



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0160611  
(43) 공개일자 2022년12월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 5/0735 (2010.01) C12N 5/074 (2010.01)  
C12N 5/0775 (2010.01) C12N 5/0789 (2010.01)  
(52) CPC특허분류  
C12N 5/0606 (2013.01)  
C12N 5/0647 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2022-7036502  
(22) 출원일자(국제) 2021년03월25일  
심사청구일자 없음  
(85) 번역문제출일자 2022년10월19일  
(86) 국제출원번호 PCT/JP2021/012557  
(87) 국제공개번호 WO 2021/200545  
국제공개일자 2021년10월07일  
(30) 우선권주장  
JP-P-2020-060490 2020년03월30일 일본(JP)

(71) 출원인  
오리엔탈고우보고오교가부시끼가이샤  
일본국도오쿄도이따바시꾸아즈사와3쵸메6방10고  
(72) 발명자  
가 아유미  
일본 5260804 시가 나가하마시 카노초 50 오리엔  
탈고우보고오교가부시끼가이샤 나이  
키노세 케이타  
일본 5260804 시가 나가하마시 카노초 50 오리엔  
탈고우보고오교가부시끼가이샤 나이  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인필엔은지

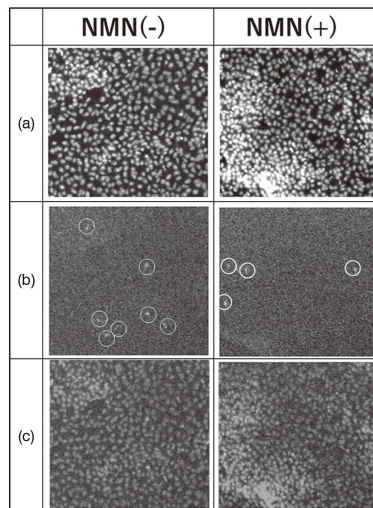
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 줄기세포의 염색체 안정화제

(57) 요약

본 발명은  $\beta$ -니코틴아미드 모노뉴클레오티드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염, 또는 이들의 용매화물을 유효 성분으로 하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 염색체 안정화제, 및 다능성 줄기세포를  $\beta$ -니코틴아미드 모노뉴클레오티드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염, 또는 이들의 용매화물을 함유하는 배양배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는 줄기세포의 배양 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**C12N 5/0662** (2013.01)

**C12N 5/0696** (2013.01)

**C12N 2500/40** (2013.01)

(72) 발명자

**토미모리 요시아**

일본 5260804 시가 나가하마시 카노초 50 오리엔탈  
교우보교오교가부시끼가이샤 나이

---

**야스다 히사타카**

일본 5260804 시가 나가하마시 카노초 50 오리엔탈  
교우보교오교가부시끼가이샤 나이

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

$\beta$ -니코틴아미드 모노뉴클레오타이드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염, 또는 이들의 용매화물을 유효 성분으로 하는 것을 특징으로 하는, 줄기세포의 염색체 안정화제.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

줄기세포의 배양배지에  $\beta$ -니코틴아미드 모노뉴클레오타이드 환산으로 0.01~5 mM 첨가되는, 염색체 안정화제.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

배아 줄기세포, 유도만능 줄기세포, 간엽계 줄기세포 및 조혈 줄기세포로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 줄기세포의 염색체 안정화를 위해 이용되는, 염색체 안정화제.

#### 청구항 4

다능성 줄기세포를,  $\beta$ -니코틴아미드 모노뉴클레오타이드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염, 또는 이들의 용매화물을 함유하는 배양배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는, 줄기세포의 배양 방법.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,

상기 배양배지의  $\beta$ -니코틴아미드 모노뉴클레오타이드 농도가 0.01~5 mM인, 배양 방법.

#### 청구항 6

제4항 또는 제5항에 있어서,

상기 줄기세포가, 배아 줄기세포, 유도만능 줄기세포, 간엽계 줄기세포 및 조혈 줄기세포로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인, 배양 방법.

#### 청구항 7

줄기세포를,  $\beta$ -니코틴아미드 모노뉴클레오타이드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염, 또는 이들의 용매화물을 함유하는 배양배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는, 줄기세포의 염색체 안정화 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 줄기세포의 배양·계대 과정에서 염색체 이상의 발생을 방지할 수 있는 소재, 및 그 소재를 사용한 줄기세포의 염색체 안정화제에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 다분화능성 줄기세포로 대표되는 줄기세포는 자기 복제능을 갖는 미분화(未分化) 세포로서, 여러 가지 세포로 분화 가능한 세포이다. 최근, 환자의 손상된 조직에 줄기세포나 줄기세포로부터 분화 유도시킨 세포를 이식해, 그 기능의 재생을 도모하는 재생 의료가 활발히 연구되고 있다. 재생 의료에서는, 줄기세포나 그 분화 세포를 대량으로 준비할 필요가 있기 때문에, 줄기세포를 효율적으로 증식시키는 방법 또는 줄기세포를 효율적으로 분화시키는 방법이 활발하게 개발되고 있다.

[0003] 그러나, 줄기세포는 배양 기간이 길어지거나 계대 횟수가 많아지면, 염색체 이상이 일어나는 경우가 있다. 염색체 이상에는, 2개가 쌍을 이루고 있는 염색체가 1개가 되는 일염색체성(monosomy), 3개가 되는 삼염색체성(trisomy) 등의 이수성(aneuploidy) 이상 외에, 전좌, 역위, 부분 중복, 부분 결실 등의 구조 이상이 있다. 줄기세포에 이와 같은 염색체 이상이 생기면, 줄기세포가 보유하고 있는 증식능이나 분화능이 없어질 뿐만 아니라, 그 줄기세포로부터 분화한 세포나 조직을 재생 의료 등에 사용하면, 암 세포로 변이하거나 종양이 될 위험성이 있다. 암 세포나 종양에서는 염색체 이상이 일어나는 경우가 있어, 최근, 염색체 이상을 보다 정확하게 검지하는 방법이 보고되고 있다(예를 들면, 특허 문헌 1 및 2 참조).

[0004] 한편, 니코틴아미드 모노뉴클레오티드(NMN, nicotinamide mononucleotide)는 조효소  $NAD^+$ 의 생합성 중간 대사산물이다. 최근, NMN은 노화 마우스에서의 인슐린 분비능의 개선 효과, 고지방식이나 노화에 의해 발현되는 2형 당뇨병의 마우스 모델에서 인슐린 감수성이나 분비를 극적으로 개선하는 효과를 갖는 것(예를 들면, 특허 문헌 3 참조), 노화 근육의 미토콘드리아 기능을 현저히 높이는 효과를 갖는 것 등이 보고되고 있다. 또한, NMN의 존재하에서 다능성 줄기세포를 배양함으로써, 그 증식능이나 분화능을 향상시킬 수 있는 것도 보고되고 있다(예를 들면, 특허 문헌 4 및 5 참조).

## 선행기술문헌

### 특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) 특허 문헌 1: 일본 특허공개 2019-213537호 공보  
(특허문헌 0002) 특허 문헌 2: 일본 특허공개 2019-144097호 공보  
(특허문헌 0003) 특허 문헌 3: 미국 특허 제7737158호 명세서  
(특허문헌 0004) 특허 문헌 4: 국제 공개 제2018/143258호 공보  
(특허문헌 0005) 특허 문헌 5: 국제 공개 제2019/182044호 공보

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 줄기세포의 배양·계대 과정에서 염색체 이상의 발생을 방지할 수 있는 소재, 그리고 그 소재를 사용한 줄기세포의 염색체 안정화제, 줄기세포의 배양 방법, 및 줄기세포의 염색체 안정화 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

### 과제의 해결 수단

[0007] 본 발명자들은, 상기 과제를 해결하기 위해 예의 연구한 결과,  $\beta$ -니코틴아미드 모노뉴클레오티드( $\beta$ -NMN)의 존재하에서 줄기세포중의 염색체의 안정성이 향상되어, 염색체 이상이 억제·방지되는 것을 알아내 본 발명의 완성에 이르렀다.

[0008] 즉, 본 발명은, 하기 줄기세포의 염색체 안정화제, 줄기세포의 배양 방법, 및 줄기세포의 염색체 안정화 방법을 제공하는 것이다.

[0009] [1]  $\beta$ -니코틴아미드 모노뉴클레오티드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염, 또는 이들의 용매화물을 유효 성분으로 하는 것을 특징으로 하는, 줄기세포의 염색체 안정화제.

[0010] [2] 줄기세포의 배양배지에,  $\beta$ -니코틴아미드 모노뉴클레오티드 환산으로 0.01~5 mM 첨가되는, 상기 [1]의 염색체 안정화제.

[0011] [3] 배아 줄기세포, 유도만능 줄기세포, 간엽계 줄기세포, 및 조혈 줄기세포로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 줄기세포의 염색체 안정화를 위해 이용되는, 상기 [1] 또는 [2]의 염색체 안정화제.

[0012] [4] 다능성 줄기세포를,  $\beta$ -니코틴아미드 모노뉴클레오티드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염, 또는 이들의 용매화물을 함유하는 배양배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는, 줄기세포의 배양 방법.

- [0013] [5] 상기 배양배지의  $\beta$ -니코틴아미드 모노뉴클레오타이드 농도가 0.01~5 mM인, 상기 [4]의 배양 방법.
- [0014] [6] 상기 줄기세포가, 배아 줄기세포, 유도만능 줄기세포, 간엽계 줄기세포, 및 조혈 줄기세포로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상인, 상기 [4] 또는 [5]의 배양 방법.
- [0015] [7] 줄기세포를,  $\beta$ -니코틴아미드 모노뉴클레오타이드 또는 이의 약리학적으로 허용되는 염, 또는 이들의 용매화물을 함유하는 배양배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는, 줄기세포의 염색체 안정화 방법.

### 발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따른 줄기세포의 염색체 안정화제는, 줄기세포에 작용함으로써 그 줄기세포의 염색체의 안정성을 향상시켜, 염색체 이상의 발생을 억제 또는 방지할 수 있다. 따라서, 상기 염색체 안정화제를 배양배지에 함유시킴으로써 줄기세포의 염색체의 안정성을 향상시켜, 염색체 이상의 발생을 억제 또는 방지해 줄기세포를 보다 안정적으로 배양할 수 있다. 또한, 상기 염색체 안정화제를 이용함으로써, 줄기세포로부터 분화시킨 세포나 조직의 암화·종양화의 리스크를 저감할 수 있다.

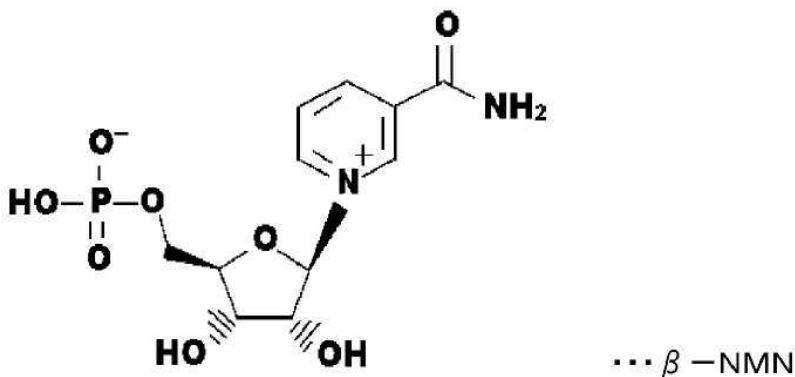
### 도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1의 (a)는 실시예 2에서 세포를 PI(Propidium iodide)로 염색한 형광 사진이고, (b)는 실시예 2에서 세포를 항  $\gamma$ H2A.X 항체로 면역 염색한 형광 사진이고, (c)는 (a)와 (b)를 머징(merging)한 사진이다.
- 도 2는 PI로 염색된 전체 세포 중의  $\gamma$ H2A.X 양성의 세포핵의 비율을 나타내는 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명 및 본원 명세서에 있어서 줄기세포란, 자기 복제능을 갖고 또한 분화능(다양한 세포종으로 분화 가능한 능력)을 갖는 미분화 세포이며, 예를 들면 ES 세포(배아 줄기세포), iPS 세포(유도만능 줄기세포) 등의 다능성 줄기세포 외에, 간엽계 줄기세포, 조혈 줄기세포, 신경 줄기세포, 피부 줄기세포 등의 체성 줄기세포를 들 수 있다. 바람직하게는 외배엽, 중배엽, 및 내배엽 유래의 어느 세포로도 분화할 수 있는 줄기세포, 중배엽 유래의 세포로 분화할 수 있는 줄기세포 등이다.
- [0019] 본 발명에 따른 줄기세포의 염색체 안정화제(이하, '본 발명에 따른 염색체 안정화제'라고도 한다)는, NMN(화학식:  $C_{11}H_{15}N_2O_8P$ )을 유효 성분으로 하고, 줄기세포를 배양·계대시킬 때 그 배양배지에 첨가되는 것이다. NMN의 존재하에서 줄기세포를 배양·계대시킴으로써, 줄기세포의 염색체의 안정성을 향상시켜 염색체 이상의 발생을 억제 또는 방지할 수 있다.
- [0020] NMN에는 광학이성체로서  $\alpha$ ,  $\beta$ 의 2 종류가 존재하는데, 본 발명에 따른 염색체 안정화제의 유효 성분이 되는 NMN은  $\beta$ -NMN(CAS 번호: 1094-61-7)이다.  $\beta$ -NMN의 구조는 다음과 같다.

### 화학식 1



- [0021]
- [0022] 유효 성분으로 하는  $\beta$ -NMN은 어떤 방법으로 조제된 것이라도 무방하다. 예를 들면, 화학 합성법, 효소법, 발효법 등에 의해, 인공적으로 합성한  $\beta$ -NMN을 정제한 것을 유효 성분으로 이용할 수 있다. 또한,  $\beta$ -NMN은 널리 생체에 존재하는 성분이기 때문에, 동물, 식물, 미생물 등의 천연 원료로부터 추출·정제함으로써 얻어진  $\beta$ -

NMN을 유효 성분으로 이용할 수도 있다. 또한, 시판되는 정제된  $\beta$ -NMN을 사용해도 된다.

- [0023]  $\beta$ -NMN을 합성하는 화학 합성법으로는, 예를 들면 니코틴아미드(NAM)와 L-리보스 테트라아세테이트를 반응시켜 얻어진 니코틴아미드 모노뉴클레오타이드를 인산화함으로써  $\beta$ -NMN을 제조할 수 있다. 또한, 효소법으로는, 예를 들면 NAM과 5'-포스포리보실-1'-피로인산(PRPP)으로부터 니코틴아미드 포스포리보실 트랜스퍼라제(NAMPT)에 의해  $\beta$ -NMN을 제조할 수 있다. 발효법으로는, 예를 들면 NAMPT를 발현하고 있는 미생물의 대사계를 이용해 NAM로부터  $\beta$ -NMN을 제조할 수 있다.
- [0024] 본 발명에 따른 염색체 안정화제의 유효 성분으로는,  $\beta$ -NMN의 약리학적으로 허용되는 염이라도 된다.  $\beta$ -NMN의 약리학적으로 허용되는 염으로는, 무기산염이어도 되고, 아민과 같은 염기성 부위를 갖는 유기산염이라도 된다. 이와 같은 산염을 구성하는 산으로는, 예를 들면 아세트산, 벤젠술폰산, 벤조산, 캄포술폰산, 시트르산, 에텐술폰산, 푸마르산, 글루콘산, 글루타민산, 브롬화수소산, 염산, 이세티온산, 락트산, 말레산, 말산, 만델산, 메탄술폰산, 점액산(mucic acid), 질산, 팜산(pamonic acid), 판토텐산(pantothenic acid), 인산, 숙신산, 황산, 주석산, p-톨루엔술폰산 등을 들 수 있다. 또한,  $\beta$ -NMN의 약리학적으로 허용되는 염으로는, 알칼리염이라도 되고, 카본산과 같은 산성 부위를 갖는 유기염이라도 된다. 이와 같은 산염을 구성하는 염기로는, 예를 들면 알칼리 금속염 또는 알칼리 토류 금속염이며, 수소화 나트륨, 수산화 칼륨, 수산화 칼슘, 수산화 알루미늄, 수산화 리튬, 수산화 마그네슘, 수산화 아연, 암모니아, 트리메틸 암모니아, 트리에틸 암모니아, 에틸렌 디아민, 리진, 아르기닌, 오르니틴, 콜린, N,N'-디벤질에틸렌 디아민, 클로로프로카인, 프로카인, 디에탄올 아민, N-벤질 페네틸아민(N-benzylphenethylamine), 디에틸 아민, 피페라진, 트리스(히드록시메틸)-아미노메탄, 수산화 테트라메틸 암모늄 등의 염기로부터 유도되는 것을 들 수 있다.
- [0025] 본 발명에 따른 염색체 안정화제의 유효 성분은, 프리  $\beta$ -NMN 또는  $\beta$ -NMN의 약리학적으로 허용되는 염의 용매 화물이라도 된다. 상기 용매화물을 형성하는 용매로는 물, 에탄올 등을 들 수 있다.
- [0026] 본 발명에 따른 염색체 안정화제는,  $\beta$ -NMN에 추가해 그 외의 유효 성분을 함유하고 있어도 된다.  $\beta$ -NMN과 병용하는 그 외의 유효 성분은 1종이라도 되고, 2종 이상의 조합이라도 된다. 상기 다른 유효 성분으로는, 예를 들면 알부민, 아스코르브산,  $\alpha$ -토코페롤, 인슐린, 트랜스페린, 아셀렌산나트륨, 에탄올 아민, Rock 저해제 등의 줄기세포의 생존 효율이나 증식 효율을 높이는 것으로 알려져 있는 성분이나, 발프로산, 디메틸설폭시드, 텍사메타손, 부티르산, 트리코스타틴 A, GSK3 저해제, BMP 저해제, Wnt 저해제, 액티빈(activin), 노긴(noggin) 등의 줄기세포의 분화 효율을 높이는 것으로 알려져 있는 성분들 중에서 적절히 선택해 이용할 수 있다.
- [0027] 줄기세포를 배양할 때, 배양배지에 본 발명에 따른 염색체 안정화제를 함유시킴으로써 줄기세포의 염색체의 안정성을 향상시켜, 염색체 이상의 발생을 억제 또는 방지하면서 줄기세포를 증식시킬 수 있다. 줄기세포의 배양 배지에 본 발명에 따른 염색체 안정화제를 함유시키는 양으로는, 상기 염색체 안정화제를 함유시키지 않은 배양 배지에서 배양한 경우와 비교해, 염색체 이상이 발생한 줄기세포의 수를 낮게 억제하기 위해 충분한 농도가 되는 양이라면 특별히 한정되지 않고, 줄기세포의 종류나, 배양배지의 기타 성분과의 밸런스 등을 고려해 적절하게 조정할 수 있다. 배양배지의  $\beta$ -NMN 농도가 너무 낮은 경우에는, 염색체 안정화 효과가 낮을 우려가 있고,  $\beta$ -NMN을 과잉 함유시켰을 경우에는, 오히려 세포 증식이 억제될 가능성이 있다. 배양배지에 함유시키는 본 발명에 따른 염색체 안정화제의 양은,  $\beta$ -NMN 농도가 0.01~5 mM이 되는 양인 것이 바람직하고, 0.05~2 mM이 되는 양인 것이 보다 바람직하고, 0.1~1 mM이 되는 양인 것이 더욱 바람직하다.  $\beta$ -NMN 농도가 상기 범위 내인 것에 의해, 줄기세포의 염색체를 충분히 안정화할 수 있다.
- [0028] 본 발명에 따른 염색체 안정화제의 존재하에서의 줄기세포의 배양은, 배양배지에 본 발명에 따른 염색체 안정화제를 함유시키는 것 외에는, 통상적인 방법에 의해 실시할 수 있다. 예를 들면, 배양배지로는, 일반적으로 줄기세포의 유지 또는 증식을 위해 이용되는 배지나, 동물세포의 배양에 이용되는 배지를 이용할 수 있다. 또한, 시판중인 각종 줄기세포를 위한 배양배지를 이용할 수도 있다. 본 발명에서, 본 발명에 따른 염색체 안정화제를 함유시켜 줄기세포의 배양에 사용되는 배지로는, 예를 들면 이글의 최소 필수 배지(Eagle's minimum essential medium; MEM), 돌베코 개변 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium; DMEM),  $\alpha$ -이글 최소 필수 배지( $\alpha$ -MEM), Iscove 개변 돌베코 배지(IMDM), F-12 배지, F-10 배지, DMEM/F12 배지, RPMI-1640 배지, 간엽계 세포 기초 배지(MSCBM), E8(Essential 8) 배지, TeSR-E8 배지, mTeSR1 배지, MCDB 배지 등을 들 수 있다. 이들 배지에, 필요에 따라, 아미노산, 무기염류, 비타민류, 항생 물질 등을 첨가해도 된다.
- [0029] 이들 배양배지에는, 본 발명에 따른 염색체 안정화제 외에, 줄기세포의 생존 효율이나 증식 효율을 높이는 것으로 알려져 있는 성분이나, 줄기세포의 미분화 상태를 유지하는 작용을 갖는 것으로 알려져 있는 성분 등을 적절하게 함유시켜도 된다. 이들 성분으로는 전술한 것을 이용할 수 있다.



- [0030] 또한, 배양 조건은 일반적으로 동물 세포를 배양하는 배양 조건으로 할 수 있고, 필요에 따라 적절하게 개변해도 된다. 예를 들면, 배양 온도 30~40℃, CO<sub>2</sub> 농도 1~10 체적%, O<sub>2</sub> 농도 0.1~25 체적%로 배양할 수 있다.
- [0031] 본 발명에 따른 염색체 안정화제에 의해 염색체가 안정화되는 줄기세포로는, 동물 유래의 줄기세포가 바람직하고, 포유류에 유래하는 줄기세포가 보다 바람직하고, 인간에 유래하는 줄기세포가 더욱 바람직하다. 또한, 본 발명에 따른 염색체 안정화제에 의해 염색체가 안정화되는 줄기세포로는, 동물 유래의 ES 세포, iPS 세포 또는 간엽계 줄기세포인 것이 바람직하고, 포유류에 유래하는 ES 세포, iPS 세포 또는 간엽계 줄기세포인 것이 보다 바람직하고, 인간에 유래하는 ES 세포, iPS 세포 또는 간엽계 줄기세포인 것이 더욱 바람직하다.
- [0032] 《실시예》
- [0033] 다음으로 실시예를 들어 본 발명을 더 상세하게 설명하지만, 본 발명이 이하의 실시예로 한정되는 것은 아니다.
- [0034] [실시예 1]
- [0035] 간엽계 줄기세포의 배양에서의 염색체에 대한 β-NMN의 효과를 조사했다. 간엽계 줄기세포로는, 인간 지방 조직 유래 간엽계 줄기세포(ADSC)(제품 번호: PT-5006, Lonza 제품)의 2 도너를 이용했다.
- [0036] 간엽계 줄기세포의 배양에서는, DMEM과 MCDB 배지를 1:1로 혼합한 배지를 기초 배지(일본 특허 제5804385호 공보를 참조)로 하고, 이 기초 배지에 FGF, PDGF, TGF-β, HGF, EGF, 인지질 및 지방산 등을 첨가한 배지를 기본 배지로 했다. β-NMN 첨가 배지는 기본 배지에 β-NMN을 0.25 mM이 되도록 첨가해 조제했다.
- [0037] <계대 배양>
- [0038] 2.5 μg/cm<sup>2</sup> 피브로넥틴으로 미리 코팅한 배양용 디쉬에, 간엽계 줄기세포를 5×10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup>가 되도록 파종하고, 기초 배지를 이용해 배양했다. 파종 1일 후에 기본 배지 또는 β-NMN 첨가 배지로 배지 교환했다. 이후, 2일 또는 3일마다 1회 배지 교환을 실시했다. 배양용 디쉬내의 세포 밀도가 약 80~90%의 컨플루언트(confluent)에 도달한 시점에서 계대 배양을 실시했다.
- [0039] 우선, 배양 상층을 제거하고, 1×PBS(-)로 세정한 후, 1×Tryple select(제품 번호: 12563011, Thermo Fisher 제품)를 이용해 세포를 박리시켜, 37℃, 5% CO<sub>2</sub>의 조건하에서 4분간 가만히 두었다. 피펫팅에 의해 세포를 싱글화한 후, 기본 배지 또는 β-NMN 첨가 배지를 첨가해 원심분리 처리를 했다. 회수한 세포를 각 배지중에 현탁시킨 후, 셀 카운트하고, 미리 코팅한 배양용 디쉬에 5×10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup>가 되도록 파종했다. 배지 교환은 기본 배지 또는 β-NMN 첨가 배지를 이용해 2일 또는 3일마다 1회의 빈도로 실시했다.
- [0040] 상기 계대 배양을 5회 실시한 후, 세포 동결용 보존액 'STEM-CELLBANKER DMSO Free GMP grade'(제품 번호 CB061, Nippon Zenyaku Kogyo 제품)을 이용해, 제조원에 의한 추천 프로토콜을 참조하여 세포를 동결했다.
- [0041] 동결한 세포를, 코팅한 배양용 디쉬에 5×10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup>가 되도록, 기본 배지 또는 β-NMN 첨가 배지에 파종하고, 파종 1일 후에 배지 교환을 행했다. 이후에는 배지 교환을 2일 또는 3일마다 1회의 빈도로 실시했다.
- [0042] 계대 배양을 1회 실시하고, T25 플라스크에 5×10<sup>3</sup> cells/cm<sup>2</sup>가 되도록 파종했다. 파종 3일 후에 T25 플라스크를 배지로 채운 상태로, 염색체 안정성 시험의 시험 위탁 기관(주식회사 일본 유전자 연구소)으로 보내 염색체 분석에 제공했다.
- [0043] <염색체 안정성 시험>
- [0044] 배양 후의 간엽계 줄기세포에 대해, G밴드 분염법에 의해 염색체 상태를 확인했다. 염색체수의 측정 결과를 표 1, 핵형 분석 결과를 표 2에 나타낸다. 한편, 분석 결과는 국제 규약에 근거하는 염색체 핵형 기재법(ISCN: International System for Human Cytogenomic Nomenclature)에 따라 기재했다.

표 1

	$\beta$ -NMN	염색체수	세포수
시험구 1	-	46	46
		47	4
			합계 50
시험구 2	-	45	1
		46	49
			합계 50
시험구 3	+	46	50
			합계 50
시험구 4	+	46	50
			합계 50

[0045]

표 2

	$\beta$ -NMN	염색체수	핵형 분석 결과	세포수
시험구 1	-	46	46, XY	17
		47	47, XY, +5	3
				합계 20
시험구 2	-	45	45, XX, -7, -18, +mar	1
		46	46, XX	19
				합계 20
시험구 3	+	46	46, XY	20
				합계 20
시험구 4	+	46	46, XX	20
				합계 20

[0046]

[0047]

시험구 1은 기본 배지에서 배양한 간엽계 줄기세포(ADSC 도너 1, 남성), 시험구 2는 기본 배지에서 배양한 간엽계 줄기세포(ADSC 도너 2, 여성)를 나타낸다. 한편, 시험구 3은  $\beta$ -NMN 첨가 배지에서 배양한 간엽계 줄기세포(ADSC 도너 1, 남성), 시험구 4는  $\beta$ -NMN 첨가 배지에서 배양한 간엽계 줄기세포(ADSC 도너 2, 여성)를 나타낸다.

[0048]

기본 배지에서 배양한 간엽계 줄기세포에서는, 2 도너(시험구 1 및 2) 모두 염색체수의 이상이 보여졌다(표 1). 즉, 각 시험구에서 50개의 세포의 염색체수를 측정한 결과, 시험구 1에서는 4개의 세포에서 염색체수가 46에서 47로 1개 증가했다. 또한, 시험구 2에서는 1개의 세포에서 염색체수가 46에서 45로 1개 감소했다. 한편,  $\beta$ -NMN 첨가 배지에서 배양한 간엽계 줄기세포에서는, 2 도너(시험구 3 및 4) 모두 모든 세포에서 염색체수가 46으로, 이는 인간의 정상적인 염색체수였다. 핵형 분석의 결과, 도너에 따라 상이한 번호의 염색체의 이상이 인정되었다(표 2). 각 시험구에서 세포 20개의 염색체의 핵형 분석의 결과, 시험구 1에서는 3개의 세포에서 5번 염색체가 1개 증가해 삼염색체성(trisomy)이 되어 있었다. 시험구 2에서는, 1개의 세포에서 염색체 7번 및 18번이 각각 1개씩 감소해, 유래 불명의 마커 염색체가 1개 증가했다. 이에 대해,  $\beta$ -NMN 첨가 배지에서 배양한 간엽계 줄기세포에서는, 2 도너(시험구 3 및 4) 모두 염색체의 핵형에 이상이 보이지 않았다(표 2). 정상의 경우, 시험구 3의 남성의 도너에서는 '46, XY'라고 기재되고, 시험구 4의 여성 도너의 경우 '46, XX'라고 기재된다. 이들 결과로부터,  $\beta$ -NMN에는 줄기세포의 염색체의 안정성을 향상시키는 효과가 있는 것이 확인되었다.

[0049]

[실시예 2]

[0050]

인간 다분화능성 줄기세포(iPSC)의 배양에서의, 염색체에 대한  $\beta$ -NMN의 효과를 조사했다.

[0051]

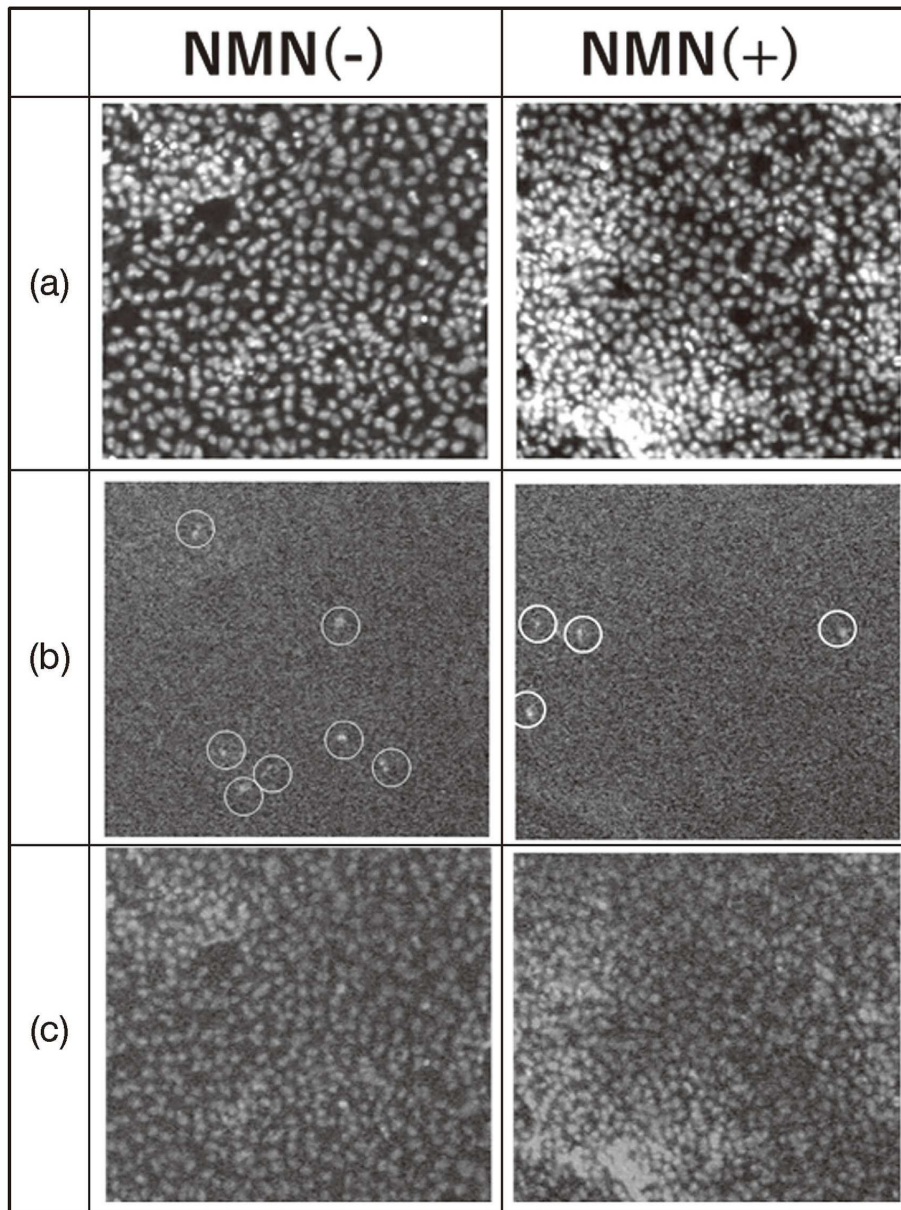
<배지 · 배양>



- [0052] 인간 다분화능성 줄기세포(iPSC)로는 201B7주를 이용하고, 세포외 매트릭스(Matrigel: Corning 제품)로 사전에 코팅한 24웰의 세포 배양용 플레이트에서 80% 정도의 세포 밀도가 될 때까지 5% CO<sub>2</sub>, 37℃에서 배양한 것을 시험에 제공했다.
- [0053] 배지로는, 기초 배지(DMEM-F12)에 iPSC의 유지 계대 배양에 필요하다는 것이 알려져 있는 사이토카인이나 염류(인슐린, 트랜스페린, TGFβ, FGF, 아셀렌산나트륨, 아스코르브산, 탄산수소나트륨)를 첨가한 기본 배지를 이용해, 기본 배지에서 배양을 실시하는 β-NMN 무첨가구(NMN(-))와, 기본 배지에 최종 농도 1 mM이 되도록 β-NMN을 첨가한 β-NMN 첨가구(NMN(+))를 마련했다.
- [0054] 상기 β-NMN 무첨가구 및 β-NMN 첨가구 각각에, 최종 농도 5μM이 되도록 NCX4016(Sigma-Aldrich 제품, 제품 번호 SML1669)을 첨가하고 2시간 배양해 염색체 손상을 유발했다. 그 후, 염색체가 얼마나 손상되었는지를 조사할 목적으로, 핵계놈 DNA가 손상된 세포를 인산화된 히스톤 H2A.X(γH2A.X) 표지함으로써 검출했다.
- [0055] <면역 염색>
- [0056] NCX4016 첨가하에서 배양된 세포를 0.99% 포름알데히드로 고정하고, 0.10% TritonX-100으로 투과 처리한 후, 항γH2A.X 항체(Thermo Fisher 제품, 제품 번호 14-9865-82)와 FITC로 형광 표지된 항마우스 IgG 항체(Thermo Fisher 제품, 제품 번호 11-4015-82)를 이용해 면역 염색하고, 형광 현미경하에서 관찰해 γH2A.X를 검출했다. 또한, 동시에 모든 세포의 핵을 관찰할 수 있도록, 프로피디움 요오드화물(Propidium iodide, PI)(나카라이테스크 제품, 제품 번호 19174-31)에 의해 DNA를 형광 염색했다.
- [0057] <결과>
- [0058] 도 1의 (b)에 나타내는 바와 같이, γH2A.X로 염색된 세포핵(원으로 표시)은 β-NMN 무첨가구(NMN(-))보다 β-NMN 첨가구(NMN(+))에서 현저하게 적었다. 또한, 도 2에 나타내는 바와 같이, 프로피디움 요오드화물(PI)로 염색된 전체 세포핵 중의 γH2A.X 양성의 세포핵의 비율은, β-NMN 무첨가구(NMN(-))보다 β-NMN 첨가구(NMN(+))에서 통계적으로 유의미하게 적었다(모비율 차의 검정, p<0.05, n>8000). 도 2에서, 막대그래프는 각각의 구의 γH2A.X 양성의 세포핵의 비율을 나타내고, 오차 막대(error bar)는 그 표준오차의 폭을 나타내고 있다. 결과는, 줄기세포에서 β-NMN의 첨가에 의해 염색체 이상의 원인이 되는 계놈 DNA로의 손상이 완화되는 것을 나타내고 있다.

도면

도면1



도면2

