

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0107786 (43) 공개일자 2014년09월05일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12Q 1/68 (2006.01) C12N 15/11 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)	(72) 발명자 손상옥 서울 종로구 이화장1길 29, (이화동) 박윤희 서울 성북구 종암로24가길 53, 102동 1901호 (종암동, SK아파트) 배현철 서울 성북구 보국문로22길 19, 402호 (정릉동, 지산빌라)
(21) 출원번호 10-2013-0021774 (22) 출원일자 2013년02월28일 심사청구일자 2013년02월28일	(74) 대리인 이처영, 장제환	

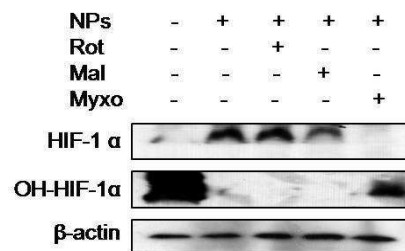
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 나노물질에 의한 피부 독성 진단용 바이오마커 및 이를 이용한 피부 독성 검출 방법

(57) 요약

본 발명은 HIF-1알파 유전자 및 VEGF 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 포함하는, 나노물질의 노출에 의해 발현 변화를 일으키는 것을 특징으로 하는 나노물질에 의해 유도된 피부 독성 유발 여부 진단용 바이오마커를 제공한다. 본 발명에 의하면 나노물질에 의한 피부 세포 독성을 간단하고 정확하게 검출할 수 있는 효과를 도모할 수 있다.

대표도 - 도3b



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012044085

부처명 한국연구재단

연구사업명 (이공)일반연구자-기본

연구과제명 나노물질의 피부독성에서 활성산소생성 기전 및 HIF-1 α 역할 연구

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

HIF-1알파 유전자 및 VEGF 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 포함하는, 나노물질의 노출에 의해 발현 변화를 일으키는 것을 특징으로 하는 나노물질에 의해 유도된 피부 독성 유발 여부 진단용 바이오마커.

청구항 2

제1항의 바이오마커로부터 선택된, 어느 하나 이상의 유전자의 핵산 서열의 전부; 또는 상기 유전자의 단편인 올리고뉴클레오타이드; 또는 그의 상보가닥 분자가 집적된, 나노물질에 의해 유도된 피부 독성 유발 여부 진단용 마이크로어레이 칩.

청구항 3

제2항의 마이크로어레이 칩을 포함하는, 나노물질에 의해 유도된 피부 독성 유발 여부 진단용 키트.

청구항 4

제1항의 바이오마커 유전자에 상보적이고 바이오마커 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍을 포함하는, 나노물질에 의해 유도된 피부독성 유발 여부 진단용 키트.

청구항 5

HIF-1알파 유전자 또는 VEGF 유전자에 의하여 코딩되는 폴리펩티드에 대한 모노클로날 항체를 하나 이상 포함하며, 진단 대상 피부 세포에서 상기 항체에 결합된 항원의 양을 측정하여, 피부 세포에서 상기 항체에 결합된 항원의 양과 비교하여, 나노물질에 의해 유도된 피부독성 유발 여부 진단용 키트.

청구항 6

나노물질에 대한 노출이 의심되는 개체(실험군) 및 대조군의 피부세포로부터 분리된 RNA 시료로부터

- 1) cDNA로 합성하면서 실험군과 대조군을 각기 다른 형광물질로 표지하는 단계;
- 2) 단계 1)의 각기 다른 형광물질로 표지된 cDNA를 제2항의 DNA 마이크로어레이 칩과 혼성화시키는 단계;
- 3) 단계 2)의 반응한 DNA 마이크로어레이 칩을 분석하는 단계; 및
- 4) 단계 3)의 분석한 데이터에서 상기 DNA 마이크로어레이 칩 상의 유전자의 발현 정도를 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 나노물질에 의해 유도된 피부독성 유발 여부를 확인하기 위해 제1항의 바이오마커를 검출하는 방법.

청구항 7

나노물질에 대한 노출이 의심되는 개체(실험군) 및 대조군의 피부세포로부터 분리된 RNA 시료로부터

- 1) 상기 RNA를 대상으로, 제1항의 바이오마커 유전자에 상보적이고 바이오마커 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍을 사용하여 실시간 RT-PCR(Real-time reverse transcript polymerase chain reaction)을 수행하는 단계; 및
- 2) 단계 1)의 유전자 산물의 양을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는, 나노물질에 의해 유도된 피부 독성 유발 여부를 확인하기 위해 제1항의 바이오마커를 검출하는 방법.

청구항 8

나노 물질에 의한 피부 독성 억제제 스크리닝 방법으로서,
세포에 시험 화합물을 처리하는 단계; 및

시험 화합물 처리 후 세포 내 제1항의 바이오마커를 검출하거나 대조군과 비교하여 상기 화합물이 상기 바이오마커 유전자의 발현을 조절하는 활성을 나타내는지 결정하는 단계를 포함하는 나노물질에 의한 피부 독성 억제제 스크리닝 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 나노물질에 의한 피부 독성 진단용 바이오마커 및 이를 이용한 피부 독성 검출 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게 본 발명은 나노물질에 의해 미토콘드리아 전자전달복합체 III를 통해 활성산소가 생성되고, 활성산소 증가에 따라 HIF-1알파 단백질이 안정화되고 HIF-1알파 타겟 유전자인 VEGF의 발현으로 이어지는 세포 신호전달 기전을 확인하고, 이를 이용한 나노물질에 의한 피부 독성 평가에 있어 나노물질에 의한 피부 독성 진단용 바이오마커 및 이를 이용한 피부 독성 검출 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 나노물질은 크기가 100 nm 미만의 물질로서, 이와 같은 작은 크기로 인해 동일 질량의 벌크 물질에 비하여 표면적이 기하급수적으로 커짐으로써 새로운 물리화학적 특성을 가질 수 있다.

[0003] 나노물질은 항균제, 정화용 필터, 복합섬유, 나노 화장품, 의약품 등 생활 전반에 걸쳐 사용되면서, 나노물질이 미치는 인체 위해성 우려가 급증하고 있다. 제조나노물질은 피부를 통하여 세포에 흡수·축적되어 노출 세포의 염증반응을 유발하거나, 나노물질이 호흡기 흡수 후 신경계로 이동 또는, 혈관벽을 통과하는 등의 연구사례가 발표되고 있다. 나노물질의 세포내 전달, 생체 내 유입에 따라 활성산소를 생성함으로써 세포내 산화적 스트레스를 촉진하여 세포내 신호전달기전이 일어나는 것으로 생각되어 지고 있으나 그 정확한 작용 기전은 알려지지 않았다.

[0004] HIF-1은 저산소 상태에서 외부의 산소 농도의 변화에 적절하게 반응하기 위해 해당과정, 혈관신생 등을 유도하는 전사인자이다. 그 중 HIF-1알파는 저산소 상태 또는 유전적 결함에 의한 피부각질세포 내 HIF-1알파 발현 증가 및 활성 증가는 HIF-1알파 의존적 신호전달 체계를 활성화 시킴으로써 피부각질 세포의 증식을 유도하고 피부표피 주변의 혈관 생성을 촉진함으로써 건선과 같은 피부질환을 촉진하는 것으로 알려져 있다.

[0005] HIF-1알파는 정상 산소 분압상태에선 PHD에 의해 HIF-1알파가 수산화되어 VHL과 결합하여 프로테오솜에 의해 분해된다. 저산소 분압상태 또는 유전적 결함에 의해 PHD가 불활성화되면 HIF-1알파는 HIF-1베타와 heterodimer를 이루어 핵으로 이동하여 다양한 표적 유전자들의 전사를 활성화시킨다. PHD의 활성화에는 산소, 2-oxoglutarate, 철 2가 이온이 필요하다. 세포내 호흡과정에서 만들어진 활성산소는 PHD의 활성 유지에 필요한 철 2가 이온을 3가 이온으로 만듦으로써 PHD의 불활성화를 유도하여 HIF-1알파의 프로테오솜 분해를 저해하게 됨으로써 결과적으로 세포내 HIF-1알파 단백질이 축적되게 된다.

[0006] 임상학적으로 HIF-1알파의 발현은 종양세포의 악성화 및 종양세포의 전이를 촉진하는 주요한 인자로 알려져 있으나 최근 건선을 비롯한 피부질환에서 HIF-1알파의 발현이 증가되어져 있음이 보고되었다. 하지만, 나노물질에 의한 HIF-1알파의 발현 증가와 그 관련 기전은 아직 규명되어 있지 않다.

[0007] HIF-1알파 의존적으로 발현하는 염증성 사이토카인으로 알려진 VEGF의 증가가 마우스에서 피부각질층의 비대화 및 면역세포의 침투, 염증반응 등 건선 등 피부질환에서 나타나는 조직학적 변화와 유사한 모습을 보이는 것으로 나타났다.

[0008] 발명의 배경이 되는 기술로, 대한민국 공개특허 제10-2012-0081936호(2012.07.20)에 Hif1a의 발현을 저해하는 siRNA 및 이를 포함하는 항암 조성물에 대해 기재되어 있고, 대한민국 등록특허 제10-0999261(2010.12.07)에는 여성호르몬 결핍으로 초래되는 여성 피부의 노화 억제제 스크리닝 방법에 대해 기재되어 있다. 그러나, 나노물질에 의한 HIF-1알파의 발현 증가와 그 관련 기전에 대해서는 알려지지 않았다.

[0009] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문

현의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2012-0081936호(2012.07.20)
(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-0999261(2010.12.07)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 상기 종래기술의 문제점 및 요구를 해결하기 위해 안출된 것으로, 본 발명자들은 나노물질이 마이토콘드리아 전자전달복합체 III를 통하여 활성산소를 생성하고 HIF-1알파와 단백질을 안정화하고 그에 따른 염증성 사이토카인인 VEGF의 발현의 신호전달기전을 거쳐서 피부각질세포에 영향을 줄 수 있음을 확인하였다. 이를 통하여 나노물질에 의한 피부독성을 평가하는 바이오마커를 제공하기 위하여 본 발명을 진행하였다.
- [0012] 따라서, 본 발명은 나노물질이 HIF-1알파와 신호전달 기전을 통해 염증성 피부질환을 유도할 때, 중간 신호전달 경로에서 중요한 역할을 하는 활성산소 생성 및 HIF-1알파로부터 유래된 유전자를 표적으로 하여 스크리닝함으로써 나노물질에 의한 피부 세포 독성을 간단하고 정확하게 검색할 수 있는 진단용 바이오마커 및 시스템을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적은 상기 마커를 이용한 나노물질에 의한 피부 독성 검출 방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 나노물질에 의한 피부 독성 억제제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 더욱 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명의 일 양태에 의하면, 본 발명은 HIF-1알파 유전자 및 VEGF 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 포함하는, 나노물질의 노출에 의해 발현 변화를 일으키는 것을 특징으로 하는 나노물질에 의해 유도된 피부 독성 유발 여부 진단용 바이오마커를 제공한다.
- [0017] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 바이오마커로부터 선택된, 어느 하나 이상의 유전자의 핵산 서열의 전부; 또는 상기 유전자의 단편인 올리고뉴클레오타이드; 또는 그의 상보가닥 분자가 집적된, 나노물질에 의해 유도된 피부 독성 유발 여부 진단용 마이크로어레이 칩을 제공한다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 마이크로어레이 칩을 포함하는, 나노물질에 의해 유도된 피부 독성 유발 여부 진단용 키트를 제공한다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 상기 바이오마커 유전자에 상보적이고 바이오마커 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍을 포함하는, 나노물질에 의해 유도된 피부독성 유발 여부 진단용 키트를 제공한다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 HIF-1알파 유전자 또는 VEGF 유전자에 의하여 코딩되는 폴리펩티드에 대한 모노클로날 항체를 하나 이상 포함하며, 진단 대상 피부 세포에서 상기 항체에 결합된 항원의 양을 측정하여, 피부 세포에서 상기 항체에 결합된 항원의 양과 비교하여, 나노물질에 의해 유도된 피부독성 유발 여부 진단용 키트를 제공한다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 나노물질에 대한 노출이 의심되는 개체(실험군) 및 대조군의 피부 세포로부터 분리된 RNA 시료로부터 1) cDNA로 합성하면서 실험군과 대조군을 각기 다른 형광물질로 표시하는 단계; 2) 단계 1)의 각기 다른 형광물질로 표시된 cDNA를 상기 DNA 마이크로어레이 칩과 혼성화시키는 단계; 3)

단계 2)의 반응한 DNA 마이크로어레이 칩을 분석하는 단계; 및 4) 단계 3)의 분석한 데이터에서 상기 DNA 마이크로어레이 칩 상의 유전자의 발현 정도를 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 나노물질에 의해 유도된 피부독성 유발 여부를 확인하기 위해 상기 바이오마커를 검출하는 방법을 제공한다.

[0022] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 나노물질에 대한 노출이 의심되는 개체(실험군) 및 대조군의 피부 세포로부터 분리된 RNA 시료로부터 1) 상기 RNA를 대상으로, 제1항의 바이오마커 유전자에 상보적이고 바이오마커 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍을 사용하여 실시간 RT-PCR(Real-time reverse transcript polymerase chain reaction)을 수행하는 단계; 및 2) 단계 1)의 유전자 산물의 양을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는, 나노물질에 의해 유도된 피부 독성 유발 여부를 확인하기 위해 상기 바이오마커를 검출하는 방법을 제공한다.

[0023] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 나노 물질에 의한 피부 독성 억제제 스크리닝 방법으로서, 세포에 시험 화합물을 처리하는 단계; 및 시험 화합물 처리 후 세포 내 상기 바이오마커를 검출하여 대조군과 비교하여 상기 화합물이 상기 바이오마커 유전자의 발현을 조절하는 활성을 나타내는지를 결정하는 단계를 포함하는 나노 물질에 의한 피부 독성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0024] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0025] 본 발명은 HIF-1알파 유전자 및 VEGF 유전자로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 유전자를 포함하는, 나노물질의 노출에 의해 발현 변화를 일으키는 것을 특징으로 하는 나노물질에 의해 유도된 피부 독성 유발 여부 진단용 바이오마커를 제공한다.

[0026] 본 발명에서, 진단 또는 검출은 본 발명의 목적상, 개체에 나노물질에 의한 피부 독성이 있는지 여부를 확인하는 것이다.

[0027] 본 발명에서 진단용 바이오마커, 검출용 바이오마커, 진단하기 위한 바이오마커, 검출하기 위한 바이오마커 또는 진단바이오마커, 검출바이오마커란 '나노물질에 의한 피부 독성이 있는 세포'를 '피부 독성이 없는 세포'와 구분할 수 있는 물질로, 나노물질에 의한 피부 독성을 나타내는 세포에서 증가양상을 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예: mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다. 본 발명의 목적상, 나노물질 검출 마커는 HIF-1알파 유전자 또는 HIF-1알파에 의해 활성화되는 VEGF 유전자로, 나노물질 존재시 발현이 증가하는 유전자들이다. 상기 유전자는 유전자 등록번호(Genebank) NM_001530(HIF-1알파) 및 유전자 등록번호(Genebank)_AB209485(VEGF)일 수 있다.

[0028] 본 발명에 있어, 상기 피부 독성은 피부 염증을 포함하는 피부 각질 세포의 이상 증식, 건선과 같은 피부 질환을 모두 포함하는 것으로 이해된다.

[0029] 본 발명에서, 나노물질은 나노 스케일인 재료의 총칭으로 3차원적으로 볼 때 적어도 한 변의 길이가 100나노미터 이하 크기의 물질을 의미한다. 구체적으로, ZnO, TiO₂, Gold nanoparticle, Silver nanoparticle, Quantum Dots, Polystyrene, nano silica 등 일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0030] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커 유전자와 반응하는 하나 이상의 물질 및 반응 생성물 검출용 시약을 포함하는 나노물질에 의한 피부 독성 진단을 위한 키트 및 진단방법을 제공한다.

[0031] 보다 구체적으로, 본 발명에 의한 진단용 키트 또는 나노물질에 의한 피부 독성 진단 마커를 검출하는 방법은 상기 바이오마커 유전자, 그의 단편 또는 그의 상보적인 서열과 대상체로부터 얻은 시료 간의 반응을 확인하여 이를 진단하는 원리를 이용한다. 상기 HIF-1α 유전자 등과 대상체로부터 얻은 시료 간의 반응의 확인은 DNA-DNA, DNA-RNA, DNA-단백질 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들, 예컨대 DNA 칩, 단백질 칩, 중합효소 연쇄반응(PCR), 노던 블롯팅, 서던 블롯팅, ELISA(Enzyme Linked Immunosorbent assay), 효모 이중 혼성법(yeast two-hybrid), 2-D 겔 분석 및 시험관 내 결합 에세이(in vitro binding assay) 등을 이용할 수 있다. 즉 상기 유전자의 전부 또는 일부를 프로브로 사용하여 대상자의 체액으로부터 분리한 핵산과 하이브리드화한 후 당 분야에 공지된 다양한 방법, 예컨대 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction), 썬더블로팅(Southern blotting), 노던 블롯팅(Northern blotting) 등으로 이를 검출함으로써 대상자에서 상기 유전자가 고발현된 상태인지 또는 저발현된 상태인지 조사하면 나노물질에 의해 유도된 피부독

성의 발생 여부를 판단할 수 있다.

- [0032] 보다 구체적으로 본 발명은 상기 바이오마커로부터 선택된, 어느 하나 이상의 유전자의 핵산 서열의 전부; 또는 상기 유전자의 단편인 올리고뉴클레오타이드; 또는 그의 상보가닥 분자가 집적된, 나노물질에 의해 유도된 피부 독성 유발 여부 진단용 마이크로어레이 칩을 제공한다.
- [0033] 상기 올리고뉴클레오타이드 또는 이의 상보가닥 분자는 상기 바이오마커 유전자의 15 내지 50개, 바람직하게는 15 내지 30개, 더욱 바람직하게는 18 내지 25개의 핵산을 포함한다.
- [0034] 또한, 본 발명은 상기 마이크로어레이 칩을 포함하는, 나노물질에 의해 유도된 피부 독성 유발 여부 진단용 키트를 제공한다.
- [0035] 상기 키트에 추가적으로 인간 피부각질 세포를 포함하는 세포에서 나노물질에 의해 유도된 피부 독성 유발 여부 진단용 키트를 제공한다.
- [0036] 또한, 상기 키트에 추가적으로 형광물질을 포함할 수 있으며, 상기 형광물질은 스트렙아비딘-알칼리 탈인화효소 접합물질(streptavidin-like phosphatase conjugate), 화학형광물질(chemifluorescence) 및 화학발광물질(chemiluminescent)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 아울러, 상기 키트에 추가적으로 반응 시약을 포함할 수 있으며, 상기 반응 시약은 혼성화에 사용되는 완충용액, RNA로부터 cDNA를 합성하기 위한 역전사효소, cNTPs 및 rNTP(사전 혼합형 또는 분리 공급형), 형광염색제의 화학적 유도제와 같은 표식시약, 세척 완충용액 등으로 구성될 수 있으나 이에 한정된 것은 아니며, 당업자에게 알려진 DNA 마이크로어레이 칩의 혼성화 반응에 필요한 반응 시약은 모두 포함할 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커 유전자에 상보적이고 바이오마커 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍을 포함하는, 나노물질에 의해 유도된 피부독성 유발 여부 진단용 키트를 제공한다.
- [0038] 상기 프라이머 쌍은 바이오마커 유전자의 증폭 산물이 100 내지 300 bp가 되도록 설계된 15 내지 50머 길이의 정방향 및 역방향 프라이머 쌍은 모두 사용 가능하다. 또한, 상기 키트에 추가적으로 인간 피부각질 세포를 포함하는 나노물질에 의해 유도된 피부 독성 유발 여부 진단용 키트를 제공한다.
- [0039] 아울러, 상기 키트에 추가적으로 반응 시약을 포함할 수 있으며, 상기 반응 시약은 RNA로부터 cDNA를 합성하기 위한 역전사효소, cNTPs 및 rNTP(사전 혼합형 또는 분리 공급형), 형광 염색제의 화학적 유도제와 같은 표식시약, 세척 완충용액 등으로 구성될 수 있으나 이에 한정된 것은 아니며, 당업자에게 알려진 RT-PCR 반응에 필요한 반응 시약은 모두 포함할 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명은 HIF-1알파 유전자 또는 VEGF 유전자에 의하여 코딩되는 폴리펩티드에 대한 모노클로날 항체를 하나 이상 포함하며, 진단 대상 피부 세포에서 상기 항체에 결합된 항원의 양을 측정하여, 피부 세포에서 상기 항체에 결합된 항원의 양과 비교하여, 나노물질에 의해 유도된 피부독성 유발 여부 진단용 키트를 제공한다.
- [0041] 바람직하게는, 상기 나노물질 마커에 대한 하나 이상의 항체를 이용한 웨스턴 블랏을 이용할 수 있다. 시료에서 전체 단백질을 분리하고, 이를 전기영동하여 단백질을 크기에 따라 분리한 다음, 니트로셀룰로즈 막으로 이동시켜 항체와 반응시킨다. 생성된 항원-항체 복합체의 양을 표지된 항체를 이용하여 확인하는 방법으로 유전자의 발현에 의해 생성된 단백질의 양을 확인하여, 피부 독성을 확인할 수 있다.
- [0042] 또한, 본 발명은 상기 바이오마커를 이용한 피부독성 유발 여부 진단 방법을 제공한다. 본 발명은 나노물질에 대한 노출이 의심되는 개체(실험군) 및 대조군의 피부 세포로부터 분리된 RNA 시료로부터 1) cDNA로 합성하면서 실험군과 대조군을 각기 다른 형광물질로 표지하는 단계; 2) 단계 1)의 각기 다른 형광물질로 표지된 cDNA를 상기 DNA 마이크로어레이 칩과 혼성화시키는 단계; 3) 단계 2)의 반응한 DNA 마이크로어레이 칩을 분석하는 단계; 및 4) 단계 3)의 분석한 데이터에서 상기 DNA 마이크로어레이 칩 상의 유전자의 발현 정도를 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 나노물질에 의해 유도된 피부독성 유발 여부를 확인하기 위해 상기 바이오마커를 검출하는 방법을 제공한다.

- [0043] 상기 피부세포는 각질 세포를 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 이때, 대조군은 건강한 개체이다.
- [0044] 또한, 단계 2)의 형광물질은 Cy3, Cy5, FITC(poly L-lysine-fluorescein isothiocyanate), RITC(rhodamine-B-isothiocyanate) 및 로다민(rhodamine)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에게 알려진 형광물질은 모두 사용 가능하다. 또한, 단계 2)의 혼성화는 40 내지 50℃에서 10 내지 20시간 동안 수행하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 또한, 단계 2)의 DNA 마이크로어레이 칩은 인간 게놈 중 본 발명에서 상기 과발현 유전자가 탑재된 마이크로어레이 칩이라면 사용가능하고, 상기 본 발명자가 제작한 DNA 마이크로어레이 칩을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0046] 아울러, 단계 3)의 분석은 혼성화된 마이크로어레이 칩을 세척 및 염색한 후 스캔하여 이미지 프로세싱을 수행한 다음 통계적 분석을 수행하는 것이 바람직하다. 상기 염색 및 세척은 uidics Station 450을 이용하고, 스캔은 GeneChip scanner 3000을 이용하며, 이미지 프로세싱은 Affymetrix GeneChip Operating System(GCOS)을 이용하며, 모든 절차는 Affymetrix사의 프로토콜에 따라 수행하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 통계학적 분석은 GenPlex software version 2.3을 이용하여 수행하는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니며, 당업자에게 알려진 분석 소프트웨어를 사용하여도 무방하다.
- [0047] 본 발명의 또 다른 양태에 의하면, 본 발명은 나노물질에 대한 노출이 의심되는 개체(실험군) 및 대조군의 피부 세포로부터 분리된 RNA 시료로부터 1) 상기 RNA를 대상으로, 상기 바이오마커 유전자에 상보적이고 바이오마커 유전자를 증폭할 수 있는 프라이머 쌍을 사용하여 실시간 RT-PCR(Real-time reverse transcript polymerase chain reaction)을 수행하는 단계; 및 2) 단계 1)의 유전자 산물의 양을 대조군과 비교하는 단계를 포함하는, 나노물질에 의해 유도된 피부 독성 유발 여부를 확인하기 위해 상기 바이오마커를 검출하는 방법을 제공한다.
- [0048] 또한, 본 발명은 나노 물질에 의한 피부 독성 억제제 스크리닝 방법으로서, 세포에 시험 화합물을 처리하는 단계; 및 시험 화합물 처리 후 세포 내 상기 바이오마커를 검출하여 대조군과 비교하여 상기 화합물이 상기 바이오마커 유전자의 발현을 조절하는 활성을 나타내는지 결정하는 단계를 포함하는 나노물질에 의한 피부 독성 억제제 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0049] 상기 스크리닝 방법에서 상기 시험 화합물이 상기 바이오마커 유전자의 발현 또는 단백질 활성을 억제 혹은 증가하는 활성을 나타내는지 결정하는 단계에서 RNA-RNA, DNA-DNA, DNA-RNA, RNA-단백질, RNA-화합물, DNA-단백질, DNA-화합물, 단백질-단백질 또는 단백질-화합물 간의 반응 여부를 확인하는데 사용되는 통상적인 방법들을 사용할 수 있다.
- [0050] 상기 바이오마커의 유전자에 의해 코딩된 단백질 작용을 촉진 또는 억제하는지를 확인하여 피부독성 억제제 후보 화합물의 효능을 스크리닝할 수 있다.

발명의 효과

- [0051] 상술한 본 발명에 의하면, 나노물질에 의한 피부 세포 독성을 간단하고 정확하게 검출할 수 있는 효과를 도모할 수 있다.
- [0052] 또한, 나노물질에 의한 피부 독성 억제제를 용이하고 정확하게 스크리닝할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0053] 도 1a ~ 도 1c는 미토콘드리아 전자전달복합체의 I, II, III의 저해제(rotenone, malonate, myxothiazol)와 NAPH oxidase의 저해제인 DPI를 나노물질과 같이 노출 시킨 후 활성산소 생성능 및 mitochondria membrane potential($\Delta \Psi_m$)변화를 측정한 결과를 나타낸 도면이다.
- 도 2a 및 도 2b는 나노물질에 의한 활성산소 증가 유도가 HIF-1알파에 발현에 영향을 주는 지 확인하기 위하여 PCR과 Western blotting을 시행한 결과를 나타내는 도면이다.
- 도 3a 및 도 3b는 나노 물질과 미토콘드리아 전자전달복합체 저해제에 혼합 노출 후 HIF-1알파의 단백질 수준

에서의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 나노물질에 의해 유도된 VEGF 발현을 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 3차원 인공피부 모델에서 나노물질에 의해 증가된 HIF-1알파의 발현 변화 확인한 결과를 나타낸 사진이다.

도 6은 마우스 모델에서 나노물질에 의해 증가된 HIF-1알파의 발현 변화 확인한 결과를 나타낸 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0055] 실시예 1. 나노 물질과 미토콘드리아 전자전달복합체 저해제에 혼합 노출 후 활성산소 생성의 변화 확인

[0056] 나노물질에 의한 활성산소 생성 기전을 확인하기 위하여 다양한 세포내 활성산소 생성 매개 단백질들의 화학적 저해제를 사용해 활성산소 생성능을 평가하였다. 다른 참고 문헌에 따르면 세포내 활성산소의 생성은 미토콘드리아내 전자전달체 및 세포질 내 NADPH oxidase에 의해 매개된다고 한다. 따라서 미토콘드리아 전자전달 복합체의 I, II, III의 저해제(rotenone, malonate, myxothiazol)와 NADPH oxidase의 저해제인 DPI를 나노물질과 같이 노출 시킨 후 활성산소 생성능 및 mitochondria membrane potential($\Delta \Psi_m$)변화를 측정하였다.

[0057] 그 결과, 도 1a, 1b, 및 1c에 나타난 바와 같이, 미토콘드리아 전자전달복합체 III의 저해제인 myxothiazol를 처리한 실험군에서 활성산소의 생성능 및 mitochondria membrane potential($\Delta \Psi_m$)의 변화가 현저히 줄어드는 것을 확인하였다.

[0058] 실시예 2. 나노 물질에 의한 HIF-1알파의 단백질 수준에서의 변화 확인

[0059] 나노물질에 의한 활성산소 증가 유도가 HIF-1알파에 발현에 영향을 주는 지 확인하기 위하여 PCR과 Western blotting을 시행하였다.

[0060] 그 결과, 도 2a, 및 2b에 나타난 바와 같이, 전사조절단계에서는 차이를 보이지 않았으며 단백질 수준에서 농도, 시간 의존적으로 증가하는 양상을 보인다. 이는 나노물질에 의해 증가되는 활성산소가 HIF-1알파의 전사 조절단계에서는 영향을 미치지 않고 단백질단계의 안정화 조절기전에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

[0061] 실시예 3. 나노 물질과 미토콘드리아 전자전달복합체 저해제에 혼합 노출 후 HIF-1알파의 단백질 수준에서의 변화 확인

[0062] 나노물질에 유도된 ROS생성이 세포독성 유도에 직접적인 영향을 미치는 것인지 확인하기 위하여 대표적 항산화제인 NAC과 Vit C를 처리한 후, HIF-1알파 단백질의 안정화 정도를 평가하였다.

[0063] 그 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이, 나노물질과 항산화제 NAC 또는 Vit C를 병용 처리한 실험군에서는 나노물질만 단독 처리한 실험군에 비해 HIF-1알파 단백질의 양이 줄어드는 것을 확인하였다. 또한, 나노물질을 처리하였을 때 HIF-1알파 단백질이 축적되어 수산화된 HIF-1알파 (OH-HIF-1알파)단백질이 줄어들지만, NAC을 병용 처리하였을 때는 HIF-1알파 단백질이 분해되어 수산화된 HIF-1알파 단백질이 축적되는 것을 확인하였다. 그리고 나노물질 처리에 따른 PHD 1, 2의 단백질양의 변화는 차이가 없었으며, PHD의 활성여부에 따라서 HIF-1알파 단백질이 안정화를 조절하는 것으로 사료된다.

[0064] 나노물질의 미토콘드리아 전자전달체 복합체 III에서 활성산소 생성 기전과 HIF-1알파 단백질의 양적 증가와의 직접적인 연관성을 확인하기 위하여, 미토콘드리아 전자전달복합체의 I, II, III의 저해제 (rotenone, malonate, myxothiazol) 와 나노물질을 같이 노출시킨 후 HIF-1알파 단백질 수준에서의 변화를 확인하였다.

[0065] 그 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이, 미토콘드리아 전자전달복합체 III의 저해제인 myxothiazol를 처리한 실험군에서 HIF-1알파 단백질의 양이 현저히 줄어드는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 나노물질에 의해 증가된

활성산소는 PDH에 활성 유지에 필요한 Fe 2가 이온을 3가 이온으로 만듦으로써 PDH의 불활성화를 유도하는 것이라 할 수 있다.

[0066] 이를 검증하기 위하여 나노물질과 과량의 Fe^{2+} 를 공급하기 위해 FeCl_2 를 병행 처리하여, 나노물질에 의한 활성산소 생성이 Fe^{2+} 에 의한 PHD의 활성 조절에 의한 것인지를 평가하였다.

[0067] 그 결과, 도 3c에 나타난 바와 같이 나노물질과 FeCl_2 를 병행 처리하였을 때 PHD가 활성화되어 HIF-1알파를 수산화시켜 HIF-1알파 단백질이 분해되는 것을 확인하였다. PDH의 불활성화는 HIF-1알파의 수산화를 감소시킴으로써 결과적으로는 HIF-1알파의 프로테오좀 분해가 저해되어 세포내 HIF-1알파 단백질이 축적되는 것이라 할 수 있다.

[0068] 이상의 결과들을 종합하면, 나노물질 노출은 미토콘드리아 전자전달복합체 III의 이상을 야기하여 활성산소 생성을 유도하며 이러한 활성산소의 증가는 미토콘드리아 막전위를 교란함으로써 세포독성을 유도할 뿐만 아니라 HIF-1알파의 단백질 분해를 조절하는 분자들의 불활성화를 초래함으로써 세포 내 HIF-1알파의 과발현을 유도하는 것이라고 할 수 있다.

[0069] 실시예 4. 나노물질에 의해 유도된 VEGF 발현 확인

[0070] HIF-1알파 의존적으로 발현하는 대표적 분자들인 VEGF의 발현을 살펴봄으로써, HIF-1알파가 전사인자(transcription factor)로써 HIF-1알파 의존적 유전자들을 활성화시키는 것을 검증하였다. HIF-1알파의 대표적 표적분자인 VEGF는 이미 다른 문헌들을 통해 피부건선환자에서도 많이 증가하여져 있고 피부염증성 질환 유발과 연관되어져 있음이 보고되어져 있으나 나노물질에 의한 그 증가기전은 알려진 것이 없다. 따라서 나노물질에 의해 유도된 HIF-1알파의 증가가 피부각질세포에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다. 그리고 나노물질에 의한 VEGF의 증가가 HIF-1알파 의존적인지를 확인하기 위하여 나노물질을 처리 후 HIF-1알파 특이적 siRNA를 형질도입하여 나노물질에 의해 유도된 HIF-1알파 의존적 분자들에 대한 발현을 평가하였다.

[0071] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 나노물질을 처리하였을 때 VEGF가 많이 발현함을 확인하였으며, 나노물질에 의한 VEGF의 발현증가가 나노물질에 의해 유도된 활성산소의 증가와 HIF-1알파의 영향인지를 평가하기 위하여 나노물질과 항산화제인 NAC와 미토콘드리아 전자전달복합체 저해제(Rotenone, Malonate, Myxothiazol), siHIF-1알파들을 병행처리하여 평가하였다. 도 4에 나타난 바와 같이 나노물질을 단독처리한 실험군과 비교하여 myxothiazol, NAC, siHIF-1알파를 병행 처리한 실험군에서 VEGF 발현양이 감소함을 확인하였다. 따라서 나노물질에 의해 증가되는 VEGF의 발현이 나노물질에 의해 유도된 활성산소와 HIF-1알파의 영향때문인 것이라 할 수 있다.

[0072] 실시예 5. 3차원 인공피부 모델에서 나노물질에 의해 증가된 HIF-1알파의 발현 변화 확인

[0073] 3차원 인공피부 모델은 인체 유래 피부 각질세포로 이루어진 인체 피부와 가장 유사한 다층 구조(기저층, 유극층, 과립층, 각화층)의 표피 분화 유형을 보이는 배양 시스템으로써, 본 실험에서는 이미 여러 피부 독성 실험과 관련한 문헌 보고에서 그 가치를 입증 받은 모델중 하나인 EpiDerm[®](MaTek Co., MA)에 나노물질을 처리하여 HIF-1알파의 발현 변화를 관찰하였다.

[0074] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 나노물질을 처리한 실험군에서 HIF-1알파의 발현양이 증가함을 확인하였다.

[0075] 실시예 6. 마우스 모델에서 나노물질에 의해 증가된 HIF-1알파의 발현 변화 확인

[0076] 피부 임상학적 관찰을 위해 피부조직의 변화의 확인이 용이한 hairless 마우스에 나노물질을 intradermal injection한 후 약 2주 후 조직학적 염색을 통해 그 변화를 확인하였다.

[0077] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 나노물질을 주입한 생쥐에서 epidermis의 비대화 및 면역세포의 유입이 관찰되었으며 이러한 현상은 건선과 같은 피부질환에서 일어나는 현상과 비슷한 것으로 사료된다. 그리고 HIF-1알

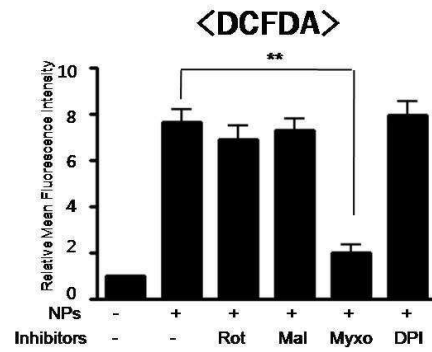
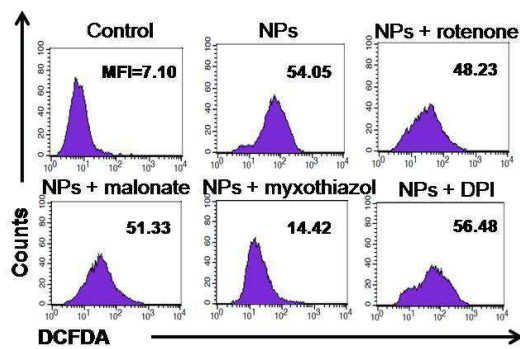
파와 VEGF를 염색하였을 때 나노물질을 처리한 실험군에서 HIF-1알파와 VEGF의 양이 많이 발현하는 것을 확인하였다.

[0078]

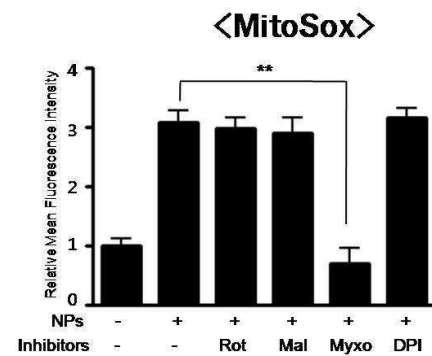
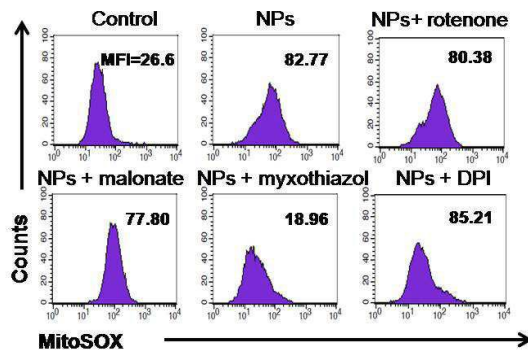
이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였으나, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현의 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 균등물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

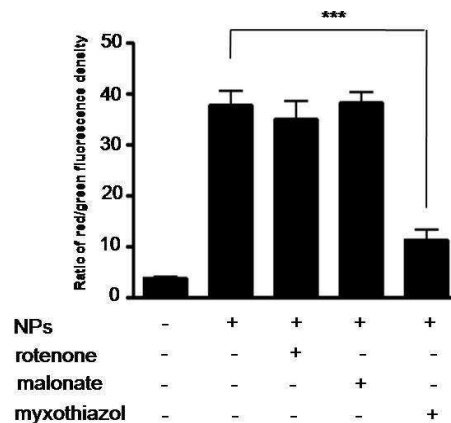
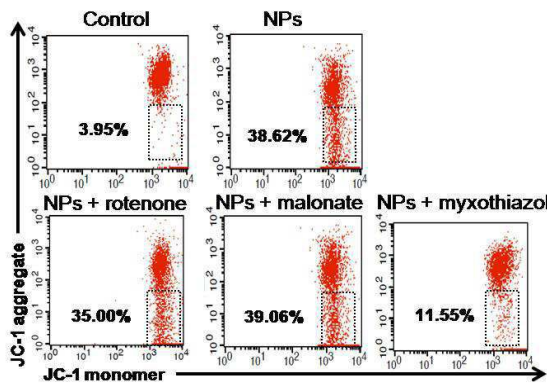
도면1a



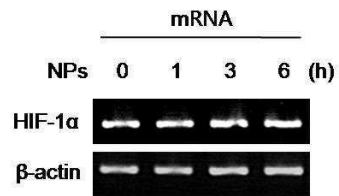
도면1b



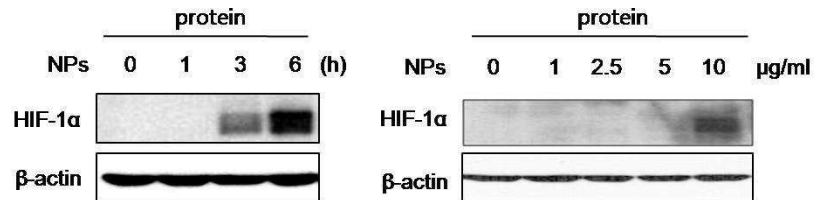
도면1c



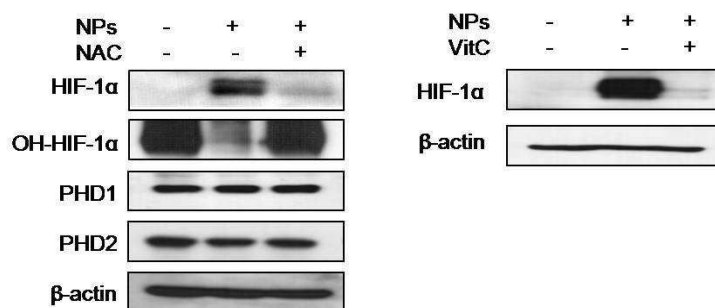
도면2a



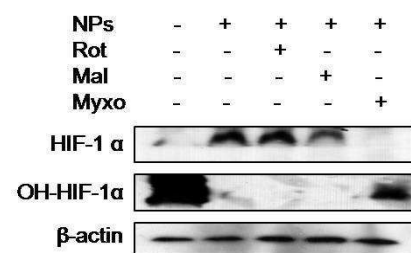
도면2b



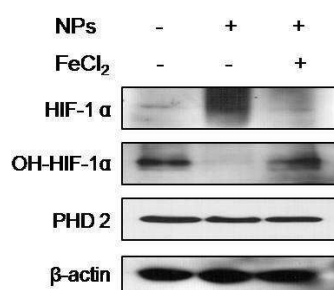
도면3a



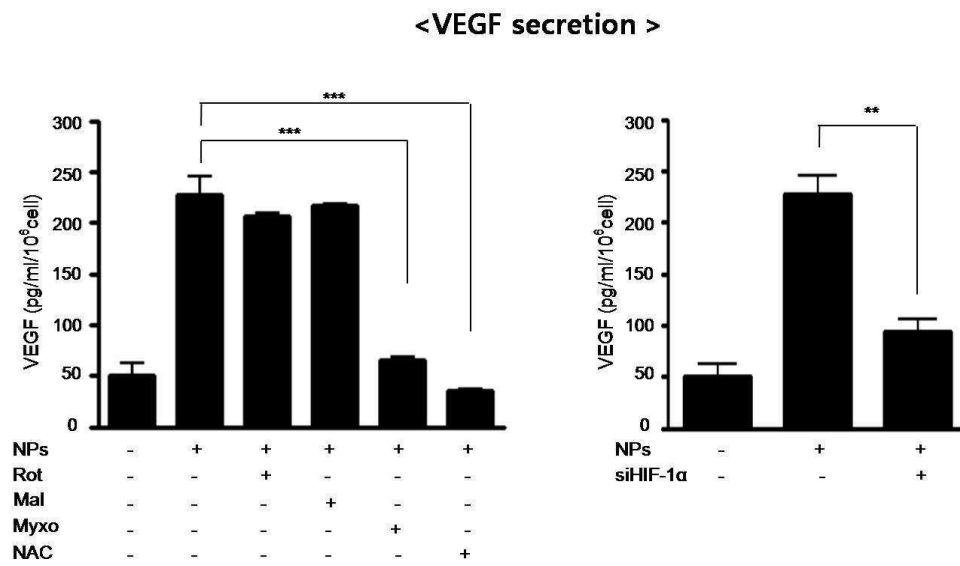
도면3b



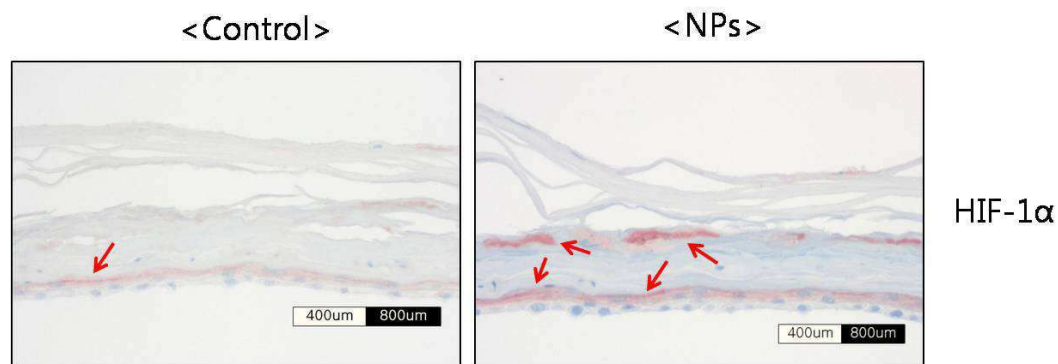
도면3c



도면4



도면5



도면6

