



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2008-0097593
(43) 공개일자 2008년11월06일

(51) Int. Cl.

A61K 35/12 (2006.01) A61K 35/36 (2006.01)

A61Q 7/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0042645

(22) 출원일자 2007년05월02일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

라정찬

경기도 수원시 장안구 정자동 918 청솔마을SK.
한화아파트 626-701

(72) 발명자

라정찬

경기도 수원시 장안구 정자동 918 청솔마을SK.
한화아파트 626-701

(74) 대리인

이처영

전체 청구항 수 : 총 6 항

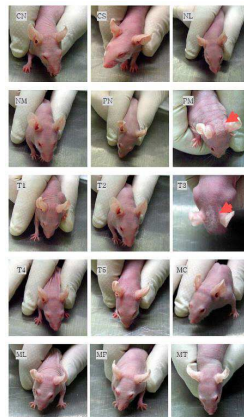
(54) 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포 및 모낭세포를함유하는 세포치료제

(57) 요약

본 발명은 인간 지방조직 유래 성체 줄기세포 및 두피조직 유래 모낭세포를 함유하는 발모유도용 세포치료제에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 인간 지방조직 유래 성체 줄기세포, 및 CD34 양성 및/또는 음성세포를 함유하는 두피조직 유래 모낭세포가 일정 혼합비율로 함유되어 있는 발모유도용 세포치료제에 관한 것이다.

본 발명에 따른 발모유도용 세포치료제는 탈모증 및 무모증을 포함하는 모낭형성이 정상적으로 이루어지지 않아 발생하는 증상에 적용하여 발모의 효능을 이끌어 내는데 유용하다.

대표도 - 도6



특허청구의 범위

청구항 1

인간 지방조직 유래 성체 줄기세포 및 두피조직 유래 모낭세포를 유효성분으로 함유하는 발모유도용 세포치료제.

청구항 2

제1항에 있어서, 두피조직 유래 모낭세포는 CD34 양성세포 및/또는 CD34 음성세포를 함유하는 발모유도능을 가지는 세포인 것을 특징으로 하는 발모유도용 세포치료제.

청구항 3

제2항에 있어서, 두피조직 유래 모낭세포에 함유되어 있는 CD34 양성세포 및 CD34 음성세포는 100:1 내지 1:100의 비율로 혼합되어 있는 것을 특징으로 하는 발모유도용 세포치료제.

청구항 4

제1항에 있어서, 인간 지방조직 유래 성체 줄기세포 및 두피조직 유래 모낭세포는 100:1 내지 1:100의 비율로 혼합되어 있는 것을 특징으로 하는 발모용 세포치료제.

청구항 5

인간 지방세포 유래 성체 줄기세포 및 두피조직 유래 모낭세포를 유효성분으로 함유하는 탈모치료제.

청구항 6

인간 지방세포 유래 성체 줄기세포 및 두피조직 유래 모낭세포를 유효성분으로 함유하는 무모증치료제.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <7> 본 발명은 인간 지방조직 유래 성체 줄기세포, 및 CD34 양성 및/또는 음성세포를 함유하는 두피조직 유래 모낭 세포가 일정 혼합비율로 함유되어 있는 발모유도용 세포치료제에 관한 것이다.
- <8> 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 (Passchier J. *et al.*, *Dermatology*, 197:217, 1998; McDonagh, A.J. and Messenger, A.G., *Dermatol Clin.*, 14:661, 1996).
- <9> 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(McDonagh, A.J. and Messenger, A.G., *Dermatol Clin.*, 14:661, 1996). 이러한 모발 주기의 시간적 간격은 신체 부위에 따라 다양한데 머리털의 경우에는 26년 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 (Cotsarelis, G. *et al.*, *Cell*, 29:61:1329, 1990).
- <10> 정상인의 경우 머리털의 수는 약 10만개 정도이며, 하루에 자라는 길이는 평균 0.37mm 정도 된다(한 달에 약 1cm 정도 성장). 보통의 경우 머리털의 85~90%는 성장기에 있고 나이를 먹음에 따라 성장기 모낭의 수가 감소한다. 따라서 10~15%의 모낭이 퇴행기나 휴지기에 있으며, 하루 평균 50~60여 개 정도의 머리털이 정상적으

로 빠지며 하루 100개 이상 빠지면 탈모증을 의심해야 한다.

- <11> 탈모의 원인에는 첫 번째로 남성호르몬의 일종인 DHT(다이하이드로테스토스테론)이 모낭에 영향을 주어 단백질 합성 저하와 모낭에 직접 손상을 주어 탈모가 발생한다는 설과 남성호르몬(testosterone)이 세포내에 있는 수용체인 5 α 리덕타아제(환원효소)와 결합하여 활동하는데 그 산물인 DHT(다이하이드로테스토스테론)이 DNA전사 과정에서 모낭에 영향, 즉 단백질 합성저해, 모낭의 손상등으로 탈모가 발생한다는 남성호르몬 영향설이 있다. 두 번째로는 탈모 유전자를 받아 남성호르몬의 영향에 의해 발생한다는 것과 탈모증 자체는 유전이 아니고, 탈모가 되기쉬운 체질을 조상으로부터 유전 받는다는 유전적 탈모설이 있으며 세 번째로는 스트레스로 인한 탈모설 네 번째로는 두피는 20세 전후까지 두개골은 30세 전 후까지 발달하는데, 이로인해 두피가 얇아지고, 혈류장애가 원인이 되어 탈모가 된다는 두개골 발달로 인한 탈모설, 마지막으로 노화에 의해 탈모가 발생한다는 설 등 여러 가지 원인이 있는 것으로 보고되고 있다 (Sheen, M., *Fighting Hair Loss*, USA Library Publishing, Inc. p. cm. 97090157, 1966).
- <12> 탈모의 치료법으로 현재 가장 많이 쓰이고 있는 수술 방법은 자기 자신의 머리털을 이용하여 이식하는 자가모발 이식(자기모발이식)이며, 프로페시아 및 미녹시딜을 사용하는 약물치료가 널리 시술되고 있다. 약물치료의 효과는 투여할 당시에는 그 발모효능이 나타나지만 치료가 중단되면 탈모가 다시 진행되며, 미녹시딜의 경우에는 성기능 장애 등의 부작용이 단점으로 알려져 있다 (Bouhanna, P., *Dermatol Surg.*, 29:1130, 2003; Thiboutot, D., *Arch Dermatol.*, 135:1417, 1999; Messenger, A.G. and Rundegren J., *Br J Dermatol.*, 150:186, 2004).
- <13> 최근에 도입된 치료방법으로는 탈모와 관련된 유전자를 모낭에 전달하거나 유전자 발현을 차단하는 방법으로 시술되는 유전자 치료를 들 수 있다. 그러나 유전자 치료는 치료의 효능성, 치료비용, 안정성 등에 대해 불확실하고, 치료법이 안전하게 현실화되기까지는 상당한 기간이 걸릴 수 있다는 단점 때문에 임상적용이 용이하지 않다.
- <14> 유전자 치료 외에 줄기세포를 이용한 탈모치료 방법도 최근 부각되고 있다. 이 방법은 줄기세포가 가지고 있는 다분화능을 이용한 탈모 치료방법은 탈모 또는 무모의 증상을 나타내는 곳에 줄기세포를 주입하여 모낭세포로 분화하도록 유도하는 과정으로 시술된다.
- <15> 줄기세포(stem cells)란 만능 줄기세포(totipotent stem cells), 배아 줄기세포라 불리는 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cells) 및 다분화능 줄기세포(multipotent stem cells)로 분류할 수 있다.
- <16> 상기 분류 중에서 다분화능 줄기세포(multipotent stem cells)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 있으며 조직 특이적 다능성 세포들을 총칭하여 성체 줄기세포라 한다. 이러한 성체 줄기세포는 인체의 각종 장기에 이미 존재하는 세포를 채취, 줄기세포를 발전시킨 것으로 특정 조직으로만 분화되는 특징이 있다. 그러나, 최근에는 성체줄기세포를 이용, 간세포 등 각종 여러 조직으로 분화시키는 실험이 성공을 거두고 있다.
- <17> 상기 다분화능 줄기세포는 성체 골수에서 최초로 분리되었으나, 그 후 피부, 혈관, 근육 및 뇌로부터도 확인되었으며, 최근에는 지방 조직이 다분화능 줄기세포의 새로운 소스임이 밝혀졌다(Tomas *et al.*, *Nat. Cell Biol.*, 3:778, 2001; Jiang *et al.*, *Nature*, 418:41, 2002; Sampaolesi *et al.*, *Science*, 301:487, 2003; Cousin *et al.*, *BBRC.*, 301:1016, 2003; Miranville *et al.*, *Circulation*, 110:349, 2004; Seo *et al.*, *BBRC.*, 328:258, 2005).
- <18> 지방조직은 지방 흡입술(liposuction) 과정에서 부수적으로 얻을 수 있고, 이러한 지방 조직은 대량으로 추출할 수 있다는 장점이 있다. 상기 조직에 포함되어 있는 지방 유래 줄기세포는 지금까지 상피세포, 연골세포, 골 형성, 지방 세포, 신경세포, 연골세포, 및 근육세포 등으로 분화할 수 있다는 보고가 있으며, 최근 연구에서는 근육 재생능 및 신경혈관분화를 촉진하는 능력이 있음이 확인되었다 (Zuk *et al.*, *Tissue Eng.*, 7:211, 2001; Rodriguez *et al.*, *BBRC.*, 315:255, 2004; Brzoska *et al.*, *BBRC*, 330:142, 2005; Safford *et al.*, *BBRC*, 294:371, 2005; *Biomaterials*, 25:3211, 2004; Fujimura *et al.*, *BBRC*, 333:116, 2005; 미국특허 6,777,231).
- <19> 임상에서는 현재 다양한 분야에서 성체줄기세포를 응용하고 있다. 예를 들면 각막 상피 줄기세포를 각막이식에 응용하거나, 조혈모세포를 자가조직의 부분적인 줄기세포 이식과 유전자 치료에 적용한 보고가 있다 (Cotsarelis, G. *et al.*, *Cell* 57, 201, 1989; Tsai, R.J. *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 343, 86,2000; Bernstein, I.D. *et al.*, *Blood Cells*, 20:15, 1994). 따라서 탈모나 화상과 같은 다른 피부 질병도 이와 마찬가지로 모낭 줄기세포의 동정과 유전자 분석과 같은 방법으로 치료의 발전을 기대할 수 있는 것으로 여겨진다.

<20> 표피에서의 줄기세포 개념은 30년 전부터 이미 논의되어 왔으며, 두피에 존재하는 성체 줄기세포는 모낭 돌출부분(bulge region)에서 얻을 수 있는 것으로 여겨지고 있다. 또한 상기 돌출부분(bulge region)에서의 모낭 줄기세포는 CD34 세포표면 단백질을 발현하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 줄기세포와 관련된 발모기전에 대해 활발한 연구가 이루어지고 있다. 최근 연구에서는 모낭형성과정에서 지방세포가 모낭 주변에 혈관생성을 유도하면서 모낭발달에 중요한 역할을 한다는 사실이 보고되었다 (Cotsarelis, G. *et al.*, *Cell*, 61: 1329, 1990; Lavker, R.M. *et al.*, *J Invest Derm*, 101:16, 1993; Morris, R.J., Potten C.S., *J Invest Derm*, 112:470, 1999; Trempus, C.S. *et al.*, *J Invest Dermatol*, 120:501, 2003; Blanpain, C. *et al.*, *Cell*, 3:118:635, 2004; Hausman, G.J., *et al.*, *Am. J. Anatomy*, 161:85, 2005).

<21> 줄기세포 사용하여 발모효과를 유도하기 위해서는 많은 양의 줄기세포가 필요하지만 아직까지 조직에서 분리한 줄기세포를 임상에 적용할 수 있을 정도로 충분한 양을 얻을 수 있는 배양기술이 미미하며, 줄기세포를 나타내는 표지 단백질도 아직까지 정확하게 확립되지 않아 줄기세포를 이용한 탈모치료방법을 실제로 임상에 적용하기에는 기술력이 상당히 미흡한 상태이다.

<22> 이에 본 연구자들은, 보다 효율적인 발모효과를 유도하고 탈모효능에 유의한 양의 줄기세포를 확보하여 탈모치료에 적용할 수 있도록 예의 노력한 결과, 지방세포 유래 성체줄기세포와 두피조직 유래 모낭세포를 적절한 비율로 혼합하여 조성된 세포치료제를 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<23> 본 발명의 목적은 인간 지방조직 유래 성체 줄기세포 및 두피조직 유래 모낭세포를 유효성분으로 함유하는 발모유도용 세포치료제를 제공하는데 있다.

<24> 본 발명의 다른 목적은 인간 지방조직 유래 성체 줄기세포 및 두피조직 유래 모낭세포를 유효성분으로 함유하는 탈모치료제 및 무모증치료제를 제공하는 데 있다.

발명의 구성 및 작용

<25> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 인간 지방조직 유래 성체 줄기세포 및 두피조직 유래 모낭세포를 유효성분으로 함유하는 발모유도용 세포치료제를 제공한다.

<26> 본 발명은 또한, 인간 지방조직 유래 성체 줄기세포 및 두피조직 유래 모낭세포를 유효성분으로 함유하는 탈모치료제 및 무모증치료제를 제공한다.

<27> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

<28> 본 발명은 일 관점에서, 인간 지방조직 유래 성체 줄기세포 및 두피조직 유래 모낭세포를 유효성분으로 함유하는 발모유도용 세포치료제에 관한 것이다.

<29> 본 발명의 두피조직 유래 모낭세포는 CD34 양성세포 및/또는 CD34 음성세포를 함유할 수 있다.

<30> 본 발명에서 ‘발모유도’는 탈모 부위 또는 무모 부위에 모낭을 형성하여 털이 나도록 유도하는 능력을 말한다.

<31> 본 발명의 인간 지방조직 성체 줄기세포는 인간 지방 조직의 지방흡입술(liposuction)에서 부수적으로 얻어지는 지방세포와 식염수 혼합물에서 플라스크 배양용기에 부착하여 배양함으로써 얻을 수 있다.

<32> 본 발명에서 '지방흡입술(liposuction)'은 지방 제거의 미용 또는 성형 수술의 한 기법으로서, 지방질 부분을 절개하여 진공 펌프로 지방질을 빨아내는 것 또는 주사기의 압력으로 빨아내는 것을 의미한다.

<33> 본 발명의 '성체 줄기세포'는 체대혈이나 성장을 마친 성인의 골수와 혈액 등에서 추출해낸 것으로, 뼈와 간, 혈액 등 구체적 장기의 세포로 분화되기 직전의 원시세포이고, 여기에는 조혈모세포와 재생의학의 재료로 각광 받고 있는 중간엽줄기세포, 신경줄기세포 등이 있다. 이밖에 간이나 표피, 췌장 등에도 줄기세포가 있다. 상기 성체 줄기세포는 증식이 어렵고 쉽게 분화되는 경향이 강한 대신에 여러 종류의 성체 줄기세포를 사용하여 실제 의학에서 필요로 하는 장기 재생을 할 수 있을 뿐 아니라 이식된 후 각 장기의 특성에 맞게 분화할 수 있는 특성을 지니고 있다.

<34> 본 발명의 ‘CD34 양성세포’와 ‘CD34 음성세포’도 마찬가지로 줄기세포의 특성, 즉 미분화, 무한정 증식 및 특정 세포로의 분화능을 갖는 줄기세포가 포함되어 있다.

- <35> 본 발명에서의 발모유도를 위해서는 인간 지방조직 및 모낭을 포함하는 두피에서 분리된 성체 줄기세포인 것이 바람직하며, 자가 성체 줄기세포인 것이 보다 바람직하다.
- <36> 본 발명의 인간 지방조직흡입으로 얻어진 성체줄기세포를 함유하는 세포 배양액에서 목적하는 표면항원을 발현하고 있는 다분화능의 줄기세포를 수득하는 방법은 세포 선별기능을 가진 세포분석기를 사용한 FACS법, 마그네틱 비드를 사용하는 MACS법, 다분화능 줄기세포를 특이적으로 인식하는 항체를 사용한 패닝법 등을 포함하는 당해 분야에서 통상의 기술을 사용하여 분리할 수 있다.
- <37> 본 발명의 두피조직유래 모낭세포는 CD34 양성세포 단독, CD34 음성세포 단독, 또는 CD34 양성세포 및 음성세포가 혼합된 상태로 발모유도능이 나타나도록 제조할 수 있으며, 혼합된 상태로 제조하는 것이 바람직하다.
- <38> 본 발명의 발모유도용 세포치료제에 함유되는 CD34 양성세포 및 CD34 음성세포는 일정비로 서로 혼합되어야 최대의 발모유도효능을 나타낼 수 있다. 따라서 상기 두 종의 세포의 혼합비율은 100:1 내지 1:100일 수 있으며, 바람직하게는 50:1 내지 1:50, 더욱 바람직하게는 20:1 내지 1:20, 가장 바람직하게는 1:2 내지 1:5일 수 있다. 일 회 투여량은 1일 당 $10^4 \sim 10^8$ 개의 세포를 함유하도록 할 수 있으나, 상기의 양은 당해 기술분야에 속하는 전문가에 의해 결정될 수 있으며, 투여자의 탈모상태 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해서도 다양하게 처방될 수 있다. 또한, 투여 횟수는 일 회 또는 피험자의 상태에 따라 수 회 투여할 수 있다.
- <39> 본 발명의 인간 지방조직 유래 성체 줄기세포는 두피조직유래 모낭세포와 혼합하여 제조할 수 있다.
- <40> 본 발명의 발모유도용 세포치료제에 함유되는 인간 지방조직 유래 성체 줄기세포는 일정비로 두피조직 모낭세포와 혼합되어야 최대의 발모유도효능을 나타낼 수 있다. 따라서 상기 두 종의 세포의 혼합비율은 100:1 내지 1:100일 수 있으며, 바람직하게는 50:1 내지 1:50, 더욱 바람직하게는 20:1 내지 1:20, 가장 바람직하게는 1:9 내지 9:1일 수 있다. 일 회 투여량은 1일 당 $10^4 \sim 10^8$ 개의 세포를 함유하도록 할 수 있으나, 상기의 양은 당해 기술분야에 속하는 전문가에 의해 결정될 수 있으며, 투여자의 탈모상태 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해서도 다양하게 처방될 수 있다. 또한, 투여 횟수는 일 회 또는 피험자의 상태에 따라 수 회 투여할 수 있다.
- <41> 본 발명의 발모유도용 세포치료제에 함유된 인간 지방조직 유래 성체 줄기세포는 체내에 투여한 후 지방세포로 분화하여 함께 혼합투여한 모낭세포가 발모 기능을 원활하게 수행하도록 혈관생성 등의 간접적 역할로 발모효능에 상승적 효과를 유도할 수 있으며, 또한, 모낭세포 자체로 분화하여 발모기능에 직접적으로 관여할 수 있다.
- <42> 본 발명은 다른 관점에서 인간 지방세포 유래 성체 줄기세포 및 두피조직 유래 모낭세포를 유효성분으로 함유하는 탈모치료제 및 무모증치료제에 관한 것이다.
- <43> 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.
- <44> 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.
- <45> 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.
- <46> 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.
- <47> 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.

<48> 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.

<49> 본 발명의 발모유도용 세포치료제, 탈모치료제 및 무모증치료제와 함께 이용될 수 있는 약물제제는 피나스테라이드(Finasteride), 두타스테라이드, 싸이옥톨(Cyootol) 및 RU58841를 포함하는 남성 호르몬 또는 DHT 유발 억제제, 부갑상선 호르몬(PTH) 억제제, 미녹시딜, 버셀린(Burserelein), 혈액순환 개선제 및 메소테라피에 응용되는 조성물 등을 들 수 있으며, 수술요법으로는 모발이식, 두피 피관술, 두피 축소술 등을 들 수 있다.

<50> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

<51> **실시예 1: 인간 지방조직에서 다분화능 줄기세포의 분리**

<52> 서울대학교 유방암센터에서 분양받은 여성의 유방조직에서 지방조직을 분리하여 PBS로 세척한 다음, 조직을 잘게 자른 후 콜라겐분해효소 타입1 (1 mg/ml)을 첨가한 DMEM배지를 사용하여 37°C에서 2시간 동안 분해하였다. 다음으로, PBS로 세척한 후, 1000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액은 제거하고 바닥에 남은 펠렛은 PBS로 세척한 후 1000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 100 μm 매쉬를 사용하여 부유물을 제거한 다음, PBS로 다시 세척하였다. DMEM(10% FBS, 2 mM NAC, 0.2 mM 아스코르브산)배지에서 배양하고, 하룻밤 지난 후 배양용기 바닥에 부착되지 세포들은 PBS로 세척하고, 2 mM NAC, 0.2 mM 아스코르브산, 0.09 mM 칼슘, 5 ng/ml rEGF, 50 μg/ml BPE, 5 μg/ml 인슐린 및 74 ng/ml 하이드로코티손을 함유한 케라티노사이트-SFM 배지를 2일마다 교체하면서 배양하여 다분화능 줄기세포를 분리하였다 (도 1).

<53> **실시예 2: 지방 유래 다분화능 줄기세포의 면역학적 특성**

<54> 실시예 1에서 수득한 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 PBS로 세척하고, 트립신으로 처리한 다음, 세포를 수거하여 5분 동안 1000rpm으로 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 2% FBS 및 PBS의 혼합액을 넣어서 세척한 후 1000rpm으로 5분동안 원심분리하였다. 상층액을 버린 후 세포를 PBS에 부유시켜 각 샘플에 대해 1×10⁵ 개의 세포를 분주하였다. 각 세포에 대해서는 항체(R-phycoerythrin-conjugated mouse anti-human monoclonal antibody)를 첨가하여 얼음에서 40분 동안 방치하여 결합을 유도하였다. 반응이 종결되면 1000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤, PBS로 2회 세척하였다. 세척 후에는 최종적으로 1% 파라포름알데하이드를 첨가하여 고정하고, FACS방법을 통하여 얻어진 다분화능 줄기세포의 표면항원을 분석하였다 (표 1).

표 1

표면항원	AD-MSCs
CD73	+
CD90	+
CD29	+
CD44	+
CD105	+
CD33	-
CD34	-
CD45	-
CD4	-
CD31	-
CD62p	-
CD14	-
HLA-DR	-

<56> 그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 인간 지방조직 유래 성체 줄기세포는 CD73에 대해서는 91%, CD90

에 대해서는 97%, CD29에 대해서는 96%, CD44에 대해서는 83%, CD105에 대해서는 80%의 양성반응을 보였다. 또한, 다른 항원에 대한 면역표현형을 확인한 결과, CD33, CD34, CD45, CD4, CD31, CD62p, CD14 및 HLA-DR에 대하여 모두 음성의 면역학적 특성을 나타내었다.

<57> **실시예 3: 인간 지방조직 다분화능 줄기세포의 스피어(sphere) 형성**

<58> 실시예 1에서 수득된 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 10 μM CORM-2, 5ml antibiotic antimycotic solution(100X), 1 μg/ml 하이드로코티손, 5 μg/ml 인슐린, 20 ng/ml EGF, 40 ng/ml FGF, B27 및 β-말캅토에 탄올을 함유한 무혈청 MEBM 배지를 함유하는 6웰 세포배양기의 각 웰에 5×10⁴~1×10⁵ 개/ml의 세포를 분주하여 배양한 결과, 3 ~ 7일째부터 스피어(sphere)를 형성하기 시작하였고, 도 2 및 도 3에 나타난 바와 같이, 7 ~ 10 일째에도 줄기세포가 증식해서 스피어를 형성하였다.

<59> 한편, 실시예 1에서 수득된 줄기세포 5×10⁴ 개/ml을 24웰 세포배양용기의 각 웰에 분주한 다음, 계대 횟수에 따라 스피어수를 조사하였다 (표 2). 그 결과, 표 2에 나타난 바와 같이, 스피어를 계대함으로써 장기간 증식 및 세포 분화성질의 유지가 가능하다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도4에 나타난 바와 같이, Oct4가 양성 발현하는 것으로 보아 미분화 상태를 유지하며 우수한 증식율을 가진다는 것을 알 수 있었다.

표 2

계대수(Passage number)	스피어 수
1	270
2	260
3	271

<61> **실시예 4: 인간 지방조직 유래 줄기세포의 면역염색분석**

<62> 상기 실시예 4에서 수득된 인간 지방조직 유래 줄기세포 스피어를 PBS로 세 번 세척하고, 4% 파라포름알데하이드를 함유한 PBS로 30분간 고정하였다. PBS로 세 번 세척한 후, 0.1% Triton- X100을 함유한 PBS로 10분간 침투(permeabilization)시킨다. PBS로 세 번 세척한 후, 10% NGS로 1시간동안 반응시키고, 1차 항체를 함유한 PBS에 하룻밤 동안 반응시킨다. PBS로 3회 세척하고, 2차 항체로 암실에서 1시간동안 반응시켰다. PBS로 세 번 세척한 후, 마운팅하였다.

<63> 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 다분화능 줄기세포 스피어는 신경 전구세포의 마커라고 할 수 있는 네스틴 및 미분화상태의 세포 마커라고 할 수 있는 Oct4 및 중간엽 줄기세포의 마커인 SH2(CD105) 및 SH3/4(CD73)에 대하여 모두 양성반응을 나타내었다.

<64> **실시예 5: 지방 유래 다분화능 줄기세포의 지방세포로의 분화**

<65> 실시예 1에서 수득한 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 5% FBS, 1μM 텍사메타손, 200 μM 인도메타신, 10μg/ml 인슐린, 0.5mM IBMX(3-isobutyl-1-methylxanthine)을 함유한 α-MEM 배지에서 2주 동안 배양하여 다분화능 줄기세포의 지방세포로의 분화를 유도하고, Oil red O 염색법을 이용하여 분석하였다. 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포가 지방세포로 분화된 것을 확인할 수 있었다.

<66> **실시예 6: 두피조직유래 모낭세포의 배양**

<67> 두피유래 조직을 세절한 다음, 콜라게나아제 타입 IA가 함유된 배지(10% 우태아혈청(Gibco, USA), 100 unit의 페니실린, 0.1 mg/ml의 스트렙토마이신, 0.25 μg/ml의 네오마이신(Gibco, USA), 100 μg/ml의 노르모신(Invivogen, USA)이 함유된 DMEM(Gibco, USA) 및 2 mg/ml의 콜라게나아제 타입 IA(Sigma, USA)이 첨가된 배지)에 넣어 130 m/min, 37°C에 30분 동안 반응시켰다. 효소분해된 조직을 원심분리로 수거하여 PBS로 3번 세척한 다음, M199/F12 혈청배지(1:1의 M199 및 F12, 0.62 μg/ml의 인슐린(Sigma, USA), 0.62 μg/ml의 트랜스페린(Gibco, USA), 100 unit의 페니실린, 0.1 mg/ml의 스트렙토마이신, 0.25 μg/ml의 네오마이신(Gibco, USA), 10 ng/ml의 rEGF(Sigma, USA), 10 ng/ml의 bFGF(Sigma, USA), 100 μg/ml의 노르모신(Invivogen, USA), 10% 우태아혈청 및 1mM의 N-아세틸-L-시스테인(Sigma, USA)을 첨가한 배지)에서 조직배양을 하였다. 약 3일 후부터 조직들이 배양용기 바닥에 부착되기 시작하면, M199/F12 무혈청 배지로 교체하여 1주일간 배양하고, 노르모신이 없는 케라티노사이트 무혈청 배지{0.2 mM 아스코르빈산(Sigma, USA)을 첨가한 케라티노사이트 무혈청 액상배지(Gibco

cat# 10785012), USA}로 교체하여 배양하였다.

<68> **실시예 7: MACS를 통한 두피조직유래 모낭세포의 분류**

<69> 상용화 되어있는 MACS(Magnetic Cell Sorting, Miltenyi Biotec Inc., Germany)를 이용하여 CD34 양성세포를 분리하였다. 실시예 1에서 얻어진 세포를 수거하여 세척한 다음, 배지를 첨가하여 피펫팅으로 단일세포로 부유시키고 150 ~ 300 μ l MACS 버퍼와 50 ~ 100 μ l 블로킹 리전트, 50 ~ 100 μ l 마이크로 비드를 순서대로 첨가하였다. 상기 혼합액을 제조하는 과정은 암상태에서 수행하였으며, 혼합액이 담긴 튜브는 알루미늄 호일로 싸고, 4 $^{\circ}$ C에서 30분 내지 4시간동안 반응시켰다. 그 후에 알루미늄 호일을 벗기고 혼합액의 약 10배 부피의 MACS 버퍼를 튜브에 추가하고 피펫으로 잘 섞어준 후 1200 rpm에서 5 ~ 6분간 원심분리하고, 상층액은 제거하였다. 500 μ l MACS 버퍼를 세포의 수에 맞게 첨가한 다음, CD34 양성세포와 CD34 음성세포를 제조사가 권장하는 방법에 따라 MACS를 사용하여 분리하였다. 이때 수거된 CD34 양성세포의 세포수는 약 $1 \sim 2 \times 10^7$ 이었으며, 멸균생리식염수 100 μ l에 재부유시켜 추후의 동물실험에 사용하였다.

<70> **실시예 8: 두피조직유래 모낭세포의 발모치료 효과**

<71> 6주령의 수컷 BALB/cAnNCrjBginu 누드마우스((주)중앙실험동물, 대한민국)에 표 3의 구성으로 두피조직유래의 각 세포를 투여하여 발모효과를 관찰하였다. 본 실험에 사용된 67마리의 누드마우스는 서울대학교 수의과대학 실험동물사육실 내 SPF 구역에서 사육하였으며, 무작위법으로 각각 5마리씩이 포함되도록 군을 분리하여 실험을 수행하였다. 시험군의 구성은 아래 표와 같다 (표 3).

표 3

<72>

그룹	세포수	마리수	
대조군	무처치(CS)	NA	5
	식염수투여(CN)	NA	5
CD34양성 단독투여군	저용량(NL)	1×10^4	5
	중용량(NM)	1×10^5	5
CD34음성 단독투여군	저용량(PL)	1×10^4	5
	중용량(PM)	1×10^5	5
CD34양성/CD34음성 혼합투여군	2:1(T1)	$6.6 \times 10^4 : 3.3 \times 10^4$	5
	1:1(T2)	$5 \times 10^4 : 5 \times 10^4$	5
	1:2(T3)	$3.3 \times 10^4 : 6.6 \times 10^4$	5
	1:4(T4)	$2 \times 10^4 : 8 \times 10^4$	5
	1:8(T5)	$1.1 \times 10^4 : 8.8 \times 10^4$	5

<73> 또한, 상용되는 탈모치료제 미녹시딜(Minoxidil, Pfizer, USA)를 배양된 세포와 병합 사용하여 발모효과를 평가하기 위해 각 군당 3마리의 마우스가 포함되도록 하여 표 1과 대비되는 실험군을 편성하였다 (표 4).

표 4

<74>

그룹	세포수	마리수	
미녹시딜 대조군(MC)	NA	3	
미녹시딜 처치군	CD34양성 단독투여군(MP)	1×10^5	3
	CD34음성 단독투여군(MN)	1×10^5	3
	CD34양성/CD34음성 혼합투여군(MT)	$5 \times 10^4 : 5 \times 10^4$	3

<75> 상기 실험군에 모낭세포를 투여하기 하루 전 칼슘티오글라이코레이트(Sigma, USA)로 실험동물의 잔털들을 제거

했고 투여한 후 30일 동안 실험동물의 두피를 관찰하였다. 매일 발모 유도 점수를 구분하여 기록하였고, 실험 시작 전과 종료시점에 동물의 체중을 측정하고, 실험 종료 후 31일째에 부검을 실시하였다.

<76> 각 실험동물의 상태에 관한 자료의 통계학적 분석을 위하여 원-웨이 ANOVA를 실시하여 군간 유의성을 검정하였고, 유의성이 인정되면 Dunnett's t-test를 실행하여 대조군 실험군 간의 통계학적 유의성을 검정하였다 ($p < 0.05$).

<77> 발모효능은 실험개시 24일 이후에 대부분 최대를 나타내었으며, 모낭세포 혼합군인 T3군에서 발모개시효과가 가장 빠르게 나타났다. 또한, 미녹시딜과 혼합투여군(MT)에서도 이와 유사한 효과를 보였으나, 24일 이후의 효능에서는 T3가 월등히 높은 것으로 나타났으며, 모낭 세포 투여 후 14일째, 21일째 및 28일째에서 발모효과를 사진으로 기록하였다 (도6, 도7 및 도8).

<78> **실시예 8: 줄기세포의 발모치료 효과**

<79> 6주령의 수컷 BALB/cAnNCr jBginu 누드마우스((주)중앙실험동물, 대한민국)에 표 3의 두피조직유래의 각 세포와 지방조직유래 줄기세포를 일정 비율로 혼합 투여하여 동물에서의 발모효과를 관찰하였다. 사용하는 마우스는 실시예 1과 동일하게 서울대학교 수의과대학 실험동물사육실 내 SPF 구역에서 사육하고, 무작위법으로 각각 5마리씩이 포함되도록 군을 분리하여 실험을 수행하였으며, 미녹시딜 첨가군을 포함시켜 세포치료제와의 발모효능을 비교한 결과, 본 발명에 따른 인간 지방세포 유래 줄기세포 및 두피조직 유래 모낭세포 혼합군에서 대조군(모낭 세포 단독투여군)에 비해 월등한 발모효과를 관찰할 수 있었으며, 이 때 최적의 발모효과를 위한 본 발명의 줄기세포와 모낭세포의 혼합비는 약 1:9 내지 9:1인 것으로 확인되었다.

발명의 효과

<80> 이상 상세히 기술한 바와 같이, 본 발명은 인간 지방조직 유래 성체 줄기세포, 및 CD34 양성 및/또는 음성세포를 함유하는 두피조직 유래 모낭세포가 일정 혼합비율로 함유되어 있는 발모유도용 세포치료제에 관한 것이다.

<81> 본 발명에 따른 발모유도용 세포치료제는 모낭형성이 정상적으로 이루어지지 않아 발생하는 탈모증 및 무모증과 같은 증상에 적용하여 발모의 효능을 이끌어 내는데 유용하다.

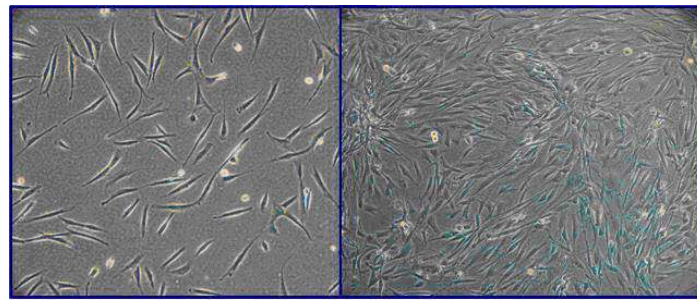
<82> 이상으로 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면의 간단한 설명

- <1> 도 1은 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 100배 배율로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.
- <2> 도 2는 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 스피어배양한 다음, 7일 후에 형성된 스피어를 200배 배율로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.
- <3> 도 3은 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 스피어배양한 다음, 12일 후에 형성된 스피어를 200배 배율로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.
- <4> 도 4는 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포를 CORM-2 함유 배지에서 배양한 후 면역염색한 결과를 100배의 배율로 관찰한 형광사진이다.
- <5> 도 5는 본 발명에 따른 인간 지방조직 유래 다분화능 줄기세포로부터 분화된 지방세포를 200배 배율로 관찰한 결과를 나타낸 것이다.
- <6> 도 6, 도 7 및 도 8은 발모유도용 모낭세포를 각 동물실험군에 주사한 후 각각 14일, 18일 및 21일째의 군별 발모효과를 관찰한 결과이다.

도면

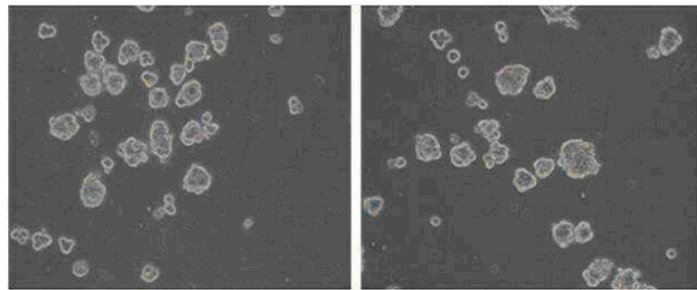
도면1



Day 1

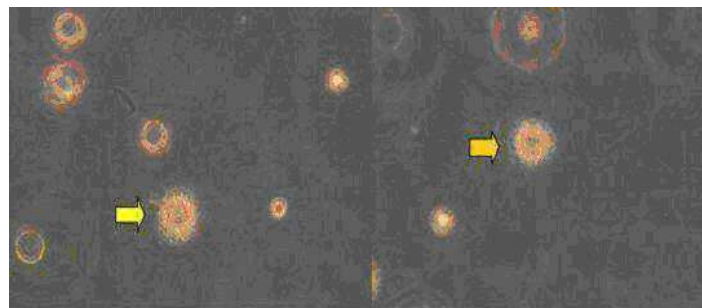
Day 4

도면2



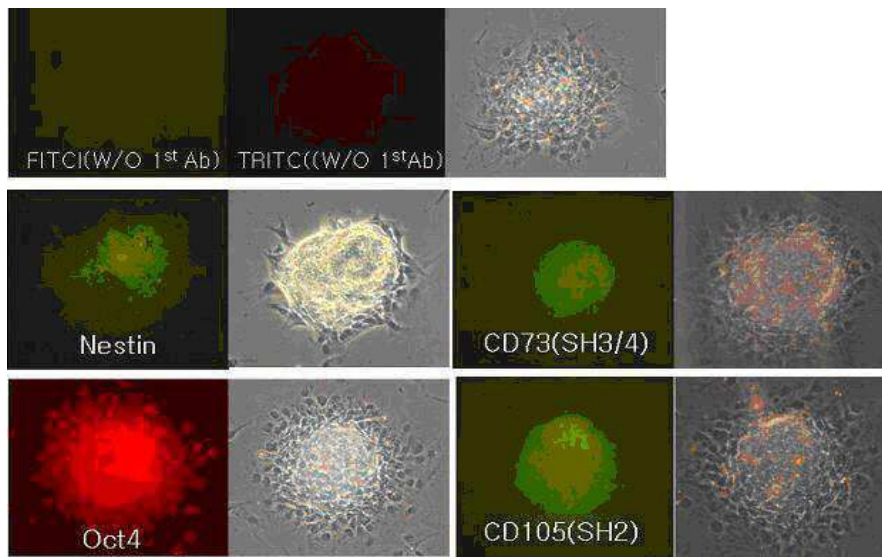
7 days

도면3

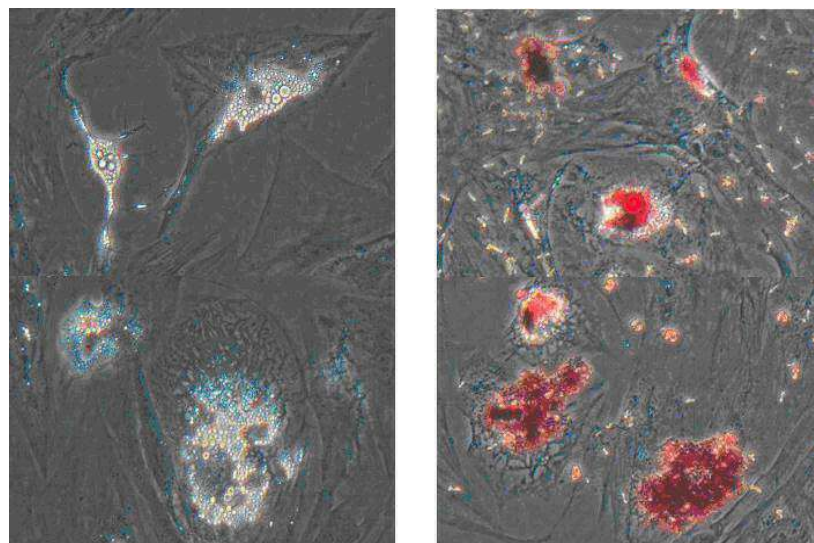


Day 12

도면4



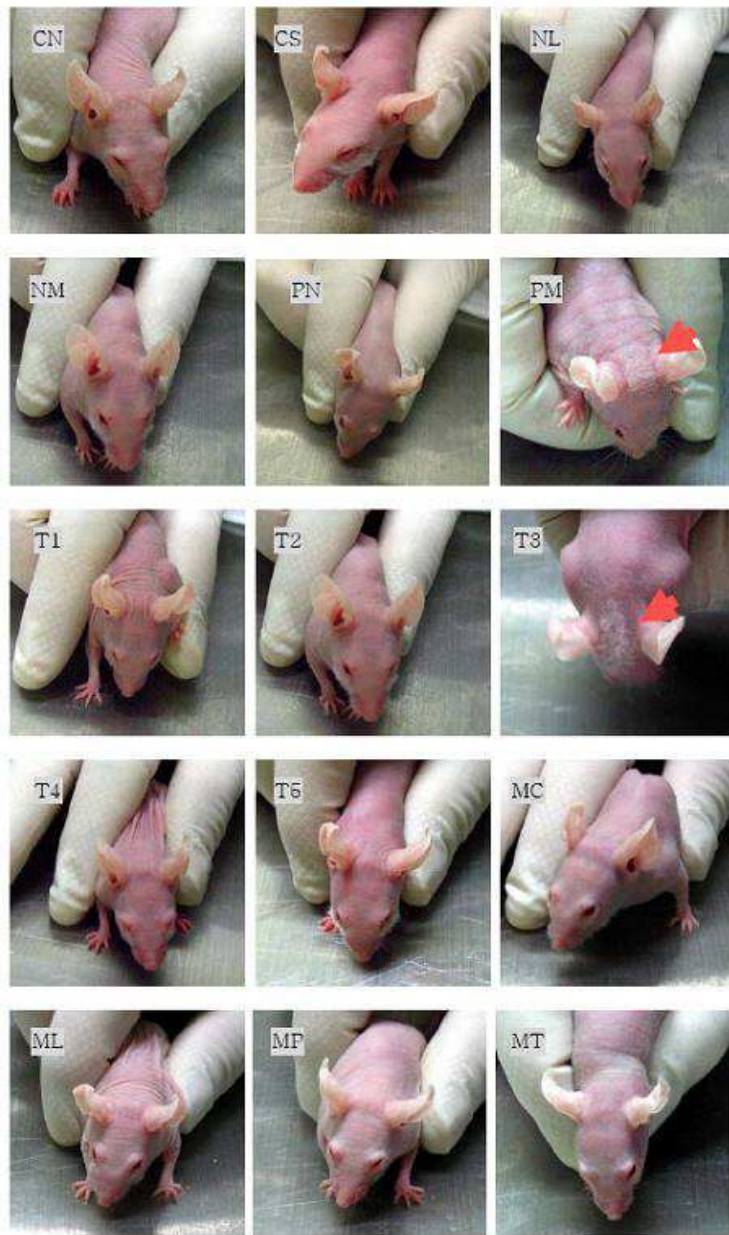
도면5



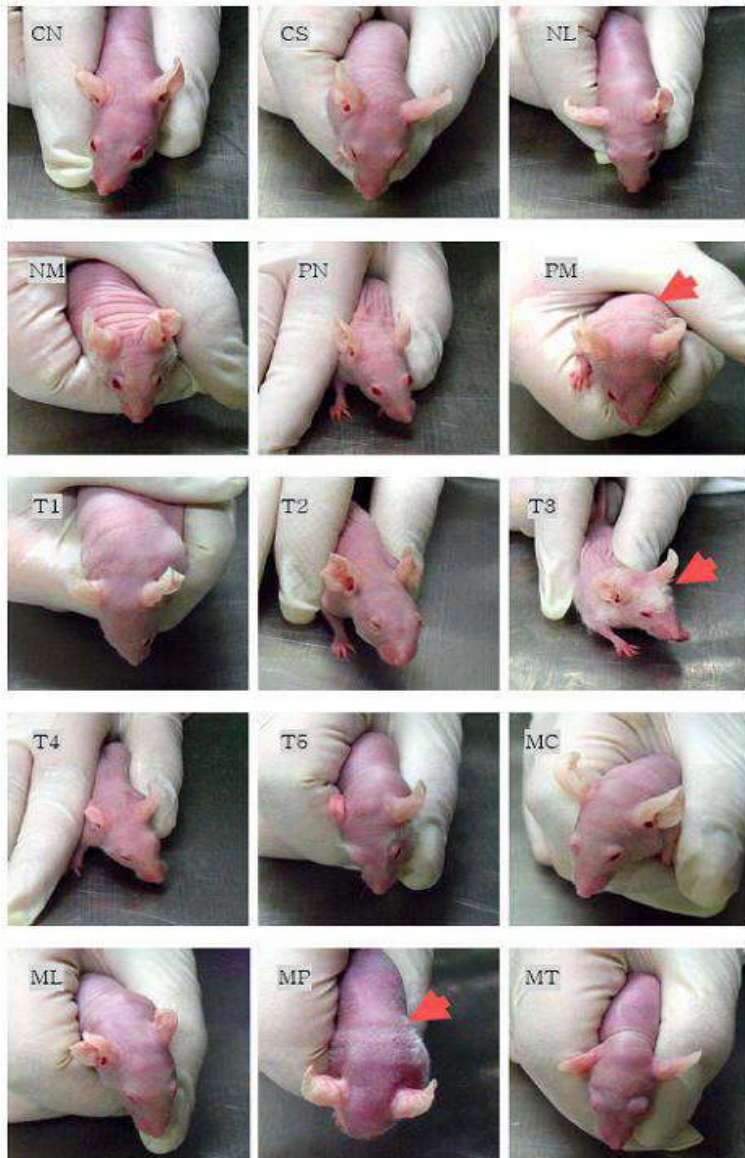
(A) Phase contrast

(B) Oil Red O stain

도면6



도면7



도면8

