



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0032531

(43) 공개일자 2016년03월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61D 7/00 (2006.01) A61N 2/02 (2006.01)

C12M 1/42 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0122791

(22) 출원일자 2014년09월16일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김찬화

서울시 용산구 이촌1동 이촌코오롱아파트 103동 402호

김재영

인천광역시 연수구 아트센터대로97번길 76, 1401동 1902호 (송도동, 더샵하버뷰 아파트)

(74) 대리인

특허법인다나

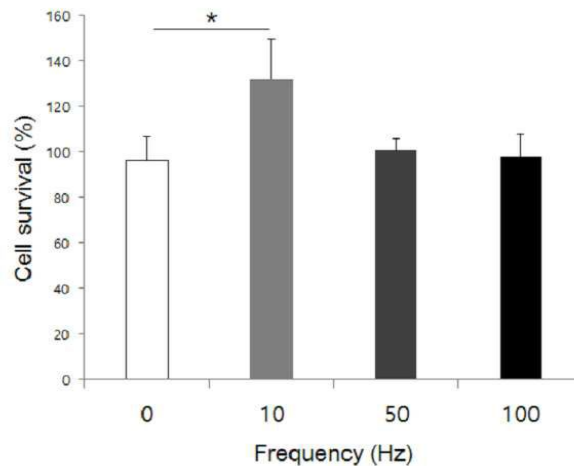
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 특이적 전자기장을 이용하여 저산소 또는 허혈 상태에서 유도되는 세포사멸을 억제하는 방법

(57) 요약

본 발명은 저산소 또는 허혈 상태에서 유도되는 세포사멸을 억제하는 전자기장의 사용 용도에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 특정 조건의 전자기장에 따른 저산소 또는 허혈 상태의 세포에서 유도되는 활성 산소종의 생성을 억제하여 세포의 생존율을 높이는 세포 보호 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014001835

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (원천)미래유망파이오니아사업

연구과제명 파동에너지 신경세포 작용 메커니즘 규명

기 여 율 1/1

주관기관 동국대학교 산학협력단

연구기간 2014.03.01 ~ 2015.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

인간을 제외한 동물의 환부에 전기장을 처리하여 저산소 또는 허혈상태에서 유도되는 세포 사멸을 억제하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 전기장은 5~30 Hz의 주파수와 0.5~1.5 mT의 세기인 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 저산소 또는 허혈상태는 신이식 후 허혈-재관류 손상인 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 세포는 신근위세뇨관 상피세포, 심근세포 또는 신경세포인 방법.

청구항 5

전자기장을 처리하여 저산소 또는 허혈 상태에서 유도되는 세포 내 활성 산소종의 생성을 억제하는 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 전기장은 5~30 Hz의 주파수와 0.5~1.5 mT의 세기인 방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 저산소 또는 허혈상태는 신이식 후 허혈-재관류 손상인 방법.

청구항 8

제 5 항에 있어서,

상기 세포는 신근위세뇨관 상피세포, 심근세포 또는 신경세포인 방법.

청구항 9

제 5 항에 있어서,

상기 활성 산소종은 슈퍼옥시드 음이온(O_2^-), 과산화수소(H_2O_2), 히드록시라디칼($\cdot OH$) 유기히드로퍼옥시드($ROOH$), 알콕시라디칼($RO\cdot$) 및 퍼옥시라디칼($ROO\cdot$)로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 특이적 전자기장을 이용하여 저산소 또는 허혈 상태에서 유도되는 세포사멸을 억제하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

신이식 후 허혈-재관류 손상은 급성 손상과 지연성 기능장애의 주요원인이다. 허혈-재관류 손상은 신이식 수술 중 불가피하게 발생하는 혈액 공급 중단과 외과적 혈관재형성 후 환자의 따뜻한 혈액이 차가운 이식 장기로 관류되면서 생기는 조직 손상이다. 임상과 기초연구에서 허혈-재관류 손상이 활성 산소종에 의해 매개된다는 증거들이 보고되었다. 허혈 동안의 저산소와 재관류에 의한 재산소화는 산화스트레스를 유발하고 이에 의해 생성된 활성 산소종은 세포사멸을 일으키는 주범으로 간주되고 있다. 그 동안 몇 가지 약물이 신이식 후 허혈-재관류 손상을 완화하는 지가 연구된 바 있다. 이들 약물들의 작용기전은 크게 두 가지로 나누어 볼 수 있는데, 하나는 신이식 후 허혈-재관류 손상의 주요 타겟인 근위세뇨관세포의 사멸을 저감하는 것이고, 다른 하나는 이식장기로의 면역세포의 침윤을 억제하는 것이다. 근위세뇨관세포의 사멸을 저감하는 대표적인 약물로는 SOD(superoxide dismutase)와 p53억제제가 있다. 조직 손상 동안 생성되는 자유라디칼, superoxide anions을 산소와 과산화수소로 전환하여 제거하는 효소인 SOD를 수술 중에 주입했을 때 4년간 동종장기 생존율과 1년후 급성 거부반응 발생율이 낮아졌다. 또한, 세포주기와 세포자살에 관여하는 p53분자의 발현을 억제하는 anti-p53 siRNA를 단회 처리해도 허혈-재관류 손상을 예방하는데 효과적이었다. 또 다른 전략은 포스파티딜세린(phosphatidylserine) 차단제와 P-셀렉틴(selectin) 리간드를 포함한다. 허혈-재관류 손상 동안 혈관 내피세포 표면에 발현하는 포스파티딜세린에 결합하여 이 분자가 면역세포 분자와 상호작용하는 것을 차단함으로써 허혈-재관류 손상을 저감할 수 있다. 마지막으로 대부분의 백혈구에서 발견되는 PSGL-1(P-selectin glycoprotein ligand-1)의 재조합 융합단백질인 YPSL(rPSGL-Ig) 투여 시 동종이식 장기의 혈관 내피세포에 발현되는 P-셀렉틴과 결합하여 백혈구의 침윤을 막고, 사이토카인 발현과 조직 손상을 저감할 수 있음이 확인되었다.

[0003]

일반적으로, 전자기장은 다양한 생물학적 효과를 생산하는 것으로 알려졌다. 비록, 그 메커니즘은 불분명하지만, 전자기장은 세포증식, 분화, 세포주기, 세포사멸, DNA 복제, 발현 등에 변화를 야기한다. 백서 심장 허혈-재관류 손상에 대한 전자기장의 보호 효과가 보고된 바 있지만, 아직까지, 신이식 후 허혈-재관류 손상에 대한 전자기장의 보호 효과에 대해서는 알려진 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004]

본 발명은 허혈-재관류 손상에 가장 민감한 신장 세포이며, 급성 신손상의 주된 장소인 근위세뇨관세포를 이용하여 시험관 저산소/재산소화 손상 모델을 확립하고, 저산소 또는 허혈 상태의 근위세뇨관 상피세포에서 유도되는 활성 산소종의 생성을 억제하여 세포의 생존율을 높이는 세포 보호 방법으로서의 전자기장의 용도를 규명하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0005]

상기 과제를 해결하기 위한 수단으로서, 본 발명은 인간을 제외한 동물의 환부에 전자기장을 처리하여 저산소 또

는 허혈 상태에서 유도되는 세포 사멸을 억제하는 방법을 제공한다.

[0006] 상기 과제를 해결하기 위한 다른 수단으로서, 본 발명은 전자기장을 처리하여 저산소 또는 허혈 상태에서 유도되는 세포 내 활성 산소종의 생성을 억제하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0007] 본 발명은 저산소/재산소화 조건에서 배양한 인간 근위세뇨관 상피세포에 전자기장을 처리하여 세포 내 활성 산소종 생성이 억제되고, 세포의 생존율이 증가함을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0008] 도 1은 정상 산소 조건(20% O₂, normal)에서 배양한 HK-2 세포의 생존율을 100%로 보았을 때, 저산소/재산소화 조건(H/R)에서 배양한 세포와 저산소/재산소화+전자기장 조건(H/R+EMF)에서 배양한 세포의 생존율을 나타낸 것이다.

도 2는 저산소/재산소화 조건(H/R)에서 배양한 세포의 생존율을 100%로 보았을 때, 저산소/재산소화+전자기장 조건(H/R+EMF)에서 배양한 세포의 생존율을 나타낸 것이다. 전자기장의 세기를 1 mT로 고정하고, 주파수만 10, 50, 100 Hz로 달리하여 조사하였다.

도 3은 저산소/재산소화 조건(H/R)에서 배양한 세포의 생존율을 100%로 보았을 때, 저산소/재산소화+전자기장 조건(H/R+EMF)에서 배양한 세포의 생존율을 나타낸 것이다. 전자기장의 주파수를 10 Hz로 고정하고, 세기만 0.01, 0.1, 1 mT로 달리하여 조사하였다.

도 4는 정상 산소 조건(20% O₂, normal)에서 배양한 HK-2 세포의 세포 내 활성 산소종의 수준을 100%로 보았을 때, 저산소/재산소화 조건(H/R)에서 배양한 세포와 저산소/재산소화+전자기장 조건(H/R+EMF)에서 배양한 세포의 세포 내 활성 산소종의 수준을 나타낸 것이다.

도 5는 저산소/재산소화 조건(H/R)에서 배양한 세포의 세포 생존 세포내 활성 산소종의 수준을 100%로 보았을 때, 저산소/재산소화+전자기장 조건(H/R+EMF)에서 배양한 세포의 세포 내 활성 산소종의 수준을 나타낸 것이다. 전자기장의 세기를 1 mT로 고정하고, 주파수만 10, 50, 100 Hz로 달리하여 조사하였다.

도 6은 저산소/재산소화 조건(H/R)에서 배양한 세포의 세포 내 활성 산소종의 수준을 100%로 보았을 때, 저산소/재산소화+전자기장 조건(H/R+EMF)에서 배양한 세포의 세포 내 활성 산소종의 수준을 나타낸 것이다. 전자기장의 주파수를 10 Hz로 고정하고, 세기만 0.01, 0.1, 1 mT로 달리하여 조사하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] 본 발명은 인간을 제외한 동물의 환부에 전기장을 처리하여 저산소 또는 허혈 상태에서 유도되는 세포 사멸을 억제하는 방법에 관한 것이다.

[0010] 또한, 본 발명은 전자기장을 처리하여 저산소 또는 허혈 상태에서 유도되는 세포 내 활성 산소종의 생성을 억제하는 방법을 포함할 수 있다.

[0011] 상기 전기장은 5~30 Hz(또는 7~20 Hz)의 주파수와 0.5~1.5 mT의 세기인 것이 바람직하다.

[0012] 본 발명에서 "저산소 또는 허혈 상태"는 신이식 후 허혈-재관류 손상인 것을 의미한다.

[0013] 또한, 상기 세포는 신근위세뇨관 상피세포, 심근세포 또는 신경세포이 바람직하다.

[0014] 또한, 상기 활성 산소종은 구체적으로 슈퍼옥사이드 음이온(O₂⁻), 과산화수소(H₂O₂), 히드록시라디칼($\cdot$ OH) 유기히드로퍼옥사이드(ROOH), 알콕시라디칼(RO $\cdot$) 및 퍼옥시라디칼(ROO $\cdot$)로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0015] 본 발명은 저산소 또는 허혈 상태에서 유도되는 세포사멸을 억제하는 방법으로서 전자기장의 사용에 관한 것으로, 5~30 Hz 주파수와 0.5~1.5 mT의 세기의 전자기장이 저산소 또는 허혈 상태의 세포에서 유도되는 활성 산소

종의 생성을 효과적으로 억제하여 세포의 생존율을 높이는 세포 보호 방법으로 사용될 수 있다.

[0016] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0017] **실시예 1: 세포 배양 및 유지**

[0018] 인간 신장 근위세뇨관 상피세포주 HK-2를 분양받아 실험에 사용하였다. DMEM/F12(Gibco BRL, MD, USA) 배지에 10%의 열 불활성화된 우태아혈청(FBS, Lonza Walkersville, Inc.) 및 1% 항생제 용액(Gibco), insulin transferrin selenium X(Gibco)를 첨가하여 배양하였다. 배양 조건은 37℃, 95% 공기와 5% CO₂ 상태로 유지하였다.

[0019] **실시예 2: 저산소/재산소화 조건에서의 세포 배양**

[0020] 실험에 들어가기 전 혈청-기아 상태를 유지하기 위해, 24시간 동안 DMEM/F12 배지에 0.1%의 열 불활성화된 우태아혈청을 첨가한 정상조건 (94% N₂, 5% CO₂, 20% O₂)에서 HK-2 세포를 배양하였다. 이 후, 24시간 동안 저산소 조건(94% N₂, 5% CO₂, 1% O₂)에서 세포를 배양하고, 12시간 동안 DMEM/F12 배지에 1% 항생제와 0.1% 열 불활성화된 우태아혈청을 첨가한 정상 조건(94% N₂, 5% CO₂, 20% O₂)에서 배양하였다.

[0021] 2-1: 저산소/재산소화 조건에서 배양중인 HK-2 세포에 전자기장 조사

[0022] 주파수 5-300 Hz, 세기 0.01-9.0 mT로 조정이 가능한 두 개의 Helmholtz 코일로 구성된 전자기장발생기를 세포 배양기 안에 설치하였다. 세포는 주파수를 10 Hz로 고정하고, 전자기장의 세기를 0.01 mT, 0.1 mT, 1 mT로 달리한 전자기장에 노출하거나 세기를 1 mT로 고정하고, 주파수를 10 Hz, 50 Hz, 100 Hz로 달리한 전자기장에 노출하였다.

[0023] 2-2: 저산소/재산소화 조건에서 배양한 HK-2 세포의 생존율 조사

[0024] 저산소/재산소화 조건에서 배양한 세포의 생존율을 조사하기 위하여 트립판 블루(trypan blue) 염색법을 사용하였다. 세포는 60mm 디쉬에 배양하였고, 배양기간 동안 전자기장을 조사한 그룹과 조사하지 않은 그룹을 설정하고 세포의 생존율을 조사하였다. 혈구계수기를 이용한 세포 계수는 1 mL의 세포표본에서 10 μl를 취하고 트립판 블루와 섞어 혈구계수기 챔버에 넣고 측정을 시행하였다. 이후 측정된 값을 이용해 살아있는 세포 수를 계산하였다. 저산소(1% O₂)에서 24시간 노출 후 12시간 재산소화(20% O₂)을 거친 HK-2의 세포생존율은 정상 조건에서만 배양한 세포의 생존율에 비해 약 55% 수준으로 감소하였다. 반면, 동일한 조건에 10 Hz/1 mT의 전자기장을 조사한 경우 세포 생존율은 약 70% 수준으로 증가하였다[도 1]. 전자기장에 의한 세포 보호 효과가 주파수 특이적인 현상인지 확인하기 위하여 주파수를 달리하여 동일한 실험을 수행하였다. 전자기장의 세기를 1 mT로 고정하고, 주파수만 10, 50, 100 Hz로 달리하여 세포 보호 효과를 조사한 결과, 10 Hz에서만 보호 효과를 관찰할 수 있었다[도 2]. 다음으로 전자기장에 의한 세포 보호 효과가 전자기장의 세기 특이적인 현상인지 확인하기 위하여 세기를 달리하여 동일한 실험을 수행하였다. 주파수를 10 Hz로 고정하고 세기를 0.01, 0.1, 1 mT로 달리하여 세포 보호 효과를 조사한 결과, 1 mT에서만 보호 효과를 관찰할 수 있었다[도 3]. 이러한 결과는 조사된 조건들 중에서 10 Hz/1 mT의 전자기장만이 특이적인 세포 보호 효과를 발휘함을 의미한다.

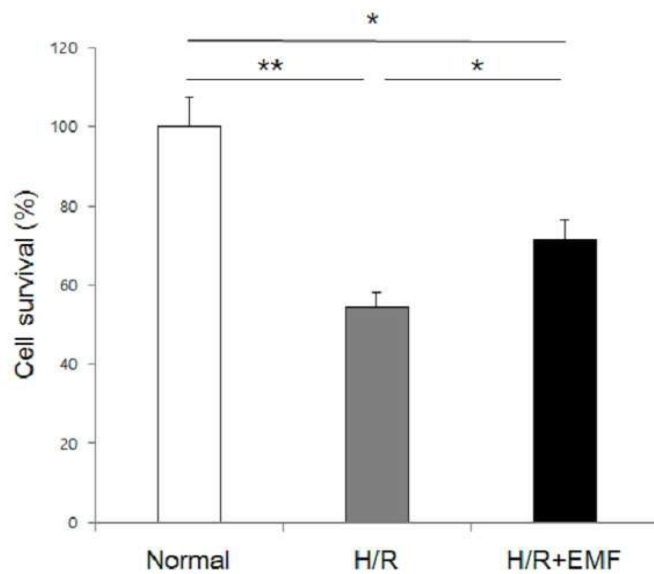
[0025] **실시예 3: 저산소/재산소화 조건에서 배양한 HK-2 세포의 세포 내 활성산소종 측정**

[0026] 세포 내에 축적된 활성 산소종을 측정하기 위해 형광물질인 DCFH-DA를 사용하였다. 배양을 마친 HK-2 세포를 PBS를 이용해 두 번 씻어낸 후, 10 μM DCFH-DA를 넣고 37 °C에서 1시간 동안 배양하였다. 이후에 Victor X4 Multilabel Plate Reader(PerkinElmer, Massachusetts, USA)를 이용하여 형광값을 측정하였다(Ex=485 nm, Em=535 nm). 저산소/재산소화에 의한 세포사멸이 증가된 세포 내 ROS 수준과 관련이 있음이 보고된 바 있기에 HK-2 세포 내 활성 산소종 수준을 조사하였다. 저산소/재산소화 조건에 노출된 HK-2에서 세포 내 활성산소종 수준이 정상 조건에서 배양한 세포의 약 190% 수준으로 증가하였고, 10 Hz/1 mT의 EMF를 조사하였을 경우에 증가

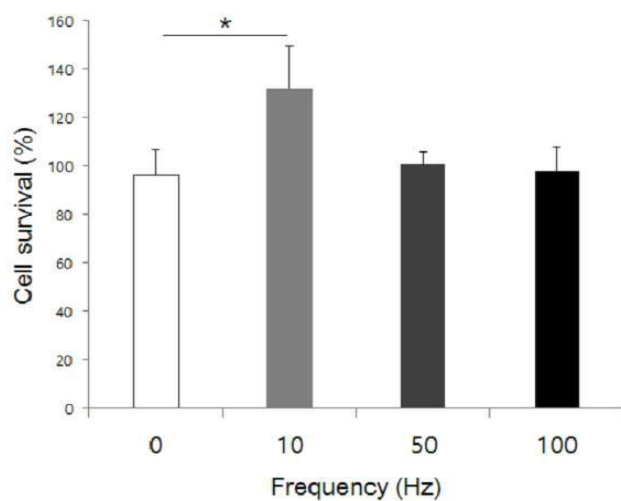
된 활성 산소종 수준이 약 145% 수준으로 감소하였다[도 4]. 저산소/재산소화에 의한 활성 산소종 생성 감소 효과가 전자기장 주파수 특이적인 현상인지 확인하기 위하여 주파수를 달리하여 동일한 실험을 수행하였다. 전자기장의 세기를 1 mT로 고정하고, 주파수만 10, 50, 100 Hz로 달리하여 세포 내 활성 산소종 생성을 측정한 결과, 10 Hz에서만 활성 산소종 수준이 감소하였다[도 5]. 다음으로 전자기장에 의한 활성 산소종 생성이 전자기장의 세기 특이적인 현상인지 확인하기 위하여 세기를 달리하여 동일한 실험을 수행하였다. 주파수를 10 Hz로 고정하고 세기를 0.01, 0.1, 1 mT로 달리하여 활성 산소종 생성을 조사한 결과, 1 mT에서만 활성 산소종 수준이 감소하였다[도 6]. 이상의 결과는 10 Hz/1 mT의 전자기장만이 특이적으로 세포 내 활성 산소종 수준을 감소시켜 세포 보호 효과를 발휘함을 의미한다.

도면

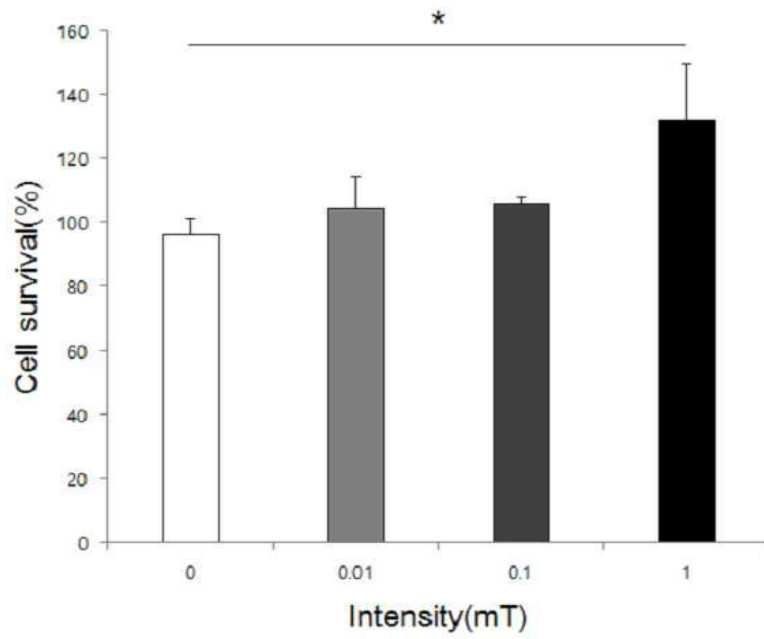
도면1



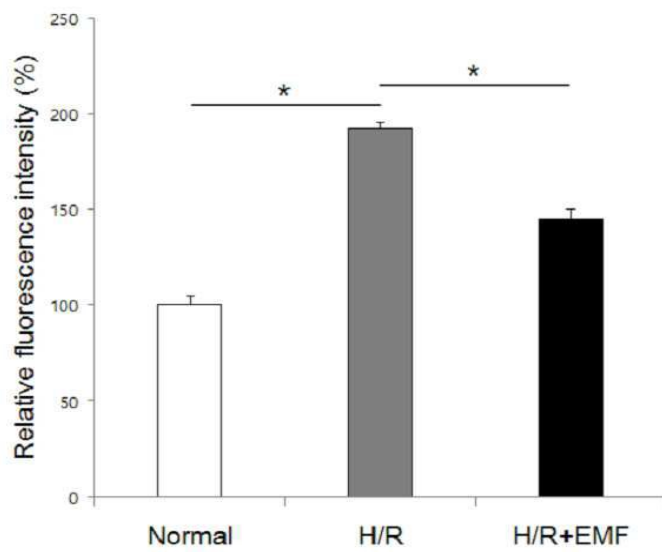
도면2



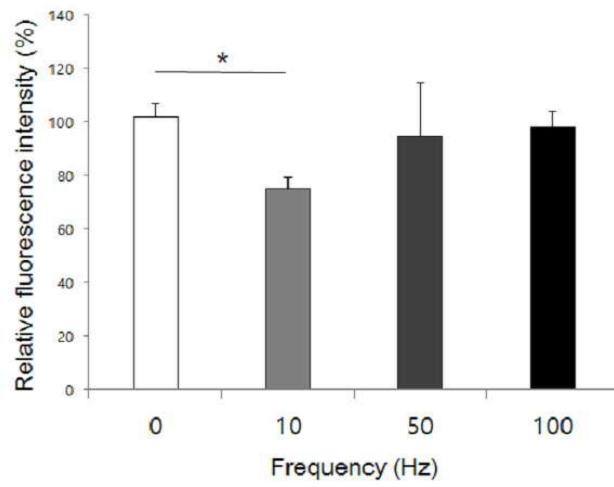
도면3



도면4



도면5



도면6

