

Development of in vitro 3D hair growth model using tissue engineering technology

Jung-Keug Park

Department of Chemical and Biochemical Engineering Dongguk University

Tel: + 82-2-2260-3365 Fax: +82-2-2271-3489

E-mail : jkpark@dongguk.edu

Abstract

The recent development of methods for culturing hair follicles in vitro has proved an important tool to investigate many aspects of drug screening. Hair follicles develop as a result of epithelial-mesenchymal interactions between epidermal keratinocytes and dermal cells. We isolated some follicle cells using explantation and enzymatic digestion method from human scalp hair follicles. So we could culture some follicular cells, such as outer root sheath (ORS) cells, dermal papilla (DP) cells, dermal sheath (DS) cells, matrix cells and melanocytes. To induce hair morphogenesis in vitro the cells were 3-D cultured as skin structures. Moreover, to develop hair follicle organ culture model, we applied dermal equivalent (DE) to culturing hair follicles to expand hair growth period.

서 론

모낭(hair follicle)에 대한 연구는 대머리 치료 연구뿐만 아니라 조직의 발생, 상피세포의 분화, apoptosis 및 종양형성과 같은 다양한 생물학적 및 의학적으로 중요한 과정의 이해를 높이는데 효과적인 연구 대상의 피부 부속기관이다. 특히, 최근에는 모낭의 줄기세포가 모낭뿐만 아니라 피부 상피의 재생에도 관여한다는 것이 알려지면서 그 관심이 더욱 커지고 있다.

모낭을 구성하는 세포에는 크게 상피세포와 진피세포 그리고 멜라닌 세포로 나눌 수 있고, 이를 각 부위에 따라서 좀더 세분하여 그 특징에 따라 다르게 부르고 있다. 상피세포에는 outer root sheath (ORS)와 matrix 세포로 구분되며, 진피세포는 dermal papilla (DP)와 derma sheath (DS) 세포로 구분되어 진다. 그리고 멜라닌 세포의 경우에는 그 위치에 따라서 색소를 합성하는 기능을 띄게 되는

데, matrix에 위치하여 DP와 상호작용을 통해 멜라닌을 합성하게 된다. 이처럼 다양한 세포들이 모낭을 구성하고 있고 이들의 상호작용이 모낭을 유지하고 있다¹⁾.

이러한 모낭의 복잡한 구조와 이의 조절 기작에 대하여 보다 깊이 이해하려면 재현성이 있고 정량적 관찰이 가능하며 각종 인자를 인위적으로 조절할 수 있는 *in vitro* 모델 시스템이 반드시 요구되며, 또한 신약 개발 관련 산업의 관점에서 보면 모발 성장에 관한 다양한 지식과 많은 수의 후보 약물을 효과적으로 선별할 수 있는 저렴한 *in vitro* 모델의 개발이 절실히 요구된다.

본 연구에서는 모낭을 구성하는 각각의 세포를 분리 및 배양하여 체외에서 모낭 유사 구조를 재구성하려는 조직공학적 방법과 생인공피부를 이용한 기관 배양 방법을 사용하여 3차원 체외 모발 성장 모델을 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

조직공학적 방법

조직으로부터 성장기의 모낭을 분리하고, 분리된 모낭의 아랫쪽인 bulb 부분을 기준으로 그 상단을 잘라 윗쪽의 bulge 부분과 분리한다. Bulge 부분의 모낭을 4°C의 dispase (1.2 units/ml Gibco BRL)에 약 16시간 동안 처리한 후 0.05% trypsin / 0.02% EDTA로 37°C에 약 15-20분간 처리하여 세포를 분리하고, K-SFM (Gibco BRL)을 이용하여 ORS세포를 배양하였다. 또한 처음 5일 동안 K-SFM과 MGM-2 (Colonetics™)를 1:1로 혼합한 배지를 사용하였다가 후에는 MGM-2만을 이용하여 멜라닌 색소를 합성하지 않는 멜라닌세포를 콜라겐 용액으로 코팅된 배양용기에 배양하였다³⁾. Bulb부분의 모낭을 microdissection을 통하여 DP, DS 및 matrix를 분리하였다. DP와 DS의 세포는 미리 혈청으로 코팅된 배양용기에 분리 조직을 붙이고 DMEM (Gibco BRL)을 첨가하여 조직으로부터 흘러나온 세포를 배양하는 explantation 방법을 이용하였고, matrix 세포의 경우 0.05% trypsin / 0.02% EDTA으로 37°C에 약 15-20분간 처리하여 세포를 분리하고, K-SFM을 이용하여 배양하였다²⁾. 유사 진피구성 세포인 DS와 DP 세포를 구분하기 위하여 α -smooth muscle actin antibody로 염색하여 살펴보았다. 또한 DP가 체외에서 모낭 형성에 있어 나타나는 ORS 세포를 유도하는지를 실제 조직을 콜라겐 젤 사이에 넣은 후 K-SFM을 첨가하여 살펴보았다.

기관배양 방법

Hair shaft의 길이성장과 외측모근초의 길이성장을 동시에 확인하기 위해 ORS 이상 자라나온 shaft를 제거한 후 실험에 이용하였다. Dermal equivalent (DE)는 진피세포를 콜라겐 용액에 섞어 젤화시킨 후 배양배지인 DMEM/ 10% FBS 로 1주일간 배양한 후 기관배양용 배지로 전환하여 모낭과 혼합배양 하였다. 기관 배양용 배지는 Williams' E media 에 0.2% ITS (최종농도: insulin 10 μ g/ml, transferrin 10 μ g/ml, sodium selenite 10 ng/ml)와 10 ng/ml hydrocortisone를 첨가하였다. In vitro model로서의 적합성여부를 확인하기 위해 DE에 minoxidil를 첨가하여 영향을 보고자 했다.³⁾ 형태학적인 분석을 위해 세포질과 세포핵을 확인하는 Hematoxylin and Eosin (H&E)과 세포의 apoptosis를 확인하는 TUNEL 검사를 수행하였다.

결과 및 고찰

조직공학적 방법

모낭을 구성하는 주요세포들을 분리 및 배양한 결과 ORS와 matrix 세포는 상피세포와 유사한 형태를 보였으며 DP와 DS 세포는 진피세포와 유사한 형태를 보임을 관찰할 수 있었다. 색소를 합성하지 않는 멜라닌 세포의 경우는 피부의 멜라닌 세포와 비교하여 dendrite가 짧거나 특징을 보였다 (Fig. 1). α -smooth muscle actin antibody로 염색하여 DP와 DS 세포를 비교해본 결과 DS 세포에는 강하게 발현되는 반면에 DP 세포에서는 비교적 약하게 발현되어 두 세포가 각각 잘 분리 및 배양되었음을 알 수 있었다. 또한 DP가 *in vitro*에서 성장기에 있는 모낭의 ORS세포를 유도하여 상피세포를 유도하는 능력이 유지됨을 알 수 있었다.

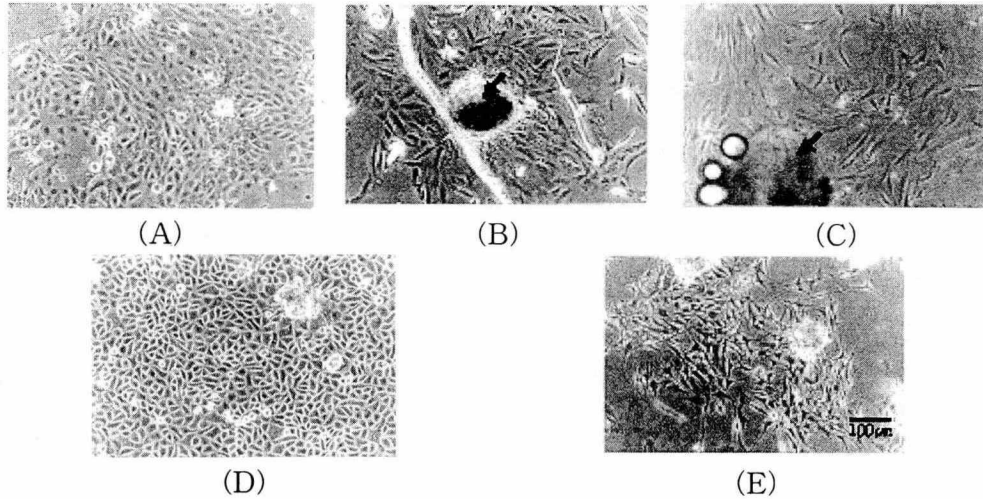


Figure 1. Morphology of various follicle cells isolated from human scalp hair follicles. ORS cells(A), DP(arrow) cells(B), DS(arrow) cells(C), matrix cells(D) and melanocytes(E)

기관배양 방법

세포가 없는 경우와 비교했을 때 DP나 dermal fibroblast (DFb)가 있는 것이 길이 성장과 morphology 면에서 우수한 결과를 나타냈으며 DP cell과 DFb를 비교하면 DFb가 모낭의 길이 성장에 더 좋은 영향을 주는 것으로 나타났다 (Fig. 2). 세포농도 면에서는 1×10^5 cells/ml 의 농도로 접종한 것이 2×10^5 cells/ml 보다 좋은 결과가 나타났다 (Fig. 3).

요 약

모낭은 복잡한 상호작용을 통하여 성장 및 주기가 조절되며 다양한 세포들로 구성된 기관이다. 본 연구에서는 조직공학적 방법을 이용하여 모낭을 구성하는 세포들을 분리 및 배양하였고 세포들의 형태와 증식양상을 관찰할 수 있었고, 기관배양의 방법을 통하여 in vitro에서 첨가물에 대한 모발의 성장 및 주기의 변화를 살펴보았다.

References

1. Jahoda CA, Reynolds AJ., Dermal-epidermal interactions ; follicle-derived cell

populations in the study of hair-growth mechanisms (1993), Journal of Investment Dermatology, Jul;101(1 Suppl):33S-38S.

2. Markus Magerl, Sbia Kausser, Ralf Paus, Desmond J. Tobin, Simple and rapid method to isolate and culture follicular papillae from human scalp hair follicles (2002), Methods in Experimental Dermatology, Aug;11(4):381-5

3. Tae Gyun Lim, Jeong Hun Park, Gwang Seong Choi, Original article : Effects of TNF- α and minoxidil on human hair growth in vitro (2003), Korean Journal of Dermatology, 41(4):445-450

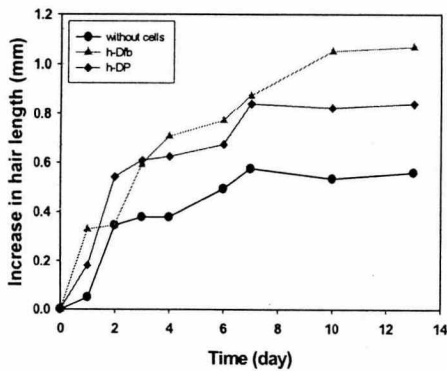


Figure 2. Effects of cell types which inoculated in DE on hair growth of organ cultured scalp hair follicles on the DE.

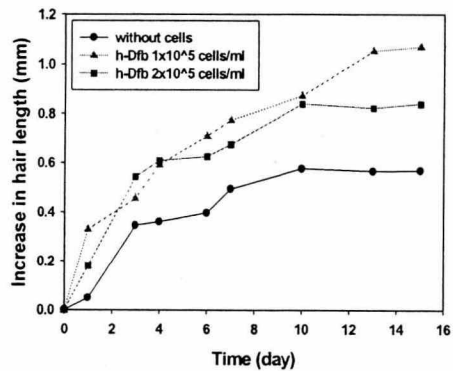


Figure 3. Effects of dermal fibroblast density of DE on hair growth of organ cultured scalp hair follicles on the DE.