

Bibliographic Data

Int.Cl.	C12N 5/02 C12N 5/0775 C12N 1/38
Application No.	1020120138985
Application Date	20121203
Unexamined Publication No.	1020130061658
Unexamined Publication Date	20130611
Priority Claims	1020110127885 20111201 KR
Requested Date of Examination	20121203
Agent.	LEECHEOYOUNG
Inventor	Kang, Sung Keun Ra, Jeong Chan Park, Hyeong Geun Lee, Hang Young

발명의 명칭

줄기세포를 젊게 만들기 위한 배지 조성물

Title of Invention

The culture composition it youngs for making the stem cell.

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.

Abstract

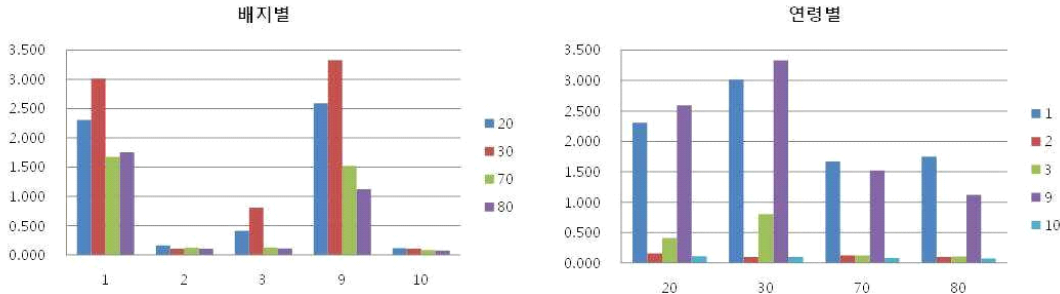
The invention relates to the method it youngs for making the stem cell culture badge composition for making in order to have the character which is the stem cell which collects from more detailed old people similar to the stem cell of the youngster as the culture composition it youngs for making the stem cell and the stem cell cultivating the old people originated stem cell in the culture composition.

According to the invention, the mesenchyme stem cell collected from the advanced age patient more than 60 part is the high blastogenesis, the telomerase activity, and the high stem cell marker expression ability etc the cytotherapy effect using the mesenchyme stem cell it is able to make the young mesenchyme stem cell had can be conspicuously made promoted.

대표도면 (Representative drawing)

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



청구의 범위

청구 1항:

FBS(fetal bovine serum), 항산화제, 사이토카인 및 NAC (N-acetyl-L-cysteine)를 함유하는 것을 특징으로 하는 고령자 유래 중간엽 줄기세포를 젊은 줄기세포로 만들기 위한 배지 조성물.

청구 2항:

제1항에 있어서, 인슐린 또는 인슐린 유사인자를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 고령자 유래 중간엽 줄기세포를 젊은 줄기세포로 만들기 위한 배지 조성물.

청구 3항:

제1항 또는 제2항에 있어서, 하이드로코르티손을 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 고령자 유래 중간엽 줄기세포를 젊은 줄기세포로 만들기 위한 배지 조성물.

청구 4항:

제1항에 있어서, 사이토카인은 EGF(epidermal growth factor) 및/또는 bFGF (basic fibroblast growth factor)인 것을 특징으로 하는 고령자 유래 중간엽 줄기세포를 젊은 줄기세포로 만들기 위한 배지 조성물.

청구 5항:

제1항에 있어서, 항산화제는 셀레늄, 아스코르브산, 비타민 E, 카테킨, 라이코펜, 베타카로틴, 코엔자임 Q-10, EPA(eicosapentaenoic acid) 및 DHA(docosahexanoic acid)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

Scope of Claims

Claim 1:

The culture composition for making aged originated mesenchyme stem cell containing the FBS (fetal bovine serum), the antioxidant, and the cytokine and NAC (N-acetyl-L-cysteine) the young stem cell.

Claim 2:

As for claim 1, insulin or the culture composition the insulin pseudo element is to the addition for making the aged originated mesenchyme stem cell done with the young stem cell.

Claim 3:

As for claim 1 or 2, the culture composition for making the aged originated mesenchyme stem cell containing the hydrocortisone with the young stem cell.

Claim 4:

As for claim 1, the culture composition for making the aged originated mesenchyme stem cell called the cytokine is the EGF (epidermal growth factor) and/or the bFGF (basic fibroblast growth factor) the young stem cell.

Claim 5:

As for claim 1, the culture composition selected from group comprised of the antioxidant is the selenium, ascorbic acid, vitamin E, catechin, lycopene, beta-carotene, coenzyme Q-10, EPA (eicosapentaenoic acid) and DHA (docosahexanoic acid).

청구 6항:

제5항에 있어서, 항산화제는 셀레늄인 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

Claim 6:

As for claim 5, the culture composition called the antioxidant is selenium.

청구 7항:

제1항에 있어서, 고령자는 60~120세의 사람인 것을 특징으로 하는 배지 조성물.

Claim 7:

As for claim 1, the culture composition called the aged is the human of 60~120 years old.

청구 8항:

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 배지 조성물에서 고령자 유래 중간엽 줄기세포를 배양하는 것을 특징으로 하는 고령자 유래 중간엽 줄기세포를 젊은 줄기세포로 만드는 방법.

Claim 8:

The method made of the stem cell looking the aged originated mesenchyme stem cell cultivating the aged originated mesenchyme stem cell in the culture composition of any one claim young among claim 1 to claim 7.

기술분야

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.

Technical Field

The invention relates to the method made of the stem cell looking the stem cell culture badge composition for making in order to have the character which is the stem cell which collects from more detailed aged similar to the stem cell of the youngster as the culture composition for making the aged originated stem cell with the young stem cell and the stem cell cultivating the aged originated stem cell in the culture composition young.

배경기술

중간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cells)는 골수, 체대혈, 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.

Background Art

The property of the totipotency in which the mesenchyme stem cell (mesenchymal stem cells) is derived from the various adults cells of the bone marrow, the umbilical cord blood, the placenta (or, the placenta tissue cell), the fat (or, the adipose tissue cell) etc may be referred to the stem cell had. For example, various researches are progressed by the totipotency in which the mesenchyme stem cell originating from the bone marrow (bonemarrow) can be specialized to the adipose tissue, the bone / cartilage tissue, and the muscle tissue for development as the cell therapy product.

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.

Recently, tendency having a low treatment efficiency the reproductive integrity and blastogenesis fall down in case of the mesenchyme stem cell collected from the organization of the aged while it begins to be in the spotlight the development of the technology which activates the mesenchyme stem cell separated from the human body in order to be suitable for the treatment is requested and there are many aged in case of especially, the patient who the cytotherapy is subjected had been having the cell therapy technique using mesenchyme stem cell. And the technology activated is the aged originated mesenchyme stem cell required like the mesenchyme stem cell of the youngster originated.

중간엽 줄기세포는, 다른 인체 초대배양 세포와 유사하게, 체외(in vitro) 배양시 텔로미어 소실(telomere shortening)과

P 16 (INK4a) called the accumulation of the environmental stress by the long-term culture in vitro t

무관한 노화(senescence) 기전에 의해 세포의 분열이 급격히 감소하는 것으로 알려져 있다(Shibata, K.R. et al. Stem cell s, 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.

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

이에, 본 발명자들은 고령의 환자로부터 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.

he Cdk impediment protein the fission of the cell drastically reduces in vitro cultivation with the aging (senescence) mechanism having no concern with the telomere disappearance (telomere shortening) was revealed with the other human body primaryocyte and it was accumulated. When the activity of the Cdk protein managing the growth of the cell was suppressed and the offer of a prize was pointed out for the main cause it generated the oncogene in the mesenchyme stem cell and the mesenchyme stem cell was the Bmi-1 it hindered the expression of the p16 the expression was confirmed (Zhang, X. et al. Biochemical and biophysical research communications 351: 853-859, 2006) that the aging of the cell was restrained. And when it processed the FGF-2 among moreover, cultivation and the activity was the p21 (Cip1), and the mRNA expression of the p16 (INK4a) and p53 suppressed the activity is reported that the mesenchyme stem cell which growth is stopped of the G1 time is suppressed with arrest of growth (Ito, T. et al., Biochemical and biophysical research communications, 359; 108-114 2007). Moreover, the method of suppressing the aging of the mesenchyme stem cell the gene coded is transform let in the mesenchyme stem cell was presented.

But because the technology about the method it youngs for returning the aged mesenchyme stem cell collected from the organization of the aged is reported it there is no.

Thus, it confirmed manufacturing mesenchyme stem cell having the activity which the adipose tissue which separates from the patient of the advanced age the inventors gathers the mesenchyme stem cell and it cultivates in the culture medium in which the antioxidant and growth factor are contained and then is similar to the mesenchyme stem cell of the youngster originated. The invention was completed.

발명의 내용

해결하고자 하는 과제

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

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

과제 해결 수단

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.

Summary of Invention

Problem to be solved

The culture composition in which it youngs this Purpose of the invention makes the mesenchyme stem cell of the aged originated is to be provided.

It is another object of the present invention to provide the method it youngs for making the mesenchyme stem cell cultivating the aged originated mesenchyme stem cell using the culture composition.

Means to solve the problem

To accomplish the above objects, the invention provides the FBS (fetal bovine serum), the antioxidant, and the cytokine, and the culture composition for making the aged originated mesenchyme stem cell containing the NAC (N-acetyl-L-cysteine) with the young stem cell.

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.

The invention also provides the method made of the stem cell looking the aged originated mesenchyme stem cell cultivating the aged originated mesenchyme stem cell in the culture composition youngs for making the aged originated mesenchyme stem cell young.

발명의 효과

Effects of the Invention

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.

According to the invention, the mesenchyme stem cell collected from the advanced age patient more than 60 part is the high blastogenesis, telomerase activity, and the high stem cell marker expression ability etc the cytotherapy effect using the mesenchyme stem cell it is able to make the young mesenchyme stem cell had can be conspicuously made promoted.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

Description of Embodiments

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

The invention relates to the FBS (fetal bovine serum) in the consistency, the antioxidant, and the cytokine, and the culture composition for making the aged originated mesenchyme stem cell containing the NAC (N-acetyl-L-cysteine) with the young stem cell.

본 발명에서 사용하는 용어 #34#줄기세포(stem cell)#34#이란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말하며, #34#성체 줄기세포#34#는 발생 과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계 혹은 성체단계에서 나타나는 줄기세포를 의미한다.

In the present invention, while having the self copy ability the term " stem cell " used means the step that each long-term of the embryo bud it is progressed it is formed or the stem cell showing up in the adult step the cell having the capability specializing to two or more cells.

본 발명에서 사용하는 용어 #34#중간엽 줄기세포#34#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.

In the present invention, it is the divided stem cell which the term " mesenchyme stem cell " used separates from the organization of human or the mammal. It can be derived from various organizations. Particularly, it can be the umbilical cord originated mesenchyme stem cell, umbilical cord blood originated mesenchyme stem cell, bone marrow originated mesenchyme stem cell, fat originated mesenchyme stem cell, muscle originated mesenchyme stem cell, nerve originated mesenchyme stem cell, skin derivation mesenchyme stem cell, amnion originated mesenchyme stem cell and placenta originated mesenchyme stem cell. And the technology separating the stem cell from each organization experiences and the technology is known to have in the business field.

본 발명에서 사용하는 용어 #34#지방 유래 줄기세포#34#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.

In the present invention, the term " adipose derived stem cell " used the separation method can be as follows: to the pulverization stem cell separated from the adipose tissue. That is, it collects after processing the stem cell layer adhered to the culture vessel including the flask etc. the saturated fat suspension floated in the saline solution obtained from the liposuction is cultivated as trypsin or the fat originated mesenchyme stem cell can be separated through the method etc. It directly collects to scratch by the scraper and be floated in a small amount of saline solution or it does.

본 발명에서 #34#줄기세포를 젊게 만든다는 것#34#은 고령자 조직 유래 중간엽 줄기세포의 표현형을 젊은이 조직 유래 줄기세포와 표현형과 유사한 상태로 만든다는 것을 의미하며, 상기 표현형은 세포의 형태, 세포의 증식속도, 텔로머라아제 활성

In the present invention, it means that it makes the expression type of the aged origin of organization mesenchyme stem cell into the state that is similar to the younger origin of organization stem cell and expression

성도, 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.

본 발명에서 상기 #34#고령자 조직 유래 중간엽 줄기세포의 표현형을 젊은이 조직 유래 줄기세포와 표현형과 유사한 상태#34#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.

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.

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.

따라서, 본 발명에서는 FBS, bFGF 및 EGF은 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.

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.

type with 34 to young make the " stem cell. And the expression type means the form of the cell, the multiplication rate of the cell, the telomerase activity, the expression and stem cell blastogenesis of the stem cell marker (the oct4, SSEA-1, tra 1-60, tra 1-81, the Nanog etc) etc. It can use. In the present invention, the aged origin of organization mesenchyme stem cell may be the be desirable it is separated from the human of 60~120 years old.

In the present invention, when the expression type of the " aged origin of organization mesenchyme stem cell is compared with the mesenchyme stem cell which is cultivated in the culture medium except the state where the expression type is similar to the youngster origin of organization stem cell than the first passage time when the aged origin of organization mesenchyme stem cell was separated or the culture badge of the present invention to change into the state " which is similar to the youngster origin of organization stem cell and expression type, the state that is similar to the youngster origin of organization stem cell is meant.

In the present invention, the culture composition is insulin or the insulin pseudo element and hydrocortisone may be referred to the cytokine is the EGF (epidermal growth factor) and/or the bFGF (basic fibroblast growth factor) it additionally can contain.

The antioxidant used for the culture composition of the present invention may be formed of selenium the selenium, the vitamin E, the ascorbic acid, the catechin, the lycopene, the beta-carotene, the coenzyme Q-10, EPA (eicosapentaenoic acid), the DHA (docosahexanoic acid) etc can be used.

Therefore, in the present invention, thing called the factor in which there should not be no FBS, and the bFGF and EGF regardless of the age in the adipose stem cell cultivation were confirmed. On the whole, it confirmed. That the differentiation rate, and the telomerase activity were decreased including the growth rate and the cell grew and these components carried the activity but the cell cultivated in the culture medium in which the versatility (pluripotency) or the differentiation rate, and the extent of the telomerase activity were high in comparison with the old age group and FBS, and the bFGF or EGF were achieved in the young age according to the culture medium was the essential element.

Moreover, in the present invention, in the control group culture medium called the control group culture medium in the young group, the result of falling down was looked at in the old age group cultivated in culture medium in which the activity in which it showed the group, in which about cytogenesis rate looked young the old age group, or the similar extent and but there is no difference between two culture mediums in the group looking young in the telomerase activity experiment. Is selenium are removed at the culture medium in which selenium is removed. It confirmed if in the old age group the selenium ingredient was surely included then having the high telomerase activity.

다른 관점에서, 본 발명은 FBS(fetal bovine serum), 항산화제, 사이토카인 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.

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.

상기 중간엽 줄기세포 배양에 사용되는 배지는 당업계에 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, 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, 뉴클레오시드 또는 뉴클레오티드, 피루빈산염, 임의의 이온화 형태 또는 염인 당원, 예컨대 글루코스, 셀레늄, 글루코코르티코이드, 예컨대 히드로코르티손 및/또는 환원제, 예컨대 β -메르캅토에탄올)을 함유할 수 있다.

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.

그 중에서도, 하기의 1이상의 추가의 첨가제를 사용하는 것이 유리할 수 있다:

- 줄기 세포 인자(SCF, Steel 인자), c-키트를 이량화하는 다른 리간드 또는 항체, 및 동일한 신호 전달 경로의 다른 활성화제

- 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

- 환형 AMP 농도를 높이는 인자, 예컨대 포스스포린

In the other point of view. And the invention provides the FBS (fetal bovine serum), the antioxidant, and the cytokine, and the method made of the stem cell looking the aged originated mesenchyme stem cell cultivating the aged originated mesenchyme stem cell in the culture composition for making the aged originated mesenchyme stem cell containing the NAC (N-acetyl-L-cysteine) with the young stem cell young.

In the relevant industry as the basal medium used in mesenchyme stem cell cultivation, the known because of being suitable for the stem cell cultivation conventional culture medium, for example, DMEM, MEM, the K-SFM culture medium etc. can be used. The invitrogen medium can be used. And more preferably, the K-SFM (Keratinocyte-SFM: Keratinocyte serum free medium) culture medium can be used.

While promoting the proliferation of the divided expression type in which the culture medium used in mesenchyme stem cell cultivation is known in the relevant industry of the mesenchyme stem cell it can be supplemented as the additive which the differentiation controls.

Moreover, the culture medium can contain the neutral buffer agent (for example, the phosphate and/or the high concentration bicarbonate) among the iso-osmotic solution and protein nutrient (for example, the blood serum, for example, FBS, the serum replacement, and the albumin or the essential amino acid and non essential amino acid, for example, glutamine). Furthermore, etc component (member of a party called for example, insulin or the transferrin, the nucleoside or the nucleotide, the pyruvate, and the arbitrary ionic shape or salt, for example, the glucose, selenium, glucocorticoid, for example, the hydrocortisone and/or the reducing agent, for example, β -mercaptoethanol) discovered in the most of conservative solution culture media of this kind and lipid (the fatty acid, cholesterol, and HDL or the LDL extract of the blood serum) can be contained.

Moreover, the culture medium can be profitable to include the purpose, the cell being thick and loud or being thick and loud in the container wall or of preventing to so form the large bunch. The anti-caking agent (anti-clumping agent), and the Invitrogen sells for example the field (Cat # 0010057AE).

Among them, it can be advantageous to use the additional additive more than below 1 :

The other activator of the other ligand dimerizing stem cell factor (SCF, and the Steel factor), and the c-kit or the signal transmission path such as antibody.

The growth factor (Platelet-Derived Growth Factor: PDGF), induced with the other tyrosine kinase related receptor, for example, platelet - the macrophage colony stimulating factor, and the ligand for the receptor of the Flt-3 ligand and blood vessel epidermal growth factor (Vascular Endothelial Growth Factor: VEGF).

The factor that increases circular AMP

- gp130을 유도하는 인자, 예컨대 LIF 또는 Oncostatin-M
- 조혈모 성장 인자, 예컨대 트롬보포이에틴(TPO)
- 변형성 성장 인자, 예컨대 TGFβ1
- 뉴로트로핀, 예컨대 CNTF

concentration, for example, the forskolin.

- The factor, inducing gp130 for example, LIF or the Oncostatin-M.
- hematopoiesis young rice plant growth factor, for example, the thrombopoietin (TPO)
- deformability growth factor, for example, the TGF β 1.
- neurotrophin, for example, the CNTF

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

The mesenchyme stem cell for the mesenchyme stem cell cultivation of the present invention can obtain to for example, the method like this.

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, 하루 밤 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 당업계에 공지된 방법으로 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다. 이 외에도 당업계에 이미 공지된 방법으로 중간엽 줄기세포를 얻을 수 있다.

Firstly, it is indignant and it washes using DMEM medium with the collagenase the organization is small pieces cut the human adipose tissue obtained with the liposuction etc. from the abdomen is separated and it washes to PBS to after, and PBS and it centrifuges for 5 minutes in 1000 rpm. The pellet which the supernatant removes and which is left in the bottom surface centrifuges for 5 minutes at 1000 rpm to PBS after doing was hing. After the suspended material was removed using 100 μm mesh it again washed to PBS. The mesenchyme stem cell while replacing the keratinocyte -SFM culture medium containing the NAC, the ascorbic acid, calcium, the rEGF, BPE, insulin it cultivates in the DMEM (10% FBS. 2 mM NAC, 0.2 mM ascorbic acid) culture medium and the head computerized axial tomography at 2 it cultivates and the mesenchyme stem cell is separated and it subcultures may be obtained. Besides, the method which is known to have in the relevant industry the mesenchyme stem cell may be obtained. Besides, the method which is known to have the already in the relevant industry the mesenchyme stem cell may be obtained.

본 발명의 일 실시예에서는 항산화제로서 셀레늄을 사용하였으며, 사용되는 셀레늄은 0.5 ~1 ng/mL 을 사용하는 것이 바람직하다. 이때, 이의 함량이 0.5 μg/ℓ미만이면 산소독성에 민감하며, 10 μg/ℓ을 초과하면 심각한 세포독성을 초래한다.

Selenium as the antioxidant in a preferred embodiment of the present invention may be referred to the selenium which used and is used. Is the be desirable to use 0.5 ~1 ng / mL. At this time, it is sensitive to the oxygen toxicity if its content is 0.5 μg / ℓ under. And if 10 μg / ℓ is exceeded the serious cytotoxin is caused.

본 발명에서 인슐린을 대체하는 성분으로 인슐린 유사인자를 사용하며, 이는 포도당 대사과 단백질 대사를 향상시켜 세포 성장을 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 μg/ℓ을 초과할 경우에는 세포독성 및 비용증가의 문제점이 있다.

In the present invention, this the insulin pseudo element is used as the component replacing insulin may be formed of especially, the be desirable turning point is the recombinant IGF- 1 (Insulin-like growth factor-1) the glucos metabolism and protein metabolism are improved. The content done with the desirable of the insulin pseudo element is 10 ~ 50 n / ml. And the apoptosis is caused in case its component is 10ng / ml under. And it has the problem of the cost Increment and cytotoxin in in case of exceeding 50 μg / ℓ.

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 바람직

Moreover, EGF the epidermal growth factor (Epidermal growth factor: EGF) was used in a preferred embodiment of the present invention may be formed of the be desirable turning point is the recombinant protein the vari

한 함량은 10~ 50 ng/mL이며, 이의 함량이 10 ng/mL 미만이면 특별한 효과가 없으며, 50ng/mL을 초과하면 세포에 독성을 가진다.

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.

본 발명의 일 양태에서는, FBS, bFGF 및 EGF가 연령에 상관 없이 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 성장률도 높다는 결과도 확인하였다.

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.

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.

도면에 대한 간단한 설명

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 상에서 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, 70

ous types of cell proliferation can be caused in vivo state. The content done with the desirable of the epidermal growth factor has the toxicity in the cell 50ng / mL is exceeded it is 10~ 50 ng / mL and there is no effect that 10 ng / mL U.S. its content is particular.

Moreover, in the present invention, this the fibroblast growth factor (bFGF) is used may be formed of the be desirable turning point is the recombinant protein the various types of cell proliferation can be caused in vivo state. The content done with the desirable of the fibroblast growth factor may be 1~ 100 ng / mL.

In one aspect of the present invention, FBS, and the bFGF and EGF were the factor which there should not be no regardless of the age in the fat mesenchyme stem cell cultivation. And the important result that it affects could be confirmed in especially, the adipose stem cell cultivation of the lack of the bFGF. Moreover, the result that the growth rate was high as it was the cell of the human which was young in the age confirmed.

In the other aspect of the present invention, FBS, and the bFGF and EGF confirmed called the important factor as to the telomerase activity of the adipose stem cell. And the telomerase activity most high showed up in 20 part. And it could confirm that the telomerase activity was decreased in case of the culture medium without selenium. And when it cultivated in the selenium contained culture medium it confirmed that the aged originated adipose stem cell could have the telomerase activity which was similar to the adipose stem cell of the younger originated.

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.

Brief explanation of the drawing

Figure 1 is a photograph in each culture medium 20 part and 30 large originated adipose stem cell, the form is confirmed to 4 tag fine branch (passage) after the group coldest day of the year on the microscope.

Figure 2 is a photograph in 70 part and 80 part, and each culture medium the originated adipose stem cell, the form is confirmed to 4 tag fine branch (passage) after the group coldest day of the year on the microscope.

Figure 3 is graph showing the age bracket CPDL (cell population doubling level) of old age phosphorus (70 part and 80 part) and young human (20 part and 30 part) cultivated in 10 seed medium.

Figure 4 is graph showing the culture medium CPDL of old age phosphorus (70 part and 80 part) and young human (20 part and 30 part) cultivated in 10 seed medium.

대, 80대 유래 지방줄기세포의 텔로머라아제 활성을 나타낸 그래프이다.

도 7은 1, 9번 배지를 사용하여, P4 및 P6 계대로 배양한 후, 계대 배양 수에 따른 텔로머라아제 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.

Figure 5 is a graph showing with the age bracket of the adipose stem cell, and the culture medium telomerase activity it cultivates in the culture medium of 5 kind.

Figure 6 is graph showing the telomerase activity of 20 part, 30 part, 70 part, 80 large originated adipose stem cell cultivated in 2 kinds culture medium (one time, and the ninth the culture medium).

Figure 7 is a graph in which the telomerase activity measures the change according to 1, and the subculture number after doing the cultivation, as the P4 using the ninth the culture medium and P6 group.

Figure 8 shows the result confirming the expression the oct4 called the versatility confirmation marker in the adipose stem cell cultivated to 1, and the ninth the culture medium, and the nanog and Rex1 at the P3.

Figure 9 shows the result confirming the expression the oct4 called the versatility confirmation marker in the adipose stem cell cultivated to 1, and the ninth the culture medium, and the nanog and Rex1 at the P4.

Figure 10 shows the result dyeing 20 part, 30 part, 70 part, 80 large originated adipose stem cell in 5 kind (1, 2, 3, 9, 10) culture medium to 3 passage after the group coldest day of the year in the inhibitory effects on adipocytes culture medium after doing cultivation with the Oil red O.

Figure 11 is a graph doing the result with a fixed quantity in 5 kind (1, 2, 3, 9, 10) culture medium 20 part, 30 part, 70 part, 80 large originated adipose stem cell, it dyes to 3 passage after the group coldest day of the year in the inhibitory effects on adipocytes culture medium after doing cultivation.

Figure 12 shows the result confirming the PPAR γ called the fat differentiation marker 20 part, 30 part, 70 part, 80 large originated adipose stem cell is differentiated to the fat cell, and the expression of the FABP4d and LPL as PCR with RT.

실시예

인간 지방조직 유래 중간엽 줄기세포 분리

환자의 연령이 20대, 30대, 70대 및 80대인 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.

하룻밤 지난 후 부착되지 않은 세포들은 PBS로 세척하고, 5% FBS, 2mM NAC, 0.2mM ascorbic acid, 0.09mM

Example(s)

The search of the medium component giving the stem cell with *** bay .

The culture medium removing one in the RKCM culture medium used in embodiment 1 among the FBS called the added active ingredient, NAC, ascorbic acid, calcium, REGF, 5 μ g / ml insulin, BFGF, hydrocortisone and selenium was manufactured. The active ingredient confirmed the expression type of the adipose stem cell of 20 part, 30 part, 70 part, 80 patient the originated at the respective removed culture medium.

The culture medium 1~10 was manufactured. One time culture medium was the RKCM culture medium

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.

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

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

줄기세포를 정제만드는배지성분의 탐색

실시에 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.

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

Media 번호RKCM 배지에서 결핍된 성분1없음2FBS3bFGF4인슐린5Hydrocortisone6EGF7ascorbic acid8NAC(N-acetyl-L-cysteine)9셀레늄10EGF/bFGF

m. And 2~10 used the culture medium lacking the component in the RKCM culture medium. And each lack component showed in the table 1.

Media number	The component which is deficient in the RKCM culture medium
1	None
2	FBS
3	bFGF
4	Insulin
5	Hydrocortisone
6	EGF
7	ascorbic acid
8	NAC(N-acetyl-L-cysteine)
9	Selenium
10	EGF/bFGF

(1) The observation of the cell proliferation speed and form.

Separated 20 part, 30 part, 70 part, 80 large originated adipose stem cell the form on the microscope was confirmed as the method of the embodiment 1 at each culture medium to 4 passage after the group coldest day of the year. And the cellular number was measured using the hemocytometer and the cell number was calculated in the passage process and the multiplication rate was confirmed (the drawing 1 and fig. 2).

The age bracket CPDL (cell population doubling level) of young human (20 part and 30 part) cultivated in 10 seed medium and old age phosphorus (70 part and 80 part) and culture medium CPDL were shown in figures 3 and 4.

The fat mesenchyme stem cell of (70,80 part) called humans (20,30 part) and the young old age cultivated to the culture medium removed the age bracket CDPL excluded two times, and the tenth the culture medium the various stem cell active materials of 10 kind and the growth rate was shown as 20, 30, 70, 80 large net. It especially had the some extent difference according to the culture medium with age but the growth rate was high by 1, 6 or the seventh the culture mediums. Two times culture medium was most low. The result having a low three times culture medium is culture mediums the growth rate was shown.

The form or the growth rate of the adipose stem cell cultivated to the culture medium of 10 kind was observed. Then the culture medium 2, 3, and 10 were the factor which there should not be no regardless of the age in the fat mesenchyme stem cell cultivation. And the lack of three times culture medium factor could confirm the important result that affect in the fat mesenchyme stem cell culti

vation in comparison with two times, and the tenth the medium group in which growth was not progressed at all. Moreover, the result that the growth rate was high as it was the cell of the human which was young in the age confirmed.

(1) 형태 및 세포증식속도의 관찰

실시에 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 헤모사이토메터를 이용하여 측정하여 세포수를 계산하여 증식속도를 확인하였다.

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.

10종의 다양한 줄기세포 활성 물질을 제거한 배양 배지로 배양한 젊은 사람(20,30대)와 노령인(70,80대)의 지방 중간엽 줄기세포는 연령별 CDPL은 2번, 10번 배지를 제외하고는 20, 30, 70, 80대 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.

(2) The telomerase activity confirmation.

Separated 20 part, 30 part, 70 part, 80 large originated adipose stem cell the telomerase activity of the stem cell was confirmed as the method of the embodiment 1 at 5 kind (1, 2, 3, 9, 10) culture medium to 3 passage after the group coldest day of the year.

The adipose derived stem cell cultivated in the culture medium may be referred to using the DME M medium which after it washes to PBS it adds, the digestion for 2 hours in 37. In 3000 Xg after PBS washing, it centrifuged at for 10 minutes. After removing the supernatant the cell was dissolved to the solution which was in the Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA KIT (Roche) and it reacted 30 min. at ice. In 16,000 x g, it centrifuged at for 20 minutes and the supernatant separated and the reaction mixture included in the supernatant and KIT of one part was mixed and it reacted at PCR. The polymerase chain reaction elongation: 25℃, 10 minutes inactivation: 94℃, 5 minutes denaturation: 94℃ 30 second annealing: 50℃, 30 second polymerization: it is 72℃, 90 second. After for 10 minutes reacting the denaturation reagent included in KIT of 25 μl at at a room temperature the hybridization solution of 225 μl was added in the amplified sample 5 μl and the denaturation reagent mixed. It was busy in the microplate coated in advance and after reacting to the speed of 300 rpm the Hybridization solution was removed of 37℃ among this only 100μl for 2 hours. After 100 μl anti-DIG-POD reacting solution being added to the cleaning solution after the several times washing and reacting in the room temperature to 300 rpm speed with 30 min. and removing this after solution it washed to the cleaning solution with several times. 100 μl TMB substrate solution is added and after reacting to 300 rpm speed with 30 min. 100 μl discontinuance solution is added in the room temperature and the color change is surveyed. At this time, the colour measured to be yellow in blue at the change, the microplate (ELISA) instrument in the wave length of 450 nm within 30 minutes if the discontinuance solution was added.

Consequently, as shown in figure 5, the cell cultivated in the ninth the culture medium of the activity of the telomerase activity of the adipose stem cell cultivated in the culture medium of 5 kind was high in 20 part or 30 part and there the activity was nearly no 2, 3, and the cell of the tenth the culture medium. In the old age group, the cell cultivated in one time culture medium a little bit showed the high activity than the ninth the culture medium. Ephemeric time, in the old age group, the telomerase activity of the cell cultivated in 2, 3, and th

e tenth the culture medium fell down.

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 Telo merase 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 μl에 KIT에 포함되어 있는 25 μl의 denaturation reagent를 상온에서 10분간 반응시킨 후 225 μl의 hybridization 용액을 첨가하여 혼합하였다. 이 중 100μl 만을 미리 코팅된 microplate 에 분주하여 37℃에서 2시간 동안 300 rpm의 속도로 반응시킨 후 Hybridization 용액을 제거하였다. 세척용액으로 수차례 세척 후 100 μl anti-DIG-POD 반응 용액을 첨가하여 실온에서 300 rpm 속도로 30분간 반응하고 이 후 용액을 제거한 뒤 세척용액으로 수차례 세척하였다. 100 μl TMB substrate 용액을 첨가하고 실온에서 300 rpm 속도로 30분간 반응한 뒤 100 μl 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 30대에

The telomerase activity of 20 part, 30 part, 70 part, 80 large originated adipose stem cell cultivated in 2 kinds culture medium (one time, and the ninth the culture medium) was shown in fig. 6.

Consequently, the telomerase activity of the adipose stem cell cultivated to one time and the ninth the culture medium is the highest activity in 20 part are shown. And the telomerase activity of the cell at regular with the exclusion one time culture medium high showed 30 part up than the cell at the ninth the culture medium.

Moreover, in 80 part called the Koryong county the P4 was the passage using 1, and the ninth the culture medium, the telomerase activity most high showed up in 20 part whereas the versatility (pluripotency) was the highest. The activity confirmed in that it could cultivate to could have the activity of the young group cell in case of cultivating the cell to the culture medium containing the component which can confirm to be the component which the removed component within the ninth the culture medium is insufficient in comparison with one time but drops down the activity of the stem cell if wants to analyze to the telomerase activity result and is fired from the old age group within 9 burn to be the important component.

Additionally, the telomerase activity according to the subculture number measured the change using 1, and the ninth the culture medium according to the P4 and P6 group after doing cultivation.

Consequently, in the P4 having a lower passage number than the P6 it shows up in fig. 7, the result

서는 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 텔로머라아제 활성도가 높게 나타났다.

또한, 1, 9번 배지를 사용하여 P4 까지 계대하였을 때, 노령군인 80대에서 다능성(pluripotency)이 가장 높은 것에 비해 텔로머라아제 활성은 20대에서 가장 높게 나타났다. 텔로머라아제 활성 결과로만 분석하자면 1번에 비해 9번 배지 내의 제거된 성분은 미비하지만 줄기세포의 활성을 떨어뜨리는 성분임을 확인할 수 있고 노령군에서 9번 배지 내의 제거된 성분이 포함된 배지로 세포를 배양할 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 텔로머라아제 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

that the activity high showed up could be ascertained.

(3) The stem cell marker manifestation confirmation.

Separated and separated 20 part, 30 part, 70 part, 80 large originated adipose stem cell was fostered in 1, and the ninth the culture medium to the method of the embodiment 1 to 3 passage after the group coldest day of the year to 90%. In this way, RNA using the Total Extraction kit (Intron Biotechnology) the culture medium is removed and the cell lysis buffer (Intron Biotechnology, Sungnam, Korea) for the RNL extraction is put in PBS over 1 time after doing washing and the cell is made with lysis are extracted from the adipose stem cell fostered. PCR was performed after producing the oct-4 called the versatility marker after doing the cDNA (Intron Biotechnology cDNA synthesis kit) the conversion extracted RNA, and the primer for the Rex1 and Nanog. The PCR product may be referred to the fixed quantity through the image dissector after doing the electrophoresis.

Consequently, as shown in figure 8, oct4 called the everyone, and the versatility confirmation marker the difference between the fat mesenchyme stem cell entity cultivated to 1, and the ninth the culture medium was big, and the nanog and Rex1 were expressed. In the age bracket the old age soldier 80 part, the incidence of the markers was high. And the incidence of the ninth the culture medium was higher than one time culture medium in 30 part and the nearly similar incidence was shown according to the culture medium in the other age.

Oct4 in which the difference between the fat mesenchyme stem cell entity cultivated in the state of the P4 to 1, and the ninth the culture medium are the versatility confirmation marker it was big, and the nanog and Rex1 were revealed (fig. 9). In the age bracket the old age soldier 80 part, the incidence of the markers was high. And the incidence of the ninth the culture medium was higher than one time culture medium according to the culture medium in all ages.

(4) The blastogenesis confirmation.

In the NH Adipodiff medium (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) called the fatty oil wallpaper after the group coldest day of the year, till 3 passage 20 part, 30 part, 70 part, 80 large originated adipose stem cell separated into the method of the embodiment 1 in 5 kind (1, 2, 3, 9, 10) culture

e medium, cultivation was progressed in 37°C, 5% CO₂ for 21. And the exchange of the inhibitory effects on adipocytes culture medium was made 2.

실시에 1의 방법으로 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 synthesis 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.

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.

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.

(4) 분화능 확인

실시에 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°C, 5% CO₂에서 21일 동안 배양을 진행하였으며, 지방세포분화배지의 교환은 2일 간격으로 이루어졌다.

In the inhibitory effects on adipocytes culture medium, the adipose stem cell confirmed the blastogenesis to the fat cell cultivation after the beginning in 21st day using the Oil red O dyeing method.

Consequently, as shown in figure 10, in all ages, and the cell within the culture medium, the vaginal atrium wool (lipid drop) was confirmed with the Oil red O dyeing whether it was the characteristic of the fat differentiation or not. The result doing this with a fixed quantity was shown in fig. 11. And the differentiation rate was high and 2 and the tenth the culture medium showed up according to the culture medium as 9, 1, and three times culture medium net. And the differentiation rate was high as the age bracket as 30, 20, 70, 80 large net.

The PPAR γ called the marker of the fat differentiation in the molecular level, and the expression of the FABP4d and LPL may be referred to the elevated level it is similar according to the culture medium it confirmed with the RT-PCR and then as shown in figure 12, the difference between the entity was big but the incidence was a bit high by the juvenile group as the age bracket in comparison with the old age group.

2 through results, 3, and inside of the culture medium the active material of 10 burn are on the whole, the versatility (pluripotency) or the differentiation rate in the young age the thing called the factor which there should not be no regardless of the age in the fat mesenchyme stem cell cultivation was confirmed, and the component within these culture mediums the extent of the telomerase activity was high in comparison with the old age group and the differentiation rate, and the telomerase activity are decreased according to the culture medium including the growth rate of the cell cultivated in 2, 3, 10 burn is the element in which the cell grows and carrying the activity but essential.

In one time culture medium and one time culture medium which are the control group culture medium in the young group, the group, in which about cytogenesis rate at the ninth the culture medium in which selenium is removed looked young the old age group, or the similar extent was shown. But because of the result of falling down is looked at in the old age group which the activity in which it There is no difference in the group looking young in the telomerase activity experiment cultivates between tw

o culture mediums in the ninth the culture medium and in the old age group the selenium ingredient removed in the ninth the culture medium is surely included having the activity of the degree of cell cultivated in one time culture medium the activity can analogize.

지방세포분화배지에서 배양을 시작 후 21일째에, Oil red O 염색법을 이용하여 지방줄기세포가 지방세포로의 분화능을 확인하였다.

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.

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 10번 배지는 비슷하게 나타났으며, 연령별로는 30, 20, 70, 80대 순으로 분화율이 높았다.

분자적 수준에서 지방 분화의 마커인 PPAR γ , LPL 및 FABP4d의 발현을 RT-PCR로 확인한 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, 개체간의 차이는 컸으나 연령별로는 젊은 군이 노령군에 비해 다소 발현율이 높았으며, 배지별로는 전체적으로 비슷하거나 2번과 9번 배지가 약간 높은 수준이었다.

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.

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 9번 배지 내에서 제거된 셀레늄 성분이 노령군에서 꼭 포함되어야 1번 배지에서 배양된 세포 정도의 활성도를 가질 수 있다고 유추할 수 있다.

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.

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 불일치등에 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.)