(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0143667
(43) 공개일자 2021년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0797 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0623 (2013.01)
C12N 2501/999 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0064027
(22) 출원일자 2021년05월18일
심사청구일자 2021년05월18일
(30) 우선권주장
1020200060552 2020년05월20일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
주식회사 스템랩
서울특별시 성북구 안암로 145 , 산학관 711호 (안암동5가, 고려대학교 자연캠퍼스)
(72) 발명자
유승권
경기도 용인시 처인구 양지면 새실로 43-3
윤원진
부산광역시 사하구 감천로21번길 35, 103동 602호 (감천동, 부영벽산파라빌)
오동훈
경기도 용인시 수지구 심곡로 81, 103동 702호 (상현동, 삼성쉐르빌)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

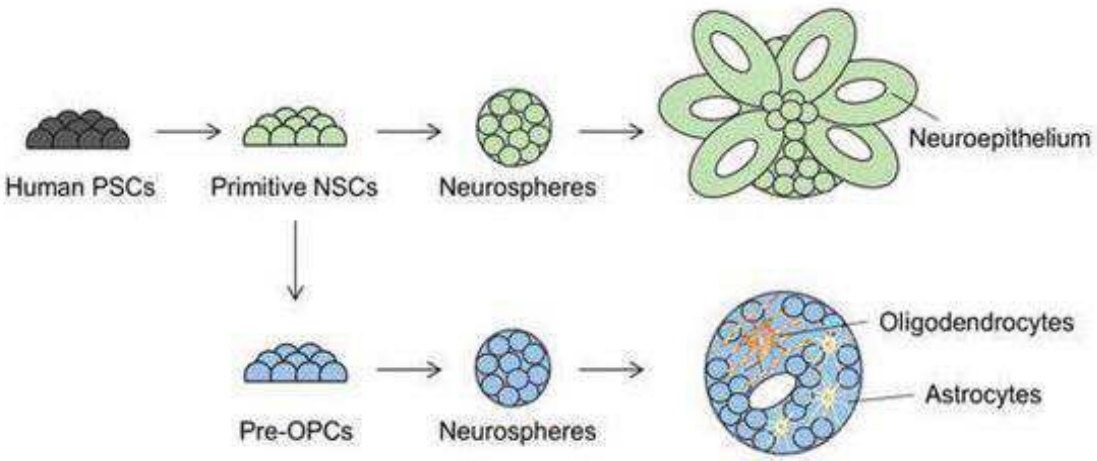
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 오가노이드 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 오가노이드 및 이의 용도에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드, 상기 오가노이드에 후보약물을 처리한 후, 수초 형성 여부를 분석하는 단계를 포함하는 탈수초 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법 및 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드 또는 상기 오가노이드에서 분리된 희소돌기아교세포를 유효성분으로 포함하는 탈수초 질환의 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C12N 2506/08 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1465030282
과제번호 HI18C2166010020
부처명 보건복지부
과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원
연구사업명 연구자주도질병극복연구(R&D)
연구과제명 척수손상질환 동물모델을 이용한 인간 유도 신경줄기세포의 유효성 및 안전성 평가
기 여 율 1/2
과제수행기관명 고려대학교산학협력단
연구기간 2020.01.01 ~ 2020.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711105535
과제번호 2015M3A9B4071074
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명 X-염색체 연관 부신백질이영양증 환자 유래 역분화 줄기세포주 플랫폼 구축 및 실용화 응용
기 여 율 1/2
과제수행기관명 고려대학교
연구기간 2020.03.01 ~ 2020.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

(1) 인간 만능성 줄기세포(Human pluripotent stem cell; hPSC)를 LIF(Leukemia Inhibitory Factor), SB431542 화합물 및 CHIR 99021 화합물을 포함하는 LSC 배지로 배양하여 원시 신경줄기세포(Primitive NSC; pNSC)로 분화시키는 단계;

(2) 상기 원시 신경줄기세포를 bFGF, EGF 및 퍼모프아민(Purmorphamine)을 포함하는 FEP 배지로 배양하여 복측 로제트 타입 신경줄기세포(Ventral rosette type NSC; vrNSC)로 분화시키는 단계;

(3) 상기 복측 로제트 타입 신경줄기세포를 bFGF, PDGF 및 퍼모프아민(Purmorphamine)를 포함하는 FPP 배지로 배양하여 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포(pre Oligodendrocyte Precursor Cell; pre-OPC)로 분화시키는 단계; 및

(4) 상기 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포를 RA(retinoic acid) 함유 배지; PDGF(Platelet-derived growth factor), IGF1(Insulin like growth factor), HGF(Hepatocyte growth factor) 및 포스콜린(forskolin) 함유 배지; 및 포스콜린(forskolin), 아스코르빅산 및 T3(3,3′,5-triiodo-L-thyronine) 함유 배지;로 순차적으로 배지를 교체하면서 배양하여 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드를 형성하는 단계를 포함하는,

희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 배지는 DMEM/F12, 중탄산나트륨, 비타민 A가 없는 B-27 보충제, N-2 보충제, 페니실린-스트렙토마이신, L-글루타민 및 비필수아미노산을 포함하는 배지를 기초배지로 사용하는 것을 특징으로 하는, 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포는 OLIG2(Oligodendrocyte transcription factor 2) 및 NKX2.2(NK2 Homeobox 2)를 발현하는 것을 특징으로 하는, 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 오가노이드에는 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 분화된 신경세포 및 성상교세포가 더 포함되어 있는 것을 특징으로 하는, 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드의 제조방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드.

청구항 6

제5항의 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드에 후보약물을 처리한 후, 수초 형성 여부를 분석하는 단계를 포함하는, 탈수초 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 후보약물 처리에 의해 수초 형성이 촉진되는 경우, 상기 후보약물을 탈수초 질환의 치료제로 판단하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 탈수초 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법.

청구항 8

제5항의 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드 또는 상기 오가노이드에서 분리된 희소돌기아교세포를 유효성분으로 포함하는, 탈수초 질환의 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 조성물은 수초화 재생을 촉진시키는 것을 특징으로 하는, 탈수초 질환의 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 탈수초 질환은 급성 파종성 탈수초(acute disseminated demyelination), 레버 유전성 시각 신경병증(Leber hereditary optic neuropathy), 탈수초성 다발성 신경병증(demyelinating polyneuropathy) 및 샤르코 마리 투스병(Charcot Marie Tooth)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 탈수초 질환의 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 오가노이드는 수초 형성 유도약물이 처리된 오가노이드인 것을 특징으로 하는, 탈수초 질환의 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 수초 형성 유도약물은 T3(3,3',5-triiodo-L-thyronine), 미코나졸(Miconazole) 또는 벤즈트로핀(Benztropine)인 것을 특징으로 하는, 탈수초 질환의 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 오가노이드 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 의료 및 과학기술의 발달로 인간의 평균수명이 늘어나면서 100세를 넘는 센터내리언(centenarian) 시대가 다가옴에 따라 개인 맞춤형 세포치료제는 인간의 장수에 밑거름이 될 근본적인 필수요소로 대두되고 있다. 다양한 중추신경계(Central Nervous System, CNS) 질환 중, 탈수초성 질환(Demyelinating disease)은 미엘린 수초(Myelin Sheath)를 형성하는 희소돌기아교세포(Oligodendrocyte)에 이상이 생겨 신경세포(Neuron)의 손상으로 인해 다양한 신경질환을 유발하는 질환으로, 희소돌기아교 세포로 분화할 수 있는 희소돌기아교 전구세포(Oligodendrocyte Precursor Cells, OPC)를 이식하는 방법이 주요 치료법으로 대두되고 있다.

[0003] 신경줄기세포(Neural Stem Cells, NSC)는 신경세포, 성상교세포(Astrocyte), 희소돌기아교세포로 3개의 세포로 분화가 가능한 다분화능 줄기세포로 신경질환을 치료할 수 있는 치료제로 각광을 받고 있으며, 분화 및 교차분화를 통하여 세포를 수득할 수 있는 방법이 개발되었지만, 희소돌기아교세포로 분화할 수 있는 능력이 현저히

낮아 탈수초성 질환의 세포 치료제로서는 적합하지 않은 것으로 알려져 있다.

[0004] 하지만, 인간의 뇌 안에는 희소돌기아교세포의 양이 극히 적은 것으로 알려져 있어 자가이식이 어렵고, 외부에서 이식에 사용될 세포를 얻고자 배아줄기세포 및 역분화 줄기세포를 통한 분화 연구가 진행되고 있지만 아직까지 실제 임상시험에서 이식을 통한 뚜렷한 효과는 입증되지 않았다.

[0005] 이에 많은 연구진들은 탈수초성 질환을 치료할 수 있는 약물(Drug)을 개발하고자 약물 스크리닝(Drug screening)을 통하여 재수초(Remyelination) 형성을 유도할 수 있는 약물을 개발하고자 노력하고 있지만 약물후보의 탐색, 전임상단계의 약물효능 평가를 위해 사용되는 다양한 동물 및 세포 모델(2D)이 인체 내 환경-세포간 상호작용 및 세포내 복잡한 신호전달 경로를 반영하지 못하여 신약개발의 어려움을 겪고 있다.

[0006] 따라서 탈수초성 질환에 대한 효과적인 약물 개발을 위해, 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드 및 재수초 형성을 신속하고 효과적으로 유도할 수 있는 기술의 개발이 필요한 실정이다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 인간 배아 줄기세포 및 역분화 줄기세포로부터 희소돌기아교세포로 특화된 인간 신경줄기세포(pre-OPCs)를 확립하였고, 이를 통해 오가노이드 형성 및 분화를 유도하는 배지에서의 3D 배양방법을 개발하여 단 기간 내에 희소돌기아교세포가 포함된 오가노이드를 형성할 수 있는 방법을 확립함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 10-2019-0106279

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 방법으로 제조된 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드에 후보약물을 처리한 후, 수초형성 여부를 분석하는 단계를 포함하는, 탈수초 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드 또는 상기 오가노이드에서 분리된 희소돌기아교세포를 유효성분으로 포함하는, 탈수초 질환의 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은, (1) 인간 만능성 줄기세포(Human pluripotent stem cell; hPSC)를 LIF(Leukemia Inhibitory Factor), SB431542 화합물 및 CHIR 99021 화합물을 포함하는 LSC 배지로 배양하여 원시 신경줄기세포(Primitive NSC; pNSC)로 분화시키는 단계; (2) 상기 원시 신경줄기세포를 bFGF, EGF 및 퍼모프아민(Purmorphamine)을 포함하는 FEP 배지로 배양하여 복측 로제트 타입 신경줄기세포(Ventral rosette type NSC; vrNSC)로 분화시키는 단계; (3) 상기 복측 로제트 타입 신경줄기세포를 bFGF, PDGF 및 퍼모프아민(Purmorphamine)를 포함하는 FPP 배지로 배양하여 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포(pre Oligodendrocyte Precursor Cell; pre-OPC)로 분화시키는 단계; 및 (4) 상기 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포를 RA(retinoic acid) 함유 배지; PDGF(Platelet-derived growth factor), IGF1(Insulin like growth factor), HGF(Hepatocyte growth factor) 및 포스콜린(forskolin) 함유 배지; 및 포스콜린(forskolin), 아스코르빅산 및 T3(3,3′ ,5-triiodo-L-thyronine) 함유 배지;로 순차적으로 배지를 교체하면서 배양하여 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드를 형성하는 단계를 포함하는, 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드의 제조방법을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 배지는 DMEM/F12, 중탄산나트륨, 비타민 A가 없는 B-27 보충제, N-2 보충제, 페니실린-스트렙토마이신, L-글루타민 및 비필수아미노산을 포함하는 배지를 기초배지로 사용하는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포는 OLIG2(Oligodendrocyte transcription factor 2) 및 NKX2.2(NK2 Homeobox 2)를 발현하는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 오가노이드에는 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 분화된 신경세포 및 성상교세포를 더 포함할 수 있다.

[0017] 또한 본 발명은 본 발명의 방법으로 제조된 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드를 제공한다.

[0018] 또한 본 발명은 본 발명의 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드에 후보약물을 처리한 후, 수초 형성 여부를 분석하는 단계를 포함하는, 탈수초 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 후보약물 처리에 의해 수초 형성이 촉진되는 경우, 상기 후보약물을 탈수초 질환의 치료제로 판단하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0020] 또한 본 발명은 본 발명의 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드 또는 상기 오가노이드에서 분리된 희소돌기아교세포를 유효성분으로 포함하는, 탈수초 질환의 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 수초화 재생을 촉진시키는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 탈수초 질환은 급성 파종성 탈수초(acute disseminated demyelination), 레버 유전성 시각 신경병증(Leber hereditary optic neuropathy), 탈수초성 다발성 신경병증(demyelinating polyneuropathy) 및 샤르코 마리 투스병(Charcot Marie Tooth)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 오가노이드는 수초 형성 유도약물이 처리된 오가노이드일 수 있다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 수초 형성 유도약물은 T3(3,3',5-triiodo-L-thyronine), 미코나졸(Miconazole) 또는 벤즈트로핀(Benztropine)일 수 있다.

발명의 효과

[0025] 본 발명에 따른 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드의 제조방법은 짧은 시간 안에 희소돌기아교세포가 포함된 오가노이드를 제조할 수 있는 효과가 있으며, 탈수초성 질환의 치료를 위한 세포치료제로 유용하게 사용할 수 있는 효과가 있다. 뿐만 아니라 본 발명의 방법으로 제조된 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드는 시험관 내에서 재수초 형성 유도 효능을 갖는 약물의 스크리닝에도 사용할 수 있어 신약개발을 위한 3D 플랫폼 기반의 마련에도 유용하게 사용될 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 hESCs 로부터 pre-OPCs를 확립하는 과정, 배양조건 및 pre-OPCs의 특성과 pre-OPCs로부터 분화된 희소돌기아교세포의 특성을 확인한 결과를 나타낸 ㄱ것으로, 1A는 hESCs 로부터 pre-OPCs를 확립하기 위한 각 단계별 모양 및 배양조건을 모식도로 나타낸 것이고, 1B는 pNSCs를 확립하기 위한 배양조건을 나타낸 것이며, 1C는 확립된 pNSCs 의 특성을 확인한 결과이고, 1D 는 pre-OPCs를 확립하기 위한 배양조건을 나타낸 것이며, 1E는 확립된 pre-OPCs의 특성을 확인한 것이고, 1F는 확립된 pre-OPCs의 분화능을 확인하기 위한 배양조건을 나타낸 것이며, 1G는 pre-OPCs로부터 분화된 성상세표의 특성을 분석한 것이고, 1H는 pre-OPCs로부터 분화된 희소돌기아교세포의 특성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 원시 신경줄기세포(pNSC) 및 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포(pre-OPC)로부터 스페로이드 형성에 대한 결과를 나타낸 것으로, 2A는 pNSC 및 pre-OPC으로부터 스페로이드의 형성 및 뉴런(TUJ1 +), 성상세포 (GFAP +), 희소돌기아교세포(MBP +)로의 분화를 위한 각 단계를 모식도로 나타낸 것이며, 각 약어의 의미는 다음과 같다. LSC는 LIF, SB431542 및 CHIR99021를 나타낸 것이고, FPP는 FGF2, PDGF-AA 및 Purmorphamine를 나타낸 것이고, FSK는 Forskolin, T3는 3,3',5-triiodo-L-thyronine을, AA는 ascorbic acid를 나타낸 것이다. 도 2B 및 2C는 각각 pNSCs 및 pre-OPC의 특징을 PAX6, SOX1, OLIG2 및 NKX2.2에 대한 면역형광염색법으로 확인한 결과를 나타낸 것이다. 도 2D 및 2E는 0일과 3일째의 pNSC(D) 및 pre-OPC(E)의 형태를 확인한 것이고, 2F 및 2G는 4주 동안 분화 시간에 따른 Matrigel droplets 내에서의 세포 분화를 확인한

것이며, 임베딩 이전에 pNSC 및 pre-OPC는 200~300um의 신경구를 형성한 것으로 나타났다. 2H는 마트리겔 임베딩 2주 후, pNSC 및 pre-OPC로부터 형성된 각 스페로이드에 대한 형광이미지를 나타낸 것으로, 점선 표시 영역이 VZ-like 영역을 나타낸 것이다. 2I 및 2J는 마트리겔 임베딩 4주 후, pNSC(passage 1 and passage 15) 및 pre-OPC로부터 형성된 각 스페로이드에 대한 형광이미지를 나타낸 것이며, 5-HT는 5-hydroxytryptamine, ChAT는 choline acetyltransferase, HB9는 MNX1, OPC는 oligodendrocyte progenitor cell, pNSC는 primitive neural stem cell을, TH는 tyrosine hydroxylase를 나타낸 것이다.

도 3은 성상세포의 신속한 생산을 위한 pre-OPC로부터 확립된 스페로이드의 배양 결과로서, 3A는 pre-OPC로부터 확립된 스페로이드 절편을 TUJ1 (green) 및 BLBP(brain lipid binding protein; red)에 대한 형광염색법으로 확인한 결과를 나타낸 것이고, 3B는 마트리겔 임배딩 후 각 절편에 대한 형광 이미지를 나타낸 것으로 S100β (green) 및 GFAP (red)의 발현 정도를 확인한 결과이고, 점선은 분리된 스페로이드를 나타낸 것이다. 3C는 시간별 S100β 또는 GFAP 양성 세포 집단을 유세포 분석기로 확인한 것이고, 3D는 pre-OPC로부터 확립된 스페로이드를 6주 동안 배양 후, 확대된 형광 이미지를 나타낸 것으로, 화살표는 길쭉한 모양의 성상세포를, 화살촉은 별모양의 성상세포를 각각 나타낸 것이며, 3E는 H9-hESCs (nos. 6 and 10) 및 hiPSCs (nos. 18)로부터 유래된 pre-OPC에서 형성된 스페로이드의 확대된 형광 이미지를 나타낸 것이고, 3F는 단층분화된 형광 이미지를 나타낸 것으로, GFAP (red) 및 S100β (green)을 염색하여 확인한 것이며, 유세포 분석을 통해 종래 2차원적 배양방법(2D) 및 본 발명에 따른 pre-OPCs로부터 오가노이드의 배양방법(3D)에 따른 성상교세포로의 분화율을 비교한 것을 나타낸 것이다.

도 4는 pre-OPC로부터 형성된 스페로이드의 배양은 희소돌기아교세포의 신속한 생산을 가능하게 함을 확인한 결과를 나타낸 것으로, 4A는 마트리겔 임배딩 4주 후, 스페로이드를 SOX10(red)를 염색한 형광 이미지 결과이고, 4B 및 4C는 pre-OPC로부터 확립된 4주차 스페로이드(B) 및 6주차 스페로이드(C)를 나타낸 것으로 희소돌기아교세포의 또 다른 마커인 OLIG2, PDGFRa, O4 또는 MBP의 발현을 확인한 것이며, 4D는 qPCR을 통해 희소돌기아교세포의 마커 유전자들의 발현수준을 비교 분석한 것이고, 4E 및 4F는 pre-OPC로부터 확립된 8주차 스페로이드를 MBP, SOX10 또는 TUJ1으로 염색한 결과를 나타낸 것이며, 4G는 DMSO, T3, Benztropine 또는 Miconazole이 각각 처리된 pre-OPC로부터 형성된 스페로이드를 TUJ1 및 MBP으로 염색한 결과를 나타낸 것이고, 4H 및 4I는 DMSO, T3, Benztropine 또는 Miconazole 처리에 따른 수초 형성 정도를 정량적으로 비교 분석한 결과를 나타낸 것이며, 4J는 Miconazole을 처리한 pre-OPCs로부터 형성된 스페로이드에서 분리한 희소돌기아교세포를 쥐에 이식한 결과를 나타낸 것이며, 4K는 전자현미경으로 관찰하여 수초 형성을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명에 따른 pre-OPCs로부터 희소돌기아교세포를 포함하는 스페로이드(오가노이드)의 확립 방법을 모식도로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 탈수초 질환(demyelinating disease)은 중추신경계 전반에 걸쳐서 희소돌기아교세포의 부재로 나타나는 난치성 신경계 질환으로 이를 치료하기 위한 종래 연구방법은 만능성 줄기세포로부터 희소돌기아교세포를 확립하여 치료하려는 연구가 많이 진행 되었지만, 임상에서 효능을 보이는 세포치료제를 확립하지 못하였고, 특히 희소돌기아교세포는 대뇌 및 척수에서도 극히 소량 존재하는 세포로 알려져 있으며 중추신경계를 구성하는 신경줄기세포에서도 희소돌기아교세포로의 분화율이 낮다고 알려져 있어, 만능성을 포함한 상위단계의 줄기세포로부터 희소돌기아교 세포를 확립하는데 많은 어려움이 있다. 또한 많은 연구에도 불구하고 아직까지 배양 가능한 인간 희소돌기아교 전구세포를 확립하지 못하고 있다.

[0028] 이에 본 발명자들은 희소돌기아교세포로 고도로 분화가 특화된 인간 신경줄기세포를 확립하였고, 이를 이용하여 단기간에 고효율로 희소돌기아교세포가 포함된 오가노이드를 형성할 수 있음을 규명함으로써 탈수초 질환을 치료할 수 있는 효과적인 세포치료제를 제공할 수 있고, 나아가 상기 오가노이드를 이용하여 탈수초 질환 치료제를 스크리닝할 수 있는 방법을 확립하였다.

[0029] 구체적으로 본 발명은, (1) 인간 만능성 줄기세포(Human pluripotent stem cell; hPSC)를 LIF(Leukemia Inhibitory Factor), SB431542 화합물 및 CHIR 99021 화합물을 포함하는 LSC 배지로 배양하여 원시 신경줄기세포(Primitive NSC; pNSC)로 분화시키는 단계; (2) 상기 원시 신경줄기세포를 bFGF, EGF 및 퍼모프아민(Purmorphamine)을 포함하는 FEP 배지로 배양하여 복측 로제트 타입 신경줄기세포(Ventral rosette type NSC; vrNSC)로 분화시키는 단계; (3) 상기 복측 로제트 타입 신경줄기세포를 bFGF, PDGF 및 퍼모프아민(Purmorphamine)를 포함하는 FPP 배지로 배양하여 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포(pre Oligodendrocyte Precursor Cell; pre-OPC)로 분화시키는 단계; 및 (4) 상기 희소돌기아교세포로 분화가 특화

된 신경줄기세포를 RA(retinoic acid) 함유 배지; PDGF(Platelet-derived growth factor), IGF1(Insulin like growth factor), HGF(Hepatocyte growth factor) 및 포스콜린(forskolin) 함유 배지; 및 포스콜린(forskolin), 아스코르빅산 및 T3(3,3′ ,5-triiodo-L-thyronine) 함유 배지;로 순차적으로 배지를 교체하면서 배양하여 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드를 형성하는 단계를 포함하는, 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드의 제조방법을 제공함에 특징이 있다.

[0030] 보다 상세하게 본 발명에 따른 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드의 제조방법을 설명하면 다음과 같다.

[0031] 먼저, (1) 인간 만능성 줄기세포(Human pluripotent stem cell; hPSC)를 LIF(Leukemia Inhibitory Factor), SB431542 화합물 및 CHIR 99021 화합물을 포함하는 배지로 배양하여 원시 신경줄기세포(Primitive NSC; pNSC)로 분화시킨다.

[0032] 상기 인간 만능성 줄기세포는 인체를 구성하는 다양한 세포로 모두 분화할 능력을 가진 줄기세포를 말하는 것으로, 내배엽, 중배엽, 외배엽을 구성하는 거의 모든 종류의 세포로 분화할 수 있는 줄기세포를 통칭한다.

[0033] 상기 인간 만능성 줄기세포는 특정 배지에서 배양하여 원시 신경줄기세포로 분화시키며, 이때 상기 배지는 LIF(Leukemia Inhibitory Factor), SB431542 화합물 및 CHIR 99021 화합물을 포함하는 배지(즉, LSC 배지)를 이용한다.

[0034] 본 발명에서 사용한 상기 LIF(Leukemia Inhibitory Factor)는, 인터루킨-6 사이토카인 계열에 속하는 멤버 중 하나로서, 세포의 증식, 분화 및 생존에 관여하는 인자로 알려져 있다. 또한, 상기 SB431542는 ALK5(Activin Receptor-Like Kinase-5) 억제제로 신속한 분화를 유도하며 염색체 안정성을 향상시키는 역할을 한다. 상기 CHIR 99021은 GSK(glycogen synthase kinase) 억제제로 GSK 신호전달과정에 관여하는 GSK1/2의 업스트림(upstream) 분자인 GSK1/2를 표적으로 하는 물질이다. 상기 CHIR 99021은 아미노피리미딘(aminopyrimidine)으로 표시된다.

[0035] 본 발명에서 사용된 모든 배지는 기초배지(BM:basal medium)를 기본배지로 하며, 기초배지에 특정 성분들을 더 포함한 배지를 세포의 각 배양 단계에서 사용하였다.

[0036] 상기 기초배지는 DMEM/F12, 중탄산나트륨, 비타민 A가 없는 B-27 보충제, N-2 보충제, 페니실린-스트렙토마이신, L-글루타민 및 비필수아미노산을 포함하는 배지를 말하며, 본 발명의 일실시예에서는 DMEM/F12, 543 ug/ml 중탄산나트륨, 1 x 비타민 A가 없는 B-27 보충제, 1 x N-2 보충제, 1% 페니실린-스트렙토마이신, 1% L-글루타민 및 1% 비필수아미노산이 함유된 기초배지를 사용하였다. 또한, 기초배지에 상기 LIF(Leukemia Inhibitory Factor), SB 431542 화합물 및 CHIR 99021 화합물을 포함하는 LSC 배지에서 인간 만능성 줄기세포를 배양함으로써 상기 인간 만능성 줄기세포를 원시 신경줄기세포로 분화 유도하였다. 배양 후에는 분화된 세포는 원시 신경줄기세포의 마커인 PAX6 및 SOX1의 발현을 확인하였다.

[0037] 다음으로, (2) 상기 분화된 원시 신경줄기세포를 배양하여 복측 로제트 타입 신경줄기세포(Ventral rosette type NSC; vrNSC)로 분화시킨다.

[0038] 이때 상기 복측 로제트 타입 신경줄기세포로의 분화를 위해, 상기 분화된 원시 신경줄기세포를 bFGF, EGF 및 퍼모프아민(Purmorphamine)을 포함하는 FEP 배지에서 배양한다.

[0039] 상기 로제트 타입 신경줄기세포는 인간 배아줄기세포의 신경분화 과정의 초기단계의 신경줄기세포를 말하며, 로제트 타입은 원주형의 방사상 형태를 갖는다. 또한 상기 로제트 타입 신경줄기세포는 PAX6 및 SOX1 같은 초기 신경외배엽(neuroectodermal) 마커를 발현하는 세포로 구성되며, 다양한 뉴런 세포 및 신경교세포로 분화할 수 있다.

[0040] 특히 본 발명에서는 복측 로제트 타입 신경줄기세포로의 분화를 위해 bFGF, EGF 및 퍼모프아민(Purmorphamine)을 포함하는 FEP 배지를 이용하였는데, FEP 배지는 기초배지에 bFGF, EGF 및 퍼모프아민(Purmorphamine)이 첨가된 배지를 말한다.

[0041] 상기 퍼모프아민은 퓨린화합물(purine compound)로서, Shh 신호체계에 관여하는 것으로 알려져 있다. 상기 퍼모프아민은 신경줄기세포 유사세포로 역분화를 유도하기 위해 사용되기도 한다.

[0042] 복측 로제트 타입 신경줄기세포로의 분화가 완료되면, 다음으로 (3) 복측 로제트 타입 신경줄기세포를 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포(pre Oligodendrocyte Precursor Cell; pre-OPC)로 분화시키는 단계를

수행한다.

[0043] 이때 상기 분화를 위한 배지는 bFGF, PDGF 및 퍼모프아민(Purmorphamine)를 포함하는 FPP 배지를 이용하여 배양한다. 상기 FPP 배지는 기초배지에 bFGF, PDGF 및 퍼모프아민(Purmorphamine)이 포함된 배지를 말한다.

[0044] 상기 FPP 배지를 이용하여 배양한 결과, 복측 로제트 타입 신경줄기세포로부터 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포를 얻을 수 있었고, 상기 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포에서 희소돌기아교 전구세포의 대표적인 마커인 OLIG2 및 NKX2.2의 발현을 확인할 수 있었다.

[0045] 또한 본 발명에서 상기 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포는 희소돌기아교세포로 분화 운명이 결정된 또는 예정된 신경줄기세포를 의미한다.

[0046] 상기 과정을 통해 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포는 다음으로, 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드가 형성되도록 배양하는 단계를 수행하는데, 구체적으로, (4) 상기 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포를 RA(retinoic acid) 함유 배지; PDGF(Platelet-derived growth factor), IGF1(Insulin like growth factor), HGF(Hepatocyte growth factor) 및 포스콜린(forskolin) 함유 배지; 및 포스콜린(forskolin), 아스코르빅산 및 T3(3,3′,5-triiodo-L-thyronine) 함유 배지;로 순차적으로 배지를 교체하면서 배양함으로써 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드를 형성한다.

[0047] 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포는 3 종류의 배지를 순차적으로 교체하면서 배양하여, 분화된 희소돌기아교세포를 포함하는 뇌 오가노이드를 제조한다.

[0048] 상세하게는, 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포를 RA(retinoic acid) 함유 배지에서 배양하는데, 이때 상기 배지는 기초배지에 0.5uM의 RA 함유 배지를 이용하여 7일 동안 배양을 수행한다.

[0049] 이후 상기 배지를 PDGF 함유 배지로 교체하여 다시 배양을 수행하는데, 즉, 기초배지에 PDGF(Platelet-derived growth factor), IGF1(Insulin like growth factor), HGF(Hepatocyte growth factor) 및 포스콜린(forskolin)을 첨가한 배지를 이용하여 추가로 14일 동안 배양한다.

[0050] 이후 다시 상기 PDGF 함유 배지를 교체포 분화배지인, 기초배지에 포스콜린(forskolin), 아스코르빅산 및 T3(3,3′,5-triiodo-L-thyronine)가 첨가된 배지를 이용하여 배양함을 통해, 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드를 얻을 수 있었다.

[0051] 상기 배지에 첨가된 포스콜린은 다데닐산고리화효소의 촉매소단위를 직접 활성화하여 세포내 cAMP의 농도를 상승시키는 작용을 하며, 트라닐시프로민은 신경말단에서 정상적으로 노르에피네프린을 분해하는 효소인 모노아민 산화효소(MAO)를 억제하는 작용을 한다. 또한, 상기 아스코르빅산은 수용성 비타민의 하나로 강한 항산화성을 가지며, 상기 T3(3,3′,5-triiodo-L-thyronine)은 갑상선 호르몬으로 작용하며 갑상선 기능 저하증에서 기분과 신경 심리학적 기능을 향상시키는 작용을 갖는 것으로 알려져 있다.

[0052] RA(retinoic acid)는 세포핵 안에 존재하는 수용체인 RAR/RXR와 상호작용을 하는 것으로 알려져 있고, 신경세포의 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다.

[0053] 또한 본 발명에 따른 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드를 신속하게 제조하는 방법은, 복측 로제트 타입 신경줄기세포를 bFGF, PDGF 및 퍼모프아민(Purmorphamine)를 포함하는 FPP 배지로 배양하여 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포(pre Oligodendrocyte Precursor Cell; pre-OPC)로 분화시키는 단계; 및 상기 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포를 RA(retinoic acid) 함유 배지; PDGF(Platelet-derived growth factor), IGF1(Insulin like growth factor), HGF(Hepatocyte growth factor) 및 포스콜린(forskolin) 함유 배지; 및 포스콜린(forskolin), 아스코르빅산 및 T3(3,3′,5-triiodo-L-thyronine) 함유 배지;로 순차적으로 배지를 교체하면서 배양하여 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드를 형성하는 단계를 통해 수행될 수 있다.

[0054] 본 발명에 따른 방법은 상기 (1) 내지 (2)의 방법, 즉 원시 신경줄기세포(Primitive NSC; pNSC)로 분화시키는 단계 및 복측 로제트 타입 신경줄기세포(Ventral rosette type NSC; vrNSC)로 분화시키는 단계를 반드시 수행하지 않아도 되며, 어떠한 복측 로제트 타입 신경줄기세포라도 상기 (3) 및 (4)의 단계, 즉 복측 로제트 타입 신경줄기세포를 FPP 배지로 배양하여 pre-OPC로 분화시키고, 상기 pre-OPC를 RA 함유 배지; PDGF, IGF1, HGF 및 포스콜린 함유 배지; 및 포스콜린, 아스코르빅산 및 T3(3,3′,5-triiodo-L-thyronine) 함유 배지;로 순차적으로 배지를 교체하면서 배양하여, 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 희소돌기아교세포를 포함

하는 오가노이드를 신속하게 제조할 수 있다.

[0055] 한편, 본 발명자들은 상기 방법으로 제조된 본 발명의 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 제조된 오가노이드에 대해, 상기 오가노이드안에서 신경교세포(glia)의 분화가 진행되었는지 확인하였는데, 면역염색화학 분석 결과, 분화 2주차에 신경교 전구세포(glial progenitor cell)의 마커인 BLBP의 발현을 확인할 수 있었고 3주차에는 성상교세포(astrocytes)의 전형적인 마커인 S100β 와 GFAP의 발현도 확인할 수 있었으며, 특히 분화 5주차에는 S100β 및 GFAP의 발현이 상당히 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0056] 또한, 상기 오가노이드안에는 성숙한 신경세포의 마커인 TH 및 GABA의 발현도 확인할 수 있었다.

[0057] 따라서 본 발명의 방법으로 제조된 상기 오가노이드에는 희소돌기아교세포 이외에도 성상교세포 및 신경세포가 분화되어 함께 존재하는 것을 확인할 수 있었다.

[0058] 뿐만 아니라, 본 발명의 일실시예에서는 상기 본 발명의 방법으로 제조된 오가노이드와 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포가 아닌 원시 신경줄기세포로부터 종래 2D 분화방법으로 제조된 오가노이드를 대상으로 형태 및 분화 속도를 비교 분석한 결과, 각 방법으로 분화되어 형성된 오가노이드의 형태가 다른 것으로 나타났고, 특히 본 발명에 따른 희소돌기아세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 형성된 오가노이드는 원시 신경줄기세포로부터 형성된 오가노이드보다 신경세포 및 희소돌기아교세포로의 분화가 더 빠르게 진행되었음을 확인할 수 있었다.

[0059] 상기 희소돌기아교세포로의 분화는 본 발명의 방법으로 제조된 오가노이드에서 분화 4주차에 희소돌기아교 전구세포의 마커인 SOX10, OLIG2, PDGFRa 및 O4의 발현을 확인할 수 있었으며, 분화 6주차에는 희소돌기아교세포의 마커인 MBP의 발현을 확인할 수 있었고, 8주차에는 4주차에 비해 희소돌기아교세포 마커들의 발현량이 월등히 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었고, 수초형성(myelination)이 이루어진 것을 확인할 수 있었다.

[0060] 이러한 결과로 본 발명자들은 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 희소돌기아교세포를 다량 포함하는 본 발명의 오가노이드를 탈수초 질환의 치료를 위한 세포치료제로 사용할 수 있음을 알 수 있었고, 또한 상기 오가노이드를 이용하여 탈수초 질환 치료제를 스크리닝할 수 있음을 알 수 있었다.

[0061] 그러므로 본 발명은 본 발명의 방법으로 제조된 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드를 제공할 수 있으며, 상기 오가노이드는 구 형상의 세포 응집체 형태를 갖는다.

[0062] 본 발명에서 상기 "오가노이드(organoid)"는 3D 입체구조를 가지는 세포덩어리를 의미하는 것으로, 오가노이드는 조직 또는 줄기세포에서 제조될 수 있으며, 자가재생 및 분화능력으로 인해 3차원으로 배양될 수 있다. 상기 오가노이드는 세포의 성장 과정에서 주변 환경과 상호 작용하도록 허용되는 환경을 가질 수 있다. 이에 따라, 3D 오가노이드는 실제로 in vivo에서 상호 작용을 하고 있는 장기를 거의 유사 또는 완벽히 모사할 수 있고, 질병의 치료제 개발 및 등을 관찰할 수 있는 훌륭한 모델이 될 수 있다.

[0063] 또한, 본 발명에서 "스페로이드(spheroid)"는 구 형상을 한 세포의 응집체를 의미한다. 실질적으로 구 형상이라고 칭하는 것은 완전한 구 형상의 것에 한정되는 것이 아니라, 약간 편평 형상으로 된 형태도 포함될 수 있다.

[0064] 또한 본 발명은 본 발명에 따른 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드에 후보약물을 처리한 후, 수초 형성 여부를 분석하는 단계를 포함하는, 탈수초 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공할 수 있다.

[0065] 구체적으로, 상기 후보약물 처리에 의해 수초 형성이 촉진되는 경우, 상기 후보약물을 탈수초 질환의 치료제로 판단하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0066] 본 발명의 일실시예에서는, 본 발명에 따른 상기 오가노이드에 수초형성 유도 약물들을 처리한 후, 수초형성 정도를 비교 분석하여, 수초 형성능이 가장 우수한 약물을 선별할 수 있음을 확인하였다.

[0067] 그러므로 본 발명의 상기 오가노이드는 수초형성 또는 재수초 형성 증진 활성을 갖는 약물을 스크리닝 하는데 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 약물의 효능을 분석하는데 사용될 수 있다.

[0068] 또한 본 발명은 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드 또는 상기 오가노이드에서 분리된 희소돌기아교세포를 유효성분으로 포함하는, 탈수초 질환의 예방 또는 치료용 세포치료제 조성물을 제공할 수 있다.

[0069] 뇌의 신경섬유는 대부분 수초(미엘린, myelin)라는 지질단백질로 구성된 조직의 많은 층으로 둘러싸여 있는 구조를 이루고 있으며, 수초는 절연체와 비슷한 역할을 수행하기 때문에, 신경섬유를 따라 정확하고 빠른 신경 충동(neural impulse)을 전달하는데 중요한 역할을 수행하고 있다. 이러한 수초가 국소 손상, 면역 장애, 감염,

영양 결핍, 약물, 또는 알려지지 않은 원인 등에 의하여 손상, 파괴 등이 유발되게 되면, 내부에 있는 신경 섬유에 영구적인 손상이 유도된다. 따라서, 체내에서는 수초가 손상되면 이를 회복시키기 위하여 재수초화가 진행되나, 종종 재수초화가 실패하고 탈수초화로 진행되는 경우가 발생된다. 이러한 탈수초화로 인하여 발생되는 탈수초 질환(demyelinating disease)으로는 다발성 경화증(Multiple sclerosis), 급성 파종성 탈수초(acute disseminated demyelination), 레버 유전성 시각 신경병증(Leber hereditary optic neuropathy), 길랭-바레증후군(Guillain-Barre syndrome), 탈수초성 다발성 신경병증(demyelinating polyneuropathy), 샤르코 마리 투스병(Charcot Marie Tooth) 등이 있다.

[0070] 따라서, 수초가 손상되었을 때 재수초화가 촉진되거나 또는 탈수초화를 억제시키기 위해서 희소돌기아교세포 전구체세포를 모집(recruitment)하고, 모인 전구체세포를 희소돌기아교세포로 분화시킬 수 있는 신규 치료제의 개발이 필요하다.

[0071] 이러한 점에서 본 발명의 방법으로 제조된 오가노이드는 희소돌기아교 전구세포 및 희소돌기아교세포의 분화가 빠르게 진행되어 있어, 다량의 희소돌기아교세포를 포함하고 있으므로, 탈수초화로 인한 다양한 탈수초 질환의 효과적인 치료제로서 사용 가능할 것으로 기대할 수 있다.

[0072] 본 발명에서 상기 “희소돌기아교세포” 및 “희소돌기아교세포 전구체 세포”는 희소돌기아교세포 계통의 세포들, 즉, 궁극적으로 희소돌기아교세포를 발생시키는 신경 전구 세포, 희소돌기아교세포 전구 세포, 및 성숙 및 수초화 희소돌기아교세포를 포함할 수 있으며, 이는 본 발명의 상기 방법에 의해 제조된 오가노이드 안에서 분화된 세포일 수 있다.

[0073] 또한 희소돌기아교세포는 기능적 특성을 가질 수 있는데, 즉, 이들은 뉴런의 수초화 능력 등을 가질 수 있다. 또한 "희소돌기아교세포 전구물질" 또는 “희소돌기아교세포 전구체 세포”는 희소돌기아교세포를 포함하는 후대를 생성할 수 있는 세포를 말한다.

[0074] 그러므로 본 발명의 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드 또는 상기 오가노이드에서 분리된 희소돌기아교세포는 수초화 재생 촉진을 통해, 신경계의 미엘린 수초에서 비정상, 특히 수초의 파괴를 수반하는 탈수초 질환(demyelinating disease)의 치료를 위한 세포치료제 조성물로 사용될 수 있다.

[0075] 본 발명에서 상기 "세포치료제(cellular therapeutic agent)"란, 인간으로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA 규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가, 동종, 또는 이종세포를 체외에서 증식 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 이러한 세포가 질병의 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.

[0076] 상기 "치료"는 상기 세포치료제의 투여로 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

[0077] 본 발명의 세포치료제 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 비경구 투여, 예를 들어, 복강 내 투여, 정맥 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 피내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0078] 상기 조성물은 세포 치료에 일반적으로 사용되는 약제학적 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).

[0079] 또한, 상기 조성물은 세포치료제가 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다.

[0080] 본 발명의 세포치료제 조성물은 질환의 치료를 위하여 치료학적으로 유효한 양의 세포치료제를 포함할 수 있다.

[0081] 또한 상기 “치료학적으로 유효한 양(therapeutically effective amount)”은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다.

[0082] 본 발명의 조성물에 포함되는 세포치료제는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 최적의 세포치료제 함량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 포함하는 것이 중요하다. 예컨대, 본 발명의 세포치료제에 해당하는 세포의 1일 투여량은 1.0×10^{4} 내지 1.0×10^{10} 세포/kg 체중, 바람직하게는 1.0×10^{5} 내지 1.0×10^{9} 세포/kg 체중을 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0083] 또한, 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 세포치료제를 유효성분으로 포함하는 조성물은 직장, 정맥내(intravenous therapy, i.v), 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0084] 본 발명은 포유동물에게 치료학적으로 유효한 양의 본 발명의 상기 세포치료제 조성물을 투여하는 것을 포함하는 치료방법을 제공한다. 여기에서 사용된 용어 포유동물은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.

[0085] 또한 본 발명에서 상기 오가노이드는 추가로 수초 형성 유도약물이 처리된 오가노이드를 세포 치료제로 사용할 수 있으며, 상기 수초 형성 유도약물은 이에 제한되지는 않으나, T3(3,3',5-triiodo-L-thyronine), 미코나졸(Miconazole) 또는 벤즈트로핀(Benztropine)일 수 있다.

[0086] 이상, 본 발명에 따른 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드의 제조방법은 3차원적 오가노이드 형태로 짧은 시간 안에 제조할 수 있어, 기존 20주 이상이 소요되는 2차원적 방법에 비해 월등히 효과적임을 알 수 있었고, 본 발명에 따른 3D 구형체의 오가노이드에는 희소돌기아교세포 뿐만 아니라 신경세포 및 성상교세포도 포함하고 있어, 실제 인간 뇌와 더욱 가까운 뇌 오가노이드를 제공할 수 있다.

[0087] 본 발명의 방법으로 제조된 희소돌기아교세포를 포함하는 오가노이드는 탈수초 질환을 위한 세포치료제로 유용하게 사용할 수 있으며 나아가 탈수초 질환의 치료제를 신속하고 정확하게 스크리닝하기 위한 약물 개발 플랫폼으로도 사용할 수 있다.

[0089] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0091] **<재료 및 실험방법>**

[0092] ① 세포배양

[0093] pNSCs 세포(PAX6 및 SOX1을 발현) 및 pre-OPCs 세포(중간전구세포, OLIG2 및 NKX2.2를 발현)의 배양은 Matrigel(356231, Corning, NY, USA) 포매 전, pNSC 세포를 LSC 배지(LIF, SB431542 및 CHIR99021 함유)를 이용하여 배양하였고, pre-OPC 세포는 FPP 배지(FGF2, PDGF-AA 및 Purmorphamine 함유)를 이용하여 배양하였다. 배양 계대를 고려하여 pNSC 세포는 15 계대(pre-OPCs 단계에 가까움)의 세포로 준비하였다. 세포는 Accutase(EMD Millipore, Burlington, MA, USA)를 이용하여 0일째 분산시키고 초저 부착 플레이트(Corning)에 분주한 후, 포매될 때까지 LSC 또는 FPP 배지에서 유지시켰다. 생성된 신경구(neurospheres, > 200 μm)는 4 일째에 Matrigel 액적에 임배드 시켰다. 임배드된 신경구는 543 μg/ml 중탄산나트륨(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1× N-2 보충제(Thermo Fisher Scientific), 비타민 A가 없는 1×B-27 보충제(Thermo Fisher Scientific), 1% 페니실린-스트렙토마이신, 1% L-글루타민(Thermo Fisher Scientific), 1% 비필수 아미노산(Thermo Fisher Scientific) 및 5 μg/ml 인슐린 (Sigma-Aldrich)이 함유된 DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 로 구성된 기초배지에서 3일 동안 배양하였다. 그 후, 액적을 오비탈 쉐이커로 옮기고 0.5 μM 레티노산 (Sigma-Aldrich)이 보충된 기초 배재에서 추가 1 주 동안 배양하였고, 배지를 10

ng/ml PDGF-AA(Peprotech), 10 ng/ml IGF-1(Peprotech), 10 ng/ml NT-3 (Peprotech), 5 ng/ml HGF(Peprotech) 및 10 μM forskolin(Tocris)이 함유된 기초 배지로 교체하였다. 이후 액적을 10 μM forskolin(Tocris), 60 ng/ml 3,3′ ,5-triiodo-L-thyronine(T3, Sigma-Aldrich) 및 20 μg/ml 아스코르빅산(Peprotech) 및 기초 배지로 구성된 아교 분화 배지(glial differentiation medium)에서 4주 동안 배양하였다. 이후 promyelinating 화합물의 스크리닝을 위해, 4 주된 스페로이드(spheroids)를 DMSO (Sigma-Aldrich), 60ng/ml T3 (Sigma-Aldrich), 1μM 벤즈트로핀(Sigma-Aldrich) 또는 1μM 미코나졸(miconazole, Sigma-Aldrich)로 8주 동안 처리하였다.

[0095] ② 샘플 준비 및 분석

[0096] 스페로이드(Spheroid) 샘플은 O.C.T. 컴파운드(Tissue Tek; Sakura Finetek USA, Inc., Torrance, CA, USA)로 임배드하였고, 20㎛ 두께로 냉동 절편화하였다. 절편들은 0.2 % Triton X-100이 포함된 PBS에서 2 % 정상 당나귀 혈청으로 1시간 동안 블록킹을 수행하였고, 지정된 1차 항체(하기 표 1 및 표 2)로 4℃에서 밤새도록 반응시킨 다음, 실온에서 1 시간 동안 Alexa Fluor 488 또는 594-접합된 이차 항체(Thermo Fisher Scientific)와 반응시켰다. 핵은 1ug/ml DAPI (Sigma-Aldrich)로 5 분 동안 대조 염색하였고, 샘플은 PBS로 3 회 세척하고 Olympus 공초점 레이저 스캐닝 현미경으로 관찰하였다. 또한 이식된 마우스 뇌 준비 및 TEM 분석은 Yun W 등에 의해 발표된 Stem Cells Dev 논문(2019;28:633-648)의 개시 내용에 따라 준비하였다.

표 1

1차 항체

[0097]

Primary antibody	Dilution	Host	Provider
PAX6	1:100	Mouse	DSHB (PAX6)
SOX1	1:100	Goat	R&D Systems (AF3369)
OLIG2	1:200	Rabbit	Merck Millipore (AB9610)
NKX2.2	1:100	Mouse	DSHB (74.5A5)
TUJ1	1:1000	Mouse	BioLegend (801202)
GABA	1:200	Rabbit	Sigma (A2052)
TH	1:200	Rabbit	Merck Millipore (AB152)
5-HT	1:5000	Rabbit	Immunostar (20080)
HB9	1:100	Mouse	DSHB (81.5C10)
ChAT	1:500	Goat	Merck Millipore (AB144P)
BLBP	1:200	Rabbit	Merck Millipore (ABN14)
PDGFRα	1:200	Rabbit	Santacruz (SC-338)
GFAP	1:500	Rabbit	Merck Millipore (AB5804)
S100β	1:500	Mouse	SIGMA-ALDRICH (S2532)
O4	1:200	Mouse	R&D Systems (AB1326)
MBP	1:50	Rat	Abcam (AB7349)
hMitochondria	1:100	Mouse	Merck Millipore (MAB1273)

표 2

2차 항체

[0098]

Secondary antibody	Dilution	Host	Provider
Alexa Fluor 488 (Mouse IgG)	1:500	Donkey	Thermo Fisher (A-21202)
Alexa Fluor 488 (Rabbit IgG)	1:500	Donkey	Thermo Fisher (A-21206)
Alexa Fluor 488 (Goat IgG)	1:500	Donkey	Thermo Fisher (A-11055)
Alexa Fluor 488 (Mouse IgM)	1:500	Goat	Thermo Fisher (A-21042)
Alexa Fluor 488 (Rat IgG)	1:500	Donkey	Thermo Fisher (A-21208)
Alexa Fluor 594 (Mouse IgG)	1:500	Donkey	Thermo Fisher (A-21203)
Alexa Fluor 594 (Rabbit IgG)	1:500	Donkey	Thermo Fisher (A-21207)
Alexa Fluor 594 (Goat IgG)	1:500	Donkey	Thermo Fisher (A-11058)
Alexa Fluor 594 (Rat IgG)	1:500	Donkey	Thermo Fisher (A-21209)

[0100] ③ 유세포 분석

[0101] 스페로이드를 Accutase를 이용하여 기계적으로 해리하고 수집하였다. 이후 차가운 PBS로 3회 세척하고, 5 % 정상 당나귀 혈청으로 15 분 동안 블록킹을 수행한 후, 먼저 S100β 및 GFAP에 대한 1 차 항체로 30 분 동안 반응시킨 다음, Alexa Fluor-conjugated 2 차 항체로 30 분 동안 반응시켰다. 염색 수행 후, 0.5 % 포름 알데히드로 세포를 고정시켰다. 세포는 블록킹 과정에서 0.1 % Triton X-100으로 투과성화 되었다. 이어서 세포를 FACS Verse 유세포 분석기 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

[0103] ④ qPCR 분석

[0104] 정량적 PCR(qPCR) 분석은 cDNA를 대상으로 3회 수행하였다. 음성대조군은 각 샘플의 역전사 음성 블랭크 및 주형이 없는 블랭크를 포함하도록 하였다. 유전자 발현 수준의 측정에서 내부 대조군으로는 GAPDH의 발현 수준을 기준으로 정규화하였다. 또한 qPCR에 사용되는 프라이머는 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

프라이머

[0105]

Genes	Primer sequences (5' to 3')	Type
PDGFRα	CAGTCCTGGTGCTGTTGGTG	Forward
	CCGGCTTAATCCATAGGCTG	Reverse
SOX10	AAGCCCAGGTGAAGACAGAGAC	Forward
	CCATATAGGAGAAGGCCGAGTAGA	Reverse
MBP	CCAGAGCAGCCTCTATGAACAA	Forward
	GGAAGTGAATGAGCCGGTTATC	Reverse
GFAP	GGCAACTCGTACCCAAATTTCCAA	Forward
	TCACACGATTCTCCATCATCCTCC	Reverse
FABP7	GATTTTTGCCCACCCTCTTTCCAA	Forward
	CGCCTAGAGCCTTCATGTACTCAT	Reverse
SOX9	GGCAACTCGTACCCAAATTTCCAA	Forward
	CGCCTAGAGCCTTCATGTACTCAT	Reverse

[0106] 또한 모든 데이터는 3 ~ 6 회 반복 수행한 평균 ± 표준 편차 (SD)로 표시하였고, 결과는 unpaired two-tailed Student's *t* 검정 및 분산 검정 (ANOVA)으로 분석하였다. 0.05 미만의 P값은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. *, P <0.05; **, P <0.01; ***, P <0.001; ****, P <0.0001.

[0108] **<실시예 1>**

[0109] **희소돌기아교세포로의 분화가 특화된 신경줄기세포 확립**

[0110] 본 발명자는 희소돌기아교세포로의 분화가 특화된 신경줄기세포를 확립하기 위해, 다양한 배양 시스템 기반의 실험을 수행하였다. 도 1A에는 hESCs(Human embryonic stem cells)로부터 pre-OPCs 세포로 확립하기까지 각 단계별 세포의 모양 및 배양조건을 나타낸 것이다. 하기는 인간 만능성 줄기세포(Human pluripotent stem cells; hPSCs)에서 희소돌기아교세포로의 분화가 특화된 신경줄기세포(pre-OPCs)의 확립을 위한 세포 배양 방법을 기술하였다.

[0111] 분화를 유도하기 위하여 만능성 줄기세포(Pluripotent stem cells)에서 유래된 모든 세포는 기초 배지(Basal Medium; BM) [DMEM/F12, 543 μg/ml sodium bicarbonate, 1×B-27 Supplement without vitamin A, 1×N-2 Supplement, 1% penicillin-streptomycin, 1% L-glutamine 및 1% non-essential amino acids 함유]를 기본으로 하여 배양하였다. 원시 신경줄기세포(Primitive NSCs, pNSCs)를 확립하기 위하여 만능성 줄기세포를 LSC 배지[BM, 10 ng/ml LIF(Leukemia Inhibitory Factor), 2 μM SB431542 및 3 μM Chir99021 함유] 분화 조건에서 배양하였다(도 1B 참조). LSC 배양액 조건에서 배양 6일 후, 분화된 세포는 원시 신경줄기세포 마커인 PAX6, SOX1을 발현하는 것을 면역화학염색법으로 확인하였다(도 1C 참조). 또한 원시 신경줄기세포를 LSC 배양액에서 계대 배양하였고, 이후 마트리겔(Matrigel)이 코팅된 세포 배양디쉬에 저밀도로 원시 신경줄기세포를 계대시키고 복측 로제트 타입 신경줄기세포(Ventral rosette type NSCs, vrNSCs)로 분화하기 위해 FEP 배지[BM, 20 ng/ml bFGF, 20 ng/ml EGF 및 0.5 μM Purmorphamine 함유] 조건에서 배양하였다. 배양 8 일 후, 로제트 모양의 콜로니가 나타났다. 또한 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포(pre-OPCs)의 확립을 위해, FEP 배양액에서 FPP 배양액[BM, 20 ng/ml bFGF 및 20 ng/ml PDGF 함유]으로 교체하여 배양하였다(도 1D 참조).

[0113] 그 결과, 상기 방법으로 확립된 희소돌기아교세포로의 분화가 특화된 신경줄기세포(pre-OPCs)에서 희소돌기아교전구세포의 대표적인 마커인 OLIG2 및 NKX2.2의 발현이 상당수 증가한 것을 확인하였다(도 1E 참조).

[0114] 또한, PDGF 배양액[BM, 20 ng/ml PDGF, 10 ng/ml NT-3, 10 ng/ml IGF-1, 10 uM Forskolin 및 60 ng/ml T3 함유]으로 교체하여 2주간의 공배양 후(도 1F 참조), 8주간의 분화를 살펴본 결과, 신경교세포의 모양이 나타나는 것을 확인하였고, 해당 세포들은 성상교세포의 대표적인 마커인 GFAP 및 S100β를 발현하는 것으로 나타났다(도 1G 참조). 또한, 희소돌기아교세포에서는 O4, MBP, MAG 등 성숙한 형태의 마커를 발현하는데, 희소돌기아교세포로의 분화가 특화된 신경줄기세포(pre-OPCs)에서 분화된 희소돌기아교세포(oligodendrocytes)에서 O4, MBP, MAG가 발현되고 있음을 확인함에 따라, 상기 방법에 의해 희소돌기아교세포로의 분화가 이루어진 것을 확인하였다(도 1H 참조).

[0116] **<실시예 2>**

[0117] **희소돌기아교세포로의 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 오가노이드 확립**

[0118] 상기 실시예 1에서 확립된 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포(pre-OPCs)로부터 오가노이드를 하기의 방법에 따라 형성시켰고, pre-OPCs로부터 형성된 오가노이드 및 원시 신경줄기세포(pNSCs)로부터 형성된 오가노이드에 대한 비교 분석을 다음과 같은 방법을 통해 수행하였다.

[0119] 먼저, 상기 실시예 1에서 확립된 PAX6 및 SOX-1을 발현하는 원시 신경줄기세포(Primitive NSCs, pNSCs)와 OLIG2 및 NKX2.2를 발현하는 희소돌기아교세포로 특화된 신경줄기세포(pre-OPCs)를 4일간 공배양을 통하여 구(sphere)를 형성하게 한 다음, 마트리겔에 임베딩(Embedding) 후 RA 배양액(BM 및 0.5uM Retinoic Acids(RA) 함유)에서 7일 동안 배양하였다. 이후, PDGF 배양액에서 14일 동안 추가 배양 후, 실험에 따라 5주~9주 동안 교세포(glial) 분화배양액(BM, 10 uM Forskolin, 60 ng/ml T3, 20 ug/ml 아스코르빅산 함유)에서 배양하였다. 이러한 배양 순서에 대한 모식도는 도 2A에 나타내었다. 4주 동안의 배양을 완료한 후, 원시 신경줄기세포와 희소돌기아교세포로의 특화된 신경줄기세포로부터 얻어진 오가노이드들에 대한 특징을 분석하였다.

[0121] 그 결과, 상기 실험에 사용한 원시 신경줄기세포(Primitive NSCs, pNSCs)와 희소돌기아교세포로 특화된 신경줄

기세포(pre-OPCs)의 특징을 면역화학염색법을 통해 확인하였는데, 원시 신경줄기세포는 PAX6 및 SOX-1을 발현하는 것을 확인할 수 있었고, 희소돌기아교세포로 특화된 신경줄기세포는 OLIG2 및 NKX2.2를 발현하는 것을 확인할 수 있었다(도 2B 및 2C). 또한 원시 신경줄기세포와 희소돌기아교세포로의 특화된 신경줄기세포로부터 얻어진 오가노이드들의 모양을 현미경으로 관찰한 결과, 이들 두 가지의 세포가 신경구를 형성하는 것을 확인할 수 있었으나 그 형태는 다른 것으로 확인되었다(도 2D 및 2E 참조). 또한 RA 처리 7일 후의 관찰 결과에서, 원시 신경줄기세포로부터 형성된 오가노이드는 뇌 오가노이드에서 관찰되는 큰 신경 상피 버드의 형성이 확인되는 것으로 나타난 반면, 본 발명의 희소돌기아교세포로의 특화된 신경줄기세포로부터 형성된 오가노이드는 직접 신경분화와 일치하는 방사형의 돌출된 프로세스를 관찰할 수 있었다(도 2F 및 2G 참조).

[0122] 면역염색화학 분석결과, 원시 신경줄기세포로부터 얻어진 오가노이드는 VZ(Ventricular zone)이 크게 형성되는 것으로 나타났고 TUJ1+ 미성숙 뉴런을 포함하는 것으로 나타난 반면, 희소돌기아교세포로의 특화된 신경줄기세포로부터 얻어진 오가노이드에서는 배양 2주째에 작은 VZ의 형성을 확인하였다(도 2H 참조).

[0123] 또한, 다양한 신경세포의 마커 분석결과, 희소돌기아교세포로의 특화된 신경줄기세포로부터 얻어진 오가노이드에서는 성숙한 신경세포의 마커인 TH와 GABA가 나타나는 신경세포로 분화가 촉진된 것을 확인할 수 있었고(도 2I 참조), 나아가 운동뉴런의 마커인 OLIG2가 여전히 발현되는 것으로 확인되었고, 반면 운동뉴런 마커인 HB9+는 관찰되지 않았다(도 2J 참조).

[0124] 이러한 결과를 토대로, 본 발명자들은 본 발명에 따른 희소돌기아세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 형성된 오가노이드는 원시 신경줄기세포로부터 형성된 오가노이드보다 분화가 빠르게 진행되는 것을 확인할 수 있었다.

[0126] **<실시예 3>**

[0127] **신경줄기세포로부터 형성된 오가노이드에서 신경교세포로의 분화 검증**

[0128] 희소돌기아교세포로 특화된 신경줄기세포(pre-OPCs)로부터 얻어진 오가노이드에서 신경교세포로(Glia)의 분화가 빠르게 진행되었는지를 면역염색화학법을 통해 분석하였다.

[0130] 그 결과, 신경교세포로의 분화 2주차에 신경교 전구세포(Glial progenitor cells)의 마커인 BLBP가 pre-OPCs로부터 형성된 오가노이드(스페로이드)에서 발현되는 것을 확인하였고(도 3A), 3주차에는 성상교세포(astrocytes)의 전형적인 마커인 S100β 와 GFAP의 발현을 면역염색화학법(도 3B) 및 유세포 분석법(도 3C)을 통해 확인할 수 있었다. 반면, 원시 신경줄기세포(pNSCs)로부터 형성된 오가노이드에서는 분화 4주차에서도 이러한 마커의 발현을 확인할 수 없었으며, 분화 5주차의 경우, S100β 와 GFAP의 발현도 매우 미비한 것으로 나타났다.

[0131] 오가노이드의 특장점으로 알려진 형태학적으로 다양한 성상교세포가 존재하는 것을 면역염색화학법을 통해 확인할 수 있었고(도 3D), 유전자 발현 또한 다양한 성상교세포가 혼합되어 있는 것을 확인할 수 있었다(도 3E).

[0132] 또한, 본 발명에 따른 희소돌기아교세포로 특화된 신경줄기세포로부터 오가노이드를 형성하는 배양 방법은 기존 2D 분화 방법에 비해 더 짧은 시간에 오가노이드로부터 성상교세포로의 분화 효율을 월등히 높일 수 있는 것으로 나타났다(도 3F 참조).

[0134] 따라서 본 발명에 따른 희소돌기아교세포로 특화된 신경줄기세포로부터 오가노이드를 형성할 수 있는 배양방법 및 상기 방법으로 형성된 오가노이드는 성상교세포로의 분화가 빠른 특징이 있고, 실제 인간의 뇌와 유사하게 다양한 성상교세포가 혼합하여 존재하는 특징이 있어, 뇌질환의 치료를 위한 세포치료제로서 더욱 효과적으로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

[0135]

[0136] **<실시예 4>**

[0137] **신경줄기세포로부터 형성된 오가노이드에서 희소돌기아교세포로의 분화 및 수초 형성능 검증**

[0138] 나아가 본 발명자들은 본 발명에 따른 희소돌기아교세포로 특화된 신경줄기세포로부터 얻어진 오가노이드 안에

서 희소돌기아교세포로의 분화가 빠르게 진행되었는지를 면역염색화학법으로 분석하였다.

[0140] 그 결과, 희소돌기아교세포로 특화된 신경줄기세포로부터 얻어진 오가노이드 안에서 분화 4주차에 희소돌기아교 전구세포의 마커인 SOX10의 발현을 확인하였고(도 4A), SOX10 양성 세포에서 OLIG2, PDGFRa 및 O4를 발현하는 것을 확인할 수 있었으며(도 4B), 6주차에는 희소돌기아교세포 마커인 MBP의 발현도 확인할 수 있었다(도 4C). 또한, 8주차의 오가노이드는 4주차의 오가노이드에 비해 희소돌기아교세포 관련 마커들의 발현량이 증가한 것으로 나타났고(도 4D 참조), 특히 8주차에는 오가노이드 안에서 시험관 내 수초(In vitro myelination) 형성이 이루어지는 것을 확인하였다(도 4E 및 4F).

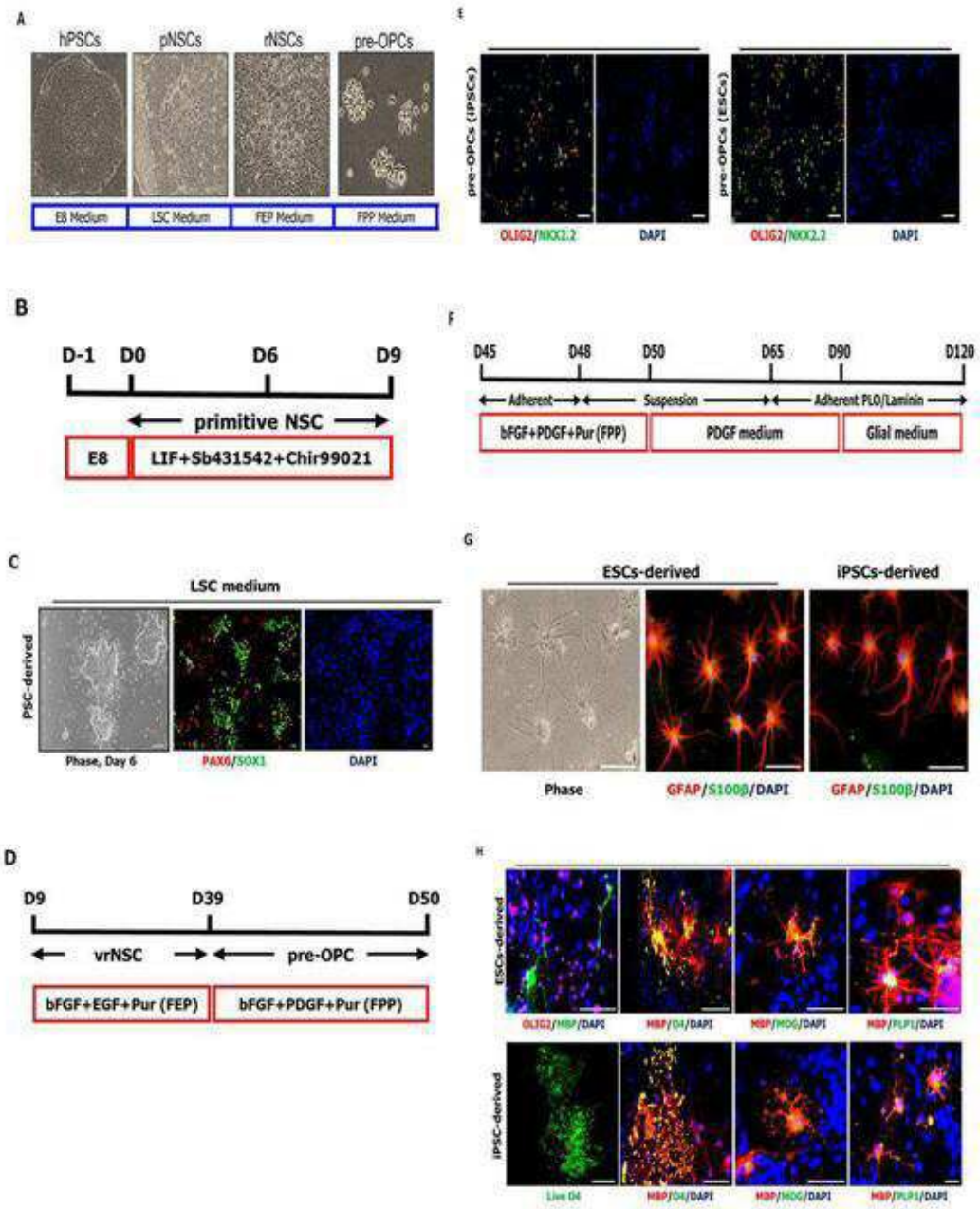
[0141] 나아가 본 발명자들은 본 발명에 따른 오가노이드 배양법을 이용하여 수초 형성능 평가를 통한 약물 스크리닝이 가능한지를 확인하기 위해, 기존에 재수초 형성(remyelination) 유도약물로 알려진 T3 (60 ng/ml), Miconazole (1uM) 및 Benztropine (1uM)을 상기 오가노이드에 처리한 결과, 대조군인 DMSO를 처리한 군에 비해 상기 약물을 처리한 군에서, 수초 형성이 더 많이 진행된 것을 확인할 수 있었고(도 4G), 구체적으로 상기 약물 중에서 특히 Miconazole을 처리한 오가노이드에서 가장 많은 양의 수초가 형성된 것을 확인할 수 있었다(도 4H 및 4I). 또한 본 발명자들은 Miconazole을 처리한 오가노이드에서 희소돌기아교세포를 분리한 후, 수초가 없는 Shiverer 쥐에 이식한 결과 MBP+ 희소돌기아교세포, 즉 수초가 형성되는 것을 확인하였고(도 4J 참조), 이식 후 12주 후에 전자현미경을 통해 수초 집단이 형성된 것을 확인할 수 있었다.

[0143] 따라서, 상기 결과를 토대로 본 발명자들은 본 발명에 의한 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 오가노이드를 형성할 수 있는 배양 방법은 원시 신경줄기세포를 사용하는 것에 비하여 더 짧은 시간 안에 희소돌기아교세포 및 성상교세포로의 분화가 가능하고 또한 재수초 형성능을 평가할 수 있어, 탈수초성 질환의 치료를 위한 약물 스크리닝에 유용하게 사용할 수 있음을 알 수 있었고, 희소돌기아교세포로 분화가 특화된 신경줄기세포로부터 형성된 오가노이드는 탈수초성 질환의 치료를 위한 세포치료제로 유용하게 사용 가능함을 알 수 있었다.

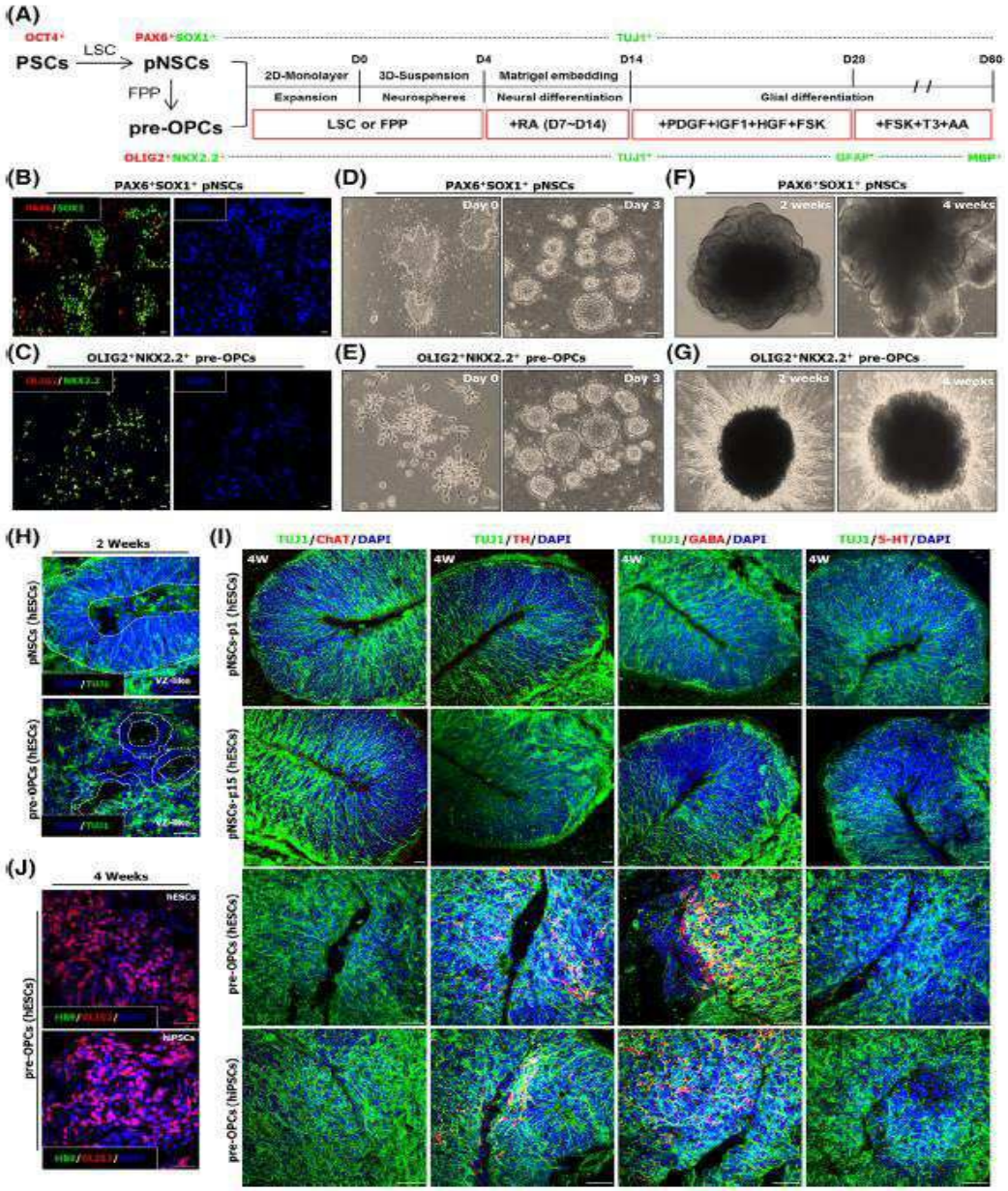
[0145] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

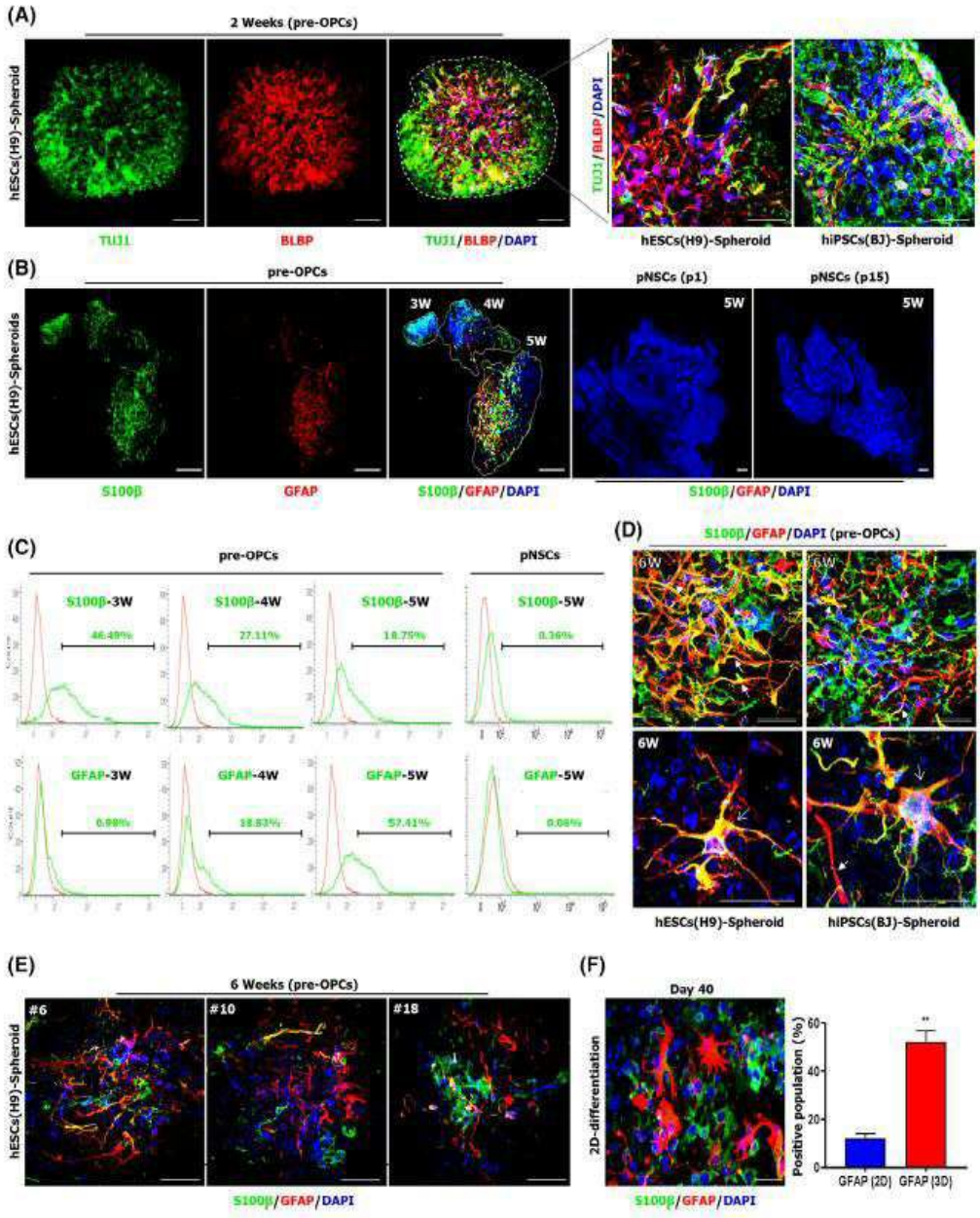
도면1


A
hPSCs
pNSCs
rNSCs
pre-OPCs
E8 Medium
LSC Medium
FEP Medium
FPP Medium
E
pre-OPCs (iPSCs)
pre-OPCs (ESCs)
OLIG2/NKX2.2
DAPI
B
D-1
D0
D6
D9
primitive NSC
E8
LIF+Sb431542+Chir99021
F
D45
D48
D50
D65
D90
D120
Adherent
Suspension
Adherent PLO/Laminin
bFGF+PDGF+Pur (FPP)
PDGF medium
Glial medium
C
LSC medium
PSC-derived
Phase, Day 6
PAX6/SOX1
DAPI
G
ESCs-derived
iPSCs-derived
Phase
GFAP/S100β/DAPI
GFAP/S100β/DAPI
D
D9
D39
D50
vrNSC
pre-OPC
bFGF+EGF+Pur (FEP)
bFGF+PDGF+Pur (FPP)
H
ESCs-derived
iPSC-derived
OLIG2/MBP/DAPI
MBP/O4/DAPI
MBP/MOG/DAPI
MBP/PLP1/DAPI
Live O4
MBP/O4/DAPI
MBP/MOG/DAPI
MBP/PLP1/DAPI

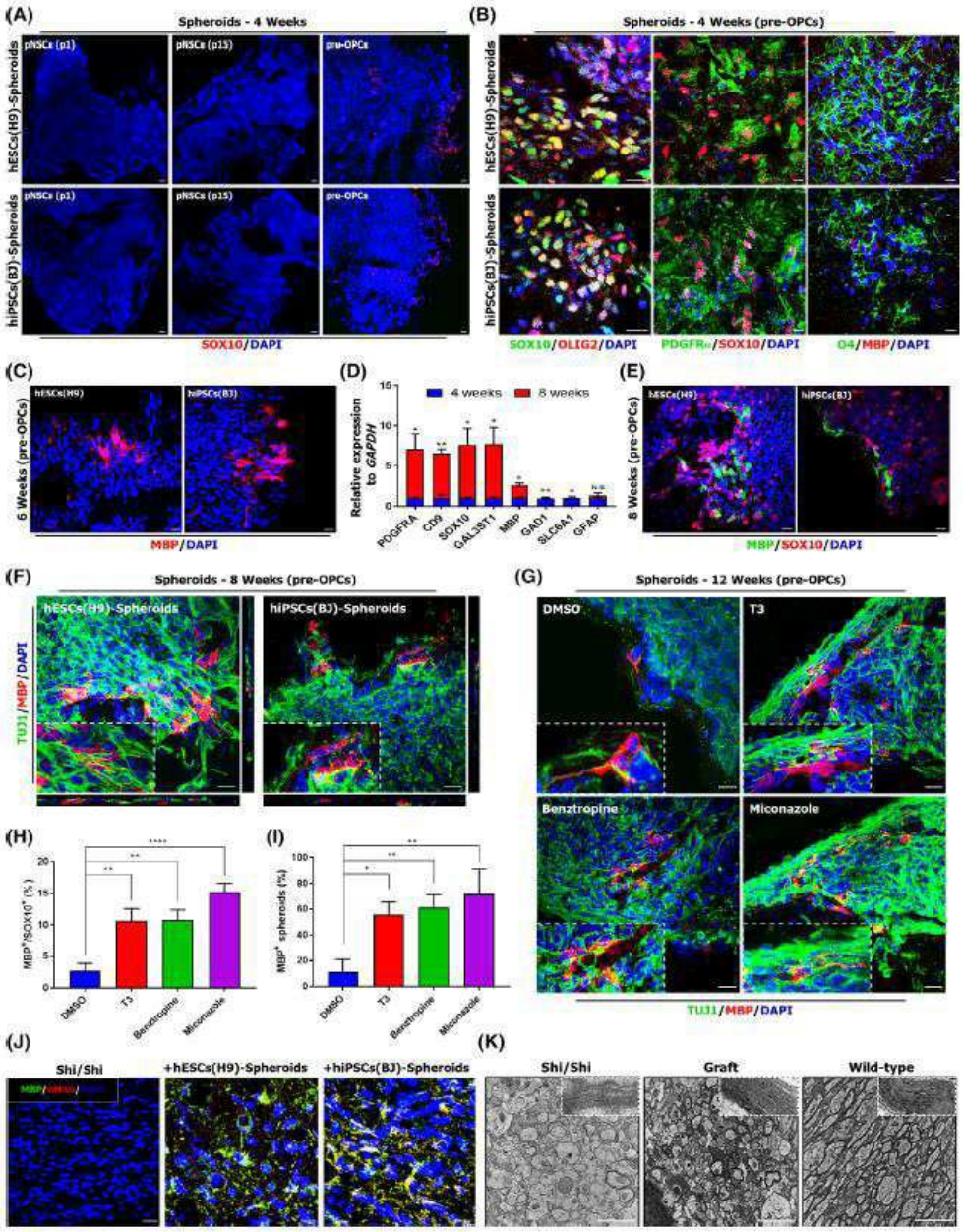
도면2


(A)
PSCs
LSC
pNSCs
FPP
pre-OPCs
D0
D4
D14
D28
D60
2D-Monolayer
Expansion
3D-Suspension
Neurospheres
Matrigel embedding
Neural differentiation
Glial differentiation
LSC or FPP
+RA (D7~D14)
+PDGF+IGF1+HGF+FSK
+FSK+T3+AA
(B)
PAX6+SOX1+ pNSCs
(C)
OLIG2+NKX2.2+ pre-OPCs
(D)
PAX6+SOX1+ pNSCs
Day 0
Day 3
(E)
OLIG2+NKX2.2+ pre-OPCs
Day 0
Day 3
(F)
PAX6+SOX1+ pNSCs
2 weeks
4 weeks
(G)
OLIG2+NKX2.2+ pre-OPCs
2 weeks
4 weeks
(H)
2 Weeks
pNSCs (hESCs)
pre-OPCs (hESCs)
VZ-like
(I)
TUJ1/ChAT/DAPI
TUJ1/TH/DAPI
TUJ1/GABA/DAPI
TUJ1/5-HT/DAPI
4W
pNSCs-p1 (hESCs)
pNSCs-p15 (hESCs)
pre-OPCs (hESCs)
pre-OPCs (hiPSCs)
(J)
4 Weeks
pre-OPCs (hESCs)
hESCs
hiPSCs

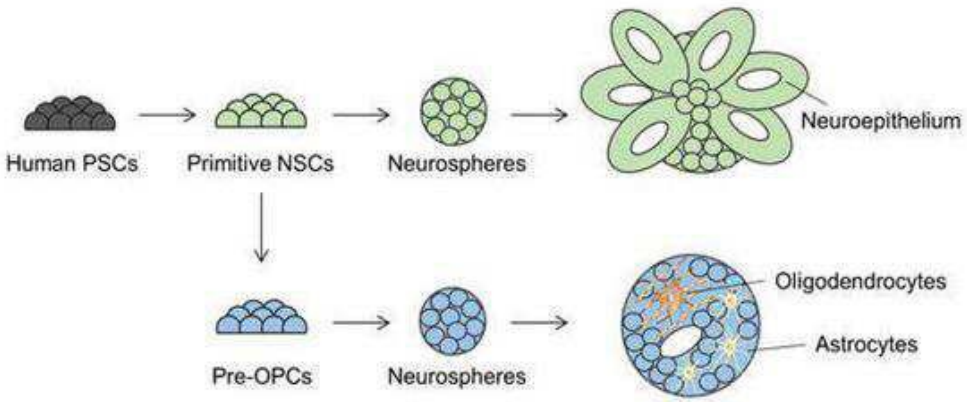
도면3


(A)
2 Weeks (pre-OPCs)
hESCs(H9)-Spheroid
TUJ1
BLBP
TUJ1/BLBP/DAPI
hESCs(H9)-Spheroid
hiPSCs(BJ)-Spheroid
(B)
pre-OPCs
pNSCs (p1)
pNSCs (p15)
hESCs(H9)-Spheroids
3W
4W
5W
5W
5W
S100β
GFAP
S100β/GFAP/DAPI
S100β/GFAP/DAPI
(C)
pre-OPCs
pNSCs
S100β-3W
S100β-4W
S100β-5W
S100β-5W
GFAP-3W
GFAP-4W
GFAP-5W
GFAP-5W
(D)
S100β/GFAP/DAPI (pre-OPCs)
6W
6W
6W
6W
hESCs(H9)-Spheroid
hiPSCs(BJ)-Spheroid
(E)
6 Weeks (pre-OPCs)
hESCs(H9)-Spheroid
#6
#10
#18
S100β/GFAP/DAPI
(F)
Day 40
2D-differentiation
S100β/GFAP/DAPI
Positive population (%)
60
40
20
0
**
GFAP (2D)
GFAP (3D)

도면4


(A)
Spheroids - 4 Weeks
hESCs(H9)-Spheroids
hiPSCs(BJ)-Spheroids
pNSCs (p1)
pNSCs (p15)
pre-OPCs
SOX10/DAPI
(B)
Spheroids - 4 Weeks (pre-OPCs)
SOX10/OLIG2/DAPI
PDGFRα/SOX10/DAPI
O4/MBP/DAPI
(C)
6 Weeks (pre-OPCs)
MBP/DAPI
(D)
4 weeks
8 weeks
Relative expression to GAPDH
PDGFRA
CD9
SOX10
GAL3ST1
MBP
GAD1
SLC6A1
GFAP
(E)
8 Weeks (pre-OPCs)
MBP/SOX10/DAPI
(F)
Spheroids - 8 Weeks (pre-OPCs)
TUJ1/MBP/DAPI
(G)
Spheroids - 12 Weeks (pre-OPCs)
DMSO
T3
Benztropine
Miconazole
TUJ1/MBP/DAPI
(H)
MBP+/SOX10+ (%)
(I)
MBP+ spheroids (%)
(J)
Shi/Shi
+hESCs(H9)-Spheroids
+hiPSCs(BJ)-Spheroids
(K)
Shi/Shi
Graft
Wild-type

도면5


Human PSCs
Primitive NSCs
Neurospheres
Neuroepithelium
Pre-OPCs
Neurospheres
Oligodendrocytes
Astrocytes