Proopiomelanocortin유래 펩티드가 인체 모낭의 면역체계와 cytokine 분비에 미치는 영향

연세대학교 대학원
의 학 과
이 상 훈

Proopiomelanocortin유래 펩티드가 인체 모낭의 면역체계와 cytokine 분비에 미치는 영향

지도교수 이 원 수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2008년 1월 일

연세대학교 대학원
의 학 과
이 상 훈

이상훈의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2008년 1월 일

감사의 글

끝없는 학문의 길에 이제 한 이정표를 지나고 있다는 생각이 듭니다. 의대생, 의사, 피부과학 박사로 성장해오기까지 많은 어려움 속에서도 저를 바른 길로 이끌어 주신 하느님께 그리고 저를 믿고 항상 모든 지원을 아끼지 않았던 부모님을 비롯한 가족과 친지들에게 감사를 드립니다. 연구의 시작부터 끝까지 항상 세심하고 자상한 조언과 가르침으로 저를 여기까지 이끌어주신 이 원수 지도 교수님께 특별한 감사를 드리며 저에게 피부과 의사로서 자질을 갖추도록 가르쳐주신 안 성구 교수님과 최 응호 교수님께 감사드립니다. 좋은 논문이 될 수 있도록 충고와 격려를 아끼지 않으셨던 조 미연 교수님, 공 인덕 교수님, 박 주영 교수님께 감사드리며, 논문이 완성되기까지 많은 도움을 주신 피 용천 선생님께도 감사를 드립니다. 마지막으로 무엇보다도 사랑하는 아내 그리고 뱃속의 우리 아기 새봄이와 함께 이 기쁨을 나누고 싶습니다.

저 자 씀

차 례

그림 차례 · iii

표 차례 · vi

국문 요약 · vii

I. 서론 · 1

II. 재료 및 방법 · 6

A. 재료 · 6

(1) 연구대상 · 6

(2) 배지성분 · 6

(a) 모낭기관배양 배지 · 6

(b) 모낭세포배양 배지 · 6

B. 방법 · 7

(1) 인체 모낭기관 배양 · 7

(a) 인체 모낭기관의 분리 · 7

(b) 배양조건 · 7

(c) Semiquantitative RT-PCR of HLA-B · · · · · · · · · · · · · · 8

(d) 면역조직화학 염색 · 8

(2) 인체 모낭세포 배양 · 9

(a) 인체 모낭세포의 분리 · 9

(b) 배양조건 · 9

(c) Real-time RT-PCR · 10

C. 통계처리 · 10

(1) 인체 모낭기관 배양 · 10

(2) 인체 모낭세포 배양 · 10

III. 결과 · 12

A. 배양된 인체 모낭기관 배양에서 POMC유래 펩티드의 영향 · · · 12

(1) Semiquantitative RT-PCR of HLA-B · · · · · · · · · · · 12

(2) 면역조직화학 염색 · 13

B. 배양된 인체 모낭세포에서 POMC유래 펩티드 처치가 cytokine 발현에 미치는 영향 · 14

(1) 외측모근초 세포에서 각종 cytokine mRNA의 real-time RT-PCR · 14

(2) 모유두 세포에서 IGF-1과 TGF-β1 mRNA에 대한 real-time RT-PCR · 14

IV. 고찰 · 15

V. 결론 · 20

참고문헌 · 21

부록 · 27

영문요약 · 37

그 림 차례

Fig. 1. The result of semiquantitative RT-PCR of HLA-B in hair follicle organ culture; Lane 1. Control(No treatment), Lane 2. IFN-γ(75 IU/ml), Lane 3. IFN-γ+10^{-6}M ACTH, Lane 4. IFN-γ+10^{-7}M ACTH, Lane 5. IFN-γ+10^{-8}M ACTH, Lane 6. IFN-γ+10^{-6}M α-MSH, Lane 7. IFN-γ+10^{-7}M α-MSH, Lane 8. IFN-γ+10^{-8}M α-MSH, Lane 9. IFN-γ+10^{-6}M β-endorphin, Lane 10. IFN-γ+10^{-7}M β-endorphin, Lane 11. IFN-γ+10^{-8}M β-endorphin. 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M α-MSH, 10^{-6}M β-endorphin significantly down-regulated INF-γ induced ectopic HLA-B mRNA expression(n=3 hair follicles in each group). Data are presented as the mean ± SE · 27

Fig. 2. Immunohistochemical staining results of HLA class I in hair follicle organ culture(original magnification×100); 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M α-MSH, 10^{-6}M β-endorphin significantly suppressed INF-γ induced ectopic HLA-class I expression. The vertical axis means staining intensity. The intensity showed as score; none(-):0, weak(+):1, moderate(++):2, strong(+++):3. Data are presented as the mean ± SE. · · · · · 28

Fig. 3. Immunohistochemical staining results of MHC class I-pathway related molecules(β2-microglobulin) in hair follicle organ culture(original magnification×100); 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M α-MSH, 10^{-6}M β-endorphin significantly suppressed INF-γ induced ectopic β2-microglobulin expression. The vertical axis means staining intensity. The intensity showed as score; none(-):0, weak(+):1, moderate(++):2, strong

(+++):3. Data are presented as the mean ± SE. · · · · · · · · 29

Fig. 4. Immunohistochemical staining results of HLA class II (DP/DQ/DR) in hair follicle organ culture(original magnification×100); 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M α-MSH, 10^{-6}M β-endorphin have no statistically significant effect on INF-γ induced ectopic HLA class II expression. The vertical axis means staining intensity. The intensity showed as score; none(-):0, weak(+):1, moderate(++):2, strong(+++):3. Data are presented as the mean ± SE. · · · · · 30

Fig. 5. Real-time RT-PCR results in outer root sheath cell culture; 10^{-6}M α-MSH, 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M β-endorphin significantly down-regulated IL-1α expression. Data are presented as the mean ± SE · 31

Fig. 6. Real-time RT-PCR results in outer root sheath cell culture; 10^{-6}M α-MSH, 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M β-endorphin significantly down-regulated IL-1β expression. Data are presented as the mean ± SE · 31

Fig. 7. Real-time RT-PCR results in hair follicle cell culture; 10^{-7}M ACTH significantly down-regulated TNF-α expression. Data are presented as the mean ± SE · · · · · · · · · · · · · · 32

Fig. 8. Real-time RT-PCR results in outer root sheath cell culture; 10^{-6}M α-MSH, 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M β-endorphin have no statistically significant effect on TGF-β1 release. Data are presented as the mean ± SE · · · · · · · · · · · · · · 32

Fig. 9. Real-time RT-PCR results in dermal papilla cell culture; 10^{-6}M α-MSH, 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M β-endorphin have no statistically significant effect on IGF-1 release. Data are presented as the mean ± SE · · · · · · · · · · · · · · · · · · 33

Fig. 10. Real-time RT-PCR results in dermal papilla cell culture; 10^{-6}M α-MSH, 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M β-endorphin have no statistically significant effect on TGF-β1 release. Data are presented as the mean ± SE · · · · · · · · · · · · · · · 33

표 차 례

Table 1. Experimental design of Semiquantitative RT-PCR of HLA-B in hair follicle organ culture · · · · · · · · · · · · 34

Table 2. Primer sequence of Semiquantitative RT-PCR of HLA-B in hair follicle organ culture · · · · · · · · · · · · · · · · · 34

Table 3. Experimental design of immunohistochemical staining of HLA class I, β2-microglobulin and HLA class II in hair follicle organ culture · 35

Table 4. Primer sequence of real-time RT-PCR for each mRNA in hair follicle cell culture · · · · · · · · · · · · · · · · · · · 35

Table 5. Summary of real-time RT-PCR for each mRNA in ORS cell culture · 36

Table 6. Summary of real-time RT-PCR for each mRNA in DP cell culture · 36

국 문 요 약

Proopiomelanocortin유래 펩티드가 인체 모낭의 면역체계와 cytokine 분비에 미치는 영향

배경: Proopiomelanocortin(POMC)유래 신경펩티드는 피부를 포함한 다양한 조직에서 형성되어 다양한 면역 조절효과를 가진다. 모낭은 특이한 면역계를 나타내는 소기관으로 생장기 모낭의 근위부는 면역특권구역을 형성하는 것으로 알려져 있다. 이러한 모낭의 면역특권은 모낭주기에 따른 동적 변화를 보여 퇴행기나 휴지기에는 면역특권이 소실된다. 모낭 면역특권의 유지와 붕괴 및 재건에는 다양한 조절인자의 작용이 관여하는 것으로 알려져 있다.

목적: 본 연구에서는 인체 실험을 통해 POMC유래 펩티드가 모낭의 면역특권 형성과 모낭세포의 cytokine분비에 어떤 영향을 미치는지 조사하여, 모낭 면역체계에 POMC유래 펩티드가 어떠한 효과를 나타내는지 알아보고자 하였다.

방법: 배양된 인체 생장기 모낭에 interferon-γ(IFN-γ)를 첨가하여 major histocompatibility(MHC) class I의 이상발현을 유도하였다. 이후 POMC유래 펩티드가 이상 발현된 인체 모낭의 human leukocyte antigen(HLA)에 어떠한 변화를 보이는지 알아보고자 반정량적 역전사 중합효소연쇄반응(semiquantitative RT-PCR)과 면역조직화학 염색을 시행하였다. 또한 POMC유래 펩티드가 모낭세포에 직접적으로 미치는 영향을 알아보고자 외측모근초세포와 모유두세포 배양을 시행하여 모낭세포의 cytokine분비에 대한 영향을 real-time RT-PCR 방법을 통해 알아보았다.

결과: IFN-γ에 의해 표현된 모낭의 HLA class I의 이상 발현은 adrenocorticotropic hormone(ACTH), α-melanocyte stimulating hormone(α-MSH), β-endorphin 모두에 의해 억제되었으며, 특히 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M α-MSH, 10^{-6}M β-endorphin에서 그 발현감소 효과가 명확하게 나타났고 면역조직화학 염색에서도 유사한 결과를 나타냈다. 외측모근초세포 배양에서 POMC유래 펩티드는 모낭성장억제 및 염증유도 cytokine인 IL-1α와 IL-1β에 대해 억제효과를 보였다.

결론: POMC유래 펩티드(ACTH, α-MSH, β-endorphin)가 모낭 면역계의 조절 인자로 작용할 수 있다고 판단된다.

핵심 되는 말: 인체 모낭, Proopiomelanocortin(POMC), Adrenocorticotropic hormone(ACTH), α-melanocyte stimulating hormone(α-MSH), β-endorphin, Major histocompatibility(MHC), 면역특권, Cytokine

Proopiomelanocortin유래 펩티드가 인체 모낭의 면역체계와 cytokine 분비에 미치는 영향

<지도 이 원 수 교수>
연세대학교 대학원 의학과
이 상 훈

I. 서론

피부는 다양한 물리적 화학적 생물학적 자극에 직접적으로 노출되는 기관이다. 피부는 전신적인 자극뿐만 아니라 국소적인 자극에도 바로 반응을 나타내어 그 항상성을 유지해야 하는 인체의 중요한 방어막이다. 전신적인 스트레스에 대한 반응은 뇌하수체-시상하부-부신피질축(hypothalamus-pituitary-adrenal axis, HPA axis) 반응이 잘 알려져 있다. 이러한 HPA axis의 중요한 조절인자로 작용하는 corticotropin-releasing hormone(CRH)는 proopiomelanocortin(POMC)과 그 유래 펩티드의 생성과 분비를 가져오며, POMC유래 펩티드는 다양한 면역조절기능이 알려져 있다. 최근의 보고에 의하면 스트레스에 대한 반응은 중추신경계를 통한 반응만으로 이루어지는 것이 아니며, 말초 조직 자체에서도 그와 유사한 반응이 일어나고 있음이 알려지고 있다. 이러한 반응이 일어나는 가장 명백한 신체 부위가 피부이다[1-5].

피부의 방어막으로서의 역할은 잘 알려져 있으며 그 기전에는 물리적인 방어 외에도 다양한 종류의 호르몬, 신경전달물질(neurotransmitters), 신경펩티드(neuropeptides)의 작용이 관여하며 피부에서 실제로 이러한 물질들의 생성과 그 수용체가 확인되었다. 모낭은 대표적인 스트레스 반응성 기관으로 생각되고 있으며 최근 보고에 의하면 모낭은 전신적인 자극뿐만 아니라 국소적인 자극에도

반응하여 HPA axis와 유사한 분비와 되먹임 반응을 나타내어 모낭이 독립적인 면역기관으로서 작용을 할 수 있음이 알려지고 있다[6-8].

인간 POMC 유전자는 2번 염색체에 존재한다[7]. POMC 유전자는 뇌, 시상, 생식샘, 갑상선, 부신피질, 태반, 피부와 같은 다양한 신체 부위에서 발견되었다. 피부에서 POMC유전자의 전사가 일어나며 POMC유래 펩티드 형성을 위한 효소가 있음이 밝혀져 있다. POMC mRNA는 adrenocorticotropic hormone(ACTH), α-melanocyte stimulating hormone(α-MSH), β-endorphin, β-lipoprotein의 전구체 단백질을 합성한다. 이 후 PC1 또는 PC2 convertase와 같은 POMC 처리 효소를 통한 연속적인 세포 특이 처리과정과 전사 후 변형을 통하여 ACTH, α-MSH, β-endorphin과 같은 POMC유래의 최종 생산물이 형성되며, POMC유래 펩티드의 생성과 분비는 기관 특이성을 가지며 다양한 요인에 의해 조절을 받는다[5-10].

인체 피부에서 POMC 유전자는 정상 피부, 모반세포, 염증성 피부질환이나 피부암과 같은 상태에서도 나타나며, 또한 표피 각질세포와 멜라닌세포, 모낭 각질세포와 같은 피부세포 배양에서도 확인되었다. 인체 피부는 뇌하수체와 함께 POMC유래 펩티드의 주요한 생성기관이며 또한 표적기관으로 작용한다. 피부에서 POMC유래 펩티드는 주로 두피에서 발견되는데, 생장기 모낭의 외측모근초세포와 모기질에 잘 나타난다[9-12]. CRH는 전체 모발주기를 통해 모낭 협부(isthmus)의 모낭 주위 신경망(perifollicular neural network)에서 나타난다. 모낭세포에서 POMC 유전자와 ACTH, α-MSH, β-endorphin과 같은 POMC유래 펩티드가 발견되었으며 또한 그 수용체인 melanocortin(MC) 수용체, μ-opioid 수용체의 발현이 발견되었다[5-8]. 이는 모낭이 신경계의 영향을 받아 POMC유래 펩티드의 생성과 분비가 조절됨을 추정할 수 있다. POMC유래 펩티드는 세포 특이적인 생성과 그 수용체의 활성을 통해 모낭 성장, 색소형성, 피부방어기전, 피부 부속기의 분비 조절, 모낭 면역계를 포함한 모낭 주위 국소 면역반응, 진피내 혈관 또는 섬유아세포 등에도 영향을 미칠 수 있다[5-8,12].

모발은 생장기, 퇴행기, 휴지기를 반복하는 특이한 주기성을 가진다. POMC 유전자와 POMC유래 펩티드의 발현은 모발주기의 활동성 성장기인 생장기 모발에서는 잘 관찰되나 휴지기 모발에서는 아주 약하게 또는 거의 발현되지 않아 모낭주기에 따라 확실한 표현의 차이를 나타낸다. 이러한 모낭의 주기성은 MC-1 수용체의 표현, 모낭 색소형성, 모낭 신경계, 모낭 면역계의 변화와도 일치된 양상을 나타낸다. 따라서 모낭주기 의존적인 POMC유래 펩티드의 생성이 모낭 주기성을 결정하는 생물학적 시계의 중요한 조절 인자로 작용할 수 있음이 제시되고 있다[6,7,12].

생장기 모낭의 근위부는 특이하게 면역특권구역(immune privileged site)을 형성하는 것으로 알려져 있다. 하지만 생장기 모낭의 면역특권이 어떻게 형성되며, 모낭 주기에 따라 변화되는 기전에 대해서는 아직까지 확실하게 알지 못하고 있다. 지금까지 알려진 모낭의 면역특권형성에 관여하는 기전으로는 모낭 상피세포 근위부의 major histocompatibility(MHC) class I의 표현의 저하 또는 소실, 면역억제 작용을 나타내는 insulin growth factor(IGF)-1, transforming growth factor(TGF)-β, α-MSH와 같은 cytokine 또는 신경펩티드의 작용, 림프계 또는 상피세포내 T세포의 부재, 항원전달세포의 기능 이상 등이 관여할 것으로 생각되고 있으며, 이 외에도 모낭 면역특권의 생성과 유지에는 다양한 조절인자의 작용이 관여할 것이다. 이러한 면역특권의 붕괴가 원형탈모증과 같은 면역질환을 유발 할 수 있으며, 면역특권의 붕괴를 유발 할 수 있는 요인으로 스트레스, 자외선, 감염, 외부 자극, 면역적 이상이 관여될 것으로 생각되고 있다. 지금까지의 보고에 의하면 면역특권의 붕괴를 일으키는 기전에 interferon-γ(IFN-γ)가 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다. 강력한 퇴행기 유발인자로 알려진 INF-γ는 인체 모낭기관 배양에서 10 IU/ml의 용량으로도 human leukocyte antigen(HLA)-A/B/C의 유도를 가져오기에 충분하며, 75 IU/ml의 IFN-γ는 인체 모낭의 근위부의 외측모근초와 모기질에서 모낭을 퇴행기로 유도하지 않고 강력한 MHC class I의 유도를 가져오는 것으로 알려져 있다. 또한 IFN-γ는 모낭에서 MHC class I 뿐만 아니라 MHC class II의 이상발현을 유도하며 이러한 면역

특권의 붕괴가 면역세포의 공격을 유도할 수 있는 것으로 알려져 있다[3,13-17].

POMC에서 형성되는 신경 펩티드들은 피부를 포함한 다양한 조직에서 형성되어 다양한 효과를 가진다. α-MSH는 말초 혈관의 단핵구(monocyte)에서 생성되는 IFN-γ, tumor necrosis factor(TNF)-α등의 생성을 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다. 또한, ACTH와 α-MSH는 피부 멜라닌 생성에 관여할 뿐만 아니라 전반적으로 다양한 면역억제 효과를 나타내는 것으로 알려져 있으며, β-endorphin은 스트레스에 반응하는 대표적인 물질로 멜라닌 세포 활성에 관여하며 면역 조절자로서의 기능도 밝혀지고 있다[3,5,6,11,13-17].

모낭 세포는 epidermal growth factor(EGF), fibroblast growth factor(FGF) family, IGF-1과 같은 성장인자와 함께 interleukin(IL)-1α, IL-1β, IL-6, TNF-α, TGF-β1과 같은 다양한 cytokine을 생성할 수 있음이 밝혀져 있다. IL-1 과 TNF-α는 대표적인 염증유발 cytokine으로 잘 알려져 있으며, 모낭에서 모낭성장 억제인자로 작용한다고 알려져 있다. 인체 모낭의 외측모근초 세포에는 IL-1α, IL-1β, TNF-α, TGF-β1 등이 존재함이 확인되었고, 모유두 세포에는 TGF-β1, IGF-1, Keratinocyte growth factor(KGF), Hepatocyte growth factor(HGF) 등의 존재가 밝혀져 있다. TGF-β1, IGF-1은 면역억제 cytokine으로 알려져 있으며 모낭에서 TGF-β1은 모낭성장 억제 인자로 작용하며, IGF-1은 모낭이 퇴행기로 이행되는 것을 막는 효과가 있다고 알려져 있다. 모낭에서 발견되는 다양한 cytokine은 모낭 면역 반응에 중요한 역할을 할 것이라 생각되며 염증성 모발질환이나 탈모성 질환에서도 중요한 역할을 할 것이라 생각된다[13,18-19].

기존 보고된 많은 연구를 통해 POMC유래 펩티드의 면역 기능이 밝혀지고 있지만 아직까지 인체 모낭에서 생성된 POMC유래 펩티드와 그 수용체가 생장기 모낭의 특이한 면역특권의 유지에 어떻게 관여할 수 있으며, 모낭 면역 체계에 어떠한 영향을 미치는 지에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 인체 모낭 실험을 통하여 POMC유래 펩티드가 인체 모낭 기관의 HLA의 발현과 모낭

세포에서 발견되는 IL-1α, IL-1β, TNF-α, TGF-β1, IGF-1과 같은 면역반응 관련 cytokine분비에 어떻게 관여하는지 규명하여 아직까지 잘 알지 못하는 모낭 면역체계를 이해하는데 도움이 되고자 하였다.

II. 재료 및 방법

A. 재료

(1) 연구대상

성형수술 또는 모발 이식수술시 얻어진 건강한 정상 성인의 두피조직을 얻어 생장기 모낭을 분리하였다. 5명의 공여자에게 각각 55~65개씩의 모낭을 채취할 수 있었으며, 총 사용된 모낭 수는 약 300개 정도였다.

(2) 배지 성분

(a) 모낭기관배양 배지

Williams E medium(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 근간으로 하는 기본 배지에, 10 ug/ml insulin(Sigma, St, Louis, MO, USA), 10 ng/ml hydrocortisone(Sigma, St, Louis, MO, USA), 2 mM L-glutamine(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA), 100 IU/ml penicillin-100 ug/ml streptomycin(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)이 함유된 antibiotic-antimycotic solution을 첨가하여 제작하였다.

(b) 모낭세포배양 배지

외측모근초 세포(outer root sheath cell)는 EpiLife Medium(Cascade Biologics, Portland, OR, USA)에서 배양하였으며, 모유두 세포(dermal papilla cell)는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium(Cascade Biologics, Portland, OR, USA)을 근간으로 하는 기본 배지에 100 IU/ml penicillin-100 ug/ml streptomycin(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)이 함유된 antibiotic-antimycotic solution과 10% fetal bovine serum을 첨가하여 제작하였다.

B. 방법

(1) 인체 모낭기관 배양

MHC class I의 강력한 유도제인 IFN-γ(PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)를 첨가하여 배양된 인체 모낭에서 HLA class I의 이상발현을 유발하였다. IFN-γ의 농도는 모낭을 조기에 퇴행기로 유도하지 않는 75 IU/ml를 사용하였다[13].그리고 HLA class I을 이상 발현시킨 배양된 인체 모낭에서 POMC유래 펩티드가 미치는 영향에 대해 역전사 중합효소연쇄반응(Reverse transcription-Polymerase chain reaction, RT-PCR)과 면역조직화학 염색을 통해 조사하였다. 이때 사용된 IFN-γ와 POMC유래 펩티드의 농도 결정은 기존 문헌을 참고하여 결정하였다[13-19].

(a) 인체 모낭기관의 분리

Phillpott 등[20]의 방법을 변형하여 모낭을 분리하였다. 먼저 진피-피하지방층의 경계부에서 메스를 이용하여 수평으로 두피조직을 양분하여 윗부분을 버리고 아랫부분은 배양액이 담긴 배양용기에 담았다. 수술용 입체박리현미경 하에서 미세수술용 포셉(Watch marker's forcep)으로 모낭을 진피 쪽에서 부드럽게 잡아당겨서 뽑아내었다. 이때 모구(Hair bulb)가 손상되지 않고 부착된 진피성분(모유두, 결체조직초)이 건재한 생장기 모낭만을 따로 추려내어 실험에 사용하였다.

(b) 배양조건

분리된 생장기 모낭은 24 well plate(Corning, NY, USA)의 각 well 당 1개씩 넣고 모낭기관배양 배지 500 ㎕를 넣은 뒤 37℃, 5% CO_2/95% Air 상태에서 배양기에 넣어 배양하였다. 배지는 배양 2일째 한번 교환하였으며 모낭은 배지 안에서 자유롭게 부유하면서 4일간 배양하였다.

① 대조군: POMC유래 펩티드를 첨가하지 않은 기본배지에서 4일간 배양하였다.

② IFN-γ군: POMC유래 펩티드를 첨가하지 않은 기본배지에 75 IU/ml IFN-γ를 첨가하여 4일간 배양하였다.

③ POMC군: 기본배지에 75 IU/ml IFN-γ를 첨가하여 4일간 배양하였으며, 배양 2일째 각각의 배지에 10^{-6}M, 10^{-7}M, 10^{-8}M의 ACTH(Sigma, St, Louis, MO, USA), α-MSH(Sigma, St, Louis, MO, USA), β-endorphin(Sigma, St, Louis, MO, USA)을 첨가하였다. 이렇게 11개의 군으로 분류한 후 각각의 군 당 3~4개씩의 모낭을 배양하였으며, 같은 실험을 3회 반복하였다(Table. 1).

(c) Semiquantitative RT-PCR of HLA-B

배양 4일째 생장기 모낭에서 Trizol®(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 이용하여 total RNA를 추출한 다음 분광광도법(Spectrophotometry)을 이용하여 260 nm에서 농도를 측정하였다. 1 ug의 RNA를 random hexamer primer(Promega, Madison, WI, USA)와 Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase(Promega, Madison, WI, USA, MML-V RTase)를 사용하여 cDNA로 합성하였다. 모든 MHC class Ia transcripts를 인지하는 HLA-B primer와 Taq polymerase(Takara Shuzo, Otsu, Shiga, Japan)를 이용하여 PCR을 시행하였다(Table 2). PCR은 다음의 조건으로 시행하였다. 반응혼합물을 94℃에서 5분 denaturing시키고 94℃에서 denaturing 30초, 56℃에서 annealing 30초, 72℃에서 elongation 1분으로 35회 반복하고 마지막으로 72℃에서 10분간 extension시켰다. PCR 생성물은 ethidium bromide가 포함된 2% agarose gel에서 전기영동을 시행하였으며, PCR 생성물의 정량분석은 BandScan software(http://www.Glyco.com)를 이용하여 densitometry에 의한 HLA-B/GAPDH 비로 비교하였다.

(d) 면역조직화학 염색

RT-PCR실험을 통해 의미 있는 차이를 보였던 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M α-MSH, 10^{-6}M β-endorphin을 배양 2일째 첨가하여 2일간 더 배양한 후 면역조직화학 염색을 시행하였으며, 각각의 군 당 5~6개씩의 모낭을 사용하였다(Table. 3).

10% formalin을 이용하여 인체모낭을 고정시킨 후 기존 방법을 통해 파라핀 포매하였다. 파라핀 포매 조직을 각각 4 ㎛로 절편하여 HLA class I에 대한 monoclonal mouse antibody(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)와 human β

2-microglobulin에 대한 monoclonal mouse antibody(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), HLA DP/DQ/DR에 대한 monoclonal mouse antibody(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 이용하여 염색을 시행하였고, ultravision LP Detection System(LABVISION)을 이용하였다.

염색 강도의 판정은 염색조직결과를 사진으로 촬영하여 판독하였으며 3명의 관찰자가 맹검법(blinded manner)으로 사진의 염색정도를 판정하여 점수를 매겼다. 염색강도는 염색 안 됨(-):0점, 약하게 염색(+):1점, 중간정도의 염색(++):2점, 강하게 염색(+++):3점으로 환산하였다.

(2) 인체 모낭세포 배양

(a) 인체 모낭세포의 분리

① 외측모근초 세포의 분리

분리된 생장기 모낭에서 진피초(dermal sheath)부분을 제거한 후 37℃에서 5분간 trypsin 처리하였다. 피펫을 이용하여 외측모근초세포를 외측모근초에서 single cell로 분리한 후 37℃, 5% CO_2/95% Air 상태에서 배양기에 넣고 배양하였다.

② 모유두 세포의 분리

생장기 모낭에서 Mergerl 등[21]의 방법을 변형하여 모유두 세포를 분리하여 실험에 사용하였다. 먼저 수술용 입체박리 현미경 하에서 미세수술용 포셉으로 모구의 바로 윗부분을 부드럽게 잡고 서서히 압력을 가하면서, 모구의 아랫부분에 있는 결체조직낭(connective tissue sheath capsule)을 비스듬히 절개하여 모유두세포를 분리하였다. 분리된 모유두 세포는 37℃, 5% CO_2/95% Air 상태에서 배양기에 넣고 배양하였다.

(b) 배양조건

앞서 언급한 세포배양 배지를 사용하여 37℃, 5% CO_2/95% Air 상태에서 배양기에 넣고 배양하였다. 2~3세대 외측모근초 세포 및 모유두 세포를 실험에 사용하였다

① 대조군: POMC유래 펩티드를 첨가하지 않은 기본배지에서 24시간 배양하였다.
② 실험군: 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M α-MSH, 10^{-6}M β-endorphin을 첨가하여 24시간 배양하였다

(c) Real-time RT-PCR

모유두 세포 및 외측모근초 세포에서 Trizol®(Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 이용하여 total RNA를 추출한 다음 분광광도법을 이용하여 260nm에서 농도를 측정하였다. 1 ug의 RNA를 random hexamer primer와 MML-V RTase를 사용하여 cDNA로 합성하였다. PCR은 cDNA template 1 ul, 각 primer 10 pM. CYBR Green Supermix(Qiagen, Hilden, Germany)를 총 10 ul되도록 반응시켰다. PCR product는 Rotor-GeneTM 3000 (Corbett Life Science, Sydney, Australia)으로 검출하고 cycle threshold(Ct)값을 사용하여 GAPDH gene에 대한 상대적인 양을 구하였다. 모낭 외측모근초 세포 배양에서 IL-1α, IL-1β, TNF-α, TGF-β1의 mRNA를 측정하였고, 모유두 세포 배양에서 TGF-β1과 IGF-1의 mRNA를 측정하였다. 실험에 사용된 primer를 표로 나타내었다(Table. 4).

C. 통계처리

(1) 인체 모낭기관 배양

각각의 실험은 3회 이상 반복하였고 실험결과는 평균 ± 표준오차(mean ± SE)로 표시하였다. 각 변수 간의 통계검정은 IBM-PC용 통계프로그램(SPSS windows용 version 14.0)을 이용하였다. RT-PCR과 면역조직화학염색에서 대조군과 INF-γ군, INF-γ군과 POMC군과의 차이를 비교하기위해 모수적방법인 Student *t*-test를 이용하여 검증하였고 $p<0.05$인 경우에 통계적인 차이가 있는 것으로 간주하였다.

(2) 인체 모낭세포 배양

각각의 실험은 3회 이상 반복하였고 실험결과는 평균 ± 표준오차(mean ± SE)로

표시하였다. 각 변수 간의 통계검정은 IBM-PC용 통계프로그램(SPSS windows용 version 14.0)을 이용하였다. Real-time RT-PCR에서 대조군과 실험군과의 차이를 비교하기위해 모수적방법인 Student *t*-test를 이용하여 검증하였고 $p<0.05$인 경우에 통계적인 차이가 있는 것으로 간주하였다.

III. 결과

A. 배양된 인체 모낭기관 배양에서 POMC유래 펩티드의 영향

(1) Semiquantitative RT-PCR of HLA-B(Fig. 1)

4일간 배양한 인체 생장기 모낭은 모두 생장기 상태를 유지하였다. 배양 4일째 시행한 Semiquantitative RT-PCR의 결과에서 무처리 대조군과 비교하여 IFN-γ군은 통계적으로 유의한 차이를 보이는 HLA-B mRNA의 발현 증가가 나타났다.

ACTH의 경우 10^{-6}M, 10^{-7}M, 10^{-8}M 모든 농도에서 IFN-γ군보다 낮은 HLA-B mRNA의 경향이 나타났다. 특히 10^{-7}M ACTH 처리군에서 IFN-γ군과 비교할 때 통계적으로 유의한 발현 억제효과가 나타났다($p<0.001$).

α-MSH의 경우 10^{-6}M의 농도에서 IFN-γ군 보다 낮은 HLA-B mRNA의 발현이 나타났으며 통계적으로도 유의한 차이를 나타내었다($p<0.001$). 하지만 10^{-7}M, 10^{-8}M 농도에서는 IFN-γ군과 비교 시 HLA-B mRNA 발현의 차이가 나타나지 않았다.

β-endorphin의 경우 10^{-6}M, 10^{-7}M, 10^{-8}M 모든 농도에서 IFN-γ군 보다 낮은 HLA-B mRNA의 발현 경향이 나타났다. 10^{-6}M의 농도에서 다른 군과 비교해서 보다 낮은 HLA-B mRNA의 발현을 나타냈다($p<0.001$).

정리하면, IFN-γ에 의한 HLA-B mRNA의 발현 증가는 ACTH, α-MSH, β-endorphin 모두에서 억제되었으며, 특히 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M α-MSH, 10^{-6}M β-endorphin에서 IFN-γ군과 비교할 때 이상발현 억제효과가 통계적으로 유의한 차이를 나타냈다.

(2) 면역조직화학 염색

HLA class I에 대한 염색에서 IFN-γ군은 대조군의 모낭에 비해 근위부 모낭의 외측모근초세포 및 모기질에서 통계적으로 유의한 차이를 보이는 이상발현을 나타내었다. 이러한 IFN-γ에 의한 이상발현은 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M α-MSH, 10^{-6}M β-endorphin에 의해 억제되는 양상을 나타내었으며 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다(Fig. 2).

MHC class I 경로 관련 인자인 β2-microglobulin에 대한 염색에서 IFN-γ군은 대조군의 모낭에 비해 근위부 모낭의 외측모근초세포 및 모기질에서 통계적으로 유의한 차이를 보이는 발현 증가를 보였다. 이러한 IFN-γ에 의한 이상발현은 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M α-MSH, 10^{-6}M β-endorphin에 의해 억제되는 양상을 나타내었으며 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다(Fig. 3).

HLA class II(DP/DQ/DR)에 대한 염색에서는 대조군에 비해 IFN-γ군에서 발현이 통계적으로 유의하게 증가되는 양상을 보였으나, IFN-γ군과 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M α-MSH, 10^{-6}M β-endorphin간에는 통계적으로 유의한 차이를 나타내지는 않았다(Fig. 4).

정리하면, 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M α-MSH, 10^{-6}M β-endorphin은 모낭 근위부에서 IFN-γ 유도성 HLA class I과 β2-microglobulin의 이상발현을 억제하였으며, IFN-γ군과 비교할 때 통계적으로 유의한 차이를 나타내었으며, IFN-γ 유도성 HLA class II(DP/DQ/DR)의 이상발현에는 유의한 차이를 보이는 효과를 나타내지 않았다.

B. 배양된 인체 모낭세포에서 POMC유래 펩티드 처치가 cytokine 발현에 미치는 영향

(1) 외측모근초 세포에서 각종 cytokine mRNA의 real-time RT-PCR(Fig. 5 to fig. 8)

10^{-7}M ACTH는 IL-1α, IL-1β, TNF-α의 mRNA 발현을 억제하였으며 TGF-β1 mRNA의 발현에는 의미 있는 차이가 나타나지 않았다.

10^{-6}M α-MSH는 IL-1α, IL-1β의 mRNA 발현을 억제하였으며 TNF-α, TGF-β1 mRNA의 발현에는 의미 있는 차이가 나타나지 않았다(Fig. 8).

10^{-6}M β-endorphin은 IL-1α, IL-1β의 mRNA 발현을 억제하였으며 TNF-α, TGF-β1의 mRNA 발현에는 의미 있는 차이가 나타나지 않았다.

정리하면, 10^{-6}M α-MSH, 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M β-endorphin의 처리는 배양된 외측모근초 세포에서 IL-1α, IL-1β의 mRNA 발현이 억제되어 나타났으며, 10^{-7}M ACTH는 TNF-α mRNA의 발현을 억제하였다(Table 5).

(2) 모유두 세포에서 IGF-1과 TGF-β1 mRNA에 대한 real-time RT-PCR(Fig. 9 and fig. 10)

10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M α-MSH, 10^{-6}M β-endorphin 처리군 모두에서 IGF-1, TGF-β1의 mRNA 발현에 유의한 차이를 보이지 않았다 (Table. 6).

IV. 고찰

POMC에서 기원하는 신경펩티드와 그 수용체는 피부를 포함한 인체의 여러 장기에서 생성되어 다양한 생물학적 작용을 나타낸다. POMC유래 펩티드의 대표적인 물질인 ACTH, α-MSH, β-endorphin과 그 수용체가 모낭세포에서 발견되었으며 그 기능이 일부 밝혀지고 있다. 모낭은 대표적인 스트레스 반응성 기관으로 생각되고 있으며, 스트레스 또는 외부적 자극에 의해 생성된 CRH는 뇌하수체뿐만 아니라 모낭에서도 POMC 유전자 전사에 관여하여 그 작용을 나타낼 수 있다. POMC유래 펩티드는 멜라닌 형성과정에 작용하는 것이 잘 알려져 있지만, 이 외에도 다양한 면역반응 조절자로서의 기능이 있으며, 이는 POMC유래 펩티드가 모낭의 멜라닌 형성뿐만 아니라 모낭 면역계의 조절자로 작용할 수 있음을 생각할 수 있다[1-8,22-25].

모낭은 생장기, 퇴행기, 휴지기를 연속적으로 반복하는 특이한 주기성 변화를 보이는 특이한 기관이다. 이러한 모낭주기의 변화에는 다양한 성장인자와 cytokine의 변화, 면역계의 작용 등이 관여할 것으로 생각되고 있지만 아직까지 정확한 생리적 기전에 대해서는 확실하게 알려져 있지 않다. 생체 내에서 생장기 모낭의 협부와 이하 근위부에서는 특이적으로 MHC class I의 발현이 거의 나타나지 않거나 발현되지 않는다. 지금까지의 면역학적 연구에 의하면 핵이 있는 모든 세포는 MHC class I을 발현하는 것으로 알려져 있는데, 모낭 조직의 이러한 특징은 모낭 조직을 면역특권구역으로 작용하게 만들었다. 이에 반하여, 퇴행기 모발에서는 모낭 상피 전 층에서 MHC class I의 반응이 나타내고 휴지기 동안에는 이차 배(secondary germ)에 MHC class I 의 표현이 나타난다[26-28]. 또한, 원형 탈모증과 같은 면역 질환에서 MHC class I과 MHC class II가 강하게 발현되며 면역세포의 침윤이 동반되는 것을 볼 때, 이는 모낭 세포 자체가 MHC를 발현할 능력을 잃어버린 것이 아니고, 성장기 모발에서 기능적으로 그 발현이 억제되고 있기 때문인 것으로 생각되고 있다[29-34].

Ito 등[13]은 모낭 면역특권을 형성할 수 있는 물질로 면역억제 작용을 나타내는 IGF-1, TGF-β, α-MSH가 작용할 수 있다고 보고했다. 이 중 POMC유래 펩티드에 속하는 α-MSH는 멜라닌세포의 증식과 분화를 조절하여 멜라닌 색소 생성을 담당하는 것뿐만 아니라 단핵구에서 IL-10과 같은 면역억제 cytokine의 생성을 유도하고, 전신적인 α-MSH의 투여 시 피부 염증과 부종을 유발하는 IL-1, IL-6, TNF-α와 같은 cytokine을 길항하며, T-cell에서 IFN-γ의 생성을 억제하여 natural cytokine antagonist로서 광범위한 면역억제 역할을 하는 것으로 알려져 있다[35-39].

본 실험에서 IFN-γ 처리에 의해 이상 발현된 HLA class I이 10^{-6}M α-MSH 처리에 의해 억제되어 α-MSH는 강력한 면역조절기능을 보였다. 이러한 결과는 Ito 등[13]이 보고한 것과 유사하다고 할 수 있겠다. 또한 면역조직화학 염색에서도 이와 같은 결과를 확인 할 수 있었으며, MHC class I 경로 관련 인자인 β2-microglobulin 발현도 억제시켰다. β2-microglobulin은 MHC class I 과 내인성 항원 복합체의 안정화에 필요한 물질이다[13]. 따라서 α-MSH가 항원의 발현에 필수적인 MHC class I 표현 과정에 작용하며 이는 mRNA뿐만 아니라 단백질발현 수준에서도 함께 작용한다고 추정할 수 있으며 MHC class I 분자 형성 및 안정화 과정에도 작용한다고 할 수 있겠다. 그리고 모낭 외측모근초 세포 배양 실험에서 α-MSH는 염증반응 유도 및 모낭성장 억제 효과를 나타내는 cytokine으로 알려진 IL-1α와 IL-1β의 발현을 억제시켰다. 이는 α-MSH가 모낭세포에 직접적인 영향을 미쳐 염증반응 유발 억제 및 모낭 성장에도 관여 할 수 있음을 나타낸다고 할 수 있겠다.

ACTH의 분비는 CRH, 혈장내 유리 cortisol, 스트레스, 수면-각성 주기에 의해 영향을 받는다. 또한 ACTH의 분비는 다른 펩티드 분비에 의해 조절되기도 하는데 β-endorphin과 enkepahlin은 ACTH의 분비를 억제한다. ACTH는 α-MSH와 함께 멜라닌의 형성과 멜라닌 세포의 증식 및 이동, 가지돌기(dendrite)형성에 관여하며, cortisol의 분비를 유도하여 강력한 면역조절 기능을 가진다. α-MSH와

ACTH는 intercellular adhesion molecule(ICAM)-1과 같은 부착분자의 표현을 억제하며, ACTH는 생쥐의 모낭에서 생장기를 유도하는 작용을 하여 모발의 성장과 주기에도 중요한 조절인자로 보고되었다. 그 외 ACTH와 α-MSH는 피지 분비를 촉진하는 등의 피부의 다른 부속기에도 영향을 미친다[40-44].

본 실험에서 IFN-γ에 의해 이상 발현된 HLA class I mRNA의 발현이 10^{-6}M, 10^{-7}M, 10^{-8}M ACTH 에 의해 억제되었다. 또한 유사한 결과를 면역조직화학 염색에서도 확인할 수 있었다. 10^{-7}M ACTH는 β2-microglobulin의 발현에서도 억제 효과를 보여서 ACTH는 α-MSH와 유사한 결과를 보였다. 그리고 모낭세포 배양에서도 α-MSH와 유사하게 IL-1α와 IL-1β의 mRNA발현을 억제하였으며, TNF-α mRNA의 발현도 억제하였다. ACTH 는 α-MSH는 MC수용체를 활성화시킨다. α-MSH와 ACTH가 모낭에서 유사한 작용을 나타내는 것은 MC-1같은 수용체를 공유하여 그 효과를 나타내는 것이라 추정할 수 있으며, ACTH는 다른 POMC유래 펩티드보다 통계적으로 유의하게 TNF-α mRNA의 발현 억제에도 관여하여 강력한 면역억제 기능을 나타내었다.

β-endorphin의 분비는 ACTH의 혈장농도에 크게 영향을 받지 않으며 주로 스트레스와 같은 자극의 정도에 의해 조절된다. 스트레스는 뇌하수체-부신을 자극하여 β-endorphin, met-enkephalin, α-MSH 등의 분비를 촉진시키는데 이 중 β-endorphin은 가장 중요한 스트레스의 매개물질로 알려져 있으며, 스트레스에 따른 β-endorphin의 증가는 수 주간 지속 가능한 것으로 알려져 있다[45]. 면역학적인 측면에서 β-endorphin의 아편양 길항제(opioid antagonist)인 naloxone이 생쥐의 비장세포(splenocyte)에서 IL-4의 생산을 억제하며, 반대로 IL-2, IFN-γ의 생산을 촉진하여 Th1 immune response를 유도하는 것으로, β-endorphin과 같은 내인성 아편양 펩티드가 Th2 cytokine의 생성을 촉진하고 Th1 cytokine의 생성을 억제한다고 하였다[46-49]. 또한 최근 실험에서 β-endorphin은 인체 모낭의 멜라닌 형성과 멜라닌 세포 가지돌기 형성 및 증식을 유도하여 멜라닌세포의 표현형에 조절자로서 역할이 있음이 보고되었다[50,51].

본 실험에서 IFN-γ에 의해 이상 발현된 HLA class I mRNA의 표현이 10^{-6}M, 10^{-7}M, 10^{-8}M β-endorphin 의해 억제되었으며 특히 10^{-6}M에서 대조군 및 α-MSH와 ACTH군과 비교할 때 그 표현이 더욱 억제되어 강력한 면역조절기능을 보였다. 또한 MHC class I 경로 관련 인자인 β2-microglobulin의 표현을 억제하여 α-MSH 및 ACTH와 유사한 결과를 보였다. 이러한 점은 POMC유래 펩티드가 HLA 분자형성에 유사한 역할을 하는 것으로 추정할 수 있다. 그리고 모낭세포 배양에서 β-endorphin은 α-MSH와 ACTH와 유사하게 IL-1α와 IL-1β mRNA의 발현을 억제시켰다. β-endorphin은 스트레스 매개체로 잘 알려져 있으며, 모낭 각질세포와 모유두 세포에서 β-endorphin과 그 수용체인 μ-opioid 수용체가 있음이 밝혀져 있다. 모낭면역체계 에서 β-endorphin의 작용에 대해서는 아직까지 잘 알려져 있으나 본 실험을 통해 스트레스와 관련된 모낭질환에서 β-endorphin이 매개체로 작용할 수 있음을 추정할 수 있다.

이상의 결과로 생장기 모낭에서 POMC유래 펩티드인 ACTH, α-MSH, β-endorphin 모두가 모낭 근위부의 HLA class I 발현 억제에 중요한 역할을 할 수 있으며, 모낭성장억제 및 염증 유도 cytokine인 IL-1α와 IL-1β 발현의 억제 인자로 작용할 수 있다고 생각된다. 이러한 POMC유래 펩티드의 작용은 모낭을 면역특권 구역으로 유지하는데 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 또한 POMC유래 펩티드는 모낭의 면역반응에 중요한 조절자로서 작용할 것으로 추정된다. 따라서 POMC유래 펩티드 변화가 면역특권의 상실과 모낭을 휴지기로 이행하게 하는데 관여할 것으로 추정되며 모발 염증성 질환 및 탈모와도 관계가 있음을 추정할 수 있다. 실제로 POMC 유전자와 POMC유래 펩티드의 발현은 정적이기 보다는 모발주기, 자외선 노출, 외부 자극 또는 피부질환에 따라 확실한 표현의 차이를 나타낸다[14]. 다양한 피부질환 및 종양에서 POMC유래 펩티드의 증가는 여러 가지 가설이 제시되고 있으나 염증반응 억제 및 종양의 면역회피와 관계되어 있다고 생각되고 있다[33].

전신적인 스트레스뿐만 아니라 국소적인 자극에도 직접적인 영향을 받는 모낭 면역계는 다양한 방어인자를 통해 모낭을 보호하고 있다. POMC유래 펩티드의 모낭에서의 역할은 아직 명확하게 밝혀져 있지 않으나 이들의 면역조절 및 면역억제기능이 모발 및 다양한 질환에서 작용할 것으로 생각되며 향후 그 역할에 대한 연구가 지속되어야 할 것으로 생각된다. 인체 모낭에서 POMC유래 펩티드와 모낭 면역체계의 기전이 구체적으로 잘 파악된다면 호르몬, 신경펩티드, cytokine과 같은 물질의 변화를 인위적으로 유도하거나 조절 인자를 사용함으로써 탈모 및 모발질환의 치료에도 응용이 가능할 것이다.

본 연구에서는 POMC유래 펩티드가 모낭의 면역계와 모낭세포의 cytokine 분비에 미치는 영향을 규명하여 모낭 면역체계를 이해하고 향후 모발 질환의 병인 규명 및 치료에 기여할 것으로 판단된다.

V. 결론

이 연구에서는 인체 모낭기관 배양과 모낭세포 배양을 통하여 POMC유래 펩티드가 모낭의 면역체계와 모낭세포의 cytokine 분비에 미치는 영향을 규명하고자 하였으며 실험을 통해 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 인체 모낭기관 배양에서 POMC유래 펩티드(ACTH, α-MSH, β-endorphin)는 IFN-γ 유도성 HLA class I과 β2-microglobulin의 이상발현 억제를 나타내었으며, 특히 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M α-MSH, 10^{-6}M β-endorphin에서 그 발현감소 효과가 명확하게 나타났고 면역조직화학 염색에서도 유사한 결과를 나타냈다.
2. 인체 모낭 외측모근초세포 배양에서 POMC유래 펩티드(ACTH, α-MSH, β-endorphin)는 모낭성장억제 및 염증 유도 cytokine인 IL-1α와 IL-1β 발현의 억제 효과를 보였다.

이상의 결과로 POMC유래 펩티드는 인체 모낭에서 모낭 근위부의 HLA class I 발현 억제에 관여하며 모낭성장억제 및 염증 유도 cytokine인 IL-1α와 IL-1β 발현의 억제 인자로 작용할 수 있다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Ito N, Ito T, Kromminga A, Bettermann A, Takigawa M, Kees F, Straub RH, Paus R. 2005. "Human hair follicles display a functional equivalent of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and synthesize cortisol". FASEB J. Aug;19(10):1332-1334.
2. Peters EM, Arck PC, Paus R. 2006. "Hair growth inhibition by psychoemotional stress: a mouse model for neural mechanisms in hair growth control". Exp Dermatol. Jan;15(1):1-13.
3. Kono M, Nagata H, Umemura S, Kawana S, Osamura RY. 2001. "In situ expression of corticotropin-releasing hormone (CRH) and proopiomelanocortin(POMC) genes in human skin". FASEB J. Oct;15(12):2297-2299.
4. Paus R, Theoharides TC, Arck PC. 2006. "Neuroimmunoendocrine circuitry of the 'brain-skin connection'". Trends Immunol. Jan;27(1):32-39.
5. Slominski A, Wortsman J, Luger T, Paus R, Solomon S. "Corticotropin releasing hormone and proopiomelanocortin involvement in the cutaneous response to stress". 2000. Physiol Rev. Jul;80(3):979-1020.
6. Paus R, Botchkarev VA, Botchkareva NV, Mecklenburg L, Luger T, Slominiski A. 1999. "The skin POMC system(SPS). Leads and lessons from the hair follicle". Ann N Y Acad Sci. Oct 20;885:350-363.
7. Bertagna X. 1994. "Proopiomelanocortin-derived peptides". Endocrinol Metab Clin North Am 23:467-485.
8. Slominski A, Wortsman J, Tuckey RC, Paus R. 2007. "Differential expression of HPA axis homolog in the skin". Mol Cell Endocrinol. Feb;265-266.
9. Funasaka Y, Sato H, Chakraborty AK, Ohashi A, Chrousos GP, Ichihashi M. 1999. "Expression of proopiomelanocortin, corticotropin-releasing hormone

(CRH), and CRH receptor in melanoma cells, nevus cells, and normal human melanocytes". J Investig Dermatol Symp Proc. Sep;4(2):105-109.

10. Bateman A, Solomon S, Bennett HP. 1990. "Post-translational modification of bovine pro-opiomelanocortin". J Biol Chem 265:22130-22136.
11. Slominski A, Wortsman J, Mazurkiewicz JE, Matsuoka L, Dietrich J, Lawrence K, Gorbani A, Paus R. 1993. "Detection of proopiomelanocortin-derived antigens in normal and pathologic human skin. J Lab Clin Med". Dec;122(6):658-666.
12. Roloff B, Fechner K, Slominski A, Furkert J, Botchkarev VA, Bulfone-Paus S, Ziffer J, Krause E, Paus R. 1998. "Hair cycle-dependent expression of corticotrophin releasing factor(CRF) and CRF receptors(CRF-R) in murine skin". FASEB J 12:287-289.
13. Ito T, Ito N, Bettermann A, Tokura Y, Takigawa M, Paus R. 2004. "Collapse and restoration of MHC class-I-dependent immune privilege: exploiting the human hair follicle as a model". Am J Pathol. Feb;164(2):623-634.
14. Paus R, Nickoloff BJ, Ito T. 2005. "A 'hairy' privilege". Trends Immunol. Jan;26(1):32-40.
15. Paus R, Ito N, Takigawa M, Ito T. 2003. "The hair follicle and immune privilege". J Investig Dermatol Symp Proc. Oct;8(2):188-194.
16. Bohm M, Eickelmann M, Li Z, Schneider SW, Oji V, Diederichs S, Barsh GS, Vogt A, Stieler K, Blume-Peytavi U, Luger TA. 2005. "Detection of functionally active melanocortin receptors and evidence for an immunoregulatory activity of alpha-melanocyte-stimulating hormone in human dermal papilla cells". Endocrinology. Nov;146(11):4635-4646.
17. Paus R, Theoharides TC, Arck PC. 2006. "Neuroimmunoendocrine circuitry of the 'brain-skin connection'". Trends Immunol. Jan;27(1):32-39.
18. Ahmed AA, Nordlind K, Schultzberg M, Brakenhoff J, Bristulf J, Novick D,

Svenson SB, Azizi M, Lidén S. 1996. "Immunohistochemical studies of proinflammatory cytokines and their receptors in hair follicles of normal human skin". Acta Derm Venereol. Sep;76(5):348-352.

19. Danilenko DM, Ring BD, Pierce GF. 1996. "Growth factors and cytokines in hair follicle development and cycling: recent insights from animal models and the potentials for clinical therapy". Mol Med Today. Nov;2(11):460-467.
20. Phillpott MP, Green MR, Kealey T. 1990. "Human hair growth in vitro". J Cell Sci 97:463-471
21. Magerl M, Kauser S, Paus R, Tobin DJ. 2002. "Simple and rapid method to isolate and culture follicular papillae from human scalp hair follicles". Exp Dermatol. Aug;11(4):381-385.
22. Miller DB, O'Callaghan JP. 2002. "Neuroendocrine aspects of the response to stress.Metabolism". Jun;51(6 Suppl 1):5-10.
23. Millington GW. 2006. "Proopiomelanocortin (POMC): the cutaneous roles of its melanocortin products and receptors". Clin Exp Dermatol. May;31(3):407-412.
24. Kauser S, Thody AJ, Schallreuter KU, Gummer CL, Tobin DJ. 2005. "A fully functional proopiomelanocortin/melanocortin-1 receptor system regulates the differentiation of human scalp hair follicle melanocytes". Endocrinology. Feb;146(2):532-543.
25. Bohm M, Luger TA. 2004. "Melanocortins in fibroblast biology-current update and future perspective for dermatology". Exp Dermatol 13 Suppl 4:16-21.
26. Christoph T, Muller-Rover S, Audring H, Tobin DJ, Hermes B, Cotsarelis G, Ruckert R, Paus R. 2000. "The human hair follicle immune system: cellular composition and immune privilege". Br J Dermatol. May;142(5):862-873.
27. Westgate GE, Craggs RI, Gibson WT. 1991. "Immune privilege in hair

growth. J Invest Dermatol". Sep;97(3):417-420.

28. Mcdonagh AJ, Snowden JA, Stierle C, Elliott K, Messenger AG. 1993. "HLA and ICAM-1 expression in alopecia areata in vivo and in vitro: the role of cytokines". Br J Dermatol. Sep;129(3):250-256.
29. Gilhar A, Kalish RS. 2006. "Alopecia areata: a tissue specific autoimmune disease of the hair follicle". Autoimmun Rev. Jan;5(1):64-69.
30. Gilhar A, Paus R, Kalish RS. 2007. "Lymphocytes, neuropeptides, and genes involved in alopecia areata". J Clin Invest. Aug;117(8):2019-2027.
31. McElwee KJ, Freyschmidt-Paul P, Zöller M, Hoffmann R. 2003. "Alopecia areata susceptibility in rodent models". J Investig Dermatol Symp Proc. Oct;8(2):182-187.
32. Niederkorn JY. 2003. "Mechanisms of immune privilege in the eye and hair follicle". J Investig Dermatol Symp Proc. Oct;8(2):168-172.
33. McElwee KJ, Freyschmidt-Paul P, Sundberg JP, Hoffmann R. 2003. "The pathogenesis of alopecia areata in rodent models". J Investig Dermatol Symp Proc. Jun;8(1):6-11.
34. McElwee KJ, Hoffmann R. 2002. "Alopecia areata - animal models". Clin Exp Dermatol. Jul;27(5):410-417.
35. Eves PC, MacNeil S, Haycock JW. 2006. "alpha-Melanocyte stimulating hormone, inflammation and human melanoma". Peptides. Feb;27(2):444-452.
36. Cooper A, Robinson SJ, Pickard C, Jackson CL, Friedmann PS, Healy E. 2005. "Alpha-melanocyte-stimulating hormone suppresses antigen-induced lymphocyte proliferation in humans independently of melanocortin 1 receptor gene status". J Immunol. Oct 1;175(7):4806-4813.
37. Nagai H, Oniki S, Oka M, Horikawa T, Nishigori C. 2006. "Induction of cellular immunity against hair follicle melanocyte causes alopecia". Arch Dermatol Res. Aug;298(3):131-134.
38. Rasmussen N, Nelson F, Govitrapong P, Ebadi M. 1999. "The actions of

melanin and melanocyte stimulating hormone(MSH)". Neuro Endocrinol Lett. 20(5):265-282.

39. Luger TA, Brzoska T, Scholzen TE, Kalden DH, Sunderkötter C, Armstrong C, Ansel J. 2000. "The role of alpha-MSH as a modulator of cutaneous inflammation". Ann N Y Acad Sci. 917:232-238.
40. Slominski A, Wortsman J. Neuroendocrinology of the skin. 2000. Endocr Rev. Oct;21(5):457-487.
41. Slominski A, Tobin DJ, Shibahara S, Wortsman J. 2004. "Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation". Physiol Rev. Oct;84(4):1155-1228.
42. Paus R, Maurer M, Slominski A, Czarnetzki B. 1994. "Mast cell involvement in murine hair growth". Dev Biol 163:230 - 240.
43. Rose J. 1998. "Adrenocorticotropic hormone (ACTH) but not melanocyte stimulating hormone (MSH) as a mediator of adrenalectomy induced hair growth in mink". J Invest Dermatol 110:456 - 457.
44. Rousseau K, Kauser S, Pritchard LE, Warhurst A, Oliver RL, Slominski A, Wei ET, Thody AJ, Tobin DJ, White A. 2007. "Proopiomelanocortin (POMC), the ACTH/melanocortin precursor, is secreted by human epidermal keratinocytes and melanocytes and stimulates melanogenesis". FASEB J. Jun;21(8):1844-1856.
45. Baek SC, Kim CW. 1995. "Concentration of β - Endorphin in Plasma of Patients with Stress - Associated Dermatoses" Kor J Dermatol. 33(5): 841-846.
46. Sacerdote P, Gaspani L, Panerai AE. 2001. "Role of beta-endorphin in the modulation of immune responses: perspectives in autoimmune diseases". Adv Exp Med Biol. 493:137-142.
47. Sacerdote P, di San Secondo VE, Sirchia G, Manfredi B, Panerai AE. 1998. "Endogenous opioids modulate allograft rejection time in mice: possible

relation with Th1/Th2 cytokines". Clin Exp Immunol. Sep;113(3):465-469.

48. Sacerdote P, Gaspani L, Panerai AE. 2000. "The opioid antagonist naloxone induces a shift from type 2 to type 1 cytokine pattern in normal and skin-grafted mice". Ann N Y Acad Sci. 917:755-763.

49. Panerai AE, Sacerdote P. 1997. "Beta-endorphin in the immune system: a role at last?". Immunol Today. Jul;18(7):317-319.

50. Kauser S, Thody AJ, Schallreuter KU, Gummer CL, Tobin DJ. 2004. "beta-Endorphin as a regulator of human hair follicle melanocyte biology". J Invest Dermatol. Jul;123(1):184-195.

51. Tobin DJ, Kauser S. 2005. "Beta-endorphin: the forgotten hair follicle melanotropin". J Investig Dermatol Symp Proc. Dec;10(3):212-216.

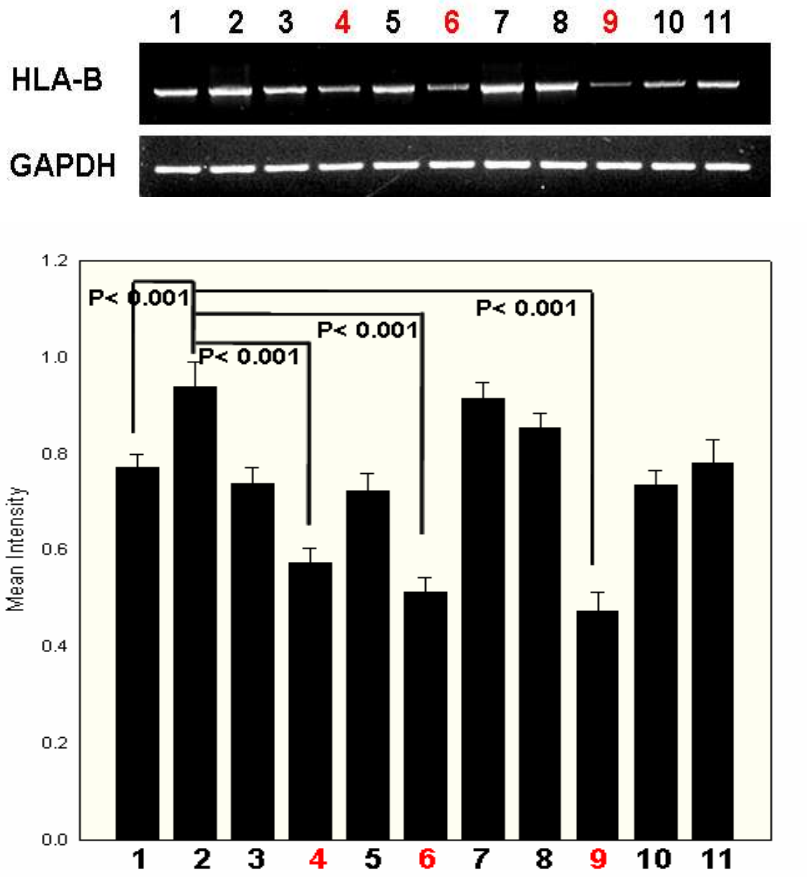

Fig. 1. The result of semiquantitative RT-PCR of HLA-B in hair follicle organ culture; Lane 1. Control(No treatment), Lane 2. IFN-γ(75 IU/ml), Lane 3. IFN-γ+10^{-6}M ACTH, Lane 4. IFN-γ+10^{-7}M ACTH, Lane 5. IFN-γ+10^{-8}M ACTH, Lane 6. IFN-γ+10^{-6}M α-MSH, Lane 7. IFN-γ+10^{-7}M α-MSH, Lane 8. IFN-γ+10^{-8}M α-MSH, Lane 9. IFN-γ+10^{-6}M β-endorphin, Lane 10. IFN-γ +10^{-7}M β-endorphin, Lane 11. IFN-γ+10^{-8}M β-endorphin. 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M α-MSH, 10^{-6}M β-endorphin significantly down-regulated INF-γ induced ectopic HLA-B mRNA expression(n=3 hair follicles in each group). Data are presented as the mean ± SE.

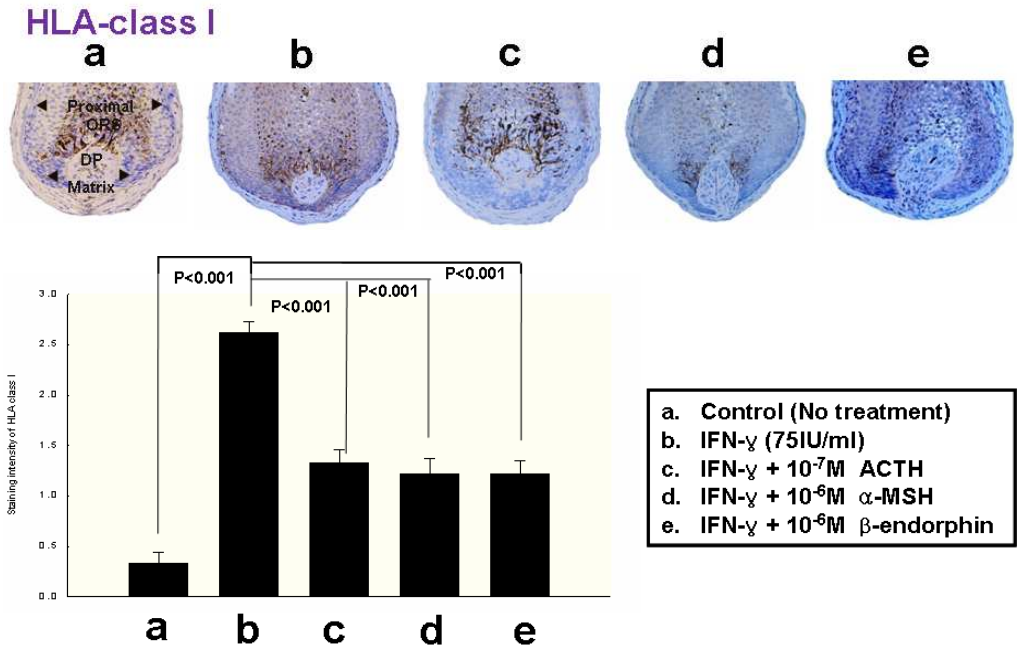

Fig. 2. Immunohistochemical staining results of HLA class I in hair follicle organ culture(original magnification×100); 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M α-MSH, 10^{-6}M β-endorphin significantly suppressed INF-γ induced ectopic HLA-class I expression. The vertical axis means staining intensity. The intensity showed as score; none(-):0, weak(+):1, moderate(++):2, strong(+++):3. Data are presented as the mean ± SE.

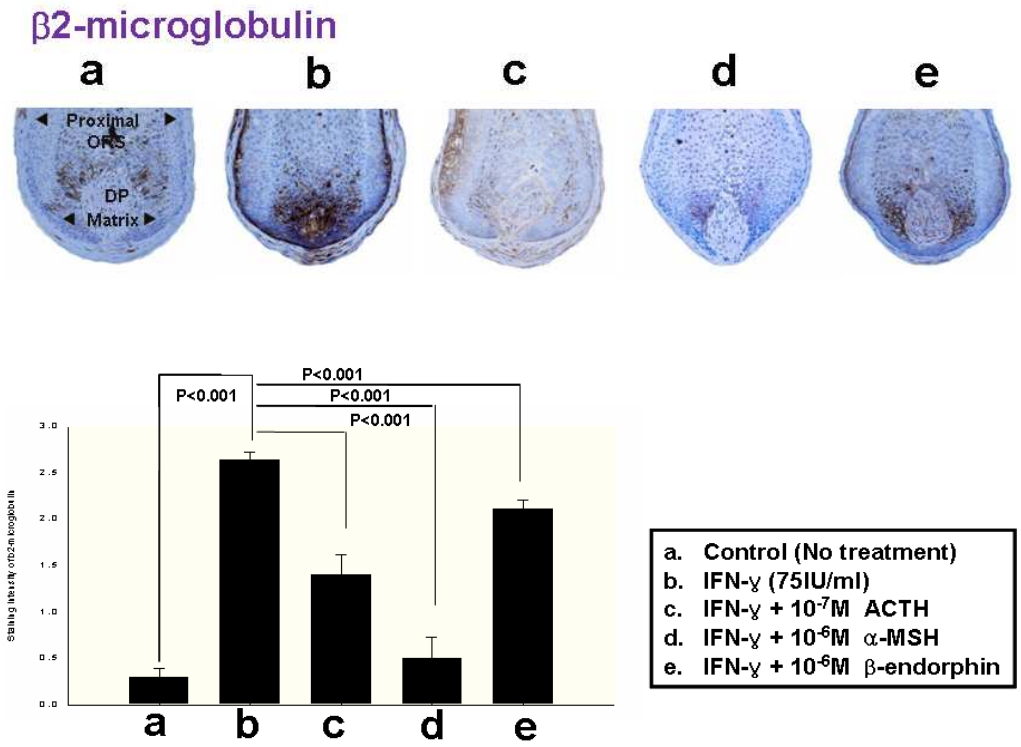

Fig. 3. Immunohistochemical staining results of MHC class I-pathway related molecules(β2-microglobulin) in hair follicle organ culture(original magnification ×100); 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M α-MSH, 10^{-6}M β-endorphin significantly suppressed INF-γ induced ectopic β2-microglobulin expression. The vertical axis means staining intensity. The intensity showed as score; none(-):0, weak(+):1, moderate(++):2, strong(+++):3. Data are presented as the mean ± SE.

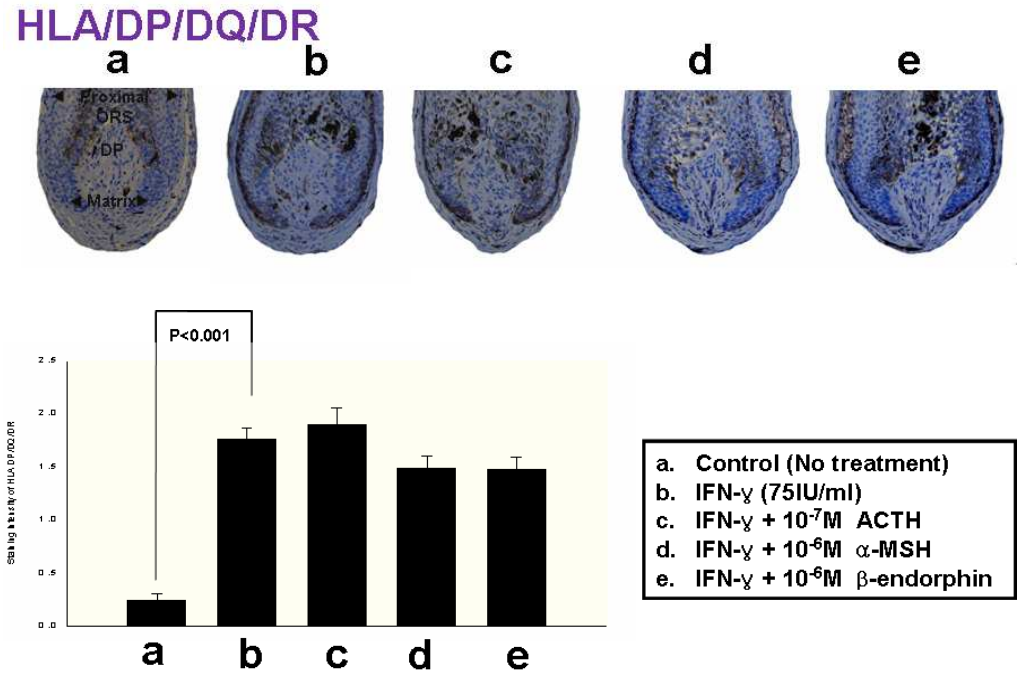

Fig. 4. Immunohistochemical staining results of HLA class II(DP/DQ/DR) in hair follicle organ culture(original magnification×100); 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M α-MSH, 10^{-6}M β-endorphin have no statistically significant effect on INF-γ induced ectopic HLA class II expression. The vertical axis means staining intensity. The intensity showed as score; none(-):0, weak(+):1, moderate(++):2, strong(+++):3. Data are presented as the mean ± SE.

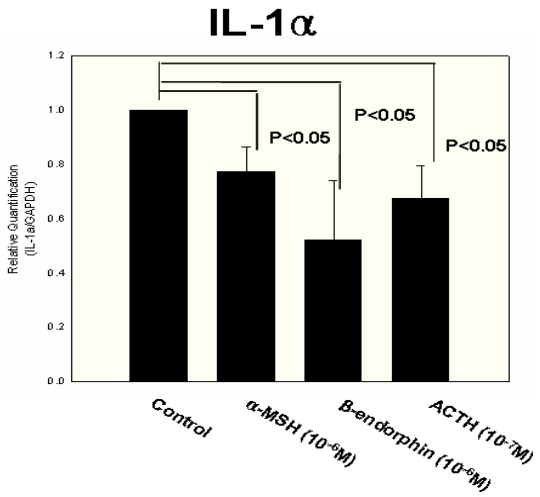

Fig. 5. Real-time RT-PCR results in outer root sheath cell culture; 10^{-6}M α-MSH, 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M β-endorphin significantly down-regulated IL-1α expression. Data are presented as the mean ± SE.

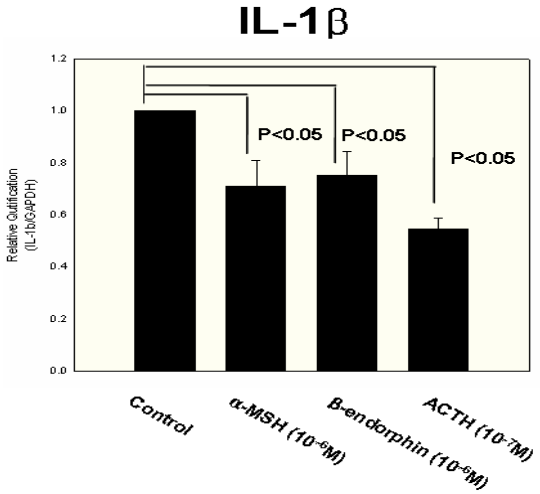

Fig. 6. Real-time RT-PCR results in outer root sheath cell culture; 10^{-6}M α-MSH, 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M β-endorphin significantly down-regulated IL-1β expression. Data are presented as the mean ± SE.

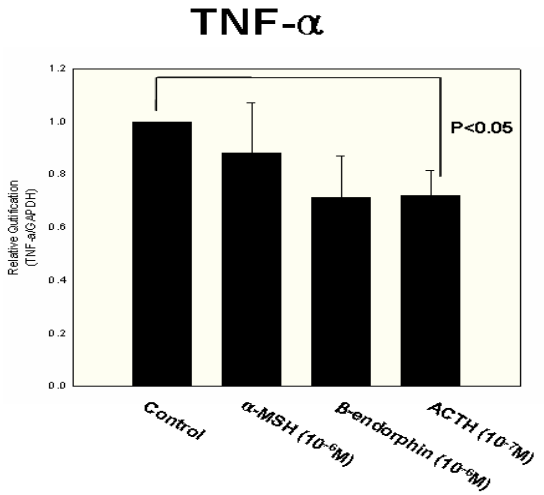

Fig. 7. Real-time RT-PCR results in hair follicle cell culture; 10^{-7}M ACTH significantly down-regulated TNF-α expression. Data are presented as the mean ± SE.

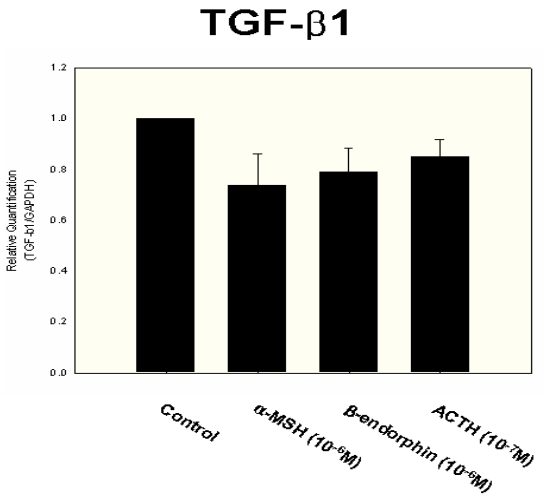

Fig. 8. Real-time RT-PCR results in outer root sheath cell culture; 10^{-6}M α-MSH, 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M β-endorphin have no statistically significant effect on TGF-β1 release. Data are presented as the mean ± SE.

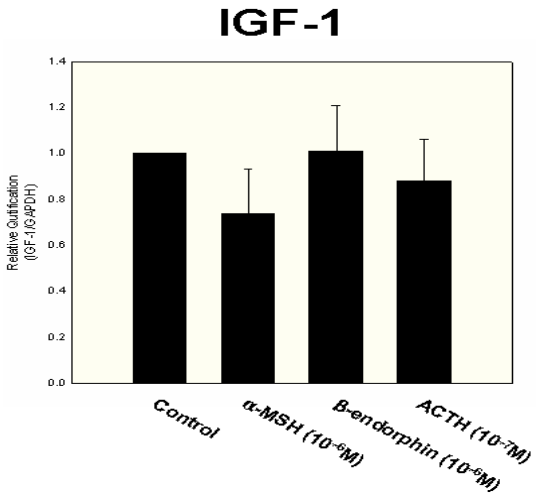

Fig. 9. Real-time RT-PCR results in dermal papilla cell culture; 10^{-6}M α-MSH, 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M β-endorphin have no statistically significant effect on IGF-1 release. Data are presented as the mean ± SE.

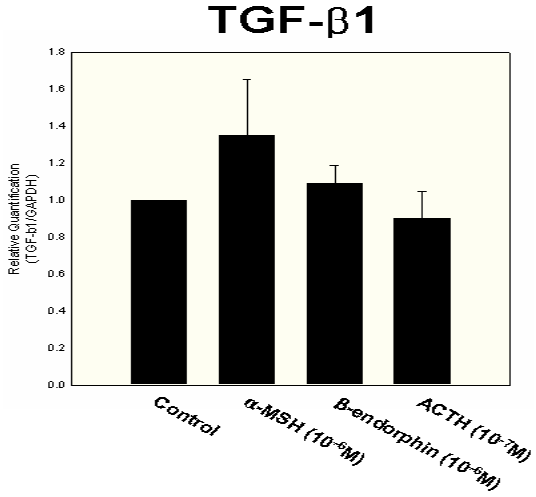

Fig. 10. Real-time RT-PCR results in dermal papilla cell culture; 10^{-6}M α-MSH, 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M β-endorphin have no statistically significant effect on TGF-β1 release. Data are presented as the mean ± SE.

Table. 1. Experimental design of Semiquantitative RT-PCR of HLA-B in hair follicle organ culture

Group \ Date	0day	2days	4days
1.Control	Vehicle		Semiquantitative RT-PCR
2.IFN-r	IFN-r(75IU/ml)		
3.ACTH	IFN-r(75IU/ml)	ACTH(10^{-6}M)	
4.ACTH	IFN-r(75IU/ml)	ACTH(10^{-7}M)	
5.ACTH	IFN-r(75IU/ml)	ACTH(10^{-8}M)	
6.α-MSH	IFN-r(75IU/ml)	α-MSH(10^{-6}M)	
7.α-MSH	IFN-r(75IU/ml)	α-MSH(10^{-7}M)	
8.α-MSH	IFN-r(75IU/ml)	α-MSH(10^{-8}M)	
9.β-endorphin	IFN-r(75IU/ml)	β-endorphin(10^{-6}M)	
10.β-endorphin	IFN-r(75IU/ml)	β-endorphin(10^{-7}M)	
11.β-endorphin	IFN-r(75IU/ml)	β-endorphin(10^{-8}M)	

Table. 2. Primer sequence of Semiquantitative RT-PCR of HLA-B in hair follicle organ culture

Primer	Forward	Reverse	Length
HLA-B	CCGGACTCAGAATCTCCTCAG	AAACACAGGTCAGCATGGGAA	1320
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	GAAGATGGTGATGGGATTTC	226

Table. 3. Experimental design of immunohistochemical staining of HLA class I, human β2-microglobulin and HLA class II in hair follicle organ culture

Group \ Date	0day	2days	4days
Control	Vehicle		Immunohisto-chemical staining
IFN-r	IFN-r(75IU/ml)		
ACTH	IFN-r(75IU/ml)	ACTH(10^{-7}M)	
α-MSH	IFN-r(75IU/ml)	α-MSH(10^{-6}M)	
β-endorphin	IFN-r(75IU/ml)	β-endorphin(10^{-6}M)	

Table. 4. Primer sequence of real-time RT-PCR for each mRNA in hair follicle cell culture

Primer	Forward	Reverse	Length
IL-1α	CAGTGCTGCTGAAGGAGATG	AACAAGTTTGGATGGGCAAC	127
IL-1β	CACATGGGATAACGAGGCTT	TCCATATCCTGTCCCTGGAG	141
TNF-α	CCTGGGATTCAGGAATGTGT	CAGGGATCAAAGCTGTAGGC	105
TGF-β1	GAGCCTGAGGCCGACTACTA	CGGAGCTCTGATGTGTTGAA	131
IGF-1	TATGCACTTGGGAGAAGGCT	ACAATAGCACCACATTGGCA	93
GAPDH	ATGTTCGTCATGGGTGTGAA	GTGCTAAGCAGTTGGTGGTG	88

Table. 5. Summary of real-time RT-PCR for each mRNA in ORS cell culture

	10^{-6}M α-MSH	10^{-7}M ACTH	10^{-6}M β-END
IL-1α	↓	↓	↓
IL-1β	↓	↓	↓
TNF-α	ns	↓	ns
TGF-β1	ns	ns	ns

↓: suppressing tendency
ns: not significant

Table. 6. Summary of real-time RT-PCR for each mRNA in DP cell culture

	10^{-6}M α-MSH	10^{-7}M ACTH	10^{-6}M β-END
TGF-β1	ns	ns	ns
IGF-1	ns	ns	ns

ns: not significant

Abstract

The effect of proopiomelanocortin-derived peptides on the immune system and cytokine release of human hair follicles

Lee, Sanghoon
Dept. of Medicine
The Graduate School
Yonsei University

Background: It is known that neuropeptides derived from proopiomelanocortin(POMC) are created in many organs including skin and display various immune regulation effects. Hair follicle is a mini organ of peculiar immune system and the proximal(lower) part of anagen hair follicle is recognized as an immune privileged area. Immune privilege(IP) of hair follicle is dynamic according to hair cycle, disappear during catagen and telogen phase. There are various regulation factors acting on the generation, maintenance, and collapse of hair follicle IP.

Objectives: The purpose of this study is to investigate the effect of POMC-derived peptides on the IP and cytokine release of human hair follicles, and therefore to provide further understanding about the effect of POMC-derived peptides on the immune system of the hair follicle.

Methods: Interferon-γ was used to make ectopic Major histocompatibility(MHC) class I expression of anagen hair follicle in human hair follicle organ culture, and then it was examined the effects of POMC-derived peptides on the regulation of ectopic human leukocyte antigen(HLA) expression in cultured human hair follicles using Semiquantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR) and immunohistochemical staining technique. To investigate the effect of POMC-derived peptides on follicle cell, we cultured outer root sheath cell and dermal papilla cell, and then examined the effects of POMC-derived peptides on the cytokine release of follicular cell using real-time RT-PCR.

Results: Adrenocorticotropic hormone(ACTH), α-melanocyte stimulating hormone(α-MSH), β-endorphin down-regulated INF- γ induced ectopic HLA class I expression, especially on the concentration of 10^{-7}M ACTH, 10^{-6}M α-MSH, 10^{-6}M β-endorphin and immunohistochemical staining shows similar effect. On outer root sheath cell culture, POMC-derived peptides suppress proinflammatory and hair growth inhibitory cytokine(IL-1α and IL-1β) release.

Conclusions: These results indicate that POMC-derived peptides(ACTH, α-MSH, β-endorphin) might be an immune modulator of the hair follicle biology.

Key words : Human hair follicle, Proopiomelanocortin(POMC), Adrenocorticotropic hormone(ACTH), α-melanocyte stimulating hormone(α-MSH), β-endorphin, Major histocompatibility(MHC), Immune privilege, Cytokine