

SC13111

세포응용연구사업
Stem Cell Research

피부성체줄기세포의 특성연구와 인공피부의 배양

Study on characteristics of skin stem cells and culture of LSE

서울대학교

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 과학기술부 특정연구개발사업 21세기프론티어연구개발사업 중 과학기술부가 지원하는 세포응용연구사업단 “피부성체줄기세포의 특성연구와 인공피부의 배양” 과제의 단계보고서로 제출합니다.

2005. 5. 27

주관연구기관명 : 서울대학교

주관연구책임자 : 박 경 찬

연 구 원 : 김 동 석 외 11명

보고서 초록

과제관리번호	SC13111	해당단계 연구기간	'02.10.1~ '05.3.31	단계 구분	(1단계) / (3단계)
연구사업명	중 사업명	21세기프론티어연구개발사업			
	세부사업명	세포응용연구사업			
연구과제명	피부성체줄기세포의 특성연구와 인공피부의 배양				
연구책임자	박경찬	해당단계 참여연구원수	총 : 13 명 내부 : 명 외부 : 명	해당단계 연구비	정부: 200,000 천원 기업: 천원 계: 200,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	서울의대 피부과		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서 면수	24
<p>피부의 각질형성세포는 사람에게 가장 쉽게 얻을 수 있는 성체줄기세포로서 이 세포의 생물학적 특성을 연구하기 위한 노력이 세계적으로 여러 연구자에 의하여 시도되고 있으나 아직 정확한 특성 구명이 되지 않은 상황임. 이 과제에서는 피부로부터 성체줄기세포를 분리하고 그 특성을 연구하였고, 배양된 줄기세포를 이용하여 인공피부를 배양하여 특성을 연구함으로써 성체줄기세포의 특성을 간접적으로 분석하였음.</p> <p>본 연구의 결과 제4형 콜라겐에 잘 달라붙는 성질을 이용하여 표피의 각질형성세포로부터 줄기세포를 분리해 내었음. 줄기세포를 확인하기 위하여 alpha6 integrin 과 anti-CD71 항체를 사용하여 유세포 분석을 실시하였음. 웨스턴 분석결과 줄기세포는 서서히 분열하고 p63을 발현하는 것으로 확인되었음. 표피의 재생능력을 확인하기 위하여 줄기세포와 비줄기세포를 비교하여 인공피부를 만든 결과, 줄기세포를 가지고 실험한 군에서 완성도가 높은 인공피부를 관찰할 수 있었음. 그러므로, 이러한 간단한 방법을 이용한 줄기세포의 분리는 쉽게 많은 수의 줄기세포를 제공하기 때문에 임상적용에 강력한 방향을 제시함.</p> <p>사람의 피부성체줄기세포의 분리는 임상적용에 결정적인 역할을 함. 따라서 본 연구과제를 통하여 개발한 “피부성체줄기세포의 분리방법”을 이용하여 줄기세포를 분리하고 이를 이용한 세포치료제를 개발하려 함. 분리된 피부줄기세포를 이용한 인공피부 배양 기술을 바탕으로 빠른 시일 내에 임상허가를 획득하고자 하며 인공피부 이외에도 여러 가지 피부세포의 자가세포치료술 등을 시도하고자 함.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	피부, 줄기세포, 각질형성세포, 인공피부, 모낭			
	영 어	skin, stem cells, keratinocytes, living skin equivalent, hair follicle			

요 약 문

I. 제 목

피부성체줄기세포의 특성연구와 인공피부의 배양

II. 연구개발의 목적 및 필요성

피부의 각질형성세포는 사람에게 가장 쉽게 얻을 수 있는 성체줄기세포로서 이 세포의 생물학적 특성을 연구하기 위한 노력이 세계적으로 여러 연구자에 의하여 시도되고 있으나 아직 정확한 특성 구명이 되지 않은 상황이다. 이 과제에서는 피부로부터 성체줄기세포를 분리하고 그 특성을 연구하였다. 또한 배양된 줄기세포를 이용하여 인공피부를 배양하여 특성을 연구함으로써 성체줄기세포의 특성을 간접적으로 분석하였다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

피부로부터 성체줄기세포를 분리, 배양하고 특성을 규명한다. 또한 배양된 줄기세포를 이용하여 인공피부를 배양한다. 모발에서 모낭줄기세포를 분리하고 피부의 성체줄기세포와 모발의 성체줄기세포의 차이를 규명한다. 조직공학기법의 안정화를 추구하며 또한 세포배양방법을 개선하여 임상에 적용할 수 있는 세포치료술을 개발한다.

IV. 주요 연구개발결과

본 연구의 결과 제4형 콜라겐에 잘 달라붙는 성질을 이용하여 표피의 각질형성세포로부터 줄기세포를 분리해 내었다. 줄기세포를 확인하기 위하여 alpha6 integrin 과 anti-CD71 항체를 사용하여 유세포 분석을 실시하였다. 웨스턴 분석결과 줄기세포는 서서히 분열하고 p63을 발현하는 것으로 확인되었다. 표피의 재생능력을 확인하기 위하여 줄기세포와 비줄기세포를 비교하여 인공피부를 만든 결과, 줄기세포를 가지고 실험한 군에서 완성도가 높은 인공피부를 관찰할 수 있었다. 그러므로, 이러한 간단한 방법을 이용한 줄기세포의 분리는 쉽게 많은 수의 줄기세포를 제공하기 때문에 임상적용에 강력한 방향을 제시하여 준다.

V. 연구개발결과의 활용계획

사람의 피부성체줄기세포의 분리는 임상적용에 결정적인 역할을 한다. 따라서 본 연구 과제를 통하여 개발한 “피부성체줄기세포의 분리방법”을 이용하여 줄기세포를 분리하고 이를 이용한 세포치료제를 개발하려고 한다. 분리된 피부줄기세포를 이용한 인공피부 배양기술을 바탕으로 빠른 시일 내에 임상허가를 획득하고자 하며 인공피부 이외에도 여러 가지 피부세포의 자가세포치료술 등을 시도하고자 한다.

S U M M A R Y

I. Title

Study on characteristics of skin stem cells and culture of LSE

II. Aimes and Necessity of Research

Keratinocytes of the skin is the adult stem cell which we can get easily from human. Many researchers tried to study the characteristics of adult stem cells from the skin but exact nature is not characterized well yet. In this study, we tried to isolate adult stem cells from the human skin and analyze the characteristics of adult stem cells from the skin. In addition, we cultured the living skin equivalent using three dimensional culture technique which is known as tissue engineering technology.

III. Contents of Research

We tried to isolate and culture adult stem cells from the human skin and analyze the characteristics of them. Then the living skin equivalent was cultured using three dimensional culture technique. In addition, we isolated hair follicle stem cells and analyzed the differences between epidermal stem cells and hair follicle stem cells. Furthermore, the characteristics of skin and hair stem cells were compared to know changes of characteristics of epithelial cells during epithelial differentiation. Stabilization of tissue engineering technique is very important to prepare ideal tissue engineering products. In addition, new culture methods have to be developed to introduce cell therapy for chronic intractable diseases.

IV. Major Results

We isolated stem cell populations of epidermal keratinocytes according to their ability to adhere to collagen type IV. To identify stem cells, flow cytometric analysis was performed using anti- $\alpha 6$ integrin and anti-CD71 antibodies. Western blot analysis showed that stem cells are slow cycling and express p63. To compare epidermal regenerative abilities, skin equivalents (SEs) were made using stem and non-stem cells. The epidermis constructed from stem cells was well formed compared to those formed from non-stem cells. Therefore, the isolation of stem cells using a simple technique offers a potential route to their clinical application, because they are easily isolated and provide a high yield of epidermal stem cells.

V. Application Plan of Research Results

The isolation of human epidermal stem cells is critical for their clinical applications. Thus, we are going to isolate epidermal stem cells according to the unique isolation method from this research and to develop cell therapy using the stem cells. Furthermore, we will obtain FDA approval about the clinical application of epidermal stem cells in the near future and try to perform autologous cell therapy with several types of skin cells including stem cells.

C O N T E N T S

Chapter 1. Introduction of Research Task	8
Chapter 2. The Present State of Technique Development at Home and Abroad	10
Chapter 3. Contents and Results of Research Achievement	12
Chapter 4. Achievement Rate and Contribution Rate to Related Areas	20
Chapter 5. Application Plan of Research Results	22
Chapter 6. Overseas Information of Science and Technology	23
Chapter 7. References	24

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	8
제 2 장 국내외 기술개발 현황	10
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	12
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	20
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	22
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	23
제 7 장 참고문헌	24

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구목적

피부의 각질형성세포는 사람에게 가장 쉽게 얻을 수 있는 성체줄기세포로서 이 세포의 생물학적 특성을 연구하기 위한 노력이 세계적으로 여러 연구자에 의하여 시도되고 있으나 아직 정확한 특성 구명이 되지 않은 상황이다. 이 과제에서는 피부로부터 성체줄기세포를 분리하고 그 특성을 연구하고자 한다. 또한 배양된 줄기세포를 이용하여 인공피부를 배양하여 특성을 연구함으로써 성체줄기세포의 특성을 간접적으로 분석하고자 한다.

제 2 절 연구개발의 필요성

1. 연구개발의 중요성

가. 기술적 측면

(1) 피부성체줄기세포의 특성에 대한 연구

피부의 각질형성세포는 사람에서 가장 쉽게 얻을 수 있는 성체줄기세포로서 이 세포의 생물학적 특성을 연구하기 위한 노력이 세계적으로 여러 연구자에 의하여 시도되고 있으나 아직 정확한 특성 규명이 되지 않은 상황이다. 또한 여러 가지 방법을 이용한 줄기세포 분리방법이 시도되고 있으나 아직 정확한 표식자도 알려지지 않은 실정에 있다.

(2) 인공피부의 배양

인공피부는 화상이나 창상 등에 사용되는 조직공학제품으로 피부의 성체줄기세포를 이용하여 배양할 수 있는 장기이며 이미 임상에서 제한적으로 사용되고 있다. 인공피부는 1998년 미국 FDA의 허가를 받았으나 아직 보편적으로 사용되기에는 어려운 점이 많고 보관의 문제, 감염성 인자의 전파 문제 등으로 인하여 수입도 어려운 실정이다. 인공피부와 함께 인공피부모델은 화장품이나 국소약물 등의 독성검사 모델 혹은 효능검사 모델로 사용되며 앞으로 여러 가지 측면에서 활용 가능성이 매우 크다.

나. 경제·산업적 측면

줄기세포의 연구를 통하여 효용성이 기대되는 분야는 유전자치료와 조직공학분야이다. 피부의 성체줄기세포는 배양이 용이하며 피부에 착상 가능하고 용이하게 제거할 수 있기 때문에 유전자치료에서 약물전달시스템으로의 가능성이 매우 높다고 생각된다. 따라서 본 연구팀에 의하여 피부성체줄기세포의 특성에 대한 연구가 진행된다면 이를 이용하여

유전자치료로의 확대적용 가능성이 매우 크리라 생각된다.

다음으로 피부의 성체줄기세포를 이용하여 배양할 수 있는 조직공학 산물인 인공피부는 이미 초기 임상적용이 이루어졌으며 국내에서도 이에 대한 연구가 진행되고 있다. 아직은 보관상의 어려움, 착상율이 낮은 점 등 여러 가지 문제점이 있어 이를 개선하기 위한 연구가 필요하며 본 연구팀도 곧 임상적용에 들어갈 예정이다. 그러나 현재 배양되고 있는 인공피부는 표피와 진피로 구성된 초보적인 형태이므로 사람의 피부와 같은 완전한 인공피부가 되기 위해서는 인공모발의 개발 등 앞으로도 많은 연구가 필요한 실정이다. 이러한 연구를 위해서는 현재와 같은 성체피부줄기세포에 대한 연구와 함께 전분화능 줄기세포에 대한 연구도 병행되어야 하리라 생각된다. 조직공학제품은 부가가치가 매우 높은 분야로서 생명공학제품의 생산을 통하여 경제기여의 효과가 크게 기대된다.

다. 사회·문화적 측면

국민소득 향상 및 첨단의료의 제공이 가능하게 될 것이며 국민의 요구에 부응하는 의료복지 향상에 기여할 것이다.

제 3 절 연구개발의 범위

1. 연구의 내용

피부로부터 성체줄기세포를 분리, 배양하고 특성을 규명한다. 또한 배양된 줄기세포를 이용하여 인공피부를 배양한다. 모발에서 모낭줄기세포를 분리하고 피부의 성체줄기세포와 모발의 성체줄기세포의 차이를 규명한다. 멜라닌세포를 분리, 배양하여 멜라닌세포를 포함한 인공피부를 배양하고 이를 응용하여 세포치료술을 개발한다. 냉동방법의 개발과 조직공학기법의 안정화를 추구하며 또한 세포배양방법을 개선하여 임상에 적용할 수 있는 세포치료술을 개발한다.

2. 연구의 방법

각질형성세포의 배양, 섬유모세포의 배양, dermal sheath cell의 배양, dermal papilla cell의 배양, hair follicle bulge cell의 분리, 표피와 모발로부터 RNA를 분리하거나 배양된 세포로부터 RNA를 분리하여 DNA chip 등의 방법을 사용하여 분화에 따른 유전자 발현의 차이를 분석한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 국외 기술개발 현황

1. 피부의 성체줄기세포에 대한 연구

세계적으로 피부의 성체줄기세포에 대한 연구는 일부 연구자에 의하여 진행되고 있는데 이태리의 De Luca 그룹, 호주의 Kaur 그룹 등의 연구자가 피부의 성체줄기세포에 대한 연구를 시행하고 있다. 아직은 피부성체줄기세포의 표식자를 확인하고 분리하는 연구에 주력하고 있으며 최근에는 기존에 알려진 marker 이외에 p63이 피부성체줄기세포의 표식자로 주목받고 있다. 또한 모낭의 줄기세포에 대한 배양방법 등도 활발히 연구되고 있다.

2. 인공피부의 배양

선진 외국에서는 학계 (미국 신시내티 의대 보이스교수, 일본 에히메대학 하시모토 교수 등)는 물론 산업체에서도 인공피부를 개발 및 상업화하고 있으며 또한 피부모델을 제조하여 시판하고 있다 (Mattek Inc). 미국의 경우 Organogenesis의 Apligraf가 FDA의 공인을 받아 임상에 사용되고 있는데 아직도 착상율이 낮은 등 여러 가지 문제점이 있어 이를 개선하기 위한 연구가 계속되고 있다. 또한 현재의 표피와 진피로 구성된 초보적인 수준을 벗어나 인공모발, 인공피지선 등을 첨가하여 완벽한 인공피부를 만들기 위해서는 앞으로도 많은 연구가 필요하리라 생각된다.

제 2 절 국내 기술개발 현황

1. 피부줄기세포에 대한 연구

국내에 피부성체줄기세포를 연구하는 학자는 많지 않으나 일부 대학에서 다음과 같은 연구가 진행되고 있다.

- 가. 피부성체줄기세포의 표식자로 최근 주목받고 있는 p63에 대한 연구
- 나. 모낭의 줄기세포에 대한 연구
- 다. 멜라닌줄기세포에 대한 연구

2. 피부줄기세포를 이용한 인공피부에 대한 연구

국내에 인공피부를 연구하는 팀 역시 소수에 불과하며 다음과 같은 연구가 진행되고 있다.

- 가. 키토산 포함 진피대체물질에 대한 연구
- 나. 인공피부 및 인공각막모델의 개발
- 다. 콜라겐의 추출 및 콜라겐 유래 진피대체물질에 대한 연구 등

제 3 절 연구결과가 국내외 기술개발 현황에서 차지하는 위치

성체줄기세포의 분리기술은 조직, 재생공학 분야의 근간이 되는 기술로서 연구자들이 최근 연구에서 순수 분리한 피부성체줄기세포는 세포치료제로서 광범위한 화상, 창상, 궤양 등의 피부질환을 치료하는데 응용될 수 있을 뿐만 아니라 탄력성 피부의 재생이나 멜라닌 색소조절에도 응용될 수 있다. 현재 유세포 분석법이 피부성체줄기세포를 분리하는 가장 좋은 방법으로 인식되고 있지만 (Liet *al.*, 2004), 유세포 분석기라는 고가의 장비를 사용하여야 하고, 분석하고 분리하는데 많은 시간이 소모되며, 수득률이 낮고, 분리한 세포들의 생존율이 낮은 문제점이 있다.

연구결과 얻어진 피부성체줄기세포의 분리법은 제4형 콜라겐에 부착성을 갖는 세포를 분리하는 것으로 값비싼 장비나 시약을 사용하지 않고 쉽고 간단하게 줄기세포를 분리할 수 있다. 또한 많은 수의 세포를 분리할 수 있을 뿐만 아니라 세포의 증식률 및 생존율도 최상의 상태를 유지 할 수 있어 피부형성능이 우수하다는 특징을 가지고 있다. 이 기술의 핵심은 피부성체줄기세포에서 발현되는 인테그린에 의한 제4형 콜라겐 부착성을 이용한 것이다.

순수 분리한 피부성체줄기세포는 세포치료제는 물론 조직공학에도 이용할 수 있으며 이는 본 연구진에 의하여 특허 등록된 인공피부의 제조방법에 관한 기술과 연결된다. 즉 여러 가지 형태의 인공피부가 있지만 섬유아세포를 포함한 콜라겐 기질 위에 각질형성세포를 배양할 때, 각질형성세포 대신에 순수 분리한 피부성체줄기세포를 사용하면, 기저층, 유극층, 과립층, 각질층 등 중층화가 잘 발달된 인체의 피부에 아주 가까운 인공피부를 만들어 낸다는 것이 가장 중요한 핵심사항이다. 따라서 이러한 연구결과는 국내외의 조직공학 및 재생의학분야에서 선도적인 위치를 차지할 것으로 기대한다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 성체줄기세포의 특성연구

1. 세포부착방법에 의한 피부성체줄기세포의 분리방법개발 및 특성연구

가. 이론적 접근방법

피부성체 줄기세포는 β 1-integrin을 많이 발현한다는 보고 (Jones and Watt, 1993)에 따라 β 1-integrin을 많이 발현하는 세포를 분리하기 위하여 세포배양 접시를 β 1-integrin과 잘 달라붙는 물질인 제4형 콜라겐으로 코팅하여 피부성체 줄기세포를 분리하려는 시도를 하게 되었다

나. 실험적 접근방법

제4형 콜라겐이 코팅된 용기를 이용하여 세포부착의 시간 차이에 따라 피부성체줄기세포의 분리가 가능할지 실험하였고, 이를 통해 분리된 피부성체줄기세포의 특성연구를 유세포 분석기등의 방법으로 시행하였다.

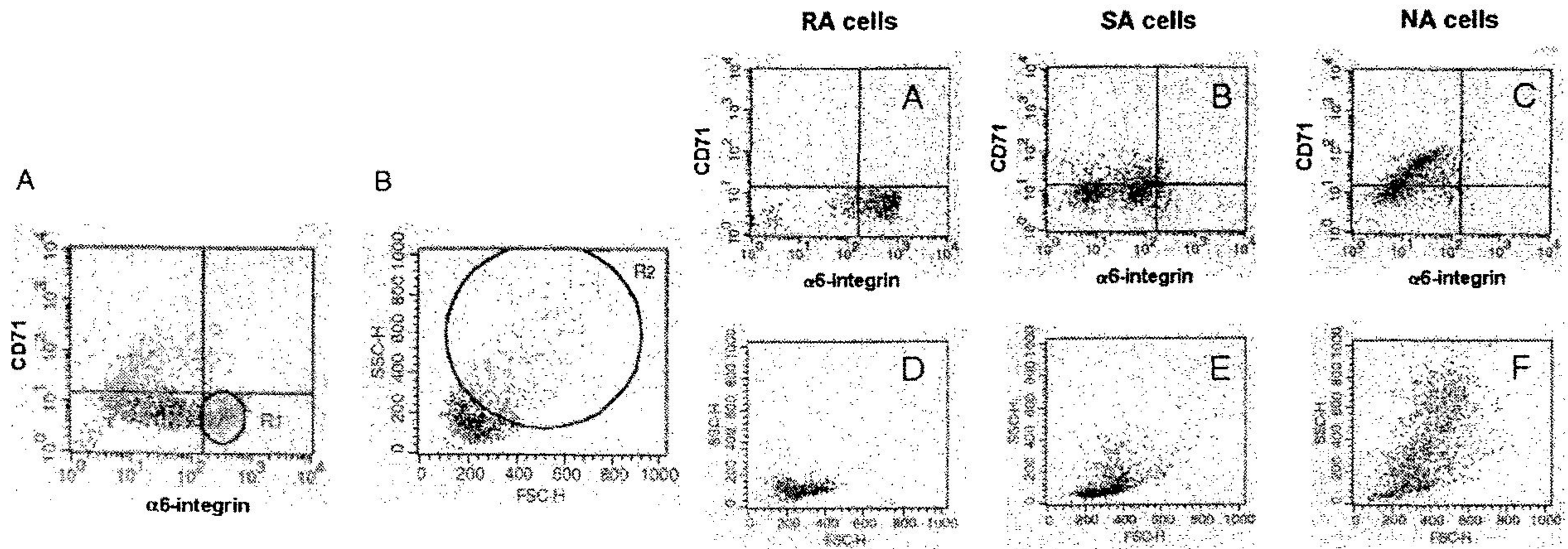


그림1. 세포표면 표식자에 따르는 유세포 분석결과

다. 연구내용 및 결과

실험결과 세포부착시간에 따라 Rapidly Adhering (RA) Cells , Slowly Adhering (SA) Cells, 그리고 Non-Adhering (NA) Cells로 구분할 수 있었으며, 유세포 분석결과 이들은 서로 다른 크기와 granularity를 보여주었을 뿐만 아니라, α 6-Integrin과 CD71의 발현에서도 매우 다른 세포군으로 구분되어 α 6-Integrin을 많이 발현하고 CD71의 발현이 낮은 RA 세포가 줄기세포라는 것을 입증하였고, 피부에서 새로운 줄기세포 분리방법을 확인하였다.

2. p63의 피부성체줄기세포 표지자로의 특성 확인

가. 이론적 접근방법

p53 종양억제유전자의 homologue인 p63은 p63 knock out 생쥐에서 표피의 발달을 저해하여 유력한 표피줄기세포의 표지자로 간주되어 진다 (Pellegrini *et al.*, 2001).

나. 실험적 접근방법

배양용기에 부착되는 시간의 차이에 따라 세포를 분리하여 p63에 대한 웨스턴 블롯을 실시하여 줄기세포에서의 p63의 발현을 관찰 하였다.

다. 연구내용 및 결과

실험결과 줄기세포라고 여겨지는 RA 세포에서는 p63은 물론 integrin $\alpha 6$ 과 p21이 많이 발현하는 것을 관찰할 수 있었으며, 반대로 SA와 NA세포에 있어서는 p63과 integrin $\alpha 6$ 및 p21이 거의 발현을 하지 않아, p63이 피부성체줄기세포의 유력한 표식자임을 보여 주었고 또한 상기 1의 줄기세포 분리방법이 이상적인 분리방법임을 전자현미경을 통하여 확인하였다.

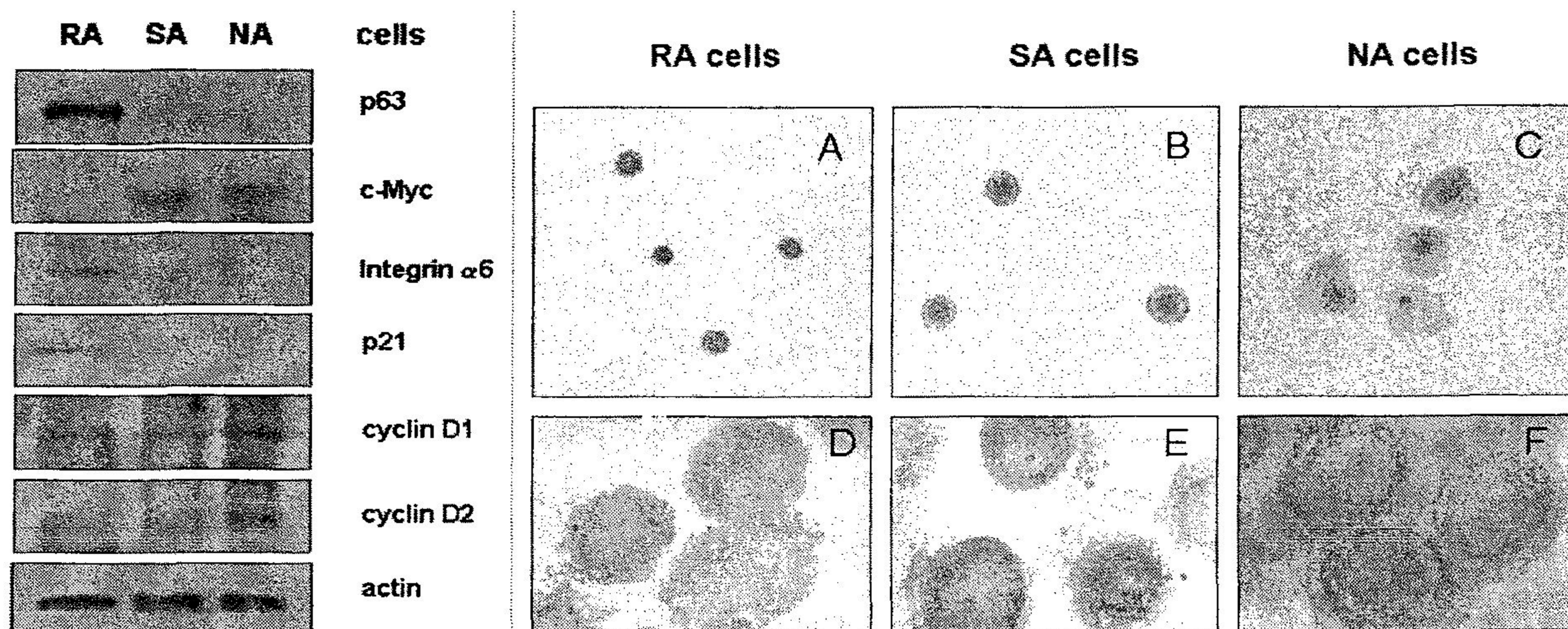


그림2. RA, SA, NA 세포에 대한 각종 표식자를 통한 분석 및 전자현미경 사진

이상의 연구결과는 *Cell Mol Life Sci* (IF 5.259)에 발표 (Kim *et al.*, 2004)하였으며, 피부성체 줄기세포의 분리방법이라는 제목으로 특허출원되었다. 이러한 결과를 가지고 분리한 줄기세포를 가지고 만든 인공피부는 최상의 형태학적 특성을 보여주고 있으며, 세포 치료제로서의 임상적용 가능성을 제시하였다.

3. 나이와 계대배양에 따른 줄기세포 특성분석

가. 이론적 접근방법

나이가 증가함에 따라 또 세포의 계대배양이 증가하면 줄기세포의 수가 줄어들 것이라는 가정 하에 접근하였다.

나. 실험적 접근방법

다양한 나이의 자원자 샘플과 다양한 계대를 거친 배양한 사람 표피유래의 각질형성세포를 가지고 줄기세포의 분획을 분석하였고, 이를 바탕으로 하여 인공피부의 구성정도를 확인하였다.

다. 연구내용 및 결과

세포노화가 세포배양결과에 영향을 미친다는 사실은 잘 알려져 있다. K19에 관한 이전의 연구는 줄기세포의 상실이 노화된 각질형성을 배양할 때 어려움을 겪는 점이라는 것을 발견하였다. 그러나 K19가 표피줄기세포의 표식자라고 일반적으로 인정받고 있지 못하기 때문에 이러한 상황은 불분명하다.

이 연구의 목적은 자연적인 노화나 반복된 계대배양에 의한 세포노화의 효과를 줄기세포의 관점에서 연구하는 것이다. 세포노화의 효과는 각질형성세포의 배양과 인공표피에 의하여 연구되었다. alpha6-integrin과 CD71의 항체를 이용하여 유세포 분석을 하였고, 각질형성세포의 줄기세포 후보들은 이러한 두개의 다른 항체에 대한 반응성에 따라 분리되었다. Living skin equivalents (LSEs)는 어린아이와 성인 그리고 노년의 공여자의 각질형성세포를 가지고 만들어 졌다. 유세포 분석은 나이와 세포계대에 의존적으로 줄기세포 후보들의 감소를 보여주었다. LSE실험은 어린이의 각질형성세포를 사용하여 재구성한 인공피부가 성년 공여자의 각질형성세포를 사용한 경우와 비교하여 더 잘 형성된다는 것을 보여주었다. 증식표지자의 상이한 발현이 공여자의 나이에 따라 역시 관찰되었다. 실험 결과는 자연적인 세포노화나 세포 계대를 통한 세포의 노화가 각질형성세포의 배양에서 줄기세포의 후보들을 감소시킨다는 것을 보여준다. 이러한 점은 왜 나이가 든 공여자의 각질형성세포나 계대를 오래간 각질형성세포를 가지고 세포배양을 하기가 어려운지를 보여주는 이유일 것이다.

결론적으로 이 연구의 결과 나이의 증가와 계대배양이 증가함에 따라 성체줄기세포의 proportion이 감소하는 양상을 보여 줄기세포 분리방법의 타당성을 검토할 수 있는 방법을 제시하였고, 가능성있는 표식자를 사용하여 성체줄기세포의 특성을 분석하였다. 이 연구결과를 J Dermatol Sci에 발표하였다 (Youn *et al.*, 2004).

제 2 절 인공피부의 배양실험

1. 인공피부 배양을 위한 조건 확립

가. 이론적 접근방법

줄기세포를 이용하여 인공피부를 배양할 경우 더 완성도가 높은 인공피부를 구축할 수 있으리라는 가정에서 출발하였다.

나. 실험적 접근방법

제1절에서 분리된 줄기세포와 줄기세포가 아닌 각질형성세포로 인공피부를 만든 것을 비교함으로써 줄기세포의 피부재생능력을 실험하였다.

다. 연구내용 및 결과

제1절에서 수행된 실험결과를 확인하기 위하여 분리된 세포를 이용하여 인공피부를 배양하였으며 분리된 세포의 특성을 재확인할 수 있었다. 다음의 결과는 제1절의 실험에서 분리된 세포를 이용한 것이다. 줄기세포 (RA 세포)를 이용할 경우 다른 세포 (SA 세포나 NA 세포)를 사용할 경우보다 월등하게 분화도가 높은 인공피부를 보여주며, 줄기세포와 관련된 각종 marker를 사용시 RA세포에서 줄기세포의 특성을 잘 나타내었다.

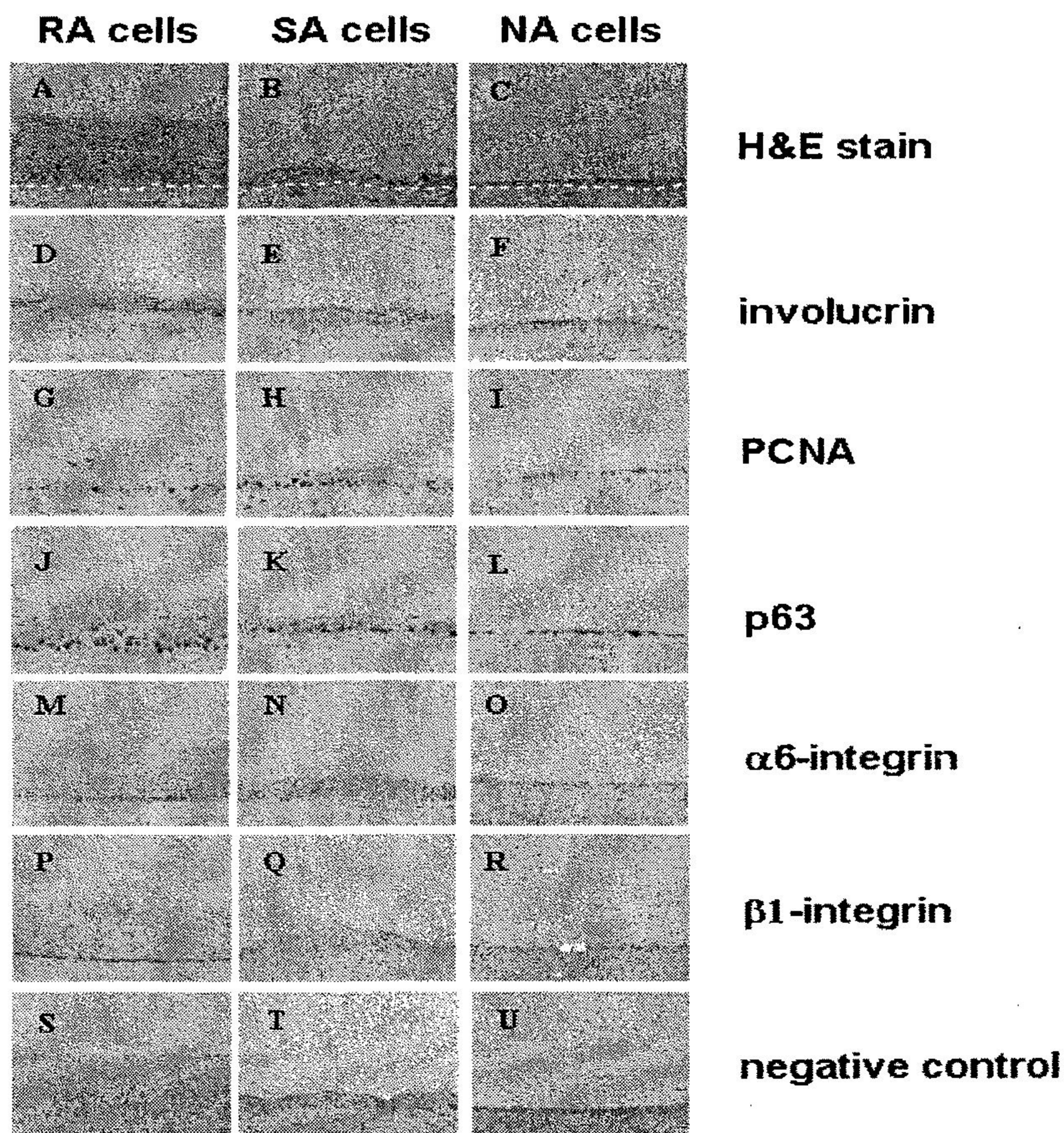


그림 3. RA, SA, NA 세포를 이용한 인공피부와 특성 비교

2. 모낭조직의 배양을 위한 조건 확립

가. 이론적 접근방법

특정한 성장인자가 모발의 성장에 중요한 역할을 할 것이라는 가정하에 실험하였다.

나. 실험적 접근방법

모낭의 줄기세포의 성장에 연관된 factor를 screening할 목적으로 Methylcellulose 15에 millicell를 올린 후 그 안에 모낭 조직을 올려 배양하였다.

다. 연구내용 및 결과

KGM과 E-media등의 다양한 배양 조건에서의 실험과 대머리 치료제로 쓰이고 있는 minoxidil 또는 상피성장인자인 EGF의 첨가유무 및 성장인자의 농도를 달리한 실험 결과 1 ng EGF과 0.5 mM minoxidil in E-media에서 모발이 가장 잘 자라는 조건임을 확인하였다.

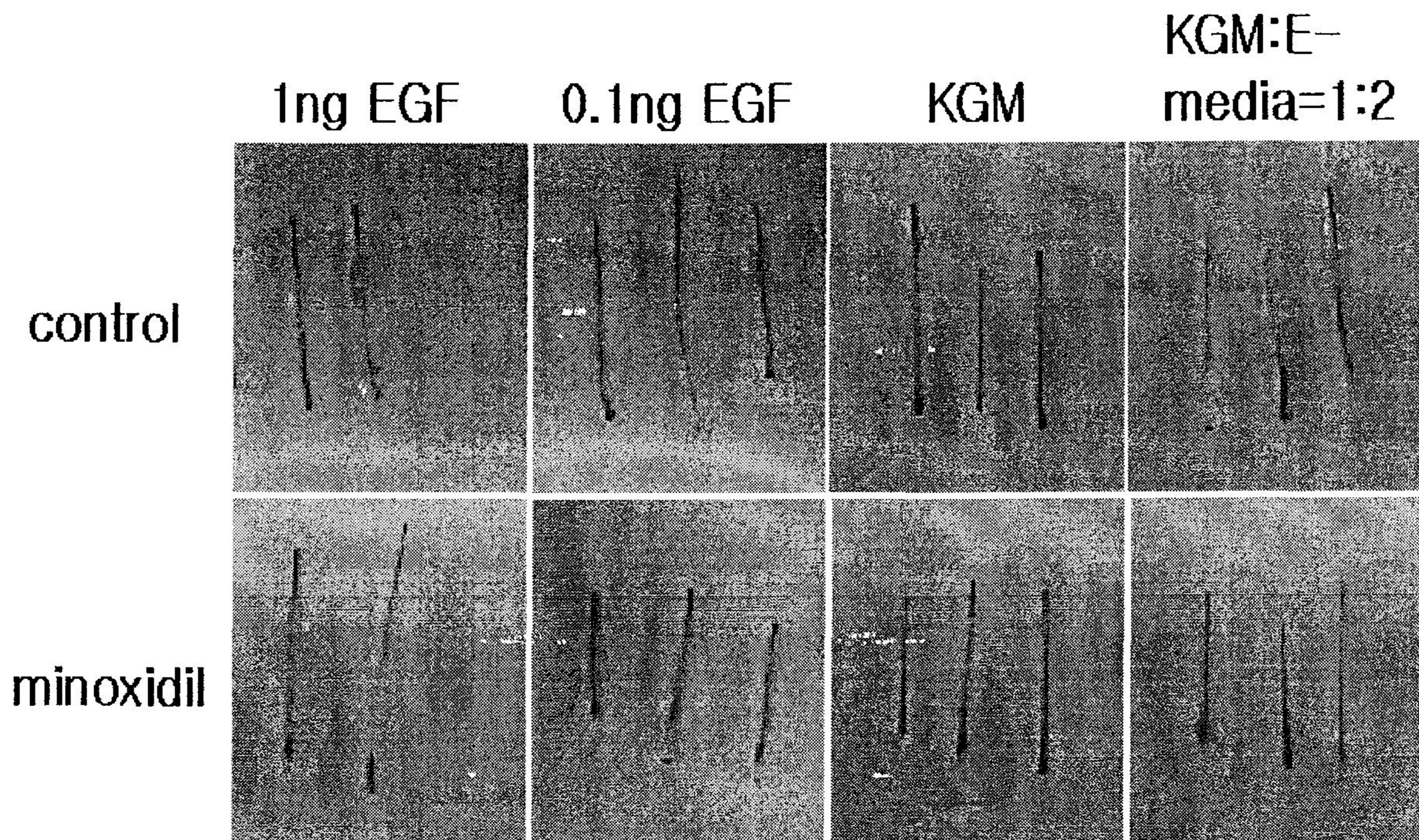


그림 4. 여러 가지 조건에서의 모발의 성장

3. 특히 모낭의 성체줄기세포인 DSC (dermal sheath cell)을 이용한 인공피부배양

가. 이론적 접근방법

모낭의 성체줄기세포인 DSC (dermal sheath cell)이 상처회복에 도움을 줄 수 있다는 보고로부터 실험하였다 (Gharzi *et al.*, 2003).

나. 실험적 접근방법

DSC와 정상적인 사람의 섬유모세포를 비교하여 어떤 쪽에서 더 완성도 높은 인공피부가 만들어 지는가를 실험하였다.

다. 연구내용 및 결과

피부는 기저막으로 나누어진 표피와 진피의 두층으로 나누어 진다. 표피와 진피의 상호작용은 피부의 항상성을 유지하는데 중요하며, 진피의 인자들은 표피의 성장과 분화를 조절하는데 중요한 역할을 한다. 몇몇 연구들은 모낭의 Dermal Sheath 세포 (DSC) 가 섬유모세포보다 더 많은 수용성 인자들을 합성해 낸다고 보고하고 있다 (Limat *et al.*, 1993).

이 연구의 목표는 인공피부의 완성에 DSC가 미치는 영향을 조사하는데 있다. 이 연구에서 인간의 각질 형성세포는 두 종류의 다른 진피대체물위에 뿌려졌다. 더 나아가 비타민 C의 영향도 평가 되었다. 조직학적으로 두꺼운 표피가 DSC 모델에서 관찰되었다. 면역조직화학염색은 DSC와 섬유모세포모델에서 유사한 양상의 involucrin 발현을 보여주었으나 filaggrin은 DSC모델에서 더 발현되었다. PCNA양성인 세포는 특히, 비타민 C의 존재하에서 DSC모델에서 섬유모세포 모델보다 더 적었다. 그러나 integrin $\alpha 6$ 은 비타민 C의 존재하에서 DSC모델에서 더 강하게 발현되었다. 이러한 발견들은 DSC가 피부의 표피와에 영향을 미치는 인자들을 합성하거나 분비하며, 비타민 C가 인간의 표피를 재형성하는데 중요한 첨가물이라는 것을 암시한다. 더 나아가 인공피부의 전자현미경 관찰이 이루어 졌으며 잘 발달된 세포간 연결이 DSC모델에서 관찰되었다. 실험결과들은 진피와 연결된 표피의 변화가 인공피부의 증식과 분화과정에 중요하다는 것을 암시한다.

결론적으로 모낭의 성체줄기세포를 분리하는 실험의 일환으로 DSC (dermal sheath cell)을 분리하여 인공피부의 배양에 성공적으로 적용할 수 있었다. DSC를 사용하여 인공피부를 만들 경우 훨씬 더 완성된 형태의 특성을 보여주며 이와 같은 결과는 줄기세포를 이용하여 사람의 피부에 가까운 인공피부를 만들어 낼 수 있다는 것을 보여었다. 이 연구결과를 J Dermatol Sci에 발표하였다 (Cho *et al.*, 2004).

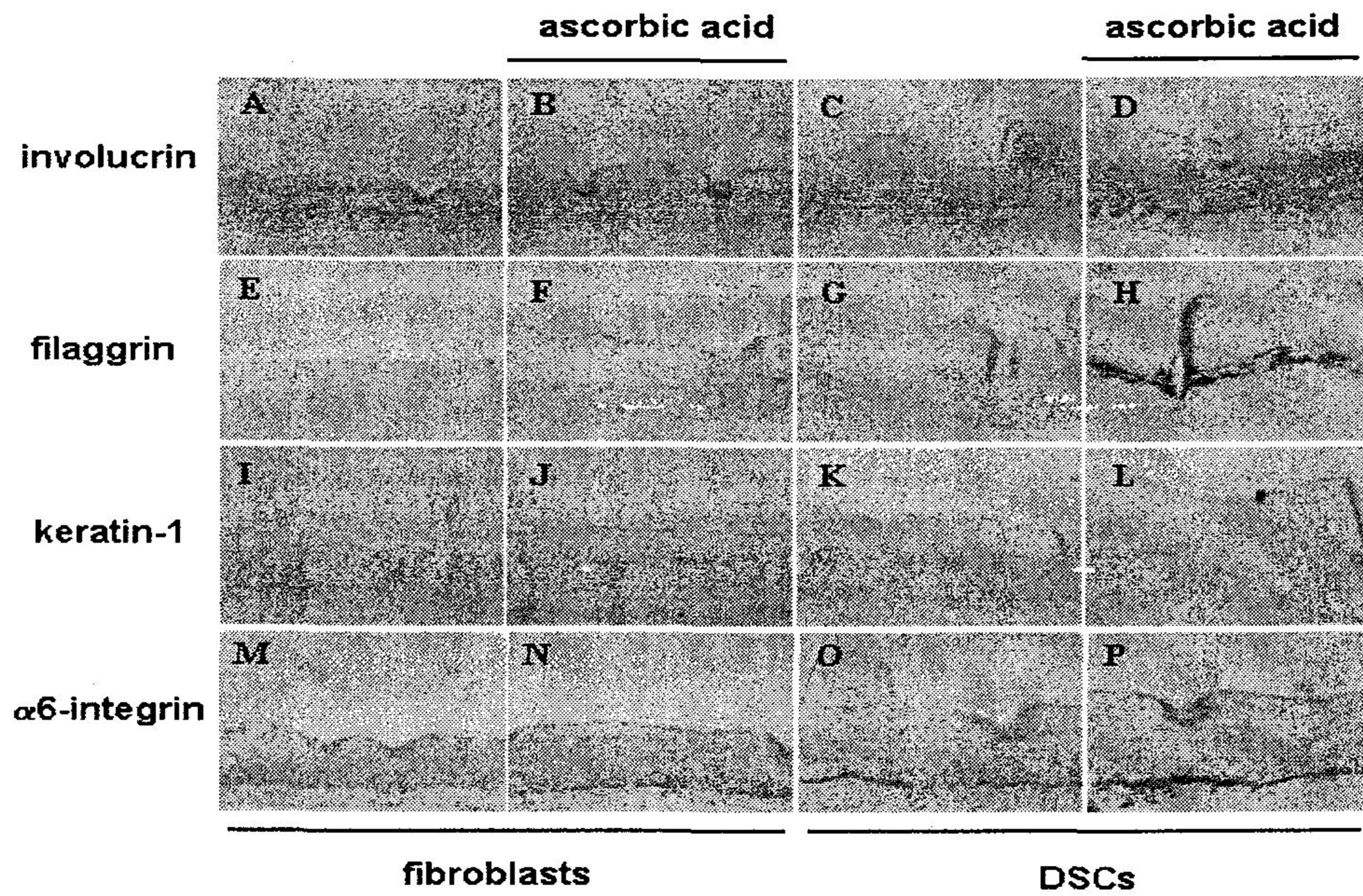


그림 5. 인공피부에 미치는 DSC의 영향

4. 다양한 사이토카인과 성장인자를 이용한 줄기세포의 유지

가. 이론적 접근방법

모낭의 성체줄기세포인 DSC (dermal sheath cell)이 인공피부를 구축하는데 도움을 준다는 결과를 토대로 특정한 성장인자가 발현될 수 있을 것이라는 가정에서 출발하였다.

나. 실험적 접근방법

모낭줄기세포인 DSC (dermal sheath cell)을 이용한 Protein Array를 통하여 실험하였다.

다. 연구내용 및 결과

Protein Array실험를 통하여 몇 가지 사이토카인이 DSC에서 특이적으로 높게 발현된다는 사실을 확인하였다.

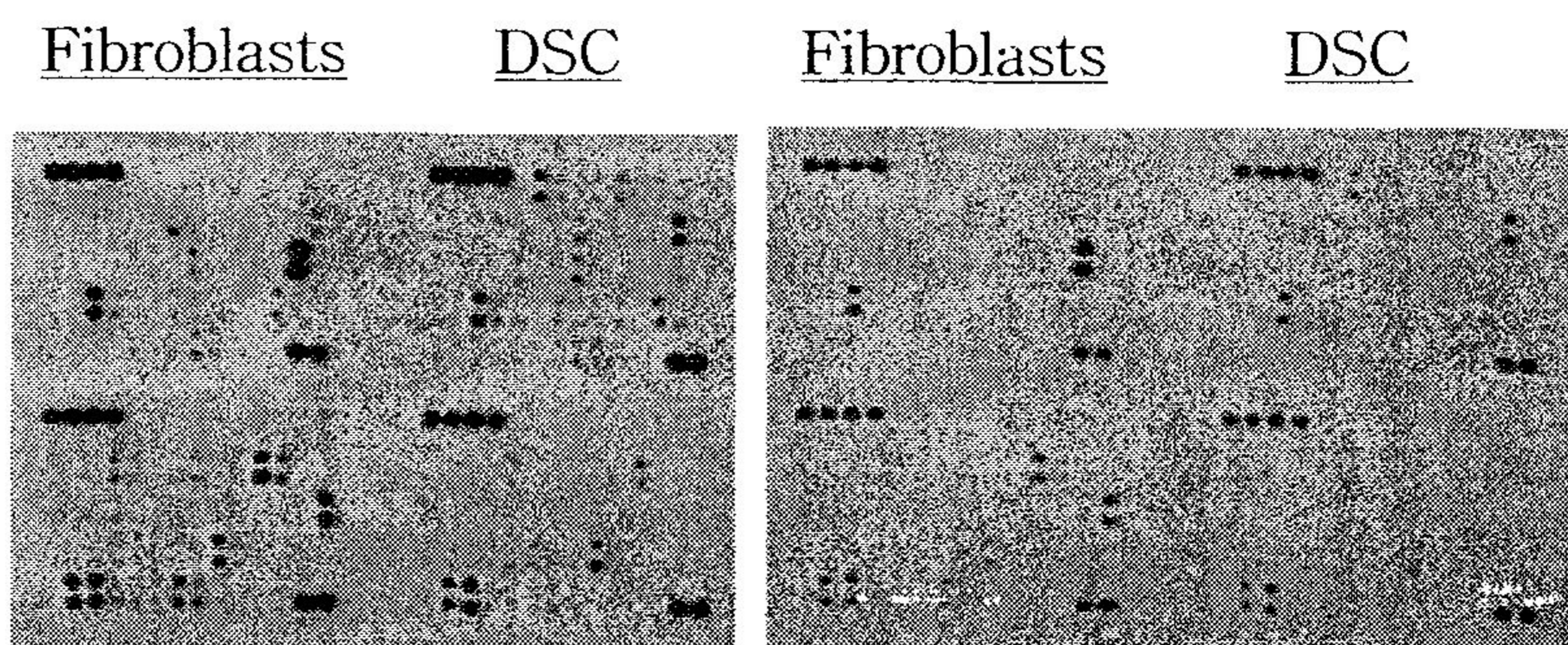


그림 6. 섬유모세포와 DSC를 이용한 Protein Array

5. 인공피부의 새로운 Fixation방법의 개발

가. 이론적 접근방법

인공피부의 Fixation방법에 대한 기존 방법의 문제점을 개선하고 최상의 실험결과를 얻기 위하여 진행되었다.

나. 연구내용 및 결과

피부줄기세포가 들어간 피부조직재건에 있어서 기존의 고정방법(Carnoy법)은 인공피부를 과도하게 수축시키고 조직을 보존하지 못하며 여러 표식자들에 대한 면역조직화학염색을 방해하는 등 고정 직전의 상태를 충분히 반영하지 못한 문제점을 가지고 있으므로 다양한 고정 방법을 비교, 평가하여 인공피부 보존에 적절한 방법(0.5%-0.05% Paraformaldehyde-Glutaraldehyde)을 결정하였다. 이 연구결과를 Appl Immunohistochem Mol Morphol에 발표하였다.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 최종목표에 따르는 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

배양된 줄기세포를 이용하여 인공피부를 배양하여 특성을 연구함으로써 성체줄기세포의 특성을 간접적으로 분석하고자 하려는 최종 연구목표에 부합하여 표식자가 잘 알려져 있지 않은 상황에서 독창적인 방법으로 피부성체 줄기세포의 손쉬운 분리법을 개발하고, 특성을 연구하였으며, 모낭줄기세포와 피부성체줄기세포를 이용한 세계수준의 완성도 높은 인공피부의 구축기술로 난치성 피부질환 또는 화상이나 창상환자에 사용하여 상처회복에 적용 가능한 세포치료제로 개발할 수 있는 기반을 마련하였다.

더 나아가 피부성체줄기세포의 연구 활성화를 이루었으며, 관련 분야에도 많은 영향을 미쳐서 조직공학기술의 발달과 난치성 질환의 치료방법의 발전을 가져오리라 생각되며, 경제·산업적 측면으로도 국내 의료수요를 창출하고 고부가가치상품을 개발하는데 일익을 담당할 것이다.

2. 과제의 연도별 연구 목표

가. 1차년도

(1) 피부 성체줄기세포의 특성연구

표식자에 대한 연구와 세포 분리, 배양에 대한 연구

(2) 인공피부의 배양

인공피부 배양실험, 표피의 증식, 분화의 조절 실험, 진피 형성의 조절실험

나. 2차년도

(1) 피부 성체줄기세포의 특성연구

표식자에 대한 연구와 세포분리, 배양에 대한 연구

배양세포치료방법의 개발, 모낭줄기세포연구

(2) 인공피부의 배양

표피진피의 증식, 분화조절실험, 모낭줄기세포를 이용한 인공피부의 배양실험

다. 3차년도

(1) 피부성체줄기세포의 특성연구

유전자치료술의 개발, 모낭의 성체줄기세포의 분화에 대한 연구

(2) 인공피부의 배양

인공표피 및 진피의 증식 및 분화조절실험

모낭의 성체줄기세포를 이용한 인공피부배양실험

3. 평가의 착안점

년도	세부연구목표	가중치	평가의 착안점 및 척도
1차년도 (’02.10~ '03. 6)	○ 피부 성체줄기세포의 특성연구	30%	성체피부줄기세포의 표식자 분석
		30%	SCI 논문 1편
	○ 인공피부의배양실험	40%	배양된 인공피부의 표피분화도 분석
2차년도 (’03. 7~ '04. 3)	○ 피부 성체줄기세포의 특성연구	40%	성체피부줄기세포이용 치료방법개발
	○ 인공피부의배양실험	30%	인공피부의 분화,증식, 진피개선
		30%	SCI 논문 1편
3차년도 (’04. 4~ '05. 3)	○ 피부 성체줄기세포의 특성연구	35%	분화에 따른 줄기세포 특성연구
		35%	SCI 논문 1편
	○ 인공피부의배양실험	30%	모낭성체줄기세포 인공피부배양

4. 목표달성도

1단계 연구개발 세부목표	추진실적	달성도(%)
○ 피부모낭성체줄기세포의 특성연구	피부모낭성체줄기세포를 활용한 인공피부완성 및 발현 사이토카인을 이용한 피부성체 줄기세포의 유지 (SCI급 논문1편, 국내논문 1편)	100%
○ 피부성체줄기세포의 특성연구	피부성체줄기세포의 분리법개발과 표식자의 확인 및 음성 표식자의 발견 (SCI급 논문2편, 특허1편)	100%
○ 인공피부 배양	분리된 피부성체줄기세포를 이용하여 완성도 높은 인공피부의 배양 성공 (SCI급 논문1편, 국내논문 2편)	100%

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 본 연구 과제를 통하여 개발한 “피부성체줄기세포의 분리방법”을 이용하여 줄기세포를 분리하고 이를 이용한 세포치료제와 인공피부의 개발이 요구된다. 다음 단계로는 성체 혹은 전분화능 줄기세포로부터 인공피지선, 인공모발 등을 배양하는 것이 장기목표가 될 것이다.

2. 분리된 피부성체줄기세포를 임상적으로 적용하고 안정적으로 공급하기 위해서는 줄기세포의 특성을 보존하여 냉동 보관하는 방법을 정립하는 것이 필수적이다. 앞으로 냉동 보존시 일어나는 생체반응을 연구함으로써 냉동보존방법을 획기적으로 개선하기 위한 연구를 할 예정이다.

3. 세포치료제 개발에 있어서 가장 큰 한계는 세포의 분리 및 배양과정에서 동물의 혈청을 사용하기 때문에 인간에게 적용 시 동물유래 감염성 질환의 전파 가능성이 있다는 것이다. 그러므로 장기적인 관점에서 현재 배양액에 첨가되는 BPE를 대체할 수 있는 물질의 발굴이 요구된다. 이에 천연 식물성 물질 및 다양한 성장인자들의 검색을 통해 줄기세포의 특성을 유지하면서 증식을 유도하는 적절한 대체 물질을 찾을 수 있으리라 기대하고 있다.

4. 현재까지 이룬 인공피부 배양기술을 바탕으로 빠른 시일 내에 임상허가를 획득하고자 하며 인공피부 이외에도 여러 가지 피부세포의 자가세포치료술 등을 시도하고자 한다. 현재 본 연구팀이 이룩한 인공진피 배양기술을 더욱 발전시켜 탄력성이 높고 생착율이 높은 인공피부를 개발하고자 한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 피부줄기세포에서 FGF-13의 중요성

피부 및 피부부속기로 분화할 수 있는 피부의 줄기세포가 모발의 bulge region에 존재한다는 사실은 여러 연구자들이 밝힌 바 있다. Imamura T 그룹에서 이 bulge region에 FGF-13의 mRNA와 단백질의 양이 증가되어 있고, 갓 태어난 생쥐에서는 bulge region 뿐만 아니라 표피의 기저층부 세포에서도 강하게 발현되고 있음을 관찰했다. 생후 3일이 지나면서 혹은 어른의 경우 기저층 세포에서는 FGF-13의 발현 정도가 미약하거나 관찰되지 않았으며, 모발의 성장주기 중에서 특히 telogen에서 anagen 초기에 걸쳐 강하게 발현되는 것으로 보아 피부줄기세포의 기능을 조절할 가능성이 있음을 처음으로 밝혔다. (4th Intercontinental Meeting of Hair Research Societies, 2004년 6월 17~19일 독일 베를린)

2. 피부줄기세포 연구의 zebrafish 모델

복잡한 피부부속기이며 피부줄기세포의 source인 모발의 발생 및 기능과 관련된 기전들을 보다 쉽게 연구하기 위하여 zebrafish가 모델 동물로 사용될 수 있음을 Mary C. Mullins 그룹에서 제시하였다. zebrafish는 이미 단일 유전자를 없앤 후 정상군과 비교하여 해당 유전자의 기능을 밝히는 유용한 실험 모델로 이미 사용되고 있다. 연구자들은 scales을 만들 수 없는 돌연변이를 이용하여 Wnt, BMP, SHH, Notch/Delta pathway들이 연관되어 있으며 돌연변이 동물에서 특히 이들 기전과 관련된 단백질의 발현이 부족하거나 거의 발현되지 않음을 관찰했으며 이는 태아줄기세포의 각 장기로의 발생 및 분화과정과 밀접한 관련이 있다고 밝혀진 기전들이다. 복잡한 모발을 연구하기에 앞서 zebrafish를 이용하여 연구에 박차를 가한다면 유용한 결과들을 빠른 시간 내에 얻어 실제 인간에서의 기전연구에 도움이 될 것이다. (4th Intercontinental Meeting of Hair Research Societies, 2004년 6월 17~19일 독일 베를린)

3. 피부성체줄기세포로부터 모발형성 (Cell지, 2004년 9월)

E. Fuchs 그룹에서 태아줄기세포가 아닌 피부성체줄기세포를 이식하여 털이 자라지 않는 생쥐에서 정상적으로 털이 나는 보통 쥐와 비슷한 정도로 털을 자라게 하는 데 성공했다. 모발을 연구하는 많은 그룹에서 모발의 일부를 이식하여 모발이 자라는 것을 확인한 결과는 있었으나 세포를 이식하여 완전한 모발로 자라게 한 것은 이 그룹이 처음이다. 현재 타인이나 본인의 모발을 나누어 이식하는 방법에서 나아가 세포를 이식하는 대머리 환자들을 위한 획기적인 치료방법이 될 것이며 다른 질병으로 인해 부작용으로 모발이 심하게 훼손된 환자들에게도 좋은 치료방법이 될 수 있을 전망이다 (Blanpain *et al.*, 2004).

제 7 장 참고문헌

- Blanpain, C., Lowry, W. E., Geoghegan, A., Polak, L. and Fuchs, E., Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell*, 118,635-48 (2004).
- Cho, H. J., Bae, I. H., Chung, H. J., Kim, D. S., Kwon, S. B., Cho, Y. J., Youn, S. W. and Park, K. C., Effects of hair follicle dermal sheath cells in the reconstruction of skin equivalents. *J Dermatol Sci*, 35,74-77 (2004).
- Gharzi, A., Reynolds, A. J. and Jahoda, C. A., Plasticity of hair follicle dermal cells in wound healing and induction. *Exp Dermatol*, 12,126-36 (2003).
- Jones, P. H. and Watt, F. M., Separation of human epidermal stem cells from transit amplifying cells on the basis of differences in integrin function and expression. *Cell*, 73,713-24 (1993).
- Kim, D. S., Cho, H. J., Choi, H. R., Kwon, S. B. and Park, K. C., Isolation of human epidermal stem cells by adherence and the reconstruction of skin equivalents. *Cell Mol Life Sci*, 61,2774-81 (2004).
- Li, A., Pouliot, N., Redvers, R. and Kaur, P., Extensive tissue-regenerative capacity of neonatal human keratinocyte stem cells and their progeny. *J Clin Invest*, 113, 390-400 (2004).
- Limat, A., Hunziker, T., Waelti, E. R., Inaebnit, S. P., Wiesmann, U. and Braathen, L. R., Soluble factors from human hair papilla cells and dermal fibroblasts dramatically increase the clonal growth of outer root sheath cells. *Arch Dermatol Res*, 285,205-10 (1993).
- Pellegrini, G., Dellambra, E., Golisano, O., Martinelli, E., Fantozzi, I., Bondanza, S., Ponzin, D., McKeon, F. and De Luca, M., p63 identifies keratinocyte stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98,3156-61 (2001).
- Youn, S. W., Kim, D. S., Cho, H. J., Jeon, S. E., Bae, I. H., Yoon, H. J. and Park, K. C., Cellular senescence induced loss of stem cell proportion in the skin in vitro. *J Dermatol Sci*, 35,113-23 (2004).