



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0128989
(43) 공개일자 2019년11월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/027 (2013.01)
G01N 33/5088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0032812
(22) 출원일자 2019년03월22일
심사청구일자 2019년03월22일
(30) 우선권주장
1020180052883 2018년05월09일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
백승국
서울특별시 성북구 인촌로 73(안암동5가) 고려대학교 의과대학
임누리
서울특별시 성북구 인촌로 73(안암동5가) 고려대학교 의과대학
(74) 대리인
특허법인 다해

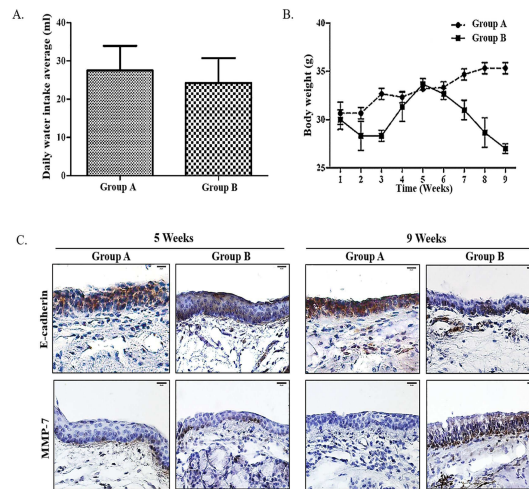
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 인후두 역류질환 마우스 모델 및 그 제작방법

(57) 요약

본 발명은 인후두 역류질환 마우스 모델 및 그 제작방법에 관한 것으로, 본 발명의 인후두 역류질환 마우스 모델을 이용하여, 타액 내 soluble E-cadherin fragment 농도 감소, 인후두 점막층의 E-cadherin 발현 증가 및 인후두 점막층의 MMP-7 발현 감소 평가 등을 통해 인후두 역류질환 치료제를 스크리닝 하는데 유용하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A01K 2207/20 (2013.01)

A01K 2227/105 (2013.01)

A01K 2267/03 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

마우스에 산성 용액을 섭취시키는 단계를 포함하는 인후두 역류질환 마우스 모델의 제작방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 산성 용액은 pH 3 내지 pH 5인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 산성 용액은 음료수에 산이나 펩신을 섞은 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 마우스에 1~2일 주기로 일반 식수와 산성 용액을 번갈아 공급하여, 총 5~10주 가량 섭취시키는 것을 특징으로 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 마우스는 야생형의 C57BL/6인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중의 어느 한 항의 방법에 의해 제작된 인후두 역류질환 마우스 모델.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 인후두염 마우스 동물모델은, (a) 타액 내 soluble E-cadherin fragment 농도 증가; (b) 인후두 점막층의 E-cadherin 발현 감소; (c) 인후두 점막층의 MMP-7(matrix metalloproteinases-7) 발현 증가로 이루어진 특성 중에서 선택되는 하나 이상의 특성을 갖는 것을 특징으로 하는 인후두 역류질환 마우스 모델.

청구항 8

다음 단계를 포함하는 인후두 역류질환 치료제의 스크리닝 방법:

(a) 인후두 역류질환 마우스 모델에 후보물질을 처리하여 타액 내 soluble E-cadherin fragment 농도 및 인후두 점막층의 E-cadherin과 MMP-7 발현량을 확인하는 단계; 및

(b) 후보물질을 처리한 마우스 모델의 soluble E-cadherin fragment 농도 및 E-cadherin과 MMP-7의 발현량이 정상과 유사할 경우 해당 후보물질을 인후두 역류질환 치료제로 선택하는 단계.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 (b)는 타액 내 soluble E-cadherin fragment 농도가 감소하고, 인후두 점막층의 E-cadherin의 발현량이 증가하며, 인후두 점막층의 MMP-7 발현량이 감소할 경우, 해당 후보물질을 인후두 역류질환 치료제로 선택하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 10

정상인의 인후두 점막층 또는 타액보다 인후두 역류질환 환자의 인후두 점막층 또는 타액에서 상대적으로 발현이 증가하는, MMP-7(matrix metalloproteinases-7)을 포함하는 인후두 역류질환 진단용 바이오 마커 조성물.

청구항 11

MMP-7(matrix metalloproteinases-7) 유전자의 mRNA 또는 의 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 인후두 역류질환 진단용 조성물.

청구항 12

제11항의 조성물을 포함하는 인후두 역류질환 진단용 키트.

청구항 13

- i) 생물학적 시료인 타액 또는 인후두점막의 MMP-7(matrix metalloproteinases-7) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 및
 - ii) 상기 MMP-7 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계;
- 를 포함하는 인후두 역류질환 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 14

제13항에서 있어서,

상기 타액은 개체의 아침 기상 후 개체에서 분리한 타액인 것인, 인후두 역류질환 진단을 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인후두 역류질환 마우스 모델 및 그 제작방법에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 마우스에 산성 용액을 섭취시켜 병변을 유발시킨 인후두 역류질환 마우스 모델, 상기 마우스 모델 제작방법 및 인후두 역류질환 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 후두 인두 역류 관련 질병은 이비인후과 클리닉을 방문하는 모든 환자의 4~10%를 차지한다. 위장관 내의 내용물이 역류하는 것이 질환의 공통적인 원인으로 제안되었다.

[0005] 후두 인두 역류 질환의 병태 생리 및 객관적인 진단은 최근 몇 년 동안 인후두 역류질환의 발병률이 급격히 증가했음에도 불구하고 여전히 불분명하다(Hicks D.M. et al., *J Voice*. 16, 564-579, 2002). 인후두 역류질환의

발병에 관해 가장 일반적으로 논의되는 이론은 증상이 직접적으로 위산 역류로 인한 후두 점막의 노출 및 세포 기형으로 인해 유발되며 전형적인 역류 또는 위식도 역류 질환과는 다른 질병으로 간주된다. 인후두 역류질환의 진단은 특정 증상에 대한 설문 조사, 후두 또는 이중 프로브 pH 모니터링으로 진단된다. 보행 가능한 24시간 이중 프로브(인두 및 식도) pH 모니터링은 인후두 역류질환의 진단에 매우 민감하고 특이적이다. 그러나, 이러한 방법은 쉽게 접근할 수 있는 videolaryngoscopic examination에 비해서 불편함과 비용 때문에 임상에서는 널리 사용하지 않는다.

[0006] 또한, 표준 요법은 인후두 역류질환 병태 생리학 기전의 가설에 근거한 고용량 양성자 펌프 억제제(PPI) 요법으로 이루어져 있지만, 무작위 임상 시험에서 위약보다 양성자 펌프 억제제 치료가 더 우월하다고 결론지을 수 있는 증거는 충분하지 않다. 또한 인후두 역류질환 증상의 개선과 함께 이러한 치료에 대한 반응을 갖는 것은 상대적으로 열악하다. 이와 같이, 현재까지 제안된 병태 생리학은 인후두 역류질환의 진단 또는 치료반응의 불일치를 적절히 설명하지 못한다.

[0007] 산 노출에 대한 병리 생리학적 기전 및 다른 영향 인자로는 염증성 사이토카인, 탄산 탈수 효소 및 점액을 비롯한 역류성 바이오 마커 뿐만 아니라 위 역류의 유해 요소로부터 비롯될 수 있지만, 이들 중 어느 것도 현재 임상적으로 개입될 수 있는 것은 없다.

[0008] 최근, 마우스와 같은 동물에서 자연적으로 발생하는 인후두 위산역류질환의 존재에 대한 기록은 없기 때문에, 인위적으로 모델을 제작을 해야 하지만 위산역류가 인두와 후두까지 이루어지지 않는다는 문제점이 있다. 또한, 위산역류질환으로 발생한 식도염 모델에 관한 연구는 있으나, 위산역류질환에 의한 인두염 모델에 대한 연구는 없는 실정이다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 상기 문제점을 해결하기 위하여 예의 노력한 결과, 마우스에 산성 용액을 섭취시켜 제작한 인후두 역류질환 마우스 모델에서 실제 사람의 인후두 역류질환과 같이 타액 내 soluble E-cadherin fragment 농도가 증가하고 인후두 점막층의 E-cadherin의 발현량이 감소하며 MMP-7 발현량이 증가되는 현상이 재현되는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명의 목적은 인후두 역류질환 마우스 모델 및 그 제작방법을 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 인후두 역류질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 마우스 모델을 이용하는 것을 특징으로 하는 인후두 역류질환 치료제 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 마우스에 산성 용액을 섭취시키는 단계를 포함하는 인후두 역류질환 마우스 모델의 제작방법을 제공한다.

[0016] 본 발명은 또한, 상기 방법에 의해 제작된 인후두 역류질환 마우스 모델을 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한, 정상인의 인후두 점막층보다 인후두 역류질환 환자의 인후두 점막층에서 상대적으로 발현이 증가하는, MMP-7(matrix metalloproteinases-7)을 포함하는 인후두 역류질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한, (a) 인후두 역류질환 마우스 모델에 후보물질을 처리하여 타액 내 soluble E-cadherin fragment 농도 및 인후두 점막층의 E-cadherin와 MMP-7 발현량을 확인하는 단계; 및 (b) 후보물질을 처리한 마우스 모델의 soluble E-cadherin fragment 농도 및 E-cadherin와 MMP-7의 발현량이 정상과 유사할 경우 해당 후보물질을 인후두 역류질환 치료제로 선택하는 단계를 포함하는 인후두 역류질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 인후두 역류질환 마우스 모델은 타액 내 soluble E-cadherin fragment 농도 감소, 인후두 점막층의 E-cadherin 발현 증가 및 인후두 점막층의 MMP-7 발현 감소 평가 등을 통해 인후두 역류질환 치료제를 스크리닝 하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 인후두 역류질환 동물모델의 인두조직에 대한 E-cadherin과 MMP-7에 대한 발현을 확인한 결과이다.
 도 2는 산 노출과 배양시간에 따른 E-cadherin의 변화를 본 것이다.
 도 3은 배양 상층액으로부터의 80-kDa E-cadherin fragment (soluble E-cadherin)에 대한 변화를 본 것이다.
 도 4는 MMP 억제제를 처리한 후 E-cadherin의 변화와 MMP-2, 3, 7, 9에 대한 mRNA 발현 변화를 본 것이다.
 도 5는 산과 MMP 억제제를 노출시켰을 때 효소 활성도에 대한 단백질 발현 변화를 본 것이다.
 도 6은 산과 MMP 억제제를 노출시킨 후의 변화를 면역세포화학염색법과 투과도를 통해 MMP 억제제에 대한 효과를 확인한 결과이다.
 도 7은 인후두 역류질환 환자의 인두 조직에 대한 E-cadherin과 MMP-7에 대한 발현을 확인한 결과이다.
 도 8은 타액의 MMP-7 단백질 발현 결과를 나타내는 그래프이다.
 도 9는 RSI(Reflux Symptom Index)에 의한 타액의 MMP-7 단백질 발현 결과를 나타내는 그래프이다.
 도 10은 인후두 역류질환 치료제인 놀텍 복용 후의 타액의 MMP-7 단백질 발현 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 본 발명에서는 마우스에 산성 용액을 섭취시켜 제작한 인후두 역류질환 마우스 모델에서 실제 사람의 인후두 역류질환과 같이 타액 내 soluble E-cadherin fragment 농도가 증가하고 인후두 점막층의 E-cadherin의 발현량이 감소하며 MMP-7 발현량이 증가되는 현상이 재현되는 것을 확인하였다.

[0024] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, 마우스에 산성 용액을 섭취시키는 단계를 포함하는 인후두 역류질환 마우스 모델의 제작방법에 관한 것이다.

[0025] 본 발명에서, 인두의 내강 환경이 pH 7.0에서 pH 중립적이고 위가 pH 1.5~2.0에 산을 분비한다는 점을 감안할 때 후두 인두 상피로의 산성 역류는 인두의 pH를 유의하게 감소시킬 수 있다. 인두의 손상은 pH의 감소 또는 펩신, 담즙염 및 체장 효소를 포함하는 역류의 유해 성분에 대한 노출로 인해 발생할 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 산성 용액은 pH 3 내지 pH 5인 것을 특징으로 할 수 있으며, 음료수에 산이나 펩신을 섞은 것을 특징으로 할 수 있다.

[0027] 본 발명에 있어서, 상기 마우스에 1~2일 주기로 일반 식수와 산성 용액을 번갈아 공급하여, 총 5~10주 가량 섭취시키는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0028] 본 발명에서, 상기 마우스는 하루 식수를 공급하지 않은 후, 1~2일 주기로 일반 식수와 산성 용액을 번갈아 공급하여, 총 5~10주 가량 섭취시키는 것을 특징으로 한다.

[0029] 본 발명에 있어서, 상기 마우스는 야생형의 C57BL/6인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0030] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 방법에 의해 제작된 인후두 역류질환 마우스 모델에 관한 것이다.

[0031] 본 발명에 있어서, 상기 인후두염 마우스 동물모델은, (a) 타액 내 soluble E-cadherin fragment 농도 증가; (b) 인후두 점막층의 E-cadherin 발현 감소; (c) 인후두 점막층의 MMP-7(matrix metalloproteinases-7) 발현 증가로 이루어진 특성 중에서 선택되는 하나 이상의 특성을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0032] 본 발명에서, E-cadherin은 타입-I 막통과 당단백질(type-I transmembrane glycoprotein)이며 다양한 상피세포

에서 접착 결합(adherens junction)과 basolateral membrane으로 정의된다. E-cadherin의 구조는 1) 큰 세포 밖의 도메인, 2) transmembrane segment, 3) conserved cytoplasmic domain으로 구성된다. 세포 밖 부분인 E-cadherin은 칼슘 이온에 결합하여 변형된 선형 분자를 형성하는 5개의 세포 외 cadherin 도메인 반복을 포함한다. E-cadherin의 결합 기능은 상피세포의 생리학에서 중요한 역할을 한다. 결합된 액틴 필라멘트와 함께 완전히 형성된 cadherin-catenin 복합체는 adherens junction의 핵심을 형성하며, 25 nm의 세포 간극을 가진 두 개의 상동성 플라스마 막을 결합한다. E-cadherin-mediated adherens junctions은 또한 관절과 틈새 사이의 대부분 용질의 수동 확산을 막는 투과성 장벽을 형성하는 중요한 상피조직인 apical tight junction의 형성에 필수적이다.

[0033] 본 발명에서, E-cadherin fragments는 여러 지점에서 생성될 수 있다. 혈장 막의 세포 외 표면에서 MMP의 분열이 일어나서 sE-cad (N-terminal 80-kDa fragment)이 생성된다. 위식도 역류질환(GERD)의 식도 상피를 이용한 이전 연구에서는, 단백질 발현 분석을 통하여, E-cadherin의 분열되어 식도 점막에 분자량 35kDa의 C-말단 조각이 존재함을 확인하였다. 또한 GERD 환자에서 80kDa N-말단 단편의 혈청 수준이 유의하게 높았다. 마찬가지로, 인두 점막 세포이 산에 노출이 되면 MMP-7이 활성화되고, 이 효소에 의해 E-cadherin이 분해되어 온전한 E-cadherin은 줄고, 분해 산물인 sE-cad가 배양 상층액에서 증가하였다.

[0034] 본 발명에서, 발현은, mRNA 전사체 또는 단백질 발현을 의미한다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에서, E-cadherin의 절단과 후두의 세포 간 결합력의 약화는 산성 내용물에 노출됨으로써 유발되므로, 인두 상피세포에 산을 노출 후 e-cadherin 발현 변화에 대한 matrix metalloproteinases(MMPs)의 역할에 대해 평가하고자 하였다. 이를 위해 건강한 지원자의 인간 인두 점막 상피세포를 배양하였다. E-cadherin은 산 노출기관과 반복 횟수와 상관계수에 의해 유의하게 감소하였다. 전체적인 MMP 억제제인 actinonin을 처리하였을 때, 변화가 억제되는 것을 확인하였다. 다양한 MMP에 대해서 분석하였을 때 MMP-7 mRNA의 발현이 증가하였으며, 산을 처리한 세포 배양 상층액에서의 MMP-7의 절단 활성도가 증가하였다. 면역화학염색과 세포 투과도 결과에서는 E-cadherin의 세포 표면 염색화 투과도가 산을 노출시킨 세포에서는 감소하는 것으로 나타났으며, 이는 MMP 억제제에 의해 현저하게 억제되었다. 결과적으로, MMP-7은 인후두역류질환 환자에서 발생하는 좀 더 생리적인 상태와 유사한 비교적 약한 산성 조건에 노출된 후에 E-cadherin의 분해를 유도하는데 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다.

[0036] 본 발명은 다른 실시예에서, MMP-7에 의해 매개되는 산 노출과 병태 생리학적 메커니즘에 의한 인두 상피세포에서의 E-cadherin의 변화를 확인하였다. 또한, 10분 이상 점막에 산성조건으로 노출되면 단일 현상에서도 상피세포가 분해된다. 그러나, 1분 내지 5분 동안의 점막의 산 노출은 점막에 산 노출 후 24시간이 경과할 때 상피세포의 E-cadherin의 최대 분해를 유도하였다. 더욱이 산 노출 후 24시간이 지나면 15초와 30초 같은 더 짧은 산 노출이 단일 노출에서 E-cadherin의 분해를 유발하지는 않지만, 반복적인 산 노출에 의해서는 유의하게 감소했다. 특히, 사람에게서 나타나는 생리학적 노출과 비슷하게 하루 3회 반복적으로 산을 노출시키게 되면 노출되는 시간이 증가함에 비례하여서 E-cadherin의 분해를 증가시켰다. 결과적으로, 이 현상은 점막에 대한 단기간의 산 노출이 화학적 손상을 통해 직접적으로 상피세포의 E-cadherin을 파괴하지는 않지만 24시간 동안 영향을 미치는 메커니즘에 의해 E-cadherin의 분해를 유발할 수 있음을 보여준다.

[0037] 상피세포가 산에 노출된 후 24시간이 지나면 세포내의 E-cadherin의 감소와 대조적으로 상층액에서의 sE-cadherin의 증가가 확인되었다. 산을 노출시킨 후 상층액에서 이와 같은 sE-cadherin의 증가는 MMP 활성화와 관련이 있다. 특히, 산 노출 시간은 상피세포의 투과성 증가와 함께 MMP-7의 mRNA 발현 및 효소 활성의 증가와 상관관계를 보였다. 예상대로, MMP 억제제를 처리하면 E-cadherin의 변성과 더불어서 투과도가 증가됨을 완화시켰다.

[0038] 본 발명에서, 인후두 역류질환의 외래성 산성도 모니터링은 pH 4 또는 5 미만이 되는 것을 질환으로 정의하는 것에 대해 사실상 논쟁이 있다. 왜냐하면, 희석 및 중화 효과와 함께 말초 식도에 비해 인두의 산성 노출이 더 짧고 지속시간이 짧기 때문이다. 타액 및 점액의 경우 인두의 pH는 일반적으로 4 이하로 떨어지지 않는다. 따라서 산 노출의 pH는 실험에서 4로 결정되었고, 1차 배양 된 인두점막세포는 최대 5분 동안 처리되었으며, 반복된 노출에서는 15초 또는 30초로 처리하였다.

[0039] 인후두 역류질환 점막 세포에 대한 pH 4에 대한 단일 산 노출은 위성한 후 24시간 동안 mRNA에서는 유의한 변화가 없었지만 단백질에서는 현저하게 감소되었다. 이러한 결과는 다른 메커니즘과의 연관성을 나타낼 수 있으며, 산 노출로 인한 직접적인 손상이 아닐 수도 있다. E-cadherin의 절단은 산 노출 후 MMP-7 발현 및 효소 활성의 증가와 관련이 있으며 이는 산 노출 후 지연된 후에 E-cadherin이 절단되는 이유일 수 있다.

- [0040] 세포 간의 결합을 유지하는 E-cadherin의 역할을 감안할 때, 산 노출에 의한 E-cadherin의 변화를 점막 손상의 전형적인 발견을 유도하면서 세포 간 간격과 틈새 공간으로의 다양한 용질의 유입을 증가시킬 수 있다. 따라서, E-cadherin 분열에 의한 sE-cadherin과 점막 투과도의 증가에 따른 양의 상관관계를 보였으므로 sE-cadherin이 인후두 역류질환의 존재와 중증도에 대한 새로운 진단 지표가 될 수 있다.
- [0041] 본 발명에서는 가래 또는 타액으로부터의 sE-cadherin으로 평가가 가능한 진단 도구로 이용하였다. 가래 또는 타액에서 sE-cadherin 수치를 평가함으로써 산 노출의 중증도를 평가할 수 있으며, 이는 인후두 역류질환의 유용한 진단 보조제가 될 수 있다. 또한, sE-cadherin 수치는 인후두 역류질환 환자의 추적 관찰에서 유용할 수 있으며 약물 치료의 효과를 모니터링할 수 있다.
- [0042] sE-cadherin(sE-cad)는 인접한 세포들 사이의 full-length E-cadherin homodimers의 hemophilic 상호작용을 방해하는 membrane-bound E-cadherin에 대한 부정적인 경쟁일 수 있다. 게다가 sE-cad는 주요 MMPs의 상향 조절을 일으키고, E-cadherin과 세포-세포 간 결합력에 영향을 준다. 본 발명에서 산 노출이 한 번의 노출과 짧게 반복 노출 모두 인두 상피세포의 유의한 영향을 미친다는 것을 확인하였다. 산을 없앴 후 24시간동안 sE-cad와 MMP의 효과가 유지된다고 생각하면 단시간이라 할지라도 단일 또는 반복 산 노출이 인후두 역류질환의 증상 및 신체적 소견을 유발할 수 있다.
- [0043] 본 발명에서, 임상적으로 이중 프로브 pH 모니터링의 인후두 역류질환 진단 기준이 여전히 논쟁이 있으나, 산 노출의 지속기간과 반복이 증가함에 따라 E-cadherin의 절단과 투과도를 증가시키는 유의한 영향을 미친다는 것을 감안할 때 산성 노출의 지속 기간과 반복이 모니터링의 일부로 포함하였다.
- [0044] 본 발명에서, 산 자체에 의한 기계적 절단에 의한 sE-cad의 생성은 원형질막의 full length E-cadherin의 양을 감소시킨다. 상기 E-cadherin의 절단에 의해 기존의 접착 결합부(adherens junction)를 추가로 파괴시키며, 이후, 세포의 영역을 절단하기 위해 MMP-7의 발현이 증가하고, 따라서, E-cadherin이 절단되고, 투과성이 증가한다(도 7E).
- [0045] 본 발명은 또 다른 관점에서, 정상인의 인후두 점막층 및/또는 타액보다 인후두 역류질환 환자의 인후두 점막층에서 상대적으로 발현이 증가하는, MMP-7(matrix metalloproteinases-7)을 포함하는 인후두 역류질환 진단용 바이오 마커에 관한 것이다.
- [0046] 본 발명의 또 다른 관점에서, MMP-7(matrix metalloproteinases-7) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는, 인후두 역류질환 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0047] 또 다른 관점에서 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 인후두 역류질환 진단용 키트를 제공한다.
- [0048] 본 발명에 있어서, 상기 mRNA 수준을 측정하는 제제는 바람직하게는 MMP-7 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머쌍 또는 프로브를 포함하는 것으로, MMP-7를 암호화하는 유전자들의 핵산 서열이 유전자 은행에 등록되어 있으므로 당업자는 상기 서열을 바탕으로 이들 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭하기 위한 프라이머쌍 또는 프로브를 디자인할 수 있다.
- [0049] 본 발명에 있어서, "프라이머"는 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3'hydroxyl group)을 가지는 핵산 서열로 상보적인 주형(template)과 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 주형의 복사를 위한 시작지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 중합효소 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다.
- [0050] 본 발명에 있어서, 프라이머는 MMP-7 유전자와 상보적으로 결합하여 증폭시킬 수 있는 한, 프라이머의 서열은 제한되지 않는다.
- [0051] 본 발명에 있어서, "프로브"는 유전자 또는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 것은 수 염기 내지 길게는 수 백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하며 표지(Labeling)되어 있어서 특정 mRNA의 존재 여부를 확인할 수 있다. 상기 프로브는 올리고 뉴클레오타이드 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다. 본 발명에서 프로브는 MMP-7 유전자와 상보적으로 결합할 수 있는 한 프로브의 서열은 제한되지 않는다.
- [0052] 본 발명의 프라이머 또는 프로브는 포스포르 아미다이트 고체 지지체 방법, 또는 기타 널리 공지된 방법을 사용하여 화학적으로 합성할 수 있다. 이러한 핵산 서열은 또한 이 기술분야에 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, 포

스포로아미 데이트, 카바메이트 등) 또는 하전된 연결체(예: 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트 등)로의 변형이 있다.

[0053] 본 발명에 있어서, 단백질 수준을 측정하는 제제는 바람직하게는 MMP-7 단백질에 특이적인 항체를 포함할 수 있다.

[0054] 본 발명에 있어서, "항체"란 항원성 부위에 대해서 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미한다. 이러한 항체는 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 여기에는 상기 단백질에서 만들어질 수 있는 부분 펩티드도 포함되며, 예를 들어 상기 부분 펩티드는 최소한 7개 아미노산, 바람직하게는 9개 아미노산, 더욱 바람직하게는 12개 이상의 아미노산을 포함한다. 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 특수항체도 포함된다. 본 발명에 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 결합기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.

[0055] 본 발명은 일 양태에서, 상기 MMP-7에 특이적으로 결합하는 항체를 유효성분으로 포함하는 인후두 역류질환 진단용 키트에 관한 것일 수 있다.

[0056] 본 발명의 키트는 마커에 해당하는 MMP-7유전자의 mRNA 발현 수준 또는 단백질 발현 수준을 확인함으로써 인후두 역류질환을 진단하는데 이용될 수 있다. 본 발명의 키트에는 인후두 역류질환 진단을 위한 프라이머, 프로브 또는 항체뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액, 또는 장치가 포함될 수 있다.

[0057] 구체적인 일례로서, 본 발명의 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다.

[0058] 상기 RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-중합효소 및 역전사효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-물(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.

[0059] 또한, 본 발명의 키트는 마이크로어레이 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. 상기 마이크로어레이 칩 키트는, 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA가 프로브로 부착되어 있는 기판을 포함하고, 기판은 정량 대조군 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있으며, 본 발명의 마커를 이용하여 이 기술분야에서 통상적으로 사용되는 제조 방법에 의하여 용이하게 제조될 수 있다. 마이크로어레이 칩을 제작하기 위해서, 상기 탐색된 마커를 탐침 DNA 분자로 이용하여 DNA 칩의 기판상에 고정화시키기 위해 파이프일렉트릭(piezoelectric) 방식을 이용한 마이크로피펫팅(micropipetting)법 또는 핀(pin) 형태의 스폿터(spotter)를 이용한 방법 등을 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 마이크로어레이 칩의 기판은 아미노-실란(amino-silane), 폴리-L-라이신(poly-Llysine) 및 알데히드(aldehyde)로 이루어진 군에서 선택되는 활성기가 코팅된 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 기판은 슬라이드 글래스, 플라스틱, 금속, 실리콘, 나일론 막 및 니트로셀룰로스 막(nitrocellulose membrane)으로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 또한, 본 발명의 키트는 항체의 면역학적 검출을 위하여 기질, 적당한 완충용액, 발색 효소 또는 형광물질로 표지된 2차 항체, 및 발색 기질 등을 포함할 수 있다. 상기에서 기질은 니트로셀룰로오스 막, 폴리비닐 수지로 합성된 플레이트, 폴리스틸렌 수지로 합성된 플레이트 및 유리로 된 슬라이드 글라스 등이 이용될 수 있고, 발색 효소는 퍼옥시다아제(peroxidase), 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase) 등이 사용될 수 있고, 형광물질은 FITC, RITC등이 사용될 수 있고, 발색기질액은 ABTS(2,2'-아지노-비스-(3-에틸벤조티아졸린-6-설폰산)), OPD(o-페닐렌디아민), TMB(테트라메틸 벤지딘)가 사용될 수 있다.

[0062] 본 발명의 또 다른 관점에서, i) 생물학적 시료인 타액 또는 인후두점막의 MMP-7(matrix metalloproteinases-7) 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질 발현 수준을 측정하는 단계; 및 ii) 상기 MMP-7 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질 발현 수준을 대조군 시료와 비교하는 단계를 포함하는 인후두 역류질환 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

- [0063] 본 발명의 일 양태에서 상기 타액은 개체의 아침 기상 후 개체에서 분리한 타액일 수 있다.
- [0064] 상기 MMP-7 유전자 또는 이의 단백질의 발현 수준이 대조군과 비교하여 높은 것으로 확인되면 생물학적 시료를 제공한 개체가 인후두 역류질환이 있다고 진단할 수 있다.
- [0065] 상기 i) 단계의 mRNA 수준 측정은 생물학적 시료에서 마커 유전자들의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 중합효소반응(PCR), 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Realtime RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 또는 DNA 마이크로어레이 분석법 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0066] 상기 i) 단계의 단백질 수준 측정은 생물학적 시료에서 마커 유전자로부터 발현된 단백질의 존재 여부와 발현 정도를 확인하는 과정으로, 웨스턴 블랏팅(western blotting), ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석법(Radioimmunoassay), 방사면역 확산법(Radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로켓트(Rocket) 면역전기영동, 조직면역염색법, 면역 침전분석법(immunoprecipitation assay), 보체 고정 분석법(complete fixation assay), 유세포분석법(Fluorescence Activated Cell Sorter, FACS) 또는 단백질 칩(protein chip) 분석법 등을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0067] 본 발명은 또 다른 관점에서, (a) 인후두 역류질환 마우스 모델에 후보물질을 처리하여 타액 내 soluble E-cadherin fragment 농도 및 인후두 점막층의 E-cadherin와 MMP-7 발현량을 확인하는 단계; 및 (b) 후보물질을 처리한 마우스 모델의 soluble E-cadherin fragment 농도 및 E-cadherin와 MMP-7의 발현량이 정상과 유사할 경우 해당 후보물질을 인후두 역류질환 치료제로 선택하는 단계를 포함하는 인후두 역류질환 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0068] 본 발명에 있어서, 상기 (b)는 타액 내 soluble E-cadherin fragment 농도가 감소하고, 인후두 점막층의 E-cadherin의 발현량이 증가하며, 인후두 점막층의 MMP-7 발현량이 감소할 경우, 해당 후보물질을 인후두 역류질환 치료제로 선택하는 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0069] 본 발명은 다른 양태에서, 상기 방법에 의해 스크리닝된 약물을 유효성분으로 함유하는 인후두 역류질환 치료용 조성물에 관한 것일 수 있다.
- [0071] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0073] **실시예 1: 인후두 역류질환 마우스 모델 확립**
- [0075] 오리엔트 바이오(Seongnam, Korea)로부터 28-30g의 수컷 C57BL/6 마우스 8주령을 구입하였다. $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$, $50 \pm 10\%$ 습도가 유지되는 환경에서 마우스들을 사육하였으며, 고려대학교 의과대학의 병원균이 없는 특정시설에서 자유롭게 음식과 물을 제공받았다.
- [0076] 인후두 역류질환 마우스 모델을 확립하기 위하여, 실험 전날 금수(식수를 공급하지 않음) 후, 1) 산성화된 물(pH 4)을 계속 공급하거나, 2) 하루 주기로 금수와 산성화된 물을 번갈아 공급하거나, 3) 하루 주기로 일반 식수와 산성화된 물을 번갈아 공급하는, 3가지 방법으로 마우스에 공급하였다. 이중 3)의 방법으로 제작한 마우스를 선택하였다. 즉, 마우스는 대조군 그룹 A군 6마리와 산에 노출시킨 B군 9마리의 두 그룹으로 나누었다.
- [0077] 일반 식수만 공급한 마우스 및 산성 식수와 일반 식수를 번갈아 공급한 마우스의 물 섭취량 및 체중의 변화를 관찰하였다. 그 결과, 시간이 지남에 따라 산성 식수를 공급한 그룹(Group B)은 일반 식수만 공급한 마우스 그룹(Group A)에 비해 5주차부터 체중이 감소하는 결과를 확인하였다(도 1B). 산성 식수를 공급한 그룹(Group B)과 일반 식수만을 공급한 그룹(Group A)의 하루 물 섭취량을 측정된 결과 섭취량의 차이는 없었으며(도 1A), 산성화된 물의 신맛이 물의 섭취량에 영향을 미치지 않는다는 것을 확인하였다.
- [0078] 이후, 5주 또는 9주 동안 마우스를 위와 동일하게 식이하게 하여, 인후두 역류질환 동물모델을 제작하였다.
- [0079] 9주차에, 일반 식수만 공급하였을 때에 비해, 일반 식수와 산성 식수를 번갈아 공급하였을 때의 하루 섭취량 및

몸무게 측정 후 몸무게의 20% 정도가 감량한 것을 확인하였다.

[0080] 실험방법 및 실험 디자인 매개 변수는 고려대학교 병원 임상 시험위원회(IRB No. KOREA-2018-0026)에 의해 검토되고 승인되었다. 모든 실험은 지침 및 규정에 따라 수행하였다.

[0082] 실시예 2: 인후두 역류질환 발병과 E-cadherin 및 MMP-7의 상관관계

[0083] 2.1 세포 배양

[0084] 편도 절제술을 시행한 환자의 인두 점막을 채취하였다. 이는 고려대학교병원 병원평가위원회(IRB No. ED15303)로부터 방법 및 실험 설계 매개 변수를 검토 및 승인받았다. 모든 참가자로부터 정보 제공 동의를 얻었고, 모든 방법은 관련 지침 및 규정에 따라 수행되었다. 인간 인두 점막을 1mg/ml dispase 용액에 보관 후, 37 °C, 5% CO₂의 조건으로 1시간동안 배양하였다. 이후 인두상피세포 부분만을 긁어서 15ml conical tube에 모은 후 원심 분리하였다. 이후 세포를 Dulbecco's modified Eagle's medium/F12(DMEM/F12)를 이용하여서 3번 워싱(washing)한 후, 소 뇌하수체 추출물, 인슐린, 하이드로코르티손, 젠타마이신, 암포테리신 B, 레티노익 산, 트랜스페린, 트리오포싸이로닌, 에피네프린, 상피성장인자, 페니실린 및 스트렙토마이신이 포함된 배양액(BEBM, Lonza, Walkersville, MD, USA)을 이용하여서 배양하였다. 이후 약 70%의 성장이 되면 세포를 0.25% 트립신 EDTA로 떼어내고, DMEM/F12로 세척한 후 산 처리를 위해 12웰 배양 플레이트(SPL, Seoul, Korea)에서 배양하였다. 통상적으로 배양은 37 °C, 5% CO₂의 배양기에서 유지되었으며, 배양액은 3일마다 교체하였다. 세포 형태는 Olympus CKX41-A32PHP(Olympus, Tokyo, Japan)현미경으로 관찰하였다.

[0086] 2.2 산 노출과 MMP 억제제 처리 조건

[0087] 인두 상피세포에 산의 영향을 조사하기 위하여, 상피세포에 염산을 BEBM 배양액에 섞어서 산성도(pH 4)를 맞추어 준 후, 30초, 1분 및 5분 동안 처리하였다. 대조군 세포는 BEBM 배양액으로만 처리하였다. 각각 산을 처리해 준 후 산성배지를 세척한 후, 세포를 BEBM 배양액만으로 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 1, 4, 8 그리고 24시간 배양한 후, 식염수로 2회 세척한 후 실험에 사용하였다.

[0088] 이후, 반복되는 산 노출의 영향을 조사하기 위하여, 마찬가지로 상피세포를 배양액에 염산을 넣어서 산성도 4(pH 4)로 맞춘 용액을 15초 또는 30초 동안 하루에 3번 8시간 간격으로 3일 동안 반복하였다. 결과는 1일, 2일 그리고 3일째 되는 세포를 실험에 사용하였다.

[0089] 또한, 인두 상피세포에 대한 산/MMP 억제제의 노출 효과를 조사하기 위하여, 산을 처리하기 전에 1시간 정도 10 uM MMP 억제제(actinonin, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 이용하여 배양하였다. 이후 산성도 4인 배양액을 각각 30초, 1분, 5분 처리하였으며, 대조군으로는 MMP 억제제만 처리하였다. 이후 각각 처리군에 대해 1, 4, 8, 24시간 배양한 후 실험에 사용하였다.

[0091] 2.3 RT-PCR을 이용한, 산 노출 후 인두 점막 세포의 E-cadherin 및 MMP-7의 발현 변화 관찰

[0092] 상피 세포에서의 유전자 발현은 정량적 실시간 유전자 증폭 방법에 의해 측정하였다. 합성된 cDNA를 준비한 후, SYBR green 마스터 믹스(Qiagen, Germantown, MD, USA)를 이용하였다. 사용한 프라이머는 GAPDH, 정방향 5' - GAG TCA ACG GAT TTG GTC GT-3' (서열번호 1), 역방향 5' -TTG ATT TTG GAG GGA TCT CG-3' (서열번호 2); MMP-2, 정방향 5' -TCT CCT GAC ATT GAC CTT GGC-3' (서열번호 3) 및 역방향 5' -CAA GGT GCT GGC TGA GTA GAT C-3' (서열번호 4); MMP-3, 정방향 5' -ATT CCA TGG AGC CAG GCT TTC-3' (서열번호 5) 및 역방향 5' -CAT TTG GGT CAA ACT CCA ACT GTG-3' (서열번호 6); MMP-7, 정방향 5' -TGA GCT ACA GTG GGA ACA GG-3' (서열번호 7) 및 역방향 5' -TCA TCG AAG TGA GCA TCT CC-3' (서열번호 8); MMP-9, 정방향 5' -TTG ACA GCG ACA AGA AGT GG-3' (서열번호 9) 및 역방향 5' -GCC ATT CAC GTC CTT AT-3' (서열번호 10); 과 E-cadherin, 정방향 5' -TGC TCT TGC TGT TTC GG-3' (서열번호 11) 및 역방향 5' -TGC CCC ATT CGT TCA AGT AG-3' (서열번호 12)의 시퀀스로 구성하였다. 조건은 95 °C에서 15초 동안 변성시킨 다음 어닐링/익스텐션(annealing/extension)을 수행하는 2단계 반응을 40사이클 반복한 60 °C, 45초 조건으로 실시간 열순환 시스템(TP800/TP860, Takara, Kusatsu, Shiga, Japan) 기기를 이용하였다. 결과 분석은 ΔCt 방법을 사용하였다.

- [0093] 인두 점막 세포에 산을 노출시킨 후 E-cadherin의 단백질 발현 변화를 분석하기 위하여, 산에 노출시킨 후 새로운 배양액으로 교체하였다.
- [0094] 그 결과, 인두 점막 세포에 산이 10분 동안 노출되면 E-cadherin의 발현이 감소하며, 면역반응에서도 거의 나타나지 않았다. 이는 상피 세포가 분해된 것을 의미한다.
- [0095] 산에 짧게 노출한 30초, 1, 5분 또는 길게 노출한 10분, 20분 이후 워싱(washing)한 다음 1시간동안 배양 후 관찰한 결과 E-cadherin의 발현 변화를 관찰하지 못했다(도 2A).
- [0096] 이후 상기와 같은 조건으로 8시간이나 24시간동안 배양한 후 관찰한 결과, E-cadherin이 감소하는 것을 관찰하였다(도 2A). 1분 또는 5분의 산 노출 후 24시간 동안 배양한 조건에서 더 현저하게 E-cadherin의 발현 감소를 확인하였다(도 2B). 그러나 mRNA의 발현 정도는 약간 감소한 것처럼 확인되었다(도 2C).
- [0097] 또한, 하루에 3회 15초, 30초 동안 산을 노출시켜서 1일에서 3일동안 관찰하였을 때, 세포 추출물에서는 E-cadherin과 MMP-7의 발현이 감소하였으며, 세포 배양액에서는 증가하는 것을 확인하였다.
- [0099] 2.4 산 노출 후, 인두 점막 세포 상등액의 E-cadherin 및 sE-cadherin의 발현 변화
- [0100] E-cadherin의 단편과 절단 부위를 평가하기 위하여, 산에 노출시킨 후 배양 상등액을 이용하여 E-cadherin의 발현을 확인하였다. 배양 상등액에서의 sE-cad(soluble 80-kDa E-cadherin)은 우세한 단편이었고 세포 구성의 전체 길이의 E-cadherin의 발견과도 관련이 있었다(도 3A). MMP 억제제인 actinonin을 이용하였을 때 E-cadherin의 절단이 방지되는 것을 확인하였다. 따라서, E-cadherin의 절단이 MMP와 관련있다는 것을 확인하였다.
- [0101] E-cadherin의 세포 외 부분이 절단되면 sE-cadherin이 방출되므로 인두 점막의 산 노출은 E-cadherin의 손상에 영향을 줄 수 있다. 그러므로, 산을 노출시켰을 때 sE-cadherin의 발현이 증가하고 E-cadherin의 발현이 감소되는 것은 MMP의 활성화에 대한 결과이다(도 3B).
- [0102] 도 3B에서, CTF는 C- 말단 단편을 의미하고, CD는 세포질 도메인을 의미하며, EC는 세포 외 cadherin 도메인을 의미하고, T은, 막 횡단 도메인을 의미한다.
- [0103] 세포에 산 노출 및 노출 후 24 시간 배양 후, E-cadherin이 감소하는 것을 관찰하였으며, MMP 억제제에 의해 개선되는 것을 확인하였다(도 4A 및 도 4B).
- [0105] 2.5 산 노출 후, MMP subset 변화 확인
- [0106] 인두 점막에 산을 처리한 후 RT-PCR을 수행한 결과, MMP-9의 발현은 현저하게 감소되는 반면 MMP-7의 발현은 증가하였다(도 4C). 그리고 MMP-3의 발현량은 통계적으로 유의하지는 않았지만 산성 조건에 노출되면 증가하는 경향을 보였다(도 4C).
- [0107] 전사 억제제의 효과를 알아보기 위하여, 인두 상피 세포를 Actinomycin D(Sigma) 5ug/ml로 37 °C, 5% CO₂ 조건에서 30분 동안 전처리하였다. 이후 세포를 각각 30초, 1분, 5분 동안 산성도 4(pH 4)의 배양액으로 노출시킨 후, 배양액을 Actinomycin D만 포함하는 배양액으로 바꾸어서 24시간 동안 배양한 후, MMP-7 인자에 대한 mRNA 발현 정도를 확인하였다.
- [0108] 그 결과, 전사 억제제인 actinomycin D를 세포에 처리하게 되면 증가되었던 mRNA에서의 MMP-7의 발현이 감소함을 확인하였다(도 4D).
- [0109] MMP subset의 단백질 정량적 검출 분석을 위하여, 산 또는 산/MMP 억제제를 처리한 인두 상피세포를 5% Laemmli buffer와 5% β-mercaptoethanol로 추출한 후 10분간 단백질 결합을 끊어주었다. 추출한 단백질을 8% SDS-폴리아크릴 아마이드 겔에서 분리하고, 트랜스퍼 버퍼(25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS 및 20% 메탄올, 산성도 8.3)를 350 mA에서 30분 동안 니트로 셀룰로오스 막으로 옮겼다. 막 상에 비특이적인 결합을 막기 위해서 실온에서 90분 동안 5% 탈지유로 차단시켰다. 그런 다음 단백질 발현 1차 항체로 E-cadherin, MMP-3 (Santa Cruz), MMP-7(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), b-actin을 이용하였다. 다음으로, 각각의 항체에 대한 2차 항체로 토끼와 쥐 항체를 이용하였다. 다음으로 chemiluminescence kit (Santa Cruz)를 이용하여 발현을 증폭시켜준 후 ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 발현을 확인하였다.

[0110] 그 결과, 단백질 레벨에서, 세포에 산을 노출시키는 시간이 길어질수록 세포 내 MMP-7의 발현이 감소하였고, 이에 상응하여서 상층액의 MMP-7 발현은 증가하였다(도 5A). 이러한 변화는 MMP 억제제가 처리된 세포에서는 다시 회복되는 경향을 보였다. 그러나, 동일한 배양 조건에서 MMP-3의 발현 변화는 일어나지 않았다(도 5B).

[0111] 이후 단백질 기능 자체를 평가하기 위하여, MMP-7과 MMP-3의 효소 활성을 분석하였다. 산성 노출시간이 길어질수록 MMP-7의 활성도는 유의하게 증가한 반면, MMP-3의 활성은 거의 동일하였다. 또한, MMP 억제제를 처리한 경우 MMP-3와 비교하여서 MMP-7의 활성도가 현저하게 감소하였다(도 5C 및 도 5D). 따라서, 산 노출 후 E-cadherin의 절단은 주로 MMP-7 때문인 것을 알 수 있다.

[0113] 2.6 MMP-3, MMP-7 효소 기질 분석

[0114] Matrix metalloproteinase MMP-3 및 MMP-7의 활성을 측정하기 위하여, 산 또는 산/MMP 억제제가 처리된 인두 상피 세포의 배양 상층액을 Centricon spin 튜브 (3kDa cutoff, Merck Millipore, Billerica, MA, USA)에서 4 °C, 3000g조건으로 40분 동안 원심분리하여 농축하였다. 분석을 위해 상기 농축액을 10 uM APMA(4-aminophenylmercuric acetate)과 함께 37 °C에서 1시간 동안 배양하였다. 이후 MMP-3 기질(5-FAM/QXLTm520FRETpeptide) 또는 MMP-7 기질(5-FAM/QXLTm520FRETpeptide)을 1:100으로 희석하여 1시간 동안 반응시킨 후, SpectraMax M2eplatereader(MolecularDevices)을 이용하여 excitation 파장 490 nm와 emission 파장 520 nm (SOFTMAX PRO V5 software, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)으로 측정하였다.

[0115] 그 결과, 산성 노출시간이 길어질수록 MMP-7의 효소 활성도는 유의하게 증가한 반면, MMP-3의 활성은 거의 동일하였다. 또한, MMP 억제제를 처리한 경우 MMP-7의 활성도는 현저하게 감소되었다. 따라서, 산 노출 후 E-cadherin이 절단되어 soluble E-cadherin이 증가되는 기전에 MMP-7이 관여할 것으로 추정된다.

[0117] 2.7 면역 세포 화학 분석을 이용한, 산 노출 후 인두 점막 세포의 E-cadherin의 발현 변화 관찰

[0118] 면역 세포 화학 분석을 위해 세포를 Cytoslides(Marienfeld-Superior, Lauda-Königshofen, Germany)에서 키운 다음 산 또는 산/MMP 억제제를 처리하였다. 면역 세포 화학 분석은 산 노출과 24시간 배양 후에 수행하였다. 세포를 4% glutaraldehyde에 30분 동안 고정시킨 후 염소 혈청(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)을 이용하여 1시간 동안 비특이적인 결합을 차단시켰다. 그 다음 세포를 E-cadherin(1:50, Santa Cruz)항체로 4 °C에서 밤새 항온 배양하였다. 다음날, 실온에서 60분 동안 토끼 2차 항체로 세포를 처리한 후 항원-항체 복합체인 아비딘-바이오틴 복합체 용액(Vectastain ABC Kit, Vector Laboratories)을 사용하여 발현을 증폭시켰다. Cytoslide는 DAB Substrate kit(Vector Laboratories)를 이용하여 발현 염색을 하였고, 세포의 핵은 mayer hematoxylin으로 염색한 후 Olympus BX51 현미경을 통해서 관찰하였다. 이미지는 Olympus DP72 및 DP2-BSW(Olympus) 프로그램을 이용하여 확인하였다.

[0119] 그 결과, 산을 처리한 경우(도 6A)에 비해, 산 및 MMP 억제제를 함께 처리한 경우, 세포-세포 결합 접합부의 E-cadherin의 발현 수준이 유지되는 것으로 나타났다(도 6C). 또한, 산을 5분 동안 노출한 경우에는, 세포 안에서 E-cadherin의 발현이 높았다. E-cadherin의 세포질 수준의 증가와 세포 간 부착 발현 수준의 차이는 E-cadherin의 세포 외 도메인의 절단을 의미한다.

[0121] 2.8 상피세포 투과도 분석

[0122] 인간 인두 상피세포를 0.4-μm 폴리 에스테르 필터(SPL) 12 well 플레이트에 1×10^5 cells/cm²의 밀도로 배양하였다. 100% 세포가 자랐을 때 상기 언급한 바와 같이 산 또는 산/MMP 억제제를 처리한 후 100uM 로다민 B 이소티오시아네이트(RITC)가 표지된 Dextran 70S(Sigma) 50ul를 플레이트 상부 챔버에 첨가하였다. 이후 3시간 동안 30분 간격으로 배양 구획으로부터 50ul의 배양액 샘플을 수집하여 excitation 파장 530 nm, emission 파장 590 nm(SOFTMAX PRO V5 software, Molecular Devices)에서 SpectraMax M2eplatereader(MolecularDevices)를 통해 분석하였다.

[0123] 상피세포의 투과도 시험을 한 결과, 산을 30초, 1분 또는 5분 처리하였을 때 시간이 길어질수록 투과도가 점차 증가하였다(도 6B). 반면, MMP 억제제를 처리한 경우에는 투과도가 감소함을 확인하였다(도 6D). 따라서, MMP에

의해 E-cadherin의 추가 분열을 차단함으로써 세포-세포 간 상호 작용을 가능하게 한다.

[0125] 2.9 조직 분석

[0126] 만성 편도선염에 대한 편도 절제술을 받은 총 10명의 지원자로부터 인두 점막을 채취하였다. 1) 쉰 목소리 또는 목소리에 문제가 있음, 2) 목구멍 청소, 3) 과도한 목구멍 또는 점안상 물방울, 4) 음식, 액체 또는 알약 삼키기 어려움, 5) 설사 증상, 6) 호흡 곤란 또는 질식, 7) 기침, 8) 목구멍에 무언가 있는 듯한 느낌, 9) 가슴 통증, 소화불량 또는 위산이 올라옴. 인후두 역류질환의 진단기준에 따르면, 환자들은 1) 역류 증상 지수(reflux symptom index, RSI)가 14 미만(n=5)인 환자, 2) RSI가 14 이상(n=5)인 환자의 두 그룹으로 분류가 된다. 적출된 점막을 E-cadherin과 MMP-7 항체로 면역 조직 화학 염색을 실시하여 평가하였고, 정량적으로 Image J 프로그램을 이용하여서 비교하였다. 고려대학교 안암병원의 기관 검토위원회(IRB No. ED15303)는 모든 프로토콜과 연구 설계를 승인했으며, 모든 환자의 서면 동의를 받았다.

[0127] 편도 절제술을 시행한 환자의 인후두 역류질환 진단 기준에 따라 두 그룹으로 분류되었다. 역류 증상 지수(RSI)가 14 이상인 군에서 E-cadherin의 발현(도 7B)이 RSI가 14 미만인 그룹의 E-cadherin의 발현(도 7A)보다 현저히 낮았으며, RSI 14 이상인 군의 인두 점막층에서 MMP-7의 발현(도 7D)은 RSI 14 미만인 그룹의 인두 점막층에서 MMP-7의 발현(도 7C)보다 현저하게 증가하였다.

[0129] 실시예 3: 인후두 역류질환 마우스 모델의 인후두 역류질환 발병 확인

[0130] 실험은 총 9주 동안 진행되었으며, 실시예 1의 마우스 그룹(A 및 B)로부터 5주와 9주차의 마우스 인두 조직을 적출하여 E-cadherin과 MMP-7의 발현을 비교한 결과, 일반 식수만을 공급한 그룹(Group A)에 비해 일반 식수와 산성 식수를 번갈아 공급한 그룹(Group B)에서 E-cadherin의 발현은 감소된 반면 MMP-7의 발현은 증가됨을 확인하였다(도 1C).

[0132] 실시예 4: 타액에서 MMP-7 발현 확인

[0133] 인후두 역류증 의심환자 증상 설문지(reflux symptom index)를 통해 13점 이상인 사람을 대상으로 하였다. 총 참가자는 15명이었다. 실험 참가자의 타액 자체에서 MMP-7 단백질의 발현 여부를 확인하고자 하루 8번씩(기상 후, 아침식전, 아침식후, 점심식전, 점심식후, 저녁식전, 저녁식후, 취침 전) 5일 동안 타액을 채취하였다. 채취 방법은 10ml의 증류수를 입안에서 30초동안 가글 후 튜브에 타액을 모았다. 이후에 BCA 단백질 정량 방법을 통하여 동일한 단백질 농도의 샘플을 특수 단백질 검출 방법인 Western blot 실험기법 및 MMP-7 효소활성도 기법을 통하여 확인하였다(도 8). 도 8에 나타난 것과 같이, MMP-7 단백질은 기상 후 타액에서 대략 5배정도의 활성도가 높다는 것을 확인하였다.

[0135] 실시예 5: RSI(Reflux Symptom Index)에 의한 타액의 MMP-7 단백질 발현 확인

[0136] 인후두 역류질환 의심 증상으로 설문하는 RSI(Reflux Symptom Index) 점수가 13점 이상인 참가자의 경우, 인후두 역류질환의 가능성이 높다고 진단한다. RSI 점수와 비례하여 타액의 발현 양 차이를 보기 위해서, 실험 참가자의 기상 후의 타액으로 3일동안 실시예 4와 같은 방법으로 채취하여 웨스턴 블랏과 MMP-7 효소활성도 실험 기법을 통하여 MMP-7 단백질 발현을 확인하였다(도 9).

[0137] 도 9에 나타난 것과 같이, RSI 점수가 13점 이상의 타액에서 반복적으로 단백질 발현량이 높아져있음을 확인하였다. 따라서 본 결과를 통해 타액의 MMP-7 단백질 발현을 확인하여 인후두 위산 역류 질환을 진단할 수 있음을 알 수 있다.

[0139] 실시예 6: 인후두 역류질환 치료제 복용 후의 타액의 MMP-7 단백질 발현 감소 확인

[0140] RSI 점수 13점 이상의 증상이 있는 환자를 대상으로 인후두 역류질환 치료제인 놀텍을 3주 동안 복용하게 하였다. 복용 중 1주에 한번씩 3주 동안 타액을 채취하여서 마찬가지로 웨스턴블랏과 MMP-7에 대한 효소활성도 실험을 통해 확인하였다(도 10). 도 10에 나타난 것과 같이, 치료제를 복용한 후의 E-cadherin과 MMP-7에 대한 단백

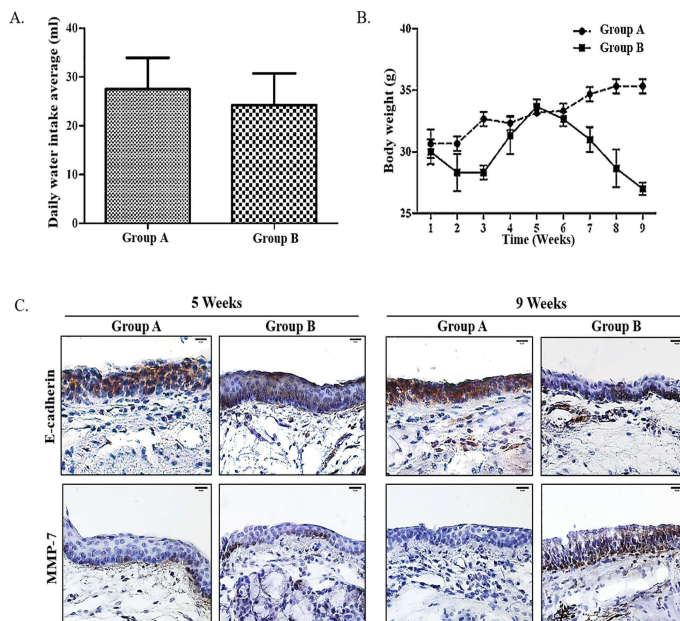
질 발현량이 복용한 주 수에 비례하여서 점차 감소함을 확인하였다.

[0141] 따라서 본 발명은 타액의 MMP-7 단백질은 인후두 위산 역류질환의 진단을 위한 바이오마커가 될 수 있음을 보여 준다.

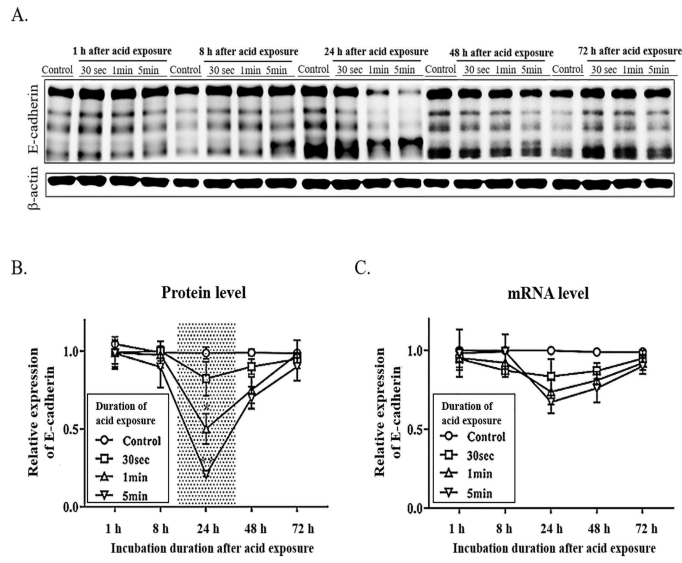
[0143] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

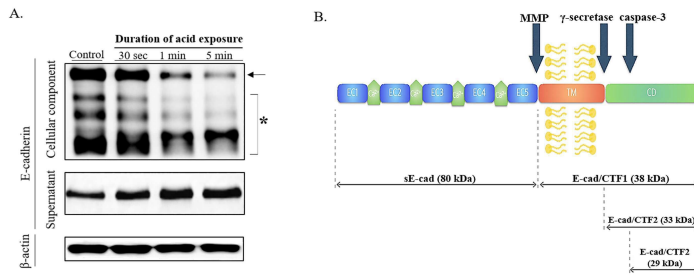
도면1



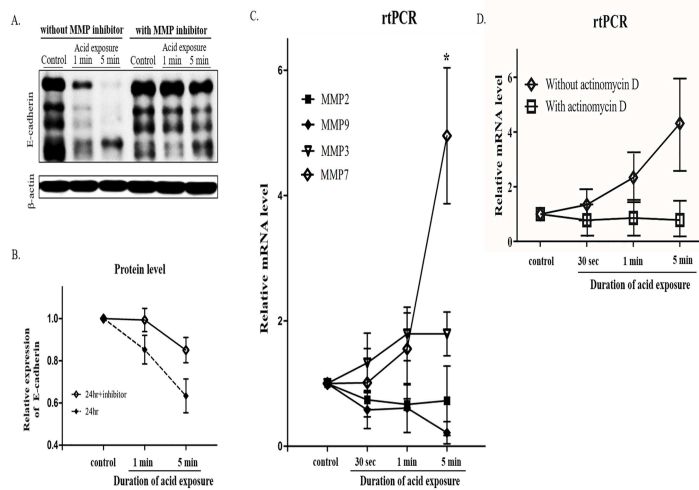
도면2



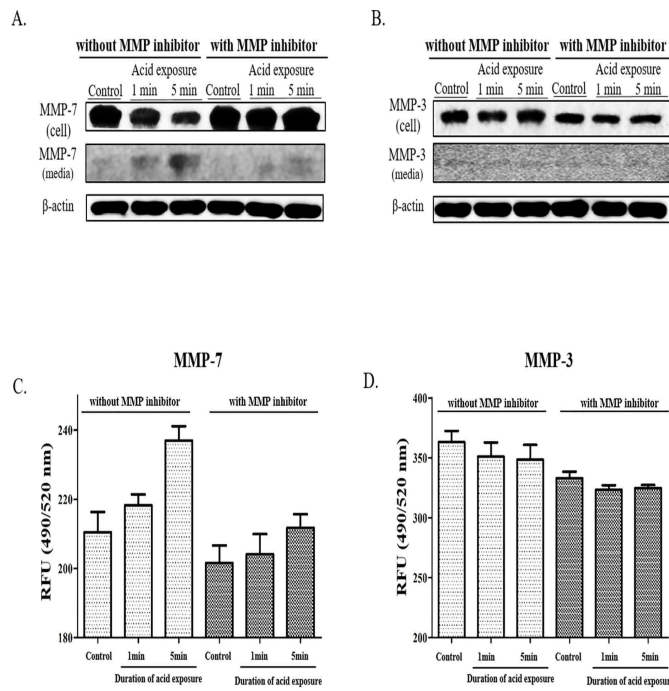
도면3



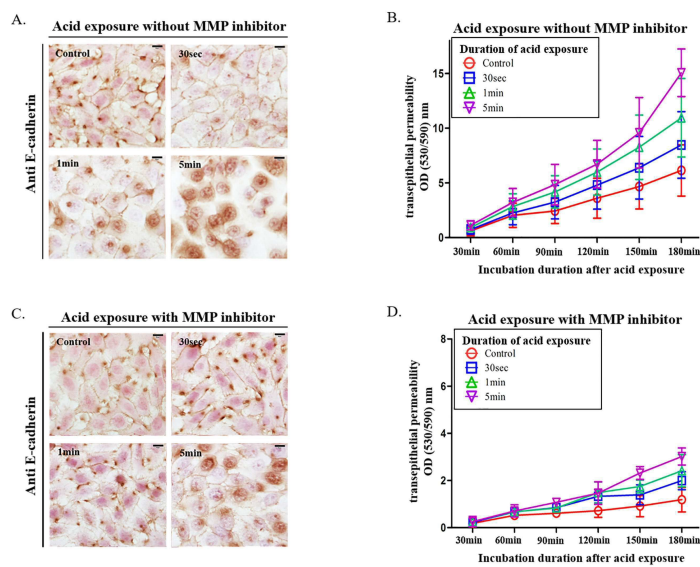
도면4



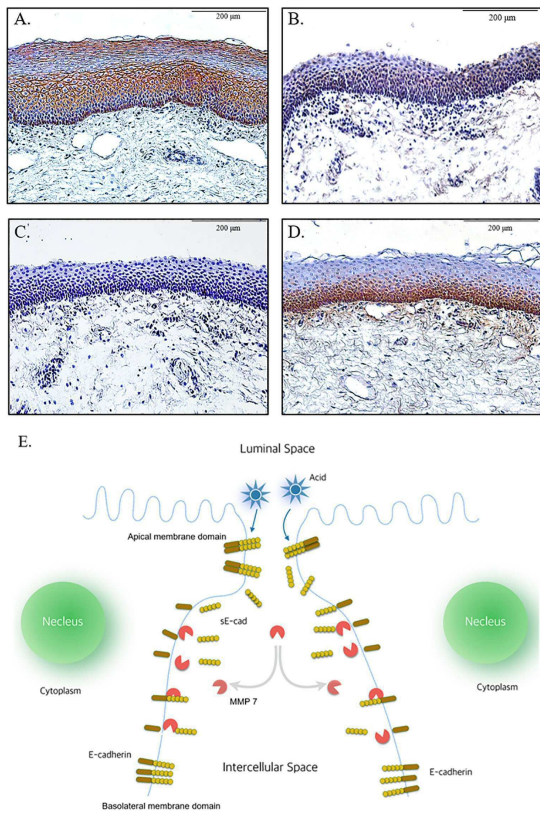
도면5



도면6

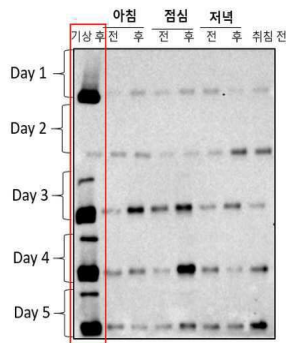


도면7

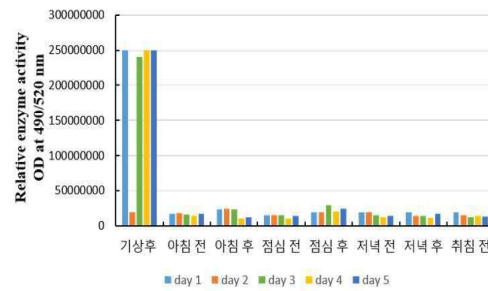


도면8

• E-cadherin의 발현

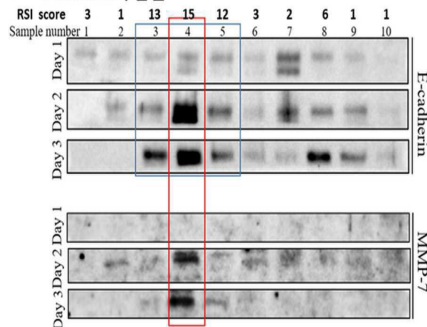


• MMP-7 enzyme activity 확인

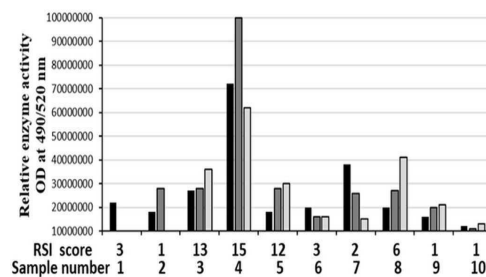


도면9

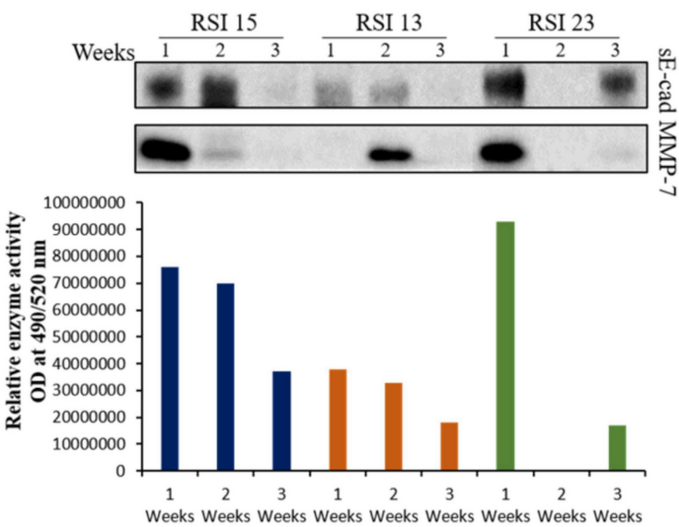
• E-cadherin의 발현



• MMP-7 enzyme activity 확인



도면10



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Mouse Model for Laryngopharyngeal Reflux Disease and Method for Preparing the Same
- <130> DHP18-227
- <160> 12
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> GAPDH forward primer
- <400> 1
- gagtcaacgg atttggtcgt 20
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> GAPDH reverse primer
- <400> 2
- ttgattttgg agggatctcg 20
- <210> 3

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMP-2 forward primer
 <400> 3
 tctcctgaca ttgaccttgg c 21
 <210> 4
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMP-2 reverse primer
 <400> 4
 caaggtgctg gctgagtaga tc 22
 <210> 5
 <211>
 > 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMP-3 forward primer
 <400> 5
 attccatgga gccaggettt c 21
 <210> 6
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMP-3 reverse primer
 <400> 6
 catttgggtc aaactccaac tgtg 24
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> MMP-7 forward primer
 <400> 7

tgagctacag	tggaacagg	20
<210>	8	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	MMP-7 reverse primer	
<400>	8	
tcacgaagt	gagcatctcc	20
<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	MMP-9 forward primer	
<400>	9	
ttgacagcga	caagaagtgg	20
<210>	10	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	MMP-9 reverse primer	
<400>	10	
gccattcacg	tccttat	17
<210>	11	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	E-cadherin forward primer	
<400>	11	
tgctcttgct	gtttcgg	17
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> E-cadherin reverse primer

<400> 12

tgccccattc gttcaagtag

20