



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0001395
(43) 공개일자 2015년01월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/11* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0074564
(22) 출원일자 2013년06월27일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
황기철
서울 노원구 중계로 184, 107동 1404호 (중계동, 라이프청구신동아아파트)
(74) 대리인
특허법인다나

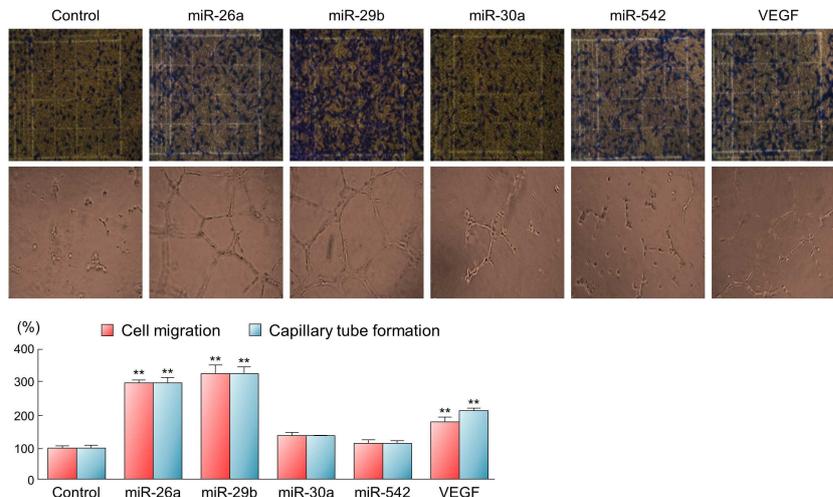
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **혈관내피세포화를 조절하는 microRNAs 및 그의 용도**

(57) 요약

본 발명은 혈관내피세포화를 조절하는 microRNAs 및 그의 용도를 제공한다. 본 발명은 다능성 기질세포의 미분화 상태를 유지하는 miRNA로서, miR-15, -144, -145, -329를 발굴하였으며, 역으로 다능성 기질세포에서 혈관내피세포로의 분화를 유도하는 miRNA로서 miR-26a 및 -29b를 발굴하였다. 이들 miRNA는 다능성 기질세포의 미분화 상태 유지를 위해 miR-15, -144, -145, -329를 활성화할 수 있는 약물, 그리고 혈관내피세포로의 분화 유도를 위한 miR-26a 및 -29b를 활성화할 수 있는 약물의 스크리닝을 위한 마커로서 또는 다능성 기질세포의 미분화 상태 유지 및 다능성 기질세포의 혈관내피세포로의 분화를 유도할 수 있는 유효성분으로서 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도15



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A120478-1201-0000100

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 보건산업진흥원

연구사업명 보건의료(줄기세포재생의료)

연구과제명 심혈관질환 특이적 생체적용을 위한 기능조절 골수유래 중간엽 줄기세포주 확립 및 최적화

기여율 1/1

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2012.08.01 ~ 2013.07.31

특허청구의 범위

청구항 1

- 1) miR-15, miR-144, miR-145 및 miR-329로 이루어진 군으로부터 선택되는 miRNA를 발현하는 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계,
- 2) 상기 시험물질에 의한 상기 miRNA의 발현 변화를 분석하는 단계,
- 3) 상기 시험물질이 상기 miRNA의 발현을 증가시키면 다능성 기질세포 (multipotent stromal cells; MSCs)의 미분화 상태 유지 (maintenance)를 위한 약물로 판단하는 것을 포함하는 다능성 기질세포의 미분화 상태 유지를 위한 약물의 스크리닝 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 miR-15, miR-144, miR-145 및 miR-329로 이루어진 군으로부터 선택되는 miRNA를 발현하는 세포주는 다능성 기질세포 유래의 세포주인 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 시험물질은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드 및 단백질로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 miR-15는 서열번호 1의 핵산서열을 갖는 것인 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 miR-144는 서열번호 2의 핵산서열을 갖는 것인 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 miR-145는 서열번호 3의 핵산서열을 갖는 것인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 miR-329는 서열번호 4의 핵산서열을 갖는 것인 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 miRNA의 발현 변화는 RT-PCR에 의해 탐지되는 것인 방법.

청구항 9

- 1) miR-26a 또는 miR-29b로부터 선택되는 miRNA를 발현하는 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계,

- 2) 상기 시험물질에 의한 상기 miRNA의 발현 변화를 분석하는 단계,
- 3) 상기 시험물질이 상기 miRNA의 발현을 증가시키면 다능성 기질세포의 혈관내피세포로의 분화를 유도하는 약물로 판단하는 것을 포함하는 다능성 기질세포의 혈관내피세포로의 분화를 유도하는 약물의 스크리닝 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 miR-26a 또는 miR-29b로부터 선택되는 miRNA를 발현하는 세포주는 다능성 기질세포 유래의 세포주인 방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 시험물질은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드 및 단백질로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 상기 miR-26a는 서열번호 5의 핵산서열을 갖는 것인 방법.

청구항 13

제9항에 있어서, 상기 miR-29b는 서열번호 6의 핵산서열을 갖는 것인 방법.

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 miRNA의 발현 변화는 RT-PCR에 의해 탐지되는 것인 방법.

청구항 15

miR-15, miR-144, miR-145 및 miR-329로 이루어진 군으로부터 선택되는 miRNA 또는 이를 포함하는 벡터를 포함하는 다능성 기질세포의 미분화 상태 유지용 조성물.

청구항 16

miR-26a 또는 miR-29b로부터 선택되는 miRNA 또는 이를 포함하는 벡터를 포함하는 다능성 기질세포의 혈관내피세포로의 분화 유도용 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 혈관내피세포화를 조절하는 microRNAs 및 그의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 줄기세포는 오랜 기간 동안 자가 복제할 수 있고 적절한 생리학적 또는 실험적 조건하에서 특정 세포로 분화할

수 있는 특수한 유형의 세포로서, 그들의 생물학적 특성과 그들의 잠재적인 의학적 중요성 때문에 관심을 얻고 있다. 골수 유래의 다능성 기질세포(multipotent stromal cells; MSCs)를 전구체로 하는 혈관내피전구세포(endothelial progenitor cells; EPCs)는 생리학 및 병리학적 내피세포화에 관여하나 (Asahara et al., Circulation research. 85, 221-228., 1999; Kalka et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 97, 3422-3427, 2000), 각각의 상이한 세포들이 어떻게 혈관내피세포(endothelial cells; ECs)로 되게 되는지에 대한 메커니즘에 대해서는 거의 알려진 바 없다. MSCs 자가-복제와 분화 간의 밸런스는 유전적 그리고 후성유전학적 조절 네트워크에 의해 제어된다 (Yu et al., Frontiers in genetics. 3, 191., 2012). 외인성 유전적 조작이나 세포 자극과는 달리, miRNAs는 유전자 발현의 전사후 조정 동안 후성유전학적 메커니즘을 조절함으로써 줄기세포 특성을 체계적으로 조절한다 (Cui et al., BMC neuroscience. 13, 116, 2012; Mazar et al., PloS one. 6, e24922., 2011; Tardito et al., Expert opinion on investigational drugs. 22, 217-233., 2013). 최근, 정상적인 포유동물의 분화 동안의 miRNAs 발현 및 기능이 지방세포, 연골세포 및 심근세포 등의 분화에 중요한 역할을 한다는 점이 밝혀졌다 (Banerjee et al., Physiol Genomics. 43, 543-556., 2011; Eskildsen et al., Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 108, 6139-6144., 2011; Visone et al., Endocr-Relat Cancer. 14, 791-798., 2007). 혈관내피세포에 초점을 맞추어 miRNAs를 연구하는 것의 잠재적 중요성을 강조하는 목적으로 내피세포 회복에서의 miRNAs의 역할에 관한 문헌들이 검토되어 왔다 (Liu et al., Journal of cellular and molecular medicine. 12, 2395-2406., 2008; Shilo et al., DNA and cell biology. 26, 227-237., 2007).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 본 발명은 혈관내피세포화를 유도하거나 억제하는 miRNA 및 이의 용도를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0004] 본 발명자들은 다능성 기질세포 (Multipotent Stromal Cells; MSCs), 혈액모세포 (Hemangioblasts; HBs), 혈관내피전구세포 (Endothelial Progenitor Cells; EPCs), 및 혈관내피세포 (Endothelial Cells; ECs)의 운명을 조절하는 miRNA의 발굴을 위해 다양한 연구를 수행하였다. 그 결과, 하기 실시예에서 볼 수 있는 바와 같이, 다능성 기질세포의 혈관내피세포로의 분화를 억제하는 miRNA로서, miR-15, -144, -145, -329를 발굴하였으며, 역으로 다능성 기질세포에서 혈관내피세포로의 분화를 유도하는 miRNA로서 miR-26a 및 -29b를 발굴하였다.

[0005] 본 발명을 통해 혈관내피세포화의 조절자로 발굴된 miRNA들은 다능성 기질세포의 유지 또는 혈관내피세포로의 분화를 유도하기 위한 화합물의 스크리닝을 위해 유용한 마커로 이용할 수 있다.

[0006] 따라서, 본 발명은

[0007] 1) miR-15, miR-144, miR-145 및 miR-329로 이루어진 군으로부터 선택되는 miRNA를 발현하는 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계,

[0008] 2) 상기 시험물질에 의한 상기 miRNA의 발현 변화를 분석하는 단계,

[0009] 3) 상기 시험물질이 상기 miRNA의 발현을 증가시키면 다능성 기질세포의 유지를 위한 약물로 판단하는 것을 포함하는 다능성 기질세포의 유지를 위한 약물의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0010] 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 miR-15, miR-144, miR-145 및 miR-329로 이루어진 군으로부터 선택되는 miRNA를 발현하는 세포주는 다능성 기질세포 유래의 세포주일 수 있다.

[0011] 또한, 상기 시험물질은 이에 제한되는 것은 아니나, 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드 및 단백질로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있다.

[0012] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 miR-15, miR-144, miR-145 및 miR-329는 각각 서열번호 1 내지 4의 핵산서열을 가질 수 있다.

[0013] 서열번호 1

- [0014] hsa-miR-15b-5p 5'-UAGCAGCACAUCAUGGUUACA-3'
- [0015] 서열번호 2
- [0016] hsa-miR-144-5p 5'-GGUAUCAUCAUAUACUGUAAG-3'
- [0017] 서열번호 3
- [0018] hsa-miR-145-5p 5'-GUCCAGUUUCCAGGAAUCCCU-3'
- [0019] 서열번호 4
- [0020] hsa-miR-329-3p 5'-AACACACCCUGGUAACCUCUUU-3'
- [0021] 또한, 본 발명에 따른 스크리닝 방법에서, 상기 miRNA의 발현 변화는 이에 제한되는 것은 아니나, RT-PCR에 의해 탐지될 수 있다.
- [0022] 본 발명은 또한
- [0023] 1) miR-26a 또는 miR-29b로부터 선택되는 miRNA를 발현하는 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계,
- [0024] 2) 상기 시험물질에 의한 상기 miRNA의 발현 변화를 분석하는 단계,
- [0025] 3) 상기 시험물질이 상기 miRNA의 발현을 증가시키면 다능성 기질세포의 혈관내피세포로의 분화를 유도하는 약물로 판단하는 것을 포함하는 다능성 기질세포의 혈관내피세포로의 분화를 유도하는 약물의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0026] 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 miR-26a 또는 miR-29b로부터 선택되는 miRNA를 발현하는 세포주는 다능성 기질세포 유래의 세포주일 수 있다.
- [0027] 마찬가지로, 상기 시험물질은 이에 제한되는 것은 아니나, 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드 및 단백질로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 miR-26a 및 miR-29b는 각각 서열번호 5 및 서열번호 6의 핵산서열을 가질 수 있다.
- [0029] 서열번호 5
- [0030] hsa-miR-26a 5'-UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU-3'
- [0031] 서열번호 6
- [0032] hsa-miR-29b-3p 5'-UAGCACCAUUGAAAUCAGUGUU-3'
- [0033] 또한, 상기 miRNA의 발현 변화는 이에 제한되는 것은 아니나 RT-PCR에 의해 탐지될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 한 구체예는 miR-15, miR-144, miR-145 및 miR-329로 이루어진 군으로부터 선택되는 miRNA 또는 이를 포함하는 벡터를 포함하는 다능성 기질세포의 미분화 상태 유지용 조성물을 제공한다.
- [0035] 또 다른 구체예에서, miR-26a 또는 miR-29b로부터 선택되는 miRNA 또는 이를 포함하는 벡터를 포함하는 다능성 기질세포의 혈관내피세포로의 분화 유도용 조성물을 제공한다.
- [0036] 본 발명에 따른 상기 조성물에 있어서, 유효성분으로 사용되는 miRNA는 miRNA 그 자체 또는 miRNA 모방체를 포함하는 개념으로 간주된다. miRNA 모방체는 천연 miRNA의 기능을 증가, 보충, 또는 대체할 수 있다. 한 실시예에서, miRNA 모방체는 성숙한 miRNA 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 다른 실시예에서, miRNA 모

방체는 pri-miRNA 또는 pre-miRNA 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. miRNA 모방체는 잠금 핵산 (locked nucleic acids), 펩타이드 핵산과 같은 화학적 변이, 2'-O-알킬(예를 들어, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시 에틸), 2'-플루오로 및 4'티오 변이와 같은 과당 변이 및 하나 이상의 티오인산, 모르포놀린 또는 카복실산포스 포는 결합과 같은 주쇄 변이를 포함할 수 있다. 특정 miRNA 모방체들은 다하마이콘(Lafayette, CO) 및 암비온사와 같은 회사들로부터 구입할 수 있다.

[0037] 상기 miRNA는 또한 이를 포함하는 벡터의 형태로 조성물 내에 포함될 수 있다. "벡터"는 세포의 내부에 관심 핵산을 전달하는데 사용될 수 있는 수단으로 이용된다. 폴리뉴클레오티드, 이온성 또는 양쪽성 화합물들과 결합된 폴리뉴클레오티드, 플라스미드 및 바이러스를 포함하나 이에 제한되지 않는 여러 벡터가 당업계에 공지되어 있다. 따라서, "벡터"라는 용어는 복제 플라스미드 또는 바이러스를 포함한다. 바이러스성 벡터의 예들은 아데노 바이러스 벡터, 아데노-결합 바이러스 벡터, 리트로바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 발현 구조체는 생체 세포에서 복제될 수 있거나 합성적으로 제조될 수 있다. 본 출원을 위해서, "발현 구조체", "발현 벡터" 및 "벡터"라는 용어는 일반적인 의미에서 본 발명의 출원을 설명하기 위해 상호교환해서 사용되며 본 발명을 제한하려는 것은 아니다. 한 구체예에서, miRNA 모방체를 발현하기 위한 발현 벡터는 특정 miRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오티드에 "작동가능하게 연결된(operably linked)" 프로모터를 포함한다. 본 발명에서 사용된 "작동가능하게 연결된" 또는 "전사제어 하에서"라는 문구는 프로모터가 폴리뉴클레오티드의 RNA 폴리머라제 및 발현에 의해 전사의 개시를 제어하기 위해 폴리뉴클레오티드와 관하여 정확한 위치와 방향에 있다는 것을 의미한다. miRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 프라이머리-miRNA 서열(pri-miRNA), 전구체-microRNA 서열(pre-miRNA) 또는 성숙한 miRNA 서열을 암호화할 수 있다. 특정 miRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 길이가 약 18 내지 약 2000 뉴클레오티드, 약 70 내지 약 200 뉴클레오티드, 약 20 내지 약 50 뉴클레오티드 또는 약 18 내지 약 25 뉴클레오티드일 수 있다. 다른 실시예에서, 특정 miRNA를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 인트론을 암호화하는 핵산 또는 mRNA의 번역되지 않은 영역을 암호화하는 핵산 또는 비-암호화 RNA에 위치된다.

[0038] 본 발명에 따른 상기 다능성 기질세포의 미분화 상태 유지용 조성물 또는 다능성 기질세포의 혈관내피세포로의 분화 유도용 조성물은 다능성 기질세포의 배양시 일반적으로 사용되는 배지를 포함할 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 이러한 배지로는 예컨대, MEM-alpha (Minimum Essential Medium alpha), MSCGM(Mesenchymal Stem Cell Growth Medium), DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 등이 포함될 수 있다.

[0039] 상기 다능성 기질세포의 미분화 상태 유지용 조성물 또는 다능성 기질세포의 혈관내피세포로의 분화 유도용 조성물은 예를 들어, 인 비트로 상에서 다능기질세포에 처리되거나 인 비보 상에서 다능성 기질세포의 미분화 상태 유지 또는 다능성 기질세포의 혈관내피세포로의 분화 유도가 요구되는 대상체에 직접 투여될 수 있다.

[0040] 인 비트로 상에서의 조성물의 처리시, 처리 농도, 처리 시간 등은 다능성 기질세포의 미분화 상태 유지의 시간, 필요한 다능성 기질세포의 수, 다능성 기질세포의 혈관내피세포로의 분화의 정도 등 사용목적에 따라 당업자가 적절히 조절할 수 있다.

[0041] 또한, 인 비보 상에서의 조성물의 처리시, 조성물은 miRNA의 투여시 적합한 공지의 약제학적 담체를 포함할 수 있다. 이 경우 투여되는 miRNA의 농도는 환자의 체중, 연령, 성별, 병변의 정도에 따라 적의 증감될 수 있다. 본 발명에 따른 제제는 비경구 또는 국소투여에 의해 인체에 적용될 수 있다.

[0042] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

발명의 효과

[0043] 본 발명은 다능성 기질세포의 미분화 상태를 유지하는 miRNA로서, miR-15, -144, -145, -329를 발굴하였으며, 역으로 다능성 기질세포에서 혈관내피세포로의 분화를 유도하는 miRNA로서 miR-26a 및 -29b를 발굴하였다. 이들 miRNA는 다능성 기질세포의 미분화 상태 유지를 위해 miR-15, -144, -145, -329를 활성화할 수 있는 약물, 그리

고 혈관내피세포로의 분화 유도를 위한 miR-26a 및 -29b를 활성화할 수 있는 약물의 스크리닝을 위한 마커로서 또는 다능성 기질세포의 미분화 상태 유지 및 다능성 기질세포의 혈관내피세포로의 분화를 유도할 수 있는 유효 성분으로서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0044]

도 1은 골수 및 말초 혈액으로부터 분리된 세포에 다능성 기질세포, 혈액모세포, 혈관내피전구세포, 혈관내피세포가 포함되어 있음을 보여주는 유세포분석 결과이다.

도 2는 RT-PCR에 의한 다능성 기질세포, 혈액모세포, 혈관내피전구세포, 내피세포에서의 Sca-1, c-Kit, vWF, CD31 및 VE-cadherin의 mRNA 레벨을 보여준다.

도 3은 경동맥 풍선 손상 모델에서, 혈관내피전구세포와 내피세포의 분포는 증가하는 반면, 다능성 기질세포의 분포는 감소함을 보여주는 유세포 분석 결과이다.

도 4은 다능성 기질세포, 혈액모세포, 혈관내피전구세포, 혈관내피세포에서의 다양한 miRNA의 상대적인 발현 레벨을 real-time PCR로 분석한 결과를 보여준다.

도 5는 TargetScan 결과와 real-time RT-PCR을 통한 microRNA 발현 양상을 기초로 다능성 기질세포의 운명에 관련된 miRNA를 벤다이어그램으로 정리한 결과를 보여준다.

도 6은 VEGF에 의한 내피세포로의 분화 유도를 보여주는 면역형광분석법(도 6A) 및 RT-PCR(도 6B)의 결과를 나타낸다.

도 7은 다능성 기질세포에 VEGF 처리시 VEGF 관련 신호전달 경로 및 내피세포 마커의 발현 변화를 보여주는 웨스턴블롯(도 7A) 및 RT-PCR(도 7B) 결과이다.

도 8은 VEGF 처리시 내피세포 특이적 마커와 다능성 기질세포 특이적 마커의 mRNA 레벨 변화를 보여주는 RT-PCR 결과를 나타낸다.

도 9는 PDGF는 MEK, ERK, AKT의 인산화를 유도하여 활성화시키는 반면, VEGF는 이들 단백질의 활성을 저해함을 보여주는 웨스턴 블롯 결과를 나타낸다.

도 10은 PDGFR을 타겟하는 miR-26a와 -29b가 PDGF에 의한 MEK와 ERK의 활성을 저해함을 보여주는 웨스턴 블롯의 결과를 나타낸다.

도 11은 miR-26a와 -29b에 의한 MEK와 ERK의 활성 저해가 세포 사멸과는 관련이 없음을 보여주는 homogeneous caspase-3 assay의 결과를 나타낸다.

도 12는 CD133을 타겟하는 miR-29b, -30a, -542가 CD133의 신호전달 단백질인 AKT와 p38의 인산화를 억제함을 보여주는 웨스턴 블롯의 결과를 나타낸다.

도 13은 miR-26a, -29b, -30a, -542의 트랜스펙션에 따른 내피세포 특이적 마커와 다능성 기질세포 특이적 마커의 발현 변화를 보여주는 RT-PCR 결과를 나타낸다.

도 14는 miR-26a, -29b, -30a, -542의 처리에 따른 세포면역염색법의 결과를 보여준다.

도 15는 microRNA에 의해 내피세포로 분화유도된 다능성 기질세포의 모세관 형성과 이동을 관찰한 결과를 보여준다.

도 16은 본 발명에 따른 microRNA에 의한 다능성 기질세포의 운명 조절을 모식도로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045]

본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0046]

[실시에]

[0047]

<실험 방법>

[0048]

경동맥 풍선 손상 모델(Carotid artery balloon injury model)의 제조

[0049]

동물의 복강 내로 졸레틸 (80 mg/kg)을 주사하여 마취 후에, 경부 정중선을 절개하여 좌경동맥을 노출시킨다. 좌경동맥의 근위부와 좌내경동맥의 근원 부위를 수술용 실을 이용하여 임시적으로 봉합하여, 풍선 카테타를 삽입하는 동안 과도하게 출혈이 일어나는 것을 막았다. 2-Fr Fogarty balloon catheter (Baxter Healthcare Corp., City, State, Deerfield, IL, USA)를 삽입한 후에, 외경동맥 혈관벽 부분을 제거하였다. 풍선 카테타를 삽입한 후에, 임시적으로 봉합해 놓은 좌경동맥의 근위부의 봉합을 풀어주고, 카테타를 대동맥이 흐르는 방향으로 접근시켜 놓았다. 그 다음 동맥 혈관 벽에 충분한 저항력을 가질 만큼 풍선을 팽창시켰다 (0.2 ml). 팽창된 풍선 카테타는 전체 경동맥 혈관 벽을 따라 전형적인 손상을 가하도록 끌어올려주었다. 혈관내막의 완벽한 노출을 위해 이러한 과정을 세 번 반복 후에, 카테타를 제거하고, 좌경동맥의 근위부를 봉합하였다. 같은 과정을 우경동맥에도 동일하게 수행하였다.

[0050]

세포 분리 및 배양

[0051]

10%의 소태아 혈청 (fetal bovine serum), 1%의 페니실린과 스트렙토마이신 용액이 첨가된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)으로 구성된 배지 10 ml로 4주령의 수컷 Sprague-Dawley rat (약 100 g)의 대퇴골과 경골에서 골수 유래 줄기 세포를 추출하여 수집하였다. 1.073 g/ml의 percoll의 상층에 분리된 골수를 넣고 원심분리하여 경계면에서 얻은 단핵세포를 두 번 세척 후 10% FBS-DMEM에 섞어 플라스크에 1×10^6 cells/100cm²로 분주하였다. 배양은 37°C로 유지되고 95% air, 5% CO₂가 있는 Forma Scientific 배양기에서 이루어졌다. 48-72시간 후 비흡착성 세포들은 제거되고 흡착성 세포들은 PBS로 두 번 세척하였다. 새 배지를 첨가하고 약 10일 동안 3-4일 간격으로 배지를 갈아주면서 배양하였고, 간엽줄기세포만 얻기 위하여 isoplex magnetic cell 분리 시스템 (Isoplex Magnetic Cell Selection System (Baxter Healthcare Corporation, Irvine, CA, USA))을 사용하였다. 선택된 세포는 항-c-kit, 항-CD31, 및 항-CD45 단일클론 항체가 코팅된 Dynabeads M-450에서 배양하였다.

[0052]

Real time-PCR

[0053]

전체 RNA는 TRIzol[®] Reagent (Life technologies)를 사용해서 분리하였다. 10 ng의 정제된 RNA를 특정 마이크로RNA에 작용하는 Taqman 프라이머와 결합하여 역전사 (Taqman MicroRNA Reverse Transcriptase Kit, Applied Biosystems)하였고, 대조군으로 U6를 사용하였다. 특정 산물의 증폭과 검출은 Light Cycler 480 II (Roche)를 통해 95°C 에서 10분, 95°C 에서 15초 동안, 그리고 60°C 에서 60초 동안 40회 사이클을 수행하였다. 각 표적 유전자의 역치 사이클 (threshold cycle; Ct)을 정의, PCR의 선형적인 증폭단계에 도달, U6 (Δ Ct value) 값에 따라 계산하였다. 세포에서 각각의 microRNA의 발현 비율의 상대적인 차이 (Δ Δ Ct)를 계산하여 2 Δ Δ Ct 값을 제시하였다.

[0054]

MicroRNA 트랜스펙션

[0055]

microRNA mimic transfection은 siLentFect[™] Lipid reagent (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 수행하였다. microRNA mimic과 대조군 (Genolution Pharmaceuticals, Inc., Korea)은 최종적으로 100 nM을 사용하였다. 37°C CO₂ 배양기에서 4-6시간 동안 배양한 후에, 배지를 배양배지로 갈아주고 계속해서 배양하였다. 랫트에 실험시 miR-144로는 서열번호 7의 랫트 유래의 miR-144 서열을 사용하였으며, miR-329로는 서열번호 8의 랫트 유래의 miR-329 서열을 사용하였다.

[0056]

서열번호 7

[0057] rno-miR-144-5p 5'-GGUAUCAUCAUUAUCUGUAAGU-3'

[0058] 서열번호 8

[0059] rno-miR-329-3p 5'-AACACACCCAGCUAACCUUUUU-3'

[0060] **이뮤노블롯 분석**

[0061] 세포들을 모은 다음 PBS로 세척해 준 뒤, 1X 용해 버퍼(10X lysis buffer; 20 mM HEPES, pH 7.5, 1.5 mM MgCl₂, 10mM KCl, 1mM EDTA, 1 mM EGTA, 250 mM sucrose, 0.1 mM PMSF, 1 mM dithiothreitol, 4 μg/ml pepstatin, 4 μg/ml leupeptin, 5 μg/mlaprotinin)에 현탁시켜 4℃에서 10분간 용해시켰다. 750 g, 4℃에서 10분간 원심분리 후, 상등액을 10,000 g, 4℃에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 분리하여 BCA protein assay reagent (Thermo Scientific)로 단백질 농도를 정량하였으며, 동량의 단백질을 크기에 맞게 8~15% SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis; Qbiogene)에 로딩 후 전기영동하였다. 원하는 크기의 젤을 자른 후 폴리비닐리덴플로라이드 (PVDF; Millipore) transfer membrane과 transfer buffer (20 mM Trizma;Sigma,190mMGlycine;Sigma,20%Methanol;Duksan)를 사용하여 단백질을 이동, 고정시켰다. 전기 이동된 막을 10% Difco™ skim milk(BD)와 TBS-t (1X TBS, 0.1% tween-20)를 혼합한 블로킹 버퍼에서 1시간 동안 반응시키고, 원하는 1차 항체 (phosphor-PLC (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, California), PLC (Santa Cruz Biotechnology), phosphor-PI3K (Cell Signaling Technology), PI3K (Cell Signaling Technology), phosphor-AKT (Cell Signaling Technology), AKT (Cell Signaling Technology), phosphor-ERK1/2 (Cell Signaling Technology), ERK1/2 (Cell Signaling Technology), phosphor-MEK1/2 (Cell Signaling Technology), MEK1/2 (Cell Signaling Technology), HDAC3 (Santa Cruz Biotechnology), p21 (Santa Cruz Biotechnology), phosphor-smad1/5/8 (ser463/ser465) (Santa Cruz Biotechnology), smad1/5/8 (Cell Signaling Technology), phosphor-p38 MAPK (T180/Y182) (Cell Signaling Technology), p38 (Cell Signaling Technology) and β-actin (Abcam, Cambridge, United Kingdom))를 넣어 2시간 내지 밤새 반응시켰다. TBS-t로 막을 3번 세척하고 호오스래디쉬 퍼옥시다아제가 부착된 2차 항체 (goat anti-mouse and goat anti-rabbit IgG-peroxidases)를 넣어 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 TBS-t로 막을 5번 세척하고 Enhanced chemiluminescence plus western blotting system (ECL; Amersham Biosciences)을 이용하여 발광시킨 후 암실에서 Hyperfilm™ ECL(AmershamBiosciences)로 밴드를 확인하였다. 밴드 강도는 NIH ImageJ version 1.34e software로 측정하였다.

[0062] **RT-PCR 분석**

[0063] 전체 RNA를 TRIzol® Reagent (500 μl/60 mm plate, Life technologies)로 분리하였다. 100 μl 클로로포름을 Tri-reagent 위에 넣고, 10초간 볼텍싱한 다음, 12,000 g, 4℃ 에서 15분간 원심분리한다. 맨 위의 상등액을 분리하여, 250 μl 2-프로판올을 넣고 30초간 볼텍싱하고, 12,000 g, 4℃ 에서 10분간 원심분리하였다. 상등액을 버리고, 펠렛을 75% 에탄올 (Sigma, St. Louis, MO, USA)이 혼합된 디에틸피로카보네이트 (DEPC; Sigma) 수용액으로 세척하였다. 7,500 g, 4℃ 에서 5분간 원심분리한 뒤, 상등액을 제거하고 펠렛을 상온에서 7분간 건조시켰다. 30 μl nuclease free water (NFW)를 넣고, DU 640 스펙트로포토미터 (Effendorf, Hamburg, Germany)로 OD₂₆₀/OD₂₈₀를 측정하여 RNA를 정성/정량하였다. 분리된 전체 RNA로부터 Avian Myeloblastosis virus (AMV) 역전사효소 (Powver cDNA Synthesis Kit, Intron Biotechnology)에 의해 단일가닥 cDNA를 합성하였다. 1 μl의 전체 RNA, 1×역전사 완충액 (10 mM Tris-HCl, pH 9.0, 50 mM KCl, 0.1% Triton X-100), 1 mM 테옥시뉴클레오사이드 트리포스페이트 (dNTPs), 0.5유닛의 RNase 저해제, 0.5 μg의 oligo(dT)15, 및 15유닛의 AMV 역전사효소를 함유하는 20 μl의 역전사 반응 혼합물을 42℃에서 15분간 인큐베이션하고, 99℃에서 5분 동안 가열한 다음, 0~5℃ 에서 5분 동안 인큐베이션하였다. PCR은 Tap 폴리머라아제 (i-Max™ DNA polymerase, Intron Biotechnology)로 표준 절차를 이용하여 수행하였다. 94℃에서 30초 동안 변성, 58~65℃에서 30초 동안 어닐링, 그리고 72℃에서 30초 동안 연장하는 조건으로 사이클 수는 25~45 사이클로 변동되었다.

[0064] 사용된 프라이머는 다음과 같다.

- [0065] **Sca-1 (345 bp)**
- [0066] sense: 5' -CATCTTCTCCTGGCCCTACT-3'
- [0067] antisense: 5' -GAGGACTGAGCCCAGGATGAA-3' ;
- [0068] **c-kit (308 bp)**
- [0069] sense: 5' -AGCCGTCTCCACCATCCATCCAG-3'
- [0070] antisense: 5' -GCGGACCAGTGCCTCGTTGTCTT-3' ;
- [0071] **vWF (305 bp)**
- [0072] sense: 5' -GCCTCTACCAGTGAGGTTTTGAAG-3'
- [0073] antisense: 5' -ATCTCATCTCTTCTCTGCTCCAGC-3' ;
- [0074] **CD31 (590 bp)**
- [0075] sense: 5' -GTGCAAAGTGGAAATCGAACC-3'
- [0076] antisense: 5' -ACCGGGGCTATTACCTTGAC-3' ;
- [0077] **VE-cadherin (175 bp)**
- [0078] sense: 5' -ACAAGGACGTGGTGCCAGTA-3'
- [0079] antisense: 5' -CCATTGTCGGAGATGAGCAC-3' ;
- [0080] **GAPDH (452 bp)**
- [0081] sense: 5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'
- [0082] antisense: 5' -TCCACCACCTGTTGCTGTGA-3'

[0083] PCR 산물은 1.2% 아가로스 젤 (Bio-Rad)로 전기영동하여 분리하고, 에티뮴 브로마이드 (EtBr; Sigma, St. Louis, MO, USA)로 염색한 뒤 Gel-Doc (Bio-Rad) 으로 밴드를 확인하였다. 증폭 산물들의 신호 강도는 각각의 GAPDH 신호 강도에 대한 그들의 상대적인 강도로 노말라이즈하였다(normalized).

[0084] **세포 이동 어세이 (Cell Migration Assay)**

[0085] 세포 이동 어세이는 8.0 μm 의 포어 크기를 갖는 폴리카보네이트 필터 (Nunc, Rochester, NY, USA) 및 microchemotaxis chambers를 이용하여, Boyden chamber method를 변형하여 진행하였다. 0.5% FBS 배지에 5×10^5 cells/ml 농도의 세포에 트립신을 처리한다. 100 μl 의 세포 현탁액을 상부 챔버에 넣고, 50 ng/ml의 VEGF가 들어있는 배지 600 μl 를 하부 챔버에 넣었다. 챔버를 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 6시간 인큐베이션하였다. 코튼 팁 (Cotton tip)을 사용하여 필터의 상부에 있는 세포를 제거하였다. 필터의 하부에 있는 세포는 메탄올로 고정시키고, 헤마토실린으로 염색하였다. 200 배율의 현미경 관찰로 랜덤하게 세 섹션을 선택하여 세포의 개수를 측정하였다. 모든 실험은 triplicate로 세 번 이상 진행하였다.

[0086] **모세혈관 형성 어세이 (Capillary Formation Assay)**

[0087] 모세관 형성은 in vitro angiogenesis kit (MILLIPORE[®])을 사용하여 제조사 매뉴얼대로 진행하였다. 24-웰 플레이트에 100 μl 의 ECMatrix[™] 용액을 넣고 37°C 인큐베이터에서 1시간 동안 굳혔다. 내피세포로 분화유도된 다능성 기질세포를 VEGF가 들어있는 내피세포 성장 배지에 재현탁하여, 2×10^4 개의 세포를 중합된 ECMatrix[™] 위에 분주하였다. 플레이트를 95% air, 5% CO₂, 37°C 배양기에서 12시간 동안 인큐베이션하였다. 현미경으로 400배율에서 튜브 형성 (straight cellular extensions joining two cell masses or at branch points)을 확인하였

다.

[0088]

면역세포화학법 (Immunocytochemistry)

[0089]

세포를 4-웰 슬라이드 챔버 (four-well slide chambers)에서 배양하고, PBS로 2번 세척한 뒤, 1% 파라포름알데히드 용액으로 10분간 고정시켰다. 세포를 PBS로 2번 세척하고 0.1% Triton X-100로 10분간 permeabilizing하였다. 블로킹 용액 (2% bovine serum albumin and 10% horse serum in PBS)으로 1시간 블로킹하고, 1차 항체 (CD31, and CD45 (1:100 dilution, Santa Cruz Biotechnology, Inc.))로 염색하였다. FITC- 또는 Texas Red-컨쥬게이트된 마우스, 및 래빗(Jackson ImmunoResearch Laboratories) 2차 항체를 사용하였다. 면역형광은 공초점 현미경 (LSM710; Carl Zeiss)으로 측정하였다.

[0090]

카스파아제-3 어세이 (Caspase-3 Assay)

[0091]

카스파아제-3 활성은 Apop-Target™ Caspase-3 Colorimetric Protease Assay를 사용하여 확인하였다. 이 어세이는 카스파아제-3에 의해 기질이 절단되면, 유리 DEVD-pNA 별색단 (chromophore)이 생성되는 정도로 활성을 측정한다. 기질이 카스파아제-3에 의해 절단되면, 유리 pNA의 광 흡수를 405nm의 파장에서 마이크로플레이트 리더로 측정할 수 있다. 서로 다른 조건에서 배양한 세포를 용해 버퍼 (1 M DTT)를 사용해서 수확한 다음, 세포 추출액에서 세포잔해를 원심분리로 제거하였다. 단백질 농도는 Protein Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 측정하였다. 50 μl의 세포 추출액을 발색단 기질과 함께 37°C 배양기에서 2시간 인큐베이션한 뒤, 유리 DEVD-pNA를 405nm의 파장에서 마이크로플레이트 리더로 측정하였다. Apoptotic 샘플에서 얻은 흡광도와 정상세포의 흡광도를 비교하여 카스파아제-3 활성의 증가 정도를 비교하였다.

[0092]

통계 분석

[0093]

데이터는 평균±SE로 표현하였다. 두 그룹의 통계적 분석은 Student's t-test에 의해 추정되었다. 두 개 이상의 그룹은 bonferroni test를 이용한 one-way ANOVA에 의해 수행되었다. P <0.05인 경우 통계적으로 유의한 결과이다.

[0094]

<실험 결과>

[0095]

실시예 1: 내피세포 회복기작에 관여하는 다능성 기질세포, 혈액모세포, 혈관내피전구세포 및 내피세포 (MSCs, HBs, EPCs 및 ECs)에 대해 특이적인 마커 단백질을 타겟으로 하는 miRNA의 스크리닝

[0096]

생리학적인 세포 운명과 줄기세포의 자가복제 및 분화 사이의 miRNA의 잠재적 역할을 확인하기 위해, 내피세포 회복기작 (endothelial recovery)에 관여하는 네 가지 세포, 다능성 기질세포 (multipotent stromal cells; MSCs), 혈액모세포 (hemangioblasts; HBs), 혈관내피전구세포 (endothelial progenitor cells; EPCs), 내피세포 (endothelial cells; ECs)를 선택하였다. 각 세포의 특이적 마커를 갖고 있는 비드를 이용하여 FACS (fluorescence activated cell sorter)로 이들 세포를 분리하였다. 그 결과, 도 1에서 볼 수 있는 바와 같이, 골수 및 말초혈액에서 네 가지 세포가 분포함을 확인하였다.

[0097]

또한, RT-PCR를 이용하여 확인한 결과, 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 세포가 다능성 기질세포에서 혈액모세포, 혈관내피전구세포, 내피세포로 변화해 갈수록 내피세포 특이적 마커인 vWF와 CD31의 발현은 증가하지만, 다능성 기질세포 특이적 마커인 Sca-1과 c-Kit의 발현은 점점 감소하였다.

[0098]

내피세포 회복기작 (endothelial recovery)에서, 풍선 카테터 삽입을 통한 혈관확장술과 같은 시술로 내피세포가 손상을 입으면, 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 혈관내피전구세포와 내피세포의 분포는 증가하지만, 다능성 기질세포의 분포는 감소하고, 이러한 세포 운명의 변화는 병리학적 조건에 의해 조절을 받는다.

[0099]

이러한 병리학적 조건에서의 세포 운명 변화는, 세포 치료를 위해 이식된 줄기세포가 숙주세포로 변화해서 내피세포 회복기작에 관여하는 현상과 유사하다.

[0100]

내피세포 회복기작에 관여하는 각 세포의 형성에 특정 microRNA가 영향을 주는지 명확히 밝히기 위해, 네 가지

세포의 특이적인 마커 단백질을 타겟으로 하는 microRNA를 TargetScan 프로그램 (<http://www.targetscan.org>)을 통해서 찾았다 (표 1 내지 4).

부호의 설명

표 1

다능성 기질세포 (Multipotent Stromal Cells)

세포 유지	ALK	miR-96/507/1271 miR-133abc
	BMPRII	miR-19ab miR-21/590-5p miR-130ac/301ab/301b/301b3p/454/721/4295/3666 miR-17/17-5p/20ab/20b-5p/93/106ab/427/518a-3p/519d miR-25/32/92abc/363/363-3p/367 miR-99ab/100 miR-216b/216b-5p miR-153 miR-181abcd/4262 miR-26ab/1297/4465
	CD133	miR-142-3p miR-29abcd
	PDGFR	miR-34ac/34bc-5p/449abc/449c-5p miR-219-5p/508/508-3p/4782-3p miR-182 miR-17/17-5p/20ab/20b-5p/93/106ab/427/518a-3p/519d miR-141/200a miR-24/24ab/24-3p miR-27abc/27a-3p miR-140/140-5p/876-3p/1244 miR-218/218a miR-130ac/301ab/301b/301b3p/454/721/4295/3666 miR-181abcd/4262 miR-33ab/33-5p miR-26ab/1297/4465 miR-29abcd
세포 분화	CD45	miR-141/200a miR-129-5p/129ab-5p miR-133abc miR-124/124ab/506
	VEGFR1	miR-204/204b/211 miR-338/338-3p miR-96/507/1271 miR-218/218a miR-182 miR-144 miR-22/22-3p miR-139-5p miR-133abc miR-124/124ab/506
	Nucleostenin	miR-143/1721/4770 miR-374ab

표 2

혈액모세포 (Hemangioblasts)

전사 인자	Brachyury	miR-219-5p/508/508-3p/4782-3p miR-217 miR-9/9ab
	GATA-1	miR-9/9ab miR-149
	RUNX1	miR-18ab/4735-3p miR-27abc/27a-3p miR-141/200a miR-22/22-3p miR-184 miR-15abc/16/16abc/195/322/424/497/1907 miR-23abc/23b-3p miR-214/761/3619-5p miR-1ab/206/613 miR-9/9ab
Cell mobilization	CD309	miR-455-5p miR-221/222/222ab/1928 miR-200bc/429/548a miR-15abc/16/16abc/195/322/424/497/1907
	CD117	miR-221/222/222ab/1928 miR-34ac/34bc5p/449abc/449c-5p miR-137/137ab miR-193/193b/193a-3p
세포 이동	CD31	miR-210 miR-26ab/1297/4465 miR-27abc/27a-3p
	CD324	miR-217 let-7/98/4458/4500 miR-23abc/23b-3p
세포 발달	EphB4	miR-133abc miR-124/124ab/506
혈관신생	Tie-2	miR-150/5127 miR-139-5p miR-144 miR-31 miR-214/761/3619-5p

표 3

혈관내피전구세포 (Endothelial Progenitor Cells)

세포 이동	CD93	miR-99ab/100 miR-29abcd miR-138/138ab miR-27abc/27a-3p miR-23abc/23b-3p miR-214/761/3619-5p
	CD105	miR-214/761/3619-5p miR-150/5127 miR-370 miR-326/330/330-5p

조직 리모델링	MMP-9	miR-491-5p miR-149
Cell homing	CD184	miR-338/338-3p miR-204/204b/211 miR-1ab/206/613 miR-9/9ab
아폽토시스 조절	TNF RI/II	miR-214/761/3619-5p miR-24/24ab/24-3p
Cell recruit	CD62P	miR-9/9ab miR-26ab/1297/4465 miR-202-3p

표 4

내피세포 (Endothelial Cells)

세포 부착	CD106	miR-145 miR-181abcd/4262 miR-202-3p miR-346
	CD112	miR-24/24ab/24-3p miR-124/124ab/506 miR-214/761/3619-5p miR-15abc/16/16abc/195/322/424/497/1907
	CD144	miR-125a-5p/125b5p/351/670/4319 miR-101/101ab miR-338/338-3p miR-27abc/27a-3p
	CD146	miR-125a-5p/125b-5p/351/670/4319 miR-129-5p/129ab-5p
	CD160	miR-874 miR-653
	CD248	miR-140/140-5p/876-3p/1244
	CD54	miR-130ac/301ab/301b/301b-3p/454/721/4295/3666 miR-223 miR-383 miR-141/200a
	CD62E	miR-141/200a miR-204/204b/211 miR-182 miR-7/7ab
	vWF	miR-24/24ab/24-3p miR-214/761/3619-5p miR-15abc/16/16abc/195/322/424/497/1907
전사 인자	CD106	miR-145 miR-181abcd/4262 miR-202-3p miR-346
세포 발달, 활성화, growth motility	CD151	miR-124/124ab/506 miR-22/22-3p miR-34ac/34bc-5p/449abc/449c-5p miR-214/761/3619-5p miR-7/7ab miR-370

TargetScan 결과를 바탕으로, target score가 높은 microRNA를 선별하여, 각 세포에서의 발현양상을 확인하였다. 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이, miR-17, -21, -23b, -29b는 내피세포에서 발현이 높았고, miR-15b, -144, -145, -329는 다능성 기질세포에서 발현이 높았다.

TargetScan 결과와 real-time RT-PCR을 통한 microRNA 발현 양상을 바탕으로, 벤다이어그램을 작성하였다. 도 5에서 볼 수 있는 바와 같이, 다능성 기질세포의 maintenance에 관여하는 단백질을 타겟하는 microRNA (붉은색 원), 내피세포 부착에 관여하는 단백질을 타겟하는 microRNA (파란색 원), 다능성 기질세포의 분화에 관여하는 단백질을 타겟하는 microRNA (초록색 원)로 정리하였고, 그 중에서 다능성 기질세포의 내피세포로의 분화에 관여할 것으로 예상되는 microRNA (열은 핑크색 부분)와 다능성 기질세포의 maintenance를 유도할 것으로 예상되는 microRNA (열은 녹색 부분)를 선택하였다. 선택된 microRNA는 추후 실험을 통해 다능성 기질세포의 maintenance와 내피세포로의 분화에 관여하는지 확인하였다.

실시예 2: 내피세포 회복기작과 다능성 기질세포의 maintenance에 관여하는 miRNA의 동정

VEGF (vascular endothelial growth factor)는 줄기세포의 내피세포로의 분화를 유도하는 대표적인 사이토카인으로 알려져 있다. MSCs에 VEGF (50 ng/ml)를 처리하고, 16일 동안 분화 유도시, 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이, 시간에 따라 다능성 기질세포 특이적 마커인 CD45와 c-Kit의 발현은 점점 감소하고 내피세포 특이적 마커인 CD31, vWF, VE-cadherin의 발현은 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

다능성 기질세포의 VEGF에 의한 내피세포로의 분화 억제에는 다능성 기질세포의 미분화 상태 유지와 연관이 있다. VEGF에 의한 내피세포로의 분화는, phospholipase C (PLC) 인산화를 통한 PKC-PI3K-AKT-HDAC3-p53-p21 pathway를 통해 일어난다. HDAC 저해제인 trichostatin A (TSA) 또는 HDAC3 siRNA를 통한 HDAC3의 활성저해는 VEGF에 의한 내피세포 마커의 발현을 억제하고, 반대로 HDAC3를 과발현시키면 내피세포 마커의 발현이 증가한다. 다능성 기질세포에 VEGF (50 ng/ml)를 처리하여 내피세포로 분화를 유도하면, PLC, PI3K, AKT 인산화가 높아지고, HDAC3의 활성을 통한 p21의 활성도 증가한다. 이러한 VEGF 수용체를 타겟으로 하는 miR-15, -144, -145, -329를 트랜스펙션하면, VEGF에 의한 신호전달기작이 저해되었다 (도 7).

또한, 도 8에서 볼 수 있는 바와 같이, 내피세포 특이적 마커인 CD31의 mRNA 발현이 증가하지 않았고 다능성 기질세포특이적 마커인 Sca-1의 mRNA 레벨은 복구되었다. 따라서 VEGFR를 타겟하는 microRNA는 VEGF에 의한 다능성 기질세포의 내피세포 분화와 다능성 기질세포의 미분화 상태 유지를 조절함을 알 수 있다.

실시예 3: 다능성 기질세포의 내피세포로의 분화에 관여하는 microRNA의 동정

다음으로, MSC 유지에 관여하는 PDGFR (platelet-derived growth factor receptor), 및 CD133 단백질을 타겟하는 microRNA가 다능성 기질세포의 내피세포로의 분화에 영향을 주는지 확인하였다. 줄기세포의 자가증식은 분화 관련 신호전달이 저해되어야 하고, 반대로 줄기세포의 분화는 자가증식관련 신호전달이 저해되어야 일어난다. 다능성 기질세포의 미분화 상태 유지는 PDGF-MAPK cascades, BMP-Smad1/5/8 phosphorylation, CD133-p38-MAPK-PI3K/AKT pathway의 신호전달을 통해 이루어진다. AKT 인산화와 ERK 인산화는 MSC의 유지와 성장에 중요한 역할을 한다. PDGF는 MEK, ERK, AKT의 인산화를 유도해서 활성화시키는데, 도 9에서 볼 수 있는 바와 같이, VEGF는 세 단백질의 활성을 저해한다.

또한, 도 10에서 볼 수 있는 바와 같이, PDGFR을 타겟하는 miR-17, -26a, -29b, -219 중에서, miR-26a와 -29b가 PDGF에 의한 MEK와 ERK의 활성을 저해하였다.

MEK와 ERK의 활성 저해는 세포 사멸과 연관이 있지만, 도 11에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 실험에서 miR-26a와 -29b에 의한 MEK와 ERK의 활성 저해는 다능성 기질세포의 미분화 상태 유지 관련 신호전달을 억제할 뿐 세포 사멸과는 관련이 없었다.

한편, CD133 (prominin-1)은 줄기세포의 특이적 마커로, 줄기세포를 미분화상태로 유지하는데 중요한 역할을 한다. 도 12에서 볼 수 있는 바와 같이, CD133을 타겟하는 miR-29b, -30a, -542는 CD133의 신호전달 단백질인 AKT와 p38의 인산화를 억제하였다. PDGFR와 BMPR을 타겟하는 microRNA와 마찬가지로, CD133을 타겟하는 microRNA는 다능성 기질세포의 미분화 상태 유지를 저해한다.

PDGFR와 CD133을 타겟하는 microRNA 중에서 신호전달을 저해한 miR-26a, -29b, -30a, -542를 선택하여 다능성 기질세포의 미분화 상태 유지의 억제가 다능성 기질세포의 내피세포로의 분화에 영향을 주는지 확인하였다. 4개의 microRNA를 트랜스펙션하고 16일 동안 배양한 다능성 기질세포에서 내피세포 특이적 마커인 CD31의 발현은 증가하였고, 다능성 기질세포 마커인 Sca-1의 발현은 감소하는 경향을 보였다 (도 13).

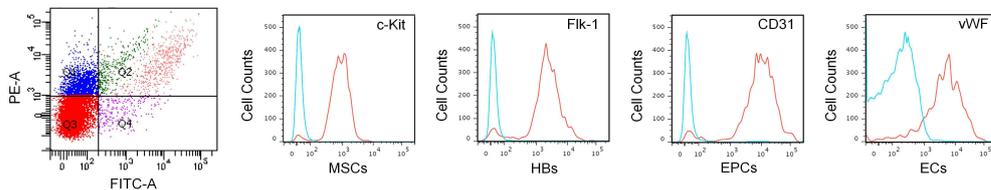
또한, 도 14의 세포면역염색법 (immunocytochemical staining) 결과에서는 다능성 기질세포 양성 마커인 CD45의 발현은 낮아졌고, 내피세포 특이적 마커인 CD31의 발현은 증가한 것을 확인하였다. 이러한 결과를 통해, 다능성 기질세포의 미분화 상태 유지 신호전달에 관여하는 단백질을 저해하는 microRNA는 다른 외부의 자극인자 없이 다능성 기질세포의 내피세포로의 분화를 유도한다는 것을 확인할 수 있었다.

마지막으로, microRNA에 의해 내피세포로 분화유도된 다능성 기질세포가 내피세포 특이적 캐릭터인 모세관 형성과 이동을 보이는지 알아보았다. 그 결과, 도 15에서 볼 수 있는 바와 같이, 4개의 microRNA 중에서 miR-26a와 -29b로 분화 유도한 다능성 기질세포에서 모세관 형성과 이동이 3배 이상 증가한 것을 확인할 수 있었다.

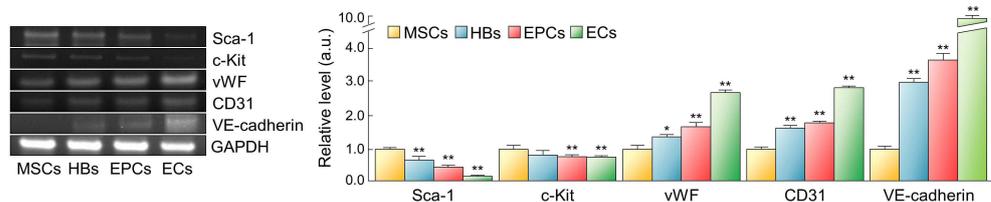
따라서, miR-26a와 -29b는 다능성 기질세포의 미분화 상태 유지에 관여하는 신호전달을 억제하여, 내피세포의 특이적 캐릭터인 모세관 형성과 이동 특성을 갖는 내피세포로 다능성 기질세포를 분화시킨다.

도면

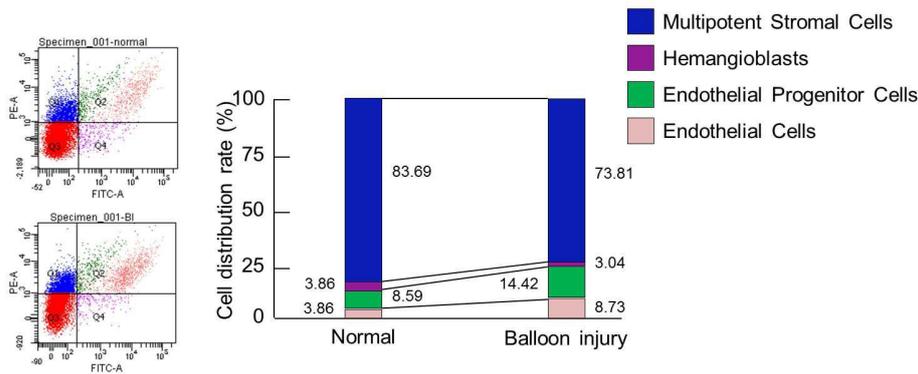
도면1



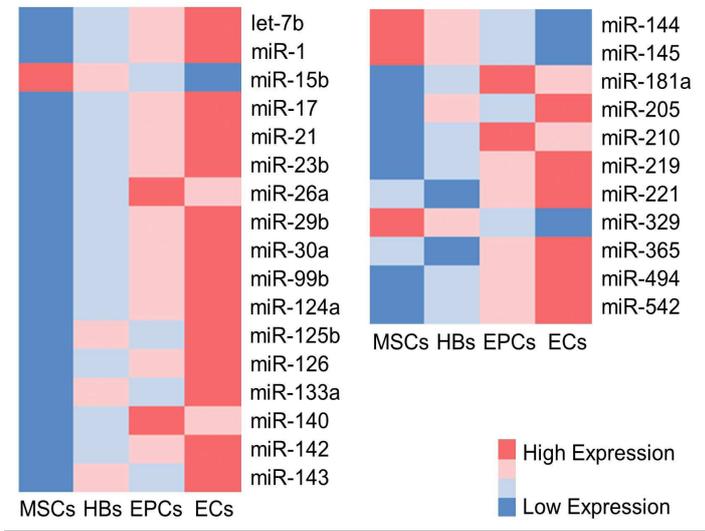
도면2



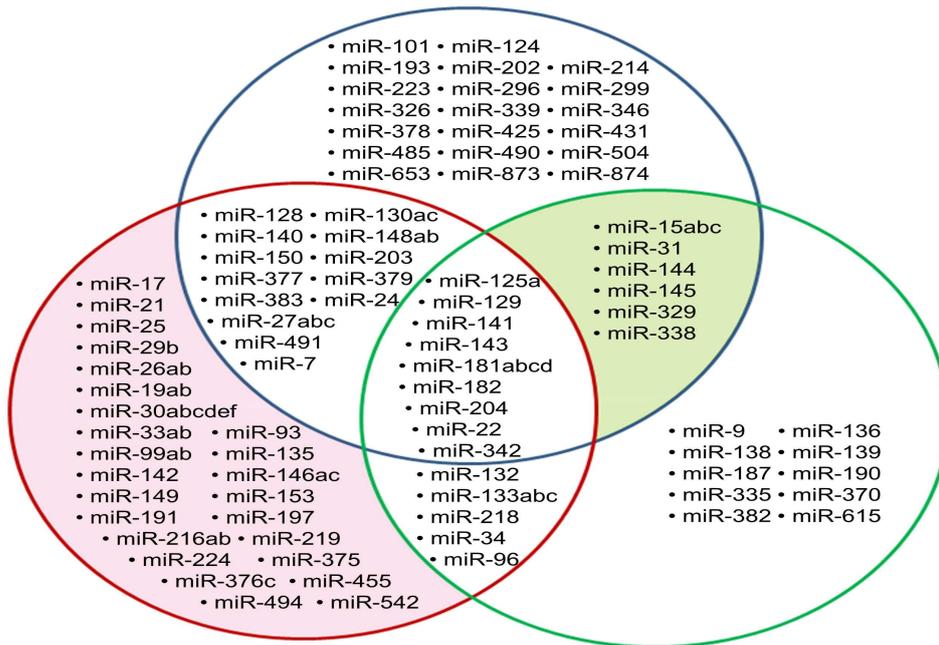
도면3



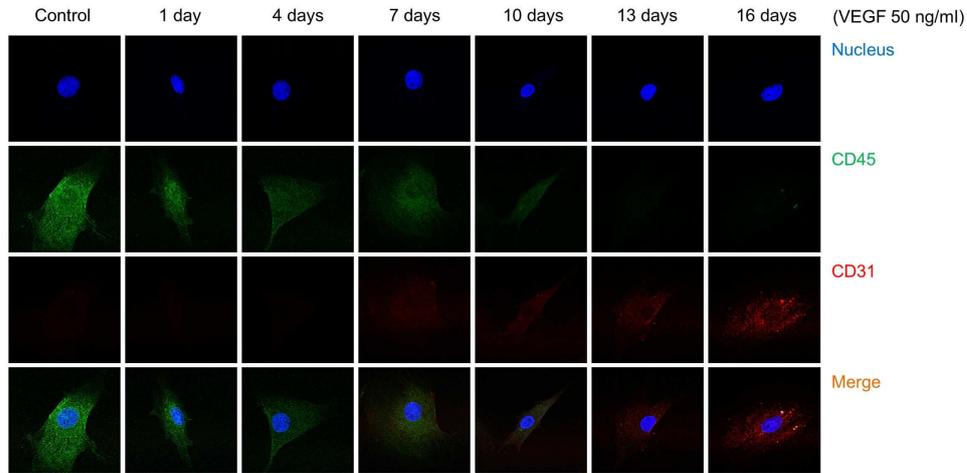
도면4



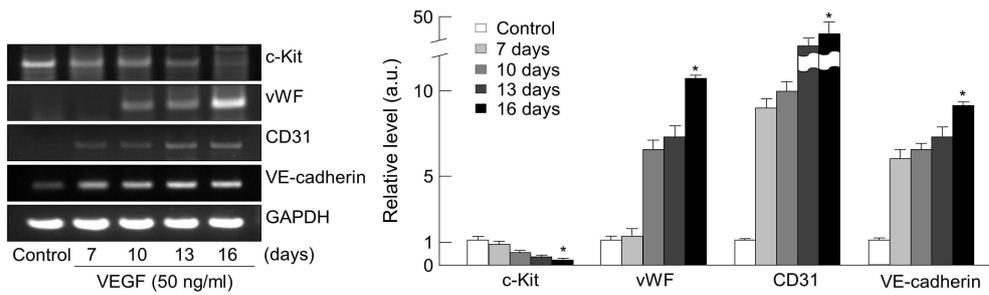
도면5



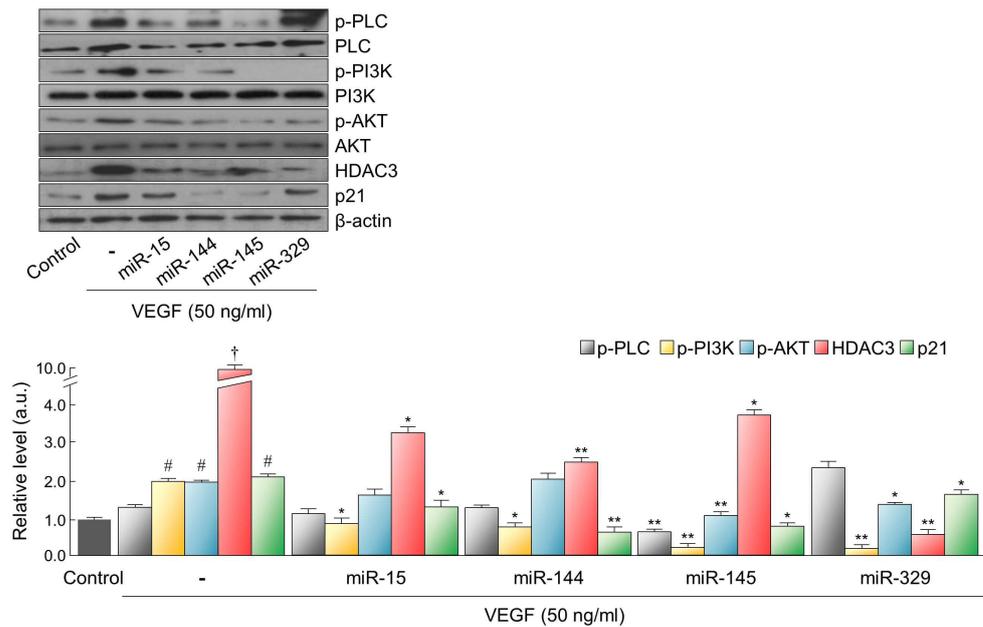
도면6a



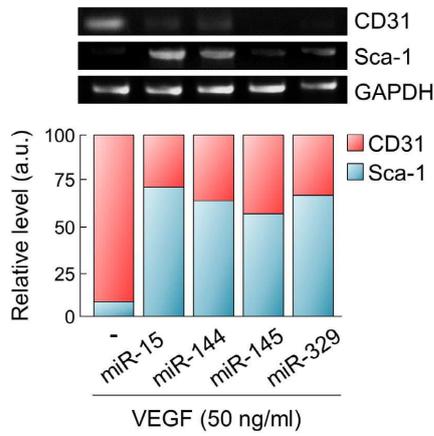
도면6b



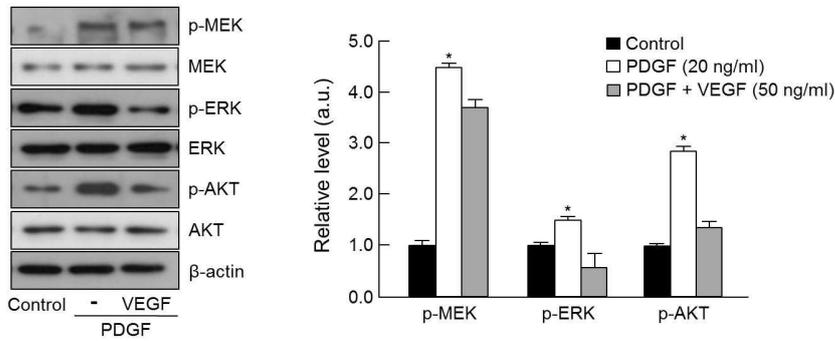
도면7



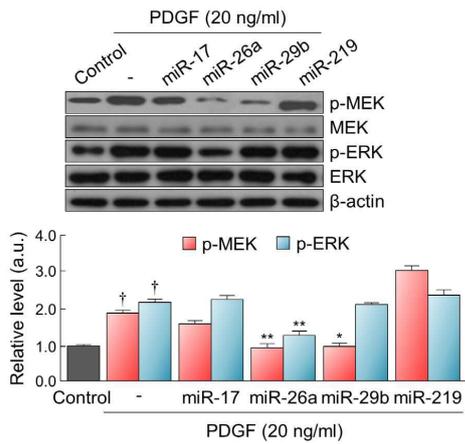
도면8



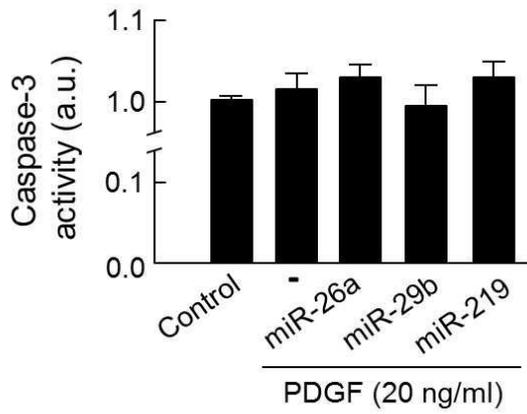
도면9



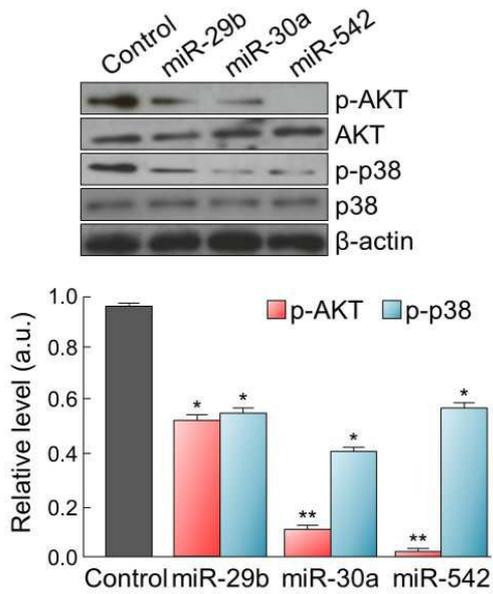
도면10



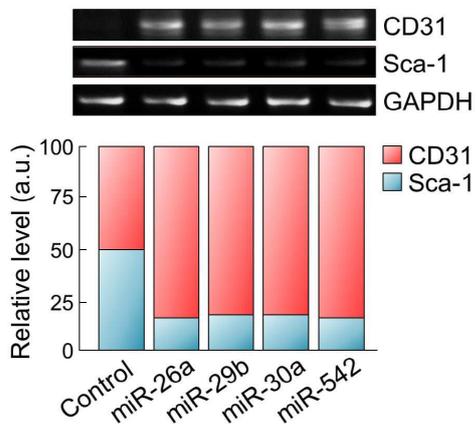
도면11



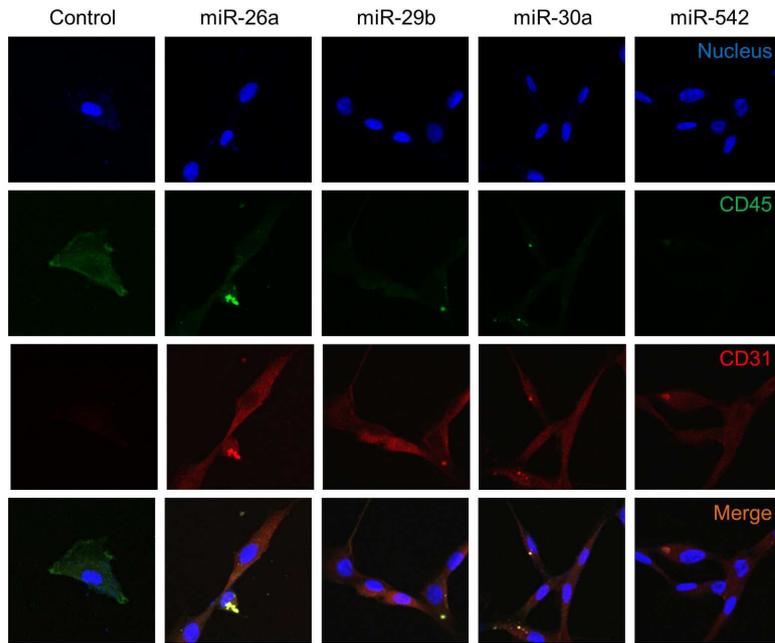
도면12



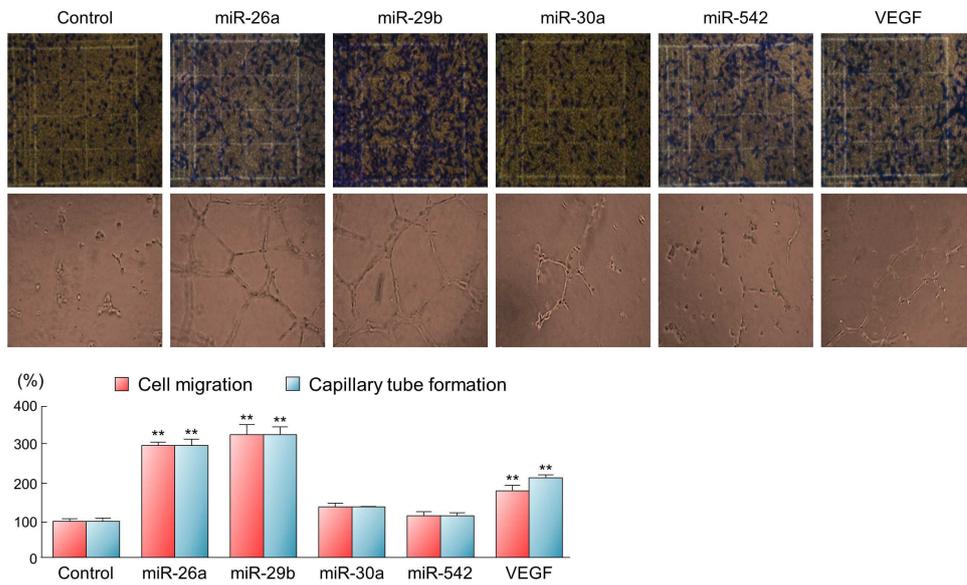
도면13



도면14



도면15



서열목록

- <110> INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY
- <120> MicroRNAs regulating vascular endothelialization and use thereof
- <130> P130234
- <160> 8

<170> KopatentIn 2.0
 <210> 1
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 uagcagcaca ucaugguuuu ca 22
 <210> 2
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 2
 ggauaucauc auauacugua ag 22

 <210> 3
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 3
 guccaguuuu cccaggauc ccu 23
 <210> 4
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 4
 aacacaccug guuaaccucu uu 22
 <210> 5
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 5
 uucaaguaau ccaggauagg cu 22
 <210> 6
 <211> 23

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 6

uagcaccauu ugaaaucagu guu 23

<210> 7

<211> 23

<212> RNA

<213> Spague-Dawley

<400> 7

ggauaucauc auauacugua agu 23

<210> 8

<211> 22

<212> RNA

<213> Spague-Dawley

<400> 8

aacacacca gcuaacuuu uu 22