



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0069375
(43) 공개일자 2015년06월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0155690

(22) 출원일자 2013년12월13일

심사청구일자 2013년12월13일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

이진우

서울 서초구 신반포로19길 10, 36동 1206호 (반포동, 신반포한신아파트)

이슬기

경기 안양시 만안구 병목안로 81, 102동 2206호 (안양동, 성원1차아파트)

윤동석

인천 서구 오동로 32, 203동 103호 오류지구 (왕길동, 검단자이2단지)

(74) 대리인

양부현

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 줄기세포로부터 연골세포로의 분화 촉진용 조성물

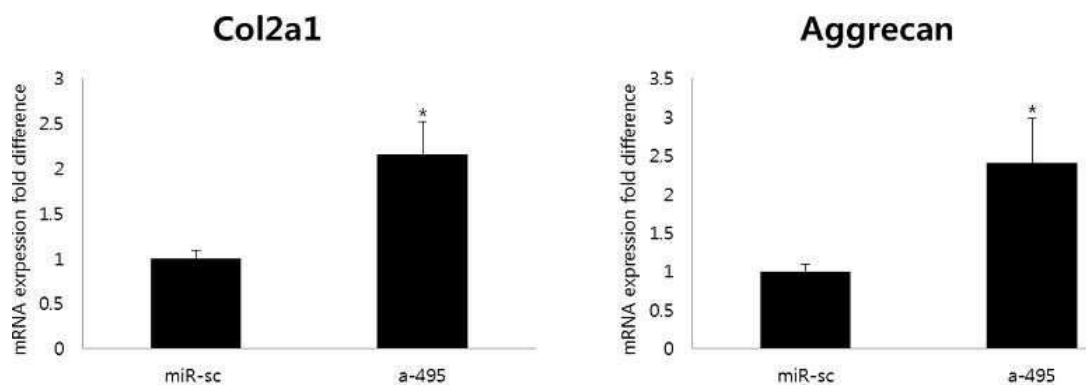
(57) 요약

본 발명은 줄기세포, 보다 구체적으로는 중간엽 줄기세포의 연골세포로의 분화 촉진용 조성물, 연골 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 이들의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

본 발명은 줄기세포의 연골세포로의 분화를 저해하는 miRNA로서 miR-495를 새롭게 규명하였으며, 이의 저해를 통해 다능성을 가진 줄기세포를 연골세포로 효율적으로 분화시킬 수 있음을 확인하였다.

본 발명은 소실된 연골조직의 재생을 통해 퇴행성 관절염을 비롯한 연골손상 관련 질환의 근본적인 예방 및 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도8b



명세서

청구범위

청구항 1

마이크로RNA-495의 발현을 억제하는 핵산분자를 유효성분으로 포함하는 줄기세포로부터 연골세포로의 분화 촉진용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 핵산분자는 siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 핵산분자는 안티센스 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 15 내지 40 뉴클레오타이드의 길이를 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 3 항에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 조성물은 줄기세포 내 Sox9의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 골수-유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 1 항 내지 제 8 항 중 어느 한 항의 조성물을 유효성분으로 포함하는 연골 손상 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 연골 손상 질환은 퇴행성 관절염인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

다음의 단계를 포함하는 줄기세포로부터 연골세포로의 분화 촉진용 조성물의 스크리닝 방법:

- (a) 줄기세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및
- (b) 상기 줄기세포에서의 마이크로RNA-495의 발현량을 측정하는 단계, 상기 마이크로RNA-495의 발현량이 감소하는 경우 상기 시료는 줄기세포로부터 연골세포로의 분화 촉진용 조성물로 판정된다.

청구항 12

제 11 항에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

다음의 단계를 포함하는 연골 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법:

- (a) 줄기세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및
- (b) 상기 줄기세포에서의 마이크로RNA-495의 발현량을 측정하는 단계, 상기 마이크로RNA-495의 발현량이 감소하는 경우 상기 시료는 연골 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 판정된다.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 13 항에 있어서, 상기 연골 손상 질환은 퇴행성 관절염인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 마이크로RNA의 저해제를 포함하는 줄기세포로부터 연골세포로의 분화 촉진용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

줄기세포(stem cell)는 생물 조직을 구성하는 생물을 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서, 배아, 태아 및 성체의 각 조직에서 얻을 수 있는 분화(differentiation)되기 전 단계의 미분화 세포들을 총칭한다. 줄기세포는 분화 자극(환경)에 의하여 특정 세포로 분화가 진행되며, 세포분열이 정지된 분화 세포와는 달리 세포분열에 의해 자신과 동일한 세포를 생산(self-renewal)할 수 있어 증식(proliferation; expansion)하는 특성이 있으며, 다른 환경 또는 다른 분화 자극에 의해 다른 세포로도 분화될 수 있어 분화에 유연성(plasticity)을 가지고 있는 것이 특징이다.

[0003]

줄기세포는 크게 배아(embryo)에서 얻어지고 모든 세포로 분화될 수 있는 잠재력(totipotent)을 지닌 전분화능

(pluripotency)의 배아줄기세포(embryonic stem cell, ES cell)와 각 조직에서 얻어지는 다분화능(multipotency)의 성체줄기세포(adult stem cell)로 구분된다. 배아줄기세포는 무제한적 증식이 가능한 미분화 세포로 모든 세포로 분화할 수 있으며, 성체줄기세포와 달리 배(germ) 세포도 만들 수 있어 다음 세대로 유전될 수 있다. 그러나 이러한 이점에도 불구하고 배아줄기세포를 세포 치료제로 이용하는 데에는 암화 형성, 면역거부반응 및 윤리적 법률적 제약 등 실용화에 어려운 점이 많은 상황이다. 최근 이러한 문제점을 극복하기 위한 대안으로 중간엽 줄기세포가 제시되고 있다. 중간엽 줄기세포는 지방세포, 골세포, 연골세포, 근육세포, 신경세포, 심근세포로의 분화가 가능한 다능성을 가진 세포로 면역 반응을 조절하는 기능도 가지고 있는 것으로 보고되고 있다.

[0004]

사람 골수 유래 중간엽 줄기세포는 배양 조건에 따라 지방세포, 연골세포, 골 세포 등의 다양한 조직으로 분화할 수 있는 능력을 가지고 있다. 줄기세포의 여러 단계를 거쳐 진행되며 각각의 단계는 다양한 인자와 그들의 상호작용에 의해 이루어지나 그 정확한 경로는 아직 규명되지 않았다. 최근 연골분화를 조절하는 물질로서 마이크로 RNA(microRNA)가 발견되어 심도있게 연구되고 있다. microRNA는 20-24 뉴클레오타이드 정도의 작은 RNA로 표적 mRNA를 분해시키거나 전사 후 과정을 억제시킴으로써 표적 유전자를 조절한다. 현재 많은 연구에서 microRNA가 세포 증식과 사멸, 분화를 포함한 다양한 생물학적 과정에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.

[0005]

관절염은 인류가 앓고 있는 질환 중 유병률 1위의 다발성 질환이다. 이 중 특히 퇴행성 관절염은 65세 이상 인구 중 70~80%가 75세 이상인 경우에는 거의 100%가 가지고 있는 대표적인 노인성 질환이다. 현재 우리나라는 전체 인구의 10% 이상이 퇴행성 관절염을 앓고 있으며, 이러한 유병률은 한국 사회의 급속한 고령화 추세로 인해 매우 빠르게 증가하고 있다. 또한 전 세계적으로는 약 5억 명 이상의 퇴행성 관절염 환자가 있는 것으로 추정될 뿐 아니라 인간 평균수명의 연장과 함께 사회활동 기간이 늘어남에 따라, 퇴행성 관절염은 인류 생활의 질적 향상 측면에서 시급히 극복해야 할 노인성 질환으로 떠오르고 있다.

[0006]

관절조직 내 뼈의 끝부분에 막처럼 둘러져 있어 구조적인 완충역할을 하는 연골조직은 뼈끼리 직접 맞닿을 때 생길 수 있는 통증 유발이나 뼈의 마모 등을 예방해주고 있다. 연골세포는 연골조직 내의 유일한 세포 성분으로서 연골조직이 정상적인 기능을 유지하기 위해 필수적인 콜라겐 및 프로테오글리칸 등의 매트릭스를 합성, 분비하고 또한 적정속도로 분해하는 역할을 담당함으로써 관절 연골조직의 기능적 항상성을 유지시켜 주는 데에 필수적인 역할을 담당하고 있다. 따라서 이러한 연골세포의 활성 유지는 관절조직의 구조적 기능성 보존과 직결되어 있다.

[0007]

연골조직 내 연골세포의 기능이 정상적으로 수행되기 위해서는 연골세포의 생성 및 분화가 적절히 이루어져야 하고, 생성된 연골세포의 생존이 잘 보호되어야 하며, 또한 존재하고 있는 연골세포의 석회화가 지속적으로 억제되어 연골조직의 경화현상이 방지되어야 한다. 퇴행성 관절염의 가장 원천적인 발병 요인은 이러한 관절 연골세포의 본질적인 기능성이 노화에 따라 상실되는 것이다

[0008]

본 발명에서는 인간 줄기세포의 연골분화 과정에 관여하는 microRNA를 규명하고, 이의 발현조절을 통해 줄기세포의 연골로의 분화 특이성을 유도함으로써 궁극적으로 소실된 연골조직을 재생, 퇴행성 관절염 등의 질환의 세포치료에 적용하고자 하였다.

[0009]

본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010]

본 발명자들은 다분화능(multipotency)를 가지는 줄기세포를 연골세포(chondrocyte)로 특이적으로 분화시키는 인자를 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 마이크로RNA-495(miR-495)가 인간 줄기세포의 연골분화를 저해하는 역할을 하며, 이의 발현을 억제할 경우 연골세포로의 특이적인 분화가 유도되어 연골 조직의 재생을 통해 치료될 수 있는 퇴행성 관절염 등의 질환에 유용하게 적용될 수 있다는 사실을 발견함으로써, 본 발명을

완성하게 되었다.

- [0011] 따라서 본 발명의 목적은 줄기세포로부터 연골세포로의 분화 촉진용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 연골 손상 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 줄기세포로부터 연골세포로의 분화 촉진용 조성물의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 연골 손상 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 마이크로RNA-495의 발현을 억제하는 핵산분자를 유효성분으로 포함하는 줄기세포로부터 연골세포로의 분화 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명자들은 다분화능(multipotency)를 가지는 줄기세포를 연골세포(chondrocyte)로 특이적으로 분화시키는 인자를 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 마이크로RNA-495(miR-495)가 인간 줄기세포의 연골분화를 저해하는 역할을 하며, 이의 발현을 억제할 경우 연골세포로의 특이적인 분화가 유도되어 연골 조직의 재생을 통해 치료될 수 있는 퇴행성 관절염 등의 질환에 유용하게 적용될 수 있다는 사실을 발견하였다.
- [0018] 본 명세서에서 용어 “줄기세포(stem cell)”는 생물 조직을 구성하는 다양한 세포들로 분화할 수 있는 세포로서, 조직 및 기관의 특수화된 세포를 형성하도록 비제한적으로 재생할 수 있는 미분화 세포들을 지칭한다. 줄기세포는 발달 가능한 만능성 또는 다능성 세포이다. 줄기세포는 2개의 딸줄기세포, 또는 하나의 딸줄기세포와 하나의 유래(전이(transit)) 세포로 분열될 수 있으며, 이후에 조직의 성숙하고 완전한 형태의 세포로 증식된다. 구체적으로는, 본 발명의 조성물로 연골세포로의 분화를 촉진할 수 있는 줄기세포는 중간엽 줄기세포이다. 보다 구체적으로는, 상기 중간엽 줄기세포는 골수-유래 중간엽 줄기세포이다.
- [0019] 본 명세서에서 용어 “중간엽 줄기세포”는 지방세포, 골세포, 연골세포, 근육세포, 신경세포, 심근세포로의 분화가 가능한 다분화능(multipotency)을 가진 줄기세포를 의미한다. 중배엽 줄기세포는 소용돌이 모양의 형태와 기본적인 세포표면 표식자 CD73(+), CD105(+), CD34(-), CD45(-)의 발현 정도를 통하여 식별된다.
- [0020] 본 명세서에서, 용어 “핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).
- [0021] 본 명세서에서 용어 “발현을 억제하는 핵산분자”는 타겟으로 하는 miRNA, 즉 miR-495의 서열에 대한 상보적인 서열을 가지고 있어 miRNA와 이합체(duplex)를 형성할 수 있는 여하한 핵산-기반 분자를 포함한다. 따라서, 본 명세서에서 용어 “발현을 억제하는 핵산분자”는 “상보적 핵산-기반 억제제”로 표현될 수도 있다.
- [0022] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 핵산분자는 siRNA, shRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다.
- [0023] 본 명세서에서 용어 “siRNA”는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 타겟 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운 방법으로서 또는, 유전자치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다.
- [0024] siRNA는 RNA끼리 짝을 이루는 이중사슬 RNA 부분이 완전히 짝을 이루는 것에 한정되지 않고 미스매치(대응하는 염기가 상보적이지 않음), 벌지(일방의 사슬에 대응하는 염기가 없음)등에 의하여 짝을 이루지 않는 부분이 포함될 수 있다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 가장 바람직하게는 20 내지 70 염기이다. siRNA 말단 구조는 타겟 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt) 말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다. 돌출하는 염기 수는 한정되지 않는다. 예를 들어, 염기 수로는 1 내지 8 염기, 바람

직하게는 2 내지 6 염기로 할 수 있다. 또한, siRNA는 타겟 유전자의 발현억제 효과를 유지할 수 있는 범위에서 예를 들어, 한 쪽 말단의 돌출 부분에 저분자 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 바이러스 RNA와 같은 천연의 RNA 분자 또는 인공의 RNA분자)를 포함할 수 있다. siRNA 말단구조는 양측 모두 절단 구조를 가질 필요는 없고, 이중사슬 RNA의 일방의 말단 부위가 링커 RNA에 의하여 접속된 스템 루프형 구조일 수도 있다. 링커의 길이는 스템 부분의 쌍을 이루는 데 지장이 없는 길이면 특별히 한정되지 않는다.

[0025] 본 명세서에서 용어 “shRNA”는 단일 가닥으로 50-70개로 구성된 뉴클레오타이드를 의미하며, *in vivo* 상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를 이루고 있다. 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성한다.

[0026] 본 명세서에서 용어 “miRNA(microRNA)”는 유전자 발현을 조절하며, 전장 20-50개 뉴클레오타이드, 바람직하게는 20-45개 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 20-40개 뉴클레오타이드, 보다 더 바람직하게는 20-30개 뉴클레오타이드, 가장 바람직하게는 21-23개의 뉴클레오타이드로 구성된 단일 가닥 RNA분자를 의미한다. miRNA는 세포내에서 발현되지 않는 올리고뉴클레오타이드이며, 짧은 스템-루프 구조를 가진다. miRNA는 1 또는 2이상의 mRNA(messenger RNA)와 전체 또는 부분적으로 상동성을 가지며, 상기 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제시킨다.

[0027] 본 명세서에서 용어 “리보자임(ribozyme)”은 RNA의 일종으로 특정한 RNA의 염기 서열을 인식하여 자체적으로 이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 전령 RNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 되어 있다.

[0028] 본 명세서에서 용어 “PNA(Peptide nucleic acid)”는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지고 있는 분자로서, DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 핵산염기(nucleobase)가 펩티드 결합으로 연결된 유사 DNA로 1999년에 처음 보고되었다(문헌 [Nielsen PE, Egholm M, Berg RH, Buchardt O, "Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide", Science 1991, Vol. 254: pp1497-1500]). PNA는 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로 합성된다. PNA는 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization) 반응을 일으켜서 이중가닥을 형성한다. 길이가 같은 경우 PNA/DNA 이중가닥은 DNA/DNA 이중가닥보다, PNA/RNA 이중가닥은 DNA/RNA 이중가닥보다 안정하다. 펩티드 기본 골격으로는 N-(2-아미노에틸)글리신이 아미드 결합에 의해 반복적으로 연결된 것이 가장 흔히 쓰이며, 이 경우 펩티드 핵산의 기본골격(backbone)은 음전하를 띠는 천연 핵산의 기본골격과 달리 전기적으로 중성이다. PNA에 존재하는 4개의 핵산염기는 공간적 크기와 핵산염기 사이의 거리가 천연 핵산의 경우와 거의 같다. PNA는 화학적으로 천연 핵산보다 안정할 뿐 아니라 핵산분해효소(nuclease)나 단백질분해효소(protease)에 의해 분해되지 않아 생물학적으로도 안정하다.

[0029] 본 명세서에서 용어 “안티센스 올리고뉴클레오타이드”이란 특정 mRNA의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 특징이 있다. 본 발명의 안티센스 뉴클레오타이드 서열은 타겟 유전자의 mRNA에 상보적이고 타겟 유전자의 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하고 타겟 유전자의 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 길이는 6 내지 100 염기이고, 바람직하게는 10 내 40 염기이다.

[0030] 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., *Curr Opin Struct Biol.*, 5(3):343-55, 1995). 올리고뉴클레오타이드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로아토믹, 헤테로시클릭 당간 결합 등으로 변형될 수 있다. 또한, 안티센스 핵산은 하나 이상의 치환된 당 모이어티(sugar moiety)를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 변형된 염기를 포함할 수 있다. 변형된 염기에는 하이포크잔틴, 6-메틸아데닌, 5-메틸 피리미딘(특히 5-메틸시토신), 5-하이드록시메틸시토신(HMC), 글리코실 HMC, 젠토비오실 HMC, 2-아미노아데닌, 2-티오우라실, 2-티오티민, 5-브로모우라실, 5-하이드록시메틸우라실, 8-아자구아닌, 7-데아자구아닌, N6 (6-아미노핵실)아데닌, 2,6-디아미노퓨린 등이 있다.

[0031] 본 발명의 보다 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 핵산분자는 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다.

[0032] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명에서 이용되는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 15 내지 40 뉴클

레오타이드의 길이를 가진다.

- [0033] 보다 구체적으로는, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.
- [0034] 가장 구체적으로는, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 서열목록 제1서열의 15번째 내지 21번째 뉴클레오타이드 서열에 상보적인 서열을 포함한다.
- [0035] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물은 줄기세포 내 Sox9의 발현을 증가시킨다.
- [0036] 본 발명에 따르면, miR-495는 연골 분화과정에 있어서의 전반적인 과정에 중요한 전사 인자인 Sox9의 발현을 억제하며, miR-495를 저해하는 본 발명의 조성물은 Sox9의 발현을 회복시킴으로써 줄기세포의 연골세포로의 분화를 촉진한다.
- [0037] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 조성물을 유효성분으로 포함하는 연골 손상 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0038] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료되는 연골 손상 질환은 퇴행성 관절염이다.
- [0039] 본 명세서에서 용어 “퇴행성 관절염(osteoarthritis)”은 관절 운동에 필요한 관절 조직이 연골조직의 양적 손실에 기인하여 손상되는 질환을 의미한다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 내재성 줄기세포 또는 이식된 치료용 줄기세포의 연골세포로의 특이적 분화를 유도함으로써 관절 내 연골조직의 재생을 촉진한다. 따라서 종래의 염증제어와 같은 대증적인 접근방법이 면역기능 이상에 기인한 염증반응으로 관절조직이 파괴되는 류마티스성 관절염을 치료하는 데에 그치는 것과 달리, 본 발명의 조성물은 퇴행성 관절염에 대한 근본적인 치료방법을 제공한다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 줄기세포로부터 연골세포로의 분화 촉진용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0041] (a) 줄기세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및
- [0042] (b) 상기 줄기세포에서의 마이크로RNA-495의 발현량을 측정하는 단계, 상기 마이크로RNA-495의 발현량이 감소하는 경우 상기 시료는 줄기세포로부터 연골세포로의 분화 촉진용 조성물로 판정된다.
- [0043] 본 발명에 따르면, 상기 서열목록 제 1 서열은 miR-495의 뉴클레오타이드 서열이다.
- [0044] 본 발명의 방법에 따르면, 우선 미분화 줄기세포에 시험물질을 접촉시킨다. 구체적으로는, 상기 미분화 줄기세포는 중간엽 줄기세포이다. 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “시험물질”은 miR-495의 발현량에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화학 물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA (small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이어, 시료가 처리된 세포에서 miR-495의 발현량을 측정한다. 발현량의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 이루어질 수 있으며, 예를 들어 마이크로 어레이 등을 통해 측정될 수 있다. 측정 결과, miR-495의 발현이 억제되는 경우에는 상기 시험물질은 연골세포로의 분화 촉진용 조성물로 판정될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 연골 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0046] (a) 줄기세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및
- [0047] (b) 상기 줄기세포에서의 마이크로RNA-495의 발현량을 측정하는 단계, 상기 마이크로RNA-495의 발현량이 감소하는 경우 상기 시료는 연골 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 판정된다.
- [0048] 본 발명에서 이용되는 줄기세포, 뉴클레오타이드, 구체적인 스크리닝 방법 및 과정에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재 생략한다. 본 발명의 방법을 이용하여 miR-495의 발현변화 여부를 통해 탐색된 물질은 내재성 줄기세포 또는 이식된 치료용 줄기세포의 연골세포로의 분화를 촉진하므로, 연골 조직이 소실을 원인으로 하는 퇴행성 관절염 등의 치료제 조성물로 이용될 수 있다.

발명의 효과

- [0049] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0050] (a) 본 발명은 줄기세포, 보다 구체적으로는 중간엽 줄기세포의 연골세포로의 분화 촉진용 조성물, 연골 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 이들의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0051] (b) 본 발명은 줄기세포의 연골세포로의 분화를 저해하는 miRNA로서 miR-495를 새롭게 규명하였으며, 이의 저해를 통해 다능성을 가진 줄기세포를 연골세포로 효율적으로 분화시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0052] (c) 본 발명은 소실된 연골조직의 재생을 통해 퇴행성 관절염을 비롯한 연골손상 관련 질환의 근본적인 예방 및 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0053] 도 1은 연골세포가 분화하는 동안 Sox9 및 miRNA의 발현양상을 나타낸 그림이다. 도 1a는 중간엽 줄기세포가 연골로 분화함에 따라 Sox9의 mRNA 발현량이 점차 증가함을 보여주는 그림이다. 도 1b는 one-way ANOVA를 이용한 microRNA 마이크로어레이 분석 결과 대조군과 1.5배 이상의 발현 차이를 보이는 것으로 나타난 microRNA들을 계층적 군집화 맵(hierarchical clustering map)으로 표시한 그림이다.
- 도 2는 연골세포가 분화하는 동안 miR-495 및 miR-431의 발현양상을 나타낸 그림이다. miR-495와 miR-431은 Sox9 3' UTR에 결합할 것으로 예상되었으며(도 2a), 중간엽 줄기세포의 연골분화 동안 miR-495 및 miR-431의 발현이 감소함을 실시간 PCR을 통해 확인하였다(도 2b).
- 도 3은 miR-495가 인간 연골육종세포(chondrosarcoma cell) SW1353의 Sox9의 발현에 미치는 영향 각각 mRNA(도 3a) 및 단백질(도 3b) 수준에서 확인한 결과를 나타낸 그림이다.
- 도 4는 miR-495가 Sox9의 3' UTR에 특이적으로 결합함을 확인한 결과를 나타낸 그림이다. 도 4a는 miR-495가 결합하는 Sox9의 3'UTR 부위를 나타낸 그림이다. 도 4b는 Sox9 3'UTR을 포함한 벡터 구조의 모식도를 나타낸 그림이다. 도 4c는 miR-495와 Sox9 3'UTR을 포함한 벡터가 같이 세포에 도입된 후 루시퍼라아제 분석을 수행한 결과를 나타낸 그림이다. 도 4d는 miR-495가 Sox9 3' UTR에 결합할 수 있는 15-21번째의 염기서열을 돌연변이시킨 후 루시퍼라아제 분석을 수행한 결과를 나타낸 그림으로, miR-495의 15-21번째 염기서열이 Sox9의 발현을 조절하는데 있어 중요함을 보여준다.
- 도 5는 중간엽 줄기세포에 miR-495를 처리한 후 TGF- β 3를 이용하여 Sox9의 발현을 증가시킨 후 Sox9의 발현량을 각각 웨스턴 블롯팅(도 5a) 및 상기 웨스턴 블롯팅 결과의 정량화(도 5b)를 통해 조사한 결과를 나타낸 그림이다.
- 도 6은 miR-495가 연골세포 마커의 발현에 미치는 영향을 나타낸 그림이다. miR-sc와 miR-495를 중간엽 줄기세포에 처리한 후 TGF- β 3로 연골분화를 유도한 뒤 연골분화 주요마커인 Col2(도 6a) 및 어그리칸(도 6b)의 mRNA를 실시간 PCR로 각각 측정하였으며, 면역 형광염색을 이용하여 Col2(도 6c) 및 어그리칸(도 6d) 단백질을 발현을 각각 관찰하였다.
- 도 7은 miR-495의 과발현이 인간 중간엽 줄기세포의 연골로의 분화에 미치는 영향을 나타낸 그림이다. 도 7a는 miR-sc와 miR-495를 중간엽 줄기세포에 처리한 후 연골분화 유도 10일째 GAG(glycosaminoglycan)을 측정하여 결과를 나타낸 그림이다. 도 7b는 miR-sc와 miR-495 처리군의 사프라닌 O 염색결과를 나타낸 그림이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0054] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

- [0055] 실시예

[0056]

실험 방법

[0057]

골수유래 인간 중간엽줄기세포(hMSC) 및 연골육종세포주의 배양

[0058]

골수 천자액(BM aspirates)은 IRB(Institutional Review Board)의 승인 하에 19-63세의 12명의 성인 기증자의 후장골릉(posterior iliac crest)에서 수득하였다. 인간 골수유래 중간엽 줄기세포(hMSC)는 플라스틱 세포배양 플라스크에 흡착하는 능력을 기준으로 선별하였다. 골수 천자액(BM aspirates)은 10% FBS(Gibco, Grand Island, NY, USA) 및 1% 항생제-항진균제 용액(Gibco)이 보충된 DMEM-LG(low-glucose Dulbecco's modified Eagle's medium; Welgene, Daegu, Korea)에서 7일 간 배양하였다. 인간 연골육종세포주인 SW1353는 10% FBS 및 1% 항생제-항진균제 용액이 보충된 DMEM-HG(DMEM-high glucose, Welgene)에서 배양하였다.

[0059]

마이크로매스 배양방법을 이용한 hMSC의 인 비트로 연골 분화

[0060]

인 비트로에서 hMSC를 연골로 분화시키기 위하여 마이크로매스 배양 방법을 이용하였다. 트립신화된 hMSC를 10% FBS가 함유된 DMEM-LG에서 1×10^7 cells/mL 농도로 재부유시키고, 이 중 10 μ L 만을 24-웰 플레이트(웰 당 1×10^5 cells)의 각각의 웰에 찍어(dotting)주었다. 세포들을 37°C에서 두 시간 동안 흡착하도록 한 뒤, 1% 항생제-항진균제 용액, 1% 인슐린 트랜스페린 셀레늄-A(ITS; Invitrogen), 50 μ g/mL 아스코르빈산(Invitrogen) 및 10ng/mL TGF- β 3(R&D systems, Minneapolis, MN, USA)가 보충된 DMEM-HG로 이루어진 연골분화 배양액을 첨가하였다. 인 비트로 분화 시기 동안에 10ng/mL TGF- β 3을 포함하는 연골분화 배양액은 2일 마다 교체하였다.

[0061]

정량적 실시간 PCR

[0062]

hMSCs 및 SW1353 세포로부터 총 RNA를 RNA iso Plus(Takara, Shiga, Japan) 시약을 이용하여 제조자의 설명서에 따라 분리하였다. cDNA 합성을 위해 총 RNA를 Omniscript 키트(Qiagen, Venlo, Netherlands)을 이용하여 역전사하였다. 수득한 cDNA로 SYBRGreen PCR Master Mix(Applied Biosystems; ABI, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 실시간 PCR을 하였다. 실시간 PCR은 ABI7500 실시간 기기(Applied Biosystems, ABI, Carlsbad, CA)를 이용하여 수행하였다. 프라이머 세트는 Bioneer (Daejeon, South Korea)에서 구입하였으며, 사용된 프라이머는 다음과 같다: GAPDH (P267613), Sox9 (P232240). Col2a1 및 aggrecan에 대한 입증된 프라이머가 없어 다음과 같이 설계하였다: Col2a1, 5'-GTCCTCTCCCAAGTCCACACAG-3' (센스) 및 5'-GGGCACGAAGGCTCATCATTC-3' (안티센스); aggrecan, 5'-CCACTGTTACCGCCACTT-3' (센스) 및 5' GTAGTCTTGGGCATTGTTGT 3' (안티센스). PCR 과정은 95°C에서 30초로 개시된 후, 95°C에서 5초간의 열 사이클이 40회 진행되고, 다시 60°C에서 20초간 진행하였다. 어닐링/연장 단계에서 SYBR 형광을 검출하였으며, 모든 실시간 PCR 산물은 최종적으로 약 100bp의 크기를 가졌다. 각 시료의 측정값은 내부 대조군인 GAPDH에 대해 표준화하였다.

[0063]

전구체-microRNA 역전사를 위하여, Mir-X™ microRNA First-Strand Synthesis 키트(Clontech, Mountain View, CA, USA)을 제조자의 설명서에 따라 사용하였으며, microRNA로부터 합성된 cDNA를 SYBRqRT-PCR(Clontech)로 정량화하였다. 특정 성숙-microRNA 증폭을 위해 사용된 프라이머 세트의 목록은 Genolution (Genolution, Seoul, South Korea) 및 Bioneer Inc.에서 수득하였다. 설계된 프라이머는 다음과 같다: U6 snRNA, 5'-CTCGCTTCGGCAGCACA-3' (센스) 및 5'-AACGCTTCACGAATTGCGT-3' (안티센스); has-miR-495, 5'-AAACAAACATGGTGCACTTCTT-3' (센스); has-miR-431, 5'-TGTCTTGCAAGCGTCATGCA-3' (센스). 실시간 PCR은 ABI7500 실시간 기기를 이용하여 수행하였다. PCR 과정은 95°C에서 10초로 개시된 후, 95°C에서 5초간의 열 사이클이 40회 진행되고, 다시 60°C에서 20초간 진행하였다. 모든 전구체-microRNA의 상대적 발현정도를 표준화하기 위해 U6 snRNA(small nuclear RNA)를 사용하였다.

[0064]

MicroRNA 어레이 분석

[0065]

동일한 공여자로부터 유래한 미분화 hMSCs(0-10일 간 배양) 및 연골생성 hMSC의 총 RNA를 RNA iso Plus(Takara)를 이용하여 제조자의 설명서에 따라 분리하였다. 총 RNA의 전체적인 질(quality)을 분광광도계를 이용하여 확인하였다. GenechipmiRNA 1.0 어레이(Affymetrix, Santa Clara, CA, USA)로 각각의 microRNA의 발현패턴을 조사하였다. 연골분화가 유도된 중간엽 줄기세포에서 특이적으로 발현되는 microRNA를 규명하

기 위하여 피어슨 상관분석을 수행하였다. 간략하게는, 분화된 그룹에서 대조군의 값을 빼는 일상적인 수학적식을 이용하여 상이하게 발현되는 유전자를 선정하였다: 유전자를 스크리닝하기 위해 최소 1.5배의 발현 정도 차이를 보이는 엄격한 컷-오프 기준점을 적용하였다. 데이터는 2명의 공여자의 것을 분석하여 수득하였으며, 2명의 공여자의 결과를 교차하여 표시하였다.

[0066] *MicroRNA* 형질전환

[0067] 스크리닝된 microRNA의 기능 및 이들이 Sox9 발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 선정된 microRNA를 Genolution Inc.로부터 구입하였다. 구입한 microRNA 미믹(mimic)을 이중가닥 형태로 준비하고, 이들은 일단 형질전환되면 성숙 microRNA를 생성하는 내부 기작이 진행된다. 항-microRNA가 miRNA의 상보적 서열을 타겟팅하는 단일 가닥으로 이루어졌으므로, 항-microRNA의 스크램블 올리고뉴클레오타이드가 microRNA 미믹의 스크램블 올리고뉴클레오타이드와 별도로 음성대조군으로 사용되었다.

[0068] 항-miR-SC 및 항-miR-495는 Bioneer inc.에서 구입하여 다음과 같은 서열로 설계하였다: 항-miR-495: 5'-AAGAAGUGACCAUGUUGUUU-3'(센스), 항-miR-SC: 5' -UCACAACCUCCUAGAAAGAGUAGA-3' (센스). 구축된 microRNA를 Lipofectamin LTX & Plus reagent(Invitrogen)를 이용하여 SW1353 및 hMSC에 설명서에 따라 형질전환하였다.

[0069] 웨스턴 블롯팅 분석

[0070] 세포를 10 µg/mL 프로테아제 및 포스파타아제 억제제를 함유하는 수동성 용해 완충액(Passive Lysis Buffer, Promega, Madison, WI, USA)에서 파쇄하고 Pierce™ BCA Protein Assay Kit(Thermo Scientific, Logan, UT)을 이용하여 정량하였다. 시료를 10% SDS-PAGE로 분리하고 PVDF 막(Amersham, Pharmacia, Piscataway, NJ, USA)으로 옮겼다. 간략하게는, 막을 1:3000 농도의 Sox9 항체(Millipore, Billerica, MA, USA) 또는 GAPDH 항체(Santa Cruz)와 함께 상온에서 4시간 동안 인큐베이션하였다. 1X TBST로 막을 반복적으로 세척한 뒤, 적절한 HRP(horseradish peroxidase)-접합 2차 항체(Amersham Pharmacia)와 함께 1시간 동안 배양하였다. GAPDH는 내부 대조군으로 사용되었으며, 밴드의 강도는 Epson 이미지 스캐너를 통해 수득한 이미지 파일을 Image J 프로그램으로 분석하여 측정하였다.

[0071] 루시페라아제 리포터 분석

[0072] pEZS-SOX9 3' UTR 및 pEZS-MT01 벡터는 Genecopoeia(Rockville, MD, USA)에서 구입하여 miR-495가 Sox9 3' UTR에 결합하는지를 확인하고자 하였다. pEZS-SOX9 3' UTR은 SOX9 3' UTR를 가지는 반딧불이 루시페라아제 유전자와 레닐라 루시페라아제 유전자를 포함하는 데에 반해, pEZS-MT01는 SOX9 3' UTR가 없는 반딧불이 루시페라아제 및 레닐라 루시페라아제 유전자를 포함한다. Lipofectamin LTX & Plus 시약(Invitrogen)을 이용하여 pEZS-SOX9 3' UTR 또는 pEZS-MT01를 miR-495 또는 음성 microRNA와 HeLa 세포에 공-형질전환하였다. 반딧불이 및 레닐라 루시페라아제 활성은 듀얼-루시페라아제 microRNA 형질전환 후 24시간 뒤에 리포터 어세이 시스템(Promega, Madison, Wisconsin, USA)을 이용하여 측정하였으며, 반딧불이 루시페라아제 활성은 레닐라 발현에 대해 3번에 걸쳐 표준화하였다.

[0073] 면역조직화학

[0074] 파라핀 포매 절편을 탈파라핀화하여, 재수화(rehydration)하고 PBS로 두 번 세척하였다. 내인성 퍼옥사이드에 의한 비특이적 배경 염색을 감소시키기 위하여, 절편을 10분 간 과산화수소 블록에서 배양하고 PBS로 2회 세척하였다. 절편을 래빗 항-COL2A1 (Santa Cruz) 또는 마우스 항-어그리칸(Santa Cruz)과 함께 4°C에서 밤새 배양하고, PBS로 세척하였다. 1차 항체의 시각화를 위하여, PE(Phycoerythrin) 접합 고트 항-래빗 2차 항체(Santa Cruz) 및 GFP(green fluorescent protein) 접합 고트 항-마우스 2차 항체를 사용하였다. 핵은 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole, Sigma)로 염색하였으며, 이미지는 도립 형광현미경(IX-71, Olympus)으로 캡처하였다.

[0075]

사프라닌 O 염색

[0076]

매스 펠렛을 PBS로 두 번 세척하고, 10% 포르말린 용액에서 24시간 동안 고정시켰다. 고정 후에, 펠렛을 에탄올에서 탈수시키고, 탈수된 펠렛을 파라핀에 포매하여 절편화하였다. 사프라닌 O 염색을 위하여, 절편화된 마이크로메스 펠렛을 탈파라핀화 및 재수화하였다. 재수화한 펠렛을 PBS로 세척하고, 1% 아세트산에 용해된 1% 사프라닌 O 용액(Sigma, St. Louis, MO, USA)으로 30분 간 염색하였다. 사프라닌 O-염색된 펠렛의 배경을 염색하기 위하여 헤마톡실린 용액(Sigma)을 사용하였다. 염색된 펠렛 절편을 현미경으로 관찰하였다.

[0077]

GAG 함량 분석

[0078]

microRNAs-형질전환된 연골분화 마이크로 매스에서 수득한 배양액 내의 황화(sulfated) GAG의 양을 Blyscan 키트(Biocolour, Newtownabbey, Northern Ireland, UK)을 이용하여 제조자의 설명서에 따라 측정하였다. 간략하게는, 총 500 μ L 배양액을 1 ml Blyscan 염색시약과 30분 간 부드럽게 흔들어 혼합함으로써 GAG-염료의 결합이 완료되도록 한다. 원심분리 후, GAG에 결합한 염료를 분리시약에서 용해시켰다. 회복된 염료 농도를 656 nm에서 측정하고 콘드로이틴 4-설페이트 표준용액(Biocolour)을 이용하여 표준 곡선을 생성하였다. 모든 시험은 세 번 실험을 진행하였다.

[0079]

통계적 분석

[0080]

hBM-MSCs, SW1353, 및 HeLa 세포주에서 얻은 결과에 대한 통계적 분석은 스튜던트의 *t*-검정을 이용하여 수행하였으며, 데이터는 평균±표준편차로 나타내었다. $P < 0.05$ 또는 0.01인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

[0081]

실험 결과

[0082]

연골세포 분화기간의 Sox9 및 miRNA 발현양상

[0083]

중간엽 줄기세포의 연골분화 유도시 증가하는 Sox9과 반대 발현 패턴을 보이는 microRNA를 선별하기 위하여 microRNA 마이크로어레이를 수행하였다. 중간엽 줄기세포의 분화를 유도하지 않은 CT0, TGF- β 3를 이용하여 10일 간 연골분화를 유도시킨 CH10 및 TGF- β 3를 처리하지 않은 CT10 샘플을 이용하여 microRNA 마이크로어레이를 수행한 결과 중간엽 줄기세포의 연골분화에 중요한 전사요소인 Sox9은 연골 분화 동안 발현이 증가하였다(도 1a). microRNA 마이크로어레이는 one-way ANOVA를 이용해 분석하였으며, 대조군과 비교하여 1.5배 이상의 발현 차이를 보이는 microRNA들을 계층적 군집화 맵(hierarchical clustering map)으로 나타냈다(도 1b).

[0084]

연골세포 분화기간의 miR-495 및 miR-431 발현양상

[0085]

타겟 스캔 및 miRanda를 이용하여 microRNA 마이크로어레이 분석 결과에서 감소하는 패턴을 보인 microRNA 중 miR-495와 miR-431이 Sox9 3' UTR에 결합하는 하의 서열을 가질 것으로 예측되었다(도 2a). 아울러, 실시간 PCR을 이용하여 중간엽 줄기세포의 연골분화 동안 miR-495, miR-431의 발현이 감소하는 것을 확인하였다(도 2b).

[0086]

miR-495가 SW1353의 Sox9의 발현에 미치는 영향

[0087]

인간 연골육종 세포주인 SW1353에 miR-495 및 miR-431을 처리한 후 mRNA와 단백질 발현변화를 관찰한 결과, miR-495는 Sox9 mRNA와 단백질의 발현을 감소시켰지만(도 3a), miR-431은 Sox9 단백질의 발현을 감소시키지 못하는 것으로 확인되었다(도 3b). 차후 실험은 miR-495로 진행하였다.

[0088]

[0089]

루시퍼라이제 어레이

[0090]

Sox9 3' UTR이 삽입된 루시퍼라이제 벡터를 이용하여 루시퍼라이제 어레이를 수행한 결과, miR-495의 증가된 농

도에 비례하여 루시퍼라아제 활성이 감소하는 것을 확인하였다(도 4c). 한편, miR-495가 결합할 것으로 예측되는 씨드 서열(seed sequence)을 변이시킨 mut-miR-495를 처리하였을 때 루시퍼라아제 활성이 변화하지 않는 것을 확인함으로써 miR-495의 씨드 서열을 확인하였다(도 4d). miR-495가 Sox9에 직접적으로 결합하여 영향을 미치는 것을 확인하였다.

[0091] *miR-495가 인간 중간엽 줄기세포의 내재적 Sox9 발현에 미치는 영향*

[0092] 중간엽 줄기세포에 miR-495를 처리한 후 TGF- β 3를 이용하여 Sox9의 발현을 증가시킨 후 Sox9의 발현을 관찰하였다. 음성 대조군인 miR-sc를 처리한 시료에 비해 miR-495를 처리한 시료에서 Sox9의 발현이 크게 감소함을 관찰함으로써(도 5a 및 5b), miR-495가 중간엽 줄기세포의 분화과정에서 Sox9의 발현을 억제함을 확인하였다.

[0093] *miR-495가 연골세포 마커의 발현에 미치는 영향*

[0094] miR-sc와 miR-495를 중간엽 줄기세포에 처리한 후 TGF- β 3를 이용하여 5일 간 연골분화를 유도한 뒤 연골 분화 주요 마커인 2형 콜라겐(collagen type2, Col2)와 어그리칸(aggrecan) 발현을 실시간 PCR로 관찰하였다. miR-495를 처리한 시료에서 Col2와 어그리칸의 발현이 대조군에 비해 감소된 것을 확인하였다(도 6a 및 6b). 또한 면역 형광염색을 이용하여 Col2와 어그리칸의 단백질 발현을 측정된 결과 miR-495에 의해 Col2와 어그리칸의 단백질 발현이 감소됨을 관찰하였다(도 6c 및 6d). 이로써 miR-495에 의해 Sox9이 억제됨으로써 연골분화 마커인 Col2와 어그리칸의 발현이 감소함을 확인하였다.

[0095] *miR-495의 과발현이 인간 중간엽 줄기세포의 연골로의 분화에 미치는 영향*

[0096] miR-sc와 miR-495를 중간엽 줄기세포에 처리한 후 연골분화 유도 10일 쯤 GAG(glycosaminoglycan) 함량을 측정하고(도 7a) 마이크로매스를 파라핀 절편화를 한 뒤 사프라닌 O 염색을 수행하였다(도 7b). 그 결과, miR-495가 중간엽 줄기세포의 연골분화를 억제함을 확인하였다.

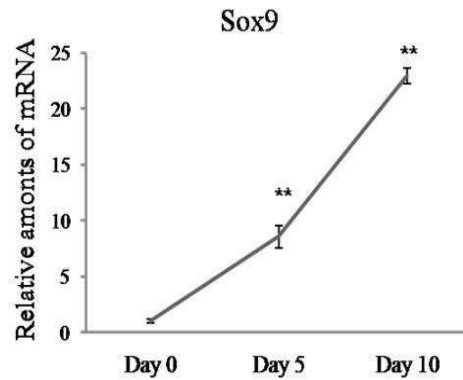
[0097] *anti-miR-495에 의한 연골분화의 유도*

[0098] miR-495의 발현억제가 실제로 줄기세포의 연골분화를 유도하는지를 확인하기 위하여 인간 중간엽 줄기세포 및 SW1353에 miR-495와 anti-miR-495를 처리한 후 Sox9 발현 변화를 웨스턴 블롯팅을 통해 확인한 결과 anti-miR-495에 의하여 Sox9 발현이 유의하게 증가함을 확인하였다(도 8a). 아울러, 인간 중간엽 줄기세포에 anti-miR-495 처리하여 연골 분화를 유도한 후 연골 분화 표지 인자인 Col2와 어그리칸의 발현을 실시간 PCR로 확인한 결과, 대조군에 비해 Col2와 어그리칸의 발현이 증가함을 확인하였다(도 8b).

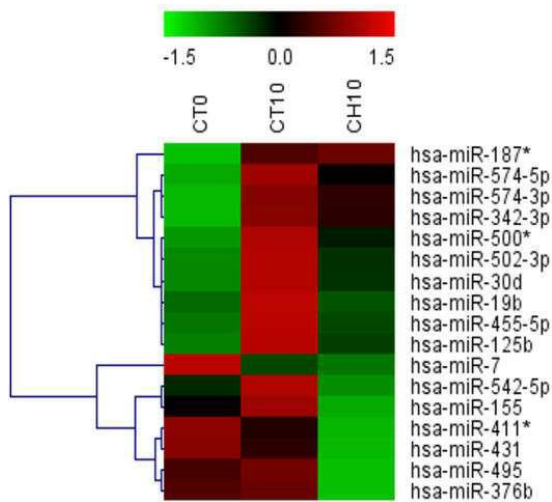
[0099] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

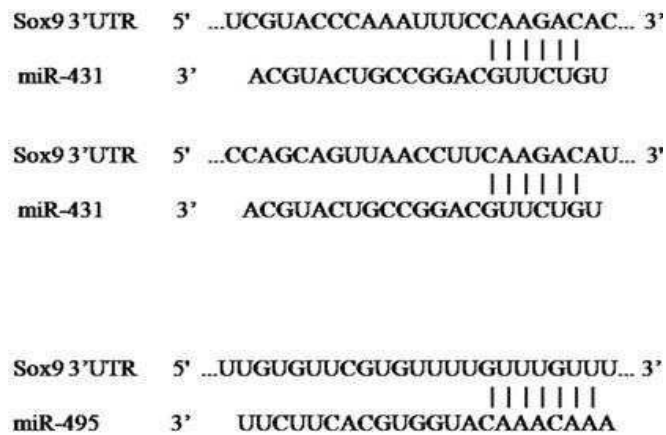
도면1a



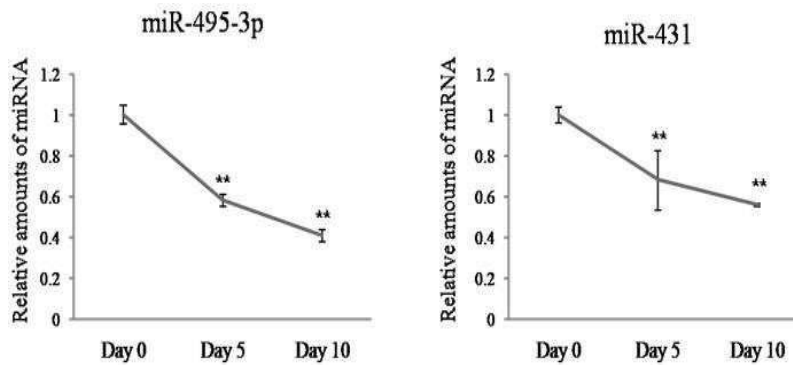
도면1b



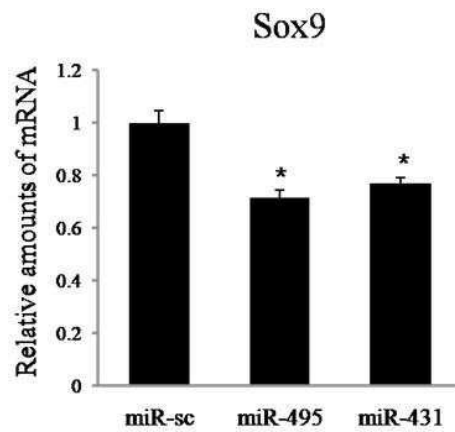
도면2a



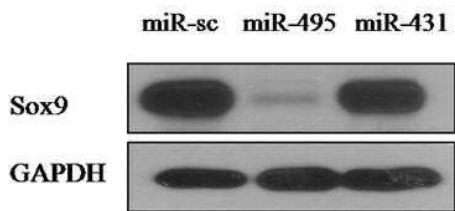
도면2b



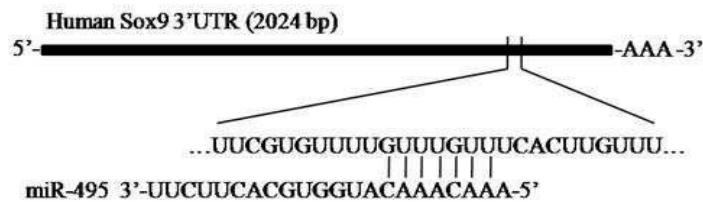
도면3a



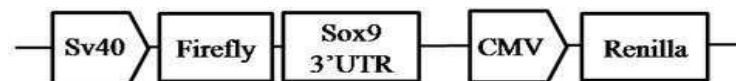
도면3b



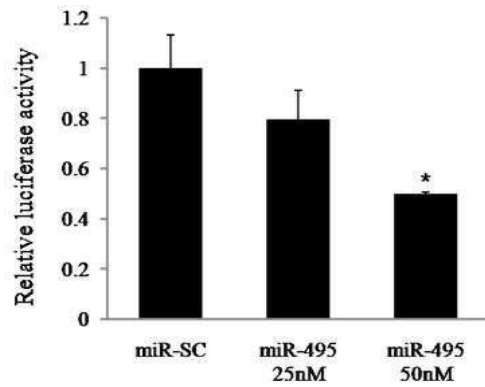
도면4a



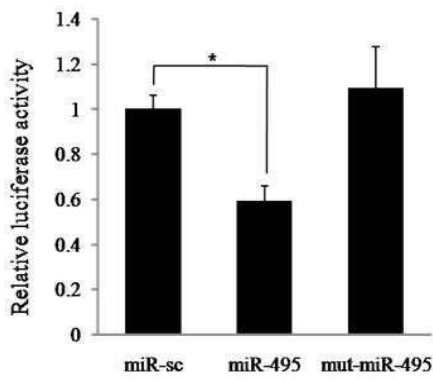
도면4b



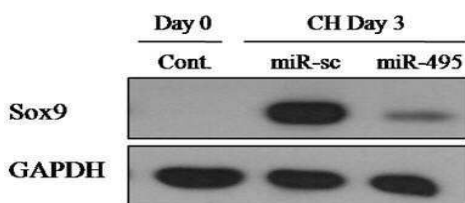
도면4c



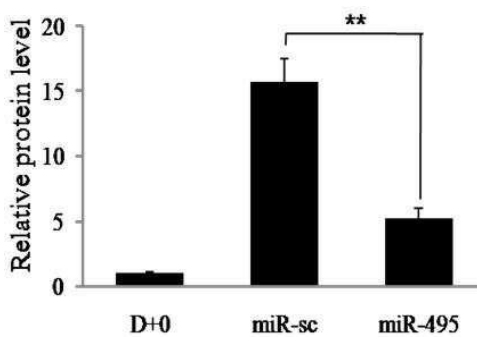
도면4d



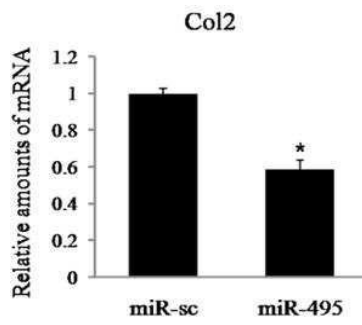
도면5a



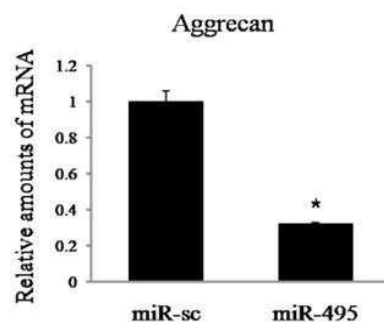
도면5b



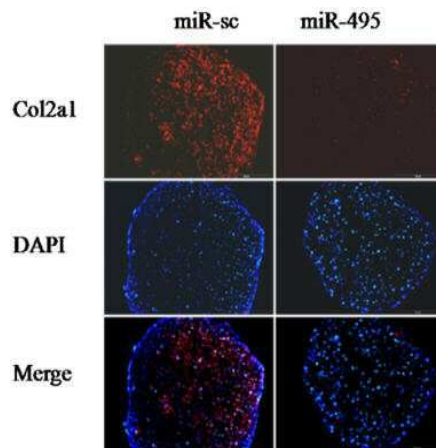
도면6a



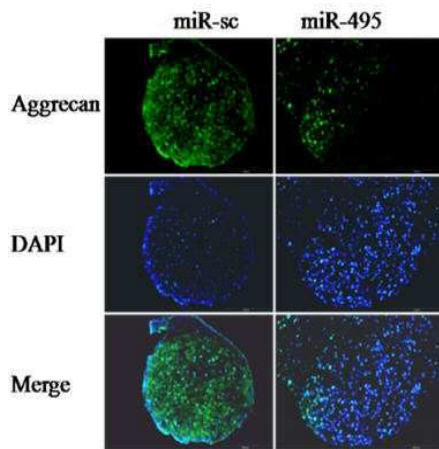
도면6b



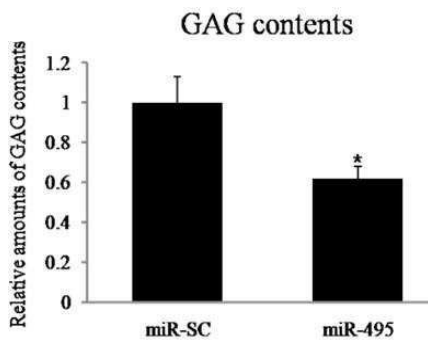
도면6c



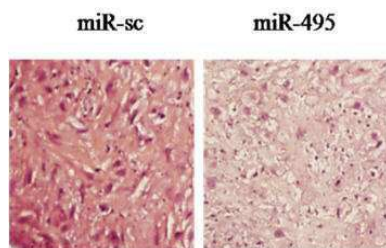
도면6d



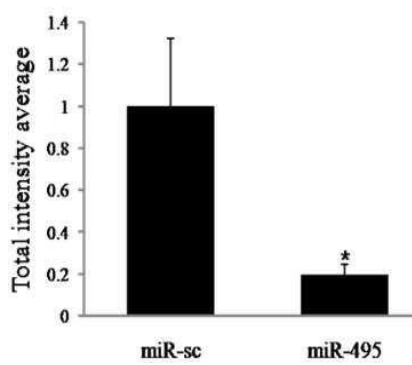
도면7a



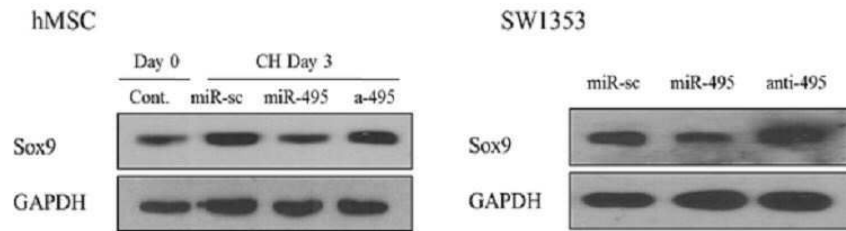
도면7b



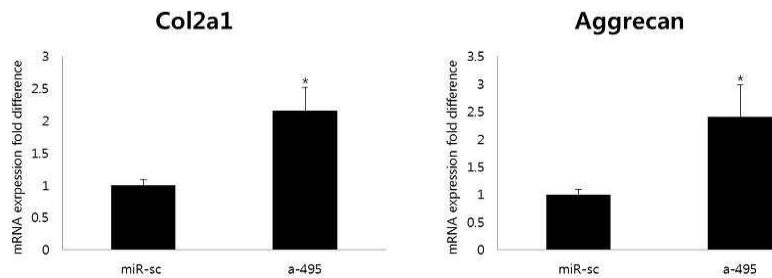
도면7c



도면8a



도면8b



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation Yonsei University

<120> A Composition for Promoting Chondrogenesis from Stem Cells

<130> PN130606

<160> 2

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> homo sapiens

<400> 1

aaacaaacau ggugcacuuc uu

22

<210> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-miR-495

<400> 2

aagaagugca ccauguuugu uu

22