



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0017710
(43) 공개일자 2018년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5044 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0101970
(22) 출원일자 2016년08월10일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
(주)아모레퍼시픽
서울특별시 용산구 한강대로 100(한강로2가)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경
희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
최현정
경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시
픽기술연구원
배일홍
경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시
픽기술연구원
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영철, 김 순 영

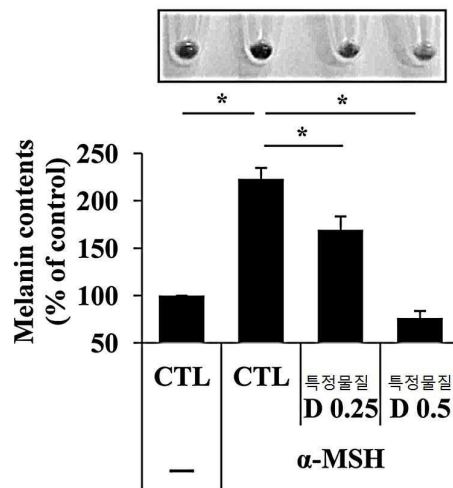
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 프라이머리 실리아를 조절하는 모발 흑화 물질 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 일측면에서, 멜라닌 형성 세포(melanocyte)의 일차 섬모(primary cilia)의 상대적 형성 정도를 확인하
는 단계를 포함하는, 모발 흑화 효능 물질, 또는 멜라닌 저하성 질환 예방 및 치료 효능 물질의 스크리닝 방법에
관한 것으로서, 본 발명의 일측면을 통하여 모발 흑화 물질, 멜라닌 저하성 질환 예방 및 치료 물질의 효과적인
스크리닝 및 발굴이 가능하며, 이를 통해 관련 산업의 비약적 발달을 도모할 수 있다.

대표도 - 도1c



(52) CPC특허분류

G01N 2500/10 (2013.01)
G01N 2800/50 (2013.01)
G01N 2800/7004 (2013.01)
G01N 2800/7042 (2013.01)

(72) 발명자

김형준

경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽
기술연구원

이영진

경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽
기술연구원

이태룡

경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽
기술연구원

조동형

경기도 용인시 기흥구 한보라2로 167, 903동 1403
호

신지현

강원도 춘천시 후석로 296, 401호

명세서

청구범위

청구항 1

멜라닌 형성 세포(melanocyte)에 시험 물질을 처리하는 단계;

상기 시험 물질을 처리한 멜라닌 형성 세포에서, 시험 물질 처리 전과 후의 일차 섬모(primary cilia)의 상대적 형성 정도를 확인하는 단계를 포함하는, 모발 흑화 효능 물질의 스크리닝 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 시험 물질 처리 후에 형성된 일차 섬모가 처리 전의 일차 섬모에 비해 적을 경우 상기 시험 물질을 모발 흑화 효능 물질로 판단하는 단계를 더 포함하는, 모발 흑화 효능 물질의 스크리닝 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 일차 섬모의 상대적 형성 정도는 일차 섬모가 발현된 멜라닌 형성 세포의 수의 비교 및 한 세포 내에 발현된 일차 섬모 양의 비교 중 하나 이상을 통하여 판정하는 것인, 모발 흑화 효능 물질의 스크리닝 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 일차 섬모의 상대적 형성 정도는 폴리글루타밀레이티드-튜불린 단백질(polyglutamylated-tubulin protein)의 발현 정도로 확인하는 것인, 모발 흑화 효능 물질의 스크리닝 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 일차 섬모의 상대적 형성 정도는 GLI(GLI family zinc finger) 전사인자의 발현 정도로 확인하는 것인, 모발 흑화 효능 물질의 스크리닝 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 GLI 전사인자는 GLI2(GLI family zinc finger 2) 전사인자인, 모발 흑화 효능 물질의 스크리닝 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 일차 섬모의 상대적 형성 정도는 티로시나제(tyrosinase) 또는 TRP1(Tyrosinase-related protein 1)의 발현 정도로 확인하는 것인, 모발 흑화 효능 물질의 스크리닝 방법.

청구항 8

멜라닌 형성 세포(melanocyte)에 시험 물질을 처리하는 단계;

상기 시험 물질을 처리한 멜라닌 형성 세포에서, 시험 물질 처리 전과 후의 일차 섬모(primary cilia)의 상대적 형성 정도를 확인하는 단계를 포함하는, 멜라닌 저하성 질환 예방 및 치료 효능 물질의 스크리닝 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 멜라닌 저하성 질환은 백화증, 백반증, 탈색소 모반, 백색 비강진, 어루러기, 염증후 탈색증, 반상 경피증, 부분 백피증, 특발성 적상 저색소증 및 점상 백피증으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인, 멜라닌 저하성 질환 예방 및 치료 효능 물질의 스크리닝 방법.

청구항 10

시험 물질 처리 전과 후의 일차 섬모의 상대적 형성 정도를 나타내는 측정부를 포함하는, 모발 흑화 효능 물질 스크리닝을 위한 키트.

청구항 11

제10항에 있어서, 멜라닌 형성 세포 및 지시서를 더 포함하고, 상기 지시서에는 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 방법이 기재되어 있는, 모발 흑화 효능 물질 스크리닝을 위한 키트.

청구항 12

시험 물질 처리 전과 후의 일차 섬모의 상대적 형성 정도를 나타내는 측정부를 포함하는, 멜라닌 저하성 질환 예방 및 치료 효능 물질 스크리닝을 위한 키트.

청구항 13

일차 섬모의 형성 정도를 확인하는 단계를 포함하는, 모발 상태 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 일차 섬모는 모낭 부위의 멜라닌 형성 세포의 일차 섬모인, 모발 상태 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 15

제13항에 있어서, 상기 모발 상태는 멜라닌과 관련된 모발 상태인, 모발 상태 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 16

제13항에 있어서, 일차 섬모 형성 정도의 확인은, 멜라닌을 형성시키는 특정 자극이 가해지기 전과 후의 일차 섬모의 형성 정도를 비교하는 것인, 모발 상태 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 모발 상태 진단은 멜라닌을 형성시키는 자극에 대하여 민감도가 높은 모발인지 여부를 판정하는 것인, 모발 상태 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 18

제16항에 있어서, 상기 자극은 외인성 자극 및 내인성 자극 중 하나 이상인 것인, 모발 상태 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 외인성 자극은 자외선, 중금속, 화학 물질, 미생물 감염, 및 스트레스에 의한 자극을 포함하는 것인, 모발 상태 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 상기 내인성 자극은 체내 산화적 스트레스 변화, 노화, 염증, 호르몬 변화, 간을 포함한 소화 기관 기능 이상, 유전자 이상, 대사기능 이상, 영양상태 이상, 비타민 및 무기질의 과부족을 포함하는 것인, 모발 상태 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 21

제13항에 있어서, 상기 일차 섬모의 형성 정도 확인은 특정한 두 시점에, 한 개체의 모낭 부위에서 일차 섬모의 형성 정도를 비교하는 것인, 모발 상태 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 모발 상태 진단은 멜라닌 침착이 증가 또는 감소하여 모발 흑화 또는 백화가 진행될 가능성이 있는 모발로 판정하는 것인, 모발 상태 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 23

제13항에 있어서, 상기 모발 상태 진단은 일차 섬모가 형성된 정도에 따라 모발의 흑화 또는 백화 가능성에 관한 등급을 판정하는 것인, 모발 상태 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 등급은 일정한 수의 개체에게서 구한 모낭 멜라닌 형성 세포 시료로부터 얻은 일차 섬모의 형성 정도에 관한 자료를 기초로 정한 기준값, 및 이를 근거로 구간을 나누어 정한 등급인, 모발 상태 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 25

일차 섬모의 형성 정도를 확인하는 단계를 포함하는, 멜라닌 저하성 질환 관련 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 진단은 멜라닌 생성이 감소하여 멜라닌 저하성 질환에 이환될 가능성이 있는 것으로 판정하는 것인, 멜라닌 저하성 질환 관련 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 27

제25항에 있어서, 상기 진단은 멜라닌 생성이 증가하는지 여부를 확인하여 멜라닌 저하성 질환에 이환된 개체의 예후를 판단하는 것인, 멜라닌 저하성 질환 관련 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 명세서는 일차 섬모(프라이머리 실리아, primary cilia)를 조절하는 모발 흑화 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것으로서, 구체적으로 세포의 소기관인 일차 섬모의 형성 정도를 확인하여 모발 흑화 효능을 발휘하는 물질을 스크리닝 하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 멜라닌(melanin)은 검은 색소와 단백질의 복합체 형태를 지니는 페놀류의 생체 고분자 물질로서, 사과, 감자, 바나나의 잘린 표면이 공기 중에 노출될 때 발생하는 갈변 또는 동물의 외피 깃털, 피부, 모발, 눈 등에서 관찰된다. 멜라닌이 과잉 생산되어 침착되는 경우 기미, 주근깨 등이 형성되고 모발 흑화 등과도 직결되며, 멜라닌으로 인해 피부 또는 모발 노화도 촉진되고 피부암도 유발될 수 있다.

[0003] 자외선, 염증, 호르몬 등에 의해서 멜라닌 형성 세포 자극 호르몬(melanocyte stimulating hormone, MSH)이 분비되고, MSH는 수용체와 반응하여 멜라닌 형성 세포 내에 cAMP를 향상시켜 멜라닌을 합성하며, 합성된 멜라닌은 멜라닌 형성 세포의 외부로 분비되어 자외선 등으로부터 피부 또는 모발을 보호하는 역할을 하게 된다. 멜라닌의 합성은 주로 α -MSH에 의해 조절되고, 멜라닌의 합성에 관여하는 단백질로는 MITF, TYR, TRP1, TRP2 등이 알려져 있다.

[0004] 모발에 있어서의 멜라닌은 모발의 색상을 결정하는 중요한 인자로서, 모낭에 존재하는 멜라닌 형성 세포 내에서 생성된 멜라닌은 모발피질세포 케라티노사이트에 전달된 후, 모발의 성장과 함께 위쪽으로 이동한다. 생리적 노화의 한 현상으로서 인식되는 모발 백화는 모발 멜라닌 형성 세포의 수적 감소 및 멜라닌 형성 세포의 기능저하 등에 의한 멜라닌 생성의 감소에 의해 유발된다. 현재 모발 백화의 해결방안으로 염색 기술이 사용되고 있으나, 염색은 일시적인 방법으로 백발의 성장에 의해 다시 염색하지 않으면 안되고, 모발 염색약의 염료 속에 포함되어 있는 성분이 자극성분이 되어 접촉성 피부염 또는 피부 알러지를 일으켜 문제시 되고 있다.

[0005] 또한, 멜라닌 생합성에 이상이 생기면 비정상적인 착색에 의해 피부의 비정상적 백화 등이 나타나는데, 이로 인해 백화증(백색증, albinism), 백반증 등의 질병이 발생하기도 한다.

[0006] 일차 섬모(primary cilia)는 세포체에서 돌출된 기관으로서, 다양한 외부자극을 감지하는 기관으로 알려져 있는데, 모발 흑화나 멜라닌과 관련된 질환과 일차 섬모 간의 관련성에 대해서는 아직 알려진 바가 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0007] (비특허문헌 0001) Jantje M. Gerdes et al., The Vertebrate Primary Cilium in Development, Homeostasis, and Disease(Volume 137, Issue 1, 3 April 2009, Pages 32-45, Cell)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 일측면에서, 세포의 일차 섬모(primary cilia)를 통해 모발 흑화 효능 물질 및 멜라닌 저하성 질환 치료용 물질을 효과적으로 스크리닝하는 새로운 방법, 모발 흑화 효능 물질 및 멜라닌 저하성 질환 치료 효능 물질을 스크리닝할 수 있는 키트, 및 일차 섬모를 이용하여 모발 상태나 멜라닌 저하성 질환 관련 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제안하기 위한 목적을 가진다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명은 일측면에서,
- [0010] 멜라닌 형성 세포(melanocyte)에 시험 물질을 처리하는 단계;
- [0011] 상기 시험 물질을 처리한 멜라닌 형성 세포에서, 시험 물질 처리 전과 후의 일차 섬모(primary cilia)의 상대적 형성 정도를 확인하는 단계를 포함하는, 모발 흑화 효능 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0012] 본 발명은 다른 측면에서, 상기 단계를 포함하는 멜라닌 저하성 질환 예방 및 치료 효능 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이기도 하다.
- [0013] 본 발명은 또 다른 측면에서, 시험 물질 처리 전과 후의 일차 섬모의 상대적 형성 정도를 나타내는 측정부를 포함하는, 모발 흑화 효능 물질 또는 멜라닌 저하성 질환 예방 및 치료 효능 물질의 스크리닝을 위한 키트에 관한 것이기도 하다.
- [0014] 또한, 본 발명은 또 다른 측면에서, 일차 섬모의 형성 정도를 확인하는 단계를 포함하는, 모발 상태 진단 또는 멜라닌 저하성 질환 관련 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법에 대한 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명은 일측면에서 멜라닌 형성 세포 내 일차 섬모(primary cilia)의 상대적 형성 정도를 확인하는 단계를 포함하는 모발 흑화 효능 물질 스크리닝 방법을 제공함으로써, 보다 효과적으로 모발 흑화 물질 및 멜라닌 저하성 질환 치료 물질을 스크리닝할 수 있도록 하고 기존의 방법으로 발견하지 못했던 모발 흑화 물질 및 멜라닌 관련 질환 치료 물질도 확인이 가능하게 하므로, 관련 분야의 산업발전에 크게 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1a는 특정 물질 D 처리에 따른 폴리글루타미레이트-튜불린 단백질(polyglutamylated-tubulin protein, PG-tubulin)의 발현 변화를 공초점 레이저 현미경으로 관찰한 것이다(스케일바는 10 μ m).
- 도 1b는 특정 물질 D 처리가 일차 섬모를 증가시키는지 여부를 확인한 것이다.
- 도 1c는 α -MSH 및 특정 물질 D 처리가 멜라닌 생성량에 미치는 영향을 확인한 것이다.
- 도 1d는 α -MSH 및 특정 물질 D 처리가 PG-tubulin, 타이로시나제(tyrosinase), 및 TRP1(Tyrosinase-related protein 1) 단백질의 발현에 미치는 영향을 웨스턴 블롯으로 나타낸 것이다.
- 도 2a는 멜라닌 형성 세포(멜란-a 세포)에서 혈청 기아로 인한 일차 섬모 형성 여부, 특정 물질 A 처리로 인한 일차 섬모형성 억제 여부를 공초점 레이저 현미경으로 확인한 것이다.
- 도 2b는 멜라닌 형성 세포(멜란-a 세포)에서 혈청 기아로 인한 일차 섬모 형성 여부, 특정 물질 A 처리로 인한 일차 섬모형성 억제 여부를 나타낸 것이다.

도 2c는 혈청 기아 및 특정 물질 A가 세포 내 멜라닌 함량에 미치는 영향을 확인한 것이다.

도 2d는 혈청 기아 및 특정 물질 A가 PG-tubulin, 타이로시나제 및 TRP1 단백질 발현에 미치는 영향을 웨스턴 블롯으로 나타낸 것이다.

도 3a는 B16F1 흑색종 세포주에서 특정 물질 D 처리가 일차 섬모를 증가시키는지 여부를 확인한 것이다.

도 3b는 B16F1 흑색종 세포주에서 α -MSH 및 특정 물질 D 처리가 멜라닌 생성량에 미치는 영향을 나타낸 것이다.

도 3c는 B16F1 흑색종 세포주에서 α -MSH 및 특정 물질 D 처리가 PG-tubulin, 타이로시나제(tyrosinase), 및 TRP1 단백질의 발현에 미치는 영향을 확인한 것이다.

도 3d는 B16F1 흑색종 세포주에서 혈청 기아로 인한 일차 섬모 형성 여부, 특정 물질 A 처리로 인한 일차 섬모 형성 억제 여부를 나타낸 것이다.

도 3e는 B16F1 흑색종 세포주에서 혈청 기아 및 특정 물질 A가 세포 내 멜라닌 함량에 미치는 영향을 나타낸 것이다.

도 3f는 B16F1 흑색종 세포주에서 혈청 기아 및 특정 물질 A가 PG-tubulin, 타이로시나제 및 TRP1 단백질 발현에 미치는 영향을 웨스턴 블롯으로 확인한 것이다.

도 4a는 B16F1 세포에 특정 물질 S를 처리한 경우 일차 섬모 발현 변화를 나타낸 것이다.

도 4b는 B16F1 세포에 α -MSH, 특정 물질 S, 알부틴을 처리한 경우 멜라닌 함량의 변화를 나타낸 것이다.

도 4c는 B16F1 세포에 α -MSH, 특정 물질 S, 알부틴을 처리한 경우 PG-튜블린, 타이로시나제, TRP1의 발현에 미치는 영향을 확인한 것이다.

도 5a는 멜란-a 세포에서 특정 물질 D 또는 혈청 기아로 유도된 일차 섬모 형성이 GLI2 억하에 의해 현저히 억제됨을 나타낸 것이다.

도 5b는 멜란-a 세포에서 GLI2 억하에 의해 멜라닌 함량이 현저하게 증가됨을 나타낸 것이다.

도 5c는 멜란-a 세포에서 GLI2 억하에 의해 타이로시나제, TRP1이 현저하게 증가됨을 나타낸 웨스턴 블롯 자료이다.

도 5d는 B16F1 세포에서 특정 물질 D 또는 혈청 기아로 유도된 일차 섬모 형성이 GLI2 억하에 의해 현저히 억제됨을 나타낸 것이다.

도 5e는 B16F1 세포에서 GLI2 억하에 의해 멜라닌 함량이 현저하게 증가됨을 나타낸 것이다.

도 5f는 B16F1 세포에서 GLI2 억하에 의해 타이로시나제, TRP1이 현저하게 증가됨을 나타낸 웨스턴 블롯 자료이다.

도 6a는 NEHMs에서 특정 물질 D 처리에 의해 일차 섬모가 증가함을 나타낸 도면이다.

도 6b는 NEHMs에서 특정 물질 D 처리에 의해 멜라닌 함성이 감소함을 나타낸 것이다.

도 6c는 피부 모델에 특정 물질 S 및 특정 물질 D를 처리한 뒤 밝기 변화를 확인한 것이다.

도 6d는 피부 모델에 특정 물질 S 및 특정 물질 D를 처리한 뒤 색도계로 밝기 변화를 평가한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

[0018] 본 명세서에서 "모발"이라 함은, 각질화된 상피세포로 이루어져 피부 표면으로 나오는 실 모양으로 된 구조물로서, 구체적으로 신체의 털을 의미하며, 머리카락 및 체모를 포함하는 최광의의 개념이다.

[0019] 본 명세서에서 "흑화"라 함은, 피부 또는 모발의 유색 색소가 증가되는 것을 의미하며, 특히 멜라닌 색소의 양이 증가되어 피부 또는 모발이 짙은 색을 나타내게 되는 현상을 의미할 수 있다. 예를 들어 모발 흑화는 머리카락이 검게 변하는 현상을 포함한다.

[0020] 본 명세서에서 "백화"라 함은, 피부 또는 모발의 유색 색소가 감소하는 것을 의미하며, 특히 멜라닌 색소의

양이 감소되어 피부 또는 모발이 옅은 색을 나타내게 되는 현상을 의미할 수 있다. 예를 들어 모발 백화 또는 백발은 머리카락이 회색 변하는 현상을 포함한다.

- [0021] 본 명세서에서 "일차 섬모"는, primary cilium(복수일 경우 primary cilia)라고도 하며, 세포체에서 돌출된 소기관으로서, 화학적 자극, 물리적 자극, 빛, 삼투압, 유체 흐름, 및 중력 신호 등을 포함하는 다양한 외부자극을 감지하는 세포 소기관을 말한다.
- [0022] 본 명세서에서 "상대적 형성 정도"는, 어떠한 조건에 처하거나 처하지 않은 세포에서의 일차 섬모(primary cilia)의 형성 또는 발현 정도를 비교하였을 때, 형성 또는 발현의 여부, 수, 양, 질(quality)의 차이를 나타내는 정도일 수 있다. 또한, 상기 형성 정도는, 예컨대, 일차 섬모를 형성 또는 발현하는 세포의 수나 양을 포함할 수 있다.
- [0023] 본 명세서에서 "모발 흑화 효능 물질"은, 모발의 밝기를 어둡게 하거나 유색 색소의 침착을 유도, 개선 및 증진시키는 등의 작용을 하는 물질을 총칭하며, 단일 화합물, 중합체, DNA, RNA, 펩티드, 단백질 등을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 본 명세서에서 "멜라닌 저하성 질환"은, 멜라닌 색소의 합성 또는 분해의 이상에 따라 비정상적으로 멜라닌 침착이 억제되는 질환을 포함한다. 예를 들어, 백화증(백색증, Albinism), 백색피부증(leukoderma), 부분 백피증, 어루러기, 백반증(vitiligo), 쿼디크롬 백반증(quadrichrome vitiligo), 반점성 백반증(vitiligo punctue), 특발성 적상 저색소증, 점상 백피증, 백색증 증후군(syndromic Albinism)(예컨대, 알레잔드리니 증후군(Alezzandrini syndrome), 헤르만스키-푸들라크 증후군(Hermansky-Pudlak syndrome), 셰디아크-히가시 증후군(Chediak-Higashi syndrome), 그리셀리 증후군(Griscelli syndrome)(엘레잘데 증후군(Ellejalde syndrome), 그리셀리 증후군 타입 2(Griscelli syndrome type 2) 및 그리셀리 증후군 타입 3(Griscelli syndrome type 3)), 바르텐부르크 증후군(Waardenburg syndrome), 티제 증후군(Tietz syndrome), 크로스-멕큐직-브린 증후군(Cross-MuKusick-Breen syndrome), ABCD 증후군(ABCD syndrome), 백색증-청각장애 증후군(Albinism-deafness syndrome) 및 보그트-고야나기-하라다 증후군(Vogt-Koyanagi-Harada syndrome)), 눈 피부 백색증(oculocutaneous albinism), 저멜라닌증(hypomelanosis)(물방울모양 저멜라닌증(idiopathic guttate hypomelanosis), 잎모양 저멜라닌증(phyllloid hypomelanosis), 진행성 반상 저멜라닌증(progressive macular hypomelanosis)), 반상 경피증, 얼룩백색증(piebaldism), 탈색소 모반(nevus depigmentosus), 염증 후 색소침착저하증(염증 후 탈색증, postinflammatory hypopigmentation), 백색 비강진(pityriasis alba), 바가본드 백반흑피증(Vagabond's leukomelanoderma), 예멘 시청각장애 색소침착저하 증후군(Yemenite deaf-blind hypopigmentation syndrome), 웬드-바우쿠스 증후군(Wende-Bauckus syndrome), 워로노프 반지증(Woronoff's ring), 멜라닌결핍증(amelanism), 및 루시즘(Leucism)을 포함한다.
- [0025] 본 명세서에서 "멜라닌 저하성 질환 예방 및 치료 효능 물질"은, 멜라닌 저하성 질환의 이환을 사전에 방지 또는 억제하는 물질, 이환된 멜라닌 저하성 질환의 증상을 경감 또는 완화시키는 물질, 멜라닌 저하성 질환의 원인을 해소시키는 물질, 멜라닌 합성을 증진시키는 물질, 멜라닌 합성의 억제를 방지하는 물질, 멜라닌의 분해를 억제시키는 물질을 포함하는 것으로서, 전체 피부 또는 특정 피부 부위의 밝기를 어둡게 하거나 멜라닌 색소의 침착을 유도, 개선 및 증진시키는 등의 작용을 하는 물질을 총칭하며, 단일 화합물, 중합체, DNA, RNA, 펩티드, 단백질 등을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 본 발명은 일 측면에서,
- [0027] 멜라닌 형성 세포(melanocyte)에 시험 물질을 처리하는 단계;
- [0028] 상기 시험 물질을 처리한 멜라닌 형성 세포에서, 시험 물질 처리 전과 후의 일차 섬모(primary cilia)의 상대적 형성 정도를 확인하는 단계를 포함하는, 모발 흑화 효능 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0029] 본 발명은 다른 측면에 의하면,
- [0030] 멜라닌 형성 세포(melanocyte)에 시험 물질을 처리하는 단계;
- [0031] 상기 시험 물질을 처리한 멜라닌 형성 세포에서, 시험 물질 처리 전과 후의 일차 섬모(primary cilia)의 상대적 형성 정도를 확인하는 단계를 포함하는 멜라닌 저하성 질환 예방 및 치료 효능 물질의 스크리닝 방법일 수 있다.
- [0032] 일 구현 예에서, 상기 멜라닌 저하성 질환은 백화증, 백반증, 탈색소 모반, 백색 비강진, 어루러기, 염증후 탈색증, 반상 경피증, 부분 백피증, 특발성 적상 저색소증 및 점상 백피증으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상

일 수 있다.

- [0033] 일 구현 예에 의하면, 상기 스크리닝 방법은 상기 시험 물질 처리 후에 형성된 일차 섬모가 처리 전의 일차 섬모에 비해 적을 경우 상기 시험 물질을 모발 흑화 효능 물질, 또는 멜라닌 저하성 질환 예방 및 치료 효능 물질로 판단하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0034] 다른 구현 예에 의하면, 상기 일차 섬모의 상대적 형성 정도는 일차 섬모가 발현된 멜라닌 형성 세포의 수의 비교 및 한 세포 내에 발현된 일차 섬모 양의 비교 중 하나 이상을 통하여 판정하는 것일 수 있다.
- [0035] 또다른 구현 예에 의하면, 상기 일차 섬모의 상대적 형성 정도는 폴리글루타밀레이티드-튜불린 단백질(polyglutamylated-tubulin protein)의 발현 정도로 확인하는 것일 수 있다. 예컨대, 폴리글루타밀레이티드-튜불린 단백질이 발현된 멜라닌 형성 세포의 수를 비교하거나, 한 세포 내에 발현된 폴리글루타밀레이티드-튜불린 단백질의 양을 비교하여 판정하는 것일 수 있고, 상기 시험 물질 처리 후의 폴리글루타밀레이티드-튜불린 단백질이 발현된 멜라닌 형성 세포의 수나 한 세포 내에 발현된 폴리글루타밀레이티드-튜불린 단백질의 양이 시험 물질 처리 전보다 적을 경우, 형성된 일차 섬모의 양이 적어진 것으로 볼 수 있고 상기 시험 물질을 모발 흑화 효능 물질, 또는 멜라닌 저하성 질환 예방 및 치료 효능 물질로 판정할 수 있다.
- [0036] 일 구현 예에서, 상기 일차 섬모의 상대적 형성 정도는 GLI(GLI family zinc finger) 전사인자의 발현 또는 활성 정도로 확인하는 것일 수 있고, 상기 GLI 전사인자는 GLI2(GLI family zinc finger 2) 전사인자일 수 있다. 예컨대, 상기 시험 물질 처리 후 상기 GLI 또는 GLI2 전사인자가 시험 물질 처리 전보다 적게 발현되거나 활성도가 억제된 경우, 형성된 일차 섬모의 양이 적어진 것으로 볼 수 있고 상기 시험 물질을 모발 흑화 효능 물질, 또는 멜라닌 저하성 질환 예방 및 치료 효능 물질로 판정할 수 있다. GLI 전사인자 또는 GLI2 전사인자가 발현되거나 활성화된 세포수가 적어진 경우에도 형성된 일차 섬모의 양이 적어진 것으로 볼 수 있고 상기 시험 물질을 모발 흑화 효능 물질, 또는 멜라닌 저하성 질환 예방 및 치료 효능 물질로 판정할 수 있다.
- [0037] 일 구현 예에 의하면, 상기 일차 섬모의 상대적 형성 정도는 티로시나제(tyrosinase) 또는 TRP1(Tyrosinase-related protein 1)의 발현 정도로 확인하는 것일 수 있다. 예컨대, 상기 시험 물질 처리 후 티로시나제 또는 TRP1의 발현이 시험 물질 처리 전보다 많아진 경우, 형성된 일차 섬모의 양이 적어져서 그런 것으로 볼 수 있고 상기 시험 물질을 모발 흑화 효능 물질, 또는 멜라닌 저하성 질환 예방 및 치료 효능 물질로 판정할 수 있다. 티로시나제 또는 TRP1이 발현된 세포수가 많아진 경우에도 형성된 일차 섬모의 양이 적어져서 그런 것으로 볼 수 있고 상기 시험 물질을 모발 흑화 효능 물질, 또는 멜라닌 저하성 질환 예방 및 치료 효능 물질로 판정할 수 있다.
- [0038] 일 구현 예에서, 일차 섬모의 상대적 형성 정도는, 공지의 기술, 예컨대, 면역형광 분석, 웨스턴 블롯(western blot), 닷 블롯(dot blot), ELISA, 노던 블롯(northern blot), PCR, RT-qPCR, GC-MS, LC-MS, NMR 등 당업자가 적절히 선택할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명은 다른 측면에서, 시험 물질 처리 전과 후의 일차 섬모의 상대적 형성 정도를 확인하거나 나타내는 측정부를 포함하는, 모발 흑화 효능 물질 스크리닝을 위한 키트를 제공한다.
- [0040] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 본 발명은 시험 물질 처리 전과 후의 일차 섬모의 상대적 형성 정도를 나타내는 측정부를 포함하는, 멜라닌 저하성 질환 예방 및 치료 효능 물질 스크리닝을 위한 키트일 수 있다.
- [0041] 일 구현 예에 의하면, 상기 키트는 멜라닌 형성 세포 및 지시서를 더 포함하고, 상기 지시서에는 상기 스크리닝 방법이 기재되어 있는 것일 수 있다.
- [0042] 본 발명은 또 다른 측면에서, 일차 섬모의 형성 정도를 확인하는 단계를 포함하는, 모발 상태 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0043] 본 발명은 또 다른 측면에서, 일차 섬모의 형성 정도를 확인하는 단계를 포함하는, 멜라닌 저하성 질환 관련 진단을 위해 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0044] 일 구현 예에 의하면, 상기 일차 섬모는 전체 피부, 특정 피부 부위, 또는 모낭 부위의 멜라닌 형성 세포의 일차 섬모일 수 있다.
- [0045] 다른 구현 예에 의하면, 상기 모발 상태는 멜라닌과 관련된 모발 상태일 수 있다. 본 명세서에서 '멜라닌과 관련된 모발 상태'는 멜라닌 색소 또는 멜라닌 형성 세포와 직접적 또는 간접적으로 관계가 있는 모발의 상태를 뜻하는 것이며, 예를 들어 상기 모발 상태는 멜라닌을 형성시키는 자극에 대하여 민감도가 높거나 낮은 모발,

향후 멜라닌이 더 침착될 가능성이 있거나 억제될 가능성이 있는 모발, 멜라닌과 관련된 모발질환에 걸릴 위험이 높거나 낮은 모발, 색이 어둡거나 밝은 모발을 포함한다.

- [0046] 일 구현 예에 의하면, 상기 멜라닌 저하성 질환 관련 진단은 멜라닌 생성이 감소하여 멜라닌 저하성 질환에 이환될 가능성이 있는 것으로 판정하는 것, 멜라닌 저하성 질환에 이환된 개체의 예후를 판단하는 것, 멜라닌 저하성 질환이 개선되거나 치료될 가능성이 있는 것으로 판정하는 것을 포함한다.
- [0047] 또 다른 구현 예에 의하면, 일차 섬모 형성 정도의 확인은, 멜라닌을 형성 또는 억제시키는 자극이 가해지기 전과 후의 일차 섬모의 형성 정도를 비교하는 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 일차 섬모의 형성 정도의 확인은 멜라닌 형성 세포를 채취하거나, 세포를 분리하지 않고 개체로부터 직접 일차 섬모의 형성 정도를 측정하여 비교하는 것일 수 있다. 상기 채취 또는 측정은 당업자에게 알려진 어떠한 방법으로도 가능하다.
- [0048] 또 다른 구현 예에 의하면, 상기 모발 상태 진단은 멜라닌을 형성 또는 억제시키는 특정 자극에 대하여 민감도가 높은 모발인지 여부를 판정하는 것일 수 있다.
- [0049] 본 발명의 일 측면에 따르면, 상기 자극은 외인성 자극 및 내인성 자극 중 하나 이상일 수 있다.
- [0050] 본 발명의 일 구현 예에 의하면, 상기 외인성 자극은 자외선, 물리적 압력, 상처, 중금속, 화학 물질, 미생물 감염, 및 스트레스에 의한 자극을 포함하는 것일 수 있다.
- [0051] 본 발명의 다른 구현 예에 의하면, 상기 내인성 자극은 체내 산화적 스트레스 변화, 노화, 염증, 유전자 이상, 호르몬 변화, 간을 포함한 소화기관 기능 이상, 대사기능 이상, 영양상태 이상, 비타민 및 무기질의 과부족을 포함하는 것일 수 있다.
- [0052] 본 발명의 또 다른 구현 예에 의하면, 상기 일차 섬모의 형성 정도 확인은 특정한 두 시점에, 한 개체의 모낭 부위에서 일차 섬모의 형성 정도를 비교하는 것일 수 있다. 예를 들어, 모낭 부위에서 멜라닌 형성 세포를 채취하거나, 세포를 분리하지 않고 개체로부터 직접 일차 섬모의 형성 정도를 측정하여 비교하는 것일 수 있다. 상기 채취 또는 측정은 당업계에 알려진 어떠한 방법으로도 가능하다.
- [0053] 또 다른 구현 예에 의하면, 상기 모발 상태 진단은 모낭 부위에서 멜라닌 침착이 증가 또는 감소하여 모발 흑화 또는 백화가 진행될 가능성이 있다고 판정하는 것일 수 있다. 본 명세서에서 “모발 흑화” 또는 흑발은 다양한 원인 또는 자극이 발생하거나 없어져서 모발 전체 또는 특정 부위의 모발이 어둡거나 검게 변하는 현상을 포함한다. 또한 본 명세서에서 “모발 백화” 또는 “백발”은 다양한 원인 또는 자극이 발생하거나 없어져서 모발 전체 또는 특정 부위의 모발이 밝거나 희게 변하는 현상을 포함한다.
- [0054] 본 발명의 다른 측면에 따르면, 상기 모발 상태 진단은 일차 섬모가 형성된 정도에 따라 모발의 흑화 또는 백화 가능성에 관한 등급을 판정하는 것일 수 있다.
- [0055] 일 구현 예에 따르면, 상기 등급은 일정한 수의 개체에게서 구한 모낭 멜라닌 형성 세포 시료로부터 얻은 일차 섬모의 형성 정도에 관한 자료를 기초로 정한 기준값, 및 이를 근거로 구간을 나누어 정한 등급일 수 있다. 상기 시료는 모낭 세포 또는 모발 시료일 수 있고, 구체적으로 모낭 또는 모발의 멜라닌 형성 세포를 포함할 수 있다.
- [0056] 모발 색소침착, 멜라닌 저하성 질환과 세포 내 일차 섬모 간의 관계에 대해서는 현재까지 알려진 바가 없는데, 본 발명은 일 측면에서 그러한 관계를 규명한 것이다. 본 발명은 일측면에서, 멜라닌 형성 세포에 멜라닌 형성을 유도하는 물질을 처리하여 멜라닌을 형성하는 과정이 일차 섬모 형성을 유도하는 물질인 특정 물질 D에 의해 억제됨을 확인하였다. 그러나, 이러한 억제 효과는 특정 siRNA를 통하여 GLI2를 억제시킨 세포에서는 나타나지 않았다. 나아가, 특정 물질 S에 의해 소닉 헛지호그(sonic hedgehog, SHH)-smoothened(Smo) 신호 경로(signaling pathway)가 활성화되고 GLI 전사인자가 발현되거나 활성화됨으로써, 일차 섬모의 형성이 유도되어 멜라닌 형성 세포에서 멜라닌 생성 및 색소 침착이 억제됨을 확인하였다. 한편, 본 발명자들은 특정 물질 A가 일차 섬모 형성을 현저하게 억제함을 확인하였고, 특정물질 A에 의해 일차 섬모 형성을 억제할 경우 멜라닌 형성 세포에서 멜라닌 형성이 촉진됨을 확인하였다.
- [0057] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 Smo-GLI2 신호체계를 거쳐 일차 섬모의 형성이 유도되고, 일차 섬모 형성으로 인해 멜라닌 합성 억제가 일어남을 확인한 것이며, 반대로 일차 섬모 형성을 억제시키면 멜라닌 합성이 증진됨을 확인한 것이다. 본 발명은 이러한 관계를 이용하여 모발 흑화 효능을 발휘하는 물질과 멜라닌 저하성 질환의 예방 및 치료 효능을 발휘하는 물질을 스크리닝하는 방법을 찾아냈다. 즉, 일차 섬모 형성을 증진 또는 억제시키는 물질은 멜라닌 형성 세포의 멜라닌 합성을 증진 또는 억제시키므로, 그러한 물질은 모낭의 멜라닌 형성

세포에서도 같은 작용을 할 것이고, 그러한 물질을 통해 모발 흑화 또는 백화를 조절할 수 있다. 따라서, 멜라닌 형성 세포가 분포하는 피부 또는 모낭에서 멜라닌 형성 세포의 일차 섬모 형성을 증진시키는지 여부를 확인하여 모발 흑화 효능이 있는 물질을 스크리닝할 수 있는 것이다. 모발의 흑화는 모낭의 멜라닌 형성 세포에서 멜라닌이 생성되어 모발에 침착되는 현상을 포함하기 때문이다.

[0058] 또한, 일차 섬모 형성을 조절하는 물질은 멜라닌 저하성 질환에 이환된 개체의 피부에서도 일차 섬모 형성을 조절할 수 있고, 이를 통해 멜라닌 형성 세포에 의한 멜라닌 합성을 증진시킬 수 있으므로 멜라닌 저하성 질환의 예방 및 치료가 가능하다. 따라서, 특정 물질이 멜라닌 형성 세포가 분포하는 전체 피부, 상기 질환에 의한 증상이 나타나는 피부 부위에서 멜라닌 형성 세포의 일차 섬모 형성을 증진시키는지 여부를 확인하여 멜라닌 저하성 질환의 예방 및 치료 효능이 있는 물질을 스크리닝할 수 있는 것이다.

[0059] 또한, 이러한 점을 응용하여 일차 섬모의 형성 정도를 확인할 수 있거나 나타낼 수 있는 측정부를 포함하는 키트의 제작이 가능하다.

[0060] 아울러, 본 발명은 일 측면에서, 일차 섬모의 형성 정도를 확인하여 멜라닌과 관련된 모발 상태를 평가하거나 진단하는데 필요한 정보를 제공하는 방법 등을 찾아낸 것이다. 본 발명의 다른 측면에 따르면, 일차 섬모의 형성 정도를 확인하여 멜라닌 저하성 질환과 관련된 평가를 하거나 진단하는데 필요한 정보를 얻을 수도 있다. 피부나 모낭의 멜라닌 형성 세포에서 일차 섬모의 형성이 상대적으로 변화될 경우 멜라닌 합성도 변화될 것임을 확인 및 예상할 수 있으므로, 모발의 향후 상태에 대해 예상할 수 있고, 멜라닌 저하성 질환의 예후, 치료 가능성 및 치료 효과에 대해서도 판단이 가능하기 때문이다.

[0061] 이하, 실시예, 실험예를 통하여, 본 발명 일측면의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 아래 예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 그에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0063] [실시예 1]

[0065] 세포 및 피부 모델 준비

[0066] 인간 표피 멜라닌 형성 세포(Normal human epidermal melanocytes, NHEMs, Cascade Biologics, Portland, OR, USA)를 입수하고, C57BL/6 J (black, a/a) 마우스에서 유래한 멜라닌 형성 세포인 멜라닌-A(Melan-A) 세포주를 Dorothy C. Bennett 박사(St. George's Hospital Medical School, London, UK)로부터 입수하였다. B16F1 마우스 흑색종(melanoma) 세포주는 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 입수하였다.

[0067] 인간 표피 멜라닌 형성 세포는 M-254 배지에서 인간 멜라닌 형성 세포 성장 보충제(Human Melanocyte Growth Supplements, HMGS) (Cascade Biologics, Inc., Mansfield, UK)하에서 유지시켰다. Melan-A세포는 RPMI 1640배지에서 10%(v/v) 우태아혈청, 1%(v/v) 페니실린-스트렙토마이신, 및 0.2 μ M phorbol 12-myristate 13-acetate 하에서 유지시켰다. B16F1 마우스 흑색종 세포주는 10% (v/v) 우태아혈청 및 1% (v/v) 페니실린-스트렙토마이신을 첨가한 DMEM에서 배양하였다.

[0068] 3차원 인간 피부 대체재(Three-dimensional human skin substitute, MelanoDerm™, MEL-312-B, MatTek사, Seoul, Korea)는 입수한 뒤 KGF(Keratinocyte Growth Factor), b-FGF(Fibroblast Growth Factor), 및 α -MSH(alpha-melanocyte stimulating hormones)로 최적화된 EPI-100-NMM-113 배지에서 제조자의 지시에 따라 유지하였다.

[0069] 상기 피부모델의 밝기 변화(ΔL) 지수는 색도계(colorimeter, CR-300, Konica Minolta사, Tokyo, Japan)에 의해 측정된 L 지수(L value, lightness index)로 계산하였고, $\Delta L = 13$ 일차 또는 20일차의 L (처치 피부) - L (대조군 피부) 로 계산하였다. ΔL 지수의 증가는 피부에서 화합물 유도에 의한 색소의 과소침착을 나타낸다 (Lee et al., 2013).

[0071] 시약 및 siRNA 트랜스펙션(transfection)

[0072] 특정 물질 D, 특정 물질 A, α -MSH, 알부틴(arbutin), 및 코지산(kojic acid)은 Sigma-Aldrich사 (St. Louis,

MO, USA)에서 입수하였다. 특정 물질 S는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 입수하였다. 또한, 마우스 GLI2(GLI family zinc finger 2)를 타겟팅하는 siRNA인 #1, #2, 및 음성 대조군 siRNA (scrambled control siRNA, siNC)(5'-CCUACGCCACCAAUUCGU-3')는 제놀루션사(Genolution, 서울, 대한민국)에서 입수하였다. 상기 siRNA #1 및 siRNA #2는 GLI2를 타겟팅하여 GLI2 발현을 억제하는 siRNA로서, 당업자가 용이하게 입수할 수 있는 것, 향후 입수가 가능한 것, 제조할 수 있는 것, 또는 향후 제조가능한 것 중 어떤 것이라도 사용할 수 있다.

[0073] Lipofectamine[®] RNAi MAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 60 mm 디쉬에서 배양한 멜란-a(Melan-a) 및 B16F1 세포에 siRNA를 트랜스펙션시켰다. siRNA와 함께 24시간 동안 배양한 뒤, 세포에 대해 각각의 화합물(시약)로 처리하고 48시간 동안 유지하였다.

[0075] 멜라닌 에세이

[0076] 세포를 트립신/EDTA로 처리 후 1000 x g에서 5분간 원심분리하고, PBS로 2회 세척하였다. 튜브 내의 최종 세포 펠렛을 사진으로 찍고, 세포 펠렛은 1 N NaOH에 용해시켰다. 균질화시킨 세포 추출물을 96-웰(well) 플레이트에 옮기고, ELISA 플레이트 리더를 이용하여 흡광도 405 nm에서 상대적 멜라닌 양을 측정하였다.

[0078] 웨스턴 블롯 분석

[0079] 모든 용해물은 2 × 램파이 시료 완충액(2 × Laemmli sample buffer, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% [v/v] glycerol, 2% [w/v] SDS, 5% [v/v] β-mercaptoethanol, 및 0.01% [w/v] bromophenol blue) (Bio-Rad, Hercules사, CA, USA)을 이용하여 준비하였다. 모든 세포 단백질은 Bradford solution (Bio-Rad)을 이용하여 측정하였다. 그 후, 상기 시료는 SDS-PAGE로 분리하고, PVDF 멤브레인(Bio-Rad)으로 이전하였다. TBST(25 mM Tris, 140 mM NaCl, 및 0.05% [v/v] Tween[®] 20) 내의 4% (w/v) 스킴 밀크(skim milk)로 블로킹한 뒤, 멤브레인을 특정 1차 항체들과 함께 오버나이트(overnight) 배양시켰다.

[0080] 항-폴리글루타미레이트드-튜불린 항체(Anti-polyglutamylated-tubulin antibody, AG-20B-0020, 1:1000)는 Adipogene사 (San Diego, CA, USA)에서 입수하였고, 항-GLI2 항체(anti-GLI2 antibody, 18989-1-AP, 1:1000)는 Proteintech사 (Chicago, IL, USA)에서 입수하였으며, 항-액틴 항체(anti-actin antibody, MAB1501, 1:10,000)는 Millipore사 (Temecula, CA, USA)에서 입수하였고, 항-αPEP7(타이로시나제) 항체(anti-αPEP7(tyrosinase) antibody, 1:1000)와 항-αPEP1(TRP1) 항체(anti-αPEP1(TRP1) antibody, 1:1000)는 V. J. Hearing (NIH, Bethesda, MD)로부터 입수하였다. 단백질 검출을 위하여, 상기 멤브레인은 HRP-컨쥬게이트드 이차 항체를 이용하여 배양하였고, 신호는 SuperSignal[®] West Dura HRP Detection Kit (Pierce사, Rockford, IL, USA)를 이용하여 측정하였다.

[0082] 공초점 레이저 현미경(confocal microscopy)을 이용한 면역형광 분석

[0083] NHEMs, Melan-a, 및 B16F1 세포는 Lab-Tek[™] 유리 챔버 슬라이드 (Thermo Scientific사, Waltham, MA, USA)를 이용하여 배양한 뒤, 차가운 PBS로 씻어내고, 20 분 동안 4% (w/v) 파라포름알데히드(paraformaldehyde)로 고정시켰으며, 다시 PBS로 두번 씻어냈다. 그리고 0.1% (v/v) Triton[™] X-100 (PBS-T)를 함유하는 PBS에서 3분 동안 배양시켰다. 상기 세포들은 PBS-T를 이용하여 3 회 더 씻어냈고 5% (v/v) 염소혈청을 포함하는 PBS-T로 희석한 항-폴리글루타미레이트드-튜불린 항체(1:100 희석, Adipogene, AG-20B-0020), 항-아세틸레이티드-튜불린 항체(1:1000 희석, Sigma-Aldrich), 및 항-ARL13B 항체 (1:200 희석, Proteintech)와 함께 실온에서 1시간 동안 배양하였다. PBS로 씻어낸 뒤, 상기 세포들은 컨쥬게이트된 이차 항체와 배양시켰고, 그 후 공초점 레이저 스캔 현미경(confocal laser scanning microscope, model LSM510, Carl Zeiss Microimaging Inc., Thornwood, NY, USA)으로 형광을 관찰하기 위해 유리 슬라이드 위에 상기 세포들을 올렸다.

[0085] 통계 분석

[0086] 각 데이터는 적어도 3회의 독립적인 실험을 거쳐서 얻었고, 평균±SE(표준오차)로 나타내었다. 결과의 통계적 평가는 일원분산분석(1-way ANOVA)를 이용하여 수행하였다(* p < 0.05, ** p < 0.01).

- [0088] [실험예 1] 일차 섬모(primary cilia) 형성에 의한 멜라닌 생성 조절
- [0089] 일차 섬모는 양극화된 구조를 가진 세포내 기관인데, 섬모의 결합(섬모 형성) 및 분해가 세포주기, 유주, 극성, 척추 발달, 및 유전적 질환 등 다양한 원인에 의해 상호연결되어 있다. 일차 섬모는 튜불린-기초의 세포 구조로 알려진 바 있다. 튜불린은 번역후 다중 변형(multiple post-translational modifications, PTMs)을 겪게 되는데, 이러한 변형 과정 중 폴리글루타밀화(polyglutamylation)는 일차 섬모 상 튜불린의 활성상태와 관계되는 것으로 여겨진다. 따라서, 일차 섬모 형성을 평가하기 위하여, 폴리글루타밀화된 튜불린 단백질의 발현 수준을 분석하였다.
- [0090] 일차 섬모를 유도하는 특정 물질이 마우스 멜라닌 형성 세포에 미치는 영향을 평가하기 위하여, 멜란-a(Melan-a) 세포를 특정 물질 D로 처리하고 48시간 뒤 일차 섬모 형성을 공초점 레이저 현미경으로 분석하였다. 상기 특정 물질 D는 일차 섬모 형성을 유도하는 물질로서, 그 종류, 형태 및 성질 등에 관계없이 세포의 일차 섬모 형성을 유도하는 것으로 당업계에 알려지거나 향후 발견될 물질을 모두 포함한다.
- [0091] 그 결과, 특정 물질 D를 처리할 경우 폴리글루타밀레이티드-튜불린 단백질(polyglutamylated-tubulin protein, PG-tubulin, 녹색)이 유도됨을 알 수 있었다(도 1a, CTL은 대조군(control), 스케일바 = 10 μ m). 또한, 특정 물질 D를 처리하지 않은 CTL(대조군, control)에 비해 특정 물질 D를 0.25 μ M로 처리한 군(특정 물질 D 0.25)과 특정 물질 D를 0.5 μ M로 처리한 군(특정 물질 D 0.5)에서 일차 섬모가 있는 세포의 양(세포수)이 현저하게 증가하였다(도 1b). 즉, 특정 물질 D를 처리한 경우 일차 섬모의 수준이 매우 증가함을 확인하였다.
- [0092] α -MSH (1 μ M)로 24시간 동안 사전 처리한 멜란-a 세포에 특정 물질 D(0.25 및 0.5 μ M)로 처리 뒤 세포의 멜라닌 함량을 측정하였고, PG-tubulin, 타이로시나제(tyrosinase), 및 TRP1 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯으로 확인하였다. 그 결과, α -MSH를 처리할 경우 멜라닌 합성이 증가하고 PG-tubulin의 발현 수준이 감소하였는데, 특정 물질 D를 처리한 경우에는 그러한 α -MSH에 의한 멜라닌 합성이 현저하게 감소하였고(도 1c), PG-tubulin 발현 또한 현저히 증가되었다(도 1d).
- [0093] 또한, 특정 물질 D에 의한 멜라닌 생성 효소의 발현 변화여부를 확인하였는데, α -MSH에 의해 증진된 타이로시나제(tyrosinase) 및 TRP1 단백질의 수준이 특정 물질 D처리에 의해 현저하게 감소하였다(도 1d).
- [0094] 혈청 기아(serum starvation)가 일차 섬모 형성을 유도하는지 여부를 확인하기 위하여, 멜라닌 형성 세포를 무혈청 배지에서 배양하였다. 그 결과, 무혈청(serum-free) 배양은 일차 섬모 형성을 강하게 유도하는 것을 확인하였다(도 2a 및 도 2b).
- [0095] 특정 물질 A가 멜라닌 형성 세포에서 일차 섬모 형성(assembly)에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 무혈청 조건에서 멜란-a 세포에 특정 물질 A(10 μ M)를 처리하고 48시간 동안 배양하였다. 상기 특정 물질 A는 일차 섬모 형성을 억제하는 물질로서, 그 종류, 형태 및 성질 등에 관계없이 세포의 일차 섬모 형성을 억제하는 것으로 당업계에 알려지거나 향후 발견될 물질을 모두 포함한다.
- [0096] 상기한 바와 같이 면역염색한 뒤 PG-tubulin 항체(녹색)에 의해 염색된 일차 섬모를 공초점 레이저 현미경으로 관찰하였다(도 2a, 스케일바=10 μ m). 또한, 특정 물질 A를 10 μ M, 30 μ M로 각각 처리하고 일차 섬모가 형성된 세포를 확인하였다.
- [0097] 그 결과, 특정 물질 A는 혈청 기아에 의해 유도된 일차 섬모 형성을 현저하게 억제함을 확인하였다(도 2a 및 도 2b). 또한, 웨스턴 블롯으로 분석한 결과, 혈청 기아는 멜란-a 세포 내 멜라닌 함량, 타이로시나제 및 TRP1 단백질 발현을 다소 감소시켰으나, 이후 특정 물질 A 처리한 결과 멜라닌 합성 증가, 타이로시나제 및 TRP1 단백질 발현 증진이 확인되었다(도 2c 및 도 2d). 혈청 기아에 의해 증가한 폴리글루타밀레이티드 튜불린(polyglutamylated tubulin)은 특정 물질 A 처리에 의해 매우 감소하였다(도 2d). 이러한 결과를 종합하여, 멜라닌 형성은 멜라닌 형성 세포에서 일차 섬모에 의해 조절된다는 것을 알 수 있었다.
- [0098] 이러한 현상이 B16F1 마우스 흑색종(melanoma) 세포주에서도 나타나는지 확인하였다. 구체적으로, B16F1 세포에 사이토칼라신 D(0.25 μ M, 0.5 μ M)를 처리 후 48시간 배양한 뒤 일차 섬모가 형성된 세포의 비율을 면역염색법으로 측정하였다(도 3a). B16F1 세포를 α -MSH(1 μ M)로 선 처리한 뒤, 사이토칼라신 D(0.25 μ M, 0.5 μ M)를 처리하여 48시간 후 세포 멜라닌 양을 측정하였다(도 3b). 또한, PG-tubulin, 타이로시나제, 및 TRP1를 웨스턴 블롯으로 분석하였다(도 3c). 한편, B16F1 세포를 혈청 기아 배지에서 특정 물질 A(10 μ M, 30 μ M) 처리 후 48시간 동안 배양하였다. 이후 면역염색을 통해 일차 섬모가 형성된 세포의 비율을 분석하였고(도 3d) 세포 멜라닌 함량

을 측정하였으며(도 3e) PG-tubulin, 타이로시나제, 및 TRP1은 웨스턴 블롯으로 분석하였다(도 3f).

[0099] 그 결과, B16F1 세포주에서도 특정 물질 D 처리에 의해 일차 섬모 형성(PG-튜불린 발현)이 증진되고 그에 따라 멜라닌 함량이 감소하였으며, 타이로시나제와 TRP1의 발현을 억제시킴을 알 수 있었다(도 3a 내지 도 3c). 또한, B16F1에서도 특정 물질 A에 의한 일차 섬모 형성의 감소로 인해 멜라닌 합성 및 멜라닌 생성 효소의 발현이 유도되었다(도 3d 내지 도 3f).

[0100] 종합하면, 일차 섬모 형성은 멜라닌 형성 세포 및 흑색종 세포주에서 멜라닌 생성에 영향을 미친다는 것을 확인한 것이다. 즉, 멜라닌 형성 세포의 일차 섬모의 형성을 유도하면 멜라닌 생성이 줄어들고, 반대로 멜라닌 형성 세포의 일차 섬모의 형성을 억제하면 멜라닌 생성이 증가함을 규명한 것이고, 이를 통해, 모낭의 멜라닌 형성 세포에 대해서도 일차 섬모의 형성을 억제할 경우 멜라닌 생성이 증가하여 모발 흑화가 일어남을 확인한 것이다. 또한, 모낭의 멜라닌 형성 세포에 대해 일차 섬모의 형성을 증진시킬 경우 멜라닌 생성이 억제되어 모발의 갈변이나 백화를 유도할 수도 있게 된다. 이러한 점을 활용하여, 모발 흑화 효능이 있는 물질을 스크리닝할 수 있을 것이다. 마찬가지로, 멜라닌 저하성 질환에 대해서도 멜라닌 형성 세포의 일차 섬모 형성을 억제하면 멜라닌 생성이 증가하여 이를 통해 멜라닌 저하성 질환의 예방 및 치료가 가능하게 된다. 이를 활용하여, 멜라닌 저하성 질환 예방 및 치료 효능이 있는 물질을 스크리닝할 수 있게 되는 것이다. 상기와 같은 점을 이용하여 관련 키트 제품 개발이 가능하고, 모발 흑화 및 멜라닌 저하성 질환 관련 진단도 가능해진다.

[0102] [실험예 2] Smo-GLI2 신호 체계에 의한 멜라닌 형성 조절

[0103] 활성화된 Smo (Smoothened) 단백질은 GLI 전사인자의 발현 및 활성을 증진시키는데, GLI 전사인자는 세포주기에 관한 유전자 및 소닉 헛지호그(sonic hedgehog, SHH) 신호 경로의 다운스트림(downstream)에 관한 유전자 발현을 조절한다.

[0104] 본 발명자들은 일차 섬모 형성을 통한 멜라닌 형성 조절 면에서 Smo 와 GLI2 전사인자와의 관계를 연구하였다. 구체적으로, B16F1세포에 특정 물질 S를 0.5 또는 1 μ M 처리하고, 24시간 후 상기한 바와 같이 면역염색을 하여 일차 섬모가 발현된 세포를 측정하여, 일차 섬모가 발현된 세포가 증가하였음을 확인하였다(도 4a). 상기 특정 물질 S는 GLI 또는 GLI2 전사인자의 발현 또는 활성화 시키거나 발현 또는 활성화를 증진시키는 물질로서, 구체적으로 Smo-GLI 또는 Smo-GLI2 신호경로를 활성화시키거나 활성화를 증진시키는 물질로 당업계에 알려지거나 향후 발견될 물질을 모두 포함한다.

[0105] B16F1세포를 α -MSH(1 μ M)로 사전처리하고 24시간 후 특정 물질 S(5 μ M) 또는 알부틴(arbutin, 500 μ M)을 처리하였다. 24시간 뒤 세포 멜라닌 함량과 타이로시나제, TRP1 단백질의 발현 수준을 웨스턴블롯으로 분석하였다. 그 결과, 특정 물질 S에 의한 일차 섬모 형성 유도는 α -MSH를 처리하여 배양한 B16F1세포에서 멜라닌 생성을 억제시켰다(도 4b). 특정물질 S에 의해 세포의 일차 섬모 형성이 활성화된 경우 타이로시나제, TRP1 단백질의 발현 수준도 감소하였다(도 4c).

[0106] siRNA 관련 정보를 스크리닝하여 GLI2에 대한 siRNA 두 종류(#1, #2)를 구한 뒤, 멜란-a(Melan-a) 세포를 GLI2에 대한 siRNA(#1, #2) 또는 스캐램블 대조군 siRNA(scrambled control siRNA, siNC)로 트랜스펙션 시키고 48시간 후 특정 물질 D(0.5 μ M) 처리 또는 무혈청 조건 하에 두어 2일간 일차 섬모 형성을 유도하였다. 그 뒤, 형광현미 기술(fluorescence microscopy)로 측정하였다. 도 5a 내지 도 5f를 통해 알 수 있듯, 특정 물질 D의 처리 또는 무혈청 조건 하의 배양은 대조군(siNC)에서 일차 섬모 형성을 강하게 유도하였다. 그러나, 자극(특정 물질 D 또는 혈청 기아)으로 유도된 일차 섬모 형성은 GLI2가 녹다운된 경우(#1, #2) 현저히 억제되었다(도 5a).

[0107] 또한, GLI2 녹다운 세포를 특정 물질 D의 처리 또는 무혈청 조건 하의 배양하여 세포 멜라닌 함량을 측정하였다. 대조군 siRNA로 처리한 세포에 대한 특정 물질 D의 처리 또는 무혈청 조건 하의 배양은 멜라닌 함량을 다소 억제시켰다. GLI2 녹다운 세포를 특정 물질 D의 처리 또는 무혈청 조건 하의 배양한 결과, 멜라닌의 함량이 현저하게 증가하였다(도 5b). GLI2 녹다운 세포에 대해 멜라닌 형성 효소 발현에 대해서도 실험을 실시하였다. 웨스턴블롯 분석 결과, 멜란-a세포에서 GLI2를 녹다운 시킨 경우 야생형 세포와 비교했을 때 타이로시나제 및 TRP1 단백질 수준이 현저하게 증가되었다(도 5c). 이를 종합하여, 특정 물질 D 또는 혈청 기아를 통한 멜라닌 생성 억제는 Smo-GLI2 신호 경로를 통한 일차 섬모 유도를 통해 매개된다는 것을 알 수 있었다.

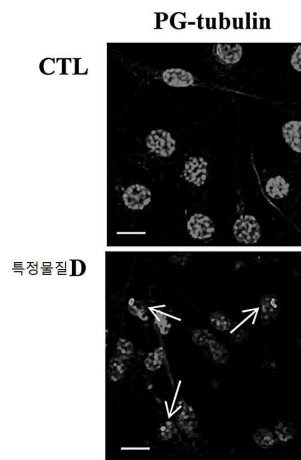
[0108] 또한, B16F1 세포에 대해서도 siNC, GLI2 siRNA를 트랜스펙션 시키고, 1일 후 특정 물질 D(0.5 μ M) 처리 또는 무혈청 배지 처리를 하여 2일 뒤 일차 섬모 형성 양상을 형광현미 기술(fluorescence microscopy)로

분석하였다. GLI2, 타이로시나제, TRP1은 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 그 결과, 특정 물질 D 또는 혈청 기아로 유도된 일차 섬모 형성은 GLI2 녹다운 B16F1 마우스 흑색종 세포에서 억제됨을 알 수 있었다. GLI2 녹다운 B16F1 세포에서 멜라닌 형성 단백질 발현 및 멜라닌 함량은, 멜라닌-a세포에서와 마찬가지로, 증가되었다(도 5d 내지 도 5f). 이를 통해, Smo-GLI2 매개 신호체계에 의한 일차 섬모 형성 조절로 멜라닌 생성을 조절할 수 있음을 확인하였다. 즉, Smo-GLI2 신호 경로의 활성화를 통해 일차 섬모 형성을 유도하면 멜라닌 생성이 억제되고, Smo-GLI2 신호 경로의 활성화를 억제하여 일차 섬모 형성을 억제하면 멜라닌 생성이 증진됨을 규명한 것이다. 따라서, 모낭의 멜라닌 형성 세포에서도 일차섬모의 형성을 억제하면 멜라닌 생성이 증진되어 모발의 흑화가 실현 가능하고 반대로, 모낭의 멜라닌 형성 세포에서 일차섬모의 형성을 증진시키면 멜라닌 생성이 억제되어 모발의 탈색 내지 백화를 유도할 수도 있을 것이다. 이러한 특성을 이용하여 모발 흑화 효능 물질을 스크리닝할 수 있다.

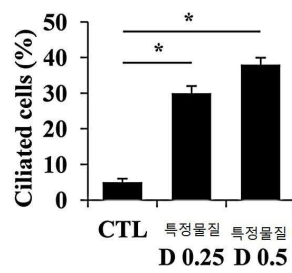
- [0109] 마찬가지로, 멜라닌 저하성 질환에 대해서도 Smo-GLI2 신호 경로의 활성화를 억제하여 일차 섬모 형성을 억제하면 멜라닌 생성이 증가하여 이를 통해 멜라닌 저하성 질환의 예방 및 치료가 가능하게 된다. 이를 활용하여, 멜라닌 저하성 질환 예방 및 치료 효능이 있는 물질을 스크리닝할 수 있게 되는 것이다.
- [0110] 상기와 같은 점을 이용하여 관련 키트 제품 개발이 가능하고, 모발 흑화 및 멜라닌 저하성 질환 관련 진단도 가능해진다.
- [0112] [실험예3] 정상 인간 표피 멜라닌 형성 세포(normal human epidermal melanocytes, NHEMs) 및 인공 피부 실험
- [0113] NHEMs와 3차원 인간 피부 대체재(정상 인간 표피 각질세포 및 NHEMs를 포함하는 재구성 표피 모델)를 이용하여 일차 섬모 형성을 통한 멜라닌 생성의 조절을 실험하였다.
- [0114] 구체적으로, NHEMs에 특정 물질 D($0.5\mu\text{M}$)를 처리하고, 2일 후 아세틸화 튜불린(튜불린의 활성화 형태, 녹색) 및 ARL13B (a small ciliary G protein of the Ras superfamily, 적색)에 대한 면역염색을 통해 NHEMs의 일차 섬모를 관찰하였다. ARL13B 대신에 IFT88(Intra flagellar transport protein 88), CP110(a 110 kDa centriolar protein), BBS2(Bardet-Biedl syndrome (BBS) protein 2)을 단백질 마커로 할 수도 있다. 또한 NHEMs에 특정 물질 D($0.5\mu\text{M}$ 및 $1\mu\text{M}$)를 처리하고 48시간 후 세포 멜라닌 함량을 확인하였다.
- [0115] 그 결과, NHEMs에서도 특정 물질 D 처리에 의해 일차 섬모 증가 및 멜라닌 합성 감소가 유도됨을 확인하였다(도 6a 및 도 6b, 스케일바= $10\mu\text{m}$).
- [0116] 또한, 특정 물질 S($5\mu\text{M}$), 특정물질 D($0.5\mu\text{M}$), 코지산(kojic acid, KA, 5mM)를 3일에 한번씩 3차원 인간 피부 대체재에 13일 간 및 20일 간 투여하고 색소침착에 미치는 일차 섬모의 영향을 평가하였다. 색소침착은 색도계(colorimeter)로 평가하였고 도 6d에서 ΔL 는 대조군과 물질 처리군 간의 밝기 차이를 계산한 값이다.
- [0117] 그 결과, 일차 섬모 형성을 촉진시키는 물질에 의해 피부 색소침착이 감소하였다(도 6c 및 도 6d). 이를 통해, 일차 섬모 형성이 NHEMs과 3차원 인간 피부 대체재에서도 멜라닌 형성을 조절하고 색소침착을 조절함을 확인하였다. 상기 내용에 의하면, 피부 대체재에서 일차 섬모 형성을 억제시키는 물질에 의해서 피부 멜라닌 침착이 증가할 것임이 명확하므로, 일차 섬모 형성을 억제시키는 물질을 이용하면 멜라닌 저하성 질환의 치료 및 예방이 가능하다는 것을 규명한 것이기도 하다.
- [0118] 한편, 모낭에도 멜라닌 형성 세포가 분포하므로, 통상의 기술자는 모낭의 멜라닌 형성 세포를 포함하는 인공모발이나 실제 모발에서도 같은 결과가 나타날 것임을 알 수 있다.
- [0119] 따라서, 일차 섬모 형성을 이용하여, 멜라닌 저하성 질환의 치료 및 예방 효능이 있는 물질, 모발 흑화 효능이 있는 물질을 스크리닝할 수 있는 것이고, 관련 키트 제품의 개발, 피부 및 모발 관련 진단이 가능해지는 것이다.
- [0120] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

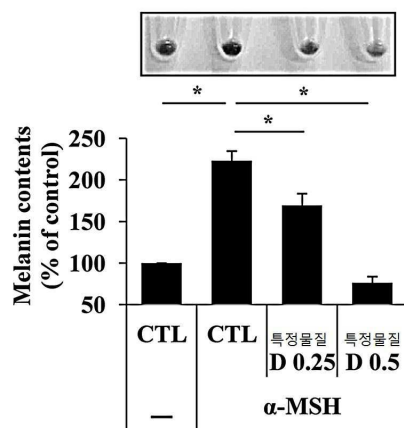
도면1a



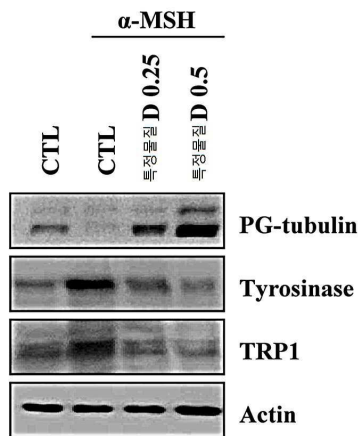
도면1b



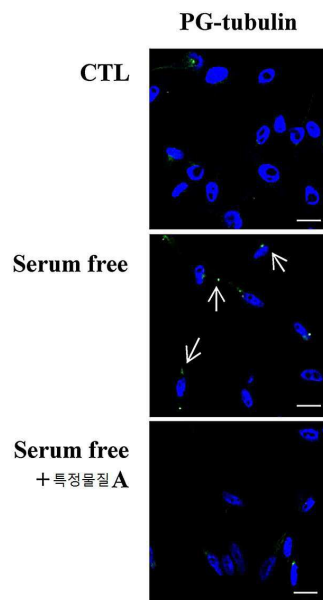
도면1c



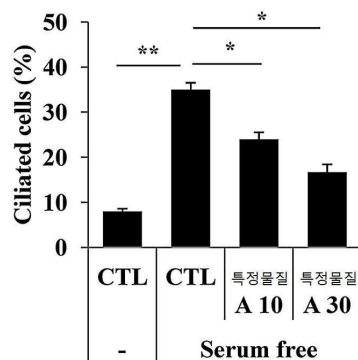
도면1d



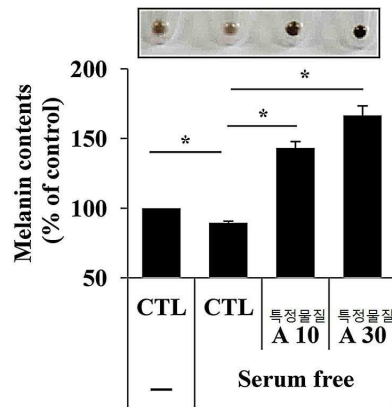
도면2a



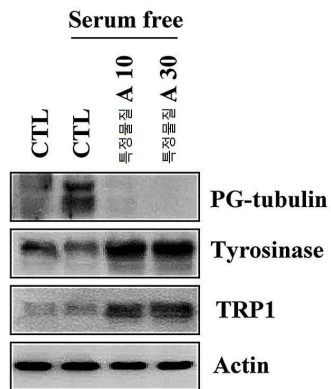
도면2b



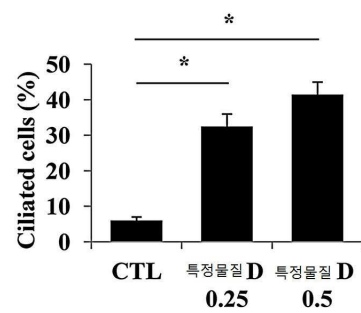
도면2c



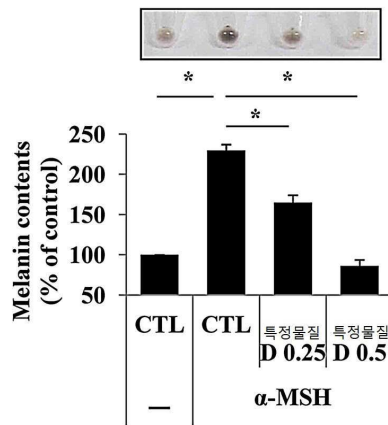
도면2d



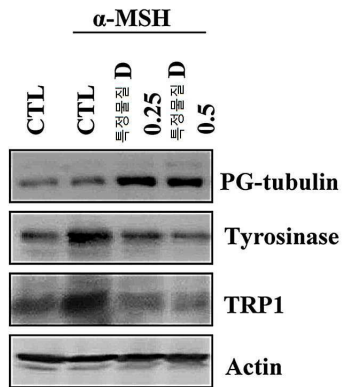
도면3a



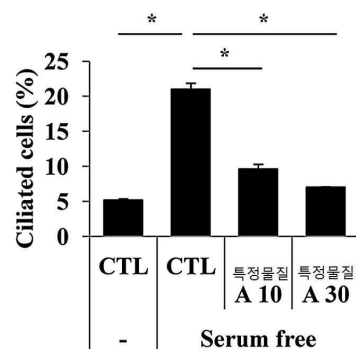
도면3b



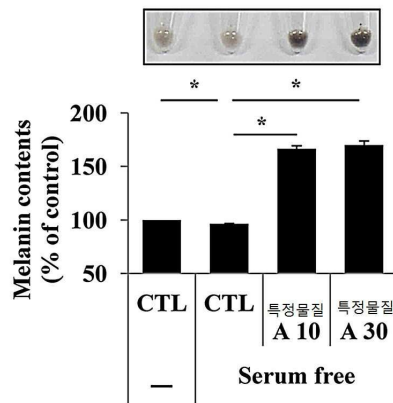
도면3c



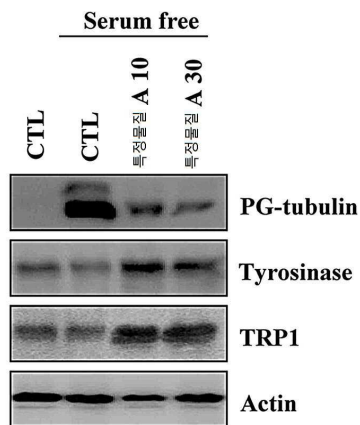
도면3d



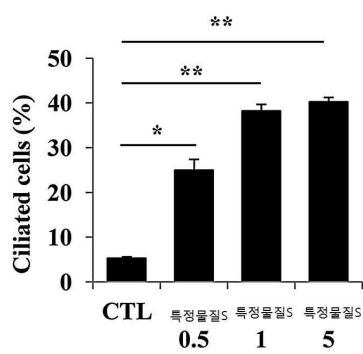
도면3e



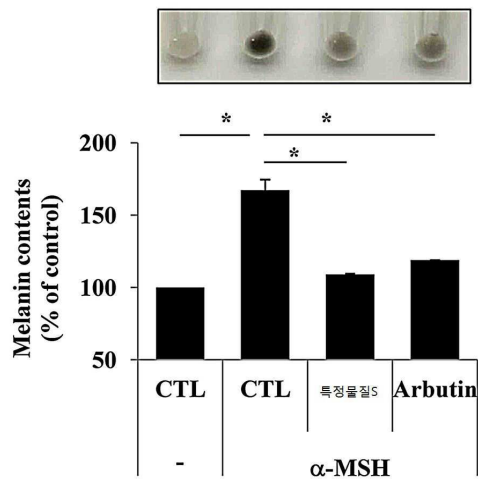
도면3f



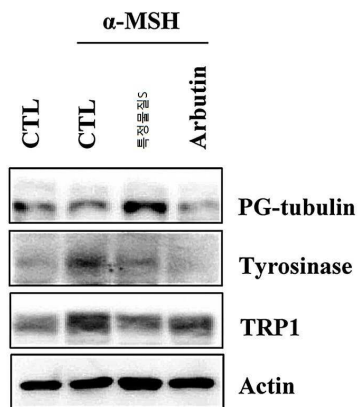
도면4a



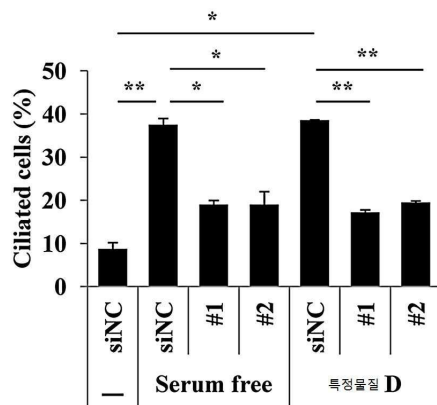
도면4b



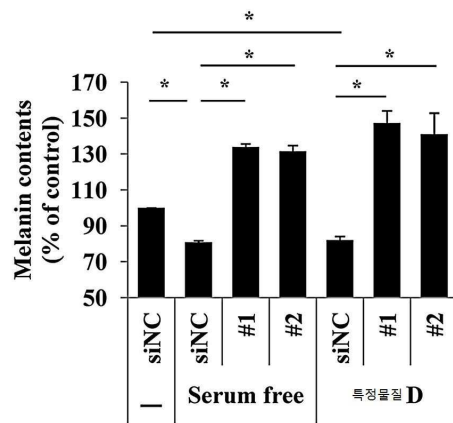
도면4c



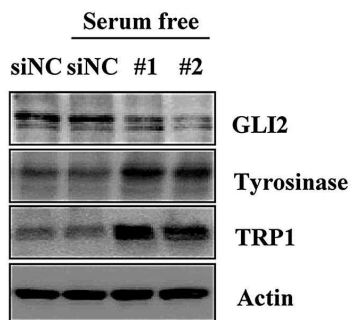
도면5a



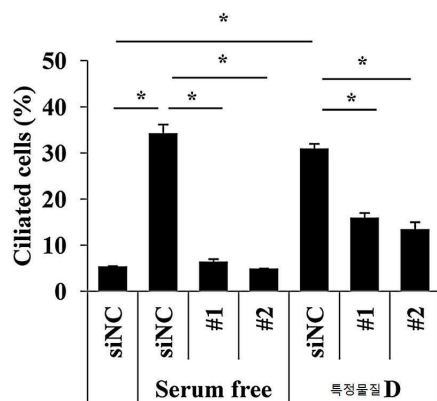
도면5b



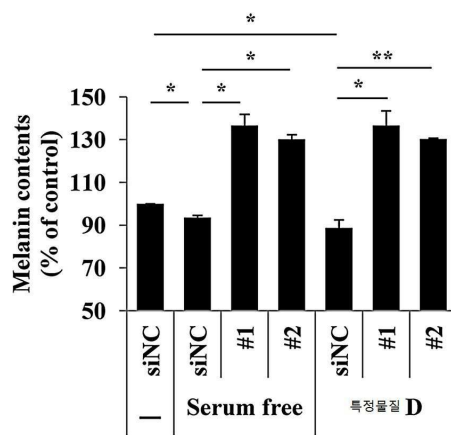
도면5c



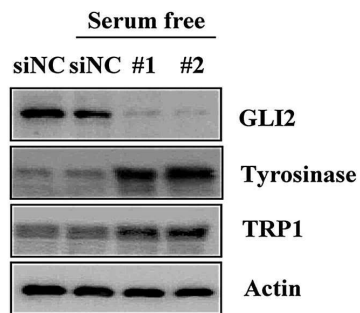
도면5d



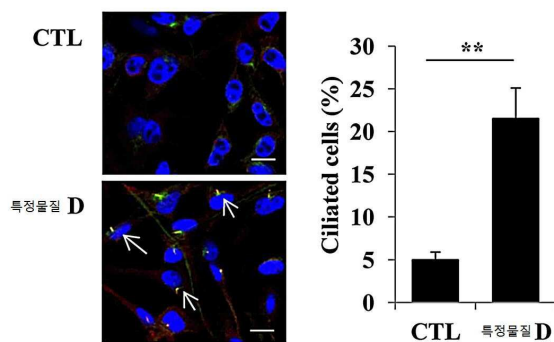
도면5e



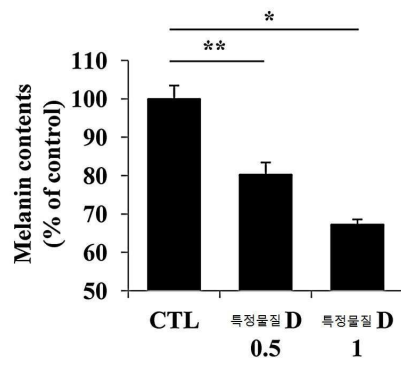
도면5f



도면6a



도면6b



도면6c



도면6d

