 보다 충분히 이해하기 위하여 각 도면의 간단한 설명이 제공된다.

도 1은 전방부 혀 오가노이드 제작 과정을 도시하였다.

도 2는 혀 전방부 상피조직으로부터 미뢰 오가노이드 배양에 있어 각종 배양조건에 SAG 첨가시 오가노이드 배양 효율을 확인한 결과이다.

도 3은 혀 전방부 상피조직으로부터 미뢰 오가노이드 배양에 있어 각종 배양조건에 SAG 첨가시 오가노이드 내 미뢰 구성세포의 표지인자의 발현 효율 변화 및 미뢰 구성세포 분화 효율 확인한 결과이다.

도 4는 혀 전방부 상피 유래의 미뢰 오가노이드 배양시, SAG 포함 기본 배양액에 Wnt 및 Notch 신호의 약리학적 조절을 통해 오가노이드 내 미뢰 구성세포의 표지인자의 발현 효율 변화 및 미뢰 구성세포 분화 효율 확인한 결과이다.

도 5는 혀 전방부 상피 유래의 미뢰 오가노이드 배양시, CHIR을 처리한 기간별로(SAG 및 CHIR를 포함한 배양액

에서 배양), 오가노이드 내 미뢰 구성세포의 표지인자의 발현 효율 및 미뢰 구성세포 분화 효율의 최적화를 확인한 결과이다.

도 6은 혀 전방부 상피 유래 미뢰 오가노이드 배양시, SAG 포함 기본 배양액에 CHIR을 배양 초기 3일 후 추가하고, 그 이후부터 성장분화인자 신호전달 조작을 통해 오가노이드 내 미뢰 구성세포의 표지인자의 발현 효율 및 미뢰 구성세포 분화 효율의 최적화를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0072] 이하, 본 발명을 하기 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예만으로 한정되는 것은 아니다.

[0074] **실시예 1: 전방부 혀 오가노이드 제조**

[0075] **1.1. 전방부 혀 상피세포 획득**

[0076] 마우스로부터 혀를 채취하여, 생리식염수에 희석한 dispase II 효소(2mg/mL)(Roche, cat #4942078001)를 상피와 상피 하 결합조직의 사이 공간에 주입하여 팽창시키고(도 1의 ②), 이렇게 팽창된 혀 조직을 dispase II 효소 희석액에서 37℃에서 30분 배양하였다. 상피 하 결합조직으로부터 상피층을 박리해 상피층판을 분리하고, 이를 trypsin/EDTA (Gibco, cat #25200072)용액 내부에서 멸균된 수술용 가위, 칼 등의 도구를 이용하여 최대한 작은 면적으로 잘게 자른다. 잘게 자른 조직을 37℃에서 30분 배양하였다. 이후, 연속적인 피펫팅으로 잘게 자른 조직에 압력을 가하여 조직으로부터 세포를 추출하여 단일세포 현탁액을 형성한다. 이 현탁액을 원심분리를 하여 얻은 세포 펠렛을 적절한 비율로 Matrigel 등 세포 외 기질에 포매한다.

[0078] **1.2. 전방부 혀 상피세포 유래 오가노이드의 제작**

[0079] 모든 배양액은 기본 배양액(DMEM/F12 + 1x GlutaMax + 1x HEPES + 1x N2 보충액 + 1x B27 보충액 + 1x penicillin/streptomycin)을 기초로 한다.

[0080] 상기 Matrigel에 포매한 단일세포는 분화 배양액 1(FIRNY+SAG)에서 4일간 배양한 후에, 분화 배양액 2(FIRN+SAG+CHIR_SU5402)로 배양액을 교체하고, 2~3일마다 배양액을 교체하면서 10일간 배양하였다.

표 1

[0081]

기본 배양액	DMEM/F12 (Gibco, cat #11320033) 1x GlutaMax (Gibco, cat #35050-061) 1x HEPES (Sigma, cat #83264) 1x N2 supplement (Gibco, cat #17502-048) 1x B27 supplement (Gibco, cat #17504-044) 1x P/S (Gibco, cat # 15140-122)
분화 배양액 1(FIRNY*+SAG)	20% R-spondin 1 10% Noggin 50 ng/mL FGF2 50 ng/mL IGF1 (BioLegend, cat #590908) 1 μM SAG (Abcam, cat #ab142160) 10 μM Y-27632 (Cayman chemical, cat # Cay10005583-50)
분화 배양액 2(FIRN+SAG+CHIR+SU5402)	20% R-spondin 1 10% Noggin 50 ng/mL FGF2 50 ng/mL IGF1 1 μM SAG 3 μM CHIR99021 (Sigma, cat #SML1046-5MG) 10 μM SU5402 (Sigma, cat #SML0443-5MG)

[0082] *F; FGF2, I; IGF1, R; R-spondin 1, N; Noggin, CHIR; CHIR99021

[0084] **실시예 2: 배양 조건에 따른 오가노이드 배양 효율 최적화**

[0085] **2.1. SAG 첨가에 따른 오가노이드 배양 효율 확인**

[0086] 혀 전방부 상피조직으로부터 미뢰 오가노이드 배양에 있어 R-spondin1, Noggin이 첨가된 기본 배양액에 EGF, FGF2, IGF1을 단독으로 추가하거나, 조합하여 추가한 경우, 그리고 상기 모든 조건에서 SAG를 추가하여 배양한 경우 오가노이드 자체의 성장 효율, 크기에는 변화가 없었으나(도 2), SAG가 추가된 경우 제1, 제2, 제3형 미각세포의 분화가 확인되었다. 특히, FGF2가 단독으로 추가되거나, EGF 및 IGF1과 조합하여 추가된 경우 분화 효율이 증가되었으며, 그 중 FGF2와 IGF1가 조합되어 추가된 경우 분화 효율이 극대됨을 면역형광염색으로 확인하였다(도 3).

[0088] **2.2. Wnt 및 Notch 신호의 약리학적 조절에 따른 분화 효율 확인**

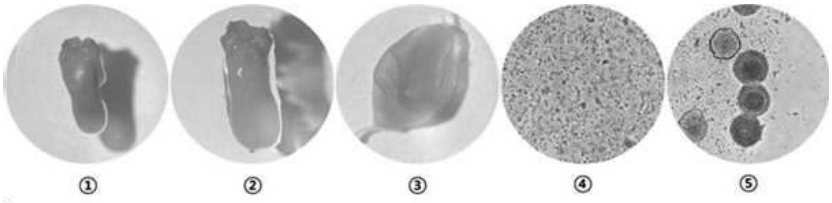
[0089] 혀 전방부 상피조직으로부터 미뢰 오가노이드 배양에 있어 SAG 포함 기본 배양액에 Wnt 및 Notch 신호 경로를 자극하는 CHIR99021(CHIR)를 처리한 경우, 제1, 제2, 제3형 미각세포의 분화 효율이 모두 증가됨을 면역형광염색으로 확인하였다(도 4). 또한, 3일차, 5일차 또는 7일차에 CHIR를 처리하여, CHIR 처리 시간별 미각세포의 분화 효율을 확인한 결과, CHIR를 이른 시기에 처리할수록, 제1, 제2, 제 3형 미각세포의 분화 효율이 증가됨을 면역형광염색으로 확인하였다(도 5).

[0090] CHIR 이외 성분에 따른 오가노이드 내 미뢰 구성세포의 표지인자 발현 효율 및 미뢰 구성세포 분화 효율의 최적화를 확인하기 위하여, CHIR를 배양 초기 3일 후 추가하였으며, FGF 제거 또는 SU5402를 추가적으로 포함하는 배양액에서 오가노이드를 배양하였다. 그 결과, 배양 3일차부터 FGF를 제거하거나, SU5402를 추가적으로 투여한 경우, 제2, 제 3형 미각세포의 분화 효율이 증가됨을 면역형광염색으로 확인하였다(도 6).

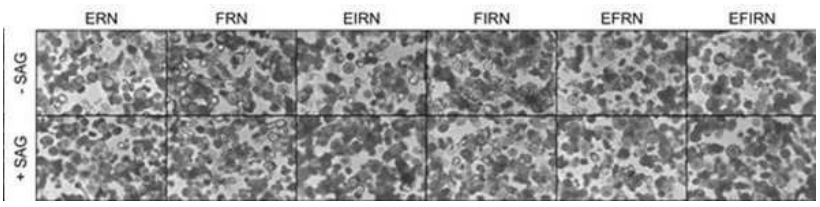
[0091] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

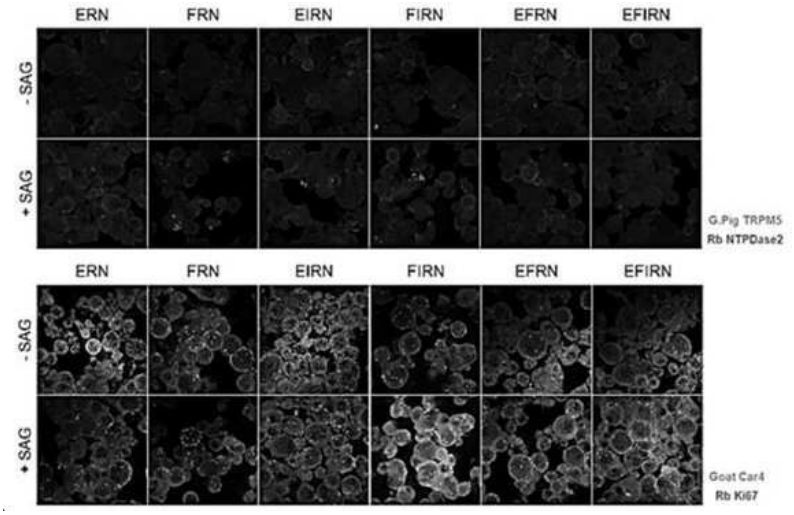
도면1



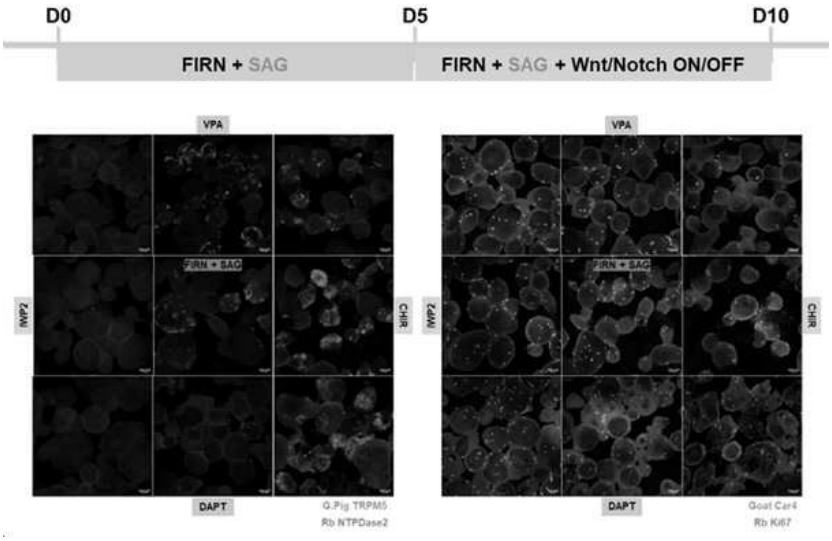
도면2



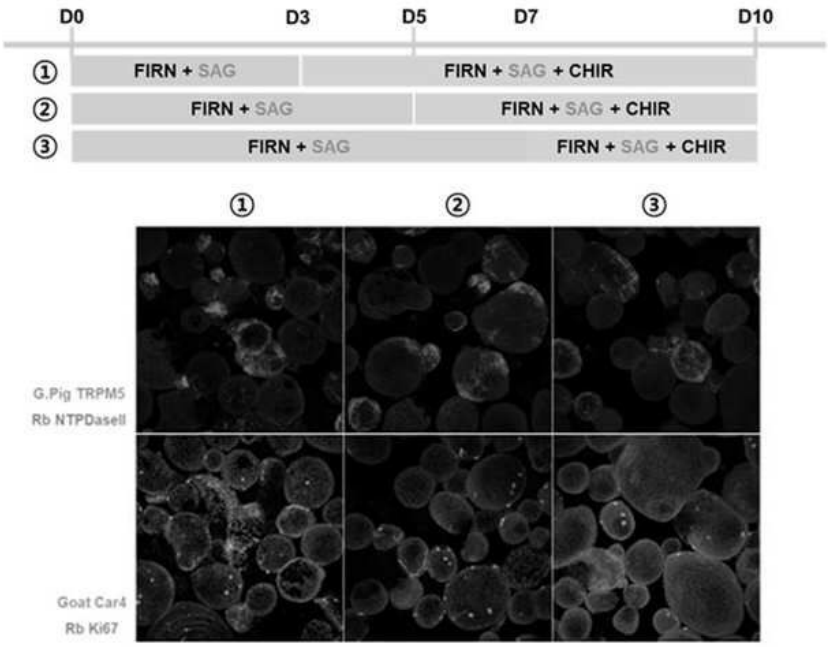
도면3


ERN
FRN
EIRN
FIRN
EFRN
EFIRN
- SAG
+ SAG
G.Pig TRPM5
Rb NTPDase2
ERN
FRN
EIRN
FIRN
EFRN
EFIRN
- SAG
+ SAG
Goat Car4
Rb Ki67

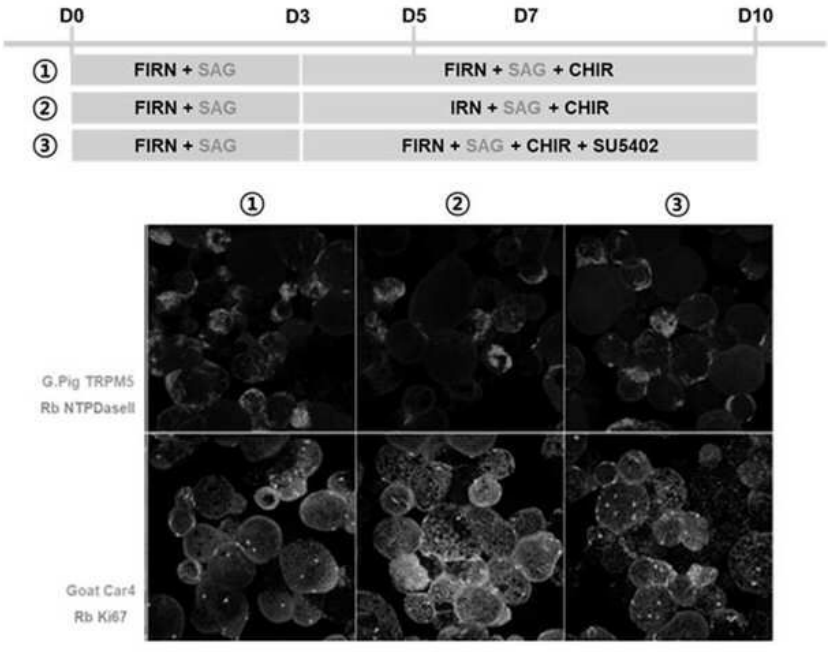
도면4


D0
D5
D10
FIRN + SAG
FIRN + SAG + Wnt/Notch ON/OFF
VPA
FIRN + SAG
IWP2
CHIR
DAPT
G.Pig TRPM5
Rb NTPDase2
VPA
FIRN + SAG
IWP2
CHIR
DAPT
Goat Car4
Rb Ki67

도면5


D0
D3
D5
D7
D10
①
FIRN + SAG
FIRN + SAG + CHIR
②
FIRN + SAG
FIRN + SAG + CHIR
③
FIRN + SAG
FIRN + SAG + CHIR
①
②
③
G.Pig TRPM5
Rb NTPDase8
Goat Car4
Rb Ki67

도면6


D0
D3
D5
D7
D10
①
FIRN + SAG
FIRN + SAG + CHIR
②
FIRN + SAG
IRN + SAG + CHIR
③
FIRN + SAG
FIRN + SAG + CHIR + SU5402
①
②
③
G.Pig TRPM5
Rb NTPDase8
Goat Car4
Rb Ki67