



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0127553
(43) 공개일자 2019년11월13일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) A61K 35/36 (2015.01)
A61K 8/98 (2006.01) A61P 17/14 (2006.01)
A61Q 7/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 5/0627 (2013.01)
A61K 35/36 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-0046897(분할)
- (22) 출원일자 2019년04월22일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2018-0051872
원출원일자 2018년05월04일
심사청구일자 2018년05월04일

- (71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
- (72) 발명자
성종혁
경기도 성남시 분당구 서관교로 73, 1005동 102호 (관교동, 관교원마을10단지아파트)
- (74) 대리인
특허법인이름리온

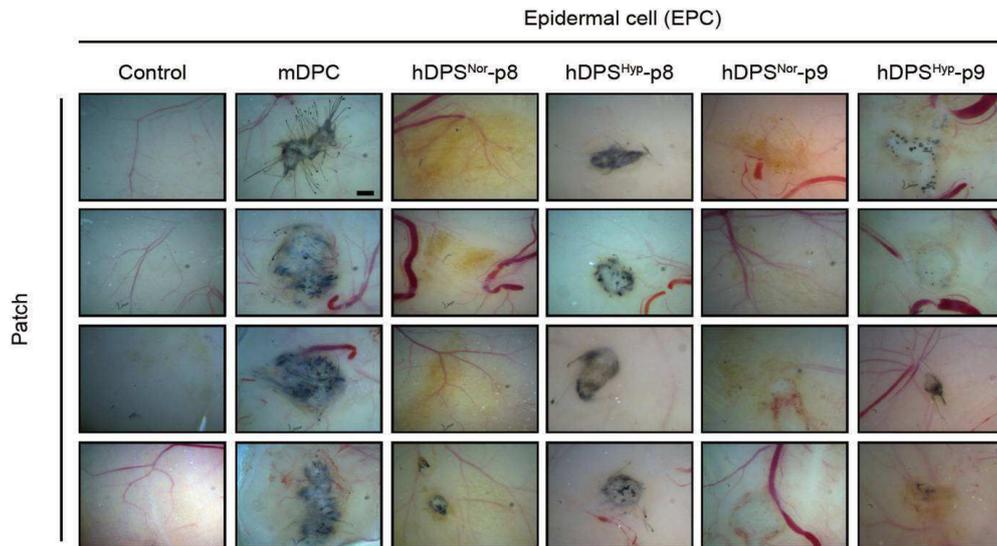
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 저산소 조건을 이용한 모유두 세포 및 세포 스페로이드의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 모발 유도 능력이 향상된 모유두 세포(dermal papilla cell), 인간 모유두 세포 유래 성장인자 및 세포 스페로이드(cell spheroid)의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 모유두 세포의 제조방법에 의하면, 연속된 계대 배양에도 불구하고 세포 증식능력, 이동능력, 노화억제능력, 발모유도능력이 우수한 모유두 세포를 얻을 수 있고, 모유두 세포를 저산소 상태에서 배양하여 성장인자를 대량으로 생산하는 방법을 제공할 수 있으며, 나아가 종래기술에 의해서는 모낭이 형성되지 않는 계대의 모유두 세포로부터 모낭을 유도할 수 있는 세포 스페로이드를 얻을 수 있으므로, 탈모예방 또는 치료제, 발모 또는 육모 촉진용 의약외품, 화장품 조성물 개발에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

A61K 8/981 (2013.01)

A61P 17/14 (2018.01)

A61Q 7/00 (2019.01)

C12N 2500/02 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

모유두 세포를 전 배양하는 단계; 및

상기 전 배양된 모유두 세포를 1 ~ 5 %의 산소분압을 갖는 저산소 상태에서 계대 배양하는 단계;를 포함하는, 모유두 세포의 증식 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 저산소 상태에서 배양함으로써 정상 조건에서 배양한 경우와 비교하여 하기의 특성 중 하나 이상을 가지는, 모유두 세포의 증식 방법:

- i) 세포 증식능력의 증가;
- ii) 세포 이동능력 증가;
- iii) 세포 노화현상 억제;
- iv) 모발 성장기 유도;
- v) 성장인자 발현 증가.

청구항 3

모유두 세포를 1 ~ 5 %의 산소분압을 갖는 저산소 조건에서 배양하는 것을 특징으로 하는 BMP6, FGF17, FGF22, FIGF, GDNF, VEGFA, PSPN, JAG2, IL4 및 VEGF의 발현이 증가된 모유두 세포의 제조방법.

청구항 4

모유두 세포를 전 배양하는 단계; 및

상기 전 배양된 모유두 세포를 1 ~ 5 %의 산소분압을 갖는 저산소 상태에서 계대 배양하는 단계;를 포함하는, 모유두 세포로부터 BMP6, FGF17, FGF22, FIGF, GDNF, VEGFA, PSPN, JAG2, IL4 및 VEGF로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 인간 성장인자를 대량으로 생산하는 방법.

청구항 5

제4항의 방법에 의하여 수득한 모유두 세포의 컨디션드 배지 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 모발 유도 능력이 향상된 모유두 세포(dermal papilla cell), 인간 모유두 세포 유래 성장인자 및 세포 스페로이드(cell spheroid)의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 모유두 세포(Dermal papilla cell, DPCs)는 모낭 하부의 모유두(dermal papilla)에 위치한 세포로써 모유두 세포에는 모세혈관이 분포하고 있어 이를 통해 모낭에 영양을 공급하고 성장인자(growth factor)와 저해인자(inhibition factor)를 분비하여 모낭 상피세포의 성장을 조절한다. 인체 모발이 성장하기 위해서는 모낭 주위의 여러 인자들의 작용과 모낭 내에 있는 표피 세포와 모유두 세포의 상호작용이 매우 중요하며, 이러한 상호작

용에 의해 모발의 성장 및 주기가 조절된다. 활발히 모발이 성장하는 성장기에는 모유두 세포의 활발한 증식 및 분화가 활발하게 일어나며 모발의 성장이 중단되며 탈모현상이 일어나는 퇴행기, 휴지기, 탈모기에는 이 세포가 사멸된다. 따라서 발모 및 탈모에는 모유두 세포의 증식 및 사멸이 밀접하게 연관되어 있으므로 이의 증식을 유도함으로써 성장기를 길게 하거나 혹은 세포 사멸을 억제하고 퇴행기, 휴지기, 탈모기를 짧게 하는 것이 탈모를 개선, 치료 방안이 될 것으로 사료된다. 또한, 모유두 부근의 세포 분열과 이동은 머리카락의 성장과 밀접한 관련을 갖고 있는데, 성장기에서 모유두로부터 모발이 새롭게 생성되는데, 여러 가지 사이토카인, 호르몬 등에 의해서 세포가 활성화 되어 모유두로 세포의 이동이 나타나 모발의 성장에 영향을 주게 된다.

[0004] 현재 탈모 치료방법으로 모낭 세포를 생체 외에서 배양하여 이식하는 기술이 시도되고 있는데, 모유두 세포를 생체 외에서 분리하여 배양하게 되면 3~4세대 이후에는 모낭유도능력을 점점 상실하게 되는 문제가 있다.

[0005] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 모유두 세포의 기능강화를 할 수 있는 새로운 모유두 세포 활성화 방법을 밝혀내고자 노력하였다. 그 결과, 저산소 조건에서 배양한 인간 유래 모유두 세포의 증식능력, 이동능력, 노화억제능력, 발모유도능력 및 발모촉진능력이 현저하게 향상된 것을 확인하였고, 인간 유래 모유두 세포를 이용하여 제조된 컨디션드 배지가 모발 성장에 미치는 효과를 확인하였다. 나아가, 마우스 in vivo 실험을 통해 정상 산소 조건 또는 저산소 조건에서 배양한 모유두 세포를 추가적으로 현적배양(hanging drop culture)하여 얻어진 세포 스페로이드의 발모유도 효과를 확인하고, 이를 이용하여 탈모 예방 및 발모 촉진 능력을 가지는 조성물을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서, 본 발명의 목적은 모유두 세포를 전 배양하는 단계; 및 상기 전 배양된 모유두 세포를 저산소 상태에서 계대 배양하는 단계;를 포함하는 모유두 세포의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 모유두 세포를 전 배양하는 단계; 및 상기 전 배양된 모유두 세포를 1 ~ 5 %의 산소분압을 갖는 저산소 상태에서 계대 배양하는 단계;를 포함하는, 모유두 세포로부터 인간 성장인자를 대량으로 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명은 다른 목적은 상기 인간 성장인자를 대량으로 생산하는 방법에 의해 수득한 인간 모유두 세포의 컨디션드 배지 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 계대 배양된 모유두 세포를 현적배양(hanging drop culture)하는 단계를 더 포함하는, 모유두 세포 스페로이드(dermal papilla cell spheroid)의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법으로 제조한 모유두 세포, 컨디션드 배지 조성물 또는 모유두 세포 스페로이드를 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 모유두 세포를 전 배양하는 단계; 및 상기 전 배양된 모유두 세포를 저산소 상태에서 계대 배양하는 단계;를 포함하는 모유두 세포의 제조방법을 제공한다.

[0014] 본 발명은 또한, 모유두 세포를 전 배양하는 단계; 및 상기 전 배양된 모유두 세포를 1 ~ 5 %의 산소분압을 갖는 저산소 상태에서 계대 배양하는 단계;를 포함하는, 모유두 세포로부터 인간 성장인자를 대량으로 생산하는 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 수득한 인간 모유두 세포의 컨디션드 배지 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 제조된 모유두 세포 또는 상기 컨디션드 배지 조성물을 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한, 계대 배양된 모유두 세포를 저산소 상태에서 현적배양(hanging drop culture)하는 단계를 더 포함하는, 모유두 세포 스페로이드(dermal papilla cell spheroid)의 제조방법을 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한, 상기 모유두 세포 스펙로이드를 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 따른 모유두 세포의 제조방법에 의하면, 연속된 계대 배양에도 불구하고 세포 증식능력, 이동능력, 노화억제능력, 발모유도능력이 우수한 모유두 세포를 얻을 수 있기 때문에, 생체 외부에서 분리하여 배양한 경우에도 저산소 배양하지 않은 모유두 세포 대비 모낭유도능력이 월등하게 향상된 우수한 효과가 있으므로, 탈모 예방 또는 치료제, 발모 또는 육모 촉진용 의약품, 화장품 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명에 의하면, 모유두 세포를 저산소 상태에서 배양하여 성장인자를 대량으로 생산하는 방법을 제공할 수 있으며, 나아가 일반 배양에서는 모낭이 형성되지 않는 계대의 모유두 세포로부터 모낭을 유도할 수 있는 세포 스펙로이드를 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 모유두 세포를 저산소에서 배양한 후 ELISA 리더기로 흡광도를 측정하여 세포 증식 정도를 확인한 결과이다.

도 2는 모유두 세포를 저산소에서 배양한 후 세포 이동능력을 확인한 결과이다.

도 3은 모유두 세포를 저산소에서 배양한 후 노화억제효과를 확인한 결과이다.

도 4는 본 발명의 저산소 배양에 따른 모유두 세포의 ALP1 레벨을 확인한 결과이다.

도 5는 본 발명의 저산소 배양에 따른 모유두 세포의 성장 인자 증가 효과를 확인한 결과이다.

도 6은 실험동물에 저산소 조건으로 배양한 모유두 세포를 피하주사하고 14일 후 새로 자란 털의 무게를 측정하여 발모 효과를 확인한 결과이다.

도 7은 실험동물에 저산소 조건으로 배양한 모유두 세포를 피하주사하고 모낭 유도효과 및 모낭 증식속도를 확인한 결과이다.

도 8은 모유두 세포를 산소 농도를 달리하여 저산소 상태로 배양한 후 ELISA 리더기로 흡광도를 측정하여 저산소 조건에 따른 모유두 세포의 증식을 개선 효과를 확인한 결과이다.

도 9는 모유두 세포를 정상 산소 조건 또는 저산소 조건으로 8 ~ 9 계대까지 계대 배양 한 후 추가로 현적배양하여 얻은 모유두 세포 스펙로이드(DPS)의 모낭형성 효과를 패치 분석으로 확인한 결과이다. 양성 대조군으로 마우스 유래 모유두 세포(DPC)를 사용하였다.

도 10은 본 발명의 저산소 배양에 따른 배양액의 모발 성장효과를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0025] 본 발명은 모유두 세포를 전 배양하는 단계; 및 상기 전 배양된 모유두 세포를 저산소 상태에서 계대 배양하는 단계;를 포함하는 모유두 세포의 제조방법을 제공한다.

[0026] 본 발명에서 용어, "모유두 세포(Dermal papilla cell, DPC)"는 모낭의 기저부에 존재하는 세포로, 모낭을 구성하는 세포들에게 산소와 영양을 공급하여 모발의 성장과 모낭 주기 조절을 담당한다. 따라서 모유두세포의 증식이 촉진되면 모발이 건강해지고 모발 성장이 촉진되며 탈모를 막을 수 있다. 모발의 성장은 모유두(dermal papilla)를 둘러싸고 있는 상피세포(epithelial cell)가 분열하여 모간(hair shaft)을 만들면서 진행되기 때문에 모유두세포는 상피세포의 분열을 조절하는 중요한 역할을 한다. 또한 남성형 탈모증에서 남성호르몬이 모낭에 작용하는 부위 역시 모유두로서 모유두세포는 발모에 있어 매우 중요한 역할을 하는데, 본 발명자들은 세포 외에서 배양할 경우 모낭 형성이 잘 되지 않는 인간유래 모유두세포를 저산소 상태에서 배양하거나 추가적인 현적 배양을 통해 인간유래 모유두 세포의 성장, 증식 및 모낭형성 능력이 증가하는 것을 확인하였다.

- [0027] 본 발명에서 용어, "저산소(hypoxia)" 상태란 일반적인 세포 배양 조건의 산소양보다 적은 양의 산소가 존재하는 것을 의미하며, 본 발명의 모유두 세포를 대량 증식할 수 있는 조건은 제한 없이 포함되나, 바람직하게는 약 5% 이산화탄소에, 1% 내지 5%의 산소 조건에서 6시간 내지 72시간 배양하는 것이 바람직하다. 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 저산소 상태는 배양 배지에 염화코발트(Cobalt chloride, CoCl_2)를 처리하여 유도할 수 있다. 염화코발트는 heme moiety에 있는 철(iron)을 대치하여 환원상태를 지속시켜 저산소 상태를 유발할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 모유두 세포는 인간으로부터 유래하였음을 특징으로 한다.
- [0029] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 인간 유래 모유두 세포(Human dermal papilla cell, hDPC)를 FDPG(Follicle Dermal Papilla cell Growth media) 배지에서 전 배양한 후, 저산소 조건에서 계대 배양하여 모유두 세포를 제조하였다(실시예 1). 그 결과, 저산소 조건에서 배양한 경우, 정상 산소 조건에서 배양한 경우보다 모유두 세포의 증식이 현저하게 증가된 것을 확인하였으며(도 1), 세포 이주능력이 월등하게 증가하고(도 2), 세포 노화가 억제되며 세포의 수명이 증가함을 확인하였다(도 3).
- [0030] 또한, 본 발명의 구체적인 실시예에서는 저산소 배양한 모유두 세포에서 ALP1 mRNA 발현이 증가하고, ALP-양성 세포의 양이 증가함을 확인하였다(도 4). ALP(alkaline phosphatase)는 모발 성장 사이클에서 혈관형성의 지표로 알려져 있으며 모발이 성장기로 유도될 때 효소 활성이 증가하게 되므로 발모의 지표인자로 사용되고 있다. 따라서, ALP-양성 세포의 증가로부터 모유두 세포의 모낭유도능이 향상됨을 확인할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 모유두 세포의 제조방법은 모유두 세포를 저산소 상태에서 배양함으로써 정상 조건에서 배양한 경우와 비교하여 하기의 특성 중 하나 이상을 가지는 방법일 수 있다.
- [0032] i) 세포 증식능력의 증가;
- [0033] ii) 세포 이동능력 증가;
- [0034] iii) 세포 노화현상 억제;
- [0035] iv) 모발 성장기 유도;
- [0036] v) 성장인자 발현 증가.
- [0038] 다른 측면에서, 본 발명은 모유두 세포를 전 배양하는 단계; 및 상기 전 배양된 모유두 세포를 1 ~ 5 %의 산소 분압을 갖는 저산소 상태에서 계대 배양하는 단계;를 포함하는, 모유두 세포로부터 인간 성장인자를 대량으로 생산하는 방법을 제공한다.
- [0039] 구체적으로 본 발명은 대머리 환자에서 수득한 인간 유래 모유두 세포를 적정한 배지 및 저산소 조건에서 배양하여 인간 성장인자, 예를 들어 BMP6, FGF17, FGF22, FIGF, GDNF, VEGFA, PSPN, JAG2, IL4, VEGF 등을 합성할 수 있도록 조작하는 방법을 제공한다. 상기 성장인자는 바람직하게는 ALP1, VEGF 및 GDNF일 수 있다.
- [0040] 본 발명의 컨디션드 배지는 바람직하게는 1 ~ 5%의 산소를 포함하는 저산소 상태에서 6 내지 72시간 배양하고, 무혈청 배지에서 추가 배양하며 제조하는 것이 바람직하며, 더 바람직하게는 2%의 산소를 포함하는 저산소 상태에서 3일간 배양하고, 무혈청 배지에서 3일간 배양하여 제조하는 것일 수 있다.
- [0041] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 인간으로부터 수득한 모유두 세포를 FDPG 배지에서 계대 배양하여 수득한 후, 2%의 저산소 상태에서 배양 후 무혈청 배지에서 추가 배양하여 얻은 배양액을 원심분리 및 여과하여 컨디션드 배지를 제조하였다.
- [0043] 또 다른 측면에서, 본 발명은 인간으로부터 수득한 모유두 세포를 저산소 조건에서 배양한 후 무혈청 배지에서 추가 배양하여 수득한 컨디션드 배지 조성물을 제공한다.
- [0044] 본 발명에서 용어, "컨디션드 배지(conditioned medium)"란 세포를 액체현탁배양하여 세포분열최성기인 대수성장기에 도달했을 때 분열세포를 원심분리 또는 여과하여 제거하고 배양액만 채취하여 이를 배양기질에 혼합한 배지를 말한다. 이는 분열중인 세포로부터 배지 내에서 추출되어 나오는 미지의 성장요소(growth factor)를 이용하는 것으로서, 저밀도의 세포 플레이팅이나 원형질체 배양에 많이 이용된다.

- [0045] 본 발명에서의 컨디션드 배지 조성물이란 인간 유래의 모유두 세포를 배양한 배지에서 상기 모유두 세포를 제거한 용액을 포함하는 조성물로서, 인간 유래의 모유두 세포에서 유래한 성장인자 등의 물질이 풍부하게 함유되어 있는 조성물을 말하며, 바람직하게는 BMP6, FGF17, FGF22, FIGF, GDNF, VEGFA, PSPN, JAG2, IL4, VEGF를 포함하고, 보다 바람직하게는 ALP1, VEGF 및 GDNF를 포함할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 컨디션드 배지의 효과를 확인하기 위하여, 상기와 같이 제조된 컨디션드 배지에 인간 유래 모유두 세포를 저산소 상태에서 6 ~ 12시간 동안 배양한 결과, 9개의 mRNA 발현이 증가하였고, VEGF, GDNF의 발현 증가를 확인하였다(도 5). 또한, 정상적인 마우스의 모발을 컨디션드 배지 조성물에서 72시간 배양한 후 모낭을 촬영한 결과 모발의 길이 증가를 확인하였다(도 10). 따라서 본 발명의 조성물이 모발 성장용 배지로 유용함을 알 수 있었다.
- [0048] 또 다른 측면에서, 본 발명은 모유두 세포를 전 배양하는 단계; 및 상기 전 배양된 모유두 세포를 저산소 상태에서 계대 배양하는 단계;를 통해 생산한 모유두 세포를 유효성분으로 포함하는, 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0049] 상기 저산소 조건은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0050] 본 발명의 조성물은 탈모 방지, 발모 촉진, 모발 성장에 효과가 있다.
- [0051] 본 발명의 일 실시예에서, 저산소 배양하여 생산한 모유두 세포를 마우스에 피하주사 한 결과, 자라난 모발의 무게가 정상산소 조건에서 배양한 모유두 세포 보다 3배 이상 증가하여 발모 효과가 우수함을 확인할 수 있었다(도 6).
- [0052] 또한, 저산소 배양하여 생산한 모유두 세포를 마우스에 이식한 결과, 정상 산소에서 배양한 모유두 세포 보다 저산소 배양한 모유두 세포가 모낭 형성능, 모낭의 증식속도가 우수함을 확인할 수 있었다(도 7).
- [0053] 본 발명의 상기 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물은 상기에서 제조한 컨디션드 배지를 더 포함할 수 있다. 즉, 상기 조성물은 모유두 세포만을 포함하거나, 컨디션드 배지 조성물만 포함하거나, 모유두 세포와 컨디션드 배지 조성물을 모두 포함할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물은 화장료 조성물일 수 있다.
- [0055] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 성분은 모유두 세포 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함하며, 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.
- [0056] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화 될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0057] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명의 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물은 저산소 배양하여 생산한 모유두 세포 및/또는 컨디션드 배지 조성물을 유효성분으로 포함하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 약학적 조성물일 수 있다.
- [0058] 본 발명의 조성물이 약학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0059] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유효제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0061] 또 다른 측면에서, 본 발명은 모유두 세포를 전 배양하는 단계; 상기 전 배양된 모유두 세포를 정상산소 상태

또는 저산소 상태에서 계대 배양하는 단계; 및 상기 계대 배양된 모유두 세포를 저산소 상태에서 현적배양(hanging drop culture)하는 단계를 포함하는, 모유두 세포 스페로이드(dermal papilla cell spheroid)의 제조 방법을 제공한다.

- [0062] 본 발명에서 용어, "모유두 세포 스페로이드(dermal papilla cell spheroid, DPS)"는 3차원 세포 조직의 형태를 말하며, 세포들이 해리되어 있지 않고 뭉쳐있는 형태로 존재하는 것을 말한다. 대체적으로 단면이 원형 또는 타원형으로 보일 수 있을 정도로 세포가 응집되어 있는 입체 구조를 의미하는데, 이러한 형태는 세포 또는 세포 응집체의 특성을 고려하여 판단되어야 하며, 완전한 스페로이드형이나 구형을 의미하는 것은 아니다.
- [0063] 상기 세포집합체는 현적배양(hanging drop culture), 스핀너 플라스크 배양(spinner flask culture), 반구형 마이크로웰 플레이트(concave microwell plate)를 이용한 삼차원 세포배양 등 입체 형태로 세포집합체를 배양할 수 있는 방법을 이용하여 제조될 수 있다.
- [0064] 본 발명의 일 실시예에서는 현적배양을 통하여 모유두 세포 스페로이드를 제조하였다. 배양 배지에 모유두 세포를 현탁하여 아랫부분에 뭉치게 하고, 배양배지를 첨가하여 세포와 현적구가 마르지 않게 하면서 6일간 배양하였다.
- [0065] 6일 후 상기 세포 스페로이드는 세포집합체 내의 세포들의 활성이 유지되면서 삼차원의 형태를 유지할 수 있는 정도의 크기인 것이 바람직하고, 구체적으로 상기 세포집합체는 직경이 250 μm 이하인 것일 수 있으며, 100 내지 250 μm 인 것일 수 있다.
- [0066] 본 발명의 일 실시예에서는 저산소 또는 정상산소 조건에서 8 내지 9 계대까지 계대배양한 모유두 세포를 추가적으로 현적배양(hanging drop culture)하여 얻은 모유두 세포 스페로이드(DPS)를 포피 세포와 혼합하여 누드 마우스 등에 피하 이식한 결과, 저산소 조건 후 현적배양을 통해 획득한 모유두 세포 스페로이드(DPS-Hyp)를 이식한 마우스에서만 양성 대조군(마우스 유래 모유두 세포, DPC)과 비슷한 수준으로 모낭 또는 모발이 관찰되는 것을 확인할 수 있었다(도 9). 음성 대조군인 진피세포(control) 및 정상산소 조건에서 배양 후 현적배양하여 획득한 모유두 세포 스페로이드(DPS-Nor)를 이식한 경우에는 모낭 또는 모발이 관찰되지 않았다.
- [0067] 본 발명의 모유두 세포 스페로이드 제조방법에 있어서, 상기 모유두 세포는 인간으로부터 수득한 것일 수 있다.
- [0068] 본 발명의 일 실시예에서는 마우스 유래 모유두 세포(DPC)와 달리, 인간유래 모유두 세포는 8-9 계대 이후에는 현적배양을 하더라도 모낭 형성능이 사라지는 것을 확인할 수 있었으나, 저산소 조건에서 8-9 계대까지 배양한 모유두 세포를 현적 배양한 경우에는 모낭이 형성됨을 확인하였으며, 이로부터 저산소 조건의 현적배양을 통해 모유두 세포의 모낭 형성능력이 다시 생성된 것을 알 수 있다.
- [0070] 다른 측면에서 본 발명은, 상기 방법에 의해 제조된 모유두 세포 스페로이드를 유효성분으로 함유하는 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0071] 상기 조성물은 화장료 조성물 또는 약학적 조성물일 수 있고, 조성물의 종류에 따라 추가적으로 포함될 수 있는 성분은 상술한 바와 동일하다.
- [0072] 본 발명의 탈모 방지 또는 발모 촉진용 조성물은 세포 이식 용도로 사용될 수 있다.
- [0074] 이하에서는 바람직한 실시예 등을 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.
- [0076] **실시예 1. 인간 유래 모유두 세포(hDPC)의 저산소 배양**
- [0077] PromoCell로부터 얻은 인간 유래의 모유두 세포(Human dermal papilla cell, hDPC)를 1% 안티바이오틱(Antibiotic) 및 안티마이코틱(Antimycotic) Hyclone sv30079.91을 포함하는 Follicle Dermal Papilla cell Growth media (Promocell, Heidelberg, Germany) 배지에 접종하고, 37°C의 5% 이산화탄소 배양기에서 배양하여 세포를 준비하였다. 6-well에 준비한 hDPC를 1×10^4 /well농도로 Follicle Dermal Papilla cell Growth media에

접종하고, 1~5% 산소분압을 갖는 저산소 조건에서 3일 동안 추가 배양하였다.

[0079] 실시예 2. 저산소 배양이 모유두 세포에 미치는 영향 확인

[0080] 2-1. 저산소 배양에 따른 모유두 세포의 증식 효과 확인(도 1)

[0081] 실시예 1에서 얻은 모유두 세포를 현미경으로 관찰하고, 트립신으로 세포를 띄운 후 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 밀층에 세포만 남겨두었다. 1X PBS를 첨가하여 세포를 잘 풀어준 후 트리판블루로 염색하였다. 공식을 이용하여 세포수를 계산해서 세포 증식 정도를 확인하였다.

[0082] 그 결과, 저산소 조건에서 배양한 경우, 대조군 대비 모유두 세포의 증식이 현저하게 증가하였다(도 1).

[0084] 2-2. 저산소 배양에 따른 모유두 세포의 이동 효과 확인(도 2)

[0085] 60mm 배양접시에 모유두 세포(hDPC)를 5×10^5 농도로 접종하였다. 하룻밤 동안 배양한 후 블루(1000 μ L)팁을 이용하여 접시 바닥에 스크래치를 내주었다. 정상산소 및 저산소 조건에서 각 48 시간 동안 추가 배양하였다. 양쪽의 세포들이 스크래치 중간 위치를 향해 이동한 거리를 측정하여, 세포 이주능을 확인하였다.

[0086] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 저산소 조건에서 배양한 모유두 세포의 이동이 대조군 대비 월등하게 증가함을 확인할 수 있었다.

[0088] 2-3. 저산소 배양에 따른 모유두 세포의 수명증가 (도 3)

[0089] 60mm 배양접시에 모유두 세포(hDPC)를 1×10^4 농도로 접종하였다. 하룻밤 동안 배양한 후 시립 없는 배지를 교체 해주었다. 정상산소 및 저산소 조건에서 각 5일 동안 추가 배양한 후 X-Gal kit (Sigma-Aldrich, MO, USA)를 사용하여 세포를 염색하여 분석하였다.

[0090] 다음으로, 12-well에 모유두 세포를 1×10^4 농도로 접종하고 성장 배지로 4일마다 계대 배양 하였다. 매번 계대 시, 트립신으로 세포를 띄운 후 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 밀층에 세포만 남겨두었다. 1x PBS를 첨가하여 세포를 잘 풀어준 후 트리판블루 (Sigma-Aldrich, MO, USA)로 염색하고, 혈구 미터를 사용하여 계수 하였다. 이주기는 최대 7 번 반복되었다 (10 계대). 각 계대의 시작에서 접종하고 마지막에 수확된 세포 수를 사용하여 population doubling의 수를 계산 하였다.

[0091] 그 결과, 저산소 조건에서 배양한 모유두 세포가 노화가 억제되고 population doubling이 증가함을 확인할 수 있었다(도 3).

[0093] 2-4. 저산소 배양에 따른 모유두 세포의 ALP1 레벨 확인(도 4)

[0094] 60mm 배양접시에 세포를 2.5×10^5 농도로 접종하였다. 하룻밤 동안 배양한 후, 6-10시간 동안 정상산소 및 저산소 조건에서 추가 배양하였다. 그 다음, RNA 추출 키트(RNeasy, Qiagen)로 총 RNA를 추출하고, cDNA 합성은 1000 ng의 총 RNA로부터 1,000U 역전사 효소 및 50 ng/ μ l oligo(dT) 프라이머를 이용한 cDNA 합성 키트 (A3500, Promega)를 사용하였다. qPCR은 SYBR Green PCR 마스터 믹스 (Takara Bio, Japan)를 이용하여 스탭 원 플러스 실시간 PCR 시스템 (Applied Biosystems, Invitrogen)으로 분석하였다.

[0095] 60mm 배양접시에 세포를 1×10^4 농도로 접종하였다. 하룻밤 동안 배양한 후 시립 없는 배지를 교체해주었다. 정상산소 및 저산소 조건에서 각 5일 동안 추가 배양한 후 ALP staining kit (Sigma-Aldrich, MO, USA)를 사용하여 세포를 염색하여 분석하였다.

[0096] 그 결과, 저산소 배양 6-10시간에는 모유두 세포에서 ALP1 mRNA의 발현이 증가함을 확인할 수 있으며(도 4의 A), 저산소 조건에서 ALP-양성 세포의 양이 증가함을 확인할 수 있다(도 4의 B).

[0098] 2-5. 저산소 배양에 따른 모유두 세포의 성장 인자 증가 확인(도 5)

[0099] 인간 신호전달경로탐색기 RT² 프로파일러 PCR 어레이(신호전달경로: PAHS-041ZA)를 이용하여 저산소 배양조건의 표적 유전자를 분석하였다. 2.5×10^5 모유두 세포를 60 mm 디쉬에 접종하여 하룻밤 동안 배양하였다. 다음날 6 시간 동안 정상조건 및 저산소 조건에서 추가 배양하였다. 그 다음, RNA 추출 키트(RNeasy, Qiagen)로 총 RNA를 추출하고, cDNA 합성은 500 ng의 총 RNA로부터 1,000U 역전사 효소 및 50 ng/ μ L oligo(dT) 프라이머를 이용한 cDNA 합성 키트(A3500, Promega)를 사용하였다. 유전자 발현은 PCR 어레이 키트(Qiagen)의 방법에 따라 분석하였다.

[0100] 도 5에 나타난 바와 같이, 저산소 조건에서 6시간 동안 배양한 모유두 세포에서 9 개의 mRNA 발현이 증가함을 확인할 수 있다.

[0102] 2-6. 실험동물에서 저산소 배양에 따른 모유두 세포의 발모효과 확인(도 6)

[0103] 저산소 조건에서 배양한 모유두 세포의 발모효과 확인하기 위하여 100mm 배양 접시에 1×10^5 농도로 접종하고 정상산소 및 저산소 조건에서 5일 동안 배양하였다. 그런 다음, 트립신으로 세포를 띄운 후 원심분리를 통해서 상층액을 버리고 밑에 층에 세포만 남겨두었다. 1ml의 PBS를 첨가하고 세포를 잘 풀어주었다. 트리판블루 염색해서 세포수를 세었다. 공식을 이용해서 계산한 후 1×10^6 의 세포를 피펫으로 새 튜브로 옮긴 후 다시 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 100 μ L의 PBS를 첨가하여 세포를 잘 풀어주었다. 6주령 female C3H쥐의 등부분의 털을 제거한 후 100 μ L의 정상산소 및 저산소 조건에서 배양한 hDPC를 피하주사를 하였다. 14일 후 등에 새로 자란 털을 밀고 무게 측정을 통해서 털 재생하는 정도를 살펴보았다.

[0104] 그 결과, 모발의 성장기 유도는 정상산소 조건에서 배양한 모유두 세포 투여군 과는 달리 저산소 조건에서 배양한 모유두 세포를 투여한 생쥐의 경우, 14일 경과 후에 등 부분의 모발이 성장하여 등 부분을 덮은 것을 확인할 수 있다(도 6의 A). 모발의 무게는 정상산소 조건에서 배양한 모유두 세포에서 3배 이상 증가하였다(도 6의 B).

[0106] 2-7. 실험동물에서 저산소 배양에 따른 모유두 세포의 모발성장효과 확인(도 7)

[0107] 3 주간의 이식 후, 조직학적 검사를 위해 표본을 파라-폼 알데하이드 완충 용액(10 % paraformaldehyde buffered solution)에 고정하고 파라핀 슬라이드를 만들고 헤마톡실린과 에오신(H & E) 염색을 시행했다. 유도된 HF는 현미경 이용하여 관찰되고 영상화되었다. 모낭의 증식속도는 Ki67 면역 염색하고 형광현미경을 이용하여 관찰되었다, 면역 염색 대조군은 DAPI로 사용되었다.

[0108] 그 결과, 저산소 조건에서 배양한 모유두 세포를 이식한 마우스의 모발성장이 증가함을 확인할 수 있다(도 7).

[0110] 실시예 3. 저산소 배양 조건이 모유두 세포에 미치는 영향 확인(도 8)

[0111] 96-well에 준비한 hDPC를 1×10^4 /well 농도로 접종하였다. 정상산소 또는 1%, 2%, 5%의 저산소 조건에서 3일 동안 배양하였다. 그런 다음, 각 well에 있는 배양 배지를 제거한 후 10 μ L의 CCK8 reagent와 90 μ L의 PBS를 첨가하고 2시간 동안 37 $^{\circ}$ C 온도에서 배양한 후 상층액을 ELISA 리더기를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 증식 정도를 확인하였다.

[0112] 그 결과, 2%의 저산소 조건에서 hDPC의 증식능력이 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있다(도 8).

[0114] 실시예 4. 저산소 배양한 모유두 세포의 현적배양 효과 확인(도 9)

[0115] 4-1. 모유두 세포의 현적배양(Hanging drop culture)

[0116] 모유두 세포 스페로이드를 제조하기 위하여, 정상산소 상태 또는 저산소 상태에서 8~9 계대까지 배양한 모유두 세포를 추가적으로 현적배양 하였다. 100mm 배양접시의 뚜껑 밑면에 1×10^4 /20 μ L의 모유두 세포를 배양하였다. 20 μ L의 배양 배지에 인간유래 모유두세포 (1×10^4 cells)를 현탁하여, culture dish lid (100 mm)의 아랫부분

에 둥치게 하고, 6ml의 배양배지를 첨가하여 세포 및 현적구가 마르지 않게 하였다. 매 2 일마다 새로운 배지를 교체하여 정상 산소 상태 또는 저산소 상태에서 6 일간 배양 하였다. 모유두 세포는 중력에 의해 방울의 바닥에 모여 구형이 된다.

[0118] **4-2. 패치 분석(patch assay)**

[0119] 저산소 상태에서 DPCs의 모발 유도능(hair-inductivity)을 결정하기 위해, 확립된 패치 분석을 수행하였다. 신생아 마우스 (C3H / HeN) 표피로부터 표피(EPC) 세포를 수득 하였다. 다음으로, 정상 산소 또는 저산소 배양에서 3차원 현적배양(3D hanging drop culture)으로부터 수확된 DPS (DP sphere) (약 100 DP sphere, 8 계대 및 9 계대의 DPC가 사용됨)를 1×10^6 표피 세포와 혼합 하고 6 주된 female 누드 마우스 (BALB / cAJcl-nu)의 등에 피하 이식 하였다. 신생 마우스 표피 세포 (1×10^6 개) 또는 표피 세포 (1×10^6 개)와 혼합 한 진피 세포를 대조군으로 사용 하였다. 3 주간의 이식 후, 육안으로 관찰하기 위해 해부 된 샘플을 현미경을 통해 먼저 이미지 확보하였다. 추가 조직학적 검사를 위해 표본을 파라-포름알데하이드 완충 용액 (10 % paraformaldehyde buffered solution)에 고정하고 파라핀 슬라이드를 만들고 헤마톡실린과 예오신 (H & E) 염색을 시행했다. 유도된 모낭(HF)은 현미경 하에서 관찰되고 영상화되었다.

[0120] 그 결과, 저산소 조건에서 3차원 현적배양 방법을 통해 획득한 DPS 이식한 마우스에서 어두운 점이나 모발 관찰되었다(도 9).

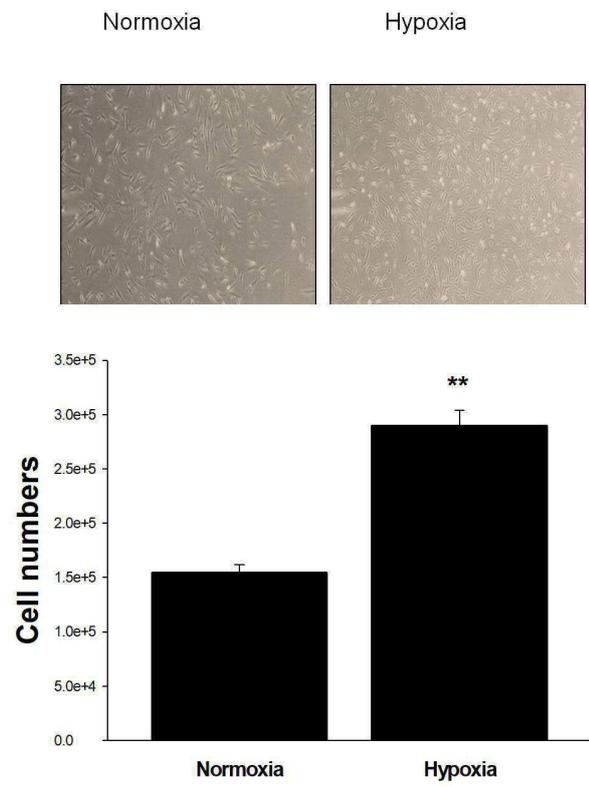
[0122] **실시예 5. 모유두 세포를 저산소 배양하여 얻은 배지의 효과 확인(도 10)**

[0123] 정상적인 생쥐의 성장기 콧수염(anagen vibrissal)을 메스와 족집게를 사용하여 분리하였다. 분리된 생쥐의 콧수염을 정량 배지(2 mM L- 글루타민, 10 µg / mL 인슐린, 10 ng / mL 하이드로 코르티손, 100 U / mL 페니실린 및 혈청 없는 100 µg / mL 스트렙토 마이신이 첨가 된 윌리엄스 E 배지)와 DPC의 정상 산소 (NorCM) 또는 저산소 (HypCM)배양 조건의 배양액과 1:1로 함께 투여하였다. 배양 시작 72 시간 후 개별 모낭을 촬영 하였다 (Edmund Optics Ltd, UK). 모발 길이의 변화를 사진으로부터 계산하고, 8-10 개의 모발 모낭의 평균 ± SE로 나타내었다.

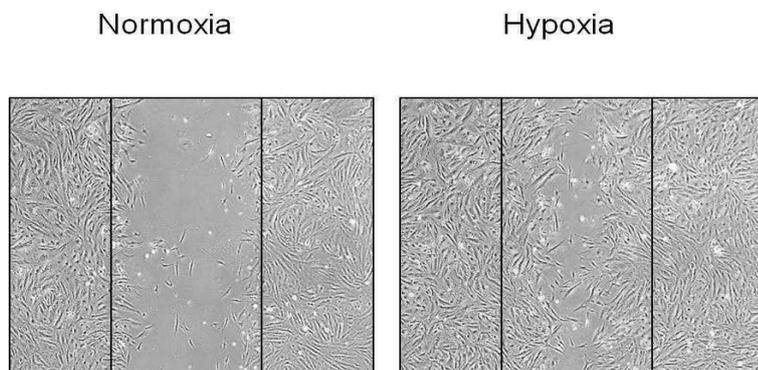
[0124] 그 결과, 정상산소의 DPC 배양액 투여군 보다 저산소 조건의 DPC 배양액을 투여한 경우, 분리된 생쥐의 콧수염의 길이 증가하였다.

도면

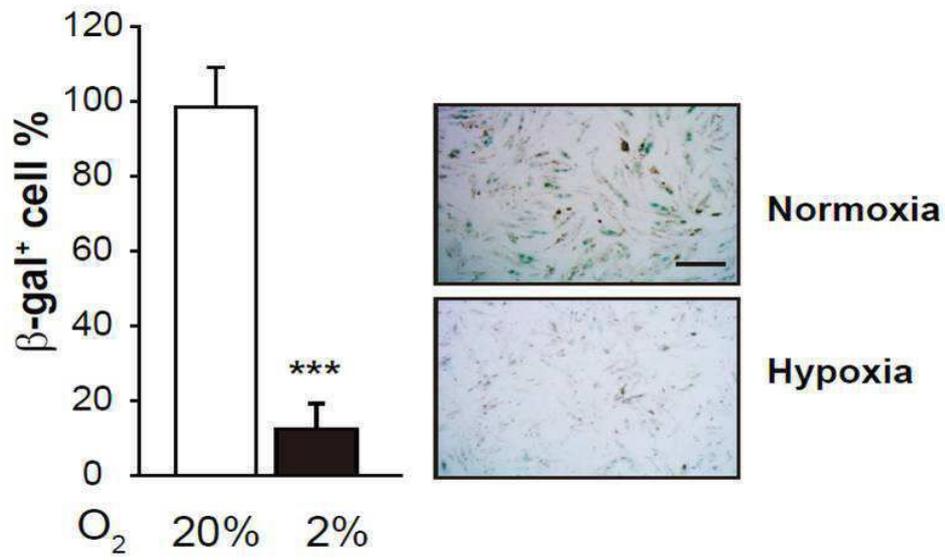
도면1



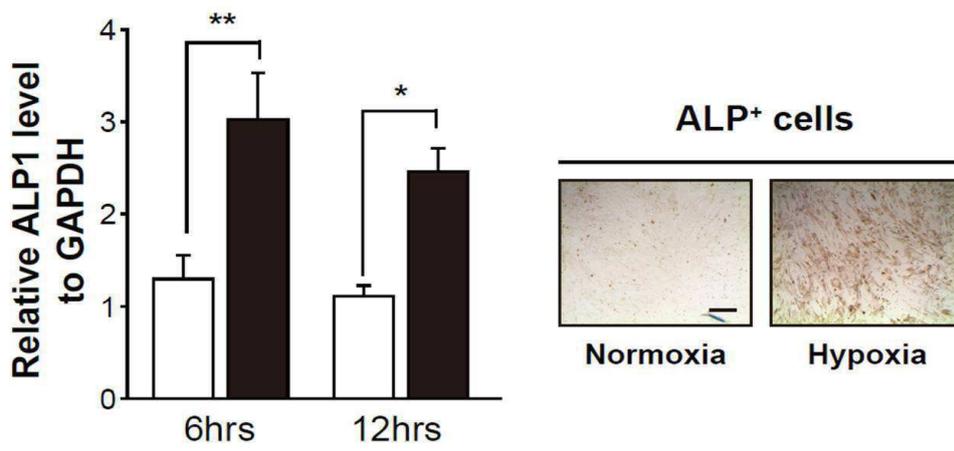
도면2



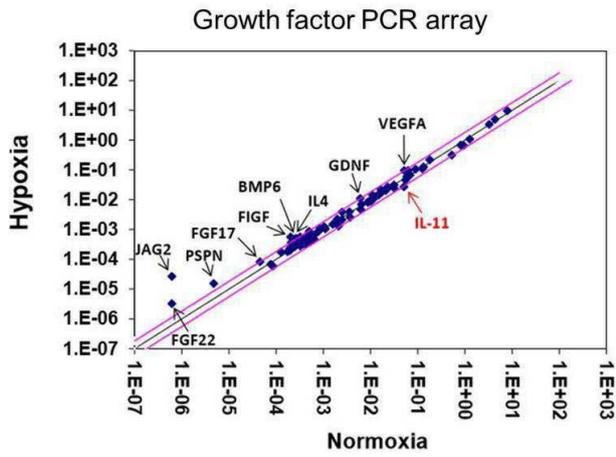
도면3



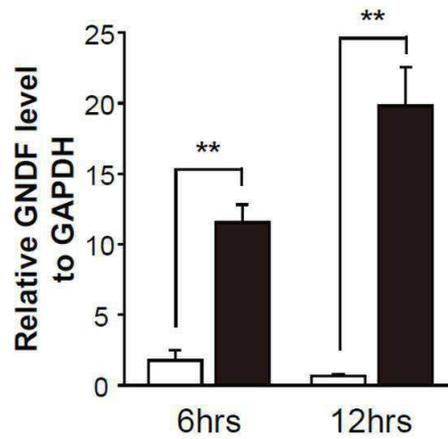
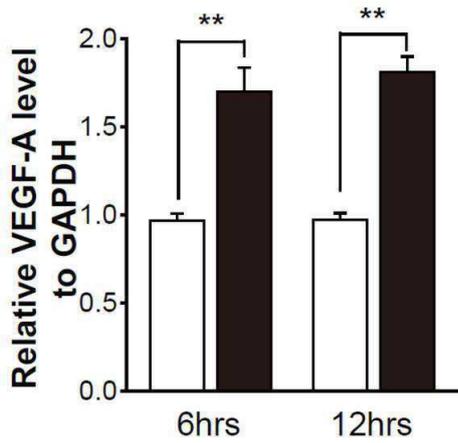
도면4



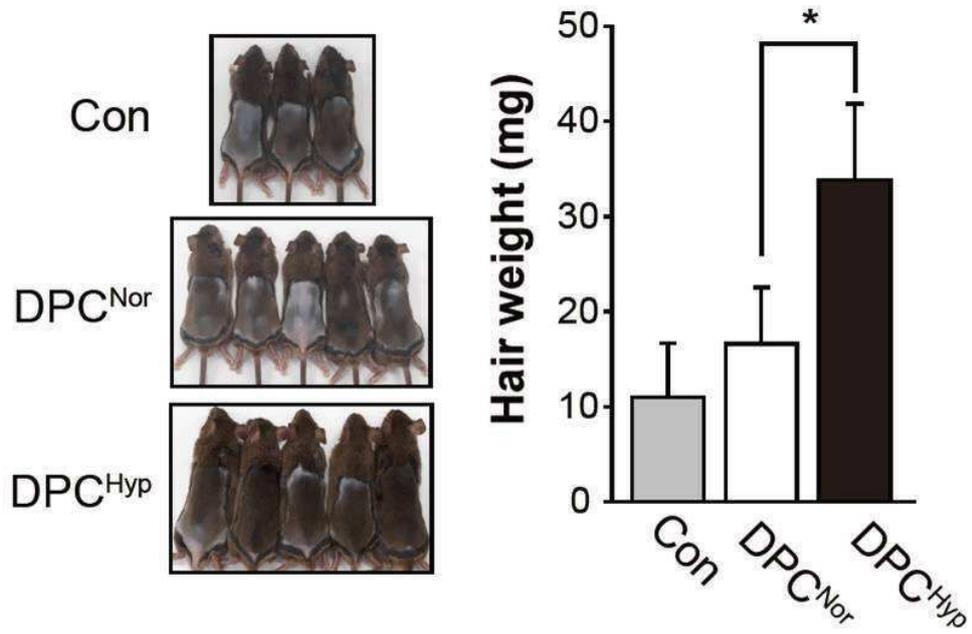
도면5



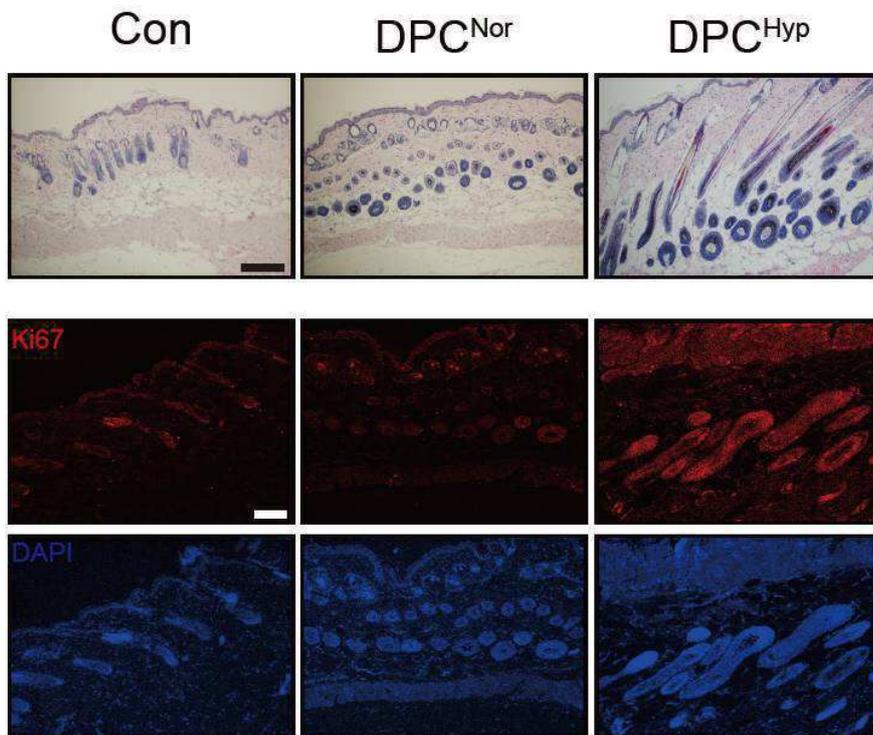
| Target gene | Fold change |
|-------------|-------------|
| BMP6 | 1.82 |
| FGF17 | 1.8 |
| FGF22 | 5.23 |
| FIGF | 2.75 |
| GDNF | 1.81 |
| VEGFA | 1.83 |
| PSPN | 3.2 |
| JAG2 | 43.01 |
| IL4 | 1.91 |
| IL11 | -1.91 |



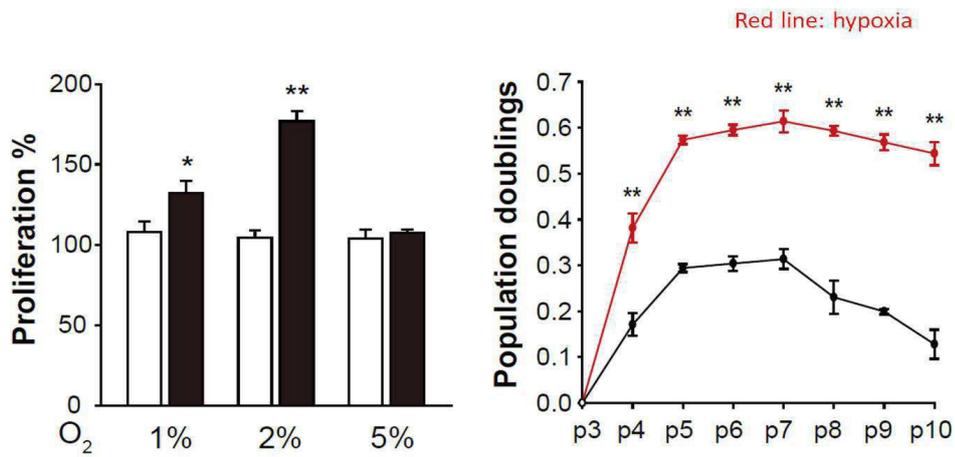
도면6



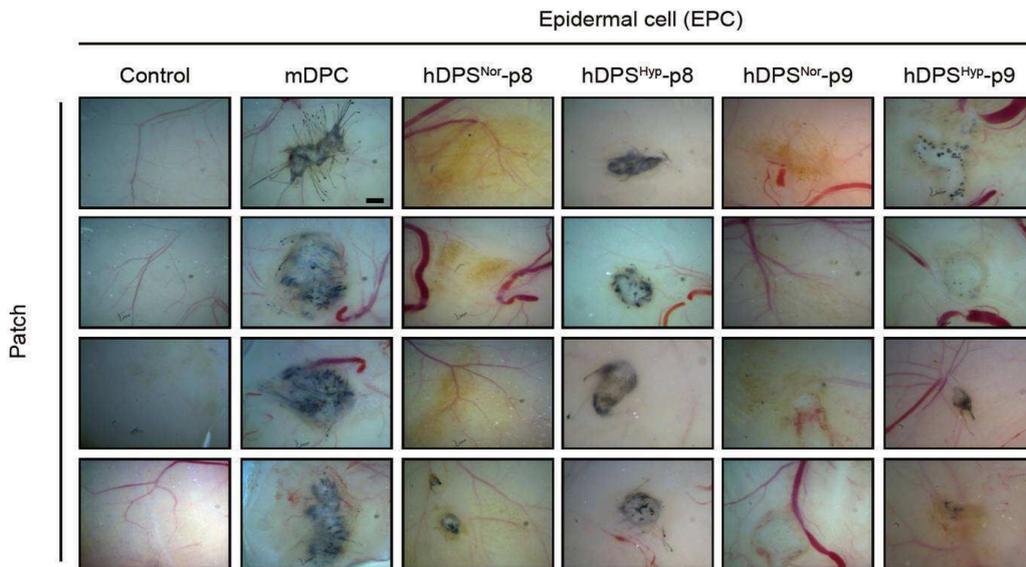
도면7



도면8



도면9



도면10

