명세서

발명의 명칭: 양막유래 중간엽 줄기세포 배양을 위한 배지조성물 및 이를 이용한 양막유래 중간엽 줄기세포의 배양방법

기술분야

[1] 본 발명은 중간엽 줄기세포 배양을 위한 배양배지에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 기본 배지, L-아스코르브산 2-인산, 우태아혈청, 염기성 섬유아세포 성장인자(b-FGF), 비필수 아미노산(NEAA; non essential amino acid), 인슐린, N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine), 칼슘클로라이드 및 하이드로코티손을 함유하는 중간엽 줄기세포 배양을 위한 배지조성물 및 이를 이용한 중간엽 줄기세포의 배양방법에 관한 것이다.

[2]

배경기술

[3] 줄기세포(stem cell)란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, 만능 줄기세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)로 분류할 수 있다.

[4] 성체 줄기세포는 인체의 각종 장기에 이미 존재하는 세포를 채취, 줄기세포를 발전시킨 것으로 특정 조직으로만 분화되는 특징이 있다. 그러나 최근에는 성체 줄기세포를 이용, 간세포 등 각종 여러 조직으로 분화시키는 실험이 성공을 거두고 있어 주목된다.

[5] 다분화능 줄기세포는 성체 골수에서 최초로 분리되었고(Y. Jiang *et*al.,*Nature* ,418:41,2002),그 후 다른 여러 성체 조직에서도 확인되었다 (C.M. Verfaillie, *TrendsCellBiol.*,12:502,2002).다시 말해, 골수는 가장 널리 알려진 줄기 세포의 소스이지만, 다분화능 줄기세포는 피부, 혈관, 근육 및 뇌로부터도 확인되었다 (J.G. Toma *etal.*,*Nat.CellBiol.*,3:778,2001;M.Sampaolesi*etal.*,*Science* ,301:487,2003;Y.Jiang*etal.*,*Exp.Hematol.*,30:896,2002).그러나, 골수와 같은 성체 조직 내에 줄기 세포는 매우 드물게 존재하고, 이러한 세포들은 분화유도 하지 않고 배양하기 어려워서, 특이적으로 스크린된 배지들이 없으면 그 세포들을 배양하기 어렵다. 즉, 줄기 세포들은 분리하여 체외에서 보존하기가 매우 어렵다는 단점이 있다. 한편, 태아 조직(fetal tissue)에서 중간엽 줄기세포의 분리를 연구한 결과, 풍부한 중간엽 줄기세포가 있음이 밝혀졌으나, 세포치료제를 목적으로 태아 조직의 사용은 윤리적으로 제한이 있기 때문에 세포치료제로 사용하기 위한 한계가 있었다. 태아 중간엽 줄기세포(fetal MSC)에 대한 소스로서 제대혈(Umbilical cord blood, UCB)에서도 중간엽 줄기세포를 분리하였지만, 그 수가 매우 작았고, 증식이 잘 되지 않는 문제점이 있었다.

[6] 최근 들어, 양막(amnion, amniotic membrane, 또는 amniotic lining membrane), 즉

태반(placenta) 및 발생중인 포유류의 배아를 둘러싸는 얇은 제일 안쪽의 막 구조에 중간엽 줄기세포가 존재하는 것이 알려져, 이를 분리, 배양하는 기술이 개발되고 있다(WO 2006/019357, 대한민국 등록특허 제0795708호, 대한민국 등록특허 제0818214호).

[7] 그러나, 기존의 양막유래 줄기세포의 배양방법은 줄기세포가 증식하는데 오랜 시간이 걸리는 단점이 있었다.

[8] 이에, 본 발명자들은 분화능을 유지하면서, 양막유래 줄기세포의 증식율을 향상시킬 수 있는 방법을 개발하고자 예의 노력한 결과, DMEM-P 및 KSFM-P를 혼합한 배지에서 양막유래 줄기세포를 배양하는 경우, 분화능을 유지하면서도 세포 증식능을 향상시킬 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[9]

[10] 발명의 요약

[11] 본 발명의 목적은 분화능을 유지하면서도 높은 세포증식율을 가지는 중간엽 줄기세포 배양용 배양배지를 제공하는데 있다.

[12] 본 발명의 다른 목적은 상기 배양배지를 이용하여 중간엽 줄기세포를 배양하는 방법을 제공하는데 있다.

[13] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 기본 배지, L-아스코르브산 2-인산, 우태아혈청, 염기성 섬유아세포 성장인자(b-FGF), 비필수 아미노산(NEAA; non essential amino acid), 인슐린, N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine), 칼슘클로라이드 및 하이드로코티손을 함유하는 중간엽 줄기세포 배양을 위한 배지조성물을 제공한다.

[14] 본 발명은 또한, 상기 배지에서 양막유래 줄기세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포의 배양방법을 제공한다.

[15] 본 발명의 다른 특징 및 구현 예는 다음의 상세한 설명 및 첨부된 특허청구범위로부터 명백해 질 것이다.

[16]

도면의 간단한 설명

[17] 도 1은 DMEM-P, KSFM-P 또는 DMEM-P와 KSFM-P 혼합배지에서 3일째 배양된 양막유래 중간엽 줄기세포의 사진이다.

[18] 도 2는 DMEM-P, KSFM-P 또는 DMEM-P와 KSFM-P 혼합배지에서 4일째 배양된 양막유래 중간엽 줄기세포의 사진이다.

[19] 도 3은 CD31에 대한 각 그룹별 유세포분석 결과를 나타낸 것이다.

[20] 도 4는 CD34에 대한 각 그룹별 유세포분석 결과를 나타낸 것이다.

[21] 도 5는 CD45에 대한 각 그룹별 유세포분석 결과를 나타낸 것이다.

[22] 도 6은 CD29에 대한 각 그룹별 유세포분석 결과를 나타낸 것이다.

[23] 도 7은 CD44에 대한 각 그룹별 유세포분석 결과를 나타낸 것이다.

[24] 도 8은 CD73에 대한 각 그룹별 유세포분석 결과를 나타낸 것이다.

[25] 도 9은 DMEM-P과 KSFM-P 혼합배지 (그룹 2) 에서 배양된 양막유래 중간엽 줄기세포의 P1 계대 세포를 나타낸 사진이다.

[26] 도 10는 DMEM-P과 KSFM-P 혼합배지 (그룹 2) 에서 배양된 양막유래 중간엽 줄기세포의 P2 계대 세포를 나타낸 사진이다.

[27] 도 11은 Alizalin red S 염색법을 이용하여 DMEM-P 또는 혼합배지 (그룹 2) 에서 배양된 양막유래 중간엽 줄기세포가 골형성 세포로 분화를 각 조건별로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

[28] 도 12은 DMEM-P 또는 혼합배지 (그룹 2)에서 배양한 후 각 조건별로 골세포로 분화된 양막유래 중간엽 줄기세포의 Alizalin red S 농도를 정량화해서 대조군 (골분화를 유도하지 않은 군)과 비교한 그래프이다.

[29]

[30] 발명의 상세한 설명 및 구체적인 구현예

[31] 본 발명은 일관점에서, 기본 배지, L-아스코르브산 2-인산, 우태아혈청, 염기성 섬유아세포 성장인자(b-FGF), 비필수 아미노산(NEAA; non essential amino acid), 인슐린, N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine), 칼슘클로라이드 및 하이드로코티손을 함유하는 양막유래 중간엽 줄기세포 배양을 위한 배지조성물에 관한 것이다.

[32] 본 발명에 있어서, 상기 기본 배지는 DMEM-HG, Defined Keratinocyte-SFM 및 이들의 혼합물로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있다.

[33] 본 발명에 있어서, 상기 각 배지 성분의 함유량은 0.05~1mM의 아스코르브산 2-인산, 2~20% 우태아혈청, 1~100㎎/ml의 염기성 섬유아세포 성장인자(b-FGF), 1~100μL/ml 비필수 아미노산(NEAA; non essential amino acid), 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 하이드로코르티손인 것을 특징으로 할 수 있다.

[34] 본 발명에 있어서, 상기 비필수 아미노산(NEAA; non essential amino acid)은 글리신, 알라닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루타민산, 프롤린 및 세린으로 구성되는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 비필수 아미노산(NEAA; non essential amino acid)은 750mg/L의 글리신, 890mg/L의 알라닌, 1,320 mg/L의 1,320 mg/L 의 아스파라긴, 1,330 mg/L의 아스파르트산, 1,470 mg/L의 글루타민산, 1, 150mg/L의 프롤린 및 1,050mg/L의 세린으로 구성되는 것을 특징으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[35] 본 발명에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 양막유래의 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 할 수 있다.

[36] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 배지에서 중간엽 줄기세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포의 배양방법에 관한 것이다.

[37] 본 발명에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 양막유래의 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 할 수 있다.

[38] 본 발명의 일양태에서 사용되는 양막유래 중간엽 줄기포는 태반으로부터 분리한 양막조직 전체에서 추출되는 여러 종류의 세포를 사용하는 것이 아니라 양막 중간엽 줄기세포만을 추출하여 분리하여 사용하였다.

[39] 본 발명의 일 양태에서, 양막유래 중간엽 줄기세포를 분리하는 방법은 분만시에 수집된 태반조직으로부터, 양막조직을 분리하고, 분리된 양막조직을 멸균생리식염수로 세척한 다음, 수술용 가위로 최대한 세절하였다. 세절된 조직에 콜라게네이즈 용액을 투입하여 잘 혼합한 후 플라스크에 넣고, 플라스크를 37℃, 5% CO_2인큐베이터에서 90분간 반응시켜 조직을 용해시켰다. 용해된 조직을 Cell strainer에 거르고, 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고, DMEM-P로 세포침전물을 현탁하여 T-플라스크에 접종 후 37℃, 5% CO_2인큐베이터에서 3~4일간 인큐베이션시켜 배양용기에 부착된 중간엽 줄기세포만을 수득하였다.

[40] 본 발명의 일양태에서, 사용된 양막유래 중간엽 줄기세포는 DMEM-P배지와 KSFM-P배지를 각각 단독으로 사용하여 배양하였을 때보다, DMEM-P배지와 KSFM-P배지를 혼합한 배지에서 세포증식율이 우수하였으며, 특히, DMEM-P배지와 KSFM-P배지를 66:33으로 혼합한 배지에서 가장 높은 증식율을 나타내었다.

[41]

[42] 실시예

[43] 이하, 실시 예를 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 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[44]

[45] 실시예 1: 양막 조직으로부터 중간엽 줄기세포의 분리

[46]

[47] 실험에 필요한 양막조직은 태반으로부터 분리하였으며, 분리된 조직은 항생제가 포함되어 있는 생리 식염수 또는 DMEM(Dulbecco modified Eagle medium) 배지에 넣어 연구실까지 옮겼다.

[48] 클린 벤치 내에서 양막 조직을 5g 정량하여 2회 멸균생리식염수로 세척하고, 페트리 디쉬에 세척된 양막 조직을 수술용 가위로 최대한 세절하였다. 세절된 조직에 콜라게네이즈 용액을 투입하여 잘 혼합한 후 플라스크에 넣고, 플라스크를 37℃, 5% CO_2인큐베이터에서 90분간 반응시켜 조직의 용해됨을 확인하였다. 용해된 조직을 50mL 튜브에 기 준비해 둔 Cell strainer에 거르고, 원심 분리하였다. 원심 분리 후 상층액을 제거하고, DMEM-P로 세포침전물을 현탁하여 T-플라스크에 접종 후 37℃, 5% CO_2인큐베이터에서 3~4일간 인큐베이션시켜 배양용기에 부착된 중간엽 줄기세포만을 얻었다.

[49]

[50] 실시예 2: 분리한 양막 중간엽 줄기세포의 DMEM-P 및 KSFM-P 혼합배지에서의 배양

[51]

[52] 상기 수득한 양막 유래 중간엽 줄기세포를, DMEM-P(표 1) 및 KSFM-P(표 3) 배지의 혼합배지를 표 4에 기재된 혼합비율로 혼합한 배지를 사용하여, T175 플라스크에 1.0x10^6 세포를 분주하여 37℃에서 4일 동안 배양하였으며, 배지는 이틀에 한 번씩 교환하였다. 배양 3일 및 배양 4일째의 세포 사진을 각 각 도 1 및 도 2에 나타내었다.

[53]

[54] 표 1

[Table 1]

DMEM-P 배지의 성분

구성성분	입수처	농도
DMEM-HG	웰진	
L-ascorbic acid 2-phosphate	Sigma-aldrich	0.2 mM
Fetal Bovine Serum	Invitrogen	10%
b-FGF	Invitrogen	10 ng/㎖
NEAA	Invitrogen	10 ㎕/㎖

[55]

[56] 표 2

[Table 2]

NEAA의 조성

NEAA 구성성분	농도 (mg/L)
Glycine	750
L-Alanine	890
L-Asparagine	1,320
L-Aspartic acid	1,330
L-Glutamic Acid	1,470
L-Proline	1,150
L-Serine	1,050

[57]

[58] 표 3

[Table 3]

NEAA의 조성

구성성분	입수처	농도
Defined Keratinocyte-SFM	Invitrogen	
L-ascorbic acid 2-phosphate	Sigma-aldrich	0.2 mM
Insulin	Millipore	5 ㎍/㎖
N-acetyl-L-cysteine	Sigma-aldrich	2 mM
Calcium chloride	Sigma-aldrich	0.09 mM
Hydrocortisone	Sigma-aldrich	74 ng/㎖
Fetal Bovine Serum	Invitrogen	5%

[59]

[60] 표 4

[Table 4]

DMEM-P 및 KSFM-P의 혼합비율

그룹	DMEM-P	KSFM-P
1	100	0
2	66	33
3	50	50
4	25	75
5	0	100

[61]

[62] 배양 4일 째에, 배양된 양막 유래 중간엽 줄기세포를 HBSS버퍼에 세척한 후 TrypLE-Express(Gibco) 또는 0.25% Trypsin-EDTA를 넣고 37℃에서 10분간 반응시켰다. FBS가 함유된 배지를 넣어 트립신을 불활성화시킨 후 수득한 양막 유래 중간엽 줄기세포의 세포수를 측정하였다.

[63] 그 결과, 표 4, 도 1 및 도 2에 나타낸 바와 같이, DMEM-P배지와 KSFM-P배지를 단독으로 사용한 배지에서 보다, DMEM-P배지와 KSFM-P배지를 혼합한 배지에서 배양된 양막유래 줄기세포가 훨씬 더 빨리 자라며, 배양 4일 째의 세포수에 있어서도, 현저히 많다는 것을 확인할 수 있었다.

[64] 표 5에 나타난 바와 같이, 그룹 2의 DMEM-P배지와 KSFM-P배지를 66:33으로 혼합한 배지에서 가장 높은 증식율을 나타내어, 상기 혼합비의 혼합배지를 이후 계대배양에 사용하였다.

[65]

[66] 표 5

[Table 5]

배지 혼합비에 따른 세포수의 변화

그룹	DMEM-P : KSFM-P	세포수
1	100 : 0	$1.2x\ 10^7$
2	66 : 33	$3.7x\ 10^7$
3	50 : 50	$2.4x\ 10^7$
4	25 : 75	$2.0x\ 10^7$
5	0 : 100	$1.4x\ 10^7$

[67]

[68] 실시예 3: 혼합배지에서 배양된 양막 유래 중간엽 줄기세포의 면역학적 특성

[69] 표면 항원 발현의 유세포분석(Flow cytometry analysis)

[70]

[71] 실시예 2에서 혼합배지로 배양된 양막 유래 중간엽 줄기세포들을 표면 CD 시리즈 항원 마커들로 캐릭터라이제이션하였다. CD29 (mononuclear cell marker), CD31(endothelial cell and stem cell marker), CD34(hematopoietic stem cell marker), CD44, CD45(PTPR, ASV, Leukocyte marker), CD73들을 FACS 분석에 적용하였다

[72] 실시예 1에서 수득한 양막 유래 중간엽 줄기세포를 PBS로 세척하고, 트립신 처리한 뒤 세포를 수거하여 5분 동안 1500rpm으로 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 Blocking buffer 용액(5% serum(Normal goat serum + Normal horse serum)을 넣어서 4℃에서 60분간 반응시킨 후 1500rpm으로 5분동안 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 세포를 PBS에 부유시켜 Negative Control 및 CD 항원 마커 수 만큼 1 x 10^5 cell을 분주하였다. 각 웰에 항체(R-phycoerythrin(PE)/ FITC(Fluorescein Isothiocyanate)-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody)를 넣고, 4℃에서 40분 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후에 1500rpm으로 3분동안 원심분리하였다. 상층액을 제거한 뒤 PBS로 세척하고 1500rpm으로 3분동안 원심분리하였다. 그리고, 한번 더 상기 상층액 제거 후 PBS로 세척하고 1500rpm에서 3분동안 원심분리하는 과정을 반복하였다. 상층액을 제거한 후 유세포분석기(플로우 사이토미터)를 이용해 분석하였다.

[73] 그 결과, 각 그룹의 양막 유래 중간엽 줄기세포들은 모두 CD29, CD44 및 CD73에 대하여 양성인 면역학적 특성을 나타내고, CD31, CD34 및 CD45에 대하여 음성의 면역학적 특성을 나타내었다(도 3 내지 도 8).

[74]

[75] 실시예 4: 혼합배지에서 계대배양된 양막유래 중간엽 줄기세포의 증식능 비교

[76]

[77] 실시예 1에서 배양된 세포들을 각각 1.0x10^6세포/T175플라스크 농도로 계대배양하여, P1 및 P2 세대의 증식능을 확인하였다.

[78] 배양은 실시예 1의 배양방법과 동일한 조건에서 수행하였다.

[79] 그 결과, DMEM-P 단독배지에서 배양한 군(그룹 1)의 P1은 5일 배양 후, 세포수를 계측하였을 때, 5.4x 10^6세포인 반면, DMEM-P와 KSFM-P배지를 66:33으로 혼합한 군(그룹 2)의 P1은 4일만 배양하고 세포수를 계측하여도, 1.25x10^7세포로 현저히 높은 세포증식능을 나타내었다 (도 9).

[80] P2의 경우는 DMEM-P 단독배지에서 배양한 군(그룹 1)은 4일 배양 후 계측하였을 때, 3.4x 10^6세포로 증식된 세포수가 P1에 배하여 감소하였으며, DMEM-P와 KSFM-P배지를 66:33으로 혼합한 군(그룹 2)의 경우는 1.38x10^7 세포로 P1에 비하여 증식능이 오히려 증가하였다 (도 10).

[81]

[82] 실시예 5: 혼합배지에서 계대배양된 양막유래 중간엽 줄기세포의 면역학적성 비교

[83]

[84] 실시예 2와 동일한 방법으로, DMEM-P 배지를 단독으로 사용하여 계대 배양한 P1 및 P2와 DMEM-P와 KSFM-P배지를 66:33으로 혼합한 배지를 이용하여 계대배양한 P1 및 P2의 면역학적 특성을 확인한 결과, 각 그룹의 양막 유래 중간엽 줄기세포들은 모두 CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 및 HLA-ABC에 대하여 양성인 면역학적 특성을 나타내고, CD31, CD34, CD45 및 HLA-DR에 대하여 음성의 면역학적 특성을 나타내었다.

[85]

[86] 실시예 6: 혼합배지에서 배양된 양막유래 중간엽 줄기세포의 골분화 정량

[87]

[88] 실시예 1에서 수득한 DMEM-P 단독배지 및 DMEM-P/KSFM-P 혼합배지에서 배양된 양막 유래 중간엽 줄기세포를 골형성 유도 배지(Nonhematopoietic OsteoDiff Medium, Miltenyi Biotec)에서 18일 동안 배양(37℃, 5% CO_2 ,배지교환주기: 3~4일)하여 중간엽 줄기세포를 골세포로 분화유도시켰으며, 2일마다 분화배지를 새로이 교환하였다. 골세포로의 분화는 정상산소상태 및 저산소상태(1 - 5%)로 나누어 실시하였으며, 각 분화조건을 표 6에 나타내었다.

[89] 배양 시작 후 18일째에, Alizalin red S 염색법을 이용하여 양막유래 중간엽 줄기세포가 골형성 세포로 분화되었음을 확인하였으며, DMEM-P 단독배지에서 배양된 세포보다, 혼합배지 (그룹 2) 에서 배양된 세포가 높은 골세포 분화율을 나타내었으며, 배양시에 과산소상태에서 배양된 세포(M-H-N))가 더 높은 분화능을 나타내었다 (도 11 및 도 12).

[90]

[91] 표 6

[Table 6]

P2 배양조건		P3 분화조건	OD405	Alizarin Red Concentration(μm)	기호
배양배지	Incubation	Incubation			
DMEM-P	Normoxia	Normoxia	0.125	4.20712	P-N-N
	Normoxia	Hypoxia	0.045333	1.6289	P-N-H
	Hypoxia	Normoxia	0.134333	4.509159	P-H-N
DMEM-P + KSFM-P Mix	Normoxia	Normoxia	0.164	5.469256	M-N-N
	Hypoxia	Normoxia	0.208	6.893204	M-H-N

[92]

[93] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당 업계의 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.

[94]

[95]

산업상 이용가능성

[96] 본 발명에 따르면, 줄기세포 치료에 필요한 중간엽 줄기세포의 개체수를 빠른 시간에 획득할 수 있으며, 중간엽 줄기세포의 분화능을 향상시켜, 줄기세포를 이용한 세포치료에 유용하다.

[97]

청구범위

[청구항 1] 기본 배지, L-아스코르브산 2-인산, 우태아혈청, 염기성 섬유아세포 성장인자(b-FGF), 비필수 아미노산(NEAA; non essential amino acid), 인슐린, N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine), 칼슘클로라이드 및 하이드로코티손을 함유하는 중간엽 줄기세포 배양을 위한 배지조성물.

[청구항 2] 제1항에 있어서, 기본 배지는 DMEM-HG, Defined Keratinocyte-SFM 및 이들의 혼합물로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포 배양을 위한 배지조성물.

[청구항 3] 제1항에 있어서, 0.05~1 mM의 아스코르브산 2-인산, 2~20% 우태아혈청, 1~100ng/ml의 염기성 섬유아세포 성장인자(b-FGF), 1~100μL/ml 비필수 아미노산(NEAA; non essential amino acid), 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 4] 제1항 또는 제3항에 있어서, 비필수 아미노산(NEAA; non essential amino acid)은 글리신, 알라닌, 아스파라긴, 아스파르트산, 글루타민산, 프롤린 및 세린으로 구성되는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포 배양을 위한 배지조성물.

[청구항 5] 제4항에 있어서, 비필수 아미노산(NEAA; non essential amino acid)은 750mg/L의 글리신, 890mg/L의 알라닌, 1,320 mg/L의 1,320 mg/L 의 아스파라긴, 1,330 mg/L의 아스파르트산, 1,470 mg/L의 글루타민산, 1, 150mg/L의 프롤린 및 1,050mg/L의 세린으로 구성되는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포 배양을 위한 배지조성물.

[청구항 6] 제1항에 있어서, 중간엽 줄기세포는 양막유래인 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포 배양을 위한 배지조성물.

[청구항 7] 제1항 내지 제3항의 배지에서 중간엽 줄기세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포의 배양방법.

[청구항 8] 제5항에 있어서, 중간엽 줄기세포는 양막유래인 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포의 배양방법.