



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0050377
 (43) 공개일자 2011년05월13일

(51) Int. Cl.
C12N 5/074 (2010.01) *C12N 5/02* (2006.01)
A61K 35/36 (2006.01) *A61P 17/14* (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2010-0109602
 (22) 출원일자 2010년11월05일
 심사청구일자 2010년11월05일
 (30) 우선권주장
 1020090107184 2009년11월06일 대한민국(KR)

(71) 출원인
주식회사 알앤엘바이오
 서울 관악구 봉천동 1596-7
 (72) 발명자
라정찬
 경기도 수원시 장안구 정자동 918 청솔마을 SK한
 화아파트 626동 701호
강성근
 서울특별시 관악구 성현동 관악드림타운아파트
 116동 504호
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
이처영

전체 청구항 수 : 총 12 항

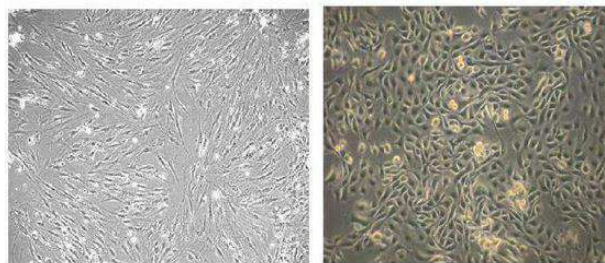
(54) 모낭 줄기세포의 대량 증식방법

(57) 요약

본 발명은 높은 수율로 모낭 줄기세포를 증식시키는 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 모낭 줄기세포 배양시 특정 농도의 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)를 첨가한 특정 배지를 사용하여 대량으로 모낭 줄기세포를 수득하는 방법 및 이에 사용되는 배지에 관한 것이다.

본 발명에 따른 모낭 줄기세포 배양용 배지는 두피 조직으로부터 분리된 모낭 줄기세포를 임상에 적용할 수 있을 정도의 양으로 증식시킬 수 있어, 상기 모낭 줄기세포를 탈모증 및 무모증 등을 위한 발모용 세포치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도8



대조군

실험군

(72) 발명자

우상규

경기도 안양시 동안구 호계동 1079-3번지 102호

김미애

경기도 수원시 팔달구 화서동 화서주공아파트 404
동 1704호

윤은지

경기도 안산시 단원구 선부1동 965번지 광신빌라
4동 202호

특허청구의 범위

청구항 1

기본 배지에 5 내지 50 μM 의 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)를 함유하는 것을 특징으로 하는 모낭 줄기세포 증식·유지용 배지.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 기본 배지는 ITS+ 프리믹스 (insulin, transferrin, selenious acid premix), EGF, bFGF 또는 항생제를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 모낭 줄기세포 증식·유지용 배지.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 ROCK 저해제는 5 내지 20 μM 의 농도로 함유되어 있는 것을 특징으로 하는 모낭 줄기세포 증식·유지용 배지.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 ROCK 저해제는 10 μM 의 농도로 함유되어 있는 것을 특징으로 하는 모낭 줄기세포 증식·유지용 배지.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 기본 배지는 M199/F12배지, MEM-alpha배지, 저농도 글루코오스 함유 DMEM배지, MCDB 131 배지 및 IMEM배지로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 배지인 것을 특징으로 하는 모낭 줄기세포 증식·유지용 배지.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 기본 배지는 M199/F12배지 또는 MEM-alpha배지인 것을 특징으로 하는 모낭 줄기세포 증식·유지용 배지.

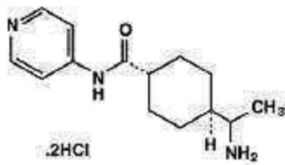
청구항 7

제1항에 있어서, 상기 모낭 줄기세포는 인간 두피조직 유래인 것을 특징으로 하는 모낭 줄기세포 증식·유지용 배지.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 ROCK 저해제는 하기 화학식 1로 표시되는 화합물인 것을 특징으로 하는 모낭 줄기세포 증식·유지용 배지:

[화학식 1]



청구항 9

모낭 줄기세포를 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는, 모낭 줄기세포의 증식·유지 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 배양은 2계대 내지 6계대로 이루어지는 것을 특징으로 하는 모낭 줄기세포의 증식·유지 방법.

청구항 11

제9항의 방법에 의해 수득된 모낭 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 탈모 치료용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 탈모 치료용 조성물은 지방조직 유래 줄기세포를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 탈모 치료용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 높은 수율로 모낭 줄기세포를 증식시키는 방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 모낭 줄기세포 배양 시 특정 농도의 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)를 첨가한 특정 배지를 사용하여 모낭 줄기세포를 대량으로 증식시키는 방법 및 이에 사용되는 배지에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근 미용에 관한 관심이 높아지면서 탈모증의 치료에 대한 관심 또한 높아지고 있다. 탈모증이란 정상적으로 모발이 있어야 할 곳에 모발이 없는 상태를 말한다. 모발은 생명에 직접 관계되는 중요한 생리적 기능은 없지만 미용적인 관점에서 역할이 매우 크며 이외에도 자외선 차단, 머리 보호 등의 기능이 있다. 탈모가 심한 경우 사회생활을 하는데 문제가 있을 수 있으며 심리적으로도 심각한 영향을 미칠 수 있어서 삶의 질 측면에서 중요하다.

[0003] 탈모는 임상적으로 상처가 동반되는 반흔성 탈모와 모발만 빠지는 비반흔성 탈모로 나뉠 수 있다. 반흔성 탈모의 경우 모낭이 파괴되므로 모발이 다시 나지 않는다. 모발은 모낭이라고 하는 곳에서 만들어지며 각 모낭은 주기적으로 활동과 정지의 단계를 거치게 된다. 이러한 모발 주기의 시간적 간격은 신체 부위에 따라 다양한데 머리털의 경우에는 2~6년 정도의 성장기(생장기)와 2~4주간의 퇴행기를 거쳐서 3~4개월 정도의 휴식기(휴지기)에 들어가게 된다. 각 모낭은 일생 동안 10~20회의 모낭 성장 주기(hair follicle growth cycle)를 갖게 된다.

[0004] 탈모의 치료법으로 여러 가지 방법들이 소개되어 있으나 최근에 기대되고 있는 치료방법으로 유전자를 이용한 치료방법을 들 수 있다. 이러한 유전자 구조를 이용하여 모낭에 직접 원하는 DNA코드를 전달하는 방법이나 유전자 발현을 차단하는 치료법이 개발되고 있다. 그러나 이러한 치료의 효능성, 치료비용, 안정성, 후대에 미칠 영

향 등에 대해 아직 밝혀지지 않은 점이 너무 많고 그러므로 탈모에 관여하는 유전인자를 밝혀낸다고 하더라도, 그걸 이용한 치료방법이 안전하게 현실화되기까지는 상당한 기간이 걸린다.

- [0005] 한편, 성장기에 있는 모발의 구근 특성이 모발에 붙어있는 채로 적출한 다음, 그 모낭세포를 배양하고 이를 다시 적출한 부위에 이식하는 모발 재생방법이 개시된 바 있으나, 그 효과는 그다지 효율적이지 않았다.
- [0006] 마지막으로 줄기세포를 이용한 탈모 치료방법이 개발되고 있는데, 탈모나 화상과 같은 다른 피부 질병도 이와 마찬가지로 모낭 줄기세포의 동정과 유전자 분석과 같은 방법으로 치료의 발전을 기대할 수 있다. 표피에서의 줄기세포 개념은 30년 전부터 이미 논의되어 왔다. 모발 성장은 독특한 주기적인 재생 현상으로, 모낭 줄기 세포의 위치 및 기능은 모발 성장의 생물학 및 병리학을 모두 이해하는데 결정적인 문제이다[Oshima H. *et al.*, *Cell*, 104:233-245, 2001]. 줄기 세포의 특징인, 레벨 보유 세포가 소위 모구 영역이라 불리는 모낭의 영구적인 상부 부분에 위치하는 것으로 밝혀졌다[참조: Cotsarelis G. *et al.*, *Cell*, 61:1329-1337, 1990].
- [0007] 그러나, 이러한 모낭 줄기세포의 명확한 배양법이 확립되지 않았고, 일부 모낭 내에 모낭 줄기세포가 존재한다는 것이 알려져 있을 지라도, 실제 사람의 대머리 치료를 위해 많은 양의 줄기세포가 필요하였으나, 아직까지 분리된 줄기세포를 임상에 적용할 수 있을 정도의 양으로 증식 시키는 기술이 미미하였다. 줄기세포의 표지 단백질도 아직까지 정확하게 확립되지 않아 줄기세포를 이용한 탈모치료방법은 여전히 미흡한 상태이다.
- [0008] 이에 본 발명자들은 모낭 줄기세포의 대량 생산을 위하여 예의 노력한 결과, 특정 농도의 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)를 함유한 다양한 배지실험을 통해 특정 종류의 배지에서 모낭 줄기세포를 대량으로 증식 및 유지시킬 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 모낭 줄기세포의 대량 생산용 배지를 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 배지를 이용하여 모낭 줄기세포를 임상에 적용 가능할 정도로 대량 증식시키는 방법을 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법으로 수득한 다량의 모낭 줄기세포를 유효성분으로 하는 탈모 치료용 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0013] 기본 배지에 5~50 μM의 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)를 함유하는 것을 특징으로 하는 모낭 줄기세포 증식·유지용 배지를 제공한다. 상기 기본 배지는 M199/F12(mixture), MEM-alpha배지, 저농도 글루코오스 함유 DMEM배지, MCDB 131배지 및 IMEM배지로 구성된 군에서 선택되는 하나일 수 있다. 이 때, 상기 저농도 글루코오스 함유 DMEM배지는 글루코오스를 약 1000mg/L농도로 함유하고 있다. 상기 배지들 중에서 특히, 바람직하게는 M199/F12(mixture)배지 또는 MEM-alpha배지이다.
- [0014] 상기 기본 배지는 ITS+ (insulin, transferrine, selenium) premix, EGF, bFGF 및 항생제, 예를 들어, Antibiotic-Antimycotic 등을 함유하는 것이 바람직하다.
- [0015] 특히, 상기 ROCK 저해제는 5~20 μM의 농도인 것이 바람직하고, 약 10 μM의 농도인 것이 더욱 바람직하다.
- [0016] 본 발명은 또한, 상기 배지들을 이용하여, 즉, 모낭 줄기세포를, 5~50 μM의 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)가 첨가된, 기본 배지에서 배양하는 것을 특징으로 하는, 모낭 줄기세포의 증식·유지 방법을 제공한다.

[0017] 이 때, 상기 배양은 2계대 내지 6계대인 것이 바람직하고, 상기 배지는 세포 배양 2일마다 교환하는 것이 바람직하다.

[0018] 본 발명은 또한 상기 방법에 따라 수득된 다량의 모낭 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 탈모증 또는 무모증 치료용 세포 치료제 조성물을 제공한다. 또한, 상기 조성물은 그 분리 수득이 비교적 용이한 지방 줄기세포를 추가로 함유할 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 모낭 줄기세포 배양용 배지는 두피 조직으로부터 분리된 모낭 줄기세포를 임상에 적용할 수 있을 정도의 양으로 증식시킬 수 있어, 상기 모낭 줄기세포를 탈모증 및 무모증 등을 위한 발모용 세포치료제로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 내지 도 5는 9종류의 배지에서의 모낭 줄기세포 배양상태를 나타내는 사진이다.
 도 6 및 도 7은 ROCK 저해제의 농도별 모낭 줄기세포 증식능 향상 효율을 비교한 결과이다.
 도 8은 M199/F12배지에 대하여 시판 중인 조성 그대로 사용한 경우와 ITS+ premix, EGF, bFGF 및 Antibiotic-Antimycotic 함유시킨 경우의 모낭 줄기세포 증식능 향상 효율을 비교한 결과이다.
 도 9는 디하이드로테스토스테론을 이용하여 탈모를 유도한 마우스에 식염수, 3% 미노시달, 모낭 줄기세포, 지방 줄기세포, 모낭 줄기세포/지방 줄기세포(병용)를 각각 투여하여 주 단위(0~14주)로 탈모 상태를 나타낸 그래프이다.
 도 10은 디하이드로테스토스테론을 이용하여 탈모를 유도한 마우스에 식염수, 3% 미노시달, 모낭 줄기세포, 지방 줄기세포, 모낭 줄기세포/지방 줄기세포(병용)를 각각 투여하여 주 단위(6~14주)로 탈모 상태를 촬영한 사진이다.
 도 11은 테스토스테론을 이용하여 탈모를 유도한 마우스에 식염수, 3% 미노시달, 모낭 줄기세포, 지방 줄기세포, 모낭 줄기세포/지방 줄기세포(병용)를 각각 투여하여 주 단위(0~16주)로 탈모 상태를 나타낸 그래프이다.
 도 12는 테스토스테론을 이용하여 탈모를 유도한 마우스에 식염수, 3% 미노시달, 모낭 줄기세포, 지방 줄기세포, 모낭 줄기세포/지방 줄기세포(병용)를 각각 투여하여 주 단위(6~16주)로 탈모 상태를 촬영한 사진이다.
 도 13은 모낭 줄기세포/지방 줄기세포(병용)를 투여하여 주 단위 (0~6주; 투여 시를 0주로 하였음)로 탈모 상태를 촬영한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하 본 발명에 대하여 구체적으로 설명한다.

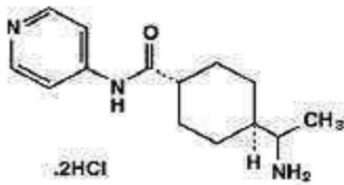
[0022] 줄기세포(stem cell)란 자기 복제 능력을 가지면서 두 개 이상의 세포로 분화하는 능력을 갖는 세포를 말한다.

[0023] 성체 줄기세포는 발생과정이 진행되어 배아의 각 장기가 형성되는 단계 혹은 성체단계에서 나타나는 줄기세포로 조직 및 기관에 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 분화능(multipotent)을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 조직 특이적 분화능을 가진 줄기세포(multipotent stem cell)는 이 세포가 포함되어 있는 조직 및 기관에 특이적인 세포로만 분화할 수 있는 줄기세포로서, 태아기, 신생아기 및 성체기의 각 조직 및 장기의 성장과 발달은 물론 성체조직의 항상성 유지와 조직손상 시 재생을 유도하는 기능에 관여하고 있다.

- [0024] 본 발명은 성체 줄기세포, 그 중에서도 상피 조직 유래의 모낭 줄기세포의 효과적인 배양에 관한 것이다.
- [0025] 모낭 줄기세포는, 모낭과 모낭 사이의 표피(interfollicular epidermis)라고 불리는 표피의 기저층(the basal cell layer of epidermis)에 위치하고 있는 약 10%의 줄기세포 및 모낭(hair follicle)에 존재하는 줄기세포를 포함하며, 특히 모낭은 세포분화가 일어나기 전의 세포로 표피의 재생과 관련하여 중요한 역할을 담당하고 있다고 알려져 있다.
- [0026] 상기 모낭 줄기세포는 인간을 포함하는 모든 포유류의 상피조직, 예를 들어, 두피조직으로부터 분리하여 사용될 수 있다. 이때 두피조직은 모낭을 포함하여야 한다.
- [0027] 즉, "상피조직 유래 모낭 줄기 세포" 또는 "두피조직 유래 모낭 줄기세포"는 모낭을 포함하는 상피조직으로부터 분리해 낸 미분화된 성체 줄기세포로서, 본 명세서에서는 축약하여 "모낭 줄기세포"라고 지칭하기도 한다. 이는 당업계에 공지된 통상의 방법을 통해 획득할 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 인간 두피조직 유래 모낭 줄기세포를 사용하였다.
- [0028] 당업계에 공지된 통상의 방법 중 일례로 이하와 같은 방법을 사용할 수 있다.
- [0029] 두피조직으로부터 모낭 줄기세포를 분리하기 위하여 우선 두피조직을 잘게 절개한다. 그 다음, 절개된 조직으로부터 모낭조직을 하나씩 분리한다. 분리된 모낭조직을 잘게 자르고 콜라게나아제가 함유된 배지에서 1차 화학적 분해를 행한다. 이때 절개된 조직의 화학적 분해는 50-200rpm, 섭씨 30-40도에서 0.5-24시간 동안 중력대류배양기에서 행할 수 있다. 그 후 상기 화학적 분해된 조직(두피세포)을 회수하여 혈청이 포함된 배지에서 배양하여 세포들을 회수한 다음, 이 중에서 모낭 줄기세포를 분리하여 획득할 수 있다.
- [0030] 본 발명은 일 관점에서, ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)를 함유하여, 상기 모낭 줄기세포를 대량으로 증식 및 유지시킬 수 있는 배양용 배지에 관한 것이다.
- [0031] 본 발명에서 모낭 줄기세포의 대량 증식에 사용되는 배지는 일반적으로 세포의 배양에 이용되는 기본 배지(basal medium)일 수 있다. 본 발명에서 기본 배지(basal medium)이라는 용어는 세포가 증식할 수 있는 배지로써 간단한 조성을 가지는 것을 뜻한다. 일반적으로 배양에 이용되는 기본 배지로는 MEM (Minimal Essential Medium), DMEM (Dulbecco modified Eagle Medium), RPMI (Roswell Park Memorial Institute Medium), K-SFM (Keratinocyte Serum Free Medium)이 있으며, 이 외에 당해 업계에서 이용되는 배지이면 족하다.
- [0032] 바람직하게는 M199/F12(mixture)(GIBCO), MEM-alpha배지(GIBCO), 저농도 글루코오스 함유 DMEM배지(Welgene), MCDB 131배지(Welgene) 및 IMEM배지(GIBCO)로 구성된 군에서 선택될 수 있다. 이 때, 상기 저농도 글루코오스 함유 DMEM배지는 글루코오스를 약 1000mg/L농도로 함유하고 있다. 그리고, 특히, 이 중에서 M199/F12(mixture)(GIBCO) 또는 MEM-alpha 배지(GIBCO)인 것이 더욱 바람직하다.
- [0033] 이 때, 상기 배지들은 ITS+ premix (insulin, transferrine, selenious acid), EGF, bFGF를 포함하고 있는 것이 바람직하다. 추가로, 항생제, 예를 들어 Antibiotic-Antimycotic 등을 더 포함할 수도 있다.
- [0034] ITS+ premix는 일반적으로 defined media를 구성하는 필수 요소인 insulin, transferrin, selenious acid를 함유하는 광범위 배양 보충물(culture supplement)로서 무혈청 배양상태에서 세포의 증식(proliferation)을 유도(stimulate)하는 역할을 한다. EGF(epidermal growth factor)는 수용체와의 결합을 통하여 세포의 성장, 증식, 분화를 조절(regulation)하는 기능을 담당한다. bFGF(basic fibroblast growth factor)는 angiogenesis, 상처 치료 등에 관여하며 일반적으로 여러 종류의 세포들의 증식과 분화의 진행과정에 중심적인 역할을 하는 세포성장인자이다.
- [0035] 특히, 본 발명에서 사용하는 상기 배지들은 "모낭 줄기세포"의 배양 및 증식에 효과적이다. 통상적으로 공지된 모낭 줄기세포 배양용 배지는 DMEM 또는 K-SFM 등이 사용되고 있으나, 본 발명에서는 실시예 2를 통해서, 그 중에서도 모낭 줄기세포에 더욱 효과적인 특정 배지들을 선별하였다.
- [0036] 이 때, 모낭줄기세포 배양에서 상기 insulin, human transferrin, selenious acid 각각의 농도들은 0.1 ug/ml(100 ng/ml) ~ 10 ug/ml, 바람직하게는 0.1~6.25 ug/ml, 더욱 바람직하게는 0.1~1ug/ml이다. 본 발명의 일 실시예에서는 약 0.625ug/ml을 사용하였다.

- [0037] 상기 배지들은 5~50 μM의 ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)를 함유하고 있는 것을 특징으로 한다. 바람직하게는 5~20 μM의 농도로, 더욱 바람직하게는 7~15 μM의 농도로, 가장 바람직하게는 약 10 μM의 농도로 함유되는 것이 좋다.
- [0038] 분리한 모낭 줄기세포를, ROCK 저해제를 첨가한 상기 배지에서 1차 배양하여 모낭 줄기세포를 회수하고, 이어서, 계대배양시에도 계속 ROCK 저해제 존재 하에서 배양하여 모낭 줄기세포가 미분화상태를 유지하도록 할 수 있다.
- [0039] ROCK 저해제 (Rho-associated kinase inhibitor)는 세포사멸(apoptosis)을 억제하는 기능을 하는 물질로서, 신경돌기의 재생, 미오신 인산화 및 평활근 수축에 있어 작용-유도성 Ca²⁺ 증감(agonist-induced Ca²⁺ sensitization)의 억제 등의 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 보다 구체적으로, ROCK 저해제는 고혈압과 천식을 일으키는 근육 세포의 비정상적 구조를 경감시켜주는 것으로 알려져 있으며 시신경유두의 혈액 흐름을 증가시키고 안압을 지속적으로 감소시키는 기능이 있는 것으로 알려져 있다. 또한 생물학적으로는 세포의 사멸과정 (Apoptosis)를 억제하고 미분화상태를 유지하는 기능이 있는 것으로 알려져 있다.
- [0040] 본 발명에서 사용가능한 대표적인 ROCK 저해제로서는, Y-27632, HA-1077, Y-39983, Wf-536 등이 있고, 본 발명의 일 구체예에서는 그 중에서 Y-27632(Calbiochem 또는 Sigma)를 사용하였다. Y-27632(Calbiochem 또는 Sigma)의 구조식은 하기와 같다.

화학식 1



- [0041]
- [0042] 본 발명에 사용할 수 있는 ROCK 저해제의 적정 처리농도는 5~50 μM고, 바람직하게는 5~20 μM, 더욱 바람직하게는 약 10 μM이다. 5 μM 미만의 농도로 ROCK 저해제를 처리할 경우 모낭 줄기세포의 미분화능이 장기간 유지되기 어려우며, 50 μM 초과 농도로 ROCK 저해제를 처리할 경우 세포의 변형이 일어나고 분화단계로 접어드는 현상이 발생할 수 있다.
- [0043] 특히, 모낭 줄기세포에 ROCK 저해제를 상기 농도로 처리한 경우, 증식된 모낭 줄기세포는 장기간 동안 형태학적으로도, 기능적으로도 건강한 상태로 유지된다.
- [0044] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 배지를 이용하여 모낭 줄기세포를 대량으로 증식 및 유지시키는 방법에 관한 것이다. 즉, 수득된 모낭 줄기세포를, ROCK 저해제(Rho-associated kinase inhibitor)가 첨가된 상기 특정 배지에서 계대배양하는 것을 특징으로 하는, 모낭 줄기세포 증식·유지 방법에 관한 것이다.
- [0045] 상기 모낭 줄기세포 증식·유지방법에 있어서, 배지에 관한 설명은 앞서 기술한 바와 같다.
- [0046] 특히, 상기 배양은 2계대 ~ 6계대인 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 2계대로 배양한다. 그리고, 상기 배지는 세포 배양 2일마다 교환하는 것이 바람직하다. 계대 배양을 통해 모낭 줄기세포의 세포수를 증가시킴에 있어서, 임상에 효과적이기 위해서는, 계대 배양 기간동안 기능적으로도 형태학적으로도 세포의 변형이 용이하게 이루어 지지 않아야 하는데, 특정 농도의 ROCK 저해제 함유 및 특정 배지 성분의 함유는 이러한 기능적 또는 형태학적 세포 변형을 막아주는 기능을 한다.
- [0047] 본 발명은 또 다른 관점에서, 상기 방법에 의해 대량으로 수득한 모낭 줄기세포를 유효성분으로 함유하는 발모 유도용 세포치료제, 탈모치료제 또는 무모증치료제; 및 탈모증 또는 무모증 치료방법에 관한 것이다. 보다 바람

직하게는, 모낭 줄기세포뿐만 아니라, 지방 줄기세포를 함께 함유할 수 있다. 지방 줄기세포는 당해업계에 공지된 방법으로 얻을 수 있으며, 일례로, 지방조직을 세척한 후, 콜라게나제 등으로 분해하여 원심분리한 후, 상층액을 제거하고 남은 지방줄기세포를 혈청배지에 하룻밤 이상 배양하는 방법으로 수득할 수 있다.

- [0048] '발모유도'는 탈모 부위 또는 무모 부위에 모낭을 형성하여 털이 나도록 유도하는 능력을 말한다.
- [0049] '치료하는'이란 용어는, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미한다. 본원에서 사용된 바와 같이, '치료'란 용어는 '치료하는'이 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다. 따라서, 포유 동물에 있어서 질환의 "치료" 또는 "치료요법" 은 하기의 하나 이상을 포함한다:
 - [0050] (1) 해당 질환의 성장을 저해함,
 - [0051] (2) 질환의 확산을 예방함,
 - [0052] (3) 질환을 경감시킴,
 - [0053] (4) 질환의 재발을 예방함, 및
 - [0054] (5) 질환의 증상을 완화함(palliating)
- [0055] 탈모증 또는 무모증을 치료하기 위해, 본 발명의 조성물을 약리학적 유효량으로 투여한다.
- [0056] '약리학적 유효량(therapeutically effective amount)'은 투여되는 화합물의 양이 치료하는 장애의 하나 또는 그 이상의 증상을 어느 정도 경감하는 것을 의미한다. 따라서, 약리학적 유효량은, (1) 질환의 진행 속도를 역전시키거나 (2) 질환의 그 이상의 진행을 어느 정도 금지시키게 하는 것을 의미하며, (3) 질환과 관련된 하나 또는 그 이상의 증상을 어느 정도 경감(바람직하게는, 제거)하는 효과를 가지는 양을 의미한다.
- [0057] 본 발명의 발모유도용 세포치료제, 탈모치료제 및 무모증치료제는 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 피하 투여, 또는 국부 투여 등을 포함하는 비경구 투여가 바람직하고, 보다 바람직하게는 피하 투여 또는 국부 투여를 이용하여 투여할 수 있으며, 주로 탈모 또는 발모를 필요로 하는 부위에 직접 주입하는 방법으로 투여할 수 있다.
- [0058] 주사를 위해서, 바람직하게는 Hank 용액, Ringer 용액, 또는 생리 식염수 버퍼와같은 약리학적으로 맞는 버퍼로 제형될 수 있다. 점막 투과 투여를 위해서, 통과할 배리어에 적합한 비침투성제가 제형에 사용된다. 그러한 비침투성제들은 당업계에 일반적으로 공지되어 있다.
- [0059] 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0060] 본 발명의 발모유도용 세포치료제, 탈모치료제 및 무모증치료제는 소위 '대머리'로 인식되는 전형적인 남성형 탈모 및 폐경 또는 난소제거 수술 후 발생할 수 있는 여성형 탈모증에 대한 치료를 위하여 두피에 적용할 수 있을 뿐만 아니라 발모를 필요로 하는 신체 부위라면 어디나 적용할 수 있다. 예를 들면, 외상으로 인한 흉터로 모발이 손상된 부위, 또는 단순 미용효과를 목적으로 하는 넓은 이마 또는 M형 이마, 속눈썹 또는 눈썹 및 무모증의 상태 호전에도 사용할 수 있다.
- [0061] 본 발명의 발모유도용 세포치료제, 탈모치료제 및 무모증치료제에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0062] 본 발명의 발모유도용 세포치료제, 탈모치료제 및 무모증치료제는 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 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.

- [0063] 본 발명의 발모유도용 세포치료제, 탈모치료제 및 무모증치료제는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0064] 본 발명의 발모유도용 세포치료제, 탈모치료제 및 무모증치료제는 단독의 요법으로 이용될 수 있으나, 다른 통상적인 발모 유도 약물요법 또는 수술요법 등과 함께 이용될 수도 있으며, 이러한 병행 요법을 실시하였을 경우 극대화된 효능을 나타낼 수 있다.
- [0065] 사람의 경우, 세포치료제의 통상적인 투여량은 $10^4 \sim 10^{10}$ cells/body, 바람직하게는 $10^6 \sim 10^8$ cells/body, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 특히, 본 발명의 조성물은 1×10^8 cells/body 내지 1×10^9 cells/body 인 것이 바람직하다.
- [0066] 그러나, 활성 성분의 실제 투여량은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별 및 체중, 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것이 아니다.
- [0067] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0068] 이하 실시한 실시예에서 사용한 각종 배지 및 시약의 입수처는 하기 표에 기재된 바와 같다.

표 1

Items	Brand	Cat No.	
Basal Media and additives	Media 199	Gibco	11150
	F-12 Nutrient mixture(Ham)	Gibco	11765
	EGF	Gibco	13247-051
		Miltenyi Biotech	130-093-827
	bFGF	Gibco	13256-029
		Miltenyi Biotech	130-093-842
	ITS+ Premix	BD	354352
	FBS	Gibco	16000
Antibiotic-antimycotic	Gibco	15240	
ROCK inhibitor	Y-27632	Sigma	Y0503
Tissue dissociation Media	L/G DMEM	Welgene	LM001-11
	Collagenase type A1	Gibco	17100-017
Tissue Transproation Buffer solution	HBSS	Gibco	14175
	DPBS	Welgene	LB001-02
	Antibiotic-antimycotic	Gibco	15240
	Normocin	Invivogen	ant-nr-1
Cell dissociation agent	TrypLE Express	Gibco	12604

[0069]

실시예 1

[0070]

모낭 줄기세포의 분리

[0071]

두피유래 조직(모발이식센터, 한국)을 세절한 다음, 콜라게나아제 타입 A1가 함유된 배지(L/G DMEM(Welgene, Korea) 및 2 mg/ml의 콜라게나아제 타입 A1(Gibco, USA)이 첨가된 배지)에 넣어 100 rpm, 37도에서 30~50분 동안 중력대류배양기에서 화학적 분해가 이루어지도록 하였다.

[0072]

화학적 분해된 조직을 원심분리로 수거하여 DPBS로 세척한 다음, M199/F12 혈청배지(1:1의 M199 및 F12, 0.1 X ITS premix, 20 ng/ml의 rEGF(Gibco, USA), 10 ng/ml의 bFGF(Gibco, USA), 1 X Antibiotic-antimycotic, 10% 우태아혈청(Gibco, USA) 첨가한 배지)에서 조직 및 세포배양을 하였다. 0.1X ITS+ premix 에는 0.625ug/ml insulin, 0.625ug/ml transferrin, 0.625ug/ml selenious acid, 0.535ug/ml linoleic acid가 포함되어 있다.

[0073]

약 3일 후부터 조직들이 배양용기 바닥에 부착되기 시작하면, M199/F12 무혈청 배지로 교체하여 배양하고(P0), 부착되지 않은 조직은 다시 수거하여 M199/F12 혈청배지(1:1의 M199 및 F12, 0.1 X ITS premix, 20 ng/ml의 rEGF(Gibco, USA), 10 ng/ml의 bFGF(Gibco, USA), 1 X Antibiotic-antimycotic, 10% 우태아혈청(Gibco, USA) 첨가한 배지)에서 3일간 2차 배양을 개시하고 POT1으로 명명하였다. 이후로 P0세포는 2일마다 새로운 배지를 공급하였고, POT1은 3일이 지난 후 M199/F-12 무혈청배지로 교체하였다. POT1에서도 붙지 않은 조직은 다시 수거하여 POT2로 명명하여 다시 배양하였다. 동일한 과정으로 P0, POT1 조직/세포들은 2일마다 새로운 배지를 공급하였고, POT2는 3일 후 M199/F-12 무혈청배지로 교체하여 지속적으로 배양하였다. 이로써 모낭 줄기세포를 분리하였다.

실시예 2

[0074] **ROCK 저해제를 함유하는 다양한 배지별 모낭 줄기세포의 배양 효율**

[0075] **2-1: 분리된 모낭 상피줄기세포의 배양**

[0076] 우선, 상기 실시예 1에서 수득한 모낭 줄기세포에 대하여 총 세포수 및 세포 생존율을 확인하였다.

[0077] P0 : 1.33×10^6 (91%)

[0078] 그 후, 12 well palte를 준비한 후, ITS+ (insulin, transferrine, selenium) premix, EGF, bFGF 및 Antibiotic-Antimycotic를 함유하고 있는, 이하의 9종류의 배지 종류별로 각 웰당 1ml씩 대조군과 실험군 2개씩 분주하였다. 각 실험군에 ROCK 저해제 Y-27632를 농도 10 μM, 10 μl씩 첨가 배양하였다.

[0079] 그 후, 2일, 3일, 4일째에 각각의 배지에서 모낭 줄기세포의 증식 상태를 관찰하고, 그 결과를 도 1 내지 도 5에 나타내었다.

표 2

번호	배지종류	제조사	Cat.	Lot.
1	M199/F12	GIBCO	11150	509175
2	DMEM-Low glucose	Welgene	LM001-11	LM01090211
3	DMEM-High glucose	Welgene	LM001-05	LM01090405
4	DMEM/F12	Welgene	LM002-08	LM02080208
5	IMEM	GIBCO	12440-053	444262
6	MEM-alpha	GIBCO	12561	548861
7	MCDB 131	Welgene	LM016-03	LM16080303
8	MCDB 153	Welgene	LM016-05	LM16080105
9	RPMI 1640	GIBCO	11875-093	571559

* supplement : ITS+ premix(0.1X), EGF(20ng/ml), bFGF(10ng/ml), Antibiotic-Antimycotic(1X)

[0081] 도 1 내지 도 5로부터 알 수 있는 바와 같이, 9종의 배지들 M199/F-12, MEM-alpha, DMEM L/G, DMEM H/G, MCDB 131, IMDM, DMEM/F-12, RPMI 1640, MCDB 153 중에서, M199/F12배지, MEM-alpha배지, DMEM L/G, DMEM H/G, MCDB 131배지 및 IMEM배지에서 모낭 줄기세포의 우수한 증식이 가능함을 확인 할 수 있었다.

[0082] 그리고, 특히 ROCK 저해제의 효능과 관련하여서도, 대조군과 비교하여 ROCK 저해제를 함유하는 M199/F12배지, MEM-alpha배지, DMEM L/G, DMEM H/G, MCDB 131배지 및 IMEM배지가 모낭 줄기세포의 증식 효과가 좋고, 그 중에서도 M199/F12배지, MEM-alpha배지가 가장 우수한 효과를 나타내었다.

[0083] 즉, ROCK 저해제를 함유한 특정 배지는 모낭 줄기세포의 세포수 증대 및 세포 생존율에 탁월한 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0084] **2-2: ROCK 저해제 농도별 모낭 줄기세포 증식능 비교**

[0085] ROCK 저해제의 농도에 따른 모낭 줄기세포의 증식능을 확인하기 위하여, ITS+ premix, EGF, bFGF 및 Antibiotic-Antimycotic를 함유하는 M199/F-12 배지에 이하 농도별로 ROCK 저해제를 첨가하여, 실시예 1에서 수득한 모낭 줄기세포를 배양하였다.

[0086] 실시예 1에서 사용했던, M199/F-12에 ROCK 저해제 10 μM를 첨가하여 배양한 P1 모낭 줄기세포를, TrypLE-Express처리하여 회수한 후 7.70×10^5 cells을 수득하고, 6-well 플레이트를 준비하여 각 웰 마다 M199/F-12 2ml를 분주하였다.

[0087] 상기 세포 현탁액 6-well 플레이트에 균등하게 플레이팅한 후, 대조군을 제외한 5개의 웰에 ROCK 저해제 Y-27632를 각각 10nM, 100nM, 1 μM, 10 μM, 100 μM의 농도로 첨가하여 모낭 줄기세포를 배양하였다. 세포 배양 2

일마다 배지를 교환하였고, 세포 배양 2, 3, 4, 5, 6일째 세포 사진을 촬영하였다.

[0088] 그 결과를 도 6 및 도 7에 나타내었다.

[0089] 도 6 및 도 7에서 확인되는 바와 같이, 100nM 농도 이하의 ROCK 저해제를 처리한 경우는 ROCK 저해제를 처리하지 않은 세포의 증식정도와 큰 차이가 없었고, 1 μ M 농도 또는 100 μ M에서는 세포의 증식이 향상되는 것은 확인되지만 세포변형이 일어나거나 분화 되는 현상이 나타나므로, 결론적으로 ROCK 저해제의 가장 바람직한 농도는 약 10 μ M인 것으로 확인되었다.

실시예 3

[0090] **배지 구성성분의 특정**

[0091] 모낭 줄기세포에 적합한 배지 조성을 찾기 위하여, 시중에 판매되고 있는 M199/F-12 배지에 대하여 기존 조성 그대로 사용하는 경우를 대조군으로 하고, 상기 M199/F-12 배지에 ITS+ premix, EGF, bFGF 및 Antibiotic-Antimycotic를 첨가하여 사용한 경우를 실험군으로 하여 모낭 줄기세포의 증식능을 비교하였다.

[0092] 실시예 1에서 수득한 모낭 줄기세포를 각 대조군 및 실험군에서 배양하여, 4일째 되는 날, 그 증식상태를 관찰하였다.

[0093] 그 결과를 도 8에 나타내었다. 도 8에서 알 수 있는 바와 같이, 기존의 M199/F-12 배지 성분 자체로 모낭 줄기세포를 배양한 경우, 모낭 줄기세포의 증식률이 낮았을 뿐만 아니라, 형태의 변형이 심하게 일어났다. 이에 반하여, ITS+ premix, EGF, bFGF 및 Antibiotic-Antimycotic를 첨가한 M199/F-12 배지에서 배양한 경우에는, 모낭 줄기세포의 형태도 온전하게 보존되고 있을 뿐만 아니라, 현저한 증식률을 나타내었다.

[0094] 상기 결과를 통해, 모낭 줄기세포의 증식에 있어서, 배양 배지의 종류뿐만 아니라, 이에 첨가되는 특정 인자 역시 모낭 줄기세포의 증식에 큰 영향을 끼치는 요소임을 알 수 있었다.

실시예 4

[0095] **줄기세포를 이용한 탈모 치료 in vivo 확인**

[0096] **4-1: 마우스 모델을 이용한 탈모 치료의 확인**

[0097] 본 발명에서 배양한 모낭 줄기세포를 이용하여 생체 내에서 실제로 효율적으로 탈모 치료가 되는지 여부를 확인하기 위하여, 줄기세포를 이용하여 탈모 치료를 시도하였다.

[0098] 실시예 1에서 수득한 모낭 줄기세포를 남성형 탈모 동물 모델인 Androchronogegetic alopecia(B6CBAF1/j) 마우스에 투여하였다. 또한, 보다 상세하게는, 12주령 female B6CBAF1 hybrid mice (female C57BL/6 male CBA)에 dihydrotestosterone을 6주간 또는 testosterone을 8주간 피하 주사 (2 mg/일) 하여 탈모를 유발한 후 시험물질을 투여하였다.

[0099] 시험군은 다음과 같이 총 5개 군으로 나누었으며, 군당 10 마리씩 총 50 마리를 실험에 이용하였다.

[0100]

[0101] [시험군]

[0102] 1. 음성대조군(saline)

[0103] 2. 양성대조군(3% Minoxidil)

[0104] 3. 모낭줄기세포 단독 투여군 (hHFSC)

[0105] 4. 지방줄기세포 단독 투여군 (hASC)

[0106] 5. 지방줄기세포/모낭줄기세포 병용 투여군 (hASC/hHFSC)

[0107]

[0108] 남성 호르몬은 탈모 유발 후에도 시험물질 투여 여부와 관계없이 시험기간 내내 실험동물에 피하주사 하였다.

[0109] 실험동물에 남성 호르몬인 디하이드로테스토스테론 (dihydrotestosterone) 또는 테스토스테론 (testosterone)을 처리하여 유발한 탈모 상태는 grading system (0-4단계로 구분, 표 3 참조)을 사용하여 2주 간격으로 평가하였다.

표 3

지수	증상
0	탈모 없음
1	내건갑부(the intrascapular area)에서 탈모 증상
2	1cm ² 정도의 탈모 증상
3	2cm ² 정도의 탈모 증상
4	4cm ² 이상의 탈모 증상

[0111] 처리한 후 4주까지는 별다른 탈모현상을 관찰할 수 없었으며, 5주부터 dihydrotestosterone 처리군에서 모발이 가늘어지고 등부위에 솜털 및 탈모가 되는 양상을 관찰할 수 있었다. testosterone 처리군에서는 dihydrotestosterone 처리군보다 탈모가 늦게 유도되어 약 7주 이후부터 탈모현상을 관찰할 수 있었다.

[0112] 따라서, 디하이드로테스토스테론 처리군은 7주차부터 시험물질을 투여하였으며, 테스토스테론 처리군은 9주차부터 시험물질을 각각 투여하였다. 그 결과를 도 9 내지 도 12에 나타내었다.

[0113] 도 9 및 도 10에서 알 수 있는 바와 같이, 디하이드로테스토스테론 처리군의 경우, 시험물질 투여 1-2주 후부터 시험물질 (지방줄기세포 단독, 모낭줄기세포 단독 또는 지방줄기세포/모낭줄기세포 병용투여) 또는 양성대조 (Minoxidil)을 투여한 군의 탈모 상태가 음성대조군보다 월등히 양호한 상태임을 관찰할 수 있었다. 시험물질 투여 개시 후 8 주차 관찰 결과, 지방줄기세포 단독 또는 모낭줄기세포 단독 투여의 탈모 억제 효과는 양성대조 (Minoxidil)와 동등하였으며 지방줄기세포/모낭줄기세포 병용 투여군의 경우 음성대조군은 물론 양성대조군보다도 양호한 탈모 억제 효과를 나타내었다.

[0114] 또한, 도 11 및 도 12에서 알 수 있는 바와 같이, 테스토스테론을 처리한 그룹에서도 시험물질 투여 개시 2주차부터 음성대조군은 탈모 정도가 심해지는 양상인데 반해 시험물질 처리군 (지방줄기세포 단독, 모낭줄기세포 단독 또는 지방줄기세포/모낭줄기세포 병용투여)의 경우 탈모 증상이 호전되는 경향을 나타냈으며, 특히 시험물질 투여 개시 후 4주차에서는 뚜렷한 탈모를 보였던 지방줄기세포/모낭줄기세포 병용 투여군의 탈모 진행 정도가 급격히 호전되는 양상이 관찰되었다. 시험물질 투여 개시 후 10 주차에서는 지방줄기세포 단독 및 모낭줄기세포 단독 처치에 의한 탈모 억제 효과가 양성대조(Minoxidil) 보다 월등함을 나타내었다.

[0115] 이로써, 실시예 1의 배지에서 수득한 모낭 줄기세포를 이용할 경우, 긍정대조군과 비슷하거나 뛰어나게 탈모병변이 저지되거나 치료됨을 확인하였으며, 이러한 결과는 본 발명의 뛰어난 증식능을 가진 모낭세포의 투여를 통해 해당 질환의 효과적 치료가 가능함을 시사한다.

[0116] **4-2: 줄기세포 병용에 따른 탈모 치료 효능의 확인**

[0117] 지방 줄기세포는 그 유래가 지방 조직으로, 그 분리와 수득이 매우 용이하며, 증식 및 유지하는 방법도 널리 알려져 있는 바, 다소 수득이 용이하지 않는 모낭 줄기세포와 병용하여 탈모 질환의 치료 시에 사용하였을 경우

그 효능을 확인하기 위해 아래 실험을 수행하였다.

- [0118] 실시예 4-1의 방법으로 마우스를 통하여 탈모질환을 유도한 후 그 치료 효과를 확인하였다. 12주령 female B6CBAF1 hybrid mice (female C57BL/6 male CBA)에 dihydrotestosterone을 6주간 피하 주사 (2 mg/day) 한 결과, 양쪽 허벅지 부위와 배쪽 부위에서 뚜렷한 탈모양상을 관찰할 수 있었다.
- [0119] 이에 탈모부위인 한 쪽 허벅지 부위에 지방줄기세포와 모낭줄기세포를 3-4일 간격으로 번갈아가며 (지방줄기세포 1회 + 모낭줄기세포 1회 / 1주일) 총 6주간 투여하였다. 시험물질 투여 기간 및 그 이후 관찰이 계속되는 동안에도 매일 남성형 호르몬을 실험 동물에 피하 주사하였다. 6주간 투여한 마우스의 사진을 찍어 도 13에 나타내었다.
- [0120] 도 13에서 알 수 있는 바와 같이, 줄기세포 투여 1주일 후에 육안적 관찰 결과, 배쪽 탈모 부위에 일부 털이 자라는 양상을 관찰할 수 있었다. 그러나 세포를 투여한 부위나 다른 탈모 부위에서는 그 호전 양상이 미미하였다. 그러나, 줄기세포 투여 2주일 후 관찰 시에, 배쪽 탈모 부위에서 털이 더 자라는 양상을 관찰할 수 있었으며, 양쪽 허벅지 부위에서는 더 이상의 탈모가 진행되지 않아 탈모질환의 치료를 확인할 수 있었다.
- [0121] 그 치료에 많은 양의 줄기세포가 필요한 탈모질환의 경우, 보다 그 분리와 수득이 쉬운 지방 줄기세포를 모낭 줄기세포와 병용하여 사용할 경우, 모낭 줄기세포만을 투여하는 경우와 비슷하거나 뛰어나게 탈모병변이 저지되거나 치료됨을 확인하였으며, 이러한 결과는 본 발명의 뛰어난 증식능을 가진 모낭세포와 병용하여 지방 줄기세포를 투여할 경우, 해당 질환의 효과적 치료가 가능함을 시사한다.
- [0122] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점을 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

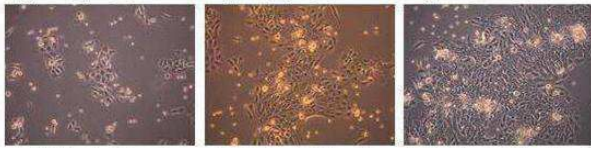
도면1



도면2

DMEM-low glucose

대조군 일-2 대조군 일-3 대조군 일-4

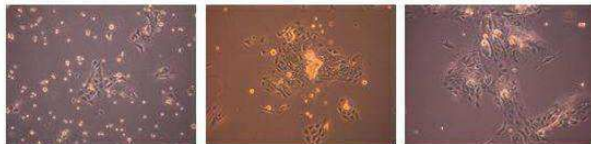


실험군 일-2 실험군 일-3 실험군 일-4

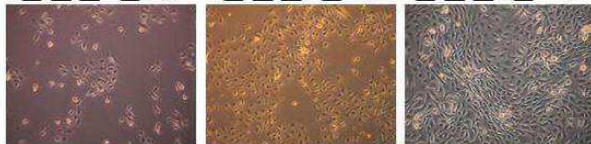


DMEM-high glucose

대조군 일-2 대조군 일-3 대조군 일-4



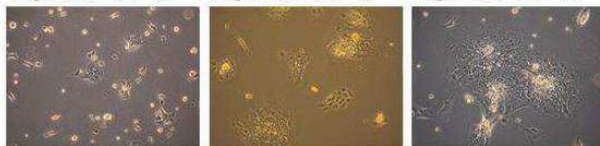
실험군 일-2 실험군 일-3 실험군 일-4



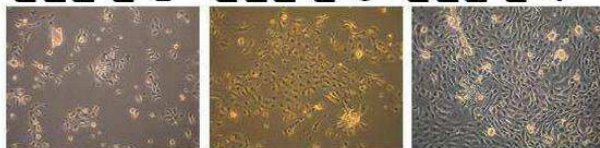
도면3

IMEM

대조군 일-2 대조군 일-3 대조군 일-4

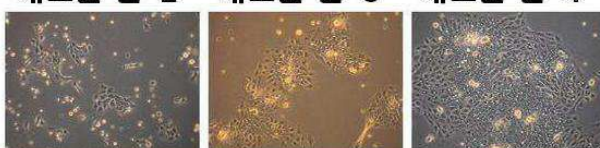


실험군 일-2 실험군 일-3 실험군 일-4

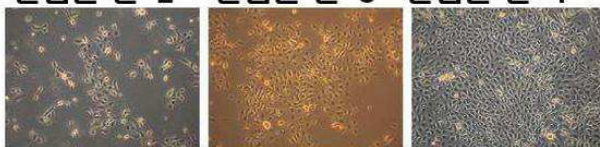


MEM-alpha

대조군 일-2 대조군 일-3 대조군 일-4



실험군 일-2 실험군 일-3 실험군 일-4



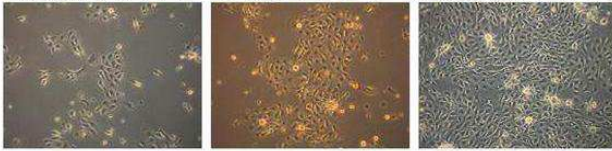
도면4

MCDB 131

대조군 일-2 대조군 일-3 대조군 일-4

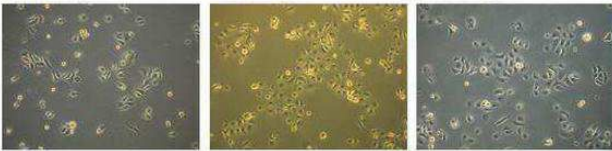


실험군 일-2 실험군 일-3 실험군 일-4

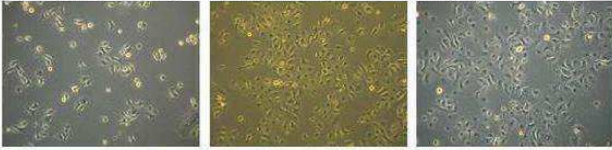


MCDB 153

대조군 일-2 대조군 일-3 대조군 일-4



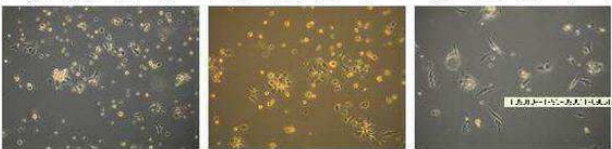
실험군 일-2 실험군 일-3 실험군 일-4



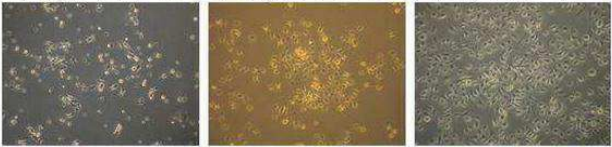
도면5

RPMI 1640

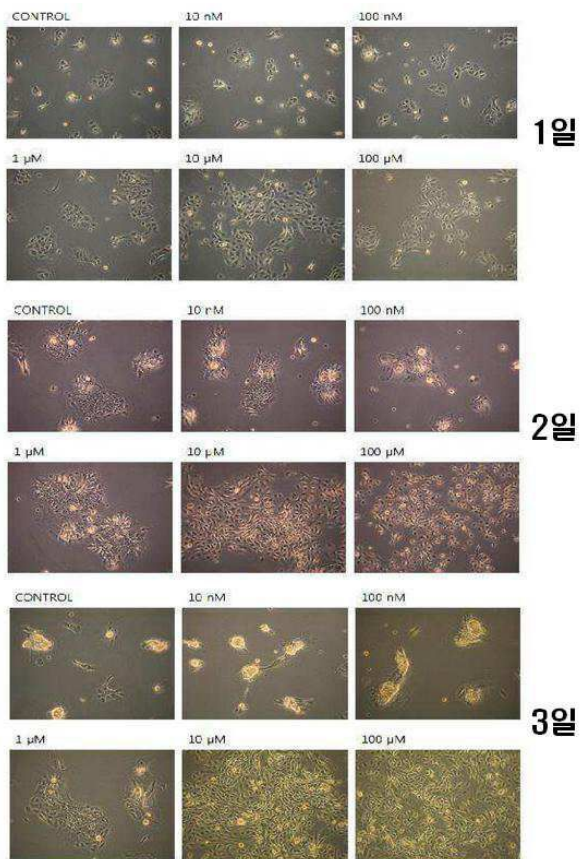
대조군 일-2 대조군 일-3 대조군 일-4



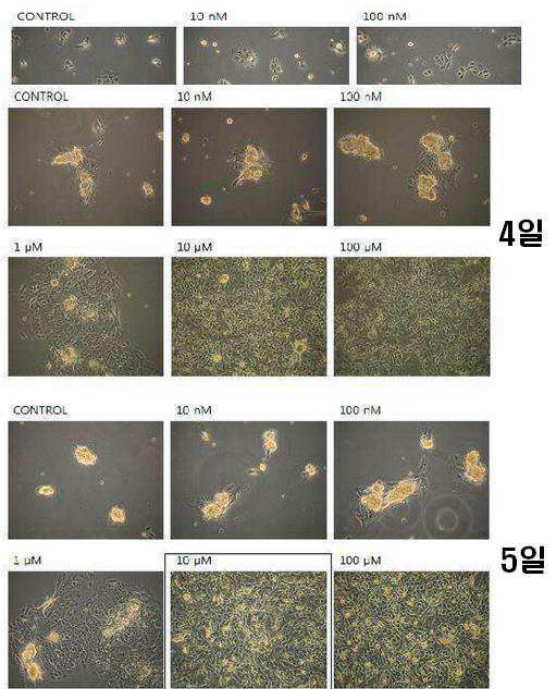
실험군 일-2 실험군 일-3 실험군 일-4



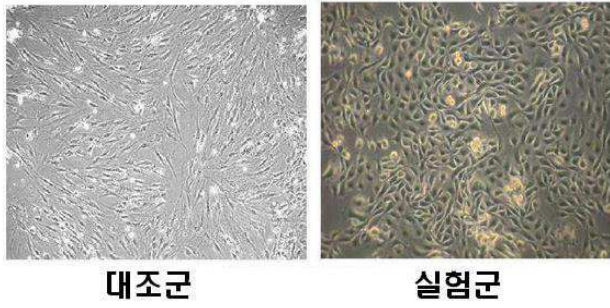
도면6



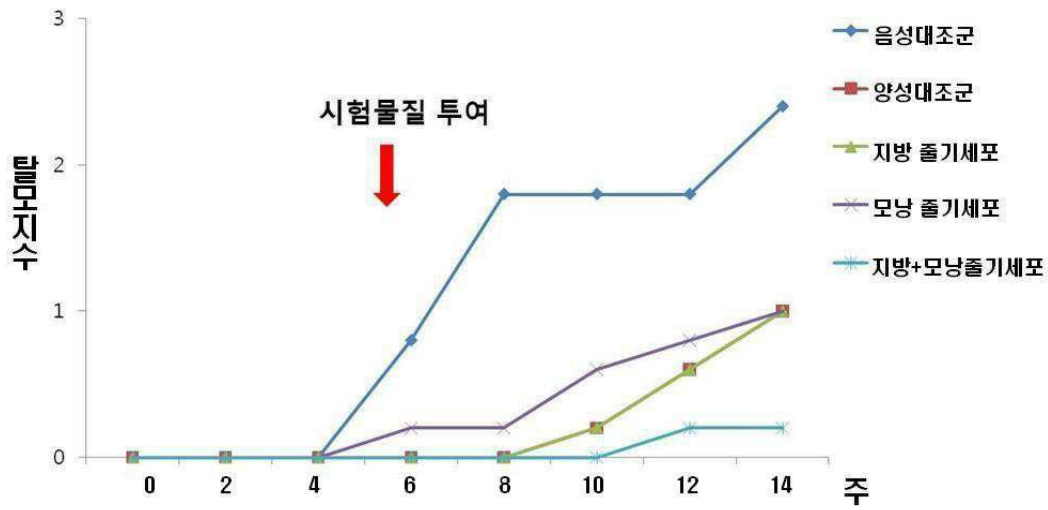
도면7



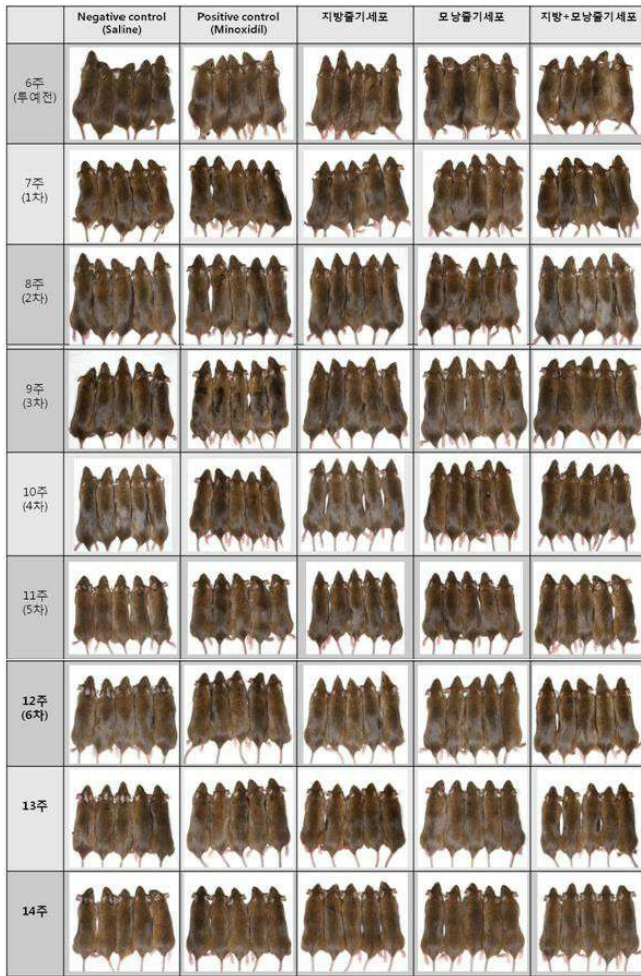
도면8



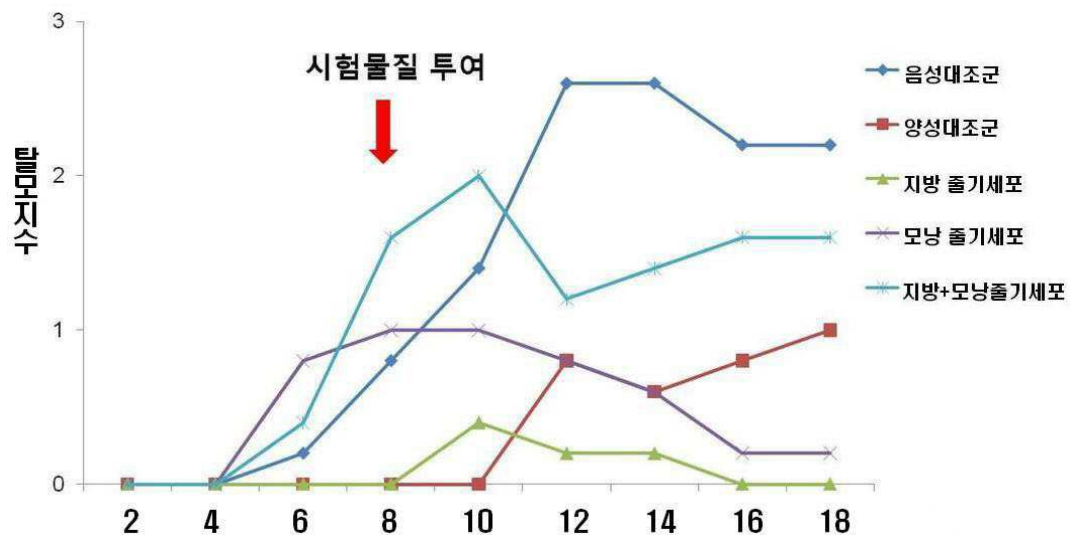
도면9



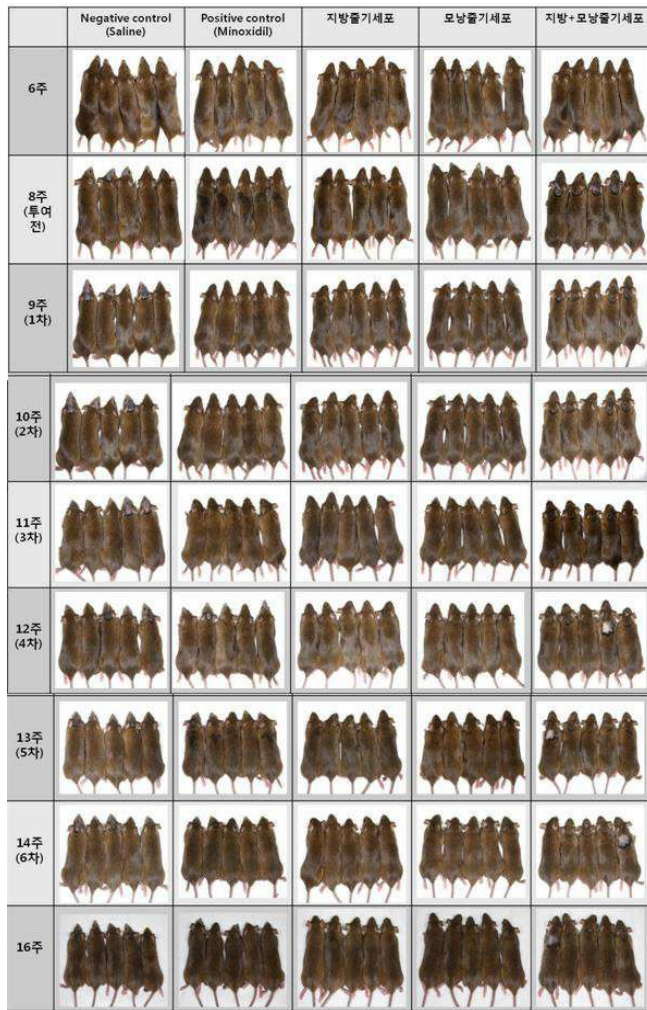
도면10



도면11



도면12



도면13

