Isolation and cultivation of follicle constituting cells from human hair follicles

Youn-Ho Shin[1], Young-Kwon Seo[1], Doo-Hoon Lee[1], Bo-Young Yoo[1], Kye-Yong Song[2], Seong-Jun Seo[3], Sung-Joo Whang[4], Young-Jin Kim[5], Eun-Kyung Yang[6], Chang-Seo Park[7], Ih-Seop Chang[8], and Jung-Keug Park[1]*

[1]Department of Chemical and Biochemical Engineering Dongguk University,
[2]Department of Pathology Chung-Ang University,
[3]Department of Dermatology Chung-Ang University,
[4]Hair Clinic Center CNP Cha and Park Hospital,
[5]Biomedical Research Center Lifecord. Co.,
[6]R&D Center Bioland. Ltd., [7]Biotech Research Lab. Doosan. Ltd.,
[8]R&D Center Amore Pacific. Ltd.
Tel: + 82-2-2260-3365 Fax: +82-2-2271-3489

Abstract

Hair follicles develop as a result of epithelial-mesenchymal interactions between epidermal keratinocytes and dermal cells. Moreover hair follicles constitute multiple cells that influence hair follicle development and cyclic activity. We isolated some 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 melanocyte.

서 론

모낭은 각 세포 및 조직과 복잡한 상호작용을 통해 모발의 성장 및 주기를 반복하고 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 되는데, matrix에 위치하여 DP와 상호작용을 통해 멜라닌을 합성하게 된다. 이처럼 다양한 세포들이 모낭을 구성하고 있고 이들의 상호작용이 모낭을 유지하고 있다

[4]. 따라서 모낭의 구성세포는 모발생성에 관한 연구나 발모제 관련 신약개발의 screening 단계에서 중요한 용도로 사용되고 있다. 본 연구에서는 모낭을 분리하고 이를 구성하고 있는 각각의 세포를 분리 및 배양하는 기술을 개발하였다.

재료 및 방법

조직으로부터 성장기의모낭을 분리하고, 분리된 모낭의 아랫쪽인 bulb 부분을 기준으로 그 상단을 잘라 윗쪽의 bulge 부분과 분리한다. Bulge 부분의 모낭을 4℃의 dispase (1.2 units/ml Gibco BRL)에 약 16시간 동안 처리한 후 0.05% trypsin / 0.02% EDTA로 37℃에 약 15-20분간 처리하여 세포를 분리하고, K-SFM (Gibco BRL)을 이용하여 ORS세포를 배양하였다[1]. 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 배양하였다[3]. Bulb부분의 모낭을 microdissection을 통하여 DP, DS 및 matrix를 분리하였다. DP와 DS의 세포는 미리 혈청으로 코팅된 배양용기에 분리조직을 붙이고 DMEM (Gibco BRL)을 첨가하여 조직으로부터 흘러나온 세포를 배양하는 explantation 방법을 이용하였고, matrix 세포의 경우 0.05% trypsin / 0.02% EDTA으로 37℃에 약 15-20분간 처리하여 세포를 분리하고, K-SFM을 이용하여 배양하였다[2]. 유사 진피구성 세포인 DS와 DP 세포를 구분하기 위하여 α-smooth muscle actin antibody로 염색하여 살펴보았다[5].

결과 및 고찰

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. 이러한 모낭을 이루는 세포를 단층배양 또는 모낭 유사조직 등을 재구성하여 *in vitro*에서 모낭에 관련된 물질들에 대한 세포들의 경향을 연구할 수 있을 것이다.

요 약

모낭은 복잡한 상호작용을 통하여 성장 및 주기가 조절되며 다양한 세포들로 구성진 기관이다. 모낭의 세포들이 *in vitro*에서 배양될 때 그들의 형태나 양상 등의 관찰을 위하여 구성 세포들을 분리 및 배양하였다. 모낭의 bulge를 구성하는 ORS 세포와 색소 합성을 하지 않는 멜라닌 세포를 두 단계의 효소처리 방법을 통하여 분리 및 배양하였고, bulge를 구성하는 세포의 경우에는 microdissection을 통하여 각각의 조직을 분리하고 DP와 DS 세포는 explantation 방법을 통하여 배양하였으며, matrix 세포는 효소처리를 통하여 분리 및 배양할 수 있었다. 또한 연속 배양을 통하여 그들의 형태적인 특성 및 증식양상을 관찰하였다.

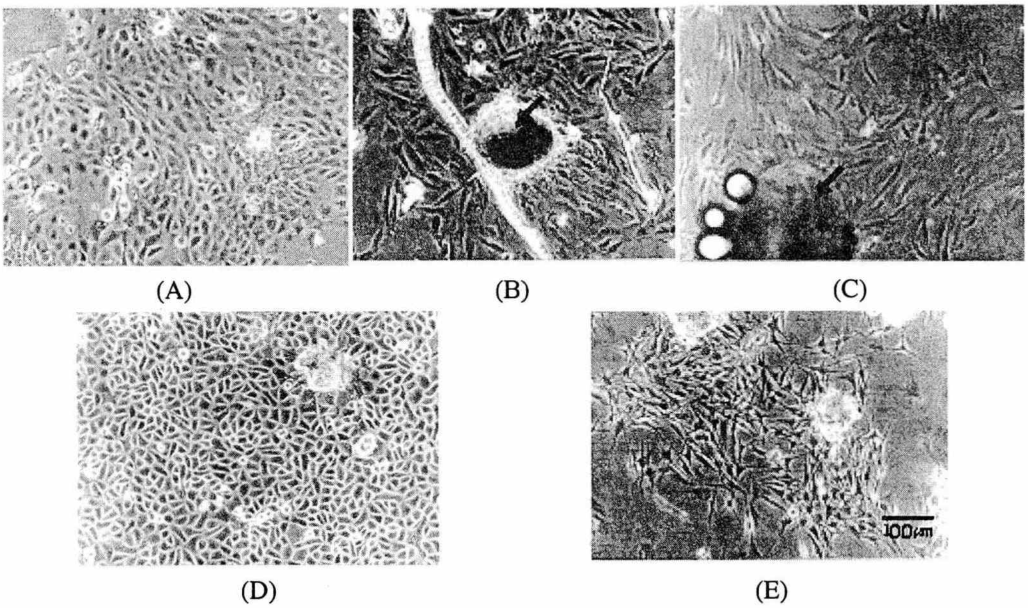

Figure 1. Morphology of various follicle cells isolatedfrom human scalp hair follicles. ORS cells(A), DP(arrow) cells(B), DS(arrow) cells(C), matrix cells(D) and melanocytes(E)

References

1. Alain Limat, Friedrich K. Noser (1986), Serial cultivation of single keratinocytes from the outer root sheath of human scalp hair follicles, *The Society for Investigative Dermatology* **87**(4), 485-8.

2. Markus Magerl, Sbia Kauser, Ralf Paus, Desmond J. Tobin (2002), Simple and rapid method to isolate and culture follicular papillae from human scalp hair follicles, *Methods in Experimental Dermatology* **11**(4), 381-5.
3. Yong Won Seo, Hye Jin Lee, Young Lip Park, Hyun Chung, Seung Hyun Lim, Kyu Uang Whang (1998), The morphologic study of outer root sheath melanocytes of human hair follicles, *Korean Journal of Investigative Dermatology* **5**(1), 63-8.
4. Jahoda C. A, Reynolds A. J. (1993), Dermal-epidermal interactions ; follicle-derived cell populations in the study of hair-growth mechanisms, *Journal of Investment Dermatology* **101**(1 Suppl), 33S-38S.
5. Hyo-Chan Jang, Sang-Won Kim, Jung-Chul Kim (1999), Characterization of dermal sheath cells from hair follicles of balding scalp, *Korean Journal of Investigative Dermatology* **6**(4), 255-61.