

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0092946

(43) 공개일자 2025년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/17 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)

A23L 33/17 (2016.01) A61K 31/05 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01) A61P 39/00 (2006.01)

A61P 43/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/17 (2013.01)

A23L 33/10 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2023-0183670

(22) 출원일자 2023년12월15일

심사청구일자 2023년12월15일

(71) 출원인

단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단

충청남도 천안시 동남구 단대로 119, 단국대학교 천안캠퍼스내(안서동)

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

순천향대학교 산학협력단

충청남도 아산시 신창면 순천향로 22, 순천향대학교내

(72) 발명자

김은주

충청남도 천안시 서북구 노태산로 145, 101동 1703호 (두정동, e편한세상 두정2차)

이상협

경기도 성남시

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태백

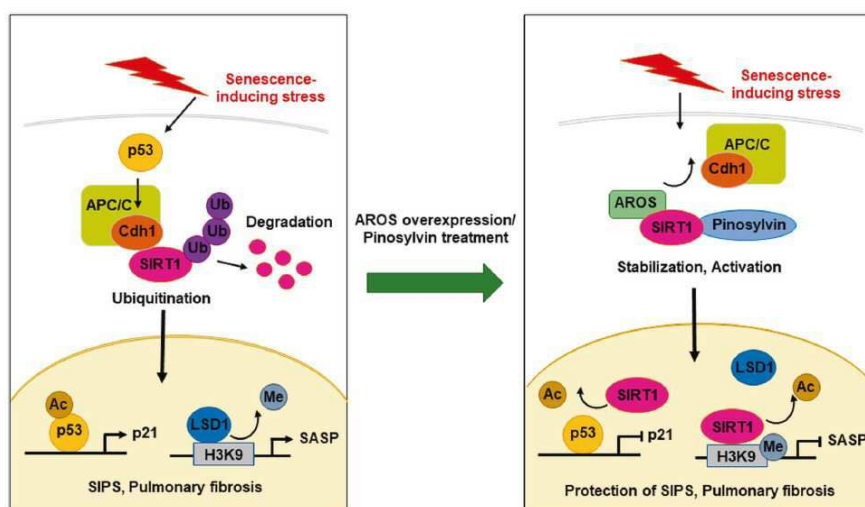
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 피노실빈 및 AROS를 유효성분으로 포함하는 세포 노화 또는 폐섬유화 질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 피노실빈 및 AROS를 유효성분으로 포함하는 세포 노화 또는 폐섬유화 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로, 항노화 단백질 SIRT1의 유비퀴틴화를 조절하는 AROS (Active regulator of SIRT1) 단백질 및 피노실빈을 유효성분으로 포함하는 조성물의 블레오마이신에 의해 유발되는 스트레스성 세포 노화의 억제 기능 및 폐섬유화 예방 효과에 관한 것이다. 전반적으로, 본 발명은 SIRT1 단백질 안정성의 상호 조절에서의 APC/C-Cdh1 및 AROS에 대한 최초의 기능적 증거를 제공하며 피노실빈의 스트레스로 인한 조기 세포 노화의 조절 효능을 통하여 세포 노화 및 노화 관련 질환의 치료나 예방에 응용될 수 있다.

대표도 - 도17



(52) CPC특허분류

A23L 33/17 (2016.08)
A61K 31/05 (2023.05)
A61P 11/00 (2018.01)
A61P 39/00 (2018.01)
A61P 43/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/314 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)
A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자

양지혜

제주특별자치도 서귀포시 열리로 81 (하예동)

엄수중

경기도 성남시 분당구 판교원로82번길 60, 1405동
201호 (운중동, 경남아너스빌아파트)

박의현

서울특별시 영등포구 양산로3길 15, 301호 (양평동3가)

김현택

충청남도 천안시 서북구 월봉7길 77, 204동 1405호
(쌍용동, 청솔2차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711089261
과제번호	2017R1A2B4011578
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	SIRT1 유비퀴틴화에 의한 세포의 조기 노화 조절 연구
기 여 율	35/100
과제수행기관명	단국대학교(천안캠퍼스)
연구기간	2019.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711142277
과제번호	2020R1F1A1049052
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	SIRT1과 BET 단백질 이중 타겟에 의한 전립선암의 에피테라피 기술
기 여 율	35/100
과제수행기관명	단국대학교(천안캠퍼스)
연구기간	2021.03.01 ~ 2022.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711169455
과제번호	2020R1A2C1007445
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	암 억제인자 p53과 암 항원 PRAME 사이의 상호 억제작용
기 여 율	30/100
과제수행기관명	세종대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

AROS(Active regulator of SIRT1) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자; 및 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 세포 노화 억제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 세포 노화는 독소루비신 또는 블레오마이신에 의해 유도된 것을 특징으로 하는 세포 노화 억제용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 Cdh1-SIRT1 결합을 억제하고, Cdh1 매개 SIRT1 유비퀴틴화를 억제하여, SIRT1 단백질의 안정화를 유도하는 것을 특징으로 하는 세포 노화 억제용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 최종농도 10 μ M 내지 100 μ M의 피노실빈(pinosylvin)을 포함하는 것을 특징으로 하는 세포 노화 억제용 조성물.

청구항 5

AROS(Active regulator of SIRT1) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자; 및 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐섬유화 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, (1) AROS 유전자의 발현 수준이 낮거나 발현되지 않은 환자; 또는 (2) AROS 유전자에 의해 발현되는 단백질의 수준이 낮은 환자의 폐섬유화 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 조성물은 SIRT1의 발현 수준을 증가시키고, Cdh1의 발현 수준을 감소시키는 것을 특징으로 하는 폐섬유화 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 조성물은 최종농도 10 μ M 내지 100 μ M의 피노실빈(pinosylvin)을 포함하는 것을 특징으로 하는 폐섬유화 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

AROS(Active regulator of SIRT1) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자; 및 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐섬유화 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 10

피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, (1) AROS 유전자의 발현 수준이 낮거나 발현되지 않은 환자; 또는 (2) AROS 유전자에 의해 발현되는 단백질의 수준이 낮은 환자의 폐섬유화 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 11

피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 시험관(in vitro) 내 노

화세포의 AROS 발현 또는 활성 조절용 시약 조성물.

청구항 12

시험관 내에서(in vitro) 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 노화세포에 처리하는 단계를 포함하는 AROS 발현 또는 활성 조절 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 피노실빈(pinosylvin) 및 AROS(Active regulator of SIRT1)를 유효성분으로 포함하는 세포 노화 또는 폐섬유화 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 노화는 생물체의 점진적인 신체 장기의 기능 저하를 특징으로 하며 여러 시스템에 걸쳐 조직적인 기능 장애를 초래하여 심혈관 질환, 치매, 암, 근소실 등의 질환을 유발하여 결국에는 죽음에 이르게 되는 생리적인 현상을 의미한다. 노화에 대한 인류의 끊임없는 연구에도 불구하고 아직까지 노화가 발생하는 기전은 명확하게 밝혀지지 않았다.

[0003] 노화관련 연구에서 최근에 주목받고 있는 것이 바로 노화된 세포의 분자적 특성에 대한 연구이다. 세포 노화는 세포가 영구적으로 분열을 멈추고 세포의 형태적 변화 및 노화 특이적 염증성 물질 분비, 세포대사의 변화 등이 나타나는 현상을 말한다. 주로 텔로미어의 기능이상, DNA 손상, 산화적 스트레스, 발암유전자 활성화 등의 다양한 스트레스 신호가 그 원인이다.

[0004] 이러한 세포 노화가 노화 관련 질환 및 개체 노화의 주 원인으로 밝혀지고 있어 노화의 치료 및 예방을 위한 세포 노화를 조절하는 분자 혹은 물질에 대한 연구가 활발히 진행 중이다. 최근 노화를 억제하는 항노화 물질을 통한 노화 관련 질병의 치료 및 피부 노화 억제 기술이 급성장하는 추세이며 대표적인 장수유전자인 SIRT1 활성화를 촉진하는 약물이 노화 시장에서 실질적으로 주목받으며 사용되고 있다. SIRT1 단백질의 발현이 DNA 손상이나 산화적 스트레스 조건에서 억제됨이 보고되고 있고 이를 조절하는 유비퀴틴화를 통한 단백질 안정성을 조절하는 E3 ligase들이 알려지고 있으나 세포노화가 진행되는 동안 SIRT1 단백질의 안정성을 조절하는 E3 ligase는 보고된 바가 없다.

[0005] 또한, SIRT1의 활성조절자 AROS의 정확한 SIRT1 활성 조절의 분자적 기전 및 세포노화 연관 기능은 지금까지 알려진 바가 거의 없다. 피노실빈은 솔잎추출물인 스틸벤계 화합물로 주로 염증 및 암, nitric oxide (NO) 억제, SIRT1 활성화에 의한 포도당 조절 등의 기능이 알려져 있을 뿐이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2023-0115689호 (2023.08.03 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 AROS(Active regulator of SIRT1) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자; 및 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 세포 노화 억제용 조성물 또는 폐섬유화 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, (1) AROS 유전자의 발현 수준이 낮거나 발현되지 않은 환자; 또는 (2) AROS 유전자에 의해 발현되는 단백질의 수준이 낮은 환자의 폐섬유화 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0009] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 AROS(Active regulator of SIRT1) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자; 및 피

노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐섬유화 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0010] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, (1) AROS 유전자의 발현 수준이 낮거나 발현되지 않은 환자; 또는 (2) AROS 유전자에 의해 발현되는 단백질의 수준이 낮은 환자의 폐섬유화 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 시험관(in vitro) 내 노화세포의 AROS 발현 또는 활성 조절용 시약 조성물 및 이를 이용한 AROS 발현 또는 활성 조절 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 AROS(Active regulator of SIRT1) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자; 및 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 세포 노화 억제용 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 AROS(Active regulator of SIRT1) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자; 및 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐섬유화 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, (1) AROS 유전자의 발현 수준이 낮거나 발현되지 않은 환자; 또는 (2) AROS 유전자에 의해 발현되는 단백질의 수준이 낮은 환자의 폐섬유화 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 AROS(Active regulator of SIRT1) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자; 및 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐섬유화 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, (1) AROS 유전자의 발현 수준이 낮거나 발현되지 않은 환자; 또는 (2) AROS 유전자에 의해 발현되는 단백질의 수준이 낮은 환자의 폐섬유화 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 시험관(in vitro) 내 노화세포의 AROS 발현 또는 활성 조절용 시약 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 시험관 내에서(in vitro) 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 노화세포에 처리하는 단계를 포함하는 AROS 발현 또는 활성 조절 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명은 피노실빈 및 AROS를 유효성분으로 포함하는 세포 노화 또는 폐섬유화 질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로, 항노화 단백질 SIRT1의 유비퀴틴화를 조절하는 AROS (Active regulator of SIRT1) 단백질 및 피노실빈을 유효성분으로 포함하는 조성물의 블레오마이신에 의해 유발되는 스트레스성 세포 노화의 억제 기능 및 폐섬유화 예방 효과에 관한 것이다. 본 발명에서 스트레스 유발 조기 노화(SIPS) 동안 SIRT1 단백질이 APC-C/Cdh1에 의해 유비퀴틴 매개 프로테아좀 분해로 발현이 억제됨을 확인하였다. SIPS 노화조건에서 APC-C/Cdh1이 결손되면 SIRT1 단백질의 발현 감소가 억제되어 SIRT1에 의한 p53 불활성화를 통해 세포 노화를 감소시키는 것을 확인하였다. 대조적으로, SIRT1 활성인자 AROS는 다양한 스트레스 요인에 의해 유발된 SIRT1 분해를 역전시키고 SIRT1과의 경쟁적 결합을 통해 Cdh1 기능을 억제함을 확인하였다. 또한, 노화 관련 분비 표현형(SASP) 유전자 IL-6 및 IL-8의 후생유전적 조절에서 Cdh1와 AROS가 서로 상반된 역할을 나타냄을 확인하였다. 마지막으로 피노실빈은 대표적인 장수유전자로 알려진 탈아세틸화 효소 SIRT1과 SIRT1 활성인자 AROS의 발현을 증가시키고, 반면에 SIRT1 단백질의 분해를 촉진하는 APC/C-Cdh1의 발현을 억제하여 블레오마이신에 의해 유발되는 세포 노화를 억제함을 확인하였다. 전반적으로, 본 발명은 SIRT1 단백질 안전성의 상호 조절에서의 APC/C-Cdh1 및 AROS에 대한 최초의 기능적 증거를 제공하며 피노실빈의 스트레스로 인한 조기 세포 노화의 조절 효능을 통하여 세포 노화 및 노화 관련 질환의 치료나 예방에 응용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020]

도 1은 SIRT1 단백질의 안정성은 DNA-손상 유도 노화(DNA damage-induced senescence) 동안 하향조절된다는 결과를 나타낸다. (a-d) Doxorubicin-유도 세포 노화. Doxorubicin은 실험예에 기재된 대로 실험에 적용됨. 오차 막대는 3번의 독립적인 실험의 평균의 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타냄. 통계적 유의성은 P 값을 기준으로 결정함(*P < 0.05, **P < 0.01). (a) SA- β -gal 염색과 염색된 세포의 정량화. (b) SAHF의 정량화. 세포는 Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich)으로 염색. (c) Ki-67 면역염색. 항-Ki-67 일차 항체와 항-rhodamine 이차항체로 면역염색 후 염색된 세포를 계수. (d) BrdU 결합. 증식하는 세포에서 새로 합성된 DNA를 측정하기 위해 BrdU로 세포를 염색. (e) Doxorubicin이 SIRT1 단백질양에 미치는 영향. SIRT1 단백질 발현의 패턴은 WB을 통해 확인; mRNA 수준은 RT-PCR로 분석됨. (f) Doxorubicin-유도 SIRT1 하향조절에서 MG132의 효과. Doxorubicin 처리된 세포를 10 μ M MG132와 incubation 하거나(+) 하지 않음(-). (g) Doxorubicin 유도 SIRT1 유비퀴틴화. SIRT1의 유비퀴틴화는 항-SIRT1 항체를 사용하여 IP 후 항-poly-ub 항체로 WB을 통해 시각화함.

도 2는 SIRT1 분해가 다른 스트레스 조건에서도 유도된다는 결과를 나타낸다. (a-d) 발암성 H-RasV12 발현의 효과. MCF-7 및 TIG-3 세포 모두 10일 동안 H-RasV12 레트로바이러스로 infection함. SA- β -gal-양성 세포의 정량화(a). BrdU 결합의 정량화(b). SIRT1 수준에 대한 효과. SIRT1 단백질 및 mRNA 수준은 WB 및 RT-qPCR을 통해 확인(c). SIRT1 유비퀴틴화에 대한 효과(d). 유비퀴틴화 분석은 도 1g에 기재된 바와 같이 수행함. (e-h) 산화적 스트레스에 의한 영향. 산화적 스트레스는 A549 및 TIG-3 세포에 H₂O₂를 처리해 유도함. 세포를 150 μ M H₂O₂로 1시간 동안 처리 후 제거하고 5일 동안 배양함. SA- β -gal-양성 세포의 정량화(e). BrdU 결합의 정량화(f). SIRT1 수준에 대한 효과(g). SIRT1 유비퀴틴화에 대한 효과(h). 모든 패널의 오차막대는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD를 나타냄(**P < 0.01).

도 3은 SIRT1을 포함한 Cdh1의 기질은 DNA 손상 및 종양유전자 발현에 의해 하향조절된다는 결과를 나타낸다. (a) Doxorubicin 처리의 효과. 세포를 doxorubicin으로 처리한 후 우측에 표시된 항체를 사용하여 WB를 실시함. (b) 종양유전자 발현의 효과. MCF-7 및 TIG-3 세포는 10일 동안 H-RasV12 레트로바이러스로 infection함. 세포 lysate는 지시된 항체를 사용하여 WB 분석을 실시함.

도 4는 APC/C-Cdh1은 SIRT1의 분해와 유비퀴틴화를 촉진시킨다는 결과를 나타낸다. (a) SIRT1은 APC/C 복합체와 결합함. HEK293 세포 lysate는 항-IgG 항체나 항-APC2 항체로 IP함. IP한 단백질은 표시된 항체로 WB을 통해 검출함. (b) Cdh1은 SIRT1 분해를 유도함. HEK293세포에서 Myc-Cdh1 또는 Myc-Cdc20을 Flag-SIRT1과 함께 발현시킴. 각 각의 항체를 사용하여 WB을 통해 검출함. (c) SIRT1의 Cdh1-매개 분해는 프로테아좀 억제제인 MG132에 의해 회복됨. (d) Cdh1 knockdown은 SIRT1의 단백질 수준을 증가시킴. HEK293세포는 대조군인 sh-Luciferase (Luc)과 sh-Cdh1, 또는 sh-Cdc20로 트랜스펙션함. 48시간 후, 세포를 harvest하고 표시된 항체로 WB 진행함. (e-f) SIRT1의 turnover에 대한 Cdh1 과발현(e) 및 결핍(f)의 효과. HEK293 세포는 표시된 대로 트랜스펙션 후 0.1 μ M doxorubicin로 1시간동안 처리함. Doxorubicin 제거 1일 후 세포를 CHX (50 μ g/ml)를 표시된 시간동안 처리한 후 표시된 단백질에 대해 WB을 실시함. SIRT1의 상대적인 단백질 수준은 ImageJ 소프트웨어를 사용해 정량화함. 오차막대는 3번의 독립적인 실험의 평균의 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타냄(*P < 0.05, **P < 0.01). (g-h) SIRT1 유비퀴틴화에 대한 Cdh1 과발현(g) 및 결핍(h)의 효과. 표시된 조건으로 HEK293 세포에 트랜스펙션하고 24시간 후, 세포를 10 μ M MG132로 12시간동안 처리해 harvest하고 항-flag 항체를 사용하여 IP를 수행. SIRT1의 유비퀴틴화는 항-HA 항체 또는 항-poly-ub 항체로 WB을 통해 시각화함. (i) Cdh1에 의한 SIRT1 In vitro 유비퀴틴화. In vitro 상에서 합성한 Flag-SIRT1과 Myc-Cdh1을 유비퀴틴화 kit (Enzo Life Science)과 항-APC2 항체로 정제한 APC/C 복합체와 incubation함. 유비퀴틴화된 SIRT1은 항-Flag 항체를 사용하여 WB을 통해 검출함. (j-l) Cdh1 타겟팅에 필요한 SIRT1 D-box 식별. (j) Cdh1과 SIRT1 M1 돌연변이 사이의 결합 감소. HEK293 세포는 표시된 것처럼 함께 트랜스펙션됨. 세포 lysate는 항-Flag 항체로 IP 수행되었고 항-GFP 항체로 WB 진행. (k) SIRT1 M1 돌연변이는 Cdh1-매개 분해에 저항성이 있음. HEK293 세포에 표시된 대로 트랜스펙션함. WB은 표시된 항체로 진행. (l) 1M 돌연변이의 SIRT1 유비퀴틴화 결함. HEK293 세포는 표시된 대로 HA-ubiquitin을 포함한 발현벡터로 트랜스펙션됨. 유비퀴틴화된 SIRT1은 항-Flag로 IP 진행 후 항-HA 항체로 WB하여 시각화함.

도 5는 SIRT1의 첫 번째 D-box는 유비퀴틴-의존성 분해에 요구된다는 결과를 나타낸다. (a) Transfection 조건에서 Cdh1과 SIRT1 사이의 상호작용. HEK293 세포는 지시된 construct들로 트랜스펙션함. Lysate는 항-Myc 항체로 IP 진행하고, 항-Flag 또는 항-GFP 항체로 WB 수행함. (b) SIRT1의 D-box (Destruction box) 모티프의 아미노산 서열. 다양한 종에서 SIRT1의 추정 D-box에 해당하는 영역이 표시됨. (c) SIRT1의 첫 번째 D-box의 돌연변이는 Cdh1-매개 SIRT1 turnover를 억제함. HEK293 세포를 표시된 construct로 트랜스펙션하고 표시된 시간 동안

CHX (50 μ g/ml)를 처리한 후 각각의 항체를 사용하여 WB 수행함. 오차막대는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD로 나타냄(*P < 0.05).

도 6은 Cdh1 결핍이 SIRT1 유비퀴틴화 및 DNA 손상-유도 노화를 저해한다는 결과를 나타낸다. Cdh1 Knockdown의 SIRT1 분해(a), SIRT1 유비퀴틴화(b), 세포 노화(c), 및 노화 관련 단백질들의 발현 패턴(d)에서의 효과. Doxorubicin 처리 전에 A549 또는 TIG-3 세포에 두 가지 종류의 sh-Cdh1 (sC1 및 sC2)와 대조군인 sh-Luc (sL)를 트랜스펙션함. (a) 단백질 발현 패턴은 표시된 항체를 사용해 WB을 통해 확인. (b) 세포는 harvest 전에 12시간 동안 10 μ M MG132으로 처리됨. SIRT1 유비퀴틴화는 항-SIRT1 항체를 이용해 IP 후 항-poly-Ub 항체로 WB하여 확인. (c) 트랜스펙션 및 doxorubicin 처리 후, SA- β -gal-양성 세포 수를 정량화함. 오차막대는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타냄(**P < 0.01). (d) 단백질 발현 패턴은 표시된 항체를 사용하여 WB를 통해 확인. A549 세포는 p16이 결핍되어 있음.

도 7은 발암성 Ras-유도 노화 및 SIRT1 분해가 Cdh1 결핍 시 억제된다는 결과를 나타낸다. (a-b) MCF-7 및 TIG-3 세포는 모두 sh-Cdh1 (sC) 또는 sh-Luc (sL)로 트랜스펙션하기 전 *H-RasV12* 레트로바이러스로 infection 되었고 종양성 Ras의 발현 패턴은 WB으로 확인함. 발암성 Ras-유도 SIRT1 분해(a) 및 SIRT1 유비퀴틴화(b)에 대한 Cdh1 결핍의 효과는 오른쪽에 표시된 항체를 사용하여 WB를 통해 확인함. (c) 발암성 Ras-유도 노화에 대한 Cdh1 knock의 효과. SA β -gal-양성 세포의 수를 계수함. 오차막대는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD로 나타냄(**P < 0.01).

도 8은 AROS가 SIRT1을 안정화하여 DNA 손상-유도 노화를 억제한다는 결과를 나타낸다. (a-c) Doxorubicin-유도 노화(a), SIRT1 분해(b), SIRT1 유비퀴틴화(c)에 대한 AROS 과발현의 효과. Flag-AROS를 안정적으로 발현시키는 A549 세포의 2개의 subclone (F-AROS1 및 F-AROS2)에 doxorubicin을 처리함. (a) Doxorubicin 제거 4일 후, SA- β -gal 염색을 통해 세포를 확인. 오차막대는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타냄(**P < 0.01). (b) 동일한 조건에서, SIRT1의 단백질 수준은 표시된 항체를 사용하여 WB을 통해 확인. (c) MG132 첨가 후, 항-SIRT1 항체를 이용하여 IP 하고 항-poly-Ub 항체를 이용해 WB 진행해 SIRT1 유비퀴틴화를 측정. (d-f) Doxorubicin-유도 노화 (d), SIRT1 분해(e), 및 SIRT1 유비퀴틴화(f)에 대한 AROS knockdown의 효과. AROS-결핍 A549 세포는 두 가지 종류의 sh 발현 벡터를 사용하여 선별됨. AROS가 고갈된 A549 세포의 두 가지 subclone 은 doxorubicin으로 처리(+)하거나 처리하지 않았다(-). (d) SA- β -gal-양성 세포를 계수함. 오차막대는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타냄(**P < 0.01). (e) SIRT1 분해는 표시된 항체를 사용하여 WB을 통해 확인함. (f) SIRT1 유비퀴틴화는 위에서 서술한 바와 같이 확인함. (g-h) SIRT1 안정화에 대한 AROS 과발현(g)과 knockdown (h)의 효과. HEK293 세포는 Flag-SIRT1, Myc-Cdh1 및 Flag-AROS (과발현) 또는 sh-AROS (knockdown)을 transient하게 트랜스펙션함. 세포 lysate는 표시된 항체를 사용하여 WB을 실시함. (i) Cdh1-매개 SIRT1 유비퀴틴화에 대한 AROS의 과발현의 효과. HEK293 세포는 표시된 바와 같이 트랜스펙션하고 MG-132로 incubation함. 유비퀴틴화된 SIRT1은 항-Flag 항체를 사용하여 IP를 통해 시각화하고 항-HA 항체로 WB를 통해 시각화함. M, mock; FE1, Flag-empty #1; FA1, Flag-AROS #1; FA2, Flag-AROS #2; sL1, sh-Luc #1; sL2, sh-Luc #2; sA1-1, sh-AROS #1-1; sA1-2, sh-AROS #1-2; sA2-1, sh-AROS #2-1; sA2-2, sh-AROS #2-2.

도 9는 AROS가 DNA 손상-유도 노화를 억제한다는 결과를 나타낸다. (a) Doxorubicin-유도 노화에서 AROS 과발현의 효과. Flag-AROS을 안정적으로 발현하는 A549 세포를 doxorubicin으로 4일간 처리함. SA- β -gal-양성 세포를 나타냄. (b) SIRT1 mRNA의 발현 수준에 대한 AROS 과발현의 효과를 RT-qPCR로 분석함. 오차막대는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD로 나타냄(*P < 0.05). (c) Doxorubicin-유도 노화에 대한 AROS knockdown의 효과. SA- β -gal-양성 세포는 현미경을 통해 관찰됨. 약어: M, Mock; FE1, Flag-Empty #1; FE2, Flag-Empty #2; FA1, Flag-AROS #1; FA2, Flag AROS #2.

도 10은 AROS와 Cdh1가 etoposide-유도 노화에서 SIRT1 turnover를 조절한다는 결과를 나타낸다. (a-b) etoposide-유도 노화(a) 및 SIRT1 분해(b)에 대한 AROS 과발현의 효과. 안정적으로 Flag-AROS를 발현하는 A549 세포(F-AROS1 and F-AROS2)에 1 μ M etoposide를 처리함. (a) 48시간 후, SA β -gal 염색을 수행함. 오차막대는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타냄(**P < 0.01, ***P < 0.001). (b) 동일한 조건에서 표시된 항체를 사용하여 WB을 통해 SIRT1의 수준을 확인함. (c-d) Etoposide-유도 노화(c) 및 SIRT1 분해(d)에 대한 Cdh1 knockdown의 효과. (c) 48시간 후, SA- β -gal 염색을 통해 세포를 확인. 오차막대는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD로 나타냄(***P < 0.001). (d) 동일 조건에서 표시된 항체를 사용하여 WB를 통해 SIRT1의 수준을 확인함.

도 11은 AROS와 Cdh1가 camptothecin-유도 노화에서 SIRT1 turnover를 조절 한다는 결과를 나타낸다. (a-b)

camptothecin-유도 노화(a) 및 SIRT1 분해(b)에 대한 AROS 과발현의 효과. 안정적으로 Flag-AROS를 발현하는 A549 세포(F-AROS1 and F-AROS2)에 10 nM camptothecin 을 처리함. (a) 4일 후, SA β -gal 염색을 수행함. 오차막대는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타냄(**P < 0.01, ***P < 0.001). (b) 동일한 조건에서 표시된 항체를 사용하여 WB를 통해 SIRT1의 수준을 확인함. (c-d) camptothecin-유도 노화(c) 및 SIRT1 분해(d)에 대한 Cdh1 knockdown의 효과. (c) 4일 후, SA- β -gal 염색을 통해 세포를 확인. 오차막대는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD로 나타냄(***P < 0.001). (d) 동일 조건에서 표시된 항체를 사용하여 WB를 통해 SIRT1의 수준을 확인함.

도 12는 AROS가 SIRT1과 결합하고 안정화하기 위해 Cdh1과 경쟁한다는 결과를 나타낸다. (a) AROS와 Cdh1의 경쟁적 SIRT 결합에 대한 모식도. SIRT1의 아미노산 114-217은 AROS의 결합 부위를 구성한다. SIRT1 Δ 은 SIRT1의 아미노산 1-217의 결실을 나타냄. (b) SIRT1의 1-217은 Cdh1과의 결합에 요구됨. HEK293 세포는 Myc-Cdh1 및 Flag-SIRT1 WT 또는 Flag-SIRT1 Δ 으로 트랜스펙션됨. 세포 lysate는 항-Myc 항체로 IP 진행하고 항-Flag 항체로 WB를 진행함. (c) SIRT1 단편과 AROS 및 Cdh1의 직접적인 결합 확인. 정제된 GST, GST-AROS, 또는 GST-Cdh1 단백질은 in vitro 합성된 Flag-SIRT1 Δ 또는 Flag SIRT1(114-217) 단편과 함께 incubation 됨. 결합된 단백질은 항-Flag 항체를 통해 시각화함. (d) Cdh1-매개 SIRT1 turnover에 SIRT1의 아미노산 1-217이 요구됨. HCT116 세포를 Myc-Cdh1 및 GFP-SIRT1-WT 또는 GFP-SIRT1 Δ 로 트랜스펙션하고 표시된 시간동안 CHX (50 μ g/ml)를 처리함. 각 항체로 WB를 통해 결과를 나타냄. 오차막대는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타냄(*P < 0.05). (e) SIRT1 결합에 대한 경쟁. GST 또는 GST-SIRT1(114-217) 및 in vitro 합성한 Myc-Cdh1을 in vitro 합성한 Flag-AROS의 양을 증가시키며 반응시킴. 결합된 단백질은 표시된 항체를 사용하여 WB로 시각화함. f SIRT1 안정화에 대한 경쟁. HEK293 세포를 Flag-SIRT1, Myc-Cdh1, 그리고 Flag-AROS를 양을 증가시키며 트랜스펙션함. 단백질 수준은 표시된 항체를 사용하여 WB로 확인함.

도 13은 Cdh1과 AROS가 SASP 관련 유전자의 후성유전학적 조절에서 상반된 역할을 한다는 결과를 나타낸다. (a) Doxorubicin에 의한 IL-6 및 IL-8의 mRNA 발현의 상향조절. Doxorubicin 처리된 A549 세포의 mRNA 발현 수준은 RT-qPCR을 통해 측정되었고 GAPDH 발현으로 정규화함. (b) Doxorubicin이 SASP 유전자의 후성유전학적 조절에 미치는 영향. A549 세포에 doxorubicin을 처리하고, 지시된 항체를 사용하여 qCHIP (quantitative chromatin IP) 분석을 실시함. (c) Cdh1의 결핍이 IL-6 및 IL-8의 mRNA 발현 패턴에 미치는 영향. A549 세포를 sh-Luc (sL) 또는 sh-Cdh1 (sC)로 트랜스펙션한 후 doxorubicin으로 처리함. mRNA의 수준은 RT-qPCR을 통해 정량화함. (d) SASP 유전자의 후성유전학적 조절에 대한 Cdh1 knockdown의 효과. A549 세포를 트랜스펙션한 뒤 서술된 바와 같이 처리 후 지시된 항체를 사용하여 IL-6 및 IL-8 프로모터의 qChIP 분석을 실시함. (e) IL-6 및 IL-8의 mRNA 발현 패턴에 대한 AROS 결핍의 영향. AROS가 stable하게 knockdown 되는 A549 세포를 doxorubicin으로 처리한 후 RT-qPCR 분석을 진행함. (f) SASP 유전자의 후성유전학적 조절에 대한 AROS knockdown의 반대 효과. AROS knockdown이 유지되는 A549 세포에 doxorubicin을 처리하거나(+) 처리하지 않고(-) 지시된 항체를 사용하여 qCHIP을 진행함. M, Mock; sL, sh-Luc; sC1, sh-Cdh1 #1; sC2, sh-Cdh1 #2; sL1, sh-Luc #1; sL2, sh-Luc #2; sA1-1, sh-AROS #1-1; sA1-2, sh-AROS #1-2; sA2-1, sh-AROS #2-1; sA2-2, sh AROS #2-2. 오차막대는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타냄(**P < 0.01).

도 14는 SASP 관련 유전자의 후성유전학적 조절에서 Cdh1 knockdown 및 AROS 과발현의 효과 결과를 나타낸다. (a-d) 모든 실험은 A549 대신 TIG-3 세포를 사용하여 도 13a 내지 도 13d에 서술한 대로 진행함. (e) IL-6 및 IL-8 mRNA 발현 패턴에 대한 AROS 과발현의 효과. 안정적으로 AROS가 과발현되는 A549 세포(FA1 and FA2)를 doxorubicin으로 처리하거나(+) 처리하지 않았고(-), RT-qPCR 분석을 진행함. (f) SASP 유전자의 후성유전학적 조절에 대한 AROS 과발현의 효과. Stable 세포에 doxorubicin을 처리한 후 지시된 항체를 사용하여 qCHIP 분석을 진행함. 약어: M, Mock; FE1, Flag-Empty #1; FE2, Flag-Empty #2; FA1, Flag-AROS #1; FA2, Flag AROS #2. 모든 패턴의 오차막대는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD를 나타냄(*P < 0.05, **P < 0.01).

도 15는 AROS와 Cdh1의 상반된 발현 패턴이 bleomycin 유도 폐 노화에서 pinosylvin-매개 SIRT1 안정화와 관련이 있다는 결과를 나타낸다. (a) Pinosylvin에 의한 bleomycin-유도 세포노화 억제. A549 또는 TIG-3 세포는 bleomycin 처리 전에 25 μ M 또는 50 μ M pinosylvin으로 전처리함. A549 또는 TIG-3 세포는 5 μ M 및 2.5 μ M 농도의 bleomycin으로 24시간 동안 처리함. Bleomycin-유도 노화는 현미경을 통해 확인하고 SA β -gal-양성 세포의 수를 계산해 정량화함. 오차막대는 3번의 독립적인 실험의 평균의 $\pm$ 표준편차(SD)로 나타냄(*P < 0.05, **P < 0.01). (b) bleomycin-유도 노화 세포에서 p53 /p21 노화 경로에 대한 pinosylvin의 효과. (c) in vivo에서 pinosylvin에 의한 bleomycin-유도 마우스 폐 노화 억제. 마우스실험은 실험예에 기술한 바와 같이 진행함. SA- β -gal 염색의 수준은 Image J 소프트웨어를 사용하여 분석함. 눈금막대는 20 μ m. (d) 조직학 및 형태학적

패턴에 대한 pinosylvin의 효과. PBS (n=5), Pino (n=5), BM (n=9), 및 BM/Pino (n=8)-투여 폐 절편의 H&E (Hematoxylin and eosin) 염색과 폐포공간의 형태학적 분석. (e) PBS-, Pino-, BM-, 및 BM/Pino-투여 폐 절편의 Masson's trichrome 염색. 오차막대는 평균 $\pm$ S.E.M을 나타냄.; ns, not significant; ***P<0.001 and ****P<0.0001, two tailed Student's t-test. 눈금막대: 200 μ m(d) and 100 μ m(e). (f) p53/p21 및 p16 경로와 관련된 유전자의 발현 패턴에 대한 pinosylvin의 효과. 단백질 발현 패턴은 표시된 항체를 사용하여 WB를 통해 확인함. (g) AROS 및 Cdh1의 발현 패턴에 대한 pinosylvin의 효과. Pinosylvin과 bleomycin을 병용 투여 후 SIRT1, AROS 및 Cdh1에 대한 항체를 사용하여 마우스 폐 조직을 IHC 염색함. PBS (n=4-5), Pino, BM, 그리고 BM/Pino (n=5). 염색된 결과는 Image J 소프트웨어를 사용해 분석함. 눈금막대는 20 μ m, 오차막대는 마우스 4개를 사용한 실험의 평균 $\pm$ SD (*P<0.001)로 나타냄.

도 16은 Pinosylvin이 SIRT1을 상향조절하여 doxorubicin-유도 노화를 역전시킨다는 결과를 나타낸다. (a) Pinosylvin은 A549 및 TIG-3 세포에서 doxorubicin-유도 노화를 억제한다. 노화된 세포 SA- β -gal 염색을 통해 확인하고 정량화함. (b) Pinosylvin은 doxorubicin-매개 노화 세포에서 p53-p21 및 p16 노화경로를 억제함. 단백질 발현 패턴은 표시된 항체를 사용하여 WB를 통해 확인함. 모든 데이터는 세 번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ SD로 나타냄. 유의성이 있는 변화를 다음과 같이 표시함; *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001. c-e PBS, Pino, Bm 및 BM/Pino 투여 폐 절편에서 fibrosis 마커인 α -SMA, Collagen Type I (Col I) (c), Fibronectin (FN) (d), 및 Elastin (ELN) (e)에 대한 면역염색을 확인함.

도 17은 스트레스 유도 조기 노화 동안 Cdh1 매개 SIRT1 유비퀴틴화에서 AROS 및 Pinosylvin의 역할에 대한 모식도를 나타낸다. DNA 손상 신호전달은 Cdh1의 활성화를 촉진하여 SIRT1 분해 및 그에 따른 조기 노화 유도를 야기한다. AROS는 Cdh1 매개 SIRT1 유비퀴틴화를 억제하여 SIPS를 약화시켜 SIRT1을 활성화시킨다. 상기 효과는 p53 불활성화 및 SASP 관련 유전자의 하향 조절을 유발한다. Pinosylvin은 SIRT1 활성화제로서 기능하여, bleomycin 유도 폐노화에 대한 보호 효과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 본 발명에서는 스트레스 유발 조기 노화(SIPS) 동안 SIRT1 단백질이 APC-C/Cdh1에 의해 유비퀴틴 매개 프로테아좀 분해로 발현이 억제됨을 확인하였다. SIPS 노화조건에서 APC-C/Cdh1이 결손되면 SIRT1 단백질의 발현 감소가 억제되어 SIRT1에 의한 p53 불활성화를 통해 세포 노화를 감소시키는 것을 확인하였다. 대조적으로, SIRT1 활성화 인자 AROS는 다양한 스트레스 요인에 의해 유발된 SIRT1 분해를 역전시키고 SIRT1과의 경쟁적 결합을 통해 Cdh1 기능을 억제함을 확인하였다. 또한, 노화 관련 분비 표현형(SASP) 유전자 IL-6 및 IL-8의 후성유전적 조절에서 Cdh1와 AROS가 서로 상반된 역할을 나타냄을 확인하였다. 마지막으로 동물실험 결과를 통하여 블레오마이신에 의해 유발되는 세포 노화에 의해 발생하는 폐섬유화에 미치는 피노실빈의 기능을 확인하였다. 피노실빈이 장수 유전자로 잘 알려진 탈아세틸화 효소 SIRT1과 SIRT1 활성화인자 AROS의 발현을 증가시키고, 반면에 SIRT1 단백질의 분해를 촉진하는 APC/C-Cdh1의 발현 억제는 분자적 기전을 통하여 블레오마이신에 의해 유발되는 세포 노화를 억제하여 폐섬유화를 감소시킴을 세포 및 동물 모델 시스템을 통하여 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [0022] 본 발명은 AROS(Active regulator of SIRT1) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자; 및 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 세포 노화 억제용 조성물을 제공한다.
- [0023] 바람직하게는, 상기 조성물은 Cdh1-SIRT1 결합을 억제하고, Cdh1 매개 SIRT1 유비퀴틴화를 억제하여, SIRT1 단백질의 안정화를 유도할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 바람직하게는, 상기 조성물은 최종농도 10 μ M 내지 100 μ M의 피노실빈(pinosylvin)을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명에서 용어 "세포노화(cellular senescence)"는 세포 내 대사는 계속 진행되지만 세포분열은 비가역적으로 더 이상 일어나지 않는 상태를 의미한다. 방사선, DNA 손상, 또는 부적절한 세포 배양 조건 등의 스트레스에 의해 세포노화가 유도될 수 있다. 상기 세포노화는 스트레스 유도노화 (stress-induced senescence) 또는 조기 노화 (premature senescence)와 혼용될 수 있다.
- [0026] 바람직하게는, 상기 세포 노화는 독소루비신 또는 블레오마이신에 의해 유도될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명에서 "AROS(Active regulator of SIRT1)"는 SIRT1과 결합하는 인자로 SIRT1의 활성을 강화시키는 작용을 하며, NCBI accession No. NM_194326.4일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0028] 본 발명에서 "피노실빈(pinosylvin)"은 소나무속(Pinus) 중에서 유래한 화합물로서, 5-[(E)-2-페닐에테닐]벤젠-1,3-다이올(5-[(E)-2-Phenylethenyl]benzene-1,3-diol)로도 명명된다.
- [0029] 또한, 본 발명은 AROS(Active regulator of SIRT1) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자; 및 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐섬유화 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0030] 또한, 본 발명은 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, (1) AROS 유전자의 발현 수준이 낮거나 발현되지 않은 환자; 또는 (2) AROS 유전자에 의해 발현되는 단백질의 수준이 낮은 환자의 폐섬유화 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0031] 바람직하게는, 상기 조성물은 SIRT1의 발현 수준을 증가시키고, Cdh1의 발현 수준을 감소시킬 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0032] 바람직하게는, 상기 조성물은 최종농도 10 μ M 내지 100 μ M의 피노실빈(pinosylvin)을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0033] 본 발명의 약학 조성물은 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 의약 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 약학 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 의약 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명의 의약 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명은 AROS(Active regulator of SIRT1) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자; 및 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 폐섬유화 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0036] 또한, 본 발명은 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, (1) AROS 유전자의 발현 수준이 낮거나 발현되지 않은 환자; 또는 (2) AROS 유전자에 의해 발현되는 단백질의 수준이 낮은 환자의 폐섬유화 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0037] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강기능식품 조성물은 유효성분 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적 예를 들어 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0038] 상기 건강기능식품 조성물에 함유된 유효성분의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.
- [0039] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명은 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는, 시험관

(in vitro) 내 노화세포의 AROS 발현 또는 활성 조절용 시약 조성물을 제공한다.

[0041] 또한, 본 발명은 시험관 내에서(in vitro) 피노실빈(pinosylvin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 노화세포에 처리하는 단계를 포함하는 AROS 발현 또는 활성 조절 방법을 제공한다.

[0042] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 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.

[0043] <실험예>

[0044] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0045] 1. 세포주와 세포 배양

[0046] HEK293 세포와 MCF-7 세포는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's Medium, Welgene) 배지, A549 세포와 HCT116 세포는 RPMI-1640 (Welgene) 배지, TIG-3 세포(Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank, Japan)는 MEM (Minimum Essential Medium, Welgene) 배지에 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% antibiotic-antimycotic mix (Thermo Fisher Scientific)를 넣어 배양하였다. 모든 세포는 5% CO₂, 37℃의 온도와 습도가 유지되는 조건에서 배양하였다. Stable cell를 얻기 위해 A549 세포에 Lipofectamine Lipofectamine Plus reagent (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 Flag, Flag-AROS, sh-Luc, 또는 sh-AROS를 트랜스펙션(transfection)하였다. 48시간 후 트랜스펙션한 세포에 0.8mg/ml G418 (Thermo Fisher Scientific) 또는 0.1mg/ml hygromycin B (Thermo Fisher Scientific)를 처리하였다. 항생제를 2주 동안 처리하여 저항성을 가진 콜로니들을 선별하였고 항-Flag 또는 항-AROS 항체로 웨스턴블롯을 진행해 stable한 유전자 발현을 확인하였다.

[0047] 2. 사용한 플라스미드 DNA와 항체

[0048] 본 발명에서 사용된 SIRT1과 AROS의 DNA는 이전에 서술하였다(Mol. Cell 28, 277-290, 2007). Full length의 Cdh1, Cdc20, APC2와 APC11은 PCR (polymerase chain reaction)을 통해 증폭되었고 Flag, Myc-tagged pcDNA3 (Thermo Fisher Scientific), pEGFP-C3 (BD Biosciences)와 pGEX4T-1 (GE Healthcare)에 클로닝하였다. 본 발명에서 사용된 항체는 다음과 같다. SIRT1 (Santa Cruz Biotechnology, sc15404), AROS (Santa Cruz Biotechnology, sc-86209; Abcam, ab201091), Cdh1 (Abcam, ab3242), Cdc20 (SantaCruz Biotechnology, sc13162), Cyclin B1 (Santa Cruz Biotechnology, sc245), APC2 (Thermo Fisher Scientific, RB-067), APC11 (Abcam, ab154546), p53 (Santa Cruz Biotechnology, sc-126), p21 (Santa Cruz Biotechnology, sc6246), p16 (Calbiochem, NA29), green fluorescent protein (GFP; Santa Cruz Biotechnology, sc-8334), polyubiquitinated conjugates (poly-Ub; Enzo Life Science, BML-PW8805-0500), acetylated-lysine (Cell Signaling Technology, 9814), hemagglutinin (HA; Merck Millipore, 05-904), Myc (Merck Millipore, 05-724), Flag M2 (SigmaAldrich, F1804), LSD1 (Abcam, ab17721), H3K9me2 (Abcam, ab1120), H3K9ac (Abcam, ab12179), α-SMA-Cy3 (Sigma, C6198), collagen type I (Abcam, ab34710), elastin (Abcam, ab21600), fibronectin (Abcam, ab2413), β-actin(Santa Cruz Biotechnology, sc47778).

[0049] 3. 바이러스 생산

[0050] 293GPG 세포에 pBABE puro *H-RasV12* (Addgene, Plasmid #9051) viral vector를 트랜스펙션하였다. 바이러스 현탁액은 2일 간격으로 5번 회수하였다. 마지막 회수 후 바이러스 현탁액은 0.45-μm 필터로 걸러졌고, Retro-X concentrator system (Thermo Fisher Scientific)을 이용해 농축시켰다. 농축된 바이러스는 TNE buffer (50mM Tris, 130mM NaCl, and 1mM ethylenediaminetetraacetic acid)를 넣어 suspension하였다.

[0051] 4. SA-β-gal (Senescence-associated β-galactosidase) 염색

[0052] 먼저 6 well plate에 1×10^4 개의 세포를 seeding하고 다음날 doxorubicin (SigmaAldrich)를 1시간 처리하였다. Doxorubicin의 농도는 MCF-7 세포에는 0.1μM, A549 세포와 TIG-3 세포에는 0.5μM로 처리하였다. Doxorubicin을 제거하고 4일 후에 SA-β-gal 염색을 수행하였다. SA-β-gal로 염색된 세포는 현미경을 통해 확인하고 계수하였다. 8-μm로 잘려진 마우스 조직 슬라이드는 fixation solution (1% formaldehyde, 0.2% glutaraldehyde, 2mM MgCl₂, 5mM ethylenediaminetetraacetic acid, and 0.02% NP40)으로 고정하였고, 0.2 M citric acid/Na phosphate buffer (pH 6.0)과 20mg/ml X-gal이 포함된 staining solution으로 37℃에서 24시간 염색하였다. SA-β-gal 염색의 정도는 ImageJ software (NIH)로 분석하였다.

[0053] **5. 면역 침강법(Immunoprecipitation, IP)과 웨스턴블롯(Western blot, WB)**

[0054] IP와 WB은 이전에 설명한 대로 수행하였다(Mol. Cell 28, 277-290, 2007). IP를 진행하기 위해 트랜스펙션한 세포에서 얻은 lysate는 지시된 항체를 넣어 4℃에서 overnight으로 결합시켰다. A/G 혹은 A bead (Santa Cruz Biotechnology)로 4시간 동안 추가로 incubation 후 boiling 하여 결합된 단백질을 bead로부터 용출하였고, WB을 진행하였다. WB을 위해 bead로부터 나온 lysate는 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 통해 분리하였고, polyvinylidene fluoride membrane (Merck Millipore)에 트랜스퍼하고 지시된 1차 항체로 검출하였다. 블롯은 horseradish peroxidase conjugated anti-mouse (Santa Cruz Biotechnology) 또는 anti-rabbit (Jackson) 2차 항체로 반응시켰다. 단백질 밴드는 enhanced chemiluminescent reagents (iNtRON Biotechnology)과 ChemiDoc imaging system (Bio-Rad)를 사용하여 확인했다.

[0055] **6. GST (Glutathione S-transferase) 풀 다운 분석법**

[0056] GST 풀 다운 분석법은 앞서 설명된 방법으로 수행하였다(Mol. Cell 28, 277-290, 2007). 요약하면, GST-fused AROS과 Cdh1 단백질은 Escherichia coli에서 발현시켰고 glutathione-Sepharose beads (GE Healthcare)로 정제하였다. Flag-SIRT1 단백질은 TNT rabbit reticulocyte system (Promega)를 사용하여 in vitro에서 합성하였다. GST 단백질(2μg)을 10μl의 SIRT1 단백질과 incubation하였다. 결합된 단백질은 항-Flag M2 항체 (SigmaAldrich, F1804)를 이용하여 WB으로 시각화하였다.

[0057] **7. CHX (Cycloheximide) 추적 분석법**

[0058] HEK293 세포를 지시된 DNA로 transient하게 트랜스펙션하였다. 24시간 후, 단백질 신생합성을 막기 위해 세포를 50μg/ml CHX (SigmaAldrich)를 지시된 시간동안 처리하였다. 세포를 harvest하고 lysis한 뒤 WB으로 분석하였다.

[0059] **8. In vivo 와 in vitro 유비퀴틴화(ubiquitination) 실험**

[0060] in vivo SIRT1의 유비퀴틴화를 확인하기 위해 harvest 12시간 전 세포에 10 μM의 MG132 (Calbiochem)를 처리하였다. 세포 lysate는 항-SIRT1 항체를 이용하여 IP 진행하였다. SIRT1의 폴리유비퀴틴화는 항-poly-Ub 항체 또는 항-HA 항체를 이용하여 검출하였다. In vitro 유비퀴틴화 실험을 위해 ubiquitination kit (Enzo Life Science)를 제조업체의 프로토콜에 따라 사용하였다. 요약하면, 항-APC2 항체를 사용해 IP를 통하여 APC/C 복합체를 HEK293 세포에서 정제하였다. 정제한 APC/C 복합체는 in vitro-translated Flag-SIRT1, Myc-Cdh1과 섞어 주었고 5μM biotinylated ubiquitin, 100 nM E1, 2.5μM MUBcH5, 5mM Mg-ATP, 5mM dithiothreitol, and 20U/ml inorganic pyrophosphate (SigmaAldrich)가 포함된 reaction buffer를 넣어 37℃에서 1시간동안 반응시켰다. 2× nonreducing gel loading buffer 50μl를 첨가하여 반응을 종료하였다. 유비퀴틴화된 SIRT1은 항-SIRT1 또는 항Flag 항체로 WB을 진행해 검출하였다.

[0061] **9. IHC (Immunohistochemical) 염색과 IF (immunofluorescence)**

[0062] 마우스의 폐를 4% paraformaldehyde로 고정하고 OCT compound(Sakura)에 포매하여 동결조직절편을 얻었다. 동결 절편(8μm)은 1% hydrogen peroxide (H₂O₂)를 처리하여 endogenous 과산화효소 활성을 소멸시킨 후 1% bovine serum albumin으로 1시간 동안 incubation하였다. 이어서, 슬라이드를 지시된 1차 항체로 4℃에서 16시간 동안 incubation한 후, 실온에서 biotinylated anti-rabbit 이차 항체(Vector Laboratories)을 1시간 동안 처리하였다. 절편을 VECTASTAIN ABC reagent (Vector Laboratories)와 1시간 동안 incubation하였고, peroxidase substrate 3,3-diaminobenzidine solution (SigmaAldrich)를 처리하여 최적의 발현이 나타날 때까지 반응시켰다. 각 염색 결과는 ImageJ software (NIH)를 사용하여 정량화하였다. 조직병리학적 분석을 위해 H&E (hematoxylin and eosin) 염색을 표준 프로토콜에 따라 수행하였다. 폐포 공간은 Image J를 사용하여 측정하였다. 결합조직 염색에 경우, 동결 조직 절편은 trichrome staining kit (ab150686, Abcam)를 사용하여 제조업체의 지침에 따라 염색하였다. IF는 표준 프로토콜에 따라 수행하였다. 면역염색은 다음과 같은 항체를 희석하여 사용하였다. SMA-Cy3 (Sigma, 1:1000), collagen type I (1:500), elastin (Abcam, 1:1000), fibronectin (Abcam, 1:500).

[0063] **10. RT-qPCR (Reverse transcription-quantitative PCR)**

[0064] MCF-7, A549 또는 TIG-3 세포의 total RNA는 TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 분리하였다. RNA는 M-MLV RTase (Promega)와 random primer (Promega)를 사용하여 역전사되었다. cDNA 산물은 SYBR

Green Master Mix과 LightCycler system (Roche)을 사용하여 증폭 및 분석하였다. cDNA 증폭을 위해 다음의 프라이머 쌍을 이용하였다.

- [0065] Cdh1, 5' -TACTCCCTGTCTCCCGTCAG-3' (forward)와 5' -GGTACAGGCACTCCACAGGT-3' (reverse); SIRT1, 5' -TCGCAACTA TACCCAGAACATAGACA-3' (forward)와 5' -CTGTTGCAAAGGAACCAT GACA-3' (reverse);
- [0066] AROS, 5' -GGAAGACGAAGGCAATTCAGGC-3' (forward)와 5' -TCGGTGAACACGGTGCC-3' (reverse);
- [0067] IL-6, 5' -CCAGGAGCCCAGCTAT GAAC-3' (forward)와 5' -CCCAGGGAGAAGGCAACTG-3' (reverse);
- [0068] IL-8, 5' -TTGGCAGCCTTCCTGATTTC-3' (forward)와 5' -TCTTTAGCACTCCTTG CAAAC-3' (reverse).
- [0069] 각 유전자의 발현 수준은 내부표준으로 GAPDH에 대해 정규화하였다.

[0070] **11. ChIP (Chromatin immunoprecipitation)**

[0071] ChIP 분석은 이전 보고와 같이 수행하였다. 간략하게 설명하면, doxorubicin을 MCF-7 세포의 경우 0.2 μ M, A549 및 TIG-3 세포의 경우 0.5 μ M의 농도로 첨가하였다. 1시간 후, doxorubicin을 배양 배지에서 제거하였다. 4일 후, SIRT1, LSD1, H3K9me2 및 H3K9ac에 대한 항체를 사용하여 ChIP 분석을 수행하였다. 정량적 PCR 분석을 위해, 다음과 같은 프라이머 쌍을 사용하였다.

- [0072] IL-6 promoter region, 5' -AATGTGG GATTTTCCCATGA-3' (forward)와 5' -GCTCCTGGAGGGGAGATAGA-3' (reverse); IL-8 promoter region, 5' -GGTTTGCCTGAGGGGATG-3' (forward)와 5' -ACAGAGCTGCAGAAATCAGGAAGGCT-3' (reverse).

[0073] **12. RNA 간섭**

[0074] Cdh1 및 AROS에 대한 short hairpin RNA (shRNA)의 표적 염기서열은 다음과 같다.

- [0075] Cdh1#1, 5' - CCACAGGATTAACGAGAAT-3' ; Cdh1 #2, 5' GGAGCCAACTGGAGCGTGA-3' ; AROS#1, 5' -GGCAATTCAGGCCAGAAA-3' ; and AROS#2, 5' -ACCTGAAGTTCTGACCAG-3' .

[0076] shRNA 트랜스펙션은 Lipofectamine Plus reagent (Thermo Fisher Scientific) 또는 polyethylenimine (Polysciences)을 사용하여 수행하였다. Cdh1, Cdc20 및 AROS의 knockdown은 WB 분석에 의해 확인되었다.

[0077] **13. Animal studies**

[0078] 6주령 수컷 C57BL/6J 마우스를 DBL (Eumseong, Korea)에서 얻어 7일 동안 local vivarium conditions에 적응시켰다. 폐섬유증을 유도하기 위해, 마우스에 1.25 units/kg의 용량으로 bleomycin (selleckchem)을 기관내 투여하였다. 대조군 마우스는 동일한 부피의 PBS (phosphate-buffered saline)을 투여받았다. Pinosylin (10mg/kg; Carbosynth) 또는 용매 대조군(1% dimethyl sulfoxide in saline)을 bleomycin에 노출되기 24시간 전에 경구투여한 후 sacrifice될 때까지 14일 동안 매일 투여하였다. bleomycin투여 후 14일에, 마우스를 sacrifice하고 IHC, SA- β -gal 염색 및 WB를 위해 마우스의 폐를 수집하였다. 모든 동물실험은 단국대학교 동물보호위원회의 가이드라인에 따라 진행하였다.

[0079] **14. 통계적 분석**

[0080] 통계적 유의성은 Student's t-test와 one-way ANOVA를 사용하여 분석하였다. 통계적 차이는 P값(*P <0.001)을 기준으로 결정하였다.

[0081] **<실시예 1> 스트레스-유도 조기 노화(stress-induced premature senescence) 동안 유비퀴틴 매개 프로테아좀 분해를 통해 하향 조절되는 SIRT1 단백질의 발현**

[0082] 다양한 기능에도 불구하고 SIRT1 단백질의 안정성을 조절하는 메커니즘은 세포 노화를 포함한 병리학적 조건에서 제대로 정의되지 않은 상태로 남아있다. 이 기전을 규명하기 위해 먼저 MCF-7 유방암 세포, A549 폐선암 세포, TIG-3 폐 섬유아세포에서 DNA 손상을 통해 조기 노화를 유도하였다. DNA-damaging agent인 doxorubicin으로 처리한 세포는 크고 편평한 노화 관련 특징을 보였다. Doxorubicin에 의한 노화는 SA- β -gal 염색(도 1a) 및 SAHF (senescence-associated heterochromatic foci)(도 1b)의 증가와 Ki-67 염색(도 1c) 및 BrdU 결합(도 1d)의 감소를 기반으로 명백하게 나타났다. 놀랍게도, Doxorubicin 처리는 mRNA 발현 패턴에는 영향을 주지 않으면서 SIRT1 단백질의 수준을 감소시켰다(도 1e). 프로테아좀 억제제인 MG132의 처리는 doxorubicin 처리된 세포에서 SIRT1 수준을 회복시켰으며(도 1f), 이는 SIRT1의 프로테아좀 의존성 분해를 나타낸다. 또한, doxorubicin

처리 후 SIRT1 폴리유비퀴틴화(polyubiquitination)가 현저하게 가속화되는 것을 관찰하였다(도 1g). 이러한 결과를 확장하기 위해 다른 스트레스 조건에서 SIRT1의 안정성을 분석하였다. 활성화된 종양유전자 *H-RasV12*의 과발현 후, MCF-7 및 TIG-3 세포 모두에서 노화 특성과 함께 SIRT1 분해 및 유비퀴틴화를 관찰하였다(도 2a 내지 도 2d). Oxidative stress를 유발하는 H_2O_2 를 처리한 A549 및 TIG-3 세포에서도 유사한 결과를 얻었다(도 2e 내지 도 2h). 종합적으로, 이러한 결과는 SIRT1 단백질 발현이 다양한 스트레스-유도 노화 조건에서 유비퀴틴 매개 프로테아좀 분해를 통해 하향 조절됨을 시사한다.

[0083] <실시예 2> SIRT1의 유비퀴틴 의존성 프로테아좀 분해를 촉진하는 APC/C-Cdh1

[0084] APC/C의 보조활성인자인 Cdh1은 DNA 손상으로 인한 조기 세포 노화에 중요한 역할을 한다. 여러 연구에 따르면 SIRT1은 DNA 손상, 담배 연기 및 insulin-like growth factor-1에 의해 유발된 노화를 방해한다. 이러한 결과를 바탕으로 Cdh1 활성화를 유발한 DNA 손상이 SIRT1 분해 및 조기 노화 유도로 이어질 수 있다는 가설을 세웠다. 특히, doxorubicin-유도 노화 세포(doxorubicin-induced senescent cell)에서 SIRT1 발현의 하향 조절은 Cdh1의 기질인 Cdc20 및 Cyclin B1의 단백질 수준 감소와 일치하였다(도 3a). 발암성 Ras 발현 세포에서도 유사한 결과를 얻었다(도 3b). 이 데이터를 토대로 SIRT1이 Cdh1과 물리적으로 결합하는 지 여부를 조사하게 되었다. 항-APC2 항체를 사용한 IP 및 WB 분석으로 입증된 바와 같이, SIRT1은 APC11 및 APC/C의 보조활성인자인 Cdh1과 Cdc20에서 보이는 것과 비슷하게 in vivo에서 APC2와 결합하였다(도 4a). 과발현 조건 하에서 항-Myc 항체(Myc-Cdh1)를 사용한 추가 IP로 Cdh1과 SIRT1 사이의 결합을 확인하였다(도 5a). 흥미롭게도, SIRT1 단백질 수준은 Cdh1을 첨가한 후 감소했지만 Cdc20을 첨가한 후에는 감소하지 않았다(도 4b). MG132의 처리는 Cdh1 과발현 세포에서 SIRT1 단백질의 수준을 회복시켰으며(도 4c), 이는 SIRT1 분해의 프로테아좀 의존성을 시사한다. 중요하게도, shRNA를 사용한 Cdh1 결핍이 endogenous SIRT1 증가시켰다(도 4d). 단백질 합성 억제제인 CHX를 사용하여 SIRT1 단백질의 turnover를 측정하였다. Cdh1 과발현은 Flag tagged SIRT1의 반감기를 실질적으로 감소시켰고(도 4e), 이 효과는 Cdh1 Knockdown에 의해 역전되어(도 4f), Cdh1이 SIRT1 단백질의 turnover를 촉진한다는 것을 확인하였다. 다음으로, Cdh1이 직접 폴리유비퀴틴화를 통해 SIRT1 분해를 촉진하는지 여부를 확인하였다. Cdh1과 SIRT1의 coexpression은 in vivo에서 SIRT1의 유비퀴틴화를 유의하게 증가시킨 반면, Cdc20은 SIRT1 유비퀴틴화에 영향을 미치지 않았다(도 4g). 반대로, Cdh1 억제제는 endogenous SIRT1의 유비퀴틴화를 현저하게 감소시켰다(도 4h). Cdh1의 효과가 직접적인지 여부를 추가로 조사하기 위해 in vitro에서 합성된 Cdh1 및 SIRT1 단백질을 사용하여 유비퀴틴화 분석을 수행하였다. SIRT1은 APC/C 복합체의 존재 하에서 Cdh1에 의해 광범위하게 유비퀴틴화되었다(도 4i). 종합하면, 이러한 발견은 APC/C 보조활성인자 Cdh1이 SIRT1의 폴리유비퀴틴화를 직접 매개한다는 것을 시사하며, 이는 아마도 스트레스-유도 노화 시 SIRT1 단백질이 하향 조절되는 기본 메커니즘을 반영하는 것으로 추정된다. Cdh1 및 Cdc20은 D-box 또는 KEN-box 파괴 모티프의 인식을 통해 기질을 모집하고 APC/C 복합체에 기질을 특이적으로 결합시킨다. 본 발명자들은 SIRT1의 아미노산 서열에서 3개의 추정 D-box motif (RXXL)를 발견했으며, 이는 종 간에 매우 보존되어 있었다(도 5b). Cdh1이 인식에 필요한 SIRT1 D-box를 결정하기 위해 D-box의 아르기닌(R) 및 류신(L) 잔기가 알라닌(AXXA)으로 대체된 SIRT1의 점 돌연변이(point mutant)들을 만들었다. 이 돌연변이들은 SIRT1 M1, M2 및 M3로 제작하였다. Co-IP 분석은 Cdh1과 SIRT1 M1의 결합이 야생형(WT) SIRT1 및 다른 돌연변이에 대한 결합보다 약하다는 것을 나타냈다(도 4j). 예상한 대로, SIRT1 M1은 WT 또는 SIRT1의 다른 돌연변이보다 Cdh1에 의한 분해에 더 저항력이 있었다(도 4k, 도 5c). 이러한 결과와 일치하게, Cdh1에 의한 SIRT1 M1의 유비퀴틴화는 현저히 감소하여(도 4l), Cdh1-매개 유비퀴틴화에 대한 SIRT1의 첫 번째 D-box로써의 조건을 뒷받침한다.

[0085] <실시예 3> SIRT1의 분해 및 스트레스-유도 노화에 필요한 Cdh1

[0086] 스트레스 하에서 SIRT1 단백질 발현의 하향 조절과 SIRT1 유비퀴틴화에서 Cdh1의 역할에 따라, 본 발명자들은 스트레스-유도 노화 동안 Cdh1이 SIRT1 turnover에 영향을 준다는 가설을 세웠다. 이 가설을 테스트하기 위해 doxorubicin-유도 노화 세포에서 SIRT1 단백질 발현 패턴에 대한 Cdh1 억제의 효과를 조사하였다. Cdh1 knockdown 후, SIRT1 분해는 A549 및 TIG-3 세포 모두에서 현저하게 억제되었다(도 6a). Cdh1 기질인 Cdc20 및 CyclinB1은 이 세포들에서 Cdh1 knockdown에 의해 복원되었다. 또한, Cdh1의 결핍은 doxorubicin에 의한 SIRT1의 유비퀴틴화(도 6b)와 노화된 세포를 감소시켰다(도 6c). 이러한 결과와 일치하게, 종양성 Ras 유도 노화 세포에서 SIRT1 분해, SIRT1 유비퀴틴화 및 SA-β-gal 염색을 통해 Cdh1 knockdown의 효과가 유사하게 관찰되었다(도 7a 내지 도 7c). 마지막으로, doxorubicin 처리된 세포에서 SIRT1-p53 신호 경로에 관여하는 단백질의 발현 패턴의 Cdh1 결핍에 의한 영향을 측정하였다. 본 발명자들은 p53의 아세틸화 감소와 함께 Cdh1 결핍 세포에서 SIRT1의 명백한 상향 조절을 관찰했으며, 이는 p21의 억제에 이어졌다. 노화 마커인 p16의 발현은 TIG-3 세포에서 Cdh1 knockdown에 의해 효과적으로 억제되었지만, p16 결핍 A549 세포에서는 그렇지 않았다(도 6d). 결론적

으로, 상기 데이터는 E3 ubiquitin ligase APC/C의 공동활성인자인 Cdh1이 스트레스-유도 세포 노화동안 유비퀴틴 의존성 SIRT1 분해를 매개한다는 것을 보여준다.

[0087] <실시예 4> SIRT1 단백질을 안정화시켜 DNA 손상-유도 노화를 약화시키는 AROS

[0088] 이전 연구에서 본 발명자들은 AROS를 SIRT1 탈아세틸화효소 활성을 촉진하는 endogenous SIRT1의 활성인자(activator)임을 확인하였다. 그러나 AROS가 SIRT1 활성을 조절하는 메커니즘과 세포 노화에 대한 역할은 여전히 불분명하였다. 본 발명에서 본 발명자들은 doxorubicin-유도 노화(doxorubicin-induced senescence)에서 AROS의 역할을 결정하는 것을 목표로 하였다. 놀랍게도, SA- β -gal-양성 세포의 수는 대조군에 비해 doxorubicin 처리된 AROS 발현 세포에서 유의하게 감소하였다(도 8a, 도 9a). AROS의 coexpression은 doxorubicin 처리 후 하향 조절된 SIRT1 단백질의 수준을 복원했으며 Cdh1 단백질의 수준(도 8b) 또는 SIRT1 mRNA 발현 패턴에 영향을 미치지 않았다(도 9b). 유사하게, AROS는 SIRT1에 대한 유비퀴틴화를 억제하였다(도 8c). 반대로, endogenous AROS의 knockdown은 doxorubicin 처리된 세포 중 SA- β -gal-양성 세포의 비율을 증가시켰다(도 8d, 도. 9c). 또한, AROS의 결핍은 SIRT1의 doxorubicin 유도 분해(도 8e) 및 SIRT1 폴리유비퀴틴화(도 8f)를 가속화하였다. 다음으로 AROS의 효과가 일반적인 조건에서 Cdh1에 의한 SIRT1의 조절과 관련이 있는지 여부를 조사하였다. AROS와 Cdh1 및 SIRT1의 coexpression은 Cdh1에 의해 감소된 SIRT1의 수준을 회복시켰다(도 8g). 이 결과는 AROS의 결핍에 의해 역전되었으며, AROS knockdown은 Cdh1에 의한 SIRT1의 분해를 가속화하였다(도 8h). 또한, AROS는 Cdh1 과발현에 의해 증가된 SIRT1 유비퀴틴화 수준을 정상 수준으로 감소시켰다(도 8i). 요약하면, 이러한 결과는 AROS가 Cdh1 매개 SIRT1 유비퀴틴화를 억제하고 SIRT1 단백질 수준을 안정화한다고 시사하며, 스트레스-유도 노화에서 AROS의 잠재적 역할을 보여준다. 흥미롭게도, 본 발명자들은 DNA 토포이소머라아제 억제제인 etoposide와 camptothecin을 사용하여 다양한 DNA 손상 조건에서 SIRT1 turnover에 대한 AROS와 Cdh1의 효과를 확인하였다. doxorubicin을 사용한 결과처럼, 이 실험은 유사한 데이터를 보였으며(도 10 및 도 11), 이는 SIRT1 분해에서 AROS와 Cdh1의 상반된 역할이 다양한 DNA 손상 및 노화 유도 조건에서 보존됨을 나타낸다.

[0089] <실시예 5> SIRT1과 결합 및 안정화를 위해 Cdh1과 경쟁하는 AROS

[0090] 다음으로, AROS가 Cdh1에 의해 촉진되는 SIRT1 유비퀴틴화를 억제하는 분자적 메커니즘을 분석하였다. 특히, 본 발명자는 두 개의 SIRT1 D-box 모티프(M1 및 M2)가 AROS 결합 영역(아미노산 114-217) 내에 위치한다는 것을 발견하였다. 따라서 본 발명자들은 AROS가 SIRT1 결합을 위해 Cdh1과 직접 경쟁하여 Cdh1 매개 SIRT1 유비퀴틴화를 방해한다는 가설을 세웠다(도 12a). 이 가설을 테스트하기 위해 본 발명자들은 AROS 결합 영역과 두 개의 D-box 모티프가 모두 없는 WT SIRT1 및 SIRT1 Δ (아미노산 218-747) construct를 사용하여 Cdh1과의 co-IP 분석을 수행하였다. 예측한 바와 같이, Cdh1과 SIRT1 Δ 사이의 확실한 결합은 관찰되지 않은 반면, WT SIRT1과의 결합은 확인되었다(도 12b). GST 풀 다운 분석은 AROS와 Cdh1 모두 SIRT1의 AROS 결합 영역과 직접 결합하지만 SIRT1 Δ 와는 결합하지 않는 것으로 나타났다(도 12c). Cdh1 유도 SIRT1 분해는 SIRT1 아미노산 218-747의 결실에 의해 억제되었으며(도 12d), 이는 Cdh1과의 결합이 SIRT1 불안정화에 필요함을 시사한다. SIRT1 결합에서 AROS와 Cdh1의 역할을 특정화하기 위해 in vitro 내에서 경쟁적 결합 실험을 수행하였다. AROS의 양이 증가함에 따라 Cdh1과 SIRT1(114-217) 사이의 결합의 감소가 증가하였다(도 12e). 이러한 발견과 일치하게, Cdh1 매개 SIRT1 단백질 하향조절은 AROS 발현의 증가에 의해 점진적으로 회복되었다(도 12f). 종합하면, 이러한 결과는 AROS가 SIRT1과의 경쟁적인 연관성을 통해 Cdh1-SIRT1 결합을 방해하고 Cdh1 매개 SIRT1 유비퀴틴화를 방해하여 SIRT1의 단백질 수준의 안정화를 초래한다는 것을 나타낸다.

[0091] <실시예 6> SASP 관련 유전자의 후성유전학적 조절에서 상반된 역할을 하는 Cdh1 및 AROS

[0092] 세포 노화는 SASP를 유도하며, 이는 염증 조절 및 주변 미세 환경의 변화와 관련이 있다. 최근 연구에 따르면 두 가지 주요 SASP인 IL-6 및 IL-8의 발현 수준이 H3K9 메틸전이효소인 G9a의 Cdh1 매개 분해에 의해 후성유전학적으로 상향 조절된다고 보고되었다. 이러한 변화는 DNA 손상에 대한 H3K9me1/me2의 enrichment를 감소시킨다. IL-6 및 IL-8의 발현 수준은 또한 노화 세포에서 SIRT1의 하향 조절에 의한 히스톤 H3K9 및 H4K16의 아세틸화를 통해 상향 조절된다. 더욱이, 본 발명자들은 이전에 SIRT1과 LSD1이 PPAR γ 활성에 대한 후성유전학적 억제를 상반되게 조절한다고 보고한 바 있다. 따라서 이러한 문헌을 바탕으로 Cdh1과 AROS가 SIRT1과 함께 스트레스-유도 노화 동안 SASP 관련 유전자의 조절에 상반되는 역할을 할 수 있다는 가설을 세웠다. 이 가설을 검증하기 위해 doxorubicin이 SASP 관련 유전자인 IL-6 및 IL-8의 발현 패턴에 미치는 영향을 분석하였다. RT-qPCR 결과는 A549 세포에 doxorubicin을 처리하면 두 유전자의 mRNA 발현 수준이 크게 증가한다는 것을 보여주었다(도 13a). 후속 ChIP 분석은 DNA 손상 조건에서 SIRT1 단백질 발현의 하향 조절과 관련이 있을 가능성이 있

는 프로모터에서 SIRT1 recruitment의 감소를 보였으며 이러한 감소는 H3K9ac(활성 히스톤 마커)의 enrichment로 이어졌다(도 13b). 또한, 히스톤탈메틸화효소 LSD1의 recruitment 증가와 일치하게 억제 히스톤 마커인 H3K9me2의 감소를 관찰했으며, 다른 세포주인 TIG-3 (도 14a 내지 도 14d) 및 MCF-7 (데이터 없음)에서도 확인하여, SASP 관련 유전자의 후성 유전학적 제어에서 Cdh1의 역할을 증명하였다. 그런 다음 AROS가 doxorubicin 유도 노화 세포에서 IL-6 및 IL-8의 발현에 영향을 미치는지 여부를 평가하였다. 특히, AROS knockdown은 A549 세포에서 대조군에 비해 doxorubicin에 의한 IL-6 및 IL-8 유전자의 발현 증가를 촉진하였다(도 13e). Doxorubicin이 없는 경우 AROS 결핍의 확실한 효과는 관찰되지 않았다. 그러나 Doxorubicin 처리된 세포에서 SIRT1 및 H3K9me2의 상당한 하향 조절과 LSD1 및 H3K9ac의 상향 조절이 관찰되었다. Doxorubicin의 이러한 효과는 AROS가 결핍된 노화 세포에서 가속화되었다(도 13f). 주목할만하게, 이러한 변화는 AROS의 과발현에 의해 역전되었다(도 14e 및 도 14f). 이러한 발견은 doxorubicin의 효과가 Cdh1가 결핍된 노화 세포에서 역전되고 AROS가 결핍된 노화 세포에서는 가속화됨을 나타낸다. 종합하면, 본 발명자들은 Cdh1과 AROS가 스트레스-유도 세포 노화 동안 SIRT1 안정성에 대한 반대 조절로 인해 SIRT1 및 modified histones (H3K9me2 및 H3K9ac)의 염색질 조절을 통하여 SASP 유전자 발현의 후성유전학적 제어에서 상반된 역할을 한다는 결론을 내렸다.

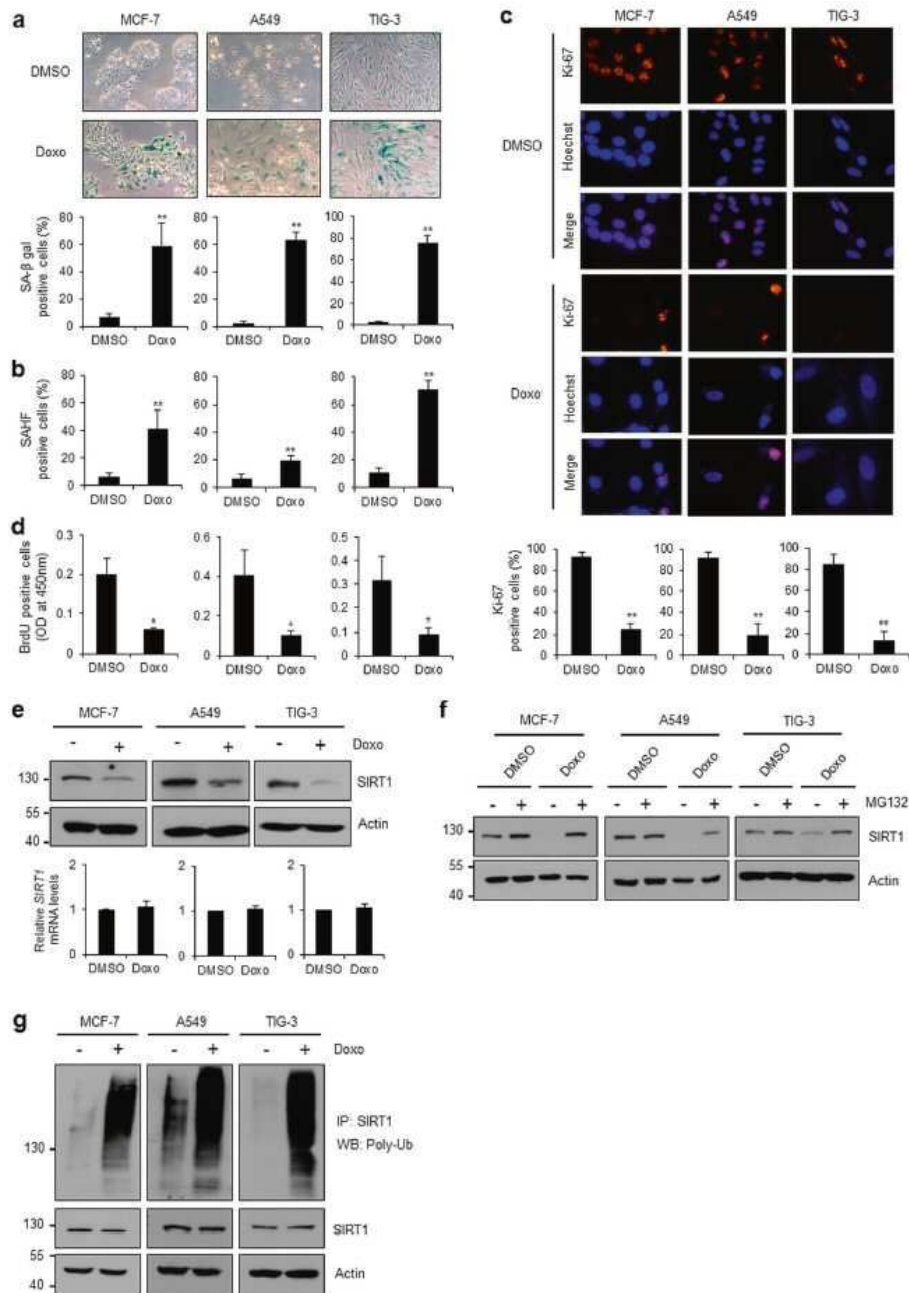
[0093] <실시예 7> SIRT1을 안정화하여 Bleomycin에 의한 폐 노화를 억제하는 피노실빈(Pinosylvin)

[0094] 세포 노화는 섬유성 폐질환의 주요 원인이다. 따라서 SIRT1, Cdh1 및 AROS가 기능적으로 폐섬유화와 관련이 있는지 여부를 확인할 필요가 있다. Resveratrol과 구조상으로 유사한 자연적인 스틸베노이드 폴리페놀인 Pinosylvin은 최근 골격근 세포 및 adipocytes에서 SIRT1의 자연적인 활성인자로 기능한다고 보고되었다. Pinosylvin이 스트레스 유도 노화에 영향을 미치는지 확인하기 위해 폐의 노화를 유도하는 것으로 보고된 bleomycin을 사용하였다. 예상대로, A549 및 TIG-3 세포에서 bleomycin의 처리는 SA- β -gal 염색으로 확인했을 때 노화를 강하게 유도한 반면, pinosylvin의 전처리는 bleomycin에 의해 유도된 SA- β -gal 활성을 감소시켰다(도 15a). pinosylvin 항노화 효과는 doxorubicin으로 처리된 A549 및 TIG-3 세포에서도 관찰되었다(도 16a). 근본적인 메커니즘을 설명하기 위해 세포에 pinosylvin, bleomycin 또는 둘 다로 처리한 다음 WB 분석을 실시하였다. Bleomycin 처리는 SIRT1 단백질의 하향 조절을 초래하여 노화마커인 p53 아세틸화와 p21 유도를 유도하였다(도 15b). p16 발현의 상향조절은 A549 세포의 p16 결핍으로 인해 TIG-3 세포에서만 관찰되었다. pinosylvin의 첨가는 bleomycin 처리만 했을 때와 비교하여 SIRT1 단백질 수준을 증가시켰으며, 이 효과는 두 세포주 모두에서 p53 탈아세틸화 및 p21 하향 조절을 동반하였다(도 15b). Doxorubicin 처리에서도 유사한 결과를 얻었다(도 16b). 다음으로, in vivo에서 폐 노화 조절에 대한 pinosylvin의 보호 효과를 확인하기 위해 마우스에서 bleomycin 유도 폐섬유증을 이용한 실험 시스템을 구축하였다. 폐섬유증을 유도하기 위해, 마우스는 한 번의 기관 내 bleomycin 투여를 진행하였다. Pinosylvin은 bleomycin에 노출되기 24시간 전과 그 후 매일 경구투여하였다. SA- β -gal 염색에 의해 보여지는 것과 같이, bleomycin에 의한 폐 노화는 pinosylvin에 의해 크게 억제되었다(도 15c). 또한, 폐섬유증의 조직학적 특성은 H&E 염색 및 Masson's trichrome 염색에 의해 확인되었다. H&E 염색은 bleomycin 처리 후 명백한 조직학적 변화와 폐 구조의 파괴를 보여줬으며, 이러한 결과는 pinosylvin의 투여에 의해 회복되었다(도 15d). Masson's trichrome 염색에 의해서도 유사한 결과가 얻어졌다(도 15e). 이러한 결과와 일관되게 bleomycin 처리 후 섬유화 마커인 α -SMA (alpha-smooth muscle actin), collagen I, fibronectin 및 elastin의 발현 수준이 증가하는 것을 관찰하였다. 대조적으로, pinosylvin의 투여는 이들 단백질의 수준을 현저하게 감소시켰다(도 16c 내지 도 16e). 다음으로 pinosylvin이 bleomycin에 의한 폐 노화 동안 p53/p21 경로 및 p16 발현 패턴에 영향을 미치는지 여부를 확인하였다. bleomycin 처리 후 p53, p21 및 p16의 발현 수준이 크게 상승했으며 이 효과는 SIRT1 하향 조절을 동반하였다. 이러한 효과는 pinosylvin의 투여에 의해 회복되었다(도 15f). 특히, Cdh1 발현은 bleomycin 처리 시 증가하였고 pinosylvin 투여 시 감소하였으며, AROS는 변하지 않은 것으로 나타났다. 또한, 폐 조직에 대한 IHC 분석은 SIRT1 및 AROS 단백질의 발현 수준이 bleomycin 처리 후 하향 조절되고 pinosylvin 투여에 의해 복원된 반면, Cdh1은 반대 발현 패턴(도 15g)을 보여 SIRT1 안정화 및 활성화에서 pinosylvin의 잠재적 역할을 나타낸다. 종합하면, 이러한 결과는 pinosylvin이 SIRT1 및 그 활성인자인 AROS의 수준을 증가시키는 동시에 SIRT1 destabilizer인 Cdh1의 수준을 감소시켜 bleomycin 유발 폐 노화를 억제함을 나타낸다.

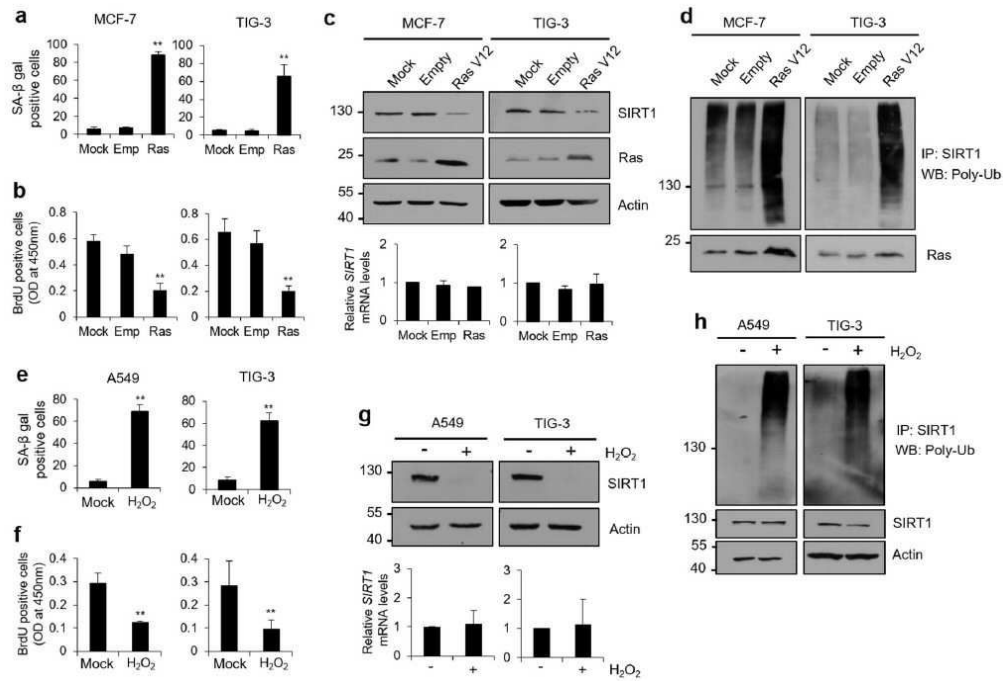
[0095] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

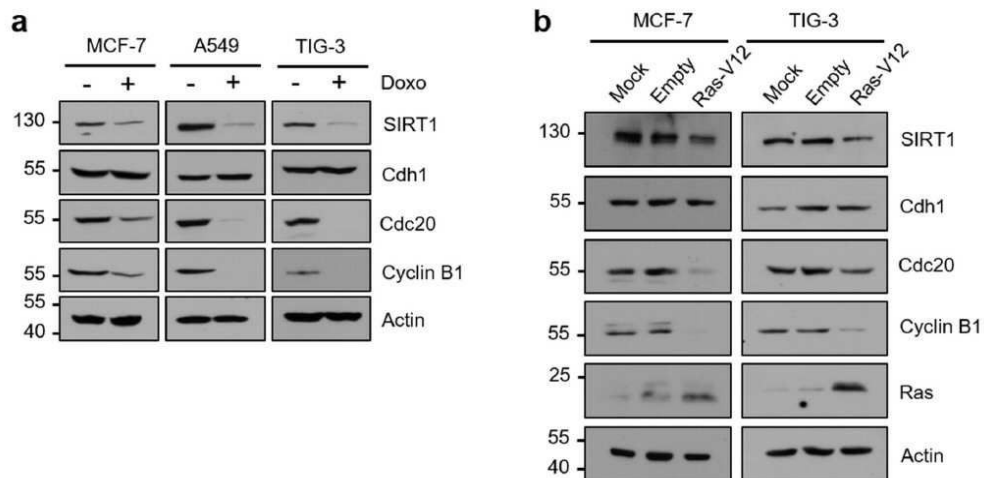
도면1



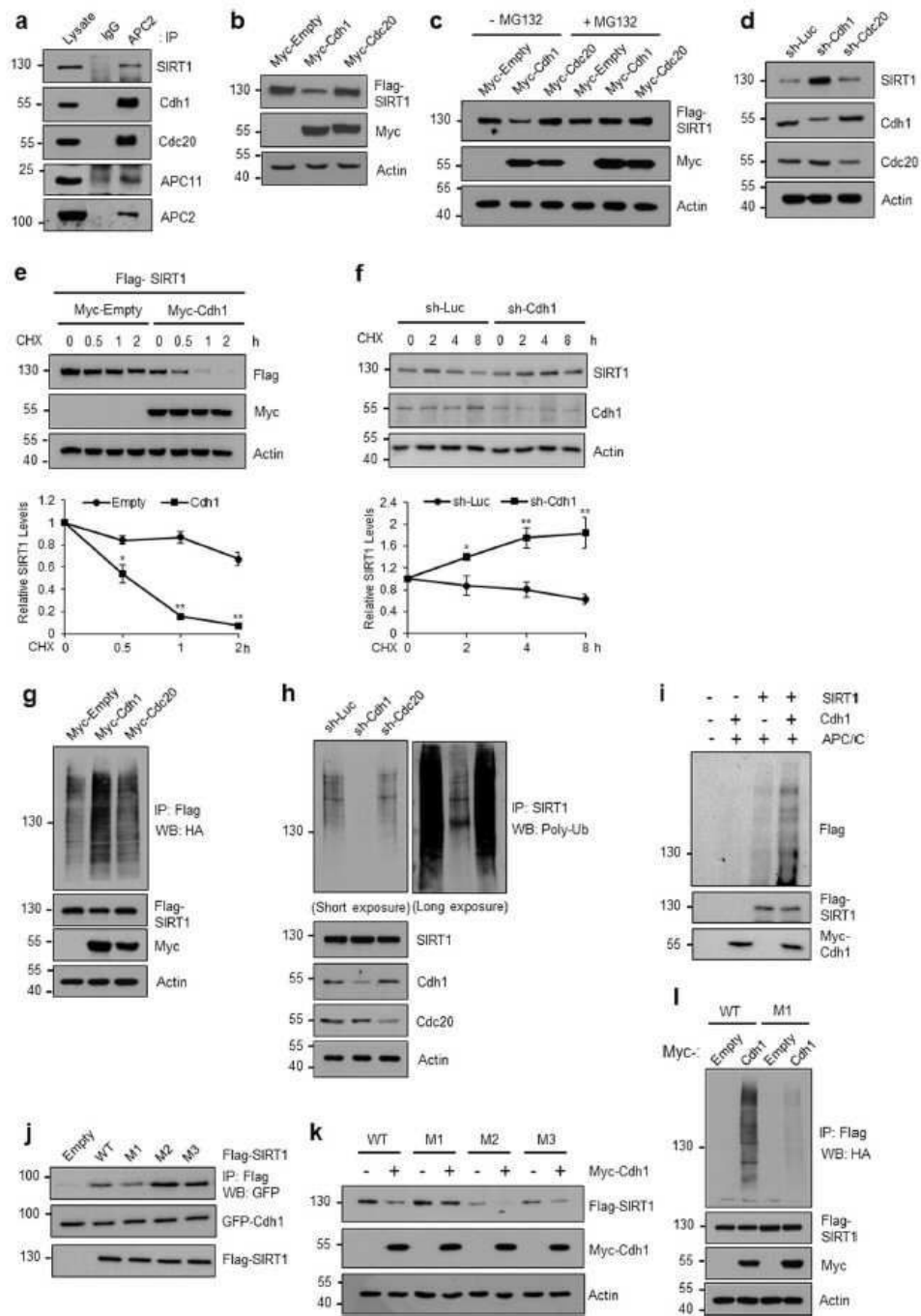
도면2



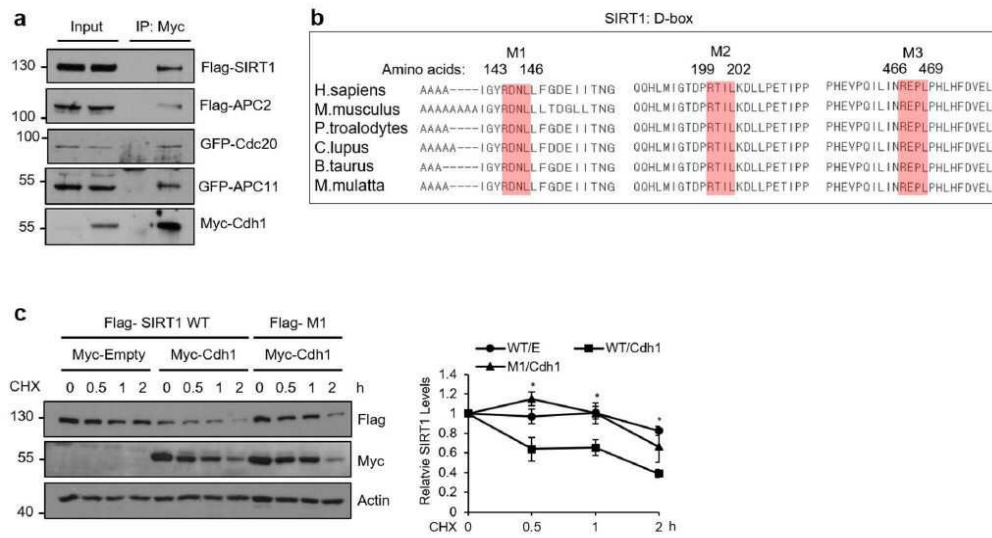
도면3



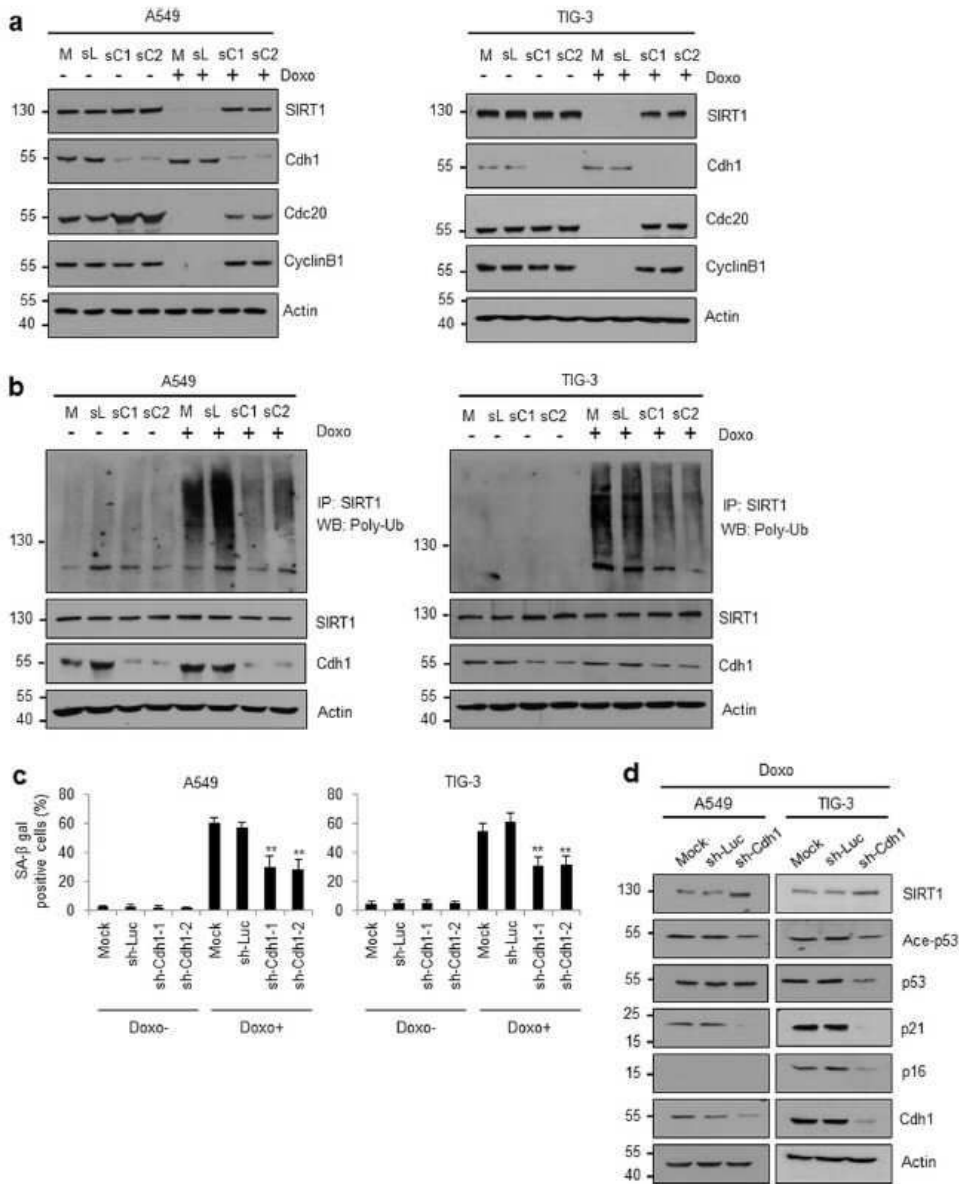
도면4



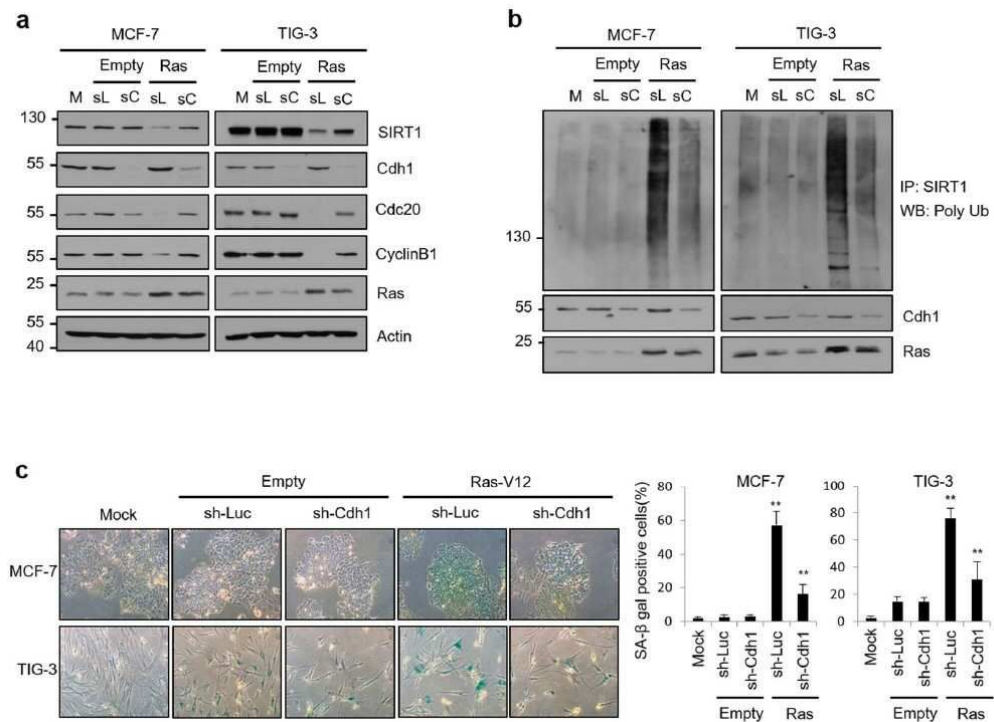
도면5



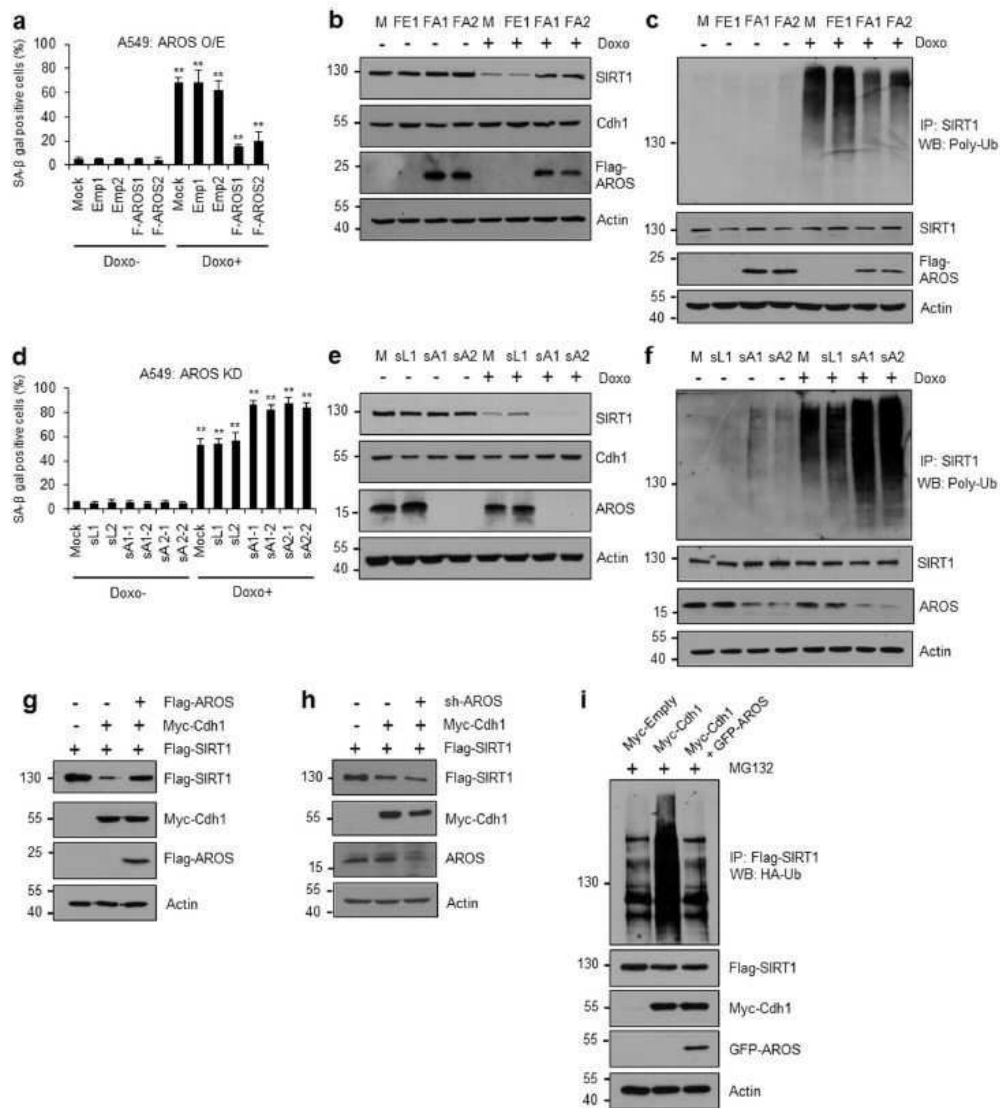
도면6



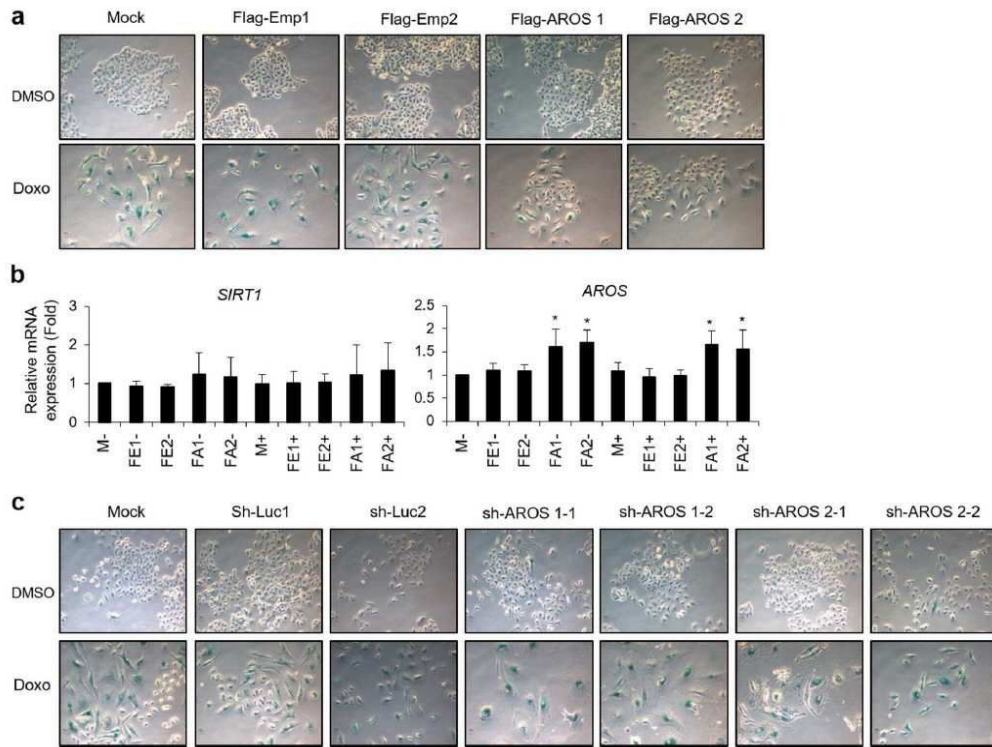
도면7



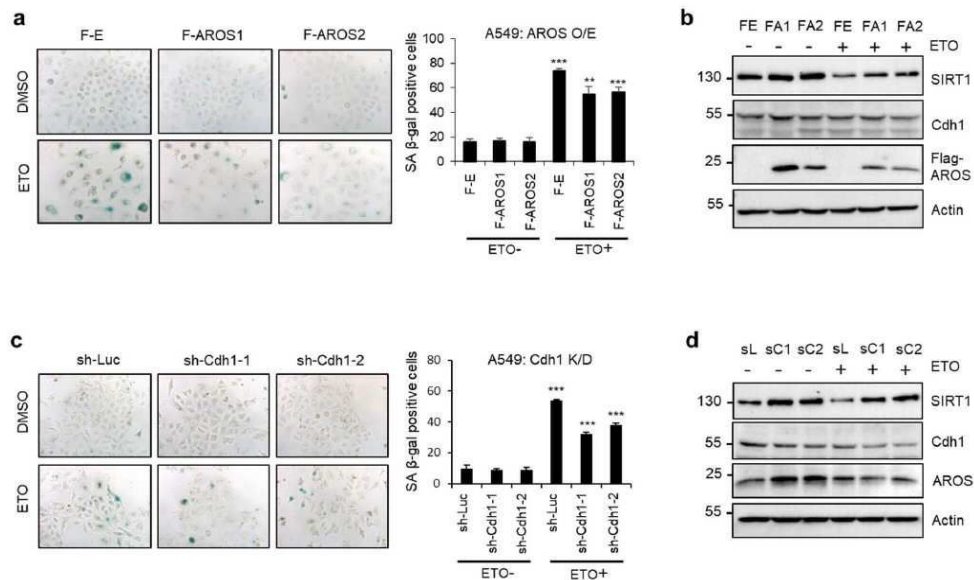
도면8



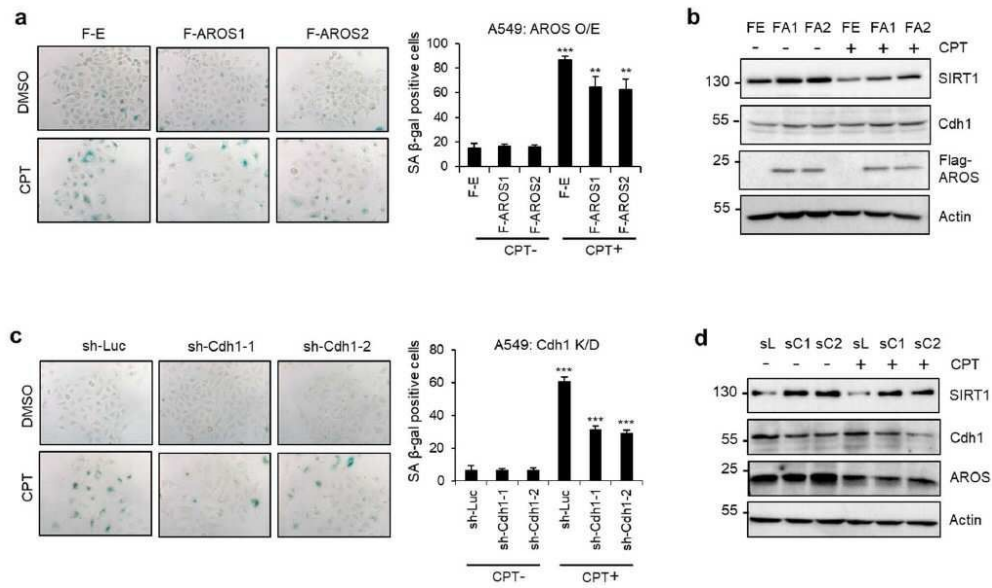
도면9



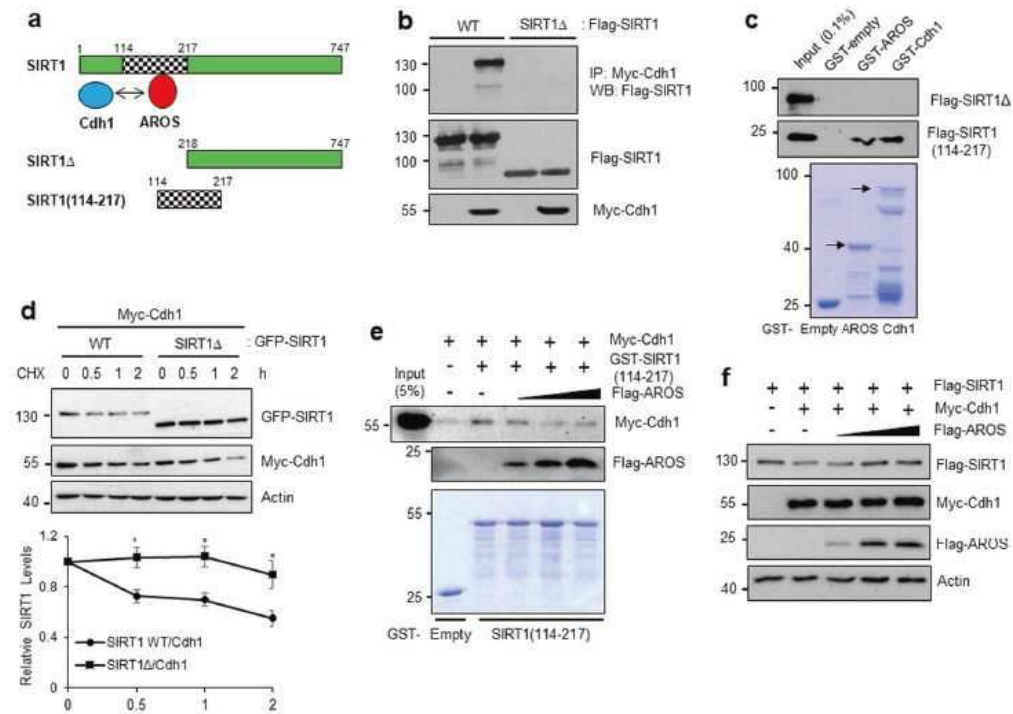
도면10



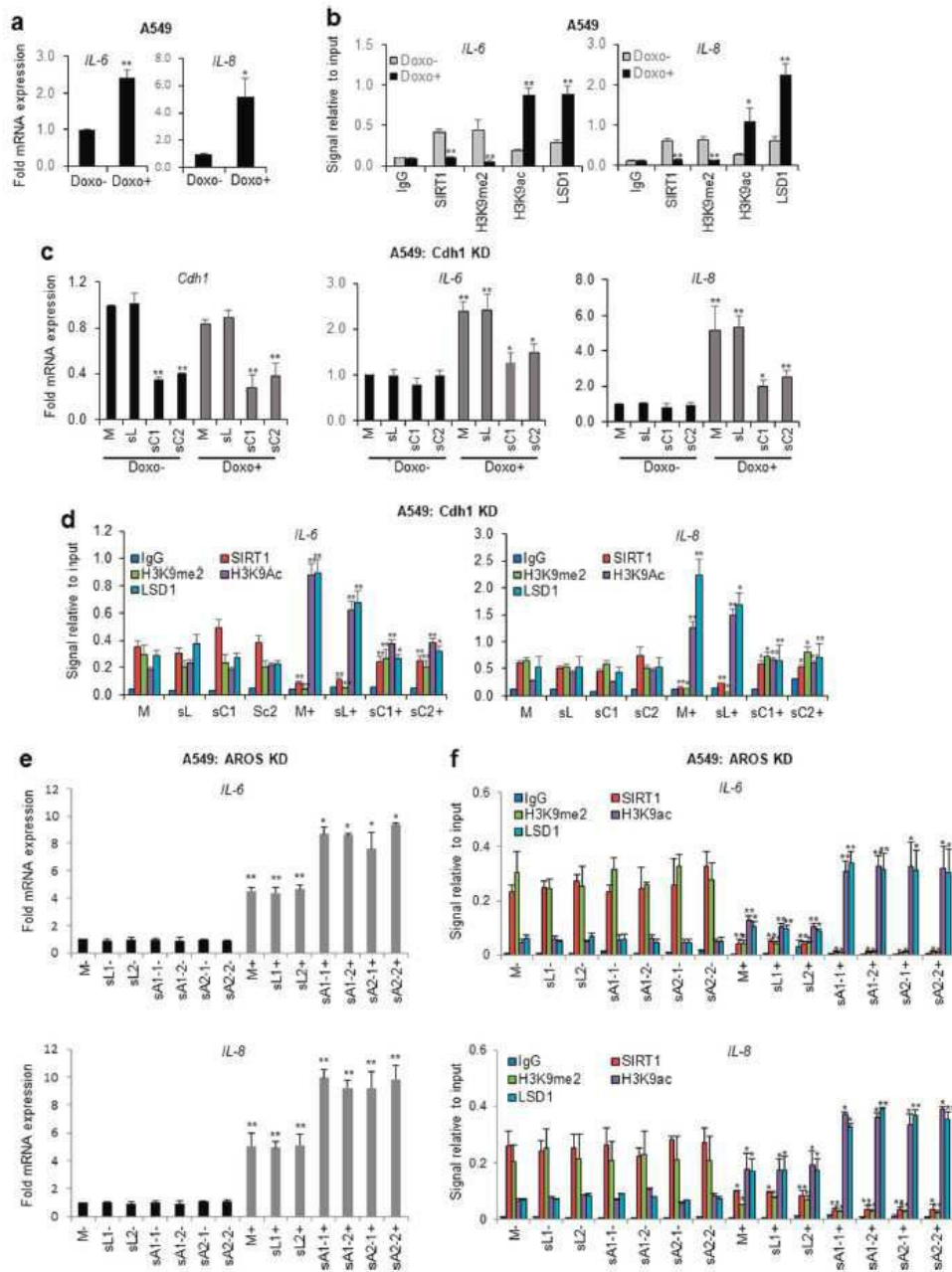
도면11



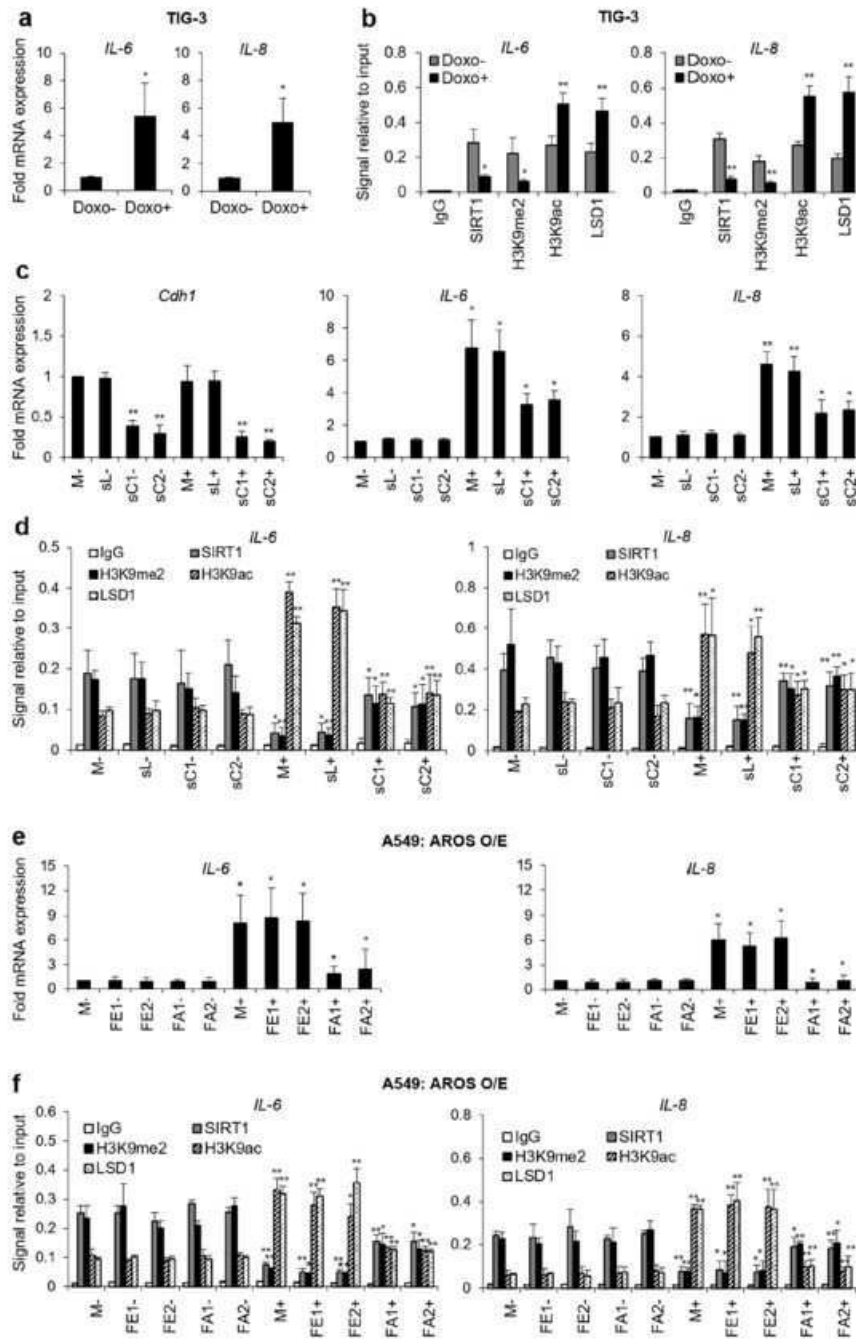
도면12



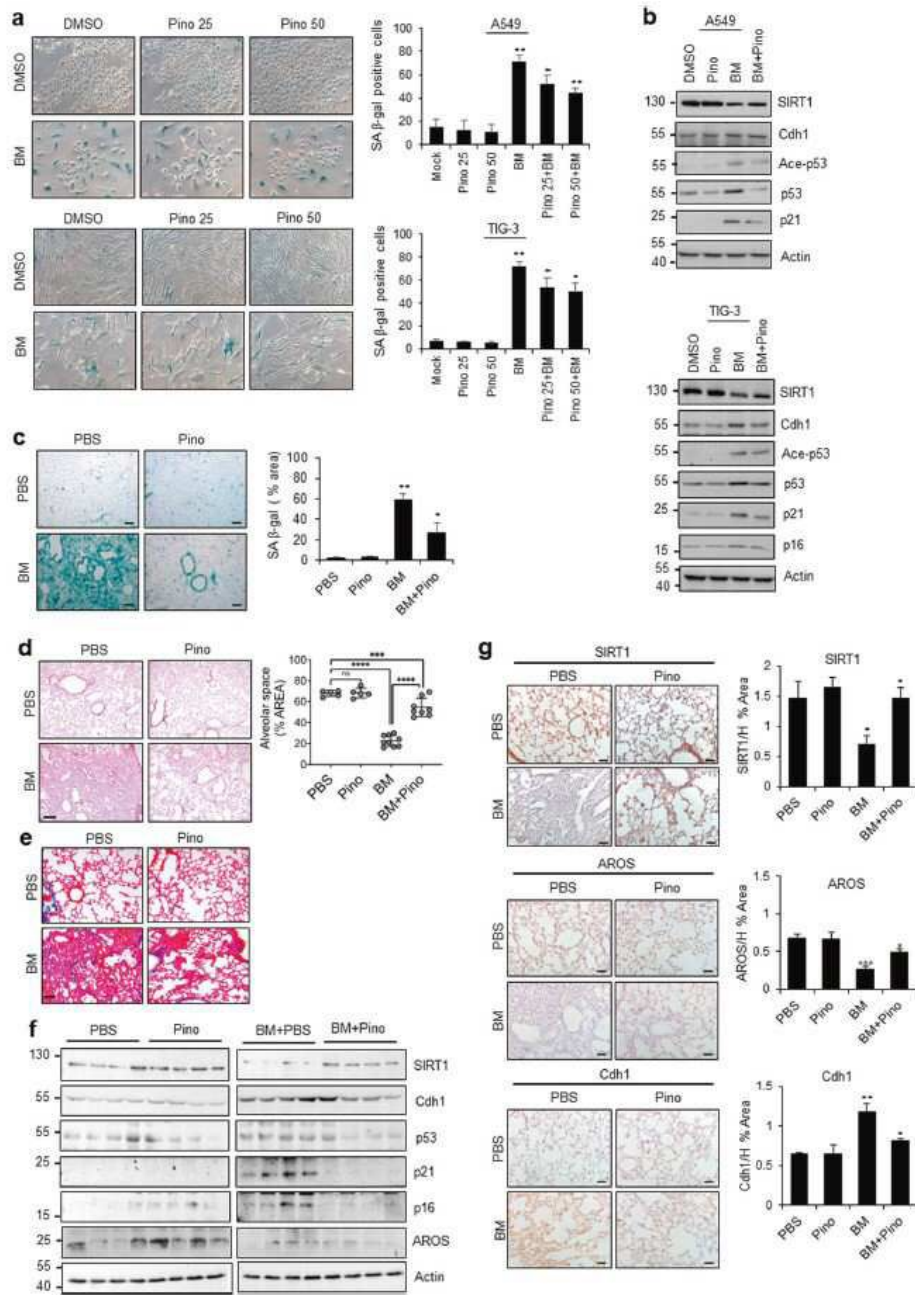
도면13



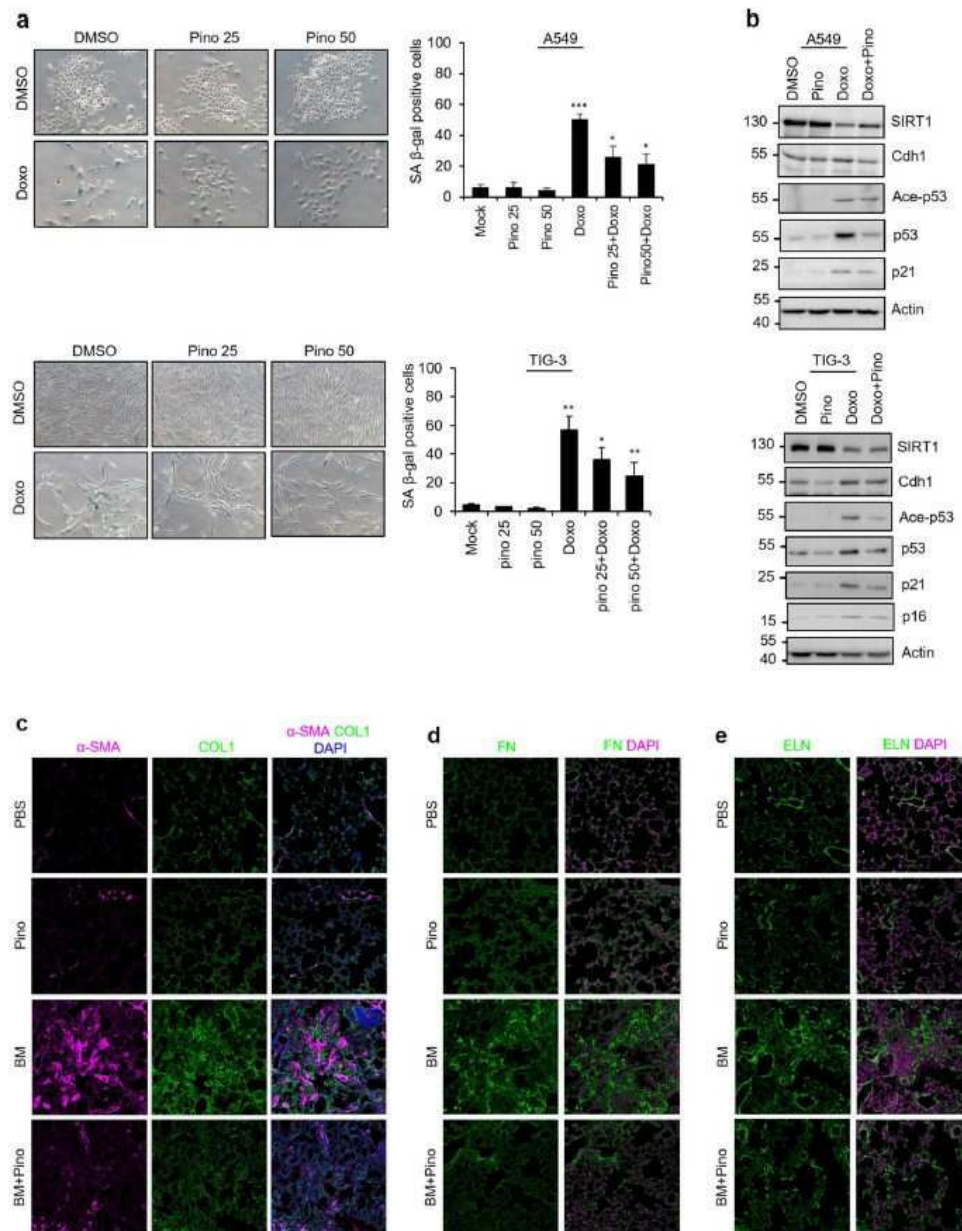
도면14



도면15



도면16



도면17

