(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。Int. Cl. [7]
C12N 5/06

(11) 공개번호 특2003-0032966
(43) 공개일자 2003년04월26일

(21) 출원번호 10-2002-7016949
(22) 출원일자 2002년12월12일
번역문 제출일자 2002년12월12일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2001/05154
(86) 국제출원출원일자 2001년06월15일
(87) 국제공개번호 WO 2001/96533
(87) 국제공개일자 2001년12월20일

(81) 지정국 국내특허 : 아랍에미리트, 안티구아바부다, 알바니아, 아르메니아, 오스트리아, 오스트레일리아, 아제르바이잔, 보스니아-헤르체고비나, 바베이도스, 브라질, 벨라루스, 벨리즈, 캐나다, 스위스, 중국, 코스타리카, 쿠바, 체코, 독일, 덴마크, 도미니카연방, 알제리, 에스토니아, 스페인, 영국, 그레나다, 그루지야, 가나, 감비아, 크로아티아, 헝가리, 인도네시아, 이스라엘, 인도, 아이슬란드, 케냐, 키르기즈, 대한민국, 카자흐스탄, 세인트루시아, 스리랑카, 라이베리아, 레소토, 리투아니아, 룩셈부르크, 라트비아, 모로코, 몰도바, 마다가스카르, 마케도니아, 말라위, 멕시코, 모잠비크, 노르웨이, 뉴질랜드, 폴란드, 포르투칼, 루마니아, 러시아, 수단, 스웨덴, 싱가포르, 슬로베니아, 슬로바키아, 시에라리온, 타지키스탄, 투르크메니스탄, 터어키, 트리니다드토바고, 탄자니아, 우크라이나, 우간다, 미국, 우즈베키스탄, 베트남, 유고슬라비아, 남아프리카, 짐바브웨, 콜롬비아, 에쿠아도르, 불가리아, 핀랜드, 몽고,
AP ARIPO특허: 가나, 감비아, 케냐, 레소토, 말라위, 모잠비크, 수단, 시에라리온, 스와질랜드, 탄자니아, 우간다, 짐바브웨,
EA 유라시아특허: 아르메니아, 아제르바이잔, 벨라루스, 키르기즈, 카자흐스탄, 몰도바, 러시아, 타지키스탄, 투르크메니스탄,
EP 유럽특허: 오스트리아, 벨기에, 스위스, 사이프러스, 독일, 덴마크, 스페인, 핀랜드, 프랑스, 영국, 그리스, 아일랜드, 이탈리아, 룩셈부르크, 모나코, 네덜란드, 포르투칼, 스웨덴, 터어키,
OA OAPI특허: 부르키나파소, 베넹, 중앙아프리카, 콩고, 코트디브와르, 카메룬, 가봉, 기네, 기네비쏘, 말리, 모리타니, 니제르, 세네갈, 차드, 토고,

(30) 우선권주장 JP-P-2000-00180376 2000년06월15일 일본(JP)
JP-P-2000-00278057 2000년09월13일 일본(JP)

(71) 출원인 다나베 세이야꾸 가부시키가이샤
일본 오사까후 오사까시 쥬오꾸 도쇼마찌 3쪼메 2반10고

(72) 발명자 나까쯔지 노리오
일본 교또후 교또시 사꾜꾸 이와꾸라니시가와라쵸 273-7
다다 다까시
일본 교또후 교또시 사꾜꾸 요시다시모오지쵸 49-10
도리이 류즈
일본 시가껭 모리야마시 미즈호쵸 1145-15
호소이 요시히꼬
일본 오사까후 사까이시 아까사까다이 1쵸 9-2
이리따니 아끼라
일본 교또후 교또시 사꾜꾸 이와꾸라나가따니쵸 1-24
아꾸따 데루오
일본 구마모또껭 구마모또시 히가시마찌 4쵸메 8-10-104

(74) 대리인 특허법인코리아나

심사청구 : 있음

(54) 원숭이 유래 배아 줄기 세포

요약

원숭이 난자와 원숭이 정자를 사용하여 체외수정법 또는 현미수정법으로 수정을 실시하여 수정란을 얻고, 이 수정란을 사용하여 체외배양법으로 배반포기배를 발생시켜 이 배반포기배를 사용하여 ES 세포를 수립하는, 원숭이 ES 세포의 생산 방법; 및 그로 인해 얻어지는 원숭이 ES 세포, 이 ES 세포를 사용하는 조직 또는 세포의 특이적 분화용 시약의 스크리닝 방법; 이 ES 세포로부터 분화시킨 분화세포 또는 분화조직. 본 발명에 의해 영장류에서의 발생학적 연구, 질환 연구, 임상응용, 실험모델 등에 대한 응용이 기대된다.

대표도

도 1

명세서

기술분야

본 발명은 영장류, 특히 인간, 원숭이에서의 발생학적 연구, 질환 연구, 임상응용, 실험모델 등에 유용한 원숭이 유래 배아 줄기 세포; 이 원숭이 유래 배아 줄기 세포를 높은 수율로 얻을 수 있는 원숭이 유래 배아 줄기 세포의 생산 방법; 원하는 분화세포 또는 분화조직을 얻는 데에 유용한 조직 또는 세포의 특이적 분화를 실시하기 위한 시약의 스크리닝 방법; 및 분화세포 또는 분화조직에 관한 것이다.

배경기술

배아 줄기 세포 (이하, ES 세포라고도 칭함) 란, 다분화능과 자기복제능을 갖는 미분화세포이다. 또, 상기 ES 세포는 손상후의 조직수복력을 갖는 것이 시사되어 있다. 이로 인해, 이러한 ES 세포는 각종 질환의 치료용 물질의 스크리닝, 재생 의료분야 등에서 유용하다고 여겨 활발히 연구되고 있다.

현재, 마우스 유래의 ES 세포는 유전자 타깃팅법에 의한 특정 유전자의 형질전환 마우스의 제작 등에 널리 이용되고 있다. 그러나, 마우스 유래의 ES 세포를 인간의 질환모델로서 응용하는 경우, a) 마우스와 인간 배에서는 발현의 시기가 다른 유전자가 있고, b) 태반 등의 배상체외 조직의 구조나 기능이 다르고, 또한 c) 착상초기배의 배상체 조직의 구조가 다른 등의 점에서, 반드시 기대되는 효과를 얻을 수 있는 것은 아닌 경우가 있다.

한편, 원숭이 유래의 ES 세포는 마우스 유래의 ES 세포에 비해 보다 인간에 가깝기 때문에 인간의 질환에 이용함에 있어서 적합하다.

종래, 세계속에 대략 200 종류의 원숭이가 알려져 있지만, 일상적인 실험에 사용되고 있는 종류는 한정되어 있는 것이 현실이다. 고등 영장류는 이하의 2 그룹으로 크게 구별된다.

(1) 신세계 영장류 (New World Primates)

마머세트 (Callithrix jacchus) 가 널리 알려져 실험용 영장류의 하나로서 사용되고 있다. 신세계 영장류의 발생은 배나 태반의 구조가 구세계 영장류인 것과 다른 면도 있지만, 기본적으로는 유사한다.

(2) 구세계 영장류 (Old World Primates)

구세계 영장류는 인간에 매우 가까운 영장류이다. 붉은 털 원숭이 (Macaca mulatta) 이나 시노몰구스 원숭이 (Macaca fascicularis) 가 알려져 있다. 일본 원숭이 (Macaca fuscata) 는 시노몰구스 원숭이와 동일 속 (Macaca속) 이다. 구세계 영장류의 발생은 인간의 발생과 매우 유사하다.

현재, 원숭이 유래의 ES 세포로서 마머세트 ES 세포 [톰슨 (Thomson, J.A.) 외, Biol. Reprod. 55, 254-259, (1996)] 및 붉은 털 원숭이 ES 세포 [톰슨 (Thomson, J.A.) 외, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92, 7844-7848 (1995)] 가 수립되어 있다. 그러나, 상기한 바와 같이 마머세트는 인간과는 계통이 먼 신세계 영장류에 속하는 것으로 배나 태반의 구조가 다른 면도 있다. 또한, 마머세트는 몸이 작기 때문에 각종 실험조작이 용이하지 않고, 또한 백그라운드데이터도 적은 것이 현실이다. 한편, 상기 붉은 털 원숭이는 실험동물로서 일본 및 유럽에서의 사용은 매우 적고 또 번식에 계절성이 있어 연간 내내 배란이 관찰되는 것은 아니다. 또한, 마머세트 ES 세포 및 붉은 털 원숭이 ES 세포의 제작에는 난자의 회수에 시간을 필요로 하여 회수의 효율이 낮다는 결점이 있다.

또, 인간의 ES 세포도 개발되고 있지만 윤리적인 관점에서 사용에 제한이 있는 경우가 있다.

발명의 상세한 설명

발명의 개시

본 발명은 상기 종래 기술을 감안하여 이루어진 것으로 영장류, 특히 인간, 원숭이에서의 발생학적 연구, 질환 연구, 임상응용, 실험모델 등에 유용한 원숭이 유래 배아 줄기 세포; 이 원숭이 유래 배아 줄기 세포를 높은 수율로 얻을 수 있는 원숭이 유래 배아 줄기 세포의 생산 방법; 원하는 분화세포 또는 분화조직을 얻는 데에 유용한 조직 또는 세포의 특이적 분화를 실시하기 위한 시약의 스크리닝 방법; 및 분화세포 또는 분화조직을 제공하는 것을 목적으로 한다.

본 발명의 요지는,

[1] (a) 원숭이 난자와 원숭이 정자를 사용하여 체외수정법 또는 현미수정법에 의해 수정을 실시하여 수정란을 얻는 공정,

(b) 공정 (a) 에서 얻어진 수정란을 사용하여 체외배양법에 의해 배반포기배를 발생시키는 공정 및,

(c) 공정 (b) 에서 얻어진 배반포기배를 사용하여 배아 줄기 세포를 수립하는 공정을 포함하는 프로세스를 실시함으로써 얻어질 수 있는 원숭이 유래 배아 줄기 세포,

[2] (a) 원숭이 난자와 원숭이 정자를 사용하여 체외수정법 또는 현미수정법에 의해 수정을 실시하여 수정란을 얻는 공정,

(b) 공정 (a) 에서 얻어진 수정란을 사용하여 체외배양법에 의해 배반포기배를 발생시키는 공정 및,

(c) 공정 (b) 에서 얻어진 배반포기배를 사용하여 배아 줄기 세포를 수립하는 공정을 포함하는 원숭이 유래 배아 줄기 세포의 생산 방법,

[3] 하기 특성:

(ⅰ) 미분화 상태를 유지한 채 증식계대가 가능한,

(ⅱ) 기원의 시노몰구스 원숭이 개체와 동일 염색체수를 갖는,

(ⅲ) 8 12 주령의 SCID 마우스 또는 누드마우스의 피하, 신피막하 또는 정소에 이식함으로써 다분화능이 관찰되는,

(ⅳ) SSEA-1 음성이며, 또한 SSEA-3 과 SSEA-4 에 대해 양성인 및,

(ⅴ) 알칼리포스파타아제 활성이 검출되는

것을 나타내는, 수립된 시노몰구스 원숭이 유래 세포,

[4] 피검물질의 존재하에 상기 [1] 에 기재된 원숭이 유래 배아 줄기 세포 및 상기 [3] 에 기재된 시노몰구스 원숭이 유래 세포로 이루어지는 군에서 선택된 세포를 유지하는 것을 특징으로 하는 조직 또는 세포의 특이적 분화를 실시하기 위한 시약의 스크리닝 방법 및,

[5] 상기 [1] 에 기재된 배아 줄기 세포 및 상기 [3] 에 기재된 시노몰구스 원숭이 유래 세포로 이루어지는 군에서 선택된 배아 줄기 세포로부터 분화되어 이루어지는 분화세포 또는 분화조직에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

도 1 은 본 발명의 시노몰구스 원숭이 유래 배아 줄기 세포의 현미경 관찰 결과를 나타내는 사진이다. 상단패널은 저배율 (100 배) 에서의 관찰결과를 나타내고, 하단패널은 고배율 (200 배) 에서의 관찰결과를 나타낸다.

도 2 는 본 발명의 시노몰구스 원숭이 유래 배아 줄기 세포를 각종 수법에 의해 관찰한 결과를 나타내는 사진이다. 패널 A 및 패널 B 는 각각 본 발명의 시노몰구스 원숭이 유래 배아 줄기 세포를 현미경 관찰한 결과를 나타낸다 [패널 A: 저배율 (Bar; 100㎛), 패널 B: 고배율 (Bar; 50㎛)]. 패널 C 는 본 발명의 시노몰구스 원숭이 유래 배아 줄기 세포를 알칼리포스파타아제 염색후에 현미경 관찰한 결과를 나타낸다 (Bar; 100㎛). 패널 D 는 본 발명의 시노몰구스 원숭이 유래 배아 줄기 세포를 SSEA-4 에 대한 면역 염색후에 현미경 관찰한 결과를 나타낸다 (Bar; 100㎛).

도 3 은 본 발명의 시노몰구스 원숭이 유래 배아 줄기 세포를 마우스에 피하주사후, 형성된 종양혹을 각종 염색후에 현미경 관찰한 결과를 나타내는 사진이다. 패널 A H 는 본 발명의 시노몰구스 원숭이 유래 배아 줄기 세포를 마우스에 피하주사후, 형성된 종양혹을 HE 염색후에 현미경 관찰한 결과를 나타낸다. 패널 A: 종양혹 전체 (Bar; 300㎛), 패널 B: 신경상피 (Bar; 200㎛), 패널 C: 글리어 (Bar; 200㎛), 패널 D: 선(腺) (Bar; 200㎛), 패널 E: 근육 (Bar; 200㎛),

패널 F: 연골 (Bar; 400㎛), 패널 G: 뼈 (Bar; 200㎛), 패널 H: 선모상피 (Bar; 150㎛). 패널 I M 은 상기 종양혹을 면역 염색후에 현미경 관찰한 결과를 나타낸다. 패널 I: 뉴런 및 글리어의 NSE 에 대한 면역 염색 (Bar; 200㎛), 패널 J: 글리어의 GFAP 에 대한 면역 염색 (Bar; 200㎛), 패널 K: 말초신경의 NSE 에 대한 면역 염색 (Bar; 200㎛), 패널 L: 근육의 데스민에 대한 면역 염색 (Bar; 200㎛), 패널 M: 연골의 S-100 단백질에 대한 면역 염색 (Bar; 400㎛).

발명을 실시하기 위한 최선의 형태

본 발명에 사용되는「원숭이」란, 영장류, 구체적으로는 신세계 영장류 및 구세계 영장류를 말한다. 그 중에서도 구세계 영장류는 인간에 매우 가까운 영장류이며, 또한 인간의 발생과 유사하므로 인간에 가까운 질환모델동물이나 다양한 질환치료제의 스크리닝계로서 이용되는 것이 기대된다. 따라서, 본 발명에서는 구세계 영장류가 바람직하고, 구체적으로는 일본 원숭이, 시노몰구스 원숭이 등을 들 수 있고, 특히 시노몰구스 원숭이가 바람직하다.

상기 일본 원숭이 및 시노몰구스 원숭이는 보다 인간에 가까운 계통으로 일본 원숭이는 중형 (체중: 5 15㎏) 이기 때문에 외과적 수술을 쉽게 실시할 수 있고, 체력도 충분하다는 점에서 유리하다. 또한, 일본 원숭이는 온순한 성격이며 트레이닝효과도 크기 때문에 무마취하에서의 각종 실험이 가능하다는 이점이 있다. 한편, 시노몰구스 원숭이는 소형 (체중: 3 6㎏) 이기 때문에 다양한 동물실험에서 취급하기 쉬워 일본 및 유럽에서 실험동물로서의 사용예가 많고 백그라운드데이터도 많이 취득되어 있다는 이점을 갖는다. 또, 시노몰구스 원숭이는 연간 내내 배란이 관찰되기 때문에 배란에 계절성이 있는 붉은 털 원숭이보다 생식생리실험에 유용하다는 이점이 있다.

본 발명의 원숭이 유래 배아 줄기 세포는 (a) 원숭이 난자와 원숭이 정자를 사용하여 체외수정법 또는 현미수정법에 의해 수정을 실시하여 수정란을 얻는 공정,

(b) 공정 (a) 에서 얻어진 수정란을 사용하여 체외배양법에 의해 배반포기배를 발생시키는 공정 및,

(c) 공정 (b) 에서 얻어진 배반포기배를 사용하여 배아 줄기 세포를 수립하는 공정을 포함하는 프로세스 (이하, 원숭이 유래 배아 줄기 세포의 생산 방법이라고 함) 에 의해 얻어질 수 있다. 이러한 원숭이 유래 배아 줄기 세포의 생산 방법도 본 발명의 범위에 포함된다.

본 발명의 원숭이 유래 배아 줄기 세포의 생산 방법은 상기 (a) (c) 의 공정을 실시함으로써 약 40 46% 라는 놀랄만한 높은 수율로 수정란에서 배반포기배를 얻을 수 있다는 본 발명자들의 지견에 기초한다. 또한, 그로 인해 본 발명의 생산 방법에 의하면 우수한 효율로 원숭이 유래 배반포기배를 발생시킬 수 있다는 우수한 효과를 발휘한다. 따라서, 종래의 방법 [예컨대, 국제공개 제96/22362호 팜플렛 등] 과 비교해도 매우 높은 수율로 원숭이 유래 배아 줄기 세포를 얻을 수 있다는 우수한 효과를 발휘한다.

공정 (a) 에서 원숭이 난자는 종래 실시되어 온, 개복하여 난소 직시하에서 난소를 천자하는 방법, 배란 난자를 난관에서 적출한 후, 세정하고 회수하는 방법 등에 의해 얻을 수도 있고, 개체에 대한 부담 저감, 수술후의 창상치유에 필요한 시간의 단축 또는 해소, 개체에서의 감염위험성의 저감의 관점에서 복강경 관찰하에 원숭이로부터 채란함으로써 얻는 것이 바람직하다. 복강경 관찰하에서의 채란에서는 예컨대 복벽에 약 1㎝ 의 절개를 실시하는 것만으로 복강경을 삽입하고 복벽을 통하여 난소를 천자하면 된다. 이로써, 국소의 확대상을 용이하게 얻을 수 있기 때문에 직시하에 난소를 천자하는 경우보다 더욱 정확하게 천자부위를 포착하여 채란할 수 있다는 이점도 있다. 또, 이러한 복강경 관찰하에서의 채란에 의하면, 채란후에는 복벽을 실 하나로 봉합하기만 하면 되므로 단시간에 수술할 수 있기 때문에 동물복지의 관점에서 바람직하다.

채란에 사용하는 암컷 원숭이의 연령은 원숭이의 종류에 따라 다른 경우도 있지만, 정기적인 월경주기를 관찰하는 것이 요구된다는 관점에서 3.5 령 이상, 바람직하게는 4 령 이상이며, 월경주기의 종료전이라는 관점에서 20 령 이하, 바람직하게는 15 령 이하이다. 구체적으로는 일본 원숭이의 경우 5 15 령, 시노몰구스 원숭이의 경우 4 15 령인 것이 바람직하다.

채란에 있어서는 배란 유발제 등을 사용해도 된다. 상기 배란 유발제로서는 난포자극호르몬 (FSH), 황체형성호르몬 (LH), 고나도트로핀방출호르몬 (GnRH) 등을 들 수 있고, 구체적으로는 예컨대 고나도트로핀방출호르몬 (GnRH), 임신한 말혈청 고나도트로핀 (PMSG), 인간 폐경기뇨성 고나도트로핀 (hMG), 인간 섬모성 고나도트로핀 (hCG), 항체형성호르몬 방출호르몬 (LHRH), 난포자극호르몬 (FSH) 등을 들 수 있다. 이러한 배란 유발제의 투여량 및 투여기간은 개체의 체중, 사용하는 배란 유발제의 종류에 따라 배란 유발효과가 발휘되는 범위에서 적절하게 선택할 수 있다.

상기 공정 (a) 에서 사용되는 원숭이 난자는 성숙되어 MII 기에 도달하고 세포질은 균일하며 탄력을 갖는 것이 바람직하다. 이러한 특성은 현미수정 또는 체외수정의 과정을 관찰함으로써 평가할 수 있다.

복강경 관찰하에서의 채란은 구체적으로는 하기와 같이 실시할 수 있다. 5 15 령의 일본 원숭이의 암컷 또는 4 15 령의 시노몰구스 원숭이의 암컷에 고나도트로핀방출호르몬 (GnRH) 1.8 3.65㎎ 을 피하투여하였다. GnRH 투여 2 주일후부터 임신한 말혈청 고나도트로핀 (PMSG) 을 25IU/kg 또는 인간 폐경기뇨성 고나도트로핀 (hMG) 10IU/kg 또는 난포자극호르몬 (FSH) 3IU/kg 을 1 일 1 회, 일정한 시각에 9 일간 연속해서 근육내 투여한다. 투여 4 5 일후에 복강경 (외경 3㎜) 을 사용하여 난소의 관찰을 실시하고 난포의 발육 유무를 확인한다. 여기에서 난포의 발육 유무는 난소에 백막이 얇게 솟아오른 듯한 형상을 이루는 것이 복수개 관찰되고, 그로 인해 난소 자체가 커지고 또한 자궁도 붉은 기를 증가시키는 것을 지표로 평가한다. 이어서, PMSG, hMG 또는 FSH 를 9 일간 투여하여 난포의 발육이 충분함을 확인한 후, 인간 섬모성 고나도트로핀 (hCG) 400IU/kg 을 1 회 근육내 투여한다. hCG 투여 38 42 시간 후에 채란한다. 채란에 대해서는 난소를 복강경 (외경 10㎜) 관찰하에서 약 0.5㎖ 의 10% SSS (Serum Substitute Supplement) 를 함유하는 α-MEM 용액을 넣은 60㎜ 의 19G 또는 20G 의 카테란침을 부착한 2.5㎖ 의 주사통을 사용하여 난포를 천자 흡인하여 난포액과 함께 난자를 회수함으로써 실시한다. 회수후, 즉시 실체 현미경하에서 난구세포에 둘러싸인 성숙난자를 분리하여 0.3% BSA 함유 TALP 중으로 옮긴다. 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2, 37℃ 의 조건하에서 3 4 시간 전배양하여 수정에 사용되는 난자를 얻을 수 있다.

또, 원숭이 정자는 정소상체에서 채취해도 되고 전기자극법에 의해 채취해도 된다. 상기 전기자극법으로는 후술하는 실시예에 기재된 직장법, 음경법 등을 들 수 있다. 구체적으로는 이하와 같다.

직장법

염산케타민, 염산자일라진 등으로 대표되는 마취제를 사용하여 수컷 원숭이를 마취하여 앙와위로 둔다. 전기자극기에 장착한 봉형상 직장전극에 케라틴크림을 도포하고 이 전극을 상기 원숭이의 직장에 가만히 삽입한다. 전기자극기를 교류전압, 5 20V 에 세트한다. 단속적으로 통전을 실시하여 음경의 끝에서 정액을 채취한다.

음경법

무마취하에서 케이지 앞면에 수컷 원숭이의 사지를 고정시켜 음경을 유지하기 쉬운 위치에 설치한다. 전기자극기의 전극을 음경에 세트하고 클립으로 접속한다. 단속적으로 통전을 실시하여 음경의 끝에서 정액을 채취한다.

상기 공정 (a) 에서 사용되는 원숭이 정자는 높은 수정능을 얻는 관점에서 정자의 활성화를 실시하는 것이 바람직하다. 정자의 활성화는 예컨대 카페인, dbC-AMP, 폴스콜린, 펜톡시필린 등이 약제에 의해 정자를 처리함으로써 실시할 수 있다. 상기 약제 중에서는 전진성을 갖는 활발한 운동성이나 생존율의 관점에서 카페인과 dbC-AMP 의 조합이 바람직하다. 또, 상기 약제에 의한 정자의 처리후, Swim up 법에 의해 보다 수정능이 높은 정자의 획득을 실시해도 된다. 상기 정자의 활성화를 실시함으로써 높은 수정율을 얻을 수 있고, 또한 미처리에서는 운동성이 부족한 정자를 사용한 경

우에서조차도 현미수정에 의해 고율로 수정시킬 수 있다는 우수한 효과를 발휘할 수 있다.

카페인 및 dbC-AMP 의 사용량은 운동성을 활성화시키는 관점에서 정자 1×10^7 개에 대해 10μM 1mM 인 것이 바람직하다.

상기 Swim up 법이란, 원심분리에 의해 둥근 바닥 시험관에 정자를 모은 후, 카페인과 dbC-AMP 를 함유하는 배지 (약 0.5㎖) 를 첨가하여 5% CO_2, 37℃ 에서 인큐베이터내에 정치함으로써 약 30 60 분후, 위로 헤엄쳐 오른 정자를 모으는 방법을 말한다.

정자의 활성화는 전진성을 갖는 활발한 운동성을 갖는 것을 지표로 평가할 수 있다.

원숭이 정자의 활성화는 예컨대 이하와 같이 실시할 수 있다.

정소상체로부터의 채취 또는 전기자극법에 의한 채취에 의해 얻어진 정자가 보존된 스트로로부터 동결보존제와 함께 정자를 시험관으로 옮긴 후, 1mM 카페인과 1mM dbC-AMP 를 함유한 BSA/BWW (Biggers, Whitten and Witting hams) 액 10㎖ 를 첨가하고, 30 분간, 5% CO_2, 37℃ 의 탄산가스 배양기에서 인큐베이트하여 수정능 획득을 실시한다. 그 후, 1,000rpm (200×g) 으로 2 분간 원심분리하여 상청을 버린다. 잔부의 정자에 새롭게 1mM 카페인과 1mM dbC-AMP 를 함유하는 BSA/BWW 약 0.5 10㎖ 를 첨가한다. 얻어진 정자용액을 37℃ 의 탄산가스 배양기에서 60 분간 정치하고, Swim Up 한 정자를 모아 정자의 운동성과 정자수를 확인한다. 또한, 정자의 운동성은 정자의 전진성과 활발성을 지표로 한다. 이로써, 정자의 활성화를 실시할 수 있다.

공정 (a) 에서 수정은 체외수정법 또는 현미수정법에 의해 실시될 수 있다. 체외수정법은 토리이 (Torii, R.) 외 [Primates, 41, 39-47 (2000)] 에 기재된 방법에 따라 실시될 수 있고, 현미수정법에 대해서는 휴잇슨 (Hewitson, L.) [Human Reproduction, 13, 3449-3455 (1998)] 에 기재된 방법에 따라 실시될 수 있다.

본 발명의 원숭이 유래 배아 줄기 세포의 생산 방법에서는 난자에 대한 영향을 저감시키는 관점에서 상기 체외수정법 또는 현미수정법을 실시할 때, TALP (Tyrode-Albumin-Lactate-Pyruvate) 액, TALP-HEPES 액 및 BWW 액으로 이루어지는 군에서 선택된 배양액을 사용하는 것이 바람직하다. TALP 액 및 TALP-HEPES 액은 하기와 같이 조제할 수 있다.

[표 1]

시약	스톡용액		최종용액(mM)	스톡용액(㎖)	
	(mM)	(g/100몰)		TALP	TALP-HEPES
HEPES	-		10.0	-	240㎎
NaCl	157.0	0.92	114.0	to 100㎖	to 100㎖
KCl	166.0	1.24	3.16	1.9	1.9
$CaCl_2$	120.0	1.76	2.0	1.7	1.7
$MgCl_2$·$6H_2O$	120.0	2.44	0.5	0.41	0.41
젖산나트륨	150.0	-	10.0	6.7	6.7
물	-		-	-	7.1
NaH_2PO_4·H_2O	20.5	-	0.35	1.7	1.7
글루코오스	295.0	5.31	5.0		
$NaHCO_3$	167.0	1.40	25.0(TALP)2.0(TALP-HEPES)	15.0	1.2
페니실린G (10,000 단위/100㎖) 및 페놀레드 (1㎎/100㎖)					

스톡용액은 오토클레이브에 의해 멸균보존.

여기에서 TALP 액 조제 직전에,

피루브산나트륨 0.5mM 0.0055g (100㎖ 에 대해)

겐타마이신황산염 (10㎎/㎖) 50㎍/㎖ 50㎕

BSA 3㎎/㎖ 0.3g

을 조제하고 얻어진 시약을 필터로 여과멸균한다.

한편, TALP-HEPES 액 조제 직전에,

피루브산나트륨 0.1mM 0.0011g (100㎖ 에 대해)

BSA 3㎎/㎖ 0.3g

을 조제하고 얻어진 시약을 필터로 여과멸균한다.

또한, TALP-HEPES 액을 조제할 때, 50㎖ NaCl 과 Na-HEPES (N-2-히드록시에틸피페라진-N'-2-에탄술폰산), 페놀레드, 페니실린G 를 먼저 용해시킨다. 얻어진 용액에 각각의 스톡용액을 규정량 첨가하고, 최후에 NaCl 스톡용액으로 100㎖ 까지 메스업한다. 이어서, 얻어진 용액의 pH 를 1M NaOH 로 pH 7.4 로 조정한다. 젖산나트륨스톡용액은 원액 (60% 시럽) 과 물을 1:35 로 혼합한다. 얻어진 혼합물에 1㎎/㎖ 의 페놀레드를 첨가한 후, 얻어진 용액의 pH 를 1M NaOH 로 pH 7.6 으로 조정하여 여과멸균한다. 얻어진 시약은 4℃ 에서 1 주간 보존할 수 있다. $NaHPO_4$、H_2O 28㎎ 은 10㎖ 의 글루코오스용액에 용해시켜 여과멸균한다. 얻어진 용액은 4℃ 에서 1 주일 보존할 수 있다.

이어서, 표 2 에 BWW (Biggers, Whitten and Whittingham) 액의 조성을 나타낸다.

[표 2]

시약	양* (㎎)
염화나트륨	2,770
염화칼륨	178
KH_2PO_4	81
황산마그네슘	147
$NaHCO_3$	1,053
피루브산나트륨염	14
D(+)-글루코오스(무수)	500
페니실린G	31
스트렙토마이신	25
DL-젖산나트륨	1,037
젖산칼슘	263
페놀레드 1㎎Merk	1
	*:/500㎖

체외수정 또는 현미수정시에 사용하는 용액은 미네랄오일 등으로 표면을 덮음으로써 난자 용액 또는 정자 용액의 건조를 방지하고, 또한 온도 pH, CO_2, O_2 농도의 변동을 방지한다는 효과를 얻을 수 있다.

또, 공정 (a) 에서 수정시, 난자에 대한 영향을 저감시키는 관점에서 TALP 액, TALP-HEPES 액 및 BWW 액으로 이루어지는 군에서 선택된 배양액을 사용하는 것이 바람직하다.

수정 유무는 자웅 전핵의 존재를 지표로 하여 위상차의 역상현미경(inverted microscope)하에서 육안으로 평가할 수 있다.

본 발명에서 실시된 체외수정법 또는 현미수정법의 일례를 이하에 나타낸다.

체외수정법

플라스틱접시내의 미네랄오일로 덮인 50㎕ 의 BSA/BWW 의 드롭중에 난구세포에 둘러싸인 난자 1 5 개를 넣는다. 이어서 드롭중에 5.0×10^{5} 1.0×10^{6} 개 (정자)/㎖ 가 되도록 정자현탁액을 옮긴다. 드롭을 미네랄오일로 덮고 이어서 수정을 실시한다.

현미수정법

(ⅰ) 난자의 조제

회수된 난모세포를 미네랄오일 (Sigma Chem. Co.) 로 덮인 50㎕ 의 0.3% BSA 를 함유하는 TALP (BSA/TALP) 용액 스폿중에 모은 후, 약 2 4 시간, 37℃, 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 의 조건하에서 전배양한다.

난자의 성숙상태는 난모세포 배양물을 0.1% 의 히알루로니다아제로 처리하여 난구세포를 제거하고, 회수된 난자에 대해 역상현미경하에서 이하의 Class-1 4 의 4 종류로 분류하여 평가될 수 있다.

Class-1: 극체 (PB) 를 갖는 성숙난자,

Class-2: PB 와 난핵포 (GV) 가 관찰되지 않는 성숙도상난자,

Class-3: GV 가 관찰되는 미성숙난자,

Class-4: 형상의 변형이 현저하거나, 세포질이 변성, 퇴행적 변화를 나타내고 있는 난자

Class-1 의 난자에 대해서는 확인후 바로 현미수정에 공시한다. Class-2 와 Class-3 의 난자에 대해서는 또한 미네랄오일로 덮인 50㎕ 의 BSA/TALP 용액 스폿중에 모은 후, 37℃, 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 의 조건하에서 계속 배양한다. 이 경우, 상기와 마찬가지로 난자의 성숙상태를 확인한다. 미성숙난자와 Class-4 의 난자에 대해서는 수정에 사용하지 않는 것이 바람직하다.

(ⅱ) 정자의 조제

체외수정에 준한 방법으로 실시한다.

(ⅲ) 현미수정법

현미수정은 마이크로 머니퓰레이터를 장비한 역상현미경하에서 실시한다. 150㎜ 접시에 스폿 1: 희석정자를 15㎕ 와, 스폿 2: 10% 폴리비닐피롤리돈 PBS 배양액 [PVP: 평균분자량 약 360,000] 을 5㎕×3 개와 스폿 3: 난자조작용 TALP-HEPES (최최종농도 3㎎/㎖ BSA) 용액 5㎕×3 개를 순서대로 두고, 표면을 미네랄오일로 덮어 건조를 방지하여 현미수정의 워킹·필드로 한다. 또한, 조작온도를 일정하게 하는 경우에는 필요에 따라 가온스테이지를 사용해도 된다.

주입용 니들을 동작정밀도가 높은 알카텔시린지에 접속한다. 주입용 니들로는 예컨대 인간 현미수정용 경사각도 30 도의 니들 등을 들 수 있다.

난자유지용 니들로는 상기 인간 현미수정용 경사각도 30 도의 니들, 마그네틱·풀러 (PN-30, 나리시게사 제조) 에 의해 제작한 외경 약 100㎛, 선단의 내경 약 15㎛ 의 니들을 들 수 있다. 상기 난자유지용 니들은 2000㎕ 의 에어타이트 시린지를 부착한 인젝터에 접속하여 사용된다.

정자는 스폿 1 에서 인간 현미수정의 기준에 따라 운동성이 있는 정자를 선택하여 흡인하고 얻어진 정자를 스폿 2 로 옮겨 배출한다. 스폿 2 에서는 PVP 의 점성에 의해 정자의 운동성이 저하된다. 그 정자 꼬리부를 인젝션니들로 문지르고 막의 일부를 파괴하여 정자의 운동을 정지시킨다. 이 정자를 점성이 높은 용액과 함께 흡인하여 스폿 3 으로 옮긴다.

성숙난자를 스폿 3 에 넣고 유지용 니들을 사용하여 극체 아래에 있는 염색체를 주입용 니들에 의해 파괴되지 않도록 6 시 또는 12 시의 위치에 고정시킨다. 그 후, 주입용 니들의 선단에 정자를 놓고 난자에 찔러 넣는다. 니들이 투명띠를 통과한 것을 확인한 후, 난세포막을 흡인한다. 막의 단열이 일어난 것을 확인하고 주입용 니틀내의 내용물 (정자와 난자의 세포질) 을 주입한다. 정자와 난자의 세포질의 주입에 관한 일련의 이들 조작을 반복 실시한다. 1 회의 조작으로 2 3 개 정자에 현미수정을 실시한다. 정자나 난세포질에 의해 선단의 내측이 오염된 경우는 스폿 2 에서 세정한다.

상기 공정 (a) 후, (b) 공정 (a) 에서 얻어진 수정란을 사용하여 체외배양법에 의해 배반포기배를 발생시키는 공정을 실시한다.

체외배양법으로는 온도와 탄산가스농도의 급격한 변화를 피하는 관점에서 미네랄오일로 배양액을 커버하는 것을 특징으로 하는 미소 현적배양법(hanging drop culture)을 들 수 있다. 이러한 미소 현적배양법은 인간에서는 통상 실시되지 않고, 마우스나 토끼 등의 실험동물에서 널리 채용되고 있는 수법인데, 이러한 배양법에 의하면 원숭이 유래의 배반포기배의 발생에 적용함으로써 예상외로 높은 발생율을 얻을 수 있다는 우수한 효과를 발휘한다.

수정란의 배양시에는 배양경과의 관찰에 의해 야기될 수 있는 온도나 pH 의 변화 등 불필요한 스트레스를 피하는 관점에서, 체외수정의 경우 배양개시후 7 9 일간, 바람직하게는 8 일간, 현미수정의 경우 배양개시후 7 10 일간, 바람직하게는 9 일간 배반포기배의 출현이 예측될 때까지 배양기 도어의 개폐를 멈추고 밀폐하는 것이 바람직하다.

배반포기배의 출현은 초기 분할의 속도와 비례하는 경향이 있다.

또, 공정 (b) 에서의 체외배양법에서는 사용된 배양액, 배양온도, 배양기상에도 하나의 큰 특징이 있다.

공정 (b) 에서는 CMRL-1066, TCM-199, DMEM, α-MEM 등을 사용하여 체외배양법을 실시하는 것이 바람직하다. 특히 CMRL-1066 을 사용하여 체외배양법을 실시하는 것이 바람직하다. 또한, CMRL-1066 액은 하기와 같이 조제할 수 있다.

10㎖ 의 A 액 [페니실린G (1000 단위), 겐타마이신황산염 (10㎎/㎖) 0.5㎖, CMRL-1066 (10×) ($NaHCO_3$ 및 L-글루타민 없음) 10㎖, $NaHCO_3$ 0.218g, 젖산나트륨 (29 g/100몰 스톡) 6.7㎖, 물로 100㎖ 에 메스업] 에 L-글루타민 0.014615g (1mM) 을 용해시킨다. 이어서, 얻어진 용액을 여과멸균한다. 멸균후의 용액 1㎖ 에 A 액 9㎖ 를 첨가하여 전량 10㎖ 의 B 액을 얻는다. 피루브산나트륨 0.0055g (최종농도 5mM) 을 B 액에 첨가하여 용해시켜 C 액을 얻는다. C 액 8㎖ 와 BCS (송아지혈청) 2㎖ 를 혼합한다. 얻어진 혼합물을 여과멸균하여 CMRL-1066 액을 얻는다.

또한, 배양액으로서 난자에 대한 영향을 저감시키는 관점에서 TALP 액, TALP-HEPES 액 및 BWW 액으로 이루어지는 군에서 선택된 배양액을 사용하는 것이 바람직하다. 상기 배양액으로는 구체적으로는 TALP 와 CMRL-1066 을 조합한 배양액을 들 수 있다. 이러한 TALP 와 CMRL-1066 을 조합한 배양액에 의하면 수정확인후, 이 배양액을 사용함으로써 상실배로부터 배반포기배로의 발생이 관찰되고, 또한 수정배의 40 46% 라는 매우 높은 발생율을 얻을 수 있다는 점에서 유리하다.

배양온도는 발생에 필요한 시간 단축의 관점 및 상실배로부터 배반포기배로의 발생을 진행시키는 관점에서 37℃ 이상이며 37.5℃ 이상인 것이 바람직하고, 38.5℃ 이하이며 38.2℃ 이하인 것이 바람직하다. 구체적으로는 38℃ 에서 배양을 실시함으로써 체외수정에서는 7 일후에, 현미수정에서는 8 일후에 효율적으로 배반포기배를 얻을 수 있다.

배양기상은 상실배로부터 배반포기배로의 발생을 진행 또는 향상시키는 관점에서 저산소의 기상이 바람직하고, 구체적으로 통상 ES 세포의 제작시에 사용되는 배양기상과 비교하여 O_2 농도가 낮고, 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 의 기상에 의하면 놀랄만하게 효율적으로 배반포기배를 얻을 수 있다는 우수한 효과를 발휘한다.

또한, (c) 공정 (b) 에서 얻어진 배반포기배를 사용하여 배아 줄기 세포를 수립하는 공정을 실시한다. 공정 (c) 에서는 공정 (b) 에서 얻어진 배반포기배에서 얻어지는 내부세포덩어리를 피더세포 위 또는 백혈구 증식억제인자 [LIF, 분화저해인자 (DIF) 로도 표기됨] 중에서 배양함으로써 배아 줄기 세포를 수립할 수 있다.

배반포기배로부터 내부세포덩어리를 취득할 때, 투명체가 제거된 배반포기배를 사용하면 된다. 상기 투명체는 히알루로니다아제, 프로나아제, 산성타이로드액 등에 의해 처리함으로써 제거해도 된다. 히알루로니다아제, 프로나아제, 산성타이로드액 등으로 투명체를 제거하는 경우, 예컨대 적절한 농도의 히알루로니다아제, 프로나아제, 산성타이로드액 등을 함유하는 M2 배양액 [예컨대, D.M.Glover 외 편저, DNA Cloning 4 Mammalian Systems A Practical Approach 제 2 판 (1995) 등을 참조할 것] 중에서 배반포기배를 인큐베이트하면 된다. 투명체 제거후, 얻어진 배반포기배를 인산완충화 생리적 식염수에 의해 적절하게 세정해도 된다.

투명체가 없는 배반포기배로부터 내부세포덩어리를 분리하기 위해서는 예컨대 이 배반포기배를 면역수술에 이용하면 된다. 또한, 내배엽계 세포를 피펫팅에 의해 박리하여 얻어진 내부세포덩어리를 피더세포 위에서 1 주간 배양하고, 증식한 내부세포덩어리를 트립신으로 처리 (예컨대, 0.25 중량% 트립신+0.5mM EDTA 등에 의한 처리) 하여 약 3 4 개의 세포로 이루어지는 덩어리로 하고, 또한 이들 세포를 피더세포 위에서 다시 배양한다.

면역수술에 사용하는 항혈청으로는 예컨대 토끼 항원숭이혈청, 구체적으로는 토끼 항일본 원숭이혈청, 토끼 항시노몰구스 원숭이혈청 등을 들 수 있다. 이러한 항혈청을 M16 배양액 [상기 DNA Cloning 4 Mammalian Systems A Practical Approach 등을 참조할 것] 으로 20 배로 희석한 용액중에 배반포기배를 옮기고, 37℃ 에서 30 분간 인큐베이트함으로써 내부세포덩어리를 분리할 수 있다. 또 필요에 따라 유리침을 사용하여 현미경하에서 물리적으로 영양 외배엽을 제거해도 된다.

피더세포로는 임신 12일 16일째인 마우스태아의 선유아세포의 초대배양세포, 마우스의 태아 선유아세포주인 STO 세포 등을 마이토마이신 C 나 X 선 처리하여 얻어진 세포 등을 들 수 있다. 이러한 마우스 유래의 피더세포는 대량으로 조제할 수 있다는 점에서 실험 등에 유리하다.

상기 피더세포의 제작은 예컨대 후술하는 실시예에 기재된 방법 등에 의해 실시할 수 있다.

피더세포는 예컨대 MEM 배지 (Minimum Essential Medium Eagle) 를 사용하여 젤라틴코팅한 배양용기에 파종된 배양용기에 파종한다. 피더세포는 배양용기를 빈틈없게 덮을 정도로 파종하면 된다.

상기 내부세포덩어리는 상기 피더세포가 파종된 배양용기중의 MEM 배지를 ES 세포배양용 배지 [ES 세포배지, 표 3] 로 교환한 피더세포 위에 파종한다.

[표 3]

제품명	첨가량
DMEM/F12 (시그마사 제조)	500㎖
FBS (JRH BIOSCIENCES 제조)	75㎖
글루타민 (시그마사 제조; 200mM)	5㎖
페니실린 (시그마사 제조; 10,000IU/㎖)스트렙토마이신 (시그마사 제조; 10㎎/㎖)혼합물	5㎖
피루브산나트륨 (시그마사 제조; 100mM)	5㎖
탄산수소나트륨 (시그마사 제조; 7.5%)	8㎖
2-메르캅토에탄올 (시그마사 제조; 최종농도 10^{-4} M)	4㎕
LIF (ESGRO 사 제조; 최종농도 1000U/㎖)	10^6 U/㎖ 인 것을 0.5㎖

세포의 배양조건은 마우스 ES 세포의 배양조건으로 통상 실시되는 조건이면 된다. 예컨대, 37℃, 5% CO_2 조건하에서 7 일간 배양하면 된다. 또한, 내부세포덩어리의 착상을 저지하지 않는 관점에서 배양개시로부터 3 일간은 배양액의 교환을 실시하지 않고, 매일 현미경하에서 착상상황을 관찰하는 것이 바람직하다. 또, 세포의 증식에 따라 순차적으로 사이즈가 큰 배양접시에 계대하면 된다.

이어서, 배아 줄기 세포의 동정 및 평가를 실시한다. 또한, 평가기준의 예시는 이하와 같다.

평가기준의 예

핵형 (karyotype):

염색체수에 이상이 없다. 통상, 기원으로 한 원숭이의 염색체수 (2n=42) 와 동일 수인지의 여부를 조사한다.

다분화능:

예컨대, 배아 줄기 세포로 생각되는 세포 (1×10^5 1×10^6 개) 를 8 12 주령의 SCID 마우스 또는 누드마우스의 피하, 신피막하 또는 정소에 주사하고, 5 16 주후에 종양혹의 형성 유무를 조사하여 종양혹이 형성된 경우에는, 이 종양혹에 대해 조직학적 검사를 실시함으로써 분화능을 조사할 수 있다. 또 피더세포를 제거하거나, 또는 레티노인산 등의 분화유도제를 첨가함으로써 다양한 분화능을 조사할 수 있어 다분화능을 평가할 수 있다.

형태학적 특징:

1. 높은 핵/세포질비, 현저한 핵소체, 콜로니형성을 나타낸다.

2. 마우스 ES 세포에 비해 콜로니형태가 편평하다.

이러한 형태학적 특징의 예를 도 1 및 도 2 의 패널 A 및 패널 B 에 나타낸다.

세포 표면 마커의 발현:

음성 대조: SSEA-1

양성 대조: SSEA-3, SSEA-4

상기 세포 표면 마커는 각각 스테이지 특이적인 배아 항원인 당질질 세포 표면 마커이다. 이러한 마커를 항원으로 각 항체를 제작하여 관용의 면역 염색 등에 의해 검출할 수 있다.

알칼리포스파타아제 활성:

관용의 알칼리포스파타아제 염색에 의해 검출할 수 있다.

본 발명의 원숭이 유래 배아 줄기 세포로는 구체적으로는 하기 특성;

(ⅰ) 미분화 상태를 유지한 채 증식계대가 가능한,

(ⅱ) 기원의 시노몰구스 원숭이 개체와 동일 염색체수를 갖는,

(ⅲ) 8 12 주령의 SCID 마우스 또는 누드마우스의 피하, 신피막하 또는 정소에 이식함으로써 다분화능이 관찰되는,

(ⅳ) SSEA-1 음성이며 또한 SSEA-3 과 SSEA-4 에 대해 양성인 및,

(ⅴ) 알칼리포스파타아제 활성이 검출되는

것을 나타내는, 수립된 시노몰구스 원숭이 유래 세포, 구체적으로는 배아 줄기 세포

를 들 수 있다. 이러한 시노몰구스 원숭이 유래 배아 줄기 세포는 (ⅵ) 높은 핵/세포질비, 현저한 핵소체, 콜로니형성을 나타내고, 또한 마우스 ES 세포에 비해 콜로니형태가 편평하다는 형태학적 특징 [예컨대, 도 1 및 도 2 의 패널 A 및 패널 B 를 참조할 것] 을 갖는다.

본 발명의 수립된 시노몰구스 원숭이 유래 배아 줄기 세포는 8 12 주령의 SCID 마우스 또는 누드마우스의 피하, 신피막하 또는 정소에 이식한 경우, 외배엽유래 세포, 중배엽유래 세포, 내배엽유래 세포 등으로의 분화능, 보다 구체적으로는 예컨대 뉴런, 글리어, 근육, 연골, 뼈, 선모상피, 장관상피 등으로의 분화능을 나타낸다.

본 발명이 수립된 시노몰구스 원숭이 유래 배아 줄기 세포에 의하면 질환모델동물의 제작을 위한 이 세포의 사용, 이식용 조직의 제작을 위한 이 세포의 사용이 기대된다.

본 발명의 원숭이 유래 배아 줄기 세포에 의하면, 조직 또는 세포, 특히 바람직하게는 영장류유래의 조직 또는 세포의 특징적 분화를 실시하기 위한 시약을 스크리닝할 수 있다. 본 발명에서는 조직 또는 세포의 특이적 분화를 실시하기 위한 시약의 스크리닝 방법도 포함된다.

본 발명의 조직 또는 세포의 특이적 분화를 실시하기 위한 시약의 스크리닝 방법은 피검물질의 존재하에 본 발명의 배아 줄기 세포를 유지하는 것을 하나의 특징으로 한다.

본 발명의 스크리닝법에서는 본 발명의 배아 줄기 세포를 사용하기 때문에, 영장류, 특히 인간, 원숭이에서의 발생학적 연구, 질환 연구, 임상응용, 실험모델 등에 유용하며, 또한 원하는 분화세포 또는 분화조직을 얻는 데에 유용한 시약을 스크리닝할 수 있다는 우수한 효과를 발휘한다.

본 발명의 스크리닝법에서는 배아 줄기 세포로부터 원하는 조직 또는 세포로의 특이적 분화는 예컨대 원하는 조직 또는 세포에 발현하는 마커를 지표로 평가될 수 있다. 상기 원하는 조직 또는 세포의 마커로는 조직 또는 세포특이적 항원을 들 수 있다. 상기 원하는 조직 또는 세포의 마커로는 예컨대 신경계 세포의 마커로서 뉴런특이적 에놀라아제, 글리어 선유성 산성 단백질, 네스틴 등, 연골의 마커로서 S-100 단백질, 타르타르산 저항성 산포스파타아제 등, 근육의 마커로서 데스민, 근육특이적 액틴 등을 들 수 있다. 이러한 특이적 마커는 이 마커에 대한 항체를 사용하여 관용의 ELISA, 면역 염색 등에 의해 검출해도 되고, 이 마커를 코드하는 핵산을 사용하여 관용의 RT-PCR, DNA 배열 혼성화 등에 의해 검출해도 된다. 또한,「핵산」이란 게놈 DNA, RNA, mRNA 또는 cDNA 를 의미한다.

상기 스크리닝법에 의해 얻어진 시약은 본 발명의 범위에 포함된다. 이러한 시약에 의하면 재생 의약분야에 대한 응용이 기대된다.

또, 본 발명의 배아 줄기 세포로부터 분화된 분화세포 또는 분화조직도 본 발명의 범위에 포함된다.

상기 분화세포 및 분화조직은 상기 조직 또는 세포에 특이적인 마커의 발현, 형태학적 특징의 관찰에 의해 동정할 수 있다.

본 발명의 분화세포 및 분화조직은 인간에 가까운 원숭이의 세포 및 조직이기 때문에, 다양한 약제에 대한 각종 시약의 피검체로서의 이용, 조직이나 세포의 이식모델로서의 이용 등에 적합하다.

실시예

이하, 실시예 등에 의해 본 발명을 더욱 상세하게 설명하지만, 본 발명은 이러한 실시예에 의해 조금도 한정되는 것은 아니다. 또한, 이하의 실시예 등에서「%」는 특별히 명기가 없는 경우는 중량% 를 나타내는 것으로 한다. 또, CO_2, O_2 및 N_2 에서의「%」표기는 체적% 를 나타내는 것으로 한다.

실시예 1 시노몰구스 원숭이의 배반포기배의 제작방법

원숭이류는 마우스와 래트, 토끼 등의 실험동물과 달리 난관이나 자궁환류에 의한 수정란 회수법은 확립되어 있지 않은 것이 현실이다. 배란주기에서의 체내수정란을 자궁내로부터 회수하는 방법은 효율이 매우 나쁘다고 알려져 있다.

그래서 금번은 배아 줄기 세포를 수립하기 위해 양호한 배반포기배를 얻기 위해, 체외수정법 및 현미수정법에 의해 수정을 실시하고, 그 후 체외배양법에 의해 배반포기배에 발생시키는 방법을 검토하였다.

(1) 난소자극법

시노몰구스 원숭이의 암컷 (4 15 령) 에 고나도트로핀방출호르몬 (GnRH) [상품명: 류플린 (Leuplin), 다케다약품공업(주) 제조; 또는 상품명: 스프레큐어 (Sprecur), 헥스트ㆍ마리온ㆍ루셀(주) 제조] 1.8㎎ 을 피하투여하였다. GnRH 투여 2 주간후부터 임신한 말혈청 고나도트로핀 (PMSG) [상품명: 세로트로핀 (Serotropin), 데이코쿠장기제약(주) 제조] 을 25IU/kg, 인간 폐경기뇨성 고나도트로핀 (hMG) [퍼고날 (Pergonal), 데이코쿠장기제약(주) 제조] 10IU/kg 또는 난포자극호르몬 (FSH) [페러티놈 (Fertinorm), 세로노ㆍ래버러토리즈사 제조] 3IU/kg 을 1 일 1 회, 일정한 시각에 9 일간 연속해서 본 실시예에서는 다핵에 근육내 투여하였다. 투여 5 일후에 복강경 (외경 3㎜) 을 사용하여 난소를 관찰하고 난포의 발육 유무를 확인하였다.

이어서, PMSG, hMG 또는 FSH 를 투여하여 난포의 발육이 충분함을 확인한 후, 인간 섬모성 고나도트로핀 (hCG) [상품명: 푸베로겐 (Puberogen), 산쿄(주) 제조] 400IU/kg 을 1 회 근육내 투여하였다. hCG 투여 40 시간 후에 채란하였다.

채란은 대해서는 난소를 복강경 (외경 10㎜) 관찰하에서 약 0.5㎖ 의 10% SSS (Serum Substitute Supplement, Irvine Scientific Sales Inc. 제조) 를 함유하는 α-MEM (alpha-Modification of Eagles Medium, ICD Biomedical Inc. 제조) 용액을 넣은 60㎜ 의 19G 또는 20G 의 카테란침을 부착한 2.5㎖ 의 주사통을 사용하여, 난포를 천자흡인하여 난포액과 함께 난자를 회수함으로써 실시하였다.

회수후, 즉시 실체현미경하에서 난구세포에 둘러싸인 성숙난자를 분리하고 0.3% BSA 함유 TALP (이하, BSA/TALP 로 나타냄) 중으로 옮겨 5% CO_2, 5% O_2, 90%$_2$, 37℃ 의 탄산가스 배양기중에서 3 4 시간 전배양하였다.

이상과 같이 복강경 관찰하에서의 채란은 복벽에 약 1㎝ 의 절개를 실시하는 것만으로 그곳으로부터 복강경을 삽입하고 복벽을 통하여 난소를 천자하는 것이다.

한편, 채란방법으로는 통상, 마우스에서는 난소, 자궁적출후, 난관 관류를 실시하는 난소적출법, 또 인간에서는 초음파 진단장치를 사용한 난소천자법에 의해 실시된다. 그러나, 원숭이류는 개체 수가 한정되어 있기 때문에 난소적출법을 사용할 수 없는 경우가 있다. 또, 체구가 인간에 비해 작기 때문에 초음파진단장치를 사용하는 방법은 매우 어렵다. 그로 인해, 원숭이류의 국내외에서의 체외수정에 사용되는 미수정란의 회수방법으로는 통상, 개복에 의한 난소 직시하에서 난소 천자법이 실시되고 있다. 그러나 이 방법은 ① 개체에 대한 부담이 큰 것, ② 수술후의 창상치유에 시간이 걸리는 것, ③ 감염의 위험성이 큰 것 등의 결점이 있다.

이에 비해 본 실시예에서 실시한 방법은 직시하보다 오히려 확대된 상이 얻어진다. 따라서, 천자부위를 정확하게 포착하여 채란을 실시할 수 있다. 또, 채란후, 복벽을 실 하나로 봉합하기만 하면 되므로 시간도 매우 단시간에 마칠 수 있기 때문에 동물애호의 관점에서도 매우 유용한 방법임을 알 수 있었다.

(2) 정자의 채취

(ⅰ) 정소상체로부터의 채취법

수컷 시노몰구스 원숭이 (10 15 령) 의 정소상체를 채취한 후, 즉시 23G 의 침을 부착한 1㎖ 의 주사통을 정관에 삽입하여 0.3% BSA 를 함유하는 BWW (이하, BSA/BWW 로 나타냄) 를 천천히 주입하고, 정소상체 꼬리부를 절단하여 유출하는 정액을 채취하였다.

(ⅱ) 전기자극법에 의한 채취법

ⅰ) 직장법

염산케타민 + 염산자일라진 (각각, 5㎎/㎏ 및 1㎎/㎏) 으로 수컷 원숭이의 시노몰구스 원숭이 (10 15 령) 에 마취를 실시하여 앙와위에 두었다. 전기자극기에 장착한 봉형상 직장전극에 케라틴크림을 도포하고 이 전극을 상기 원숭이의 직장에 가만히 삽입하였다. 음경을 멸균 생리식염수로 세정하고 종이수건 등으로 닦아내어 음경의 끝을 시험관 (50㎖) 안에 넣었다. 이어서, 전기자극기를 교류전압, 5V 에 세트하여 통전을 실시하였다. 통전을 3 5 초간 실시한 후, 5 초간 휴지하였다. 이것을 최대 3 회까지 반복하였다. 사정이 관찰되었을 때는 그 시점에서 종료하였다. 사정이 관찰되지 않을 때는 전압을 10V 로 하여 동일한 조작을 실시하였다. 다시, 사정이 관찰되지 않을 때는 15V, 20V 로 실시하였다.

ⅱ) 음경법

무마취하에서 케이지 앞면에 수컷 시노몰구스 원숭이 (10 15 령) 의 사지를 고정시켜 음경을 유지하기 쉬운 위치에 설치하였다. 수술용 고무장갑을 끼고 음경을 무균생리식염수로 세정하고 종이수건 등으로 닦아냈다. 전기자극기를 준비하고 전극을 음경에 세트하여 클립으로 접속하였다. 통전은 우선 직류 전압 5V 로 1 초 간격으로 ON-OFF 를 반복하면서 서서히 그 간격을 짧게 해 가는 조작으로 하였다. 사정이 관찰되지 않을 때는 동일한 조작을 10V, 15V, 20V 로 실시하였다. 다시 사정이 관찰되지 않을 때는 교류로 동일한 조작을 반복하였다.

(3) 정액채취후의 처리와 동결보존법 (Torii et al, 1998)

직장법 또는 음경법으로 채치한 정액을 37℃ 탄산가스 배양기내에서 약 30 분간 정치하였다. 액상 성분만을 채취하여 0.3% BSA 함유 BWW (Biggers, Whitten and Wittinghams) (BSA/BWW) 배양약을 약 1 2㎖ 첨가하여 정자용액을 조제한 후, 80% 퍼콜 (American Permacia Biotech Inc. 제조) 2.5㎖ 와 60% 퍼콜 2.5㎖ 의 액 위에 가만히 중복 층을 만들었다. 얻어진 것을 1,400rpm 으로 20 분, 실온에서 원심분리한 후, 시험관내 바닥부의 약 0.5㎖ 를 남기

고 상층을 흡인제거하였다. 또한, BSA/BWW 를 약 10㎖ 첨가하여 가볍게 혼합하였다. 얻어진 혼합물을 1,400rpm 으로 3 분, 실온에서 원심분리한 후, 바닥부의 약 0.5㎖ 를 남기고 상층을 흡인제거하였다.

얻어진 정자에 정자수 약 5×10^7 1.0×10^8 개/㎖ 가 되도록 BSA/BWW 를 적량 첨가하여 정자용액을 조제한 후, 4℃ 에서 약 60 90 분간 정치하였다. 그 후, 빙수중에서 정자용액의 1/5 량의 TTE-G 용액 [최종농도 12% 의 글리세롤을 함유하는 TTE 배지 (배지 100㎖ 중의 조성: Tes 1.2g, Tris-HCl 0.2g, 글루코오스 2g, 락토오스 2g, 라피노오스 0.2g, 난황 20㎖, 페니실린G 10,000IU, 스트렙토마이신황산염 5㎎) 를 가만히 적가하여 5 분간 정치하였다. 또한, 상기 TTE-G 용액의 적가 및 정치의 조작을 5 회 반복하였다.

빙수중에서 60 90 분간 방치한 후, 얻어진 정자용액을 0.25 또는 0.5㎖ 의 스트로에 넣었다. 스트로를 액체질소의 용기 상부에서 약 5 분간 유지한 후, 액체질소 상면에서 다시 5 분간 유지하였다. 상기 스트로를 액체질소중에 투입하여 보존하였다.

(4) 체외수정용 정자의 조제

액체질소로부터 꺼낸 스트로를 일단 실온에서 30 초간 유지한 후, 37℃ 의 온욕중에 30 초간 투입하여 보존정자용액을 융해하였다. 이어서, 상기 스트로에 1mM 카페인 (시그마사 제조) 과 1mM dbC-AMP (시그마사 제조) 를 함유한 BSA/BWW 10㎖ 를 첨가하여 30 분간 37℃ 의 탄산가스 배양기에서 인큐베이트하여 수정능 획득을 실시하였다.

그 후, 1,000rpm (200g) 으로 2 분간, 정자용액을 원심분리하여 상청을 버렸다. 이어서, 새롭게 1mM 카페인과 1mM dbC-AMP 를 함유하는 BSA/BWW 약 0.5 1㎖ 를 정자에 첨가하였다. 얻어진 정자용액을 37℃ 의 탄산가스 배양기에서 60 분간 정치하고, Swim Up 한 정자를 모아 정자의 운동성과 정자수를 확인하였다. 이로써, 체외수정용 정자를 얻었다.

(5) 수정방법

1) 체외수정법

플라스틱접시내의 미네랄오일로 덮인 50μℓ 의 BSA/BWW 의 드롭중에 난구세포에 둘러싸인 난자 1 5 개를 넣었다. 이어서 드롭중에 5.0×10^5 1.0×10^6 개 (정자)/㎖ 가 되도록 정자현탁액을 옮겼다. 드롭을 미네랄오일로 덮고 이어서 수정을 실시하였다.

그 후, 수정후의 난자를 37℃, 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 의 탄산가스 배양기에서 배양하였다. 수정 5 시간후, BWW 액으로부터 TALP 액으로 교환하고 수정을 확인하였다. 그 결과, 약 45% 의 높은 수정율로 수정란이 얻어졌다. 수정이 확인된 난자에 대해 약 20 시간 배양하고, 그 후 CMRL-1066 액으로 옮겨 배양을 계속하였다.

2) 현미수정법

(ⅰ) 난자의 조제

회수된 난모세포를 미네랄오일 (시그마사 제조) 로 덮인 50μℓ 의 0.3% BSA 를 함유하는 TALP (BAS/TALP) 용액을 스폿중에 모은 후, 약 2 4 시간, 37℃, 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 의 조건하에서 전배양하였다.

난자의 성숙상태를 확인하기 위해 0.1% 의 히알루로니다아제 (시그마사 제조) 를 함유하는 TALP-HEPES 용액중에 난모세포 배양물을 1 분간 노출시킨 후, 피펫팅으로 난구세포를 제거하였다. 회수된 난자에 대해 역상현미경하에서 이하의 Class-1 4 의 4 종류로 분류하였다.

Class-1: 극체 (PB) 를 갖는 성숙난자,

Class-2: PB 와 난핵포 (GV) 가 관찰되지 않는 성숙도상난자,

Class-3: GV 가 관찰되는 미성숙난자,

Class-4: 형상의 변형이 현저하거나, 세포질이 변성, 퇴행적 변화를 나타내고 있는 난자

Class-1 의 난자에 대해서는 확인후 바로 현미수정에 사용하였다. Class-2 와 Class-3 의 난자에 대해서는 또한 미네랄오일로 덮인 50㎕ 의 BSA/TALP 용액 스폿중에 모은 후, 37℃, 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2의 조건하에서 계속 배양하였다. 배양후 24 시간동안 난자의 성숙상태를 확인하였다. 성숙한 난자에 대해서는 그 시점에서 현미수정에 사용하였다. 나머지 미성숙난자와 Class-4 의 난자에 대해서는 수정에는 사용하지 않았다.

(ii) 정자의 조제

체외수정에 준한 방법으로 실시하였다.

(iii) 현미수정법

현미수정을 나리시게사 제조의 마이크로 머니퓰레이터를 장비한 올림퍼스IX70 역상현미경하에서 실시하였다.

150㎜ 접시에 스폿 1: 희석정자를 15㎕, 스폿 2: 10% 폴리비닐피롤리돈 PBS 배양액 [PVP: 평균분자량 약 360,000, 나카라이 테스크(주) 제조] 5㎕×3 개와 스폿 3: 난자조작용 TALP-HEPES (최최종농도 3㎎/㎖ BSA) 용액 5㎕×3 개를 순서대로 놓고, 표면을 미네랄오일로 덮어 건조를 방지하여 현미수정의 워킹·필드로 하였다. 또한, 본 실시예에서는 조작온도의 변화에는 유의하지 않고 가온스테이지를 사용하지 않았다.

주입용 니들로는 인간 현미수정용 경사각도 30 도의 니들 (외경 7 8㎛, 내경 5 7㎛, 메디·콘인터내셔날사 제조) 을 사용하였다. 상기 니들을 동작정밀도가 높은 알카텔시린지에 접속하였다.

난자유지용 니들로는, 마찬가지로 인간 현미수정용 경사각도 30 도의 니들, 또는 마그네틱·풀러 (PN-30, 나리시게사 제조) 에 의해 제작한 외경 약 100㎛, 선단의 내경 약 15㎛ 의 니들을 사용하였다. 상기 니들은 2000㎕ 의 밀폐 주사기를 부착한 나리시게의 인젝터에 접속하였다.

스폿 1 에서 인간 현미수정의 기준에 따라 운동성이 있는 정자를 선택하여 흡인하고 얻어진 정자를 스폿 2 로 옮겨 배출하였다. 스폿 2 에서는 PVP 의 점성에 의해 정자의 운동성이 저하되었다. 상기 정자 꼬리부를 인젝션니들로 문지르고 막의 일부를 파괴하여 정자의 운동을 정지시킨다. 이 정자를 점성이 높은 용액과 함께 흡인하여 스폿 3 으로 옮긴다.

성숙난자를 스폿 3 에 넣고 유지용 니들을 사용하여 극체 아래에 있는 염색체를 주입용 니들에 의해 파괴되지 않도록 6 시 또는 12 시의 위치에 고정시켰다. 그 후, 주입용 니들의 선단에 정자를 놓고 이 정자를 난자에 찔러 넣었다. 니들이 투명띠를 통과한 것을 확인한 후, 난세포막을 흡인하였다. 막의 단열이 일어난 것을 확인한 후, 주입용 니들내의 내용물 (정자와 난자의 세포질) 을 주입하였다. 정자와 난자의 세포질의 주입에 관한 일련의 이들 조작을 반복 실시하였다. 1 회의 조작으로 2 3 개 난자에 현미수정을 실시하는데, 정자나 난세포질에 의해 선단의 내측이 오염된 경우는 스폿 2 에서 세정한다.

현미수정된 난자를 즉시 배양기로 복귀시켜 37℃, 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2의 조건하에서 배양을 개시하였다. 현미수정후, 바로 60㎜ 논코팅 배양접시에 50㎕ 의 CMRL-1066 용액의 스폿을 만들고, 그것을 파라핀오일로 커버하였다. 또한, 스폿과 기상의 평형은 원칙적으로는 3 시간 이상 실시하였다. 현미수정후, 24 시간동안 TALP 용액으로부터 상기 CMRL-1066 용액의 스폿으로 옮겨 탄산가스 배양기중에서 37℃, 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2의 조건하에서 밀봉인 상태로 8 일간 배양하였다. 그 결과, 약 75 85% 의 높은 수정율로 수정란이 얻어졌다.

이상과 같이 원숭이류의 체외수정, 현미수정을 실시함에 있어서 정자의 활성화를 실시하였다. 마우스나 인간의 경우에는 통상적인 체외수정, 현미수정을 실시할 때 정자를 그대로 사용하지만, 본 실시예에서는 보다 높은 수정율을 얻기 위해 카페인과 dbC-AMP 에 의한 활성화를 실시한 후, Swim up 법에 의해 보다 수정능이 높은 정자의 획득을 실시하였다. 이 조작을 가함으로써 체외수정에서 높은 수정율을 얻을 수 있음이 판명되었다. 또한 운동성이 부족하고 체외수정에 부적합한 정자에 대해서는 동일한 처리를 실시함으로써 현미수정으로 고율로 수정시킬 수 있었다. 이 방법은 수정율이 나쁜 정자가 공급된 경우 등에는 매우 유효함을 알 수 있었다.

(6) 배양방법

체외수정 및 현미수정에서 수정을 확인한 후에는 배양을 실시함에 있어서 온도와 탄산가스농도의 급격한 변화를 피하기 위해, 인간에서는 통상 실시되지 않고 마우스나 토끼 등의 실험동물에서 널리 채용되고 있는 미네랄오일로 배지를 커버하는 미소 현적배양법을 채용하였다. 또, 배양경과를 관찰함으로써 온도나 pH 의 변화에 의한 불필요한 스트레스를 주는 것을 피하기 위해, 체외수정에서는 배양개시후 7 일간, 현미수정에서는 배양개시후 8 일간, 배반포기배의 출현이 예측될 때까지 배양기 도어의 개폐를 실시하지 않고 밀폐하여 배양을 실시하였다.

여기에서 사용한 배양액, 배양온도, 배양기상은 이하와 같다.

배양액: TALP & CMRL-1066

통상, 마우스에서 사용되는 BWW 나 인간에서 사용되는 Pl (나카메디컬사 제조), Blast medium (나카메디컬사 제조) 및 새롭게 개발된 HFF (human folicular fluid, 후소약품(주) 제조) 를 사용한 결과, 수정과 분할까지는 순조롭게 진행하지만 상실배까지의 발생에 그침을 알 수 있다. 수정확인후, TALP & CMRL-1066 의 배양액과 조합하여 사용함으로써 배반포기배로의 발생이 관찰되고, 또한 그 비율은 수정배의 40 46% 로 매우 고율로 관찰됨이 판명되었다. 배양기 밖의 조작에서 인산완충액계 PBS 를 사용하지 않고 HEPES 완충액계 TALP 를 사용함으로써 난자에 대한 악영향을 감소시킨 것으로 생각된다.

배양온도: 38℃

마우스나 인간에서는 통상 37℃ 에서 실시하지만, 이 온도에서는 발생이 늦고 또한 상실배 이후로의 발생은 전혀 없었다. 그래서, 38.5℃ 에서 배배양을 실시하는 소 등과 마찬가지로, 38℃ 라는 약간 높은 온도에서 배양을 실시함으로써 체외수정에서는 7 일후에, 현미수정에서는 8 일후에 배반포기배를 얻었다.

배양기상: 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2

통상 사용되는 5% CO_2, 95% 공기의 조건하에서는 상실배까지의 발생에 그쳤지만, 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2 에서 배양을 실시함으로써 배반포기배에 대한 발생율이 높은 비율로 관찰되게 되었다.

실시예 2 원숭이 ES 세포수립법

(1) 피더세포의 제작

생후 12.5 일된 마우스배에서 얻은 초대 배선유아세포 (이하, PEFs 라고도 칭함) 를 10% 소태아혈청 (FBS) 을 함유하는 MEM 배지에서 콘플루언트가 될 때까지 초대 3 대째 사이에서 배양하였다. 이어서, 최최종농도 10㎍/㎖ 의 마이

토마이신C (MMC) 를 함유하는 MEM 배지에서 PEFs 를 2 3 시간 배양하여 세포분열을 불활성화하였다. 그 후, MMC 를 함유하는 배지를 제외하고 세포를 PBS 로 3 회 세정하였다. 트립신처리 (0.05% 트립신, 1mM EDTA) 에 의해 세정후의 세포를 배양접시에서 떼내어 세포수를 카운트하였다.

젤라틴코팅한 24 웰 배양접시의 각 웰에 2×10^4 개의 MMC 처리된 PFEs 를 파종하였다.

얻어진 세포에 대해 실제로 접시 위에 파종하여 적합한 세포수임을 확인한 뒤, 마우스 ES 세포를 배양하여 성질을 조사하였다. 그 결과, 증식능이 양호하며 미분화 상태가 유지되었기 때문에 얻어진 세포가 피더세포로서 적합함이 나타났다. 3 대째 이하 (초대 3 대째) 까지의 배양의 피더세포가 양호하였다.

(2) 원숭이 배반포기배로부터의 내부세포덩어리의 분리

투명체 제거를 위해 원숭이 배반포기배를 최최종농도 0.5% 프로나아제 또는 타이로드를 함유하는 M2 배양액 [예컨대, D.M. Glover 외 편저, DNA Cloning 4 Mammalian Systems A Practical Approach 제 2 판 (1995) 등을 참조할 것] 으로 옮겨 37℃ 에서 10 분간 인큐베이트하였다. 또한, 투명체가 남아 있는 배반포기배에 대해 추가로 37℃ 에서 5 분간 프로나아제처리를 실시하였다. 투명체의 제거를 확인한 후, 얻어진 배반포기배를 PBS 로 2 회 세정하였다.

이어서, 토끼 항시노몰구스 원숭이 림프구혈청을 M16 배양액 [상기 DNA Cloning 4 Mammalian Systems A Practical Approach 등을 참조할 것] 으로 20 배로 희석한 용액중에 배반포기배를 옮겨 37℃ 에서 30 분간 인큐베이트하였다. 그 후 얻어진 배반포기배를 PBS 로 3 회 세정하였다. 보체를 M16 배양액으로 50 배로 희석한 용액중에 배반포기배를 옮겨 37℃ 에서 30 분간 인큐베이트하였다. 얻어진 배반포기배를 PBS 로 3 회 세정하였다. 배반포기배의 영양 외배엽을 완전히 제거할 수 없는 경우는, 유리침을 사용하여 현미경하에서 물리적으로 영양 외배엽을 제거하였다. 이로써, 내부세포덩어리 (Inner Cell Mass; ICM) 를 분리하였다.

(3) 원숭이 내부세포덩어리의 배양

(1) 에서 얻어진 피더세포를 파종한 24 웰 배양접시에서 MEM 배양을 제외하고 웰마다 ES 세포배양 [표 3] 을 800㎕ 씩 첨가하였다.

이어서, (2) 에서 얻어진 ICM 을 마이크로피펫을 사용하여 각 웰에 1 개씩 옮겨 37℃, 5% CO_2 조건하에서 7 일간 배양하였다. ICM 의 착상을 저해하지 않기 위해 배양개시부터 3 일간은 배지의 교환을 실시하지 않고 매일 현미경하에서 착상상황을 관찰하였다.

배양 7 일째에 ICM 세포의 해리를 실시하였다. 웰에서 ES 세포배지를 제외하고 PBS 로 1 회 세정하였다. 300㎕ 의 0.25%, 트립신/0.02% EDTA 를 웰에 첨가하여 즉시 제거하였다. 이어서, 24 웰 배양접시를 37℃ 에서 1 분간 인큐베이트하였다. 현미경하에서 세포의 해리를 확인한 후, 웰에 500㎕ 의 ES 세포배지를 첨가하여 피펫만으로 잘 피펫팅하였다.

피더세포를 미리 파종한 24 웰 배양접시의 웰에 상기 모든 세포를 옮겼다. 300㎕ 의 ES 세포배지를 첨가하여 모두 800㎕ 의 배지량으로 한 후, 세포의 파종불균일이 없도록 잘 혼합하였다. 2 일에 1 회, ES 세포배지를 교환하였다. 해리 후, 7 일 이내에 ES 세포로 생각되는 세포집단이 증식하여 콜로니로 출현하기 때문에 매일 관찰하였다.

ES 세포의 콜로니가 출현하면 24 웰 배양접시 위의 세포를 트립신처리하여 계대증식을 반복하였다. 이 동안 매일 또는 2 일에 1 회의 빈도로 ES 세포배지를 교환하였다. 그 결과, 시노몰구스 원숭이의 배반포기배로부터 복수 ES 세포주를 얻었다.

실시예 3 원숭이 ES 세포의 평가

(1) 시노몰구스 원숭이 ES 세포

핵형 (karyotype):

염색체수가 정상 (기원으로 한 원숭이의 염색체수와 동일 수: 2n=42) 인지의 여부를 조사하였다. 이 결과, 수립된 ES 세포주는 정상 핵형을 유지하였다.

다분화능:

1×10^6 개의 시노몰구스 원숭이 ES 세포를 8 주령의 SCID 마우스의 서혜부에 피하주사하였다. 주사후 5 12 주후에 종양혹의 형성이 확인되었다. 상기 종양혹을 부안액 또는 파라포름알데히드액으로 고정시킨 후, 얇게 잘라 헤마톡시린-에오진염색 (HE 염색) 또는 면역 염색을 실시하여 조직학적 검사를 실시하였다. 또한, 면역 염색에서는 이용할 수 있는 원숭이조직 특이항체가 매우 적기 때문에 인간의 뉴런 특이적 에놀라아제 (NSE) 에 대한 항체, 글리어 선유성 산성 단백질 (GFAP) 에 대한 항체, S-100 단백질에 대한 항체 및 데스민에 대한 항체를 사용하였다.

그 결과, 형성된 종양덩어리는 외배엽 (뉴런, 글리어) 유래, 중배엽 (근육, 연골, 뼈) 유래 및 내배엽 (선모상피, 장관상피) 유래의 세포군으로 구성되는 테라토마임을 알 수 있었다. 또, 면역조직학적 검사에서 뉴런은 NSE 에 대한 항체, 글리어는 NSE 에 대한 항체 및 GFAP 에 대한 항체, 말초신경은 NSE 에 대한 항체, 연골은 S-100 단백질에 대한 항체, 근육은 데스민에 대한 항체에 의해 각각 검출되었다. 이상의 결과로부터, 시노몰구스 원숭이 ES 세포가 외배엽유래 세포, 중배엽유래 세포, 내배엽유래 세포 등, 보다 구체적으로는 뉴런, 글리어, 근육, 연골, 뼈, 선모상피, 장관상피 등으로의 다분화능을 갖는 것이 밝혀졌다.

이러한 HE 염색후의 현미경 관찰의 결과를 도 3 의 패널 A H 에 면역 염색후의 현미경 관찰의 결과를 도 3 의 패널 I M 에 각각 나타낸다.

형태학적 특징:

1. 높은 핵/세포질비, 현저한 핵소체, 콜로니형성을 나타냈다.

2. 마우스 ES 세포에 비해 콜로니형태가 편평하였다.

이러한 형태학적 특징을 도 1 및 도 2 의 패널 A 및 패널 B 에 나타낸다.

세포 표면 마커의 발현:

세포 표면 마커인 Stage-specific embryonic antigens (SSEA) 의 유무를 확인하기 위해 SSEA-1 (음성대조), SSEA-3, SSEA-4 의 각 세포 표면 마커에 대한 항체를 사용하여 면역 염색을 실시하였다. 이들 항체는 The Developmental Studies Hybridoma Bank of the National Institute of Child Health and Human Development 에서 입수하였다. SSEA 의 각 세포 표면 마커에 대해 하기 조작에 의해 평가하였다. 4% 파라포름알데히드로 고정시킨 세포와 1차 항체를 반응시켰다. 이어서, 다음에 아미노산폴리머에 퍼옥시타아제와 2차 항체를 결합시킨 표식폴리머 (심플스테인 PO, 니치레이사 제조) 를 반응시킨 후, 심플스테인 DAB 용액 (니치레이사 제조) 을 첨가하여 검출하였다.

그 결과, SSEA-1 은 검출되지 않고 SSEA-3 및 SSEA-4 가 검출되었다.

이러한 면역 염색에 의한 SSEA-4 의 검출결과를 도 2 의 패널 D 에 나타낸다.

알칼리포스파타아제 활성:

Fast-Red TR SaH 를 기질로서 알칼리포스파타아제 활성을 HNPP (로슈사 제조) 를 사용하여 측정하였다. 그 결과, 알칼리포스파타아제 활성이 검출되었다. 이러한 검출결과를 도 2 의 패털 C 에 나타낸다.

산업상 이용 가능성

본 발명의 원숭이 유래 배아 줄기 세포는 영장류, 특히 인간, 원숭이에서의 발생학적 연구, 질환 연구, 임상응용, 실험모델로서 유용하다. 또, 본 발명의 원숭이 유래 배아 줄기 세포의 생산 방법에 의하면, 상기 원숭이 유래 배아 줄기 세포를 높은 수율로 얻을 수 있기 때문에 영장류, 특히 인간, 원숭이에서의 발생학적 연구, 질환 연구, 임상응용, 실험모델에서의 이용이 기대된다. 또한, 본 발명의 조직 또는 세포의 특이적 분화를 실시하기 위한 시약의 스크리닝 방법에 의하면, 원하는 분화세포 또는 분화조직을 얻는 데에 유용한 조직 또는 세포의 특이적 분화를 실시하기 위한 시약의 스크리닝에 이용할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

(a) 원숭이 난자와 원숭이 정자를 사용하여 체외수정법 또는 현미수정법에 의해 수정을 실시하여 수정란을 얻는 공정,

(b) 공정 (a) 에서 얻어진 수정란을 사용하여 체외배양법에 의해 배반포기배를 발생시키는 공정 및,

(c) 공정 (b) 에서 얻어진 배반포기배를 사용하여 배아 줄기 세포를 수립하는 공정을 포함하는 프로세스를 실시함으로써 얻어질 수 있는 원숭이 유래 배아 줄기 세포.

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 원숭이가 일본 원숭이 또는 시노몰구스 원숭이인 배아 줄기 세포.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 원숭이가 시노몰구스 원숭이인 배아 줄기 세포.

청구항 4.

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 공정 (a) 에서 TALP 액, TALP-HEPES 액 및 BWW 액으로 이루어지는 군에서 선택된 배양액을 사용하는 배아 줄기 세포.

청구항 5.

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 공정 (b) 에서의 체외배양법이 미소 현적배양법인 배아 줄기 세포.

청구항 6.

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 공정 (b) 에서 CMRL-1066 을 사용하여 체외배양법을 실시하는 배아 줄기 세포.

청구항 7.

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항에 있어서, 공정 (b) 에서 배양온도가 38℃ 인 배아 줄기 세포.

청구항 8.

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 공정 (b) 에서 배양조건이 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2의 조건인 배아 줄기 세포.

청구항 9.

(a) 원숭이 난자와 원숭이 정자를 사용하여 체외수정법 또는 현미수정법에 의해 수정을 실시하여 수정란을 얻는 공정,

(b) 공정 (a) 에서 얻어진 수정란을 사용하여 체외배양법에 의해 배반포기배를 발생시키는 공정 및,

(c) 공정 (b) 에서 얻어진 배반포기배를 사용하여 배아 줄기 세포를 수립하는 공정을 포함하는 원숭이 유래 배아 줄기 세포의 생산 방법.

청구항 10.

제 9 항에 있어서, 원숭이가 일본 원숭이 또는 시노몰구스 원숭이인 방법.

청구항 11.

제 9 항에 있어서, 원숭이가 시노몰구스 원숭이인 방법.

청구항 12.

제 9 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항에 있어서, 공정 (a) 에서 TALP 액, TALP-HEPES 액 및 BWW 액으로 이루어지는 군에서 선택된 배양액을 사용하는 방법.

청구항 13.

제 9 항 내지 제 12 항 중 어느 한 항에 있어서, 공정 (b) 에서의 체외배양법이 미소 현적배양법인 방법.

청구항 14.

제 9 항 내지 제 13 항 중 어느 한 항에 있어서, 공정 (b) 에서 배양온도가 38℃ 인 방법.

청구항 15.

제 9 항 내지 제 14 항 중 어느 한 항에 있어서, 공정 (b) 에서 배양조건이 5% CO_2, 5% O_2, 90% N_2의 조건인 방법.

청구항 16.

제 9 항 내지 제 15 항 중 어느 한 항에 있어서, 공정 (b) 에서 CMRL-1066 을 사용하여 체외배양법을 실시하는 방법.

청구항 17.

하기 특성:

(ⅰ) 미분화 상태를 유지한 채 증식계대가 가능하고,

(ⅱ) 기원의 시노몰구스 원숭이 개체와 동일 염색체수를 갖고,

(ⅲ) 8 12 주령의 SCID 마우스 또는 누드마우스의 피하, 신피막하 또는 정소에 이식함으로써 다분화능이 관찰되고,

(ⅳ) SSEA-1 음성이며, 또한 SSEA-3 과 SSEA-4 에 대해 양성이고,

(ⅴ) 알칼리포스파타아제 활성이 검출되는

것을 나타내는, 수립된 시노몰구스 원숭이 유래 세포.

청구항 18.

제 17 항에 있어서, 8 12 주령의 SCID 마우스 또는 누드마우스의 피하, 신피막하 또는 정소에 이식한 경우, 외배엽, 중배엽, 내배엽으로 이루어지는 군에서 선택된 적어도 1 종으로의 분화능을 나타내는, 수립된 시노몰구스 원숭이 유래 세포.

청구항 19.

제 17 항 또는 제 18 항에 있어서, 8 12 주령의 SCID 마우스 또는 누드마우스의 피하, 신피막하 또는 정소에 이식한 경우, 뉴런, 글리어, 근육, 연골, 뼈, 선모상피 및 장관상피로 이루어지는 군에서 선택된 적어도 1 종으로의 분화능을 나타내는, 수립된 시노몰구스 원숭이 유래 세포.

청구항 20.

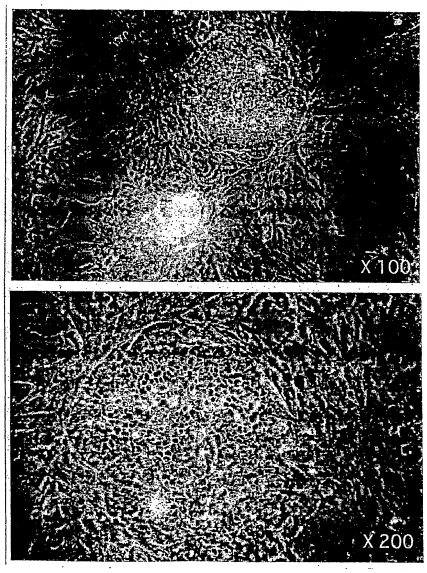
피검물질의 존재하에, 제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 기재된 원숭이 유래 배아 줄기 세포 및 제 17 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 기재된 시노몰구스 원숭이 유래 세포로 이루어지는 군에서 선택된 세포를 유지하는 것을 특징으로 하는 조직 또는 세포의 특이적 분화를 실시하기 위한 시약의 스크리닝 방법.

청구항 21.

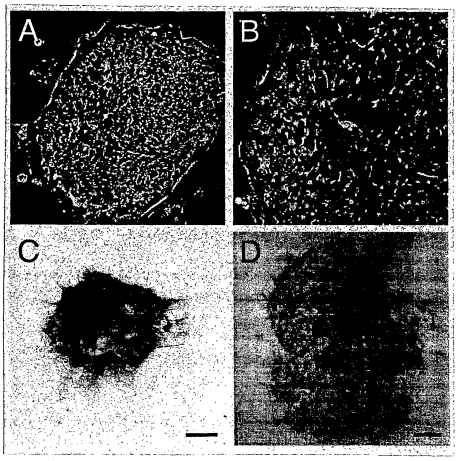
제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 기재된 배아 줄기 세포 및 제 17 항 내지 제 19 항 중 어느 한 항에 기재된 시노몰구스 원숭이 유래 세포로 이루어지는 군에서 선택된 세포로부터 분화되어 이루어지는 분화세포 또는 분화조직.

도면

도면 1



도면 2



도면 3