



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0109999
(43) 공개일자 2013년10월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/98 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2013-0006163
(22) 출원일자 2013년01월18일
심사청구일자 2013년01월18일
(30) 우선권주장 1020120031994 2012년03월28일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
- (72) 발명자
홍성희
서울특별시 중구 신당동 845 한진그랑빌아파트
102-508호
- 확인식
서울특별시 성동구 왕십리2동 889-12
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김선애

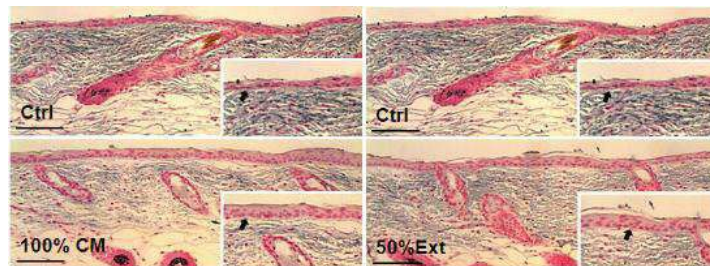
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백용 화장품 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 인간의 성체줄기세포 중에서 인간 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 추출한 신경줄기세포(neural stem cells, NSCs) 배양액 및 신경줄기세포 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백용 화장품 조성물 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 상기 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물은 우수한 멜라닌 생성 억제 효과를 가지므로 이를 피부 미백 개선을 위한 기능성 화장품 및 의약품의 원료로 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도9a



(72) 발명자

오승익

서울특별시 송파구 잠실동 19 엘스아파트 132동
2203호

박항수

서울특별시 성북구 안암동3가 53-1 옥탑

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2012050131
부처명	미래창조과학부
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	나노기술을 이용한 역분화 줄기세포의 개발과 기전 연구
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2012.10.01 ~ 2013.09.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	A12039212010000300
부처명	보건복지부
연구사업명	보건의료연구개발사업
연구과제명	다양한 세포근원 유래 신경 줄기세포의 임상적용 가능성 검증 연구
주관기관	고려대학교 산학협력단
연구기간	2012.08.01 ~ 2013.07.31

특허청구의 범위

청구항 1

신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백용 화장품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 신경줄기세포는 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 추출된 신경줄기세포인 미백용 화장품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 티로시나아제의 활성을 억제하거나, TRP 1(tyrosinase-related protein-1), TRP 2(tyrosinase-related protein-2) 또는 MITF(*microphthalmia-associated transcription factor*) 발현을 억제하여 미백활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 미백용 화장품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, β -카테닌(catenin) 발현 억제 작용을 통해 미백활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 미백용 화장품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, β -카테닌(catenin) 발현 또는 MITF(*microphthalmia-associated transcription factor*) 발현을 억제하는 억제자(inhibitor)를 포함하는 것을 특징으로 하는 미백용 화장품 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 0.01 ~ 15%(v/v)의 FBS를 포함하는 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 유효성분으로 하는 미백용 화장품 조성물.

청구항 7

신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 유효성분으로 함유하는 과다색소침착 질환(hyperpigmentation disease)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 8

신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 9

신경줄기세포를 배양하는 단계; 및

배양액으로부터 상기 신경줄기세포를 분리하는 단계를 포함하는, 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 신경줄기세포는 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 추출하여 불멸화시키는 단계를 포함하는 조성물의 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백용 화장품 조성물 및

이의 제조방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게, 본 발명은 외배엽 유래 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물의 새로운 용도에 관한 것으로, 인간 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 추출된 신경줄기세포(neural stem cells, NSCs)를 적절한 배지 및 조건에서 배양한 줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물은 멜라닌 생성을 저해하므로, 이를 미백과 관련된 화장품, 의약품, 또는 의약품의 개발을 위한 원료로 이용하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 사람의 피부색을 결정하는 멜라닌(melanin)은 멜라노사이트(melanocyte)라 불리는 피부 세포에서 만들어져 케라티노사이트(keratinocyte)라는 표피세포로 이동한다. 여기서 멜라닌은 자외선으로부터 유전자를 보호하고 자유라디칼(free radical)을 제거하여 세포 내 단백질을 보호하는 등 중요한 역할을 하게 된다. 이러한 멜라닌을 분해하는 효소가 생체 내에는 없고 다만 케라티노사이트(각질형성세포)가 표피에서 떨어져나갈 때 피부에서 떨어져 나가는 것으로 제거된다.

[0003] 상기 멜라닌 생성과 소멸 사이클을 살펴보면 다음과 같다. 멜라노사이트(melanocytes)내 멜라노솜(melanosome)에서 멜라닌합성(melanogenesis)을 한다. 자외선 등의 자극은 자극호르몬계에 영향을 미쳐 뇌하수체중엽에서 멜라닌 세포 자극호르몬 (α -melanocyte stimulating hormone, α -MSH)분비가 많아지며 이는 멜라닌의 생성을 촉진시킨다. 멜라닌 세포 내에 포함되어 있는 티로신(tyrosine)이라는 아미노산은 티로시나아제(tyrosinase)의 작용으로 도파(L-dopa)로 변하고, 이어 도파옥시다제(dopaoxidase)의 작용으로 도파키논(dopa-quinone)으로 변환 후, 티로시나아제 관련단백질-1(tyrosinase-related protein-1, 이하 TRP 1이라고 함)과 티로시나아제 관련단백질-2(tyrosinase-related protein-2, dopachrome tautomerase, 이하 TRP 2, Dct 및 Dct/TRP 2를 혼용하여 나타냄)의 작용에 의하여 멜라닌을 생성한다. 이와 같이 생성된 멜라닌은 케라티노사이트(각질형성세포)로 이동하며 표피 박리와 함께 멜라닌이 상실되어 소멸하는 순환 작용을 보인다.

[0004] 상기 멜라닌이 필요 이상으로 많이 생기게 되면 기미, 주근깨, 점 등과 같이 과색소침착(hyperpigmentation)을 유발하여 미용상 또는 건강상으로 좋지 않은 결과를 가져오게 된다. 또한, 레이저 인구의 증가로 외부에서 활동하는 것을 즐기는 사람들이 많아지면서 자외선에 의한 멜라닌 색소 침착을 막고자 하는 요구가 증가하게 되었다.

[0005] 현재까지의 미백제 개발은 주로 멜라닌 생합성에서 없어서는 안 될 기본적인면서도 가장 중요한 역할을 하는 효소인 티로시나아제(Tyrosinase)의 활성을 저해하는 것을 통해 멜라닌양을 줄이는 물질을 찾는 것으로 이루어져 왔다. 이렇게 개발된 미백제 물질은 하이드로-퀴논, 티올(thiol), 코지산, 알부틴, 비타민 C등이 있지만 만족할 만한 미백효과를 갖지 못하고 있고 오랜 기간 사용시 알레르기, 피부 흡수, 빠른 산화에 따른 색깔 변화와 같은 부작용을 유발하거나 하여 이를 대체하는 소재를 찾고, 개발하려는 시도는 소재연구의 핵심적인 부분을 차지하고 있다.

[0006] 한편, 줄기세포는 미분화 세포로서, 자기재생(self-renewal)을 통해 오랫동안 분열을 할 수 있으며, 특정 환경 하에서는 다양한 종류의 세포로 분화할 수 있는 세포를 말한다. 줄기세포는 기원이 되는 조직에 따라 배아줄기세포(embryonic stem cells)와 성체줄기세포(adult stem cells)로 나누어지고, 이를 이용한 연구적인 측면에서 성체줄기세포의 잠재 능력은 배아줄기세포보다 제한적인 단점이 있으나, 윤리적인 문제가 적어 성체줄기세포를 대상으로 많은 연구 및 치료제 개발 목적으로 많은 연구가 진행되고 있다.

[0007] 본 발명은 줄기세포를 이용한 화장품 조성물에 관한 발명이다. 본 발명의 배경이 되는 기술로 대한민국 특허공보 제10-0848056호(2009.07.23)에는 중간엽 줄기세포인 지방유래 줄기세포 배양액을 이용한 멜라닌 합성저해 방법이 기재되어 있고(실시예 및 도면), 대한민국 공개특허공보 제10-2009-0116659호(2009.11.11)에는 체대혈유래 중간엽 줄기세포 배양액을 포함하는 미백 화장품 조성물에 대해 기재되어 있으나, 외배엽 유래 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물에 의한 미백 화장품 조성물에 대해서는 알려진 바가 없다.

[0008] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허가 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공보 제10-0848056호(2009.07.23)
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2009-0116659호(2009.11.11)

비특허문헌

- [0010] (비특허문헌 0001) Kobayashi T, Urabe K, Winder A, Jimenez-Cervantes C, Imokawa G, Brewington T, Solano F, Garcia-Borron JC, and Hearing VJ., Tyrosinase related protein 1 (TRP1) functions as a DHICA oxidase in melanin biosynthesis. EMBO J. (1994) 13, 5818-5825
(비특허문헌 0002) Levy Carmit, Khaled Mehdi, David E Fisher., MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene., Trends Mol Med. (2006) 12(9), 406-414
(비특허문헌 0003) Barbara Bellei, Enrica Flori, Enzo Izzo, Vittoria Maresca, Mauro Picardo., GSK3 β inhibitor Promotes melanogenesis in B16 melanoma cells and normal human melanocytes. Cell. Signal. (2008) 20, 1750-1761
(비특허문헌 0004) Barbara Bellei, Angela Pitisci, Caterina Catricala, Lionel Larue and Mauro Picardo., Wnt/ β -catenin signaling is stimulated by α -melanocyte-stimulating hormone in melanoma and melanocyte cells: implication in cell differentiation., Pigment Cell Melanoma Res. (2010) 24; 309-325
(비특허문헌 0005) Eun-Jung Lee, Yun Sang Lee, Soonho Hwang, Sanghee Kim, Jae Sung Hwang and Tae-Yoon Kim., N-(3,5-Dimethylphenyl)-3-Methoxybenzamide (A3B5) Targets TRP-2 and Inhibits Melanogenesis and Melanoma Growth., Journal of Investigative Dermatology (2011) 131, 1701-1709

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 상기 종래 기술의 문제점 및 요구를 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명자들은 새로운 미백제의 대안으로서 외배엽 줄기세포의 한 종류인 신경줄기세포의 배양액 또는 신경줄기세포 추출물이 멜라닌 생성 억제에 효과적이어서 우수한 미백효과를 나타내는 것과, Wnt/ β -catenin signaling pathway에 관여하는 것을 발견하고 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 따라서, 본 발명은 외배엽 줄기세포인 신경줄기세포(neural stem cells, NSCs)의 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 이용한 미백 관련 기능성 화장품 내지 의약(외)품 조성물 및 암 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0013] 또한 본 발명의 다른 목적은 신경줄기세포를 이용한 미백 관련 기능성 화장품 조성물 등을 제조하는 방법 내지 신경줄기세포를 미백 관련 기능성 화장품 내지 의약(외)품 개발의 원료로 이용하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 유효성분으로 함유하는 과다색소침착 질환(hyperpigmentation disease)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

- [0017] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 신경줄기세포를 배양하는 단계; 및 배양액으로부터 상기 신경줄기세포를 분리하는 단계를 포함하는, 상기 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0019] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0020] 본 발명은 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 유효성분으로 함유하는 미백용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명에서, 상기 배양액 또는 추출물을 제조하기 위한 신경줄기세포는 그 종류에 제한을 받지 않는다. 바람직하게는 태아에서 유래한 성체 줄기세포이고, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 태아 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 추출된 신경줄기세포를 사용하여 배양액 및 추출물을 제조하였다.
- [0022] 본 발명에서, '신경줄기세포 배양액'이란 외배엽 줄기세포의 일종인 신경줄기세포를 계대배양하여 수득한 배지 내에 포함된 구성 성분을 포함하는 물질이고, '신경줄기세포 추출물'은 신경줄기세포를 배양하고 호모게나이저(homogenizer)로 균질화한 혼합물을 원심분리 하여 얻은 상등액으로 이는 세포내 성분을 함유하고 있다. (실시예 1 참조)
- [0023] 본 발명의 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물은 다양한 성장인자 및 사이토카인을 포함하여 미백 기능을 수행하며, 바람직하게 미백을 결정하는 멜라노사이트에서의 멜라닌 색소 합성 억제능을 가지며, 더욱 바람직하게는 티로시나아제의 활성을 억제하거나, TRP 1(tyrosinase-related protein-1), TRP 2(tyrosinase-related protein-2) 또는 MITF(*microphthalmia-associated transcription factor*) 발현을 억제한다(도 1a ~ 도 15b).
- [0024] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물이 멜라닌 생성을 억제하고 티로시나아제 활성을 저해하는지 확인하기 위하여, B16F10 멜라노마 세포주에 멜라닌 자극호르몬(α -MSH)과 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물을 다양한 농도로 처리한 다음 생성된 멜라닌의 양과 티로시나아제 활성 정도를 측정하였다. 그 결과 신경줄기세포 배양액과 신경줄기세포 추출물이 멜라닌 생성을 억제하고 티로시나아제 활성을 저해하는 것을 확인하였다(도 2a ~ 도 3b).
- [0025] 또한 본 발명에 따른 신경줄기세포 배양액과 신경줄기세포 추출물에는 티로시나아제, TRP 1 및 Dct/TRP 2 유전자들의 발현을 억제하는 물질이 존재함을 확인하였고, 또한 위의 3가지 유전자들을 조절하는 MITF(*microphthalmia-associated transcription factor*) 유전자의 발현을 억제(inhibition)하는 물질도 함유되어 있음을 확인하였다(도 4a ~ 도 5e).
- [0026] 또한 신경줄기세포 배양액과 신경줄기세포 추출물을 털을 제거한 동물모델 C57BL/6J 마우스 등(back)에 도포한 후, colormeter로 측정한 결과 뚜렷한 피부 미백 효과를 보였다(도 8 ~ 도 9c).
- [0027] 또한, 본 발명의 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물은, β -카테닌(catenin) 발현 억제 작용을 통해 미백활성을 나타내는 것을 특징으로 한다(도 12 ~ 도 13b).
- [0028] 본 발명의 조성물은 β -카테닌(catenin) 발현 또는 MITF(*microphthalmia-associated transcription factor*) 발현을 억제하는 억제자(inhibitor)를 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 억제자는 이에 한정되는 것은 아니나 DKK1(Dickkopf 1), WIF(Wnt inhibitory factor 1), sFRP2(secreted Frizzled related protein 2), sFRP5(secreted Frizzled related protein 5)가 바람직하고, 이들은 Wnt가 receptor에 바인딩하는 것을 저해하여 β -카테닌(catenin) 발현 또는 MITF(*microphthalmia-associated transcription factor*) 발현을 억제하게 된다.
- [0029] 또한, 본 발명의 조성물은 Wnt/ β -catenin signaling pathway의 β -카테닌(catenin) 발현 또는 MITF(*microphthalmia-associated transcription factor*) 발현을 조절할 수 있는 Wnt/ β -catenin signaling pathway의 관련 유전자를 하나 이상 유효성분으로 함유할 수 있다. 구체적으로 억제자인 DKK1, WIF 1 및 sFRP의

발현을 조절하는 유전자를 함유할 수 있다.

- [0030] 본 발명에 의한 외배엽 유래 신경줄기세포 배양액과 대조군으로 중배엽 유래 지방줄기세포 배양액(지방줄기세포 배양액 특허 제10-0848056)의 미백활성을 비교하였다.
- [0031] 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액(Neural stem cells conditioned medium, NSC-CM) 및 지방줄기세포 배양액(Adipose-derived stem cells conditioned medium, ADSC-CM)을 각각 10%, 50%, 100% 처리하여, 멜라닌 생성 및 티로시나아제 활성에 미치는 영향을 측정한 결과, B16 세포주에 동일한 농도의 배양액을 처리했을 때, 신경줄기세포 배양액을 처리한 군이 지방줄기세포 배양액을 처리한 군보다 멜라닌 함량은 더 낮아졌고, 멜라닌생성에 관여하는 가장 중요한 효소인 티로시나아제 활성 억제 효과는 더 높아졌음을 알 수 있다(도 10a ~ 도 10d).
- [0032] 또한 신경줄기세포 배양액 100% 처리군과 신경줄기세포 추출물 50% 처리군에서 MITF와 티로시나아제, TRP 1 및 TRP 2 유전자의 발현이 현저히 억제되었지만(도 4a 및 도 5a 참조), 이와 달리 지방줄기세포 배양액 100% 처리군에서는 TRP 2 mRNA 유전자의 발현에 있어서만 미미한 수준의 감소를 보였고, 나머지 MITF, 티로시나아제 및 TRP 1 유전자의 발현은 거의 변동이 없었다(도 10e).
- [0033] 단백질수준에서 지방줄기세포는 티로시나아제, TRP 1에서만 변화가 있었으나 멜라닌생성에 관여하는 세 가지 효소(티로시나아제, TRP 1, TRP 2)를 조절하는 MITF와 TRP 2는 변화가 없었다(Won-Serk Kim et al. 2008). 그러나 신경줄기세포를 이용하면 멜라닌생성에 관여하는 세 가지 효소의 단백질수준을 모두 줄였고, 이들 효소를 조절하는 MITF를 단백질수준에서 조절하는 것으로 나타났다. 신경줄기세포에서 지방줄기세포와 달리 MITF를 조절함으로써 좀 더 원천적으로 멜라닌생성 억제효과를 나타낸 것이라 할 것이다.
- [0034] 한편, MITF는 Wnt/ β -catenin signaling의 downstream target으로 β -catenin/TCF가 MITF promoter 의해서 발현량이 조절된다고 알려져 있다. Wnt 단백질은 매우 보존된 secreted signaling molecule로써 많은 종과 기관에서 세포운명의 결정이나 간세포(progenitor cell)의 세포 증식 그리고 비대칭적 세포 분할(asymmetric cell division)과 같은 기본적 발달과정에서 분비되는 중요한 단백질이다. Wnt 유전자나 Wnt pathway의 구성요소(component)들의 돌연변이는 발생적 결함을 일으키며 또한 암과 같은 인간 질병에 관련하여 많이 연구되고 있다.
- [0035] Wnt/ β -catenin signaling은 Wnt 리간드가 receptor와 결합시 inhibitor의 영향에 따라 On/Off상태로 변화된다. On(리간드의 결합시) GSK-3 β 의 phosphorylation되어 inactivation시 β -catenin이 분해되지 않고 핵내로 이동하여 TCF/LEF1과 결합하여 target 유전자(MITF)를 발현을 증가시키고, Off(inhibitor의 영향으로 리간드가 결합하지 못함)시 GSK-3 β 가 β -catenin을 phosphorylation시켜 분해를 유도하여 핵내로 이동하지 못하면 target 유전자(MITF)의 발현을 억제시킨다.
- [0036] 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액 처리군에서 나타나는 MITF의 유전자, 단백질수준에서의 발현량 조절이 β -catenin/TCF 통한 것인지를 확인하기 위해 Wnt/ β -catenin signaling에 관련된 리간드(Wnt3a), receptor (Fzd, LRP6), inhibitor (DKK1, WIF1 및 sFRP)와 그 이하 β -catenin 분해에 관련된 복합체(GSK-3 β , Axin2, CK1 α , β -TrCP), TCF/LEF1을 유전자수준에서 분석하였다. 신경줄기세포 처리군에서 리간드가 증가하였으나 receptor는 모두 감소하였고 Fzd가 더 크게 감소하였다(도 11). 또한 리간드와 receptor의 결합을 방해하는 억제자(inhibitor)인 DKK1이 크게 증가함을 보였고 β -catenin의 유전자수준은 변화는 나타나지 않았다. 그러나 단백질수준에서 β -catenin이 분해됨을 보였다(도 12). 신경줄기세포 배양액의 처리군에서 Off(inhibitor의 영향으로 리간드가 결합하지 못함)가 유도되었나를 확인하기 위하여 DKK1, GSK-3 β , pGSK-3 β 의 단백질수준에서 분석하였다. 억제자(inhibitor)인 DKK 1이 크게 증가됨을 보였고 이는 Off 상태를 유도하여 β -catenin을 phosphorylation시켜 분해를 유도하였다고 생각된다. 또한 β -catenin 분해시에 GSK-3 β 에 의존적인가를 보기 위하여 LiCl, BIO (GSK-3 β 의 inhibitor)을 처리하여 β -catenin량을 분석한 결과 신경줄기세포 배양액 처리군에서 감소하였던 β -catenin이 회복됨을 보였다(도 13a 및 13b).
- [0037] 최종적으로 anti β -catenin와 anti MITF 항체를 이용하여 ChIP 분석을 하였다. 그 결과 신경줄기세포 배양액 처리군에 anti β -catenin 항체로 침전시킨 후에 MITF promoter를 PCR한 결과 발현양이 줄어들었음을 확인하였고, anti MITF 항체로 침전시킨 후에 티로시나아제, Dct(TRP 2) 및 TRP 1을 PCR한 결과 발현양이 줄어들었음을 확인하였다(도 15a 및 15b). 결국 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액을 처리하면 대조군에 비해서 β -catenin이 더 많이 분해(degradation)되어서 핵(nuclear)내로의 이동이 적어지며 이는 결국 MITF promoter 부분에 β -catenin/TCF의 결합이 저하되어 MITF의 발현을 조절하게 되어 멜라닌 생성을 저해하는 영향을 미치게 된다.

- [0038] 따라서 지방줄기세포 배양액과 달리 MITF을 조절하는 신경줄기세포 배양액은 기능성화장품의 원료로 이용하는데 있어 미백효과 이외에도 MITF의 또 다른 target 유전자 (CDK2, Bcl 등)에 효과가 있으며 화장료의 원료뿐 아니라 의약(외)품의 이용가치도 높다 할 것이다.
- [0039] 본 발명의 신경줄기세포 배양을 위한 배지는 당업계에 알려진 기본 배지를 제한 없이 사용할 수 있다. 기본 배지는 인위적으로 합성하여 제조할 수 있으며, 상업적으로 제조된 배지를 사용할 수도 있다. 상업적으로 제조되는 배지의 예를 들면, DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's 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 Isocove's Modified Dulbecco's Medium 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 DMEM 배지일 수 있다.
- [0040] 또한, 상기 기본 배지에는 0.01 ~ 15%(v/v)의 FBS를 포함하는 것이 바람직하며, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 DMEM 배지에 배양시켰으며, 10% FBS를 사용하여 미백 효과를 측정하였다.
- [0041] 본 발명에 있어, '화장료 조성물'은 상기 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 포함하는 조성물로서 그 제형은 어떠한 형태라도 가능하다. 이러한 제형의 예로 상기 화장료 조성물을 이용하여 제조된 화장료는 크림류, 팩류, 로션류, 에센스류, 화장수류, 파운데이션류 및 메이크업 베이스류 등이고, 본 발명의 목적을 달성하기 위하여 이러한 제형 중 어떠한 형태로도 제조되어 상용화될 수 있으며, 상기 예들에 한정되지 않는다. 본 발명의 화장품 조성물에 포함되는 성분은 유효 성분 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.
- [0042] 나아가, 본 발명은 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 유효성분으로 함유하는 과다색소침착 질환(hyperpigmentation disease)의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공할 수 있다.
- [0043] 본 명세서에서 사용되는 용어 "과다색소침착(hyperpigmentation)"은 피부 또는 손발톱의 특정 부위에서 멜라닌의 과도한 증가에 의해 다른 부위에 비해 검게 또는 어둡게 되는 것을 의미한다. 바람직하게는 상기 과다색소침착에 의한 질환은 기미, 주근깨, 노인성 색소반, 또는 일광흑색증(solarlentigines) 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 바람직한 구현예에 의하면, 상기 과다색소침착(hyperpigmentation)에 의한 질환의 치료 또는 예방 효능은 β -카테닌(catenin) 발현억제 또는 MITF(microphthalmia associated transcription factor) 발현억제 작용을 통해 이루어진다.
- [0044] 또한, 본 발명은 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 유효성분으로 함유하는 암 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0046] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.01-2000 mg/kg(체중)이다.
- [0047] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 적용되는 질환의 종류에 따라, 투여경로가 결정되는 것이 바람직하다. 예를 들어, 본 발명의 약제학적 조성물은 멜라닌 색소의 과침착에 의한 피부 질환의 치료에 사용되기 때문에 피부에 국소적으로 적용되는 방식으로 투여되는 것이 바람

직하다.

[0048] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0049] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 신경줄기세포를 배양하는 단계 및 배양액으로부터 상기 신경줄기세포를 분리하는 단계를 포함하는 화장료 조성물 및 약제학적 조성물의 제조방법을 제공한다. 상기 조성물의 제조는 통상적으로 사용되는 어떠한 방법으로도 제조될 수 있으며, 신경줄기세포를 단리하고 배양하고 분리하는 과정은 본 발명의 방법에 한정되지 않고 당업계에서 통상적으로 수행되는 방법으로 실시가능하다.

[0050] 바람직하게는, 상기 신경줄기세포는 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 추출된 신경줄기세포를 불멸화시켜 얻는 세포이다. 본 발명의 구체적인 실시예에서는 태아 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 분리한 성체 신경줄기세포(neural stem cells, NSCs)를 이용하고 이를 불멸화(immortal)시켜 세포를 얻었다. 이를 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10% FBS (fetal bovine serum), 및 1% penicillin streptomycin이 포함된 비유도성 배지에 배양하여 비접착성 세포들은 제거하였다. 상기 과정으로 배양된 신경줄기세포(neural stem cells, NSCs)를 계대배양하는 과정에서 배양액을 수득하고 이를 원심분리하여 상등액을 여과하였으며, 신경줄기세포 추출물은 트립신(Trypsin-EDTA) 과정으로 얻은 세포를 균질화(homogenization)를 통해서 수득하였다.

[0051] 상술한 바와 같이, 본 발명에 따른 외배엽 유래 신경줄기세포 배양액과 신경줄기세포 추출물은 피부의 색소 침착을 예방 및 치료할 수 있는 기능성 화장품 및 의약(외)품 개발의 원료로 유용하게 사용될 수 있다. 상기에서는 미백용 기능성 화장품 조성물을 중심으로 설명하였으나, 본 발명은 외배엽 유래 신경줄기세포 배양액 또는 신경줄기세포 추출물을 유효성분으로 포함하는 미백 치료효과 및 암 성장 억제 효과가 있는 의약품 및 의약외품 조성물로서 공지 기술을 이용하여 활용할 수 있다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에게 자명하다 할 것이다.

발명의 효과

[0052] 상술한 바와 같이, 본 발명에 의한 외배엽 유래 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물은 다양한 성장인자 및 사이토카인을 포함하여 멜라닌 합성 저해 및 티로시나아제 활성 억제 효과가 우수한 것으로 확인되었다. 특히 본원발명에 의한 조성물은 Wnt/ β -catenin signaling pathway를 통해 MITF를 조절함으로써 좀 더 원천적으로 멜라닌생성 억제효과를 나타낸 것이라 할 것이다.

[0053] 따라서 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물 또는 여기서 분리한 특정인자(들)를 미백 목적의 기능성 화장품과 의약외품 등의 원료로 사용할 수 있어, 기능성 화장품 등 관련 분야에서 매우 유용한 발명이다. 또한, 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액 및 그의 추출물에는 암 성장 억제에 효과적인 인자들이 포함되어 있어 암 예방 및 치료 효과도 도모할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1a 및 도 1b는 본 발명에 의한 신경줄기세포의 배양액 및 신경줄기세포 추출물을 B16F10 멜라노마 세포에 처리시 우수한 미백 효능을 나타내는 것을 보인 사진이고,

도 2a 및 도 2b는 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물의 효과적인 미백 효능으로 멜라닌 함량이 감소한 것을 나타낸 도면이고,

도 3a 및 도 3b는 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물의 효과적인 미백 효능으로 티로

시나아제의 활성이 억제된 것을 나타낸 도면이고,

도 4a ~ 도 4e는 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액을 B16F10 멜라노마 세포에 처리한 후 멜라닌 합성과 관련된 조절인자의 발현량을 RT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 5a ~ 도 5e는 본 발명에 의한 신경줄기세포 추출물을 B16F10 멜라노마 세포에 처리한 후 멜라닌 합성과 관련된 조절인자의 발현량을 RT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 6a 및 도 6b는 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액을 B16F10 멜라노마 세포에 처리한 후 멜라닌 합성과 관련된 조절인자의 발현량을 세포 면역형광법(Immunocytochemistry) 및 RT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 사진이고,

도 7은 본 발명에 의한 신경줄기세포 추출물을 B16F10 멜라노마 세포에 처리한 후 멜라닌 합성과 관련된 조절인자의 발현량을 세포 면역형광법(Immunocytochemistry)으로 확인한 결과를 나타낸 사진이고,

도 8은 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물을 마우스(mice)의 피부 조직에 도포한 후 피부 조직에서 멜라닌 합성과 관련된 조절인자의 발현량을 면역조직화학적 염색법(immunohistochemical staining)으로 확인한 결과를 나타낸 사진이고,

도 9a ~ 도 9c는 도 8의 피부 조직에서의 멜라닌 함량을 Fontana masson staining으로 확인한 결과를 나타낸 사진이고,

도 10a는 본 발명에 의한 외배엽 유래 신경줄기세포 배양액과 대조군 중배엽 유래 지방줄기세포 배양액 내의 전체 단백질(혈청이 없는 배지에 각각의 세포를 72h 노출시켜 수득한 배지내의 각각의 줄기세포로부터 분비된 성장인자(growth factor)와 사이토카인(cytokine)등을 포함하는 전체 단백질을 Bradford assay를 통해서 함량을 비교한 도면이고,

도 10b는 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액 및 대조군 지방줄기세포 배양액을 B16F10 멜라노마 세포에 처리시 미백 효능을 비교한 사진이고,

도 10c는 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액 및 대조군 지방줄기세포 배양액 처리시 멜라닌 함량을 비교한 도면이고,

도 10d는 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액 및 대조군 지방줄기세포 배양액 처리시 티로시나아제 활성 억제 효과를 비교한 도면이고,

도 10e는 대조군 지방줄기세포 배양액 처리시 멜라닌 합성과 관련된 조절인자의 발현량을 RT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 11a는 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액을 B16F10 멜라노마 세포에 처리한 후 Wnt/ β -catenin signaling pathway에 관련된 유전자의 발현량을 qRT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 11b는 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액을 B16F10 멜라노마 세포에 처리한 후 Wnt/ β -catenin signaling pathway의 억제자 역할을 하는 유전자의 발현량을 qRT-PCR로 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 12는 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액을 B16F10 멜라노마 세포에 처리한 후 Wnt/ β -catenin signaling pathway에서 특정 유전자(target gene)를 조절하는 β -catenin의 단백질 발현정도를 세포면역형광법(Immunocytochemistry)을 통해 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 13a는 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액을 B16F10 멜라노마 세포에 처리한 후 Wnt/ β -catenin signaling pathway에서 특정 유전자(target gene)를 조절하는 β -catenin의 발현량 조절이 GSK3 β 의 인산화(phosphorylation)에 의존적으로(GSK3 β -dependent) 변화됨을 웨스턴블롯(western-blot)으로 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 13b는 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액을 B16F10 멜라노마 세포에 처리한 후 Wnt/ β -catenin signaling pathway에서 특정 유전자(target gene)를 조절하는 β -catenin의 발현량 조절이 GSK3 β 의 인산화(phosphorylation)에 의존적으로(GSK3 β -dependent) 변화됨을 세포면역형광법(Immunocytochemistry)을 통해 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 14a는 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액을 B16F10 멜라노마 세포에 처리한 후 Wnt/ β -catenin signaling pathway에서 GSK3 β 의 인산화(phosphorylation)에 영향을 미치는 억제자(inhibitor)중에 DKK 1(Dickkopf 1)의

발현양을 세포면역형광법(Immunocytochemistry)을 통해 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 14b는 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액을 B16F10 멜라노마 세포에 처리한 후 Wnt/ β -catenin signaling pathway에서 GSK3 β 의 인산화(phosphorylation)에 영향을 미치는 억제자(inhibitor) 중에 DKK 1(Dickkopf 1)을 웨스턴블롯(western-blot)으로 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 15a는 신경줄기세포 배양액을 B16F10 멜라노마 세포에 처리한 후 Wnt/ β -catenin signaling pathway에 다운스트림(downstream)에서 특정 유전자(target gene)를 조절하는 β -catenin/TCF 복합체가 MITF 유전자의 promoter의 서로 다른 부위에서의 결합력을 PCR로 확인한 결과를 나타낸 도면이고,

도 15b는 신경줄기세포 배양액을 B16F10 멜라노마 세포에 처리한 후 MITF가 각각 티로시나아제(tyrosinase), Dct/TRP 2, TRP 1 유전자의 promoter의 서로 다른 부위에서의 결합력을 PCR로 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예만 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0056] <실시예 1> 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물 생산

[0057] 태아 뇌의 뇌실영역(ventricular zone)에서 분리한 성체 신경줄기세포(neural stem cells, NSCs)를 불멸화(immortal)시켜 세포를 얻었다. 구체적으로는, 14주 된 태아 신경 neural cell tissue를 0.1% collagenase와 0.1% hyaluronidase 용액을 37℃에서 1시간 동안 처리하고 0.05% Trypsin-EDTA 2-3분 처리하여 single cells로 분리한 후, markers (CD45-/CD133+/CD34-)를 이용하여 FACS로 분리하였다. 이를 N-2 supplements, 0.2mg/ml heparin, 20ng/ml bFGF (basic Fibroblast Growth Factors), 20ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor), 그리고 10ng/ml LIF가 첨가된 human neurosphere culture media에 배양한다. 10-14일 경과 후, 형성된 neurospheres에 collagenase를 처리하여 single cells로 분리하고 레트로바이러스매개체(retroviral vector)를 이용하여 v-myc 유전자를 형질도입(transduction)하고 선별(selection)과정을 통해서 얻은 세포를 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10% FBS (fetal bovine serum), 및 1% penicillin/streptomycin이 포함된 비유도성 배지에 배양하였다 (Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes., Flax JD et al., Nature Biotechnology, vol.16, 1998; Neuroprotective effect of neural stem cell-conditioned media in *in vitro* model of Huntington's disease., Lim H-C et al., Neuroscience Letters 435, pp175-180, 2008). 150mm 배양 접시(culture dish)에 상기 세포를 5×10^5 을 분주하고, 배양배지(culture medium) 15ml 첨가 후 37℃, 5% CO₂ Incubator에서 80% confluence시에 배양액을 수득하였다. 이때, 배양배지는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), 10% FBS (fetal bovine serum), 1% penicillin streptomycin이 포함된 비유도성 배지였고, 배양 후 비접착성 세포들은 제거하였다. 상기 과정으로 배양된 신경줄기세포(neural stem cells, NSCs)를 계대배양하는 과정에서 배양액을 수득하였고, 이를 원심분리하여 상등액을 여과하였으며, 신경줄기세포 추출물은 PBS로 두 번 세척한 후 트립신(Trypsin-EDTA) 과정으로 얻은 세포를 3차 증류수 100ml을 넣고 호모게나이저(homogenizer)로 6,000RPM에서 5분 동안 균질화(homogenization)하고 이를 원심분리(1500rpm, 5분)하여 상등액을 수득하였다.

[0058] <실시예 2> 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물의 멜라닌 합성 억제 확인

[0059] 이 실험을 위하여 설치류 B16F10 멜라노마 세포주를 24-웰플레이트(24-well plate)에 웰(well)당 1.5×10^4 개의 세포를 접종하고, 그 다음날 비접착성 세포를 제거하고 신경줄기세포 배양액을 5%, 10%, 20%, 50%, 100%과 신경줄기세포 추출물을 5%, 10%, 20%, 50% 각각 처리하였다. 72시간 처리 후 인산화 완충용액(PBS)으로 씻어준 후, 트립신(Trypsin-EDTA)으로 세포를 수득하였다.

[0060] 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물의 멜라노마 세포의 멜라닌 억제효과는 양성대조군으로 알부틴(100 μ M)을 처리한 것과 비교하여 농도 의존적으로 우수한 효과를 나타내고 있다(도 1a 및 도 1b).

[0061] 또한 멜라닌 추출을 위해 1N NaOH + 50% DMSO 용액을 웰(well)당 100 μ l씩 첨가하여 80℃에서 세포를 용해시킨

후 마이크로플레이트 판독기(microplate reader)로 492nm에서 멜라닌 흡광도를 측정하였다(도 2a 및 도 2b). 그 결과 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물은 농도에 의존적으로 대조군에 비해서 우수한 멜라닌 합성 억제효과를 보였다.

[0062] <실시예 3> 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물의 티로시나아제 활성 억제 확인

[0063] 96-웰 배양접시(96-well culture dish)에 0.1M 인산염완충액(pH6.8, 0.1% PMSF) 80 μ l와 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물을 40 μ l를 넣고 1500U 버섯 티로시나아제 40 μ l를 차례대로 넣고 37℃에서 6분 동안 반응시켰다. 이 용액에 10mM L-DOPA(L-3,4-dihydroxyphenylalanine)용액을 40 μ l 넣은 후 마이크로플레이트 판독기(microplate reader)를 이용하여 492nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0064] 그 결과 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물을 처리한 경우 티로시나아제 활성이 농도 의존적으로 억제됨을 확인하였다(도 3a 및 도 3b).

[0065] <실시예 4> RT-PCR을 통한 멜라닌 합성에 관여하는 유전자들의 발현량 확인

[0066] 이 실험을 위하여 설치류 B16F10 멜라노마 세포주를 24-웰플레이트(24-well plate)에 웰(well)당 1.5×10^4 개의 세포를 접종하고, 그 다음날 신경줄기세포 배양액과 신경줄기세포 추출물을 각각 0%, 5%, 10%, 20%, 50%, 100% (배양액만 해당)씩 처리하였다. 72시간 처리 후 인산화 완충용액(PBS)으로 씻어주고 트리졸 시약(Trizol reagent)를 이용하여 총 RNA(total RNA)를 얻은 다음 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA를 합성하고 semiquantitative과 real-time RT-PCR을 수행하였다.

[0067] 그 결과 도 4a 및 도 5a에서와 같이 신경줄기세포 배양액 100% 처리군과 신경줄기세포 추출물 50% 처리군에서 MITF와 티로시나아제, TRP 1 및 TRP 2 유전자의 발현이 현저히 억제되었다.

[0068] <실시예 5> 면역형광염색(immuncyto-chemistry)법과 웨스턴블롯(Western-blot)을 통한 멜라닌 합성에 관여하는 유전자들 발현 확인

[0069] 실시예 4에서의 신경줄기세포 배양액과 신경줄기세포 추출물을 처리한 세포를 4% 파라포름알데히드(paraformaldehyde)에 고정시킨 후, 0.1% 트리톤(Triton) X-100과 정상 당나귀 혈청(normal donkey serum)을 블로킹(blocking)을 거치고 1차 항체를 1:1000으로 24시간 처리하였다. 이후 2차 항체를 이용하여 1시간 동안 처리하고 DAPI 염색을 5분간 진행하였다. 벡타실드 마운팅(vectashield mounting medium)제를 이용하여 슬라이드에 고정시킨 후 공초점 현미경(Confocal Microscope)으로 결과를 확인하였다. 또한 세포를 수득한 후, 50 μ l의 RIPA buffer (20 mM Tris (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 1 mM PMSF, and protease inhibitors)에 30분 동안 시켰다. 세포 lysate를 원심분리기(13,000g, 4℃)로 15분 동안 원심분리하였다. 이후 상층액(supernatant)을 얻은 후에 단백질농도를 Bradford protein assay로 측정하였다. 동량의 단백질(30 μ g)을 SDS-PAGE와 nitrocellulose membrane 통해서 수행한 후 항체와 ECL (enhanced chemiluminescence)를 이용하여 수행하였다.

[0070] 그 결과 도 6a 및 도 7에서와 같이 신경줄기세포 배양액 100% 처리군과 신경줄기세포 추출물 50% 처리군에서 MITF와 티로시나아제 및 Dct/TRP 2 유전자의 발현이 현저히 억제되었다. 또한 신경줄기세포 배양액 처리군에서 TRP 1의 발현 정도가 미미하게 감소됨을 보였다 (도 6a 및 도 6b).

[0071] <실시예 6> 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물을 도포한 C57BL/6J 피부조직에서의 MITF, 티로시나아제, TRP 1 및 TRP 2 유전자의 발현 확인

[0072] 5주령 C57BL/6J 암컷 마우스(female mice)를 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 7일 동안 순응 과정을 거친 후 등(back)의 털을 제거하고 1일 1회 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액(50%, 100%)과 신경줄기세포 추출물(20%, 50%)을 1ml 처리하였다. 대조군으로는 complete culture media(DMEM + 10% FBS)를 사용하였으며, 처리 10일 후 마우스를 희생(sacrifice) 시키고, 그 피부조직을 4% 포름알데하이드에 고정하고, 조직의 파라핀 제작 후, 3 μ m 두께로 절단한 조직을 슬라이드에 붙이고 파라핀 제거 및 재수화 과정(deparaffinize and rehydrate)을 실시하였다. 이 후

항체 회수(antigen retrieval; citrate buffer, pH 6.0)하고 3% H₂O₂로 5분간 내재적 퍼옥시다아제(endogenous peroxidase) 활성을 억제시키고 정상토끼 혈청(normal rabbit serum)으로 30분간 블록킹(blocking)을 하였으며, 1차 항체(santa cruz, 1:1000)를 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 이후 비오틴이 결합된(biotinylated) 2차 항체와 퍼옥시다아제 기질(peroxidase substrate, DAB)을 이용하여 염색을 진행하였다.

[0073] 그 결과 도 8에서와 같이 대조군에 비해서 신경줄기세포 배양액 100% 와 신경줄기세포 추출물 50%를 처리한 군에서 기질(substrate, DAB)의 발색 정도가 약하게 나오는 것을 확인하였다.

[0074] <실시예 7> 신경줄기세포 배양액 및 신경줄기세포 추출물 도포를 통한 C57BL/6J 피부조직에서의 멜라닌 함량 확인

[0075] 5주령 C57BL/6J 암컷 마우스(female mice)를 24±2℃에서 7일 동안 순응 과정을 거친 후 등(back)의 털을 제거하고 1일 1회 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액(50%, 100%)과 신경줄기세포 추출물(20%, 50%)을 1ml 처리하였다. 대조군으로는 complete culture media(DMEM + 10% FBS)를 사용하였으며, 처리 10일 후 color-meter를 이용한 멜라닌 함량 측정하였고 마우스를 희생 (sacrifice) 시켜, 그 피부조직을 4 % 포름알데하이드에 고정하고, 조직을 파라핀 제작 후, Fontana-masson silver staining을 진행하였다.

[0076] 그 결과 도 9a ~ 도 9c에서와 같이 본 발명에 의한 신경줄기세포 배양액 100% 처리군과 신경줄기세포 추출물 50% 처리군에서 피부내 멜라닌 함량이 줄어들었음을 Fontana-masson silver staining과 color-meter를 통해서 확인하였다.

[0077] <실시예 8> 신경줄기세포 배양액과 지방 줄기세포 배양액의 미백 활성 비교

[0078] 본 발명에 의한 외배엽 유래 신경줄기세포 배양액과 대조군으로 중배엽 유래 지방줄기세포 배양액의 미백 활성을 비교하였다. 상기 지방줄기세포 배양액은 특허 제10-0848056호를 참고하였다.

[0079] 상기 신경줄기세포 배양액(NSC-CM) 및 지방줄기세포 배양액(ADSC-CM)을 실시예 2 및 실시예 3에서처럼 각각 10%, 50%, 100% 처리하여, 멜라닌 생성 및 티로시나아제 활성에 미치는 영향을 측정한 결과, B16 세포주에 동일한 농도의 배양액을 처리했을 때, 신경줄기세포 배양액을 처리한 군이 지방줄기세포 배양액을 처리한 군보다 멜라닌 함량은 더 낮아졌고, 티로시나아제 활성 억제 효과는 더 높아졌음을 알 수 있다(도 10a ~ 10d).

[0080] 또한 신경줄기세포 배양액 100% 처리군과 신경줄기세포 추출물 50% 처리군에서 MITF 와 티로시나아제, TRP 1 및 TRP 2 유전자의 발현이 현저히 억제되었지만(도 4a 및 도 5a 참조), 지방줄기세포 배양액 100% 처리군에서는 TRP 2 유전자의 발현에 있어서만 미미한 수준의 감소를 보였고, 나머지 MITF, 티로시나아제, 및 TRP 1 유전자의 발현은 거의 변동이 없었다 (도 10e).

[0081] <실시예 9> MITF 유전자를 조절하는 Wnt/ β -catenin pathway 의 유전자 발현 확인

[0082] 실시예 8에서 나타난 결과 신경줄기세포(NSC-CM)의 paracrine 효과를 좀 더 구체적으로 확인하였다.

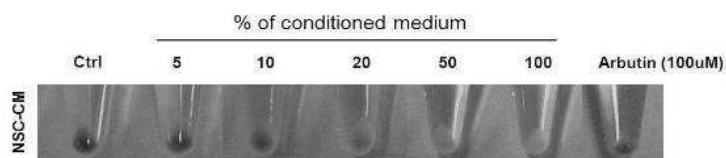
[0083] 신경줄기세포 배양액(NSC-CM)을 실시예 2, 실시예 3 및 실시예 4를 토대로 아무것도 처리하지 않은 대조군과 신경줄기세포 배양액 100%를 72h처리하였다. 이후 인산화 완충용액(PBS)으로 씻어주고 트리졸 시약(Trizol reagent)를 이용하여 총 RNA(total RNA)를 얻은 다음 역전사효소(reverse transcriptase)를 이용하여 cDNA를 합성하고 real-time RT-PCR을 수행하였다. 또한 실시예 5에서와 같은 방법으로 세포면역형광염색법을 수행하였다.

[0084] 그 결과 도 11a에서와 같이 리간드(ligand)인 Wnt 3a가 증가됨을 보였으나, 수용기(receptor)인 Fzd(Frizzled)의 감소와 이들의 결합(binding)을 방해하는 억제자(inhibitor)인 WIF 1과 DKK 1(Dickkopf 1)이 발현이 크게 증가됨을 보였다. 또한 β -catenin의 분해에 관여하는 GSK3 β 와 β -catenin의 유전자의 발현은 거의 변동이 없었고, β -catenin과 복합체를 이루어 특정유전자(target gene)를 조절하는 TCF 역시 감소하였다. 그러나 단백질 수준에서는 신경줄기세포배양액 100%를 처리한 군에서 β -catenin의 분해가 현저히 나타났다 (도 12).

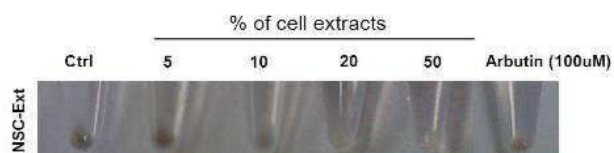
- [0085] <실시예 10> Wnt/ β -catenin pathway 의 β -catenin의 분해와 GSK3 β 에 의존적(GSK3 β -dependent) 확인
- [0086] 실시예 9에서 나타낸 결과 신경줄기세포(NSC-CM) 처리군에서 β -catenin의 분해가 GSK3 β 에 의존적인가를 좀 더 구체적으로 GSK3 β 의 억제자(inhibitor)인 염화리튬(Lithium chloride, LiCl)과 BIO (GSK-3 inhibitor IX)을 각각 20mM과 5nM을 72h 처리하여 세포면역형광염색(immunocyto-chemistry)법과 웨스턴블롯(Western-blot)을 실시예 5에서 사용한 방법을 이용하여 확인하였다.
- [0087] 그 결과 GSK3 β 의 Ser9에 비인산화(dephosphorylation)는 β -catenin 분해에 인산화(phosphorylation)는 β -catenin 안정화에 관여한다. GSK3 β 의 억제자인 LiCl(20mM), BIO(5nM) 처리시 β -catenin이 증가됨을 확인하였고, 신경줄기세포 배양액을 100% 처리시 감소된 β -catenin이 신경줄기세포 배양액과 GSK3 β 의 억제자(inhibitor)를 동시에 처리하였더니 β -catenin이 증가됨을 보였다 (도 13a 및 도 13b).
- [0088] <실시예 11> GSK3 β 인산화(phosphorylation)의 조절 확인
- [0089] 실시예 9에서 나타낸 결과 리간드(ligand)와 수용자(receptor)의 결합을 억제하는 억제자가 (DKK 1, WIF 1 등) 증가하면 GSK3 β 의 인산화(phosphorylation)가 되어 비활성화 형태가 되면서 β -catenin의 비인산화를 유도하여 proteosomal degradation 되지 못하게 하고 안정화시키게 된다. 세포면역형광염색(immunocyto-chemistry)법과 웨스턴블롯(Western-blot)을 실시예 5에서 사용한 방법을 이용하여 억제자(inhibitor)인 DKK 1을 확인하였다.
- [0090] 그 결과 도 14a 및 도 14b에서와 같이 신경줄기세포 배양액 100% 처리군에서 DKK 1(Dickkopf 1)의 발현량이 크게 증가됨을 보였다.
- [0091] <실시예 12> ChIP(Chromatin immunoprecipitation)을 통한 β -catenin/TCF 복합체의 MITF 유전자 조절 확인
- [0092] 세포를 1% 포름알데하이드(formaldehyde)로 상온에서 10분간 고정하고 차가운 PBS(protease inhibitor cocktail)에 넣고 수득하였다. 이후 SDS lysis 용액을 넣고 DNA를 길이가 200~1000bp 되도록 초음파분쇄(sonication)하고 Protein G Agarose를 이용하여 비특이적인 반응을 제거한 후에 β -catenin 항체 (5ug)를 넣고 4 °C에서 24h 반응시킨다. Protein G Agarose를 넣고 4 °C에서 1h 동안 반응시킨 후 세척용액(wash buffer), LiCl 세척용액, TE 세척용액으로 세척하고 cross-links과정을 거치고, proteinase K를 넣고 55 °C에서 2h 동안 반응시켰다. 최종적으로 spin column을 이용하여 순수 DNA를 얻고 이를 RT-PCR하였다.
- [0093] 그 결과 도 15a에서와 같이 신경줄기세포 배양액 100% 처리군에서 감소된 β -catenin이 β -catenin/TCF 복합체를 통해서 MITF promoter에 적게 결합하여 MITF유전자의 발현을 감소시키는 결과를 보였다.
- [0094] <실시예 13> ChIP(Chromatin immunoprecipitation)을 통한 MITF 유전자의 텔라닌생성하는 유전자인 티로시나아제, TRP 2, TRP 1 조절 확인
- [0095] 세포를 1% 포름알데하이드(formaldehyde)로 상온에서 10분간 고정하고 차가운 PBS(protease inhibitor cocktail)에 넣고 수득하였다. 이후 SDS lysis 용액을 넣고 DNA를 길이가 200~1000bp 되도록 초음파분쇄(sonication)하고 Protein G Agarose를 이용하여 비특이적인 반응을 제거한 후에 MITF 항체 (5ug)를 넣고 4 °C에서 24h 반응시킨다. Protein G Agarose를 넣고 4 °C에서 1h 동안 반응시킨 후 세척용액(wash buffer), LiCl 세척용액, TE 세척용액으로 세척하고 cross-links과정을 거치고, proteinase K를 넣고 55 °C에서 2h 동안 반응시켰다. 최종적으로 spin column을 이용하여 순수 DNA를 얻고 이를 RT-PCR하였다.
- [0096] 그 결과 도 15b에서와 같이 신경줄기세포 배양액 100% 처리군에서 감소된 MITF 유전자가 티로시나아제, TRP 2, TRP 1 promoter에 적게 결합하여 이들 유전자의 발현을 감소시키는 결과를 보였다.
- [0097] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

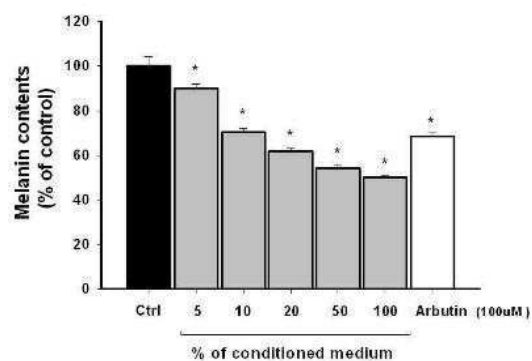
도면1a



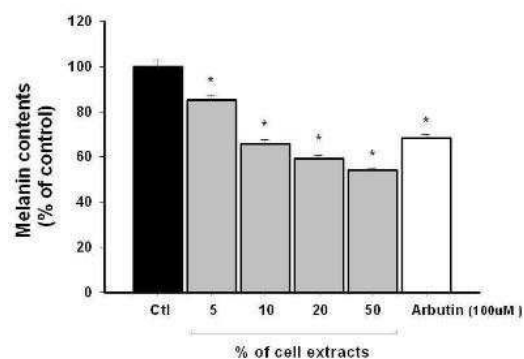
도면1b



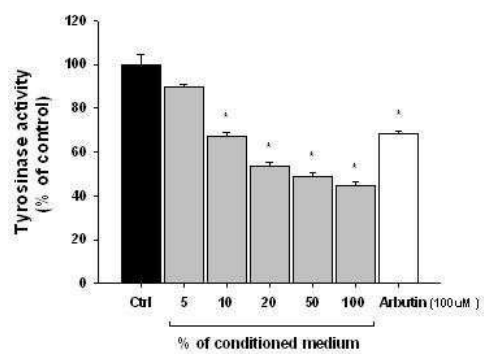
도면2a



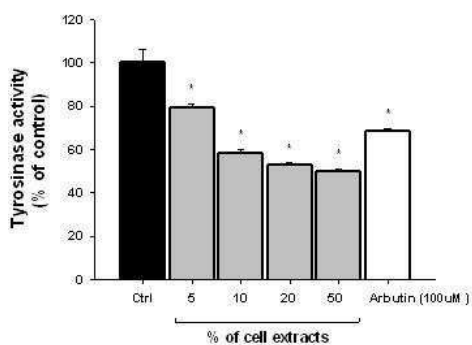
도면2b



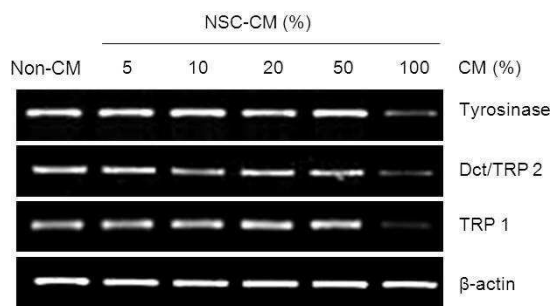
도면3a



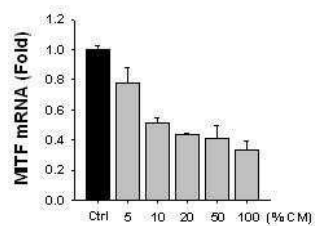
도면3b



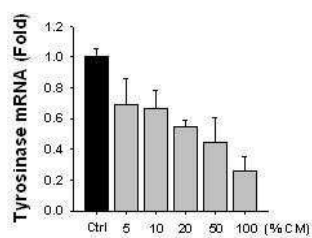
도면4a



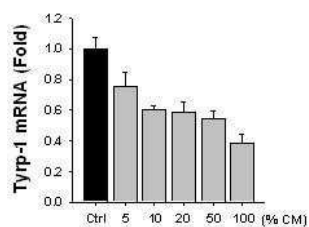
도면4b



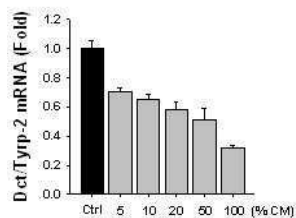
도면4c



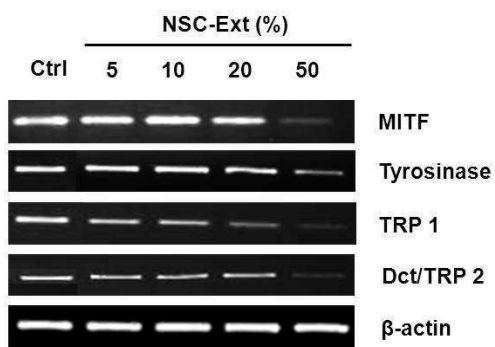
도면4d



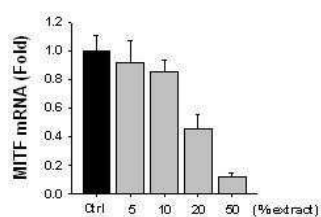
도면4e



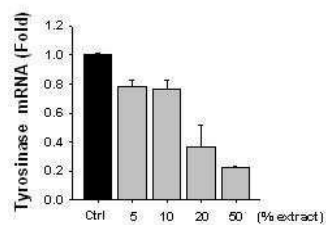
도면5a



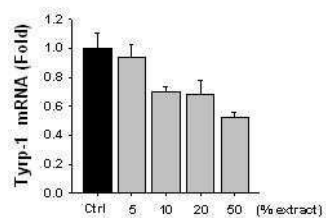
도면5b



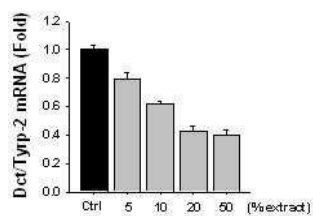
도면5c



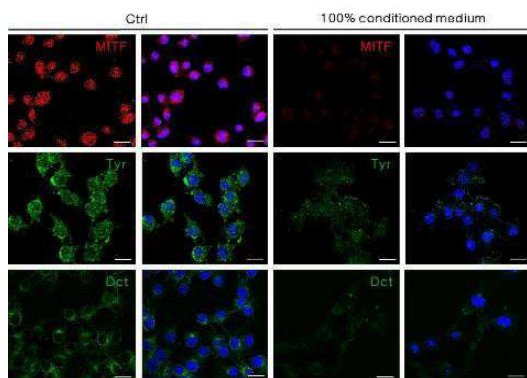
도면5d



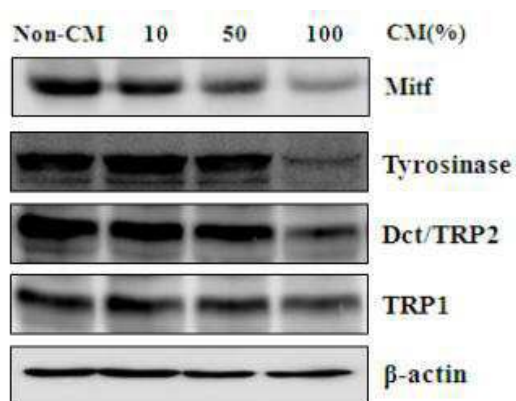
도면5e



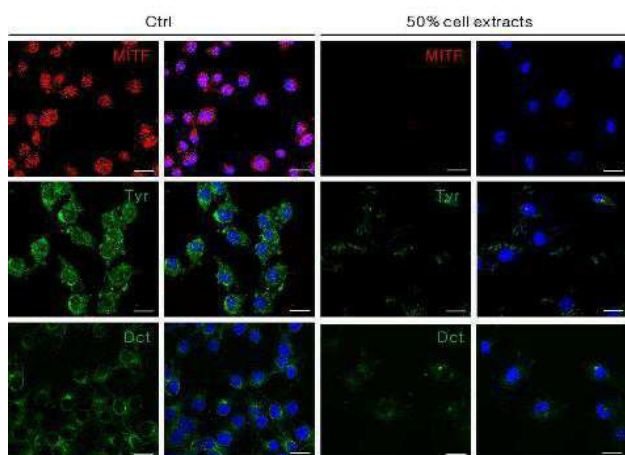
도면6a



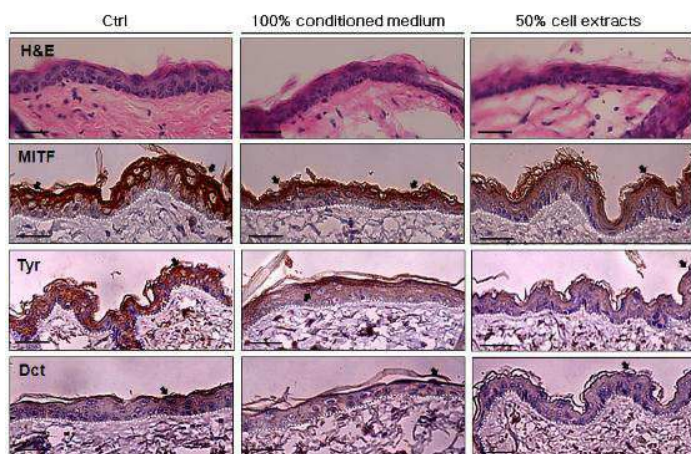
도면6b



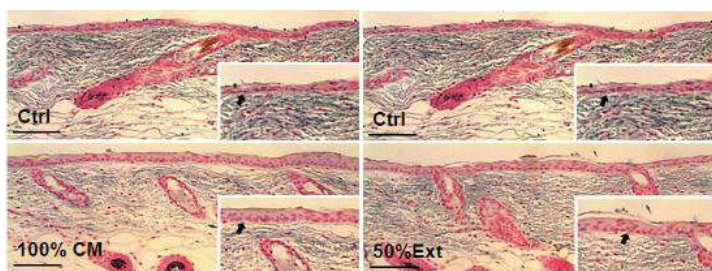
도면7



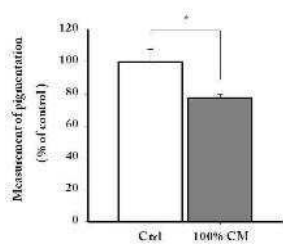
도면8



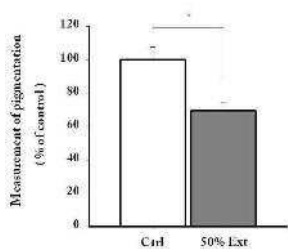
도면9a



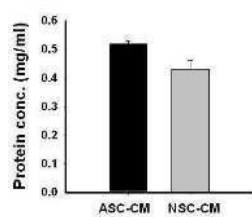
도면9b



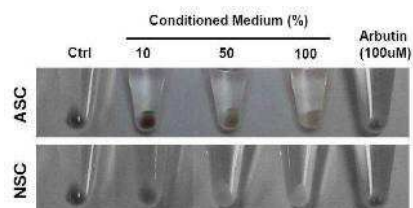
도면9c



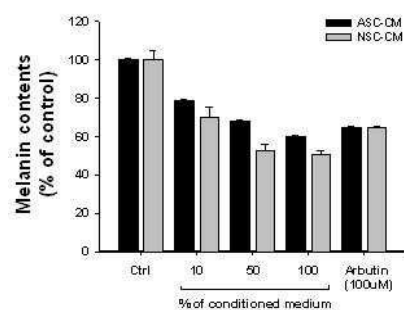
도면10a



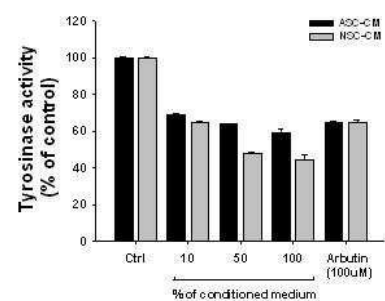
도면10b



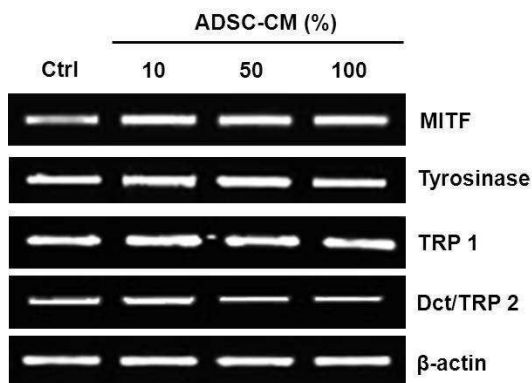
도면10c



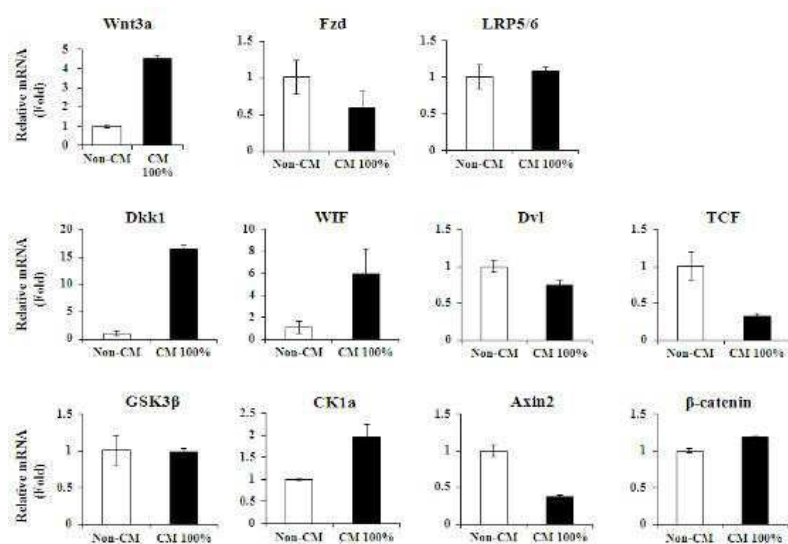
도면10d



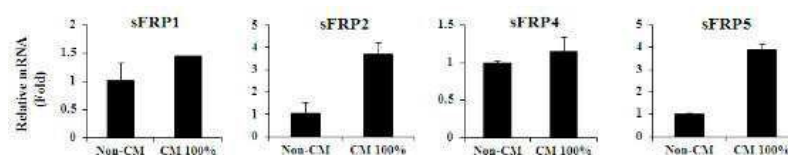
도면10e



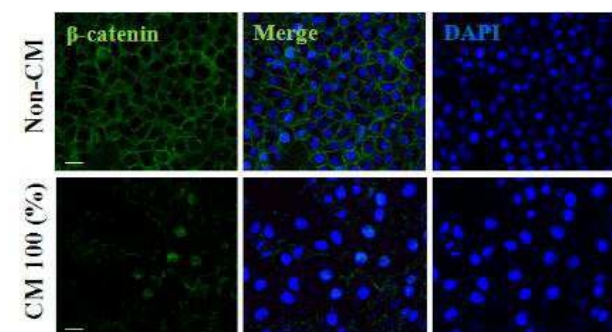
도면11a



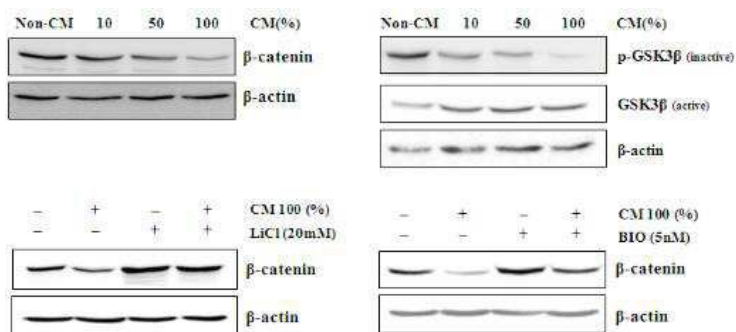
도면11b



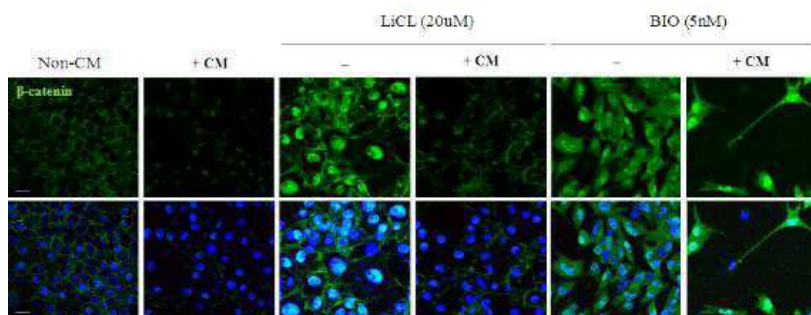
도면12



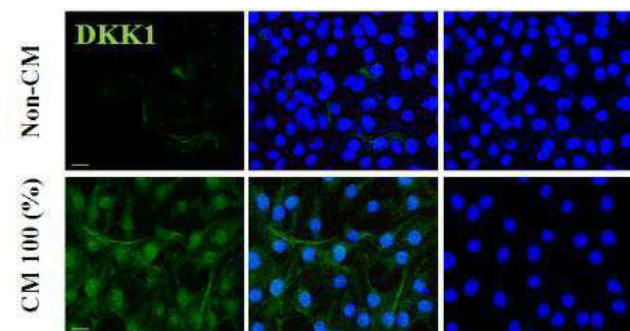
도면13a



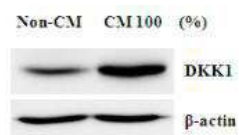
도면13b



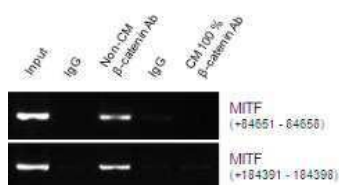
도면14a



도면14b



도면15a



도면15b

