

명세서

발명의 명칭: 줄기세포 배양을 위한 배지조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 줄기세포 배양을 위한 배지 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 다양한 준완성배지 (DMEM, a-MEM, IMDM, F12, DMEM/F12)와 Defined Keratinocyte-SFM를 혼합한 기본 배지, L-아스코르브산 2-인산, 우태아혈청, 염기성 섬유아세포 성장인자(b-FGF), 인슐린, N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine), 칼슘클로라이드 및 하이드로코티손을 함유하는 중간엽 줄기세포 배양을 위한 배지조성물에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 자기 복제 능력을 유지하면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 가지는 세포를 줄기세포(stem cell)라 한다. 줄기세포는 크게 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)로 분류할 수 있으며 이 중 조직 및 기관에 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 줄기세포로서, 태아기, 신생아기 및 성체기의 각 조직 및 장기의 발달, 성체조직의 항상성 유지 및 조직손상의 재생을 유도하는 기능에 관여하는 세포를 총칭하여 성체 줄기세포라 한다.
- [4] 최근 성체 줄기세포는 각종 병이나 사고에 의한 기능 장애나 부조화에 빠진 생체 조직 및 장기의 재생 및 기능 회복 등 새로운 재생의료 치료 기법 개발 연구에서 주목을 받고 있다. 또한 줄기세포를 이용한 치료기법의 개발연구는 기존의 고전적인 약물치료나 수술적 치료방법을 넘어서 세포·조직대체치료법 개발로의 발전이 예측됨으로 줄기세포의 활용도는 더욱 높아지게 될 것이다.
- [5] 따라서, 현재 줄기세포의 다양한 기능이 연구되고 있는 실정이며, 그 중에서도 중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cells)를 이용한 세포치료기술이 각광을 받기 시작하면서, 인체로부터 분리된 중간엽 줄기세포를 치료에 적합하도록 개선하기 위한 기술이 개발되고 있다 (WO 2006/019357, 대한민국 등록특허 제0795708호, 대한민국 등록특허 제0818214호).
- [6] 현재 성체줄기세포를 이용한 세포치료제관련 연구 개발과정은 환자로부터 줄기세포, 혈액 유래 단핵 세포 혹은 골수 유래 단핵세포를 수집하여 시험관 배양을 통해 세포 증식 및/또는 분화를 유도하고 미분화(줄기세포 및/또는 전구세포) 및/또는 분화세포의 착상을 유도함으로써 환자 자신의 몸에 도입하는 일련의 과정을 통해 진행되어고 있다. 그러나 중간엽 줄기세포의 줄기세포성(stemness) 지속력, 높은 분열능, 컴팩트한 형태(morphology) 유지 등에 가장 최적화 되어 있는 현재 사용되는 중간엽줄기세포 배양배지는 높은

비용으로 인하여 줄기세포치료제 연구에 있어서 재정적인 부담감으로 작용하고 있는 실정이다(대한민국 등록특허 제0795708호).

- [7] 이에, 본 발명자들은 중간엽 줄기세포의 생산비용을 절감하고 배양 효율을 보다 강화할 수 있는 줄기세포 배양용 배지를 개발하고자 예의 노력한 결과, 현재 줄기세포 배양에 사용되고 있는 고비용 고효율의 KSFM-P 배지를 세포 배양에 범용적으로 사용되는 비교적 저가의 준완성품 배지 또는 완성품 줄기세포 배양배지와 일정한 비율로 혼합한 배지를 개발하고, 상기 혼합배지를 이용하여 중간엽 줄기세포의 배양한 결과, 줄기세포의 배양효율이 증가되는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[8]

[9] **발명의 요약**

- [10] 본 발명의 목적은 높은 증식율을 가지면서도, 분화능을 유지할 수 있는 경제적인 줄기세포 배양용 배지조성물을 제공하는데 있다.

- [11] 본 발명의 다른 목적은 상기 배지 조성물을 이용한 중간엽 줄기세포의 배양방법을 제공하는데 있다.

- [12] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 DMEM, a-MEM, IMDM, F12 및 DMEM/F12로 구성된 군에서 선택되는 배지와 Defined Keratinocyte-SFM가 혼합된 기본 배지, L-아스코르브산 2-인산, 우태아혈청, 염기성 섬유아세포 성장인자(b-FGF), 인슐린, N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine), 칼슘클로라이드 및 하이드로코티손을 함유하는 중간엽 줄기세포 배양을 위한 배지조성물을 제공한다.

- [13] 본 발명은 또한, 상기 배지조성물에서 중간엽 줄기세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포의 배양방법을 제공한다.

[14]

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은 준완성배지인 DMEM과의 혼합배지에서 지방유래 중간엽 줄기세포의 형태 변화를 나타낸 것이다.

- [16] 도 2은 준완성배지인 a-MEM과의 혼합배지에서 지방유래 중간엽 줄기세포의 형태 변화를 나타낸 것이다.

- [17] 도 3는 준완성배지인 IMDM과의 혼합배지에서 지방유래 중간엽 줄기세포의 형태 변화를 나타낸 것이다.

- [18] 도 4는 준완성배지인 F12과의 혼합배지에서 지방유래 중간엽 줄기세포의 형태 변화를 나타낸 것이다.

- [19] 도 5는 준완성배지인 DMEM/F12과의 혼합배지에서 지방유래 중간엽 줄기세포의 형태 변화를 나타낸 것이다.

- [20] 도 6은 준완성배지인 DMEM과의 혼합배지에서 지방유래 중간엽 줄기세포의 세포수득율을 나타낸 것이다.

- [21] 도 7은 준완성배지인 a-MEM과의 혼합배지에서 지방유래 중간엽 줄기세포의 세포수득율을 나타낸 것이다.
- [22] 도 8은 준완성배지인 IMDM과의 혼합배지에서 지방유래 중간엽 줄기세포의 세포수득율을 나타낸 것이다.
- [23] 도 9는 준완성배지인 F12과의 혼합배지에서 지방유래 중간엽 줄기세포의 세포수득율을 나타낸 것이다.
- [24] 도 10은 준완성배지인 DMEM/F12과의 혼합배지에서 지방유래 중간엽 줄기세포의 세포수득율을 나타낸 것이다.
- [25] 도 11은 준완성배지인 DMEM과의 혼합배지에서 지방유래 중간엽 줄기세포의 배양 후 세포크기의 변화를 나타낸 것이다.
- [26] 도 12는 각 혼합배지에서의 지방유래 중간엽 줄기세포의 세포수득율을 KSFM-P배지에서의 세포수득율에 대하여 백분율로 표시한 결과를 나타낸 그래프이다.
- [27] 도 13은 혼합배지에서 줄기세포 표면마커의 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [28] 도 14는 혼합배지에서 줄기세포 표면마커의 발현을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [29]
- [30] 발명의 상세한 설명 및 바람직한 구현예
- [31] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에 기술하는 실험 방법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [32]
- [33] 본 발명에서는 기존에 중간엽 줄기세포 배양에 사용되어 왔던 KSFM-P배지(대한민국 등록특허 0679642호)와 준완성품 형태로 비교적 저렴하게 구입가능한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium), a-MEM (Alpha Modification of Eagle's Medium), F12 (Nutrient Mixture F-12) 및 DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 배지를 혼합한 각각의 배지에, 5% FBS를 첨가한 환경에서 지방유래 중간엽줄기세포를 배양하였을 때, 줄기세포의 특성변화가 거의 없고, 효과적으로 세포가 증식되면서도 세포의 크기를 일정하게 유지시킬 수 있다는 것을 확인하였다.
- [34] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, DMEM, a-MEM, IMDM, F12 및 DMEM/F12로 구성된 군에서 선택되는 배지와 Defined Keratinocyte-SFM가 혼합된 기본 배지, L-아스코르브산 2-인산, 우태아혈청, 염기성 섬유아세포 성장인자(b-FGF), 인슐린, N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine), 칼슘클로라이드 및

하이드로코티손을 함유하는 중간엽 줄기세포 배양을 위한 배지조성물에 관한 것이다.

- [35] 본 발명에서 사용하는 용어 "줄기세포(stem cell)"이란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, "성체 줄기세포"는 발생과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계 혹은 성체단계에서 나타나는 줄기세포를 의미한다.
- [36] 본 발명에서 사용하는 용어 "중간엽 줄기세포"는 인간 또는 포유류의 조직으로부터 분리해 낸 미분화된 줄기세포로서, 다양한 조직에서 유래할 수 있다. 특히, 제대 유래 중간엽 줄기세포, 제대혈 유래 중간엽 줄기세포, 골수 유래 중간엽 줄기세포, 지방 유래 중간엽 줄기세포, 근육 유래 중간엽 줄기세포, 신경 유래 중간엽 줄기세포, 피부 유래 중간엽 줄기세포, 양막 유래 중간엽 줄기세포 및 태반 유래 중간엽 줄기세포일 수 있으며, 각 조직에서 줄기세포를 분리하는 기술은 당해 업계에 이미 공지되어 있다.
- [37] 본 발명에서 사용하는 용어 "지방 유래 줄기세포"란 지방조직에서 분리해 낸 미분화 줄기세포로, 그 분리 방법은 예를 들어 다음과 같을 수 있다. 즉, 지방흡입술로부터 얻어지는 생리 식염수에 부유된 지방 함유 suspension을 배양한 다음, 플라스크 등 배양용기에 부착된 줄기세포 층을 트립신으로 처리한 다음 회수하거나, 스크래퍼로 긁어서 소량의 생리 식염수에 부유되는 것을 직접 회수하거나 하는 방법 등을 통해 지방 유래 중간엽 줄기세포를 분리할 수 있다.
- [38] 본 발명에 있어서, 상기 배지는 0.05~1 mM의 아스코르브산 2-인산, 2~20% 우태아혈청, 10~1ng/ml의 염기성 섬유아세포 성장인자(b-FGF), 0.1~100µg/ml의 인슐린, 0.2~20mM의 N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine), 0.01~1mM의 칼슘클로라이드 및 5ng/ml~1µg/ml의 하이드로코티손을 함유하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [39] 본 발명에 있어서, 상기 준완성 배지 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), IMDM (Iscoe's Modified Dulbecco's Medium), a-MEM (Alpha Modification of Eagle's Medium), F12 (Nutrient Mixture F-12) 및 DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12) 배지와 Defined Keratinocyte-SFM 배지의 혼합비는 1:0.1~10인 것이 바람직하고, 1:0.25~3인 것이 더욱 바람직하다.
- [40] 본 발명의 일 양태에서는 준완성 배지 DMEM, IMDM, a-MEM, F12 및 DMEM/F12 배지와 KSFМ-P배지를 1:0.5; 1:1; 1:2, 1:3 및 1:4로 혼합한 혼합배지를 사용하였을 때, KSFМ-P 단독배지를 사용하여 배양한 경우와, 유사한 세포 형태를 얻을 수 있고, KSFМ-P 단독배지를 사용하였을 때 보다 현저히 우수한 세포수득율을 나타내었다.
- [41] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 배지조성물에서 중간엽 줄기세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포의 배양방법에 관한 것이다.
- [42] 본 발명에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 인간지방유래인 것을 특징으로 할

수 있다.

[43]

[44] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[45]

[46] 실시예 1: 인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 분리

[47] 지방흡입술(Liposuction)에 의해 복부지방으로부터 얻어진 인간 지방조직을 분리하여 PBS로 세척하였다. 조직을 잘게 자른 후 collagenase type1 (1mg/ml)을 첨가한 DMEM media를 이용해 37도에서 2시간 동안 digestion하였다. PBS로 세척 후 1000rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액은 suction하고 바닥에 남은 펠렛은 PBS로 세척한 후 1000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 100 μ m mesh에 필터링하여 debris를 제거한 후 PBS로 세척한 후, DMEM (10% FBS, 2mM NAC, 0.2mM ascorbic acid) 배지에 배양하였다.

[48] 하룻밤 지난 후 부착되지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, 5% FBS, 2mM NAC, 0.2mM ascorbic acid, 0.09mM calcium, 5ng/ml rEGF, 5 μ g/ml 인슐린 및 74ng/ml Hydrocortisone를 함유한 Keratinocyte-SFM media를 2일마다 교체하면서 계대배양하여 4계대의 지방조직 유래 다분화능 중간엽 줄기세포를 준비하였다.

[49] 실시예 2: 혼합배지에서의 인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포의 배양

[50] KSFM-P(표 1)과 준완성 배지 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, Gibco, BRL), α -MEM (Alpha Modification of Eagle's Medium, Gibco, BRL), F12 (Nutrient Mixture F-12, Gibco, BRL) 및 DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, Gibco, BRL) 배지 단독 또는 혼합된 배지에서 배양하여, 줄기세포의 부착능, 밀집도, 형태 및 수득율 등을 확인하였다.

[51]

[52] [표1]

본 발명에서 사용한 KSFM-P 배지의 성분

구성성분	입수처	농도
Defined Keratinocyte-SFM	Invitrogen	
L-ascorbic acid 2-phosphate	Sigma-aldrich	0.2 mM
Insulin	Millipore	5 $\mu\text{g}/\text{mL}$
N-acetyl-L-cysteine	Sigma-aldrich	2 mM
Calcium chloride	Sigma-aldrich	0.09 mM
Hydrocortisone	Sigma-aldrich	74 ng/mL
Fetal Bovine Serum	Invitrogen	5%

[53]

[54] (1) 준완성배지로 DMEM을 사용한 경우

[55] ① KSFM-P (10%FBS)

[56] ② DMEM (10% FBS)

[57] ③ DMEM (10%FBS)+ KSFM-P (10%FBS); 혼합비율 1:1

[58] ④ DMEM (10%FBS)+ KSFM-P (10%FBS); 혼합비율 1:2

[59] ⑤ DMEM (10%FBS)+ KSFM-P (10%FBS); 혼합비율 1:3

[60] ⑥ DMEM (10%FBS)+ KSFM-P (10%FBS); 혼합비율 1:4

[61] ⑦ DMEM (10%FBS)+ KSFM-P (10%FBS); 혼합비율 2:1

[62]

[63] P4의 지방유래 중간엽 줄기세포 1×10^4 cells/well를 상기 각 배지가 들어있는 6-well plate에 접종, 총 5일간 배양하고, 배양 2일과 5일에 걸쳐 각각 줄기세포의 morphology를 측정하였다. 배양 5일후 배양된 줄기세포를 DPBS를 사용하여 세척 후 TriPLE 용액 $200 \mu\text{L}$ 을 첨가하여 37°C 배양기에서 5분간 반응하여 세포를 탈착하였다. 각 well에 $800 \mu\text{L}$ 의 DMEM (10% FBS)을 첨가하여 TriPLE 용액을 중화시킨 후 멸균된 1.5ml EP tube에 옮겨 담은 후 800rpm에서 3분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 500 μL 의 DPBS를 첨가하여 분리된 세포를 재부유시켰다. $10 \mu\text{L}$ 의 세포가 부유된 DPBS와 $10 \mu\text{L}$ 의 trypan blue를 혼합 후 세포수, 생존율, 세포의 크기를 측정하였다.

[64]

[65] (2) 준완성배지로 a-MEM, IMDM, F12 및 DMEM/F12을 사용한 경우

[66] ① KSFM-P (5%FBS)

[67] ② 준완성배지 (5% FBS)

[68] ③ 준완성배지 (5% FBS) + KSFM-P (5%FBS); 혼합비율 1:1

[69] ④ 준완성배지 (5% FBS) + KSFM-P (5%FBS); 혼합비율 1:2

[70] ⑤ 준완성배지 (5% FBS) + KSFM-P (5%FBS); 혼합비율 1:3

- [71] ⑥ 준완성배지 (5% FBS) + KSFM-P (5%FBS); 혼합비율 2:1
- [72] ⑦ 준완성배지 (5% FBS) + KSFM-P (5%FBS); 혼합비율 3:1
- [73]
- [74] P4의 지방유래 중간엽 줄기세포 3×10^5 cells/well 를 상기 각 배지가 들어있는 T75 plate에 접종, 90% density 를 보일 때까지 배양하고, 각각 줄기세포의 morphology를 측정하였다. 배양 5일후 배양된 줄기세포를 DPBS를 사용하여 세척 후 TriPLE 용액 $200 \mu\text{l}$ 을 첨가하여 37°C 배양기에서 5분간 반응하여 세포를 탈착하였다. 각 well에 $800 \mu\text{l}$ 의 DMEM (10% FBS)을 첨가하여 TriPLE 용액을 중화시킨 후 멸균된 1.5ml EP tube에 옮겨 담은 후 800rpm에서 3분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고 500 ml의 DPBS를 첨가하여 분리된 세포를 재부유시켰다. $10 \mu\text{l}$ 의 세포가 부유된 DPBS와 $10 \mu\text{l}$ 의 trypan blue를 혼합 후 세포수, 생존율, 세포의 크기를 측정하였다.
- [75] (1) 줄기세포의 형태 (morphology)
- [76] 각각의 배지에서 배양동안 세포의 형태 변화를 배양동안 촬영하여 관찰하였다. 그 결과, 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 세포의 초기 부착능 (배양 2일)은 KSFM-P나 DMEM 배지에 비해서 두 가지 배양배지가 혼합된 그룹 (그룹 3, 4)에서 뛰어난 것이 확인되었으며, 도 2~5에 나타난 바와 같이, 세포의 증식능은 KSFM-P나 각각의 준완성배지에 비해서 두 가지 배양배지가 혼합된 그룹 (그룹 3~7)에서 뛰어난 것이 확인되었다.
- [77] 세포의 형태는 각각의 준완성 배지에서 배양한 세포가 다른 그룹의 배지에서 배양한 세포에 비해서 세포크기가 비교적 크고 길어지는 형태로 나타났으며 그 외에 그룹에서는 KSFM-P배지에서 배양된 세포와 유사하게 확인되었다. 반면, KSFM-P나 각각의 준완성배지 단독배지에서 배양한 경우에 비해 혼합배지에서 배양한 경우 세포의 밀집도가 크게 증가한다는 사실을 확인하였다. 따라서, KSFM-P과 준완성배지가 혼합된 혼합배지가 세포의 크기와 생장에 보다 효과적이라는 것을 확인하였다.
- [78]
- [79] (2) 줄기세포의 수득율 (number) 및 세포 크기(size)
- [80] 지방유래 중간엽 줄기세포를 각각의 배지에서 5일간 배양 후 TriPLE 용액을 이용하여 줄기세포를 수집하여 그 수를 trypan blue를 이용한 기법으로 측정하였다.
- [81] 배양한 지방유래 줄기세포의 크기는 줄기세포를 수득한 후 Luna™ automated cell counter (Logos Biosystems, Inc. USA)을 사용하여 세포의 평균 크기를 설정하였다.
- [82] 그 결과를 표 2~4와 도 11에 나타내었다.
- [83] 그 결과, 표 2~4에 나타난 바와 같이, 줄기세포 최적조건의 배지인 KSFM-P 배지에서의 세포 수득율은 준완성배지에 비해서 약 2배정도 증가한 것으로 나타났고, 이는 KSFM-P배지가 줄기세포 배양에 있어서, 준완성배지에 비해서

적합하다는 것을 확인할 수 있다.

[84] 이와 더불어, KSFM-P 배양배지와 준완성 배지를 일정비율 혼합한 배양배지에서 줄기세포를 배양한 결과, KSFM-P배지에서 수거된 세포수 보다도 2~3배 정도 월등히 증가한 세포 수득율을 보인다는 사실을 확인하였다.

[85] 또한, KSFM-P 배양배지와 각각의 혼합배지의 줄기세포증식능을 비교했을 때 준완성배지인 IMDM배지를 혼합했을 때 다른 배지에서 배양한 줄기세포보다 월등히 높은 세포수득율을 보이는 사실이 확인되었다.

[86] 따라서, KSFM-P배지와 준완성배지를 혼합함으로써 세포의 성장에 필요한 배양조건이 KSFM-P 배양 배지 단독보다는 더 효과적인 결과를 나타낸다는 것을 알 수 있다.

[87] 그 결과, 표 2~3에 나타난 바와 같이, 각각의 배양배지에서 배양된 줄기세포의 크기에는 큰 차이가 없이 15~17 μ m정도의 평균을 보였다. 즉, 각각의 배양배지는 육안으로 보여지는 세포의 성장과는 다르게 수득을 했을 시 세포의 크기에는 큰 영향을 주지 않음을 알 수 있었다.

[88]

[89] [표2]

혼합배지에서의 줄기세포 수득율

Culture condition			Cell No. (x10 ⁵ cells/ml)
KSFM-P + 10% FBS			28
DMEM + 10% FBS			13.8
KSFM-P + DMEM (1:1)	10% FBS		72
KSFM-P + DMEM (3:1)	10% FBS		54

Culture condition			Cell No. (x10 ⁵ cells/ml)
KSFM-P + 10% FBS			40
DMEM + 10% FBS			6.5
KSFM-P + DMEM (2:1)	10% FBS		92
KSFM-P + DMEM (4:1)	10% FBS		33
KSFM-P + DMEM (1:2)	10% FBS		8.7

[90]

[91] [표3]

혼합배지에서의 줄기세포 크기

Culture condition		Cell size (μm)
KSFM-P+10% FBS		14.5
DMEM+10% FBS		15.6
KSFM-P+DMEM (1:1)	10% FBS	14.5
KSFM-P+DMEM (3:1)	10% FBS	15

Culture condition		Cell size (μm)
KSFM-P+10% FBS		14.5
DMEM+10% FBS		18.9
KSFM-P+DMEM (2:1)	10% FBS	16.3
KSFM-P+DMEM (4:1)	10% FBS	16.3
KSFM-P+DMEM (1:2)	10% FBS	16

[92]

[93] [표4]

1. a-MEM 혼합배지

P4	세포수 (x10 ⁶)	생존율 (%)	사이즈 (μm)	P5	세포수 (x10 ⁶)	생존율 (%)	사이즈 (μm)
KSFM-P-P	2.69	96	15.3	KSFM-P-P	2.73	92.9	15.8
a-MEM	0.25	85.7	18.2	a-MEM	1.7	96.3	21.95
KSFM-P-P/a-MEM (1:1)	4.73	97.4	16.3	KSFM-P-P/a-MEM (1:1)	6.63	97.7	16.3
KSFM-P-P/a-MEM (1:2)	4.8	97.2	16.3	KSFM-P-P/a-MEM (1:2)	6.7	98	16.4
KSFM-P-P/a-MEM (1:3)	4.53	96.6	16.7	KSFM-P-P/a-MEM (1:3)	6.5	96.8	16.8
KSFM-P-P/a-MEM (2:1)	4.03	95.7	16.7	KSFM-P-P/a-MEM (2:1)	4.8	97	18.3
KSFM-P-P/a-MEM (3:1)	3.9	95.6	17.6	KSFM-P-P/a-MEM (3:1)	4.63	95.6	18.7

2. IMDM 혼합배지

P4	세포수 (x10 ⁶)	생존율 (%)	사이즈 (μm)	P5	세포수 (x10 ⁶)	생존율 (%)	사이즈 (μm)
KSFM-P-P	3.10	93.1	15.3	KSFM-P-P	2.4	96.5	16.2
IMDM	1.07	92.1	20.3	IMDM	0.71	96.5	20.5
KSFM-P-P/IMDM (1:1)	5.90	98.03	17.6	KSFM-P-P/IMDM (1:1)	5.3	98.2	18.3
KSFM-P-P/IMDM (1:2)	7.30	97.5	17.5	KSFM-P-P/IMDM (1:2)	5.6	97.3	18.1
KSFM-P-P/IMDM (1:3)	6.00	97.96	15.9	KSFM-P-P/IMDM (1:3)	4.2	96.5	18.4
KSFM-P-P/IMDM (2:1)	7.20	96.53	15.2	KSFM-P-P/IMDM (2:1)	3.53	97.5	16.4
KSFM-P-P/IMDM (3:1)	6.00	99	15.4	KSFM-P-P/IMDM (3:1)	3.73	97.8	16.4

[94] 3. F12 혼합배지

P4	세포수 (x10 ⁶)	생존율 (%)	사이즈 (μm)	P5	세포수 (x10 ⁶)	생존율 (%)	사이즈 (μm)
KSFМ-P	2.3	95.8	14.6	KSFМ-P	1.5	93.4	16.8
F12	0.9	89.2	17.5	F12	0.17	80.8	17.2
KSFМ-P+F12(1:1)	3	96.9	16.7	KSFМ-P+F12(1:1)	2.46	91.9	17.2
KSFМ-P+F12(1:2)	3.6	93.7	16.7	KSFМ-P+F12(1:2)	3.3	92.8	17
KSFМ-P+F12(1:3)	3.6	95.1	17	KSFМ-P+F12(1:3)	2.47	90.7	16.5
KSFМ-P+F12(2:1)	3.4	94.9	14.6	KSFМ-P+F12(2:1)	2.77	92.7	17
KSFМ-P+F12(2:1)	3.9	95.1	14.9	KSFМ-P+F12(2:1)	3.7	94.5	17.4

4. DMEM/F12 혼합배지

P4	세포수 (x10 ⁶)	생존율 (%)	사이즈 (μm)	P5	세포수 (x10 ⁶)	생존율 (%)	사이즈 (μm)
KSFМ-P	2.1	94.8	15.2	KSFМ-P	1.6	93.3	16.5
DMEM/F12	0.38	85.7	21.6	DMEM/F12	0.81	94.6	18
KSFМ-P+DMEM/F12(1:1)	4.4	96	16.3	KSFМ-P+DMEM/F12(1:1)	2.6	94.5	17.2
KSFМ-P+DMEM/F12(1:2)	4.2	96.6	16.5	KSFМ-P+DMEM/F12(1:2)	3.2	94.5	16.8
KSFМ-P+DMEM/F12(1:3)	3.2	95.8	16.3	KSFМ-P+DMEM/F12(1:3)	3.8	96.6	16.8
KSFМ-P+DMEM/F12(2:1)	3.4	96	16.1	KSFМ-P+DMEM/F12(2:1)	2.7	95.2	17.2
KSFМ-P+DMEM/F12(2:1)	3.3	95.9	16.1	KSFМ-P+DMEM/F12(2:1)	4.1	95.4	16.9

[95]

[96] (3) 줄기세포의 표면 마커(surface marker) 발현

[97] 지방유래 중간엽 줄기세포를 각각의 배지에서 5일간 배양 후 TriPLE 용액을 이용하여 줄기세포를 수집한 후 각각의 표면마커 항체 (negative marker, CD31, CD34, CD45; positive marker, CD90, CD105, CD166)를 이용하여 염색하였다. 표면항체는 FITC conjugated 이차항체로 표지 한 후 FACs 기기를 사용하여 표면항체를 발현하는 세포의 분포를 측정하였다.

[98] 그 결과, 도 13 및 도 14에 나타난 바와 같이, KSFМ-P배지에서 배양한 줄기세포가 나타내는 줄기세포 특이적인 표면마커를 발현하는 줄기세포의 분포는 negative marker인 CD31, CD34, CD45는 대부분 0.5%이하의 발현분포를 나타낸 반면, 줄기세포 positive marker인 CD90, CD105, CD166의 발현분포는 대부분 99%이상 나타나는 것으로 확인이 되었다.

[99] 또한 각각의 혼합 조건 (대표 1:2혼합)에도 KSFМ-P배지에서 배양한 줄기세포와 유사하게 줄기세포 특이적인 표면마커를 발현하는 줄기세포의 분포가 negative marker인 CD31, CD34, CD45는 0.5%이하로 확인되었고, positive marker인 CD90, CD105, CD166 또한 대부분 99%이상의 발현 분포를 나타내는 사실이 확인이 되었다. 즉 각각의 혼합배지에서의 배양조건이 줄기세포의 특이적인 표면마커의 발현에는 전혀 영향을 주지 않고 주지 않고 줄기세포의 분화나 특성에는 영향을 주지 않음을 알 수 있었다.

[100]

산업상 이용가능성

[101] 본 발명에 따르면, 중간엽 줄기세포의 분화능과 증식능을 향상시킬 수 있으며, 기존의 배양방법보다 저렴한 가격으로 중간엽 줄기세포의 배양이 가능하며 동시에 줄기세포능을 유지하여 중간엽 줄기세포를 이용한 세포치료제를 보다 경제적으로 생산할 수 있다.

[102]

[103] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] DMEM, a-MEM, IMDM, F12 및 DMEM/F12로 구성된 군에서 선택되는 배지와 Defined Keratinocyte-SFM가 혼합된 기본 배지, L-아스코르브산 2-인산, 우태아혈청, 염기성 섬유아세포 성장인자(b-FGF), 인슐린, N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine), 칼슘클로라이드 및 하이드로코티손을 함유하는 중간엽 줄기세포 배양을 위한 배지조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서, 0.05~1 mM의 아스코르브산 2-인산, 2~20% 우태아혈청, 10~1ng/ml의 염기성 섬유아세포 성장인자(b-FGF), 0.1~100μg/ml의 인슐린, 0.2~20mM의 N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine), 0.01~1mM의 칼슘클로라이드 및 5ng/ml~1μg/ml의 하이드로코티손을 함유하는 중간엽 줄기세포 배양을 위한 배지조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서, DMEM, a-MEM, IMDM, F12 및 DMEM/F12로 구성되는 군에서 선택되는 배지와 Defined Keratinocyte-SFM 배지의 혼합비는 1:0.1~10인 것을 특징으로 하는 배지 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서, 상기 혼합비는 1:0.25~3인 것을 특징으로 하는 배지 조성물.
- [청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 배지조성물에서 중간엽 줄기세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포의 배양방법.
- [청구항 6] 제5항에 있어서, 중간엽 줄기세포는 인간지방유래인 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포의 배양방법.