



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0133034
(43) 공개일자 2019년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/074 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0696 (2013.01)
C12N 2500/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7031674
(22) 출원일자(국제) 2018년03월27일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년10월25일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2018/012476
(87) 국제공개번호 WO 2018/181342
국제공개일자 2018년10월04일
(30) 우선권주장
JP-P-2017-063842 2017년03월28일 일본(JP)

(71) 출원인
아지노모토 가부시카가이샤
일본국 도쿄도 주오구 교바시 1쵸메15만1고
각고후우징 게이오기주크
일본국 도쿄도 미나토쿠 미타 2쵸메 15-45
(72) 발명자
고세키 고토에
일본 2108681 가나가와켄 가와사키시 가와사키쿠
스즈키초 1-1 아지노모토 가부시카가이샤 내
오카모토 사토루
일본 2108681 가나가와켄 가와사키시 가와사키쿠
스즈키초 1-1 아지노모토 가부시카가이샤 내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
장훈

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 미분화 유지 배지 첨가제

(57) 요약

본 발명은, L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 176 μM 이상의 농도로 포함하는, 다능성 줄기세포 배양용 배지를 제공한다.

(52) CPC특허분류

C12N 2500/32 (2013.01)

(72) 발명자

도야마 슈고

일본 1608582 도쿄도 신주쿠구 시나노마치 35반치
게이오기주쿠 다이가쿠 이가쿠부 내

후지타 준

일본 1608582 도쿄도 신주쿠구 시나노마치 35반치
게이오기주쿠 다이가쿠 이가쿠부 내

후쿠다 게이이치

일본 1608582 도쿄도 신주쿠구 시나노마치 35반치
게이오기주쿠 다이가쿠 이가쿠부 내

소메야 쇼타

일본 1608582 도쿄도 신주쿠구 시나노마치 35반치
게이오기주쿠 다이가쿠 이가쿠부 내

명세서

청구범위

청구항 1

L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 176 μM 이상의 농도로 포함하는, 다능성(多能性) 줄기세포 배양용 배지.

청구항 2

제1항에 있어서, 배지 중의 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 176 μM 내지 1,408 μM 의 농도로 포함하는, 배지.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 무혈청 배지인, 배지.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 다능성 줄기세포가 유도 다능성 줄기세포인, 배지.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 트립토판 유도체가, 트립토판과 아미노산이 펩티드 결합된 디펩티드인, 배지.

청구항 6

제5항에 있어서, 디펩티드가 L-알라닐-L-트립토판인, 배지.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 기재된 배지 중에서 다능성 줄기세포를 배양하는 것을 포함하는, 다능성 줄기세포의 배양 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 다능성 줄기세포를 증식하기 위한 방법인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 기재된 배지 및 다능성 줄기세포를 포함하는, 다능성 줄기세포 배양 조제물(調製物).

청구항 10

이하의 공정을 포함하는, 다능성 줄기세포의 배양 방법:

- (1) L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 포함하는 배지 중에서, 다능성 줄기세포를 배양하는 것;
- (2) 얻어진 다능성 줄기세포 배양물에, L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 첨가하여, (1)에서 소비된 배지 중의 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체의 일부 또는 전부를 보충하는 것; 및
- (3) L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체가 첨가된 다능성 줄기세포 배양물을 계속해서 배양하는 것.

청구항 11

제10항에 있어서, L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 포함하는 배지가, 무혈청 배지인, 방법.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 트립토판 유도체가, 트립토판과 아미노산이 펩티드 결합된 디펩티드인, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 디펩티드가 L-알라닐-L-트립토판인, 방법.

청구항 14

L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 포함하는, 다능성 줄기세포의 증식을 촉진하기 위한 배지 첨가제.

청구항 15

제14항에 있어서, 트립토판 유도체가, 트립토판과 아미노산이 펩티드 결합된 디펩티드인, 배지 첨가제.

청구항 16

제15항에 있어서, 디펩티드가 L-알라닐-L-트립토판인, 배지 첨가제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 미분화 상태를 유지하면서 다능성(多能性) 줄기세포를 효율적으로 증식하기 위한 배지, 및 상기 배지를 사용한 다능성 줄기세포의 증식 방법 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] ES 세포(Embryonic stem cell)나 유도 다능성 줄기세포(iPS: induced pluripotent stem cell) 등의 다능성 줄기세포는, 이들의 우수한 증식성이나 다분화능으로부터 재생 의료 등에서의 사용이 기대되고 있다. 특히, iPS 세포는, 제작·입수가 비교적 용이한 것, 제작시의 윤리적 제약이 적은 것, 게다가 이식시의 거절 반응의 관점에서, 매우 우수한 재생 의료 재료로 주목받고 있다.

[0003] 다능성 줄기세포를 사용하여 재생 의료를 행하는 경우, 질환의 치료나 치료법의 개발 연구에 다량의 다능성 줄기세포가 필요해진다. 이 때문에, 다량의 다능성 줄기세포의 공급을 가능하게 하는, 다능성 줄기세포 배양 방법을 개발 및 개량하는 것이 중요해진다. 그 중에서도, 주축이 되는 것이 배지의 개량이다. 다량의 세포를 배양하기 위해서는, 다량의 배지가 필요해진다. 예를 들어, 10⁶개의 iPS 세포를 배양하여, 10¹⁰ 정도의 심근세포를 제작하여 환자 한명에게 이식하는 경우, 한명의 환자당 100리터의 배지가 필요해져, 배지에 드는 비용은 적게 어렵잡아도 대략 100,000달러에 달한다. 배지에 드는 비용을 억제하는 방법 중 하나는, 단위 배지 체적당 배양하는 것이 가능한 세포수를 늘리는 것이다. 즉, 보다 고효율 및 저비용 효과적인 다능성 줄기세포 배양용 배지의 니즈가 존재한다.

[0004] 통상, 배지에는 필수 아미노산이 첨가되어 있다. 예를 들어, 줄기세포 배양용 배지인 mTeSR1 배지(비특허문헌 1, 2, 3)나 Essential-8 배지(비특허문헌 4)는, 돌베코 개변(改變) 이글 배지(DMEM)/F12 배지를 기초 배지로 하고, bFGF나 인슐린 등의 몇 가지의 인자를 더한 것이다. 이 DMEM/F12 배지 중의 아미노산의 함유량은, 혈액 중의 유리 아미노산 양을 바탕으로 설정되어 있고, 9.0200mg/L의 L-트립토판이 포함되어 있다. 지금까지 많은 배지가 개발되어 왔지만, 배지 중의 아미노산 조성에 대해서는 거의 개량되지 않았다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0005] (특허문헌 0001) 일본 공개특허공보 특개2004-135672호
- (특허문헌 0002) 일본 공개특허공보 특개2007-228815호
- (특허문헌 0003) US2010/0317104A1
- (특허문헌 0004) W02011/100286A2

비특허문헌

- [0006] (비특허문헌 0001) Ludwig TE et. al. Nat. Methods 3(8): 637-49; 2006
- (비특허문헌 0002) Ludwig TE et. al. Nat. Biotechnol 24(2): 185-7; 2006
- (비특허문헌 0003) Masters et. al. Human Cell Culture. Dordrecht: Springer Netherlands; 2007
- (비특허문헌 0004) Chen G et. al. Nat. Methods 8(5)424-9; 2011

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 목적은, 다능성 줄기세포를 효율적으로 증식하는 것이 가능한 배지, 및 상기 배지를 사용하여 다능성 줄기세포를 효율적으로 증식하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 본 발명자들은, 상기 목적을 달성하기 위해, 다능성 줄기세포의 배양 과정에서의, 배지 중의 아미노산 양 변화에 주목했다. 그 결과, 다능성 줄기세포의 배양 과정에서 배지 중의 L-트립토판 양이 급격히 감소하여, 배지에 포함되는 전체 아미노산 중에서 L-트립토판이 가장 빨리 고갈되는 것을 발견했다. 여기서, 필수 아미노산인 L-트립토판은 다른 아미노산에 비해서도 배지 처방 농도가 낮아(비특허문헌 1, 2, 3, 4), 다능성 줄기세포의 대량 증식시 가장 먼저 부족해져, 세포 증식을 제한하는 요인이 될 것으로 예측됐다. 따라서, 본 발명자들은, 배지 중의 L-트립토판 양을 증가시키거나, 배양 도중에 L-트립토판을 첨가하여 소비된 L-트립토판을 보충함으로써, 다능성 줄기세포의 증식을 촉진할 수 있는 것을 발견하여, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [0009] 즉, 본 발명은 이하와 같은 것이다.
- [0010] [1] L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 176 μM 이상의 농도로 포함하는, 다능성 줄기세포 배양용 배지.
- [0011] [2] 배지 중의 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 176 μM 내지 1,408 μM의 농도로 포함하는, [1]의 배지.
- [0012] [3] 무혈청 배지인, [1] 또는 [2]의 배지.
- [0013] [4] 다능성 줄기세포가 유도 다능성 줄기세포인, [1] 내지 [3] 중 어느 하나의 배지.
- [0014] [5] 트립토판 유도체가, 트립토판과 아미노산이 펩티드 결합된 디펩티드인, [1] 내지 [4] 중 어느 하나의 배지.
- [0015] [6] 디펩티드가 L-알라닐-L-트립토판인, [5]의 배지.
- [0016] [7] [1] 내지 [6] 중 어느 하나의 배지 중에서 다능성 줄기세포를 배양하는 것을 포함하는, 다능성 줄기세포의 배양 방법.
- [0017] [8] 다능성 줄기세포를 증식하기 위한 방법인, [7]의 방법.
- [0018] [9] [1] 내지 [6] 중 어느 하나의 배지 및 다능성 줄기세포를 포함하는, 다능성 줄기세포 배양 조제물(調製物).
- [0019] [10] 이하의 공정을 포함하는, 다능성 줄기세포의 배양 방법:
- [0020] (1) L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 포함하는 배지 중에서, 다능성 줄기세포를 배양하는 것;
- [0021] (2) 얻어진 다능성 줄기세포 배양물에, L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 첨가하여, (1)에서 소비된 배지 중의 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체의 일부 또는 전부를 보충하는 것; 및
- [0022] (3) L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체가 첨가된 다능성 줄기세포 배양물을 계속해서 배양하는 것.
- [0023] [11] L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 포함하는 배지가, 무혈청 배지인, [10]의 방법.
- [0024] [12] 트립토판 유도체가, 트립토판과 아미노산이 펩티드 결합된 디펩티드인, [10] 또는 [11]의 방법.
- [0025] [13] 디펩티드가 L-알라닐-L-트립토판인, [12]의 방법.

- [0026] [14] L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 포함하는, 다능성 줄기세포의 증식을 촉진하기 위한 배지 첨가제.
- [0027] [15] 트립토판 유도체가, 트립토판과 아미노산이 펩티드 결합된 디펩티드인, [14]의 배지 첨가제.
- [0028] [16] 디펩티드가 L-알라닐-L-트립토판인, [15]의 배지 첨가제.

발명의 효과

- [0029] 본 발명에 의하면, 다능성 줄기세포의 세포 증식을 촉진시키는 것이 가능해지기 때문에, 다능성 줄기세포를 효율 좋게 대량으로 배양할 수 있다. 본 배지의 사용에 의한 구체적인 효과로서는, 종래의 배지에 비해서 단기간에 목표 세포수를 얻을 수 있는 것, 대량 배양에 특화된 배양 설비에 대한 변경없이, 기존 설비 그대로의 배양으로도 목표 세포수를 얻을 수 있는 것 등을 기대할 수 있다. 따라서, 다능성 줄기세포의 배양에 드는 인적 비용 및 금전적 비용을 대폭적으로 삭감할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0030] [도 1] L-트립토판을 최종 농도 44 μM, 176 μM, 352 μM, 704 μM, 1,408 μM가 되도록 첨가한 Essential-8 배지 중에서의, 인간 유도 다능성 줄기세포 201B7의 세포 회복율(%). 6웰 플레이트에, 1웰당 13,000개의 201B7 세포를 싱글 셀로 파종하여, 6일간 배양했다. L-트립토판을 상기 농도가 되도록 첨가한 시간을 0시간으로 하여, 24, 48, 72, 96, 120시간 후에 세포 회복율을 측정했다. L-트립토판 농도 의존적으로 증식 촉진 효과를 나타내는 결과가 얻어졌다.

[도 2] L-트립토판을 최종 농도 44 μM, 176 μM, 352 μM, 704 μM, 1,408 μM가 되도록 첨가한 mTeSR1 배지 중에서의, 인간 유도 다능성 줄기세포 201B7의 세포 회복율(%). 6웰 플레이트에, 1웰당 13,000개의 201B7 세포를 싱글 셀로 파종하여, 6일간 배양했다. L-트립토판을 상기 농도가 되도록 첨가한 시간을 0시간으로 하여, 24, 48, 72, 96, 120시간 후에 세포 회복율을 측정했다. L-트립토판 농도 의존적으로 증식 촉진 효과를 나타내는 결과가 얻어졌다.

[도 3] L-트립토판을 최종 농도 44 μM, 176 μM, 352 μM, 704 μM, 1,408 μM가 되도록 첨가한 TeSR2 배지 중에서의, 인간 유도 다능성 줄기세포 201B7의 세포 회복율(%). 6웰 플레이트에, 1웰당 13,000개의 201B7 세포를 싱글 셀로 파종하여, 6일간 배양했다. L-트립토판을 상기 농도가 되도록 첨가한 시간을 0시간으로 하여, 24, 48, 72, 96, 120시간 후에 세포 회복율을 측정했다. L-트립토판 농도 의존적으로 증식 촉진 효과를 나타내는 결과가 얻어졌다.

[도 4] L-트립토판을 최종 농도 44 μM, 176 μM, 352 μM, 704 μM, 1,408 μM가 되도록 첨가한 mTeSR1 배지 중에서의, 인간 유도 다능성 줄기세포 253G4의 세포 회복율(%). 6웰 플레이트에, 1웰당 40,000개의 253G4 세포를 싱글 셀로 파종하여, 6일간 배양했다. L-트립토판을 상기 농도가 되도록 첨가한 시간을 0시간으로 하여, 24, 48, 72, 96, 120시간 후에 세포 회복율을 측정했다. L-트립토판 농도 의존적으로 증식 촉진 효과를 나타내는 결과가 얻어졌다.

[도 5] L-트립토판을 최종 농도 44 μM, 176 μM, 352 μM, 704 μM, 1,408 μM가 되도록 첨가한 mTeSR1 배지 중에서의, 인간 배아 줄기세포 H9의 세포 회복율(%). 6웰 플레이트에, 1웰당 10,000개의 H9 세포를 싱글 셀로 파종하여, 6일간 배양했다. L-트립토판을 상기 농도가 되도록 첨가한 시간을 0시간으로 하여, 24, 48, 72, 96, 120시간 후에 세포 회복율을 측정했다. L-트립토판 농도 의존적으로 증식 촉진 효과를 나타내는 결과가 얻어졌다.

[도 6] L-트립토판을 최종 농도 44 μM, 176 μM, 352 μM, 704 μM, 1,408 μM가 되도록 첨가한 10% FCS를 첨가한 DMEM 배지 중에서의, 인간 태아 신장 유래 세포 293T의 세포 회복율(%). 6웰 플레이트에, 1웰당 10,000개의 293T 세포를 싱글 셀로 파종하여, 6일간 배양했다. L-트립토판을 상기 농도가 되도록 첨가한 시간을 0시간으로 하여, 24, 48, 72, 96, 120시간 후에 세포 회복율을 측정했다. L-트립토판 농도 의존적인 증식 촉진 효과를 나타내는 결과는 얻어지지 않았다.

[도 7] L-키누레닌을 최종 농도 50 μM, 100 μM, 200 μM, 500 μM, 1,000 μM가 되도록 첨가한 mTeSR1 배지 중에서의, 인간 유도 다능성 줄기세포 201B7의 세포 회복율(%). 6웰 플레이트에, 1웰당 20,000개의 201B7 세포를 싱글 셀로 파종하여, 6일간 배양했다. L-키누레닌 첨가시를 0으로 하여, 0, 24, 48, 72, 96, 120시간 후에 세포 회복율을 측정했다. L-키누레닌 50 내지 500 μM 첨가구에서 증식 촉진 효과를 나타내는 결과가 얻어졌다.

[도 8] 키누렌산을 최종 농도 50 μM, 100 μM, 200 μM, 500 μM, 1,000 μM가 되도록 첨가한 mTeSR1 배지 중에서의

의, 인간 유도 다능성 줄기세포 201B7의 세포 회복율(%). 6웰 플레이트에, 1웰당 20,000개의 201B7 세포를 싱글 셀로 파종하여, 6일간 배양했다. 키누렌산 첨가시를 0으로 하여, 0, 24, 48, 72, 96, 120시간 후에 세포 회복율을 측정했다. 키누렌산 50 내지 500 μM 첨가구에서 증식 촉진 효과를 나타내는 결과가 얻어졌다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 본 발명은, 세포의 세포 증식을 촉진하는 배지(이하, 이것을 본 발명의 배지라고도 함), 세포의 증식을 촉진하는 방법(이하, 이것을 본 발명의 방법이라고도 함), 및 세포 증식 촉진용 배지 첨가제를 제공한다.
- [0032] (1) L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체
- [0033] L-트립토판(2-아미노-3-(인돌릴)프로피온산)은, 단백질을 구성하는 필수 아미노산의 일종이다.
- [0034] 본 명세서 중, L-트립토판은 L-트립토판의 염을 포함한다. L-트립토판의 염으로서, 예를 들면, 염산염, 브롬화수소산염, 황산염, 요오드화수소산염, 질산염, 인산염 등의 무기산염, 시트르산염, 옥살산염, 아세트산염, 포름산염, 프로피온산염, 벤조산염, 트리플루오로아세트산염, 말레산염, 주석산염, 메탄설폰산염, 벤젠설폰산염, 또는 파라톨루엔설폰산염 등의 유기산염; 나트륨염, 칼륨염, 칼슘염, 마그네슘염, 암모늄염 등의 무기 염기염, 트리에틸암모늄염, 트리에탄올암모늄염, 피리디늄염, 디이소프로필암모늄염 등의 유기 염기염; 아르기닌, 아스파라긴산, 글루타민산 등의 아미노산염 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.
- [0035] L-트립토판의 염으로서, 염산염, 나트륨염 또는 칼륨염을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0036] L-트립토판은, 자체 공지의 방법으로 입수가 가능하다. 예를 들어, L-트립토판의 제조방법으로서, 일본 공개특허공보 특개2012-223092호, 일본 공개특허공보 특개2012-100537호, 일본 공개특허공보 특개2011-167071호, 일본 공개특허공보 특개2010-263790호, 일본 공개특허공보 특개2010-110217호에 기재된 방법 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.
- [0037] 또한, L-트립토판은, 상업적으로 입수가 가능한 것을 사용할 수도 있다. 상업적으로 입수가 가능한 L-트립토판으로서, 와코 준야쿠 코교사 038-23581(형번(型番)), 도쿄 카세이 코교사 T0541(형번), 나카라이테스크사 13043-92(형번), MP Biomedicals사 ICN1031505(형번), 시그마 알드리치사 T8941(형번) 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.
- [0038] L-트립토판 유도체는, 배지 중에 L-트립토판을 제공하는 한 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면 배지에 첨가했을 때에 가수분해에 의해 L-트립토판을 제공하는 물질 등을 들 수 있다. L-트립토판 유도체로서, 트립토판과 아미노산이 펩티드 결합된 디펩티드, 트립토판의 C1-6 알킬에스테르, N아세틸트립토판 등을 들 수 있지만 이들에 한정되지 않는다.
- [0039] 트립토판과 아미노산이 결합된 디펩티드의 예로서는, L-알라닐-L-트립토판, L-아르기닐-L-트립토판, L-아스파라기닐-L-트립토판, L-아스파라긴산-L-트립토판, L-시스테인-L-트립토판, L-글루타미닐-L-트립토판, L-글루타민산-L-트립토판, 글리실-L-트립토판, L-히스티딘-L-트립토판, L-이소류실-L-트립토판, L-류실-L-트립토판, L-리실-L-트립토판, L-메티오닐-L-트립토판, L-페닐알라닐-L-트립토판, L-프롤릴-L-트립토판, L-세릴-L-트립토판, L-트레오닐-L-트립토판, L-티로실-L-트립토판, L-발릴-L-트립토판, L-트립토판닐-L-트립토판, L-트립토판닐-L-알라닌, L-트립토판닐-L-아르기닌, L-트립토판닐-L-아스파라긴, L-트립토판닐-L-아스파라긴산, L-트립토판닐-L-시스테인, L-트립토판닐-L-글루타민, L-트립토판닐-L-글루타민산, L-트립토판닐-글리신, L-트립토판닐-L-히스티딘, L-트립토판닐-L-이소류신, L-트립토판닐-L-류신, L-트립토판닐-L-리신, L-트립토판닐-L-메티오닌, L-트립토판닐-L-페닐알라닌, L-트립토판닐-L-프롤린, L-트립토판닐-L-세린, L-트립토판닐-L-트레오닌, L-트립토판닐-L-티로신, L-트립토판닐-L-발린 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.
- [0040] 트립토판의 C1-6 알킬에스테르로서는, L-트립토판메틸에스테르, L-트립토판에틸에스테르 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.
- [0041] 본 명세서 중, L-트립토판 유도체는, L-트립토판 유도체의 염을 포함한다. L-트립토판 유도체의 염으로서, L-트립토판의 염으로서 상기한 것을 들 수 있다.
- [0042] 다능성 줄기세포의 배양에 사용하는 경우, L-트립토판 유도체는, L-알라닐-L-트립토판, 글리실-L-트립토판이 바람직하다.
- [0043] 본 명세서 중, L-트립토판 유도체는, L-트립토판의 대사물 또는 이의 염을 포함한다. L-트립토판

대상물로서는, 다능성 줄기세포의 배양에 사용하는 경우, L-키누레닌, 키누렌산이 바람직하다.

- [0044] L-트립토판 유도체는, 자체 공지의 방법으로 입수가 가능하다. 예를 들어, L-트립토판디펩티드의 제조방법으로서, 일반적인 고상 합성법 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.
- [0045] 또한, L-트립토판 유도체는, 상업적으로 입수가 가능한 것을 사용할 수도 있다. 상업적으로 입수가 가능한 L-트립토판 유도체로서는, 와코 준야쿠 코교사 038-23581(형번), 도쿄 카세이 코교사 T0541(형번), 나카라이테스크사 13043-92(형번), MP Biomedicals사 ICN1031505(형번), 시그마 알드리치사 T8941(형번) 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.
- [0046] (2) 다능성 줄기세포
- [0047] 본 명세서 중, 다능성 줄기세포란, 자기 복제능 및 분화/증식능을 가진 미숙한 세포로서, 생체를 구성하는 모든 조직이나 세포로 분화할 수 있는 능력을 가진 세포를 의미한다. 다능성 줄기세포의 예로서는, 배아 줄기세포(ES 세포), 유도 다능성 줄기세포(iPS 세포)(Takahashi K et al., Cell. 2007 Nov 30; 131(5): 861-72), 정자 줄기세포(mGS 세포)(Kanatsu-Shinohara M et al., Biol Reprod. 2007 Jan; 76(1): 55-62), 배아 생식세포(Matsui Y et al., Cell. 1992 Sep 4; 70(5): 841-7) 등을 들 수 있다.
- [0048] 다능성 줄기세포는 자체 공지의 방법으로 입수할 수 있다. 예를 들어, 배아 줄기세포(ES 세포)는, 포유동물의 배반포 중의 내부 세포괴를 배양하는 방법(예를 들어 Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Fourth Edition 2014 Cold Spring Harbor Laboratory Press에 기재된 방법), 체세포 핵 이식에 의해 제작된 초기배를 배양하는 방법(Wilmot et al., Nature. 1997 Feb 27; 385(6619): 810-3, Wakayama et al., Nature. 1998 Jul 23; 394(6691): 369-74, Wakayama T et al., Science. 2001 Apr 27; 292(5517): 740-3) 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.
- [0049] 또한, 배아 줄기세포는 소정의 기관으로부터 입수할 수도 있다. 예를 들어, 인간 ES 세포인 KhES-1 세포, KhES-2 세포 및 KhES-3 세포는, 교토대학 재생 의과학 연구소로부터 입수가 가능하다.
- [0050] 유도 다능성 줄기세포의 입수 방법의 예로서는, 핵 초기화 물질(예를 들어, Oct3/4, Sox2, c-Myc 및 Klf4 등)을 체세포에 도입하는 방법(Takahashi K et al., Cell. 2006 Aug 25; 126(4): 663-76, 국제공개 공보 W02007/069666)을 들 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 또한, 유도 다능성 줄기세포는, Takahashi K et al., Nat Protoc. 2007; 2(12): 3081-9, Aoi et al., Science. 2008 Aug 1; 321(5889): 699-702, Takahashi, K et al., Cell. 2007 Nov 30; 131(5): 861-72, Yu, J et al., Science. 2007 Dec 21; 318(5858): 1917-20, Nakagawa, M et al., Nat Biotechnol. 2008 Jan; 26(1): 101-6 등에 기재된 방법에 준하여 제작할 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.
- [0051] 또한 유도 다능성 줄기세포는 소정의 기관으로부터 입수할 수도 있다. 예를 들어 인간 iPS 세포인 253G1 세포, 201B7 세포는, iPS 아카데미 재팬 카부시기가이샤로부터 구입할 수 있다.
- [0052] 배아 생식세포는, 상법에 따라서 시원 생식세포를 단리하고, 이것을 LIF, bFGF 및 SCF의 존재 하에 배양함으로써 유도할 수 있다. 또한, mGS 세포는 W02005/100548에 기재된 방법에 준하여, 정소 세포로부터 제작할 수 있다.
- [0053] 본 발명에서 사용되는 다능성 줄기세포는, 바람직하게는 배아 줄기세포 또는 유도 다능성 줄기세포이며, 보다 바람직하게는 유도 다능성 줄기세포이다.
- [0054] 본 발명에서는, 통상, 포유동물 유래의 다능성 줄기세포가 사용된다. 포유동물로서는, 예를 들어, 마우스, 래트, 햄스터, 기니피그 등의 설치류, 토끼 등의 토끼목, 돼지, 소, 염소, 말, 양 등의 유제목, 개, 고양이 등의 고양이목, 인간, 원숭이, 붉은털 원숭이, 마모셋, 오랑우탄, 침팬지 등의 영장류 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 본 발명에서는, 바람직하게는 마우스 등의 설치류 또는 인간 등 영장류 유래의 다능성 줄기세포, 보다 바람직하게는, 인간 유래의 다능성 줄기세포가 사용된다.
- [0055] 본 발명에서는, 가장 바람직하게는, 인간 유도 다능성 줄기세포가 사용된다.
- [0056] (3) 다능성 줄기세포 배양용 배지
- [0057] 본 발명의 일 실시형태로서, 본 발명은, 고농도의 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 함유하는, 다능성 줄기세포 배양용 배지(본 명세서 중, 본 발명의 배지라고도 함)를 제공한다. 본 발명의 배지를 사용함으로써, 다능성 줄기세포를 효율적으로 증식시키는 것이 가능해진다. 특히, 본 발명의 배지는, 미분화 상태를 유지하면서,

다능성 줄기세포를 증식하고 유지하는 데에 유용하다.

- [0058] 본 발명의 배지는, 고농도의 L-트리토판 또는 L-트리토판 유도체를 포함하는 것을 특징으로 한다. 「고농도」란, 인간 혈액 중의 유리 L-트리토판 농도 상당의 L-트리토판 농도(44 μM)를 상회하는 것을 의미한다. 인간 혈액 중의 유리 L-트리토판 농도 상당의 L-트리토판을 함유하는 통상의 배지를 사용하여 다능성 줄기세포의 배양을 행하면, 배지 중의 L-트리토판의 초기 고갈에 의해, 다능성 줄기세포의 증식이 제한되어 버린다. 본 발명의 배지는, 고농도의 L-트리토판 또는 L-트리토판 유도체를 함유하므로, 다능성 줄기세포 배양시에 L-트리토판의 고갈이 발생하기 어렵고, 다능성 줄기세포의 높은 증식률, 및 장기간에 걸친 다능성 줄기세포의 증식을 달성할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 배지 중의 L-트리토판 또는 L-트리토판 유도체의 농도는, 다능성 줄기세포의 증식 촉진을 달성할 수 있는 한 특별히 한정되지 않지만, 예를 들어, 본 발명의 배지 중의 L-트리토판 농도는 176 μM 이상, 바람직하게는 352 μM 이상, 더욱 바람직하게는 704 μM 이상이다. 본 발명의 배지 중의 L-트리토판 또는 L-트리토판 유도체 농도의 상한값은, 이론적으로는 L-트리토판 또는 L-트리토판 유도체의 포화 농도이지만, 배지에 대한 L-트리토판 또는 L-트리토판 유도체의 용해성이나 비용 관점에서, 배지 중의 L-트리토판 또는 L-트리토판 유도체 농도는, 바람직하게는 1,408 μM 이하이다.
- [0060] 본 발명의 배지는, 다능성 줄기세포의 증식을 촉진시키는 효과를 갖는다. 「다능성 줄기세포의 증식을 촉진시킨다」란, 본 발명의 배지 중에서 배양했을 때에, L-트리토판 농도가 인간 혈액 중의 유리 L-트리토판 농도 상당(44 μM)인 것 이외에는 본 발명의 배지와 동일한 조성을 갖는 컨트롤 배지 중에서 배양했을 때와 비교하여, 다능성 줄기세포의 증식이 촉진되어 있는 것을 의미한다.
- [0061] 본 발명의 배지에 포함되는, L-트리토판 또는 L-트리토판 유도체 이외의 성분에 대해서는, 다능성 줄기세포의 증식 촉진 효과를 달성할 수 있는 한 특별히 한정되지 않고, 통상의 다능성 줄기세포의 유지 배양에 사용되는 조성을 적절히 채용할 수 있다.
- [0062] 본 발명의 배지는, 다능성 줄기세포의 유지 배양이 가능한 배지에 L-트리토판 또는 L-트리토판 유도체를, 상기 농도가 되도록 첨가함으로써 제작할 수 있다. 배지의 제작에는, 1종류의 L-트리토판 또는 L-트리토판 유도체를 사용해도 좋고, 복수 종류의 L-트리토판 및/또는 L-트리토판 유도체를 조합하여 사용해도 좋다.
- [0063] 본 발명의 배지는, 포유동물 세포의 배양에 통상 사용되는 배지를 기초 배지로 하여 조제해도 좋다. 기초 배지로서는, 다능성 줄기세포의 증식 촉진 등의 원하는 효과를 달성할 수 있는 한 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면, BME 배지, BGJb 배지, CMRL 1066 배지, Glasgow MEM 배지, Improved MEM Zinc Option 배지, IMDM 배지, Medium 199 배지, Eagle MEM 배지, αMEM 배지, DMEM 배지, F-12 배지, DMEM/F12 배지, IMDM/F12 배지, 햄 배지, RPMI 1640 배지, Fischer's 배지, 또는 이들의 혼합 배지 등, 동물 세포의 배양에 사용할 수 있는 배지를 들 수 있다. 또한, 다능성 줄기세포 배양용으로서 통상 사용되는 배지를 기초 배지로 하여 조제해도 좋다. 시판의 줄기세포 배양용 기초 배지로서는, StemFit(등록상표) AK 배지(아지노모토 카부시기가이샤), Essential 8 배지(Life Technologies사), mTeSR1 배지(STEMCELL Technologies사), TeSR2 배지(STEMCELL Technologies사), RHB 배지(StemCells, Inc.사), TeSR™-E6(STEMCELL Technologies사), hESF-GRO 배지(니프로 카부시기가이샤), HESF-DIF 배지(니프로 카부시기가이샤), CSTI-7(카부시기가이샤 사이호우 카가쿠 켄큐쇼), Essential 6배지(Life Technologies사) 등을 들 수 있다.
- [0064] 본 발명의 배지는, 화학적으로 미결정된 성분의 혼입을 회피하는 관점에서, 바람직하게는, 함유 성분이 화학적으로 결정된 배지(Chemically defined medium; CDM)이다. 본 발명의 배지는, 화학적으로 미결정된 성분의 혼입을 회피하는 관점에서, 무혈청 배지인 것이 바람직하다. 본 발명에서의 「무혈청 배지」란, 무조정 또는 미정제된 혈청을 포함하지 않는 배지를 의미한다. 본 발명에서는, 정제된 혈액 유래 성분이나 동물 조직 유래 성분(예를 들어, bFGF 등의 증식 인자)을 포함하는 배지도, 무조정 또는 미정제된 혈청을 포함하지 않는 한 무혈청 배지에 포함된다.
- [0065] 무혈청 배지는, 혈청 대체물을 함유하고 있어도 좋다. 혈청 대체물로서는, 예를 들어, 혈청 알부민, 트랜스페린, 지방산, 콜라겐 전구체, 미량 원소, 2-머캅토에탄올 또는 3' 티올글리세롤, 또는 이들의 균등물 등을 적절히 함유하는 것을 들 수 있다. 이러한 혈청 대체물은, 예를 들면, W098/30679에 기재된 방법에 의해 조제할 수 있다. 혈청 대체물로서는 시판품을 이용해도 좋다. 이러한 시판 혈청 대체물로서는, 예를 들어, Knockout™ Serum Replacement(Life Technologies사: 이하, KSR로 표기하는 경우도 있음), Chemically-defined Lipid concentrated(Life Technologies사), Glutamax™(Life Technologies사), B27(Life Technologies사), N2(Life

Technologies사) 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다.

- [0066] 통상, 본 발명의 배지는, L-트립토판에 더하여, L-트립토판 이외의 모든 필수 아미노산(L-류신, L-라이신, L-페닐알라닌, L-이소류신, L-트레오닌, L-히스티딘, L-메티오닌, 및 L-발린)을 포함한다.
- [0067] 본 발명의 배지는, 바람직하게는, 모든 비필수 아미노산(L-알라닌, L-아르기닌, L-아스파라긴, L-아스파라긴산, 글리신, L-글루타민, L-글루타민산, L-시스테인, L-세린, L-티로신, L-프롤린)을 포함한다. 여기서, L-글루타민 대신에, L-알라닌-L-글루타민을 사용해도 좋다.
- [0068] 본 발명의 배지는, 상기 20종의 아미노산에 더하여, L-시스틴 등의 천연 아미노산을 포함하고 있어도 좋다.
- [0069] 본 발명의 배지는, 추가로 배지 첨가물을 함유해도 좋다. 배지 첨가물로서는, Y-27632 등의 ROCK(Rho-associated coiled-coil forming kinase/Rho 결합 키나아제) 저해제, 페니실린-스트렙토마이신 등의 항생물질, 비타민류, L-아스코르브산, 인산L-아스코르빌마그네슘, 피루브산나트륨, 2-아미노에탄올, 글루코스, 탄산수소나트륨, HEPES, 인슐린, 프로게스테론, 셀렌산나트륨, 푸트레신 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 첨가물은 자체 공지의 농도 범위 내에서 포함되는 것이 바람직하다.
- [0070] 본 발명의 배지는, 지방산을 포함해도 좋다. 본 발명의 배지에 포함되는 지방산으로서, 올레산, 리놀레산, α-리놀렌산, γ-리놀렌산, 팔미트산, 스테아르산, 아라키돈산, 이코사펜타엔산, 도코사헥사엔산, 부티르산, 아세트산, 팔미톨레산, 길초산(발레르산), 카프로산, 에난트산(헵틸산), 카프릴산, 펠라르곤산, 카프르산, 라우르산, 미리스트산, 펜타데실산, 마르가르산, 쿠센산, 엘레오스테아르산, 아라키드산, 8,11-에이코사디엔산, 5,8,11-에이코사트리엔산, 베헨산, 리그노세린산, 네르본산, 세로틴산, 몬탄산, 펠리산 등을 들 수 있지만, 이들에 한정되지 않는다. 본 발명의 배지에 포함되는 지방산은 포화 지방산이라도 좋고, 불포화 지방산이라도 좋다.
- [0071] 본 발명의 배지는 이의 사용 목적에 따라서, 공지의 세포 배양에 사용되는 조성을 적절히 채용할 수 있다. 예를 들어, 다능성 줄기세포의 미분화성을 유지시킨 채 증식시키는 것을 목적으로 하는 경우, 본 발명의 배지는, 다능성 줄기세포의 분화를 촉진시키는 효과를 갖는 물질을 포함하지 않는 것이 바람직하고, 다능성 줄기세포의 분화를 억제하는 효과를 갖는 물질을 포함하는 것이 바람직하다. 다능성 줄기세포의 분화를 억제하는 효과를 갖는 물질로서는, 예를 들어, 인간 다능성 줄기세포에 대해서는, FGF2 등을, 마우스 다능성 줄기세포에 대해서는, 백혈병 저지 인자(LIF) 등을 들 수 있다.
- [0072] 보다 구체적으로는, 다능성 줄기세포의 미분화성을 유지시킨 채 증식 촉진시키기 위한 배지로서는, DMEM/F-12 배지에 L-아스코르브산, 셀렌, 트랜스페린, NaHCO₃, 인슐린, FGF2 및 TGFβ1을 첨가한 배지(Chen G et al., Nat Methods. 2011 May; 8(5): 424-429), DMEM/F-12 배지에 비필수 아미노산, L-글루타민, β-머캅토에탄올, 인슐린, 트랜스페린, 콜레스테롤, 혈청 알부민, 피페롤산, 염화리튬, FGF2 및 TGFβ1을 첨가한 배지(Ludwig TE et al., Nat Methods. 2006 Aug; 3(8): 637-46), 백혈병 억제 인자, 폴리비닐알코올, L-글루타민, 인슐린, 트랜스페린, 셀레늄, 2-머캅토에탄올 및 항생물질을 첨가한 마우스 배아 줄기세포 유지용 혈청 배지(일본 공개특허공보 특개 2007-228815호), 파백신, bFGF, PDGF, EGF 및 비타민 C를 혼합하여 이루어진 무혈청 배지(일본 공개특허공보 특개 2008-148643호), TGF-β를 함유하는 것을 특징으로 하는 간엽계 줄기세포의 다분화능 유지용 배지(일본 공개특허공보 특개 2010-094062호) 등을 들 수 있고, 이러한 조성을 참고로 본 발명의 배지를 조제할 수 있다.
- [0073] 예를 들어, 본 발명의 배지는, L-아스코르브산, 셀렌, 트랜스페린, 인슐린, FGF2 및 TGFβ1을 포함한 기초 배지에, 종농도(終濃度) 176 μM 이상이 되도록 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 첨가하여 조제할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0074] 본 발명의 배지의 pH는, 약 6.0 내지 8.5인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 약 7.0 내지 7.5로 조정된다. 배지는, 멤브레인 필터 등을 사용한 여과 멸균 등의 멸균 처리를 행하는 것이 바람직하다.
- [0075] 본 발명의 배지는, 접착 배양, 부유 배양, 포매 배양, 조직 배양 등의 어느 배양 방법에도 사용할 수 있다.
- [0076] 또한, 본 발명의 배지의 형태는, 본 발명의 원하는 효과가 얻어지는 한 특별히 한정되지 않고, 예를 들면, 액체 배지, 반유동 배지, 및 고형 배지 형태로서 조제할 수 있다. 또한, 본 발명의 배지를, 분말상 형태로 조제해도 좋다. 분말상 형태로 조제함으로써, 수송이나 보존이 매우 용이해질 수 있다. 또한, 사용시에 멸균수 및/또는 한천 등을 첨가함으로써, 용이하게 액체상, 반액체상 또는 고체상 배지를 조제할 수 있다.
- [0077] (4) 다능성 줄기세포의 배양 방법 1

- [0078] 본 발명은, 상기 본 발명의 배지 중에서 다능성 줄기세포를 배양하는 것을 포함하는, 다능성 줄기세포의 배양 방법(본 명세서 중, 본 발명의 방법 1이라고도 함)을 제공한다.
- [0079] 본 발명의 배지를 사용함으로써, 다능성 줄기세포를 효율적으로 증식시키는 것이 가능해진다. 특히, 본 발명의 배지는, 미분화 상태를 유지하면서, 다능성 줄기세포를 증식하고 유지하는데에 유용하다. 따라서, 본 발명의 방법 1은, 바람직하게는 다능성 줄기세포를 증식하기 위한 방법이며, 보다 바람직하게는, 미분화 상태를 유지하면서, 다능성 줄기세포를 증식 또는 유지하기 위한 방법이다.
- [0080] 본 발명의 방법 1에서의, 배지 중의 다능성 줄기세포의 농도는, 원하는 효과를 갖는 한 특별히 제한되지 않지만, 통상 10^0 내지 10^7 개/cm², 바람직하게는, 10^1 내지 10^6 개/cm², 보다 바람직하게는 10^2 내지 10^5 개/cm²이다.
- [0081] 다능성 줄기세포의 배양은, 미리 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체 농도를 원하는 농도로 조정한 상기 본 발명의 배지 중에, 다능성 줄기세포를 파종함으로써 행해도 좋고, 세포 배양 개시 후에, 배지 중에 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 첨가하여, L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체 농도를 본 발명의 배지가 요하는 농도로 조정 후, 추가로 배양을 계속함으로써 행해도 좋다.
- [0082] 세포 배양 개시 후에 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 첨가하는 경우, 하기에 상술하는 본 발명의 배지 첨가물을 사용해도 좋다.
- [0083] 본 발명의 방법 1에서의 배양 조건은, 본 발명의 배지가 사용되는 것을 제외하고는, 다능성 줄기세포의 증식 촉진 등의 원하는 효과를 달성할 수 있는 한 특별히 한정되지 않고, 배양의 목적에 따라서 통상의 다능성 줄기세포의 배양에 사용되는 배양 조건을 적절하게 채용할 수 있다.
- [0084] 예를 들어, 다능성 줄기세포의 미분화성을 유지시킨 채 배양하는 방법으로서, 실험 의학 별책 목적별로 선택하는 세포 배양 프로토콜(요우도샤) 등에 기재된 방법을 들 수 있다. 다능성 줄기세포의 배양은 마우스 태자(胎仔) 섬유아세포(MEF)나 마우스 섬유 아세포주(STO) 등의 피더 세포를 사용해도 좋고, 피더 프리 환경 하에서 행해도 좋다.
- [0085] 본 발명의 방법 1에서, 세포 배양에 사용되는 배양기는, 세포 배양이 가능한 것이면 특별히 한정되지 않지만, 플라스크, 조직배양용 플라스크, 디쉬, 페트리 디쉬, 조직배양용 디쉬, 멀티 디쉬, 마이크로플레이트, 마이크로웰플레이트, 멀티플레이트, 멀티웰플레이트, 마이크로슬라이드, 챔버슬라이드, 샬레, 튜브, 트레이, 배양백, 및 롤러보틀 등을 들 수 있다.
- [0086] 세포 배양에 사용되는 배양기는, 세포 접착성이라도 세포 비접착성이라도 좋고, 목적에 따라서 적절하게 선택된다.
- [0087] 세포 접착성 배양기는, 배양기의 표면의 세포와의 접착성을 향상시킬 목적으로, 세포의 매트릭스(ECM) 등의 임의의 세포 지지용 기질 또는 이들의 기능을 모방하는 인공물로 코팅된 것일 수 있다. 세포 지지용 기질은, 줄기세포 또는 피더 세포(사용되는 경우)의 접착을 목적으로 하는 임의의 물질일 수 있다.
- [0088] 기타 배양 조건은, 적절히 설정할 수 있다. 예를 들면, 배양 온도는, 세포의 증식 촉진 등의 원하는 효과를 달성할 수 있는 한 특별히 한정되지 않지만, 약 30 내지 40℃, 바람직하게는 약 37℃이다. CO₂ 농도는, 약 1 내지 10%, 바람직하게는 약 2 내지 5%이다. 산소 농도는, 통상 1 내지 40%이지만, 배양 조건 등에 따라 적절히 선택된다.
- [0089] 본 발명의 방법 1에 있어서, 다능성 줄기세포는, 접촉 배양, 부유 배양, 조직 배양 등의 자체 공지의 방법으로 배양 가능하다.
- [0090] 세포의 증식 촉진 등의 원하는 효과를 달성할 수 있는 한 특별히 제한되는 것은 아니지만, 본 발명의 방법 1에서의 다능성 줄기세포를 배양하는 기간은, 통상 2일간 이상, 바람직하게는 4일간 이상, 보다 바람직하게는 7일간 이상이며, 이론적으로는 무한으로 배양을 계속할 수 있다. 본 발명의 배지 중에서 배양한 다능성 줄기세포를 회수하여, 이의 일부 또는 전부를 신선한 본 발명의 배지 중에 계대하고, 이어서 배양을 계속함으로써, 장기간에 걸쳐 미분화 상태를 유지하면서, 다능성 줄기세포를 증식 또는 유지할 수 있다.
- [0091] (5) 다능성 줄기세포 배양 조제물
- [0092] 본 발명은, 상기 본 발명의 배지 및 다능성 줄기세포를 포함하는, 다능성 줄기세포 배양 조제물(본 발명의 배양 조제물)을 제공한다.

- [0093] 본 발명의 배양 조제물에서의 다능성 줄기세포는, 생존하여 증식하고 있는 세포이다.
- [0094] 본 발명의 배양 조제물에서의 다능성 줄기세포는, 바람직하게는 단리되어 있다. 「단리」란, 목적으로 하는 성분이나 세포 이외의 요인을 제거하는 조작이 이루어져, 천연으로 존재하는 상태를 벗어나 있는 것을 의미한다. 「단리된 다능성 줄기세포」의 순도(전체 세포수에서 차지하는 다능성 줄기세포의 수의 백분율)는, 통상 70% 이상, 바람직하게는 80% 이상, 보다 바람직하게는 90% 이상, 더욱 바람직하게는 99% 이상, 가장 바람직하게는 100%이다.
- [0095] 본 발명의 배양 조제물에 있어서, 다능성 줄기세포는, 예를 들어, 액체상, 또는 반유동상의 본 발명의 배지 중에 존재한다. 일 양태에서, 본 발명의 배양 조제물은, 다능성 줄기세포의, 본 발명의 배지 중의 현탁액이다. 본 발명의 배양 조제물은, 적절한 용기 중에 봉입되어 있어도 좋다.
- [0096] 본 발명의 배양 조제물은, 상기 본 발명의 방법 1의 실시예에 유용하다.
- [0097] (6) 다능성 줄기세포의 배양 방법 2
- [0098] 이하의 공정을 포함하는, 다능성 줄기세포의 배양 방법(본 발명의 배양 방법 2):
- [0099] (1) L-트리פט판 또는 L-트리프트판 유도체를 포함하는 배지 중에서, 다능성 줄기세포를 배양하는 것;
- [0100] (2) 얻어진 다능성 줄기세포 배양물에, L-트리프트판 또는 L-트리프트판 유도체를 첨가하여, (1)에서 소비된 배지 중의 L-트리프트판 또는 L-트리프트판 유도체의 일부 또는 전부를 보충하는 것; 및
- [0101] (3) L-트리프트판 또는 L-트리프트판 유도체가 첨가된 다능성 줄기세포 배양물을 계속해서 배양하는 것.
- [0102] 본 발명의 배지를 공정 (1)에서 사용해도 좋다. 그러나, 공정 (1)에서 사용되는 배지 중의 L-트리프트판 또는 L-트리프트판 유도체 농도는, 다능성 줄기세포를 증식시키는 것이 가능한 농도(바람직하게는, 미분화 상태를 유지하면서, 다능성 줄기세포를 증식하고 유지하는 것이 가능한 농도)이면 충분하며, 본 발명의 배지와 같은 「고농도」인 것을 요하지 않는다. 공정 (1)에서 사용되는 배지 중의 L-트리프트판 또는 L-트리프트판 유도체 농도는, 예를 들면, 배양 개시 시점에서 10 μM 이상, 바람직하게는 15 μM 이상, 보다 바람직하게는 44 μM 이상이다.
- [0103] 공정 (1)에서 사용되는 배지의 조성은, L-트리프트판 또는 L-트리프트판 유도체 농도가 「고농도」인 것을 요하지 않는 점을 제외하고, 본 발명의 배지와 동일하다.
- [0104] 공정 (1)에서의 배양 조건은, 배지 중의 L-트리프트판 또는 L-트리프트판 유도체 농도가 「고농도」인 것을 요하지 않는 점을 제외하고, 상기 본 발명의 방법 1과 동일하다.
- [0105] 공정 (1)의 배양의 결과, 다능성 줄기세포는 증식하고(바람직하게는, 미분화 상태를 유지한 채로 증식하고), 이에 따라, 배지 중의 L-트리프트판 또는 L-트리프트판 유도체가 소비되어, 이의 배지 중의 농도가 저하된다.
- [0106] 공정 (2)에 있어서, 공정 (1)에서 얻어진 다능성 줄기세포 배양물에 L-트리프트판 또는 L-트리프트판 유도체를 첨가하는 타이밍은, 다능성 줄기세포의 증식 촉진 등의 원하는 효과를 달성할 수 있는 한 특별히 제한되지 않고, 임의의 타이밍에 첨가할 수 있다. 예를 들어, 공정 (1)에 있어서, 배지 중의 L-트리프트판 또는 L-트리프트판 유도체 농도가, 10 μM 미만, 바람직하게는 15 μM 미만, 보다 바람직하게는 44 μM 미만으로까지 감소한 단계에서 L-트리프트판 또는 L-트리프트판 유도체를 첨가한다. 또는, 공정 (1)에 있어서, 배지 중의 L-트리프트판 또는 L-트리프트판 유도체 농도가, 배양 개시시를 100%로 하여, 50% 이하, 바람직하게는 25% 이하로까지 감소한 단계에서 L-트리프트판 또는 L-트리프트판 유도체를 첨가한다. 예를 들어, 공정 (1)의 배양 개시로부터, 2 내지 5일 후에, 바람직하게는 3 내지 5일 후에, 보다 바람직하게는 4 내지 5일 후에 L-트리프트판 또는 L-트리프트판 유도체를 첨가할 수 있다.
- [0107] 배지에 첨가하는 L-트리프트판 및/또는 L-트리프트판 유도체는, 1종류의 L-트리프트판 또는 L-트리프트판 유도체를 사용해도 좋고, 복수 종류의 L-트리프트판 및/또는 L-트리프트판 유도체를 조합하여 사용해도 좋다.
- [0108] 배지에 첨가되는 L-트리프트판 또는 L-트리프트판 유도체의 양은, 다능성 줄기세포의 증식 촉진 등의 원하는 효과를 달성할 수 있는 한 특별히 한정되지 않지만, 배지 중의 L-트리프트판 또는 L-트리프트판 유도체의 농도가, 다능성 줄기세포를 증식시키는 것이 가능한 농도(바람직하게는, 미분화 상태를 유지하면서, 다능성 줄기세포를 증식하고, 유지하는 것이 가능한 농도)가 되도록 첨가한다. 예를 들어, 배지 중의 L-트리프트판 또는 L-트리프트판 유도체 농도가, 176 μM 이상, 바람직하게는 352 μM 이상이 되도록 첨가를 행한다. 배지 중의 L-트리프트판 또는 L-트리프트판 유도체 농도가, 본 발명의 배지와 같은 「고농도」가 되도록 첨가를 행해도 좋다. 일 양태에서, 배지

중의 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체 농도가, 176 μM 이상, 바람직하게는 352 μM 이상, 더욱 바람직하게는 704 μM 이상이 되도록 첨가를 행한다. 첨가 후의 배지 중의 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체 농도의 상한값은, 이론적으로는 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체의 포화 농도이지만, 배지에 대한 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체의 용해성이나 비용 관점에서, 배지 중의 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체 농도는, 바람직하게는 1,408 μM 이하이다.

- [0109] 또한, 본 명세서에서의 「(1)에서 소비된 배지 중의 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체의 일부 또는 전부를 보충하는 것」에는, 공정 (1)에서 배양 당초에 첨가되어 있었던 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체의 양의 일부 또는 전량을 보충하는 것에 더하여, 배양 당초에 첨가되어 있었던 양 이상의 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 배지에 첨가하는 것도 포함된다.
- [0110] 여기에서, 본 발명의 방법 2의 특징은, 다능성 줄기세포의 배양에 있어서, 배지 중에 함유된 아미노산 중, 가장 빨리 소비되어 고갈되는 L-트립토판의 일부 또는 전부를, 외부로부터의 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체의 첨가에 의해 보충하는 점에 있으므로, L-트립토판 이외의 아미노산에 대해서는, L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체와 함께 첨가해도 좋고, 첨가하지 않아도 좋다.
- [0111] 일 양태에서, 공정 (2)에 있어서는, 아미노산으로서는, L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체만을 첨가하고, 다른 아미노산은 첨가하지 않는다.
- [0112] 다른 양태에서, 공정 (2)에 있어서, L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체와 함께, L-트립토판 이외의 아미노산 (L-류신, L-라이신, L-페닐알라닌, L-이소류신, L-트레오닌, L-히스티딘, L-메티오닌, L-발린, L-알라닌, L-아르기닌, L-아스파라긴, L-아스파라긴산, 글리신, L-글루타민, L-글루타민산, L-시스테인, L-세린, L-티로신, L-프롤린) 또는 이의 유도체를 첨가해도 좋고, 첨가하지 않아도 좋다. 첨가하는 아미노산은, 1종류라도 좋고, 복수 종류라도 좋다.
- [0113] 그리고, 공정 (3)에 있어서, L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체가 첨가된 다능성 줄기세포 배양물을 계속해서 배양한다. 공정 (3)에서의 배양 조건은, 공정 (1)과 동일해도 좋고, 본 발명의 원하는 효과가 얻어지는 한, 변경되어도 좋다. 본 발명의 바람직한 일 양태에서, 공정 (3)에서의 배양 조건은, 공정 (1)과 동일하다. L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체의 첨가에 의해 L-트립토판의 고갈이 회피되므로, 다능성 줄기세포는, 계속해서 (바람직하게는, 미분화 상태를 유지하면서) 증식을 계속할 수 있다.
- [0114] 본 발명의 방법 2에서는, 배지 전체 교환을 요하지 않고, 아미노산으로서 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체만의, 또는 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 포함하는 일부의 아미노산만의 첨가에 의해, 다능성 줄기세포의 증식을 유지할 수 있으므로, 저비용 및 효율적으로, 다능성 줄기세포를 증식시킬 수 있다.
- [0115] (7) 배지 첨가제
- [0116] 본 발명은, L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 포함하는 배지 첨가제(본 명세서 중, 본 발명의 배지 첨가제라고도 함)를 제공한다. 본 발명의 배지 첨가제는, 상기 본 발명의 방법 1 또는 2에서 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 첨가할 때에 사용할 수 있다.
- [0117] 본 발명의 배지 첨가제에 포함되는 L-트립토판 및/또는 L-트립토판 유도체는, 1종류의 L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체를 사용해도 좋고, 복수 종류의 L-트립토판 및/또는 L-트립토판 유도체를 조합하여 사용해도 좋다.
- [0118] 본 발명의 배지 첨가제를, 다능성 줄기세포 배양용 배지에 첨가함으로써, 다능성 줄기세포의 증식을 촉진시키는 효과를 갖는다. 본 발명의 배지 첨가제는, 바람직하게는 다능성 줄기세포 증식 촉진용이다.
- [0119] 본 발명의 배지 첨가제는, 원하는 효과를 해치지 않는 한, L-트립토판 및/또는 L-트립토판 유도체에 더하여, 사용 목적에 따라서, 혈청 대체물, 배지 첨가물, 지방산을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 혈청 대체물, 배지 첨가물, 지방산은 상기에 기재된 바와 같고, 각각 자체 공지의 농도 범위 내에서 포함되는 것이 바람직하다. 본 발명의 배지 첨가제는, 원하는 효과를 해치지 않는 한, L-트립토판 및/또는 L-트립토판 유도체에 더하여, 종래부터 세포의 배양에 사용되어 온 첨가제 등을 적절히 포함할 수 있다.
- [0120] 일 양태에서, 본 발명의 배지 첨가제는, 아미노산으로서는, L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체만을 함유하고, 다른 아미노산은 함유하지 않는다.
- [0121] 일 양태에서, 본 발명의 배지 첨가제는, L-트립토판 또는 L-트립토판 유도체에 더하여, L-글루타민, L-아르기닌, L-시스테인, L-아스파라긴산, L-세린 및 L-메티오닌으로 이루어지는 그룹으로부터 선택되는 1, 2,

3, 4, 5 또는 6종의 아미노산을 함유한다. 이 경우, 본 발명의 배지 첨가제에 함유되는 아미노산으로서 상기된 아미노산 이외의 아미노산에 대해서는, 본 발명의 배지 첨가제에 포함되어 있어도 좋고, 포함되어 있지 않아도 좋다.

[0122] 본 발명의 배지 첨가제는, 원하는 효과를 해치지 않는 한, L-트립토판 및/또는 L-트립토판 유도체에 더하여, 추가로, 임의의 첨가제, 예를 들면, 안정화제 등장화제, pH 조절제 등을 적당량 함유하고 있어도 좋다.

[0123] 본 발명의 배지 첨가제는, 원하는 효과가 얻어지는 한, 어떠한 제형이라도 좋고, 예를 들면, 용액, 고형, 분말상 등을 들 수 있다. 고형 또는 분말상인 경우에는, 적절한 완충액 등을 사용하여 원하는 농도가 되도록 용해하여 사용할 수 있다.

[0124] 배지 첨가제가 용액인 경우, 상기 용액의 pH는, 약 5.0 내지 8.5인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 약 6.0 내지 약 8.0으로 조정된다. 배지 첨가제가 용액인 경우, 상기 용액은, 바람직하게는, 멤브레인 필터 등을 사용한 여과 멸균 등의 멸균 처리를 행한다.

[0125] 이하에 참고예 및 실시예를 나타내어, 본 발명을 보다 상세하게 설명하지만, 이들은 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0126] (참고예)

[0127] 배지 중의 각 아미노산양을 미리 정량한 배지를 사용하여, 다능성 줄기세포 201B7주(iPS 아카데미아 재팬사)를 5일간 배양하여, 배지 중의 각 아미노산 양을 측정했다. 다능성 줄기세포의 배양은, 메트리겔(354277, 코닝사)을 코팅한 100mm 조직 배양용 디쉬(353003 니혼 백톤 디킨슨사) 중에, 1,000,000개의 세포를 파종하여, 5% CO₂/37°C에서 배양했다. 또한, 배지 중에 잔존하는 아미노산 양의 측정은, 이하의 방법으로 행했다. 아미노산의 정량 분석은, 신보 등(Anal Chem. 2009 Jul 1; 81(13): 5172-9. Multifunctional and highly sensitive precolumn reagents for amino acids in liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Shimbo K, Yahashi A, Hirayama K, Nakazawa M, Miyano H)에 보고되어 있는 LC-MS/MS 시스템으로 실시했다. 세포 배양 후 상청은 1.5mL 튜브에 넣어, 측정시까지 마이너스 80°C에서 보존했다. 샘플은 단백 제거 처리를 실시 후, APDS 시약으로 유도체화를 실시하여 분석 장치에 가했다. 각 샘플 중의 아미노산 농도는 검량선을 사용하여 산출했다. 그 결과, 배양 개시시에 44 μM의 농도로 포함되어 있었던 L-트립토판은 배양 4일째에 고갈됐다. 한편으로, 기타 아미노산은, 배양 5일 후라도 배지 중에 잔존하고 있으며, 가장 적은 것이라도 약 20% 정도의 잔존이 확인되었다. 따라서, 다능성 줄기세포의 배양에 있어서는, L-트립토판이 전체 아미노산 중에서 가장 빨리 고갈되는 것을 알 수 있었다.

[0128] **실시예**

[0129] 실시예 1: L-트립토판의 시판 배지 3종에서의 증식 촉진 효과

[0130] 우선, L-트립토판에 의한 유도 다능성 줄기세포(iPS 세포)의 증식 촉진 효과를 3종류의 시판 배지를 사용하여 평가했다. 인간 iPS 세포는, iPS 아카데미아 재팬사로부터 구입한 201B7주를 사용하여, 5% CO₂/37°C의 조건에서 행했다.

[0131] L-트립토판(시그마 알드리치사: T8941)은, Essential-8(라이프 테크놀로지스사: A1517001), mTeSR1(스텝 셀 테크놀로지스사: 05850), TeSR2(스텝 셀 테크놀로지스사: 05860)의 배지에 소정의 농도가 되도록 첨가하고, 배양에 사용함으로써 그 효과를 검토했다.

[0132] Essential-8, mTeSR1, TeSR2의 배지에 L-트립토판(시그마 알드리치사: T8941)을 최종 농도 44, 176, 352, 704, 1,408 μM가 되도록 첨가한 배지를 조제하여, L-트립토판의 증식 촉진 효과를 검토했다. 기저막 매트릭스로서 메트리겔(니혼 백톤 디킨슨사)을 코팅한 6웰 플레이트를 준비하여, 1웰당 13,000개의 세포를 싱글 셀로 파종했다. 세포를 파종한 다음날에 상기에서 조제한 배지를 사용하여 평가를 행했다. 배양 기간은 6일간으로 하고, L-트립토판 첨가시를 0으로 하여, 24, 48, 72, 96, 120시간 후에 IncuCyte를 사용하여 세포 회복율을 측정했다. 파종시에 사용하는 배지에는, 최종 농도 10 μM의 Y-27632를 첨가하고 있지 않은 배지에서 배양했다.

[0133] 각각의 배지마다 실험을 1연속으로 행한 결과를 도 1, 2, 3에 나타낸다. L-트립토판 농도 의존적으로 증식 촉진 효과를 나타내는 결과가 얻어졌다. 또한 미분화 마커(OCT, Nanog, 알칼리포스파타아제)의 발현은 고농도의 L-트립토판 첨가에 의한 영향은 보이지 않았다(데이터 표시되지 않음).

[0134] 실시예 2: L-트립토판의 증식 촉진 효과 - 다른 인간 유도 다능성 줄기세포주를 사용한 배양 결과

- [0135] 다음으로, L-트립토판에 의한 증식 촉진 효과를 인간 유도 다능성 줄기세포(iPS 세포)의 다른 주 253G4 및 인간 배아 줄기세포 H9주를 사용하여 평가했다. 배지는 mTeSR1(스템 셀 테크놀로지스사: 05850)을 사용하여, 5% CO₂/37°C의 조건에서 배양을 행했다.
- [0136] L-트립토판(시그마 알드리치사: T8941)은, mTeSR1(스템 셀 테크놀로지스사: 05850) 배지에 소정의 농도가 되도록 첨가하고, 배양에 사용함으로써 그 효과를 검토했다.
- [0137] mTeSR1의 배지에 L-트립토판(시그마 알드리치사: T8941)을 최종 농도 44, 176, 352, 704, 1,408 μM가 되도록 첨가한 배지를 조제하여, L-트립토판의 증식 촉진 효과를 검토했다. 기저막 매트릭스로서 메트리젤(니혼 백톤 디킨슨사)을 코팅한 6웰 플레이트를 준비하여, 1웰당 253G4는 40,000개, H9는 10,000개의 세포를 싱글 셀로 파종했다. 세포를 파종한 다음날에 상기에서 조제한 배지로 치환하여 평가를 행했다. 배양 기간은 6일간으로 하고, L-트립토판 첨가치를 0으로 하여, 24, 48, 72, 96, 120시간 후에 IncuCyte를 사용하여 세포 회복율을 측정했다. 파종시에 사용하는 배지에는, 최종 농도 10 μM의 Y-27632를 첨가하고 있지 않은 배지에서 배양했다.
- [0138] 각각의 세포마다 실험을 5연속으로 행한 결과를 도 4, 5에 나타낸다. L-트립토판의 농도 의존적 증식 촉진 효과는 다른 인간 다능성 줄기세포에서도 확인되었다.
- [0139] 실시예 3: L-트립토판의 증식 촉진 효과 - 인간 태아 신장 유래 세포주 HEK293T를 사용한 배양 결과
- [0140] 다음으로, L-트립토판에 의한 증식 촉진 효과를 인간 태아 신장 유래 세포주 HEK293T 세포로 평가했다. 배지는 소 태아 혈청을 10% 첨가한 DMEM 배지(서모 피셔 사이언티픽사: 11965)를 사용하여, 5% CO₂/37°C의 조건에서 배양을 행했다.
- [0141] L-트립토판(시그마 알드리치사: T8941)은, 10%의 소 태아 혈청을 첨가한 DMEM 배지(서모 피셔 사이언티픽사: 11965)에 소정의 농도가 되도록 첨가하고, 배양에 사용함으로써 그 효과를 검토했다.
- [0142] 소 태아 혈청을 10% 첨가한 DMEM 배지(서모 피셔 사이언티픽사: 11965)에 L-트립토판(시그마 알드리치사: T8941)을 최종 농도 44, 176, 352, 704, 1,408 μM가 되도록 첨가한 배지를 조제하여, L-트립토판의 증식 촉진 효과를 검토했다. 6웰 플레이트를 준비하여, 1웰당 10,000개의 세포를 싱글 셀로 파종했다. 세포를 파종한 다음날에 상기에서 조제한 배지로 치환하여 평가를 행했다. 배양 기간은 6일간으로 하고, L-트립토판 첨가치를 0으로 하여, 24, 48, 72, 96, 120시간 후에 IncuCyte를 사용하여 세포 회복율을 측정했다.
- [0143] 실험을 5연속으로 행한 결과를 도 6에 나타낸다. L-트립토판의 농도 의존적 증식 촉진 효과는 인간 태아 신장 유래 세포주 HEK293 세포에서는 확인되지 않았다.
- [0144] 실시예 4: L-키누레닌의 시판 배지에서의 증식 촉진 효과
- [0145] mTeSR1 배지에 L-키누레닌(시그마 알드리치사: K8625)을 최종 농도 50, 100, 200, 500, 1,000 μM가 되도록 첨가한 배지를 조제하여, 증식 촉진 효과를 검토했다. 파종시부터 2일간은 최종 농도 10 μM의 Y-27632를 첨가했다. 기저막 매트릭스로서 메트리젤(니혼 백톤 디킨슨사)을 코팅한 6웰 플레이트를 준비하여, 1웰당 20,000개의 세포를 싱글 셀로 파종했다. 세포를 파종한 다음날에 Y-27632를 포함하지 않는, 상기와 같이 조제한 배지를 사용하여 평가를 행했다. L-키누레닌 첨가치를 0으로 하여, 0, 24, 48, 72, 96, 120시간 후에 IncuCyte를 사용해서 세포 회복율을 측정했다. 결과를 도 7에 나타낸다. 도 7에 나타내는 바와 같이, L-키누레닌 50 내지 500 μM 첨가구에서 세포 증식 촉진 효과를 나타내는 결과가 얻어졌다.
- [0146] 실시예 5: 키누렌산의 시판 배지에서의 증식 촉진 효과
- [0147] mTeSR1 배지에 키누렌산(시그마 알드리치사: K3375)을 최종 농도 50, 100, 200, 500, 1,000 μM가 되도록 첨가한 배지를 조제하여, 증식 촉진 효과를 검토했다. 파종시부터 2일간은 최종 농도 10 μM의 Y-27632를 첨가했다. 기저막 매트릭스로서 메트리젤(니혼 백톤 디킨슨사)을 코팅한 6웰 플레이트를 준비하여, 1웰당 20,000개의 세포를 싱글 셀로 파종했다. 세포를 파종한 다음날에 Y-27632를 포함하지 않는, 상기와 같이 조제한 배지를 사용하여 평가를 행했다. 키누렌산 첨가치를 0으로 하여, 0, 24, 48, 72, 96, 120시간 후에 IncuCyte를 사용하여 세포 회복율을 측정했다. 결과를 도 8에 나타낸다. 도 8에 나타내는 바와 같이, 키누렌산 50 내지 500 μM 첨가구에서 세포 증식 촉진 효과를 나타내는 결과가 얻어졌다.

산업상 이용가능성

- [0148] 본 발명에 의하면, 다능성 줄기세포의 세포 증식을 촉진시키는 것이 가능해져, 다능성 줄기세포의 배양에 드는

인적 비용 및 금전적 비용을 삭감할 수 있다.

[0149]

본 출원은, 일본에서 출원된 특허출원 특원2017-063842호(출원일: 2017년 3월 28일)를 기초로 하고 있으며, 이의 내용은 본 명세서에 모두 포함되는 것이다.

도면

도면1

Effect of L-Trp on cell confluency (%) (Human iPS 201B7 1.3x10 ⁴ /well)							
Essential-8 medium		Time elapsed after L-Trp treatment (hours)					
		0	24	48	72	96	120
L-Trp concentration (micro M)	44	1.3	2.1	5.1	12.5	33.0	55.7
	176	1.4	2.3	6.1	15.5	40.1	65.5
	352	1.3	2.3	6.9	17.7	45.6	71.6
	704	1.5	2.8	9.2	24.4	59.7	83.7
	1408	1.6	3.4	12.0	33.0	75.5	92.7

도면2

Effect of L-Trp on cell confluency (%) (Human iPS 201B7 1.3x10 ⁴ /well)							
mTeSR1 medium		Time elapsed after L-Trp treatment (hours)					
		0	24	48	72	96	120
L-Trp concentration (micro M)	44	1.2	1.6	3.1	4.8	12.4	17.3
	176	1.3	1.9	3.9	6.9	17.1	21.8
	352	1.2	1.9	3.9	7.1	17.2	22.8
	704	1.4	2.3	5.2	10.6	25.9	33.9
	1408	1.5	2.8	6.6	15.8	42.0	55.3

도면3

Effect of L-Trp on cell confluency (%) (Human iPS 201B7 1.3x10 ⁴ /well)							
TeSR2 medium		Time elapsed after L-Trp treatment (hours)					
		0	24	48	72	96	120
L-Trp concentration (micro M)	44	1.1	1.3	2.1	2.8	7.2	13.0
	176	1.2	1.4	2.3	3.2	8.7	16.1
	352	1.2	1.5	2.5	3.9	10.2	19.1
	704	1.2	1.8	3.1	5.2	14.4	26.5
	1408	1.3	2.1	4.0	7.0	19.6	32.8

도면4

Effect of L-Trp on cell confluency (%) (Human iPS 253G4 4.0x10 ⁴ /well)							
mTeSR1 medium		Time elapsed after L-Trp treatment (hours)					
		0	24	48	72	96	120
L-Trp concentration (micro M)	44	5.5	5.1	6.6	7.4	18.9	28.7
	176	5.8	5.6	7.9	11.0	27.7	38.3
	352	5.6	5.5	7.7	11.3	29.3	40.3
	704	5.6	5.5	7.7	11.2	29.0	40.9
	1408	5.8	6.2	10.7	22.1	54.7	68.7

도면5

Effect of L-Trp on cell confluency (%) (Human ES H9 1.0x10 ⁴ /well)							
mTeSR1 medium		Time elapsed after L-Trp treatment (hours)					
		0	24	48	72	96	120
L-Trp concentration (micro M)	44	1.2	1.0	1.1	1.2	2.2	5.1
	176	1.2	1.1	1.3	1.5	2.6	6.1
	352	1.2	1.1	1.3	1.6	2.8	6.5
	704	1.2	1.3	1.7	2.1	3.9	9.0
	1408	1.3	1.4	2.0	2.7	5.1	11.3

도면6

Effect of L-Trp on cell confluency (%) (Human Embryonic Kidney HEK293T 1.0x10 ⁴ cells /well)							
DMEM+10% FBS medium		Time elapsed after L-Trp treatment (hours)					
		0	24	48	72	96	120
L-Trp concentration (micro M)	44	6.2	17.8	55.7	89.5	94.6	95.8
	176	6.0	18.2	57.2	90.5	96.6	97.4
	352	5.7	18.0	56.3	90.2	96.2	97.1
	704	5.9	18.7	55.4	89.0	96.2	97.2
	1408	6.2	20.2	52.9	86.9	97.7	98.4

도면7

Effect of L-Kynurenine on cell confluency (%) (Human iPS 201B7 2.0x10 ⁴ /well)							
mTeSR1 medium		Time elapsed after L-Kynurenine treatment (hours)					
		0	24	48	72	96	120
L-Kynurenine concentration (micro M)	0	4.1	3.9	6.1	11.0	33.3	54.2
	50	4.4	4.2	7.1	13.4	39.6	60.7
	100	4.1	3.9	6.5	11.8	36.5	59.4
	200	4.1	4.1	6.7	12.2	36.2	59.1
	500	4.3	4.3	7.2	13.1	37.6	64.6
	1000	4.1	4.0	6.4	9.6	23.1	41.4

도면8

Effect of Kynurenic acid on cell confluency (%) (Human iPS 201B7 2.0x10 ⁴ /well)							
mTeSR1 medium		Time elapsed after Kynurenic acid treatment (hours)					
		0	24	48	72	96	120
Kynurenic acid concentration (micro M)	0	4.7	3.9	4.6	4.7	12.3	23.2
	50	5.2	4.4	5.5	6.6	18.6	33.0
	100	5.0	4.2	5.1	5.8	15.3	28.3
	200	5.0	4.3	5.1	6.2	16.0	28.9
	500	5.3	4.5	5.7	6.9	18.7	34.1
	1000	5.0	4.3	4.4	3.6	6.9	10.5