



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0098228
(43) 공개일자 2021년08월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/1709 (2020.05)
A61P 1/16 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2020-0012150
(22) 출원일자 2020년01월31일
심사청구일자 2020년01월31일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
황은숙
서울특별시 강남구 삼성로64길 5, 107동 204호(대치동, 대치현대아파트)
홍정호
서울특별시 강남구 삼성로64길 5, 107동 204호(대치동, 대치현대아파트)
(74) 대리인
리앤목특허법인

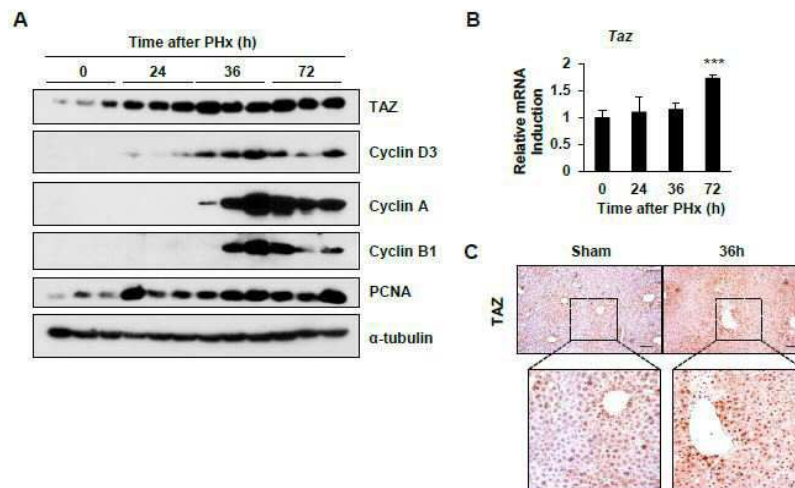
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 TAZ 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 간 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

TAZ 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 간 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 일 양상에 따르면, TAZ 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 약학적 조성물은 간세포에서 인터루킨(interleukin)-6의 분비를 감소시키면서 NF- κ B, Stat3, Erk 및 Akt 신호전달 과정을 통하여 간 재생을 촉진시킬 수 있으므로 간 질환의 예방, 개선, 또는 치료에 사용할 수 있다. 아울러 일 양상의 약학적 조성물은 간의 섬유화를 효과적으로 억제하고, 간 세포의 아포토시스를 억제하여 효과적인 간 재생 및 이의 보호가 가능하다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018R1A5A2025286
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	선도연구센터지원사업
연구과제명	섬유화질환제어연구센터
기 여 율	1/2
과제수행기관명	이화여자대학교 산학협력단
연구기간	2018.07.01 ~ 2025.06.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2019R1A2C2008430
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	미토콘드리아 생합성 및 에너지 대사의 새로운 조절 기전 연구
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2022.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) 단백질 또는 이의 변이체;

상기 단백질을 코딩하는 핵산분자; 및

상기 TAZ의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 간 질환은 간 경변증, 간 섬유증, 알코올 성 간 질환, 비알코올성 간질환, 감염성 간 질환, 감염성 간질환, B형 간염, C형 간염, 자가면역성 만성간염, 원발성 담관성 간경변증, 지방성 간염, 간암, 간 손상, 약물에 의한 간염 및 황달로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것인 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 TAZ는 간세포의 증식을 증진시키는 것인 조성물.

청구항 4

청구항 2에 있어서, 상기 간 손상은 간 절제술, CCl₄, 및 이들의 조합에 의하여 유도된 급성 간 손상에 의한 것인 조성물.

청구항 5

TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) 단백질 또는 이의 변이체;

상기 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자; 및

상기 TAZ의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 간 질환의 예방 또는 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] TAZ 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 간 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] TAZ (Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif)는 14-3-3과 상호결합하는 세포 단백질로 동정된 바 있으며, TAZ는 또한 지방세포-특이적인 전사 인자에 해당하는 퍼옥시좀 증식자-활성화된 수용체- γ (PPAR γ), 와 상호결합을 통하여, PPAR γ 에 의해 유도된 지방세포 분화를 저해한다. 또한, 중간엽 줄기세포에서 TAZ의 발현 수준은 조골세포 또는 지방세포로 세포 운명 결정에 대하여 중요한 역할을 하므로, TAZ는 중간엽 줄기세포 분화의 전사 조절 보조인자로 작용하는 것으로 인식되고 있다. 이 뿐만 아니라, TAZ는 갑상선 (thyroid) 전사 인자-1 (TTF-1/Nkx2.1), T-박스 전사 인자 (Tbx5), 페어드 박스 유전자 3 (Pax3), Gli-Similar 3 (Glis3) 및 Smad2/3-4 복합체를 포함하는 몇몇의 다른 전사인자와 상호작용을 하고, 그들의 타겟 유전자의 전사 활성 및 그 발현에 따른 세포내 기능을 조절한다.

[0003] 따라서, TAZ는 신장 및 폐 형성 (Park, K. S., 등(2004) J Biol Chem 279, 17384-17390;Kang, H. S., 등(2009) Mol Cell Biol 29, 2556-2569; Makita, R., 등 (2008) Am J Physiol Renal Physiol 294, F542-5535, 8, 12), 심장 및 팔다리 발생 (Murakami, M., Nakagawa, M., Olson, E. N., and Nakagawa, O. (2005) Proc Natl Acad Sci U S A 102, 18034-18039), 갑상선 분화 (Di Palma, T., 등 (2009) Exp Cell Res 315, 162-175), 배아 줄

기세포 자가-재생 (Varelas, X., 등 (2008) Nat Cell Biol 10, 837-848), 및 내피-중간엽 전이 및 암세포의 침습 (Chan, S. W., 등 (2008) Cancer Res 68, 2592-2598; Lei, Q. Y., 등 (2008) Mol Cell Biol 28, 2426-2436)과 같은 생물학적 기능에 관여하는 것으로 알려져 있으나, 간세포의 재생과 인터류킨(interleukin)-6의 분비를 감소시키면서 NF- κ B, Stat3, Erk 및 Akt 신호전달 과정을 통하여 간 재생을 촉진시킬 수 있는 TAZ 에 대해서는 아직 알려진 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 일 양상은 TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) 단백질을 또는 이의 변이체; 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자; 및 상기 TAZ의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0005] 다른 양상은 TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) 단백질을 또는 이의 변이체; 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자; 및 상기 TAZ의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 간 질환의 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 일 양상은 TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) 단백질을 또는 이의 변이체; 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자; 및 상기 TAZ의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하는 간 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0007] 본 명세서에서 용어, "예방"은 일 양상에 따른 약학적 조성물을 개체에 투여하여 대사성 질환을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 포함한다. 본 명세서에서 용어, "치료"는 일 양상에 따른 약학적 조성물을 개체에 투여하여 대사성 질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미한다.

[0008] 본 명세서에서 용어, "TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif)"는 14-3-3 단백질과 상호작용하는 세포 단백질로 동정된 바 있으며, WWTR1으로도 명명될 수 있다. 상기 TAZ는 단백질을 코딩하는 유전자의 서열은, 사람의 경우 GeneBank Accession No. NM_000116.5, NM_001303465.1, NM_181311.3, NM_181312.3, 또는 NM_181313.3, 마우스의 경우, NM_001173547.2, NM_001242615.2, NM_001242616.2, NM_001290738.1, 또는 NM_181516.6로부터 취득되는 서열일 수 있다. 상기 TAZ 단백질의 아미노산 서열은 GeneBank Accession No. **NP_001161753**, **NP_001161753**, NP_001335291.1, NP_000107.1, NP_001290394.1, NP_851828.1, NP_851829.1, 또는 NP_851830.1로부터 취득되는 아미노산 서열일 수 있다. 아울러, 상기 아미노산 서열은 예를 들어, 서열번호 1, 2 또는 서열번호 3으로 표시되는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 상기 핵산 서열 또는 아미노산 서열과 일부 핵산 서열 또는 아미노산 서열이 일치하지 않더라도, 생물학적으로 동등한 활성을 갖는 핵산 서열 또는 아미노산 서열은 TAZ의 mRNA 또는 단백질로 간주될 수 있다.

[0009] 상기 TAZ 단백질은 인간, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개 등의 포유 동물 유래의 모든 TAZ 단백질을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 사용 가능한 TAZ 단백질은 이들의 야생형(wild type)의 아미노산 서열을 갖는 단백질뿐만 아니라 TAZ 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 단백질의 변이체 (예컨대, 각 단백질의 아형(subtype)들)를 포함할 수 있다.

[0010] TAZ 단백질의 변이체란 TAZ 단백질의 천연 아미노산 서열의 하나 이상의 아미노산 잔기가 결실, 삽입, 비보전적 또는 보전적 치환 또는 이들의 조합에 의하여 천연 아미노산 서열과 상이한 서열을 가지면서 천연(wild-type) 단백질의 고유의 생물학적 기능을 유지하는 단백질을 의미한다. 상기 변이체는 천연 단백질과 동일한 생물학적 활성을 나타내는 기능적 등가물이거나 필요에 의해서 단백질의 물리 화학적 성질이 변형된 변이체일 수 있고, 물리, 화학적 환경에 대한 구조적 안정성이 증대되거나 생리학적 활성이 증대된 변이체일 수 있다.

[0011] 상기 TAZ 단백질 또는 이의 변이체는 천연에서 분리되거나, 재조합적 또는 합성적으로 제조된(non-naturally occurring) 것 일 수 있다.

[0012] 또한, 상기 TAZ 단백질을 코딩하는 핵산은 야생형 또는 상기한 바와 같은 변이체 형태의 TAZ 단백질을 코딩하는 염기서열로서, 하나 이상의 염기가 치환, 결실, 삽입 또는 이들의 조합에 의해 변이될 수 있으며, 천연에서 분리되거나 화학적 합성법을 이용하여 제조할 수 있다. 상기 TAZ 단백질을 코딩하는 염기서열을 갖는 핵산은 단쇄

또는 이중쇄일 수 있으며, DNA 분자(게놈, cDNA) 또는 RNA (mRNA) 분자일 수 있다.

- [0013] 상기 TAZ의 변이체는 N- 말단이 절두된(truncated) C-말단 도메인을 포함할 수 있다. 상기 TAZ 단백질의 아미노산 서열의 N-말단으로부터 예를 들어, 80번째, 예를 들어, 90번째, 예를 들어, 100번째, 예를 들어, 110번째, 예를 들어, 120번째, 예를 들어, 130번째, 예를 들어, 140번째, 예를 들어, 150번째, 예를 들어, 160번째, 예를 들어, 170번째, 예를 들어, 180번째, 예를 들어, 190번째, 예를 들어, 200번째 아미노산부터 C-말단까지의 영역일 수 있으나, 다른 단백질과 상호작용할 수 있는 WW 도메인을 포함하는 TAZ 단백질 변이체라면 이에 제한되지 않는다.
- [0014] 상기 간 질환은 약물성 간질환, 알코올성 간질환, 비알코올성 간질환, 대사성 간질환, 감염성 간질환 등일 수 있으며, 예컨대 간 경변증, 간 섬유증, 알코올 성 간 질환, 비알코올성 간질환, 감염성 간질환, 감염성 간질환, B형 간염, C형 간염, 자가면역성 만성간염, 원발성 담관성 간경변증, 지방성 간염, 간암, 간 손상, 약물에 의한 간염 및 황달로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다. 또한 일 양상이 약학적 조성물이 예방 또는 치료가 가능한 간 손상은 간 절제술 및 CC1₄ 및 이들의 조합에 의하여 유도된 급성 간 손상에 의한 것일 수 있다.
- [0015] 상기 조성물은 간 세포의 재생 또는 증식을 증가시키는 것일 수 있다. 상기 약학적 조성물은 간세포의 증식을 증가시키고, 간 재생 촉진을 촉진시키고 간 섬유화를 억제시키면서 간세포의 아포토시스를 억제시킬 수 있는 간 질환의 예방 또는 치료 활성을 갖는 공지의 유효 성분을 더 포함할 수 있다. 상기 유효 성분은 공지의 천연 추출물, 천연물 기반 화합물, 합성 화합물 또는 이들의 조합일 수 있다.
- [0016] 상기 약학적 조성물은 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 담체, 부형제, 또는 희석제는 예를 들어, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알기네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 또는 광물유를 포함할 수 있다.
- [0017] 상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여 제형을 갖는 것일 수 있다. 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화될 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0018] 상기 약학적 조성물에 있어서, 경구 투여를 위한 고형 제제는 정제, 환제, 산제, 과립제, 또는 캡슐제일 수 있다. 상기 고형 제제는 부형제 또는 유효제를 더 포함할 수 있다. 부형제는 예를 들면, 전분, 칼슘 카르보네이트(calcium carbonate), 수크로스, 락토스, 또는 젤라틴일 수 있다. 또한, 상기 유효제는 마그네슘 스테아레이트, 또는 탈크일 수 있다. 상기 약학적 조성물에 있어서, 경구를 위한 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 또는 시럽제일 수 있다. 상기 액상 제제는 물, 또는 리퀴드 파라핀을 포함할 수 있다. 상기 액상 제제는 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 또는 보존제를 포함할 수 있다. 상기 약학적 조성물에 있어서, 비경구 투여를 위한 제제는 크림, 로션, 연고, 액제, 패취, 향낭(sachet), 주사제, 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 또는 및 좌제일 수 있다.
- [0019] 상기 약학적 조성물은 TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) 단백질 또는 이의 변이체; 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자; 및 상기 TAZ의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 유효한 양으로 포함할 수 있다. 상기 유효한 양은 질환의 중증도, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 상기 약학적 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 상기 유효한 양은 상기 약학적 조성물 당 약 10 mg 내지 약 10 g, 약 100 mg 내지 약 8 g, 약 250 mg 내지 약 6 g, 약 500 mg 내지 약 4 g, 약 500 mg 내지 약 2 g, 또는 약 500 mg 내지 약 1 g일 수 있다. 상기 약학적 조성물은 경구, 경피, 피하, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 국소, 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여될 수 있다. 상기 약학적 조성물의 투여량은 예를 들어, 성인 기준으로 약 0.001 mg/kg 내지 약 100 mg/kg, 약 0.01 mg/kg 내지 약 10 mg/kg, 또는 약 0.1 mg/kg 내지 약 1 mg/kg의 범위 내이고, 1일 1회 내지 6회, 2 일 내지 3일에 1회, 또는 수일 1회 투여될 수 있다.
- [0020] 본 명세서에서 상기 TAZ의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질이란 근육 세포에서 TAZ 단백질의 발현량을 증가시키거나 TAZ의 반응 활성 또는 반응 속도의 향상을 유도할 수 있는 물질을 의미하는 것으로, 그 종류가 특별히

제한되지 않으며, 펩타이드, 항체, 앵타머, 천연추출물 또는 화학물질일 수 있으며, 예를 들면, 상기 물질은 간 세포 특이적으로 TAZ의 발현 또는 활성을 증가시키는 프로모터의 치환에 의한 물질일 수 있다.

- [0021] TAZ는 다양한 외부물질 투여 혹은 신호자극에 의해 발현 또는 활성이 증가될 수 있다. 그 예로 TAZ 활성은 radiation (UV, ionizing radiation 등), chemotherapeutic 약물, 외부 pathogens (rhinoviruses, N. gonorrhea, S. aureus, P. aeruginosa, C. parvum 등), 사이토카인, 산화적 스트레스 등에 의해 그 활성이 증가될 수 있다.
- [0022] 또한 본 발명의 조성물은 TAZ를 코딩하는 핵산분자를 벡터를 통하여 도입할 수 있는데, 본 발명에서 사용할 수 있는 벡터는 예컨대 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 (Retrovirus) 벡터, HIV(Human immunodeficiency virus) 벡터, MLV(Murineleukemia virus)벡터, ASLV(Avian sarcoma/leukosis) 벡터, SNV(Spleen necrosis virus)벡터, RSV(Rous sarcoma virus)벡터, MMTV(Mouse mammary tumor virus) 벡터, 아데노바이러스(Adenovirus) 벡터, 아데노 관련 바이러스(Adenoassociatedvirus) 벡터, 헤르페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus) 벡터 및 에피조말 (episomal) 벡터로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 벡터일 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 "벡터"란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 전달체를 의미할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널, 인핸서 같은 발현 조절 요소 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 신호 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한, 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택성 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함한다. 벡터는 자가 복제하거나 숙주 DNA에 통합될 수 있다.
- [0026] 다른 양상은 TAZ 또는 이의 변이체를 유효성분으로 포함하는 간 조직 손상 및 간기능 저하 예방 또는 개선용 식품 조성물 또는 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0027] 상기 TAZ 또는 이의 변이체를 식품 첨가제로 사용할 경우, TAZ 또는 이의 변이체를 그대로 첨가하거나, 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 혼합하여 사용되는 등 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.
- [0028] 또한 상기 TAZ 또는 이의 변이체의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 변경될 수 있음은 물론이며, 조성물 총 중량에 대하여 0.01~95중량%로 포함되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 1~80 중량%로 포함되는 것이다. 그 함량이 0.01중량% 미만일 경우에는 복용의 효율성이 떨어질 수 있으며, 95중량%를 초과할 경우에는 사용량 대비 효과 상승률이 낮아 비 경제적일 수 있다.
- [0029] 구체적인 예로, 식품 또는 음료의 제조 시에는 본 발명의 TAZ 또는 이의 변이체는 원료에 대하여 15중량% 이하, 바람직하게는 10중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하여 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 양으로 첨가될 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0030] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없으나, 본 발명의 TAZ 또는 이의 변이체를 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료, 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0031] 본 발명의 식품 조성물이 음료로 제조될 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등의 추가 성분을 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물로는 포도당, 과당 등의 모노사카라이드; 말토오스, 수크로오스 등의 디사카라이드; 텍스트린, 사이클로텍스트린 등의 천연 감미제; 사카린, 아스파르탐 등의 합성 감미제 등이 사용될 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 본 발명의 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01~10중량%, 바람직하게는 0.01~0.1중량%로 포함된다.
- [0032] 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있으며, 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기의 첨가제

비율은 크게 제한되지는 않으나, 본 발명의 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01~0.1중량% 범위내로 포함되는 것이 바람직하다.

[0033] 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취인 경우, 일 양상의 식품 조성물은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 장기간 복용이 가능하다.

[0035] 다른 양상은 TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) 단백질 또는 이의 변이체; 상기 단백질을 코딩하는 핵산분자; 및 상기 TAZ의 발현 또는 활성을 증가시키는 물질로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 간 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0036] 상기 방법은 간 세포 내 인터류킨(interleukin)-6의 분비를 감소시키면서 NF- κ B, Stat3, Erk 및 Akt 신호전달 과정을 통하여 간 재생을 촉진시켜 간 질환을 치료할 수 있다.

[0037] 또 다른 양상은 상기 방법은 시험관 내(*in vitro*) 상에서 간 세포에 TAZ(Transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) 단백질 또는 이의 변이체를 가하여 간 세포의 증식을 촉진시켜 간 세포의 손상을 저해 또는 간 세포를 보호하는 방법을 제공한다.

[0039] 또 다른 양상은 간 세포 TAZ의 발현 수준을 측정하는 단계; 상기 근육 세포에 간 질환 예방 또는 치료용 시험물질을 가하는 단계; 상기 시험물질이 처리된 근육 세포에서 TAZ 발현 수준을 측정하는 단계; 및 상기 시험물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 TAZ의 발현을 증가시킨 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 간 질환의 예방 또는 치료 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0040] 구체적으로, 간 질환 치료 시험 물질의 존재 및 부존재하에서 TAZ 단백질 발현의 증가 또는 감소를 비교하는 방법으로 간 질환 치료제를 스크리닝하는데 유용하게 사용할 수 있다. 근육 세포의 TAZ 단백질의 발현 수준을 간접적으로 또는 직접적으로 증가시키는 물질은 본 발명에서 개시하고 있는 간 질환의 치료제로서 선택할 수 있다.

[0041] 즉, 간 질환의 치료 시험 물질의 부존재시 및 존재시의 근육 세포에서 TAZ 단백질 발현 수준을 비교한 후, TAZ의 발현 수준을 증가시키는 물질을 간 질환의 치료제로 예측할 수 있다.

[0043] 본 명세서에서 달리 정의되지 않은 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상적으로 사용되는 의미를 갖는 것이다.

발명의 효과

[0044] 일 양상에 따르면, TAZ 단백질 또는 이의 변이체를 포함하는 약학적 조성물은 간세포에서 인터류킨(interleukin)-6의 분비를 감소시키면서 NF- κ B, Stat3, Erk 및 Akt 신호전달 과정을 통하여 간 재생을 촉진시킬 수 있으므로 간 질환의 예방, 개선, 또는 치료에 사용할 수 있다. 아울러 일 양상의 약학적 조성물은 간의 섬유화를 효과적으로 억제하고, 간 세포의 아포토시스를 억제하여 효과적인 간 재생 및 이의 보호가 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 간 재생과정 중 TAZ의 발현을 확인한 도에 관한 것으로, 2/3의 부분 간절제술(PHx)을 수행하고 PHx 후 24, 36 및 72 시간후에 면역 블롯팅을 사용하여 TAZ, 사이클린 D3, 사이클린 A, 사이클린 B1, PCNA, TAZ 발현 및 알파-튜불린의 수준을 분석한 결과(도 1A), qRT-PCR을 사용하여 Taz 발현을 분석하고 글리세르알데히드 3-포스페이트 디하이드로게나아제(*Gapdh*) 수준으로 정규화한 결과(도 1B) (데이터는 평균 $\pm$ SEM로 나타냄, 스튜던트 t-검정, n = 3/그룹, *** P < 0.001). TAZ 수준을 면역조직화학분석을 사용하여 분석하고 그 결과(도 1C)를 나타낸 도이다.

도 2는 간에서의 TAZ의 결실이 간세포 증식을 감소시키고 간 재생을 지연시키는 것을 나타낸 도로서, PHx 후 36 시간에 WT 및 LKO 마우스에서 면역조직화학분석을 사용하여 분석하여 TAZ 발현 수준을 확인한 결과(도 2A), Ki-67 수준을 PHx 후 24, 36, 48 및 72 시간에서의 간 조직을 면역조직화학분석을 사용하여 분석하였고, 오른쪽은 각 그룹에서 3 내지 4 개 상이한 마우스를 관찰함으로써 PHx 후 Ki-67-양성 간세포의 계수하여 그래프화 한 결

과(도 2B)를, TAZ, PCNA, 사이클린 B1, 사이클린 D3 및 포스포-히스톤 H3(p-히스톤 H3)의 수준을 면역 블롯팅을 사용하여 분석한 결과(도 2C), WT와 LKO 마우스의 간 대 체중의 비를 측정한 결과(도 2D)를 나타낸 도(* P <0.05, ** P <0.01)이다.

도 3은 TAZ 고갈이 시험관 내(*in vitro*)에서 간세포 증식을 감소시킨다는 결과를 나타낸 도이며, 1 차(Primary) 간세포를 WT 또는 LKO 마우스로부터 분리하고, 이를 12, 24 또는 36 시간 후에 TAZ, PCNA, 사이클린 D1 및 빈쿨린의 발현을 면역 블롯팅으로 분석한 결과(도 3A), Taz, Ctgf, Cyr61, Ccnd1 및 Ccne1 발현을 qRT-PCR을 사용하여 분석한 결과(도 3B)(* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 대 WT의 12 시간 샘플; #P <0.05, ## P <0.01, ### P <0.001 vs. WT 샘플), BrdU-양성 세포를 면역세포화학에 의해 분석한 결과(도 3C) 및 BrdU-양성 세포의 정량 분석을 확인한 결과(도 3D)(** P <0.01, *** P <0.001)를 나타낸 도이다.

도 4는 간에서의 TAZ 결실이 케모카인을 유도하고, 대식세포의 수를 감소시켜, 간 절제술 이후 IL-6의 분비를 감소시키는 것을 확인한 결과를 나타낸 도이며, PHx 수행 3시간 이후에 혈청 중 IL-6의 수준을 정량화한 결과(도 4A), IL-6 발현을 qRT-PCR을 사용하여 분석한 결과(도 4B), PHx 을 유도한 WT 및 LKO 마우스에서 F4/80 발현을 확인한 결과(도 4C), qRT-PCR을 사용하여 케모카인 유전자 발현을 분석한 결과(도 4D)를 확인한 도이다(* P <0.05, ** P <0.01).

도 5는 간 절제술 수행 24, 36 및 72 시간에 이의 면역 블롯팅을 통해 TAZ, NF-κB p65, 포스포-NF-κ p65 (S536), Stat3, 포스포-Stat3 (S727), 및 α-튜불린의 발현을 확인한 결과(도 5A), 상기 세포 용해물의 면역 블롯팅 분석을 사용하여 Akt, phospho-Akt (S473), Erk1/2, 및 phospho-Erk1/2 (T202/Y204)의 발현을 확인한 결과(도 5B)를 나타낸 도이다.

도 6은 WT 및 LKO 마우스 간 조직에서의 H & E 염색, 시리우스 레드 염색 및 α-SMA 발현을 확인한 결과(도 6A), 시리우스 레드-양성 염색 면적을 측정한 결과(도 6B), α-SMA 양성 염색 면적을 확인한 결과(도 6C), qRT-PCR을 사용하여 유전자 발현을 분석하고 Gapdh 수준으로 정규화한 결과(도 6D)를 나타낸 도이다(n = 6-10/그룹, * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001).

도 7은 TAZ의 간 세포 사멸 억제능을 확인한 결과를 나타낸 도로, 구체적으로 WT와 LKO의 간 조직을 TMR 레드 염색한 결과를 확인한 도로, 우측 도에서는 TUNEL 양성 세포의 수를 정량화하여 나타낸 결과(도 7A), 면역 블롯팅을 사용하여 절단된 카스파제-3 및 -9, Bim, Erk1/2, 및 α-튜불린의 발현을 나타낸 결과(도 7B), qRT-PCR을 통한 Bax의 발현을 확인한 결과(도 7C)를 나타낸 도이다(. n = 8 / 그룹, * P <0.05, *** P <0.001).

도 8은 CCl₄에 의하여 유도된 급성 간 손상에서 TAZ가 간세포 사멸 보호 효과가 있음을 확인한 도로서, 구체적으로 CCl₄-유도된 WT 마우스에서 TAZ의 발현을 면역 블롯팅을 통하여 확인한 결과(도 8A), WT 및 LKO 마우스에 CCl₄를 주사하고 24 시간 이후, 간 색전을 H & E로 염색한 결과와, 이의 괴사 영역을 백분율로 나타낸 결과(도 8B), 절단된 카스파 제-3, Bim 및 Erk1 / 2 수준을 면역 블롯팅에 의해 분석한 결과(도 8C), 혈청 ALT 수준을 CCl₄ 주사 후 48 시간에 분석한 결과(도 8D)에 나타낸 도이다(n = 4 / 그룹, * P <0.05, *** P <0.001).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하 실험예 및 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실험예 및 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0047] 실험예 1. 실험에 사용한 마우스의 제조

[0048] 네오 마이신 선택 카세트 및 엑손 2 플랭킹 *loxP* 부위를 포함하는 TAZ 대립 유전자를 상동 재조합을 통해 생성하였다. *EIIa-cre* 마우스와 교차함으로써, 네오 마이신 선택 카세트가 제거된 C57BL/6 마우스로부터 TAZ^{f/f} 마우스를 생성하였다. 간 특이적으로 TAZ 녹아웃(LKO)된 마우스를 생성하기 위해 알부민-크레(cre) 마우스(Jackson Laboratory)와 사육된 TAZ^{f/f} 마우스를 교배하였다. LKO 마우스 및 그들의 연령-매치된 한배새끼 대조군을 표준 조건 (12 시간 빛/12 시간 암주기)하에 사육하고 표준 실험실 식이를 공급하였다. 모든 동물 실험은 고려대학교 동물 실험윤리위원회(KUIACUC-2017-110)가 승인한 절차에 따라 수행되었다.

[0050] 실험예 2. 부분 간 절제술(Partial hepatectomy)의 수행

[0051] 8 내지 12 주령의 수컷 마우스에 2/3의 부분 간절제술(Partial hepatectomy, PHx)을 수행하였다. PHx을 수행하는 동안 이소플루란의 흡입에 의해 마우스를 마취시켰다. 중간선 절개 후, 절개를 위해 간을 두 지점에서 실크 실로 묶었다. 이 중 첫 번째 매듭은 왼쪽 측면엽과 간 나머지 부분 사이에 위치하고, 두 번째 매듭은 중간엽과 간 나머지 부분 사이에 위치시켰다. 간의 2/3를 제거한 후, 상처를 봉합하고 수술 부위를 멸균하였다. 지정된 시점에서, 마우스를 희생시키고 분석을 위하여, 각 간 샘플을 수집 하였다.

[0053] 실험예 3. 사염화탄소의 주입

[0054] 사염화탄소(CCl₄)로 유도된 급성 간 손상을 위해, 8 내지 12 주령의 수컷 마우스에 미네랄오일에 용해된 사염화탄소(1:10 v/v)를 0.35 mL/kg로 복강 내 주사하였다. 지정된 시점에서, 마우스를 희생시키고 분석하였다.

[0056] 실험예 4. 조직학적 분석

[0057] 마우스 조직을 4 % 파라포름알데히드로 4 °C에서 밤새 고정시켰다. 다음으로, 조직을 에탄올로 탈수시키고 파라핀에 포매시켰다. 조직을 마이크로톰 (LEICA RM2255)을 사용하여 절편화 한 후 탈 파라핀화 및 재수화를 수행하였다. 실온에서 15분 동안 내인성 퍼옥시다제와 함께 3% H₂O₂로 차단한 후, 절편을 압력 쿠키(cooker)를 사용하고, 항원 회수를 위하여 10mM 시트르산 나트륨 완충액 (pH 6.0)과 함께 배양하였다. 이어서, 색인을 아비딘/비오틴 차단 키트 (Vector Laboratories) 및 정상 혈청과 함께 실온에서 인큐베이션 하였다. 블로킹 단계 후, 조직 색인을 4°C에서 1차 항체와 함께 밤새 인큐베이션 하였다. 다음날, Vectastain ABC 면역 퍼옥시다제 검출 키트 (Vector Laboratories) 및 액체 DAB⁺ 기질 염색체 시스템 (Dako, K3467)을 사용하여 색인을 시각화하였다. 마지막으로, 색인을 메이어 헤마톡실린 (Sigma-Aldrich)으로 대조 염색하고 에탄올 및 자일렌으로 탈수시켰다.

[0058] 헤마톡실린 및 에오신 (H & E) 염색을 위해, 재수화된 조직 색인을 8분 동안 해리스 헤마톡실린 (Sigma-Aldrich)으로 염색하였다. 수돗물로 세척한 후, 색인을 70% 에탄올 내 0.5 % HCl에서 3 초 동안 분화시키고 0.2 % 암모니아수에서 30초 동안 인큐베이션 하였다. 이어서, 색인을 에오신 (Sigma-Aldrich)으로 1분 동안 염색하고 에탄올 및 자일렌으로 탈수시켰다.

[0059] 피크로-시리우스 레드 염색의 경우, 재수화된 조직 색인을 피크르산 500mL에 다이렉트 레드 0.5g 가 혼합된 피크로-시리우스 레드 용액으로 1시간 동안 염색하고, 0.5 % 아세트산 산성수로 2 회 세척하였다. 이어서, 색인을 100 % 에탄올에서 탈수시키고 자일렌으로 세척하였다.

[0060] 아포토시스의 검출을 위해 항원 회수 후, 절편을 제자리(*In Situ*) 사멸 검출 키트, TMR 레드 (Roche)를 사용하여 1시간 동안 37 °C에서 어두운 곳에서 염색하였다. 4', 6-디아미디노-2-페닐인돌(DAPI) (Vector Laboratories)을 포함하는 VECTASHIELD HardSet Antifade 마운팅 미디움을 사용하여 절편을 고정시키고, 공 초점 레이저 스캐닝 현미경 (Carl Zeiss LSM700)을 사용하여 실온에서 형광을 확인하였다. 구체적으로, Plan-Apochromat 20x 또는 EC Plan-Neofluar 10x 대물 렌즈로 관찰하였고, ZEN 2009 소프트웨어를 밝기 조정과 같은 이미지 처리에 사용하였다.

[0062] 실험예 5. 혈청 분석 및 세포 배양

[0063] 마우스로부터 혈액을 수득하고 37 °C에서 배양하였다. 30 분 후, 응고물을 원심 분리로 제거하고 혈청을 분리하였다. 혈청 IL-6 (# K4144-100)을 ELISA 키트(BioVision)를 사용하여 정량하고, 혈청 ALT (# MAK052)를 ALT 활성 분석 키트 (Sigma-Aldrich)를 사용하여 정량하였다.

[0064] 마우스 1 차 간세포를 콜라게나제 수액법(perfusion method)을 사용하여 8 주 내지 10 주령의 마우스로부터 분리하였다. Percoll (Sigma-Aldrich)을 이용한 밀도분리 후, 다른 세포를 제외한 순수한 간세포 집단을 수득하였다. 세포를 PRIMARIATM 6-웰 플레이트 (FALCON)에 플레이팅하고, 10 % 소태아혈청(HyClone), 0.1 % 소 혈청 알부민, 23 mM HEPES, 10 nM 텍사메타손 및 100 유닛/mL 페니실린 및 100 µg/mL 의 스트렙토마이신 항생제(1000)이 보충된 M199/EBSS (HyClone)에서 유지시켰다. 세포 시딩 4 내지 5 시간 이후, 배양 배지를 새로운 M199/EBSS로 교체하였다. 세포를 5 % CO₂ 배양기에서 37 °C로 배양하였다.

[0066] **실험예 6. 면역 형광 분석 및 면역블롯팅 분석**

[0067] 마우스 1차 간세포를 분리하고 35-mm 디쉬에 시딩하였다. 세포를 고정하기 전에 10 μ M의 BrdU로 3 시간 동안 처리하였다. 세포를 15 분 동안 4 % 파라포름알데히드로 고정시키고, 10 분 동안 0.25 % 트리톤 X-100으로 투과 화시키고, 1 시간 동안 5 % BSA로 블로킹하였다. 이어서, 세포를 4 $^{\circ}$ C에서 밤새 BrdU를 표적으로 하는 1차 항체와 함께 인큐베이션하였다. 다음날, 세포를 Alexa Fluor 488-접합된 이차항체 (Thermo Scientific, 1:100)와 함께 2시간 동안 배양하고 DAPI (Sigma Aldrich, D9542)를 사용하여 대조염색 하였다. 공 초점 현미경 (Carl Zeiss LSM 700)을 사용하여 형광 신호를 확인하였다.

[0068] 마우스 간 또는 1 차 간세포로부터 얻은 전세포 용해물을 소듐도데실 설페이트-폴리아크릴아미드 겔을 이용하여 분리한 다음, 폴리비닐리덴 디플루오라이드 (PVDF) 막 (Millipore)으로 트랜스퍼 시켰다. 막은 1 차 항체와 함께 밤새 인큐베이션 되었으며 홀스래디쉬 퍼옥시다제-접합된 2차 항체와 함께 1시간 동안 인큐베이션 되었다.

[0070] **실험예 7. 정량적 실시간 중합 효소 연쇄 반응 (qRT-PCR), 사용한 시약 및 통계 분석**

[0071] 마우스 간 샘플을 분리하고 TRIzol 시약 (Invitrogen)을 사용하여 총 RNA를 추출하였다. cDNA는 M-MLV 역전사 효소 (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 합성되었고, mRNA 수준은 qRT-PCR (LightCycler 480; Roche)에 의해 분석되었다. 아울러, 실험에 사용한 시약인 재조합 마우스 IL-6 (406-ML-005)은 R & D Systems에서 구입하였다.

[0072] 모든 실험값을 평균의 평균 $\pm$ 표준 오차 (SEM) 또는 평균 $\pm$ 표준 편차 (SD)로 표시하였으며, 스튜던트 t-테스트를 사용하여 통계 분석을 수행하였다(* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001).

[0074] **실시예 1. 간 재생에서 TAZ의 역할 확인**

[0075] **1.1 간 재생에 있어서 TAZ 역할의 확인**

[0076] 간 재생에서 TAZ의 역할을 확인하기 위해, 2/3의 부분 간절제술(PHx)을 수행하고 TAZ 발현수준을 야생형 (WT) 마우스에서 분석하였다. PHx 후 24, 36 및 72 시간 후에 마우스 간 조직을 분리하고, 사이클린 D3, 사이클린 A, 사이클린 B1 및 증식세포핵항원 (proliferating cell nuclear antigen : PCNA)을 포함한 TAZ 및 세포 증식 마커의 수준을 면역 블롯팅을 사용하여 분석한 결과를 도 1A에, qRT-PCR을 사용하여 Taz 발현을 분석하고 글리세르알데히드 3-포스페이트 디하이드로게나아제 (*Gapdh*) 수준으로 정량화한 결과를 도 1B에, TAZ 수준을 면역조직 화학분석을 사용하여 분석하고 그 결과를 도 1C에 나타내었다.

[0077] 도 1A에 도시된 바와 같이, TAZ 단백질 수준은 PCNA 의 동시 발현과 함께 PHx 후 24, 36 및 72 시간 이후에 극적으로 증가한 것을 확인하였다. 도 1B에 나타난 바와 같이, PHx 후 24 시간 및 36 시간에 Taz mRNA 발현이 유의하게 증가하지는 않았지만, PHx 후 72 시간에 유의한 증가가 나타난 것을 확인할 수 있어, 간이 재생되는 동안 TAZ 발현의 전사 후 조절이 있음을 나타내는 것을 확인하였다. 또한, 도 1C 에서 확인한 바와 같이, 면역조직 화학 분석을 통하여 TAZ 단백질의 수준은 간에서 증가하였고, 특히 간세포의 핵에 주로 위치하여, 간 재생 신호는 TAZ 단백질의 발현 및 핵으로의 위치를 촉진시키는 것을 확인하였다.

[0079] **1.2 TAZ의 결실로 인한 간 재생 지연의 확인**

[0080] 다음으로, 간 재생에서 TAZ의 역할을 연구하기 위해, WT 및 LKO 마우스에 부분 간절제술을 수행하고, PHx 후 36 시간에 WT 및 LKO 마우스 간조직에서 면역조직화학분석을 사용하여 분석하였다. TAZ 발현 수준을 확인한 결과를 도 2A에 나타냈으며, Ki-67 수준을 PHx 후 24, 36, 48 및 72 시간에서의 간 조직을 면역조직화학분석을 사용하여 분석하여 함께 나타냈고, 오른쪽은 각 그룹에서 3 내지 4 개 상이한 마우스를 관찰함으로써 PHx 후 Ki-67-양성 간세포의 계수하여 그래프화 한 결과를 도 2B에, TAZ, PCNA, 사이클린 B1, 사이클린 D3 및 포스포-히스톤 H3(p-히스톤 H3)의 수준을 면역 블롯팅을 사용하여 분석한 결과를 도 2C에, WT와 LKO 마우스의 간 대 체중의 비를 측정 한 결과를 도 2D에 나타내었다.

[0081] 도 2A에 나타난 바와 같이, TAZ 발현은 WT 마우스에서 PHx 이후에 유도되었으나, LKO 마우스에서는 유도되지 않

은 것을 확인하였다. 도 2B에서 확인한 바와 같이, WT 대비 LKO 마우스에서만 세포 증식 마커인 Ki-67의 발현이 감소되었으며, PHx 수행 후 48 시간 이후에 WT 마우스 간세포의 약 70.9 %는 Ki-67을 발현하지만, LKO 마우스 간세포의 약 28.9 %만이 Ki-67을 발현하는 것을 확인하였다. 도 2C에서 확인한 바와 같이, WT 마우스 대비 PCNA, 사이클린 B1, 사이클린 D3 및 포스포-히스톤 H3의 수준이 LKO 마우스에서 확연히 감소하였다. 도 2D에 나타난 바와 같이, 간 대 체중의 비율은 간 재생의 증식 단계인 PHx를 수행한 1 일 및 3 일 후에 WT 마우스에 비해 LKO 마우스에서 더 낮았으나, 5일 및 8일 후에는 WT 마우스의 것과 유사하였다. 따라서, 이와 같은 결과를 통하여 TAZ가 간 재생 동안 간세포 증식에서 중요한 역할을 수행한다는 것을 확인하였다.

[0083] 1.3. 시험관 내(*in vitro*)에서 TAZ 고갈을 통한 간세포 증식 감소의 확인

[0084] 1 차(Primary) 간세포를 WT 또는 LKO 마우스로부터 분리하고, 이를 12, 24 또는 36 시간 후에 TAZ, PCNA, 사이클린 D1 및 빈쿨린의 발현을 면역 블롯팅으로 분석한 결과를 도 3A에, Taz, Ctgf, Cyr61, Ccnd1 및 Ccne1 발현을 qRT-PCR을 사용하여 분석한 결과를 도 3B에(* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 대 WT의 12 시간 샘플; #P <0.05, ## P <0.01, ### P <0.001 vs. WT 샘플), BrdU-양성 세포를 면역세포화학에 의해 분석한 결과를 도 3C에, 및 BrdU-양성 세포의 정량 분석을 확인한 결과를 도 3D(** P <0.01, *** P <0.001)에 나타내었다. 도 3B에서 글리세르알데히드 3-포스페이트 디하이드로게나아제 (Gapdh) 수준과 비교하여 정량화하였고, 도 3C에서 BrdU-양성 핵을 녹색으로 염색하고 DAPI를 사용하여 전체 핵을 나타내었고, 도 3D는 각 그룹 각 세트당 적어도 25 개의 상이한 세포를 관찰한 후 세포의 백분율을 정량화 하고, 데이터는 평균 $\pm$ SD로 나타내었다.

[0085] 도 3A에 나타난 바와 같이, 간세포가 증식하는 동안, LKO 간세포는 WT 대비 TAZ, PCNA 및 사이클린 D1 단백질 수준이 감소하였다. 도 3B에 나타난 바와 같이, LKO 간세포에서 WT 대비 Ctgf, Cyr61, Ccnd1 및 Ccne1을 포함한 증식 마커 유전자의 발현의 발현 역시 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 3C 및 3D에서 나타난 바와 같이, BrdU 혼입 분석으로 LKO 간세포에서 WT 대비 S-기로 나타나는 그룹이 확연히 적은 것을 확인할 필수적이므로 간 재생에서도 중요한 인자임을 확인할 수 있었다.

[0087] 실시예 2. TAZ의 결실로 인한 간 세포 인터류킨(interleukin)-6의 분비 감소

[0088] 간이 손상되면 여러 신호가 동시에 활성화되어 손상을 복구하는 것으로 알려져 있는데, 일반적으로 LPS, 보체 인자 (C3a, C5a) 및 세포 간 접착 분자(intercellular adhesion molecule) 1은 간에 특화된 대식세포인 쿠퍼세포를 자극하여 TNF α 및 IL-6을 분비하고, IL-6 신호 전달은 세포 증식 및 생존에 중요한 포스포타일 이노시톨 3-키나아제-Akt와 같은 여러 신호 전달 경로를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 이에, TAZ의 간 결실이 PHx 후 IL-6 분비를 감소시키는지 여부를 확인하는 실험을 수행하였다. PHx 수행 3시간 이후에 혈청 중 IL-6의 수준을 정량화한 결과를 도 4A에, IL-6 발현을 qRT-PCR을 사용하여 분석한 결과를 도 4B에, PHx 을 유도한 WT 및 LKO 마우스에서 F4/80 발현을 확인한 결과를 도 4C에, qRT-PCR을 사용하여 케모카인 유전자 발현을 분석한 결과를 도 4D에 나타내었다(* P <0.05, ** P <0.01).

[0089] 도 4A에서 확인한 바와 같이, 혈청 내 IL-6은 PHx 후 짧은 시간 내에 분비되므로, PHx 수행 3 시간 이후에 LKO 마우스에서 혈청 IL-6 수준은 WT 마우스에서와 비교하여 감소하였다. 아울러 도 4에 확인한 바와 같이, IL-6 mRNA 발현은 역시 LKO 마우스에서 유의하게 감소하여, 이러한 결과를 통하여 IL-6 수준의 감소가 LKO 마우스에서 간 재생을 억제시키는 것을 확인할 수 있었다. 간을 재생하는 동안 LKO 마우스에서 IL-6이 하향 조절되는 이유를 확인하기 위해, 간 재생 동안 IL-6이 대식세포에 의해 지배적으로 분비되기 때문에 대식세포 수를 분석하였고, 대식세포 마커, F4/80 항체를 사용하여 면역조직화학분석을 통해 측정된 결과, 도 4C에 나타난 바와 같이, PHx 후 1 시간 동안 WT 마우스에서는 유의한 수의 F4/80-양성 대식세포가 검출되었으나, LKO 마우스에서는 검출되지 않았다. 이 결과를 통하여 LKO 마우스에서 대식세포 수의 감소하여, IL-6 분비 역시 감소되었음을 확인할 수 있었다.

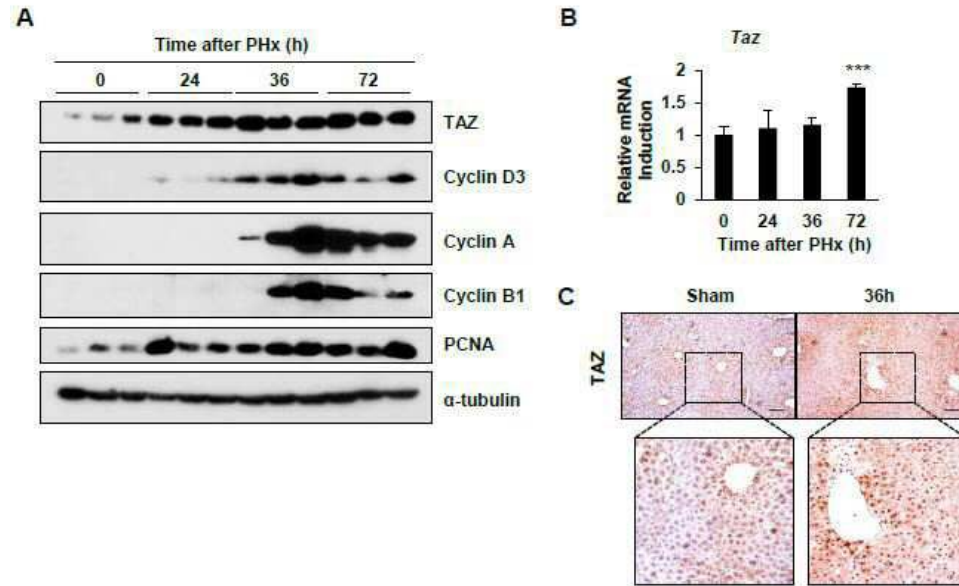
[0090] 대식세포 침윤은 일반적으로 간 손상 후 사이토카인에 의해 유도되므로, WT 및 LKO 마우스에서 간이 재생되는 동안 사이토카인의 발현을 연구하였고, 도 4D에 나타난 바와 같이, Ccl3, Ccl5, Cxcl1 및 Cxcl12 발현이 LKO 마우스에서 유의하게 감소된 것이 확인되었고, LKO 마우스에서 사이토카인 수용체 Ccr2 및 Cxcr4의 발현이 감소되었다. 특히, Ccl5는 대식세포 침윤에 관여하고, Cxcl12 / Cxcr4는 손상 부위로 조혈줄기 세포 동원에 관여하므로, 이와 같은 결과를 통하여 간 TAZ가 사이토카인 발현의 조절을 통해 대식세포 침윤 및 활성화를 조절할 수 있음을 확인할 수 있었다.

- [0092] **실시예 3. TAZ의 NF- κ B, Stat3, Erk 및 Akt 신호전달 과정을 통한 간 재생 촉진능 확인**
- [0093] LKO 마우스에서 간 재생 장애의 기전을 추가로 연구하기 위해, 간 재생에 관여하는 신호 성분을 확인하기 위하여, 마우스의 간을 분리하고 이의 세포 용해물을 간 절제술 수행 24, 36 및 72 시간에 이의 면역 블롯팅을 통해 TAZ, NF- κ B p65, 포스포-NF- κ B p65 (S536), Stat3, 포스포-Stat3 (S727), 및 α -튜불린의 발현을 확인한 결과를 도 5A에, 상기 세포 용해물의 면역 블롯팅 분석을 사용하여 Akt, 포스포-Akt (S473), Erk1/2, 및 포스포-Erk1/2 (T202/Y204)의 발현을 도 5B에서 확인하였다.
- [0094] 도 5A에서 확인한 바와 같이, 세린 536에서 NF- κ B의 인산화에 의한 NF- κ B의 활성화는 LKO 마우스에서 현저히 억제되는 것이 확인되었고, 이를 통해 TAZ가 간이 재생되는 동안 NF- κ B 활성화를 유도하고, 아울러 세린 727에서 Stat3의 인산화에 의한 Stat3 활성화는 LKO 마우스에서도 감소되었으며, 따라서 이를 통해 IL6-Jak-Stat3 축이 간 손상 이후 TAZ를 통해 활성화되는 것을 확인하였다.
- [0095] 도 5B에 나타난 바와 같이, 인산화된 Erk로 표시된 Erk의 활성화는 LKO 마우스에서 감소되었으며, 세린 473에서 Akt의 인산화 역시 LKO 마우스에서 감소된 것으로 확인되었다. 따라서, 이러한 결과를 통하여 NF- κ B 활성화 및 Jak-Stat3, Erk 및 Akt 신호 전달이 간이 재생되는 동안 TAZ에 의해 유도되는 것을 확인하였다.
- [0097] **실시예 4. 부분 간절제술 이후 간 재생 과정에서의 TAZ의 결핍으로 인한 간 섬유화의 확인**
- [0098] WT 및 LKO 마우스 간 조직에서의 H & E 염색, 시리우스 레드 염색 및 α -SMA 발현을 확인한 결과를 도 6A에, 시리우스 레드-양성 염색 면적을 측정된 결과를 도 6B에, α -SMA 양성 염색 면적을 확인한 결과를 도 6C에, qRT-PCR을 사용하여 유전자 발현을 분석하고 Gapdh 수준으로 정규화한 결과를 도 6D에 나타내었다. (n = 6-10/그룹, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001).
- [0099] LKO 마우스에서 간 절제술 이후 간 재생이 진행되고 종결되는 단계에서 관주위 섬유화가 진행(periductal fibrogenic progression)된 것을 확인할 수 있었는데, 구체적으로 도 6 및 도 6B에서 확인한 바와 같이, 시리우스 레드 염색을 통해 증가된 콜라겐 퇴적이 확인되었으며, 아울러 도 6A 및 도 6C를 통하여 섬유화의 마커인 α -SMA 수준이 증가된 것 역시 확인할 수 있었다. 또한 도 6D에서 확인한 바와 같이, Tgfb1, Colla1, Acta2 및 Timp1을 포함한 섬유화 마커 유전자의 발현이 LKO 마우스에서 유의하게 증가된 것이 확인되어, TAZ가 PHx 이후 간 재생의 종결 단계에도 필요하며, TAZ가 간 섬유화증으로의 진행을 차단할 수 있음을 확인하였다.
- [0100] **실시예 5. 간 손상 이후 간 재생과정에서 TAZ의 간세포 아포토시스 억제능 확인**
- [0101] 간 절제술로 인한 간 손상 및 CC14에 의하여 유도된 급성 간 손상에서 있어서 WT와 LKO 마우스의 아포토시스를 확인하는 실험을 수행하였다. WT와 LKO의 간 조직을 TMR 레드로 염색한 결과를 확인한 결과 및 TUNEL 양성 세포의 수를 정량화하여 나타낸 결과를 도 7A에, 면역 블롯팅을 사용하여 절단된 카스파제-3 및 -9, Bim, Erk1/2, 및 α -튜불린의 발현을 나타낸 결과를 도 7B에, qRT-PCR을 통한 Bax의 발현을 확인한 결과를 도 7C에 나타내었다.
- [0102] 도 7A에서 확인한 바와 같이, PHx 수행 후 8 일에 아포토시스 중 생성되는 이중가닥 DNA 절단에서 나타나는 3'-하이드록실 말단을 라벨링함으로써 DNA 단편화를 검출하는 말단 데옥시 뉴클레오티딜 트랜스퍼라제 dUTP Nick End Labeling 분석에 의해 결정된 바와 같이, LKO 마우스는 WT 마우스 대비 아포토시스가 나타나는 간 세포의 수가 상당히 증가된 것으로 확인되었다. 또한, 도 7B에서 확인한 바와 같이, Bim 및 절단된 카스파제-3 및 -9를 포함하는 세포 사멸 마커 단백질의 수준도 LKO 마우스에서 증가되었다. 또한 도 7C에 나타난 바와 같이 Bax mRNA 발현 역시 LKO 마우스에서 증가되었다.
- [0103] 아울러 이와 같은 결과가 CC14에 의하여 유도된 급성 간 손상에서 TAZ가 간세포 사멸 보호 효과가 있는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. CC14-유도된 WT 마우스에서 TAZ의 발현을 면역 블롯팅을 통하여 확인한 결과를 도 8A에, WT 및 LKO 마우스에 CC14를 주사하고 24 시간 이후, 간 섹션을 H & E로 염색한 결과와, 이의 괴사 영역을 백분율로 나타낸 결과를 도 8B에, 절단된 카스파제-3, Bim 및 Erk1 / 2 수준을 면역 블롯팅에 의해 분석한 결과를 도 8C에, 혈청 ALT 수준을 CC14 주사 후 48 시간에 분석한 결과를 도 8D에 나타내었다.
- [0104] 도 8A에서 확인한 바와 같이, WT 마우스에서 TAZ 단백질 수준은 CC14 손상이 일어난 약 3 일 후에 증가하였다. 아울러 도 8B에서 확인한 바와 같이, 정맥 주위의 괴사 영역이 WT 및 LKO 마우스에서 확인되었지만, LKO 마우스

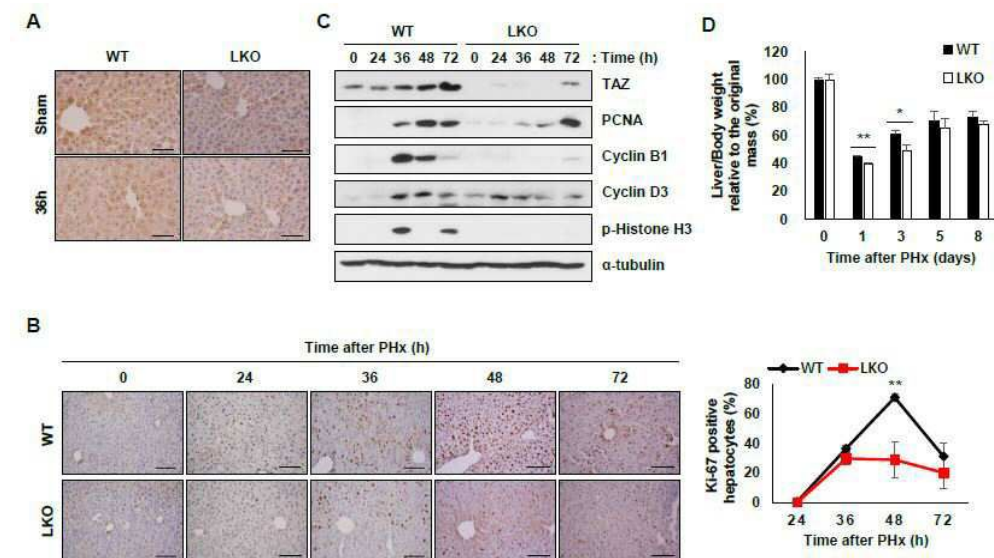
에서 WT 마우스 보다 괴사 영역이 더 크게 확인되었다. 또한, 도 8C에서 확인한 바와 같이, 절단된 카스파제 -3 및 Bim 단백질 수준이 LKO 마우스에서 증가되었고, 도 8D에서 확인한 바와 같이 혈청 ALT 수준은 WT 마우스와 비교하여 LKO 마우스에서 증가되었다. 따라서, 종합적으로 TAZ가 간 손상 후 간이 재생되는 동안 간 세포 사멸을 저해하고, 아울러 관 주위의 섬유화 역시 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였다.

도면

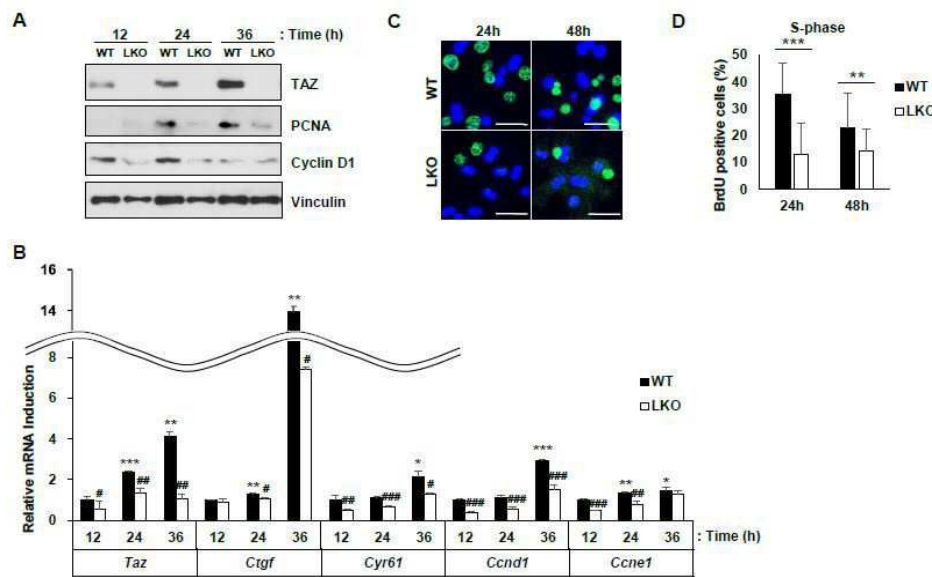
도면1



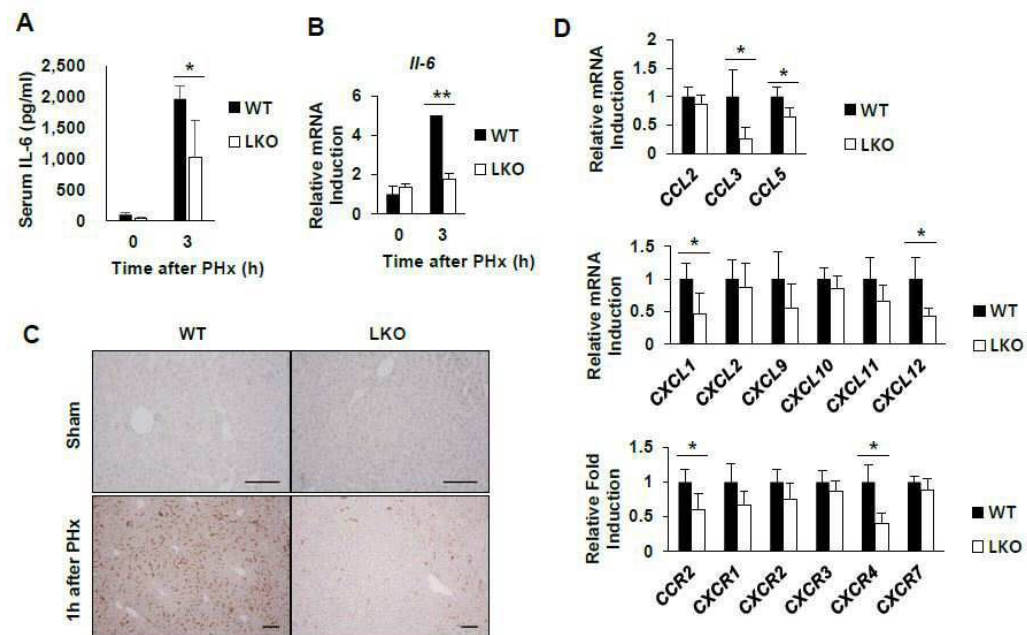
도면2



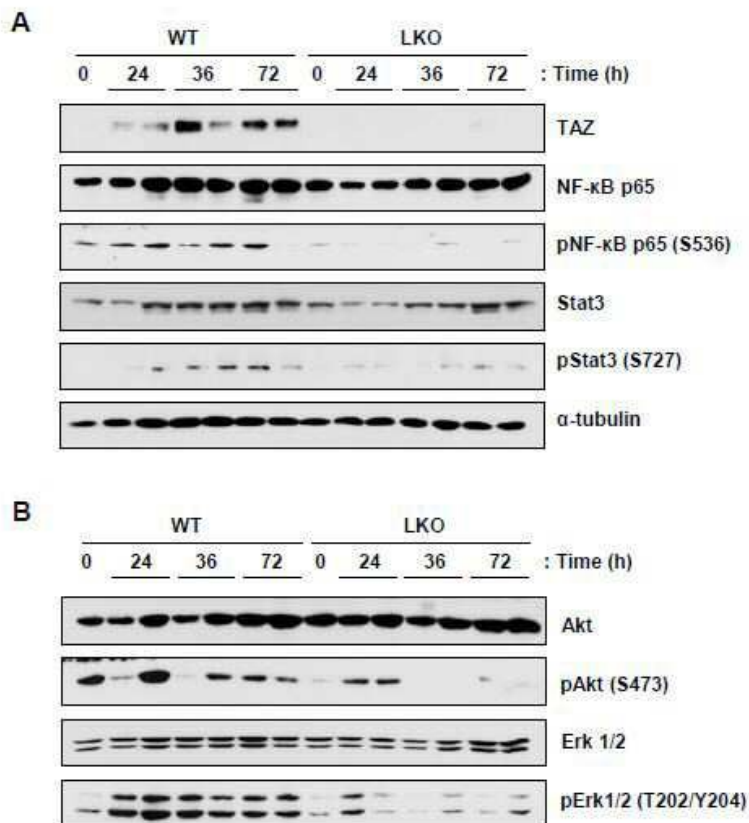
도면3



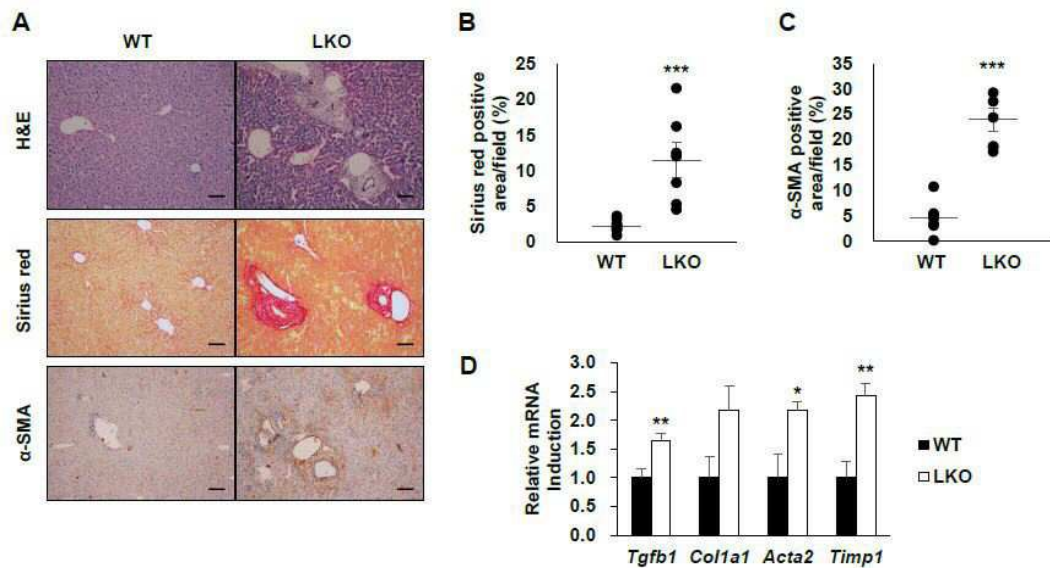
도면4



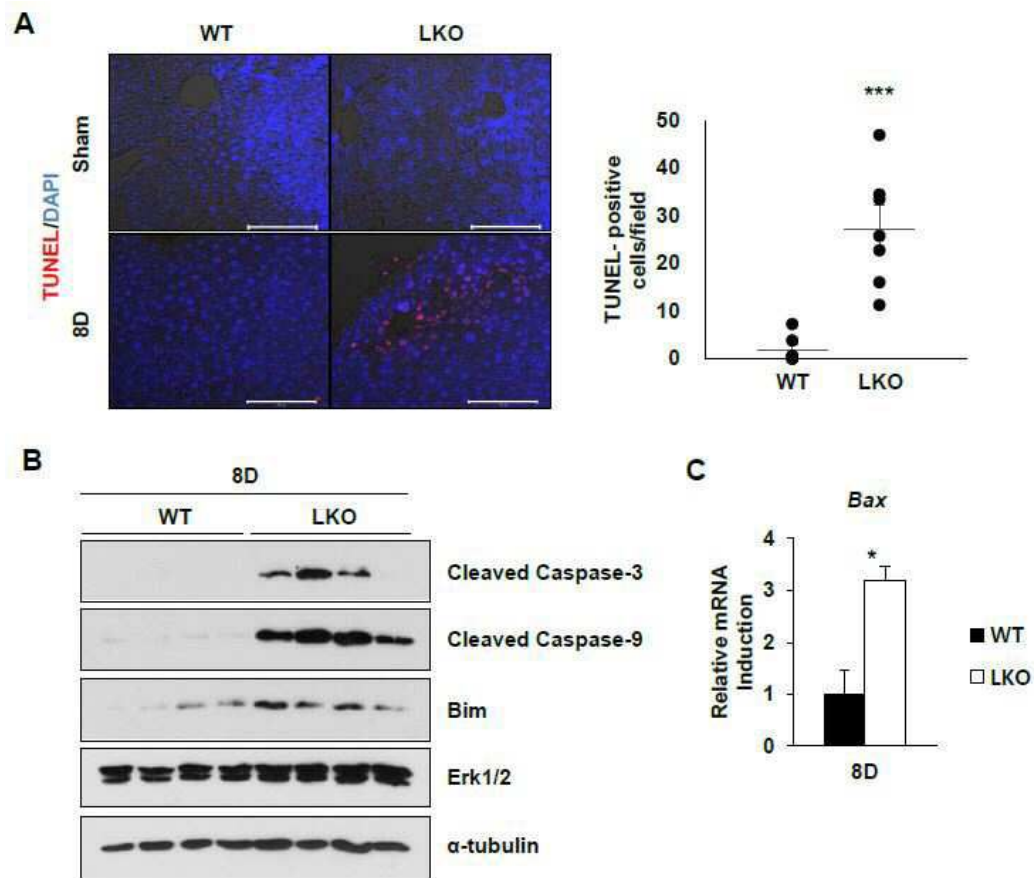
도면5



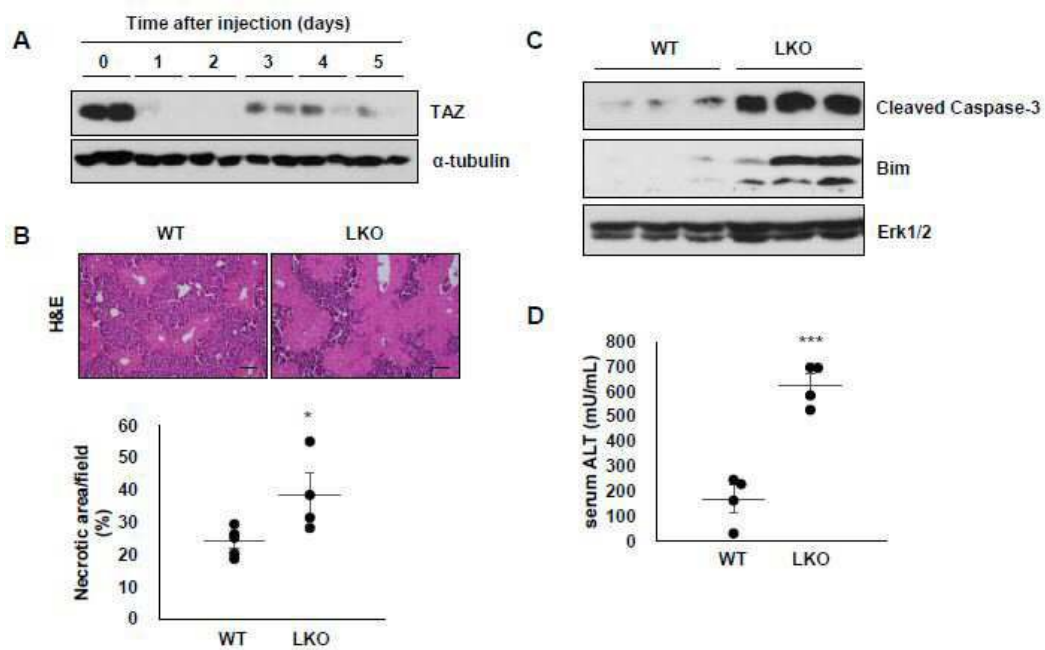
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

Korea University Research and Business Foundation

<120> Pharmaceutical composition for preventing or treating liver
disease comprising TAZ protein or a variant thereof

<130> PN131444

<160> 3

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 452

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Met His Asn Ser Thr Ala Pro Leu Ser Ala Arg Leu Phe Pro Lys Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Leu Gln Thr Leu Phe Met Gly Gln Ser Gly Ser Arg Gly
20 25 30

Gly Cys Ala Arg Leu Arg Leu Leu Cys Arg Leu Leu Ala Gln Trp Glu
35 40 45

Arg Pro Arg Pro Val Pro Gly Ile Lys Met Asn Pro Ser Ser Val Pro
50 55 60

His Pro Leu Pro Pro Pro Gly Gln Gln Val Ile His Val Thr Gln Asp
65 70 75 80

Leu Asp Thr Asp Leu Glu Ala Leu Phe Asn Ser Val Met Asn Pro Lys

85 90 95

Pro Ser Ser Trp Arg Lys Lys Ile Leu Pro Glu Ser Phe Phe Lys Glu
100 105 110

Pro Asp Ser Gly Ser His Ser Arg Gln Ser Ser Thr Asp Ser Ser Gly
115 120 125

Gly His Pro Gly Pro Arg Leu Ala Gly Gly Ala Gln His Val Arg Ser
130 135 140

His Ser Ser Pro Ala Ser Leu Gln Leu Gly Thr Gly Ala Gly Ala Ala
145 150 155 160

Gly Gly Pro Ala Gln Gln His Ala His Leu Arg Gln Gln Ser Tyr Asp

165 170 175
 Val Thr Asp Glu Leu Pro Leu Pro Pro Gly Trp Glu Met Thr Phe Thr
 180 185 190
 Ala Thr Gly Gln Arg Tyr Phe Leu Asn His Ile Glu Lys Ile Thr Thr
 195 200 205
 Trp Gln Asp Pro Arg Lys Val Met Asn Gln Pro Leu Asn His Val Asn
 210 215 220
 Leu His Pro Ser Ile Thr Ser Thr Ser Val Pro Gln Arg Ser Met Ala

 225 230 235 240
 Val Ser Gln Pro Asn Leu Ala Met Asn His Gln His Gln Gln Val Val
 245 250 255
 Ala Thr Ser Leu Ser Pro Gln Asn His Pro Thr Gln Asn Gln Pro Thr
 260 265 270
 Gly Leu Met Ser Val Pro Asn Ala Leu Thr Thr Gln Gln Gln Gln Gln
 275 280 285
 Gln Lys Leu Arg Leu Gln Arg Ile Gln Met Glu Arg Glu Arg Ile Arg
 290 295 300

 Met Arg Gln Glu Glu Leu Met Arg Gln Glu Ala Ala Leu Cys Arg Gln
 305 310 315 320
 Leu Pro Met Glu Thr Glu Thr Met Ala Pro Val Asn Thr Pro Ala Met
 325 330 335
 Ser Thr Asp Met Arg Ser Val Thr Asn Ser Ser Ser Asp Pro Phe Leu
 340 345 350
 Asn Gly Gly Pro Tyr His Ser Arg Glu Gln Ser Thr Asp Ser Gly Leu
 355 360 365
 Gly Leu Gly Cys Tyr Ser Val Pro Thr Thr Pro Glu Asp Phe Leu Ser

 370 375 380
 Asn Met Asp Glu Met Asp Thr Gly Glu Asn Ser Gly Gln Thr Pro Met
 385 390 395 400
 Thr Val Asn Pro Gln Gln Thr Arg Phe Pro Asp Phe Leu Asp Cys Leu
 405 410 415
 Pro Gly Thr Asn Val Asp Leu Gly Thr Leu Glu Ser Glu Asp Leu Ile

420 425 430
 Pro Leu Phe Asn Asp Val Glu Ser Ala Leu Asn Lys Ser Glu Pro Phe
 435 440 445

 Leu Thr Trp Leu
 450
 <210> 2
 <211> 395
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 2
 Met Asn Pro Ser Ser Val Pro His Pro Leu Pro Pro Pro Gly Gln Gln
 1 5 10 15
 Val Ile His Val Thr Gln Asp Leu Asp Thr Asp Leu Glu Ala Leu Phe
 20 25 30
 Asn Ser Val Met Asn Pro Lys Pro Ser Ser Trp Arg Lys Lys Ile Leu
 35 40 45
 Pro Glu Ser Phe Phe Lys Glu Pro Asp Ser Gly Ser His Ser Arg Gln

 50 55 60
 Ser Ser Thr Asp Ser Ser Gly Gly His Pro Gly Pro Arg Leu Ala Gly
 65 70 75 80
 Gly Ala Gln His Val Arg Ser His Ser Ser Pro Ala Ser Leu Gln Leu
 85 90 95
 Gly Thr Gly Ala Gly Ala Ala Gly Gly Pro Ala Gln Gln His Ala His
 100 105 110
 Leu Arg Gln Gln Ser Tyr Asp Val Thr Asp Glu Leu Pro Leu Pro Pro
 115 120 125

 Gly Trp Glu Met Thr Phe Thr Ala Thr Gly Gln Arg Tyr Phe Leu Asn
 130 135 140
 His Ile Glu Lys Ile Thr Thr Trp Gln Asp Pro Arg Lys Val Met Asn
 145 150 155 160
 Gln Pro Leu Asn His Val Asn Leu His Pro Ser Ile Thr Ser Thr Ser
 165 170 175

Val Pro Gln Arg Ser Met Ala Val Ser Gln Pro Asn Leu Ala Met Asn
180 185 190

His Gln His Gln Gln Val Val Ala Thr Ser Leu Ser Pro Gln Asn His
195 200 205

Pro Thr Gln Asn Gln Pro Thr Gly Leu Met Ser Val Pro Asn Ala Leu
210 215 220

Thr Thr Gln Gln Gln Gln Gln Lys Leu Arg Leu Gln Arg Ile Gln
225 230 235 240

Met Glu Arg Glu Arg Ile Arg Met Arg Gln Glu Glu Leu Met Arg Gln
245 250 255

Glu Ala Ala Leu Cys Arg Gln Leu Pro Met Glu Thr Glu Thr Met Ala
260 265 270

Pro Val Asn Thr Pro Ala Met Ser Thr Asp Met Arg Ser Val Thr Asn
275 280 285

Ser Ser Ser Asp Pro Phe Leu Asn Gly Gly Pro Tyr His Ser Arg Glu
290 295 300

Gln Ser Thr Asp Ser Gly Leu Gly Leu Gly Cys Tyr Ser Val Pro Thr
305 310 315 320

Thr Pro Glu Asp Phe Leu Ser Asn Met Asp Glu Met Asp Thr Gly Glu
325 330 335

Asn Ser Gly Gln Thr Pro Met Thr Val Asn Pro Gln Gln Thr Arg Phe
340 345 350

Pro Asp Phe Leu Asp Cys Leu Pro Gly Thr Asn Val Asp Leu Gly Thr
355 360 365

Leu Glu Ser Glu Asp Leu Ile Pro Leu Phe Asn Asp Val Glu Ser Ala
370 375 380

Leu Asn Lys Ser Glu Pro Phe Leu Thr Trp Leu
385 390 395

<210> 3
<211> 400
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Asn Pro Ala Ser Ala Pro Pro Pro Leu Pro Pro Pro Gly Gln Gln

1 5 10 15
Val Ile His Val Thr Gln Asp Leu Asp Thr Asp Leu Glu Ala Leu Phe
20 25 30
Asn Ser Val Met Asn Pro Lys Pro Ser Ser Trp Arg Lys Lys Ile Leu
35 40 45
Pro Glu Ser Phe Phe Lys Glu Pro Asp Ser Gly Ser His Ser Arg Gln
50 55 60
Ser Ser Thr Asp Ser Ser Gly Gly His Pro Gly Pro Arg Leu Ala Gly
65 70 75 80

Gly Ala Gln His Val Arg Ser His Ser Ser Pro Ala Ser Leu Gln Leu
85 90 95
Gly Thr Gly Ala Gly Ala Ala Gly Ser Pro Ala Gln Gln His Ala His
100 105 110
Leu Arg Gln Gln Ser Tyr Asp Val Thr Asp Glu Leu Pro Leu Pro Pro
115 120 125
Gly Trp Glu Met Thr Phe Thr Ala Thr Gly Gln Arg Tyr Phe Leu Asn
130 135 140
His Ile Glu Lys Ile Thr Thr Trp Gln Asp Pro Arg Lys Ala Met Asn

145 150 155 160
Gln Pro Leu Asn His Met Asn Leu His Pro Ala Val Ser Ser Thr Pro
165 170 175
Val Pro Gln Arg Ser Met Ala Val Ser Gln Pro Asn Leu Val Met Asn
180 185 190
His Gln His Gln Gln Gln Met Ala Pro Ser Thr Leu Ser Gln Gln Asn
195 200 205
His Pro Thr Gln Asn Pro Pro Ala Gly Leu Met Ser Met Pro Asn Ala
210 215 220

Leu Thr Thr Gln Gln Gln Gln Gln Gln Lys Leu Arg Leu Gln Arg Ile
225 230 235 240

Gln Met Glu Arg Glu Arg Ile Arg Met Arg Gln Glu Glu Leu Met Arg
 245 250 255
 Gln Glu Ala Ala Leu Cys Arg Gln Leu Pro Met Glu Ala Glu Thr Leu
 260 265 270
 Ala Pro Val Gln Ala Ala Val Asn Pro Pro Thr Met Thr Pro Asp Met
 275 280 285
 Arg Ser Ile Thr Asn Asn Ser Ser Asp Pro Phe Leu Asn Gly Gly Pro
 290 295 300
 Tyr His Ser Arg Glu Gln Ser Thr Asp Ser Gly Leu Gly Leu Gly Cys
 305 310 315 320
 Tyr Ser Val Pro Thr Thr Pro Glu Asp Phe Leu Ser Asn Val Asp Glu
 325 330 335
 Met Asp Thr Gly Glu Asn Ala Gly Gln Thr Pro Met Asn Ile Asn Pro
 340 345 350
 Gln Gln Thr Arg Phe Pro Asp Phe Leu Asp Cys Leu Pro Gly Thr Asn
 355 360 365
 Val Asp Leu Gly Thr Leu Glu Ser Glu Asp Leu Ile Pro Leu Phe Asn
 370 375 380
 Asp Val Glu Ser Ala Leu Asn Lys Ser Glu Pro Phe Leu Thr Trp Leu
 385 390 395 400