



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0056073
(43) 공개일자 2025년04월25일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
C12N 5/0697 (2013.01)
C12N 5/067 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-0178393</p> <p>(22) 출원일자 2023년12월11일
심사청구일자 2023년12월11일</p> <p>(30) 우선권주장
1020230138605 2023년10월17일 대한민국(KR)</p> | <p>(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)</p> <p>(72) 발명자
김중훈
서울특별시 강북구 삼양로27길 80 (미아동, 두산위브트레지움아파트)</p> <p>지건유
서울특별시 노원구 공릉로46길 32 (공릉동, 삼익포레스트아파트)</p> <p>(74) 대리인
특허법인(유)남아이피그룹, 특허법인 남앤남</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 16 항

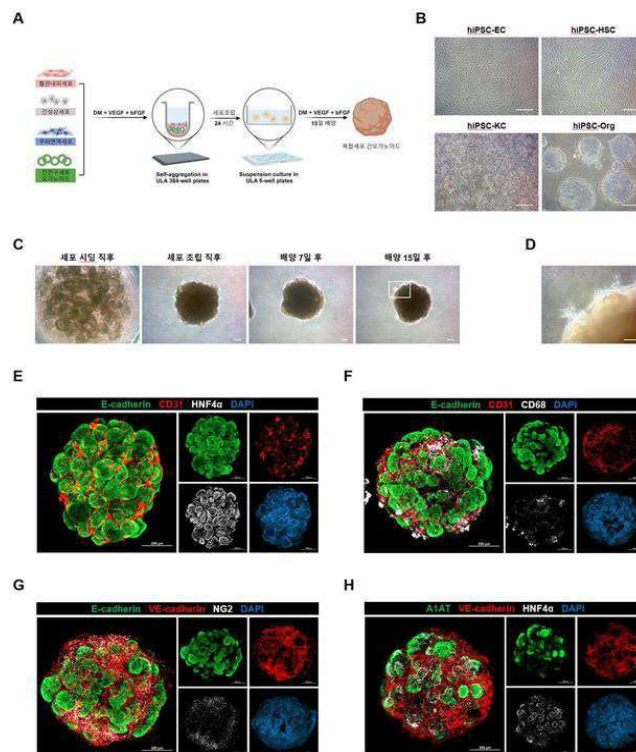
(54) 발명의 명칭 **비알코올성 지방간염 모델링을 위한 줄기세포 유래 복합세포 간오가노이드 및 이의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 비알코올성 지방간염 모델링을 위한 줄기세포 유래 복합세포 간오가노이드 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 간 전구세포 오가노이드 및 간의 비실질세포(non-parenchymal cell)가 조합되어 분화된 복합세포 간오가노이드, (1) 인간 유도만능 줄기세포로부터 분화된 간 전구세포 오가노이드를 수득하는

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1



단계; (2) 인간 유도만능 줄기세포로부터 분화된 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포를 각각 수득하는 단계; 및 (3) 상기 (1)단계에서 수득한 간 전구세포 오가노이드 및 상기 (2) 단계에서 수득한 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포를 혼합하고 배양하여 복합세포 간오가노이드를 형성하는 단계를 포함하는 복합세포 간오가노이드의 제조방법, 상기 본 발명의 복합세포 간오가노이드에 지방산을 처리하는 단계를 포함하는 비알콜성 지방간염 특성을 갖는 복합세포 간오가노이드의 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 비알콜성 지방간염 특성을 갖는 복합세포 간오가노이드에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12N 2500/38 (2013.01)
C12N 2501/119 (2013.01)
C12N 2501/12 (2013.01)
C12N 2501/155 (2013.01)
C12N 2501/165 (2013.01)
C12N 2501/345 (2013.01)
C12N 2501/39 (2013.01)
C12N 2501/727 (2013.01)
C12N 2506/45 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1415184206
과제번호	20009350
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술기획평가원
연구사업명	3D생체조직칩기반신약개발플랫폼구축기술개발사업(산업부)
연구과제명	인간 줄기세포 유래 장기유사체 모델 기반 독성 및 약물대사 측정표준 기술 개발
기 여 율	7/10
과제수행기관명	한국화학연구원부설안전성평가연구소
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711179434
과제번호	00070637
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	(재단)범부처재생의료기술개발사업단
연구사업명	범부처재생의료기술개발사업
연구과제명	분화 신경외배엽 세포외소포/MFG-e8 기반 내재성 줄기세포의 병적 미세환경 회생기술 및 이를 활용한 중추신경 조직재생 후보물질 개발
기 여 율	3/10
과제수행기관명	고려대학교산학협력단
연구기간	2023.01.01 ~ 2023.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

간 전구세포 오가노이드 및 간의 비실질세포(non-parenchymal cell)가 조합되어 분화된 복합세포 간오가노이드.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 간 전구세포 오가노이드 및 간의 비실질세포는 인간 유도만능 줄기세포(human induced pluripotent stem cell)로부터 분화된 것을 특징으로 하는, 복합세포 간오가노이드.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 간의 비실질세포는 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포인 것을 특징으로 하는, 복합세포 간오가노이드.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 복합세포 간오가노이드는 인간 유도만능 줄기세포로부터 분화된 간 전구세포 오가노이드가 60~70개, 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포가 25000~35000 : 4500~5500 : 4500~5500의 세포수의 비로 조합되어 있는 것을 특징으로 하는, 복합세포 간오가노이드.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 복합세포 간오가노이드는 간 전구세포 오가노이드, 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포가 하나의 단위체로 세포 조립되어 있는 것을 특징으로 하는, 복합세포 간오가노이드.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 복합세포 간오가노이드는,

관형 혈관 네트워크가 형성되어 있고, 성숙 간세포 표지자들이 발현되고 및 요소생성과 약물대사효소 활성을 모두 가지고 있어, 생체 간과 유사도가 높은 것을 특징으로 하는, 복합세포 간오가노이드.

청구항 7

(1) 인간 유도만능 줄기세포로부터 분화된 간 전구세포 오가노이드를 획득하는 단계;

(2) 인간 유도만능 줄기세포로부터 분화된 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포를 각각 획득하는 단계; 및

(3) 상기 (1)단계에서 획득한 간 전구세포 오가노이드 및 상기 (2) 단계에서 획득한 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포를 혼합하고 배양하여 복합세포 간오가노이드를 형성하는 단계를 포함하는,

복합세포 간오가노이드의 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 (3) 단계의 배양은, B27 minus vitamin A, BMP7, FGF19, HGF, [Leu¹⁵]-Gastrin 1, N-acetyl-L-cysteine, A83-01, DAPT, Dexamethasone, VEGF, bFGF 및 matrigel을 포함하는 배지로 배양하는 것을 특징으로 하는, 복합 세포 간오가노이드의 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 (3) 단계는, 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포를 혼합한 혼합세포의 50% 세포수에 해당되는 혼합 세포를 세포배양 웰에 분주하고 상기 혼합세포가 웰 바닥에 가라앉도록 한 후, 상기 간 전구세포 오가노이드를 상기 혼합세포가 가라앉은 웰에 분주한 다음, 상기 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포를 혼합한 혼합세포의 남은 50% 세포수에 해당되는 혼합세포를 상기 웰에 분주하고 배양하여 세포 조립을 통해 복합세포 간오가노이드를 형성하도록 하는 것을 특징으로 하는, 복합세포 간오가노이드의 제조방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 간 전구세포 오가노이드는 60~70개, 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포는 25000~35000 : 4500~5500 : 4500~5500의 세포수의 비율로 사용되는 것을 특징으로 하는, 복합세포 간오가노이드의 제조방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 복합세포 간오가노이드는 관형 혈관 네트워크가 형성되어 있고, 성숙 간세포 표지자들이 발현되고 및 요소 생성과 약물대사효소 활성을 모두 가지고 있어, 생체 간과 유사도가 높은 것을 특징으로 하는, 복합세포 간오가노이드의 제조방법.

청구항 12

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 복합세포 간오가노이드에 지방산을 처리하는 단계를 포함하는,

비알콜성 지방간염 특성을 갖는 복합세포 간오가노이드의 제조방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 지방산의 처리는 지방산과 알부민이 결합된 지방산-알부민 결합체를 복합세포 간오가노이드의 배지에 처리하는 방법으로 수행하는 것을 특징으로 하는, 비알콜성 지방간염 특성을 갖는 복합세포 간오가노이드의 제조방법.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 지방산은 소듐팔미테이트 및 소듐올레이트가 1:1의 몰비율로 혼합된 지방산 혼합액이고,

상기 지방산-알부민 결합체는 지방산과 알부민이 5:1의 몰비율로 결합된 것을 특징으로 하는, 비알콜성 지방간염 특성을 갖는 복합세포 간오가노이드의 제조방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 비알콜성 지방간염 특성을 갖는 복합세포 간오가노이드는,

지방증(steatosis) 유도,

염증반응 유도,

모세혈관화(capillarization) 현상,

세포 스트레스 유도, 및

간 섬유화 현상이 나타나는 것을 특징으로 하는, 비알콜성 지방간염 특성을 갖는 복합세포 간오가노이드의 제조 방법.

청구항 16

제12항 내지 제15항 중에서 선택되는 어느 한 항의 방법으로 제조된, 비알콜성 지방간염 특성을 갖는 복합세포 간오가노이드.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비알콜성 지방간염 모델링을 위한 줄기세포 유래 복합세포 간오가노이드 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비알콜성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 과도한 음주 이력이 없음에도 불구하고 간에 지방이 과축적되는 비알콜성 지방간(non-alcoholic fatty liver, NAFL) 상태와 지방간이 지속됨에 따라 간 염증 및 간세포 풍선변성(hepatocyte ballooning)이 동반되는 NASH(비알콜성 지방간염) 상태를 지칭한다. 특히, NASH의 경우 장기간 지속 시 간 이식이 절대적으로 필요한 중증 간 질환인 간경화증(liver cirrhosis) 및 간암(hepatocellular carcinoma)으로 악화될 확률이 매우 높은 것으로 알려져 있다.

[0003] 최근 통계에 따르면 전 세계 32%, 국내 30.3%의 인구가 NAFLD를 겪고 있으나, 현재 FDA 승인을 받은 NASH 치료제는 부재하며, 이에 따라 신약 개발 및 NASH의 발병과 억제 기전 규명을 위한 다양한 NASH 동물모델과 세포모델이 개발되는 추세이다. 최근 윤리적 문제 및 종 간 차이(species difference)로 인해 동물모델이 아닌 다양한 세포모델이 개발되었으며 특히, 기존의 2차원 세포모델보다 개선된 생체유사도를 보이는 것으로 알려진 3차원 세포모델인 오가노이드(organoid)를 활용한 NASH 모델링 (modelling) 연구가 활발히 진행 중이다.

[0004] 현재 간오가노이드를 기반으로 NAFL 혹은 NASH 유도 및 직접적으로 관련된 기술들이 존재 하지만, 개발된 기술들의 경우, NASH 모델링에 핵심적인 혈관내피세포(endothelial cell), 간성상세포(hepatic stellate cell), 쿠퍼면역세포(Kupffer cell)와 같은 간의 비실질세포(non-parenchymal cell)가 부재한 기술이거나, 간의 비실질세포를 포함하는 기술일 경우 간세포와 비실질세포가 젤(gel) 형태의 세포 배양 매트릭스 안에 일부 산재하여 존재하는 형태에 불과하다.

[0005] 따라서 종래 기술은 실제 생체 간과 다르게 NAFLD로 인한 비실질세포 특이적인 질환 특성들과, 간 구성 세포들 사이의 직접적인 접촉을 통한 상호작용에서 기인한 질환의 개시 및 심화 과정을 정확하게 반영하기 어렵다는 제한점이 있다.

[0006] 그러므로 이러한 종래 문제점을 개선할 수 있는 보다 생체 간과 유사한 간 오가노이드의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 10-2022-0168167

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에 본 발명자들은 간세포와 3종의 간 비실질세포인 혈관내피세포, 간성상세포, 쿠퍼면역세포가 개별 오가노이드 단위체 안에 모두 포함되어 있는 복합세포 간오가노이드의 제조기술을 개발하였고, 개발한 본 발명의 복합세

포 간오가노이드를 대상으로 NASH를 유도함으로써 NASH의 질병 연구 및 치료제 개발을 위한 생체 유사조직 모델을 확립함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 간 전구세포 오가노이드 및 간의 비실질세포(non-parenchymal cell)가 조합되어 분화된 복합세포 간오가노이드를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은, (1) 인간 유도만능 줄기세포로부터 분화된 간 전구세포 오가노이드를 수득하는 단계; (2) 인간 유도만능 줄기세포로부터 분화된 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포를 각각 수득하는 단계; 및 (3) 상기 (1)단계에서 수득한 간 전구세포 오가노이드 및 상기 (2) 단계에서 수득한 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포를 혼합하고 배양하여 복합세포 간오가노이드를 형성하는 단계를 포함하는, 복합세포 간오가노이드의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 본 발명의 복합세포 간오가노이드에 지방산을 처리하는 단계를 포함하는, 비알콜성 지방간염 특성을 갖는 복합세포 간오가노이드의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 본 발명의 방법으로 제조된 비알콜성 지방간염 특성을 갖는 복합세포 간오가노이드를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 그러므로 본 발명은 간 전구세포 오가노이드 및 간의 비실질세포(non-parenchymal cell)가 조합되어 분화된 복합세포 간오가노이드를 제공한다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 간 전구세포 오가노이드 및 간의 비실질세포는 인간 유도만능 줄기세포(human induced pluripotent stem cell)로부터 분화된 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 간의 비실질세포는 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 복합세포 간오가노이드는 인간 유도만능 줄기세포로부터 분화된 간 전구세포 오가노이드 60~70개와, 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포가 25000~35000 : 4500~5500 : 4500~5500의 세포수의 비로 조합되어 있는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 복합세포 간오가노이드는 간 전구세포 오가노이드, 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포가 하나의 단위체로 세포 조립되어 있는 것일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 복합세포 간오가노이드는, 관형 혈관 네트워크가 형성되어 있고, 성숙 간세포 표지자들이 발현되고 및 요소생성과 약물대사효소 활성을 모두 가지고 있어, 생체 간과 유사도가 높은 것일 수 있다.

[0019] 또한 본 발명은, (1) 인간 유도만능 줄기세포로부터 분화된 간 전구세포 오가노이드를 수득하는 단계; (2) 인간 유도만능 줄기세포로부터 분화된 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포를 각각 수득하는 단계; 및 (3) 상기 (1)단계에서 수득한 간 전구세포 오가노이드 및 상기 (2) 단계에서 수득한 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포를 혼합하고 배양하여 복합세포 간오가노이드를 형성하는 단계를 포함하는, 복합세포 간오가노이드의 제조방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (3) 단계의 배양은, B27 minus vitamin A, BMP7, FGF19, HGF, [Leu¹⁵]-Gastrin 1, N-acetyl-L-cysteine, A83-01, DAPT, Dexamethasone, VEGF, bFGF 및 matrigel을 포함하는 배지로 배양하는 것일 수 있다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 (3) 단계는, 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포를 혼합한 혼합세포의 50% 세포수에 해당되는 혼합세포를 세포배양 웰에 분주하고 상기 혼합세포가 웰 바닥에 가라앉도록 한 후, 상기 간 전구세포 오가노이드를 상기 혼합세포가 가라앉은 웰에 분주한 다음, 상기 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포를 혼합한 혼합세포의 남은 50% 세포수에 해당되는 혼합세포를 상기 웰에 분주하고 배양하여 세포 조립을 통해 복합세포 간오가노이드를 형성하도록 하는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 간 전구세포 오가노이드는 60~70개, 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포는 25000~35000 : 4500~5500 : 4500~5500의 세포수의 비율로 사용할 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 복합세포 간오가노이드는 관형 혈관 네트워크가 형성되어 있고, 성숙 간세포

포 표지자들이 발현되고 및 요소생성과 약물대사효소 활성을 모두 가지고 있어, 생체 간과 유사도가 높은 것일 수 있다.

[0024] 또한 본 발명은 본 발명에 따른 복합세포 간오가노이드에 지방산을 처리하는 단계를 포함하는, 비알콜성 지방간염 특성을 갖는 복합세포 간오가노이드의 제조방법을 제공한다.

[0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 지방산의 처리는 지방산과 알부민이 결합된 지방산-알부민 결합체를 복합세포 간오가노이드의 배지에 처리하는 방법으로 수행하는 것일 수 있다.

[0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 지방산은 소듐팔미테이트 및 소듐올레이트가 1:1의 몰비율로 혼합된 지방산 혼합액이고, 상기 지방산-알부민 결합체는 지방산과 알부민이 5:1의 몰비율로 결합된 것일 수 있다.

[0027] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 비알콜성 지방간염 특성을 갖는 복합세포 간오가노이드는, 지방증(steatosis) 유도, 염증반응 유도, 모세혈관화(capillarization) 현상, 세포 스트레스 유도 및 간 섬유화 현상이 나타나는 것일 수 있다.

[0028] 나아가 본 발명은 본 발명의 방법으로 제조된 비알콜성 지방간염 특성을 갖는 복합세포 간오가노이드를 제공한다.

발명의 효과

[0029] 본 발명에서 제공하는 간 전구세포 오가노이드 및 간의 비실질세포(non-parenchymal cell)가 조합되어 분화된 복합세포 간오가노이드는 인간 유도만능줄기세포 유래의 간 전구세포 오가노이드 및 간의 비실질세포들을 모두 포함하여 제조된 복합세포 간오가노이드로서, 관형 혈관 네트워크가 형성되어 있고, 성숙 간세포 표지자들이 발현되고 및 요소생성과 약물대사효소 활성을 모두 가지고 있어, 생체 간과 유사도가 매우 높은 특징을 갖는다. 또한 본 발명은 본 발명의 복합세포 간오가노이드에 지방산을 처리할 경우, 비알콜성 지방간염의 질환특징을 갖는 복합세포 간오가노이드의 제조가 가능함을 확인함으로써, 비알콜성 지방간염 질환의 특성, 약물 독성 평가 및 약물 스크리닝 등에 유용하게 사용될 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명의 복합세포 간오가노이드는 간세포와 간 비실질세포들이 개별 오가노이드 단위에서 공존하므로, 직접적인 세포 간 접촉을 통한 상호작용을 반영할 수 있는 효과가 있고, 혈관내피세포가 단순 세포 덩어리가 아닌 혈관화(vascularization)에 따른 분기된 혈관 형태(branched vasculature)로 존재하고 있어 비알콜성 지방간염과 관련된 혈관내피세포의 질환 특성을 오가노이드 수준에서 연구할 수 있는 모델링을 제공할 수 있는 효과가 있다.

[0031] 뿐만 아니라 본 발명의 복합세포 간오가노이드는 96 웰이 아닌 384 웰을 제작 플랫폼으로 활용함에 따라, 추후 자동화를 통한 대량생산 및 고속대량 스크리닝(high-throughput screening)과 쉽게 호환 가능한 3차원 세포모델로 활용될 수 있으며, 복합세포 간오가노이드 배양 과정 중 젤(gel) 형태의 세포외기질에 임베딩(embedding)하는 과정이 없어 오가노이드의 회수 및 핸들링(handling)이 용이하며, 개별 단위체에 간세포 및 비실질세포들이 공존함으로써 개별 또는 소수의 오가노이드 만으로 복합적인 질환 특성 분석이 가능하다는 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 본 발명의 방법에 따라 복합세포 간오가노이드를 제작하는 과정 및 오가노이드 내 세포 존재 형태를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 분화가 완료된 복합세포 간오가노이드의 구조적 생체유사도를 확인하기 위해 복합세포 간오가노이드 내 혈관 구조 및 간세포 구조의 분석결과를 나타낸 것이다.

도 3은 복합세포 간오가노이드의 간 성숙도와 약물대사능을 포함한 간 기능성 검증 분석을 수행한 결과이다.

도 4는 실질적인 복합세포 오가노이드 질환 모델링 가능 여부를 검증하기 위해, 비알콜성 지방간염의 질환 스펙트럼 중 지방증(steatosis) 측면의 질환 특성을 분석한 결과이다.

도 5는 실질적인 복합세포 오가노이드 질환 모델링 가능 여부를 검증하기 위해, 비알콜성 지방간염의 질환 스펙트럼 중 염증반응(inflammation) 관련 질환 특성을 검증한 결과이다.

도 6은 지방산 처리를 통한 복합세포 간오가노이드의 모세혈관화(capillarization) 및 세포 스트레스 검증 실험결과를 나타낸 것이다.

도 7은 지방산 처리를 통한 복합세포 간오가노이드의 조직학적 변화 및 간 섬유화 여부 검증 실험 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 본 발명은 인간 유도만능줄기세포(human pluripotent stem cell, hiPSC)를 기반으로 다양한 종류의 간 구성세포를 포함하는 복합세포 간오가노이드(multicellular liver organoid)에 관한 것이며, 본 발명의 복합세포 간오가노이드를 이용하여 비알코올성 지방간염(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)이 유도된 생체 유사성이 높은 질병 오가노이드 모델을 제공함에 특징이 있다.
- [0034] 비알코올성 지방간염(NASH)의 경우, 간세포, 혈관내피세포, 간성상세포, 쿠퍼면역세포와 같은 다양한 간 구성세포들의 유기적인 상호작용으로 인해 발병 및 심화되는 것으로 알려져 있다. 따라서 비알코올성 지방간염의 발병 기전 및 효과적인 치료제 개발을 위해서는 실질세포인 간세포와 간 비실질세포를 모두 포함하는 간오가노이드 모델이 필수적으로 요구된다.
- [0035] 간오가노이드를 활용하는 NAFL 또는 NASH 질병 모델링에 대한 종래 기술은 앞서 서술한 바와 같이 간 비실질세포를 포함하고 있지 않거나, 간 비실질세포들이 개별 오가노이드 단위체가 아닌 배양 매트릭스 단위에서 일부 산재된 형태로 존재하고 있어 정확한 질환에 대한 연구가 어렵다는 문제가 있다.
- [0036] 이에 본 발명에서는 인체 내 모든 세포로 분화 가능한 전능성(pluripotent) 세포인 인간 유도만능 줄기세포(human induced pluripotent stem cell; hiPSC)를 기반으로 복합세포 간오가노이드 제작에 필요한 모든 세포종류(간세포, 혈관내피세포, 간성상세포, 쿠퍼면역세포)를 분화하여 사용하였고, 인간 배아줄기세포(human embryonic stem cell)가 지닌 윤리적 문제와 초대배양세포(primary cell)의 침습적 세포 수확의 단점을 보완하였다.
- [0037] 따라서 본 발명은 간 전구세포 오가노이드 및 간의 비실질세포(non-parenchymal cell)가 조합되어 분화된 복합세포 간오가노이드를 제공한다.
- [0038] 상기 간 전구세포 오가노이드 및 간의 비실질세포는 인간 유도만능 줄기세포(human induced pluripotent stem cell)로부터 분화시킨 세포를 사용할 수 있다.
- [0039] 상기 간의 비실질세포로는 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포일 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명에 따른 상기 복합세포 간오가노이드는 인간 유도만능 줄기세포로부터 분화된 간 전구세포 오가노이드 60~70개, 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포가 25000~35000 : 4500~5500 : 4500~5500의 세포수의 비로 조합되어 있는 특징이 있으며, 본 발명의 일실시예에서는 간 전구세포 오가노이드 60개, 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포를 30000 : 5000 : 5000의 세포수의 비로 사용하였다.
- [0041] 또한 본 발명의 상기 복합세포 간오가노이드는 간 전구세포 오가노이드, 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포가 하나의 단위체로 세포 조립되어 있는 특징을 갖는다.
- [0042] 본 발명의 일실시예에서는 본 발명에 따른 복합세포 간오가노이드에 대한 특성을 분석하였는데, 그 결과, 관형 혈관 네트워크가 형성되어 있고, 성숙 간세포 표지자들이 발현되고 및 요소생성과 약물대사효소 활성을 모두 가지고 있어, 생체 간과 유사도가 매우 높다는 것을 확인하였다.
- [0043] 또한 본 발명은 본 발명에 따른 복합세포 간오가노이드의 제조방법을 제공할 수 있으며, 상기 방법은 바람직하게 (1) 인간 유도만능 줄기세포로부터 분화된 간 전구세포 오가노이드를 수득하는 단계; (2) 인간 유도만능 줄기세포로부터 분화된 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포를 각각 수득하는 단계; 및 (3) 상기 (1)단계에서 수득한 간 전구세포 오가노이드 및 상기 (2) 단계에서 수득한 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포를 혼합하고 배양하여 복합세포 간오가노이드를 형성하는 단계를 포함한다.
- [0044] 상기 방법에 대한 구체적인 실험과정은 하기 실시예에 기재되어 있다.
- [0045] 먼저, (1) 인간 유도만능 줄기세포를 간 전구세포 오가노이드로 분화시켜 분화된 간 전구세포 오가노이드를 수득한다.
- [0046] 구체적으로, 미분화 인간 유도만능 줄기세포를 간 전구세포로 분화시키는 과정은, 미분화 상태의 인간 유도만능 줄기세포를 중배엽 세포로 분화시키고, 이후 내배엽 세포로 분화시킨 다음, 전장 내배엽 세포로 분화시키고 다음으로 간모세포로 분화시키는 과정을 수행한다.

- [0047] 상기 과정으로 분화된 간모세포는 다음으로 간 전구세포 오가노이드로 분화시키고 유지 배양하는 과정을 수행하는데, 분화가 완료된 간모세포를 마트리젤을 포함하는 오가노이드 증식 배지에 분주하고 배양하여 낭포 형태의 간 전구세포 오가노이드로 분화시킨다.
- [0048] 다음은, (2) 인간 유도만능 줄기세포로부터 분화된 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포를 각각 수득한다.
- [0049] 즉, 인간 유도만능 줄기세포로부터 분화시켜 분화된 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포를 각각 수득한다.
- [0050] 상기 혈관내피세포로의 분화는, 미분화 인간 유도만능 줄기세포를 먼저 중배엽세포로 분화시키고 이후 중배엽세포를 혈관내피세포로 분화시켜 수득한다.
- [0051] 상기 간성상세포로의 분화는, 상기 혈관내피세포로의 분화 과정에서 혈관내피세포를 정제하는 과정 중, MACS(magnetic activated cell sorting) 방법으로 분리된 혈관내피세포 중에서 CD31을 미발현하는 혈관 전구세포를 활용하여 간성상세포로 분화 유도하여 수득한 세포를 사용하였다.
- [0052] 상기 쿠퍼면역세포로의 분화는 미분화 인간 유도만능 줄기세포를 원시선 세포로 분화시키고, 이후 원시선세포를 혈관모세포로 분화시킨 후, 혈관모세포를 혈구형성세포로 분화시킨 다음, 혈구형성세포를 골수성 전구세포로 분화시켰고, 간 특이 대식세포인 쿠퍼면역세포로 분화유도하여 수득한 세포를 사용하였다.
- [0053] 다음으로, (3) 상기 (1)단계에서 수득한 간 전구세포 오가노이드 및 상기 (2) 단계에서 수득한 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포를 혼합하고 배양하여 복합세포 간오가노이드를 형성하는 단계를 수행한다.
- [0054] 이때 상기 배양은 B27 minus vitamin A, BMP7, FGF19, HGF, [Leu¹⁵]-Gastrin 1, N-acetyl-L-cysteine, A83-01, DAPT, Dexamethasone, VEGF, bFGF 및 matrigel을 포함하는 배지를 이용하여 배양하였다.
- [0055] 또한, 상기 (3) 단계는, 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포를 혼합한 혼합세포의 50% 세포수에 해당되는 혼합세포를 세포배양 웰에 분주하고 상기 혼합세포가 웰 바닥에 가라앉도록 한 후, 상기 간 전구세포 오가노이드를 상기 혼합세포가 가라앉은 웰에 분주한 다음, 상기 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포를 혼합한 혼합세포의 남은 50% 세포수에 해당되는 혼합세포를 상기 웰에 분주하고 배양하여 세포 조립을 통해 복합세포 간오가노이드를 형성하도록 하였다.
- [0056] 이때 상기 간 전구세포 오가노이드는 60~70개, 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포는 25000~35000 : 4500~5500 : 4500~5500의 세포수의 비율로 사용할 수 있으며, 본 발명의 일실시예에서는 간 전구세포 오가노이드 60개, 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포를 30000 : 5000 : 5000의 세포수의 비로 사용하였다.
- [0057] 또한 본 발명의 상기 방법은 인간 유도만능 줄기세포(hiPSC)를 기반으로 얻은 간 구성 세포 종류들을 384-well ultra low attachment plate에서 조립함으로써, 개별 오가노이드 단위체 내에서 간세포와 간 비실질세포들이 접촉을 통한 상호작용을 하고 있는 복합세포 간오가노이드를 제작할 수 있는 특징이 있다.
- [0058] 상기 본 발명의 방법으로 제조된 인간 유도만능 줄기세포는 앞서 기술한 바와 같이 생체 간이 갖는 특성과 유사한 특성을 가지고 있음을 확인하였다. 따라서 본 발명의 방법은 생체 간과 유사도가 높은 관형 혈관 네트워크가 형성되어 있고, 성숙 간세포 표지자들이 발현되고 및 요소생성과 약물대사효소 활성을 모두 가지고 있는 복합세포 간오가노이드를 제조할 수 있다.
- [0059] 나아가 본 발명은 본 발명에 따른 복합세포 간오가노이드에 지방산을 처리하는 단계를 포함하는, 비알콜성 지방간염 특성을 갖는 복합세포 간오가노이드의 제조방법을 제공할 수 있다.
- [0060] 본 발명자들은 본 발명의 복합세포 간오가노이드가 간 질환의 발병기전, 약물독성 및 약물을 스크리닝하는데에 유용하게 사용할 수 있는지를 확인하였다.
- [0061] 이를 위해 본 발명의 복합세포 간오가노이드에 지방산을 처리한 결과, 비알콜성 지방간염 질환의 특성을 나타내는 복합세포 간오가노이드가 형성됨을 확인할 수 있었다.
- [0062] 상기 비알콜성 지방간염 특성을 갖는 복합세포 간오가노이드의 제조를 위한 지방산의 처리는 지방산과 알부민이 결합된 지방산-알부민 결합체를 복합세포 간오가노이드의 배지에 처리하는 방법으로 수행할 수 있으며, 상기 지방산은 소듐팔미테이트 및/또는 소듐올레이트를 사용할 수 있고, 바람직하게는 상기 지방산을 1:1의 몰비율로 혼합한 지방산 혼합액을 사용할 수 있다.

- [0063] 또한, 상기 지방산-알부민 결합체는 지방산과 알부민이 5:1의 몰비율로 사용하여 결합된 결합체일 수 있다.
- [0064] 본 발명의 일실시예에서는 지방산이 처리된 복합세포 간오가노이드에 대하여 비알콜성 지방간염 특성을 갖는지를 분석하였는데, 그 결과, 지방산 처리에 의해 복합세포 간오가노이드에서 지방증(steatosis) 유도, 염증반응 유도, 모세혈관화(capillarization) 현상, 세포 스트레스 유도 및 간 섬유화 현상이 확인되어, 비알콜성 지방간염이 발병된 복합세포 간오가노이드가 제조됨을 확인할 수 있었다.
- [0065] 따라서 본 발명은 비알콜성 지방간염 특성을 갖는 복합세포 간오가노이드를 제공할 수 있으며, 이러한 질병 특성을 갖는 복합세포 간오가노이드는 간세포 및 비실질세포 측면에서 비알콜성 지방간염의 특성을 반영할 수 있는 특징을 갖는다. 특히, 지방산 분자 그대로가 아닌 생체와 같이 알부민(albumin)과 결합된 형태의 지방산을 제작 및 처리함으로써, 보다 실제와 비슷한 질환 발병 기전을 모사할 수 있었다.
- [0067] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0069] <재료준비 및 실험방법>
- [0070] 1. 복합세포 간오가노이드를 구성하는 4종의 세포로의 분화
- [0072] 1-1) 복합세포 간오가노이드 형성을 위한 간 전구세포 오가노이드로의 분화
- [0073] ① 0단계: 미분화 줄기세포의 유지배양
- [0074] hiPSC 세포주인 HDF의 경우, 상온에서 30분 동안 matrigel (Corning)로 코팅한 배양접시에 mTeSR^{TM1} (Stemcell Technologies) 배지를 사용하여 지지세포 없이(feeder-free) 배양하였다. 상기 세포를 표준조건(37℃, 5% CO₂ 및 포화습도)에서 배양하고, 매일 배지를 교체하였다. 계대배양을 위해서는 ReLeSR (Stemcell Technologies)를 상온에서 1분가량 처리하여 콜로니(colony) 형태로 떼어 낸 후 1:40의 비율로 계대 배양하였다. 이는 약 5일마다 진행하였다.
- [0076] ② 1단계: 미분화 줄기세포의 간전구세포로의 분화
- [0077] 미분화 상태로 배양중인 HDF는 총 4 단계의 세포 분화 과정을 거쳐 간모세포(hepatoblast)로 분화 된다. 우선 배양중인 미분화 세포의 배지를 제거하고 PBS로 세척 후, TrypLETM Express (Gibco)를 3분 동안 처리하여 분리시킨 단일세포를 1000rpm에서 5분간 원심분리하여 수집하였다. 이후 matrigel (Corning)이 코팅된 100mm 배양접시(TPP) 위에 5 μM Y-27632 (ROCK 억제제)가 포함된 mTeSR^{TM1} (Stemcell Technologies) 배지에 LUNATM Automated Cell Counter (Logosbiosystems)로 개수를 센 5백만 개의 세포를 분주하였다. 다음 날에 Y-27632 (ROCK inhibitor)가 포함되지 않은 mTeSR1 배지로 교체 후 2일간 추가 배양한 다음, 간세포 분화를 수행하였다.
- [0078] 간 세포로의 분화는, 첫 번째 단계인 중내배엽(mesendoderm) 세포로의 분화를 위해 3일간 배양한 미분화 세포를 mTeSR1 배지를 제거 후, 2 μM CHIR99021 및 100 ng/ml Activin A를 포함하는 RPMI (Gibco) 배지에서 1.5일간 배양하였다.
- [0079] 다음으로 두 번째 단계인 내배엽(definitive endoderm) 세포로의 분화를 위해 1.5일간 배양한 중내배엽 세포의 배지를 제거 후 0.5 μM sodium butyrate 및 100 ng/ml Activin A를 포함하는 RPMI 배지에서 추가로 1.5일간 분화 유도하였다.
- [0080] 다음으로 세 번째 단계인 전장 내배엽(ventral foregut endoderm) 세포로의 분화를 위해 1.5일간 배양한 내배엽 세포의 배지를 제거 후 20 ng/ml BMP2, 25 ng/ml FGF4 그리고 1X B27 (Gibco)이 포함된 RPMI 배지에서 2일간 배양하였다.
- [0081] 이후, 네 번째 단계인 간모세포(hepatoblast)로의 분화를 위해 2일간 배양한 전장 내배엽 세포의 배지를 제거 후 2 μM 레티노산(retinoic acid)와 1X B27 (Gibco)이 포함된 DMEM 배지에서 2일간 배양하여 간모세포로 분

화시켰다.

[0083] ③ 2단계: 간모세포의 간전구세포 오가노이드로의 분화 및 유지배양

[0084] 간전구세포 오가노이드 제작을 위해 필요한 배지는 오가노이드 기본 배지 (basal media)에 간전구세포 오가노이드의 제작 및 증식을 위한 첨가물이 혼합된 오가노이드 증식 배지(Expansion medium, 이하 EM)이다.

[0085] 오가노이드 기본 배지는 Advanced DMEM/F12 (Gibco) 배지에 10 mM HEPES (Gibco), 2 mM GlutaMAX (Gibco), 1X PS (penicillin streptomycin) (Gibco) 및 0.1% BSA (bovine serum albumin)를 첨가하여 제조하였다.

[0086] 또한, 오가노이드 증식 배지(EM)는 오가노이드 기본 배지에 1X N2 (Gibco), 1X B27 minus vitamin A (Gibco), 10 mM nicotinamide, 50 ng/ml FGF10, 25 ng/ml HGF, 10 nM [Leu¹⁵]-Gastrin 1, 1.25 mM N-acetyl-L-cysteine, 5 μ M A83-01, 10 μ M forskolin과 3 μ M CHIR99021을 첨가하여 제조하였다.

[0087] 간전구세포 오가노이드 제작을 위해 상기 1단계를 통해 분화가 완료된 간모세포의 배지를 제거하고 PBS로 세척 후, TrypLETM Express (Gibco)를 3분 동안 처리하여 분리시킨 단일세포를 1000rpm에서 5분간 원심분리하여 수집하였다. 이후, 24-웰 ultra low attachment dish(Corning)의 1개의 웰 (well)에, 0.566 mg/ml matrigel (Corning)이 포함된 EM(이하 EM+M) 500 μ l을 첨가한 후, LUNATM Automated Cell Counter (Logosbiosystems)로 개수를 세어 간모세포 2만 개를 분주하였다. 상기 세포를 표준조건 (37℃, 5% CO2 및 포화습도)에서 배양하면 낭포 (cyst) 형태의 간전구세포 오가노이드로 분화하게 된다. 간모세포 분주 3일 후 배지 교체를 진행하며, 그 과정은 부유 상태로 배양 중인 간전구세포 오가노이드를 배지 채로 수거하여 동량의 오가노이드 기본 배지와 파이펫팅 (pipetting)을 통한 혼합 후 1000rpm에서 1분간 원심분리하였다. 상등액 제거 후 새로운 EM+M 배지로 간전구세포 오가노이드를 부유시킨 후 24-웰 ultra low attachment dish (corning)으로 다시 옮겨주는 것으로 배지 교체를 진행하였다. 배지 교체 3일 후 배양 중인 간전구세포 오가노이드를 상기 과정과 같이 원심분리한 후 새로운 200 μ l의 EM+M 배지에 부유시킨다. 이후 강한 파이펫팅을 통해 낭포 형태의 간전구세포 오가노이드를 작은 덩어리로 분해한 다음, 새로운 EM+M 배지 500 μ l가 담긴 24-웰 ultra low attachment dish (corning)의 웰 4개에 나누어 시딩하여 3~4배 비율의 증식과정을 진행하였다.

[0088] 증식과정 진행 후, 2일 차에 새로운 EM+M으로 배지교체를 진행하고, 배지 교체 2일 후, 다시 파이펫팅을 통한 증식 과정을 진행하는 과정을 반복하여 간전구세포 오가노이드를 유지배양 및 증식배양 하였다. 복합세포 간오가노이드 제작 시에는 5~6일간 배양한 간전구세포 오가노이드를 사용하였다.

[0090] 1-2) 복합세포 간오가노이드 형성을 위한 혈관내피세포로의 분화

[0091] ① 0단계: 미분화 줄기세포의 유지배양

[0092] hiPSC 세포주인 HDF의 경우, 상온에서 30분 동안 matrigel (Corning)로 코팅한 배양접시에 mTeSRTM1 (Stemcell Technologies) 배지를 사용하여 지지세포 없이 (feeder-free) 배양하였다. 상기 세포를 표준조건 (37℃, 5% CO2 및 포화습도)에서 배양하고, 매일 배지를 교체하였다. 계대배양을 위해서는 ReLeSR (Stemcell Technologies)를 상온에서 1분가량 처리하여 콜로니 (colony) 형태로 떼어 낸 후 1:40의 비율로 계대 배양하였다. 이는 약 5일마다 진행된다.

[0094] ② 1단계: 미분화 줄기세포의 증배엽세포로의 분화

[0095] 우선 배양중인 미분화 세포의 배지를 제거 하고 PBS 세척 후, TrypLETM Express (Gibco)를 3분 동안 처리하여 분리시킨 단일세포를 1000rpm에서 5분간 원심분리하여 수확한다. 이후 하루 전 5 μ g/ml fibronectin (Millipore)으로 코팅해 둔 100mm 배양접시 (Corning)에 1x ITS (Gibco), 10 μ M Y-27632 (ROCK inhibitor), 3 μ M CHIR99021, 2 ng/ml Activin A, 200 μ M ascorbic acid를 포함하는 DMEM/F12 배지에 LUNATM Automated Cell Counter (Logosbiosystems)로 개수를 센 5십만 개의 세포를 분주하였다. 시딩 후 48시간 동안은 배지를 교체하지 않는다.

[0097] ③ 2단계: 중배엽세포의 혈관내피세포로의 분화

[0098] 상기 1단계에서 수득한 중배엽세포의 배지를 제거 후 50 ng/ml VEGF165가 포함된 Stemline II (Sigma) 배지에서 5일간 배양한다. 5일 동안의 분화 기간 중 2일 차 및 4일 차에 새로운 Stemline II (sigma) 배지로 교체하였다.

[0100] ④ 3단계: 혈관내피세포의 정제

[0101] 분화 5일차에 비 혈관내피세포를 제외한 고순도의 혈관내피세포만을 분리하기 위하여 MACS (magnetic activated cell sorting) 방법을 통해 혈관내피세포를 정제하였다. MACS에는 혈관내피세포/전구세포의 마커인 CD31을 사용하였다. PBS 세척 후, TrypLE™ Express (Gibco)를 3분 동안 처리하여 분리시킨 단일세포를 1000rpm에서 5분간 원심분리하여 수확 후, 40 µm strainer (BD)에 걸러 완벽하게 단일 세포만을 얻었다. 이후 5 µl의 mouse anti human CD31 항체 (BD)가 포함된 0.01 g/ml 농도의 BSA/PBS 100 µl (MACS buffer)에 세포를 현탁시키고 4℃에서 30분 반응시켰다. 이후 MACS 버퍼 3 ml을 이용하여 1번 세척을 거친 후, MACS 버퍼 80 µl에 anti-mouse IgG microbead (Miltenyi biotec) 20 µl를 섞은 용액에 세포를 현탁한 후 4℃에서 20분간 반응시킨다. 이후 MACS manual separator (Miltenyi biotec)를 이용하여 CD31을 발현하는 혈관내피세포만을 분리 정제하였다. 정제된 혈관내피세포는 MACS 하루 전에 5 µg/ml fibronectin (Millipore)으로 코팅해 둔 배양접시에 50 ng/ml VEGF165를 포함하는 stemline II 배지로 분주하여 배양하였다.

[0103] ⑤ 4단계: 정제된 혈관내피세포의 배양

[0104] 정제된 혈관내피세포는 그 특성을 유지하면서 계대배양이 5~7회 가량 가능하나 복합세포 간오가노이드 제작을 위해서는 계대배양을 하지 않은 정제 배양된 직후의 세포를 사용하도록 하였다. 따라서 새로운 50 ng/ml VEGF165를 포함하는 새로운 Stemline II 배지로 2일에 한 번 배지 교체를 진행하며 배양 5~6일 차가 된 시점에서 복합세포 간오가노이드 제작에 사용하였다. 상기 과정을 통해 분화된 세포는 복합세포 간오가노이드 상태로 간세포와 공배양하도록 하였고 추가적인 간 동양혈관내피세포 (liver sinusoidal endothelial cell)로의 분화를 유도하였다.

[0106] 1-3) 복합세포 간오가노이드 형성을 위한 간성상세포로의 분화

[0107] 간 성상세포 분화를 위해, 혈관내피세포 분화 3단계에서 MACS 과정을 통해 수확한 세포들 중 CD31을 미발현하는 혈관 전구세포 (vascular progenitor cell, VPC)를 활용하여 혈관주위세포 (pericyte)로 분화를 유도한다. CD31 미발현 세포들은 하루 전 3 µg/ml fibronectin (Millipore), 10 µg/ml collagen 1 (Sigma)로 코팅된 100mm 배양접시 (Corning) 위에 10 ng/ml bFGF, 10 ng/ml PDGFBB가 포함된 pericyte medium (Sciencell) 배지에 LUNA™ Automated Cell Counter (Logosbiosystems)로 개수를 측정하여 5십만 개의 세포를 분주하였다. 분주 후, 2일에 한 번 배지 교체를 진행하였고 배양 5~6 일차가 된 시점에서 복합세포 간오가노이드 제작에 사용하였다. 상기 과정을 통해 분화된 세포는 복합세포 간오가노이드 상태로 간세포와 공배양하였고 추가적인 간 성상세포로의 분화를 유도하였다.

[0109] 1-4) 복합세포 간오가노이드 형성을 위한 쿠퍼면역세포로의 분화

[0110] ① 0단계: 미분화 줄기세포의 유지배양

[0111] hiPSC 세포주인 HDF의 경우, 상온에서 30분 동안 matrigel (Corning)로 코팅한 60mm tissue culture dish (corning)에 mTeSR™ (Stemcell Technologies) 배지를 사용하여 지지세포 없이 (feeder-free) 배양하였다. 상기 세포를 표준조건 (37℃, 5% CO2 및 포화습도)에서 배양하고, 매일 배지를 교체하였다. 계대배양을 위해서는 ReLeSR (Stemcell Technologies)를 상온에서 1분가량 처리하여 콜로니 (colony) 형태로 떼어 낸 후 1:40의 비율로 계대 배양하였다. 이는 약 5~6일마다 진행하였다.

- [0113] ② 1단계: 미분화 줄기세포의 원시선 (primitive streak) 세포로의 분화
- [0114] 미분화 상태로 배양중인 HDF는 총 4 단계의 세포 분화 과정을 거쳐 대식세포 전구체 (macrophage precursor)로 분화된다. 우선 배양중인 미분화 세포의 배지를 제거하고 D/F12 배지(Gibco)로 세척 후, ReLeSR (Stemcell Technologies)를 3분 동안 처리하여 콜로니 (colony) 형태의 세포 덩어리를 수확하였다. 이후 파이펫팅을 통해 세포 덩어리를 적당한 크기로 쪼갬 후, matrigel (Corning)이 코팅된 6-웰 플레이트 배양접시 (Corning) 위에 한 웰당 mTeSR1 배지에 1:50~1:70의 비율로 분주하였다. 다음날에 mTeSR1 배지로 갈아주고, 2일차에 mTeSR1 배지에 80 ng/ml BMP4를 첨가하여 4일간 원시선 (primitive streak) 세포로 분화시켰다.
- [0116] ③ 2단계: 원시선세포의 혈관모세포 (hemangioblast)로의 분화
- [0117] 1단계에서 수득한 원시선세포의 배지를 제거 후 2 mM Glutamax, 100 ng/ml SCF, 80 ng/ml VEGF165, 25 ng/ml bFGF가 첨가된 StemPro-34 SFM (Gibco) 배지로 교체하여 혈관모세포 (hemangioblast)로의 분화를 2일간 진행하였다.
- [0119] ④ 3단계: 혈관모세포의 혈구형성세포 (hematopoietic cell; EMP)로의 분화
- [0120] 2단계에서 수득한 혈관모세포의 배지를 제거 후 2 mM Glutamax, 50 ng/ml SCF, 50 ng/ml IL-3, 5 ng/ml TPO, 50 ng/ml M-CSF, 50 ng/ml FLT3 리간드가 첨가된 StemPro-34 SFM (Gibco) 배지로 교체하여 4일 주기로 총 8일간 배지 교체를 통해 혈구형성세포 (hematopoietic cell)로 분화시켰다.
- [0122] ⑤ 4단계: 혈구형성세포의 골수성 전구세포 (myeloid progenitor)로의 분화
- [0123] 3단계에서 수득한 혈구형성세포의 배지를 제거 후 2 mM Glutamax, 50 ng/ml FLT3 리간드, 25 ng/ml GM-CSF, 50 ng/ml M-CSF 가 첨가된 StemPro-34 SFM (gibco) 배지로 교체하여 3~4일 주기로 총 7~9일간 배지 교체를 통해 골수성 전구세포 (myeloid progenitor)로 분화시켰다. 분화가 완료된 골수성 전구세포를 복합세포 간오가노이드를 제작하는데 사용하였고, 상기 과정을 통해 분화된 세포는 복합세포 간오가노이드 상태로 간세포와 공배양하였으며, 추가적인 간 특이 대식세포인 쿠퍼면역세포로의 분화를 유도하였다.
- [0125] **2. 분화시킨 4종의 세포(간전구세포 오가노이드, 혈관내피세포, 간성상세포, 쿠퍼면역세포) 조립을 통한 복합세포 간오가노이드의 형성**
- [0126] 복합세포 간오가노이드 제작 및 배양에 기본적으로 사용되는 배지는 오가노이드 기본 배지 (Basal medium)에 간세포로의 분화를 위한 첨가물을 혼합하여 제작한 오가노이드 분화배지 (Differentiation medium, 이하 DM)를 사용하였다. DM 배지는, 오가노이드 기본 배지에 1X B27 minus vitamin A (Gibco), 25 ng/ml BMP7, 100 ng/ml FGF19, 25 ng/ml HGF, 10 nM [Leu¹⁵]-Gastrin 1, 1.25mM N-acetyl-L-cysteine, 0.5 μM A83-01, 10 μM DAPT, 3 μM Dexamethasone을 첨가하여 제조하여 사용하였다. 복합세포 간오가노이드 안에 포함된 혈관내피세포 및 간성상세포의 분화 및 생존을 위해 100 ng/ml VEGF165, 50 ng/ml bFGF를 DM에 첨가하였고, 추가적으로 0.566 mg/ml의 matrigel (Corning)을 혼합한 배지 (이하 DM+V+b+M)를 복합세포 간오가노이드 제작 및 배양 전 과정에 동일하게 사용하였다.
- [0128] **1-1) 복합세포 간오가노이드 제작을 위한 4종 세포의 준비 과정**
- [0129] 복합세포 간오가노이드 제작을 위한 간전구세포 오가노이드의 준비과정은, EM에서 부유상태로 배양 중인 간전구세포 오가노이드를 배지 채로 수거하여 동량의 오가노이드 기본 배지와 파이펫팅을 통한 혼합 후 1000rpm에서 1분간 원심분리하였다. 이후 상등액을 제거하고 DM+V+b+M 배지에 현탁하여 복합세포 간오가노이드 조립 때까지 4℃에 보관하였다.
- [0130] 복합세포 간오가노이드 제작을 위한 혈관내피세포와 간성상세포의 준비과정은, 100mm 배양접시 (Corning)에 배

양중인 각 세포의 배지를 제거 후 PBS로 세척 후, Tryp-LE select (Gibco)를 37℃ 인큐베이터에서 5분간 처리하여 수거하였다. 이후 1000rpm에서 5분간 원심분리한 후 상등액 제거 뒤 DM+V+b+M 배지에 현탁하여 복합세포 간 오가노이드 조립 때까지 4℃에 보관하였다.

[0131] 쿠퍼면역세포의 경우, 부유 상태인 세포를 배양액 채로 수거 후 150 g-force에서 3분간 원심분리하였고, 이후 상등액 제거 뒤 DM+V+b+M 배지에 현탁하여 복합세포 간오가노이드 조립 때까지 4℃에 보관하였다.

[0133] 1-2) 복합세포 간오가노이드 제작을 위한 4종 세포의 조립 과정

[0134] 개별 복합세포 간오가노이드는 간전구세포 오가노이드 60~70 개, 혈관내피세포 3 만개, 간성상세포 5 천개, 쿠퍼면역세포 5 천개로 구성되도록 하였다. 개별 세포 단위로 분리된 혈관내피세포, 간성상세포, 쿠퍼면역세포의 경우 DM+V+b+M에 현탁된 상태의 세포를 LUNATM Automated Cell Counter (Logosbiosystems)를 사용하여 각 세포 종류별 세포 수를 측정 한 후 각 세포 종류별로 필요한 세포 수에 상응하는 볼륨 (volume)을 계산하였다. 간전구세포 오가노이드의 경우 DM+V+b+M에 현탁된 상태의 간전구세포 오가노이드 일부 볼륨을 샘플링하여 해부 현미경을 통해 개수를 파악한 후 전체 볼륨 내 간전구세포 오가노이드 개수 및 이에 따른 간전구세포오가노이드 60~70 개에 상응하는 볼륨을 계산하였다.

[0135] 이후 384-ultra low attachment plate (Shimadzu)의 웰 한 개당 Y-27632 (ROCK 억제제) 10 μM이 첨가된 DM+V+b+M 배지 80 μl를 넣은 후 다음과 같이 4종 세포의 조립을 진행하였다.

[0136] 우선 제작하고자 하는 복합세포 간오가노이드의 개수의 배수만큼 필요한 양의 혈관내피세포, 간성상세포, 쿠퍼면역세포를 한 군데 혼합한 후, 복합세포 간오가노이드 한 개를 구성하는데 필요한 각 세포 종류별 개수의 절반 (혈관내피세포 1.5만개, 간성상세포 2천5백개, 쿠퍼면역세포 2천5백개)에 상응하는 혼합액 볼륨을 배지가 들어 있는 각 웰에 분주하였다. 이후 5분 동안 세포들이 가라앉도록 한 후, 간전구세포 오가노이드 60~70개를 가라앉은 세포들이 들어있는 웰에 분주하였다. 간전구세포 오가노이드 분주 직후 복합세포 간오가노이드를 구성하는데 필요한 나머지 절반의 혈관내피세포, 간성상세포, 쿠퍼면역세포 혼합액 볼륨을 분주하여 5분간 가라앉도록 하였다. 세포 분주가 완료된 384-ultra low attachment plate (Shimadzu)를 표준 조건 (37℃, 5% CO₂ 및 포화습도)의 인큐베이터에서 24시간 동안 정적(static) 배양하여 세포 조립 (self-aggregation)이 일어나도록 하였다.

[0137]

[0138] 1-3) 복합세포 간오가노이드의 배양 과정

[0139] 384-well ultra low attachment plate의 개별 웰에서 세포조립이 완료된 복합세포 간오가노이드를 회수하여 Y-27632 (ROCK 억제제)가 없는 DM+V+b+M 배양액 3ml이 들어있는 6-well ultra low attachment plate (Corning)의 개별 웰에 복합세포 간오가노이드를 20~30개씩 나누어 표준 조건에서 배양하였다. 배양액의 교체는 2~3일 주기로 진행하며 배양액 교체 과정은 부유 배양 (suspension culture)중인 복합세포 간오가노이드를 배양액 채로 수거 후 동량의 오가노이드 기본 배지와 파이펫팅을 통한 혼합 후 자연적으로 가라앉도록 하였다. 이후 상등액을 제거한 뒤 새로운 DM+V+b+M 배지 2~3ml로 가라앉은 복합세포 간오가노이드를 다시 부유시킨 후 6-well ultra low attachment plate 개별 웰에 옮겨 지속적으로 배양하였다. 상기 배양 과정을 15일간 진행하여 복합세포 간오가노이드 제작을 완료하였다.

[0141] 3. 복합세포 간오가노이드에 처리를 위한 지방산-알부민 결합체 준비 및 처리 방법

[0142] 지방산의 경우 물에 대한 용해도가 매우 낮아 직접적인 처리가 어려우므로 생체에서 지방산 분자가 혈류를 통해 운반되는 방식을 모방하여 알부민 분자에 결합 후 복합세포 간오가노이드 배지에 처리하였다. 이를 위해 DM+V+b+M에 지방산을 제거한 소 혈청 알부민 (Sigma)을 녹인 후 37℃에 보관하였다. 지방산인 소듐팔미테이트 (Sigma)와 소듐올레이트 (Sigma)의 경우 분자량 1:1의 비율로 70℃의 물에 녹여 지방산 혼합액을 만들었고, 이후, 소 혈청 알부민 용액에 지방산 혼합액을 10 분 간격으로 5회에 걸쳐 소 혈청 알부민의 분자수와 지방산 혼합액의 지방산 분자수 비율이 1 : 5가 되도록 37℃에서 볼텍싱 (vortexing)하며 추가하였다. 상기 과정과 같이 제작된 지방산-알부민 결합체는 복합세포 간오가노이드 분화 과정 중 마지막 5일에 배지의 지방산 농도가 800 μM가 되도록 처리하였다. 대조군의 경우 지방산 처리군과 동일한 양의 소 혈청 알부민이 대조군의 배지에 첨가되도록 하였다.

[0144] 4. 본 발명의 실시예에서 사용한 실험방법

[0145] 면역형광염색(Immunofluorescence staining)

[0146] 본 발명에서 사용한 면역형광염색 방법은 총 두 가지로, 첫 번째는 전조직 면역형광염색 (whole-mount immunofluorescence staining)이며 두 번째는 동결절단 (cryo-section) 후 면역형광 염색을 수행하였다.

[0147] 전조직 면역형광염색의 경우 배양중인 복합세포 간오가노이드를 PBS에 3회 washing 후 4% PFA (paraformaldehyde)를 포함하는 PBS에 1시간 동안 처리하여 고정시킨다. PBS 3회 washing 이후 10% 당나귀 혈청 (Abcam), 0.1% 소 혈청 알부민 (Bovogen), 0.5% Tween 20 (Sigma), 0.5% Triton X-100 (Sigma)이 포함된 PBS로 상온에서 2시간 동안 블로킹 및 천공시킨 후 10% 당나귀 혈청 (Abcam), 0.1% 소 혈청 알부민 (Bovogen), 0.5% Tween 20 (Sigma)이 포함된 PBS에 1차 항체를 혼합하여 블로킹이 완료된 복합세포 간오가노이드에 4℃에서 12~16시간 동안 반응시킨다. 반응이 완료된 복합세포 간오가노이드를 PBS로 3회 washing 후 10% 당나귀 혈청 (Abcam), 0.1% 소 혈청 알부민 (Bovogen), 0.5% Tween 20 (Sigma)이 포함된 PBS에 2차 항체를 혼합하여 상온에서 1시간 30분 동안 반응시킨다. 이후 PBS로 3회 washing 후 2 µg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)가 포함된 PBS에서 30분 동안 반응시켜 세포의 핵을 염색한다. PBS로 3회 washing 후 10%, 30%, 50% 70%, 90%, 100%의 에탄올이 포함된 PBS를 사용하여 낮은 에탄올 퍼센트 (10%)부터 높은 에탄올 퍼센트 (100%)까지 순차적으로 10분간 탈수 (dehydration) 과정을 진행한다. 이후 CytoVista™ Tissue clearing reagent (Invitrogen)을 상온에서 4~5일 처리하여 투과율을 개선한다. 최종 염색된 복합세포 간오가노이드 샘플을 마운팅 (mounting)한 뒤 공초점현미경 (Zeiss, LSM800)을 활용하여 면역형광염색 이미지를 촬영하였다.

[0148] 동결절단 (cryo-section) 후 면역형광염색의 경우 배양중인 복합세포 간오가노이드를 PBS에 3회 washing 후 4% PFA를 포함하는 PBS에 1시간 동안 처리하여 고정 시킨다. PBS 3회 washing 후 20% sucrose (Sigma)가 포함된 PBS로 4℃에서 12~16시간 동안 반응시킨다. 이후 O.C.T compound (Tissue-tec)에 복합세포 간오가노이드 샘플을 마운팅 한 즉시 액체 질소를 사용하여 동결한 후 동결절편기 (Leica, CM3050S)를 사용해 30 µm 두께로 절단 후 슬라이드 글라스에 붙인다. 절단된 슬라이드 글라스 위의 샘플들을 24시간 동안 건조 시킨 후 10% 당나귀 혈청 (Abcam)이 들어간 PBS로 블로킹한다. 이후 10% 당나귀 혈청 (Abcam)이 들어간 PBS에 1차 항체를 혼합하여 4℃에서 12~16시간 동안 반응시킨 후 PBS로 3회 washing 한다. 이후 PBS에 2차 항체를 혼합하여 상온에서 1시간 30분 동안 반응시킨 후 PBS로 3회 washing 한다. 최종적으로 1 µg/ml DAPI가 포함된 PBS에서 30분 동안 반응시켜 세포의 핵을 염색한 뒤 마운팅하여 공초점현미경 (Zeiss, LSM800)으로 면역형광염색 이미지를 촬영하였다. 사용한 1차 및 2차 항체의 정보는 하기 표 1 및 표 2에 기재된 바와 같다.

표 1

[0149] 1차 항체

1차 항체	제조사	제품 번호
Collagen 1 항체	Millipore	234167
E-cadherin 항체	R&D Systems	AF648
Zo-1 항체	Invitrogen	33-9100
CD31 항체	Bethyl	IHC-00055
CD68 항체	Invitrogen	14-0688-82
VE-cadherin 항체	Santa Cruz	SC52751
A1AT 항체	GeneTex	GTX77515
HNF4a 항체	Cell Signaling	3113S
NG2 항체	Millipore	AB5320

표 2

[0150] 2차 항체

2차 항체	제조사	제품 번호
Donkey anti-mouse IgG Alexa 568	Invitrogen	A10037
Donkey anti-rabbit IgG Alexa 647	Invitrogen	A31573

Donkey anti-goat IgG Alexa 488	Invitrogen	A11055
Donkey anti-goat IgG Alexa 594	Invitrogen	A11058

[0152] 역전사 PCR (RT-PCR) 및 정량적 PCR (qRT-PCR) 수행

[0153] 전체 RNA를 세포에서 추출하기 위해 복합세포 간오가노이드를 PBS로 3회 세척 후, Trizol 시약을 처리하였으며, 추출한 RNA의 농도는 Colibri Microvolume Spectrometer (Titertek-Berthold)를 활용하여 측정하였다. 측정된 농도를 기반으로 역전사 시스템 (Promega)을 사용하여, 생성된 cDNA의 농도가 10 μ l/ml가 되도록 역전사 과정을 수행하였다. qRT-PCR 분석은 SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems)를 사용하여 수행하였다. PCR 반응물은 cDNA, SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 유전자 프라이머, nuclease-free water (Thermo Fisher Scientific)로 구성하였으며, CFX Connect Real-Time PCR Detection System (BIO-RAD)를 사용하여 각 프라이머에 맞는 조건에서 증폭한 결과를 분석하였다. 각 유전자의 상대적 발현 수준은 하우스키핑 유전자 (housekeeping gene)인 GAPDH, B2M, ACTB 유전자 발현을 기준으로 정규화하여 측정하였으며, 3회의 독립적인 실험을 수행하였다. 사용된 프라이머의 서열은 하기 표 3에 기재된 바와 같다.

표 3

프라이머 서열

[0154]

유전자	정방향 (5'→ 3')	역방향 (5'→ 3')
ALB	GCCTGCTGACTTGCCTTCATTAG	TCAGCAGCAGCAGCAGAGTA
ASGPR1	CCTGCTCTTCCATCTGAAGC	CCAGCTGGCAGTACTTCTCC
CEBPA	GCAAACCTACCGCTCCAAT	TTAGGTCCAAGCCCCAAGT
HNF4a	AAGAGGAACCAAGTCCGCTA	CGCATTTGATGGAGGGCAG
G6PC	GGCTCTCAACTCCAGCATGT	GGGATGGGGTTTCAAGGAG
CDH1	CATCTCCCTTCACAGCAGAA	CTAAGGCCATCTTTGGCTTC
CYP3A4	GTGGGGCTTTTATGATGGTCA	GCCTCAGATTCTCACCAACACA
CYP2D6	GGTGTGACCCATATGACATCC	TTGGTGATGAGTGTGCTTC C
CYP2C8	TTTCTCCCTCACAACCTTGC	GGGTGAAGCCTTGGTTTTT C
CYP2B6	CCGGGGATATGGTGTGATCTT	CCGAAGTCCCTCATAGTGG TC
CYP2E1	GTGATGCACGGCTACAAGG	GGGTGGTCAGGAAAACCG
CYP2C19	AAAACCAAGGCTTACCCCTGT	CCCGGAAATAATCAATGA TAGTGG
CYP3A5	CAATCCACAAGACCCCTTTG	CGTTGAGGCGACTTTTCTT C
CYP3A7	GGCTATCACAGATCCCGACA	TTTCCGCTGGTGAATGTTG G
PLIN2	GAGCAGTGGCGTAGAAAATG	GCTGAGAAATGGTCTGTTG G
ACSL5	TCCTGTCTTTCCATCTTCG	CCCTTGACCCCTGAACTT G
ACOX1	CGTGAAACCGCTGAGTAACA	CCCACAACTGGAAGGCAT A
CPT1A	GATTTTGCTGTCGGTCTTGG	CTCTTGCTGCCTGAATGTG A
ACADVL	CTCCATCCGAACCTCTGCT	CTTCTCCTTCACGGCTCCT
DGAT2	TTTCTTGGGTGGCTGATGAC	AAAAGTGAGGCTTGGGTTC G
PDK4	CTGAGGCTGATGACTGGTGTA	CGTTGCTGTCGTTGTTTT GG
GSK3B	TACCCATCCCCCTTTCTCTT	ATTCTTTCCCTCCCTTTC C
CD68	AGGCTGGCTGTGCTTTTCT	GTGGTTTTGTGGCTTTGG T

GPBAR1	GTGTGGAGCAAAGACGAGTCA	GGCTGGTGTGTAGTGGTCT TC
CD163	TGGAGTTGCCCTTTCTACCC	GCCACAGCACTTTCTTCTG G
TLR4	GGCCCTAAACCACACAGAAGA	ACGGCAGCATTAGCAAGA AG
CD14	GCCGCTGTGTAGGAAAGAAG	GCTGAGGTTCGGAGAAGTT G
TNFA	CATCTATCTGGGAGGGGTCTT	CGTTTGGGAAGGTGGATG TT
IL1A	CATCTATCTGGGAGGGGTCTT	CGTTTGGGAAGGTGGATG TT
IL6	GGAGACTTGCCTGGTGAAAA	GCATTGTGGTTGGGTCAG
IL8	CAGCCTTCCTGATTTCTGC	AGTTTTCTTGGGGTCCAG
CXCL10	CCTCTCCCATCACTTCCCTACA	AAGCAGGGTCAGAATCC AC
IL10	CTGATACCTCAACCCCAT	TGGCTCCCCAAGAACAT
CD31	CCTGATGCCGTGGAAAGC	TCCAGGGATGTGCATCTG
CD34	TTCTGTCTCTGCCTCCCTCA	CTGCTCAACCCCTCTGGAA A
CD144	GCCATCGATAATTCTGGACG	CTTCCACCACGATCTCATA C
CD44	CTGCCGCTTTCAGGTGTA	CATTGTGGGCAAGGTGCTA TT
VCAM1	CCCTTGACCGGCTGGAGATT	TGGGGCAACATTGACATA AA GTG
AOC3	CTGGGTGTGTTTCAGGACAG	CTGGAGTTGTAGGGGCTTT G
SELP	AGGAGAGTGCCTCGAGACCA	TCCAGGGTAACAGGAGCAG GT
ICAM1	GGAAATACTGAACTTGCTGCCTAT	ACACATGTCTATGGAGGGC CAC
PLVAP	CGGAGGTGAGAACAGGAAGC	GGAGTTGGGGGAGAAGGAG T
ATF6	CTGCTAAAGAGGCACAGGAC	GACAAGGAGGTGGAGGAAT G
IRE1	GGCAGTAACCCAAGAGAGGAT	GGCTAAAACAGGGAGATGA CAC
PERK	GGGGCACTCCTTTGAACTTT	ATTTGCTACTGGTGGGCTT G
ACTA2	AATGGCTCTGGGCTCTGTAA	CTCTTTTGTCTGTGCTTC G
CCN2	TTACCAATGACAACGCCTCC	GGCTTGAGATTTTGGGAG TA
GREM1	GTCACACTCAACTGCCCTGA	GCACACGAACTACGCACAA G
MMP1	GTTCTGGGGTGTGGTGTCTC	ACATCTGGGCTGCTTCATC A
MMP3	CCCACTCTATCACTCACTCACA	CAGCATCAAAGGACAAAGC AG
TIMP1	ACTTCCACAGGTCCCACAAC	GTCCGTCCACAAGCAATGA G
PDGFB	CAAACACCAGTCACCTCGTC	CACCATCTACAGCCACCTC A
PDGFRB	CAGGGAGGTGGATTCTGATG	GATGGAGCGGATGTGGTAA G
GAPDH	AGGGCTGCTTTTAACTCTGGT	CCCCACTTGATTTTGGAGG GA
ACTB	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	AGCACTGTGTTGGCGTACA G
B2M	TGTCTGGGTTTCATCCATCCG	ACGGCAGGCATACTCATCT TT

[0156] 중성지방 Nile red 염색

[0157] 배양중인 복합세포 간오가노이드를 PBS에 3회 세척 후, 4% PFA (paraformaldehyde)를 포함하는 PBS에 1시간 동안 처리하여 고정시킨다. PBS 3회 세척 이후 10% 당나귀 혈청 (Abcam), 0.1% 소 혈청 알부민 (Bovogen), 0.5% Tween 20 (Sigma), 0.5% Triton X-100 (Sigma)이 포함된 PBS로 상온에서 2시간 동안 블로킹 및 천공시킨 후 10% 당나귀 혈청 (Abcam), 0.1% 소 혈청 알부민 (Bovogen), 0.5% Tween 20 (Sigma)이 포함된 PBS에 1차 항체를 혼합하여 블로킹이 완료된 복합세포 간오가노이드에 4℃에서 12~16시간 동안 반응 시킨다. 반응이 완료된 복합세포 간오가노이드 샘플을 PBS로 3회 세척 후 10% 당나귀 혈청 (Abcam), 0.1% 소 혈청 알부민 (Bovogen), 0.5% Tween 20 (Sigma)이 포함된 PBS에 2차 항체를 혼합하여 상온에서 1시간 30분 동안 반응시킨다. 이후 PBS로 3회 세척 후 2 μg/ml DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)가 포함된 PBS에서 30분 동안 반응시켜 세포의 핵을 염색한다. 이후 중성지방 염색을 위해 nile red (Sigma) 염료 10 μg/ml이 포함된 PBS에서 10분 간 상온에서 반응시킨 후, 최종 염색된 복합세포 간오가노이드 샘플을 마운팅 (mounting)하여 공초점현미경 (Zeiss, LSM800)으로 이미지를 촬영하였다.

[0159] 인도시아닌그린(indocyanine green, ICG) 흡수 및 세포 외 분비 실험

[0160] 복합세포 간오가노이드의 수송단백질을 통한 ICG 흡수 및 세포 외 분비 검증을 위해 ICG (Cayman)을 복합세포 간오가노이드 배지에 1 mg/ml의 농도로 15분간 처리하여 흡수능력을 검증하였다. ICG 처리 후 12시간 뒤 ICG 잔존 여부를 확인하여 흡수 후 세포 외 분비 능력을 검증하였다.

[0162] 효소면역측정법(enzxyme-linked immunosorbent assay, ELISA)를 통한 단백질 분비량 측정

[0163] 복합세포 간오가노이드의 단백질 분비량 측정을 위해 단백질 별로 다음 표의 ELISA 키트를 사용하였으며, 실험 과정은 각 키트별로 제조사의 프로토콜을 따라 3회 이상의 독립적인 실험을 수행하였다(표 4).

표 4

[0164] 사용된 ELISA 키트

단백질	제조사	제품 번호
IL6	R&D	D6050
IL8	R&D	D800C
TNF α	Abcam	ab181421
CK18-30	Abcam	ab254515
P1CP	Takara	MK101

[0166] 복합세포 간오가노이드 특성 분석을 위한 실험

[0167] 복합세포 간오가노이드의 특성 중 요소 생성량을 확인하기 위해 quantichrom urea assay kit (BioAssay Systems)을 제조사 프로토콜대로 사용하였으며, CYP 약물대사효소 활성 측정을 위해 P450-Glo™ CYP3A4 assay (Promega), P450-Glo™ CYP2C9 assay (Promega), P450-Glo™ CYP2C19 assay (Promega), P450-Glo™ CYP1A2 assay (Promega), P450-Glo™ CYP2D6 assay (Promega)를 제조사 프로토콜에 따라 사용하였다. 복합세포 간오가노이드의 지질 특성 중 트라이글리세라이드 (triglyceride) 양 측정을 위해 triglyceride assay kit (Abcam)을 제조사 프로토콜에 따라 사용하였으며, 산화 스트레스의 검증 지표로 글루타싸이온 (glutathione, GSH) 과 산화형 글루타싸이온 (glutathione disulfide, GSSG)의 비율 (GSH/GSSG ratio)을 GSH/GSSG Ratio kit (Abcam)를 통해 측정하였다. 포도당 분비량의 경우 glucose assay kit (Abcam)을 제조사 프로토콜에 따라 사용하였으며 상기 모든 실험들은 3회 이상의 독립적인 반복을 수행하였다.

[0169] H&E (Hematoxylin & Eosin), Sirius red 및 Oil-Red-O 염색의 경우 (주)KP&T에 시험분석의뢰 하였으며, 주사전사 현미경 (transmission electron microscopy, TEM) 촬영의 경우 연세대학교 의료원 전자현미경실의 HT7800 (Hitachi) 모델을 사용하여 촬영하였다.

[0171] <실시예 1>

[0172] **복합세포 간오가노이드의 제조 및 이의 구성세포들의 존재와 분포 양상 확인**

[0173] 본 발명자들은 앞서 기술된 방법을 통해 hiPSC 세포주인 HDF를 기반으로 간전구세포 오가노이드와 3종의 비실질 세포인 혈관내피세포 (Endothelial cell, EC), 간성상세포 (Hepatic stellate cell, HSC), 쿠퍼면역세포 (Kupffer cell, KC)를 분화 시킨 후 복합세포 간오가노이드를 제조하였다.

[0174] 이에 본 발명에서 제조된 복합세포 간오가노이드 내 구성세포들의 존재 형태를 분석하였고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0176] 도 1에서 A는 앞서 기술한 본 발명에 따른 복합세포 간오가노이드의 제작 과정을 모식도로 나타낸 것으로, 복합 세포 간오가노이드 제작을 위한 4종의 세포, 세포 조립 플랫폼, 기간 및 배지, 복합세포 간오가노이드 배양 플랫폼, 기간 및 배지에 대한 내용을 나타낸 것이다. B는 복합세포 제작에 사용된 유도만능줄기세포 유래 3종의 비실질세포들인 혈관내피세포 (hiPSC-EC), 간성상세포 (hiPSC-HSC), 쿠퍼면역세포 (hiPSC-KC)와 간전구세포 오가노이드(hiPSC-Org)를 위상차현미경으로 관찰한 이미지 (phase-contrast image)이며, 4종의 세포 모두 전형적인 각 세포의 세포 형태(morphology)를 보임을 확인할 수 있었다(scale bar = 200 μ m). C는 복합세포 간오가노이드 제작 및 배양 과정 중, 각각의 특정 시점에서 복합세포 간오가노이드의 형태를 위상차 현미경으로 촬영한 이미지로서(scale bar = 200 μ m), 세포 조립을 위한 4종의 간 구성세포의 분주(시딩) 직후에는 개별 간전구세포 오가노이드와 비실질세포들이 하나의 오가노이드 단위체로 조립되어 있지 않은 형태이나, 24시간 동안 정적 배양을 진행한 경우(세포 조립 직후) 복합세포 간오가노이드의 모든 구성 세포들이 하나의 단위체로 세포 조립 되는 것으로 나타났다. 또한, 복합세포 간오가노이드의 분화가 진행됨에 따라(배양 7일 후 및 배양 15일 후) 전체적인 복합세포 오가노이드의 크기는 줄어들면서, 내부의 개별 간전구세포 오가노이드는 낭포성 (cystic) 형태에서 내부 공간이 채워진 형태로 변환되는 것을 확인하였다. 특히 분화가 완료된 시점의 복합세포 간오가노이드의 외부에서는 혈관 신생에 따른 발아 현상 (endothelial sprouting)을 확인할 수 있었다(도 1D)(scale bar = 200 μ m).

[0177] 또한, 복합세포 간오가노이드의 형태 및 구성 세포들의 분포 양상 확인을 위해 전조직 면역형광염색 (whole-mount immunofluorescence staining)을 세포조립 직후 시점(도 1E)과 분화 완료 시점(도 1F, 도 1G, 도 1H)에서 수행하였는데, 그 결과, 세포조립 직후 시점의 경우 성숙 간세포 표지 인자인 HNF4 α 와 E-cadherin이 복합세포 간오가노이드의 구조 중 낭포 구조의 간전구세포 오가노이드에서 특이적으로 발현하는 것을 확인하였다(도 1E). 특히, 혈관내피세포 표지 인자인 CD31의 경우 반복적인 간전구세포 오가노이드 구조 사이사이에 네트워크 형태로 발현하는 것을 확인함으로써 실제 생체와 유사한 구조로 세포조립이 이루어진 것을 확인하였다 (도 1E). 분화 완료 시점의 복합세포 간오가노이드 면역형광염색 이미지 분석 결과, 혈관내피세포 표지인자인 CD31이 분기된 혈관 형태 (vasculature)로 발현하고 있으며, 쿠퍼면역세포 표지인자인 CD68의 경우 혈관 구조와 공존 (co-localization)하는 형태로 발현하는 것을 확인하였다(도 1F). 특히 CD31을 발현하는 혈관 내피세포와 CD68을 발현하는 쿠퍼면역세포가 E-cadherin으로 표지된 유사 간 로블 (hepatic lobule-like) 구조의 간세포 사이사이에 공존하며 분포하는 것을 확인하였다(도 1F). NG2를 발현하는 간성상세포의 경우 쿠퍼면역세포와 마찬가지로, E-cadherin으로 표지된 유사 간 로블 구조 사이사이에 VE-cadherin으로 표지된 혈관내피세포 vasculature와 공존하는 것을 확인하였다(도 1G). 또한, 성숙 간세포 표지인자인 A1AT와 HNF4 α 의 경우, 도 1F와 1G에서 나타난 유사 간 로블 구조로 발현하고 있으며, 그 사이로 혈관내피세포 표지 인자인 VE-cadherin이 혈관구조 (vasculature) 형태로 발현하는 것을 확인할 수 있었다(도 1H).

[0179] 이를 통해 본 발명의 복합세포 간오가노이드 제조를 위해 사용된 혈관내피세포, 간성상세포 및 쿠퍼면역세포가 분화 완료 시점에 존재하고 있음을 확인하였고, 특히 유사 간 로블 형태로 분포하고 있는 다수의 단일 간세포

오가노이드 사이의 혈관 구조와, 혈관 구조 부분에 특이적으로 분포하고 있는 간성상세포와 쿠퍼면역세포의 존재를 확인함으로써, 본 발명의 복합세포 간오가노이드는 생체 간 구조와 높은 유사도를 보인다는 것을 확인할 수 있었다.

[0181] <실시예 2>

[0182] 본 발명의 복합세포 간오가노이드의 구조적 생체유사도 확인

[0183] 분화가 완료된 본 발명의 복합세포 간오가노이드에 대해 구조적 생체유사도를 확인하기 위하여 복합세포 간오가노이드 내 혈관 구조 및 간세포 구조를 분석하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0185] 먼저 복합세포 간오가노이드 내 혈관 구조의 분석을 위해 전조직 면역형광 염색을 통해 간세포 표지인자 E-cadherin, 혈관내피세포 표지인자 CD31과 쿠퍼 면역세포 표지인자 CD68의 발현 양상을 분석하였다. 공초점 현미경으로 (confocal microscopy) 촬영한 결과, 유사 간 로블 형태의 E-cadherin 발현과 혈관 구조(vasculature) 형태의 CD31 발현 및 혈관 구조와 공존하는 CD68의 발현 양상을 확인할 수 있었다(도 2A) (scale bar = 200 μ m). 존재하는 혈관 구조의 자세한 분석을 위해 복합세포 간오가노이드를 공초점 현미경으로 고배율 z-stack 촬영하여 내부 구조를 확인한 결과 CD31을 발현하는 혈관내피세포의 관(lumen)형 구조를 확인할 수 있었다(도 2B의 2번 및 3번). 특히, CD68을 발현하는 일부 쿠퍼면역세포가 CD31로 표현된 관형 혈관 구조의 내부에 존재하는 것을 확인하였다(도 2B의 1번 및 4번) (scale bar = 100 μ m).

[0186] 이러한 결과를 통해 본 발명의 복합세포 간오가노이드 내에는 생체와 유사한 관형의 혈관 네트워크가 형성되어 있으며, 혈관 내부의 쿠퍼면역세포가 존재하고 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[0188] 나아가, 혈관 구조의 검증을 위해 주사전자현미경(transmission electron microscopy, TEM) 관찰을 수행한 결과, 내부가 비어 있는 관형 구조의 단면을 확인하였다(도 2C) (scale bar = 2 μ m). 또한, 관형 혈관 구조에서 세포막이 단절된 양상을 관찰하였고(도 2C, 우측), 이를 통해 간 동양혈관내피세포 (liver sinusoidal endothelial cell)의 특성 중 하나인 천공구조 (fenestrae)가 존재한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0189] 또한, 본 발명의 복합세포 간오가노이드의 내부 구조 확인을 위해 동결절단 후 면역형광염색을 진행하였으며, 그 결과 간세포 막 전반에 발현하는 것으로 알려진 E-cadherin과 달리 극성(polarity)을 가진 성숙한 간세포의 정단막 (apical membrane)에 특이적으로 발현한다고 알려진 ZO-1이 복합세포 간오가노이드의 간세포 내부 단면에만 특이적으로 발현하는 것을 확인하였다(도 2D, 좌측) (scale bar = 100 μ m). 또한, CD31을 발현하는 혈관 세포의 경우 복합세포 간오가노이드 내부에서도 간세포 사이에 분포하는 것을 확인함으로써, 복합세포 간오가노이드의 외부뿐만 아니라 내부에도 혈관 네트워크가 존재하는 것을 확인하였다(도 2D, 우측) (scale bar = 100 μ m).

[0191] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명의 복합세포 간오가노이드가 관형 혈관 네트워크(luminal vascular network)를 형성하고 있고, 성숙한 간세포에서 보이는 극성 현상이 나타남에 따라 생체와 매우 높은 유사도를 가지고 있음을 알 수 있었다.

[0193] <실시예 3>

[0194] 본 발명의 복합세포 간오가노이드에 대한 간 성숙도 및 기능성 검증확인

[0195] 본 발명의 복합세포 간오가노이드에 대한 간 성숙도와 약물대사능을 포함한 간 기능성 검증을 위해, 2D 분화된 간세포(2D Hep), 간 전구세포 오가노이드를 분화시킨 단일 간세포 오가노이드(Simple org.) 및 본 발명에서 제조한 복합세포 간오가노이드 (Multi org.)를 비교분석하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0197] 간 성숙도 분석을 위해 대표적인 성숙 간세포 마커 5종(ALB, ASGPR1, CEBPA, HNF4A, G6PC)의 유전자 발현을

qRT-PCR을 통해 분석한 결과, 모든 성숙 간세포 마커 5종의 발현이 2D 분화 간세포 보다 본 발명의 복합세포 간 오가노이드에서 유의미하게 증가한 것으로 나타났고, ALB과 HNF4A 마커의 경우, 단일 간세포 오가노이드와 비슷한 수준의 발현을 보였다(도 3A). 그러나 단일 간세포 오가노이드와 다르게 본 발명의 복합세포 간 오가노이드에는 비실질세포들이 포함되어 있다는 점을 고려할 때, 비슷한 수준의 성숙 간세포 마커 발현은 복합세포 간 오가노이드에서 단일 간세포 오가노이드에 비해 보다 유의미한 간세포 성숙이 진행된 것으로 판단할 수 있다(도 3A).

[0198] 또한, 대표적인 간 기능성을 평가할 수 있는 지표인 요소 생성을 분석한 결과, 본 발명의 복합세포 간 오가노이드에서 가장 높은 생성량을 보였고(도 3B), 간세포의 수송단백질을 통한 인도시아닌그린 (indocyanine green) 흡수 및 세포 외 분비를 검증한 결과, ICG의 흡수와 세포 외 분비도 복합세포 간 오가노이드에서 원활히 이루어지는 것으로 나타났다(도 3C) (scale bar = 200 μ m).

[0200] 나아가, 가장 중요한 간 기능성 확인 지표인 약물대사 측면을 확인하기 위해, 약물대사 효소 8종(CYP3A4, CYP2D6, CYP2C8, CYP2B6, CYP2E1, CYP2C19, CYP3A5, CYP3A7)의 유전자 발현을 qRT-PCR로 분석한 결과, 모든 CYP 약물대사 효소들의 발현이 2D 분화 간세포보다 복합세포 간 오가노이드에서 유의미하게 더 향상된 것으로 나타났다(도 3D). 특히, CYP2C19와 CYP3A5 및 태아 특이적으로 높게 발현하는 CYP3A7을 제외한 나머지 5종(CYP3A4, CYP2D6, CYP2C8, CYP2B6, CYP2E1)의 CYP 약물대사 효소 유전자 발현은 단일 간세포 오가노이드보다 복합세포 간 오가노이드에서 유의미하게 더 높아진 것으로 나타났다(도 3D).

[0202] 또한, 실질적인 약물대사능 검증을 위해 CYP 약물대사 효소 5종(CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP1A2, CYP2C19)의 활성을 비교 분석한 결과, 모든 CYP 약물대사 효소들의 활성이 2D 분화 간세포보다 본 발명의 복합세포 간 오가노이드에서 유의미하게 더 높았으며, CYP2C19를 제외한 4종(CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP1A2, CYP2C19)의 약물대사 효소 활성의 경우 단일 간세포 오가노이드보다 복합세포 간 오가노이드에서 더 높은 것으로 나타났다(도 3E).

[0204] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 본 발명의 복합세포 간 오가노이드가 기존 2D 분화 간세포 및 단일 간세포 오가노이드와 비교했을 때, 간성숙도 마커의 발현, 요소 생성 및 약물대사효소 활성과 같은 대표적인 간 기능성이 더 높은 것을 알 수 있었다.

[0206] <실시예 4>

[0207] 지방산 처리를 통한 복합세포 간 오가노이드의 지방증(steatosis) 유도 및 검증

[0208] 나아가 본 발명자들은 본 발명에서 제조한 복합세포 간 오가노이드를 이용하여 실질적으로 간 질환이 발병된 조직 모델로 사용 가능한지를 확인하기 위해, 비알콜성 지방간염의 질환 스펙트럼 중 지방증(steatosis) 측면의 질환 특성 검증을 위해 본 발명의 복합세포 간 오가노이드에 지방증이 유발된 질병 모델의 제조가 가능한지 확인하기로 하였다.

[0209] 이를 위해 알부민 (albumin)에 소든파르미트산 (sodium palmitate)과 소듐올레산 (sodium oleate)을 결합한 형태의 지방산을 800 μ M의 농도로 본 발명의 복합세포 간 오가노이드 배양 기간의 마지막 5일 동안 처리하였다(도 4A).

[0210] 그런 뒤, 위상차현미경 촬영을 통해 확인한 결과, 지방산 처리 기간이 길어짐에 따라 본 발명의 복합세포 간 오가노이드 내부에 지방이 축적되고 세포 사멸 현상이 발생하는 것으로 나타났고, 이러한 현상에 따라 오가노이드가 어두워지는 것을 (dark morphology) 확인하였다(도 4B) (scale bar = 200 μ m). TEM 촬영 결과에서는 지방산 처리를 하지 않은 대조군 (control)의 경우 전형적인 간세포의 특징인 미세융털 (microvilli, MV)과 인접한 세포와의 밀착연접 (tight junction, TJ) 구조가 관찰되었으나, 지방산 처리군의 경우 미세융털 및 밀착연접 구조가 손상된 반면 대조군과 다르게 다수의 지방 방울(lipid droplet, LD)이 간세포 내부에 축적된 것을 확인하였다(도 4C) (scale bar = 5 μ m). 추가적인 지방 축적 현상 검증을 위해 중성지방을 염색하는 형광 시료인 Nile red와 간세포 특이적 마커인 E-cadherin으로 전조직 면역형광염색을 진행한 결과, 대조군과 달리 지방산

처리군에서 복합세포 간오가노이드의 간세포 부분 내에 특이적으로 Nile Red의 면적 및 강도가 증가한 것을 확인하였다(도 4D) (scale bar = 200 μ m). 또한, 조직학적 염색 방법인 Oil-Red-O 염색을 진행한 결과 지방산 처리 군에서 빨간색으로 염색되는 중성지방의 양이 대조군 대비 크게 증가한 것을 확인하였다 (도면 4E) (scale bar = 100 μ m). 또한, 간세포 내 지방방울의 가장 주요한 구성 성분인 트라이글리세라이드 (triglyceride, TG)의 양을 복합세포 간오가노이드에서 측정된 결과, 지방산 처리군에서 대조군 대비 약 6배 증가한 TG 양을 확인하였다(도 4F). 또한, qRT-PCR 분석 결과, 지방방울 형성 (PLIN2), 지방산 대사 (ACSL5, ACADVL, PDK4, GSK3B), 지방산 산화 (CPT1A, ACOX1) 및 지방 신생합성 (DGAT2)과 같이, 지방증과 직접적으로 관련된 지방대사 관련 유전자들의 발현이 지방산을 처리한 복합세포 간오가노이드에서 유의미하게 증가한 것을 확인하였다(도 4G). 추가적으로, 지방산 처리에 따른 간세포의 인슐린 저항성 검증을 위해 지방산 처리군과 대조군의 배양액 내 포도당 양을 측정된 결과, 지방산을 처리한 복합세포 간오가노이드에서 인슐린 저항성에 따른 포도당 분비 증가 현상을 확인하였다(도 4H).

[0212] 이를 통해 본 발명자들은 본 발명의 복합세포 간오가노이드에 지방산을 처리한 결과, 지방 축적 증가, 지방 대사 변화, 세포 손상 및 인슐린 저항성과 같은 지방증 관련 질환 특성을 갖는 것을 확인할 수 있었고, 궁극적으로 본 발명의 복합세포 간오가노이드를 이용하여 간 질환이 발병된 조직 모델링이 가능함을 알 수 있었다.

[0214] <실시예 5>

[0215] 지방산 처리를 통한 복합세포 간오가노이드의 염증반응(inflammation) 유도 및 검증

[0216] 다음으로 본 발명자들은 지방산이 처리된 본 발명의 복합세포 오가노이드가 비알콜성 지방간염의 질환 스펙트럼 중 염증반응 (inflammation) 관련 질환 특성을 갖는지 검증하였다(도 5).

[0218] qRT-PCR을 통해 대표적인 쿠퍼면역세포 마커(CD68, GPBAR1, CD163, TLR4, CD14)의 발현을 종합적으로 분석한 결과, 지방산 처리에 따라 복합세포 간오가노이드에서 상기 유전자들의 발현이 유의미하게 증가한 것을 확인하였다(도 5A). 염증반응을 일으키는 대표적인 염증성 사이토카인들 (TNFA, IL1A, IL6, IL8, CXCL10)의 유전자 발현 또한 지방산이 처리된 복합세포 간오가노이드에서 유의미하게 증가하였으며, 항염증성 사이토카인으로 알려진 IL10 유전자 발현은 지방산이 처리된 복합세포 간오가노이드에서 유의미하게 감소한 것을 확인하였다(도 5B).

[0220] ELISA를 통해 상기 염증성 사이토카인 중 IL6, IL8, TNF α 의 실질적인 단백질 분비를 측정된 결과 지방산 처리에 따라 복합세포 간오가노이드에서 상기 3종의 (IL6, IL8, TNF α) 사이토카인 분비가 모두 유의미하게 증가한 것을 확인하였다(도 5C, 5D, 5E).

[0221] 이를 통해, 지방산이 처리된 본 발명의 복합세포 간오가노이드를 이용하여 염증반응과 관련된 유전자 및 단백질의 발현수준 분석을 통해 염증 관련 질환 특성을 유도 및 분석할 수 있음을 알 수 있었다.

[0223] <실시예 6>

[0224] 지방산 처리를 통한 복합세포 간오가노이드의 모세혈관화(capillarization) 및 세포 스트레스 분석

[0225] 지방산에 처리된 복합세포 간오가노이드를 대상으로, 비알콜성 지방간염의 질환 스펙트럼 중 동양혈관내피세포의 천공구조가 사라지는 혈관내피세포의 모세혈관화 (capillarization) 현상 및 다양한 종류의 세포 스트레스 현상이 나타나는지를 분석하였고 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0227] qRT-PCR을 통해 모세혈관화 현상을 나타내는 다양한 유전자들의 발현을 비교 분석한 결과, 모세혈관화 지표 유전자들인 (CD31, CD34, CD144, CD44)의 발현이 지방산 처리에 따라 복합세포 간오가노이드에서 유의미하게 증가하였으며, 모세혈관화 현상에 의해 발현이 증가하며, 면역세포들과의 결합을 통한 염증반응 가속화를 일으키는 것으로 알려진 세포 부착 분자 (cell adhesion molecule) VCAM1, AOC3 및 ICAM1의 유전자 발현이 유의미하게

증가한 것을 확인하였다(도 6A). 반면 천공 구조 형성에 기여하는 PLVAP 유전자 발현의 경우, 지방산 처리에 의한 모세혈관화가 일어나며 유전자 발현이 유의미하게 감소한 것을 확인하였다(도 6A). 비알콜성 지방간염의 경우 과도한 지방산 베타산화 및 지질 과산화 현상으로 인해 산화성 스트레스 (oxidative stress)에 노출되는 것으로 알려져 있다. 이에 인체의 항산화 기전 중 하나이며 세포 산화 스트레스의 지표인 글루타싸이온 (glutathione, GSH)과 산화형 글루타싸이온 (glutathione disulfide, GSSG)의 비율 (GSH/GSSG ratio)을 확인하였다. 그 결과, 증가한 산화 스트레스로 인해 지방산을 처리한 복합세포 간오가노이드의 상기 항산화 기전이 고갈되며 GSH/GSSG ratio가 감소한 것을 확인하였다(도 6B). 또한, 실제 임상에서 단순한 지방증과 실질적으로 간세포가 사멸하는 비알콜성지방간염을 구분하는 비침습적인 바이오마커 (non-invasive biomarker)인 CK18-30의 분비를 ELISA를 통해 측정한 결과, 지방산을 처리한 복합세포 간오가노이드에서 유의미하게 분비가 증가한 것을 확인하였다(도 6C). 비알콜성 지방간염에 동반되는 지방 과축적, 산화 스트레스 및 염증반응은 소포체 (endoplasmic reticulum) 스트레스를 증가시키는 것으로 알려져 있으며, 이에 지방산을 처리한 복합세포 간오가노이드를 분석한 결과, 대조군 대비 3종의 소포체 스트레스 지표 유전자 ATF6, IRE1 및 PERK의 발현이 유의미하게 증가한 것을 확인하였다(도 6D).

[0229] 이를 통해, 지방산이 처리된 복합세포 간오가노이드는 모세혈관화 현상을 비롯하여 산화 스트레스, 소포체 스트레스 및 CK18-30 단백질 분비가 증가한 것을 확인할 수 있었고, 따라서 생체 간에서 일어나는 질환 특성 모델링 연구에 본 발명의 복합세포 간오가노이드를 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

[0231] <실시예 7>

[0232] 지방산 처리를 통한 복합세포 간오가노이드의 조직학적 변화 및 간 섬유화 여부 검증

[0233] 나아가 본 발명자들은 본 발명의 복합세포 간오가노이드에 지방산을 처리함에 따라 나타나는 조직학적 변화 및 지방산 처리만으로 비알콜성지방간염이 심화될 경우 나타나는 간 섬유화 현상 확인이 가능한지 검증하였다. 검증 결과는 도 7에 나타내었다.

[0235] 비알콜성지방간염의 조직 기반 진단법인 NAS 점수 (NAFLD activity score, NAS)의 경우 3가지 질환 특성에 대한 평가가 이루어지며 그 중 두 가지 특성인 1) 간세포 지방방울 형성, 및 2) 간세포 풍선변성 (hepatocyte ballooning) 현상이 지방산을 처리한 복합세포 간오가노이드에서 나타나는지 검증하였다(도 7A) (scale bar = 200 μ m). H&E (Hematoxylin & Eosin) 염색 결과 대조군 복합세포 간오가노이드의 경우 밀집된 간세포 형태(도 7A, 윗줄)를 확인할 수 있었으나, 지방산을 처리한 복합세포 간오가노이드의 경우 세포 내부에 흰색으로 표현된 지방방울과 (도 7A, 밑줄 검정색 화살표) 부푼 세포질을 가진 풍선변성(도 7A, 밑줄 빨간색 화살표)이 일어난 것을 확인하였다. 간 섬유화의 경우 간성상세포가 활성화되며 세포외기질의 종류 중 하나인 콜라겐 (collagen)이 과도하게 분비되어 과축적으로 섬유화가 심화되며, 지방산 처리만으로 콜라겐 축적이 증가하는지 검증을 위해 콜라겐을 염색하는 조직학적 염색법인 시리우스레드 (Sirius red) 염색을 진행하였다(도 7B) (scale bar = 200 μ m).

[0236] 그 결과, 대조군 복합세포 간오가노이드(도 7B, 윗줄) 대비 지방산을 처리한 복합세포 간오가노이드(도 7B, 밑줄)에서 빨간색으로 표현되는 콜라겐 축적 현상이 오가노이드 단면의 내부 및 외부에서 증가한 것을 확인하였다(도 7B). 섬유화가 일어난 간의 경우, 정상 간 보다 콜라겐 종류 중 특히 제 1형 콜라겐 (collagen type 1)의 생성 및 축적이 증가하는 것으로 알려져 있으며, 이에 따라 전조직 면역형광염색을 통해 제 1형 콜라겐의 축적을 검증하였다(도 7C) (scale bar = 200 μ m). 그 결과, E-cadherin으로 표현된 복합세포 간오가노이드의 간세포의 부분 주변에서 대조군 오가노이드(도 7C, 윗줄) 대비 지방산처리 오가노이드 (도 7C, 밑줄)에서 제 1형 콜라겐의 양이 증가한 것을 확인하였다.

[0237] 또한, qRT-PCR 분석 결과, 간 섬유화와 관련된 유전자들 중 간성상세포 활성화 (ACTA2), 세포외기질 축적 및 리모델링 (CCN2, MMP1, MMP3, TIMP1), 간 섬유화 신호전달 기전 (PDGFB, PDGFRB, GREM1) 관련 유전자들의 발현이 간 섬유화 유도 방향으로 유의미하게 증가한 것을 확인하였다(도 7D). 특히, 간 섬유화 환자에서 높은 혈청 농도를 보이는 제 1형 프로콜라겐 C-펩티드 (Procollagen type 1 C-peptide, P1CP)의 분비량이 지방산을 처리한 복합세포 간오가노이드에서 유의미하게 증가한 것을 확인하였다(도 7E).

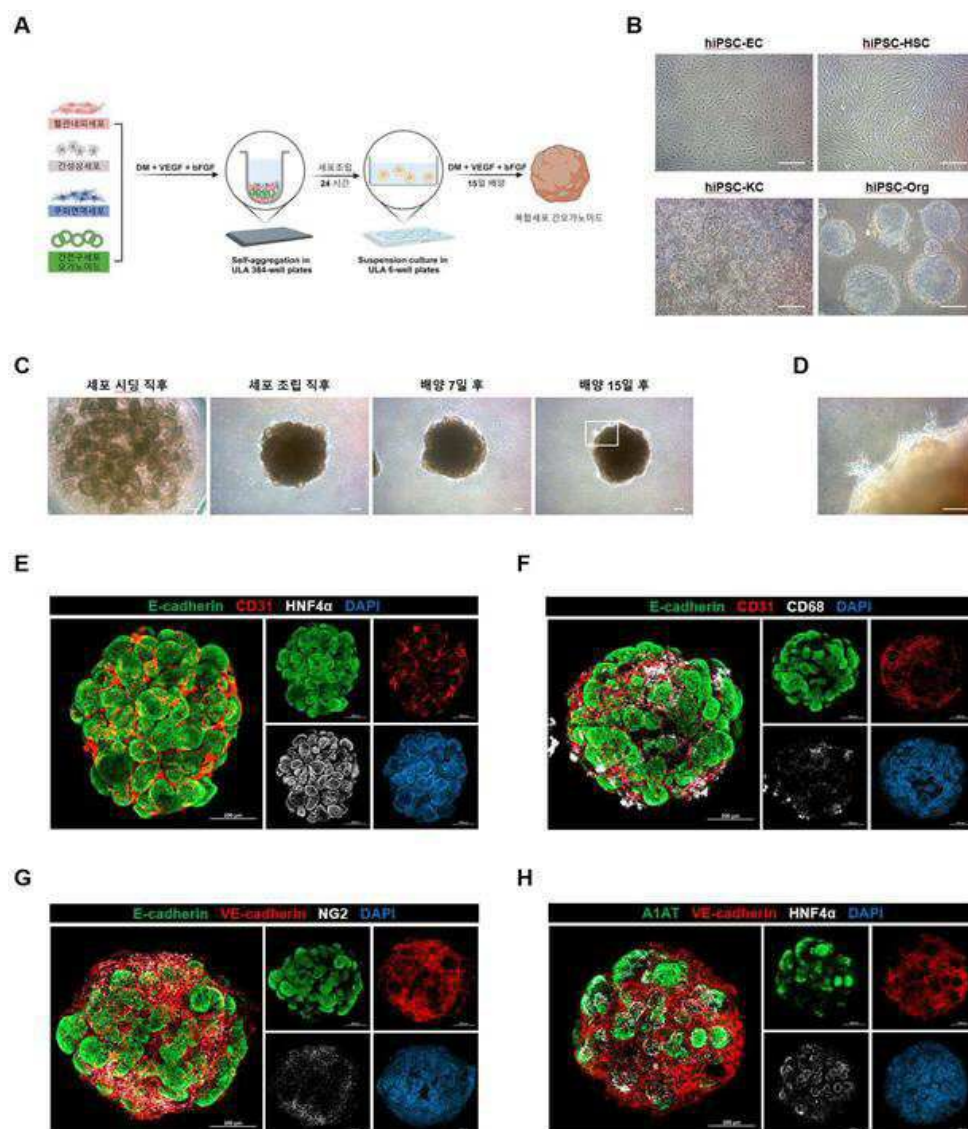
[0239] 이를 통해, 본 발명자들은 지방산이 처리된 본 발명의 복합세포 간오가노이드는 조직학적 레벨에서 비알콜성 지방간염 진단 지표로 쓰이는 지방 축적 및 풍선변성 현상이 확인되었고, 따라서 지방산 처리만으로 복합세포 간오가노이드의 간 섬유화 모델링이 가능함을 유전자 수준, 조직학적 수준 및 단백질 수준에서 검증할 수 있었다.

[0240] 그러므로 본 발명자들은 본 발명의 복합세포 간오가노이드가 생체 간과 가장 유사한 형태를 가질 수 있으며, 지방산 처리 시 비알콜성지방간염 등 간질환이 발병된 형태와 특징을 갖는 간조직을 모사할 수 있음을 확인함으로써, 질병의 연구 및 치료제의 개발 등에 매우 유용하게 사용할 수 있음을 알 수 있었다.

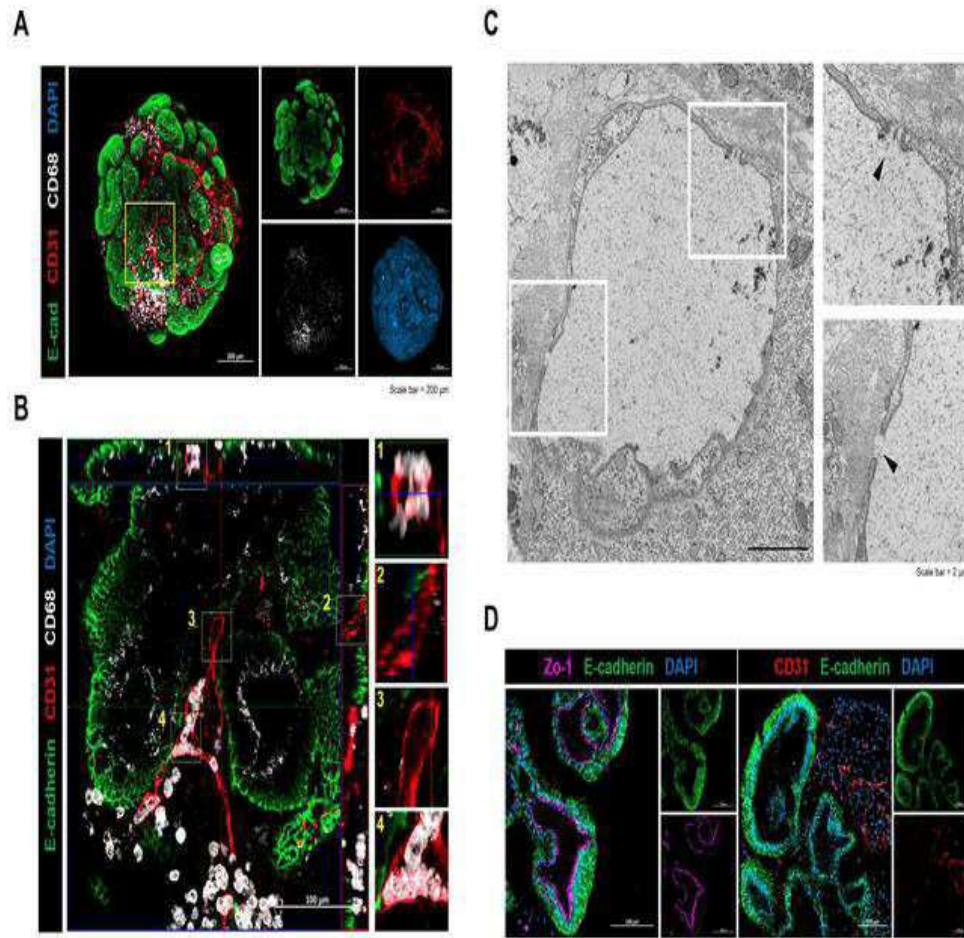
[0242] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시 예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

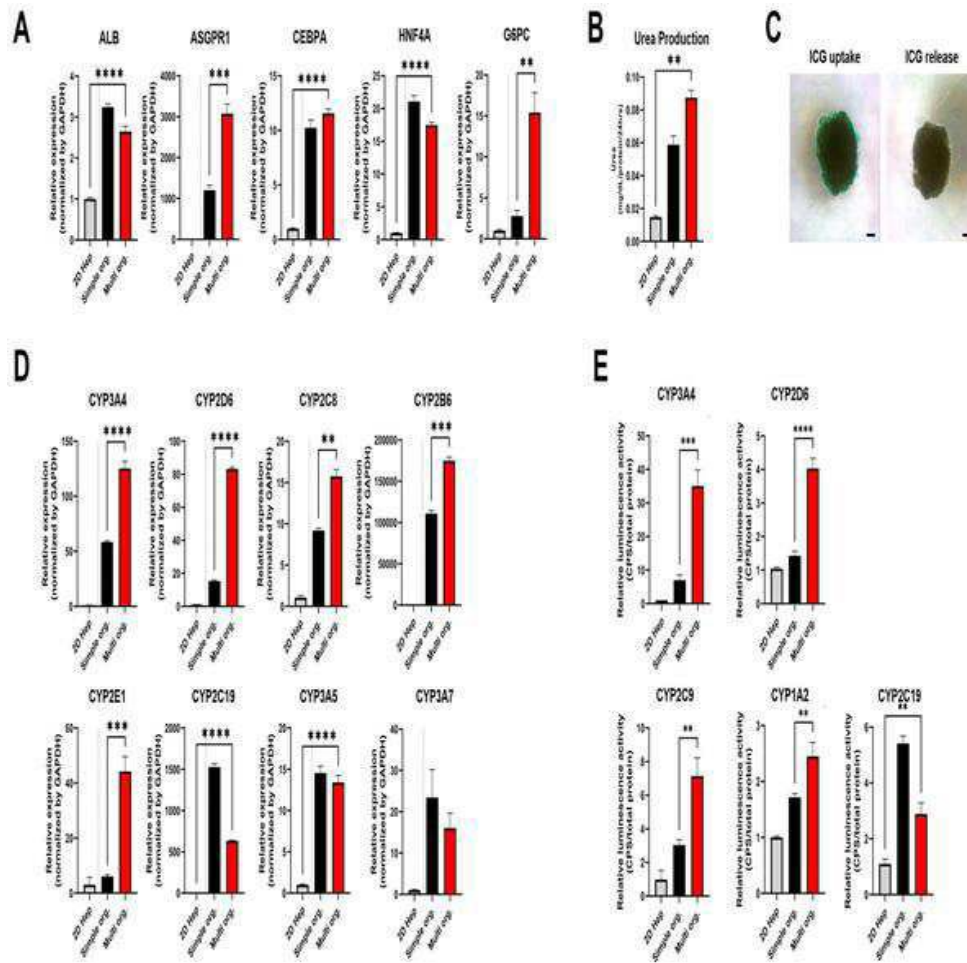
도면1



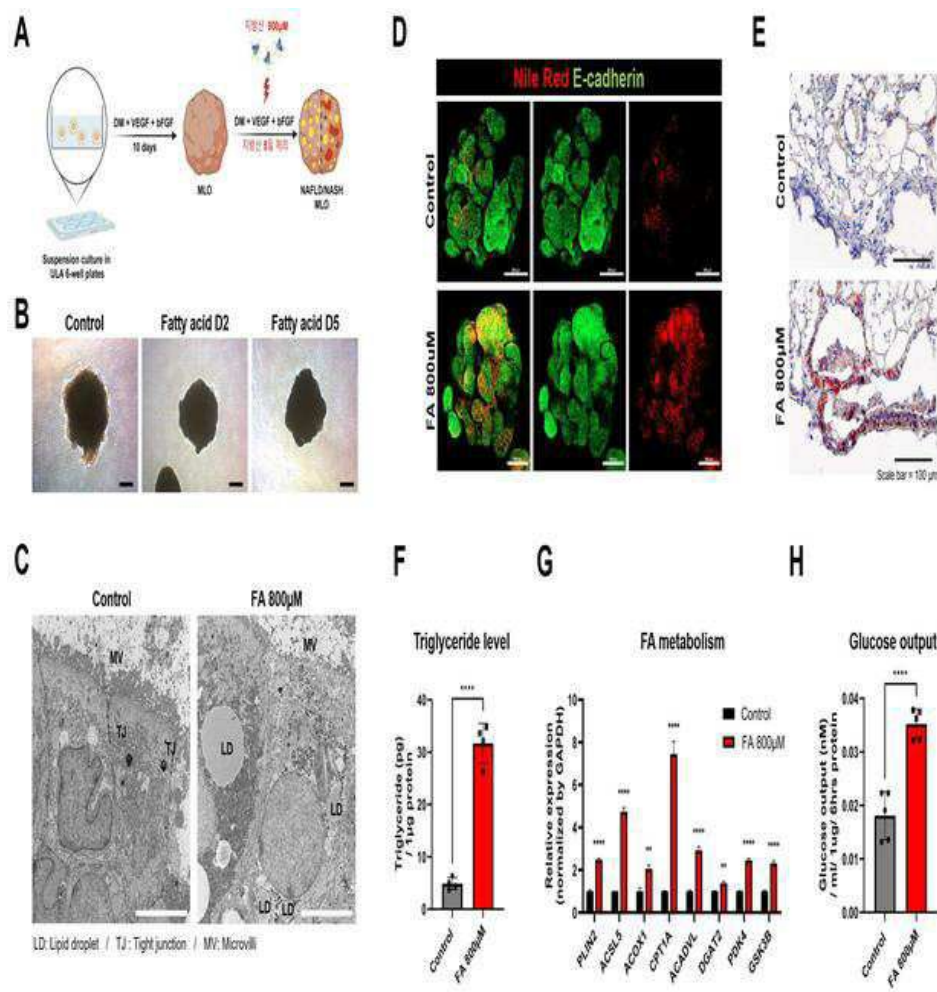
도면2



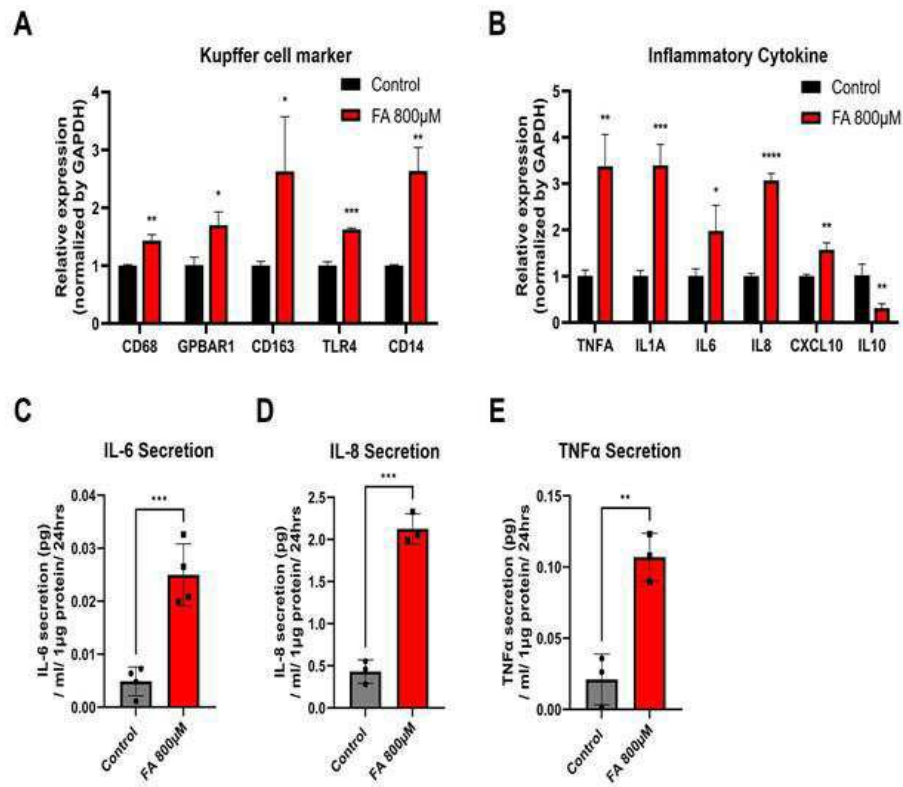
도면3



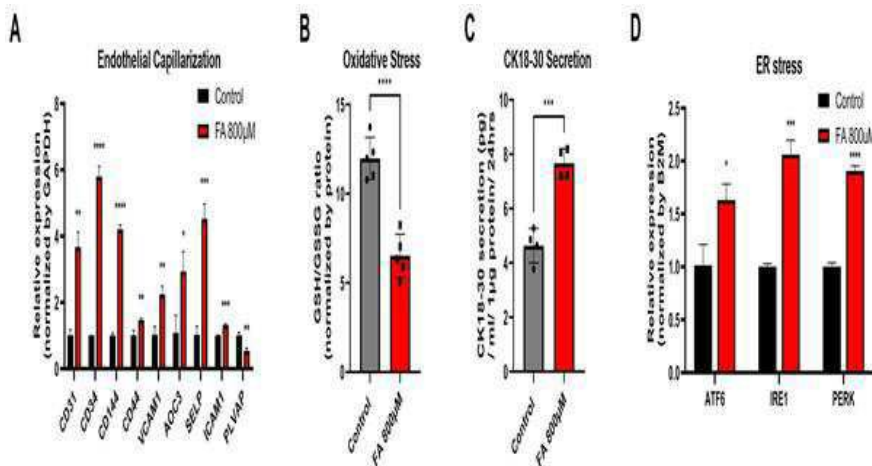
도면4



도면5



도면6



도면7

