

인간세포지도사업 기획 연구
(Human Cell Atlas Planning)

연구기관 : 한국생명공학연구원

2018. 5. 15.

과 학 기 술 정 보 통 신 부

안 내 문

본 연구보고서에 기재된 내용들은 연구책임자의
개인적 견해이며 미래창조과학부의 공식견해가
아님을 알려드립니다.

과학기술정보통신부 장관 유 영 민

제 출 문

과 학 기 술 정 보 통 신 부 장 관 귀하

본 보고서를 “ 인간세포지도사업 기획에 관한 연구 ”의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 05. 15.

목차

1.	추진 배경 및 필요성.....	3
1.1	추진 배경.....	3
1.1.1.	인간세포지도 작성 개요.....	3
1.1.2	인간세포지도 작성을 위한 국제 컨소시엄 현황.....	3
1.2.	추진 필요성.....	3
1.2.1.	인체를 생물학적으로 이해하는 토대 및 세포 수준의 표준 지표 제공.....	3
1.2.2.	국제 컨소시엄 참여를 통한 국내 연구 수준의 발전 및 국제화 촉진.....	4
1.2.3.	인간세포지도 기반 기초, 중개 및 임상 연구 활성화.....	5
1.2.4.	단일세포 오믹스 기술 개발.....	6
2.	국내외 동향 분석.....	10
2.1.	인간세포지도 작성을 위한 국제 컨소시엄 현황.....	10
2.1.1.	HCA (The Human Cell Atlas) 개요.....	10
2.1.2.	HCA 사업의 목표와 내용.....	10
2.1.3.	HCA 구성 체계.....	14
2.1.4.	HCA 참가 조건과 현황.....	16
2.1.5.	HCA의 출연금 현황.....	17
2.2.	국외 연구 및 기술 개발 동향.....	19
2.2.1	세포지도 작성을 위한 단일세포 분석 방법	19
2.2.2.	단일세포 분석 기반 임상 연구 동향.....	36
2.2.3.	오가노이드 연구 동향.....	41
2.2.4.	단일세포 생물정보학 동향.....	48
2.3.	국내 연구 및 기술 개발 동향.....	50
2.3.1.	단일세포 오믹스 분석.....	50
2.3.2.	단일세포 이미징 분석.....	51
2.3.3.	임상시료 확보.....	54
2.3.4.	단일세포 생물정보학.....	54
2.4.	국외 산업 동향.....	55
2.4.1.	단일세포 분석 장비 및 시약 시장 동향.....	55
2.4.2.	오가노이드 시장 동향.....	59
2.5.	국내 산업 동향.....	60
2.5.1.	단일세포 분석 장비 및 시약 시장 동향.....	60
2.5.2.	오가노이드 시장 동향.....	61
2.6.	특허 분석	62
2.6.1.	국제특허	62
2.6.2.	국내특허	66
2.7.	SWOT 분석.....	68

3.	연구 사업 추진 계획.....	70
3.1.	추진 목표 및 연구내용.....	70
3.1.1.	추진목표	70
3.1.2.	연구내용 및 범위	70
3.1.3.	단계별 추진목표	72
3.2.	추진 전략 및 체계.....	73
3.2.1.	추진전략.....	73
3.2.2.	추진체계.....	73
3.2.3.	소요 예산 및 일정.....	74
3.3.	추진 내용.....	75
3.4.	사업 추진을 위한 과제제안서(RFP) 초안.....	78
4..	기대효과 및 활용방안.....	83
4.1.	과학기술적 기대효과.....	83
4.2.	경제사회적 파급효과.....	85
4.3.	활용 분야	85
5.	연구자 토론회 및 자문회의	87
5.1.	인간세포지도 사업 기획을 위한 연구자 토론회	87
5.1.1.	연구자 토론회 일정	87
5.1.2.	토론 내용 요약 정리.....	87
5.2.	인간세포지도 사업 기획 전문가 자문회의	90
5.2.1	자문회의 일정	90
5.2.2.	자문회의 내용 요약 정리.....	90
5.3.	인간세포지도 사업 기획 해외 전문가 서면 자문	94
5.3.1.	해외 자문을 위한 요약 white paper	94
5.3.2.	해외 전문가 자문 내용 요약 정리	96
6.	참고문헌.....	98

1. 연구의 추진 배경 및 필요성

1.1. 추진 배경

1.1.1. 인간세포지도 작성의 개요

- 세포는 인간의 몸을 구성하는 가장 기본적인 단위로 인간의 생물학적 특성을 이해하고 다양한 질병을 진단·치료하는 데 있어 근원이 되는 단위임
- 인간 몸의 기본 단위인 세포를 이해하기 위해 많은 연구가 이루어졌지만 기술적인 한계로 인해 현재까지는 개별 세포가 아닌 세포들의 집합체인 조직·장기 수준에서 연구들이 진행되어 옴
- 최근 유전체 분석 기술, 세포 분리 기술, 광학 영상 기술 및 정보 분석 기술 등 다양한 기술의 발달로 인해 각 조직을 이루는 세포 수준에서 여러 특성을 분석하는 것이 가능해짐

1.1.2. 인간세포지도 작성을 위한 국제 컨소시엄 출범

- 단일세포 오믹스 정보 생산 및 이미징 기술의 발달 등으로 인해 단일세포 수준에서 여러 가지 정보를 얻고 분석하는 것이 가능해지면서 생명체의 기본 단위인 세포 수준에서 인체를 이해하고자 하는 연구들이 선진국들을 중심으로 활발하게 이루어지고 있음
- 인체는 200여 가지 이상의 서로 다른 조직으로 이루어져 있고 약 50-100조 개의 세포로 이루어진 복잡한 생명체임. 이러한 인체를 구성하는 수십 조 개 이상의 세포들의 분자적인 특성과 상호작용을 이해하는 것은 어느 한 연구진 혹은 한 국가에서 단기간에 완성할 수 있는 범위를 넘어서는 거대한 프로젝트임
- 이러한 인간세포지도 작성 사업의 중요성 및 거대 규모를 고려하여 2016년 가을부터 인간세포지도 작성을 위한 국제 컨소시엄을 결성하고자 하는 모임이 이루어졌고, 여러 차례의 활발한 논의를 거쳐 2017년 10월 1단계 계획을 발표함
- 현재 인간세포지도 컨소시엄에는 미국, 영국, 독일, 이스라엘, 일본 등 10여 개 국가들이 참여하고 있으며, 다양한 인종 및 민족을 포함하는 인간세포지도 작성을 위해 더 많은 국가들의 참여를 권장하고 있음

1.2. 추진 필요성

1.2.1. 인체를 생물학적으로 이해하는 토대 및 세포 수준의 표준 지표 제공

- 지난 십여 년 동안 실험 및 데이터 분석 기술의 발달로 유전체, 후성유전체, 단백질체, 대사체 등 분자 시스템 수준의 연구가 빠르게 발전함
- 최근에는 단일세포 수준에서 다양한 오믹스 정보를 분석하는 기술이 발전하면서 인

체 조직 단계를 넘어 인체를 구성하는 개별 세포의 종류, 수 및 위치에 대한 정보를 파악하고, 개별 세포의 분자적인 상태, 계통분화 및 발생 단계를 규명하는 연구가 활발히 진행되고 있음

- 인간세포지도를 활용하여 질병과 관련 있는 세포의 종류 혹은 세포의 병리학적 이상을 규명하고 이를 질병의 진단 및 치료 기술 개발에 활용하고자 하는 연구가 시작되고 있음
- 인간세포지도의 활용도를 높이기 위해서는 다양한 인종, 환경, 연령을 아우르는 인체 시료들의 인간세포지도 작성이 필수적인데, 이를 위해 여러 국가가 참여하는 국제 컨소시엄이 추진되고 있음

1.2.2. 국제 컨소시엄 참여를 통한 국내 연구 수준의 발전 및 국제화 촉진

- 최근의 분석에 따르면 개방적인 체계를 갖추고 국제적인 교류를 긴밀하게 하는 국가일수록 연구 성과가 더 우수한 경향이 있는 것으로 나타남(그림 1)



그림 1 국제협력과 연구 성과 우수성과의 연관성(Nature 2017)

- 우리나라는 GDP 대비 연구개발비의 투자가 세계적으로도 상위권이지만 연구개발 결과의 우수성은 그에 미치지 못하고 있는데, 그 원인 중 하나로 국제적인 개방성의 결여 및 국제 협력의 부족이 지적되고 있음

- 우리나라는 인간게놈프로젝트, 인간배수체 프로젝트, 1000명 유전체 프로젝트, 국제 암유전체 프로젝트 등 그 동안 진행되어 온 국제 컨소시엄에 참여하지 못함으로써 세계적인 수준으로 발전할 수 있는 기회를 살리지 못했음
- 2011년 국제인간 후성유전체 프로젝트(IHEC)에 국립보건연구원이 정식 회원기관으로 참여하여 50종의 후성유전체 데이터 생산 및 공개를 진행하고 있는데, 이러한 국제 컨소시엄 참여를 통해 국내 후성유전체 연구 수준을 높이는 데 기여하고 있음
- 다양한 분야의 융합 및 여러 나라의 국제 공동 연구를 통해 우수한 성과들이 많이 만들어지고 있는 현 추세에서, 인간세포지도 작성과 같은 국제 컨소시엄에 참여하는 것은 우리나라 생명과학을 국제적인 수준으로 발전시키는 데 좋은 기회가 될 것으로 기대됨
- 생산될 인간세포지도는 다양한 연구 분야에서 참조지도로 활용될 것임. 한국인 세포지도 생산을 통해 좀 더 한국인의 건강과 질병을 연구하기에 적합한 참조지도를 만들 필요가 있으며, 세포지도 작성에 조기투자를 수행하여 모든 질병연구에 기본이 되는 데이터에 대한 초기접근이 필요함. 또한, 인간세포지도를 작성하기 위해 필요한 기본적 기술은 개발되었지만 지도의 내용이 충실해지기 위해서는 현재 기술을 발전시킬 필요가 있음

1.2.3. 인간세포지도 기반 기초, 중개, 임상 및 융합 연구 활성화

- 인간세포지도는 인체를 구성하는 기본 단위인 세포에 대한 기본적인 지식을 제공할 뿐 아니라, 이러한 세포들 간의 상호 작용을 통한 세포/조직 생리, 해부, 조직 발생 및 분화, 세포 항상성 및 질병의 이해 등 다양한 측면에서 많은 분야에 영향을 끼칠 것으로 기대됨
- **세포의 분류:** 기존의 세포 유형의 분류는 주로 세포의 형태 및 세포막에 존재하는 일부 마커에 근거하여 이루어짐. 단일세포 전사체 및 단백체 연구를 통해 각각의 세포를 이루는 분자적인 특성을 오믹스 수준에서 밝힘으로써 좀 더 객관적인 세포 분류 체계를 이룰 수 있고, 또 기존에 파악하지 못했던 새로운 유형의 세포들을 발견할 수 있음
- **세포 조직학:** 단일세포 오믹스 분석을 통한 세포의 분자적인 특성 규명과 더불어 3차원 조직 상 세포의 위치를 규명하는 기술들의 발달로 각각의 세포들이 어디에 위치하고 어떠한 세포들과 상호 작용하는지 규명함으로써 인체를 이루는 각 조직/장기들을 더욱 잘 이해할 수 있도록 함
- **발생 및 분화:** 단세포인 수정란으로부터 인체를 이루는 수십 조개의 세포로 분화하는 과정에서 각각의 세포들이 어떠한 세포로 분화하는 지 규명함으로써 발생·분화 단계를 이해할 수 있고, 이러한 지식은 재생 의학에 널리 활용할 수 있음. 세포들의 변화하는 과정을 추적하는 cell fate tracing 기법으로부터 다양한 단계의 세포들에 대한 단일세포 전사체 정보를 통해 세포들의 분화 과정을 추적하는 pseudo timing 분석 기법 등 다양한 방법들이 개발되어 사용되고 있음

- **세포·조직 생리 및 항상성 유지:** 다양한 환경에서 조직을 이루는 세포들이 항상성을 유지하면서 외부 자극에 반응하는 과정을 단일세포 수준에서 분석함으로써 세포들의 일시적인 변화 및 항상성 유지 과정을 연속적인 상태에 있는 세포들의 정량적 변화 분석을 통해 더욱 잘 이해할 수 있음
- **질병의 이해:** 생명체를 이루는 기본 단위인 세포에 이상이 생기는 것이 질병인데, 단일세포 수준에서 질병이 생긴 조직·장기를 분석함으로써, 질병 조직 내 세포의 이질성을 이해하고 질병의 원인을 더욱 정확하게 파악할 수 있음. 또한, 다양한 환자들의 질병 조직을 단일세포 수준에서 분석함으로써 개개인의 차이를 이루는 요인들을 더욱 정확하게 밝힐 수 있고, 각각의 환자에 적합한 맞춤형 치료법을 제시할 수 있음
- **세포 내 분자 기작 및 세포-세포 상호 작용:** 단일세포 다중 오믹스 분석을 통해 단일세포 내 유전체, 후성유전체, 전사체, 단백체 등을 이루는 다양한 분자들의 상호 작용 및 조절 기작을 더욱 정확하게 이해할 수 있음. 또한, 단일세포 수준에서 CRISPR과 같은 분자 제어 기술의 활용을 통해 개별 분자들의 기능을 명확하게 규명할 수 있음
- **신약 및 바이오마커 개발:** 세포 수준에서 신약 타겟 발굴, 인체 독성 예측, 약물 효능 및 부작용 예측 등 관련 정보를 제공함으로써 신약 개발 성공 가능성을 높이고, 질환 조직의 세포 수준에서 바이오마커를 발굴함으로써 정확도 및 성능이 향상된 임상 바이오마커를 개발할 수 있음
- **융합 연구 활성화:** 인간세포 지도 작성을 위해서는 임상 시료 확보 및 처리 과정, 단일세포 오믹스 분석, 단일세포 광학 영상, 데이터마이닝, 생물정보 분석 등 다양한 학문 분야의 협력이 필요함. 이러한 협력을 통해 융합 연구를 활성화하고 새로운 학문 영역을 개척할 것으로 기대됨
- **인간세포지도 작성은 개인의 연구로 이루는 것이 불가능함.** 인간을 대상으로 하는 시료 획득부터, 기술 개발, 실행이 여러 수준에서 조화를 이루어야 가능하므로 매우 정교한 공동연구가 가능하도록 별도의 연구사업 조성이 필요함

1.2.4. 단일세포 분석 기술 개발

- **인간세포지도 작성을 위해서는 단일세포 오믹스 분석, 단일세포 이미징, 단일세포 생물정보 분석 등 다양한 분야의 기술 개발이 뒷받침되어야 함.** 또한, 인간세포지도를 보완할 수 있는 오가노이드 및 다양한 모델 생물체에 대한 단일세포 분석 또한 병행되어야 함
- **단일세포 오믹스 분석**
 - 단일세포 오믹스 분석은 유전체, 전사체, 후성유전체, 단백체 등 세포를 이루는 다양한 분자들의 정량적인 분석을 포함함. 지난 150년간은 개별 세포에 대한 분석 대신 수천에서 수십억 개의 세포들에 대한 평균치(ensemble)에 의존한 분석만이 가능했음. 그런데, 평균치에 의존한 접근은 조직 내 존재할 수 있는 이질성(heterogeneity)에 의한 유전체 및 전사체의 차이 및 단백질 발현과 같은 개별 세포

에 대한 분자수준의 특성 파악이 불가능한 한계를 가진

- 현재의 기술적 수준은 3세대 시퀀싱 기술인 대량 병렬 단일 세포 지놈 분석 기술의 발달에 따라 수십만 개의 세포에 대한 분석이 가능하며 단일 세포 내에서 DNA와 단백질을 동시 분석하거나 동일 세포 내에서 DNA와 RNA 그리고 단백질 조합을 분석하는 기술을 통해 세포의 다양성/이질성 정보를 유지한 채 조직과 시스템 내 세포 및 분자 상태를 이해하는 것이 가능해짐
- 인간세포지도를 완성하기 위해서는 (1) 각 단계별 기술들의 최적화가 요구되는 한편, (2) 동일한 개별 세포 상에서 지놈 DNA와 mRNA 시퀀싱, 단일 세포 메틸놈(methylome) 및 전사체(transcriptome) 분석, 그리고 동일한 단일 세포에 대한 염색질(chromatin) 접근성 및 메틸화(methylation)와 전사체를 결합과 같은 다중 체(-omics) 측정 기술 개발이 필요함
- 이와같이 새롭게 개발되는 단일 세포 다중체학적 방법은 지놈, 계통(lineage), (하이드록시)메틸놈, 지놈 접근성, 구조, 전사체 및 단백체에 대한 정보 결합을 통해 각 세포 종류 간 관계 및 속성에 대한 더 포괄적인 그림을 제공할 수 있음.

○ 단일세포 이미징

- 1990년대 말 시작되어 2014년 노벨 화학상으로 주목을 받게 된 초해상도 현미경(super-resolution microscope) 기반 단분자 이미징(single-molecule imaging) 기법의 발전에 힘입어, 광학 현미경의 회절 한계를 뛰어 넘어 분자수준의 해상도로 살아 있는 세포 내 다양한 분자들을 실시간으로 추적이 가능하게 되었음. 이에 따라 형광 현미경을 이용한 세포내 유전체 연구는 비약적으로 발전하였음
- 이러한 기술적 발전에 힘입어 개별 세포내 전사과정, mRNA의 정량 분석, mRNA의 반감기 측정 등 다양한 유전 정보에 대한 실시간 모니터링이 가능해 졌을 뿐 아니라 염기서열 분석까지 가능하게 되면서 단일세포 이미징은 개별 세포의 유전정보와 조직 내 세포의 공간정보를 동시에 얻을 수 있는 도구로써 주목을 받음
- 현재 전 세계 여러 그룹에서 독자적인 방법을 개발하여 세포 이미징 기반 단일세포 내 유전체 염기서열 분석에 관한 정보를 구축하고 있지만, 각각의 기술마다 장단점 및 한계점이 존재하고, 기술적 개발상태가 아직 초기단계여서, 개발의 여지가 많이 남아 있음
- 형광 이미징을 이용한 단일세포 염기서열 분석 기술은 전 세계적으로 최근 5년간 급속도로 발전하고 있으나, 상용화 되지 않은 고가의 이미징 장비 설치가 필요하고, 데이터 습득 및 분석에 오랜 시간이 소요 됨. 국내 실정상 개별 연구자가 관심만 가지고 진행하기에는 어려운 분야이므로 아직 이 분야의 총체적 전문가가 국내에는 없는 실정임
- 단분자를 이용한 단일세포 이미징 분야의 우리나라 연구자들의 개별적인 기술 기반은 확보되어 있으나, 유기적이며 조직적인 연구를 수행할 만한 동기가 부족한 상황임. 특히, 이미징 장비 구축, 세포 및 조직 등의 시료 확보, 막대한 데이터 분석 및

이를 기반으로 한 생명 현상 규명 등 다양한 분야의 융합연구가 필요한 상황인데, 대규모의 연구비 재원이 현재까지 없었음

- 형광 이미징 기반 단일세포 염기서열 분석 기술을 실현하는 데 필수적으로 필요한 연구 분야의 전문가들을 모으고 인간세포지도 국제 컨소시엄에 참여할 수 있는 기반을 만든다면, 해당 기술의 국내 기술적 수준을 발전할 수 있는 기회를 만들 수 있음. 이를 통해 축적된 연구 역량을 활용하여 그동안 이해하지 못한 생명현상을 밝히는 데 큰 기여를 할 수 있을 것으로 기대됨

○ 단일세포 생명정보학의 필요성

- 인간세포지도에서 생산하는 단일세포 다중오믹스 정보 및 위치 정보 등은 수십만의 개별 세포의 정보를 얻고 이를 바탕으로 큰 조직의 고해상도 분석이 가능하도록 한 반면, 데이터 분석 및 해석에 있어 새로운 차원의 도전을 가져옴
- 인간세포지도 데이터는 단일세포 오믹스 정보뿐 아니라 세포군집에서 세포의 종류, 상태, 변이와 위치를 결정할 수 있는 새로운 정보 처리 및 분석 기술 개발을 필요로 함. 이러한 필요에 맞추어 새로운 전산 기법의 개발을 통해 인간세포지도 완성을 위한 분석 표준화를 구축하고 세포 수준의 유전체통합분석이 가능한 최신 알고리즘 구축이 필요함

○ 오가노이드 세포지도의 필요성

- 오가노이드는 기존의 세포모델 또는 인간에서 관찰하기 어려운 생물학적 측면을 연구하기 위한 유용한 기술임. 오가노이드를 통한 인체 장기 모델링 기술은 인체 장기처럼 다양한 세포 유형으로 구성이 가능하므로 현재 사용 중인 실험용 오가노이드와 인체 장기간의 유사도 평가만 이루어진다면 인체 장기를 보완·대체할 수 있는 모델로써 사용 가능함
- 현재의 오가노이드 기술은 핵심 세포 유형의 결핍, 생물학적 또는 기술적 요인으로 인한 환자들 간 오가노이드 변이 여부, 그리고 신경, 혈관, 섬유아세포 및 면역세포와 같은 부속세포의 부재라는 한계가 있음
- 오가노이드의 강력한 자기-조직화 특성은 기존에 가지는 한계를 넘기 위해 세포질 또는 미생물 요소를 적절하게 배합시킬 수 있으며, 오가노이드와 일치하는 조직의 지도를 개발함으로써 보완할 수 있을 것이라고 기대됨
- 오픈액세스(open-access)가 가능한 오가노이드 세포 지도는 새로운 오가노이드 과제를 수행하는 연구자를 위한 로드맵이 될 것이며, 질병에서 발생하는 변화를 평가하고 더 나은 질병 모델링 및 약물 스크리닝에 사용할 수 있게 할 것으로 예상됨
- 오가노이드 기술을 이용한 질환 모델은 기존의 인체 세포를 이용한 질환 모델보다 보다 효과적으로 질환 상태를 모사할 수 있으며 환자로부터 확보하기 어려운 조직

을 오가노이드 기반의 질환 모델을 통해 확보할 수 있어, 환자 조직의 대안으로 활용할 수 있을 것으로 기대 됨

- 오가노이드 생산의 용이함, 정상 및 질환을 가진 인간 기관과의 유사성 때문에 오가노이드 세포 지도는 중개연구에 있어 각광을 받고 있으며, 즉시 임상에 적용이 가능함

2. 국내외 동향 분석

2.1. 인간세포지도 작성을 위한 국제 컨소시엄 현황

2.1.1. The Human Cell Atlas (HCA) 개요

- 2016년 8개국(미국, 영국, 네덜란드, 독일, 이스라엘, 스웨덴, 일본, 인도)의 과학자들이 모여, 모든 인간 세포의 종류와 개수, 위치를 규정하는 인간세포 표준지도 작성을 위한 국제 협력 기구로써 The Human Cell Atlas (HCA)를 발족함(그림 2)



그림 2. 2016년부터 2018년까지 HCA 활동사항

- HCA 사업의 Phase 0-1 단계로 2016년 10월부터 2018년 1월까지 모두 9번의 미팅 및 워크숍을 개최하고 HCA 사업 관련 기술, 운영에 관한 기초와 방침을 협의함
- 2017년 10월부터는 Phase 1 단계를 시작하고 Facebook 창업자 가족이 운영하는 Chan-Zuckerberg Initiative (CZI)의 출연을 통해 38개 관련 기술개발 과제를 선정(그림 2)하고, 컨소시엄의 1단계 연구에 착수함
- 2017년 10월에는 HCA 사업의 전략기획서인 ‘White paper’를 공개하고 컨소시엄의 비전과 목표를 발표함
- HCA 사업의 성공적인 완수를 위한 가치로 (1) 투명한 정보 공개, (2) 생산된 데이터의 질적 보장, (3) 사업 운영의 유연성, (4) 전 세계 다양한 구성원의 참여, (5) 분석 시료의 지리적, 성별, 나이, 인종의 다양성 확보, (6) 시료 출처의 개인정보 보장, (7) 관련 신규 기술의 적절한 활용 및 개발, (8) 컴퓨터 기반 정보 분석 기술 개발 등의 사안을 선정하고 사업 운영 방침의 기본 틀을 정함

2.1.2. HCA 사업 목표와 내용

- HCA의 최종 목표는 인간 신체를 구성하는 모든 세포의 표준 지도를 작성하는 것임. 최종 목표 달성을 위한 1단계 목표로써 최고 3천만에서 1억 개의 단일세포와 이들



그림 3. HCA의 1단계 과제 (자료출처; CZI)

이 위치한 조직의 정보에 대한 데이터베이스를 구축하고자 함(그림 3)

- 1단계 연구 목표 달성을 위해 (1) 분석 장기, 기관, 조직에 대한 선정, (2) 세포 종류와 위치 결정을 위한 최소 해상도, (3) 시료 확보와 데이터 측정 방법, (4) 생산된 데이터 분석과 플랫폼에 대한 기준 제시
- 분석 재료 선정: 1단계에서는 모든 인간 장기 대신 정상인으로부터 유래한 선별된 장기의 조직을 대상으로 분석을 수행함(표 1). 인종다양성 확보를 위해 최소 20여개의 다인종 시료를 확보하고, 대상의 나이는 20-55세로 선정함

표 1. HCA 국제 컨소시엄의 1단계 추진 계획

기관	장기/조직	선정 이유	추진 계획
중추신경계	소뇌, 대뇌, 뇌간, 척수	• 뇌 작용 기작 이해의 기초 • 폭 넓은 기초 및 임상 응용 가능성(뇌질환 진단 및 치료)	• 소수(2-6명) 개인 뇌 100곳 이상의 상세한 지도 작성 • 단일세포/핵 전사체 • smFISH를 이용한 2차원, 3차원 발현지도
면역계	면역세포	• 면역세포의 다양성 이해 • 체내 환경 변화에 따른 면역 체계 변화 이해 • 환자 간 변이 이해	• 인체 내 다양한 조직에 존재하는 모든 면역세포 분석 • 3 지역(다른 인종)의 건강한 성인 20명 이상씩 • 단일세포 전사체
비뇨기계	신장	• 신장 내 다양한 세포 지도 작성 • 노화에 따른 신장세포 기능 변화 이해의 기초	• 3-4 지역(다른 인종; 흑인, 아시아인, 유럽인)의 건강한 성인 20명 이상씩 • 10명 이상의 고령 성인(55-80세) • 단일세포 전사체, 단백질 패널 • 3차원 발현지도 작성

호흡계	폐	40가지 이상의 세포로 이루어진 복잡한 조직 - 다양한 폐질환에 의한 사망(7백만명 이상) - 만성 폐질환 치료를 위한 기초 자료	3-4 지역(다른 인종)의 건강한 비흡연 성인 20-30명 이상 - 폐질환 환자(COPD, 천식, 폐섬유증 환자) 일부 포함 - 단일세포/핵 전사체 3차원 발현지도
간담췌장계	간	- 수백 가지 기능을 수행하는 다양한 간 세포 특성 이해 - 간 질환 관련 세포 특성 이해 - 간 재생 과정 이해	- 최소 4 지역(다른 인종)의 건강한 성인 20명 이상씩 - 한 사람의 간 조직에서 8곳 이상 시료 채취 - 단일세포 전사체 3차원 발현지도
	췌장	- 췌장세포 파괴는 당뇨병의 원인 - 췌장세포와 주변세포(섬유세포, 면역세포) 상호작용 연구	- 최소 3 지역(다른 인종)의 건강한 성인 20명 이상씩 - 한 사람 췌장에서 10 이상 시료 채취 - 단일세포 전사체 3차원 발현지도
소화기계	소장·대장	40종 이상의 다양한 세포 - 장의 기본 기능 및 다양한 만성질환(크론병, 만성장염, 대장암, 음식 알레르기) 치료의 기본 자료	3 지역(다른 인종)의 건강한 성인 20명 이상씩 - 한 사람당 4곳(right, left, transverse, rectum) 시료 - 단일세포 전사체 3차원 발현지도
피부계	피부, 피하 지방	- 신체 전신에 분포하며 신체를 보호하는 조직 - 시료 수집 용이	3 지역(다른 인종)의 건강한 성인 20명 이상씩 - 유방 및 피하지방 - 단일세포/핵 전사체 3차원 발현지도
심장혈관계	심장	- 심장 기능을 수행하는 다양한 세포들의 기능 이해 - 심장 발달·재생 과정 이해	3 지역(다른 인종)의 건강한 성인 20명 이상씩 - 다양한 발달 단계 사람 포함 - 단일세포/핵 전사체 - 단일세포 ATAC-Seq 3차원 발현지도
	성체줄기세포	- 조직 발달 과정의 이해 - 조직 재생의학의 기초	- 다양한 발달 단계 조직(간, 신장, 피부 등의 후기 발달 단계) 2 지역(다른 인종), 20명 이상씩 - 단일세포/핵 전사체 3차원 발현지도
소아/유아	소아/유아	- 소아 질병의 이해 - 소아 발달 과정의 이해	3 지역(다른 인종), 20명 이상씩 - 다양한 조직 확보 - 단일세포/핵 전사체 3차원 발현지도

Organoids	다 양 한 organoids	• 다양한 인체 조직의 모델 재료 • organoid의 원 조직 재현 정도 분석	• 3 지역(다른 인종), 20명 이상의 건강한 성인 • 다양한 조직의 organoid 유도 (triplicate 이상) • 단일세포 전사체 • 3차원 발현지도
내분비계	2순위	2단계 추진	
근육골격계	2, 3순위	2단계 추진	
유방	2순위	2단계 추진	
여성생식계	2, 3순위	2단계 추진	
남성생식계	2, 3순위	2단계 추진	

- 최소 해상도 : (i) 희귀 세포로 선정하기 위한 최소 발견 빈도의 결정을 기반으로 한 세포 해상도, (ii) 세포의 위치 확인을 위한 위치 해상도, (iii) 대량 세포 분석을 위한 최소 분자 수준의 해상도에 대한 결정을 1단계 사업 착수 이전에 완료함
- 1단계 사업을 통해 대표 장기 조직 시료의 채취, 전처리, 분석을 위한 데이터 측정에 대한 기술의 기반을 확보하고자 함. 각 조직별 인간 세포는 두 수준으로 나누어진 추진 전략을 통해 분석함(그림 4)
 - 단일세포/단일 핵 분석: 동결된 세포로부터 단일세포 혹은 단일 핵을 분리하고 이를 대상으로 하는 단일세포 전사체 및 후성유전체 분석
 - 온전한 조직 내에서의 위치 정보 분석 : 대량 분석이 가능한 기술을 통해 서로 다른 세포의 위치 정보 파악
- 분석을 위한 정상인 유래 시료의 확보를 위해 기증자의 동의를 통해 생체 및 사체들을 대상으로 조직 혹은 장기 자원을 확보하고 자원은행 형태로 운영하는 방안을 구상 중으로, Genotype-Tissue Expression (GTEx) 사업과 Cambridge Biorepository for Translational Medicine (CBTM)과 같은 사업에서 구축한 윤리, 행정적인 절차 및 규정과 자원 추출, 보관 기술을 표준 프로토콜 확립에 도입함
- HCA 사업을 통해 생산된 인간세포 데이터는 생산과 동시에 공개하는 것을 원칙으로 하여 Data Coordination Platform(DCP)를 구축하고, 이는 오픈 소스/오픈 데이터로 활용 할 계획임. DCP를 구성할 데이터에는 세포의 성격을 규정할 수 있는 종류, 상태, 변성, 발달 단계와 조직 구성에 대한 내용이 포함됨. DCP를 통해 생성된 데이터는 포털과 앱 등을 통해 사용자에게 제공함
- HCA 사업으로 생산된 각종 장기 분석 결과, 기술개발 등의 정보를 종합한 공식적인 보고서를 발행하고 HCA의 차기 단계 사업 기획에 활용하도록 함
- HCA는 Human Genome Project 이후 이어지고 있는 주요 국제 컨소시엄의 하나로써 기존의 ICGC (International Cancer Genome Consortium), FANTOM, 1000 Genomes, ENCODE/ModENCODE, ImmGen, BLUEPRINT 등의 다른 컨소시엄에서

활동한 경험이 있는 연구자들이 주요 위원으로 참여하고 있으며, 기존 컨소시엄으로부터 개별 분야에 필요한 방법론들을 습득함

○ HCA를 통해 생산된 데이터는 ENCODE, 4D Nucleome, Human Protein Atlas,



그림 4. HCA 1단계 사업 추진 전략

Tumor Cell Atlas 등의 기존 컨소시엄 데이터와 상호보완적으로 활용함

○ HCA는 인간세포 표준 지도의 생성 이외에도 GA4GH (Global Alliance for Genomics and Health) driver project와 Kidney Precision Medicine Program과 같은 질환 특이적인 프로젝트 등에 대한 연구 기획 수행 중임

2.1.3. HCA 구성 체계

○ HCA 컨소시엄은 아래와 같은 4개의 기구로 구성됨(그림 5)

- Collaborative Biological Networks : 인간 세포 지도 작성을 위한 특정 장기 및 시스템 관련, 유전체, 컴퓨터 공학, 기술개발 관련 학계 전문가
- Technical Forum : 기존의 단일세포 분석 기법의 시험 및 신기술 개발과 함께 파일럿 프로젝트 수행
- Data Coordination Platform : 인간세포지도를 위해 생산된 데이터의 저장, 가공, 분석, 시각화, 공개를 위한 소프트웨어 개발
- Analysis Garden : 컴퓨터 분석 기법과 알고리즘 개발을 위한 개방형 생태계



그림 5. HCA 구성 요소

- HCA는 약 35명의 위원으로 구성된 Organizing Committee (OC)를 통해 공식적으로 운영됨. OC는 주요 활동으로 HCA의 정기 모임 운영, HCA 관련 핵심 문서 제작 및 구성, 과학적 가치와 윤리 규정에 대한 정립, QC(quality control) 및 분석 표준 설정, HCA 성과 관리, HCA 공식 대외 창구 역할, HCA 사업 관련 정기 점검을 수행함
- 현재 OC는 2명의 위원장이 있으며, 위원은 10개국 (이스라엘, 캐나다, 영국, 일본, 네델란드, 독일, 미국, 스웨덴, 인도, 호주), 27명의 과학자로 구성되고, 이들의 임기는 5년임
- OC는 2명의 위원장과 5명의 OC 위원으로 구성된 Executive Committee(EC)를 운영하고, 영국 (생어 연구소), 미국 (브로드 연구소), 유럽연합, (캐롤린스카 연구소), 아시아 (리켄 연구소), 4군데에 거점 사무소(Executive Offices)를 둠
- OC 산하에는 Working Groups을 구성하여 특정 분야 관련 이슈를 담당하도록 함
- 현재 Working Groups으로는 (i) Analysis Working Group (AWG), (ii) Meta Data

Working Group (MDWG), (iii) Common Coordinate Framework Working Group (CCFWG), (iv) Standard and Technology Working Group (STWG), (v) Ethics Working Group (EWG)이 있고 각 그룹은 OC 위원 1인, 비위원 1인으로 구성된 공동의장과 이들에 의해 선출된 위원으로 구성되며 모든 위원은 3년의 임기와 1회의 재임이 가능함

- OC는 DCP 운영 기구인 DCP Governance Group (DCPGG) 구성을 포함한 DCP 운영에 관한 모든 사항을 직접 관리함. DCPGG는 2인의 OC 위원, AWG, MDWG, CCFWG 참여 위원 중 각 1인, 그리고 최소한 3명의 HCA 참가 멤버로 구성됨(그림 6)

2.1.4. HCA 참가 요건과 현황



그림 6. HCA 구성도

- HCA 참가는 HCA Member Registry 등록 후 HCA의 승인을 받은 모든 개인 및 기관이 가능함. HCA 참가자 중 HCA 사업을 수행하고 있거나 OC에 의해 지명된 HCA 그룹은 참여가 제한적인 일부 활동이 가능한 HCA Collaborating Member가 됨
- 단일세포 수준의 시스템적인 동정을 기반으로 하는 모든 형태의 연구 사업은 HCA Project Registry에 등록을 함으로써 HCA 사업에 참여할 수 있음. 또한, HCA에 등록이 된 과제인 경우 HCA의 기준과 정보 공개 정책의 이행에 동의한 것으로 간주됨
- HCA 프로젝트는 3개의 범주로 나누어짐 (1) HCA Participating Projects : 단일세

포 분석 관련 데이터 생산, 실험 방법 개발, 컴퓨터 분석 기법 개발에 기반 한 모든 과제로써 HCA 프로젝트 등록만으로 참여 가능, (2) HCA Network Projects : HCA 이외의 다른 컨소시엄 과제와 연계되는 HCA participating projects, (3) HCA Flagship Projects : HCA 1차 과제 결과물인 HCA Draft Atlas Plan 1.0을 구성하는 것을 목표로 하는 과제로써 HCA 기본 계획에 따라 수행 계획을 수립하고 과제 총 수행기간동안 최소한 2천만 유로의 연구비를 집행하는 과제

- HCA 과제를 통해 생산된 데이터는 DCP에 기탁 후, 윤리 규정을 준수하여 정기적인 공개를 수행하고 개별 연구자에 의해 사용 가능함. 모든 HCA 과제에 사용된 실험 방법 및 컴퓨터 기반 분석법은 공개를 기본으로 함
- OC는 학술 저널을 통해 핵심 데이터 컬렉션과 분석에 관한 학술 논문을 기획함
- HCA를 통해 생산되는 인간세포지도는 전 인류를 대표하는 표준세포지도가 되기 위해 유전적, 경험적, 환경성 다양성을 아우를 수 있어야 하므로 전 세계의 모든 국가에서 성별, 나이, 인종, 환경, 문화를 대표할 수 있는 시료를 확보하고 분석하도록 과제 참여를 독려함
- 시료의 다양성 확보를 위해 지역 거점을 확보하고 시료 확보 표준 프로토콜을 확립하여 개별 국가, 지역에서 분석을 수행할 수 있는 과제 참여를 유도하고 관련 계획 수립하기 위해 2018년 HCA 미팅에서 OC 주관으로 논의를 진행할 예정
- 시료의 다양성 뿐 아니라 참여 연구자의 다양성도 확보하기 위하여 여러 나라의 다양한 배경을 가진 연구자들의 참여 유도함. 현재, 북미, 유럽, 아시아, 호주의 연구자들이 OC 위원으로 활동 중이고 HCA community에는 이미 세계 모든 대륙의 연구자들이 등록되어 있음
- 관련하여, 아시아 대륙에서는 한국, 일본, 싱가포르, 인도 등을 포함한 아시아-인간세포지도의 컨소시엄을 발족하고 궁극적으로 HCA에 참가하는 방안이 구상중임
- 시료 및 연구자 다양성 확보를 위해 HCA는 개별 과제의 기획 미팅부터 참여하도록 노력하며 OC를 중심으로 개별 지역 모임들에 표준화된 실험 기법과 컴퓨터 분석법 등에 대한 정보를 보급함. 또한, HCA 과제 참가자들에게 훈련 프로그램, 워크샵, 컨퍼런스 등을 제공하여 각 과제 성과의 질을 향상하고 표준화를 용이하게 하는 방법을 도모함

2.1.5. HCA의 출연금 현황

- HCA의 연구비 출연 기관은 (1) 각국 정부기관, (2) 민간 독지 단체, (3) 제약, 생명공학 관계 산업계 등이 있음
- 대표적인 각국 정부 출연기관은 아래와 같음(표 2)
 - 미국: NIH Common Fund, NIH BRAIN Initiative, National Cancer Institute (Cancer Moonshot), National Institute of Allergy and Infectious Disease (Immune system 분석 사업), National Institute of Diabetes and Digestive and

Kidney Disease (Kidney 분석 사업)

- EU: H2020 funding mechanism
- 독일: German Federal Ministry of Education and Research
- 이외에 일본, 호주, 인도 정부가 연구비 출연을 준비 중이거나 관심이 있음

○ HCA에 출연한 민간 단체로는 Wellcome Trust (영국), Chan-Zuckerberg Initiative (미국), Kalvi Foundation (미국), Helmsley Charitable Trust (미국) 등이 있음

표 2. HCA 관련 국제 대표 사업 및 사업비 규모

국가	기관	연구비	비고
미국/ 영국	Broad Institute, Wellcome Trust Sanger Institute	\$220M (2천4백억 원)	HCA 초기 사업 집행 투자 비용(인간 발생단계별 세포 지도, 면역세포 지도 등의 사업에 투입)
미국	National Institute of Health	\$200M (2천2백억 원; 2015-2018년 현재)	지난 3년 동안 단일세포 분석 분야에 지원한 연구비
미국	NIH-Brain Initiative	\$65.6M (약 7백억원; 2017-2021년)	마우스 뇌세포 지도 작성 사업(단위과제 규모; 연간 55억 - 총 5년의 사업기간)
미국	NIH-Kidney Precision Medicine Project	\$33.75M (약 380억원; 2017-2021)	총 11개 단위 과제 중 4-5개가 단일세포 기반 신장 세포 지도 작성 연구
미국	Chan Zuckerberg Initiative	\$600M(약 6천6백억원; 2017-2022)	2018년 38개의 시범사업 선정
영국	Cancer Research UK	\$25M(약 270억원; 2017-2022)	유방암 세포지도 기반 virtual reality map 작성
영국	Cancer Research UK	\$20M(약 220억원; 2017-2022)	대사체/단백체 기반 암세포 지도 제작

- HCA는 장비와 재료의 제공을 통한 산업계 참여의 기회를 제공하여 해당 산업에서 관련 기술 및 소프트웨어의 개발 기회를 확보할 수 있도록 유도함
- HCA 생산 데이터가 신약 개발을 위한 자료를 제공할 수 있다는 점을 부각하여 제약 회사들의 컨소시엄을 통해 연구비를 확보하기 위한 방안 구상 중
- HCA는 과제 연구비를 출연하는 개인과 기관이 참여하여 연구비 수혜자에 대한 정보에 접근할 수 있는 Funder's Forum을 구성하고 모든 출연 개인 및 기관의 참여를 독려함. 또한 HCA 사업의 확장과 함께 더 많은 출연 기관의 참여를 유도할 예정임

2.2. 국외 주요 연구 및 기술 개발 동향

2.2.1. 세포지도 작성을 위한 단일세포 분석 방법

○ 단일세포 분석을 위한 다양한 오믹스 분석 기술 개요

- 세포 종류를 결정하기 위해 전사체, DNA와 후성유전체, 단백질 정보를 독립적으로 혹은 연계하여 사용하는 것이 가능함(그림 7)
- 전사체의 경우 현 기술 수준에서 비용과 데이터 생산량 측면 모두 가장 높은 효율로 정보를 얻을 수 있음. 또한 전사체 데이터로부터 활성화된 유전자와 pathway 분석을 통해 세포의 종류와 기능에 대한 정보를 얻을 수 있으므로 인간세포지도 작성을 위한 주요 플랫폼으로 활용될 것임
- DNA 체세포 변이 정보를 활용하여 세포 계보를 추적하거나, 염기서열 변이 이외의 메틸화 정보 및 3차 구조, 염색질 접근성 데이터와 같은 후성유전체 정보를 활용하여 세포 종류를 분석하는 것도 가능함. DNA 염기서열 및 후성유전체 정보를 이용하면 전사체보다 안정적인 계보 추적이 가능하므로 가용성이 큰 전사체 데이터를 보완할 수 있음
- 다만, DNA 염기서열 정보의 경우 많은 수의 세포를 분석하기에 기술적 한계가 있으며, 세포 종류를 구분할 수 없으므로, 후성유전체가 세포지도 작성을 위한 2차 데이터로서의 활용도가 더 높음
- 단백질의 경우 여러 오믹스 데이터 중 세포의 기능을 가장 잘 대변하며, 전사체로 구분할 수 없는 단백질 인산화 등에 의한 신호전달 네트워크 분석이 가능하므로 세포의 상태를 정의하는 중요한 정보로 활용될 것임. 최근 단백질과 전사체 정보를 연계하여 분석할 수 있는 기술이 개발되어 단백질 정보 사용을 촉진할 것으로 예측됨



그림 7. 인간세포지도 작성을 위해 필요한 데이터 종류

○ 단일세포 전사체 분석

- 단일세포 용해물로부터 유전자 발현 분석을 가능하게 했던 미량의 mRNA 증폭 기술들을 바탕으로 flow cytometry 기반의 세포 분류와 microfluidics 기반의 세포 배

분 기술 등과 같은 단일세포 취급 기술의 빠른 발전을 통해 최대 수백 개의 세포에 대한 전장 전사체(whole transcriptome) 연구가 가능해짐

- 이후 프라이머가 코팅된 마이크로 입자를 이용한 DNA 기반 세포 바코딩의 기술이 액적 미세유체기술 및 나노웰 어레이 기술에 접목되면서 단일세포 분석의 수준을 수십만 개 세포 수준으로 끌어 올림
- 2009년 Cambridge 대학의 Lao와 Surani 그룹이 단일세포 디지털 유전자 발현분석 프로토콜을 이용하여 쥐의 blastomere에 대해 처음으로 단일세포에서 전장 전사체 분석 결과를 발표함. scRNA-seq 기술은 높은 분해능으로 유전체 스케일의 분석이 가능하기 때문에 많은 주목을 받음
- 2014년 이스라엘의 Weizmann Institute의 Tanay 그룹과 Amit 그룹은 수천 개의 단일세포 내에서 in vivo 전사 상태를 분석하기 위한 자동화된 대량 병렬 단일세포 RNA 시퀀싱(massively parallel single-cell RNA-sequencing) 방법인 MARS-Seq 접근법을 제시함
- 2015년 하버드 대학교의 McCarroll과 Macosko는 개별 세포의 RNA에 대한 바코드를 포함하는 나노 리터 체적의 액적에 개별 세포를 분리 수용함으로써 수천 개의 개별 세포에 대한 빠른 분석이 가능한 Drop-Seq 방법을 제시하고 Drop-Seq를 이용하여 전사의 세포 유래 정보를 유지한 채 44,808 개의 쥐 망막 세포 분석을 수행하여 39개의 전사적으로 구분지어지는 세포 개체군을 정의함으로써 알려진 망막 세포 부류와 새로운 후보 세포 아형에 대해 유전자 발현 분자 지도를 제시함
- 2015년 Cellular Research Inc.은 CytoSeq 프로토콜을 이용하여 수천 개의 혈액세포에 대해 성공적으로 세포 이질성을 확인함. 세포별 바코드와 분자 바코드를 동시에 이용하여 단일세포 내에서 mRNA를 각각 표지하고 증폭 및 분석하는 한편 개별 세포들의 유전자 발현은 바코드를 이용하여 재구성함으로써 추가적인 분석에서 단일세포 기술을 생략하여 기술적으로 단순한 접근방법을 제시함. 이 기술은 Illumina사에 의해 CytoSeq로 상용화됨
- 2017년 MIT Shalek 그룹은 대량 병렬 단일세포 RNA 시퀀싱을 위한 Seq-Well이라는 이동 가능한 저비용 플랫폼을 제시함. Seq-Well은 반투막을 이용한 서브나노 리터 웰 어레이를 이용하여 효과적인 세포 lysis와 포집이 가능함. 이들은 Seq-Well을 이용하여 결핵균에 노출된 수천 개의 일차 인간 대식세포에 대한 전사체 분석을 수행함
- 전사체 데이터는 RNA 시퀀싱 분석을 활용함. 수천~수만 개의 세포 분석이 가능한 RNA 시퀀싱 플랫폼으로는 oil droplet에 세포를 가두는 Droplet 방식과 미세우물(microwell)에 세포를 넣는 방식이 있음. 두 경우 모두 단일세포가 격리된 상태에서 역전사(reverse transcription) 반응이 일어나며 이때 합성되는 cDNA에 세포마다 서로 다른 DNA 시퀀스를 추가하여 세포 바코드를 부착함. 현재 상용화된 역전사 방법은 Clontech (현재 다카라)이 개발한 SMART-seq임
- 단일세포 유전체 시퀀싱은 증폭과정을 동반하게 되므로 균일하지 못한 증폭을 최소화하기 위해 수만 종류의 Unique molecular identifier (UMI)를 전사체에 부착시켜

유전자 발현을 UMI count로 측정하는 방법을 사용함. UMI 사용을 원활히 하고 시퀀싱 용량을 줄이기 위해서 full length 대신 유전자의 3'부분만 시퀀싱하는 방법이 사용됨

- 이와 같은 high-throughput RNA 시퀀싱 방식은 아주 많은 수의 세포를 시퀀싱하고 종류를 구분하는데 효과적인 반면, 세포별 전사체의 다양한 측면을 깊이 있게 분석하기엔 제한이 따름. Medium 혹은 low throughput의 full length RNA 시퀀싱을 통해 좀 더 깊이 있는 전사체 분석이 가능할 것임(그림 8, 9)
- 단백질체와 전사체 연계 분석의 경우 DNA 시퀀스 tag가 부착된 항체를 사용하여 전사체와 DNA tag를 함께 분석하는 방법으로 전사체만으로 세포 종류 구분이 어려운 경우를 보완할 수 있음. 일례로 전사체 수준에서 구분이 어려운 human CD4와 CD8 T 림프구를 항체 사용을 통해 구분해낼 수 있음



그림 8. Droplet 기반의 single cell RNA-seq. A. Oil drop 안에 바코드된 cDNA 합성. B. 바코드된 cDNA. C. UMI (Unique molecular identifier)



그림 9. Droplet 기반의 scRNA-Seq과 scTHS-seq 데이터 생산 (PMID29227469)

- Frozen tissue로부터 핵을 분리하여 전사체와 chromatin accessibility를 분석함 두 데이터를 연계하여 유전자 발현 수준과 조절 패턴을 사용하여 세포 타입을 분석
- DNA 시퀀스 바코드가 장착된 항체를 사용하여 세포 표지 후 scRNA-Seq 수행하고 Cell-Gene UMI 정보와 Cell-Ab barcode (protein) 정보를 분석함(그림 10)

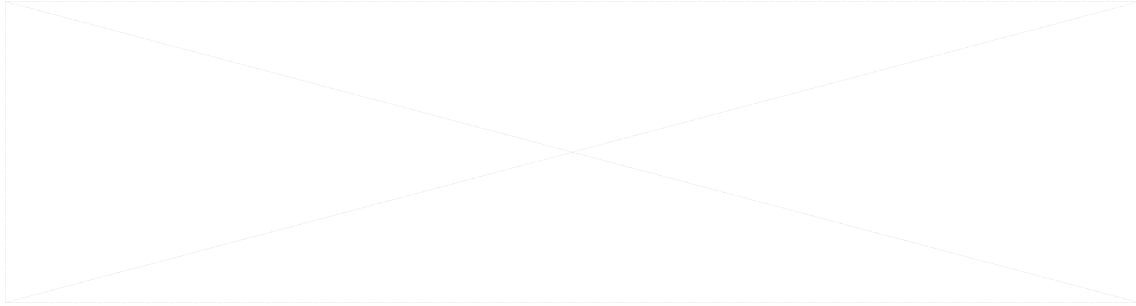


그림 10. REAP-seq을 이용한 단백질체와 전사체 동시 분석 (PMID28854175)

- 세포지도 작성 시 활용될 플랫폼을 살펴보면, 현 기술수준에서는 suspension 상태의 세포를 Droplet 방식으로 RNA 시퀀싱하는 것이 가장 효율적일 것으로 여겨짐. 다만 위에 언급한 다양한 2차 플랫폼이 많은 숫자의 세포로부터 효과적으로 데이터를 얻을 수 있도록 개선될 것을 고려하면 RNA 시퀀싱 데이터의 보완은 물론 대체 플랫폼으로 사용될 수도 있음(그림 11)



그림 11. FISSEQ을 사용한 non-targeted 방식의 다중 공간 분석 (PMID23852452). mRNA로부터 cDNA 합성후 padlock probe를 결합시킴. GAP filling과 ligation으로 생성된 DNA circle을 증폭하고 “Sequencing by ligation” 수행

○ 단일세포 후성유전체 분석

- 단일세포 후성유전체 분석기술: 후성유전체학은 크로마틴구조를 이루고 있는 DNA와 히스톤 단백질의 변형 및 구조적 변화를 규명함으로써 세포의 정체성(identity)과 조직 특이적 기능을 유지하는 원리를 연구하는 분야임
- 최근의 후성유전체 분석기술은 특정 세포집단의 평균적인 후성유전체적 특성을 알아

내는데 그치지 않고, 이질적(heterogeneous) 조직 내의 다양한 세포를 단일세포 수준에서 분석하는 기술 개발에 관심이 모아지고 있음. 단일세포 수준에서 DNA 메틸화(scDNAm-seq), 크로마틴 접근성(scATAC-seq), 히스톤 변형(scChIP-seq), 크로모좀 3차원 구조분석기술(scHi-C)이 빠른 속도로 개발되고 있으며, 줄기세포 및 암조직 등에서 세포의 가변성과 다양성을 연구하는 강력한 도구로 주목되고 있음

- 후성유전체 데이터 중 high-throughput 세포 분석이 가능한 경우는 tagmentation을 이용하는 chromatin accessibility 측정 방법으로 Assay for Transposase accessible chromatin (ATAC-Seq) 이나 이를 개선시킨 transposome hypersensitive site sequencing (THS-Seq)이 해당됨
- Methylation 정도를 측정하는 다양한 방법의 경우 단일세포 적용된 사례가 존재하지만 대용량 데이터 생산이 어려운 실정임

단일세포 메틸화 분석(single cell DNAm-seq)

- Bisulfite sequencing을 이용한 DNA 메틸화 분석기술은 단일염기수준에서 DNA 메틸화 프로파일링이 가능하며, NGS 기술이 발달함에 따라, 전체 게놈의 DNA 메틸화 분석이 가능해짐
- DNA 메틸화는 in vitro, in vivo 모두에서 매우 안정적인 상태로 존재하기 때문에, 단일세포로 분리 및 실험이 비교적 용이하다고 할 수 있음. 그러나 수천 개의 세포를 high-depth로 시퀀싱하는 것은 여전히 비용부담이 매우 크다는 문제점이 있음
- 인헨서나 프로모터부위만 선택적으로 증폭 가능한 기술이 동반된다면, 보다 낮은 depth에서도 분석이 가능할 것으로 보임. 또한 3세대 시퀀싱 기술의 발달로 bisulfite modification이나 증폭을 거치지 않고도 직접적으로 DNA 메틸화 시퀀싱이 가능해진다면 단일세포 DNA 메틸화 분석은 보다 용이할 것으로 보임.
- 현재까지 개발된 단일세포 DNA 메틸화 분석 기술로는 1) RRBS (reduced-representation bisulfite sequencing) 방법을 단일세포 수준으로 응용하여 한 튜브 내에서 모든 반응을 끝냄으로써 DNA 손실을 최소화한 기술(Guo, H. et al Genome Res, 2013); 2) PBAT (post-bisulfite adaptor tagging) 방법으로 세포 당 2천만 read로 시퀀싱하여, 약 4백만 CpG 사이트를 분석하는 기술 (Miura, F. et al, Nucleic Acids Res, 2012); 3) post-bisulfite 라이브러리 제작 기술로, 보다 낮은 시퀀싱 depth(세포 당 2백만 read)로 보다 낮은 coverage (마우스 게놈의 8~48.4% CpG)로 분석한 레가 있음(Smallwood, S. A. et al, Nat. Methods, 2014; 그림 12)

단일세포 ChIP-seq

- 크로마틴 면역 침강(chromatin immuno precipitation) 시퀀싱은 히스톤 변형, 전사 조절인자 등 단백질과 DNA 간의 상호 작용을 전체 게놈 수준에서 분석하는 기술임. ChIP-seq 역시 특정 세포 집단의 평균적인 상태만을 나타낼 수 있음으로 조직 내의 세포 간 이질성을 정확히 알 수 없는 한계가 있음



그림 12. 단일세포 DNA 메틸화 분석. RRBS, reduced-representation bisulfite sequencing; PBAT, post-bisulfite adaptor tagging (Schwartman & Tanay, Nature Reviews Cancer, 2015)

- 미국 하버드대학의 Bradley Bernstein 팀은 microfluidics, DNA 바코딩, NGS 기술을 결합하여, 단일세포의 히스톤 변형(H3K4me3, H3K4me2)을 분석하는데 성공하였음(Rotem, A. et al, Nat Biotechnology, 2015). ChIP의 가장 큰 문제점인 off-target 사이트의 비특이적인 항체 결합을 막기 위하여, 면역침강이전에 단일세포의 크로마틴에 인덱스를 붙인 후, 한꺼번에 모아서 IP를 수행하였음. 배아줄기세포를 각 세포 당 1000 unique reads를 생산하여 분석한 결과 pluripotency 상태와 differentiation priming 상태의 크로마틴 시그니처를 가지는 세포들의 subpopulation 스펙트럼을 관찰할 수 있었음(그림 13)

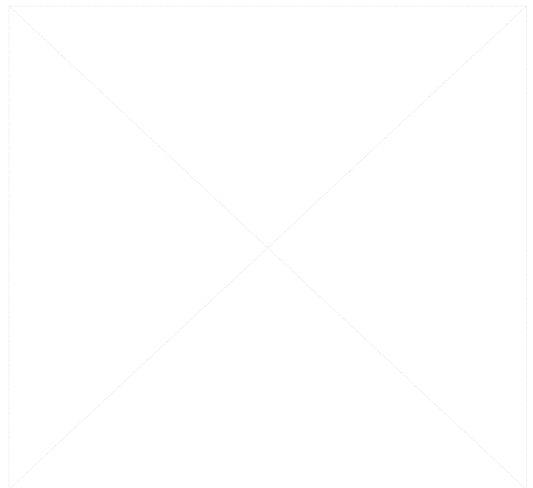


그림 13. 단일세포 ChIP-seq 기술. (Rotem, A. et al, Nat Biotechnology, 2015)

단일세포 ATAC-seq

- ATAC-seq(assay for transposase-accessible chromatin using sequencing)은 크로마틴 접근성(accessibility)을 분석하는 기술로 원핵생물의 Tn5 transposase를 이

용하여 게놈 상의 접근성이 높은 지역을 잘라서 시퀀싱 어댑터를 붙이는 원리를 이용함. 미국 스텐포드대학의 William Greenleaf 팀은 마이크로플루이딕스 플랫폼을 이용한 단일세포 ATAC-seq 기술을 개발하였음(Buenrostro, et al, Nature, 2015; 그림 14)



그림 14. 단일세포 ATAC-seq(Buenrostro, et al, Nature, 2015)

단일세포 Hi-C

- 3C(Chromosome Conformation Capture) 기술에 기반 한 Hi-C 기술의 개발로 세포 핵 내의 크로마틴 삼차구조와 Topologically associated domain(TAD)라는 크로마틴 세부단위의 물리적 상호작용 연구가 활발히 진행되고 있음. 하지만, Hi-C 실험은 수백만 개의 핵이 input으로 필요하며, 따라서 세포집단의 평균값이라는 한계가 있음.
- 2013년 단일세포 Hi-C 분석이 마우스 세포에서 처음 시도되었으나 물리적으로 분리된 세포 개개의 반응에 의존하는 낮은 throughput의 실험이었음(Nagano, T. et al, Nature, 2013).
- 2017년 미국 워싱턴대학의 Jay Shendure팀은 바코드 인덱스 조합에 의한 10,696개 단일세포 Hi-C 데이터를 생산하는데 성공하였음(Ramani, V., et al, Nat Protocol, 2017). 이 기술은 천만 개의 세포를 한꺼번에 포름알데하이드로 고정하고 핵을 노출시켜서 DpnII 제한효소로 자른 후, 96-well에 핵을 분주하고 바이오틴 레이블된 바코드 DNA브리지를 넣어서 ligation하였음. 바코드가 들어간 핵들을 다시 모아서 pooling한 후, 2차 96-well에 핵을 분주하고 새로운 바코드가 있는 Y-어댑터를 ligation하는 방법으로 96X96 조합의 단일세포 Hi-C 데이터를 생산하였음. 단일세

포 Hi-C 데이터로 핵형(karyotype)과 세포주기에 따라 세포를 분류할 수 있었으며, 세포와 세포사이에 크로마틴 3차구조에 차이가 있음을 밝혔음(그림 15)



그림 15. 단일세포 Hi-C 기술 (Ramani V, et al, 2017, Nat Methods)

○ 단일세포 이미징 및 위치 분석 기술(spatial transcriptomics)

- 위의 방법들은 모두 부유 상태로 떨어진 세포를 사용하는 방법이며, 살아있는 상태의 세포 및 동결조직으로부터 분리한 핵으로부터 DNA나 RNA를 획득함. 부유 상태의 시료를 사용할 경우 세포의 위치 정보를 잃어버리는 단점이 있음. 기관이나 조직에서 정상세포의 기능은 위치와 서로 떼어낼 수 없는 상관관계를 가지므로 세포의 위치 정보를 유지한 상태에서 오믹스 데이터를 얻게 되면 더욱 정확한 세포 종류 구분이 가능함
- 고도로 다중화 된 공간 분석이 가능한 RNA 측정법으로는 시퀀싱 혹은 형광 기반 측정인, 단백질은 항체 기반으로 형광 혹은 질량분석(mass cytometry)을 이용할 수 있음. 알려진 분자들을 표적으로 하는 경우 현재의 기술 수준에서 슬라이드 조직으로부터 단백질은 50 ~ 70 종, RNA 는 수백 ~ 수천 개 multiplexing이 가능함

이미징 기반 단일세포 단백질 분석

- 질량분석 기반 기술을 사용하여 항체로 단백질을 측정하는 경우 금속 동위원소에 결합된 항체의 카테일을 사용하는데, 이 방법은 병리에서 사용하는 포르말린 고정 파라핀 조직(FFPE)의 자가 형광의 간섭을 피할 수 있다는 장점이 있음.
- 또한 금속 동위 원소를 사용하므로 형광 분석 방법과 비교하면 생체에서 오는 잡음 대비 신호가 훨씬 좋다는 것이 장점임.
- 그러나 sample throughput이 작아 1 mm² 영역을 이미징 하는 데에만 여덟 시간이 걸린다는 단점이 있고, 사용되고 있는 장비들의 가격이 매우 높아서, 대학 등 연구기

관에서도 조차 구입하기 어렵다는 문제가 있음.

- Imaging Mass Cytometry (IMC)는 고 에너지, 고 해상도 자외선 레이저를 이용하여 조직의 영역 일부를 체계적으로 절제하여 얻어진 조직 입자를 태워 플라즈마 비행-시간형 질량분석기(plasma time-of-flight mass spectrometer=mass cytometer=CyTOF)로 분석함. 이 기술은 현재 형광표지와 유사한 500-1000nm 해상도에서 52개 항체 측정이 가능. 3차 구조 재현을 위해서는 조직의 두께를 조절하여 Z축 정보를 얻으며 저장되는 데이터는 이미지와 단백질 정보가 됨(그림 16)



그림 16. CyTOF를 이용한 다중 공간 분석 (PMID24584193)

- 또 다른 방법인 multi-parameter ion beam imaging (MIBI)은 이차이온 질량분광 분석(Secondary ion mass spectrometry, SIMS)를 이용하여 거의 단일 항체 감수성을 이끌어 냄. 이 기술은 이온 빔폭이 50nm에서 4,000 nm 범위에서 조직을 1 nm에서 250 nm의 Z 심도로 절제할 수 있음.
- MIBI는 동위 원소 표지 된 항체를 태그로 사용하고 있지만, 가벼운 원소를 이용하여 탄소, 질소, 산소 등을 조직 내에서 측정할 수 있으므로 대사 표지에도 사용할 수 있음. 측정 시간은 현재 기술 수준에서 약 1,000 nm의 빔 폭으로 (약 500 nm의 해상도) 1 mm²의 조직에 대해 1분이 걸림. 낮은 해상도 (2,000 nm)에서 신속한 검사 (15초)을 한 후 고해상도 (200 nm~500 nm)에서 다시 이미지화하는 방식으로 데이터를 얻는 것이 효율적일 것으로 여겨짐(그림 17)
- 2017년 스위스 ETH의 Bodenmiller 그룹에서는, 질량분석 이미징 기반으로 단백질체와 mRNA를 동시에 분석하는 방법을 발표하였음. 이 기법은 IMC를 이용하여 기존의 항체를 이용한 단백질체 분석 방법에, fluorescence in situ hybridization (FISH) 기법을 접목시킨 것으로 fluorescence를 내는 형광체 대신 질량 분석이 가능한 metal conjugated DNA를 이용하였음.



그림 17. 질량분석 IMC를 이용한 RNA와 단백질 분석을 동시에 하는 방법 개요 (Schultz et al, 2017 Cell Systems)

- 2017년 유럽의 DcDonnell 그룹에서는 초고감도 MALDI 이미징과 질량분석계를 이용하여 동물 뇌암모델에서 단백질과 대사체를 동시에 검출하였음 (MALDI-FTICR MSI). MALDI 이미징은 비표지 방법으로 단백질을 검출할 수 있다는 장점이 있음 (Dilillo et al, 2017 Scientific Report; 그림 18).



그림 18. MALDI-FTICR MSI를 이용한 대사체 이미징의 예 (Dilillo et al 2017 Scientific Report)

- 단백질을 분석하는 또 다른 방법으로 cyclic immunofluorescence 방법이 있음. 특정 단백질에 결합하는 항체의 형광을 이용하여 검출하고 형광을 소광시킨 후 다시

다른 단백질에 결합하는 항체의 형광을 검출하는 방법으로, 동시에 M개의 형광이 검출 가능하고 N번 반복한다면 $M \times N$ 개의 단백체를 검출할 수 있음.

- 기존의 형광 이미징 장비를 사용하므로 범용성이 높으며, 형광 이미징에 걸리는 시간은 상대적으로 작고, 넓은 범위의 조직에 적용 가능하여 질량분석 기반에 비해 high throughput이 가능하다는 장점이 있음. 또한 RNA 분석과 병용하여 단백질과 유전체를 동시에 다중분석이 가능함.
- 그러나 특정 단백질당 형광 검출 후 소광 시켜야 하는 과정에서, 소광이 제대로 이뤄지지 않는다면 신호대 잡음비가 낮아질 수 있다는 문제점이 존재함.
- 따라서 특정 단백질 검출후 형광을 소광시키는 방법들이 다양하게 시도되어지고 있음(그림 19).

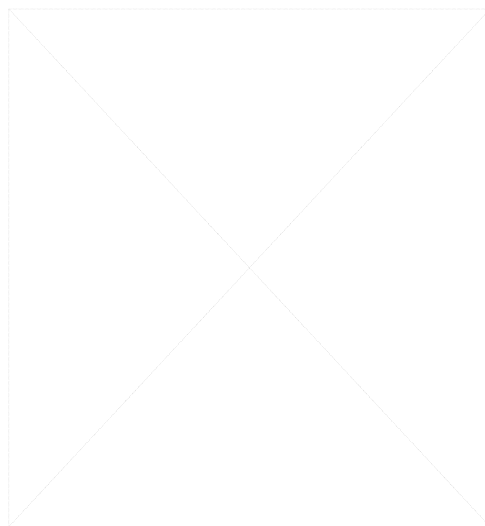


그림 19. Cyclic Immunofluorescence을 이용한 단백질 검출법의 다양한 소광방법 (Lim 2017 Assay Drug Dev Tech)

- Cyclic immunofluorescence의 다른 한 방법으로 연속 형광 이미징 접근법을 사용하여 단백질의 멀티 플렉스 분석을 할 수도 있는데 Nolan 그룹에서는 CODEX (CO Detection of Expression) 방법이라 명명하였음. 형광현미경을 사용하여 50 ~ 100 개의 세포 이미징을 저렴하고 쉽게 수행할 수 있음. CODEX는 항체 칩테일로 조직을 염색하며 항체에는 DNA 태그가 붙어 있고 검출후 DNA에 붙어 있는 형광물질을 TCEP 에 의한 disulfide cleavage를 이용해 제거하는 방법임. 형광표지를 사용하여 한번에 2-5개까지의 단백질 측정을 반복하게 됨. 400nm 해상도로 인간 면역 기관의 초기지도를 작성하기 위해 이미 사용된 바 있음.

질량 분석 기반 단일세포 단백질 분석

- 최근에는 (i) 질량 분석에 사용되는 단백질의 손실을 최소화하고 (ii) tandem mass tags (TMT) 방법의 개선하여 단일세포로부터 천개 이상의 단백질을 정량하는 새로

운 방법(SCoPE-MS; Single Cell ProtEomics by Mass Spectrometry)을 개발함 (Budnik et al 2017 Bioaxiv; 그림 20)



그림 20 SCoPE-MS; Single Cell ProtEomics by Mass Spectrometry

- 향후 multiplexing 증가 등을 통해 동시 분석 가능한 단백질의 수를 계속 증가시키면 단일세포 단백질 분석도 단일세포 전사체나 후성유전체 분석처럼 보편적으로 사용될 수 있을 것으로 기대됨

이미징 기반 단일세포 전사체 분석

- 단분자 분광학을 이용한 세포 연구가 활발히 진행되기 시작하면서 1998년 Singer 그룹에서 Single-Molecule Fluorescence In-Situ Hybridization (smFISH) 연구를 발표하였고, 이후, 2006년 Bezig 그룹의 Photo Activated Localization Microscopy (PALM), Zhuang 그룹의 STochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM) 등 초해상도 현미경 (super-resolution imaging) 기술의 개발로 인해 smFISH의 세포내 해상도가 좋아지면서, 단순한 mRNA의 검출이 아닌, 정량적 분석 및 염기 서열 분석 까지도 가능하게 되는 기술적 발전이 있었음(그림 20).



그림 21. 단일세포 이미징 기반 전사체 분석 방법의 개요, (2018 HCA White Paper)

- 분석 대상을 설정하지 않고 다중 공간데이터를 얻을 수 있는 방법으로는 in situ sequencing과 spatial barcoding 방법이 있음.

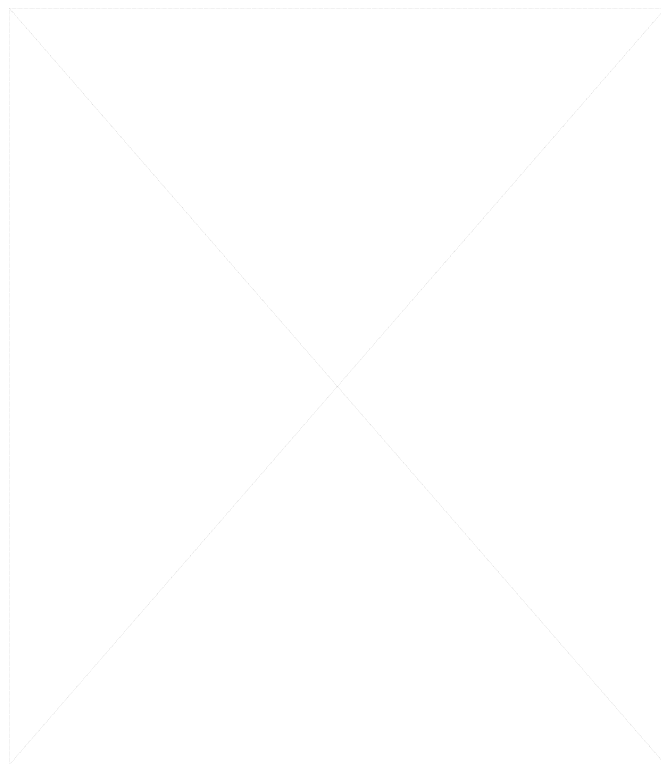


그림 22. FISSEQ을 위한 library 구성 방법
(Lee et al 2014 Science)

- 2014년 Church 그룹에서는 **Fluorescence In Situ RNA SEQuencing (FISSEQ)** 이라

는 이름으로 세포 내에 분석하고자 하는 RNA에 해당하는 cDNA amplicon을 rolling circle amplification (RCA)로 만들고, 이를 SoLiD 라는 ligation 기반 염기서열 분석 방법으로 분석 가능함을 보였음(Lee et al 2014 Science). 현 기술 수준은 multiplexed FISH 방법보다는 효율이 낮으며 낮은 농도의 mRNA는 측정할 수 없으나, 타겟 설정 없이 분석이 가능하다는 장점이 있음(그림 21).

- Spatial barcoding 방법 중 하나인 **Spatial Transcriptomics (ST)** 는 조직을 oligonucleotide array가 심어진 유리 슬라이드에 배치하여 공간바코드를 부착한 후 형광 표지된 염기를 이용하여 cDNA를 만듦으로써 특정 유전자의 이미징 가능함을 보였고, 수백개의 유전자 분석이 가능함을 보임(Stahl et al 2016 Science; 그림 22).

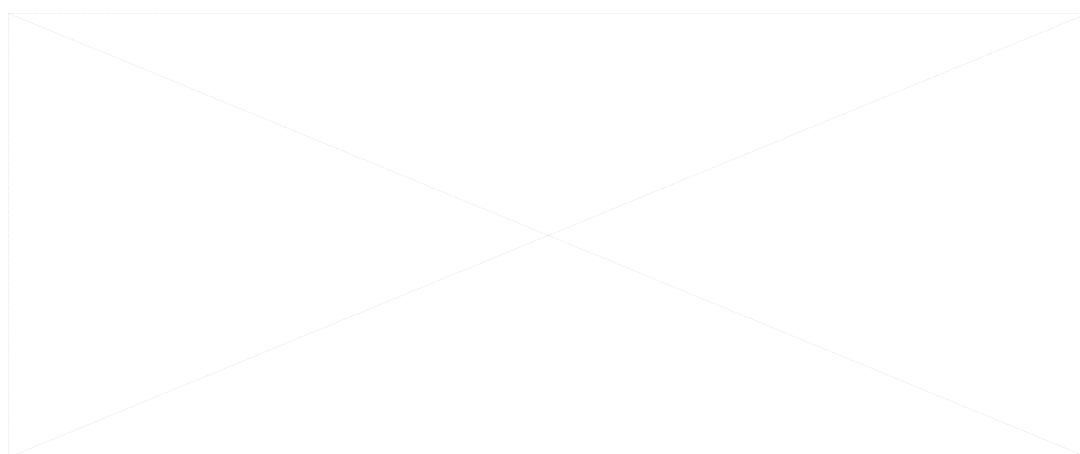


그림 23. **Spatial Transcriptomics** 방법을 사용한 바코딩과 데이터 분석
(Stahl et al 2016 Science)

- 형광 기반의 측정법으로는 RNA에 대한 멀티 플렉스 **Fluorescence In Situ Hybridization (FISH)** 이 있음. RNA 이미징 기법에서 single molecular FISH (smFISH)는 개별 세포에서 RNA 분자의 매수와 위치를 볼 수 있는 표준화된 방법. 다양한 방법이 개발되어 있으며 10~1,000 개 RNA 종의 이미징을 할 수 있음.
- 2012년 Cai 그룹에서 형광 색깔 혹은 형광의 위치를 기반으로 한 바코드 mRNA를 이용하여 32개 유전자의 mRNA 발현을 동시에 조사하는 논문을 Nat. Methods에 발표함(Lubeck et al 2012 Nat Methods). 이후 이러한 방법으로 염기서열 분석까지 가능함을 2014년 Nat. Methods에 발표하고 **Sequential In Situ Hybridization (SeqFISH)** 라 명함(Lubeck et al 2014 Nat Methods). 이 방법들은 조직투명화 기술이나 조직팽창 기술과 접목하면 RNA 검출의 정확도와 해상도를 개선시킬 수 있음(그림 23).



그림 24. SeqFISH 방법의 개요 및 이미징 결과 (Lubeck et al 2014 Nature Methods)

- 2015년 Zhuang 그룹에서는 **Multiplexed Error Robust FISH (MERFISH)** 방법을 이용한 RNA sequencing 기술을 발표함. 이 기술은 특정 바코드가 특정 RNA에 붙는지 안 붙는지를 공간적으로 2진법으로 구분(0 혹은 1) 하는데, 바코드의 종류와 염기서열의 길이에 따라 140개의 유전자까지 분석이 가능함(그림 24).



그림 25. MERFISH를 이용한 다중 공간 분석 (Moffitt et al 2016 PNAS)

- 같은 해, Eberwine 그룹에서는 **Transcriptome In Vivo Analysis (TIVA)** 라는 기술을 개발하였는데, 조직 절편에서 특정 세포만을 빛에 의해 선택적으로 활성화하여 선택적으로 mRNA를 얻어 분석하는 방법을 보임 (Lovatt et al 2014 Nat Methods).

표 3. 현존하는 단일세포 이미징 기반 전사체 분석 기술의 장, 단점 및 한계점

방법		특징
FISSE Q	개요	RCA를 이용한 cDNA 생성 및 SoLiD sequencing by ligation
	장점	- 기능적으로 중요한 전사인자들을 10배 이상 enrich 가능, 재현성 좋음. - 상용화된 컨포칼 장비 사용, 기술적 제약이 많지 않음.
	단점	- 노이즈 제거와 시그널 검출의 민감성을 위해 컨포칼 현미경 사용, 이미징 속도가 느림, 약 2-3주간 이미징 시간 필요함. - rRNA (ribosomal RNA)가 제거되지 않고 존재, 약 80% 이상의 read를 차지함.
	기술의 한계 및 극복 방법	- 이미징 시간을 단축하기 위한 sequencing 기술 혹은 새로운 이미징 기법 필요. 예를 들면 signal/background ratio (S/N ratio)를 높이기 위한 light sheet을 이용한 excitation 등 - rRNA를 선택적으로 제거할 수 있는 기술 개발
Spatial Transcriptomics	개요	조직 절편을 바코드가 표지된 RT primer의 array 위에 놓고 형광 표지된 염기를 이용하여 cDNA를 만. 이를 이용하여 염기서열을 분석함.
	장점	- 세포의 공간적 정보를 유지하면서 단일세포 이미징 기반의 복잡한 이미징 장비 혹은 분석 기술이 필요하지 않음. - 조직 절편의 형태를 그대로 유지하면서 가장 많은 수의 유전자 분석이 가능
	단점	세포수준의 높은 해상도/분해능이 필요한 경우 적절하지 않을 수도 있음.
	기술의 한계 및 극복 방법	분해능을 높이기 위한 조직 팽창 기술의 접목 필요성
SeqFISH H	개요	초해상도 현미경을 이용, 공간적 혹은 파장별 증가된 해상도로 mRNA 바코드의 확인
	장점	파장 선택에 따른 증가된 해상도에 따라 많은 종류의 유전자 동시 분석 가능
	단점	- 초해상도 현미경 사용, 장비의 제약 - 이미징 후 DNase를 이용한 형광 바코드 제거 과정에 따른 노이즈 증가 - 이미징을 위한 바코드 제작이 중요
	기술의 한계 및 극복 방법	- 초해상도 현미경과 같은 복잡한 장비가 아니면서 분해능을 높일 수 있는 방법: 예를 들면 조직 팽창에 의한 분해능 증가 - 형광 바코드 제거 방법 개선: MERFISH 같이 chemical 방법을 이용하면 좀 더 간편하고 빠른 이미징 가능
MERFISH	개요	특정 readout 바코드와 이와 결합 가능한 여러 개의 encoding 바코드를 시간에 따라 순차적으로 넣어주면서 결합/비결합 여부를 공간적으로 2진법으로 구분하고 이를 분석함.
	장점	multiplex 방법과 disulfide 결합을 이용한 형광 바코드 제거에 따라 짧은 시간에 많은 수의 세포를 분석할 수 있게 됨.

		• 단일세포 염기분석 방법과 거의 유사한 수준.
	단점	• 정교한 바코드 제작 및 많은 수의 세포에서 나온 데이터를 빠른 시간에 처리하기 위한 새로운 이미지 분석 방법 필요
	기술의 한계 및 극복 방법	• 현재 존재하는 이미징 기반 염기서열 분석법 중 가장 많은 수의 세포를 빠른 시간에 분석 가능하나, 바코드 설정에 따른 특정 염기서열 분석만이 가능하다는 제약
TIVA	개요	• 조직 절편에서 특정 세포만을 선택적으로 수거, 기존의 단일세포 sequencing 방법 사용함.
	장점	• 세포의 공간적 정보를 유지하면서 단일세포 이미징 기반의 복잡한 이미징 장비 혹은 분석 기술이 필요하지 않음 • <i>In vivo</i> 분석이 가능함.
	단점	• TIVA tag를 이용해야 함. 합성이 용이하지 않고 안정성(stability)이 떨어짐. • CPP (cell penetrating peptide)를 이용하므로 세포 종류에 따라 막 투과성이 달라짐. multiplex, • 3D in vivo 조직에서 민감성을 위한 TIVA tag의 개선 필요
	기술의 한계 및 극복 방법	• TIVA tag의 개선 혹은 빛을 이용한 특정 세포 선택적 용해 기술 개발 필요. 이미징 기반의 유전체 분석이 아니므로 기존 단일세포 염기서열 방법의 한계가 그대로 적용

이미징 기반 단일세포 오믹스 기술 및 사업화 현황 분석 및 연구 필요성



그림 26. 이미징 기반 단일세포 오믹스 기술 및 사업화 현황

- 위에서 정리한 바와 같이 연구자 수준에서 형광 검출 및 질량 분석 기반으로 단일세포 이미징 및 단백질 기술이 다수 개발되고 있음. 하지만, 대부분 초기 단계이고 고가의 상용화된 장비를 필요로 하는 경우가 많아 국내 연구자들이 쉽게 활용하기 어려운 점이 많음. 또한 새로운 분석 도구 개발 및 기술의 안정화가 필요함
- 또한 개별 연구자 수행 범위를 넘어서는 연구로서 (i) 세포 및 조직 확보 (ii) 프로브 개발 및 이미징 장비 구축, (iii) 데이터 분석 도구 등 다양한 분야의 융합이 필요함
- 한편으로 본 기술은 다양한 생물학 연구 분야에 범용적으로 활용될 수 있는 분야로써 단일세포 질환 오믹스 연구 뿐 아니라 뇌 연구를 비롯한 다양한 연구 사업에 공통적으로 활용될 수 있음

2.2.2 단일세포 분석 기반 임상 연구 동향

○ 임상 연구 일반 동향

- 인간세포지도 작성은 정상 시료를 필요로 함. HCA는 가능한 경우 지원자를 모집하거나 (혈액, 지방, 피부, 수술이나 내시경으로 획득 가능한 조직), 장기기증자의 시료 이용 또는 사체를 이용하는 세 가지 방안을 제안하고 있음.
- 국내의 경우에도 혈액, 지방, 피부의 경우 지원자 모집이 가능하며, 다양한 수술 과정에서 생검 조직을 획득하는 것이 가능함. 지원자로부터 얻을 수 없는 경우 장기기증자와 사체로부터 손상되지 않은 시료를 얻기 위해서는 별도의 프로그램 운용이 필요함
- HCA는 인간세포지도 작성을 위해 영국의 CBTM (Cambridge Biorepository for Translational Medicine; www.CBTM.group.cam.ac.uk)과 미국의 GTEx (Genotype-Tissue Expression; <https://commonfund.nih.gov/gtex>) 두 기관으로부터 조직을 제공받고 있음
- 다양한 장기의 세포지도 작성을 위해서는 정상조직을 얻을 수 있는 경로를 확립하는 것이 필수적임. 정상 시료의 지도와 함께 다양한 질병 상태의 세포를 분석하는 것 역시 질병뿐 아니라 정상세포를 이해하는 데에도 도움을 줄 수 있음
- 실제 인간세포지도 작성은 조직·장기에 따라 구분하여 이루어지도록 프로젝트를 나누어 진행되어야함. HCA는 조직/장기 중 1차 대상으로 신경계, 면역계, 비뇨기/신장, 호흡기(폐), 간, 췌장, 소장/대장, 피부, 심혈관계를 계획하고 있으며 주로 성인을 대상으로 프로젝트를 수행하지만, 이와 더불어 소아를 대상으로 하거나 발달 단계에 따른 프로젝트 또한 추구함. 추가적으로 오가노이드 및 다른 모델 동물의 세포지도가 인간세포지도 작성에 도움을 줄 수도 있으므로 병행하여 데이터를 수집하고 있음
- 2018년도 1월까지 발표된 논문들을 살펴보면 개별 장기에 대한 데이터가 일부 생산되어 있어 추후 인간세포지도 작성에 참고할 수 있음

- 정상 인간세포 지도의 작성과 병행하여 암을 포함한 여러 질병을 대상으로 하는 질병 세포지도 연구도 활발하게 진행되고 있음
- 질병의 진행 단계에 따른 세포의 상태 변화 및 분화 다양성에 대한 정보는 정밀의료 구현을 위한 바이오마커 발굴 및 환자 맞춤형 치료 전략 수립에 핵심적인 정보를 제공해 줄 것으로 기대됨
- 관련한 대표적인 질병 세포지도 연구 사업으로는, 미국의 National Cancer Institute (NCI)에서 2018년부터 추진 중인 Human Tumor Atlas 사업이 있는데, 이 사업의 일차 대상은 전립선, 난소, 유방, 대장, 소아암으로, 전이와 항암내성을 아우르는 다양한 암의 단계에서 세포 지도를 구축하는 것을 목표로 하고 있고, 또 다른 대상인 식도, 폐, 자궁경부암의 경우 전암(pre-cancer) 단계의 조직 내 세포 지도 작성을 목표로 하고 있음
- 또한, NIH를 주축으로 하는 BRAIN initiative 사업에서는 정상인과 뇌 질환 환자의 세포지도 작성을 최종 목표로 마우스 모델의 뇌 지도를 작성하는 시범 과제를 진행 중이며, NIH의 또 다른 사업인 ‘신장 정밀의료 사업’에서는 2018년부터 다양한 신장 질환 환자 유래 신장조직의 세포 지도를 작성하는 사업을 착수함
- 정밀 의료의 구현을 위해서는 다양한 유전, 환경적 배경을 가지고 있는 환자의 정보를 확인하고 구별하는 것이 필수적이나 단일 국가 혹은 단일 연구진이 이를 아우르기에는 기술적, 자원적 한계가 있기 때문에 인간의 정상 세포지도 뿐 아니라 질병 세포지도의 경우에도 국제적이고 광범위한 협업이 필요하며, 이에 따라 HCA에서도 질병 대상의 세포지도 연구자들의 참여를 독려하고 있음

○ 신경계(Nervous System, Brain map)

- 뇌는 우리 몸에서 가장 구조적으로 복잡하며 기본적인 구조와 기능과의 상관관계가 잘 밝혀지지 않은 영역이 많음. 뇌 세포지도 작성으로 뇌의 다양한 신경세포(Neuron) 및 그 이외 세포의 특징을 밝힘으로써 뇌 연구에 큰 도움이 되는 자료를 제공하게 될 것임. 또한 이미징 분석을 통해 다양한 뇌세포들을 3차 구조상 특정 뇌의 영역으로 mapping 하는 작업을 수행하여 뇌 과학 분야의 표준화된 지도/명명법을 제시할 수 있음.
- 뇌세포지도 작성을 위해서는 전사체, 후성유전체, 단백질체 정보는 물론, 형태와 고해상도 세포구조와 같은 해부학적 정보, 전기생리적 특징과 같은 기능 정보도 필요함. 대부분 뇌 시료는 frozen 상태의 nuclear RNA-Seq의 대상이 되며 태아 시료의 경우 fresh cellular dissociate에 대한 정보를 얻을 수도 있을 것으로 여겨짐. 뇌 세포지도 작성은 기존에 생산된 영역별 뇌 지도를 참조할 수 있으며 또한 기존 지도에 mapping 하는 작업이 필요함.
- 미국의 Allen Human Reference Atlas 혹은 Big Brain Atlas가 2D/3D 의 “common coordinate framework”로 쓰일 수 있음. 현재까지 Cerebral cortex 3227개 세포, Frontal cortex/Visual cortex/ Cerebellar hemisphere 35289세포, Temporal lobe 466 세포(epilepsy), Hippocampus와 prefrontal cortex 19550세포의 single cell

RNA-seq이 논문으로 보고되었으며, 각각 microfluidic C1 장비로 nuclei, Drop-seq으로 Nuclei (snDrop-seq), C1으로 fresh cells, Drop-seq으로 Nuclei (DroNc-seq)를 사용하여 데이터가 생산되었음

○ 면역계(Immune system map)

- 면역체계를 이루는 세포는 세포 유형이 다양하고 조직의 위치나 감염 여부 및 질병 등 환경적 요인에 의해 성질이 급변하며 무수한 아류를 형성함. 같은 면역세포에서 유래했다라도 조직의 위치에 따라 세포 유형과 기능이 매우 상이함
- 면역세포는 부유세포이므로 상피세포 등과는 달리 dissociation 과정이 필요없으므로 실험 중 세포변형에 대한 문제가 발생하지 않음. 따라서 매우 다양한 시료를 대상으로 단일세포 전사체와 단백질 연구 결과가 보고되어 있음

○ 호흡기/폐(Lung map)

- 현재까지 폐에는 적어도 40여개의 특징적인 세포유형이 존재하는 것으로 알려져 있으나, 세포의 특징이나 질환과의 기능적 연관성에 대해서는 제한적으로 알려져 있음. 폐 세포지도 (Lung cell atlas)의 구축을 위해서는 기도의 중심축(proximal-distal axis)을 따라 다층적 시료 확보가 필요하며 이를 위해 표준화된 실험 방법 확립을 확립할 필요가 있음
- 폐/기도는 호흡기를 유지하는 세포 뿐 아니라 점액성 면역계 (mucosal immune system)의 중요한 부분을 차지하므로 면역계 세포지도 완성을 위해서도 심층적 분석이 필요함. 폐 조직 확보 방안은 1) broncho-biopsy를 통한 폐기도 (lung airway) 조직 2) 조직 이식으로부터 나오는 중심부와 주변 조직 3) 암수술 조직으로부터 얻는 종양이 없는 부분 확보 등이 있음
- 정상 폐 조직 이외에 폐 발달과 폐질환의 역학적 이해를 위해 특징적인 폐질환 (예: 만성 폐색성 폐질환 COPD, 천식, 특발성폐섬유증 IRF 등)을 앓고 있는 환자들로부터의 시료 확보도 필요함. 현재 생산된 정상 폐 조직에 대한 scRNA-Seq 데이터는 mouse 시료를 사용한 데이터로, 아직은 생산량이 많지 않음

○ 비뇨기계/신장(Urinary/Kidney map)

- 신장 세포지도 (kidney map) 작성을 위해서는 폐기된 신장이식 장기, 신장적출 시료, 그리고 신장 biopsy를 통해 kidney cortex, medulla, pelvis, ureter를 분석할 수 있음
- 이러한 신장 조직들은 micro-dissection 과정을 통해 해부학적으로 흥미로운 부분 (예: glomerulus)에 대한 심층 분석 대상으로 이용할 수 있음. 더불어 다양한 신장 질환시료들(lupus nephritis, nephrotic syndrome, immune complex glomerulonephritis, diabetic kidney disease, acute kidney injury, etc.)이나 거부반응 혹은 기능감퇴를 동반한 신장이식을 가지고 있는 개인들로부터 시료를 수집할 수

있음. 이를 통해 특정 세포 군집들이나 신장의 특정 부위가 각각의 질환에서 어떻게 변화되었는지 확인할 수 있음

- 기본적인 scRNA-Seq 외에 flow cytometry나 mass cytometry를 활용한 단백질 수준에서의 검증이 필요하고 세포들의 공간적 분포도 정립하여야 함
- 정상인의 시료라 하더라도 고혈압, 당뇨, 고지혈증을 동반하고 있는 경우나, 연령, 성별, 그리고 민족성이 다른 경우, 시료 quality에 어떠한 영향을 끼치는지 고려해야 함. 이식 장기의 경우 얼음에 담겨 운송되기 때문에 여기서 발생하는 fresh tissue와의 차이점도 고려해야 함.
- 신장의 상피세포 (epithelial cell)들은 신장 면역세포 (immune cell)들보다 dissociation protocol에서 더 손상을 입기 쉽기 때문에, fresh tissue와 snap-frozen의 nuclei prep 간의 dissociation protocol이 어떠한 영향을 끼치는지도 확인해야 함. Spatial analysis를 위해 모든 조직에서 non-disaggregated sample들을 snap-frozen과 FFPE block으로 보관해야 함

○ 간(Liver map)

- 간은 대사 조직으로 다른 장기들과 다르게 엄청난 재생력을 보이는 특징이 있고 80%가 손실되어도 다시 자랄 수 있음. Liver map 프로젝트를 통해 간 이식의 실패 요인을 찾거나 조직재생의학의 발전에 기여할 수 있음.
- 간질환의 특징은 highly localized, 특정 cell type의 관여로 이들 특정 세포 유형을 규명하는 것이 간질환 이해에 중요함
- 간 세포지도의 작성을 위해서는 Parenchymal (PC)와 nonparenchymal (NPC)을 포함한 다량의 세포를 얻어야 하고, 해부학적으로 2 major lobes, 세부적으로 8개의 segments에 대해 구분하여 biopsy를 진행해야함(PC, NPC, gallbladder, common bile duct). 서로 다른 부위마다 다양한 세포 구성을 가지고 있기 때문에 다양한 부위에서 cell type signature, proteome, metabolome 분석을 진행해야 함
- 간의 또 다른 특징은 환경적 영향을 많이 받는 것으로 개인, 나이, 성별, 비음주지방간, C형간염, 지역적, 특정 인구를 비롯하여 수면 시간이나 주변 환경에 의해서도 영향을 많이 받을 수 있음
- 간질환에 대한 감수성은 면역기능과도 관련이 있으며 간세포와 면역세포들의 기능은 해부학적 위치에 영향을 받기 때문에 간세포의 3D 분포를 확인할 필요가 있음. 많은 간세포들은 조직 수준의 metabolic gradients에 영향을 받기 때문에 시료 준비를 균일하게 하는 것이 중요함
- 간 시료는 사망자의 간을 이식할 때 segment나 wedge biopsies를 얻을 수 있고 장기이식에 실패할 경우 간 전체를 얻을 수 있음. 이 외에도 암환자의 정상조직 부분이나 기본 간 진단 검사 시에 시료를 얻을 수도 있음
- 현재까지 이루어진 간세포 scRNA-Seq은 대부분 mouse에서 수행되었으며 인간 시료의 경우 간암 환자에서 간 조직, 혈액, 근접한 정상 조직에서 T세포 분석이 수행

된 바 있음

○ 췌장(Pancreas map)

- 췌장은 외분비(exocrine)와 내분비(endocrine) 기능을 하는 세포들로 구성되어 있음. exocrine pancreas는 zymogens을 생산하는 acinar cells과 branched tubules를 구성하는 ductal cells로 구성되지만, 이 둘의 전체적인 다양성은 아직 알려져 있지 않음
- Endocrine pancreas는 랑게르한스 섬이라 불리는 구조를 구성하는 hormone-secreting epithelial cells로 구성되어 있음. 이들 중 a, b, d cell이 각각 glucagon, insulin, somatostatin을 생산함. 췌장 관련 질환으로는 제1형 당뇨병, 2형 당뇨병, pancreatitis, cystic fibrosis, adenocarcinoma등의 질병이 있으며, pancreatitis와 adenocarcinoma 같은 경우는 stromal cell (fibroblast, stellate cell, vascular endothelial and smooth muscle cells)과의 상호작용이 중요함
- 췌장 시료의 경우 인간 사체에서 적출된 췌장은 몇 분에서 몇 시간 후 부터 자가분해가 진행되며 in vitro culture를 하고 짧은 시간 안에도 유전자의 조절 기작이나 세포의 기능이 변하므로 이를 고려한 실험법이 적용되어야 함. 다수의 정상 조직과 2형 당뇨병 조직에 대한 scRNA-seq 데이터가 논문으로 발표되어 있음

○ 소장/대장(Gastrointestinal: Small intestine, colon)

- 소장과 대장은 음식물이나 미생물을 분리해주는 장벽이며 영양소와 염분/수분을 흡수하는 통로임. 이러한 선택적 장벽의 역할 수행을 위해 소장과 대장의 상피세포는 각각 3-5일 혹은 72시간마다 교체됨. 빠른 속도의 Self-renewal은“crypts”라고 불리는 구조에서 장 줄기세포가 분열하고 12가지 세포 유형으로 분화함으로써 이루어짐
- 이들 세포의 기능은 또한 장내 미생물, 면역세포, 기질, 신경세포등과의 상호작용에 의해 조절됨. 장내미생물의 영향은 무척 광범위하여 전반적인 건강상태를 비롯하여 알레르기, 천식, 조울증, 심지어 파킨슨병의 감수성에도 관여하는 것으로 알려져 있음. 소장과 대장에는 40여종 이상의 세포 유형이 존재하는 것으로 알려져 있음
- 시료는 건강검진시의 생검 시료를 비교적 쉽게 얻을 수 있으나 전체 layer에 대한 세포지도 작성을 위해서는 수술 샘플이나 장기기증이 필요함. 해리가 어려운 세포 유형이나 매우 수가 적은 세포를 얻기 위함 방법이 강구되어야 함
- 그간 발표된 대부분의 단일세포 전사체 데이터는 mouse 데이터이며 사람의 대장암 주변 정상조직에 대한 시퀀싱 데이터가 일부 존재함

○ 피부(skin)

- 피부는 신체 보호를 위한 물리적 장벽일 뿐 아니라 1차 면역 방어 기관임. 피부의

위치에 따라 다양한 미생물들이 존재하기도 함. 피부는 부착성이 강하여 단일세포로 해리하는 과정이 매우 어렵기 때문에 다양한 세포타입을 회수하기 위한 방법 개발이 필요함.

- 배양된 상피세포 (keratinocyte)와 lupus 환자의 단일세포 전사체 시퀀싱 데이터가 논문으로 발표된 바 있음

○ 심혈관계(Cardiovascular system)

- 심혈관계에 대해서는 세포 생리학적 이해도는 높은 편이지만, 다양한 세포타입을 총체적으로 이해하기 위한 구체적인 분자생물학적 지식이 부족함. 발생과정의 이해는 주로 model 동물을 이용하여 이루어졌는데, 사람에게서 건강하고 온전한 심장을 채취하기 어려운 점과 빠른 시간 안에 단일세포로 분해하여 사용하기 어려운 점이 모두 작용했을 것임. 이런 어려움은 유도만능 줄기세포를 이용한 심장세포 생성을 통해 어느 정도 극복 가능함.
- 현 수준은 정교한 세포 유형의 분화도 가능한 수준이나 기능적으로 완벽한 재현이 어려움. 성인 심장은 밀도 높은 섬유상으로 단일세포 해리가 어려울 것이므로, 조직 해리가 필요 없는 nuclear scRNA-seq이 대안이 될 수 있음

○ 줄기세포, 발달 단계 및 소아 단계

- 세포 발달과 분화의 분자적 기전을 이해하기 위해 단일세포 연구를 통해 필요한 분야이며 연속적인 trajectory 분석이 필요한 분야임. 분석 대상은 뇌, 심장, 간, 신장, 체장 등에서 일어나는 adult stem-cell process와 in vitro system, 태반을 포함한 developmental time courses에서의 조직 확보 등으로 다른 조직 연구와의 상호 협조를 통한 광범위한 샘플 수집이 필요함
- 배아나 줄기세포 연구의 경우 중국 연구진에 의한 분석이 활발히 이루어지고 있음
- 소아의 경우 성인과는 전혀 다른 세포적 및 분자적 특성을 가지고 있으므로 별도의 세포지도 작성이 필요하며 14세 이하를 대상으로 함. 성인 조직과 대비되는 소아 조직 내 세포 발달 과정이나 조성, 특성, 기능 등의 복합적인 이해를 통해 소아 질환의 치료법을 개선할 수 있을 것임. 현재 발표된 소아대상 단일세포 논문은 없음

2.2.3. 오가노이드 연구 동향

○ 오가노이드의 정의

- 조직으로부터 분리한 세포를 3차원 배양법으로 다시 응집시키고, 재조합시켜 장기의 일부를 모방하거나 장기와 유사한 형태로 만들 수 있는데, 이렇게 생성된 3차원 세포 집합체를 오가노이드(organoid, 장기유사체)라 함
- 3차원 오가노이드에는 장기 특이적 세포들이 포함되어 있으며, 장기가 가진 특정 기능을 재현할 수 있고, 실제 장기와 유사한 형태로 공간적 조직화가 가능함. 인체 내

조직/장기의 기능을 대체하거나 생체모방 모델을 구현할 수 있는 3차원 오가노이드 제작·평가·활용 관련 플랫폼 기술을 포함(그림 25)

- 줄기세포를 기존에 알려진 신호물질에 노출시켜 신장, 폐, 장, 뇌 또는 망막과 같은 장기의 주요 특성을 반영하는 오가노이드를 형성할 수 있음. 건강한 조직 뿐 아니라 환자의 조직으로도 오가노이드 제작이 가능하며, 이 기술은 인간의 장기발달, 생리 및 암을 포함한 인간의 병리학적 모델로 적용 가능함
- 오가노이드 기술은 다양한 영역에서 활용 가치가 기대되나 아직 전 세계적으로 연구 초기단계에 있어 신속한 원천기술 개발 집중을 통한 세계 시장 선점이 필요함. 줄기세포의 특성 및 발생학적 접근법을 이용한 오가노이드 기술은 발생학적 기초연구부터 신약개발 활용과 장기 대체 등 재생의학 적용까지 광범위한 영역에서 활용 가능함

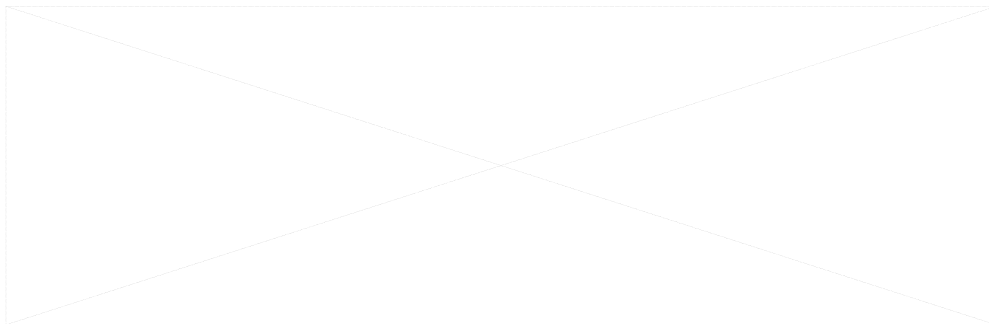


그림 27 인체 장기 모델링을 위한 3차원 오가노이드

○ 인체 발생 과정 모방을 통한 세포 분화 및 인체 장기 모델링

- 최근 3차원 조직발생 및 세포조직화 연구는 발생학적 접근방법을 이용하여 바이오장기 혹은 오가노이드 및 장기유사체를 개발하거나, 조직을 재생할 수 있는 연구를 수행하는 새로운 패러다임으로 등장함. 향후 오가노이드의 다양한 활용을 위해서는 인체의 발달과정을 모방할 수 있는 세포 자체의 자기조직화, 패턴닝 및 세포의 복합적 조합을 통한 인체 장기와 가장 유사한 형태와 기능을 가진 오가노이드 제작이 필요함
- 줄기세포의 다양한 세포로 분화할 수 있는 분화능과 자기조직화 특성을 이용하여 발달과정(natural development)을 모방하는 분화방법 및 3차원 배양을 통해 다양한 장기를 모방하는 오가노이드를 제작할 수 있음
- 개인 맞춤형 줄기세포를 이용하여 실제 장기의 구조와 기능을 모사하는 3D 오가노이드 분화기술이 주목 받고 있음. 유럽 등 선진국을 중심으로 동물실험 규제가 확대되고 있으며, 실험동물을 대체하고 인체유사도가 높은 장기모사 오가노이드 연구 수요가 급증하는 추세임. 이에 따라 신체 내 발달과정을 모사하여 체외에서 배양되는 오가노이드 기술은 여러 기초연구 및 응용연구에 활용될 수 있는 모델 시스템으로서 기대됨
- 오가노이드 모델의 장점은 인간 장기를 모사한다는 점으로서 실제 세포의 행동이나,

약물 탐색, 질환 모델로써 심층 분석에 이용 가능함. 오가노이드는 질환 모델링 응용 분야에서 질환의 발생 기작 규명 뿐 아니라, 병원체와 세포 간의 상호작용, 유전자 편집에 의한 질환 표현형 분석 등에 광범위하게 사용되고 있음. 오가노이드를 이용하여 질환모델 쥐 등에 이식함으로써 치료 효과를 증명하는 연구가 발표되고 있으며, 차세대 의료분야에서도 응용이 기대됨. 3D 바이오 프린팅 기술 및 첨단 소재기술 등 융합연구의 발전과 함께 개인맞춤형 장기의 제작에 대한 기대와 수요가 증가 (그림 26, 27)



그림 28. 오가노이드 분화와 응용 연구 분야 모식도 (출처 : BRIC VIEW 2017-R30, 사람의 발생과 질병에 대한 생체 외 모델로서 오가노이드)



그림 29. 줄기세포 유래 3차원 오가노이드

○ 오가노이드 연구 분야 주요연구 성과

- 인공 위장 제작 및 이식 성공
 - 연구팀: 미국 하버드대 연구팀
 - 주요내용: 실험 쥐의 위장과 십이지장 사이 상피세포로 유도만능 줄기세포를 만든 뒤 인슐린을 분비하는 베타세포로 분화시켜 인공 위장을 제작 (Ariyachet C, et al 2017, Cell Stem Cell) 베타세포가 없는 쥐에게 이 인공 위장을 이식하자 인슐린이 분비되어 혈당치가 정상 수준을 회복.
 - 시사점: 베타세포를 상실한 당뇨병 환자의 경우에도 환자 자신의 세포로 인공 위장을 만들면 췌장 기능이 부작용 없이 개선될 수 있을 것으로 기대
- 쥐의 등에 인간 키 배양 성공
 - 연구팀: 일본 동경대, 교토대 공동 연구팀
 - 주요내용: 환자-특이적 유도만능 줄기세포로 연골세포 제작 후 3mm 플라스틱 관에 채워 인간 키 형상 제작하여 쥐 등에 이식 2개월 후 5cm의 인간 키 유사 기관 생성됨 (2016.1)
 - 시사점: 5년 뒤 얼굴 기형 신생아 혹은 키 재건이 필요한 성인 대상으로 인공 키 이식 가능성 제시
- 줄기세포로 인공 눈 제작
 - 연구팀: 일본 오사카대 연구팀
 - 주요내용: 인간 눈 외배엽 세포 유래 유도만능 줄기세포로부터 눈 구성 세포 (망막, 각막, 결막, 망막 내피 등)를 구성하는 세포로 분화 후 성숙시기를 통해 유기적 연결 성공 (Hayashi R et al, 2016, Nature). 눈이 먼 토끼에 이식 시 7일 이후 정상시력 거의 회복
 - 시사점: 과거 인공 눈 조직 일부 배양은 성공했으나, 전체 구조를 모사한 모델 제시는 처음. 인간 줄기세포 유래 각막 상피세포가 토끼에서도 기능을 가지며, 이를 통해 기증자에 의존되어있는 각막 이식을 대체할 수 있는 새로운 치료법으로서의 가능성 제시(그림 28)

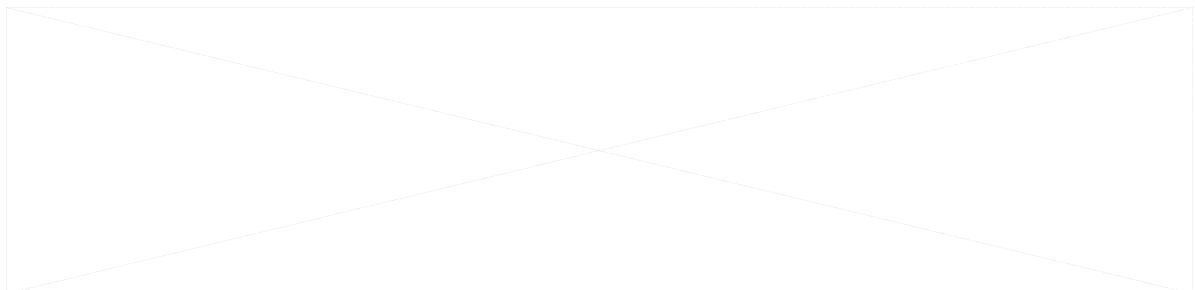


그림 30. 인공 키를 이식한 쥐와, 인공 눈의 각막상피세포를 이식한 토끼 눈

- 인공 피부 조직 제작

- 연구팀: 일본 이화학연구소와 도쿄대 공동 연구팀
- 주요내용: 배아가 외분비기관 (모공, 피지샘 등)을 형성시키는 과정 중 "Wnt10b"라는 분자의 역할에 착안하여 유도만능 줄기세포 기반 세포 덩어리 형성 시 Wnt10b 넣고 관찰 (Takagi R et al, 2016, Sci Adv). 1주일 만에 세포 덩어리에서 모공, 피지샘 조직 형성되었고, 쥐에 이식 성공(그림 29)
- 시사점: 피지와 땀을 내는 실제 기능을 가진 피부조직 최초로 재현



그림 31. 쥐의 기능성 피부조직 제작과 이식 후 기능성 확인

- 줄기세포 기반 뇌 유사조직을 이용한 지카 바이러스의 소두증 유발 입증 연구

- 연구팀: 브라질 리우데자네이루 연방주립대 연구팀
- 주요내용: 유도만능 줄기세포 기반 뇌 유사조직(오가노이드)에 지카 바이러스 감염 후 표현형 관찰 시, 세포사멸로 인한 뇌 유사조직 크기 감소 (약 40% 정도) 확인 (Garcez PP et al, 2016, Science). 같은 계열의 Deng기열 바이러스는 뇌 유사조직에서 손상 없음을 통해 지카 바이러스가 소두증의 원인이라고 추측
- 시사점: 발육 단계에 따른 지카 바이러스 감염에 의한 영향 연구 필요성

- 자궁 조직세포로 자궁 내막 오가노이드 제작

- 연구팀: 영국 캠브리지대 연구팀
- 주요내용: 자궁내막 오가노이드는 여성 성호르몬에 반응하고, 임신 첫 몇 달 동안 자궁유상액 (배아에게 영양을 공급하는 단백질)을 분비하고, 생리주기가 시작되면 자궁내막 두께와 혈관이 늘어나 임신을 준비하기도 하고, 임신을 하지 않는 경우 생리혈로 두꺼워진 조직이 방출됨을 확인(Turco MY et al, 2016, Nature cell biology; 그림 30)
- 시사점: 월경주기 (생리불순, 생리혈의 양 차이 등)에 대한 연구, 임신 초 자궁 내 변화, 자궁내막 관련 질환에 대한 연구가 가능할 것으로 예상



그림 32. 자궁 내막 오가노이드

○ 오가노이드를 이용한 단일세포 분석 연구 및 주요 성과

• 일반 동향

- 줄기세포로부터 유래한 오가노이드는 인간의 발달 과정을 높은 수준으로 모사함으로써 샘플 채취가 어려운 태아의 조직 및 세포를 발달 단계에 따라 단일세포수준에서 분석할 수 있도록 해줌
- 오가노이드를 구성하고 있는 세포의 다양성 및 구성 비율이 실제 장기 및 조직과 매우 흡사함으로써 시료 획득이 어려운 장기 및 조직의 단일세포 분석을 가능하게 해줄 수 있음
- 유전자 편집을 이용하여 오가노이드를 기반으로 한 질병 모델링이 가능해짐으로써 질병의 발생 과정 및 발달 단계별로 단일세포 분석이 가능함으로 인해 질병의 발병 기전에 대한 이해를 높여줄 수 있음
- 고병원성 질병의 경우 시료 채취가 어렵고, 질병 모델링에 제약이 많음. 최근 오가노이드를 이용한 고병원성 질병의 기전 연구가 활발히 이루어짐으로 인해 고병원성 질병의 발생 기전을 단일세포 수준에서 분석할 수 있는 기회가 증대
- 인간의 장기와 조직에는 수많은 공생미생물이 존재함으로 인해 시료의 분석에 영향을 미칠 수 있으나 실험실에서 배양된 오가노이드의 경우 공생미생물이 존재하지 않음으로 교차 감염으로 인한 분석 오류를 없앨 수 있으며, 오가노이드로 분석 데이터를 이용하여 인간 시료 분석에 포함된 오류를 제거하는 도구로도 사용이 가능함

• 뇌 오가노이드를 이용한 단일세포 분석

- 연구팀: 독일 막스플랑크 연구팀
 - 주요내용: 대뇌 오가노이드를 이용하여 단일 세포 수준에서 오가노이드의 특성을 분석한 결과 발달과정에 있는 태아의 뇌와 매우 유사한 것을 밝혔으며, 대뇌 발달에 중요한 유전자 발현 양상 역시 매우 흡사한 것을 발견(Camp JG, 2015, PNAS)
 - 시사점: 대뇌 오가노이드와 태아의 대뇌가 세포 조성 및 유전자 발현 패턴이 매우 흡사하므로 태아 두뇌 발달 과정에 영향을 주는 질병(예, 지카 바이러스, 소아마비 등)에 관한 기전 연구를 대뇌 오가노이드를 이용하여 수행할 수 있을 것으로 예상
- 장 오가노이드를 이용한 단일세포 분석
 - 연구팀: 네덜란드 휴브렛연구소 연구팀
 - 주요내용: 장 오가노이드에 존재하는 단일 세포들의 유전자 발현 양상을 분석하여 장에 존재하는 다양한 세포들을 특징을 밝혔으며, 극소수 존재하는 세포들을 분석함으로써 인해 새로운 표지 유전자 발굴에 성공(Grun D et al, 2015, Nature)
 - 시사점: 단일세포 분석 연구를 통해 다양한 세포의 특성 연구가 가능하며, 앙상블(ensemble) 효과로 인하여 분석이 어려웠던 극소수의 세포의 특성 연구가 가능해짐으로 인해 지금까지 알려지지 않는 새로운 세포 발굴 및 표지 유전자 발굴이 가능해질 것으로 전망됨
- 위 오가노이드를 이용한 단일세포 분석
 - 연구팀: 미국 스탠포드 연구팀
 - 주요내용: 위 오가노이드를 기질세포와 함께 배양하여 위 발달 과정에 있어서 기질 세포들의 역할을 규명하기 위하여 단일 세포 분석을 수행하였고, 대식세포와 섬유아세포가 위 오가노이드 발달에 중요한 역할을 수행하고 있음을 확인함(Chen J, 2017, BioRxiv)
 - 시사점: 단일세포 분석 연구를 통해 오가노이드 자체의 특성 분석과 더불어 오가노이드와 기질 세포 또는 미세 환경과의 상호 작용 기전 분석이 가능함
- 간 오가노이드를 이용한 단일세포 분석
 - 연구팀: 독일 막스플랑크 연구팀
 - 주요내용: 줄기세포로부터 유래된 간세포와 섬유아세포, 내피세포를 공배양을 통해 생성된 간 씨앗세포의 특성을 단일 세포 분석 기법을 이용하여 분석하였고, 간 씨앗세포는 태아의 간 세포와 매우 흡사한 것으로 밝혀졌으며 간 씨앗 발달과정에 있어 VEGF 신호전달체계가 핵심적인 역할을 수행함을 밝힘. (Camp JG, 2017, Nature)
 - 시사점: 단일세포 분석과 pseudo-timing 기법을 이용하여 오가노이드 및 장기의 발달과정을 추적할 수 있으며, 발달 과정에 핵심적인 역할을 하는 타겟 유전자 또는 신호전달과정을 밝힐 수 있음

- 신장 오가노이드를 이용한 단일세포 분석
 - 연구팀: 호주 멜버른대 연구팀
 - 주요내용: 유도만능줄기세포로부터 생성된 사람의 신장 오가노이드와 쥐 배아의 신장을 단일 세포 분석을 통해 비교 분석함. 사람의 신장 오가노이드는 쥐 배아의 신장은 매우 흡사한 특징을 보이지만 기능적으로 여전히 미성숙 상태이며, 아직 명확히 밝혀지지 않은 세포들이 존재하고 있는 것으로 알려짐. (Wu H et al, 2017, BioRxiv)
 - 시사점: 사람의 신장 오가노이드는 태아의 신장과 흡사한 특성을 나타내지만 아직 기능적으로 미성숙함으로 신장 오가노이드를 성숙시킬 수 있는 실험법의 개발이 필요하며, 아직 정확히 규명되지 않은 세포들의 발달과 기능에 대한 후속 연구가 필요함

2.2.4. 단일세포 생물정보학 동향

- 국외 연구의 경우 컨소시엄의 형성을 통해 대형 프로젝트를 진행하는 것이 두드러진 특징으로 나라별로 다양한 연구들의 진행 결과물이 발표되고 있음
- 미국의 NIH에서 자금 지원을 받고 있는 Single Cell Analysis Program (SCAP)은 3개의 대학에서 인간의 뇌와 심장을 기반으로 단일세포의 전사체 데이터를 분석하고 컨소시엄에서 공개 포털을 개발하여 NCBI의 dbGAP과 연동하여 원 데이터와 표현형 정보를 포함하는 메타 데이터를 제공하고 있으나 승인된 접근 권한이 없는 경우에는 데이터 다운로드가 가능하지 않음
- 단일세포 유전체 분석은 하나의 단일세포에서 세포 군집까지 유전체 정보를 동시에 정량화 할 수 있는 기술이기 때문에 방대한 양의 데이터를 처리하기 위한 전산 알고리즘과 통계적 방법이 개발되고 있음
- 기존의 bulk population에 사용되던 NGS 데이터 분석 기술이 그대로 적용이 가능하지만 단일세포 유전체 시퀀싱 실험의 몇 가지 독특한 특성을 위해 새로운 분석기술 전략이 요구되고 있음
- 시퀀싱 실험 과정에서 발생할 수 있는 bias를 보정하기 위하여 기존의 bulk 시퀀싱 데이터는 보통 시퀀싱 과정에서 생산한 전체 library 품질 (quality)과 크기 (size)에 중점을 두고 보정하였지만 단일세포의 경우 각 단일세포 레벨에서 데이터의 양적, 질적 품질저하 여부를 결정해야함
- 이를 위해 단일세포 전사체의 경우 알려진 control RNA를 넣어주는 ERCC spike-in 방법을 통해 세포 별로 RNA 저하 여부를 수행하고 Unique Molecular Identifier (UMI) 바코드 방법을 통해서 transcript 별로 발현 수치를 계산하고 3'에 편향된 Oligo-dT primer 방법에 의해 전사체 길이를 조정함에 따라서 세포 별 유전자 발현량을 normalization하는 방법이 달라짐
- 또한, 데이터에서 발현이 검출되지 않는 유전자의 비율이 높게 나타나고 bimodal 분포의 특성이 나타나기 때문에 정규분포를 가정하는 고전적인 통계 방법은 대신 이에 맞는 확률통계 모델을 고려해야 함
- 세포들 간의 DNA 변이 분석을 통해 암에서 세포 이질성 분석을 수행하고 stochastic한 유전자 발현으로 세포 주기 단계를 구분하는 것처럼 내부 그룹

(subgroup/subpopulation)을 정의하는 단계는 단일세포 분석에서 핵심 기술임

- 세포 간의 유사성과 차이를 바탕으로 세포의 상태 및 종류에 따른 특성을 식별할 수 있도록 기존의 principal component analysis (PCA), tSNE (t-distributed stochastic neighbor embedding) 방법과 클러스터링 (clustering) 방법을 주로 사용하고 최근에는 더욱 향상된 정확성을 위해 다양한 툴들이 개발되었음
- Single Cell Consensus Clustering (SC3)은 PCA와 spectral dimensionality reductions을 기반으로 k-mean을 활용하여 consensus clustering을 도출하고 Clustering through Imputation and Dimensionality Reduction (CIDR)은 새로운 imputation 방법을 통해 더욱 빠르고 정확한 클러스터링 결과를 보여주고 더 나아가 Single cell interpretation via multi-kernel learning (SIMLR)은 machine learning 기술을 도입하여 스케일과 성능을 향상시킴
- 정의된 그룹을 바탕으로 다양한 그룹 간의 비교 (1) within cell type (2) between cell types (3) between tissues 분석을 통해 유전자 발현 패턴 분석과 조절 네트워크 추론과 같은 기존의 분석 기술도 적용이 가능하지만 세포 상태 전이 (cell-state transitions), 세포 혈통 (cell lineage), 발달 단계 추적과 같은 데이터의 시간과 공간 차원의 확대는 새로운 기술개발이 필요함
- 중국의 경우에도 단일세포 유전체 분석 분야에 많은 연구를 진행하고 있으며 특히 Harvard University의 Xie 교수는 DNA 증폭기술인 MALBAC (Multiple Annealing and Looping Based Amplification Cycle)을 개발하고 이를 단일세포의 whole genome sequencing에 적용하여 부모 세포와 자녀 세포 사이의 완전히 똑같지 않은 유전체 차이를 결과로 발표함. 이 그룹에서 많은 전문가가 배출되고 있으며 북경대학교를 필두로 단일세포 유전체 연구를 수행하고 있음

표 4. 국외 연구현황

연구수행 기관	연구수행 내용
University of Pennsylvania, University of Southern California, University of California San Diego	- NIH의 Common Fund를 통해 지원을 받은 Single Cell Analysis Program (SCAP) 을 수행 - 세포의 이질성을 평가하기 위하여 인간의 뇌와 심장에서 단일세포를 전사체 레벨에서 분석 - 3개의 기관에서 생산된 56개의 subjects에서 생산된 697 단일세포의 전사체 데이터를 포털에 공개
EMBL-EBI, Broad Institute, UCSC Genomics Institute	- 국제 컨소시엄인 The Human Cell Atlas (HCA)에서 생성되는 데이터의 기본적인 분석을 수행할 수 있는 새로운 알고리즘을 개발 - 종합적인 인간세포 참조 카탈로그를 위하여 최고의 기존 방법을 알아내고 해결이 부족한 문제에 새로운 방법을 개발하는 전략을 수립 - 다양한 기술에서 생성되는 데이터의 통합적인 분석 기법과 그들의 비교 분석과 최적화를 수행할 수 있는 벤치마킹 데이터 세트를 결정

2.3. 국내 연구 및 기술 개발 동향

2.3.1. 단일세포 오믹스 분석

- 국내의 경우 여러 연구진이 주로 단일세포 전사체 데이터 생산 및 분석 연구를 진행하고 있음. NTIS를 통해 2015년부터 2018년 4월 현재까지 진행 중인 과제를 분석한 결과 최소 25개 팀의 연구과제가 ‘단일세포’ 키워드로 검색되며, 이 중 11건의 과제는 연간 예산 1억 이상 규모의 사업으로 파악됨. 1억 이상 과제 중 대다수를 차지하는 9건의 과제는 암을 대상으로 하고, 나머지 2건의 경우, 혈관질환과 통증질환을 대상으로 함(표 5)

표 5. 2015년 이래 진행 중인 연간 1억 이상 규모의 단일세포 분석 관련 과제

사업종류	연구수행기관	연구 기간	연구비	과제명
중견연구자 지원사업	경희대학교	2018.03.01. - 2021.02.28.	1.5억/년	단일세포 빅데이터 기반 항암제 스크리닝 플랫폼 개발
포스트게놈 다부처유전체사업	삼성서울병원	2017.06.01. - 2022.02.28.	3억/년	폐암 단일세포 전사체 기반 전이 및 치료예측 마커 검증과 기전 규명
바이오의료 기술개발사업	이화여자대학교	2017.09.01. - 2022.05.31.	3.5억/년	유방암 줄기세포 특이적 신호전달체계의 작용 기전 규명 및 제어 후보물질 발굴
바이오의료 기술개발사업	대구경북과학기술원	2017.09.01. - 2022.05.31.	1.5억/년	유방암 줄기세포 단일세포 전사체 분석 및 신규 신호전달체계 발굴
중견연구자 지원사업	인제대학교	2016.06.01. - 2019.05.31.	1억/년	개별 암 환자 맞춤형 치료 및 예후평가를 위한 단일 혈중암세포 분리기술 개발
신진연구지원사업	대구경북과학기술원	2017.03.01. - 2020.02.28	1억/년	표적 항암제의 후생유전적 변이에 의한 내재적 내성 기전 규명
포스트게놈 다부처유전체사업	삼성서울병원	2016.06.01. - 2022.02.28.	2.56억/년	단일세포 전사체 분석을 통한 폐암 전이예측 바이오마커와 치료타겟 발굴
선도연구센터지원사업	숙명여자대학교	2016.06.01. - 2022.12.31.	13억/년	이질성 기반 세포적응 연구센터
선도연구센터지원사업	성균관대학교	2016.12.01. - 2023.08.31.	8.33억/년	단일세포 네트워크 연구센터
중견연구자 지원사업	경북대학교	2017.03.01. - 2022.02.28.	3억/년	혈관질환 치롤르 위한 혈관 발아와 혈관 네트워크 형성의 분자적 조절 기전 연구
바이오의료 기술개발사업	서울대학교	2016.05.01. - 2021.01.31.	2.5억/년	Single-cell transcriptomics 기반 치과 통증질환 제어기술 개발

- 국내에서 진행되는 단일세포 전사체 연구의 경우 C1 Fluidigm 장비와 drop-seq 기

표 6. 국내 10x genomics 장비 구축 현황

기관	대수	설치 시기
서울 삼성병원 유전체연구소	1	2016.12
서울대학교 농생명기지원	1	2017.01
대구경북과학기술원	1	2017.06
가톨릭대학교(서울 성모병원)	1	2017.08
고려대학교 안암병원	1	2017.09
한국뇌연구원	1	2017.10
한국과학기술원	1	2018.01
서울대학교 병원	1	2018.03
한국생명공학연구원	1	2018.04(예정)

반의 10x genomics 장비를 이용한 연구가 많이 진행되고 있음. 국내 연구진 중 drop-seq 플랫폼을 보유한 숫자는 2018년 4월 기준 9 팀으로 파악됨(표 6)

- 한편으로, C1 Fluidigm 장비는 6대가 국내에서 사용되고 있음(표 7)

표 7. 국내 C1 Fluidigm 장비 구축 현황

기관	대수
연세대학교 줄기세포연구센터	1
서울대학교	1
울산과학기술원	1
대구경북과학기술원	1
삼성서울병원	1
포항공과대학교	1

- 단일세포 후성유전체 연구의 경우 아직 국내 연구진의 결과가 논문으로 발표된 적은 없으나, 소수의 연구진이 초기 단계 연구를 진행하고 있음
- Spatial context를 단백질체로 볼 수 있는 Helios 장비의 경우 국내 입고가 진행된 바 없으나 1개 기관에서 구매 절차를 진행하고 있는 것으로 파악됨. Spatial context는 Helios 이외의 방법으로도 데이터 획득이 가능함

2.3.2. 단일세포 이미징 분석

○ 이미징 기반 단일세포 단백질체 분석

- 국내에서도 세포수준에서 질량 분석 이미징을 시도하는 연구들이 진행되고 있으나, 특정 항체-금속을 이용한 단백질 연구는 아직 보고된 바 없음
- DGIST의 문대원 교수팀은 대기압 상태에서도 뇌 조직의 생체분자들의 질량분석 이미징을 얻는데 성공하였음(Lee et al 2017 Nat. Comm.; 그림 31)



그림 33. AP-nanoPALDI 개요도 (Lee et al 2017 Nat Comm.)

- 한국표준과학연구원 이태걸 박사 연구팀은 TOF-SIMS 이미징을 이용하여 조직을 분석하고 분석속도와 해상도를 높일수 있는 기술을 개발하였음
- 서울대학교 권성훈 교수 연구진은 현미경과 infrared pulse laser에 기반한 조직 분리 기술을 보유하고 있으나, 단일세포를 분리하기에는 공간 분해능이 부족하며, 레이저를 serial로 적용하기 때문에 throughput을 높이는데 한계가 있음

○ 이미징 기반 단일세포 전사체 분석

- 2014년 이후 단일세포 형광 이미징을 이용한 염기서열 분석법이 다양하게 개발되고 실제 환자세포 혹은 병변 조직에 적용 가능함을 보이는 결과들이 보고되고 있으나, 국내에서는 아직 이미징 기반의 염기서열을 분석에 관한 연구는 발표되지 않았음
- 단일세포 내 mRNA 검출 방법, smFISH 혹은 분석을 이용한 세포연구 등은 몇몇 연구자에 의해 진행되고 있는데, 대표적 연구자로는 중앙대 고혜란 교수, 고려대 심상희 교수, 서울대 박혜윤 교수, 한국과학기술연구원 (KIST) 김소연 박사 등이 있음
- 중앙대 고혜란 교수는 smFISH 분석법을 이용하여 RNAi 현상이나 RNA splicing 현상 등, RNA 레벨에서 유전자가 조절되는 현상을 단일 분자 및 단일세포 수준에서 규명하는 연구를 수행하고 있음 (Koh et al 2017 PNAS; 그림 32)



그림 34. RNA silencing을 정량 분석하기 위한 smFISH 방법 개요 (Koh et al 2017 PNAS)

- 고려대 심상희 교수는 light sheet 현미경을 이용한 빠른 시간 이미징 기법, in situ 염기서열 및 단백질 분석을 위한 새로운 형광 표지 방법 등을 개발하고 있음
- 서울대 박혜운 교수는 살아 있는 신경 세포내 단일 mRNA 의 동력학에 관한 연구를 수행하고 있음. 최근엔 Graphene Oxide가 형광을 소광시키는 현상을 이용하여 paraffin embedded tissue 의 FISH를 수행하였고, 이러한 방법이 CLARITY 로 투명화된 조직에서도 적용 가능함을 보임 (Hwang et al 2017 BioRxiv; 그림 33)
- KIST 김소연 박사는 smFISH를 이용하여 대장암세포 내 암 대사에 중요한 역할을 하는 단백질 PKM2 mRNA의 splicing isomer 분석 및 이를 이용한 항암제 개발에 관한 연구를 수행하고 있음
- 한편 조직 투명화 기술 및 조직 팽창 기술은 국내의 여러 연구자들에 의해 사용되어지고 있는데, MIT 정광훈 교수, 선두로, 서울대 김성연 교수, 성균관대 장재범 교수, 고려대학교 선웅 교수 등이 있고, 우리나라에서 CLARITY 기술을 상용화하여 로고스 바이오시스템즈에서 판매되어지고 있음



그림 35. G-FISH 방법을 이용한 알츠하이머 모델 쥐 뇌 조직의 BC1 RNA 이미징 (Hwang et al 2017 BioRxiv)

2.3.3. 임상시료 확보

- **획득 가능한 임상 시료의 범위 설정:** 미국이나 영국의 경우처럼 autopsy 프로그램이나 장기 기증자를 통한 시료 획득은 어려울 것으로 보임. 따라서 국내 바이오뱅크에서 보유하고 있거나 수술, 생검 등을 통해 기증받을 수 있는 장기의 목록을 확보하는 작업이 필요함. 예를 들면 breast reduction 수술 시료나 예방적 난소제거술을 통한 시료 등의 경우임
- 다양한 질병으로 인한 수술 시료의 주변 정상조직도 분석의 대상이 될 수 있음. 바이오뱅크에서 수령 가능한 시료만을 이용할 경우 인간세포지도의 대상이 중요도(예: 다빈도 중증 질병 발생 부위)에 따라 결정되지 않고 획득의 용이성에 의해 결정된다는 단점이 있음
- **국내 바이오뱅크의 현황 파악:** 국내 바이오뱅크는 질병관리본부가 인체자원은행사업을 운영하며 17개 인체자원단위은행에서 종양 및 비종양성 질환에 대해 38만 명의 질환자 유래 혈청, 혈장, 연막, DNA 및 수술 환자의 조직 등을 공개 분양하고 있음. 따라서 국내에는 미국의 GTEX 와 같은 정상인을 대상으로 한 시료 은행이 존재하지 않음
- A병원의 바이오뱅크의 샘플을 조사한 결과 정상 조직은 암 조직으로부터 분리한 조직을 보관하고 있었으며 별도의 정상 조직을 보유하고 있지는 않음. 따라서 유전체 데이터 공개가 가능하도록 포괄적 동의를 받은 정상 조직의 확보가 무엇보다 시급함

2.3.4. 단일세포 생물정보학

- 국내 연구진이 수행하고 있는 과제의 경우 대부분 단일세포 유전체 데이터를 이용한

질병 진단과 치료 영역의 바이오 마커 발굴에 초점을 두고 있으며 데이터를 분석하는 기술에 대한 연구는 수행하고 있지 않음

- 국내에서 차세대 유전체 데이터 분석을 위한 최대 인프라 보유 기관은 KOBIC으로 다년간의 유전체 분석 관련 프로그램과 파이프라인 개발 경험을 보유하고 있으며, 다양한 분석 실무 경험도 함께 보유하고 있음
- 최근 유전체 정보 분석을 위해서 개발된 CLOSHA는 NGS 분석 파이프라인을 클라우드 환경에서 제공하고 하둡을 활용한 클라우드 서비스에 대한 연구 개발을 진행하고 있으며 이를 웹을 통해 워크플로우 형태로 서비스 하고 있음
- 민간업계에서는 KT가 KT-GenomeCloud라는 NGS 데이터 분석 서비스 기반의 클라우드 서비스를 상용으로 제공하나 실제 이용은 거의 없는 편이며, 분석 서비스의 완성도도 낮은 편임
- 단일세포 네트워크 연구센터 (성균관대학교 의과대학)에서 단일세포 생명정보 분석 및 응용기술을 연구하고 임상적으로 이용 가능한 수준의 파이프라인을 구축하는 것을 목표로 연구하고 있으나 참여연구진이 의대 교수에 한정되어 있어 생명정보학 전문가의 기술개발이 필요함 or 분석 플랫폼을 개발하고 서비스를 제공하는 기반은 고려하지 않음

표 8. 국내 연구현황		
연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용 현황
마크로젠(주)	- Whole genome sequencing - copy number variation	- 최초의 고해상도 한국인 참조 유전체 완성 - 아시아인의 초고해상도 유전자 복제수 변이지도 완성 - GenomeAsia 100K (GA100K)의 프로젝트를 주도
국가생명연구자 원정보센터 (KOBIC)	- NGS 데이터 분석 파이프라인 구축 - 대용량 유전체 데이터 확보	- 한국인 게놈 데이터 분석 - 폐암 다중오믹스 데이터 분석 - 대용량 유전체 데이터의 저장, 관리, 분석을 위한 시스템 개발 진행 중
단일세포네트워 크 연구센터, 성균관대학교 의과대학	- 단일세포 수준의 유전자 분석 - 임상 진단/치료기술을 개발	- 아직은 성과 및 활용 없음

2.4. 국외 산업 및 시장 동향

2.4.1. 단일세포 분석 장비 및 시약 시장 동향

- 단일세포 분석관련 세계시장은 연평균 19.72% 성장으로 2016년 14.5억 달러에서 2025년 약 7억 달러에 이를 것으로 예상(그림 34)



그림 36. Global single cell analysis market forecast (2017-2025)

- 단일세포 분석 기술 및 생명공학, 바이오 제약 산업의 발달과 세계적인 전염병 확산 가능성 증대는 세계적으로 단일세포 분석 시장의 확장을 이끄는 주요 요인이며 이외 요인으로는 기술적 혁신, 노인 인구 증가, 정부 연구지원 확대 등이 있음

○ 단일세포 분석 장비 시장 동향

단일세포 전사체 분석 장비

- 인간세포지도 작성을 위해서는 대상 조직의 확보 및 전처리 과정이 필요하고 데이터 생산 플랫폼과 분석 플랫폼이 필요함. 이들 중 데이터 생산 플랫폼은 장비 및 그의 부속 시약이 제품으로 개발되어 있고 분석 플랫폼은 장비와 함께 제공되거나 오픈소스로 개방되어 있음
- 단일세포 전사체 데이터를 생산하기 위한 1차 플랫폼으로의 사용이 유력한 Droplet 기반의 RNA-seq prep 장비의 경우 10X genomics사의 GemCode system과 1CellBio의 InDrop system이 상용화되어 있음. GemCode system의 출시가 좀 더 빨랐고 사용법이 간단하여 국내외 여러 기관에서 사용 중인 반면 InDrop system의 사용은 좀 더 숙련도를 요구함. InDrop의 경우 다양한 application protocol 접목이 용이한 장점이 있음
- 전사체 데이터 생산을 위해서는 Droplet 기반의 장비들이 높은 throughput, 낮은 비용, 사용법의 용이성 측면에서 장점이 있는 반면, 미세우물 (microwell) 기반의 장비는 특정 시료를 선별하거나 deep sequencing하는데 적합한 플랫폼임. 대표 장비로는 WAFERGEN biosystems의 ICELL8 장비로, 분주 방식으로 미세우물에 세포를 넣은 후, 이미징 장비로 원하는 세포(형광염색)가 들어간 미세우물 시료를 선택적으로 얻

어 전사체 분석을 할 수 있음. 자동화 프로토콜이 없이 단일세포 혹은 단일세포 핵을 mouth pipetting이나 FACS 장비로 sorting 하는 방식이나 Qiagen의 QIASCOUT 같은 raft release 방식을 활용하는 것도 가능함

- Fluidigm사의 C1 장비는 microfluidics를 이용하여 세포를 capture하고 장비 내부에서 cDNA 합성과 증폭이 가능함. 초기 플랫폼은 사이즈가 구분된 (5-10/10-17/17-25micron) 96-well chip을 사용하여 amplified full length cDNA를 output으로 내며, 현재는 800 well chip을 사용하여 3'RNA 시퀀싱을 하도록 출시되어 있음. C1 을 사용한 단일세포 DNA 증폭도 가능하며 후성유전체 정보를 얻는 다양한 프로토콜 구현이 가능함
- 인간 세포지도 작성을 위한 기본 플랫폼인 high-throughput RNA-seq 장비는 Drop-seq 으로 상용화되었다고 볼 수 있으나, 다양한 application을 위해 적용 범위를 확장하고 있음. 상용화 장비나 house-built drop-seq 장비를 활용하여 ATAC-seq 과 같은 후성유전체 분석이 가능해졌고 (바코드 프라이머를 이용한 transposon insertion site 시퀀싱), DNA바코드가 달린 항체를 사용하여 단백질체와 전사체 정보를 연계 분석하는 것도 가능해짐. 이들은 조만간 상용화 제품으로 출시될 예정.

단일세포 유전체 분석 장비

- 초기 drop-seq 장비가 단일세포 전사체 프로파일링에 집중한 반면 Mission bio의 Tapestry 플랫폼은 single-cell DNA의 targeted sequencing을 위해 개발되었으며 최근 10000개 AML (acute myeloid leukemia) 세포의 hotspot mutation을 보고한 바 있음. 부유세포를 사용하는 장비의 경우 다양한 혈액암의 진단 영역으로 빠르게 확산될 것으로 여겨짐. 또한 1CellBio는 2018년도 flow cytometry와 microfluidic technology를 병합하는 플랫폼 개발을 예고하였는데, 이와 같이 바이오마커와 세포 기능 연구를 병합하려는 움직임도 활발함

단일세포 단백질체 분석 장비

- 단백질체 분석을 위한 장비로는 mass cytometry 장비인 Fluidigm사의 Helios가 상용화되어 있음. Helios는 항체를 사용하여 단백질을 detection하는데 conventional cytometer가 형광을 사용하여 최대 15-18 파라미터를 구분하는 반면 metal을 사용하여 이론적으로 100여개의 파라미터 구분이 가능함. 기본 장비는 부유세포를 input으로 사용하나 부가 장비를 부착하여 조직을 대상으로 한 분석도 가능함. 따라서 spatial context를 보유한 데이터 분석이 가능하다는 장점이 있음
- 조직 이미지와 시퀀싱을 병합하려는 노력이 지속되고 있으나, 현재 상용화된 장비들은 Helios 장비를 제외하면 high throughput 분석이 어려움. Helios 장비의 경우에도 항체 의존적이므로 볼 수 있는 단백질들이 제한적이라는 단점이 있음. 인간세포지도 작성을 위해서는 이미지와 전사체 데이터를 동시에 얻을 수 있는 플랫폼 상용화가

필요함

○ 단일세포 분석 시약 시장 동향

- 위에 기술한 장비들에 공통적으로 사용되는 시약은 전사체의 경우 SMART-seq (clontech 개발, Takara)이며 version-4까지 출시되어 있다. SMART-seq은 Switch Mechanism at the 5' End of RNA Templates를 통해 cDNA 합성이 이루어짐. Adaptor sequence를 포함하는 oligo(dT) primer를 사용하며 cDNA first strand는 murine leukemia virus reverse transcriptase에 의해 끝에 template 없이 몇개의 Cytosine 염기를 붙인 채로 만들어짐 Cytosine overhang은 full length transcript에만 붙여지므로 poly-C를 이용하여 second strand를 합성하면 높은 coverage의 cDNA 합성이 가능함
- 단일세포 유전체 시퀀싱은 기본적으로 기존의 시퀀싱 방법을 사용하기 때문에 Bulk 시퀀싱 산업을 주도하고 있는 일루미나가 시장을 독점하고 있으며 단일세포 분리와 DNA/RNA 증폭, 바코드 기술과 장비를 상용화한 회사들이 시장을 점유하고자 힘쓰고 있음
- 전사체 데이터를 spatial context와 함께 생산하기 위해서는 in situ RNA sequencing을 수행하거나; microdissection으로 단일세포를 분리, 혹은 single cell RNA 시퀀싱 데이터와 제한적으로 얻은 tissue 데이터를 연계하여 분석하는 방법들을 활용할 수 있음. RNA in situ sequencing의 경우 상용화 장비는 출시되어 있지 않으며 이미징 장비와 시퀀서를 결합하여 함께 운용하여야 하므로 연구자의 부담이 큰 편임. Microdissection 혹은 제한적 tissue 데이터를 얻기 위해서도 manual 프로토콜을 사용해야 하므로 많은 데이터를 얻기에 어려움이 있음

○ 단일세포 분석 소프트웨어 시장 동향

- 미국의 10X Genomics의 경우 단일세포 분리 플랫폼인 Chromium system을 개발하고 HCA 컨소시엄과 계약을 맺어 시범 사업에서 단일세포 전사체 시퀀싱 (scRNA-Seq) 지원을 담당하여 시장 확보에 나서고 있음. 시퀀싱 장비에서 생산된 데이터를 분석해주는 윈도우 기반의 분석 솔루션인 Chromium Software Suite를 제공하여 DNA 레벨에서는 phasing과 structural variant calling을 실행하는 프로그램과 RNA 레벨에서는 유전자 발현을 분석하는 프로그램을 제공함
- 칩을 사용하고 microfluidics 기술이 적용된 단일세포 분리 장비인 C1을 개발한 Fluidigm사는 장비와 함께 단일세포 데이터 분석을 할 수 있는 소프트웨어를 제공하고 있음. 세포적인 이질성과 모든 세포 군집의 기능적인 속성을 탐구할 수 있는 C1TM Script BuilderTM, 단일세포 레벨에서 유전자발현과 변이 패턴을 동정하는 Singular Analysis Toolset Software v3.6.2, 세포 바코드에 따라서 각 단일세포 샘플을 자동적으로 분리해주는 C1 mRNA Seq HT Demultiplex Script을 자체적으로 개발하고 서비스 하고 있음

○ 단일세포 분석 서비스 시장 동향

- DNA/RNA 증폭 기술인 SMART-seq을 개발한 Clontech는 모기업인 TAKARA BIO를 통해 국내에서 단일세포 유전체 분석 서비스를 제공하고 있음
- 중국의 유전체 분석 대표 회사인 BGI는 MDA (multiple displacement amplification)와 Smart-seq2 기술을 바탕으로 단일세포 유전체 분석 제품을 선보이고 있으며 raw 데이터의 분석 서비스까지 제공함

2.4.2. 오가노이드 시장 동향

○ 3차원 배양 시장

- 줄기세포 기반 3차원 배양시장은 '13년 1.5억 달러에서 연평균 29.4%로 성장해 '19년 6억 달러에 달하는 규모를 형성할 것으로 전망됨(그림 35)
- 오가노이드를 포함한 3D 세포배양 관련 업체는 Synthecon, BD bioscience, Reinnervate, Life technologies, 3D Biomatirx 등이며 대부분 미국이 주도함
- 글로벌 줄기세포 제품별 시장은 성체줄기세포 시장이 가장 큰 비중을 차지하나, 성장 추세를 고려할 때 iPSC가 가장 높은 성장률을 보일 것으로 전망됨. 줄기세포 제품별 시장은 2017년 628억 달러에서 연평균 (2017-2025년) 25.8% 성장하여 2025년에 3,944억 달러까지 증가할 전망
- 성체줄기세포 제품이 2016년 375억 달러로 가장 큰 규모를 차지하였으며, 연평균 (2017-2025년) 25% 성장하여 2025년에는 2,732억 달러 규모가 될 것으로 예상됨
- iPSC 관련 줄기세포 제품은 연평균 (2017-2025년) 31.8%의 가장 빠른 시장 성장을 보일 것으로 기대됨

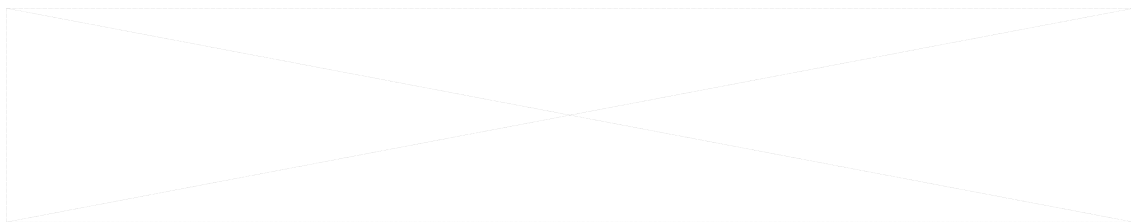


그림 37. 제품(Product)별 글로벌 줄기세포 시장 현황 및 전망 (단위: 십억 달러). (출처 : Inkwood Research, Global Stem Cell Market Forecast: 2017-2025(2017.4))

○ 조직재생 시장

- 글로벌 조직공학 및 재생시장은 '11년 599억 달러에서 연평균 8.4%로 성장해 '16년 897억 달러 규모로 확대될 것으로 전망됨(그림 36)
- 기존 인공피부 및 골 대체제 개발 등을 중심으로 한 조직재생 시장이 최근 3차원 세포프린팅 기술 및 줄기세포 연구와의 융합을 통한 3차원 오가노이드 개발로 연구영

역 확대 추세



그림 38. 글로벌 조직공학 및 재생 관련 제품시장 현황
및 전망. (2009-2016년, 단위 : 백만달러)

- 동물실험 대체 및 신약개발 효율화를 위한 글로벌 제약 회사들의 줄기세포 유래 특정 장기세포 활용 확대 추세
- 최근 동물사용 규제가 확대됨에 따라 전 세계적으로 동물실험 대체기술 관련 시장이 확대되는 추세로, 제약사와 줄기세포/바이오 기업 간 줄기세포 모델 개발 공동연구가 활발하게 이루어지고 있음
- 아직까지는 2차원적 줄기세포 수준에서의 모델을 수립하여 신약 독성/효능 평가에 활용하고 있으나 향후 3차원 배양시스템을 이용한 오가노이드 모델이 개발되면 신약 개발 위험요소 및 임상시험 축소 등의 이점으로 인해 제약 회사들의 요구가 더욱 증대될 것으로 예상됨
- 연구기관 및 대학을 중심으로 다양한 벤처 형태의 기업들이 인공 장기를 제작하고 있음. 미국 보스턴에 본사를 둔 기업 HART(Harvard Apparatus Regenerative Technology)는 환자의 골수세포에서 채취한 줄기세포를 증식시키는 방식을 이용하여 인공 장기를 제작하고 있음

2.5. 국내 산업 및 시장 동향

2.5.1. 단일세포 분석 장비 및 시약 시장 동향

- 국내는 주로 외국에서 개발한 장비 및 실험 방법을 도입하여 연구자들에게 서비스를 제공하는 것이 현실적인 상황임. 디엔에이링크(DNA Link, Inc)는 PacBio 시퀀싱을 이용하여 단일세포에서 Full-length Transcriptome 분석이 가능한 RNA-isoform 시퀀싱을 서비스하고 있고, 테라젠이텍스 (Theragen Etex Co.)는 10X Genomics의 Chromium을 도입하여 올해부터 단일세포 전사체 분석 서비스를 제공할 예정임
- 삼성서울병원의 삼성유전체연구소에서는 단일세포 유전체 생성과 분석을 세팅하고 자체 연구용으로 현재 임상결과를 발표하고 있음

2.5.2. 오가노이드 시장 동향

- 국내 오가노이드 연구의 실용화 실적은 아직 미비하나, 일부 세포 기반 조직재생용 제품이 상용화되어 판매 중임
- 메디포스트의 연골재생용 치료제가 세계 최초로 품목허가 받아 시판 중. 카테스탐은 동종 제대혈유래 줄기세포와 반고체형의 고분자인 히알루론산-하이드로겔을 섞어 이식하는 형태의 복합 관절염 치료제로, 현재 말기 관절염 환자의 치료제로 사용 중임

표 9. 상용화된 조직재생용 국내제품 현황

종류	제품명	제조회사	특징
뼈	RMS Ossron	세원셀론텍	자가 골세포
연골	Cartistem	메디포스트	동종 제대혈 유래 중간엽 줄기세포/ 반고형 고분자
배양피부	Hyalograft 3D	한스바이오텍	자가표피형성세포/히알루론산막

(출처 : 2015년 BioINpro 16호, 바이오장기 및 생체조직공학 연구동향, 바이오인)

- 오가노이드 융합 기술로써 생체재료 분야의 국내 시장은 초보적인 수준이나 의료용 재료 등 일부 제품은 국산화가 빠르게 진행되고 있음
- 생체재료 분야와의 오가노이드 융합기술은 현재 정형화되지 않은 상태로, 향후 새로운 개념의 제품, 새로운 산업의 원천기술을 확보하며, 우리나라의 고부가가치 산업을 이끌어갈 수 있는 중요한 기술로 자리매김할 것임
- 인공 장기는 최근 국내 병원 및 대학을 중심으로 실제 치료에 활용 중임
- 삼성서울병원 이비인후과에서 수술에 의한 부작용을 막기 위하여 국내 최초로 3D 프린터 활용 중, 포항공과대학교와 서울 성모병원에서는 태어날 때부터 코와 콧구멍이 없던 몽골 소년에게 3D 프린터로 제작한 인공 코와 콧구멍을 이식함

표 10. 국내 바이오 인공 장기 업체

치료제	회사	단계
자가연골 세포치료제	셀론텍	콘드론 (시판허가)
	듀플로젠	아티셀 (시판허가)
항암면역 세포치료제	크로아젠	크레아백스 (임상시험)
	이노셀	—
	파미셀	—
췌도 세포치료제	한국췌도이식	증식성 췌도 (임상시험신청)
제대혈	라이프코드	—
	메디포스트	—
	히스토스탐	—
	녹십자라이프라인	—

	보령아이맘셀뱅크	—
	아이코드	—
	셀론택베이비셀	—
배양피부	엠티티	BAS I, BAS II, BAS III
	테고사이언스	홀로덤 (시판허가), 칼로덤 (시판허가신청)
	바이오랜드	AmnisSite-Skin, AmnisSite-Cornea
지지체	덴키스트	Charm Foam
	이노테크메디칼	InnoPol
	리젠바이오텍	xtopore
	바이오메드랩	—
	오스코텍	OsteoPeak
	태산솔루션즈	—
유전자 조작 동물 복제	엠젠바이오	o-gal 결핍 돼지 개발, 형광 발현 돼지 개발
	조아제약	—

(출처 : 2017 미래유망기술 프로그램 03 인공 장기 바이오, 한국연구재단)

- **국내 산업 환경의 문제점:** 국내 3D 배양 및 오가노이드 관련 연구개발 및 제품 파이프라인 확대를 위해서는 국내 산업기술 수준의 상향 추진이 필요. 오가노이드 관련 3D 배양 기술 및 제품 개발 분야는 미개발 상태로, 향후 시장 증대가 예상되며 이에 국산화가 시급함
- 아직까지 비용 및 전문적 기술 측면에서 해결해야 할 부분이 많으며 따라서 잠재 기술력 향상에 대한 불확실성 존재. 현재 대부분의 생체재료 제품은 해외의 대기업이 전 세계 시장을 점유하고 있으며, 국내 생체재료 관련 기업은 대부분 중소기업으로 국가적 투자와 집중 육성 필요함
- 생체재료의 경우 수입된 고가의 소재를 이용하여 제품화하고 있어 원자재비의 비율이 높으므로 국내 완제품 생산 업체의 사업적 부담이 크고 활성화에 제한됨. 국내기업의 골질환 치료 및 심혈관용 등의 생체재료 세계시장 점유율은 0%에 가까움 (출처: 지식경제부, 'WPM 바이오메디컬 소재 기획보고서', 2010)

2.6. 특허 분석

2.6.1. 국제특허 분석

○ 검색어 : Single Cell Analysis, Genome

- 총 1467건의 특허 공개 및 등록 확인
- 국가별 특허 최다 출원은 중국, 미국, PCT, 유럽 순이며 한국은 3건으로 10위임

- 1990년대 후반부터 출원 건수 급격히 증가함(그림 37)
- IP 경쟁력 분석 결과 기술영향력과 시장지배력 수준에서는 (i) Immunomedics Inc (항체치료제 개발사) (ii) Chemimage Corp(의료장비 개발사) (iii) Amnis Corp(실험용 이미징 장비사)가, 기술영향력과 점유율면에서는 (i) TOA Medical Electronics (Sysmex UK), (ii) Amnis Corp, (iii) General Electron Company, (iv) Tripath Imaging Inc(의료장비사), (v) Abbot Point of Care Inc(의료장비사)가 우세를 보임
- Immunomedics의 경우 항암제 개발을 위한 항체와 약물의 immunoconjugate의 특허가 주를 이루며, Chemimage는 라만 현상을 이용한 비선형 이미징을 이용한 암 진단과 관련된 특허가 주를 이루고 있음
- Amnis는 Imaging flow cytometer를 이용한 단일세포 분리 및 이미징 기술을 보유하고 있어, 세포내 특정 단백질 혹은 생분자를 검출하는데 유용하나, 다양한 단백질 혹은 전사체를 동시에 검출하는 기술은 아님
- Sysmex는 유전자, 단백질, flow cytometry를 이용한 세포 검출 등 in vitro 진단 관련 다양한 플랫폼 기술을 가지고 있어, 단일세포 이미징을 이용한 다양한 생분자 분석 관련 기술을 개발할 수 있는 잠재력을 지닌 회사로 생각됨
- 인체 단일세포 유전체 관련 특허 부문에서는 암 조기 진단 kit 개발사인 진뉴스 사 (GeneNews Inc)가, 비영리 단체로는 파스퇴르연구소(Institute Pasteur)의 경쟁력이 두드러짐



그림 39. 단일세포 유전체 분석에 관한 국제특허

○ 검색어 : Single Cell Analysis, Imaging

- 총 2905건의 특허 공개 및 등록 확인
- 국가별 특허 최다 출원은 중국, 미국, PCT, 유럽 순이며 한국은 3건으로 10위임(그림 38)



그림 40. 단일세포 이미징 분석에 관한 국제특허

- 1990년대부터 출원건수 급격히 증가함
- IP 경쟁력 분석 결과 기술영향력과 시장지배력 수준에서는 (i) Immunimedics Inc (항체치료제 개발사) (ii) Chemimage Corp(의료장비 개발사) (iii) Amnis Corp(실험용 이미징 장비사)가, 기술영향력과 점유율면에서는 (i) TOA Medical Electronics, (ii) Amnis Corp, (iii) General Electron Company, (iv) Tripath Imaging Inc(의료장비사), (v) Abbot Point of Care Inc(의료장비사)가 우세를 보임
- 대체적으로 의료장비 및 진단 시스템 개발 관련 산업에서 높은 경쟁력을 보이고 있으나, 캘리포니아 대학 (U of California)을 포함한 학계의 지식재산권 점유율도 상당한 비중을 차지하고 있음

○ 검색어 : 오가노이드

- 오가노이드 관련 특허 등고선 분석: 특허의 텍스트 마이닝을 통하여 연구 주제들을 분석해 보면 주요한 연구 주제들을 분석할 수 있기 때문에 아래와 같이 특허 등고선 분석을 통해 살펴본 오가노이드, 조직 및 장기재생 분야 기술개발 동향은 크게 원천 기술 측면의 장기 형성, 조직재생 관련 특허군과 응용기술 측면의 질환치료 적용 관련 특허군으로 나뉨
- 세부적으로 원천기술 측면에서는 줄기세포, 전구세포 등 줄기세포 활용 관련 특허와 조직공학 관련 기술개발 관련 특허들로 군집을 형성하고 있음
- 질환치료 적용 기술개발은 뇌신경질환, 신장, 폐, 피부질환 등 적용 가능한 다양한 질환에 대해서 특허들이 출원되고 있음



그림 41. “Single cell RNA Sequencing”관련 특허 출원인 분석

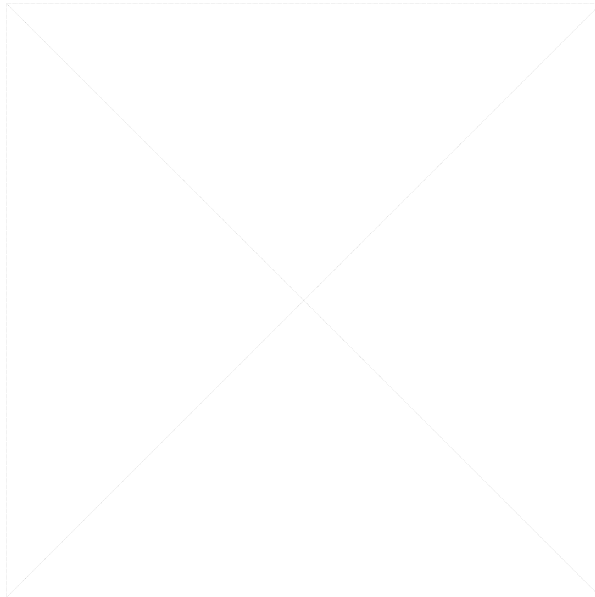


그림 42. “Single cell RNA Sequencing”관련
특허 키워드 분석



그림 43. 오가노이드 분야 특허등고선

- 2014-2015년 발표된 줄기세포 관련 논문을 분석하면, 줄기세포치료제, 질환모델링, 오가노이드 연구가 관심 연구주제로 부각됨을 알 수 있음
- 2차원적으로 만든 세포조직에 비해 3차원 오가노이드는 실제 인체 조직과의 유사성이 검증되면서 연구가 더욱 활발해 지고 있음(그림 42)



그림 44. 줄기세포 연구 분야 논문등고선 ('14~'15년)

2.6.2. 국내특허

○ 검색어 : 단일세포

- 총 51건의 특허 공개 및 등록 확인 (등록 40건, 출원 및 심사 11건)
- 단일세포를 핵심어로 하는 특허 출원은 2001년부터 시작되어 2010년 이후 증가 추세(그림 43)
- 국내 특허의 IP 경쟁력은 한국표준과학연구원, 한국생명공학연구원, 서울대학교를 중심으로 우세를 보임
- 전세계 시장에 비해 단일세포 분석 분야의 지식재산권 규모가 협소함
- 서울대학교, 한국표준과학연구원, 한국생명공학연구원 등의 비영리 연구 기관을 통한 지식재산권 확보가 대다수를 차지함



그림 45. 단일세포 관련 국내 특허 분석

- 서울대학교 특허의 경우, 단일세포 배양을 위한 미소 유체 세포 배양 장치에 대한 특허가 주를 이룸.
- 한국표준과학연구원의 특허의 경우 라만 현상을 이용한 비선형 광학현미경의 경우가 대부분을 차지하고, 비표지된 분자를 볼 수 있다는 장점이 있으나 주로 지질과 같이 진동 모드가 특정한 분자만 관측이 가능하므로 유전체, 단백질 등을 보기엔 적절하지 않음.
- 한국생명공학연구원의 특허는 서울대학교와 유사하게, 단일세포로 세포를 구획 혹은 분리하는 방법에 관한 것이 주를 이룸.
- 결론적으로, 국내 특허의 경우 단일세포 비선형 이미징 혹은 미세유체칩이나 매쉬, 액적 어레이 등을 이용한 세포 분리 기술로써, 세포내 유전체, 전사체, 단백체를 분석하거나 이미징 하는 기술에 대한 특허는 전무한 상황임.

2.7. SWOT 분석

2.7.1. 인간세포지도 정보 생산 분야

강점(Strength)	약점(Weakness)
- 대형 병원 시스템 연계 다수의 임상 시료 및 임상정보 수집 가능 - 고품질의 시료 수집	- 체계적인 정상 조직 시료 모집 시스템 부재 - 단일세포 유전체 분석 기술 인력 부족 - 단일세포 분석 장비 개발 경험 부족
기회(Opportunity)	위협(Threat)
- 체계적인 정상 시료 모집 시스템 구축 - 정상 및 질병 세포 지도 작성 - 단일세포 유전체 분석 기술 인력 양성 - 단일세포 분석 장비 관련 기술 육성	- 서구인 중심 정상 및 질병 세포지도 작성 - 장비 및 시약에 대한 대외 의존 심화 - 새로운 분석 기술의 해외 의존 심화 - 생명정보 분석 도구 의존 심화

2.7.2. 인간세포지도 정보 분석 분야

강점(Strength)	약점(Weakness)
- 빅데이터에 관련된 최신 기술 개발 경험 - 유전체 빅데이터 분석용 클라우드 시스템 보유 - 다양한 오믹스 데이터의 표준화된 파이프라인 구축 보유	- 생명정보 전문 인력 및 육성체계 부족 - 실험장비의 원천기술 부재로 분석 기술의 창의성 부족 - GPU 기반의 분석 인프라 및 기술 부족
기회(Opportunity)	위협(Threat)
- 연구 장비의 발달로 새로운 정보처리 기술 개발이 대두 - 단일세포 오믹스 분석의 생명정보기술 다양화 - 인공지능을 이용한 최신 알고리즘 구축 필요	- 공개된 HCA와의 차별성 대두 - 선두그룹과의 기술력 격차 - 벤치마크를 위한 참고 데이터 부재

2.7.3. 인간세포지도 정보 저장 및 공개 분야

강점(Strength)	약점(Weakness)
대용량의 유전체 데이터 저장 및 관리 인	글로벌 인프라에 비해 상대적으로 낮은 경

프라 보유 • 유전체 연구 성과물과 정보 연계 시스템 보유 • 유전체 정보의 체계적인 통합관리 구축을 위한 지속적 사업 추진으로 국가적 허브 기반 구축	경쟁력 • 유전체 정보 자원의 활용 기반 강화 필요
기회(Opportunity)	위협(Threat)
• 단일세포 유전체 정보 공유의 국제적 필요성 증가 • 범부처 차원의 유전체 정보공유 체계 활성화 • 국가연구개발 사업에서 생산된 유전체 정보 공동 활용 촉진	• 개인 정보보호 및 국가 정보 유출에 대한 정부 규제 • 민간 기업에서 제공하는 서비스와의 경쟁력 • 오픈 소스 프로젝트

3. 연구 사업 추진 계획

3.1. 추진 목표 및 연구내용

3.1.1. 추진목표

- (목표/성과물) 암을 비롯한 만성 난치성 질환 환자 유래 조직의 **단일세포 수준** 오믹스 분석을 통한 질환 특이적 **질병세포지도** 생산과 이를 기반으로 한 **초정밀의료 구현**
- (질병에 따른 3차원 세포 지도 생산) 질병의 발생 및 진행에 따른 세포의 상태와 계통 변화에 대한 3차원 세포 지도 생산
- (질병 치료를 위한 초정밀 의료 원천기술 개발) 질환 세포 지도 분석을 통해 질환 원인 규명, 진단 바이오 마커 개발 및 치료 효과 개선 등과 같은 신규 치료법 개발의 원천기술 확보

< 인간세포표준지도의 현재와 미래 >

AS-IS		TO-BE
- 인간게놈 프로젝트, 인간후성유전체 프로젝트, 인간 단백질체 프로젝트 등 다양한 컨소시엄을 통해 인체 조직 수준에서 다양한 오믹스 정보 생산 - 조직을 구성하는 세포 수준에서 지도 작성을 위한 국제 컨소시엄이 2016년에 시작됨	➡	- 인체 내 모든 세포의 종류, 위치 및 상태를 파악하는 인간세포지도 작성 - 세포 수준의 생리·병리학적 변성을 분석할 수 있는 표준 지표를 제공하여 다양한 질병을 이해하고 치료하는 데 활용

3.1.2. 연구내용 및 범위

- **단일세포 기반의 질병세포지도 생산과 국제 인간세포지도(HCA) 컨소시엄 참여**
 - 암을 비롯한 3종의 난치성 질환 환자 조직의 검출 및 임상적 분석
 - 단일세포 전사체·후성유전체 등의 초정밀 오믹스 분석
 - Super resolution 이미징 기술을 이용한 조직 내 세포 위치 정보 분석
 - 생산된 오믹스 정보와 임상정보를 통합하여 질병세포지도 구축
 - 서로 다른 세포의 상호관계 분석을 통해 세포생태계 내 생리동역학의 지식 확보
 - 질병세포지도 사업 수행 연구자들을 주축으로 인간세포지도 국제 컨소시엄 참가 및 HCA 운영 위원회 활동 등에 대한 전략 수립
 - 일본, 싱가포르 등의 아시아국 연구자들과 협력을 통해 아시아-인간세포지도 컨소시엄 구축 및 협력사업 모색
- **오가노이드 기반 단일세포 분석의 검증 시스템 개발**
 - 인체 모사 오가노이드 기반 단일세포 분석 및 검증 기술 개발
 - 오가노이드 기반 단일세포 분석 결과와 인체 조직 단일세포 분석 결과의 비교 분석을 통한 인간세포지도의 신뢰도를 높일 수 있는 검증 시스템 개발

- 질병 진행에 따른 관련 세포 상태 변화 및 세포 계통 분석을 위한 오가노이드 기반 표준시스템 개발

○ 단일세포 초고속, 대용량 시퀀싱 기술 개발

- Microfluidics 및 NT 기술 접목을 통한 전사체/후성유전체 분석 기술 개발
- 단일세포 단백질체 분석 기술 개발
- 단일세포 이미징 기반과의 호환 또는 연계 가능한 형태의 flexible 시스템 개발

○ 단일세포 이미징 (질량분석, 형광 검출) 기반 고해상도 다중 오믹스 신기술 개발

- 단백질체 및 전사체 프로브 및 표지기술 개발 - 단위 세포당 한 번에 검출 가능한 단백질체 혹은 전사체 수를 획기적으로 늘릴 수 있고, 전사체 및 단백체를 동시에 검출 가능한 새로운 프로브 및 표지기술 개발
- 3차원 단일세포 이미징 기술 개발 - 기존의 한계를 뛰어넘는 고효율, 고감도, 고해상도, automation 가능한 이미징 장비 개발
- 단일 세포 내 단백질체 및 전사체, 후성유전체, 대사체 등의 생분자 검출이 동시에 가능한 이미징 신기술 개발
- 이미징 데이터, 세포 위치에 따른 정보의 통합 분석 및 다중 생분자 검출 기반 멀티플렉스 분석 가능한 소프트웨어 개발

○ 단일세포 생물정보 분석 기술 개발

- 인간세포지도 완성을 위한 생물정보 분석 핵심 알고리즘 및 프로그램 개발 - 데이터 특성에 따른 단일세포 유전체 분석 전산학 신기술 개발, 다양한 단일세포 유전체 정보와 메타데이터 통합 기술 개발
- 인간세포지도 사업의 단일세포 유전체 데이터 분석을 위한 생명정보 신기술을 개발하고 대용량 데이터 처리를 위한 클라우드 컴퓨팅을 통해 표준화된 분석 파이프라인을 개방형 서비스로 지원
- 단일세포 기반의 이미지 데이터 처리 및 분석기술 개발과 정밀한 단일세포 정보 구축을 위한 오믹스 및 위치 정보의 통합분석 기술 개발

○ 단일세포지도 정보 저장 및 공개

- 인간세포지도 사업에서 생산된 데이터의 저장 및 처리를 위한 클라우드 시스템 구축 - 대용량의 단일세포 유전체 데이터 저장 및 검색을 위한 시스템 구축, 표준화된 단일세포 유전체, 전사체, 후성 유전체 분석 파이프라인 구축
- 생산된 데이터와 관련 정보를 즉시 공개하여 국내외 연구자들이 다양하게 활용할 수 있도록 데이터 포털 서비스 구축(특히 HCA의 open data coordination platform에

연동이 가능하거나 부합하는 수준의 정보 공개 플랫폼 구축)

- 데이터와 메타정보를 제공하기 위한 데이터베이스와 시각화 프로그램을 구축하고 새로운 데이터와 통합적인 분석이 가능한 제3의 포털 시스템 개발 및 연동지원

3.1.3. 단계별 추진목표

단계	연구 목표	연구 내용
1단계 (2019 - 2022)	한국인 호발 질환 특이적 질병세포지도 작성 및 세포 기반 바이오마커 발굴	• 암을 비롯한 3종의 한국인 호발 난치성 질환 환자 대상 단일세포 오믹스 지도 생산 - 질환 환자 유래 단일세포 분석용 임상 시료 채취, 보관 및 분석용 전처리 프로토콜 확립 및 표준화 - 단일세포 전사체·후성유전체 정보 생산 - 초고해상도 영상 기술을 이용한 단일세포 위치 추적 - 임상정보와 단일세포 오믹스 통합 분석을 통한 질병세포지도 작성
	국제 HCA 컨소시엄 참여	• 국내 HCA 컨소시엄 구성 및 국제 HCA 참여를 통한 국제 연구 협력체계 구축
2단계 (2022 - 2025)	세포 기반 바이오마커의 유효성 검증 및 진단·치료 기술 기반 확립	• 세포 바이오마커의 임상적 유용성 평가 • 질환 모델(세포주, 동물모델, 오가노이드 등)을 통한 질환 기전 규명 • 질환 특이적 세포 지도를 활용한 신규 치료 기술 기반 확립 • 질환 특이적 세포 지도 활용을 위한 데이터베이스 구축 및 웹 서비스 제공
	국제 HCA 컨소시엄과의 협력 고도화	• 국제 HCA 참여 팀과의 협력 체계 고도화



그림 44. 인간세포지도 사업 로드맵

3.2. 추진 전략 및 체계

3.2.1. 추진전략

○ 인간세포지도 작성을 위한 핵심연구 분야 신규 과제 지원

- 정상 및 질환 인체 조직의 세포 지도 작성을 위한 임상 시료 확보
- 단일세포 유전체 및 후성유전체 분석 기술을 이용하여 선별된 조직과 장기에 위치한 모든 세포들의 분자적 특성 규명
- 단일세포 단백질체 분석 기술 개발(항체 기반 및 질량 분석 기반)
- 단일세포 이미징 (질량분석, 형광 검출) 기반 고해상도 다중 오믹스 신기술 개발
 - 궁극적으로 단일 세포 이미징을 기반으로 세포내 다양한 생분자-유전체, 단백질, 전사체, 대사체 등을 동시에 검출하여 위치정보와 정량정보 및 정성정보를 모두 얻을 수 있는 신기술을 개발
 - 이를 위하여 이미징을 위한 프로브 및 표지 기술, 새로운 이미징 기술 및 데이터 분석 부분으로 구분하고, 현존하는 기술의 한계를 극복할 수 있는 새로운 기술 및 분석 방법 제안
 -
- 인공지능 분야 (데이터 마이닝을 통한 세포의 위치 추정기술 개발)
- 단일세포 오믹스 정보의 새로운 분석 방법, 품질관리 및 통합 분석을 위한 생물정보학 및 전산생물학
- 생산된 정보의 저장, 통합 분석 기술 개발 및 실시간 공개를 위한 정보 인프라 과제
- 질병과 상관관계를 보이는 세포 종류를 발굴하고 질병 연관성을 평가

○ 국내 HCA 컨소시엄 구성 및 국제 HCA 컨소시엄 참여

- 위에서 제시한 신규 과제에 현재 수행 중인 과제 중 컨소시엄 목적에 부합하는 과제들을 포함하여 인간세포지도 연구의 국내 컨소시엄을 구성함
- 국내 HCA 컨소시엄의 총괄 코디네이터 선발 및 사무국 구성
- 국제 HCA 컨소시엄 참여 및 연구 활동

3.2.2. 추진체계

○ 연구과제 구성 체계

- 질병세포 오믹스 지도 연구(3개 팀)
 - 인체 시료 확보 및 처리 기술 개발을 위한 임상 연구 분야
 - 단일세포 유전체 및 후성유전체 정보 생산 분야
 - 단일세포 위치정보 분석을 위한 광학 영상 혹은 질량 분석 분야
- 단일세포 분석 결과 검증을 위한 오가노이드 연구
 - 질환 관련 세포의 기능 평가를 위한 세포/생리 연구
- 단일세포 이미징 및 시퀀싱 기술 개발
 - 단일세포 이미징 기반 유전체 분석을 통한 세포 위치 정보 확보 기술 개발 분야
 - 단일세포 이미징을 기반으로한 고해상도 광학 영상 혹은 질량 분석 분야



그림 45. 우리나라의 HCA 및 HCA-Asia 참여 전략

- 단일세포 오믹스 정보 분석 및 저장 기술 개발
 - 유전체, 이미징, 질량분석 등 다양한 빅데이터를 통합 분석하는 생물정보학 혹은 인공지능 분야 연구 분야
 - 데이터의 저장 및 공개를 담당하는 연구 분야

○ 컨소시엄 참여를 위한 국내 총괄 기구 구성

- 각 분야 연구자들을 아우르는 총괄 기구(기관)를 구성하고 이를 통해 국제 HCA 가입 및 운영 추진



그림 46. 질병세포지도 사업 구성 체계

3.2.3. 소요예산 및 일정

- 3 + 3 년(6년: 2019-25)
- 사업비 80억 내외/년 (총 사업비: 480억)
- 4개 분야: 7-8개 총괄과제 운영
- 각 총괄과제를 연계하는 사무국 운영

3.3. 추진 내용

3.3.1 질병세포지도 구축을 위한 단일세포 오믹스 데이터 생산 및 국제 컨소시엄 참여

- 임상 시료 선정 및 확보: 국내 조직 은행 현황 파악 및 시료 확보 가능성 점검
- 국내 연구진이 강점을 보일 수 있는 난치성 질환 연구 분야 선정
 - 기존에 HCA에서 수행하고 있는 정상 및 질환 조직은 가급적 배제
 - 한국인 호발 난치성 질환(예: 5대 암인 폐암, 간암, 대장암, 유방암, 위암 등) 등 고려
 - 일상적인 건강 검진 등을 통해 조직 시료 확보가 쉬운 조직(예: 위, 대장 내시경 등) 고려
 - HCA-Asia와의 공동 연구를 고려하여 아시아 지역 호발 질환 조직을 우선적으로 고려
- 임상시료의 채취, 보관, 전처리 기술에 대한 프로토콜 확립 및 표준화
- 단일세포/핵 전사체 정보 생산
- 단일세포 이미징 기반 위치 정보 생산
- 질병세포지도 기반 바이오 마커 발굴 및 진단/치료 기술 개발의 기반 확립

3.3.2 인체 장기 오가노이드 세포지도 구축

- 인체유사 오가노이드 제작 및 장기 배양 기술 (주요 장기 (예; 뇌, 장, 간 등) 포함) 및 오가노이드 성숙화 기술 개발
 - 오가노이드 기반 단일세포 오믹스 분석
 - 오가노이드를 활용한 생체시스템/개체 모사 및 질환 모델링 기술을 실제 생체 또는 질환과의 유사성을 단일 세포 수준에서 비교 분석
 - Pseudo-timing 기법을 통해 오가노이드를 이용한 발달 과정 또는 질병 발생 과정에 따른 단일 세포 다이내믹스 분석
 - 오가노이드를 활용한 질환 모델링과 단일 세포 분석을 통해 새로운 치료제 발굴 및 치료제의 효능 및 독성을 단일 세포 수준에서 비교 분석
 - 오가노이드 단일세포 분석을 통한 생체시스템/개체 모사 및 질환 모델링 기술 개발
- ※오가노이드는 인간세포 구조 및 상태와 많이 다를 수 있으므로 현 단계에서는 인간 단일세포 분석으로부터 얻어진 특정 마커 패널의 검증만을 위해서만 적용하는 것이 바람직할 수도 있음

3.3.3 단일세포 이미징(질량분석, 형광 검출)기반 고해상도 다중 오믹스 신기술 개발

- 단백질 및 전사체 프로브 및 표지기술 개발

- 질량분석 이미징: 기존 항체-금속 동위원소 기반 검출 한계를 뛰어넘어 분석 가능한 생분자 개수를 증가 시키는 프로브 및 표지 기술 개발 등
- 형광 이미징: 항체-형광체 소광 방법, 신호대 잡음비 증가 방법, 새로운 표지기술 개발 등
- 단백질, 전사체, 에피지놈 등의 생분자 동시 검출 가능한 새로운 표지 기술 개발
- 향상된 3차원 단일세포 이미징 기술 개발
 - 기존 검출 한계 극복하는 새로운 기술 개발
 - 고효율 - 이미징 시간 단축, 단위 시간당 검출 가능한 세포 개수
 - 고감도 - 신호대 잡음비 개선을 위한 이미징 방법 개선
 - 고해상도를 위한 super-resolution microscope, 조직 팽창 혹은 투명화 기술 접목 등
 - 생물학자들이 쉽게 이용 가능한 automation 기술 등
- 단일 세포 내 단백질 및 전사체, 후성유전체, 대사체 등의 생분자 검출이 동시에 가능한 이미징 신기술 개발
- 차세대 질량 분석 기반의 단일세포 분석 기술 개발(1000개 이상 단백질 동시 분석 기술)
- 이미징 데이터 분석, 세포 위치에 따른 정보의 통합 분석 및 다중 생분자 검출 기반 멀티 플렉스 분석 가능한 소프트웨어 개발
- 제안된 기술의 개별세포 수준 확인 및 현존하는 기술과의 비교를 통한 유효성 검증
- 고도화된 공간 분석 기술 기반 개별세포 특이성 확인 검증
- ※ 이미징 기반 단일 세포 분석은, discovery를 위한 profiling에서 단일세포 오믹스 분석만큼의 coverage 및 신빙성 있는 정보를 얻기 위해서는 많은 기술 개발이 필요해 보임
- ※ 현 단계에서는 인간 단일세포 분석으로부터 얻어진 특정 마커 패널의 검증을 위해서만 적용하는 것이 바람직할 수도 있음

3.3.4 단일세포 생물정보 분석 기술 개발

- 단일세포 유전체, 전사체, 후성 유전체 분석 기술 개발
- 다양한 멀티 오믹스 데이터의 통합 분석 기술 개발
- 대용량 데이터 처리를 위한 컴퓨팅 기술 개발
- 이미징 데이터 분석을 위한 GPU 컴퓨팅 기술 개발
- 세포 분류를 위한 유전자 조절 네트워크 분석 기술 개발
- 개발된 분석 프로그램의 성능비교 분석을 통한 최적화된 파이프라인 구축
- 클라우드 컴퓨팅을 통해 표준화된 분석 파이프라인 개방
- 단일세포 오믹스 및 위치 정보의 통합분석 및 데이터마이닝, 인공지능 활용 생물정보 기술 개발

3.3.5. 단일세포지도 정보 저장 및 공개

- 대용량 데이터 정보의 저장 및 처리를 위한 하드웨어 인프라 구축

- 데이터 저장용 대용량 스토리지 및 백업 시스템 구축
- 바이오 빅데이터 관리를 위한 클라우드 컴퓨팅 시스템 구축
- 단일세포 유전체 정보 공유를 위한 통합관리 포털 서비스 구축
- 인간세포지도 정보통합 3차 데이터베이스 구축 및 운영시스템 개발
- 인간세포지도 정보 공개를 위한 데이터 포털 서비스 구축
- 통합적인 데이터 정보 전달을 위한 시각화 플랫폼 개발
- 단일세포 데이터 특성에 따른 메타 데이터 정보 등록 표준안 수립

3.4. 사업 추진을 위한 과제제안서(RFP)

RFP번호	
연구 분야	단일세포 유전체 기반 인체 장기의 정상-질병 세포지도 작성
1. 연구목표	○ 최종목표 : 인간세포지도 작성을 위한 국제협력 기반의 한국인 세포지도 작성 및 질병 특이적 치료표적 발굴 ○ 1단계 목표('19~'21) - 인체 특정 장기의 정상 및 1종 이상 질병 상태 시료 확보와 국제협력 플랫폼 구축 - 세포지도 작성을 위한 단일세포 유전체 기반 다중 분석 프로토콜 개발과 데이터 생산 ○ 2단계 목표('22~'24) - 정상-질병 세포지도 비교를 통한 질병 특이적 치료타겟 발굴
2. 연구내용 및 범위	○ 1 단계('19~'21) • 세포지도 작성을 위한 정상-질병군 특정 장기 확보 • 장기 내 모든 주요 세포 유형을 포함하는 단일세포 전사체 데이터 생산 • 장기 내 세포의 위치정보를 포함한 유전체 또는 단백체 데이터 생산 • Human cell atlas 국제 컨소시엄과 데이터 공유 및 분석 프로토콜 표준화를 위한 협력체계 구축 ○ 2 단계('22~'24) • 국제협력체계 고도화 • Massively parallel RNA 시퀀싱과 위치 데이터 통합 분석 및 세포 지도 작성 • 정상과 질병 세포 비교를 통한 질병 특이적 치료표적 발굴
3. 성과목표	○ 성과 창출 및 성과 활용·확산 지표 및 목표치 - (1, 2단계/과학적 성과) : 세포지도 작성 국제 협력 체계 구축, SCI 논문(JCR 상위 5%) - (1, 2단계/기술적 성과) : 국제특허 ○ 지원성과 및 기여효과 : 국제협력 플랫폼 구축을 통한 한국인 세포지도 작성 질병 특이적 치료표적 발굴
4. 특기사항	○ 총 연구기간은 6년(3+3)임 ○ RFP 상의 “연구내용 및 범위” 전체를 포함하여 총괄과제 형식으로 진행하고, 총괄과제 책임자는 세부과제(세부과제 수는 2개 이상) 책임자를 겸함 ○ 재정상황 등에 따라 연구비 및 기간은 조정 가능하며, 이에 준하여 연구내용은 변경될 수 있음 ○ 단계평가 후 계속지원 여부를 결정하고, 연구기간, 연구예산 및 연구내용은 변경될 수 있음 ○ Human cell atlas asia와 구체적인 협력 추진계획을 제시하여야 함 ○ 연구에서 도출된 유전체 정보는 KOBIC에 등록하여야 함. ○ 임상 시료를 이용하므로 기관생명윤리위원회(IRB)의 승인을 받아야 함 ○ 기존 HCA 컨소시엄과 중복되는 정상 조직 및 질병 검체에 대한 데이터 구축 사업은 지양함 ○ 연구비로 단일세포 분석 장비 구매를 지양함 ○ 연차 평가 및 계속 지원 여부의 핵심 평가 지표는 생산된 데이터 공개 여부임
5. 2019년 예산	40억 원 내외 (총괄과제 4개 내외)

RFP번호	
연구 분야	오가노이드 세포지도 구축을 위한 인체 장기 모델링
1. 연구목표	○ 최종목표 : 오가노이드 기술 고도화를 통한 인간세포지도 구축을 위한 인체 장기 모델 구축 ○ 1단계 목표('19~'21) - 조직/장기-특이적 인체모방 오가노이드 제작 및 기능 향상 기술 고도화 - 오가노이드에서 단일세포 분리 기술 - 오가노이드 성숙화를 통한 조직/장기-특이적 세포다양성 확보 기술 ○ 2단계 목표('22~'24) - 인간세포지도를 위한 복합/다장기/질환 생체시스템 모사 기술
2. 연구내용 및 범위	○ 1 단계('19~'21) • 인체유사 오가노이드 제작 및 장기 배양 기술 (주요 장기 (예; 뇌, 장, 간 등) 포함) • 장기-특이적 세포 다양성 확보를 위한 오가노이드 성숙화 및 기술 고도화 • 오가노이드에서 단일세포 분리 기술 • 오가노이드 기능평가/특성분석을 통한 인체 장기 유사도 평가 기술 • 오가노이드 기반 단일세포 오믹스 분석 ○ 2 단계('22~'24) • 오가노이드 기반 개인맞춤형 다장기 모델링 기술 • 오가노이드 기반 생체시스템/개체 모사 기술 • 오가노이드 기반 질환 모델링 기술 • 개인맞춤형 장기모델링을 통한 단일세포 오믹스 분석
3. 성과목표	○ 성과 창출 및 성과 활용·확산 지표 및 목표치 - (1, 2단계/과학적 성과) : SCI 논문 (IF>10, JCR 상위 5%) - (1, 2단계/기술적 성과) : 국제특허 - (1, 2단계/경제적 성과) : 기술이전 ○ 지원성과 및 기여효과 : 오가노이드 세포지도 구축을 통한 기초, 중개, 임상 연구 활성화
4. 특기사항	○ 총 연구기간은 6년(3+3)임 ○ RFP 상의 “연구내용 및 범위” 전체를 포함하여 총괄과제 형식으로 진행하고, 총괄과제 책임자는 세부과제(세부과제 수는 2개 이상) 책임자를 겸함 ○ 기존 유사과제 수행 또는 참여하고 있는 경우는 중복지원을 지양함 ○ 재정상황 등에 따라 연구비 및 기간은 조정 가능하며, 이에 준하여 연구내용은 변경될 수 있음 ○ 단계평가 후 계속지원 여부를 결정하고, 연구기간, 연구예산 및 연구내용은 변경될 수 있음 ○ (전)임상 또는 인간 유래 시료를 이용하는 경우 동물실험윤리위원회(IACUC) 또는 기관생명윤리위원회(IRB)의 승인을 받아야 함 ○ 기존 HCA 컨소시엄과 중복되는 정상 조직 및 질병 검체에 대한 데이터 구축 사업은 지양함 ○ 연구비로 단일세포 분석 장비 구매를 지양함 ○ 연차 평가 및 계속 지원 여부의 핵심 평가 지표는 생산된 데이터 공개 여부임
5. 2019년 예산	5억 원 내외 (총괄과제 1개 내외)

RFP번호	
연구분야	이미징 기반 고해상도 단일세포 다중 분자 맵핑 기술 개발
1. 연구목표	○ 최종목표: 단일 세포 내 다중 분자 맵핑이 가능한 고도의 공간 분해능 이미징 시스템 개발 ○ 1 단계 목표 ('19 ~ '21) 이미징 기반 단일세포 다중 분자 맵핑 기술 개발 및 유효성 검증 ○ 2 단계 목표 ('22 ~ '24) - 단일세포 이미징 기반 다중 분자 맵핑 기술 고도화 - 질병 모델 오믹스 분석 기반 진단 및 치료전략 확보
2. 연구내용 및 범위	○ 1 단계 ('19 ~ '21): - 조직에 적용 가능한 단일 세포 단백질 혹은 전사체 프로브 기술 개발 - 조직에 적용 가능한 프로브 표지 및 회수 기술 개발 - 현존하는 이미징 기반 단일 세포 오믹스 분석 기술의 분해능 및 처리량 한계 극복 기술 개발 - 단일 세포 다중 분자 지도 구축을 위한 Bioinformatics 기술 개발 - 제안 기술에 대한 개별 세포 및 배양 세포층 수준에서의 유효성 비교 검증 ○ 2 단계 ('22 ~ '24): - 고해상도 이미징 기반 단일 세포 오믹스 분석 기술의 조직수준 적용 및 검증 - 고도화된 공간 분석 기술 기반 개별세포 특이성 확인 검증 - 질환모델 대상 개별세포 수준의 세포 특이성 발굴 및 정상세포와의 비교를 통한 타겟 후보 발굴 - 세포 혹은 동물 수준에서 발굴된 타겟 후보를 이용한 진단 혹은 치료 가능성 검증
3. 성과목표	○ 성과 창출 및 활용 목표치 - (1/2단계 과학적 성과) : SCI급 논문(JCR 상위 10%이내) - (1/2단계 기술적 성과) : 국제특허 - (1/2단계 경제적 성과) : 기술이전 ○ 지원성과 및 기여효과 : 이미징 기반 단일 세포 분자 맵핑 시스템 개발을 통한 효율성 제고 및 상용화를 통한 시장 개척
4. 특기사항	○ 총 연구기간은 6년(3+3)임 ○ RFP 상의 “연구내용 및 범위” 전체를 포함하여 총괄과제 형식으로 제안하고, 총괄과제 책임자는 세부과제(세부과제 수는 2개 이상) 책임자를 겸함 ○ 연구비 및 기간은 조정 가능하며, 이에 준하여 연구내용은 변경될 수 있음 ○ 연차/단계평가 후 계속지원 여부를 결정하고, 연구기간, 연구예산 및 연구내용은 변경될 수 있음 ○ 본 과제에서 도출된 데이터 및 분석 파이프라인은 KOBIC에 등록/이관하여야 함 ○ 연구에서 개발된 소프트웨어는 한국저작권위원회 또는 정보통신산업진흥원에 등록하여야 함. ○ (전)임상 또는 인간 유래 시료를 이용하는 경우 동물실험윤리위원회(IACUC) 또는 기관생명윤리위원회(IRB)의 승인을 받아야 함 ○ 기존 HCA 컨소시엄과 중복되는 정상 조직 및 질병 검체에 대한 데이터 구축 사업은 지양함 ○ 연구비로 단일세포 분석 장비 구매를 지양함 ○ 연차 평가 및 계속 지원 여부의 핵심 평가 지표는 생산된 데이터 공개 여부임
5. 2019년 예산	총 20억 원 내외 (총괄과제 2개 내외)

RFP번호	
연구분야	생명정보학 기반 단일세포 분석 기술개발
1. 연구목표	○ 최종목표: 인간세포지도 사업의 대용량 오믹스 데이터 생산과 분석을 지원하기 위한 시스템 구축과 고해상도 데이터를 처리를 위한 신기술 개발 ○ 1 단계 목표 ('19 ~ '21) - 다양한 단일세포 오믹스 데이터 분석 핵심 알고리즘 개발 및 통합 분석 - 이미징 데이터를 통한 세포 위치 분석기술 개발 ○ 2 단계 목표 ('22 ~ '24) - 인간세포지도 완성을 위한 단일세포 데이터 분석의 표준 파이프라인 구축 - 인공지능 기술을 통한 세포 타입 분류, 상호 작용과 계통 추정 기술 개발
2. 연구내용 및 범위	○ 1 단계 ('19 ~ '21): - 단일세포 유전체, 전사체, 후성 유전체 분석 기술 개발 - 다양한 멀티 오믹스 데이터의 통합 분석 기술 개발 - 대용량 데이터 처리를 위한 컴퓨팅 기술 개발 - 이미징 데이터 분석을 위한 GPU 컴퓨팅 기술 개발 - 세포 분류를 위한 유전자 조절 네트워크 분석 기술 개발 ○ 2 단계 ('22 ~ '24): - 개발된 분석 프로그램의 성능비교 분석을 통한 최적화된 파이프라인 구축 - 클라우드 컴퓨팅을 통해 표준화된 분석 파이프라인 개방 - 단일세포 오믹스 및 위치 정보의 통합분석 및 데이터마이닝, 인공지능 생물정보 기술개발
3. 성과목표	○ 성과 창출 및 활용 목표치 - (1/2단계 과학적 성과) : SCI급 논문(JCR 상위 10%이내) - (1/2단계 기술적 성과) : 국제특허 - (1/2단계 경제적 성과) : 기술이전 ○ 지원성과 및 기여효과 : 인간세포지도 사업의 고도화 및 단일세포 유전체 생물정보 분석에 광범위하게 활용되어 유전체 연구의 국제적 지위 향상에 기여
4. 특기사항	○ 총 연구기간은 6년(3+3)임. ○ RFP 상의 “연구내용 및 범위” 전체를 포함하여 총괄과제 형식으로 제안하고, 총괄과제 책임자는 세부과제(세부과제 수는 2개 이상) 책임자를 겸함. ○ 연구비 및 기간은 조정 가능하며, 이에 준하여 연구내용은 변경될 수 있음. ○ 연차/단계평가 후 계속지원 여부를 결정하고, 연구기간, 연구예산 및 연구내용은 변경될 수 있음. ○ 본 과제에서 도출된 데이터 분석 파이프라인은 KOBIC에 등록/이관하여야 함. ○ 연구에서 개발된 소프트웨어는 한국저작권위원회 또는 정보통신산업진흥원에 등록하여야 함. ○ (전)임상 또는 인간 유래 시료를 이용하는 경우 동물실험윤리위원회(IACUC) 또는 기관생명윤리위원회(IRB)의 승인을 받아야 함.
5. 2019년 예산	총 10억 원 내외 (총괄과제 2개 내외)

		RFP번호	
연구분야	단일세포지도 정보 관리 및 활용 서비스 기반구축		
1. 연구목표	○ 최종목표: 인간세포지도 사업의 대용량 데이터 저장과 처리를 위한 시스템 구축과 활용 서비스를 위한 운영기술 개발 ○ 1 단계 목표 ('19 ~ '21) - 단일세포 데이터 저장 인프라 구축 및 데이터 관리 시스템 구축 ○ 2 단계 목표 ('22 ~ '24) - 인간세포지도 정보공개를 위한 데이터 분석 플랫폼 개발 및 활용체계 구축		
2. 연구내용 및 범위	○ 1 단계 ('19 ~ '21): - 대용량 데이터 정보의 저장 및 처리를 위한 하드웨어 인프라 구축 - 데이터 저장용 대용량 스토리지 및 백업 시스템 구축 - 유전체 데이터 관리를 위한 클라우드 컴퓨팅 시스템 구축 - 단일세포 유전체 정보 공유를 위한 통합관리 서비스 구축 - 인간세포지도 정보통합 2차 데이터베이스 구축 및 운영시스템 개발 ○ 2 단계 ('22 ~ '24): - 인간세포지도 정보 공개를 위한 데이터 포털 서비스 구축 - 통합적인 데이터 정보 전달을 위한 시각화 플랫폼 개발 - 단일세포 데이터 종류에 따른 정보 등록 표준안 수립		
3. 성과목표	○ 성과 창출 및 활용 목표치 - (1/2단계 과학적 성과) : 국내 연구 성과물관리 및 공개체계 구축, SCI 논문(JCR 상위 10%) - (1/2단계 기술적 성과) : 국제특허 - (1/2단계 경제적 성과) : 기술이전 ○ 지원성과 및 기여효과 : 인간세포지도 정보 공유를 통한 효율적인 연구 생태계 조성 및 단일세포 정보 활용의 국제 경제력 강화		
4. 특기사항	○ 총 연구기간은 6년(3+3)임. ○ RFP 상의 “연구내용 및 범위” 전체를 포함하여 총괄과제 형식으로 제안하고, 총괄과제 책임자는 세부과제(세부과제 수는 2개 이상) 책임자를 겸함 ○ 연구비 및 기간은 조정 가능하며, 이에 준하여 연구내용은 변경될 수 있음 ○ 연차/단계평가 후 계속지원 여부를 결정하고, 연구기간, 연구예산 및 연구내용은 변경될 수 있음 ○ 본 과제에서 도출된 데이터 관리 시스템은 KOBIC에 등록/이관하여야 함 ○ 연구에서 개발된 소프트웨어는 한국저작권위원회 또는 정보통신산업진흥원에 등록하여야 함		
5. 2019년 예산	총 5억 원 내외 (총괄과제 1개 내외)		

4. 기대효과 및 활용방안

4.1. 과학기술적 기대효과



그림 47. 인간세포지도의 활용 분야

- (질병 치료표적 발굴) 세포 수준에서의 유전체/전사체 변이 분석을 통해 치료 표적이 되는 세포군 발굴
- (세포재생 표준지표 제시) 세포 재생공학을 통해 생산한 세포, 조직, 장기들이 성공적으로 만들어졌는지 확인할 수 있는 분자지표 제시
- (질병 기전 규명 연구) 질병 관련 세포의 병리적 이상을 규명하고 조직 및 장기에서 다른 세포와의 상호관계를 이해하는 연구의 토대 마련
- (신약 개발) 세포 종류 및 분화 단계별 특징적인 유전표지 발굴을 통해 신약 스크리닝에 활용

- (독성 확인) 세포 종류별 유전자 발현 양상 파악을 통해 인체 시스템에 공급되는 약물의 부작용 예측 가능
- (약물 효능 및 내성 예측) 세포 간 상호작용에 대한 분석을 바탕으로 표적 세포와 주변 세포의 반응을 포괄하는 세포-생태적 약물반응성 예측 가능
- (진단) 인체 내 모든 세포 종류에 대한 정보를 통해 질병 진단의 지표로 활용 가능
- (융합 연구 활성화) 단일세포 분석 기술, 세포 및 조직 이미징 기술, 빅데이터 분석 기술, 임상 활용 기술 등 다양한 분야 전문가들의 융합 연구 활성화(그림 48)



그림 48. 다학제 학문 분야의 융합 연구 활성화

- (국제 협력 강화) 신생 국제 컨소시엄 참여를 통한 국제 협력 강화, 국내 연구 경쟁력 제고 및 국내 과학계의 국제적인 위상 강화
- (이미징) 세포내 공간적 정보 뿐 아니라 조직 내 공간적 정보를 동시에 얻을 수 있는 유일한 방법으로, 세포 이질성에 대한 연구 및 이를 바탕으로 한 생명현상의 이해, 더 나아가 질병 치료의 근간이 될 수 있음
- 질병 치료의 예를 들면, 암 조직 내 다양한 세포들— 암줄기세포, 암섬유아세포, 대식세포와 같은 면역세포, 중간엽 줄기세포 등의 공간적 분포 및 이들 간의 상호작용 및 단백질, 전사체, 대사체 등의 발현 정도 차이를 근본적으로 밝힐 수 있고, 약물에

의한 이들 세포간의 반응 차이를 살펴본다면 이를 이용한 새로운 선택적 세포 사멸 항암제를 모색 가능함.

- 발달 과정을 예를 들면, 조직 혹은 오가노이드 내에서 특정 세포들의 분열, 분화 과정을 시, 공간적으로 분석하고 이들의 단백질, 전사체, 대사체 등의 변화에 따라 조직 내 특정 세포의 이동 및 분화가 조절됨을 밝힌다면 세포의 기능에서부터 생명현상을 새롭게 이해할 수 있는 근간이 될 수 있음.
- (생물정보 분석 플랫폼 제공) 인간세포지도 완성을 위한 단일세포 유전체 데이터 분석기술 개발을 통해 선진국에 비해 취약한 단일세포 유전체 정보 분석 기술을 대등한 수준으로 향상
- 이를 제공하기 위한 클라우드 기반의 바이오 빅데이터 활용 플랫폼을 바탕으로 손쉬운 정보 공유를 통해 연구 효율 증대에 기여하고 다양한 종류의 통합 분석 시스템을 제공하여 맞춤형 연구지원 인프라 제공

4.2. 경제사회적 파급효과

- 신약 타겟 발굴, 인체 독성 예측, 약물 효능 및 부작용 예측 등 신약 개발 여러 분야에서 신약의 성공 가능성을 높임
- 정교한 세포 지도를 이용한 세포 분화 과정 확립으로 조직 재생의학 분야의 산업적 성장 촉진
- 단일세포 유전체 분석 분야의 시장 성장 촉진
- 단일세포 이미징 기술은 기술적 개발상태가 아직 초기 단계이므로 우리나라 전문가들이 적극적으로 참여할 수 있는 연구 과제 및 사업이 도출된다면, 우리나라가 기술적 우위를 차지할 수 있는 좋은 기회가 될 수 있음
- 또한 아직 상용화된 장비나 기술이 존재하지 않으므로 원천 기술 개발이 가능하다면 새로운 시장을 개척함으로써 산업적 성장 촉진 가능
- 대용량 유전체 정보를 기반으로 하는 바이오 빅데이터 관련 사업에 기본적인 데이터 제공 및 활용에 유용하며 대용량 데이터 분석을 위한 원천기술을 확보를 바탕으로 산업화에 기여 가능

4.3. 활용 분야

- 제약, 진단 기술, 바이오 의학 및, 암 예방 분야 등 다양한 분야 활용
- 세포 수준에서의 새로운 표적 발굴을 통한 신약 개발, 세포 종류별 독성 확인을 통한 인체 내 부작용 예측, 세포 간 상호 작용을 통한 약물 반응성 예측 등 신약 개발의 여러 단계에서 활용 가능(그림 49)
- 질병별 세포 수준 마커 발굴을 통한 새로운 진단법 개발에 활용 가능
- 각 장기별 세포 지도는 재생의학 분야에서 줄기세포로부터 새로운 장기/조직을 만드는

데 중요한 정보로 활용 가능

- 세포 수준의 유전체 빅데이터의 통합적 관리와 분석 및 공유에 활용할 수 있는 국가적 인프라를 제공하여 유전체 정보의 공공 활용 및 사업화 연계 증대
- 대용량 유전체 정보 생산이 수반되는 바이오·의료 분야 최초의 연구사업을 전방위로 지원하기 위한 공동활용 서비스 기반 제공
- 대용량 유전체 데이터의 활용 생태계를 조성하여 유전체 지식 기반 헬스케어 신시장 창출을 꾀하는 산업체 수요에 적극적으로 부응



그림 49. 세포 수준의 질병 진단 및 치료

5. 연구자 토론회 및 자문회의

5.1. 인간세포지도 사업 기획을 위한 연구자 토론회

5.1.1. 연구자 토론회 일정

- 일시: 2018년 2월 6일 오전 9시 - 10시 20분
- 장소: 홍천 비발디파크 메이플동 토파즈홀
- 참석자: 30여명의 연구자
- 세부 일정

시 간	내 용	비 고
09:00~09:05	인사말	염영일 박사(생명연)
09:05~09:15	인간세포지도 사업 소개	김선영 박사(생명연)
09:15~09:25	단일세포 분석기술 현황 소개	이혜옥 박사(삼성유전체연구소)
09:25~10:20	인간세포지도 사업 추진을 위한 계획안 토의	전 체

5.1.2. 토론 내용 정리

○ 조직 선정 및 수집

토론자	내용
이혜옥 (삼성유전체연구소)	• 해외사업의 경우 사후 부검 프로그램이 진행될 예정인데 국내에서 유사한 프로그램 가능 여부에 대한 전문가 의견 요청 • 사후 부검 이외의 조직 확보 방법은 어떤 형태가 가능할지 의견 요청 • 현재 파악한 바로는 2군데 병원에서 암 인접 정상조직의 조직은행이 있는 것으로 파악하였으나, 이외의 정상 조직 및 장기를 확보할 수 있을지 대한 의견 요청
주영석 (카이스트)	• 현재 사후 부검 연구 수행하고 있으며, 사망 후 12시간 이내의 시료로 genome 분석 중임 • 사후 12시간 경과한 시료의 경우, RNA의 상태가 불량해짐 • 따라서 사후 단시간에 시료를 확보하기 위해서는 상당한 인력과 시간의 동원이 필요하여 어려움이 있을 것으로 전망 • 특히, 위장관의 경우 상당량의 microbiota가 존재하기 때문에 어려움이 따를 수 있음 • 단일세포 분석보다는 단일핵 분석 플랫폼이 시료 안정성 면에서 효과적일 있음 • 대상 시료로는 내시경을 통한 시료확보가 용이한, 위, 식도, 대장, 기관지, 간, 유방 등이 시료 전처리 시간이 짧아 시료 안정성 면에서 유리할 것으로 전망
이혜옥 (삼성유전체연구소)	• 뇌세포를 대상으로 단일핵 분석 연구를 현재 진행 중 • 전체 RNA의 1/8 정도의 양 확보 가능

체연구소)	- 암 조직으로부터 세포 분리 시 암세포나 면역세포와 달리 stromal cell 분리가 기술적으로 어렵기 때문에 단일핵 분석이 더 좋은 플랫폼이 될 것으로 전망함 - Loss가 크다는 단점은 고려해야 하고, 위치 정보 수집이 불가능하다는 점도 주요 사항임
김소연 (KIST)	- 위치 정보 분석은 고가의 장비가 필요하고 분석에 많은 시간이 소요되는 어려움이 있어 개인연구자에게는 부담이 큼 - 현재 관련 연구를 직접 수행하는 연구자는 거의 없으나 기반 기술을 가지고 있는 연구자는 다수 있음
주영석 (카이스트)	- 사업을 통해 많은 양의 데이터 생산이 될 것이므로 국가적 계획과 관리 필요 - 암유전체 연구 결과를 보면 이용활용도가 낮음. 이에 데이터 공개와 활용도 증가에 대한 고려 필요
김선영 (생명연)	사업을 통해 생산된 데이터는 생산 즉시 공개를 원칙으로 할 예정임
노태영 (포항공대)	- 사업에 요구되는 장비 비용이 높은 관계로 국내에서 원천기술 개발은 어려울 것으로 생각함 - 특히, 엔지니어들의 낮은 참여율로 어려움이 예상됨 - 대상 시료 선정, 준비, 데이터 생산, 분석의 시작부터 끝까지 모든 단계의 관계자들의 참여가 필요하고 관련한 구체적인 계획안이 필요함 - 국내 특수성이 반영되는 플랜이 필요하지만, 참여하지 않는 연구자들의 반발을 설득할 수 있는 계획 필요
김선영 (생명연)	TCGA의 경우, 특정 한두 기관에서 선별된 장기를 대상으로 수행하였는데, 이런 TCGA 플랫폼을 따를 경우 참여자 선정에서 문제 발생할 소지 있음

○ 기술개발

토론자	내용
김선영 (생명연)	사업을 통한 기술 개발 가능 여부에 대한 의견 요청
노태영 (포항공대)	- X 프로젝트와 유사하게 실패 부담을 줄여주는 기술개발 투자 이루어진다면 가능할 것으로 전망 - 관련하여, 일정 비율의 연구비를 배분하는 전략 필요할 것으로 생각함
이혜옥 (삼성유전체연구소)	데이터 생산 관련해서고, 데이터 생산 자체와 공개를 성과로 인정해 주는 것이 필요함
김용민 (생명연)	- 실험 연구자와 분석 연구자의 입장 차이를 고려하여 반영되기를 요청함 - 사업 기획 시 조직 선정, 데이터 분석 해상도를 포함한 모든 실험 디자인과 설계 부분에 분석 연구자의 의견 반영 요청
최무림	정상 조직 이외의 pathologic profiling도 고려하는지 질문

(서울대)	
김선영 (생명연)	아시아 인간세포지도 미팅에서 질병 관련 프로파일링에 대한 의견 있었음 - 정상 프로파일링의 경우, 선도 그룹을 추격만 하다가 성공하지 못할 가능성 고려 필요하다는 의견
주영석 (카이스트)	- 장기를 집중하면 한계 극복 가능하지 않을까하는 의견 - 특히, 위 선호
김선영 (생명연)	- HCA 본 사업에서는 위가 2단계 장기로 선정되어 있음 - 현재 과기부의 플랜은 내년 초에 시범사업을 진행하고 예타 후 대규모 사업을 기획하는 방향 구상 중

○ 기타 논의 내용

토론자	내용
김선영 (생명연)	데이터 생산의 규모와 시료의 크기 등에 대한 의견 요청
최무림 (서울대)	일본 바이오산업은 원천기술 부재에도 불구하고 특허를 통해 성공한 바, 인간세포지도사업의 경우에도 특정 장기에 집중하는 전략 필요할 듯
김선영 (생명연)	- 일본 IHEC 사업의 경우, 데이터 생산과 분석의 효과적인 연계 부족했음 - 관련하여 국내 다른 국제협력 사례의 예가 반영될 수 있도록 추진할 예정임
김선영 (생명연)	- 출연연, 대학 등 사업거점에 대한 의견 요청 - KOBIC을 통한 데이터 생산과 공개에 대한 부분은 충분히 고려할 필요 있음
김선영 (생명연)	단일세포 생물학 및 기능 연구에 대한 국내 현황 파악 부족하므로 관련자들의 의견 요청
이혜옥 (삼성유전체 연구소)	- CRISPR 접목한 시퀀싱 분야에 국내 연구자 있는지 파악 필요 - Phenotype 분석의 필요에 관한 부분이 사업에 반영될지에 대한 의견 필요 - 연구비 배분에 반영 여부 - 활용에는 긍정적인 의견
김소연 (KIST)	- 단일세포 기반 live cell 내의 이미징 연구 수행 중 - 현재 사업 기획은 non-viable cell 기반 - 이미징으로는 기능 연구 수행 가능

5.2. 인간세포지도 사업 전문가 자문회의

5.2.1. 자문회의 일정

- 일시: 2018년 4월 9일 오후 5시 - 7시 30분
- 장소: 강남 팔래스 호텔 10층 아이리스홀
- 참석자: 국내 전문가 9인 및 기획위원 10인
- 국내전문가: 고혜란 교수(중앙대학교), 김영준 교수(연세대학교), 김재상 교수(이화여자대학교 및 한국연구재단 정책본부 차세대바이오 분야 단장), 박종훈 교수(숙명여자대학교), 방두희 교수(연세대학교), 성제경 교수(서울대학교), 심상희 교수(고려대학교), 이영식 교수(서울대학교), 정연준 교수(가톨릭대학교)
- 세부 일정

시 간	내 용	비 고
17:00~17:05('5)	인사말	염영일 박사(생명연)
17:05~17:15('10)	세포지도 작성 분야 설명	김정애 박사(생명연)
17:15~17:25('10)	단일세포 이미징 기반 오믹스 분석 기술 설명	김소연 박사(KIST)
17:25~19:25('120)	인간세포지도 사업 추진을 위한 계획안 토의	전 체
19:25~19:30('5)	마무리	염영일 박사(생명연)

5.2.2. 자문위원 의견 정리

○ 인간세포지도 사업의 목표와 방향성

토론자	내용
이영식 (서울대)	• 사업의 최종 목적을 컨소시엄 참여와 단일세포 분석 연구 기반 마련 중 어느 쪽을 더 중요하게 여길 지 분명히 하는 것이 필요함 • 컨소시엄 참여를 위한 연구를 뚜렷하게 하는 것이 좋을 듯. 이를 위해서는 암과 같은 질환 중심은 지양하는 것이 나을 것으로 판단함
정연준 (가톨릭대)	• 질병 중심의 연구보다는 정상 세포지도 중심의 연구가 바람직함 • 국내 시료 확보의 측면에서 보면 골수 이식 시스템을 활용하거나, 갑상선 조직 검사 시료를 활용할 수 있을 것으로 생각함 • CNS 분야의 경우에도 뇌 은행 활용 등을 이용하는 방안이 있음
박종훈 (숙명여대)	• 호발성 난치성 질환보다는 정상 조직의 분석이 우선적이라고 보지만, 현실적인 문제 및 필요성에 대한 설득의 측면 고려도 필요하다고 봄 • 정상세포지도의 현실 및 필요성에 대한 분석을 보고서에 반영하는 것이 필요함
방두희	• 정상세포 아틀라스는 이미 선도 그룹이 진행 중이지만 연구의 수월

(연세대)	정보다는 중요성을 고려하는 것이 필요할 듯 3년 후가 본 사업이라고 생각한다면, 질환/질병 중심이 바람직하다고 봄. 세포의 다양성/이질성이 중요한 질환/질병을 표적으로 하는 것이 필요하다고 봄
-------	--

○ 인간세포지도 사업의 규모와 구성 및 HCA 참여 전략

토론자	내용
이영식 (서울대)	- HCA는 인간세포지도 사업의 초기부터 참여할 필요가 있음 - 초기 참여를 통해 SOP와 표준 프로토콜의 확보 등이 가능할 것으로 기대함
김재상 (연구재단)	- 현재 제안한 연구비 규모가 너무 작지 않은지 (현재-연 50억, 6년의 연구. 총 300억 규모) - 예타 회피 전략은 이해가 되나 국가적 규모로 제안을 할 때는 조금 더 공격적으로 제안하여야 하지 않을까 생각함
박종훈 (숙명여대)	- 국제 컨소시엄 참여를 위해서는 시급성 반영이 필요함 - 확장된 규모의 예산을 확보하기 위해서는 작은 규모라도 먼저 시작을 하는 것이 필요함 - 이를 통해 아시아-HCA 컨소시엄 등의 적극적 참여도 필요함
방두희 (연세대)	- 사업의 예산 규모가 너무 작음 - 기획연구에서는 방향성만 설정하고 사업의 구체적인 내용과 대상은 경쟁형 R&D로 진행하는 것이 나을 것으로 생각함 - 탐다운 방식보다는 기존에 이미 활발히 연구를 진행하고 있는 연구자 중심의 투자가 경쟁력이 있을 것임
이영식 (서울대)	- 인간세포지도 사업이 상향식 사업 선정으로 진행되는 것은 바람직하지 않다고 생각 - 컨소시엄의 조기 참여를 위해서는 신속한 사업의 진행이 좋음
정연준 (가톨릭대)	인간세포지도와 함께 동물세포지도의 병행도 고려해야 하지 않을까
성제경 (서울대)	- HCA 참여를 위해서는 HCA의 산하 조직인 OC와 AWG를 통한 교류 네트워크를 만드는 것이 필요함 - 마우스 세포 아틀라스의 경우, 다른 그룹이 논의를 진행하는 동안 중국에서 신속히 연구를 진행하여 결과물을 생산함 (2018. 03 발표) - 이 사례를 고려한다면 신속한 사업의 진행이 우선시되어야 함 - 또한, 컨소시엄 참여 밀도도 충분히 반영되어야 함
김영준 (연세대)	- 인간세포지도 사업의 기획 목표와 예타 수준 과제를 원한다면 연구의 미래 비전이 필요함 - 현재 국제 컨소시엄의 경향은 개방형이기 때문에 단순 컨소시엄 참여를 목표로 한다면 사업의 위험성이 높음 - 또한, 예산 확보를 위해서 세포지도라는 개념을 이해시키고 설득하는 것에 어려움이 따를 수 있음

	• 1단계 완료 후, 2단계의 뚜렷한 목표와 인간세포지도가 왜 필요한지에 대한 분명한 목적이 필요함. 아울러, 3년간 50억의 과제가 필요한 이유에 대한 충분한 설명이 요구됨. 현재의 모양으로는 1단계 50억의 필요성이 보이지 않음 • 앞으로의 유전체 연구는 기관 중심이 아니라 개별 연구자 중심이 될 것으로 보이지만, 그럼에도 불구하고 국내의 기술 기반을 확보하는 측면을 강화하고, 미래 유전체 연구를 lead하는 역할이 필요하다는 논리가 필요함 • 모든 종류의 세포 분석을 위해 국내 인프라 구축이 필요함을 강조할 필요 있음 • 3년 후 2단계에서 필요한 것은 특정 질환/질병의 극복에 대한 근거가 필요함 • 전체적으로 뚜렷한 목표 설정이 필요하고, 컨소시엄 참여를 목적으로 내세우는 것은 바람직하지 않음 • 컨소시엄 가입은 정출연이 현재 진행하는 것이 필요하다고 봄. 요즘의 모든 사업이 일몰형으로 가는 점을 고려하면 예산의 여유가 있을 수도 있음 • 인간세포지도의 목표를 질환 중심으로 한다고 하여도, 사업을 통해 인간세포지도의 기타 연구도 포괄적으로 될 것으로 기대함
염영일 (생명연)	• 국내 컨소시엄의 구심점 역할을 담당하라는 의견이신지?
김영준 (연세대)	• 국내에서 개별 연구자들의 구심점, 허브 역할을 생명연 등이 하면 좋겠음

○ 단일세포 분석 기술 개발

토론자	내용
이영식 (서울대)	• 단일세포 분리 기술은 상용화가 많이 되어 있으므로 신기술 개발 초점과 기존 기술의 발전 중에서 신중한 접근 필요
정연준 (가톨릭대)	• 기초 기반 기술에 대한 논의가 더 필요함 • 조직에서 직접 단일세포 분리를 시행하고 이를 통한 경험을 축적하여 기반 기술을 다지는 작업이 필요함 • 특히 질병 대상 단일세포 분석 시 약 2000개의 세포를 분석하지만 정상세포 분석 시 약 10배의 세포가 필요한 점을 감안해야 함 (이혜옥 박사의 답변 기반) • 세포 수 확보 부분은 현장의 경험 반영이 필수적으로 인간세포지도 사업에서는 이를 위한 기반을 다지는데 초점이 맞추어지는 것이 좋음
심상희 (고려대)	• 단일분자 형광기반 분석은 국내 연구진 인프라는 갖추어져 있음 • 또한, 국내 2-3개 기업을 중심으로 기반 기술 확보되어 있기 때문에 상용화 장비 개발은 상대적으로 쉬울 수 있음 • 그러나 실질적인 사업 수행을 위해서는 프로브 셀 확보 등에 막대한 비용이 투입되기 때문에 어려움이 따를 것임 • HCA를 통한 기술의 확보가 더 손쉬울 수 있을 것으로 보임

이영식 (서울대)	• 단일세포 분리, 분석에 대한 국제학회 참여 등을 통해 기술개발의 동향 등을 파악하는 방안도 고려하는 것을 추천. • 이미징 기술의 경우 프로브 없이 분석 가능한 기술이 개발 될 가능성도 있음
방두희 (연세대)	• 신기술의 개발은, 특히 상용화 단계의 고려는 선도 그룹과의 기술적인 갭이 상당하기 때문에 어렵다고 생각함
이영식 (서울대)	• 기술개발의 측면에서 살펴보면, NIH에서는 기술개발의 단계는 완료되었다고 보았기 때문에 Single Cell Analysis 사업을 종료했다고 생각함 • 따라서 신기술개발은 어려울 것이라는 관점에 동의함
고혜란 (중앙대)	• 인간세포지도 사업이 데이터 생산에만 그친다면 국내 기술은 여전히 추격형으로 남을 것임 • 신규 기술 개발을 중요한 과제로 다루는 것이 필요함
성제경 (서울대)	• 기술개발도 중요하지만, HCA의 적극적인 참여가 목적이려면, 단계적인 전략이 필요함 • 기반기술의 확보도 중요하지만, 사업의 중심 설정을 위해서는 초점이 중요함

5.3. 인간세포지도 사업 기획 해외 전문가 서면 자문

5.3.1. 해외 자문을 위한 요약 white paper

Title: Korean Human Cell Atlas Project

Purposes

- To apply cutting-edge omics technologies towards personalized medicine
- To develop diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers for cancer patients based on single-cell molecular profiling of patient tissues
- To develop novel technologies for single cell analyses including single cell imaging, in situ sequencing, single cell proteomics, and data analysis algorithms
- To join human cell atlas (HCA)-Asia projects and collaborate with other researchers (Japan, Singapore, India, and others)

Backgrounds

- Recent developments of single cell analytic technologies allow us to profile cells (normal or diseased) at each cell level
- The human cell atlas (HCA) project started with an aim to map all the cells (approximately 34 trillion) in the human body
- The HCA-Asia project are under development to foster collaborations among Asian scientists

Goals

- To realized precision medicine based on single-cell analyses of disease tissues (cancer, neurodegenerative diseases, and other chronic diseases)
- To evaluate various organoid model systems for human disease modeling and testing
- To develop cutting-edge technologies for single cell sequencing and image analysis

- To join international collaboration networks including human cell atlas (HCA) and HCA–Asia develop bioinformatics tools and infrastructures for sharing and analyses of single cell omics data

Planned projects

- Samples acquisition for single cell analyses of diseased tissues (i.e., cancer)
- Single cell omics of disease tissues (single cell transcriptomics, epigenomics, proteomics, etc)
- Single cell omics of patient derived organoids and key model organisms
- Super–resolution imaging of cells for spatial analyses
- Bioinformatics for single–cell omics data (analysis pipelines, algorithms, tools and software)
- Establishment of data storage and data sharing infrastructure

Budgets and schedules

- 3 + 3 years (6 years: 2109–2024)
- \$5M per year (a total of \$30M for six years)
- 5–7 projects (single cell transcriptomics of disease tissues including cancer, single cell imaging, organoids and stem cells, bioinformatics, data storage and sharing, and clinical applications, etc)

Expected results

- Fostering of multi–disciplinary collaborations among diverse fields including clinical applications, omics analyses, molecular imaging, stem cell and developmental biology, and computational biology
- Development of novel biomarkers based on cell–level association studies of patients
- Development of novel therapeutic targets based on single–cell level omics analyses

5.3.2. 해외 전문가 자문 내용 요약 정리

- Dr. Shyam Prabhakar (Associated Director, Integrated Genomics Center, Genome Institute of Singapore)



6. 참고문헌

- Ariyachet, C., Tovaglieri, A., Xiang, G., Lu, J., Shah, M.S., Richmond, C.A., Verbeke, C., Melton, D.A., Stanger, B.Z., Mooney, D., *et al.* (2016). Reprogrammed Stomach Tissue as a Renewable Source of Functional beta Cells for Blood Glucose Regulation. *Cell Stem Cell* *18*, 410–421.
- Bacher, R., and Kendzierski, C. (2016). Design and computational analysis of single-cell RNA-sequencing experiments. *Genome Biol* *17*, 63.
- Behjati, S., Huch, M., van Boxtel, R., Karthaus, W., Wedge, D.C., Tamuri, A.U., Martincorena, I., Petljak, M., Alexandrov, L.B., Gundem, G., *et al.* (2014). Genome sequencing of normal cells reveals developmental lineages and mutational processes. *Nature* *513*, 422–425.
- Budnik B, Levy E, and Slavov N (2017) Mass-spectrometry of single mammalian cells quantifies proteome heterogeneity during cell differentiation, *Peer J Preprints* 5:e2767v1
- Buenrostro, J.D., Wu, B., Litzenburger, U.M., Ruff, D., Gonzales, M.L., Snyder, M.P., Chang, H.Y., and Greenleaf, W.J. (2015). Single-cell chromatin accessibility reveals principles of regulatory variation. *Nature* *523*, 486–490.
- Camp, J.G., Badsha, F., Florio, M., Kanton, S., Gerber, T., Wilsch-Brauninger, M., Lewitus, E., Sykes, A., Hevers, W., Lancaster, M., *et al.* (2015). Human cerebral organoids recapitulate gene expression programs of fetal neocortex development. *Proc Natl Acad Sci U S A* *112*, 15672–15677.
- Camp, J.G., Sekine, K., Gerber, T., Loeffler-Wirth, H., Binder, H., Gac, M., Kanton, S., Kageyama, J., Damm, G., Seehofer, D., *et al.* (2017). Multilineage communication regulates human liver bud development from pluripotency. *Nature* *546*, 533–538.
- Chen, F., Tillberg, P.W., and Boyden, E.S. (2015a). Optical imaging. Expansion microscopy. *Science* *347*, 543–548.
- Chen, F., Wassie, A.T., Cote, A.J., Sinha, A., Alon, S., Asano, S., Daugharthy, E.R., Chang, J.B., Marblestone, A., Church, G.M., *et al.* (2016). Nanoscale imaging of RNA with expansion microscopy. *Nat Methods* *13*, 679–684.
- Chen, K.H., Boettiger, A.N., Moffitt, J.R., Wang, S., and Zhuang, X. (2015b). RNA imaging. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells. *Science* *348*, aaa6090.
- Dilillo, M., Ait-Belkacem, R., Esteve, C., Pellegrini, D., Nicolardi, S., Costa, M., Vanninim, E., deGraaf, E. L., Caleo, M., McDonnell, L. A., (2017). Ultra-high mass resolution MALDI imaging mass spectrometry of proteins and metabolites in an mouse model of glioblastoma. *Scientific Reports* *7*, 603.
- Fan, H.C., Fu, G.K., and Fodor, S.P. (2015). Expression profiling. Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry. *Science* *347*, 1258367.
- Garcez, P.P., Loiola, E.C., Madeiro da Costa, R., Higa, L.M., Trindade, P., Delvecchio, R., Nascimento, J.M., Brindeiro, R., Tanuri, A., and Rehen, S.K. (2016). Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science* *352*, 816–818.
- Gerdes, M.J., Sevinsky, C.J., Sood, A., Adak, S., Bello, M.O., Bordwell, A., Can, A., Corwin, A., Dinn, S., Filkins, R.J., *et al.* (2013). Highly multiplexed single-cell analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded cancer tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A* *110*, 11982–11987.
- Gierahn, T.M., Wadsworth, M.H., 2nd, Hughes, T.K., Bryson, B.D., Butler, A., Satija, R.,

- Fortune, S., Love, J.C., and Shalek, A.K. (2017). Seq-Well: portable, low-cost RNA sequencing of single cells at high throughput. *Nat Methods* *14*, 395–398.
- Giesen, C., Wang, H.A., Schapiro, D., Zivanovic, N., Jacobs, A., Hattendorf, B., Schuffler, P.J., Grolimund, D., Buhmann, J.M., Brandt, S., *et al.* (2014). Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat Methods* *11*, 417–422.
- Goltsev, Y., Samusil, N., Kennedy–Darling, J., Bhate, S., Hale, M., Vasquez, G., Nolan, G.P., (2018) Deep profiling of mouse splenic architecture with CODEX multiplexed imaging. *BioRxiv* Feb. 5
- Grün, D., Lyubimova, A., Kester, L., Wiebrands, K., Basak, O., Sasaki, N., Clevers, H., and van Oudenaarden, A. (2015) Single-cell messenger RNA sequencing reveals rare intestinal cell types. *Nature*. *525*, 251–255.
- Guo, H., Zhu, P., Wu, X., Li, X., Wen, L., and Tang, F. (2013). Single-cell methylome landscapes of mouse embryonic stem cells and early embryos analyzed using reduced representation bisulfite sequencing. *Genome Res* *23*, 2126–2135.
- Haque, A., Engel, J., Teichmann, S.A., and Lonnberg, T. (2017). A practical guide to single-cell RNA-sequencing for biomedical research and clinical applications. *Genome Med* *9*, 75.
- Hayashi, R., Ishikawa, Y., Sasamoto, Y., Katori, R., Nomura, N., Ichikawa, T., Araki, S., Soma, T., Kawasaki, S., Sekiguchi, K., *et al.* (2016). Co-ordinated ocular development from human iPS cells and recovery of corneal function. *Nature* *531*, 376–380.
- Jaitin, D.A., Kenigsberg, E., Keren–Shaul, H., Elefant, N., Paul, F., Zaretzky, I., Mildner, A., Cohen, N., Jung, S., Tanay, A., *et al.* (2014). Massively parallel single-cell RNA-seq for marker-free decomposition of tissues into cell types. *Science* *343*, 776–779.
- Ke, R., Mignardi, M., Pacureanu, A., Svedlund, J., Botling, J., Wahlby, C., and Nilsson, M. (2013). In situ sequencing for RNA analysis in preserved tissue and cells. *Nat Methods* *10*, 857–860.
- Klein, A.M., Mazutis, L., Akartuna, I., Tallapragada, N., Veres, A., Li, V., Peshkin, L., Weitz, D.A., and Kirschner, M.W. (2015). Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell* *161*, 1187–1201.
- Lake, B.B., Chen, S., Sos, B.C., Fan, J., Kaeser, G.E., Yung, Y.C., Duong, T.E., Gao, D., Chun, J., Kharchenko, P.V., *et al.* (2018). Integrative single-cell analysis of transcriptional and epigenetic states in the human adult brain. *Nat Biotechnol* *36*, 70–80.
- Lee, J.H., Daugharthy, E.R., Scheiman, J., Kalhor, R., Yang, J.L., Ferrante, T.C., Terry, R., Jeanty, S.S., Li, C., Amamoto, R., *et al.* (2014). Highly multiplexed subcellular RNA sequencing in situ. *Science* *343*, 1360–1363.
- Levesque, M.J., and Raj, A. (2013). Single-chromosome transcriptional profiling reveals chromosomal gene expression regulation. *Nat Methods* *10*, 246–248.
- Levsky, J.M., Shenoy, S.M., Pezo, R.C., and Singer, R.H. (2002). Single-cell gene expression profiling. *Science* *297*, 836–840.
- Lovatt, D., Ruble, B.K., Lee, J., Dueck, H., Kim, T.K., Fisher, S., Framcos., C., Spaethling, J. M., Wolf, J. A., Grady, M. S., *et al.* (2014). Transcriptome in vivo analysis (TIVA) of spatially defined single cells in live tissue. *Nat Methods* *11*, 190–196
- Lubeck, E., and Cai, L. (2012). Single-cell systems biology by super-resolution imaging and combinatorial labeling. *Nat Methods* *9*, 743–748.

- Lubeck, E., Coskun, A.F., Zhiyentayev, T., Ahmad, M., and Cai, L. (2014). Single-cell in situ RNA profiling by sequential hybridization. *Nat Methods* *11*, 360–361.
- Macosko, E.Z., Basu, A., Satija, R., Nemesh, J., Shekhar, K., Goldman, M., Tirosh, I., Bialas, A.R., Kamitaki, N., Martersteck, E.M., *et al.* (2015). Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell* *161*, 1202–1214.
- Miura, F., Enomoto, Y., Dairiki, R., and Ito, T. (2012). Amplification-free whole-genome bisulfite sequencing by post-bisulfite adaptor tagging. *Nucleic Acids Res* *40*, e136.
- Moffitt, J.R., Hao, J., Bambah-Mukku, D., Lu, T., Dulac, C., and Zhuang, X. (2016a). High-performance multiplexed fluorescence in situ hybridization in culture and tissue with matrix imprinting and clearing. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 14456–14461.
- Moffitt, J.R., Hao, J., Wang, G., Chen, K.H., Babcock, H.P., and Zhuang, X. (2016b). High-throughput single-cell gene-expression profiling with multiplexed error-robust fluorescence in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 11046–11051.
- Peterson, V.M., Zhang, K.X., Kumar, N., Wong, J., Li, L., Wilson, D.C., Moore, R., McClanahan, T.K., Sadekova, S., and Klappenbach, J.A. (2017). Multiplexed quantification of proteins and transcripts in single cells. *Nat Biotechnol* *35*, 936–939.
- Pollen, A.A., Nowakowski, T.J., Shuga, J., Wang, X., Leyrat, A.A., Lui, J.H., Li, N., Szpankowski, L., Fowler, B., Chen, P., *et al.* (2014). Low-coverage single-cell mRNA sequencing reveals cellular heterogeneity and activated signaling pathways in developing cerebral cortex. *Nat Biotechnol* *32*, 1053–1058.
- Ramani, V., Deng, X., Qiu, R., Gunderson, K.L., Steemers, F.J., Disteché, C.M., Noble, W.S., Duan, Z., and Shendure, J. (2017). Massively multiplex single-cell Hi-C. *Nat Methods* *14*, 263–266.
- Rotem, A., Ram, O., Shores, N., Sperling, R.A., Goren, A., Weitz, D.A., and Bernstein, B.E. (2015). Single-cell ChIP-seq reveals cell subpopulations defined by chromatin state. *Nat Biotechnol* *33*, 1165–1172.
- Rozenblatt-Rosen, O., Stubbington, M.J.T., Regev, A., and Teichmann, S.A. (2017). The Human Cell Atlas: from vision to reality. *Nature* *550*, 451–453.
- Schubert, W., Bonnekoh, B., Pommer, A.J., Philipsen, L., Bockelmann, R., Malykh, Y., Gollnick, H., Friedenberger, M., Bode, M., and Dress, A.W. (2006). Analyzing proteome topology and function by automated multidimensional fluorescence microscopy. *Nat Biotechnol* *24*, 1270–1278.
- Shalek, A.K., Satija, R., Adiconis, X., Gertner, R.S., Gaublot, J.T., Raychowdhury, R., Schwartz, S., Yosef, N., Malboeuf, C., Lu, D., *et al.* (2013). Single-cell transcriptomics reveals bimodality in expression and splicing in immune cells. *Nature* *498*, 236–240.
- Smallwood, S.A., Lee, H.J., Angermueller, C., Krueger, F., Saadeh, H., Peat, J., Andrews, S.R., Stegle, O., Reik, W., and Kelsey, G. (2014). Single-cell genome-wide bisulfite sequencing for assessing epigenetic heterogeneity. *Nat Methods* *11*, 817–820.
- Stahl, P.L., Salmen, F., Vickovic, S., Lundmark, A., Navarro, J.F., Magnusson, J., Giacomello, S., Asp, M., Westholm, J.O., Huss, M., *et al.* (2016). Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science* *353*, 78–82.
- Stoeckius, M., Hafemeister, C., Stephenson, W., Houck-Loomis, B., Chattopadhyay, P.K., Swerdlow, H., Satija, R., and Smibert, P. (2017). Simultaneous epitope and transcriptome

- measurement in single cells. *Nat Methods* *14*, 865–868.
- Sylwestrak, E.L., Rajasethupathy, P., Wright, M.A., Jaffe, A., and Deisseroth, K. (2016). Multiplexed Intact–Tissue Transcriptional Analysis at Cellular Resolution. *Cell* *164*, 792–804.
- Takagi R., Ishimaru J., Sugawara A., Toyoshima KE., Ishida K., Ogawa M., Sakakibara K., Asakawa K., Kashiwakura A., Oshima M., *et al.* (2016). Bioengineering a 3D integumentary organ system from iPS cells using an in vivo transplantation model. *Sci Adv.* *2*, e1500887.
- Tang, F., Barbacioru, C., Wang, Y., Nordman, E., Lee, C., Xu, N., Wang, X., Bodeau, J., Tuch, B.B., Siddiqui, A., *et al.* (2009). mRNA–Seq whole–transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods* *6*, 377–382.
- Turco MY, Gardner L, Hughes J, Cindrova–Davies T, Gomez MJ, Farrell L, Hollinshead M, Marsh SGE, Brosens JJ, Critchley HO, Simons BD, Hemberger M *et al.* (2017) Long–term, hormone–responsive organoid cultures of human endometrium in a chemically defined medium. *Nat Cell Biol.* *19*, 568–577.
- Wang, H.A., Grolimund, D., Giesen, C., Borca, C.N., Shaw–Stewart, J.R., Bodenmiller, B., and Gunther, D. (2013). Fast chemical imaging at high spatial resolution by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal Chem* *85*, 10107–10116.
- White, A.K., VanInsberghe, M., Petriv, O.I., Hamidi, M., Sikorski, D., Marra, M.A., Piret, J., Aparicio, S., and Hansen, C.L. (2011). High–throughput microfluidic single–cell RT–qPCR. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 13999–14004.