



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2008년01월22일
(11) 등록번호 10-0797143
(24) 등록일자 2008년01월16일

- (51) Int. Cl.
C12N 5/06 (2006.01) C12N 5/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2005-7023771
- (22) 출원일자 2005년12월09일
심사청구일자 2005년12월09일
번역문제출일자 2005년12월09일
- (65) 공개번호 10-2006-0017542
- (43) 공개일자 2006년02월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/JP2004/008120
국제출원일자 2004년06월10일
- (87) 국제공개번호 WO 2004/111212
국제공개일자 2004년12월23일
- (30) 우선권주장
JP-P-2003-00166684 2003년06월11일 일본(JP)
- (56) 선행기술조사문헌
Brain Research Vol.677:300-310 (1995)
European Journal of Neuroscience
Vol.9:1795-1803 (1997)
Differentiation Vol. 70(2-3):101-108 (2002)

- (73) 특허권자
재팬 사이언스 앤드 테크놀로지 에이전시
일본국, 사이타마켄, 가와구치시, 혼조 4 쯔메 1-8
- (72) 발명자
코사카, 미츠코
일본 700-0016 오카야마 오카야마-시 이시마-조 2-5-26-101
- (74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 12 항

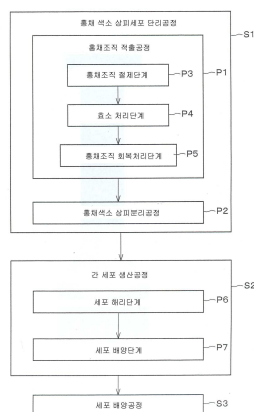
심사관 : 안규정

(54) 동물의 홍채색소 상피세포 유래의 다능성 간세포로부터조직세포를 생산하는 방법, 및 그 방법에 의해 얻어지는조직세포

(57) 요약

본 발명은 세포조직에 의한 면역거절의 문제, 윤리적 문제, 이식 세포원의 수요와 공급의 불균형 등의 문제를 해결하기 위해 얻어지는 동물의 홍채색소 상피세포 유래의 조직세포의 생산방법, 및 이 방법에 의해 얻어지는 조직세포를 제공한다. 본 발명의 조직세포의 생산방법에서는 먼저, 동물의 안구로부터 단리된 홍채색소 상피세포를 부유응집과 배양방법에 의해 선택적으로 배양하여 다능성 간세포를 얻는다. 다음으로, 이 다능성 간세포를, 혈청 등을 이용하여 배양함으로써 각종 조직세포를 생산한다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

동물 안구 유래의 홍채색소 상피세포를 부유응집과 배양방법에 의해 선택적으로 배양함으로써 다능성간세포를 얻는 공정과, 상기 다능성간세포를 배양하여, 당해 다능성간세포로부터 조직세포를 얻는 공정을 포함하는 것을 특징으로 하는 조직세포의 생산방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 동물은 치킨, 마우스, 래트, 사람 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조직세포의 생산방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 동물은 출생 후의 개체인 것을 특징으로 하는 조직세포의 생산방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 다능성간세포는 Oct-3/4 양성인 것을 특징으로 하는 조직세포의 생산방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 홍채색소 상피세포는 동물의 안구 유래의 홍채조직으로부터 홍채색소상피를 분리하는 홍채색소상피 분리공정에 의해 단리된 것임을 특징으로 하는 조직세포의 생산방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 홍채조직은 효소처리된 후에 회복된 조직인 것을 특징으로 하는 조직세포의 생산방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 다능성간세포로부터 조직세포를 얻는 공정에서는 상기 다능성간세포를 분화조건하의 배양에 있어 1종류 이상의 조직세포로 분화시키는 것을 특징으로 하는 조직세포의 생산방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 분화 조건 하의 배양에서는 혈청을 사용하여 배양을 행하는 것을 특징으로 하는 조직세포의 생산방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 혈청은 소 태아 혈청 또는 조류 혈청인 것을 특징으로 하는 조직세포의 생산방법.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서, 상기 분화 조건 하의 배양에 있어서 추가로 성장인자를 사용하는 것을 특징으로 하는 조직세포의 생산방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 성장인자는 EGF 또는 FGF인 것을 특징으로 하는 조직세포의 생산방법.

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

제1항 또는 제4항에 있어서, 상기 다능성간세포는 삼배엽성 분화능을 가지는 것을 특징으로 하는 조직세포의 생산방법.

명세서

기술분야

<1> 본 발명은, 동물의 홍채색소 상피세포로부터 다능성 간세포를 생산하고, 그 다능성 간세포로부터 조직세포를 생산하는 방법, 및 그 방법에 의해 얻어지는 조직세포에 관한 것이다.

배경기술

<2> 최근, 뇌, 척수 유래의 신경간세포나 ES 세포(배(胚)성간세포)의 다분화기능을 이용하여 세포를 만들고, 이를 이식한다고 하는 재생의료가 주목되고 있다.

<3> 상기 신경 간세포나 ES 세포의 의료에의 응용을 고려한 경우에는, 세포이식에 의한 면역거절의 문제, 윤리적 문제, 이식 세포원의 수요나 공급의 언밸런스 등의 많은 문제가 있다.

<4> 따라서, 이식 대상으로 되는 개체 자신에 유래하는 세포를 이식원으로 하여 이용하는 것이 가능하다면, 자가이식이 가능하게 되어 상기의 문제를 해결할 수 있다.

<5> 상기 이식원으로서의 이용이 기대되고 있는 세포로서, 안구의 홍채색소 상피세포가 있다.

<6> 홍채색소 상피세포는 광량이 따라 동공을 개방하거나 좁혀 망막에 굴절되는 광량을 조절하기 위한 조직인 홍채를 구축하고 있는 세포의 하나이다.

<7> 본 발명자는 병아리의 홍채색소 상피세포를 단리 배양하는 것에 성공한 것을, 비특허문헌 1: Experimental Cell Res. (1998) 245, 245-251:에서 보고하고 있다.

<8> 또한, 본 발명자는 상기 비특허문헌 1의 방법에 개변을 가함으로써, 포유동물(마우스, 래트, 사람태아)의 홍채세포의 단리 배양을 가능하게 하였다(비특허문헌 2: nature neuroscience(2001) 4 (12), 1163:을 참고).

<9> 홍채색소 상피세포는 환자 본인으로부터 그의 세포의 일부를 채취하는 것이 가능하기 때문에, 만약 홍채색소 상피세포를 이용한 조직세포의 생산이 가능하다면, 환자 자신의 세포를 이용한 재생치료가 실현되게 된다. (지금까지 본 발명자가 조사한 바로는, 본 발명에 관한 동물의 홍채색소 상피세포 유래의 간세포로부터 조직세포를 생산하는 방법, 및 그 방법에 의해 얻어지는 조직세포에 관한 종래기술 문헌은 발견되지 않았다.)

<10> 그러나, 동물의 홍채색소 상피세포로부터 신경계 이외의 조직세포를 생산하는 방법은 확립되지 않았다.

<11> 본 발명은, 상기 종래의 문제점을 감안하여 이루어진 것으로서, 그 목적은, 세포이식에 의한 면역거절의 문제, 윤리적 문제, 이식 세포원의 수요와 공급의 언밸런스 등의 문제를 해결할 수 있는, 동물의 홍채색소 상피세포 유래의 조직세포의 생산방법, 및 그 방법에 의해 얻어지는 조직세포를 제공하는 것에 있다.

발명의 상세한 설명

<12> 본 발명자는, 상기 과제에 대하여 예의 검토한 결과, 동물의 안구로부터 단리한 홍채색소 상피세포를 부유(浮遊) 응집괴(凝集塊) 배양 방법에 의하여 선택적으로 배양하여 얻은 간세포를 특정의 배양 조건에서 유지하면, 응집괴가 얻어지는 것, 또한 상기 응집괴는 배양체(embryoid body) 구조를 형성하고 있고, 그 중에는, 예컨대, 근육세포나 혈관내피 양세포 등의 다양한 조직세포가 포함되는 것을 발견하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다. 결국, 본원 발명자는 동물의 안구로부터 단리한 홍채색소 상피세포를 부유응집괴 배양방법에 의하여 선택적으로 배양하여 얻은 간세포는 각종 조직으로 분화하는 능력을 가지는 다능성 간세포인 것을 발견하였다.

<13> 본 발명의 조직세포의 생산방법은, 상기 과제를 해결하기 위하여, 동물의 안구로부터 단리한 홍채색소 상피세포를 부유응집괴 배양방법에 의하여 선택적으로 배양함으로써 다능성 간세포를 얻는 공정과, 상기 다능성 간세포를 배양하여 당해 다능성 간세포로부터 조직세포를 얻는 공정을 포함하는 것을 특징으로 한다.

- <14> 상기의 구성에 의하면, 종래 공지의 동물 성체의 홍채색소 상피의 단리방법에 의하여, 동물의 안구로부터 홍채 조직을 적출하고, 홍채조직으로부터 홍채색소 상피를 단리하고, 단리한 홍채색소 상피를 부유응집피 배양방법에 의하여 선택적으로 배양함으로써 다능성 간세포를 얻을 수 있다.
- <15> 따라서, 상기 다능성 간세포를 배양함으로써, 배양체(embrioid body) 구조를 형성할 수 있다.
- <16> 상기 배양체는, 주로 ES 세포로부터 분화유도되어 생성되는 배(胚)와 같은 조직을 포함하는 구조체이다. 이 배양체는 삼배엽성 세포를 포함하고 있기 때문에, 홍채유래 간세포가 ES 세포와 닮은 다능성을 유지하는 것으로 생각된다. 따라서, 이 홍채 상피세포 유래의 배양체 구조에 포함되는 세포를, 본 발명에서는 동물의 홍채색소 상피세포 유래의 조직세포로 부른다.
- <17> 본 발명의 조직세포의 생산 도중 얻어지는 다능성 간세포는, 자가 조직으로부터 비교적 간편하고도 저 침해성으로 채취, 작제할 수 있다고 하는 우위성을 가지고 있다. 즉, 기존의 ES 세포에 의하여, 태아배 유래라고 하는 것에 기인한 윤리성이나 면역거절의 문제를 가지지 않고, 또한 다능성 성체 간세포(multipotent adult progenitor/stem cells: MAPC)와 같이 골수 천공(穿孔)이라고 하는 침해성 높은 회수 방법을 사용할 필요도 없다.
- <18> 본 발명에서는, 상기 동물은, 예를 들면, 치킨, 마우스, 래트, 또는 사람 중 어느 하나이다. 또한, 상기 동물은, 배아기의 개체를 사용하는 것이 가능하지만, 출생 후의 개체도 사용가능하다. 상기 출생 후의 개체로는, 출생 전의 배아를 제거한 개체의 것을 의미한다. 이 출생 후의 개체로서는, 성(性) 성숙 후의 성체, 출생 직후의 유체 등을 열거할 수 있으나, 어느 시기의 개체도 좋다.
- <19> 또한, 상기 다능성 간세포는, 이하의 (1), (2)의 성질 중 적어도 어느 하나를 가지고 있다.
- <20> (1) Oct-3/4 양성이다.
- <21> (2) 삼배엽성 분화능을 가진다.
- <22> 상기 (1), (2)에 대해서는 실시예에서 설명한다.
- <23> 또한, 본 발명의 조직세포의 생산 방법에 있어서, 상기 다능성 간세포로부터 조직세포를 얻는 공정에서는, 상기 다능성 간세포를 분화 조건 하의 배양에 있어 1 종류 이상의 조직세포로 분화시킨다.
- <24> 여기서, 상기 분화 조건 하의 배양으로는, 세포를 분화시키는 것을 목적으로 한 종래 공지의 다양한 조건 하의 배양을 포함한다. 구체적으로는, 혈청이나 각종 성장인자(FGF, EGF, CNTF, RA 등)를 가한 배지에서, 다양한 세포 외 기질 성분을 피복한 배양조 중에서의 배양 방법을 말한다. 이에 따라, 상기 다능성 간세포는, 분화 조건 하의 배양에 의해 1 종류 또는 수 종류의 조직세포로 분화하는 분화능을 가지고 있다.
- <25> 상기 분화조건 하의 배양에서는, 혈청을 이용하여 배양을 행하는 것이 바람직하다. 상기 혈청은, 예를 들어, 소 태아 혈청 또는 조류 혈청이다.
- <26> 상기 분화 조건 하의 배양에 있어서, 또한 성장 인자를 사용하여도 좋다. 상기 성장인자로서는, 예를 들어, EGF(epidermal growth factor: 상피성장인자), FGF(fibroblast growth factor: 섬유아세포 성장인자) 등을 사용할 수 있다.
- <27> 본 발명에 따른 상기 조직세포는, 환자 본인으로부터 그의 세포의 일부를 채취하는 것이 가능한 홍채색소 상피 세포에 유래하고 있다. 따라서, 본 발명에 의하면, 동물의 홍채색소 상피세포로부터 재생치료에서 이식원으로서 활용할 수 있는 조직세포를 생산할 수 있다.
- <28> 또한, 본 발명의 조직세포의 생산 방법에서는, 상기 홍채색소 상피세포는, 동물의 안구로부터 홍채조직을 적출하는 공정과, 적출한 상기 홍채조직으로부터 홍채색소 상피를 분리하는 홍채색소 상피 분리공정에 의하여 단리되는 것을 특징으로 한다.
- <29> 이에 의하면, 동물의 홍채색소 상피세포를 효율 좋게 분리함으로써, 본 발명의 조직세포를 효율 좋게 생산할 수 있다.
- <30> 또한, 본 발명에서는, 상기 홍채조직 적출공정은, 동물의 안구로부터 홍채조직만을 절제하는 홍채조직 절제단계와, 상기 절제한 홍채조직을 효소처리하는 효소처리단계와, 상기 효소처리한 홍채조직을 회복시키는 홍채조직 회복단계를 포함하는 것을 특징으로 한다.

- <31> 이에 의하면, 동물의 안구로부터 홍채조직만을 효율 좋게 적출함으로써, 본 발명의 조직세포를 효율 좋게 생산할 수 있다.
- <32> 본 발명에 따른 조직세포는, 본 발명의 조직세포의 생산방법을 사용하여 얻어지는 것으로, 상술한 바와 같이, 동물의 홍채색소 상피세포에 유래한 것이다. 따라서, 본 발명의 조직세포를, 세포이식에 의한 면역거절의 문제, 윤리적 문제, 이식된 세포의 수요와 공급의 언밸런스 등의 문제를 해결할 수 있는 이식세포원으로 제공할 수 있다.
- <33> 따라서, 본 발명에 따른 조직세포는, 외배엽 세포 또는 외배엽 유래의 세포, 중배엽 세포 또는 중배엽 유래의 세포, 내배엽 세포 또는 내배엽 유래의 세포 중의 어느 것도 될 수 있다.
- <34> 또한, 본 발명의 조직세포는, 생체내의 기관을 구성하는 조직을 형성하는 것이다. 이 "생체내의 기관을 형성하는 조직"이란, 구체적으로는, 신경계기관, 근육기관, 심장, 혈관 등과 같은 각 기관을 구성하고 있는 신경조직, 간조직, 심장조직, 혈관조직 등의 것이다.
- <35> 본 발명의 또 다른 목적, 특징, 및 우수한 점은, 이하에 나타내는 기재에 의하여 충분히 알 수 있을 것이다. 또한, 본 발명의 이점은 다음 설명에 의하여 명백하게 될 것이다.

실시예

- <44> 본 발명의 실시의 일 형태에 대하여 도 1에 의하여 설명하면, 이하와 같다. 본 발명은 이에 제한되는 것이 아니다.
- <45> 본 발명자는 재생의료에 있어 세포이식에 의한 면역거절의 문제, 윤리적 문제, 이식세포원의 수요와 공급의 언밸런스 등의 문제를 해결할 목적으로, 동물의 홍채색소 상피세포 유래의 조직세포를 생산하였다.
- <46> 실시예의 형태에 따른 조직세포의 생산방법은 동물의 안구로부터 단리한 홍채색소 상피세포를 부유응집과 배양 방법에 의하여 선택적으로 배양함으로써 다능성 간세포를 얻는 공정과, 상기 다능성 간세포를 배양하여 상기 다능성 간세포로부터 조직세포를 얻는 공정을 포함하여 구성된다.
- <47> 즉, 본 실시 형태의 조직세포의 생산방법은, 도 1에 나타난 바와 같이, 적어도, 동물의 안구로부터 홍채색소 상피세포를 단리하는 홍채색소 상피세포 단리과정(스텝 1, 이하, 스텝을 S로 약칭한다)과, 단리한 홍채색소 상피세포를 부유응집과 배양방법에 의해 선택적으로 배양함으로써 다능성 간세포를 얻는 공정(이하, 간세포생산공정이라 칭함)(S2)과, 상기 다능성 간세포를 혈청 등을 사용하여 배양하고, 상기 다능성 간세포로부터 조직세포를 얻는 공정(이하, 간세포배양공정이라 칭함)(S3)을 포함하고 있다. 본 발명에 따른 조직세포의 생산방법은 이들에 한정되지 않으며, 다른 공정이 포함되어도 좋다. 또한, S3의 간세포 배양공정은 조직세포 유도공정으로도 부를 수 있다.
- <48> 상기 동물은 출생 후의 개체라면, 유체로부터 성체에 이르기까지 어떤 시기의 개체라도 좋다. 즉, 본 실시의 형태에 따른 조직세포의 생산방법은, 동물 새끼 개체의 홍채색소 상피세포 유래의 조직세포를 생산하는 것이 가능한 것은 말할 것도 없고, 동물 성체의 홍채색소 상피세포 유래의 조직세포를 생산하는 것도 가능하다.
- <49> S1의 홍채색소 상피세포 단리공정은, 홍채색소 상피세포를 단리할 수 있다면 좋고, 그의 구체적인 수법 등에 대해서는 특히 제한되는 것이 아니다. 일반적으로는, 종래 공지의 수법을 이용하여 동물의 안구로부터 홍채조직을 적출하고, 적출한 홍채조직으로부터 홍채색소 상피세포를 단리한다면 좋다. 동물의 안구로부터 홍채조직을 적출하는 방법으로는, nature neuroscience(2001) 4 (12), 1163(전기 비특허문헌 2)에 기재된 방법을 사용하는 것이 바람직하다.
- <50> S2의 간세포 생산공정은 동물의 안구로부터 단리한 홍채색소 상피세포만을 선택적으로 배양할 수 있다면 좋고, 그의 구체적인 수법 등에 대해서는 특히 제한되는 것이 아니다. 일반적으로는, 종래 공지의 수법을 이용하여 동물의 안구로부터 단리한 홍채색소 상피세포만을 선택적으로 배양한다면 좋다.
- <51> 여기서, 간세포 생산공정(S2)에는, 프로세스 6(이하, 프로세스를 P로 약칭한다)으로서, 홍채색소 상피세포 단리 공정(S1)에 있어 단리된 홍채색소 상피세포를, 응집하고 있는 상태에서부터 개개의 세포로 해리하기 위한 세포해리단계와, P7으로서, 단리한 홍채색소 상피세포만을 선택적으로 배양하는 세포배양단계가 포함된다.
- <52> 이하, 간세포 생산공정(S2)의 각 단계 P6 및 P7에 대하여 상세히 설명한다. 우선, P6의 세포해리단계로는, 단리된 홍채색소 상피의 시트 상 세포를 개개의 세포로 해리한다.

- <53> 예를 들면, P6의 세포해리단계는, 시판되는 트립신 용액을 사용하여 단리한 홍채색소 상피의 시트 상 세포를 개개의 세포로 해리한다. 또한, 예를 들어, P6의 세포 해리단계는, 트립신 용액을 사용하지 않고, 시판되는 마이크로피펫을 이용한 피펫팅 조작에 의하여, 단리한 홍채색소 상피의 시트 상 세포를 개개의 세포로 해리하는 것도 가능하다.
- <54> P6의 세포해리단계에 사용되는 시약 및 기구는 특히 제한되지는 않고, 단리된 홍채색소 상피세포를 응집하고 있는 상태에서부터 개개의 세포로 해리하는 것이 가능한 종래 공지의 시약 및 기구를 사용할 수 있다.
- <55> P7의 세포배양단계로는, 단리한 홍채색소 상피세포를 부유상태로서 FGF(fibroblast growth factor: 섬유아세포 성장인자), LIF(leukemia inhibitory factor: 백혈병저해인자), 또는 SCF(human SCF (Stem Cell Factor: 인간 간세포인자)의 단독, 또는 조합에 의한 인자를 첨가한 무혈청 배지에서 배양한다. 이로 인해, 상기 홍채색소 상피세포를 미분화 상태에서 증식시키는 것이 가능하게 되므로, 그 결과 얻어지는 조직세포도 많아진다. 이 단계에서는, Science 1992: 225; 1707-1710에 기재된 부유응집과 배양법(nerosphere법)을 사용하여 동물의 안구로부터 단리한 홍채색소 상피세포를 선택적으로 배양하는 것이 바람직하다.
- <56> 예를 들면, P7의 세포배양 단계에서는, 시판되는 무혈청 배지에, 시판되는 N2 서플리먼트를 첨가한 것을 부유응집과 배양용의 배양액으로서 사용한다. P6의 세포해리단계에서 해리된 상기 홍채색소 상피세포를, 상기 부유응집과 배양용의 배양액 중에서, 시판되는 웨이커를 이용하여 회전을 가하면서 배양한다. 이에 따라, 다능성 간세포를 많이 포함하는 세포집단을 선택적으로 분리, 회수할 수 있다.
- <57> P7의 세포배양단계에 사용되는 배양액 및 시약은 특히 제한되는 것이 아니며, 상기 간세포를 얻는 것이 가능한 종래 공지의 배양액 및 시약을 사용할 수 있다.
- <58> 또한, 본 실시의 형태에서는, P7의 세포배양단계에 있어 배양시기는 필요에 따라 적절 설정한다면 좋다. 다만, 이 때 배양을 너무 오래 한다면, 얻어지는 응집체는 과성장하여 분화되어버릴 염려가 있다. 따라서, 본 실시의 형태에서는, 3~4 일 이내에 세포를 해리하여 계대(繼代)하는 것이 바람직하다.
- <59> 그리고, S3의 간세포배양공정에서, 혈청을 이용하여 P7의 세포배양단계에서 얻어진 간세포를 배양한다. S3의 간세포배양공정에서는, 혈청을 사용하여 상기 간세포를 배양할 수 있으면 좋고, 그 구체적인 수법 등에 대해서는 특히 제한되는 것은 아니다. 그런데, 예를 들어, 시판되는 마이크로피펫을 이용하여 상기 간세포를 혈청을 포함하는 배지로 이동시켜 배양할 수도 있다.
- <60> 상기 혈청으로서는, 예를 들어, 소 태아 혈청 및 조류 혈청 등을 들 수 있고, 이들에 특히 제한되는 것은 아니다. 또한, 본 실시의 형태에서는, 이들 혈청을 1 종류 사용하여도 좋고, 필요에 따라 2 종류 이상 사용하여도 좋다.
- <61> 또한, 상기 혈청의 농도는 5~30%인 것이 바람직하며, 10~20%인 것이 더욱 바람직하며, 이와 같은 혈청 농도에서 배양을 행하면 바람직한 결과가 얻어진다. 그런데, 그 이하 또는 그 이상의 농도에서도 본 발명은 실시 가능하기 때문에, 상술한 혈청 농도에 한정되는 것은 아니다.
- <62> 본 실시의 형태에서는 상기 혈청에 또한 성장인자를 첨가하여 상기 간세포를 배양하여도 좋다. 상기 성장인자로서 구체적으로는, 예를 들어, EGF(epidermal growth factor: 상피성장인자), FGF(fibroblast growth factor: 섬유아세포성장인자) 등을 들 수 있다. 본 실시의 형태에서는 이들 성장인자를 1 종류 사용하여도 좋고 필요에 따라 2 종류 이상 사용하여도 좋다.
- <63> 또한, 상기 성장인자의 농도는 특히 한정되는 것이 아니며, 필요에 따라 적의 설정한다면 좋은 것이다.
- <64> 본 실시의 형태에서는, 특히 한정되는 것은 아니지만, S3의 간세포배양공정에서 상기 간세포의 배양 시간을 1~3 개월로 하는 것이 바람직하다. 상기 S3의 간세포배양공정에서 배양기간이 1 개월 이하(특히, 2 주간 이하)라면 분화유도효율이 낮아지기 때문에 바람직하지 않고, 반대로 3 개월 이상에서는 응집체 내부의 세포생존이 나빠질 가능성이 있어 바람직하지 않다.
- <65> 본 실시의 형태에서는 상기 S3의 간세포배양공정을 행함으로써 배양체를 얻는다. 이 배양체는, 동물의 홍채색소 상피세포 유래이고, 이 홍채색소 상피세포는 외배엽성 세포이다. 따라서, 본 실시의 형태에서 얻어지는 상기 배양체에는 신경간세포가 포함되지만, 그 외에, 예를 들어 근육세포나 혈관내피양세포 등 다양한 조직세포가 상기 배양체에 포함되어 있다. 이로 인해, 본 실시의 형태에 의하면, S3의 간세포배양공정에 의해 동물의 홍채색소 상피세포 유래의 조직세포를 얻을 수 있다.

- <66> 본 실시의 형태에 따른 조직세포의 생산방법은, 상기 홍채색소 상피세포가 동물의 안구로부터 홍채조직을 적출하는 홍채조직적출공정과, 적출한 상기 홍채조직으로부터 홍채조직 상피를 분리하는 홍채색소 상피 분리공정에 의해 단리되는 방법이다. 이제, 본 발명에 따른 조직세포의 생산방법은 이에 한정되는 것은 아니며, 다른 공정이 포함되어도 좋다.
- <67> 즉, 본 실시의 형태의 조직세포의 생산방법은 도1에 나타난 바와 같이, 적어도 홍채색소 상피세포 단리공정(S1), 간세포생성공정(S2), 및 간세포배양공정(S3)이 포함되고, 또한, 상기 홍채색소 상피세포 단리공정(S1)에는, 후술하는 홍채조직적출공정(P1) 및 홍채색소 상피 분리공정(P2)이 포함된다. 본 발명에 따른 조직세포의 생산방법은 이들에 한정되는 것이 아니며, 다른 공정이 포함되어도 좋다.
- <68> 상기 홍채조직적출공정(P1)은 동물의 안구로부터 홍채조직을 적출할 수 있다면 좋고, 그 구체적인 수법 등에 대해서는 특히 제한되는 것이 아니다. 일반적으로는 종래 공지의 수법을 이용하여 동물의 안구로부터 홍채조직을 적출한다면 좋다. 바람직하게는, Nature Neuroscience (2001), 4 (12) 1163 (전기 비특허문헌 2)에 기재된 방법을 이용하여 동물의 안구로부터 홍채조직을 적출하여도 좋다.
- <69> 여기서, 상기 홍채조직적출공정(P1)은, 도 1에 나타난 바와 같이, P3으로서 동물의 안구로부터 홍채조직만을 절제하는 홍채조직절제단계를, P4로서 절제한 홍채조직을 효소처리하는 효소처리단계를, P5로서 효소처리한 홍채조직을 회복시키는 홍채조직 회복처리단계를 포함하고 있다. 본 발명에 따른 조직세포의 생산방법은 이들에 한정되는 것은 아니며, 다른 공정이 포함되어도 좋다.
- <70> 이하, 홍채조직적출공정(P1)의 각 단계 P3-P5 에 대하여 상세히 설명한다. 우선, P3의 홍채조직절제단계는 동물의 안구로부터 홍채조직만을 절제할 수 있다면 좋고, 그의 구체적인 수법 등에 대해서는 특히 한정되는 것은 아니다. 일반적으로는 종래 공지의 수법을 이용하여 동물의 안구로부터 홍채조직만을 절제한다면 좋다.
- <71> 예를 들어, P3의 홍채조직절제단계는, 시판되는 마이크로 가위를 사용하여 동물의 안구로부터 홍채조직만을 절제한다.
- <72> P4의 효소처리단계는 홍채조직으로부터 홍채색소 상피를 분리하기 쉽게 하기 때문에 홍채조직을 효소처리하는 것으로서, 그 구체적인 수법 등에 대해서는 특히 한정되는 것은 아니다. 일반적으로는 종래 공지의 수법을 이용하여 홍채조직으로부터 홍채색소 상피를 분리하기 쉽게 하기 위하여 홍채조직을 효소처리한다면 좋다.
- <73> 예를 들어, 닭의 안구로부터 홍채색소 상피를 분리하는 경우는, P4의 효소처리단계에서, 홍채조직을 시판되는 디스파제를 함유하는 디스파제 용액 중에서 15~49 분간 반응시킨 후, 시판되는 EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid: 에틸렌디아민테트라아세트산)를 함유하는 EDTA 용액 중에서 20~30 분간 반응시킨다. P4의 효소처리단계에 사용되는 효소 및 시약은 특히 한정되는 것은 아니고, 홍채조직으로부터 홍채색소 상피를 분리하기 쉽게 하기 위하여 홍채조직을 처리하는 것이 가능한 종래 공지의 효소 및 시약을 이용할 수 있다.
- <74> P5의 홍채조직회복처리수단은 효소처리에 의해 쇠약한 홍채조직을 회복시키는 것으로서, 그 구체적인 수법 등에 대해서는 특히 한정되는 것은 아니다. 일반적으로는 종래 공지의 수법을 이용하여 효소처리에 의해 쇠약한 홍채조직을 회복시키면 좋다.
- <75> 예를 들면, P5의 홍채조직회복단계는 P4의 효소처리단계의 반응 후, 홍채조직을 시판되는 소 태아 혈청을 포함하는 배양액 중에서 30~60 분간 반응시켜 홍채조직을 회복시킨다. P5의 홍채조직회복처리단계에 사용되는 혈청을 포함하는 배양액 및 시약은 특히 한정되는 것은 아니며, 쇠약한 홍채조직이 회복되는 것이 가능한 종래 공지의 혈청을 포함하는 배양액을 사용할 수 있다.
- <76> 또한, 홍채조직적출공정(P1)에 있어서는, P4의 효소처리단계 및 P5의 홍채조직회복처리단계의 반응시간이 특히 중요하다. P4의 효소처리단계의 상기 홍채조직의 디스파제 용액에 의한 반응시간, 및 상기 EDTA 용액에 의한 반응시간, 및 P5의 홍채조직회복처리수단의 상기 소 태아 혈청을 포함하는 배양액에 의한 반응 시간을 조절함으로써, 치킨 뿐 아니라 마우스, 래트, 사람의 안구로부터 홍채색소 상피를 분리하는 것이 가능하다.
- <77> 마우스 안구로부터 홍채색소 상피를 분리하는 경우는, 상기 홍채조직을 25~37℃ 의 상기 1000 U/ml의 디스파제 용액에 의하여 15~40 분간 반응시키고, 실온 하에서 상기 0.05~0.1% EDTA 용액에 의해 16~40 분간 반응시키고, 소 태아 혈청을 8~10% 포함하는 배양액에 의해 30~120 분간 반응시키는 것이 바람직하다.
- <78> 또한, 생후 10일의 마우스 안구로부터 홍채색소 상피를 분리하는 경우는, 상기 홍채조직을 37℃의 상기 1000 U/mL의 디스파제 용액에 의해 16 분간 반응시키고, 실온 하에서 상기 0.05% EDTA 용액에 의해 20 분간 반응시키

고, 소 태아 혈청을 8% 포함하는 배양액에 의해 90 분간 반응시키는 것이 특히 바람직하다.

- <79> 또한, 생후 12일의 마우스의 안구로부터 홍채색소 상피를 분리하는 경우는, 상기 홍채조직을 37℃의 상기 1000 U/mL의 디스파제 용액에 의해 20 분간 반응시키고, 실온 하에서 상기 0.05% EDTA 용액에 의해 25 분간 반응시키고, 소 태아 혈청을 8% 포함하는 배양액에 의해 60 분간 반응시키는 것이 특히 바람직하다.
- <80> 또한, 생후 2 개월의 마우스의 안구로부터 홍채색소 상피를 분리하는 경우는, 상기 홍채조직을 37℃의 상기 1000 U/mL의 디스파제 용액에 의해 30 분간 반응시키고, 실온 하에서 상기 0.05% EDTA 용액에 의해 40 분간 반응시키고, 소 태아 혈청을 8% 포함하는 배양액에 의해 30 분간 반응시키는 것이 특히 바람직하다.
- <81> 래트의 안구로부터 홍채색소 상피를 단리하는 경우는, 상기 홍채조직을 37℃의 상기 1000 U/mL의 디스파제 용액에 의해 15~40 분간 반응시키고, 실온 하에서 상기 0.05% EDTA 용액에 의해 15~60 분간 반응시키고, 소 태아 혈청을 8% 포함하는 배양액에 의해 30~120 분간 반응시키는 것이 특히 바람직하다.
- <82> 인간 태아의 안구로부터 홍채색소 상피를 분리하는 경우는, 상기 홍채조직을 25~37℃의 상기 500~1000 U/mL의 디스파제 용액에 의해 15~30 분간 반응시키고, 실온 하에서 상기 0.05~0.1% EDTA 용액에 의해 15~40 분간 반응시키고, 소 태아 혈청을 8~10% 포함하는 배양액에 의해 10~60 분간 반응시키는 것이 특히 바람직하다.
- <83> 또한, 생후 19 주의 사람 태아의 안구로부터 홍채색소 상피를 분리하는 경우는, 상기 홍채조직을 37℃의 상기 1000 U/mL의 디스파제 용액에 의해 30 분간 반응시키고, 실온 하에서 상기 0.05% EDTA 용액에 의해 30 분간 반응시키고, 소 태아 혈청을 8% 포함하는 배양액에 의해 60 분간 반응시키는 것이 특히 바람직하다.
- <84> 이제, 상기 배양액으로서는, 예를 들어, DMEM 배지(Invitrogen사 제품)를 사용하고, 시판되는 소 태아 혈청을 적량 첨가한 것을 이용한다면 좋다.
- <85> P2의 홍채색소 상피 분리공정은, 홍채조직적출공정(P1)에서 적출한 홍채 기질과 홍채색소 상피로부터 구축되는 홍채조직으로부터 홍채색소 상피만을 분리할 수 있다면 좋고, 그 구체적인 수법 등에 대해서는 특히 한정되는 것은 아니다. 일반적으로는 종래 공지의 수법을 이용하여, 홍채조직으로부터 홍채색소 상피만을 분리할 수 있다면 좋다.
- <86> 예를 들어, P2의 홍채상피분리공정은, 회복된 상피 홍채조직으로부터, 시판되는 마이크로핀셋을 사용하여, 홍채색소 상피만을 골라 회수함으로써 홍채기질과 홍채색소 상피를 분리한다.
- <87> 이와 같이, 본 실시의 형태에 의하면, 상기 홍채색소 상피세포를 P1의 홍채조직적출공정과, P2의 홍채색소 상피 분리공정에 의해 단리함으로써 상기 홍채색소 상피세포를 효율 좋게 분리할 수가 있고, 이에 따라 상기 조직세포를 효율 좋게 생산하는 것이 가능하다.
- <88> 이상과 같이, 본 실시의 형태에 따른 조직세포는, 환자 본인으로부터 그의 세포의 일부를 채취하는 것이 가능한 홍채색소 상피세포에 유래하고 있다. 따라서, 본 실시의 형태에 의하면, 본인의 홍채색소 상피세포로부터 각종의 조직세포로의 분화능을 가지는 다능성 간세포를 생산하는 것이 가능하다. 그리하여, 이 다능성 간세포를 각종의 분화 조건 하에서 배양함으로써, 나아가 재생의료에 있어 이식원으로서 활용시키는 각종의 조직세포를 생산할 수 있다. 또한, 본 실시의 형태의 조직세포를 이식세포원으로서 사용한다면, 세포이식에 의한 면역거절의 문제, 윤리적 문제, 이식원세포의 수요와 공급의 불균형 문제를 해결할 수 있다.
- <89> [실시예]
- <90> 이하, 실시예 및 도2~도6b에 근거하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명하지만, 본 발명은 이들에 한정되는 것은 아니다.
- <91> [실시예 1]
- <92> (홍채색소 상피세포의 단리)
- <93> 시판되는 마이크로 가위를 사용하여 병아리의 안구로부터 홍채조직만을 절제하였다. 그 홍채조직을 37℃의 디스파제 용액("디스파제(dispase) 합동청주사 제품") 1000 U/mL 중에서 15~40 분간 반응시킨 후, 실온 하에서 0.05% EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산) 용액 중에서 20~30 분간 반응시켰다.
- <94> 반응 후, 상기 홍채조직을 소 태아 혈청을 8% 포함하는 배양액("DMEM배지" Invitogen 사 제품) 중에서 30~60 분간 반응시키고, 상기 홍채조직을 회복시켰다. 그 후, 시판되는 마이크로핀셋을 이용하여 홍채색소 상피만을 상기 홍채조직으로부터 골라 회수함으로써, 홍채 기질과 홍채색소 상피를 분리하였다.

- <95> (부유응집과 배양법)
- <96> 상기 분리한 홍채색소 상피는, 시판되는 트립신 용액을 사용하여 세포에 해리하였다. 그 후, 이 해리한 홍채색소 상피세포를 Science 1992: 225; 1707-1710에 기재된 부유응집과 배양법(neurosphere법)에 의하여 선택적으로 배양하였다.
- <97> 부유응집과 배양의 배지에는 무혈청배지("DMEM/F12배지" Invitrogen 사 제품)에 N2 서플리먼트(Invitrogen 사 제품)를 100 분의 1의 양, FGF 2(섬유아세포성장인자-2, PeproTech 사 제품)를 20 ng/mL 단독, 또는, LIF(백혈병저해인자, ESGRO, Chemicon 사 제품)를 1000 U/mL 및 SCF(인간 SCF(인간 간세포인자), DIACLONE 사 제품)를 10 ng/mL 이 되도록 첨가하였다.
- <98> 트립신 처리한 상기 홍채색소 상피세포를, 상기의 부유응집과 배지에서 시판되는 웨이커를 사용하여 회전을 부여하면서, 탄산 가스 배양기 중에서 3~7 일간 배양함으로써 간세포를 얻었다. 얻어진 간세포의 형태를 도 2a에 나타낸다.
- <99> (간세포 배양에 의한 응집과의 형성)
- <100> 상기 병아리 안구로부터 단리한 홍채색소 상피세포를 상기 부유응집과 배양 후, 간세포 배양을 이하와 같이 행하였다.
- <101> 상기 부유응집과 배양법에 의하여 얻어진 상기 병아리의 홍채색소 상피세포 유래의 간세포를, 시판되는 마이크로핀셋을 사용하여, 이하의 (b)에 나타내는 조성의 배지에 이동시켰다.
- <102> (b) 소 태아 혈청(8%), 및 성장인자로서 EGF 및 FGF2(각각 20 ng/mL)를 포함하는 DMEM 배지(Invitrogen 사 제품).
- <103> 그리고, 상기 (b) 및 (c) 각각의 배지를 사용하여 상기 간세포를 1~2 개월간 배양하였다. 그 결과, 도 2((b), (c))에 각각 나타난 바와 같은 응집과를 얻었다.
- <104> 상기 (b), (c) 각각의 배지에서 배양함으로써 얻어지는 응집과를 디스민(근육세포 마커) 항체 및 DAPI 염색(핵)으로 표지하였다. 그 결과를 도 3(a) 및 도 3(b)에 나타낸다. 도 3a는 도2에 있어 (b)에 나타내는 배지에서 배양함으로써 얻어지는 응집과를 나타내며, 도3(b)는 도2에 있어서 (c)에 나타내는 배지에서 배양함으로써 얻어진 응집과를 나타내고 있다. 도 3(a) 및 도 3(b)에 있어서, 백색의 부분이 디스민으로 표지된 응집과의 상을 나타내며, 회색으로 나타나는 부분이 DAPI 염색(핵)으로 표지된 응집과의 상을 나타내고 있다.
- <105> [실시예 2]
- <106> 실시예 1과 마찬가지로 하여 해리한 홍채색소 상피를, 무혈청배지("DMEM/F12 배지" Invitrogen 사 제품), N2 서플리먼트(Invitrogen 사 제품) 100 분의 1의 양 및 FGF2(섬유아세포성장인자-2, PeproTech 사 제품) 20 ng/mL 로써 3일간 배양한 후, 하기 (1)~(3)의 조성을 포함하는 3 종류의 배지 중에서, 부유응집과 배양법에 의한 배양을 1~2 개월간 행하였다.
- <107> (1) 소 태아 혈청(8%), EGF(20 ng/mL), 및 FGF2(20 ng/mL).
- <108> (2) 소 태아 혈청(8%), 및 닭 혈청(2%).
- <109> (3) 소 태아 혈청(8%), 닭 혈청(2%), EGF(20 ng/mL), 및 FGF2(20 ng/mL).
- <110> 얻어진 응집과로부터 RNA를 추출하고, RT-PCR법을 이용하여 내배엽 마커인 α 헵토프로테인, 중배엽 마커인 미오신 및 MEF2, 외배엽 마커인 pax6 및 튜블린 J에 대하여 유전자 발현의 유무를 조사하였다. 그 결과, 상기 (1)~(3)의 어떤 조건 하에서도 상기 마커 유전자의 발현이 인식되었다. 이로부터, 얻어진 응집과에는 세 배엽 전부의 조직계열로 분화된 세포가 포함되어 있음을 알 수 있다.
- <111> 이 결과에 의해, 상기 응집과는, 주로 ES 세포가 분화유도에 의해 생성되고, 배(胚)에 의해 다종다양한 분화 세포를 포함하는 배엽체로 불리는 세포구조체와 마찬가지로의 성질을 가지는 것임을 알 수 있었다. 홍채색소 상피세포는 외배엽성의 세포지만, 본 실시예에 의하여, 동물의 홍채색소 상피세포 유래의 간세포로부터 배엽성을 초월한 분화를 일으키는 것이 가능하다는 것을 보였다. 결국, 간세포 생산공정에 의하여 얻어지는 세포는 중배엽, 내배엽, 외배엽의 어느 것으로도 분화할 수 있는 삼배엽성 분화능을 가지는 다능성 간세포인 것임을 알 수 있다.

- <112> 또한, 도 4에는, 3 일간의 무혈청 배지에서 배양의 단계(즉, 간세포생산공정 S2)와, 그 후의 1~2 개월의 배양의 단계(간세포배양공정 S3) 각각에 있어 배양세포에 대하여, RNA를 추출하고, RT-PCR 법으로 심근세포 특이적 유전자의 발현유도를 확인한 결과를 나타낸다.
- <113> 라인 1은, S2의 간세포 생산공정에 있어 세포배양단계(S7)의 배양 2 일째의 샘플에서의 결과이다. 또한, 라인 2는 S3의 간세포배양공정에 있어 상기 (3)의 조건 하에서 배양 2 개월 후의 샘플에서의 결과이다. 이 도에 나타나는 결과로부터, 라인 1의 간세포 생산공정에서는 다능성 간세포가 조직세포로 분화하기 이전의 상태이고, 라인 2의 간세포배양공정 중에 심근세포로 분화하고 있는 것을 알 수 있다.
- <114> [실시예 3]
- <115> Oct-3/4는 전능성 미분화 세포에 특이적으로 발현하는 분자로서, 그 발현이 확인되는 세포는 극히 한정된다(도 5에 나타나는 "마우스 초기 발생 과정에 있어서 Oct-3/4 발현양식"을 참고). 생후에 있어서는, 생식 간세포인 정원(精原) 세포에서만 발현하는 것으로 알려져 있고, 다른 체세포 조직에는 발현하지 않는 것으로 알려져 왔다.
- <116> 본 실시예에서는, 출생 후의 마우스 및 래트의 홍채조직 및 그들로부터 얻어진 간세포의 일부에 있어서의 Oct-3/4의 발현을 조사하였다. 그 결과를 도 6(a, 도6(b)에 나타낸다. 이제, 도 6(a 및도 6(b)는 본 발명에 의한 방법을 사용하여 출생 후 11 일 및 3 주째의 래트 각각으로부터 얻어진 간세포를, Oct-3/4 항체에 의한 염색 및 DAPI 염색으로 표지한 결과를 나타내고 있는데, 백색이 표지된 부분을 나타낸다. 도 6(a), 도 6(b)의 결과로부터, 출생 후의 마우스 및 래트의 홍채조직 및 그들로부터 얻어진 간세포의 일부에 있어서, Oct-3/4 유전자의 발현, 및, 유전자 산물(Oct-3/4 단백질)의 발현이 있음(즉, Oct-3/4 양성인)을 알 수 있다.
- <117> 이 결과는, 홍채라고 하는 휴세포(休細胞) 조직 중에도, 미분화 전능성을 유지하는 세포가 포함되어 있는 가능성을 강하게 시사하는 것으로, 이들 세포를 순화, 배양하고, 적당한 조건에서 분화유도한다면, 다양한 조직세포를 생산하는 것이 가능하게 될 것이다. ES 세포를 응용한 재생의료의 연구는 널리 행해지고 있지만 윤리적 문제가 크다. 홍채조직이라면, 환자 본인의 세포를 이용하는 것이 가능하므로, 자가 이식에 의한 재생의료를 실현하는 것으로 연결될 것으로 기대된다.
- <118> 또한, 발명을 실시하기 위한 최선의 형태의 향으로서 나타낸 구체적인 실시형태 또는 실시예는, 명백하게, 본 발명의 기술내용을 명확하게 하기 위한 것으로서, 그와 같은 구체예로만 한정하여 협의로 해석해야 하는 것은 아니며, 본 발명의 정신과 다음에 기재하는 특허청구의 범위 내에서 다양하게 변경시켜 실시하는 것이 가능하다.

산업상 이용 가능성

- <119> 이상과 같이, 본 발명의 조직세포의 생산방법에 따르면, 동물의 홍채색소 상피세포로부터, 각종의 조직세포로의 분화능을 가지는 다능성 간세포를 생산하고, 나아가, 이 다능성 간세포로부터 각종 조직세포를 생산할 수 있다는 효과를 가진다. 이 조직세포는 재생의료에서 이식원으로서 활용하는 것이 가능하다.
- <120> 또한, 본 발명의 생산방법에 의하여 얻어지는 조직세포는 세포이식에 의한 면역거절의 문제, 윤리적 문제, 이식 원세포의 수요와 공급의 불균형 문제 등을 해결할 수 있는 이식원으로서 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

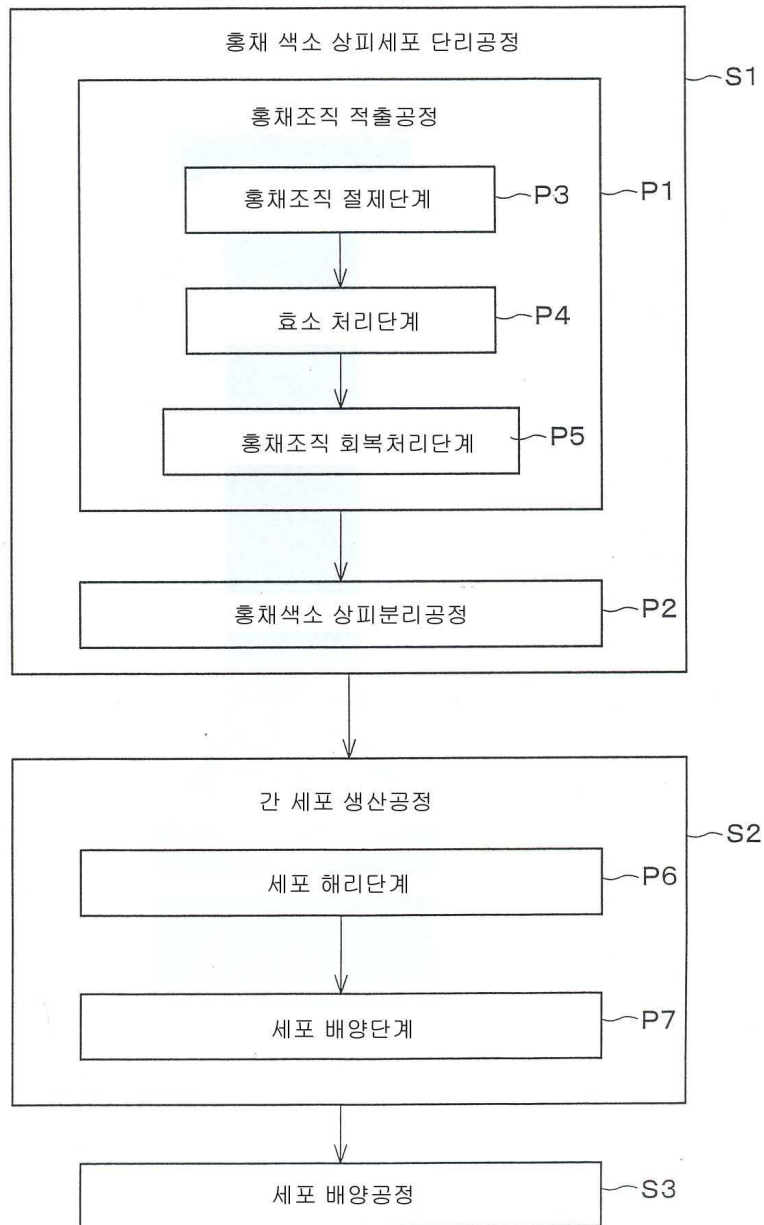
- <36> 도 1은 본 발명에 따른 조직세포의 생산방법의 일 예를 나타내는 개략 공정도이다.
- <37> 도 2는 실시예 1에 따른 간세포의 양자(樣子)를 나타내는 도면이다.
- <38> 도 3a는 실시예 1에 있어서, 디스민(근육세포 마커) 항체, 및 DAPI 염색(핵)으로 표지한 응집괴를 나타내는 도면이다.
- <39> 도 3b는 실시예 1에 있어서, 디스민(근육세포 마커) 항체, 및 DAPI 염색(핵)으로 표지한 응집괴를 나타내는 도면이다.
- <40> 도 4는 실시예 2에 있어서, 홍채색소 상피세포로부터 각 조직세포를 유도하는 각 공정에 있어 심근세포의 출현을 나타내는 도면이다.
- <41> 도 5는 마우스 초기 발생 과정에 있어 Oct-3/4 발현양식을 설명하는 도면이다.

<42> 도 6a는 실시예 3에 있어 래트로부터 얻어진 간세포를 Oct-3/4 항체에 의한 염색 및 DAPI 염색으로 표지한 결과를 나타내는 도면이다.

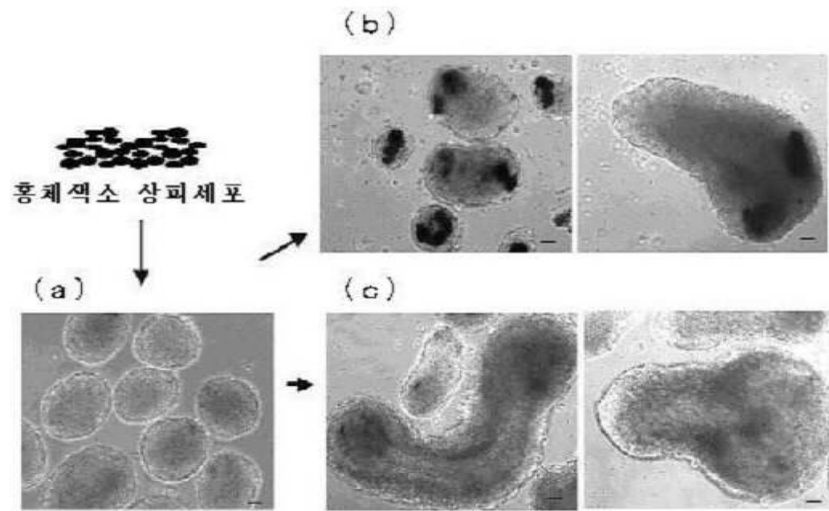
<43> 도 6b는 실시예 3에 있어 래트로부터 얻어진 간세포를 Oct-3/4 항체에 의한 염색 및 DAPI 염색으로 표지한 결과를 나타내는 도면이다.

도면

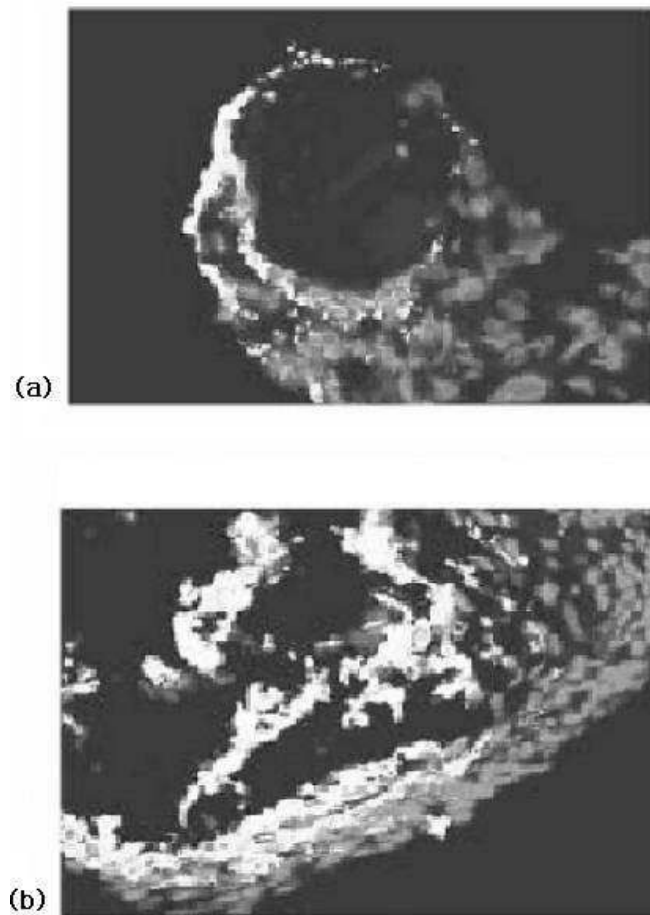
도면1



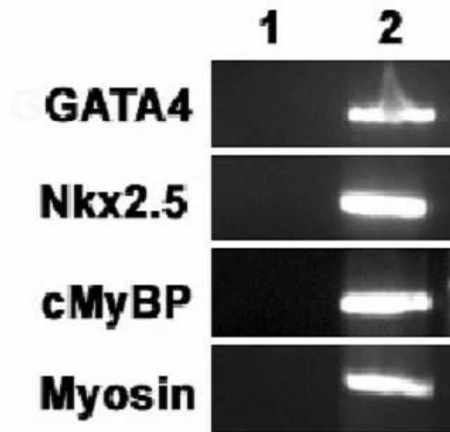
도면2



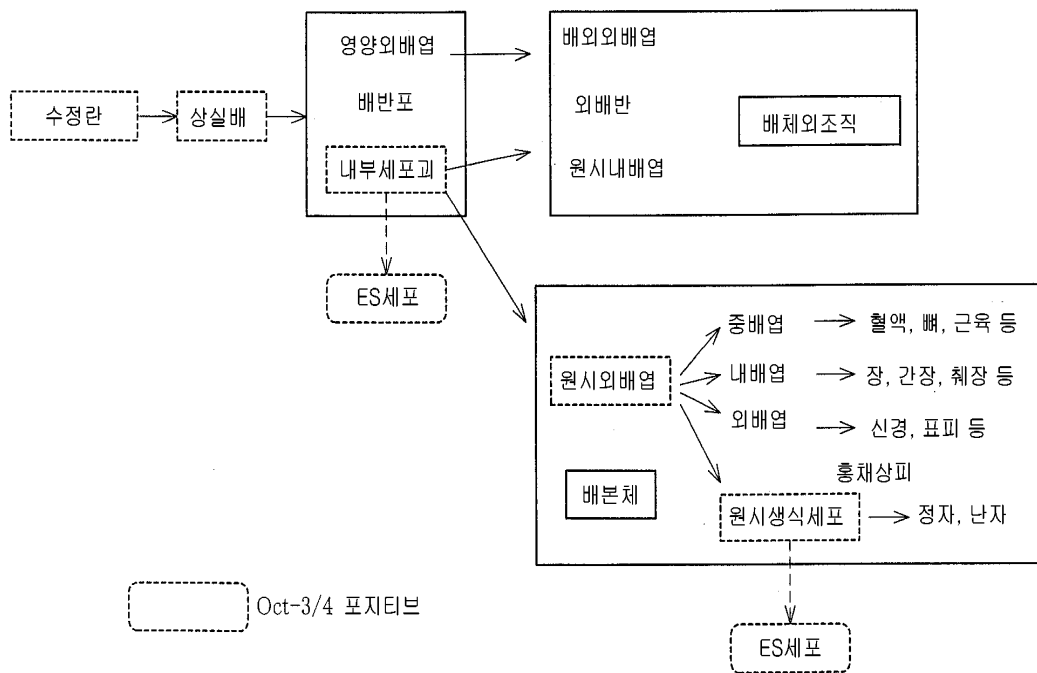
도면3



도면4



도면5



도면6

