(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0021108
(43) 공개일자 2020년02월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/077 (2010.01) *C12M 1/00* (2006.01)
C12M 1/32 (2006.01) *G01N 33/50* (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0653 (2013.01)
C12M 23/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7005061(분할)
(22) 출원일자(국제) 2012년03월16일
심사청구일자 2020년02월20일
(62) 원출원 특허 10-2018-7037546
원출원일자(국제) 2012년03월16일
심사청구일자 2019년01월02일
(85) 번역문제출일자 2020년02월20일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2012/001872
(87) 국제공개번호 WO 2012/124353
국제공개일자 2012년09월20일
(30) 우선권주장
JP-P-2011-057770 2011년03월16일 일본(JP)

(71) 출원인
주식회사 쿠라레
일본국 오카야마켄 구라시키시 사카즈1621
(72) 발명자
잇쵸다 요코
일본 이바라키켄 츠쿠바시 미유키가오카 41반치 가부시키가이샤 구라레 나이
호소다 마사야
일본 이바라키켄 츠쿠바시 미유키가오카 41반치 가부시키가이샤 구라레 나이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리아나

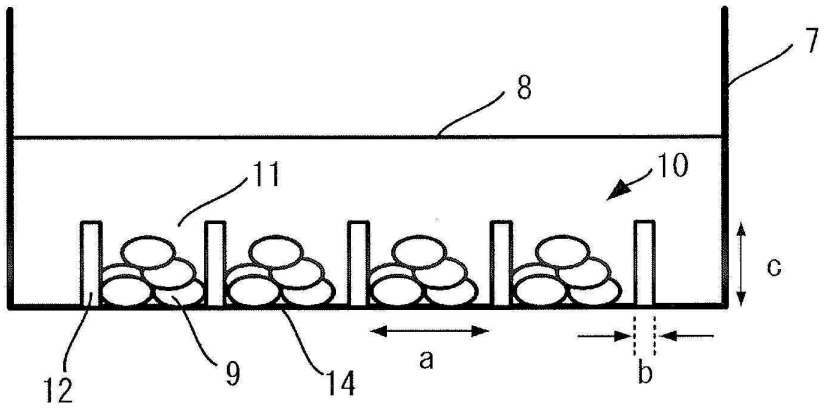
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 **배양 방법, 성숙 지방 세포군 및 약물 스크리닝 방법**

(57) 요 약

지방 세포의 배양 방법에서는, 파종된 지방 세포를, 배양 바닥면 (14) 과 배양 바닥면 (14) 에 대해서 수직 방향으로 배치된 벽 (12) 과 접착시키면서 배양하고, 지방 세포를 배양액 중에 부유시키지 않고, 구상이고 비대화된 지방적을 세포 내에 생성시킨 성숙 지방 세포를 얻는다. 이 방법에서는 배양 바닥면 (14) 에 대해서 수직으로 벽 (12) 이 형성된 배양 용기 (10) 를 사용한다. 세포 또는 세포의 응집괴는 벽 (12) 과 배양 바닥면 (14) 의 2 개 지점 이상에서 접착시킨 상태에서, 세포 내에 구상이고 비대한 지방적을 갖는 구상의 성숙 지방 세포를 배양한다. 이로써, 생체 내에 가까운 형태의 지방 세포를 얻는다.

대 표 도 - 도3a



(52) CPC특허분류
C12M 23/20 (2013.01)
C12M 23/22 (2013.01)
G01N 33/5044 (2013.01)
C12N 2501/33 (2013.01)
C12N 2501/39 (2013.01)
C12N 2503/02 (2013.01)
C12N 2513/00 (2013.01)
(72) 발명자
후쿠다 모토히로
일본 니이가타켄 다이나이시 구라시키쵸 2방 28고 가부시키가이샤 구라레 나이
나가야마 마사후미
일본 홋카이도 삿포로시 기타쿠 기타 8죠 니시 5쵸메 국립대학법인 홋가이도 다이가쿠 나이

명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 공정들을 포함하는 지방 세포의 배양 방법으로서:

바닥 및 측벽들을 갖는 마이크로 용기에 전구 지방 세포를 첨가하는 공정으로서, 상기 측벽들은 10 ㎛ 내지 500 ㎛ 의 높이를 갖고 측벽들 사이의 거리는 70 ㎛ 내지 300 ㎛ 인 공정;

배양 용기 내에 전구 지방 세포가 90% 이상의 컨플루언트 상태를 형성하도록 전구 지방 세포를 배양하는 공정;

전구 지방 세포가 지방 세포로 분화하도록 분화-유도 배지를 첨가하는 공정,

분화된 지방 세포가 구상인 지방적을 갖고 세포 응집체이고, 상기 구상인 지방적의 직경이 20 ㎛ 내지 60 ㎛ 인 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 적어도 바닥면이 코팅되거나 처리된 배양 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 분화된 지방 세포가 0.5×10^{3} μm^{3} 미만의 지방적을 포함하는 배양 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 분화된 지방 세포가 골수 간질 세포, 간엽계 간세포, 배성 간세포, 또는 유도 다능성 간세포로부터 분화된 지방 세포인 배양 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

상기 분화 유도 공정이, (1) 덱사메타손 및 인슐린을 함유하는 배지에서 전구 지방 세포를 배양하는 공정; (2) 덱사메타손을 함유하지 않고, 인슐린을 함유하는 배지에서 전구 지방 세포를 배양하는 공정; 및 (3) 인슐린이나 덱사메타손 중 어느 것도 함유하지 않는 배지에서 전구 지방 세포를 배양하는 공정을 포함하는 배양 방법.

청구항 6

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 배양 용기에 대해서, 0.1×10^{4} 개/㎠ ~ 1×10^{6} 개/㎠ 세포 파종 밀도로 세포를 파종하는 공정을 포함하는 배양 방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 배양 용기에 있어서, 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 측벽들이 연속되어 있는 배양 방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 배양 용기에 있어서, 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 측벽들이 연속되어 있지 않는 배양

방법.

청구항 9

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 배양 용기에 있어서, 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 측벽들에 의해서 구획화된 영역이 형성되어 있는 배양 방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서,

상기 구획화된 영역이 규칙적으로 배열되어 있는 배양 방법.

청구항 11

제 9 항에 있어서,

상기 구획화된 영역의 각각의 바닥 면적의 내접원의 직경이 측벽의 높이의 0.1 배 ~ 4 배의 범위인 배양 방법.

청구항 12

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

지방적의 체적이 $0.5\times10^{3}\ \mu m^{3}$ ~ $3\times10^{6}\ \mu m^{3}$ 인 배양 방법.

청구항 13

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

지방세포가, 지방적의 최소 직경 (단경) 을 최대 직경 (장경) 으로 나눈 값이 0.4 ~ 1.0 인 형상을 갖는 배양 방법.

청구항 14

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 배양 용기의 바닥면이 투명한 배양 방법.

청구항 15

제 1 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 배양 용기에 있어서, 극성 관능기를 갖는 배양 바닥면 및 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 측벽들을 포함하는 배양 방법.

청구항 16

제 14 항에 있어서,

상기 배양 용기에 있어서, 배양 바닥면 및 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 측벽들의 표면에 무기물이 코트되어 있는 배양 방법.

청구항 17

제 14 항에 있어서,

상기 배양 용기에 있어서, 배양 바닥면 및 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 측벽들의 표면에, 콜라겐 및 피브로넥틴으로 대표되는 세포 외 매트릭스가 코트되어 있는 배양 방법.

청구항 18

제 14 항에 있어서,

상기 배양 용기에 있어서, 배양 바닥면 및 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 측벽들의 표면에 합성 물질이 코트되어 있는 배양 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 지방 세포의 배양에 관한 것으로서, 특히 세포 내에 구상 (球狀) 의 지방적 (脂肪滴) 을 갖는 지방 세포를, 시험 등에 이용하기 쉽도록 배양하는 배양 방법, 성숙 지방 세포군 및 약물 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근, 지방 조직은 영양분의 저장·방출뿐만 아니라, 렙틴 등의 다양한 생리 활성 물질을 방출하는 중요한 기관인 것이 밝혀지고 있다. 당뇨병이나 여러 가지 성인병의 중요한 원인 기관으로도 인식되고 있다. 따라서, 지방 세포는 이들의 치료에 제공하는 약물의 타깃으로서 연구되고 있다. 이와 같은 약물의 개발이나 스크리닝 시험에는, 배양된 지방 세포의 이용이 불가결하다.

[0003] 생체 내에 있어서, 지방 조직 내에 함유되는 섬유 아세포형의 전구체 세포 또는 전구 지방 세포는 먼저 세포 내에 미소한 지방적이 형성된다. 그리고, 점차 축적되고 비대화된 지방적이 축적되어, 구상의 성숙한 지방 세포 (성숙 지방 세포) 가 형성된다. 전구 지방 세포로부터 성숙 지방 세포로의 분화 과정은 지방 세포 조직 형성에 중요하기 때문에, 본 과정에 있어서의 약제의 영향을 조사하는 것은 의의가 있다.

[0004] 예를 들어, 특허문헌 1 에서는, 단층 세포계에서, 보다 생체 내에 가까운 상태에서 내장 지방 세포를 배양하고, 검정하기 위한 배지가 개시되어 있다. 그러나, 단층 세포계를 사용하는 단층 배양법에서는 지방 세포가 완전히 성숙할 때까지 분화 유도를 실시하기는 어려웠다. 상세하게는, 초기 단계에서는 지방 세포를 플라스크 바닥면에 접착시켜 배양한다. 지방 세포가 분화됨으로써 유적 (油滴) 이 축적되고 비대화되면, 지방 세포는 형태가 변화되고, 둥근 형상이 되어 부상하게 된다. 이 때문에, 플라스크 접착면으로부터 성숙 지방 세포가 쉽게 박리되고, 결과적으로 지방 세포 내에 유적이 다포상 (多胞狀) 으로 축적된 분화의 중간 단계인 세포밖에 관찰되지 않았다. 따라서, 장기에 걸친 분화 배양이나 최종 분화까지의 관찰, 혹은 성숙 지방 세포로밖에 방출되지 않는 생리 활성 물질 등의 실험은 곤란하였다.

[0005] 이러한 문제를 해결하는 방법으로서, 특허문헌 2 에서는 단포성 지방 세포의 배양 방법을 개시하고 있다. 지방 세포는 세포질 내에 포함되는 중성 지방에 의해서 배양액 중에서 부유한다. 특허문헌 2 의 단포성 지방 세포의 배양 방법에서는, 이 부유성을 역으로 이용하여, 배지를 100 % 충만시킨 플라스크의 내측 상면 (천장면) 에 지방 세포를 접착시켜 배양하는 방법 (천장 배양) 을 이용한 기술을 개시하고 있다. 이 방법을 이용하여 단포성 지방 세포를 수일간 천장 배양하면, 대부분의 세포는 세포질의 일부를 신장 혹은 확장시켜 플라스크 천장면에 견고하게 접착되고, 대형의 지방적의 주변에 다양한 크기의 지방적을 갖는 성숙 지방 세포로 형태 변화한다.

[0006] 또, 비특허문헌 1, 2 에 의하면, 2 개 이상의 세포의 집합체인 응집괴의 크기에 관해서 연구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 국제공개 제2007/125859호 팜플렛

(특허문헌 0002) 일본 공개특허공보 2000-83656호

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Rachel Glicklis 외 저, "Modeling Mass Transfer in Hepatocyte Spheroids via Cell Viability, Spheroid Size, and Hepatocellualr Functions", Publised online in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com), 23 April, 2004

(비특허문헌 0002) Franziska Hirschhaeuser 외 저, "Multicelluar tumor spheroids : An underestimated tool is catching up again", Jornal of Biotechnology 148, 2010, pp.3-15

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 그러나, 스크리닝 시험에서는, 동일 조건 하에서, 평가하는 약물의 양, 또는 농도 등의 양을 변경하여 그 효과를 측정하는 것이다. 그 때문에, 사용하는 배양 용기의 재질, 형상 등도 동일하게 할 필요가 있다. 배양 용기로는 플라스틱제 샬레, 유리제 샬레, 웰 플레이트 (마이크로 플레이트) 등이 있고, 웰 플레이트에는, 예를 들어 6 웰, 12 웰, 48 웰, 96 웰, 384 웰의 규격화된 웰 플레이트가 있다. 또한 이와 같은 배양 용기의 사양에 합치되는, 자동 배양 장치, 자동 분석 장치, 또는 다검체 동시 측정이 가능한 평가 장치가 개발되고 있다. 따라서, 산업상, 이러한 배양 용기의 사양과 동 형상, 동 조작, 그리고 관찰성의 관점에서 투명성이 높은 배양 용기를 사용하는 세포 배양 방법이 요청되고 있다. 한편, 특허문헌 2 에서는, 천장면에서 지방 세포를 배양하는 것이기 때문에, 각종 표준 배양 용기와는 현저하게 상이한 형태의 배양 용기가 되지 않을 수 없다. 그 결과, 천장 배양에서 사용하는 배양 용기를, 규격화된 웰 플레이트를 사용하는 분석 장치 및 배양 장치에서 이용할 수 없다는 문제가 있다. 혹은, 천장 배양에서 이용하는 배양 용기를, 규격화된 웰 플레이트를 사용하는 측정 장치에서 이용할 수 없기 때문에 이 측정 장치를 사용하는 스크리닝 시험을 실시할 수 없다는 문제가 있다.

[0010] 그래서 본 발명은, 배양 바닥면과 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 벽을 갖는 배양 용기를 이용하여, 지방 세포를 시험 등에 이용하기 쉽도록 배양하는 세포 배양 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
즉, 종래 사용되고 있는 배양, 검사·평가 장치에 적용할 수 있는 웰 플레이트 (규격화된 웰 플레이트) 등과 호환 가능한 배양 용기를 이용하여, 지방 세포의 배양하는 세포 배양 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명에 관련된 지방 세포의 배양 방법의 일 양태는 파종된 지방 세포를 배양 바닥면과 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 벽과 접착시키면서 배양하고, 지방 세포를 배양액 중에 부유시키지 않고, 구상이고 비대화된 지방적을 세포 내에 생성시킨 구상의 성숙 지방 세포를 얻는 것을 특징으로 하는 지방 세포의 배양 방법이다. 배양 방법에서는, 배양 바닥면에 대해서 수직으로 벽이 형성된 배양 용기를 사용한다. 세포 1 개, 또는 2 개 이상의 세포의 집합체인 응집괴의 일부를 벽과 배양 바닥면의 2 개 지점 이상에서 접착시킨 상태에서, 세포 내에 구상의 지방적을 가짐과 함께 입체적인 형상의 지방적이 비대화된 구상의 성숙 지방 세포를 얻는다.

[0012] 본 발명에 관련된 지방 세포의 배양 방법의 일 양태에 있어서, 상기 지방적의 체적이 0.5×10^{3} ㎛^{3} ~ 3×10^{6} ㎛^{3} 의 범위인 것, 또는 상기 지방적의 최소 직경 (단경) 을 최대 직경 (장경) 으로 나눈 값이 0.4 ~ 1.0 의 범위인 것이 바람직하다.

[0013] 본 발명에 관련된, 2 개 이상의 세포의 집합체인 응집괴의 크기는, 비특허문헌 1, 2 에 기초하면, 응집체의 중심부까지 영양분이나 산소를 공급시켜 생존시키기 위해서는, 배지와 접착되는 최외층으로부터의 거리가 250 ㎛ 이내의 크기인 응집체 바람직하다. 웰 내의 세포 상태를 균일하게 유지하기 위해서는, 응집체는 균일한 500 ㎛ 이하의 직경을 갖는 구 또는 반구상의 응집체가 보다 바람직하다.

[0014] 상기 배양 바닥면에 대해서 수직인 벽을 갖는 배양 용기의 표면에, 플라즈마 처리 또는 무기물을 코트함으로써, 세포 접착성 단백 (콜라겐 등) 의 접착성을 높이기 위한 친수화 처리가 되어 있는 것이 바람직하고, 또한 배양 바닥면과 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 벽을 갖는 배양 용기의 표면에, 콜라겐 또는 피브로넥틴으로 대표되는, 세포 외 매트릭스가 코트된 것인 것, 또는 합성 물질이 코트되어 있는 것이 바람직하다.

[0015] 본 발명은 하기를 제공한다.

[0016] [1] 배양 바닥면과 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 벽을 갖는 배양 용기를 사용하여, 배양하는 지방 세포를, 상기 배양 바닥면과 상기 벽에 접착시키고, 배양액 중에 부유시키지 않고, 구상이고 비대화된 지방적이 축적된 구상의 성숙 지방 세포를 얻는 것을 특징으로 하는 지방 세포의 배양 방법.

[0017] [2] [1]에 있어서,

[0018] 상기 배양하는 지방 세포가 0.5×10^{3} ㎛^{3} 미만의 지방적을 갖는 것을 특징으로 하는 배양 방법.

[0019] [3] [1]에 있어서,

[0020] 상기 배양하는 지방 세포가 골수 간질 세포, 간엽계 간세포, 배성 간세포, 유도 다능성 간세포로부터 분화시킨 지방 세포인 것을 특징으로 하는 배양 방법.

[0021] [4] [1]에 있어서,

[0022] 상기 배양하는 지방 세포가 전구 지방 세포인 것을 특징으로 하는 배양 방법.

[0023] [5] [4]에 있어서,

[0024] 상기 전구 지방 세포를, 90 % 컨플루언트 상태로 될 때까지 증식시킨 후, 분화 유도시키는 공정을 포함하는 배양 방법.

[0025] [6] [5]에 있어서,

[0026] 상기 분화 유도 공정이 (1) 덱사메타손, 인슐린을 함유하는 배지에서 배양한 후, (2) 덱사메타손을 함유하지 않고, 인슐린을 함유하는 배지에서 배양하고, (3) 인슐린, 덱사메타손을 함유하지 않는 배지에서 배양하는 공정을 포함하는 배양 방법.

[0027] [7] [1] 내지 [6] 중 어느 하나에 있어서,

[0028] 상기 배양 용기에 대해서, 0.1×10^{4} 개/㎠ ~ 1×10^{6} 개/㎠ 파종 밀도로 세포를 파종하는 공정을 갖는 배양 방법.

[0029] [8] [1] 내지 [7] 중 어느 하나에 있어서,

[0030] 상기 배양 용기에 있어서, 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 벽의 높이가 10 ㎛ ~ 500 ㎛ 인 것을 특징으로 하는 배양 방법.

[0031] [9] [1] 내지 [8] 중 어느 하나에 있어서,

[0032] 상기 배양 용기에 있어서, 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 벽이 연속되어 있는 배양 방법.

[0033] [10] [1] 내지 [8] 중 어느 하나에 있어서,

[0034] 상기 배양 용기에 있어서, 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 벽이 연속되어 있지 않는 배양 방법.

[0035] [11] [1] 내지 [10] 중 어느 하나에 있어서,

[0036] 상기 배양 용기에 있어서, 배양 바닥면에 대해서 상기 수직 방향으로 배치된 벽에 의해서 구획화된 영역이 형성되어 있는 것을 특징으로 하는 배양 방법.

[0037] [12] [11]에 있어서,

[0038] 상기 구획화된 영역이 규칙적으로 배열되어 있는 것을 특징으로 하는 배양 방법.

[0039] [13] [1] 내지 [12] 중 어느 하나에 있어서,

[0040] 상기 배양 용기에 있어서, 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 벽의 임의의 1 개와 그 벽과 마주 보는 다른 벽의 가장 가까운 거리가 10 ㎛ 이상인 배양 방법.

[0041] [14] [11] 또는 [12] 에 있어서,

[0042] 상기 구획화된 영역의 바닥 면적의 내접원의 직경이 측벽의 높이의 0.1 배 ~ 4 배의 범위인 배양 방법.

[0043] [15] [1] 내지 [14] 중 어느 하나에 있어서,

[0044] 구상의 비대화된 지방적의 체적이 0.5×10^{3} ㎛^{3} ~ 3×10^{6} ㎛^{3} 인 배양 방법.

[0045] [16] [1] 내지 [15] 중 어느 하나에 있어서,

[0046] 지방적의 최소 직경 (단경) 을 최대 직경 (장경) 으로 나눈 값이 0.4 ~ 1.0 인 형상인 배양 방법.

[0047] [17] [1] 내지 [16] 중 어느 하나에 있어서,

[0048] 상기 배양 용기의 바닥면이 투명한 것을 특징으로 하는 배양 방법.

[0049] [18] [1] 내지 [16] 중 어느 하나에 있어서,

[0050] 상기 배양 용기에 있어서, 극성 관능기를 갖는 배양 바닥면 및 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 벽인 것을 특징으로 하는 배양 방법.

[0051] [19] [17] 에 있어서,

[0052] 상기 배양 용기에 있어서, 배양 바닥면 및 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 벽의 표면에 무기물이 코트되어 있는 배양 방법.

[0053] [20] [17] 내지 [19] 중 어느 하나에 있어서,

[0054] 상기 배양 용기에 있어서, 배양 바닥면 및 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 벽의 표면에, 콜라겐, 피브로넥틴으로 대표되는 세포 외 매트리스 코트되어 있는 배양 방법.

[0055] [21] [17] 내지 [19] 중 어느 하나에 있어서,

[0056] 상기 배양 용기에 있어서, 배양 바닥면 및 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 벽의 표면에 합성 물질이 코트되어 있는 배양 방법.

[0057] [22] 배양 바닥면과 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 벽으로 이루어지는 세포 배양 위치를 복수 갖는 배양 용기에 있어서, 상기 배양 바닥면과 상기 배양 바닥면에 대해서 수직으로 배치된 벽에 접착시켜, 배양액 중에 부유시키지 않고 배양된, 구상이고 또한 0.5×10^{3} ㎛^{3} ~ 3×10^{6} ㎛^{3} 의 체적으로 비대화된 지방적을 축적한 복수의 성숙 지방 세포로 이루어지는 성숙 지방 세포군.

[0058] [23] [22]에 기재된 성숙 지방 세포군의 성숙 지방 세포에 약물을 작용시킴으로써, 당해 약물의 지방 조직에 대한 영향을 시험하는 약물 스크리닝 방법.

발명의 효과

[0059] 본 발명에 의하면, 배양 바닥면과 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 벽을 갖는 배양 용기를 이용하여, 지방 세포를 시험 등에 이용하기 쉽도록 특히 종래 이용되고 있는 배양, 검사·평가 장치에 적용할 수 있는 웰 플레이트 등과 호환 가능한 형태로 배양할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1 은 본 발명의 실시형태에 관련된 배양 용기의 구성을 나타내는 평면도이다.

도 2 는 도 1 의 배양 용기의 Ⅱ-Ⅱ 단면도이다.

도 3a 는 도 1 의 배양 용기를 이용하여 세포를 배양하는 상태를 나타내는 모식도이다.

도 3b 는 하나의 지방 세포가 구획화된 영역에서 배양되는 모습을 나타내는 도면이다.

도 3c 는 도 3b 의 지방 세포가 비대화된 상태를 나타내는 도면이다.

도 4 는 본 발명의 실시형태에 관련된 배양 용기의 다른 구성을 나타내는 평면도이다.

도 5 는 도 4 의 배양 용기의 V-V 단면도이다.

도 6a 는 본 발명의 실시형태에 관련된 배양 용기의 또 다른 구성예를 나타내는 평면도이다.

도 6b 는 도 6a 의 배양 용기에서 지방 세포를 배양하는 상태를 위에서 본 모식도이다.

도 6c 는 도 6b 의 VI-VI 단면도이다.

도 7a 는 본 발명의 실시형태에 관련된 배양 용기의 또 다른 구성예를 나타내는 평면도이다.

도 7b 는 도 7a 의 ⅦⅡ-ⅦⅡ 단면도이다.

도 8 은 본 발명의 실시형태에 관련된 배양 용기의 또 다른 구성을 나타내는 평면도이다.

도 9 는 도 8 의 배양 용기의 IX-IX 단면도이다.

도 10 은 비교예 1 의 분화 20 일 후의 세포의 대물 렌즈 40 배의 위상차 현미경 사진이다.

도 11 은 실시예 1 의 분화 20 일 후의 세포의 대물 렌즈 40 배의 위상차 현미경 사진이다.

도 12 는 실시예 2 의 분화 20 일 후의 세포의 대물 렌즈 40 배의 위상차 현미경 사진이다.

도 13a 는 실시예 2 의 염색된 세포의 슬라이스 화상을 촬영한 사진 (바닥부 : Z 축 방향 0 ㎛) 이다.

도 13b 는 실시예 2 의 염색된 세포의 슬라이스 화상을 촬영한 사진 (Z 축 방향 10 ㎛) 이다.

도 13c 는 실시예 2 의 염색된 세포의 슬라이스 화상을 촬영한 사진 (Z 축 방향 20 ㎛) 이다.

도 13d 는 실시예 2 의 염색된 세포의 슬라이스 화상을 촬영한 사진 (Z 축 방향 30 ㎛) 이다.

도 13e 는 실시예 2 의 염색된 세포의 슬라이스 화상을 촬영한 사진 (Z 축 방향 40 ㎛) 이다.

도 13f 는 실시예 2 의 염색된 세포의 슬라이스 화상을 촬영한 사진 (Z 축 방향 50 ㎛) 이다.

도 13g 는 실시예 2 의 염색된 세포의 슬라이스 화상을 촬영한 사진 (상부 : Z 축 방향 60 ㎛) 이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 이하, 도면을 참조하여 본 발명의 실시형태에 대해서 설명한다. 단, 본 발명이 이하의 실시형태에 한정되는 것은 아니다. 설명을 명확하게 하기 위해서, 이하의 기재 및 도면은 적절히 생략 및 간략화되어 있다. 각 도면에 있어서 동일한 구성 또는 기능을 갖는 구성 요소 및 상당 부분에는 동일한 부호를 붙이고, 그 설명은 생략한다.

[0062] 실시형태 1

[0063] 실시형태 1 에서는, 배양 바닥면과 배양 바닥면에 대해서 수직 방향으로 배치된 벽을 갖는 배양 용기를 사용하여, 지방 세포를 시험 등에 이용하기 쉽도록 배양하는 세포 배양 방법을 다음과 같이 하여 실현한다. (1) 지방 세포를 배양액 중에 부유시키지 않고, 생체 내에 존재하는 성숙 지방 세포에 유사한 형태로 배양한다. 즉, 구상이고 비대화된 지방적을 세포 내에 가진 상태에서 배양한다. (2) 시험 등에 이용하기 쉬운 배양 용기를 사용한다.

[0064] 구체적으로는, 생체 내에서 지방 조직은 1 개의 지방 세포의 세포막 내에 구상의 지방적이 축적되고, 복수의 구상의 지방 세포가 응집된 상태를 나타내고 있다. 본 실시형태에서는, 이와 같은 생체 내의 지방 세포에, 보다 가까운 형상의 성숙 지방 세포를 얻는 세포 배양 방법을 실현한다. 예를 들어, 실험에서 사용되는 지방 세포는, 플레이트나 플라스크 등의 바닥에 접착시켜 성장시키기 때문에, 구체가 아니고 이차원 상태에 가까운 것으로 되어 있었다. 또, 성숙화 단계, 즉 세포막 내에 존재하는 지방적의 체적 비율이 높아지면, 지방적의 부력에 의해서 세포가 배양 용기로부터 박리되기 때문에 배양이 불가능해져 성숙 지방 세포를 얻기가 곤란하였다. 이와 같이, 지방 세포의 형태의 차가 크기 때문에, 본래 생체 내에서 지방 세포가 분비하는 물질 등이 생체 외와 상이하다는 문제가 있었다. 그래서, 본 실시형태에서는, 지방 세포를 배양 바닥면과 배양 바닥면에 대해서 수직인 벽의 양방에 접착시킨 상태에서 배양함으로써, 지방 세포를 입체적이고 또한 배양 용기에 접착시킨 상태에서, 종래의 배양 방법에 비해 구체에 가까운 성숙 지방 세포 또는 세포괴를 얻는 것을 실현한다.

[0065] 또한 시험 등, 예를 들어 스크리닝 시험이나 약물의 개발에 있어서 이용되고 있는 배양 용기나 관찰하기 위한 기구 (현미경 등) 에 적용할 수 있는 상태에서 지방 세포를 배양하는 것을 실현한다. 예를 들어, 기존의 현미경 관찰에 사용할 수 있도록 투명한 재질의 플라스틱을 사용함으로써, 세포를 다른 용기에 옮기지 않고 배양에 제공한 용기를 사용하여 관찰할 수 있도록 한다.

[0066] 이후의 설명에서는, 먼저, 실시형태 1 에 관련된 배양 용기에 대해서 설명하고, 그 후 세포 배양 방법에 대해서 설명한다.

[0067] 1. 배양 용기

[0068] 도 1 은 본 실시형태에 관련된 배양 용기의 구성을 나타내는 평면도이고, 도 2 는 도 1 의 Ⅱ-Ⅱ 단면도이다. 도 1 에 나타내는 바와 같이, 배양 용기 (10) 는 배양 바닥면 (14) 에 대해서 수직인 벽 (이하 적절히, 수직

인 벽을「벽」이라고도 칭한다)(12) 을 구비한다. 지방 세포를 배양 바닥면 (14) 과 벽 (12) 에 접착시켜 배양한다. 이 때문에, 배양 바닥면 (14) 과 벽 (12) 의 교점 근방이 세포 배양 위치가 된다. 배양 용기 (10) 는 지방 세포가 접착할 수 있는 세포 배양 위치를 복수 구비하고 있는 것이 바람직하다. 여기서, 배양 바닥면 (14)(배양면) 은 세포를 배양하는 공간에서의 바닥이 되는 부분 (배양 공간에서의 바닥부) 을 의미한다.

[0069] 도 1 에 있어서, 배양 용기 (10) 에 있어서, 배양 바닥면 (14) 은 수직으로 형성된 벽 (12) 으로 구획화된 영역 (배양 영역)(11) 을 갖고 있다. 마주 보는 벽 (12) 의 거리 (대향하는 벽 사이의 거리) a, 벽 (12) 의 폭 b, 높이 c 를 도 1 에 나타낸다. 이 구획화된 영역 (11) 과 벽 (12) 에 의해서 형성되는 공간이 세포 배양 위치 (배양하는 공간) 가 된다.

[0070] 배양 바닥면 (14) 에 수직으로 형성시키는 벽 (12) 의 형상은 특별히 제한되는 것은 아니다. 예를 들어, 연속하는 벽이어도 되고 비연속하는 벽이어도 된다. 또, 그 벽의 형상이 평면이어도 되고 만곡되어 있어도 된다. 또한 다각형, 원주상이어도 되고, 그 형상은 배양 바닥면 (14) 에 대해서 수직이면 특별히 한정되지 않는다. 지방 세포의 기능을 재현시키기 위해서는, 지방적이 축적된 세포 1 개 ~ 수십 개가 일정한 장소에 존재할 수 있도록, 배양 용기 (10) 는 벽 (12) 에 의해서 구획화된 영역 (11) 을 갖고 있는 것이 바람직하다.

[0071] 마주 보는 벽 (12) 의 거리 a 는 70 ㎛ ~ 300 ㎛ 가 바람직하다. 벽 (12) 의 폭 b 는 특별히 한정되지 않으나, 벽 (12) 상에 세포가 접착되지 않도록 20 ㎛ 이하인 것이 바람직하고, 15 ㎛ 이하인 것이 보다 바람직하다.

[0072] 벽 (12) 의 높이 c 는 벽 (12) 에 의해서 구획화된 영역 (11) 에서 배양하는 세포가 벽 (12) 을 올라타서, 인접하는 영역 (벽 (12) 에 의해서 구획화된 영역 (11)) 으로 이동하지 않으면 되고, 50 ㎛ ~ 500 ㎛ 가 바람직하다. 예를 들어, 벽 (12) 의 높이 c 는 상당 직경 70 ㎛ 의 지방적을 갖는 지방 세포를 형성시키는 경우에 50 ㎛ ~ 150 ㎛ 가 바람직하다. 또, 예를 들어 상당 직경 150 ㎛ 의 지방 세포를 형성시키는 경우에 50 ㎛ ~ 300 ㎛ 가 바람직하다.

[0073] 배양 바닥면 (14) 에 대해서 수직인 벽 (12) 은 실질적으로 배양 바닥면 (14) 에 대해서 수직이면 된다. 예를 들어, 배양 바닥면 (14) 과 벽 (12) 이 이루는 각 (이루어지는 각은 지방 세포가 접착되는 구획화된 영역 (11) 과 반대측의 각도) 가 88° 내지 90° 혹은 85° 내지 90° 이어도 된다.

[0074] 배양 바닥면 (14) 과 벽 (12) 이 이루는 각도는 세포가 올라타지 않는 각도이어야 하기 때문에, 측면의 상부로부터 50 % 이상인 부분은 80° ~ 90° 가 바람직하고, 특히 85° ~ 90° 인 것이 바람직하다.

[0075] 도 3a 는 도 1 의 배양 용기를 사용하여 세포를 배양하는 상태를 나타내는 모식도이다. 도 3a 에서는, 배양 용기를 측면에서 투시해서 본 도면이다. 배지 (8) 로 배양 용기 (10) 를 채운다. 벽 (12) 에 의해서 구획화된 영역 (11) 에서, 지방 세포 (9) 가 세포괴를 형성하여 배양되는 모습을 나타내고 있다. 도 3a 내지 3c 중에서, 도 1, 2 와 마찬가지로 마주 보는 벽의 거리를 a, 벽 (12) 의 폭 b, 높이 c 를 나타낸다. 이 경우, 세포괴를 형성하는 지방 세포 중에서 어느 지방 세포가 배양 바닥면 (14) 에 접착되고, 동일 지방 세포 또는 다른 어느 지방 세포가 벽 (12) 에 접착되어 있으면 된다. 바꾸어 말하면, 세포괴 전체로서 배양 바닥면 (14) 과 벽에 접착되어 있으면 된다.

[0076] 도 3b 는, 1 개의 지방 세포 (9) 가 구획화된 영역 (11) 에 있어서, 일방의 벽 (12) 과 배양 바닥면 (14) 의 2 개 지점에서 접착된 상태에서 비대화된 상태를 나타낸다. 도 3c 는 지방 세포가 배양 영역을 구성하고 있는 복수의 벽과 배양 바닥면 (14) 의 3 개 지점 이상과 접착된 상태에서 비대화된 상태를 나타낸다. 이와 같이, 구획화된 배양 영역에 1 개 지방 세포가 배양되는 경우에 있어서, 1 개의 지방 세포가 배양 바닥면 (14) 과 벽 (12) 에 2 개 지점 이상 접착되어 있으면 된다.

[0077] 또한, 도 4 및 도 5 에 나타내는 바와 같이, 벽 (12) 에 의해서 구획화된 영역 (11) 에 있어서, 배양 바닥면 (14) 에 대해서 수직으로 형성된 벽 (12) 이 비연속이어도 된다. 비연속인 벽 (12) 과 벽 (12) 사이의 폭 d 는 배양 세포가 최초로 파종된 구획화된 영역 (11) 에서부터 인접하는 영역 (구획화된 영역 (11)) 으로 이동할 수 없을 정도이면 된다. 예를 들어, 배양 세포의 상당 직경이 20 ㎛ 이면 5 ~ 15 ㎛ 인 것이 바람직하다.
여기서, 도 4 는 본 실시형태에 관련된 다른 배양 용기의 구성을 나타내는 평면도이고, 도 5 는 도 4 의 V-V 단면도이다.

[0078] 배양면에 형성되는 벽 (12) 은 도 6a 와 같은 형상이어도 상관없다. 도 6b 는 지방 세포 (9) 가 벽 (12) 에 접착된 상태를 위에서 본 도면이고, 도 6c 는 도 6b 의 VI-VI 단면을 나타내는 도면이다. 도 6b, 도 6c 에서는, 좌측의 벽 (12) 에는 하나의 지방 세포가 접착되고, 우측의 벽 (12) 에는 복수의 지방 세포 (9) 로 이루

어지는 세포괴가 접착되어 있는 예를 나타내고 있다.

[0079] 또한, 배양면에 형성되는 벽 (12) 은, 도 7a, 도 7b 에 나타내는 바와 같이, 연속된 벽 (12) 이 배양면의 일단에서부터 타단까지 형성되는 경우이어도 된다. 도 7b 는 도 7a 의 VII-VII 단면을 나타내는 도면이다.

[0080] 벽 (12) 은 도면에 나타낸 형상에 한정되는 것은 아니다. 벽 (12) 은 지방 세포가 벽 (12) 의 측벽에 접착되기 쉬운 형상인 것이 바람직하다.

[0081] 또, 도 8 및 도 9 에 나타내는 바와 같이, 본 실시형태에 관련된 배양 용기는, 소정 수의 복수의 배양 바닥면에 대해서 수직인 벽 (12) 을 갖는 배양면을 가진 스폿을 갖고 있어도 된다. 여기서, 도 8 은 본 실시형태에 관련된 또 다른 세포 배양부의 구성을 나타내는 평면도이고, 도 9 는 도 8 의 IX-IX 단면도이다. 도 8 및 도 9 에서는, 도 1 및 도 2 에 나타내는 배양 바닥면에 대해서 수직인 벽을 갖는 용기의 구조를 사용하는 예를 나타낸다. 도 8 에는, 복수의 측벽 (24) 과 배양 바닥면에 대해서 수직인 벽 (12) 에 의해서 구획화된 영역 (11) 이 규칙적으로 배열되어 있는 스폿 (23) 을 나타냈다. 측벽 (24) 의 높이 e 는 배양액이나 반응액 등의 상청액이 건조되지 않고 유지할 수 있는 용량이면 되고, 적절히 설정하면 된다. 측벽 (24) 을 가짐에 따라서, 각 스폿 (23) 에서 상이한 배지를 사용하는 것도 가능해진다. 또, 도 8 및 도 9 에 있어서, 측벽 (24) 을 갖는 구성예를 나타냈으나, 측벽 (24) 을 구비하는 구성이어도 된다.

[0082] 배양 바닥면에 대해서 수직인 벽을 제작하는 방법으로는 특별히 한정되지 않고, 예를 들어 몰드를 사용한 전사 성형, 3 차원 광 조형, 정밀 기계 절삭, 웨트 에칭, 드라이 에칭, 레이저 가공, 방전 가공 등의 방법을 들 수 있다. 배양 용기의 용도, 요구되는 가공 정밀도, 비용 등을 고려하여 이들의 제조 방법을 적절히 선택하는 것이 바람직하다.

[0083] 몰드를 사용하여 전사 성형하는 방법의 구체예로는, 금속 구조체를 형으로 하여 수지 성형에 의해 배양면에 대해서 수직인 벽을 갖는 요철 구조를 형성하는 방법을 들 수 있다. 이 방법은 금속 구조체의 형상을 높은 전사율로 수지에 재현하는 것이 가능하고, 또 범용의 수지 재료를 사용함으로써 재료 비용을 낮출 수 있기 때문에 바람직하다. 이와 같은 금속 구조체의 형을 사용하는 방법은 저비용이고, 높은 치수 정밀도를 만족할 수 있는 점에서 우수하다.

[0084] 상기 금속 구조체의 제조 방법으로는, 예를 들어 포토리소그래피에 의해서 제작된 레지스트 패턴이나 3 차원 광조형에 의해서 제작된 수지 패턴에 대한 도금 처리, 정밀 기계 절삭, 웨트 에칭, 드라이 에칭, 레이저 가공, 방전 가공 등을 들 수 있다. 용도, 요구되는 가공 정밀도, 비용 등을 고려하여 적절히 선택하면 된다.

[0085] 상기에서 얻어진 금속 구조체를 형으로서 사용하여 수지에 요철 구조를 성형하는 방법으로는, 예를 들어 사출 성형, 프레스 성형, 모노머 캐스트 성형, 용제 캐스트 성형, 핫 엠보스 성형, 압출 성형에 의한 롤 전사 등의 방법을 들 수 있다. 생산성 및 형 전사성의 관점에서 사출 성형을 채용하는 것이 바람직하다.

[0086] 배양 용기를 구성하는 재료로는, 자기 지지성을 갖는 것이면 특별히 제한되지 않고, 예를 들어 합성 수지, 실리콘, 유리 등을 들 수 있다. 비용면이나 현미경 관찰에 의한 세포 시인성의 관점에서 투명한 합성 수지를 재료로 하는 것이 바람직하다. 투명한 합성 수지로는, 예를 들어 폴리메타크릴산메틸, 메타크릴산메틸-스티렌 공중합체 등의 아크릴계 수지, 폴리스티렌, 아크릴·스티렌계 공중합 수지 등의 스티렌계 수지, 시클로올레핀 등의 올레핀계 수지, 폴리에틸렌테레프탈레이트, 폴리락트산, 폴리글리콜산 등의 에스테르계 수지, 폴리디메틸실록산 등의 실리콘계 수지, 폴리카보네이트 수지, 폴리에스테르계 수지, 폴리비닐알코올계 수지, 에틸렌·비닐알코올계 공중합 수지, 열가소성 엘라스토머, 염화비닐계 수지, 실리콘 수지 등을 들 수 있다. 이와 같은 수지에는 투명성을 저해하지 않는 범위에서 착색제, 확산제, 증점제 등의 각종 첨가제를 함유하고 있어도 된다.

[0087] 배양 용기는 용기 표면의 친수성, 생체 적합성, 세포 친화성 등을 향상시키는 것을 목적으로 하여 배양 표면에 (배양 바닥면 (14), 벽 (12) 의 측벽, 벽 (12) 의 상면) 표면 처리를 실시하고, 관능기를 갖는 개질층 및/또는 코팅층이 배치되어 있어도 된다. 상기 개질층을 형성하는 방법으로는, 자기 지지성을 상실하는 방법 또는 100 ㎛ 이상의 극단적인 표면 거칠기를 일으키는 방법이 아니면 특별히 제한은 없고, 예를 들어 약품 처리, 용제 처리, 표면 그래프트 중합에 의한 그래프트 폴리머의 도입 등의 화학적 처리, 코로나 방전, 오존 처리, 플라즈마 처리 등의 물리적 처리 등의 방법을 들 수 있다. 또 코팅층을 형성하는 방법으로는 특별히 제한되는 것은 아니고, 예를 들어 스퍼터, 증착 등의 드라이 코팅, 무기 재료 코팅, 폴리머 코팅 등의 웨트 코팅 등의 방법을 들 수 있다. 배양 바닥면 (14) 과 벽 (12) 의 측벽의 경계 부분이나 벽 (12) 에 둘러싸인 공간, 인접하는 벽 (12) 의 간극에 기포가 혼입시키지 않고 배양액을 주입하기 위해서는 친수성을 부여하는 것이 바람직하고, 균일한 친수성 막을 형성시키는 방법으로서 무기 증착이 바람직하다.

[0088] 또, 세포 친화성을 고려한 경우에는, 예를 들어 콜라겐, 피브로넥틴, 라미닌 등의 세포 친화성 단백질을 코팅하는 것이 보다 바람직하다. 콜라겐 수용액 등을 균일하게 코트하기 위해서, 상기 서술한 친수성 막을 형성시킨 후에 코트하는 것이 바람직하다. 생체 내 환경을 모방하여 세포 외 매트릭스 표면에서의 배양이 바람직하기 때문에, 상기와 같이 균일한 친수성 무기막을 배치한 후에 배양 세포에 적절한 세포 외 매트릭스로 이루어지는 유기막을 배치하는 것이 특히 바람직하다.

[0089] 상기의 각 표면 처리는 각각 단독으로 실시해도 되고, 필요에 따라 적절히 조합하여 실시해도 된다.

[0090] 또한 추가적으로, 배양 바닥면 (14) 에 대해서 수직인 벽을 갖는 배양 용기의 바닥부가 투명한 것이 바람직하다. 이것은, 지방 세포를 배양 후, 배양된 지방 세포를 현미경 관찰할 경우, 배양 용기를 그대로 사용하는 것을 가능하게 한다. 이로써, 배양된 지방 세포를 현미경 관찰을 가능하게 하는 용기 등에 옮길 필요가 없어진다. 그 때문에, 시험 등의 순서 간략화·시간 삭감을 실현한다. 덧붙여, 배양된 지방 세포를 다른 용기로 이동할 때 발생되는 지방 세포의 손상을 방지할 수 있다.

[0091] 2.세포 배양 방법

[0092] 본 실시형태에서는, 배양 바닥면 (14) 에 대해서 수직인 벽 (12) 을 갖는 배양 용기 (10) 로서, 상기 서술한 도 1 의 형상을 사용한다. 지방 세포를 배양 바닥면 (14) 과 벽 (12) 에 접착시킨 상태에서 배양한다. 이 배양 방법에 의해서, 세포 내에 구상의 지방적을 갖는 입체적인 형상의 성숙 지방 세포를 얻는다. 여기서, 입체적인이란 구상의 지방적이 축적된 구상의 형태, 즉 생체 내의 지방 세포의 형상에 더욱 근접시키는 것을 가리킨다.

[0093] 본 명세서에서는, 세포 배양 방법을 설명할 때 다음의 용어를 사용한다.

[0094] 용어「지방 세포」는 세포 내에 지방적을 갖는 세포이다. 지방 세포는 동물의 섬유 아세포에서 유래하는 세포로서, 세포질 내에 지방을 축적하도록 분화되어 지방 조직을 형성한다. 지방 세포는 단포성 지방 세포 (백색 지방 세포) 와 다포성 지방 세포 (갈색 지방 세포) 로 분류된다. 단포성 지방 세포는 대형의 지방적이 존재하고, 핵이나 세포 소기관은 변 가장자리에서 압박받고 있는 저장형의 세포이다. 다포성 지방 세포는 소형 혹은 중형의 지방적이 다수 존재하고, 세포 소기관이 발달되어 있는 대사형의 세포이다.

[0095] 지방 세포는 골수 간질 세포, 간엽계 간세포, 배성 간세포, 유도 다능성 간세포로부터 분화시킨 세포를 포함한다. 여기서 말하는 골수 간질 세포는 골수중에 존재하는 망목 구조를 한 조직을 말한다. 간엽계 간세포는 골세포나 지방 세포 등의 간엽 조직에 존재하는 간세포로서, 간엽 (지방 세포, 뼈 등) 의 세포로 분화할 수 있는 세포를 말한다. 간엽계 간세포는 골수나 지방 조직으로부터 분리할 수 있다. 동물의 발생 초기 단계인 배반포기의 배의 일부에 속하는 내부 세포괴로부터 만들어지는 간세포 세포주이다. 생체 외에서, 이론상 모든 조직으로 분화되는 분화 다능성을 유지하면서, 거의 무한으로 증식시킬 수 있다. 유도 다능성 간세포란 만능 세포의 일종으로서, 배성 간세포와 동일하게 증식하여 각종 세포로 분화할 수 있는 것이 가능한 세포이다. iPS 세포는 피부 세포 등으로부터 만들어 낼 수 있다.

[0096] 용어「지방적」은 세포질 내에 존재하는 지방의 소적 (小滴) 으로서, 지방 세포로의 분화 과정 등에서 볼 수 있다. 세포가 성숙함에 따라서 이 소적이 결합하여 서서히 큰 구상의 지방적이 형성된다.

[0097] 용어「성숙 지방 세포」는 지방적이 축적된 지방 세포를 가리킨다. 성숙 지방 세포에는, 지방적이 형성된 세포이면 지방적의 크기는 관계없기 때문에, 비대화된 지방적을 포함하는 지방 세포와, 비대화된 지방적보다 작은 지방적을 포함하는 지방 세포가 포함된다. 예를 들어, 본 명세서에서는, 미소한 지방적이란 $0.5\times10^{3}\ \mu m^{3}$ 미만의 지방적을 말하고, 전구 지방 세포로부터 최종적으로 분화된 비대화된 성숙 세포가 되기 전의 지방 세포를 말한다. 본 명세서에서는, 배양하는 지방 세포로서 미소한 지방적이 축적된 성숙 지방 세포를 포함한다. 이와 같은 미소한 지방적이 축적된 성숙 지방 세포를 배양하고, 비대화된 지방적이 축적된 성숙 지방 세포를 얻는다.

[0098] 용어「분화된다」는 그것이 얻어진 세포형보다 잘 분화된 세포형의 산생을 가리킨다. 따라서, 본 용어는 부분적으로 분화 및 종말 분화된 세포형을 포함한다.

[0099] 용어「분화 유도」는 생물의 발생 분화에서 특정 조직이나 화학 물질이 자연적으로 또는 인위적으로 다른 조직이나 세포의 분화를 일으키는 것을 가리킨다. 분화 유도를 일으키는 물질을「분화 유도 물질」이라고 한다.

[0100] 용어「접착 배양」은 세포를 배양 용기에 접착시켜 배양하는 것을 말한다.

[0101] 용어「계대 배양」은 세포 배양에 있어서 세포의 일부를 새로운 배양 용기로 옮겨 다시 배양하는 것을 말한다.

[0102] 세포 배양 방법에서는, 배양 바닥면 (14) 에 대해서 수직인 벽 (12) 을 갖는 배양면, 예를 들어 상기 서술한, 벽 (12) 에 의해서 구획화된 영역 (11) 을 갖는 3 차원 형상의 배양면을 사용한다. 지방 세포를 배양 바닥면 (14) 과 벽 (12) 의 측면에 접착시킨 상태로 하여 배양한다. 그 때문에, 세포의 분화가 진행되어, 지방적이 커져도 세포가 배양면으로부터 박리되어 부상하는 것을 억제한다. 덧붙여, 세포의 형상을 입체적인 형상으로 한다. 이와 같이, 세포를 구획화된 영역 (11) 에 접착하여 배양함으로써, 세포 내에 구상의 지방적을 갖는 입체적인 형상의 성숙한 지방 세포를 얻는다.

[0103] 이 세포 배양 방법에서는, 예를 들어 특허문헌 2 에 개시되어 있는 배양 용기 (플라스크) 의 천장면에 접착시켜 배양하지 않고, 예를 들어 웰 플레이트 상에서 세포를 배양할 수 있다.

[0104] 본 실시형태의 세포 배양 방법에 있어서, 지방 세포 (성숙 지방 세포), 세포 배양 방법의 공정 등은 다음의 특징을 갖고 있어도 된다.

[0105] 배양에 의해서 얻어지는 비대화된 성숙 지방 세포는 직경이 20 ㎛ ~ 180 ㎛ 인 구상의 지방적, 즉 지방적의 체적이 4×10^{3} ㎛^{3} ~ 3×10^{6} ㎛^{3} 인 범위이고, 지방적의 최소 직경 (단경) 을 최대 직경 (장경) 으로 나눈 값 (연산치) 이 0.4 ~ 1.0 인 범위인 것이 바람직하다.

[0106] 세포 배양 방법은, 배양 바닥면 (14) 에 대해서 수직인 벽 (12) 을 갖는 배양 용기에서 지방 세포를 증식시킨 후, 분화 유도하는 구성을 포함하는 경우가 있다. 분화 유도하는 구성이란, 증식에 사용하고 있는 배지로부터, 분화 유도 인자를 함유하는 배지로 교환하여 배양하는 과정을 말한다. 구체적으로는, 인슐린을 함유하는 배지에서 배양하는 공정 (물질) 을 포함한다.

[0107] 또, 배양하는 지방 세포가 2 층 이상이 되는 경우, 구체적으로는 지방 세포가 배양 바닥면 (14) 를 완전히 덮고 있어 증식할 스페이스가 없어지고, 지방 세포가 층상이 되는 경우에는 90 % 이상의 컨플루언트 상태로부터 분화 유도를 개시한다.

[0108] 세포의 파종 밀도는 세포가 생존할 수있거나 혹은 증식할 수 있는 수이면 되고, 0.1×10^{4} 개/㎠ ~ 10×10^{4} 개/㎠ 밀도로 파종하고, 90 % 컨플루언트가 될 때까지 증식시키고 분화 유도 배지를 사용하여 분화 유도시킨 후, 분화 유도 공정을 실시하는 것이 바람직하다. 또, 분화되어 있는 세포이고, 또한, 증식하지 않는 세포에 대해서는 10×10^{4} 개/㎠ ~ 1×10^{6} 개/㎠ 에서 파종하는 것이 바람직하다.

[0109] 상기 서술한 세포 배양 방법에 의해서, 세포 내에 구상의 지방적을 갖는 입체적인 형상의 성숙 세포를 얻는다. 이것은, 생체 내와 동일하게 1 개의 지방 세포가 구체로 존재하고, 그 구체인 것이 모여 있는 상태에 근접하게 하는 것을 가능하게 한다. 이로써, 생체 내의 형상에 가까운 지방 세포를 제공할 수 있다. 또한, 상기 서술한 배양 바닥면 (14) 에 대해서 수직인 벽 (12) 을 갖는 배양 용기 (10) 를 사용함으로써 세포를 통상적으로 사용되는 웰 플레이트, 샬레 등과 동일한 형상의 용기를 사용하여, 또한 천장 배양이나 겔 내에서 배양하는 겔 배양 등의 복잡한 조작을 실시하지 않고, 성숙한 지방 세포를 배양할 수 있는 방법을 제공할 수 있다. 덧붙여, 그 배양 방법에 의해서 약제 스크리닝등에 바람직한 성숙 지방 세포군을 제공할 수 있다.

[0110] 또한, 지방 세포가 특이하게 산생하는 사이토카인의 하나인 아디포넥틴이 많이 분비되는 성숙한 지방 세포를 배양할 수 있는 방법을 제공하는 것을 가능하게 한다.

[0111] 실시예

[0112] [실시예 1-3, 비교예 1]

[0113] 1. 배양 용기

[0114] 배양 바닥면에 대해서 수직인 벽을 형성시킨 배양면으로서, 상기 서술한 도 1, 2 에 나타낸 배양면을 갖는 1 ㎝ ×1 ㎝ 의 필름을 웰 플레이트 형상의 배양 용기의 바닥면에 첩부 (貼付) 하고, 주화 지방 전구 세포 (3T3-L1) 를 배양하였다.

[0115] 실시예는 이 필름 부분을, 비교예는 필름이 없는 평평한 부분을 배양면으로 하였다.

[0116] 1-1.실시예 1 및 2

[0117] 실시예 1 및 2 에서 사용하는, 배양 바닥면 (14) 에 대해서 수직인 벽 (12) 을 갖는 배양면으로서, 다음의 구획

화된 영역 (11) 을 갖는 2 종류의 필름을 준비하였다. 실시예 1 은, 도 1 의 거리 a 가 200 ㎛, 도 2 의 높이 c 가 50 ㎛ 이고, 실시예 2 는 도 1 의 거리 a 가 200 ㎛, 도 2 의 높이 c 가 100 ㎛ 이다.

[0118] 1-2.비교예 1

[0119] 비교예 1 은 1 ㎝ ×1 ㎝ 의 필름 이외의 평평한 부분을 배양면으로 하였다.

[0120] 2. 세포 배양 및 관찰

[0121] 2-1.실시예 1 및 2

[0122] 주화 지방 전구 세포 (3T3-L1) 를 25 ㎠ 플라스크에서 계대 배양하고, 70 % 컨플루언트가 되었을 때 각 웰에 세포를 파종하였다.

[0123] 여기서, 컨플루언트는 배양면 전체에서 차지하는 세포가 차지하는 면적의 비율을 말한다. 예를 들어, 25 ㎠ 의 면적을 갖는 플라스크를 사용한 경우, 그 면적의 50 % 를 세포가 차지하고 있으면 50 % 컨플루언트라고 한다. 70 % 컨플루언트는 배양면 전체의 70 % 가 세포에 덮여 있는 상태를 가리킨다. 여기서는, 단순히 「컨플루언트가 된다」라는 것과 같이 수치를 기재하고 있지 않은 경우, 90 % 이상의 컨플루언트가 되는 것을 말한다.

[0124] $0.145 \sim 1.16\times10^{4}$ 개/㎠ 의 밀도로 세포를 파종하였다.

[0125] 배양액은, 컨플루언트가 될 때까지, D-MEM (Gibco-Invitrogen, #11965-084 or #12100-046) + 10 % Donor Calf Serum (Tissue Culture Biologicals, #301D) + Antibiotic-Antimycotic (Gibco-Invitrogen, #15240-062) 를 사용하여 2 일에 1 회의 빈도로 배양액을 교환하였다.

[0126] 세포가 컨플루언트가 된 후, 분화 유도 배지로 변경하여 분화 유도를 개시하였다. 분화 유도를 개시한 날을 분화 유도 0 일로 한다. 분화 유도 배지는 분화 유도 0 ~ 2 일째까지는 D-MEM + 10 % Fetal Bovine Serum (BioWest, #S1820) + Antibiotic-Antimycotic+0.25 ㎛ Dexamethasone (Nacalai, #11107-51) + 0.5 mM 3-Isobutyl-1-Metylxanthine (Nacalai, #19624-31) + 4 ㎍/㎖ Humulin R (Eli Lilly Japan, 100 U/㎖, #HI0210) 을 사용한다. 분화 유도 2 일째 ~ 4 일째까지는 D-MEM + 10 % Fetal Bovine Serum+ Antibiotic-Antimycotic + 4 ㎍/ Humulin R 을 사용한다. 분화 유도 4 일째 이후부터, D-MEM + 10 % Fetal Bovine Serum + Antibiotic-Antimycotic 를 사용한다.

[0127] 각 웰에 세포를 뿌리고 나서 분화 20 일간 배양하고, 도립 현미경을 사용하여 관찰하였다. 실시예 2 는, 도립 현미경의 관찰에 부가하여, 분화 유도 31 일째에 2.5 ㎛ Bodipy493/503 으로 지방적을, 1 ㎍/㎖ Hoechst33342 로 세포핵을 세포 고정시키지 않고 산 채로 형광 염색하였다. 공초점 레이저 현미경을 사용하여, 이 형광 염색한 세포의 Z 축 (높이) 방향 슬라이스 화상 시퀀스를 촬영하였다 (세포 염색의 슬라이스 화상 순서).

[0128] 세포 염색에서 사용하는 형광 염색은 다음의 특징을 구비한다. 형광 색소는 광을 쏘이면 전자가 여기된다. 그러나, 전자는 안정된 장소로 돌아간다. 돌아갈 때 에너지를 방출하여 원래대로 돌아가지만, 에너지를 상실하기 때문에, 방출된 에너지는 광에서 얻은 에너지보다 작은 에너지로서 방출된다. Bodipy493 /503 은 중성 지방에 선택적으로 용해되는 형광 색소로서, 청색의 광을 흡수하여 녹색의 광을 방출한다. Hoechst33342 는 DNA 선택적으로 결합되는 형광 색소로서, 자색 (UV) 의 광을 흡수하여 청색의 광을 방출한다. 촬영된 화상의 흑백 영상에서는 녹색 부분이 백색이 된다.

[0129] 2-1. 비교예 1

[0130] 실시예 1, 2 의 평판 부분으로 하였다. 그 때문에, 배양 바닥면이 상이한 것 이외에는 완전히 동일한 조건이 된다.

[0131] 세포를 뿌리고 나서 분화 유도 20 일째에, 실시예 1, 2 와 동일하게 도립 현미경을 사용하여 관찰하였다.

[0132] 3. 결과

[0133] 3-1. 분화 20 일 후의 세포

[0134] 실시예 1-3, 또는 비교예 1 의 각각의 조건에서 배양한, 분화 20 일 후의 세포의 사진을 참조하여 배양 결과를 설명한다.

[0135] · 비교예 1

[0136] 도 10 에 비교예 1 의 분화 20 일 후의 세포를 촬영한 사진을 나타낸다. 도 10 에서 원으로 둘러싼 부분이 세포 1 개이다. 도 10 에서 원으로 둘러싼 세포의 지방적은 50 ㎛ 정도의 크기였다. 복수의 큰 지방적을 포함하고 있기 때문에 세포가 구상으로는 되지 않았다.

[0137] · 실시예 1

[0138] 도 11 에 실시예 1 의 분화 20 일 후의 세포를 촬영한 사진을 나타낸다. 도 11 에서 원으로 둘러싼 부분이 세포 1 개이다. 사각으로 둘러싼 부분은 세포가 모여 집단으로 되어 있다. 분화 20 일 후에는 구획화된 영역의 중앙 부근에 세포가 모여 있는 것이 관찰된다.

[0139] 분화 20 일이 경과되기까지의 관찰에서는, 마이크로 용기의 중앙 부근뿐만 아니라, 벽 (측벽) 부근에도 세포가 존재하여 바닥을 다 메우고 있었다. 그러나, 세포가 성숙해 가면서, 마이크로 용기의 중앙 부근에 세포가 모이게 되었다. 도 11 의 40 배의 사진에서는, 지방적이 겹쳐 보이는 점에서 하나 하나의 세포가 중앙 부근에 집중되어 덩어리를 만들고 있는 것이 관찰되었다. 이것은 자기 조직적으로 세포 응집체를 형성하고 있는 것이 추측된다.

[0140] 덧붙여, 1 개의 세포 크기가 비교예 1 과 비교하여 작은 경향이 있었다. 이것은 실시예 1 에서는 세포의 체적이 작은 것이 아니고, 세포 형태가 평평하지 않고 구상으로 되었기 때문으로 추측된다.

[0141] · 실시예 2

[0142] 도 12 에 실시예 2 의 분화 20 일 후의 세포를 촬영한 사진을 나타낸다. 도 12 에서, 사각으로 둘러싼 부분은 1 개의 세포가 마이크로 용기의 중앙 부근에 모여 지방 세포의 덩어리를 만들고 있었다.

[0143] 3-2. 세포 염색의 슬라이스 화상

[0144] 도 13a ~ 13g 에, 실시예 2 에 대해서, 세포 염색하여 촬영한 슬라이스 화상 순서의 사진을 나타낸다. 사진 중의 우하에 나타내는 스케일은 30 ㎛ 의 길이를 나타낸다. X 축 및 Y 축을 고정시키고 Z 축 방향을 이동시켜, 염색된 세포를 위에서 촬영하였다. 도 13a 가 바닥부 세포의 사진이고, 순서대로 상방의 세포로 이행하고, 도 13g 가 상부의 세포이다. 도 13a ~ 13g 에 있어서, 하얗게 보이는 부분이 지방적이다. 도 13a ~ 13g 에 있어서, 좌상, 좌하 및 우상에 보이는 점선상의 사선이 마이크로 용기의 벽이다.

[0145] 도 13c (Z = 20 ㎛) 의 화살표로 가리킨 세포는 세포질이 1 개의 지방적에 의해서 차지되어 있고, X-Y 평면에서의 직경은 20 ㎛ 로 확인된다. 이에 대해서, Z 축 방향의 관찰에 있어서는, 도 13b (Z = 10 ㎛) 내지 도 13d (Z = 30 ㎛) 에서는 확실하게 보이지만, 도 13a (Z = 0 ㎛) 및 도 13e (Z = 40 ㎛) 에서 희미하게 되어 있다.

[0146] 도 13d (Z = 30 ㎛) 의 화살표로 가리킨 세포도 세포질이 1 개의 지방적에 의해서 차지되어 있고 X-Y 평면에서의 직경은 30 ㎛ 로 확인된다. 이에 대해서, Z 축 방향의 관찰에 있어서는, 도 13c (Z = 20 ㎛) 내지 도 13e (Z = 40 ㎛) 에서는 확실하게 보이지만, 도 13a (Z = 0 ㎛) 및 도 13f (Z = 50 ㎛) 에서 희미하게 되어 있다.

[0147] 어느 세포도 Z 축 방향의 직경은 20 ~ 40 ㎛ 로 추찰할 수 있다. 직경은 상기 서술한 바와 같이 20 ~ 30 ㎛ 이기 때문에, 실시예 2 의 세포 응집체를 형성하고 있는 세포의 지방적, 세포의 형태는 구상이다.

[0148] 이 출원은 2011년 3월 16일에 출원된 일본출원 특원 2011-057770 을 기초로 하는 우선권을 주장하고, 그 개시의 모두를 여기에 받아들인다.

부호의 설명

[0149] 7 : 샬레 혹은 웰 플레이트

8 : 배지

9 : 세포

10 : 배양 용기

11 : 구획화된 영역

12 : 벽

13 : 개구부

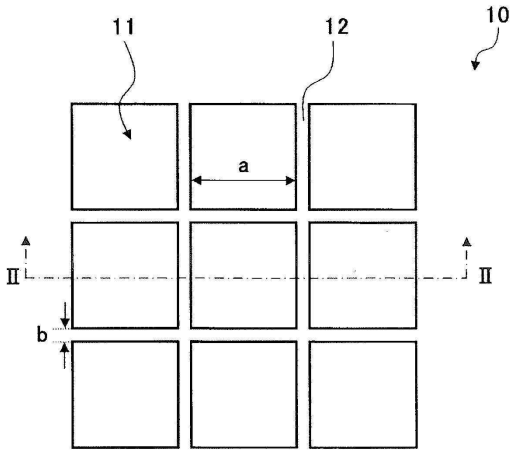
14 : 배양 바닥면

23 : 스폿

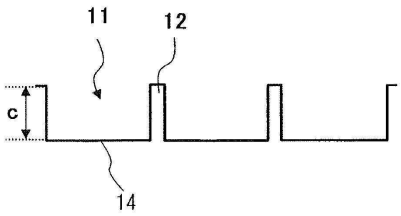
24 : 스폿의 측벽

도면

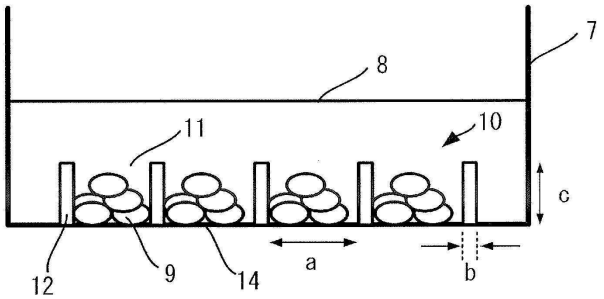
도면1



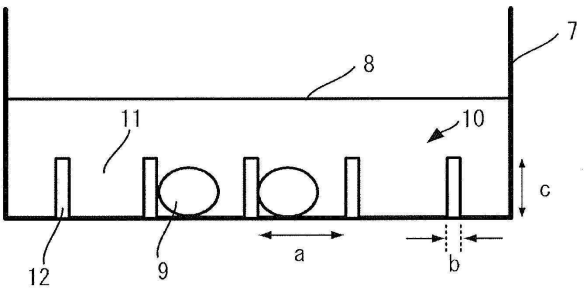
도면2



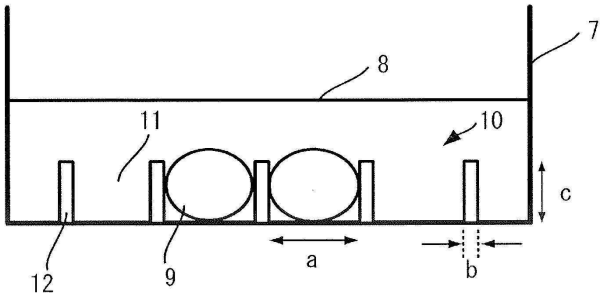
도면3a



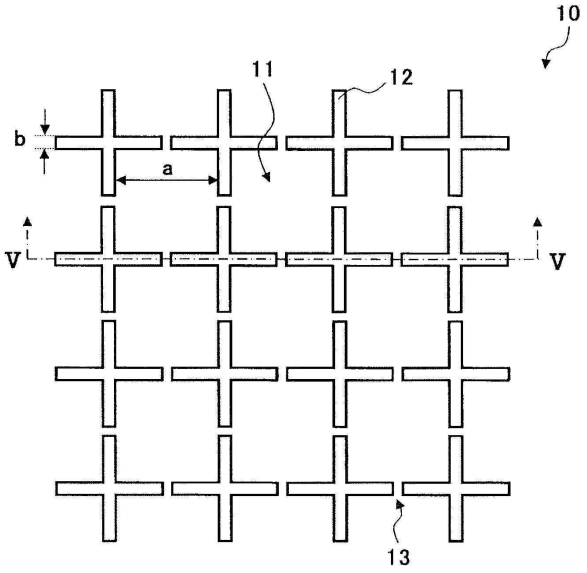
도면3b



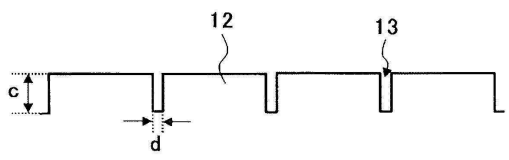
도면3c



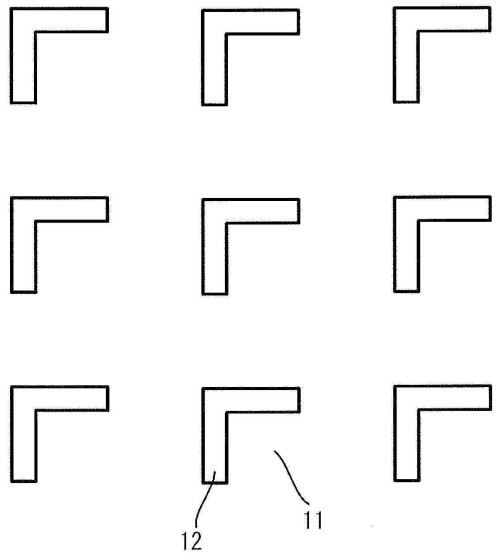
도면4



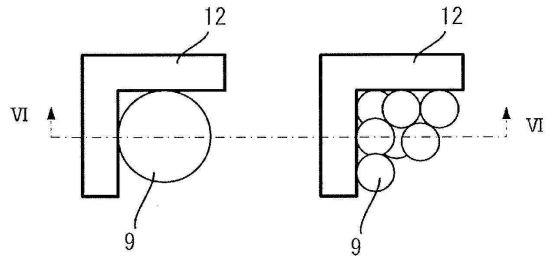
도면5



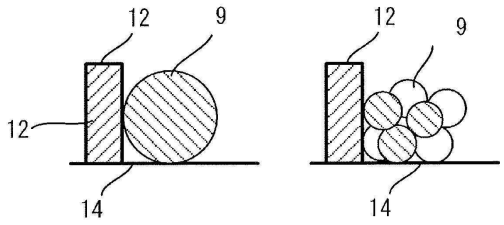
도면6a



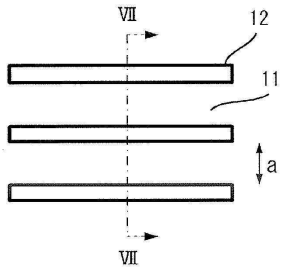
도면6b



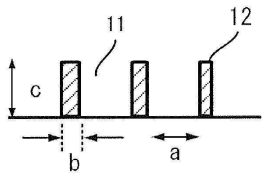
도면6c



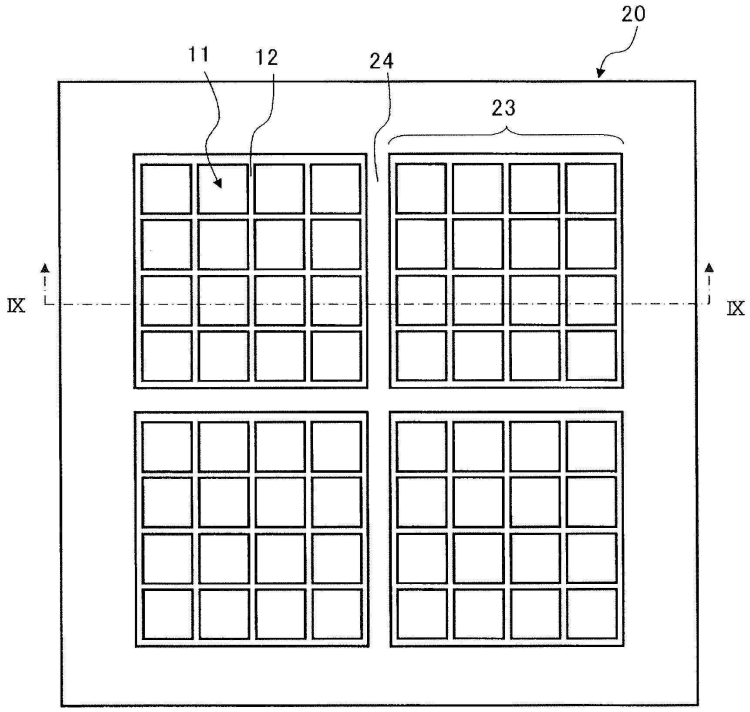
도면7a



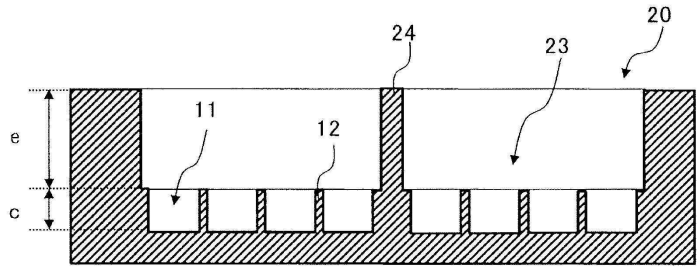
도면7b



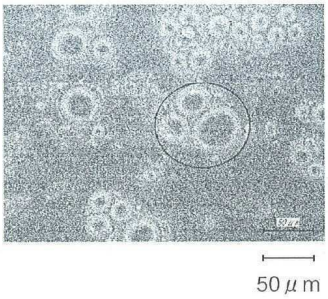
도면8



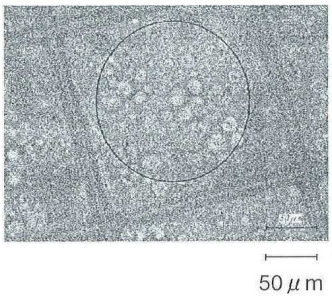
도면9



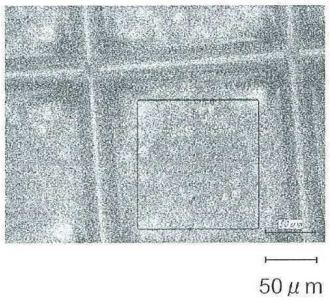
도면10



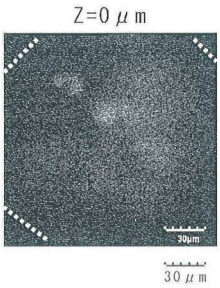
도면11



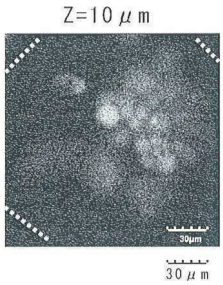
도면12



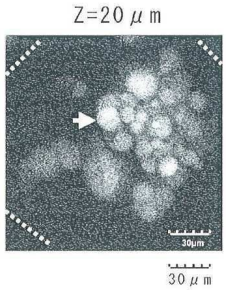
도면13a



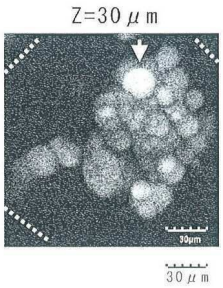
도면13b



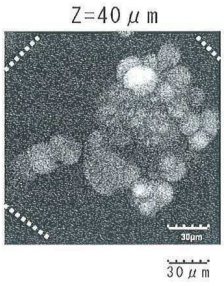
도면13c



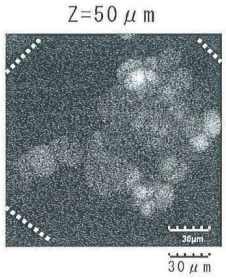
도면13d



도면13e



도면13f



도면13g

