



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107736337 A

(43)申请公布日 2018.02.27

(21)申请号 201710914871.8

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2012.11.22

A01N 1/02(2006.01)

(30)优先权数据

2011-258208 2011.11.25 JP

(62)分案原申请数据

201280058085.8 2012.11.22

(71)申请人 住友化学株式会社

地址 日本国东京都

申请人 独立行政法人理化学研究所

(72)发明人 安藤觉 中野德重 笹井芳树

永乐元次

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 张国梁

权利要求书1页 说明书11页 附图5页

(54)发明名称

冷冻保存来源于多能干细胞的组织的方法

(57)摘要

本发明提供冷冻保存来源于多能干细胞的组织的方法,所述方法包括以下(1)至(3):(1)第一步,使来源于多能干细胞的组织与含有亚矾和链状多元醇的细胞保护溶液接触,(2)第二步,将在所述第一步中与所述细胞保护溶液接触的所述来源于多能干细胞的组织保持在冷冻保存溶液中,以及,(3)第三步,在冷却剂存在下,冷冻保存在所述第二步中被保持在所述冷冻保存溶液中的所述来源于多能干细胞的组织。根据本发明的方法,可以提供稳定的来源于多能干细胞的组织的保存方法。

1. 冷冻保存来源于多能干细胞的组织的方法,所述方法包括以下(1)至(3):

(1) 第一步,使来源于多能干细胞的组织在0℃至8℃与第一溶液接触进行渗透处理,所述第一溶液是含有亚砷和链状多元醇的细胞保护溶液,

(2) 第二步,将在所述第一步中与所述细胞保护溶液接触的所述来源于多能干细胞的组织保持在第二溶液中,所述第二溶液是冷冻保存溶液,以及

(3) 第三步,冷冻保存在所述第二步中被保持在所述冷冻保存溶液中的所述来源于多能干细胞的组织,

其中所述组织是细胞群体的结构,其具有一定的构造,其中形状和性质不同的多种类型的细胞在空间上被布置成特定的模式。

2. 根据权利要求1所述的冷冻保存方法,其中所述渗透处理进行15min到30min。

3. 根据权利要求1所述的冷冻保存方法,其中所述含有亚砷和链状多元醇的细胞保护溶液是含有亚砷、链状多元醇和寡糖的细胞保护溶液。

4. 根据权利要求3所述的冷冻保存方法,其中所述细胞保护溶液的亚砷浓度为5至15%,链状多元醇浓度为4至15%,并且寡糖浓度为5至20%。

5. 根据权利要求3或4所述的冷冻保存方法,其中所述亚砷是二甲亚砷并且所述链状多元醇是乙二醇并且所述寡糖是蔗糖。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的冷冻保存方法,其中所述多能干细胞是人多能干细胞。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的冷冻保存方法,其中所述组织是脑神经组织,在所述脑神经组织中,构成神经层的多类细胞或其先祖细胞在空间上被布置成层。

8. 根据权利要求1至6中任一项所述的冷冻保存方法,其中所述组织是视网膜组织,在所述视网膜组织中,构成视网膜层的多类细胞或其先祖细胞在空间上被布置成层。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的冷冻保存方法,其中所述第三步以不小于10℃/min的降温速率进行。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的冷冻保存方法,其中所述第三步在冷却剂存在下进行。

11. 根据权利要求10所述的冷冻保存方法,其中所述冷却剂是液氮。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的冷冻保存方法,其中所述冷冻保存溶液是含有二甲亚砷、乙酰胺和丙二醇的冷冻保存溶液。

13. 根据权利要求12所述的冷冻保存方法,其中二甲亚砷的浓度为1至4M并且乙酰胺的浓度为0.5至2M并且丙二醇的浓度为1.5至6M。

## 冷冻保存来源于多能干细胞的组织的方法

[0001] 本申请是国际申请号PCT/JP2012/080365,国际申请日2012年11月22日,中国申请号201280058085.8,发明名称为“冷冻保存来源于多能干细胞的组织的方法”的专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及来源于多能干细胞的组织的冷冻保存方法。

### 背景技术

[0003] 组织是具有一定构造的细胞群体的结构,其中形状和性质不同的多种类型的细胞在空间上被布置成特定的模式。

[0004] 例如,作为眼球的组成元件之一的视网膜组织是类似膜的组织,其覆盖眼球后部的内壁,并且视网膜组织具有层结构,其中神经细胞有规律地排列。视网膜含有五种类型的极大分化的神经细胞:视细胞,双极细胞,水平细胞,无长突细胞,和神经节细胞。视细胞将光转化为电信号并且信息经由化学突触被传递至双极细胞和水平细胞。双极细胞与无长突细胞和神经节细胞形成突触连接,并且作为视神经的神经节细胞的轴突与脑中的视觉中枢通讯。为了视网膜疾病的治疗,病因学的研究,药物发现中效力和安全性的研究,至今进行细胞移植治疗等。然而,难以获得成为所述研究的材料的、反映人生物学组织的、具有层结构的视网膜组织。

[0005] 近年来,已经报道了通过诱导多能干细胞如ES细胞的分化来制备比得上活体中的视网膜组织的视网膜组织(非专利文献1)。为了将通过多能干细胞的分化获得的组织用于再生医学、安全性试验等,稳定供应大量具有一致品质的组织是必要的。另一方面,通过多能干细胞的分化来制备各种组织需要给定的或较长的分化诱导时间,如由以下所示:例如由人ES细胞制备视网膜组织需要不小于3周的时间。并且,分化诱导的效率通常取决于分化诱导的处理而改变。因此,当在使用时逐个制备这样的组织时,实际的实践是困难的,并且非常需要用于在分化诱导过程中的特定阶段保存所述组织的技术。

[0006] [文献列表]

[0007] [非专利文献]

[0008] 非专利文献1:M.Eiraku等,Nature 472,p51-56(2011):Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture(三维培养中的自组织视杯形态发生)

[0009] 发明概述

[0010] 发明要解决的问题

[0011] 为了稳定供应大量的用于再生医学、安全性和效率评估等的来源于多能干细胞的组织,迫切需要开发组织的保存方法。

[0012] 解决问题的方式

[0013] 本发明的发明人鉴于所述情况而进行了大量研究并且发现稳定保存来源于多能

干细胞的组织的方法,这导致了本发明。

[0014] 因此,本发明提供以下。

[0015] [1]冷冻保存来源于多能干细胞的组织的方法,所述方法包括以下(1)至(3):

[0016] (1) 第一步,使来源于多能干细胞的组织与含有亚砷和链状多元醇的细胞保护溶液接触,

[0017] (2) 第二步,将在所述第一步中与所述细胞保护溶液接触的所述来源于多能干细胞的组织保持在冷冻保存溶液中,

[0018] (3) 第三步,在冷却剂存在下,冷冻保存在所述第二步中被保持在所述冷冻保存溶液中的所述来源于多能干细胞的组织。

[0019] [2]前述[1]的冷冻保存方法,其中所述含有亚砷和链状多元醇的细胞保护溶液是含有亚砷、链状多元醇和寡糖的细胞保护溶液。

[0020] [3]前述[2]的冷冻保存方法,其中所述细胞保护溶液的亚砷浓度为5至15%,链状多元醇浓度为4至15%,并且寡糖浓度为5至20%。

[0021] [4]前述[2]或[3]的冷冻保存方法,其中所述亚砷是二甲亚砷并且所述链状多元醇是乙二醇并且所述寡糖是蔗糖。

[0022] [5]前述[1]至[4]中任一项的冷冻保存方法,其中上述多能干细胞是人多能干细胞。

[0023] [6]前述[1]至[5]中任一项的冷冻保存方法,其中所述组织是脑神经组织。

[0024] [7]前述[1]至[5]中任一项的冷冻保存方法,其中所述组织是视网膜组织。

[0025] [8]前述[1]至[7]中任一项的冷冻保存方法,其中所述第三步以不小于10°C/min的降温速率进行。

[0026] [9]前述[1]至[8]中任一项的冷冻保存方法,其中所述冷却剂是液氮。

[0027] [10]前述[1]至[9]中任一项的冷冻保存方法,其中所述冷冻保存溶液是含有二甲亚砷、乙酰胺和丙二醇的冷冻保存溶液。

[0028] [11]前述[10]的冷冻保存方法,其中二甲亚砷的浓度为1至4M并且乙酰胺的浓度为0.5至2M并且丙二醇的浓度为1.5至6M。

[0029] [12]用于冷冻保存来源于多能干细胞的组织的细胞保护溶液,其包含亚砷和链状多元醇。

[0030] [13]前述[12]的细胞保护溶液,其还包含寡糖。

[0031] 发明效果

[0032] 本发明使得能够稳定保存来源于多能干细胞的组织。

[0033] 附图简述

[0034] 图1是这样的视图,其显示通过分化诱导RAX::绿色荧光蛋白(下文中,有时被称为“GFP”)敲入人ES细胞获得的聚集体中产生的视网膜组织的光场图像。

[0035] 图2是这样的视图,其显示图1中所示的具有视网膜组织的聚集体的荧光图像。

[0036] 图3是这样的视图,其显示在从聚集体分离后培养的视网膜组织的光场图像。

[0037] 图4是这样的视图,其显示图3中所示的视网膜组织的荧光图像。

[0038] 图5是这样的视图,其显示利用抗-GFP抗体、抗-Chx10抗体、抗-Pax6抗体或抗-Brn3抗体的从聚集体分离后培养的视网膜组织的冷冻切片的免疫染色的结果。

[0039] 图6是这样的视图,其显示从聚集体分离后培养的视网膜组织的状态,其是,未冷冻的作为实验的对照(A,B),冷冻而不与细胞保护溶液接触(C,D),在利用含有11.0% (w/v) 二甲亚砜(DMSO)的溶液渗透处理后冷冻(E,F),在利用含有11.0% (w/v) 二甲亚砜(DMSO)和5.55% (w/v) 乙二醇的溶液渗透处理后冷冻(G,H),以及在利用含有11.0% (w/v) 二甲亚砜(DMSO),5.55% (w/v) 乙二醇和10% (w/v) 蔗糖的溶液渗透处理后冷冻(I,J)。

[0040] 图7是这样的视图,其显示从聚集体分离后培养的视网膜组织的状态,其是,未冷冻的作为实验的对照(A,B),在利用含有5% (w/v) 蔗糖的溶液渗透处理后冷冻(C,D),在利用含有10% (w/v) 蔗糖的溶液渗透处理后冷冻(E,F),在利用含有20% (w/v) 蔗糖的溶液渗透处理后冷冻(G,H),在利用含有11.0% (w/v) 二甲亚砜(DMSO)和10% (w/v) 蔗糖的溶液渗透处理后冷冻(I,J),在利用含有5.55% (w/v) 乙二醇和10% (w/v) 蔗糖的溶液渗透处理后冷冻(K,L)。

[0041] 图8是这样的视图,其显示从聚集体分离后培养的视网膜组织的冷冻切片的利用抗-GFP抗体(A,C,E),抗-Chx10抗体(B),抗-Chx10和抗-Pax6抗体(D),抗-Chx10和抗-TuJ1抗体(F)的免疫染色的结果,所述视网膜组织在利用含有11.0% (w/v) 二甲亚砜(DMSO)和5.55% (w/v) 乙二醇的溶液渗透处理后(A,B)以及在利用含有11.0% (w/v) 二甲亚砜(DMSO),5.55% (w/v) 乙二醇和10% (w/v) 蔗糖的溶液渗透处理后(C,D,E,F)被冷冻。

[0042] 实施发明的方式

[0043] 以下详细地说明实施本发明的方式。

[0044] 在本发明中,“转化体”是指通过转化产生的有生命的物质如细胞的全部或部分。转化体的实例包括原核细胞,酵母,动物细胞,植物细胞,昆虫细胞等。根据靶标,转化体有时也被称为转化细胞,转化组织,转化宿主等。用于本发明的细胞也可以是转化体。

[0045] 用于涉及本发明的遗传改造技术的原核细胞的实例包括属于埃希氏菌属(genus *Escherichia*),沙雷氏菌属(genus *Serratia*),芽孢杆菌属(genus *Bacillus*),短杆菌属(genus *Brevibacterium*),棒杆菌属(genus *Corynebacterium*),微杆菌属(genus *Microbacterium*),假单胞菌属(genus *Pseudomonas*)等的原核细胞,具体地包括,埃希氏菌XL1-Blue,埃希氏菌XL2-Blue,埃希氏菌DH1等。这些细胞具体描述于,例如,Sambrook,J和Russell,D.W.的“Molecular Cloning(分子克隆)(第3版)”,附录3(卷3),Vector and Bacterial strains(载体和菌株).A3.2(Cold Spring Harbor USA2001)。

[0046] 涉及本发明的“载体”是指能够将所需的多核苷酸序列转移到目标细胞中的载体。这样的载体的实例包括能够在宿主细胞如原核细胞,酵母,动物细胞,植物细胞,昆虫细胞,动物个体和植物个体等中自主复制的那些,或允许整合到染色体中并且在适于多核苷酸转录的位置处含有启动子的那些等等。

[0047] 在所述载体中,适于克隆的载体有时被称为“克隆载体”。这样的克隆载体通常具有含有多个限制酶位点的多个克隆位点。目前,有很多载体可用于相关领域中的基因克隆,并且它们被经销商以不同的名称销售,因为它们稍有不同(例如,多克隆位点处的限制酶的种类和序列)。例如,代表的克隆载体描述于(经销商也被描述) Sambrook,J和Russell,D.W.的“Molecular Cloning(分子克隆)(第3版)”,附录3(卷3),Vector and Bacterial strains(载体和菌株).A3.2(Cold Spring Harbor USA2001),并且本领域普通技术人员可以根据目标适当地使用它们。

[0048] 涉及本发明的“载体”还包括“表达载体”，“报告载体”，和“重组载体”。“表达载体”是指这样的核酸序列，其中除了结构基因和启动子以外的调节其表达的各种调节元件可操作地连接于宿主细胞中。“调节元件”的实例包括终止子，选择标记如药物抗性基因，以及含有增强子的调节元件等。本领域技术人员公知，使用的有生命的物质（例如，动物）的表达载体的类型和调节元件的类型可以根据宿主细胞而改变。

[0049] 涉及本发明的“重组载体”的实例包括 (a) 用于基因组文库筛选的 $\lambda$ FIX载体（噬菌体载体），(b) 用于cDNA筛选的 $\lambda$ ZAP载体（噬菌体载体），(c) 用于克隆基因组DNA的pBluescript II SK+/-载体，pGEM载体，pCR2.1载体（质粒载体），等等。“表达载体”的实例包括pSV2/neo载体，pcDNA载体，pUC18载体，pUC19载体，pRc/RSV载体，pLenti6/V5-Dest载体，pAd/CMV/V5-DEST载体，pDON-AI-2/neo载体，pMEI-5/neo载体等（质粒载体）等。“报告载体”的实例包括pGL2载体，pGL3载体，pGL4.10载体，pGL4.11载体，pGL4.12载体，pGL4.70载体，pGL4.71载体，pGL4.72载体，pSLG载体，pSLO载体，pSLR载体，pEGFP载体，pAcGFP载体，pDsRed载体等。根据前述Molecular Cloning（分子克隆）文献可以适当地使用这些载体。

[0050] 关于本发明，用于将核酸分子引入细胞中的技术的实例包括转化，转导，转染等。作为此种引入技术，可以具体提及例如，描述于Ausubel F.A.等编辑（1988），Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, New York, NY; Sambrook J.等（1987），Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第2版和第3版; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; 特刊, Experimental Medicine “transgene& expression analysis experiment method” YODOSHA CO., LTD., 1997等中的方法等。用于确认基因的胞内引入的技术的实例包括RNA印迹分析，蛋白质印迹分析或其他公知的常规技术等。

[0051] 关于本发明，载体引入方法的实例包括转染，转导，转化等（例如，磷酸钙法，脂质体法，DEAE-葡聚糖法，电穿孔法，使用粒子枪（基因枪）的方法等）。

[0052] 本发明的冷冻保存方法是表征为包括以下(1)至(3)的冷冻保存方法：

[0053] (1) 第一步，使来源于多能干细胞的组织与含有亚砷和链状多元醇的细胞保护溶液接触，

[0054] (2) 第二步，将在所述第一步中与所述细胞保护溶液接触的所述来源于多能干细胞的组织保持在冷冻保存溶液中，以及，

[0055] (3) 第三步，在冷却剂存在下，冷冻保存在所述第二步中被保持在所述冷冻保存溶液中的所述来源于多能干细胞的组织。

[0056] 在本发明中，“干细胞”是指甚至在细胞分化后仍保持相同分化能力的细胞，并且所述细胞可以在组织损伤时再生组织。此处，干细胞可以是胚胎干细胞（ES细胞）或组织干细胞（也被称为组织的干细胞，组织特异性干细胞或体干细胞），或人造的多能干细胞（iPS细胞：诱导的多能干细胞），但不限于此。如从上述来源于干细胞的组织细胞可以再生组织的事实理解的，已知干细胞可以分化为与活体中的细胞接近的正常细胞。

[0057] 干细胞可以获得自给定的组织，或者也可以购买市售产品。例如，人胚胎干细胞，KhES-1, KhES-2和KhES-3可获得自Kyoto University的前沿医学研究所（Institute for Frontier Medical Sciences）。小鼠胚胎干细胞的实例包括EB5细胞等。

[0058] 干细胞可以通过根据本身已知的方法培养来维持。例如，干细胞可以通过补充以

胎牛血清 (FCS)、敲除血清置换物 (Knockout Serum Replacement, KSR) 和 LIF 的无饲养细胞培养来维持。

[0059] 在本发明中,“多能干细胞”是指这样的干细胞,其可以在体外培养并且有能力分化成构成除胎盘以外的活体的任何细胞(来源于三胚层(外胚层、中胚层、内胚层)的组织)(多能性),其包括胚胎干细胞(ES细胞)。“多能干细胞”获得自受精卵,克隆胚胎,再生干细胞,和组织中的干细胞。其还包括,在向体细胞中引入若干种基因后具有类似于胚胎干细胞的多能性的人工多能性的细胞(也被称为人造多能干细胞)。多能干细胞可以通过本身已知的方法制备。制备方法的实例包括描述于 Cell 1131 (5) pp. 861-872 (2007), Cell 126 (4) pp. 663-676 (2006) 等中的方法。

[0060] 在本发明中,“胚胎干细胞(ES细胞)”是指具有自身复制能力和多能性(即,“多能性”)的干细胞,其是源自早期胚胎的多能干细胞。胚胎干细胞首先建立于1981年,并且自1989年起已被应用于产生敲除小鼠。在1998年,建立了人胚胎干细胞,其也被用于再生医学。

[0061] 在本发明中,“人造多能干细胞”是指通过直接重编程分化的细胞如成纤维细胞等,通过表达若干种基因如 Oct3/4、Sox2、Klf4、Myc 等被诱导而具有多能性的细胞,其在2006年由 Yamanaka 等在小鼠细胞中建立 (Takahashi K, Yamanaka S. Cell. 2006, 126 (4), p663-676)。在2007年,其也在人成纤维细胞中被建立,并且具有类似于胚胎干细胞的多能性 (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), p1917-1920.; 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), p101-106)。

[0062] 在本发明中,“分化”是指这样的现象,其中在来源于单个细胞的分裂的子细胞群体中产生在形态上和/或功能上具有不同品质的两种以上类型的细胞。因此,分化中也包括这样的过程,其中来源于本身不具有可检测的特殊特性的细胞的细胞群体(细胞谱系)变得显示清楚的特性如产生特定的蛋白质等。目前通常认为,细胞分化是基因组中的特定基因群体被表达的状态,并且细胞分化可以通过寻找导致此种基因表达状态的胞内或胞外因素或状况来鉴别。原则上,细胞分化的结果是稳定的,并且向其他类型的细胞分化仅格外特别地发生在动物细胞中。

[0063] 在本发明中,“组织”是指细胞群体的结构,其具有一定的构造,其中形状和性质不同的多种类型的细胞在空间上被布置成特定的模式,并且本发明中的“来源于多能干细胞的组织”是指通过诱导多能干细胞分化获得的细胞的聚集体,其是细胞群体的结构,其具有一定的构造,其中形状和性质不同的多种类型的细胞在空间上被布置成特定的模式。

[0064] 通过诱导多能干细胞分化获得的细胞的实例包括大脑神经细胞,间脑神经细胞,下丘脑神经细胞,基底核神经细胞,小脑神经细胞,肠组织细胞,心肌细胞,胰腺细胞,肝细胞,及其先祖细胞。具体地,其可以根据以下制备:WO2009/148170, J Neurosci. 2011Feb2; 31 (5):1919-33, Nat Neurosci. 2010Oct; 13 (10):1171-80, Cell Stem Cell. 2008Nov 6; 3 (5):519-32, Proc Natl Acad Sci USA. 2008Aug 19; 105 (33):11796-801, Nature. 2011Feb

3;470 (7332):105-9, Nat Biotechnol. 2011Mar;29 (3):267-72, Cell Stem Cell. 2011Feb 4;8 (2):228-40, Development. 2011Mar;138 (5):861-71, Nat Biotechnol. 2006Nov;24 (11):1402-11。

[0065] 在本发明中,“脑神经组织”是指这样的结构,其中,在活体的大脑,间脑,中脑,小脑和后脑中,至少构成各神经层的多类细胞及其先祖细胞(例如,在大脑的情况中,第6层特有的Tbr1阳性细胞,第5层特有的Crip2阳性细胞,第2-3层特有的Brn2阳性细胞等)在空间上被布置成层。作为脑神经组织的部分,可以提及视网膜组织。“视网膜组织”是指这样的视网膜组织,其中至少构成活体视网膜中相应的视网膜层的多类细胞如视细胞,水平细胞,双极细胞,无长突细胞,视网膜神经节细胞,其先祖细胞等,在空间上被布置成层。关于每种细胞,哪种细胞构成视网膜的哪一层可以通过已知方法确认,所述方法是基于例如以下的表达:细胞标记物(Chx10(双极细胞),L7(双极细胞),TuJ1(神经节细胞),Brn3(神经节细胞),钙视网膜蛋白(Calretinin)(无长突细胞),钙结合蛋白(Calbindin)(水平细胞),恢复蛋白(Recoverin)(视细胞),视紫红质(Rhodopsin)(视细胞),RPE65(色素上皮细胞),Mitf(色素上皮细胞)等)。

[0066] 例如,视网膜组织可以通过分化人ES细胞制备,具体地,通过Nature472,p51-56(2011)和W02011/055855中所述的方法制备。

[0067] 在本发明中,“冷冻保护溶液”是指冷冻保护剂和溶剂的混合物。“冷冻保护剂”是这样的物质,其在细胞的冷冻保存期间被加入以防止由冷冻所致的多种失调,试图尽可能多地保持细胞的功能和存活率。可以提及冷冻保护溶液,并且其与细胞保护溶液具有相同含义,因为其在冷冻期间保护细胞。

[0068] 在本发明中,细胞保护溶液(冷冻保护溶液)含有亚砷和链状多元醇作为冷冻保护剂,并且优选地含有亚砷、链状多元醇和寡糖。具体地,例如,亚砷如二甲亚砷(DMSO)等;链状多元醇如乙二醇、甘油,丙二醇(propanediol),丙二醇(propylene glycol),丁二醇,聚乙二醇等,并且优选地还含有寡糖如蔗糖,海藻糖,乳糖,棉子糖等。需要时,可以加入酰胺化合物如乙酰胺等,percoll, ficoll 70, ficoll 70000, 聚乙烯吡咯烷酮等。

[0069] 溶剂的实例包括缓冲剂如盐水, PBS, EBSS, HBSS等,用于培养细胞、组织等的培养基如DMEM, GMEM, RPMI等,血清,血清替代物(Knock Out Serum Replacement: Invitrogen), 它们的混合物等。

[0070] 在本发明中,亚砷在细胞保护溶液(冷冻保护溶液)中的终浓度为,例如,5至15% (w/v), 优选为9至13% (w/v), 更优选为约11% (w/v)。

[0071] 在本发明中,链状多元醇在细胞保护溶液(冷冻保护溶液)中的终浓度为,例如,4至15% (w/v), 优选为4.5%至8% (w/v), 更优选为约5.5% (w/v)。

[0072] 在本发明中,寡糖在细胞保护溶液(冷冻保护溶液)中的终浓度为,例如,5至20% (w/v), 优选为8至12% (w/v), 更优选为约10% (w/v)。

[0073] 在本发明中,“冷冻保存溶液”是指用于冷冻保存来源于多能干细胞的组织的介质。作为冷冻保存溶液,也可以使用市售产品如细胞BANKER 1, 1plus, 2, 3 (JUJI FIELD INC.), TC-Protector (DS Pharma Biomedical Co., Ltd.), 人ES/iPS细胞用冷冻介质(Freezing Medium for human ES/iPS Cells) (Reprocell Incorporated), 无DMSO CryoScarless (CryoScarless DMSO free) (BioVerde), StemCell Keep (BioVerde), EFS溶



液(NK system)等。

[0074] 冷冻保存溶液可以是冷冻保护剂和溶剂的混合物。作为冷冻保护剂和溶剂,可以提及上述那些。

[0075] 本发明中的冷冻保存溶液优选含有二甲亚砜、乙酰胺和丙二醇。

[0076] 在本发明中,二甲亚砜在冷冻保存溶液的浓度优选为1至4M,乙酰胺的浓度优选为0.5至2M,并且丙二醇的浓度优选为1.5至6M。

[0077] 本发明的冷冻保存方法的第一步是在冷冻前使来源于多能干细胞的组织与含有亚砷和链状多元醇的细胞保护溶液接触的步骤。

[0078] 在上述第一步中,使来源于多能干细胞的组织与含有亚砷和链状多元醇的细胞保护溶液接触。

[0079] 为了“使来源于多能干细胞的组织与含有亚砷和链状多元醇的细胞保护溶液接触”,可以将来源于多能干细胞的组织转移到含有亚砷和链状多元醇的细胞保护溶液中,或者可以将含有亚砷和链状多元醇的细胞保护溶液添加到来源于多能干细胞的组织。

[0080] 将来源于多能干细胞的组织与含有亚砷和链状多元醇的细胞保护溶液接触的时间为,例如,1min至180min,优选为5min至60min,更优选为15min至30min。来源于多能干细胞的组织与含有亚砷和链状多元醇的细胞保护溶液接触的温度为,例如,-10℃至40℃,优选为0℃至25℃,更优选为0℃至8℃。

[0081] 在上述第一步中在接触系统中来源于多能干细胞的组织的密度(例如,来源于多能干细胞的组织在细胞保护溶液中的密度)为(例如,基于聚集体的数目)约1至1000个聚集体/mL,优选为1至100个聚集体/mL。每个聚集体的细胞数为约 $10^3$ 至 $10^6$ 个细胞。

[0082] 用于接触细胞保护溶液的细胞培养容器不受特别限制,并且可以由本领域技术人员适当地确定。所述容器的实例包括烧瓶,组织培养烧瓶,盘,培养皿,组织培养皿,多盘(multidish),微板,微孔板,微孔,多板(multiplate),多孔板,室载玻片(chamber slide),盘碟(schale),试管,碟,培养袋和滚瓶(roller bottle)。

[0083] 本发明的冷冻保存方法的第二步是将与细胞保护溶液接触的来源于多能干细胞的组织保持在冷冻保存溶液中的步骤。

[0084] 在上述第二步中,在所述第一步中与细胞保护溶液接触的来源于多能干细胞的组织被保持在冷冻保存溶液中。

[0085] 在上述第二步中在细胞保存溶液中来源于多能干细胞的组织的密度为,例如基于聚集体的数目,约1至1000个聚集体/mL,优选为1至100个聚集体/mL。每一个聚集体的细胞数为约 $10^3$ 至 $10^6$ 个细胞。

[0086] 本发明的冷冻保存方法的第三步是在冷却剂存在下,冷冻保存被保持在冷冻保存溶液中的来源于多能干细胞的组织的步骤。

[0087] 作为用于“冷冻保存”组织等的方法,若干方法是已知的。代表性的冷冻保存方法是,例如,涉及以0.1至10℃/min的缓慢速率长时间冷冻的方法。该方法可以使用仪器、工具等如程序冷冻机、BICELL(NIHON FREEZER CO.,LTD.)等进行。

[0088] 作为快速冷冻保存方法,可以提及涉及应用当晶性液体或气体快速固化时在不超过玻璃化转变温度在不结晶的情况下发生的玻璃化现象的方法。该方法的优越之处在于:提前浸入高浓度的保存溶液中的组织,胚胎和卵可以通过简单的玻璃化操作在短时间内被

稳定地冷冻保存。

[0089] 此处,快速冷冻保存方法是生物学样品的冷冻方法,其包括将样品投入冷却剂如液氮等中。例如,可以提及涉及将来源于多能干细胞的组织和冷冻保存溶液置于冰上的冷冻管中,并且利用镊子将前述冷冻管浸入冷却剂中的方法。从将来源于多能干细胞的组织保持在冷冻保存溶液中到将其投入冷却剂中的时间优选地尽可能地短,其为30秒内,优选为在10秒内。

[0090] 将用于本发明的“冷却剂”优选为能够导致细胞玻璃化的冷却剂,并且通常可以在-20℃以下,优选在-80℃以下,更优选在-150℃以下使用冷却剂。

[0091] 冷却剂的具体实例包括液氮,氮浆(slush nitrogen),液氦,液体丙烷,和乙烷浆(ethane sluch),优选的是液氮和氮浆。氮浆是通过将液氮保持在减压下从而将液氮温度降低至-205至-210℃而获得的氮,液氮温度在常压下低于-196℃(Huang等,Human Reproduction,Vol.20,No.1,pp.122-128(2005))。当将氮浆用作冷却剂时,通过玻璃化的保存可以通过仪器如Vit-Master™(IMT,Nes Ziona,Israel)等进行。

[0092] 在冷却剂存在下冷冻保存的降温速率为,例如,不小于10℃/min,优选不小于30v/min,更优选不小于50℃/min,特别优选不小于100℃/min。

[0093] 在冷却剂存在下冷冻保存以从环境温度达到理想的冷冻保存温度(例如,对于液氮为-196℃)所需的时间为,例如,在5min内,更优选地在3min内,进一步优选地在1min内。

## 实施例

[0094] 以下更详细地说明本发明的实施例。

[0095] (RAX敲入人ES细胞的建立)

[0096] 制备人ES细胞系,其具有敲入RAX基因座的GFP,RAX是视网膜先祖细胞的标记基因之一。

[0097] 特异性地切割人ES细胞系(KhES-1:由Kyoto University建立的人ES细胞系)的基因组DNA上的RAX基因的锌指核酸酶(ZFN)购买自Sigma Aldrich。使用分散为单个细胞的人ES细胞,通过电穿孔法将编码ZFN的mRNA和包含GFP和药物选择标记物新霉素抗性基因的敲入载体共转染到其中,并且将细胞涂板于用丝裂霉素C处理过的新霉素抗性小鼠成纤维细胞上。在涂板后的次日向培养基加入G418,并进行药物选择。挑取获得的抗性克隆的菌落然后培养,并且然后通过PCR法和DNA印迹法选择敲入细胞,导致RAX::GFP敲入人ES细胞系的建立。

[0098] (将RAX敲入人ES细胞诱导分化为视网膜组织)

[0099] 使用建立的RAX::GFP敲入人ES细胞,诱导分化为视网膜组织。

[0100] 根据“Ueno,M.等PNAS 2006,103(25),9554-9559”“Watanabe,K.等Nat Biotech 2007,25,681-686”中所述的方法培养RAX::GFP敲入人ES细胞(来源于KhES-1)并用于实验。

[0101] 使用添加有20%KSR(敲除血清替代物(Knockout Serum Replacement);Invitrogen),0.1mM 2-巯基乙醇,5至10ng/ml bFGF等的DMEM/F12培养基(Invitrogen)作为培养基。为了通过漂浮培养诱导分化为视网膜组织,将ES细胞在0.25%胰蛋白酶-EDTA(Invitrogen)中分散为单个细胞,并且以 $9 \times 10^3$ 个细胞/非细胞粘附性96孔培养板(SUMILON球形板,SUMITOMO BAKELITE)的孔漂浮在150 $\mu$ l分化培养基中,以允许聚集体的快

速形成,聚集体在37℃,5%CO<sub>2</sub>下培养。

[0102] 作为用于其的分化培养基,使用无血清培养基(添加有20%KSR、Y27632等的G-MEM培养基)。从培养第2天起,将Matrigel加入到培养物中。在分化诱导开始后,从大约第12天起,通过荧光显微镜观察聚集体中的GFP的表达并且,在大约第14天,表达GFP的神经上皮样结构在聚集体周围形成(图1、图2)。在从第18天到第30天期间,利用镊子将神经上皮样结构与聚集体分离,并且随后在加入胎牛血清和视黄酸后在非粘附性塑料盘(schale)中进行培养(图3,图4)。制备切片,并且通过荧光免疫染色法分析分化的状态(图5)。例如,显示的是,自分化诱导开始起40天后的神经上皮结构由表达RAX基因的GFP阳性细胞构成,并且在GFP阳性细胞中,Pax6(一种视网膜先祖细胞标记基因阳性细胞),Chx10(一种双极细胞标记基因阳性细胞),和Brn3(一种神经节细胞标记基因阳性细胞)被布置成层从而形成视网膜组织(图5)。

[0103] 比较例1(冷冻保存通过诱导分化人ES细胞获得的视网膜组织)

[0104] 以不小于100℃/min的降温速率冷冻保存通过分化诱导获得的视网膜组织。

[0105] 将添加有2M二甲亚砜(DMSO),1M乙酰胺和3M丙二醇(DAP213)的DMEM/F12培养基用作冷冻保存溶液。从培养板将约10个视网膜组织收集在15ml聚丙烯管中,之后除去上清并加入200μl的冷冻保存溶液,并将视网膜组织与冷冻保存溶液一起转移到冷冻管。利用镊子将冷冻管立即浸入液氮中,并且以不小于100℃/min的降温速率进行冷冻保存。将冷冻管保存在-150℃的冷冻机中直至解冻。

[0106] 将冷冻管从-150℃的冷冻机中取出,并将在37℃水浴中提前温热至37℃的培养基加入到冷冻管以解冻组织。将混合物分配至15ml管中,并且将视网膜组织置于温热至37℃的培养基(10ml)中,之后除去上清。将组织用PBS(10ml)洗涤并将其加入至含有培养基(添加有N2、10%FBS,视黄酸等的DMEM/F12培养基)(视网膜组织培养基)的漂浮培养皿,并在37℃培养。从解冻次日起进行显微镜观察和荧光显微镜观察,并将上皮结构的细胞存活状态和外观与未进行冷冻保存的视网膜组织的那些进行比较(图6A、B),并且核对冷冻保存成功与否。

[0107] 结果,几乎所有细胞死亡,并且观察到很多死亡的细胞的碎片。几乎没有观察到GFP的表达。因此,证明仅仅以不小于100℃/min的降温速率进行冷冻保存不导致视网膜组织的冷冻保存(图6C、D)。

[0108] 比较例2(通过在冷冻保护剂(11.0%(w/v)二甲亚砜(DMSO)中进行渗透处理后冷冻来冷冻保存通过诱导人ES细胞的分化获得的视网膜组织)

[0109] 在冷冻前,在含有二甲亚砜(DMSO)作为冷冻保护剂的溶液中对通过诱导分化获得的视网膜组织进行渗透处理,并且以不小于100℃/min的降温速率进行冷冻保存。

[0110] 从培养板将约10至20个视网膜组织收集在15ml聚丙烯管中,之后除去上清并且加入预先在冰水冷却的含有冷冻保护剂的溶液(1ml),并将混合物在冰水静置15min至30min。作为含有冷冻保护剂的溶液,使用添加有11.0%(w/v)二甲亚砜(DMSO)的前述视网膜组织培养基。除去含有冷冻保护剂的溶液,加入DAP213(200μl)作为冷冻保存溶液,并将视网膜组织与冷冻保存溶液一起转移至冷冻管。利用镊子将冷冻管立即浸入液氮中,并且以不小于100℃/min的降温速率进行冷冻保存。将冷冻管保存在-150℃的冷冻机中直至解冻。

[0111] 当在使用含有11.0%(w/v)二甲亚砜(DMSO)作为冷冻保护剂的视网膜组织培养基

渗透处理后以不小于100℃/min的降温速率进行冷冻保存时,与不进行冷冻的对照相比,表达RAX的视网膜组织急剧减少(图6E,F)。

[0112] 实施例1(通过在利用冷冻保护剂(11.0% (w/v) 二甲亚砜(DMSO)和5.55% (w/v) 乙二醇)渗透处理后冷冻来冷冻保存通过诱导人ES细胞的分化获得的视网膜组织)

[0113] 以与比较例2相同的方式进行,不同之处在于使用含有11.0% (w/v) 二甲亚砜(DMSO)和5.55% (w/v) 乙二醇(EG)作为冷冻保护剂的溶液对通过分化诱导获得的视网膜组织进行渗透处理。

[0114] 当在使用含有11.0% (w/v) 二甲亚砜(DMSO)和5.55% (w/v) 乙二醇(EG)的视网膜组织培养基进行冷冻保护剂渗透处理后以不小于100℃/min的降温速率进行冷冻保存时,相对于使用含有11.0% (w/v) 二甲亚砜(DMSO)的视网膜组织培养基的前述冷冻保护剂渗透处理,表达RAX的视网膜组织的保存性质得到提高(图6G,H),并且发现层结构得以保持(图8A,B)。

[0115] 实施例2(通过在利用冷冻保护剂(11.0% (w/v) 二甲亚砜(DMSO),5.55% (w/v) 乙二醇(EG)和10% (w/v) 蔗糖)进行渗透处理后冷冻来冷冻保存通过诱导人ES细胞的分化获得的视网膜组织)

[0116] 以与比较例2相同的方式进行,不同之处在于使用含有11.0% (w/v) 二甲亚砜(DMSO),5.55% (w/v) 乙二醇(EG)和10% (w/v) 蔗糖作为冷冻保护剂的溶液对通过分化诱导获得的视网膜组织进行渗透处理。

[0117] 当在使用含有11.0% (w/v) 二甲亚砜(DMSO),5.55% (w/v) 乙二醇(EG)和10% (w/v) 蔗糖的视网膜组织培养基进行冷冻保护剂渗透处理后以不小于100℃/min的降温速率进行冷冻保存时,可与未进行冷冻保存的视网膜组织相比的状态得到保持,而与未进行冷冻保存的视网膜组织相比,GFP表达的强度稍弱。保存性质非常好(图6I,J),并且层结构也得以保持(图8C,D,E)。

[0118] 比较例3(通过在利用冷冻保护剂(蔗糖)渗透处理后冷冻来冷冻保存通过诱导人ES细胞的分化获得的视网膜组织)

[0119] 使用分别添加有5%蔗糖、添加有10%蔗糖、添加有20%蔗糖、添加有5.55%EG和10%蔗糖、以及添加有11% (w/v) 二甲亚砜(DMSO)和10% (w/v) 蔗糖作为冷冻保护剂渗透溶液的前述视网膜组织培养基,通过与上述那些类似的方法进行冷冻和解冻。

[0120] 当在使用仅添加有蔗糖作为冷冻保护剂渗透溶液的视网膜组织培养基进行渗透处理后以不小于100℃/min的降温速率进行冷冻保存时,在5% (w/v)、10% (w/v)和20% (w/v)中的任意浓度,与未进行冷冻的对照(图7A,B)相比,解冻后的细胞存活性质相当差,并且几乎没有观察到GFP表达(图7C,D,E,F,G,H)。并且,当在使用含有5.55% (w/v) EG和10% (w/v) 蔗糖的视网膜组织培养基进行渗透处理后以不小于100℃/min的降温速率进行冷冻保存时,与未进行冷冻的对照相比,解冻后的细胞存活性质相当差,并且几乎没有观察到GFP表达(图7K,L)。当在使用含有11.0% (w/v) 二甲亚砜(DMSO)和10% (w/v) 蔗糖的进行渗透处理后以不小于100℃/min的降温速率进行冷冻保存时,与未进行冷冻的对照相比,解冻后的细胞存活性质是差的并且GFP表达弱,并且以可以与未进行冷冻的对照相比的状态保存是不可能的(图7I,J)。

[0121] 工业实用性

[0122] 根据本发明,可以提供来源于多能干细胞的组织的保存方法。

[0123] 本申请是基于在日本提交的专利申请号2011-258208(申请日:2011年11月25日),所述日本申请的内容完整地结合于此。

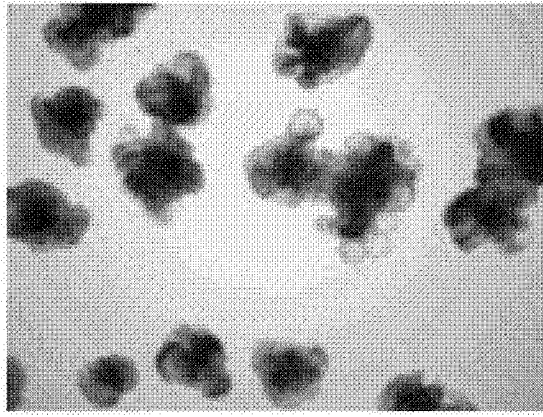


图1

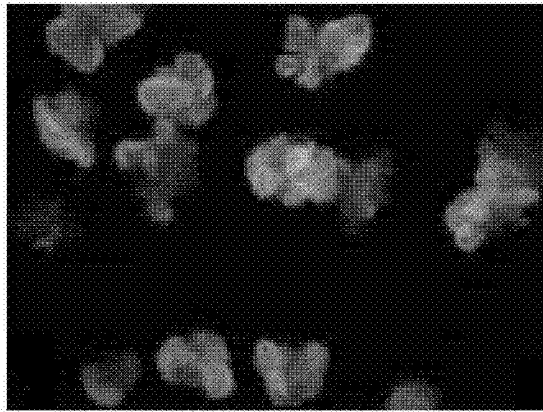


图2

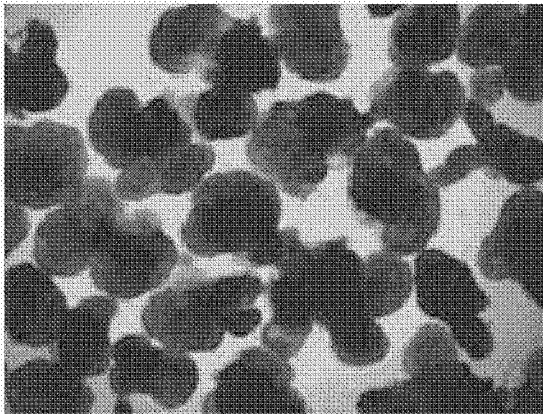


图3

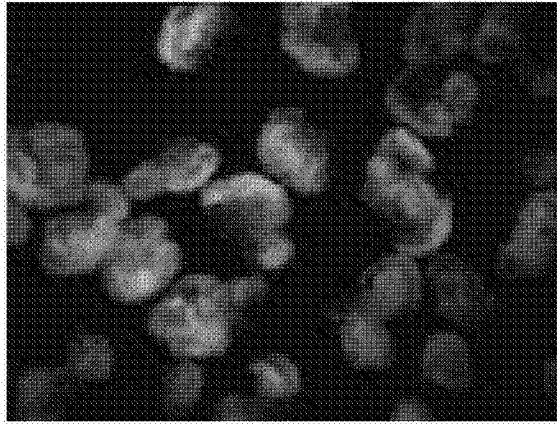


图4

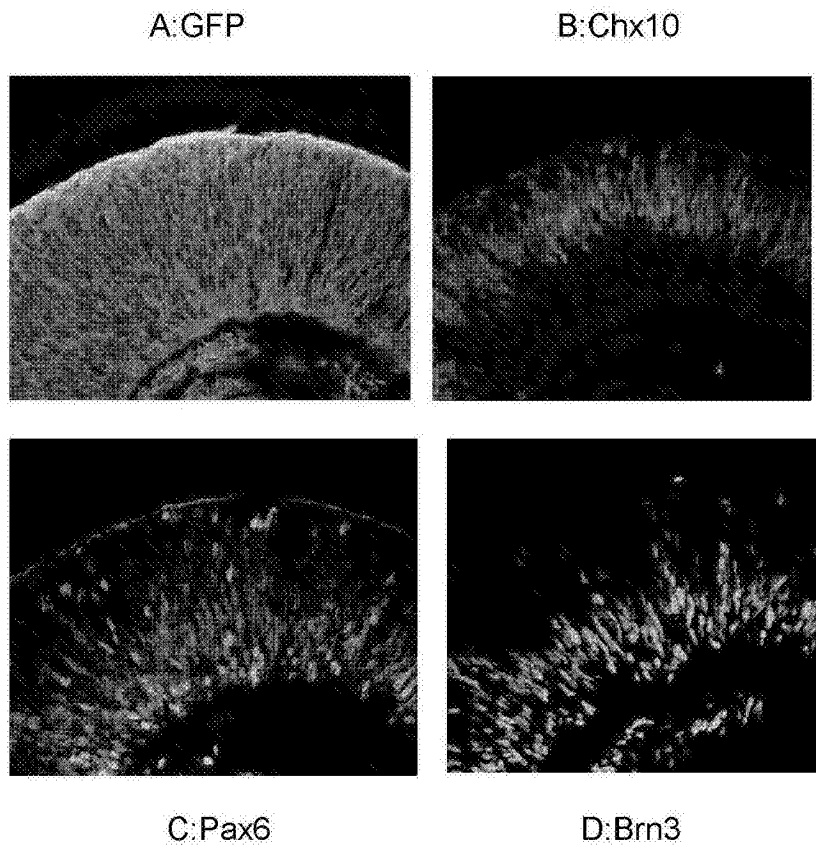


图5

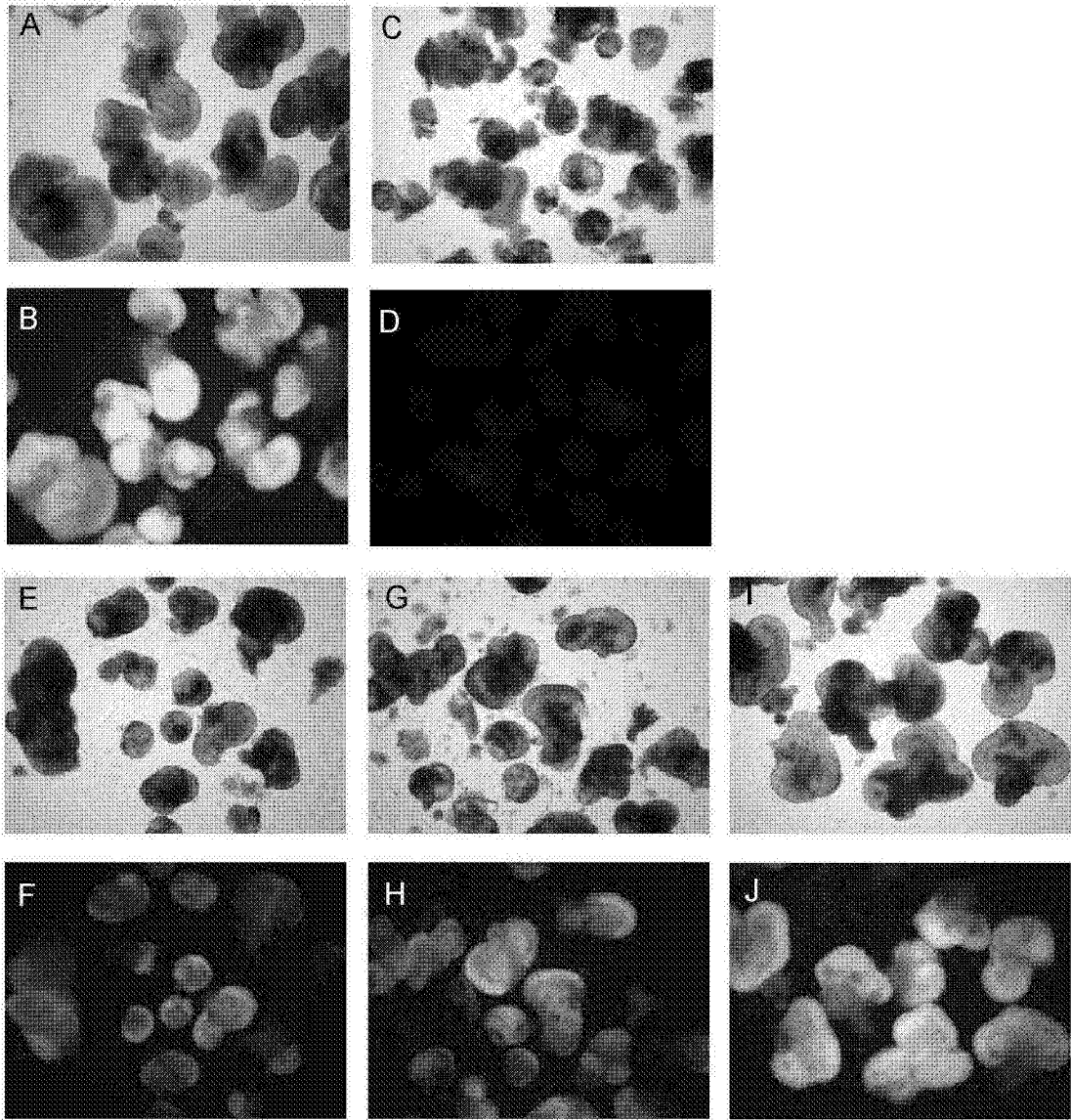


图6



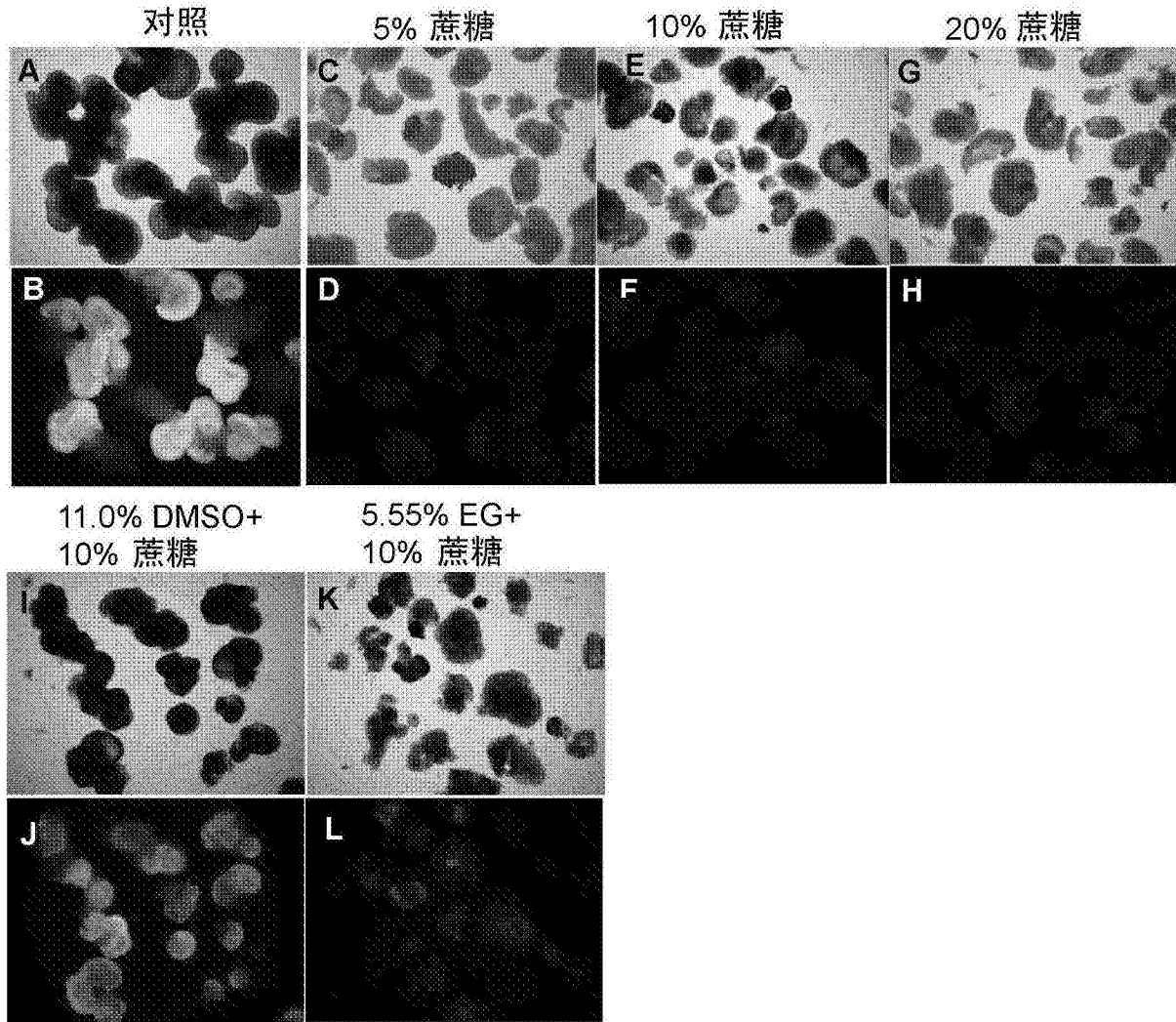


图7

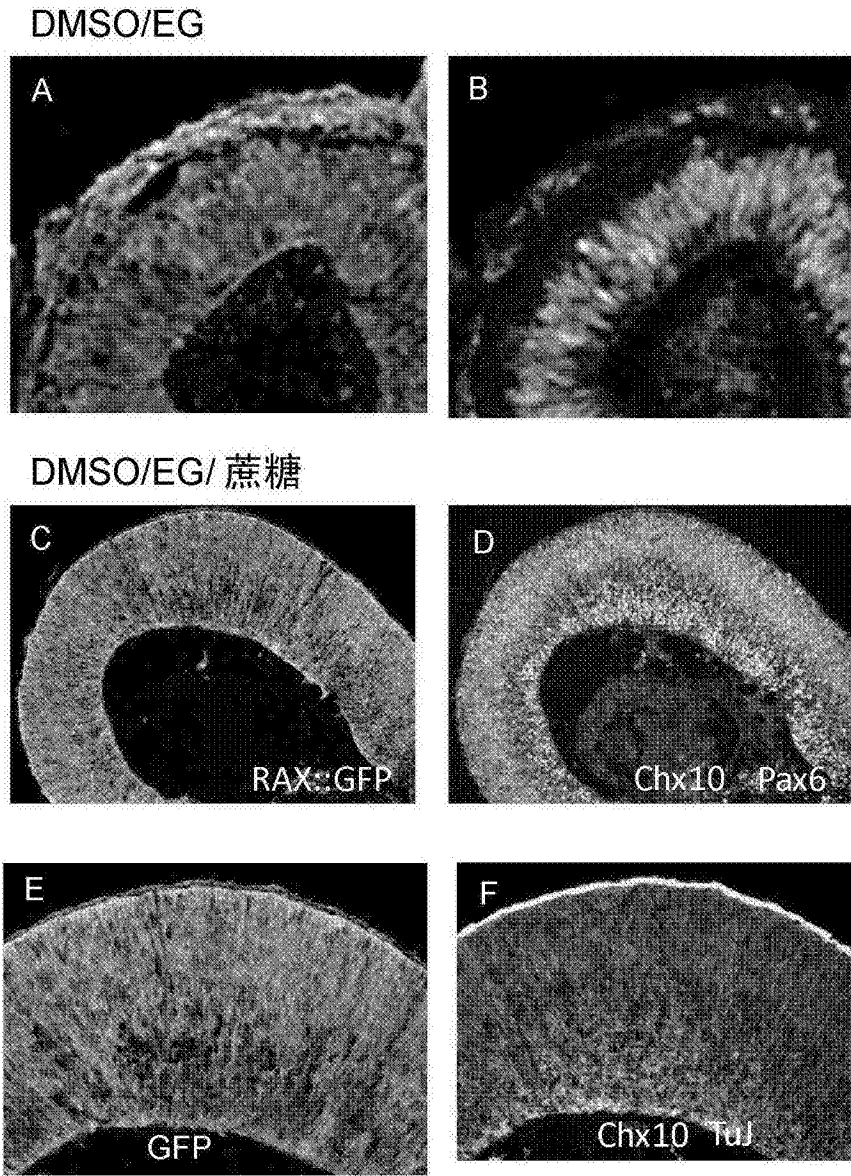


图8