



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0175266
(43) 공개일자 2024년12월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/09 (2010.01) C12N 5/071 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0693 (2013.01)
C12N 5/0697 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0075202
(22) 출원일자 2023년06월12일
심사청구일자 2023년06월12일

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
최중우
서울특별시 강남구 봉은사로105길 45, 현대빌라2
차 B동 301호
정기석
서울특별시 송파구 토성로 38-6, 한강극동아파트
107동 703호
정다정
경기도 성남시 수정구 수정로 319, 산성역포레스
티아아파트 134동 303호
(74) 대리인
특허법인태평양

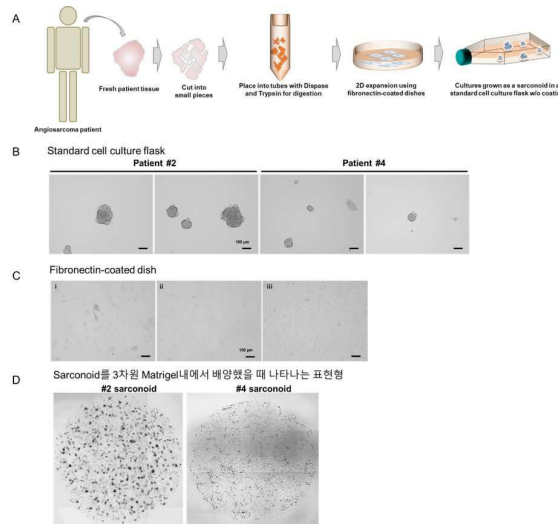
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 3차원의 육종 오가노이드 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 3차원의 육종 오가노이드 제조 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 환자 유래 육종 세포를 코팅되지 않은 배양 용기에서 배양하는 단계; 및 상기 배양 용기에서 탈착되어 부유하는 세포의 응집체를 수득하는 단계를 포함하는 3차원의 육종 오가노이드 제조 방법을 제공한다. 본 발명에 따른 3차원 육종 오가노이드 제조 방법을 이용하는 경우 오가노이드화 효율이 좋아지며 계대 배양이 가능하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2501/727 (2013.01)

C12N 2501/91 (2013.01)

C12N 2513/00 (2013.01)

C12N 2533/52 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465039079

과제번호 HR21C0198020023

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 연구중심병원 육성 R&D

연구과제명 체외환자 모델의 데이터 기반 분류를 통한 인공지능형 약물 반응 예측 기술 개발

기 여 율 80/100

과제수행기관명 서울아산병원

연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711181669

과제번호 2022R1F1A1069608

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 혈관육종 오가노이드 구축 및 약물 재창출을 위한 약리효능평가에 적용을 위한 연구

기 여 율 20/100

과제수행기관명 서울아산병원

연구기간 2023.03.01 ~ 2024.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

환자 유래 육종 세포를 코팅되지 않은 배양 용기에서 배양하는 단계; 및
상기 배양 용기에서 탈착되어 부유하는 세포의 응집체를 수득하는 단계;를 포함하는 3차원의 육종 오가노이드 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 환자 유래 육종 세포는, 환자에서 채취한 육종 세포를 피브로넥틴이 코팅된 배양 용기에서 사전 배양한 것인, 3차원의 육종 오가노이드 제조 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,
상기 사전 배양은 비타민 A가 없는 B27, N2 보충제, 헤파린 및 ROCK(Rho-associated protein kinase) 저해제를 포함하는 FBS-비함유 배지 조성물을 이용하여 수행되는 것인, 3차원의 육종 오가노이드 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,
상기 육종 세포는 혈관 육종, 지방 육종, 섬유 육종, 혈관외피종, 골육종, 말초 신경의 악성 종양, 활막 육종, 횡문근 육종 및 평활근 육종으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 1종 이상인, 3차원의 육종 오가노이드 제조 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,
상기 육종 세포는 혈관 육종인 것인, 3차원의 육종 오가노이드 제조 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 배양은 비타민 A가 없는 B27, N2 보충제 및 헤파린을 포함하는 FBS-비함유 배지 조성물을 이용하여 수행되는 것인, 3차원의 육종 오가노이드 제조 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 배양은 5일 내지 14일동안 이루어지는, 3차원의 육종 오가노이드 제조 방법.

청구항 8

제1항에 있어서

상기 탈착은 육종 세포로부터 분리된 MMP에 의해 세포의 응집체가 비인위적으로 배양 용기로부터 탈착되는 것인, 3차원의 육종 오가노이드 제조 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 세포의 응집체를 PROCR를 바이오마커로 하여 3차원의 육종 오가노이드를 확인하는 단계를 포함하는, 3차원의 육종 오가노이드 제조 방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 세포의 응집체를 수득하는 단계는 2회 이상 반복 수득 가능한 것인, 3차원의 육종 오가노이드 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 육종 세포를 체외에서 3차원으로 배양하여 오가노이드를 제작하는 방법에 관한 기술이다.

배경 기술

[0003] 수십년 동안, 수술, 화학 요법 및 방사선은 다양한 암에 대한 확립된 치료법이였다. 환자들은 일반적으로 그들의 질병의 유형 및 정도에 따라 이들 치료법의 조합을 적용받았다. 그러나, 화학 요법은 외과적 치료(즉, 질병 조직의 제거)가 불가능할 때 암 환자를 위한 가장 중요한 옵션이었다. 수술은 유방, 결장 및 피부의 특정 부위에 위치한 종양을 제거하는 데 효과적이지만, 이는 척추와 같은 다른 영역에 위치한 종양의 치료, 또는 혈액 및 혈액-형성 조직(예컨대 골수)의 암을 비롯한 산재성 혈액암의 치료에는 사용될 수 없었다.

[0004] 고형 종양은 일반적으로 낭종 또는 액체 영역을 함유하지 않는 비정상적인 조직 덩어리이다. 다양한 유형의 고형 종양은 종양을 형성하는 세포의 유형에 대해 명명될 수 있으며, 고형 종양의 예는 암종 및 육종이다. 암은 임상에서 관찰되는 경우의 대부분을 포함하는 암종(carcinoma)과 백혈병, 림프종, 중추신경계 종양 및 육종(sarcoma)을 포함하는 조금 덜 빈번하게 발생하는 암으로 분류될 수 있다. 암종은 상피조직으로부터 발생하는 반면에 육종은 결합 조직 및 중배엽 조직으로부터 기원하는 조직으로부터 유래된다. 예를 들어, 육종은 근육 또는 뼈에 영향을 미치며, 혈관, 뼈, 방광, 신장, 간, 폐, 이하선(parotid) 또는 비장에서 발생할 수 있다. 암은 침습적(invasive)이며 새로운 위치로 전이되는 경향이 있다.

[0005] 암 치료에 있어, 환자 유래 암 오가노이드는 환자의 암조직 샘플에서 채취한 세포를 체외에서 배양하여 3차원의 세포 집합체로 형성하는 것으로, 환자의 유전적 특성을 그대로 가지고 있어 체내 특징을 장기적으로 보존하는데 유리한 것으로 여겨지고 있다. 또한, 오가노이드는 환자의 주요 유전적 특성을 가지고 있기 때문에 항암 표적치료제에 대한 반응이 환자와 유사하게 반응하는 장점을 가지고 있어서, 항암제 반응에 대해서 환자의 아바타 같은 역할을 수행할 수 있다.

[0006] 종래 3차원 오가노이드(Organoid)는 세포 외 기질을 모사하는 매트릭셀(Matrigel)과 같은 물질 속에서 배양되고, 이러한 3차원적인 배양 기술은 기존의 2차원적 세포 배양 방법과 달리 핵형변화가 극히 적고, 자발적인 암화과정이 없는 것으로 보고되고 있다.

[0007] 최근 3차원 장기모사 오가노이드는 질병 이해의 기초적인 연구뿐 아니라 환자 맞춤형 치료를 구현함에 있어서 필수적인 질병 모사 모델이 될 수 있기 때문에 향후 정밀의료분야에서 유용하게 적용될 것으로 예상되고 있다. 더욱 구체적으로는, 환자별로 성상이 다른 질병의 특징을 이해하고, 가장 효율적일 수 있는 약물을 오가노이드 플랫폼을 이용해 발굴해 내어 맞춤형 치료에 적용할 수 있을 것이며, 특히 조직재생, 장기구현과 같은 재생의학에 적용될 수 있을 것으로 학계는 판단하고 있다.

[0008] 기존에도 암종(carcinoma) 같은 상피성 종양에서 다양한 환자유래 암 오가노이드에 대한 배양법 및 이를 이용한 약물평가에 대한 보고는 있으나, 현재까지 육종(sarcoma) 암에 대한 오가노이드 배양법은 보고된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 본 발명은 3차원의 육종 오가노이드 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 측면은, 환자 유래 육종 세포를 코팅되지 않은 배양 용기에서 배양하는 단계; 및 상기 배양 용기에서 탈착되어 부유하는 세포의 응집체를 수득하는 단계;를 포함하는 3차원의 육종 오가노이드 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 기재된 방법으로 육종 세포의 조직을 분리하고 배양하면 지속적으로 체외에서 배양이 가능한 3차원의 육종 오가노이드를 제조할 수 있다. 또한, 본원 발명의 배양 과정에서 이용되는 배지의 조성이 조합되는 경우에 오가노이드화 효율이 더욱 좋아지며, 계대 배양이 가능한 오가노이드의 형성이 가능하다.

[0015] 다만, 본 발명의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 육종 오가노이드를 배양하는 일련의 과정과 오가노이드가 배양된 것을 확인한 결과이다.

도 2는 환자에서 채취한 정상조직, 암조직 및 본 발명에서 형성된 혈관 육종암 오가노이드를 대상으로 면역조직화학 염색을 통해 혈관 신생 마커 및 림프 마커를 확인한 결과이다.

도 3은 환자에서 채취한 정상조직, 암조직 및 본 발명에서 형성된 혈관 육종암 오가노이드를 대상으로 한 중간엽, 내피 및 상피 마커의 상대적 유전자 발현 비교 결과이다.

도 4는 환자에서 채취한 정상조직, 암조직 및 본 발명에서 형성된 혈관 육종암 오가노이드를 대상으로 한 전사체 분석 결과이다.

도 5는 혈관 육종암 오가노이드를 대상으로 한 단일세포 RNA 시퀀싱 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 먼저, 본 발명에서 공통적으로 이용되는 용어를 정의한다.

[0019] 본원에 있어서 용어 "육종(sarcoma)"이란 뼈, 연골, 근육, 지방, 신경, 혈관 등의 비상피성 결합조직에서 발생한 종양을 의미한다. 결합조직은 태생기의 중배엽에서 기원하며, 크게 악성 골종양과 연부조직 육종으로 구분할 수 있다. 악성 골종양은 뼈에서 발생한 종양이며, 연부조직 육종은 피부, 지방, 신경, 혈관, 근육 등의 연부조

직에서 발생한 종양이다.

- [0020] 본원에 있어서 용어 "오가노이드(organoid)"는 3D 입체 구조를 가지는 세포를 의미하며, 동물 등에서 수집, 취득하지 않은 인공적인 배양 과정을 통해 제조한 모델을 의미한다. 이를 구성하는 세포의 유래는 제한되지 않는다. 2D 배양과는 달리, 3D 세포 배양은 체외에서 세포가 모든 방향으로 성장할 수 있는바, 상기 오가노이드는 생체 내에서 상호작용하고 있는 장기를 유사하게 모사하여 질병의 치료제 개발 또는 약물의 스크리닝 등에 이용될 수 있다. 또한, 상기 오가노이드를 배양함으로써, 기존의 동물 모델의 한계인 인간의 생리학적 및 진화적 차이를 극복하는 데에 활용될 수 있다. 본원에 있어서, "세포의 응집체"는 "오가노이드"와 동일한 의미로 상호교환적으로 사용 가능하다.
- [0021] 본원에 있어서 용어 "배지"는 당, 아미노산, 각종 영양물질, 혈청, 성장인자, 무기질 등의 세포의 성장 및 증식에 필수적인 요소를 포함하는 생체 외 (in vitro)에서 육종 세포 등의 세포의 성장 및 증식을 위한 혼합물을 말한다. 특히, 본 발명의 배지는 육종 세포의 배양을 위한 배지이다.
- [0022] 본원에 있어서 용어 "기본 배지"는 세포가 살아가기 위해 필요한 필수적인 당, 아미노산, 물 등이 포함되어 있는 혼합물로서 본 발명의 기본 배지는 인위적으로 합성하여 제조하여 사용하거나 상업적으로 제조된 배지를 사용할 수 있다. 상업적으로 제조된 배지는 예를들면, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), MEM (Minimal Essential Medium), BME (Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, α -MEM (α -Minimal Essential Medium), G-MEM (Glasgow's Minimal Essential Medium) 및 Iscove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한 본 발명의 배양 배지는 영양혼합물(Nutrient Mixture)을 추가로 포함할 수 있다. 상기 영양 혼합물은 세포배양에 일반적으로 사용되는 각종 아미노산, 비타민, 무기염 등을 포함하는 혼합물로서, 상기 아미노산, 비타민, 무기염 등을 혼합하여 제조하거나 상업적으로 제조된 영양 혼합물을 사용할 수 있다.
- [0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0025] 본 발명은 육종 오가노이드 제조 방법을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 상기 육종 오가노이드의 제조 방법은 환자 유래 육종 세포를 코팅되지 않은 배양 용기에서 배양하는 단계; 및 상기 배양 용기에서 탈착되어 부유하는 세포의 응집체를 수득하는 단계;를 포함한다.
- [0027] 먼저, 환자 유래 육종 세포를 코팅되지 않은 배양 용기에서 배양한다.
- [0028] 상기 환자 유래 육종 세포는, 육종을 보유하고 있는 것으로 진단을 받은 환자의 조직에서 채취한 것일 수 있고, 상기 육종 세포의 채취는 수술 진행 중 절제된 조직으로부터 분리된 것일 수 있다.
- [0029] 특히, 상기 육종 세포는 혈관 육종, 지방 육종, 섬유 육종, 혈관외피종, 골육종, 말초 신경의 악성 종양, 활막 육종, 횡문근 육종, 평활근 육종 등일 수 있다. 예컨대, 상기 육종 세포는 혈관 육종, 지방 육종, 섬유 육종, 혈관외피종, 골육종, 평활근 육종 등일 수 있고, 특히 상기 육종 세포는 혈관 육종일 수 있다.
- [0030] 상기 환자 유래 육종 세포는 사전 배양된 것일 수 있다. 상기 사전 배양은 상기 환자 유래 육종 세포를 코팅되지 않은 배양 용기에서 배양하기에 앞서 오가노이드로 제작되기에 충분하도록 상기 환자 유래 육종 세포의 수를 늘리기 위한 것으로, 피브로넥틴이 코팅된 배양용기에서 사전 배양한 것일 수 있다. 상기 육종 세포는 환자로부터 채취한 암조직을 작은 조각으로 자르고 디스페이즈(disperse) 및 트립신으로 효소적으로 분해한 후, 기계적으로 분해하여 조직으로 분리된 세포로서 배양에 이용될 수 있다.
- [0031] 여기서, 상기 사전 배양은 비타민 A가 없는 B27, N2 보충제, 헤파린 및 ROCK(Rho-associated protein kinase) 저해제를 포함하는 FBS-비함유 배지 조성물을 이용하여 수행되는 것일 수 있다. 본 발명의 배지 조성물을 이용하는 경우, 2차원의 배양에서 3차원의 육종 오가노이드 제조시 오가노이드화 효율이 더욱 좋아질 수 있다. 구체적으로, FBS-비함유 배지 조성물은 FBS-비함유 내피 세포 기본 배지 조성물일 수 있다.
- [0032] 상기 조성물에 포함되는 비타민 A가 없는 B27은 분리된 육종 세포가 다른 세포로 분화되는 것을 방지하는 목적으로 사용되었다. 특히, 비타민 A는 신경세포(neuronal cell) 배양에 적합한 보충제로, 본원발명에서 배양하고자 하는 육종 세포의 배양 효율을 더 좋게 하기 위해 비타민 A가 없는 B27로 변형하여 이용된 것일 수 있다.
- [0033] 사전 배양에 이용되는 배지 조성물에 포함되는 ROCK 저해제는 조직으로부터 분리된 세포의 생존과 증식을 촉진시키기 위한 것으로, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 ROCK 저해제로서 Y-27632를 이용하였으나, 이에 제한

되지 않는다.

- [0034] 상기 헤파린은 0.01 내지 1mg/ml의 농도로 이용될 수 있으며, 바람직하게는 0.05 내지 0.5mg/ml의 농도로 이용될 수 있다.
- [0035] 상기와 같이 사전 배양된 환자 유래 육종 세포는, 상기 코팅된 배양 용기로부터 탈착시킨 다음, 재현탁하여 이용될 수 있다. 이때 상기 탈착은 배양 용기에서 조밀한 배양이 달성된 이후, 트립신-EDTA를 이용하여 이루어질 수 있다.
- [0036] 이후, 상기 사전 배양된 환자 유래 육종 세포는 코팅되지 않은 배양 용기에서 배양될 수 있으며, 상기 배양은 비타민 A가 없는 B27, N2 보충제 및 헤파린을 포함하는 FBS-비함유 배지 조성물을 이용하여 수행되는 것일 수 있다. 배지 조성물에 포함될 수 있는 구성은 전술한 바와 그 내용이 동일한 바, 기재를 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.
- [0037] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 배양은 세포 응집체가 부유하기 시작할 때까지 수행될 수 있고, 예컨대 5일 이상, 7일 이상, 9일 이상, 특히 10일 이상의 시간 동안 수행될 수 있다. 상기 배양 기간보다 이보다 짧은 경우, 세포 응집체가 충분히 형성되지 않아 부유하지 않고 세포응집체 상태로 배양 용기에 부착되어 있어 오가노이드의 특성이 드러나지 않을 수 있다. 한편, 상기 배양은 세포가 과다배양되는 경우 바닥에서 탈착되어 부유한 오가노이드의 품질 뿐만 아니라 바닥에 부착되어 있는 세포의 품질 또한 저하될 수 있다는 측면에서 14일 이하의 시간 동안 수행되는 것이 바람직할 수 있다.
- [0038] 상기와 같이 배양을 수행한 다음, 상기 배양 용기에서 탈착되어 부유하는 세포의 응집체를 수득할 수 있다. 상기 수득은 배양 용기에서 탈착되어 부유하는 세포의 응집체가 수득되는 것이므로, 배양 용기 바닥에 부착되어 있는 세포는 새로운 배양 배지로 교체 후 다시 증식하여 상기 기간을 거쳐 재수확이 가능하다. 따라서, 본 발명의 3차원의 육종 오가노이드 제조 방법을 이용하는 경우, 오가노이드의 계대 배양을 통해 지속적인 오가노이드 형성이 가능하다.
- [0039] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 탈착은 육종 세포로부터 분비된 MMP(Matrix Metalloproteinase)에 의해 세포의 응집체가 배양 용기로부터 비인위적으로 탈착되는 것일 수 있다. 구체적으로, MMP는 세포의 기질의 분해에 관여하는 효소로서, 세포의 침투와 전이에 중요한 역할을 한다. 특히, 혈관육종 환자의 조직 내 MMP-1, MMP-2, MMP-13의 발현이 정상 조직에 비해 다량 검출된다는 보고가 있다. 같은 맥락으로, 본 발명의 3차원 혈관육종 오가노이드 배양 배지에서 다량의 MMP-1, MMP-2, MMP-13이 검출된다. 이는 배양 용기에서 배양되는 육종 세포가 일정 밀도 이상으로 배양되면, 국소적으로 MMP가 농축이 되며, MMP에 의해 세포의 응집체가 배양 용기로부터 자연스럽게 떨어지게 됨을 의미한다. 이 때, 부유 배양되는 세포 응집체가 오가노이드로서의 특징을 갖는 것일 수 있다. 따라서, 상기 비인위적으로 탈착된다는 것은 상기 육종 세포의 응집체를 배양 용기로부터 인위적으로 탈착시키기 위해 별도의 물리적 수단이나, 화학적 또는 생물학적 제제(예, 효소 등)를 처리하지 않는다는 것을 의미한다.
- [0040] 구체적인 일 실시예에서는, 생성된 세포 응집체가 육종 세포의 특성을 드러내는 오가노이드인지 여부를 확인하였다. [실시예 3]에서는 면역조직화학 염색을 통해 오가노이드의 마커를 확인하였으며, 본 발명의 방법에 의하여 형성된 오가노이드는 혈관내피 줄기세포 마커인 CD157과 혈관 육종암 마커인 ERG가 높게 발현하는 것을 근거로 암 조직의 특성을 가지고 있음을 확인하였다(도 2). 또한, [실시예 4]에서는 혈관 내피세포의 마커로 CD31 및 CD157, 상피세포의 마커로 E-Cadherin 및 Mucin-1의 발현 정도를 확인하여, 정상조직 대비 암조직의 특성을 나타내는 것을 확인하였다(도 3). [실시예 5]에서는 전사체 분석을 통해 본 발명에서 제조한 오가노이드가 환자의 암조직과 전사 프로필을 비교하였으며, 차별 발현 유전자와 유전자 온톨로지 분석을 통해 본 발명에서 제조한 오가노이드는 혈관 육종암, 평활근육종암, 지방육종암과 유전체적으로 유사하였다(도 4). 이를 통해, 본 발명의 제조방법으로 제조된 3차원의 육종 오가노이드는 육종 세포의 특성을 드러내는 오가노이드임을 알 수 있다.
- [0041] 나아가, 본 발명의 상기 세포의 응집체를 PROCR를 바이오마커로 하여 3차원의 육종 오가노이드를 확인하는 단계를 포함할 수 있다. PROCR(Protein C receptor) 발현 전구 세포는 혈관 내피 줄기 세포로, PROCR이 정상 세포에 비해 환자에서 유래한 육종 오가노이드에서 유의하게 더 높게 발현될 수 있다. PROCR 발현 세포는 혈관 육종의 진행에서 비정상적인 혈관 신생에 기여할 수 있으므로 혈관 육종에 대한 새로운 예후 지표로서 활용 가능하다. 구체적으로, [실시예 6]에서는 본 발명의 제조 방법으로 형성한 혈관 육종암 오가노이드의 전사체를 분석하여 PROCR의 발현이 정상 세포에 비해 환자에서 더 높게 발현되는 것을 확인하였다(도 5d, e). 따라서, 본 발명

의 제조방법으로 형성한 세포의 응집체의 PROCR 발현 수준이 정상세포의 PROCR 발현 수준보다 높은 경우, 육종 오가노이드가 정상적으로 형성되었음을 확인할 수 있다.

[0042] 본 발명의 일측면에 있어서, 상기 세포의 응집체를 수득하는 단계는 2회 이상 반복 수득 가능한 것일 수 있다. 세포 응집체가 형성되어 수득한 후 배양 새로운 배양 배지로 교체하고, 나머지 세포는 바닥에 부착된 상태로 다시 증식할 수 있게 된다. 배양 배지의 교체 이후, 세포 응집체가 다시 증식하여 새롭게 부유하게 될 수 있으며, 이러한 세포 응집체의 수확 절차는 2회 이상 반복 수득이 가능하다. 본 발명의 오가노이드 제조 방법을 이용하여 오가노이드를 생성하는 경우, 다량의 오가노이드의 생성이 용이하며, 몇 달에 걸쳐 수득이 가능하므로 장기간 배양 증식이 가능하다.

[0043] 본 발명은 또한, 본 발명의 제조 방법으로 제조된 오가노이드를 시험 화합물과 함께 배양하는 단계를 거쳐, 약물 스크리닝 방법을 제공할 수 있다. 육종 세포의 특성을 나타내는 오가노이드를 시험 화합물과 함께 배양하여, 육종 세포에서 특이적으로 차별 발현 유전자의 발현 수준 분석을 통해 약물의 효능을 평가할 수 있다.

[0045] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

[0046] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되지 아니한다.

[준비예]

[0049] 대한민국 서울 아산병원의 IRB(Institutional Review Board) 및 ACC(Institutional Review Board and Animal Care Committee)로부터 승인을 받아 실험을 진행하였다. 9명의 혈관 육종암 환자의 수술 진행 중 절제된 조직으로부터 인간 혈관 육종암 시료를 수득하였다.

[실시예 1]

[0052] 본 발명은 환자 유래 육종 세포를 분리하여, 코팅되지 않은 배양 용기에서 배양하는 단계를 포함하는 3차원의 육종 오가노이드를 배양하는 방법에 대한 것이다. 도 1a는 혈관 육종암 오가노이드를 배양하는 일련의 과정을 나타낸다. 우선, 혈관 육종암 환자에서 암샘플을 채취하고 이를 다시 잘라서 세포를 분리하였다. 세포화 분리는 디스페이즈(Dispase)와 트립신(Trypsin)을 이용한 효소적 분해와, 강한 피펫팅(pipetting)을 이용한 기계적 분해를 수행하고, 원심분리하여 세포 펠렛을 얻었다. 이후, 피브로넥틴 코팅된 배양 조직 배양접시에 상기 세포를 플레이팅하고, 배양 배지를 이용하여 2D 배양을 수행하였고, 조밀한 배양이 달성되면 트립신 처리하여 계대 배양하였다. 오가노이드 배양을 위하여 코팅되지 않은 플라스크에 상기 세포를 현탁하고 배양을 수행하였다.

[0053] 이러한 과정 후 스탠다드 세포 배양 플라스크(Cat#70075; SPL)에서 혈관 육종암 오가노이드를 형성한 것을 확인하였다(도 1b). 피브로넥틴(Fibronectin)이 코팅된 세포배양접시에서 배양했을 때는 혈관 육종암 오가노이드가 형성되지 않으며 세포가 증식하는 모습을 나타냈다(도 1c). 도 1b와 같이 형성한 오가노이드를 매트릭셀(Matrigel)에 배양하게 되면 3차원 오가노이드의 형태가 아닌 혈관과 유사한 형태로 발아(sprouting)되는 것을 확인할 수 있으며(도 1d), 이는 혈관 육종암 오가노이드가 혈관내피세포와 유사한 특징을 가지고 있는 것과 동시에 기존에 알려진 세포외기질 성분의 복합체인 매트릭셀 드로플렛(Matrigel droplet) 방법을 이용한 배양은 3차원 오가노이드의 형성 및 유지가 불가능 하며, 본 발명의 제조 방법과 같이 세포외기질 성분의 복합체를 사용하지 않는 배양법을 통하여 3차원 혈관 육종 오가노이드를 수득할 수 있음을 알 수 있다.

[실시예 2]

[0056] 환자 유래 혈관 육종암 세포의 오가노이드 배양

[2-1] 환자 유래 혈관 육종암 조직의 세포화

[0058] 상기 준비예의 시료를 공지된 프로토콜에 따라 세포화하였다. 구체적으로, 준비예의 시료를 페트리 디쉬(petri dish)에 놓고 수술 나이프를 이용하여 암 조직 부분만을 정리하였다. 종양 조직을 대략 작은 조각으로 자르고 2.5 U/ml의 디스페이즈(dispose) II(Cat#17105041; Gibco™)와 함께 4° C에서 밤새 배양하였다. 다음 날,

0.04% 트립신-EDTA(Cat#T4049; Sigma-Aldrich)로 교체 후 2시간 동안 37° C에서 배양하였다. 효소적으로 소화된 조직을 격렬한 피펫팅으로 기계적으로 분쇄하고, 100-µm 메쉬 나일론 스트레이너(Cat#93100, SPL)를 통해 여과하여 소화가 덜 된 조직과 조직으로부터 분리된 세포를 구분한다. 그 후, 현탁액을 실온에서 5분 동안 500 g에서 원심분리하였다. 조직으로부터 분리된 세포펠렛을 보충제 믹스(Cat#1001; ScienCell™)를 포함하는 FBS-비함유 내피 세포 기본 배지로 세척하였다.

[0059] 세포화과정을 거친 후, 환자 유래 종양 세포의 2D 배양을 위해 세포를 피브로넥틴(Cat#354403; Corning®)으로 코팅된 조직 배양 접시에 플레이팅하고, 보충제 믹스(Cat#1001; ScienCell™), 비타민 A가 없는 B27(Cat#12587010; Gibco™), N2 보충제(Cat#17502048; Gibco™), 0.1 mg/ml 헤파린(Cat#H3149; Sigma-Aldrich) 및 Y-27632(Cat#1254; TOCRIS)를 포함하는 FBS-비함유 내피 세포 기본 배지를 사용하여 배양하였다. 조밀한 배양이 달성되면, 세포를 0.25% 트립신-EDTA(Cat#T4049; Sigma-Aldrich)로 트립신 처리하여 계대 배양하였다.

[0060] [2-2] 혈관 육종암 세포의 오가노이드 배양

[0061] 혈관 육종암 오가노이드를 생성하기 위해, 코팅되지 않은 T75 플라스크(Cat#70075; SPL)에서 세포를 2×10^5 세포의 최종 농도로 재현탁시켰다. 배양 배지는 보충제 믹스(Cat#1001; ScienCell™), 비타민 A가 없는 B27(Cat#12587010; Gibco™), N2 보충제(Cat#17502048; Gibco™), 0.1 mg/ml 헤파린(Cat#H3149; Sigma-Aldrich)를 포함하는 FBS-비함유 내피 세포 기본 배지로 구성된다.

표 1

재료	구입처	카탈로그 넘버	스탁 농도	처리 농도
내피 세포 기본 배지(Endothelial cell basal medium)	ScienCell	1001		
페니실린-스트렙토마이신(Penicillin-Streptomycin)	Gibco	15140-122		1%
내피 세포 성장 보충제(Endothelial cell growth supplement)	ScienCell	1052		
B27 w/o vit.A	Life Technologies	12587-010	X50	X1(1:50)
N2 보충제	Life Technologies	17502-048	X100	X1(1:100)
헤파린(Heparin)	SIGMA	H3149	10 mg/ml	0.1 mg/ml (1:100)

[0063] 세포 응집체는 T75 플라스크에서 배양 시작 10일 후부터 형성되며, 형성된 혈관 육종암 오가노이드는 배양액 내에 부유한다. 배양 14일째 배지 교환 시, 혈관 육종암 오가노이드를 수집하며, 새로운 배양 배지 교체 후 나머지 세포는 바닥에 부착된 상태로 다시 증식하고 10일 후부터 세포 응집체가 새롭게 부유하게된다. 이러한 혈관 육종암 오가노이드의 수확하는 절차는 몇 달에 걸쳐 반복될 수 있어, 오가노이드의 생성이 용이하다.

[0065] [실시예 3]

[0066] 면역조직화학 염색을 통한 오가노이드의 마커 확인

[0067] H&E(hematoxylin and eosin) 염색 및 면역조직화학 염색을 이용하여, 환자에서 채취한 정상조직, 암조직 및 본 발명에서 형성된 혈관 육종암 오가노이드상에서 표현되는 마커들을 확인하였다. 마커로는 혈관 신생 마커 마커(CD31, CD157, ERG 및 p53) 및 림프 마커(D2-40)를 관찰하였다.

[0068] 그 결과, 도 2에 도시된 바와 같이, 본 발명의 방법에 의해 형성된 혈관 육종암 오가노이드와 암조직에서는 CD157, D2-40, p53, 그리고 ERG가 공통적으로 발현되었다. 특히, 혈관 내피 줄기세포의 마커 CD157과 혈관 육종암 마커 ERG가 정상조직에 비해 암조직 또는 혈관 육종암 오가노이드에서 높게 발현하는 것을 근거로 형성된 혈관 육종암 오가노이드가 암 조직의 특성을 가지고 있음을 알 수 있다. 또한, 환자에 따른 차이도 관찰할 수 있는데 2번 환자의 암조직 (#2-T_tissue)과 4번 환자의 암조직 (#4-T_tissue)에서 ERG의 발현 정도의 차이가 형성

된 혈관 육종암 오가노이드에서 동일하게 관찰되고 있음을 확인하였다.

[실시예 4]

중간엽, 내피 및 상피 마커의 상대적 유전자 발현 비교

환자에서 채취한 정상조직, 암조직 및 본 발명에서 형성된 혈관 육종암 오가노이드의 간엽줄기세포, 혈관내피세포, 그리고 상피세포 마커의 RNA 발현을 비교하였다.

그 결과, 도 3에 도시된 바와 같이, 간엽줄기세포 마커인 CD44 및 SNAIL은 조직 내 발현에서는 특징을 찾아볼 수 없었으나, 형성된 혈관 육종암 오가노이드와 정상세포 간의 비교에서는 혈관 육종암 오가노이드에서 높게 발현됨을 확인할 수 있었다. 이는 체외 배양을 거치면서 배양액의 구성에 의해 줄기세포 또는 전구체 세포가 선택적으로 생존함으로써 나타나는 결과라 사료된다.

혈관 육종암은 혈관내피세포 또는 림프관에 주로 발생하는 암으로 신생혈관생성이 활발히 일어나는 암이다. 따라서, 정상조직 대비 암조직에서 혈관내피세포 마커인 CD31 및 CD157의 과발현을 관찰할 수 있었으며, 형성된 혈관 육종암 오가노이드에서도 동일한 결과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

또한, 혈관 육종암에서 형성된 오가노이드는 대부분 혈관내피세포 유래 세포로 구성되어 있을 것으로 예측하여 대표적인 상피세포 마커인 E-Cadherin 및 Mucin-1을 확인한 결과, 정상조직에 비해 암조직에서 E-Cadherin의 발현이 하향조절되어 있음을 확인하였다. 이는 형성된 혈관 육종암 오가노이드에서도 동일하게 관찰되었다. 반면, Mucin-1은 암조직과 암 오가노이드 모두 정상샘플에 비해 높은 발현을 보였는데 이는 혈관 육종암의 특징으로 전이성이 높은 혈관 육종암에서 Mucin-1이 높게 발현됨을 확인하였다.

RNA 발현 수준의 차이는 오가노이드 배양 시스템이 환자 개개의 조직에서 유래하는 세포로 제작된 것이므로 환자의 유전적 특성에 따라 그 발현의 정도에 차이를 나타낸다. 나아가, 혈관육종은 환자별 이질성이 매우 높은 암으로 분자적, 유전적 복잡성을 지니고 있다. 환자 개개의 유전적 차이를 오가노이드 또한 반영하므로, #2 및 #4의 두 암조직에서의 Mucin-1의 발현에도 차이가 났으며, 형성된 오가노이드에서도 그 발현 차이가 동일하게 반영되었음을 확인하였다.

[실시예 5]

오가노이드의 전사체 분석

환자에서 채취한 정상조직, 암조직, 형성된 혈관 육종암 오가노이드간 전사체 분석을 통해서 형성한 혈관 육종암 오가노이드가 환자 암조직의 유전적 특성의 표현하는지 여부를 확인하였다.

그 결과, 도 4에 도시된 바와 같이, 암조직과 형성된 혈관 육종암 오가노이드의 표현형적 유사성에도 불구하고, 전사체 분석 데이터 (bulk RNA-seq)는 혈관 육종암 오가노이드가 정상 및 암조직과 다른 전사 프로필을 가지고 있음을 나타냈다(도 4a). 이는 외과적으로 절제된 암조직에 포함된 정상 세포가 혈관 육종암 오가노이드 형성 시, 함께 분리 추출되어 이질성을 도입하기 때문으로 사료된다.

또한, 일련의 공통 유전자를 확인하기 위해 암조직과 환자 #2 및 #4에서 확립된 오가노이드의 상향 조절된 유전자의 교차점을 히트맵(heatmap)으로 분석하였다(도 4b). 상향조절된 차별 발현 유전자(DEG)의 유전자 온톨로지(GO) 분석을 통해 차별적으로 발현되는 유전자가 혈관신생, 근육 세포 분화 및 ECM 구성과 관련된 생물학적 과정을 유의하게 변화시킴을 확인할 수 있었다(도 4c-e). 또한, 이전에 보고된 데이터(the National Library of Medicine's Gene Indexing initiative)를 기반으로 육종을 별개의 하위 그룹으로 계층화하여 유전자 집합 변이 분석한 결과, 본 발명에서 제조한 혈관 육종암 오가노이드가 혈관 육종암(angiosarcoma), 평활근육종암(leiomyosarcoma) 및 지방육종암(liposarcoma)과 유전체적으로 유사함을 확인하였다(도 4f).

[실시예 6]

단일세포 RNA 시퀀싱

전사체 이질성과 혈관 육종암 오가노이드의 세포 구성을 조사하기 위해 단일세포 RNA 시퀀싱을 사용하여 형성한

혈관 육종암 오가노이드의 전사체를 분석하였다.

[0087]

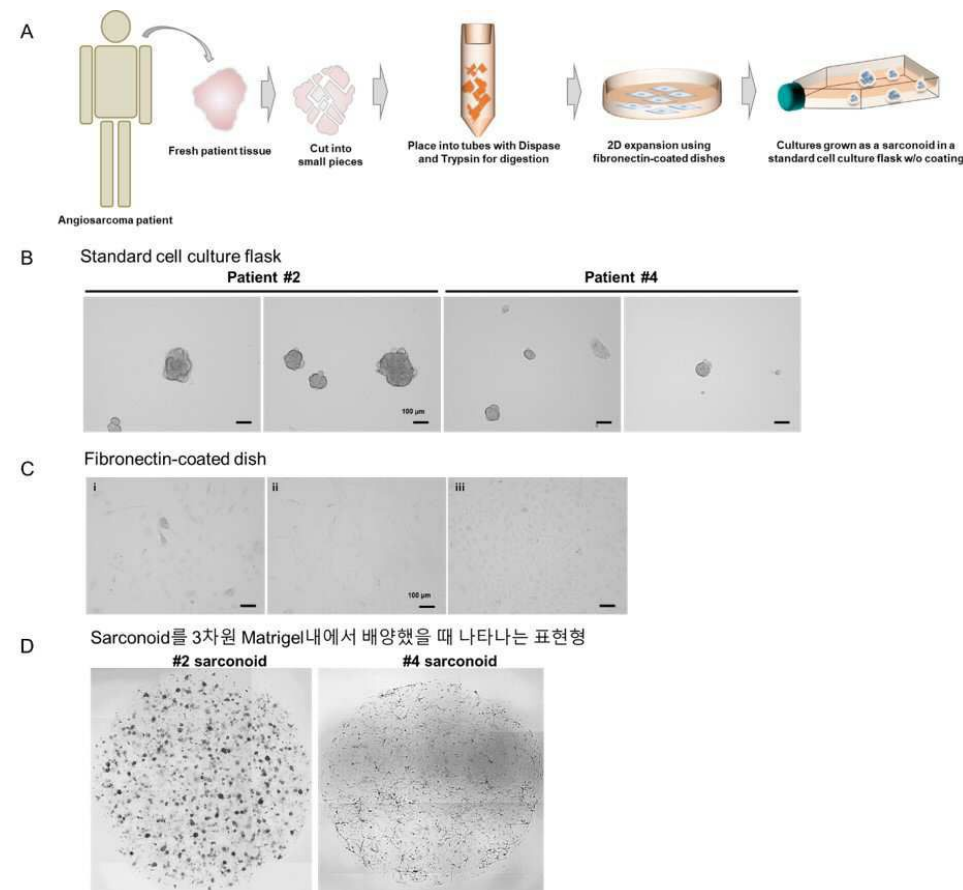
우선, UMAP(Uniform Manifold Approximation and Projection)를 사용하여 단일 세포 발현 데이터를 클러스터링했으며, 6개의 세포 집단(C0-C5)을 확인하였다(도 5a). 알려진 마커를 활용하여 각 클러스터에서 가장 대표적인 발현 유전자를 매핑하였다. 도 5b는 상위 10개 DEG의 유전자 발현 히트맵을 나타낸다. 클러스터 내의 세포 집단 식별을 위해 CellMarker DB를 활용하여 하나의 클러스터 내 세포 유형별 분포를 분석하였으며, 각 클러스터는 AKAP12+VIM+CD44+ 중간엽 세포(클러스터 1), FN1+THY1+DKK3+ 중간엽 세포(클러스터 2), IGFBP7+DKK3+MMP2+ 중간엽 세포(클러스터 3), MFAP4+RCN3+PLAC9 +IL11RA+ PROCR+발현 전구 세포(클러스터 5)를 포함하고 있음을 확인하였다(도 5c). 클러스터 5를 부분적으로 차지하는 PROCR 발현 전구 세포는 혈관 내피 줄기 세포로, PROCR이 정상 세포에 비해 환자 #2- 및 환자 #4-에서 유래한 혈관 육종암 오가노이드에서 유의하게 더 높게 발현됨을 관찰하였다 (도 5d, e). 이를 통해, 본 발명의 제조 방법으로 형성한 혈관 육종암 오가노이드는 PROCR을 발현하는 혈관 내피 줄기세포를 포함하며, PROCR 발현 세포는 혈관 육종의 진행에서 비정상적인 혈관 신생에 기여할 수 있으므로 혈관 육종에 대한 새로운 예후 지표로서의 가능성을 확인하였다.

[0089]

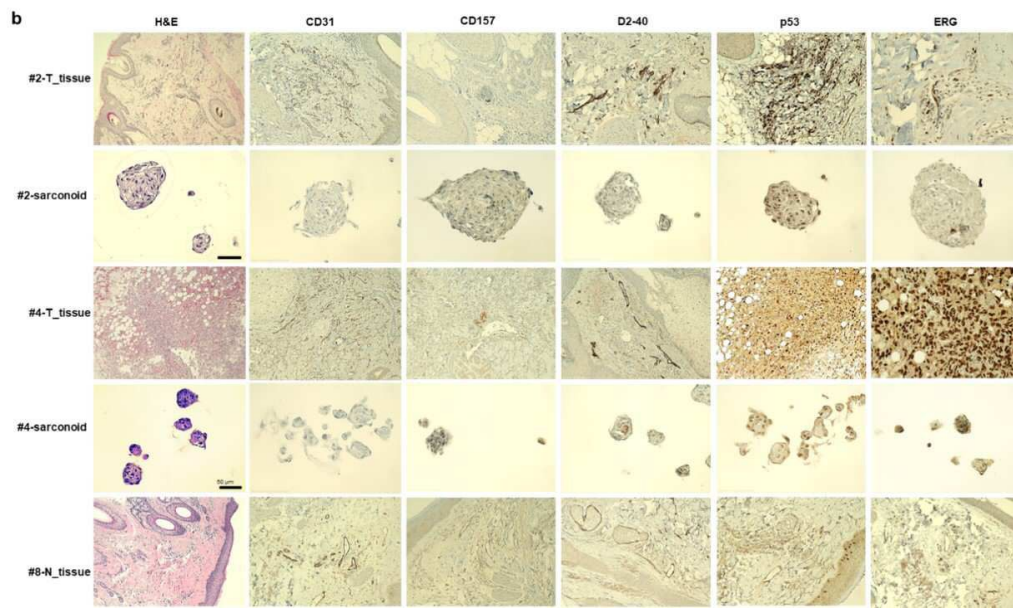
상기에서는 본 발명의 대표적인 실시예를 예시적으로 설명하였으나, 본 발명의 범위는 상기와 같은 특정 실시예에만 한정되지 아니하며, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 출원의 청구범위에 기재된 범주 내에서 적절하게 변경이 가능할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

