

Lgr5와 결합하는 신규 헵타펩타이드를 이용한 인체 모낭 세포의 활성화와 모낭줄기세포 분화 유도

김민웅[†] · 이응지 · 길하나 · 정용지 · 김은미^{††}

(주)케어젠 중앙연구소

(2023년 2월 23일 접수, 2023년 3월 27일 수정, 2023년 3월 30일 채택)

Novel Heptapeptide Binds to the Lgr5 Induces Activation of Human Hair Follicle Cells and Differentiation of Human Hair Follicle Bulge Stem Cells

Min Woong Kim[†], Eung Ji Lee, Ha-Na Gil, Yong Ji Chung, and Eun Mi Kim^{††}

Caregen R&D center, 46-38, LS-ro 91 beon-gil, Dongan-gu, Anyang-si, Gyeonggi-do 14119, Korea

(Received February 23, 2023; Revised March 27, 2023; Accepted March 30, 2023)

요약: 본 연구에서는 7 개의 아미노산으로 이루어진 헵타펩타이드의 Lgr5 binding에 따른 인체 모낭 구성 세포의 활성화에 대한 영향을 확인하였다. 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance, SPR) 시스템을 이용하여 헵타펩타이드가 Lgr5에 결합하는 것을 확인하였다. 인체 모유두세포(human hair follicle dermal papilla cell, HHFDPC)에 헵타펩타이드를 처리한 결과, 농도 의존적인 세포 증식이 나타났으며 β -catenin의 세포 내 핵 이동 및 하위 유전자인 LEF1, Cyclin-D1, c-Myc의 발현 증가가 관찰되었다. 그리고 세포 증식 기전 관련 인자인 Akt와 ERK의 인산화 수준이 증가되었으며, 성장인자인 hepatocyte growth factor (HGF), keratinocyte growth factor (KGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) 발현이 유도되었다. 또한 인체 모모세포(human hair germinal matrix cell, HHGMC)의 분화 관련 전사 인자와 인체 외모근초세포(human hair outer root sheath cell, HHORSC)의 분화 표지 인자들도 헵타펩타이드 처리 시 높은 발현율을 보였다. 추가적으로 우리는 헵타펩타이드의 인체 모낭줄기세포(human hair follicle stem cell, HHFSC) 분화에 대한 영향을 조사하였다. 그 결과, HHFSC 표지인자들의 mRNA와 단백질 수준이 감소하였고 반면에 분화 표지인자들은 증가하였다. 상기의 결과들은 헵타펩타이드가 인체 모낭 구성 세포에서 Wnt/ β -catenin 경로를 촉진시켜 증식 또는 분화를 유도할 수 있음을 보여준다. 이를 토대로 종합해 볼 때, 본 연구의 헵타펩타이드는 모발 성장을 유도하고 탈모 개선에 도움을 줄 수 있는 기능성 원료로 사용될 수 있을 것으로 보인다.

Abstract: This study was conducted to assess the effect of heptapeptide, composed of seven amino acids, on the activation of human hair cells isolated from human hair follicles. We have confirmed that the heptapeptide could bind to Lgr5 from the results of surface plasmon resonance (SPR) analysis. Heptapeptide enhanced the proliferation of human hair follicle dermal papilla cells (HHFDPCs) in a dose dependent manner. It induced the protein level of nuclear β -catenin, and the expressions of β -catenin downstream target genes, including LEF1, Cyc-D1 and c-Myc, in HHFDPCs. Heptapeptide significantly induced the phosphorylation of Akt and ERK, and the mRNA expressions of growth factors, including hepatocyte growth factor (HGF), keratinocyte growth factor (KGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF), in

† 주 저자 (e-mail: mwkim@caregen.co.kr)
call: 031-420-9288

†† 교신저자 (e-mail: dmsal@caregen.co.kr)
call: 031-420-9281

HHFDPCs. In addition, heptapeptide significantly increased mRNA expression levels of differentiation-related transcription factors of human hair germinal matrix cells (HHGMCs) and differentiation markers of human hair outer root sheath cells (HHORSCs). Additionally, we investigated the effect of heptapeptide on human hair follicle stem cells (HHFSCs) differentiation and found that the heptapeptide reduced the mRNA and protein levels of stem cell markers, while it increased those levels of differentiation markers. These results have indicated that the heptapeptide promotes proliferation or differentiation of various types of hair follicle constituent cells through the induction of Wnt/ β -catenin signaling. From the results, we have suggested that the heptapeptide in this study could be applied as a new functional material for the improvement of hair growth and alopecia.

Keywords: heptapeptide, human hair follicle, Lgr5, Wnt, β -catenin

1. 서론

일반적으로 탈모(alopecia)라고 부르는 모발 손실은 남성 뿐만 아니라 여성들에게서도 나타나며 스트레스, 유전적 소질, 생활방식, 영양결핍, 호르몬 불균형 등이 그 원인으로 알려져 있다[1]. 많은 종류의 후보물질들이 탈모치료에 논의되었지만[2], 현재까지는 모발이식이나 FDA 승인을 받은 미녹시딜과 피나스테라이드만이 탈모치료에 사용되고 있는 실정이다[3,4]. 그러나 이들의 효험은 제한적이거나 일시적으로 나타나고 불안정한 효과나 부작용을 초래한다. 따라서 탈모 억제 능력을 가진 새로운 후보물질을 발굴하는 작업이 더욱 필요하다.

모낭의 주요 구성 세포인 HHFDPC 및 각질형성세포의 활성을 통해 생성된 모발은 두피 보호나 체온조절, 성적 매력 어필 등 다양한 역할을 한다. 모발 성장은 성장기(anagen), 퇴화기(catagen), 휴지기(telogen)의 세 단계의 순환 과정으로 구성된다[5]. 탈모는 모발 성장 주기가 불균형을 이루어 성장기가 감소하고 퇴화기가 증가하는 원인으로 나타난다[6,7]. 이를 바탕으로, 모발의 퇴화기를 성장기로 전환하고 성장기를 지속시켜 탈모를 치료하는 것을 목표로 연구가 진행되고 있다.

Wnt/ β -catenin 경로는 모낭의 재생에 있어서 중요한 역할을 하고 성장기에 나타나는 유전자들을 활성화시켜 모발 성장을 유도하는 탈모 억제 물질들의 이상적인 신호 경로이다. 최근 연구들에서 이 β -catenin은 HHFDPC의 성장기를 활성화시켰고 반대로 퇴화기에 β -catenin 감소를 보여주었다. 또한 팽대부(bulge region) 줄기세포내의 β -catenin 활성화가 마우스의 모발 재생을 유도하였다[8-10]. HHFDPC에서 나타나는 FGF, HGF, VEGF 등 많은 신호전달 인자들은 bulge 내의 HHGMC와 HHORSC에 직접적인 영향을 주고 이로 인해 모발 성장 주기를 조절한다[11-14].

Leucin-rich G protein coupled receptor 5 (Lgr5)는 모낭의 bulge, secondary hair germ, 그리고 lower outer root sheath에서 발현되며, 특히 Wnt-responsive HHFSC의 마커로 잘 알려져 있다 [15-16]. Lgr5의 리간드로 알려진 R-spondin 결합 시 homologue ring finger 43 (RNF43)/zinc and ring finger 3 (ZNRK3)와 복합구조를 형성하여 세포 내 이동 및 프로테아좀 분해가 유도되며, 이에 따라 frizzled 수용체가 안정화되어 Wnt 신호전달 증가가 이루어지는 것으로 알려져 있다[17-18]. Lgr5를 발현하는 HHFSC는 모낭 주위의 모든 세포에 영향을 주고 모발 순환 시 휴지기를 성장기로 전환하는데 있어서 필수적인 역할을 한다[19-21].

2~50개의 아미노산으로 구성된 펩타이드는 높은 생체 친화성과 생산 효율로 인해 화장품 및 의약품에 사용되고 많은 연구 개발이 이루어지고 있으며 활성 펩타이드는 천연 단백질, 합성 라이브러리, 또는 유전자 재조합 라이브러리에서 유래된다[22,23].

본 연구에서는, SPR 시스템 분석을 통해 신규 펩타이드의 Lgr5에 대한 결합친화도 상승을 확인하였고, 이후 모낭 구성 세포에서의 펩타이드 효능을 확인하였다. HHFDPC에서 Wnt/ β -catenin 경로 촉진으로 인한 세포 활성 증가를 확인하였고, 그 외의 모낭 구성 세포인 HHORSC, HHGMC, HHFSC의 분화 마커 발현 촉진 효과를 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약

펩타이드 합성 과정에서 사용한 2-CTC resin은 BeadTech (Korea)사의 제품을 사용하였고 fmc-아미노산, hydroxybenzotriazole (HOBt), N,N,N',N'-tetramethyl-O-(1H-benzotriazol-1-yl) uronium hexafluorophosphate (HBTU)는 CSBio Co. (USA) 제품을 사용

하였다. Dimethylformamide (DMF), N,N-diisopropylethylamine (DIEA), piperidine, trifluoroacetic acid (TFA), triisopropyl silane (TIS), diethyl ether 와 같은 합성에 사용된 시약은 대정화금 (Korea)의 제품을 구입해 사용하였다.

SPR 분석에 사용한 series S sensor chip CM5, N-ethyl-N'-(dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)/N-hydroxysuccinimide (NHS) amine coupling kit, 10 mM sodium acetate (pH 4.0), 10 X HBS-EP buffer 모두 Cytiva (USA)에서 구입하였다.

세포 실험에서 사용한 mesenchymal stem cell media (MSCM)은 ScienCell (USA)에서 구입하였고 fetal bovine serum (FBS)는 thermo fisher scientific (USA)에서 구입하였으며 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), phosphate buffered saline (PBS) 및 penicillin/streptomycin은 웰진(Korea)에서 구입하였다. Human hair follicle stem cell media는 CELPROGEN에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 대정화금(Korea) 제품을 구입하였고 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma-Aldrich (USA)에서 구입하여 사용하였다. HDAC1, α -tubulin에 대한 항체는 Santa cruz biotechnology (USA)에서 구입하였고, phospho-Akt, phospho-ERK, Akt, ERK, β -catenin에 대한 항체는 Cell Signaling Technology (USA)에서 구입하였다. 또한 CD34, Keratin 15, α -SMA 항체는 Abcam (UK) 제품이 며 K6hf 항체는 NOVUS (USA)에서 구입하였다. 이차항체인 goat anti-mouse IgG Ab와 goat anti-rabbit IgG Ab는 Jackson Immunoresearch (USA)에서 구입하였다. Recombinant human Lgr5 단백질은 R&D systems (USA)에서 구입하였다.

2.2. 실험방법

2.2.1. 펩타이드 합성

Capacity 0.54 mmol/g인 2-CTC 레진을 DMF 용매를 포함한 반응기에서 팽윤 반응을 15 min 동안 실시하였다. 위의 반응기에 3 당량 Fmoc-arginine 과, 2.5 당량 DIEA 를 DMF 용매로 가한 후 실온에서 2 h 동안 반응하였다. DMF 로 레진 세척 후, deprotection solution (piperidine : DMF = 2 : 8) 을 20 min간 처리하여 아미노산의 Fmoc을 제거하였다. 카이저 테스트 키트(Sigma Aldrich, USA)를 사용하여 반응의 종결을 확인하고 레진을 DMF로 세척 하였다. 이후 arginine, lysine, leucine, valine, histidine, arginine 순서로 다음 과정을 반복하였다. 2 당량 Fmoc-아미노산과 2 당량 HBTU, 2 당량 HOBT, 2.5당량 DIEA 를 DMF 용매로 가한 후 2시간 동안 반응 하였다. 카이저 테스트로 반응의 종결

을 확인하고 DMF로 세척하였다. 최종 합성 완료 후, cleavage cocktail solution (trifluoroacetic acid : water : triisopropylsilane = 95 : 2.5 : 2.5)을 사용하여 펩타이드를 레진에서 분리하고 diethyl ether를 이용하여 침전 시킨 후 건조를 진행하여 펩타이드 최종 생성물을 회수하였다.

합성된 펩타이드의 순도를 high-performance liquid chromatography (HPLC, U-3000, Thermo fisher scientific, USA) 분석을 통해 확인하였으며, C₁₈ (Pursuit XRs, 250 × 4.65 mm 100 Å, Agilent, USA) 컬럼을 이용하여 이동상 0.1 % TFA in water / 0.1 % TFA in acetonitrile gradient 하에 유속 1 mL/min 조건으로 UV 214 nm 에서 검출하여 확인하였다.

분자량 확인을 위해 LC-MS/MS (3200 Q-trap, AB SCIEX, USA) 분석을 진행하였으며 C₁₈ 컬럼을 이용하여 이동상 0.1 % formic acid in water/0.1 % formic acid in acetonitrile gradient 하에 유속 0.25 mL/min 조건으로 MS/MS로 검출 확인 하였다. MS/MS 분석 조건은 ESI Positive mode, Source/Gas : CUR = 20, CAD = High, IS = 5500, TEM = 350, GS1 = 50, GS2 = 50/Compound DP = 50 ~ 80, EP = 10, CE = 10 ~ 50, CES = 1 ~ 10로 확인하였다(Table 1).

2.2.2. 표면 플라즈몬 공명 분석(SPR Analysis)

헵타펩타이드와 Lgr5간에 결합력은 Biacore T200 system (USA) 장비를 이용하였고 표면 플라즈몬 공명 기법을 통해 측정되었다. EDC/NHS amine coupling kit을 사용하여 Human recombinant Lgr5-His 단백질을 1800 RU값으로 CM5 sensor chip에 고정하였다. 헵타펩타이드를 HBS-EP 완충용액과 함께 25 °C에서 분당 30 μ L 비율로 flow cell 안에 주입하였다. 이후 데이터 분석에는 Biacore T200 evaluation software ver. 3.1 (USA)를 이용하였다.

2.2.3. 세포 배양

실험에 사용한 HHFDPC, HHORSC, HHGMC 세포는 ScienCell (USA)에서 구입하였고 5 % FBS, 1 % penicillin/streptomycin을 포함한 MSCM 배지로 37 °C, 5 % CO₂조건 하에서 배양하였다. HHFSC 세포는 CELPROGEN (USA)에서 구입하였고 human hair follicle stem cell media with

Table 1. Synthesized Heptapeptide

Name	Sequence	Purity (%)	M.W. (Da)
Heptapeptide	NH ₂ -RHVLKRR-OH	98.8	964.2

serum 배지로 배양하였다. 배양 조건은 위와 동일하다.

2.2.4. 세포 증식 확인 실험

세포의 증식에 대한 효능을 확인하기 위해 HHFDPC를 4×10^3 cells/well 밀도로 96 well plate에 분주하여 24 h 배양 후 24 h 동안 serum-free DMEM 배지로 배양하였다. 이후 serum-free DMEM 배지 조건에서 헵타펩타이드를 10, 50, 100 μ M 농도로 처리하고 37 °C에서 72 h 동안 배양 하였다. 배양이 완료된 세포를 이용하여 다음과 같이 MTT assay를 진행하였다. 5 mg/mL MTT를 각 well에 10 μ L씩 첨가하고 4 h 동안 37 °C 조건에서 유지한 후 배지를 제거하고 DMSO 100 μ L를 처리하여 포마잔(formazan)을 녹였다. 분광광도계(SpectraMax M2e, Molecular device, USA)를 사용하여 540 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

2.2.5. 유전자 발현 분석(RT-PCR)

유전자 발현 관찰을 위한 처리 조건은 다음과 같다. HHFDPC, HHORSC, HHGMC 세포를 2×10^5 cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 24 h 배양 후 24 h 동안 serum-free DMEM 배지로 배양하였다. 이후 serum-free DMEM 배지 조건에서 헵타펩타이드를 농도별로 처리하고 37 °C에서 24 h 동안 배양 하였다.

모낭줄기세포의 분화 관찰을 위한 처리 조건은 다음과 같다. HHFSC 세포를 2×10^5 cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 24 h 배양 후 24 h 동안 serum-free human hair follicle stem cell media로 배양하였다. 이후 serum-free human hair follicle stem cell media 조건에서 헵타펩타이드를 농도별로 72 h 처리하였다.

배양 종료 후 easy-BLUE kit (iNtRON Biotechnology, Korea)로 세포를 회수하고 RNA를 분리한 후 RT DryMIX (enzymomics, Korea)를 이용하여 cDNA 합성을 진행 하였다. 이 후 DryMIX-nTaq (enzymomics, Korea)와 각 유전자에 대한 프라이머(Table 2)를 이용하여 샘플 준비 후, PCR 장비 (Vapo. Protect, Eppendorf, Germany)를 이용하여 annealing temperature를 60 °C로 설정하고 30 cycle로 PCR 진행한 다음 전기영동을 통해 유전자 발현 양상을 확인하였다. 이미지 촬영 및 분석은 molecular imager[®] Gel Doc[™] XR System (Bio-Rad, USA)을 이용하여 진행 하였다.

2.2.6. 단백질 발현 분석(Western Blotting)

세포 증식 관련 인자인 Akt 및 ERK의 인산화 수준 관

Table 2. Primer Sequences

Gene	Primer
LEF1	Forward 5'- CCAGCTATTGTAACACCTCA -3'
	Reverse 5'- TTCAGATGTAGGCAGCTGTC -3'
Cyclin-D1	Forward 5'- ACCTTCGTTGCCCTCTGTGCCACAGATG -3'
	Reverse 5'- AGGCCCGGAGGCAGTCCGGGT -3'
c-Myc	Forward 5'- ACCAGCAGCGACTCTGAGGAGGAAC -3'
	Reverse 5'- TGACCCCTCTGGCAGCAGGATAGTCC -3'
HGF	Forward 5'- CAATGCCTCTGGTTCCCCCTT -3'
	Reverse 5'- CCCCTCGAGCATTTTCGACAG -3'
KGF	Forward 5'- TCTGTGAAACACAGTGGTACCT -3'
	Reverse 5'- GTGTGTCCATTTAGCTGATGCAT -3'
VEGF	Forward 5'- ATGAACTTTCTGCTGTCTTGGGT -3'
	Reverse 5'- TGGCCTTGGTGAGGTTTGATCC -3'
Ha3-II	Forward 5'- GATCATCGAGCTGAGACGCA -3'
	Reverse 5'- CTGGCCCCAGGGTATCTAGT -3'
KRT5	Forward 5'- CCCTCAAGGATGCCAGGAAC -3'
	Reverse 5'- CACTGCTACCTCCGCAAC -3'
KRT14	Forward 5'- CCAAATCCGCACCAAGGTCA -3'
	Reverse 5'- GTATTGATTGCCAGGAGGGGG -3'
MSX2	Forward 5'- CGGTCAAGTCGAAAATTCA -3'
	Reverse 5'- GAGGAGCTGGGATGTGGTAA -3'
HOXC13	Forward 5'- GCCGTCTATACGGACATCCC -3'
	Reverse 5'- GCAGTACACCTGACTGTCCC -3'
CD34	Forward 5'- CGGCATGCAAGTGTGACACC -3'
	Reverse 5'- GACATTGCCCTTCCCTTTG -3'
CD133	Forward 5'- GAGACCAAAGAGGCGTTGGA -3'
	Reverse 5'- GGCTAGTTTTTACGCTGGTC -3'
KRT15	Forward 5'- CCAGCAAGACGGAGATCACA -3'
	Reverse 5'- GAAGAGGCTTCCCTGATGGC -3'
SOX9	Forward 5'- CAGGTGCTCAAAGGCTACGA -3'
	Reverse 5'- CGCCTTGAAGATCCCGTTG -3'
Corin	Forward 5'- CAGTGAATCTGCATCCCCG -3'
	Reverse 5'- CAGCGATGCTCTGTTGTGG -3'
Versican	Forward 5'- CCGTCTTCCCAGGAAACTT -3'
	Reverse 5'- TGCAGCGATCAGGTGCTTTA -3'
Vimentin	Forward 5'- TGGACCAGCTAACCAACGAC -3'
	Reverse 5'- GTCATTGTTCCGGTTGGCAG -3'
GAPDH	Forward 5'- GGAGCCAAAAGGGTCATCAT -3'
	Reverse 5'- GTGATGGCATGGACTGTGGT -3'

찰을 위한 처리 조건은 다음과 같다. HHFDPC 세포를 2×10^5 cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 24 h 배양 후 24 h 동안 serum-free DMEM 배지로 배양하였다. 이후 serum-free DMEM 배지 조건에서 헵타펩타이드를 농도별로 30 min 처리하였다.

활성화된 β -catenin 핵 이동 관찰을 위한 처리 조건은 다음과 같다. HHFDPC 세포를 2×10^5 cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 24 h 배양 후 24 h 동안 serum-free DMEM 배지로 배양하였다. 이후 serum-free DMEM 배지 조건에서 헵타펩타이드를 농도별로 24 h 처리하였다. β -catenin의 핵과 세포질 분리를 위해서 Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents (Thermo, USA)를 사용하였다.

모낭줄기세포의 분화 관찰을 위한 처리 조건은 다음과 같다. HHFSC 세포를 2×10^5 cells/well 밀도로 6 well plate에 분주하여 24 h 배양 후 24 h 동안 serum-free human hair follicle stem cell media로 배양하였다. 이후 serum-free human hair follicle stem cell media 조건에서 헵타펩타이드를 농도별로 72 h 처리하였다.

배양 종료 뒤 lysis buffer (Merk, Germany)로 세포를 용해한 후 BCA protein assay kit (Thermo, USA)을 이용한 단백질 정량을 진행하였다. 각 처리군의 단백질 양을 맞춰 샘플 준비하여 SDS-PAGE 및 PVDF membrane으로의 transfer 진행하였다. 0.5 % Tween 20을 포함한 PBS에 녹인 5 % 탈지분유로 2 h blocking한 후 각 단백질에 대한 항체 부착을 4 °C 에서 overnight 과정으로 진행하였다. 이차 항체에 부착된 HRP를 western detection reagent 와 반응한 후 Amersham ImageQuant™ 800 (Cytiva, USA) 으로 이미지 분석을 진행하였다.

2.2.7. 통계

본 연구에서 실시된 모든 실험은 3 회 이상 반복되었고 데이터의 통계적 유의성 검정은 student's *t*-test로 시행되었다. 실험 결과 값들은 mean \pm standard deviation (SD)으로 나타내었고 *p* value 0.05 미만인 경우를 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 헵타펩타이드와 Lgr5의 결합 확인

우리는 Biacore T200 장비를 이용한 SPR 분석을 통해 Lgr5에 대한 헵타펩타이드의 binding을 확인하였다. Lgr5-

immobilized CM5 chip에 분석물인 헵타펩타이드를 농도별로 주입 후 sensorgram을 확인하였을 때 비교적 빠른 association과 빠른 dissociation이 관찰되었지만 농도 의존적인 response unit (RU) 증가가 관찰되었다(Figure 1A). 결합 친화도 분석을 위해 Biacore T200 evaluation software 3.1을 이용하여 1 대1 fitting을 진행하였고 그 결과, K_D value는 $182.4 \pm 55.8 \mu\text{M}$ 로 산출되었다(Figure 1B).

3.2. 헵타펩타이드의 HHFDPC 증식 촉진 효과

헵타펩타이드가 HHFDPC의 증식을 높일 수 있는지 확인하기 위해 헵타펩타이드를 10, 50, 100 μM 로 72 h 처리 후 MTT assay를 수행하였다. 그 결과 농도 의존적인 세포 증가 경향이 관찰되었고 고농도에서 최대 38 %의 증식 촉진이 이루어지는 것을 확인할 수 있었다(Figure 2A).

세포 신호 경로 중 세포 증식과 서바이벌에 관련된

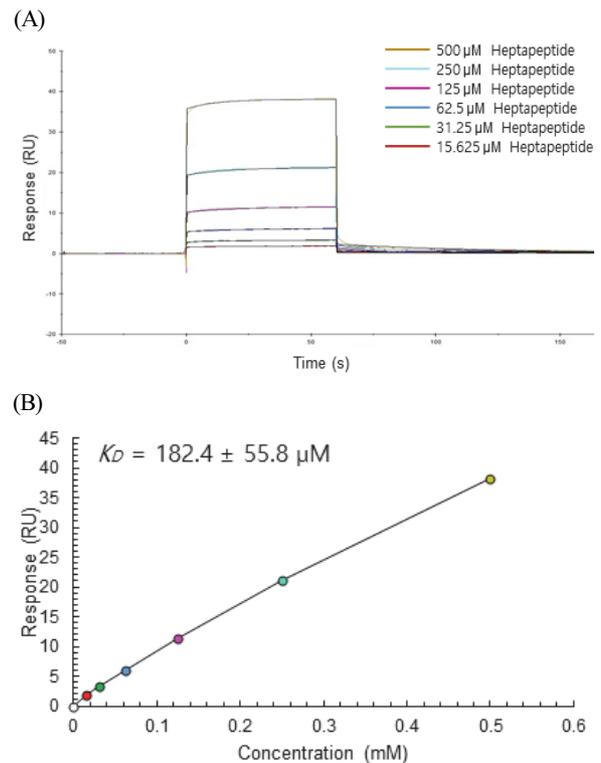


Figure 1. (A) Typical SPR sensorgrams are demonstrated interaction of heptapeptide with immobilized Lgr5 protein at different concentrations (15.625 to 500 μM) on the CM5 chip. (B) Shown here is the heptapeptide ($K_D = 182.4 \pm 55.8 \mu\text{M}$). The binding responses (RU) have been reference subtracted and normalized for clarity.

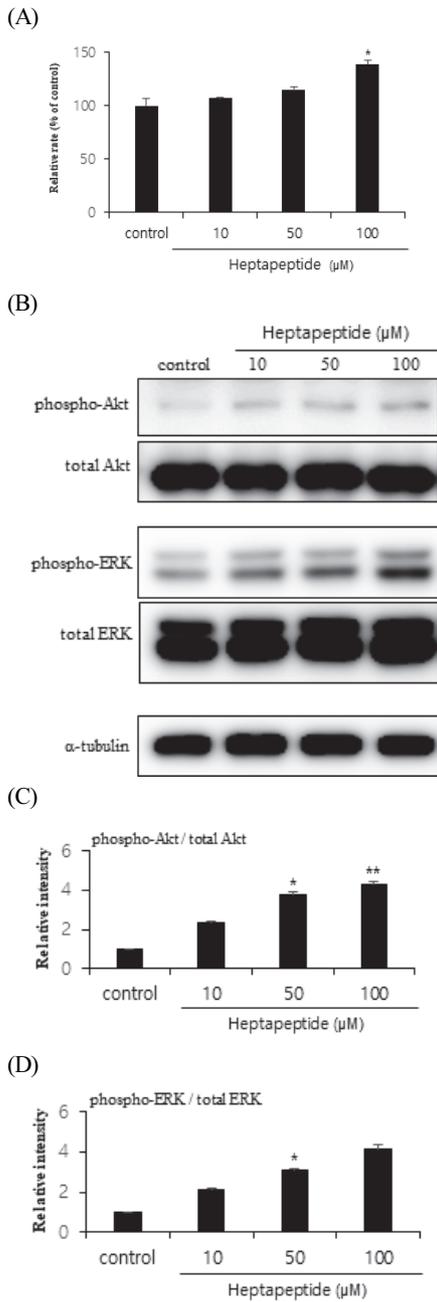


Figure 2. Heptapeptide stimulated HHFDPCs proliferation. (A) Cells were treated with three concentrations of heptapeptide for 72 h and cell viability was measured by MTT assay. (B) Cells were treated with various concentrations of heptapeptide for 30 min and the levels of phospho-Akt and phospho-ERK were analyzed by western blotting. The ratio of phospho-Akt / total Akt (C) and phospho-ERK / total ERK (D) was calculated. The results were expressed as the mean ± SD from the three independent experiments **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

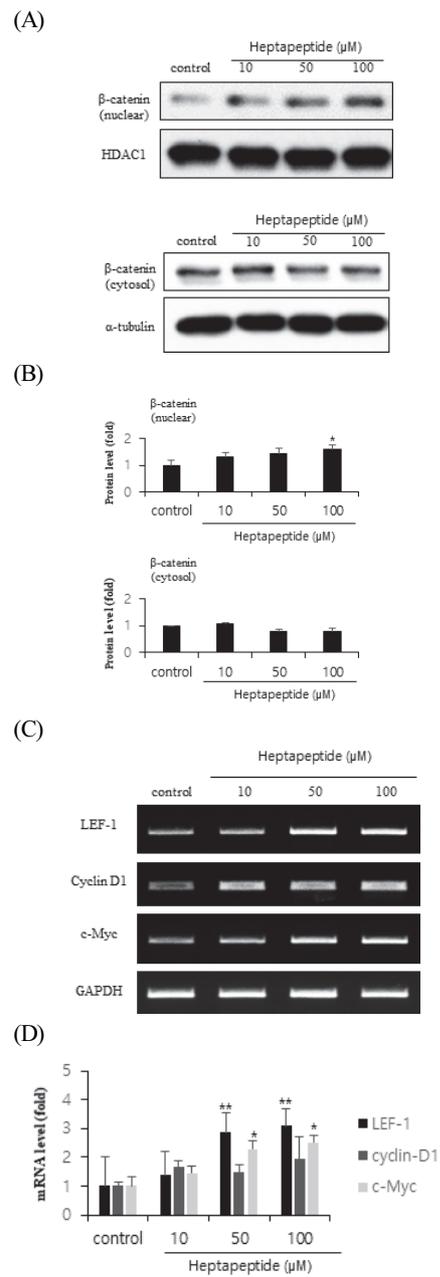


Figure 3. Heptapeptide activated the Wnt/β-catenin signaling pathway in HHFDPCs. HHFDPCs were treated with heptapeptide for 24 h. (A) The protein levels of cytoplasmic and nuclear β-catenin in the HHFDPCs were determined by western blotting. (B) Quantitative analysis of β-catenin (cytoplasmic and nuclear) protein level. (C) LEF-1, cyclin D1 and c-Myc mRNA levels were determined by RT-PCR. (D) Relative mRNA expression levels of LEF-1, cyclin D1 and c-Myc. The western blotting and RT-PCR results are the mean ± SD from duplicates of three independent experiments. **p* < 0.05, ***p* < 0.01.

molecule인 ERK와 Akt의 인산화 정도를 관찰하기 위해 western blotting을 수행하였다[24]. 그 결과 헵타펩타이드 처리군 전체에서 유의한 인산화 증가가 확인되었다(Figure 2B). 헵타펩타이드 고농도 처리군에서 phospho-Akt와 phospho-ERK 모두 4 fold 이상의 증가율을 나타내었다(Figure 2C, D). 이 결과로 헵타펩타이드가 HHFDPC 내에서 Akt와 ERK의 인산화를 통해 세포 증식을 나타내는 것을 알 수 있었다.

3.3. 헵타펩타이드에 의한 Wnt/ β -catenin 신호전달 활성화

헵타펩타이드가 HHFDPC에서 Wnt/ β -catenin 경로를 조

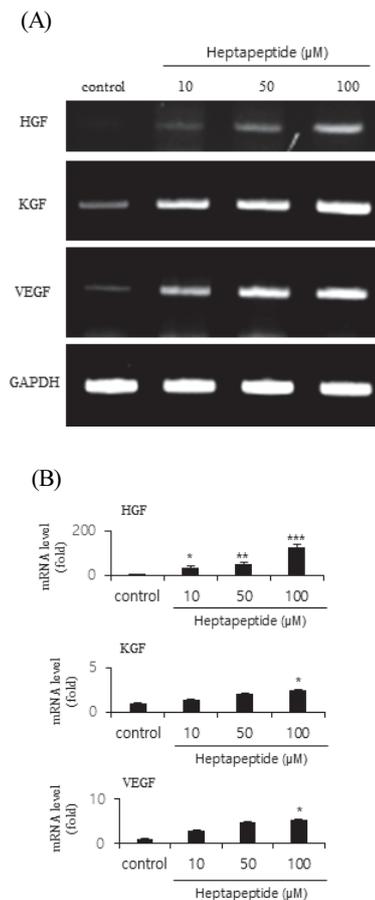


Figure 4. Heptapeptide increased the expression of growth factors in HHFDPCs. (A) The HGF, KGF, and VEGF mRNA expression levels were measured by RT-PCR. (B) The fold changes were normalized to the expression of GAPDH. The results were expressed as the mean \pm SD from the three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

절하는지 알아보기 위해서 Nuclear & cytosol fractionation 후 western blotting을 진행하였다(Figure 3A). 핵 내의 β -catenin 단백질 양이 헵타펩타이드 농도 의존적 처리군에서 최대 59 %로 점차 증가 하였지만 반대로 세포질 내의 β -catenin은 감소한 것을 알 수 있다(Figure 3B). β -catenin 표적 유전자들의 발현 정도를 알아보기 위해 헵타펩타이드를 HHFDPC에 24 h 처리 후 RT-PCR을 수행한 결과(Figure 3C), LEF-1, Cyclin-D1, c-Myc 유전자 모두 농도별로 높은 증가율을 나타내었다. LEF-1 발현은 3 fold 이상 증가하였고 cyclin-D1은 1.9 fold 증가를 나타내었다. C-Myc는 헵타펩타이드 고농도 처리군에서 최대 2.5 fold 이상 발현 수준을 보여주었다(Figure 3D). 본 결과를 통해 헵타펩타이드가 세포내 β -catenin의 활성을 유도하고 하위 표적 유전자들의 발현을 상승시키는 것이 확인되었다.

3.4. 헵타펩타이드의 성장인자 발현 효과

성장인자가 모발성장에 미치는 영향에 대해서 EGF, IGF, FGF, VEGF 등이 관여한다고 밝혀진 바 있다. 그리고 KGF, HGF는 모발성장을 촉진시키는 paracrine growth factor라고 보고하였다[25]. 본 연구에서는 헵타펩타이드가 HGF, KGF, VEGF 발현을 촉진시켰는데(Figure 4A), 이는 대조군 대비 각각 127 fold, 2 fold, 5 fold 이상의 수준이었다(Figure 4B).

3.5. 헵타펩타이드로 인한 ORS와 GMC의 표적인자 발현 효과

헵타펩타이드가 HHFDPC 외에 주변 세포에 어떠한 영향을 주는지 관찰하고자 각 세포들 중 대표되는 표적인자들의 발현 정도를 확인하였다. 모근 분화과정에서 KRT5와 KRT14는 HHORSC 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다[26]. HHORSC에 헵타펩타이드를 농도별로 처리 시 Ha3-II, KRT5, KRT14 발현이 점차 증가하였다. 그 중에 Ha3-II 발현은 20 fold 이상 증가하였고 KRT14는 29 fold 증가하는 등 HHORSC 분화에 영향을 줄 것으로 확인되었다(Figure 5A, B). MSX2와 HOXC13은 HHGMC 전사인자로서 모발 성장기에 케라틴 합성을 조절하고 모발로 분화시키는 역할을 한다[27,28]. 헵타펩타이드는 HHGMC에서 MSX2와 HOXC13의 발현을 증가시켰다(Figure 5C). GAPDH 보정 후 HOXC13이 50 fold이상 크게 증가하는 양상을 보였다

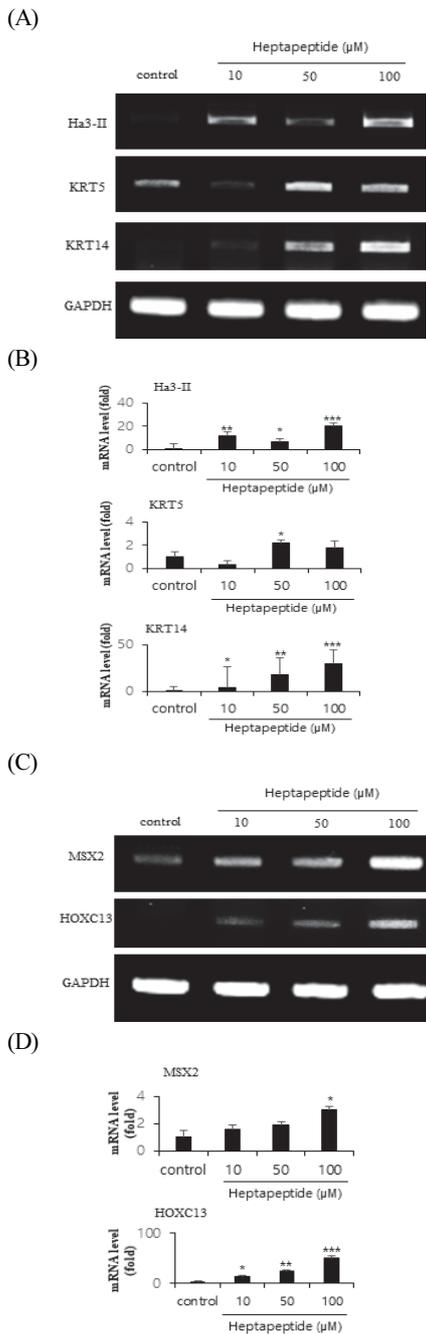


Figure 5. Heptapeptide increased the expression of differentiation markers in HHORSCs and HHGMCs. (A), (C) Cells were treated with various concentrations of heptapeptide for 24 h. mRNA expression levels were measured by RT-PCR. (B), (D) The bands that were densitometrically measured and normalized against the mRNA expression level of GAPDH. The RT-PCR results are the mean \pm SD from duplicates of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

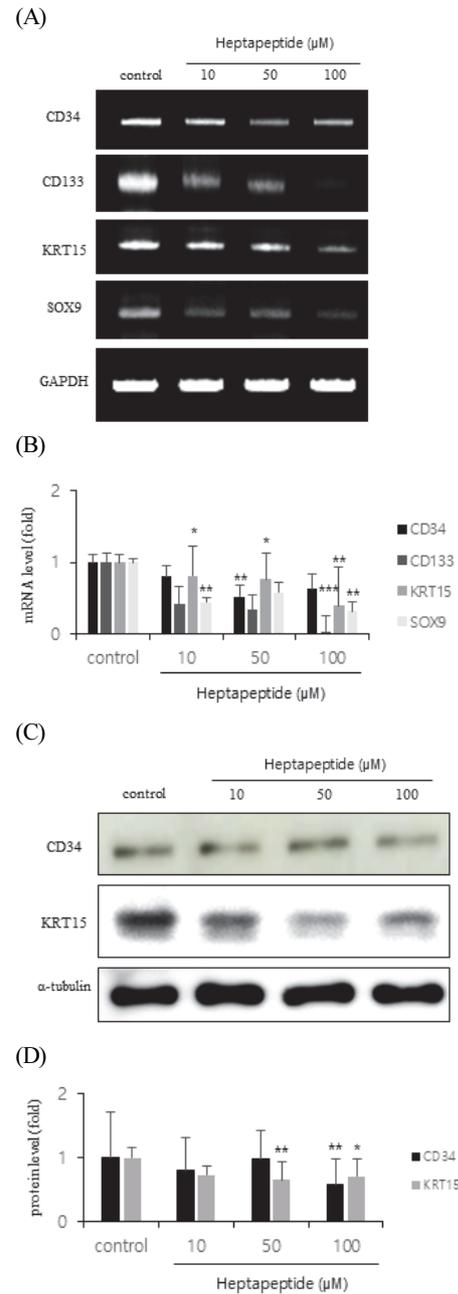


Figure 6. Heptapeptide decreased the expression of stem cell markers in HHFSCs. (A) mRNA expression levels of CD34, CD133, KRT15 and SOX9 were measured by RT-PCR. (B) The fold changes were normalized to the expression of GAPDH. (C) Protein levels of CD34 and KRT15 protein levels were detected by western blot. (D) The fold changes were normalized to the expression of α -tubulin. The RT-PCR and western blotting results are the mean \pm SD from duplicates of three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

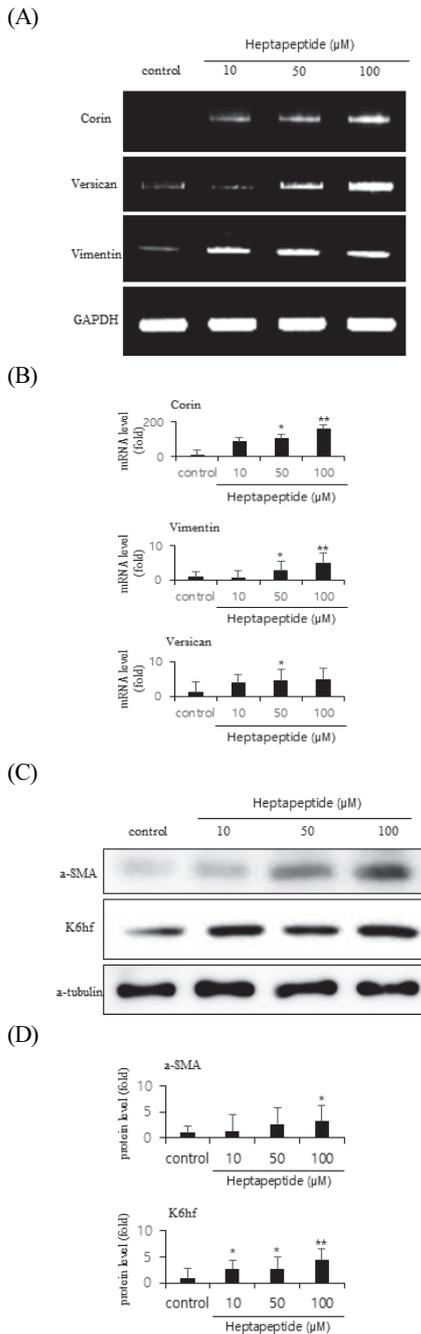


Figure 7. Heptapeptide increased the expression of differentiation markers in HHFSCs. (A) mRNA expression levels of Corin, Versican, Vimentin were measured by RT-PCR. (B) The fold changes were normalized to the expression of GAPDH. (C) Protein levels of α -SMA and K6hf were detected by western blot. (D) The fold changes were normalized to the expression of α -tubulin. The results were expressed as the mean \pm SD from the three independent experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

(Figure 5D). 헵타펩타이드가 HHFDPC뿐만 아니라 모발을 구성하는 세포들에 영향을 주어 모발 성장을 도울 수 있을 것으로 사료되는 부분이다.

3.6. 헵타펩타이드의 HHFSC 분화 촉진 효과

HHFSC의 분화에 대한 헵타펩타이드의 효능을 관찰하고자 각각의 표지 인자들의 mRNA 발현 및 단백질 수준을 관찰하였다. HHFSC 표지인자인 CD34와 KRT15 mRNA 발현 level이 감소하였고 CD133과 SOX9는 각각 96%, 68%의 높은 감소를 나타내었다(Figure 6A, B). CD34와 KRT15 단백질 level 역시 감소하는 경향을 보였다(Figure 6C, D). HHFSC 분화 시 증가되는 HHFDPC 표지 인자들에 대한 mRNA 발현을 확인하였는데 Corin (159 fold), Versican (4.9 fold), Vimentin (4.5 fold)이 농도 의존적인 증가를 나타내었고(Figure 7A, B), α -SMA와 K6hf는 단백질 수준에서 상승하였다(Figure 7C, D). 헵타펩타이드가 HHFSC의 분화능을 조절해 HHFDPC로 분화시킬 수 있다는 것을 입증하는 결과였다.

4. 결론

R-spondin은 Wnt 신호기전을 증진시키는 역할을 하는 단백질로써 Lgr4, Lgr5, Lgr6에 결합하여 β -catenin의 분해를 막는 동시에 Wnt 활성을 가져온다[29,30]. 정상 마우스에 비해 R-spondin이 결합된 마우스에서 모발 성장이 더디게 나타났고 R-spondin 투여 시 HHFDPC와 hair dermal keratinocyte의 증식이 촉진되는 등 모낭 전구세포의 활성화에 영향을 주었다[31]. 이에 중점을 두고 본 연구에서는 7개의 아미노산으로 이루어진 헵타펩타이드를 이용한 발모 촉진과 신호기작, 모낭줄기세포 분화 활성화 등을 규명하고자 하였다.

우리는 Wnt/ β -catenin 신호 경로를 향상시켜 모발 유지 및 발모에 중요한 역할을 하는 Lgr5에 대한 헵타펩타이드의 결합을 SPR 분석법으로 확인하였다. 이후 HHFDPC에서의 헵타펩타이드 활성을 확인해보았고, 세포 증식 관련 인자인 Akt, ERK의 인산화 수준 증가가 관찰되었다. 또한 헵타펩타이드에 의해 세포 핵 내로의 β -catenin 이동이 유도되었고, 그 하위 유전자들인 LEF-1, Cyclin-D1, c-Myc 역시 높은 수치로 발현이 증가되었다. 성장인자 발현에서는 HGF가 헵타펩타이드에 의해 월등히 높은 증가를 보이며 HHFDPC 활성화에 긍정적인 역할을 할 것으로 여겨졌다. 이

와 더불어 HHFDPC 주변 세포인 HHORSC와 HHGMC에 대한 헵타펩타이드의 효능을 관찰하였을 때 각각의 분화 표지 인자들인 Ha3-II, KRT5, KRT14 및 MSX2, HOXC13 발현 역시 증가를 나타내었다.

흥미롭게도 신규 헵타펩타이드는 인체 모낭 줄기세포 분화에도 영향을 주었다. 모낭 줄기세포의 대표적 표지 인자인 CD34와 KRT15가 단백질과 mRNA level에서 줄어든 반면에 HHFDPC 특이적 표지 인자들 중 Corin, Versican, K6hf 의 수준이 두드러지게 증가하여 줄기세포 분화에도 관련되는 것으로 나타났다.

위의 결과들을 바탕으로 모발의 성장 촉진 및 탈모 개선 소재로서 본 연구의 헵타펩타이드가 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

References

1. Y. E. Kim, H. C. Choi, G. W. Nam, and B. Y. Choi, Costunolide promotes the proliferation of human hair follicle dermal papilla cells and induces hair growth in C57BL/6 mice, *J. Cosmet. Dermatol.*, **18**(1), 398 (2019).
2. V. H. Price, Treatment of hair loss, *N. Engl. J. Med.*, **341**(13), 964 (1999).
3. K. D. Kaufman, E. A. Olsen, D. Whiting, R. Savin, R. DeVillez, W. Bergfeld, V. H. Price, D. van Neste, J. L. Roberts, and M. Hordinsky, Finasteride in the treatment of men with androgenetic alopecia, Finasteride male pattern hair loss study group, *J. Am. Acad. Dermatol.*, **39**(4), 578(1998).
4. J. L. Burton and A. Marshall, Hypertrichosis due to minoxidil, *Br. J. Dermatol.*, **101**(5), 593 (1979).
5. S. Tiede, J. E. Kloeppe, D. A. Whiting, and R. Paus, The 'follicular trochanter' : an epithelial compartment of the human hair follicle bulge region in need of further characterization, *Br. J. Dermatol.*, **157**(5), 1013 (2007).
6. M. R. Schneider, R. Schmidt-Ullrich, and R. Paus, The hair follicle as a dynamic miniorgan, *Curr. Biol.*, **19**(3), R132-R142 (2009).
7. G. Cotsarelis and S. E. Millar, Towards a molecular understanding of hair loss and its treatment, *Trends Mol. Med.*, **7**(7), 293 (2001).
8. D. Enshell-Seijffers, C. Lindon, K. Kashiwagi, and B. A. Morgan, β -catenin activity in the dermal papilla regulates morphogenesis and regeneration of hair, *Dev. Cell.*, **18**(4), 633 (2010).
9. T. Tong, N. Kim, and T. Park, Topical application of oleuropein induces anagen hair growth in telogen mouse skin, *PLoS One*, **10**(6), e0129578 (2015).
10. D. Van Mater, F. T. Kolligs, A. A. Dlugosz, and E. R. Fearon, Transient activation of beta-catenin signaling in cutaneous keratinocytes is sufficient to trigger the active growth phase of the hair cycle in mice, *Genes Dev.*, **17**(10), 1219 (2003).
11. G. Cotsarelis, T. T. Sun, and R. M. Lavker, Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis, *Cell*, **61**(7), 1329 (1990).
12. M. P. Philpott, D. A. Sanders, and T. Kealey, Effects of insulin and insulin-like growth factors on cultured human hair follicles: IGF-I at physiologic concentrations is an important regulator of hair follicle growth *in vitro*, *J. Invest. Dermatol.*, **102**(6), 857 (1994).
13. L. Guo, L. Degenstein, and E. Fuchs, Keratinocyte growth factor is required for hair development but not for wound healing, *Genes Dev.*, **10**(2), 165 (1996).
14. S. Shimaoka, R. Tsuboi T Jindo, R. Imai, K. Takamori, J. S. Rubin, and H. Ogawa, Hepatocyte growth factor/scatter factor expressed in follicular papilla cells stimulates human hair growth *in vitro*, *J. Cell Physiol.*, **165**(2), 333 (1995).
15. V. Jaks, N. Barker, M. Kasper, J. H. van Es, H. J. Snippert, H. Clevers, and R. Toftgård, Lgr5 marks cycling, yet long-lived, hair follicle stem cells, *Nat. Genet.*, **40**(11), 1291 (2008).
16. K. M. Polkoff, N. K. Gupta, A. J. Green, Y. Murphy, J. Chung, K. L. Gleason, S. G. Simpson, D. M. Walker, B. Collins, and J. A. Piedrahita, LGR5 is a conserved marker of hair follicle stem cells in multiple species and is present early and throughout follicle morphogenesis, *Scientific Report*, **12**, 9104 (2022).
17. H. X. Hao, Y. Xie, Y. Zhang, O. Charlat, E. Oster, M. Avello, H. Lei, C. Mickanin, D. Liu, H. Ruffner, X.

- Mao, Q. Ma, R. Zamponi, T. Bouwmeester, P. M. Finan, M. W. Kirschner, J. A. Porter, F. C. Serluca, and F. Cong, ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner, *Nature*, **485**(7397), 195 (2012).
18. W. D. Lau, W. C. Peng, P. Gros, and H. Clevers, The R-spondin Lgr5 Rnf43 module- regulator of Wnt signal strength, *Genes Dev.*, **28**(4), 305(2022).
 19. A. Flores, J. Schell, A. S. Krall, D. Jelinek, M. Miranda, M. Grigorian, D. Braas, A. C. White, J. L. Zhou, N. A. Graham, T. Graeber, P. Seth, D. Evseenko, H. A. Coller, J. Rutter, H. R. Christofk, and W. E. Lowry, Lactate dehydrogenase activity drives hair follicle stem cell activation, *Nat. Cell. Biol.*, **19**(9), 1017 (2017).
 20. A. A. Smith, J. Li, B. Liu, D. Hunter, M. Pyles, M. Gillette, G. R. Dhamdhare, A. Abo, A. Oro, and J. A. Helms, Activating hair follicle stem cells via R-spondin2 to stimulate hair growth, *J. Invest. Dermatol.*, **136**(8), 1549 (2016).
 21. J. D. Hoeck, B. Biehs, A. V. Kurtova, N. M. Kljavin, F. S. E. Melo, B. Aliche, H. Koeppen, Z. Modrusan, R. Piskol, and F. J. Sauvage, Stem cell plasticity enables hair regeneration following Lgr5⁺ cell loss, *Nat. Cell Biol.*, **19**(6), 666 (2017).
 22. L. H. Kligman, C. H. Duo, and A. M. Kligman, Topical retinoic acid enhances the repair of ultraviolet damaged dermal connective tissue, *Connect Tissue Res.*, **12**(2), 139 (1984).
 23. J. J. Leyden, Treatment of photodamaged skin with topical tretinoin: an update, *Plast. Reconstr. Surg.*, **102**(5), 1667 (1998).
 24. K. M. Sohn, K. H. Jeong, J. E. Kim, Y. M. Park, and H. Kang, Hair growth-promotion effects of different alternating current parameter settings are mediated by the activation of Wnt/beta-catenin and MAPK pathway, *Exp. Dermatol.*, **24**(12), 958 (2015).
 25. W. H. Lin, L. J. Xiang, H. X. Shi, J. Zhang, L. P. Jiang, P. T. Cai, Z. L. Lin, B. B. Lin, Y. Huang, and H. L. Zhang, Fibroblast growth factors stimulate hair growth through β -catenin and Shh expression in C57BL/6 mice, *BioMed Res. Int.*, **2015**, 730139 (2015).
 26. H.J. Morgan, A. Benketah, C. Olivero, E. Rees, S. Ziaj, A. Mukhtar, S. Lanfredini, and G. K. Patel, Hair follicle differentiation-specific keratin expression in human basal cell carcinoma, *Clin. Exp. Dermatol.*, **45**(4), 417 (2019).
 27. L. F. Jave-Suarez, H. Winter, L. Langbein, M. A. Rogers, and J. Schweizer, HOXC13 is involved in the regulation of human hair keratin gene expression, *J. Biol. Chem.*, **277**(5), 3718 (2002).
 28. L. Ma, J. Liu, T. Wu, M. Plikus, T. X. Jiang, Q. Bi, Y. H. Liu, S. Müller-Röver, H. Peters, J. P. Sundberg, R. Maxson, R. L. Maas, and C.M. Chuong, 'Cyclic alopecia' in Msx2 mutants: defects in hair cycling and hair shaft differentiation, *Development.*, **130**(2), 379 (2003).
 29. K. S. Carmon, X. Gong, Q. Lin, A. Thomas, and Q. Liu, R-spondins function as ligands of the orphan receptors LGR4 and LGR5 to regulate Wnt beta-catenin signaling, *PNAS*, **108**(28), 11452 (2011).
 30. H. Ruffner, J. Sprunger¹, O. Charlat, J.,L. Davies, B. Grosshans, A. Salathe, S. Zietzling, V. Beck, M. Therier, A. Isken, Y. Xie, Y. Zhang, H. Hao, X. Shi, D. Liu, Q. Song, I. Clay, G. Hintzen, J. Tchorz, L.,C. Bouchez, G. Michaud, P. Finan, V. E. Myer, T. Bouwmeester, J. Porter, M. Hild, F. Bassilana, C. N. Parker, and F. Cong, R-Spondin potentiates Wnt/ β -catenin signaling through orphan receptors LGR4 and LGR5, *PLoS One*, **7**(7), e40976 (2012).
 31. A. Hagner, W. Shin, S. Sinha, W. Alpaugh, M. Workentine, S. Abbasi, W. Rahmani, N. Agabalyan, N. Sharma, H. Sparks, J. Yoon, E. Labit, J. Cobb, I. Dobrinski, and J. Biernaskie, Transcriptional profiling of the adult hair follicle mesenchyme reveals R-spondin as a novel regulator of dermal progenitor function, *iScience*, **23**(4), 101019 (2020).