

Organoid

연구의 이해와 활용:

Multi-Omics 분석의 적용



Organoid 연구의 이해와 활용: Multi-Omics 분석의 적용

1. 오가노이드(Organoid)란?

오가노이드(Organoid)는 줄기세포가 증식과 분화 과정을 거쳐 형성하는 3 차원(3D) 세포 구조체로, 실제 장기의 구조적·기능적 특성을 일부 모사할 수 있어 '장기 유사체' 또는 '미니 장기'라고도 불린다. 오가노이드 제작에는 크게 성체줄기세포(adult stem cells, ASCs)와 만능줄기세포(pluripotent stem cells, PSCs)가 활용되며, 만능줄기세포(PSCs)에는 배아줄기세포(embryonic stem cells, ESCs)와 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cells, iPSCs) 포함된다[1]. 이처럼 오가노이드 제작에는 기원과 특성이 서로 다른 다양한 줄기세포가 활용될 수 있다(그림 1).

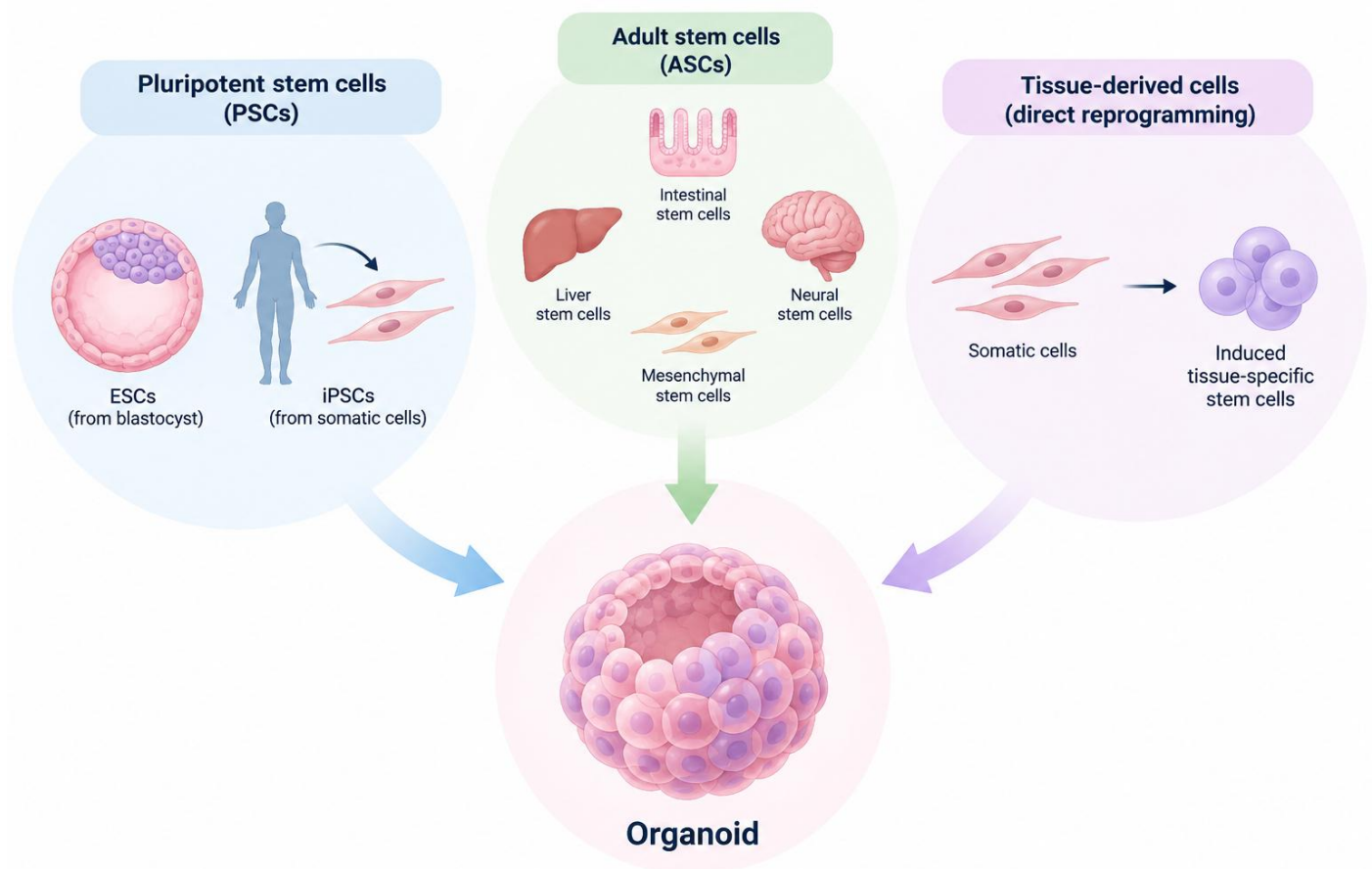


그림 1. Stem Cell Sources for Organoid Generation

이러한 줄기세포는 적절한 3 차원 배양 환경에서 증식하고 특정 세포로 분화하면서 조직화된 구조를 형성한다. 오가노이드 배양에는 세포외기질을 모사한 지지체(matrix)를 비롯하여 microwell, chip, dynamic culture 등 다양한 배양 및 공학적 기술이 활용된다. 이러한 기술을 통해 세포의 분화와 조직 형성을 조절하고, 실제 조직과 유사한 미세환경을 구현할 수 있다[1]. 특히 조직 특이적인 세포 구성과 미세환경을 보다 정교하게 재현하기 위한 배양 기술이 발전하면서 오가노이드 모델도 지속적으로 고도화되고 있다.

기존의 2 차원 세포 배양은 비교적 간단하고 기존 연구 자료가 풍부한 연구 모델이지만, 평면적인 배양 환경으로 인해 실제 조직에서 나타나는 세포 간 상호작용과 세포외기질(extracellular matrix, ECM)의 영향을

충분히 반영하는 데 한계가 있다. 반면 오가노이드는 세포가 3 차원 환경에서 조직화되면서 세포 간 또는 세포와 주변 미세환경 간의 상호작용을 보다 효과적으로 구현할 수 있다[2].

이러한 특성을 바탕으로 현재는 줄기세포의 분화 조건과 배양 환경을 조절하여 뇌(brain), 망막(retina), 피부(skin), 신장(kidney), 위(stomach), 소장/장(intestine), 간(liver) 등 다양한 조직을 모사하는 오가노이드가 개발되고 있다[1]. 각 오가노이드는 해당 조직의 구조와 세포 구성, 기능적 특성의 일부를 재현할 수 있어, 실제 조직의 생물학적 특성을 연구하기 위한 3 차원 모델로 활용되고 있다[2].

2. 오가노이드의 연구적 가치

오가노이드는 실제 조직의 구조와 생리적 특성을 일부 모사할 수 있어 질병 모델링, 신약 개발 및 독성 평가, 정밀의료, 조직 재생 등 다양한 연구 분야에서 활용되고 있다[3,4](그림 2). 특히 특정 질환이나 처리 조건에 따른 변화를 체외에서 재현함으로써, 질환의 발생 및 진행 과정에서 나타나는 세포 및 분자 수준의 변화를 연구하는 모델로 활용할 수 있다. 또한 환자 유래 세포를 이용하여 제작한 오가노이드는 개인별 질환 특성이나 약물 반응을 연구하는 데 활용되며, 나아가 조직공학 기술과 접목해 손상된 조직의 재생 및 기능 회복을 도모하는 연구로도 확장되고 있다[1,3].

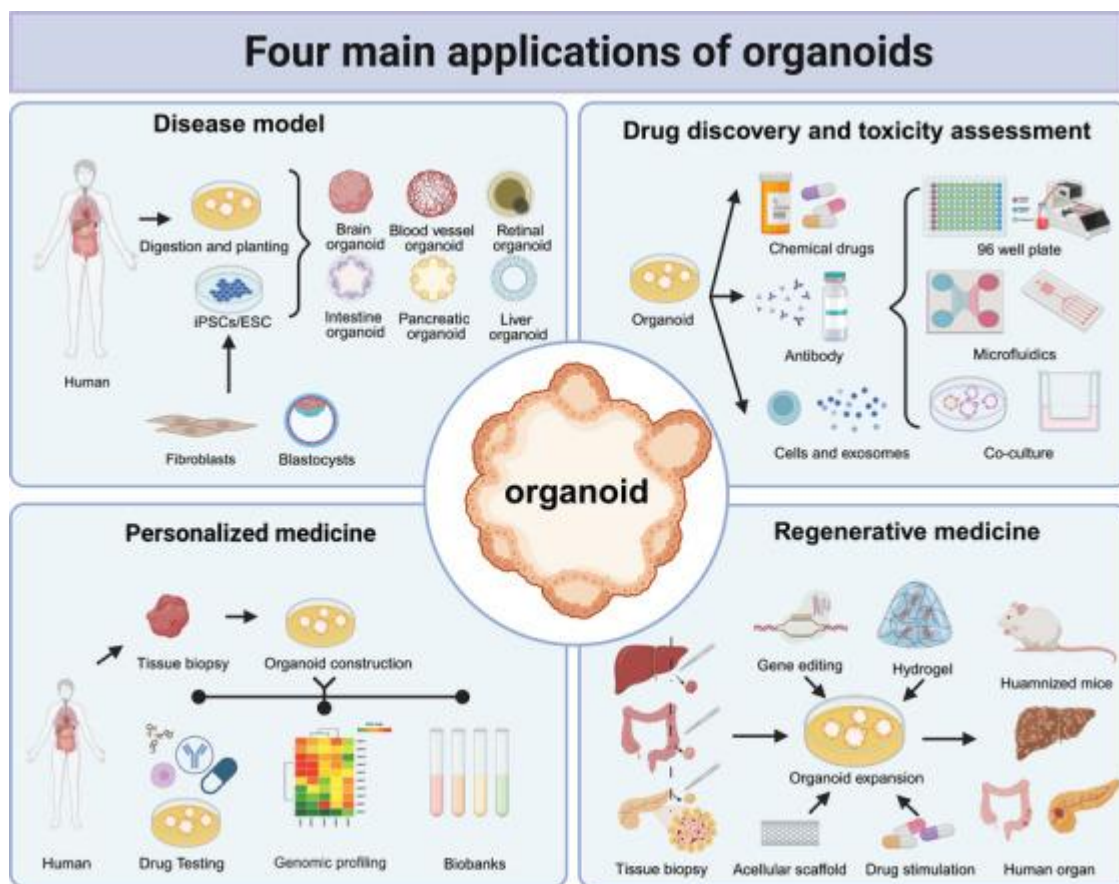


그림 2. Four Main Applications of Organoids [4]

이처럼 오가노이드가 다양한 연구 모델로 활용됨에 따라 형태학적 특성뿐만 아니라 분화 및 성숙 과정, 질환 또는 약물 처리에 따른 변화를 분자 수준에서 확인하는 분석의 중요성도 높아지고 있다. RNA sequencing 과 같은 NGS 기반의 전사체 분석을 통해 오가노이드의 전반적인 유전자 발현 양상과 조건에 따라 변화하는 유전자 및 관련 생물학적 경로(biological pathway)를 확인할 수 있으며, LC-MS/MS 등의 다양한 기술을 이용한 단백질체

분석(proteomics)을 통해 단백질 발현과 기능적 변화를 분석하는 등 연구 목적에 따라 다양한 분자 분석을 적용할 수 있다.

특히 오가노이드는 여러 종류의 세포로 구성될 수 있는 3 차원 모델이라는 점에서 세포 구성과 세포별 상태를 구분하여 분석하는 것도 중요하다. Bulk RNA-seq 은 오가노이드 전체의 transcriptome 변화를 확인하는 데 활용할 수 있는 반면, single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) 혹은 single nucleus RNA-Seq(snRNA-Seq)을 적용하면 오가노이드를 구성하는 세포 유형을 구분하고 각 세포 집단에서 나타나는 유전자 발현 특성을 분석할 수 있다. 최근에는 환자 유래 오가노이드(patient-derived organoid, PDO)에 scRNA-seq 을 적용하여 오가노이드 내 세포 이질성을 확인하고, 특정 질환이나 약물 반응과 관련된 세포 집단의 분자적 특성을 규명하는 연구도 이루어지고 있다[5].

오가노이드는 약물의 효능과 독성을 평가하기 위한 연구 모델로도 활용된다. 특히 환자 유래 세포로 제작한 오가노이드에 다양한 약물을 처리하고 반응을 비교함으로써 환자별 약물 반응을 평가할 수 있으며, 이러한 접근은 정밀의료 연구에도 활용 가능성이 제시되고 있다[3,4]. 실제로 낭포성 섬유증에서는 환자 유래 오가노이드의 약물 반응을 기반으로 치료 약물을 선택한 사례가 보고된 바 있다[3].

또한 오가노이드는 조직 재생 및 이식 연구에서도 적용되고 있다. 장(Intestine), 간(Lung), 망막(Retina) 등 다양한 장기에서 오가노이드를 이용한 이식 연구가 수행되고 있으며, 동물 모델을 통해 이식 후 생착과 조직 재생, 기능 회복 가능성이 평가되고 있다[1,4]. 이처럼 오가노이드는 다양한 분자 분석 기술과 연계하여 오가노이드의 특성과 생물학적 변화를 보다 구체적으로 확인할 수 있으며, 질환 모델링부터 약물 반응 평가와 정밀의료, 조직 재생 연구에 이르기까지 폭넓게 활용되고 있다.

3. 오가노이드의 주요 활용 및 연구 사례

오가노이드는 실제 조직의 구조와 세포 구성을 일부 모사하는 3차원 모델로 bulk RNA-seq, single-cell RNA-seq, Proteomics 등 다양한 오믹스 분석을 통해 오가노이드의 특성과 질환 또는 약물 처리에 따른 생물학적 변화를 확인할 수 있다.

예를 들어 Lu *et al.* (2021)은 마우스 소장의 duodenum, jejunum 및 ileum에서 intestinal crypt를 분리한 후, 일부는 원조직 상태에서 분석하고 나머지는 3D intestinal organoid로 배양하여 RNA-seq 기반으로 transcriptome을 비교하였다[6]. 연구 결과, RNA-seq 데이터의 principal component analysis(PCA)에서 원조직 crypt와 배양된 organoid가 뚜렷하게 구분되었으며, in vivo와 in vitro 조건의 차이가 전체 transcriptome variation의 약 60%를 설명하는 것으로 나타났다(그림 3). 또한 장의 위치에 따른 일부 transcriptional feature는 organoid에서도 유지된 반면, age 및 gender와 관련된 여러 특성은 배양 과정에서 감소하거나 소실되는 양상을 보였다.

이러한 결과는 RNA-seq을 통해 오가노이드와 원조직의 전반적인 유전자 발현 양상을 비교하고, 배양 후 유지되거나 변화하는 분자적 특성을 평가할 수 있음을 보여준다. 또한 배양 조건 자체가 transcriptome에 영향을 미칠 수 있으므로, 오가노이드를 연구 모델로 활용할 때에는 이러한 분자적 특성을 함께 고려할 필요가 있다는 것을 시사한다.

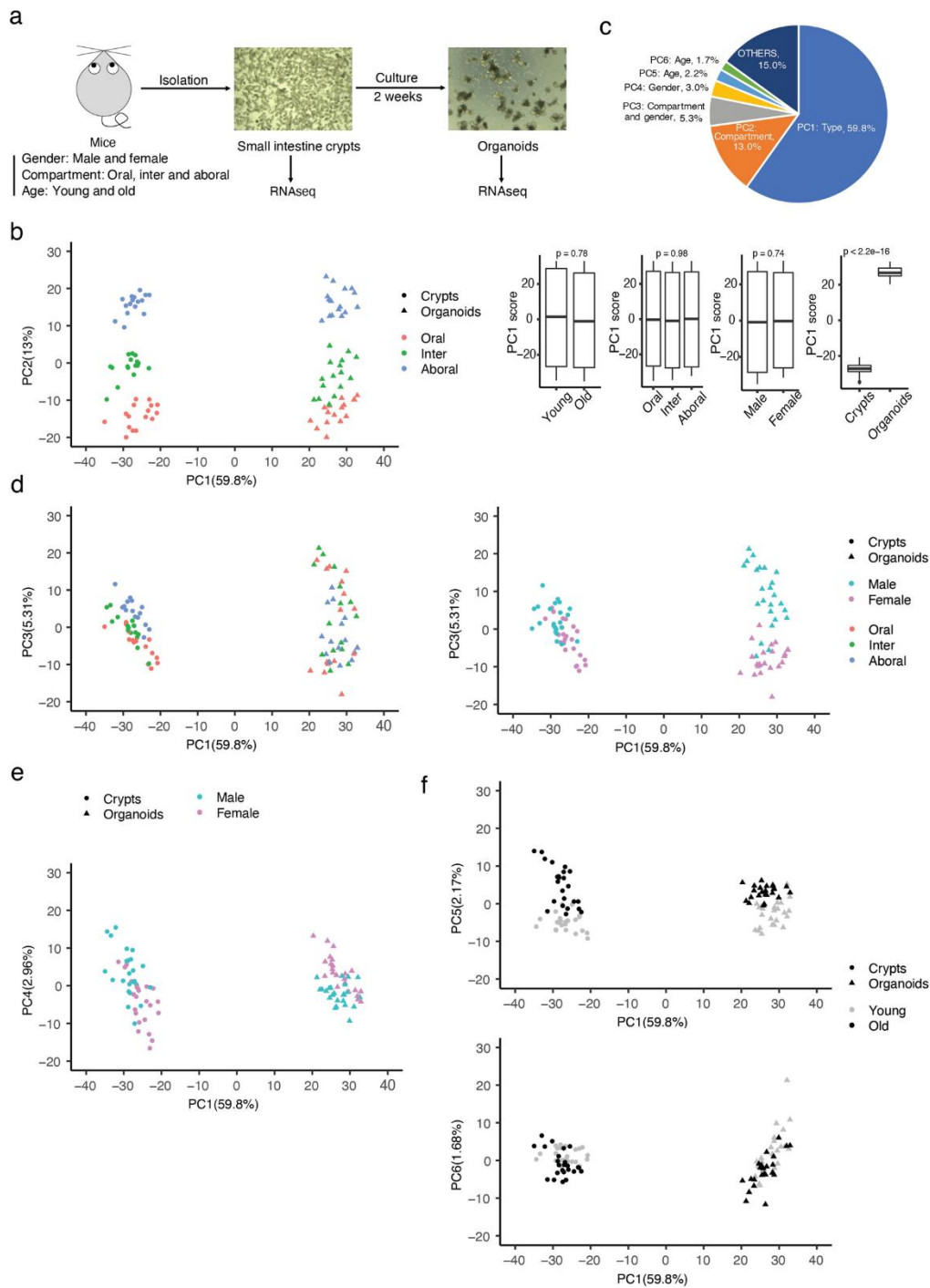


그림 3. Transcriptomic Comparison of Intestinal Crypts and Organoids [6]

한편 오가노이드는 다양한 세포 유형과 분화 상태를 포함할 수 있어, scRNA-seq 을 통해 개별 세포 수준의 구성과 특성을 분석할 수 있다. Fleck *et al.* (2021)은 다양한 human brain organoid 에 single-cell transcriptome 분석을 적용하고 reference atlas 와 비교하여, organoid 를 구성하는 세포의 identity 와 developmental state, brain region 특성을 분석하였다[7]. 그 결과 서로 다른 brain organoid model 에서 특징적인 세포 집단과 regional identity 를 확인하였으며(그림 4), 이를 통해 오가노이드의 세포 구성과 이질성을 세포 수준에서 평가할 수 있음을 보여주었다[7].

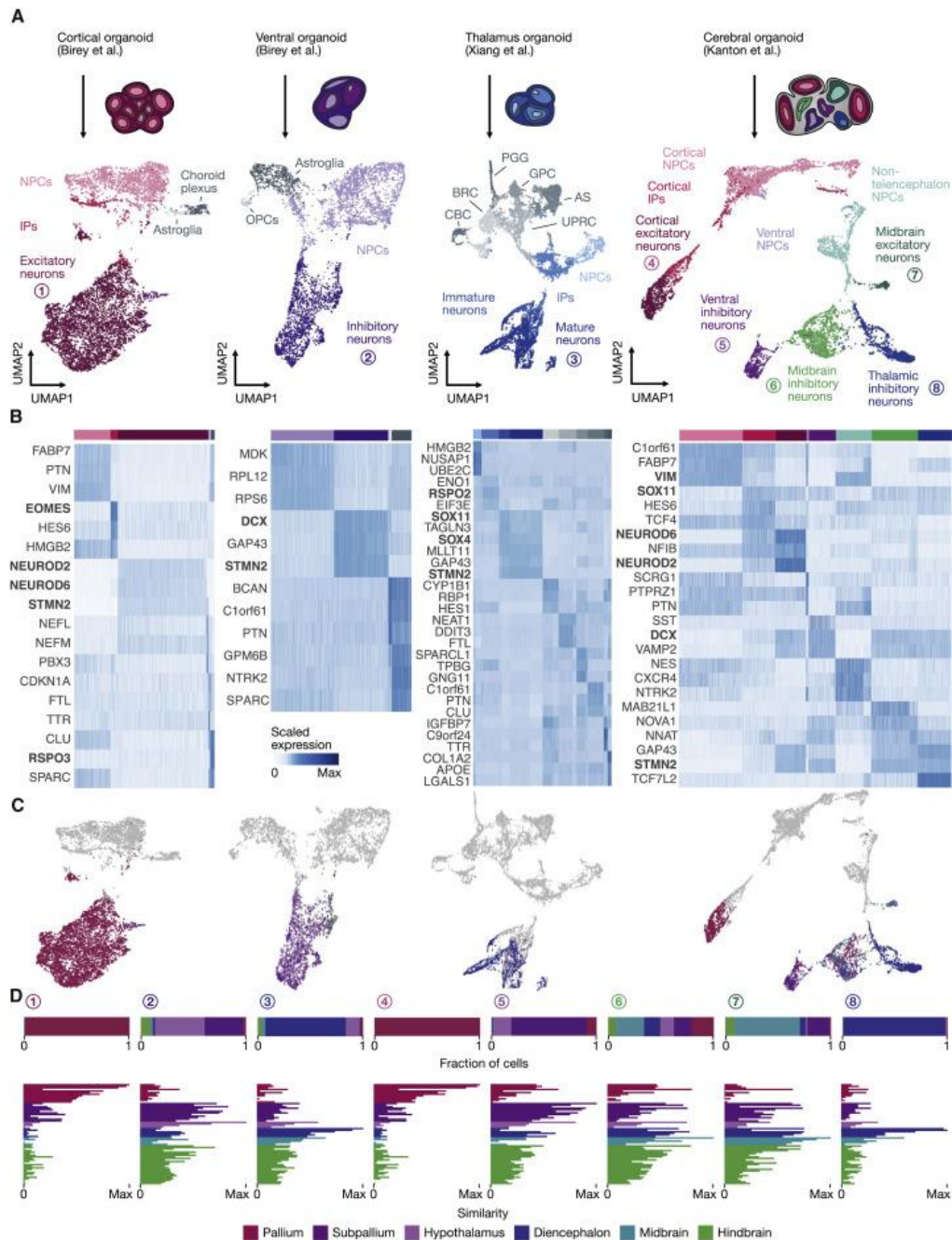


그림 4. Single-Cell Transcriptomic Profiles of Brain Organoids [7]

이처럼 오가노이드에 scRNA-seq 을 적용하면 전체 오가노이드의 평균적인 유전자 발현뿐만 아니라 개별 세포 집단의 구성과 유전자 발현 특성을 확인할 수 있어, 오가노이드의 분화 상태와 세포 이질성을 보다 세분화하여 분석할 수 있다.

또한 오가노이드의 분자적 특성과 기능적 변화를 단백질 수준에서 확인하기 위해 proteomics 를 활용할 수 있다. Gonneaud *et al.* (2017)은 다양한 organoid model 에 적용된 quantitative proteomics 연구를 정리하였다[8]. 이 중 intestinal organoid 에 SILAC 기반 proteomics 를 적용한 연구에서는 HDAC inhibitor 처리에 따른 형태학적 변화와 함께 2,500 개 이상의 단백질을 확인하고 정량하였다[8]. 분석 결과, 흡수계통(absorptive lineage)과 관련된 단백질은 증가하고 분비계통(secretory lineage) 관련 단백질은 감소하였으며, metabolic process 와 관련된 단백질의 증가와 DNA replication, cell cycle 등 proliferation-associated function 의 감소가 확인되었다.

이러한 연구는 오가노이드에 proteomics 를 적용하여 처리 조건에 따른 단백질 발현 변화와 관련 biological process 를 분석하고, 형태학적 변화와 연관된 분자적 특성을 단백질 수준에서 확인할 수 있음을 보여준다[8].

4. E-biogen's Service

RNA-Seq

이바이오젠에서는 NGS 기반으로 오가노이드의 분화 및 배양 조건, 질환 모델링, 약물 처리 등에 따른 전사체 변화를 분석하는 RNA Sequencing 서비스를 제공한다. 연구 목적과 시료 상태에 따라 mRNA-Seq 및 QuantSeq 3' mRNA-Seq 을 적용할 수 있으며, 오가노이드의 전반적인 유전자 발현 양상과 조건 간 DEG 및 관련 biological pathway 를 분석할 수 있다. 분석 결과는 이바이오젠에서 자체 개발한 ExDEGA & GraphicPlus 와 함께 제공되어, DEG 분석과 clustering heatmap, correlation, PCA 등 다양한 분석 결과를 보다 쉽게 확인하고 활용할 수 있다.

QuantSeq 3' mRNA-Seq

Sample requirement⁺	>1μg total RNA (Min. >10ng total RNA)
Library method	QuantSeq 3' mRNA-Seq Library Prep Kit FWD
NGS run format	NextSeq, SE100 bp
Data yield	>10M read/sample
Turnaround time	~2 weeks after RNA QC

Total RNA-Seq / mRNA-Seq

	Total RNA-Seq	mRNA-Seq
Sample requirement	>2μg total RNA	>2μg total RNA
Library method	RiboCop rRNA Depletion kit + CORALL RNA-Seq V2 Library Prep Kit	Poly(A) RNA Selection kit + CORALL RNA-Seq V2 Library Prep Kit
NGS run format	NovaSeq, PE150 bp	NextSeq, PE150 bp
Data yield	> 9 Gb/sample	> 6 Gb/sample
Turnaround time	~5 weeks after RNA QC	~2 weeks after RNA QC

LC-MS/MS Proteomics

LC-MS/MS 기반 Proteomics 분석을 통해 오가노이드의 단백질 발현 양상과 분화 및 배양 조건, 질환 모델링, 약물 처리 등에 따른 단백질 발현 변화를 전장 수준에서 분석할 수 있다. 다양한 분석 전략을 적용하여 수천 종의 단백질을 동시에 확인하고, 조건 간 발현 변화와 관련 biological pathway를 분석함으로써 오가노이드의 기능적 특성과 분자적 변화를 확인할 수 있다. 분석 결과는 ExDEPA & GraphicPlus와 함께 제공되어 단백질 발현 프로파일과 기능적 해석을 시각적으로 지원한다.

Sample requirement	> 150 µg protein (Labeling, PTM 시료는 추가시료 필요)
Analysis Instrument (HPLC & UPLC)	Thermo Scientific EASY-nLC 1200 System Thermo Scientific Ultimate 3000 UPLC
Analysis Instrument (Mass Spectrometry)	Thermo Orbitrap Series
Turnaround time	~6 weeks after QC

Epigenetics

NGS 기반 Epigenetics 분석을 통해 오가노이드의 분화 및 배양 조건, 질환 모델링, 약물 처리 등에 따른 후성유전학적 변화를 분석할 수 있다. 오가노이드에서 확보한 시료를 이용하여 EM-Seq 을 통해 genome-wide DNA methylation 양상과 DMC 및 DMR 을 확인할 수 있으며, ATAC-Seq 을 통해 chromatin accessibility 와 open chromatin 영역의 변화를 분석할 수 있다. 또한 ChIP-Seq 을 통해 특정 단백질과 DNA 의 상호작용 및 genome-wide binding pattern 을 분석함으로써, 오가노이드의 분화 및 다양한 조건에 따른 유전자 발현 조절 특성을 후성유전학적 관점에서 확인할 수 있다.

	EM-Seq	ATAC-Seq	ChIP-Seq
Analysis Target	DNA Methylation	Chromatin Accessibility	Protein-DNA Interaction
Sample Requirement	>2 µg gDNA	~1×10 ⁶ cells in 1 mL media (Cell viability >80%)	>20 µL IP-DNA
Library Method	NEBNext® Enzymatic Methyl-seq Kit	Hyperactive ATAC-Seq Kit	NEB Ultra DNA Library Kit
NGS Run Format	NovaSeq, PE150 bp	NovaSeq, PE150 bp	NovaSeq, PE150 bp
Data Yield	~120 G/sample	~9 G/sample	~6 G/sample
Turnaround Time	~6 weeks after DNA QC	~5 weeks after Cell QC	~3 weeks after Library QC

5. 참고문헌

1. Cho SW, Park J. Organoid-based regenerative therapeutics: convergence of stem cells and tissue engineering. *BT News*. 2024;31(1):34-47.
2. Lee SJ. Cardiotoxicity assessment using human iPSC-derived cardiac organoids and strategies to improve differentiation efficiency [dissertation]. Seoul: Seoul National University; 2026.
3. Choo JW, Kim SH, Nam SM, Choi EK, Hong SY, Yoo SH. Ethical considerations for the research and use of organoids: focusing on research subjects, donation procedures, and future use. *Korean J Med Ethics*. 2023;26(1):1-16. doi:10.35301/ksme.2023.26.1.1.
4. Yao Q, Cheng S, Pan Q, et al. Organoids: development and applications in disease models, drug discovery, precision medicine, and regenerative medicine. *MedComm*. 2024;5(10):e735.
5. Chen G, Gong T, Wang Z, et al. Colorectal cancer organoid models uncover oxaliplatin-resistant mechanisms at single cell resolution. *Cell Oncol (Dordr)*. 2022;45(6):1155-1167. doi:10.1007/s13402-022-00705-5.
6. Lu J, Krepelova A, Rasa SMM, et al. Characterization of an in vitro 3D intestinal organoid model by using massive RNAseq-based transcriptome profiling. *Sci Rep*. 2021;11:16668. doi:10.1038/s41598-021-96321-8.
7. Fleck JS, Sanchís-Calleja F, He Z, et al. Resolving organoid brain region identities by mapping single-cell genomic data to reference atlases. *Cell Stem Cell*. 2021;28(6):1148-1159.e8. doi:10.1016/j.stem.2021.02.015.
8. Gonneaud A, Asselin C, Boudreau F, Boisvert FM. Phenotypic analysis of organoids by proteomics. *Proteomics*. 2017;17(20):1700023. doi:10.1002/pmic.201700023.