



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0138852
(43) 공개일자 2017년12월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) C12N 9/12 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2013.01)
C12N 9/12 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0071210

(22) 출원일자 2016년06월08일

심사청구일자 2016년06월08일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

김국성

대전광역시 중구 충무로107번길 100, 109동 2302호 (대흥동, 센트럴자이)

최수정

서울특별시 강서구 초록마을로32길 11, 101호 (화곡동)

정재별

대전광역시 중구 충무로107번길 100, 109동 2302호 (대흥동, 센트럴자이)

(74) 대리인

김순용

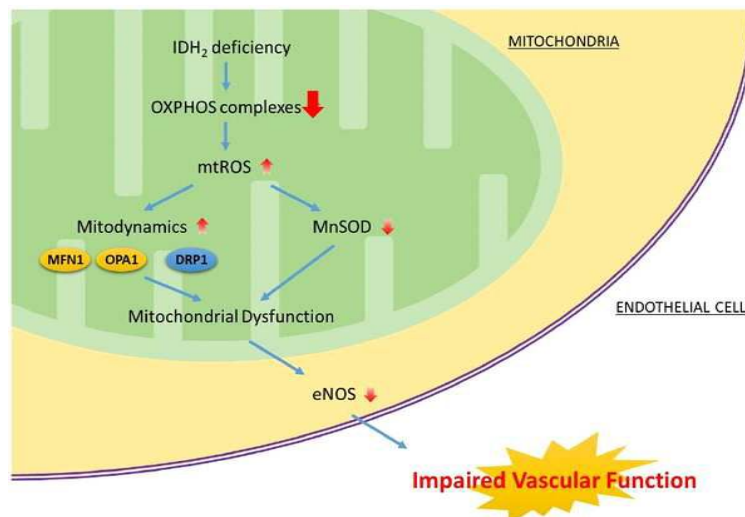
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 이소시트릴산 탈수소화효소 2를 포함하는 혈관 질환 진단용 바이오 마커 조성물

(57) 요약

본 발명은 이소시트릴산 탈수소화효소 2를 포함하는 혈관 질환 진단용 바이오 마커 조성물, 혈관 질환 진단용 조성물 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 이소시트릴산 탈수소화효소 2(isocitrate dehydrogenase 2, IDH2)를 포함하는 혈관 질환 진단용 바이오 마커를 이용 시, IDH2 저해에 따른 혈관 손상 및 혈관 기능 장애와 관련된 혈관 질환을 진단할 수 있다. 또한, IDH2 저해를 증가시킴으로써, IDH2 저해로 인해 유발되는 혈관 손상 및 혈관 기능 장애를 개선하여, 혈관 질환의 예방 또는 치료 용도로도 이용 가능하여, 관련된 제약 및 의료 사업에 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도32



(52) CPC특허분류

G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 2525/107 (2013.01)
C12Q 2525/205 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
C12Q 2600/178 (2013.01)
G01N 2333/912 (2013.01)
G01N 2800/32 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1D1A1A01061516
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 기본연구지원사업
 연구과제명 혈관내피세포 미토콘드리아 기능 장애에 의한 동맥경화증 발병 기전 규명
 기 여 율 60/100
 주관기관 충남대학교
 연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014R1A6A1029617
 부처명 교육부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 중점연구소지원사업
 연구과제명 혈관염증제어 및 유효성평가기술개발
 기 여 율 30/100
 주관기관 충남대학교
 연구기간 2014.09.01 ~ 2017.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C1990010013
 부처명 보건복지부
 연구관리전문기관 한국보건산업진흥원
 연구사업명 질환극복기술개발
 연구과제명 충남대학교병원 중개임상연구 인력양성사업
 기 여 율 10/100
 주관기관 충남대학교병원
 연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

이소시트릴산 탈수소화효소 2(isocitrate dehydrogenase 2, IDH2)를 포함하는 혈관 질환 진단용 바이오 마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 혈관 질환은 고혈압, 동맥경화증, 심장발작, 뇌졸중, 암, 노화, 발기부전, 겸상 적혈구 빈혈증(sickle cell disease), 당뇨병, 협심증, 심근경색, 관절염, 당뇨병성 망막증, 건선, 신생혈관 녹내장, 혈관종 및 허혈성 질환으로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 혈관 질환 진단용 바이오 마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 IDH2는 OXPHOS(oxidative phosphorylation) 복합체 활성화, MnSOD(manganese superoxide dismutase) 단백질의 발현 및 일산화탄소(nitric oxide, NO)를 감소시키는 것을 특징으로 하는, 혈관 질환 진단용 바이오 마커 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 IDH2는 세포 내 미토콘드리아의 mtROS(mitochondrial reactive oxygen species) 활성을 증가시키고, Mfn-1(mitofusin-1), OPA-1(optic atrophy Protein- 1) 및 Drp-1(dynamin-related protein-1)의 단백질 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 혈관 질환 진단용 바이오 마커 조성물.

청구항 5

IDH2의 발현 또는 활성; 또는 IDH2을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 측정하는 제제를 포함하는, 혈관 질환 진단용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 IDH2의 발현 또는 활성을 측정하는 제제는 올리고핵타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메라(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 또는 앵타머(aptamer)인 것을 특징으로 하는, 혈관 질환 진단용 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 IDH2를 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 측정하는 제제는 상기 IDH2 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 siRNA(small interference RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머 쌍 또는 프로브인 것을 특징으로 하는, 혈관 질환 진단용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 siRNA는 서열번호 1 또는 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 IDH2 siRNA인 것을 특징으로 하는, 혈관 질환

진단용 조성물.

청구항 9

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 혈관 질환 진단용 키트.

청구항 10

생물학적 시료에서 IDH2의 발현 또는 활성; 또는 IDH2을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 측정하는 단계를 포함하는, 혈관 질환 진단에 대한 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 생물학적 시료는 환자의 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 타액 및 신장 조직으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 혈관 질환 진단에 대한 정보를 제공하는 방법.

청구항 12

IDH2를 포함하는 혈관 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

- (1) 실험군으로서 생물학적 시료에 스크리닝 하고자 하는 대상 물질을 처리하는 단계;
- (2) 상기 (1)의 실험군 생물학적 시료와 대물질물을 처리하지 않은 대조군 생물학적 시료에서 IDH2의 발현 또는 활성; 또는 IDH2을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 측정하여 비교하는 단계; 및
- (3) 상기 (2)의 대조군과 비교하여 실험군의 IDH2의 발현 또는 활성; 또는 IDH2을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 증가시키는 대상 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 혈관 질환 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 이소시트릴산 탈수소화효소 2를 포함하는 혈관 질환 진단용 바이오 마커 조성물, 혈관 질환 진단용 조성물 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 활성 산소(Reactive oxygen species, ROS)-유도된 산화적 스트레스는 고혈압(hypertension), 심장 비대(cardiac hypertrophy) 및 죽상동맥경화증(atherosclerosis)과 같은 심장혈관계 질병을 포함하는 다수의 일반적인 질병의 주요 구성 요소이다(Dikalova, A. E. 등, 2010, Circulation research, 107, 106-116; Doughan, A. K. 등, 2008, Circulation research, 102, 488-496; Dai, D. F. 등, 2011, Circulation research, 108, 837-846; Madamanchi, N. R. 등, 2007, Circulation research, 100, 460-473). 미토콘드리아는 ROS의 주요 근원이고, 산화적 손상에 매우 취약하다. 증가된 미토콘드리아 ROS 생성 및 미토콘드리아 손상은 심장혈관계 질병을 포함하는 다수의 질병에서 발견되었다(Dai, D. F. 등, 2011, Circulation research 108, 837-846; Madamanchi, N. R. 등, 2007, Circulation research, 100, 460-473; Ku, H. J 등, 2015, Free radical biology & medicine, 80, 84-92). 미토콘드리아 내에서 ROS가 증가되면, 산화적 인산화(oxidative phosphorylation, OXPHOS) 복합체 및 분열-융합(fission-fusion) 단백질과 같은 미토콘드리아 효소를 손상시킬 수 있거나(Ku, H. J 등, 2015, Free radical biology & medicine, 80, 84-92; Nagar, H 등, 2014, PloS one 9, e98670), 미토콘드리아 DNA의 돌연변이를 일으킬 수 있다(Esposito, L. A 등, 1999, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 96, 4820-4825). 세포 손상을 일으킬 수 있는 다양한 면역 사이토키닌 및 단백질의 분비를 유도하면서(Nagar, H 등, 2014, PloS one 9, e98670; Zhou, R 등, 2011, Nature 469, 221-225), 미토콘드리아 ROS는 미토콘드리아 막 전위 및 독성(integrity)(Nagar, H 등, 2014, PloS one 9, e98670)을 동시에 조절한다.

[0003] 내피 세포에서, 미토콘드리아는 세포의 작은 비율의 부피를(약 5%) 차지하며, 산화적 인산화를 통하여 ATP 생성 제한에 기여한다. 산화적 인산화는 호기성 조건 하의 글루코스에서 ATP 합성에 대한 주요 경로이다(Quintero, M 등, 2006, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 103, 5379-5384). 따라서, 내피 세포 미토콘드리아는 ROS 생산에 생리학적으로 주요한 역할을 수행할 수 있다. 미토콘드리아에서, complex I 및 III은 ROS 생산에 기여하고, 산소 소비의 주요 원천은 시토크롬 C 산화효소(cytochrome c oxidase)(complex IV)이다. 미토콘드리아 슈퍼옥사이드(superoxide)는 미토콘드리아에 국한된 내인성 항산화제에 의하여 소진(scavenged)된다. 미토콘드리아의 주요 항산화제 중 하나는 과산화 수소에 대한 과산화물 음이온(superoxide anions)의 전환을 촉매하는 MnSOD(manganese superoxide dismutase)이다. 미토콘드리아는 심장 근육 세포(Papanicolaou, K. N 등, 2012, Circulation research, 111, 1012-1026) 및 내피 세포(Kluge, M. 등, 2013, Circulation research, 112, 1171-1188)를 포함하는 많은 세포 종류의 융합 및 분열의 사이클을 통하여 지속적으로 생성되고 이동한다. 상기 융합 및 분열 과정은 mitofusin-1(Mfn-1), mitofusin-2(Mfn-2), optic atrophy protein1(OPA-1), dynamin-related protein-1(Drp-1), 및 fission-1(FIS-1)을 포함하는 당단백질에 의하여 매개된다(Kluge, M. 등, 2013, Circulation research, 112, 1171-1188). 외부 미토콘드리아 막의 융합은 OPA-1에 의해 조절되는 반면, 내부 미토콘드리아 막의 융합은 막 관통 GTPases Mfn-1 및 Mfn-2에 의하여 매개된다. 대조적으로, 분열은 Drp-1 및 FIS-1에 의하여 매개된다. 미토콘드리아 융합 및 분열은 내피 세포 기능과 관련되어 있다는 새로운 증거가 있다. 최근 연구에서는 Mfn-1의 저해 및 융합은 Akt-의존 경로를 통하여 혈관 내피 성장 인자 및 eNOS 활성화에 대한 혈관 신생을 저해한다고 보고하였다(Lugus, J. J. 등, 2011, Journal of molecular and cellular cardiology, 51, 885-893).

[0004] IDH2(isocitrate dehydrogenase 2)는 에너지 및 산화 환원 상태(redox status)를 제어하고, 티오레독신(thioredoxin) 시스템을 재생하기 위한 근본적인 보조 인자인 NADPH 생산함으로써, 알파-케토글루타르산(alpha-ketoglutarate)에 대한 이소시트르산(isocitrate)의 산화적 탈탄산을 촉매한다(Mustacich, D. 등, 2000, The Biochemical journal, 346, Pt 1, 1-8). NADPH는 티오레독신 시스템의 재생뿐만 아니라, 감소된 상태의 GSH-pool 유지에 필수적이다. 따라서, NADPH-의존적 항산화 효소에 대한 NADPH를 제공하는, IDH2는 미토콘드리아 산화 환원의 균형을 조절하고, 산화 스트레스에 의한 세포 손상을 감소하는 데 중요한 역할을한다(Park, S. Y 등, 2008, Free radical research, 42, 467-473).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 이에 본 발명자들은 혈관 질환을 효과적으로 진단하는 바이오 마커를 연구한 결과, 이소시트릴산 탈수소화효소 2(isocitrate dehydrogenase 2, IDH2)를 더다운시키면 미토콘드리아 역학 변화가 유도됨에 따라 혈관 내피 세포 기능장애가 유발됨을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0006] 본 발명의 목적은, 이소시트릴산 탈수소화효소 2(isocitrate dehydrogenase 2, IDH2)를 포함하는 혈관 질환 진단용 바이오 마커 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 또한 본 발명의 목적은, IDH2의 발현 또는 활성; 또는 IDH2을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 측정하는 제제를 포함하는, 혈관 질환 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 또한 본 발명의 목적은, 상기 조성물을 포함하는 혈관 질환 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0009] 또한 본 발명의 목적은, 생물학적 시료에서 IDH2의 발현 또는 활성; 또는 IDH2을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 측정하는 단계를 포함하는, 혈관 질환 진단에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 또한 본 발명의 목적은, IDH2를 포함하는 혈관 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 또한 본 발명의 목적은, 혈관 질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 이소시트릴산 탈수소화효소 2(IDH2)를 포함하는 혈관 질환 진단용 바이오 마커 조성물을 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은, IDH2의 발현 또는 활성; 또는 IDH2을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 측정하는 제제를 포함하는, 혈관 질환 진단용 조성물을 제공한다.

- [0014] 또한 본 발명은, 상기 조성물을 포함하는 혈관 질환 진단용 키트를 제공한다.
- [0015] 또한 본 발명은, 생물학적 시료에서 IDH2의 발현 또는 활성; 또는 IDH2을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 측정하는 단계를 포함하는, 혈관 질환 진단에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0016] 또한 본 발명은, IDH2를 포함하는 혈관 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0017] 또한 본 발명은, (1) 실험군으로서 생물학적 시료에 스크리닝 하고자 하는 대상 물질을 처리하는 단계; (2) 상기 (1)의 실험군 생물학적 시료와 대상 물질을 처리하지 않은 대조군 생물학적 시료에서 IDH2의 발현 또는 활성; 또는 IDH2을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 측정하여 비교하는 단계; 및 (3) 상기 (2)의 대조군과 비교하여 실험군의 IDH2의 발현 또는 활성; 또는 IDH2을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 증가시키는 대상 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 혈관 질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명에 따른 이소시트릴산 탈수소화효소 2(isocitrate dehydrogenase 2, IDH2)를 포함하는 혈관 질환 진단용 바이오 마커를 이용 시, IDH2 저해에 따른 혈관 손상 및 혈관 기능 장애와 관련된 혈관 질환을 진단할 수 있다. 또한, IDH2 저해를 증가시킴으로써, IDH2 저해로 인해 유발되는 혈관 손상 및 혈관 기능 장애를 개선하여, 혈관 질환의 예방 또는 치료 용도로도 이용 가능하여, 관련된 제약 및 의료 사업에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 OXPHOS의 서브 유닛 I, II, III, IV 및 V 단백질 및 대조군으로서 베타-액틴 단백질의 발현을 확인한 도이다.
- 도 2는 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 OXPHOS의 서브 유닛 I, II, III, IV 및 V 단백질 수준을 Image J 소프트웨어를 이용하여 계산한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 ATP 합성 억제제인 Oligo(oligomycin), CCCP(carbonyl cyanide m-chloro phenyl hydrazine) 및 Rote(rotenone)을 각각 처리한 후, 이에 따른 OCR을 측정 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 ROS 수준 변화를 측정하기 위하여 MitoSOX Red dye의 염색 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 MnSOD, IDH2 및 베타-액틴의 발현 정도를 웨스턴 블랏을 이용하여 확인하고(도 5(A)), Image J 소프트웨어를 이용하여 분석한 결과(도 5(B))를 나타낸 도이다.
- 도 6은 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 융합 단백질인 Mfn-1, Mfn-2 및 OPA-1과, 분해 단백질인 Drp-1의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 7은 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 융합 단백질인 Mfn-1, Mfn-2 및 OPA-1과 분해 단백질인 Drp-1의 발현을 Image J 소프트웨어를 이용하여 밴드 강도를 측정한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 8은 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 미토콘드리아 형태를 공 초점 현미경을 이용하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 9는 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 P(phosphor)-eNOS, T(total)-eNOS, P-Akt, T-Akt, IDH2 및 베타-액틴의 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 10은 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 총 eNOS 단백질에 대한 인산화 eNOS 발현 단백질량을 Image J 소프트웨어를 이용하여 농도계로 분석하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 11은 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 총 Akt 단백질에 대한 인산화 Akt 발현 단백질량을 Image J 소프트웨어를 이용하여 농도계로 분석하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 12는 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포의 상등액에서 세포 NO(일산화질

소) 생산 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 13은 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 NO(일산화탄소)의 형광 지표인 DAF-FM DA 염색 처리하여 NO(일산화질소) 수준 변화를 확인하고(도 13(A)), 이에 대한 형광 강도를 측정된 결과(도 13(B))를 나타낸 도이다.

도 14는 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 세포의 미토콘드리아 ROS 수준 변화 측정을 위하여, MitoSOX Red dye로 염색하여 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 15는 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 융합 단백질인 Mfn-1 및 OPA-1과, 분해 단백질인 Drp-1 및 항산화 관련 단백질인 MnSOD의 발현을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 16은 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 융합 단백질인 Mfn-1의 발현을 Image J 소프트웨어를 이용하여 밴드 강도를 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 17은 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 융합 단백질인 OPA-1의 발현을 Image J 소프트웨어를 이용하여 밴드 강도를 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 18은 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 융합 단백질인 Drp-1의 발현을 Image J 소프트웨어를 이용하여 밴드 강도를 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 19는 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 융합 단백질인 MnSOD의 발현을 Image J 소프트웨어를 이용하여 밴드 강도를 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 20은 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 P(phosphor)-eNOS, T(total)-eNOS, P-Akt, T-Akt, IDH2 및 베타-액틴의 발현 정도를 확인하여, Akt 및 eNOS의 인산화 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 21은 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 총 eNOS 단백질에 대한 인산화 eNOS 발현 단백질을 Image J 소프트웨어를 이용하여 농도계로 분석하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 22는 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포에서 총 Akt 단백질에 대한 인산화 Akt 발현 단백질을 Image J 소프트웨어를 이용하여 농도계로 분석하여 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 23은 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질감염된 MS-1 내피 세포의 상등액에서 세포 NO(일산화질소) 생산 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 24는 야생형(WT) 또는 IDH2 KO 마우스(KO)의 대동맥 조직에서 P(phosphor)-eNOS, T(total)-eNOS, P-Akt, T-Akt, IDH2 및 베타-액틴의 발현 정도를 확인하여, Akt 및 eNOS의 인산화 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 25는 야생형(WT) 또는 IDH2 KO 마우스(KO)의 대동맥 조직에서 총 eNOS 또는 단백질에 대한 인산화 eNOS 발현 단백질을 Image J 소프트웨어를 이용하여 농도계로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 26은 야생형(WT) 또는 IDH2 KO 마우스(KO)의 대동맥 조직에서 총 Akt 단백질에 대한 인산화 Akt 발현 단백질을 Image J 소프트웨어를 이용하여 농도계로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 27은 야생형(WT) 또는 IDH2 KO 마우스(KO)의 대동맥 조직에서 아르기나아제(Arginase) 활성을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 28은 야생형(WT) 또는 IDH2 KO 마우스(KO)의 혈장에서 NO(일산화질소) 생산 정도를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 29는 야생형(WT) 또는 IDH2 KO 마우스(KO)의 대동맥 링(aortic rings)에 처리된 아세틸콜린에 따른 혈관 수축(vasorelaxation) 정도를 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 30은 야생형(WT) 또는 IDH2 KO 마우스(KO)의 대동맥 링(aortic rings)에 처리된 SNP(Sodium nitroprusside)에 따른 혈관 수축(vasorelaxation) 정도를 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 31은 야생형(WT) 또는 IDH2 KO 마우스(KO)의 대동맥 링(aortic rings)에 처리된 페닐에피린에 따른 생물학적 이용 가능한 일산화질소(bioavailable NO)를 측정한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명은 이소시트릴산 탈수소화효소 2(IDH2)를 포함하는 혈관 질환 진단용 바이오 마커 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명에 있어서, "이소시트릴산 탈수소화효소 2(IDH2)"는 IDH2는 미토콘드리아 산화 환원의 균형을 조절하고, 산화 스트레스에 의한 세포 손상을 감소하는 데 중요한 역할을 한다.
- [0022] 본 발명에 있어서, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 상기 진단은 발병 여부뿐만 아니라 예후, 암의 경과, 병기 등을 확인하는 것을 모두 포함하는 의미이다. 본 발명의 목적상, 진단은 혈관 질환의 발병, 예후, 경과, 병기 상태 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다.
- [0023] 본 발명에서 있어서, "바이오 마커"는 진단용 마커 또는 진단 마커로도 쓰일 수 있으며, 생물학적 시료에서 혈관 질환 감염 여부를 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 정상 시료에 비하여 혈관 질환에 감염된 환자에서 채취한 시료에서 IDH2의 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다.
- [0024] 상기 혈관 질환은 고혈압, 동맥경화증, 심장발작, 뇌졸중, 암, 노화, 발기부전, 겸상 적혈구 빈혈증(sickle cell disease), 당뇨병, 협심증, 심근경색, 관절염, 당뇨병성 망막증, 건선, 신생혈관 녹내장, 혈관종 및 허혈성 질환으로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, IDH2의 저해 시, 도 32에 나타난 바와 같이, 미토콘드리아의 OXPHOS 복합체는 감소되고 mtROS가 증가됨을 확인하였다. 이에 따라, 융합 단백질인 Mfn-1 및 OPA-1와 분해 단백질인 Drp-1의 발현이 증가되고, 미토콘드리아의 주요 항산화제 중 하나인 MnSOD 단백질의 발현이 감소됨을 확인하였다. 이에 따라, 미토콘드리아 역학(dynamics)이 변화되어 Akt-eNOS 기전이 저해되어 NO(일산화질소) 생성이 저해됨을 확인하였다. 또한, 마우스의 대동맥 내에서 IDH2의 저해 시, eNOS가 감소되고, 혈청 및 생물학적 이용 가능한 일산화질소(bioavailable NO)가 낮아지고 대동맥의 혈관이 수축함을 확인하였다.
- [0027] 또한 본 발명은, IDH2의 발현 또는 활성; 또는 IDH2을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 측정하는 제제를 포함하는, 혈관 질환 진단용 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명에 있어서, "IDH2의 발현 또는 활성; 또는 IDH2을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 측정하는 제제"란 상기와 같이 혈관 질환 환자의 생물학적 시료에서 발현이 감소하는 마커인 IDH2의 단백질 또는 이를 코딩하는 mRNA에 특이적으로 결합하여, 이의 발현 또는 활성 수준을 확인함으로써 마커의 검출에 사용될 수 있는 분자를 의미한다.
- [0029] 상기 IDH2의 발현 또는 활성을 측정하는 제제는 상기 IDH2에 특이적으로 결합하는 올리고펩타이드, 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 키메릭(chimeric) 항체, 리간드, PNA(Peptide nucleic acid) 또는 앵타머(aptamer)일 수 있다.
- [0030] 본 발명에 있어서 "IDH2 발현 또는 활성을 측정"이란 혈관 질환을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서의 혈관 질환 마커 유전자에서 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 상기 단백질에 대하여 특이적으로 결합하는 분자를 이용하여 단백질의 양을 확인하는 것이다.
- [0031] 이를 위한 분석 방법으로는 웨스턴 블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(rocket) 면역전기영동, 조직 면역 염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩(protein chip) 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명에 있어서, "항체"란 당해 분야에서 공지된 용어로서 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 본 발명의 목적상, 항체는 본 발명의 마커인 IDH2에 대해 특이적으로 결합하는 항체를 의미하며, 이러한 항체는, 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서만 들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함된다. 본 발명의 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함된다. 나아가, 본 발명의 항체에는 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함된다.
- [0033] 본 발명의 혈관 질환 진단용 마커의 검출에 사용되는 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란

적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.

- [0034] 상기 IDH2를 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 측정하는 제제는 상기 IDH2 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 siRNA(small interference RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머 쌍 또는 프로브일 수 있다.
- [0035] 본 발명에 있어서, "mRNA 발현수준 측정"이란 혈관 질환을 진단하기 위하여 생물학적 시료에서 혈관 질환 진단용 마커 유전자의 mRNA 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, mRNA의 양을 측정함으로써 알 수 있다. 이를 위한 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩 등이 있으나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명에 있어서, "siRNA"는, 이중가닥의 RNA가 다이스에 의해 절단되어 생성되는 21-25 뉴클레오타이드 크기의 작은 RNA 조각으로 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제하는 것을 말한다. 본 발명의 목적 mRNA에 특이적으로 결합하여 상기 유전자의 발현을 억제하는 것을 의미한다. siRNA는 화학적으로 또는 효소학적으로 합성될 수 있다. siRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다.
- [0037] 상기 siRNA는 서열번호 1 또는 2로 표시되는 염기서열을 포함하는 IDH2 siRNA이나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 본 발명에 있어서, "shRNA"는, 45 내지 70 뉴클레오타이드의 길이를 가지는 단일가닥의 RNA로서 타겟유전자 siRNA 염기서열의 sense와 상보적인 nonsense 사이에 3-10 개의 염기 링커를 연결하는 올리고 DNA를 합성한 후 플라스미드 벡터에 클로닝하거나 또는 shRNA를 레트로바이러스인 렌티바이러스(lentivirus) 및 아데노바이러스(adenovirus)에 삽입하여 발현시키면 루프(loop)가 있는 헤어핀(hairpin) 구조의 shRNA (short hairpin RNA)가 만들어지고 세포 내의 Dicer에 의해 siRNA로 전환되어 RNAi 효과를 나타내는 것을 의미한다. shRNA(small hairpin RNA)를 포함한 발현 컨스트럭트/벡터는 당분야에서 공지된 방법으로 제조할 수 있다.
- [0039] 본 발명에 있어서 "miRNA(microRNA)"는, mRNA의 3' 비번역 영역(UTR) 부위와의 염기결합을 통해 전사 후 억제자 역할을 하는 대략 22 nt의 비번역 RNA를 의미한다. miRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다.
- [0040] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 짧은 자유 3말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성이 개시할 수 있다. 본 발명에서는 IDH2 폴리뉴클레오타이드의 센스 및 안티센스 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 실시하여 원하는 생성물의 생성 여부를 통해 암을 진단할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0041] 본 발명에 있어서, "프로브"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 라벨링 되어 있어서 특정 mRNA의 존재 여부를 확인할 수 있다. 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서는 IDH2 폴리뉴클레오타이드와 상보적인 프로브를 이용하여 혼성화를 실시하여, 혼성화 여부를 통해 암을 진단할 수 있다. 적당한 프로브의 선택 및 혼성화 조건은 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포라미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 당해 분야에 공지된 많은 수단을 이용하여 변형시킬 수 있다. 이러한 변형의 비-제한적인 예로는 메틸화, "캡화", 천연 뉴클레오타이드 하나 이상의 동족체로의 치환, 및 뉴클레오타이드 간의 변형, 예를 들면, 하전되지 않은 연결체(예: 메틸 포스포네이트, 포스포트리에스테르, 포스포로아미데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.
- [0044] 또한 본 발명은, 상기 조성물을 포함하는 혈관 질환 진단용 키트를 제공한다.
- [0045] 상기 키트에는 IDH2의 발현 또는 활성; 또는 IDH2를 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 측정하는 제제뿐만 아

나라, 면역학적 분석에 사용되는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함될 수 있다.

- [0046] 상기 도구 또는 시약의 일 예로, 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 발색단(chromophores), 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등이 포함되나 이에 제한되지 않는다. 표지물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있다. 담체는 가용성 담체, 불용성 담체가 있고, 가용성 담체의 일 예로 당 분야에서 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS가 있고, 불용성 담체의 일 예로 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소 수지, 가교 텍스트란, 폴리스카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가로오스 및 이들의 조합일 수 있다.
- [0047] 본 발명의 키트는 상술한 바이오 마커 조성물 및 진단용 조성물을 구성으로 포함하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [0049] 또한 본 발명은, 생물학적 시료에서 IDH2의 발현 또는 활성; 또는 IDH2를 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 측정하는 단계를 포함하는, 혈관 질환 진단에 대한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0050] 상기 진단에 대한 정보는 혈관 질환 환자의 IDH2 저해에 따른 혈관의 손상에 대한 측정 정보이고, 본 발명의 목적상, IDH2의 발현 또는 활성이 저해된 것으로 측정되는 경우, 혈관 내피 세포 및 마우스 내 대동맥의 미토콘드리아의 OXPHOS 복합체 활성 및 MnSOD 단백질의 발현을 감소시키고, mtROS 활성을 증가시키며, Mfn-1, OPA-1 및 Drp-1의 단백질 발현을 증가시켜 미토콘드리아 역학(dynamics)이 변화되어 Akt-eNOS 기전이 저해되어 NO(일산화질소) 생성 저해 및 ROS 생성이 유도되는 것으로 혈관 기능 장애를 야기시킨다는 것을 제시하며, 이를 기반으로 본 발명은 대상의 혈관 손상에 따른 혈관 질환에 대한 정보를 제공한다.
- [0052] 또한 본 발명은, IDH2를 포함하는 혈관 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0053] 상기 약학적 조성물에서 IDH2는 IDH2가 저해된 혈관 질환을 갖는 개체에서 IDH2의 발현 또는 활성을 증가시킬 수 있는 목적을 달성하기 위한 물질이다. IDH2에서 유래된, 단백질의 형태 또는 이를 포함하는 벡터 등의 유전자 전달체 및 단백질 전달체 등을 제한 없이 포함할 수 있다.
- [0054] 본 발명에 있어서, "예방"은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸리기 쉬운 경향이 있는 동물에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다. 본 명세서에서 용어 "치료"는 혈관 질환 또는 질병의 발전의 억제; 혈관 질환 또는 질병의 경감; 및 혈관 질환 또는 질병의 제거를 의미한다.
- [0055] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 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 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0057] 본 발명의 약학적 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.
- [0058] 한편, 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.0001-100 mg/kg(체중)이다.
- [0059] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구로 투여되는 경우, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물은 적용되는 질환의 종류에 따라, 투여 경로가 결정되는 것이 바람직하다.
- [0060] 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분인 증진제 내 해당 유전자 또는 이의 단백질의 발현 억제제의 농도는 치료 목적, 환자의 상태, 필요 기간, 질환의 위중도 등을 고려하여 결정하며 특정 범위의 농도로 한정되지

않는다.

[0061] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0063] 또한 본 발명의 목적은, (1) 실험군으로서 생물학적 시료에 스크리닝 하고자 하는 대상 물질을 처리하는 단계; (2) 상기 (1)의 실험군 생물학적 시료와 대상 물질을 처리하지 않은 대조군 생물학적 시료에서 IDH2의 발현 또는 활성; 또는 IDH2을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 측정하여 비교하는 단계; 및 (3) 상기 (2)의 대조군과 비교하여 실험군의 IDH2의 발현 또는 활성; 또는 IDH2을 코딩하는 유전자의 발현 또는 활성을 증가시키는 대상 물질을 선별하는 단계;를 포함하는 혈관 질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0065] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0067] 실험예 1. 실험 준비 및 수행 조건

[0068] 1-1. 세포 배양 및 형질주입 사용한 동물

[0069] 마우스 MS-1 내피세포는 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 구입하였고, 배양은 5% 소태아 혈청, 10 U/ml 페니실린 및 10 mg/ml 스트렙토마이신이 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)배지에서 배양하였다. 아-융합성의(Sub-confluent) 증식성 MS-1 세포는 2-8 계대 이후 사용하였다. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)에서 구입한 리포펙타민 2000 시약을 제조사의 매뉴얼에 따라 이용하여, 상기 세포에 마우스 IDH2 short interfering RNA (siRNA)(서열번호 1(sense); 5'-GCGACCAGUACAAGGCCACAGAUUU-3' 및 서열번호 2(antisense); 5'-AAAUCUGUGGCCUUGUACUGGUCGC-3') 또는 음성 대조군 siRNA를 형질 주입하였다.

[0071] 1-2. 사용한 동물

[0072] 모든 동물 실험은 충남대학교의 동물관리위원회(CNU-00084)의 가이드라인에 따라 수행하였다. 본 발명의 동물은 *idh2/ germ-line knockout* (IDH2 KO) 수컷 마우스를 이용하였으며, 이의 유사 유전자형 배경 균주(C57BL/6 J)는 야생형 (wild-type, WT)(*idh2+/+*)으로 대조군으로서 사용하였다. 상기 마우스를 광조건(매일 6:00 am 부터 18:00 pm까지) 및 온도 조건($24 \pm 1^\circ\text{C}$)으로 조절한 환경에서 유지시키고, 먹이 및 식수는 제한 없이 제공하였으며, 모든 장비는 무균 조건하에 사용하였다.

[0074] 1-3. 항체 준비 및 웨스턴 블랏 수행 조건

[0075] 본 발명에서 사용한 항-IDH2, 항-eNOS, 항-Mfn-1, 항-Mfn-2, 항-Drp-1, 항-OPA-1, 항-TOM22, 항-phospho Akt 항체 및 DAF-FM DA 다이는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서, 항-phospho eNOS 및 항-총 Akt 항체는 Cell Signaling(Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. OXPHOS complex subunits(NDUFA9, SDHA, UQCRC2, COX4 및 ATP5A1)에 대한 항체는 Invitrogen에서, 항- β actin 항체는 Sigma Aldrich에서, 항-OPA-1 항체는 BD Biosciences (NJ, USA)에서 구입하였다.

[0076] 웨스턴 블랏 수행 조건으로는, 구체적으로, 30 μg 의 전-세포 용해물 또는 조직 균질은 해당 일차 및 이차 항체를 이용하였고, 전-세포에서 미토콘드리아 분리는 Mitochondria Isolation Kit for Cultured Cells from Thermo Scientific(Waltham, MA, USA)를 이용하여 수행하였다. 블랏은 chemiluminescence assay kit를 이용하여 Pharmacia Amersham (Freiburg, Germany)에서 영상화하였으며, 밴드 농도는 Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA)를 이용하여 Gel Doc 2000 Chemi Doc system상에서 정량하였다. 각 값은 β -actin(로딩 대

조군)을 통하여 표준화하였다.

[0078] 1-4. 미토콘드리아 ROS 측정

[0079] 음성 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입된 MS-1 세포 내 미토콘드리아 ROS 수준은 MitoSOX Red dye(Invitrogen)를 이용하여 미토콘드리아 ROS를 측정하였다. 구체적으로, 음성 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA을 MS-1 세포에 도입하여 형질 감염한 후 48 시간 배양하고, 상기 세포를 PBS로 두 번 세척하고, 트립신 처리 후, 3 μ M MitoSOX Red가 포함된 완전 배지에 37도, 15분 및 암조건으로 배양하였다. 배양 기간 동안, 시약이 ROS에 충분히 반응하였는지 확인하기 위하여 매 5분씩 교반하였다. 형광 배경(fluorescence background)을 감소시키기 위하여, 각 샘플을 PBS로 두 번 세척한 후, 각 530 nm 및 590 nm의 여기 및 방출 파장으로 Fluoroskan Ascent fluorescence reader(Thermo Scientific)을 이용하여 형광 강도를 검출하였다. 각 MitoSOX 형광은 각각 수득한 형광 강도에서 각 블랭크 수준(MitoSOX에 대한 염색 처리하지 않은 세포)을 감산하여 표준화하였다.

[0081] 1-5. 산소 소비 비율(Oxygen consumption rate, OCR) 측정

[0082] OCR은 Seahorse XF-24 analyzer(Seahorse Bioscience, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 구체적으로, OCR 측정 전날에, 37도의 조건에서 센서 카트리지를 보정 버퍼(Seahorse Bioscience)로 측정하였다. 음성 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA을 MS-1 세포에 도입하여 형질 감염한 후 48 시간 배양한 후, 상기 세포를 탄산수소나트륨 및 페놀 레드가 포함되지 않은 XF media로 2회 세척하고 37도에서 45분에서 1시간 동안 배양하여 이를 측정에 이용하였다. 각 미토콘드리아 억제제 후 후속 억제제를 첨가한 후 3회 리딩하였다. 상기 미토콘드리아 억제제는 다음을 사용하였다: 올리고마이신(2 μ g/ml), CCCP(carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine)(10 μ M) 및 로테논(rotenone)(2 μ M). OCR은 자동적으로 계산되었으며, 센서 카트리지 및 Seahorse XF-24 소프트웨어로 기록하였다. 단백질 농도는 웰 당 세포와 거의 동일한 수를 확인하기 위해 계산하였다.

[0084] 1-6. 미토콘드리아 분절 측정

[0085] 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA을 MS-1 세포에 도입하여 형질 감염한 후 48 시간 배양한 후, 미토콘드리아 형태적 특성을 확인하였다. 구체적으로, 미토콘드리아를 시각화하기 위하여, 10⁻⁷ M MitoTracker Red FM (Cell Signaling, MA, USA)를 이용하여 30분 동안 상기 세포를 염색하였다. 염색된 세포를 media를 이용하여 3회 세척한 후, 공 초점 현미경을 이용하여 이미지를 촬영하였다.

[0087] 1-7. 질소 산화물 함량 확인을 위한 DAF-FM DA 염색

[0088] DAF-FM DA(diaminofluorescein-FM diacetate; 3-amino, 4-aminomethyl-2',7'-difluorofluorescein diacetate)는 세포 투과성 산화 질소(nitric oxide, NO) 지표이므로, 세포 내 질소 산화물 함량을 확인하기 위하여 이를 사용하였다. 구체적으로, 음성 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA을 MS-1 세포에 도입하여 형질 감염한 후 48 시간 배양한 후, 상기 세포를 페놀-프리 DMEM media에 37도, 10분 조건으로 10 μ M DAF-FM DA를 첨가하여 배양하였다. fluorescence microscope(Carl Zeiss, New York)를 이용하여 이미지를 촬영하였으며, 형광 강도는 Image J 소프트웨어를 이용하여 측정하였다.

[0090] 1-8. 산화 질소(Nitric oxide) 검정

[0091] NO 대사 산물인(metabolites) 아질산염(NO₂) 및 질산염(NO₃)은 NO(일산화질소)의 안정적 파괴 산물이므로, 산화 질소는 Nitrate/nitrite Fluorometric Assay Kit(Cayman Chemicals, Lexington, KY, USA)를 제조사의 매뉴얼에 따라 분석하였다. Media를 10-kDa cutoff filter (Microcon YM10 Millipore, Billerica, MA, USA)를 이용하여 단백질을 제거하였다. 배경 형광(background fluorescence)을 제거한 후, 값은 총 단백질 양을 수득하는 것으로 표준화하였다.

[0093] 1-9. 혈관의 반응도(Vascular reactivity) 측정

[0094] 페닐레프린(Phenylephrine, PE), 아세틸콜린(acetylcholine, Ach), 니트로프루시드 나트륨(sodium nitroprusside, SNP), 및 L-NAME($N\omega$ -nitro-L-arginine methyl ester)는 Sigma Aldrich에서 구입한 후, 탈 이온수에 용해하였다. 2-3개월된 성인 마우스를 과도한 우레탄 마취로 희생시키고, 중간-흉골 분할을 수행하였다. 그 후, 대동맥을 조심스럽게 절제하고 차가운 크랩 버퍼(118.3 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 2.5 mM $CaCl_2$, 1.2 mM KH_2PO_4 , 25 mM $NaHCO_3$, 1.2 mM $MgSO_4$, 11 mM glucose 및 0.0026 mM $CaNa_2$ EDTA)에 두었다. 대동맥의 과다 지방을 제거한 후, 5-10 고리(2.0-3.0 mm)의 크기로 횡방향으로 절단하였다. 상기 대동맥 고리를 Jung, S. B. 등의 방법으로(Jung, S. B. 등, 2013, PloS one 8, e65415) 혈관 반응도를 측정하였다.

[0096] 1-10. 마우스 유전형 분석

[0097] 염색체 DNA를 마우스 꼬리(2~3 mm 길이)에서 분리하였고, 제조사의 지침에 따라, KOD-FX (TOYOBO, Iwakuni, Japan) genotyping kit를 이용하여 PCR을 수행하였다. IDH2 KO 에 대한 프라이머는 다음과 같다: 정방향 프라이머(서열번호 3) (5'-GATAGAATTTCCGTGGCAAC-3'), 역방향 프라이머(서열번호 4)(5'-CCAGTCATAGCCGAATAGCC-3'). IDH2 WT(음성 대조군)에 대한 프라이머는 다음과 같다 : 정방향 프라이머(서열번호 5)(5'-ACTGTTCTGGAACATGCTGC-3'), 역방향 프라이머(서열번호 6)(5'-TCCTCAAAGCATCAGGTACC-3'). PCR 조건은 다음과 같다 : 94도에서 5분(1회 반복), 94에서 1분, 53도에서 1분, 72도에서 1분(35회 반복) 및 72도에서 5분 수행하였다.

[0099] 실시예 1. IDH2 녹다운에 따른 미토콘드리아 OXPHOS 기능 확인

[0100] 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질 감염된 MS-1 내피 세포를 이용하여 IDH2 저해에 따른 미토콘드리아 내 OXPHOS 발현 저해 정도를 확인하고, 미토콘드리아 내 OXPHOS에 대한 IDH2의 영향을 확인하였다.

[0101] 구체적으로, 상기 실험예 1-1의 방법에 따라, 대조군 siRNA 또는 서열번 IDH2 siRNA(10 및 50 pmol)을 MS-1 내피 세포에 형질 감염 뒤 48시간 배양하였다. 그 후, 상기 1-3의 웨스턴 블랏 방법을 이용하여, 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질 감염된 MS-1 내피 세포 내 IDH2 단백질 발현, OXPHOS의 서브 유닛 I, II, III, IV 및 V 단백질 및 대조군으로서 베타-액틴 단백질의 발현을 확인하였다(도 1). 또한, 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입되어 형질 감염된 MS-1 내피 세포 내 OXPHOS의 서브 유닛 I, II, III, IV 및 V 단백질 수준을 Image J 소프트웨어를 이용하여 계산하였다(도 2). 또한, 상기 1-5의 산소 소비 비율(Oxygen consumption rate, OCR) 측정 방법에 따라, Seahorse XF-24 flux analyzer를 이용하여 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA(10 및 50 pmol)이 도입된 MS-1 내피 세포에 순차적으로 ATP 합성 억제제인 Oligo(oligomycin), CCCP(carbonyl cyanide m-chloro phenyl hydrazine) 및 Rote(rotenone)을 각각 처리한 후, 이에 따른 OCR을 측정하였다(도 3). 또한, 상기 1-4의 미토콘드리아 ROS 측정 방법에 따라, 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA(10 및 50 pmol)이 도입된 MS-1 내피 세포의 ROS 수준 변화를 측정하기 위하여 MitoSOX Red dye를 염색하여 확인하였다(도 4). 또한, 망간-의존적 과산화물 제거 효소(manganese-dependent superoxide dismutase, MnSOD) 발현 수준을 확인하기 위하여, 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입된 MS-1 내피 세포의 MnSOD, IDH2 및 베타-액틴의 발현 정도를 상기 1-3의 웨스턴 블랏을 이용하여 확인하고(도 5(A)), Image J 소프트웨어를 이용하여 분석하였다(도 5(B)). 상기 결과를 도 1 내지 도 5에 나타내었다.

[0102] 도 1 및 2에 나타낸 바와 같이, 음성 대조군 siRNA이 도입된 세포보다, IDH2 siRNA이 도입된 세포에서 NDUF9(Complex I), UQCRC2(Complex III) 및 COX4 (Complex IV)의 발현 수준이 유의적으로 감소됨을 확인하였다.

[0103] 또한, 도 3에 나타낸 바와 같이, IDH2 siRNA이 도입된 세포에서 산소 소비 비율(OCR)이 대조군과 비교하여 특이적으로 감소함을 확인하였다.

[0104] 또한, 도 4에 나타낸 바와 같이, 50 pmol의 IDH2 siRNA 세포에서 MitoSox 형광 강도가 대조군과 비교하여 유의적으로 증가함을 확인하였다.

[0105] 또한, 도 5에 나타낸 바와 같이, IDH2 siRNA 세포에서 MnSOD 발현이 대조군에 비하여 특이적으로 감소함을 확인하였다.

[0106] 따라서, IDH2 저해는 내피 세포의 미토콘드리아 OXPHOS 발현을 저해하도록 영향을 끼쳐, 혈관 기능에 장애를 야기시킬 수 있음을 확인하였다.

[0108] 실시예 2. IDH2 억대운에 의한 미토콘드리아 역학(dynamics) 변화

[0109] 미토콘드리아는 종합적으로 미토콘드리아 역학이라고 하는 융합 및 분열이라 지칭된 과정을 통하여 형태학적 및 크기의 변화가 나타나며, 상기 과정은 산화적 스트레스를 통하여 자극된다. 따라서, 미토콘드리아 형태적 변화의 원인이 되는 분자 메커니즘을 확인하기 위하여, 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입된 MS-1 내피 세포의 미토콘드리아 내 융합 및 분열 단백질 밸런스를 확인하였다.

[0110] 보다 구체적으로, 상기 실험예 1-1의 방법에 따라, 대조군 siRNA 또는 서열번호 1 및 2의 IDH2 siRNA(50 pmol)을 MS-1 내피 세포에 형질 감염 뒤 48시간 배양하였다. 이 후, 상기 실험예 1-3의 웨스턴 블랏 방법에 따라, 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA(50 pmol)이 도입된 MS-1 내피 세포의 미토콘드리아 일부에서 융합 단백질인 Mfn-1, Mfn-2 및 OPA-1과, 분해 단백질인 Drp-1의 발현을 확인하였으며, TOM22 발현은 대조군으로서 이용하였다(도 6). 또한, 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA(50 pmol)이 도입된 MS-1 내피 세포의 미토콘드리아 일부에서 융합 단백질인 Mfn-1, Mfn-2 및 OPA-1에와, 분열 단백질인 Drp-1의 발현을 Image J 소프트웨어를 이용하여 밴드 강도를 측정하여 단백질 양을 확인하였다(도 7). 또한, 상기 실험예 1-6의 방법에 따라, MitoTracker Red로 염색하여 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA(50 pmol)이 도입된 MS-1 내피 세포의 미토콘드리아 형태를 공 초점 현미경을 이용하여 확인하였다(도 8). 그 결과를 도 6 내지 8에 나타내었다.

[0111] 도 6 및 도 7에 나타낸 바와 같이, IDH2이 억대운된 MS-1 세포는 대조군보다 융합 단백질인 Mfn-1이 유의적으로 감소됨을 확인하였다. 반면, 융합 단백질인 OPA-1 및 분해 단백질인 Drp-1는 특이적으로 증가함을 확인하였다.

[0112] 또한, 도 8에 나타낸 바와 같이, IDH2이 억대운된 MS-1 세포는 대조군보다 분절된 미토콘드리아가 더 많이 관찰됨을 확인하였다.

[0113] 따라서, IDH2 저해는 내피 세포의 미토콘드리아 역학에 영향을 끼쳐, 미토콘드리아 내 융합 및 분해 단백질의 비정상 밸런스를 유도하고, 미토콘드리아 분절을 유도함을 확인하여, 혈관 기능에 장애를 야기시킬 수 있음을 확인하였다.

[0115] 실시예 3. IDH2 억대운이 Akt-eNOS(Endothelial nitric oxide synthase) 기전에 미치는 영향 확인

[0116] eNOS의 인산화는 내피 세포 내에서 L-아르기닌으로부터 NO(일산화질소) 생성을 촉진하는 역할을 하고, L-아르기닌은 NO를 생산하는 NOS에 대한 기질이다. 아르기나아제(Arginase)는 L-아르기닌에 반응하고, 아르기나아제 활성은 세포의 활성화 및 밀접한 연관이 있다. 따라서, 내피세포에서 IDH2 결핍과 eNOS간의 관계를 확인하기 위하여, IDH2 억대운 세포에서 Akt 및 eNOS의 인산화를 확인하였다.

[0117] 구체적으로, 상기 실험예 1-1의 방법에 따라, 대조군 siRNA 또는 서열번호 1 및 2의 IDH2 siRNA(10 및 50 pmol)을 MS-1 내피 세포에 형질 감염 뒤 48시간 배양하였다. 이 후, 상기 실험예 1-3의 방법에 따라, 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA(10 및 50 pmol)이 각각 도입된 MS-1 내피 세포에서 P(phosphor)-eNOS, T(total)-eNOS, P-Akt, T-Akt, IDH2 및 베타-액틴의 발현 정도를 확인하여, Akt 및 eNOS의 인산화 정도를 확인하였다(도 9). 또한, 총 eNOS 또는 Akt 단백질에 대한 인산화 eNOS 또는 Akt 발현 단백질량을 Image J 소프트웨어를 이용하여 농도계로 분석하여 확인하였다(도 10 및 도 11). 또한, 상기 실험예 1-8의 방법에 따라, 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 각각 도입된 MS-1 내피 세포의 상등액에서 세포 NO(일산화질소) 생산 정도를 확인하였다(도 12). 또한, 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 각각 도입된 MS-1 내피 세포에 NO(일산화탄소)의 형광 지표인 DAF-FM DA 염색 처리하여 NO(일산화질소) 수준 변화를 확인하고(도 13(A)), 이에 대한 형광 강도를 측정하였다(도 13(B)). 그 결과를 도 9 내지 13에 나타내었다.

[0118] 도 9 내지 도 11에 나타낸 바와 같이, Akt 및 eNOS의 인산화 발현은 대조군에 비하여 각 10 및 50 pmol 농도로 IDH2이 억대운된 MS-1 세포에서 모두 유의적으로 감소됨을 확인하였다.

[0119] 또한, 도 12에 나타낸 바와 같이, IDH2이 억대운된 MS-1 세포에서 NO(일산화질소)의 생산이 대조군과 비교하여 현저히 낮음을 확인하였다.

- [0120] 또한, 도 13에 나타난 바와 같이, IDH2이 녹다운된 MS-1 세포에서 대조군과 비교하여 DAF-FM DA 형광 강도가 감소하고, NO(일산화탄소) 생성이 감소됨을 확인하였다.
- [0121] 따라서, IDH2 저해는 내피 세포에서 eNOS의 활성을 저해하여, 혈관 기능에 장애를 야기시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0123] **실시예 4. mtROS(mitochondrial reactive oxygen pieces)의 저해에 따른 미토콘드리아 손상, 내피 질소 산화물 합성(endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 인산화 및 NO(일산화질소) 생산 회복**
- [0125] 4-1. mtROS(mitochondrial reactive oxygen pieces)의 저해에 따른 미토콘드리아 손상 회복
- [0126] IDH2 녹다운에 따른 미토콘드리아 노쇠(senescence) 및 미토콘드리아 역학(dynamic)에 대한 mtROS의 역할을 확인하였다.
- [0127] 구체적으로, 상기 실험에 1-1의 방법에 따라, 미토콘드리아 특이 O_2^- 스캐빈저(scavenger)로서, 10 nM Mito-TEMPO를 MS-1 내피 세포에 1시간 처리한 후, 대조군 siRNA 또는 서열번호 1 및 2의 IDH2 siRNA(10 및 50 pmo l)을 MS-1 내피 세포에 형질 감염 뒤 48시간 배양하였다. 상기 1-5의 실험예의 방법에 따라, 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 각각 도입된 MS-1 내피 세포의 미토콘드리아 ROS 수준 변화 측정을 위하여, MitoSOX Red dye로 염색하여 측정하였다(도 14). 또한, 상기 1-3의 웨스턴 블랏 방법에 따라, 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 각각 도입된 MS-1 내피 세포의 미토콘드리아 내 융합 단백질인 Mfn-1 및 OPA-1과, 분해 단백질인 Drp-1 및 항산화 관련 단백질인 MnSOD의 발현을 확인하였으며, TOM22는 대조군으로 이용하였다(도 15). 또한, 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 각각 도입된 MS-1 내피 세포의 미토콘드리아 융합 단백질인 Mfn-1, OPA-1, Drp-1 및 MnSOD의 발현을 Image J 소프트웨어를 이용하여 밴드 강도를 측정하였다(도 16 내지 19). 그 결과를 도 14 내지 19에 나타내었다.
- [0128] 도 14에 나타난 바와 같이, IDH2이 녹다운된 MS-1 세포에서 미토콘드리아ROS 수준은 감소됨을 확인하였다.
- [0129] 또한, 도 15 내지 도 19에 나타난 바와 같이, IDH2이 녹다운된 MS-1 세포에서 미토콘드리아 내 융합 단백질인 Mfn-1 및 항산화 관련 단백질인 MnSOD의 발현은 유의적으로 감소하였으나, 융합 단백질인 OPA-1과, 분해 단백질인 Drp-1 및 의 발현을 확인하여, IDH2 저해는 미토콘드리아 내 융합 또는 분해 단백질의 밸런스를 비정상적으로 유도함을 확인하였다. 또한, 미토콘드리아 특이 O_2^- 스캐빈저(scavenger)로서 Mito-TEMPO 처리한 군에서는 IDH2이 녹다운된 MS-1 세포와 반대의 결과를 나타내므로, Mito-TEMPO 처리는 산화 스트레스 환경으로부터 내피 세포를 보호함을 확인하였다. 따라서, IDH2 저해는 mtROS를 증가시키고, mtROS의 저해 시에는 미토콘드리아의 손상이 회복됨을 확인하여, IDH2 저해는 혈관 기능에 장애를 야기시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0131] 4-2. mtROS(mitochondrial reactive oxygen pieces)의 저해에 따른 내피 질소 산화물 합성(endothelial nitric oxide synthase ,eNOS) 인산화 및 NO(일산화질소) 생산 회복
- [0132] IDH2 녹다운 세포 상에서, eNOS 활성에 대한 mtROS의 저해에 따른 조절적 역할을 확인하였다.
- [0133] 구체적으로, 상기 실험에 1-1의 방법에 따라, 미토콘드리아 특이 O_2^- 스캐빈저(scavenger)로서, 10 nM Mito-TEMPO를 MS-1 내피 세포에 1시간 처리한 후, 대조군 siRNA 또는 서열번호 1 및 2의 IDH2 siRNA(10 및 50 pmo l)을 MS-1 내피 세포에 형질 감염 뒤 48시간 배양하였다. 상기 1-3의 실험예의 방법에 따라, 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 도입된 MS-1 내피 세포에서 P(phosphor)-eNOS, T(total)-eNOS, P-Akt, T-Akt, IDH2 및 베타-액틴의 발현 정도를 확인하여, Akt 및 eNOS의 인산화 정도를 확인하였다(도 20). 또한, 총 eNOS 또는 Akt 단백질에 대한 인산화 eNOS 또는 Akt 발현 단백질량을 Image J 소프트웨어를 이용하여 농도계로 분석하여 확인하였다(도 21 및 도 22). 또한, 상기 실험에 1-8의 방법에 따라, 대조군 siRNA 또는 IDH2 siRNA이 각각 도입된 MS-1 내피 세포의 상등액에서 세포 NO(일산화질소) 생산 정도를 확인하였다(도 23). 그 결과를 도 20 내지 도 23에 나타내었다.
- [0134] 도 20 내지 도 22에 나타난 바와 같이, Mito-TEMPO가 처리된 IDH2이 녹다운 MS-1 세포에서 Akt 및 eNOS 인산화

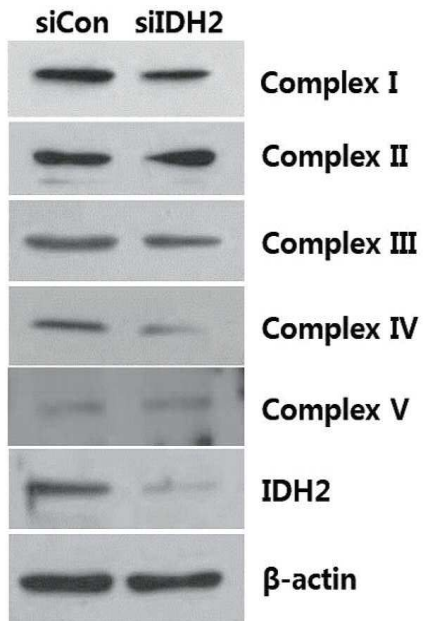
가 증가됨을 확인하였다.

- [0135] 또한, 도 23에 나타난 바와 같이, Mito-TEMPO가 처리된 IDH2이 넉다운 MS-1 세포에서 NO(일산화질소)가 증가됨을 확인하였다.
- [0136] 따라서, IDH2 저해를 통한 mtROS 수준의 조절은 내피 세포에서 eNOS 활성 및 미토콘드리아 기능에 영향을 미쳐, 혈관 기능에 장애를 야기시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0138] **실시예 5. IDH2 저해에 따른 Akt-eNOS 경로 저해로 인한 혈관 기능 손상**
- [0139] IDH2 저해에 따른 내피 세포 및 혈관 기능의 생리학적 관련성을 확인하기 위하여, 야생형(WT) 또는 IDH2 KO 마우스(KO)의 대동맥 조직의 eNOS 활성 및 혈관 수축을 확인하였다.
- [0140] 구체적으로, 상기 실험에 1-10의 야생형(WT) 또는 IDH2 KO 마우스(KO)의 대동맥 조직을 이용하였다. 상기 실험에 1-3의 웨스턴 블랏 방법을 수행하여, 야생형(WT) 또는 IDH2 KO 마우스(KO)의 대동맥 조직에서 P(phosphor)-eNOS, T(total)-eNOS, P-Akt, T-Akt, IDH2 및 베타-액틴의 발현 정도를 확인하여, Akt 및 eNOS의 인산화 정도를 확인하였다(도 24). 또한, 총 eNOS 또는 Akt 단백질에 대한 인산화 eNOS 또는 Akt 발현 단백질량을 Image J 소프트웨어를 이용하여 농도계로 분석하여 확인하였다(도 25 및 도 26). 또한, 아르기나아제(Arginase) 활성을 야생형(WT) 또는 IDH2 KO 마우스(KO)의 대동맥 조직을 이용하여 확인하였다(도 27). 또한, 상기 실험에 1-8의 방법에 따라, 야생형(WT) 또는 IDH2 KO 마우스(KO)의 혈장에서 NO(일산화질소) 생산 정도를 확인하였다(도 28). 또한, 상기 실험에 1-8의 방법에 따라, 각 4마리의 야생형(WT) 또는 IDH2 KO 마우스(KO)의 대동맥 링(aortic rings)에 처리된 아세틸콜린(도 29) 또는 SNP(Sodium nitroprusside)에 따른 혈관 수축(vasorelaxation) 정도를 측정하였다(도 30). 또한, 상기 실험에 1-8의 방법에 따라, 각 4마리의 야생형(WT) 또는 IDH2 KO 마우스(KO)의 대동맥 링(aortic rings)에 처리된 페닐에피린에 따른 생물학적 이용 가능한 일산화질소(bioavailable NO)를 측정하였다(도 31). 그 결과를 도 24 내지 31에 나타내었다.
- [0141] 도 24 내지 도 26에 나타난 바와 같이, IDH2 KO 마우스(KO)의 Akt 및 eNOS의 인산화는 야생형(WT)보다 감소됨을 확인하였다.
- [0142] 또한, 도 27에 나타난 바와 같이, IDH2 KO 마우스(KO)의 아르기나아제 활성은 야생형(WT)보다 더 증가됨을 확인하였다.
- [0143] 또한, 도 28에 나타난 바와 같이, IDH2 KO 마우스(KO)의 혈청 NO(일산화질소) 수준은 야생형(WT)보다 감소됨을 확인하였다.
- [0144] 또한, 도 29에 나타난 바와 같이, 아세틸콜린이 처리된 IDH2 KO 마우스(KO)의 대동맥 링 내피 세포의 혈관이 야생형(WT)보다 더 수축되었음을 확인하였다.
- [0145] 또한, 도 30에 나타난 바와 같이, SNP(Sodium nitroprusside)이 처리된 IDH2 KO 마우스(KO)의 대동맥 링 내피 세포의 혈관은 야생형(WT)과 비교하여 수축 정도가 유사함을 확인하여, IDH2 KO 마우스(KO)는 내피세포만이 수축됨을 확인하였다.
- [0146] 또한, 도 31에 나타난 바와 같이, IDH2 KO 마우스(KO)의 대동맥 링에서 야생형(WT)보다 생물학적 이용 가능한 일산화질소(bioavailable NO)가 더 낮음을 확인하였다.
- [0147] 따라서, IDH2 저해에 따라 세포 내 eNOS 활성이 감소되고 혈관이 수축함에 따라, 혈관 기능에 장애를 야기시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0149] 상기와 같은 결과를 통해 IDH2의 저해 시, 도 32에 나타난 바와 같이, 미토콘드리아의 OXPHOS 복합체는 감소되고 mtROS가 증가됨을 확인하였다. 이에 따라, 융합 단백질인 Mfn-1 및 OPA-1와 분해 단백질인 Drp-1의 발현이 증가되고, 미토콘드리아의 주요 항산화제 중 하나인 MnSOD 단백질의 발현이 감소됨을 확인하였다. 이에 따라, 미토콘드리아 역학(dynamics)이 변화되어 Akt-eNOS 기전이 저해되어 NO(일산화질소) 생성이 저해됨을 확인하였다. 또한, 마우스의 대동맥 내에서 IDH2의 저해 시, eNOS가 감소되고, 혈청 및 생물학적 이용 가능한 일산화질소(bioavailable NO)가 낮아지고 대동맥의 혈관이 수축함을 확인하였다.
- [0150] 따라서, IDH2의 저해 시, 혈관 손상을 야기시킬 수 있음을 확인하였으며, IDH2는 혈관 질환의 진단용, 예방 및

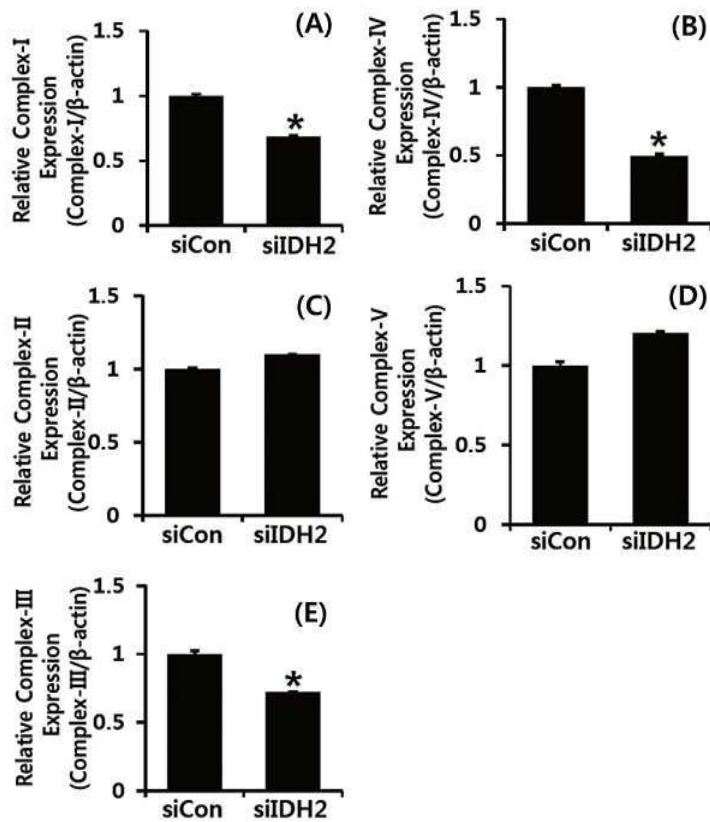
치료 용도로도 이용 가능함을 확인하였다.

도면

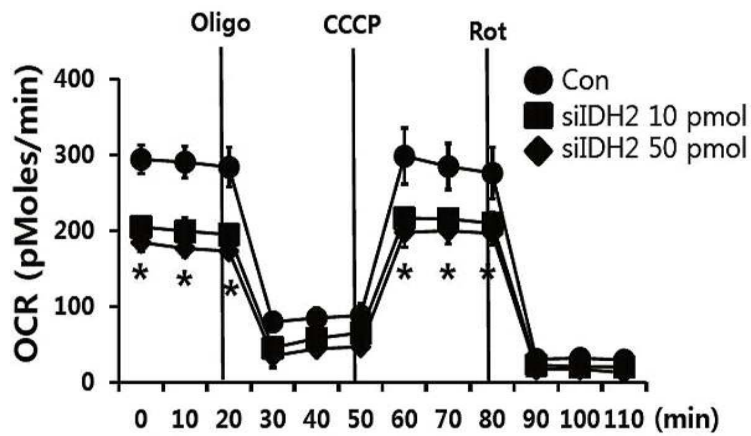
도면1



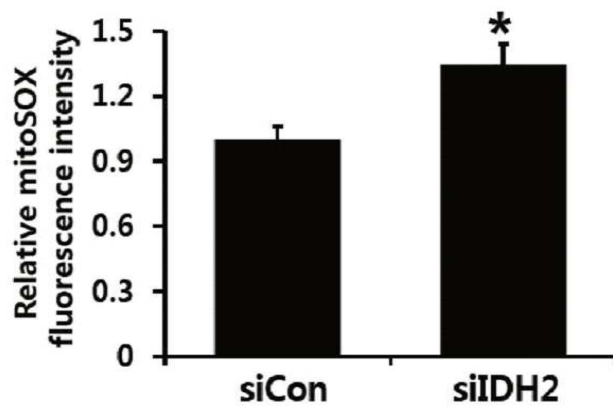
도면2



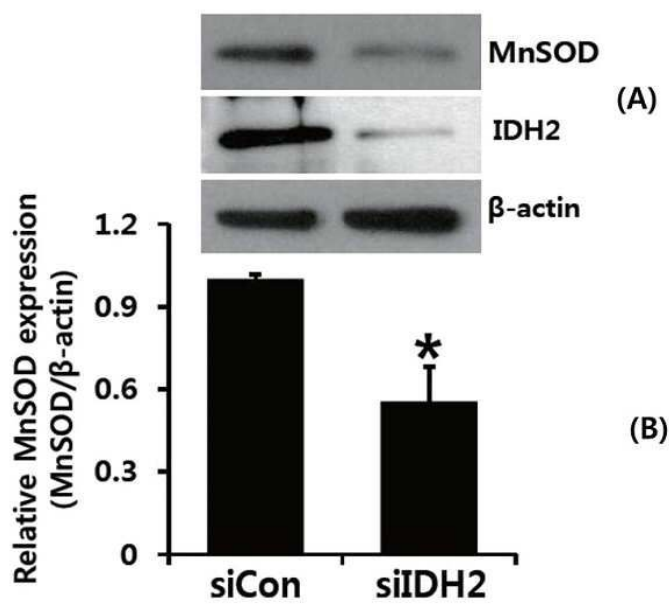
도면3



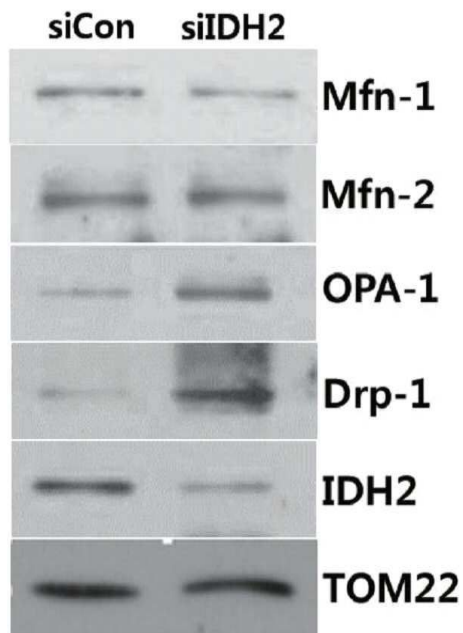
도면4



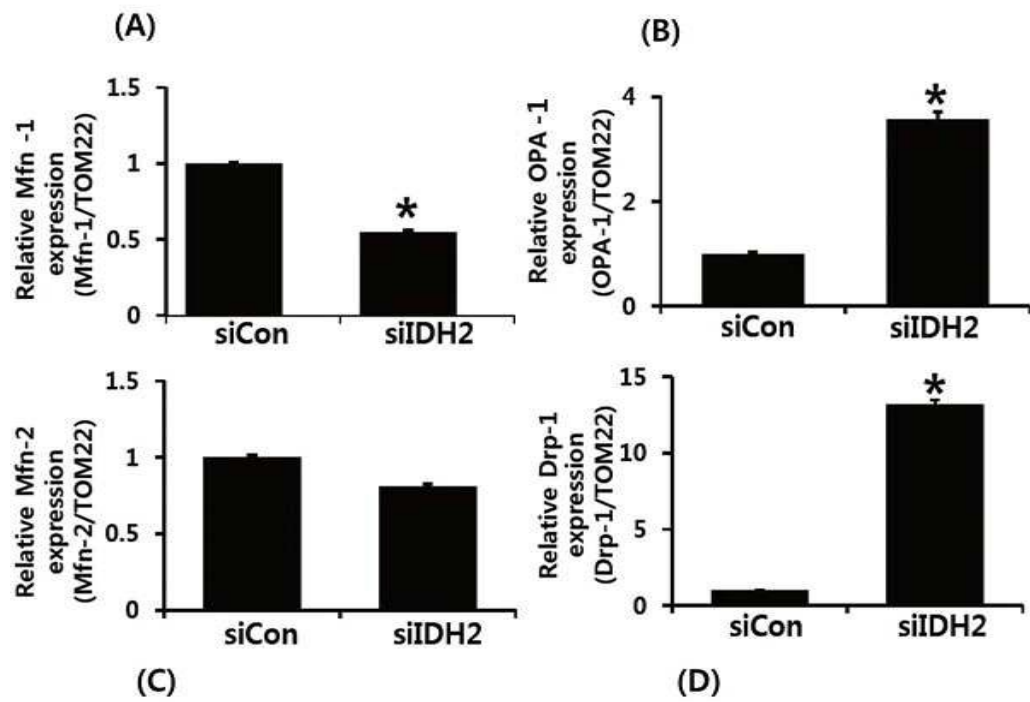
도면5



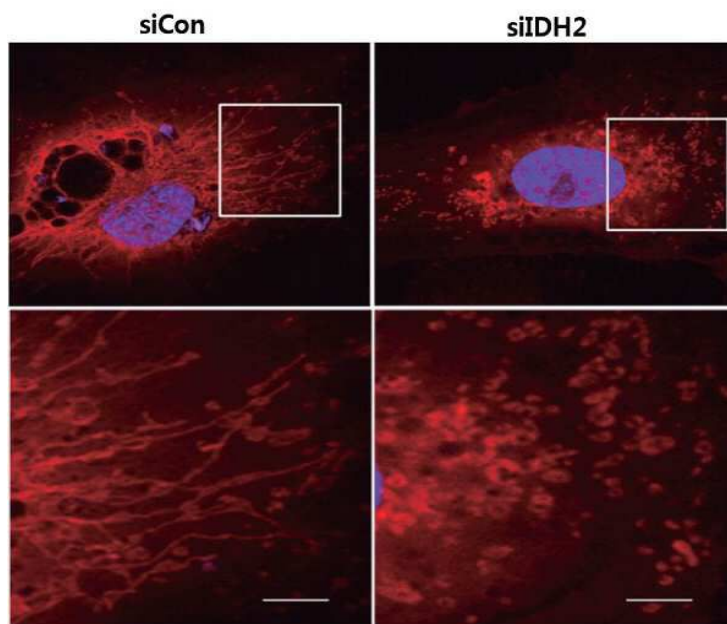
도면6



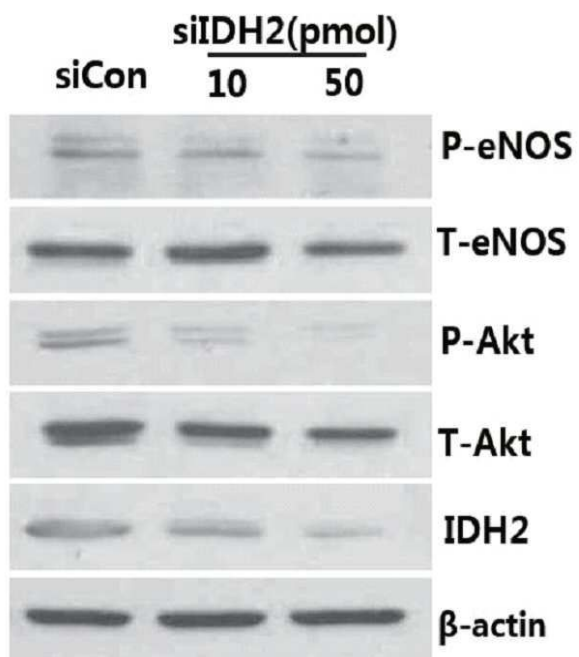
도면7



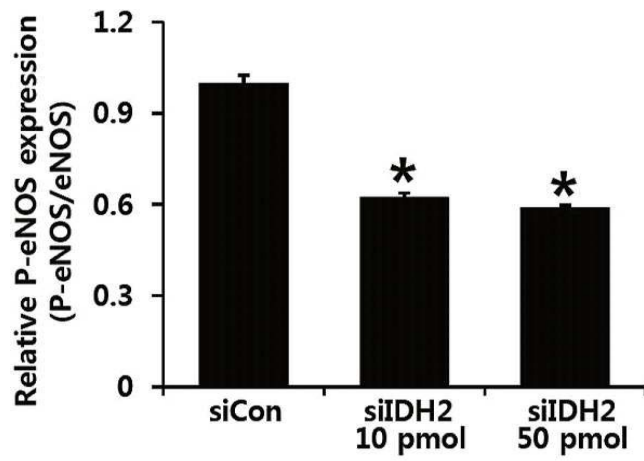
도면8



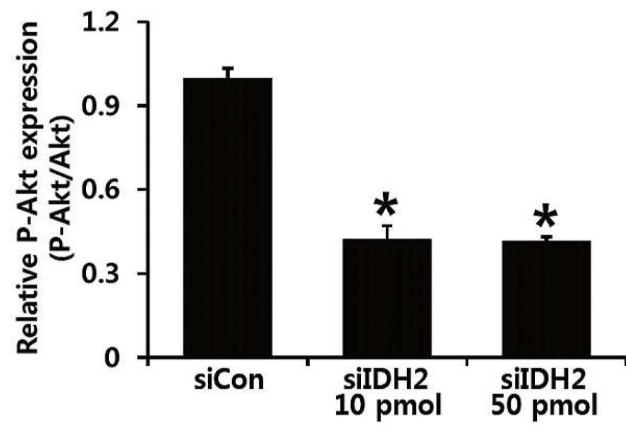
도면9



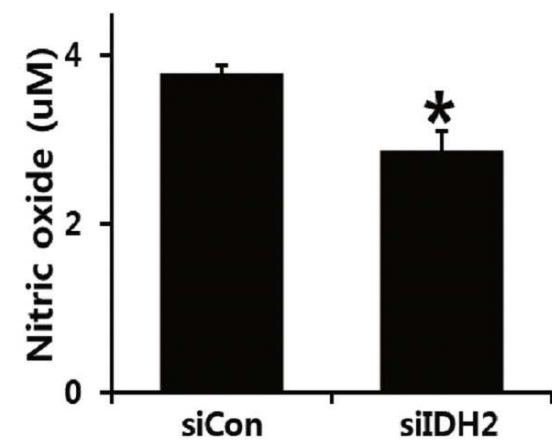
도면10



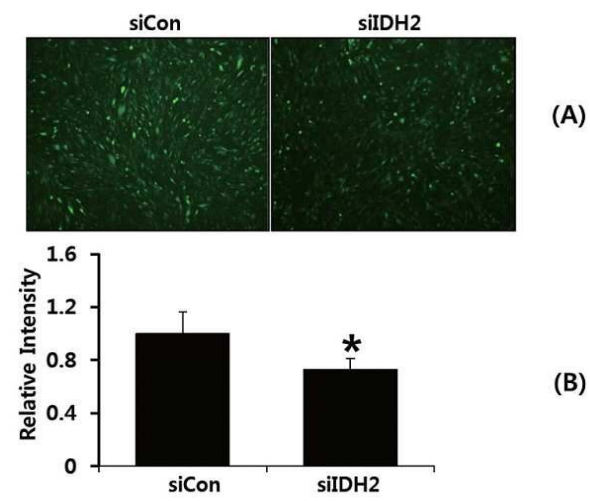
도면11



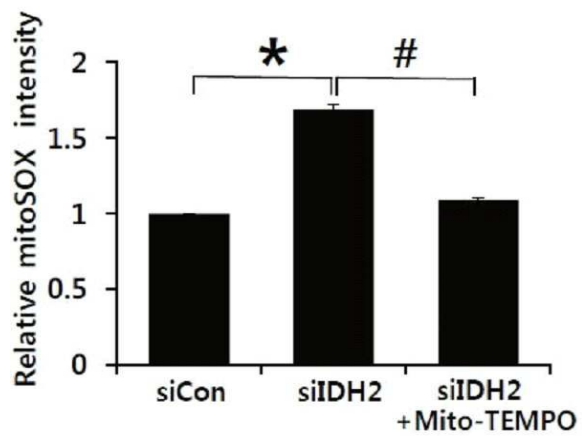
도면12



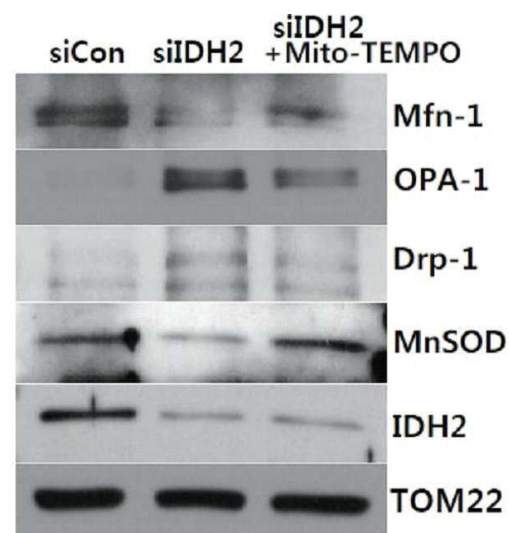
도면13



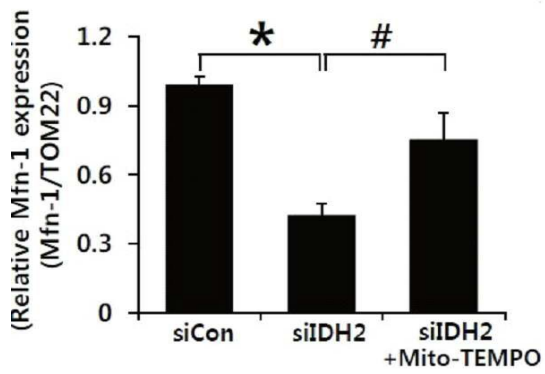
도면14



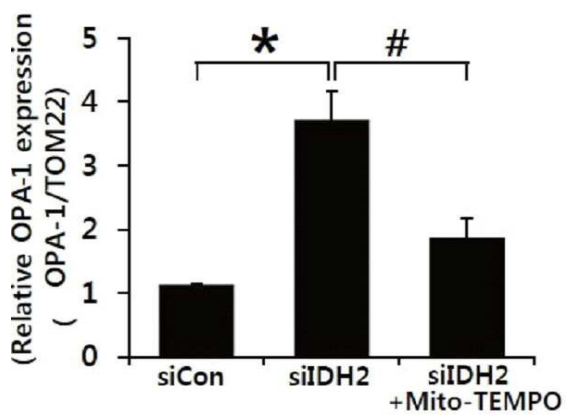
도면15



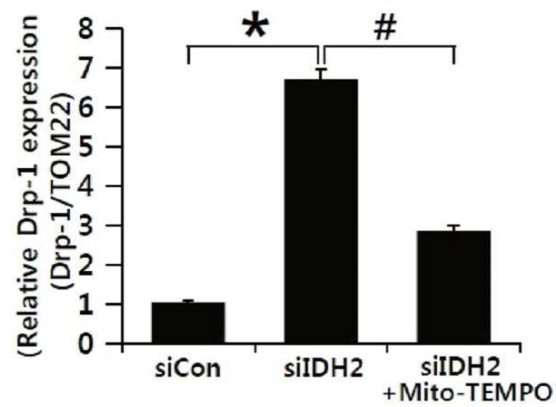
도면16



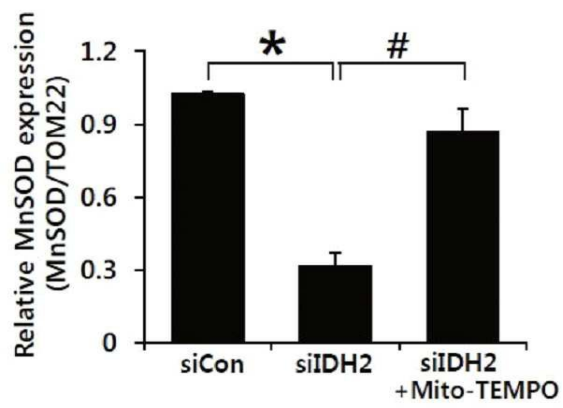
도면17



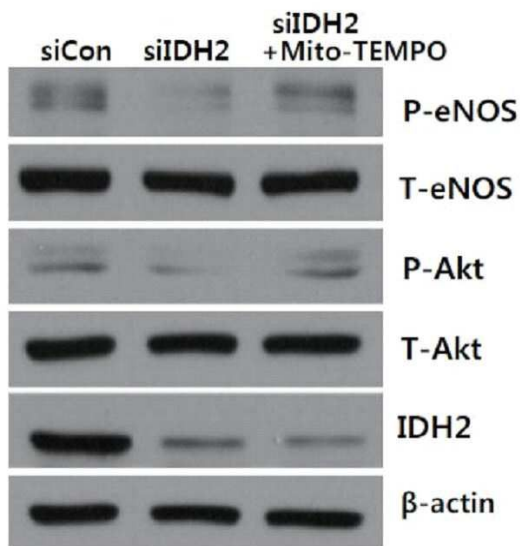
도면18



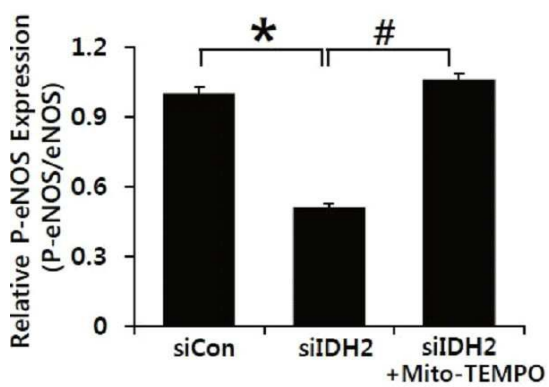
도면19



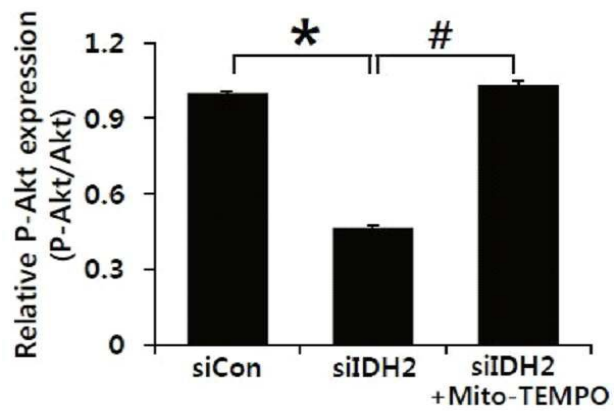
도면20



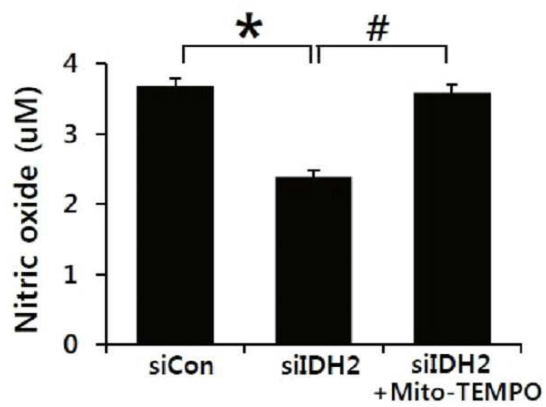
도면21



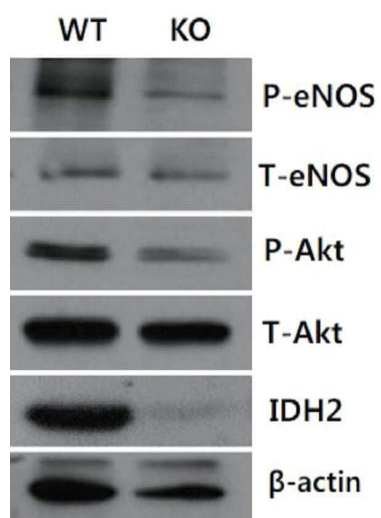
도면22



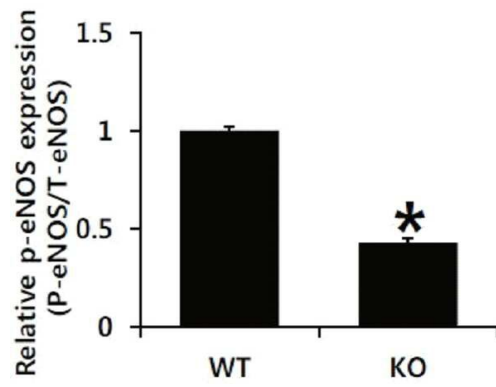
도면23



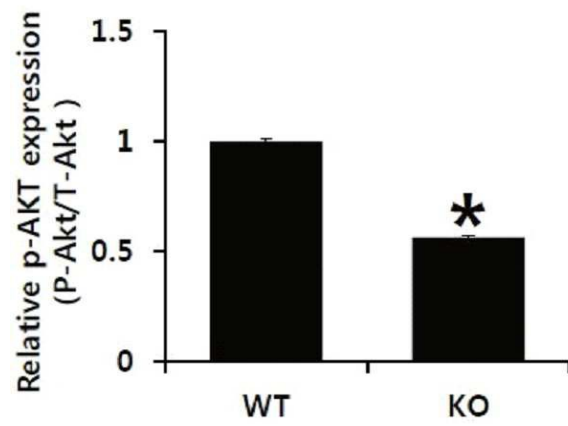
도면24



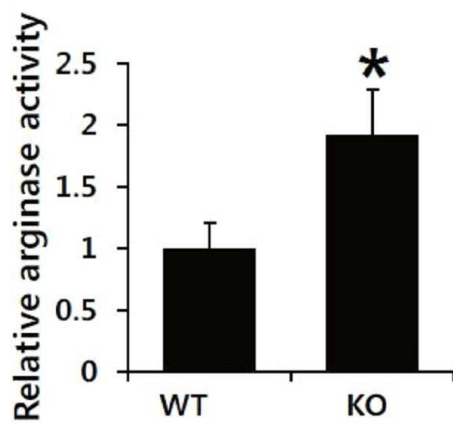
도면25



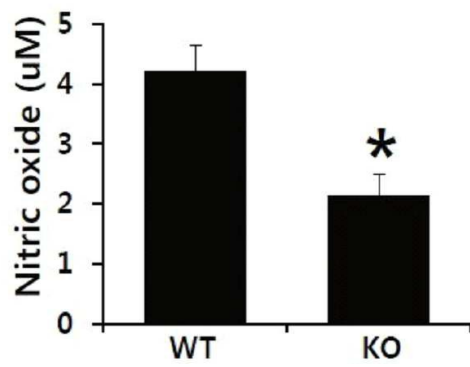
도면26



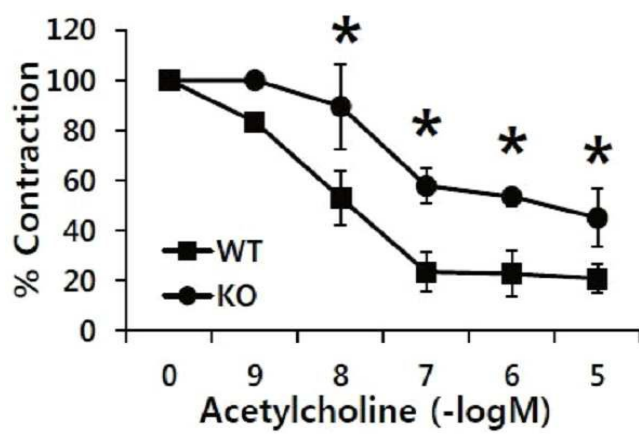
도면27



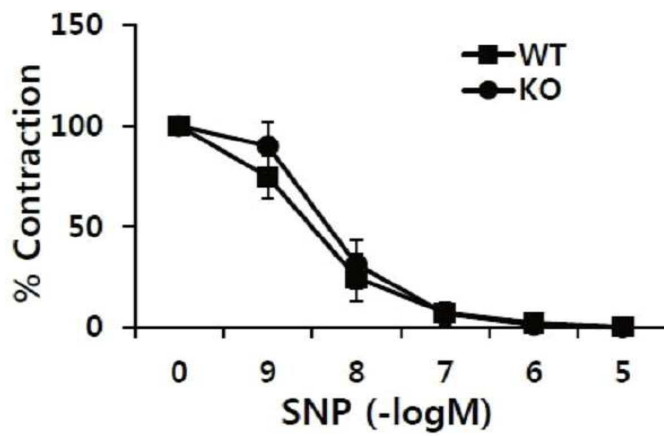
도면28



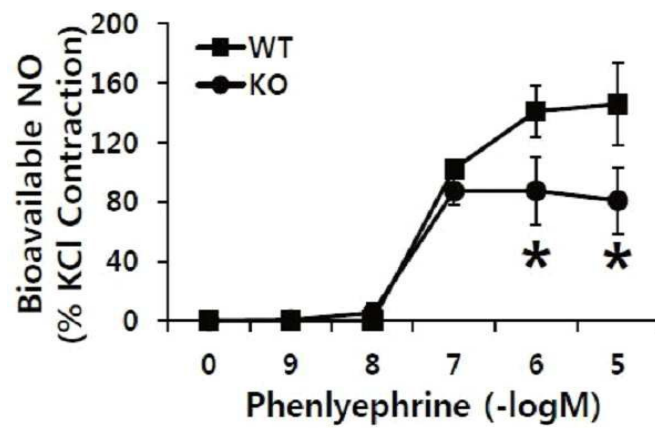
도면29



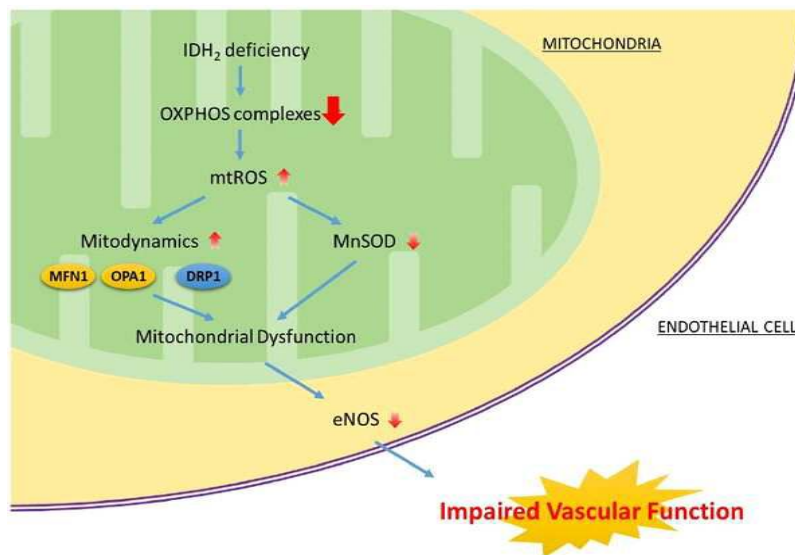
도면30



도면31



도면32



서열 목록

- <110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)
- <120> A biomarker composition for diagnosis of vascular diseases comprising isocitrate dehydrogenase 2
- <130> 1-35
- <160> 6
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 25
- <212> DNA
- <213> IDH2 short interfering RNA (siRNA) sense
- <400> 1

gcgaccagua caagccaca gauuu	25
<210> 2	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> IDH2 short interfering RNA (siRNA) antisense	
<400> 2	
aaaucugugg ccuuguacug gucgc	25
<210> 3	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IDH2 KO forward primer	
<400> 3	
gatagaattt ccgtggcaac	20
<210> 4	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IDH2 KO reverse primer	
<400> 4	
ccagtcatag ccgaatagcc	20
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IDH2 WT forward primer	
<400> 5	
actgttctgg aacatgctgc	20
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> IDH2 WT reverse primer	

<400> 6

tcctcaaagc atcaggtacc

20