



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0090187
(43) 공개일자 2019년08월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0627 (2013.01)
G01N 33/5044 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0008748
(22) 출원일자 2018년01월24일
심사청구일자 2018년01월24일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
박기영
서울특별시 송파구 풍성로 12, 202호(풍납동)
원종현
서울특별시 서초구 효령로33길 50, 102동 402호(방배동, 방배서리풀이편한세상)
(74) 대리인
특허법인충현

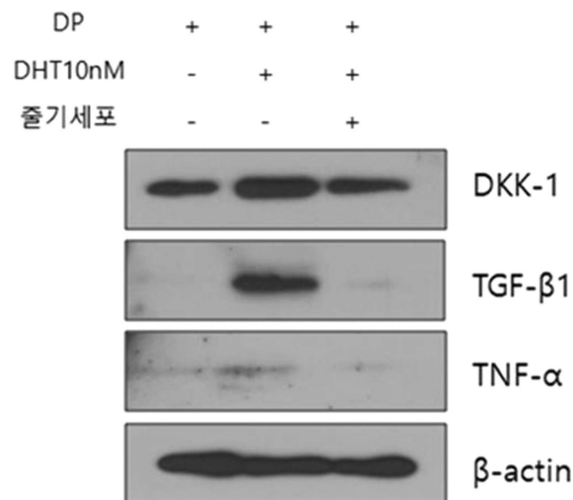
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **중간엽 줄기세포, 모유두 세포 및 외모근초 세포의 상호작용을 이용한 외모근초 세포 증식방법 및 탈모치료제 스크리닝 방법**

(57) 요약

본 발명은 각기 다른 3종의 세포에서 서로간의 직접적인 상호작용을 통해 외모근초 세포의 증식을 촉진시키는 배양방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 본 발명의 외모근초 세포 증식을 통해 세포치료제를 스크리닝하거나, 탈모치료제를 스크리닝하는 방법으로도 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

C12N 2501/39 (2013.01)

C12N 2502/092 (2013.01)

C12N 2502/1352 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 줄기세포와 모유두 세포를 1차 공배양하는 단계; 및
- 2) 상기 1) 단계에서 공배양한 후에 회수된 모유두 세포를 외모근초 세포와 2차 공배양하는 단계;를 포함하는 외모근초 세포의 증식방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 줄기세포는 골수, 혈액, 뇌, 피부, 지방, 체대혈 및 체대 유래 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 외모근초 세포의 증식방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 모유두 세포는 디하이드로테스토스테론(dehydrotestosterone, DHT)에 의해 TGF- β 1, TNF- α 및 DKK-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 인자 발현이 상향 조절된(up-regulated)된 것을 특징으로 하는 외모근초 세포의 증식방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 1) 단계의 1차 공배양은 1 내지 6 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 외모근초 세포의 증식방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 2) 단계의 2차 공배양은 1일 내지 5일 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 외모근초 세포의 증식방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 1) 단계의 1차 공배양시 줄기세포와 모유두 세포의 혼합 비율은 1 : 0.5 내지 1 : 5인 것을 특징으로 하는 외모근초 세포의 증식방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 2) 단계의 2차 공배양시 모유두 세포와 외모근초 세포의 혼합 비율은 1 : 0.5 내지 1 : 1.5인 것을 특징으로 하는 외모근초 세포의 증식방법.

청구항 8

줄기세포 및 모유두 세포를 공배양하는 단계를 포함하는, TGF- β 1, TNF- α 및 DKK-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 인자 발현이 하향 조절(down-regulated)된 모유두 세포의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 줄기세포는 골수, 혈액, 뇌, 피부, 지방, 체대혈 및 체대 유래 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는

어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 모유두 세포의 제조방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 공배양 단계는 1 내지 6 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 모유두 세포의 제조방법.

청구항 11

제8항에 있어서,

상기 공배양시 줄기세포와 모유두 세포의 혼합 비율은 1 : 0.5 내지 1 : 5인 것을 특징으로 하는 모유두 세포의 제조방법.

청구항 12

a) 디하이드로테스토스테론(dehydrotestosterone, DHT) 존재하에서 의약 후보물질과 모유두 세포를 1차 공배양하는 단계;

b) 상기 a) 단계에서 공배양한 후에 회수된 모유두 세포를 외모근초 세포와 2차 공배양하는 단계; 및

c) 상기 외모근초 세포의 증식 정도를 평가하는 단계;를 포함하는 DHT에 의해 유발된 탈모를 치료하는 물질을 스크리닝하는 방법.

청구항 13

디하이드로테스토스테론(dehydrotestosterone, DHT)으로 처리된 모유두 세포 및 외모근초 세포가 각각 분리되어 포함되어 있는, 탈모 치료제 스크리닝용 키트.

청구항 14

A) 디하이드로테스토스테론(dehydrotestosterone, DHT) 존재 하에서 의약 후보물질과 모유두 세포를 1차 공배양하는 단계;

B) 상기 A) 단계에서 공배양한 후에 회수된 모유두 세포를 외모근초 세포와 2차 공배양하는 단계; 및

C) 상기 외모근초 세포의 증식 정도를 측정하는 단계;를 포함하는, 의약 후보물질의 외모근초 세포 증식도 측정 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 각기 다른 3종의 세포에서 서로간의 직접적인 상호작용을 통해 외모근초 세포의 증식을 촉진시키는 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 본 발명의 외모근초 세포 증식을 통해 DHT에 의해 유발되는 탈모를 치료하는 물질을 스크리닝하는 방법으로도 사용될 수 있다.

배경 기술

[0002] 남성형 탈모(AGA: androgenetic alopecia)란 탈모의 대표적 질환으로 안드로겐성 탈모증, 유전성 안드로겐성 탈모증, 남성형 탈모증이라고 하며, 유전과 남성호르몬인 안드로겐(androgen)에 의해 모발이 빠지는 대표적 탈모 질환이다. 병리적 기전은 체내에 있는 남성호르몬인 테스토스테론(testosterone)이 모낭에 있는 5 α -환원효소(5-alpha reductase, 5-AR)에 의해서 남성형 탈모의 원인이 되는 디하이드로테스토스테론(dehydrotestosterone, DHT)으로 전환되어 안드로겐 수용체(AR)와 결합하여 모낭(hair follicle)에 단백질 합성 물질을 저해하고 모유두(dermal papilla)의 축소를 유발시켜 탈모를 일으킨다. 이는 탈모가 진행중인 전두부 모낭(frontal follicle)과 탈모가 일어나지 않는 후두부 모낭(occipital follicle)에서의 5 α -환원효소 활성을 비교한 결과로부터 확인되었다(비특허문헌 1). 남성형 안드로겐성 탈모증에서의 탈모는 디하이드로테스토스테론(DHT)에 의존적이며, DHT에 의해 모낭의 모유두(dermal papilla, DP) 세포로부터 모낭 성장을 억제하는 DKK-1(Dickkopf-1)가 분비되어 모낭의 성장에 중요한 역할을 하는 외모근초(Outer root sheath, ORS) 세포의 성장

을 억제함으로써 남성형 탈모를 유발하게 되는 것이다.

[0003] 이에 따라, 탈모 및 전립선 비대증에 대한 호르몬적 치료 중에서 DHT의 생성단계를 차단하는 5-알파 환원효소 억제제(5-alpha reductase inhibitor, 5-ARI)가 관심을 끌게 되었다. 잘 알려진 5-알파 환원효소 억제제로는 피나스테리드(Finasteride)와 두타스테리드(Dutasteride)가 있는데, 이들 5-알파 환원효소 억제제는 5RD 5-알파 환원효소를 억제하여 DHT 생성을 저해함으로써 혈중 및 두피의 DHT를 감소시키고 정수리와 앞이마 모두에 효과가 있어 현재 남성형 탈모증의 치료에 널리 사용되고 있다.

[0004] 현재 상용화되는 5-알파 환원효소 억제제들은 스테로이드(steroid) 계통의 약물로서 성욕감퇴, 성기능 장애, 정액량의 이상, 여성형 유방 등의 부작용이 있으며, 일부 고등급 분화도의 전립선 암의 발생률을 유의하게 증가시키므로, 건강한 남성에서 탈모 치료를 위한 5-알파 환원효소 억제제의 복용은 권고되고 있지 않다.

[0005] 따라서, 부작용 없이 DHT에 의해 성장이 저해된 모유두 세포와 외모근초 세포의 증식을 촉진하는 새로운 기술 개발에 관심이 집중되고 있고, 이와 더불어 스테로이드 계통의 약물이 아닌 물질 중에서 부작용 없고, DHT 호르몬에 의해 손상된 모유두 세포의 기능을 회복시키고, 외모근초 세포의 성장을 촉진할 수 있는 새로운 예방 또는 치료제를 개발할 수 있는 스크리닝 기술 개발에 대해 절실히 요구되고 있다.

[0006] 상기한 배경기술로서 설명된 사항들은 본 발명의 배경에 대한 이해 증진을 위한 것일 뿐, 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 이미 알려진 종래기술에 해당함을 인정하는 것으로 받아들여져서는 안 될 것이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1. Itami S, Inui S. Role of androgen in mesenchymal epithelial interactions in human hair follicle. J Investig Dermatol Symp Proc. 2005, 10(3):209-11

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 줄기세포, 모유두 세포 및 외모근초 세포의 상호작용을 기반으로 하여, DHT에 의해 기능 및 성장이 저해된 모유두 세포와 외모근초 세포의 증식을 개선하고자 예의 노력을 하였다. 그 결과, 세포 간 상호작용을 기반으로 하여 각각의 세포에 대한 배양전략을 고안하였고, 이를 이용하여 DHT에 의해 손상된 모유두 세포의 기능을 회복시키고, 회복된 모유두 세포를 통해 외모근초 세포의 증식을 촉진하는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 1) 줄기세포와 모유두 세포를 1차 공배양하는 단계; 및

[0010] 2) 상기 1) 단계에서 수득한 모유두 세포를 외모근초 세포와 2차 공배양하는 단계;를 포함하는 외모근초 세포의 증식방법을 제공하는데 있다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 줄기세포 및 모유두 세포를 공배양하는 단계를 포함하는, TGF- β 1(형질전환 성장 인자- β 1), TNF- α (종양 괴사 인자- α) 및 DKK-1[딕코프(Dickkopf)-1]로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 인자 발현이 하향 조절된(down-regulated)된 모유두 세포의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 a) DHT 존재하에서 의약 후보물질과 모유두 세포를 1차 공배양하는 단계; b) 상기 a) 단계에서 수득한 모유두 세포를 외모근초 세포와 2차 공배양하는 단계; 및 c) 상기 외모근초 세포의 증식 정도를 평가하는 단계;를 포함하는 DHT에 의해 유발된 탈모를 치료하는 물질을 스크리닝하는 방법 및 키트를 제공하는데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 A) 디하이드로테스토스테론(dehydrotestosterone, DHT) 존재 하에서 의약 후보물질과 모유두 세포를 1차 공배양하는 단계; B) 상기 A) 단계에서 공배양한 후에 회수된 모유두 세포를 외모근초 세포와 2차 공배양하는 단계; 및 C) 상기 외모근초 세포의 증식 정도를 측정하는 단계;를 포함하는, 의약 후보물질

의 외모근초 세포 증식도 측정방법을 제공하는데 있다.

[0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 줄기세포, 모유두 세포 및 외모근초 세포의 상호작용을 기반으로 하는 외모근초 세포의 증식을 촉진하는 배양방법을 제공한다.

[0016] 본 발명자는 남성형 안드로겐성 탈모증에서의 탈모가 디하이드로테스토스테론(DHT)으로부터 모낭 성장을 억제하는 DKK-1이 분비되어 외모근초 세포의 성장을 억제하고 약화시키고 있다는 점을 기반으로 하여, 분비된 DKK-1에 의한 외모근초 세포의 분열 저하를 억제하는 외모근초 세포의 증식방법을 발굴하고자 노력한 결과, 줄기세포와 모유두 세포를 1차 공배양하고, 이로부터 수득된 모유두 세포와 외모근초 세포를 2차 공배양함으로써 DHT에 의해 성장이 억제된 모유두 세포에서 DKK-1 발현을 억제하고, 이를 이용하여 외모근초 세포의 증식을 직접적이고 효과적으로 촉진됨을 확인하였다.

[0017] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 외모근초 세포의 증식방법은 하기의 단계를 포함한다:

[0018] 1) 줄기세포와 모유두 세포를 1차 공배양하는 단계; 및

[0019] 2) 상기 1) 단계에서 수득한 모유두 세포를 외모근초 세포와 2차 공배양하는 단계.

[0020] 우선, 1) 줄기세포와 모유두 세포를 공배양한다.

[0021] 상기 줄기세포는 다능성을 유지하면서 자가 재생 능력을 가지는 것일 수 있고, 예를 들어 상기 줄기세포는 골수, 혈액, 뇌, 피부, 지방, 제대혈 및 제대 유래 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 제대의 와튼 젤리(Wharton's jelly)일 수 있다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 배양에 의해 시험관 내에서 증식될 수 있고, 동결보존되고, 해동되고, 이후 배양에 의해 시험관 내에서 증식된 것일 수 있다.

[0023] 또한 상기 줄기세포는 모유두 세포와 공배양하기 전에 배양배지(무혈청 또는 혈청 보충)로 전배양한 것을 사용할 수 있는데, 예를 들면 본 발명에 따른 세포 배양 배지에 1×10^6 내지 1×10^3 개의 생존가능한 세포/ml로 씨딩하고, 5% CO₂, 37°C 조건에서 밤새 배양한 것을 사용할 수 있다. 전배양 과정에서는 배양 배지를 교체하거나 필요한 바와 같이 변경하지 아니함으로써, 상기 줄기세포를 굶주리게 하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 줄기세포는 전배양 과정에서 증식률이 80 내지 90%일 때 계대배양한 것일 수 있다.

[0024] 상기 모유두 세포는 외부 환경 요인들에 의하여 TGF- β 1, TNF- α 및 DKK-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 인자 발현이 상향 조절된(up-regulated)된 것일 수 있고, 바람직하게는 디하이드로테스토스테론(DHT)에 의해 TGF- β 1, TNF- α 및 DKK-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 인자 발현이 증가된 것일 수 있다. 상기 인자들은 퇴행기를 유도할 수 있다.

[0025] 본 발명에서 "퇴행기"란, 모주기(hair cycle)의 총 4 단계 중에서 성장을 종료하고 모구부가 축소하는 시기를 의미한다. 앞서 설명한 바와 같이 탈모는 머리카락을 생성하는 모유두 세포에 디하이드로테스토스테론이나 각종 스트레스 등 탈모 유발 요인으로 작용하는 외부 환경 요인들에 의해 자극을 받은 세포에서 세포사멸인자 즉, 퇴행기 유도 인자(BMP, DKK-1, TGF-beta, IL-1, FGF5, TNF-alpha)가 방출되고, 상기 인자들에 의해 자가 및 주변 세포들에 세포사멸신호를 보내게 되어, 모낭의 수축되거나, 소형화되는 퇴행기가 유도되게 된다. 퇴행기로 유도된 모발은 약한 자극이나 힘에도 손쉽게 탈락하게 되고, 상술한 인자에 의해 발생기로 접어들지 못하므로 모발이 빠진 다음 새로운 주기의 모발이 형성되지 못하게 되어 탈모가 발생하게 된다. 이러한 퇴행기 유발인자로 알려진 것들은 TGF- β 1, TNF- α 및 DKK-1가 있다.

[0026] 상기 1) 단계의 1차 공배양은 1 내지 6 시간 동안 수행될 수 있는데, 1 시간 미만으로 수행될 경우 충분한 배양 시간을 확보하지 못하여 모유두 세포에서 퇴행기 유도인자 발현이 억제되지 못하는 문제가 발생하고, 6 시간을 초과할 경우 상기 모유두 세포에서 오히려 퇴행기 유도인자 발현이 증가되는 현상이 발생할 수 있다.

[0027] 또한 상기 줄기세포와 모유두 세포의 공배양시 혼합 비율은 1 : 0.5 내지 1 : 5일 수 있는데, 상기 줄기세포 대비 모유두 세포의 혼합 비율이 0.5 미만일 경우 상기 모유두 세포에서 오히려 퇴행기 유도인자 발현이 증가하는

문제가 발생할 수 있고, 상기 줄기세포 대비 모유두 세포의 혼합 비율이 5를 초과할 경우 세포 간에 상호작용을 형성할 충분한 시간을 확보하지 못하여 모유두 세포에서 퇴행기 유도인자 발현이 억제되지 못하는 문제가 발생할 수 있다.

- [0028] 본 발명에서 상기 줄기세포와 모유두 세포의 혼합 비율은, 상기 줄기세포의 세포수 대비 상기 모유두 세포의 세포수 비율을 의미한다.
- [0029] 상술한 1) 단계의 1차 공배양을 통해 모유두 세포는 퇴행기 유도인자(TGF- β 1, TNF- α 및 DKK-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나)의 발현이 하향 조절(down-regulated)됨으로써, 외부 환경 인자(예를 들어, 디하이드로테스토스테론)로 인해 손상된 기능이 회복 또는 활성화되는 것이다.
- [0030] 다음으로 2) 상기 1) 단계에서 공배양 후에 회수된 모유두 세포를 외모근초 세포와 2차 공배양하여, 외모근초 세포의 증식을 촉진한다. 이때, 상기 2) 단계의 2차 공배양은 1일 내지 5일 동안 수행될 수 있다. 만약 상기 2차 공배양이 1 일 미만으로 수행될 경우 충분한 배양 시간을 확보하지 못하여 외모근초 세포의 증식이 충분히 촉진되지 못하는 문제가 발생하고, 5일을 초과하여도 무방하나, 세포의 밀도가 과도해져 세포증식이 저하되는 현상이 발생하므로 시간 대비 비용효율적이지 못하다.
- [0031] 상기 2) 단계의 2차 공배양시 모유두 세포와 외모근초 세포의 혼합 비율은 1 : 0.5 내지 1 : 1.5일 수 있는데, 상기 1) 단계로부터 수득된 모유두 세포 대비 외모근초 세포 혼합 비율이 0.5 미만이거나, 1.5를 초과할 경우 세포 간에 상호작용을 형성할 충분한 시간을 확보하지 못하여 모유두 세포에 의해 외모근초 세포의 증식이 촉진되지 못하는 문제가 발생할 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 상기 1) 단계로부터 수득된 모유두 세포와 외모근초 세포의 혼합 비율은, 상기 1) 단계로부터 수득된 모유두세포의 세포수 대비 상기 외모근초 세포의 세포수 비율을 의미한다.
- [0033] 본 발명에서 용어 "촉진"은 세포 증식의 증가 또는 가속화를 정의하기 위해 사용된다. 증가되거나 가속화된 세포의 증식을 확인하기 위한 방법으로는 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법들이 사용될 수 있는데, 예를 들어 MTT 분석법, 브로모데옥시우리딘(BrdU) 혼입 분석법 또는 실시간 증식 분석법, 예를 들어, 로슈(Roch)사의 xCELLigence(상표명) 시스템을 사용하여 시간에 걸쳐 생성되는 세포의 수에 기초하여 측정될 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 "증식" 또는 "성장" 이란 세포가 분열되어 동질의 거시 불어나는 것으로서 보통 다세포생물의 체내에서 세포수가 증가되어 가는 것을 말한다. 세포수가 증식(증폭)되어 어느 시기에 이르면 형질이 변화(분화)되어 가는 것과 동시에 제어되고 있는 것이 보통이다.
- [0035] 세포 증식이 촉진되었는지를 확인하는 방법으로, 세포의 집단을 본 발명에 따른 세포 배양 배지 또는 동등한 대조군 배지에서 배양함으로써, 각 배양 배지에서의 세포 증식을 매일, 배양 중에 소정의 기간에 걸쳐 평가하거나 실시간으로 추적하여 측정할 수 있다. 소정의 기간 동안 세포의 수가 대조군에 비하여 증가되었거나 가속화되었다면 이는 세포 증식이 촉진된 것으로 나타낼 수 있다.
- [0036] 본 발명에서 사용되는 배지는 세포 주변의 환경의 구성성분을 포함하고, 상기 배지는 세포가 성장되게 하기에 적합한 조건에 기여하거나 이를 제공하는 것으로서, 고체, 액체, 기체 및 이들의 혼합물을 포함할 수 있다. 본 발명에서의 배양배지는 기본 배양 배지를 사용함으로써 제조될 수 있는데, 이는 줄기세포, 모유두 세포 및 외모근초 세포의 배양에 사용될 수 있는 통상적으로 널리 알려진 배지라면 특별히 제한되지 않는다. 상업적으로 제조된 배지는 예를 들어 상업적으로 제조된 배지는 예를 들면, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium), EDM(Endothelial differentiation medium), MEM(Minimal Essential Medium), BME(Basal Medium Eagle), RPMI 1640, F-10, F-12, α -MEM(α -Minimal Essential Medium), G-MEM(Glasgow's Minimal Essential Medium) 및 Iscove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명에서의 배양 배지는 임의의 구성성분, 예컨대 지방산 또는 지질, 비타민, 사이토카인, 항산화제, 완충제, 무기염 등을 함유할 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 사용되는 세포 배양 배지는 모든 필수 아미노산을 함유하고, 비필수 아미노산을 또한 함유할 수 있다. 일반적으로, 아미노산은 필수 아미노산(Thr, Met, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Lys, His) 및 비-필수 아미노산(Gly, Ala, Ser, Cys, Gln, Asn, Asp, Tyr, Arg, Pro)으로 분류된다.
- [0039] 해당 분야의 숙련자는 최적의 결과를 위하여, 기본 배지가 세포 증식을 증진시키기에 적당한 수준으로 이용가능한 주요 영양소와 함께, 관심 세포주에 적절해야 하는 것을 이해할 것이다. 예를 들어, 에너지원이 고갈되고 이에 따라 세포 증식을 제한하는 것으로 관찰된다면, 기본 배지에서 글루코스(또는 다른 에너지원)의 수준을 증가

시키거나, 배양 과정 동안 글루코스(또는 다른 에너지원)를 첨가하는 것이 필요할 수 있다.

- [0040] 본 발명의 일 양태에 있어서, 본 발명의 배양 배지는 추가 성분들이 첨가될 수 있는데, 구체적으로 항생제, 항진균제, 알부민, 아미노산, 및 기타 세포 배양 기술분야에 공지된 성분이 될 수 있다. 또, 필요 시 분화 과정을 강화시켜 주기 위한 성분들이 첨가될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 외모근초 세포의 증식방법은 줄기세포의 세포막을 깨어, 세포 내 유효성분을 분리하는 단계를 거치지 않고도 퇴행기의 유도인자 발현이 증가된 모유두 세포의 기능을 활성화함으로써, 상기 활성화된 모유두 세포를 통해 외모근초 세포의 증식을 촉진하는 효과를 나타낸다.
- [0042] 또한 이렇게 추출한 모유두 세포 및 외모근초 세포는, 줄기세포를 직접 사용하지 않고, 모유두 세포를 거쳐 외모근초 세포에 간접적으로 적용하기 때문에 법적 문제나 윤리적인 문제, 인체 내 면역 거부 반응 등의 부작용이 없다는 장점이 있다.
- [0043] 앞서 배경기술에도 언급한 바와 같이 탈모의 원인이 되는 DHT를 감소시키는 약물로 피나스테리드로 만들어진 프로페시아가 개발된 바 있으나, 이는 5 α -reductase를 차단하여 DHT 생성을 억제하여 남성형 탈모증세가 진행되는 것을 최대한 늦추는 효과가 있을 뿐이라는 점에서 한계가 있으나, 본 발명을 통해 DHT 존재 하에서 모유두 세포의 기능을 회복 및 활성화할 수 있고 외모근초 세포의 증식을 촉진할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 외모근초 세포의 증식방법은 실시예 1, 2 및 도 1에 도식화한 2 단계 배양 공정을 이용하여 외부 환경 인자들에 의해 손상된 모유두 세포를 회복시키고, 이를 디하이드로테스토스테론에 의해 성장이 감소된 외모근초 세포에 처리함으로써, 외모근초 세포의 성장 및 증식을 촉진시킬 수 있다. 상기 실시예에 따른 배양방법으로 외모근초 세포를 배양한 결과, 10 nM의 디하이드로테스토스테론(DHT) 존재 하에서도 세포 증식이 정상 수치로 회복되었음을 확인할 수 있다. 이와 대비하여 공배양 과정이 생략되는 경우에는 외모근초 세포의 증식률이 50% 감소됨을 알 수 있다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 줄기세포 및 모유두 세포를 공배양하는 단계를 포함하는, TGF- β 1, TNF- α 및 DKK-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 인자 발현이 억제된 모유두 세포의 제조방법을 제공한다. 이때, 상기 TGF- β 1, TNF- α 및 DKK-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 퇴행기 유도인자 발현이 억제된 모유두 세포의 제조방법에 대한 설명 중 상술한 본 발명의 외모근초 세포의 증식방법에 대한 설명과 동일한 부분은 그 부분을 참고하기로 한다.
- [0046] 상기 줄기세포는 다능성을 유지하면서 자가 재생 능력을 가지는 것일 수 있고, 예를 들어 상기 줄기세포는 골수, 혈액, 뇌, 피부, 지방, 제대혈 및 제대 유래 줄기세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 제대의 와튼 젤리(Wharton's jelly)일 수 있다.
- [0047] 본 발명에 있어서, 상기 줄기세포는 배양에 의해 시험관 내에서 증식될 수 있고, 동결보존되고, 해동되고, 이후 배양에 의해 시험관 내에서 증식된 것일 수 있다.
- [0048] 또한 상기 줄기세포는 모유두 세포와 공배양하기 전에 배양배지(무혈청 또는 혈청 보충)로 전배양한 것을 사용할 수 있는데, 예를 들면 본 발명에 따른 세포 배양 배지에 1×10^6 내지 1×10^3 개의 생존가능한 세포/ μ l로 씨딩하고, 5% CO₂, 37°C 조건에서 밤새 배양한 것을 사용할 수 있다. 전배양 과정에서는 배양 배지를 교체하거나 필요한 바와 같이 변경하지 아니함으로써, 상기 줄기세포를 굶주리게 하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 줄기세포는 전배양 과정에서 증식률이 80 내지 90%일 때 계대배양할 수 있다.
- [0049] 상기 모유두 세포는 외부 환경 요인들에 의하여 TGF- β 1, TNF- α 및 DKK-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 퇴행기 유도인자 발현이 증가된 것일 수 있고, 바람직하게는 디하이드로테스토스테론(DHT)에 의해 TGF- β 1, TNF- α 및 DKK-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 퇴행기 유도인자 발현이 증가된 것일 수 있다.
- [0050] 상기 공배양은 1 내지 6 시간동안 수행될 수 있는데, 1 시간 미만으로 수행될 경우 충분한 배양 시간을 확보하지 못하여 모유두 세포에서 퇴행기 유도인자 발현이 억제되지 못하는 문제가 발생하고, 6 시간을 초과할 경우 상기 모유두 세포에서 오히려 퇴행기 유도인자 발현이 증가되는 현상이 발생할 수 있다.
- [0051] 또한 상기 줄기세포와 모유두 세포의 공배양시 혼합 비율은 1 : 0.5 내지 1 : 5일 수 있는데, 상기 줄기세포 대비 모유두 세포의 혼합 비율이 0.5 미만일 경우 상기 모유두 세포에서 오히려 퇴행기 유도인자 발현이 증가하는

문제가 발생할 수 있고, 상기 줄기세포 대비 모유두 세포의 혼합 비율이 5를 초과할 경우 세포 간에 상호작용을 형성할 충분한 시간을 확보하지 못하여 모유두 세포에서 퇴행기 유도인자 발현이 억제되지 못하는 문제가 발생할 수 있다.

- [0052] 본 발명에서 상기 줄기세포와 모유두 세포의 혼합 비율은, 상기 줄기세포의 세포수 대비 상기 모유두 세포의 세포수 비율을 의미한다.
- [0053] 상술한 공배양을 통해 퇴행기 유도인자(TGF- β 1, TNF- α 및 DKK-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나)의 발현이 하향 조절(down-regulated)됨으로써, 외부 환경 인자(예를 들어, 디하이드로테스토스테론)로 인해 손상된 기능이 회복 또는 활성화된 모유두 세포를 획득할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 DHT에 의해 유발된 탈모를 치료하는 물질을 스크리닝하는 방법을 제공한다.
- [0055] a) DHT 존재하에서 의약 후보물질과 모유두 세포를 1차 공배양하는 단계;
- [0056] b) 상기 a) 단계에서 공배양한 후에 회수된 모유두 세포를 외모근초 세포와 2차 공배양하는 단계; 및
- [0057] c) 상기 외모근초 세포의 증식 정도를 평가하는 단계.
- [0058] 상기 의약 후보물질은 합성 또는 천연 화합물로부터 얻을 수 있으며, 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다. 시험 물질은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레스를 패러럴 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, "1-비드 1-화합물" 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6909, 1993; Erb et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37, 2678, 1994; Cho et al., Science 261, 1303, 1993; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2059, 1994; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2061; Gallop et al., J. Med. Chem. 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.
- [0059] 또한 상기 의약 후보물질은 세포 또는 바이오분자일 수도 있는데, 바이오분자란 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질 또는 생체내 및 생체 외에서 세포 시스템 등을 이용하여 생산된 물질을 의미하며, 구체적으로 폴리뉴클레오타이드, 펩타이드, 항체 또는 기타 혈장에서 발견되는 단백질 또는 생물학적 유기물질일 수 있다.
- [0060] 본 발명의 스크리닝 방법은, DHT 존재하에서 상기 의약 후보물질과 모유두 세포를 공배양한 후, 획득된 모유두 세포를 외모근초 세포와 2차 공배양하여, 상기 외모근초 세포의 증식 정도를 대조군과 비교함으로써 DHT에 의해 유발된 탈모를 치료하는 물질을 선별하는 것이다.
- [0061] 상기 모유두 세포의 경우, 디하이드로테스토스테론(dehydrotestosterone,DHT)에 의해 안드로겐 수용체(AR)와 결합하여 모낭에 단백질 합성 물질을 저해하고 모유두의 기능 및 성장이 축소된다. 이를 외모근초 세포와 공배양할 경우, 정상적인 외모근초 세포와 비교하여 외모근초 세포의 성장이 저해되는 것이다.
- [0062] 따라서, 상기 DHT 존재하에서, 상기 의약 후보물질과 모유두 세포를 1차 공배양하고, 이로부터 획득된 모유두 세포를 외모근초 세포와 2차 공배양한 경우, DHT 존재하에서 의약 후보물질을 처리하지 않은 음성대조군과 비교하여 상기 외모근초 세포의 증식이 증가된 경우, 상기 의약 후보물질을 DHT에 의해 유발된 탈모를 치료하는 물질로 선별한다. 음성대조군과 비교하여 10% 이상, 바람직하게는 30% 이상, 보다 더 바람직하게는 50% 이상 증가된 것을 탈모를 치료하는 물질로 선별할 수 있다. 이러한 물질은 임상실험 등을 거쳐 모유두 세포에서 DKK-1 하향 조절제로 개발될 수 있거나 또는 외모근초 세포의 증식을 촉진하는 조성물의 성분으로 포함될 수 있다.
- [0063] 이와 반대로 상기 DHT 존재하에서, 상기 의약 후보물질과 모유두 세포를 1차 공배양 하고, 이로부터 획득된 모유두세포를 외모근초 세포와 2차 공배양한 경우, DHT 존재하에서 의약 후보물질을 처리하지 않은 음성대조군과 비교하여 상기 외모근초 세포의 증식이 감소한 경우, DHT에 의해 유발된 탈모를 치료하는 물질로 선별될 수 없다.

- [0064] 상기 외모근초 세포의 증식은 직접 또는 간접적으로 측정될 수 있으며, 세포 증식이 촉진되었는지를 확인하는 방법으로, 세포의 집단을 본 발명에 따른 세포 배양 배지 또는 동등한 대조군 배지에서 배양함으로써, 각 배양 배지에서의 세포 증식을 매일, 배양 중에 소정의 기간에 걸쳐 평가하거나 실시간으로 추적하여 측정할 수 있다. 소정의 기간 동안 세포의 수가 대조군에 비하여 증가되었거나 가속화되었다면 이는 세포 증식이 촉진된 것으로 나타낼 수 있다.
- [0065] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 디하이드로테스토스테론(dehydrotestosterone, DHT)으로 처리된 모유두 세포 및 외모근초 세포가 각각 분리되어 포함되어 있는, 탈모 치료제 스크리닝용 키트를 제공한다.
- [0066] 상기 모유두 세포와 외모근초 세포는 서로 분리된 용기에 각각 존재하며, 시료 혹은 의약 후보물질을 모유두 세포에 첨가하여 1차 공배양한 후, 상기 1차 공배양한 후에 회수된 모유두 세포를 외모근초 세포와 2차 공배양하여, 외모근초 세포의 증식을 평가함으로써, 탈모 치료제를 스크리닝 할 수 있는 키트이다.
- [0067] 본 발명의 용어 "스크리닝용 키트"란 다수의 후보물질 중에서 특정한 효과를 나타내는 물질을 선별하는데 사용되는 키트를 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 스크리닝용 키트는 특별히 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 본 발명의 모유두세포와 외모근초 세포를 이용하여 2단계 공정을 통해 외모근초 세포의 증식을 개선 또는 촉진할 수 있는 효과를 나타내는 물질을 선별하는데 사용되는 키트가 될 수 있다. 보다 바람직하게는 각각의 기판에 상기 모유두 세포 및 외모근초 세포가 서로 분리되어 위치하여 2 단계 세포 공배양을 용이하게 수행하고, 외모근초 세포의 증식 변화를 용이하게 검출할 수 있는 키트가 될 수 있다.
- [0068] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 의약 후보물질의 외모근초 세포 증식도 측정방법을 제공한다.
- [0069] A) 디하이드로테스토스테론(dehydrotestosterone, DHT) 존재 하에서 의약 후보물질과 모유두 세포를 1차 공배양하는 단계;
- [0070] B) 상기 A) 단계에서 공배양한 후에 회수된 모유두 세포를 외모근초 세포와 2차 공배양하는 단계; 및
- [0071] C) 상기 외모근초 세포의 증식 정도를 측정하는 단계.
- [0072] 이때, 상기 외모근초 세포의 증식 정도를 측정방법에 대한 설명 중 상술한 본 발명의 DHT에 의해 유발된 탈모를 치료하는 물질을 스크리닝하는 방법에 대한 설명과 동일한 부분은 그 부분을 참고하기로 한다.
- [0073] 상기 의약 후보물질은 합성 또는 천연 화합물로부터 얻을 수 있으며, 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다. 시험 물질은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레스블 패러렐 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, "1-비드 1-화합물" 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6909, 1993; Erb et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37, 2678, 1994; Cho et al., Science 261, 1303, 1993; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2059, 1994; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2061; Gallop et al., J. Med. Chem. 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.
- [0074] 또한 상기 의약 후보물질은 세포 또는 바이오분자일 수도 있는데, 바이오분자란 단백질, 핵산, 탄수화물, 지질 또는 생체내 및 생체 외에서 세포 시스템 등을 이용하여 생산된 물질을 의미하며, 구체적으로 폴리뉴클레오타이드, 펩타이드, 항체 또는 기타 혈장에서 발견되는 단백질 또는 생물학적 유기물질일 수 있다.
- [0075] 본 발명의 외모근초 세포 증식도 측정방법은, DHT 존재하에서 상기 의약 후보물질과 모유두 세포를 공배양한 후, 수득된 모유두 세포를 외모근초 세포와 2차 공배양하여, 상기 외모근초 세포의 증식 정도를 대조군과 비교함으로써 DHT에 의해 유발된 외모근초 세포의 증식 억제와 이에 따른 모발길이성장 억제를 치료하는 물질을 선별하는 것이다.

- [0076] 상기 모유두 세포의 경우, 디하이드로테스토스테론(dehydrotestosterone, DHT)에 의해 안드로겐 수용체(AR)와 결합하여 모낭에 단백질 합성 물질을 저해하고 모유두의 기능 및 성장이 축소된다. 이를 외모근초 세포와 공배양할 경우, 정상적인 외모근초 세포와 비교하여 외모근초 세포의 성장이 저해되는 것이다.
- [0077] 따라서, 상기 DHT 존재하에서, 상기 의약 후보물질과 모유두 세포를 1차 공배양하고, 이로부터 수득된 모유두 세포를 외모근초 세포와 2차 공배양한 경우, DHT 존재하에서 의약 후보물질을 처리하지 않은 음성대조군과 비교하여 상기 외모근초 세포의 증식이 증가된 경우, 상기 의약 후보물질을 DHT에 의해 유발된 탈모를 치료하는 물질로 선별한다. 음성대조군과 비교하여 10% 이상, 바람직하게는 30% 이상, 보다 더 바람직하게는 50% 이상 증가된 것을 외모근초 세포 증식촉진 물질로 선별할 수 있다.
- [0078] 이와 반대로 상기 DHT 존재하에서, 상기 의약 후보물질과 모유두 세포를 1차 공배양 하고, 이로부터 수득된 모유두세포를 외모근초 세포와 2차 공배양한 경우, DHT 존재하에서 의약 후보물질을 처리하지 않은 음성대조군과 비교하여 상기 외모근초 세포의 증식이 감소한 경우, 외모근초 세포 증식을 촉진하는 물질로 선별될 수 없다.
- [0079] 상기 외모근초 세포의 증식은 직접 또는 간접적으로 측정될 수 있으며, 세포 증식이 촉진되었는지를 확인하는 방법으로, 세포의 집단을 본 발명에 따른 세포 배양 배지 또는 동등한 대조군 배지에서 배양함으로써, 각 배양 배지에서의 세포 증식을 매일, 배양 중에 소정의 기간에 걸쳐 평가하거나 실시간으로 추적하여 측정할 수 있다. 소정의 기간 동안 세포의 수가 대조군에 비하여 증가되었거나 가속화되었다면 이는 세포 증식이 촉진된 것으로 나타낼 수 있다.
- [0080] 상기 방법은 기존의 방법이 인체 모발 조직을 이용하기 때문에 조직을 구하기 어렵고 이에 따른 실험기간이 길며 반복실험을 하는데 제한적인 문제점을 대체하는 새로운 방법으로서, 외모근초 세포의 증식정도에 대해 재현성 있고 객관적 수치화가 가능하다.

발명의 효과

- [0081] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0082] (i) 본 발명은 2 단계 배양공정을 통해 외부 환경 인자에 의해 손상된 모유두 세포 및 외모근초 세포의 기능 및 성장을 증식시킬 수 있는 방법을 제공한다.
- [0083] (ii) 또한, 본 발명은 TGF- β 1, TNF- α 및 DKK-1로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 퇴행기 유도인자 발현이 억제된 모유두 세포의 제조방법을 제공한다.
- [0084] (iii) 본 발명의 배양방법을 통해 배양된 모유두 세포와 외모근초 세포는 줄기세포를 직접 사용하지 않고, 모유두 세포를 거쳐 외모근초 세포에 간접적으로 적용하기 때문에 법적 문제나 윤리적인 문제, 인체 내 면역 거부 반응 등의 부작용이 없다는 장점이 있다.
- [0085] (iv) 또한 본 발명은 줄기세포, 모유두 세포 및 외모근초 세포의 상호작용에 대한 이해를 기반으로 하여 DHT 존재 하에서 모유두 세포의 기능을 회복 및 활성화를 통해, 외모근초 세포의 증식을 촉진할 수 있어, 탈모의 개선, 완화 또는 치료에 효과적으로 활용되거나, DHT에 의한 탈모를 치료하기 위한 물질을 스크리닝 하는데 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0086] 도 1은 본 발명에 따른 2 단계 배양공정을 통해 외모근초 세포의 증식을 촉진하는 과정을 도시한 도면이다.
- 도 2는 DHT를 10 nM 또는 50 nM 처리하고 3, 6, 24 시간 배양한 모유두 세포(DP cell)에 대한 웨스턴 블롯 결과이다.
- 도 3은 실시예 1로부터 수득한 공배양된 모유두 세포에 대한 웨스턴 블롯 결과 사진이다.
- 도 4는 2 단계 공배양을 통해 배양된 외모근초 세포의 증식률을 측정하여 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0087] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0088] 실험방법

[0089] 1. 중간엽 줄기세포와 인간 모유두세포 분리 및 배양

[0090] 사람 탯줄의 와튼젤리(Wharton's Jelly)로부터 유래된 중간엽 줄기세포는 서울아산병원 줄기세포센터로부터 제공받아 10% 소태아혈청(fetal bivaïne serum, FBS)을 함유하는 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)(DMEM, WELGENE Inc.)배지를 이용하여 5% CO₂, 37°C 조건에서 배양되었다. 인간 모유두 세포(human dermal papilla cell, DP cell)는 인체 두피조직에서 모낭(hair follicle)을 낱개로 분리한 후, 모구(hair bulb)에서 모유두 세포를 채취하였다. 1% 항생제가 포함된 Follicle Dermal Papilla Cell Medium(PromoCell, Heidelberg, Germany) 배지를 사용하여 채취된 모유두 세포가 세포배양 접시(Cell Culture Dish)에 붙어 증식률 80% 수준에 다다르면 계대배양 하였으며 passage 3~4를 실험에 사용하였다.

[0091] 2. 외모근초세포(Outer root sheath, ORS cell) 배양

[0092] 외모근초 세포는 ScienCell사의 제품(HHORSC:human hair outer Roor Sheath Cells #2420)을 구매하여 Mesenchymal Stem Cell Medium(ScienCell Research Laboratories, Inc.)배지를 이용하여 5% CO₂, 37°C 조건에서 배양하였다.

[0093] 3. 단백질 분석을 위한 웨스턴 블롯(Western blot)

[0094] 우선, 측정하고자 하는 시료의 세포들을 모아서 RIPA buffer(20mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM Na₂EDTA, 1mM EGTA, 1% NP-40, 1% 소듐 데옥시콜레이트(sodium deoxycholate), 2.5mM 소듐 피로포스페이트(sodium pyrophosphate), 1mM β-글리세로포스페이트(β-glycerophosphate), 1mM Na₃VO₄, 1μg/ml 류펩틴(leupeptin)에 프로테아제 저해제 콕테일(protease inhibitor cocktail)(Roche Applied Science, Mannheim, Germany)을 첨가하여 단백질을 추출하였다. 이때 측정하고자 하는 시료는 다양한 농도의 DHT를 시간별로 처리한 모유두 세포 혹은 1차 공배양한 모유두 세포(DP cell) 등이 될 수 있다.

[0095] 상술한 과정을 통해 추출한 단백질 농도는 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)을 표준화하고, 브래드포드(Bradford)(Bio-Rad, USA)법으로 정량하여 10% 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔 전기영동(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)로 전기영동하여 분리한 다음, 이모빌론-P 막(Immobilon-P membrane)(Millipore, Billerica, MA, USA)에 전이시켰다. 이모빌론-P 막은 5% BSA로 처리하고 1차 항체로 TGF-β1, TNF-α(희석배수 1:1000, rabbit polyclonal, Abcam), DKK-1(희석배수 1:1000, mouse monoclonal, Santa cruz biotechnology), β-actin(희석배수 1:3000, mouse monoclonal, Sigma-aldrich)을 사용하였다. 단백질 발현 정도는 LuminateTM Forte western HRP substrate(Millipore, Billerica, MA, USA)을 이용하여 확인하였다.

[0096] 4. 외모근초 세포(Outer root sheath cell, ORS cell)의 증식률 측정

[0097] 외모근초 세포의 세포 증식률은 Cell Counting Kit-8(CCK-8)(Dojindo Lab, Tokyo, Japan)을 이용하여 측정하였다. 구체적으로 MCDB153을 이용하여 CCK-8을 1:10배로 희석하여 외모근초 세포에 첨가하고 1 시간 30 분 동안 반응시킨 후 마이크로플레이트 리더(microplate reader)(Victor X3, Perkin Elmer, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포증식 정도는 대조군의 흡광도 값과 비교하여 조사하였다.

[0098] <실시예 1> 중간엽 줄기세포(stem cell)와 인간 모유두 세포(DP cell)의 1차 공배양(co-culture)

[0099] 우선, 모유두 세포(DP cell)에 DHT를 10 nM를 첨가하고 3 시간 배양한 다음, 이를 중간엽 줄기세포와 1차 공배양(co-culture)하였다. 구체적으로 트랜스웰(Transwell)(24 mm Transwell[®] -COL Collagen-Coated 0.4 μm Pore PTFE Membrane Insert, Sterile, Corning Inc.)을 이용하여 모유두 세포(5×10⁴ cell/2 ml)는 상단칸

(upper compartment)에서 배양하고 중간엽 줄기세포(1×10^5 cell/2 ml)는 하단칸(lower compartment)에서 각각 배양하여 24시간 동안 굶주리게(Starvation)한 후 모유두 세포(DP cell)에 DHT 10 nM를 3 시간동안 처리하고, 다음으로 DHT에 의해 손상된 모유두 세포와 중간엽 줄기세포를 무혈청의 Follicle Dermal Papilla Cell Medium((PromoCell, Heidelberg, Germany) 배지를 이용하여 5% CO₂, 37°C 조건에서 2시간동안 공배양하였다.

<실시예 2> 2 단계 공배양을 통해 외모근초 세포 증식 촉진

1) 1차 공배양

우선, 모유두 세포(DP cell)에 DHT를 10 nM를 첨가하고 3 시간 배양한 다음, 이를 중간엽 줄기세포와 1차 공배양(co-culture)하였다. 구체적으로 Transwell(24 mm Transwell[®] -COL Collagen-Coated 0.4 μ m Pore PTFE Membrane Insert, Sterile, Corning Inc.)을 이용하여 모유두 세포(5×10^4 cell/2 ml)는 하단칸(lower compartment)에서 배양하고 중간엽 줄기세포(1×10^5 cell/2 ml)와 외모근초 세포(5×10^4 cell/2 ml)는 하단칸(lower compartment)에서 각각 배양하여 24시간 동안 굶주리게 (Starvation)한 후 모유두 세포(DP cell)에 DHT 10 nM를 3 시간동안 처리하고, 다음으로 DHT에 의해 손상된 모유두 세포와 중간엽 줄기세포를 무혈청의 Follicle Dermal Papilla Cell Medium((PromoCell, Heidelberg, Germany)배지를 이용하여 5% CO₂, 37°C 조건에서 2시간동안 공배양하였다.

2) 2차 공배양

2차 공배양은 상기 1차 공배양을 통해 회수한 모유두 세포(5×10^4 cell/2 ml)를 외모근초 세포(5×10^4 cell/2 ml)와 함께 무혈청 MCDB153(WELGENE Inc.) 배지를 이용하여 5% CO₂, 37°C 조건에서 2 일동안 공배양하였다.

<실험예 1> DHT 존재 하에서, 모유두 세포의 TGF- β 1, TNF- α , DKK-1(Dickkopf-1)의 발현양상 분석

모유두 세포에서 남성호르몬인 Dihydrotestosterone(DHT, Sigma-Aldrich, Inc.)에 의한 모발 퇴행기 물질인 TGF- β 1(Transforming growth factor-beta 1), TNF- α (tumor necrosis factor-alpha), DKK-1(Dickkopf-1)의 단백질 발현양상을 확인하기 위해 모유두 세포(DP cell)에 DHT를 농도별 10 nM 또는 50nM로 3, 6, 24 시간 별로 처리한 후, 각 세포에 대해 웨스턴 블롯으로 분석하였다.

도 2는 DHT를 10 nM 또는 50 nM 처리하고 3, 6, 24 시간 배양한 모유두 세포(DP cell)에 대한 웨스턴 블롯 결과로, 이에 따르면 남성호르몬인 DHT를 저농도와 고농도(10 또는 50 nM)로 모유두 세포에 시간별로 처리한 후, 각각의 세포에서 TGF- β 1, TNF- α , DKK-1(Dickkopf-1) 발현차이를 확인 결과 3 시간부터 퇴행기 유도물질들의 발현이 증가되고 있음을 확인하였다. 즉, 남성호르몬인 디하이드로테스토스테론(DHT)를 3 시간 이상 처리할 경우, 모유두 세포로부터 DKK-1가 발현되고, 모유두 세포의 기능을 억제하며 모낭세포의 성장을 억제하는 것을 알 수 있다.

<실험예 2> 1차 공배양에 의해 배양된 모유두 세포에서 TGF- β 1, TNF- α , DKK-1(Dickkopf-1)의 발현양상 분석

실시예 1의 1차 공배양이 완료된 모유두 세포에서 TGF- β 1, TNF- α , DKK-1(Dickkopf-1)의 발현양상을 웨스턴 블롯으로 분석하였다. 상기 TGF- β 1(Transforming growth factor-beta 1), TNF- α (tumor necrosis factor-alpha) 및 DKK-1(Dickkopf-1)는 모발성장을 종료하고 모구부(hair bulb)가 축소하는 시기인 퇴행기(catagen)를 유도하는 것으로, 이들의 발현을 통해 모유두 세포의 기능 활성화 정도를 파악할 수 있다.

도 3은 실시예 1로부터 수득한 1차 공배양된 모유두 세포에 대한 웨스턴 블롯 결과 사진이다. 이때 DP는 모유두 세포이고, DHT10nM은 DHT 처리 유무를 나타낸 것이며, 줄기세포는 줄기세포와의 1차 공배양 유무를 표기한 것이다.

도 3에 나타난 바와 같이 DHT에 의해 모유두 세포에서 증가되었던 퇴행기 유도물질들이, 중간엽 줄기세포와 1차 공배양한 후에는 현저히 억제되었음을 확인하였다. 이는 중간엽 줄기세포와의 공배양 과정을 통해 DHT에 의해

손상된 모유두 세포로부터 DKK-1의 발현을 억제시킬 수 있음을 확인한 것이다. 즉 남성형 탈모증에 의해 모낭에서 DHT이 증가되어 모낭 성장이 억제된 경우, 중간엽 줄기세포 혹은 중간엽 줄기세포와 공배양된 모유두 세포가 모낭의 성장을 촉진하여 탈모예방에 도움이 될 수 있음을 알 수 있다.

[0112] <실험예 3> 2단계 공배양에 따른 외모근초 세포(Outer root sheath cell, ORS cell) 성장분석

[0113] 앞선 실험들을 통해 남성호르몬인 Dihydrotestosterone(DHT)에 의해 모유두 세포로부터 퇴행기 유도물질인 DKK-1의 발현이 증가됨을 확인하였고, 상기 DHT에 의해 손상된 모유두 세포를 중간엽 줄기세포와 1차 공배양함으로써, DKK-1(Dickkopf-1)의 발현을 억제할 수 있음을 확인하였다.

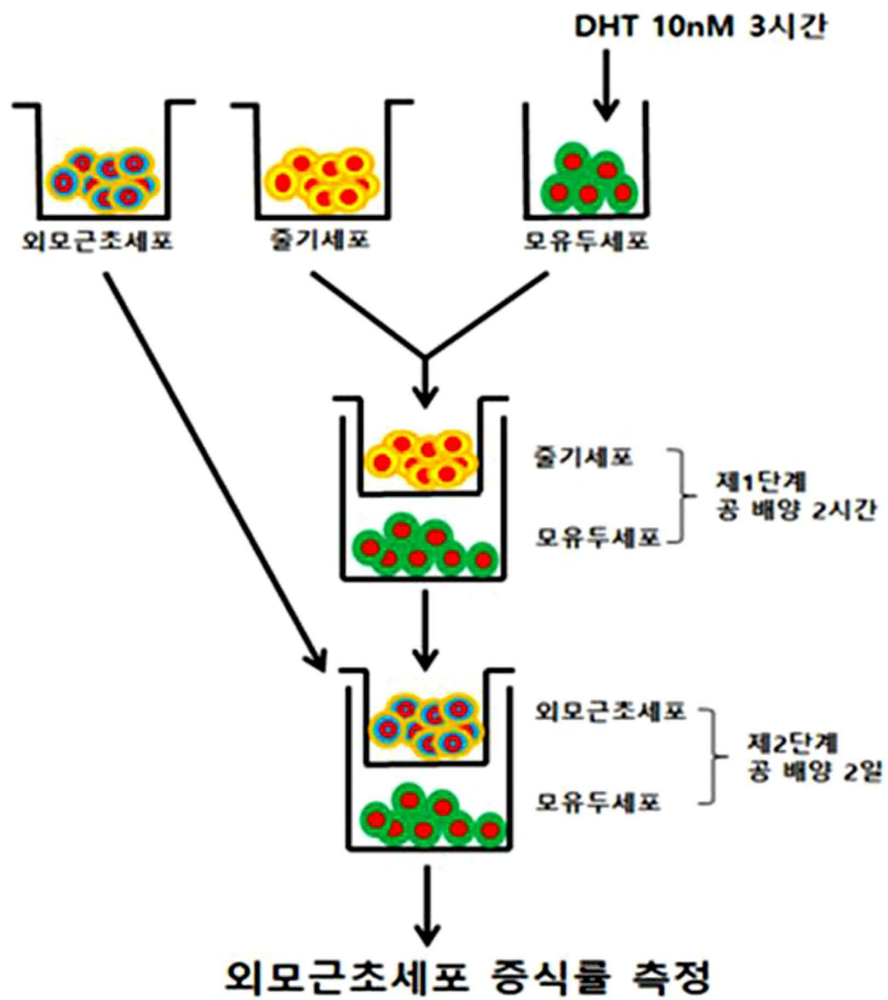
[0114] 다음으로, 중간엽 줄기세포와 1차 공배양하여 DKK-1(Dickkopf-1)의 발현이 억제된 모유두 세포와 외모근초 세포의 상호작용을 확인하기 위하여, 실시예 2에서와 같이 중간엽 줄기세포와 모유두 세포, 외모근초 세포를 순차적으로 공배양한 다음, 상기 외모근초 세포의 증식률을 세포 계수 키트-8(Cell Counting Kit-8)로 측정하였다.

[0115] 도 4는 2 단계 공배양을 통해 배양된 외모근초 세포의 증식률을 측정하여 나타낸 그래프로, 이에 따르면 중간엽 줄기세포에 의해 외모근초 세포의 증식은 비교군에 비해 증가하였고, DHT에 의해 감소된 외모근초 세포 성장은 줄기세포에 의해 증가되었음을 확인하였다.

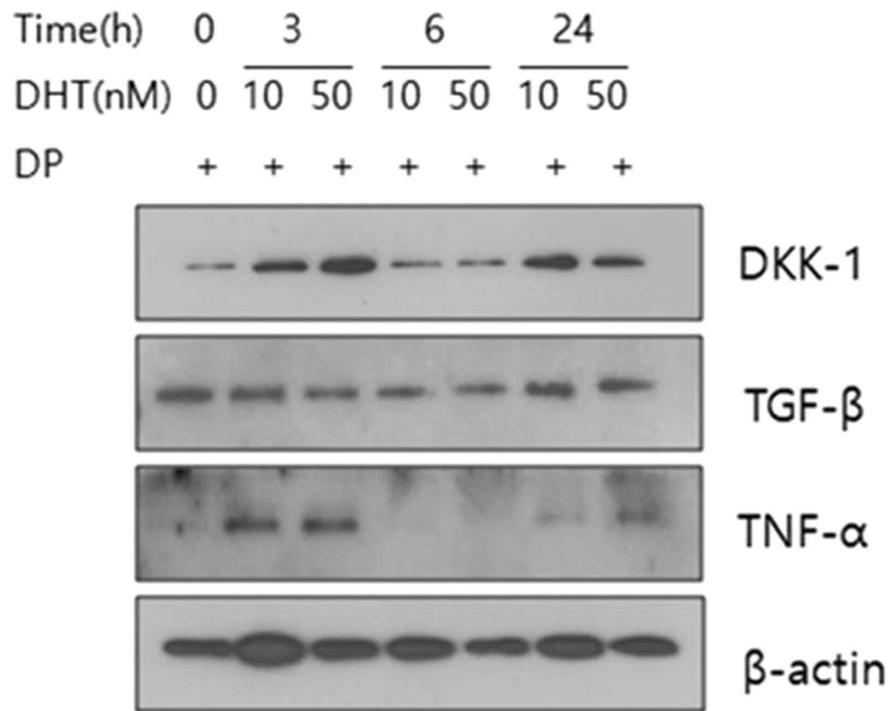
[0116] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

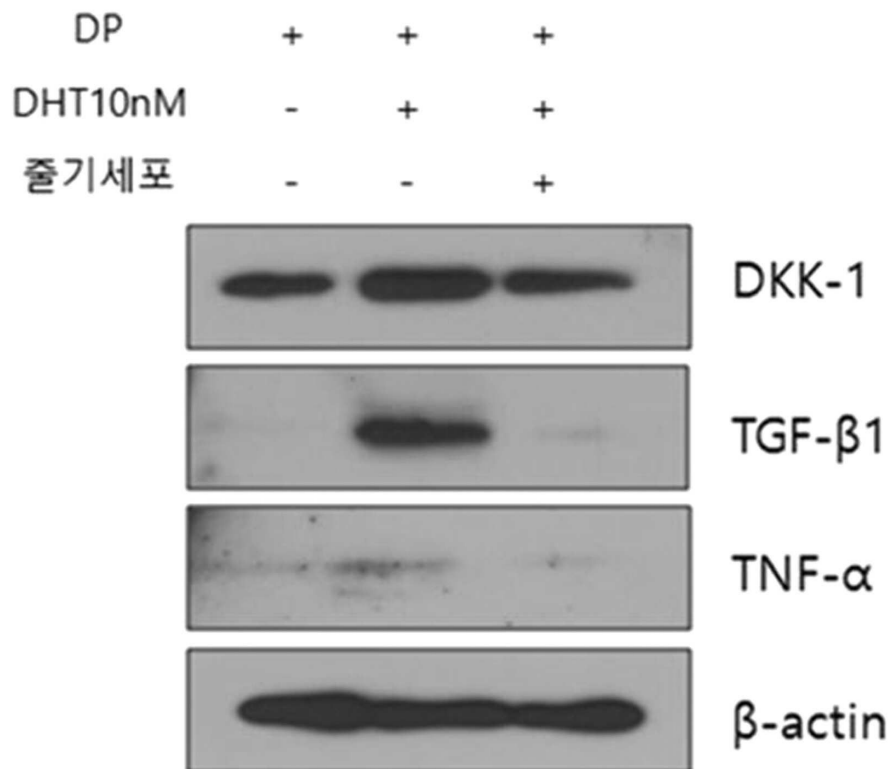
도면1



도면2



도면3



도면4

