

Bibliographic Data

Int.Cl.	C12N 5/0775 C12N 5/02
Published Date	20121213
Registration No.	1012119130000
Registration Date	20121207
Application No.	1020100068959
Application Date	20100716
Unexamined Publication No.	1020120008223
Unexamined Publication Date	20120130
Requested Date of Examination	20100716
Agent.	LEECHEOYOUNG
Inventor	RA, Jeong Chan Kang, Sung Keun Seo, Ju Yeon Kim, HyoEun
Rightholder	GwonRi ByeonDong ItEum

발명의 명칭

양막유래 중간엽 줄기세포 배양을 위한 배지조성물 및 이를 이용한 양막유래 중간엽 줄기세포의 배양방법

Title of Invention

The culture method of the culture composition for the amnion originated mesenchyme stem cell cultivation and amnion originated mesenchyme stem cell using the same.

요약

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) (100X), 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.

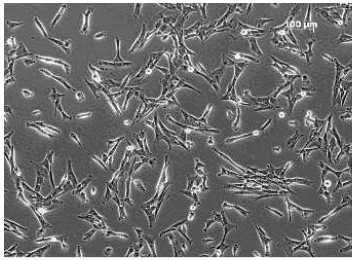
본 발명에 따르면, 줄기세포 치료에 필요한 중간엽 줄기세포의 개체수를 빠른 시간에 획득할 수 있으며, 중간엽 줄기세포의 분화능을 향상시켜, 줄기세포를 이용한 세포치료에 유용하다.

Abstract

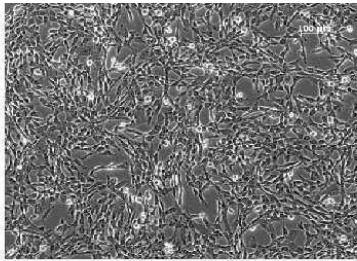
The invention relates to basal medium more detailed as the culture medium for the mesenchyme stem cell cultivation, the L-ascorbic acid 2-phosphoric acid, the fetal bovine serum, the basic fibroblast growth factor (b-FGF), the non essential amino acid (NEAA: non essential amino acid) (100X), insulin, the N-acetyl-L-cysteine, the calcium chloride, and the culture method of the culture composition for the mesenchyme stem cell cultivation containing the head computerized axial tomography and the mesenchyme stem cell using the same.

According to the invention, the population of the mesenchyme stem cell needing for medical treatment the stem cell is made the best use of in the fast time in the cytotherapy using the stem cell the blastogenesis of the mesenchyme stem cell is improved it can obtain.

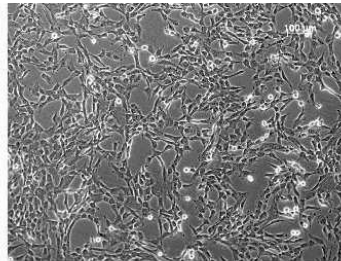
대표도면 (Representative drawing)



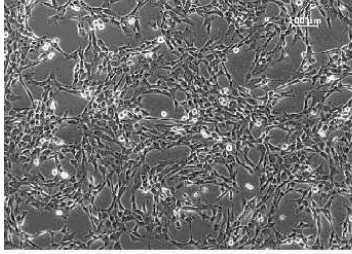
그룹 1



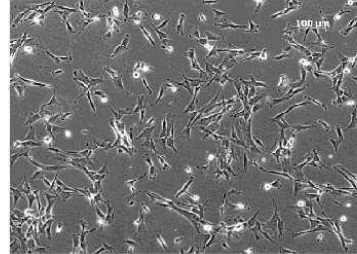
그룹 2



그룹 3



그룹 4



그룹 5

청구의 범위

청구 1항:

기본 배지, L-아스코르브산 2-인산, 우태아혈청, 염기성 섬유아세포 성장인자(b-FGF), 비필수 아미노산(NEAA; non essential amino acid) (100X), 인슐린, N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine), 칼슘클로라이드 및 하이드로코티손을 함유하는 중간엽 줄기세포 배양을 위한 배지조성물.

청구 2항:

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

청구 3항:

제1항에 있어서, 0.05~1 mM의 아스코르브산 2-인산, 2~20% 우태아혈청, 10~1ng/ml의 염기성 섬유아세포 성장인자(b-FGF), 10~1#956#g/ml비필수 아미노산(NEAA; non essential amino acid) (100X), 0.1~100#956#g/ml의 인슐린, 0.2~20mM의 N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine), 0.01~1mM의 칼슘클로라이드 및 5ng/ml~1#956#g/ml의 하이드로코티손을 추가로 함유하는 중간엽 줄기세포 배양을 위한 배지조성물.

청구 4항:

제1항에 있어서, 중간엽 줄기세포는 양막유래인 것을 특징으로 하는 간엽 줄기세포 배양을 위한 배지조성물.

청구 5항:

Scope of Claims

Claim 1:

The culture composition for mesenchyme stem cell cultivation containing the basal medium, L-ascorbic acid 2-phosphoric acid, fetal bovine serum, basic fibroblast growth factor (b-FGF), the non essential amino acid (NEAA: non essential amino acid) (100X), insulin, N-acetyl-L-cysteine, calcium chloride and head computerized axial tomography.

Claim 2:

As for claim 1, the culture composition for the mesenchyme stem cell cultivation selected from group comprised of the basal medium is the DMEM-HG, and the Defined Keratinocyte-SFM and their mixture.

Claim 3:

As for claim 1, the culture composition for the mesenchyme stem cell cultivation containing the ascorbic acid 2-phosphoric acid of 0.05~1 mM, 2~20% fetal bovine serum, the basic fibroblast growth factor (b-FGF) of 10~1ng / ml, 10~1#956#g / ml non essential amino acid (NEAA: non essential amino acid) (100X), the insulin of 0.1~100#956#g / ml, the N-acetyl-L-cysteine of 0.2~20mM, and the calcium chloride of 0.01~1mM and head computerized axial tomography of 5ng / ml~1#956#g / ml.

Claim 4:

As for claim 1, the culture composition for the mesenchymal stem cell cultivation called the mesenchyme stem cell is the amnion originated.

Claim 5:

제1항 내지 제3항의 배지에서 중간엽 줄기세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포의 배양방법.

The culture method of the mesenchyme stem cell cultivating the mesenchyme stem cell in the culture medium of claim 1 to claim 3.

청구 6항:

Claim 6:

제5항에 있어서, 중간엽 줄기세포는 양막유래인 것을 특징으로 하는 중간엽 줄기세포의 배양방법.

As for claim 5, the culture method of the mesenchyme stem cell called the mesenchyme stem cell is the amnion originated.

기술분야

Technical Field

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) (100X), 인슐린, N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine), 칼슘클로라이드 및 하이드로코르티손을 함유하는 중간엽 줄기세포 배양을 위한 배지조성물 및 이를 이용한 중간엽 줄기세포의 배양방법에 관한 것이다.

The invention relates to basal medium more detailed as the culture medium for the mesenchyme stem cell cultivation, the L-ascorbic acid 2-phosphoric acid, the fetal bovine serum, the basic fibroblast growth factor (b-FGF), the non essential amino acid (NEAA: non essential amino acid) (100X), insulin, the N-acetyl-L-cysteine, the calcium chloride, and the culture method of the culture composition for the mesenchyme stem cell cultivation containing the head computerized axial tomography and the mesenchyme stem cell using the same.

배경기술

Background Art

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.

The stem cell refers to the cell having the capability specializing to two or more cells while having the self copy ability. And it can classify into the pluripotent stem cell (totipotent stem cell), the pluripotent stem cell, and the Multipotent stem cell.

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.

There can be the specialized characteristic as the specific tissue the stem cell is developed the cell in which the adult stem cell already exists in all kinds of the long-terms of the human body is picked. But recently, the adult stem cell is used. The experiment let differentiate as all kinds of different organization including the interstitial cell etc. gets the success and the experiment is watched.

다분화능 줄기세포는 성체 골수에서 최초로 분리되었고(Y. Jiang et al., Nature, 418:41, 2002), 그 후 다른 여러 성체 조직에서도 확인되었다(C.M. Verfaillie, Trends Cell Biol., 12:502, 2002). 다시 말해, 골수는 가장 널리 알려진 줄기세포의 소스이지만, 다분화능 줄기세포는 피부, 혈관, 근육 및 뇌로부터도 확인되었다(J.G. Toma et al., Nat. Cell Biol., 3:778, 2001; M. Sampaolesi et al., Science, 301:487, 2003; Y. Jiang et al., Exp. Hematol., 30:896, 2002). 그러나, 골수와 같은 성체 조직 내에 줄기세포는 매우 드물게 존재하고, 이러한 세포들은 분화유도 하지 않고 배양하기 어려워서, 특이적으로 스크린된 배지들이 없으면 그 세포들을 배양하기 어렵다. 즉, 줄기세포들은 분리하여 체외에서 보존하기가 매우 어렵다는 단점이 있다.

In the Multipotent stem cell is the adult bone marrow, it was separated. Thereafter it was confirmed in the other different adult tissue (C.M. Verfaillie, Trends Cell Biol., 12:502, 2002). In other words, the bone marrow is the source of the most widely known stem cell. And the Multipotent stem cell was confirmed from skin, the blood vessel, and the muscle and brain (J.G. Toma et al., Nat. Cell Biol., 3:778, 2001; M. Sampaolesi et al., Science, 301:487, 2003; Y. Jiang et al., Exp. Hematol., 30:896, 2002). But the stem cell very rarely exists within the adult tissue like the bone marrow. It is difficult to these cells be not issued with differentiation induction and cultivate. It is difficult to cultivate the cells if there are no culture mediums which the specifically are screened. That is, it has the disadvantage that it is very difficult to stem cells separate and preserve in vitro.

한편, 태아 조직(fetal tissue)에서 중간엽 줄기세포의 분리를 연구한 결과, 풍부한 중간엽 줄기세포가 있음이 밝혀졌으나, 세포치료제를 목적으로 태아 조직의 사용은 윤리적으로 제한이

In the meantime, there can be the limit for using as the cell therapy product because the limit ethically has the use of the embryo tissue as the purpose the cell therapy

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.

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).

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

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

py product the separation of the mesenchyme stem cell was studied in the embryo tissue (fetal tissue). There is a problem that in the umbilical cord blood (Umbilical cord blood, UCB) as the source about the fetus mesenchyme stem cell (fetal MSC), the mesenchyme stem cell was separated. However the number was very small. Proliferation does not go well.

Recently, it is known that the mesenchyme stem cell exists in the film structure of the thin inside surrounding the embryo bud of the mammal generated with amnion (the amnion, and the amniotic membrane or the amniotic lining membrane), in other words, the placenta. This is separated. It develops the technology cultivated (WO 2006/019357, KR0795708 B, and KR0818214 B).

But the disadvantage that the stem cell increased but it took the long time had the culture method of the existing amnion originated stem cell.

Thus, it made many efforts in order to develop the method improving the breeding ratio of the amnion originated stem cell the inventors maintain the blastogenesis. Then the case of cultivating the amnion originated stem cell in the DMEM-P and the culture medium mixing the KFSM-P, and the that it could improve the cell proliferating activity even when maintaining the blastogenesis and thing were confirmed the invention was completed.

발명의 내용

해결하고자 하는 과제

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

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

과제해결 수단

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) (100X), 인슐린, N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine), 칼슘클로라이드 및 하이드로코티손을 함유하는 중간엽 줄기세포 배양을 위한 배지조성물을 제공한다.

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

발명의 효과

Summary of Invention

Problem to be solved

The culture medium for the mesenchyme stem cell cultivation which has the high cell yield even when this Purpose of the invention maintains the blastogenesis is to be provided.

It is another object of the present invention to provide the method of cultivating the mesenchyme stem cell using the culture medium.

Means to solve the problem

To accomplish the above objects, the invention provides the basal medium, the L-ascorbic acid 2-phosphoric acid, the fetal bovine serum, the basic fibroblast growth factor (b-FGF), the non essential amino acid (NEAA: non essential amino acid) (100X), insulin, the N-acetyl-L-cysteine, the calcium chloride, and the culture composition for the mesenchyme stem cell cultivation containing the head computerized axial tomography.

The invention also provides the culture method of the mesenchyme stem cell cultivating the amnion originated stem cell in the culture medium.

Effects of the Invention

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

According to the invention, the population of the mesenchyme stem cell needing for medical treatment the stem cell is made the best use of in the fast time in the cytotherapy using the stem cell the blastogenesis of the mesenchyme stem cell is improved it can obtain.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

Description of Embodiments

본 발명은 일관점에서, 기본 배지, L-아스코르브산 2-인산, 우태아혈청, 염기성 섬유아세포 성장인자(b-FGF), 비필수 아미노산(NEAA; non essential amino acid) (100X), 인슐린, N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine), 칼슘클로라이드 및 하이드로코티손을 함유하는 양막유래 중간엽 줄기세포 배양을 위한 배지조성물에 관한 것이다.

The invention relates to the basal medium in the consistency, the L-ascorbic acid 2- phosphoric acid, the fetal bovine serum, the basic fibroblast growth factor (b-FGF), the non essential amino acid (NEAA: non essential amino acid) (100X), insulin, the N-acetyl-L-cysteine, the calcium chloride, and the culture composition for the amnion originated mesenchyme stem cell cultivation containing the head computerized axial tomography.

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

In the present invention, it is selected in group comprised of the basal medium is the DMEM-HG, and the Defined Keratinocyte-SFM and their mixture than.

본 발명에 있어서, 상기 각 배지 성분의 함유량은 0.05~1 mM의 아스코르브산 2-인산, 2~20% 우태아혈청, 10~1ng/ml의 염기성 섬유아세포 성장인자(b-FGF), 10~1#956#g/ml비필수 아미노산(NEAA; non essential amino acid) (100X), 0.1~100#956#g/ml의 인슐린, 0.2~20mM의 N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine), 0.01~1mM의 칼슘클로라이드 및 5ng/ml~1#956#g/ml의 하이드로코르티손인 것을 특징으로 할 수 있다.

In the present invention, the content of each medium component may be the ascorbic acid 2- phosphoric acid of 0.05~1 mM, 2~20% fetal bovine serum, the basic fibroblast growth factor (b-FGF) of 10~1ng / ml, 10~1 µg / ml non essential amino acid (NEAA: non essential amino acid) (100X), the insulin of 0.1~100µg / ml, the N-acetyl-L-cysteine of 0.2~20mM, and the calcium chloride of 0.01~1mM and hydrocortisone of 5ng / ml~1µg / ml.

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

In the present invention, the mesenchyme stem cell may be the mesenchyme stem cell of the amnion originated.

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

The invention relates to the culture method of the mesenchyme stem cell cultivating the mesenchyme stem cell in the other point of view in the culture medium.

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

In the present invention, the mesenchyme stem cell may be the mesenchyme stem cell of the amnion originated.

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

It was not to use the cell of the various kind in which the amnion originated lobus medius stem cannonade used in one aspect of the present invention was extracted from the amnion organization whole separated from the placenta but it extracted only the amnion mesenchyme stem cell and it separated and it used.

본 발명의 일 양태에서, 양막유래 중간엽 줄기세포를 분리하는 방법은 분만 시에 수집된 태반조직으로부터, 양막조직을 분리하고, 분리된 양막조직을 멸균생리식염수로 세척한 다음, 수술용 가위로 최대한 세절하였다. 세절된 조직에 콜라게네이즈 용

In one aspect of the present invention, the method of separating amnion originated mesenchyme stem cell separated the amnion organization in the childbirth from the collected placenta tissue. After the separated amni

액을 투입하여 잘 혼합한 후 플라스크에 넣고, 플라스크를 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 90분간 반응시켜 조직을 용해시켰다. 용해된 조직을 Cell strainer에 거르고, 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 제거하고, DMEM-P로 세포침전물을 현탁하여 T-플라스크에 접종 후 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 3~4일간 인큐베이션시켜 배양용기에 부착된 중간엽 줄기세포만을 수득하였다.

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

실시예

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 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

실시예 1: 양막 조직으로부터 중간엽 줄기세포의 분리

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

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% CO₂ 인큐베이터에서 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% CO₂ 인큐베이터에서 3~4일간 인큐베이션시켜 배양용기에 부착된 중간엽 줄기세포만을 얻었다.

실시예 2: 분리한 양막 중간엽 줄기세포의 DMEM-P 및

on organization was washed to the sterile physiological saline solution it to the utmost sliced to the scissor for the operation. The collagenase solution was injected in the split organization and it well put in the flask after doing the mixing. The flask for 90 minutes was reacted at 37℃, 5% CO₂ incubator and the organization was dissolved. The dissolved organization was strained through the Cell strainer. It centrifuged. It obtained only the mesenchyme stem cell adhered to the culture vessel the supernatant is removed after the centrifugation it incubates 3~4 days to the T- flask at 37℃, 5% CO₂ incubator after the inoculation.

The amnion originated mesenchyme stem cell used in one aspect of the present invention in the DMEM-P culture medium, the DMEM-P culture medium and the culture medium mixing the KSFМ-P culture medium it cultivated the KSFМ-P culture medium was independently used exhibit especially, the highest breeding ratio in the DMEM-P culture medium and the culture medium mixing the KSFМ-P culture medium to 66:33 the cell yield was excellent.

Embodiment .

Hereinafter, the invention tries to be more particularly explained through the embodiment. These embodiments only exemplify the invention. Therefore it has to be person skilled in the art and it will be obvious in the relevant industry not to be interpreted that the scope of the present invention is limited by these embodiments.

embodiment 1: the separation

of the mesenchyme stem cell from the amnion organization.

The amnion organization necessary for experiment put into saline solution containing the organization which separated from the placenta and is separated. Is the antibiotic or the DMEM (Dulbecco modified Eagle medium) culture medium and it moved to the laboratory.

It was 5g fixed quantity and the amnion organization was washed in the clean bench to two times sterile physiological saline solution. The amnion organization was sliced in the petri dish was sliced to the utmost to the scissor for the operation. The collagenase solution was injected in the split organization and it well put in the flask after doing the mixing. It confirmed to react for 90 minutes at 37℃, 5% CO₂ incubator and be the flask dissolved of the organization. It strained through the Cell strainer which already prepared for the dissolved organization in 50mL tube. It centrifuged. It obtained only the mesenchyme stem cell adhered to the culture vessel the supernatant is removed after the centrifugation it incubates 3~4 days to the T- flask at 37℃, 5% CO₂ incubator after the inoculation.

embodiment 2: the cultivation at the DMEM-P of the

KSFM-P 혼합배지에서의 배양

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 1.0x10⁶ 세포를 분주하여 37℃에서 4일 동안 배양하였으며, 배지는 이틀에 한 번씩 교환하였다. 배양 3일 및 배양 4일째의 세포 사진을 각각 도 1 및 도 2에 나타내었다.

amnion mesenchyme stem cell separated and KSFM-P mixed medium.

It was busy and 1.0x 10⁶ cell was cultivated using the culture medium mixing the obtained amnion originated mesenchyme stem cell as described above to mixing ratio described in the table 4 the mixed medium of the DMEM- P (table 1) and KSFM- P (table 3) culture medium in the T175 flask in 37℃ for 4. And the culture medium exchanged in two days. Each angular showed the cell photograph of the cultivation 4th day and cultivation 3 in 1 and fig. 2.

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/ml
NEAA(100X)	Invitrogen	10 μl/ml

The component of the DMEM-P culture medium

Compositional component	Place of acquisition	Concentration
DMEM-HG	It is muddy with well	
L-ascorbic acid 2-phosphate	Sigma-aldrich	0.2 mM
Fetal Bovine Serum	Invitrogen	10%
b-FGF	Invitrogen	10 ng/ml
NEAA(100X)	Invitrogen	10 μl/ml

NEAA(100X)의 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

NEAA(100X)Composition

NEAA compositional component	Concentration(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

KSFM-P 배지의 성분

구성성분	입수처	농도
Defined Keratinocyte-SFM	Invitrogen	
L-ascorbic acid 2-phosphate	Sigma-aldrich	0.2 mM
Insulin	Millipore	5 μg/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%

The component of the KSFM-P culture medium

Compositional component	Place of acquisition	Concentration
Defined Keratinocyte-SFM	Invitrogen	
L-ascorbic acid 2-phosphate	Sigma-aldrich	0.2 mM
Insulin	Millipore	5 μg/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%

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

The mixing ratio of the KSFM-P and DMEM-P

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

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.

In the cultivation 4th day, the TrypLE- Express (Gibco) or 0.25% Trypsin-EDTA was put into the HBSS buffer after doing washing and the cultivated amnion originated mesenchyme stem cell for 10 minutes was reacted at 37℃. The cell number of the amnion originated mesenchyme stem cell which it obtained after filling the culture medium in which FBS was contained and inactivating trypsin was measured.

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 있어서

Consequently, as shown in figures 1 and 2, amnion originated stem cell more cultivated in the DMEM-P culture medium and the culture medium mixing the KSFM-P culture medium much more quickly grew in the DMEM-P

도, 현저히 많다는 것을 확인할 수 있었다.

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

culture medium and the culture medium using the KSF M-P culture medium with the table 4. And it could confirm as to the cell number of the cultivation 4th day being remarkably many.

As shown in the above table 5, in the DMEM-P culture medium of the group 2 and the culture medium mixing the KSFM-P culture medium to 66:33, the highest breeding ratio was shown. Thereafter the mixed medium of the mixing ratio was used in the subculture.

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

The change of the cell number according to the culture medium mixing ratio

Group	DMEM-P : KSFM-P	Cell number
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

실시에 3: 혼합배지에서 배양된 양막 유래 중간엽 줄기세포의 면역학적 특성

embodiment 3: the immunological characteristic of the amnion originated mesenchyme stem cell cultivated in the mixed medium.

표면 항원 발현의 유세포분석(Flow cytometry analysis)

The flowcytometry (Flow cytometry analysis) of the surface revelation of antigen.

실시에 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

In the embodiment 2, amnion originated mesenchyme stem cells cultivated to the mixed medium were characterized to surface CD series antigen markers. The CD29 (mononuclear cell marker), CD 31 (endothelial cell and stem cell marker), the CD 34 (hematopoietic stem cell marker), the CD44, the CD 45 (PTPR, ASV, Leukocyte marker), CD73s were applied to the FACS analysis.

실시에 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 10⁵ 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.

The amnion originated mesenchyme stem cell obtained in the embodiment 1 was washed to PBS. After trypsinizing the cell was taken away and it centrifuged at 1500rpm for 5 minutes. After after throwing the supernatant away the Blocking buffer solution (5% serum (Normal goat serum + Normal horse serum) being put and reacting for 60 minutes at 4℃ it centrifuged at 1500rpm for 5 minutes. After throwing the supernatant away the cell was floated in PBS and it was 1 x 10⁵ cell busy as the Negative Control and CD antigen marker number. The antibody (R-phycoerythrin(PE)/ FITC(Fluorescein Isothiocyanate)-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody) was put into each well. It incubated in 4℃ for 40 minutes. It centrifuged at 1500rpm after incubation for 3 minutes. After removing the supernatant it washed to PBS and it centrifuged at 1500rpm for 3 minutes. And it washed to PBS and the process of centrifuging was once more repeated after the supernatant removal in 1500rpm for 3 minutes. Using the Flow Cytometer the supernatant is removed, it analyzed.

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).

Consequently, amnion originated mesenchyme stem cells of each group represents altogether, the CD29, and the bisexual person immunological characteristic about the CD44 and CD73. And the immunological characteristic of voice was shown about the CD31, and the CD34 and CD45 (the figures 3 through 8).

실시예 4: 혼합배지에서 계대배양된 양막유래 중간엽 줄기세포의 증식능 비교

실시예 1에서 배양된 세포들을 각각 1.0×10^6 세포/T175플라스크 농도로 계대배양하여, P1 및 P2 세대의 증식능을 확인하였다.

배양은 실시예 1의 배양방법과 동일한 조건에서 수행하였다.

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

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

실시예 5: 혼합배지에서 계대배양된 양막유래 중간엽 줄기세포의 면역학적 특성 비교

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.

실시예 6: 혼합배지에서 배양된 양막유래 중간엽 줄기세포의 골분화 정량

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°C, 5% CO₂, 배지교환주기: 3~4일)하여 중간엽 줄기세포를 골세포로 분화유도시켰으며, 2일 마다 분화배지를 새로이 교환하였다. 골세포로의 분화는 정상산소상태 및 저산소상태(1 - 5%)로 나누어 실시하였으며, 각 분화조건을 표 6에 나타내었다.

embodiment 4: the reproductive integrity comparison of the amnion originated mesenchyme stem cell subcultured in the mixed medium.

Cells cultivated in the embodiment 1 were subcultured in the respective 1.0×10^6 cell / T175 flask concentration. The reproductive integrity of the P2 generation and P1 was confirmed.

Cultivation performed in the culture method of the embodiment 1 and same condition.

Consequently, the P1 of the group (group 1) cultivated in the DMEM-P single medium exhibits the high cell proliferating activity when the cell number was measured after 5 cultivation it is 5.4×10^6 cell (fig. 9).

In case of the P2, when the group (group 1) cultivated in the DMEM-P single medium measured after 4 cultivation it received in the P1 the cell number proliferated to 3.4×10^6 cell did. And the reproductive integrity increased in case of the group (group 2) mixing the DMEM-P and KSFM-P culture medium to 66:33 to 1.38×10^7 cell in comparison with the P1 (fig. 10).

embodiment 5: the immunology acceptable characteristic comparison of the amnion originated mesenchyme stem cell subcultured in the mixed medium.

Amnion originated mesenchyme stem cells of each group the P1, which it uses the DMEM-P culture medium the P1 subcultured using the culture medium mixing the P2, the DMEM-P and KSFM-P culture medium to 66:33 and immunological characteristic of the P2 are confirmed as the embodiment 2 and same method represent altogether, the bisexual person immunological characteristic about the CD29, the CD44, the CD73, the CD90, the CD105 and HLA-ABC. And the immunological characteristic of voice was shown about the CD31, the CD34, and the CD45 and HLA-DR.

embodiment 6: the bone meal fixed quantity of the amnion originated mesenchyme stem cell cultivated in the mixed medium.

The DMEM-P single medium obtained in the embodiment 1 and the amnion originated mesenchyme stem cell cultivated in the DMEM-P / KSFM-P mixed medium were done cultivation (37°C, 5% CO₂, and the medium exchange cycle : 3~4) in the osteoconduction culture medium (Nonhematopoietic OsteoDiff Medium, Miltenyi Biotec) for 18 and the mesenchyme stem cell was induce subdivision into to the bone cell. And differentiation media were afresh exchanged at 2. The differentiation to the bone cell divided into the normoxia and hypoxic state (1 - 5%) and it performed. And each differentiation condition was shown in the table 6.

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).

The bone cell differentiation rate with high cell which confirmed after the culture start that the amnion originated mesenchyme stem cell was specialized in 18th day using the Alizalin red S dyeing method to the bony osteogenesis cell and is cultivated than the cell cultivated in the DMEM-P single medium in the mixed medium (group 2) are shown. And the blastogenesis in which the cell (M-H-N)) cultivated in cultivation in the peracid first anniversary of the death of a person hand was much higher was shown (figures 11 and 12).

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 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

The content of the present invention was particularly described to the or more. And the or more has to a person skilled in the art of the relevant industry. It is the embodiment which this concrete technology only does with desirable. And it will be clear the scope of the present invention is not limited by this. Therefore, it is defined with claims and their equivalent in which the substantial range of the present invention is attached.

도면에 대한 간단한 설명

도 1은 DMEM-P, KSFМ-P 또는 DMEM-P와 KSFМ-P 혼합배지에서 3일째 배양된 양막유래 중간엽 줄기세포의 사진이다.

도 2는 DMEM-P, KSFМ-P 또는 DMEM-P와 KSFМ-P 혼합배지에서 4일째 배양된 양막유래 중간엽 줄기세포의 사진이다.

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

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

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

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

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

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

도 9는 DMEM-P과 KSFМ-P 혼합배지 (그룹 2) 에서 배양된 양막유래 중간엽 줄기세포의 P1 계대 세포를 나타낸 사진이다.

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

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.

도 12는 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.

Brief explanation of the drawing

Figure 1 is a photograph of the amnion originated mesenchyme stem cell cultivated in the DMEM-P, and the KSFМ-P or the DMEM-P and KSFМ-P mixed medium with 3rd day.

Figure 2 is a photograph of the amnion originated mesenchyme stem cell cultivated in the DMEM-P, and the KSFМ-P or the DMEM-P and KSFМ-P mixed medium with 4th day.

Figure 3 shows each by group flow cytometry result about the CD31.

Figure 4 shows each by group flow cytometry result about the CD34.

Figure 5 shows each by group flow cytometry result about the CD45.

Figure 6 shows each by group flow cytometry result about the CD29.

Figure 7 shows each by group flow cytometry result about the CD44.

Figure 8 shows each by group flow cytometry result about the CD73.

Figure 9 is a photograph showing the P1 cell of the amnion originated mesenchyme stem cell cultivated in the DMEM-P and KSFМ-P mixed medium (the group 2).

Figure 10 is a photograph showing the P2 cell of the amnion originated mesenchyme stem cell cultivated in the DMEM-P and KSFМ-P mixed medium (the group 2).

Figure 11 shows the result that the amnion originated mesenchyme stem cell cultivated using the Alizalin red S dyeing method in the DMEM-P or the mixed medium (the group 2) confirms the differentiation as the bony osteogenesis cell as each conditional.

Figure 12 is a graph which quantifies the Alizalin red S concentration and compared with the control group (the group which does not induce the bone meal) of the amnion originated mesenchyme stem cell specialized in the DMEM-P or the mixed medium (the group 2) after doing cultivation to each conditional to the bone cell.

면책안내

본 문서는 특허 및 과학기술문헌 전용의 첨단 자동번역 시스템을 이용해 생성되었습니다. 따라서 부분적으로 오역의 가능성이 있으며, 본 문서를 자격을 갖춘 전문 번역가에 의한 번역물을 대신하는 것으로 이용되어서는 안 됩니다. 시스템 및 네트워크의 특성때문에 발생한 오역과 부분 누락, 데이터의 불일치 등에 대하여 본원은 법적인 책임을 지지 않습니다. 본 문서는 당사의 사전 동의 없이 권한이 없는 일반 대중을 위해 DB 및 시스템에 저장되어 재생, 복사, 배포될 수 없음을 알려드립니다.

(The document produced by using the high-tech machine translation system for the patent and science & technology literature. Therefore, the document can include the mistranslation, and it should not be used as a translation by a professional translator. We hold no legal liability for inconsistency of mistranslation, partial omission, and data generated by feature of system and network. We would like to inform you that the document cannot be regenerated, copied, and distributed by being stored in DB and system for unauthorized general public without our consent.)