



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0074029
(43) 공개일자 2011년06월30일

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01) A61Q 5/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0130869

(22) 출원일자 2009년12월24일

심사청구일자 2010년12월29일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울 성북구 안암동5가 1

(72) 발명자

김재홍

경기도 고양시 일산동구 마두동 백마마을 극동삼
환아파트 211-102

류호철

대전광역시 대덕구 대화동 236-3 9/3

(74) 대리인

특허법인다나

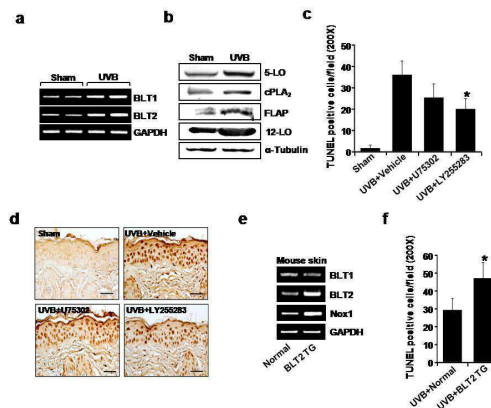
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) B L T 2 억제제를 포함하는 자외선 보호용 조성물

(57) 요약

본 발명은 BLT2 억제제를 포함하는 자외선 보호용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 자외선 조사에 의해 세포막 단백질인 BLT2, 이들의 리간드 및 이들의 합성효소 등이 과발현되어 활성산소종 생성 및 MAP 키나아제 활성화를 통한 세포사멸을 유도하며, 상기 단백질의 발현을 억제하는 억제제가 자외선으로부터 피부 또는 모발 등을 효과적으로 보호함을 규명함으로써 이를 피부보호제, 피부염증제, 자외선차단 피부보호제 등에 사용할 수 있다.

대표도 - 도10



특허청구의 범위

청구항 1

BLT2 억제제를 유효성분으로 포함하는 자외선 보호용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

자외선 조사에 의해 과발현된 BLT2 매개 경로를 통한 세포내 활성산소종 생성 및 MAP 키나아제 활성화를 억제시킴으로써 세포사멸을 억제하는 자외선 보호용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

자외선이 UVB인 자외선 보호용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

BLT2 억제제가 LY255283, BLT2 siRNA 및 BLT2 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 자외선 보호용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

BLT2 siRNA가 서열목록 서열번호 1에 기재된 서열을 갖는 자외선 보호용 조성물.

청구항 6

BLT2 억제제를 유효성분으로 포함하는 자외선으로부터 피부 또는 모발 보호용 약제학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

피부 염증, 예민성 색소침착, 흑색종, 또는 비흑색종 피부암을 예방 또는 치료하는 자외선으로부터 피부 또는 모발 보호용 약제학적 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

BLT2 억제제가 LY255283, BLT2 siRNA 및 BLT2 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 자외선으로부터 피부 또는 모발 보호용 약제학적 조성물.

청구항 9

BLT2 억제제를 유효성분으로 포함하는 자외선으로부터 피부 또는 모발 보호용 화장품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서,

BLT2 억제제가 LY255283, BLT2 siRNA 및 BLT2 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 자외선으로부터 피부 또는 모발 보호용 화장품 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서,

분자상 또는 미립형 자외선 차단제, 또는 이들의 조합을 더 포함하는 자외선으로부터 피부 또는 모발 보호용 화장품 조성물.

청구항 12

자외선 조사 전 또는 후 BLT2 억제용 후보 물질을 피부세포 또는 BLT2를 발현하는 동물모델에 투여하는 단계; 및

상기 세포 또는 동물모델에서 세포사멸(apoptotic cell death) 여부를 조사하는 단계를 포함하는 BLT2 억제물질의 스크리닝 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

피부세포는 사람 케라티노사이트인 BLT2 억제물질의 스크리닝 방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

동물이 생쥐, 집쥐, 기니피그, 토끼, 고양이, 개, 양, 돼지, 소, 원숭이, 비비, 또는 침팬지인 BLT2 억제물질의 스크리닝 방법.

청구항 15

제12항에 있어서,

자외선은 UVB인 BLT2 억제물질의 스크리닝 방법.

청구항 16

제12항에 있어서,

세포사멸은 생존세포수 또는 세포사멸성 세포(apoptotic cell)수를 측정하여 조사하는 것인 BLT2 억제물질의 스크리닝 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 BLT2 억제제를 포함하는 자외선 보호용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 자외선 조사에 의해 세포막 단백질인 BLT2, 이들의 리간드 및 이들의 합성효소 등이 과발현되어 활성산소종 생성 및 MAP 키나아제 활성화를 통한 세포사멸을 유도하며, 상기 단백질의 발현을 억제하는 억제제가 자외선으로부터 피부 또는 모발 등을 효과적으로 보호함을 규명함으로써 이를 피부보호제제, 피부염증제제, 자외선차단 피부보호제 등에 사용하는 BLT2 억제제를 포함하는 자외선 보호용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인체의 대부분은 피부로 덮여있어 자외선 및 생체이물(xenobiotic agents) 등의 환경 스트레스로부터 내부 기관을 보호한다. 오존층의 고갈은 표면 자외선 수준을 증가시키고, 염증, 예민성 색소침착(hyper-pigmentation), 흑색종 및 비흑색종 피부암 등의 피부질환을 유발할 수 있다. 또한, 자외선에 대한 피부세포의 급성 및 만성 노출은 세포사멸(apoptotic cell death)을 유발할 수 있다. 지구의 태양 자외선 스펙트럼은 UVA(320-400 nm), UVB(280-320 nm) 및 UVC(200-280 nm)로 나눌 수 있다. UVB 영역의 파장은 피부의 표피로 흡수되어 일광화상세포(sunburn cell; apoptotic cells) 및 피부암의 형성 등 피부질환을 유발한다. UVB에 의한 세포사멸은 DNA 손상, 사멸수용체(death receptor) 활성화, 및 활성산소종의 생성에 의해 매개되는 것으로 나타났다. 특히, UVB 신호전달경로에서 활성산소종의 중요성은 효소적 및 비효소적 항산화제에 대한 노출로 UVB에 의한 케라티노사이트 세포사멸이 감소되는 다양한 증거를 통해 강조되고 있는 반면, 활성산소종의 수준을 높이는 제제는 MAP 키나아제(JNK 및 p38 키나아제)가 관여하는 UVB에 의한 신호전달경로를 촉진하고, 세포사멸을 유도한다. 그러나, 활성산소종의 소스가 UVB 조사에 의한 반응으로 생성되는 것인지 그들이 피부에서 생성되는 경로에 의한 것인지 명백하게 알려진바 없다.

[0003] 한편, 류코트리엔 B₄ (Leukotriene B₄, LTB₄)는 cytosolic phospholipase A₂ (cPLA₂), 5-lipoxygenase (5-LO) 및 LTA₄ hydrolase의 연쇄 반응에 의해 아라키돈산으로부터 유래하며, 인체 조직에서 어디에서나 발현되며 LTB₄ 뿐만 아니라 12(S)-HETE, 12(S)-HPETE 및 15(S)-HETE 등의 몇몇 아이카사노이드(eicosanoids)에 대해 광범위한 기질 특이성을 갖는 두 종류의 류코트리엔 B₄ 수용체인 BLT1 및 BLT2에 의해 인지된다. 'LTB₄-BLT2' 연관된 캐스케이드는 활성산소종의 발생과 연관되어 있고, 세포 주화성 및 형질전환을 매개함이 보고된 바 있다. 또한, LTB₄는 케라티노사이트에서 lysophosphatidic acid(LPA)에 의한 활성산소종 방출과 연관되어 있는 것으로 관찰되었다. 동시에, 최근에 BLT2가 마우스 피부에서 다량 발현되어 12(S)-lipoxygenase의 산물에 반응하여 마우스 피부의 가려움에 수반된 스크래칭을 유발함이 보고되었다.

[0004] 그러나, 피부 또는 케라티노사이트에서 특히 자외선 노출과 관련하여 BLT2의 명백한 생리적 활성은 규명된 바 없다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 UVB 조사 시 피부 세포에서 세포사멸에 대한 BLT2 역할을 규명함으로써 이를 이용한 자외선 보호용 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 세포사멸 경로에서 BLT2의 캐스케이드를 이용한 BLT2 억제물질 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 BLT2 억제제를 유효성분으로 포함하는 자외선 보호용 조성물을 제공한

다.

- [0008] 본 발명은 또한 BLT2 억제제를 유효성분으로 포함하는 자외선으로부터 피부 또는 모발 보호용 억제학적 조성물을 제공한다.
- [0009] 본 발명은 또한 BLT2 억제제를 유효성분으로 포함하는 자외선으로부터 피부 또는 모발 보호용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명은 또한
- [0011] 자외선 조사 전 또는 후 BLT2 억제용 후보 물질을 피부세포 또는 BLT2를 발현하는 동물모델에 투여하는 단계; 및
- [0012] 상기 세포 또는 동물모델에서 세포사멸(apoptotic cell death) 여부를 조사하는 단계를 포함하는 BLT2 억제물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

효 과

- [0013] 본 발명은 자외선 조사 시 과발현되는 BLT2에 의한 활성산소종 발생 및 MAP 키나아제 활성화를 통한 세포사멸을 규명함으로써 상기 BLT2 억제제를 이용하여 자외선에 의한 피부손상, 피부질환 등을 개선할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0014] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.
- [0015] 본 발명은 BLT2 억제제를 유효성분으로 포함하는 자외선 보호용 조성물에 관한 것이다.
- [0016] 본 발명의 자외선 보호용 조성물은 자외선 조사에 의해 BLT2, 그 리간드인 LTB₄ 및 12(S)-HETE, 및 이들의 합성 효소들의 수준이 증가하고, 이를 매개로 하여 세포내 활성산소종 생성 및 MAP 키나아제 활성화를 통한 세포사멸 반응이 진행됨을 규명하여 상기 BLT2 억제제를 이용하여 세포내 활성산소종 생성 및 MAP 키나아제 활성화를 억제함으로써 세포사멸을 억제하여 자외선에 의한 피부손상, 또는 피부질환을 예방 또는 치료할 수 있는 것임을 특징으로 한다.
- [0017] 본 명세서에서 "세포사멸"은 "apoptotic cell death"를 의미한다.
- [0018] 상기 자외선은 UVB일 수 있다.
- [0019] 또한, 상기 BLT2 억제제는 자외선에 의한 BLT2의 발현을 억제할 수 있는 물질이라면 특별히 제한하지는 않는다. 예를 들어, LY255283(Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI), BLT2 siRNA, 또는 BLT2 항체 등일 수 있다.
- [0020] 상기 BLT2 siRNA는 특별히 제한하는 것은 아니나, 서열목록 서열번호 1에 기재된 서열을 가질 수 있다.
- [0021] 상기 BLT2 항체는 BLT2 단백질 또는 펩타이드의 일부 또는 전체와 결합할 수 있는 단클론성 또는 다클론성 항체라면 특별히 제한하지는 않는다.
- [0022] 본 발명은 또한 BLT2 억제제를 유효성분으로 포함하는 자외선으로부터 피부 또는 모발 보호용 억제학적 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 상기 자외선 보호용 억제학적 조성물은 자외선에 의한 피부손상, 또는 피부질환 등을 예방 또는 치료할 수 있다.
- [0024] 상기 피부질환으로 피부 염증, 예민성 색소침착, 흑색종, 또는 비흑색종 피부암 등을 들 수 있으나, 이에 특별

히 제한하는 것은 아니다.

- [0025] 상기 BLT2 억제제는 자외선에 의한 BLT2의 발현을 억제할 수 있는 물질이라면 특별히 제한하지는 않는다. 예를 들어, LY255283(Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI), BLT2 siRNA, 또는 BLT2 항체 등일 수 있다.
- [0026] 상기 BLT2 siRNA는 특별히 제한하는 것은 아니나, 서열목록 서열번호 1에 기재된 서열을 가질 수 있다.
- [0027] 상기 BLT2 항체는 BLT2 단백질 또는 펩타이드의 일부 또는 전체와 결합할 수 있는 단클론성 또는 다클론성 항체라면 특별히 제한하지는 않는다.
- [0028] 또한, 본 발명의 약제학적 조성물은 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함할 수 있다.
- [0029] 구체적으로, 이온 교환 수지, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 여러 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연 염), 교질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 조성물은 또한 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구 투여용 제형 또는 주사제와 같은 비경구 투여용 제형으로 제조할 수 있다. 경구 투여용 제형의 예로서는 정제, 트로치제, 로젠지, 수용성 또는 유성 현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제(elixirs)를 들 수 있다. 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제하기 위해서 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 마니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 디칼슘포스페이트와 같은 부형제, 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕괴제, 스테아르산 마그네슘, 스테아르산 칼슘, 스테아질 푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유가 함유될 수 있다. 또한 캡슐 제형의 경우에는 상기에서 언급한 물질 외에도 지방유와 같은 액체 담체를 함유할 수 있다. 경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제가 포함된다. 비수성용제, 현탁 용제는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 또는 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0031] 한 양태로서, 본 발명에 따른 조성물은 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있다. 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 텍스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.
- [0032] 본 발명의 약제학적 조성물의 다른 바람직한 양태는 수성 또는 유성 현탁액의 멸균 주사용 제제의 형태일 수 있다. 이러한 현탁액은 적합한 분산제 또는 습윤제(예를 들면 트윈 80) 및 현탁화제를 사용하여 본 분야에 공지된 기술에 따라 제형화할 수 있다. 멸균 주사용 제제는 또한 무독성의 비경구적으로 허용되는 희석제 또는 용매 중의 멸균 주사 용액 또는 현탁액(예를 들면 1,3-부탄디올 중의 용액)일 수 있다. 사용될 수 있는 비히클 및 용매로는 만니톨, 물, 링거 용액 및 등장성 염화나트륨 용액이 있다. 또한, 멸균 비휘발성 오일이 통상적으로 용매 또는 현탁화 매질로서 사용된다. 이러한 목적을 위해 합성 모노 또는 디글리세라이드를 포함하여 자극성이 적은 비휘발성 오일은 그 어느 것도 사용할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 환자의 연령, 체중 및 질환의 정도에 따라 차이가 있으나, 통상 성인(체중 60kg 기준)의 경우 비경구로 1일 1회 20~52mg으로 투여하는 것이 바람직하며, 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자의 경험에 의하여 적절히 결정될 수도 있다.
- [0034] 본 발명은 또한 BLT2 억제제를 유효성분으로 포함하는 자외선으로부터 피부 또는 모발 보호용 화장품 조성물에 관한 것이다.
- [0035] 상기 BLT2 억제제는 자외선에 의한 BLT2의 발현을 억제할 수 있는 물질이라면 특별히 제한하지는 않는다. 예를 들어, LY255283(Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI), BLT2 siRNA, 또는 BLT2 항체 등일 수 있다.
- [0036] 상기 BLT2 siRNA는 특별히 제한하는 것은 아니나, 서열목록 서열번호 1에 기재된 서열을 가질 수 있다.

- [0037] 상기 BLT2 항체는 BLT2 단백질 또는 펩타이드의 일부 또는 전체와 결합할 수 있는 단클론성 또는 다클론성 항체라면 특별히 제한하지는 않는다.
- [0038] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 하나 이상의 분자상 또는 미립형 자외선 차단제, 또는 이들의 조합을 더 포함할 수 있다.
- [0039] 상기 분자상 자외선 차단제로 벤조페논 및 이의 유도체, 예를 들면, 4-페닐-벤조페논, 2-하이드록시-4-n-옥틸옥시벤조페논, 2-하이드록시-4-메톡시벤조페논, 2,2'-디하이드록시-4,4'-디메톡시-벤조페논, 설이소벤존, 벤즈이미다졸 유도체, 예를 들면, 페닐벤즈이미다졸 설펜산, 캄포어 유도체, 예를 들면, 3-벤질리덴 캄포어, 3-(4-메틸-벤질리덴) 캄포어, 테레프탈릴리덴 디캄포어 설펜산, 디벤조일메탄, 예를 들면, 4-이소프로필-디벤조일-메탄, 4-3급-부틸-4'-메톡시-디벤조일메탄, 신남산 에스테르, 예를 들면, p-메톡시신남산-2-에틸헥실 에스테르, p-메톡시신남산 이소아밀 에스테르, p-메톡시신남산 옥틸 에스테르, p-메톡시신남산 프로필 에스테르, p-아미노벤조산(PABA) 및 이의 유도체, 예를 들면, p-아미노벤조산 글리세롤 에스테르, 부틸-PABA, 옥틸-디메틸-PABA, 또는 기타 물질, 예를 들면, 2-에틸헥실 살리실레이트, 호모살레이트, 멕소릴® (Mexoryl®) SX, 멕소릴® XL, 옥틸살리실레이트, 옥틸트리아존, 옥시벤존을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0040] 또한, 상기 미립형 자외선 차단제로, 황산바륨, 벤토나이트, 탄산칼슘, 황산칼슘, 산화철(III), 수산화제이철, 카올린, 카본 블랙, 산화구리, 산화마그네슘, 은, 이산화규소(예: 에어로실), 실로이드, 소수성 알킬화이산화규소(예: 에어로실 R972), 탈쿰, 이산화티탄, 옥시염화비스무트, 산화아연, 아연 스테아레이트, 멜라닌 등을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명의 화장료 조성물은 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 더 포함할 수 있다. 예컨대 향산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.
- [0042] 또한 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0046] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

- [0048] 또한, 본 발명에 따른 화장료 조성물은 통상적인 사용방법에 따라 사용될 수 있으며, 사용자의 피부 상태 또는 취향에 따라 그 사용횟수를 달리할 수 있다.
- [0049] 본 발명은 또한
- [0050] 자외선 조사 전 또는 후 BLT2 억제용 후보 물질을 피부세포 또는 BLT2를 발현하는 동물모델에 투여하는 단계; 및
- [0051] 상기 세포 또는 동물모델에서 세포사멸(apoptotic cell death) 여부를 조사하는 단계를 포함하는 BLT2 억제물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0052] BLT2는 세포사멸 경로에서 활성산소종 생성 및 MAP 키나아제의 활성화를 유도하여 세포사멸을 유발하므로 상기 BLT2 억제물질은 세포사멸을 유의하게 억제시킬 수 있으므로 이를 이용하여 BLT2 억제물질을 스크리닝할 수 있는 것이다.
- [0053] 본 발명의 BLT2 억제물질의 스크리닝 방법을 단계별로 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0054] 제1단계는 자외선을 조사하기 전 또는 후에 피부세포 또는 BLT2를 발현하는 동물모델에 BLT2 억제용 후보 물질을 투여하는 단계이다.
- [0055] 상기 피부세포는 BLT2를 발현하는 세포라면 특별히 제한하지는 않는다. 예를 들어, 사람 케라티노사이트 등을 사용할 수 있다.
- [0056] 상기 또는 BLT2를 발현하는 동물은 통상의 방법을 이용하여 BLT2로 형질전환되어 BLT2를 안정적으로 과발현하는 동물을 의미하는 것으로, 예를 들어, 생쥐, 집쥐, 기니피그, 토끼, 고양이, 개, 양, 돼지, 소, 원숭이, 비비, 또는 침팬지 등을 형질전환시켜 사용할 수 있다.
- [0057] 상기 자외선은 UVB일 수 있다.
- [0058] 상기 자외선 조사는 세포의 경우 혈청 결핍 조건에서 전배양한 후 실시할 수 있다. 동물의 경우에는 등쪽 털을 제거한 상태에서 조사할 수 있다. 자외선 선량 및 조사 시간은 세포 또는 동물모델에 따라 적절히 변경할 수 있다.
- [0059] BLT2 억제용 후보물질의 투여는 세포의 경우 함께 배양하여 실시하고, 동물의 경우에는 국소 투여하여 실시할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0060] 상기 BLT2 억제용 후보물질의 투여량 및 투여시간은 세포 또는 동물모델에 따라 적절히 변경할 수 있다.
- [0061] 제2단계는 BLT2 억제용 후보물질이 투여되고 자외선이 조사된 세포 또는 BLT2 발현 동물모델에서 세포사멸이 억제되는지를 확인하는 단계이다.
- [0062] 상기 세포사멸 여부는 생존세포수 또는 세포사멸성 세포(apoptotic cell)수를 측정하여 확인할 수 있다.
- [0063] 상기 생존세포수 또는 세포사멸성 세포수는 당업계에 알려진 통상의 분석방법을 이용하여 확인할 수 있다. 예를 들어, ELISA 분석, MTT 분석, TUNEL system 등을 이용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0064] 이하, 본 발명에 따르는 실시예 및 본 발명에 따르지 않는 비교예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 제시된 실시예에 의해 제한되는 것은 아니다.
- [0065] <실시예 1> 사람 케라티노사이트에서 UVB 조사에 의한 BLT2 캐스케이드 규명
- [0066] 사람 케라티노사이트에서 UVB 조사에 의한 BLT2 캐스케이드를 규명하기 위해 하기와 같은 실험을 실시하였다.
- [0067] 이를 위해, 사람 피부 케라티노사이트 불사화 세포주인 HaCaT는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지에서 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 상기 세포들은 80-90% 컨플루언스에 도달하는 3-4일마다 계대배양하였다. 프라이머리 사람 케라티노사이트(PHK) 세포를 분리하고(Lee *et al.*, *J Invest Dermatol* 129:460-7, 2009), KGM(Cambrex Bio Science) 및 KBM(Cambrex Bio Science)의 혼합배지에서 37℃ 및 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 패시지 번호

가 3 또는 4인 PHK 세포를 실험에 사용하였다. 모든 실험들은 60mm 배양접시에서 실시하였고, 세포들은 confluent monolayer까지 배양하였다.

[0068] BLT2 길항제인 LY255283, LTB₄ 및 12(S)-HETE는 Cayman Chemical Company(Ann Arbor, MI)에서 구입하였다. BLT1 길항제인 U75302는 BioMol(Plymouth Meeting, PA)에서 구입하였고, 디페닐렌 아이오도늄(diphenylene iodonium; DPI), 로테논(rotenone) 및 *N*-아세틸시스테인(NAC)은 Calbiochem (La Jolla, CA)에서 얻었다. 우태아혈청 및 DMEM 배지는 Life Technologies, Inc.(Gaithersburg, MD)에서 얻었다. 케라티노사이트 기초배지(Keratinocyte basal medium; KBM) 및 케라티노사이트 성장배지(keratinocyte growth medium; KGM)는 Cambrex Bio Science(Walkersville, MD)에서 얻었다. MAP 키나아제(ERK, JNK 및 p38 키나아제), 카스파제(-3, -8 및 -9), PARP, Bax 및 Bcl-2에 대한 다클론성 항체들은 Cell Signaling Technology(MA, USA)에서 얻었다. 항-마우스 및 항-랫 2차 항체 호스-래디쉬 페록시다제는 Amersham Biosciences(Piscataway, NJ)에서 구입하였고, MAP 키나아제 억제제인 PD98059, SB203580 및 SP600125는 Calbiochem(San Diego, CA)에서 얻었다. 다른 모든 화합물들은 표준 소스로부터 얻었고, 분자생물학적 등급 또는 그 이상의 고급 수준의 것을 사용하였다.

[0069] (UVB 조사)

[0070] 세포는 조건부 배지에서 12시간 동안 결핍시켰다(HaCaT 세포는 무혈청 DMEM에서, PHK 세포는 KGM을 뺀 KBM에서). UVB 조사 전에 상피 배지를 제거하고, 따뜻한 PBS로 세포를 세척하고, 세포가 젖은 상태를 유지하도록 각 배양접시에 200 μ l PBS를 피펫으로 주입하였다. 302nm에서 방출피크를 갖는 UVB 파장범위 내에서 그들의 에너지 대부분을 방출하는 5 $\times$ 8 W 튜브가 포함된 UV 크로스링커(Upland, CA)를 이용하여 세포에 조사하였다. UVB 선량은 UVB 미터로 정확히 계산하였다. PBS 제거 후 2 mL의 조건부 배지를 각 배양접시에 첨가하였다.

[0071] (ELISA 를 이용한 LTB₄ 및 12-(S) HETE 측정)

[0072] HaCaT 세포 및 PHK 세포를 60mm 배양접시에 접종하고, 90% 컨플루언스에 도달할 때까지 배양하였다. 상기 세포들은 무혈청 DMEM(HaCaT 세포) 또는 KBM(PHK 세포)에서 12시간 동안 결핍시키고 나서, UVB를 60분 동안 조사하였다(40mJ/cm²). 시간대별로 1mL씩 배지를 옮기고(0, 15, 30 및 60 분), 4 $^{\circ}$ C 및 12,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상등액은 동결건조하고, LTB₄ ELISA 키트(Amersham International, Amersham, UK) 및 12(S)-HETE ELISA 키트(Assay Designs, Ann Arbor, MI)에 포함된 분석용 버퍼로 현탁하였다. 제조업체 설명서에 따라 LTB₄ 및 12(S)-HETE를 측정하였다.

[0073] (BLT2 및 Nox1에 대한 RNA 간섭)

[0074] pSUPER 벡터(대조군) 및 pSUPER-siNox1는 Dr. YS Bae로부터 얻었다. 후자는 이미 알려져 있는 Nox1 표적 서열을 이용하여 작제하였다(Park *et al.*, *Mol Cell Biol* 24:4384-94, 2004).

[0075] 사람의 Nox1 cDNA 서열을 기초로 한 siRNA는 다음을 서열을 갖는다: (5'-CCAGGATTGAAGTGGATGG -3').

[0076] 사람의 BLT2 cDNA 서열을 기초로 한 BLT2 siRNA는 다음의 서열을 갖는다: siBLT2 (5'-CCACGCAGTCAACCTTCTG-3').

[0077] RNA 간섭 실험을 위해, 60mm 배양접시 당 2 $\times$ 10⁵ 세포밀도로 세포를 플레이팅하였다. 24시간 후 제조업체 설명서에 따라 oligofectamine reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 이들 20 nM 올리고머를 세포에 형질감염시켰다. 24시간 후, RT-PCR을 이용하여 각 유전자의 mRNA 수준을 분석하였다.

[0078] (Nox1, BLT1 및 BLT2에 대한 Semi-quantitative RT-PCR)

[0079] Easy Blue-TM(Intron Inc., Korea)를 이용하여 디에틸파이로카보네이트를 처리한 물에 녹인 세포에서 세포내 총 RNA를 추출하고, UV 스캐닝에 의해 정량하였다. RNA를 역전사하고, 전사체는 RT-PCR PreMix Kit(Intron Inc., Korea)를 이용하여 Nox1, BLT1, BLT2 및 glyceraldehyde 3-phosphate(GAPDH)를 증폭하였다. two-step RT-

PCR(Chamulitrat *et al.*, *Oncogene* 22:6045-53, 2003)에 따라 사람의 Nox1 mRNA를 분석하였다. 하기에 설명된 first-round PCR의 역방향 프라이머를 이용하여 Gene-specific priming RT를 실시하고, 2 μ g의 총 RNA 유래의 cDNA를 각 PCR 반응에 사용하였다.

- [0080] first-round PCR을 위한 사람의 Nox1 정방향 프라이머는 뉴클레오티드 1523에서 시작하는 5'-CAGGGAGACAGGTGCCTTTTCC-3'이고, 역방향 프라이머는 뉴클레오티드 2037에서 끝나는 5'-GCTCAACCTGACGAGACCAAG-3'(GeneBank accession no. 007052를 이용하여 디자인함).
- [0081] second-round nested PCR을 위한 정방향 네스티드 프라이머는 뉴클레오티드 1554에서부터 시작하는 5'-AACCTGTTGACTTCCCTGGAAC-3'이고, 역방향 네스티드 프라이머는 뉴클레오티드 1858에서 끝나는 5'-TCCAGACTGGAATATCGGTGAC-3'이다.
- [0082] first-round 및 네스티드 PCR을 위한 구체적인 프로토콜은 다음과 같다: 95 $^{\circ}$ C, 30초; 61 $^{\circ}$ C, 40초; 및 72 $^{\circ}$ C, 45초를 1사이클로 하여 27 사이클 실시함.
- [0083] 사람 BLT1에 대한 프라이머는 다음과 같다: 5'-TATGTCTGCGGAGTCAGCATGTACGC-3' (정방향) 및 5'-CCTGTAGCCGACGCCCTATGTCCG-3' (역방향). 사람 BLT1에 대한 PCR 프로토콜은 다음과 같다: 94 $^{\circ}$ C, 30초; 67 $^{\circ}$ C, 30초; 및 72 $^{\circ}$ C, 30초를 1 사이클로 하여 30 사이클 실시하고, 72 $^{\circ}$ C, 10분 동안 연장단계를 거침.
- [0084] 마우스 Nox1용 프라이머는 다음과 같다: 5'-AATGCCAGGATCGAGGT-3' (정방향) 및 5'-GATGGAAGCAAAGGGAGTGA-3' (역방향). 마우스 Nox1에 대한 PCR 프로토콜은 다음과 같다: 94 $^{\circ}$ C, 30초; 58 $^{\circ}$ C, 30초; 및 72 $^{\circ}$ C, 30초를 1사이클로 하여 33 사이클 실시하고, 72 $^{\circ}$ C, 10분 동안 연장단계를 거침.
- [0085] 사람 BLT2용 프라이머는 다음과 같다: 5'-TCTCATCGGGCATCACAGGT-3' (정방향) 및 5'-CCAAGCTCCACACCACGAA G-3' (역방향). PCR 프로토콜은 다음과 같다: 94 $^{\circ}$ C, 30초; 65 $^{\circ}$ C, 30초; 및 72 $^{\circ}$ C, 30초를 1 사이클로 하여 35 사이클 실시하고, 72 $^{\circ}$ C, 10분 동안 연장단계를 거침.
- [0086] 마우스 BLT1용 프라이머는 다음과 같다: 5'-GCATGTCCCTG TCTCTGTTG-3' (정방향) 및 5'-CGGGCAAAGGCCTTAGTACG-3' (역방향).
- [0087] 마우스 BLT2용 프라이머는 다음과 같다: 5'-CAGCATG TACGCCAGCGTGC-3' (정방향) 및 5'-CGATGGCGCTCACCAGACG-3' (역방향). 마우스 BLT1/2에 대한 PCR 프로토콜은 다음과 같다: 94 $^{\circ}$ C, 30초; 68 $^{\circ}$ C, 30초; 및 72 $^{\circ}$ C, 30초를 1 사이클로 하여 35 사이클을 실시하고, 72 $^{\circ}$ C, 10분 동안 연장단계를 거침.
- [0088] 증폭된 PCR 산물들은 1.2% 아가로우즈 젤에서 전기영동을 실시하고, 에티디움 브로마이드 염색을 통해 밴드를 확인하고 Polaroid 667 film(Cambridge, MA)으로 이미지화 하였다.
- [0089] 모든 프라이머들의 특이성은 PCR 산물들을 시퀀싱하여 확인하였다. RNA 추출 산물들은 대조군 RT 반응에서 시험하였고, DNA 오염이 없음을 확인하였다.
- [0090] (Fluorescence-activated cell sorting (FACS) 분석)
- [0091] 케라티노사이트에서 BLT1 및 BLT2 단백질들의 발현을 입증하기 위해, FACS 분석을 실시하였다(Kim *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:915-20, 2009).
- [0092] (sub-G1 세포사멸성 세포(apoptotic cell) 분석, DNA 균열 분석 및 Hoechst 염색)
- [0093] HaCaT 세포를 무혈청 DMEM에서 12시간 동안 결핍시키고, 1 μ M U75302 또는 10 μ M LY255283를 1시간 동안 처리하였다. 12시간 동안 UVB 조사(40mJ/cm²) 후 원심분리하여 세포를 수확하고, 70% 에탄올에서 고정하고, 0.5mL DNA 추출용 버퍼[19.2mM Na₂HPO₄, 0.004% Triton X-100 (v/v)]를 첨가한 0.5mL PBS에서 5분간 재현탁하였다. 400g에서 5분간 원심분리하고, RNase A를 포함하는 PBS에 녹인 50g/mL PI로 30분 동안 염색하고, Cell Quest software(BD Bioscience)를 이용하여 FACScan에 의해 분석하였다. G1 기에서의 세포 보다 더 낮은 DNA 함량을 갖는 세포들(sub-G1)은 세포사멸성인 것으로 가정하였다.
- [0094] DNA 균열 분석을 위해, UVB를 조사한(40mJ/cm²) HaCaT 세포를 라이시스 버퍼(20mM Tris/HCl, pH 8.0, 0.1mM EDTA, 1% SDS, 및 0.5mg/mL proteinase K)에서 재현탁하고, 50 $^{\circ}$ C에서 오버나이트 동안 배양하였다. 페놀/클로

로포름으로 DNA를 추출하고, 1.8% 아가로우즈 젤에서 전기영동하고, 에티디움 브로마이드 염색하여 확인하였다.

- [0095] Hoechst 33258 염색을 위해, 12시간 동안 UVB 조사된 HaCaT 세포를 포함하는 60mm 배양접시에 2 μ g/mL Hoechst 33258를 첨가하고, 20분 간 암 조건에서 배양하고, 세포사멸을 나타내는 형태적 특징들에 대한 블라인드를 기록하였다. 4개의 무작위 지점에서 핵 응축 및 균열을 나타내는 밝은 푸른색 점을 카운팅하였다
- [0096] (카스파제 3 활성화 및 미토콘드리아 막 전위 ($\Delta \Psi_m$) 측정)
- [0097] HaCaT 세포를 12시간 동안 혈청 결핍시키고, UVB 조사(40mJ/cm²) 전에 6시간 및 12시간 동안 1 μ M U75302, 10 μ M LY255283, 10 μ M SB203580 또는 10 μ M SP600125를 세포와 배양하였다. 상기 세포들을 수확하고, 단백질 억제제가 없이 200 μ l의 변형 RIPA 버퍼(50mM Tris-HCl, pH 7.4; 1% NP40; 0.25% sodium deoxycholate; 150mM NaCl; 1mM EGTA; 10mM DTT)에서 재현탁하고, 카스파제-3 활성화 검출 키트(Upstate/Millipore, Billerica, MA)로 분석하였다.
- [0098] 미토콘드리아 막 전위를 평가하기 위해, UVB 조사된 HaCaT 세포를 5 μ M 형광 프로브 JC-1 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)과 함께 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 배양하고, PBS로 세척하였다. 미토콘드리아 막 전위($\Delta \Psi_m$)는 JC-1의 미토콘드리아 내 축적을 측정하여 Zeiss fluorescence microscope에서 여기파장 490nm, 방출파장 525nm 및 590nm에서 모니터링하였다.
- [0099] 미토콘드리아 막 전위는 녹색(525nm; 탈분극된 $\Delta \Psi_m$ 의 단량체 형태)에서 적색(590nm; 분극된 $\Delta \Psi_m$ 의 응집 형태)으로의 형광 방출 이동으로부터 읽는다. 또한, 미토콘드리아 막 전위의 수치는 UV Spectrofluorophotometer(Zenith 3100, Anthos Company, Salzburg, Austria)로 계산하였다.
- [0100] (ROS 측정)
- [0101] UVB 조사 전에 HaCaT 세포를 무혈청 DMEM에서 12시간 동안 결핍시키고, PHK 세포는 KBM에서 12시간 동안 결핍시켰다. 이들 세포에 1 μ M U75302, 10 μ M LY255283, 5 μ M DPI, 10mM NAC 또는 10 μ M 로테논을 1시간 동안 처리하였다. 정해진 시간 동안 UVB를 조사한 후, Cell Quest software(BD Bioscience, San Diego, CA)를 이용한 FACS 분석을 통해 세포내 활성산소종의 수준을 측정하였다.
- [0102] 또한, H₂O₂에 민감한 형광단인 20 μ M 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)(Molecular Probes, Eugene, OR)를 세포에 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 암 조건에서 20분간 배양하고 세포내 H₂O₂를 측정하였다(Woo *et al.*, *J Biol Chem* 277:8572-8, 2002).
- [0103] (BLT2 형질전환(TG) FVB 마우스의 제조 및 동정)
- [0104] 이미 알려진 방법 대로 BLT2 형질전환 FVB 마우스를 제조하고 사용하였다(Kim *et al.*, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:915-20, 2009).
- [0105] (동물 모델 및 처리)
- [0106] 마우스 피부에서 UVB에 의한 세포사멸에 대한 BLT2의 효과를 측정하기 위해, 전기면도기로 성체 수컷 FVB 마우스(6-12 주령)의 등쪽 털을 제거하고, 남아있는 털은 80% 티오글리콜산(ILDONG Inc. Korea)을 포함하는 Niclean lotion으로 제거하고 상기 마우스를 24시간 동안 휴식시켰다. 마우스 마취를 위해 ketamine(1.69mg/mouse) 및 xyazine(0.115mg/mouse)의 혼합제를 사용하였다. 이후, 상기 마우스에 Sankyo Denki, Inc.(Kobe, Japan)에서 구입한 280nm 및 360nm(피크 306nm) 사이의 UV를 방출하는 UVB 램프(G4T5E)로부터 UVB를 조사하였다. 마우스는 17.5cm 간격으로 조사되고, 램프에서 발생하는 열은 이들 조건 하에서 무시하였다. 총 UVB 선량은 측정 수치 및 노출 길이로부터 계산하였다. 노출시간은 약 15분이었고, 마우스는 180mJ/cm²의 UVB를 조사받았다. 48시간 후, 절개한 피부 조각을 차가운 PBS로 세척하고 균질화하였다. 피부 추출물에서 BLT1/2 mRNA 및 5-LO, 12-LO, FLAP 및 cPLA₂ 단백질의 수준은 semi-quantitative RT-PCR 및 웨스턴 블랏팅으로 측정하였다.

- [0107] 또한, UVB에 의한 생체내 세포사멸에 대한 BLT1/2 길항제의 효과를 시험하기 위해, 등쪽 털이 제거된 마우스에 50 μ l의 DMSO(비히클), U75302(100 μ g) 또는 LY255283(200 μ g)를 국소 투여하고, 2시간 후 48시간 동안 UVB를 조사하였다(180mJ/cm²). DeadEndTM Colorimetric TUNEL system (Promega, Madison, WI)를 이용하여 UVB가 조사된 피부 조각에서 세포사멸성 세포를 검출하였다. 피부 조각(3×4cm; 길이×너비)을 포르말린으로 고정하고 파라핀에 끼워 넣었다. 자일렌으로 5- μ m 피부 섹션의 파라핀을 벗기고, 에탄올로 다시 수화시키고, proteinase K(100 μ g/mL)를 처리하였다. TUNEL-양성(apoptotic)세포는 짙은 갈색을 나타내었다(Afaq *et al.*, *J Invest Dermatol* 127:222-32, 2007). 실험은 실험동물의 관리 및 이용에 대한 실험실 동물 과학 지침에 대한 한국규정 하에서 수행하였다.
- [0108] (통계)
- [0109] 상기 결과는 평균±S.D.로 나타내었다. 분석은 SigmaPlot software 를 이용하여 Student's *t* test로 수행하였다. $p < 0.05$ 값은 유의한 것으로 간주되며, $p < 0.05$ 및 $p < 0.01$ 는 각각 숫자마다 * 및 **로 나타내었다.
- [0110] <실험예 1> 자외선 조사에 의한 케라티노사이트에서 BLT2의 발현 및 세포사멸에 대한 효과 조사
- [0111] BLT2 캐스케이드는 케라티노사이트에서 UVB에 의한 세포사멸에 필수적이다. 케라티노사이트에서 BLT의 역할을 시험하기 위해, 특이 프라이머 및 항체(anti-hBLT1 및 -hBLT2)를 이용하여 BLT 발현에 대해 semi-quantitative RT-PCR 및 FACS 분석을 실시하였다.
- [0112] 사람의 BLT1 및 BLT2에 특이적인 프라이머를 이용한 RT-PCR은 사람 케라티노사이트 HaCaT 세포에서 기대했던 크기의 산물이 증폭되었고(도 1), FACS 분석 결과, BLT1 및 BLT2 단백질들은 HaCaT 및 사람의 프라이머리 케라티노사이트(PHK) 세포의 표면 상에서 정상적으로 발현되었다(도 2a).
- [0113] 다음으로, BLT2 리간드인 LTB₄ 및 12(S)-HETE의 합성 시 UVB 조사에 의한 효과를 ELISA를 이용하여 분석하였다.
- [0114] 도 2b에 나타난 바와 같이, 15분간 UVB 조사 시 LTB₄ 및 12(S)-HETE 둘 다 약 2.5배 정도 증가하였고, 1시간 조사 후에는 약 4배 정도 증가하였다. 또한, 1시간 동안 UVB 조사 시, 두 케라티노사이트에서 12-lipoxygenase protein(12-LO, 12(S)-HETE 합성을 촉매하는 효소)뿐만 아니라 5-lipoxygenase(5-LO, LTB₄ 합성을 촉매하는 효소) 및 5-lipoxygenase activating protein(FLAP)의 발현이 상향조절되었다(도 2c). 따라서, BLT2 리간드의 수준과 그들의 합성에 관여하는 효소가 UVB 조사에 대한 반응 시 유의하게 모두 증가하였다.
- [0115] 또한, UVB 조사에 의한 세포사멸에서 BLT의 역할을 시험하기 위해, UVB에 의한 세포사멸에서 BLT1- 및 BLT2 특이 길항제(U75302, BLT1 길항제; LY255283, BLT2 길항제)의 효과를 측정하였다.
- [0116] 결과적으로, U75302(1 μ M)를 제외하고, LY255283(10 μ M)를 전처리한 경우, UVB에 의한 세포사멸은 시간 및 농도의존적으로 억제되었다(도 3a 및 b).
- [0117] U75302는 제외하고, LY255283에 의한 유사한 억제 효과가 PHK 세포에서도 관찰되었다(도 3c).
- [0118] U75302에 의한 효과가 없다는 것은 UVB에 의한 세포사멸 반응에서 BLT1의 역할이 없다는 것을 의미한다(도 3a, b 및 c).
- [0119] 또한, BLT2 mRNA 수준을 BLT2에 특이적인 siRNA로 낮춘 시킬 경우 HaCaT 세포에서 UVB에 의한 세포사멸이 현저히 감소하였다(도 3d).
- [0120] BLT2 siRNA 실험 조건 하에서, FACS 분석을 통해 낮춘 효과는 단백질 수준에서 확인되었다(BLT1 수준에는 영향을 주지 않으면서 BLT2 단백질의 발현 수준에서 65% 이하로 감소함)(도 4).
- [0121] 또한, Hoechst 염색 결과, UVB(40mJ/cm²)는 DNA 응축을 크게 향상시켰으며, 이는 LY255283에 의해 유의적으로

감소하였고, U75302에 의해서는 그렇지 않았다(도 3e).

- [0122] 마지막으로, LY255283를 전처리한 경우, sub-G1 집단이 실제로 감소하였고(DMSO 처리한 41.51%에 비해 21.51%임), 이들 결과는 DNA 균열 분석에 의해 확인되었다(도 3f).
- [0123] 상기 결과로부터, BLT2가 케라티노사이트의 UVB에 의한 세포사멸에서 중요한 역할을 담당하는 것으로 사료된다.
- [0124]
- [0125] <실험예 2> UVB 조사에 의한 세포사멸 경로에서 BLT2 캐스케이드의 활성산소종 발생 및 MAP 키나아제 활성화에 대한 효과 조사
- [0126] 케라티노사이트에서 활성산소종이 UVB에 의한 세포사멸에 관여함이 보고된 바 있어 HaCaT 세포에 UVB를 조사한 결과($40\text{mJ}/\text{cm}^2$), 활성산소종 생성이 빠르게 증가하여 30분 이내에 최고에 도달하였다(도 5a).
- [0127] 다음으로, UVB에 의한 활성산소종 생성에 대한 BLT2의 기여도를 조사하였다.
- [0128] 도 5b 및 c에 나타난 바와 같이, UVB에 의한 활성산소종 발생은 siBLT2를 형질감염시키거나 LY255283 처리에 의해 유의하게 감소한 반면, BLT1의 억제에는 효과가 없었다.
- [0129] U75302를 제외하고 LY255283에 의한 유사한 억제 효과가 PHK 세포에서 관찰되었다(도 6).
- [0130] 또한, MAP 키나아제(예를 들어, p38 및 JNK)는 UVB에 의한 세포사멸 경로에서 활성산소종의 다운스트림에 위치하는 것으로 보고되어 있어, MAP 키나아제 활성화에 대한 활성산소종 소거제 및 BLT2 억제제의 효과를 시험하였다.
- [0131] 항산화제인 *N*-acetylcysteine(NAC)로 전처리한 경우, 활성산소종의 생성뿐만 아니라 MAP 키나아제(예를 들어, p38 및 JNK)의 인산화가 실제로 감소하였다(도 5b).
- [0132] 마찬가지로, LY255283로 전처리한 경우, UVB에 의한 MAP 키나아제, 특히 HaCaT(도 5e) 및 PHK(도 5f) 세포에서 둘 다 JNK 및 p38 키나아제의 인산화를 감소시켰다.
- [0133] UVB에 의한 세포사멸에서 p38 및 JNK에 의한 역할을 평가하기 위해, UVB 조사 전에 p38 kinase 억제제(SB203580) 또는 JNK 억제제(SP600125)를 세포에 처리하였다.
- [0134] 도 5g에 나타난 바와 같이, UVB 조사에 대한 반응으로 대표적인 pro-apoptotic 카스파제인 카스파제-3의 활성 증가는 SB203580 또는 SP600125 전처리 시 유의하게 감소하였다. 그러나, MEK 억제제인 PD98059는 카스파제-3 활성 또는 세포사멸에 영향을 미치지 않았다(미도시됨).
- [0135] 상기 결과로부터, UVB는 케라티노사이트에서 BLT2를 매개로 한 활성산소종 발생 및 p38/JNK 활성화를 촉진하여 pro-apoptotic 카스파제의 활성화에 의한 세포사멸을 유도하는 것으로 사료된다.
- [0136]
- [0137] <실험예 3> 케라티노사이트에서 BLT2 캐스케이드의 미토콘드리아 막 전위($\Delta \psi_m$)에 대한 효과 조사
- [0138] PARP 및 Bid의 cleavage 뿐만 아니라 카스파제의 UVB에 의한 활성화에 대한 BLT2의 억제 효과를 분석하였다.
- [0139] 12시간 동안 UVB 조사($40\text{mJ}/\text{cm}^2$) 후, PARP 및 Bid 뿐만 아니라 카스파제-3, 8, 9의 분열된 활성형을 명백히 관찰할 수 있었고(도 7a), U75302를 제외하고 LY255283로 전처리한 경우, 이들 단백질의 분열(도 7a), 카스파제의 활성화 촉진(예를 들어, 카스파제-3)(도 7b) 및 Bcl-2 단백질의 유실이 현저히 감소하였다. 그러나, HaCaT 및 PHK 세포에서 다른 Bcl-2 단백질인 Bax의 수준은 변하지 않았다.
- [0140] 또한, 형광성 친유성 카보시아닌 프로브(JC-1)를 이용하여 미토콘드리아 막 전위($\Delta \psi_m$)에 대한 BLT2의 효과를 시험하였다.
- [0141] UV spectro-fluorophotometer(도 7c) 및 confocal microscopy(도 7d)로 측정한 결과와 같이, 미토콘드리아 막 전위는 UVB 노출 후 6시간째에 탈분극하였으며, 이는 UVB에 의한 세포사멸이 미토콘드리아 막 전위의 파열에 의

해 이루어짐을 말하는 것이다.

- [0142] U75302를 제외하고 LY255283로 전처리한 경우, $\Delta \psi_m$ 의 탈분극을 유의하게 억제하였다(도 7c 및 d).
- [0143] 상기 결과로부터, BLT2가 관련된 경로가 UVB에 의한 세포사멸 경로에서 카스파제의 활성화 및 $\Delta \psi_m$ 의 탈분극을 유발시키는 것으로 사료된다.
- [0144] <실험예 4> UVB 조사에 의한 세포내 활성산소종의 소스 조사
- [0145] UVB 조사에 의해 발생한 세포내 활성산소종의 소스를 측정하기 위해, NADPH 옥시다제와 같은 플라보엔자임 억제제인 디페닐렌아이오디늄 클로라이드(DPI) 및 미토콘드리아 복합체 1 억제제인 로테논(mitochondrial complex 1 inhibitor)의 효과를 시험하였다.
- [0146] 도 8a에 나타난 바와 같이, 활성산소종 소거제인 DPI 및 NAC 둘 다 UVB 조사($40\text{mJ}/\text{cm}^2$) 후 세포내 활성산소종 수준에서의 증가를 억제한 반면, 로테논은 어떠한 효과도 나타내지 않았다.
- [0147] 선행보고에 따르면, HaCaT 세포에서 NADPH 옥시다제인 Nox1, Nox2 및 Nox4 (Nox3는 제외)의 전사체를 검출할 수 있으나, Nox1 만이 단백질 수준에서 풍부하였다(Chamulitrat *et al.*, *J Invest Dermatol* 122:1000-9, 2004). 따라서, siNox1 녹다운 시스템(Park *et al.*, *Mol Cell Biol* 24:4384-94, 2004)을 이용하여 UVB에 의한 활성산소종 발생에서 Nox1의 역할을 시험하였다.
- [0148] siNox1를 형질감염시킬 경우, Nox1 mRNA를 선택적으로 녹다운시켜 농도의존적인 방식으로 UVB에 의한 활성산소종 형성을 감소하였다(도 8b). UVB에 의한 세포사멸 역시 siNox1에 의해 감소하였다(도 8c).
- [0149] BLT2가 Nox1에 의한 활성산소종 발생을 촉진하는지를 측정하기 위해, BLT2 발현 플라스미드를 세포에 형질감염시키고 나서, 300nM LTB_4 및 300nM 12(S)-HETE과 5분 동안 배양시켰다.
- [0150] 도 8d에 나타난 바와 같이, BLT2 발현에 대한 반응에서 활성산소종 생성은 BLT2 리간드인 LTB_4 및 12(S)-HETE에 의해서도 증가하였고, 활성산소종 수준의 증가는 siNox1와 함께 형질감염시킴으로써 완전히 없어졌다.
- [0151] 중요한 것은 BLT2를 안정적으로 발현하는 HaCaT 세포에서 Nox1 mRNA가 크게 상승한다는 것이다(도 8e). HaCaT 세포에서 BLT1 과발현은 활성산소종 생성 또는 Nox1 수준에는 유의적인 효과를 나타내지 않았다(미도시됨).
- [0152] 상기 결과로부터 Nox1이 BLT2의 다운스트림에 위치하며, 이 'BLT2-Nox1' 캐스케이드는 향상된 활성산소종 생성에 관여하여 케라티노사이트의 세포사멸을 유도하는 것으로 사료된다.
- [0153] <실험예 5> BLT2 과발현에 의한 UVB 유도성 세포사멸에 대한 민감도 조사
- [0154] UVB에 의한 세포사멸에서 BLT2가 관여하는지를 추가로 시험하기 위해, BLT2 과발현이 UVB에 의한 세포사멸에 대한 민감도를 증가시키는지를 평가하였다.
- [0155] 도 9a에 나타난 바와 같이, BLT2를 안정적으로 발현하는 HaCaT 세포는 24시간 동안 UVB 조사(20 및 $40\text{mJ}/\text{cm}^2$) 후 대조군 pcDNA를 발현하는 HaCaT 세포와 비교하여 증가된 세포사멸을 겪었다. 유사하게, 카스파제-3 및 PARP의 분열(도 9b), ROS 발생(도 9c), 및 MAP 키나아제(예를 들어, JNK, p38 키나아제)의 인산화(도 9d)가 향상되었다. 그리하여, BLT2는 피부 케라티노사이트에서 UVB에 의한 세포사멸에 대한 민감도의 중요 결정인자로 작용하는 것으로 보인다.
- [0156] <실험예 6> BLT2 봉쇄를 통한 UVB 조사 시 마우스 표피에서 세포사멸에 대한 효과 조사
- [0157] 마지막으로, *in vivo* 모델을 이용하여 마우스 피부에서 BLT2 및 BLT2 리간드인 LTB_4 및 12(S)-HETE의 합성을 촉매하는 효소들(예를 들어, 5-LO, cPLA2, FLAP 및 12-LO)의 수준에 대한 UVB 조사의 효과를 분석하였다.
- [0158] 도 10a 및 b에 나타난 바와 같이, BLT mRNA 및 이들 효소들의 수준은 UVB 조사($180\text{mJ}/\text{cm}^2$) 후 48시간 동안 현저히 증가하였다.

- [0159] 또한, 도 10c 및 d에 나타난 바와 같이, LY255283를 국소 처리한 경우, 유의하게 세포사멸을 억제하였다(TUNEL-양성세포는 짙은 밤색으로 나타남). 대조적으로, U75305는 세포사멸에 대한 약한 억제효과를 나타냈다.
- [0160] 마우스 피부에서 UVB에 의한 세포사멸에서 BLT2의 역할을 평가하기 위해, BLT2 형질전환 마우스를 사용하였다.
- [0161] semi-quantitative RT-PCR 결과 TG 마우스의 피부에서 BLT2 및 Nox1 mRNA의 수준이 향상됨을 입증하였고(도 10e), TG 마우스의 표피 피부가 야생형 마우스와 비교하여 UVB에 의한 세포사멸에 보다 민감함을 발견하였다(도 10f).
- [0162] 상기 결과로부터, BLT2가 UVB에 의한 세포사멸의 중추 매개체로 피부의 광보호를 위한 신규 표적이 될 수 있는 것으로 사료된다.

도면의 간단한 설명

- [0163] 도 1은 BLT1 및 BLT2 mRNA를 발현하는 HaCaT 세포를 도시한 것이다.
- [0164] 도 2는 사람 케라티노사이트에서 UVB 조사에 의한 BLT2 리간드 및 이들의 합성 효소들의 수준을 조사한 결과를 나타낸 것으로, (a)는 BLT1 및 BLT2에 대한 일차 항체를 이용하여 HaCaT 및 PHK 세포에서의 FACS 분석 결과이고, (b)는 UVB 조사 전에 혈청 결핍시킨 HaCaT 및 PHK 세포에서 LTB₄ 및 12(S)-HETE를 시간대별로 ELISA 분석 결과이고, (c)는 5-L0, FLAP, cPLA₂, 12-L0 및 α -tubulin에 대한 항체들을 이용하여 HaCaT 및 PHK 세포에서의 웨스턴 블랏팅 결과이다.
- [0165] 도 3은 UVB 조사에 따른 BLT2 캐스케이드에 의한 세포사멸 유도를 나타낸 것으로, (a)는 DMSO, U75302(1 μ M) 또는 LY255283(10 μ M)을 전처리하고 UVB 조사한 HaCaT 세포에서 생존세포를 측정된 결과이고, (b)는 U75302(0, 1, 2.5 및 5 μ M) 또는 LY255283(0, 1, 5 및 10 μ M)로 전처리하고, UVB 조사한 HaCaT 세포에서 생존세포를 측정된 결과이고, (c)는 DMSO, U75302(1 μ M) 또는 LY255283(10 μ M)로 전처리한 후 UVB 조사한 PHK 세포에서 생존세포를 측정된 결과이고, (d)는 혼합된 siRNA(50nmol/ml) 또는 BLT2 siRNA(50nmol/ml)를 형질감염시키고 UVB 조사된 HaCaT 세포에서 생존세포를 측정된 결과이고, (e, f)는 U75302(1 μ M) 또는 LY255283(10 μ M)로 전처리하고 UVB 조사한 HaCaT 세포에서 Hoechst 염색 결과(e), 및 sub-G1 FACS 분석(f; 왼쪽) 및 DNA 균열분석(f; 오른쪽) 결과이다.
- [0166] 도 4는 케라티노사이트에서 BLT1 및 BLT2 발현에 대한 siRNA Nick다운의 효과를 나타낸 것이다.
- [0167] 도 5는 UVB에 의한 세포사멸 경로에서 BLT2의 활성산소종 생성 및 MAP 키나아제 활성화에 대한 효과를 조사한 결과로서, (a)는 DCF-DA(10 μ g/mL)로 전처리 하고 UVB 조사한 HaCaT 세포에서 FACS 분석에 의한 세포내 활성산소종을 모니터링한 결과이고, (b, c)는 U75302(1 μ M), LY255283(10 μ M) 또는 NAC(10mM)로 전처리하거나(b), 혼합된 siRNA(50nmol/mL) 또는 siBLT2(50nmol/mL)로 형질감염시킨 후(c) UVB 조사한 세포에서 세포내 활성산소종의 수준을 모니터링한 결과이고, (d, e)는 NAC(10mM)(d) 또는 LY255283(10 μ M)(e)로 전처리한 후 UVB 조사한 세포에서 MAP 키나아제 및 그들의 인산화된-MAP 키나아제(p-p38, p-JNK, p-ERK)의 항체들과 웨스턴 블랏팅한 결과이고, (f)는 DMSO 또는 LY255283(10 μ M)로 전처리하고 UVB 조사한 PHK 세포에서 MAP 키나아제 및 그들의 인산화된-MAP 키나아제의 항체들과 웨스턴 블랏팅한 결과이고, (g)는 SB203580(20 μ M) 또는 SP600125(20 μ M)로 전처리한 후 UVB 조사한 HaCaT 세포에서 카스파제-3 활성을 조사한 결과이다.
- [0168] 도 6은 DMSO, U75302(1 μ M), LY255283(10 μ M), 또는 DPI(5 μ M)로 전처리한 후 UVB 조사한 PHK 세포에서 세포내 활성산소종 수준을 FACS 분석에 의해 모니터링한 결과를 나타낸 것이다.
- [0169] 도 7은 BLT2 캐스케이드 봉쇄를 통한 카스파제 활성화 및 미토콘드리아 막 전위에 미치는 효과를 조사한 것으로, (a)는 U75302(1 μ M) 또는 LY255283(10 μ M)로 전처리한 후 UVB 조사한 HaCaT 및 PHK 세포에서 카스파제(-3, -8 및 9), Bid, Bax, Bcl-2, PARP 및 α -tubulin 항체들과의 웨스턴 블랏팅 결과이고, (b)는 상기 HaCaT 세포에서 카스파제-3 활성을 측정된 결과이고, (c, d)는 상기 HaCaT 세포를 JC-1(5 μ M)과 배양한 후 UV spectrofluorophotometer로 정량한 결과(c)와 Zeiss fluorescence microscope에서 얻은 형광 이미지(d)를 나타낸 것이다.
- [0170] 도 8은 BLT2-Nox1 캐스케이드에 의한 UVB 유도성 활성산소종 발생을 나타낸 것으로, (a)는 DPI(5 μ M), 로테논(10 μ M) 및 NAC(10mM)로 전처리하고 UVB 조사한 HaCaT 세포를 DCF-DA(10 μ g/mL)와 배양하여 세포내 활성산소종을 DCF 형광의 FACS 분석을 통해 측정된 결과이고, (b)는 pSUPER 및 pSUPER-siNox1(1, 3 및 5 μ g)를 HaCaT 세포에 형질감염시킨 후 semi-quantitative RT-PCR에 의해 Nox1 mRNA 전사체를 검출한 결과(오른쪽)와, DCF 형광의

FACS 분석에 의한 세포내 활성산소종 측정 결과(왼쪽)이고, (c)는 pSUPER 및 pSUPER-siNox1으로 형질감염된 세포들을 UVB 조사한 후 생존세포를 분석한 결과이고, (d)는 pcDNA 또는 pcDNA-BLT2를 안정적으로 과발현하는 HaCaT 세포와 300nM LTB₄ 및 300nM 12(S)-HETE과 배양하고(왼쪽), BLT2를 안정적으로 과발현하는 HaCaT 세포에 pSUPER 및 pSUPER-siNox1을 형질감염시키고, 300nM LTB₄ 및 300nM 12(S)-HETE과 배양하여(오른쪽) DCF 형광의 FACS 분석에 의해 세포내 활성산소종을 측정한 결과이고, (e)는 pcDNA 또는 pcDNA-BLT2를 안정적으로 발현하는 HaCaT 세포에서 semi-quantitative RT-PCR에 의해 BLT1, BLT2 및 Nox1 발현을 나타낸 것이다.

[0171] 도 9는 BLT2를 안정적으로 과발현하는 HaCaT 세포의 UVB에 의한 세포사멸 민감도를 측정한 결과로서, (a)는 UVB를 조사한 pcDNA 또는 pcDNA-BLT2이 안정적으로 형질감염된 HaCaT 세포의 생존세포를 나타낸 것이고, (b)는 상기 세포들에서 카스파제-3 및 PARP의 cleavage를 검출한 결과이고, (c)는 상기 세포들에서 DCF 형광의 FACS 분석에 의해 활성산소종을 측정한 결과이고, (d)는 상기 세포들에서 MAP 키나아제 (p38, JNK 및 ERK)의 항체들과의 웨스턴 블랏팅 결과를 나타낸 것이다.

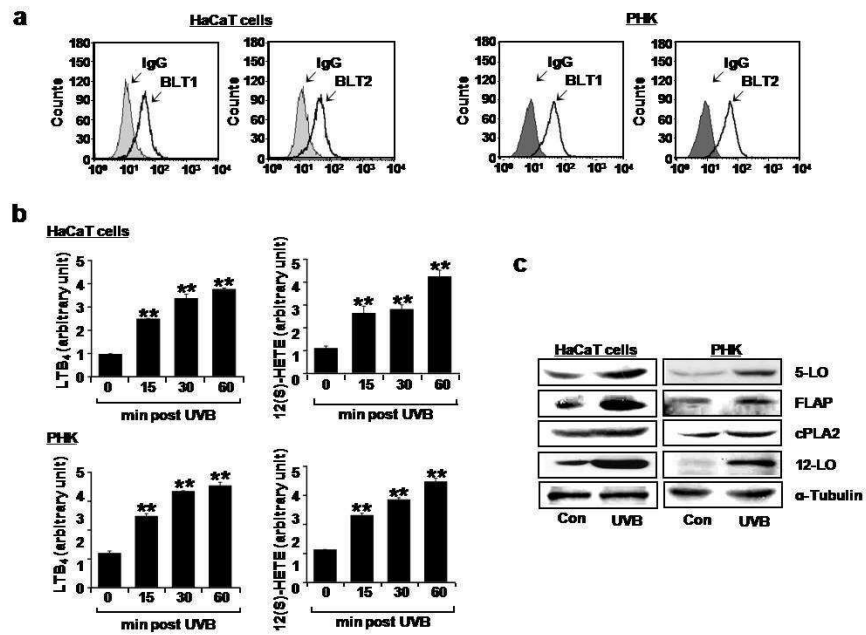
[0172] 도 10은 마우스 피부에서 UVB에 의한 세포사멸에 대한 BLT2 캐스캐이드의 효과를 조사한 것으로, (a, b)는 Sham-조사(Sham) 및 UVB-조사한 성체 수컷 FVB 마우스의 피부에서 semi-quantitative RT-PCR에 의한 BLT1 및 BLT2 전사체의 분석결과(a)와, 웨스턴 블랏 분석을 통한 5-LO, cPLA₂, FLAP, 및 12-LO 단백질 수준 측정 결과(b)이고, (c, d)는 상기 마우스에 대조군 비히클, U75302(100 μ g/50 μ l/mouse), 또는 LY255283(200 μ g/50 μ l/mouse)를 국소 처리하고, UVB 조사한 후 TUNEL 분석에 의한 세포사멸을 검출한 결과로 TUNEL-양성세포의 정량화(c) 및 염색된 이미지(d)이며, (e)는 BLT2 형질전환 마우스 피부에서 semi-quantitative RT-PCR을 통해 BLT1, BLT2 및 Nox1의 mRNA 수준을 정량한 결과이고, (f)는 정상 마우스 및 BLT2- 과발현 형질전환 마우스에 UVB를 조사하여 5개의 영역에서 TUNEL-양성세포들을 카운팅한 결과를 나타낸 것이다.

도면

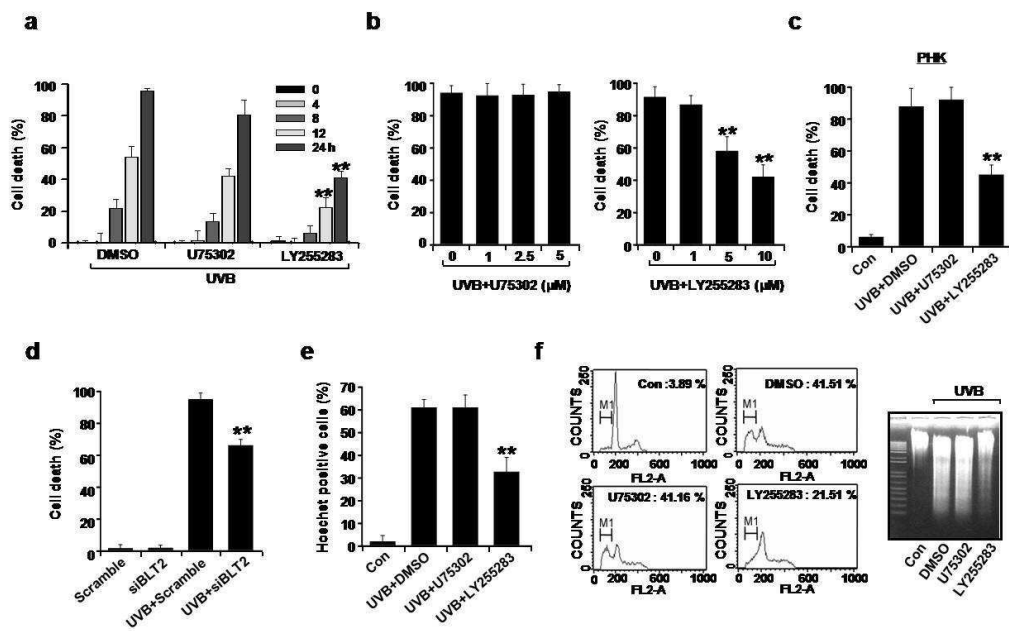
도면1



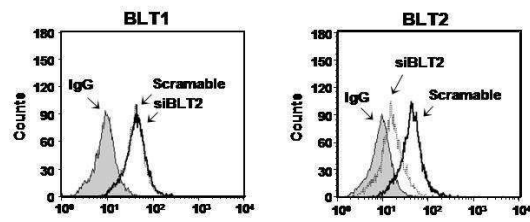
도면2



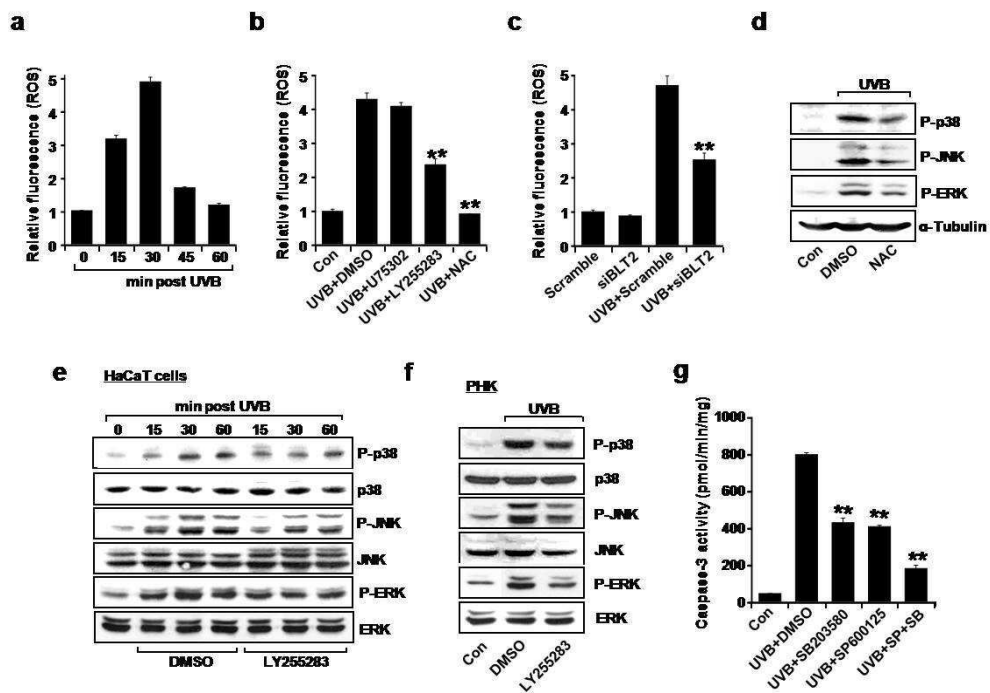
도면3



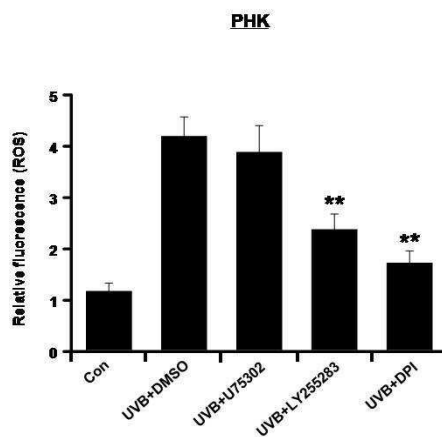
도면4



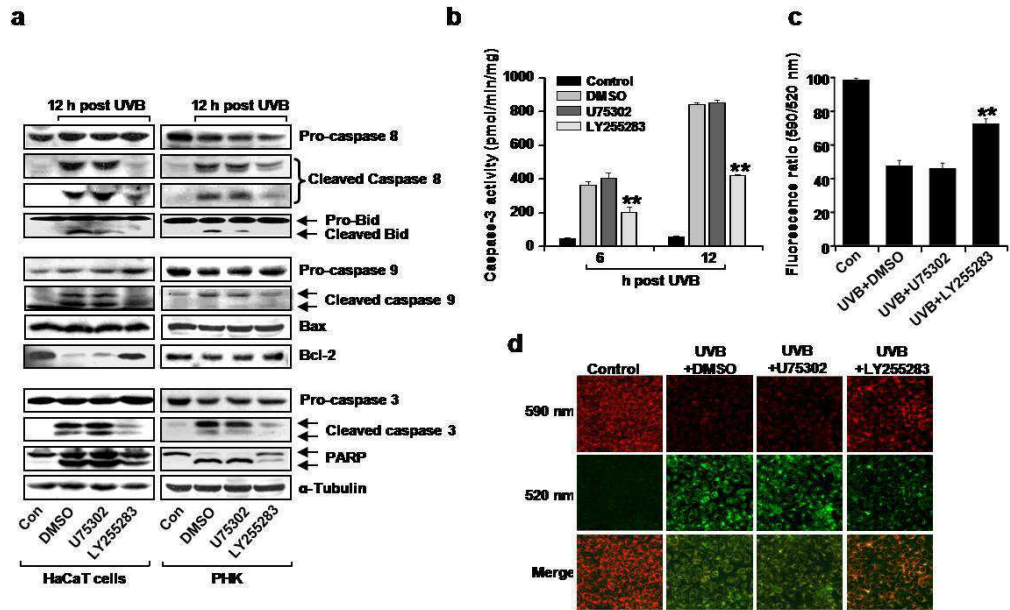
도면5



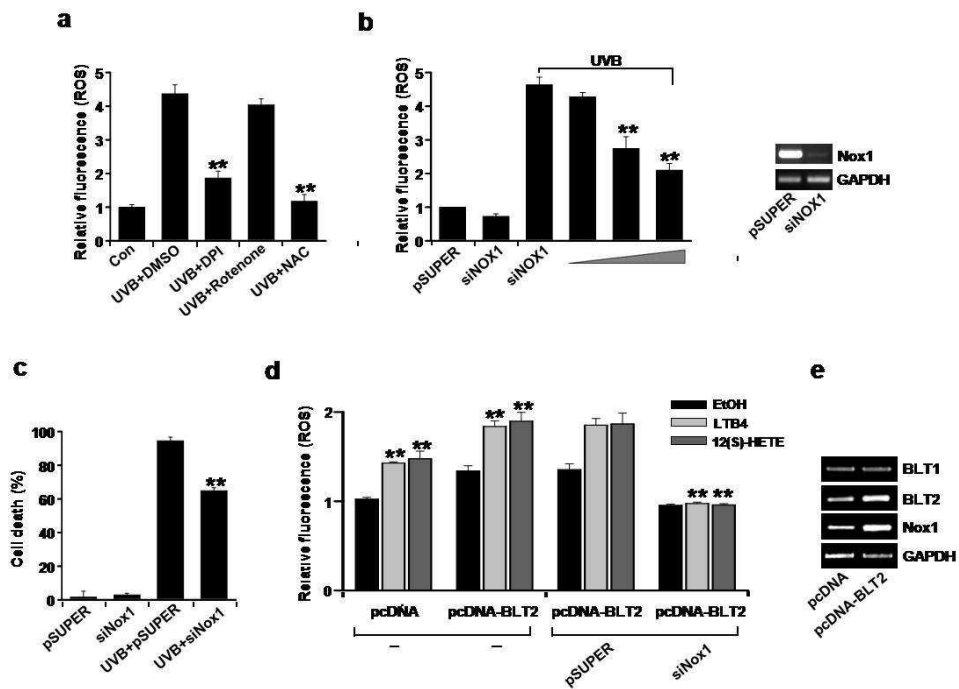
도면6



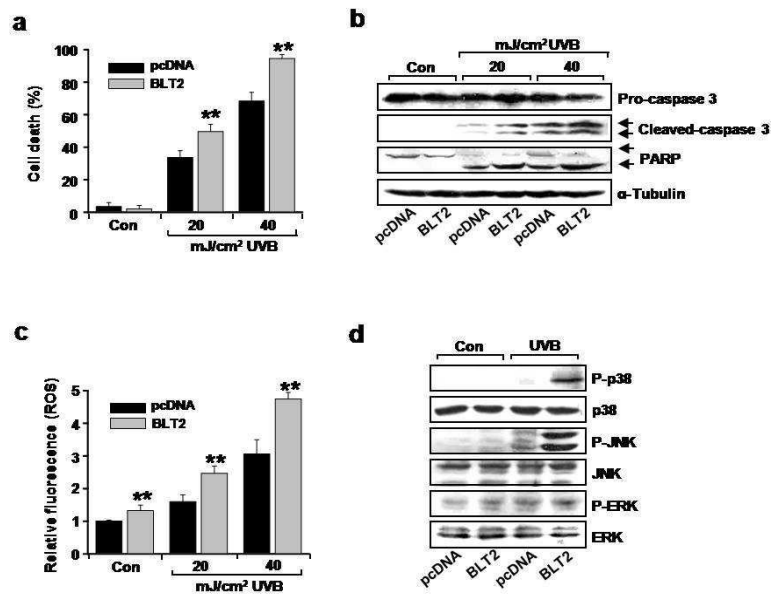
도면7



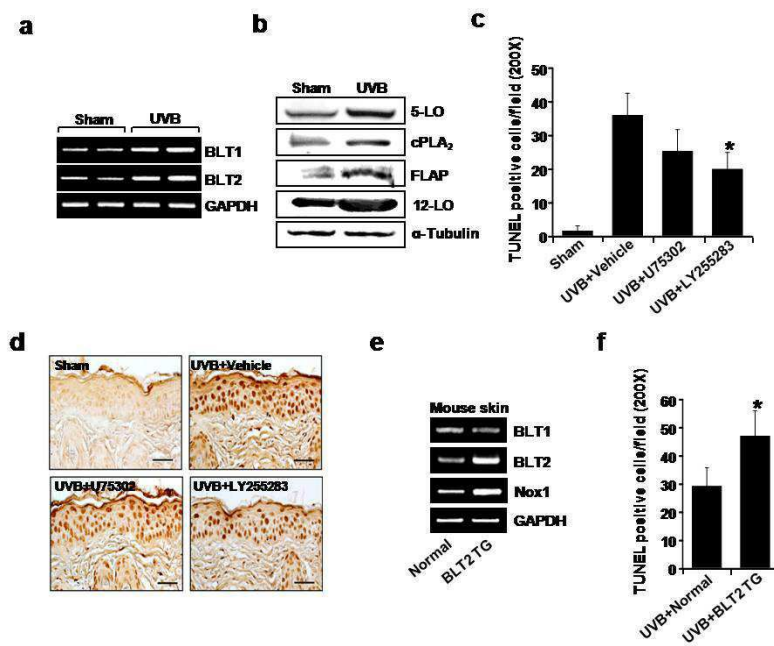
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Composition for protecting skin from ultraviolet comprising BLT2 inhibitor

<160> 1

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> BLT2 SiRNA

<400> 1

ccacgcagtc aacattctg

19