



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0093645

(43) 공개일자 2015년08월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/00 (2006.01) C12N 5/0775 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/00 (2013.01)
C12N 5/0018 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0110688(분할)
(22) 출원일자 2015년08월05일
심사청구일자 2015년08월05일
(62) 원출원 특허 10-2012-0138985
원출원일자 2012년12월03일
심사청구일자 2012년12월03일
(30) 우선권주장
1020110127885 2011년12월01일 대한민국(KR)

(71) 출원인
주식회사 케이시스템셀
서울특별시 영등포구 국회대로76길 10 (여의도동, 기독교한국침례회총회빌딩)
(72) 발명자
강성근
서울특별시 관악구 성현로 80, 116동 504호 (봉천동, 관악드림타운아파트)
라정찬
충청북도 청주시 청원구 내수읍 신기초정로 699 (조정리)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이처영

전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 줄기세포를 젊게 만들기 위한 배지 조성물

(57) 요약

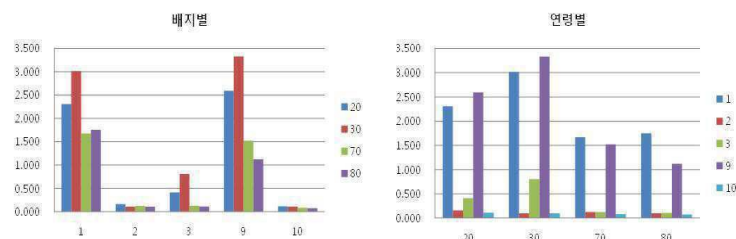
본 발명은 줄기세포를 젊게 만들기 위한 배지 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 노인으로부터 채취한 줄기세포를 젊은이의 줄기세포와 유사한 형질을 갖도록 만들기 위한 줄기세포 배양용 배지 조성물 및 상기 배지 조성물에서 노인 유래 줄기세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 줄기세포를 젊게 만드는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 60대 이상의 고령환자로부터 채취한 중간엽 줄기세포도 높은 분화능, 텔로머레이즈 활성, 높은 줄기세포마커 발현능 등을 가지는 젊은 중간엽 줄기세포로 만들 수 있어, 중간엽 줄기세포를 이용한 세포치료 효능을 획기적으로 증진시킬 수 있다.

대표도 - 도5

Telomerase activity assay

Age 배지	1	2	3	9	10
20	2.254	0.158	0.410	2.591	0.112
30	3.016	0.099	0.805	3.329	0.102
70	1.672	0.121	0.124	1.520	0.084
80	2.342	0.099	0.105	1.120	0.070



(52) CPC특허분류

C12N 5/0667 (2013.01)
C12N 2500/05 (2013.01)
C12N 2500/32 (2013.01)
C12N 2501/105 (2013.01)
C12N 2501/11 (2013.01)
C12N 2501/115 (2013.01)
C12N 2501/33 (2013.01)

(72) 발명자

박형근

경기도 수원시 장안구 화산로 85, 106동 601호 (천
천동, 천천푸르지오)

이항영

경기도 수원시 장안구 천천로22번길 34, 526동
1803호 (정자동, 백설마을삼환나우빌아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

FBS(fetal bovine serum), 셀레늄, EGF(epidermal growth factor) 또는 bFGF (basic fibroblast growth factor) 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine)를 함유하는 배지 조성물에서 60~120세의 고령자의 지방조직 유래 줄기세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 60~120세의 고령자 유래 중간엽 줄기세포가 하기 (i)~(v) 중 어느 하나 이상의 특성을 나타내도록 개선하는 방법:

- (i) Oct4, nanog 및 Rex1으로 구성된 군에서 선택되는 줄기세포 마커의 발현증가;
- (ii) 성장률 증가;
- (iii) 텔로머라아제 활성증가;
- (iv) 다능성 증가; 및
- (v) 분화능 증가.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 배지 조성물은 인슐린 또는 인슐린 유사인자를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 배지 조성물은 하이드로코르티손을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 고령자 유래 줄기세포를 젊은 줄기세포로 만들기 위한 배지 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 고령자로부터 채취한 줄기세포를 젊은이의 줄기세포와 유사한 형질을 갖도록 만들기 위한 줄기세포 배양용 배지 조성물 및 상기 배지 조성물에서 고령자 유래 줄기세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 줄기세포를 젊은 줄기세포로 만드는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0003]

중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cells)는 골수, 제대혈, 태반(또는 태반 조직세포), 지방(또는 지방조직 세포) 등의 다양한 성체 세포로부터 유래하는 다분화성의 성질을 갖는 줄기 세포이다. 예를 들어, 골수(bonemarrow)로부터 유래된 중간엽 줄기 세포는 지방조직, 뼈/연골 조직, 근육조직으로 분화될 수 있는 다분화성에 의해 세포치료제로서의 개발을 위해 다양한 연구가 진행되고 있다.

[0004]

최근, 중간엽 줄기세포를 이용한 세포치료기술이 각광을 받기 시작하면서, 인체로부터 분리된 중간엽 줄기세포를 치료에 적합하도록 활성화시키는 기술의 개발이 요구되고 있으며, 특히, 세포치료 대상이 되는 환자의 경우, 고령자가 많고, 고령자의 조직으로부터 채취된 중간엽 줄기세포의 경우, 증식능과 분화능이 떨어져 치료효율이 낮은 경향이 있어 왔으며, 고령자 유래 중간엽 줄기세포를 젊은이 유래의 중간엽 줄기세포와 같이 활성화시키는 기술이 요구되고 있다.

[0005] 중간엽 줄기세포는, 다른 인체 초대배양 세포와 유사하게, 체외(in vitro) 배양시 텔로미어 소실(telomere shortening)과 무관한 노화(senescence) 기전에 의해 세포의 분열이 급격히 감소하는 것으로 알려져 있다 (Shibata, K.R. *et al. Stem cells*, 25; 2371-2382, 2007). 이러한 노화 현상은, 그 기전이 아직 명확히 밝혀진 것은 아니나, 장기간의 체외 배양에 의한 환경적 스트레스의 축적으로 Cdk 저해 단백질인 p16(INK4a)가 발현되고 축적되어, 세포의 성장을 담당하는 Cdk 단백질의 활성이 억제되어 현상이 주요 원인으로 지적되고 있다. 중간엽 줄기세포에서는 Bmi-1이라는 종양유전자를 발현시켜 p16의 발현을 저해하였을 때, 세포의 노화가 억제되는 것이 확인되었으며(Zhang, X. *et al. Biochemical and biophysical research communications* 351; 853-859, 2006), 또한 배양 중에 FGF-2를 처리하여 p21(Cip1), p53, 및 p16(INK4a)의 mRNA 발현을 억제되었을 때, G1 시기의 성장 정지된 중간엽 줄기 세포가 성장 정지 억제되는 것이 보고된 바 있다(Ito, T. *et al., Biochemical and biophysical research communications*, 359; 108-114 2007). 또한 대한민국공개특허 제 10-2009-0108141호에서는 Wip1 단백질을 코딩하는 유전자를 중간엽 줄기세포에 형질전환시켜, 중간엽 줄기세포의 노화를 억제시키는 방법을 제시하였다.

[0006] 그러나, 고령자의 조직으로부터 채취한 노화된 중간엽 줄기세포를 젊게 복귀시키는 방법에 대한 기술은 보고된 바가 없는 실정이다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 고령의 환자로 부터 분리한 지방조직에서 중간엽 줄기세포를 채취하여 항산화제 및 성장인자가 함유된 배지에서 배양한 결과, 젊은이 유래의 중간엽줄기세포와 유사한 활성을 가지는 중간엽 줄기세포를 제조할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 고령자 유래의 중간엽 줄기세포를 젊게 만들기 위한 배지 조성물을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 배지 조성물을 이용하여 고령자 유래 중간엽 줄기세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포를 젊게 만드는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 FBS(fetal bovine serum), 항산화제, 싸이토카인 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine)를 함유하는 것을 특징으로 하는 고령자 유래 중간엽 줄기세포를 젊은 줄기세포로 만들기 위한 배지 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명은 또한, 상기 고령자 유래 중간엽 줄기세포를 젊게 만들기 위한 배지 조성물에서 고령자 유래 중간엽 줄기세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 고령자 유래 중간엽 줄기세포를 젊은 줄기세포로 만드는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따르면, 60대 이상의 고령환자로부터 채취한 중간엽 줄기세포도 높은 분화능, 텔로머레이즈 활성, 높은 줄기세포마커 발현능 등을 가지는 젊은 중간엽 줄기세포로 만들 수 있어, 중간엽 줄기세포를 이용한 세포치료 효능을 획기적으로 증진시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 20대 및 30대 유래 지방줄기세포를 상기 각각의 배지에서 4 패세지(passage)까지 계대한 후 현미경 상에서 형태를 확인한 사진이다.

도 2는 70대 및 80대, 유래 지방줄기세포를 상기 각각의 배지에서 4 패세지(passage)까지 계대한 후 현미경 상

에서 형태를 확인한 사진이다.

도 3은 10종 배지에서 배양한 젊은 사람(20대 및 30대)과 노령인(70대 및 80대)의 연령별 CPDL(cell population doubling level)을 나타낸 그래프이다.

도 4는 10종 배지에서 배양한 젊은 사람(20대 및 30대)과 노령인(70대 및 80대)의 배지별 CPDL을 나타낸 그래프이다.

도 5는 5종의 배지에서 배양한 지방줄기세포의 연령별, 배지별 텔로머라아제 활성 나타낸 그래프이다.

도 6은 2종 배지(1번, 9번 배지)에서 배양한 20대, 30대, 70대, 80대 유래 지방줄기세포의 텔로머라아제 활성을 나타낸 그래프이다.

도 7은 1, 9번 배지를 사용하여, P4 및 P6 계대로 배양한 후, 계대 배양 수에 따른 텔로머레이즈 활성도 변화를 측정한 그래프이다.

도 8은 1, 9번 배지로 배양한 지방줄기세포에서 다능성 확인 마커인 oct4, nanog 및 Rex1을 발현을 P3에서 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 1, 9번 배지로 배양한 지방줄기세포에서 다능성 확인 마커인 oct4, nanog 및 Rex1을 발현을 P4에서 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 20대, 30대, 70대, 80대 유래 지방줄기세포를 5종(1, 2, 3, 9, 10) 배지에서 3 passage까지 계대한 후, 지방세포 분화배지에서 배양한 후, Oil red O 염색한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 20대, 30대, 70대, 80대 유래 지방줄기세포를 5종(1, 2, 3, 9, 10) 배지에서 3 passage까지 계대한 후, 지방세포 분화배지에서 배양한 후 염색한 결과를 정량한 그래프이다.

도 12는 20대, 30대, 70대, 80대 유래 지방줄기세포를 지방세포로 분화시킨 후, 지방 분화 마커인 PPAR γ , LPL 및 FABP4d의 발현을 RT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명은 일관점에서, FBS(fetal bovine serum), 항산화제, 싸이토카인 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine)를 함유하는 것을 특징으로 하는 고령자 유래 중간엽 줄기세포를 젊은 줄기세포로 만들기 위한 배지 조성물에 관한 것이다.

[0019] 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.

[0020] 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.

[0021] 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.

[0022] 본 발명에서 "줄기세포를 젊게 만든다는 것"은 고령자 조직 유래 중간엽 줄기세포의 표현형을 젊은이 조직 유래 줄기세포와 표현형과 유사한 상태로 만든다는 것을 의미하며, 상기 표현형은 세포의 형태, 세포의 증식속도, 텔로머라아제 활성도, 줄기세포 마커(Oct4, SSEA-1, Tra 1-60, Tra 1-81, Nanog 등)의 발현 및 줄기세포 분화능 등을 의미한다. 사용할 수 있다. 본 발명에서 고령자 조직 유래 중간엽 줄기세포는 60~120세의 사람으로 부터 분리된 것이 바람직하다.

[0023] 본 발명에서 상기 "고령자 조직 유래 중간엽 줄기세포의 표현형을 젊은이 조직 유래 줄기세포와 표현형과 유사

한 상태"로 변화하는 것은 고령자 조직 유래 중간엽 줄기세포가 분리되었던 첫 passage 때보다 상기 표현형이 젊은이 조직 유래 줄기세포와 유사하게 되는 상태 또는 본 발명의 배양용 배지 이외의 배지에서 배양된 중간엽 줄기세포와 비교하여 젊은이 조직 유래 줄기세포와 유사하게 되는 상태를 의미한다.

- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 배지 조성물은 인슐린 또는 인슐린 유사인자 및 하이드로코르티손을 추가로 함유할 수 있으며, 상기 싸이토카인은 EGF(epidermal growth factor) 및/또는 bFGF (basic fibroblast growth factor)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 배지조성물에 사용되는 상기 항산화제는 셀레늄(selenium), 비타민 E, 아스코르브산, 카테킨, 라이코펜, 베타카로틴, 코엔자임 Q-10, EPA(eicosapentaenoic acid), DHA(docosahexanoic acid) 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 셀레늄을 사용할 수 있다.
- [0026] 따라서, 본 발명에서는 FBS, bFGF 및 EGF는 연령에 상관없이 지방줄기세포 배양에는 없어서는 안 될 인자인 것을 확인하였고, 전체적으로 젊은 연령에서 다능성(pluripotency)이나 분화율, 텔로머레이즈 활성의 정도가 노령군에 비해 높았으며 배지별로는 FBS, bFGF 또는 EGF가 결실된 배지에서 배양된 세포가 성장율을 포함하여 분화율, 텔로머레이즈 활성이 낮아져 이들 성분이 세포가 자라고 활성을 지니는데 필수적인 요소라는 것을 확인하였다.
- [0027] 또한, 본 발명에서는 젊은 군에서는 대조군 배지인 대조군 배지에서 셀레늄이 제거된 배지에서의 세포 분화율 정도가 젊은 군이나 노령군이나 비슷한 정도를 나타냈으나, 두 배지간 텔로머레이즈 활성 실험에서 젊은 군에서는 차이가 없던 활성도가 셀레늄이 제거된 배지에서 배양한 노령군에서 떨어지는 결과를 보아, 셀레늄 성분이 노령군에서 꼭 포함되어야 높은 텔로머레이즈 활성도를 가질 수 있다는 것을 확인하였다.
- [0028] 다른 관점에서, 본 발명은 FBS(fetal bovine serum), 항산화제, 싸이토카인 및 NAC(N-acetyl-L-cysteine)를 함유하는 것을 특징으로 하는 고령자 유래 중간엽 줄기세포를 젊은 줄기세포로 만들기 위한 배지 조성물에서 고령자 유래 중간엽 줄기세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 고령자 유래 중간엽 줄기세포를 젊은 줄기세포로 만드는 방법을 제공한다.
- [0029] 상기 중간엽 줄기세포 배양에 사용되는 기본 배지로서는 당업계에서 줄기세포 배양에 적합하다고 알려져 있는 통상적인 배지, 예를 들면 DMEM, MEM, K-SFM 배지 등을 사용할 수 있는데, 바람직하게는 무혈청 배지를 사용할 수 있으며, 가장 바람직하게는 K-SFM (Keratinocyte-SFM;Keratinocyte serum free medium) 배지를 사용할 수 있다.
- [0030] 상기 중간엽 줄기세포 배양에 사용되는 배지는 당 업계에 공지된, 중간엽 줄기세포의 미분화된 표현형의 증식을 촉진하면서 분화는 억제하는 첨가제로 보충될 수 있다.
- [0031] 또한, 배지는 등장액 중의 중성 완충제(예컨대 인산염 및/또는 고농도 중탄산염) 및 단백질 영양분(예를 들면 혈청, 예컨대 FBS, 혈청 대체물, 알부민, 또는 필수 아미노산 및 비필수 아미노산, 예컨대 글루타민)을 함유할 수 있다. 나아가, 지질(지방산, 콜레스테롤, 혈청의 HDL 또는 LDL 추출물) 및 이 종류의 대부분의 보존액 배지에서 발견되는 기타 성분(예컨대 인슐린 또는 트랜스페린, 뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드, 피루빈산염, 임의의 이온화 형태 또는 염인 당원, 예컨대 글루코스, 셀레늄, 글루코코르티코이드, 예컨대 히드로코르티손 및/또는 환원제, 예컨대 β-메르캅토에탄올)을 함유할 수 있다.
- [0032] 또한, 배지는 세포가 서로 유착하거나, 용기벽에 유착하거나, 너무 큰 다발을 형성하는 것을 방지할 목적으로, 항응집제 (anti-clumping agent), 예컨대 Invitrogen이 판매하는 것들(Cat # 0010057AE)을 포함하는 것이 유익할 수 있다.
- [0033] 그 중에서도, 하기의 1이상의 추가의 첨가제를 사용하는 것이 유리할 수 있다:
- [0034] · 줄기 세포 인자(SCF, Steel 인자), c-키트를 이량화하는 다른 리간드 또는 항체, 및 동일한 신호 전달 경로의 다른 활성제
- [0035] · 다른 티로신 키나아제 관련 수용체, 예컨대 혈소판-유도된 성장 인자(Platelet-Derived Growth Factor; PDGF), 대식세포 콜로니-자극 인자, Flt-3 리간드 및 혈관 내피 성장 인자(Vascular Endothelial Growth Factor; VEGF)의 수용체를 위한 리간드
- [0036] · 환형 AMP 농도를 높이는 인자, 예컨대 포르스콜린
- [0037] · gp130을 유도하는 인자, 예컨대 LIF 또는 Oncostatin-M

[0038] · 조혈모 성장 인자, 예컨대 트롬보포이에틴(TPO)

[0039] · 변형성 성장 인자, 예컨대 TGF β 1

[0040] · 뉴로트로핀, 예컨대 CNTF

[0042] 본 발명의 중간엽 줄기세포 배양을 위한 중간엽 줄기세포는, 예를 들어, 이하와 같은 방법으로 획득할 수 있다.

[0043] 우선, 지방흡입술(Liposuction) 등에 의해 복부로부터 얻어진 인간 지방조직을 분리하여 PBS로 세척한 다음, 조직을 잘게 자른 후 콜라겐 분해 효소를 첨가한 DMEM배지를 사용하여 분해 후, PBS로 세척하고 1000 rpm에서 5분간 원심분리 한다. 상층액은 제거하고 바닥에 남은 펠렛은 PBS로 세척한 후 1000 rpm으로 5분간 원심분리 한다. 100 μ m 매쉬를 사용하여 부유물을 제거한 다음, PBS로 다시 세척하였다. DMEM(10% FBS, 2 mM NAC, 0.2 mM 아스코르브산)배지에서 배양하고, 하룻밤 지난 후 배양용기 바닥에 부착되지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, NAC, 아스코르브산, 칼슘, rEGF, BPE, 인슐린 및 하이드로코티손을 함유한 케라티노사이트-SFM 배지를 2일마다 교체하면서 배양하여 중간엽 줄기세포를 분리하여 계대 배양하여 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다. 이 외에도 당업계에서 공지된 방법으로 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다. 이 외에도 당업계에 이미 공지된 방법으로 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다.

[0044] 본 발명의 일 실시예에서는 항산화제로서 셀레늄을 사용하였으며, 사용되는 셀레늄은 0.5 ~ 1 ng/mL 을 사용하는 것이 바람직하다. 이때, 이의 함량이 0.5 μ g/ ℓ 미만이면 산소독성에 민감하며, 10 μ g/ ℓ 을 초과하면 심각한 세포독성을 초래한다.

[0045] 본 발명에서 인슐린을 대체하는 성분으로 인슐린 유사인자를 사용하며, 이는 포도당 대사와 단백질 대사를 향상시켜 세포성장을 촉진하는 역할을 하며, 특히 바람직하기로는 재조합 IGF-1(Insulin-like growth factor-1)을 사용한다. 인슐린 유사인자의 바람직한 함량은 10 ~ 50 n/ml이며, 이의 성분이 10ng/ml미만일 경우에는 세포자살(Apoptosis)을 초래하며, 50 μ g/ ℓ 을 초과할 경우에는 세포독성 및 비용증가의 문제점이 있다.

[0046] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 상피세포 성장인자(Epidermal growth factor; EGF)를 사용하였으며, EGF는 *in vivo* 상태에서 다양한 형태의 세포증식을 야기할 수 있으며, 바람직하기로는 재조합 단백질을 사용한다. 상피세포 성장인자의 바람직한 함량은 10~ 50 ng/mL이며, 이의 함량이 10 ng/mL 미만이면 특별한 효과가 없으며, 50ng/mL을 초과하면 세포에 독성을 가진다.

[0047] 또한, 본 발명에서는 섬유아세포 증식인자 (bFGF)를 사용하며, 이는 *in vivo* 상태에서 다양한 형태의 세포증식을 야기할 수 있으며, 바람직하기로는 재조합 단백질을 사용한다. 섬유아세포 증식인자의 바람직한 함량은 1~ 100 ng/mL이다.

[0048] 본 발명의 일 양태에서는, FBS, bFGF 및 EGF가 연령에 상관없이 지방 중간엽 줄기세포 배양에는 없어서는 안 될 인자이며, 특히, bFGF의 결핍의 지방줄기세포 배양에 중요한 영향을 미친다는 결과를 확인할 수 있었다. 또한 연령이 젊은 사람의 세포일수록 성장율도 높다는 결과도 확인하였다.

[0049] 본 발명의 다른 양태에서는, 지방줄기세포의 텔로머라아제 활성에 있어서, FBS, bFGF 및 EGF가 중요한 인자라는 것을 확인하였으며, 텔로머레이즈 활성은 20대에서 가장 높게 나타났으며, 셀레늄이 없는 배지의 경우 텔로머레이즈 활성이 떨어지는 것을 확인할 수 있었으며, 셀레늄 함유 배지에서 배양할 경우, 고령자 유래 지방줄기세포도 젊은이 유래의 지방줄기세포와 비슷한 텔로머레이즈 활성도를 가질 수 있다는 것을 확인하였다.

[0051] 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 해석되지는 않는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

[0053] 인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 분리

[0054] 환자의 연령이 20대, 40대 및 70대인 환자로부터 지방흡입술(Liposuction)에 의해 복부지방으로부터 지방조직을

각각 분리하여 PBS로 세척하였다. 세척된 지방조직을 잘게 자른 후 collagenase type1 (1mg/ml)을 첨가한 DMEM media를 이용해 37℃에서 2시간 동안 조직을 분해시켰다. 콜라게나아제 처리된 조직을 PBS로 세척 후 1000rpm에서 5분간 원심분리 하여, 상층액을 제거하고, 펠렛을 PBS로 세척한 후 1000rpm으로 5분간 원심분리하였다. 100 μ m mesh에 필터링하여 부유물을 제거한 후 PBS로 세척하고, 10% FBS, 2mM NAC(N-acetyl-L-cysteine), 0.2mM ascorbic acid가 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였다.

[0055] 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, 10ng/mL bFGF 및 74ng/ml Hydrocortisone 및 1ng/ml의 셀레늄(selenium)을 함유한 Keratinocyte-SFM media(RKCM)을 2일마다 교체하면서 계대배양하였으며, 3계대 배양 후, 20대, 40대 및 70대 유래 지방줄기세포의 줄기세포 활성을 분석하였다.

[0056] 줄기세포 활성은 현미경상에서의 형태, 줄기세포 분화마커, 텔로머레이즈 활성, 텔로미어 길이 및 분화능을 확인하였다.

[0057] 그 결과, 20대, 40대 및 70대에서 분리된 지방줄기세포가 3계대 배양 후, 각각 유사한 줄기세포 활성을 가지는 것으로 확인되었다.

실시예 2

[0059] **줄기세포를 젊게만드는 배지성분의 탐색**

[0060] 실시예 1에서 사용된 RKCM 배지에 첨가되는 활성성분인 FBS, NAC, ascorbic acid, calcium, rEGF, 5 μ g/ml 인슐린, bFGF, hydrocortisone 및 셀레늄(selenium) 중 하나씩을 제거한 배지를 제조하고, 상기 활성성분이 각각 제거된 배지에서의 20대, 30대, 70대, 80대 환자 유래의 지방줄기세포의 표현형을 확인하였다.

[0061] 배지 1~10을 제조하고, 1번 배지는 RKCM 배지이며, 2~10은 RKCM 배지에서 성분을 결핍시킨 배지를 사용하였으며, 각 결핍성분은 표 1에 나타내었다.

표 1

Media 번호	RKCM 배지에서 결핍된 성분
1	없음
2	FBS
3	bFGF
4	인슐린
5	Hydrocortisone
6	EGF
7	ascorbic acid
8	NAC(N-acetyl-L-cysteine)
9	셀레늄
10	EGF/bFGF

[0063] (1) 형태 및 세포증식속도의 관찰

[0064] 실시예 1의 방법으로 분리된 20대, 30대, 70대, 80대 유래 지방줄기세포를 상기 각각의 배지에서 4 passage까지 계대한 후 현미경 상에서의 형태를 확인하였으며(도 1 및 도 2), 계대 과정에서 세포의 수를 헤모사이트미터를 이용하여 측정하여 세포수를 계산하여 증식속도를 확인하였다.

[0065] 10종 배지에서 배양한 젊은 사람(20대 및 30대)과 노령인(70대 및 80대)의 연령별 CPDL(cell population doubling level) 및 배지별 CPDL을 도 3 및 도 4에 각각 나타내었다.

[0066] 10종의 다양한 줄기세포 활성 물질을 제거한 배양 배지로 배양한 젊은 사람 (20,30 대)와 노령인 (70,80대)의 지방 중간엽 줄기세포는 연령별 CDPL은 2번, 10번 배지를 제외하고는 20, 30, 70, 80 대 순으로 성장속도를 보였다. 배지 별로는 연령대 별로 다소 차이가 있으나 1, 6 혹은 7번 배지들이 성장율이 높았고, 2번 배지가 가장 낮았다. 3번 배지도 타 배지들에 비해 성장율이 낮은 결과를 보였다.

[0067] 10종의 배지로 배양한 지방줄기세포의 형태나 성장율을 관찰한 결과, 배지 2, 3, 10번은 연령에 상관없이 지방

중간엽 줄기세포 배양에는 없어서는 안 될 인자이며, 전혀 성장이 진행되지 않는 2번, 10번 배지군에 비해 3번 배지 인자의 결핍은 지방 중간엽 줄기세포 배양에 중요한 영향을 미친다는 결과를 확인할 수 있었다. 또한 연령이 젊은 사람의 세포일수록 성장율도 높다는 결과도 확인하였다.

(2) 텔로머라아제 활성확인

실시에 1의 방법으로 분리된 20대, 30대, 70대, 80대 유래 지방줄기세포를 상기 5종(1, 2, 3, 9, 10) 배지에서 3 passage까지 계대한 후, 줄기세포의 텔로머라아제 활성을 확인하였다.

배양배지에서 배양한 지방 유래 줄기세포를 PBS로 세척한 다음, 첨가한 DMEM 배지를 이용해 37에서 2시간동안 digestion하였다. PBS로 세척 후 3000 Xg 에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거한 뒤 Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA KIT (Roche) 에 있는 용해액으로 세포를 용해하여 얼음에서 30분간 반응시켰다. 16,000 x g 에서 20분간 원심분리하여 상층액만 분리해 일부분의 상층액과 KIT에 포함되어 있는 reaction mixture를 혼합하여 PCR 반응을 시켰다. PCR 반응은 elongation: 25℃, 10 분, inactivation: 94℃, 5분, denaturation : 94℃ 30초, annealing: 50℃, 30초, polymerization: 72℃, 90초이다. 증폭된 시료 5 μ l에 KIT에 포함되어 있는 25 μ l 의 denaturation reagent를 상온에서 10분간 반응시킨 후 225 μ l의 hybridization 용액을 첨가하여 혼합하였다. 이 중 100 μ l 만을 미리 코팅된 microplate 에 분주하여 37℃에서 2시간 동안 300 rpm의 속도로 반응시킨 후 Hybridization 용액을 제거하였다. 세척용액으로 수차례 세척 후 100 μ l anti-DIG-POD 반응 용액을 첨가하여 실온에서 300 rpm 속도로 30분간 반응하고 이 후 용액을 제거한 뒤 세척용액으로 수차례 세척하였다. 100 μ l TMB substrate 용액을 첨가하고 실온에서 300 rpm 속도로 30분간 반응한 뒤 100 μ l 중단 용액을 첨가하여 색 변화를 관찰한다. 이때 색은 중단 용액을 첨가하면 파란색에서 노란색으로 변화며, microplate (ELISA) 기기로 450 nm의 파장에서 30분 이내에 측정하였다.

그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 5종의 배지에서 배양한 지방줄기세포의 텔로머라아제 활성은 20대나 30대에서는 9번 배지에서 배양한 세포가 활성이 높았고 2, 3, 10번 배지의 세포는 거의 활성이 없었다. 노령군에서는 1번 배지에서 배양한 세포가 9번 배지보다는 약간 높은 활성을 나타내었다. 역시 노령군에서도 2, 3, 10번 배지에서 배양한 세포의 텔로머라아제 활성은 떨어졌다.

2종 배지(1번, 9번 배지)에서 배양한 20대, 30대, 70대, 80대 유래 지방줄기세포의 텔로머라아제 활성을 도 6에 나타내었다.

그 결과, 1번과 9번 배지로 배양한 지방줄기세포의 텔로머라아제 활성은 20대에서 가장 높은 활성도를 나타냈으며 30대를 제외하고를 1번 배지에서의 세포가 9번 배지에서의 세포보다 텔로머레이즈 활성도가 높게 나타났다.

또한, 1, 9번 배지를 사용하여 P4 까지 계대하였을 때, 고령군인 80대에서 다능성(pluripotency)이 가장 높은 것에 비해 텔로머레이즈 활성은 20대에서 가장 높게 나타났다. 텔로머레이즈 활성 결과로만 분석하자면 1번에 비해 9번 배지 내의 제거된 성분은 미비하지만 줄기세포의 활성을 떨어뜨리는 성분임을 확인할 수 있고 노령군에서 9번 내에 제거된 성분이 포함된 배지로 세포를 배양 할 경우 젊은 군 세포의 활성도를 가질 수 있게 배양할 수 있다는 점에서 중요한 성분임을 다시 한번 확인하였다.

추가적으로, 1, 9번 배지를 사용하여, P4 및 P6 계대로 배양한 후, 계대 배양 수에 따른 텔로머레이즈 활성도 변화를 측정하였다.

그 결과, 도 7에서 나타난 바와 같이, 모든 연령에서와 두 배지에서 모두 P6보다 계대 수가 낮은 P4에서 활성도가 높게 나타난다는 결과를 확인할 수 있었다.

(3) 줄기세포 마커 발현 확인

실시에 1의 방법으로 분리된 분리된 20대, 30대, 70대, 80대 유래 지방줄기세포를 상기 1, 9번 배지에서 3 passage까지 계대한 후 90%까지 키웠다. 이렇게 키운 지방줄기세포에서 배지를 제거하고 PBS로 1회 이상 세척한 후 RNL 추출을 위한 세포 lysis buffer (Intron Biotechnology, Sungnam, Korea)를 넣어 세포를 lysis 시키고 Total Extraction kit (Intron Biotechnology)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출된 RNA를 cDNA (Intron Biotechnology cDNA syntheis kit)로 변환한 후 다능성 마커인 oct-4, Nanog 및 Rex1에 대한 프라이머를 작성한 후 PCR를 실시하였다. PCR 산물을 전기영동한 후 이미지 분석기를 통해 정량하였다.

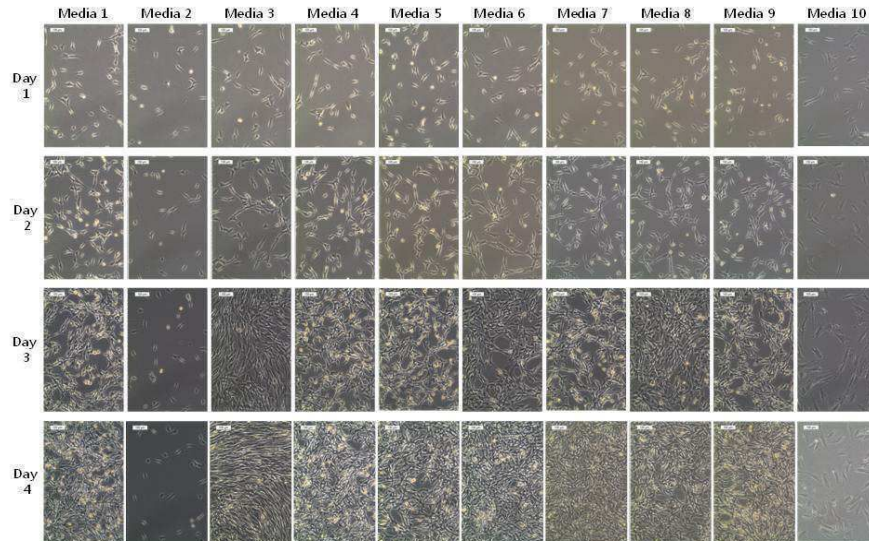
- [0081] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 1, 9번 배지로 배양한 지방 중간엽 줄기세포 개체간의 차이가 컸으나 모두, 다능성 확인 마커인 oct4, nanog 및 Rex1을 발현하였다. 연령별로는 노령군인 80대에서 마커들의 발현율이 높았으며, 배지별로는 30대에서만 1번 배지보다는 9번 배지의 발현율이 높았고 다른 연령대에서는 거의 비슷한 발현율을 나타내었다.
- [0082] P4의 상태에서 1, 9번 배지로 배양한 지방 중간엽 줄기세포 개체간의 차이가 컸으나 다능성 확인 마커인 oct4, nanog 및 Rex1이 발현하였다(도 9). 연령별로는 노령군인 80대에서 마커들의 발현율이 높았으며, 배지별로는 모든 연령에서 1번 배지보다는 9번 배지의 발현율이 높았다.
- [0084] (4) 분화능 확인
- [0085] 실시예 1의 방법으로 분리된 20대, 30대, 70대, 80대 유래 지방줄기세포를 5종(1, 2, 3, 9, 10) 배지에서 3 passage까지 계대한 후, 지방유도배지인 NH Adipodiff medium (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)에서 37℃, 5% CO₂에서 21일 동안 배양을 진행하였으며, 지방세포분화배지의 교환은 2일 간격으로 이루어졌다.
- [0086] 지방세포분화배지에서 배양을 시작 후 21일째에, Oil red O 염색법을 이용하여 지방줄기세포가 지방세포로의 분화능을 확인하였다.
- [0087] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, 모든 연령, 배지 내에서의 세포에서는 Oil red O 염색과 함께 지방 분화의 특징인 지질방울(lipid drop)이 확인되었다. 이를 정량한 결과를 도 11에 나타내었으며, 배지별로는 9, 1, 3번 배지 순으로 분화율이 높았고 2과 10 번 배지는 비슷하게 나타났으며, 연령별로는 30, 20, 70, 80대 순으로 분화율이 높았다.
- [0088] 분자적 수준에서 지방 분화의 마커인 PPAR α , LPL 및 FABP4d의 발현을 RT-PCR로 확인 한 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, 개체간의 차이는 컸으나 연령별로는 젊은군이 노령군에 비해 다소 발현율이 높았으며, 배지별로는 전체적으로 비슷하거나 2번과 9번 배지가 약간 높은 수준이었다.
- [0089] 상기 결과들을 통하여, 2, 3, 10번의 배지 내 활성 물질은 연령에 상관없이 지방 중간엽 줄기세포 배양에는 없어서는 안 될 인자인 것을 확인하였고, 전체적으로 젊은 연령에서 다능성(pluripotency)이나 분화율, 텔로머레이즈 활성의 정도가 노령군에 비해 높았으며 배지별로는 2, 3, 10번에서 배양한 세포의 성장율을 포함하여 분화율, 텔로머레이즈 활성이 낮아져 이들 배지내 성분은 세포가 자라고 활성을 지니는데 필수적인 요소이다.
- [0090] 젊은 군에서는 대조군 배지인 1번 배지와 1번 배지에서 셀레늄이 제거된 9번 배지에서의 세포 분화율 정도가 젊은 군이나 노령군이나 비슷한 정도를 나타냈으나, 두 배지간 텔로머레이즈 활성 실험에서 젊은 군에서는 차이가 없던 활성도가 9번 배지에서 배양한 노령군에서 떨어지는 결과를 보아 9 번 배지 내에서 제거된 셀레늄 성분이 노령군에서 꼭 포함되어야 1번 배지에서 배양된 세포 정도의 활성도를 가질 수 있다고 유추할 수 있다.
- [0092] 이상으로 본 발명의 내용을 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.

도면

도면1

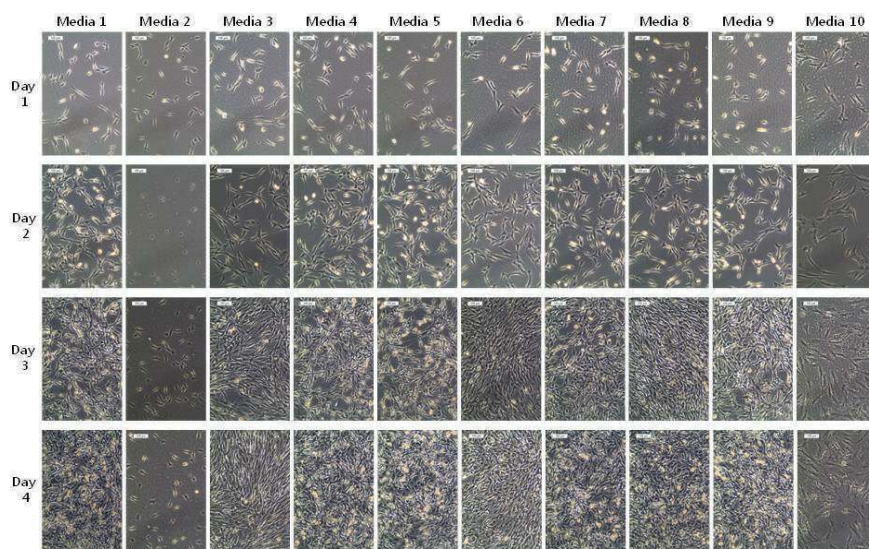
A)

20대(P4)



B)

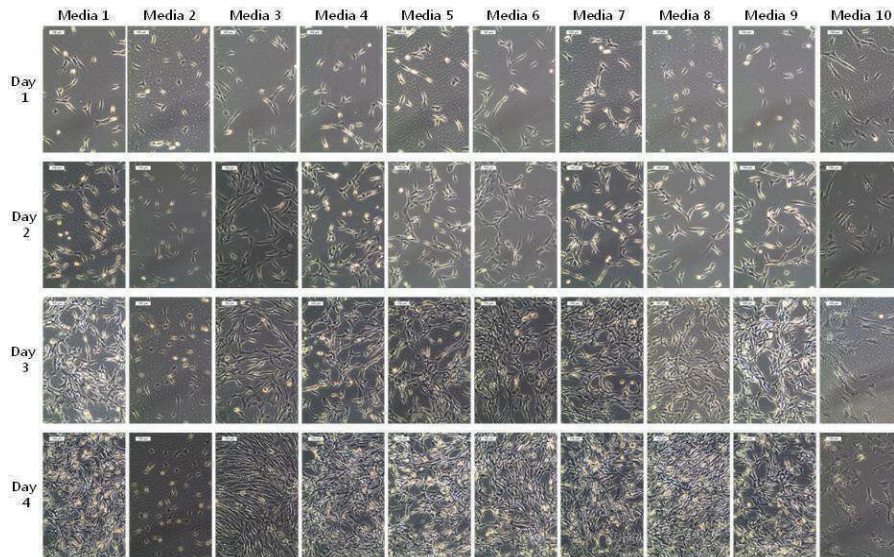
30대(P4)



도면2

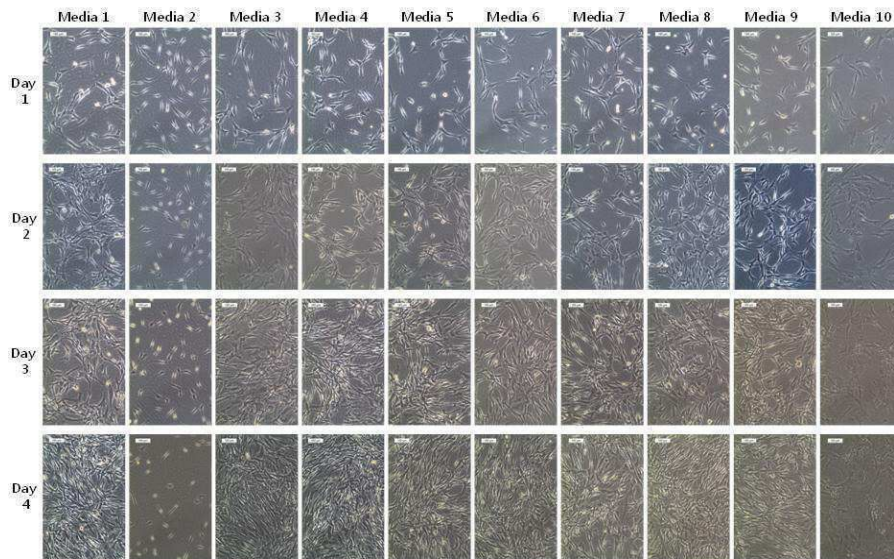
A)

70대 (P4)



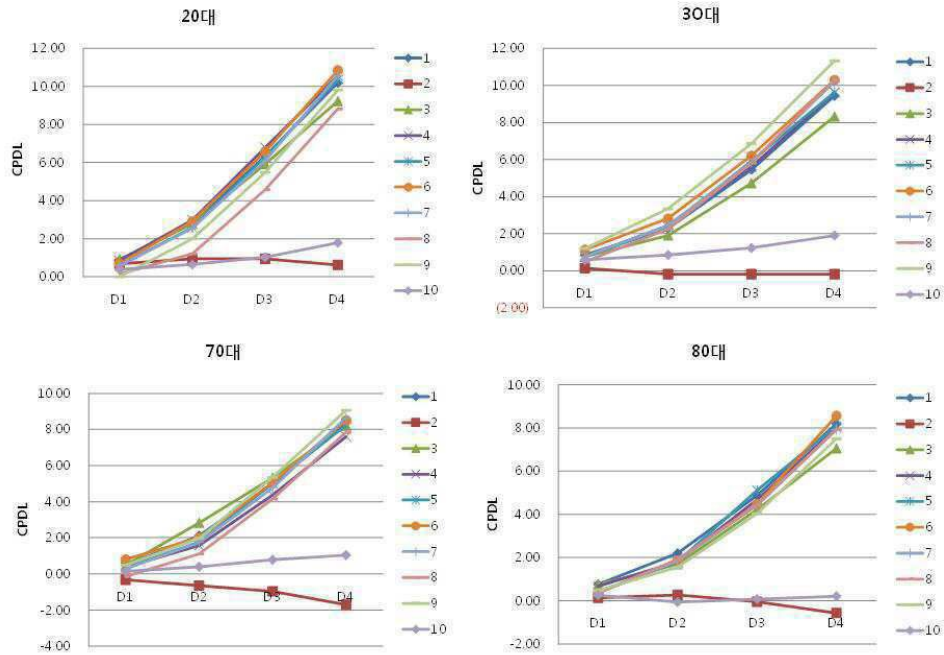
B)

80대 (P4)



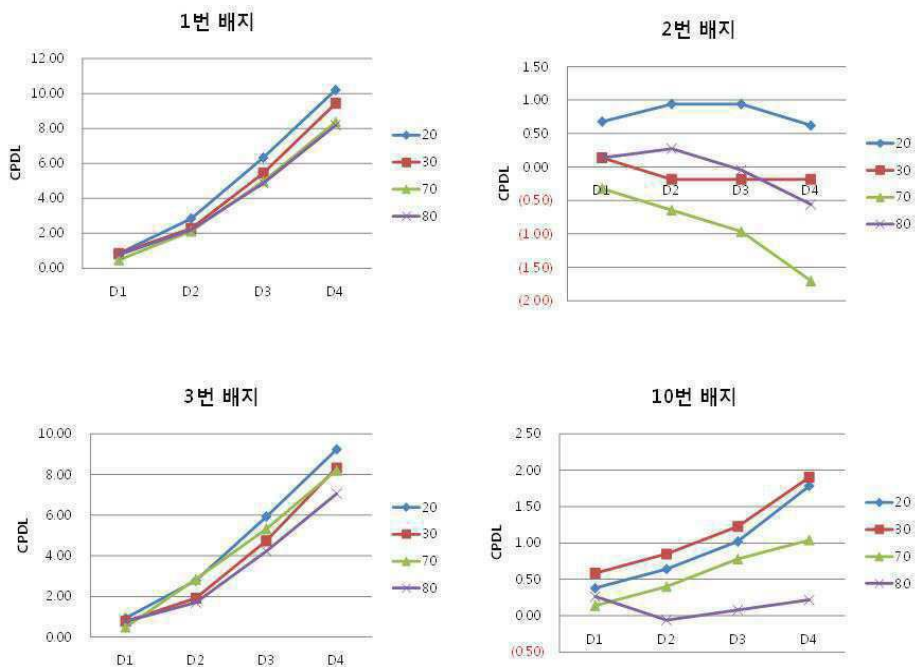
도면3

연령별 CPDL



도면4

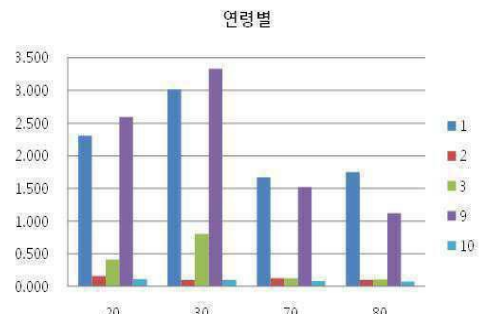
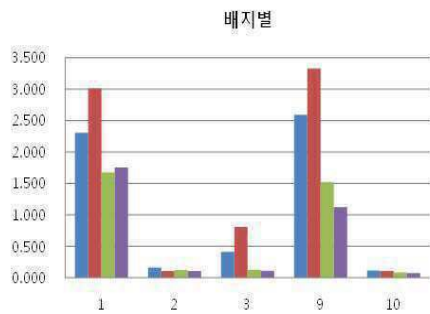
배지별 CPDL



도면5

Telomerase activity assay

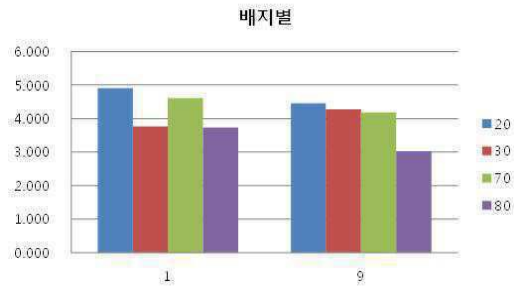
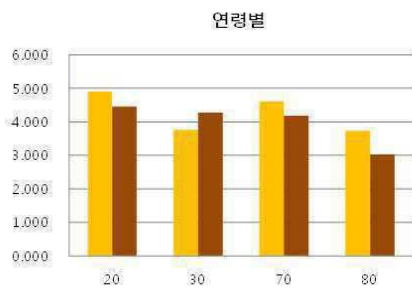
Age 배지	1	2	3	9	10
20	2.254	0.158	0.410	2.591	0.112
30	3.016	0.099	0.805	3.329	0.102
70	1.672	0.121	0.124	1.520	0.084
80	2.342	0.099	0.105	1.120	0.070



도면6

Telomerase activity assay

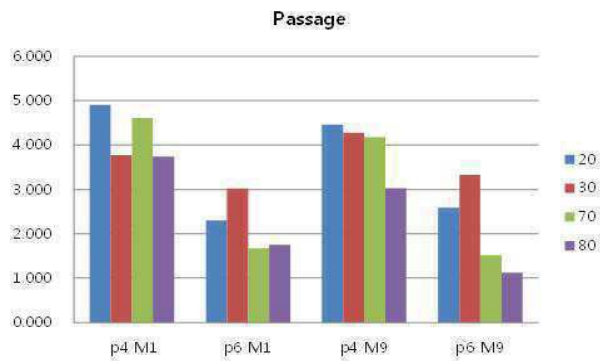
age 배지	1	9
20	4.910	4.464
30	3.767	4.272
70	4.609	4.181
80	3.742	3.022



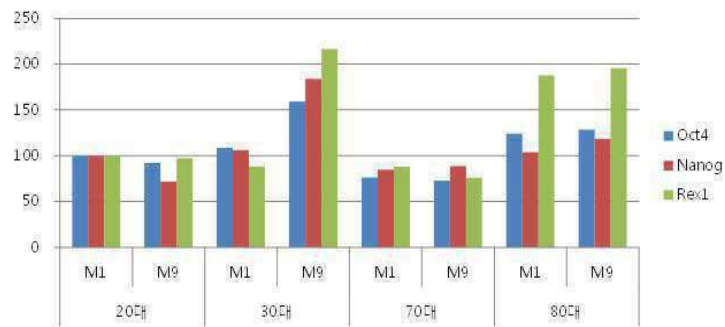
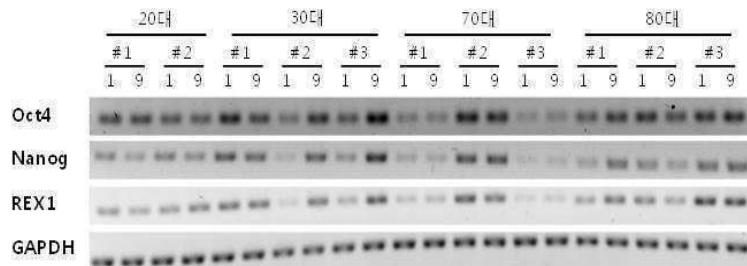
도면7

계대별 telomerase activity

연령 \ 배지	p4 M1	p6 M1	p4 M9	p6 M9
20	4.910	2.307	4.464	2.591
30	3.767	3.016	4.272	3.329
70	4.609	1.672	4.181	1.520
80	3.742	1.750	3.022	1.120



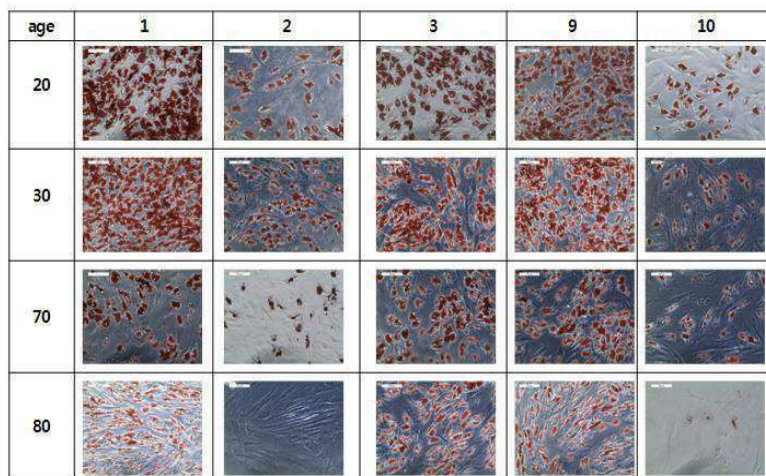
도면8



도면9



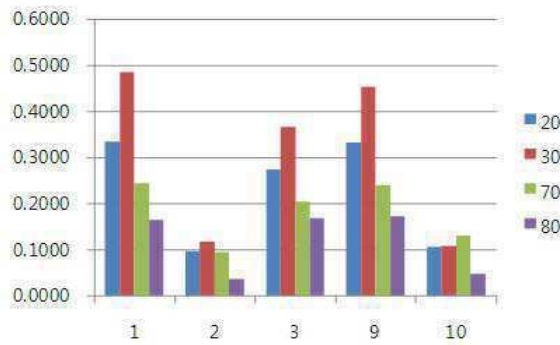
도면10



도면11

quantity

Age 배 지	1	2	3	9	10
20	0.3340	0.0985	0.2755	0.3338	0.1067
30	0.4857	0.1185	0.3677	0.4533	0.1090
70	0.2440	0.0962	0.2057	0.2405	0.1312
80	0.1658	0.0372	0.1690	0.1732	0.0490



도면12

