



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0074589
(43) 공개일자 2022년06월03일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>A61K 48/00</i> (2006.01) <i>A61K 31/7105</i> (2006.01)
 <i>A61K 31/713</i> (2006.01) <i>A61P 1/16</i> (2006.01)
 <i>A61P 19/06</i> (2006.01) <i>A61P 3/00</i> (2006.01)
 <i>G01N 33/68</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>A61K 48/00</i> (2013.01)
 <i>A61K 31/7105</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2020-0163258
 (22) 출원일자 2020년11월27일
 심사청구일자 2021년08월11일</p> | <p>(71) 출원인
 울산과학기술원
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50</p> <p>(72) 발명자
 최장현
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
 이요한
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50</p> <p>(74) 대리인
 특허법인(유한)아이시스</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 8 항

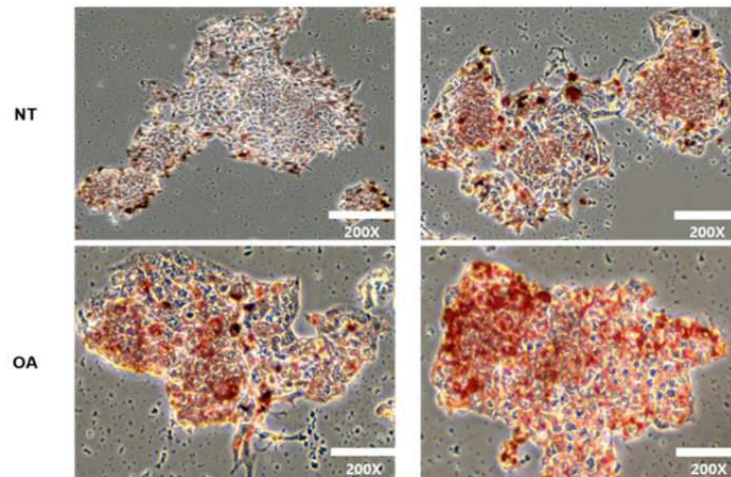
(54) 발명의 명칭 **miRNA-20b-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요약

본 발명은 miRNA-20b-5p 억제제의 용도에 관한 것으로, miRNA-20b-5p 억제제를 포함하는 조성물을 처리하는 경우 PPAR α 와 직접적으로 작용하고, PPAR α 의 타겟 유전자 및 대사 관련 유전자의 발현이 변화하여 대사성 질환이 치료될 수 있음을 확인하였다.

현재 대사 관련 치료제는 그 효과가 미미한바, 본 발명에 따른 조성물은 지방 방울 생성 및 대사 관련 유전자의 발현을 조절하여 대사성 질환의 치료할 수 있기에, 대사성 질환의 개선 또는 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도5b



(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)
A61P 1/16 (2018.01)
A61P 19/06 (2018.01)
A61P 3/00 (2018.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 2500/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711112683
과제번호	2018R1A5A1024340
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	대사스트레스 세포대응 연구센터
기 여 율	40/100
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711117644
과제번호	2020R1F1A1061267
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	Thrap3 기능규명을 통한 만성 염증 유도 지방간 질환 극복 기술 개발
기 여 율	30/100
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2020.06.01 ~ 2021.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711116116
과제번호	2016M3A9D5A01952411
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발(R&D)
연구과제명	지방세포분화 및 리모델링 기전 규명
기 여 율	30/100
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2020.03.20 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

miRNA-20b-5p 억제제를 포함하는, 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 miRNA-20b-5p는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 억제제는 miRNA-20b-5p에 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 억제제는 PPAR α 의 단백질 및 mRNA의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 대사성 질환은 비만, 당뇨병증, 지방간, 고인슐린혈증, 고요산혈증, 고지질혈증, 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증, 대사증후군 및 내피기능장애로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 6

하기 단계를 포함하는, 대사성 질환 치료 물질 스크리닝 방법:

(a) 후보물질을 처리하는 단계;

(b) 상기 후보물질이 처리된 세포에서 miRNA-20b-5p와 PPAR α 의 결합정도를 측정하는 단계; 및

(c) 후보물질 비처리군에 비해 상기 miRNA-20b-5p와 PPAR α 의 결합정도를 감소시키는 물질을 대사성 질환 치료 물질로 선정하는 단계.

청구항 7

제 6항에 있어서,

상기 (b) 단계는 면역침강법(immunoprecipitation), 면역화학염색법(immunohistochemistry), 마이크로어레이(microarray), 노던 블롯팅(northern blotting), 웨스턴 블롯팅(western blotting), 효소면역분석법(ELISA), 중합효소연쇄반응(PCR), 및 면역형광염색법(immunofluorescence)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의

방법을 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

청구항 8

제 6항에 있어서,

상기 대사성 질환은 비만, 당뇨병증, 지방간, 고인슐린혈증, 고요산혈증, 고지질혈증, 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증, 대사증후군 및 내피기능장애로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는, 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 miRNA-20b-5p 억제제의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 miRNA-20b-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 인류가 풍요로운 사회로 점점 발전해 감에 따라 생활습관이 급속하게 서구화되면서 질병의 양상도 크게 변하고 있다. 특히, 현대인에게 식습관의 변화로 인해 콜레스테롤, 혈압, 혈당치가 이상수치를 보여주는 경우가 많은데, 이 3개지 수치 중 2개 이상의 수치가 이상을 보이는 경우를 대사 증후군(metabolic syndrome)이라고 하며, 이러한 증상을 방지하는 경우 동맥 경화, 심근 경색, 뇌졸중 등의 심혈관 질환 또는 제2형 당뇨병 등의 대사성 질환의 발생으로 이어지게 된다.

[0004] 비알코올성 지방간 질환(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 의학적으로 의미 있는 음주력이 없는 사람에게서 알코올 간염과 유사한 조직소견을 보이는 질환이며, 비알코올성 지방간(nonalcoholic fatty liver, NAFL)을 비롯한 비알코올성 지방간 염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH) 등을 포함하며 비알코올성 지방간과 연관된 간경변증이나 간세포암과 같은 만성 간 질환으로 진행되는 사실이 밝혀지면서 임상적 중요성이 커지고 있다. 비알코올성 지방간 질환은 매우 흔하게 접하게 되는 질환으로서 비만 및 당뇨 등 각종 대사증후군의 발생 증가와 함께 유병률이 급격하게 증가하고 있으며 우리나라에서의 유병률은 16-33% 정도로 추정되고 있다. 비알코올성 지방간 질환은 과거 대사증후군의 간 내 표현형으로 생각되었으나 최근 많은 연구 결과에 따르면 비알코올성 지방간 질환이 심혈관계 질환, 제2형 당뇨, 대사증후군, 고혈압 및 신장 질환과 같은 만성 성인 질환 발생의 독립적인 위험인자로 밝혀지고 있고, 지방간염을 보이는 환자는 약 10%에서 간경변이나 간암으로 진행될 수 있다고 한다(대한내과학회지: 제 86 권 제 4 호 2014).

[0005] 이러한 비알코올성 지방간 등을 치료하기 위한 노력이 계속 되고 있으며, 그에 대한 치료제도 꾸준히 개발되고 있으나, 임상에서 그 효과가 미비하여 치료제로 개발되지 못하고 있는 실정이다. 따라서, 비만 및 비알코올성 지방간 등 대사성 질환을 치료할 수 있는 현저한 효과를 갖는 치료제의 발굴이 절실하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 기존의 상기와 같은 문제점을 해결하고 대사성 질환에 현저한 치료효과를 가지는 조성물을 발굴하기 위한 연구를 수행하여 본 발명의 miRNA-20b-5p의 억제제가 PPAR α 의 단백질 및 mRNA의 발현을 억제하는 방법으로 대사성 질환에 대한 예방 및 치료효과를 가진다는 사실을 확인하였다.

[0008] 이에, 본 발명은 miRNA-20b-5p 억제제를 포함하는 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 대사성 질환 치료 물질 스크리닝 방법을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

- [0010] (a) 후보물질을 처리하는 단계;
- [0011] (b) 상기 후보물질이 처리된 세포에서 miRNA-20b-5p와 PPAR α 의 결합정도를 측정하는 단계; 및
- [0012] (c) 후보물질 비처리군에 비해 상기 miRNA-20b-5p와 PPAR α 의 결합정도를 감소시키는 물질을 대사성 질환 치료 물질로 선정하는 단계.
- [0014] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0017] miRNA-20b-5p 억제제를 포함하는, 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 일구현예로, 상기 miRNA-20b-5p는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 억제제는 miRNA-20b-5p에 특이적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 억제제는 PPAR α 의 단백질 및 mRNA의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨병증, 지방간, 고인슐린혈증, 고요산혈증, 고지질혈증, 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증, 대사증후군 및 내피기능장애로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 대사성 질환 치료 물질 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0023] (a) 후보물질을 처리하는 단계;
- [0024] (b) 상기 후보물질이 처리된 세포에서 miRNA-20b-5p와 PPAR α 의 결합정도를 측정하는 단계; 및
- [0025] (c) 후보물질 비처리군에 비해 상기 miRNA-20b-5p와 PPAR α 의 결합정도를 감소시키는 물질을 대사성 질환 치료 물질로 선정하는 단계.
- [0026] 본 발명의 일 구현예로, 상기 (b) 단계는 면역침강법(immunoprecipitation), 면역화학염색법(immunohistochemistry), 마이크로어레이(microarray), 노던 블롯팅(northern blotting), 웨스턴 블롯팅(western blotting), 효소면역분석법(ELISA), 중합효소연쇄반응(PCR), 및 면역형광염색법(immunofluorescence)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 방법을 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 대사성 질환은 비만, 당뇨병증, 지방간, 고인슐린혈증, 고요산혈증, 고지질혈증, 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증, 대사증후군 및 내피기능장애로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명에 따른 miRNA-20b-5p 억제제를 포함하는 약학적 조성물은 대사성 질환에 대한 치료효과를 가지는 바, 대사성 질환의 예방 및 치료용 약학적 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.
- [0030] 단, 본 발명의 효과는 상기 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0032]

도 1은 비알코올성 지방간 환자에서 miRNA-20b-5p 발현량이 증가하는지 여부를 확인하기 위한 결과로서, 도 1a는 일반식이(normal control diet, NCD)한 쥐와 고 지방식이(high fat diet, HFD)한 마우스의 간 조직에서 miRNA-20b-5p의 발현량을 확인한 결과이고, 도 1b는 대조군(lean)과 렙틴(leptin)생성에 문제가 있는 마우스(ob/ob)의 간 조직에서 miRNA-20b-5p의 발현량을 확인한 결과이며, 도 1c는 대조군(NT)과 올레익 산(oleic acid, OA)을 처리하여 유도한 in vitro fatty liver model에서 miRNA-20b-5p의 발현량을 확인한 결과이고, 도 1d는 일반인(normal)과 비알코올성 지방간 환자(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)의 miRNA-20b-5p의 발현량을 Public database 시스템을 토대로 관찰한 결과이다.

도 2는 miRNA의 타겟을 예측하는데 활용되는 database 5개(TargetSCAN, miRmap, miRSystem, picTAR, miRDB)를 활용하여 도출된 7개의 miRNA-20b-5p의 타겟(NAGK, PPAR α , USP46, ITGB8, BMPR2, ZNF1, EPHA5) 중, 간의 지방대사와 관련이 있는 PPAR α 를 miRNA-20b-5p의 타겟으로 선정하는 과정에 대한 모식도이다.

도 3은 PPAR α 가 miRNA-20b-5p의 타겟이 된다는 사실을 확인한 결과로서, 도 3a 및 도 3b는 인간 간 세포인 HepG2와 Huh-7에서 대조군(miR-NC)과 miRNA-20b-5p가 과발현된 세포(miR-20b-5p mimic, 이하 miR-20b-5p)에서의 PPAR α 의 단백질(도 3a) 및 mRNA(도 3b)의 발현량을 비교한 결과이다.

도 4는 miRNA-20b-5p가 직접적으로 PPAR α 의 발현을 조절하는지 여부를 확인한 결과로서, 도 4a는 miRNA 타겟 database를 토대로 miRNA-20b-5p가 PPAR α 에 결합하는 부위를 direct target assay를 통해 관찰한 결과이며, 도 4b는 miRNA-20b-5p가 PPAR α 를 타겟으로 하는지 확인을 위한 luciferase assay 관찰결과이고, 도 4c는 상기 3가지 부위 중 어떠한 부위에 결합하는지 확인하기 위한 3가지 부위의 점 돌연변이(point mutant mutagenesis) 화를 통해 돌연변이 모델을 제작한 후, luciferase assay를 통해 결합 부위를 관찰한 결과이다.

도 5는 인간 간 세포인 HepG2에서 miR-20b-5p의 비알코올성 지방간 조절 효과를 확인한 결과로서, 도 5a는 대조군(miR-NC)과 miRNA-20b-5p이 과발현된 세포(miR-20b-5p)에서 miRNA-20b-5p의 발현량을 비교한 결과이고, 도 5b는 대조군(NT)과 올레익 산을 처리해 유도한 in vitro fatty liver model(OA)에서 oil-red O staining을 통해 지방 방울(lipid droplet)의 형성 양상을 관찰한 결과이며, 도 5c 및 도 5d는 대사의 매개변수(metabolic parameter)인 트리글리세라이드(Triglyceride)(도 5c) 및 콜레스테롤(Cholesterol)(도 5d)의 발현의 변화를 측정된 결과이고, 도 5e 내지 도 5g는 PPAR α 및 PPAR α 의 타겟 유전자(대사 관련 유전자)인 Acox1, CPT1a, FASN, PGC-1a, TFAM, SIRT5, CPT2, ACADM, ACOT1, HVR1, ATPase6의 발현의 변화를 대조군(miR-NC), 대조군에 올레익 산을 처리한 그룹(miR-NC OA), miRNA-20b-5p가 과발현된 그룹(miR-20b-5p) 및 miRNA-20b-5p가 과발현된 그룹에 올레익 산을 처리한 그룹(miR-20b-5p OA)에 대하여 관찰한 결과이며, 도 5h는 미토콘드리아 신생(mitochondrial biogenesis)을 관찰하기 위해, MitoTracker를 통해 관찰한 결과이고, 도 5i 및 도 5j는 미토콘드리아 신생(mitochondrial biogenesis)가 miRNA-20b-5p에 의해 조절되는지 여부를 확인하기 위해 OCR을 측정하여 mitochondria의 활성을 확인한 결과이며, 도 5k는 OCRATP를 통해 ATP 생성의 변화를 확인한 결과이다.

도 6은 miRNA-20b-5p 억제제의 비알코올성 지방간의 개선 효과를 확인한 결과로서, 도 6a는 대조군(NT)과 올레익 산 처리한 그룹(OA)에 대하여 억제제를 처리하지 않은 그룹(miR-NC)과 억제제를 처리한 그룹(miR-20b-5p inhibitor)으로 나누어 oil-red O staining을 통해 lipid droplet을 관찰한 결과이고, 도 6b 및 도 6c는 억제제를 처리하지 않은 그룹(miR-NC)과 억제제를 처리한 그룹(miR-20b-5p inhibitor)에서 대사의 매개변수(metabolic parameter)인 트리글리세라이드(Triglyceride)(도 6b) 및 콜레스테롤(Cholesterol)(도 6c)의 발현의 변화를 측정된 결과이다.

도 7은 miRNA-20b-5p 억제제를 처리한 그룹에서 단백질 및 mRNA의 발현을 확인한 결과로서, 도 7a는 PPAR α 의 단백질 발현을 대조군(miR-NC) 및 억제제 처리한 그룹(miR-20b-5p inhibitor)에서 확인한 결과이고, 도 7b 내지 7d는 대조군(miR-NC), 대조군에 올레익 산만 처리한 그룹(miR-NC OA), miRNA-20b-5p가 과발현된 그룹에 억제제를 처리한 그룹(miR-20b-5p inhibitor), miRNA-20b-5p가 과발현된 그룹에 올레익 산을 처리한 그룹(miR-20b-5p inhibitor OA)에 대해서 PPAR α 및 대사 관련 유전자 인 PPT1a, Acox1, VLCAD, SIRT5, CPT2, ACADM, ACOT1, ACC-1, chREBP, SREBP-1c, FASN, SCD1, DGAT2의 발현 변화를 관찰한 결과이다.

도 8은 miRNA-20b-5p가 과발현된 상태에서 PPAR α 를 재첨가(addback)한 경우 비알코올성 지방간 관련인자의 변화를 확인한 것으로서, 도 8a는 인간의 지방간 세포(HepG2)에서 대조군(miR-NC), miRNA-20b-5p 과발현된 그룹(miR-20b-5p), miRNA-20b-5p 과발현된 그룹에 PPAR α 를 처리한 그룹(miR-20b-5p + PPAR α WT)을 비교할 때, PPAR α 의 발현의 정도를 확인한 것이고, 도 8b 및 도 8c는 대조군(miR-NC), miRNA-20b-5p 과발현된 그룹(miR-

20b-5p), miRNA-20b-5p 과발현된 그룹에 PPAR α 를 처리한 그룹(miR-20b-5p + PPAR α WT)에서 PPAR α 와 대사 관련 유전자인 CPT1a, Acox1, SREBP-1c, FASN, PGC-1a, TFAM, NRF1, CPT1b, CPT2, ACADM, ACOT1의 발현변화를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0033] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0034] 본 발명자들은 기존의 상기와 같은 문제점을 해결하고 대사성 질환에 현저한 치료효과를 가지는 조성물을 발굴하기 위한 연구를 수행하여 본 발명의 miRNA-20b-5p의 억제제가 PPAR α 의 단백질 및 mRNA의 발현을 억제하는 방법으로 대사성 질환에 대한 예방 및 치료효과를 가진다는 사실을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [0035] 이에, 본 발명은 miRNA-20b-5p 억제제를 포함하는, 대사성 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0036] 본 발명에 있어서, "예방"이란, 대사성 질환의 발생이 예상되는 개체에게 본 발명의 miRNA-20b-5p 억제제를 포함하는 약학적 조성물을 투여하여 상기 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0037] 본 발명에 있어서, "치료"란, 치료하고자 하는 개개인 또는 세포의 천연과정을 변경시키기 위해 임상적으로 개입하는 모든 행위를 의미하는데, 임상 병리 상태가 진행되는 동안 또는 이를 예방하기 위해 수행될 수 있다. 목적하는 치료 효과에는 질병의 발생 또는 재발의 예방, 증상의 완화, 질병에 따른 모든 직접 또는 간접적인 병리학적 결과의 저해, 질병 진행속도의 감소, 질병 상태의 경감 또는 일시적인 완화 및 예후의 개선이 포함된다. 본 발명의 목적상 상기 치료는 대사성 질환이 발생한 환자에게 본 발명의 miRNA-20b-50 억제제를 포함하는 약학적 조성물을 투여하여 대사성 질환이 발생한 환자를 호전시키는 모든 행위를 포함하는 것으로 해석될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 miRNA-20b-5p는 약 22개의 뉴클레오타이드로 구성된 작은 비발현 RNA 분자인 miRNA의 하나로서, miRNA-20b의 3'arm에서 유래한 것이며, 본 발명의 miRNA-20b-5p는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서, 상기 억제제는 miRNA-20b-5p의 발현 억제제로서, 상기 발현 억제제는 miRNA-20b-5p에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 작은 간섭 RNA(small interfering RNA; siRNA), 짧은 헤어핀 RNA(short hairpin RNA; shRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 상기 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는 표적 핵산, 특히 표적 핵산 상의 인접 서열에 혼성화함으로써 표적 유전자의 발현을 조절할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 본질적으로 이중가닥으로 구성되지 않는다는 점에서 siRNA 및 shRNA와는 차이가 있다.
- [0041] 상기 "작은 간섭 RNA(siRNA)"는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중가닥 RNA를 의미한다. 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knock-down) 방법으로서 또는, 유전자치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다.
- [0042] 상기 "짧은 헤어핀 RNA(shRNA)"란 단일 가닥으로 50-60개로 구성된 뉴클레오타이드를 의미하며, in vivo상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를 이루고 있다. 즉, shRNA는 RNA 간섭을 통해 유전자 발현을 억제하기 위한 타이트한 헤어핀 구조를 만드는 RNA 서열이다. 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 15-30개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성한다. shRNA는 언제나 발현되도록 하기 위하여 U6 프로모터를 포함하는 벡터를 통해 세포 내로 형질도입되며 대개 딸세포로 전달되어 유전자 발현억제가 유전되도록 한다. shRNA 헤어핀 구조는 세포 내 기작에 의하여 절단되어 siRNA가 된 후 RISC(RNA-induced silencing complex)에 결합한다. 이들 RISC는 mRNA에 결합하여 이를 절단한다. shRNA는 RNA 폴리머라아제(polymerase)에 의해 전사된다.
- [0043] 본 발명에 있어서, "대사성 질환"은 물질대사 조절에 관여하는 호르몬, 간, 신장 등에 이상이 생긴 경우에 주로 발생하는 질환으로서, 상기 대사성 질환의 종류로는 이에 제한되는 것은 아니지만, 비만, 당뇨병증, 지방간, 고인슐린혈증, 고요산혈증, 고지질혈증, 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증, 대사증후군 또는 내피기능장애 등 일 수 있으며, 보다 바람직하게 비만 또는 지방간일 수 있다.
- [0044] 본 발명에 있어서, 상기 지방간은 알코올성 지방간, 비알코올성 지방간 또는 지방간염일 수 있고, 보다 바람직

하게 비알코올성 지방간일 수 있다.

- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 억제제는 PPAR α 의 단백질 및 mRNA의 발현을 증가시킬 수 있고, 본 발명에서는 구체적인 실시예를 통해 본 발명에 따른 조성물의 PPAR α 조절을 통한 대사성 질환 치료효과를 확인하였다.
- [0046] 본 발명의 일 실시예에서는, 비알코올성 지방간을 가진 개체(인간, 마우스 등)의 경우 miRNA-20b-5p의 발현량이 유의하게 증가되어 있는 것을 확인했다(실시예 2 참조).
- [0047] 본 발명의 다른 실시예에서는, 상기 miRNA-20b-5p가 간의 지방대사와 관련이 있는 PPAR α 를 조절할 수 있다는 사실을 database를 활용하여 도출해 내었고(실시예 3-1 참조), 이에 따라 miRNA-20b-5p가 PPAR α 를 실제로 조절하는지 여부를 확인하기 위한 direct target assay를 수행한 결과, miRNA-20b-5p가 PPAR α 의 3가지 결합 부위와 상보적으로 결합할 수 있고, 그 중에서도 3번째 부위와 직접적으로 결합하여 PPAR α 의 발현을 조절한다는 사실을 확인했다(실시예 3-2 참조).
- [0048] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, miRNA-20b-5p와 비알코올성 지방간의 연관성을 확인하기 위해, miRNA-20b-5p가 과발현된 세포(miRNA-20b-5p)에서 oil-red O staining을 통해 지방산 방울을 관찰한 결과, 상기 miRNA-20b-5p 그룹에서 지방산 방울이 다량 생성되어 있음을 확인했고(실시예 4-1 참조), PCR을 통한 mRNA 발현 분석을 통해 PPAR α 와 그 타겟 유전자들의 발현이 변화했음을 확인했으며(실시예 4-2 참조), mitotracker 분석, OCR 분석 및 OCR-ATP 분석을 수행한 결과, miRNA-20b-5p 그룹에서 미토콘드리아 신생 및 활성도가 저하된다는 사실을 관찰하였다(실시예 4-3 참조).
- [0049] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 상기 결과를 토대로 miRNA-20b-5p를 억제하는 경우 비알코올성 지방간이 개선될 수 있을 것으로 보아, miRNA-20b-5p의 억제제를 활용한 비알코올성 지방간에 대한 치료효과를 확인하였다. 이를 위해, 상기 억제제를 투여한 군과 대조군을 oil-red O staining을 통해 관찰한 결과 억제제를 투여한 그룹에서 지방 방울이 감소함을 관찰하였고(실시예 5-1 참조), PCR을 통해 mRNA의 발현을 관찰한 결과 PPAR α 의 발현이 증가하고, 대사 관련 유전자의 발현이 조절됨을 확인해 miRNA-20b-5p의 억제제를 투여하는 경우 비알코올성 지방간이 개선될 수 있다는 사실을 확인하였다(실시예 5-2 참조).
- [0050] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 상기 결과가 miRNA-20b-5p와 PPAR α 의 상호작용에 의한 결과인지 여부 확인을 위해 PPAR α 를 재첨가 하였을 때, 유전자의 수준이 회복(recovery)되는지 여부를 PCR을 통해 관찰하였고, 그 결과 PPAR α 를 첨가한 그룹의 경우 그 유전자 수치가 회복됨을 확인해, miRNA-20b-5p가 PPAR α 를 타겟으로 하여 비알코올성 지방간을 조절한다는 사실을 다시 확인할 수 있었다(실시예 6 참조).
- [0051] 한편, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있으며, 이러한 고형제제에는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다.
- [0052] 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0053] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.
- [0054] 상기 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다.
- [0055] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 대상에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 말하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 약학적 조성물은 목적 또는 필요에 따라 당업계에서 사용되는 통상적인 방법, 투여 경로, 투여량에

따라 적절하게 개체에 투여될 수 있다. 투여 경로의 예로는 경구, 비경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 및 비강 내로 투여 될 수 있으며, 비경구 주입에는 근육 내, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내 또는 피하투여가 포함된다.

[0057] 또한, 당업계에서 공지된 방법에 따라 적절한 투여량 및 투여 횟수가 선택될 수 있으며, 실제로 투여되는 본 발명의 약학적 조성물의 양 및 투여 횟수는 치료하고자 하는 증상의 종류, 투여 경로, 성별, 건강 상태, 식이, 개체의 연령 및 체중, 및 질환의 중증도와 같은 다양한 인자에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

[0058] 본 발명에서의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 용도에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 대사성 질환을 억제 또는 완화하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0059] 또한, 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는, 대사성 질환 치료 물질 스크리닝 방법을 제공한다.

[0060] (a) 후보물질을 처리하는 단계;

[0061] (b) 상기 후보물질이 처리된 세포에서 miRNA-20b-5p와 PPAR α 의 결합정도를 측정하는 단계; 및

[0062] (c) 후보물질 비처리군에 비해 상기 miRNA-20b-5p와 PPAR α 의 결합정도를 감소시키는 물질을 대사성 질환 치료 물질로 선정하는 단계.

[0063] 본 발명의 상기 세포의 miRNA-20b-5p와 PPAR α 의 결합정도를 측정하는 단계는 miRNA-20b-5p와 PPAR α 와의 결합에 의해 생성되는 mRNA 또는 단백질의 양 또는 miRNA-20b-5p의 수준을 측정할 수 있는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 바람직하게 mRNA의 발현량은 중합효소연쇄반응(PCR), 마이크로어레이(microarray), 노던 블롯팅(northern blotting) 등을 통해 측정할 수 있고, 단백질의 발현량은 웨스턴 블롯팅(western blotting), 효소면역분석법(ELISA), 면역침강법(immunoprecipitation), 면역화학염색법(immunohistochemistry), 또는 면역형광염색법 (immunofluorescence) 등을 통해 측정할 수 있으며, 당업자에 의해 매우 간단하고 용이하게 실시될 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다.

[0064] 본 발명에 있어서, 상기 세포는 보다 바람직하게 대사성 질환이 유발된 간 조직유래 세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0065] 상기 후보물질은 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연물 추출물, 핵산 및 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0066] 또한, 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 대사성 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0067] 본 발명에 있어서, "개체"란, 비만, 당뇨병증, 지방간, 고인슐린혈증, 고요산혈증, 고지질혈증, 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증, 대사증후군 및 내피기능장애로 이루어지는 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 질환을 보유하거나 또는 발명한, 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다. 본 발명의 약학적 조성물을 개체에 투여함으로써, 비만, 당뇨병증, 지방간, 고인슐린혈증, 고요산혈증, 고지질혈증, 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증, 대사증후군 및 내피기능장애로 이루어지는 군으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 질환을 완화 또는 치료할 수 있다. 상기 완화는 본 발명에 따른 조성물의 투여로 질환이 호전되거나 이롭게 되는 모든 행위를 의미한다.

[0069] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0070] [실시예]

[0071] 실시예 1. 샘플 준비 및 실험 방법

[0072] 실험에 사용하기 위해 인간 간 세포인 HepG2와 Huh-7는 FBS DMEM 배지를 넣은 6-웰 플레이트(6-well plate)에 접종하였으며, miR-NC(대조군, NT), miR-20b-5p(miRNA 20b-5p 과발현됨), miR-20b-5p inhibitor(miRNA 20b-5p 억제됨) 그룹을 얻기 위해 opti MEM 배지에 RNAi Max transfection reagent를 사용하여 형질전환을 수행하면서(miR-NC, miR-20b-5p, miR-20b-5p inhibitor의 형질전환을 위해 30nM의 농도로 처리하였으며, 실온에서 수행하였다), 18시간이 지난 후 배지를 교환해 주었고, 24시간이 더 경과한 다음 샘플링을 수행하였다. 실험을 위해

샘플들을 1 X PBS로 세척한 뒤, 단백질 샘플은 용해 버퍼(lysis buffer)를 이용하여 확보하였고, RNA 샘플은 Easy-blue 용액을 사용하여 확보하였다.

[0073] 상기와 같은 방법으로 확보한 샘플을 단백질의 경우 분광광도법(spectrophotometer)을 사용하여 농도를 측정 한 다음, 최소농도에 맞추어 정량화를 진행하였고, 최종적으로 샘플 버퍼(sample buffer)를 넣어서 샘플을 준비 하였으며, RNA의 경우 Easy-blue 용액을 넣은 e-tube에 확보한 RNA 샘플을 넣은 뒤, 클로로포름(chloroform)을 Easy-blue 용액의 1/5 부피만큼 추가하고 4 °C의 온도에서 15000 RPM으로 15분 동안 원심분리 하였다. 그 후, 상층액을 새로운 e-tube로 옮긴 다음, 100%의 이소프로판올(isopropanol)을 1:1의 부피비로 첨가한 뒤, 4 °C의 온도에서 15000 RPM으로 10분간 원심분리를 수행하였다. 펠릿(pellet)을 제외한 상층액을 모두 제거한 뒤, 70%의 에탄올 용액을 사용하여 세척하였고, DNase RNase Free water로 용출(elution)하였다. 상기와 같은 방법으로 준비한 샘플들의 농도는 Nano-DROP 장비를 이용하여 측정하였고, 모두 2ng 농도로 맞추어 정량화 한 다음, 단백질 분석은 웨스턴 블롯(western blot)을 통해, RNA 분석은 Reverse transcriptase를 이용하여 PCR을 수행하였다. 올레익산(OA)은 1mM의 농도로 24시간 동안 처리하여 주었고, OA의 처리 유무에 따른 효과를 비교하는 실험에서 OA를 처리하지 않은 그룹은 소 혈청 알부민(bovine serum albumin, BSA)을 처리해 주었다.

[0075] 실시예 2. 비알코올성 지방간을 가지는 개체에서 miR-20b-5p의 발현량 확인

[0076] 비알코올성 지방간 환자에서 일반 환자보다 miRNA-20b-5p의 발현량이 증가되어 있다는 기존의 보고를 확인하기 위한 일련의 실험을 수행하였다.

[0077] 일반식이(normal control diet, NCD)한 쥐와 고 지방식이(high fat diet, HFD)한 마우스의 간 조직의 miRNA-20b-5p의 발현량을 확인한 결과, 도 1a에서 나타난 바와 같이, 일반 식이를 한 마우스에 비해, 고 지방 식이를 한 마우스에서 miRNA-20b-5p의 발현이 2.5배 가량 증가되어 있는 것으로 나타났다.

[0078] 대조군(lean)과 렙틴(leptin) 생성에 문제가 있는 마우스(ob/ob)의 간 조직에서 miRNA-20b-5p의 발현량을 확인 했을 때, 도 1b에 나타난 바와 같이, ob/ob 마우스에서 miRNA-20b-5p의 발현이 1.6배 이상 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 아무 처리하지 않은 대조군(NT)과 올레익 산(oleic acid, OA)을 처리하여 유도한 in vitro fatty liver model에서 miRNA-20b-5p의 발현량을 확인한 결과, 도 1c에 나타난 바와 같이, 올레익 산을 처리한 경우에 HepG2 및 Huh-7 모두에서 miRNA-20b-5p의 발현이 굉장히 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다.

[0079] 또한, 일반인(normal)과 비알코올성 지방간 환자(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)의 miRNA-20b-5p의 발현량을 Public database 시스템을 토대로 관찰했을 때에도, 도 1d에 나타난 바와 같이, NAFLD에서 miRNA-20b-5p의 발현량이 더 높게 나타남을 확인하였다.

[0080] 이러한 결과를 토대로, 기존의 보고와 같이 비알코올성 지방간이 발생한 경우 miRNA-20b-5p의 발현량이 증가한 다는 사실을 확인할 수 있었다.

[0082] 실시예 3. miRNA-20b-5p의 타겟이 되는 유전자 도출 및 도출된 유전자의 확인

[0083] 3-1. miRNA-20b-5p의 조절의 대상이 되는 유전자의 도출

[0084] 비알코올성 지방간에서 증가하는 것으로 보이는 miRNA-20b-5p의 대사적 역할의 규명을 위해, 도 2에 표시된 miRNA의 타겟을 예측하는데 활용되는 database 5개(TargetSCAN, miRmap, miRSystem, picTAR, miRDB)를 활용하 여 도출된 7개의 타겟(NAGK, PPAR α , USP46, ITGB8, BMPR2, ZNF1, EPHA5) 중, 간의 지방대사와 관련이 있다고 알려진 PPAR α 를 miRNA-20b-5p의 타겟이 되는 유전자로 최종 선정하였다.

[0086] 3-2. miRNA-20b-5p의 PPAR α 에 대한 발현 조절능 확인

[0087] 상기 데이터 베이스를 통해 도출된 PPAR α 가 miRNA-20b-5p의 타겟이 된다는 사실을 확인하기 위해, 인간 간 세 포인 HepG2와 Huh-7에서 대조군(miR-NC)과 miRNA-20b-5p가 과발현된 세포(miR-20b-5p mimic, 이하 miR-20b-5p)를 준비하여, PPAR α 의 단백질 및 mRNA의 발현량을 비교 확인 하였고, 본 발명의 실험에서 사용된 프라이머 의 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

프라이머	Forward Sequence(5'-3')	Reverse sequence(5'-3')
PPAR α	GCTATCATTACGAGTCCACG	TCGCACTTGTATACACCAG
CPT1A	AGGCGACATCAATCCGAAC	AAAGGCTACGAATGGGAAGG
ACOX1	CCACGTATGACCCGAAACC	TCCATAGCATTTCCTTAGTG
SREBP-1c	CAACACAGCAACCAGAACTC	CTCCACCTCAGTCTCACG
FASN	CAAGCTGAAGGACCTGTCTAG	CGGAGTGAATCTGGGTGATG
Pgc1a	ACCAAACCCACAGAGAACAG	GGGTCAGAGGAAGAGATAAAGTTG
TFAM	TTTCTCCGAAGCATGTGGG	GCCAAGACAGATGAAACCAC
VLCAD	ATCATGCCACTAATCGTACCC	TGGTCCATGTTAGCACTCAC
ACC-1	ACAGTGGAGCAAGAATCGG	AATGGACAGAGTTGAGAGCAC
chREBP	GCCTCTTCGAGTGCCTTGA	CCGCTTCACATACTGGATATACC
SCD1	AGTTCTACACCTGGCTTTGG	GTTGGCAATGATCAGAAAGAGC
DGAT2	TCCGAATGCCTGTGTGTAG	CAAATAGTCTATGGTGTCCCGG
ACADM	TCATTGTGGAAGCAGATACCC	CAGCTCCGTCACCAATTTAAAC
CPT2	TTGAGTGCTCCAAGTACCATG	GCAACAAGTGTCGGTCAAAG
NRF1	GGAAACGGCCTCATGATTTG	GTTTGGAGGGTGAGATACAGAG
SIRT5	TCGCCCCTGTGATTATATGTC	ACCTGAATCTGTTCTGTAGCTG
CPT1b	ATCCTACTCTATGACCCCG	TCTGCATTGAGACCAACTG
ACOT1	GGAAGGGTTTGTGTGTATG	CCCAACTCTGGACCTTTTAC

[0088] 그 결과 도 3a에 나타난 바와 같이, miRNA-20b-5p가 과발현된 그룹에서 PPAR α 단백질의 발현이 억제되는 것을 확인할 수 있었고, 도 3b에 나타난 바와 같이, miRNA-20b-5p가 과발현된 그룹은 HepG2 및 Huh-7 모두에서 PPAR α mRNA의 발현이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다.

[0090] miRNA-20b-5p가 직접적으로 PPAR α의 발현을 조절하는지 확인하기 위해, miRNA의 타겟에 대한 database를 토대로 miRNA-20b-5p가 PPAR α에 결합하는 부위를 direct target assay를 통해 관찰했다. 이에 따라 도 4a에 나타난 바와 같이, miRNA-20b-5p는 PPAR α의 3가지 부위에 결합한다는 사실을 확인하였고, 또한 도 4b에 표시된 대로 PPAR α 유전자에 대한 luciferase assay를 통해 HepG2 및 Huh-7에서 miRNA-20b-5p의 PPAR α에 대한 결합 여부를 확인하였다.

[0091] 한편, 상기 database를 통해 밝혀낸 3가지의 결합 부위 중, 어느 부위에 결합하여 PPAR α의 발현을 억제하는지 확인을 하기 위해, 각각의 서열을 점 돌연변이화(point mutant mutagenesis)를 통해 돌연변이 모델을 제작하고, 각각의 모델에 대한 miRNA-20b-5p의 결합여부를 관찰한 결과, 도 4c에 나타난 바와 같이, 3가지의 결합 부위 중, 3번째의 서열(PPAR α 3'-UTR Mutant 03)에 miRNA-20b-5p가 결합한다는 사실을 밝혀내었다.

[0092] 상기 실험을 통해, miRNA-20b-5p는 PPAR α의 3가지 결합부위에 상보적으로 결합할 수 있고, 그 중에서도, 3번째 결합부위와 결합하여 직접적으로 PPAR α의 발현을 조절한다는 사실을 확인했다.

[0094] 실시예 4. miRNA-20b-5p와 비알코올성 지방간의 연관성 확인

[0095] 4-1. miRNA-20b-5p의 과발현과 비알코올성 지방간의 연관성 확인

[0096] 상기 실험 결과를 통해, miRNA-20b-5p는 대사와 관련이 있는 PPAR α와 결합하여 직접적으로 조절하는 것을 확인하였으며, 이를 통해 miRNA-20b-5p와 대사성 질환인 비알코올성 지방간의 연관성을 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 인간 간 세포인 HepG2에서 대조군(miR-NC)과 miRNA-20b-5p의 발현량이 증가되어 있는, miRNA-20b-5p가 과발현된 세포(miR-20b-5p)를 준비하였고, 상기 대조군과 miR-20b-5p를 다시 올레익 산을 처리하지 않은 그룹(NT)과 올레익 산을 처리해 유도한 in vitro fatty liver model(OA) 그룹으로 나누어 oil-red O staining을 통해 지방 방울(lipid droplet)의 형성 양상을 관찰하였다(도 5b). 상기 결과를 통해 miRNA-20b-5p가 과발현된 경우, 대상 세포에서 지방 방울(lipid droplet)이 다량 생성되어 있음을 확인하였다.

[0097] miRNA-20b-5p 과발현된 그룹에 대한 상기 결과를 토대로 대조군(NT)과 올레익 산을 처리한 그룹(OA)에 대하여 대사 관련 매개변수(metabolic parameter)인 triglyceride와 cholesterol 수치를 측정한 결과, triglyceride(도 5c) 및 cholesterol(도 5d)이 miRNA-20b-5p 과발현된 그룹에서 모두 증가되어 있는 것을 확인할 수

있었다.

[0099] 4-2. miRNA-20b-5p의 과발현과 대사관련 유전자의 연관성 확인

[0100] 유전자 수준에서 miRNA-20b-5p과 비알코올성 지방간의 연관성을 확인하기 위해, PPAR α 의 타겟 유전자(대사 관련 유전자)인 Acox1, CPT1a, FASN, PGC-1a, TFAM, SIRT5, CPT2, ACADM, ACOT1, HVR1, ATPase6의 발현의 변화를 관찰하였다. 이를 위해, 대조군(miR-NC), 대조군에 올레익 산을 처리한 그룹(miR-NC OA), miRNA-20b-5p가 과발현된 그룹(miR-20b-5p) 및 miRNA-20b-5p가 과발현된 그룹에 올레익 산을 처리한 그룹(miR-20b-5p OA)을 준비한 후, PCR을 수행하여 상기 유전자의 발현 변화를 관찰했다(도 5e, 도 5f, 도 5g). 그 결과, miRNA-20b-5p의 과발현 및 올레익 산 처리에 의해 지방산 산화(fatty acid oxidation) 관련 유전자(Acox1, CPT1a)가 감소하고 미토콘드리아 신생(mitochondrial biogenesis) 관련 유전자(PGC-1a, TFAM)도 유의적으로 감소하는 것을 확인하였으며, 추가적으로 PPAR α 의 타겟 유전자들을 확인하였을 때, FASN를 제외한 유전자의 발현 또한 모두 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다.

[0102] 4-3. miRNA-20b-5p와 미토콘드리아 신생과의 연관성 확인

[0103] 미토콘드리아 신생(mitochondrial biogenesis)을 관찰하기 위해, MitoTracker를 통해 대조군(NT) 및 올레익 산 처리된 그룹(OA)을 miRNA-20b-5p의 과발현 여부에 따라 나누어 비교한 결과, 도 5h에 나타난 바와 같이, miRNA-20b-5p가 과발현된 그룹에서 mitotracker intensity가 상대적으로 낮게 관측됨을 확인하였다.

[0104] 상기 결과를 토대로 미토콘드리아 신생이 miRNA-20b-5p에 의해 직접적으로 조절되는지 여부를 확인하기 위해 OCR assay(oxygen consumption rate)를 활용하여 mitochondria의 활성을 확인했고(도 5i 및 도 5j), ATP의 소모율을 확인하기 위해 ATP와 관련한 OCR assay도 수행하였다(도 5k). 그 결과, OCR 수치가 유의적으로 감소하고, ATP-OCR 수치가 감소하여 ATP 생성도 감소된다는 것을 확인할 수 있었다.

[0105] 상기 결과를 통해, miRNA-20b-5p가 과발현된 경우 비알코올성 지방간이 유발될 수 있다는 사실을 확인하였다.

[0107] 실시예 5. miRNA-20b-5p의 억제제의 비알코올성 지방간 개선 및 치료능 확인

[0108] 5-1. miRNA-20b-5p 억제제의 비알코올성 지방간의 개선 효과 확인

[0109] miRNA-20b-5p의 과발현이 있는 경우, 비알코올성 지방간이 발생할 수 있다는 사실을 확인한 상기 결과를 토대로, miRNA-20b-5p의 억제제(시판중인 si/shRNA를 사용)(miR-20b 5p 상보적 염기서열, 5'-CTACCTGCACTATGAGCACTTTG -3')를 처리한 경우 비알코올성 지방간의 개선되는지 여부를 확인하는 실험을 수행하였다. 인간 간 세포인 HepG2를 대조군(miR-NC)과 miRNA-20b-5p 억제제 처리한 그룹(miR-20b-5p Inhibitor)으로 나누는 뒤, 또 다시 대조군(NT)과 올레익 산을 처리해 유도한 in vitro fatty liver model(OA)로 나누어, oil-red O staining을 통해 염색된 세포를 관찰하였다. 염색된 세포를 관찰하여 지방 방울(lipid droplet)의 형성 양상을 관찰한 결과, 도 6a에 나타난 바와 같이, miRNA-20b-5p의 억제제가 처리된 그룹에서 지방 방울의 형성이 감소되어 있음을 확인하였다.

[0110] miRNA-20b-5p 억제제에 대한 상기 결과를 토대로 대조군(NT)과 올레익 산을 처리한 그룹(OA)에 대하여 대사 관련 매개변수(metabolic parameter)인 triglyceride와 cholesterol의 수치를 측정한 결과, triglyceride(도 6b) 및 cholesterol(도 6c)이 miRNA-20b-5p 억제제가 처리된 그룹에서 모두 유의적으로 감소되어 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0112] 5-2. miRNA-20b-5p의 억제제 처리시, 유전자의 발현변화 확인

[0113] miRNA-20b-5p 억제제를 처리한 그룹에서 웨스턴 블롯 및 PCR을 활용하여 단백질 및 mRNA의 발현량을 확인하였다. PPAR α 의 단백질 발현을 대조군(miR-NC) 및 상기 억제제 처리한 그룹(miR-20b-5p inhibitor)으로 나누어 관찰한 결과, 도 7a에서 나타난 바와 같이, PPAR α 의 발현이 유의적으로 증가함을 확인할 수 있었다.

[0114] mRNA의 발현변화를 분석하기 위해, 대조군(miR-NC), 대조군에 올레익 산만 처리한 그룹(miR-NC OA), miRNA-20b-5p가 억제제를 처리한 그룹(miR-20b-5p inhibitor), miRNA-20b-5p가 억제제를 처리한 그룹에 올레익 산을

처리한 그룹(miR-20b-5p inhibitor OA)을 준비하고, 각 그룹에서 PPAR α , 지방산 산화와 관련된 유전자인 CPT1a, Acox1, VLCAD, SIRT5, CPT2, ACADM 및 ACOT1과 지방형성(lipogenesis)과 관련된 유전자인 ACC-1, chREBP, SREBP-1c, FASN, SCD1, DGAT2의 발현 변화를 PCR을 통해 분석하였다(도 7b, 도 7c, 도 7d). 이와 같은 결과를 통해 miR-20b-5p 억제제를 처리하는 경우 지방산 산화에 유의적인 변화가 발생하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 발명자들은 miR-20b-5p 억제제가 지방형성이 아닌, PPAR α 조절을 통한 지방산화 조절을 통해 비알콜성 지방간을 개선할 수 있다는 사실을 확인하였다.

[0116] 실시예 6. miRNA-20b-5p 과발현된 그룹에 PPAR α 를 재첨가 했을 때, 대사 관련 인자의 발현 변화 확인

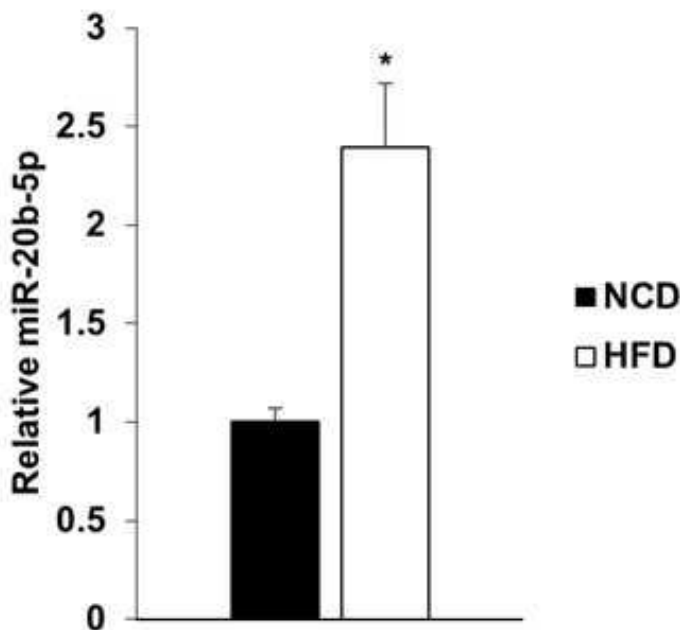
[0117] 지금까지의 결과를 통해, miR-20b-5p가 PPAR α 를 직접적으로 조절하여 fatty acid oxidation의 유전자 발현을 조절하고 이로 인해 비 알코올성 지방간의 양상을 조절하는 것을 확인하였다.

[0118] 이러한 결과가 PPAR α 를 통해 변화하는 양상인지 여부를 보다 더 명확히 하고자 miRNA-20b-5p가 과발현된 상태에서 PPAR α 를 재첨가(addback)한 경우 비알코올성 지방간 관련인자가 변화하는지 여부를 확인하는 실험을 수행하였다. 인간의 지방간 세포(HepG2)에서 대조군(miR-NC), miRNA-20b-5p 과발현된 그룹(miR-20b-5p), miRNA-20b-5p 과발현된 그룹에 PPAR α 를 처리한 그룹(miR-20b-5p + PPAR α WT)을 준비한 뒤, 웨스턴 블롯을 통해 PPAR α 의 단백질 발현의 정도를 관찰하였고(도 8a), PCR을 통해 관련 mRNA의 발현량을 확인하였다(도 8b, 도 8c) 그 결과, PPAR α 를 재첨가한 그룹에서 PPAR α 의 단백질 수준이 증가함을 확인할 수 있었고, miRNA-20b-5p 과발현 그룹에서 발현량이 조절되었던 mRNA들의 수치가 회복(recovery)됨을 확인할 수 있었다.

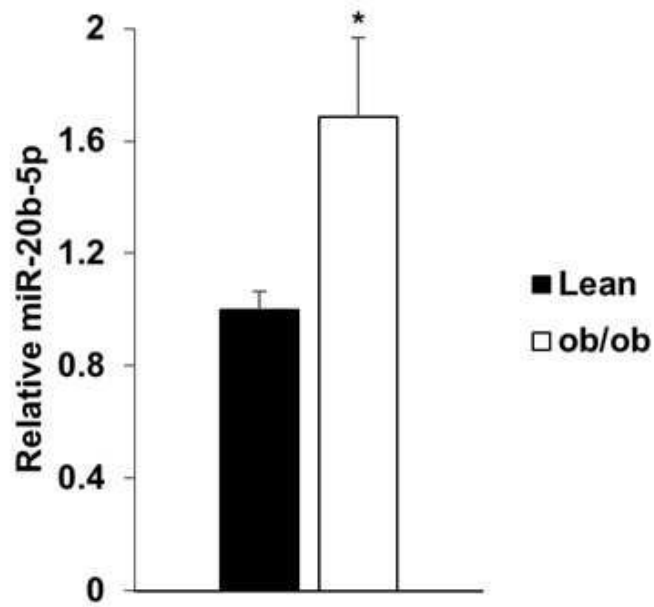
[0120] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

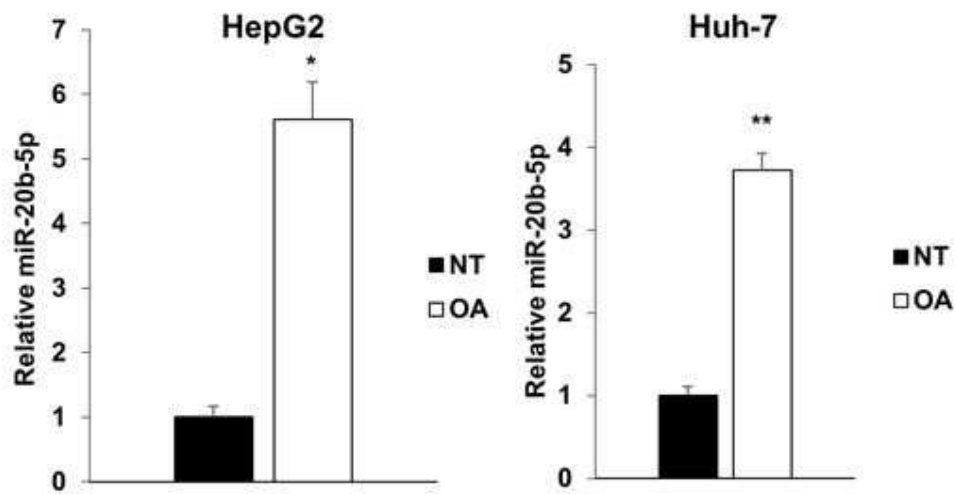
도면1a



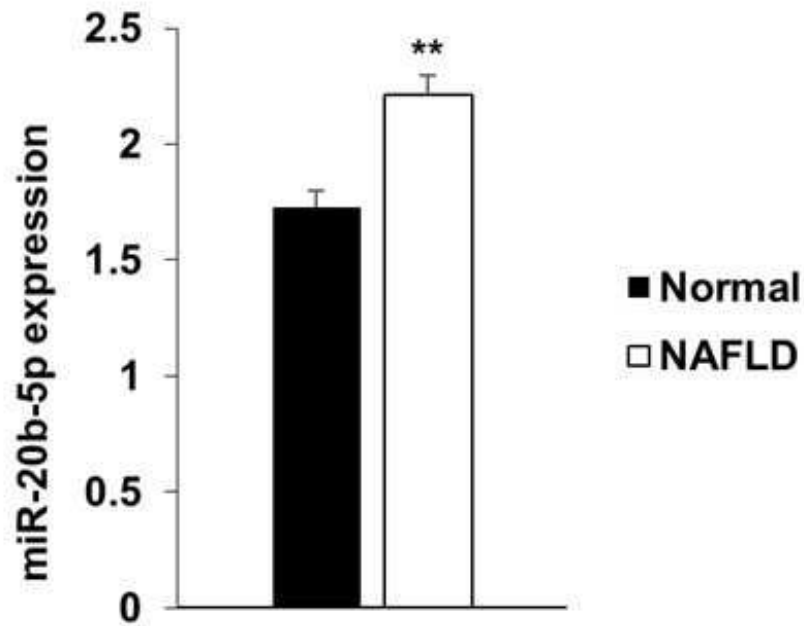
도면1b



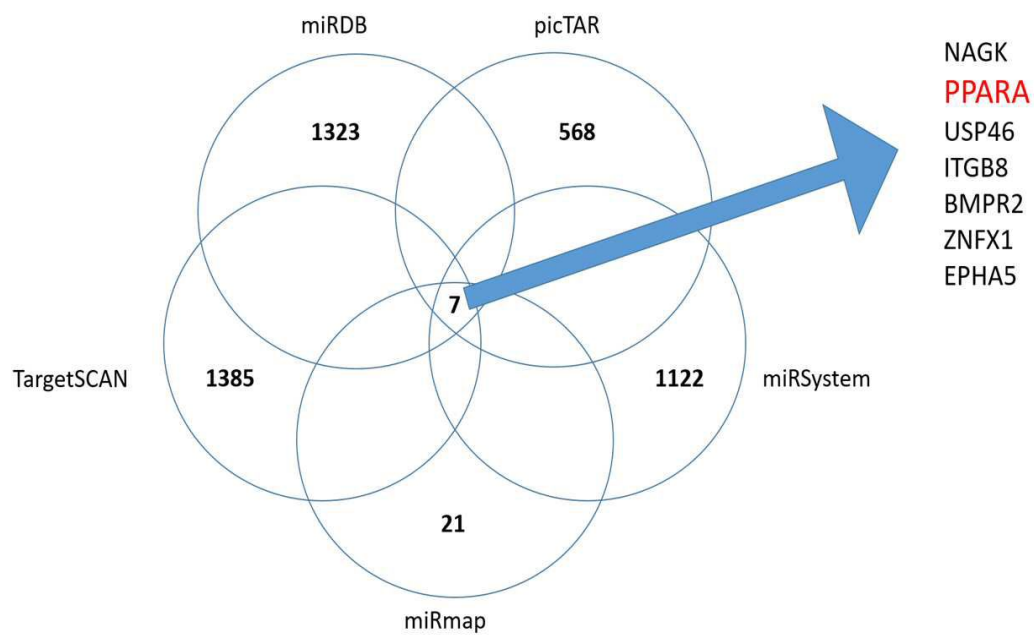
도면1c



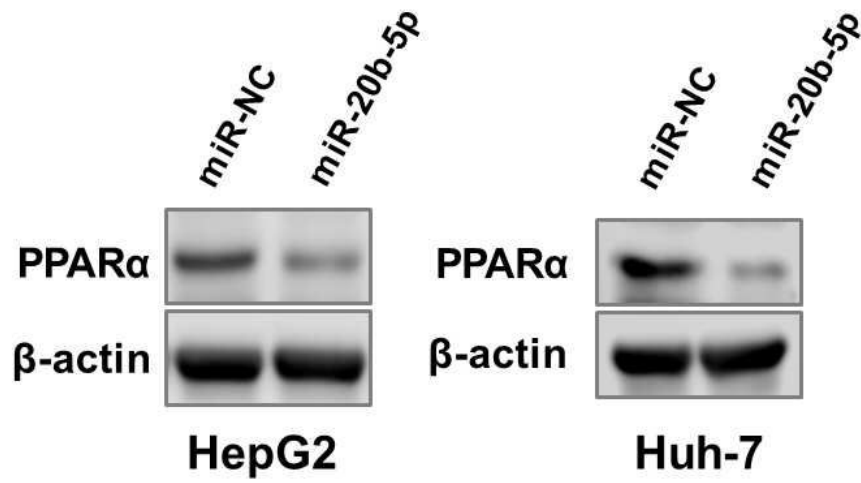
도면1d



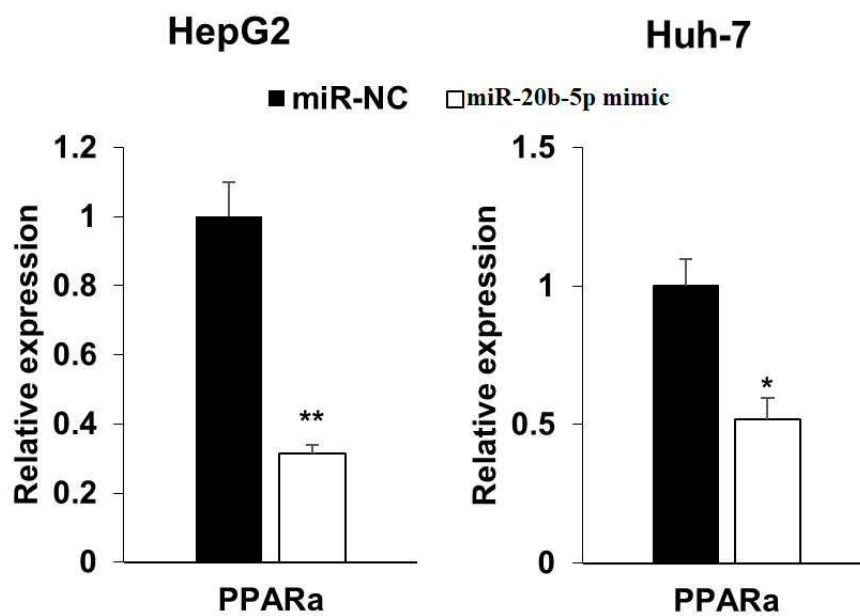
도면2



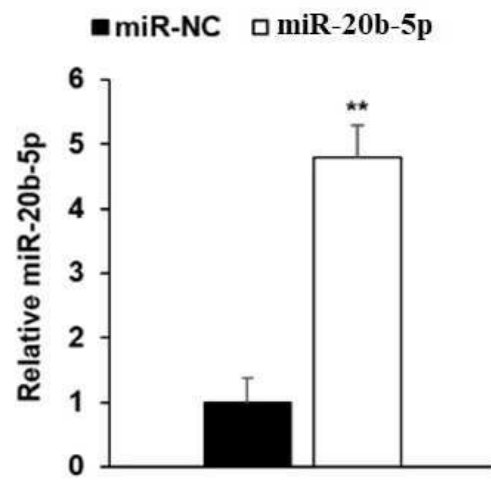
도면3a



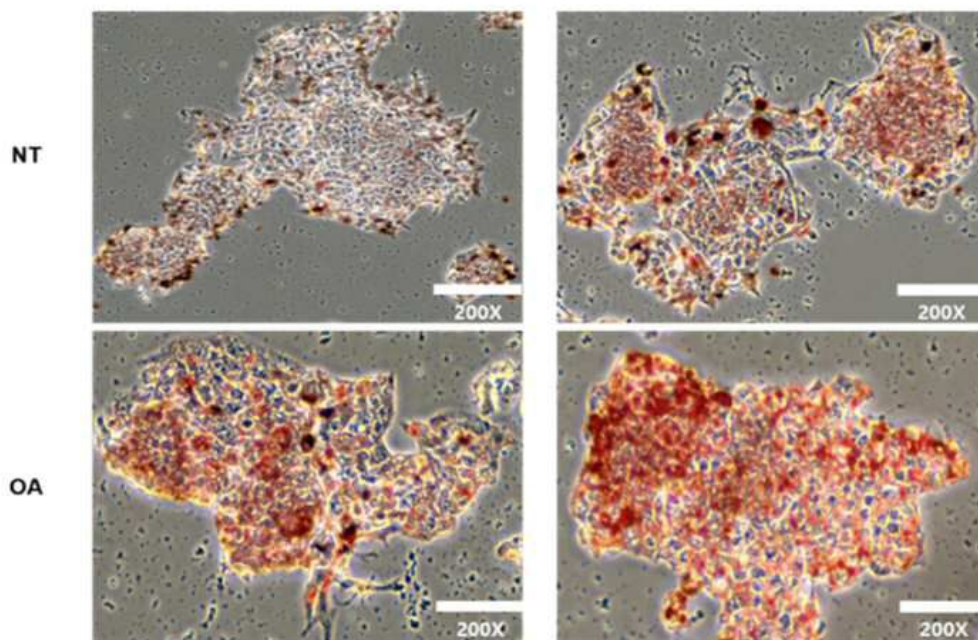
도면3b



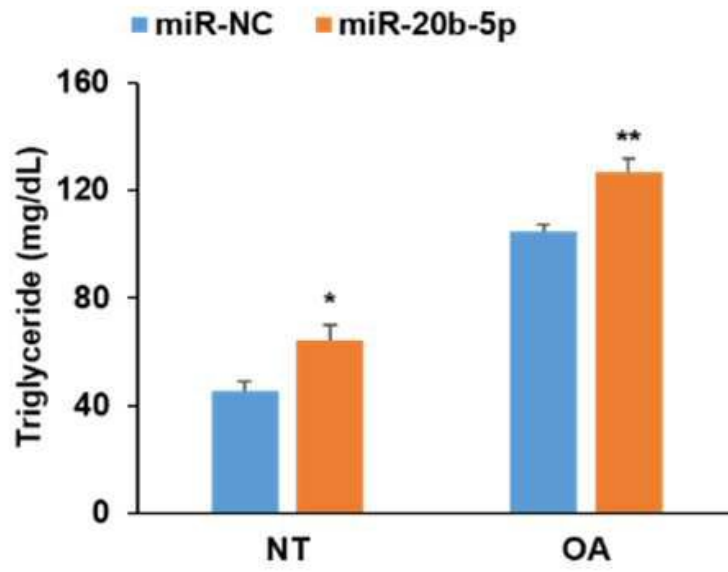
도면5a



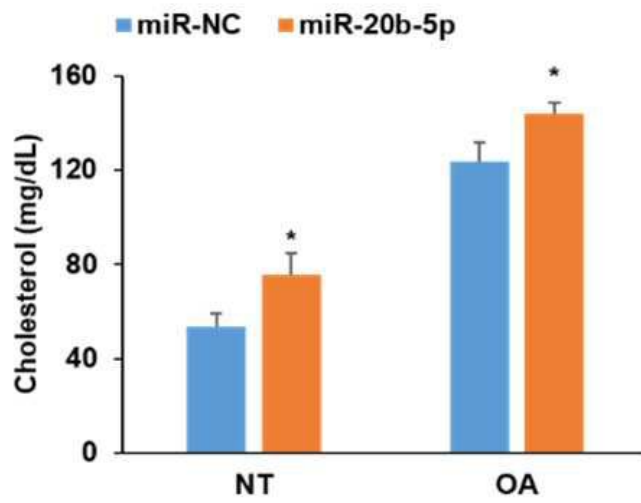
도면5b



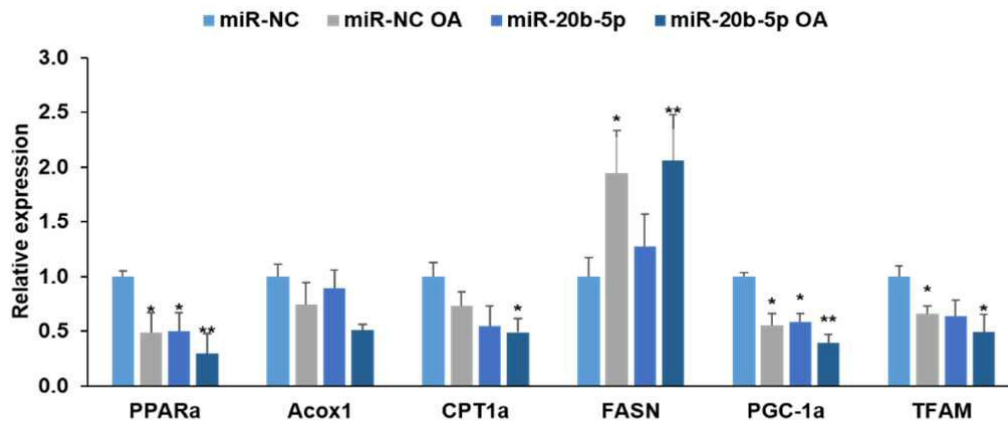
도면5c



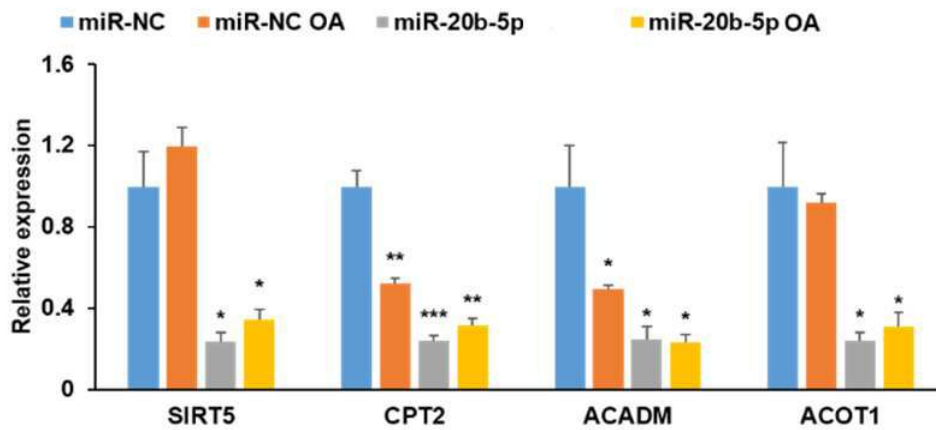
도면5d



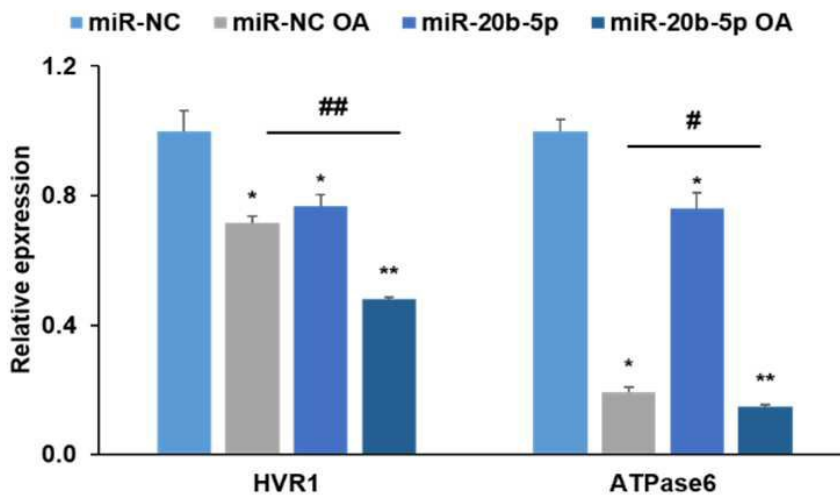
도면5e



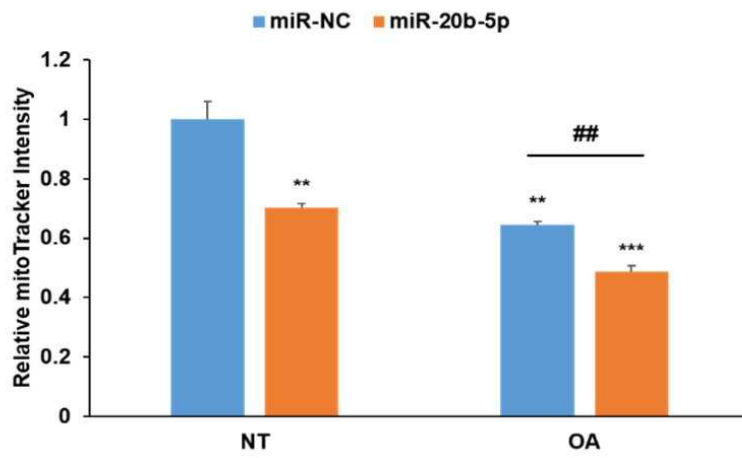
도면5f



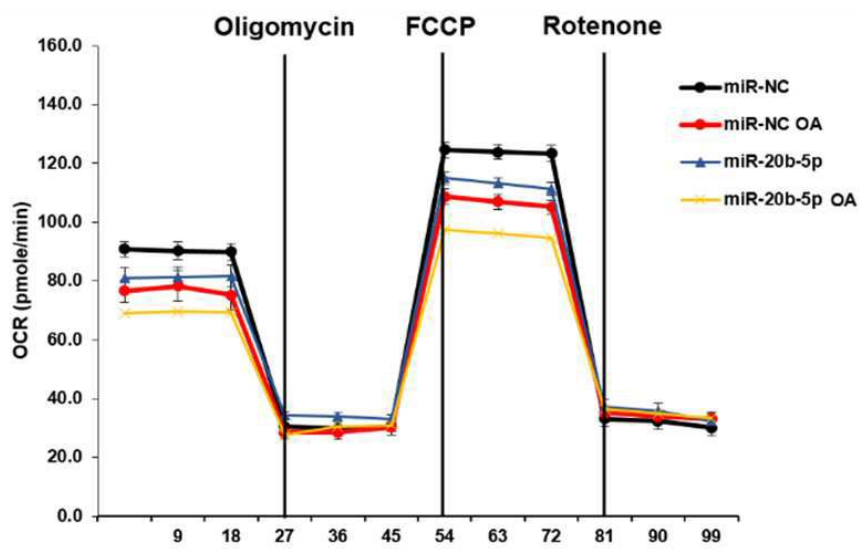
도면5g



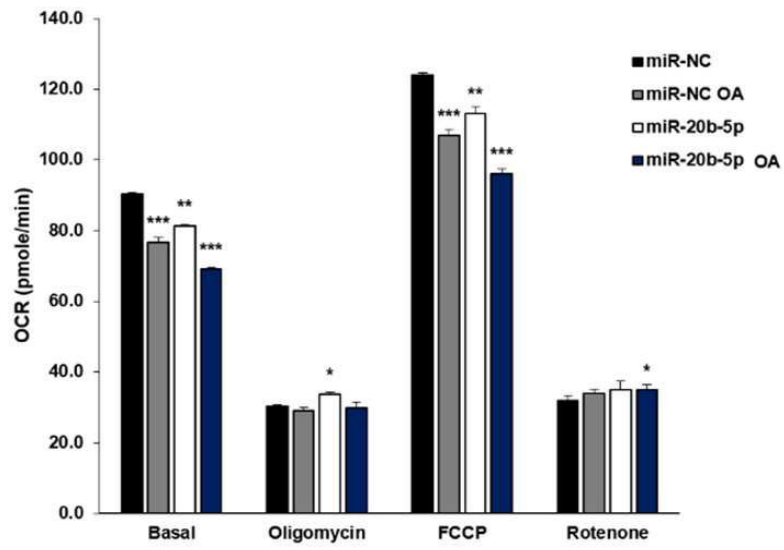
도면5h



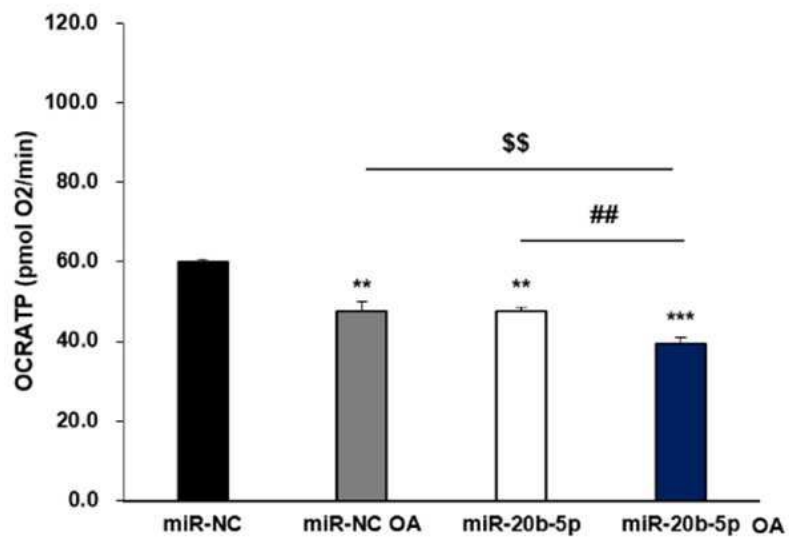
도면5i



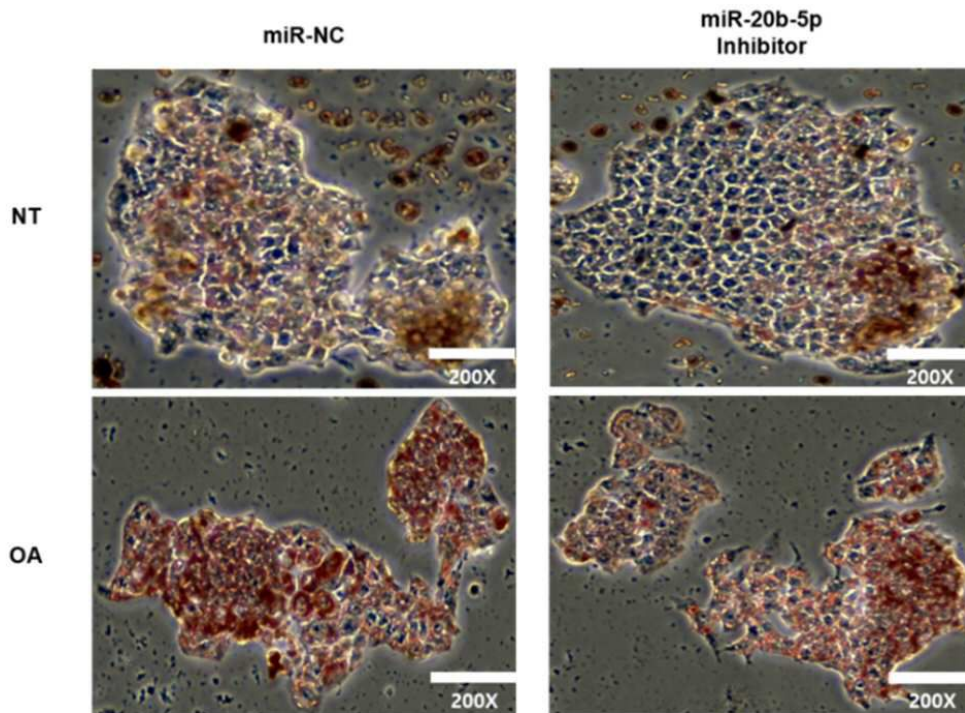
도면5j



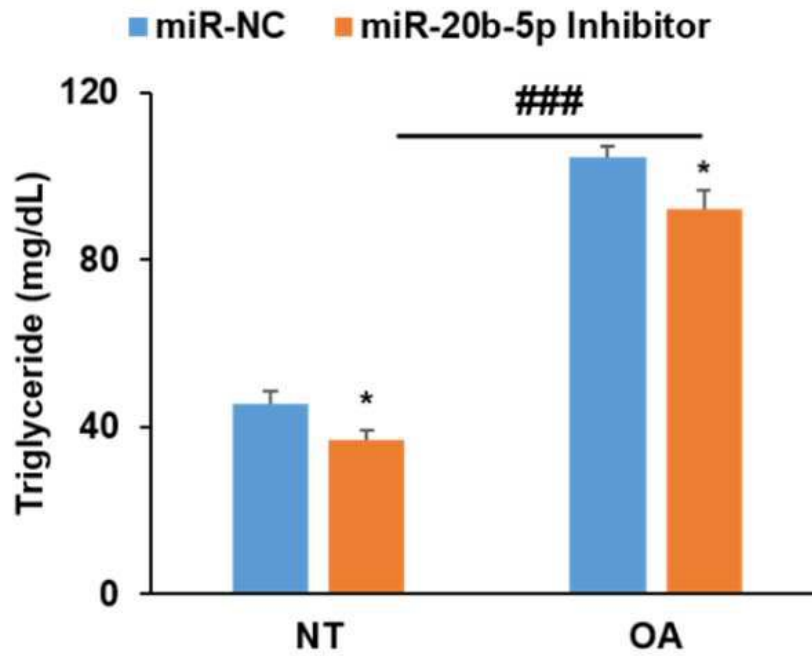
도면5k



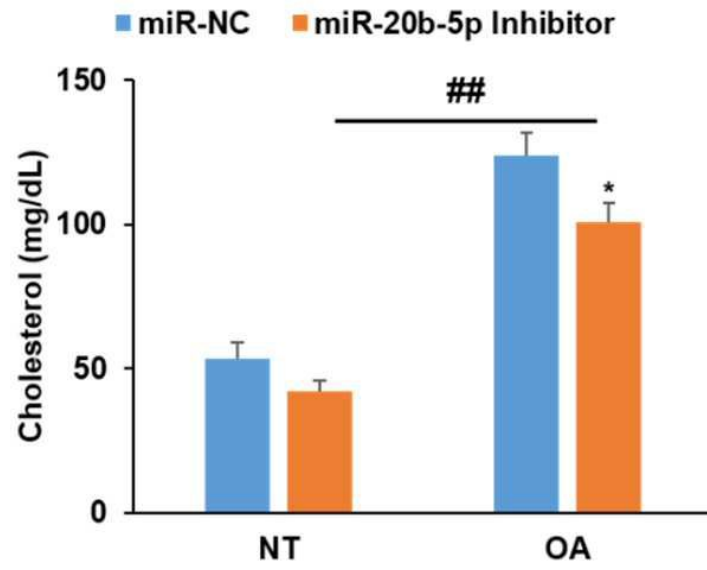
도면6a



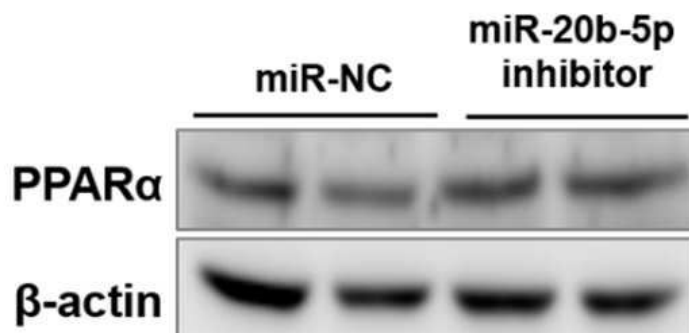
도면6b



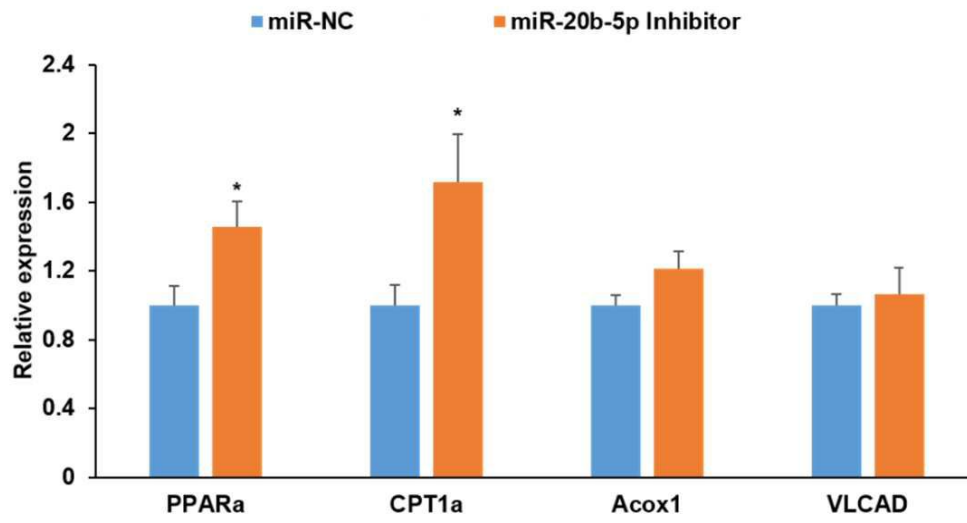
도면6c



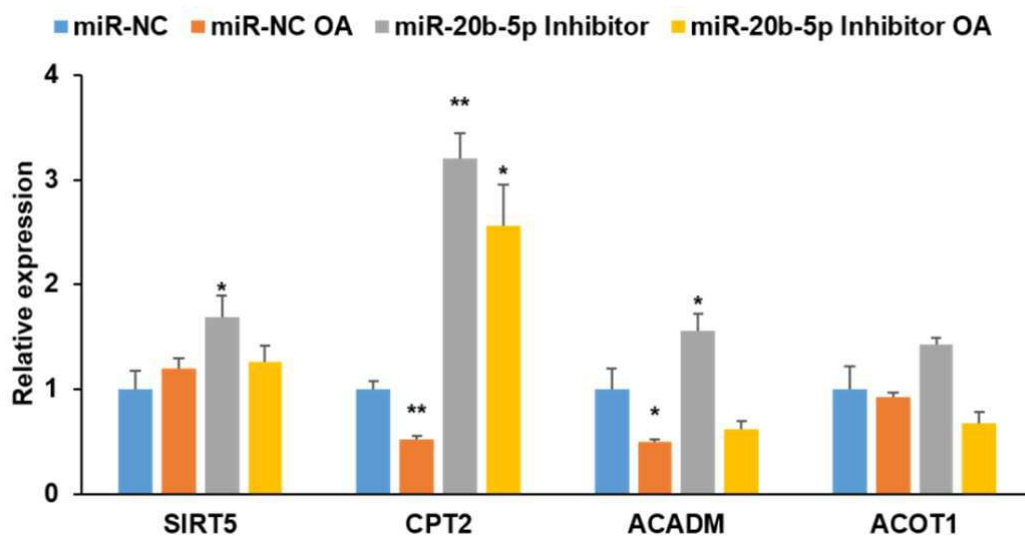
도면7a



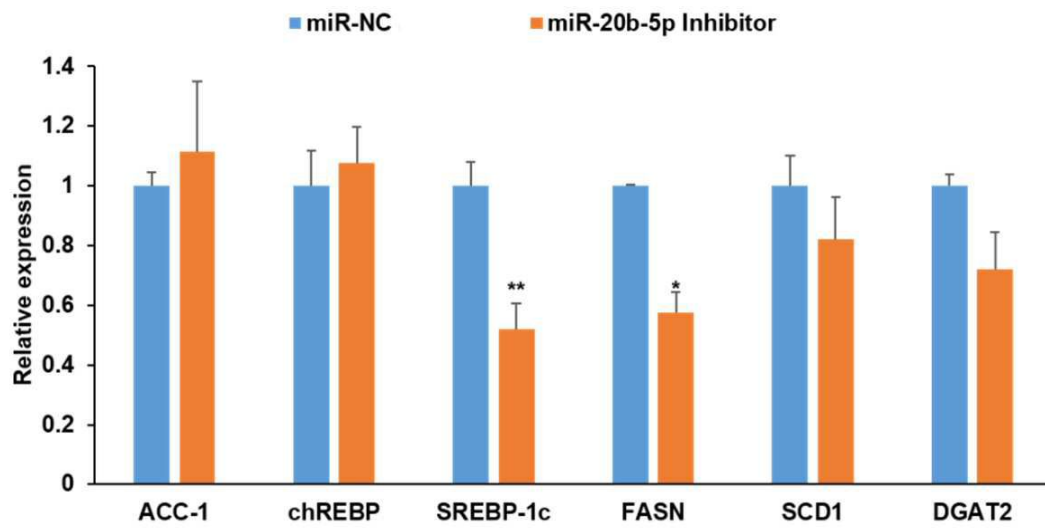
도면7b



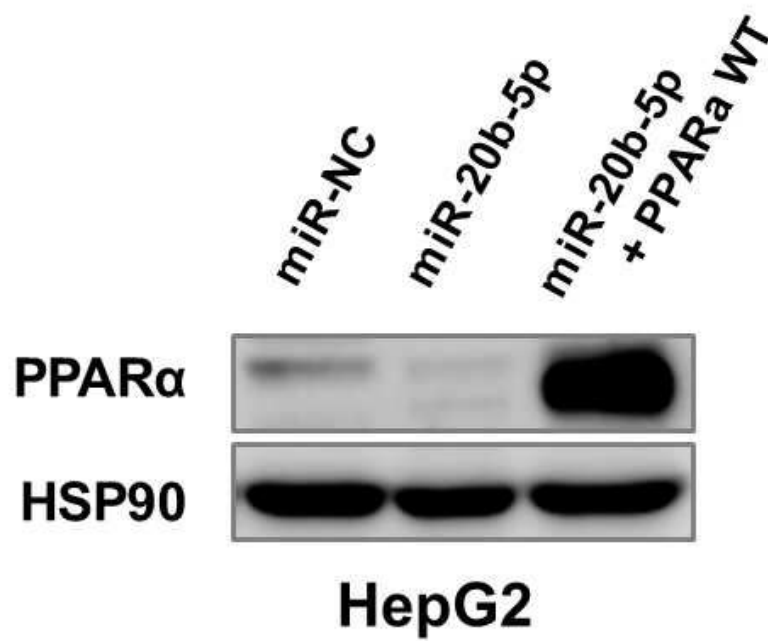
도면7c



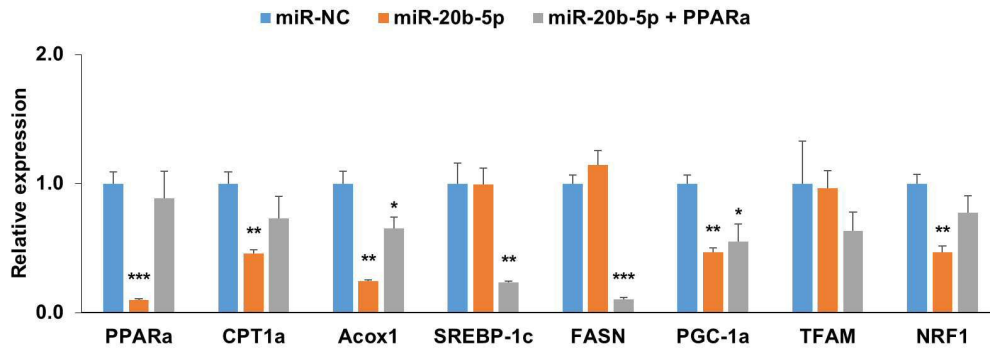
도면7d



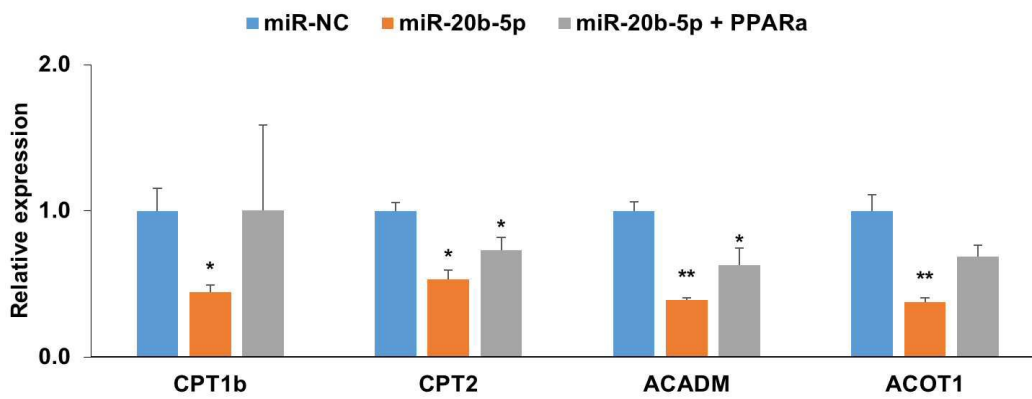
도면8a



도면8b



도면8c



서열 목록

- <110> UNIST Academy-Industry Research Corporation
- <120> Pharmaceutical composition for preventing or treating metabolic related diseases containing miRNA-20b-5p inhibitor as an active ingredient
- <130> PD20-170
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 23
- <212> RNA
- <213> miRNA-20b-5p
- <400> 1

caaagugcuc auagugcagg uag