

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0071446
(43) 공개일자 2020년06월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7105 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
G01N 33/50 (2017.01) *G01N 33/68* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/7105 (2013.01)
A61K 39/3955 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-0159186
 (22) 출원일자 2018년12월11일
 심사청구일자 없음
- (71) 출원인
 광주과학기술원
 광주광역시 북구 첨단과기로 123 (오룡동)
- (72) 발명자
 전장수
 광주광역시 북구 첨단과기로 123(오룡동, 광주과학기술원 생명과학부)
- 최완수
 광주광역시 북구 첨단과기로 123(오룡동, 광주과학기술원 연골퇴행제어연구센터)
- (74) 대리인
 제일특허법인(유)

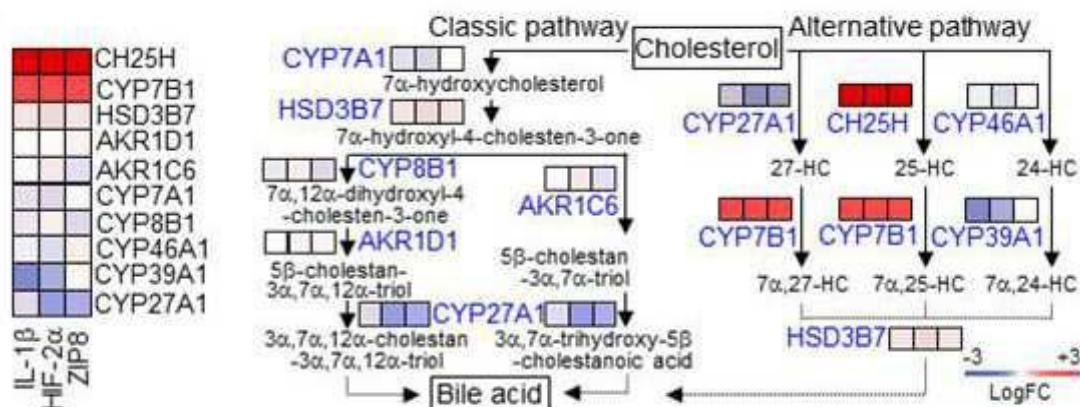
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 옥시스테롤의 생성 억제를 이용한 관절염 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 옥시스테롤의 생성 억제제를 이용한 관절염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 콜레스테롤-25-수산화효소(CH25H) 또는 25-하이드록시콜레스테롤-7-알파-수산화효소(CYP7B1)의 발현 또는 활성 억제제를 통한 옥시스테롤의 생성 억제제를 이용한 관절염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 관절염 치료제를 선별할 수 있는 관절염 예방 또는 치료용 의약 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

대표도 - 도2a



(52) CPC특허분류

A61P 19/02 (2018.01)

A61P 29/00 (2018.01)

G01N 33/5044 (2013.01)

G01N 33/6887 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465026026(GM11700)

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 중개연구

연구과제명 Cholesterol metabolism을 표적으로 하는 연골퇴행 제어기술 개발

기 여 율 7/10

주관기관 광주과학기술원

연구기간 2018.02.01 ~ 2018.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711072792(NN21170)

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 리더연구

연구과제명 연골퇴행 제어연구

기 여 율 3/10

주관기관 광주과학기술원

연구기간 2018.04.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

콜레스테롤-25-수산화효소(CH25H) 또는 25-하이드록시콜레스테롤-7-알파-수산화효소(CYP7B1)의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 관절염의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 CH25H는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는, 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 아미노산 서열은 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열로 코딩되는, 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 CYP7B1은 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시되는, 약학 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 아미노산 서열은 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열로 코딩되는, 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 발현 억제제는 CH25H 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 상보적으로 결합 가능한 연속적으로 18 내지 30개의 뉴클레오티드 서열을 갖는 shRNA, siRNA 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 약학 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 siRNA는 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 뉴클레오티드 서열로 표시되는, 약학 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 발현 억제제는 CYP7B1 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드에 상보적으로 결합 가능한 연속적으로 18 내지 30개의 뉴클레오티드 서열을 갖는 shRNA, siRNA 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 약학 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 siRNA는 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하

나의 뉴클레오타이드 서열로 표시되는, 약학 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 활성 억제제는 CH25H 단백질 또는 CYP7B1 단백질에 상보적으로 결합하는 항체, 앵타머 및 안타고니스트로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 약학 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 관절염은 골관절염, 퇴행성 관절염, 류마티스 관절염, 반응성 관절염, 건선성 관절염, 패혈성 관절염, 류마티스 다발근육통 및 다발성 근육염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인, 약학 조성물.

청구항 12

(a) 관절염 질병 모델 동물로부터 유래한 연골세포에 시험물질을 처리하는 단계;

(b) 상기 (a) 단계 이후, 콜레스테롤-25-수산화효소(CH25H) 또는 25-하이드록시콜레스테롤-7-알파-수산화효소(CYP7B1)의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 (b) 단계에서 측정한 mRNA 또는 단백질 수준이 대조군(미처리군)에 비해 감소된 시험물질을 후보물질로 선별하는 단계를 포함하는 관절염 예방 또는 치료용 의약 후보물질의 스크리닝 방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 mRNA 또는 단백질 수준은 RT-PCR, 정량적 PCR, ELISA, 면역조직화학, 웨스턴 블랏 및 유세포 분석법(FACS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 측정되는 것인, 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 옥시스테롤의 생성 억제를 이용한 관절염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 콜레스테롤-25-수산화효소(CH25H) 또는 25-하이드록시콜레스테롤-7-알파-수산화효소(CYP7B1)의 발현 또는 활성 억제를 통한 옥시스테롤의 생성 억제를 이용한 관절염 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 관절염이란 관절연골조직이 손상 또는 손실되는 증상으로, 노화, 유전적 요인, 영양 불균형, 운동 부족, 비만 등 여러 요인이 복합적으로 작용하여 발병하게 된다. 관절염은 노년층뿐만 아니라 다양한 폭넓은 연령대에서 발병 빈도가 높은 질환으로, 한번 손상된 조직은 자연적으로 재생이 힘들어 장기간 환자의 사회적 활동을 제한하고 삶의 질을 저하시키는 원인이 된다.

[0003] 이와 같은 관절염을 치료하기 위한 방법으로 외과적인 이식 수술법이 수행될 수 있으나, 이식 수술법은 합병증의 유발, 질병 전염 가능성, 골 재생 효과의 부진 등과 같은 문제점이 있다. 또한, 관절염 통증 치료제로서 아스피린, 비스테로이드성 소염제, 코티손 등과 같은 스테로이드성 약물이 사용되고 있으나, 이러한 약물요법은 관절염의 근본적인 치료법이 아니며, 장기간 사용 시 부작용을 유발하는 단점이 있다(Clouet J et al. Drug Discovery Today (2009) 14:19/20, 913-925; Gegout PP et al. Joint Bone Spine (2008) 669-671).

[0004] 따라서, 보다 근본적으로 관절염을 치료할 수 있으면서도 통증을 효과적으로 완화시킬 수 있는 부작용이 적은 새로운 기전의 치료제가 필요한 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0005] (비특허문헌 0001) Clouet, Johann, et al. "From osteoarthritis treatments to future regenerative therapies for cartilage." Drug discovery today 14.19-20 (2009): 913-925.
- (비특허문헌 0002) Gegout, Pascale Pottie, et al. "Adipokines in osteoarthritis: friends or foes of cartilage homeostasis?." Joint, bone, spine: revue du rhumatisme 75.6 (2008): 669-671.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 이에 본 발명자들은 세포 내 콜레스테롤 유입 기전과 관절염의 관계를 규명하고, 콜레스테롤 수산화효소인 CH25H 또는 CYP7B1의 발현 증가에 의해 콜레스테롤이 옥시스테롤로 변환되어 연골조직 분해효소인 MMP3, MMP13 및 ADAMTS5의 발현이 조절됨을 입증하였다. 또한, 상기 CH25H 또는 CYP7B1의 발현을 억제하는 경우 연골퇴행이 억제되고, CH25H 또는 CYP7B1을 과발현하는 경우 연골퇴행이 촉진됨을 확인하였다.
- [0007] 이에 따라, 본 발명의 목적은 CH25H 또는 CYP7B1의 발현 및 활성을 조절하여 관절염의 예방 또는 치료에 적용할 수 있는 약학 조성물을 제공하고, 관절염 치료제를 선별할 수 있는 관절염 예방 또는 치료용 의약 후보물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 콜레스테롤-25-수산화효소(CH25H) 또는 25-하이드록시콜레스테롤-7-알파-수산화효소(CYP7B1)의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 관절염의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 (a) 관절염 질병 모델 동물로부터 유래한 연골세포에 시험물질을 처리하는 단계; (b) 상기 (a) 단계 이후, 콜레스테롤-25-수산화효소(CH25H) 또는 25-하이드록시콜레스테롤-7-알파-수산화효소(CYP7B1)의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 mRNA 또는 단백질 수준이 대조군(미처리군)에 비해 감소된 시험물질을 후보물질로 선별하는 단계를 포함하는 관절염 예방 또는 치료용 의약 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0010] 본 발명의 약학 조성물을 이용하는 경우, 종래의 치료제에 비해 보다 효과적으로 관절염을 치료할 수 있을 뿐만 아니라 관절염으로 인한 통증을 완화시키는 효과가 우수하다. 또한, 본 발명의 관절염 예방 또는 치료용 의약 후보물질의 스크리닝 방법을 이용하는 경우, 관절염의 치료제를 개발할 수 있는 효과적인 플랫폼을 제공할 수 있고, 보다 효과적으로 의약 후보물질을 도출할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0011] 도 1a는 고콜레스테롤 식이 마우스의 연골퇴행 정도를 OARSI 점수로 나타낸 것이다.
- 도 1b는 골관절염 유도 환경에서 연골세포에서의 콜레스테롤 함량을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 1c는 골관절염 유도 환경에서 연골세포에서의 총 콜레스테롤 함량을 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 1d는 연골세포 내 LOX-1(Lectin-like, oxidized low-density lipoprotein receptor-1)의 발현 정도를 나타낸 것이다.
- 도 1e는 퇴행성 관절염의 연골조직에서 LOX1의 발현 정도를 면역조직화학적 분석을 통해 나타낸 것이다.
- 도 1f는 LOX-1의 발현 정도에 따른 콜레스테롤의 수치를 나타낸 것이다.
- 도 1g는 LOX-1의 발현 정도에 따른 세포 내 콜레스테롤의 유입 정도를 나타낸 것이다.
- 도 1h는 LOX-1의 발현 정도에 따른 콜레스테롤의 함량을 형광현미경 분석을 통해 나타낸 것이다.
- 도 2a는 골관절염 유도 환경에서 세포 내 CH25H 및 CYP7B1 유전자의 발현이 증가한 것을 마이크로어레이를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.

- 도 2b는 정량적 PCR을 통한 연골세포 내 CH25H 및 CYP7B1의 mRNA의 발현 정도를 나타낸 것이다.
- 도 2c는 정량적 PCR을 통한 관절염의 연골조직 내 CH25H 및 CYP7B1의 mRNA 발현 정도를 나타낸 것이다.
- 도 2d는 면역조직화학적 분석을 통해 마우스 관절염의 연골조직 내 CH25H 및 CYP7B1의 mRNA 발현 정도를 나타낸 것이다.
- 도 2e는 면역조직화학적 분석을 통해 인간 관절염의 연골조직 내 CH25H 및 CYP7B1의 mRNA 발현 정도를 나타낸 것이다.
- 도 2f는 연골세포 내 25-HC 및 7 α ,25-HC의 발현 정도를 확인한 것이다.
- 도 3은 LC-MS/MS 분석을 통한 연골세포 내 25-HC 및 7 α ,25-HC의 발현 정도를 확인한 것이다.
- 도 4a는 연골세포 내 콜레스테롤, 25-HC 또는 7 α ,25-HC 처리에 따른 연골퇴행 관련 유전자(MMP3, MMP13 및 ADAMTS5) 및 연골형성 관련 유전자(SOX9, 콜라겐 및 아그레칸)의 발현 정도를 나타낸 것이다.
- 도 4b는 연골세포 내 Ad-CH25H 또는 Ad-CYP7B1 처리에 따른 연골퇴행 관련 유전자(MMP3, MMP13 및 ADAMTS5) 및 연골형성 관련 유전자(SOX9, 콜라겐 및 아그레칸)의 발현 정도를 나타낸 것이다.
- 도 4c는 연골세포 내 Ad-CH25H, Ad-CYP7B1, 콜레스테롤, 25-HC 또는 7 α ,25-HC 처리에 따른 MMP3 및 MMP13의 발현 정도를 웨스턴 블랏으로 나타낸 것이다.
- 도 4d는 연골세포 내 DIPEN 또는 NITEGE의 생성 정도를 면역조직화학적 검사를 통해 확인한 것이다.
- 도 4e는 연골세포 내 DIPEN 또는 NITEGE의 생성 정도를 면역조직화학적 검사를 통해 확인한 것이다.
- 도 5a는 CH25H의 과발현이 연골퇴행에 미치는 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5b는 CH25H의 결핍이 연골퇴행에 미치는 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5c는 CH25H의 결핍이 연골퇴행에 미치는 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5d는 CYP7B1의 과발현이 연골퇴행에 미치는 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5e는 CYP7B1의 결핍이 연골퇴행에 미치는 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 5f는 CH25H 또는 CYP7B1의 발현을 통한 MMP3 및 MMP13의 발현 정도를 나타낸 것이다.
- 도 6a는 CH25H의 발현 억제를 통한 관절 통증의 억제 효과를 본 프레이 분석을 통해 확인한 것이다.
- 도 6b는 CH25H의 발현 억제를 통한 관절 통증의 억제 효과를 핫 플레이트 분석을 통해 확인한 것이다.
- 도 6c는 CYP7B1의 발현 억제를 통한 관절 통증의 억제 효과를 본 프레이 분석을 통해 확인한 것이다.
- 도 6d는 CYP7B1의 발현 억제를 통한 관절 통증의 억제 효과를 핫 플레이트 분석을 통해 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0012] 본 발명의 일 측면은 콜레스테롤-25-수산화효소(CH25H) 또는 25-하이드록시콜레스테롤-7-알파-수산화효소(CYP7B1)의 발현 억제제 또는 활성 억제제를 유효성분으로 포함하는 관절염의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 명세서에서 사용된 용어 "콜레스테롤-25-수산화효소(CH25H)"란, 콜레스테롤을 산화형태인 옥시스테롤로 변환시키는 수산화효소를 의미한다. 구체적으로 CH25H는 콜레스테롤을 25-하이드록시콜레스테롤(25-HC)로 변환시키는 효소이다.
- [0014] 본 명세서에서 사용된 용어 "25-하이드록시콜레스테롤-7-알파-수산화효소(CYP7B1)"란, 콜레스테롤을 산화형태인 옥시스테롤로 변환시키는 수산화효소를 의미한다. 구체적으로 CYP7B1은 콜레스테롤을 7 α ,25-디하이드록시콜레스테롤(7 α ,25-HC)로 변환시키는 효소이다.
- [0015] 본 명세서에서 사용된 용어 "옥시스테롤"이란, 콜레스테롤의 산화 형태를 갖는 것으로, 옥시스테롤의 증가는 연골조직 분해에 중요한 역할을 하는 기질단백질 분해효소인 MMP3, MMP13 및 ADAMTS5의 발현을 조절할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 CH25H는 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시될 수 있으며, 상기 아미노산 서열

은 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열로 코딩될 수 있다.

- [0017] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 CYP7B1은 서열번호 3의 아미노산 서열로 표시될 수 있으며, 상기 아미노산 서열은 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열로 코딩될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 발현 억제제는 CH25H 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 상보적으로 결합 가능한 연속적으로 18 내지 30개의 뉴클레오티드 서열, 바람직하게는 22 내지 24개의 뉴클레오티드 서열을 갖는 shRNA, siRNA 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 siRNA는 서열번호 5, 서열번호 6, 서열번호 7 및 서열번호 8로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 뉴클레오티드 서열로 표시될 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 발현 억제제는 CYP7B1 유전자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 상보적으로 결합 가능한 연속적으로 18 내지 30개의 뉴클레오티드 서열, 바람직하게는 22 내지 24개의 뉴클레오티드 서열을 갖는 shRNA, siRNA 및 안티센스 뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 siRNA는 서열번호 9, 서열번호 10, 서열번호 11 및 서열번호 12로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 뉴클레오티드 서열로 표시될 수 있다.
- [0022] 본 명세서에서 사용된 용어 "shRNA"란, 고가의 siRNA 생합성 비용, 낮은 세포 형질감염 효율로 인한 RNA 간섭 효과의 단시간 유지 등의 단점을 극복하기 위한 것으로, RNA 중합효소 III의 프로모터로부터 아데노바이러스, 렌티바이러스 및 플라스미드 발현 벡터 시스템을 이용하여 세포 내로 도입하여 발현시킬 수 있다. 상기 shRNA는 세포 내에 존재하는 siRNA 프로세싱 효소(Dicer 또는 Rnase III)에 의해 정확한 구조를 갖는 siRNA로 전환되어 표적 유전자의 사일런싱을 유도할 수 있다.
- [0023] 본 명세서에서 사용된 용어 "siRNA"란, 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi 간섭 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 상기 siRNA는 표적 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있어 효율적인 유전자 녹다운 방법 또는 유전자 치료의 방법으로 제공될 수 있다. 상기 siRNA는 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-유도된 siRNA 발현 카세트를 형질전환 또는 형질감염시켜 세포 내로 도입시킬 수 있다.
- [0024] 본 명세서에서 사용된 용어 "안티센스 뉴클레오티드"란, 특정 mRNA 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA, RNA 또는 이들의 유도체를 의미하는 것으로, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해한다. 안티센스 뉴클레오티드는 RNA 폴리머라제 I을 이용하여 시험관에서 합성하여 생체 내로 투여하거나, 인식부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 활성 억제제는 CH25H 단백질 또는 CYP7B1 단백질에 상보적으로 결합하는 항체, 앵타머 및 안타고니스트로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0026] 본 명세서에서 사용된 용어 "항체"란, 단일클론항체 및 이에 대한 키메라 항체, 인간화 항체 및 인간 항체를 모두 포함할 수 있으며, CH25H 단백질 또는 CYP7B1 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 분자 및 이의 단편을 포함할 수 있다.
- [0027] 본 명세서에서 사용된 용어 "앵타머"란, 그 자체로 안정된 삼차구조를 가지면서 표적분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)을 의미한다.
- [0028] 본 명세서에서 사용된 용어 "안타고니스트"란, 수용체의 생물학적 활성을 직접적으로 또는 간접적으로 감소시킬 수 있는 분자를 의미하며, 수용체의 리간드와 함께 사용하는 경우에 상기 리간드의 작용을 감소시킬 수 있는 분자를 포함할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 관절염은 골관절염, 퇴행성 관절염, 류마티스 관절염, 반응성 관절염, 건선성 관절염, 패혈성 관절염, 류마티스 다발근육통 및 다발성 근육염으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0030] 상기 약학 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있으며, 상기 "약학적으로 유효한 양"이란, 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수해/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 이는 환자의 질병 종류, 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간,

동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

- [0031] 상기 약학 조성물은 비경구로 투여되는 것이 바람직하며, 특히 관절 내 투여되는 것이 바람직하다.
- [0032] 또한, 본 발명의 일 측면은 (a) 관절염 질병 모델 동물로부터 유래한 연골세포에 시험물질을 처리하는 단계; (b) 상기 (a) 단계 이후, 콜레스테롤-25-수산화효소(CH25H) 또는 25-하이드록시콜레스테롤-7-알파-수산화효소(CYP7B1)의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계에서 측정한 mRNA 또는 단백질 수준이 대조군(미처리군)에 비해 감소된 시험물질을 후보물질로 선별하는 단계를 포함하는 관절염 예방 또는 치료용 의약 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0033] 본 명세서에서 사용된 용어 "시험물질"은 유전자의 발현량에 영향을 미치거나, 단백질의 발현 또는 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 후보물질을 의미한다. 상기 시험물질은 개별적인 핵산, 단백질, 기타 추출물 또는 천연물 또는 화합물 등이 될 수 있고, 구체적으로, 저분자 화합물, 유기합성물질, 천연물질, microRNA, siRNA, shRNA, 항체, 앵타머 등이 될 수 있다.
- [0034] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 mRNA 또는 단백질 수준은 RT-PCR, 정량적 PCR, ELISA, 면역조직화학, 웨스턴 블랏 및 유세포 분석법(FACS)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 측정될 수 있다.
- [0035] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- [0036] **실시예 1. 실험모델의 준비**
- [0037] **실시예 1.1. 인간 퇴행성 관절염 연골조직의 준비**
- [0038] 인간 퇴행성 관절염 연골조직을 인공관절(arthroplasty) 수술을 받은 개인들로부터 수득하였다. 원광대학교 병원 IRB(Institutional Review Board)의 승인을 받았으며, 모든 개인들로부터 수술 전 동의서를 받았다.
- [0039] **실시예 1.2. 마우스 퇴행성 관절염 연골조직의 준비**
- [0040] 12주령의 수컷 마우스 C57BL/6을 퇴행성 관절염 실험에 이용하였다. Ch25h^{-/-} 마우스를 Jackson Laboratory로부터 수득하였으며, 모든 실험들을 광주과학기술원 동물실험윤리위원회로부터 승인을 받아 수행하였다. 마우스에 DMM(destabilization of medial meniscus) 수술을 실시하여 퇴행성 관절염을 유도하였다. 즉, DMM 수술을 통해 마우스의 관절조직에 존재하는 내측 반월상 연골판을 고정하고 있는 인대를 절개하여 관절조직의 기계적 불안정상을 유도하여 연골손상을 인위적으로 유도하였다. CH25H(Ad-CH25H), CYP7B1(Ad-CYP7B1), ZIP8(Ad-ZIP8) 및 HIF-2 α (Ad-HIF-2 α)를 1X10⁹ PFU로 일주일에 한 번씩 3주 동안 관절 내(intra-articular; IA) 주입하여 퇴행성 관절염을 유도하였다. 수술 후 3주 또는 8주에 마우스를 희생시킨 후 분석하였다.
- [0041] **실시예 1.3. 고콜레스테롤 식이 마우스의 준비**
- [0042] 야생형 마우스 또는 CH25H가 결핍된 녹아웃(KO) 마우스에 Feed Lab에서 구매한 AIN-76A 사료를 13주 동안 급여하여 일반 식이를 실시하였다. 반면, 일반 사료(AIN-76A)에 2% 콜레스테롤이 함유된 사료를 13주 동안 급여하여 고콜레스테롤 식이를 실시하였다. 고콜레스테롤에 의한 연골퇴행 효과를 확인하기 위해 고콜레스테롤 식이를 수행한 마우스를 DMM 수술 후 4주 또는 6주에 희생시킨 후 분석하였다.
- [0043] **실시예 1.4. 관절연골세포의 배양**
- [0044] 생후 4일된 마우스의 대퇴골두(femoral head), 대퇴골 관절(femoral condyle) 및 경골고원부(tibial plateau)로부터 0.2% 콜라겐분해효소(collagenase)를 이용하여 야생형 마우스에서 유래된 관절연골조직을 수득하였다(문헌 [Nat. Med. 16, 687-693 (2010)]; [Ann. Rheum. Dis. 74, 595-602 (2015)]; [Cell 156, 730-743 (2014)]; [Ann. Rheum. Dis. 75, 2045-2052 (2016)]; 및 [Nat. Proc. 3, 1253-1260 (2008)] 참조). 연골세포를 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)에서 단일층으로 유지하였으며, 배양 2일에 바이러스 또는 사이토카인 등을 세포에 처리하였다.
- [0045] **실험예 1. 분석 실험**
- [0046] **실험예 1.1. 면역조직화학적 분석**
- [0047] 동결처리한 인간 골관절염(OA) 연골조직을 5 μ m의 두께로 절편화하여 파라포름알데하이드에 고정하였다. 설페이트 프로테오글라이칸을 알시안 블루 염색으로 검출하였고, 마우스 연골조직의 파괴 정도를 사프란-0 염색으로

로 분석하였다. 즉, 연골조직을 4% 파라포름알데하이드에 고정시키고 0.5 M EDTA로 칼슘을 제거한 후, 파라핀에 임베드(embed)하였다. 파라핀 블록을 5 μ m의 두께로 절편화하였다. 전체 관절로부터 연속 절편들을 70 μ m 간격으로 수득하였다. 상기 절편들을 자일렌으로 탈파라핀화시키고, 등급 에탄올로 수화시킨 후, 사프란인-O로 염색하였다. 연골조직의 파괴 정도를 OARSI 점수(0 내지 6)를 이용하여 3명의 관찰자(blinded observer)가 점수를 기록하였다(문헌 [Nat. Med. 16, 687-693 (2010)]; [Ann. Rheum. Dis. 74, 595-602 (2015)]; [Cell 156, 730-743 (2014)]; [Ann. Rheum. Dis. 75, 2045-2052 (2016)]; 및 [Osteoarthritis Cartilage 18, Suppl 3:S17-23 (2010)] 참조). 활막염(synovitis)을 사프란인-O 및 헤마톡실린 염색으로 분석하였고, 골극 형성(osteophyte formation), 크기 및 골경화(subchondral bone sclerosis)를 Aperio Image Scope V12(Leica Biosystems)로 측정하였다. 인간 연골조직 및 마우스 연골조직 내 CYP7B1을 Thermo Fisher Scientific으로 확인하였으며, CH25H, MMP3 및 MMP13을 Abcam에서 구매한 항체를 이용하여 면역염색으로 검출하였다.

실험예 1.2. 아데노바이러스의 연골세포 감염 및 IA 주입

아데노바이러스 CH25H(Ad-CH25H), CYP7B1(Ad-CYP7B1), CYP7B1(Ad-shCYP7B1), HIF-2 α (Ad-HIF-2 α) 및 ZIP8(Ad-ZIP8)을 Vector Biolabs에서 구매하였다. 마우스 관절연골세포를 2일 동안 배양하여 지시된 MOI(multiplicity of infection)의 공백터 바이러스(Ad-C), Ad-CH25H, Ad-CYP7B1, Ad-shCYP7B1, Ad-HIF-2 α 및 Ad-ZIP8로 2시간 동안 감염시킨 후, 약물학적 제제의 존재 또는 부존재 하에서 배양시켰다. 아데노바이러스의 IA 주입을 위해, Ad-C, Ad-CH25H, Ad-shCYP7B1, Ad-CYP7B1, Ad-HIF-2 α 및 Ad-ZIP8을 1×10^9 PFU로 일주일 동안 한 번씩 3주 동안 마우스 무릎 관절에 주입하였다(문헌 [Nat. Med. 16, 687-693 (2010)]; [Ann. Rheum. Dis. 74, 595-602 (2015)]; [Cell 156, 730-743 (2014)]; 및 [Ann. Rheum. Dis. 75, 2045-2052 (2016)] 참조).

실험예 1.3. 콜레스테롤 측정

실험예 1.3.1. 콜레스테롤의 수치 변화 측정

다양한 요인들에 의한 세포 내 콜레스테롤 수치 변화를 확인하기 위해, 배양한 연골세포에 사이토카인(IL-1 β 및 TNF- α), 아데노바이러스(Ad-HIF-2 α 및 Ad-ZIP8) 등을 처리한 후 수치를 측정하였다. 세포 내 콜레스테롤 수치를 토탈 콜레스테롤 분석 키트(Cell Biolabs)를 이용해 분석하였다. 즉, 세포 내 지질 성분을 micro-homogenizer를 이용해서 클로로폼 : 2-프로판올 : NP-40(7 : 11 : 0.1) 용액에서 추출하였다. 이어서, 추출된 지질 성분 내에 포함된 총 콜레스테롤, 유리(free) 콜레스테롤 및 콜레스테롤 에스테르의 양을 측정하였다. 또한, 인간 연골조직 내 콜레스테롤을 확인하기 위해서 동결절편 처리한 연골조직을 4% 파라포름알데하이드(PFA)로 고정된 후, 4°C에서 필리핀(filipin) 용액(Sigma)으로 하룻밤 동안 반응시켰다.

실험예 1.3.2. 콜레스테롤의 세포 내 유입 측정

콜레스테롤을 함유하는 지질단백질의 세포 내 유입을 확인하기 위해, 연골세포를 3,3'-디옥타데실옥사카보시아닌(DIO)-산화 저밀도 지질단백질(oxLDL; Kalen Biomediacal)과 반응시킨 후, 4% PFA로 고정시켰다. 이후, 0.2% 트리톤 X-100 용액에 담가 항원을 노출시키고, DAPI와 10분간 반응시켜 핵을 염색한 후, 형광현미경을 이용해서 콜레스테롤의 세포 내 유입을 확인하였다. 콜레스테롤의 세포 내 유입을 세포 기초적 콜레스테롤 유입 분석 키트(Cholesterol Uptake Cell-Based Assay kit; Cayman Chemicals)를 이용해서 재확인하였다. 즉, 연골세포를 연골퇴행인자(IL-1 β , TNF- α , Ad-HIF-2 α 및 Ad-ZIP8)와 NBD-콜레스테롤을 함께 배양하거나, 콜레스테롤 단독으로 36시간 동안 배양한 후, 형광현미경을 이용해서(480 nm 여기 파장 및 520 nm 흡기 파장) 세포 내 콜레스테롤의 유입을 확인하였다. 세포 내 콜레스테롤 유입의 양적 변화를 정량화하기 위해서 Image-J 소프트웨어를 이용하였으며, 각각의 요인들을 처리한 군에서의 콜레스테롤 유입 정도를 비교하여 퍼센트로 표기하였다.

실험예 1.4. 옥시스테롤의 LC-MS/MS 분석

1차 배양한 연골세포에 각각의 요인(IL-1 β , TNF- α , Ad-HIF-2 α 및 Ad-ZIP8)들을 처리한 후, 연골세포 내 콜레스테롤 대사산물인 옥시스테롤의 양적 변화를 LC-MS/MS 분석을 이용하여 확인하였다. 즉, 각각의 요인들을 처리한 연골세포를 micro-homogenizer로 100 μ l 물 및 200 μ M 부틸레이트 하이드록시톨루엔(BTH)이 혼합된 용액을 이용해서 용해시켰다. 이후, 100% 에탄올 900 μ l을 점진적으로 첨가하면서 흔들어주고, 4°C에서 천천히 침전시켰다. 침전물을 질소 증기를 이용해 건조시키고, 완전히 마른 후에 추출물을 에탄올 : 물(50 : 50)의 혼합액으로 다시 재부유시켰다. 재부유시킨 시료 및 정량을 위한 내부정량표준물질(중수소화 25-하이드록시콜레스테롤 및 중수소화 7 α , 25-하이드록시콜레스테롤; Avanti Polar Lipids)을 분석용 컬럼(fused-silica capillary 100 μ m i.d. x 360 μ m o.d.; 7.5 cm Aqua C18로 충전)에 주입한 후, HPLC 및 텐덤 질량분석기(LC-MS/MS)로 분석을

진행하였다.

[0057] 실험예 1.5. 관절염 통증 분석

[0058] 실험동물 모델에서의 관절염 통증 분석을 위해 핫 플레이트 분석 및 본 프레이 분석을 수행하였다. 정확한 분석을 위해서 DMM 수술 전 세 번의 측정을 통해 기선(base line)을 설정하고, 수술 후 2주 간격으로 측정을 진행하였다.

[0059] 실험예 1.5.1. 핫 플레이트 분석

[0060] 핫 플레이트 분석을 위해, 유리 실린더(높이 40 cm 및 지름 20 cm)를 이용하여 반응 시간을 측정하였다. 마우스를 55℃의 핫 플레이트에 올려놓은 후, 마우스가 발을 흔들거나 점프하는 행동을 보이기가까지의 시간을 측정하여 기록하였다. 각 마우스마다 3회 반복실험을 진행하였으며, 평균값을 측정하였다.

[0061] 실험예 1.5.2. 본 프레이(von Frey) 분석

[0062] 본 프레이 분석을 통해 통각과민 측정을 수행하였다. 마우스를 방풍 유리에 넣고 금속격자판에 올려놓았다. 금속격자 아래에서 얇은 본 프레이 필라멘트를 이용해서 마우스의 발을 자극하였다. 본 프레이 필라멘트의 두께를 점진적으로 두껍게 바뀌가면서 마우스가 반응하는 필라멘트의 두께를 기록하였다. 마우스의 반응은 필라멘트에 의해 발을 움찔하거나 필라멘트를 피하는 반응으로 파악하였다. 각 마우스마다 3회 반복실험을 진행하였으며, 평균값을 측정하였다.

[0063] 실험예 1.6. RT-PCR 및 정량적 PCR

[0064] 1차 배양한 연골세포로부터 TRI 시약(Molecular Research Center Inc.)을 이용하여 총 RNA를 추출하였다. 연골 조직의 경우에는, 야생형 마우스의 무릎 관절에 DMM 수술 또는 아테노바이러스 주입을 수행하고 칼(blade)로 끊어 연골조직을 수득한 후 TRI 시약을 이용하여 RNA를 추출하였다(문헌 [Nat. Med. 16, 687-693 (2010)]; [Ann. Rheum. Dis. 74, 595-602 (2015)]; [Cell 156, 730-743 (2014)]; 및 [Ann. Rheum. Dis. 75, 2045-2052 (2016)] 참조). 상기 RNA를 역전사시켜 수득한 cDNA를 PCR로 증폭하였다. PCR 프라이머 및 실험 조건을 하기 표 1에 나타내었다. 전사체 정량을 qRT-PCR을 이용하여 수행하였다.

표 1

Targets	Sequence	Purpose	AT
Adams 5(mouse)	서열번호 19(S 5'-GCCATTGTAATAACCTGCACC-3') 서열번호 20(AS 5'-TCAGTCCCATCCGTAACCTTTG-3')	RT-PCR	60℃
AGGRECAN(mouse)	서열번호 21(S 5'-GAAGACGACATCACCATCCAG-3') 서열번호 22(AS 5'-CTGTCTTTGTTCACCCACACATG-3')	RT-PCR	60℃
β-ACTIN(mouse)	서열번호 23(S 5'-AGGGTGTGATGGTGGGAATGGGTC-3') 서열번호 24(AS 5'-ACGACCAGAGGCATACAGGGACAG-3')	RT-PCR	60℃
COLL-II(mouse)	서열번호 25(S 5'-CACACTGGTAAGTGGGCAAGACCG-3') 서열번호 26(AS 5'-GGATTGTGTTGTTTCAGGGTTCGGG-3')	RT-PCR	60℃
LDLR(mouse)	서열번호 27(S 5'-AGACCCAGAGCCATCGTAGT-3') 서열번호 28(AS 5'-CTCACACCAGTTCACCCCTC-3')	RT-PCR	60℃
LDLR(human)	서열번호 29(S 5'-TGTTCCACGTCCTGCAATGA-3') 서열번호 30(AS 5'-GGATGAGGCTGGTGTACTCG-3')	RT-PCR	60℃
LOX1(mouse)	서열번호 31(S 5'-ACTGGCTCTGGCATAAAGAAAAC-3') 서열번호 32(AS 5'-GTAAAGAAACGCCCTGGTCTTA-3')	RT-PCR	60℃
LOX1(human)	서열번호 33(S 5'-GGCATGCAATTATCCAGGTG-3') 서열번호 34(AS 5'-TGCCAGATCCAGTCTTGCG-3')	RT-PCR	60℃
MMP3(mouse)	서열번호 35(S 5'-TCCTGATGTTGGTGGCTTCAG-3') 서열번호 36(AS 5'-TGCTTTGGCAAAATCCGGTGTA-3')	RT-PCR	60℃
MMP13(mouse)	서열번호 37(S 5'-TGATGGACCTTCTGGTCTTCTGG-3') 서열번호 38(AS 5'-CATCCACATGGTTGGGAAGTTCT-3')	RT-PCR	60℃
CH25H(mouse)	서열번호 39(S 5'-GTGCTGGACGTCCTGTATCC-3') 서열번호 40(AS 5'-AGCACGTCGAAGAAGTTCAG-3')	RT-PCR	60℃
CH25H(human)	서열번호 41(S 5'-GGTCATCTTCTCCATCACCACA-3') 서열번호 42(AS 5'-TCCATGTCGAAGAGTAGCAGG-3')	RT-PCR	60℃
CYP7B1(mouse)	서열번호 43(S 5'-GTGCGAAAGGGAGACTTGGT-3') 서열번호 44(AS 5'-AGCGGCTGTAGTTTAGTCCT-3')	RT-PCR	60℃

CYP7B1(human)	서열번호 45(S 5'-TCTCTTTGCCGCCACCTTAC-3') 서열번호 46(AS 5'-AGGCTTTCGCTGATAATCGG-3')	RT-PCR	60℃
GAPDH(human)	서열번호 47(S 5'-CGTCTTACCACCATGGAGA-3') 서열번호 48(AS 5'-CGGCCATCACGCCACAGTTT-3')	RT-PCR	60℃
SOX9(mouse)	서열번호 49(S 5'-CACTGGCAGTTACGGCATCAG-3') 서열번호 50(AS 5'-CATGTAAGTGAAGGTGGAGTAGAGC-3')	RT-PCR	60℃

*S: sence, AS: antisense

실험예 1.7. 웨스턴 블랏

총 세포 용해물을 용해 완충액(150 mM NaCl, 1% NP-40, 50 mM Tris, 0.5% 소듐 데옥시콜레이트 및 5 mM NaF)을 이용하여 제조하였고, 이를 세포 내 ERK(extracellular-regulated protein kinase) 단백질 검출에 사용하였다. 900 μ l의 혈청-부재 조건배지를 트리클로로아세트산(TCA)으로 침전시킨 후 분비되는 단백질인 MMP3 및 MMP13을 검출하였다. 모든 용해 완충액은 프로테아제 억제제 및 포스파타제 억제제들(Roche)의 콕테일을 포함하였다.

실험예 1.8. 마이크로어레이

마우스 연골세포에서의 총 RNA를 Ambion사의 Purelink RNA mini kit를 이용하여 추출하였다. RNA의 농도 및 순도를 분광광도법을 이용하여 측정하였다. 각각 4회 반복한 실험군의 RNA를 Affymetrix Gene Chip arrays(Affymetrix GeneChip Mouse Gene 2.0 ST Array)를 이용하여 분석하였다. 원 데이터의 프로브 신호를 RMA(Robust Multi-array Average)로 각각의 세트(IL-1 β 처리군, Ad-C, Ad-HIF-2 α 및 Ad-ZIP8 바이러스 감염군)를 정량화하였고, DEG(Differentially Expressed Genes)를 Student's t-test로 통계 처리하였다.

실험예 1.9. 실험에 사용된 RNA 서열

실험에 사용된 뉴클레오타이드 서열을 각각 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

Targets	Sequence	Purpose
Ad-shCYP7B1(mouse)	서열번호 13(S 5'-CCCTATCTTAGTATCTGACAT-3')	I.A. injection
	서열번호 14(AS 5'-ATGTCAGATACTAAGTATGGG-3')	
Ad-shScramble(mouse)	서열번호 15(S 5'-AGTACTGCTTACGATACGG-3')	I.A. injection
	서열번호 16(AS 5'-CCGTATCGTAAGCAGTAC-3')	
CYP7B1 siRNA #1(mouse)	서열번호 9(S 5'-GGAUGUUUUAGGUAUUCAtt-3')	RT-PCR
	서열번호 10(AS 5'-UGAAUACCUAAAAACAUCGga-3')	
CYP7B1 siRNA #2(mouse)	서열번호 11(S 5'-CUAUGAUCCAAGAAGUAAAtt-3')	RT-PCR
	서열번호 12(AS 5'-UUUACUUCUUGGAUCAUAGtt-3')	
CH25H siRNA #1(mouse)	서열번호 5(S 5'-ACUCACCAUCUUUACCUUUtt-3')	RT-PCR
	서열번호 6(AS 5'-AAAGGUAAAGAUGGUGAGUgg-3')	
CH25H siRNA #2(mouse)	서열번호 7(S 5'-GGACUUCUCGCCUUCGUAtt-3')	RT-PCR
	서열번호 8(AS 5'-UAGGAAGGCGAGAAGUCCgg-3')	
LOX1 siRNA(mouse)	서열번호 17(S 5'-CCCUCACCUUGAAGCUGAAtt-3')	RT-PCR
	서열번호 18(AS 5'-UUCAGCUCCAAGGUGAGGGtg-3)'	

*S: sence, AS: antisense

실험예 1.10. 통계 분석

모든 통계 분석에 IBM SPSS Statistics 21 software를 이용하였다. 상대적인 배수 변화(fold change)로 표시된 qRT-PCR 데이터를 쌍대 비교(pair-wisecomparisons) 및 다중 비교(multi-comparisons)를 위해 각각 Student's t-검정 및 사후검정(post hoc test)을 포함하는 ANOVA(analysis of variance)를 이용하였다. 마우스 실험으로부터 수득된 정량화된 데이터를 비모수(non-parametric) Mann-Whitney U test의 통계학적 방법을 이용하여 분석하였다. 통계적 유의성은 0.05 수치의 확률로 받아들여졌다(P < 0.05).

실험예 2. 분석 결과

[0078] 실험예 2.1. 연골퇴행 조건하에서 연골세포 내 콜레스테롤 유입의 증가 확인

[0079] 고콜레스테롤 식이를 수행한 마우스에 DMM 수술을 실시한 후 연골의 퇴행 정도를 확인하였다. 그 결과, 일반 식이를 수행한 마우스보다 고콜레스테롤 식이를 한 마우스의 연골퇴행이 더 심화된 것을 확인하였다(도 1a).

[0080] 상기 연골퇴행이 연골세포 내 콜레스테롤 수치 변화에 의한 것인지 확인하기 위해, 각각의 연골퇴행인자(IL-1 β , TNF- α , Ad-HIF-2 α 및 Ad-ZIP8)를 처리한 연골세포에서의 콜레스테롤 함량을 확인하였다. 그 결과, 연골퇴행인자를 처리하지 않은 비교군(vehicle 및 Ad-C)에 비해 연골퇴행인자들을 처리한 군에서의 총 콜레스테롤, 유리 콜레스테롤 및 콜레스테롤 에스테르와 같이 모든 콜레스테롤 함량이 증가한 것을 확인하였다(도 1b 및 도 1c).

[0081] 이어서, 상기 세포 내 콜레스테롤 수치 변화가 콜레스테롤 합성에 의한 것인지 여부를 확인하였다. 콜레스테롤 합성 저해제를 이용해 확인한 결과, 연골세포 내 콜레스테롤 함량 변화는 콜레스테롤의 합성과는 무관한 반면, 콜레스테롤 세포 내 유입 관련 유전자인 LOX-1의 발현 증가와 연관된다는 것을 확인하였다(도 1d).

[0082] 또한, 퇴행성 관절염 환자의 연골조직 또는 퇴행성 관절염 마우스의 연골조직에서도 조직 내 콜레스테롤 함량이 증가한 것을 확인하였으며, 콜레스테롤 유입 관련 단백질인 LOX-1의 발현이 증가했음을 면역조직화학적 분석을 통해 확인하였다(도 1e).

[0083] 실제로 LOX-1 유전자가 연골세포 내 콜레스테롤의 유입을 조절하는지 확인하기 위해, LOX-1 siRNA를 이용한 녹아아웃 실험을 수행하였다. 그 결과, LOX-1의 발현 정도에 따라서 연골세포 내 콜레스테롤의 함량이 조절되는 것을 콜레스테롤 분석 키트 또는 형광현미경 분석을 통해 확인하였다(도 1f 내지 도 1h).

[0084] 실험예 2.2 연골세포 내 콜레스테롤 유입 증가에 의한 콜레스테롤 대사 변화 확인

[0085] 세포 내 증가한 콜레스테롤에 의해 연골퇴행이 심화되는지 또는 콜레스테롤 대사의 활성 변화가 연골퇴행과 관련이 있는지 확인하기 위해, 마이크로레이를 수행하였다. 그 결과, 콜레스테롤을 옥시스테롤로 변환시키는 수산화효소 중 CH25H 및 CYP7B1 유전자의 발현이 특이적으로 증가한 것을 확인하였다(도 2a).

[0086] 상기 유전자의 발현 변화를 재확인하기 위해, 마우스의 연골세포를 배양하여 여러 연골퇴행인자(IL-1 β , TNF- α , Ad-HIF-2 α 및 Ad-ZIP8)를 처리하여 정량적 PCR을 통해 확인하였다. 그 결과, 모든 연골퇴행인자들에 의해 CH25H 및 CYP7B1의 mRNA의 발현이 특이적으로 증가함을 확인하였다(도 2b).

[0087] 또한, 퇴행성 관절염 환자의 연골조직 및 관절염 생쥐의 연골조직에서 CH25H 및 CYP7B1의 mRNA 발현을 정량적 PCR을 통해서 확인하였다. 그 결과, 정상군에 비해 CH25H 및 CYP7B1의 유전자가 특이적으로 증가한 것을 확인하였고, 면역조직화학적 분석을 통해 단백질의 발현을 확인한 결과, 마찬가지로 증가한 것을 확인하였다(도 2c 내지 도 2e).

[0088] 실제로 퇴행 연골세포 내에서 상기 유전자의 발현 증가에 의해 세포 내 옥시스테롤 함량이 증가하는지 여부를 확인하였다. 연골세포에 각각의 연골퇴행인자(IL-1 β , TNF- α , Ad-HIF-2 α 및 Ad-ZIP8)를 처리하거나 이들 유전자들의 과발현을 유도(Ad-CH25H, Ad-CYP7B1)한 후, 옥시스테롤(25-HC 및 7 α ,25-HC)의 실질적인 증가를 확인하였다(도 2f 및 도 3).

[0089] 실험예 2.3. 연골세포에서의 MMP3 및 MMP13 발현 증가 확인

[0090] 연골세포 내 콜레스테롤의 증가 또는 옥시스테롤의 증가가 연골퇴행에 미치는 영향을 확인하였다. 마우스의 연골세포를 배양한 후 콜레스테롤, 25-HC 또는 7 α ,25-HC를 처리하거나, Ad-CH25H 또는 Ad-CYP7B1을 처리하여 연골퇴행과 관련된 유전자들의 발현을 정량적 PCR 및 웨스턴 블랏을 통해 분석하였다. 그 결과, 연골퇴행 매트릭스 분해 효소인 MMP3 및 MMP13의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(도 4a 내지 도 4c).

[0091] 연골조직에서 MMP3 또는 MMP13에 의해 아그레간이 분해됨으로써 생성되는 DIPEN 또는 NITEGE의 생성 정도를 확인하여 연골조직의 퇴행 정도를 분석하였다. 즉, 연골강 내 아데노바이러스를 이용해서 CH25H 및 CYP7B1을 주입한 후, 신생본자의 생성 정도를 면역조직화학적 검사를 통해 확인하였다. 그 결과, CH25H 및 CYP7B1의 발현 증가에 의해 DIPEN 및 NITEGE의 생성이 증가된 것을 확인하였다. 이는 연골조직에서도 CH25H 및 CYP7B1의 활성 변화로 생성되는 옥시스테롤이 MMP3 및 MMP13의 발현에 간접적으로 영향을 준다는 것을 시사한다(도 4d 및 e).

[0092] 실험예 2.4. CH25H 또는 CYP7B1 발현 조절을 통한 퇴행성 관절염의 조절 확인

[0093] Ad-CH25H 또는 Ad-CYP7B1을 IA 주입한 후, 연골조직에서의 CH25H 또는 CYP7B1의 과발현을 확인하였다. IA 주입

후, 8주에 연골조직이 현저히 파괴되었으며, 뼈 돌기 형성 및 골경화 현상 또한 현저하게 야기되었다(도 5a 및 도 5d).

[0094] CH25H 및 CYP7B1이 관절염에 미치는 영향을 확인하기 위해, CH25H가 결핍된 KO 마우스를 이용하였다. 상기 KO 마우스의 유전자, mRNA 및 단백질을 분석하여 KO 마우스임을 검증하였고, 뼈의 발달 정도를 분석하여 정상적인 뼈 형성을 확인하였다. 12주령의 KO 마우스(CH25H^{-/-})에 DMM 수술을 수행한 후 8주에 마우스를 분석하였다. 그 결과, 마우스에서 연골퇴행, 연골조직의 파괴, 뼈돌기 형성 및 골경화가 대조군에 비해 유의적으로 완화된 것을 확인하였다(도 5b 및 도 5c). 또한, KO 마우스(CH25H^{-/-})는 DMM에 의한 MMP3 및 MMP13의 발현이 야생형 마우스의 연골조직보다 감소한 것을 확인하였다(도 5f). 이는 KO 마우스(CH25H^{-/-})에서의 연골퇴행 억제 기전은 MMP3 및 MMP13의 발현 감소에 의한 것임을 시사한다.

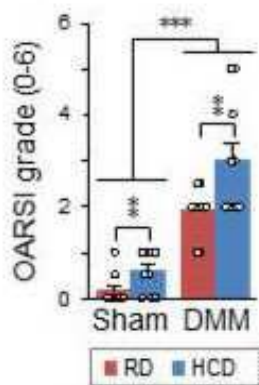
[0095] 또한, 아데노바이러스 이용한 CYP7B1의 발현 억제 모델(Ad-shCYP7B1 IA 주입)을 이용하여 분석한 결과, DMM에 의한 연골퇴행, 연골조직 파괴, 골경화 등 퇴행성 관절염 증상들이 통계적으로 완화된 것을 확인하였다(도 5e). 이를 통해 CYP7B1의 결핍 시 퇴행성 관절염이 억제됨을 통해, CYP7B1이 퇴행성 관절염에서 매우 중요한 유발 유전자임을 확인하였다. 또한, KO 마우스(CH25H^{-/-})와 마찬가지로 Ad-shCYP7B1의 연골조직에서도 DMM에 의한 MMP3 및 MMP13의 발현이 대조군 마우스의 연골조직보다 감소한 것을 확인하였다(도 5f).

[0096] **실험예 2.5. CH25H 또는 CYP7B1 발현 억제를 통한 관절 통증의 억제 효과 확인**

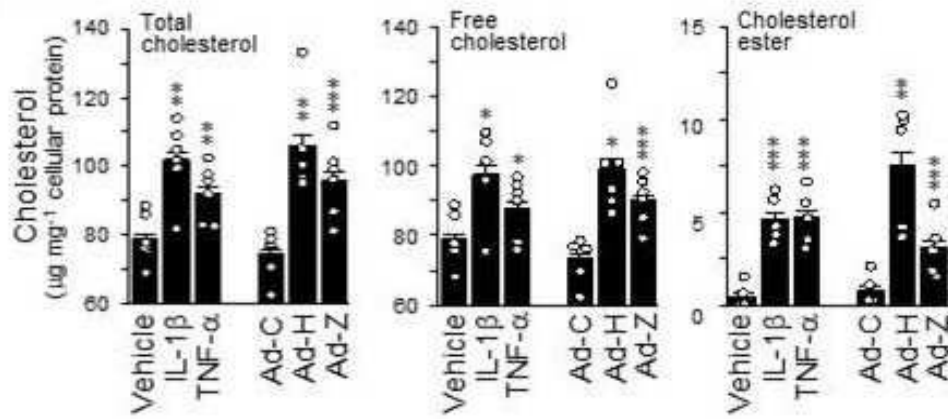
[0097] 본 프레이 분석을 수행한 결과, DMM 수행 후 4주차부터 야생형 마우스에 비해 CH25H KO 마우스에서의 통각과민 정도가 경감되는 것을 확인하였다(도 6a). 또한, Ad-shCYP7B1을 이용하여 실험한 결과, DMM 수행후 8주차부터 대조군 마우스에 비해 통각과민 정도가 경감되는 것을 확인하였다(도 6c). 또한, 핫 플레이트 분석을 수행한 결과, CH25H KO 마우스 및 Ad-shCYP7B1을 IA 주입한 마우스 모두에서 DMM 수행 후 8주차부터 통증 완화 효과를 보였다(도 6b 및 도 6d). 상기 결과를 통해 CH25H 및 CYP7B1이 퇴행성 관절염 시 나타나는 통증을 완화시킬 수 있음을 확인하였다.

도면

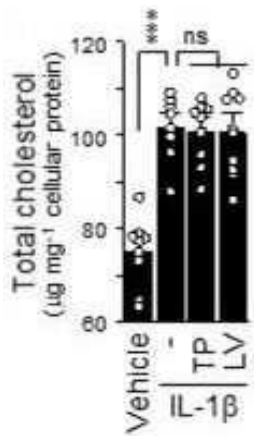
도면1a



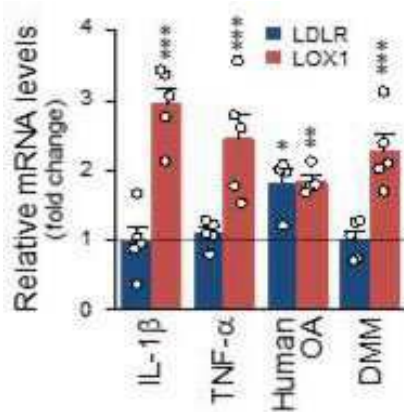
도면1b



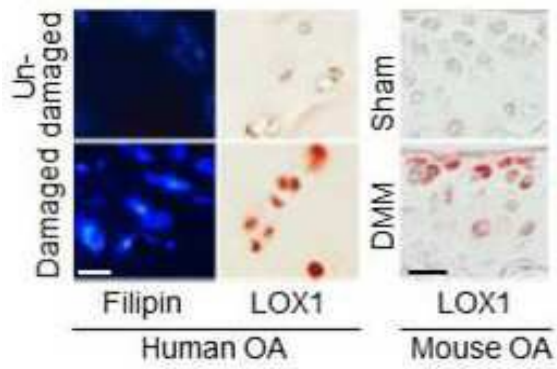
도면1c



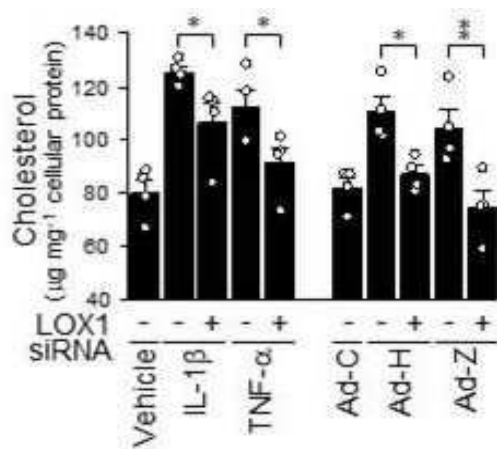
도면1d



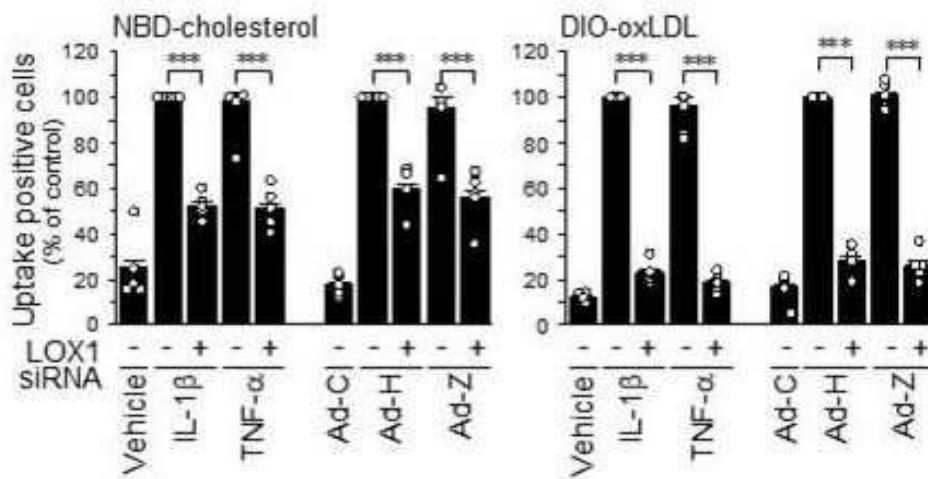
도면1e



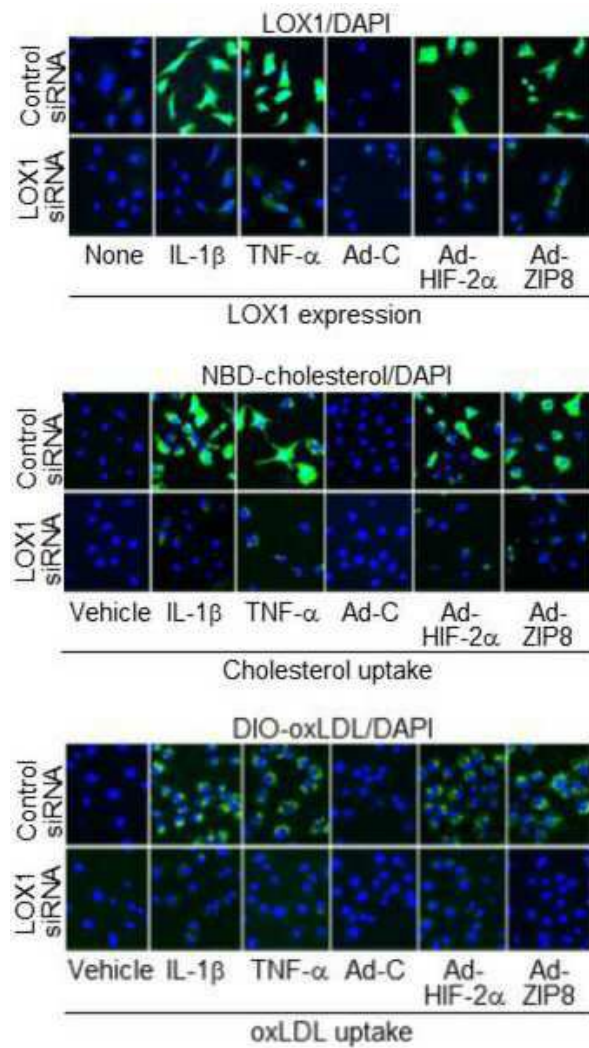
도면1f



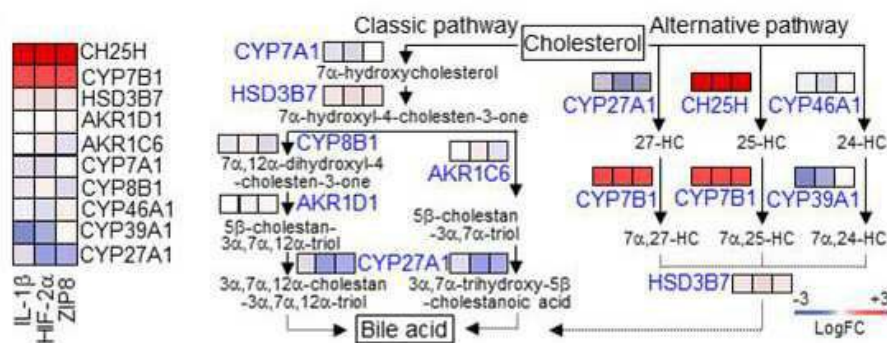
도면1g



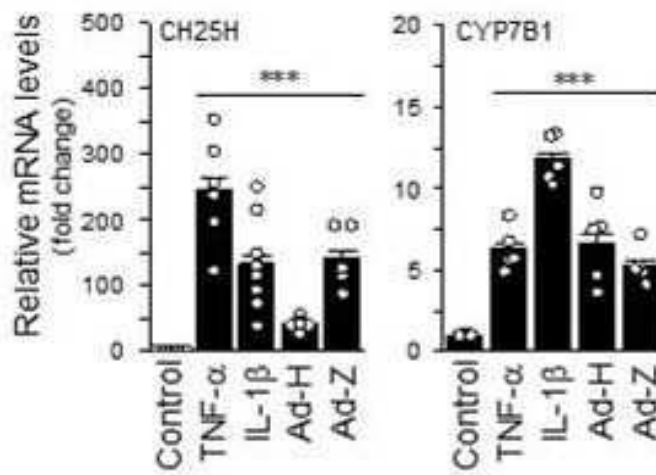
도면1h



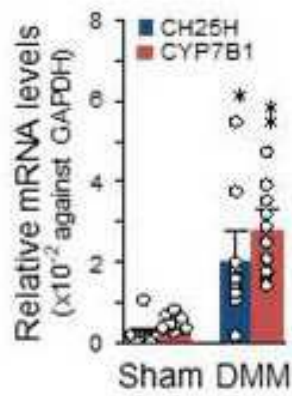
도면2a



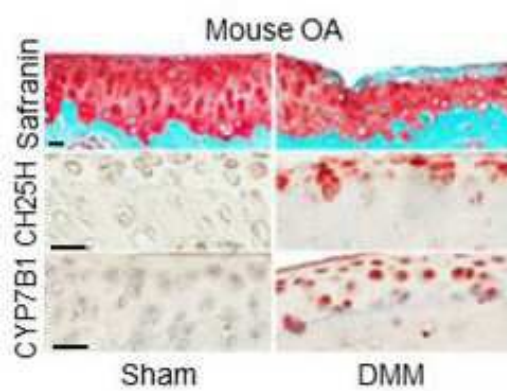
도면2b



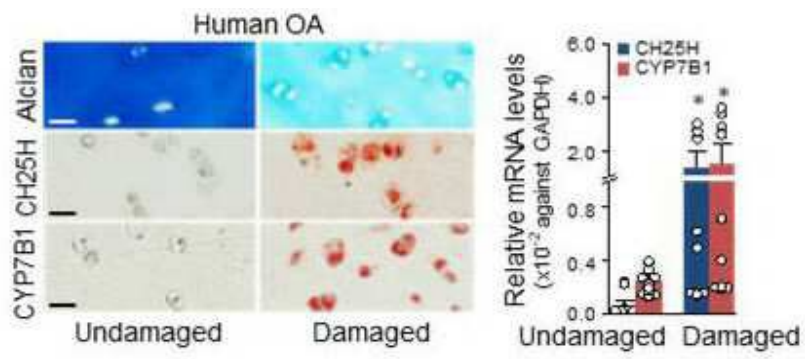
도면2c



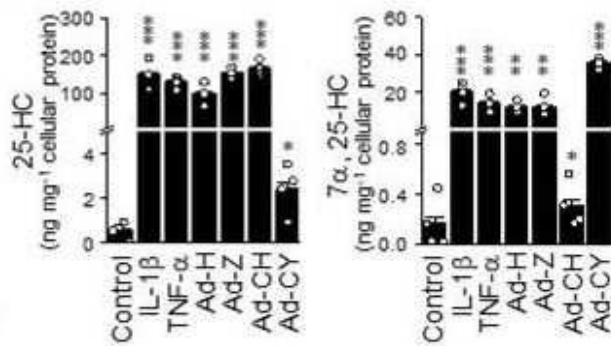
도면2d



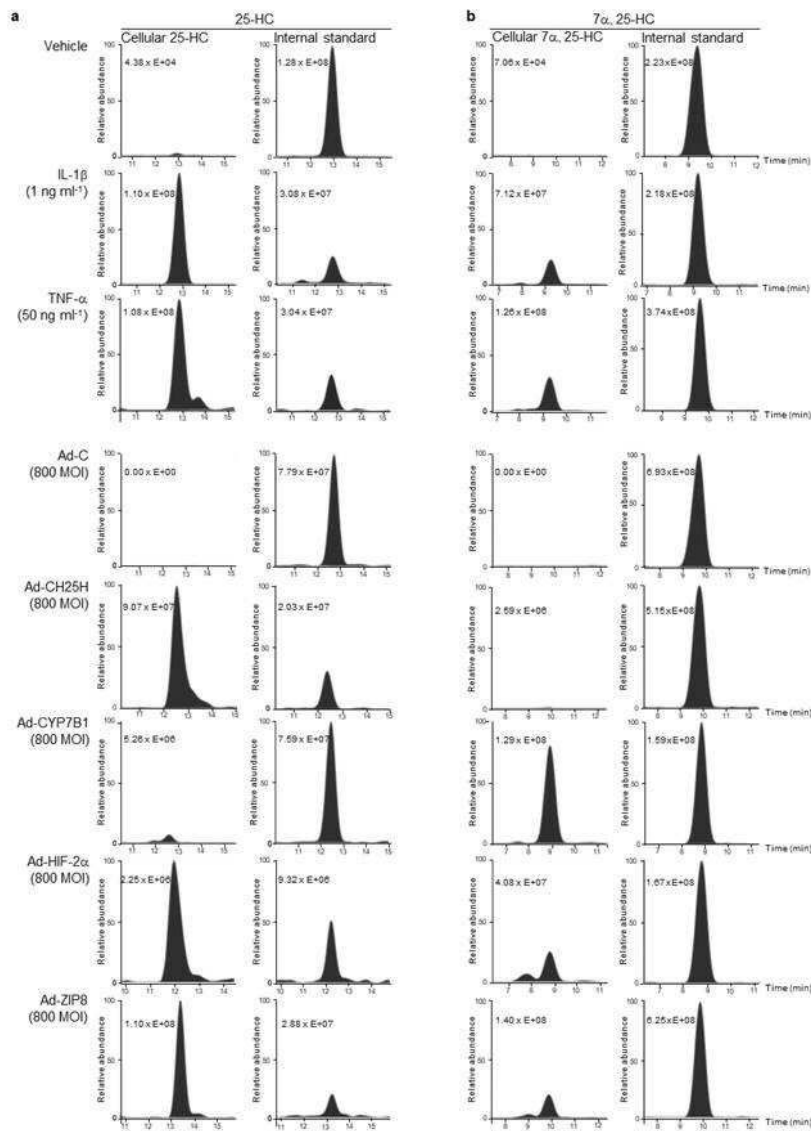
도면2e



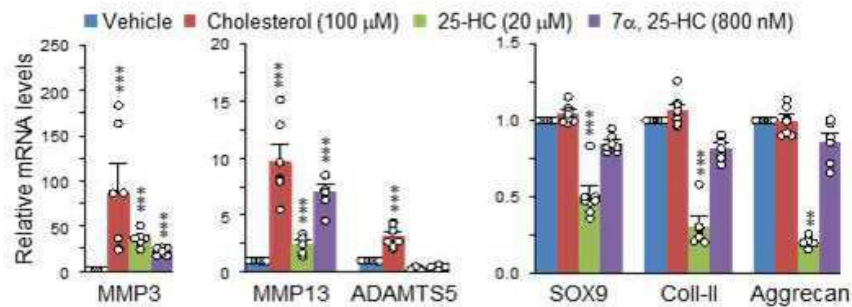
도면2f



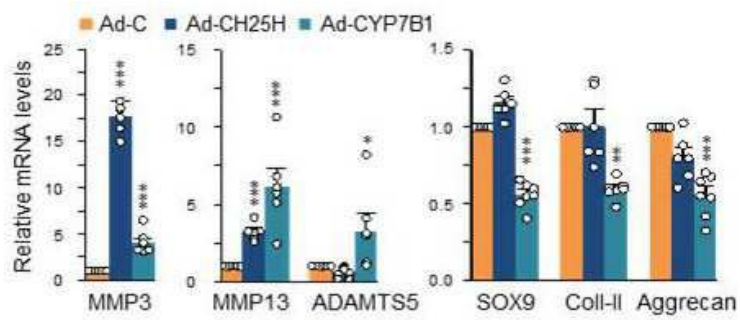
도면3



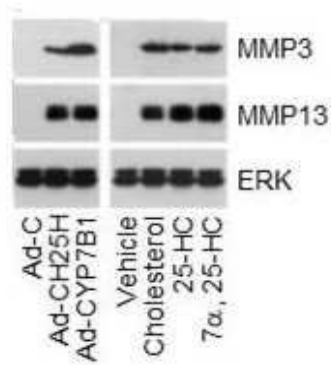
도면4a



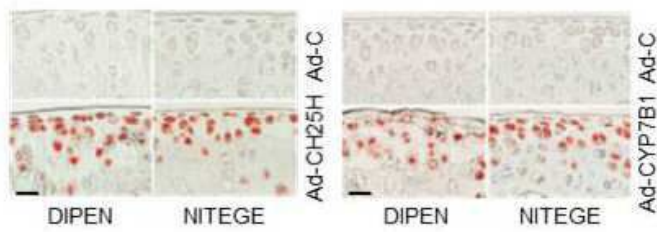
도면4b



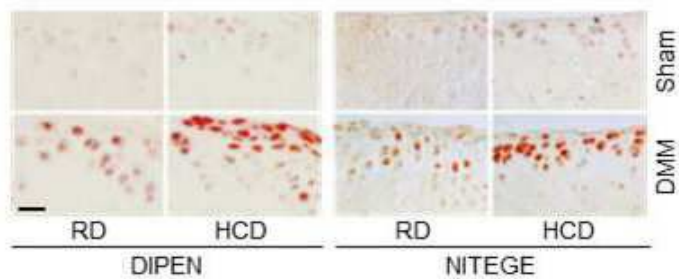
도면4c



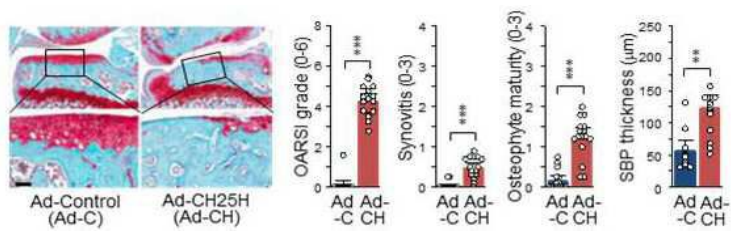
도면4d



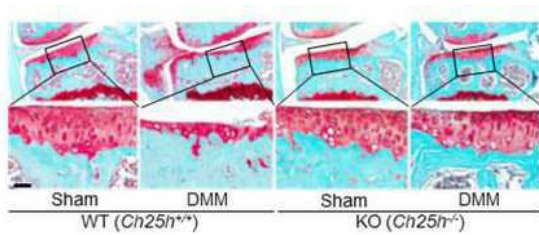
도면4e



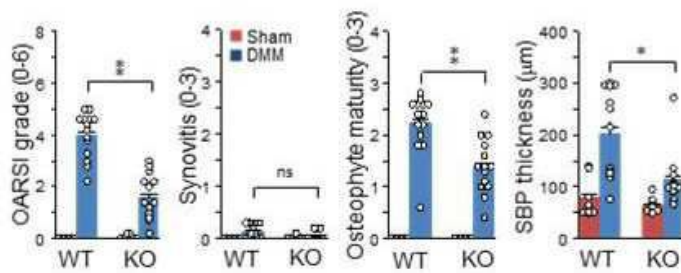
도면5a



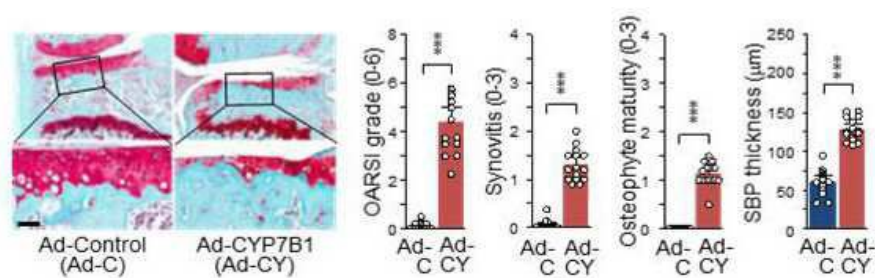
도면5b



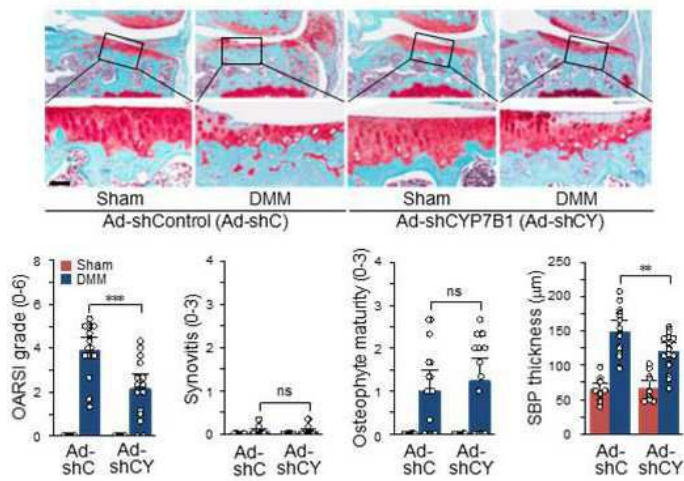
도면5c



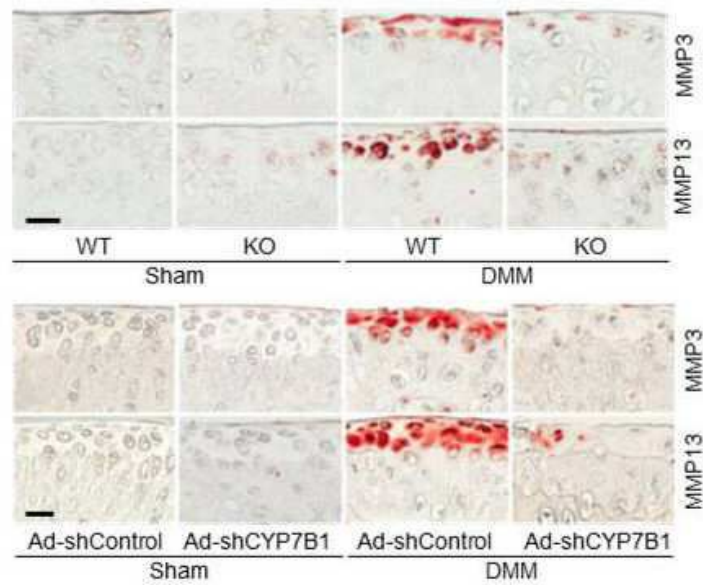
도면5d



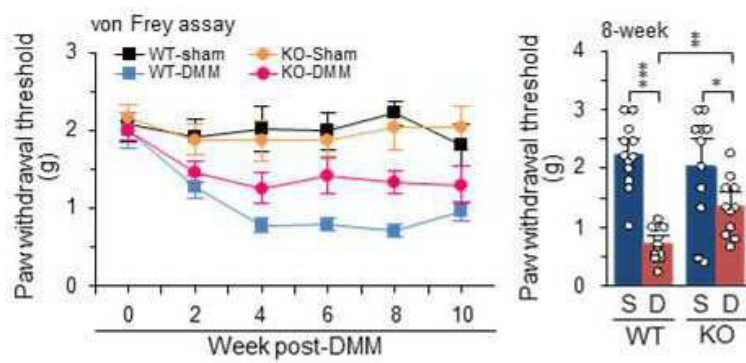
도면5e



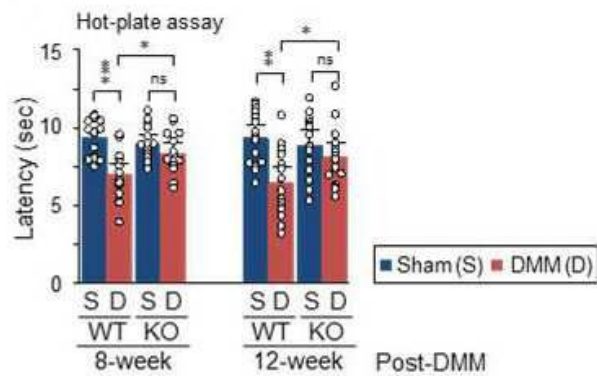
도면5f



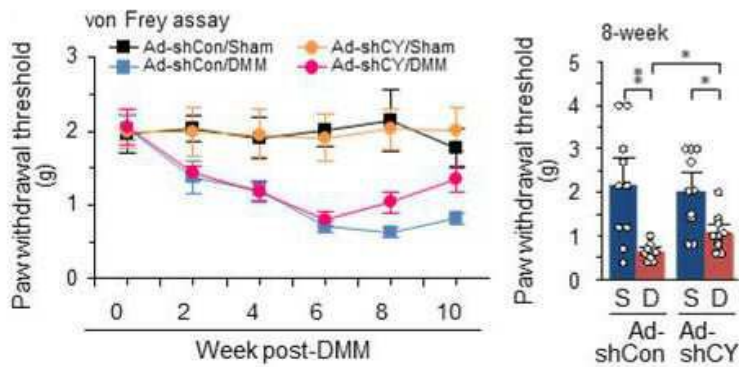
도면6a



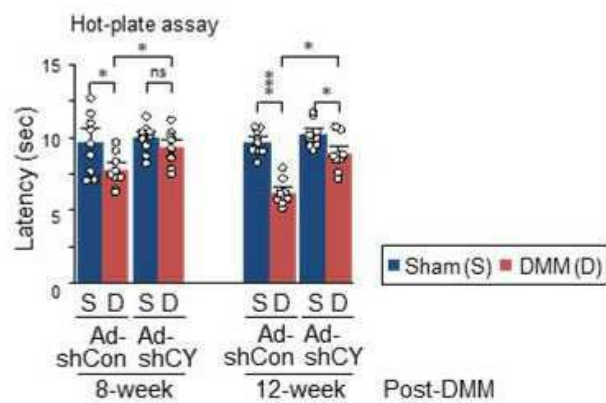
도면6b



도면6c



도면6d



서열 목록

- <110> Gwangju Institute of Science and Technology
- <120> COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING OSTARTHRTIS USING
INHIBITING OXYSTEROL PRODUCTION
- <130> FPD/201810-0091
- <160> 50
- <170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 272

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino sequence of CH25H

<400> 1

Met Ser Cys His Asn Cys Ser Asp Pro Gln Val Leu Cys Ser Ser Gly

1 5 10 15

Gln Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp Asp His Leu Arg Ser Trp Glu Ala

20 25 30

Leu Leu Gln Ser Pro Phe Phe Pro Val Ile Phe Ser Ile Thr Thr Tyr

35 40 45

Val Gly Phe Cys Leu Pro Phe Val Val Leu Asp Ile Leu Cys Ser Trp

50 55 60

Val Pro Ala Leu Arg Arg Tyr Lys Ile His Pro Asp Phe Ser Pro Ser

65 70 75 80

Ala Gln Gln Leu Leu Pro Cys Leu Gly Gln Thr Leu Tyr Gln His Val

85 90 95

Met Phe Val Phe Pro Val Thr Leu Leu His Trp Ala Arg Ser Pro Ala

100 105 110

Leu Leu Pro His Glu Ala Pro Glu Leu Leu Leu Leu Leu His His Ile

115 120 125

Leu Phe Cys Leu Leu Leu Phe Asp Met Glu Phe Phe Val Trp His Leu

130 135 140

Leu His His Lys Val Pro Trp Leu Tyr Arg Thr Phe His Lys Val His

145 150 155 160

His Gln Asn Ser Ser Ser Phe Ala Leu Ala Thr Gln Tyr Met Ser Val

165 170 175

Trp Glu Leu Phe Ser Leu Gly Phe Phe Asp Met Met Asn Val Thr Leu

180 185 190

Leu Gly Cys His Pro Leu Thr Thr Leu Thr Phe His Val Val Asn Ile

195 200 205

Trp Leu Ser Val Glu Asp His Ser Gly Tyr Asn Phe Pro Trp Ser Thr
 210 215 220
 His Arg Leu Val Pro Phe Gly Trp Tyr Gly Gly Val Val His His Asp
 225 230 235 240

Leu His His Ser His Phe Asn Cys Asn Phe Ala Pro Tyr Phe Thr His
 245 250 255
 Trp Asp Lys Ile Leu Gly Thr Leu Arg Thr Ala Ser Val Pro Ala Arg
 260 265 270

<210> 2

<211> 1378

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> nucleotide sequence of CH25H

<400> 2

agctgccttg cacagcctcg caatgagctg ccacaactgc tccgaccccc aggtcctttg 60

cagctccggg cagctgttcc tgcagcccct ctgggaccac ctgaggagct gggaggccct 120

cctacagtgc cctttcttcc cggtcatctt ctccatcacc acatacgtgg gcttttgcct 180

gcccttcgtg gtcttgata tctgtgctc ctgggtgccc gccctgcggc gctacaagat 240

ccacctgac ttctgccat ccgcgcagca gctgctacct tgcctggggc agacctcta 300

ccagcatgtg atgttttgt tccccgtgac gctgctgcat tgggcccga gcccgccct 360

cctgccccac gaagctccc agctgctcct gctgctgcac cacatcctgt tctgctgct 420

actcttcgac atggagtct tctgtggca cctgctgcac cacaaggtgc cctggctgta 480

ccgcaccttc cacaaggtgc accaccagaa ctgctcctcg ttcgcgctgg caacgcagta 540

tatgagcgtc tgggaactgt tttctttggg cttcttcgac atgatgaac tcacactgct 600

cgggtgccac ccgtcacca ccctgacctt ccacgtggtc aacatctggc tttccgtgga 660

ggaccactcc ggctacaact tcccttggtc cactcacaga ctggcgccct tcgggtggta 720

cgggggtgtg gtgcaccacg acctgcatca ctctacttt aactgcaact tcgctccgta 780

ctttacacac tgggacaaaa tactgggaac gctgcggact gcatctgtcc cagcgcggtg 840

atgtggctgc ggtgggtgcc cctaagactc gggactgctg tgcctttcac acttgaatga 900

agagaaacac ctgagctata tattttttta aagcaactaa cttattgctt tatgtttatc 960

tatgaaaacc atagataaaa tctgatgcat ttttgtaac tgacaaagta atttacatac 1020

tgtttgta tcaatacaat ttgtgttct tggatttctt agtctagctc acctcaatag	1080
ccttgaatcc tgcatatgaa ttagacattc atcactggca tatttagaat atctctaaaa	1140
ggacttgttt gtagaataag gaattttcta tgtttcaaag tgttctaaaa cctggctaaa	1200
agaatgtatt ttgtggatg gtgttgactt ctgactctaa aagcaatcaa acatgtttct	1260
gctggacagt gaccaagaat tatagtacct tcttatattt ttttatagaa ctgtatattt	1320
attttgaaag aaatgttatt cgtgctttta aaaggaaaaa aaaccatgaa tcaaataa	1378

<210> 3

<211> 506

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> amino sequence of CYP7B1

<400> 3

Met Ala Gly Glu Val Ser Ala Ala Thr Gly Arg Phe Ser Leu Glu Arg

1 5 10 15

Leu Gly Leu Pro Gly Leu Ala Leu Ala Ala Leu Leu Leu Leu Ala

20 25 30

Leu Cys Leu Leu Val Arg Arg Thr Arg Arg Pro Gly Glu Pro Pro Leu

35 40 45

Ile Lys Gly Trp Leu Pro Tyr Leu Gly Val Val Leu Asn Leu Arg Lys

50 55 60

Asp Pro Leu Arg Phe Met Lys Thr Leu Gln Lys Gln His Gly Asp Thr

65 70 75 80

Phe Thr Val Leu Leu Gly Gly Lys Tyr Ile Thr Phe Ile Leu Asp Pro

85 90 95

Phe Gln Tyr Gln Leu Val Ile Lys Asn His Lys Gln Leu Ser Phe Arg

100 105 110

Val Phe Ser Asn Lys Leu Leu Glu Lys Ala Phe Ser Ile Ser Gln Leu

115 120 125

Gln Lys Asn His Asp Met Asn Asp Glu Leu His Leu Cys Tyr Gln Phe

130 135 140

Leu Gln Gly Lys Ser Leu Asp Ile Leu Leu Glu Ser Met Met Gln Asn

145 150 155 160

Leu Lys Gln Val Phe Glu Pro Gln Leu Leu Lys Thr Thr Ser Trp Asp
 165 170 175
 Thr Ala Glu Leu Tyr Pro Phe Cys Ser Ser Ile Ile Phe Glu Ile Thr
 180 185 190
 Phe Thr Thr Ile Tyr Gly Lys Val Ile Val Cys Asp Asn Asn Lys Phe
 195 200 205
 Ile Ser Glu Leu Arg Asp Asp Phe Leu Lys Phe Asp Asp Lys Phe Ala
 210 215 220
 Tyr Leu Val Ser Asn Ile Pro Ile Glu Leu Leu Gly Asn Val Lys Ser
 225 230 235 240
 Ile Arg Glu Lys Ile Ile Lys Cys Phe Ser Ser Glu Lys Leu Ala Lys
 245 250 255
 Met Gln Gly Trp Ser Glu Val Phe Gln Ser Arg Gln Asp Val Leu Glu
 260 265 270
 Lys Tyr Tyr Val His Glu Asp Leu Glu Ile Gly Ala His His Leu Gly
 275 280 285
 Phe Leu Trp Ala Ser Val Ala Asn Thr Ile Pro Thr Met Phe Trp Ala
 290 295 300
 Met Tyr Tyr Leu Leu Arg His Pro Glu Ala Met Ala Ala Val Arg Asp
 305 310 315 320
 Glu Ile Asp Arg Leu Leu Gln Ser Thr Gly Gln Lys Lys Gly Ser Gly
 325 330 335
 Phe Pro Ile His Leu Thr Arg Glu Gln Leu Asp Ser Leu Ile Cys Leu
 340 345 350
 Glu Ser Ser Ile Phe Glu Ala Leu Arg Leu Ser Ser Tyr Ser Thr Thr
 355 360 365
 Ile Arg Phe Val Glu Glu Asp Leu Thr Leu Ser Ser Glu Thr Gly Asp
 370 375 380
 Tyr Cys Val Arg Lys Gly Asp Leu Val Ala Ile Phe Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 His Gly Asp Pro Glu Ile Phe Glu Ala Pro Glu Glu Phe Arg Tyr Asp

405	410	415	
Arg Phe Ile Glu Asp Gly Lys Lys Lys Thr Thr Phe Phe Lys Arg Gly			
420	425	430	
Lys Lys Leu Lys Cys Tyr Leu Met Pro Phe Gly Thr Gly Thr Ser Lys			
435	440	445	
Cys Pro Gly Arg Phe Phe Ala Leu Met Glu Ile Lys Gln Leu Leu Val			
450	455	460	
Ile Leu Leu Thr Tyr Phe Asp Leu Glu Ile Ile Asp Asp Lys Pro Ile			
465	470	475	480
Gly Leu Asn Tyr Ser Arg Leu Leu Phe Gly Ile Gln Tyr Pro Asp Ser			
485	490	495	
Asp Val Leu Phe Arg Tyr Lys Val Lys Ser			
500	505		
<210>	4		
<211>	7531		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	nucleotide sequence of CYP7B1		
<400>	4		
ggcggggagg gggcagtcga cgaacttttg tcattcagcc tgggagacca cggtagacatt		60	
cctgtctgcg ctgcgggcag gccagcctct ccggccctgg actagggggc gccgccgaga		120	
gaagccgccg caggctgcag agtcgccgac cgcgctgttc gcaggcagac cccgggctgc		180	
ccaccgcggc ctacgcgcgc ccggatggca ggagaagtgt ccgcggccac gggccgcttt		240	
tcgctggagc ggttgggcct cccgggcctg gccctcgcgc cgccctgtct gctcctggcc		300	
ctctgcttgc ttgtccggcg caccaggaga ccgggtgagc ctccattgat aaaaggttgg		360	
cttccttacc ttggagtggc cctgaactta cgaaaagacc ccttaaggtt catgaaaaca		420	
cttcaaaagc aacatggtga cactttcaca gttcttcttg gtggaaagta cataacattt		480	
atcctggacc ccttcagta ccagctagt ataaaaaatc ataaacaatt aagctttcga		540	
gtattttcta ataaattatt agagaaagca tttagcatca gtcagttgca aaaaaatcat		600	
gacatgaatg atgagcttca cctctgctat caatttttgc aaggcaaacc tttggacata		660	
ctcttggaag gcatgatgca gaatctaaaa caagtttttg aaccccagct gttaaaaaac		720	

acaagttggg acacggcaga actgtatcca tctgcagct caataatatt tgagatcaca	780
tttacaacta tatatggaaa agttattgtt tgtgacaaca acaaatttat tagtgagcta	840
agagatgatt ttttaaaatt tgatgacaag tttgcatatt tagtatccaa cataccatt	900
gagcttctag gaaatgtcaa gtctattaga gagaaaatta taaaatgctt ctcacagaa	960
aagttagcca agatgcaagg atggtcagaa gtttttcaaa gcaggcaaga tgcctggag	1020
aaatattatg tgcacgagga ccttgaaata ggagcacatc atttaggctt tctctgggcc	1080
tctgtggcaa acactattcc aactatgttc tgggcaatgt attatcttct gcggcaccca	1140
gaagctatgg cagcagtcgc tgacgaaatt gaccgtttgc tgcagtcaac aggtcaaaag	1200
aaagggtctg gatttcccat ccacctcacc agagaacaat tggacagcct aatctgccta	1260
gaaagcagca tttttgaagc tttacgactg tcctcatatt caaccacat tcgttttgtt	1320
gaggaggatt tgactctcag ttcagagacc ggggactact gtgtgcgaaa gggagacttg	1380
gtagccatct ttctccagt cctacatggt gacctgaaa tctttgaagc tccagaggag	1440
tttagatatg atcgttttat agaagatggt aagaagaaaa ccaccttttt caaaagaggg	1500
aaaaagctga agtgttacct aatgccgttt ggaactggaa ccagcaaag tccaggccga	1560
ttttttgcac ttatggaaat aaaacaattg ttggttatac ttttaactta ttttgattta	1620
gaaataattg atgataagcc cataggacta aactacagcc gcttgttgtt tggatttcag	1680
tatccagatt ctgatgtttt atttagatac aaagtgaat cttagagaag ctaaaaggaa	1740
agaaaataaa tctatcaaaa ttacctaaa catcctaagc tcactatatt ctttttaatt	1800
tctgcaaag taattgattt atttgtttaa aaagcgctaa tttctatttg atctgatatc	1860
agtccagttt gtcccttagtc acaaagccca tcataatata aaacaggatg gtggcaggaa	1920
aatggacatc aaaaatcaact taagggtagg ctcaaaacag ggttgttgtt gtttttttag	1980
tttctccttg ttgtgatttt cacctgttat aataaatgta ccttcacacc aatagattgg	2040
gcactgtgga atttaaatca ctcaaatgt tctctaata gtaaaattac actttgaact	2100
actagaaaat tgtgctggaa atggacacag tctaacaat tccaaattct cacagaagaa	2160
ggaaattgaa tttccatgag ttacactgga tgaatgtt cccttcaagt ataatatata	2220
taatacctat atttccaggg tatgtgtgca ttaaatgagt ttcacagtag attgaatgct	2280
tcaacttcac ttcaatatat aatcatgcat aaatgttctt tattactttg tatactatgg	2340
ctcaatagaa caaaatttct ggttacataa gacctttcat gttcaagta gatactgata	2400
agatttaattg tataagaaaa cacagaacct attatatatt cagaaattgc cctagacatt	2460
agtattagggt ttattatggg agcaaatgtt gaaataatta cagcattgat tatatcattt	2520
ggcttttagta taaactatag aggttatgca aatattgcaa ttaacccttt cctaaatgct	2580

ttcatatata taaactgaga agctagatat agtatttggg tttgatgtct caccttttgg	2640
atttggagtt catgtgttct attttgaatt acaacatcat gtaatgcagt gtaatttcat	2700
atgacacatg cagcattgtg tcaataattc aaagattttt tttcaattga gagagtatct	2760
ggctgtgttg cccaggctgg tctcaaatcc tgacctcaag tgatcctccc gctttgggcc	2820
cttgggaacc tggactacag gcatgtacca ccaagcccag tgattcaaag attctaatat	2880
cagagtacca catgattggc atctgatata aatgatgatg caatatataa gcaggcaagg	2940
caggtataaa agtccagtta attcatgctt cgtaattgg aacttctaatt atttcagaaa	3000
tctgctactg ttttgagaaa aggaaactga ctttaaaaat aacattacaa aatatttaca	3060
ttcttagtaa gtaaataaga cagtctagca tttattttat ccttcctgaa gtacatgttc	3120
tgaatgttcc ttcagtgaag gtctgctggg gcaaattcta tttttgcttg atttaggggtg	3180
tctttatttt tactctcctt cttgaaagat gggtttgctg gatgcacaaa tctagattga	3240
cagttatttc ctcacagcac tttgaagata ttgcccgttc ttaagggtatc cattgttgtt	3300
attgggcgga tagccgttag tgagttaaat tactcaatag gtagtctgtc tcttctctct	3360
gactacttta acgtgtcctc tttgtctttg atgttcttag tttctttctg tttctcatgc	3420
ttgcatgtcc tgctgcttct tgaatctgag cacagggtgc tcccatcaag tatggaatct	3480
tctcagccat tctctctgtg aatattactg ttctcacact ctacattaga tcctctcact	3540
ctacatacat cctttgatct tttctcacca cactttgtat ctctaactta cactccatgt	3600
aatttcttta gatgtctctt ccagtttctt ctttgaacag tatactaat ctctccaact	3660
catccactga gtttgttttt tccttctttt tgttttaact ctaggttcat cgagttgagt	3720
gatcactctc cttacactct ttagttcatg atacacaatt ataattgggtt ctaataaggt	3780
ccctctggct ttatttactt attctgtttt gtccctaata cccactttca tacccttcc	3840
taatatcata ggcaaatatt ctaatgtgtt tgatgcataat cttggtatgt atatgttttc	3900
atgtaacata tattatcttg agtacctatt tttctgtaagt tataattcttc ctaattttct	3960
tatgaagctc tgtgatttta aagatatatt catatttctg tagtatatac atagtatact	4020
actatattta atctattgct tctaactgct gcacagcaat ccataatgtg cacacattat	4080
gttttaatga tctagttacc cagtgatgga cactgtcagc aggacagtta ttgtgggaca	4140
gaggccaaag cagaacttaa aagcttttcc atcacctatc ctcacactac tgtgcctaac	4200
catctcagcc cagggtctgt aaatgccttg tcccaagcc ccaccacca cccccacat	4260
acacacattt agtccatgat aactttaatt cttcctaaga tgttctaaat ttgttatgtc	4320

ccatcctcag atccatccaa tcctctccat tctgtagggg ctccaagggt gattttgagt	4380
cagagtgtca gtctccagct tgtaaacctt caggttttcc attccactga gtttgctaag	4440
ttcaatcatt acatttttca gttttacgat tcccttttgt tcttcatata tgctgcttat	4500
tttttataat atcttgtacc tttattataa actcaacatc ctttttcatt tcttcaactg	4560
tatgaagcaa acatttttaga ttctgtatct gatatttcca aatcattggg gttttgtgga	4620
tctaattctg tagtttatgt gttttgctgt cactgttacc aggaatggct tgtttactga	4680
gccccgttc ctiggatttt tatctctgaa aaatctttag acctagattt aaagttcatt	4740
cctcaagaga gaatttgtat ttgcattttt cagactgctg atactactac caaactcaga	4800
tcaccttaaa atttcagctt gatttatctgg gagtggggag ggaacgctac ataggatttg	4860
tggtttctag ccctaaatca ggtagaatgc aaccatttta ttaggaatag acaggggaca	4920
catttggggg ttcatTTTTT tgtttatttt taccgggagc taagactgag ataggcaaat	4980
atactgacag ttttgcctg tggagcacag tttctttcta gttcacctat tgagtatgtt	5040
gtctttgcaa gttcttggct ttatgcaaag gccttggatt acacacacac acacacacac	5100
acacacacac acacacacac acacacacac acaccctggg ccctagcctt tagtcacca	5160
caaagcatac tcgtccttt tcgtacttgg acgtctagtt cgccatgttg cctaaagtgg	5220
aagttccata gctttaaat caacttagtg gtacactttt gtgatgttaa ggcacagaga	5280
acacaggaaa ttattccatt ccaatttcgg ctatttttat aactggaaat gtgtacagga	5340
atttagaaat ggaaagtaag gataaatgaa atggttgaga aaagatgaca taaaaggaat	5400
gaatagtaga accaaaacaa aacattgaga atcttgtgac agtcttaaat ccagtaacta	5460
aatagtattt acaaatagaa aaacatgtcc tggacaaatc agttaaaga tgcagattct	5520
ggctgtgaca taactggctt attattaaac aatttcgctc tcagagcttc aacgtcctca	5580
tttgaaaaat aaaataataa ggccctttga catcagagtt cattgtaacg attaaacaca	5640
glaacgtgta tggatttatg gtataatgca atataccaat gcaaagtta atgaagatac	5700
ttcaacagtg ttgtgccttt aaaaaattgc tcttgtgtat tgttcaaggg aatcgTTTTT	5760
tatagtcatt tgtaattca ttgttcattt attcaacaa acattcattg agcattttct	5820
ctgttctaga tatgattgat gctagacact ggattccctt tcccttcaa gaacatacta	5880
tttgttaggg aaaacaatc gtaggcaact aatttattat aaatgcagtt gtaagtata	5940
aattcatctc tttaaaacta ttttaaaatt ctgatttata actagttcta actagccttc	6000
catcagtcac tccaaagtaa tggctctgta tgagaaatca ctatgtataa ttatacacia	6060

taaaaatata tacaacaggt attttgataa tatgataatt aaaaccaa atagtcattg 6120
 aggccttagaa tttttaaaaa ctgtattata tattgtaaaa tcccatcctt tttttttttt 6180
 agatggagtc ttgctctgtc gccacggctg gaggccagtg gcatgatctc agctcactgc 6240
 aacctccact tcctgggttc aagcaattcc cttgtctcag cctccgagt agctgggact 6300
 acaggcacc accactatgc ctgaccaact tttgtatatt tagtggagac gaggtttcac 6360
 catgttgatc aggcctggct cgaactccag acctcagggtg atccaccgc ctcggactcc 6420
 ctaagtgtg gggttgcaga catgagccac cgtgcccgcc cccatctttt cttttttata 6480

gcttcaccta agttttgaat taaaagaaat aaataattaa taccacaaat attgttttat 6540
 atcaatgacc aacgtaatga aacactcagc agaaactaaa gccctgaagt ggtaagaaa 6600
 aagctaccta tcactaaatc aggcattgct ataagcaacc tagaagaaaa cttttatctg 6660
 ccttgttttg gctttctgg catacttctt tacttcatct ccattttata attaagtttt 6720
 gggtcacaag tctaaggcaa aggagcttcc atactgaaaa tctacatttt taatgcttat 6780
 tttatcataa aaataatttg ggtaattttc tgcaagtgc ttctaactta acagtagaag 6840
 tttaaaactg ttcaaagacc aaagcacaac atttatctag tgtttgatcc tagtataaaa 6900

gaatggcaat aattatgtga acaggaatta catgccctta gaatgtgcat ttttaacct 6960
 attaaatttg ccaatcttgc aaactattgt ttacttgtat tgcataatta gatactcata 7020
 ttaacatatt gaattcagaa aaagttagca agccaagatg acattctctg tagcactatt 7080
 ttaaattata atgaatgac acataaaact ctttagtatt tatctaaagt aattattact 7140
 ctacttcatt tgtttatcta aatcagtgat cattgatgtt tgaacttttt ggcttaaatg 7200
 tttattttgt ttatactact tgctagagta aaataaattt aatacatgaa aaactctaca 7260
 caatttaaaa taggttataa tttgtcaata cttatgtttt aaaatatttt tagaaggagg 7320

agtgtgtat attattaaaa caattttctg aaattgttta atattatctt tgattttaaa 7380
 atgacatata tttggattta caatgaatca aattgtccta aaagatgtca gataagaaat 7440
 gcaagtgtt tgcaagtcta atacttaatg tttttttatg tacaacaaaa atttaataaa 7500
 ttaactttta agcaaaaaaa aaaaaaaaaa a 7531

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CH25H siRNA (sense)

<400> 5

acucaccauc uuuaccuuut t	21
<210> 6	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CH25H siRNA (antisense)	
<400> 6	
aaagguaaag auggugagug g	21
<210> 7	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CH25H siRNA (sense)	
<400> 7	
ggacuucucg ccuuccguat t	21
<210> 8	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CH25H siRNA (antisense)	
<400> 8	
uaggaaggcg agaaguccgg	20
<210> 9	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> CYP7B1 siRNA (sense)	
<400> 9	
ggauguuuuu agguauucat t	21
<210> 10	
<211> 21	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223> CYP7B1 siRNA (antisense)
 <400> 10
 ugaauaccua aaaacaucg a 21
 <210> 11

<211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CYP7B1 siRNA (sense)
 <400> 11
 cuaugaucca agaaguaat t 21
 <210> 12
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CYP7B1 siRNA (antisense)
 <400> 12
 uaggaaggcg agaaguccgg 20
 <210> 13
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ad-shCYP7B1 (sense)
 <400>
 13
 ccctatctta gtatctgaca t 21
 <210> 14
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ad-shCYP7B1 (antisense)
 <400> 14
 atgtcagata ctaagtatgg g 21
 <210> 15
 <211> 19

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ad-shScramble (sense)
 <400> 15
 agtactgctt acgatacgg 19
 <210> 16

 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ad-shScramble (antisense)
 <400> 16
 ccgtatcgta agcagtac 18
 <210> 17
 <211> 21
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LOX1 siRNA (sense)
 <400> 17
 cccucacuu gaagcugaat t 21
 <210> 18
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> LOX1 siRNA (antisense)
 <400>
 > 18
 uucagcuucc aaggugaggg tg 22
 <210> 19
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer sequence of ADAMTS 5 (mouse)
 <400> 19
 gccattgtaa taaccctgca cc 22

<210> 20
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer sequence of ADAMTS 5 (mouse)
 <400> 20
 tcagtcccat ccgtaacctt tg 22

<210> 21
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer sequence of AGGRECAN (mouse)
 <400> 21
 gaagacgaca tcaccatcca g 21

<210> 22
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer sequence of AGGRECAN (mouse)
 <400> 22
 ctgtctttgt caccacaca tg 22

<210> 23
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <

<220><223> primer sequence of beta-actin (mouse)
 <400> 23
 aggggtgtgat ggtgggaatg ggtc 24

<210> 24
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer sequence of beta-actin (mouse)

<400>	24	
agggtgtgat ggtgggaatg ggtc		24
<210>	25	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer sequence of COLL-II (mouse)	
<400>	25	
cacactggta agtggggcaa gaccg		25
<210>	26	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer sequence of COLL-II (mouse)	
<400>	26	
ggattgtgtt gtttcagggt tcggg		25
<210>	27	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer sequence of LDLR (mouse)	
<400>	27	
agaccagag ccatcgtagt		20
<210>	28	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><		
223>	primer sequence of LDLR (mouse)	
<400>	28	
ctcacaccag ttcaccctc		20
<210>	29	
<211>	22	
<212>	DNA	

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence of LDLR (human)

<400> 29

gccattgtaa taaccctgca cc 22

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence of LDLR (human)

<400> 30

ggatgaggct ggtgtactcg 20

<210> 31

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence of LOX1 (mouse)

<400> 31

actggctctg gcataaagaa aac 23

<210> 32

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence of LOX1 (mouse)

<400> 32

gtaaagaaac gccctggtc tta 23

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>

> primer sequence of LOX1 (human)

<400> 33

ggcatgcaat tatcccaggt g 21

<210> 34

<211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer sequence of LOX1 (human)
 <400> 34
 tgccagatcc agtcttgcg 19
 <210> 35
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer sequence of MMP3 (mouse)
 <400> 35
 tcctgatgtt ggtggcttca g 21
 <210> 36
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer sequence of MMP3 (mouse)
 <400> 36
 tgtcttggca aatccggtgt a 21
 <210> 37
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer sequence of MMP13 (mouse)
 <400> 37
 tgatggacct tctgtcttc tgg 23
 <210> 38
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > primer sequence of MMP13 (mouse)
 <400> 38

catccacatg gttgggaagt tct	23
<210> 39	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer sequence of CH25H (mouse)	
<400> 39	
gtgctggacg tcctgtatcc	20
<210> 40	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer sequence of CH25H (mouse)	
<400> 40	
agcacgtcga agaaggtcag	20
<210> 41	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer sequence of CH25H (human)	
<400> 41	
ggtcaccttc tccatcacca ca	22
<210> 42	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer sequence of CH25H (human)	
<400> 42	
tccatgtcga agagtagcag g	21
<210> 43	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223>	

> primer sequence of CYP7B1 (mouse)

<400> 43

gtgcgaaagg gagacttggt 20

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence of CYP7B1 (mouse)

<400> 44

agcggctgta gtttagtcct 20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence of CYP7B1 (human)

<400> 45

tctctttgcc gccaccttac 20

<210> 46

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence of CYP7B1 (human)

<400> 46

aggctttcgc tgataatcgg 20

<210> 47

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence of GAPDH (human)

<400> 47

cgtcttcacc accatggaga 20

<210> 48

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><

223> primer sequence of GAPDH (human)

<400> 48

cggccatcac gccacagttt

20

<210> 49

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence of SOX9 (mouse)

<400> 49

ggcatgcaat tatcccaggt g

21

<210> 50

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer sequence of SOX9 (mouse)

<400> 50

catgtaagtg aaggtggagt agagc

25