



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0011588
(43) 공개일자 2017년02월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0104437
(22) 출원일자 2015년07월23일
심사청구일자 2015년07월23일

(71) 출원인
서강대학교산학협력단
서울특별시 마포구 백범로 35 (신수동, 서강대학교)
(72) 발명자
차혁진
서울특별시 강남구 선릉로130길 19 (삼성동, 서광아파트) 서광아파트 101동 106호
(74) 대리인
윤대웅, 공병욱

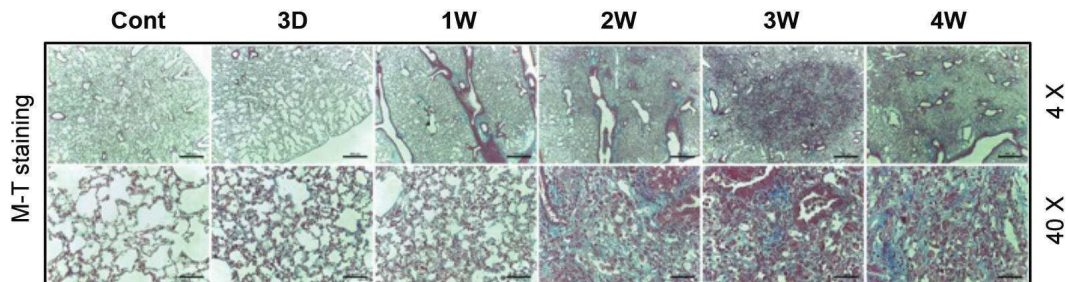
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 방사선-유발 폐 섬유증의 진단방법 및 이를 이용한 진단키트

(57) 요약

본 발명은 (a) 본 발명은 방사선-유발 폐섬유증 진단을 위한 정보제공방법 및 이를 이용한 진단키트에 관한 것이다. 본 발명자들은 폐암을 치료하기 위한 3차원 방사선 조사 (3DRT) 요법의 부작용인 방사선-유발 폐섬유증의 조기 진단마커로서 miR-2를 규명하였으며, 이를 이용하여 방사선 조사에 의해 유발되는 폐 섬유증을 조기 진단할 수 있다. 폐 섬유증은 명확한 치료방법이 없어 조기 진단 및 관리가 중요하며, 본 발명의 진단방법은 조기에 방사선-유발 폐 섬유증을 진단할 수 있으므로 폐암환자의 폐 섬유증에 의한 사망률을 감소시키는데 기여할 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

G01N 33/5044 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201433032

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국원자력의학원

연구사업명 원자력 연구기반 확충 사업

연구과제명 방사선 폐암 부작용의 줄기세포 기반 세포치료 연구

기 여 율 40/100

주관기관 서강대학교

연구기간 2014.12.01 ~ 2015.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201421038

부처명 교육부

연구관리전문기관 (재)한국연구재단

연구사업명 중점 연구소 지원 사업

연구과제명 세포 손상 제어 소재 발굴

기 여 율 40/100

주관기관 서강대학교

연구기간 2014.09.01 ~ 2015.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201453011

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술연구개발사업

연구과제명 미분화 만능줄기세포의 선택적 세포사멸 유도에 의한 테라토마 형성 억제연구

기 여 율 20/100

주관기관 서강대학교

연구기간 2014.12.01 ~ 2015.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 진단하고자 하는 개체로부터 분리된 검체에서 miRNA-21의 발현율을 측정하는 단계; 및 (b) 정상 검체와 비교하여 상기 miRNA-21의 발현이 증가하는 경우 방사선-유발 폐 섬유증(radiation-induced lung fibrosis: RILF)인 것으로 판단하는 단계를 포함하는 방사선-유발 폐섬유증 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 정보제공방법은 검체 내의 콜라겐 생성 증가여부를 측정하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 정보제공방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 정보제공방법은 ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1), α-SMA (alpha-smooth muscle actin), FN (fibronectin) 및 p21CIP1으로 구성된 군에서 선택된 1 이상의 발현 증가여부를 측정하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 정보제공방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 ICAM-1, α-SMA, FN 및 p21CIP1의 발현은 방사선 용량 의존적으로 증가하는 것을 특징으로 하는 정보제공방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 검체는 세포 또는 조직인 것을 특징으로 하는 정보제공방법.

청구항 6

진단하고자 하는 개체로부터 분리된 검체에서 miRNA-21의 발현율을 측정하며, 정상 검체와 비교하여 상기 miRNA-21의 발현이 증가하는 경우 방사선-유발 폐 섬유증(radiation-induced lung fibrosis: RILF)인 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는 방사선-유발 폐섬유증 진단키트.

청구항 7

다음의 단계를 포함하는 방사선-유발 폐 섬유증(radiation-induced lung fibrosis: RILF) 치료물질의 스크리닝 방법:

(a) 방사선-조사된(exposed) 폐 세포 또는 조직에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 세포 또는 조직 내의 miRNA-21의 발현율을 분석하는 단계,

시험물질을 접촉시키지 않은 대조군과 비교하여, 상기 시험물질을 처리한 세포 또는 조직 내의 miRNA-21의 발현이 감소하는 경우, 방사선-유발 폐 섬유증의 치료물질로 판단한다.

청구항 8

miRNA-21 억제제를 유효성분으로 포함하는 방사선-유발 폐 섬유증의 치료 또는 억제용 약제학적 조성물.

청구항 9

상기 제 8 항에 있어서, 상기 miRNA-21 억제제는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

상기 제 8 항에 있어서, 상기 miRNA-21 억제제는 서열목록 제2서열 또는 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

상기 제 9 항에 있어서, 상기 올리고뉴클레오타이드는 서열목록 제5서열로 구성되는 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 방사선-유발 폐 섬유증의 진단방법 및 이를 이용한 진단키트에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 방사선-유발 폐 섬유증의 바이오마커를 이용한 진단방법/진단키트 및 상기 바이오마커를 이용한 방사선-유발 폐 섬유증의 치료 또는 억제조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 방사선성 폐렴(Radiation pneumonitis)은 정위 몸체 방사선 요법(stereotactic body radiotherapy, SBRT) 이후 가장 일반적으로 나타나는 합병증으로서, 가벼운 증상부터 심각한 증상까지 그 증상의 범위가 다양하다. 특히 섬유증(fibrosis), 즉 방사선-유발 폐 섬유증(radiation-induced lung fibrosis: RILF)은 섬유아세포, 근섬유아세포 및 백혈구의 축적으로 인해 나타나며, 콜라겐 등의 세포외 기질단백질이 증가하고, 호흡 장애로 인하여 생명의 위협을 나타내는 매우 심각한 합병증이다[1-3]. 그럼에도 불구하고, 병원성 반응이 시작되기 전 방사선-유발 폐 섬유증의 위험성이 높은 환자들에게 있어 스테로이드성 항염증 약물은 유일한 의학적 수단이 되어 왔으나, 방사선 유발 폐 섬유증에 대한 초기 진단 마커가 잘 알려져 있지 않아, 시기 적절한 치료가 어려운 형편이다. 따라서 방사선-유발 폐 섬유증의 대체 치료방법을 개발하기 위해서는 방사선-유발 폐 섬유증의 초기 마커를 동정하는 것뿐 만 아니라, 발병에 대한 분자적 메커니즘을 이해하는 것이 매우 중요하다[4-6].

[0004] 방사선-유발 폐 섬유증의 발병에는 다양한 세포타입의 복잡한 과정이 관여한다[1]. 간엽 세포의 축적이 증가함에 따라 콜라겐의 생성이 증가하는 것은 방사선-유발 폐 섬유증에서 전형적으로 나타나는 일이다. 다양한 기원(origin)으로부터 유래한 근섬유아세포 또는 섬유아세포는 병리생리학적(pathophysiological) 섬유증 반응에서 중요한 역할을 한다. 따라서 간엽 세포의 축적 또는 콜라겐의 생성을 조절하는 방법은 방사선-유발 폐 섬유증의 새로운 치료방법이 될 것이다. 최근 연구에서는 이온화 방사선(ionizing radiation, IR) 또는 블레오마이신(bleomycin)이 내피성-간엽성 전환(endothelial-to-mesenchymal transition; EndMT or EndoMT) 과정에서 내피세포(endothelial cell)를 손상시켜 섬유아세포와 같은 세포특성을 나타내도록 한다는 것이 밝혀졌다[7-9]. 알파-평활근 액틴(alpha-smooth muscle actin, α -SMA), 비멘틴(vimentin) 및 섬유아세포-특이 단백질-1(FSP-1) 과 같은 간엽 마커가 밝혀졌을 뿐만 아니라, 타입 I 또는 타입 II 등의 콜라겐 생성이 현저히 증가하며, 이로 인해 섬유화 반응이 나타난다.

[0005] MicroRNAs (miRNAs)는 작은 비코딩 RNA로서, 특정 mRNA 타겟에 결합하여 번역을 억제하거나 mRNA를 분해시킴으

로써 타겟 단백질의 발현을 억제시키고, 다양한 병리생리학적 조건 하에서 상향조절 또는 하향조절된다. 따라서, 어떠한 miRNA의 발현 레벨은 혈액, 혈청, 뇨 및 침과 같은 체액에서 즉시 결정될 수 있어서, 많은 특이 질병의 초기 진단을 위한 바이오마커로서 적용가능하여 매우 광범위하게 연구되었다[10-12]. 또한 miRNA의 발현 이상은 타겟 단백질 발현과 밀접하게 연관되어 있으며, miRNA는 또한 질병상태에 있어 병리생리학적 반응의 개시와 관련된다. 예컨대, miR-21은 만성 염증성 상태 또는 TGF- β (transforming growth factor β)에 의해 발현이 상향조절되며, 폐[13], 심장[14] 및 간[15]과 같은 다양한 조직에서 섬유화 반응을 일으킨다. 특히, miR-21은 레벨은 특발성 폐 섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF) 환자뿐 만 아니라 블레오마이신-처리 마우스의 폐에서 현저히 증가하였다[13].

[0006] 본 발명자들은 정위 몸체 방사선 요법(SBRT)에 의한 폐손상과 유사한 환경을 만들기 위하여 화상-안내 동물 조사 시스템[16]을 이용하였으며, 손상된 폐에서의 분자적 기전을 연구하였다. miRNA 어레이를 통하여, 방사선에 의해 손상된 폐 영역에서 miR-21 증가현상이 나타나며, 이로 인해 방사선 손상 후 간엽 세포 타입에서 콜라겐 생성이 증가함을 밝혔다. 본 발명의 연구결과를 통하여 정위 몸체 방사선 요법으로 인해 나타나는 miR-21 증가를 통해 폐섬유화의 진행을 진단할 수 있으며 증가된 miR-21을 억제시켜 방사선-유발 폐 섬유증 및 이와 연관된 병리학적 증상을 효과적으로 치료할 수 있을 것으로 예상된다.

[0008] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명자들은 3차원 방사선 조사 (3DRT) 치료법의 부작용으로 나타나는 방사선-유발 폐 섬유증(radiation-induced lung fibrosis: RILF)을 억제 또는 제어할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 방사선 유발 폐섬유증의 초기 진단 바이오 마커로서 miR-21을 발견하였으며, antisense miR-21을 이용하여 miR-21를 억제시킨 경우 방사선 유발 폐 섬유증의 주원인인 콜라겐 합성을 억제할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0011] 따라서, 본 발명의 목적은 방사선-유발 폐 섬유증 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 방사선-유발 폐 섬유증 진단키트를 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 방사선-유발 폐 섬유증 치료물질의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 miRNA-21 억제제를 유효성분으로 포함하는 방사선-유발 폐 섬유증의 치료 또는 억제용 약제학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0016] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0018] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 진단하고자 하는 개체로부터 분리된 검체에서 miRNA-21의 발현을 측정하는 단계; 및 (b) 정상 검체와 비교하여 상기 miRNA-21의 발현이 증가하는 경우 방사선-유발 폐 섬유증(radiation-induced lung fibrosis: RILF)인 것으로 판단하는 단계를 포함하는 방사선-유발 폐섬유증 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0020] 본 발명자들은 3차원 방사선 조사 (3DRT) 치료법의 부작용으로 나타나는 방사선-유발 폐 섬유증(radiation-induced lung fibrosis: RILF)을 억제 또는 제어할 수 있는 방법을 개발하고자 예의 연구노력한 결과, 방사선

유발 폐섬유화증의 조기 진단 바이오 마커로서 miR-21을 발견하였다. 또한 antisense miR-21을 이용하여 miR-21을 억제시킨 경우 방사선 유발 폐 섬유증의 주원인인 콜라겐 합성을 억제할 수 있음을 확인하였다.

[0021] 방사선-유발 폐 섬유증은 폐암 방사선 치료법이 정상 조직에 미치는 가장 심각한 부작용으로서, 폐암 방사선요법을 인체에 적용하기 위해 극복해야할 주요 기술적 장애이다. 방사선 치료 시 나타나는 만성 염증반응이 세포외 기질의 과잉축적에 영향을 미치는지에 대한 근거가 부족함에도 불구하고, 지속적인 섬유증의 자세한 분자적 기전에 대해서는 설명이 가능하다. 본 발명에서는 정위 몸체 방사선 요법(SBRT)에 의한 폐손상과 유사한 환경을 만들기 위하여 화상-안내 동물 조사 시스템을 이용하였으며, 방사선 손상 후에 나타나는 만성 섬유화 반응의 분자적 특징을 연구하였다. 손상된 폐 조직의 microRNA 어레이를 통하여, SBRT에 의해 특정 miRNA 발현이 증가함을 발견하였으며, 특히 miR-21의 증가는 콜라겐 축적을 유도하였다. miR-21의 억제제인 antagomir는 폐의 내피세포에서 내피성-전엽성 전이(epithelial-mesenchymal transition, EMT) 과정에 거의 영향을 주지 않았으며, 폐의 섬유아세포에서 콜라겐 합성을 현저히 감소시켰다. 이러한 결과를 뒷받침하기 위해, 폐 섬유아세포에서 miR-21의 이소성 발현만으로 섬유화 반응이 촉진됨을 확인하였다. 상기 결과들은 miR-21 증가가 방사선 손상된 부위에서 간엽성 세포의 섬유화 반응에 영향을 준다는 것을 의미한다. 따라서, miR-21의 로컬 타겟팅(local targeting)은 방사선-매개된 폐 섬유증을 완화시키는데 유용한 치료적 도구로 사용될 수 있을 것이다.

[0022] 본 발명의 검출대상인 miR-21은 microR-21; miRNA21; hsa-mir-21; 또는 MIRN21 와 동일한 의미로 사용된다. microRNAs (miRNAs)는 짧은 비코딩 RNA로서 다양한 생물체에서 유전자 발현의 전사후 조절에 관여하며, mRNA의 안정성 및 번역에 영향을 준다. miRNAs는 RNA 폴리머라아제 II에 의해 전사되며, 단백질 코딩 또는 비코딩될 수 있는 pri-miRNAs (capped and polyadenylated primary transcripts)의 일부이다. 1차 전사체(primary transcript)는 Drosha 리보뉴클라아제 III 효소에 의해 절단되어 약 70-nt stem-loop 전구체 miRNA (pre-miRNA)를 생성하며, 이어 세포질의 Dicer 리보뉴클라아제에 의해 절단되어 성숙한 miRNA 및 안티센스 miRNA star (miRNA*) 생성물을 형성한다. 이러한 성숙한 miRNA는 RISC (RNA-induced silencing complex)에 포함되어, 불완전한 염기쌍을 가진 miRNA를 통하여 타겟 mRNA를 인지한다. 그 결과로서 타겟 mRNA의 번역 억제 또는 불안정화가 나타난다.

[0023] 본 발명의 검출대상인 miRNA-21 는 서열목록 제1서열로 표시되며, Accession Number: NR_029493 이다. miRNA-21 유사체인 miR-21-3p 및 miR-21-5p의 서열은 각각 서열목록 제2서열 및 제3서열로 표시된다.

[0024] 본 발명에서 방사선-유발 폐 섬유증(radiation-induced lung fibrosis: RILF)은 폐암환자에게 시행되는 주요한 치료법중 하나인 3차원 방사선 조사 (3DRT)를 통한 치료법의 부작용으로 나타나는 질환이다. 이 질환은 넓게는 특발성 폐 섬유증의 하위개념에 포함되지만, 그 발병원인에 있어 뚜렷한 특징을 나타낸다. 즉, 특발성 폐 섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis)은 환경, 바이러스 등 다양한 원인에 의해 발생할 것으로 추측되나 그 원인이 뚜렷하지 않으나, 방사선-유발 폐 섬유증은 방사선 조사에 의해 유발된다는 차이점이 있다.

[0025] 본 발명에서 용어 “진단하고자 하는 개체”는 방사선-유발 폐 섬유증이 이미 발생한 대상 또는 방사선-유발 폐 섬유증을 갖기 쉬운 대상을 포함하며, 포유동물일 수 있다. 바람직한 포유동물은, 예를 들면, 인간, 인간이 아닌 영장류, 마우스, 래트, 개, 고양이, 말, 및 소를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0026] 본 발명의 방법을 실시하기 위하여, 진단하고자 하는 개체로부터 검체(생물학적 시료)를 수집할 수 있으며, 이로부터 상기 방사선-유발 폐 섬유증 조직/세포와 정상 조직/세포에서 miRNA-21의 발현량을 측정할 수 있다.

[0027] 본 발명의 방사선-유발 폐 섬유증 진단을 위한 정보제공방법은 진단을 위하여 검체로부터 miRNA-21의 발현율을 측정할 수 있으며, 이 경우 miRNA-21의 mRNA 레벨의 발현율을 측정할 수 있다. mRNA 레벨은 예컨대 실시간 PCR, RT-PCR, 노던 블로팅(northern blotting), 마이크로어레이(microarray), NPA (nuclease protection assay (NPA) 또는 인 시투 하이브리다이제이션(in situ hybridization)을 이용할 수 있으며 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 상술한 방법으로서 miRNA-21의 발현율을 측정하여, 정상 검체와 비교하여 miRNA-21 발현이 증가하는 경우 방사선-유발 폐 섬유증인 것으로 판단한다.

[0029] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 검체 내의 콜라겐 생성 증가여부를 측정하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다. 방사선-유발 폐 섬유증은 섬유아세포, 근섬유아세포 및 백혈구의 축적으로 인해 나타나며, 콜라겐 등의 세포외 기질단백질이 증가하는 특징이 있다. 따라서, 검체 내의 타입 I 또는 타입 II 콜라겐의 생성이 증가하는 경우 방사선-유발 폐 섬유증이 진행 또는 악화 중임을 알 수 있다.

- [0030] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 방법은 ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1), α -SMA (alpha-smooth muscle actin), FN (fibronectin) 및 p21CIP1으로 구성된 군에서 선택된 1 이상의 발현 증가여부를 측정하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다. 예컨대, 이온화방사선(IR)을 조사하여 인간 폐 미세혈관의 내피세포(human pulmonary microvascular endothelial cell, HPMEC)의 EndMT를 재현한 경우, 이들 세포에서 ICAM-1, α -SMA 또는 FN의 발현 레벨이 증가하는 경우, 섬유화 반응이 나타나는 것으로 판단할 수 있다. ICAM-1, α -SMA 및 FN은 간염성 마커이다(도 3a 참조). 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 ICAM-1, α -SMA, FN 및 p21CIP1의 발현은 방사선 용량 의존적으로 증가하는 경향을 나타낸다(도 3b 참조). 상승한 콜라겐 생성 여부 및 ICAM-1, α -SMA 또는 FN의 발현 레벨은 mRNA 레벨 또는 단백질 레벨을 측정하는 유전자 증폭방법, 면역 분석방법 또는 혼성화법을 이용하여 확인할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 진단하고자 하는 개체로부터 분리된 검체에서 miRNA-21의 발현율을 측정하며, 정상 검체와 비교하여 상기 miR-21의 발현이 증가하는 경우 방사선-유발 폐 섬유증(radiation-induced lung fibrosis: RILF)인 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는 방사선-유발 폐 섬유증 진단키트를 제공한다.
- [0033] 본 발명의 진단키트는 상술한 원발성 갑상선암 전이진단을 위한 정보제공방법을 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재 생략한다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 방사선-유발 폐 섬유증(radiation-induced lung fibrosis: RILF) 억제 또는 치료물질의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0036] (a) 방사선-조사된(exposed) 폐 세포 또는 조직에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및
- [0037] (b) 상기 세포 또는 조직 내의 miRNA-21의 발현율을 분석하는 단계,
- [0038] 시험물질을 접촉시키지 않은 대조군과 비교하여, 상기 시험물질을 처리한 세포 또는 조직 내의 miRNA-21의 발현이 감소하는 경우, 방사선-유발 폐 섬유증의 억제 또는 치료물질로 판단한다.
- [0039] 본 발명의 스크리닝 방법은 시험물질의 존재 및 부재하에서 miRNA-21의 발현율을 비교분석하는 방법으로서 방사선-유발 폐 섬유증 억제물질을 스크리닝하는데 유용하게 사용될 수 있다. 즉, 시험물질을 접촉시키지 않은 대조군과 비교하여, 시험물질을 처리한 세포 내의 miRNA-21의 발현이 감소하는 경우, 상기 시험물질을 방사선-유발 폐 섬유증 억제물질로 판단할 수 있다.
- [0041] 본 발명을 각각의 단계 별로 상세하게 설명하면 다음과 같다:
- [0042] 단계 (a): 방사선-조사된(exposed) 폐 세포 또는 조직과 시험물질의 접촉
- [0043] 우선, 방사선-조사된(exposed) 폐 세포 또는 조직에 시험물질을 처리한다.
- [0044] 상기 시험물질은 방사선-조사된(exposed) 폐 세포와 접촉하여, 폐 세포의 섬유화 반응에 영향을 준다.
- [0045] 상기 접촉은 인 비트로 또는 인 비보 상에서 수행될 수 있으며, 예컨대 상기 방법이 (1) 인 비트로 분석방법일 경우에는 상기 세포 및 시험물질을 인 비트로 상(예컨대, 세포 배양 플레이트)에서 결합시켜 수행할 수 있고, (2) 인 비보 분석방법일 경우에는 방사선-조사된(exposed) 폐 세포가 내재된 인 비보 상의 개체에 상기 시험물질을 투여하여, 상기 세포와 시험물질을 접촉을 유도할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 방사선-유발 폐 섬유증 억제물질의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 시험물질은 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA), miRNA, 펩타이드, 단백질, 항체 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0047] 본 발명의 miRNA-21 발현 억제 활성 평가방법에 의해 분석되는 시험물질이 화합물인 경우, 상기 화합물은 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물)일 수 있다. 시험물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예컨대, 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(UK), Comgenex(USA), Brandon

Associates(USA), Microsource(USA) 및 Sigma-Aldrich(USA)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(USA) 및 MycoSearch(USA)에서 상업적으로 구입 가능하다. 시험 물질은 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레스able 패러렐 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, “1-비드 1-화합물” 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6909, 1993; Erb et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37, 2678, 1994; Cho et al., Science 261, 1303, 1993; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2059, 1994; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2061; Gallop et al., J. Med. Chem. 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.

- [0048] 한편, 본 발명의 스크리닝 방법에 있어서, 시험물질은 검출가능한 표지(detectable label)로 레이블링될 수 있다. 예를 들어, 상기 검출가능한 표지(detectable label)는, 화학적 표지(예컨대, 바이오틴), 효소 표지(예컨대, 호스래디쉬 퍼옥시다아제, 알칼린 포스파타아제, 퍼옥시다아제, 루시페라아제, β -갈락토시다아제 및 β -글루코시다아제), 방사능 표지(예컨대, C14, I125, P32 및 S35), 형광 표지[예컨대, 쿠마린, 플루오레세인, FITC(fluorescein Isothiocyanate), 로다민 6G(rhodamine 6G), 로다민 B(rhodamine B), TAMRA(6-carboxy-tetramethyl-rhodamine), Cy-3, Cy-5, Texas Red, Alexa Fluor, DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole), HEX, TET, Dabsyl 및 FAM], 발광 표지, 화학발광(chemiluminescent) 표지, FRET(fluorescence resonance energy transfer) 표지 또는 금속 표지(예컨대, 금 및 은)이다.
- [0049] 검출가능한 표지가 레이블링된 시험물질을 이용하는 경우, 시험물질의 세포 내 위치 또는 특정 단백질과의 결합 여부는 표지로부터 나오는 시그널을 검출하여 분석할 수 있다. 예를 들어, 표지로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질을 이용하여 시그널을 검출한다. 표지로서 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌과 같은 기질을 이용하여 시그널을 검출한다.
- [0050] 상기 세포 또는 조직에 조사되는 방사선량은 0 - 200 Gy 범위이며, 본 발명의 일 구현예에 따르면 0 - 100 Gy 범위일 수 있다.
- [0051] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 조직에 조사되는 상기 방사선량은 80 - 100 Gy 이며 세포에 조사되는 방사선량은 0 Gy - 30 Gy이다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면 조직에 조사되는 상기 방사선량은 90 Gy 이며 세포에 조사되는 방사선량은 0 - 20 Gy이다.
- [0053] 단계 (b): miRNA-21의 발현을 분석
- [0054] 이어, 세포 또는 조직 내의 miRNA-21의 발현을 분석한다.
- [0055] 본 발명에 따르면, 상기 시험물질이 처리된 세포 또는 조직의 miRNA-21의 mRNA 레벨을 분석함으로써 실시할 수 있다. 시험물질을 접촉시키지 않은 대조군과 비교하여, 상기 시험물질을 처리한 세포 내의 miRNA-21의 발현이 감소하는 경우, 방사선-유발 폐 섬유증 억제물질로 판단한다.
- [0056] 본 발명의 일 예에 따르면, 본 발명의 스크리닝 방법은 방사선에 의한 손상 여부를 측정하는 방법으로 ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1) 및 p21CIP1의 발현 증가여부를 추가적으로 포함할 수 있으며, 또는 방사선에 의한 EndoMT 여부를 확인하는 방법으로 α -SMA (alpha-smooth muscle actin) 또는 FN (fibronectin)의 발현 증가여부를 측정하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0058] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 miRNA-21 억제제를 유효성분으로 포함하는 방사선-유발 폐 섬유증의 치료 또는 억제용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0059] 본 발명에서 용어 "miRNA-21 억제제 또는 저해제"는 세포 내에서 miRNA-21의 발현 또는 활성을 감소시키는 물질

을 의미하는 것으로서, 보다 상세하게는 miRNA-21에 직접적으로 작용하거나 또는 miRNA-21의 상위 조절자에 간접적으로 작용하여 miRNA-21의 발현을 전사 수준에서 감소시키거나; 발현된 miRNA-21의 분해를 증가시키거나, 그 활성을 방해함으로써, 마이크로RNA-21의 발현 수준 또는 그 활성을 감소시키는 물질을 의미한다.

[0060] 본 발명에서는 miRNA-21 유도(induction)를 억제하기 위하여 miRNA-21에 상보적인 염기서열을 가지고 있는 올리고뉴클레오타이드를 이용하였다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 miRNA-21 서열 중 전체(서열목록 제1서열) 또는 일부(서열목록 제2서열 또는 제3서열) 서열을 타겟으로 하며, 상기 올리고뉴클레오타이드가 miRNA-21 서열에 결합하면 miRNA-21의 기능이 억제된다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 miRNA-21 억제체는 서열목록 제2서열 또는 서열목록 제3서열의 뉴클레오타이드 서열에 대하여 상보적인 서열을 가지는 올리고뉴클레오타이드이며, 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 올리고뉴클레오타이드는 서열목록 제5서열로 구성된다.

[0061] 본 명세서에서 올리고뉴클레오타이드를 언급하면서 사용되는 용어 “상보적”은 소정의 혼성화 또는 어닐링 조건, 바람직하게는 생리학적 조건 하에서 올리고뉴클레오타이드가 miRNA-21에 선택적으로 혼성화 할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary) 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 것을 모두 포괄하는 의미를 가지며, 바람직하게는 완전히 상보적인 것을 의미한다.

[0062] 본 발명에서 올리고뉴클레오타이드는 다양한 분자를 포함한다. 본 발명에서 사용할 수 있는 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥 또는 이중 가닥의 올리고뉴클레오타이드를 모두 포함하며, 길이는 특별히 한정되지 않는다. 바람직하게는 상기 올리고뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드, 디옥시리보뉴클레오타이드, 2'-O-변형 올리고뉴클레오타이드, 포스포로티오에이트-백본 디옥시리보뉴클레오타이드, PNA(peptide nucleic acid) 또는 LNA(locked nucleic acid)이며, 보다 바람직하게는 리보뉴클레오타이드이다.

[0063] 상기 리보뉴클레오타이드는 당업계에서 디자인, 제작할 수 있는 다양한 종류의 리보뉴클레오타이드를 포함하며, 예컨대 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA (short interfering RNA) 또는 shRNA (small hairpin RNA)를 사용할 수 있다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 타겟으로 하는 유전자 또는 RNA의 씨드 서열에 대한 상보적인 서열을 가지고 있어 DNA 또는 RNA와 이합체(duplex)를 형성할 수 있는 핵산-기반 분자를 포괄한다. miR-21 발현을 억제하기 위하여 적합한 올리고뉴클레오타이드의 길이는 7-50 뉴클레오타이드, 바람직하게는 10-40 뉴클레오타이드, 보다 바람직하게는 15-30 뉴클레오타이드, 보다 더 바람직하게는 15-25 뉴클레오타이드, 보다 더욱 더 바람직하게는 20-25 뉴클레오타이드이다.

[0064] 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 적어도 20-25 뉴클레오타이드 서열을 포함하도록 구성되며, 예컨대 적어도 20-23 뉴클레오타이드를 포함하거나, 적어도 21-22 뉴클레오타이드를 포함하도록 구성된다.

[0065] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 22 뉴클레오타이드이며 세포의 투과성을 높이기 위해 세포 투과성 펩타이드를 포함하는 안티센스 miRNA-21 (서열목록 제5서열)을 사용하였다.

[0066] 본 발명에서 안티센스 miRNA-21를 통한 miRNA-21을 억제를 통해 폐섬유화를 억제하였으며 이 때 사용한 안티센스 miRNA-21은 miRNA-21의 특정 서열인UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA 서열을 타겟팅하도록 디자인되었다. 즉, 바람직하게는 상기 miRNA-21 서열과 상보적인 올리고뉴클레오타이드(예컨대, 안티센스 miRNA-21)는 서열목록 제1서열의 뉴클레오타이드 서열에서 8번째 내지 29번째 서열에 상보적인 서열을 포함한다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 본 발명에 사용한 안티센스 miRNA-21의 서열은 TCAACATCAGTCTGATAAGCTA 이다.

[0067] 한편, 상기 안티센스 miRNA-21는 추가적으로 세포 내로의 투과성을 높여주는 펩타이드가 추가적으로 결합될 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 펩타이드는 RRRQRKKR의 아미노산 서열을 추가적으로 포함하며, 바람직하게는 상기 아미노산 서열은 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 5'에 결합된다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 상기 펩타이드 서열을 포함하는 안티센스 miRNA-21는 RRRQRKKR-X-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA 이다. RRRQRKKR는 세포 투과성을 높이는 펩타이드 서열이며 링커(linker, X)를 통해 본 안티센스 올리고뉴클레오타이드 서열과 연결되어 있다.

[0068] 본 발명의 안티센스 miRNA-21의 전체적인 구조에서, 상기 링커는 상기 세포투과성 증진 펩타이드 및 안티센스 miRNA-21을 인위적으로 연결하는 작용을 하는 일정 길이의 아미노산 서열을 의미한다. 상기 링커로서 이용되는 것은 당업계에 공지된 어떠한 펩타이드 링커도 포함한다. 이 펩타이드 링커는 세포투과성 펩타이드 및 안티센스 miRNA-21를 충분한 거리로 이격시킨다. 바람직한 펩타이드 링커는 Ala, Glu, Gly, Asn 또는 Ser 잔기를 포함한다. Thr과 같은 다른 중성 아미노산들도 링커 서열에 포함될 수 있다. 링커에 적합한 아미노산 서열은 Maratea et al., Gene 40:39-46(1985); Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-

8562(1986); 미국 특허 제4,935,233호, 제4,751,180호 및 제5,990,275호에 개시되어 있다. 링커 서열은 1-50 아미노산 잔기로 구성될 수 있으며, 예컨대 1-40 아미노산 잔기, 1-30 아미노산 잔기, 1-20 아미노산 잔기, 1-10 아미노산 잔기 또는 1-5 아미노산 잔기로 구성될 수 있다. 본 발명의 일 구현예에 따르면, 상기 링커는 알라닌 및 글루탐산으로 구성되었으며, 예시적인 링커 서열로서, miRNC 와 miR21 모두 AEEA linker를 포함하고 있다.

[0069] 본 발명자들은 방사선 조사 후 유전자 발현의 분석을 통해 miR-21의 발현이 증가됨을 발견하였으며, 이는 방사선 조사 후 증가된 miR-21이 폐섬유증을 유발시킴을 나타낸다. 이를 통해 폐암 환자의 방사선 치료 후 발생하는 폐 섬유증을 miR-21의 억제제 (anti-sense 염기서열)를 이용하여 완화시킬 수 있음을 알 수 있다. 하기의 실시예에서 입증된 바와 같이, 본 발명의 올리고뉴클레오타이드는 miR-21을 억제하여 방사선 유발 폐섬유증의 주원인인 콜라겐 합성을 억제하고, 결과적으로 폐 조직의 섬유화 반응을 억제시켜 방사선 유발 폐 섬유증을 완화 또는 치료한다.

[0070] 본 발명의 약제학적 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

[0071] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여인 경우에는 정맥 내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 또한, 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 바람직하게는 진피 또는 피하 주입을 위한 주사제 형태로 제조된다.

[0072] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 1일 투여량은 예컨대 0.0001-1000 mg/kg이며, 바람직하게는 30-50 mg/kg이다. siRNA, 안티센스뉴클레오타이드 등의 올리고뉴클레오타이드를 사용하는 경우, 세포내에 투여될 siRNA 발현벡터 또는 siRNA의 적정 수는 상태에 따라 다르나 세포에서의 최종농도가 50 nM 내지 100 nM 정도로 하는 것이 바람직하다.

[0073] 상기 조성물에 함유되는 화합물, 올리고뉴클레오타이드, 단백질 또는 그 저해제의 유효 투여량의 범위는 성별, 중증도, 연령, 투여방법, 표적 세포, 발현 수준 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0074] 본 발명의 약제학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액, 시럽제 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 산제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0076] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0077] (a) 본 발명은 방사선-유발 폐섬유증 진단을 위한 정보제공방법 및 이를 이용한 진단키트에 관한 것이다.

[0078] (b) 본 발명자들은 폐암을 치료하기 위한 3차원 방사선 조사 (3DRT) 요법의 부작용인 방사선-유발 폐섬유증의 조기 진단마커로서 miR-2를 규명하였으며, 이를 이용하여 방사선 조사에 의해 유발되는 폐 섬유증을 조기 진단할 수 있다.

[0079] (c) 폐 섬유증은 명확한 치료방법이 없어 조기 진단 및 관리가 중요하며, 본 발명의 진단방법은 조기에 방사선-유발 폐 섬유증을 진단할 수 있으므로 폐암환자의 폐 섬유증에 의한 사망률을 감소시키는데 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0081]

도 1a 내지 1c는 방사선-조사된 폐에서의 섬유화된 병변 부위를 나타낸 것이다. (A) 90Gy 방사선 조사 후 적절한 시기에 마우스 폐를 Masson's Trichrome으로 염색하였다. (B) 마이크로어레이실험 후 heatmap을 이용하여 다양한 콜라겐 유전자들을 나타낸 것이다(n=4). (C) XRAD320를 이용하여 90Gy 방사선 조사 후, GAPDH에 대한 Col1A2 mRNA 레벨을 실시간 PCR로 확인하였다(n=4, one-way ANOVA).

도 2a 내지 2d는 방사선 조사 후 폐에서 miR-21이 증가되었음을 보여준다. (A) microRNA 어레이 결과에 기반한 폐 섬유증-관련 miRNA의 트리다이어그램을 나타낸다. (B) taqman miRNA 실시간 PCR을 이용하여, 대조군과 비교한 miR-21 레벨 변화를 측정하였다. U6 snRNA는 내부 대조군으로 사용하였다(n=3, one-way ANOVA). (C) taqman miRNA 실시간 PCR을 이용하여, 90Gy 방사선 조사 후, 비처리된 폐와 비교한 miR-21 레벨을 측정하였다. U6 snRNA는 내부 대조군으로 사용하였다(n=4, one-way ANOVA). (D) 폐 조직에서 in situ hybridization을 수행하여, 스크램블 프로브(상부 패널) 또는 miR-21 프로브(중간 및 하부 패널)의 위치를 관찰하였다.

도 3a 내지 3e는 방사선이 인간 폐 내피세포(human pulmonary microvascular endothelial cells, HPMEC)에서 내피성-간엽성 전환(endothelial-to-mesenchymal transition; EndMT or EndoMT)을 일으키는 것을 나타낸다. HPMEC에 5 Gy 또는 20 Gy의 방사선을 조사하고, 3일 후 세포를 수거하였다. (A) 방사선 조사 후 방사선에 의한 손상 후 발현 유전자(ICAM-1)와 섬유아세포 발현 유전자(α -SMA, FN)의 mRNA 레벨을 실시간 PCR로 정량하였다. β -액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다(n=4, one-way ANOVA). (B) ICAM-1, α -SMA 및 p21의 레벨을 면역블로팅 분석으로 확인하였다. α -튜불린을 로딩 대조군으로 사용하였다. (C) HPMEC를 팔로이딘(녹색) 및 V-cadherin(적색)으로 염색하였다. DAPI는 핵 계수 염색으로 사용하였다. (D)콜라겐 유전자(Col1A2, Col3A1)의 mRNA 레벨을 실시간 PCR로 정량하였다. β -액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다(n=4, one-way ANOVA). (E) taqman miRNA 실시간 PCR을 이용하여 방사선 조사후의 miR-21 레벨변화를 측정하였다. U6 snRNA를 내부 대조군으로 사용하였다(n=4, one-way ANOVA).

도 4a 내지 4g 는 폐 내피세포에서 방사선-유발 섬유화반응이 EndMT를 통한 miR-21에 의해 거의 영향을 받지 않음을 보여준다. 리포펙타민2000을 이용하여 HPMEC를 miR-N.C 또는 miR-21 억제제 (500 nM)로 형질감염시키고, 다음날 5 Gy 방사선 조사 후, 3일 뒤 세포를 수거하였다(도 4a-4e). (A) miR-21 억제제에 의한 miR-21 레벨감소는 miRNA 추출(invitrogen) 및 taqman miRNA 실시간 PCR으로 확인하였다. U6 snRNA를 내부 대조군으로 사용하였다(n=4, two-way ANOVA). miR N.C는 RRRQRRKKR-X-CTCCCTTCAATC 로 표시되며, miR-21 억제제는 RRRQRRKKR-X-TCAACATCAGTCTGATAAGCTA 로 표시된다. X는 펩타이드 링커로서 AEEA linker 이다. (B) 실시간 PCR로서 방사선 마커인 ICAM-1 mRNA 레벨을 정량하였다. (C) 섬유아세포-발현 유전자(α -SMA 및 FN) mRNA 레벨을 실시간 PCR로 정량하였다. (D) 콜라겐 유전자(Col1A2 및 Col3A1) mRNA 레벨을 실시간 PCR로 정량하였다. β -액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다(n=4, two-way ANOVA). (E) HPMEC를 팔로이딘(녹색) 및 V-cadherin(적색)으로 염색하였다. DAPI는 핵 계수 염색으로 사용하였다. Dharmafect를 이용하여 HPMEC를 miR-21 유사체(has-mir-21-3p, -5p) (30 nM)로 형질감염시키고, 48시간 후 세포를 수거하였다(도 4f-4g). (F) taqman miRNA 실시간 PCR을 통하여 miR-21 레벨이 증가됨을 확인하였다. U6 snRNA를 내부 대조군으로 사용하였다(n=3, one-way ANOVA). (G) 섬유아세포-발현 유전자(α -SMA 및 FN) mRNA 레벨을 실시간 PCR로 정량하였다. β -액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다(n=3, one-way ANOVA).

도 5a 내지 5f 는 miR-21이 폐 섬유아세포에서 콜라겐 합성에 직접적으로 관여함을 나타낸다. 리포펙타민2000을 이용하여 MRC-5를 miR-21 억제제 (500 nM)로 형질감염시키고, 일정 시기에 세포를 수거하였다(도 5a-5c). (A) taqman miRNA 실시간 PCR을 이용하여 miR-21 레벨을 측정하였다. U6 snRNA를 내부 대조군으로 사용하였다(n=3, two-way ANOVA). (B) Col1A2 및 Col3A1 mRNA 레벨을 실시간 PCR로 정량하였다. β -액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다(n=3, two-way ANOVA). (C) Col3A1 레벨을 면역블로팅으로 확인하였으며, β -액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다. MRC-5를 miR-21 유사체(has-mir-21-3p, -5p) (30 nM)로 형질감염시키고, 48시간 후 세포를 수거하였다(도 5d-5f). (D) taqman miRNA 실시간 PCR을 이용하여 miR-21 레벨을 측정하였으며, U6 snRNA를 내부 대조군으로 사용하였다(n=3, two-way ANOVA). (E) Col1A2 및 Col3A1 mRNA 레벨을 실시간 PCR로 정량하였다. β -액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다(n=3, two-way ANOVA). (F) Col3A1 레벨을 면역블로팅으로 확인하였으며, β -액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다.

도 6a 내지 6d는 방사선-유발 폐 섬유증에 miRNA-21이 관여함을 나타낸다. (A) 방사선-유발 폐 섬유증과 관련된 miRNA를 동정하기 위하여 방사선 조사 후 3주 및 4주째의 샘플 및 대조군 샘플로부터 miRNA 발현의 스캐터 플롯을 비교한 결과(cut-off score = 2)이다. (B) 기존에 알려진 결과들을 토대로 Ingenuity Pathway Analysis (IPA)를 도식화한 결과 p53, PDCD4 그리고 SERPINB5 등과 같은 여러 메신저 RNA들이 miRNA-21과 상호작용을 하는 것을 나타낸 것이다. (C) 90Gy의 방사선이 조사된 마우스의 폐를 방사선 조사 후 3주와 4주후에 수거하여 miRNA 어레이를 수행한 결과를 나타낸 heat map이다. 이 때 방사선을 조사하지 않은 다른 쪽 폐를 대조군으로 사용하였다. (D) miRNA 어레이 결과 방사선 조사 후 유의미하게 증가되는 4가지의 miRNA를 실시간 PCR로 확인한 결과이다.

도 7a 내지 7b는 방사선 조사 후 HPMEC에서 miRNA-21의 증가를 나타낸다. (A) HPMEC 에 5Gy의 방사선을 조사하였을 때 FN, Col1A2 그리고 Col3A1의 발현이 시간에 비례하게 증가함을 나타낸다. (B) HPMEC에 20Gy의 방사선을 조사하였을 경우 miRNA-21의 발현이 시간에 비례하여 증가함을 나타낸다.

도 8은 HPMEC에서 miR-21의 과발현에 따른 콜라겐 생성율을 나타낸 것이다. HPMEC에 miRNA-21 유사체인 miR21-3p와 miR21-5p를 리포펙타민 2000을 이용하여 형질감염 시킨 후 2일 후에 수거하여 Col1A2과 Col3A1의 메신저 RNA의 레벨을 확인한 결과이며 b-actin의 mRNA 레벨이 대조군으로 사용되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0082] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0084] 실시예

[0085] 실험재료 및 실험방법

[0086] 시약 및 세포배양

[0087] ICAM-1 (sc-8439), p21 (sc-397), col3A1 (sc-28888), VE-cadherin (sc-9989), β -액틴 (sc-47778) 및 α -튜불린 (sc-8035)의 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Alexa Fluor 488 팔로이딘(A12397)은 life technology (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였다. 알파-평활근 액틴(α -SMA) (#a5228)의 1차 항체는 Sigma (St Louis, MO, USA)에서, miR-21-3p 또는 -5p 유사체는 Bioneer (Daejeon, South Korea)에서, miR N.C 또는 miR-21 억제제는 PANAGENE (Daejeon, South Korea, PN-1001, PI-1050)에서 구입하였다. 각각의 뉴클레오타이드 서열은 서열목록 제2서열 내지 제5서열로 표시되며, miR N.C 또는 miR-21 억제제는 5' 위치에 펩타이드(RRRQRRKKR)가 결합되어 있다. 인간 폐 내피세포는 37°C, 5% CO₂ 인큐베이터 조건 하에서 0.1 % 젤타마이신(Sigma)을 첨가한 MV2 배지 (c-22022, promocell, Heidelberg, Germany)에서 배양하였다.

[0089] 동물 모델 및 방사선 조사

[0090] 마우스를 이용한 모든 동물 실험은 연세대학교 의과대학 동물 관리 및 사용 위원회의 승인 하에 수행하였다. 이전 실험방법과 같이[16], 방사선-유발 폐섬유화증 연구를 위하여 C57BL/6 수컷 마우스(8주령)를 사용하였다. 정위 몸체 방사선 요법(SBRT)과 유사한 조건을 만들기 위하여, 3 mm 콜리메이터(collimator)로 마우스의 왼쪽 폐에 90Gy 용량의 방사선을 조사하여, 방사선 손상을 유도하였다. 각 마우스의 오른쪽 폐는 대조군으로 사용하였다. 초점 방사선 빔(focal radiation beam)을 생성하는 5 cm 두께 구리로 이루어진 콜리메이터 시스템이 장착된 X-RAD 320 (Precision, North Branford, CT, USA)를 이용하여 방사선을 조사하였다. 90Gy 폐 방사선 조사된 마우스를 매주 4 마리씩 희생시켰다.

[0092] MicroRNA 마이크로어레이 및 분석

[0093] Trizol 시약(Life technologies, Inc., Carlsbad, CA)을 이용하여 각 샘플로부터 전체 RNA를 분리하였다. 대조군 및 시험군 RNA를 만들기 위하여, Agilent사의 miRNA 라벨링 시약 및 Labeling Reagent and Hybridization

kit (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) 타겟 miRNA 프로브의 합성 및 혼성화를 수행하였다. 모든 데이터의 정규화 및 fold-changed 프로브의 선별은 GeneSpringGX 7.3 (Agilent Technologies)을 이용하여 수행하였다. 이후 데이터 변환(0.01 이하 세트 측정) 및 칩 당(75th 퍼센타일로 정규화함) 정규화를 수행하였다.

[0095] **TaqMan 실시간 PCR microRNA 어레이**

[0096] Trizol 시약(Invitrogen)을 이용하여 전체 RNA를 추출하였고, miRNA는 TaqMan 실시간 PCR microRNA assay (Applied Biosystems, Carlsbad, CA)를 이용하여 측정하였다. 특정 miRNA 발현을 정량화하기 위하여, 다양한 조직 샘플 및 세포에서 추출한 전체 RNA를 TaqMan microRNA Assay 키트 (Applied Biosystems, Carlsbad, CA)를 이용하는 실시간 PCR에 적용하여, miRNAs (miR-21; 000397, U6; 001937; Ambion, Austin, Tx)의 발현을 분석하였다.

[0098] **RNA 추출 및 정량적 실시간 PCR 분석**

[0099] 각 샘플의 전체 RNA는 Trizol 시약(Life technologies, Inc., Carlsbad, CA)을 이용하여 추출하였다. 유전자-특이적 프라이머는 다음과 같다: mouse col1a2 (forward: 5' -TGGTCTTACTGGGAACCTTGCTGC-3' , reward: 5' -ACCCTGTGGTCCAACGACTCCTCTC-3'), housekeeping gene mouse GAPDH (forward: 5' -TATGGAAAGCTGTGGCCTGG-3' , reward: 5' -CAGATGCCTGCTTCACCACCTTC-3'), human ICAM-1 (forward: 5' -CGTGGGAGAAGGAGCTGAA-3' , reward: 5' -CAGTGGCGGACGAGAAATTG-3'), human aSMA (forward: 5' -CATCACCAACTGGGACGACATGGAA-3' , reward: 5' -GCATAGCCCTCATAGATGGGGACATTG-3'), human fibronectin (FN) (forward: 5' -GTGTTGGGAATGGTCGTGGGGAATG-3' , reward: 5' -CCAATGCCACGCCATAGCAGTAGC-3'), human col1a2 (forward: 5' -GGTGGTGGTTATGACTTTGG-3' , reward: 5' -TCTGGGTGGCTGAGTCTCAA-3'), human col3a1 (forward: 5' -GCTCTGCTTCATCCCACTATTA-3' , reward: 5' -AACATTCTCCAAATG GAATT-3') 및 housekeeping gene human β -actin (forward: 5' -GTCCTCTCCCAAGTCCACAC-3' , reward: 5' -GGGAGACCAAAAGCCTTCAT-3').

[0100] 모든 증폭반응은 500 nmol/l 프라이머, 6 μ l 주형을 포함하는 pre-mixture (20 μ l)에서 수행되었으며, 반응조건은 다음과 같다: 변성 95°C, 1분; 이어 40 사이클 95°C/15초, 58°C/15초, 및 72°C/15초, 최종 연장반응 72°C/5분. PCR 검증을 위하여, 증폭산물을 2% 아가로스 젤 상에서 에디티움브로마이드 염색으로 확인하였다. 반응은 Roche LC480로 수행하였다.

[0102] **면역블로팅**

[0103] 차가운 PBS로 세포를 세척한 후, 조직 용해 버퍼를 첨가하고, 적어도 30분정도 얼음상에 두었다. 이후 13,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포 용해액을 수득하였다. 전체 단백질을 SDS-PAGE로 분리하였다. 이어 단백질을 PVDF 멤브레인에 옮긴 후, 0.05% Tween-20을 포함하는 Tris-buffered saline (TBS-T)을 이용한 5% nonfat dry milk 에서 1시간동안 블로킹하고, 4°C에서 1차 항체를 O/N 처리하였다. 항체 처리 후, TBS-T로 멤브레인을 여러 번 세척하고 HRP-conjugated 이차항체(0.1 μ Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)를 처리하였다. 면역활성은 화학발광분석 시스템(enhanced chemiluminescence detection system, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)을 이용하여 검출하였다.

[0105] **면역조직화학(IHC)**

[0106] 마우스 폐를 0.1 M 인산 버퍼(pH 7.4) 하의 4% 파라포름알데하이드에 고정한 후, 파라핀 조직샘플을 제작하였다. 파라핀 절편에서 파라핀을 모두 제거하고 탈수시킨 후, 시트레이트-기반 antigen retrieval 시스템에 적용하였다. 상기 절편에서 폐섬유를 관찰하기 위하여 masson's trichrome으로 염색하였다.

[0108] **In situ hybridization**

[0109] miRCURY LNATM microRNA ISH Optimization 키트 (FFPE)는 Exiqon (Vedbaek, Denmark)에서 구입하였다. in

situ 혼성화에는 3 μ M 두께 마우스 폐 조직을 이용하였고 모든 실험과정은 RNase-free 상태에서 진행되었다. miR-21에 대한 ISH 프로브 및 스크램블 대조군은 5' 및 3' 에 디옥시제닌(DIG)으로 표지하였다. U6는 양성대조군으로 사용하였으며, 5' 말단에만 표지하였다.

[0110] 조직 슬라이드에서 파라핀을 제거한 후 proteinase-K를 처리하였다. 프로브 혼성화, 엄격한 세척과정, 블로킹 과정을 차례로 수행하였다. 최종적으로 슬라이드에 항-DIG 시약, NBT/BCIP 기질 (nitro-blue tetrazolium 및 5-브로모-4-클로로-3'-indolylphosphate), 및 핵 계수 염색시약을 처리하였다. 절편을 마운팅 배지에 놓고 현미경으로 관찰하였다.

[0112] **통계분석**

[0113] 그래픽 데이터는 평균±표준오차로 나타내었다. 3 그룹 간 및 그룹 간 통계적 유의성은 one-way 또는 two-way ANOVA (analysis of variance), Bonferroni post-test 및 Student's t-test로 결정하였다. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**), $p < 0.001$ (***), $p < 0.0001$ (****).

[0114]

[0115] **실험결과**

[0116] **XRAD320을 이용한 이온화방사선의 국소 조사 및 임상적으로 유사한 폐 섬유증의 유도**

[0117] 임상적으로 정위 몸체 방사선 요법(SBRT)과 유사한 조건을 형성하는 90Gy의 이온화방사선을 마우스의 왼쪽 폐에 조사하였다[16]. 모든 마우스는 폐를 적출하기 전까지 적어도 4주간 생존하였다. 도 1a 에서와 같이, IR 조사 2주 후 폐의 왼쪽 측면의 손상부위에서 콜라겐 축적이 현저히 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 마우스 동물모델에서 방사선-유발 폐 섬유증(radiation-induced lung fibrosis: RILF)이 발생하였음을 의미한다(도 1a). RILF에서 나타나는 분자적 변화를 알아보기 위하여, 일정 시간 간격으로 폐의 왼쪽과 오른쪽 조직에 대한 마이크로어레이 분석을 실시하였다. 방사선 조사 2주 후부터 다양한 콜라겐 아형(col1A1, 1A2, 2A1, 3A1, 10A1, 11A1, 15A1, 22A1, 24A1 및 28A1)이 점진적으로 증가하였으며, 이들 발현은 4주째까지 유지되었다(도 1b, 적색 점선). 특히 콜라겐 타입 1 α (Col1A2)의 점진적 증가양상은 실시간 PCR 분석으로도 확인하였다(도 1c),

[0119] **방사선에 의해 손상된 폐에서의 miR-21 상향조절**

[0120] 최근, 피부, 신장, 간 및 폐의 섬유증에서 발현이 증가하는 miRNA가 섬유화 반응에 관여하는 것으로 밝혀졌으며 [10,17,18], 이는 miRNA의 선별적 조절이 섬유증 치료를 위한 비-스테로이드 치료법에 적용될 수 있음을 나타낸다. 이를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 3주 및 4주째에 왼쪽 폐 조직(90Gy IR 조사) 및 오른쪽 폐 조직(대조군)을 이용한 miRNA 어레이를 실시하였으며, 방사선 조사에 의해 손상된 부위에서 콜라겐 축적이 나타날 때(도 1a), 방사선-유발 폐 섬유증과 관련된 miRNA를 동정하였다. 3주 및 4주째의 샘플 및 대조군 샘플로부터 miRNA 발현의 스캐터 플롯을 비교한 결과(cut-off score = 2), 몇 개의 miRNA 발현이 변화하는 것으로 나타났다(3주: $R^2 = 0.96033$, 4주: $R^2 = 0.97093$)(도 6a). 방사선 조사에 의해 손상된 폐 조직에서 발현 변화된 miRNA 세트에 대하여 Ingenuity Pathway Analysis (IPA)를 실시하여 IR 손상과 관련된 주요 miRNA를 결정하였다.

[0121] 이어, RILF와 관련된 miRNA를 동정하기 위하여, 상기 miRNA 세트를 질병-연관 miRNA 데이터베이스에 적용하였다. 본 발명자들이 이용한 데이터베이스는 공공 데이터베이스이며 TarBase, miRecords and TargetScan 이다. 흥미로운 점은 miR-184 및 miR-21a 의 증가와 miR-423 및 miR-92a 의 감소가 특발성 폐 섬유화증과 관련있다는 것이다(도 2a). 본 발명자들은 이들 중 miR-21에 중점을 두어, 폐[9] 및 신장[19] 등 다양한 조직에서의 섬유화 관련인자로서 miR-21에 대해 연구하였다.

[0122] 방사선 손상 폐조직에서의 miR-21 증가는 실시간 PCR 분석으로 확인하였다(도 2b). 중요한 점은, miR-21의 증가 프로파일이 콜라겐 발현 레벨과 매우 연관성이 높다는 것이며(도 1b 및 도 1c 참조), 이는 시간 의존적으로 나타나는 전형적인 섬유증의 표현형이다(도 2c). 따라서, miR-21의 증가는 IR 손상에 의한 폐 섬유증과 밀접한 연관성이 있을 것으로 예상된다. 이를 증명하기 위하여 in situ hybridization을 수행하여 방사선 손상된 부위에서 miR-21이 현저히 증가함을 확인하였다(도 2d). 이러한 결과는 방사선-손상된 폐에서의 miR-21의 국

소적 발현 증가가 폐 섬유증의 진행에 영향을 미침을 나타낸다.

[0124] **이온화방사선(IR)은 폐의 내피세포에서 EndMT를 촉진시킴과 동시에 miR-21 증가를 유도한다**

[0125] 최근 연구에 따르면, 방사선-유발 폐 섬유증(RILF)에서 간엽 세포가 콜라겐 과생성에 의한 병리학적 증상과 관련있으며, 이러한 간엽 세포는 방사선 손상 후 내피성-간엽성 전환(EndMT)이라는 과정을 통하여 폐 내피세포의 변화에서 유래함이 밝혀졌다[1,20]. 이에, 우선 본 발명자들은 손상된 폐조직에서의 miR-21 증가(도 2)가 EndMT 과정과 관련성이 있는지 실험하였다.

[0126] 이온화방사선(IR)을 조사하여 인간 폐 미세혈관의 내피세포(human pulmonary microvascular endothelial cell, HPMEC)의 EndMT를 재현하였고[21], EndMT 과정 동안 miR-21의 증가가 나타나는지 관찰하였다. 5Gy 및 20Gy의 X-선 조사에 의해 손상된 HPMEC에서 IR 손상의 마커로 잘 알려진 ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule 1)가 증가하였으며, α -SMA (alpha-smooth muscle actin), 및 FN (fibronectin)도 증가하였다. 이들은 모두 간엽성 마커이다(도 3a). ICAM-1 및 α -SMA 단백질 발현 또한 방사선 용량 의존적으로 현저히 증가했으며, p21CIP1 발현도 같은 양상을 나타내었다(도 3b).

[0127] HPMECs 대조군에서는, 알려진 바와 같이(세포 표면에 세포-세포 부착과 밀접하게 관련된 팔로이딘-표지된 액틴이 우세하게 나타났다(도 3c)[24]. IR 조사 이후, HPMECs 는 세포 간 부착(adhesion)을 동반함과 동시에, 세포 표면에서 액틴 재배열의 증가 및 VE-cadherin 결실과 같은 EndMT의 전형적인 형태변화를 나타내었다(도 3c)[25].

[0128] EndMT 이후의 HPMEC (M-HPMEC)가 간엽성 특징을 갖는지 확인하기 위하여, M-HPMEC의 콜라겐 생성여부를 실시간 PCR을 수행하였다. 도 3d에서와 같이, M-HPMEC에서는 IR 손상 폐에서 명확히 증가하는 것으로 나타났던(도 1b 참조) 콜라겐 타입 I $\alpha 2$ (Col1A2) 및 타입 III $\alpha 1$ (Col3A1)의 발현이 매우 증가하였다. 흥미로운 점은, M-HPMEC가 간엽성 특징을 나타내고(도 3a 내지 3d), IR 손상 폐 조직에서 관찰되었던 것과 유사하게 M-HPMEC에서 miR-21의 발현 또한 현저히 증가했다는 것이다. 이러한 결과는 IR 손상 폐에서 miR-21의 증가가 EndMT 과정 및 콜라겐 생성에 모두 관여함을 의미한다.

[0130] **miR-21은 EndMT 과정에서 미비한 역할을 한다.**

[0131] M-HPMEC에서 miR-21 증가가 뚜렷이 나타나므로(도 3e), miR-21 증가가 M-HPMEC에서 EndMT 과정에 중요하게 작용할 것으로 예상된다. 이러한 가설은 최근 연구에서도 뒷받침되는데, 이 연구에서는 miR-21가 TGF- β 에 의해 유도되는 EndMT 과정의 일부에 관여함이 밝혀졌다[26]. 본 발명에서는 상기 가설을 증명하기 위하여, anti-sense miR-21 (antagomir-21)를 이용하여 HPMEC에서 miR-21의 발현을 간단히 억제하였고[13], IR 조사에 의해 EndMT를 유도하였다.

[0132] 이온화방사선 또는 이와 동등한 방사선 조사 이후 antagomir-21에 의해 miR-21의 발현이 효과적으로 억제됨을 ICAM-1 상승에 의해 확인하였지만(도 4b), miR-21 억제는 방사선-유발 EndMT (도 4c) 또는 콜라겐 생성(도 4d)에 영향을 주지 않았다. 마찬가지로, IR 이후 세포 형태는 miR-21 억제에 의해 영향을 받지 않았다(도 4e).

[0133] 이러한 예상치 못한 결과를 확인하기 위하여, 폐 손상에서 miR-21가 유도되는 것과 유사하게 HPMEC에서 miR-21을 과발현시켰다. 또한, HPMECs에서 miR-21의 이소성 발현(ectopic expression)을 유도하였지만 이온화방사선 조사에서 α -SMA 및 FN 가 현저히 증가했던 것과 달리(대조군과 비교하여 50배 내지 200배까지 발현)(도 4f), α -SMA 또는 FN 발현에 영향을 주지 않았다(도 4g). 이와 유사하게, HPMEC에서 miR-21 발현에 의해 콜라겐 생성이 증가하지 않았다(도 8). 상기 결과들은 miR-21의 발현 증가가 HPMEC의 EndMT 과정에는 필수적인 요소가 아님을 나타낸다.

[0134]

[0135] **miR-21는 섬유아세포에서 콜라겐 생성에 관여한다.**

[0136] HPMECs에서 miAs miR-21 상향조절은 EndMT에는 필수적이지 않은 것으로 보이며(도 4), miR-21의 역할은 아직 불분명하지만, IR 손상 부위에서는 명백히 증가된다(도 2d). 이에 본 발명자들은 증가된 miR-21가 간엽 세포(예컨대, EndMT 이후 내피세포로부터 유래한 섬유아세포 또는 근섬유아세포)의 간엽성(mesenchymal properties)을 증가시키는데 기여할 것으로 예상하였다[26]. miR-21 억제가 폐 섬유아세포의 콜라겐 생성에 주는 영향에 대

하여 실험하였다. 인간 폐 섬유아세포인 MRC-5 세포에서 antagomir-21에 의해 miR-21가 억제된 경우(도 5a), Col1A2 및 Col3A1 등의 콜라겐 합성이 억제되었다(도 5b 및 5c). HPMECs의 경우와 극명하게 대조적으로, 형질 감염을 통하여 MRC-5 세포에서 miR-21의 이소성 발현을 48시간 지속시킨 경우(도 5d), mRNA 레벨 및 단백질 레벨에서 콜라겐 합성이 증가하였다(도 5e 및 도 5f). 이러한 데이터들은 이온화방사선에 의한 miR-21 발현증가는 내피세포의 EndMT 보다는 간엽 세포의 콜라겐 생성에 주로 영향을 준다는 것을 명확히 나타낸다.

[0138] 논의

[0139] 정위 몸체 방사선 요법(stereotactic body radiotherapy, SBRT)은 초기 암치료 뿐만 아니라 전이된 폐종양의 치료에도 사용되었던 치료법이다[27]. 그러나, SBRT 치료사례 중 약 9%-28%의 확률로 SBRT 방사선 독성반응인 방사선-유발 폐렴(radiation-induced pneumonitis, RP)이 나타났으며, 이러한 증상은 방사선 용량, 종양분화도(tumor grade), 정상 폐조직의 손상부위 등에 따라 나타났다[28, 29]. 특히, 방사선-유발 폐 섬유증(RILF)은 방사선-유발 폐렴(RP)에 걸린 일부 환자에서 나타나며, 드물게 치명적인 상태를 유발한다. RP의 발병은 1개월에서 6개월이 걸리는 반면, RILF는 수개월에서 수년이 걸린다. 따라서, 스테로이드 및 소분자와 같은 항-섬유화 방법을 적용하기 위해서는 RILF가 진행되기 전에 조기 진단하는 것이 중요하며, 이는 RILF 증후를 감소시키기 위해 효과적인 것으로 보고되었다[30-32].

[0140] miRNA, 특히 순환성 miRNA (또는 혈청 miRNA)는 특정 질병(예컨대, 암)에 있어 바이오마커를 결정하는 연구에 널리 이용되어 왔다[33]. 이 방법은 향후 환자에게 즉시 적용될 수 있으며, RILF에서 miRNA를 동정하는데 적용될 수 있을 것으로 보인다. miR-135b [34], miR-184 [35] 및 miR-21 [36]의 miRNAs는 혈청에서 발현되는 것으로 나타났으며(순환성 miRNA), SBRT 폐 조직에서 현저히 증가하였다(도 2c 및 2d). RILF 환자 혈청의 추가 연구에서는, 특발성 폐 섬유증에서 보고된 것과 유사하게, 이러한 순환성 miRNA의 조기 검출의 검증방법에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다[37].

[0141] 본 발명자들은 SBRT 폐 조직에서 명확히 증가된 상기 3가지 순환성 miRNAs를 포함한 miRNA 세트 중에서, 콜라겐 축적이 관찰될 때(도 1a 및 1c), 블레오마이신 유도성 폐성유증(bleomycin induced pulmonary fibrosis, BLM-fibrosis)에서 보고된 miR-21과 같이[13], miR-21의 기능적 역할에 중점을 두었다. BLM-섬유증에서 miR-21 유도된 것과 마찬가지로, SBRT 손상 부위에서 콜라겐 생성과 함께 miR-21 레벨이 점진적으로 증가하였으며(도 1), 이는 손상부위에서의 miR-21 증가가 섬유화 반응에 영향을 줄을 의미한다(도 2d). 신장[19,38], 심부전[14]과 같은 다른 섬유화 질병에서 miR-21의 역할이 잘 알려져 있고, miRNA 억제제로서 antagomir-21가 섬유화 반응을 지연시키는 연구에 이용되며, 이들이 섬유화 반응 억제에 효과적이라는 사실은 주목할만 하다[13,14,19].

[0142] 본 연구에서는 SBRT 손상부위에서의 miR-21 유도로 인해 콜라겐이 생성되고, 이로써 간엽타입 세포 및 폐 내피 세포에서의 콜라겐 생성을 촉진시킨다는 것을 증명하였다. miR-21가 부분적으로 TGF- β 에 의해 매개되는 EndMT에 관여한다는 이전 연구와는 달리[26], miR-21 억제는 EndMT 과정을 회복시키지 못했으며, miR-21의 이소성 발현은 폐 내피세포의 EndMT에 적은 영향을 줄 뿐이었다. 이러한 결과들은 SBRT에 의한 miR-21 유도가 EndMT 과정에 필수적이지 않음을 의미한다. 이전 연구결과와의 이러한 차이점이 나타나는 이유는 EndMT를 유도하는 자극물질이 다른 것(예컨대, TGF- β vs IR)을 제외하고는 명확하지 않다[26]. 이보다는 miR-21의 억제 또는 유도가 간엽성 세포에서 섬유화 반응에 영향을 주는 것으로 나타났다(도 5). 이에, 본 발명자들은 TGF- β -의존성 유전자 반응[13,19]에 의해 발현이 상향조절되는 miR-21이 근섬유아세포 또는 섬유아세포에서 다양한 메커니즘(내피세포의 recruitment 또는 EndMT)을 통하여 손상 부위에 나타나는 섬유화 반응을 촉진하는데 영향을 줄 것이라 예상하였다. SBRT 이후 환자 혈청에서 miR-21이 증가할 때, antagomir-21에 의한 miR-21 조절은 명확한 접근법이 될 것이다.

[0143] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0145] 참조문헌

[0146] 1. Ding NH, Li JJ, Sun LQ (2013) Molecular mechanisms and treatment of radiation-induced lung

fibrosis. *Curr Drug Targets* 14: 1347-1356.

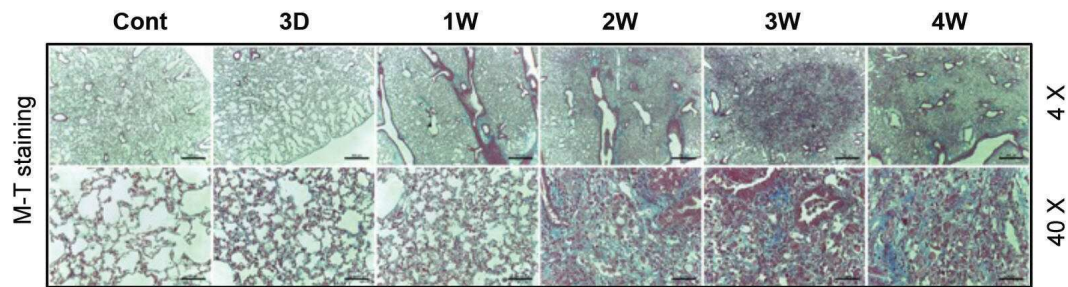
- [0147] 2. Ghafoori P, Marks LB, Vujaskovic Z, Kelsey CR (2008) Radiation-induced lung injury. Assessment, management, and prevention. *Oncology (Williston Park)* 22: 37-47; discussion 52-33.
- [0148] 3. Martin M, Delanian S, Sivan V, Vozenin-Brotans MC, Reisdorf P, et al. (2000) [Radiation-induced superficial fibrosis and TGF- α 1]. *Cancer Radiother* 4: 369-384.
- [0149] 4. Yarnold J, Brotans MC (2010) Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis. *Radiother Oncol* 97: 149-161.
- [0150] 5. Wynn TA (2008) Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J Pathol* 214: 199-210.
- [0151] 6. Wynn TA, Ramalingam TR (2012) Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease. *Nat Med* 18: 1028-1040.
- [0152] 7. Piera-Velazquez S, Jimenez SA (2012) Molecular mechanisms of endothelial to mesenchymal cell transition (EndoMT) in experimentally induced fibrotic diseases. *Fibrogenesis Tissue Repair* 5: S7.
- [0153] 8. Piera-Velazquez S, Li Z, Jimenez SA (2011) Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Am J Pathol* 179: 1074-1080.
- [0154] 9. Hashimoto N, Phan SH, Imaizumi K, Matsuo M, Nakashima H, et al. (2010) Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 43: 161-172.
- [0155] 10. Roderburg C, Luedde T (2014) Circulating microRNAs as markers of liver inflammation, fibrosis and cancer. *J Hepatol*.
- [0156] 11. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, et al. (2008) Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 18: 997-1006.
- [0157] 12. Huang Y, Shen XJ, Zou Q, Wang SP, Tang SM, et al. (2011) Biological functions of microRNAs: a review. *J Physiol Biochem* 67: 129-139.
- [0158] 13. Liu G, Friggeri A, Yang Y, Milosevic J, Ding Q, et al. (2010) miR-21 mediates fibrogenic activation of pulmonary fibroblasts and lung fibrosis. *J Exp Med* 207: 1589-1597.
- [0159] 14. Thum T, Gross C, Fiedler J, Fischer T, Kissler S, et al. (2008) MicroRNA-21 contributes to myocardial disease by stimulating MAP kinase signalling in fibroblasts. *Nature* 456: 980-984.
- [0160] 15. Roderburg C, Urban GW, Bettermann K, Vucur M, Zimmermann H, et al. (2011) Micro-RNA profiling reveals a role for miR-29 in human and murine liver fibrosis. *Hepatology* 53: 209-218.
- [0161] 16. Hong ZY, Eun SH, Park K, Choi WH, Lee JI, et al. (2014) Development of a small animal model to simulate clinical stereotactic body radiotherapy-induced central and peripheral lung injuries. *J Radiat Res* 55: 648-657.
- [0162] 17. Kumar V, Mahato RI (2014) Delivery and Targeting of miRNAs for Treating Liver Fibrosis. *Pharm Res*.
- [0163] 18. Lv LL, Cao YH, Ni HF, Xu M, Liu D, et al. (2013) MicroRNA-29c in urinary exosome/microvesicle as a biomarker of renal fibrosis. *Am J Physiol Renal Physiol* 305: F1220-1227.
- [0164] 19. Zhong X, Chung AC, Chen HY, Meng XM, Lan HY (2011) Smad3-mediated upregulation of miR-21 promotes renal fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 22: 1668-1681.
- [0165] 20. Rodemann HP, Bamberg M (1995) Cellular basis of radiation-induced fibrosis. *Radiother Oncol* 35: 83-90.
- [0166] 21. Kim M, Choi SH, Jin YB, Lee HJ, Ji YH, et al. (2013) The effect of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) on radiation-induced endothelial-to-mesenchymal transition. *Int J Radiat Biol* 89: 356-363.
- [0167] 22. Gaugler MH, Squiban C, van der Meeren A, Bertho JM, Vandamme M, et al. (1997) Late and persistent

up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells in vitro. *Int J Radiat Biol* 72: 201-209.

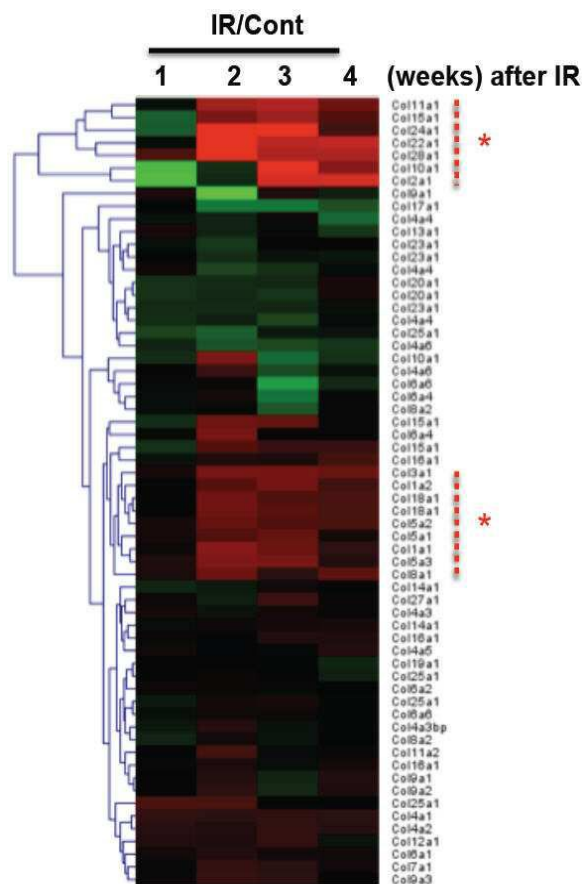
- [0168] 23. Behrends U, Peter RU, Hintermeier-Knabe R, Eissner G, Holler E, et al. (1994) Ionizing radiation induces human intercellular adhesion molecule-1 in vitro. *J Invest Dermatol* 103: 726-730.
- [0169] 24. Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, Derynck R (1994) TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. *J Cell Biol* 127: 2021-2036.
- [0170] 25. Andarawewa KL, Erickson AC, Chou WS, Costes SV, Gascard P, et al. (2007) Ionizing radiation predisposes nonmalignant human mammary epithelial cells to undergo transforming growth factor beta induced epithelial to mesenchymal transition. *Cancer Res* 67: 8662-8670.
- [0171] 26. Kumarswamy R, Volkmann I, Jazbutyte V, Dangwal S, Park DH, et al. (2012) Transforming growth factor-beta-induced endothelial-to-mesenchymal transition is partly mediated by microRNA-21. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 32: 361-369.
- [0172] 27. Nagata Y, Negoro Y, Aoki T, Mizowaki T, Takayama K, et al. (2002) Clinical outcomes of 3D conformal hypofractionated single high-dose radiotherapy for one or two lung tumors using a stereotactic body frame. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 52: 1041-1046.
- [0173] 28. Ong CL, Palma D, Verbakel WF, Slotman BJ, Senan S (2010) Treatment of large stage I-II lung tumors using stereotactic body radiotherapy (SBRT): planning considerations and early toxicity. *Radiother Oncol* 97: 431-436.
- [0174] 29. Stauder MC, Macdonald OK, Olivier KR, Call JA, Lafata K, et al. (2011) Early pulmonary toxicity following lung stereotactic body radiation therapy delivered in consecutive daily fractions. *Radiother Oncol* 99: 166-171.
- [0175] 30. Antonadou D, Coliarakis N, Synodinou M, Athanassiou H, Kouveli A, et al. (2001) Randomized phase III trial of radiation treatment +/- amifostine in patients with advanced-stage lung cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 51: 915-922.
- [0176] 31. Okunieff P, Augustine E, Hicks JE, Cornelison TL, Altemus RM, et al. (2004) Pentoxifylline in the treatment of radiation-induced fibrosis. *J Clin Oncol* 22: 2207-2213.
- [0177] 32. Flechsig P, Dadrich M, Bickelhaupt S, Jenne J, Hauser K, et al. (2012) LY2109761 attenuates radiation-induced pulmonary murine fibrosis via reversal of TGF-beta and BMP-associated proinflammatory and proangiogenic signals. *Clin Cancer Res* 18: 3616-3627.
- [0178] 33. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, et al. (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 10513-10518.
- [0179] 34. Faltejskova P, Bocanek O, Sachlova M, Svoboda M, Kiss I, et al. (2012) Circulating miR-17-3p, miR-29a, miR-92a and miR-135b in serum: Evidence against their usage as biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Biomark* 12: 199-204.
- [0180] 35. Kosaka N, Iguchi H, Ochiya T (2010) Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci* 101: 2087-2092.
- [0181] 36. Xu J, Wu C, Che X, Wang L, Yu D, et al. (2011) Circulating microRNAs, miR-21, miR-122, and miR-223, in patients with hepatocellular carcinoma or chronic hepatitis. *Mol Carcinog* 50: 136-142.
- [0182] 37. Li P, Zhao GQ, Chen TF, Chang JX, Wang HQ, et al. (2013) Serum miR-21 and miR-155 expression in idiopathic pulmonary fibrosis. *J Asthma* 50: 960-964.
- [0183] 38. Chau BN, Xin C, Hartner J, Ren S, Castano AP, et al. (2012) MicroRNA-21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways. *Sci Transl Med* 4: 121ra118.

도면

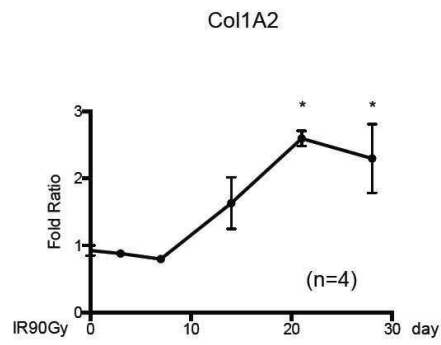
도면 1a



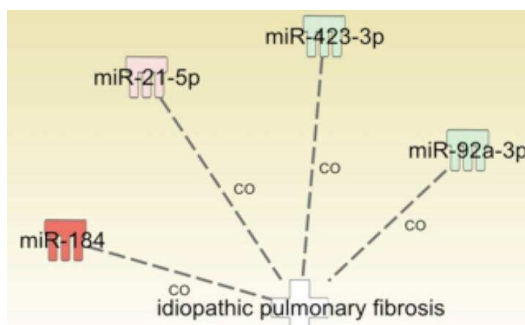
도면1b



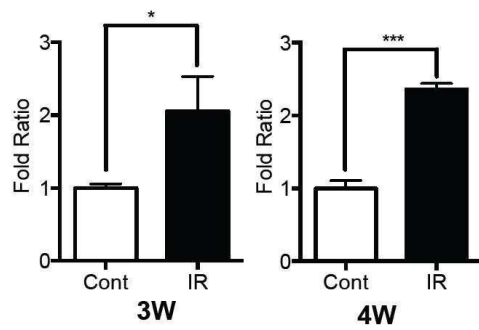
도면1c



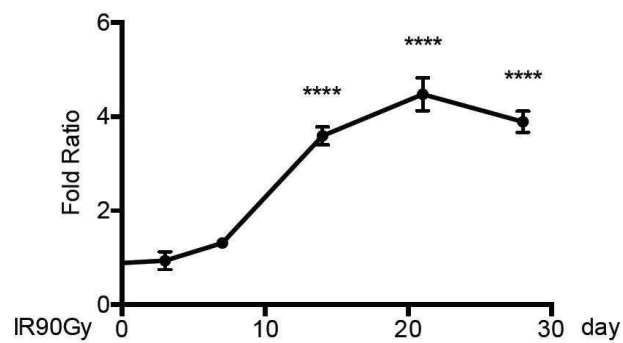
도면2a



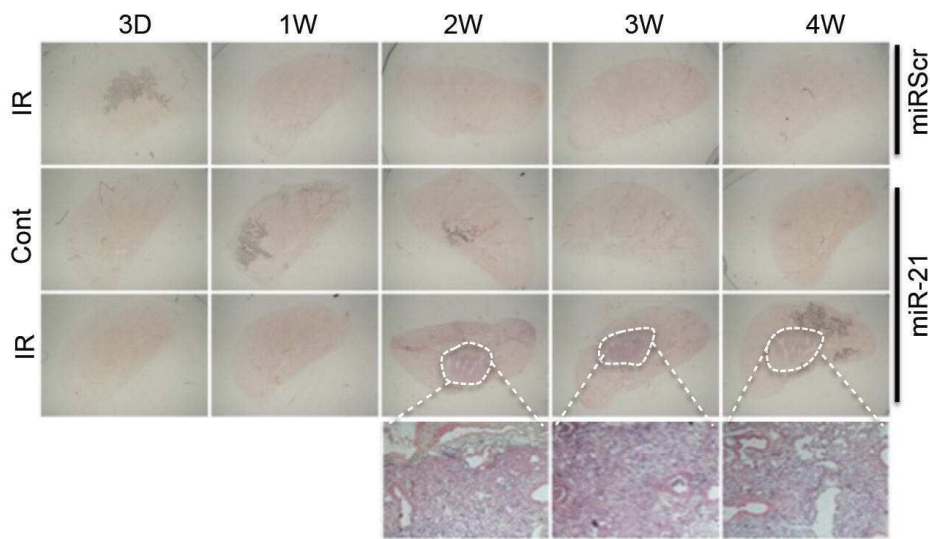
도면2b



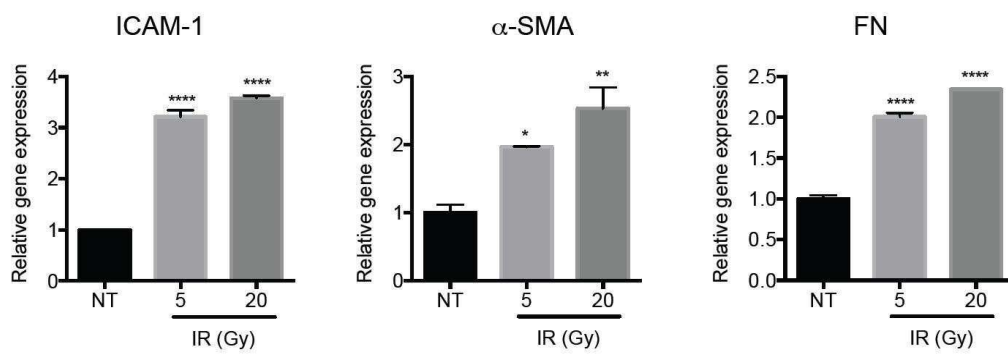
도면2c



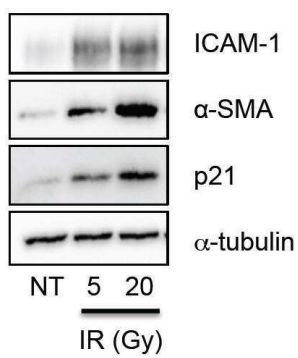
도면2d



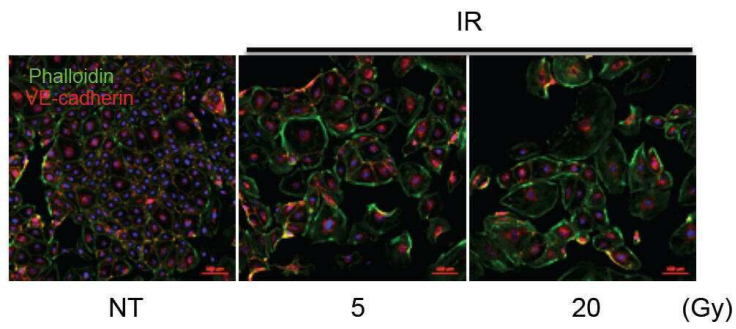
도면3a



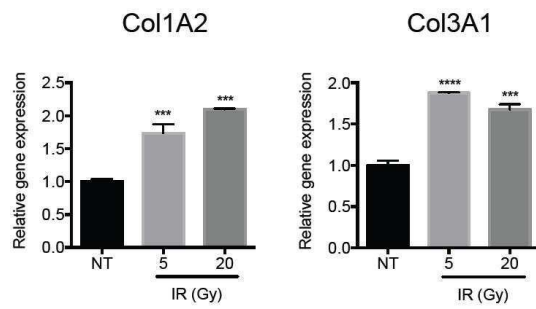
도면3b



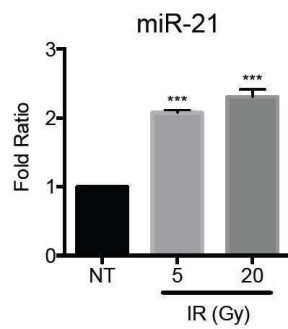
도면3c



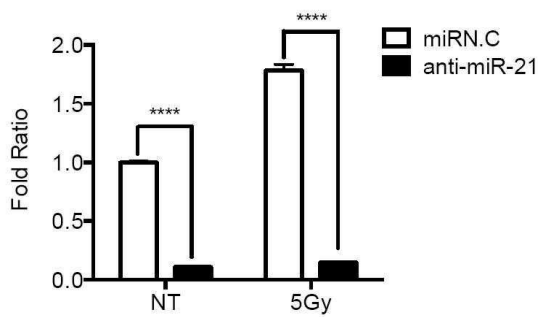
도면3d



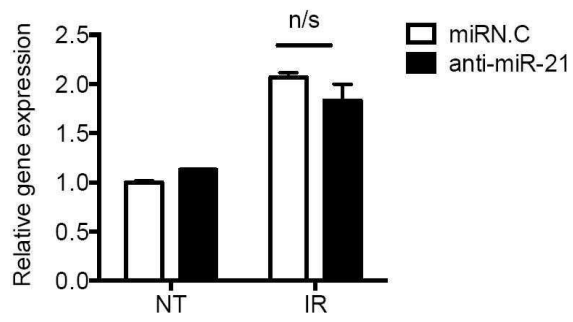
도면3e



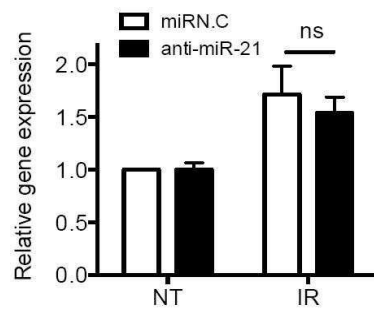
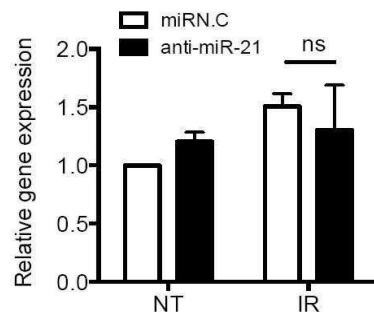
도면4a



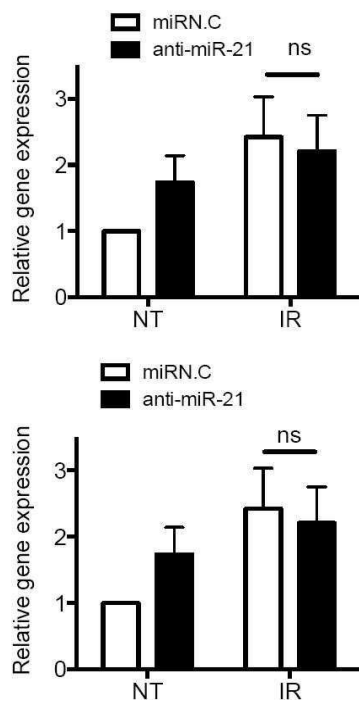
도면4b



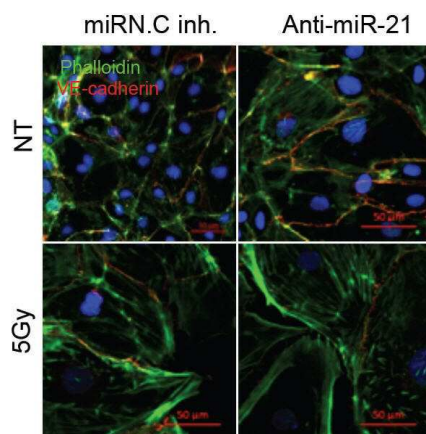
도면4c



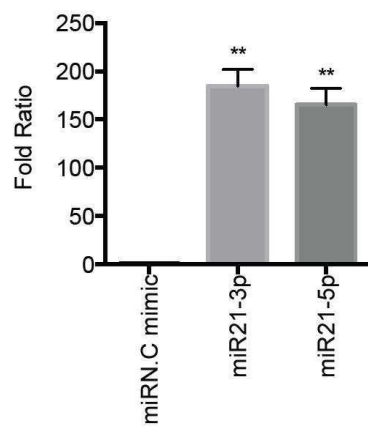
도면4d



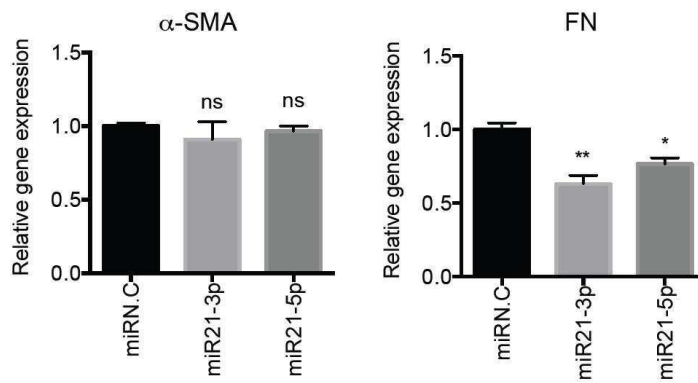
도면4e



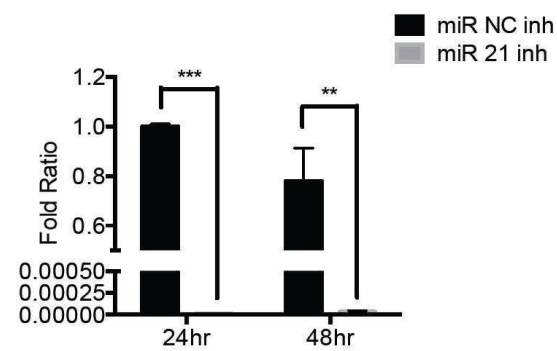
도면4f



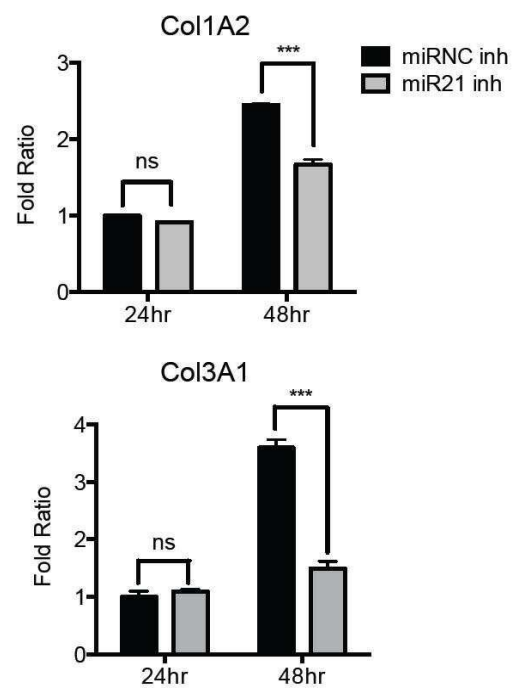
도면4g



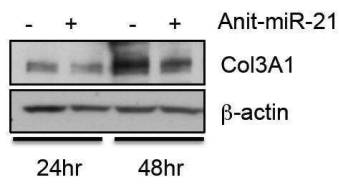
도면5a



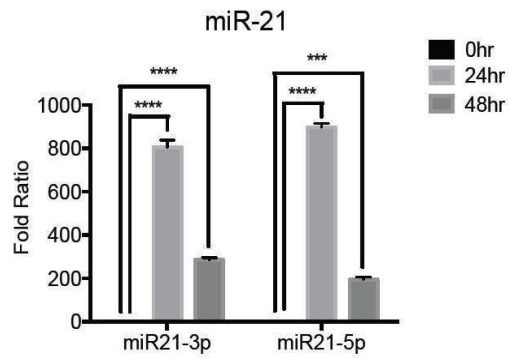
도면5b



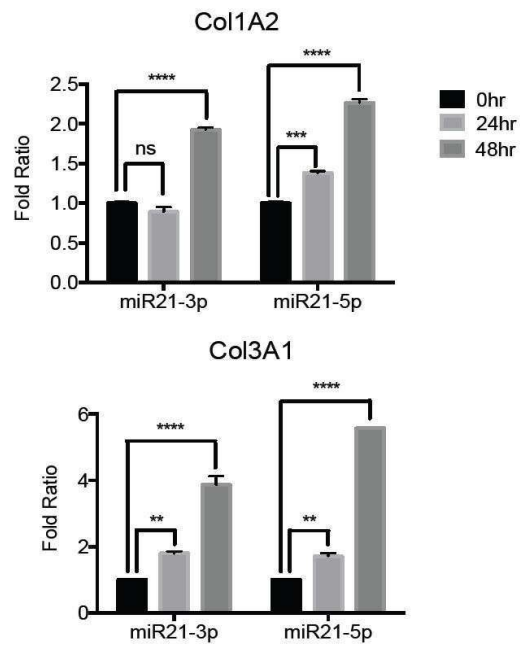
도면5c



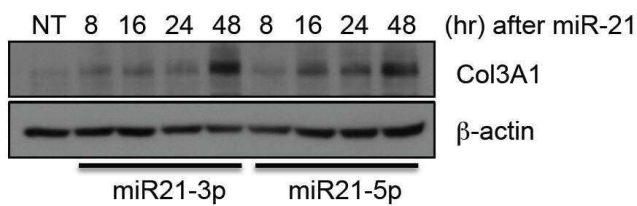
도면5d



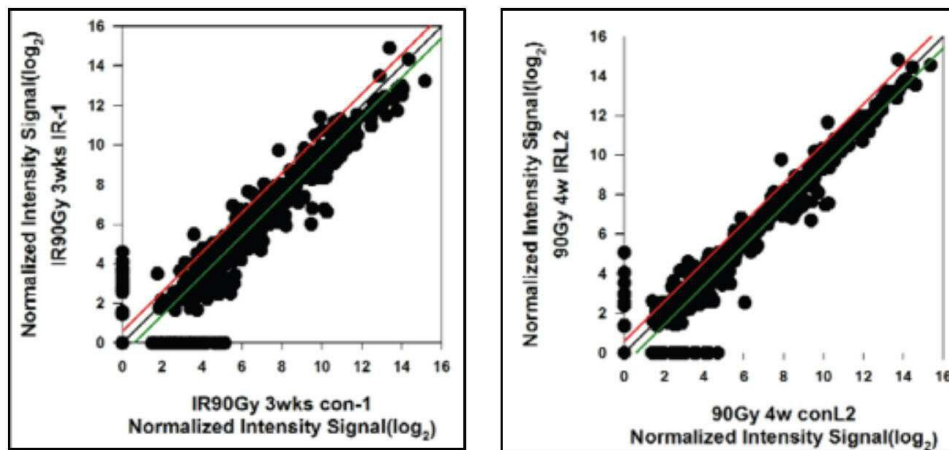
도면5e



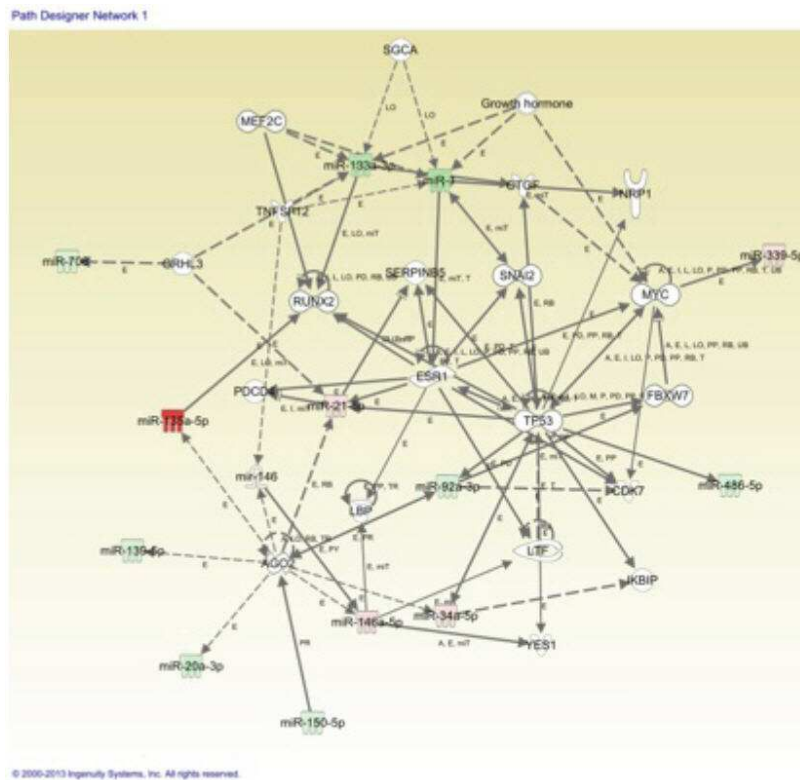
도면5f



도면6a



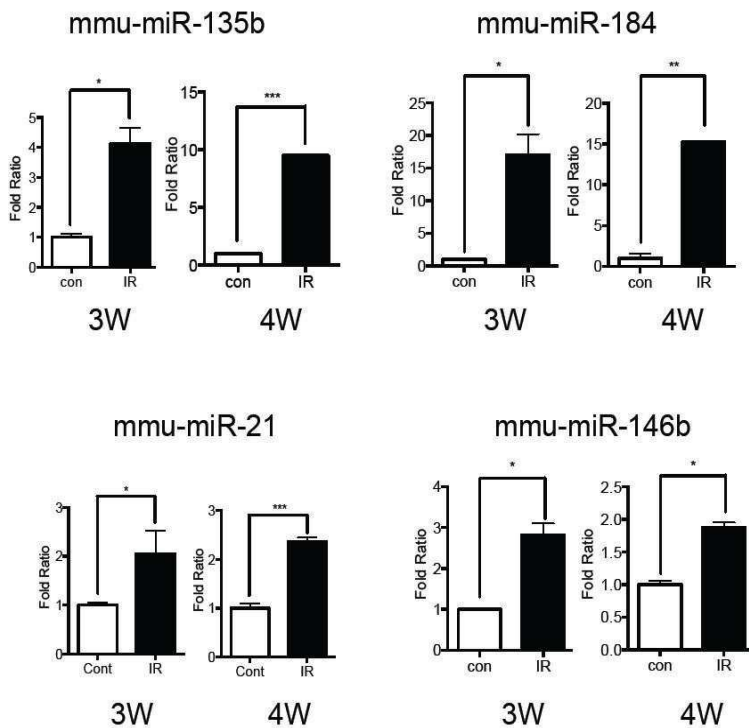
도면6b



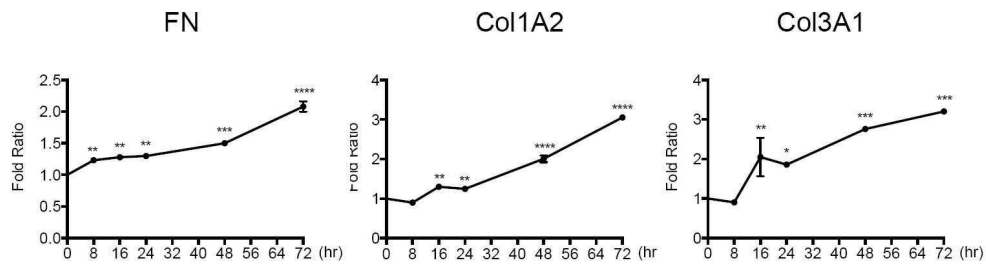
도면6c



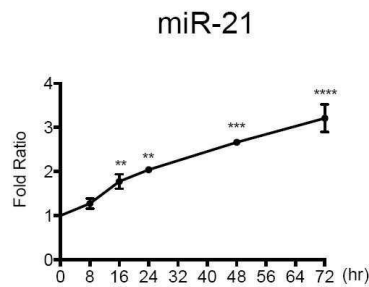
도면6d



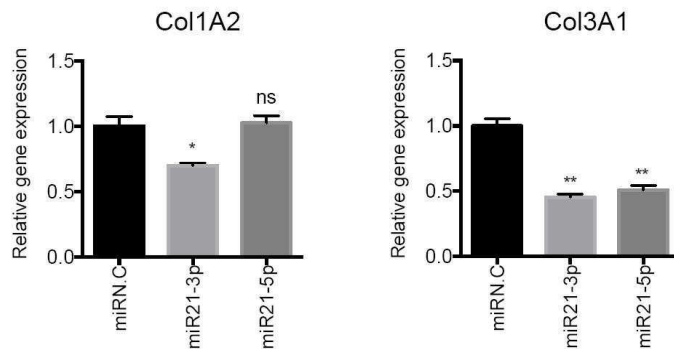
도면7a



도면7b



도면8



서열목록

- <110> Industry-University Cooperation Foundation Sogang University
- <120> A method for diagnosing a metastasis of radiation-induced lung fibrosis and a diagnostic kit using the method
- <130> PN150239
- <160> 5
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 72
- <212> DNA
- <213> miR21
- <400> 1

tgctgggtag cttatcagac tgatgttgac tgttgaatct catggcaaca ccagtcgatg	60
ggctgtctga ca	72
<210> 2	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miR21-3p	
<400> 2	
caacaccagt cgatgggctg t	21
<210> 3	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miR21-5p	
<400> 3	
tagcttatca gactgatgtt ga	22
<210> 4	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> miR N.C	
<400> 4	
ctcccttcaa tc	12
<210> 5	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> antisense miR21	
<400> 5	
tcaacatcag tctgataagc ta	22