



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년09월21일
(11) 등록번호 10-1901552
(24) 등록일자 2018년09월17일

- | | |
|--|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
<i>G01N 33/68</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
<i>G01N 33/6893</i> (2013.01)
<i>G01N 33/6854</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-0076075(분할)</p> <p>(22) 출원일자 2018년06월29일
심사청구일자 2018년06월29일</p> <p>(65) 공개번호 10-2018-0080163</p> <p>(43) 공개일자 2018년07월11일</p> <p>(62) 원출원 특허 10-2016-0086046
원출원일자 2016년07월07일
심사청구일자 2016년07월07일</p> <p>(56) 선행기술조사문헌
Journal of the Egyptian Women's Dermatologic Society, 2013, Vol. 10, pp 89-93.
Experimental Dermatology, 2008, Vol. 17, pp 1059-1062.
KR1020110104246 A</p> | <p>(73) 특허권자
동국대학교 산학협력단
서울특별시 중구 필동로1길 30 (필동3가, 동국대학교)</p> <p>(72) 발명자
이애영
서울특별시 종로구 사직로 102, 신동아 블루아 아파트 A801호
김향미
전라북도 군산시 설립1길 7 (소룡동)</p> <p>(74) 대리인
이명진</p> |
|--|---|

전체 청구항 수 : 총 2 항

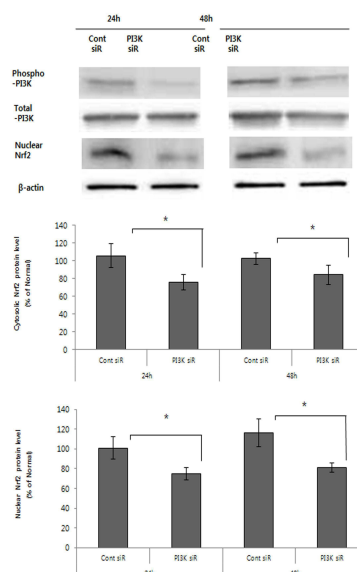
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 백반증 발생 예측용 바이오 마커 및 이를 이용한 예측 평가방법

(57) 요약

본 발명은 백반증 발생을 예측할 수 있는 바이오 마커 및 이를 이용한 예측 평가방법에 관한 것으로, 본 발명에 의해 간편하면서도 신속하게 백반증을 조기에 진단하고 치료함으로써, 백반증의 치료 효율을 증가시킬 수 있는 효과가 있으며, 나아가 본 발명을 이용하여 화장품 구성성분이나 제품의 백반증 발생을 예측하는 데 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도4a



(52) CPC특허분류

G01N 2800/20 (2013.01)

G01N 2800/50 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HN15C0102

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 항노화화장품연구개발

연구과제명 노화에 의한 피부색소변화 제어전략연구

기여율 1/1

주관기관 동국대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 백반증 의심환자의 피부 시료를 채취하는 단계;
- b) 상기 채취된 시료에서 표피를 분리하는 단계;
- c) 상기 분리된 표피로부터 각질형성세포를 배양하는 단계;
- d) 상기 배양된 각질형성세포의 Nrf2 단백질 핵내 발현 수준을 측정하여 대조군인 각질형성세포의 Nrf2 단백질 핵내 발현 수준과 비교하는 단계; 및
- e) 상기 배양된 세포에 존재하는 Nrf2 단백질의 핵내 발현 수준이 대조군에 비해 감소된 경우 백반증이 발병한 것으로 판정하는 단계

를 포함하고, 상기 Nrf2 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 백반증의 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단백질의 발현 수준을 측정하기 위한 방법은 웨스턴 블롯, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석 (RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법 (radioimmudiffusion), 오우크테로니 (Ouchterlony) 면역확산법, 로켓 (rocket) 면역전기영동, 조직 면역 염색, 면역침전 분석법 (Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법 (Complement Fixation Assay), 유세포분석 (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) 및 단백질 칩 (protein chip)으로 이루어진 군에서 선택된 1개 이상의 방법인 것을 특징으로 하는, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 백반증 발생을 예측할 수 있는 바이오 마커 및 이를 이용한 예측 평가방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 백반증 (白斑症)은 후천적으로 멜라닌세포가 죽음으로써 피부색이 하얗게 변하는 질환으로 인종과 성별에 차이가 없이 전 세계 인구의 약 1-2%에서 발생하는 비교적 흔한 질환이다. 발생하는 연령이 정해져 있지는 않으나 환자의 반 이상이 20세 이전에 나타나고, 얼굴이나 손과 같이 의복에 의해 가려지지 않는 부위, 사타구니나 겨드랑이 같이 피부가 접히는 부위, 팔꿈치, 무릎 및 손관절 같이 돌출한 뼈 위의 피부, 입이나 코 같이 신체의 구멍 주위에 잘 생긴다. 대개 좌우 대칭으로 나타나지만, 신경절을 따라 좌우 한쪽에만 있을 수 있고 한곳 또는 몇몇 부위에만 국한되는 경우도 있으며, 드물게는 피부의 거의 대부분이 하얗게 되기도 한다.

[0003] 케라틴세포는 전문화된 표피세포로, 그것의 발달 및 항상성 유지에는 다중 시그널 경로가 필요하다. AKT의 활성이 케라틴 세포 말단 분화의 시작에 관여하고, PI3K (phosphoinositide 3-kinase)의 활성화에 의해 그 분화가 진행된다는 것이 알려진 바 있다.

[0004] 백반증 환자의 정상적으로 색소가 침착된 상피에 비해서 색소가 감소한 표피에서 상당히 더 많은 케라틴세포가 아포토시스를 겪으며, 그로 인해 멜라닌세포의 생존에 필요한 케라틴세포 유래 인자의 합성이 감소하여 수동적으로 멜라닌세포의 죽음을 초래한다. 즉, 백반증 환자의 각질형성세포 (Keratinocytes)에서는 PI3K 활성이 감소되어 있으며, 아포토시스와 전염증성 사이토카인 생성이 증가된다.

[0005] 상기와 같은 백반증이 생기는 원인에 대해서는 여러 가지 설이 있으나, 약 30%에서 유전적 소인이 작용하는 것으로 알려져 있다. 이에 따라 그 치료요법으로, 스테로이드 외용제, 광화학요법, 부신피질호르몬제 전신요법, 피부이식법 등이 현재 적용되고 있으나, 백반증은 그 증상이 구체적으로 나타나기 시작하는 경우 또는 증상이 상당히 진행된 경우에 치료가 시작되므로, 치유 속도가 느리며, 대부분 완전 치유가 어려운 문제점이 있다. 따라서, 이와 같은 증상이 구체적으로 나타나지 않은 경우라도 백반증을 조기에 진단하여, 그 치료 효율을 높일 필요성이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0672853호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에, 본 발명자들은 백반증 환자의 각질형성세포에서 PI3K 활성이 감소되어 있음에 근거하여, PI3K 억제 발현된 각질형성세포에 화학물질 처리시 발생기산소 (ROS) 생성의 증가 및 Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related Factor 2) 단백질 감소가 현저해지는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0008] 이에, 본 발명의 목적은 Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related Factor 2) 단백질을 포함하는 백반증 진단 마커용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related Factor 2) 단백질에 특이적으로 결합하는 분자를 포함하는 것을 특징으로 하는 백반증 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 백반증 의심환자의 피부 시료로부터 분리된 표피에서 각질형성세포를 추출하여 배양하고, 상기 배양된 세포로부터 Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related Factor 2) 단백질의 핵내 발현 수준을 측정하고, 이를 정상 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 백반증의 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related Factor 2) 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 백반증 발생 위험 예측용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 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

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related Factor 2) 단백질을 포함하는 백반증 진단 마커용 조성물을 제공한다.

[0014] 또한 본 발명은 Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related Factor 2) 단백질에 특이적으로 결합하는 분자를 포함하는 것을 특징으로 하는 백반증 진단용 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 구현예로, 상기 분자는 항체일 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 Nrf2 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어질 수 있다.

[0017] 또한 본 발명은 백반증 의심환자의 피부 시료로부터 분리된 표피에서 각질형성세포를 추출하여 배양하고, 상기 배양된 세포로부터 Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related Factor 2) 단백질의 핵내 발현 수준을 측정하고, 이를 정상 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 백반증의 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0018] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 배양된 세포에 존재하는 Nrf2 단백질의 핵내 발현 수준이 대조군에 비해 감소된 경우 백반증이 발병한 것으로 판정할 수 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하기 위한 방법은 웨스턴 블롯, ELISA (enzyme

linked immunosorbent assay), 방사선면역분석 (RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법 (radioimmunodiffusion), 오우크테로니 (Ouchterlony) 면역확산법, 로켓 (rocket) 면역전기영동, 조직 면역 염색, 면역침전 분석법 (Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법 (Complement Fixation Assay), 유세포 분석 (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) 및 단백질 칩 (protein chip)으로 이루어진 군에서 선택된 1개 이상의 방법일 수 있다.

[0020] 또한 본 발명은 Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related Factor 2) 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 백반증 발생 위험 예측용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 백반증 발생을 예측할 수 있는 바이오 마커 및 이를 이용한 예측 평가방법에 관한 것으로, 본 발명에 의해 간편하면서도 신속하게 백반증을 조기에 진단하고 치료함으로써, 백반증의 치료 효율을 증가시킬 수 있는 효과가 있으며, 나아가 본 발명을 이용하여 화장품 구성성분이나 제품의 백반증 발생을 예측하는 데 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1a 및 1b는 PI3K-억제 발현된 (knockdown) 각질형성세포에서 4-TBP (1a) 및 HQ (1b)에 의해 유도된 세포사멸 (apoptosis)을 MTT 분석에 의해 확인하는 도이고, 도 1c는 FACS 분석에 의해 확인하는 도이다.

도 2a 및 2b는 PI3K-억제 발현된 (knockdown) 각질형성세포에서 4-TBP에 의한 TNF- α 및 IL-1 α 발현을 나타내는 도이고, 도 2c 및 2d는 HQ에 의한 TNF- α 및 IL-1 α 발현을 나타내는 도이다.

도 3a는 PI3K-억제 발현된 (knockdown) 각질형성세포에서 4-TBP에 의해 유도된 ROS 수준을 나타내는 도이고, 도 3b는 HQ에 의해 유도된 ROS 수준을 나타내는 도이다. 또한, 도 3c 및 3d는 상기 ROS 유도된 세포에 N-아세틸-L-시스테인 (NAC)을 처리한 후 생존 가능한 세포를 확인하는 도이다. 도 3e 및 3f는 상기 NAC 처리된 각질형성세포에서 4-TBP에 의한 TNF- α 및 IL-1 α 발현을 나타내는 도이고, 도 3g 및 3h는 HQ에 의한 TNF- α 및 IL-1 α 발현을 나타내는 도이다.

도 4a 및 4b는 PI3K-억제 발현된 (knockdown) 각질형성세포에서 4-TBP (4a) 및 HQ (4b)에 의한 Nrf2 핵 변위 감소 효과를 나타내는 도이고, 도 4c는 상기 세포를 공초점 현미경으로 확인한 도이며, 도 4d는 면역형광염색으로 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명자들은, 실시예에서 PI3K-억제 발현된 (knockdown) 각질형성세포에 피부 자극물질인 4-TBP 또는 하이드로퀴논 (HQ)을 처리하는 경우, 세포사멸 (apoptosis) 및 발생기산소 (ROS) 생성이 증가한다는 점에 기반하여 PI3K-억제 발현된 (knockdown) 각질형성세포에서 4-TBP 및 HQ에 의해 유도된 ROS 생성 증가 및 Nrf2 핵 변위 감소 등을 구체적으로 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.

[0025] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0027] 본 발명은 Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related Factor 2) 단백질을 포함하는 백반증 진단 마커용 조성물을 제공한다.

[0028] 또한, 본 발명은 Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related Factor 2) 단백질에 특이적으로 결합하는 분자를 포함하는 것을 특징으로 하는 백반증 진단용 조성물을 제공한다.

[0029] 본 발명의 일 구현예로, 상기 Nrf2 단백질은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어질 수 있고, 상기 분자는 항체일 수 있다.

[0030] 본 발명에서, "항체"란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 마커 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다.

[0031] 또한, 본 발명은 백반증 의심환자의 피부 시료로부터 분리된 표피에서 각질형성세포를 추출하여 배양하고, 상기 배양된 세포로부터 Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related Factor 2) 단백질의 핵내 발현 수준을 측정하고, 이를 정상 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 백반증의 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

이때, 상기 배양된 세포에 존재하는 Nrf2 단백질의 핵내 발현 수준이 대조군에 비해 감소된 경우 백반증이 발병한 것으로 판정할 수 있다.

[0032] 본 발명에서 "단백질 발현 수준 측정"이란 피부 자극 후보 물질을 스크리닝하기 위하여 각질형성세포에서 본 발명의 유전자로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 단백질의 양을 측정하여 이루어진다. 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, ELISA (enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석 (RIA: Radioimmunoassay), 방사면역 확산법 (radioimmunodiffusion), 오우크테로니 (Ouchterlony) 면역확산법, 로켓트 (rocket) 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법 (Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법 (Complement Fixation Assay), 유세포분석 (Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS), 단백질 칩 (protein chip) 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 단백질 발현 수준을 측정하는 체계는 바람직하게는 항체이다.

[0033] 본 발명의 실시예에서는, 백반증 발생 예측을 위한 Nrf2 핵 변위 감소 효과를 확인하기 위하여, PI3K-억제 발현된 (knockdown) 각질형성세포에 피부 자극물질을 처리하여 이를 확인한 결과, PI3K-억제 발현된 (knockdown) 각질형성세포에 피부 자극물질인 4-TBP 또는 하이드로퀴논 (HQ)을 처리하는 경우, Nrf2 핵 변위가 감소한다는 것을 알 수 있었다 (실시예 5 참조).

[0034] 따라서, 본 발명에 따른 Nrf2 단백질은 PI3K-knockdown 각질세포 (백반증 환자의 표피에서 분리된 각질세포의 모델)에 피부 자극물질 처리 시, 그 발현이 감소되는 바, 상기 단백질을 이용하여 백반증 발생 예측 또는 진단이 요구되는 다양한 목적 및 용도로 사용될 수 있다.

[0035] 이에, 본 발명은 Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related Factor 2) 단백질을 포함하는 것을 특징으로 하는 백반증 발생 위험 예측용 조성물을 제공한다.

[0036] 본 발명에서, 상기 조성물에 화장품 구성성분이나 제형 처리 시, 상기 Nrf2 단백질의 발현이 감소하는 경우, 백반증 발생 위험이 높은 것으로 판단할 수 있다.

[0038] 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.

[0040] **[실시예]**

[0041] **실시예 1. 실험 준비 및 실험 방법**

[0042] **1-1. 환자**

[0043] 본 연구에는 백반증 (vitiligo)으로 진단받은 8명의 환자 (남성 4명 및 여성 4명; 15세와 53세 사이로서 평균 나이는 38.5세; 분절형 2명 및 비분절형 6명)가 포함되었다. 동국대학교 일산 병원의 기관 감사 위원회 (Institutional Review Board)는 헬싱키 선언 (Declaration of Helsinki)의 원칙에 따라 수행된 본 연구를 승인하였다. 각각의 지원자로부터 서면 고지 동의 (written informed consent)를 받은 후, 3명의 환자에서 탈색되고 정상적으로 유색된 피부 시료들을 생검하고, 면역 형광 분석을 위해 기타 2명의 환자에서 흡입 수포의 천정부 (roof)로부터 채집하였다.

[0045] **1-2. 면역형광염색**

[0046] Nrf2 (NF-E2-related Factor 2) 및 인산화된 PI3K의 면역 형광 염색을 위해, 탈색되고 정상적으로 유색된 고정 표피 샘플을 파라핀 왁스에 포매하고, 5 mm로 절편화하였다. 파라핀 제거 이후, 절편을 시트르산 용액 (100 mM citrate, pH 6.0) 및 0.5 % Triton X-100으로 전처리하였다. 3% 소 혈청 알부민 (BSA)으로 차단한 이후, 상기 절편을 항-Nrf2 항체 (토끼 다클론성: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)의 1:100 희석액으로 배양하고, Alexa Fluor® 488 염소 항-토끼 IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)의 1:200 희석액으로 염색하였다. 이중 염색을 위해, 상기 절편을 항-phospho-PI3K (염소 다클론성: Santa Cruz Biotechnology) 및 Alexa Fluor-표지 당나귀 항-염소 IgG (594; Molecular Probes)로 연속적으로 염색하였다. 핵은 Hoechst 33258 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 대비 염색하였다. 상기 염색된 시료는 Dp Manager 2.1 형광 현미경 (Olympus Optical Co., Tokyo, Japan)을 이용하여 관측하였다.

[0048] **1-3. 세포 배양 및 PI3K-knockdown**

[0049] 제왕절개 수술로부터 수득된 성인 피부 시료들을 세포 배양에 사용하였다. 표피는 피부로부터 분리하고, 개개의 표피 세포에 대한 현탁액을 제조하였다. 소 뇌하수체 추출물, 소 인슐린, 하이드로코티손 (hydrocortisone), 인

간 표피 성장 인자 및 소 트랜스페린 (Invitrogen)이 첨가된 EpiLife 배지 (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 개개의 표피 세포를 현탁하였다. 상기 수확된 각질 세포를 배양 배지에 7.5×10^4 cell/mL로 재현탁하고, 6-well 플레이트에 웰당 1.5×10^5 cell로 접종하였다.

[0050] 접종 24 시간 후, 각 6-well 플레이트를 제조사의 지침서에 따라 TransIT-siQUEST 형질 감염 시약 (Mirus, Madison, WI, USA)을 이용하여 인간 PI3K siRNA (50nM) 또는 음성 대조군 (ON-TARGETplus SMARTpool or nontargeting small interfering RNA; Dharmacon, Lafayette, CO, USA)로 형질 감염시켰다. 상기 세포의 형질 감염 24 시간 후, NAC (Sigma Aldrich)를 배양액에 10mM로 첨가하였다. 1 시간 후, 적절한 농도의 각 화학약품을 상기 세포에 첨가하였다.

[0051] 화학약품에 의한 처리 24 시간 및 48 시간 후, 세포 생존능 및 FACS 분석을 위해 상기 세포를 시험하고, ROS 함량, TNF- α 및 IL-1 α 수준 (ELISA 이용)에 대해 검사하였으며, 또한 Nrf2 발현에 대한 웨스턴 블롯 분석 및 공초점 현미경 검사에 적용하였다.

[0053] **1-4. MTT 분석**

[0054] 세포를 MTT로 4시간 동안 염색하고, 침전된 포르마잔 (formazan)을 DMSO에 용해하고, 광학 밀도는 분광 광도계를 이용하여 570nm (630nm background subtraction)에서 측정하였다. 세포 성장에 대한 화학약품의 효과는 DMSO의 존재 시 세포 생존능에 대한 상기 화학약품의 세포 생존능의 비율로부터 산정하였다.

[0056] **1-5. FACS 분석**

[0057] 세포를 결합 완충액에서 재현탁하고, Annexin V-FITC 염색 용액 (5 μ l)으로 10분 동안 처리하고 암실에서 요오드화 프로피디움 (PI, 100 μ g/ml)을 1 μ l 추가하고 5분 동안 처리하였다. CytomicsTM FC500 Flow Cytometry (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)에 의해 FACS 분석을 수행하였다.

[0059] **1-6. ROS 검사**

[0060] 반응성 산소종 (ROS)은 제조사의 지침서에 따라 총 ROS 검출 키트 (Enzo Life, Farmingdale, NY, USA)를 이용하여 검출하였다. 동일하게 접종된 세포의 웰은 세척 완충액으로 2회 세척하고, 이어 암실에서 37 $^{\circ}$ C, 1 시간 동안 ROS 검출 용액으로 배양하였다. 형광 마이크로플레이트 판독기를 이용하여 플레이트를 즉시 판독하였다.

[0062] **1-7. 웨스턴 블롯 분석**

[0063] 동일한 양의 추출된 단백질을 용해시키고, 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 전달하였다. 상기 멤브레인을 PI3K 및 phospho-PI3K에 대한 항체 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 및 Nrf2 (Santa Cruz Biotechnology)와 함께 배양하였다. 적절한 항-마우스 또는 항-토끼 horseradish 과산화효소-접합 항체 (Thermo) 및 enhanced 화학발광 용액 (Thermo)와 함께 배양한 이후, 영상 입력장치 (LAS-3000, Fuji Photo Film, Tokyo, Japan) 상에 신호를 포획하였다. 각 레인에 적재된 단백질의 양을 모니터링하기 위해, 상기 멤브레인을 마우스 단클론성 항- β -액틴 항체 (Sigma) 및 항-라민 A/C 항체 (Santa Cruz Biotechnology)로 재-탐침하고, 상술한 바와 같이 가공하였다. 이어 단백질 밴드를 밀도 측정법에 의해 분석하였다.

[0065] **1-8. ELISA 분석**

[0066] 이전 실험의 모든 단계에서 배양된 각질 세포의 상층액을 수집하고, 제조사의 지침서에 따라 ELISA 키트 (R&D Systems)를 이용하여 상기 상층액 중의 인간 TNF α 또는 IL-1 α 의 농도를 측정하였다.

[0068] **1-9. 공초점 현미경 검사**

[0069] 배양된 세포를 4% (w/v) 파라포름알데히드에서 고정하고, 0.05% Triton X-100으로 전처리한 후, 3% 소 혈청 알부민 (BSA)으로 차단하였다. Nrf2 및 인산화된 PI3K 항체를 이용한 이중 염색을 위해, 상기 세포를 상응하는 항체의 1:100 희석액으로 배양하고, 이어 Alexa Fluor[®] 488 당나귀 항-염소 IgG (Molecular Probes) 또는 Alexa Fluor[®] 594 염소 항-토끼 IgG (Molecular Probes)의 1:200 희석액으로 염색하였다. 핵은 Hoechst 33258 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA)로 대비 염색하였다. 상기 염색된 시료는 C1 공초점 레이저 스캔 현미경 (C1; Nikon, Tokyo, Japan)을 이용하여 관측하였다. 이중 염색된 세포 중의 각 항원의 위치를 분석하기 위해, 동일한 영역에서 취득된 서로 상이한 영상을 EZ-C1 software (EZ-C1; Nikon, Tokyo, Japan)를 이용하여 병합하고, NIS-Elements AR 3.2 software (Nikon Instruments, Melville, NY, USA)를 이용하여 측정하였다.

- [0071] 1-10. 통계 분석
- [0072] 상기 실험 데이터의 통계 분석은 Student's t-test를 이용하여 수행하였다. 그 결과는 평균 ± 표준편차 (SD)로 나타났다. P 값(<0.05)은 유의한 것으로 고려되었다.
- [0074] **실시예 2. PI3K-억제 발현된 (knockdown) 각질형성세포에서 4-TBP 및 HQ에 의해 유도된 세포사멸 (apoptosis) 확인**
- [0075] PI3K-knockdown 각질형성세포에 화학물질 처리 시, 세포사멸 (apoptosis)이 유도되는지 확인하기 위하여 MTT 분석 (실시예 1-4) 및 FACS 분석 (실시예 1-5)을 실시하였다.
- [0076] 그 결과, 도 1a 내지 1c에 나타난 바와 같이, MTT 분석에 따르면, 4-TBP 및 HQ는 각각 300 μ M 및 100 μ M로 사용하는 경우 48 시간 시점에 생존 가능한 세포의 개수를 미처리 대조군 세포의 40 내지 50 %까지 감소시키는 것으로 나타났으며 (도 1a 및 1b, 추가 연구를 위해 이들의 농도를 고정하였다.), 4-TBP는 처리 48 시간 이후에 생존 가능한 세포의 개수를 대조군 대비 유의하게 감소시켰으며 (도 1a), HQ의 경우, 처리 24 시간 및 48 시간 이후에 유의하게 감소를 나타내었다 (도 1b). 또한, FACS 분석에 따르면, 초기 세포사멸 (annexin-양성 및 PI-음성) 및 후기 세포사멸 (이중 양성) 비율의 합은 대조군 및 화학물질-처리 PI3K-knockdown 각질형성세포 둘 모두에서 유의하게 증가하는 것으로 나타났다 (도 1c).
- [0078] **실시예 3. PI3K-억제 발현된 (knockdown) 각질형성세포에서 4-TBP 및 HQ에 의한 TNF- α 및 IL-1 α 발현 확인**
- [0079] 백반증 환자의 탈색된 표피에서 전염증성 사이토카인의 생성이 증가한다고 알려져 있다. 이에, PI3K-knockdown 각질형성세포 및 대조군에서 전염증성 사이토카인 (TNF- α 및 IL-1 α)의 생성을 비교하기 위하여 ELISA (실시예 1-8)를 실시하였다.
- [0080] 그 결과, 도 2a 내지 2d에 나타난 바와 같이, PI3K-knockdown 각질형성세포에서 TNF- α (도 2a 및 2b) 및 IL-1 α (도 2c 및 2d)의 수준은 대조군에 비하여 4-TBP 처리 48 시간 시점, 및 HQ 처리 24 시간 및 48 시간 이후 시점에 유의하게 증가하는 것으로 나타났다(도 2a 내지 2d).
- [0082] **실시예 4: PI3K-억제 발현된 (knockdown) 각질형성세포에서 4-TBP 및 HQ에 의해 유도된 ROS 생성의 세포독성 효과**
- [0083] ROS 발현에 의한 화학적 세포독성의 효과를 확인하기 위하여 산화 방지제의 존재 또는 부재 하에 이들 각질형성 세포에서 ROS 검사 (실시예 1-6), MTT 분석 (실시예 1-4) 및 ELISA (실시예 1-8)를 실시하였다.
- [0084] 그 결과, 도 3a 내지 3h에 나타난 바와 같이, PI3K-knockdown 각질형성세포에서 ROS 수준은 대조군에 비하여 4-TBP 처리 48 시간 시점, 및 HQ 처리 24 시간 및 48 시간 시점에 유의하게 증가하는 것으로 나타났다 (도 3a 및 3b). 또한, 산화 방지제 및 ROS 차단제인 N-아세틸-L-시스테인 (NAC)은 그 처리 48 시간 시점 및 24 시간 및 48 시간 시점에 4-TBP 및 HQ에 의한 PI3K-knockdown 각질형성세포의 생존 가능한 개수의 감소 (세포사멸)를 억제하였지만, 대조군에서는 4-TBP 및 HQ에 의하여 유도되는 세포사멸을 억제하지 않았다 (도 3c 및 3d). 또한, ELISA에 따르면, PI3K-knockdown 각질형성세포에서 NAC 처리 이후 4-TBP 및 HQ에 의한 TNF- α /IL-1 α 의 증가는 처리 48 시간 이후 및 처리 24 시간 및 48 시간 이후에 각각 약화되었다 (도 3e 내지 3h).
- [0085] 상기 내용을 종합한 결과, 화학적 세포독성에 의한 ROS 생성 및 NAC 전처리에 의한 이의 회복 (도 3a 내지 도 3h)은, PI3K-knockdown 각질형성세포에서 화학물질 처리에 따른 세포사멸에 산화적 스트레스가 관여하고 있음을 시사하고 있다.
- [0087] **실시예 5: PI3K-억제 발현된 (knockdown) 각질형성세포에서의 4-TBP 및 HQ에 의한 Nrf2 핵 변위 감소 효과**
- [0088] 상기 실시예 4의 결과에 따라, PI3K-knockdown 각질형성세포에서의 산화적 스트레스 유도 기작을 이해하기 위하여 화학물질 처리/비처리 또는 산화 방지제 부재/존재 하에 하기와 같은 방법으로 Nrf2 (Nuclear factor erythroid 2-related Factor 2) 활성화에 의한 PI3K-knockdown 각질형성세포 활성화 효과를 검토하였다.
- [0089] Nrf2 핵 수준을 검토하기 위하여, 형질주입 (transfection) 없이 배양된 각질형성세포, 대조군-siRNA 형질주입 각질형성세포 및 PI3K-siRNA 형질주입 각질형성세포에서 각 핵 분획을 다른 분획들로부터 분리하고, 웨스턴 블롯 분석 (실시예 1-7), 공초점 현미경 검사 (실시예 1-9) 및 면역형광염색 (실시예 1-3)을 수행하였다.
- [0090] 그 결과, 도 4a 내지 4d에 나타난 바와 같이, PI3K-knockdown (PI3K-p85 α 의 인산화를 감소)은 대조군-siRNA 형질주입 세포에 비해 PI3K-siRNA 형질주입 각질형성세포 핵 분획에서 Nrf2 발현을 감소시켰으며 (도 4a), 상기

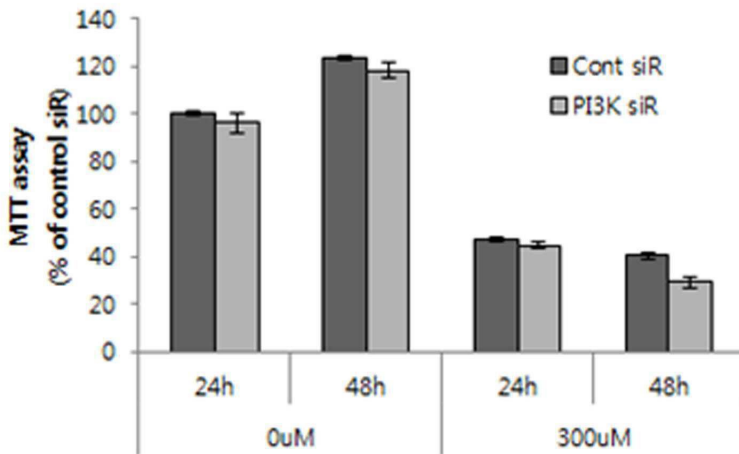
Nrf2 핵 수준은 48 시간 동안 4-TBP 및 HQ로 처리된 PI3K-knockdown 각질형성세포에서 더욱 낮았고, 이는 NAC 처리에 의해 4-TBP 및 HQ로 처리된 대조군보다 낮지 않는 수준까지 회복하였다 (도 4b). 또한, 공초점 현미경 검사에 따르면, Nrf2의 염색 세기는 PI3K-knockdown 각질형성세포에서 매우 약한 것으로 나타났고 (도 4c), 백반증 환자로부터 생김된 8개 세트의 피부 시료에서의 항-Nrf2 및 항-phospho-PI3K 항체에 의한 면역형광염색에 따르면, 이중 양성 세포의 개수가 적었으며, 탈색된 표피에서의 염색 강도가 낮은 것으로 나타났다 (도 4d).

[0091] 상기 내용을 종합한 결과, 화학적 세포독성은 ROS 생성 증가 및 Nrf2 활성 감소를 통하여 정상세포 대비 PI3K-knockdown 각질형성세포의 세포사멸을 증가시키며, 백반증 환자의 탈색된 표피에서와 마찬가지로 Nrf2의 핵 변위를 감소시키는 것을 알 수 있었다.

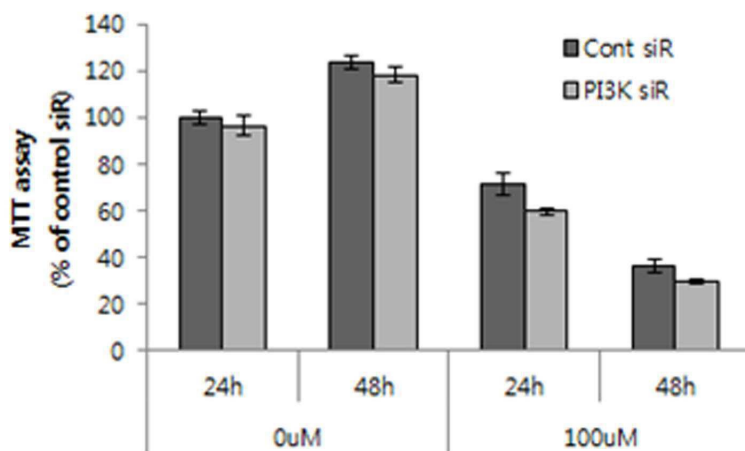
[0093] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

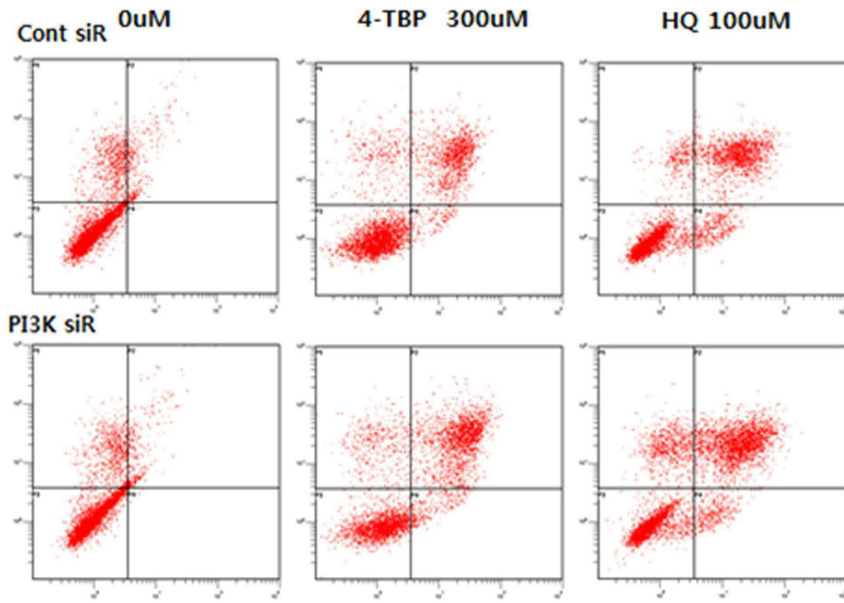
도면1a



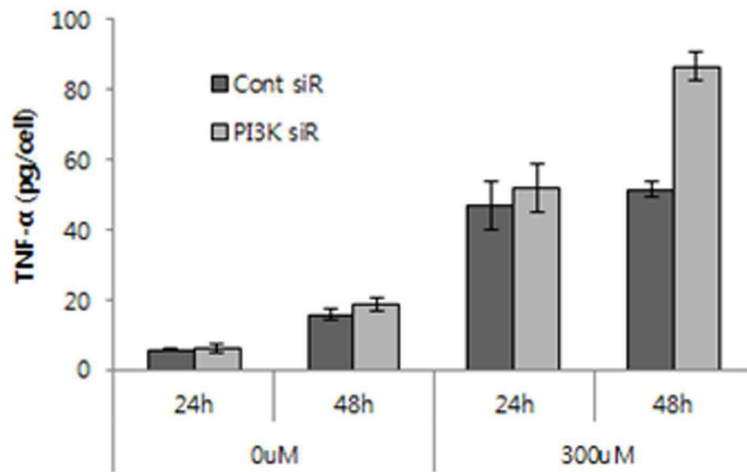
도면1b



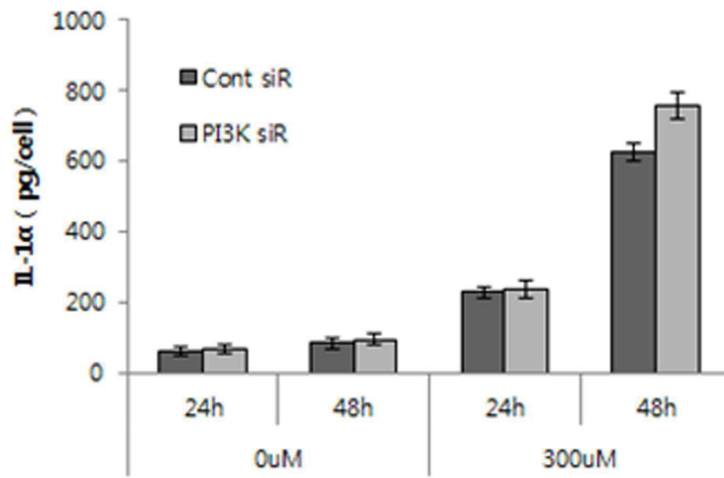
도면1c



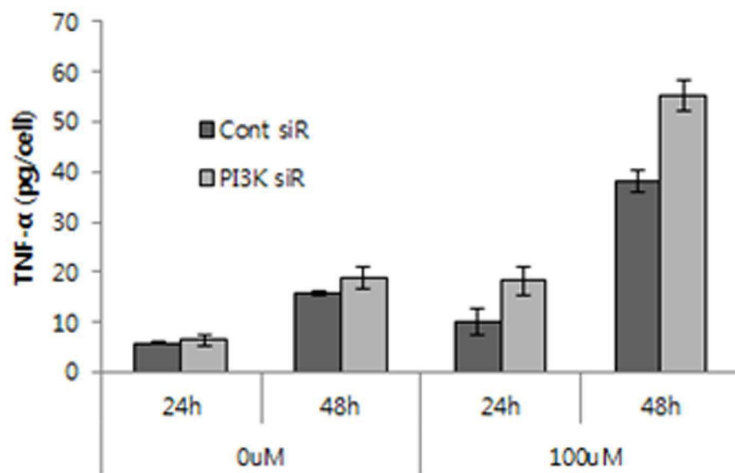
도면2a



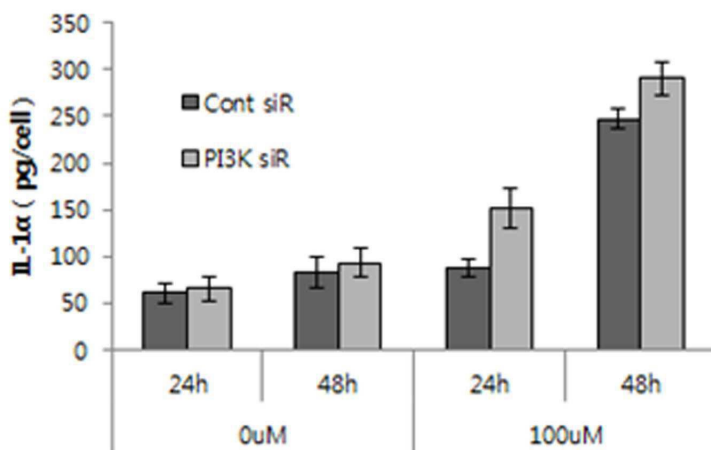
도면2b



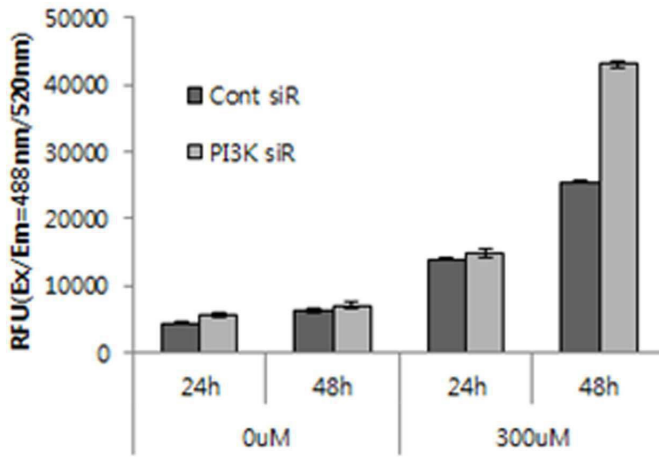
도면2c



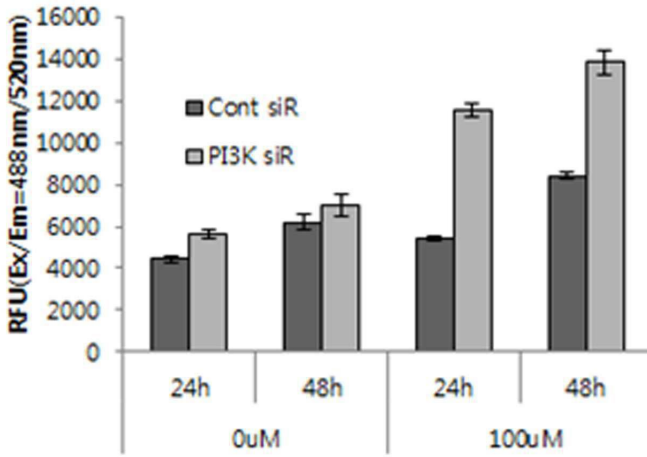
도면2d



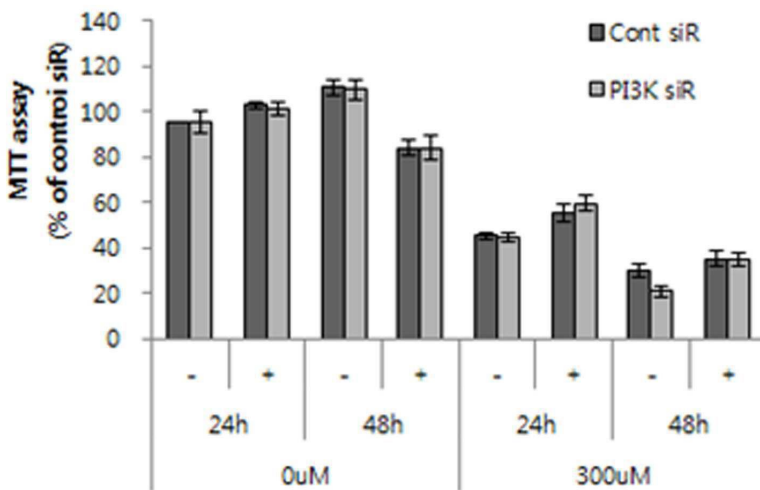
도면3a



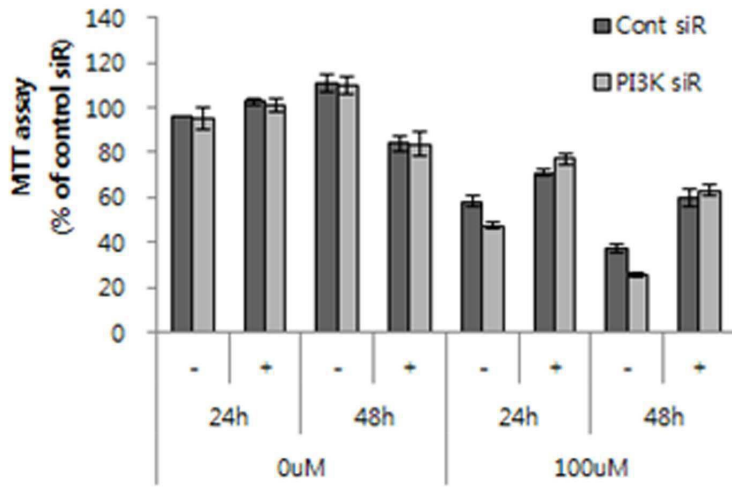
도면3b



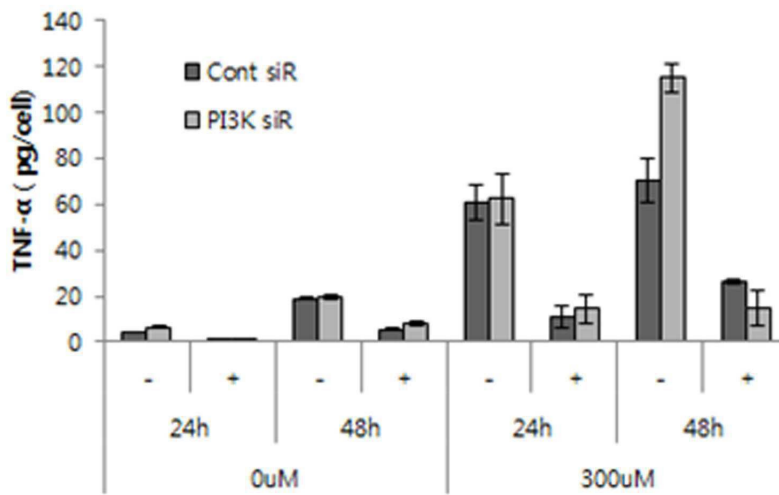
도면3c



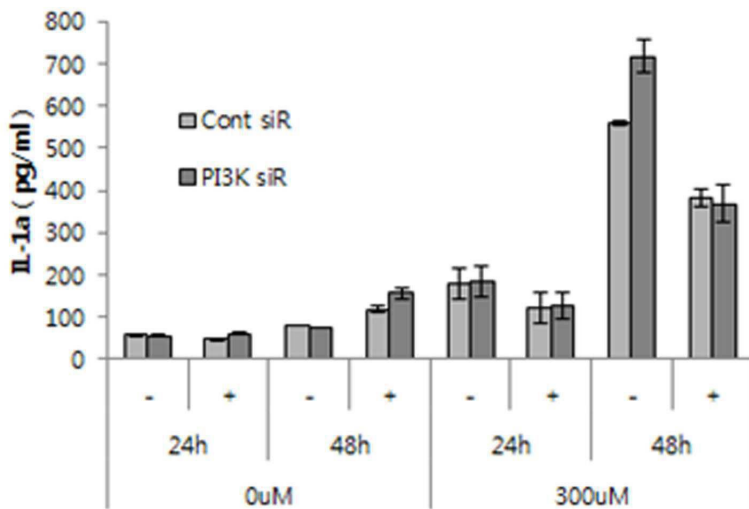
도면3d



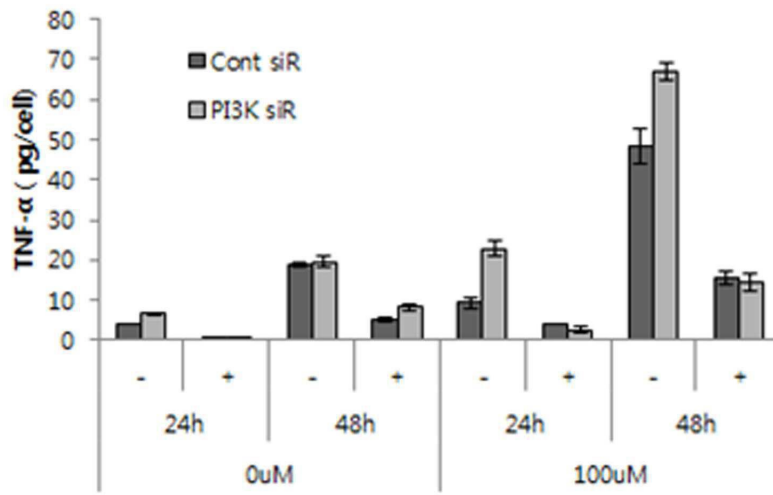
도면3e



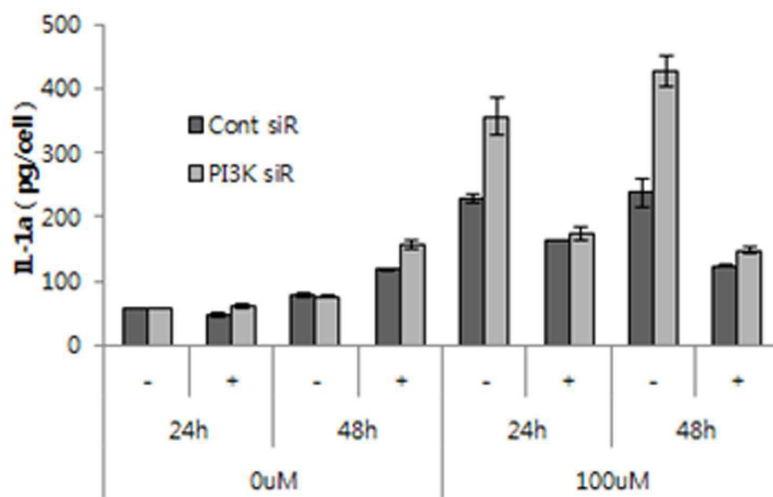
도면3f



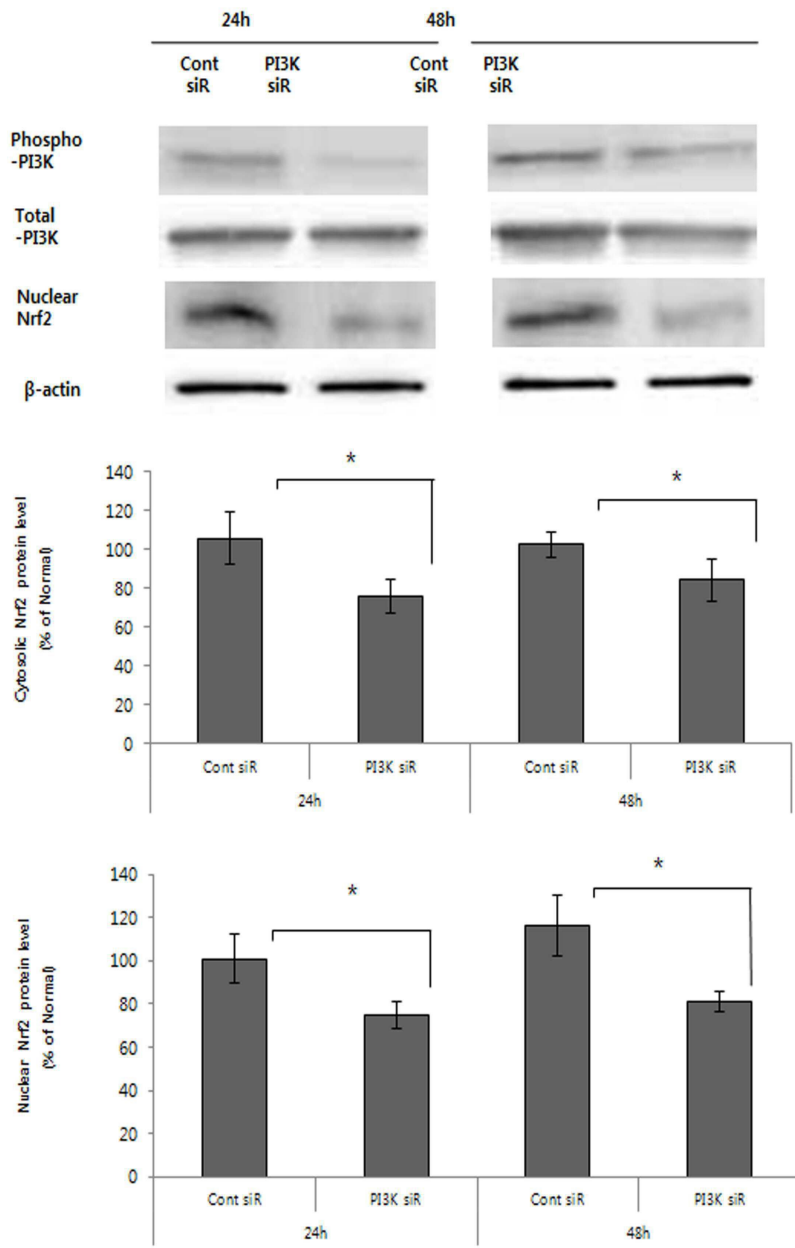
도면3g



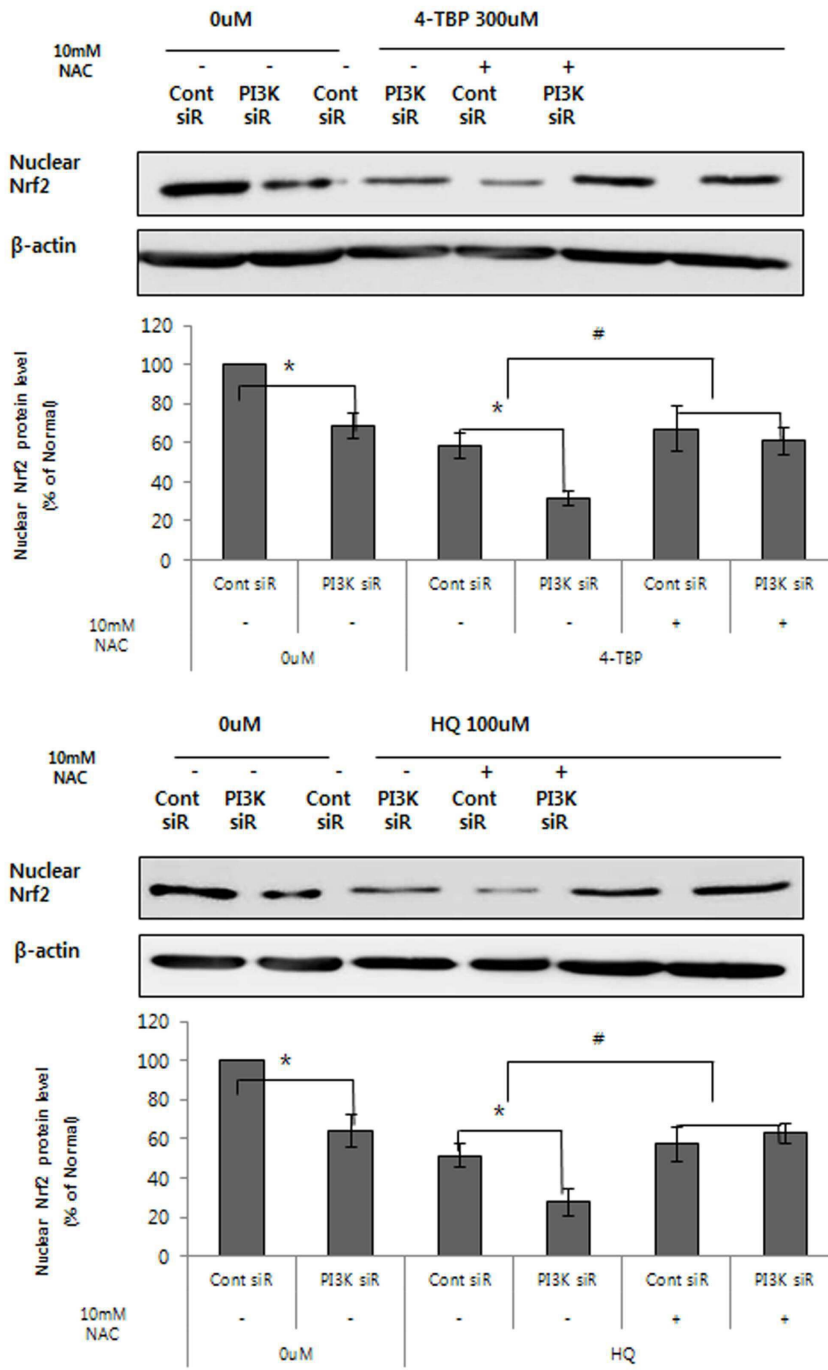
도면3h



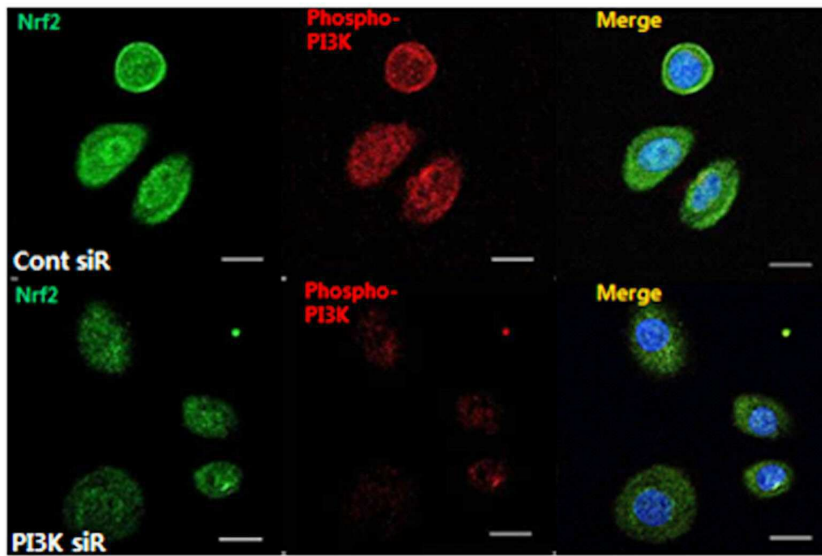
도면4a



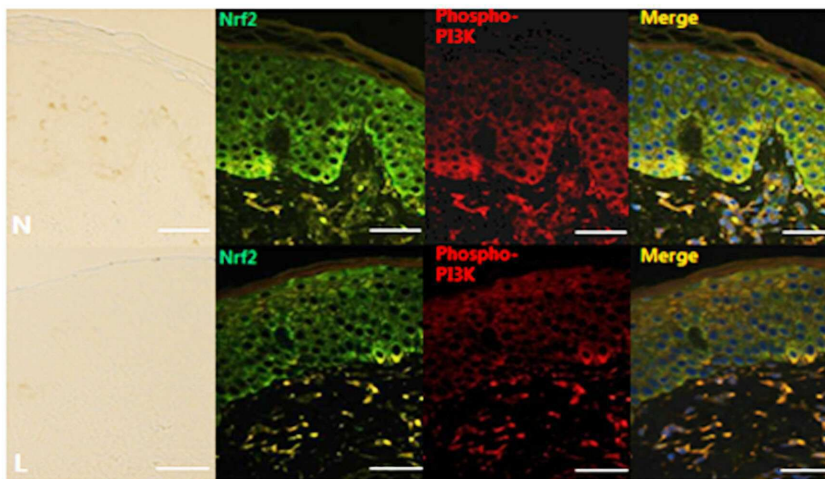
도면4b



도면4c



도면4d



서열 목록

- <110> Dongguk University Industry-Academy Cooperation Foundation
- <120> New Biomarker for Diagnosis of Vitiligo Susceptibility and method for predicting assessment using the same
- <130> MP16-360_division
- <160> 1
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 505
- <212> PRT
- <213> Nuclear factor erythroid 2-related Factor 2 isoform 6

<400> 1

Met Lys Arg Gln Val Ala His Ile Pro Lys Ser Asp Ala Leu Tyr Phe
 1 5 10 15

Asp Asp Cys Met Gln Leu Leu Ala Gln Thr Phe Pro Phe Val Asp Asp
 20 25 30

Asn Glu Val Ser Ser Ala Thr Phe Gln Ser Leu Val Pro Asp Ile Pro
 35 40 45

Gly His Ile Glu Ser Pro Val Phe Ile Ala Thr Asn Gln Ala Gln Ser
 50 55 60

Pro Glu Thr Ser Val Ala Gln Val Ala Pro Val Asp Leu Asp Gly Met
 65 70 75 80

Gln Gln Asp Ile Glu Gln Val Trp Glu Glu Leu Leu Ser Ile Pro Glu

85 90 95

Leu Gln Cys Leu Asn Ile Glu Asn Asp Lys Leu Val Glu Thr Thr Met
 100 105 110

Val Pro Ser Pro Glu Ala Lys Leu Thr Glu Val Asp Asn Tyr His Phe
 115 120 125

Tyr Ser Ser Ile Pro Ser Met Glu Lys Glu Val Gly Asn Cys Ser Pro
 130 135 140

His Phe Leu Asn Ala Phe Glu Asp Ser Phe Ser Ser Ile Leu Ser Thr
 145 150 155 160

Glu Asp Pro Asn Gln Leu Thr Val Asn Ser Leu Asn Ser Asp Ala Thr
 165 170 175

Val Asn Thr Asp Phe Gly Asp Glu Phe Tyr Ser Ala Phe Ile Ala Glu
 180 185 190

Pro Ser Ile Ser Asn Ser Met Pro Ser Pro Ala Thr Leu Ser His Ser
 195 200 205

Leu Ser Glu Leu Leu Asn Gly Pro Ile Asp Val Ser Asp Leu Ser Leu
 210 215 220

Cys Lys Ala Phe Asn Gln Asn His Pro Glu Ser Thr Ala Glu Phe Asn

225 230 235 240

Asp Ser Asp Ser Gly Ile Ser Leu Asn Thr Ser Pro Ser Val Ala Ser
 245 250 255
 Pro Glu His Ser Val Glu Ser Ser Ser Tyr Gly Asp Thr Leu Leu Gly
 260 265 270
 Leu Ser Asp Ser Glu Val Glu Glu Leu Asp Ser Ala Pro Gly Ser Val
 275 280 285
 Lys Gln Asn Gly Pro Lys Thr Pro Val His Ser Ser Gly Asp Met Val
 290 295 300

 Gln Pro Leu Ser Pro Ser Gln Gly Gln Ser Thr His Val His Asp Ala
 305 310 315 320
 Gln Cys Glu Asn Thr Pro Glu Lys Glu Leu Pro Val Ser Pro Gly His
 325 330 335
 Arg Lys Thr Pro Phe Thr Lys Asp Lys His Ser Ser Arg Leu Glu Ala
 340 345 350
 His Leu Thr Arg Asp Glu Leu Arg Ala Lys Ala Leu His Ile Pro Phe
 355 360 365
 Pro Val Glu Lys Ile Ile Asn Leu Pro Val Val Asp Phe Asn Glu Met

 370 375 380
 Met Ser Lys Glu Gln Phe Asn Glu Ala Gln Leu Ala Leu Ile Arg Asp
 385 390 395 400
 Ile Arg Arg Arg Gly Lys Asn Lys Val Ala Ala Gln Asn Cys Arg Lys
 405 410 415
 Arg Lys Leu Glu Asn Ile Val Glu Leu Glu Gln Asp Leu Asp His Leu
 420 425 430
 Lys Asp Glu Lys Glu Lys Leu Leu Lys Glu Lys Gly Glu Asn Asp Lys
 435 440 445

 Ser Leu His Leu Leu Lys Lys Gln Leu Ser Thr Leu Tyr Leu Glu Val
 450 455 460
 Phe Ser Met Leu Arg Asp Glu Asp Gly Lys Pro Tyr Ser Pro Ser Glu
 465 470 475 480
 Tyr Ser Leu Gln Gln Thr Arg Asp Gly Asn Val Phe Leu Val Pro Lys
 485 490 495

Ser Lys Lys Pro Asp Val Lys Lys Asn

500

505