(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0103979
(43) 공개일자 2014년08월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0789 (2010.01)
(21) 출원번호 10-2014-7017031
(22) 출원일자(국제) 2012년11월22일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2014년06월20일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2012/080365
(87) 국제공개번호 WO 2013/077424
국제공개일자 2013년05월30일
(30) 우선권주장
JP-P-2011-258208 2011년11월25일 일본(JP)

(71) 출원인
스미또모 가가꾸 가부시끼가이샤
일본 도쿄도 주오쿠 신가와 2쵸메 27-1
도꾸리쯔교세이호징 리가가쿠 겐큐소
일본국 사이타마현 와코시 히로사와 2-1
(72) 발명자
안도 사토시
일본국 오사카후 오사카시 고노하나쿠 가스가데나카 3쵸메 1방 98고 스미또모 가가꾸 가부시끼가이샤 나이
나카노 도쿠시게
일본국 오사카후 오사카시 고노하나쿠 가스가데나카 3쵸메 1방 98고 스미또모 가가꾸 가부시끼가이샤 나이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **다능성 간세포 유래 조직의 동결 보존 방법**

(57) 요 약

본 발명은, 하기 (1) 내지 (3) 을 포함하는 것을 특징으로 하는 다능성 간세포 유래 조직의 동결 보존 방법을 제공한다.

(1) 다능성 간세포 유래의 조직을 술폭시드 및 사슬형 폴리올을 함유하는 세포 보호 용액과 접촉시키는 제 1 단계.

(2) 제 1 단계에서 세포 보호 용액과 접촉시킨 다능성 간세포 유래의 조직을 동결 보존액 중에서 유지시키는 제 2 단계.

(3) 제 2 단계에서 동결 보존액 중에 유지시킨 다능성 간세포 유래의 조직을, 냉각제 존재 하에서 동결 보존하는 제 3 단계.

본 방법에 의해, 다능성 간세포 유래의 조직을 안정적으로 보존하는 방법을 제공할 수 있다.

(72) 발명자

사사이 요시키

일본국 사이타마현 와코시 히로사와 2-1 도꾸리쯔 교세이호징 리가가쿠 겐큐소 나이

에이라쿠 모토츠구

일본국 사이타마현 와코시 히로사와 2-1 도꾸리쯔 교세이호징 리가가쿠 겐큐소 나이

특허청구의 범위

청구항 1

하기 (1) 내지 (3) 을 포함하는 다능성 간세포 유래 조직의 동결 보존 방법:

(1) 다능성 간세포 유래의 조직을 술폭시드 및 사슬형 폴리올을 함유하는 세포 보호 용액과 접촉시키는 제 1 단계,

(2) 제 1 단계에서 세포 보호 용액과 접촉시킨 다능성 간세포 유래의 조직을 동결 보존액 중에서 유지시키는 제 2 단계, 및

(3) 제 2 단계에서 동결 보존액 중에 유지시킨 다능성 간세포 유래의 조직을 냉각제 존재 하에서 동결 보존하는 제 3 단계.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 술폭시드 및 사슬형 폴리올을 함유하는 세포 보호 용액이 술폭시드, 사슬형 폴리올 및 올리고당을 함유하는 세포 보호 용액인 동결 보존 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 세포 보호 용액에서 술폭시드의 농도가 5 내지 15% 이고, 사슬형 폴리올의 농도가 4 내지 15% 이고, 올리고당의 농도가 5 내지 20% 인 동결 보존 방법.

청구항 4

제 2 항 또는 제 3 항에 있어서, 술폭시드가 디메틸 술폭시드이고, 사슬형 폴리올이 에틸렌 글리콜이고, 올리고당이 수크로오스인 동결 보존 방법.

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 다능성 간세포가 인간 다능성 간세포인 동결 보존 방법.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 조직이 뇌 신경 조직인 동결 보존 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서, 조직이 망막 조직인 동결 보존 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 있어서, 제 3 단계가 10℃/분 이상의 온도 저하 속도로 수행되는 동결 보존 방법.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항에 있어서, 냉각제가 액체 질소인 동결 보존 방법.

청구항 10

제 1 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 동결 보존액이 디메틸 술폭시드, 아세트아미드 및 프로필렌 글리콜을 함유하는 동결 보존액인 동결 보존 방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 디메틸 술폭시드의 농도가 1 내지 4 M 이고, 아세트아미드의 농도가 0.5 내지 2 M 이고, 프로필렌 글리콜의 농도가 1.5 내지 6 M 인 동결 보존 방법.

청구항 12

술폭시드 및 사슬형 폴리올을 포함하는, 다능성 간세포 유래 조직의 동결 보존을 위한 세포 보호 용액.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 올리고당을 추가로 포함하는 세포 보호 용액.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 다능성 간세포 유래 조직의 동결 보존 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 조직이란, 형태 및 성질이 상이한 복수 종류의 세포가 일정한 패턴으로 입체적으로 배치되는 구조를 갖는 세포 집단의 구조체이다.

[0003] 예를 들어, 안구의 구성 요소의 하나인 망막 조직은, 안구의 뒤측의 내벽을 덮는 막상의 조직이며, 망막 조직은 신경 세포가 규칙적으로 정렬되는 층 구조를 갖는다. 망막은 크게 나누어 시세포, 쌍극 세포, 수평 세포, 아마크린 세포 및 신경절 세포의 5 종류의 신경 세포를 포함한다. 광은 시세포에 의해 전기 신호로 변환되어 그 정보가 화학 시냅스를 통해 쌍극 세포 및 수평 세포에 전달된다. 쌍극 세포는 아마크린 세포 및 신경절 세포와 시냅스 결합을 형성하며, 신경절 세포의 축색이 시신경으로서 대뇌의 시각 중추와 교신한다. 망막 장애의 치료를 위해, 지금까지도 병인 연구, 약물 발견에 있어서의 약효 및 안전성 연구, 세포 이식 치료 등이 수행되고 있다. 그러나, 이와 같은 연구의 재료가 되는 인간 생체 조직을 반영한 층 구조를 갖는 망막 조직은 입수하기가 어렵다.

[0004] 최근, ES 세포와 같은 다능성 간세포의 분화 유도에 의한 생체내 망막 조직에 필적하는 망막 조직의 제작이 보고되었다 (비특허 문헌 1). 다능성 간세포를 분화시켜 수득한 조직을 재생 의학, 안전성 시험 등에 활용하려면, 균일한 품질을 갖는 조직을 안정적으로 대량 공급하는 것이 필수적이다. 한편, 다능성 간세포를 분화시켜 여러 조직을 제작하려면, 예를 들어 인간 ES 세포로부터 망막 조직을 제작하기 위해서는 3 주 이상의 기간을 필요로 하는 바와 같이, 일정 기간 이상의 분화 유도 기간이 필요하다. 또한, 분화 유도의 효율도 분화 유도 처리에 따라 종종 변화한다. 따라서, 이러한 조직을 사용시 순서대로 제작하는 경우 현실적인 실용화가 어렵고, 상기 조직을 분화 유도의 도중 단계에서 보존하는 기술이 간절히 필요하다.

[0005] [선행 기술 문헌]

[0006] [비특허 문헌]

[0007] 비특허 문헌 1: M. Eiraku et al., Nature 472, p51-56 (2011): Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 재생 의학, 안전성 및 효능의 평가 등에 사용하기 위해 다능성 간세포 유래의 조직을 다량으로 안정적으로 공급하려면, 조직의 보존 방법 개발이 급선무이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명자들은, 이와 같은 상황을 검토하고 집중 연구를 수행하였으며, 다능성 간세포 유래의 조직을 안정적으로 보존하는 방법을 찾아내어, 본 발명에 이르렀다.

[0010] 따라서, 본 발명은 하기를 제공한다.

[0011] [1] 하기 (1) 내지 (3) 을 포함하는 다능성 간세포 유래 조직의 동결 보존 방법:

[0012] (1) 다능성 간세포 유래의 조직을 술폭시드 및 사슬형 폴리올을 함유하는 세포 보호 용액과 접촉시키는 제 1 단계,

[0013] (2) 제 1 단계에서 세포 보호 용액과 접촉시킨 다능성 간세포 유래의 조직을 동결 보존액 중에서 유지시키는 제 2 단계,

[0014] (3) 제 2 단계에서 동결 보존액 중에 유지시킨 다능성 간세포 유래의 조직을 냉각제 존재 하에서 동결 보존하는 제 3 단계.

[0015] [2] 술폭시드 및 사슬형 폴리올을 함유하는 세포 보호 용액이 술폭시드, 사슬형 폴리올 및 올리고당을 함유하는 세포 보호 용액인 상기 [1] 의 동결 보존 방법.

[0016] [3] 세포 보호 용액에서 술폭시드의 농도가 5 내지 15% 이고, 사슬형 폴리올의 농도가 4 내지 15% 이고, 올리고당의 농도가 5 내지 20% 인 상기 [2] 의 동결 보존 방법.

[0017] [4] 술폭시드가 디메틸 술폭시드이고, 사슬형 폴리올이 에틸렌 글리콜이고, 올리고당이 수크로오스인 상기 [2] 또는 [3] 의 동결 보존 방법.

[0018] [5] 상기 다능성 간세포가 인간 다능성 간세포인 상기 [1] 내지 [4] 중 어느 하나의 동결 보존 방법.

[0019] [6] 조직이 뇌 신경 조직인, 상기 [1] 내지 [5] 중 어느 하나의 동결 보존 방법.

[0020] [7] 조직이 망막 조직인, 상기 [1] 내지 [5] 중 어느 하나의 동결 보존 방법.

[0021] [8] 제 3 단계가 10℃/분 이상의 온도 저하 속도로 수행되는, 상기 [1] 내지 [7] 중 어느 하나의 동결 보존 방법.

[0022] [9] 냉각제가 액체 질소인, 상기 [1] 내지 [8] 중 어느 하나의 동결 보존 방법.

[0023] [10] 동결 보존액이 디메틸 술폭시드, 아세트아미드 및 프로필렌 글리콜을 함유하는 동결 보존액인, 상기 [1] 내지 [9] 중 어느 하나의 동결 보존 방법.

[0024] [11] 디메틸 술폭시드의 농도가 1 내지 4 M 이고, 아세트아미드의 농도가 0.5 내지 2 M 이고, 프로필렌 글리콜의 농도가 1.5 내지 6 M 인, 상기 [10] 의 동결 보존 방법.

[0025] [12] 술폭시드 및 사슬형 폴리올을 포함하는, 다능성 간세포 유래 조직의 동결 보존을 위한 세포 보호 용액.

[0026] [13] 올리고당을 추가로 포함하는, 상기 [12] 의 세포 보호 용액.

발명의 효과

[0027] 본 발명에 의해, 다능성 간세포 유래 조직의 안정적 보존이 가능해진다.

도면의 간단한 설명

[0028] 도 1 은 RAX::녹색 형광 단백질 (이하, 때때로 "GFP" 로 지칭함) 녹-인 (knock-in) 인간 ES 세포의 분화 유도에 의해 수득한 응집체에 생긴 망막 조직의 명시야 이미지를 나타내는 도면이다.

도 2 는 도 1 에 나타낸 망막 조직을 갖는 응집체의 형광 이미지를 나타내는 도면이다.

도 3 은 응집체로부터 분리한 후 배양한 망막 조직의 명시야 이미지를 나타내는 도면이다.

도 4 는 도 3 에 나타낸 망막 조직의 형광 이미지를 나타내는 도면이다.

도 5 는 응집체로부터 분리한 후 배양한 망막 조직의 동결 절편을 항-GFP 항체, 항-Chx10 항체, 항-Pax6 항체 또는 항-Brn3 항체를 이용해 면역염색한 결과를 나타내는 도면이다.

도 6 은 응집체로부터 분리한 후 배양한 망막 조직으로서, 실험의 대조군으로서 동결하지 않은 망막 조직 (A, B), 세포 보호 용액과 접촉시키지 않고 동결한 망막 조직 (C, D), 11.0% (w/v) 디메틸 술폭시드 (DMSO) 를 함유하는 용액으로 침투 처리한 후 동결한 망막 조직 (E, F), 11.0% (w/v) 디메틸 술폭시드 (DMSO) 및 5.55% (w/v) 에틸렌 글리콜을 함유하는 용액으로 침투 처리한 후 동결한 망막 조직 (G, H), 및 11.0% (w/v) 디메틸 술폭시드 (DMSO), 5.55% (w/v) 에틸렌 글리콜 및 10% (w/v) 수크로오스를 함유하는 용액으로 침투 처리한 후 동결한 망막 조직 (I, J) 의 상태를 나타내는 도면이다.

도 7 은 응집체로부터 분리한 후 배양한 망막 조직으로서, 실험의 대조군으로서 동결하지 않은 망막 조직 (A, B), 5% (w/v) 수크로오스를 함유하는 용액으로 침투 처리한 후 동결한 망막 조직 (C, D), 10% (w/v) 수크로오스

를 함유하는 용액으로 침투 처리한 후 동결한 망막 조직 (E, F), 20% (w/v) 수크로오스를 함유하는 용액으로 침투 처리한 후 동결한 망막 조직 (G, H), 11.0% (w/v) 디메틸 술폭시드 (DMSO) 및 10% (w/v) 수크로오스를 함유하는 용액으로 침투 처리한 후 동결한 망막 조직 (I, J), 5.55% (w/v) 에틸렌 글리콜 및 10% (w/v) 수크로오스를 함유하는 용액으로 침투 처리한 후 동결한 망막 조직 (K, L) 의 상태를 나타내는 도면이다.

도 8 은 응집체로부터 분리한 후 배양한 망막 조직으로서, 11.0% (w/v) 디메틸 술폭시드 (DMSO) 및 5.55% (w/v) 에틸렌 글리콜을 함유하는 용액으로 침투 처리한 후 동결한 망막 조직의 동결 절편 (A, B) 및 11.0% (w/v) 디메틸 술폭시드 (DMSO), 5.55% (w/v) 에틸렌 글리콜 및 10% (w/v) 수크로오스를 함유하는 용액으로 침투 처리한 후 동결한 망막 조직의 동결 절편 (C, D, E, F) 을 항-GFP 항체 (A, C, E), 항-Chx10 항체 (B), 항-Chx10 및 항-Pax6 항체 (D), 항-Chx10 및 항-TuJ1 항체 (F) 를 이용해 면역염색한 결과를 나타내는 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0029] 본 발명을 실행하기 위한 형태(들) 를 하기에 상세히 설명한다.

[0030] 본 발명에서, "형질전환체" 란 형질전환에 의해 제작된 세포와 같은 생명체의 전부 또는 일부를 의미한다. 형질전환체의 예는 원핵 세포, 효모, 동물 세포, 식물 세포, 곤충 세포 등을 포함한다. 표적에 따라, 형질전환체는 또한 때때로 형질전환 세포, 형질전환 조직, 형질전환 숙주 등으로 불린다. 본 발명에서 사용되는 세포는 또한 형질전환체일 수 있다.

[0031] 본 발명에 관련되는 유전자 조작 기술에 사용되는 원핵 세포의 예는 에스케리키아 (Escherichia) 속, 세라티아 (Serratia) 속, 바실러스 (Bacillus) 속, 브레비박테리움 (Brevibacterium) 속, 코리네박테리움 (Corynebacterium) 속, 마이크로박테리움 (Microbacterium) 속, 슈도모나스 (Pseudomonas) 속 등에 속하는 원핵 세포, 구체적으로는, 에스케리키아 XL1-블루, 에스케리키아 XL2-블루, 에스케리키아 DH1 등을 포함한다. 이들 세포는 예를 들어, "Molecular Cloning (3rd edition)", Sambrook, J and Russell, D.W., Appendix 3 (Volume 3), Vectors and Bacterial strains. A3.2 (Cold Spring Harbor USA 2001) 에 구체적으로 기재되어 있다.

[0032] 본 발명에 관련되는 "벡터" 란 원하는 폴리뉴클레오티드 서열을 목적하는 세포에 이동시킬 수 있는 벡터를 의미한다. 이러한 벡터의 예는 원핵 세포, 효모, 동물 세포, 식물 세포, 곤충 세포, 동물 개체 및 식물 개체 등의 숙주 세포에서 자율 복제할 수 있거나, 염색체에 혼입이 가능하고, 폴리뉴클레오티드 전사에 적합한 위치에서 프로모터를 함유하는 것들 등을 포함한다.

[0033] 이러한 벡터 중에서, 클로닝에 적합한 벡터를 때때로 "클로닝 벡터" 로 표시한다. 이와 같은 클로닝 벡터는 일반적으로 복수의 제한 효소 부위를 포함하는 다양한 클로닝 부위를 갖는다. 현재, 유전자의 클로닝에 사용가능한 벡터는 당해 기술 분야에 있어서 다수 존재하고 있으며, 약간씩 상이하기 때문에 (예를 들어 멀티 클로닝 부위에서의 제한 효소의 종류 및 서열), 상이한 명칭으로 판매자에 의해 시판되고 있다. 예를 들어, "Molecular Cloning (3rd edition)", Sambrook, J and Russell, D.W., Appendix 3 (Volume 3), Vectors and Bacterial strains. A3.2 (Cold Spring Harbor USA, 2001) 에 대표적인 것이 기재 (판매자도 기재되어 있음) 되어 있고, 당업자는 이들을 목적에 따라 적절하게 사용할 수 있다.

[0034] 본 발명에 관련되는 "벡터" 는 "발현 벡터", "리포터 벡터" 및 "재조합 벡터" 를 또한 포함한다. "발현 벡터" 란, 구조 유전자 및 그 발현을 조절하는 프로모터에 추가하여 여러 조절 요소가 숙주 세포 내에서 작동가능하게 연결되는 핵산 서열을 의미한다. "조절 요소" 의 예는 터미네이터, 약제 내성 유전자와 같은 선택 마커, 및 인핸서를 함유하는 것 등을 포함한다. 생물 (예를 들어 동물) 의 발현 벡터의 유형 및 사용되는 조절 요소의 종류가 숙주 세포에 따라 가변적일 수 있다는 것이 당업자에게 널리 공지되어 있다.

[0035] 본 발명에 관련되는 "재조합 벡터" 의 예는 (a) 게놈 라이브러리의 스크리닝을 위한 람다 FIX 벡터 (파지 벡터), (b) cDNA 의 스크리닝을 위한 람다 ZAP 벡터 (파지 벡터), (c) 게놈 DNA 의 클로닝을 위한 pBluescript II SK+/- 벡터, pGEM 벡터, pCR2.1 벡터 (플라스미드 벡터) 등을 포함한다. "발현 벡터" 의 예는 pSV2/neo 벡터, pcDNA 벡터, pUC18 벡터, pUC19 벡터, pRc/RSV 벡터, pLenti6/V5-Dest 벡터, pAd/CMV/V5-DEST 벡터, pDON-AI-2/neo 벡터, pMEI-5/neo 벡터 등 (플라스미드 벡터) 등을 포함한다. "리포터 벡터" 의 예는 pGL2 벡터, pGL3 벡터, pGL4.10 벡터, pGL4.11 벡터, pGL4.12 벡터, pGL4.70 벡터, pGL4.71 벡터, pGL4.72 벡터, pSLG 벡터, pSLO 벡터, pSLR 벡터, pEGFP 벡터, pAcGFP 벡터, pDsRed 벡터 등을 포함한다. 이들 벡터는 상술한 Molecular Cloning 참고문헌을 참조로 하여 적절히 이용될 수 있다.

[0036] 본 발명에 관하여, 핵산 분자를 세포에 도입하는 기술의 예는 형질전환, 형질도입, 트랜스펙션 등을 포함한다.

이와 같은 도입 기술로서, 예를 들어 Ausubel F. A. et al. ed. (1988), Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, New York, NY; Sambrook J. et al. (1987), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. and 3rd Ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; 별책 실험 의학 "transgene & expression analysis experiment method" YODOSHA CO., LTD., 1997 등에 기재되는 방법 등을 구체적으로 언급할 수 있다. 유전자의 세포내 도입을 확인하는 기술의 예는 노던 블롯 분석, 웨스턴 블롯 분석 또는 기타 널리 공지된 종래 기술 등을 포함한다.

[0037] 본 발명에 관하여, 벡터의 도입 방법의 예는 트랜스펙션, 형질도입, 형질전환 등 (예를 들어 인산칼슘 방법, 리포솜 방법, DEAE-덱스트란 방법, 전기천공법, 입자 총 (유전자 총) 을 사용하는 방법 등) 을 포함한다.

[0038] 본 발명의 동결 보존 방법은 하기 (1) 내지 (3) 을 포함하는 것을 특징으로 하는 동결 보존 방법이다:

[0039] (1) 다능성 간세포 유래의 조직을 술폭시드 및 사슬형 폴리올을 함유하는 세포 보호 용액과 접촉시키는 제 1 단계,

[0040] (2) 제 1 단계에서 세포 보호 용액과 접촉시킨 다능성 간세포 유래의 조직을 동결 보존액 중에서 유지시키는 제 2 단계, 및

[0041] (3) 제 2 단계에서 동결 보존액 중에서 유지시킨 다능성 간세포 유래의 조직을 냉각제 존재 하에서 동결 보존하는 제 3 단계.

[0042] 본 발명에서, "간세포" 란 세포 분열을 거친 후에도 동일한 분화능을 유지하는 세포를 지칭하며, 상기 세포는 조직이 상해를 입었을 때 그 조직을 재생시킬 수 있다. 여기서 간세포는 배아 간세포 (ES 세포) 또는 조직 간세포 (또한 조직성 간세포, 조직-특이적 간세포 또는 체세포 간세포라고도 함), 또는 인공 다능성 간세포 (iPS 세포: 유도 다능성 간세포 (induced pluripotent stem cell)) 일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 상기 언급한 간세포 유래의 조직 세포가 조직을 재생시킬 수 있다는 점에서 알 수 있듯이, 간세포가 생체 내 세포에 가까운 정상적 세포로 분화될 수 있다는 것이 알려져 있다.

[0043] 간세포는 소정의 기관으로부터 입수 가능하거나, 시판 제품을 또한 구입할 수 있다. 예를 들어, 인간 배아 간세포인 KhES-1, KhES-2 및 KhES-3 은 쿄토 대학 재생 의과 학연 연구소에서 입수 가능하다. 마우스 배아 간세포의 예는 EB5 세포 등을 포함한다.

[0044] 간세포는, 자체 공지된 방법에 따라 배양하여 유지될 수 있다. 예를 들어, 간세포는 소 태아 혈청 (FCS), 녹아웃 혈청 대체물 (Knockout Serum Replacement) (KSR) 및 LIF 가 보충된 무-피더 세포 배양에 의해 유지될 수 있다.

[0045] 본 발명에서, "다능성 간세포" 란 시험관내 배양될 수 있으며 태반을 제외한 생체를 구성하는 임의 세포 (3 배엽 (외배엽, 중배엽, 내배엽)-유래 조직) 로 분화하는 능력 (다능성) 을 갖는 간세포를 지칭하고, 배아 간세포 (ES 세포) 를 포함한다. "다능성 간세포" 는 수정란, 클론 배아, 생식 간세포 및 조직내 간세포로부터 수득된다. 이는 또한, 체세포에 여러 종류의 유전자를 도입한 후, 배아 간세포와 유사한 인공 다능성을 갖는 세포 (인공 다능성 간세포로도 불림) 를 포함한다. 다능성 간세포는 자체 공지된 방법으로 제작될 수 있다.

제작 방법의 예는 Cell 131 (5) pp.861-872 (2007), Cell 126 (4) pp.663-676 (2006) 에 기재된 방법 등을 포함한다.

[0046] 본 발명에서, "배아 간세포 (ES 세포)" 란 자가 복제 능력 및 다분화 능력 (즉, "다능성") 을 갖는 간세포를 지칭하는데, 이는 초기 배아로부터 유래하는 다능성 간세포이다. 배아 간세포는 1981 년에 처음으로 확립되었으며 1989 년 이후 녹아웃 마우스 제작에도 적용되고 있다. 1998 년에는 인간 배아 간세포가 확립되었고, 재생 의학에 또한 이용되고 있다.

[0047] 본 발명에서, "인공 다능성 간세포" 란 섬유아세포 등과 같은 분화된 세포를 Oct3/4, Sox2, Klf4, Myc 등과 같은 여러 종류의 유전자 발현에 의해 직접 재프로그래밍하여 다분화 능력을 갖도록 유도한 세포를 지칭하며, 이는 2006 년에 Yamanaka 등에 의해 마우스 세포에서 확립되었다 (Takahashi K, Yamanaka S. Cell. 2006, 126 (4), p 663-676). 2007 년에, 이는 인간 섬유아세포에서도 확립되었으며 배아 간세포와 유사한 다분화 능력을 갖는다 (Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Cell. 2007, 131 (5), p 861-872.; Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA., Science. 2007, 318 (5858), p 1917-1920.;

Nakagawa M, Koyanagi M, Tanabe K, Takahashi K, Ichisaka T, Aoi T, Okita K, Mochiduki Y, Takizawa N, Yamanaka S. Nat Biotechnol., 2008, 26 (1), p 101-106).

[0048] 본 발명에서, "분화" 란 단일 세포의 분열에서 유래한 딸세포 집단 중에서 형태적 및/또는 기능적으로 상이한 품질을 갖는 둘 이상의 유형의 세포가 생성되는 현상을 지칭한다. 따라서, 본래 특별한 특징을 검출할 수 없는 세포에서 유래한 세포 집단 (세포 계보) 이 특정 단백질 생성 등과 같은 뚜렷한 특징을 나타내게 되는 과정이 또한 분화에 포함된다. 현재는 세포 분화를 게놈 중의 특정 유전자 군이 발현하는 상태라고 여기는 것이 일반적이며, 이와 같은 유전자 발현 상태를 초래하는 세포내 혹은 세포외 인자 또는 조건을 탐색함으로써 세포 분화를 확인할 수 있다. 원칙적으로, 세포 분화 결과는 안정하며, 특히 동물 세포에서는 다른 유형의 세포로 분화하는 것은 오직 예외적으로만 발생한다.

[0049] 본 발명에서, "조직" 이란 형태 및 특성이 상이한 복수 유형의 세포가 일정한 패턴으로 입체적으로 배치되는 구조를 갖는 세포 집단의 구조체를 지칭하고, 본 발명에서 "다능성 간세포 유래의 조직" 이란 다능성 간세포의 분화 유도에 의해 수득한 세포의 응집체를 지칭하여, 형태 및 특성이 상이한 복수 유형의 세포가 일정한 패턴으로 입체적으로 배치되는 구조를 갖는 세포 집단의 구조체를 지칭한다.

[0050] 다능성 간세포의 분화 유도에 의해 수득한 세포의 예는 대뇌 신경 세포, 간뇌 신경 세포, 시상하부 신경 세포, 기저 핵 신경 세포, 소뇌 신경 세포, 장 조직 세포, 심근 세포, 췌장 세포, 간장 세포 및 이의 선구 세포를 포함한다. 구체적으로는, WO 2009/148170, J Neurosci. 2011 Feb 2; 31 (5): 1919-33, Nat Neurosci. 2010 Oct; 13 (10): 1171-80, Cell Stem Cell. 2008 Nov 6; 3 (5): 519-32, Proc Natl Acad Sci USA. 2008 Aug 19; 105 (33): 11796-801, Nature. 2011 Feb 3; 470 (7332): 105-9, Nat Biotechnol. 2011 Mar; 29 (3): 267-72, Cell Stem Cell. 2011 Feb 4; 8 (2): 228-40, Development. 2011 Mar; 138(5): 861-71, Nat Biotechnol. 2006 Nov; 24 (11): 1402-11 에 기초하여 제작할 수 있다.

[0051] 본 발명에서, "뇌 신경 조직" 이란 생체의 대뇌, 간뇌, 중뇌, 소뇌 및 후뇌에 있어서 각 신경층을 구성하는 세포 및 이의 선구 세포 (예를 들어 대뇌의 경우, 제 6 층에 특이적인 Tbr1 양성 세포, 제 5 층에 특이적인 Crip2 양성 세포, 제 2 - 제 3 층에 특이적인 Brn2 양성 세포 등) 의 적어도 복수 종류가 층상에서 입체적으로 배열되는 구조체를 의미한다. 뇌 신경 조직의 일부로서, 망막 조직을 언급할 수 있다. "망막 조직" 이란 생체 망막에 있어서 각 망막층을 구성하는 시세포, 수평 세포, 쌍극 세포, 아마크린 세포, 망막절 세포, 이의 선구 세포 등과 같은 세포의 적어도 복수 종류가 층상에서 입체적으로 배열되는 망막 조직을 의미한다. 각각의 세포에 대해, 어떤 세포가 어떤 망막층을 구성하는지는 공지된 방법, 예를 들어 세포 마커 (Chx10 (쌍극 세포), L7 (쌍극 세포), Tuj1 (신경절 세포), Brn3 (신경절 세포), 칼레티닌 (Calretinin) (아마크린 세포), 칼빈딘 (Calbindin) (수평 세포), 레코베린 (Recoverin) (시세포), 로돕신 (Rhodopsin) (시세포), RPE65 (색소 상피 세포), Mitf (색소 상피 세포) 등) 의 발현을 기반으로 하여 확인할 수 있다.

[0052] 예를 들어, 망막 조직은 인간 ES 세포의 분화에 의해, 구체적으로는 Nature 472, p51-56 (2011) 및 WO2011/055855 에 기재된 방법에 의해 제작될 수 있다.

[0053] 본 발명에서, "동결 보호 용액" 이란 동결 보호제 및 용매의 혼합물을 지칭한다. "동결 보호제" 란, 세포를 동결 보존하는 동안 세포의 기능 및 생존률을 가능한 한 많이 유지시키고자 동결에 의해 초래된 여러 장애를 방지하기 위해 첨가된 물질이다. 동결 보호 용액은, 동결 동안 세포를 보호하므로, 세포 보호 용액과 동일한 것을 의미한다.

[0054] 본 발명에서, 세포 보호 용액 (동결 보호 용액) 은 동결 보호제로서 술폭시드 및 사슬형 폴리올을 함유하고, 바람직하게는 술폭시드, 사슬형 폴리올 및 올리고당을 함유한다. 구체적으로 말하면, 예를 들어 디메틸 술폭시드 (DMSO) 등과 같은 술폭시드; 에틸렌 글리콜, 글리세롤, 프로판디올, 프로필렌 글리콜, 부탄디올, 폴리에틸렌 글리콜 등과 같은 사슬형 폴리올, 및 바람직하게는 수크로오스, 트레할로스, 락토오스, 라피노오스 등과 같은 올리고당을 추가로 함유한다. 원하는 바에 따라 아세트아미드 등과 같은 아미드 화합물, 퍼콜 (percoll), 피콜 (ficoll) 70, 피콜 70000, 폴리비닐피롤리돈 등을 첨가할 수 있다.

[0055] 용매의 예는 염수, PBS, EBSS, HBSS 등과 같은 완충액, DMEM, GMEM, RPMI 등과 같은 세포, 조직 등의 배양을 위한 배양 배지, 혈청, 혈청 대체물 (녹아웃 혈청 대체물: Invitrogen사), 이의 혼합물 등을 포함한다.

[0056] 본 발명에서, 세포 보호 용액 (동결 보호 용액) 중의 술폭시드의 최종 농도는 예를 들어 5 내지 15% (w/v), 바람직하게는 9 내지 13% (w/v), 보다 바람직하게는 약 11% (w/v) 이다.

[0057] 본 발명에서, 세포 보호 용액 (동결 보호 용액) 중의 사슬형 폴리올의 최종 농도는 예를 들어 4 내지 15%

(w/v), 바람직하게는 4.5% 내지 8% (w/v), 보다 바람직하게는 약 5.5% (w/v) 이다.

[0058] 본 발명에서, 세포 보호 용액 (동결 보호 용액) 중의 올리고당의 최종 농도는 예를 들어 5 내지 20% (w/v), 바람직하게는 8 내지 12% (w/v), 보다 바람직하게는 약 10% (w/v) 이다.

[0059] 본 발명에서, "동결 보존액" 이란 다능성 간세포 유래의 조직을 동결 보존하기 위한 배지를 지칭한다. 동결 보존액으로서, cell BANKER 1, 1plus, 2, 3 (JUJI FIELD INC.), TC-Protector (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.), 인간 ES/iPS 세포용 동결 배지 (Reprocell Incorporated), CryoScarless DMSO free (BioVerde), StemCell Keep (BioVerde), EFS 용액 (NK system) 등의 시판 제품을 또한 사용할 수 있다.

[0060] 동결 보존액은 동결 보호제 및 용매의 혼합물일 수 있다. 동결 보호제 및 용매로서, 상기 기재된 것들을 언급할 수 있다.

[0061] 본 발명의 동결 보존액은 바람직하게는 디메틸 술폭시드, 아세트아미드 및 프로필렌 글리콜을 함유한다.

[0062] 본 발명에서, 동결 보존액 중의 디메틸 술폭시드의 농도는 바람직하게는 1 내지 4 M, 아세트아미드의 농도는 바람직하게는 0.5 내지 2 M, 프로필렌 글리콜의 농도는 바람직하게는 1.5 내지 6 M 이다.

[0063] 본 발명의 동결 보존 방법의 제 1 단계는, 동결 전에 다능성 간세포 유래의 조직을 술폭시드 및 사슬형 폴리올을 함유하는 세포 보호 용액과 접촉시키는 단계이다.

[0064] 상기 언급한 제 1 단계에서는, 다능성 간세포 유래의 조직을 술폭시드 및 사슬형 폴리올을 함유하는 세포 보호 용액과 접촉시킨다.

[0065] "다능성 간세포 유래의 조직을 술폭시드 및 사슬형 폴리올을 함유하는 세포 보호 용액과 접촉시키기 위해서", 다능성 간세포 유래의 조직을 술폭시드 및 사슬형 폴리올을 함유하는 세포 보호 용액 중에 옮길 수 있거나, 술폭시드 및 사슬형 폴리올을 함유하는 세포 보호 용액을 다능성 간세포 유래의 조직에 첨가할 수 있다.

[0066] 다능성 간세포 유래의 조직을 술폭시드 및 사슬형 폴리올을 함유하는 세포 보호 용액과 접촉시키는 시간은 예를 들어 1 분 내지 180 분, 바람직하게는 5 분 내지 60 분, 보다 바람직하게는 15 분 내지 30 분이다. 다능성 간세포 유래의 조직을 술폭시드 및 사슬형 폴리올을 함유하는 세포 보호 용액과 접촉시키는 온도는 예를 들어 -10℃ 내지 40℃, 바람직하게는 0℃ 내지 25℃, 보다 바람직하게는 0℃ 내지 8℃ 이다.

[0067] 상기 언급한 제 1 단계에 있어서의 접촉 시스템 내 다능성 간세포 유래 조직의 밀도 (예를 들어 세포 보호 용액 중의 다능성 간세포 유래 조직의 밀도) 는 예를 들어, 응집체 수를 기준으로 약 1 내지 1000 개 응집체/mL, 바람직하게는 1 내지 100 개 응집체/mL 이다. 1 개 응집체 당 세포 수는 약 10^3 내지 10^6 개 세포이다.

[0068] 세포 보호 용액 접촉에 사용되는 세포 배양기는 특별히 제한되지 않으며, 당업자에 의해 적절히 결정될 수 있다. 이와 같은 배양기의 예는 플라스크, 조직 배양용 플라스크, 디쉬, 페트리 디쉬, 조직 배양용 디쉬, 멀티디쉬, 마이크로플레이트, 마이크로웰 플레이트, 마이크로포어, 멀티플레이트, 멀티웰 플레이트, 챔버 슬라이드, 샬레, 튜브, 트레이, 배양 백 및 롤러 보틀을 포함한다.

[0069] 본 발명의 동결 보존 방법의 제 2 단계는, 세포 보호 용액과 접촉시킨 다능성 간세포 유래의 조직을 동결 보존액 중에서 유지시키는 단계이다.

[0070] 상기 언급한 제 2 단계에서는, 제 1 단계에서 세포 보호 용액과 접촉시킨 다능성 간세포 유래의 조직을 동결 보존액 중에서 유지시킨다.

[0071] 상기 언급한 제 2 단계에서 세포 보존액 중의 다능성 간세포 유래 조직의 밀도는, 예를 들어 응집체 수를 기준으로 약 1 내지 1000 개 응집체/mL, 바람직하게는 1 내지 100 개 응집체/mL 이다. 1 개 응집체 당 세포 수는 약 10^3 내지 10^6 개 세포이다.

[0072] 본 발명의 동결 보존 방법의 제 3 단계는, 동결 보존액 중에 유지시킨 다능성 간세포 유래의 조직을 냉각제 존재 하에서 동결 보존하는 단계이다.

[0073] 조직 등을 "동결 보존" 하는 방법으로서, 몇몇 방법이 알려져 있다. 대표적인 동결 보존 방법은 예를 들어 0.1 내지 10℃/분의 완만한 속도로 장시간 동안 동결시키는 방법이다. 상기 방법은 프로그램 냉각기, BICELL (NIHON FREEZER CO., LTD.) 등과 같은 장치, 기구 등을 사용하여 수행될 수 있다.

[0074] 급속 동결 보존 방법으로서, 결정질의 액체 또는 기체를 결정화시키지 않고 급격하게 유리 전이 온도 이하에서

고체화시켰을 때 생기는 유리화 현상을 응용하는 방법을 언급할 수 있다. 상기 방법은 미리 고농도의 보존액에 침지시킨 조직, 배아 및 난자를 단기간에 간단한 조작의 유리화에 의해 안정적으로 동결 보존할 수 있다는 점에 있어서 우수하다.

[0075] 여기서, 급속 동결 보존 방법은 생물 샘플의 동결 방법이며, 이는 액체 질소 등과 같은 냉각제에 샘플을 투입하는 것을 포함한다. 예를 들어, 빙상에서 다능성 간세포 유래의 조직 및 동결 보존액을 동결 튜브에 넣고, 핀셋으로 상기 동결 튜브를 냉각제에 침지시키는 것을 포함하는 방법이 언급될 수 있다. 다능성 간세포 유래의 조직을 동결 보존액 중에서 유지시키고나서 냉각제에 투입할 때까지의 시간은 가능한 한 짧은 것이 바람직하고, 30 초 이내, 바람직하게는 10 초 이내이다.

[0076] 본 발명에서 사용하는 "냉각제" 는 세포의 유리화를 일으킬 수가 있는 것이 바람직하고, 일반적으로 -20℃ 이하, 바람직하게는 -80℃ 이하, 보다 바람직하게는 -150℃ 이하의 냉각제를 사용할 수 있다.

[0077] 냉각제의 구체적 예는 액체 질소, 슬러시 질소, 액체 헬륨, 액체 프로판 및 에탄 슬러시를 포함하며, 액체 질소 및 슬러시 질소가 바람직하다. 슬러시 질소는 액체 질소를 감압 하에서 유지시켜 액체 질소 온도를 상압에서 -196℃ 보다 낮게 -205 내지 -210℃ 로 저하시켜 수득한 질소이다 (Huang et al., Human Reproduction, Vol.20, No.1, pp.122-128 (2005)). 냉각제로서 슬러시 질소를 사용하는 경우, Vit-Master™ (IMT, Nes Ziona, Israel) 등과 같은 장치에 의해 유리화 보존을 수행할 수 있다.

[0078] 냉각제 존재 하에서의 동결 보존에 대한 온도 저하 속도는 예를 들어 10℃/분 이상, 바람직하게는 30℃/분 이상, 보다 바람직하게는 50℃/분 이상, 특히 바람직하게는 100℃/분 이상이다.

[0079] 냉각제 존재 하에서의 동결 보존에 대한, 상온으로부터 목적으로 하는 동결 보존 온도 (예를 들어, 액체 질소에 대해서는 -196℃) 까지 도달하는데 필요한 시간은 예를 들어 5 분 이내, 보다 바람직하게는 3 분 이내, 더욱 바람직하게는 1 분 이내이다.

[0080] 실시예

[0081] 본 발명의 실시예를 하기에서 보다 상세하게 설명한다.

[0082] (RAX 녹-인 인간 ES 세포의 확립)

[0083] 망막 선구 세포의 마커 유전자 중 하나인 RAX 유전자자리에서 GFP 녹-인된 인간 ES 세포주를 제작하였다.

[0084] 인간 ES 세포주 (KhES-1: 쿄토 대학에 의해 확립된 인간 ES 세포주) 의 게놈 DNA 상 RAX 유전자를 특이적으로 절단하는 징크 핑거 뉴클레아제 (Zinc Finger Nuclease) (ZFN) 를 Sigma Aldrich사로부터 구입하였다. 단일 세포에 분산된 인간 ES 세포를 사용하여, ZFN 인코딩 mRNA 및 GFP 와 약물 선택 마커, 네오마이신 내성 유전자를 함유하는 녹-인 벡터를 전기천공법에 의해 그에 트랜스펙션시키고, 미토마이신 C 처리한 네오마이신 내성 마우스 섬유아세포 상에 세포를 플레이팅하였다. 플레이팅 다음날에 G418 을 배양 배지에 첨가하고, 약물 선택을 수행하였다. 수득한 내성 클론의 콜로니를 집어내고 이어서 배양한 후, PCR 법 및 서던 블롯법에 의해 녹-인 세포를 선택하여, RAX::GFP 녹-인 인간 ES 세포주를 확립하였다.

[0085] (RAX 녹-인 인간 ES 세포의 망막 조직으로의 분화 유도)

[0086] 확립한 RAX::GFP 녹-인 인간 ES 세포를 사용하여, 망막 조직으로의 분화를 유도하였다.

[0087] RAX::GFP 녹-인 인간 ES 세포 (KhES-1 유래) 를 "Ueno, M. et al. PNAS 2006, 103(25), 9554-9559" "Watanabe, K. et al. Nat Biotech 2007, 25, 681-686" 에 기재된 방법에 따라 배양하고, 실험에 사용하였다.

[0088] 배지로서, 20% KSR (녹아웃 혈청 대체물 (Knockout Serum Replacement); Invitrogen), 0.1 mM 2-메르캅토에탄올, 5 내지 10 ng/ml bFGF 등이 첨가된 DMEM/F12 배지 (Invitrogen) 를 사용하였다. 부유 배양에 의한 망막 조직으로의 분화 유도를 위해, 0.25% 트립신-EDTA (Invitrogen) 중에 ES 세포를 단일 세포로 분산시키고, 비-세포 접착성 96-웰 배양 플레이트 (SUMILON 스페로이드 플레이트, SUMITOMO BAKELITE) 의 웰 당 9×10^3 세포로 150 μl 분화 배지에 부유시켜, 응집물을 신속하게 형성시키고, 이를 37℃, 5% CO_2 에서 배양하였다.

[0089] 이를 위한 분화 배지로서, 무혈청 배지 (20% KSR, Y27632 등이 첨가된 G-MEM 배지) 를 사용하였다. 배양 2 일째부터 마트리겔 (Matrigel) 을 배양물에 첨가하였다. 분화 유도 개시 후, 대략 12 일째부터 응집물 내에 GFP 발현이 형광 현미경 관찰에 의해 관찰되었고, 대략 14 일째에 응집물 주위에 GFP 를 발현하는 신경상피형

구조체가 형성되었다 (도 1, 도 2). 18 일째부터 30 일째의 기간 동안, 상기 신경상피형 구조체를 핀셋으로 응집물로부터 분리시키고, 이후 비-접착성 플라스틱 샬레 내에서 소 태아 혈청 및 레티노산을 첨가한 후 배양하였다 (도 3, 도 4). 절편을 제작하고, 형광 면역염색법에 의해 분화 상태를 분석하였다 (도 5). 예를 들어, 분화 유도 개시부터 40 일 후 신경상피형 구조체는 RAX 유전자를 발현하는 GFP 양성 세포로 구성되며, GFP 양성 세포에 있어서, 망막 선구 세포 마커 유전자 중 하나인 Pax6 양성 세포, 쌍극 세포 마커 유전자 중 하나인 Chx10 양성 세포, 및 신경절 세포 마커 유전자 중 하나인 Brn3 양성 세포가 층상으로 배열하여 망막 조직을 형성한다는 것이 나타났다 (도 5).

[0090] 비교예 1 (인간 ES 세포의 분화 유도에 의해 수득한 망막 조직의 동결 보존)

[0091] 분화 유도에 의해 수득한 망막 조직을 100℃/분 이상의 온도 저하 속도로 동결 보존하였다.

[0092] 2 M 디메틸 술폭시드 (DMSO), 1 M 아세트아미드 및 3 M 프로필렌 글리콜이 첨가된 DMEM/F12 배지 (DAP213) 를 동결 보존액으로서 사용하였다. 약 10 개의 망막 조직을 배양 플레이트로부터 15 ml 폴리프로필렌 튜브에 수집한 후, 상청액을 제거하고 200 μl 의 동결 보존액을 첨가하고, 망막 조직을 동결 보존액과 함께 동결 튜브에 옮겼다. 즉시 동결 튜브를 핀셋으로 액체 질소에 침지시키고, 100℃/분 이상의 온도 저하 속도로 동결 보존하였다. 동결한 튜브는 해동할 때까지 -150℃ 에서 냉각기 내에 보존하였다.

[0093] -150℃ 에서 냉각기로부터 동결 튜브를 꺼내고, 37℃ 수조에서 사전에 37℃ 로 가온한 배지를 동결 튜브에 첨가하여 조직을 해동하였다. 혼합물을 15 ml 튜브에 분배하고, 망막 조직을 37℃ 로 가온한 배지 (10 ml) 에 넣은 후 상청액을 제거하였다. 조직을 PBS (10 ml) 로 세척하고, 배지 (N2, 10% FBS, 레티노산 등이 첨가된 DMEM/F12 배지) (망막 조직 배양용 배지) 를 함유하는 부유 배양 디쉬에 첨가하고, 37℃ 에서 배양하였다. 해동 다음날 이후에 현미경 관찰 및 형광 현미경 관찰을 수행하고, 세포의 생존 상태 및 상피 구조의 외관을 동결 보존을 하지 않은 망막 조직 (도 6A, B) 과 비교하고, 동결 보존의 성공 여부를 점검하였다.

[0094] 결과적으로, 거의 모든 세포가 사멸하였고, 사멸 세포의 파편이 많이 관찰되었다. GFP 의 발현은 거의 관찰되지 않았다. 따라서, 단순한 100℃/분 이상의 온도 저하 속도로의 동결 보존으로는 망막 조직이 동결 보존되지 않는다는 것이 나타났다 (도 6C, D).

[0095] 비교예 2 (동결 보호제 (11.0% (w/v) 디메틸 술폭시드 (DMSO)) 중의 침투 처리 후 동결에 의한, 인간 ES 세포의 분화 유도에 의해 수득한 망막 조직의 동결 보존)

[0096] 동결 전에, 분화 유도에 의해 수득한 망막 조직을 동결 보호제로서 디메틸 술폭시드 (DMSO) 를 함유하는 용액 중에서 침투 처리하고, 100℃/분 이상의 온도 저하 속도로 동결 보존하였다.

[0097] 약 10 내지 20 개의 망막 조직을 배양 플레이트로부터 15 ml 폴리프로필렌 튜브에 수집한 후, 상청액을 제거하고 미리 빙상에서 냉각시킨 동결 보호제를 함유하는 용액 (1 ml) 을 첨가하고, 혼합물을 빙상에서 15 분 내지 30 분 동안 정치시켰다. 동결 보호제를 함유하는 용액으로서, 상술한 11.0% (w/v) 디메틸 술폭시드 (DMSO) 가 첨가된 망막 조직 배양용 배지를 사용하였다. 동결 보호제를 함유하는 용액을 제거하고, DAP213 (200 μl) 을 동결 보존액으로서 첨가하고, 망막 조직을 동결 보존액과 함께 동결 튜브에 옮겼다. 즉시 동결 튜브를 핀셋으로 액체 질소에 침지시키고, 100℃/분 이상의 온도 저하 속도로 동결 보존하였다. 동결한 튜브는 해동할 때까지 -150℃ 에서 냉각기 내에 보존하였다.

[0098] 11.0% (w/v) 디메틸 술폭시드 (DMSO) 를 동결 보호제로서 함유하는 망막 조직 배양용 배지를 사용하여 침투 처리한 후 100℃/분 이상의 온도 저하 속도로 동결 보존한 경우, 동결하지 않은 대조군과 비교하여 RAX 를 발현하는 망막 조직이 큰 폭으로 축소하였다 (도 6E, F).

[0099] 실시예 1 (동결 보호제 (11.0% (w/v) 디메틸 술폭시드 (DMSO) 및 5.55% (w/v) 에틸렌 글리콜) 로의 침투 처리 후 동결에 의한, 인간 ES 세포의 분화 유도에 의해 수득한 망막 조직의 동결 보존)

[0100] 분화 유도에 의해 수득한 망막 조직을 동결 보호제로서 11.0% (w/v) 디메틸 술폭시드 (DMSO) 및 5.55% (w/v) 에틸렌 글리콜 (EG) 을 함유하는 용액을 사용하여 침투 처리한 것을 제외하고는, 비교예 2 와 동일한 방식으로 수행하였다.

[0101] 11.0% (w/v) 디메틸 술폭시드 (DMSO) 및 5.55% (w/v) 에틸렌 글리콜 (EG) 을 함유하는 망막 조직 배양용 배지를 사용하여 동결 보호제 침투 처리한 후에 100℃/분 이상의 온도 저하 속도로 동결 보존한 경우, 상술한 11.0% (w/v) 디메틸 술폭시드 (DMSO) 를 함유하는 망막 조직 배양용 배지를 사용하는 동결 보호제 침투 처리에 관하여, RAX 를 발현하는 망막 조직의 보존성이 개선되고 (도 6G, H), 층 구조가 유지된 것으로 발견되었다 (도

8A, B).

[0102] 실시예 2 (동결 보호제 (11.0% (w/v) 디메틸 술폭시드 (DMSO), 5.55% (w/v) 에틸렌 글리콜 (EG) 및 10% (w/v) 수크로오스) 로의 침투 처리 후 동결에 의한, 인간 ES 세포의 분화 유도에 의해 수득한 망막 조직의 동결 보존)

[0103] 분화 유도에 의해 수득한 망막 조직을 동결 보호제로서 11.0% (w/v) 디메틸 술폭시드 (DMSO), 5.55% (w/v) 에틸렌 글리콜 (EG) 및 10% (w/v) 수크로오스를 함유하는 용액을 사용하여 침투 처리한 것을 제외하고는, 비교예 2와 동일한 방식으로 수행하였다.

[0104] 11.0% (w/v) 디메틸 술폭시드 (DMSO), 5.55% (w/v) 에틸렌 글리콜 (EG) 및 10% (w/v) 수크로오스를 함유하는 망막 조직 배양용 배지를 사용하여 동결 보호제 침투 처리한 후 100℃/분 이상의 온도 저하 속도로 동결 보존한 경우, 동결 보존하지 않은 망막 조직에 필적할 정도의 상태가 유지된 한편, 동결 보존하지 않은 망막 조직에 비해 GFP 발현 강도가 약간 약했다. 보존성은 매우 양호하였고 (도 6I, J), 층 구조 또한 유지되었다 (도 8C, D, E).

[0105] 비교예 3 (동결 보호제 (수크로오스) 로의 침투 처리 후 동결에 의한, 인간 ES 세포의 분화 유도에 의해 수득한 망막 조직의 동결 보존)

[0106] 동결 보호제 침투 용액으로서 상술한 망막 조직 배양용 배지에 각각 5% 수크로오스를 첨가한 것, 10% 수크로오스를 첨가한 것, 20% 수크로오스를 첨가한 것, 5.55% EG 및 10% 수크로오스를 첨가한 것, 11% (w/v) 디메틸 술폭시드 (DMSO) 및10% (w/v) 수크로오스를 첨가한 것을 사용하여 상기 언급한 것들과 유사한 과정으로 동결 및 해동을 수행하였다.

[0107] 동결 보호제 침투 용액으로서 수크로오스 단독 첨가된 망막 조직 배양용 배지를 사용하여 침투 처리한 후에 100℃/분 이상의 온도 저하 속도로 동결 보존한 경우, 동결하지 않은 대조군 (도 7A, B) 과 비교하여, 5% (w/v), 10% (w/v) 및 20% (w/v) 의 어느 농도에서도 해동 후의 세포 생존성이 매우 불량하였고, GFP 발현이 거의 관찰되지 않았다 (도 7C, D, E, F, G, H). 또한, 5.55% (w/v) EG 및 10% (w/v) 수크로오스를 함유하는 망막 조직 배양용 배지를 사용하여 침투 처리한 후에 100℃/분 이상의 온도 저하 속도로 동결 보존한 경우, 동결 보존하지 않은 대조군과 비교하여, 해동 후의 세포 생존성이 매우 불량하였고, GFP 발현이 거의 관찰되지 않았다 (도 7K, L). 11.0% (w/v) 디메틸 술폭시드 (DMSO) 및 10% (w/v) 수크로오스를 함유하는 망막 조직 배양용 배지를 사용하여 침투 처리한 후에 100℃/분 이상의 온도 저하 속도로 동결 보존한 경우, 동결하지 않은 대조군과 비교하여, 세포 생존성이 불량하였고, GFP 발현이 약했으며, 동결하지 않은 대조군에 필적하는 정도의 상태로 보존할 수 없었다 (도 7I, J).

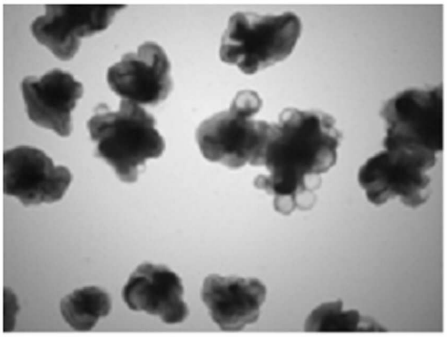
산업상 이용가능성

[0108] 본 발명에 따라서, 다능성 간세포 유래 조직의 보존 방법을 제공할 수 있다.

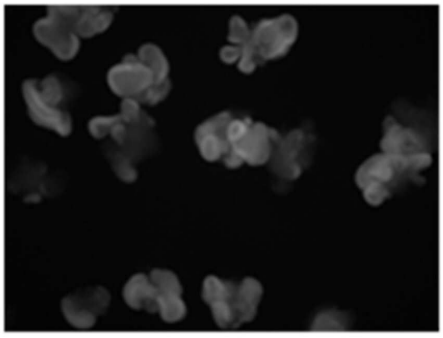
[0109] 본 출원은, 일본에서 출원한 특허출원 2011-258208 호 (출원일: 2011 년 11 월 25 일) 을 기초로 하고 있으며 이의 전문이 본원에 포함된다.

도면

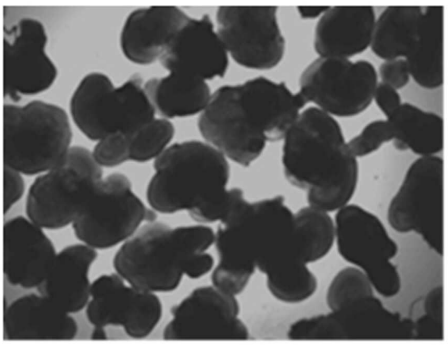
도면1



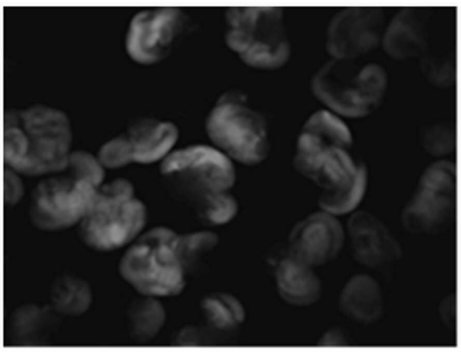
도면2



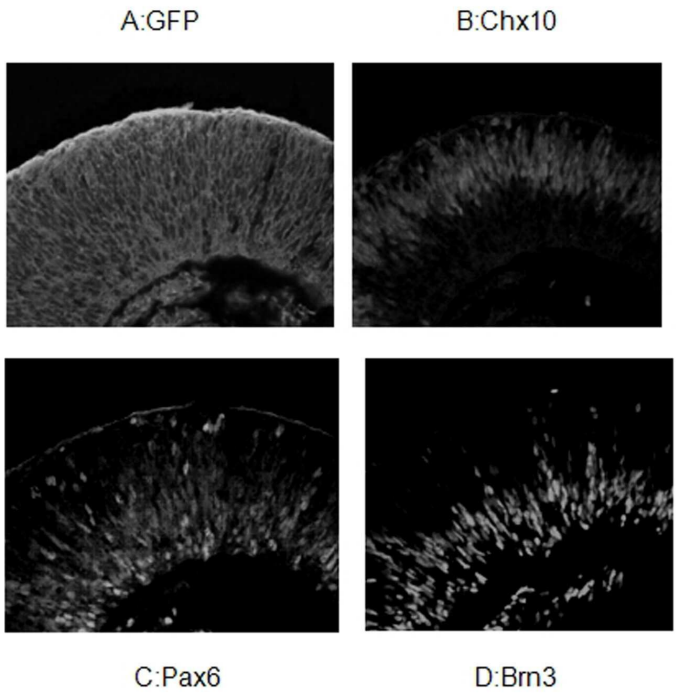
도면3



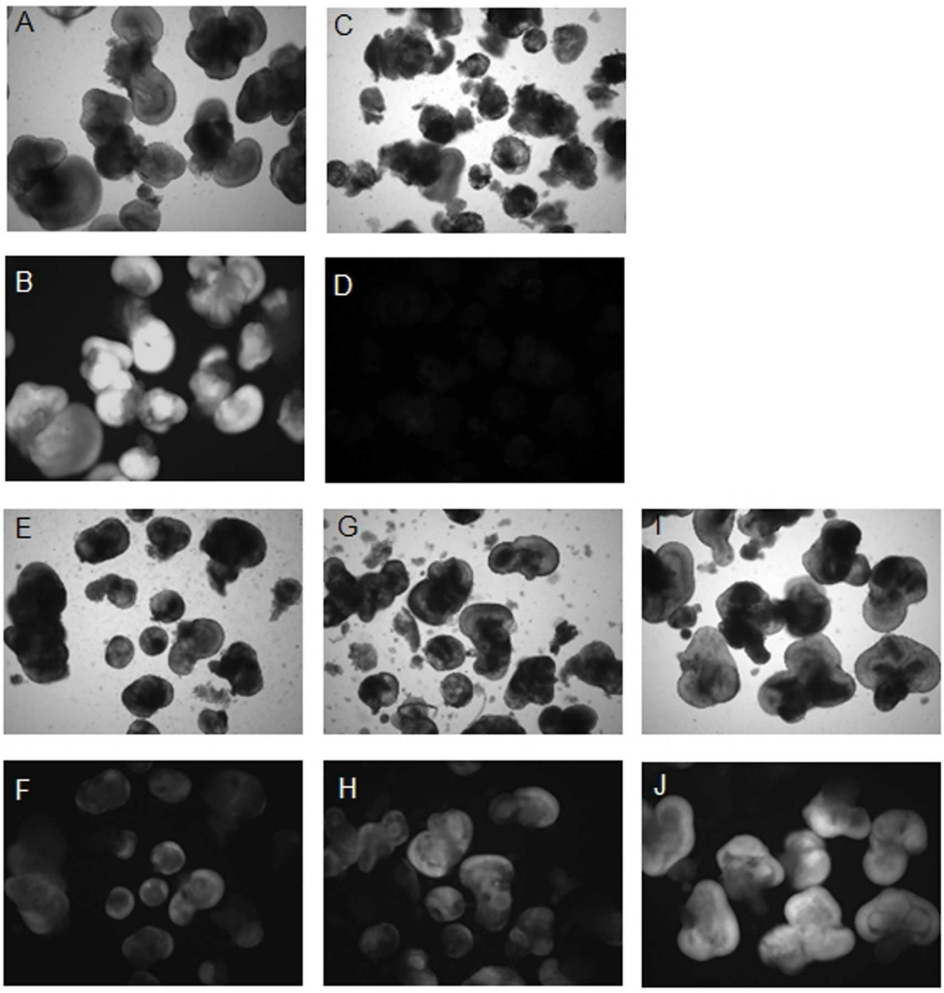
도면4



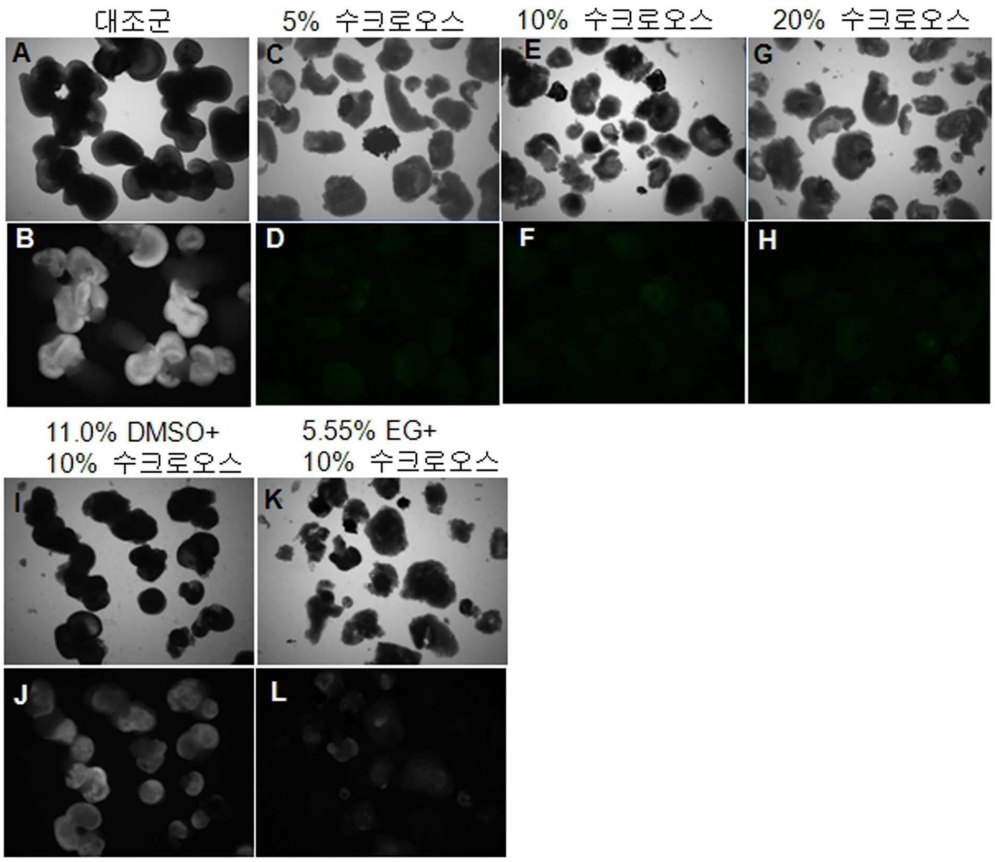
도면5



도면6



도면7


대조군
5% 수크로오스
10% 수크로오스
20% 수크로오스
A
C
E
G
B
D
F
H
11.0% DMSO+
10% 수크로오스
5.55% EG+
10% 수크로오스
I
K
J
L

도면8

