



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0055979
(43) 공개일자 2020년05월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/071 (2010.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0625 (2013.01)
G01N 33/5044 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0139739
(22) 출원일자 2018년11월14일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
(주)아모레퍼시픽
서울특별시 용산구 한강대로 100(한강로2가)
(72) 발명자
함미라
경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원
김형준
경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원
손의동
경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원
(74) 대리인
김영철, 임희택, 김 순 영

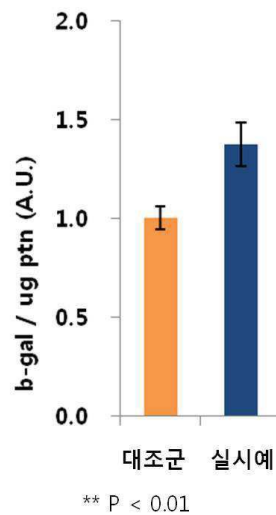
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 피부 노화 모델의 제조방법, 그 방법에 의해 제조된 피부 노화 모델 및 그 피부 노화 모델을 이용한 항노화 물질의 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 분리된 지방 유래 줄기세포에 디클로로아세테이트를 처리하여 제조된 노화 현상의 연구에 사용할 수 있는 피부 노화 모델을 제조하는 방법, 그 방법에 의해 제조된 피부 노화 모델과, 그 모델을 이용하여 항노화 물질을 스크리닝하는 방법에 관한 것으로, 분리된 지방 유래 줄기세포에 디클로로아세테이트를 처리함으로써 시간 및 비용 효율적으로 피부 노화 모델을 제조할 수 있는 우수한 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 2501/999 (2013.01)

C12N 2506/1384 (2013.01)

G01N 2333/46 (2013.01)

G01N 2333/938 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

분리된 지방 유래 줄기세포(Adipose-derived stem cell, ADSC)에 디클로로아세테이트(dichloroacetate, DCA)를 처리하는 단계를 포함하는, 피부 노화 모델 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 분리된 지방 유래 줄기세포는 3 내지 20회 계대배양된 것인, 피부 노화 모델 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 디클로로아세테이트의 처리는 7 내지 30일 동안 처리하는 것인, 피부 노화 모델 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 디클로로아세테이트의 처리는 10 내지 20일 동안 처리하는 것인, 피부 노화 모델 제조방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 방법에 의하여 제조된, 분리된, 피부 노화 모델.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 피부 노화 모델은 항노화 물질을 스크리닝하기 위한 것인, 피부 노화 모델.

청구항 7

디클로로아세테이트(dichloroacetate, DCA)를 유효성분으로 포함하는 피부 노화 모델 제조용 조성물.

청구항 8

제5항의 피부 노화 모델에, 항노화 후보물질을 처리하는 단계; 및

상기 후보물질 처리 전후의 노화 지표를 검출하는 단계를 포함하는, 항노화 물질 스크리닝 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 노화 지표는 베타-갈락토시다아제(β -galactosidase), p21 및 고이동성 그룹 박스 1(High mobility group box 1, HMGB1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인, 항노화 물질 스크리닝 방법.

청구항 10

제8항에 있어서,

상기 후보물질의 처리 후의 노화 지표의 발현량이 후보물질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 10% 이상 증가 또는 감소하면 항노화 물질로 결정하는 단계를 더 포함하는, 항노화 물질 스크리닝 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 항노화 물질 결정단계는,

후보물질의 처리 후의 HMGB1의 발현량이 후보물질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 10% 이상 증가하면 항노화 물질로 결정하는 단계; 또는

후보물질의 처리 후의 베타-갈락토시다아제(β -galactosidase) 또는 p21의 발현량이 후보물질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 10% 이상 감소하면 항노화 물질로 결정하는 단계인, 항노화 물질 스크리닝 방법.

청구항 12

제5항의 피부 노화 모델을 포함하는, 항노화 물질 스크리닝을 위한 인 비트로(*in vitro*) 모델.

청구항 13

제5항의 피부 노화 모델; 및

지시서를 포함하며,

상기 지시서에는, 후보물질 처리 전후의 노화 지표를 검출한 후, 상기 후보물질의 처리 후의 노화 지표의 발현량이 후보물질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 10% 이상 증가 또는 감소하면 항노화 물질로 판단하는 내용을 포함하는, 항노화 물질 스크리닝용 키트.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 피부 노화 모델은 냉동보존 또는 담체 보존된 상태인, 항노화 물질 스크리닝용 키트.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 노화 지표는 베타-갈락토시다아제(β -galactosidase), p21 및 고이동성 그룹 박스 1(High mobility group box 1, HMGB1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인, 항노화 물질 스크리닝용 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 명세서에는 분리된 지방 유래 줄기세포에 디클로로아세트산을 처리하여 제조된 노화 현상의 연구에 사용할 수 있는 피부 노화 모델을 제조하는 방법, 그 방법에 의해 제조된 피부 노화 모델과, 그 모델을 이용하여 항노화 물질을 스크리닝하는 방법이 개시된다.

배경 기술

[0002] 최근 생활수준이 향상됨에 따라 현대인들은 건강한 신체를 유지하는 것에 더하여 건강한 피부를 유지하는 데에도 많은 관심을 기울이고 있다. 따라서 피부미용과 피부노화 개선에 대한 관심이 높아지고 있다.

[0003] 피부는 인체의 가장 큰 기관으로서 전체 인체 부피의 약 16%를 차지하고, 외부환경과 직접 접해 있으면서, 인체 안으로 침입하려는 치명적인 많은 유해인자, 예를 들면, 온도, 습도 및 자외선 등으로부터 인체를 보호하는 중요한 보호막 역할을 담당한다. 그러나, 각종 오염물질, 강한 자외선과 같은 외부환경으로 인해 피부 세포들이 손상을 입게 되어, 세포 증식이 제대로 이루어지지 않게 되어 피부에 주름, 탄력 손실 및 각질화, 불규칙한 색소 침착 등이 발생한다.

[0004] 피부 노화는 크게 자연 노화(또는, 내인성 노화)와 외인성 노화로 구분되며, 자연 노화는 유전적인 요소에 영향을 받기 때문에 인위적인 조절이 어려운 반면 외인성 노화는 환경적인 요소에 영향을 받기 때문에 인위적인 조절이 비교적 용이하다. 대표적인 외인성 노화 인자로는 자외선, 활성 산소종(reactive oxygen species) 및 스트레스 등이 알려져 있다.

[0005] 따라서, 최근 외인성 노화를 개선하기 위한 방법들이 활발히 연구되고 있으며, 특히 노화방지 또는 개선을 위한

물질을 규명하기 위한 노력이 계속되고 있다. 종래 피부 노화 모델을 제조하기 위해 수회 계대배양을 하는 방법이 있으며, 이를 이용하여 제조한 피부 노화 모델을 활용하여 항노화 물질 검증 및 발굴 연구에 사용하였다. 그러나, 이러한 방법은 1개월 이상 세포 배양을 해야 하므로 소요되는 시간과 비용이 크다는 단점이 있다.

[0006] 이에, 본 발명자는 보다 짧은 시간 내에 적은 비용으로 피부 노화 모델을 제조할 수 있는 방법을 연구하여, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) KR 10-2018-0019613 A
 (특허문헌 0002) KR 1,040,486 B
 (특허문헌 0003) JP 평 11-0501653 A

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Protective effects of adipose-derived stem cells secretome on human dermal fibroblasts from ageing damages, Int J Clin Exp Pathol, 2015;8(12):15739-15748.
 (비특허문헌 0002) Characterization of Senescence of Culture-expanded Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells, Int J Stem Cells. 2016 May; 9(1): 124-136.
 (비특허문헌 0003) P.W.Stacpoole, The pyruvate dehydrogenase complex as a therapeutic target for age-related diseases, Aging Cell, 2012, vol.11, pp371-377.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 일 측면에서, 본 발명의 목적은, 분리된 지방 유래 줄기세포(Adipose-derived stem cell, ADSC)에 디클로로아세테이트(dichloroacetate, DCA)를 처리하는 단계를 포함하는 피부 노화 모델 제조방법을 제공하는 것이다.
 [0010] 다른 측면에서, 본 발명의 목적은, 상기 피부 노화 모델 제조방법에 의하여 제조된, 분리된, 피부 노화 모델을 제공하는 것이다.
 [0011] 다른 측면에서, 본 발명의 목적은, 디클로로아세테이트(dichloroacetate, DCA)를 유효성분으로 포함하는 피부 노화 모델 제조용 조성물을 제공하는 것이다.
 [0012] 다른 측면에서, 본 발명의 목적은, 상기 피부 노화 모델 제조방법에 의하여 제조된 피부 노화 모델에, 항노화 후보물질을 처리하는 단계; 및 상기 후보물질 처리 전후의 노화 지표를 검출하는 단계를 포함하는, 항노화 물질 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
 [0013] 다른 측면에서, 본 발명의 목적은, 상기 피부 노화 모델 제조방법에 의하여 제조된 피부 노화 모델을 포함하는, 항노화 물질 스크리닝을 위한 인 비트로(*in vitro*) 모델을 제공하는 것이다.
 [0014] 다른 측면에서, 본 발명의 목적은, 상기 피부 노화 모델 제조방법에 의하여 제조된 피부 노화 모델; 및 지시서를 포함하는, 항노화 물질 스크리닝용 키트를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 일 측면에서, 본 발명은, 분리된 지방 유래 줄기세포(Adipose-derived stem cell, ADSC)에 디클로로아세테이트(dichloroacetate, DCA)를 처리하는 단계를 포함하는 피부 노화 모델 제조방법을 제공한다.
 [0016] 다른 측면에서, 본 발명은, 상기 피부 노화 모델 제조방법에 의하여 제조된, 분리된, 피부 노화 모델을 제공한다.

- [0017] 다른 측면에서, 본 발명은, 디클로로아세테이트(dichloroacetate, DCA)를 유효성분으로 포함하는 피부 노화 모델 제조용 조성물을 제공한다.
- [0018] 다른 측면에서, 본 발명은, 상기 피부 노화 모델 제조방법에 의하여 제조된 피부 노화 모델에, 항노화 후보물질을 처리하는 단계; 및 상기 후보물질 처리 전후의 노화 지표를 검출하는 단계를 포함하는, 항노화 물질 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0019] 다른 측면에서, 본 발명은, 상기 피부 노화 모델 제조방법에 의하여 제조된 피부 노화 모델을 포함하는, 항노화 물질 스크리닝을 위한 인 비트로(*in vitro*) 모델을 제공한다.
- [0020] 다른 측면에서, 본 발명은, 상기 피부 노화 모델 제조방법에 의하여 제조된 피부 노화 모델; 및 지시서를 포함하는, 항노화 물질 스크리닝용 키트를 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명은, 기존의 1개월 이상 소요되는 계대 배양을 통한 피부 노화 모델 제조방법과는 달리, 약 2주 이내의 기간 동안 분리된 지방 유래 줄기세포에 디클로로아세테이트를 처리함으로써 시간 및 비용 효율적으로 피부 노화 모델을 제조할 수 있음을 확인하였다. 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 피부 노화 모델은 신속하고 정확하게 항노화 물질을 스크리닝할 수 있는 우수한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 2주 동안 지방 유래 줄기세포에 디클로로아세테이트(DCA)를 처리하여 제조한 피부 노화 모델(실시예)과 대조군의 노화-관련 베타-갈락토시다아제(SA-βgal) 활성을 나타낸 그래프이다.
 도 2는 2주 동안 지방 유래 줄기세포에 디클로로아세테이트(DCA)를 처리하여 제조한 피부 노화 모델(실시예)과 대조군의 pPDH S232, PDH, p21 및 HMGB1의 웨스턴 블롯을 수행한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0023] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0025] 일 측면에서, 본 발명은 분리된 지방 유래 줄기세포(Adipose-derived stem cell, ADSC)에 디클로로아세테이트(dichloroacetate, DCA)를 처리하는 단계를 포함하는, 피부 노화 모델 제조방법을 제공한다.
- [0026] 상기 분리된 지방 유래 줄기세포는 3 내지 20회 계대배양한 것일 수 있고, 구체적으로 3회 이상, 4회 이상, 5회 이상, 6회 이상, 7회 이상, 8회 이상, 9회 이상, 10회 이상, 11회 이상, 12회 이상, 13회 이상, 14회 이상, 15회 이상, 16회 이상, 17회 이상, 18회 이상 또는 19회 이상 계대배양한 것일 수 있고, 20회 이하, 19회 이하, 18회 이하, 17회 이하, 16회 이하, 15회 이하, 14회 이하, 13회 이하, 12회 이하, 11회 이하, 10회 이하, 9회 이하, 8회 이하, 7회 이하, 6회 이하, 5회 이하 또는 4회 이하 계대배양한 것일 수 있으나, 디클로로아세테이트 처리로 피부 노화 모델을 제조할 수 있는 지방 유래 줄기세포라면 계대배양 횟수는 제한되지 않는다.
- [0027] 본 발명의 피부 노화 모델 제조방법에서, 상기 디클로로아세테이트는 지방 유래 줄기세포의 미토콘드리아에 존재하는 피루브산 탈수소효소(pyruvate dehydrogenase, PDH)의 발현 또는 활성을 증가시키며, 상기 PDH의 활성 억제 효소인 피루브산 탈수소효소 인산화효소(pyruvate dehydrogenase kinase, PDK)의 발현 또는 활성을 저해함으로써, 지방 유래 줄기세포에서 노화를 유도하는 것일 수 있다. 상기 피루브산 탈수소효소 인산화효소(PDK)는 상기 피루브산 탈수소효소(PDH)를 인산화(phosphorylation)시키는 효소(kinase)로서, 상기 피루브산 탈수소효소(PDH)가 인산화되면 불활성화(inactive)된다. 상기 디클로로아세테이트는 피루브산 탈수소효소 인산화효소(PDK)의 발현 또는 활성 억제제로서, 상기 디클로로아세테이트 처리에 의해 피루브산 탈수소효소 인산화효소(PDK)의 발현 또는 활성이 억제되어 피루브산 탈수소효소(PDH)의 인산화가 억제되는 바, 상기 피루브산 탈수소효소(PDH)의 발현 또는 활성이 증가 또는 증진되어 노화가 유도될 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 10회 이상 계대배양한 분리된 지방 유래 줄기세포에 디클로로아세테이트를 2주 동안 처리하였을 때(실시예), 대조군에 비하여 인산화된 피루브산 탈수소효소(pPDH S232)의 단백질 양(발현량)이 감소하였는바, 디클로로아세테이트 처리에 의해 피루브산 탈수소효소(PDH)의 인산화가 억제되어 상기 피루브산 탈수소효소 활성 증진에 의해 시간 및 비용 효율적으로 피부 노화 모델을 제조할 수 있음을 확인하였다(실험예 2).

- [0028] 본 발명의 피부 노화 모델 제조방법에서, 상기 디클로로아세테이트의 농도는 0.01 mM 내지 1000 mM일 수 있고, 구체적으로 0.01 mM 이상, 0.1 mM 이상, 0.5 mM 이상, 1 mM 이상, 2 mM 이상, 3 mM 이상, 4 mM 이상, 5 mM 이상, 6 mM 이상, 7 mM 이상, 8 mM 이상, 9 mM 이상, 10 mM 이상, 20 mM 이상, 30 mM 이상, 40 mM 이상, 50 mM 이상, 60 mM 이상, 70 mM 이상, 80 mM 이상, 90 mM 이상, 100 mM 이상, 200 mM 이상, 300 mM 이상, 400 mM 이상, 500 mM 이상, 600 mM 이상, 700 mM 이상, 800 mM 이상 또는 900 mM 이상일 수 있고, 1000 mM 이하, 900 mM 이하, 800 mM 이하, 700 mM 이하, 600 mM 이하, 500 mM 이하, 400 mM 이하, 300 mM 이하, 200 mM 이하, 100 mM 이하, 90 mM 이하, 80 mM 이하, 70 mM 이하, 60 mM 이하, 50 mM 이하, 40 mM 이하, 30 mM 이하, 20 mM 이하, 10 mM 이하, 9 mM 이하, 8 mM 이하, 7 mM 이하, 6 mM 이하, 5 mM 이하, 4 mM 이하, 3 mM 이하, 2 mM 이하, 1 mM 이하, 0.5 mM 이하 또는 0.1 mM 이하일 수 있으나, 지방 유래 줄기세포로부터 피부 노화 모델을 제조할 수 있는 디클로로아세테이트의 농도라면 제한되지 않는다.
- [0029] 본 발명의 피부 노화 모델 제조방법에서, 상기 디클로로아세테이트의 처리는 7 내지 30일 동안 처리하는 것일 수 있고, 구체적으로 10 내지 20일 동안 처리하는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 7일 이상, 8일 이상, 9일 이상, 10일 이상, 11일 이상, 12일 이상, 13일 이상, 14일 이상, 15일 이상, 16일 이상, 17일 이상, 18일 이상, 19일 이상, 20일 이상, 21일 이상, 22일 이상, 23일 이상, 24일 이상, 25일 이상, 26일 이상, 27일 이상, 28일 이상 또는 29일 이상 처리하는 것일 수 있고, 30일 이하, 29일 이하, 28일 이하, 27일 이하, 26일 이하, 25일 이하, 24일 이하, 23일 이하, 22일 이하, 21일 이하, 20일 이하, 19일 이하, 18일 이하, 17일 이하, 16일 이하, 15일 이하, 14일 이하, 13일 이하, 12일 이하, 11일 이하, 10일 이하, 9일 이하 또는 8일 이하 처리하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 10회 이상 계대배양한 분리된 지방 유래 줄기세포에 디클로로아세테이트를 2주 동안 처리하였을 때(실시예), 대조군에 비하여 노화 지표인 SA-βgal 활성이 증가하고 p21의 발현량은 증가, HMGB1의 발현량은 감소하였는바, 시간 및 비용 효율적으로 피부 노화 모델을 제조할 수 있음을 확인하였다(실험예 1 및 2).
- [0031] 본 명세서에서 최적화된 상태의 피부 노화 모델은, 예컨대, 세포 군집 중 노화가 진행되지 않은 정상세포 및 이미 세포 사멸이 일어나서 살아있지 않은 세포를 제외하고 대사 활동이 저하된 세포로서, 세포 노화 정도를 측정하는 노화 지표가 증가 또는 감소하는 세포일 수 있고, 세포 증식 속도가 감소하는 세포일 수 있으며, 항노화 물질 처리시, 노화가 지연되거나 일어나지 않을 수 있는 세포를 의미할 수 있다. 즉, 더 이상 세포 증식을 유도하지 않으면서, 허용 가능한 생존률을 보이는 상태의 세포를 의미할 수 있다.
- [0033] 다른 측면에서, 본 발명은 상기 피부 노화 모델 제조방법에 의해 제조된, 분리된, 피부 노화 모델을 제공한다. 상기 피부 노화 모델은 항노화 물질을 스크리닝하기 위한 것일 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 10회 이상 계대배양한 분리된 지방 유래 줄기세포에 디클로로아세테이트를 2주 동안 처리하여 제조한 피부 노화 모델(실시예), 대조군에 비하여 노화 지표인 SA-βgal 활성이 증가하고 p21의 발현량은 증가, HMGB1의 발현량은 감소하는 등 노화 지표에 변화가 있는바, 항노화 물질 스크리닝에 이용하기에 적절함을 확인하였다(실험예 1 및 2).
- [0036] 또 다른 측면에서, 본 발명은 디클로로아세테이트(dichloroacetate, DCA)를 유효성분으로 포함하는 피부 노화 모델 제조용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 피부 노화 모델을 제조하기 위한 배양배지일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 조성물에서, 디클로로아세테이트는 조성물 총 중량 기준으로 0.001 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 구체적으로 0.001 중량% 이상, 0.005 중량% 이상, 0.01 중량% 이상, 0.02 중량% 이상, 0.03 중량% 이상, 0.04 중량% 이상, 0.05 중량% 이상, 0.06 중량% 이상, 0.07 중량% 이상, 0.075 중량% 이상, 0.08 중량% 이상, 0.09 중량% 이상, 0.1 중량% 이상, 0.5 중량% 이상, 1 중량% 이상, 5 중량% 이상, 10 중량% 이상, 15 중량% 이상, 20 중량% 이상, 25 중량% 이상, 30 중량% 이상, 35 중량% 이상, 40 중량% 이상 또는 45 중량% 포함될 수 있고, 50 중량% 이하, 45 중량% 이하, 40 중량% 이하, 35 중량% 이하, 30 중량% 이하, 25 중량% 이하, 20 중량% 이하, 15 중량% 이하, 10 중량% 이하, 5 중량% 이하, 1 중량% 이하, 0.5 중량% 이하, 0.1 중량% 이하, 0.09 중량% 이하, 0.08 중량% 이하, 0.075 중량% 이하, 0.07 중량% 이하, 0.06 중량% 이하 또는 0.05 중량% 이하로 포함될 수 있으나, 피부 노화 모델을 제조할 수 있는 디클로로아세테이트의 함량이라면 이에 제한되는 것은 아니

다.

- [0039] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 제조방법에 의하여 제조된, 분리된 피부 노화 모델에, 항노화 후보물질을 처리하는 단계; 및 상기 후보물질 처리 전후의 노화 지표를 검출하는 단계를 포함하는, 항노화 물질 스크리닝 방법을 제공한다. 상기 제조방법, 피부 노화 모델에 관한 설명은 상술한 바와 같다.
- [0040] 상기 항노화 물질 스크리닝 방법은 상기 후보물질의 처리 후의 노화 지표의 발현량이 후보물질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 10% 이상 증가 또는 감소하면 항노화 물질로 결정하는 단계를 더 포함할 수 있다. 본 명세서에서, 노화 지표란, 노화된 세포 또는 세포주에서 특이적으로 발현양이 증가하거나 감소하여, 세포의 노화 정도를 확인할 수 있는 유전자, 그 유전자의 발현산물을 의미할 수 있다. 상기 노화 지표는, 예컨대, 베타-갈락토시다아제(β -galactosidase) 또는 및 노화-관련 베타-갈락토시다아제(SA- β gal, senescence-associated β -galactosidase)의 활성, p16, p21, p53, 고이동성 그룹 박스 1(High mobility group box 1, HMGB1) 유전자, 또는 그 단백질일 수 있으며, 구체적으로 베타-갈락토시다아제(β -galactosidase), p21 및 고이동성 그룹 박스 1(High mobility group box 1, HMGB1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고, 업계에 알려진 공지의 노화 지표를 포함한다. 상기 항노화 물질 결정 단계는 상기 후보물질의 처리 후의 후보물질의 처리 후의 HMGB1의 발현량이 후보물질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 10% 이상 증가하면 항노화 물질로 결정하는 단계일 수 있고, 구체적으로 10% 이상, 12% 이상, 14% 이상, 16% 이상, 18% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 32% 이상, 34% 이상, 36% 이상, 38% 이상, 40% 이상, 42% 이상, 44% 이상, 46% 이상, 48% 이상, 50% 이상, 52% 이상, 54% 이상, 56% 이상, 58% 이상, 60% 이상, 62% 이상, 64% 이상, 66% 이상, 68% 이상, 70% 이상, 72% 이상, 74% 이상, 76% 이상, 78% 이상, 80% 이상, 82% 이상, 84% 이상, 86% 이상, 88% 이상, 90% 이상, 92% 이상, 94% 이상, 96% 이상 또는 98% 이상 증가하면 항노화 물질로 결정하는 단계일 수 있다. 또는, 상기 항노화 물질 결정 단계는 상기 후보물질의 처리 후의 베타-갈락토시다아제(β -galactosidase) 또는 p21의 발현량이 후보물질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 10% 이상 감소하면 항노화 물질로 결정하는 단계일 수 있고, 구체적으로 10% 이상, 12% 이상, 14% 이상, 16% 이상, 18% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 32% 이상, 34% 이상, 36% 이상, 38% 이상, 40% 이상, 42% 이상, 44% 이상, 46% 이상, 48% 이상, 50% 이상, 52% 이상, 54% 이상, 56% 이상, 58% 이상, 60% 이상, 62% 이상, 64% 이상, 66% 이상, 68% 이상, 70% 이상, 72% 이상, 74% 이상, 76% 이상, 78% 이상, 80% 이상, 82% 이상, 84% 이상, 86% 이상, 88% 이상, 90% 이상, 92% 이상, 94% 이상, 96% 이상 또는 98% 이상 감소하면 항노화 물질로 결정하는 단계일 수 있다.
- [0042] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 제조방법에 의하여 제조된, 분리된 피부 노화 모델을 포함하는, 항노화 물질 스크리닝을 위한 인 비트로(*in vitro*) 모델을 제공한다. 상기 제조방법, 피부 노화 모델, 항노화 물질 스크리닝에 관한 설명은 상술한 바와 같다.
- [0044] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 제조방법에 의하여 제조된, 분리된 피부 노화 모델; 및 지시서를 포함하며, 상기 지시서에는, 후보물질 처리 전후의 노화 지표를 검출한 후, 상기 후보물질의 처리 후의 노화 지표의 발현량이 후보물질을 처리하지 않은 대조군에 비하여 10% 이상 증가 또는 감소하면 항노화 물질로 판단하는 내용을 포함하는, 항노화 물질 스크리닝용 키트를 제공한다. 상기 제조방법, 피부 노화 모델, 항노화 물질 스크리닝, 노화 지표에 관한 설명은 상술한 바와 같다.
- [0045] 상기 피부 노화 모델은 냉동보존 또는 담체 보존된 상태인 것일 수 있다. 상기 키트 내에 포함되는 피부 노화 모델은, 추가적인 세포 증식이나 노화를 최소화하기 위해, 상기 나열된 기술 외에도 당업자에게 잘 알려진 기술에 의해, 최적의 노화 상태가 보존된 채로 키트 내에 포함될 수 있다.
- [0046] 상기 노화 지표는, 예컨대, 베타-갈락토시다아제(β -galactosidase) 또는 및 노화-관련 베타-갈락토시다아제(SA- β gal, senescence-associated β -galactosidase)의 활성, p16, p21, p53, 고이동성 그룹 박스 1(High mobility group box 1, HMGB1) 유전자, 또는 그 단백질일 수 있으며, 구체적으로 베타-갈락토시다아제(β -galactosidase), p21 및 고이동성 그룹 박스 1(High mobility group box 1, HMGB1)로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니고, 업계에 알려진 공지의 노화 지표를 포함한다.
- [0047]

[0048] 이하, 실시예 및 실험예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 아래 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 그에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0050] **[제조예] 피부 노화 모델 제조**

[0052] 지방 유래 줄기세포(Adipose-derived stem cell, ADSC)(Lonza)를 지방 유래 줄기세포 성장 배지(adipose derived stem cell growth media, ADSCGM)(Lonza)에 첨가물(supplements)와 성장 인자(growth factors)(ADSC-GM SingleQuots™ Kit, Lonza)를 첨가하여 37℃의 5% CO₂ 인큐베이터(incubator)에서 배양하였다. 하기에서는 계대배양 10회 이하(passage number-10 이하)의 지방 유래 줄기세포를 사용하였다.

[0053] 디클로로아세트레이트(dichloroacetate, DCA)가 노화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 상기 계대배양된 지방 유래 줄기세포에 DCA 5 mM(Sigma)를 2주간 처리하여 피부 노화 모델을 제조하였다(실시예). 이 때 대조군에는 DCA 대신 증류수(distilled water, DW) 처리하였다. 처리 기간 동안 이틀마다 배지를 갈아주었고, 배지를 교체할 때 마다 대조군에는 증류수를, 상기 실시예에는 DCA 5 mM을 각각 처리하였다.

[0055] **[실험예 1] 노화-관련 베타-갈락토시다아제(SA-β gal, senescence-associated β-galactosidase) 활성 측정**

[0057] 상기 실시예의 피부 노화 모델의 노화 정도를 측정하기 위해 노화-관련 베타-갈락토시다아제(SA-β gal, senescence-associated β-galactosidase) 활성을 측정하였다.

[0058] 구체적으로, 노화 지표인 노화-관련 베타-갈락토시다아제 활성을 측정(SA-β gal activity assay)(Enzo life science)하기 위해 상기 제조예에서 제조된 대조군 및 실시예의 세포를 PBS로 세척(washing)한 뒤, 용해 버퍼(lysis buffer)를 이용하여 각각의 세포 용해물(cell lysate)을 수득하였다. 상기 수득된 세포 용해물 각각을 에세이 버퍼(assay buffer)와 섞은 뒤 37℃에서 2시간 동안 반응시킨 후 각각의 형광의 세기를 측정하였으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0059] 도 1에 나타난 바와 같이, DCA를 처리하지 않은 대조군에 비하여 DCA를 처리하여 제조한 세포(실시예)에서 SA-β gal 활성이 약 1.4배 이상 증가함을 확인하였다.

[0060] 이를 통해, 지방 유래 줄기세포에 DCA를 처리하였을 때, 보다 짧은 시간동안 적은 비용으로 피부 노화 모델을 제조할 수 있음을 알 수 있었다.

[0062] **[실험예 2] 인산화된 PDH, p21 및 HMGB1 발현량 측정**

[0064] 상기 실시예의 피부 노화 모델의 노화 정도를 측정하기 위해 인산화된 피루브산 탈수소효소(pyruvate dehydrogenase, PDH), p21 및 고이동성 그룹 박스 1(High mobility group box 1, HMGB1)의 발현량을 웨스턴 블롯(western blot)을 수행하여 측정하였다.

[0065] 구체적으로, RIPA 용해 버퍼(RIPA lysis buffer)(Millipore)를 이용하여 상기 상기 제조예에서 제조된 대조군 및 실시예 각각의 세포 용해물(cell lysate)를 얻은 후 단백질 측정 키트(protein assay kit)(Bio-rad)를 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 단백질을 포함한 세포 용해물(cell lysate)을 SDS-PAGE를 이용해 분리하고 PVDF 막(membrane)에 옮긴 뒤 블로킹 용액(blocking solution)(thermo scientific)을 이용하여 블로킹(blocking)하였다. 항-pPDH S232(calbiochem), 항-PDH(novex), 항-p21(cell signaling) 또는 항-HMGB1(abcam), 0.1% tween 20(sigma)이 포함된 TBS(tris-buffered saline)(thermo scientific)와 상기 막을 12시간 이상 동안 인큐베이션한 뒤 ECL 화학 발광 시스템(ECL chemiluminescence system)(Amersham Pharmacia Biotech)을 이용하여 단백질 양을 측정하였으며, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에서 대조군과 실시예의 세포에서 PDH의 단백질 양에 차이가 없으며, PDH는 로딩 대조군(loading control)로 사용되었다.

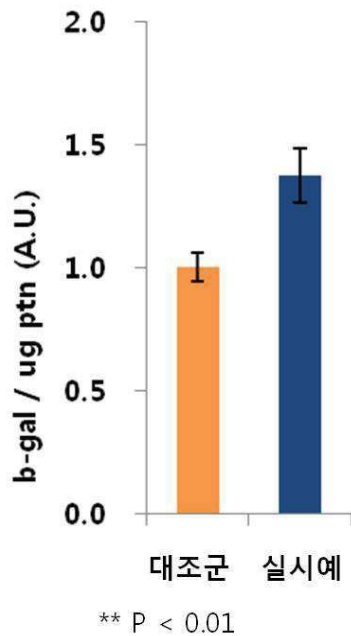
[0066] 도 2에 나타난 바와 같이, DCA를 처리하지 않은 대조군에 비하여 DCA를 처리하여 제조한 세포(실시예)에서 pPDH S232의 단백질 양이 감소하였는데, DCA 처리에 의해 피루브산 탈수소효소(PDH)의 인산화가 억제되었음을 의미한다. 또한, DCA를 처리하지 않은 대조군과는 달리 DCA를 처리하여 제조한 세포(실시예)에서 세포 노화 시 증가하는 것으로 알려진 p21의 발현량이 증가하고, 세포 노화 시 감소하는 것으로 알려진 HMGB1의 발현량이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다.

[0067] 이를 통해, 지방 유래 줄기세포에 DCA를 처리하였을 때, 보다 짧은 시간동안 적은 비용으로 피부 노화 모델을 제조할 수 있음을 알 수 있었다.

[0069] 따라서, 본 발명의 일 측면에 따른 분리된 지방 유래 줄기세포(Adipose-derived stem cell, ADSC)에 디클로로아세테이트(dichloroacetate, DCA)를 처리하는 단계를 포함하는 피부 노화 모델 제조방법은 시간과 비용 효율적으로 피부 노화 모델을 제조할 수 있음을 확인하였다.

도면

도면1



도면2

