(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월16일
(11) 등록번호 10-2695330
(24) 등록일자 2024년08월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/04 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/04 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7001809
(22) 출원일자(국제) 2018년07월20일
심사청구일자 2021년06월16일
(85) 번역문제출일자 2020년01월20일
(65) 공개번호 10-2020-0029479
(43) 공개일자 2020년03월18일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2018/027372
(87) 국제공개번호 WO 2019/017491
국제공개일자 2019년01월24일
(30) 우선권주장
JP-P-2017-141382 2017년07월20일 일본(JP)
(56) 선행기술조사문헌
JP2012116823 A*
WO1997037537 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
고쿠리쓰 겐큐 가이하쓰 호징 리가가쿠 겐큐소
일본국 사이타마현 와코시 히로사와 2-1
스미토모 파마 가부시키가이샤
일본 오오사까후 오오사까시 쥬오꾸 도쇼오마치 2쵸메 6방 8고
(72) 발명자
만다이, 미치코
일본 3510198 사이타마켄 와코시 히로사와 2반 1고 고쿠리쓰 겐큐 가이하쓰 호징 리가가쿠 겐큐소 내
다카하시, 마사요
일본 3510198 사이타마켄 와코시 히로사와 2반 1고 고쿠리쓰 겐큐 가이하쓰 호징 리가가쿠 겐큐소 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장수길, 홍미란, 박보현

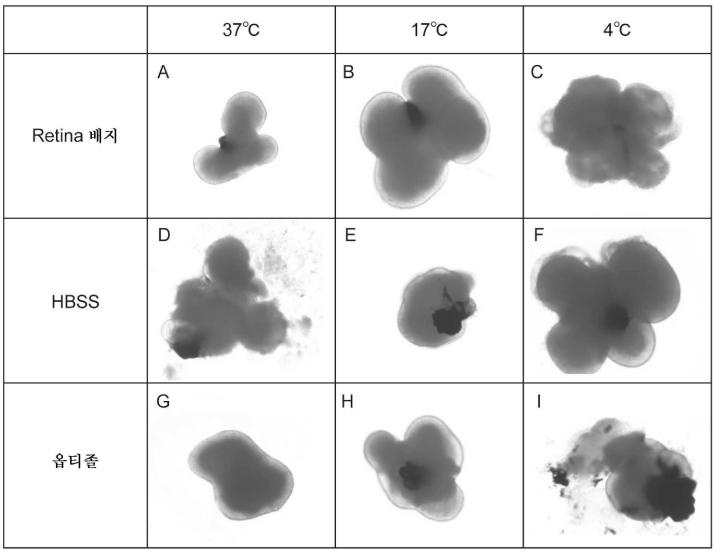
전체 청구항 수 : 총 27 항 심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 **신경 조직의 보존 방법**

(57) 요 약

본 발명은 신경 조직을 동결하지 않고 수 시간 내지 수 주일 보존하는 방법, 그를 위한 보존액, 그리고 이들 방법 및 보존액을 사용한 신경 조직의 수송 방법, 및 이식용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다. 본 발명의 신경 조직의 보존 방법은, 신경 조직을 칼륨 이온 농도가 0mM 초과 115mM 미만인 보존액 중에서 8℃ 내지 30℃의 보존 온도로 보존하는 것을 포함한다. 본 발명의 보존액은, 칼륨 이온 농도가 0mM 초과 115mM 미만인, 다능성 줄기세포 유래의 신경 조직을 8℃ 내지 30℃의 보존 온도에서 보존하기 위한 보존액이다.

대 표 도



(72) 발명자

구와하라, 아츠시

일본 6500047 효고켄 고베시 츄오쿠 미나토지마미나미마치 1-5-2 고베 키멕 센터 빌딩 5층 다이니뽄스미토모 세이야쿠 가부시키가이샤 내

와타리, 겐지

일본 6500047 효고켄 고베시 츄오쿠 미나토지마미나미마치 1-5-2 고베 키멕 센터 빌딩 5층 다이니뽄스미토모 세이야쿠 가부시키가이샤 내

마츠시타, 게이조

일본 5540022 오사카후 오사카시 고노하나쿠 가스가데나카 3쵸메 1방 98고 다이니뽄 스미토모 세이야쿠 가부시키가이샤 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

연속 상피 구조를 가진 전뇌 조직, 중뇌 조직 및 망막 조직으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 또는 복수의 신경 조직을, 칼륨 이온 농도가 0mM 초과 115mM 미만인 보존액 중에서 12℃ 내지 22℃의 보존 온도로 보존하는 것을 포함하는, 신경 조직의 보존 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 보존 온도가 17℃인, 보존 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 신경 조직이 인간 유래인, 보존 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 신경 조직이 다능성 줄기세포 유래의 조직인, 보존 방법.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 신경 조직이 이식에 제공되기 위한 조직인, 보존 방법.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 신경 조직이 망막 조직인, 보존 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 신경 조직이 신경계 전구 세포를 포함하는 조직인, 보존 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 신경 조직이, 연속 상피 구조를 가지며 또한 시세포 전구 세포를 포함하는 세포층 및 신경 망막 전구 세포를 포함하는 세포층을 갖는 망막 조직인, 보존 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 시세포 전구 세포가 Crx 양성 세포이고, 신경 망막 전구 세포가 Chx10 양성 세포인, 보존 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 칼륨 이온 농도가 0mM 초과 60mM 미만인, 보존 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 칼륨 이온 농도가 0.1mM 내지 10mM인, 보존 방법.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 48시간 이상의 기간 동안 보존하는 것을 특징으로 하는, 보존 방법.

청구항 13

제1항 또는 제2항에 있어서, 14일 이내의 기간으로 보존하는 것을 특징으로 하는, 보존 방법.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 5일 이내의 기간으로 보존하는 것을 특징으로 하는, 보존 방법.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 보존액이, 완충 작용 물질을 포함하며, 또한 pH를 6.0 내지 8.6의 범위로 완충하는 작용을 갖는 수성 용액인, 보존 방법.

청구항 16

제1항 또는 제2항에 있어서, 보존액이, 추가로 글리코사미노글리칸류를 포함하는 수성 용액인, 보존 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 글리코사미노글리칸류의 농도가 0.1%(w/v) 이상 10%(w/v) 이하인, 보존 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 글리코사미노글리칸류가, 콘드로이틴황산 및 히알루론산으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 또는 복수의 글리코사미노글리칸류인, 보존 방법.

청구항 19

연속 상피 구조를 가진 전뇌 조직, 중뇌 조직 및 망막 조직으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 또는 복수의 신경 조직을 칼륨 이온 농도가 0mM 초과 115mM 미만인 보존액 중에서 12℃ 내지 22℃의 보존 온도로 수송하는 것을 포함하는, 신경 조직의 수송 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 보존 온도가 17℃인, 수송 방법.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 신경 조직이 인간 다능성 줄기세포 유래의 조직인, 수송 방법.

청구항 22

제19항 또는 제20항에 있어서, 신경 조직이 이식에 제공되기 위한 조직인, 수송 방법.

청구항 23

제19항 또는 제20항에 있어서, 신경 조직이 망막 조직인, 수송 방법.

청구항 24

제19항 또는 제20항에 있어서, 신경 조직이, 연속 상피 구조를 가지며 또한 시세포 전구 세포를 포함하는 세포층 및 신경 망막 전구 세포를 포함하는 세포층을 갖는 망막 조직인, 수송 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 시세포 전구 세포가 Crx 양성 세포이고, 신경 망막 전구 세포가 Chx10 양성 세포인, 수송 방법.

청구항 26

제19항 또는 제20항에 있어서, 칼륨 이온 농도가 0mM 초과 60mM 미만인, 수송 방법.

청구항 27

제26항에 있어서, 칼륨 이온 농도가 0mM 초과 30mM 미만인, 수송 방법.

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신경 조직의 보존 방법, 신경 조직의 보존액 및 신경 조직의 수송 방법에 관한 것이며, 특히 신경 조직을 동결하지 않고 수 시간 내지 수 주일 보존하는 방법, 그를 위한 보존액 및 신경 조직을 보존하면서 수송하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한, 이식용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 생체의 신경 조직에서는, 1종류 또는 복수 종류의 신경계 세포가 층 구조를 형성하고 있다. 신경 조직의 하나인 망막 조직은, 주로 시세포, 쌍극 세포, 수평 세포, 아마크린 세포 및 신경절 세포의 5종류의 신경 세포와 글리아 세포에 의해 구성되며, 입체적인 층 구조를 형성하고 있다. 신경 질환, 예를 들어 망막 변성 질환에 대한 치료법으로서, 신경 조직을 사용한 이식 치료가 유효하다는 것이 시사되어 왔지만, 인간의 생체의 신경 조직을 반영한 층 구조와 기능을 유지한 조직을 입수하기가 어려워, 치료법으로서 일반화하기가 어려웠다. 근년, 신경 조직(예를 들어 망막 조직)을, 다능성 줄기세포로부터 분화 유도함으로써 안정적으로 제조하는 것이 가능하게 되었다(비특허문헌 1 및 2). 그래서 신경 조직을 사용한 이식 치료를 실현하기 위한 다음 과제로서, 제조한 신경 조직을 품질 시험 또는 이식 시설로의 수송에 요하는 기간에 있어서 안정적으로 보존하는 기술을 개발할 필요가 있었다.

[0003] 신경 조직의 보존 방법으로서 동결 보존법이 개발되어 왔지만(예를 들어 특허문헌 1), 동결하면 조직의 품질이 열화되는 경우도 있고, 또한 동결 보존에는 숙련된 기술을 요하는 경우도 있다. 한편, 간장의 경우에는, 거대한 장치를 사용하여 관류를 행하고, 또한 22℃로 보존함으로써 조직을 보존할 수 있음이 보고되었다(비특허문헌 3). 그러나, 망막 조직과 같은 1종류 또는 복수 종류의 세포가 층 구조를 이루어 구성되는 신경 조직에 대해서는, 동결 이외의 적절한 보존 방법이 없어, 수 시간 내지 수 주일의 보존에 적합한 방법을 확립하는 것이 과제였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 일본 특허 번호 제6012164호

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Cell Stem Cell, 3, 519-32(2008)

(비특허문헌 0002) Nature Communications, 6, 6286(2015)

(비특허문헌 0003) Scientific Reports, 5, 9563(2015)

(비특허문헌 0004) Transplantation, 74, 1414-9(2002)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 신경 조직을 동결하지 않고 수 시간 내지 수 주일 보존하는 방법, 그를 위한 보존액, 그리고 이들 방법 및 보존액을 사용한 신경 조직의 수송 방법, 및 이식용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명자들은, 상기 과제를 해결하기 위해 검토를 거듭한바, 칼륨 이온 농도가 115mM보다 낮은 보존액 중에서, 8℃ 내지 30℃의 보존 온도로, 신경 조직의 기능을 유지한 채 수일간 보존할 수 있음을 알아내고, 본 발명에 이르렀다.

[0008] 즉, 본 발명은 이하에 관한 것이다.

[0009] [1] 신경 조직을 칼륨 이온 농도가 0mM 초과 115mM 미만인 보존액 중에서 8℃ 내지 30℃의 보존 온도로 보존하는 것을 포함하는, 신경 조직의 보존 방법.

[0010] [2] 보존 온도가 12℃ 내지 22℃인, [1]의 보존 방법.

[0011] [3] 신경 조직이 인간 유래인, [1] 또는 [2]의 보존 방법.

[0012] [4] 신경 조직이 다능성 줄기세포 유래의 조직인, [1] 내지 [3] 중 어느 하나의 보존 방법.

[0013] [5] 신경 조직이 이식에 제공되기 위한 조직인, [1] 내지 [4] 중 어느 하나의 보존 방법.

[0014] [6] 신경 조직이 층 구조를 갖는 세포 응집체인, [1] 내지 [5] 중 어느 하나의 보존 방법.

[0015] [7] 신경 조직이 신경 상피 구조를 갖는 세포 응집체인, [6]의 방법.

[0016] [8] 신경 상피 구조가, 세포 응집체 표면에 존재하는 연속 상피 구조, 및/또는 세포 응집체 표면 혹은 내부에 존재하는 로제트 구조인, [7]의 보존 방법.

[0017] [9] 신경 조직이 전뇌 조직, 중뇌 조직 및 망막 조직으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 또는 복수의 신경 조직인, [1] 내지 [8] 중 어느 하나의 보존 방법.

[0018] [10] 14일 이내의 기간으로 보존하기 위한, [1] 내지 [9] 중 어느 하나의 보존 방법.

[0019] [11] 5일 이내의 기간으로 보존하기 위한, [1] 내지 [9] 중 어느 하나의 보존 방법.

[0020] [12] 보존액이, 완충 작용 물질을 포함하며, 또한 pH를 6.0 내지 8.6의 범위로 완충하는 작용을 갖는 수성 용액인, [1] 내지 [11] 중 어느 하나의 보존 방법.

[0021] [13] 보존액이, 추가로 글리코사미노글리칸류를 포함하는 수성 용액인, [1] 내지 [12] 중 어느 하나의 보존 방법.

[0022] [14] 글리코사미노글리칸류의 농도가 0.1%(w/v) 이상 10%(w/v) 이하인, [13]에 기재된 보존 방법.

[0023] [15] 글리코사미노글리칸류가, 콘드로이틴황산 및 히알루론산으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 또는 복수의 글리코사미노글리칸류인, [13] 또는 [14]에 기재된 보존 방법.

[0024] [16] 칼륨 이온 농도가 0mM 초과 115mM 미만인, 다능성 줄기세포 유래의 신경 조직을 8℃ 내지 30℃의 보존 온도에서 보존하기 위한 보존액.

[0025] [17] 보존 온도가 12℃ 내지 22℃인, [16]의 보존액.

[0026] [18] 신경 조직이 층 구조를 갖는 세포 응집체인, [16] 또는 [17]의 보존액.

[0027] [19] 신경 조직이, 신경 상피 구조를 갖는 세포 응집체인, [18]의 보존액.

[0028] [20] 신경 상피 구조가, 세포 응집체 표면에 존재하는 연속 상피 구조, 및/또는 세포 응집체 표면 혹은 내부에 존재하는 로제트 구조인, [19]의 보존액.

[0029] [21] 신경 조직을 칼륨 이온 농도가 0mM 초과 115mM 미만인 보존액 중에서 8℃ 내지 30℃의 보존 온도로 수송하는 것을 포함하는, 신경 조직의 수송 방법.

[0030] [22] 보존 온도가 12℃ 내지 22℃인, [21]의 수송 방법.

[0031] [23] 신경 조직이 인간 다능성 줄기세포 유래의 조직인, [21] 또는 [22]의 수송 방법.

[0032] [24] 신경 조직이 이식에 제공되기 위한 조직인, [21] 내지 [23] 중 어느 하나의 수송 방법.

[0033] [25] 신경 조직이 층 구조를 갖는 세포 응집체인, [21] 내지 [24] 중 어느 하나의 수송 방법.

[0034] [26] 신경 조직이, 신경 상피 구조를 갖는 세포 응집체인, [25]의 수송 방법.

[0035] [27] 신경 상피 구조가, 세포 응집체 표면에 존재하는 연속 상피 구조, 및/또는 세포 응집체 표면 혹은 내부에 존재하는 로제트 구조인, [26]의 수송 방법.

[0036] [28] 신경 조직이 전뇌 조직, 중뇌 조직 및 망막 조직으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 또는 복수의 신경 조직인, [21] 내지 [27] 중 어느 하나의 수송 방법.

[0037] [29] 칼륨 이온 농도가 0mM 초과 115mM 미만이고, 완충 작용 물질에 의해 pH가 6.0 내지 8.6의 범위로 조정된 수성 용액, 및 다능성 줄기세포 유래의 인간 신경 조직을 포함하는, 12℃ 내지 22℃ 하의, 이식용 조성물.

[0038] [30] 신경 조직이 신경 상피 구조층 구조를 갖는 세포 응집체인, [29]에 기재된 조성물.

[0039] [31] 신경 상피 구조가, 세포 응집체 표면에 존재하는 연속 상피 구조, 및/또는 세포 응집체 표면 혹은 내부에 존재하는 로제트 구조인, [30]에 기재된 조성물.

[0040] [32] 신경 조직이 전뇌 조직, 중뇌 조직 및 망막 조직으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 또는 복수의 신경 조직인, [29] 내지 [31] 중 어느 하나의 조성물.

[0041] [33] 수성 용액이, 추가로 0.1%(w/v) 이상 10%(w/v) 이하의 글리코사미노글리칸류를 포함하는 수성 용액인, [29] 내지 [32] 중 어느 하나의 조성물.

발명의 효과

[0042] 본 발명에 따르면, 예를 들어 신경 조직을 생체로부터 취출하고 나서, 혹은 다능성 줄기세포로부터 분화 유도하고 나서 이식에 제공할 때까지의 기간, 예를 들어 이식에 제공할 때까지의 품질 관리, 그리고 수송에 요하는 기간에 있어서, 동결하지 않고 수 주일까지 보존하는 것이 가능하게 되어, 이식 치료에 따른 신경 조직의 장애에 기초하는 질환 또는 신경 조직의 손상 상태의 치료가 보다 실현 가능하게 된다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은, 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를, 여러 가지 보존 조건 하에서 보존하고, 또한 37℃에서 7일간 회복 배양하여 얻어진 세포 응집체를, 명시야 관찰한 결과를 도시한다.

도 2는, 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를, 여러 가지 보존 조건 하에서 보존하고, 또한 37℃에서 7일간 회복 배양하여 얻어진 세포 응집체에 관하여, Chx10의 발현을 면역 조직 염색에 의해 비교한 결과를 도시한다.

도 3은, 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를, 여러 가지 보존 조건 하에서 보존하고, 또한 37℃에서 7일간 회복 배양하여 얻어진 세포 응집체에 관하여, Crx의 발현을 면역 조직 염색에 의해 비교한 결과를 도시한다.

도 4는, 인간 ES 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를, 여러 가지 보존 조건 하에서 보존하고, 또한 37℃에서 7일간 회복 배양하여 얻어진 세포 응집체에 관하여, 명시야 관찰한 결과를 도시한다.

도 5는, 인간 ES 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를, 여러 가지 보존 조건 하에서 보존하고, 또한 37℃에서 7일간 회복 배양하여 얻어진 세포 응집체에 관하여, Chx10의 발현을 면역 조직 염색에 의해 비교한 결과를 도시한다.

도 6은, 인간 ES 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를, 여러 가지 보존 조건 하에서 보존하고, 또한 37℃에서 7일간 회복 배양하여 얻어진 세포 응집체에 관하여, Crx의 발현을 면역 조직 염색에 의해 비교한 결과를 도시한다.

도 7은, 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를, 여러 가지 보존 조건 하에서 보존하고, 또한 37℃에서 7일간 회복 배양하여 얻어진 세포 응집체에 관하여, 여러 가지 단백질의 발현을 면역 조직 염색에 의해 비교한 결과를 도시한다. (상단) Chx10 및 Crx, (중단) Chx10, (하단) Crx.

도 8은, 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를, 여러 가지 보존 조건 하에서 보존하고, 또한 37℃에서 7일간 회복 배양하여 얻어진 세포 응집체에 관하여, 여러 가지 단백질의 발현을 면역 조직 염색에 의해 비교한 결과를 도시한다. (상단) 리커버린(Recoverin), (중단) Rx, (하단) Ki67.

도 9는, 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를, 여러 가지 보존 조건 하(보존 조건 A 및 B)에서 보존한 직후, 및 37℃에서 7일간 회복 배양하여 얻어진 세포 응집체에 관하여, 명시야 관찰한 결과를 도시한다.

도 10은, 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를, 보존 전 및 보존 후에 각각 생세포율을 측정한 결과를 도시한다.

도 11은, 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체에 관하여, 여러 가지 보존 조건 하(보존 조건 B 내지 F)에서 보존한 직후에 있어서의 세포 응집체를 명시야 관찰한 결과(상단), 37℃에서 7일간 회복 배양한 후에 있어서의 세포 응집체를 명시야 관찰한 결과(중단), 및 회복 배양 후의 세포 응집체에 대하여 Crx의 발현을 면역 조직 염색에 의해 비교한 결과(하단)를 도시한다.

도 12는, 도 11에서 나타낸 결과에 대하여, Crx 양성 세포의 수를 정량하고, 그래프화한 결과를 도시한다.

도 13은, 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체에 관하여, 여러 가지 보존 조건 하(보존 조건 B 내지 F)에서 보존한 직후에 있어서의 세포 응집체를 명시야 관찰한 결과(상단), 37℃에서 7일간 회복 배양한 후에 있어서의 세포 응집체를 명시야 관찰한 결과(중단), 및 회복 배양 후의 세포 응집체에 대하여 Crx의 발현을 면역 조직 염색에 의해 비교한 결과(하단)를 도시한다.

도 14는, 도 11에서 나타낸 면역 조직 염색의 결과에 관하여, Crx 양성의 세포수를 정량하여 그래프화한 결과를 도시한다.

도 15는, 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체에 관하여, 여러 가지 보존 조건 하(보존 조건 A, B)에서 보존한 직후에 있어서의 세포 응집체를 명시야 관찰한 결과(상단), 37℃에서 7일간 회복 배양한 후에 있어서의 세포 응집체를 명시야 관찰한 결과(중단), 및 회복 배양 후의 세포 응집체에 대하여 Crx의 발현을 면역 조직 염색에 의해 비교한 결과(하단)를 도시한다.

도 16은, 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체에 관하여, 여러 가지 보존 조건 하(보존 조건 A, B)에서 보존한 직후에 있어서의 세포 응집체를 명시야 관찰한 결과(상단), 37℃에서 7일간 회복 배양한 후에 있어서의 세포 응집체를 명시야 관찰한 결과(중단), 및 회복 배양 후의 세포 응집체에 대하여 Crx의 발현을 면역 조직 염색에 의해 비교한 결과(하단)를 도시한다.

도 17은, 인간 iPS 세포로 제작한 전뇌 및/또는 중뇌 조직을 포함하는 세포 응집체에 관하여, 여러 가지 보존 조건 하(보존 조건 A 내지 D)에서 보존한 직후에 있어서의 세포 응집체를 명시야 관찰한 결과(상단), 37℃에서 7일간 회복 배양한 후에 있어서의 세포 응집체를 명시야 관찰한 결과(중단), 및 회복 배양 후의 세포 응집체에 대하여 Rx 및 Otx2의 발현을 면역 조직 염색에 의해 비교한 결과(하단)를 도시한다.

도 18은, 도 17에서 나타낸 면역 조직 염색의 결과에 관하여, 각 보존 조건에 대하여, Otx2 양성의 세포를 포함하는 관강 구조가 보인 세포 응집체의 수의 전체 세포 응집체에 대한 비율을 산출하고, 그래프화한 결과를 도시한다.

도 19는, 인간 ES 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를, 보존 없음(A, C로 나타냄) 또는 보존 있음(B, D로 나타냄)의 조건 하에서 48시간 두고, 망막 변성 누드 래트의 망막 하 이식 후, 누드 래트 망막의 동결 절편의 면역 조직 염색상을 도시한다.

도 20은, 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체에 관하여, 여러 가지 보존 조건 하(보존 조건 A 내지 D)에서 보존한 직후에 있어서의 세포 응집체를 명시야 관찰한 결과(상단), 37℃에서 7일간 회복 배

양한 후에 있어서의 세포 응집체를 명시야 관찰한 결과(위에서 2단째), 및 회복 배양 후의 세포 응집체에 대하여 시세포 전구 세포의 마커 Crx(밑에서 2단째) 및 망막 전구 세포의 마커 Chx10(하단)의 발현을 면역 조직 염색에 의해 비교한 결과를 도시한다.

도 21은, 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를 17℃에서 옵티졸액 중에 96시간 두고, 망막 변성 누드 래트의 망막 하에 이식한 후, 누드 래트 망막의 동결 절편의 면역 조직 염색상을 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 본 발명의 신경 조직의 보존 방법은, 신경 조직을 칼륨 이온 농도가 0mM 초과 115mM 미만인 보존액 중에서 8℃ 내지 30℃의 보존 온도로 보존하는 것을 포함한다.

[0045] 본 명세서에 있어서의 「조직」이란, 형태 및 성질이 균일한 1종류의 세포, 또는 형태 및 성질이 상이한 복수 종류의 세포가, 일정한 패턴으로 입체적으로 배치된 구조를 갖는 세포 집단의 구조체(「세포 응집체」라고도 함)를 의미한다. 조직은, 생체로부터 채취하거나, 혹은 줄기세포를 이용하여 인위적으로 제작함으로써, 생체 외에서 단리된 상태로 유지된다.

[0046] 본 발명에 있어서, 세포는, 발생 생물학상의 세포의 형태학상 구분으로부터, 상피 세포(epithelial cell)와 간엽 세포(mesenchymal cell)를 포함한다. 상피 세포는, 세포가 정단면(apical)-기저(basal) 방향의 극성을 갖는다. 정단면측이 간강측인 경우가 많으며, 한편, 기저측이 기저막(basement membrane)을 갖고, 세포 외 매트릭스(extra-cellular matrix)에 접한다. 상피 세포는, 정단면측의 접착 결합(adherence junction) 또는 밀착 결합(tight junction)에 의해 상피 세포끼리 견고한 결합을 만들어, 상피 조직(epithelium)을 형성할 수 있다. 상피 조직이란, 상피 시트라고도 하며, 단층 편평 상피, 단층 원기둥 상피, 중층 편평 상피를 포함한다. 간엽 세포는, 정단면-기저의 극성이 약한 세포이며, 접착 결합 및/또는 밀착 결합의 기여가 약하여, 시트를 형성하기 어렵다. 간엽 세포는, 생체 내에서는 세포 외 매트릭스 내에서 성상(星狀)으로 산재하여 존재하는 경우가 많다.

[0047] 본 명세서에 있어서, 「신경 조직(Neural tissue)」이란, 신경계 세포에 의해 구성되며, 1종류 또는 복수 종류의 신경계 세포가, 층상으로 입체적으로 배열된 조직을 의미한다. 대표적인 신경 조직으로서는, 전뇌 조직, 중뇌 조직, 망막 조직을 들 수 있는 것 외에, 대뇌, 소뇌, 간뇌, 후뇌, 종뇌, 척수 등의 조직을 들 수 있으며, 이들을 구성하는 세포 및/또는 전구 세포가, 적어도 복수 종류, 층상으로 입체적으로 배열된 구조체, 그리고 이들 각 조직의 복수의 조합도 이것에 포함된다. 신경 조직은, 광학 현미경(예를 들어, 명시야 현미경, 위상차 현미경, 미분 간섭 현미경, 호프만 간섭 현미경, 실체 현미경)에 의한 현미경 관찰, PSA-NCAM, N-카드헤린(cadherin) 등의 신경 조직 마커의 발현을 지표로 함으로써 확인할 수 있다.

[0048] 신경 조직은, 신경 상피 구조라고 불리는 구조체를 형성하는 경우가 있다. 신경 상피 구조란, 신경계 세포에 의해 구성되며, 1종류 또는 복수 종류의 신경계 세포가, 층상으로 입체적으로 배열된 형태를 말한다. 일 양태에 있어서, 신경 상피 구조는, 정단면(apical)-기저(basal) 방향의 극성을 갖는다.

[0049] 일부의 양태에 있어서, 신경 상피 구조는 세포 응집체의 표면을 덮도록 존재하는 경우가 있다. 다른 양태에 있어서, 신경 상피 구조가 세포 응집체의 내부에도 형성될 수 있다.

[0050] 일부의 양태에 있어서, 신경 상피 구조가, 세포 응집체 표면의 후술하는 연속 상피 구조, 또는 세포 응집체 표면 혹은 세포 응집체 내부의 후술하는 로제트 구조(신경 로제트, 관강 구조라고도 함)인 경우가 있다.

[0051] 세포 응집체 중의 신경 상피 구조는 광학 현미경을 사용한 명시야 관찰에 의해 존재량을 평가할 수 있다.

[0052] 본 발명에 있어서, 「신경계 세포(Neural cell)」란, 외배엽 유래 조직 중 표피계 세포(예: 표피, 머리카락, 손톱, 피지선 등) 이외의 세포를 나타낸다. 즉, 신경계 전구 세포, 뉴런(신경 세포), 글리아, 신경 줄기세포, 뉴런 전구 세포 및 글리아 전구 세포 등의 세포를 포함한다. 신경계 세포에는, 하기 상술하는 망막 조직을 구성하는 세포(망막 세포), 망막 전구 세포, 망막층 특이적 신경 세포, 신경 망막 세포, 망막 색소 상피 세포도 포함된다.

[0053] 신경 세포(Neuron 또는 Neuronal cell)는, 신경 회로를 형성하여 정보 전달에 공헌하는 기능적인 세포이며, TuJ1, Dcx, HuC/D 등의 미성숙 신경 세포 마커, 및/또는 Map2, NeuN 등의 성숙 신경 세포 마커의 발현을 지표로 동정할 수 있다.

[0054] 글리아(glia)로서는, 아스트로사이트, 올리고덴드로사이트, 뮐러 글리아 등을 들 수 있다. 아스트로사이트의

마커로서는 GFAP, 올리고덴드로사이트의 마커로서는 O4, 뮐러 글리아의 마커로서는 CRALBP 등을 들 수 있다.

[0055] 신경 줄기세포란, 신경 세포 및 글리아 세포로의 분화능(다분화능)과, 다분화능을 유지한 증식능(자기 복제능이라고 하는 경우도 있음)을 갖는 세포이다. 신경 줄기세포의 마커로서는 Nestin, Sox2, Musashi, Hes 패밀리, CD133 등을 들 수 있는데, 이들 마커는 전구 세포 전반의 마커이며 신경 줄기세포 특이적인 마커라고는 생각되지 않는다. 신경 줄기세포의 수는, 뉴로스피어 검정 또는 클로날 검정 등에 의해 평가할 수 있다.

[0056] 뉴런 전구 세포란, 증식능을 가지며, 신경 세포를 산생하고, 글리아 세포를 산생하지 않는 세포이다. 뉴런 전구 세포의 마커로서는, Tbr2, Tα1 등을 들 수 있다. 혹은, 미성숙 신경 세포 마커(TuJ1, Dcx, HuC/D) 양성이며, 또한 증식 마커(Ki67, pH3, MCM) 양성의 세포를, 뉴런 전구 세포로서 동정할 수도 있다.

[0057] 글리아 전구 세포란, 증식능을 가지며, 글리아 세포로 분화되고, 신경 세포로 분화되지 않는 세포이다.

[0058] 신경계 전구 세포(Neural Precursor cell)는, 신경 줄기세포, 뉴런 전구 세포 및 글리아 전구 세포를 포함하는 전구 세포의 집합체이며, 증식능과 뉴런 및 글리아 분화능을 갖는다. 신경계 전구 세포는 Nestin, GLAST, Sox2, Sox1, Musashi, Pax6 등을 마커로서 동정할 수 있다. 혹은, 신경계 세포의 마커 양성이며, 또한 증식 마커(Ki67, pH3, MCM) 양성의 세포를, 신경계 전구 세포로서 동정할 수도 있다.

[0059] 본 명세서에 있어서, 「뇌 조직」이란 신경 조직 중 전후 축 방향에서 전방의 영역을 말한다. 생체의 뇌는, 태아기의 뇌 조직으로부터 발생한다. 뇌 조직은, 전후 축 방향으로 전뇌, 중뇌 및 후뇌로 나누어진다.

[0060] 본 명세서에 있어서, 「전뇌 조직(Forebrain tissue)」이란, 뇌 조직 중 전후 축 방향에서 전방의 영역을 말한다. 전뇌 조직은, 발생의 단계가 진행된, 종뇌 조직, 간뇌 조직, 대뇌 조직, 간뇌 조직, 대뇌 피질 조직, 시상하부 조직, 시상 등을 포함한다. 본 명세서에 있어서, 「전뇌 조직」에는 전술한 조직으로부터 발생하는 조직도 포함된다. 구체적으로는, 망막 조직은 간뇌 조직으로부터 발생하기 때문에, 망막 조직은 전뇌 조직에 포함된다. 일부의 양태에 있어서, 배양 접시 상의 전뇌 조직은, 신경 상피 구조를 형성하는 경우가 있다. 일부의 양태에 있어서, 배양 접시 상의 전뇌 조직은, 연속 상피 구조 및/또는 로제트 구조를 갖는 경우가 있다.

[0061] 본 명세서에 있어서, 「중뇌 조직(Midbrain tissue)」이란, 뇌 조직 중, 전후 축 방향에서 전뇌보다 후방이며, 또한 후뇌보다 전방인 영역을 말한다. 중뇌 조직은, 피개, 상구, 하구, 흑질, 적핵, 대뇌각 등을 포함한다. 일부의 양태에 있어서, 배양 접시 상의 중뇌 조직은, 신경 상피 구조를 형성하는 경우가 있다. 일부의 양태에 있어서, 배양 접시 상의 중뇌 조직은, 연속 상피 구조 및/또는 로제트 구조를 갖는 경우가 있다.

[0062] 뇌 조직 중, 어느 영역의 뇌 조직인지를 조사하기 위해서는, 공지 문헌(Shiraishi et al. Development 2017)에 기재된 마커 유전자의 발현으로 조사할 수 있다.

[0063] 마커 유전자로서는, Six3(전뇌의 전방), FoxG1(전뇌의 전방부의 종뇌), Rx(전뇌 중의 종뇌보다 후방), Otx2(전뇌와 중뇌의 일부), Otx2 양성이며 또한 Rx 음성(전뇌 또는 중뇌이며 망막 조직이 아닌 영역), Irx3(중뇌 또는 후뇌)을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0064] 본 명세서에 있어서, 「망막 조직(Retinal tissue)」이란, 시세포, 수평 세포, 쌍극 세포, 아마크린 세포, 망막 신경절 세포, 이들의 전구 세포, 또는 망막 전구 세포 등의 세포가, 1종류 또는 적어도 복수 종류, 층상으로 입체적으로 배열된 조직을 의미한다. 각각의 세포가 어느 층을 구성하는 세포인지는, 공지의 방법, 예를 들어 당업자에게 주지된 세포 마커(Chx10(망막 전구 세포 또는 쌍극 세포), L7(쌍극 세포), TuJ1(망막 신경절 세포), Brn3(망막 신경절 세포), 칼레티딘(Calretinin)(아마크린 세포), 칼빈딘(Calbindin)(수평 세포), 리커버린(시세포), 로돕신(Rhodopsin)(시세포), RPE65(망막 색소 상피 세포), Mitf(망막 색소 상피 세포) 등)의 발현 유무 혹은 그의 정도 등에 의해 확인할 수 있다.

[0065] 본 명세서에 있어서의 「망막층」이란, 망막을 구성하는 각 층을 의미하며, 구체적으로는 망막 색소 상피층 및 신경 망막층을 들 수 있고, 신경 망막층에는 외경계막, 시세포층(외과립층), 외망상층, 내과립층, 내망상층, 신경절 세포층, 신경 섬유층 및 내경계막이 포함된다.

[0066] 본 명세서에 있어서의 「망막 전구 세포」란, 시세포, 수평 세포, 쌍극 세포, 아마크린 세포, 망막 신경절 세포, 망막 색소 상피 세포 등 중 어느 성숙된 망막 세포로도 분화될 수 있는 전구 세포를 말한다. 망막 전구 세포의 마커로서, Rx(Rax라고도 함), PAX6 및 Chx10 등을 들 수 있다.

[0067] 본 명세서에 있어서, 「줄기세포」란, 분화능 및 증식능(특히 자기 복제능)을 갖는 미분화의 세포를 의미한다. 줄기세포에는, 분화 능력에 따라, 다능성 줄기세포(pluripotent stem cell), 복능성 줄기세포(multipotent

stem cell), 단능성 줄기세포(unipotent stem cell) 등의 아집단이 포함된다. 다능성 줄기세포란, 인비트로에 있어서 배양하는 것이 가능하며, 또한 3배엽(외배엽, 중배엽, 내배엽) 및/또는 배체 외 조직에 속하는 세포 계보 전부로 분화될 수 있는 능력(분화 다능성(pluripotency))을 갖는 줄기세포를 말한다. 복능성 줄기세포란, 모든 종류는 아니지만, 복수종의 조직 혹은 세포로 분화될 수 있는 능력을 갖는 줄기세포를 의미한다. 단능성 줄기세포란, 특정한 조직 혹은 세포로 분화될 수 있는 능력을 갖는 줄기세포를 의미한다.

[0068] 「다능성 줄기세포」는, 수정란, 클론배, 생식 줄기세포, 조직 내 줄기세포, 체세포 등으로부터 유도할 수 있다. 다능성 줄기세포로서는, 배아 줄기세포(ES 세포: Embryonic stem cell), EG 세포(Embryonic germ cell), 인공 다능성 줄기세포(iPS 세포: induced pluripotent stem cell) 등을 들 수 있다. 간엽계 줄기세포(mesenchymal stem cell; MSC)로부터 얻어지는 Muse 세포(Multi-lineage differentiating stress enduring cell) 및 생식 세포(예를 들어 정소)로 제작된 GS 세포도 다능성 줄기세포에 포함된다.

[0069] 1998년에 인간 배아 줄기세포가 수립되어, 재생 의학에도 이용되고 있다. 배아 줄기세포는, 내부 세포 응집체를 피더 세포 상 또는 bFGF를 포함하는 배지 중에서 배양함으로써 제조할 수 있다. 배아 줄기세포의 제조 방법은, 예를 들어 WO96/22362, WO02/101057, US5,843,780, US6,200,806, US6,280,718 등에 기재되어 있다. 배아 줄기세포는, 소정의 기관에서 입수할 수 있고, 또한 시판품을 구입할 수도 있다. 예를 들어, 인간 배아 줄기세포인 KhES-1, KhES-2 및 KhES-3은, 교토 대학 재생 의과학 연구소에서 입수 가능하다. 인간 배아 줄기세포인 Crx::Venus주(KhES-1 유래)는 국립 연구 개발 법인 이화학 연구소에서 입수 가능하다.

[0070] 본 명세서에 있어서의 「인공 다능성 줄기세포」란, 체세포를, 공지의 방법 등에 의해 초기화(reprogramming)함으로써, 다능성을 유도한 세포이다.

[0071] 인공 다능성 줄기세포는, 2006년, 야마나카 등에 의해 마우스 세포에서 수립되었다(Cell, 2006, 126(4), pp.663-676). 인공 다능성 줄기세포는, 2007년에 인간 섬유 아세포에서도 수립되었으며, 배아 줄기세포와 마찬가지로 다능성과 자기 복제능을 갖는다(Cell, 2007, 131(5), pp.861-872; Science, 2007, 318(5858), pp.1917-1920; Nat. Biotechnol., 2008, 26(1), pp.101-106).

[0072] 인공 다능성 줄기세포는, 구체적으로는 섬유 아세포, 말초혈 단핵구 등 분화된 체세포를 Oct3/4, Sox2, Klf4, Myc(c-Myc, N-Myc, L-Myc), Glis1, Nanog, Sall4, lin28, Esrrb 등을 포함하는 초기화 유전자군으로부터 선택되는 복수의 유전자의 조합 중 어느 발현에 의해 초기화하여 다분화능을 유도한 세포를 들 수 있다. 바람직한 초기화 인자의 조합으로서는, (1) Oct3/4, Sox2, Klf4 및 Myc(c-Myc 또는 L-Myc), (2) Oct3/4, Sox2, Klf4, Lin28 및 L-Myc(Stem Cells, 2013; 31: 458-466)를 들 수 있다.

[0073] 인공 다능성 줄기세포로서, 유전자 발현에 의한 직접 초기화로 제조하는 방법 이외에, 화합물의 첨가 등에 의해 체세포로부터 인공 다능성 줄기세포를 유도할 수도 있다(Science, 2013, 341, pp.651-654).

[0074] 또한, 주화된 인공 다능성 줄기세포를 입수하는 것도 가능하며, 예를 들어 교토 대학에서 수립된 201B7 세포, 201B7-Ff 세포, 253G1 세포, 253G4 세포, 1201C1 세포, 1205D1 세포, 1210B2 세포, 1231A3 세포 등의 인간 인공 다능성 세포주를, 교토 대학 및 iPS 아카데미아 재팬 가부시키가이샤에서 입수 가능하다. 주화된 인공 다능성 줄기세포로서, 예를 들어 교토 대학에서 수립된 Ff-I01 세포 및 Ff-I14 세포를, 교토 대학에서 입수 가능하다.

[0075] 본 명세서에 있어서, 다능성 줄기세포는, 바람직하게는 배아 줄기세포 또는 인공 다능성 줄기세포이고, 보다 바람직하게는 인공 다능성 줄기세포이다.

[0076] 본 명세서에 있어서, 다능성 줄기세포는, 포유 동물의 다능성 줄기세포이며, 바람직하게는 설치류(예, 마우스, 래트) 또는 영장류(예, 인간, 원숭이)의 다능성 줄기세포이고, 보다 바람직하게는 인간 다능성 줄기세포, 더욱 바람직하게는 인간 인공 다능성 줄기세포(iPS 세포) 또는 인간 배아 줄기세포(ES 세포)이다.

[0077] 인간 iPS 세포 등의 다능성 줄기세포는, 당업자에게 주지된 방법으로 유지 배양 및 확대 배양에 제공할 수 있다.

[0078] 본 명세서에 있어서, 신경 조직은, 바람직하게는 인간 유래이며, 또한 다능성 줄기세포 유래인 것이 바람직하다. 다능성 줄기세포 유래의 신경 조직으로서는, 구체적으로는 예를 들어 배아 줄기세포 혹은 인공 다능성 줄기세포 유래의 신경 조직을 들 수 있다. 즉, 신경 조직으로서, 바람직하게는 다능성 줄기세포, 구체적으로는 배아 줄기세포 혹은 인공 다능성 줄기세포를 원료로 하여, 분화 유도시키는 공정을 거쳐 제조되는 신경 조직을 들 수 있다.

[0079] 본 명세서에 있어서, 망막 조직은, 바람직하게는 다능성 줄기세포 유래이다. 다능성 줄기세포 유래의 망막 조직으로서는, 구체적으로는 예를 들어 배아 줄기세포 혹은 인공 다능성 줄기세포 유래의 망막 조직을 들 수 있다. 즉, 망막 조직으로서, 바람직하게는 다능성 줄기세포, 구체적으로는 배아 줄기세포 혹은 인공 다능성 줄기세포를 원료로 하여, 분화 유도시키는 공정을 거쳐 제조되는 망막 조직을 들 수 있다.

[0080] 다능성 줄기세포를 사용하여, 당업자에게 주지된 방법으로, 망막 조직 등의 신경 조직을 제조할 수 있다. 당해 방법으로서는, 예를 들어 WO2011/055855, WO2011/028524, WO2013/077425, WO2015/025967, WO2016/063985 및 WO2016/063986에 기재된 방법 등을 들 수 있다. 또한, 당해 방법으로서 비특허문헌: Nature 472, pp51-56(2011), Proc Natl Acad Sci U S A. 111(23): 8518-8523(2014), Nat Commun. 5: 4047(2014), Nature Communications, 6, 6286(2015), Stem Cells. (2017); doi:10.1002/stem.2586 등에 기재된 방법 등을 들 수 있다.

[0081] 다능성 줄기세포를 사용하여, 당업자에게 주지된 방법으로, 전뇌 조직 및 중뇌 조직을 제조할 수 있다. 당해 방법으로서는, 예를 들어 Cell Stem Cell, 3, 519-32(2008), WO2009/148170, WO2016/063985 등을 들 수 있다.

[0082] 다능성 줄기세포로 제조하는 방법 이외에도, 생체 유래의 신경 전구 세포, 신경 망막 전구 세포 등의 세포를 분리한 후에 재응집시켜, 다층의 신경 조직, 망막 조직을 제조할 수 있다.

[0083] 상술한 방법에 의해 제조된 신경 조직 또는 망막 조직은 세포 응집체를 형성하며, 일 양태에 있어서, 당해 응집체는, (1) 둥글고, (2) 표면이 매끄럽고, (3) 형태가 무너지지 않으며, (4) 응집체의 내부가 밀하다는 등의 특징을 나타낸다.

[0084] 본 명세서에 있어서, 「세포 응집체」(Cell Aggregate)란, 복수의 세포끼리 접착하여 형성된 덩어리를 의미하며, 특별히 한정되지 않는다. 배양체(Embryoid body), 스피어(Sphere), 스페로이드(Spheroid), 오르가노이드(Organoid)도 세포 응집체에 포함된다. 세포 응집체는, 증식 세포, 비증식 세포(증식 정지한 세포) 또는 그 양쪽을 포함한다.

[0085] 일 양태에 있어서, 「세포 응집체」는, 전술한 신경 상피 구조를 갖는다. 일 양태에 있어서, 당해 세포 응집체는 1 혹은 복수의 신경 상피 구조를 갖는다.

[0086] 상기 방법에 의해 제조된 망막 조직은, 일 양태에 있어서, 망막계 세포가, 1종류 또는 적어도 복수 종류, 층상으로 입체적으로 배열된 구조(소포성 층상 형태)를 갖는다.

[0087] 망막 조직이 소포성 층상 형태를 갖는지 여부는, 당업자라면 명시야 현미경 하에서 망막 조직을 관찰함으로써 판별할 수 있다. 구체적으로는, 망막 조직의 응집체의 주위가 밝고, 소포 또는 컵 모양의 구조를 갖는 것을 확인하면 된다.

[0088] 본 명세서에 있어서의 신경 조직은, 신경 상피 구조를 갖는 경우, 일 양태에 있어서, 연속 상피 구조를 갖는다. 여기서, 연속 상피 구조란, 상피 조직이 연속되어 있는 상태를 말한다. 상피 조직이 연속되어 있다는 것은, 예를 들어 상피 조직에 대한 접선 방향으로 10 세포 내지 10000000 세포, 바람직하게는 접선 방향으로 30 세포 내지 10000000 세포, 더욱 바람직하게는 100 세포 내지 10000000 세포 배열되어 있는 상태를 말한다.

[0089] 예를 들어, 망막 조직에 있어서 형성되는 연속 상피 구조는, 망막 조직이 상피 조직에 특유한 정단면을 갖고, 정단면이 신경 망막층을 형성하는 각 층 중, 적어도 시세포층(외과립층) 등과 대략 평행으로, 또한 연속적으로 망막 조직의 표면에 형성된다. 예를 들어, 다능성 줄기세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체의 경우, 응집체의 표면에 정단면이 형성되고, 표면에 대하여 접선 방향으로 10 세포 이상, 바람직하게는 30 세포 이상, 보다 바람직하게는 100 세포 이상, 더욱 바람직하게는 400 세포 이상의 시세포 또는 시세포 전구 세포가 규칙적으로 연속해서 배열된다.

[0090] 본 명세서에 있어서, 상피 조직에 대한 접선 방향이란, 상피 조직에 있어서 하나하나의 세포가 일정 방향으로 배열되어 있는 경우의 세포가 나란히 있는 방향을 말하며, 상피 조직(또는 상피 시트)에 대하여 평행 방향 또는 횡방향을 말한다.

[0091] 상술한 방법에 의해 제조된 망막 조직은, 일 양태에 있어서, 로제트 유사 구조를 갖는다. 본 명세서에 있어서, 망막 조직에 있어서의 「로제트 유사 구조」란, 중심부의 관강을 둘러싸도록 방사상 또는 나선상으로 세포가 배열된 구조를 가리킨다. 로제트 유사 구조를 형성한 망막 조직에 있어서는, 그의 중심부(관강)를 따라 정단면 및 시세포, 또는 시세포 전구 세포가 존재하는 상태로 되고, 정단면은 로제트 유사 구조마다 분단되어 있다.

[0092] 본 명세서에 있어서, 「정단면(apical)」이란, 상피 조직에 있어서, 뮤코 다당이 풍부하고(PAS 염색 양성), 라미닌 및 IV형 콜라겐을 많이 포함하는 50 내지 100nm의, 상피 세포가 산생한 기저(basal)측의 층(기저막)이 존재하는 기저막측과는 반대측에 형성되는 표면(표층면)을 말한다. 일 양태에 있어서, 시세포 또는 시세포 전구 세포가 보일 정도로 발생 단계가 진행한 망막 조직에 있어서는, 외경계막이 형성되고, 시세포, 시세포 전구 세포가 존재하는 시세포층(외과립층)에 접하는 면을 말한다. 또한, 이러한 정단면은, 정단면의 마커(예: 비정형(atypical)-PKC(이하, 「aPKC」라고 약칭함), E-카드헤린, N-카드헤린)에 대한 항체를 사용하여, 당업자에게 주지된 면역 염색법 등으로 동정할 수 있다.

[0093] 신경 조직이 연속 상피 구조를 갖는지 여부는, 신경 조직이 갖는 정단면의 연속성(즉, 분단되어 있지 않은 형태)에 의해 확인할 수 있다. 정단면의 연속성은, 예를 들어 정단면의 마커인 aPKC, E-카드헤린, N-카드헤린의 면역 염색, 또는 세포핵의 염색(DAPI 염색, PI 염색, Hoechst 염색, 또는 세포핵에 국재하는 마커 단백(Rx, Chx10, Ki67, Crx 등)의 염색 등을 들 수 있음)으로 판별할 수 있다.

[0094] 망막 조직의 경우, 구체적으로는 정단면의 마커(예: aPKC, E-카드헤린, N-카드헤린), 정단면측에 위치하는 시세포 또는 시세포 전구 세포의 마커(예: Crx 또는 리커버린)를 면역 염색하고, 취득한 화상 등에 대하여 정단면과 시세포층, 및 각 망막층의 위치 관계를 해석함으로써 판정할 수 있다. 정단면 및 시세포층(외과립층) 이외의 망막층에 대해서는, 세포핵을 염색하는 DAPI 염색, PI 염색, Hoechst 염색, 또는 세포핵에 국재하는 마커 단백(Rx, Chx10, Ki67, Crx 등) 등에 의한 면역 염색 등에 의해 동정할 수 있다.

[0095] 신경 조직이 로제트 유사 구조를 갖는지 여부는, 세포 응집체를 4% 파라포름알데히드로 고정하거나 한 후 동결절편을 제작하고, 정단면 마커인 aPKC, E-카드헤린, N-카드헤린에 대한 항체, 혹은 핵을 특이적으로 염색하는 DAPI 등을 사용하여 통상 실시되는 면역 염색 등에 의해 로제트 유사 구조의 이형성(예: 분단된 정단면 또는 정단면의 세포 응집체 내로의 침입)을 관찰함으로써 결정할 수 있다.

[0096] 상술한 방법에 의해 제조된 신경 조직에는, 상술한 신경계 세포가 존재한다. 특정한 신경계 세포의 비율은, 분화 단계에 따라 상이하다.

[0097] 상술한 방법에 의해 제조된 전뇌 조직의 일부는, Otx2 양성의 관강을 갖는 응집체로서 존재한다.

[0098] 상술한 방법에 의해 제조된 중뇌 조직의 일부는, Otx2 양성의 관강을 갖는 응집체로서 존재한다.

[0099] 상술한 방법에 의해 제조된 망막 조직에는, Chx10 양성의 신경 망막 전구 세포, Crx 양성의 시세포 전구 세포 등이 존재한다. 그들 세포의 비율은, 분화 단계에 따라 상이하다. 일 양태에 있어서, 일정한 분화 단계에 있어서의 망막 조직에 있어서는, Crx 양성의 시세포 전구 세포가 시세포층으로서 망막 조직의 표층(apical면측)에 층상으로 존재하고, 그의 내측에 Chx10 양성의 신경 망막 전구 세포가 층상으로 존재하는 전구 세포층(Neuroblastic layer라고도 함)으로서 존재한다.

[0100] 본 명세서에 있어서 신경 조직의 보존 또는 수송에 사용되는 「보존액」은, 0mM 초과 115mM 미만의 칼륨 이온 농도를 갖는다. 보존액은 동물 세포 또는 동물 조직의 생존에 적합한 수성 용액이라면, 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게 완충 작용 물질을 포함한다.

[0101] 완충 작용이란, 약산과 그의 공액 염기 또는 약염기와 그의 공액산을 혼합하였을 때의, 수소 이온 농도를 일정하게 유지하는 작용을 의미한다. 즉, 완충 작용이란, 수성 용액 중의 외적 인자가 변화해도 pH를 일정 범위 내로 유지하는 작용을 의미한다. 외적 인자의 변화가 일어날 수 있는 상황으로서는, 예를 들어 소량의 산성 또는 염기성의 물질을 수성 용액 중에 첨가하는 조작, 액체의 희석, 대기 중의 CO_2 농도의 변화, 세포 또는 조직으로부터의 대사산물의 산생, 온도의 변화 등을 들 수 있다.

[0102] 완충 작용 물질이란, 수성 용액 중에서 다른 성분과 서로 작용함으로써 pH를 일정 범위 내로 유지하는 물질을 가리키며, 수성 용액에 대하여 완충 작용을 초래하는 물질을 말한다. 즉, 본 명세서에 있어서의 보존액이란 pH를 6.0 내지 8.6의 범위 내로 완충하는 작용을 갖는 수성 용액이다. 보존액의 pH는 바람직하게는 6.2 내지 8.4의 범위 내이고, 보다 바람직하게는 6.7 내지 7.9의 범위 내이고, 보다 더 바람직하게는 7.2 내지 7.8의 범위 내이고, 더욱 바람직하게는 7.2 내지 7.4의 범위 내이다.

[0103] 본 명세서에 있어서, 보존액 중에 포함되는 완충 작용 물질로서는, 수성 용액을 상술한 pH의 범위 내로 유지할 수 있다면 특별히 한정은 없으며, 약산과 그의 공액 염기의 조합(예를 들어, 나트륨 혹은 칼륨 등의 알칼리 금속염, 칼슘 혹은 마그네슘 등의 알칼리 토류 금속염, 암모늄염), 또는 약염기와 그의 공액산(예를 들어, 아민 화합물과 염산염)의 조합을 들 수 있다. 당업자에게 주지인 1 혹은 복수의 물질을 조합하여 적절하게 사용할

수 있다. 예를 들어, 탄산 완충액(탄산수소나트륨, 탄산나트륨), 인산 완충액(인산, 인산칼륨, 인산나트륨, 인산수소이나트륨, 인산수소이칼륨, 인산이수소나트륨, 인산이수소칼륨, 인산삼나트륨, 인산삼칼륨), 굿 버퍼(HEPES, MES, PIPES 등), 트리스, 시트르산 완충액(시트르산삼나트륨), 아세트산 완충액(아세트산나트륨, 아세트산칼륨), 붕산 완충액(붕산나트륨, 사붕산나트륨), 타르타르산(타르타르산나트륨), 아미노산의 완충액(히스티딘, 타우린, 아스파르트산) 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 일 양태에 있어서는, 복수의 완충 작용 물질로부터 적절하게 선택되는 1 이상의 완충 작용 물질의 조합이 보존액 중에 포함될 수 있다. 완충 작용 물질로서, 바람직하게는 탄산수소나트륨, 인산 완충액(인산이수소나트륨, 인산수소이나트륨), HEPES 등을 들 수 있다. 또한, 일 양태에 있어서는, 보존액 중에 포함되는 완충 작용 물질로서, 탄산수소나트륨과 함께, 그 밖의 완충 작용 물질로부터 적절하게 선택되는 1 이상의 완충 작용 물질을 포함해도 된다.

[0104] 본 명세서에 있어서의 수성 용액이란, 물(H_2O)을 기본 용매로 하는 용액을 말하며, 세포의 생존에 영향을 미치지 않을 정도의 수용성 액체를 소량 포함하고 있어도 된다.

[0105] 본 명세서에 있어서 신경 조직의 보존에 사용되는 보존액은, 완충 작용 물질 이외에 무기염을 포함하고 있어도 된다.

[0106] 보존액에 포함되는 무기염으로서는, 포유류의 생체에 함유되는 성분, 또는 세포의 생존에 유용한 성분으로서 알려진 무기염을 들 수 있으며, 구체적으로 말하면, 질산, 황산, 염산 등의 금속염을 들 수 있다. 또한, 본 명세서에 있어서, 수성 용액에 대하여 완충 작용을 초래하는 무기염은, 완충 작용 물질로서 취급한다. 당해 금속염으로서는, 안정한 무기염을 형성하며, 또한 세포의 생존에 유용한 금속염이라면 특별히 한정은 없으며, 알칼리 금속(나트륨, 칼륨)염, 알칼리 토류 금속(칼슘, 마그네슘)염, 구리, 아연, 철 등의 염을 들 수 있다. 구체적으로는, 칼륨염, 나트륨염, 칼슘염, 마그네슘염, 철염을 들 수 있고, 구체적으로는 염화칼륨, 염화나트륨, 염화칼슘, 질산철, 염화마그네슘 등을 들 수 있다.

[0107] 본 명세서에 있어서의 보존액은 칼륨염을 완충 작용 물질 또는 그 이외의 무기염으로서 포함하고 있어도 되며, 당해 보존액 중에 포함되는 칼륨 이온 농도는, 0mM 초과이며 115mM보다 낮은 농도라면 특별히 한정되지 않는다. 바람직하게는, 60mM, 보다 바람직하게는 30mM, 더욱 바람직하게는 10mM보다 낮은 농도이다. 상기 칼륨 이온 농도는, 바람직하게는 0mM 내지 60mM, 보다 바람직하게는 0mM 내지 30mM, 더욱 바람직하게는 0.01mM 내지 20mM, 보다 더 바람직하게는 0.1mM 내지 10mM, 보다 더 바람직하게는 1mM 내지 8mM을 들 수 있다.

[0108] 또한, 본 명세서에 있어서, 보존액 중에 포함되는 나트륨 이온 농도에 대한 칼륨 이온 농도의 비는 바람직하게는 0.8배보다 낮고, 더욱 바람직하게는 0.5배, 보다 더 바람직하게는 0.4배, 0.3배, 0.2배, 0.1배, 더 더욱 바람직하게는 0.05배보다 낮은 비율이다.

[0109] 본 명세서에 있어서, 「칼륨 이온 농도」는, 보존액 중에 존재하는 모든 염이 이온으로 해리된 경우의 상기 무기 이온의 농도를 의미하며, 칼륨염이 보존액 중에 해리되어 있는지 여부에는 의존하지 않는 값이다. 예를 들어, 보존액 중에 인산칼륨(K_3PO_4)과 염화칼륨(KCl)이 모두 포함되는 경우, 칼륨 이온(K^+)과 인산 이온(PO_4^{3-})이 완전히 해리되어 있고, 또한 칼륨 이온(K^+)과 염화물 이온(Cl^-)도 완전히 해리되어 있는 것으로 상정하고, 양쪽 염으로부터 유래하는 칼륨 이온 농도를 합한 것을, 본 보존액 중에 포함되는 칼륨 이온 농도라고 정의한다.

[0110] 본 명세서에 있어서, 보존액이 충족해야 할 중요한 특성의 하나로서 침투압을 들 수 있다. 완충 작용 물질 및 그 이외의 무기염의 농도는, 보존액의 침투압에 영향을 주는 인자의 하나로서 들 수 있다. 보존액의 침투압은, 보존 기간 중에, 보존 대상인 신경 조직이 팽창 또는 수축하지 않을 정도로 조절되어 있는 것이 바람직하다. 일 양태에 있어서, 보존액이란, 보존 대상인 신경 조직이 팽창 또는 수축하지 않을 정도의 침투압을 갖는 수성 용액이다. 보존액은, 바람직하게는 pH를 6.0 내지 8.6의 범위 내로 유지하도록 조제된 완충하는 작용을 가지며, 또한 보존 대상인 신경 조직이 팽창 또는 수축하지 않을 정도의 침투압을 갖는 수성 용액이다.

[0111] 신경 조직이 보존 중에 팽창 또는 수축하지 않을 정도의 침투압으로서는, 구체적으로는 200 내지 500mOsm/kg, 예를 들어 200 내지 400mOsm/kg, 또는 250 내지 360mOsm/kg을 들 수 있다. 보존액의 침투압은, 보존액에 함유되는 이온을 포함하는 전체 물질의 농도에 의해 정해진다. 보존액의 침투압은, 보존액에 포함되는 이온 등의 함유량을 변화시킴으로써, 적절하게 조정할 수 있고, 혹은 침투압 조정제(예를 들어, 히드록시에틸전분 등)를 첨가해도 된다. 침투압은, 예를 들어 시판되는 침투압 측정 장치를 사용하여 측정할 수 있다.

[0112] 본 명세서에 있어서, 보존액에는, 신경 조직에 포함되는 세포가 생존 가능하며, 신경 조직의 보존이 가능한 범위에 있어서, 상술한 완충 작용 물질 및 그 이외의 무기염 이외에, 아미노산, 비타민류, 당류, 핵산염기, 피루

브산염류 등의 영양제, 항생 물질(예를 들어, 페니실린, 스트렙토마이신, 겐타마이신, 암포테리신), 콜레스테롤 등의 스테로이드, 2-머캅토에탄올, 혈청 및 혈청 대체물 등으로부터 적절하게 선택되는 1 이상의 첨가물이 포함될 수 있지만, 첨가물은 이들에 한정되지 않는다. 구체적으로는 본 명세서의 표 1 내지 표 9에 기재된 배지에 포함되는 성분을 예시할 수 있다.

[0113] 보존액으로서, 상기 조건을 만족하는 시판 중인 세포 혹은 생체 조직용 보존액, 배지 등을 적절하게 사용할 수 있다. 본 명세서에 있어서의 보존액은, 신경 조직의 형태 및 성상을 변화시키지 않고 유지하는 능력이 높을수록 바람직하며, 그 의미에서, 세포를 증식 또는 분화시키는 능력이 낮은 쪽이 바람직하다. 보존액 중에서 세포가 증식하는지 여부는, 세포 증식 마커인 Ki67의 면역 염색, 혹은 핵산 아날로그(트리튬 표지품, BrdU, CldU, IdU, EdU 등)의 도입율 등의 당업자에게 주지된 방법에 의해 확인할 수 있다.

[0114] 일 양태에 있어서, 상기 보존액은, 글리코사미노글리칸류를 함유할 수 있다. 글리코사미노글리칸류로서는, 아미노당과 우론산을 포함하는 기본 골격을 갖는 직쇄의 다당류를 들 수 있다. 본 명세서에 있어서 보존액 중에 사용되는 글리코사미노글리칸류로서는, 물에 용해 가능하고, 신경 조직의 생존 등에 악영향을 주지 않는 물질이라면, 특별히 한정되지 않는다. 본 명세서에 있어서, 당해 글리코사미노글리칸류로서, 바람직하게는 콘드로이틴황산 또는 히알루론산을 들 수 있다. 글리코사미노글리칸류를 함유하는 이점의 하나로서, 보존액에 점성이 부가됨으로써 수송에 의한 진동을 저감할 수 있다.

[0115] 여기서, 보존액 중의 글리코사미노글리칸류의 농도는, 전체 글리코사미노글리칸류의 농도가, 예를 들어 10%(w/v) 이하, 4%(w/v) 이하, 3%(w/v) 이하, 또는 2.5%(w/v) 이하이다. 또한, 전체 글리코사미노글리칸류의 농도가, 예를 들어 0.1%(w/v) 이상, 0.2%(w/v) 이상, 0.5%(w/v) 이상, 또는 0.7%(w/v) 이상이다. 또한, 전체 글리코사미노글리칸류의 농도로서, 예를 들어 0.1%(w/v) 이상 10%(w/v) 이하, 0.2%(w/v) 이상 4%(w/v) 이하, 0.5%(w/v) 이상 3%(w/v) 이하, 및 0.7%(w/v) 이상 2.5%(w/v) 이하를 들 수 있다.

[0116] 글리코사미노글리칸류로서 콘드로이틴황산을 보존액에 포함하는 경우, 콘드로이틴황산의 농도는, 콘드로이틴황산에스테르나트륨으로서, 예를 들어 10%(w/v) 이하, 4%(w/v) 이하, 3%(w/v) 이하, 또는 2.5%(w/v) 이하이다. 또한, 콘드로이틴황산의 농도는, 콘드로이틴황산에스테르나트륨으로서, 예를 들어 0.1%(w/v) 이상, 0.2%(w/v) 이상, 0.4%(w/v) 이상, 또는 0.5%(w/v) 이상이다. 또한, 콘드로이틴황산의 농도는 콘드로이틴황산에스테르나트륨으로서, 예를 들어 0.1%(w/v) 이상 10%(w/v) 이하, 0.2%(w/v) 이상 4%(w/v) 이하, 0.4%(w/v) 이상 3%(w/v) 이하, 및 0.5%(w/v) 이상 2.5%(w/v) 이하를 들 수 있다.

[0117] 글리코사미노글리칸류는 1종류의 단독 사용도 가능하지만, 복수종의 글리코사미노글리칸류를 조합하여 사용하는 것도 가능하며, 예를 들어 콘드로이틴황산 및 히알루론산을, 1:1 내지 3:1, 또는 2:1 내지 3:1의 중량비로 사용할 수 있다.

[0118] 일 양태에 있어서, 상기 보존액은, 세포의 대사를 촉진하는 활성이 낮아도 된다. 세포의 대사 상태는, 대사 경로 물질(예를 들어, 출발 물질, 중간체, 최종 대사물 등)의 양을 측정함으로써 평가할 수 있다. 대사 경로 물질의 양은, 액체 크로마토그래피, 가스 크로마토그래피, 겔 여과, NMR, 질량 분석기, UV 분광계, IR 분광계 등의 분석 기기 혹은 그들 분석 기기의 조합으로 측정할 수 있다.

[0119] 일 양태에 있어서, 상기 보존액은, 혈청 및/또는 혈청 대체물을 포함할 수 있지만, 그 농도는 낮아도 된다. 보존액에 포함되는 혈청 및/또는 혈청 대체물의 농도가 낮은 경우에, 세포의 증식 및/또는 세포의 대사가 낮아지는 효과를 기대할 수 있다.

[0120] 보존액으로서, 세포 또는 조직의 유지 배양에 사용되는 배지를 사용할 수도 있다. 세포 또는 조직의 배양용 배지, 바람직하게는 동물 세포 또는 동물 조직의 배양에 사용하는 배지로서 시판되고 있는 수성 용액이라도, 본 발명에 있어서의 보존 온도에서 실질적으로 신경 조직의 형태가 변화하는 세포 증식 혹은 분화가 일어나지 않는 한 본 발명의 보존액으로서 사용 가능하다. 상기 배지란, 예를 들어 BME 배지, BGJb 배지, CMRL 1066 배지, Glasgow MEM(GMEM) 배지, Improved MEM Zinc Option 배지, IMDM 배지, Medium 199 배지, Eagle MEM 배지, α MEM 배지, DMEM 배지, F-12 배지, DMEM/F12 배지, IMDM/F12 배지, 뉴로베이슬(Neurobasal) 배지, 햄 배지, RPMI 1640 배지, Fischer's 배지, 또는 이들의 혼합 배지 등, 동물 세포의 배양에 사용할 수 있는 배지를 들 수 있다. 바람직하게는, DMEM(Gibco), DMEM/F-12, 뉴로베이슬 배지(Thermo Fisher), 또는 이들의 혼합 배지를 들 수 있다. 이들은, 세포 또는 조직의 유지 배양 시에는, 혈청, 혈청 대체물, 항생 물질 등을 적절하게 첨가하여 사용하는 것도 가능하다. 한편, 혈청, 혈청 대체물 및/또는 항생 물질은 보존액의 필수적인 성분은 아니므로, 본 발명에 있어서 보존액으로서 사용할 때에는, 보존액 중에서의 품질 관리 항목을 적게 한다고 하는 관점에서,

바람직하게는 이들을 첨가하지 않거나, 첨가한다고 해도 통상의 세포 배양과 비교하여 낮은 농도로 첨가한다. 일 양태에 있어서, 보존액으로서는, 완충 작용 물질 및 무기염을 포함하고, 아미노산, 비타민류, 당류를 포함하지 않는 D-PBS 등을 사용하는 것도 가능하다.

[0121] 일 양태에 있어서, 상기 보존액으로서, 바람직하게는 완충 작용 물질 및 무기염을 포함하며, 또한 아미노산 및/또는 비타민류를 포함해도 된다. 보존액으로서 보다 바람직하게는, 완충 작용 물질, 아미노산 및 비타민류를 포함하는 수성 용액을 들 수 있다. 구체적으로는, HBSS(Thermo Fisher로부터 구입 가능), DMEM(Thermo Fisher로부터 구입 가능), DMEM(글루코오스 없음(no-glucose))(Thermo Fisher로부터 구입 가능), 뉴로베이슬 배지(Thermo Fisher로부터 구입 가능), 하기 표 1의 조성을 갖는 각막 보존액(미국 특허 5,104,787; 5,407,669를 참조), 또는 Optisol(Bausch and Lomb으로부터 구입 가능)을 들 수 있으며, 보다 바람직하게는 Optisol을 들 수 있다.

표 1

무기염	(mg/L)	(mM)
염화칼슘 ($CaCl_2$)	200	1.80
질산철 $Fe(NO_3)_3$ $9H_2O$	0.5	0.00124
염화칼륨 (KCl)	400	5.33
황산마그네슘 ($MgSO_4$ $7H_2O$)	200	0.813
염화나트륨 (NaCl)	6800	117
탄산수소나트륨 ($NaHCO_3$)	2200	26.2
인산이수소나트륨 (NaH_2PO_4 H_2O)	140	1.01
상기 이외에 함유되는 주된 성분		
아미노산류, 비타민류, 아데닌황산염, 콜레스테롤, 글루코오스, 페놀 레드, 피루브산나트륨, 2-머캅토에탄올, 콘드로이틴황산, 겐타마이신, 덱스트란 등		

[0122]

[0123] 일 양태에 있어서, 본 발명은 보존액 및 인간 신경 조직을 포함하는, 12℃ 내지 22℃ 하, 바람직하게는 15℃ 내지 20℃의 이식용 조성물, 즉 12℃ 내지 22℃, 또는 15℃ 내지 20℃로 온도 조절된 이식용 조성물을 제공한다.

[0124] 여기에 있어서, 보존액으로서, 칼륨 이온 농도가 0mM 초과 115mM 미만이고, 완충 작용 물질에 의해 pH가 6.0 내지 8.6의 범위로 조정된 수성 용액을 들 수 있다. 당해 수성 용액은, 추가로 아미노산 및 비타민류를 포함하고 있어도 된다. 당해 수성 용액으로서, 칼륨 이온 농도가 0mM 초과 115mM 미만이고, 완충 작용 물질에 의해 pH가 6.0 내지 8.6의 범위로 조정된 세포나 조직의 유지 혹은 배양용 수성 용액을 들 수 있다. 구체적으로는, Optisol, HBSS, DMEM, DMEM(글루코오스 없음), 뉴로베이슬 배지, 표 1의 조성을 갖는 각막 보존액을 예시할 수 있다.

[0125] 당해 수성 용액은, 바람직하게는, 추가로 글리코사미노글리칸류, 구체적으로는 콘드로이틴황산 및/또는 히알루론산을 포함한다. 여기서 글리코사미노글리칸류의 농도로서는, 상술한 바와 같다.

[0126] 인간 신경 조직으로서, 다능성 줄기세포 유래의 인간 신경 조직, 예를 들어 신경 상피 구조를 갖는 세포 응집체인 인간 신경 조직을 들 수 있다.

[0127] 세포 응집체로서, 구체적으로는 세포 응집체 표면에 존재하는 연속 상피 구조를 갖는 망막 조직, 또는 세포 응집체 표면 혹은 내부에 존재하는 연속 상피 구조 및/또는 로제트 구조를 갖는 전뇌·중뇌 조직을 들 수 있다. 망막 조직으로서, 상술한 망막 조직을 들 수 있으며, 예를 들어 CRX 및/또는 N-카드헤린 양성 세포를 포함하는 연속 상피 구조를 갖는 신경 망막 조직을 들 수 있다. 전뇌·중뇌 조직으로서, 예를 들어 Otx2 양성 세포를 포함하는 연속 상피 구조, 및/또는 로제트(관강) 구조를 갖는 전뇌·중뇌 조직을 들 수 있다.

[0128] 본 발명의 보존 방법 또는 수송 방법에 사용하는 보존액은, 신경 조직의 보존이 가능한 범위에 있어서, 보존 기간의 도중에 조성을 변경해도 된다. 또한, 보존 도중에, 동일한 조성의 보존액으로 교환해도 된다. 교환으로서는 절반량 교환, 8할 양 교환, 전량 교환을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0129] 본 발명의 보존 방법 또는 수송 방법에 있어서 사용되는 용기는, 특별히 한정되지 않으며, 당업자라면 적절하게 결정하는 것이 가능하다. 이러한 용기로서는, 예를 들어 플라스크, 조직 배양용 플라스크, 배양 접시(디쉬), 페트리 디쉬(샤알레), 조직 배양용 디쉬, 멀티 디쉬, 마이크로 플레이트, 마이크로 웰 플레이트, 마이크로 포어, 멀티 플레이트, 멀티 웰 플레이트, 챔버 슬라이드, 튜브, 스크루 캡식 튜브, 바이알, 트레이, 배양 백을 들 수 있다. 이들 용기는, 신경 조직의 부유 보존을 가능하게 하기 위해, 세포 비접착성인 것이 바람직하다. 세포 비접착성 용기로서는, 용기의 내측 표면이, 세포와의 접착성을 향상시킬 목적으로 인공적으로 처리(예를 들어, 기저막 표품, 라미닌, 엔탁틴, 콜라겐, 젤라틴 등의 세포 외 매트릭스 등, 또는 폴리리신, 폴리오르니틴 등의 고분자 등에 의한 코팅 처리, 또는 양전하 처리 등의 표면 가공)되어 있지 않은 것 등을 사용할 수 있다. 세포 비접착성 용기로서는, 용기의 표면이, 세포와의 접착성을 저하시킬 목적으로 인공적으로 처리(예를 들어, MPC 폴리머 등의 초친수성 처리, 단백 저흡착 처리 등)된 것 등을 사용할 수 있다. 용기의 소재로서는, 폴리스티렌, 폴리프로필렌 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 용기의 저면은, 평평한 바닥이어도 되고, 요철이 있어도 된다.

[0130] 일 양태에 있어서, 상기 용기는 무균인 것이 바람직하다. 용기를 멸균하여 무균화하는 방법으로서는, 당업자가 주지된 방법을 사용할 수 있다. 또한, 무균의 용기를 구입하여 사용해도 된다.

[0131] 일 양태에 있어서, 상기 용기로서, 세포 보존용 튜브를 사용해도 된다. 상기 세포 보존용 튜브로서, 예를 들어 크라이오 튜브, 코니칼 튜브, 원심관, 플라스틱제 튜브 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.

[0132] 본 발명의 보존 방법 또는 수송 방법에 있어서, 신경 조직은, 8℃ 이상 혹은 12℃ 이상, 30℃ 이하 혹은 22℃ 이하의 보존 온도에서 보존한다. 8℃ 내지 30℃, 바람직하게는 12℃ 내지 22℃, 보다 바람직하게는 약 17℃(15℃ 내지 19℃ 또는 16℃ 내지 18℃)의 보존 온도에서 보존한다. 보존 온도를 제어할 목적으로는, 후술하는 온도 유지 장치를 사용해도 된다.

[0133] 일 양태에 있어서, 보존 온도란, 보존액의 온도를 온도계 등으로 실측한 값이어도 되고, 온도 유지 장치 내의 온도를 실측한 값이어도 되고, 온도 유지 장치에 있어서 설정된 온도여도 된다. 온도를 실측하는 경우에, 예를 들어 온도계를 사용할 수 있다.

[0134] 상기 온도 유지 장치는, 밀폐된 기상, 혹은 액상을 상기 범위의 온도로 유지하는 기능이 있다면 특별히 한정되지 않는다. 구체적으로는, 세포 배양용 CO_2 인큐베이터, 냉장고, 원심기, 항온 수조, 항온조, 블록 인큐베이터, 보온 겔 등을 사용할 수 있다. 당업자라면, 보존하는 조직 등에 따라, 그 밖의 설정(산소 농도, 이산화탄소 농도 등)을 적절하게 행할 수 있다.

[0135] 신경 조직은, 시설간(예: 신경 조직의 제조 시설로부터 이식 시설로 수송)에 수송되는 경우가 있는데, 당해 기간도 적절하게 보존되는 것이 바람직하며, 본 명세서의 보존 방법을 적용 가능하다. 수송 방법은 특별히 한정되지 않고, 차량, 선박, 또는 항공기 등의 어느 방법이어도 된다. 따라서, 수송 수단에 있어서 적절한 온도 유지 장치가 구비되어 있거나, 혹은 온도 유지 장치를 포함시켜 수송할 수 있는 것이 바람직하다. 또한, 온도 유지 장치는, 수송에 의한 진동이 내부의 보존액에 전해지지 않는 구조를 갖고 있는 편이 바람직하다. 따라서, 칼륨 이온 농도가 0mM 초과 115mM보다 낮은 보존액 중, 8℃ 내지 30℃, 바람직하게는 12℃ 내지 22℃, 보다 바람직하게는 약 17℃(15℃ 내지 19℃ 또는 16℃ 내지 18℃)의 보존 온도로, 신경 조직을 수송하는 방법도 또한 본 발명의 범주이다.

[0136] 본 명세서에 있어서, 신경 조직의 보존은, 신경 조직을 상술한 범위 내의 온도로 설정된 온도 유지 장치 내에 둠으로서 개시되고, 신경 조직을 당해 온도 유지 장치로부터 꺼냄으로써 종료된다.

[0137] 본 발명의 보존액을 사용함으로써, 신경 조직은 14일을 초과하지 않는 기간, 5일을 초과하지 않는 기간, 또는 3일을 초과하지 않는 기간 보존될 수 있다. 당해 기간은, 이식에 제공할 때까지의 품질 관리 또는 수송에 필요하기 때문에, 통상 2시간 이상이다. 본 명세서에 있어서, 「X일을 초과하지 않는 기간」이란, 보존을 개시한 날을 0일째로 하여, X일째까지의 기간을 말한다. 일 양태에 있어서, 신경 조직의 품질이 떨어질 가능성은 있지만, 당해 방법으로 신경 조직을 예를 들어 1개월을 초과하지 않는 기간 보존해도 된다.

[0138] 본 발명의 보존 방법 또는 수송 방법에 있어서, 신경 조직의 보존은 배양 공정과 구별된다. 신경 조직의 배양 공정(예를 들어, 유지 배양 또는 분화 유도 배양)의 경우에는, 세포의 대사, 증식, 운명 결정, 분화, 성숙화, 이동 등이 단속적으로 일어날 수 있다. 상기 배양 공정(예를 들어, 유지 배양, 분화 유도 배양) 시에는, 신경 세포의 생존 및 증식 혹은 분화 유도에 적합한 조건에서 배양한다. 당해 조건으로서는, 배지 조성(당류, 아미노산, 비타민류 등의 영양 성분을 포함함), 온도(통상 36 내지 37℃), 습도(통상 95%), 이산화탄소 농도(통상

5 내지 10%), 산소 농도(통상 2 내지 60%) 등의 조건을 들 수 있다.

[0139] 한편, 본 발명에 있어서의 보존 온도는 30℃ 이하이며, 배양 공정(예를 들어, 신경 조직의 유지 배양 또는 분화 유도 배양)의 최적 온도와는 상이하다. 본 발명에 있어서 보존할 때, 배지 중의 영양 성분, 습도 및 이산화탄소 농도의 유지 및 조정은 필수적이지 않다.

[0140] 본 명세서에 있어서의 신경 조직의 보존이란, 세포의 증식 및 분화를 실질적으로 수반하지 않고, 보존 전후에 있어서의 신경 조직의 상태가 실질적으로 동등한 것이 바람직하다. 예를 들어, 신경 조직을 이식에 사용하는 경우, 제조한 신경 조직의 품질 검사를 행하는 경우가 있는데, 당해 품질 검사에는, 그 내용에 따라 수 시간 내지 수일의 기간을 요한다. 보존 전과 보존 후에 신경 조직이 동등한 것은, 당업자가 설정 가능한 품질 시험을 행함으로써 실증할 수 있다. 일 양태에 있어서, 보존 전과 보존 후에 신경 조직이 실질적으로 동등한 것은, 동물 모델에 이식하였을 때의 효과를 비교함으로써 실증할 수 있다.

[0141] 또한, 신경 조직이, CPC 세포 배양 센터 등의 제조 설비에서 제조된 경우, 이식을 필요로 하는 환자(리시피언트)의 의료 기관으로 수송할 필요가 있는데, 원격지인 경우 거리에 따라, 수송에 수 시간 내지 수일을 요하는 것도 상정된다.

[0142] 그 때문에, 당해 품질 검사 혹은 수송에 요하는 기간, 신경 조직의 상태가 실질적으로 동등한 것은 중요하다.

[0143] 일 양태에 있어서, 신경 조직의 「보존」은, 세포 증식을 수반하는 「배양」과 구별된다. 유지 배양 또는 분화 유도 시에는, 세포의 증식 또는 분화가 단속적으로 행해지며, 신경 세포의 생존 및 증식 혹은 분화 유도에 적합한, 배지 조성(당류, 아미노산, 비타민류 등의 영양 성분을 포함함)과 온도(통상 37℃), 습도(통상 95%), 이산화탄소 농도(통상 5%) 등의 외부 환경 등의 조건이 요구된다. 본 명세서에 있어서의 「보존」은, 세포의 증식 및 분화를 실질적으로 수반하지 않고, 세포 응집체의 성상이 변화하지 않고 유지되는, 즉 실질적인 동등성이 유지됨을 의미한다.

[0144] 일 양태에 있어서, 신경 조직의 「보존」은, 조직의 형태 변화를 수반하는 「배양」과 구별된다. 조직을 「배양」할 때에는, 조직의 형태 변화(예를 들어, 신장, 함입, 반전)가 일어나는 경우가 있어, 조직의 「배양」에 적합한, 배지 조성(당류, 아미노산, 비타민류 등의 영양 성분을 포함함)과 온도(통상 37℃), 습도(통상 95%), 이산화탄소 농도(통상 5%) 등의 외부 환경 등의 조건이 요구된다.

[0145] 본 발명의 보존 방법에 있어서의 보존 온도는 30℃ 이하이며, 세포의 증식 또는 분화의 최적(조건) 온도와는 상이하다.

[0146] 일 양태에 있어서, 본 명세서의 방법으로 보존함으로써, 신경 조직 중에 포함되는 신경계 세포의 보존 전후에 있어서의 생세포율은 동등한 것이 바람직하다. 여기서, 생세포율이 동등하다는 것은, 본 발명의 보존액에 접촉시키기 전의 생세포율에 대한 보존 후의 생세포율의 비율이 실질적으로 변화하지 않는, 구체적으로는 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상인 것을 의미한다.

[0147] 여기서, 예를 들어 이식에 사용되는 신경 조직 중에 포함되는 신경계 세포의 생세포율이, 본 발명의 보존액에 접촉시키기 전에 95% 이상인 경우, 본 발명의 방법에 있어서 보존된, 즉 당해 보존액 중에서 수 시간 내지 14일간 보존 후의 당해 조직 중의 신경계 세포의 생세포율은, 보존 기간 및 보존 조건에 의존하지만, 80% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상으로 유지된다.

[0148] 일 양태에 있어서, 본 발명의 방법으로 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를 보존함으로써, 보존 전후에 있어서, 당해 세포 응집체 중의 CRX 양성 세포수는 동등하다. 여기서, CRX 양성 세포수가 동등하다는 것은, 본 발명의 보존액에 접촉시키기 전의 CRX 양성 세포수에 대한, 당해 보존액 중에서 수 시간 내지 14일간 보존 후의 CRX 양성 세포수의 비율이, 보존 기간 및 보존 조건에 의존하지만, 70% 이상, 80% 이상, 또는 95% 이상으로 유지되는 것을 의미한다.

[0149] 일 양태에 있어서, 본 발명의 방법으로 신경 조직을 포함하는 세포 응집체를 보존함으로써, 보존 전후에 있어서, Otx2 양성의 로제트 구조(관강)를 갖는 응집체수는 동등하다. 여기서, Otx2 양성의 로제트 구조를 갖는 응집체수가 동등하다는 것은, 본 발명의 보존액에 접촉시키기 전의 Otx2 양성의 로제트 구조를 갖는 응집체수에 대한, 당해 보존액 중에서 수 시간 내지 14일간 보존 후의 Otx2 양성의 관강을 갖는 응집체수의 비율이, 보존 기간 및 보존 조건에 의존하지만, 50% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상으로 유지되는 것을 의미한다.

[0150] 일 양태에 있어서, 본 발명의 방법으로 보존함으로써, 보존 전후에 있어서, 실질적으로 동등한 신경 조직의 응집체에 특유한 층 구조 또는 입체적인 세포 배치를 유지할 수 있다. 예를 들어, 신경 망막층을 포함하는 망막

조직의 경우, 구체적으로는 연속 상피 구조, 소포성 층상 형태, 및 Crx 양성 세포가 표층에 층상으로 존재하고, 그의 내측에 Chx10 양성 세포가 층상으로 존재하는 세포 배치 등을 들 수 있다. 「실질적으로 동등한 층 구조 또는 입체적인 세포 배치를 유지하는」이란, 본 발명의 보존액에 접촉시키기 전의, 특정한 성상을 나타내는 층 구조 또는 입체적인 세포 배치를 갖는 응집체의 수에 대한, 당해 보존액 중에서 수 시간 내지 14일간 보존 후의, 당해 층 구조 또는 입체적인 세포 배치를 갖는 응집체수의 비율이, 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 95% 이상인 것을 의미한다. 다른 양태로서, 특정한 성상을 나타내는 층 구조 또는 입체적인 세포 배치가 동등하다는 것은, 응집체의 외주 중에 포함되는 당해 층 구조 또는 입체적인 세포 배치를 나타내는 부분의 비율이, 본 발명의 보존 전과 접촉시키기 전과 비교하여, 보존 기간 및 보존 조건에 의존하지만, 70% 이상, 80% 이상, 또는 95% 이상으로 유지되는 것을 의미한다.

[0151] 당해 보존 방법에 의해 보존된 신경 조직은, 빠르게 목적으로 하는 사용, 구체적으로는 품질 검사 및 환자(리시피언트)로의 이식 수술에 제공할 수 있다. 보존 기간 후에, 신경 조직을 배지 중에서 단기간(예를 들어, 3시간 내지 7일간) 혹은 장기간(8일간 내지 수개월)의 회복 배양을 행해도 되고, 회복 배양은 당업자에게 주지된 방법으로 행할 수 있으며, 예를 들어 37℃로 설정된 CO_2 인큐베이터 내에서 행해진다. 일 양태에 있어서, 회복 배양은, 통상의 분화 배양 또는 성숙 배양과 완전히 동일한 조건에서 행해도 된다.

[0152] 본 발명의 보존 또는 수송 방법에 의해 보존된 신경 조직, 구체적으로는 전뇌 조직, 중뇌 조직 또는 망막 조직 등은, 예를 들어 생체(리시피언트)로의 이식에 사용할 수 있다.

[0153] 일 양태에 있어서, 상기 보존된 신경 조직을, 구체적으로는 전뇌 조직, 중뇌 조직 또는 망막 조직 등을, 생체에 이식할 때, 보존액으로부터 취출된 후에, 직접 이식해도 된다. 일 양태에 있어서, 상기 보존된 신경 조직은, 조직 또는 세포를 포함하는 의약에 통상 사용되는, 보존제, 안정제, 환원제, 등장화제 등을 사용하여 세정하고, 이것들을 담체로 하여 이식해도 된다.

[0154] 본 발명의 보존 또는 수송 방법에 의해 보존되는 신경 조직(예, 망막 조직, 전뇌 조직, 중뇌 조직)은, 당해 신경 조직의 장애에 기초하는 질환의 이식 의료에 유용하다. 그래서, 본 발명은, 본 발명의 보존 방법에 의해 보존되는 신경 조직을 포함하는, 당해 신경 조직의 장애에 기초하는 질환의 치료약을 제공한다. 당해 신경 조직의 장애에 기초하는 질환의 치료약으로서, 혹은 당해 신경 조직의 손상 상태에 있어서, 해당되는 손상 부위를 보충하기 위해, 본 발명의 보존 방법에 의해 보존되는 신경 조직을 사용할 수 있다. 이식을 필요로 하는, 신경 조직의 장애에 기초하는 질환, 또는 신경 조직의 손상 상태의 환자에게, 본 발명의 보존 방법에 의해 보존되는 신경 조직을 이식하여, 당해 장애 또는 손상을 받은 신경 조직 자체를 보충함으로써, 신경 조직의 장애에 기초하는 질환, 또는 신경 조직의 손상 상태를 치료할 수 있다. 예를 들어, 신경 조직의 장애에 기초하는 질환으로서는, 예를 들어 신경 변성 질환(예를 들어, 뇌허혈 장애, 뇌경색, 파킨슨씨병, 척수 손상, 뇌혈관 장해, 뇌/척수 외상성 장애(예, 뇌경색, 두부 외상/뇌좌상(TBI), 척수 손상 다계통 위축증), 전형적인 신경 변성 질환(근위축성 측색 경화증(ALS), 파킨슨씨병(PD), 파킨슨 증후군, 알츠하이머형 치매, 진행성 핵상성 마비(PSP), 헌팅톤병, 다계통 위축증(MSA), 척수 소뇌 변성증(SCD)), 탈골수 질환, 신경근 질환(다발성 경화증(MS), 급성 산재성 뇌척수염(ADEM), 염증성 광범성 경화증(Schilder병), 아급성 경화증 전뇌염, 진행성 다소성 백질뇌증, 저산소뇌증, 교중심 수초 파괴증, 빈스방거(Binswanger)병, 길랭-바레 증후군, 피셔 증후군, 만성 염증성 탈수성 다발근신경염, 척수 공동증, 척수 소뇌 변성증, 흑질 선조체 변성증(SND), 올리브교소뇌 위축증(OPCA), 샤이-드레거 증후군(Shy-Drager 증후군)), 안과 질환(황반 변성증, 노인성 황반 변성, 망막 색소 변성, 백내장, 녹내장, 각막 질환, 망막증), 난치성 간질, 진행성 핵상성 마비, 척수 공동증, 척수성 근위축증(SMA), 구척수성 근위축증(SBMA), 원발성 측색 경화증(PLS), 진행성 핵상성 마비(PSP), 대뇌 피질 기저핵 변성증(CBD), 헌팅톤병(HD), 유극적혈구 무도병, 척수 공동증, 전두측두엽 변성증, 샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease), 디스토니아, 판토테네이트 키나아제-연관 신경병성(Pantothenate kinase-associated neurodegeneration), 가족성 인지증, 파킨슨 증후군, 노인성 실인증, 강직성 하반신마비, 레비소체형 인지증, 하수체 기능 저하증, 뇌종양의 외과적 적출술에 의해 생긴 기능 부전 등을 들 수 있다. 예를 들어, 대뇌 조직 또는 대뇌 관련 세포의 장애에 기초하는 질환으로서는, 예를 들어 신경 변성 질환(예를 들어, 뇌허혈 장애, 뇌경색, 운동 뉴런병, ALS, 알츠하이머병, 폴리글루타민병, 대뇌 피질 기저핵 변성증)을 들 수 있다. 망막 조직 또는 망막 관련 세포의 장애에 기초하는 질환으로서는, 예를 들어 망막 변성증, 망막 색소 변성증, 노인성 황반 변성증, 유기 수은 중독, 클로로퀸 망막증, 녹내장, 당뇨병성 망막증, 신생아 망막증 등을 들 수 있다. 또한, 신경 조직의 손상 상태로서는, 신경 조직 적출 후의 환자, 신경 조직 내 종양으로의 방사선 조사 후의 환자, 외상을 들 수 있다.

[0155] <실시예>

[0156] 이하에 실시예를 들어 본 발명을 상세하게 설명하지만, 본 발명은 전혀 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0157] 실시예 1: 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를, 여러 가지 보존 조건 하에서 보존한 예(보존 온도 및 보존액의 스크리닝 실험)

[0158] 인간 iPS 세포(1231A3주, 교토 대학에서 입수)를, Scientific Reports, 4, 3594(2014)에 기재된 방법에 준하여 피더 프리 배양하였다. 피더 프리 배지로서는 StemFit 배지(AK03N, 아지노모토사제), 피더 프리 기반에는 Laminin 511-E8(닛삐사제)을 사용하였다.

[0159] 구체적인 유지 배양 조작으로서는, 우선 서브컨플루언트가 된 인간 iPS 세포(1231A3주)를 PBS로 세정 후, TrypLE Select(Life Technologies사제)를 사용하여 단일 세포에 분산하였다. 그 후, 상기 단일 세포에 분산된 인간 iPS 세포를, Laminin 511-E8로 코팅한 플라스틱 배양 디쉬에 파종하고, Y27632(ROCK 저해 물질, 10μM) 존재 하, StemFit 배지에서 피더 프리 배양하였다. 상기 플라스틱 배양 디쉬로서, 6웰 플레이트(이와키사제, 세포 배양용, 배양 면적 9.4㎠)를 사용한 경우, 상기 단일 세포에 분산된 인간 iPS 세포의 파종 세포수는 1.0×10^4으로 하였다. 파종한 1일 후에, Y27632를 포함하지 않는 StemFit 배지로 교환하였다. 이후, 1일 내지 2일에 1회 Y27632를 포함하지 않는 StemFit 배지로 배지 교환하였다. 그 후, 파종한 6일 후에, 서브컨플루언트(배양 면적의 6할이 세포로 덮일 정도)가 될 때까지 배양하였다.

[0160] 분화 유도 조작으로서는, 인간 iPS 세포(1231A3주)를, StemFit 배지를 사용하여, 서브컨플루언트 1일 전(배양 면적의 5할이 세포로 덮일 정도)이 될 때까지 피더 프리 배양하였다. 당해 서브컨플루언트 1일 전의 인간 iPS 세포를, SB431542(5μM) 및 SAG(300nM)의 존재 하, 1일간 피더 프리 배양하였다(사전조건화(Precondition) 처리).

[0161] 사전조건화 처리한 인간 iPS 세포를, TrypLE Select(Life Technologies사제)로 처리하고, 추가로 피펫팅 조작에 의해 단일 세포에 분산하였다. 그 후, 상기 단일 세포에 분산된 인간 iPS 세포를 비세포 접착성의 96구멍 배양 플레이트(PrimeSurface 96V 바닥 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)의 1웰당 1.2×10^4 세포가 되도록 100㎕의 무혈청 배지에 부유시키고, 37℃, 5% CO_2에서 부유 배양하였다. 그때의 무혈청 배지(gfCDM+KSR)에는, F-12 배지와 IMDM 배지의 1:1 혼합액에 10% KSR, 450μM 1-모노티오글리세롤, 1×화학적으로 규정된 지질 농축물(Chemically defined lipid concentrate)을 첨가한 무혈청 배지를 사용하였다. 부유 배양 개시 시(부유 배양 개시 후 0일째)에, 무혈청 배지에 IWR-1e(최종 농도 3μM), Y27632(최종 농도 20μM) 및 SAG(최종 농도 30nM)를 첨가하였다. 부유 배양 개시 후 3일째에, Y27632 및 SAG를 포함하지 않고, IWR-1e 및 인간 재조합 BMP4(R&D사제)를 포함하는 배지에서, 외래성 인간 재조합 BMP4의 최종 농도가 1.5nM(55ng/ml)이 되고, 또한 IWR-1e의 최종 농도가 3μM이 되도록 새로운 상기 무혈청 배지를 50㎕ 첨가하였다.

[0162] 그 3일 후(부유 배양 개시 6일 후)에, Y27632 및 인간 재조합 BMP4를 포함하지 않고, IWR-1e를 포함하는 상기 무혈청 배지로 절반량 배지 교환하였다. 그 4일 후(부유 배양 개시 10일 후)에, 외래성 IWR-1e의 농도가 배지 교환 전에 비하여 3% 이하가 되도록, IWR-1e, Y27632 및 인간 재조합 BMP4를 포함하지 않는 상기 무혈청 배지를 사용하여 80% 배지 교환 조작을 2회 행하였다. 그 후, 2 내지 4일에 1회, IWR-1e, Y27632 및 인간 재조합 BMP4를 포함하지 않는 상기 무혈청 배지로 절반량 배지 교환하였다. 절반량 배지 교환 조작으로서는, 배양기 중의 배지를 체적의 절반량 즉 75㎕ 폐기하고, 새로운 상기 무혈청 배지를 75㎕ 첨가하여, 배지량은 합계 150㎕로 하였다.

[0163] 이와 같이 하여 얻어진 부유 배양 개시 후 17일째의 세포 응집체를, Wnt 시그널 전달 경로 작용 물질인 CHIR99021(3μM) 및 FGF 시그널 전달 경로 저해 물질인 SU5402(5μM)를 포함하는 무혈청 배지(DMEM/F12 배지에, 1% N2 보충제(supplement)가 첨가된 배지)에서 3일간 즉 부유 배양 개시 후 20일째까지 배양하였다.

[0164] 또한, Wnt 시그널 전달 경로 작용 물질 및 FGF 시그널 전달 경로 저해 물질을 포함하지 않는 혈청 배지로서, DMEM/F12 배지에, 10% 소 태아 혈청, 1% N2 보충제, 0.5μM 레티노산 및 100μM 타우린이 첨가된 배지(이하, 「Retina 배지」라고 칭함)를 제작하고, 당해 부유 배양 개시 후 20일째의 세포 응집체를 Retina 배지에서, 65일간 즉 부유 배양 개시 후 85일째까지 부유 배양하였다. 부유 배양 개시 후 20일째부터 85일째까지의 동안, 2 내지 4일에 1회, Retina 배지로 절반량 정도를 배지 교환하였다.

[0165] 이와 같이 하여 얻어진 부유 배양 개시 후 85일째의 세포 응집체에 대하여, 도립 현미경(니콘사제, ECLIPSE Ti)으로 명시야상(위상차상)을 관찰한바, 세포 응집체가 입체의 신경 조직을 포함하고 있고, 그의 일부가 연속 상피 구조를 포함하고 있음을 확인할 수 있었다.

[0166] 검토한 보존액은 이하의 3종류였다(표 2 내지 표 4 참조).

[0167] ·Retina 배지: DMEM/F12 배지에, 10% 소 태아 혈청, 1% N2 보충제, 0.5μM 레티노산 및 100μM 타우린이 첨가된 배지

[0168] ·행크 평형 염 용액(Hank's balanced salt solution)(Gibco사제, 이하 「HBSS」라고 칭함)

[0169] ·Optisol-GS(등록 상표)(Bausch and Lomb사제, 이하 「Optisol」 또는 「옵티졸」이라고 칭함)

표 2

DMEM／F12 배지의 성분

무기 염류(농도)	(mg/L)	(mM)
염화칼슘 ($CaCl_2$) (무수화물)	117	1.05
황산구리($CuSO_4$-$5H_2O$)	0.0013	0.0000052
질산철 ($Fe(NO_3)_3$ $9H_2O$)	0.05	0.000124
황산철 ($FeSO_4$-$7H_2O$)	0.417	0.0015
염화마그네슘 ($MgCl_2$) (무수화물)	28.6	0.301
황산마그네슘 ($MgSO_4$) (무수화물)	48.8	0.407
염화칼륨 (KCl)	311	4.16
탄산수소나트륨 ($NaHCO_3$)	2438	29.0
염화나트륨 (NaCl)	7000	121
인산수소이나트륨 (Na_2HPO_4)(무수화물)	71.02	0.500
인산이수소나트륨 (NaH_2PO_4-H_2O)	62.5	0.453
황산아연 ($ZnSO_4$-$7H_2O$)	0.432	0.00150

상기 이외에 함유되는 성분

아미노산, 비타민류, 글루코오스, 히포크산틴나트륨, 리놀렌산, 리포산, 페놀 레드, 푸트레신이염산염, 피루브산나트륨, 티미딘

(Thermo Fisher Scientific 사 웹 페이지에서 발췌: https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/technical-resources/media-formulation.58.html)

[0170]

표 3

HBSS의 성분

무기 염류(농도)	(mg/L)	(mM)
염화칼륨 (KCl)	400	5.33
인산이수소칼륨 (KH_2PO_4)	60	0.441
탄산수소나트륨 ($NaHCO_3$)	350	4.17
염화나트륨 (NaCl)	8000	138
인산수소이나트륨 (Na_2HPO_4) (무수화물)	48	0.338

상기 이외에 함유되는 성분

글루코오스

(Thermo Fisher Scientific 사 웹 페이지에서 발췌: https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/technical-resources/media-formulation.156.html)

[0171]

표 4

Optisol 의 성분

무기 염류
염화칼슘 ($CaCl_2$)(무수화물)
질산철 $Fe(NO_3)_3\ 9H_2O$
염화칼륨 (KCl)
황산마그네슘 ($MgSO_4$)
염화나트륨 (NaCl)
탄산수소나트륨 ($NaHCO_3$)
인산이수소나트륨 ($NaH_2PO_4\ H_2O$)

상기 이외에 함유되는 주된 성분
아미노산류, 비타민류, 아데닌황산염, 콜레스테롤, 글루코오스, 페놀 레드, 피루브산나트륨, 2-머캅토에탄올, 콘드로이틴황산, 겐타마이신, 스트렙토마이신, 덱스트란 등

(American journal of ophthalmology, 114, 345-356, (1992), Bausch and Lomb 사제 Optisol GS 안전성 정보 시트에서 발췌)

[0172]

[0173] 검토한 보존 온도는, 이하의 3점이었다.

[0174] ·37℃(인큐베이터, 5% CO_2 조건, 파나소닉사제)

[0175] ·17℃(인큐베이터, 5% CO_2 조건, 아스텍사제)

[0176] ·4℃(냉장고, 밀봉 조건, 파나소닉사제)

[0177] 검토한 보존 용기는, 모두 60mm 저접착 플레이트(저접착 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)였다.

[0178] 구체적으로 검토한 것은, 하기의 보존 조건 A 내지 I였다.

[0179] ·보존 조건 A(통상의 배양 조건). 보존액이 Retina 배지, 보존 온도가 37℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0180] ·보존 조건 B. 보존액이 Retina 배지, 보존 온도가 17℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0181] ·보존 조건 C. 보존액이 Retina 배지, 보존 온도가 4℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(밀봉)

[0182] ·보존 조건 D. 보존액이 HBSS, 보존 온도가 37℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0183] ·보존 조건 E. 보존액이 HBSS, 보존 온도가 17℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0184] ·보존 조건 F. 보존액이 HBSS, 보존 온도가 4℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(밀봉)

[0185] ·보존 조건 G. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 37℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0186] ·보존 조건 H. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 17℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0187] ·보존 조건 I. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 4℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(밀봉)

[0188] 상기 부유 배양 개시 후 85일째의 세포 응집체를 사용하여, 이상의 보존 조건 A 내지 I에서 48시간 보존하였다. 보존 직후(부유 배양 개시 후 87일째)의 세포 응집체를 도립 현미경(니콘사제, ECLIPSE Ti)으로 명시야상(위상차상)을 관찰하였다.

[0189] 그 결과, 보존 조건 A, B, E, F, G, H의 보존 직후의 세포 응집체에서는, 대부분의 세포 응집체에서 입체 조직의 형태가 유지되었다. 보존 조건 D, I에서는, 입체 조직의 형태가 유지되는 세포 응집체가 있기는 하였지만, 형태가 무너진 응집체가 많았다. 한편, 보존 조건 C에서는, 거의 모든 세포 응집체에서 입체 조직의 형태가 크게 무너졌다.

[0190] 이어서, 보존 후의 세포 응집체에 포함되는 세포가, 정상적으로 배양되는지, 및 분화 세포가 세포사를 일으키는 등의 이상이 일어나지 않는지를 검증하기 위해, 회복 배양 조작을 행하였다. 구체적으로는, 보존 조건 A 내지 I에서 48시간 보존 후의 세포 응집체를, Retina 배지 중에서, 저접착 플레이트를 사용하여, 인큐베이터 내에서 37℃, 5% CO_2의 조건 하에서, 부유 배양을 행하였다(회복 배양).

[0191] 얻어진 회복 배양 후의 세포 응집체에 대하여, 도립 현미경(니콘사제, ECLIPSE Ti)으로 명시야상(위상차상)을 관찰하였다(도 1).

[0192] 그 결과, 보존 조건 A, B, E, F, G, H의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 층 구조를 가진 연속 상피 구조를 갖는 신경 조직이, 대부분의 세포 응집체에서 관찰되었다. 보존 조건 D, I에서는, 층 구조를 가진 연속 상피 구조를 갖는 신경 조직이 관찰된 세포 응집체가 있기는 하였지만, 약 7할의 세포 응집체이며, 도 1에 도시하는 바와 같이 세포 응집체(입체 망막)의 형태가 무너져 있었다. 평균적으로는 도 1에 있어서의 D, I의 형태를 나타내었다. 한편, 보존 조건 C에서는, 도 1에 있어서의 C로 도시되는 바와 같이, 거의 모든 세포 응집체에 있어서 입체 조직의 형태가 크게 무너지는 경향이 있었다.

[0193] 얻어진 회복 배양 후의 세포 응집체를, 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 동결 절편을 작성하였다. 이들 동결 절편에 관하여, 망막 조직 마커 중 하나인 Chx10(항Chx10 항체, Exalpha사, 양), 및 시세포 전구 세포의 마커 중 하나인 Crx(항Crx 항체, Takara사, 토끼)에 대하여 면역 염색을 행하였다. DAPI로 세포핵을 염색하였다. 이들 염색된 절편을, 형광 현미경(Keyence사제)을 사용하여 관찰하고, 면역 염색상을 취득하였다(도 2 및 도 3).

[0194] 그리고, 면역 염색상을 형태적으로 해석하였다. 즉 Crx 양성의 시세포 전구 세포가 표층에 층상으로 존재하며, 또한 그의 내측에 Chx10 양성의 신경 망막 전구 세포가 층상으로 존재한다고 하는 특징을 갖는 신경 망막 조직이 있는지 조사하였다. 또한, 상기 신경 망막 조직이 응집체의 외주에 접선 방향으로 100㎛ 이상 연속되는, 연속 상피 구조를 형성하고 있는지를 조사하였다(이하, 「신경 망막 조직의 연속 상피 구조」라고 칭함).

[0195] 그 결과, 보존 조건 A, B, E, F, G, H의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 신경 망막 조직의 연속 상피 구조가 대부분의 세포 응집체에서 존재함을 알 수 있었다(도 2 및 도 3). 보존 조건 D, I에서도, 신경 망막 조직의 연속 상피 구조가 관찰된 세포 응집체가 있기는 하였지만, 7할 정도의 세포 응집체이며, 도면에 도시하는 바와 같이 입체 망막의 형태가 무너져 있었다. 한편, 보존 조건 C에서는, 대부분의 세포 응집체에 있어서 신경 망막 조직의 연속 상피 구조가 거의 검출되지 않았다.

[0196] 이들 결과로부터, 통상의 배양 조건과 동일한 보존 조건 A와 비교하여, 보존 조건 B, E, F, G, H에서, 세포 응집체가 신경 망막 조직의 연속 상피 구조를 유지한 채, 48시간 보존할 수 있음을 알 수 있었다. 또한, 보존 조건 D, I에서도, 신경 망막 조직의 연속 상피 구조를 부분적으로 유지할 수 있음을 알 수 있었다.

[0197] 그리고, 보존 조건 B, E, H, 즉 보존 온도가 17℃인 조건에서, 여러 가지 보존액에서, 안정하게 보존할 수 있음을 알 수 있었다.

[0198] 실시예 2: 인간 ES 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를, 여러 가지 보존 조건 하에서 보존한 예(보존 온도 및 보존액의 스크리닝 실험)

[0199] Crx::Venus 녹인 인간 ES 세포(KhES-1 유래; Nakano, T. et al. Cell Stem Cell 2012, 10(6), 771-785; 교토대학에서 입수, 리켄 CDB에서 수립하여 사용)를, 실시예 1 기재의 방법으로, StemFit 배지에서, 서브컨플루언트 1일 전이 될 때까지 피더 프리 조건 하에서 배양하였다. 당해 서브컨플루언트 1일 전의 인간 ES 세포를, SB431542(5μM) 및 SAG(300nM)의 존재 하, 1일간 피더 프리 배양하였다(사전조건화 처리).

[0200] 사전조건화 처리된 인간 ES 세포를, TrypLE Select(Life Technologies사제)를 사용하여 세포 분산액 처리하고, 추가로 피펫팅 조작에 의해 단일 세포에 분산하였다. 그 후, 상기 단일 세포에 분산된 인간 iPS 세포를 비세포 접착성의 96구멍 배양 플레이트(PrimeSurface 96V 바닥 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)의 1웰당 1.2×10^4 세포가 되도록 100㎕의 무혈청 배지에 부유시키고, 37℃, 5% CO_2에서 부유 배양하였다(부유 배양 개시 후 0일째). 그때의 무혈청 배지(gfCDM+KSR)에는, F-12 배지와 IMDM 배지의 1:1 혼합액에 10% KSR, 450μM 1-모노티오글리세롤, 1×화학적으로 규정된 지질 농축물을 첨가한 무혈청 배지를 사용하였다.

[0201] 부유 배양 개시 시(부유 배양 개시 후 0일째)에, 상기 무혈청 배지에 Y27632(최종 농도 20μM) 및 SAG(30nM)를 첨가하였다. 부유 배양 개시 후 3일째에, Y27632 및 SAG를 포함하지 않고, 인간 재조합 BMP4(상품명:

Recombinant Human BMP-4, R&D사제)를 포함하는 배지를, 인간 재조합 BMP4의, 최종 농도가 1.5nM(55ng/ml))이 되도록 50μL 첨가하였다.

[0202] 이와 같이 하여 조제된 세포를 부유 배양 개시 후 6일째에, 배지를 60μL 제거하고, 새롭게 90μL 배지를 첨가하였다. 부유 배양 개시 후 9, 12 및 15일째에 배지를 85μL 제거하고, 새롭게 90μL의 배지를 첨가하여, 부유 배양 개시 후 18일째까지 배양하였다.

[0203] 당해 부유 배양 개시 후 18일째의 응집체를, CHIR99021(3μM) 및 SU5402(5μM)를 포함하는 무혈청 배지(DMEM/F12 배지에, 1% N2 보충제가 첨가된 배지)에서 3일간 즉 부유 배양 개시 후 21일째까지 배양하였다.

[0204] 얻어진 부유 배양 개시 후 21일째의 세포 응집체를, 하기의 배양액에 대해서는 하기 [1], [2] 및 [3]에 나타낸 혈청 배지를 사용하여, 5% CO_2 조건 하에서, 부유 배양 개시 후 80일째까지 배양하였다.

[0205] [1] 부유 배양 개시 후 21일째부터 40일째까지: DMEM/F12 배지에, 10% 소 태아 혈청, 1% N2 보충제 및 100μM 타우린이 첨가된 배지(이하 「A 배지」라고 함).

[0206] [2] 부유 배양 개시 후 40일째부터 60일째까지: A 배지와, 뉴로베이슬 배지(표 5를 참조)에, 10% 소 태아 혈청, 2% B27 보충제, 200mM 글루타민 및 100μM 타우린이 첨가된 배지(이하 「B 배지」라고 함)를 1:3의 비율로 혼합한 배지.

[0207] [3] 부유 배양 개시 후 60일째 이후: B 배지.

[0208] 얻어진 부유 배양 개시 후 80일째의 세포 응집체를, 도립 현미경(EVOS, Thermo Fisher Scientific사제)으로 관찰한바, 신경 조직의 연속 상피 구조를 포함하고 있었다. 부유 배양 개시 후 80일째의 세포 응집체를 사용하여, 보존 조건의 검토를 행하였다.

[0209] 검토한 보존액은 이하의 4종류였다.

[0210] ·상기 B 배지

[0211] ·HBSS(실시예 1 기재)

[0212] ·옵티졸(실시예 1 기재)

[0213] ·University of Wisconsin액(상품명 비아스판, 아스텔라스 세이야쿠에서 판매, 이하 「UW액」이라고 칭함. 표 6을 참조)

표 5

뉴로베이슬 배지의 성분

무기 염류(농도)	(mg/L)	(mM)
염화칼슘 ($CaCl_2$)(무수화물)	200	1.80
질산철 $Fe(NO_3)_3\ 9H_2O$	0.1	0.000248
염화마그네슘 ($MgCl_2$) (무수화물)	77.3	0.814
염화칼륨 (KCl)	400	5.33
탄산수소나트륨 ($NaHCO_3$)	2200	26.2
염화나트륨 (NaCl)	3000	51.7
인산이수소나트륨 ($NaH_2PO_4\ H_2O$)	125	0.906
황산아연 ($ZnSO_4$-$7H_2O$)	0.194	0.000674

상기 이외에 함유되는 성분

아미노산, 비타민류, 글루코오스, HEPES, 페놀 레드, 피루브산나트륨

(Thermo Fisher Scientific사 웹 페이지에서 발췌:
https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/technical-resources/media-formulation.251.html)

[0214]

표 6

UW액의 성분

무기 이온류(농도)	(mM)
나트륨 (Na)	30
칼륨 (K)	120
마그네슘 (Mg)	5
황산 이온	5
인산 이온	25
락토비온산 이온	100
상기 이외에 함유되는 성분	
라피노오스, 히드록실에틸전분, 글루타티온	

(논문에서 발췌: World J Transplant. 2015 Dec 24; 5(4): 154-164.)

[0215]

[0216] 검토한 보존 온도는, 이하의 3점이었다.

[0217] ·37℃(인큐베이터, 5% CO_2 조건, 파나소닉사제)

[0218] ·17℃(인큐베이터, 5% CO_2 조건, 아스텍사제)

[0219] ·4℃(냉장고, 밀봉 조건, 파나소닉사제)

[0220] 검토한 보존 용기는, 모두 60mm 저접착 플레이트(저접착 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)였다.

[0221] 구체적으로 검토한 것은, 하기의 보존 조건 A 내지 H였다.

[0222] ·보존 조건 A(통상의 배양 조건). 보존액이 B 배지, 보존 온도가 37℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0223] ·보존 조건 B. 보존액이 B 배지, 보존 온도가 17℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0224] ·보존 조건 C. 보존액이 HBSS, 보존 온도가 17℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0225] ·보존 조건 D. 보존액이 HBSS, 보존 온도가 4℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(밀봉)

[0226] ·보존 조건 E. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 17℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0227] ·보존 조건 F. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 4℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(밀봉)

[0228] ·보존 조건 G. 보존액이 UW액, 보존 온도가 17℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0229] ·보존 조건 H. 보존액이 UW액, 보존 온도가 4℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(밀봉)

[0230] 상기 부유 배양 개시 후 80일째의 세포 응집체를 사용하여, 이상의 보존 조건 A 내지 H에서 48시간 보존하였다. 보존 직후의 세포 응집체를 도립 현미경(니콘사제, ECLIPSE Ti)으로 명시야상(위상차상)을 관찰하였다.

[0231] 그 결과, 보존 조건 A(통상의 배양 조건)와, 보존 조건 B, C, E의 보존 직후의 세포 응집체에서는, 대부분의 세포 응집체에서 입체 조직의 형태가 유지되었다. 보존 조건 D, F에서는, 입체 조직의 형태가 유지되는 세포 응집체가 있기는 하였지만, 형태가 무너진 세포 응집체가 많았다. 한편, UW액을 사용한 보존 조건 G, H에서는, 거의 모든 세포 응집체에서 입체 조직의 형태가 크게 무너졌다.

[0232] 이어서, 보존 조건 A 내지 H에서 보존한 후의 세포 응집체를, B 배지 중에서, 저접착 플레이트를 사용하여, 인큐베이터 내에서 37℃, 5% CO_2의 조건 하에서, 부유 배양을 행하였다(회복 배양).

[0233] 얻어진 회복 배양 후의 세포 응집체를, 도립 현미경(니콘사제, ECLIPSE Ti)으로 명시야상(위상차상)을 관찰하였

다(도 4).

[0234] 그 결과, 보존 조건 A(통상의 배양 조건)와, 보존 조건 B, C, E의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 층 구조를 가진 연속 상피 구조를 갖는 신경 조직이 높은 빈도로 관찰되었다. 보존 조건 D, F에서는, 층 구조를 가진 연속 상피 구조를 갖는 신경 조직이 일부의 세포 응집체에서 관찰되었다. 한편, UW액을 사용한 보존 조건 G, H에서는, 대부분의 세포 응집체에서 입체 조직의 형태가 크게 무너지는 경향이 있었다.

[0235] 얻어진 회복 배양 후의 세포 응집체를, 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 동결 절편을 작성하였다. 이들 동결 절편에 관하여, 망막 조직 마커 중 하나인 Chx10(항Chx10 항체, Exalpha사, 양), 및 시세포 전구 세포의 마커 중 하나인 Crx(항Crx 항체, Takara사, 토끼)에 대하여 면역 염색을 행하였다. DAPI로 세포핵을 염색하였다. 이들 염색된 절편을, 형광 현미경(Keyence사제)을 사용하여 관찰하고, 면역 염색상을 취득하였다(도 5 및 도 6). 또한, 신경 망막 조직의 연속 상피 구조가 형성되어 있는지를 실시예 1 기재의 방법으로 조사하였다.

[0236] 그 결과, 보존 조건 A(통상의 배양 조건)와, 보존 조건 B, C, E의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 층 구조를 가진 연속 상피 구조를 갖는 신경 조직이, 대부분의 세포 응집체에서 관찰되었다. 보존 조건 D, F에서는, 층 구조를 가진 연속 상피 구조를 갖는 신경 조직이 관찰된 세포 응집체가 있기는 하였지만, 약 7할의 세포 응집체이며, 도 5 및 도 6에 도시하는 바와 같이 로제트 구조가 많이 형성되고, 세포 응집체(입체 망막)의 형태가 무너져 있었다. 평균적으로는, 도 5 및 도 6에 있어서의 D, I의 형태를 나타내었다. 한편, UW액을 사용한 보존 조건 G, H에서는, 도 5 및 도 6에 있어서의 G, H로 도시되는 바와 같이, 거의 모든 세포 응집체에 있어서, 입체 망막의 형태가 크게 무너지는 경향이 있었다.

[0237] 이들 결과로부터, 통상의 배양 조건과 동일한 보존 조건 A와 비교하여, 보존 조건 B, C, E, 즉 보존 온도가 17℃인 조건에서는, 여러 가지 보존액을 사용하여, 세포 응집체가 신경 망막 조직의 연속 상피 구조를 유지한 채, 48시간 보존할 수 있음을 알 수 있었다.

[0238] 한편, 보존액으로서 UW액을 사용한 보존 조건 G, H에서는, 신경 망막 조직의 연속 상피 구조가 거의 유지되지 않음을 알 수 있었다.

[0239] 실시예 3: 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를, 보존액으로서 옵티졸을 사용하여 17℃에서 보존한 예

[0240] 인간 iPS 세포(1231A3주, 교토 대학에서 입수)를, 실시예 1 기재의 방법으로, 피더 프리 배양하고, 분화 유도하여, 부유 배양 개시 후 20일째의 세포 응집체를 제작하였다.

[0241] 얻어진 부유 배양 개시 후 20일째의 세포 응집체를, 실시예 2 기재의 방법으로, 혈청 배지 [1], [2] 및 [3]을 사용하여, 부유 배양 개시 후 97일째까지 배양하였다. 얻어진 부유 배양 개시 후 97일째의 세포 응집체를, 도립 현미경(EVOS, Thermo Fisher Scientific사제)으로 관찰한바, 신경 조직의 연속 상피 구조를 포함하고 있었다.

[0242] 부유 배양 개시 후 97일째의 세포 응집체를, 하기 보존 조건 A 내지 C에서 보존하였다.

[0243] ·보존 조건 A. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 17℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2), 보존 기간이 48시간

[0244] ·보존 조건 B. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 17℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2), 보존 기간이 72시간

[0245] ·보존 조건 C. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 17℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2), 보존 기간이 120시간

[0246] 보존 조건 A 내지 C에서 보존한 세포 응집체를, 실시예 2 기재의 방법으로, B 배지를 사용하여 7일간 회복 배양하였다.

[0247] 얻어진 회복 배양 후의 세포 응집체를, 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 동결 절편을 작성하였다. 이들 동결 절편에 관하여, 망막 조직 마커 중 하나인 Chx10(항Chx10 항체, Exalpha사, 양), 시세포 전구 세포의 마커 중 하나인 Crx(항Crx 항체, Takara사, 토끼), 시세포 마커 중 하나인 리커버린(항리커버린 항체, Proteintech사, 토끼), 망막 조직의 마커 중 하나인 Rx(항Rx 항체, Takara사, 모르모트), 증식 중인 세포의 마커 중 하나인 Ki67(항Ki67 항체, BD사, 마우스)에 대하여 면역 염색을 행하였다. DAPI로 세포핵을 염색하였다. 이들 염색된

절편을, 형광 현미경(Keyence사제)을 사용하여 관찰하고, 면역 염색상을 취득하였다(도 7 및 도 8). 그리고, 신경 조직의 연속 상피 구조가 존재하는지를 조사하였다.

[0248] 그 결과, 보존 조건 A 내지 C의 어느 조건에서 보존한 세포 응집체에서도, 신경 조직의 연속 상피 구조가 높은 빈도로 존재함을 알 수 있었다. 그리고, 보존 조건 A 내지 C의 어느 신경 조직의 연속 상피 구조에 있어서도, 표면(apical면측)에 Crx 양성의 시세포 전구 세포, 그의 내측에 Chx10 양성의 신경 망막 전구 세포가 존재함을 알 수 있었다. 연속 절편의 해석으로부터, Chx10 양성 세포층과 Ki67 양성 세포층은 겹침을 알 수 있었다. 또한, A 내지 C의 어느 신경 조직의 연속 상피 구조에 있어서도, 표면(apical면측)에 리커버린 양성의 시세포가 존재함을 알 수 있었다.

[0249] 이들 결과로부터, 보존 온도가 17℃인 조건에서, 보존 기간이 48시간, 72시간, 120시간의 어느 보존 조건에서도, 응집체의 표면(apical면측)에 Crx 양성의 시세포 전구 세포 및 리커버린 양성의 시세포를 모두 포함하는 시세포층이 존재하고, 그의 내측에 Chx10 양성의 신경 망막 전구 세포 및 Ki67 양성의 증식 세포를 모두 포함하는 신경 망막 전구 세포층이 존재하고, 또한 그의 내측에 Crx 양성의 시세포가 기저측에 존재하는 특징을 갖는, 신경 조직의 연속 상피 구조가 유지됨이 실증되었다.

[0250] 실시예 4: 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를, 5% CO_2 존재 하 혹은 비존재 하에서 보존한 예

[0251] 인간 iPS 세포(1231A3주, 교토 대학에서 입수)를, 실시예 1 기재의 방법으로 피더 프리 배양하였다. 피더 프리 배지로서는 StemFit 배지(AK03N, 아지노모토사제), 피더 프리 기반에는 Laminin 511-E8(닛삐사제)을 사용하였다.

[0252] 분화 유도 조작으로서는, 인간 iPS 세포(1231A3주)를, StemFit 배지를 사용하여, 서브컨플루언트 1일 전(배양 면적의 5할이 세포로 덮일 정도)이 될 때까지 피더 프리 배양하였다. 당해 서브컨플루언트 1일 전의 인간 iPS 세포를, SB431542(5μM) 및 SAG(300nM)의 존재 하, 1일간 피더 프리 배양하였다(사전조건화 처리).

[0253] 사전조건화 처리한 인간 iPS 세포를, TrypLE Select(Life Technologies사제)를 사용하여 세포 분산액 처리하고, 추가로 피펫팅 조작에 의해 단일 세포에 분산하였다. 그 후, 상기 단일 세포에 분산된 인간 iPS 세포를 비세포 접착성의 96구멍 배양 플레이트(PrimeSurface 96V 바닥 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)의 1웰당 1.3×10^4 세포가 되도록 100㎕의 무혈청 배지에 부유시키고, 37℃, 5% CO_2에서 부유 배양하였다. 그때의 무혈청 배지(gfCDM+KSR)에는, F-12 배지와 IMDM 배지의 1:1 혼합액에 10% KSR, 450μM 1-모노티오글리세롤, 1×화학적으로 규정된 지질 농축물을 첨가한 무혈청 배지를 사용하였다. 부유 배양 개시 시(부유 배양 개시 후 0일째)에, 무혈청 배지에 IWR-1e(최종 농도 3μM), Y27632(최종 농도 20μM) 및 SAG(최종 농도 30nM)를 첨가하였다. 부유 배양 개시 후 3일째에, Y27632 및 SAG를 포함하지 않고, IWR-1e 및 인간 재조합 BMP4(R&D사제)를 포함하는 배지에서, 외래성 인간 재조합 BMP4의 최종 농도가 1.5nM(55ng/ml)이 되고, 또한 IWR-1e의 최종 농도가 3μM이 되도록 새로운 상기 무혈청 배지를 50㎕ 첨가하였다.

[0254] 3일 후(부유 배양 개시 6일 후)에, 배양기 중의 배지를 60㎕ 폐기하고, Y27632 및 인간 재조합 BMP4를 포함하지 않고, IWR-1e(최종 농도 3μM)를 포함하는 상기 무혈청 배지를 90㎕ 첨가하였다(배지량은 합계 180㎕).

[0255] 4일 후(부유 배양 개시 후 10일째)에, 외래성 IWR-1e의 농도가 배지 교환 전에 비하여 10% 이하가 되도록, IWR-1e, Y27632 및 인간 재조합 BMP4를 포함하지 않는 상기 무혈청 배지를 사용하여 67% 배지 교환 조작을 2회 행하였다. 그 후, 2 내지 4일에 1회, Y27632, 인간 재조합 BMP4 및 IWR-1e를 포함하지 않는 상기 무혈청 배지로 절반량 배지 교환하였다. 절반량 배지 교환 조작으로서는, 배양기 중의 배지를 체적의 절반량 즉 90㎕ 폐기하고, 새로운 상기 무혈청 배지를 90㎕ 첨가하였다(배지량은 합계 180㎕).

[0256] 이와 같이 하여 얻어진 부유 배양 개시 후 22일째의 세포 응집체를, CHIR99021(3μM) 및 SU5402(5μM)를 포함하는 무혈청 배지(DMEM/F12 배지에, 1% N2 보충제가 첨가된 배지)에서 3일간, 부유 배양 개시 후 25일째까지 배양하였다.

[0257] 얻어진 부유 배양 개시 후 25일째의 세포 응집체를, 실시예 2 기재의 방법으로, 혈청 배지 [1], [2] 및 [3]을 사용하여, 부유 배양 개시 후 66일째까지 배양하였다. 부유 배양 개시 후 66일째의 세포 응집체를, 도립 현미경(EVOS, Thermo Fisher Scientific사제)으로 관찰한바, 신경 조직의 연속 상피 구조를 포함하고 있었다.

[0258] 얻어진 부유 배양 개시 후 66일째의 세포 응집체를 사용하여, 보존 조건의 검토를 행하였다.

[0259] 검토한 보존액은, 모두 옵티졸(실시예 1 기재)이었다.

[0260] 검토한 보존 온도 및 주변 조건은, 이하의 2점이었다.

[0261] ·17℃: 인큐베이터(5% CO_2 조건, 아스텍사제)

[0262] ·17℃: 원심기(대기압, 밀봉 조건, 히타치사제)

[0263] 검토한 보존 용기는, 이하의 2점이었다.

[0264] ·60mm 저접착 플레이트(저접착 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)

[0265] ·2.0mL 크라이오 바이알(Thermo Fisher Scientific사제)

[0266] 구체적으로 검토한 것은, 하기의 보존 조건 A, B였다.

[0267] ·보존 조건 A. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 17℃(인큐베이터), 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0268] ·보존 조건 B. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 17℃(원심기, 히타치사제), 보존 용기가 2.0mL 크라이오 바이알(대기압에서 밀봉). 당해 조건에서는, 원심기는 온도 관리를 할 목적으로, 원심하지 않고 사용하였다. 보존 기간 중, 원심기 내의 온도가 16.2 내지 17.8℃로 유지되어 있었음을 온도 로거를 사용하여 측정함으로써 확인하였다.

[0269] 상기 부유 배양 개시 후 66일째의 세포 응집체를 사용하여, 이상의 보존 조건 A, B에서 72시간 보존하였다. 보존 직후의 세포 응집체를 도립 현미경(니콘사제, ECLIPSE Ti)으로 명시야상(위상차상)을 관찰하였다(도 9, 상단).

[0270] 그 결과, 보존 조건 A와 보존 조건 B의 보존 직후의 세포 응집체에서는, 입체 조직의 형태가 동등한 빈도로 유지되는 경향이 있었다.

[0271] 이어서, 보존 조건 A, B에서 보존한 후의 세포 응집체를, 실시예 2 기재의 B 배지 중에서, 비세포 접착성의 96구멍 배양 플레이트(PrimeSurface 96U 바닥 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)를 사용하여, 인큐베이터 내에서 37℃, 5% CO_2의 조건 하에서, 부유 배양을 행하였다(회복 배양).

[0272] 회복 배양 개시 7일 후의 세포 응집체를, 도립 현미경(니콘사제, ECLIPSE Ti)으로 명시야상(위상차상)을 관찰하였다(도 9, 하단).

[0273] 그 결과, 보존 조건 A와 보존 조건 B의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 층 구조를 가진 연속 상피가 높은 빈도로 관찰되었다. 또한 도립 현미경(니콘사제, ECLIPSE Ti)을 사용하여, 호프만 간섭상에서의 현미경 검사를 행한 결과, 보존 조건 A 및 보존 조건 B의 어느 조건에서도, 층 구조를 가진 연속 상피를 갖는 신경 망막 조직이 높은 빈도로 존재함을 확인할 수 있었다.

[0274] 이들 결과로부터, 대기 중에서 밀전 보존한 보존 조건 B에서는, 5% CO_2의 보존 조건 A와 비교하여 실질적으로 차이가 없는 수준으로, 입체의 신경 조직을, 연속 상피 구조를 유지한 채, 72시간 보존할 수 있음을 알 수 있었다.

[0275] 실시예 5: 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를, 보존액으로서 옵티졸을 사용하여, 17℃에서 보존한 후, 생세포율을 측정한 예

[0276] 인간 iPS 세포(1231A3주, 교토 대학에서 입수)를, 실시예 1 기재의 방법으로, 피더 프리 배양하고, 분화 유도하여, 부유 배양 개시 후 20일째의 세포 응집체를 제작하였다.

[0277] 얻어진 부유 배양 개시 후 20일째의 세포 응집체를, 실시예 2 기재의 방법으로, 혈청 배지 [1], [2] 및 [3]을 사용하여, 부유 배양 개시 후 91일째까지 배양하였다. 그 후, 이하의 조건 A(보존 없음), 조건 B(보존 있음)에서 조제하였다.

[0278] ·조건 A(보존 없음): 부유 배양 개시 후 91일째의 세포 응집체를 2개, 배지로서 B 배지를 사용하여, 37℃, 5% CO_2에서 72시간 배양하였다.

[0279] ·조건 B(보존 있음): 부유 배양 개시 후 91일째의 세포 응집체를 2개, 보존액으로서 옵티졸을 사용하고, 보존 장치로서 17℃ 인큐베이터(와켄 비테크사제)를 사용하여, 17℃, 대기압(밀봉) 조건에서, 72시간 보존하였다.

[0280] 이와 같이 하여 조제한 조건 A(보존 없음) 및 조건 B(보존 있음)의 세포 응집체를 각각 신경 세포 분산액(파파인계, 와코 쥰야쿠사제)을 사용하여 분산하고, 세포 현탁액을 조제하였다. 또한, 얻어진 세포 현탁액을 뉴클레오카운터(ChemoMetec사제)로 생세포율을 측정하였다(도 10).

[0281] 그 결과, 조건 A(보존 없음)의 세포 응집체 2개의 생세포율은 99.8%와 99.1%였다. 한편, 조건 B(보존 있음)의 세포 응집체 2개의 생세포율은 99.3%와 98.2%였다. 즉, 보존 후의 응집체라도 생세포율이 98% 이상으로 매우 높은 생세포율로서, 보존의 유무로 생세포율에 실질적인 차이가 없음을 알 수 있었다.

[0282] 이들 결과로부터, 신경 조직을 보존한 조건이라도, 신경 조직을 보존하지 않은 조건과 비교하여, 생세포율에 실질적으로 차이가 없음이 실증되었다.

[0283] 실시예 6: 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를 사용한, 보존 온도의 검토예 (1)

[0284] 인간 iPS 세포(1231A3주, 교토 대학에서 입수)를, 실시예 4 기재의 방법으로, 피더 프리 배양하고, 사전조건화 처리하고, 분화 유도하고, CHIR99021 및 SU5402를 작용시켜, 「부유 배양 개시 후 25일째의 세포 응집체」를 제작하였다.

[0285] 얻어진 부유 배양 개시 후 25일째의 세포 응집체를, 실시예 2 기재의 혈청 배지 [1], [2] 및 [3]을 사용하여, 5% CO_2 조건 하에서, 부유 배양 개시 후 73일째까지 배양하였다. 부유 배양 개시 후 73일째의 세포 응집체를, 도립 현미경(EVOS, Thermo Fisher Scientific사제)으로 관찰한바, 신경 조직의 연속 상피 구조를 포함하고 있었다.

[0286] 얻어진 부유 배양 개시 후 73일째의 세포 응집체를 사용하여, 보존 조건의 검토를 행하였다.

[0287] 검토한 보존액은, 모두 옵티졸(실시예 1 기재)이었다.

[0288] 검토한 보존 온도는, 이하의 5점이었다.

[0289] ·4℃: 냉장고(밀봉, 파나소닉사제)

[0290] ·8℃: 원심기(밀봉, 히타치사제)

[0291] ·17℃: 원심기(밀봉, 히타치사제)

[0292] ·30℃: 항온조(밀봉, 애즈원사제)

[0293] ·37℃: 인큐베이터(밀봉 또는 5% CO_2, 파나소닉사제)

[0294] 검토한 보존 용기는, 이하의 2점이었다.

[0295] ·60mm 저접착 플레이트(저접착 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)

[0296] ·2.0mL 크라이오 바이알(Thermo Fisher Scientific사제)

[0297] 구체적으로 검토한 것은, 하기의 보존 조건 A 내지 F였다.

[0298] ·보존 조건 A(통상의 배양 조건). 보존액이 B 배지, 보존 온도가 37℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0299] ·보존 조건 B. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 4℃, 보존 용기가 2.0mL 크라이오 바이알(밀봉)

[0300] ·보존 조건 C. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 8℃, 보존 용기가 2.0mL 크라이오 바이알(밀봉)

[0301] ·보존 조건 D. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 17℃, 보존 용기가 2.0mL 크라이오 바이알(밀봉)

[0302] ·보존 조건 E. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 30℃, 보존 용기가 2.0mL 크라이오 바이알(밀봉)

[0303] ·보존 조건 F. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 37℃, 보존 용기가 2.0mL 크라이오 바이알(밀봉)

[0304] 상기 부유 배양 개시 후 73일째의 세포 응집체를 사용하여, 이상의 보존 조건 A 내지 F에서 72시간 보존하였다. 보존 직후의 세포 응집체를 도립 현미경(니콘사제, ECLIPSE Ti)으로 명시야상(위상차상)을 관찰하였다(도 11, 상단).

[0305] 그 결과, 보존 조건 A(통상의 배양 조건)와, 보존 조건 D의 보존 직후의 세포 응집체에서는, 대부분의 세포 응

집체에서 입체 조직의 형태가 유지되었다. 보존 조건 B, C, E에서는, 입체 조직의 형태가 유지되는 세포 응집체가 있기는 하였지만, 형태가 무너진 응집체가 많았다. 한편, 보존 조건 F에서는, 대부분의 세포 응집체에서 입체 조직의 형태가 크게 무너졌다.

[0306] 또한 회복 배양 처리로서, 보존 조건 A 내지 F에서 보존한 후의 세포 응집체를, 실시예 2 기재의 B 배지 중에서, 비세포 접착성의 96구멍 배양 플레이트(PrimeSurface 96U 바닥 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)를 사용하여, 인큐베이터 내에서 37℃, 5% CO_2의 조건에서, 부유 배양을 행하였다(회복 배양).

[0307] 얻어진 회복 배양 후의 세포 응집체를, 도립 현미경(니콘사제, ECLIPSE Ti)으로 명시야상(위상차상)을 관찰하였다(도 11, 중단).

[0308] 그 결과, 보존 조건 A(통상의 배양 조건)와, 보존 조건 D의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 층 구조를 가진 연속 상피 구조를 갖는 신경 조직이, 대부분의 세포 응집체에서 관찰되었다. 보존 조건 B, C, E의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 층 구조를 가진 연속 상피 구조를 갖는 신경 조직이 관찰된 세포 응집체가 있기는 하였지만, 약 5할의 세포 응집체이며, 도면에 도시하는 바와 같이 세포 응집체(입체 망막)의 형태가 무너져 있었다. 평균적으로는 도 11에 있어서의 B, C, E의 형태를 나타내었다. 한편, 보존 조건 F에서는, 도 11에 있어서의 F로 도시되는 바와 같이, 거의 모든 세포 응집체에 있어서 입체 조직의 형태가 크게 무너지는 경향이 있었다.

[0309] 얻어진 회복 배양 후의 세포 응집체를, 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 동결 절편을 작성하였다. 이들 동결 절편에 관하여, 시세포 전구 세포의 마커 중 하나인 Crx(항Crx 항체, Takara사, 토끼)에 대하여 면역 염색을 행하였다. 이들 염색된 절편을, 형광 현미경(Keyence사제)을 사용하여 관찰하고, 면역 염색상을 취득하였다(도 11, 하단). 그리고, 실시예 1 기재의 방법으로, Crx 양성의 시세포 전구 세포가 표층에 층상으로 존재하고, 신경 망막 조직의 연속 상피 구조가 존재하는지를 조사하였다.

[0310] 그 결과, 보존 조건 A(통상의 배양 조건)와, 보존 조건 D의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 신경 망막 조직의 연속 상피 구조가 대부분의 세포 응집체에서 존재함을 알 수 있었다. 한편, 보존 조건 B, C, E에서도, 신경 망막 조직의 연속 상피 구조가 관찰된 세포 응집체가 있기는 하였지만, 약 5할의 세포 응집체이며, 도면에 도시하는 바와 같이 입체 망막의 형태가 무너져 있었다. 또한, 보존 조건 F에서는, 대부분의 세포 응집체에 있어서 Crx 양성의 시세포 전구 세포가 표층에 존재하지 않고, 연속 상피 구조가 없으며, 로제트가 형성되어 있었다.

[0311] 또한 보존 조건 A 내지 E에 있어서의 Crx 양성 세포의 수를 정량하였다. Crx 양성 세포의 수의 정량에는, 각 응집체에 대하여 Crx 양성 세포가 관찰되는 개소를 키엔스 도립 현미경(BZ-X710) 20배 렌즈로 촬상한 화상으로부터, 400×400 픽셀의 크기로 잘라낸 화상을 사용하여, 화상 전체의 양성 세포수를 비교하였다(도 12). 보존 조건 F에 대해서는, Crx 양성의 시세포 전구 세포가 많이 보이기는 하였지만, 이들 세포가 표층에 존재하지 않고, 연속 상피 구조가 없으며, 세포 응집체의 형태도 크게 무너져 있었기 때문에, 조사하지 않았다. 그 결과, 보존 조건 D에서 보존한 세포 응집체에 있어서의 Crx 양성의 시세포 전구 세포의 수는, 보존 조건 A와 비교하여 많았다. 한편, 보존 조건 B, C, E에서 보존한 세포 응집체에 있어서의 Crx 양성의 시세포 전구 세포의 수는, 보존 조건 A와 비교하여 적었다.

[0312] 이들 결과로부터, 보존 조건 D 즉 보존 온도 17℃에서 보존한 세포 응집체에 있어서, 대부분의 세포 응집체에서 입체 조직의 형태가 유지되었다. 한편, 보존 조건 B, C, E 즉 보존 온도 4, 8, 30℃에서 보존한 세포 응집체에 있어서는, 입체 조직의 형태가 유지되는 세포 응집체가 있기는 하였지만, 형태가 무너진 응집체가 많음을 알 수 있었다. 또한, 보존 조건 F 즉 보존 온도가 37℃인 조건에서는, 거의 모든 세포 응집체에서 입체 조직의 형태가 크게 무너졌다.

[0313] 실시예 7: 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를 사용한, 보존 온도의 검토예 (2)

[0314] 인간 iPS 세포(1231A3주, 교토 대학에서 입수)를, 실시예 4 기재의 방법으로, 피더 프리 배양하고, 사전조건화 처리하고, 분화 유도하고, CHIR99021 및 SU5402를 작용시켜, 「부유 배양 개시 후 25일째의 세포 응집체」를 제작하였다.

[0315] 얻어진 부유 배양 개시 후 25일째의 세포 응집체를, 실시예 2 기재의 혈청 배지 [1], [2] 및 [3]을 사용하여, 5 % CO_2 조건 하에서, 부유 배양 개시 후 80일째까지 배양하였다. 부유 배양 개시 후 80일째의 세포 응집체를, 도립 현미경(EVOS, Thermo Fisher Scientific사제)으로 관찰한바, 신경 조직의 연속 상피 구조를 포함하고 있었다.

[0316] 얻어진 부유 배양 개시 후 80일째의 세포 응집체를 사용하여, 보존 조건의 검토를 행하였다.

[0317] 검토한 보존액은, 모두 옵티졸(실시예 1 기재)이었다.

[0318] 검토한 보존 온도는, 이하의 5점이었다.

[0319] ·4℃: 냉장고(밀봉, 파나소닉사제)

[0320] ·12℃: 원심기(밀봉, 히타치사제)

[0321] ·17℃: 원심기(밀봉, 히타치사제)

[0322] ·22℃: 원심기(밀봉, 히타치사제)

[0323] ·37℃: 인큐베이터(밀봉 또는 5% CO_2, 파나소닉사제)

[0324] 검토한 보존 용기는, 이하의 2점이었다.

[0325] ·60mm 저접착 플레이트(저접착 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)

[0326] ·2.0mL 크라이오 바이알(Thermo Fisher Scientific사제)

[0327] 구체적으로 검토한 것은, 하기의 보존 조건 A 내지 F였다.

[0328] ·보존 조건 A(통상의 배양 조건). 보존액이 B 배지, 보존 온도가 37℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0329] ·보존 조건 B. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 4℃, 보존 용기가 2.0mL 크라이오 바이알(밀봉)

[0330] ·보존 조건 C. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 12℃, 보존 용기가 2.0mL 크라이오 바이알(밀봉)

[0331] ·보존 조건 D. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 17℃, 보존 용기가 2.0mL 크라이오 바이알(밀봉)

[0332] ·보존 조건 E. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 22℃, 보존 용기가 2.0mL 크라이오 바이알(밀봉)

[0333] ·보존 조건 F. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 37℃, 보존 용기가 2.0mL 크라이오 바이알(밀봉)

[0334] 상기 부유 배양 개시 후 80일째의 세포 응집체를 사용하여, 이상의 보존 조건 A 내지 F에서 72시간 보존하였다. 보존 직후의 세포 응집체를 도립 현미경(니콘사제, ECLIPSE Ti)으로 명시야상(위상차상)을 관찰하였다(도 13, 상단).

[0335] 그 결과, 보존 조건 A(통상의 배양 조건)와, 보존 조건 C, D, E의 보존 직후의 세포 응집체에서는, 대부분의 세포 응집체에서 입체 조직의 형태가 유지되었다. 보존 조건 B에서는, 입체 조직의 형태가 유지되는 세포 응집체가 있기는 하였지만, 형태가 무너진 응집체가 많았다. 한편, 보존 조건 F에서는, 거의 모든 세포 응집체에서 입체 조직의 형태가 크게 무너졌다.

[0336] 이어서, 보존 조건 A 내지 F에서 보존한 후의 세포 응집체를, 실시예 2 기재의 B 배지 중에서, 비세포 접착성의 96구멍 배양 플레이트(PrimeSurface 96U 바닥 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)를 사용하여, 인큐베이터 내에서 37℃, 5% CO_2의 조건 하에서, 부유 배양을 행하였다(회복 배양).

[0337] 얻어진 회복 배양 후의 세포 응집체를, 도립 현미경(니콘사제, ECLIPSE Ti)으로 명시야상(위상차상)을 관찰하였다(도 13, 중단). 그 결과, 보존 조건 A(통상의 배양 조건)와, 보존 조건 C, D, E의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 층 구조를 가진 연속 상피 구조를 갖는 신경 조직이, 대부분의 세포 응집체에서 관찰되었다. 보존 조건 B의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 층 구조를 가진 연속 상피 구조를 갖는 신경 조직이 관찰된 세포 응집체가 있기는 하였지만, 약 5할의 세포 응집체이며, 도 13에 도시하는 바와 같이 세포 응집체(입체 망막)의 형태가 무너져 있었다. 한편, 보존 조건 F의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 도 13에 있어서의 F로 도시되는 바와 같이, 거의 모든 세포 응집체에 있어서 입체 조직의 형태가 크게 무너지는 경향이 있었다.

[0338] 얻어진 회복 배양 후의 세포 응집체를, 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 동결 절편을 작성하였다. 이들 동결 절편에 관하여, 시세포 전구 세포의 마커 중 하나인 Crx(항Crx 항체, Takara사, 토끼)에 대하여 면역 염색을 행하였다. 이들 염색된 절편을, 형광 현미경(Keyence사제)을 사용하여 관찰하고, 면역 염색상을 취득하였다(도 12, 하단). 그리고, 실시예 1 기재의 방법으로, Crx 양성의 시세포 전구 세포가 표층에 층상으로 존재하고, 신

경 망막 조직의 연속 상피 구조를 형성하고 있는지를 조사하였다.

[0339] 그 결과, 보존 조건 A(통상의 배양 조건)와, 보존 조건 C, D, E의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 신경 망막 조직의 연속 상피 구조가 대부분의 세포 응집체에서 존재함을 알 수 있었다(도 13, 하단). 한편, 보존 조건 B에서도, 신경 망막 조직의 연속 상피 구조가 관찰된 세포 응집체가 있기는 하였지만, 5할 정도의 세포 응집체이며, 도면에 도시하는 바와 같이 입체 망막의 형태가 무너져 있었다. 또한, 보존 조건 F에서는, 대부분의 세포 응집체에 있어서, Crx 양성의 시세포 전구 세포가 표층에 존재하지 않고, 로제트를 형성하고 있었다.

[0340] 또한 보존 조건 A 내지 E에 있어서의 Crx 양성의 시세포 전구 세포의 수를 정량하였다. Crx 양성 세포의 수의 정량에는, 각 응집체에 대하여 Crx 양성 세포가 관찰되는 개소를 키엔스 도립 현미경(BZ-X710) 20배 렌즈로 촬상한 화상으로부터, 400×400 픽셀의 크기로 잘라낸 화상을 사용하여, 화상 전체의 양성 세포수를 비교하였다(도 14). 보존 조건 F에 대해서는, Crx 양성의 시세포 전구 세포가 많이 보이기는 하였지만, 이들 세포가 표층에 존재하지 않고, 세포 응집체의 형태도 크게 무너져 있었기 때문에, 조사하지 않았다. 그 결과, 보존 조건 D, E에서 보존한 세포 응집체에 있어서의 Crx 양성의 시세포 전구 세포의 수는, 보존 조건 A와 비교하여 많았다. 한편, 보존 조건 C에서 보존한 세포 응집체에 있어서의 Crx 양성의 시세포 전구 세포의 수는, 보존 조건 A와 거의 동등하였다. 또한, 보존 조건 B에서 보존한 세포 응집체에 있어서의 Crx 양성의 시세포 전구 세포의 수는, 보존 조건 A와 비교하여 적었다.

[0341] 이들 결과로부터, 보존 조건 D, E 즉 보존 온도 17, 22℃에서 보존한 세포 응집체에 있어서, 층 구조를 가진 연속 상피 구조를 갖는 신경 조직이, 대부분의 세포 응집체에서 관찰되었다. 또한, 보존 조건 C 즉 보존 온도 12℃에서 보존한 세포 응집체에 있어서는, 17, 22℃와 비교하여 거의 동등한 빈도로 연속 상피 구조가 관찰되기는 하지만, 시세포 전구 세포의 수가 17, 22℃와 비교하여 적음을 알 수 있었다. 또한, 보존 조건 B 즉 보존 온도 4℃에서 보존한 세포 응집체에 있어서는, 연속 상피 구조가 관찰되는 빈도가 적었다. 보존 조건 F 즉 보존 온도가 37℃인 조건에서는, 연속 상피 구조뿐만 아니라, 세포 응집체 자체가 무너져 버리는 경향이 있음을 알 수 있었다. 즉, 신경 조직의 보존 온도로서는, 17 내지 22℃가 가장 바람직하고, 보존 온도 12℃도 바람직함을 알 수 있었다.

[0342] 실시예 8: 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를 사용한, 칼륨 이온 농도의 검토예

[0343] 전술한 UW액은, 췌도 등 내배엽 조직의 장기 이식을 위해 실제로 임상에서 사용되고 있는 보존액이며, 이식 치료 업계에서는 골든 스탠다드로 되어 있다. 한편, 실시예 2의 결과로부터, UW액이 신경 조직의 보존에 부적합함이 시사되었다. UW액은, 염화칼륨(KCl) 농도가 120mM으로, 다른 보존액보다 높은 것이 알려져 있다(표 6). 그래서, 보존액으로서 바람직한 조건이 무엇인지를 조사할 목적으로, 염화칼륨이 보존에 미치는 영향을 조사하였다.

[0344] 인간 iPS 세포(1231A3주, 교토 대학에서 입수)를, 실시예 4 기재의 방법으로, 피더 프리 배양하고, 사전조건화 처리하고, 분화 유도하고, CHIR99021 및 SU5402를 작용시켜, 「부유 배양 개시 후 25일째의 세포 응집체」를 제작하였다.

[0345] 얻어진 부유 배양 개시 후 25일째의 세포 응집체를, 실시예 2 기재의 혈청 배지 [1], [2] 및 [3]을 사용하여, 5% CO_2 조건 하에서, 부유 배양 개시 후 99일째까지 배양하였다. 부유 배양 개시 후 99일째의 세포 응집체를, 도립 현미경(EVOS, Thermo Fisher Scientific사제)으로 관찰한바, 신경 조직의 연속 상피 구조를 포함하고 있었다.

[0346] 얻어진 부유 배양 개시 후 99일째의 세포 응집체를 사용하여, 보존 조건의 검토를 행하였다.

[0347] 검토한 보존액은, 이하의 2점이었다.

[0348] ・옵티졸(실시예 1 기재)

[0349] ・고농도 칼륨 이온을 함유한 옵티졸(옵티졸에, 염화칼륨을 칼륨 이온 최종 농도가 120mM이 되도록 첨가한 것)

[0350] 검토한 보존 온도는, 모두 17℃(인큐베이터, 5% CO_2, 아스텍사제)였다.

[0351] 검토한 보존 용기는, 모두 60mm 저접착 플레이트(저접착 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)였다.

[0352] 구체적으로 검토한 것은, 하기의 보존 조건 A, B였다.

[0353] ·보존 조건 A. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 17℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0354] ·보존 조건 B. 보존액이 고농도 칼륨 이온을 함유한 옵티졸, 보존 온도가 17℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0355] 상기 부유 배양 개시 후 99일째의 세포 응집체를 사용하여, 이상의 보존 조건 A 및 B에서, 120시간 보존하였다. 보존 직후의 세포 응집체를 도립 현미경(니콘사제, ECLIPSE Ti)으로 명시야상(위상차상)을 관찰하였다(도 15, 상단).

[0356] 그 결과, 보존 조건 A의 보존 직후의 세포 응집체에서는, 대부분의 세포 응집체에서 입체 조직의 형태가 유지되었다. 한편, 보존 조건 B에서는, 입체 조직의 형태가 유지되는 세포 응집체가 있기는 하였지만, 표층의 형태가 무너진 응집체가 많았다.

[0357] 이어서, 보존 조건 A, B에서 보존한 후의 세포 응집체를, 실시예 2 기재의 B 배지 중에서, 비세포 접착성의 96 구멍 배양 플레이트(PrimeSurface 96U 바닥 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)를 사용하여, 인큐베이터 내에서 37℃, 5% CO_2의 조건 하에서, 부유 배양을 행하였다(회복 배양).

[0358] 얻어진 회복 배양 후의 세포 응집체를, 도립 현미경(니콘사제, ECLIPSE Ti)으로 명시야상(위상차상)을 관찰하였다(도 15, 중단).

[0359] 그 결과, 보존 조건 A의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 층 구조를 가진 연속 상피가 높은 빈도로 관찰되었다. 한편, 보존 조건 B에서는, 일부의 세포 응집체에서 입체 망막의 구조가 무너지는 경향이 있었다.

[0360] 얻어진 회복 배양 후의 세포 응집체를, 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 동결 절편을 작성하였다. 이들 동결 절편에 관하여, 시세포 전구 세포의 마커 중 하나인 Crx(항Crx 항체, Takara사, 토끼)에 대하여 면역 염색을 행하였다. 이들 염색된 절편을, 형광 현미경(Keyence사제)을 사용하여 관찰하고, 면역 염색상을 취득하였다(도 15, 하단). 그리고, 실시예 6 기재의 방법으로, 세포 응집체가 신경 망막 조직의 연속 상피 구조를 형성하고 있는지를 조사하였다.

[0361] 그 결과, 보존 조건 A의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 층 구조를 가진 연속 상피 구조를 갖는 신경 조직이, 대부분의 세포 응집체에서 관찰되었다. 한편, 보존 조건 B의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, Crx 양성의 시세포 전구 세포가 거의 관찰되지 않아, 그것들이 층상으로 존재하는 모습이 보이지 않았다.

[0362] 이들 결과로부터, 칼륨 이온 농도가 UW액과 동등한 120mM인 보존액 중에서는, 입체 망막의 형태가 무너져, 시세포 전구 세포를 사멸시킴을 알 수 있었다. 즉, 신경 조직의 보존액으로서는, 칼륨 이온 농도가 120mM보다 낮은 것이 중요함이 실증되었다.

[0363] 실시예 9: 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체의 보존예

[0364] 인간 iPS 세포(1231A3주, 교토 대학에서 입수)를, 실시예 4 기재의 방법으로, 피더 프리 배양하고, 사전조건화 처리하고, 분화 유도하고, CHIR99021 및 SU5402를 작용시켜, 「부유 배양 개시 후 25일째의 세포 응집체」를 제작하였다.

[0365] 얻어진 부유 배양 개시 후 25일째의 세포 응집체를, 실시예 2 기재의 혈청 배지 [1], [2] 및 [3]을 사용하여, 5% CO_2 조건 하에서, 부유 배양 개시 후 99일째까지 배양하였다. 부유 배양 개시 후 99일째의 세포 응집체를, 도립 현미경(EVOS, Thermo Fisher Scientific사제)으로 관찰한바, 신경 조직의 연속 상피 구조를 포함하고 있었다.

[0366] 얻어진 부유 배양 개시 후 99일째의 세포 응집체를 사용하여, 보존 조건의 검토를 행하였다.

[0367] 검토한 보존액은, 이하의 2점이었다(각 보존액의 조성은, 표 7에 기재).

[0368] ·DMEM(글루코오스 없음)(Thermo Fisher Scientific사제)

[0369] ·DMEM(글루코오스 없음)(Thermo Fisher Scientific사제)에, 최종 농도가 1mM이 되도록 피루브산나트륨 용액(Thermo Fisher Scientific사제)을 첨가한 것

표 7

DMEM (글루코오스 없음)의 성분표

무기 염류(농도)	(mg/L)	(mM)
염화칼슘 ($CaCl_2$) (무수화물)	200	1.80
질산철 $Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$	0.100	0.000248
황산마그네슘 ($MgSO_4$) (무수화물)	97.7	0.814
염화칼륨 (KCl)	400	5.33
탄산수소나트륨 ($NaHCO_3$)	3700	44.0
염화나트륨 (NaCl)	6400	110
인산이수소나트륨 ($NaH_2PO_4 \cdot H_2O$)	125	0.906
상기 이외에 함유되는 성분		
페놀 레드, 아미노산, 비타민류		

(Thermo Fisher Scientific사 웹 페이지에서 발췌:
https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/technical-resources/media-formulation.49.html)

[0370]

[0371] 검토한 보존 온도는, 모두 17℃(인큐베이터, 5% CO_2, 아스텍사제)였다.

[0372] 검토한 보존 용기는, 모두 60mm 저접착 플레이트(저접착 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)였다.

[0373] 구체적으로 검토한 것은, 하기의 보존 조건 A, B였다.

[0374] ·보존 조건 A. 보존액이 DMEM(글루코오스 없음), 보존 온도가 17℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0375] ·보존 조건 B. 보존액이 DMEM(글루코오스 없음)에, 최종 농도가 1mM이 되도록 피루브산나트륨 용액을 첨가한 것, 보존 온도가 17℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0376] 상기 부유 배양 개시 후 99일째의 세포 응집체를 사용하여, 이상의 보존 조건 A, B에서 120시간 보존하였다. 보존 직후의 세포 응집체를 도립 현미경(니콘사제, ECLIPSE Ti)으로 명시야상(위상차상)을 관찰하였다(도 16, 상단).

[0377] 그 결과, 보존 조건 A, B의 보존 직후의 세포 응집체는, 모두, 대부분의 세포 응집체에서 입체 조직의 형태가 유지되었다.

[0378] 이어서, 보존 조건 A, B에서 보존한 후의 세포 응집체를, 실시예 2 기재의 B 배지 중에서, 비세포 접착성의 96 구멍 배양 플레이트(PrimeSurface 96U 바닥 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)를 사용하여, 인큐베이터 내에서 37℃, 5% CO_2의 조건 하에서, 부유 배양을 행하였다(회복 배양).

[0379] 얻어진 회복 배양 후의 세포 응집체를, 도립 현미경(니콘사제, ECLIPSE Ti)으로 명시야상(위상차상)을 관찰하였다(도 16, 중단).

[0380] 그 결과, 보존 조건 A, B의 회복 배양 후의 세포 응집체는, 모두, 층 구조를 가진 연속 상피가 높은 빈도로 관찰되었다.

[0381] 얻어진 회복 배양 후의 세포 응집체를, 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 동결 절편을 작성하였다. 이들 동결 절편에 관하여, 시세포 전구 세포의 마커 중 하나인 Crx(항Crx 항체, Takara사, 토끼)에 대하여 면역 염색을 행하였다. 이들 염색된 절편을, 형광 현미경(Keyence사제)을 사용하여 관찰하고, 면역 염색상을 취득하였다(도 16, 하단). 그리고, 실시예 6 기재의 방법으로, 세포 응집체가 신경 망막 조직의 연속 상피 구조를 형성하고 있는지를 조사하였다.

[0382] 그 결과, 보존 조건 A, B의 회복 배양 후의 세포 응집체는, 모두, 층 구조를 가진 연속 상피 구조를 갖는 신경 조직이, 대부분의 세포 응집체에서 관찰되었다.

[0383] 이들 결과로부터, 세포 배양용 배지인 DMEM 중에 있어서도, 17℃에서 보존하면, 망막 조직을, 그의 형태 및 표

층의 연속 상피 구조를 무너뜨리지 않고 보존할 수 있음을 알 수 있었다.

[0384] 실시예 10: 인간 iPS 세포로 제작한 전중뇌를 포함하는 세포 응집체를 사용한 보존예

[0385] 실시예 1 기재의 방법으로, 인간 iPS 세포(1231A3주)를, Scientific Reports, 4, 3594(2014)에 기재된 방법에 준하여 피더 프리 배양하였다. 피더 프리 배지로서는 StemFit 배지(AK03; 아지노모토사제), 피더 프리 기반에는 Laminin 511-E8(닛삐사제)을 사용하였다.

[0386] 분화 유도 조작으로서는, 인간 iPS 세포(1231A3주)를, StemFit 배지를 사용하여, 서브컨플루언트 1일 전(배양 면적의 5할이 세포로 덮일 정도)이 될 때까지 피더 프리 배양하였다. 당해 서브컨플루언트 1일 전의 인간 iPS 세포를, SB431542(5μM) 및 SAG(300nM)의 존재 하, 1일간 피더 프리 배양하였다(사전조건화 처리).

[0387] 사전조건화 처리한 인간 iPS 세포를, TrypLE Select(Life Technologies사제)를 사용하여 세포 분산액 처리하고, 추가로 피펫팅 조작에 의해 단일 세포에 분산하였다. 그 후, 상기 단일 세포에 분산된 인간 iPS 세포를 비세포 접착성의 96구멍 배양 플레이트(스미론 스페로이드 V 바닥 플레이트 PrimeSurface 96V 바닥 플레이트, 스미토모 베이크라이트사)의 1웰당 1.0×10^4 세포가 되도록 100㎕의 무혈청 배지에 부유시키고, 37℃, 5% CO_2에서 부유 배양하였다. 그때의, 무혈청 배지(GMEM+KSR)에는, GMEM 배지(Life Technologies사제)에 20% KSR(Life Technologies사제), 0.1mM 2-머캅토에탄올, 1x비필수 아미노산(Life Technologies사제) 및 1mM 피루브산(Life Technologies사제)을 첨가한 무혈청 배지를 사용하였다.

[0388] 부유 배양 개시 시(부유 배양 개시 후 0일째)에, 상기 무혈청 배지에, Wnt 시그널 전달 경로 저해 물질(IWR-1-endo, 3μM), TGFβR 저해제(SB431542, 5μM) 및 Y27632(20μM)를 상기 무혈청 배지에 첨가하여 배양하였다.

[0389] 부유 배양 개시 후 4일째에, Y27632를 포함하지 않고, Wnt 시그널 전달 경로 저해 물질(IWR-1-endo, 3μM) 및 TGFβR 저해제(SB431542, 5μM)를 포함하는 무혈청 배지를 80㎕ 첨가하고, 배지량은 합계 180㎕로 하였다. 그 후, 부유 배양 개시 후 17일째까지, 2 내지 4일에 1회, Y27632를 포함하지 않고, Wnt 시그널 전달 경로 저해 물질(IWR-1-endo, 3μM) 및 TGFβR 저해제(SB431542, 5μM)를 포함하는 상기 무혈청 배지로 절반량 배지 교환하였다.

[0390] 이와 같이 하여 얻어진 부유 배양 개시 후 17일째의 세포 응집체를, 1% N2 보충제 및 1% 화학적으로 규정된 지질 농축물(Thermo Fisher Scientific사제)을 포함하는 무혈청 배지(DMEM/F12 배지)를 사용하여, 5% CO_2 조건 하에서, 부유 배양 개시 후 45일째까지 배양하였다. 부유 배양 개시 후 45일째의 세포 응집체를, 도립 현미경(EVOS, Thermo Fisher Scientific사제)으로 관찰한바, 신경 상피 조직을 포함하고 있었다.

[0391] 얻어진 부유 배양 개시 후 45일째의 세포 응집체를 사용하여, 보존 조건의 검토를 행하였다.

[0392] 검토한 보존액은, 이하의 4점이었다(각 보존액의 조성은, 상기 기재대로).

[0393] ·1% N2 보충제 및 1% 화학적으로 규정된 지질 농축물을 포함하는 무혈청 배지(DMEM/F12 배지)

[0394] ·옵티졸(실시예 1 기재)

[0395] ·HBSS(실시예 1 기재)

[0396] ·UW액(실시예 2 기재)

[0397] 검토한 보존 온도는, 하기의 2점이었다.

[0398] ·37℃: 인큐베이터, 5% CO_2, 파나소닉사제

[0399] ·17℃: 인큐베이터, 5% CO_2, 아스텍사제

[0400] 검토한 보존 용기는, 모두 60mm 저접착 플레이트(저접착 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)였다.

[0401] 구체적으로 검토한 것은, 하기의 보존 조건 A 내지 D였다.

[0402] ·보존 조건 A(통상의 배양 조건). 보존액이 1% N2 보충제 및 1% 화학적으로 규정된 지질 농축물을 포함하는 무혈청 배지(DMEM/F12 배지), 보존 온도가 37℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0403] ·보존 조건 B. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 17℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0404] ·보존 조건 C. 보존액이 HBSS, 보존 온도가 17℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0405] ·보존 조건 D. 보존액이 UW액, 보존 온도가 17℃, 보존 용기가 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0406] 상기 부유 배양 개시 후 45일째의 세포 응집체를 사용하여, 이상의 보존 조건 A 내지 D에서 72시간 보존하였다. 보존 직후의 세포 응집체를 도립 현미경(니콘사제, ECLIPSE Ti)으로 명시야상(위상차상)을 관찰하였다(도 17, 상단). 보존 직후에는 어느 보존 조건의 세포 응집체에 있어서도 신경 상피 조직이 관찰되었다.

[0407] 이어서, 보존 조건 A 내지 D에서 보존한 후의 세포 응집체를, 1% N2 보충제 및 1% 화학적으로 규정된 지질 농축물을 포함하는 무혈청 배지(DMEM/F12 배지)에서, 비세포 접착성의 96구멍 배양 플레이트(PrimeSurface 96U 바닥 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)를 사용하여, 인큐베이터 내에서 37℃, 5% CO_2의 조건 하에서, 부유 배양을 행하였다(회복 배양).

[0408] 얻어진 회복 배양 후의 세포 응집체를, 도립 현미경(니콘사제, ECLIPSE Ti)으로 명시야상(위상차상)을 관찰하였다(도 17, 중단).

[0409] 그 결과, 보존 조건 A(통상의 배양 조건) 및 보존 조건 B, C의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 일부의 세포 응집체에서 신경 상피 조직이 관찰되었다. 한편, 보존 조건 D의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 신경 상피 조직을 갖는 세포 응집체는 전혀 보이지 않았다.

[0410] 얻어진 회복 배양 후의 세포 응집체를, 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 동결 절편을 작성하였다. 이들 동결 절편에 관하여, 망막 조직 마커 중 하나인 Rx(항Rx 항체, Takara사제, 모르모트)와 전뇌 및/또는 중뇌의 마커 중 하나인 Otx2(항Otx2 항체, Abcam사제, 토끼)에 대하여 면역 염색을 행하였다. 이들 염색된 절편을, 형광 현미경(Keyence사제)을 사용하여 관찰하고, 면역 염색상을 취득하였다(도 17, 하단). 그리고, Rx가 음성이고, 또한 Otx2가 양성인, 망막 조직을 포함하지 않고, 전뇌 조직 및/또는 중뇌 조직을 포함하는 관강 구조(신경 로제트)의 유무를 조사하였다.

[0411] 그 결과, 보존 조건 A(통상의 배양 조건) 및 보존 조건 B, C의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 일부의 세포 응집체에서 상기 관강 구조가 관찰되었다. 한편, 보존 조건 D의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 상기 관강 구조를 갖는 세포 응집체는 전혀 보이지 않았다.

[0412] 망막 조직을 포함하지 않고, 전뇌 및/또는 중뇌 조직을 포함하는 관강 구조를 갖는 세포 응집체의 수를 조사하였다(도 18).

[0413] 그 결과, 보존 조건 A(통상의 배양 조건)의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 6개의 세포 응집체 중 4개의 세포 응집체에서 상기 관강 구조가 보였다. 보존 조건 B의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 6개의 세포 응집체 중 2개의 세포 응집체에서 상기 관강 구조가 보이고, 보존 조건 C의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 6개의 세포 응집체 중 3개의 세포 응집체에서 상기 관강 구조가 보였다. 한편, 보존 조건 D의 회복 배양 후의 세포 응집체에서는, 6개의 세포 응집체 중 상기 관강 구조가 보인 세포 응집체는 1개도 없었다.

[0414] 이들 결과로부터, 통상의 배양 조건과 동일한 보존 조건 A와 비교하여, 보존 온도가 17℃인 보존 조건 B, C에서는, 보존액으로서 옵티졸 또는 HBSS를 사용한 조건에서, 전뇌 및/또는 중뇌 조직을 포함하는 관강 구조를 갖는 세포 응집체의 형태를 유지한 채, 72시간 보존할 수 있음을 알 수 있었다.

[0415] 한편, UW액을 사용한 보존 조건 D에서는, 상기 관강 구조가 거의 유지되지 않음을 알 수 있었다.

[0416] 이 결과는, 실시예 2에 있어서의 신경 망막 조직에서의 보존 결과와 거의 마찬가지였다.

[0417] 이상의 결과로부터, 신경 조직이, 신경 상피 구조로서 연속 상피 구조를 갖는 신경 망막 조직의 경우에도, 신경 상피 구조로서 관강 구조를 갖는 전중뇌 조직의 경우에도, 보존 온도가 17℃ 부근이면, 신경 상피 구조를 유지한 채 보존할 수 있음을 알 수 있었다. 또한, 보존액의 조성에 대해서는, 칼륨 이온 농도가 120mM인 UW액은, 전중뇌 조직을 보존하는 경우에도 부적합함을 알 수 있었다.

[0418] 실시예 11: 인간 ES 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를 보존한 후, 망막 변성 래트에 이식한 예

[0419] 인간 ES 세포(KhES1주, 교토 대학에서 입수, 리켄 CDB에서 사용)를, 실시예 2 기재의 방법으로, 피더 프리 배양하고, 사전조건화 처리하고, 분화 유도하고, CHIR99021 및 SU5402를 작용시켜, 부유 배양 개시 후 21일째의 세

포 응집체를 제작하였다.

[0420] 얻어진 부유 배양 개시 후 21일째의 세포 응집체를, 실시예 2 기재의 방법으로, 혈청 배지 [1], [2] 및 [3]을 사용하여, 5% CO_2 조건 하에서, 부유 배양 개시 후 80일째까지 배양하였다.

[0421] 얻어진 부유 배양 개시 후 80일째의 세포 응집체를 사용하여, 이하의 조건 A(보존 없음), 조건 B(보존 있음)에서, 세포 응집체를 조제하였다.

[0422] ·조건 A(보존 없음). 부유 배양 개시 후 80일째의 세포 응집체를, 배지로서 상기 B 배지를 사용하여, 37℃에서 48시간, 5% CO_2에서 배양하였다.

[0423] ·조건 B(보존 있음). 부유 배양 개시 후 80일째의 세포 응집체를, 보존액으로서 옵티졸을 사용하고, 보존 장치로서 17℃ 인큐베이터(5% CO_2 조건, 아스텍사제)를 사용하여, 17℃에서 48시간 보존, 5% CO_2에서 배양하였다.

[0424] 검토한 보존 용기는, 모두 60mm 저접착 플레이트(저접착 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)였다.

[0425] 조건 A(보존 없음) 및 조건 B(보존 있음)의 세포 응집체를, 공지 문헌(Shirai et al. PNAS 113, E81-E90)에 기재된 방법으로 주사기를 사용하여 시세포 변성 모델인 망막 변성 누드 래트(SD-Foxn1 Tg(S334ter) 3LavRrrc nude rat)의 망막 하에 이식하였다.

[0426] 부유 배양 개시 후 240일 상당령의 눈 조직을 파라포름알데히드로 고정(PFA 고정)하고 수크로오스 치환하였다. 고정된 눈 조직을, 크라이오스탯을 사용하여 동결 절편을 제작하였다. 이들 동결 절편을, 간체 시세포의 마커 중 하나인 로돕신(항RetP1 항체, Sigma사, 마우스), 추체 시세포 전구 세포의 마커 중 하나인 S+M+L 옵신(opsin)(항S+M+L 옵신 항체, Millipore사, 토끼)에 대하여 면역 염색을 행하였다. Crx의 발현은, Crx::Venus의 형광상으로 관찰하였다. 면역 염색한 동결 절편을, 공초점 레이저 현미경(상품명: TCS SP8, 라이카사제)을 사용하여 형광 관찰을 행하였다(도 19).

[0427] 우선, 당해 래트에서는, 이식한 세포 응집체 유래 인간 세포가 존재하고 있지 않은 영역에서는, 시세포는 거의 대부분 관찰되지 않았다. 조건 A(보존 없음)의 세포 응집체를 이식한 래트의 망막에서는, 로돕신 양성의 간체 시세포 및 S+M+L 옵신 양성의 추체 시세포가 로제트 구조를 형성하여 생착되고, 성숙화되어 있음이 관찰되었다. 그리고, 조건 B(보존 있음)의 세포 응집체를 이식한 래트의 망막에서도, 로돕신 양성의 간체 시세포 및 S+M+L 옵신 양성의 추체 시세포가 로제트 구조를 형성하여 생착되고, 성숙화되어 있음이 관찰되었다. 또한 넓은 영역을 현미경 검사한바, 조건 A(보존 없음)에서도 조건 B(보존 있음)에서도 거의 동일한 빈도로 시세포 로제트가 생착되어, 성숙화되어 있음을 알 수 있었다.

[0428] 이들 결과로부터, 보존한 망막 조직을 이식한 경우에도, 보존하지 않은 망막 조직과 실질적으로 차이가 없는 수준으로, 생착되어, 성숙화됨을 알 수 있었다. 즉, 본원에서 발명한 방법을 사용하면, 이식에 적합한 신경 조직을 보존할 수 있음이 실증되었다.

[0429] 실시예 12: 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 덩어리에 있어서의 콘드로이틴황산 농도의 검토

[0430] 인간 iPS 세포(TFH-HA주, 다이닛폰 스미토모 세이야쿠에서 수립)는, 시판되고 있는 센다이 바이러스 벡터(Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc의 4 인자, IDPharma사제 사이트 튜 키트)를 사용하여, Thermo Fisher Scientific사의 공개 프로토콜(iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, Publication Number MAN0009378, Revision 1.0) 및 교토 대학의 공개 프로토콜(피더 프리로의 인간 iPS 세포의 수립·유지 배양, CiRA_Ff-iPSC_protocol_JP_v140310, http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/protocol.html)에 기재된 방법을 기초로, StemFit 배지(AK03; 아지노모토사제), Laminin 511-E8(닛삐사제)을 사용하여 수립하였다.

[0431] 당해 인간 iPS 세포(TFH-HA주)를, 실시예 1 기재의 방법으로, StemFit 배지에서, 서브컨플루언트 1일 전이 될 때까지 피더 프리 조건 하에서 배양하였다. 당해 서브컨플루언트 1일 전의 인간 iPS 세포(TFH-HA주)를, SB431542(5μM) 및 SAG(300nM)의 존재 하, 1일간 피더 프리 배양하였다(사전조건화 처리).

[0432] 사전조건화 처리한 인간 iPS 세포를, TrypLE Select(Life Technologies사제)를 사용하여 세포 분산액 처리하고, 추가로 피펫팅 조작에 의해 단일 세포에 분산하였다. 그 후, 상기 단일 세포에 분산된 인간 iPS 세포를 비세포 접착성의 96구멍 배양 플레이트(PrimeSurface 96V 바닥 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)의 1웰당 1.3×10^4 세포가 되도록 100㎕의 무혈청 배지에 부유시키고, 37℃, 5% CO_2에서 부유 배양하였다. 그때의

무혈청 배지(gfCDM+KSR)에는, F-12 배지와 IMDM 배지의 1:1 혼합액에 10% KSR, 450μM 1-모노티오글리세롤, 1×화학적으로 규정된 지질 농축물을 첨가한 무혈청 배지를 사용하였다. 부유 배양 개시 시(부유 배양 개시 후 0일째)에, 무혈청 배지에 Y27632(최종 농도 20μM) 및 SAG(최종 농도 10nM)를 첨가하였다. 부유 배양 개시 후 3일째에, Y27632 및 SAG를 포함하지 않고, 인간 재조합 BMP4(R&D사제)를 포함하는 배지에서, 외래성 인간 재조합 BMP4의 최종 농도가 1.5nM(55ng/ml)이 되도록 새로운 상기 무혈청 배지를 50㎕ 첨가하였다.

[0433] 그 4일 후(부유 배양 개시 7일 후)에, Y27632, 인간 재조합 BMP4를 포함하지 않는 상기 무혈청 배지로 배지 교환하였다. 배지 교환의 조작으로서는, 배양기 중의 배지를 60㎕ 폐기하고, 새로운 상기 무혈청 배지를 90㎕ 첨가하는 조작을 실시하여, 배지량은 합계 180㎕가 되도록 하였다. 그 후, 2 내지 4일에 1회, Y27632 및 인간 재조합 BMP4를 포함하지 않는 상기 무혈청 배지로 절반량 배지 교환하였다. 절반량 배지 교환 조작으로서는, 배양기 중의 배지를 체적의 절반량 즉 90㎕ 폐기하고, 새로운 상기 무혈청 배지를 90㎕ 첨가하여, 배지량은 합계 180㎕로 하였다.

[0434] 이와 같이 하여 얻어진 부유 배양 개시 후 17일째의 세포 덩어리를, CHIR99021(3μM) 및 SU5402(5μM)를 포함하는 무혈청 배지(DMEM/F12 배지에, 1% N2 보충제가 첨가된 배지)에서 3일간 즉 부유 배양 개시 후 20일째까지 배양하였다.

[0435] 얻어진 부유 배양 개시 후 20일째의 세포 응집체를, 하기의 배양액에 대해서는 하기 [1], [2] 및 [3]에 나타낸 혈청 배지를 사용하여, 5% CO_2 조건 하에서, 부유 배양 개시 후 84일째까지 배양하였다.

[0436] [1] 부유 배양 개시 후 20일째부터 40일째까지: A 배지.

[0437] [2] 부유 배양 개시 후 40일째부터 60일째까지: A 배지와 B 배지를 1:3의 비율로 혼합한 배지.

[0438] [3] 부유 배양 개시 후 60일째 이후: B 배지.

[0439] 얻어진 부유 배양 개시 후 84일째의 세포 응집체를, 도립 현미경(EVOS, Thermo Fisher Scientific사제)으로 관찰한바, 신경 조직의 연속 상피 구조를 포함하고 있었다. 부유 배양 개시 후 84일째의 세포 응집체를 사용하여, 보존 조건의 검토를 행하였다.

[0440] 검토한 보존액은 이하의 4종류였다(표 4, 8 내지 9 참조).

[0441] ·상기 B 배지

[0442] ·옵티졸(2.5% 콘드로이틴황산 함유)

[0443] ·1% 콘드로이틴황산 함유 배지(DMEM(저글루코오스(low glucose))과 디스코비스크를 3:1로 혼합한 액. DMEM(저글루코오스)은 Thermo Fisher Scientiric사제(형번: 11885-084)의 것을, 디스코비스크는 니혼 알콘사제(판매명 코드: 1319818Q1025)의 것을, 각각 사용하였음)

[0444] ·0.5% 콘드로이틴황산 함유 배지(DMEM(저글루코오스)과 디스코비스크를 7:1로 혼합한 액)

표 8

DMEM (저글루코오스)의 성분표

무기 염류(농도)	(mg/L)	(mM)
염화칼슘 ($CaCl_2$)(무수화물)	200	1.80
옥살산철 $Fe(NO_3)_3$ $9H_2O$	0.100	0.000248
황산마그네슘 ($MgSO_4$)(무수화물)	97.7	0.814
염화칼륨(KCl)	400	5.33
탄산수소나트륨 ($NaHCO_3$)	3700	44.0
염화나트륨(NaCl)	6400	110
인산이수소나트륨 (NaH_2PO_4 H_2O)	125	0.906
상기 이외에 함유되는 성분		
페놀 레드, D-글루코오스, 피루브산나트륨		

[0445]

표 9

디스코비스크의 성분

(mg/mL)

히알루론산나트륨	16.5
콘드로이틴황산에스테르나트륨	40

상기 이외에 함유되는 성분

인산이수소나트륨 수화물(NaH_2PO_4 H_2O)、무수 인산-수소나트륨(Na_2HPO_4)、등장화제, pH 조정제 2 성분

[0446]

[0447] 검토한 보존 온도는, 이하의 2점이었다.

[0448] ·37℃(인큐베이터, 5% CO_2 조건, 파나소닉사제)

[0449] ·17℃(항온조, 대기압, 밀봉 조건, 와켄 비테크사제)

[0450] 검토한 보존 용기는, 이하의 2점이었다.

[0451] ·60mm 저접착 플레이트(저접착 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)

[0452] ·2.0mL 크라이오 바이알(Thermo Fisher Scientific사제)

[0453] 구체적으로 검토한 것은, 하기의 보존 조건 A 내지 D였다.

[0454] ·보존 조건 A(통상의 배양 조건). 보존액이 B 배지, 보존 온도가 37℃(인큐베이터), 보존 용기가 60mm 저접착 플레이트(5% CO_2)

[0455] ·보존 조건 B. 보존액이 옵티졸, 보존 온도가 17℃(항온조), 보존 용기가 2.0mL 크라이오 바이알(대기압에서 밀봉)

[0456] ·보존 조건 C. 보존액이 1% 콘드로이틴황산 함유 배지, 보존 온도가 17℃(항온조), 보존 용기가 2.0ml 크라이오 바이알(대기압에서 밀봉)

[0457] ·보존 조건 D. 보존액이 0.5% 콘드로이틴황산 함유 배지, 보존 온도가 17℃(항온조), 보존 용기가 2.0ml 크라이오 바이알(대기압에서 밀봉)

[0458] 상기 부유 배양 개시 후 84일째의 세포 응집체를 사용하여, 이상의 보존 조건 A 내지 D에서 72시간 보존하였다. 보존 직후의 세포 응집체를 도립 현미경(올림푸스사제, IX83)으로 명시야상(위상차상)을 관찰하였다(도 20 상단). 그 결과, 어느 보존 조건에 있어서도, 대부분의 세포 응집체에서 입체 조직의 형태가 유지되었다.

[0459] 또한 회복 배양 처리로서, 보존 조건 A 내지 D에서 보존한 후의 세포 응집체를, B 배지 중에서, 비세포 접착성의 96구멍 배양 플레이트(PrimeSurface 96 슬릿 웰 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)를 사용하여, 인큐베이터 내에서 37℃, 5% CO_2의 조건에서, 부유 배양을 행하였다(회복 배양).

[0460] 얻어진 회복 배양 후의 세포 응집체를, 도립 현미경(올림푸스사제, IX83)으로 명시야상(위상차상)을 관찰하였다(도 20 위에서 2단째). 그 결과, 어느 보존 조건에 있어서도, 대부분의 세포 응집체에서 입체 조직의 형태가 유지되고, 신경 상피 구조가 관찰되었다.

[0461] 얻어진 회복 배양 후의 세포 응집체를, 4% 파라포름알데히드로 고정하고, 동결 절편을 작성하였다. 이들 동결 절편에 관하여, 시세포 전구 세포의 마커 중 하나인 Crx(항Crx 항체, Takara사, 토끼) 및 Chx10(항Chx10 항체, Exalpha사, 양)에 대하여 면역 염색을 행하였다. 이들 염색된 절편을, 형광 현미경(Keyence사제)을 사용하여 관찰하고, 면역 염색상을 취득하였다(도 20, 밑에서 2단째 및 하단). 그리고, 실시예 1 기재의 방법으로, Crx 양성의 시세포 전구 세포가 표층에 층상으로 존재하고, 신경 망막 조직의 연속 상피 구조가 존재하는지를 조사하였다. 그 결과, Crx 양성의 시세포 전구 세포가 표층에 층상으로 존재함을 알 수 있었다(도 20, 밑에서 2단

째). 또한, Chx10 양성 세포의 신경 망막 전구 세포가 표층의 Crx 양성 세포층의 내측에 층상으로 존재함을 알 수 있었다(도 20, 하단). 이들의 결과, 어느 보존 조건에 있어서도, 신경 망막 조직의 연속 상피 구조가 높은 빈도로 존재함을 알 수 있었다.

[0462] 이들 결과로부터, 어느 보존 조건에 있어서도, 대부분의 세포 응집체에서 입체 조직의 형태가 유지되었다. 즉, 콘드로이틴황산 농도가 0.5 내지 2.5%인 액 중에서, 입체 망막을 저온 보존할 수 있었다.

[0463] 또한, 실시예 1에서 HBSS를, 실시예 9에서 DMEM을 사용하여, 각각 48시간, 120시간 세포 응집체를 보존할 수 있었다. 이들 용액은 콘드로이틴황산을 포함하지 않는다는 점에서, 입체 망막의 형태를 유지 가능한 콘드로이틴황산 농도는, 0 내지 2.5%임이 실증되었다.

[0464] 실시예 13: 인간 iPS 세포로 제작한 망막 조직을 포함하는 세포 응집체를, 보존한 후, 망막 변성 래트에 이식한 예

[0465] 인간 iPS 세포(DSP-SE주, 다이닛폰 스미토모 세이야쿠에서 수립)는, 센다이 바이러스 벡터(Oct3/4, Sox2, KLF4, c-Myc의 4 인자, IDPharma사제 사이트 튠 키트)를 사용하여, Thermo Fisher Scientific사의 공개 프로토콜(iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit, Publication Number MAN0009378, Revision 1.0) 및 교토 대학의 공개 프로토콜(피더 프리로의 인간 iPS 세포의 수립·유지 배양, CiRA_Ff-iPSC_protocol_JP_v140310, http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/j/research/protocol.html)에 기재된 방법을 기초로, StemFit 배지(AK03N; 아지노모토사제), Laminin 511-E8(닛삐사제)을 사용하여 수립하였다.

[0466] 당해 인간 iPS 세포(DSP-SE주)를, 실시예 1 기재의 방법으로, StemFit 배지에서, 서브컨플루언트 1일 전이 될 때까지 피더 프리 조건 하에서 배양하였다.

[0467] 분화 유도 조작으로서는, 서브컨플루언트 1일 전의 인간 iPS 세포(DSP-SE주)를, SB431542(5μM) 및 SAG(300nM)에 의해 추가로 1일간 피더 프리 배양하였다(사전조건화 처리).

[0468] 사전조건화 처리한 인간 iPS 세포를, TrypLE Select(Life Technologies사제)를 사용하여 세포 분산액 처리하고, 추가로 피펫팅 조작에 의해 단일 세포에 분산하였다. 그 후, 상기 단일 세포에 분산된 인간 iPS 세포를 비세포 접착성의 96구멍 배양 플레이트(PrimeSurface 96V 바닥 플레이트, 스미토모 베이크라이트사제)의 1웰당 1.3×10^4 세포가 되도록 100㎕의 무혈청 배지에 부유시키고, 37℃, 5% CO_2에서 부유 배양하였다. 그때의 무혈청 배지(gfCDM+KSR)에는, F-12 배지와 IMDM 배지의 1:1 혼합액에 10% KSR, 450μM 1-모노티오글리세롤, 1×화학적으로 규정된 지질 농축물을 첨가한 무혈청 배지를 사용하였다. 부유 배양 개시 시(부유 배양 개시 후 0일째)에, 무혈청 배지에 IWR-1e(최종 농도 3μM), Y27632(최종 농도 20μM) 및 SAG(최종 농도 10nM)를 첨가하였다. 부유 배양 개시 후 3일째에, Y27632 및 SAG를 포함하지 않고, 인간 재조합 BMP4(R&D사제) 및 IWR-1e(최종 농도 3μM)를 포함하는 배지에서, 외래성 인간 재조합 BMP4의 최종 농도가 1.5nM(55ng/ml)이 되도록 새로운 상기 무혈청 배지를 50㎕ 첨가하였다.

[0469] 그 3일 후(부유 배양 개시 6일 후)에, Y27632, SAG, 인간 재조합 BMP4 및 IWR-1e를 포함하지 않는 상기 무혈청 배지로 배지 교환하였다. 배지 교환의 조작으로서는, 외래성 IWR-1e의 농도가 배지 교환 전에 비하여 10% 이하가 되도록, 배양기 중의 배지를 100㎕ 폐기하고, 새로운 상기 무혈청 배지를 130㎕ 첨가하는 조작을 실시한 후에, 추가로 배양기 중의 배지를 130㎕ 폐기하고, 새로운 상기 무혈청 배지를 130㎕ 첨가하는 조작을 실시하여, 배지량은 합계 180㎕가 되도록 하였다. 그 후, 2 내지 4일에 1회, IWR-1e, Y27632, SAG 및 인간 재조합 BMP4를 포함하지 않는 상기 무혈청 배지로 절반량 배지 교환하였다. 절반량 배지 교환 조작으로서는, 배양기 중의 배지를 체적의 절반량 즉 90㎕ 폐기하고, 새로운 상기 무혈청 배지를 90㎕ 첨가하여, 배지량은 합계 180㎕로 하였다.

[0470] 이와 같이 하여 얻어진 부유 배양 개시 후 13일째의 세포 덩어리를, CHIR99021(3μM) 및 SU5402(5μM)를 포함하는 무혈청 배지(DMEM/F12 배지에, 1% N2 보충제가 첨가된 배지)에서 3일간 즉 부유 배양 개시 후 16일째까지 배양하였다.

[0471] 얻어진 부유 배양 개시 후 16일째의 세포 응집체를, 하기의 배양액에 대해서는 하기 [1], [2] 및 [3]에 나타낸 혈청 배지를 사용하여, 5% CO_2 조건 하에서, 부유 배양 개시 후 82일째까지 배양하였다.

[0472] [1] 부유 배양 개시 후 21일째부터 40일째까지: A 배지.

[0473] [2] 부유 배양 개시 후 40일째부터 60일째까지: A 배지와 B 배지를 1:3의 비율로 혼합한 배지.

[0474] [3] 부유 배양 개시 후 60일째 이후: B 배지.

[0475] 얻어진 부유 배양 개시 후 82일째의 세포 응집체를 사용하고, 보존액으로서 옵티졸을 사용하고, 보존 장치로서 17℃ 항온조(대기압, 밀봉 조건, 와켄 비테크사제)를 사용하여, 17℃에서 96시간 보존하였다.

[0476] 검토한 보존 용기는, 1.5mL 에펜도르프 튜브(에펜도르프사제)였다.

[0477] 상기 세포 응집체를, 공지 문헌(Shirai et al. PNAS 113, E81-E90) 기재의 방법으로 주사기를 사용하여 시세포 변성 모델인 망막 변성 누드 래트(SD-Foxn1 Tg(S334ter) 3LavRrrc nude rat)의 망막 하에 이식하였다.

[0478] 부유 배양 개시 후 294일 상당령의 눈 조직을 파라포름알데히드로 고정(PFA 고정)하고 수크로오스 치환하였다. 고정된 눈 조직을, 크라이오스탯을 사용하여, 동결 절편을 제작하였다. 이들 동결 절편을, 간체 시세포의 마커 중 하나인 로돕신(항RetP1 항체, Sigma사, 마우스), 추체 시세포의 마커 중 하나인 콘 아레스틴(cone arrestin)(항-콘 아레스틴 항체, Novus Biological사, 염소), 시세포 외절의 마커 중 하나인 PRPH2(항페리페린(Peripherin)-2 항체, Proteintech사, 토끼), 인간 핵의 마커 중 하나인 human nuclei(항Ku80 항체, R&D systems사, 염소)에 대하여 면역 염색을 행하였다. 면역 염색한 동결 절편을 공초점 레이저 현미경(상품명: TCS SP8, 라이카사제)을 사용하여 형광 관찰을 행하였다(도 21의 A 내지 E).

[0479] 우선, 당해 래트에서는, 이식한 세포 응집체 유래 인간 세포가 존재하고 있지 않은 영역에서는, 시세포는 거의 대부분 관찰되지 않았다. 한편, 17℃에서 96시간 보존한 세포 응집체를 이식한 래트의 망막에서, 로돕신 양성의 간체 시세포가 로제트 구조를 형성하여 생착되고, 성숙화되어 있음이 관찰되었다. 또한 콘 아레스틴 양성의 추체 시세포 및 PRPH2 양성의 시세포 외절도 검출되며, 이식한 망막 조직이 생착되어, 성숙화됨을 알 수 있었다.

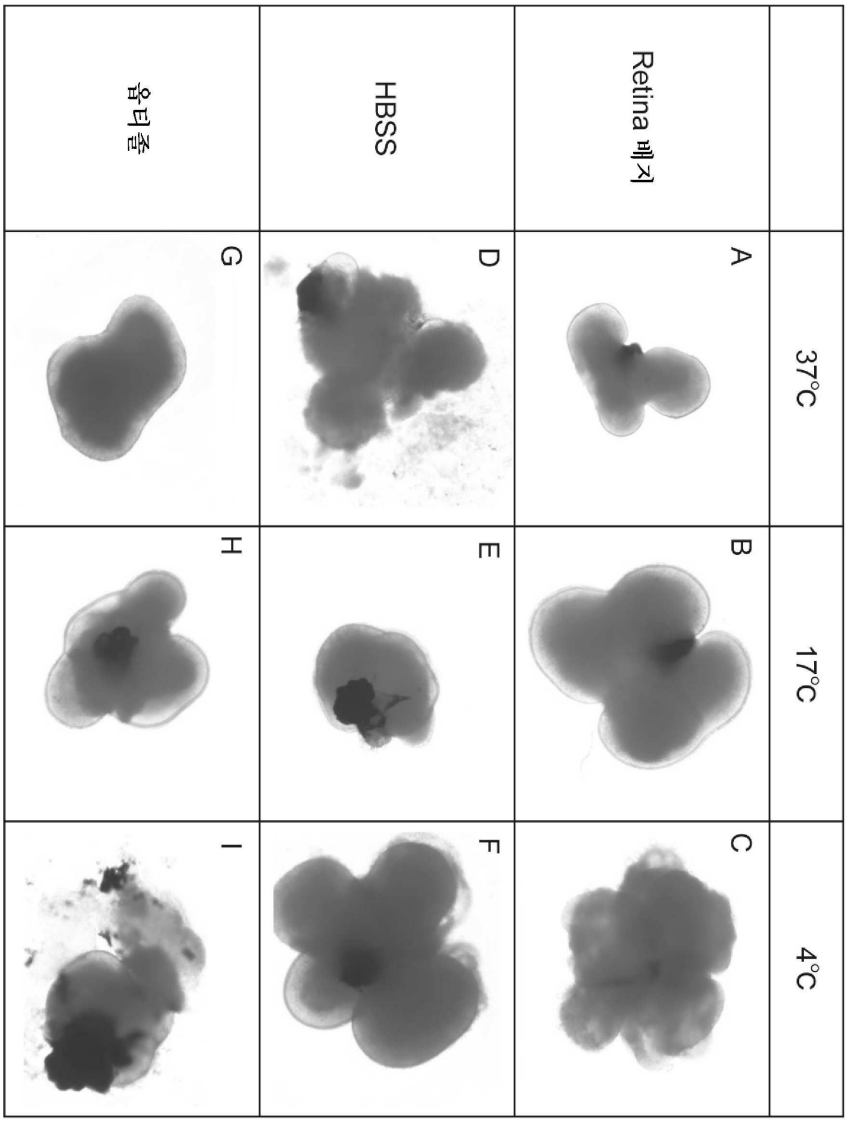
[0480] 이들 결과로부터, 96시간 저온 보존한 망막 조직도 이식 후에 생착되어, 성숙화됨을 알 수 있었다. 즉, 본원에서 발명한 방법을 사용하면, 이식에 적합한 신경 조직을 4일간 보존할 수 있음이 실증되었다.

산업상 이용가능성

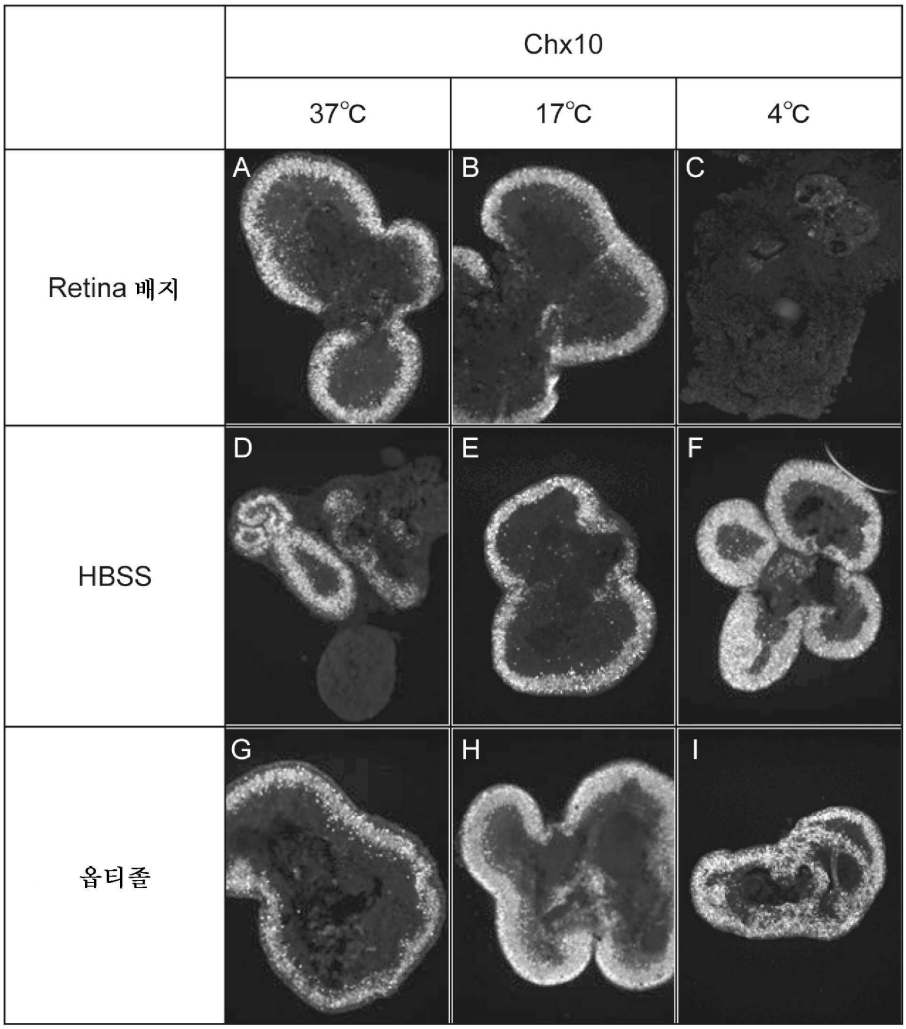
[0481] 본 발명에 따르면, 생체로부터 취출한 신경 조직, 및 다능성 줄기세포로 제작한 신경 조직을 동결하지 않고 2주일을 초과하지 않는 기간 보존하는 것이 가능하게 된다. 그에 의해, 이식 치료에 따른 신경 변성 질환의 치료가 보다 실현 가능하게 된다.

도면

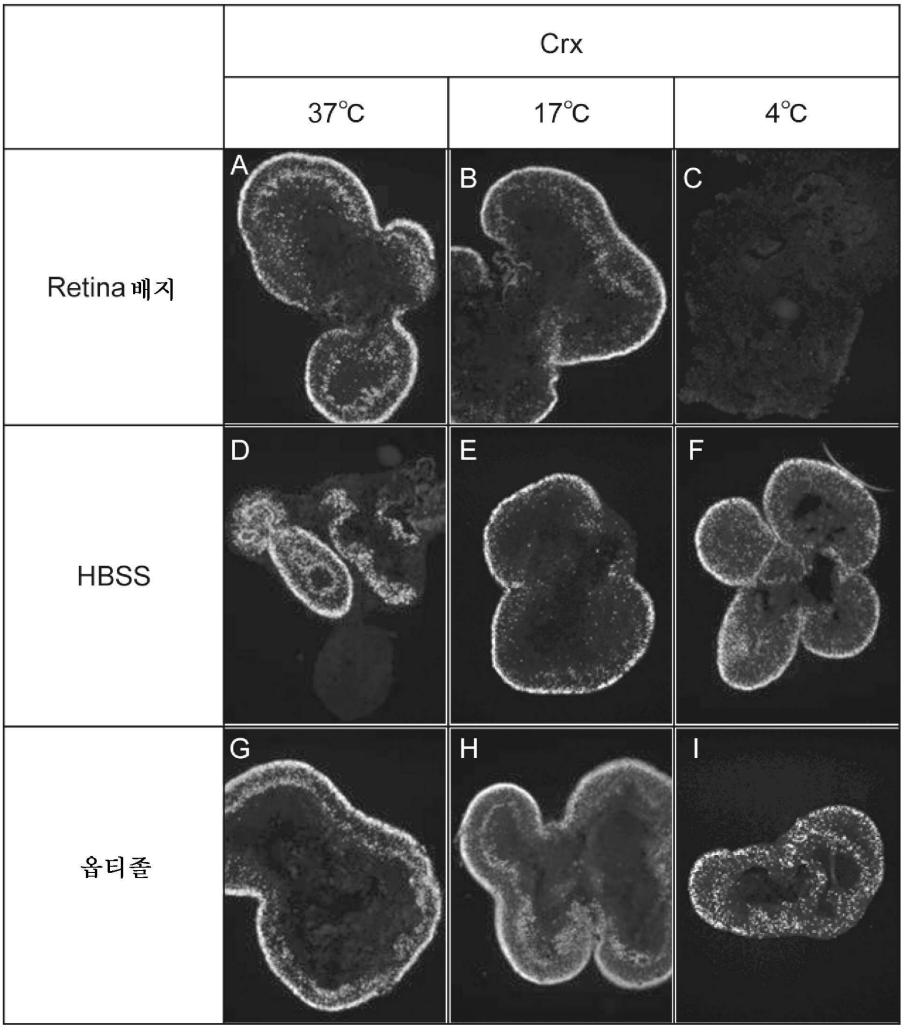
도면1



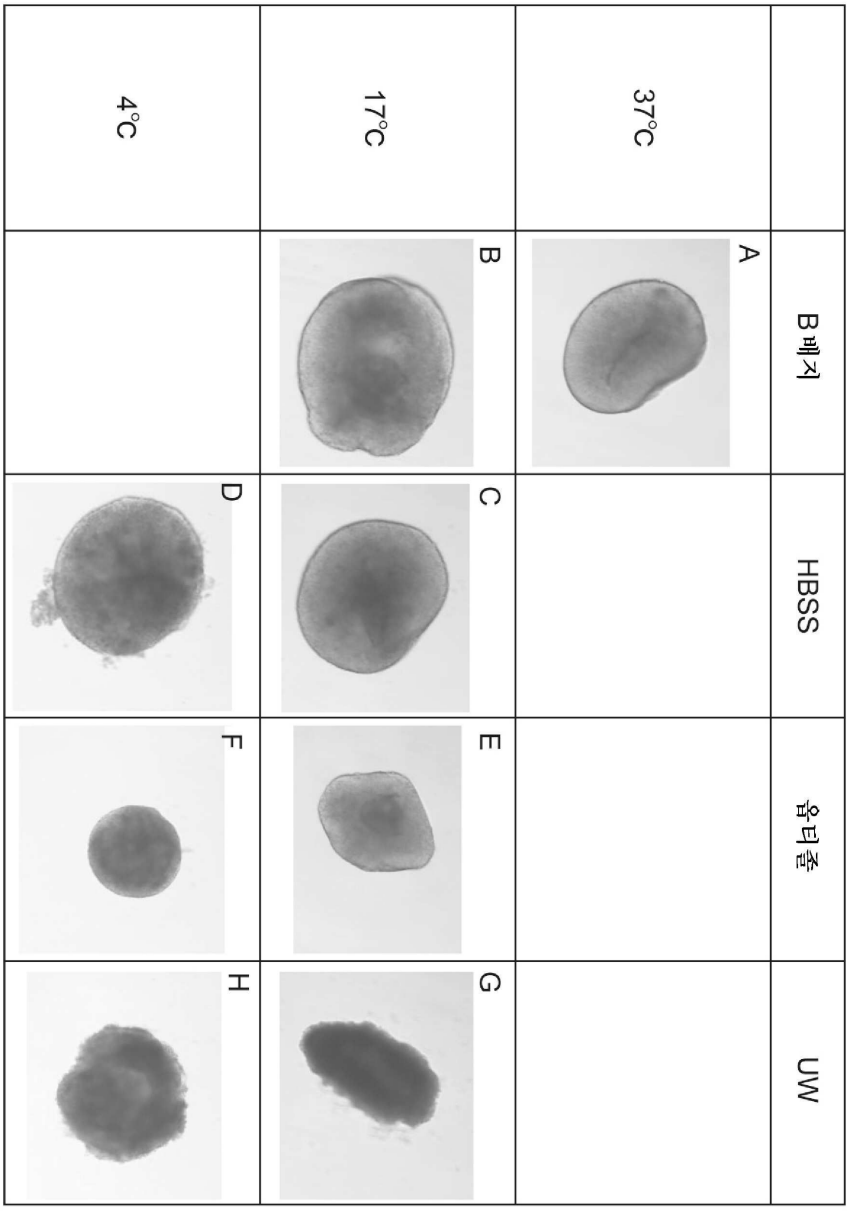
도면2



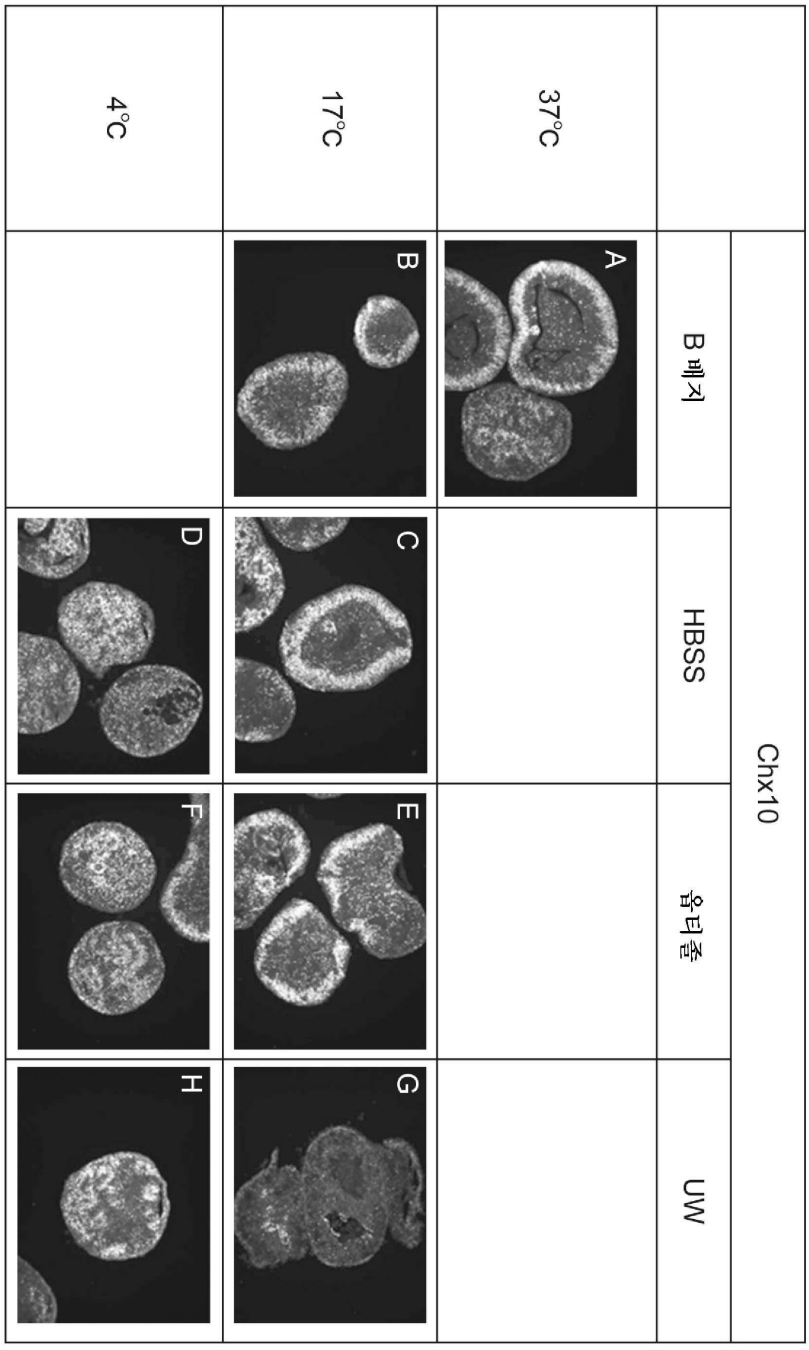
도면3



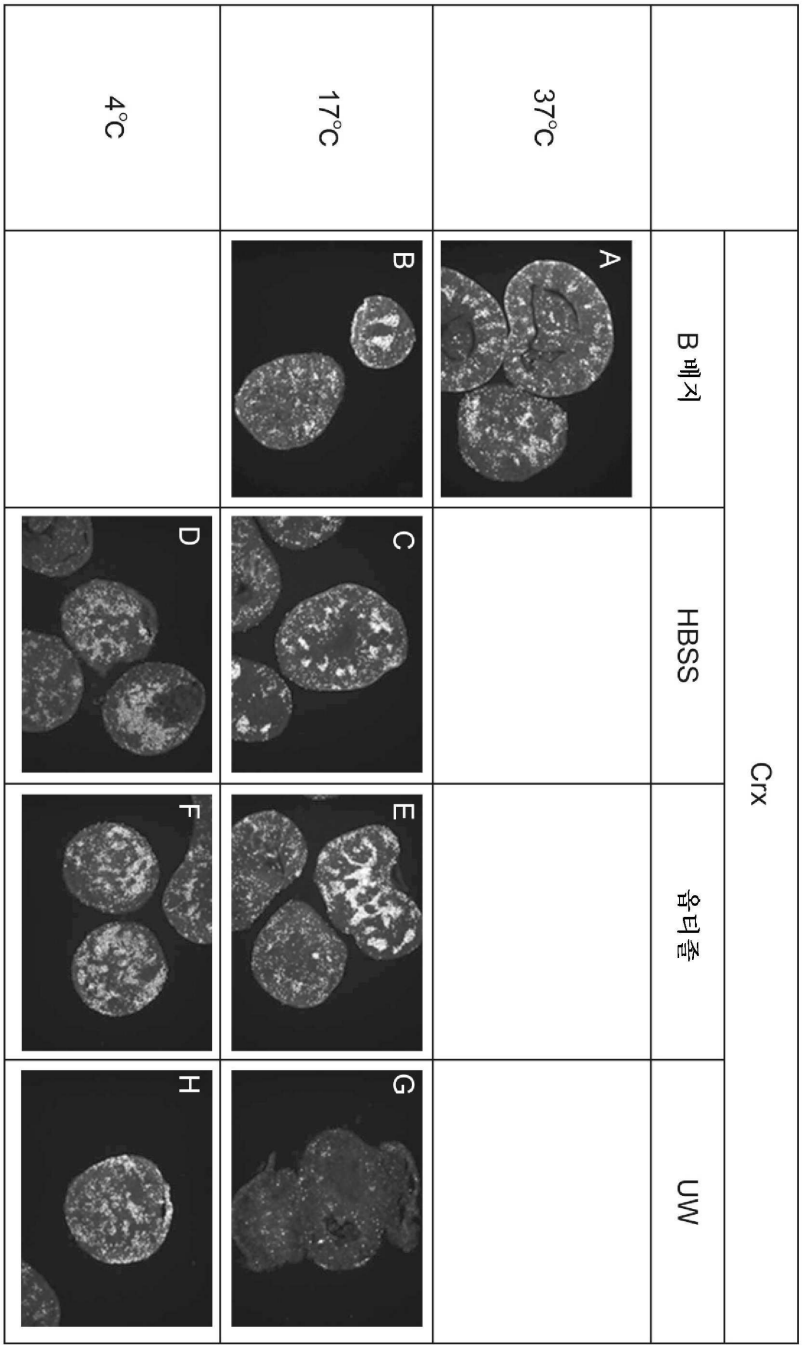
도면4



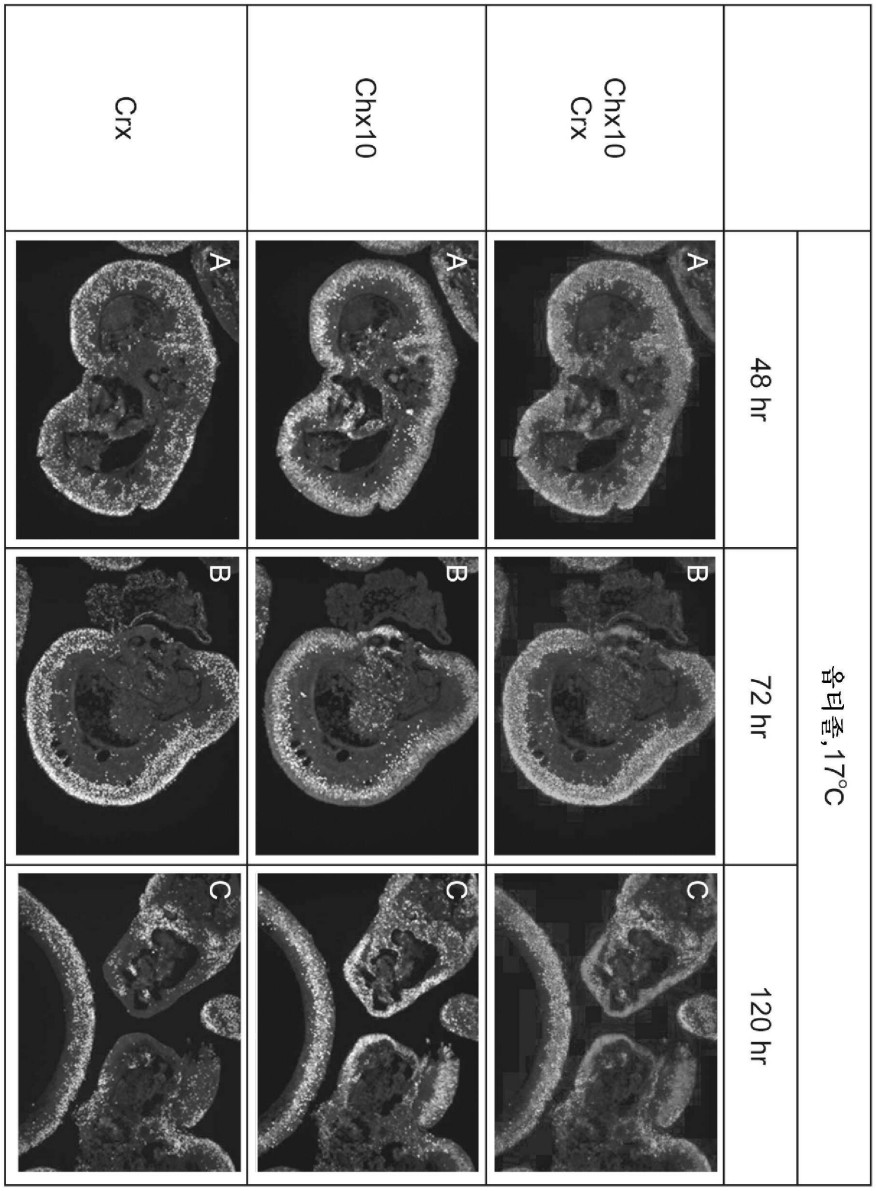
도면5



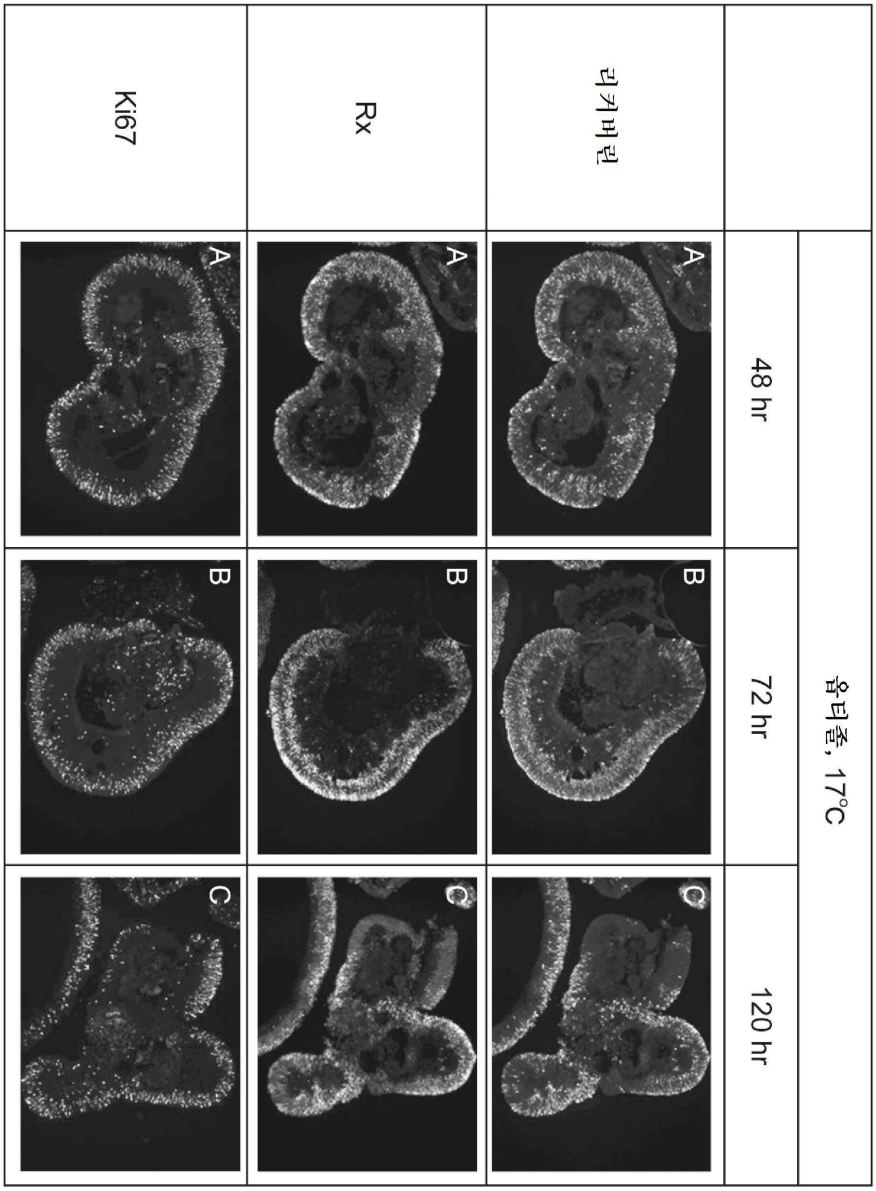
도면6



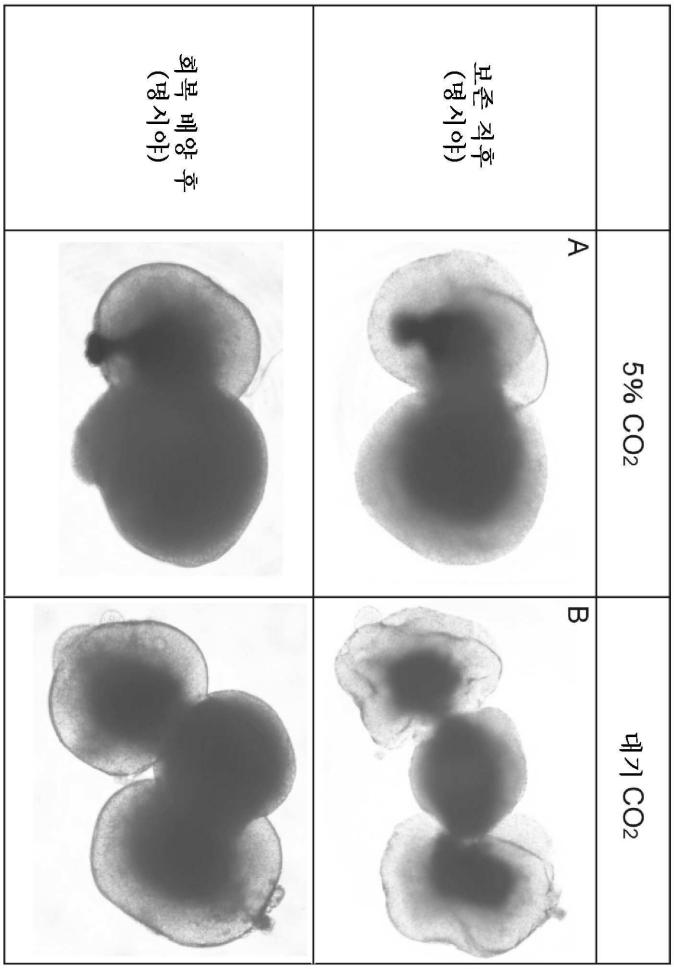
도면7



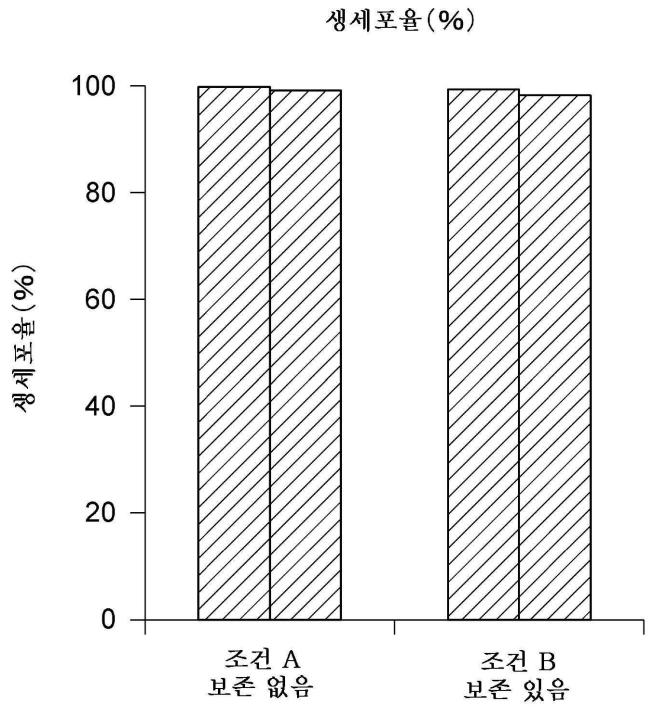
도면8



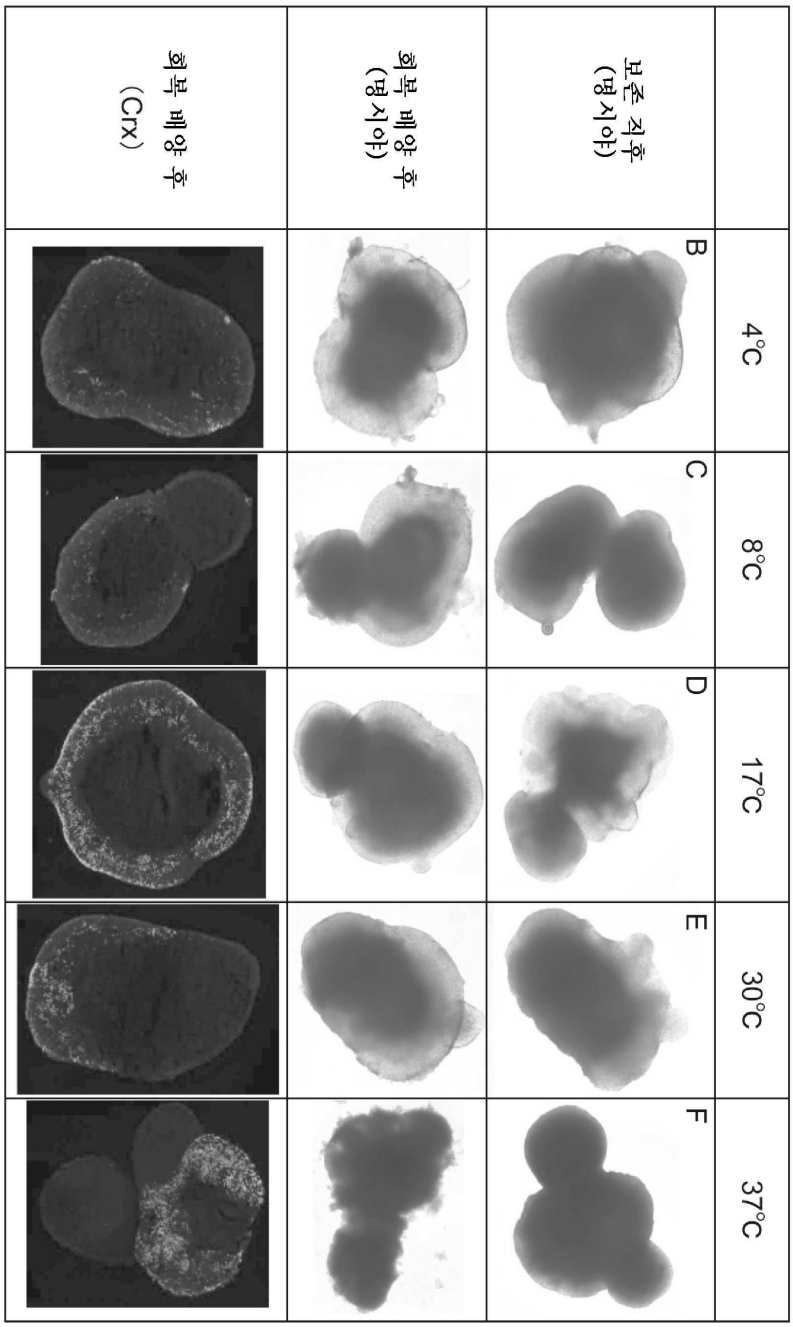
도면9



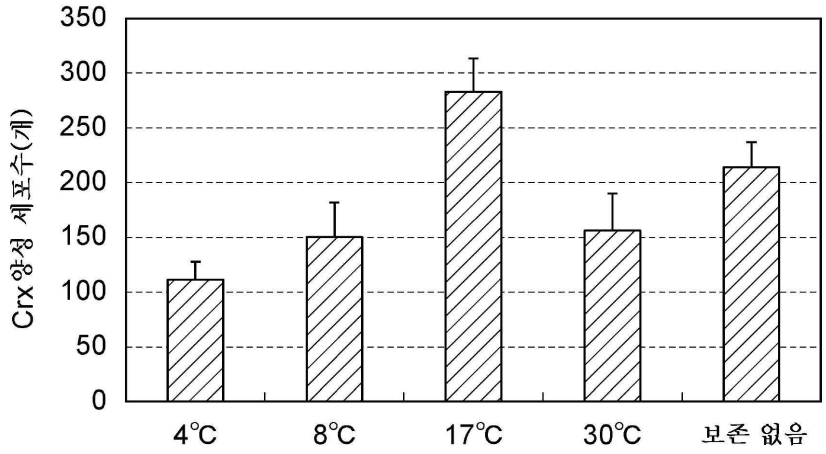
도면10



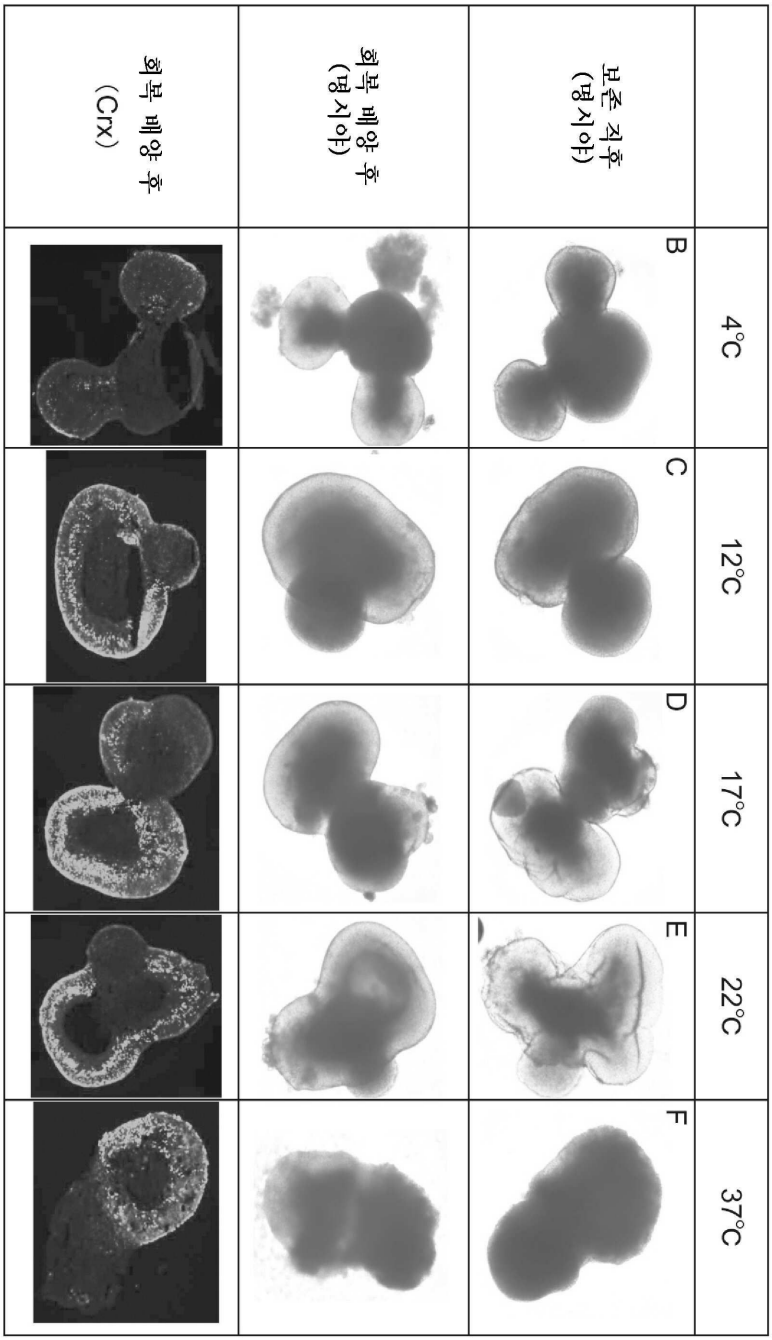
도면11



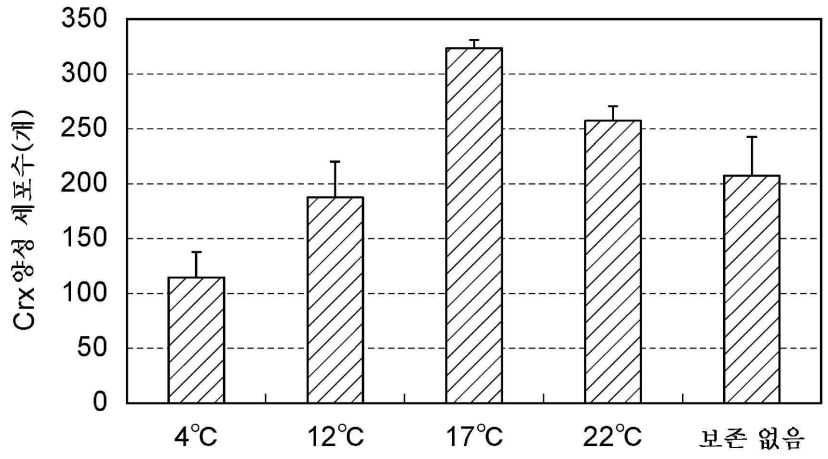
도면12



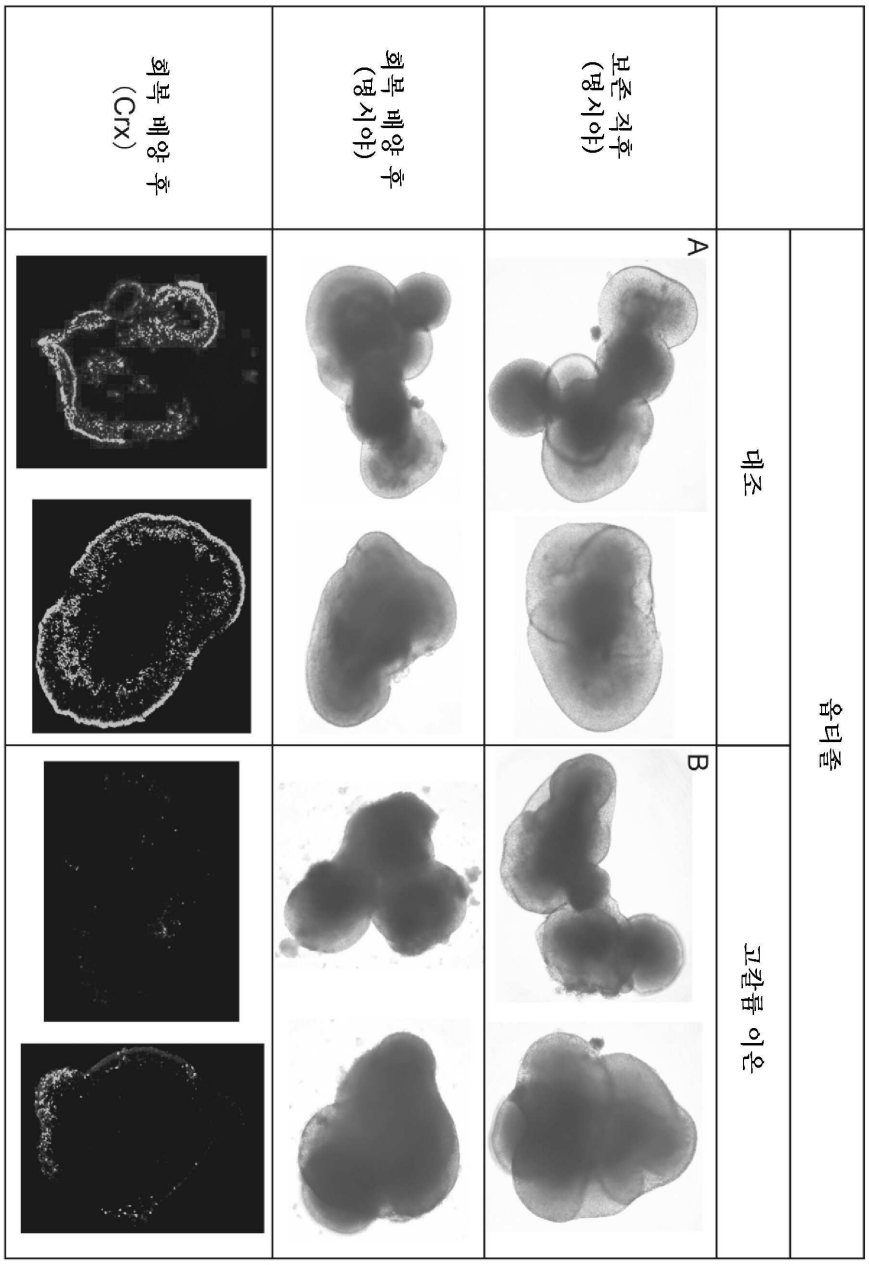
도면13



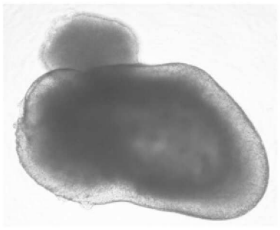
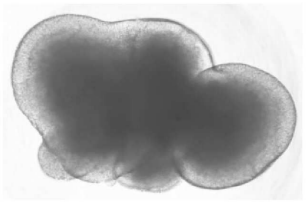
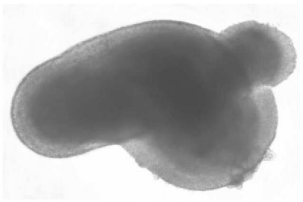
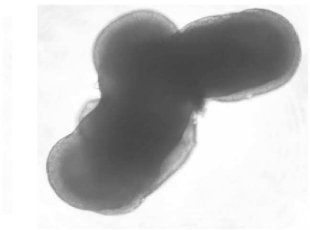
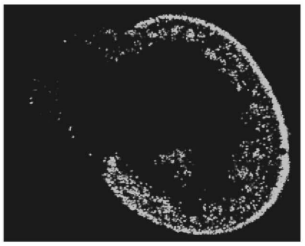
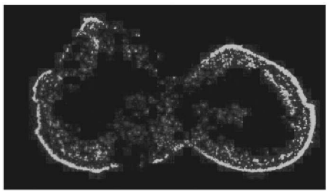
도면14



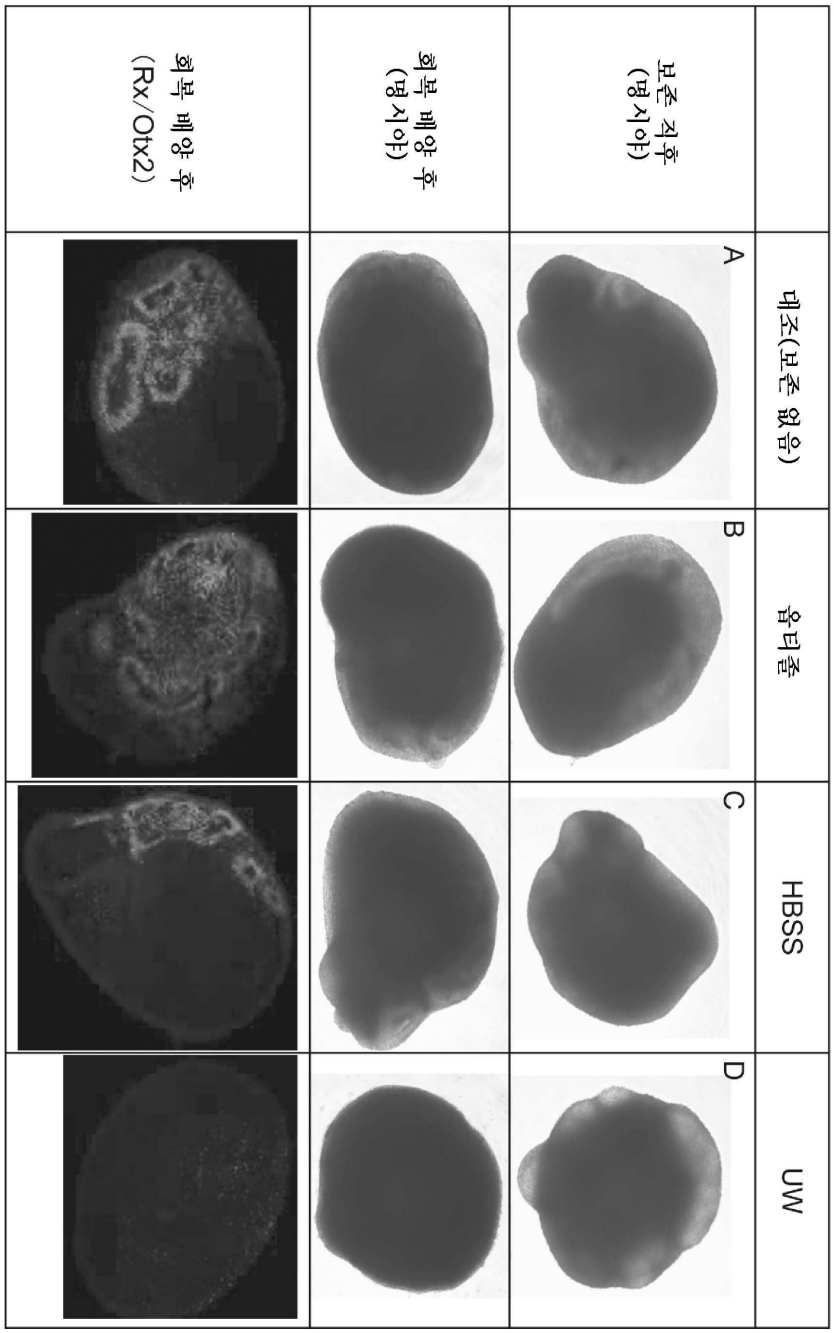
도면15



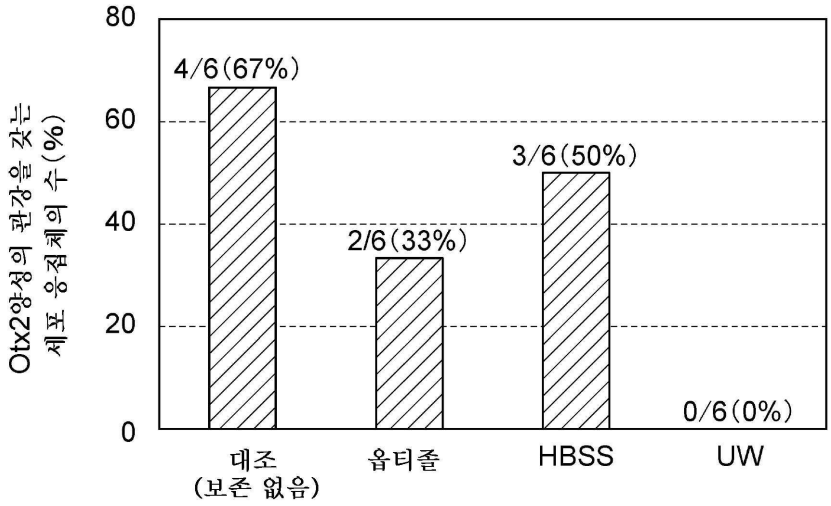
도면16

	DMEM	
	－ 피루브산염	＋ 피루브산염
보존 직후 (명시야)	A 	B 
회복 배양 후 (명시야)		
회복 배양 후 (Crx)		

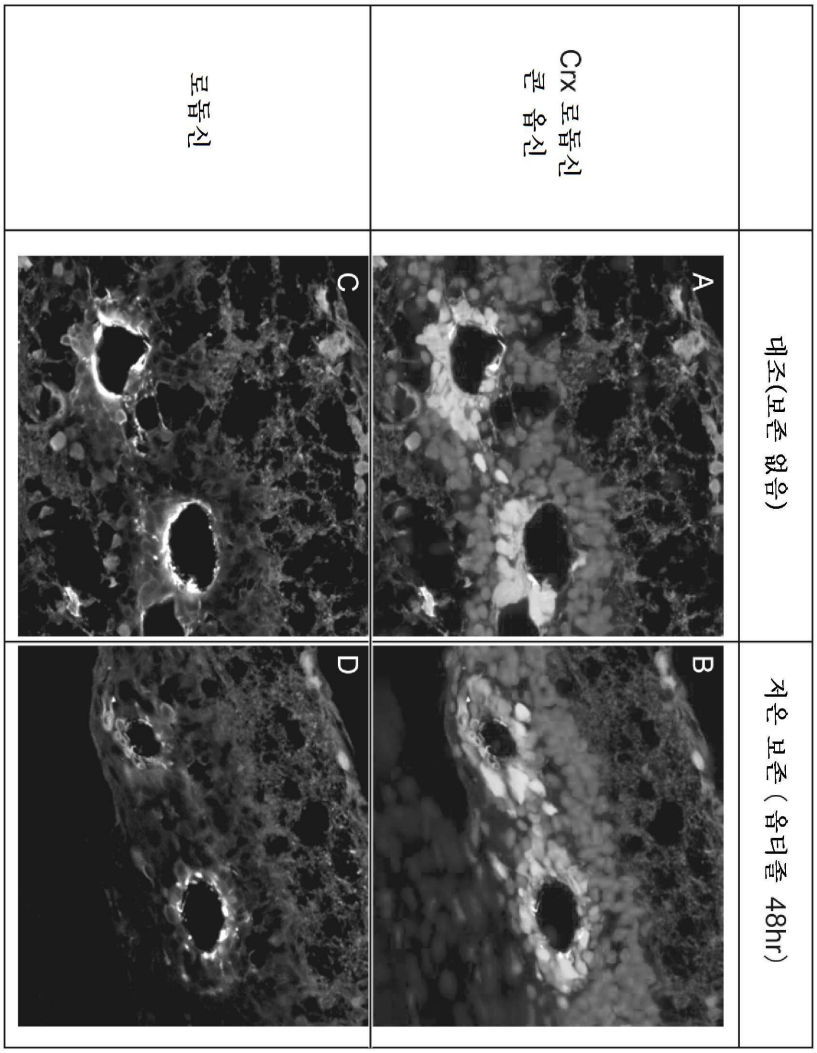
도면17



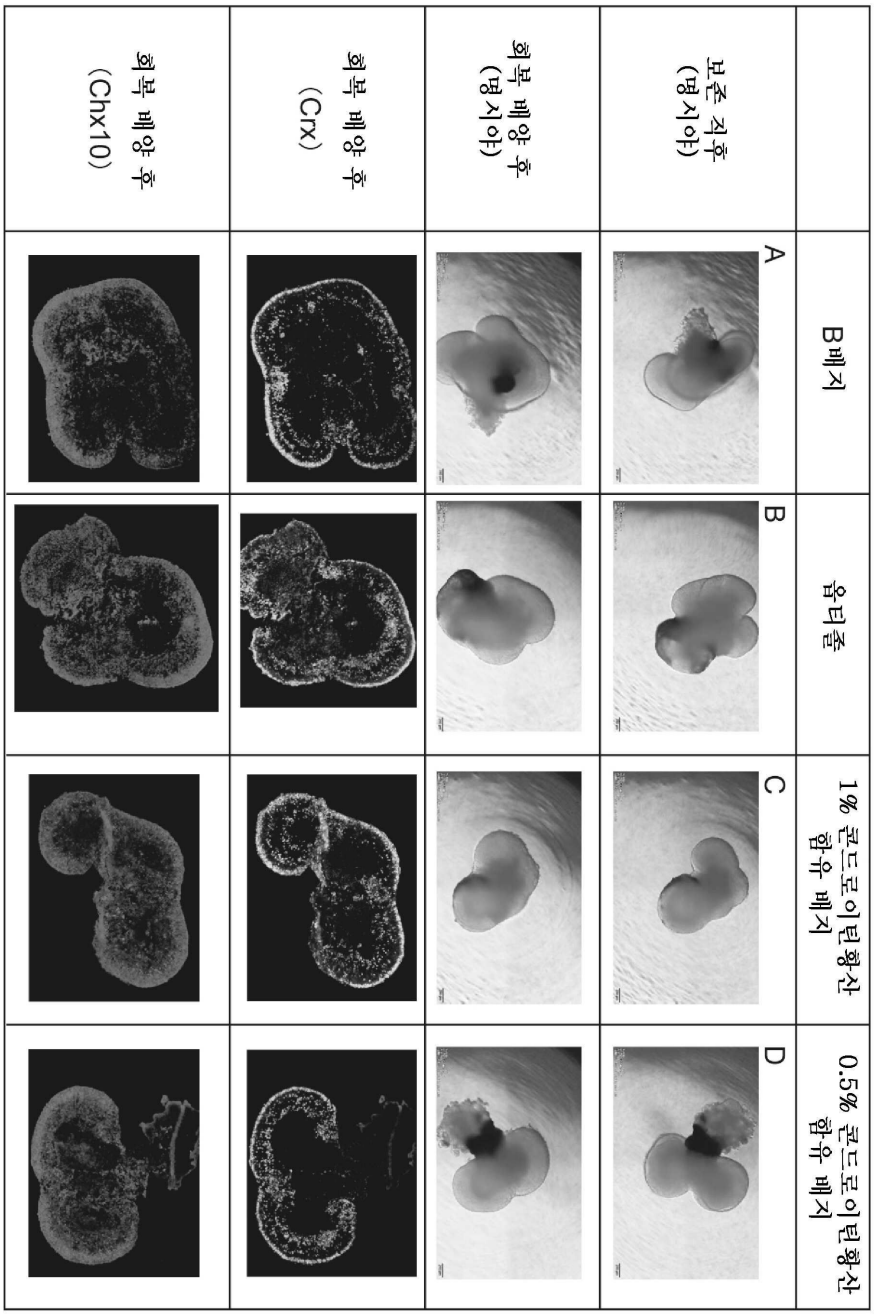
도면18


Otx2양성의 관강을 갖는
세포 응집체의 수(%)
80
60
40
20
0
4/6(67%)
2/6(33%)
3/6(50%)
0/6(0%)
대조
(보존 없음)
옵티졸
HBSS
UW

도면19


대조(보존 없음)
저온 보존 (옵티졸 48hr)
Crx 로돕신
글 옵신
로돕신
A
B
C
D

도면20


B배지
옵티졸
1% 콘드로이틴황산 함유 배지
0.5% 콘드로이틴황산 함유 배지
보존 직후 (명시야)
회복 배양 후 (명시야)
회복 배양 후 (Crx)
회복 배양 후 (Chx10)
A
B
C
D

도면21

