(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0103978
(43) 공개일자 2021년08월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12M 3/00 (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12M 21/08 (2013.01)
C12N 5/0627 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0019940
(22) 출원일자 2021년02월15일
심사청구일자 2021년02월15일
(30) 우선권주장
1020200018360 2020년02월14일 대한민국(KR)

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
조승우
서울특별시 서대문구 연세로 50, 공학원 347호
이종승
서울특별시 성동구 무학봉길 64-8, 202호
김진
서울특별시 서대문구 연세로 50, 제2공학관 525호
(74) 대리인
특허법인 피씨알

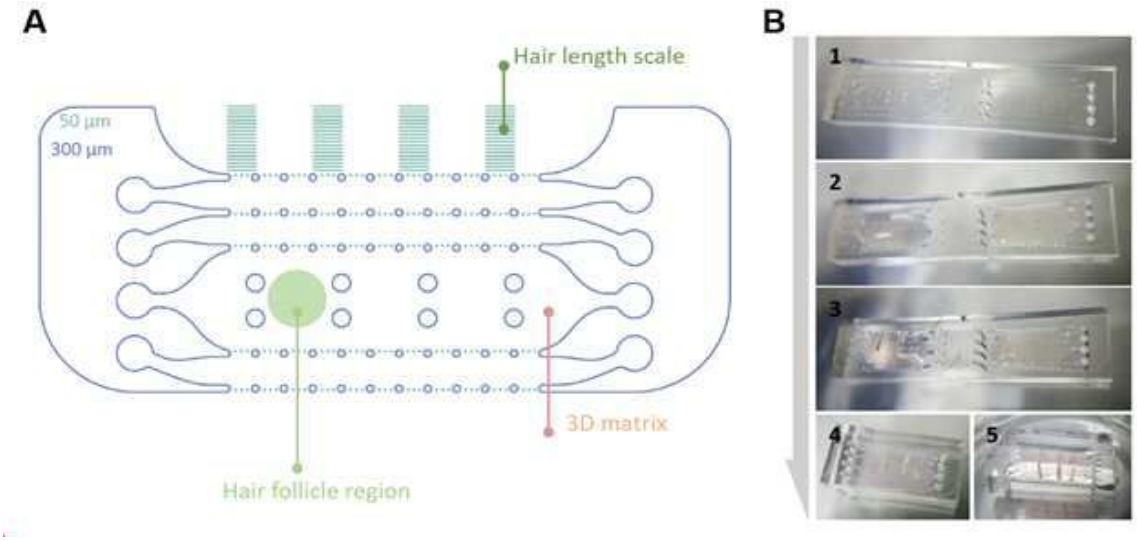
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **삼차원 모발 배양 및 실시간 모발 성장 분석을 위한 헤어 칩 및 이의 제작방법**

(57) 요 약

본 발명은 모발 조직 중 모낭을 배양하기 위한 삼차원 매트릭스 영역; 및 상기 매트릭스 영역 상에, 모발 조직 중 모간(shaft)을 성장시키기 위한 공간 영역을 포함하는 헤어 칩에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 5/0697 (2013.01)
C12N 2502/092 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711083321
과제번호 2017R1A2B3005994
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 중견연구자지원사업
연구과제명 삼차원 세포 패터닝 미세자극 기반 심장 및 골격 근육세포 리프로그래밍 효율 증진 연구(3/3)
기 여 율 1/2
과제수행기관명 연세대학교
연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711081384
과제번호 2018M3A9H1021382
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오의료기술개발사업
연구과제명 간 조직 특이적 매트릭스와 마이크로 디바이스를 이용한 간오가노이드 생산 플랫폼 개발(2/3, 1단계)
기 여 율 1/2
과제수행기관명 연세대학교
연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

모발 조직 중 모낭을 배양하기 위한 삼차원 매트릭스 영역; 및 상기 매트릭스 영역 상에, 모발 조직 중 모간(shaft)을 성장시키기 위한 공간 영역을 포함하는 헤어 칩.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 삼차원 매트릭스 영역은 모낭이 위치하는 모낭 배양영역이 구비된 헤어 칩.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 삼차원 매트릭스 영역은 매트리겔을 포함하는 헤어 칩.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 공간 영역은 노출된 것인 헤어 칩.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 헤어 칩은 측정 영역을 더 포함하는 것인 헤어 칩.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 삼차원 모발 배양 및 실시간 모발 성장 분석을 위한 헤어 칩 및 이의 제작방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 현재 탈모 및 모발 성장 관련 연구와 발모제 개발을 위한 연구에 적용되어 왔던 종래의 모발 배양 기술은 모발을 배양액에 담가 배양하는 단순한 방식으로 진행되어 왔다. 하지만 단순 배양액에서 배양되는 환경은 실제 조직에서의 모발의 성장 환경과 전혀 다르고 체외 환경에서는 모발의 성장 순환이 반복되지 않아 휴지기에 들어가기 때문에 아주 짧은 기간 배양 동안만 배양이 가능한 한계점이 있었다. 체외 조건에서 효율적으로 모발 성장을 장기간 유도할 수 있는 배양 시스템에 대한 연구는 전무한 상황이다.

[0004] 또한, 발모제 테스트를 위해 마우스와 같은 동물 모델을 이용하는 경우 인간과 동물 사이의 생리학적 차이로 인해 정확한 효능 평가가 어려우며 따라서 체외 조건에서 약물 처리에 따른 인간 모발의 성장을 정확하게 평가할 수 있는 체외 모델의 개발이 절실히 요구되고 있다. 마이크로 디바이스를 기반으로 하는 생체 장기 칩 기술이

각광을 받고 있으나 인간 모발의 3D 배양이 가능한 플랫폼 연구는 진행된 바 없다.

[0005] 기존의 배양액에 담가 모발을 배양하는 종래의 기술과 비교하여 본 연구에서 개발한 3D 모발 배양 칩은 실제 조직 내에서의 모발의 미세 환경을 모사함으로써 체외 조건에서도 오랜 기간 동안 모발의 성장기를 유지시켜 인간의 모발 배양이 장기간 가능하였다. 또한, 기존 배양액 기반 기술에서는 개체 별로 길이 성장을 측정하기가 어려웠으니 본 발명에서 개발된 헤어 칩을 이용하면 모발의 성장율을 개체 별로 실시간 모니터링이 가능한 장점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2019-0143698호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 체외 조건에서 삼차원 모발 배양 및 실시간 모발 성장 분석을 위한 것으로, 모발 조직 중 모낭을 배양하기 위한 삼차원 매트릭스 영역; 및 상기 매트릭스 영역 상에, 모발 조직 중 모간을 성장시키기 위한 공간 영역을 포함하는 헤어 칩 및 이의 제작 방법을 제공하기 위한 것이다.

[0009] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 이하에서는 첨부한 도면을 참조하여 본 발명을 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 따라서 여기에서 설명하는 실시예로 한정되는 것은 아니다. 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성요소를 더 구비할 수 있다는 것을 의미한다.

[0012] 본 명세서에 달리 정의되어 있지 않으면, 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 당업계에 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 같은 의미를 가진다.

[0013] 본 명세서에 포함되는 용어를 포함하는 다양한 과학적 사전이 잘 알려져 있고, 당업계에서 이용가능하다. 본 명세서에 설명된 것과 유사 또는 등가인 임의의 방법 및 물질이 본원의 실행 또는 시험에 사용되는 것으로 발견되나, 몇몇 방법 및 물질이 설명되어 있다. 당업자가 사용하는 맥락에 따라, 다양하게 사용될 수 있기 때문에, 특정 방법학, 프로토콜 및 시약으로 본 발명이 제한되는 것은 아니다. 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0016] 본 발명은 모발 조직 중 모낭을 배양하기 위한 삼차원 매트릭스 영역; 및 상기 매트릭스 영역 상에, 모발 조직 중 모간(shaft)을 성장시키기 위한 공간 영역을 포함하는 헤어 칩을 제공한다.

[0017] 상기 삼차원 매트릭스 영역은 모발 조직 중 모낭을 배양하기 위한 구성으로, 후술되는 공간 영역과는 반대로 모낭이 배양되기 위해 노출되지 않고, 모낭을 배양하기 위한 물질로 채워져 있을 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 삼차원 매트릭스 영역은 모낭이 위치하는 모낭 배양영역이 구비된 것일 수 있다.

[0019] 상기 모낭 배양영역은 분리된 모낭 각각이 위치하는 것으로, 모낭이 배양하면서 서로 인접하는 모낭에 영향을 주지 않는 범위에서 임의의 형태 및 크기로 구비될 수 있다.

[0020] 모낭 배양영역 형태의 일 예시로, 모낭 배양을 위한 물질 순환을 방해하지 않기 위해 모낭을 지지할 수 있는 최소한의 지지부와 모낭이 성장하면서 인접하는 모낭의 배양에 방해가 되지 않도록 이격시켜주는 이격부만을 구비할 수 있다. 이러한 구성을 통하여 배양되는 모낭에 영양 성분 및/또는 시험물질의 흐름이 원활하게 이루어질 수 있으면서, 모낭 간 영향이 줄어들어 균일한 배양환경이 제공된다.

[0021] 한편, 상기 모낭 배양영역은 일정한 크기가 반복적으로 형성된 것일 수 있고, 특히 같은 높이에서 반복되는 것일 수 있다. 구체적으로, 종래에 모낭 배양에 사용하는 벌크(bulk) 배양에서는 실험자가 모낭을 각각 분리, 위치 시켰기 때문에 작업 효율성이 떨어졌고, 모낭 간 간격과 높이가 일정하지 않아 모낭 배양 시 영양성분 및/또는 시험물질의 흐름의 균일하지 못하고, 배양되는 모발 간 영향을 주어 균일성이 낮은 실험이 이루어지는 문제점이 있었다. 그러나, 본 발명은 모낭 배양의 형상 특히, 같은 높이에서 반복되는 형상을 통하여 종래에 모낭 배양에 사용하는 벌크(bulk) 배양 시 실험자가 모낭을 각각 위치 시켜 작업 효율성이 떨어지고, 모낭 간 간섭 또는 균일하지 못한 환경으로 실험이 이루어지는 문제점을 해결할 수 있다.

[0022] 상기 삼차원 매트릭스 영역은 모낭을 지지할 수 있고, 모낭 배양을 위한 물질 순환이 가능하면서도 모낭을 노출시키지 않는 물질을 포함할 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서, 상기 삼차원 매트릭스 영역은 매트리겔을 포함하는 것일 수 있다.

[0023] 상기 “매트리겔(matrigel)”은 EHS(Engelbreth-Holm-Swarm) 마우스의 육종세포에서 추출된 단백질 복합체로서(BD Bioscience社의 제품명), 라미닌(laminin), 콜라겐(collagen), 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(heparan sulfate proteoglycan)과 같은 세포외 매트릭스와 모낭 배양에 필요한 공지의 성장인자를 더 포함할 수 있다.

[0024] 상기 공간 영역은 상기 매트릭스 영역 상에, 모발 조직 중 모간(shaft)을 성장시키기 위한 영역이다. 상기 모간은 모발 조직에서 모낭의 세포분열에 의해 외부로 노출되는 영역을 말하고, 더 이상 세포 분열을 하지 않고 케라틴 단백질로 구성되어 있다.

[0025] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 공간 영역은 노출된 것일 수 있다. 이는 전술한 매트릭스 영역과는 반대로 배양지지체나 모낭 배양을 위한 물질 순환이 이루어지지 않아, 세포분열이 이루어지지 않고, 케라틴 단백질로 노출되어 모발을 이루게 된다.

[0026] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 헤어 칩은 측정 영역을 더 포함하는 것일 수 있다. 상기 측정 영역은 모낭 및/또는 모간의 성장을 측정할 수 있는 영역으로, 상기 측정 영역은 전술한 매트릭스 영역에만 포함되거나 공간 영역까지 포함될 수 있다. 구체적으로, 모낭의 측정을 위하여 매트릭스 영역 내 모낭 배양영역의 상단에서부터 정한 간격의 표시가 연속될 수 있고, 모간의 측정을 위하여 공간 영역 내 매트릭스 영역의 상단에서부터 일정한 간격의 표시가 연속될 수 있다. 모낭과 모간의 측정 목적에 따라 매트릭스 영역의 측정 영역과 공간 영역 내 측정 영역의 간격은 서로 동일하거나, 상이할 수도 있다.

[0027] 상기 측정 영역의 간격을 표시하는 방법은 공지의 방법으로 이루어질 수 있으며, 일 구체예에서, 매트릭스 영역 및/또는 공간 영역 내 일정 간격으로 음각 처리할 수 있다.

[0028] 상기 헤어 칩은 상기 매트릭스 영역에 모낭 배양을 위한 물질 및/또는 시험 물질의 순환시켜주는 순환 출입구를 더 포함할 수 있고, 모낭의 배양을 저해하지 않는 범위에서 헤어 칩의 임의의 위치, 형태 및 크기로 이루어질 수 있다. 구체적으로는, 전술한 공간 영역에 영향을 주지 않으면서 매트릭스 영역과 연결되는 구조로 매트릭스 영역의 양 측부에 한 쌍 이상 포함될 수 있다.

[0029] 상기 헤어칩은 공지의 물질 및 제조방법으로 제작될 수 있고, 구체적으로는 헤어칩의 앞면과 뒷면을 각각 PDMS 고분자 용액을 웨이퍼 몰드에 찍어내는 방식으로 제작하고, 삼차원 매트릭스를 채운 뒤 분리된 모낭을 모낭 배양영역에 위치시키고 앞면과 뒷면을 덮고 겔화를 진행하여 제조될 수 있다.

발명의 효과

[0031] 탈모 치료에 대한 전 세계 탈모인의 갈망은 그 어떤 미용 산업보다 간절하다. 많은 연구진이 이에 관련된 연구를 진행하고 있으며 다양한 방식의 접근을 통한 탈모 치료법 개발 연구가 각광을 받고 있다. 특히, 체외 모발 배양을 통한 약물 테스트가 많이 진행되고 있는데 효과적인 인간 모발 배양 기술의 부재로 인해 약물 유효성 및 독성 평가에 막대한 비용이 소모되고 있으며 약물 개발의 성공률을 낮추는 요인이 되고 있다.

[0032] 발모제의 동물 실험의 경우 인간과의 다른 생리학적 특징으로 인해 약물 테스트 결과의 정확도가 낮다. 발모제

약물이 아닌 모발 성장을 촉진하거나 탈모를 방지할 수 있는 기능성 헤어 제품이나 화장품으로 분류되는 제품의 경우에는 전 세계적인 동물실험의 금지 추세에 따라 기능적인 체외 모델의 개발이 절실히 요구되는 상황이다.

[0033] 따라서 본 발명에서 개발된 헤어 칩은 실제 모발의 성장 환경과 유사한 배양 플랫폼으로 구현되었기 때문에 보다 정확한 약물 테스트가 가능하고 이에 따라 성공적인 탈모 치료제 개발을 위한 체외 모델로서 무궁한 활용도가 기대된다. 또한, 동물실험이 금지된 화장품 및 헤어 제품의 개발에도 활용될 수 있기 때문에 동물 모델 대체를 통해 막대한 시장성 확보가 가능하여 부가가치 창출이 가능할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1은 PDMS 고분자 기반 hair 조직 배양을 위한 마이크로 디바이스 제작을 나타낸 것이다.

도 2 및 3은 Bulk 배양과 hair chip 배양에서의 hair growth를 비교한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] 본 발명은 체외 조건에서 효율적인 모발 배양을 위한 디바이스 개발에 관한 내용으로 기존에 이용되던 단순 배양 기술과 비교하여 보다 오랜 기간 동안 모발의 성장을 유지 가능하게 하며 동시에 모발의 성장을 실시간으로 손쉽게 확인할 수 있는 체외 모델 시스템을 제공한다.

[0037] 생체 장기 칩 (Organ on a chip) 기술은 칩 내에 특정 조직 및 장기를 구성하는 세포를 배양하고 해당 장기의 구조 및 기능을 모사할 뿐 아니라 약물에 대한 생리적인 세포 반응을 구현하는 기술이다. 국내 및 해외에서도 칩을 제작하는 공정 기술의 발달과 더불어 3D 세포 배양이 가능해지면서 생체 장기 칩을 이용한 체외 모델 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0038] 본 발명에서는 모발의 실제 미세 환경이 구현된 3D 매트릭스를 이용한 배양이 가능하고 동시에 모발의 성장을 실시간으로 확인할 수 있는 눈금(scale)이 포함되도록 디자인된 디바이스를 제작하였다. 기존 배양 기술에 비해 월등히 향상된 모발 성장 유도가 가능하고 모발 성장을 손쉽게 정량할 수 있는 3D 헤어 칩이 성공적으로 개발되었다.

[0039] 실제 조직에서와 같이 모낭은 피부 내에 존재하지만 자라나는 모발은 공기 중에 노출이 되어 자랄 수 있는 환경을 모사할 수 있도록 디바이스가 디자인된다. 이를 위해 디바이스 내에 공간을 구획하여 모발 조직의 모낭은 배양액이 공급되는 3D 매트릭스 내부에서 배양되면서 성장하는 모발은 공기 중에 노출된 부분으로 자라나올 수 있도록 고안된다. 또한, 모발이 성장하는 부분에 눈금을 추가하여 실시간으로 모발의 성장 정도를 관찰하고 정량화 할 수 있도록 디자인한다.

[0040] 모발을 배양액에 담가 배양하는 기존 방식보다 본 발명에서 개발한 디바이스에서 인간의 모발을 배양하면 체외 조건에서 모발의 성장이 더 오랜 시간 지속될 수 있으며 길이 성장 역시 증진되었다. 나아가 모발 개체 별로 길이 성장을 직접 실시간 모니터링 할 수 있으므로 발모제 유효성 평가를 위한 체외 모델로서 무궁한 활용 가능성이 있다.

[0042] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0044] **실시예 1: PDMS 고분자 기반 hair 조직 배양을 위한 헤어 칩 제작**

[0045] 모발 조직을 삼차원 매트릭스 내에서 배양하면서 성장 과정을 확인하고 길이를 측정할 수 있도록 헤어칩을 제작하였다.

[0046] 구체적으로, 모발 조직의 모간 부분이 자라는 공간은 공기에 노출 될 수 있도록 하고 모낭 부분은 삼차원 매트릭스 내에서 배양 가능하도록 디자인하였다(도 1 A).

[0047] 이를 위하여 앞면과 뒷면을 각각 PDMS 고분자 용액을 웨이퍼 몰드에 찍어내는 방식으로 제작한 후 삼차원 매트릭스로 매트리겔을 채우고 모낭 조직을 넣고 디바이스를 덮은 후 겔화시켜 삼차원 배양 환경을 구성해 주었다

(도 1 B).

[0049] **실험예 1: 벌크 배양과 본 발명 헤어 칩 배양에서의 hair growth 비교**

[0050] 기존 방식은 모낭 조직을 배양액에 담가 배양을 하였다. 이러한 벌크 환경에서의 배양 조건에서 모낭 조직 사진을 촬영하고 성장률 분석을 진행하였다

[0051] 도 2 (A), (B) 에서 확인되는 바와 같이, 종래 이러한 기존의 방식으로 배양된 모낭 조직은 개체 별로 길이도 편차가 크고 성장률을 모니터링 하기도 어려웠다.

[0052] 그에 비하여, 본 발명의 헤어 칩을 이용한 모낭 조직 배양의 경우 모낭은 삼차원 매트릭스 내에서 배양되고 모간 부분은 공기 중으로 자라나올 수 있어 실제 환경과 더 유사하게 배양이 가능하였다 (도 2C). 본 발명 헤어 칩을 이용하여 모낭 조직을 배양하면 디바이스에 있는 측정 영역의 간격을 통해 실시간으로 모낭 조직의 길이를 바로 측정할 수 있으며 개체 별 비교가 직접 가능하였다 (도 2 D).

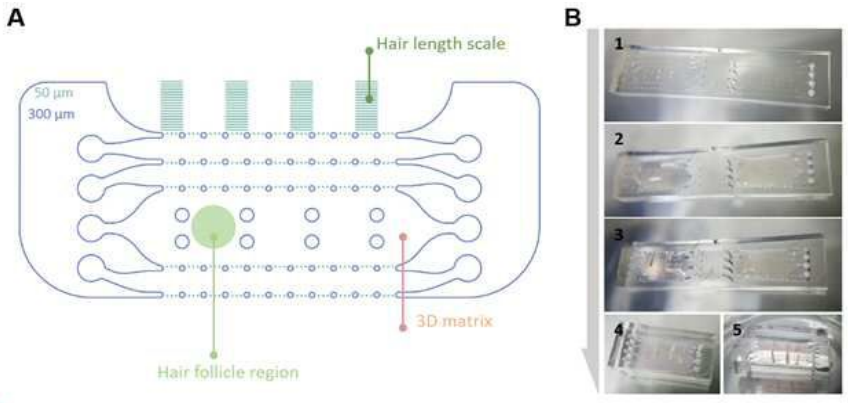
[0055] 또한, 기존 벌크 배양액 조건과 본 발명 헤어 칩 기반 삼차원 미세환경 조건에서 모낭 조직 배양을 각각 진행한 후 세포 증식 마커인 Ki67 발현양을 면역 염색을 통해 확인하였다.

[0056] 그 결과, 벌크 배양 조건에서의 모발 샘플에서는 Ki67 발현이 거의 관찰되지 않았지만 헤어 칩에서 배양된 모발 조직에서는 Ki67을 발현하는 증식하고 있는 세포가 존재함을 확인함으로써 디바이스의 삼차원 매트릭스에서 배양되는 경우 더 오랜 기간 동안 모날 조직의 성장이 가능함을 확인하였다 (도 3A). 본 발명의 헤어 칩에서 배양된 모낭 조직의 길이 성장과 벌크 배양액 조건에서 배양된 모낭 조직의 길이 성장을 비교하였을 때 디바이스의 삼차원 매트릭스에서 배양되는 경우에 기존 배양 방식보다 오랜 기간 동안 더 길게 자라는 것을 확인하였다 (도 3 B). 본 발명 헤어 칩에서 배양되는 모낭 조직의 경우 개체 별로 길이 성장을 실시간으로 확인할 수 있었다 (도 3 C). 이를 통해 모낭 조직 개체 별로 물질 처리에 따른 성장을 직접 실시간으로 모니터링 할 수 있으므로 발모제 개발을 위한 약물 평가 및 스크리닝을 위해 헤어 칩 배양을 적용할 수 있을 것으로 기대한다.

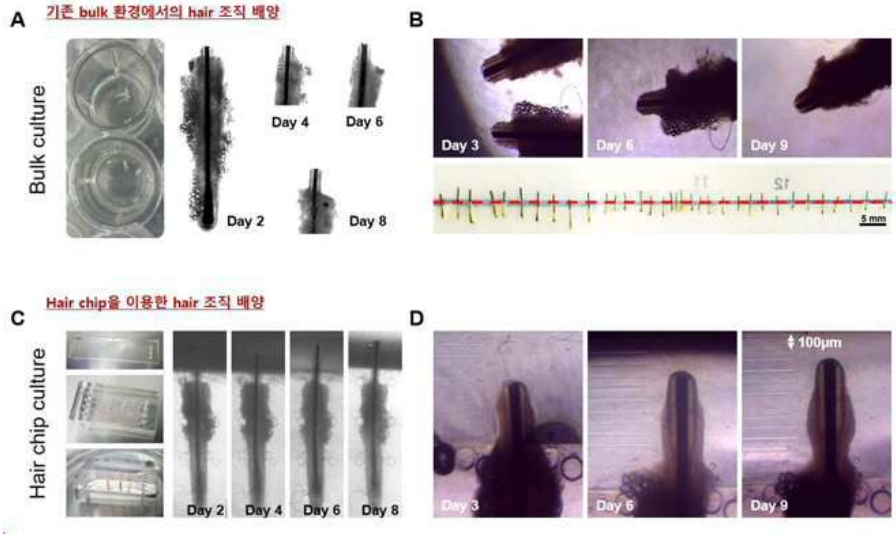
[0058] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

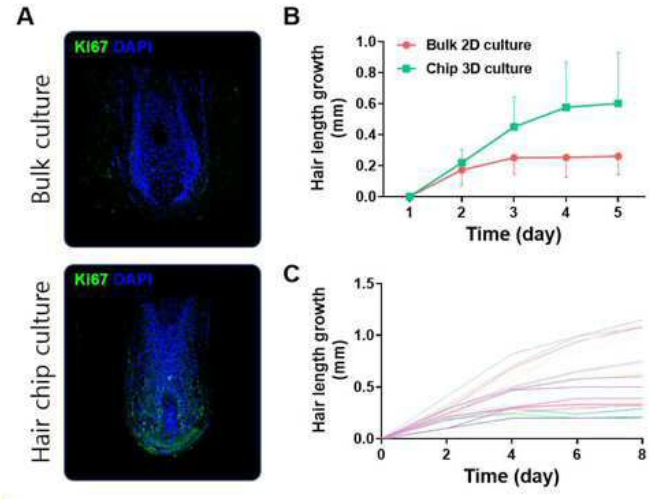
도면1



도면2


A
기존 bulk 환경에서의 hair 조직 배양
Bulk culture
Day 2
Day 4
Day 6
Day 8
B
Day 3
Day 6
Day 9
5 mm
C
Hair chip을 이용한 hair 조직 배양
Hair chip culture
Day 2
Day 4
Day 6
Day 8
D
100μm
Day 3
Day 6
Day 9

도면3


A
Bulk culture
Ki67 DAPI
Hair chip culture
Ki67 DAPI
B
Bulk 2D culture
Chip 3D culture
Hair length growth (mm)
Time (day)
C
Hair length growth (mm)
Time (day)