



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0133040
(43) 공개일자 2014년11월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/02 (2006.01) C12N 5/074 (2010.01)
C12N 5/0775 (2010.01)
(21) 출원번호 10-2013-0052558
(22) 출원일자 2013년05월09일
심사청구일자 2014년04월17일

(71) 출원인
라정찬
충청북도 청원군 내수읍 신기초정로 699
주식회사 케이스템셀
서울특별시 영등포구 국회대로76길 10 (여의도동, 기독교한국침례회총회빌딩)
(72) 발명자
라정찬
충청북도 청원군 내수읍 신기초정로 699
강성근
서울특별시 관악구 성현로 80, 116동 504호 (봉천동, 관악드림타운아파트)
조정윤
서울특별시 송파구 동남로28길 13 (오금동)
(74) 대리인
이처영

전체 청구항 수 : 총 9 항

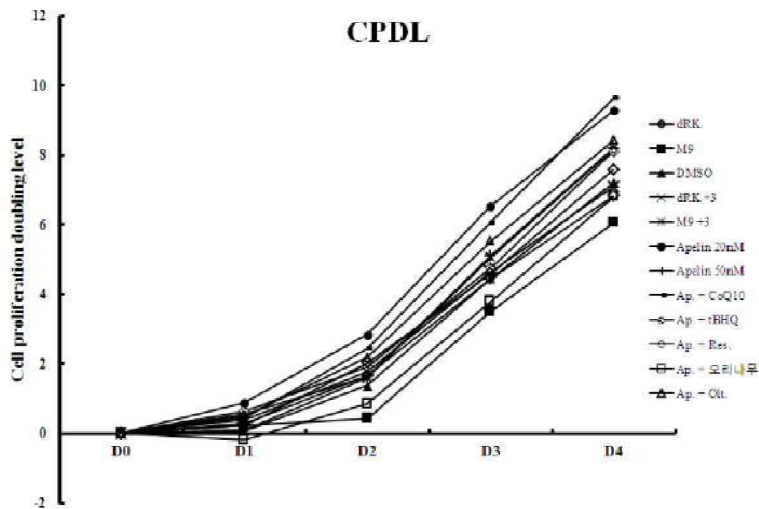
(54) 발명의 명칭 줄기세포의 재생능 향상을 위한 배지 조성물 및 이를 이용한 줄기세포의 배양방법

(57) 요약

본 발명은 줄기세포의 재생능 향상을 위한 아펠린을 함유하는 배지 조성물 및 이를 이용한 줄기세포의 배양방법에 관한 것이다.

본 발명에 따르면, 줄기세포를 세포 특성의 변화 없이 효과적으로 증식 및 배양할 수 있고 활성을 증가시킬 수 있으므로 줄기세포를 이용한 세포치료 효능을 획기적으로 증진시킬 수 있다.

대표도 - 도4



특허청구의 범위

청구항 1

1 내지 100 nM의 아펠린 (apelin)을 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 재생능 향상을 위한 배지 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 배지는 셀레늄(selenium), 아스코르브산, 비타민 E, 카테킨, 라이코펜, 베타카로틴, 코엔자임 Q-10 (CoQ-10), 레스베라톨 (resveratol), T-BHQ, oltipraz, 오리나무 추출물, EPA(eicosapentaenoic acid) 및 DHA(docosahexanoic acid)로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 재생능 향상을 위한 배지 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 추가되는 성분은 코엔자임 Q-10 (CoQ-10) 또는 oltipraz인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 재생능 향상을 위한 배지 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 배지는 NAC(N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 하이드로코르티손, 텍사메타손, bFGF (basic fibroblast growth factor), 헤파란 황산 (heparan sulfate), 2-메르캅토에탄올 (2-mercaptoethanol) 및 EGF (epidermal growth factor)로 구성된 군에서 선택되는 1가지 이상의 성분을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 재생능 향상을 위한 배지 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 줄기세포는 성체 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 재생능 향상을 위한 배지 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 줄기세포는 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 재생능 향상을 위한 배지 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 배지 조성물에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 재생능을 향상시키는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 줄기세포는 성체 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 재생능을 향상시키는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 줄기세포는 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 줄기세포의 재생능을 향상시키는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 줄기세포의 재생능 향상을 위한 배지 조성물 및 이를 이용한 줄기세포의 배양방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 노령인의 줄기세포가 젊은 사람의 줄기세포 수준의 재생능을 가지도록, 크기와 활성의 변화 없이 줄기세포의 재생능을 효과적으로 향상시킬 수 있는 줄기세포의 배지 조성물 및 이를 이용한 줄기세포의 배양방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 줄기세포(stem cell)는 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. 만능 줄기세포(totipotent stem cell)는 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있는 만능의 성질을 가진 세포로 난자와 정자의 수정 이후 8세포기까지의 세포가 이러한 성질을 가지며 이 세포를 분리하여 자궁에 이식하면 하나의 완전한 개체로 발생해 나갈 수 있다. 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell)는 외배엽, 중배엽, 내배엽층 유래의 다양한 세포와 조직으로 발생할 수 있는 세포로서, 수정 4~5일 후 나타나는 배반포(blastocyst)의 안쪽에 위치한 내세포괴(inner cell mass)에서 유래하며, 이를 배아 줄기 세포라 하며 다양한 다른 조직 세포로 분화되지만 새로운 생명체를 형성하지는 못한다. 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell)는 이 세포가 포함되어 있는 조직 및 기관에 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 줄기세포로서, 태아기, 신생아기 및 성체기의 각 조직 및 장기의 성장과 발달은 물론 성체조직의 항상성 유지와 조직손상 시 재생을 유도하는 기능에 관여하고 있으며 조직 특이적 다능성 세포들을 총칭하여 성체 줄기세포라 한다.

[0003] 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. 특히, 병이나 사고에 의한 기능 장애나 부조화에 빠진 생체 조직 및 장기의 재생 및 기능 회복을 위해 세포를 적극적으로 활용하여 실시하는 치료법인 재생 의료에 있어서, 환자 본인으로부터 줄기세포, 혈액 유래 단핵세포 혹은 골수 유래 단핵세포를 수집하는 단계, 시험관 배양으로 세포 증식 및/또는 분화를 유도하는 단계, 및 선택된 미분화(줄기세포 및/또는 전구세포) 및/또는 분화세포를 착상에 의해 환자 자신의 몸에 도입하는 단계를 포함하는 방법이 많이 이용되고 있다. 이처럼, 기존의 고전적인 약물치치나 수술적 방법을 통한 질병치료가 손상된 세포·조직·장기를 건강한 것으로 바꾸는 세포·조직대체치료법으로 대체될 것으로 예측됨으로써, 줄기세포의 활용도는 더욱 높아지게 될 것이다.

[0004] 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).

[0005] 한편, 인간의 연령이 증가하면 몸속 장기의 기능이나 세포의 재생 능력이 감소하듯이, in vitro 상에서 줄기세포를 거듭 배양하거나 외부 인자의 자극이 있는 경우, 세포의 기능 및 모양이 변할 수 있다. 즉, in vitro 상에서 세포의 배양이 시작되는 순간 거의 감지할 수 없을 정도이지만 세포가 기능을 잃기 시작하며 노화(senescence)의 상태로 들어간다. 이러한 세포 특성 때문에 유전자 치료에 이용할 세포로는 초기 세포를 사용하는 것이 좋으며, 또는 오랜 기간 배양을 진행하여도 증식능, 분화능, 표현형, 형태, 활성 (telomere 길이)과 같은 줄기세포의 특성에 큰 변화가 없는 줄기세포를 사용하는 것이 좋으므로 이와 관련된 연구들이 진행 중에 있다 (BMC Cell Biology 2006, 7:14, Ageing Research Reviews 5, 2006, 91116).

[0006] 이에, 본 발명자들은 줄기세포를 거듭 배양하여도 세포의 모양이나 활성 등의 세포 특성에 변화가 없으면서 세포의 재생능을 개선할 수 있는 배지 성분을 탐색하고자 예의 노력한 결과, 아펠린을 함유하는 배지 조성물에서 줄기세포를 배양하는 경우, 세포의 재생능을 향상시킬 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 노령인의 줄기세포로부터 젊은 사람의 줄기세포 수준의 재생능을 갖도록 줄기세포의 재생능을 향상시키기 위한 배지 조성물 및 이를 이용한 줄기세포의 배양방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아펠린을 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포 배양용 배지 조성물을 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한, 아펠린을 함유하는 배지 조성물에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 재생능을 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명에 따르면, 줄기세포를 거듭 배양하여도 세포의 활성이나 크기 등의 세포의 특성에는 변화가 없으면서 세포의 재생능은 향상시킬 수 있으므로 단기간에 다량의 줄기세포를 수득할 수 있어 줄기세포를 이용한 세포치료 효능을 획기적으로 증진시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 40대, 50대 및 60대 유래의 지방줄기세포를 실시예 1에 제시한 배양배지로 3 계대 (passage)까지 계대한 후, 각각의 배지에서 4일차까지의 현미경 상에서 형태를 확인한 사진이다.

도 2는 40대, 50대 및 60대 유래의 지방줄기세포를 실시예 1에 제시한 배양배지로 3 계대 (passage)까지 계대한 후, 각각의 배지에서 4일차까지의 세포의 생존력(viability)을 나타낸 그래프이다.

도 3은 40대, 50대 및 60대 유래의 지방줄기세포를 실시예 1에 제시한 배양배지로 3 계대 (passage)까지 계대한 후, 각각의 배지에서 4일차까지의 세포의 크기를 나타낸 그래프이다.

도 4은 40대, 50대 및 60대 유래의 지방줄기세포를 실시예 1에 제시한 배양배지로 3 계대 (passage)까지 계대한 후, 각각의 배지에서 4일차까지의 CPDL(cell population doubling level)을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법 및 이하에서 기술하는 실험 방법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0013] 본 발명에서, "줄기세포(stem cell)"란 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.

[0014] 본 발명에서, "중간엽 줄기세포"는 인간 또는 포유류의 조직으로부터 분리해 낸 미분화된 줄기세포로서, 다양한 조직에서 유래할 수 있다. 특히, 체대 유래 중간엽 줄기세포, 체대혈 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.

[0015] 본 발명에서, "지방 조직 유래 중간엽 줄기세포"란 지방조직에서 분리해 낸 미분화된 성체 줄기세포로서, 본 명세서에 축약하여 “지방 유래 성체 줄기세포”, “지방 줄기세포” 또는 “지방 유래 줄기세포”라고 지칭하기도 한다. 이는 당업계에 공지된 통상의 방법을 통하여 수득할 수 있는데, 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.

[0016] 본 발명에서, “줄기세포의 크기의(가) 변화 없이”는 줄기세포의 형태 (morphology)나 크기 (size)가 배지 조성

물에서 배양되기 전의 상태와 거의 유사하게 그 형태를 유지하는 것을 의미하는 것이다.

- [0017] 본 발명에서, “배지 (culture media)”는 체외배양 조건에서 줄기세포의 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 배양액을 의미하고, 줄기세포의 배양에 적절한 당 분야에서 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다. 또한, 세포의 종류에 따라 배지와 배양 조건을 선택할 수 있다.
- [0018] 본 발명에서, “증식(proliferation)”이란, 세포 수의 증가를 의미하는 것으로 성장(growth)과 동일한 의미로 사용된다.
- [0019] 본 발명에서, “재생능 (renewal ability)”이란, 세포가 자신과 똑같은 복사본을 만들어낼 수 있는 능력을 의미하는 것으로, 재생능이 개선되는 경우 세포의 증식능이 우수하다.
- [0020] 본 발명에서, “계대 배양”이란, 세포를 건강한 상태로 지속적으로 장기간 배양하기 위해 주기적으로 세포의 일부를 새로운 배양용기에 옮긴 후 배양배지를 갈아주면서 세포의 대 (代)를 계속 이어서 배양하는 방법을 의미한다. 한정된 공간을 가진 배양용기 내에서 세포의 수가 늘어나면서 일정시간이 지나면 증식 영양분이 소비되거나 오염 물질이 쌓여 세포가 자연히 죽게 되므로, 건강한 세포의 수를 늘리기 위한 방법으로 사용되며, 통상적으로 한 차례 배지 (배양용기)를 교체하는 것 또는 세포군을 나누어 배양하는 것을 1 계대 (1 passage)라고 한다. 계대 배양의 방법은 당업계에 공지된 방법을 제한 없이 사용할 수 있으나, 바람직하게는 기계적 분리 또는 효소적 분리로 수행될 수 있다.
- [0021] 줄기세포는 배양을 거듭하거나, 외부로부터 자극을 받을수록 세포의 형태나 크기 등이 미세하게 변형되거나 달라지며, 세포의 재생능과 활성 (telomerase activity)이 낮아진다는 문제점, 즉 세포 노화가 진행된다는 문제점이 있다. 세포의 재생능과 활성 등의 특징은 세포를 어떤 배지에서 배양하는지에 따라 차이가 있으므로, 거듭되는 배양에도 불구하고 형태 등의 세포 특성에 큰 변화없이 재생능이나 활성도가 낮아지지 않도록 하는 배지 조성물에서 줄기세포를 배양하는 것이 중요하다. 즉, 세포의 노화를 지연 또는 개선시키거나 초기 세포상태를 유지시키는 배지 조성물에서 줄기 세포를 배양하는 것이 중요하다.
- [0022] 그러나 종래의 배지 조성물에서의 줄기세포 배양에 의하면, 높은 수율의 줄기세포를 얻기 위하여 계대 배양을 여러 차례 수행하여야 하므로 인력 및 시간이 많이 소요되며, 특히 계대 배양에 필요한 배지 성분 중 일부는 대단히 고가여서 경제적으로도 장점이 존재하지 않았다. 또한, 거듭되는 계대 배양에 의하여 세포의 재생능이 낮아진다는 문제점이 있었다. 본 발명은 세포의 형태나 활성에 변화가 없으면서 세포의 재생능을 향상시킬 수 있는 배지 조성물을 제공하는 것이 가능하다.
- [0023] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 아펠린을 함유하는 것을 특징으로 하는 줄기세포 배지 조성물을 제공한다.
- [0024] “아펠린(apelin)”은, 1998년 Fujino M 팀에서 rat와 bovin의 우유에서 발견된 것으로, 특히 초유에 많은 신규한 펩타이드로 APLN 유전자에 암호화되는 인체 내에 있는 단백질이며 (Tatemoto K et al., (1998). "Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251 (2): 4716. doi:10.1006/bbrc.1998.9489. PMID9792798), 몇몇 세포 표면에 발현하는 G-단백질에 결합되어 있는 APJ 수용체에 대한 내재적인 리간드이다 (Lee DK et al., (2000). "Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor", *J. Neurochem.* 74 (1): 3441. doi:10.1046/j.1471-4159.2000.0740034.x. PMID10617103. Szokodi I et al., (2002). "Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility". *Circ. Res.* 91 (5): 4344. doi:10.1161/01.RES.0000033522.37861.69. PMID12215493, Kleinz MJ, Davenport AP (2005). "Emerging roles of apelin in biology and medicine". *Pharmacol. Ther.* 107 (2): 198211. doi:10.1016/j.pharmthera.2005.04.001. PMID15907343, O'Dowd BF et al., (December 1993). "A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11". *Gene* 136 (12): 35560. doi:10.1016/0378-1119(93)90495-0. PMID8294032, Devic E et al., (October 1996). "Expression of a new G protein-coupled receptor X-msr is associated with an endothelial lineage in *Xenopus laevis*". *Mech. Dev.* 59 (2): 12940. doi:10.1016/0925-4773(96)00585-0. PMID8951791). 아펠린은 폭넓게 심장, 간, 폐, 신장, 지방 조직, 위장관, 뇌, 부신 땀샘, 내피, 그리고 사람의 혈장 등 다양한 기간에서 발현되며, 이 중 혈관 내피조직에서 높은 발현을 나타낸다.

[0025] 아펠린 유전자는 N-terminal 부분에서 신호 단백질인 77개의 아미노산의 pre-proprotein을 암호화한다. 아펠린의 몇 가지 활성적인 fragment (apelin-36, apelin-19, apelin-17, apelin-16, apelin-13 및 apelin-12)는 비교적 유사한 생물학적 활성을 공유한다 (Invited Review Article, Targeting the ACE2 and Apelin Pathways are Novel Therapies for Heart Failure: Opportunities and Challenges). 더 자세히 기술하면 endoplasmic reticulum (세포 망상질) 안에서 translocation과 신호 단백질을 절단한 후 55개의 아미노산의 proprotein은 여러 가지 활성적인 fragment를 생성할 수 있는데 이는 42-77 (apelin 36) sequence에 연결되는 36 개 아미노 펩타이드, 61-77 (apelin 17) sequence에 연결되는 17개 아미노 펩타이드, 65-77 (apelin 13) sequence에 연결되는 13개 아미노 펩타이드이다. 이 다음 fragment는 N-terminal 글루타민 잔기의 수준에서 pyroglutamylation (N-terminal에 있는 글루타민에서 pyroglutamic acid의 에스테르 (ester)를 형성하는 과정)을 겪는다. 그러나 사람의 혈장내의 이들 펩타이드의 농도에 대해서는 아직까지 잘 알려져 있지는 않다 (Mesmin C, Dubois M, Becher F, Fenaille F, Ezan E (2010). "Liquid chromatography/tandem mass spectrometry assay for the absolute quantification of the expected circulating apelin peptides in human plasma". *Rapid Commun Mass Spectrom* 24 (19): 287584. doi:10.1002/rcm.4718. PMID20857448). 아펠린은 2006년 Audigier에 의해 G protein-coupled receptors의 family인 막 수용체 (membrane receptor) 또는 몇몇의 포텐셜 리간드 (potential ligands)와 작용하는 시그널 경로 (signal pathway)가 밝혀졌다. Receptor 발현의 sites는 organism 내에서 아펠린에 의해 작동한 다른 기능으로 연결된다 (wikipedia 발췌). 아펠린 수용체의 활성은 아펠린 펩타이드에 결합하여 세포 활성 변화를 개시한다. 아펠린은 심장 부전의 biomarker로써 적용될 가능성이 있고 혈관 수축 및 확장을 포함한 생물학적 효과에 직접적으로 관여한다고 한다. 최근 연구에서도 아펠린과 아펠린 수용체 시스템이 혈관 발생과 관련이 있다는 보고들이 있으며, 혈관 계통의 질병에서도 밀접한 관계가 있다는 보고가 있다. 아펠린과 수용체의 기능은 사람의 생리학과 병리생리학에 중요하며, 그 예로 아펠린이 혈관확장에서 산화질소 (nitric oxide)를 생산하여 L-아르기닌/산화질소 합성효소 (nitric oxide synthase ;NOS)/ 산화질소를 활성화한다고 하며 이는 혈관 확장과 수축의 역할과도 관계가 있다고 한다. 아펠린 수용체와 Angiotensin II 수용체는 상당한 homology를 가지는데 혈관 병리생리학의 관점에서 아펠린 시그널링이 잠재적 역할을 할 것으로 생각된다. 혈관 기능 (Vascular function)의 관점에서 아펠린 시그널링의 기능은 내피 세포에 의한 아펠린 수용체의 활성에 의해서 발현 되는데 혈관생성과 혈관의 가소성에 도움을 주며, 그리고 휴지상태의 내피 세포에 저혈압을 유도하는 기능을 한다. 2008년 Eyses에 의해 연구된 내용에서도 저 산소 상황에서 아펠린의 발현이 내피 세포의 분열과 혈관형성 재생을 조절한다고 기술되어 있다. 이는 저산소증으로 아펠린 유전자의 상향조절 (upregulation)에 의해 유도되거나 내피세포에서 아펠린의 mitogenic activity에 관여된다. 반면에 Akt의 Activation에 의한 혈압강하 작용도 일어난다. 또한 혈관에서는 혈압을 조절하며 신생혈관의 생성을 촉진하며 NO 생성은 증가시키고 동맥경화증과 대동맥류를 유발하는 안지오텐신 II 에 의해 유발되는 신호전달은 차단시켜 안지오텐신 II의 작용을 억제시킨다. 아펠린 시그널링의 혈관과 내피세포에서의 기능은 리간드와 수용체 유전자를 무효화 시킴으로 그에 따라 나타나는 표현형 (phenotype)으로 증명되었다. 아펠린 수용체에 결핍이 있는 쥐에 실험한 결과 혈관 수축제에 대하여 Angiotensin II가 증가하는 반면 아펠린 결핍이 있는 쥐에서는 망막의 혈관 발달이 감소되는 것을 보였다. 또한 다른 기관에서도 영향을 미치는데 심장에서는 초기 배아형성 단계에서 발현되며 혈압과 혈류조절에 관여, 뇌에서는 수분과 식이 섭취를 담당하는 부위의 뉴런에서 발현하며 호르몬과 채액을 조절에 관여한다. 소화기관의 몇몇 창자친크롬세포에서도 아펠린 수용체가 발현 되는데, 히스타민 분비를 억제시키거나 위산 분비 억제, 글루코스에 의해 증가된 인슐린 분비 억제, 혈액 내 글루코스를 일정하게 조절하는데 관여한다. 또한 골아세포의 표면에서 발현되며 뼈 형성에 관여한다. 따라서 아펠린 / APJ system에 의한 아펠린 시그널링은 이 시그널링의 조절장애로 인한 허혈성 질환이나 심혈관 질환 관한 질환과 같은 혈관기능 장애, 그 밖의 질병으로 인한 환자들에게 높은 치료 효능이 있을 것이라고 생각된다 (Dr Yves AUDIGIER. Institute of Molecular Medicine of Ranguelil. Archived topic page last updated on 22 September 2008. http://www.scitopics.com/APJELIN_SIGNALLING.html).

[0026] 그러나, 아펠린은 줄기세포의 증식과 관련하여서는 그 기능이나 활성이 전혀 알려진 바 없다. 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면, 아펠린을 함유하는 배지에서 중간엽 줄기세포를 배양시키면 3 계대 이상에서도 줄기세포의 형태 등의 세포의 특성에는 변화가 없으면서 세포의 활성이 유지되며, 그 증식능은 효율적으로 증가한다는 것을 알 수 있었다.

[0027] 본 발명에서 “아펠린 (apelin)” 은 시중에서 판매하는 것을 구입하여 사용할 수 있는데, 이에 제한되지 않으며 직접 합성한 것을 사용할 수도 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는, 1 내지 100 nM의 농도로 아펠린이 배지 조성물 내에 함유될 수 있도록, 바람직하게는 20 내지 50 nM의 농도로 아펠린이 함유되도록 하였으며, 아펠린은 Bachem사의 catalog no H-4566 (powder 형태)을 구입한 것을 용해물질 (예컨대, DMSO (dimethyl sulfoxide))

등)에 용해시켜 사용하였다.

- [0028] 아펠린을 함유하는 본 발명의 배지 조성물에서 배양되는 줄기세포는 형태나 활성의 변화 없이 세포의 재생능은 개선되므로 세포의 특성의 변화없이 단기간에 다량의 줄기 세포를 수득하는 것이 가능하다 (실시예 2 참조).
- [0029] 상기 본 발명의 배지 조성물은 아펠린 이외에, 셀레늄(selenium), 아스코르브산, 비타민 E, 카테킨, 라이코펜, 베타카로틴, 코엔자임 Q-10 (CoQ-10), 레스베라톨 (resveratol), T-BHQ, oltipraz, 오리나무 추출물, EPA(eicosapentaenoic acid) 및 DHA(docosahexanoic acid) 중에서 선택된 1종 이상의 항산화제를 추가로 함유할 수 있다. 아펠린과 상기 항산화제를 함유하는 배지 조성물에서 배양된 줄기세포도 형태나 활성의 변화 없이 세포의 증식능이 우수함을 확인할 수 있었다. 이때, 상기 항산화제는 아펠린 20nM에 대하여 1uM 내지 20uM의 양으로 포함될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 아펠린과 코엔자임 Q-10을 함유하는 배지에서 배양된 줄기세포의 세포 증식능이 우수함을 알 수 있었다 (실시예 2 참조).
- [0030] 한편, 본 발명의 배지 조성물은 아펠린; 또는 아펠린과 셀레늄(selenium), 아스코르브산, 비타민 E, 카테킨, 라이코펜, 베타카로틴, 코엔자임 Q-10 (CoQ-10), 레스베라톨 (resveratol), T-BHQ, oltipraz, 오리나무 추출물, EPA(eicosapentaenoic acid) 및 DHA(docosahexanoic acid) 중에서 선택된 1종 이상의 항산화제는 당업계에서 줄기세포 배양에 적합하다고 알려져 있는 간단한 조성을 가지는 통상적인 배지 (basal medium)를 함께 함유할 수 있다. 일반적으로 배양에 이용되는 기본 배지로는 MEM (Minimal Essential Medium), DMEM (Dulbecco modified Eagle Medium), RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium), K-SFM (Keratinocyte Serum Free Medium)이 있으며, 이 외에도 당해 업계에서 이용되는 배지이면 족하다. 바람직하게는, M199/F12(mixture)(GIBCO), MEM-alpha배지(GIBCO), 저농도 글루코오스 함유 DMEM배지(Welgene), MCDB 131배지 (Welgene), IMEM배지(GIBCO), K-SFM, DMEM/F12 배지, PCM 배지 및 MSC 확장배지 (Chemicon)로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 특히, 이 중에서도 바람직하게는 K-SFM 배지를 사용할 수 있다.
- [0031] 상기 중간엽 줄기세포 배양물의 획득에 사용되는 기본 배지는 당 업계에 공지된, 중간엽 줄기세포의 미분화된 표현형의 증식을 촉진하면서 분화는 억제하는 첨가제로 보충될 수 있다. 또한, 배지는 등장액 중의 중성 완충제 (예컨대 인산염 및/또는 고농도 중탄산염) 및 단백질 영양분(예를 들면 혈청, 예컨대 FBS, FCS (fetal calf serum), horse serum, 혈청 대체물, 알부민, 또는 필수 아미노산 및 비필수 아미노산, 예컨대 글루타민, L-글루타민)을 함유할 수 있다. 나아가, 지질(지방산, 콜레스테롤, 혈청의 HDL 또는 LDL 추출물) 및 이 종류의 대부분의 보존액 배지에서 발견되는 기타 성분(예컨대 트랜스페린, 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드, 피루빈산염, 임의의 이온화 형태 또는 염인 당원, 예컨대 글루코스, 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-Kit를 이량화하는 다른 리간드 또는 항체, 및 동일한 신호 전달 경로의 다른 활성화제
- [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 포로스콜린
- [0037]
 - gp130을 유도하는 인자, 예컨대 LIF 또는 Oncostatin-M
- [0038]
 - 조혈모 성장 인자, 예컨대 트롬보포이에틴(TPO)
- [0039]
 - 변형성 성장 인자, 예컨대 TGFβ1
- [0040]
 - 뉴로트로핀, 예컨대 CNTF
- [0041]
 - 항생제, 예컨대 겐타마이신 (gentamicin), 페니실린, 스트렙토마이신

- [0042] 본 발명의 배지 조성물은 상기 성분 이외에, NAC(N-acetyl-L-cysteine), 인슐린 또는 인슐린 유사인자, 하이드로코르티손, 텍사메타손, bFGF (basic fibroblast growth factor), 헤파란 황산 (heparan sulfate), 2-메르캅토에탄올 (2-mercaptoethanol) 및 EGF (epidermal growth factor)로 구성된 군에서 선택되는 1가지 이상의 성분을 추가로 함유할 수도 있다.
- [0043] 구체적으로, 인슐린을 대체하는 성분으로 인슐린 유사인자를 함유할 수 있는데, 이는 포도당 대사와 단백질 대사를 향상시켜 세포성장을 촉진하는 역할을 한다. 특히 재조합 IGF-1(Insulin-like growth factor-1)을 사용하는 것이 바람직하다. 인슐린 유사인자의 바람직한 함량은 10 내지 50 ng/ml이며, 이의 성분이 10ng/ml 미만일 경우에는 세포자살(Apoptosis)을 초래하며, 50 ng/ml을 초과할 경우에는 세포독성 및 비용증가의 문제점이 있다.
- [0044] 섬유아세포 증식인자 (bFGF)를 함유할 수 있는데, 이는 in vivo 상태에서 다양한 형태의 세포증식을 야기할 수 있으며, 바람직하기로는 재조합 단백질을 사용한다. 섬유아세포 증식인자의 바람직한 함량은 1 내지 100 ng/ml 이다 .
- [0045] 본 발명에서 사용되는 배지는 FBS (fetal bovin serum), 칼슘 및 EGF으로 구성된 군에서 선택되는 성분을 추가로 함유할 수 있다. 상피세포 성장인자(Epidermal growth factor; EGF)는 바람직하기로는 재조합 단백질을 사용한다. 상피세포 성장인자의 바람직한 함량은 10 내지 50 ng/ml이며, 이의 함량이 10 ng/ml 미만이면 특별한 효과가 없으며, 50ng/ml을 초과하면 세포에 독성을 가진다.
- [0046] 본 발명에서 사용되는 줄기세포는 바람직하게는 성체 줄기세포, 그 중에서도 지방조직, 또는 모낭·양막 등 상피조직에서 얻어지는 성체 줄기세포를 이용할 수 있다. 가장 바람직하게는 지방 조직 유래 성체 줄기세포를 사용할 수 있다. 중간엽 줄기세포 (mesenchymal stem cells, MSCs)를 사용할 수 있고, 특히 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 (Adipose tissue-derived mesencymal stem cell, AdMSCs)일 수 있다.
- [0047] 상기 지방 또는 상피조직은 포유류 유래인 것이 바람직하고, 그 중에서도 인간 유래인 것이 더욱 바람직하다. 본 발명의 일 실시예에서는 인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 (Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cell, AdMSCs)를 사용하였다.
- [0048] 본 발명의 줄기세포 배지 조성물에서 줄기세포를 배양하는 경우, 줄기세포의 특성에는 변화가 없으면서 증식능이 향상된 줄기세포를 수득하는 것이 가능하다.
- [0049] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, 아펠린을 함유하는 배지 조성물에서 줄기세포를 배양하는 단계를 포함하는 줄기세포의 증식능을 향상시키는 방법을 제공한다.
- [0050] 본 발명의 일 실시예에서는 본 발명에 따른 배지에서 지방 유래 중간엽 줄기세포를 배양하였다. 지방 유래 중간엽 줄기세포는 다음과 같은 방법으로 획득할 수 있다. 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 μm 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, 인슐린 및 하이드로코르티손을 함유한 K-SFM 배지를 2일마다 교체하면서 배양하여 중간엽 줄기세포를 분리하여 계대 배양하여 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다. 그러나 이 외에도 당업계에 공지된 방법으로 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다.
- [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.
- [0052] **실시예 1: 인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 분리**
- [0053] 지방흡입술(Liposuction)에 의해 40대 (n=1), 50대 (n=1) 및 60대 (n=1)의 복부 피하에서 지방조직을 각각 분리한 후, PBS로 세척하였다. 세척된 지방조직을 잘게 자른 후 콜라게나아제 타입 1 (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 μm mesh에 필터링하여 부유물을 제거한 후 PBS로 세척하고, 10% FBS, 2mM NAC(N-acetyl-L-cysteine), 0.2mM 아스코르브산이 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였다.

[0054] 하루밤 지난 후 부착되지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, 5% FBS, 2mM NAC, 0.2mM 아스코르브산, 0.09mM 칼슘, 5ng/ml rEGF, 5μg/ml 인슐린, 10 ng bFGF 및 74ng/ml 하이드로코르티손 및 1ng/ml의 셀레늄(selenium)을 함유한 K-SFM을 2일마다 교체하면서 계대배양하였으며, 3계대까지 배양하여 지방 유래 중간엽 줄기세포를 얻었다.

[0055] **실시예 2: 줄기세포의 재생능에 영향을 미치는 배지성분의 탐색**

[0056] 실시예 1에서 3 계대까지 배양하여 얻은 연령별 1명씩, 총 3명의 지방유래 중간엽 줄기세포를 하기의 각 배지에 seeding하고 4일에 걸쳐 배양하였다. 4일의 배양 동안, 세포의 형태(morphology)를 관찰하였다. 또한, 세포의 크기, 생존률 및 CDPL(Cell population doubling level)을 측정하여 평균값을 표시하였다.

[0057] 배지 1 :dRK 배지

[0058] * dRK 배지는, "K-SFM (Keratinocyte-SFM) 배지 + 2mM NAC + 0.2 mM 아스코르브산 + 0.09 mM 칼슘 + 5 μg/ml 인슐린 + 74 ng/ml 하이드로코르티손 + 항산화제 (셀레늄)"이다.

[0059] 배지 2: : M9 배지 (대조군)

[0060] * M9 배지는, dRK 배지에서 항산화제(셀레늄)를 제외시킨 배지임.

[0061] 배지 3: M9배지 + 0.07 % DMSO (대조군)

[0062] 배지 4: dRK 배지 + 3 factors

[0063] * 3 factors는, 20 nM 아펠린 + 5 μM CoQ10 + 20 μM T-BHQ

[0064] 배지 5: M9 배지 + 3 factors

[0065] 배지 6: M9 배지 + 20 nM 아펠린

[0066] 배지 7: M9 배지 + 50 nM 아펠린

[0067] 배지 8: M9 배지 + 20 nM 아펠린 + 5 μM CoQ10

[0068] 배지 9: M9 배지 + 20 nM 아펠린 + 20 μM T-BHQ

[0069] 배지 10: M9 배지 + 20 nM 아펠린 + 1 μM Resveratol

[0070] 배지 11: M9 배지 + 20 nM 아펠린 + 5 μg/ml 오리나무 추출물

[0071] 배지 12: M9 배지 + 20 nM 아펠린 + 10 μM oltipraz

[0072] 상기 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 중간엽 줄기세포를 각 배지에서 배양하면서 각 배양일수별로 지방조직 유래 중간엽 줄기세포를 분리하여 세포의 생존률, 세포크기, CPDL를 측정하였으며, telomerase activity는 3계대 상태에서 측정하였다. 배지 11의 오리나무 추출물은 다음과 같은 방법으로 제조한 것을 사용하였다. 오리나무 수피(중국산)를 세척한 후, 80%로 회석한 주정으로 침전하여 60℃에서 1차 추출하였다. 1차 추출액을 여과한 후, 농축 탱크로 이송하고 60℃에서 진공 농축하여 주정은 완전히 회수하였다. 1차 농축액(고형분 25%)은 회수하고, 탱크 내벽에 부착되어 미 회수 정유성분은 주정을 소량 첨가하고 60℃에서 20~40분간 가열, 용출하여 재 회수하였다. 재 회수한 용출액은 1차 농축액과 혼합하였다 (1). 1차 추출한 오리나무수피에 회수한 80% 주정을 이용하여 침전시켜 60℃에서 10~16시간 2차 추출하였다. 2차 추출액을 여과 후 농축탱크에서 진공 농축하여 주정을 완전히 회수하였다. 2차 농축액(고형분 25%)은 회수하고, 탱크 내벽에 부착되어 미 회수 정유성분은 주정(95%)을 농축 탱크에 소량 첨가하고 60℃에서 가열, 용출하여 재 회수하였다. 재 회수한 용출액은 2차 농축액과 혼합하였다 (2). (1)과 (2) 혼합 농축액 (고형분 함량 25%)을 함께 혼합하고, 부형제 (텍스트린) 20% (오리나무 수피 추출물 고형분 대비 20%) 혼합하여 분무건조 후 함습되지 않는 조건 하에서 가급적 빠르게 포장하는 방법

으로 제조하였다.

[0073] **(1) 줄기세포의 형태 (morphology)**

[0074] 줄기세포의 형태는 위상차현미경하에서 관찰 후 촬영하였다 (도 1 참조). 관찰 결과 세포의 morphology에 있어서는 큰 차이가 없었다. 즉, 아펠린 또는 본 발명에서 사용된 CoQ10 등의 항산화제가 세포의 형태에 큰 영향을 주지 않음을 알 수 있었다.

[0075] **(2) 줄기세포의 생존력(viability)**

[표 1]

Media Day (Post seeding)	dRK	M9	DMSO	dRK+3 factor	M9 +3 factor	Apelin 20nM	Apelin 50nM	Ap +Co	Ap +tBHQ	Ap +Res	Ap +오리	Ap +Olti
Day 1	95.2	97.2	96.4	93.3	96.4	97.2	91.7	96.4	92.5	95.9	91.7	94.1
Day 2	97.4	95	98.8	96.3	98.4	98.9	100	99.2	98.2	99	97.8	99
Day 3	97.1	99	98.1	98.8	97.7	98.8	98.8	99.4	99.1	99.5	99.4	99.2
Day 4	99.1	98.8	99.1	98.1	99.2	99.4	99.2	99.2	99	98.6	99.2	98.9

[0076]

[0077] 실험 결과, 첨가되는 성분에 따른 줄기세포의 생존력에는 큰 차이가 없었다. 즉, 아펠린 또는 본 발명에서 사용된 CoQ10 등의 항산화제가 세포의 크기에 큰 영향을 주지 않음을 알 수 있었다 (도 2 참조). Luna™ automated cell counter를 이용하여 줄기세포의 생존률을 측정하였다 (n=3).

[0078] **(3) 줄기세포의 크기(size)**

[표 2]

Media Day (Post seeding)	dRK	M9	DMSO	dRK +3	M9+3	Apelin 20nM	Apelin 50nM	Ap +Co	Ap +tBHQ	Ap +Res	Ap +오리	Ap +Olti
Day 1	19.4	18.8	18.8	19.9	18.4	19.0	18.6	18.9	18.3	18.7	18.3	19.4
Day 2	18.8	14.9	16.8	19.2	17.3	18.3	15.6	17.9	17.0	17.7	17.3	17.3
Day 3	18.6	16.6	15.9	19.4	17.6	18.2	18.0	17.0	16.6	15.4	16.3	17.5
Day 4	20.3	18.7	17.1	19.7	18.6	18.5	17.9	18.8	18.7	17.6	17.4	18.6

[0079]

[0080] 실시예 1에서 분리한 지방조직 유래 중간엽 줄기세포를 각 배지에서 seeding 한 후, 배양일별로 트립신을 처리한 후 지방조직유래 중간엽 줄기세포를 분리한 후, Luna™ automated cell counter를 이용하여 줄기세포의 입도(μm)를 측정하였다 (n=3). 측정 결과, 첨가되는 성분에 따른 세포의 크기에는 큰 차이가 없었다 (도 3 참조). 즉, 아펠린 또는 본 발명에서 사용된 CoQ10 등의 항산화제가 세포의 크기에 큰 영향을 주지 않음을 알 수 있었다.

[0081] (4) 줄기세포의 세포성장률 (CPDL : cell population doubling level)

[표 3]

Media Day (post seeding)	dRK	M9	DMSO	dRK +3	M9 +3	Apelin 20nM	Apelin 50nM	Ap. +Co	Ap.+TB HQ	Ap +Res.	Ap. +오리	Ap. +Olt
Day 0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Day 1	0.29	0.23	0.07	0.41	0.10	0.89	0.56	0.46	0.66	0.23	-0.19	0.51
Day 2	1.67	0.43	1.38	1.78	1.60	2.84	1.65	2.45	1.92	2.03	0.86	2.19
Day 3	4.46	3.51	4.46	4.65	5.06	6.54	5.11	6.07	4.76	4.59	3.80	5.53
Day 4	6.83	6.05	7.22	7.09	8.18	9.28	8.20	9.64	8.11	7.59	6.80	8.43

[0082]

[0083] 줄기세포의 세포성장률인 Cell population doubling level (CPDL)은 다음의 계산법으로 계산하였다.

[0084] $CPDL = \text{Log} (N_{\text{final}} - N_{\text{initial}}) / \text{Log} 2 (N_{\text{final}} : \text{최종적으로 얻은 세포수} ; N_{\text{initial}} : \text{처음 seeding 세포수})$

[0085] 실험 결과, 아펠린을 첨가한 배지에서 줄기세포를 배양한 경우, 아펠린과 기타의 항산화제를 함께 첨가한 배지에서 줄기세포를 배양한 경우, 세포의 CPDL 값이 증가하였음, 즉 재생능이 개선됨을 확인할 수 있었다 (도 4 참조). 아펠린과 기타 항산화제가 함께 첨가된 경우와 관련하여, CoQ10 또는 oltipraz를 아펠린과 함께 사용한 경우 CPDL 값이 높았다. 또한, 동종 계열이 제거된 dRK 배지, M9 배지의 mix 된 3 factor (3 factor= apelin+ coQ10 + T-BHQ)군이 dRK 배지이나 M9 단독 군보다는 CPDL 값이 높았으나 다른 2가지 mix 군에 비하면 좋지 않았다. 오히려 dRK 배지에 들어있는 항산화제가 3 factor의 효과를 감소 시킨다는 결과를 얻었다.

[0086] (5) 줄기세포의 telomerase activity 측정

[표 4]

Media	telomerase activity (N=3)
dRK	2.593
M9	2.249
M9 + Oltipraz (7 μM)	1.968
M9 + Oltipraz (10 μM)	2.137
M9 + Resveratrol (1 μM)	2.042
M9 + Resveratrol (2 μM)	1.654
M9 + TBH-Q (5 μM)	2.524
M9 + TBH-Q (20 μM)	2.838
M9 + Coenzyme Q10 (5 μM)	2.817
M9 + Coenzyme Q10 (10 μM)	1.964
M9 + Apelin (5 nM)	2.838
M9 + Apelin (20 nM)	3.068
M9 + 오리나무 추출물 (5ug/ml)	2.415
M9 + 오리나무 추출물 (5ug/ml)	1.885

[0087]

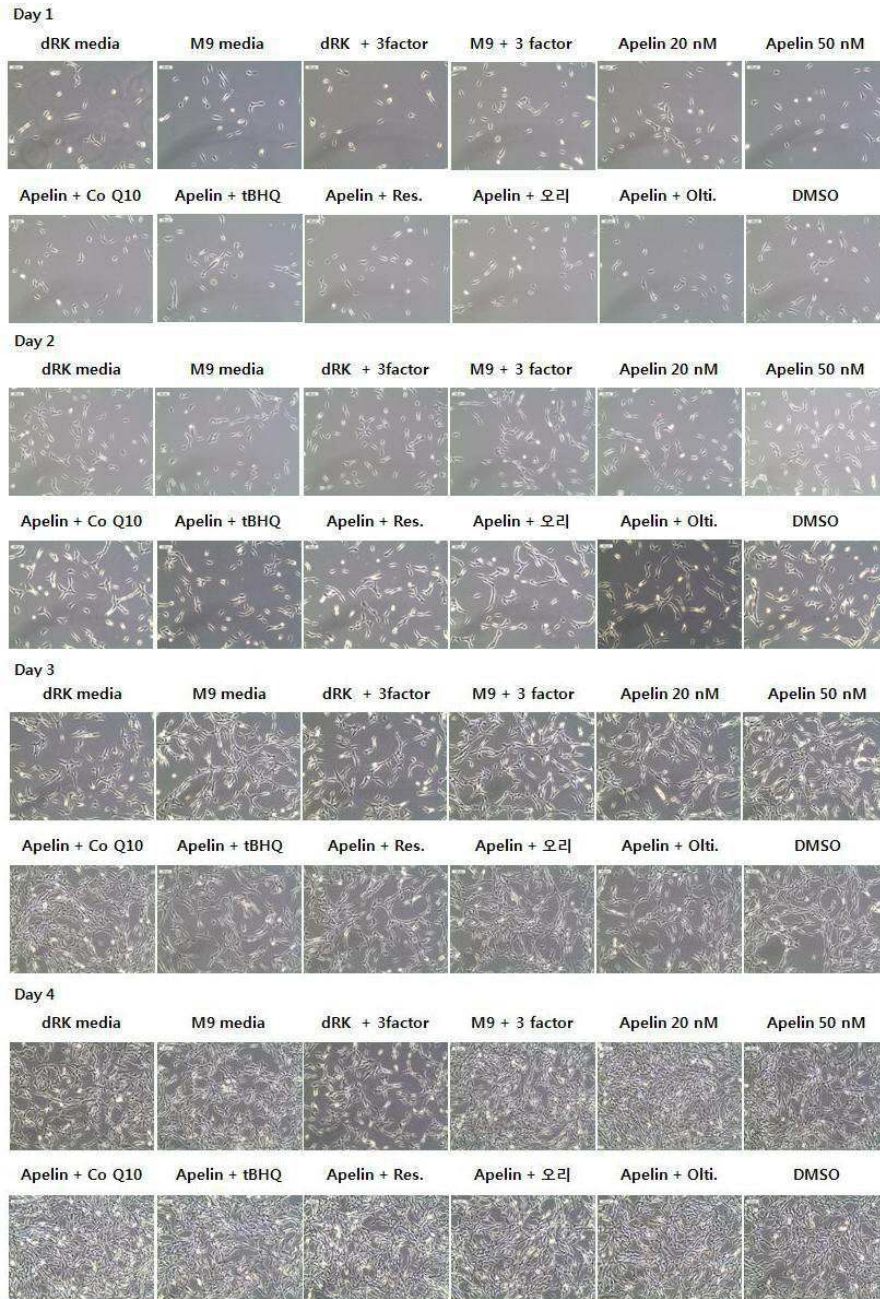
[0088] 실시예 1의 방법으로 분리된 40대, 50대 및 60대 유래 지방줄기세포를 상기 표 4에 나타난 배지에서 3세대까지 계대한 후, 줄기세포의 텔로머라아제 활성을 확인하였다. telomerase activity의 활성은 Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA kit (Roche)을 이용하여 측정하였다. 확인 결과, 아펠린을 20 nM의 농도로 첨가한 배지에서 배양한 줄기세포의 telomerase activity가 가장 높다는 것을 확인할 수 있었다.

[0089] 이상으로 본 발명의 내용을 상세히 기술하였는바, 당 업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적

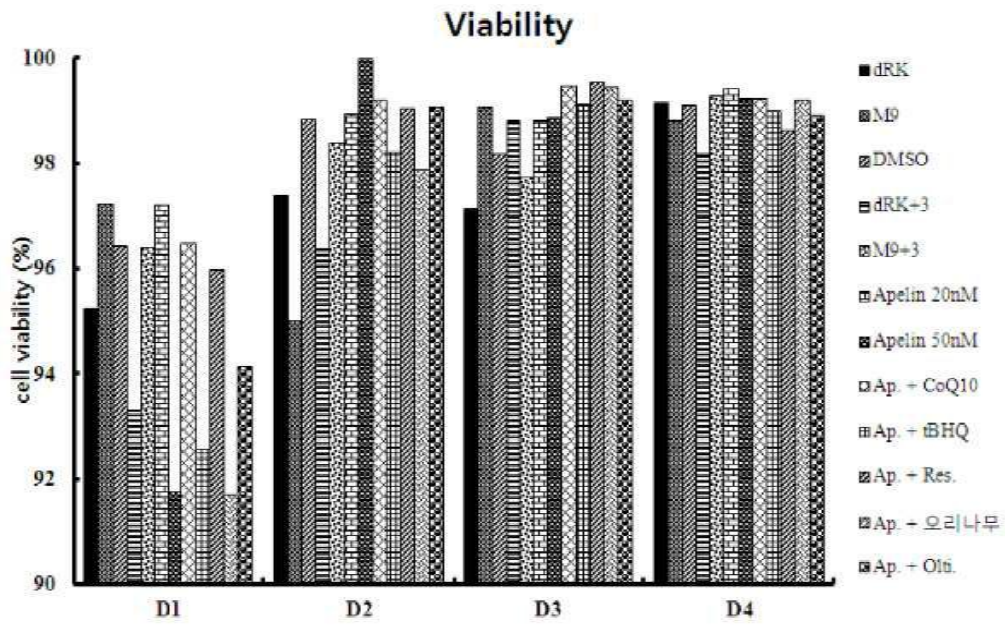
기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

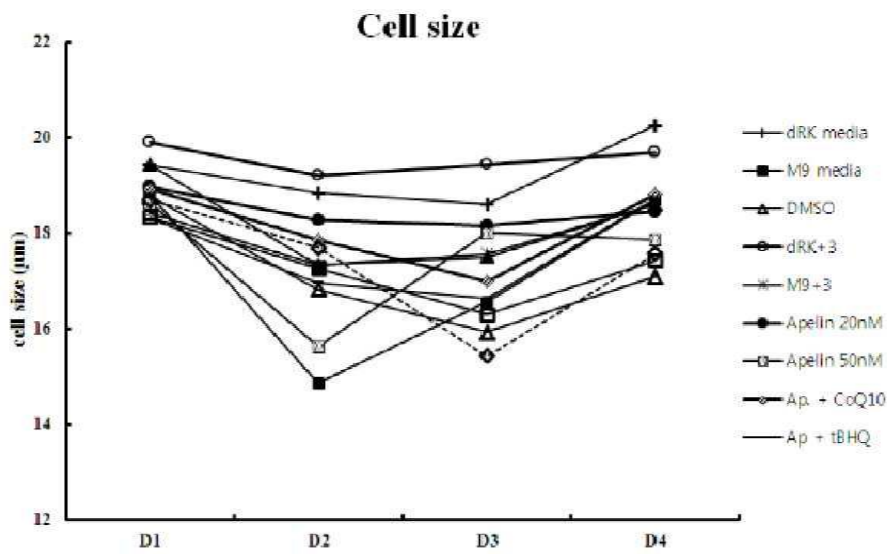
도면1



도면2



도면3



도면4

