

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0126249

(43) 공개일자 2021년10월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/7105* (2006.01)*A61K 31/713* (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)*A61P 17/02* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)*A61K 31/7105* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0043797

(22) 출원일자 2020년04월10일

심사청구일자 2020년04월10일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

서정훈

서울 영등포구 버드나루로7길 12, 한림대학교 한강성심병원 재활의학과

김준범

서울 영등포구 버드나루로7길 12, 한림대학교 한강성심병원 소아청소년과

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강성혜

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 CPEB1 또는 CPEB4 억제제를 포함하는 비후성 반흔 예방 또는 치료용 약제학적 조성물

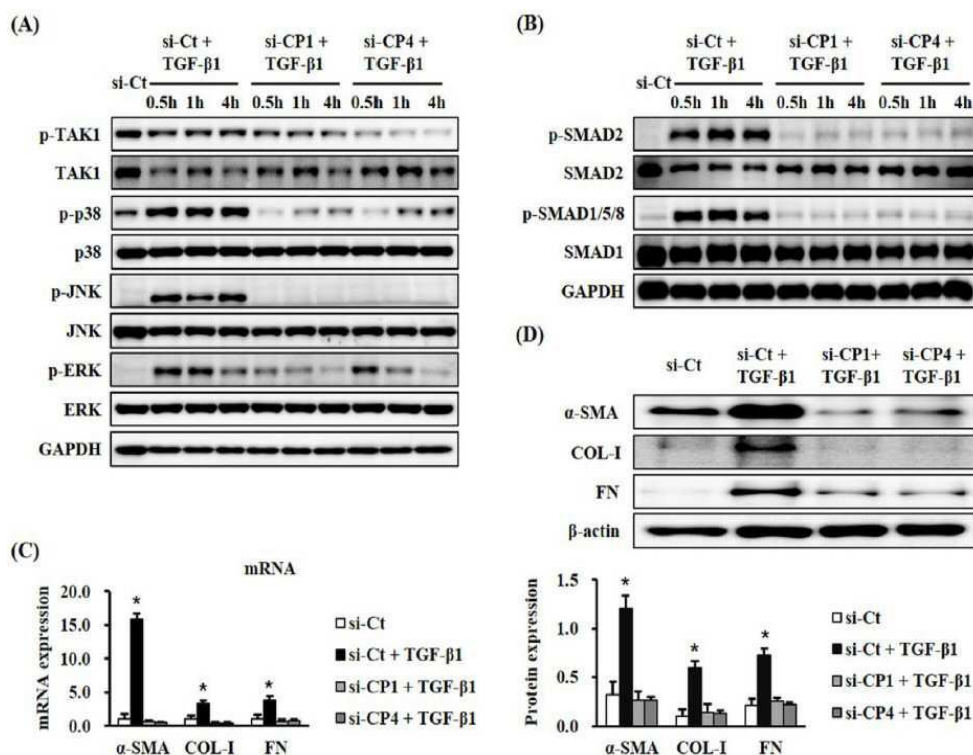
(57) 요약

화상 후 비후성 반흔 (hypertrophic scar; HTS)은 피부 흉터를 특징으로 하는 과도한 피부 섬유증의 한 형태로, 화상 손상 후 환자에게 흔하다. 또한, HTS의 50% 이상이 염증을 동반한다.

세포질 폴리아데닐화 요소 결합 (Cytoplasmic polyadenylation element binding; CPEB) 단백질은 여러 mRNA의

(뒷면에 계속)

대표도 - 도4



번역을 제어하는 주요 mRNA-결합 단백질이다. 그러나, 피부 섬유증 및 흉터를 치료하는 데 있어서 이들의 잠재적인 역할은 알려져있지 않다. 따라서, 본 연구에서, 본 발명자들은 LPS와 TGF- β 1으로 처리된 인간 THP-1 대식세포 및 피부 섬유아세포에서 CPEB1 또는 CPEB4의 siRNA-매개 knockdown 효과를 조사하고자 하였다. 본 발명자들은 LPS-처리된 THP-1 세포 및 TGF- β 1-처리된 섬유아세포에서 CPEB1 및 CPEB4 mRNA 및 단백질 수준이 상당히 증가한 것을 발견하였다. CPEB1 및 CPEB4 knockdown은 THP-1 세포에서 TNF- α 및 인산화된 TAK1, p38, ERK, JNK 및 NF- κ B-p65의 수준을 감소시킴으로써 LPS-활성화된 TAK1 신호 전달 캐스케이드를 억제하였다. CPEB1 및 CPEB4 knockdown은 또한 섬유아세포에서 TAK1, p38, ERK, JNK 및 인산화된 Smad 2와 Smad 1/5/8의 수준을 감소시킴으로써 TGF- β 1 활성화된 Smad-의존적 및 Smad-독립적 신호 캐스케이드를 약화시켰다. 또한, CPEB1 또는 CPEB4 knockdown은 섬유아세포에서 α -SMA, 타입 I 콜라겐 및 피브로넥틴을 포함한 섬유증 마커의 수준을 현저하게 감소시켰다. 우리의 발견은 CPEB1 및 CPEB4가 인간 대식세포 및 피부 섬유아세포에서 TAK1 및 Smad 신호전달의 조절에 관여한다는 것을 나타낸다. 이러한 활성화는 피부 흉터 반응에 중요한 역할을 할 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/713 (2013.01)

A61K 39/3955 (2013.01)

A61P 17/02 (2018.01)

최혜송

서울시 동작구 신대방14길 18, 201호

(72) 발명자

조윤수

서울특별시 서초구 신반포로33길 30, 904호

주소영

서울특별시 강남구 언주로 107, 210동 107호 (개포동, 현대2차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1D1A1A02018478

과제번호 없음

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 한국형 SGER

연구과제명 창상 치유와 비후성 반흔 형성에서 CPEB-1, 4 단백질의 기능 규명

기 여 율 1/1

과제수행기관명 한림대학교

연구기간 2019.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

CPEB1 (Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1) mRNA 발현 억제제를 포함하는 비후성 반흔 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 CPEB1 mRNA 발현 억제제는 CPEB1 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드임을 특징으로 하는 비후성 반흔 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 CPEB1 mRNA 발현 억제제는 CPEB1 유전자에 대한 siRNA (short interfering RNA) 또는 shRNA (Short hairpin RNA)임을 특징으로 하는 비후성 반흔 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 4

CPEB1 단백질 활성 억제제를 포함하는 비후성 반흔 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 5

청구항 4에 있어서,

상기 CPEB1 단백질 활성 억제제는 CPEB1 단백질에 결합하는 항체임을 특징으로 하는 비후성 반흔 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 6

CPEB4 (Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4) mRNA 발현 억제제를 포함하는 비후성 반흔 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 CPEB4 mRNA 발현 억제제는 CPEB4 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드임을 특징으로 하는 비후성 반흔 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 8

청구항 6에 있어서,

상기 CPEB4 mRNA 발현 억제제는 CPEB4 유전자에 대한 siRNA (short interfering RNA) 또는 shRNA (short hairpin RNA)임을 특징으로 하는 비후성 반흔 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 9

CPEB4 (Cytoplasmic polyadenylation element binding protein 4) 단백질 활성 억제제를 포함하는 비후성 반흔 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 CPEB4 단백질 활성 억제제는 CPEB4 단백질에 결합하는 항체임을 특징으로 하는 비후성 반흔 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 화상 후 비후성 반흔 (hypertrophic scar; HTS)은 피부 흉터를 특징으로 하는 과도한 피부 섬유증의 한 형태로, 화상 손상 후 환자에게 흔히 발생한다. 또한, 화상 후 비후성 반흔의 50% 이상이 염증을 동반한다.

[0002] 세포질 폴리아데닐화 요소 결합 (Cytoplasmic polyadenylation element binding; CPEB) 단백질은 여러 mRNA의 번역을 제어하는 주요 mRNA-결합 단백질이다. 그러나 피부 섬유증 및 흉터를 치료하는 데 있어서 이들의 잠재적인 역할은 알려지지 않았다. 따라서, 본 발명에서 본 발명자들은 LPS (Lipopolysaccharide)와 TGF- β 1으로 처리된 인간 THP-1 대식세포 및 피부 섬유아세포에서 CPEB1 또는 CPEB4의 siRNA-매개 녹다운 효과를 조사하고자 하였다. 본 발명자들은 LPS-처리된 THP-1 세포 및 TGF- β 1-처리된 섬유아세포에서 CPEB1 및 CPEB4 mRNA 및 단백질 수준이 상당히 증가한 것을 발견하였다. CPEB1 및 CPEB4 녹다운은 THP-1 세포에서 TNF- α 및 인산화된 TAK1, p38, ERK, JNK 및 NF- κ B-p65의 수준을 감소시킴으로써 LPS-활성화된 TAK1 신호전달 캐스케이드를 억제하였다. CPEB1 및 CPEB4 녹다운은 또한 섬유아세포에서 TAK1, p38, ERK, JNK 및 인산화된 Smad 2와 Smad 1/5/8의 수준을 감소시킴으로써 TGF- β 1 활성화된 Smad-의존적 및 Smad-독립적 신호 캐스케이드를 약화시켰다. 또한, CPEB1 또는 CPEB4 녹다운은 섬유아세포에서 α -SMA, 타입 I 콜라겐 및 피브로넥틴을 포함한 섬유증 마커의 수준을 현저하게 감소시켰다. 본 연구 결과는 CPEB1 및 CPEB4가 인간 대식세포 및 피부 섬유아세포에서 TAK1 및 Smad 신호전달의 조절에 관여한다는 것을 나타낸다. 이러한 CPEB1 및 CPEB4의 활성화는 피부 흉터 반응에 중요한 역할을 할 수 있다.

배경 기술

[0004] CPEB1-4를 포함한 포유류 CPEB (Cytoplasmic polyadenylation element binding; CPEB) 단백질은 폴리 (A) 꼬리 신장 및 폴리아데닐화 유도된 번역을 제어하는 서열-특이적 mRNA-결합 단백질이다 [1]. 개구리 (Xenopus) 난모 세포, 설치류 세포 및 동물 실험과 관련된 연구 결과, 건강한 개체와 질병 상태 개체에서 CPEB 단백질의 생물학적 기능을 확인했다. CPEB1은 인슐린 신호전달 및 포도당 대사에 관여하며 [2], CPEB4는 세포 생존과 암 진행을 조절하고 [3,4], CPEB1과 CPEB4는 모두 세포 유사분열을 조절한다 [5]. CPEB1과 CPEB4는 특히 간경변 환자의 간에서 강하게 발현되어 간섬유증 병리에 비정상적인 CPEB 발현이 관여함을 시사한다 [6].

[0005] 대부분의 그람 음성 세균의 외막에서 유래한 지다당 (Lipopolysaccharide; LPS)은 염증 과정에 기여하는 강력한 단핵구/대식세포 활성인자이다 [7]. 대식세포 표면상의 톨-유사 수용체 (TLR) 2/4에 LPS의 결합은 TNF- α , IL-1 β 및 IL-6을 포함하는 친염증성 매개인의 생성을 유도하는 일련의 신호 전달 캐스케이드를 개시한다 [8,9]. 이들 중, 미토겐-활성화 단백질 3 키나제 7 (MAP3K7)로도 알려진 TGF- β 1-활성화 키나제 1 (TAK1)은 TLR-매개 활성화 경로의 하류 분자이고, 세포 외 신호 조절 키나제 1/2 (ERK1/2), c-Jun N-말단 키나제 (JNK) 및 NF- κ B

신호전달을 포함하는 고전적인 염증 경로를 조절하는 세포 내 신호 허브로 기능한다 [9,10].

[0006] 화상 후 비후성 반흔은 화상 이후 상처가 회복되는 과정에서 흉터가 위로 불거져 나오는 것을 말한다. 화상 후 비후성 반흔의 발생비율은 화상환자의 60%~90%로 발생 빈도가 매우 높아 화상환자들의 육체적, 정신적 고통과 경제적 피해는 매우 크고 심각한 사회적 문제이다. 비후성 반흔은 화상 상처가 치유되면서 1~2주 경부터 생겨나기 시작해, 대부분 4~6개월, 길게는 2년까지 자라며 다양한 증상을 동반하는데, 치료를 하지 않으면 영구적으로 남아 이차적인 피부 구축 (contraction)과 관절 구축을 초래한다. 또한, 정상 피부와 달리 땀샘이나, 지방샘, 모발, 모낭 등 피부 부속기를 포함하지 않아 경미한 자극에도 쉽게 상처가 생기고 잘 아물지 않는다. 화상 후 비후성 반흔은 보기에 흉할 뿐만 아니라 통증과 가려움증 등 다양한 감각 이상을 동반하며 부위에 따라 심각한 기능 장애를 초래한다.

[0007] 화상 후 비후성 반흔은 화상환자들에게서 나타나는 매우 흔하고 심각한 문제이지만 아직까지 정확한 발병 기전과 정립된 효과적인 치료방법이 없어 명확한 병태생리학적 발생기전 규명과 그 기전에 근거한 병증 특이적 치료제 개발이 시급한 실정이다.

[0008] 과도한 세포 외 기질 (ECM) 침착을 특징으로 하는 비후성 반흔 (Hypertrophic scar; HTS)은 심부 피부 조직에서 열 또는 외상성 손상 후 종종 발생하는 섬유증식성 피부 흉터이다 [11]. 기계적 응력은 비후성 반흔 발달에서 중요한 요소이며, 시험관 내 콜라겐의 전사를 유발하고, 흉터 및 표피 비후, 비만 세포 침습, 혈관 과다생성 및 과다 세포 증식과 같은 생체 내 비후성 반흔 특징의 발달을 유도한다. 또한, 기계적 응력은 사람에게 있어서 화상 상처 동안 섬유아세포의 근섬유아세포로의 분화를 자극한다 [12,13]. 중요하게는, 기계적 자극은 세포 내 작은 GTPase Rho 경로의 $\alpha v \beta 6$ 인테그린-매개 자극을 통해 잠복성 TGF- $\beta 1$ 을 활성화시킨다 [14]. 장기간의 염증 또는 심한 염증은 화상 환자에서 비후성 반흔 형성의 또 다른 중요한 원인이다 [14,15]. 따라서 비후성 반흔은 염증성 병리학적 병변으로 간주된다. 실제로, 염증성 사이토카인 IL-6 및 IL-1 β 는 비후성 반흔 조직 섬유아세포에서 과다 발현된다 [15,16]. 또한, M2 표현형에 대한 대식세포 극화 (polarization)는 비후성 반흔 형성 및 과도한 TGF- $\beta 1$ 분비를 유도하는 반면, M1 표현형에 대한 정상적인 상처 치유를 보장한다 [17,18]. TGF- $\beta 1$ 은 섬유아세포 증식 및 분화의 강력한 유도인자로서 작용하여 과도한 ECM 합성을 유발하기 때문에 비후성 반흔 형성에 중요한 분자 인자이다 [11]. 조직 섬유증에서 TGF- $\beta 1$ 의 이러한 병리학적 역할은 Smad-의존적 및 Smad-독립적 신호전달 경로를 포함한다 [11]. TGF- $\beta 1$ 에 의해 활성화되는 Smad-독립적 신호전달 경로에서 중요한 상류 신호전달 분자인 TAK1은 신장, 폐 및 심장과 같은 다양한 기관의 염증성 또는 섬유성 질환에 관여한다 [19-21].

[0009] 이 연구에서 우리는 각각 THP-1 대식세포와 진피 섬유아세포에서 LPS 유발 친염증성 반응 및 TGF- $\beta 1$ 유발 친섬유화 반응에 미치는 siRNA-매개 CPEB1 또는 CPEB4 녹다운의 영향을 조사했다. 우리는 CPEB1 또는 CPEB4 녹다운이 TAK1, P38, JNK 및 ERK 키나제를 통해 발생하는 LPS-유도 친염증성 신호전달을 억제하고 THP-1 세포에서 NF- κB 및 피부 섬유아세포에서 TGF- $\beta 1$ -유도된 Smad-의존적 및 Smad-독립적 친섬유화 신호전달 경로에서 NF- κB 를 현저하게 억제함을 발견하였다. 따라서, CPEB1과 CPEB4 및 이들의 발현을 조절하는 경로는 피부 섬유증에 관여하는 세포 경로에 영향을 미칠 수 있다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) S. Aarabi et al., Faseb. J. : Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 21 (12) (2007) 3250-3261
- (비특허문헌 0002) I.M. Alexandrov et al., PLoS Genet. 8 (1) (2012) e1002457.
- (비특허문헌 0003) M.C. Kan et al., Mol. Cell Biol. 30 (24) (2010) 5658-5671.
- (비특허문헌 0004) E. Ortiz-Zapater et al., Nat. Med. 18 (1) (2011) 83-90.
- (비특허문헌 0005) I. Novoa et al., Nat. Cell Biol. 12 (5) (2010) 447-456.
- (비특허문헌 0006) V. Calderone et al., Gastroenterology 150 (4) (2016) 982-997 e30.7.
- (비특허문헌 0007) R.J. Ulevitch et al., Curr. Opin. Immunol. 11 (1) (1999) 19-22.

- (비특허문헌 0008) I. Sabroe et al., J. Immunol. 168 (9) (2002) 4701-4710 (Baltimore, Md. : 1950).
- (비특허문헌 0009) P.Y. Ng et al., Front. Immunol. 6 (2015) 166.
- (비특허문헌 0010) K. Newton et al., Cold Spring Harbor Perspect. Biol. 4 (3) (2012).
- (비특허문헌 0011) A. Armour et al., Wound Repair Regen.: Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissues Repair Soc. 15 (Suppl 1) (2007) S6-S17.
- (비특허문헌 0012) J.P. Junker et al., Burns: J. Int. Soc. Burn Inj. 34 (7) (2008) 942-946.
- (비특허문헌 0013) C.A. Derderian et al., Ann. Plast. Surg. 55 (1) (2005) 69-75 discussion 75.
- (비특허문헌 0014) R.S. Chiang et al., Wound Repair Regen.: Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissues Repair Soc. 24 (3) (2016) 466-477.
- (비특허문헌 0015) R. Ogawa, Int. J. Mol. Sci. 18 (3) (2017).
- (비특허문헌 0016) H. Xue et al., J. Burn Care Rehabil. 21 (2) (2000) 142-146.
- (비특허문헌 0017) S.I. Kim et al., Kidney Res. Clin. Pract. 31 (2) (2012) 94-105.
- (비특허문헌 0018) J. Li et al., Cell Discov. 3 (2017) 17023.
- (비특허문헌 0019) R.M. Salgado et al., Burns : J. Int. Soc. Burn Inj. 38 (5) (2012) 668-676.
- (비특허문헌 0020) B. Mahdavian Delavary et al., Immunobiology 216 (7) (2011) 753-762.
- (비특허문헌 0021) H. Sakurai, Trends Pharmacol. Sci. 33 (10) (2012) 522-530.
- (비특허문헌 0022) K.J. Livak et al., Methods (San Diego, Calif.) 25 (4) (2001) 402-408.
- (비특허문헌 0023) Z. Zhu et al., Burns & Trauma 4 (2016) 2.
- (비특허문헌 0024) M.R. Dasu et al., J. Pathol. 202 (4) (2004) 476-485.
- (비특허문헌 0025) E.M. Tan et al., Biochem. J. 310 (Pt 2) (1995) 585-588.
- (비특허문헌 0026) J. Wang et al., Wound Repair Regen.: Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissues Repair Soc. 19 (2) (2011) 274-285.
- (비특허문헌 0027) J. Ding et al., Wound Repair Regen.: Off. Publ. Wound Heal. Soc. Eur. Tissues Repair Soc. 22 (5) (2014) 622-630.
- (비특허문헌 0028) M. Ivshina et al., Mol. Cell Biol. 35 (3) (2015) 610-618.
- (비특허문헌 0029) C. Castagnoli et al., Cell. Immunol. 147 (1) (1993) 51-63.
- (비특허문헌 0030) M.R. Duncan et al., J. Invest. Dermatol. 92 (5) (1989) 699-706.
- (비특허문헌 0031) F. Verrecchia et al., World J. Gastroenterol. 13 (22) (2007) 3056-3062.
- (비특허문헌 0032) S.I. Kim et al., Kidney Res. Clin. Pract. 31 (2) (2012) 94-105.
- (비특허문헌 0033) M. Endale et al., Mediat. Inflamm. 2017 (2017) 7250968.
- (비특허문헌 0034) E.E. Tredget et al., Plast. Reconstr. Surg. 102 (5) (1998) 1317-1328 discussion 1329-30.
- (비특허문헌 0035) H.S. Cui et al., Int. J. Mol. Sci. 19 (1) (2018).
- (비특허문헌 0036) J. Ninomiya-Tsuji et al., J. Biol. Chem. 278 (20) (2003) 18485-18490.
- (비특허문헌 0037) F.A. Bava et al., Nature 495 (7439) (2013) 121-125.
- (비특허문헌 0038) S. Carpenter et al., Nat. Rev. Immunol. 14 (6) (2014) 361-376.

(비특허문헌 0039) H.S. Cui et al., Archives of biochemistry and biophysics 630 (2017) 9-17

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 좀 더 효과적인 비후성 반흔 형성 예방 또는 치료제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명에서, 발명자들은 CPEB1 및 CPEB4 양자가 모두 THP-1 대식세포 및 피부 섬유아세포에서 각각 LPS 및 TGF- β 1에 의해 유도됨을 보여 주었다. 이 세포들은 섬유성 반흔에서 세포외 기질 (extracellular matrix; ECM)의 중요한 원천이다. 또한, 우리는 siRNA-매개 CPEB1 또는 CPEB4 녹다운이 THP-1 세포에서 LPS-활성화 염증 신호전달 및 섬유아세포에서 TGF- β 1-유도된 섬유성 신호전달을 억제함을 입증하였다. 이러한 발견은 CPEB1 및 CPEB4가 염증성 및 섬유성 신호전달의 활성화를 통해 섬유성 반흔 형성에서 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다.

[0015] 비후성 반흔 형성은 심한 화상 환자의 재활 동안 중요한 관심사이다. 그것은 환자의 최종 회복을 제한할 뿐 아니라 치료 결과를 복잡하게 하고 악화시킨다. 비후성 반흔은 일반적으로 부상 부위에서 발생하여 외관을 손상하며 관절에 비후성 반흔이 형성되면 기능 장애가 발생할 수 있다 [11]. 비록 비후성 반흔 형성의 정확한 기작이 여전히 잘 밝혀지지는 않았지만, 기계적 스트레스, 염증 세포, 사이토카인, 케모카인 및 성장 인자를 포함한 다수의 요인이 관여한다는 것이 널리 받아들여지고 있다. 대식세포는 상처 치유 동안 비후성 반흔 형성에 중요한 역할을 한다. 고전적으로 활성화된 M1 대식세포는 친염증성 사이토카인 (IL-6 및 TNF- α)을 생산하는 반면, 대안적으로 활성화된 M2 대식세포는 영양 인자 (PDGF 및 TGF- β 1)를 분비한다 [23]. IL-6는 섬유아세포에서 ECM 합성을 자극하고 MMP-1 및 MMP-3을 억제하는데, 이들은 ECM을 분해하기 때문에 흉터 방지 효과가 있다 [24]. PDGF 및 TGF- β 1은 근섬유아세포 형성을 활발하게 유도하고 이들 근섬유아세포에서 과도한 콜라겐 합성을 자극한다 [11,25]. 면역 조직 화학 분석은 인간 비후성 반흔-유사 누드 마우스 모델에서 대식세포 수의 증가를 보여 주었다. 그러나, CXCR4 길항제 처리는 대식세포의 수, TGF- β 1 발현, 근섬유아세포 분화 및 섬유성 유전자 발현을 감소시켰다 [26,27].

[0016] 우리의 예비 연구에서, 환자로부터 얻은 20쌍의 비후성 반흔 및 정상 피부 조직에서의 qPCR 분석 결과, 비후성 반흔 조직에서의 CPEB1 및 CPEB4의 mRNA 수준이 각각 정상 피부 조직에서의 CPEB1 및 CPEB4의 mRNA 수준의 1.8 배 및 2.2배인 것으로 밝혀졌다 (데이터는 제시되지 않음). 이러한 결과는 CPEB1 및 CPEB4가 비후성 반흔 형성에 관여함을 시사한다.

[0017] 모든 CPEB 단백질 (CPEB1-4)의 녹다운은 TAK1 및 MAPK 신호를 증가시키고, I κ B α 분해를 연장시키며, NF- κ B를 활성화하고, LPS 처리된 마우스 RAW 264.7 대 식세포에서 염증성 사이토카인 생성을 증가시키는 것으로 나타났다 [28]. 이러한 결과는 CPEB 단백질이 TAK1 발현을 제어하고, 이어서 염증 반응을 매개한다는 것을 나타낸다. 그럼에도 불구하고, 염증 반응에서 개별 아형의 역할을 조사하는 것이 제안되었다. 그러나, 결과는 siRNA-매개 CPEB1 또는 CPEB4 녹다운이 인간 단핵구 유래 THP-1 대식세포에서 TAK1, p38, JNK, ERK1/2, I κ B α 및 p65의 LPS-유도된 인 단백질 발현을 감소시켰음을 보여 주었다 (도 1A). 녹다운은 또한 TNF- α 의 mRNA 및 단백질 수준을 감소시켰다 (도 2B, C).

[0018] 앞서, 비후성 반흔 조직에서의 TNF- α 발현은 정상 영양 반흔 및 정상 피부 조직에서의 발현보다 낮았다 [29]. 이와 같이 예기치 않게 낮은 TNF- α 발현은 비후성 반흔에서 감소된 아포토시스와 관련이 있을 수 있다 [23]. 낮은 TNF- α 농도는 섬유아세포의 증식을 촉진하여 과도한 ECM을 생성하여 비후성 반흔 형성에 기여한다 [30]. 따라서, TNF- α 합성을 조절하는 기작이 섬유성 반흔 형성 과정에 관여할 수 있다. 본 발명에서는 CPEB1 또는 CPEB4 녹다운이 LPS 처리된 THP-1 세포에서 TNF- α 생산을 감소시켰다.

[0019] TGF- β -매개 Smad-의존적 신호전달을 표적으로 하는 것은 섬유증에 대한 새로운 치료 전략으로 간주되어 왔다 [31]. 그러나, 최근의 연구는 섬유증에서 TAK1 신호전달의 병리학적 역할을 밝혀냈다. TAK1 신호전달은 TGF- β 1-활성화된 Smad-비의존적 경로이고 [21], 그것의 다운스트림 표적 p38, JNK, ERK, 및 NF- κ B는 병원성 친섬유화 반응에 관여한다 [32,33]. 화상 환자는 대조군 환자보다 현저히 높은 혈청 TGF- β 수준을 갖는 것으로 밝혀

졌다 [34]. 또한, 우리는 이전에 비후성 반흔 조직에서 유래한 섬유아세포에서 TGF- β 1, α -SMA, I형 콜라겐 및 피브로넥틴의 발현이 정상 피부 유래 섬유아세포에 비해 증가하였음을 밝혔다 [35]. 본 발명에서, CPEB1 또는 CPEB4 녹다운은 TGF- β 1 매개 Smad-의존적 및 Smad-독립적 신호를 억제하고 (도 4A, B) α -SMA, I형 콜라겐 및 피브로넥틴의 TGF- β 1-유도 상향 조절을 감소시켰다 (도 4C와 D). TAK1 신호전달이 섬유아세포에서 Smad-의존적 신호전달을 조절하는지를 확인하기 위해, 우리는 강력한 TAK1 억제제인 (5Z)-7-옥소제에놀을 사용하여 억제제 연구를 수행했다 [36]. 본 발명자들은 30 μ M (5Z)-7-옥소제에놀 처리가 SMAD2 및 SMAD1/5/8의 인산화 및 TAK1-하류 신호전달 분자 JNK 및 ERK의 인산화를 감소시켰지만 p38의 인산화는 감소시키지 않았음을 밝혔다 (데이터 나타내지 않음). 이러한 결과는 CPEB1 및 CPEB4 녹다운이 TAK1을 통한 Smad-의존적 신호전달 경로를 부분적으로 억제함을 시사한다.

- [0021] 본 발명은 CPEB1 또는 CPEB4에 대한 발현 억제제 또는 활성 억제제를 포함하는 비후성 반흔 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 CPEB1 또는 CPEB4에 대한 발현 억제제가 CPEB1 또는 CPEB4 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 뉴클레오타이드, shRNA (short hairpin RNA) 및 siRNA (short interfering RNA)로 구성된 군 중 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.
- [0023] 상기 CPEB1 또는 CPEB4에 대한 siRNA는 Sigma-Aldrich사 등에서 시판 중인 제품을 사용할 수 있으며, CPEB1 또는 CPEB4에 대한 siRNA는 CPEB1 또는 CPEB4 유전자 서열을 바탕으로 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 널리 알려진 siRNA 서열생성 프로그램을 이용하여 용이하게 서열을 생성하여 제조할 수 있다. 또한, CPEB1 또는 CPEB4 유전자에 대한 siRNA가 CPEB1 또는 CPEB4 유전자와 결합하여 CPEB1 또는 CPEB4의 발현을 저해할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명함을 밝혀둔다.
- [0024] 또한, 상기 CPEB1 또는 CPEB4에 대한 shRNA는 Sigma-Aldrich사 등에서 시판 중인 제품을 사용할 수 있으며, 다른 방법으로는 CPEB1 또는 CPEB4에 대한 shRNA는 CPEB1 또는 CPEB4 유전자 서열을 바탕으로 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 널리 알려진 shRNA 서열생성 프로그램을 이용하여 용이하게 서열을 생성하여 제조할 수 있다. 또한, CPEB1 또는 CPEB4 유전자에 대한 shRNA가 CPEB1 또는 CPEB4 유전자와 결합하여 CPEB1 또는 CPEB4의 발현을 저해할 수 있음은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명함을 밝혀둔다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 CPEB1 또는 CPEB4 단백질 활성 억제제가 CPEB1 또는 CPEB4 단백질에 결합하는 항체임을 특징으로 하는 조성물을 제공한다.
- [0026] 상기 CPEB1 또는 CPEB4 단백질에 결합하는 항체는 Sigma-Aldrich사 등에서 시판 중인 제품을 사용할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 CPEB1 또는 CPEB4 발현 억제제 또는 활성 억제제를 유효성분으로 함유하는 비후성 반흔 예방 또는 치료용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 유효성분을 0.0001 내지 50중량%로 포함한다.
- [0028] 본 발명의 조성물은 상기 CPEB1 또는 CPEB4 단백질의 발현 억제제 또는 활성 억제제에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다. 본 발명의 조성물은 임상 투여시 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 및 이들 성분 중 1성분 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 있으며, 표적 기관에 특이적으로 작용할 수 있도록 표적 기관 특이적 항체 또는 기타 리간드를 상기 담체와 결합시켜 사용할 수 있다. 더 나아가 당해 기술분야의 적절한 방법으로 또는 레밍턴의 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 조성물은 특히 등장 멸균 용액 또는 멸균수 또는 적절한 생리 식염수의 첨가에 따라 주사 가능한 용액의 조성을 위해 동결건조 조성물을 포함할 수 있다. 사용되는 유효성분의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별,

건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 약 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 일 회 내지 수 회 나누어 투여될 수 있다.

[0031] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 화학 치료, 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법 및 다른 치료제 등과 병용하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0033] 본 발명의 CPEB1 또는 CPEB4 단백질 활성 억제제 또는 발현 억제제를 포함하는 비후성 반흔 예방 또는 치료용 약제학적 조성물은 TAK1을 통한 Smad-의존적 신호전달 경로를 억제하고, 섬유아세포에서 TGF-β1-유도된 섬유증 신호전달을 억제하여 비후성 반흔 형성을 억제할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1. LPS 처리는 THP-1 세포에서 CPEB1 및 CPEB4 발현을 증가시켰다. (A, B) siRNA 형질감염 24시간 후 RT-PCR 분석 결과. 결과는 음성 대조군 siRNA 처리 세포에서의 수준에 대한 배수 변화로 표현된다. (C, D) siRNA 형질감염 48시간 후 웨스턴 블롯팅 결과. 정량 분석을 위해, GAPDH의 단백질 수준으로 단백질 수준을 표준화하였다.

모든 시료를 3회 분석하고, 실험을 독립적으로 3회 수행하였다. 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시하였다. *p < 0.01은 음성 대조군 siRNA-형질감염된 세포와 비교한 값; †p < 0.01은 음성 대조군 siRNA-형질감염 세포 및 LPS-처리 세포와 비교한 값. si-Ct, 음성 대조군 siRNA; si-CP1, CPEB1 siRNA; si-CP4, CPEB4 siRNA.

도 2. CPEB1 또는 CPEB4 녹다운은 THP-1 세포에서 LPS-유도 염증 신호전달을 억제했다. (A) 0.5, 1 또는 4시간 동안 LPS 처리 후 웨스턴 블롯팅한 결과. CPEB1 및 CPEB4 녹다운은 TAK1, p38, JNK, ERK, IκBα 및 NF-κB-p65의 LPS-유도 인산화 수준을 감소시켰다. (B) 4시간 동안 LPS 처리 후 RT-qPCR 분석 결과. CPEB1 및 CPEB4 녹다운은 LPS-유도에 의한 TNF-α mRNA 수준 증가를 감소시켰다. 이 결과는 음성 대조군 siRNA-처리된 세포의 수준에 대한 배수 변화로 표현된다. (C) 4시간 동안 LPS 처리 후 TNF-α 수준에 대한 ELISA 결과. CPEB1 및 CPEB4 녹다운은 LPS-유도에 의한 TNF-α 단백질 수준 증가를 감소시켰다.

모든 시료를 3회 분석하고, 실험을 독립적으로 3회 수행하였다. 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시된다. * p < 0.01은 음성 대조군 siRNA-형질감염 세포와 비교한 값; † p < 0.01은 음성 대조군 siRNA-형질감염 세포 및 LPS-처리 세포와 비교한 값. si-Ct, 음성 대조군 siRNA; si-CP1, CPEB1 siRNA; si-CP4, CPEB4 siRNA.

도 3. TGF-β1 처리는 섬유아세포에서 CPEB1 및 CPEB4 발현을 증가시켰다. (A, B) siRNA 형질감염 24시간 후 RT-qPCR 분석 결과. 결과는 음성 대조군 siRNA-처리된 세포의 수준에 대한 배수 변화로 표현된다. (C, D) siRNA 형질감염 48시간 후 웨스턴 블롯팅 결과. 정량 분석을 위해, 단백질 수준을 GAPDH 수준으로 표준화하였다.

모든 시료를 3회 분석하고, 실험을 독립적으로 3회 수행하였다. 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시된다. * p < 0.01은 음성 대조군 siRNA-형질감염 세포와 비교한 값; † p < 0.01은 음성 대조군 siRNA-형질감염 세포 및 LPS-처리 세포와 비교한 값. si-Ct, 음성 대조군 siRNA; si-CP1, CPEB1 siRNA; si-CP4, CPEB4 siRNA.

도 4. CPEB1 또는 CPEB4 녹다운은 섬유아세포에서 TGF-β1에 의한 섬유화 신호전달을 억제했다 (A, B). 0.5, 1 또는 4시간 동안 TGF-β1 처리 후 웨스턴 블롯팅 결과. CPEB1 및 CPEB4 녹다운은 Smad-독립적 신호전달에 관여하는 TAK1, p38, JNK 및 ERK의 TGF-β1-유도 인산화를 감소시키고 Smad-의존적 신호전달에 관여하는 SMAD2 및 SMAD1/5/8의 TGF-β1 유도 인산화를 약화시켰다. (C) 24시간 동안 TGF-β1 처리 후 RT-qPCR 분석 결과. CPEB1 및 CPEB4 녹다운은 TGF-β1-유도된 α-SMA, 타입 I 콜라겐 및 피브로넥틴 mRNA 수준 증가를 감소시켰다. 결과는 음성 대조군 siRNA-처리 세포의 수준과 비교하여 배수 변화로 표현된다. (D) 48시간 동안 TGF-β1 처리 후 웨스턴 블롯팅 결과. CPEB1 및 CPEB4 녹다운은 TGF-β1-유도 α-SMA, 유형 I 콜라겐 및 피브로넥틴 단백질 수준 증가를 감소시켰다.

모든 시료를 3회 분석하고, 실험을 독립적으로 3회 수행하였다. 데이터는 평균 ± 표준편차로 표시된다. * p < 0.01은 음성 대조군 siRNA-형질감염 세포 및 TGF-β1-처리 세포와 비교한 값. si-Ct, 음성 대조군 siRNA; si-

CP1, CPEB1 siRNA; si-CP4, CPEB4 siRNA; COL-I, 타입 I 콜라겐; FN, 피브로넥틴.

도 5. 다른 서브타입 발현에 대한 CPEB1 및 CPEB4 siRNA의 효과. (A, B) siRNA 형질감염 후 24 시간에 RT-PCR 분석 결과. 결과는 음성 대조군 siRNA 처리된 세포의 수준과 관련하여 배수 변화로 표현된다. 모든 시료를 3회 분석하고, 실험을 독립적으로 3회 수행하였다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시된다. * $p < 0.01$ 은 음성 대조군 siRNA로 형질감염된 세포와 비교한 값임. si-Ct, 음성 대조군 siRNA; si-CP1, CPEB1 siRNA; si-CP4, CPEB4 siRNA; CP2, CPEB2; CP4, CPEB4.

도 6. CPEB1 및 CPEB4 녹다운이 세포 증식에 미치는 영향. (A, B) siRNA 형질감염 후 24 시간 및 48 시간에 THP-1 및 섬유아세포 증식 결과. 결과는 음성대조군 siRNA 처리된 세포의 수준과 관련하여 배수 변화로 표현된다. 모든 시료를 3회 분석하고, 실험을 독립적으로 3회 수행하였다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시된다. * $p < 0.05$ 는 음성 대조군 siRNA-형질감염된 세포와 비교한 값임. si-Ct, 음성 대조군 siRNA; si-CP1, CPEB1 siRNA; si-CP4, CPEB4 siRNA.

도 7. CPEB1 및 CPEB4 녹다운은 TGF- β 1-유도된 섬유아세포 이동을 억제하였다. (A) 시험관 내 상처 치유 분석에서 섬유아세포 이동의 결과. 이미지는 광학 현미경 (스케일 바, 1 mm) 하에서 촬영되었다. (B) 섬유아세포 이동의 정량 분석. 모든 시료를 3회 분석하고, 실험을 독립적으로 3회 수행하였다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시된다. * $p < 0.01$ 은 TGF- β 1 처리된 세포와 비교한 값이다. si-Ct, 음성 대조군 siRNA; si-CP1, CPEB1 siRNA; si-CP4, CPEB4 siRNA.

도 8. p-TAK1, p-p38, p-JNK, p-ERK, p-IK β 및 p-p65의 정량 분석. 각 밴드의 강도를 측정하고 인산화 형태를 총 형태의 강도로 정규화하였다. 모든 실험은 독립적으로 세 번 수행되었다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시된다. * $p < 0.01$ 은 LPS-처리된 세포와 비교한 값이다. si-Ct, 음성 대조군 siRNA; si-CP1, CPEB1 siRNA; si-CP4, CPEB4 siRNA.

도 9. CPEB1 및 CPEB4 녹다운은 섬유아세포에서 TGF- β 수용체 I 발현을 억제하였다. (A, B) 0.5, 1 및 4시간 동안 TGF- β 1 처리 후 웨스턴 블롯팅의 결과. CPEB1 녹다운은 TGF- β 1-유도 TGF- β 수용체 I 발현을 감소시켰다. TGF- β 수용체 II 발현은 변하지 않았다. 모든 실험은 독립적으로 세 번 수행되었다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시된다. * $p < 0.01$ 은 TGF- β 1 처리된 세포와 비교한 값이다. si-Ct, 음성 대조군 siRNA; si-CP1, CPEB1 siRNA; si-CP4, CPEB4 siRNA.

도 10. p-TAK1, p-p38, p-JNK 및 p-ERK의 정량 분석. 각 밴드의 강도를 측정하고 인산화 형태를 총 형태의 강도로 정규화하였다. 모든 실험은 독립적으로 세 번 수행되었다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시된다. * $p < 0.01$ 은 TGF- β 1 처리된 세포와 비교한 값이다. si-Ct, 음성 대조군 siRNA; si-CP1, CPEB1 siRNA; si-CP4, CPEB4 siRNA.

도 11. p-SMAD2 및 p-SMA1/5/8의 정량 분석. 각 밴드의 강도를 측정하고 인산화 형태를 총 형태의 강도로 정규화하였다. 모든 실험은 독립적으로 세 번 수행되었다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시된다. * $p < 0.01$ 은 TGF- β 1 처리된 세포와 비교한 것이다. si-Ct, 음성 대조군 siRNA; si-CP1, CPEB1 siRNA; si-CP4, CPEB4 siRNA.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036]

아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속한 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0038]

1. 세포 배양

[0039]

한국 세포주은행 (Korean Cell Line Bank; KCLB, Seoul Korea)에서 구매한 THP-1 세포를 10% 소 태아 혈청 (FBS; Biowest, Riverside, MO, USA) 및 항생제-항균제 (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)가 보충된 RPMI 1640 (안정된 글루타민 및 25 mM HEPES 포함)에 1×10^6 /ml로 도말하고 조직 배양 접시에서 2일 동안 배양하였다. 세포를 48시간 동안 10^{-8} M 포볼 -12- 미리스테이트-13-아세테이트 (phorbol-12-myristate-13-acetate; PMA)를 사용하여 분화시켰다. 인간 1차 피부 섬유아세포 (2계대)는 PromoCell (Heidelberg, Germany)에서 구입하여 10% FBS (모든 실험에서 섬유아세포는 4-6계대 사용)가 보충된 DMEM (Dulbecco's Modified

Eagle Medium; Biowest, MO, USA)에서 배양했다.

2. siRNA 형질 감염 및 LPS 및 TGF- β 1 처리

음성 대조군, CPEB1 및 CPEB4 SMARTpool siRNA는 Dharmacon (Lafayette, CO, USA)에서 구입하였다. 분화된 THP-1 세포 및 섬유아세포 모두를 50-70%로 성장시키고 Dulbecco's 완충액 식염수 (Biowest)를 사용하여 세척하고 24시간 동안 항생제가 없는 배지에서 배양하였다. 제조사의 지시에 따라 StemFect RNA 형질감염 키트 (Stemgent, Cambridge, MA, USA)를 사용하여 각 siRNA (50 nM)를 5시간 동안 형질감염시켰다. 이어서, 배지를 보충 배지로 교체하였다. 이어서, 세포를 0.1% FBS 함유 배지에서 6시간 동안 배양하고 LPS 또는 TGF- β 1로 처리하였다. 염증 신호 분석을 위해, THP-1 세포를 0.5, 1 또는 4시간 동안 LPS (1 μ g/ml)로 처리하고, 배양 배지의 TNF- α 농도 분석을 위해, THP-1 세포를 LPS (1 μ g/ml)로 4시간 동안 처리하였다. 섬유아세포에서 TGF- β 1 신호전달을 평가하기 위해, 섬유아세포를 0.5, 1 또는 4시간 동안 TGF- β 1 (5 ng/ml)로 처리하였다. α -평활근 액틴 (α -SMA), 콜라겐-I 및 피브로넥틴 mRNA 및 단백질 수준을 평가하기 위해, 섬유아세포를 24시간 또는 48시간 동안 TGF- β 1로 처리하였다.

3. 효소 결합 면역 흡착 분석 (ELISA)

세포 배양 배지에서 TNF- α 농도를 측정하기 위해, 상청액을 LPS-처리된 THP-1 세포로부터 수집하였다. TNF- α 의 농도는 제조사의 지시에 따라 ELISA (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)를 사용하여 측정하였다.

4. 역전사 정량 실시간 중합효소 연쇄반응 (RT-qPCR)

THP-1 세포 또는 섬유아세포로부터의 총 RNA는 제조사의 지시에 따라 ReliaPrep TM RNA Miniprep 시스템 (Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 추출되었다. 500 ng RNA 및 PrimeScript TM RT 마스터 믹스 (Takara, Siga, Japan)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. PCR 프리믹스 (Takara), 50 ng cDNA 및 0.5 μ M 프라이머를 사용하여 LightCycler 96 시스템 (Roche, Basel, Switzerland)에서 실시간 PCR을 수행하였다. 프라이머는 다음과 같았다 : CPEB1, 5'-GGTGTCTCCCAAAGGTAATA-3' (정방향) 및 5'-CAAGCCTGAGCAAGGATCG-3' (역방향); CPEB2, 5'-CGATATTATGAGAGCAGAG-3' (정방향) 및 5'-CTATTGGAAAGAGGGAAG-3' (역방향); CPEB3, 5'-GCTGATATAATGTGGAGGAA-3' (정방향) 및 5'-CCAGGAAGGCATTGTAA-3' (역방향); CPEB4, 5'-TGGGATCAGCCTCTTCATA-3' (정방향) 및 5'-CAATCCGCCTACAAACACCT-3' (역방향); IL-6, 5'-TGCTTGTTCCTC AGCCTT-3' (정방향) 및 5'-CAGAGGGCTGATTAGAGAGAGGT-3' (역방향); α -SMA, 5'-CCGACCGAATGCAGAAGGA-3' (정방향) 및 5'-ACAGAGTATTGCGCTCCGAA-3' (역방향); COL1A1, 5'-ATGTTTCAGCTTGTGGACCTC-3' (정방향) 및 5'-CTGTACGCAGGTGATTGGTG-3' (역방향); 및 피브로넥틴, 5'-CCAGTCCACAGCTATTCCTG-3' (정방향) 및 5'-ACAACCACGGATGAGCTG-3' (역방향). 추정된 mRNA 수준은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 사용하여 GAPDH mRNA 수준으로 표준화되었다 [22].

5. 웨스턴 블롯팅

THP-1 세포 또는 섬유아세포를 프로테아제 억제제 (Sigma, St. Louis, MO, USA) 및 포스파타제 억제제 (Roche)를 함유하는 차가운 RIPA 완충액 (Biosesang, Seongnam, Korea)에서 용균하였다. 시료 (30 μ g 단백질/웰)를 8% SDS-PAGE로 분해하고 PVDF 막 (Merck Millipore, Billerica, MA, USA)으로 전기 전달하였다. 하기 1차 항체가 사용되었다: 토끼 폴리클론 항-CPEB1 및 항-CPEB4 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA); 토끼 폴리클론 항-phospho-TAK1, 항-TAK1, 항-p38, 항-phospho-JNK, 항-JNK, 항-phospho-ERK 및 항- β -액틴-토끼 단일클론 항-포스포-SMAD2 및 항-SMAD1-및 마우스 폴리클론 항-포스포-p38 및 항-ERK (Cell Signaling Technology Danvers, MA, US); 토끼 폴리클론 항-NF- κ B-p65 및 항-콜라겐-I, 마우스 폴리클론 항- α -SMA, 및 마우스 모노클론 항-피브로넥틴 및 항-SMAD2 (Abcam, Cambridge, UK); 마우스 모노클론 항-포스포-I κ B α , 항-I κ B α 및 항-GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA); 토끼 폴리클론 항-포스포-SMAD1/5/8 (Merck Millipore); 토끼 폴리클론 TGF β 수용체 I 항체 (1:500) 및 토끼 폴리클론 TGF β 수용체 II 항체 (1:1000) (Abcam, Cambridge, UK). 퍼옥시다제-접합된 항-마우스 또는 항-토끼 IgG (1 : 3,000, Merck

Millipore)를 이차 항체로 사용하였다. 화학 발광 이미징 시스템 (ATTO, Tokyo, Japan)을 사용하여 이미지를 얻고, CS 분석기 4 소프트웨어 (ATTO)를 사용하여 밴드 밀도를 분석하였다.

6. 세포증식 분석

CellTiter 96® AQueous One Solution 세포증식 분석 키트 (Promega, Madison, WI, USA)를 사용하여 세포 증식을 평가하였다. THP-1 (1×10^5 세포/웰) 및 섬유아세포 (2×10^4 /웰)를 siRNA 형질감염 전에 96 웰 플레이트에서 성장시켰다. $100\mu\text{l}$ 의 배양 배지로 교체한 후, CellTiter 96174; AQueous One Solution 시약 $20\mu\text{l}$ 를 첨가하였다. 세포 배양 인큐베이터에서 37°C 또는 2시간 동안 플레이트를 배양하고 96 웰 플레이트 리더 (BioTek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다. 증식은 다음과 같이 계산되었다: 증식 (%) = (시료 흡광도-백그라운드 흡광도)/(대조군 시료 흡광도-백그라운드 흡광도) X 100.

7. 세포 이동 분석

섬유아세포 이동 분석을 참고문헌과 같이 수행하였다 (39). 간단히 설명하면, 삽입물 (Ibidi, GmbH, Planegg, Germany)에서 섬유아세포 (2×10^4 /웰)를 성장시키고, 24 시간의 siRNA 형질감염 후, 삽입물을 제거하고 세포는 세포가 없는 틈새 (정의된 상처)로 이동하기 시작했다. 세포를 광학 현미경 (IX 70, Olympus, Tokyo, Japan) 하에서 24 및 48 시간에 이미지화하고, 갭으로 이동한 세포의 수를 Image J 소프트웨어 (NIH, Bethesda, MD, USA)로 분석하였다. TGF- β 1은 세포를 양성 대조군으로 처리하였다. 이동 분석의 정량 분석은 음성 대조군 siRNA 처리된 세포에 대한 백분율로 표현되었다.

8. 통계 분석

모든 결과는 평균±표준편차로 제시된다. Mann-Whitney U 테스트는 두 군 간의 비교에 사용되었다. 통계 분석은 PASW 통계 24 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 수행하였다. $p < 0.01$ 은 유의성을 나타내는 것으로 간주되었다.

결과 1. CPEB1 siRNA와 CPEB4 siRNA 사이의 교차 반응성 측정

THP-1 세포 및 섬유아세포에서 CPEB1 및 CPEB4 siRNA의 특이성을 확인하기 위해 RT PCR을 수행하였다. CPEB4 발현에서 CPEB1 siRNA 또는 CPEB1 발현에서 CPEB4 siRNA의 유의한 교차 반응성은 THP-1에서 관찰되지 않았다. 또한, CPEB1 siRNA 및 CPEB4 는 CPEB2 mRNA 수준을 각각 135% 및 128%만큼 약간 증가시켰다 (도 5). CPEB1 siRNA는 음성 대조군 siRNA로 형질감염된 섬유아세포에서의 수준과 비교하여 CPEB4 mRNA 수준을 320% 증가시켰으나, CPEB1 발현에 대한 CPEB4 siRNA의 교차 반응성은 관찰되지 않았다. CPEB1 siRNA 및 CPEB4 siRNA는 모두 섬유아세포에서 CPEB2 mRNA 수준을 각각 225% 및 328% 증가시켰다 (도 5의 B). CPEB1 siRNA 또는 CPEB4 siRNA 는 THP-1 세포 또는 섬유아세포에서 CPEB3 mRNA 수준에 영향을 미치지 않았다.

결과 2. THP-1 세포 및 섬유아세포에서 siRNA 형질 감염이 증식에 미치는 영향

CellTiter 96® AQueous One 솔루션 세포 증식 분석 키트를 사용하여 CPEB1 siRNA 또는 CPEB4 siRNA 형질감염 24시간 또는 48시간 후에 THP-1 및 섬유아세포의 증식을 조사했다. 24시간 동안 CPEB1 또는 CPEB4 녹다운은 THP-1 세포의 증식에 영향을 미치지 않았다. 그러나, 녹다운 48시간 후, THP-1 증식이 유의하게 감소하였다 (도 6의 A). 대조적으로, CPEB1 또는 CPEB4 녹다운은 24시간 또는 48시간 후 섬유아세포의 증식을 증가시켰다 (도 6의 B).

결과 3. 섬유아세포의 이동에 대한 siRNA 형질감염의 효과

시험관 내 상처 치유 분석법을 이용하여 CPEB1 또는 CPEB4 siRNA 형질감염후 24시간 또는 48시간 후 섬유아세포

이동을 측정했다. siRNA 형질감염 후 CPEB1 및 CPEB4 녹다운은 TGF- β 1 처리 세포와 비교하여 siRNA 형질감염 후 섬유아세포 이동을 상당히 감소시켰다 (도 7).

[0071] **결과 4. LPS는 THP-1 세포에서 CPEB1과 CPEB4 발현을 유도했다.**

[0072] LPS는 대식세포-매개 염증의 강력한 자극인자이다. 이 연구에서 우리는 LPS 자극이 THP-1 세포에서 CPEB1과 CPEB4의 mRNA와 단백질 수준을 현저하게 증가시키는 것을 관찰했다 (도 1). 그러나, siRNA-매개 CPEB1 또는 CPEB4의 일시적인 녹다운은 LPS의 효과를 억제하였고, mRNA 수준은 음성 대조군 siRNA-형질감염된 세포의 것보다 낮았다. 실제로, CPEB1 및 CPEB4 siRNA는 THP-1 세포에서 LPS-유도 CPEB1 및 CPEB4 mRNA 수준을 각각 90% 및 85%, 단백질 수준을 75% 및 70% 감소시켰다 (도 1). 이러한 결과는 CPEB1 및 CPEB4 siRNA 형질감염의 높은 효율을 확인할 뿐만 아니라 CPEB1 및 CPEB4가 THP-1 세포에서 LPS-매개 염증 반응에 관여함을 시사한다.

[0074] **결과 5. CPEB1 및 CPEB4 녹다운은 THP-1 세포에서 LPS-유도된 염증 신호를 억제하였다.**

[0075] CPEB1 또는 CPEB4가 LPS-매개 TAK1 신호전달을 조절하는지를 결정하기 위해, 본 발명자들은 웨스턴 블롯팅을 사용하여 LPS-처리된 CPEB1- 또는 CPEB4-녹다운 THP-1 세포에서 TAK1 신호전달 경로의 변화를 조사하였다. 미처리 대조군과 비교하여, 0.5, 1 또는 4시간 동안 LPS로 처리된 세포는 TAK1, p38, JNK, ERK, I κ B α 및 NF- κ B-p65의 인산화가 상당히 증가한 것으로 나타났다 (도 2A, 도 8). 또한, CPEB1 또는 CPEB4 녹다운은 이들 단백질의 LPS-활성화 인산화를 억제하였다. 그러나, 이들 단백질의 총 수준은 크게 다르지 않았다 (도 2A, 도 8). 또한, RT-qPCR 및 ELISA는 CPEB1 또는 CPEB4 녹다운이 THP-1 세포 및 배양 배지에서 각각 TNF- α mRNA (도 2B) 및 단백질 (도 2C) 수준을 감소시키는 것을 밝혔다. 그러나, CPEB1- 또는 CPEB4-녹다운된 세포에서 TNF- α 의 mRNA 및 단백질 수준 모두는 음성 대조군 siRNA-형질감염된 세포에서의 것보다 더 높았다 (도 2B 및 C). 이러한 결과는 LPS-활성화된 염증 신호가 CPEB1 및 CPEB4 발현에 의해 조절됨을 나타낸다.

[0077] **결과 6. 섬유아세포에서 TGF- β 1은 CPEB1 및 CPEB4 발현을 유도한다.**

[0078] TGF- β 1은 시험관내 섬유증 모델을 개발하는데 널리 사용된다. 따라서, 본 발명자들은 섬유아세포에서 CPEB1 및 CPEB4 발현에 대한 TGF- β 1 처리의 효과를 조사하였다. 24시간 동안 TGF- β 1 처리는 섬유아세포에서 CPEB1 및 CPEB4의 mRNA 및 단백질 발현 모두를 유의하게 증가시키는 것으로 관찰되었다 (도 3). 그러나, CPEB1 및 CPEB4 siRNA 형질감염은 CPEB1 및 CPEB4의 TGF- β 1-유도된 mRNA 발현을 각각 80% 및 88% 감소시키고, CPEB1 및 CPEB4의 단백질 발현을 각각 60% 및 73% 감소시켰다. 또한, 이들 수준은 음성 대조군 siRNA로 형질감염된 섬유아세포의 것보다 낮았다 (도 3). 이 결과들은 siRNA 형질감염 효율을 확인하고 섬유아세포에서 TGF- β 1 매개된 섬유증 신호 전달에 CPEB1 및 CPEB4의 관여를 시사한다.

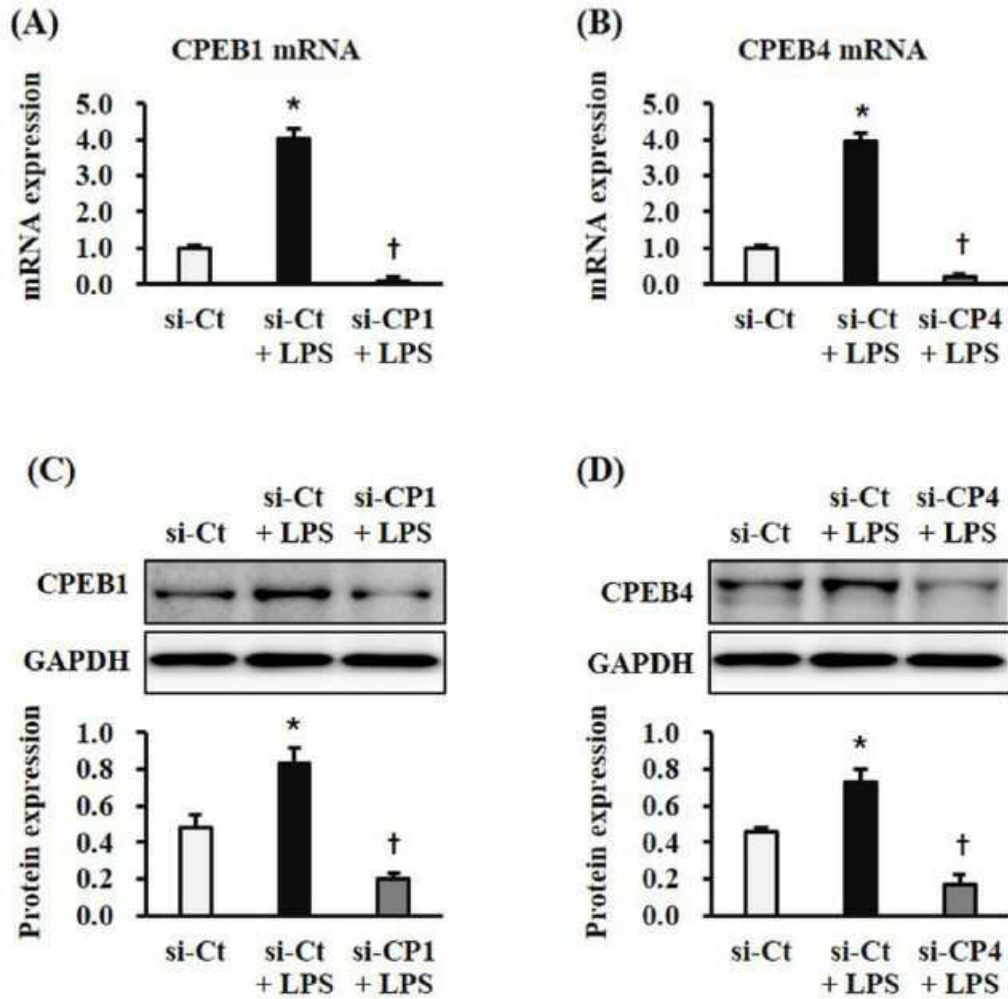
[0080] **결과 7. CPEB1 및 CPEB4 녹다운은 섬유아세포에서 TGF- β 1-유도된 Smad-의존적 및 Smad-독립적 신호전달 경로를 억제하였다.**

[0081] Smad-의존적 신호전달 경로와 TGF- β 1-유도 Smad-독립적 신호전달 경로인 TAK1 신호전달 경로는 함께 조직의 섬유성 반흔 형성에 기여한다 [19]. 따라서, CPEB1 또는 CPEB4 녹다운이 TGF- β 1 신호전달 경로를 변경하였는지 연구하기 위해, 먼저 섬유아세포에서 TGF- β 수용체 I (TbRI) 및 TGF- β 수용체 II (TbR II)의 단백질 수준의 변화를 검출하기 위해 웨스턴 블롯팅을 수행하였다. CPEB1 녹다운에 의해 TGF- β 1-유도된 TbRI 및 TbR II의 단백질 수준이 현저하게 감소하였다. 그러나 CPEB4 녹다운은 TGF- β 1-유도된 TbRI 및 TbR II의 단백질 수준에 영향을 미치지 않았다 (도 9). 다음으로, 우리는 Smad-독립적 신호전달 경로를 측정했다. CPEB1 및 CPEB4 녹다운은 0.5, 1 또는 4시간 동안 TGF- β 1로 처리된 섬유아세포에서 인산화된 TAK1, p38, JNK 및 ERK의 수준을 현저하게 감소시켰다 (도 4A 및 도 10). 마지막으로 Smad-의존적 신호전달의 구성요소인 SMAD2 및 SMAD1/5/8에서 변화를 조사했다. 0.5, 1 또는 4시간 동안의 TGF- β 1 처리는 SMAD2 및 SMAD1/5/8의 인산화에 현저한 증가를 초래하였지만 (도 4B, 도 11), CPEB1 또는 CPEB4 녹다운은 TGF- β 1-유도 SMAD2 및 SMAD1/5/8의 인산화를 유의하게 억제하였다 (도 4B 및 도 11). 이러한 결과는 CPEB1 및 CPEB4가 TGF- β 1-유도된 섬유증 신호전달을 조절함을 나타낸다. 섬유성 반흔 형성에 대한 CPEB1 및 CPEB4 녹다운의 억제 효과를 추가로 탐구하기 위해, 피부 섬유증 또는 반흔의 여러 분자 마커의 발현을 평가하였다. RT-qPCR 및 웨스턴 블롯팅은 TGF- β 1-처리된 CPEB1- 또는 CPEB4-

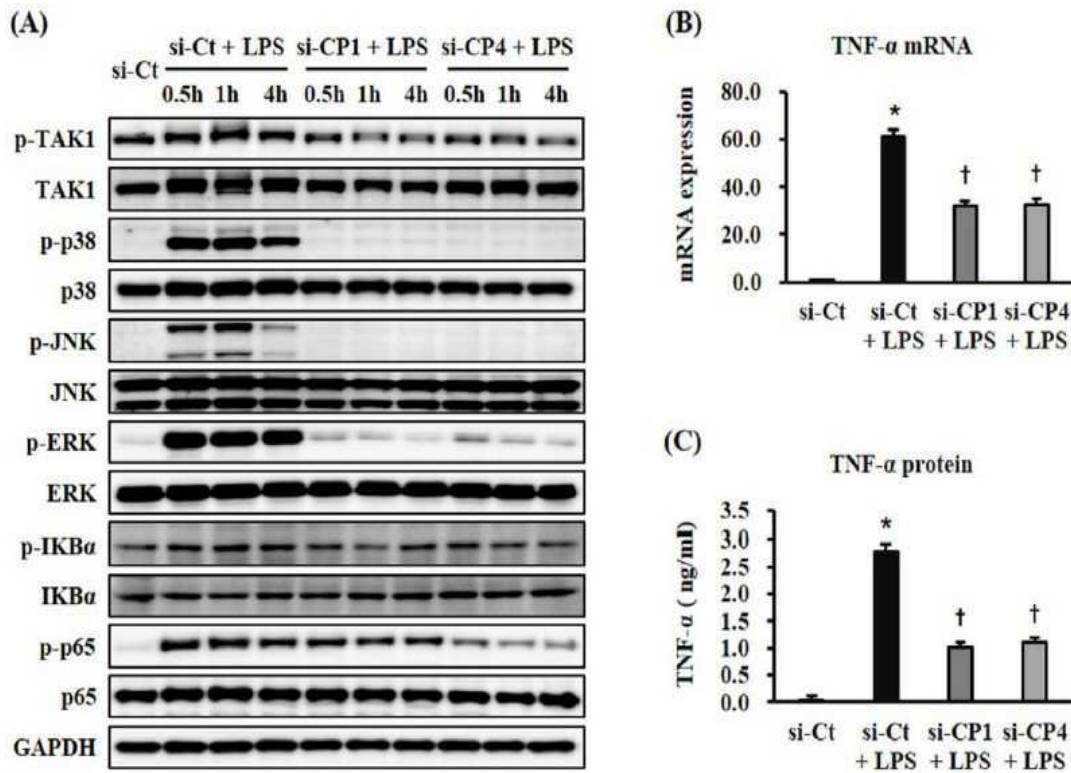
녹다운된 섬유아세포에서 각각 α -SMA, 타입 I 콜라겐 및 피브로넥틴의 감소된 mRNA 및 단백질 수준을 나타냈다 (도 4C 및 D). 이 결과들은 CPEB1 및 CPEB4가 Smad-의존적 및 Smad-독립적인 신호전달 경로를 조절함으로써 섬유성 반흔 형성에서 역할을 할 수 있음을 나타낸다.

도면

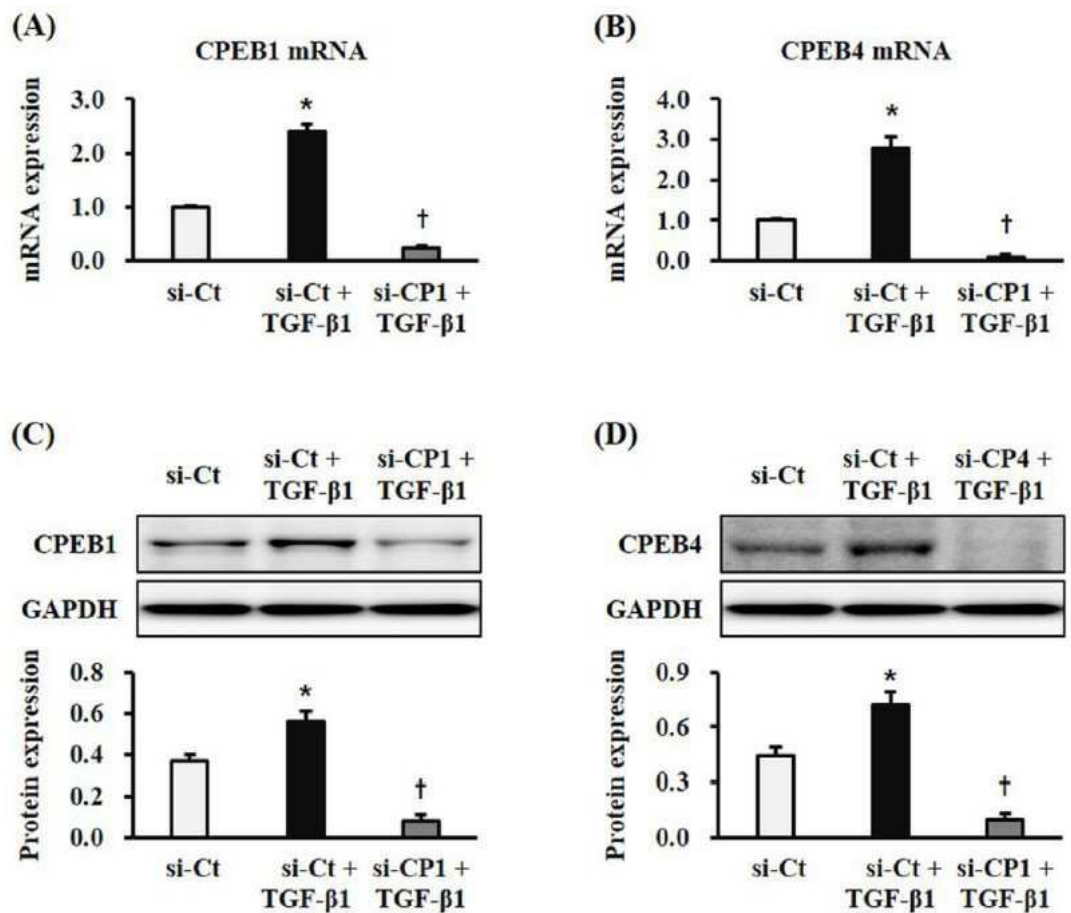
도면1



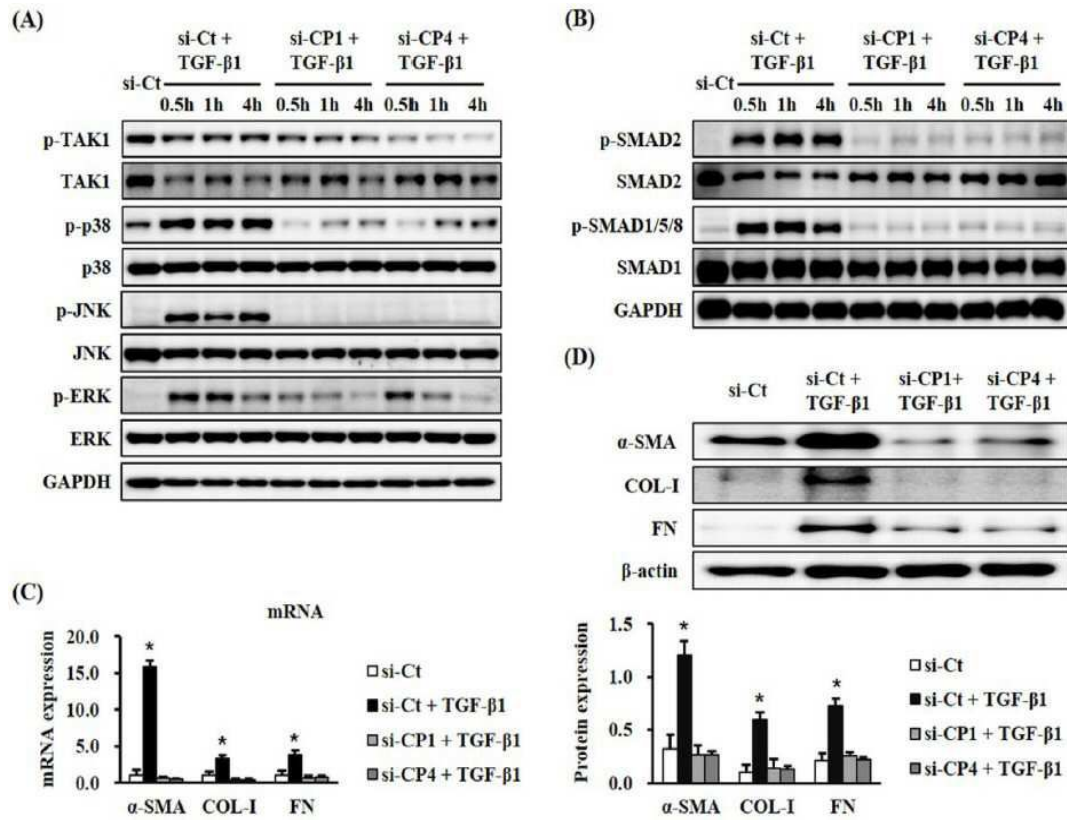
도면2



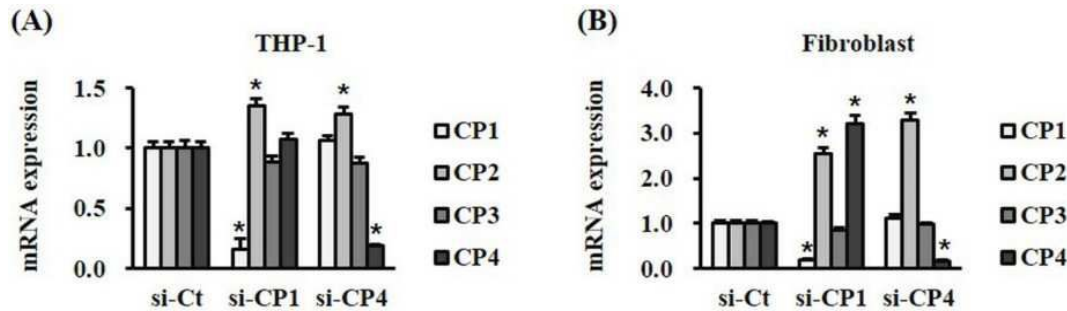
도면3



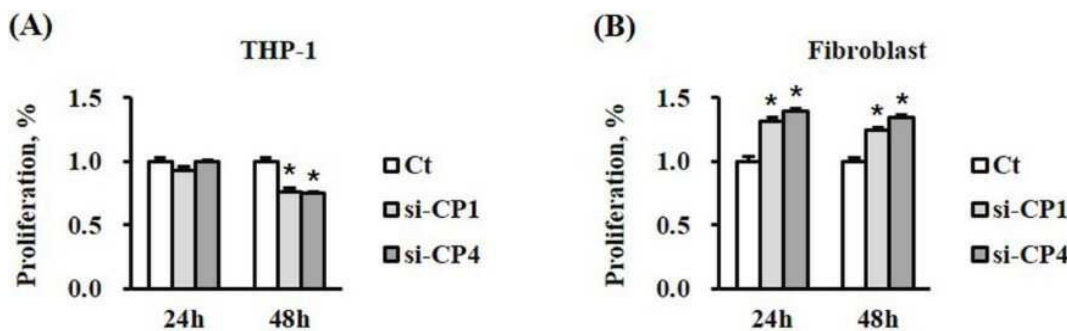
도면4



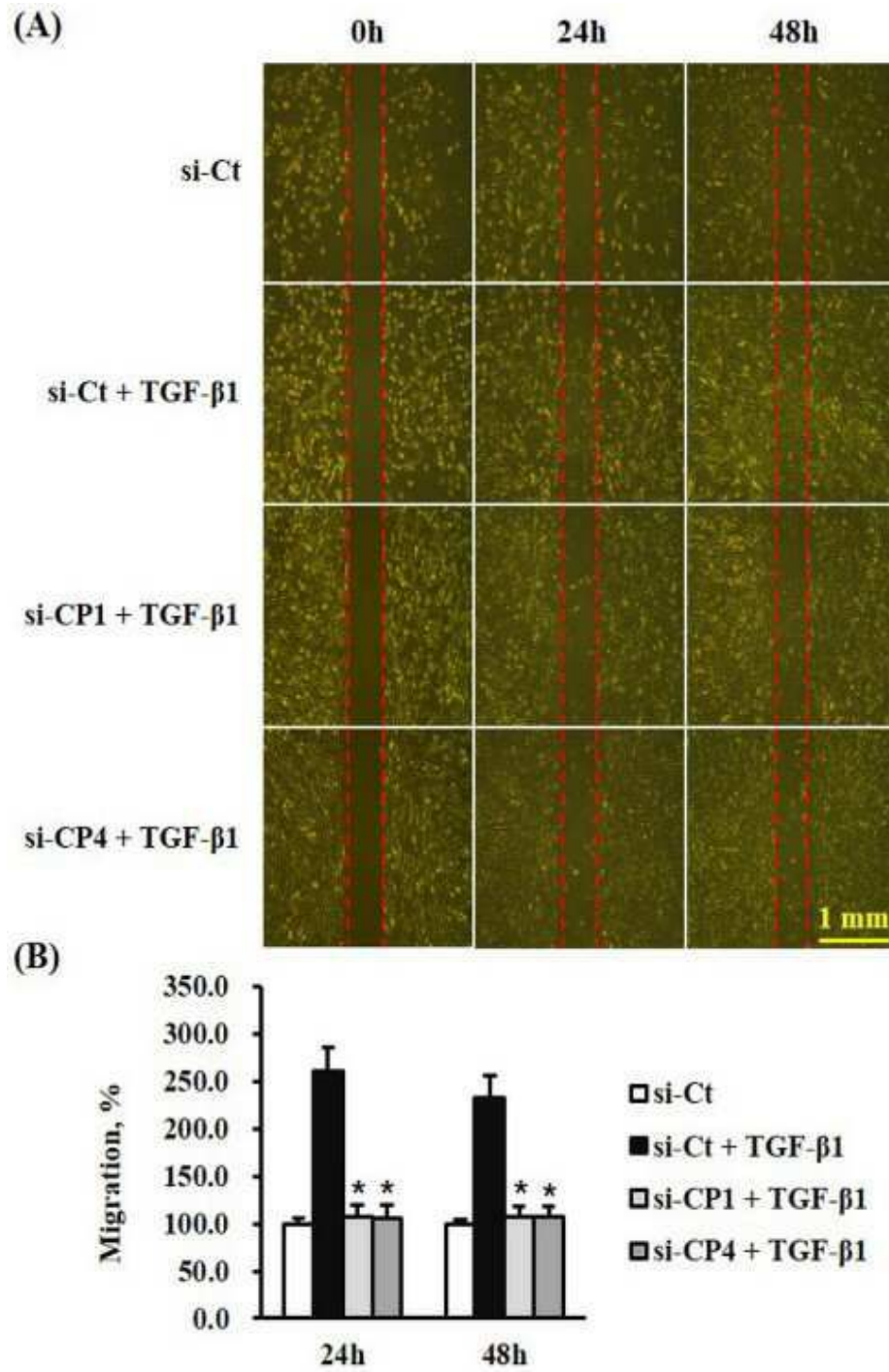
도면5



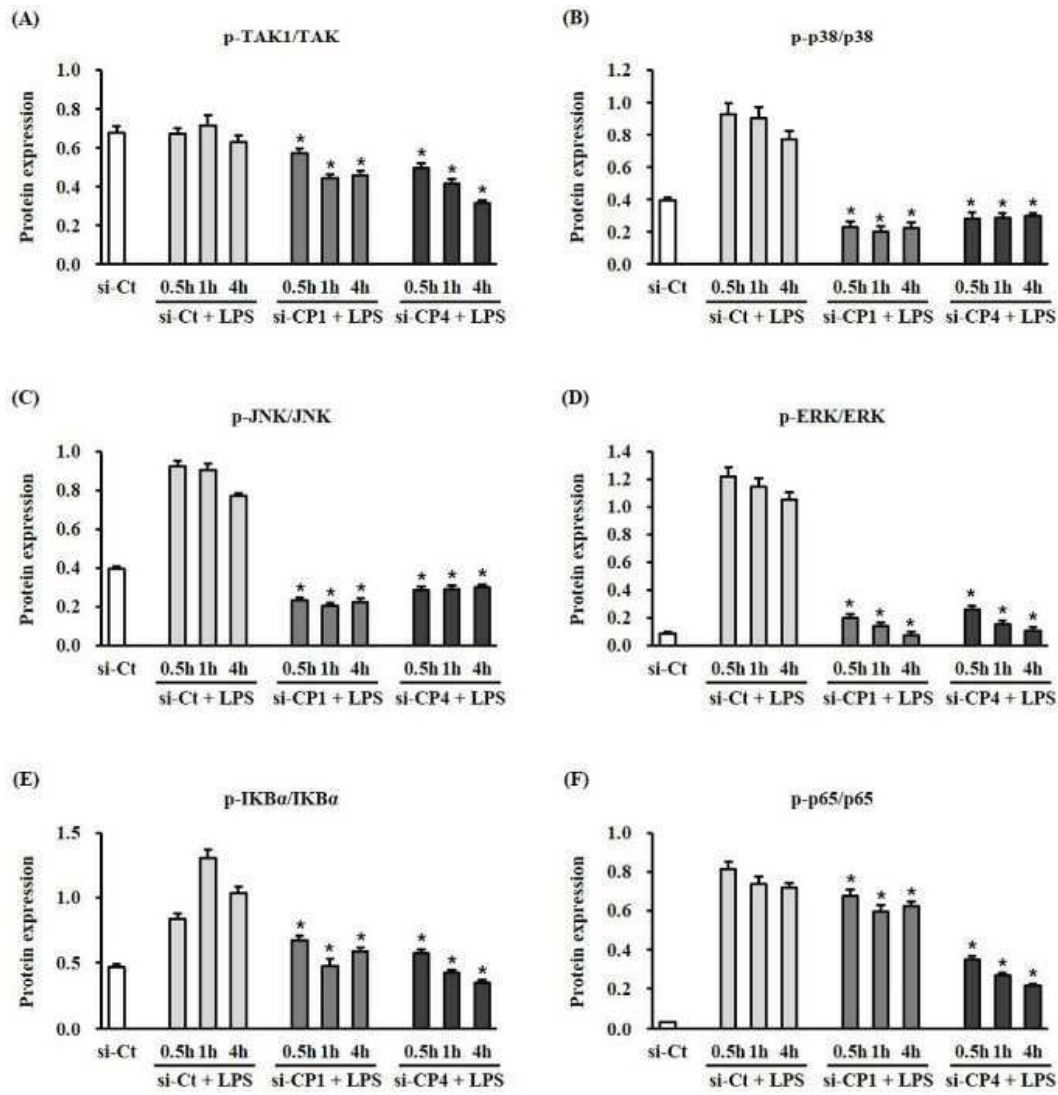
도면6



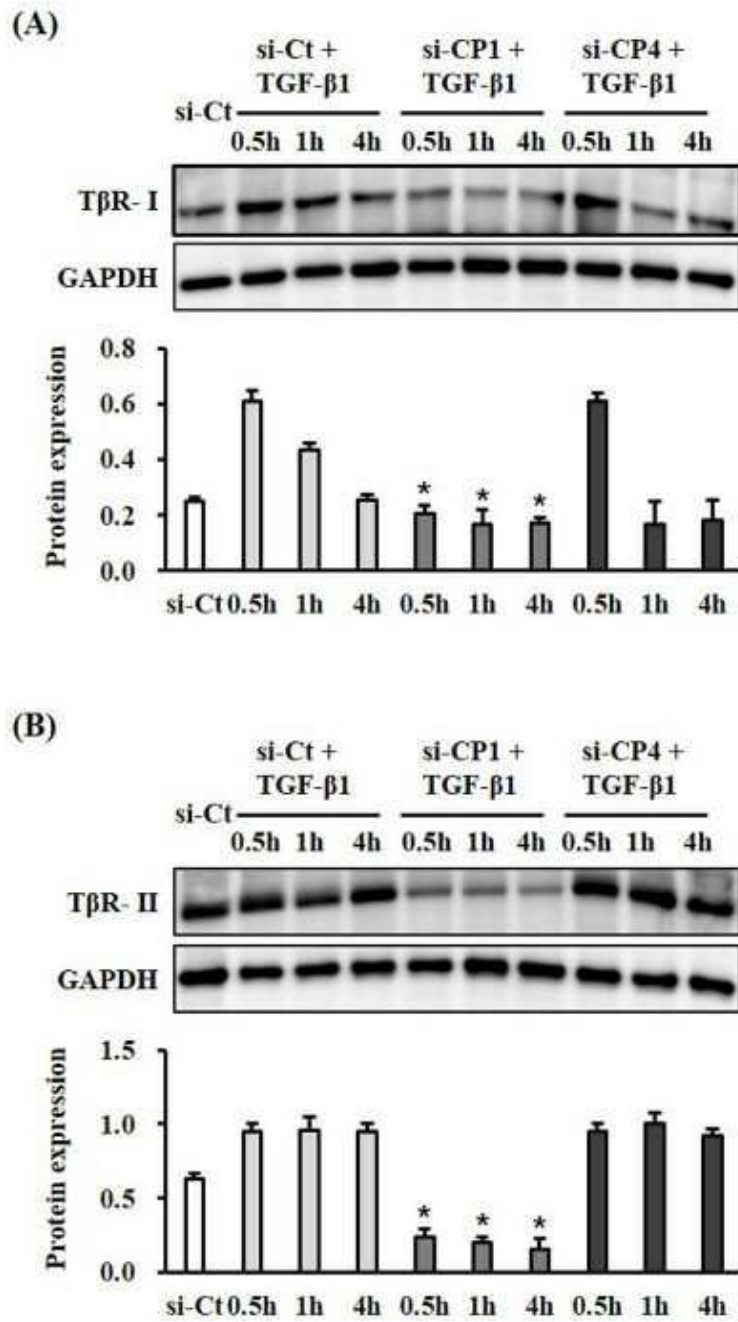
도면7



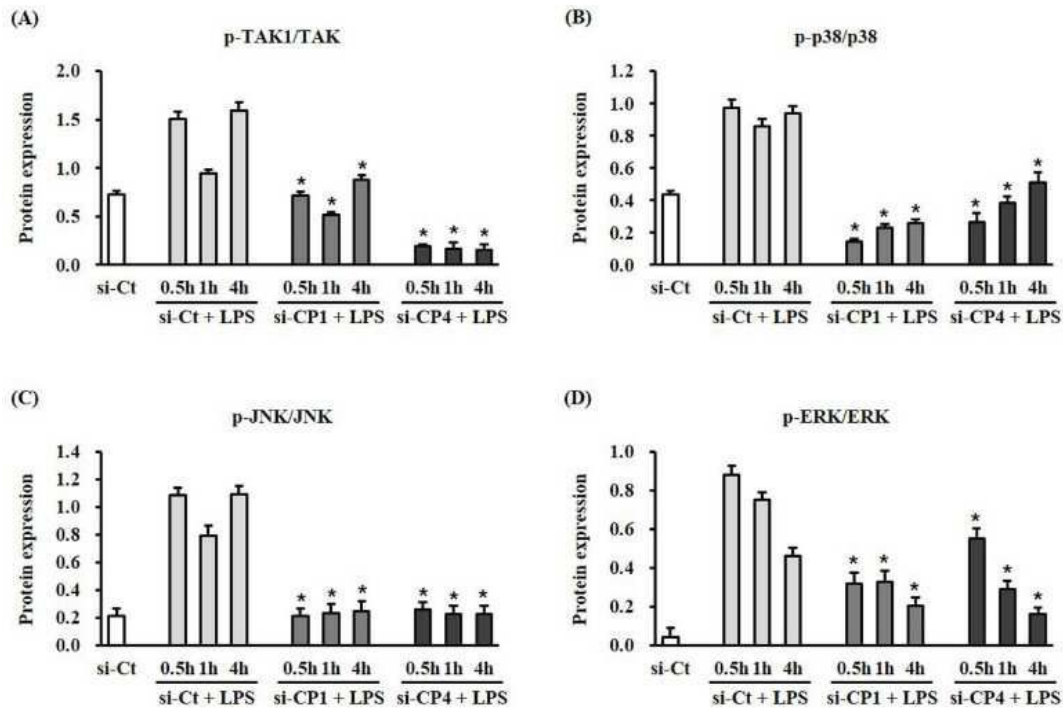
도면8



도면9



도면10



도면11

