(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0000841
(43) 공개일자 2019년01월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/16 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/16 (2013.01)
A61K 38/1732 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0072402
(22) 출원일자 2018년06월22일
심사청구일자 2018년06월22일
(30) 우선권주장
1020170079974 2017년06월23일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
이지희
서울특별시 양천구 목동중앙로7길 32, 102동 302호 (목동, 이편한세상)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 8 항

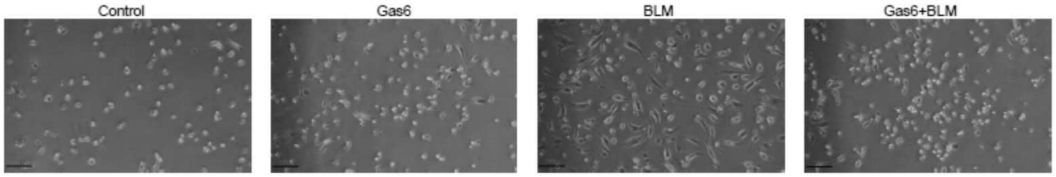
(54) 발명의 명칭 **Gas6 단백질 또는 이의 수용체 활성화제를 포함하는 섬유증의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 Gas6 단백질 또는 이의 수용체 활성화제를 포함하는 섬유증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

Gas6 단백질은 상피세포에서 그 수용체를 통해 PGE_2, PGD_2 및 HGF의 분비 생산을 유도하고, 이들의 하위 신호전달 경로를 거쳐 자가분비 방식으로 EMT 현상을 억제하며, 이에 따라 섬유증을 예방 및 치료할 수 있으므로, Gas6 단백질 및 이의 수용체 활성화제는 섬유증의 예방 또는 치료 용도로 매우 우수한 효과를 가진다.

대 표 도 - 도79



(52) CPC특허분류
A61K 9/0053 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2015R1A2A1A15053112
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업(학술진흥)(2015)-중견연구자지원사업-도약연구지원사업(전략)(성과확산)
연구과제명 암세포의 간엽전환, 침윤 및 전이에 미치는 사멸화 암세포 인식 및 포식작용의 억제효과 및 기전 규명
기 여 율 20/100
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2015.11.01 ~ 2016.10.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017R1A2B2004864
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업(학술진흥)(2017)-중견연구자지원사업-총연구비3억초과~5억이하
연구과제명 종양미세환경에서 섬유아세포의 활성 및 섬유아세포와 암세포 상호작용에 미치는 사멸화 암세포의 억제 효과 및 기전연구
기 여 율 30/100
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2010-0027945
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업-선도연구센터육성사업-기초의과학분야(MRC)
연구과제명 조직손상 방어 연구센터-내인성 염증 치유 및 조직 복구 프로그래밍 강화를 통한 조직손상 개선 연구(1세부)
기 여 율 50/100
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2010.09.01 ~ 2019.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

Gas6 (Growth arrest-specific 6) 단백질 또는 Gas6 단백질 수용체의 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 섬유증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 Gas6 단백질 수용체는 AXL 수용체 타이로신 키나아제, Mer 타이로신 키나아제 및 TYRO3로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인, 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 Gas6 단백질 수용체의 활성화제는 Protein S (Pros1), Tubby and tubby-like protein 1, 또는 Galectin3로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상인, 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 섬유증은 폐, 신장, 간, 심장, 뇌, 혈관, 관절, 장, 피부, 연조직, 골수, 음경, 복막, 랜즈, 근육, 척추, 고환, 난소, 유방, 갑상선, 고막, 췌장, 담낭, 방광 또는 전립선에서 발병한 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조성물은 100 ㎍/kg 내지 500 ㎍/kg의 용량으로 투여되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 경구 또는 비경구로 투여되는 것인, 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 조성물은 세포의 EMT (epithelial to mesenchymal transition)를 억제하는 것인, 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 Gas6 단백질 또는 이의 수용체 활성화제를 포함하는 섬유증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 섬유증은 섬유아세포에 의한 세포 외 기질의 비정상적 생성, 축적 및 침착이 일어나는 질환으로, 기관 또는 조직의 섬유화에 의해 발병한다. 섬유증은 장기 손상을 유발하는 매우 치명적인 질환이다. 일례로 IPF (idiopathic pulmonary fibrosis)는 섬유아세포 축적 및 근섬유아세포 분화와 관련된 재발성 폐포 상피세포 손상의 결과로 나타나며, 폐 실질 (lung parenchyma) 조직의 비가역적 파괴와 함께 세포 외 기질 (extracellular matrix; ECM)의 과량 축적을 야기하는 만성, 진행성, 그리고 치사성 질환이다. 그러나 현재까지 섬유증에 대한

효과적인 치료법이 없는 실정이므로 (Fibrogenesis Tissue Repair, 2012, 5(1): 11; N Engl J Med, 2001, 345(7): 517), 섬유증을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 치료제 개발이 지속적으로 요구되고 있다.

[0003] 본 발명자들은 섬유증의 예방 또는 치료용 조성물을 개발하기 위해 예의 노력한 결과, Gas6 단백질의 새로운 역할 및 폐포 제2형 상피세포의 EMT (epithelial to mesenchymal transition), 이동 및 침습에 대한 Gas6 단백질의 작용기전을 규명하고, 블레오마이신으로 유도된 폐 섬유증 마우스 모델에서 Gas6의 예방 및 치료 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명의 하나의 목적은 Gas6 단백질 또는 Gas6 단백질의 수용체 활성화제를 포함하는, 섬유증의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

[0005] 본 발명의 다른 하나의 목적은 Gas6 단백질 또는 Gas6 단백질의 수용체 활성화제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 섬유증의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0008] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, Gas6 (Growth arrest-specific 6) 단백질 또는 Gas6 단백질 수용체의 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 섬유증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물이다.

[0009] 본 발명에서 용어, "섬유증"은 장기 또는 조직에서 과량의 섬유성 결합 조직이 형성되는 것을 의미한다. 이는 장기 또는 조직에서 정상적 구성요소로서의 섬유성 조직과는 구별될 수 있다. 섬유아세포에 의한 피브로넥틴 (fibronectin), 콜라겐 (collagen) 등의 세포 외 기질 (extracellular metrix)의 과량 축적으로 인해, 섬유증은 종국적으로 장기 손상을 일으키는 치명적인 질병으로 이해될 수 있다.

[0010] 본 발명에서 용어, "EMT (epithelial to mesenchymal transition)"는 상피 세포가 간엽 세포로 전환되는 현상을 말하며, 배아 발생, 기관 발달, 상처 치유 및 줄기세포 거동 등과 관련되고, 기관 섬유화 및 암 발달에 병리학적으로 기여하는 것으로 알려져 있다 (J Clin Invest, 2009, 119(6): 1420). 섬유아세포는 (1) 체류 폐 섬유아세포 (resident lung fibroblast)의 증식 및 분화, (2) AEC (alveolar epithelial cell)에서 (근)섬유아세포로 전환되는 EMT, 및 (3) 골수 전구세포의 분화와 같이 다양한 유래를 갖는 것으로 보고되었는데 (Curr Rheumatol Rep, 2006, 8: 145), 현재까지 보고된 결과들은 EMT가 IPF와 같은 섬유증 발병에서 주요 현상임을 시사한다 (Am J Pathol, 2009, 175: 3; J Exp Med, 2011, 208: 1339). 따라서 EMT 억제가 섬유증에 대한 예방 및 치료 효과를 가질 수 있음은 당업자에게 매우 자명한 사항으로 볼 수 있다.

[0011] 본 발명에서 상기 섬유증은 폐, 신장, 간, 심장, 뇌, 혈관, 관절, 장, 피부, 연조직, 골수, 음경, 복막, 랜즈, 근육, 척추, 고환, 난소, 유방, 갑상선, 고막, 췌장, 담낭, 방광 또는 전립선 등 모든 조직에서 나타나는 섬유화 관련 질환을 포함할 수 있다. 구체적으로, 본 발명에서 섬유증은 신체 각 조직에서 발생하는 섬유화에 의해 야기되는 질환, 예컨대 이상 창상 치유, 알콜성 간 손상 유도 간 섬유증, 연결 섬유증, 크론병 (장의 섬유증), 췌장 및 폐의 낭포성 섬유증, 특히 아이들에서 근육간 주사의 합병증으로서 발생할 수 있는 주사 섬유증, 심내막심근 섬유증 또는 심장 섬유증, 이식편대숙주병 (Graft-Versus-Host Disease, GVHD)에 의한 섬유증, 비장의 섬유증, 망막 섬유증을 포함한 눈의 섬유증, 수술 또는 주사 섬유증의 섬유화 합병증, 사구체 신염, 간질 섬유증, 켈로이드 및 비대성 반흔 (피부의 섬유증), 황반 변성, 종격동 섬유증 (종격동의 연조직 섬유증), 국소피부경화증 (morphea), 다초점 섬유소증, 골수 섬유증, 신장성 전신 섬유증 (피부의 섬유증), 결절성 표피 섬유증 (예를 들면, 양성 섬유성 조직구종, 흉막 섬유증, 수술 (예를 들면, 수술 이식)의 결과로서의 섬유증, 증식성 섬유증, 파이프자루 섬유증 (pipestem fibrosis), 후섬유소 섬유증, 진행성 다발 섬유증 (폐의 섬유증 유형, 석탄 노동자 진폐증의 합병증), 오래된 심근 경색 (심장의 섬유증), 췌장 섬유증, 진행성 다발 섬유증, 방사선 섬유증, 신장 섬유증, 만성 신장 질환 관련 또는 이를 유발하는 신장 섬유증, 후복막 섬유증 (후복막의 연조직의 섬유증), 수술 후 반흔화, 경피증/전신 경화증 (피부의 섬유증), 상피세포증, 자궁섬유증, 또는 바이러스성 간

염 유도 섬유증일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0012] 본 발명에서 폐 섬유증은 특발성 폐 섬유증 (Idiopathic Pulmonary Fibrosis), 비특이성 간질성 폐렴 (Nonspecific Interstitial Pneumonia), 급성간질성 폐렴 (Acute Interstitial Pneumonia), 특발성 기질화 폐렴 (Cryptogenic Organizing Pneumonia), 호흡계기관지염 관련성 간질성 폐질환 (Respiratory Bronchiolitisassociated Interstitial Lung), 박리성 간질성 폐렴 (Desquamative Interstitial Pneumonia), 임파구성 간질성 폐렴 (Lymphoid Interstitial Pneumonia), 간질성 폐 섬유증, 및 미만성 폐 섬유증 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0013] 본 발명에서 사용된 용어, "치료"는 상기 약학적 조성물의 투여로 섬유증의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미하고, "예방"은 상기 약학적 조성물의 투여로 섬유증의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0014] 본 발명에서는 Gas6 단백질 또는 Gas6 단백질 수용체의 활성화제가 EMT 현상을 억제할 수 있음을 최초로 확인하여, Gas6 단백질 또는 Gas6 단백질 수용체의 활성화제를 섬유증에 대한 예방 및 치료 용도로 사용할 수 있음을 규명하였다.

[0015] 본 발명에서 용어, "Gas6 (Growth arrest-specific protein 6)"는 분비성 비타민 K-의존성 단백질을 말하며, AXSF 또는 AXLLG 등으로도 명명된다. 본 발명에서 Gas6 단백질은, 예컨대 NCBI accession number (NP_062394.2)의 아미노산 서열 (서열번호 35)을 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않고, 공지된 Gas6 단백질과 상동성을 가지고, 본 발명에서 확인한 것과 동일한 활성을 가지는 한 일부 서열이 결실, 부가, 치환된 것이거나, 혹은 인간 또는 다른 동물 유래의 Gas6 단백질이라 하더라도 모두 본 발명의 범주 내에 포함될 수 있다. 본 발명에서 서열 상동성은 야생형 Gas6 단백질과 70 % 이상, 80 % 이상, 90 % 이상, 95 % 이상, 98 % 이상 또는 99 % 이상의 서열이 일치하는 것일 수 있다. 또한, 야생형 Gas6 단백질에서 활성을 위해 일부 도메인을 절단한 단편, 그리고 단백질의 발현, 분리, 정제, 또는 활성을 증가시키기 위해 공지된 펩타이드를 결합한 융합 단백질 형태의 경우에도 야생형 Gas6 단백질과 동일한 활성을 갖는 한 본 발명의 Gas6 단백질 범주 내에 포함될 수 있다. 본 발명에서 Gas6 단백질은 당업계에 공지된 방법, 예를 들어 펩타이드 합성 또는 형질전환 세포를 이용한 단백질의 생산을 통해 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 실시예에서는 예시적으로 서열번호 35의 마우스 Gas6 단백질을 합성하여 사용하였다 (R&D Systems; Minneapolis, MN, USA).

[0016] Gas6는 N-말단 감마-카르복시글루탐산 (Gla) 도메인, 4 개의 EGF (epidermal growth factor)-유사 도메인, 및 SHBG (sex hormone binding globulin)에 상동성을 가지는 큰 C-말단 영역을 포함한다 (Mol Cell Biol, 1993, 13: 4976; Blood Cells Mol Dis, 2006, 36: 373). Gas6는 폐, 심장, 신장, 장, 섬유아세포, 내피세포, 골수세포, 혈관 평활근, 백혈구, 및 뉴런 등에서 발현되며, TAM (Tyro3/Axl/Mer) 수용체 서브패밀리의 공통 리간드로 알려져 있다 (Cell, 1995, 82: 355; Nature Reviews Immunology, 2008, 8: 327). 이에, 본 발명에서 Gas6 단백질 수용체는 이에 제한되는 것은 아니나, AXL 수용체 타이로신 키나아제, Mer 타이로신 키나아제 또는 TYRO3를 포함한다. 상기 수용체들은 모두 두 개의 세포 외 N-말단 면역글로불린-유사 도메인 및 두 개의 피브로넥틴-III-유사 도메인과 이에 뒤 따르는 수용체 C-말단 세포질 끝 부분에 위치한 타이로신 키나아제 도메인을 포함하여 상당한 도메인 유사성을 공유한다. Gas6에 의한 TAM 활성은 세포 생존, 증식, 포식 작용, 분화, 혈소판 기능 및 혈전 안정화를 매개하는 신호를 유도하는 것으로 보고되었다. 또한 최근 연구에서는 대식세포 및 수지상세포에서 Gas6 신호가 TLR에 의해 유도되는 사이토카인 분비를 조절하여 면역 반응을 조절하는 것으로 확인되었다. 나아가 최근, 본 발명자들은 대식세포가 Gas6에 의해 리프로그래밍되어 대식세포에서 Mer/RhoA/Akt/MAP 키나아제 신호전달경로에 의해 유도되는 HGF의 주변분비 (paracrine) 역할을 통해 상피세포 증식 및 상처 회복을 촉진할 수 있음을 확인하였으나, 상피세포 항상성에 대한 Gas6의 직접적인 역할은 여전히 알려지지 않았다.

[0017] 본 발명에서 Gas6 단백질 수용체의 활성화제는 Gas6 단백질 수용체를 활성화시켜 그 하위 신호전달경로를 활성화시킬 수 있는 물질을 의미하며, 특히 본 발명의 목적상 PEG2, PGD_2 또는 HGF를 생산, 분비할 수 있는 신호전달경로에 대한 활성화 물질을 말한다. 예를 들어, 상기 Gas6 단백질 수용체의 활성화제는 Protein S (Pros1), Tubby and tubby-like protein 1, 또는 Galectin3일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명의 구체적 일 실시예에서는 폐포 및 신장 상피세포에서 TGF-β으로 유발되는 EMT를 Gas6가 억제하는 효과를 세포의 형태와 EMT 마커의 mRNA 및 단백질 수준 변화를 통해 직접적으로 확인하였다 (도 1 내지 도 4). 다른 일 실시예에서는 이러한 Gas6의 항-EMT 활성은 ERK 및 Akt 경로를 포함하는 Smad 독립적 TGF-β신호를 차단함으로써 나타난다는 것을 확인하였다 (도 5 내지 도 10). 또한, Gas6 처리에 의해 PGE_2, PGD_2 및 HGF 분비가

유도되고, 주로 EP2, DP2 및 c-Met 수용체를 통해 항-EMT 효과를 나타낸다는 것을 확인하였다 (도 11 내지 도 53). Gas6는 세포막에 분포하는 Axl 또는 Mer 수용체 티로신 키네이즈와 작용하여 COX-2 유래 PGE_2, PGD_2 분비와 RhoA 의존적인 HGF 분비를 통해 TGF-β신호를 차단함으로써 항-EMT 효과가 나타남을 확인하였다(도 5 내지 도 62). 특히 마우스 초대 폐포상피세포에서도, 마우스 폐포상피세포에서 나타났듯이, PGE_2, PGD_2 및 HGF 신호 의존적인 Gas6의 항-EMT 효과를 확인하였다(도 63 내지 도 75). 더욱이 인간의 폐선종세포(A549 세포)에서 인간 Gas6 재조합 단백질을 투여시 유사하게 항-EMT 효과가 확인되었다(도 76 내지 도 78). 다른 일 실시예에서는 폐 섬유증이 유발된 동물모델에서 Gas6 투여에 따라 폐 섬유증이 개선되는 것을 확인하였다(도 79 내지 88).

[0019] 따라서 본 발명의 조성물은 세포에서 PEG2, PGD_2 또는 HGF를 생산, 분비하여 자가분비 방식으로 EMT (epithelial to mesenchymal transition)를 억제할 수 있어, 섬유증의 예방 및 치료에 우수한 효과를 가지므로, 섬유증의 예방 또는 치료 용도로 매우 유용하게 사용될 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있으며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스 (sucrose) 또는 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 이에 제한되지는 않으나, 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[0023] 상기 조성물은 100 ㎍/kg 내지 500 ㎍/kg의 용량으로 투여되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 조성물은 이미 알려진 섬유증 치료제와 다른 시간에 또는 동시에 병용하여 투여될 수 있고, 또는 이미 알려진 공지의 섬유증 치료 방법이 함께 적용될 수 있다. 또한 상기 조성물은 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0024] 본 발명에서 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 대상에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 말하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0025] 상기 약학적 조성물은 목적 또는 필요에 따라 당업계에서 사용되는 통상적인 방법, 투여 경로, 투여량에 따라 적절하게 개체에 투여될 수 있다. 투여 경로의 예로는 경구, 비경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 및 비강 내로 투여될 수 있으며, 비경구 주입에는 근육 내, 정맥 내, 동맥 내, 복강 내 또는 피하투여가 포함된다. 또한 당업계에 공지된 방법에 따라 적절한 투여량 및 투여 횟수가 선택될 수 있으며, 실제로 투여되는 본 발명의 약학적 조성물의 양 및 투여 횟수는 치료하고자 하는 증상의 종류, 투여 경로, 성별, 건강 상태, 식이, 개체의 연령 및 체중, 및 질환의 중증도와 같은 다양한 인자에 의해 적절하게 결정될 수 있다.

[0026] 본 발명에서의 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 용도에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 혈관 투과성 증가를 억제 또는 완화하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0027] 본 발명에서 용어, "개체"는 본 발명의 섬유증 질환을 보유하거나 또는 질환이 발병한, 인간을 포함한 모든 동물을 의미한다. 본 발명의 약학적 조성물을 개체에 투여함으로써, 섬유증을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0028] 본 발명의 다른 하나의 양태는, Gas6 단백질 또는 Gas6 단백질의 수용체 활성화제를 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 섬유증의 예방 또는 치료 방법이다.

[0029] Gas6 단백질, 이의 수용체 활성화제의 섬유증 예방 또는 치료 용도는 상기 설명한 바와 같다.

발명의 효과

[0030] Gas6 단백질은 상피세포에서 그 수용체를 통해 PGE_2, PGD_2 및 HGF의 분비 생산을 유도하고, 이들의 하위 신호전달 경로를 거쳐 자가분비 방식으로 EMT 현상을 억제하며, 이에 따라 섬유증을 예방 및 치료할 수 있으므로, Gas6 단백질 및 이의 수용체 활성화제는 섬유증의 예방 또는 치료 용도로 매우 우수한 효과를 가진다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 TGF-β 및 Gas6 처리에 따른 LA-4 세포의 모양을 위상차 현미경으로 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤 10 ng/ml의 TGF-β를 48 시간 또는 72 시간 처리하였다.

도 2는 TGF-β 및 Gas6 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커 단백질의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤 10 ng/ml의 TGF-β를 48 시간 또는 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 3은 TGF-β 및 Gas6 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤 10 ng/ml의 TGF-β를 48 시간 또는 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 4는 TGF-β 및 Gas6 처리에 따른 HEK-293 신장 상피 세포 내 EMT 마커 단백질의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤 10 ng/ml의 TGF-β를 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 5은 TGF-β 및 Gas6 처리에 따른 LA-4 세포 내 Snai1/2, Zeb1/2 및 Twist1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤 10 ng/ml의 TGF-β를 48 시간 또는 72 시간 처리하였다.

도 6은 TGF-β 및 Gas6 처리에 따른 HEK-293 세포 내 Snai1/2, Zeb1/2, 및 Twist1 mRNA 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤 10 ng/ml의 TGF-β를 72 시간 처리하였다.

도 7은 TGF-β 및 Gas6 처리에 따른 LA-4 세포 내 Smad2 또는 Smad3 단백질의 인산화를 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤 10 ng/ml의 TGF-β를 30 분 또는 1 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비.

도 8는 TGF-β 및 Gas6 처리에 따른 LA-4 세포 내 ERK1/2 단백질의 인산화를 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤 10 ng/ml의 TGF-β를 5 분, 30 분 또는 1 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 9은 TGF-β 및 Gas6 처리에 따른 LA-4 세포 내 AKT 단백질의 인산화를 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤 10 ng/ml의 TGF-β를 1 시간, 3 시간 또는 8 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 10은 TGF-β 및 Gas6 처리에 따른 LA-4 세포 내 P38 단백질의 인산화를 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤 10 ng/ml의 TGF-β를 15 분, 1 시간 또는 6 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비.

도 11는 Gas6 처리에 따른 LA-4 세포 내 COX-2 또는 COX-1 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 각각 표시된 시간으로 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비.

도 12은 Gas6 처리에 따른 LA-4 세포 내 COX-2 또는 COX-1 단백질 수준을 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 각각 표시된 시간으로 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비.

도 13는 Gas6 처리에 따른 LA-4 세포 배양 배지 내 PGE_2 또는 PGD_2 단백질 수준을 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 8 시간 또는 20 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비.

도 14는 COX-2 특이적 siRNA 처리에 따른 LA-4 세포 내 COX-2 단백질 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포를 COX-2 특이적 siRNA 또는 대조군 siRNA로 6 시간 동안 형질주입하였다. *P < 0.05, 대조군 대비.

도 15은 COX-2 특이적 siRNA 처리에 따른 LA-4 세포 배양 배지 내 PGE_2 또는 PGD_2 단백질 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포를 COX-2 특이적 siRNA 또는 대조군 siRNA로 6 시간 동안 형질주입한 다음, 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교

도 16은 NS-398 처리에 따른 LA-4 세포의 형태 변화를 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 10 μM NS-398을 1 시간 처리하고 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, 10 ng/ml TGF-β으로 72 시간 자극하였다.

도 17은 NS-398 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커의 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 10 μM NS-398을 1 시간 처리하고 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, 10 ng/ml TGF-β으로 72 시간 자극하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 18는 NS-398 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커의 단백질 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 10 μM NS-398을 1 시간 처리하고 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, 10 ng/ml TGF-β으로 72 시간 자극하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 19은 COX-2 특이적 siRNA 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커의 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 COX-2 siRNA 또는 대조군 siRNA를 6 시간 형질주입하고 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, 10 ng/ml TGF-β으로 72 시간 자극하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 20은 COX-2 특이적 siRNA 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커의 단백질 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 COX-2 siRNA 또는 대조군 siRNA를 6 시간 형질주입하고 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, 10 ng/ml TGF-β으로 72 시간 자극하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 21는 NS-398 처리에 따른 LA-4 세포 내 Snai1, Zeb1 및 Twist1의 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 10 μM NS-398을 1 시간 처리하고 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, 10 ng/ml TGF-β으로 72 시간 자극을 주었다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 22은 COX-2 siRNA 처리에 따른 LA-4 세포 내 Snai1, Zeb1 및 Twist1의 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 COX-2 siRNA 또는 대조군 siRNA를 6 시간 처리하고 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, 10 ng/ml TGF-β으로 72 시간 자극을 주었다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 23는 COX-2 siRNA 처리에 따른 LA-4 세포 내 ERK1/2 단백질의 인산화 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 COX-2 siRNA 또는 대조군 siRNA를 6 시간 처리하고 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, 10 ng/ml TGF-β으로 5 분 자극을 주었다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 24는 COX-2 siRNA 처리에 따른 LA-4 세포 내 AKT 단백질의 인산화 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 COX-2 siRNA 또는 대조군 siRNA를 6 시간 처리하고 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, 10 ng/ml TGF-β으로 8 시간 자극을 주었다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 25은 수용체 길항제 처리에 따른 LA-4 세포의 형태 변화를 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리하고, 각 수용체의 길항제 EP2 (AH-6809), EP4 (AH-23848), DP1 (BW-A868C) 또는 DP2 (BAY-u3405) 10 mM을 투여하거나 투여하지 않은 조건에서 TGF-β을 48 시간 또는 72 시간째에 형태 변화를 확인하였다.

도 26은 수용체 길항제 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커의 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리하고, 각 수용체의 길항제 EP2 (AH-6809) 또는 EP4 (AH-23848) 10 mM을 투여하거나 투여하지 않은 조건에서 TGF-β을 48 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 27은 수용체 길항제 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커의 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리하고, 10 mM DP2 길항제 (BAY-u3405)이 존재하거나 존재하지 않는 조건에서 TGF-β을 48 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 28는 수용체 길항제 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커의 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리하고, 10 mM DP1 길항제 (BW-A868C)이 존재하거나 존재하지 않는 조건에서

TGF-β을 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 29은 수용체 길항제 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커의 단백질 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리하고, 각 수용체의 길항제 EP2 (AH-6809) 또는 EP4 (AH-23848) 10 mM을 투여하거나 투여하지 않은 조건에서 TGF-β을 48 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 30은 수용체 길항제 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커의 단백질 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리하고, 10 mM DP2 길항제 (BAY-u3405)이 존재하거나 존재하지 않는 조건에서 TGF-β1을 48 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 31는 수용체 길항제 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커의 단백질 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리하고, 10 mM DP1 길항제 (BW-A868C)이 존재하거나 존재하지 않는 조건에서 TGF-β을 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 32은 수용체 길항제 처리에 따른 LA-4 세포 내 Snai1, Zeb1 및 Twist1 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리하고, 각 수용체의 길항제 EP2 (AH-6809), EP4 (AH-23848) 또는 DP2 (BAY-u3405) 10 mM을 투여하거나 투여하지 않은 조건에서 TGF-β을 48 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 33는 수용체 길항제 처리에 따른 LA-4 세포 내 Snai1, Zeb1 및 Twist1 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리하고, 10 mM DP1 길항제 (BW-A868C)이 존재하거나 존재하지 않는 조건에서 TGF-β을 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 34는 Gas6 처리에 따른 LA-4 세포 내 HGF mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 400 ng/ml Gas6를 표시된 시간으로 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비.

도 35은 Gas6 처리에 따른 LA-4 세포 배양 배지 내 HGF 단백질 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 400 ng/ml Gas6를 8 시간 또는 20 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비.

도 36은 Gas6 처리에 따른 LA-4 세포 내 HGF 단백질 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 400 ng/ml Gas6를 8 시간 또는 20 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비.

도 37은 RhoA 특이적 siRNA 처리에 따른 LA-4 세포 내 RhoA 단백질 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 RhoA 특이적 siRNA 또는 대조군 siRNA를 24 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비.

도 38는 RhoA 특이적 siRNA 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 RhoA 특이적 siRNA 또는 대조군 siRNA를 24 시간 처리한 뒤 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, 10 ng/ml TGF-β으로 48 시간 자극하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 39은 RhoA 특이적 siRNA 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커 단백질 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 RhoA 특이적 siRNA 또는 대조군 siRNA를 24 시간 처리한 뒤 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, 10 ng/ml TGF-β으로 48 시간 자극하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 40은 Y-27632 처리에 따른 LA-4 세포의 형태 변화를 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 10 mM Y-27632를 1 시간 처리한 뒤 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 처리한 뒤, 10 ng/ml TGF-β으로 48 시간 자극하였다. 다음 세포 형태 변화를 관찰하였다.

도 41는 Y-27632 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 10 mM Y-27632를 1 시간 처리한 뒤 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, 10 ng/ml TGF-β으로 48 시간 자극하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 42은 Y-27632 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커 단백질 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 10 mM Y-27632를 1 시간 처리한 뒤 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리하한 뒤, 10 ng/ml TGF-β으로 48 시간 자극하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 43는 RhoA 특이적 siRNA 처리에 따른 LA-4 세포 내 Snai1, Zeb1 및 Twist1 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 RhoA siRNA 또는 대조군 siRNA를 24 시간 형질주입한 뒤, 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, 10 ng/ml TGF-β으로 72 시간 자극하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 44는 Y-27632 처리에 따른 LA-4 세포 내 Snai1, Zeb1 및 Twist1 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 10 mM Y-27632를 1 시간 처리한 뒤, 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, 10 ng/ml TGF-β으로 48 시간 자극하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 45은 RhoA 특이적 siRNA 처리에 따른 LA-4 세포 내 ERK1/2 단백질의 인산화 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 RhoA siRNA 또는 대조군 siRNA를 24 시간 형질주입한 뒤, 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, 10 ng/ml TGF-β으로 5 분 자극하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 46은 RhoA 특이적 siRNA 처리에 따른 LA-4 세포 내 AKT 단백질의 인산화 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 RhoA siRNA 또는 대조군 siRNA를 24 시간 형질주입한 뒤, 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, 10 ng/ml TGF-β으로 8 시간 자극하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 47은 c-Met 길항제 처리에 따른 LA-4 세포의 형태를 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, c-Met 길항제인 PHA-665752 250 nM이 존재하거나 존재하지 않는 조건에서 TGF-β을 72 시간 처리하고 형태 변화를 관찰하였다.

도 48는 c-Met 길항제 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커의 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, c-Met 길항제인 PHA-665752 250 nM이 존재하거나 존재하지 않는 조건에서 TGF-β을 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 49은 c-Met 길항제 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커의 단백질 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, c-Met 길항제인 PHA-665752 250 nM이 존재하거나 존재하지 않는 조건에서 TGF-β을 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 50은 c-Met 길항제 처리에 따른 LA-4 세포 내 Snai1, Zeb1 및 Twist1의 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, c-Met 길항제인 PHA-665752 250 nM이 존재하거나 존재하지 않는 조건에서 TGF-β을 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 51는 PGE_2, PGD_2 또는 HGF 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커의 단백질 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 PGE_2 (35 또는 118 pg/ml), PGD_2 (6 또는 28 pg/ml) 또는 HGF (169 또는 194 pg/ml)를 10 ng/ml TGF-β과 함께 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 52은 HGF 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커의 단백질 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 다음 새로운 배지로 교체한 뒤, HGF (169 또는 194 pg/ml)를 10 ng/ml TGF-β과 함께 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 53는 Gas6 처리에 따른 LA-4 세포 내 c-Met, EP2, EP4, DP1 또는 DP2 수용체 단백질 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 400 ng/ml Gas6를 12 시간 또는 20 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 54는 Gas6 처리에 따른 LA-4 세포 내 Axl 또는 Mer 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 0, 5, 15, 30, 60 및 120 분 동안 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 55은 Axl 또는 Mer 특이적 siRNA 처리에 따른 LA-4 세포 내 Axl 또는 Mer 단백질 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 Axl 또는 Mer siRNA 또는 대조군 siRNA를 48시간 동안처리하고 400 ng/ml Gas6를 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 56은 Axl 또는 Mer 특이적 siRNA 처리에 따른 LA-4 세포 내 COX-2 mRNA, PGE_2 및 PGD_2 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 Axl 또는 Mer siRNA 또는 대조군 siRNA를 48시간 동안처리하고 400 ng/ml Gas6를 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 57은 Axl 또는 Mer 특이적 siRNA 처리에 따른 LA-4 세포 내 RhoA 활성, HGF mRAN 및 단백질 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 Axl 또는 Mer siRNA 또는 대조군 siRNA를 48시간 동안 처리하고 400 ng/ml Gas6를 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 58는 Axl 또는 Mer 특이적 siRNA 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커의 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 Axl 또는 Mer siRNA 또는 대조군 siRNA를 48시간 동안 처리하고 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, TGF-β을 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 59은 Axl 또는 Mer 특이적 siRNA 처리에 따른 LA-4 세포 내 EMT 마커의 단백질 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 Axl 또는 Mer siRNA 또는 대조군 siRNA를 48시간 동안 처리하고 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, TGF-β을 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 60은 Axl 또는 Mer 특이적 siRNA 처리에 따른 LA-4 세포 내 Snai1, Zeb1 및 Twist1의 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 Axl 또는 Mer siRNA 또는 대조군 siRNA를 48시간 동안 처리하고 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, TGF-β을 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 61는 Axl 또는 Mer 특이적 siRNA 처리에 따른 LA-4 세포 내 ERK1/2 단백질의 인산화를 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 Axl 또는 Mer siRNA 또는 대조군 siRNA를 48시간 동안처리하고 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, TGF-β을 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 62은 Axl 또는 Mer 특이적 siRNA 처리에 따른 LA-4 세포 내 AKT 단백질의 인산화를 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 Axl 또는 Mer siRNA 또는 대조군 siRNA를 48시간 동안처리하고 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, TGF-β을 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 63은 Gas6 처리에 따른 초대 마우스 AT II 세포 내 EMT 마커 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, TGF-β을 48 또는 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 64은 Gas6 처리에 따른 초대 마우스 AT II 세포 내 EMT 마커 단백질의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, TGF-β을 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 65은 TGF-β및 Gas6 처리에 따른 초대 마우스 AT II 세포 내 Snai1/2, Zeb1/2 및 Twist1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤 10 ng/ml의 TGF-β를 48 시간 또는 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 66은 Gas6 처리에 따른 초대 마우스 AT II 세포 내 COX-2 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 각각 표시된 시간으로 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비.

도 67은 NS-398 및 Gas6 처리에 따른 초대 마우스 AT II 세포 내 EMT 마커 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. 10 μM NS-398를 1시간 처리한 후, 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤 10 ng/ml의 TGF-β를 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 68는 NS-398 및 Gas6 처리에 따른 초대 마우스 AT II 세포 내 Snai1/2, Zeb1/2 및 Twist1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. 10 μM NS-398를 1시간 처리한 후, 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤 10 ng/ml의 TGF-β를 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 69은 AH6, BAY 및 Gas6 처리에 따른 초대 마우스 AT II 세포 내 EMT 마커 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤 48 시간동안 TGF-β만 처리하거나, 10 μM의 EP2 (AH-6809)을 함께 처리하거나, 10 μM의 DP2 (BAY-u3405)을 함께 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 70은 AH6, BAY 및 Gas6 처리에 따른 초대 마우스 AT II 세포 내 Snai1/2, Zeb1/2 및 Twist1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤 48 시간동안 TGF-β만 처리하거나, 10 μM의 EP2 (AH-6809)을 함께 처리하거나, 10 μM의 DP2 (BAY-u3405)을 함께 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 71는 Gas6 처리에 따른 초대 마우스 AT II 세포 내 HGF mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 400 ng/ml Gas6를 표시된 시간으로 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비.

도 72은 Y-27632 처리에 따른 초대 마우스 AT II 세포 EMT 마커 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 10 mM Y-27632를 1 시간 처리한 뒤 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, 10 ng/ml TGF-β으로 48 시간 자극하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 73는 Y-27632 처리에 따른 초대 마우스 AT II 세포 Snai1, Zeb1 및 Twist1 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 10 mM Y-27632를 1 시간 처리한 뒤 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, 10 ng/ml TGF-β

으로 48 시간 자극하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 74는 c-Met 길항제 처리에 따른 초대 마우스 AT II 세포 내 EMT 마커의 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, c-Met 길항제인 PHA-665752 250 nM이 존재하거나 존재하지 않는 조건에서 TGF-β을 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 75은 c-Met 길항제 처리에 따른 초대 마우스 AT II 세포 내 Snai1, Zeb1 및 Twist1 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. LA-4 세포에 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤, c-Met 길항제인 PHA-665752 250 nM이 존재하거나 존재하지 않는 조건에서 TGF-β을 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 76은 TGF-β및 Gas6 처리에 따른 사람 폐 선암종 세포(549 세포) 내 EMT 마커 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤 10 ng/ml의 TGF-β를 48 시간 또는 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 77은 TGF-β및 Gas6 처리에 따른 사람 폐 선암종 세포(549 세포) 내 EMT 마커 단백질 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤 10 ng/ml의 TGF-β를 48 시간 또는 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 78는 TGF-β및 Gas6 처리에 따른 사람 폐 선암종 세포(549 세포) 내 Snai1/2, Zeb1/2 및 Twist1 mRNA의 수준을 확인한 결과를 나타낸다. 400 ng/ml Gas6를 20 시간 처리한 뒤 10 ng/ml의 TGF-β를 48 시간 또는 72 시간 처리하였다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 79은 생체 내 블레오마이신 및 Gas6 처리에 따른 초대 마우스 AT II 세포의 모양을 위상차 현미경으로 확인한 결과를 나타낸다.

도 80은 생체 내 블레오마이신 및 Gas6 처리에 따른 초대 마우스 AT II 세포의 EMT 마커 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 81는 생체 내 블레오마이신 및 Gas6 처리에 따른 초대 마우스 AT II 세포의 Snai1, Zeb1 및 Twist1 mRNA의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 82은 생체 내 블레오마이신 및 Gas6 처리에 따른 초대 마우스 AT II 세포의 COX-2 mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 83는 생체 내 블레오마이신 및 Gas6 처리에 따른 초대 마우스 AT II 세포의 PGE_2 또는 PGD_2 단백질 수준을 확인한 결과를 나타낸다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 84는 생체 내 블레오마이신 및 Gas6 처리에 따른 초대 마우스 AT II 세포의 HGF mRNA 수준을 확인한 결과를 나타낸다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 85은 생체 내 블레오마이신 및 Gas6 처리에 따른 초대 마우스 AT II 세포의 HGF 및 TGF-β단백질 수준을 확인한 결과를 나타낸다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 86은 생체 내 블레오마이신 및 Gas6 처리에 따른 14일 째 폐조직에서EMT 마커 및 세포외기질 단백질의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 87은 생체 내 블레오마이신 및 Gas6 처리에 따른 21일 째 폐조직에서EMT 마커 및 세포외기질 단백질의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

도 88는 생체 내 블레오마이신 및 Gas6 처리에 따른 21일 째 폐조직에서 하이드록시프롤린 수준을 확인한 결과를 나타낸다. *P < 0.05, 대조군 대비; +P < 0.05, 표시된 값 비교.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

[0035] **실시예 1: 세포주 및 배양**

[0037] LA-4 및 HEK-293 세포는 ATCC로부터 구입하였다. LA-4 세포는 37 ℃5 % CO_2 조건에서 열 처리로 불활성화된 15 % FBS (fetal bovine serum)를 함유하는 F12K 배지 (스위스 Lonza 사)에서 배양하였다. HEK-293 세포는 37 ℃5 % CO_2 조건에서 10 % FBS, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린 및 100 mg/ml 스트렙토마이신을 함유하는 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium; 미국 Media Tech 사)에서 배양하였다.

[0039] **실시예 2: 초대 세포의 분리 및 배양**

[0041] 초대 마우스 AT II (alveolar type II) 상피 세포를 BALB/c 마우스로부터 분리, 정제하였다.

[0042] 폐 동맥에 0.9% 식염수를 주입하여 폐 혈액을 제거하였다. 1 ml의 식염수로 폐를 세척한 후, 디스파제(dispase) 100 unit을 마우스 폐에 주입한 다음, 실온에서 45분 동안 배양하였다. 그 다음, 기계적 수단으로 큰 기관지에서 폐를 분리하고, 분리된 폐 조직을 DNase I 0.01%를 함유한 DMEM 배지에 37 ℃에서 10 분간 배양하였다. 세포를 여과하고, 원심 분리한 후, 대식세포와 섬유아세포를 각각 제거하기 위해 37 ℃에서 1 시간 동안 마우스 IgG 0.75 mg/ml으로 코팅된 세포 배양 페트리 디쉬에 순차적 플레이팅으로 재현탁하였다. 최종 세포 분리물을 15 mM HEPES, 0.8 mM $CaCl_2$, 0.25 % BSA, 5 mg/ml 인슐린, 5 mg/ml 트랜스페린, 5 ng/ml 소듐 셀레나이트 및 2 % 마우스 혈청을 함유하는 Ham 's F12 배지가 첨가된 제1형 콜라겐 코팅 35-mm 배양 접시에 접종하였다.

[0043] pro-SP-C 면역형광 염색으로 평가한 AT II 세포의 순도는 90 % 이상이었다.

[0045] **실시예 3: 상피세포의 인큐베이션**

[0047] LA-4 및 HEK-293 세포는 6-웰 배양 접시에 접종 (2 x 10^5 개의 세포/웰)하고 10 % FBS를 함유하는 RPMI 1640 또는 DMEM 200 ㎕에서 밤새 배양하였다. 초대 AT II 세포는 제1형 콜라겐 코팅 배양 접시 (1 x 10^6 개의 세포/웰)에 접종하고 48 시간 동안 배양하였다. 10 ng/ml의 TGF-β(R&D Systems Inc)이 존재하거나 존재하지 않는 조건에서 400 ng/ml의 Gas6로 20 시간 동안 세포를 처리하였다. 일부 실험에서, COX-2 억제를 위해 10 μM NS-398, Rho 키나아제 억제를 위해 30 mM Y-27632를 사용하였다. 각 억제제는 Gas6를 처리하기 1 시간 전에 첨가되었다. 또한, EP2, EP4, DP1, DP2 또는 c-Met에 대한 길항제로 각각 AH-6809, AH-23848, BW-A868C, BAY-u3405 10 mM 또는 PHA-665752 250 nM을 사용하였다. 각 수용체 길항제는 TGF-β처리 1 시간 전에 첨가되었다.

[0049] **실시예 4: 일시적 형질주입 (transient transfection)**

[0051] 5 μl의 siRNA 형질주입 시약 (Genlantis 사)를 사용하여 COX-2 또는 RhoA 특이적 siRNA, 또는 대조군 siRNA 1 μg/ml를 LA-4 세포에 일시적으로 형질주입하였다. Axl 또는 Mer 특이적 siRNA는 75 nM을 사용하였다. 사용된 siRNA 서열을 표 1에 나타내었다.

표 1

[0053]

siRNA 표적	센스 서열	안티센스 서열
COX-2	5'-CUAUGAUAGGAGCAUGUAA-3' (서열번호 1)	5'-UUACAUGCUCCUAUCAUAG-3' (서열번호 2)
RhoA	5'-GAAGUCAAGCAUUUCUGUCUUA-3' (서열번호 3)	5'-GACAGAAAUGCUUGACUUCUU-3' (서열번호 4)

Axl	5′ -GAGAUGGACAGAUCCUAGA-3′ (서열번호 5)	5′ -UCUAGGAUCUGUCCAUCUC-3′ (서열번호 6)
Mer	5′ -CACAGUUUUAUCCUGAUGA-3' (서열번호 7)	5′ -UCAUCAGGAUAAAACUGUG-3′ (서열번호 8)
대조군	5'-CCUACGCCACCAAUUUCGU-3' (서열번호 9)	5'-ACGAAAUUGGUGGCGUAGG-3' (서열번호 10)

[0055] 실험 전에 세포를 COX-2 siRNA를 함유하는 무혈청 배지에서 6 시간, RhoA siRNA를 함유하는 무혈청 배지에서 24 시간, 또는 Axl 또는 Mer siRNA를 함유하는 무혈청 배지에서 48 시간 동안 배양하였다. 사용된 모든 siRNA에 대하여 세포 생존성에 유의적 효과는 관찰되지 않았다.

[0057] **실시예 5: 면역블랏 분석**

[0059] 상피성 마커 및 간엽성 마커 발현을 확인하기 위해, 0.5 % 트리톤 X-100을 함유하는 용해 완충액에서 세포를 용해시키고 10 % SDS-PAGE 젤에 로딩한 뒤 니트로셀룰로스 멤브레인으로 옮겼다. 상기 멤브레인을 상온에서 3 % BSA 또는 5 % 탈지유 함유 TBS (Tris-buffered saline)로 블록킹한 뒤, 각각의 항-마우스 일차 항체와 함께 상온에서 인큐베이션하고, 항-마우스 HRP-결합 이차 항체를 부착시켰다. 단백질 밴드는 향상된 화학발광법 (enhanced chemiluminescence)을 이용하여 확인하였다.

[0061] **실시예 6: ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) 측정**

[0063] 세포 배양 상층액을 회수하여 ELISA를 수행하였다. PGE_2 PGD_2, HGF 및 활성 형태의 TGF-β 농도 수준을 ELISA 키트 (R&D Systems, Minneapolis, MN)로 측정하였다.

[0065] **실시예 7: qPCR (Quantitative real-time PCR)**

[0067] StepOnePlus 시스템 (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)에서 리얼타임 qPCR로 유전자 발현을 분석하였다. 각각의 qPCR 분석에서, 총 50 ng의 cDNA를 사용하였다. Primer Express 소프트웨어를 사용하여 PCR-기반 증폭에 대한 프라이머 세트를 설계하였다. 본 발명에서 사용된 프라이머는 표 2에 나타내었다.

표 2

[0069]

프라이머	정방향 (Forward)	역방향 (Reverse)
E-cadherin	5'-GCACTCTTCTCCTGGTCCTG-3' (서열번호 11)	5'-TATGAGGCTGTGGGTTCCTC-3' (서열번호 12)
N-cadherin	5'-CCTCCAGAGTTTACTGCCATGAC-3' (서열번호 13)	5'-CCACCACTGATTCTGTATGCCG-3' (서열번호 14)
α-SMA	5'-CCACCGCAAATGCTTCTAAGT-3' (서열번호 15)	5'-GGCAGGAATGATTTGGAAAGG-3' (서열번호 16)
Snai1	5'-CCCAAGGCCGTAGAGCTGA-3' (서열번호 17)	5'-GCTTTTGCCACTGTCCTCATC-3' (서열번호 18)
Snai2	5'-ATCCTCACCTCGGGAGCATA-3' (서열번호 19)	5'-TGCCGACGATGTCCATACAG-3' (서열번호 20)
Zeb1	5'-ATTCAGCTACTGTGAGCCCTGC-3' (서열번호 21)	5'-CATTCTGGTCCTCCACAGTGGA-3' (서열번호 22)

Zeb2	5'-GCAGTGAGCATCGAAGAGTACC-3' (서열번호 23)	5'-GGCAAAAGCATCTGGAGTTCCAG-3' (서열번호 24)
Twist1	5'-TCGACTTCCTGTACCAGGTCCT-3' (서열번호 25)	5'-CCATCTTGGAGTCCAGCTCG-3' (서열번호 26)
COX-1	5'-CGATCTGGCTTCGTGAAC-3' (서열번호 27)	5'-GAGCTGCAGGAAATAGCC-3' (서열번호 28)
COX-2	5'-GGGAGTCTGGAACATTGTGA-3' (서열번호 29)	5'-GTGCACATTGTAAGTAGGTG-3' (서열번호 30)
HGF	5'-CACCCCTTGGGAGTATTGTG-3' (서열번호 31)	5'-GGGACATCAGTCTCATTCAC-3' (서열번호 32)
HPRT	5'-CCAGTGTCAATTATATCTTCAAC-3' (서열번호 33)	5'-CAGACTGAAGAGCTACTGTAATG-3' (서열번호 34)

[0071] cDNA는 HPRT (hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase)의 양으로 표준화하였고, 대조군에 대비 배수(fold-change)로 나타내었다.

[0073] **실시예 8: RhoA 활성 분석**

[0075] ELISA-based RhoA activation assay Biochem Kit (G-LISA; Cytoskeleton)를 사용하여 LA-4 세포 용해물에서 RhoA 활성을 측정하였다. RhoA의 Rhotekin 결합 도메인으로 30 분간 코팅한 RhoA-GTP 친화성 플레이트에 세포 용해물을 첨가하였다. RhoA의 활성 GTP-결합 형태는 간접 면역 검출법을 사용하여 측정하였고 마이크로플레이트 분광 광도계로 490 nm에서 색도 반응을 측정하였다.

[0077] **실시예 9: 히드록시프롤린 측정**

[0079] 히드록시프롤린 함량은 히드록시프롤린 분석 키트(중국 난징 Jiancheng Bioengineering 사)를 제조사의 지시에 따라 사용하여 측정하였다.

[0081] **실시예 10: 동물 실험**

[0083] 모든 실험에 20 - 25 g의 특정 병원체 부재 수컷 C57BL/6 마우스(Orient Bio, 성남, 한국)를 사용하였다. 마우스 인두 흡인으로 블레오마이신(5 U/kg 체중 30 μl)을 함유한 시험 용액을 투여하였다. 블레오마이신 투여 하루 전에 식염수 단독 또는 Gas6 (50 μg/kg, i.p.)를 투여하였다. 첫 블레오마이신 투약 후 억제제는 하루에 한 번 투여 되었으며, 블레오마이신 투여 14일 및 21일 째에 마우스를 안락사시켰다.

[0085] **실시예 11: 통계적 분석**

[0087] 평균 값은 ± SEM 으로 표시하였다. 다양한 분석을 위해 분산 분석(ANOVA)을 적용하고, Tukey's post hoc test를 적용하였다. 두 샘플의 표본 평균을 비교하기 위해 Student's t-tests을 사용하였다. 0.05 이하의 p 값을 통계적으로 유의하다고 간주하였다. 모든 데이터는 JMP 소프트웨어 (SAS Institute, Cary, NC)를 사용하여 분석하였다.

[0089] **실험예 1: 폐 및 신장 상피세포에서 TGF-β유도 EMT에 대한 Gas6의 억제 효과**

[0091] TGF-β신호는 EMT와 섬유증 발달에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007, 293: L525). 본 발명자들은 Gas6 처리가 마우스 폐포 제2형 유사 폐 상피세포 (LA-4)에서 TGF-β유도 EMT 과정을 조절하는지 확인하고자 하였다.

[0092] 먼저, 10 ng/ml의 TGF-β처리로 48 시간 또는 72 시간 자극을 준 경우 LA-4 세포가 방추-유사 형태 (spindle-like morphology)로 변환되는 것을 확인하였으나, TGF-β과 함께 400 ng/ml의 Gas6를 처리한 경우 LA-4 세포의 방추-유사 형태 변환을 막고 상피세포의 형태를 나타내는 것을 확인하였다 (도 1). 또한 10 ng/ml의 TGF-β으로 48 또는 72 시간 자극을 준 경우, 부착 접합점 (adherens junction) 단백질인 E-cadherin 발현이 감소되고, 근섬유아세포 분화 마커인 N-cadherin과 α-SMA (α-smooth muscle actin)의 발현이 증가되었으나, TGF-β과 함께 400 ng/ml의 Gas6를 처리한 경우 이러한 EMT 마커 발현 양상이 억제되는 것을 단백질 및 mRNA 수준에서 확인하였다 (도 2 및 도 3). 상기 데이터는 Gas6 처리 후 합성, 분비된 생활성 매개체들이 LA-4 세포에서 자가분비 (autocrine) 방식으로 TGF-β신호를 막을 수 있다는 가능성을 시사한다. 또한 본 HEK-293 인간 신장 상피세포 (도 4)에서도 Gas6 처리를 통해 TGF-β유도 EMT 마커 변화가 억제되는 것을 단백질 수준에서 확인하였다.

[0094] **실험예 2: LA-4 세포에서 TGF-β에 의해 유도되는 Smad-독립적 신호 및 EMT 조절 전사인자 발현에 대한 Gas6 처리의 효과**

[0096] EMT 유도에서, 활성화된 Smad 또는 비-Smad 신호는 Snai, Zeb 및 Basic helix-loop-helix 전사인자 패밀리의 전사 조절을 매개하여, 상피성 마커 유전자 (epithelial marker gene) 발현을 억제하고, 간엽성 유전자 (mesenchymal gene) 발현을 활성화시킨다 (Sci Signal, 2014, 7: re8). 이에, 본 발명자들은 Gas6가 TGF-β으로 자극된 LA-4 세포에서 상기 전사인자 발현을 억제하는지 확인하고자 하였다.

[0097] LA-4 세포 또는 HEK 293 세포에 Gas6를 처리하고 20 시간 후 TGF-β을 처리한 결과, TGF-β에 의해 유도되는 Snai1/2, Zeb1/2 및 Twist1의 mRNA 발현이 모두 억제되는 것을 확인하였다 (각각 도 5 및 도 6). LA-4 세포에서 Gas6의 처리는 TGF-β에 의해 매개되는 Smad2 및 Smad3의 인산화에 영향을 미치지 않았으나 (도 7), TGF-β에 의해 유도되는 ERK (extracellular signal-regulated kinase) 및 Akt의 인산화를 부분적으로 억제하였다 (도 8 및 도 9). p38 MAP (mitogen-activated protein) 키나아제의 인산화에는 영향이 없었다 (도 10). 상기 데이터들은 Gas6 처리 후 합성되거나 분비되는 생활성 매개체들이 ERK 및 Akt 경로를 포함하는 Smad-독립적인 TGF-β신호를 실질적으로 차단함으로써, LA-4 세포에서 EMT 과정을 막기 위해 상기 전사 조절자들을 감소시킨다는 것을 시사한다.

[0099] **실험예 3: LA-4 세포에서 Gas6 처리에 의한 COX-2 유래 PGE_2 및 PGD_2 분비, 및 이의 EMT 억제 효과 확인**

[0101] COX-2/PGE_2 및 PGD_2 경로는 폐와 신장 상피세포에서 EMT를 억제하는 것으로 알려져 있다 (Sci Rep, 2016, 6: 20992). 따라서, 본 발명자들은 Gas6에 반응하여 LA-4에서 분비되는 COX-2 유래 PGE_2 및 PGD_2가 자가분비로 LA-4 세포에서 항-EMT 효과를 매개하는 것인지 확인하고자 하였다.

[0102] 먼저, 본 발명자들은 LA-4 세포에서 Gas6에 의한 COX-1 및 COX-2의 mRNA 및 단백질 발현, 그리고 PGE_2 및 PGD_2의 생산 변화를 확인하였다. 그 결과, COX-2 mRNA 수준은 Gas6 처리 1 시간 후 최대치를 보이고, 20 시간째에 원래 수준으로 회복되었으며, COX-1 mRNA 발현은 Gas6 처리 후 24 시간 이내에 변화가 없었다 (도 11). COX-2 단백질 발현은 Gas6 처리 후 24 시간 까지 점진적으로 증가하였으나, COX-1 발현은 상기 기간 동안 변화가 없었다 (도 12). 또한 Gas6 처리 후 20 시간째에 LA-4 세포에서 EIA로 측정된 PGE_2 및 PGD_2 분비는 각각 3.3 및 2.5 배로 증가하였다 (도 13).

[0103] 다음으로, LA-4 세포에서 Gas6 자극에 의한 COX-2 유도가 PGE_2 및 PGD_2 생산을 향상시키는지 확인하기 위해,

LA-4 세포를 COX-2 특이적 siRNA 또는 음성-대조군 siRNA로 형질주입하고, 6 시간 동안 배양하였다. 그 결과, 음성-대조군 siRNA는 세포 내 COX-2 단백질 양에 영향을 미치지 않았으나, COX-2 특이적 siRNA로 형질주입시킨 세포에서는 야생형 LA-4 세포에 비해 COX-2 단백질 양이 ~60 % 이상 감소되었다 (도 14). COX-2 siRNA를 형질주입한 경우 Gas6에 의해 유도되는 PGE_2 및 PGD_2 분비를 막았는데 (도 15), 이는 LA-4 세포에서 Gas6로 유도된 PGE_2 및 PGD_2 생산 증가가 COX-2 발현 유도로부터 유래된다는 것을 시사한다.

[0104] Gas6의 항-EMT 효과에서 COX-2 신호의 기능적 연관성을 추가적으로 확인하기 위해, Gas6를 처리하기 전 1 시간 동안 고선택성 COX-2 억제제인 NS-398을 LA-4 세포에 처리하였다. 그 결과, NS-398은 TGF-β으로 유도되는 세포 형태 변화, 그리고 유전자 및 단백질 수준에서 E-cadherin 손실 및 α-SMA와 N-cadherin의 합성에 대한 Gas6의 효과를 모두 반전시켰다 (도 16 내지 도 18). 또한 LA-4 세포에서 COX-2 유전자를 넉다운 (knockdown)시킨 경우에도 마찬가지로 Gas6의 효과를 반전시켰다 (도 19 및 도 20). 나아가, NS-398과 COX-2 siRNA는 모두 TGF-β으로 유도되는 Snai1, Zeb1 및 Twist1 mRNA 발현을 감소시키는 Gas6의 효과를 반전시켰다 (도 21 및 도 22). 또한, COX-2 siRNA는 LA-4 세포에서 TGF-β으로 유도되는 ERK1/2 및 AKT의 인산화를 감소시키는 Gas6의 효과를 반전시켰으나, 음성 대조군 siRNA에서는 이러한 결과가 나타나지 않았다 (도 23 및 도 24).

[0105] 다음으로, LA-4 세포에서 COX-2로부터 유래된 PGE_2 및 PGD_2 분비가 항-EMT 효과를 매개하는지 확인하기 위해, Gas6가 있거나 없는 조건에서 TGF-β처리 한 시간 전 LA-4 세포에 EP2 (E-prostanoid-2 receptor) 길항제 (AH-6809), EP4 길항제 (AH-23848), DP1 길항제 (BW-A868C) 또는 DP2 길항제 (BAY-u3405)와 같은 PGE_2- 또는 PGD_2-특이적 수용체의 길항제를 처리하였다. 그 결과, Gas6의 항-EMT 효과는 EP2와 DP2의 길항제에 의해 현저하게 반전되었다 (도 25 내지 도 27, 도 29, 도 30 및 도 32). 그러나 EP4 길항제 및 DP1 길항제는 Gas6의 항-EMT 효과에 약하게 영향을 미치거나 거의 영향을 미치지 않았다 (도 25, 도 26, 도 28, 도 29, 도 31 및 도 33). 상기 결과들은 LA-4 세포에서 항-EMT 효과는 주로 EP2 및 DP2 수용체를 통한 COX-2 유래 PGE_2 및 PGD_2 신호 각각에 의해 매개된다는 것을 시사한다.

[0107] **실험예 4: LA-4 세포에서 Gas6 처리에 의한 RhoA 경로-의존적 HGF 분비 및 이의 EMT 억제 효과 확인**

[0109] 본 발명자들은 종래 Gas6가 RhoA-의존적 경로를 통해 대식세포에서 HGF의 mRNA 및 단백질 생산을 유도한다고 보고한바 있다 (J Pharmacol Exp Ther, 2014, 350: 563). HGF는 LA-4 세포에서 TGF-β으로 유도되는 EMT를 매개한다 (Sci Rep, 2016, 6: 20992). 따라서 본 발명자들은 Gas6로 유도되는 항-EMT 효과에 있어서 LA-4 세포에서의 RhoA-의존적 HGF 분비가 가지는 역할을 확인하고자 하였다.

[0110] LA-4 세포에 Gas6를 처리한 결과, Gas6로 유도되는 HGF mRNA 발현은 3 시간째에 가장 높은 수준을 나타낸 뒤, 6 시간째까지 절반 수준으로 감소되었다 (도 34). ELISA로 측정된 LA-4 세포의 HGF 분비는 기본 분비 수준과 비교하였을 때 Gas6 처리로 인해 다소 증가하였다 (도 35). 항-HGF α쇄 항체를 이용한 LA-4 세포 용해물에 대한 면역블랏 분석 결과를 통해 세포 내 HGF 단백질 수준 역시 Gas6 처리에 의해 증가된다는 것을 알 수 있었다 (도 36).

[0111] 다음으로, RhoA/Rho 키나아제 신호를 억제하기 위해, Gas6 자극 전 LA-4 세포에 RhoA-특이적 siRNA를 24 시간 동안 형질주입하거나 Rho 키나아제 억제제인 Y-27632를 1 시간 동안 처리하였다. 그 결과 RhoA 넉다운 및 Rho 키나아제 억제는 모두 TGF-β유도 EMT에 대한 Gas6의 효과를 반전시켰다 (도 37 내지 도 44). 또한 RhoA siRNA는 LA-4 세포에서 TGF-β유도 ERK1/2 및 AKT의 인산화 감소에 대한 Gas6의 효과를 완전히 반전시켰으나, 음성 대조군은 이러한 효과를 나타내지 않았다 (도 45 및 도 46). 또한 TGF-β처리 1 시간 전 LA-4 세포에 c-Met 길항제인 PHA-665752를 처리함으로써 c-Met 신호를 억제한 경우에도, Gas6의 항-EMT 효과를 반전시켰다 (도 47 내지 도 50). 상기 데이터들은 LA-4 세포에서 RhoA/Rho 키나아제-의존적 HGF 생산 역시 자가분비로 c-Met 신호를 통해 Gas6의 항-EMT 효과를 매개한다는 것을 강력하게 시사한다.

[0113] **실험예 5: Gas6의 EP2, DP2 및 c-Met 발현 향상 효과**

[0115] 앞선 실시예에서 확인한 바와 같이, Gas6 처리에 의해 생산된 PGE_2, PGD_2 및 HGF는 주로 각각 EP2, DP2 및 c-MET을 통해 항-EMT 신호를 야기한다. PGE_2, PGD_2 및 HGF가 EMT 억제제로서 자가분비 방식으로 작용하는지 평가하기 위해, LA-4 세포에서 상기 가용성 중재자 (soluble mediator)의 효과를 기저 농도 (각각 35, 6 및 169 pg/ml) 및 자극 농도 (각각 118, 28 및 194 pg/ml)에서 확인하였다.

[0116] 그 결과, 자극 농도의 PGE_2 및 PGD_2는 기저 농도와 비교하여 단백질 수준에서 TGF-β으로 유도되는 EMT 마커 변화를 억제하였다 (도 51). 상기 데이터는 LA-4 세포에서 Gas6로 유도되는 PGE_2 및 PGD_2 방출에 의해 EMT 억제가 현저히 유발된다는 것을 뒷받침하는 것이다.

[0117] 이와 달리, HGF는 자극 농도 (194 pg/ml) 및 기저 농도 (169 pg/ml) 모두에서 항-EMT 효과를 보이지 않았지만 (도 51), Gas6로 전처리하고 20 시간 후 새로운 배지로 교체한 뒤 HGF 194 pg/ml을 첨가한 경우, TGF-β으로 유도된 EMT 마커 변화가 억제되었다 (도 52). 그러나 기저 농도의 HGF는 상기 실험 조건에서 항-EMT 효과를 보이지 않았다. 나아가 c-MET 단백질 양은 Gas6 처리 20 시간 후 증가되었다 (도 53). 상기 데이터는 상대적으로 낮은 HGF 생산에도 불구하고, 상기 실험 조건에서 HGF가 c-MET 발현을 증가시키기 때문에 항-EMT 활성을 가지게 할 수 있다는 가능성을 시사한다. LA-4 세포에서 Gas6 처리는 EP2 및 DP2 단백질 양 역시 증가시켰으나, EP4 및 DP1 단백질 양을 증가시키지는 않았다 (도 53). 한편, LA-4 세포에서 상기 중재자들을 모두 자극 농도로 첨가한 경우 시너지 효과를 보이지 않았는데 (도 51), 이는 이들이 동일 표적 분자를 통해 TGF-β으로 유도되는 신호경로를 억제한다는 것을 시사한다.

[0119] **실험예 6: LA-4 세포에서 Gas6-유도 EMT 억제에 대한 Axl 또는 Mer 영향**

[0121] 다음으로, 본 발명자들은 LA-4 세포에서 Gas6에 의해 Gas6/Axl 또는 Mer 신호가 조절되는지 확인하고자 하였다.

[0122] LA-4 세포에서 400 ng/ml의 Gas6를 시간 별로(0, 5, 15, 30, 60 및 120 분) 처리 하고, Axl 또는 Mer의 인산화 수준을 측정하였다(도 54). 그 결과, Axl 또는 Mer 인산화 수준은 모두 Gas6 처리 30분 후 최대치를 보이고, 점진적으로 감소하였다.

[0123] 다음으로, LA-4 세포를 Axl 또는 Mer 특이적 siRNA 또는 음성-대조군 siRNA로 형질주입하고, 48 시간 동안 배양하고, Axl 또는 Mer 발현 수준을 측정하였다(도 55). 그 결과, 음성-대조군 siRNA는 세포 내 Axl 또는 Mer 단백질 양에 영향을 미치지 않았으나, Axl 또는 Mer 특이적 siRNA로 형질주입시킨 세포에서는 야생형 LA-4 세포에 비해 Axl 또는 Mer 단백질 양이 70% 이상 감소되었다.

[0124] 또한, Axl 또는 Mer siRNA를 형질주입한 경우 Gas6에 의해 유도되는 COX-2 mRNA 상승, PGE_2 및 PGD_2 분비를 막았는데(도 56), 이는 LA-4 세포에서 Gas6로 유도된 PGE_2 및 PGD_2 생산 증가가 Axl 또는 Mer 발현 유도로부터 유래된다는 것을 시사한다.

[0125] 또한, Axl 또는 Mer siRNA를 형질주입한 경우 Gas6에 의해 유도되는 RhoA 활성 증가, HGF mRNA 및 단백질 수준 증가를 막았는데(도 57), 이는 LA-4 세포에서 Gas6로 유도된 RhoA활성 증가, HGF mRNA 및 단백질 수준 증가가 Axl 또는 Mer 발현 유도로부터 유래된다는 것을 시사한다.

[0127] 또한, 본 발명자들은 LA-4 세포에서 Gas6에 의해 EMT 억제에 대한 Axl 또는 Mer의 영향을 확인하고자 하였다.

[0128] LA-4 세포를 Axl 또는 Mer 특이적 siRNA 또는 음성-대조군 siRNA로 형질주입하고, 48 시간 동안 배양하고, EMT 마커의 mRNA 및 단백질 발현 수준을 측정하였다(도 58 및 도 59). 그 결과, Axl 또는 Mer siRNA를 형질주입한 경우 Gas6에 의해 유도되는 E-cadherin 증가 및 α-SMA와 N-cadherin 감소를 모두 반전시켰다. 이는 LA-4 세포에서 Gas6로 유도된 E-cadherin 증가 및 α-SMA와 N-cadherin 감소가 Axl 또는 Mer 발현 유도로부터 유래된다는 것을 시사한다.

[0130] 또한, 본 발명자들은 LA-4 세포에서 Gas6에 의해 EMT 조절 전사 인자 발현 및 비 Smad TGF-β1 신호에 대한 Axl

또는 Mer의 영향을 확인하고자 하였다.

[0131] LA-4 세포를 Axl 또는 Mer 특이적 siRNA 또는 음성-대조군 siRNA로 형질주입하고, 48 시간 동안 배양하고, EMT 조절 전사 인자의 mRNA 및 단백질 발현 수준을 측정하였다(도 60). 그 결과, Gas6에 의해 억제된 Snai1, Zeb1 및 Twist1의 mRNA 발현이 모두 증가하였다. 또한, Gas6에 의해 억제된 ERK (extracellular signal-regulated kinase) 및 Akt의 인산화를 모두 증가하였다(도 61 및 도 62). 이는 LA-4 세포에서 Gas6로 유도된 EMT 전사 인자 및 ERK 및 Akt 인산화 억제가 Axl 또는 Mer 발현 유도로부터 유래된다는 것을 시사한다.

[0133] **실험예 7: 초대 마우스 AT II 세포에서 EMT에 대한 Gas6 영향**

[0135] **7-1. 초대 마우스 AT II 세포에서 TGF-β1-유도 EMT에 대한 Gas6 전처리의 효과**

[0136] 본 발명자들은 Gas6 처리가 초대 마우스 AT II 세포에서 TGF-β유도 EMT 과정을 조절하는지 확인하고자 하였다. AT II 세포에 400 ng/ml의 Gas6를 처리하고 20 시간 후, 10 ng/ml의 TGF-β처리로 48 시간 또는 72 시간 처리하고, EMT 마커 mRNA 및 단백질 발현 수준을 확인하였다. mRNA 발현 수준은 Hprt mRNA을 기준으로 측정하였다(도 63 및 도 64). 상기 데이터는 Gas6 처리 후 합성, 분비된 생활성 매개체들이 AT II 세포에서 자가분비(autocrine) 방식으로 TGF-β신호를 막을 수 있다는 가능성을 시사한다. 또한 본 발명자들은 AT II 세포에 Gas6를 처리하고 20 시간 후 TGF-β을 처리한 결과, TGF-β에 의해 유도되는 Snai1/2, Zeb1/2 및 Twist1의 mRNA 발현이 모두 억제되는 것을 확인하였다(도 65). 상기 데이터들은 Gas6 처리 후 AT II 세포에서 EMT 과정을 막기 위해 상기 전사 조절자들을 감소시킨다는 것을 시사한다.

[0138] **7-2. 초대 마우스 AT II 세포에서 Gas6-유도 EMT 억제에 대한 COX-2-신호 확인**

[0139] 본 발명자들은 초대 마우스 AT II 세포에서 Gas6에 의한 COX-2 신호를 조절하는 확인하고자 하였다.

[0140] 본 발명자들은 초대 마우스 AT II 세포에 400 ng/ml의 Gas6를 시간 별로(0, 1, 2, 3, 및 6 시간) 처리 하고, COX-2 mRNA 발현 수준을 측정하였다(도 66). COX-2 mRNA 발현 수준은 Gas6 처리 1시간 후 최대치를 보이고, 점진적으로 감소하였다.

[0141] 다음으로, 본 발명자들은 Gas6의 항-EMT 효과에서 COX-2 신호의 기능적 연관성을 추가적으로 확인하기 위해, Gas6를 처리하기 전 1 시간 동안 고선택성 COX-2 억제제인 NS-398을 초대 마우스 AT II 세포에 처리하였다. 그 결과, NS-398은 TGF-β으로 유도되는 유전자 수준에서 E-cadherin 손실 및 α-SMA와 N-cadherin의 합성, Snai1, Zeb1 및 Twist1 mRNA 발현 감소에 대한 Gas6의 효과를 모두 반전시켰다(도 67 및 도 68).

[0142] 다음으로, 본 발명자들은 Gas6가 있거나 없는 조건에서 TGF-β처리 한 시간 전 초대 마우스 AT II 세포에 EP2 (E-prostanoid-2 receptor) 길항제 (AH-6809) 또는 DP2 길항제 (BAY-u3405)와 같은 PGE_2- 또는 PGD_2- 특이적 수용체의 길항제를 처리하였다. 그 결과, Gas6의 항-EMT 효과는 EP2와 DP2의 길항제에 의해 현저하게 반전되었다(도 69 및 도 70).

[0143] 상기 결과들은 AT II 세포에서 항-EMT 효과는 주로 EP2 및 DP2 수용체를 통한 COX-2 유래 PGE_2 및 PGD_2 신호 각각에 의해 매개된다는 것을 시사한다.

[0145] **7-3. 초대 마우스 AT II 세포에서 Gas6-유도 EMT 억제에 대한 RhoA 경로-의존적 HGF-신호 확인**

[0146] 본 발명자들은 초대 마우스 AT II 세포에서 Gas6에 의한 RhoA 경로-의존적 HGF-신호를 조절하는 확인하고자 하였다.

[0147] 초대 마우스 AT II 세포에 Gas6를 처리한 결과, Gas6로 유도되는 HGF mRNA 발현은 점진적으로 증가하였다(도 71).

[0148] 다음으로, RhoA/Rho 키나아제 신호를 억제하기 위해, Gas6 자극 전 초대 마우스 AT II 세포에 RhoA-특이적 siRNA를 24 시간 동안 형질주입하거나 Rho 키나아제 억제제인 Y-27632를 1 시간 동안 처리하였다. 그 결과 RhoA 넉다운 및 Rho 키나아제 억제는 모두 TGF-β유도 EMT에 대한 Gas6의 효과를 반전시켰다(도 72 및 도 73). 또한

TGF-β처리 1 시간 전 AT II 세포에 c-Met 길항제인 PHA-665752를 처리함으로써 c-Met 신호를 억제한 경우에도, Gas6의 항-EMT 효과를 반전시켰다(도 74 및 도 75).

[0149] 상기 데이터들은 AT II 세포에서 RhoA/Rho 키나아제-의존적 HGF 생산 역시 자가분비로 c-Met 신호를 통해 Gas6의 항-EMT 효과를 매개한다는 것을 강력하게 시사한다.

[0151] **실험예 8: 사람 폐 선암종 세포(A549 세포)에서 TGF-β1-유도 EMT에 대한 Gas6 전처리의 효과**

[0153] 본 발명자들은 A549 세포에서 Gas6 투여가 TGF-β유도 EMT 과정을 조절하는지 확인하고자 하였다.

[0154] A549 세포에 400 ng/ml의 Gas6를 처리하고 20 시간 후, 10 ng/ml의 TGF-β를 72 시간 처리하고, EMT 마커 mRNA 및 단백질 발현 수준을 확인하였다. mRNA 발현 수준은 Hprt mRNA을 기준으로 측정하였다(도 76 및 도 77). 상기 데이터는 Gas6 처리 후 합성, 분비된 생활성 매개체들이 A549 세포에서 자가분비 방식으로 TGF-β신호를 막을 수 있다는 가능성을 시사한다.

[0155] 또한 본 발명자들은 A549 세포에 Gas6를 처리하고 20 시간 후 TGF-β을 처리한 결과, TGF-β에 의해 유도되는 Snail1/2, Zeb1/2 및 Twist1의 mRNA 발현이 모두 억제되는 것을 확인하였다(도 78). 상기 데이터들은 Gas6 처리 후 A549 세포에서 EMT 과정을 막기 위해 상기 전사 조절자들을 감소시킨다는 것을 시사한다.

[0157] **실험예 9: 폐 섬유증 동물모델에서 Gas6의 EMT 억제 효과**

[0159] **9-1. 폐 섬유증 동물모델에서 블레오마이신-유도 EMT에 대한 Gas6의 억제 효과**

[0160] 본 발명자들은 Gas6 투여가 생체 내 폐 상피세포에서 EMT 과정을 조절하는지 확인하고자 하였다.

[0161] C57BL/6 마우스를 대조군(Control), Gas6 투여군(Gas6), 블레오마이신 투여군(BLM), Gas6+블레오마이신 투여군(Gas6+BLM)으로 각 5마리씩 분류하였다. 매일 블레오마이신 투여 전에 50 μg/ kg의 Gas6을 각 분류군 에 따라 투여하였다. 블레오마이신 투여 후 14일 째에 마우스의 폐에서 초대 마우스 AT II 세포를 분리하였다.

[0162] 분리된 마우스 세포의 형태를 확인하하였다. 그 결과, 블레오마이신이 투여된 마우스의 세포는 방추-유사 형태(spindle-like morphology)로 변환되는 것을 확인하였으나, 블레오마이신 투여 전에 Gas6이 투여된 마우스의 세포는 방추-유사 형태가 감소하였다(도 79).

[0163] 또한, EMT 마커(E-cadherin, N-cadherin 및 α-SMA)와 EMT-활성화 전사인자(Snai1, Zeb1 및 Twist1)의 발현 양상을 확인하기 위해 각 mRNA 수준을 측정하였다(도 80 및 도 81). 블레오마이신을 투여한 마우스는 E-cadherin 발현이 감소되고, N-cadherin과 α-SMA의 발현이 증가되었으나, Gas6를 처리한 경우 이러한 EMT 마커 발현 양상이 억제되는 것을 mRNA 수준에서 확인하였다. 또한, 블레오마이신에 의해 유도되는 Snai1, Zeb1 및 Twist1의 mRNA 발현이 Gas6를 처리한 경우 모두 억제되는 것을 확인하였다. 상기 결과는 Gas6 처리를 통해 폐 섬유증 마우스 모델에서 블레오마이신으로 유도된 EMT를 억제할 수 있다는 가능성을 시사한다.

[0165] **9-2. 폐 섬유증 동물모델에서 COX-2 유래 PGE_2, PGD_2 및 HGF 분비에 대한 Gas6 처리의 효과**

[0166] 본 발명자들은 생체 내에서 Gas6 투여가 PGE_2, PGD_2 및 HGF 경로를 조절하는지 확인하고자 하였다.

[0167] C57BL/6 마우스를 대조군(Control), Gas6 투여군(Gas6), 블레오마이신 투여군(BLM), Gas6+블레오마이신 투여군(Gas6+BLM)으로 각 5마리씩 분류하였다. 매일 블레오마이신 투여 전에 50 μg/ kg의 Gas6을 각 분류군 에 따라 투여하였다. 블레오마이신 투여 후 14일 째에 마우스의 폐에서 초대 마우스 AT II 세포를 분리하였다. 분리된 마우스 세포에서 COX-2 및 HGF의 mRNA, PGE_2, PGD_2, HGF 및 TGF-β 생산량을 확인하였다.

[0168] 그 결과, COX-2의 mRNA 수준은 Gas6 투여로 인해 대조군에 비해 2배 이상 상승하였고, 대조군에서 분비되지 않던 PGE_2는 4000 pg/ml 이상 분비되었고, PGD_2 단백질 수준은 대조군의 비해 약 4배 정도 증가하였다(도 82 및

도 83). 상기 결과는 폐 섬유증 마우스 모델에서 Gas6로 인한 EMT 억제가 COX-2 발현, PGE_2 및 PGD_2 생산 증가로부터 유래된다는 것을 시사한다.

[0169] 또한, HGF의 mRNA 수준은 Gas6 투여로 인해 대조군에 비해 3배 이상 상승하였고, HGF는 2500 pg/ml 이상 분비되었고, 블레오마이신에 의해 증가한 TGF-β 단백질 수준은 Gas6 투여로 인해 감소하였다(도 84 및 도 85). 상기 결과는 폐 섬유증 마우스 모델에서 Gas6로 인한 EM을 억제가 HGF 증가 및 TGF-β 억제로부터 유래된다는 것을 시사한다.

[0171] **9-3. 폐 섬유증 동물모델에서 블레오마이신에 의해 유도된 EMT 마커 및 콜라겐 침착 변화에 대한 Gas6 처리의 효과**

[0172] 본 발명자들은 생체 내에서 Gas6 투여가 EMT 마커 및 콜라겐 침착 변화를 조절하는지 확인하고자 하였다.

[0173] C57BL/6 마우스를 대조군(Control), Gas6 투여군(Gas6), 블레오마이신 투여군(BLM), Gas6+블레오마이신 투여군(Gas6+BLM)으로 각 5마리씩 분류하였다. 매일 블레오마이신 투여 전에 50 μg/ kg의 Gas6을 각 분류군 에 따라 투여하였다. 블레오마이신 투여 후 14일 및 21일 째에 마우스의 폐에서 초대 마우스 AT II 세포를 분리하였다. 각 분리된 마우스 세포에서 항-E-cadherin, 항-N-cadherin, 항-α-SMA, 항-제1형 콜라겐(collagen 1) 또는 항-피브로넥틴(Fibronectin) 항체를 이용하여 웨스턴블럿하였다. A-tubulin을 기준으로 각 밴드의 상대 밀도(Relative Density)를 결정하였다.

[0174] 그 결과, 14일째 및 21일째의 마우스 폐 조직에서 블레오마이신에 의해 감소한 E-cadherin 수준은 Gas6 투여로 인해 상승하였고, 블레오마이신에 의해 증가한 N-cadherin, α-SMA, 제1형 콜라겐 및 피브로넥틴 수준은 Gas6 투여로 인해 감소하였다(도 86 및 도 87).

[0175] 또한, 전체 폐의 콜라겐 축적은 21일 째에 하이드록시프롤린 수준을 측정하였다(도 88). 그 결과 블레오마이신에 의해 증가한 하이드록시프롤린 수준은 Gas6 투여로 인해 대조군과 비슷한 수준으로 감소하였다.

[0176] 상기 결과는 생체 내 블레오마이신에 의해 유발되는 섬유증이 Gas6 투여로 개선된다는 것을 시사한다.

[0178] 상기 결과를 모두 종합하면, Gas6는 상피세포에서 PGE_2, PGD_2 및 HGF의 분비 생산을 유도하고, 이들의 수용체를 통한 신호전달 경로를 거쳐 자가분비 방식으로 작용함으로써, TGF-β에 의해 유도되는 EMT를 억제하는 항-EMT 효과를 가짐을 알 수 있다.

[0179] 또한, LA-4 세포에서 Gas6는 Axl 또는 Mer 신호 경로를 기반으로 COX-2 신호 경로 및 RhoA 경로 의존적 HGF 분비하며, 초대 마우스 AT II 세포 및 사람 폐 선암종 세포에서도 LA-4 세포와 동일한 효과를 가짐을 알 수 있다.

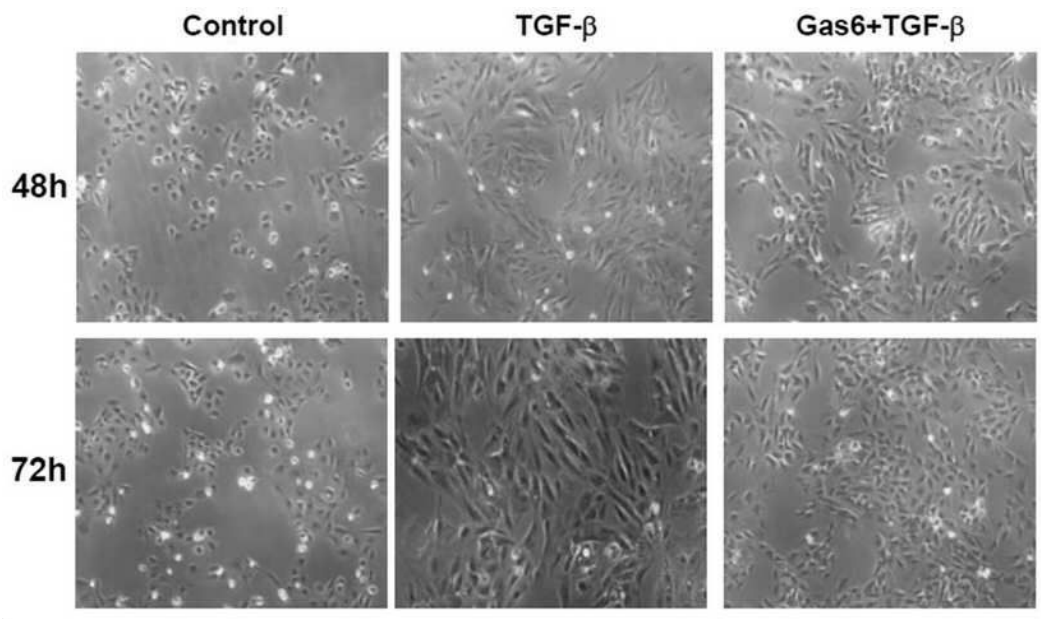
[0180] 또한, 동물실험을 통해 Gas6 투여가 생체 내에서 블레오마이신에 의해 유도되는 EMT를 억제하여 섬유증에 대한 우수한 예방 및 치료 효과를 가짐을 확인하였다.

[0181] 따라서 Gas6는 섬유증의 예방 또는 치료 용도로 매우 유용하게 이용될 수 있다.

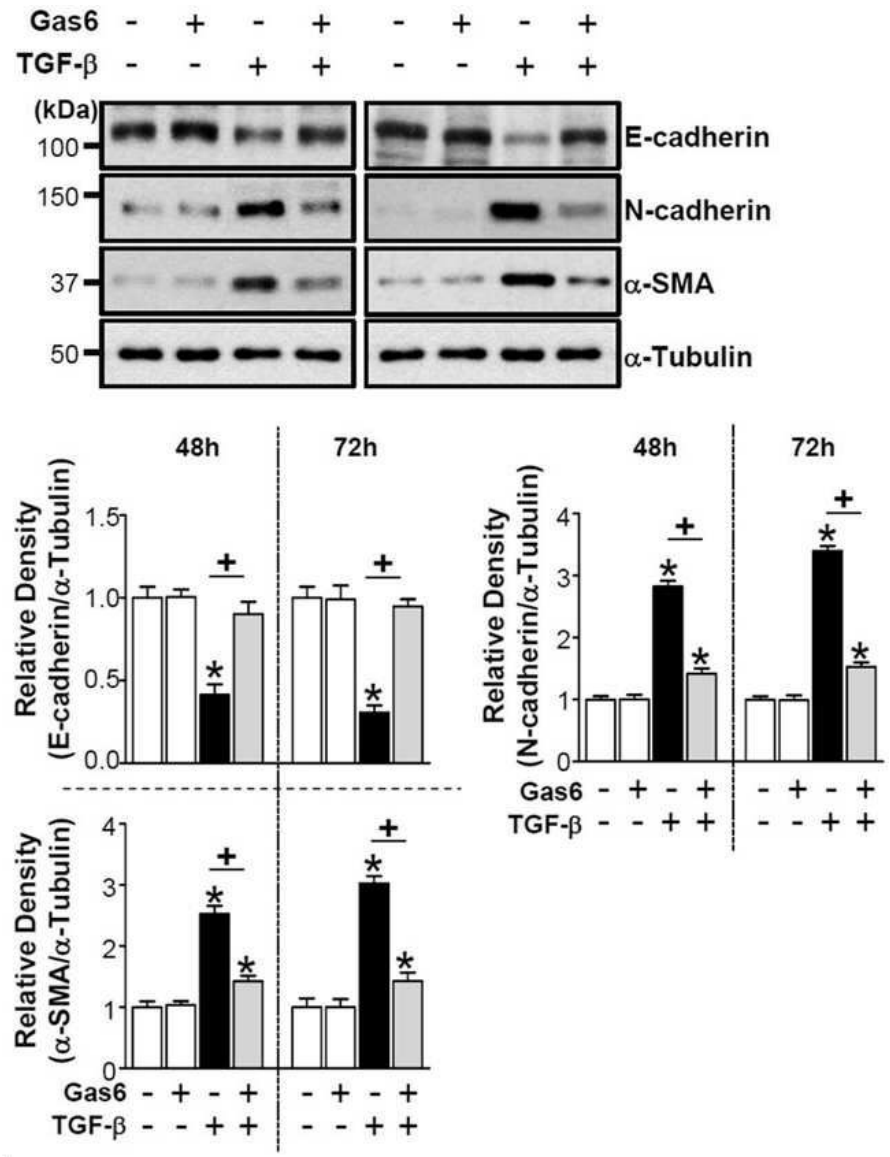
[0183] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

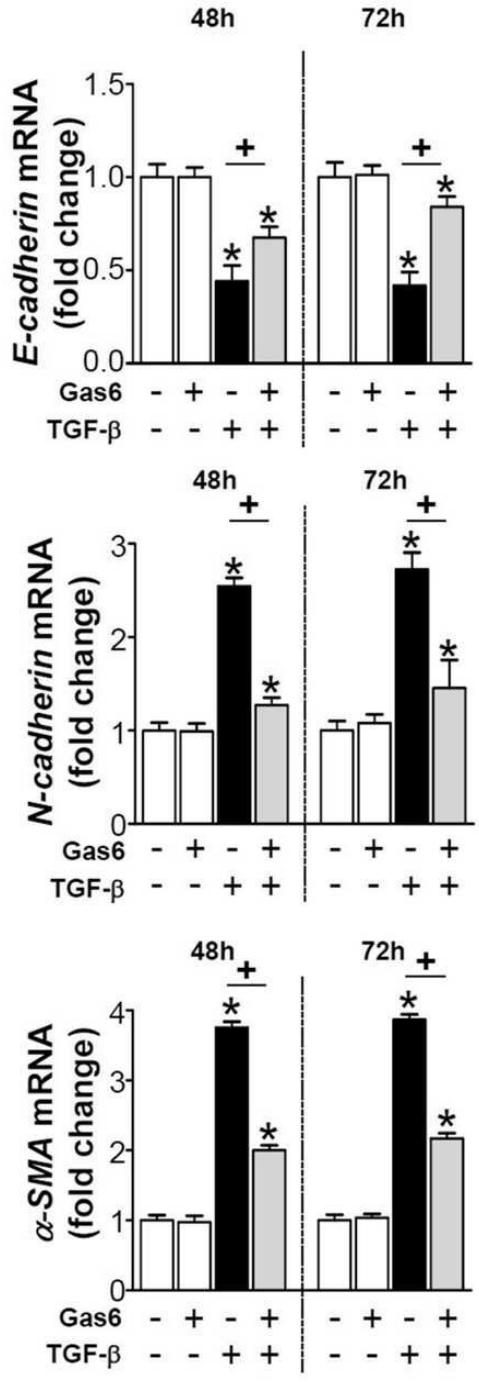
도면1



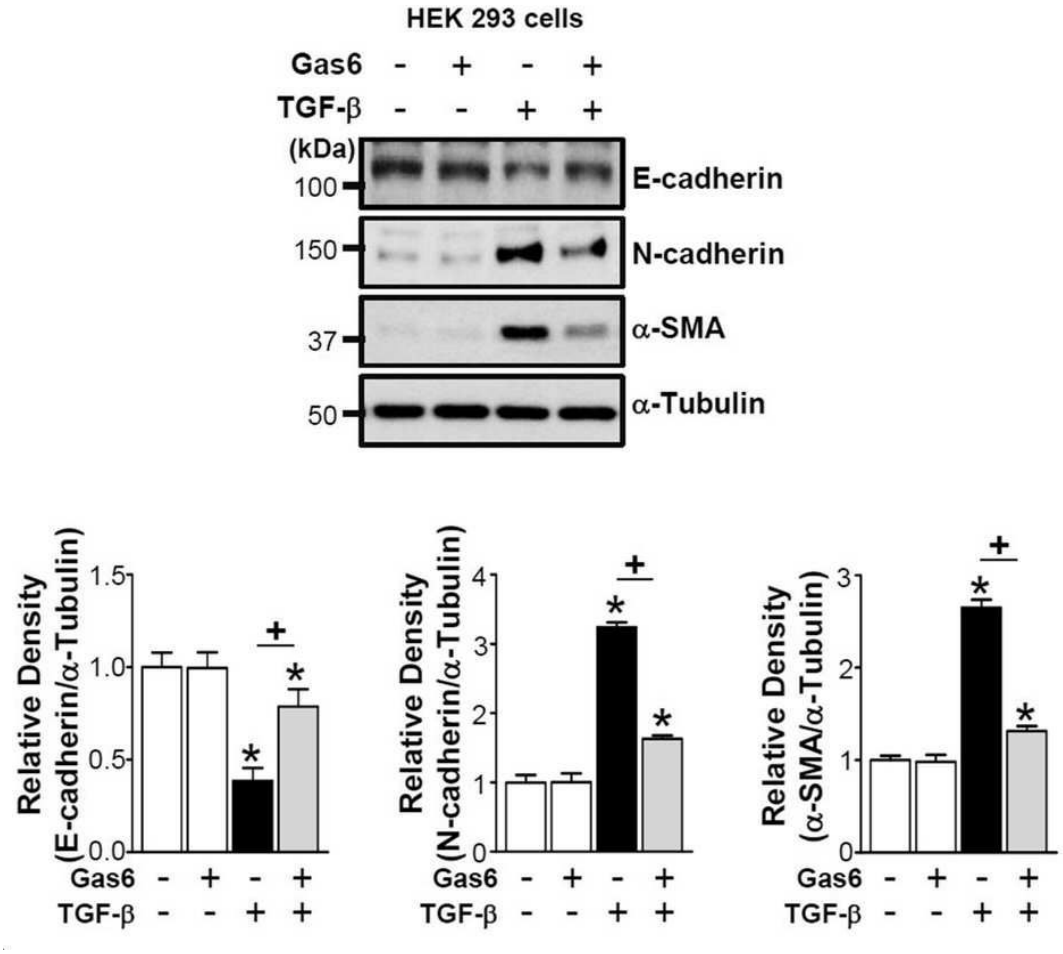
도면2


Gas6 - + - + - + - +
TGF-β - - + + - - + +
(kDa)
100
150
37
50
E-cadherin
N-cadherin
α-SMA
α-Tubulin
48h
72h
Relative Density (E-cadherin/α-Tubulin)
Relative Density (N-cadherin/α-Tubulin)
Relative Density (α-SMA/α-Tubulin)
Gas6 - + - + - + - +
TGF-β - - + + - - + +

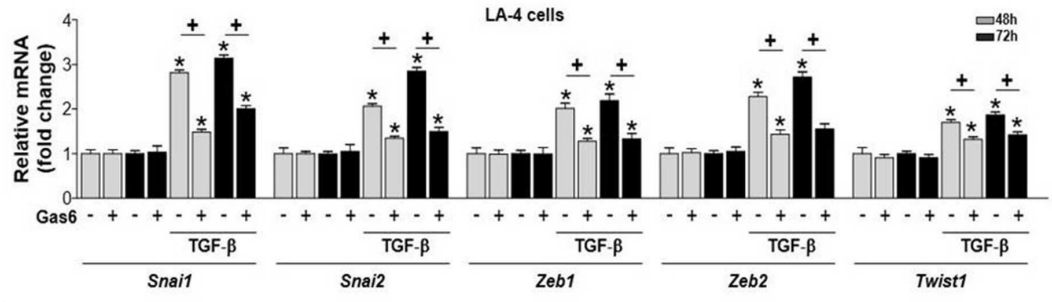
도면3


48h
72h
E-cadherin mRNA (fold change)
1.5
1.0
0.5
0.0
Gas6 - + - + - + - +
TGF-β - - + + - - + +
48h
72h
N-cadherin mRNA (fold change)
3
2
1
0
Gas6 - + - + - + - +
TGF-β - - + + - - + +
48h
72h
α-SMA mRNA (fold change)
4
3
2
1
0
Gas6 - + - + - + - +
TGF-β - - + + - - + +

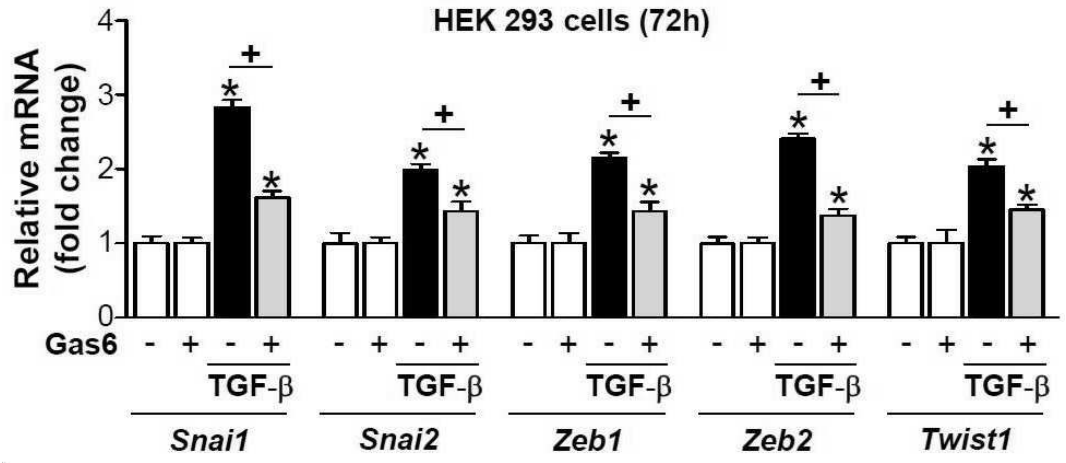
도면4


HEK 293 cells
Gas6 - + - +
TGF-β - - + +
(kDa)
100
E-cadherin
150
N-cadherin
37
α-SMA
50
α-Tubulin
Relative Density (E-cadherin/α-Tubulin)
Relative Density (N-cadherin/α-Tubulin)
Relative Density (α-SMA/α-Tubulin)

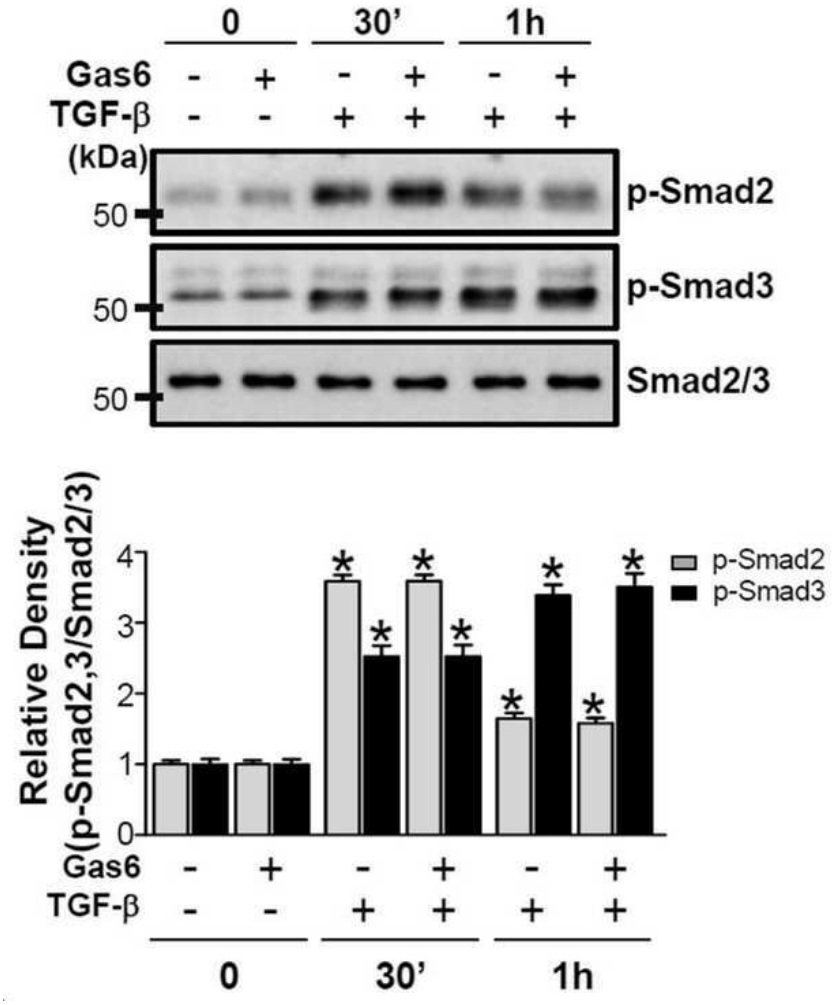
도면5


LA-4 cells
48h
72h
Relative mRNA (fold change)
Gas6
TGF-β
Snai1
Snai2
Zeb1
Zeb2
Twist1

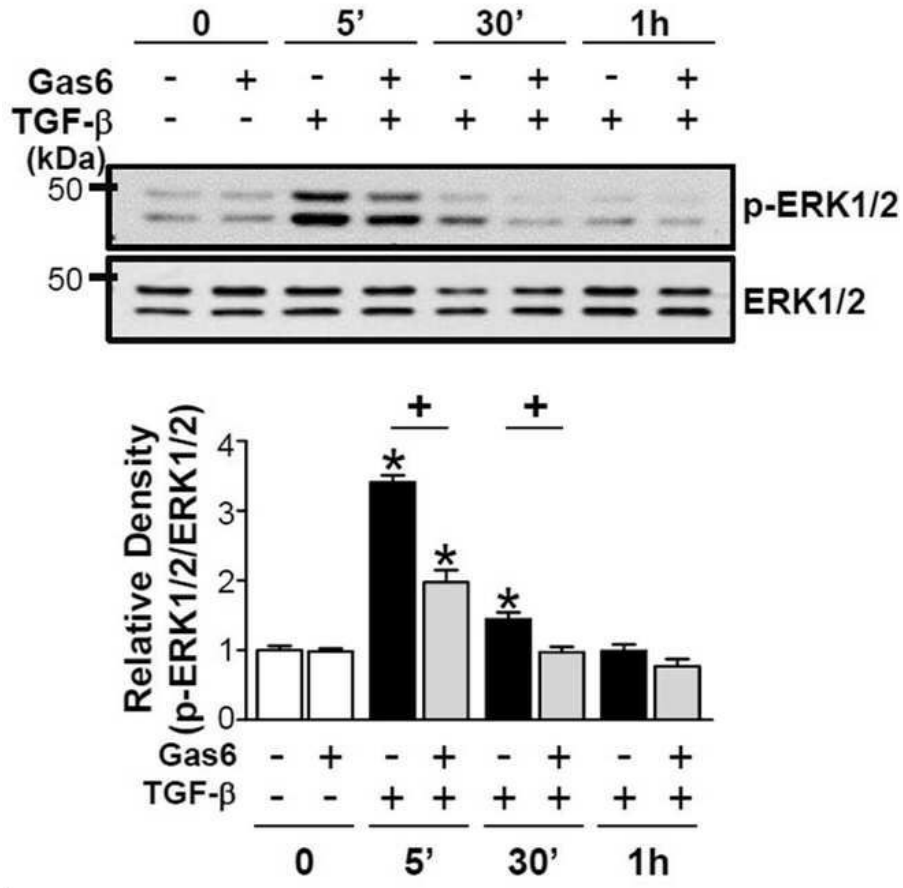
도면6


HEK 293 cells (72h)
Relative mRNA (fold change)
Gas6
TGF-β
Snai1
Snai2
Zeb1
Zeb2
Twist1

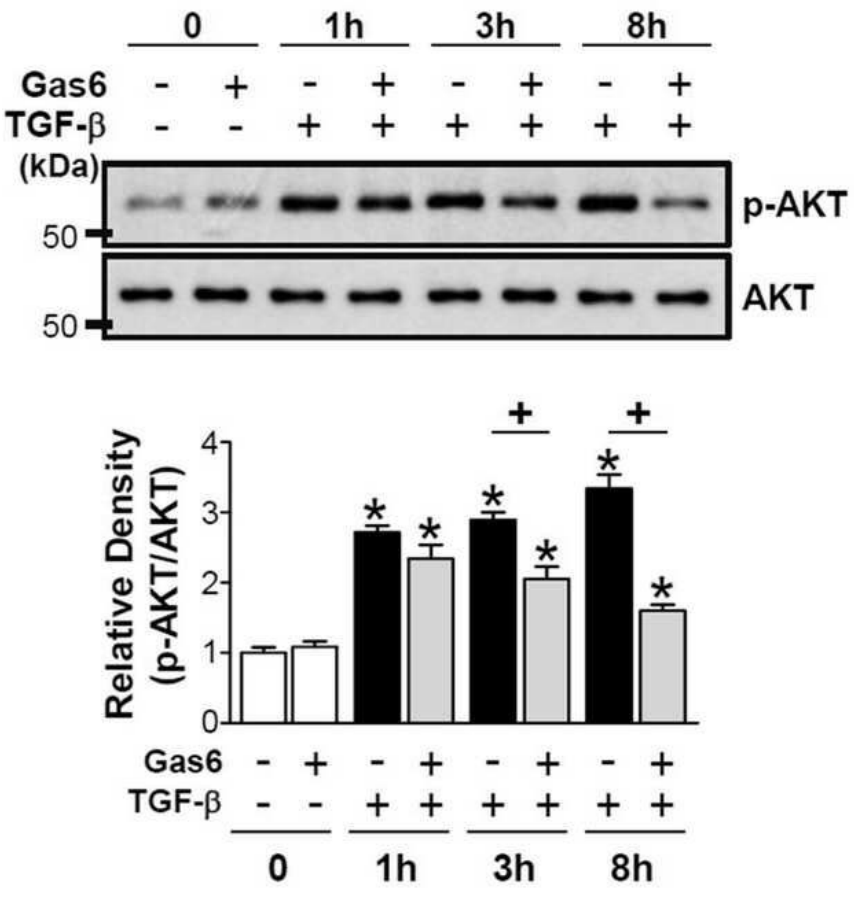
도면7


0
30'
1h
Gas6
TGF-β
(kDa)
p-Smad2
p-Smad3
Smad2/3
Relative Density (p-Smad2,3/Smad2/3)

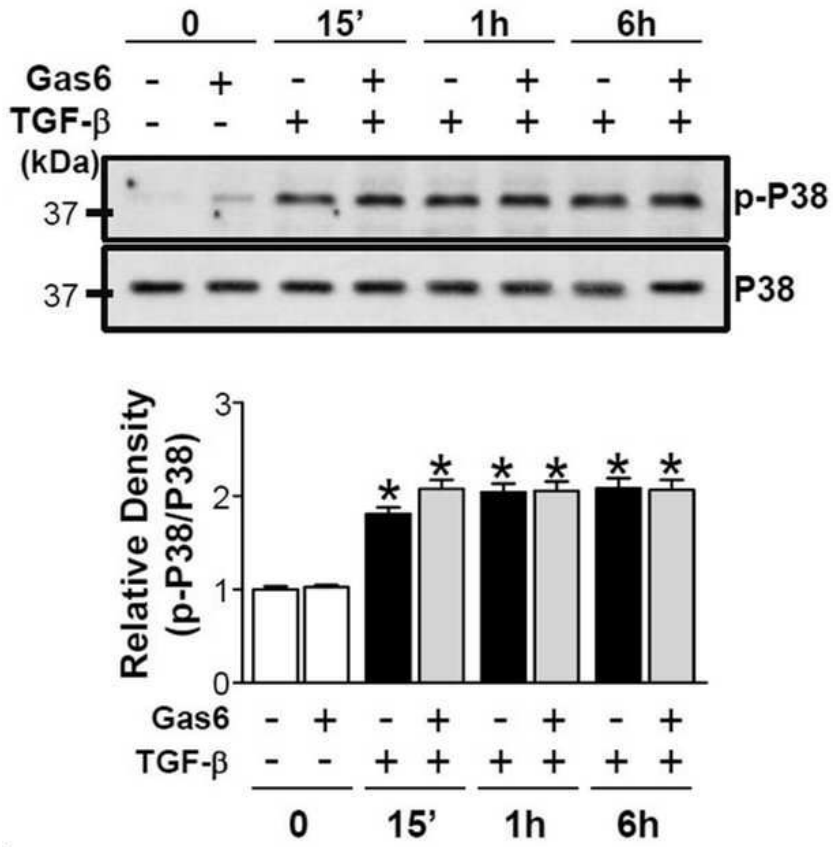
도면8


0
5'
30'
1h
Gas6
TGF-β
(kDa)
50
50
p-ERK1/2
ERK1/2
Relative Density
(p-ERK1/2/ERK1/2)
4
3
2
1
0
*
*
*
+
+
Gas6
TGF-β
0
5'
30'
1h

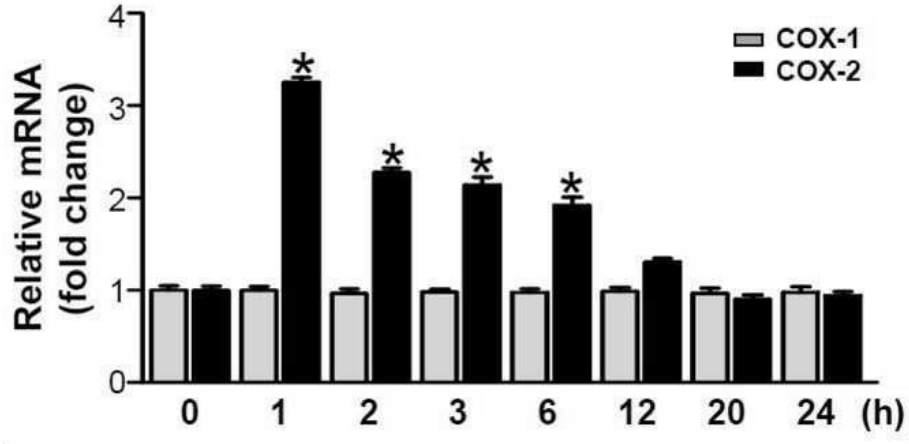
도면9


0
1h
3h
8h
Gas6 - + - + - + - +
TGF-β - - + + + + + +
(kDa)
50
p-AKT
50
AKT
Relative Density (p-AKT/AKT)
0
1
2
3
4
*
+
Gas6 - + - + - + - +
TGF-β - - + + + + + +
0
1h
3h
8h

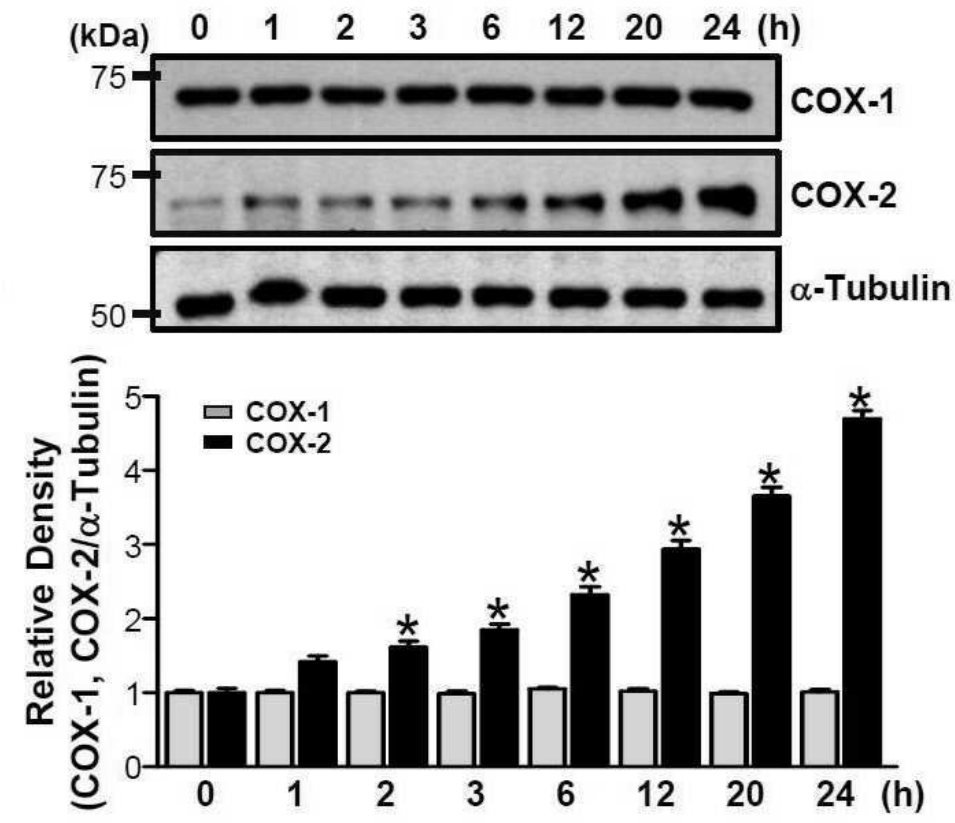
도면10


0
15'
1h
6h
Gas6 - + - + - + - +
TGF-β - - + + + + + +
(kDa)
37
p-P38
37
P38
Relative Density
(p-P38/P38)
3
2
1
0
Gas6 - + - + - + - +
TGF-β - - + + + + + +
0
15'
1h
6h

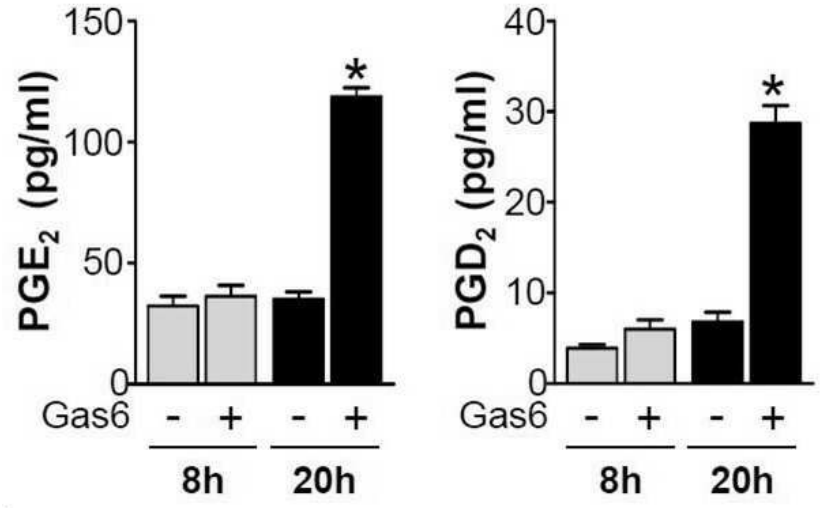
도면11


COX-1
COX-2
Relative mRNA
(fold change)
4
3
2
1
0
0
1
2
3
6
12
20
24
(h)

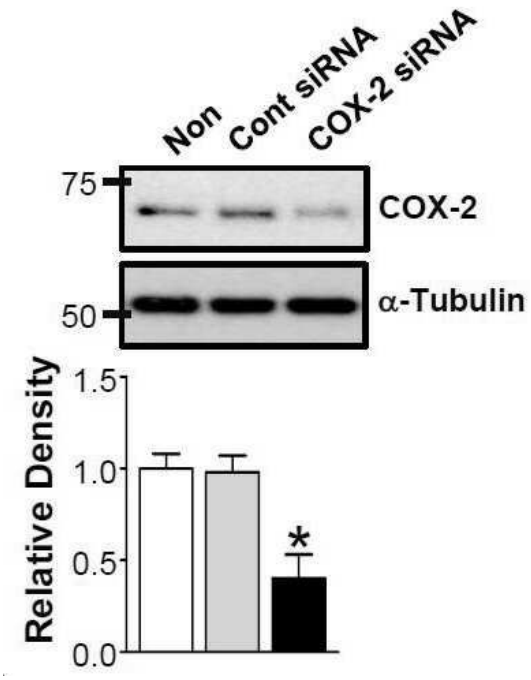
도면12


(kDa)
0 1 2 3 6 12 20 24 (h)
75
COX-1
75
COX-2
50
α-Tubulin
Relative Density
(COX-1, COX-2/α-Tubulin)
COX-1
COX-2
0 1 2 3 4 5
0 1 2 3 6 12 20 24 (h)

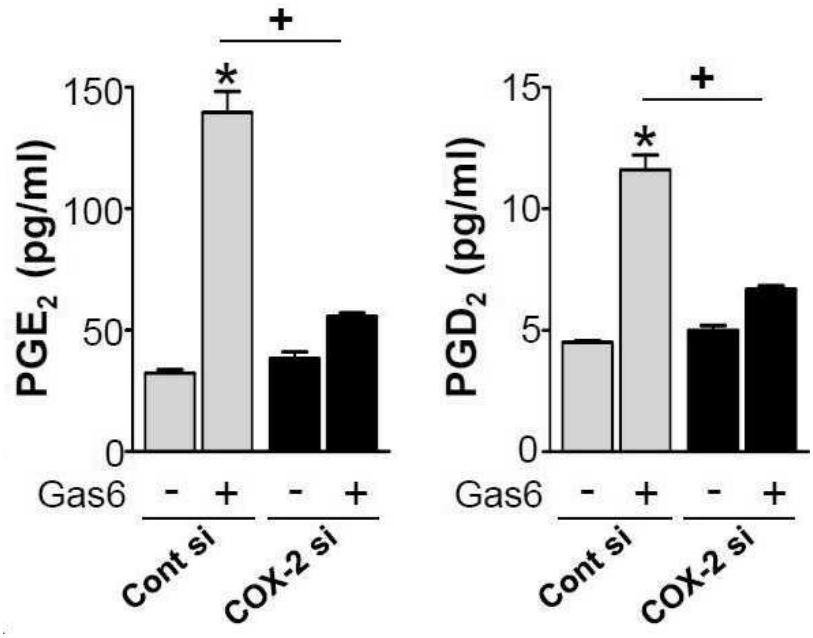
도면13


PGE2 (pg/ml)
150
100
50
0
Gas6 - + - +
8h 20h
PGD2 (pg/ml)
40
30
20
10
0
Gas6 - + - +
8h 20h

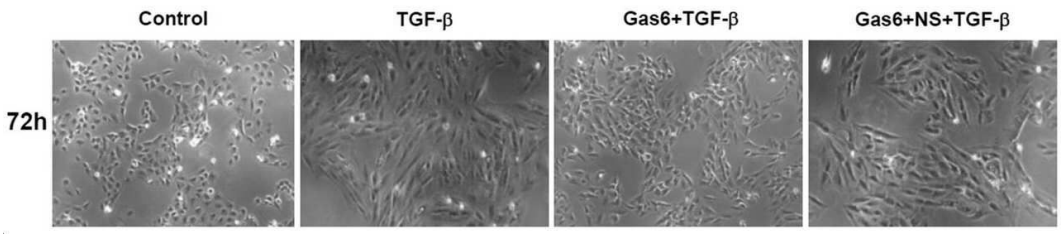
도면14



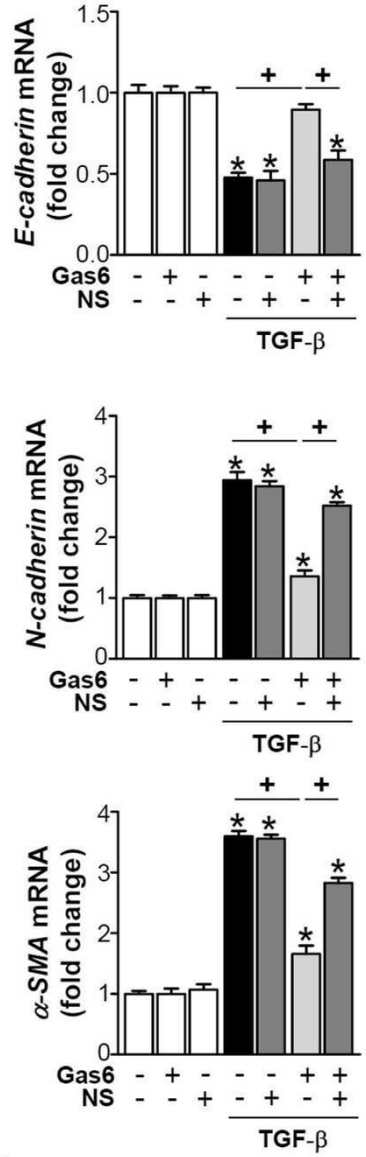
도면15



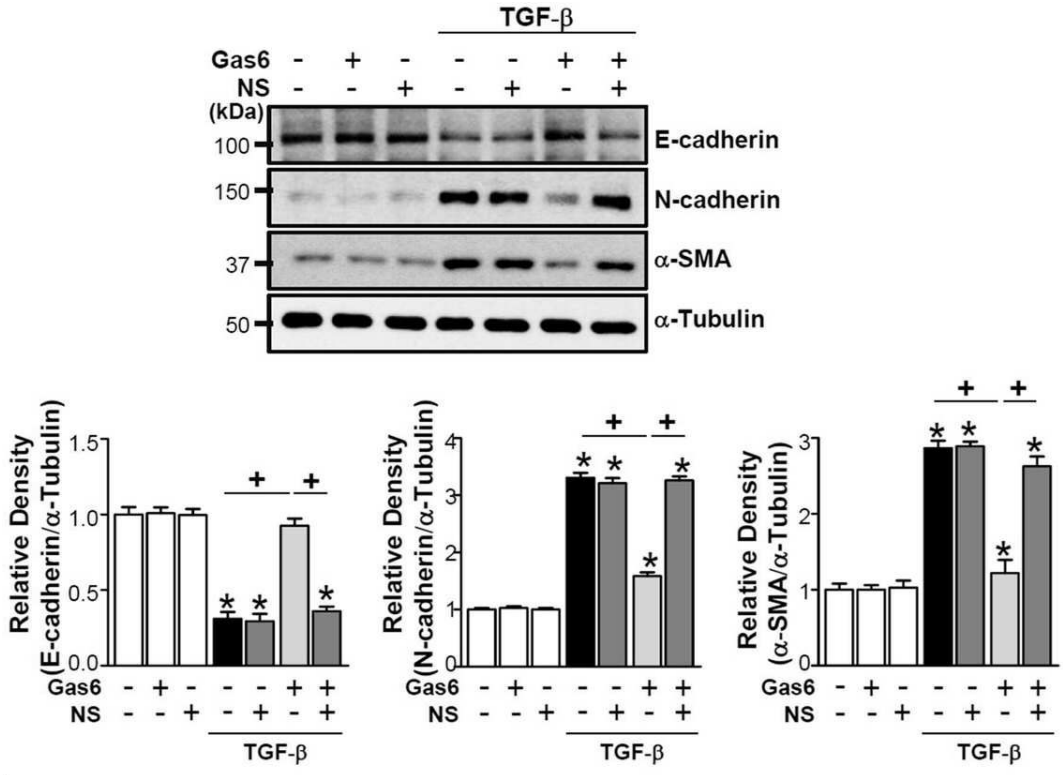
도면16



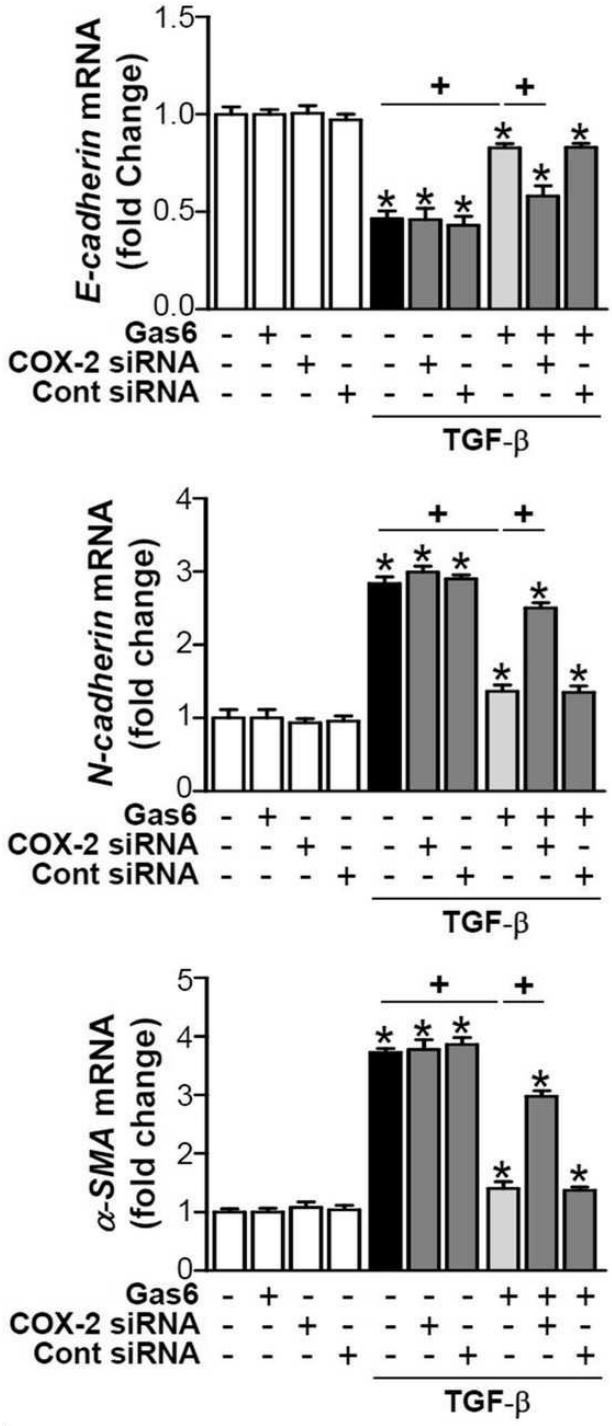
도면17


E-cadherin mRNA (fold change)
1.5
1.0
0.5
0.0
Gas6 - + - - - + +
NS - - + - + - +
TGF-β
N-cadherin mRNA (fold change)
4
3
2
1
0
Gas6 - + - - - + +
NS - - + - + - +
TGF-β
α-SMA mRNA (fold change)
4
3
2
1
0
Gas6 - + - - - + +
NS - - + - + - +
TGF-β

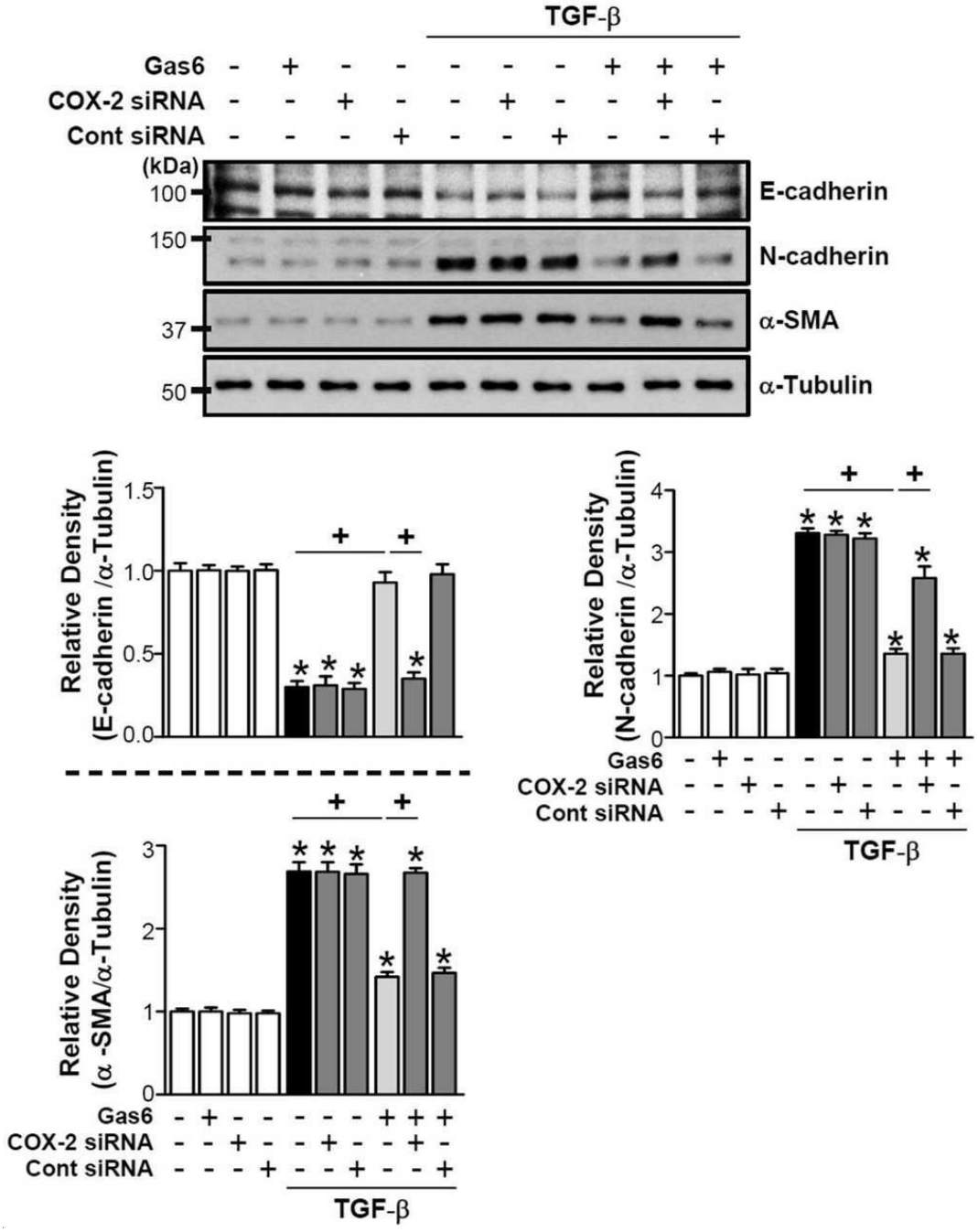
도면18


TGF-β
Gas6 - + - - - + +
NS - - + - + - +
(kDa)
100
150
37
50
E-cadherin
N-cadherin
α-SMA
α-Tubulin
Relative Density (E-cadherin/α-Tubulin)
Relative Density (N-cadherin/α-Tubulin)
Relative Density (α-SMA/α-Tubulin)
Gas6
NS
TGF-β

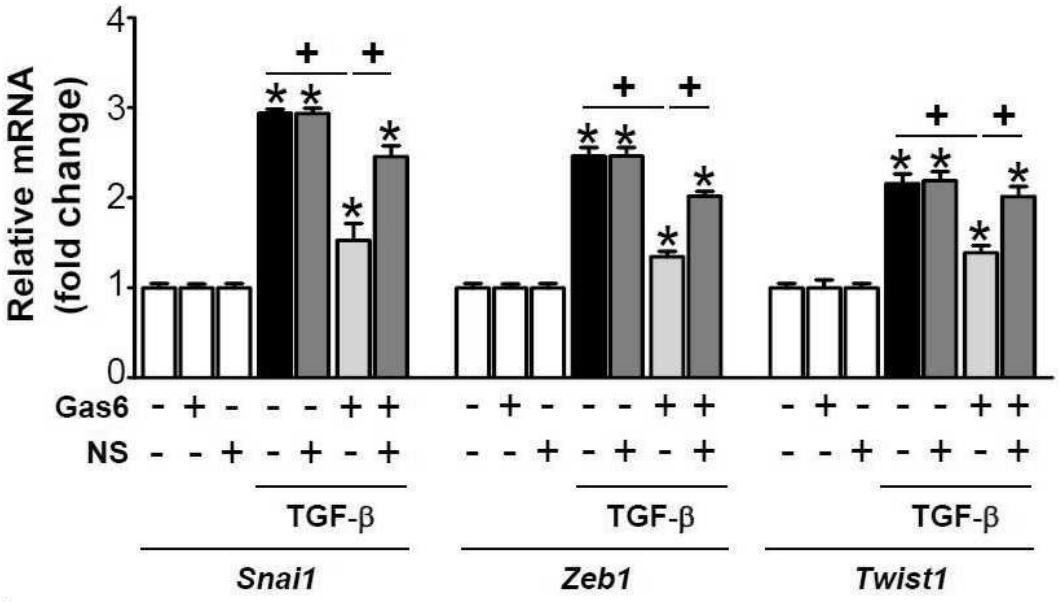
도면19


E-cadherin mRNA (fold Change)
1.5
1.0
0.5
0.0
Gas6 - + - - - - - + + +
COX-2 siRNA - - + - - + - - + -
Cont siRNA - - - + - - + - - +
TGF-β
N-cadherin mRNA (fold change)
4
3
2
1
0
Gas6 - + - - - - - + + +
COX-2 siRNA - - + - - + - - + -
Cont siRNA - - - + - - + - - +
TGF-β
α-SMA mRNA (fold change)
5
4
3
2
1
0
Gas6 - + - - - - - + + +
COX-2 siRNA - - + - - + - - + -
Cont siRNA - - - + - - + - - +
TGF-β

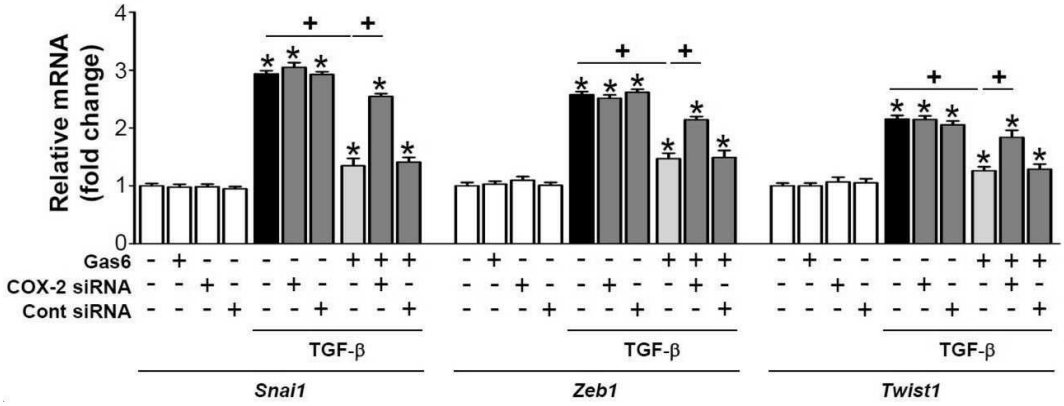
도면20


TGF-β
Gas6
COX-2 siRNA
Cont siRNA
(kDa)
100
150
37
50
E-cadherin
N-cadherin
α-SMA
α-Tubulin
Relative Density (E-cadherin /α-Tubulin)
Relative Density (N-cadherin /α-Tubulin)
Relative Density (α -SMA/α-Tubulin)

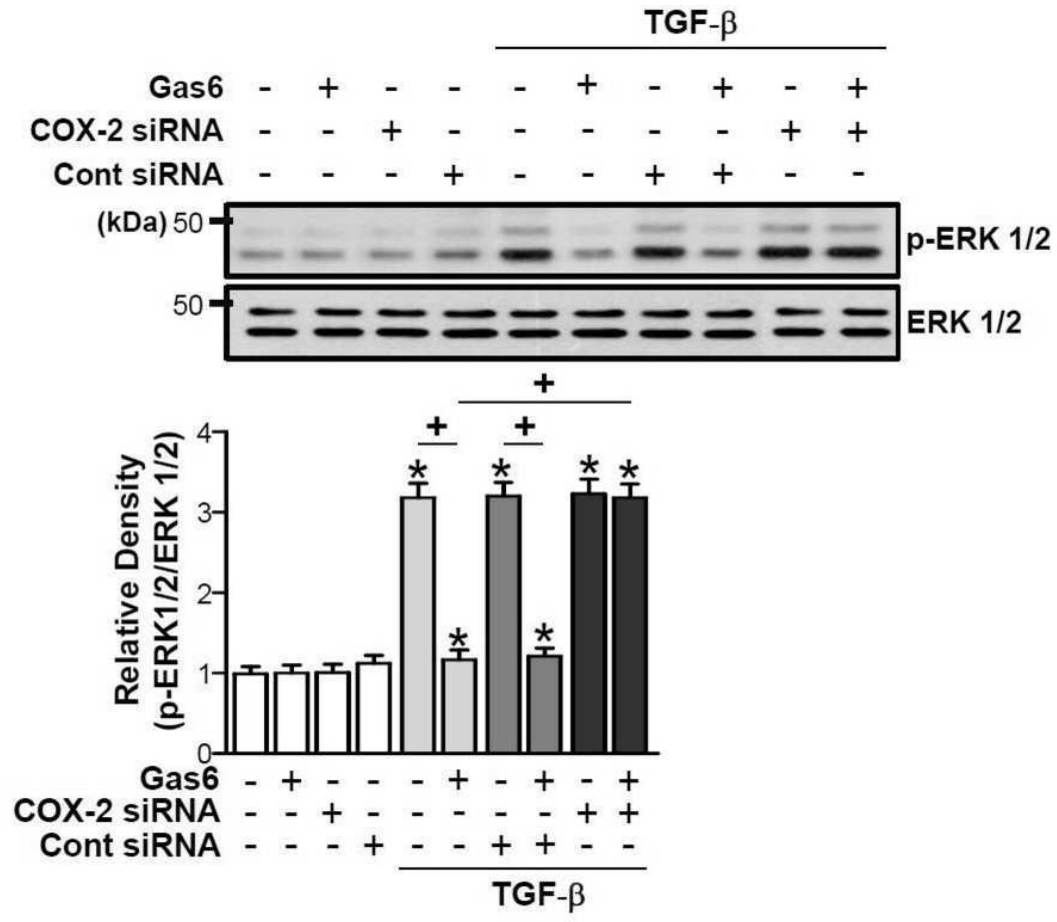
도면21


Relative mRNA (fold change)
Gas6
NS
TGF-β
Snai1
Zeb1
Twist1

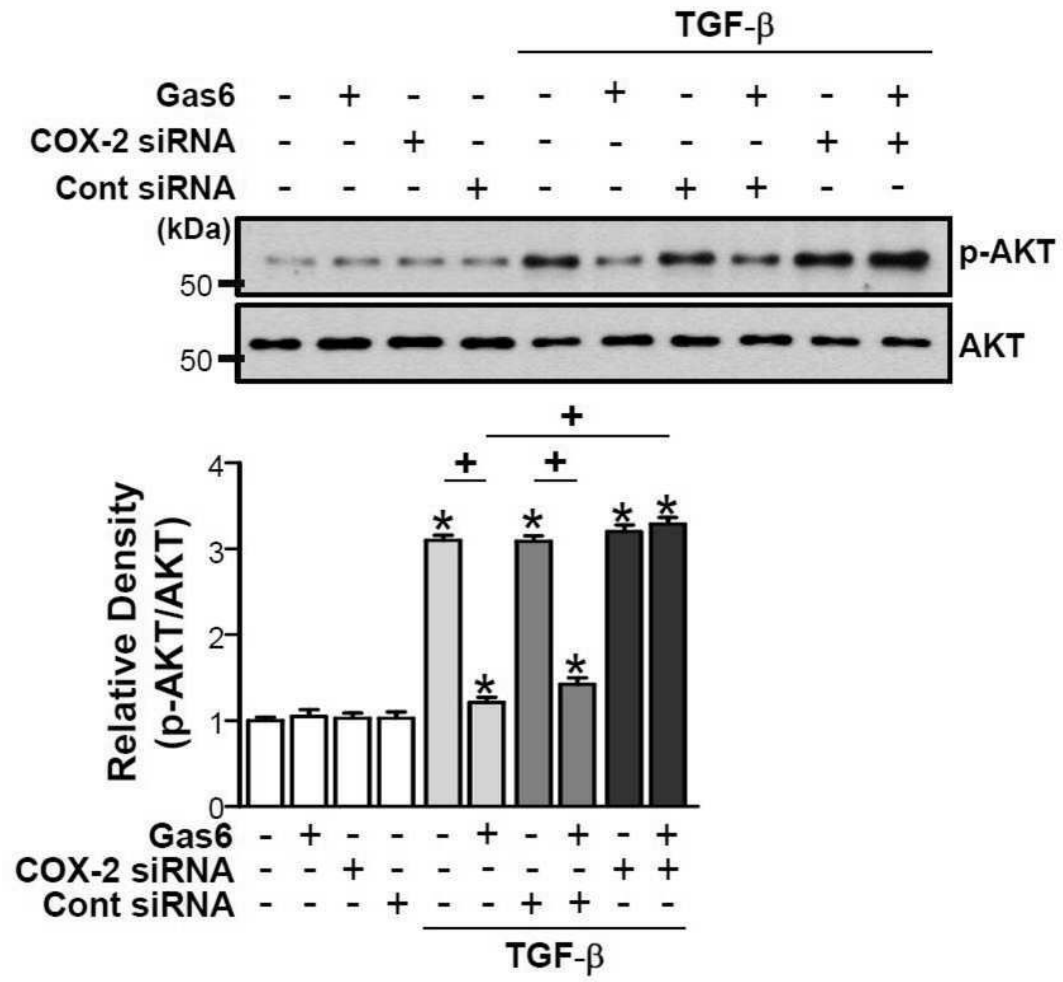
도면22


Relative mRNA (fold change)
Gas6
COX-2 siRNA
Cont siRNA
TGF-β
Snai1
Zeb1
Twist1

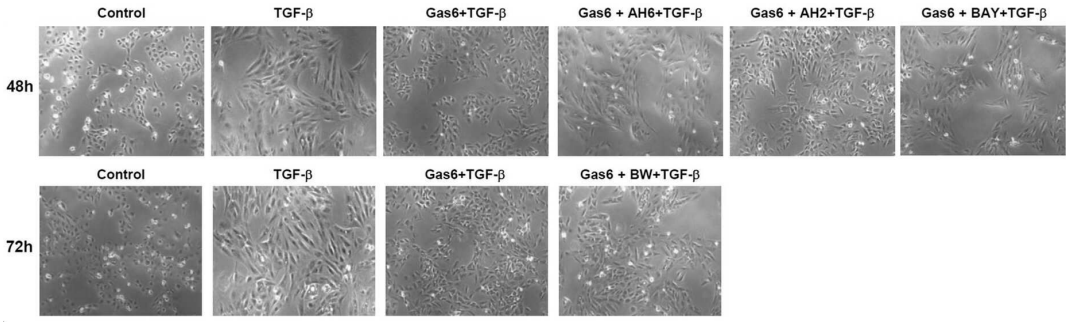
도면23


TGF-β
Gas6 - + - - - + - + - +
COX-2 siRNA - - + - - - - - + +
Cont siRNA - - - + - - + + - -
(kDa) 50
p-ERK 1/2
50
ERK 1/2
+
+ +
Relative Density (p-ERK1/2/ERK 1/2)
4
3
2
1
0
Gas6 - + - - - + - + - +
COX-2 siRNA - - + - - - - - + +
Cont siRNA - - - + - - + + - -
TGF-β

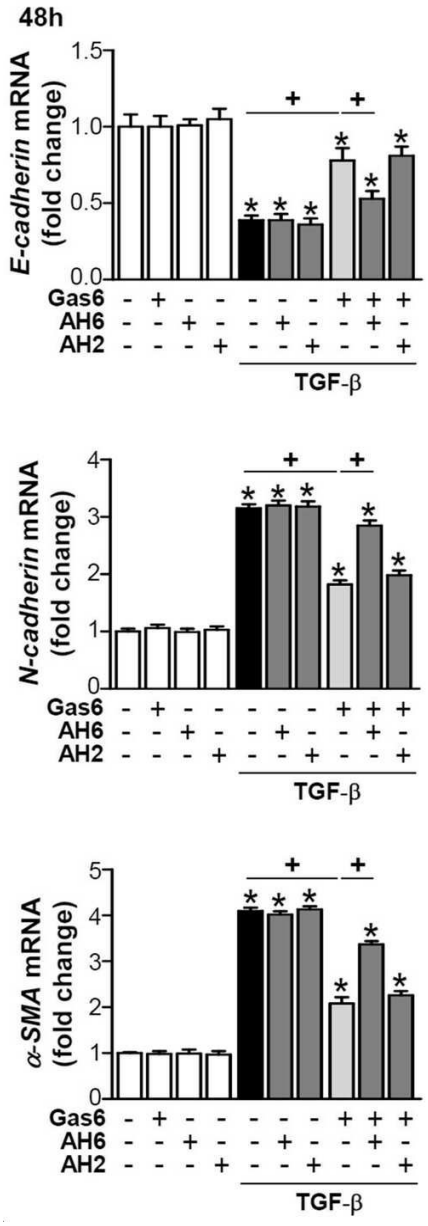
도면24


TGF-β
Gas6 - + - - - + - + - +
COX-2 siRNA - - + - - - - - + +
Cont siRNA - - - + - - + + - -
(kDa)
50
p-AKT
50
AKT
Relative Density (p-AKT/AKT)
0
1
2
3
4
*
Gas6 - + - - - + - + - +
COX-2 siRNA - - + - - - - - + +
Cont siRNA - - - + - - + + - -
TGF-β

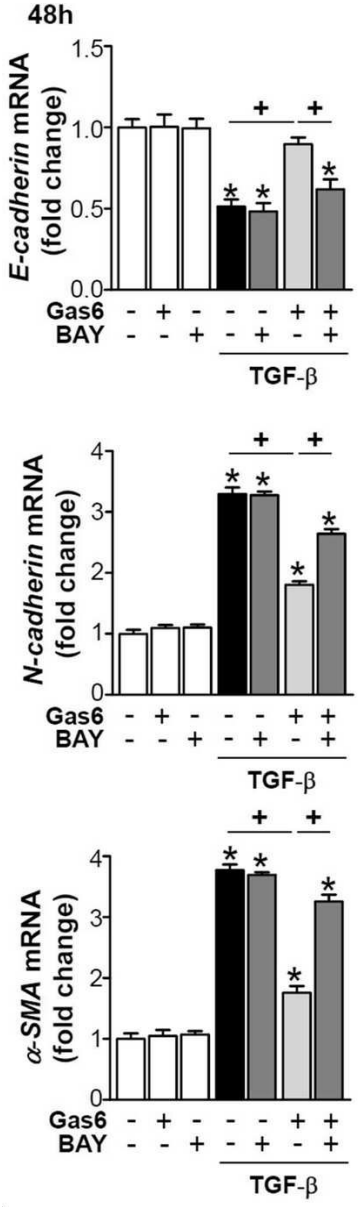
도면25


Control
TGF-β
Gas6+TGF-β
Gas6 + AH6+TGF-β
Gas6 + AH2+TGF-β
Gas6 + BAY+TGF-β
48h
Control
TGF-β
Gas6+TGF-β
Gas6 + BW+TGF-β
72h

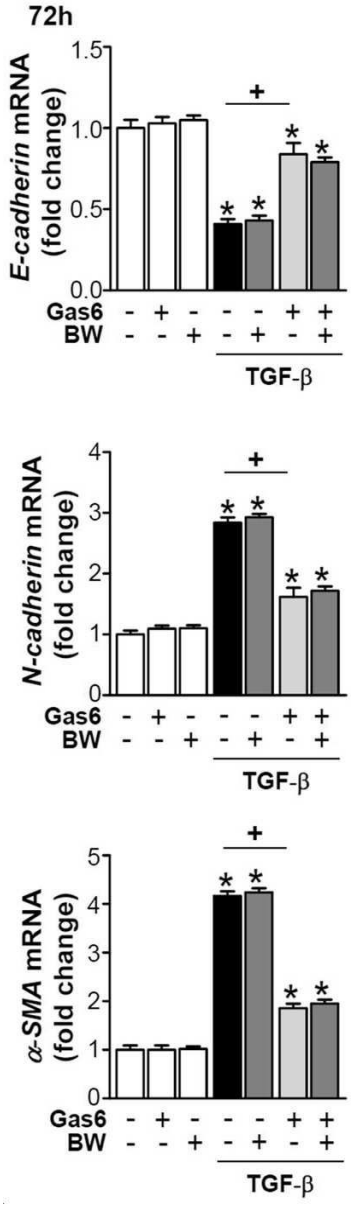
도면26


48h
E-cadherin mRNA (fold change)
1.5
1.0
0.5
0.0
Gas6 - + - - - - - + + +
AH6 - - + - - + - - + -
AH2 - - - + - - + - - +
TGF-β
N-cadherin mRNA (fold change)
4
3
2
1
0
Gas6 - + - - - - - + + +
AH6 - - + - - + - - + -
AH2 - - - + - - + - - +
TGF-β
α-SMA mRNA (fold change)
5
4
3
2
1
0
Gas6 - + - - - - - + + +
AH6 - - + - - + - - + -
AH2 - - - + - - + - - +
TGF-β

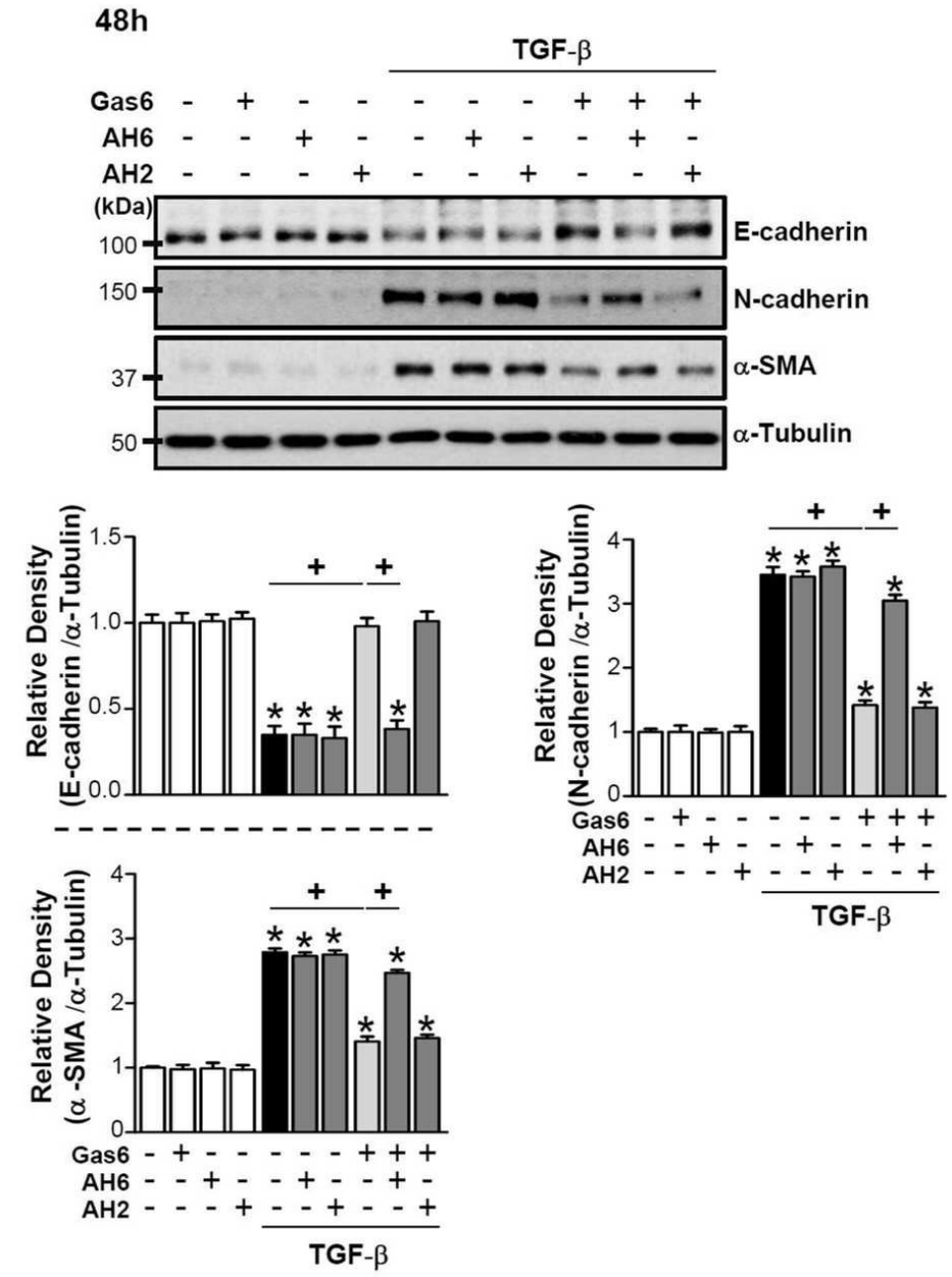
도면27


48h
E-cadherin mRNA (fold change)
1.5
1.0
0.5
0.0
Gas6 - + - - - + +
BAY - - + - + - +
TGF-β
N-cadherin mRNA (fold change)
4
3
2
1
0
Gas6 - + - - - + +
BAY - - + - + - +
TGF-β
α-SMA mRNA (fold change)
4
3
2
1
0
Gas6 - + - - - + +
BAY - - + - + - +
TGF-β

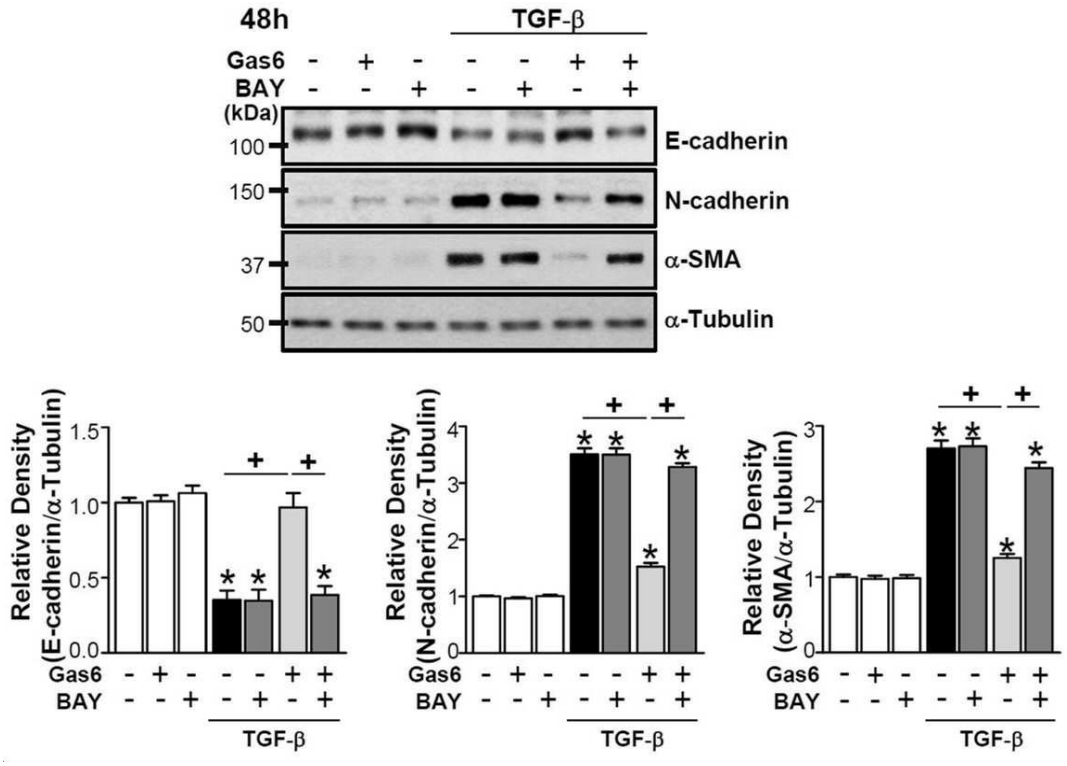
도면28


72h
E-cadherin mRNA (fold change)
1.5
1.0
0.5
0.0
+
*
Gas6 - + - - - + +
BW - - + - + - +
TGF-β
N-cadherin mRNA (fold change)
4
3
2
1
0
α-SMA mRNA (fold change)
5
4
3
2
1
0

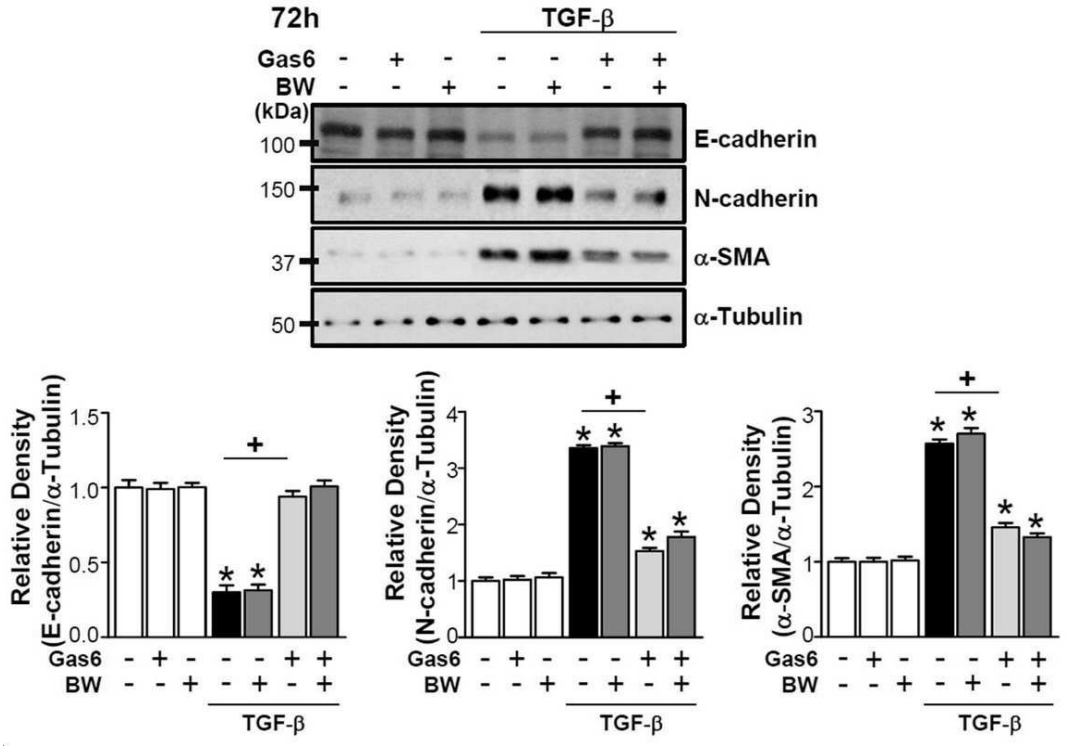
도면29


48h
TGF-β
Gas6
AH6
AH2
(kDa)
100
150
37
50
E-cadherin
N-cadherin
α-SMA
α-Tubulin
Relative Density (E-cadherin /α-Tubulin)
Relative Density (N-cadherin /α-Tubulin)
Relative Density (α -SMA /α-Tubulin)

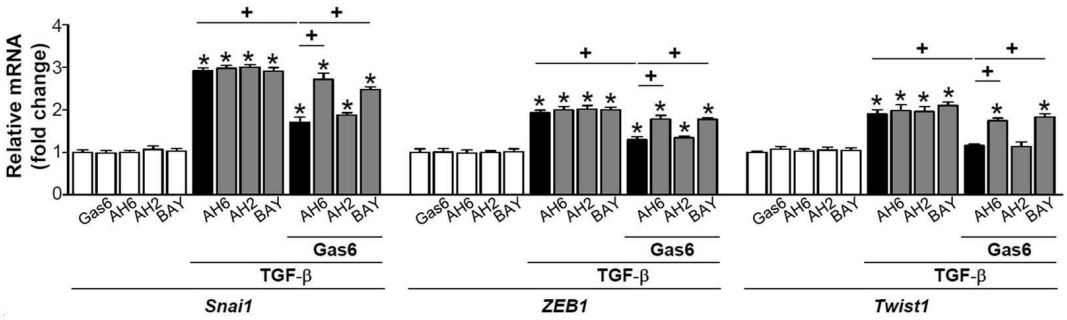
도면30


48h
TGF-β
Gas6
BAY
(kDa)
100
150
37
50
E-cadherin
N-cadherin
α-SMA
α-Tubulin
Relative Density (E-cadherin/α-Tubulin)
Relative Density (N-cadherin/α-Tubulin)
Relative Density (α-SMA/α-Tubulin)
TGF-β

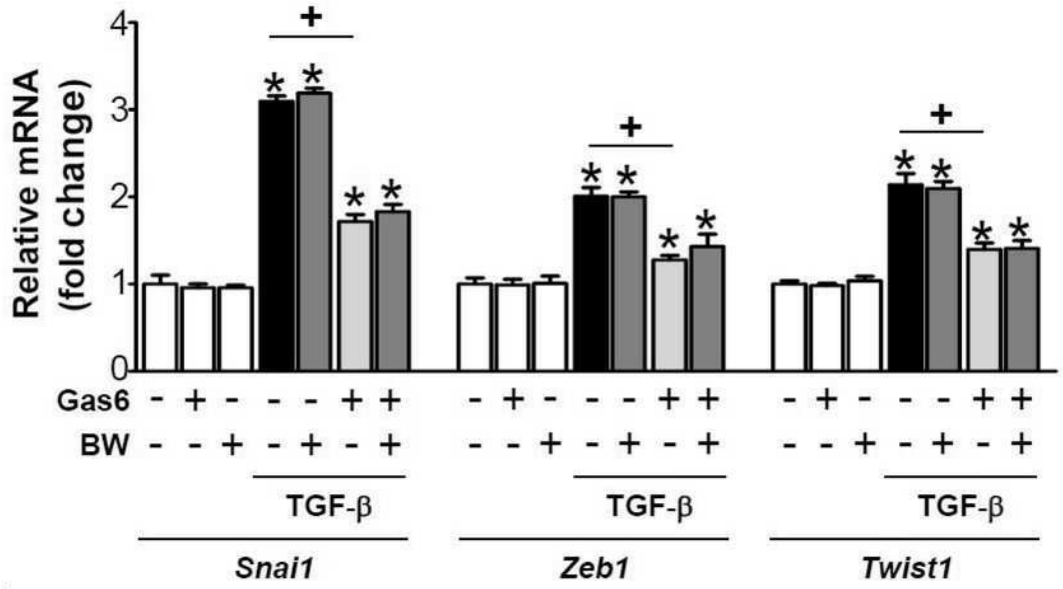
도면31


72h
TGF-β
Gas6
BW
(kDa)
100
150
37
50
E-cadherin
N-cadherin
α-SMA
α-Tubulin
Relative Density (E-cadherin/α-Tubulin)
Relative Density (N-cadherin/α-Tubulin)
Relative Density (α-SMA/α-Tubulin)
TGF-β

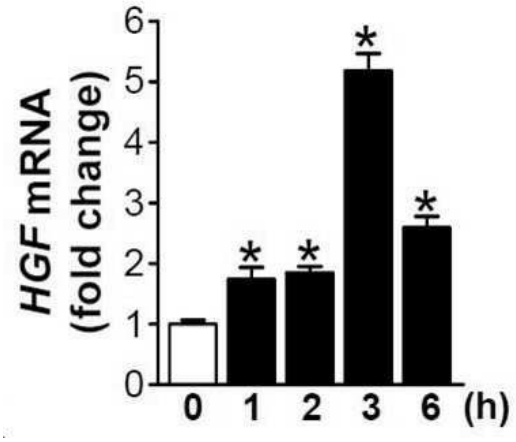
도면32



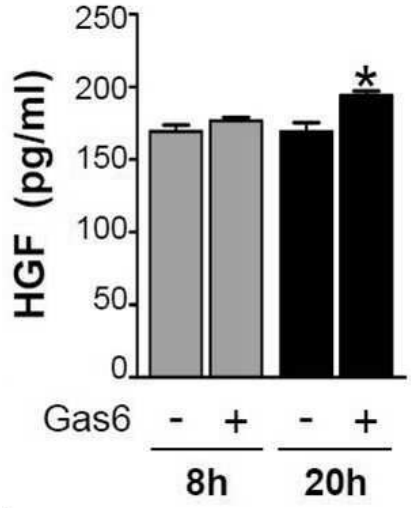
도면33



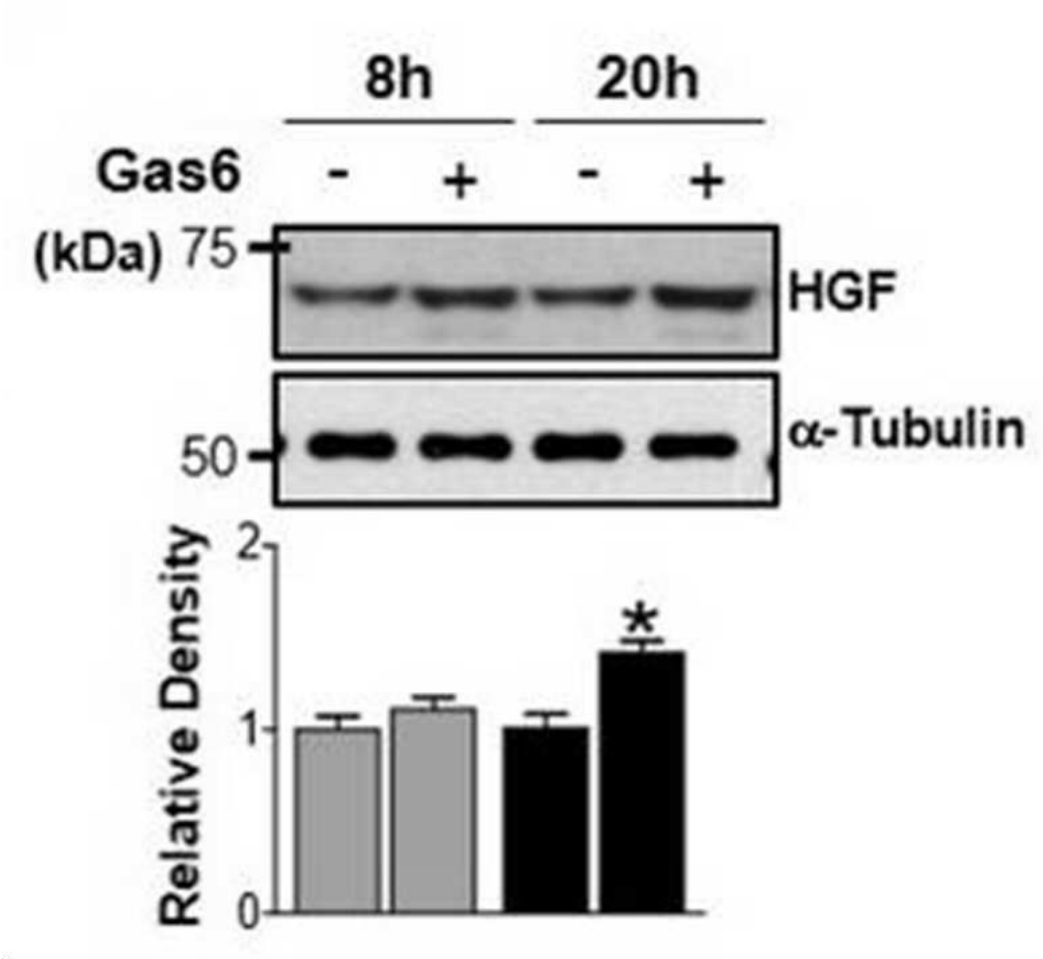
도면34



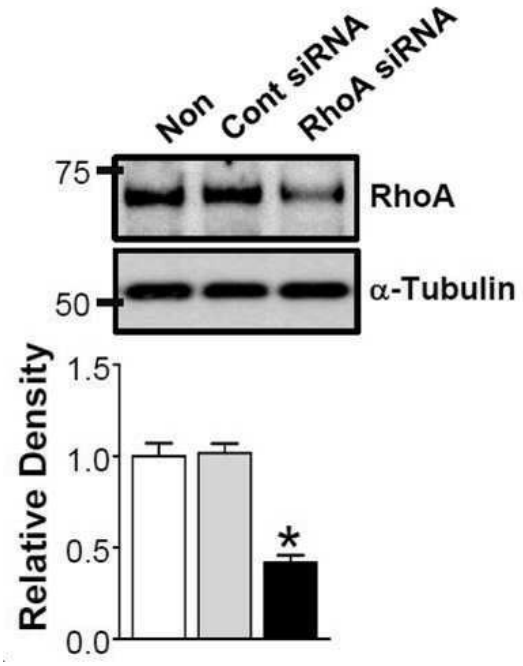
도면35


HGF (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
*
Gas6 - + - +
8h
20h

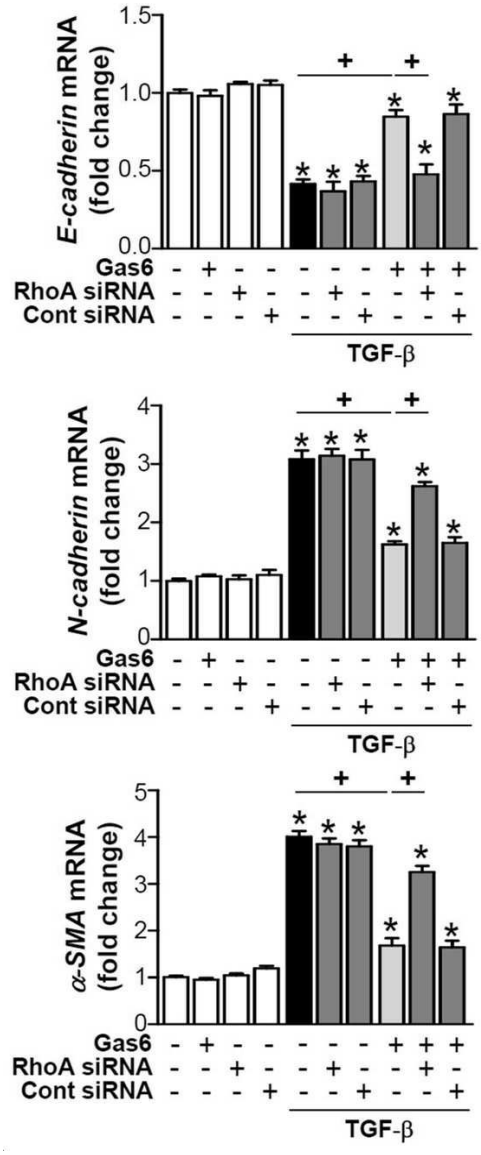
도면36


8h
20h
Gas6 - + - +
(kDa) 75
HGF
50
α-Tubulin
Relative Density
2
1
0
*

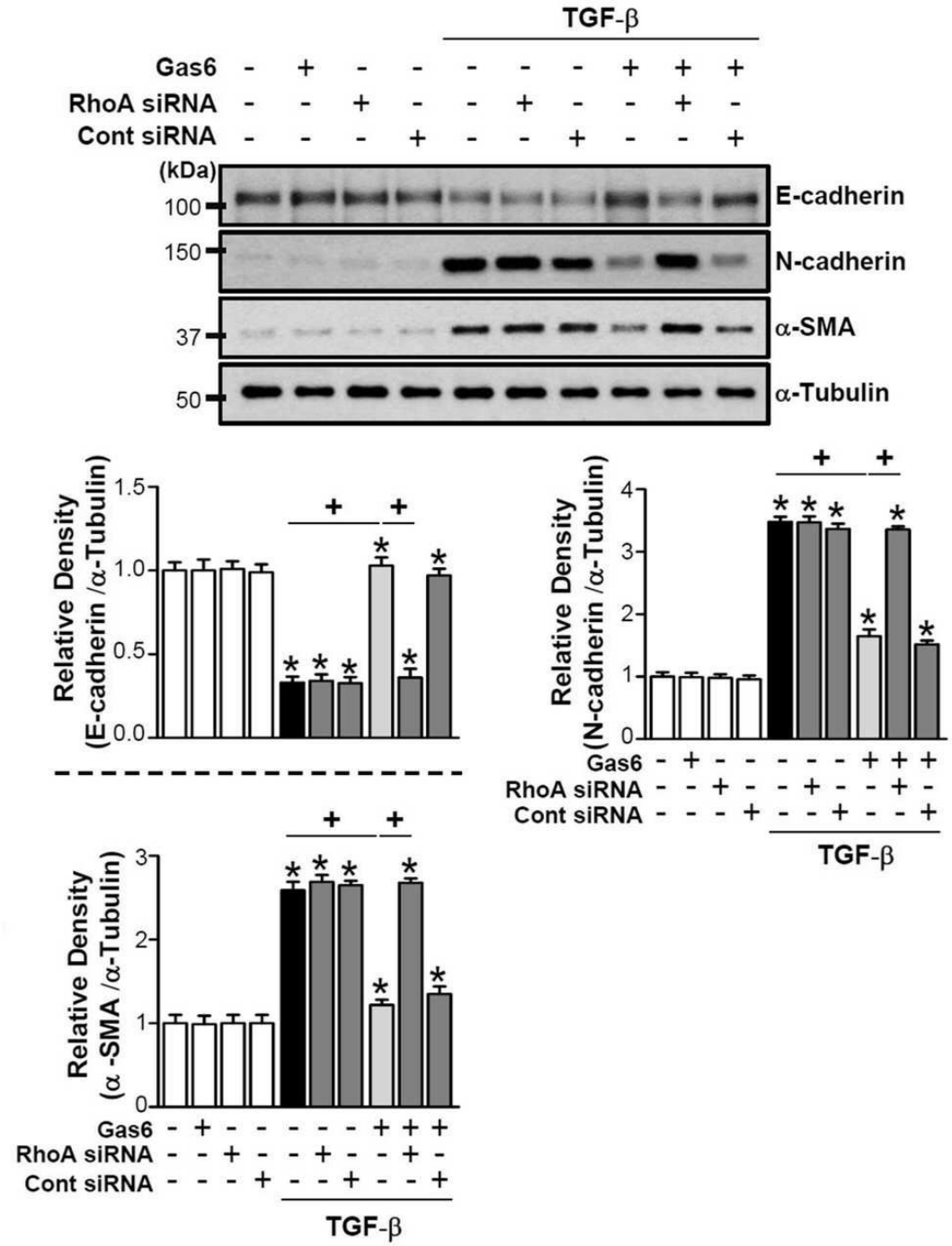
도면37


Non
Cont siRNA
RhoA siRNA
75
RhoA
50
α-Tubulin
Relative Density
1.5
1.0
0.5
0.0
*

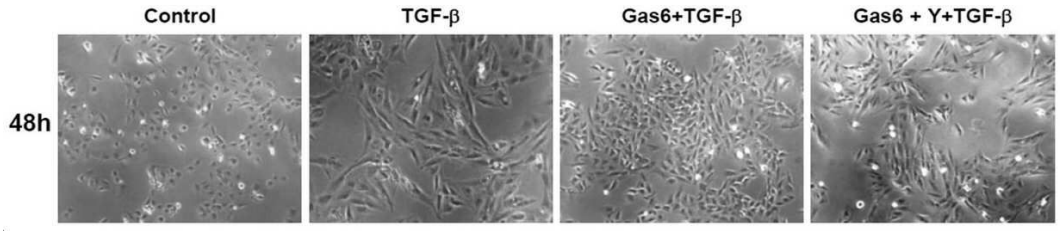
도면38


E-cadherin mRNA (fold change)
1.5
1.0
0.5
0.0
Gas6 - + - - - - - + + +
RhoA siRNA - - + - - + - - + -
Cont siRNA - - - + - - + - - +
TGF-β
N-cadherin mRNA (fold change)
4
3
2
1
0
Gas6 - + - - - - - + + +
RhoA siRNA - - + - - + - - + -
Cont siRNA - - - + - - + - - +
TGF-β
α-SMA mRNA (fold change)
5
4
3
2
1
0
Gas6 - + - - - - - + + +
RhoA siRNA - - + - - + - - + -
Cont siRNA - - - + - - + - - +
TGF-β

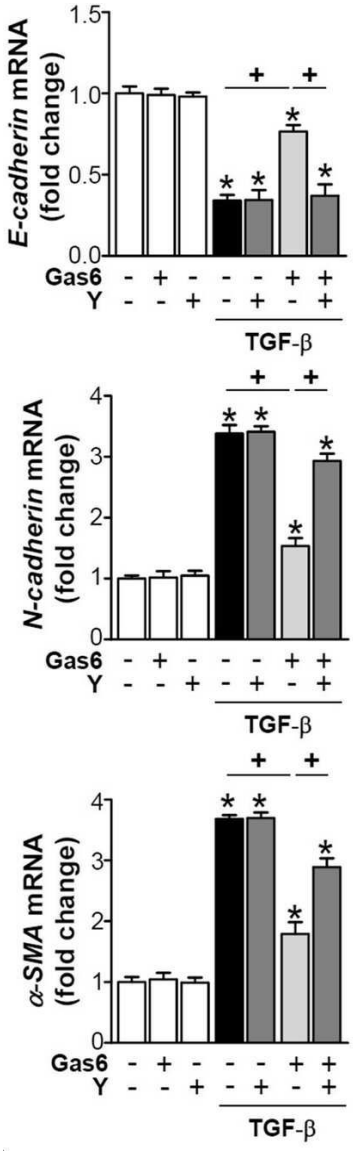
도면39


TGF-β
Gas6
RhoA siRNA
Cont siRNA
(kDa)
100
150
37
50
E-cadherin
N-cadherin
α-SMA
α-Tubulin
Relative Density (E-cadherin /α-Tubulin)
Relative Density (N-cadherin /α-Tubulin)
Relative Density (α -SMA /α-Tubulin)
TGF-β

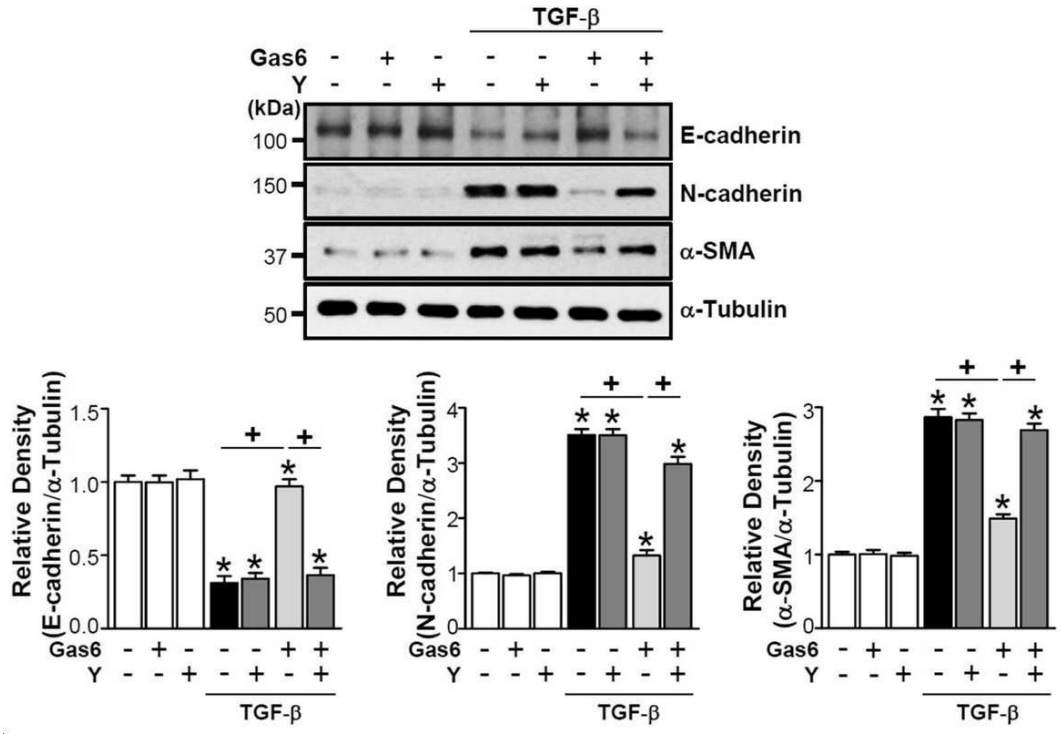
도면40


Control
TGF-β
Gas6+TGF-β
Gas6 + Y+TGF-β
48h

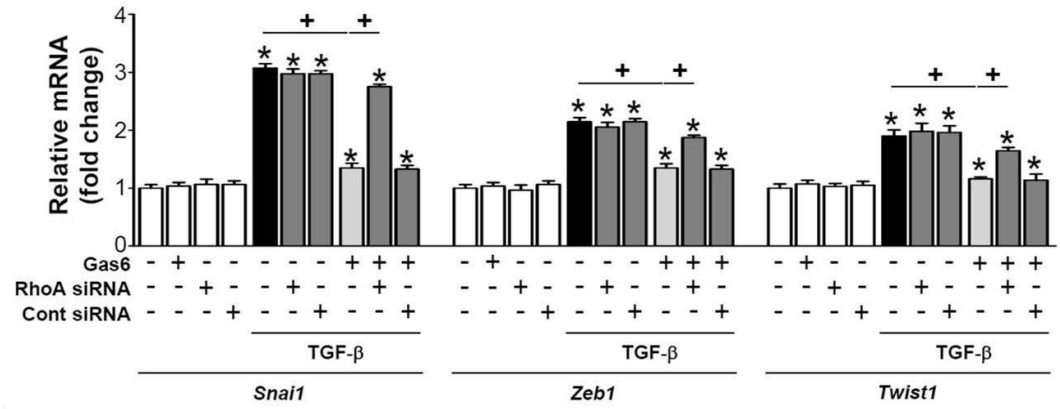
도면41


E-cadherin mRNA (fold change)
1.5
1.0
0.5
0.0
Gas6 - + - - - + +
Y - - + - + - +
TGF-β
N-cadherin mRNA (fold change)
4
3
2
1
0
Gas6 - + - - - + +
Y - - + - + - +
TGF-β
α-SMA mRNA (fold change)
4
3
2
1
0
Gas6 - + - - - + +
Y - - + - + - +
TGF-β

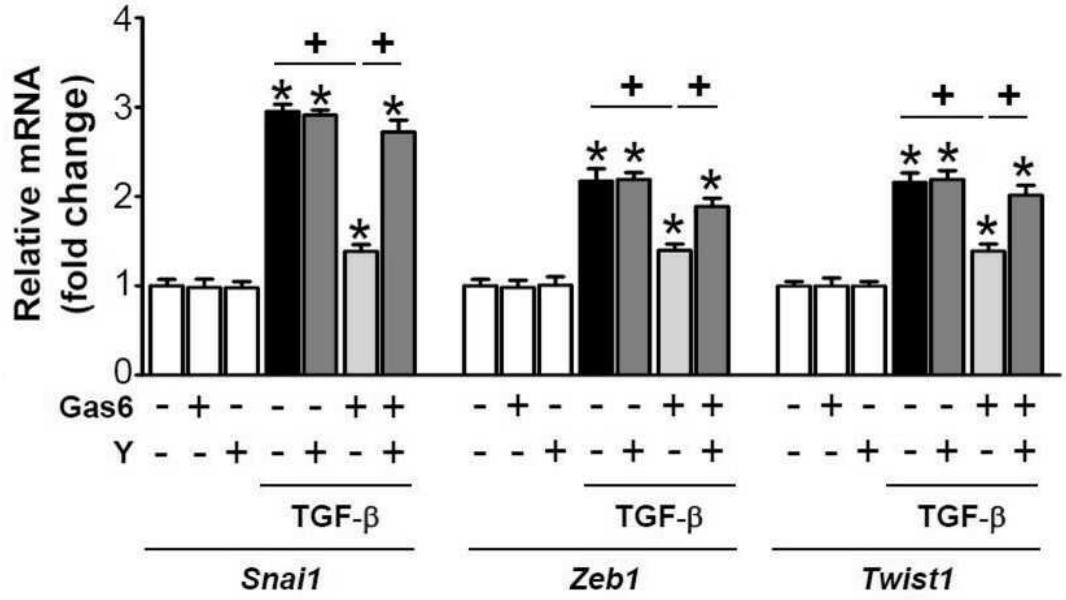
도면42


TGF-β
Gas6
Y
(kDa)
100
150
37
50
E-cadherin
N-cadherin
α-SMA
α-Tubulin
Relative Density (E-cadherin/α-Tubulin)
Relative Density (N-cadherin/α-Tubulin)
Relative Density (α-SMA/α-Tubulin)

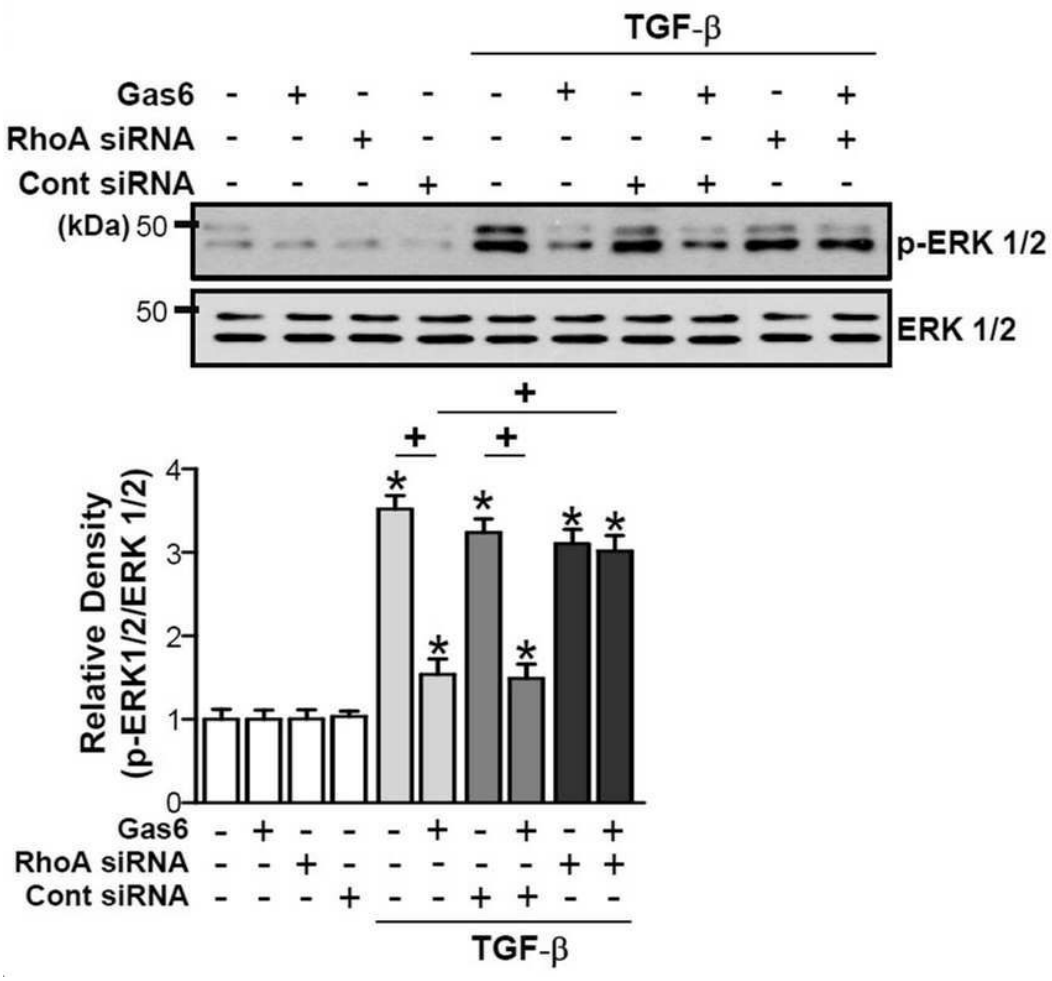
도면43


Relative mRNA (fold change)
Gas6
RhoA siRNA
Cont siRNA
TGF-β
Snai1
Zeb1
Twist1

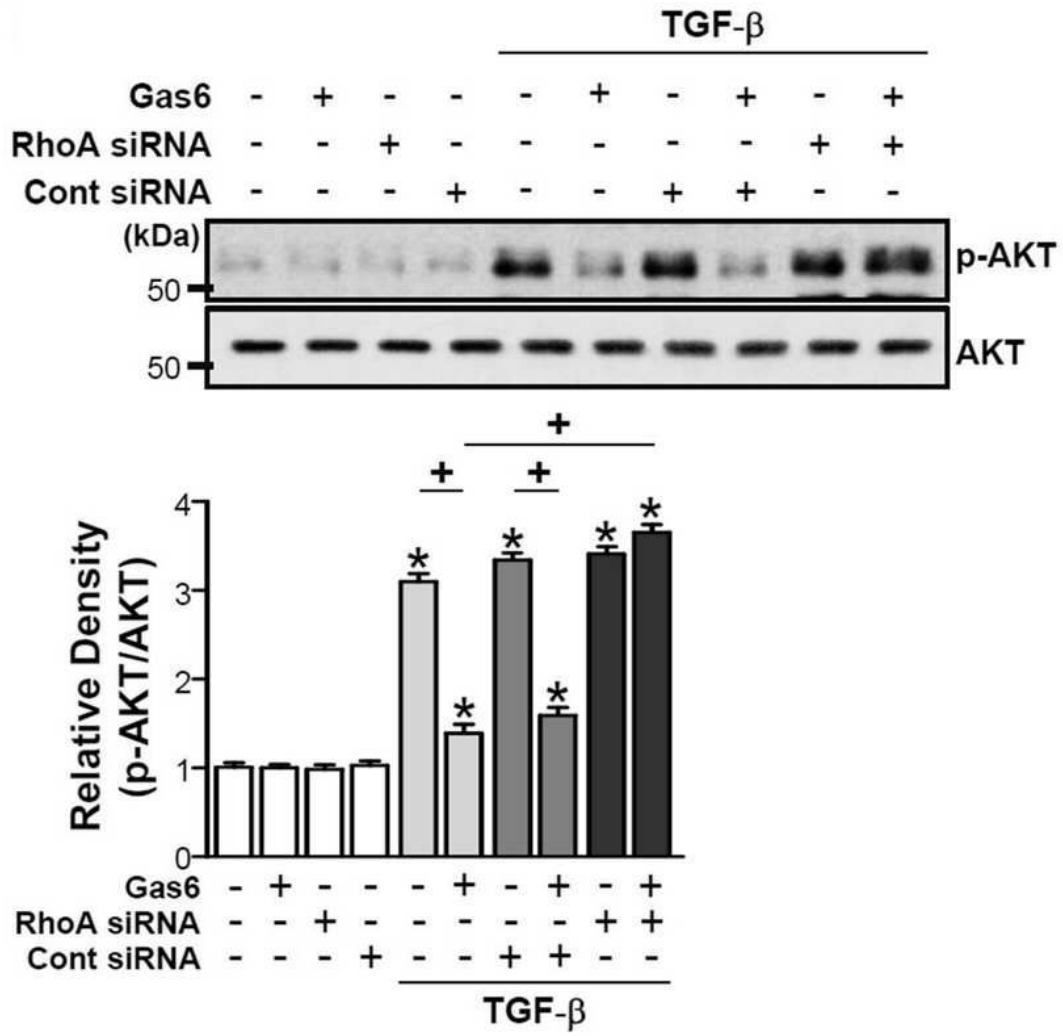
도면44


Relative mRNA (fold change)
Gas6
Y
TGF-β
Snai1
Zeb1
Twist1

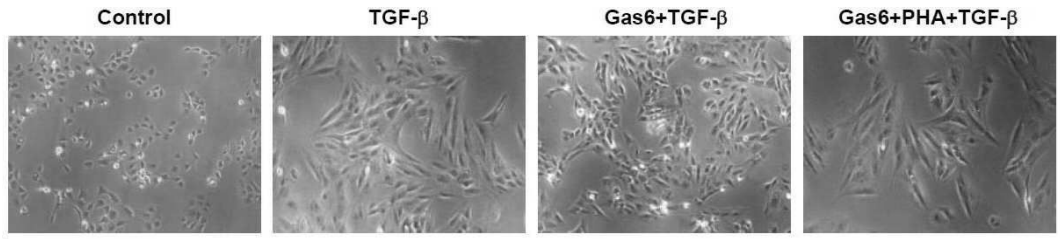
도면45


TGF-β
Gas6
RhoA siRNA
Cont siRNA
(kDa)
50
p-ERK 1/2
ERK 1/2
Relative Density (p-ERK1/2/ERK 1/2)

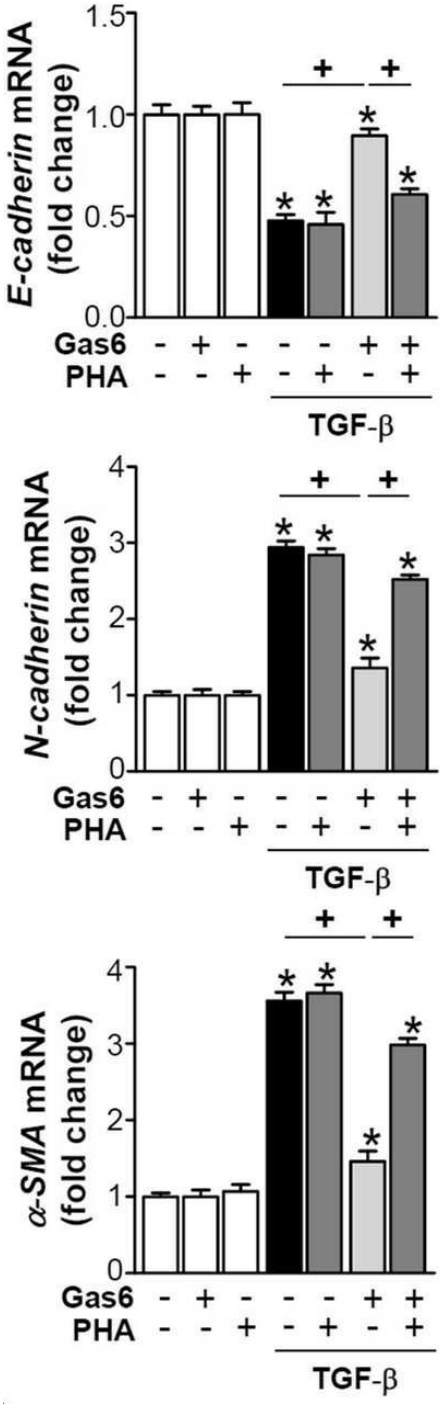
도면46


TGF-β
Gas6
RhoA siRNA
Cont siRNA
(kDa)
50
50
p-AKT
AKT
Relative Density
(p-AKT/AKT)
0
1
2
3
4
*
TGF-β

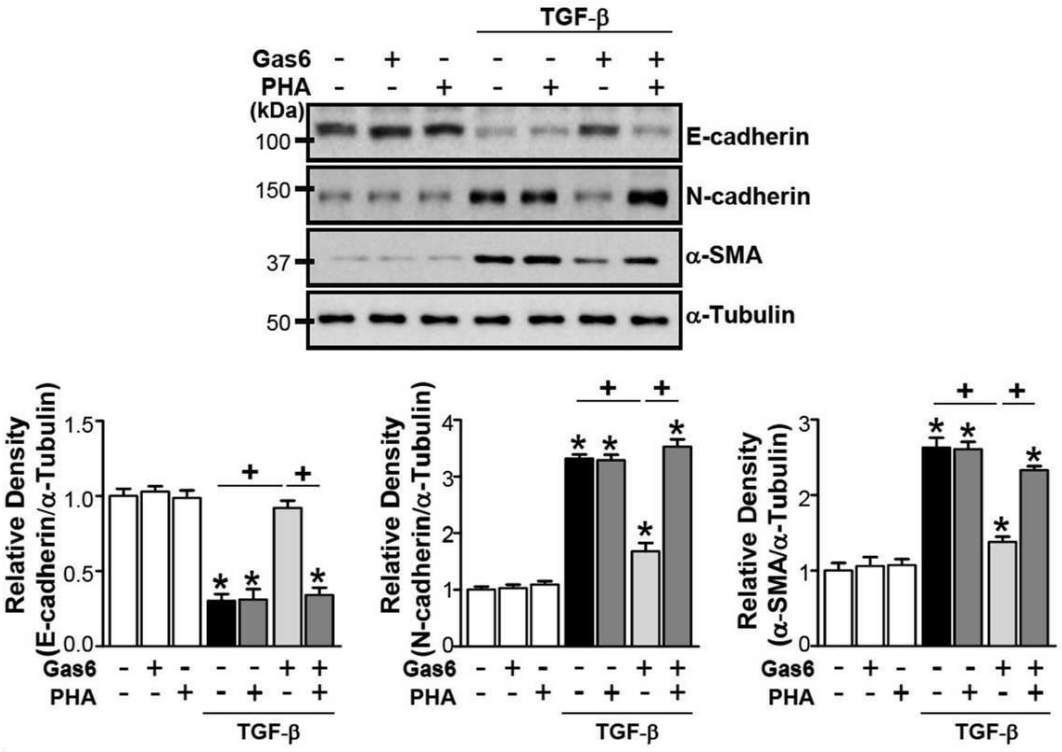
도면47


Control
TGF-β
Gas6+TGF-β
Gas6+PHA+TGF-β

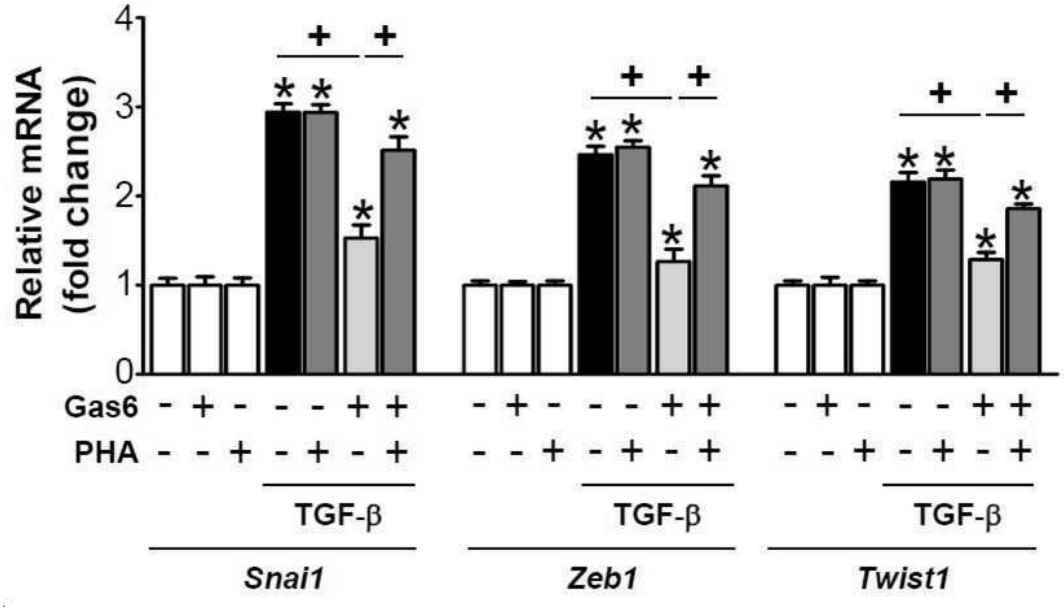
도면48


E-cadherin mRNA (fold change)
1.5
1.0
0.5
0.0
Gas6 - + - - - + +
PHA - - + - + - +
TGF-β
N-cadherin mRNA (fold change)
4
3
2
1
0
Gas6 - + - - - + +
PHA - - + - + - +
TGF-β
α-SMA mRNA (fold change)
4
3
2
1
0
Gas6 - + - - - + +
PHA - - + - + - +
TGF-β

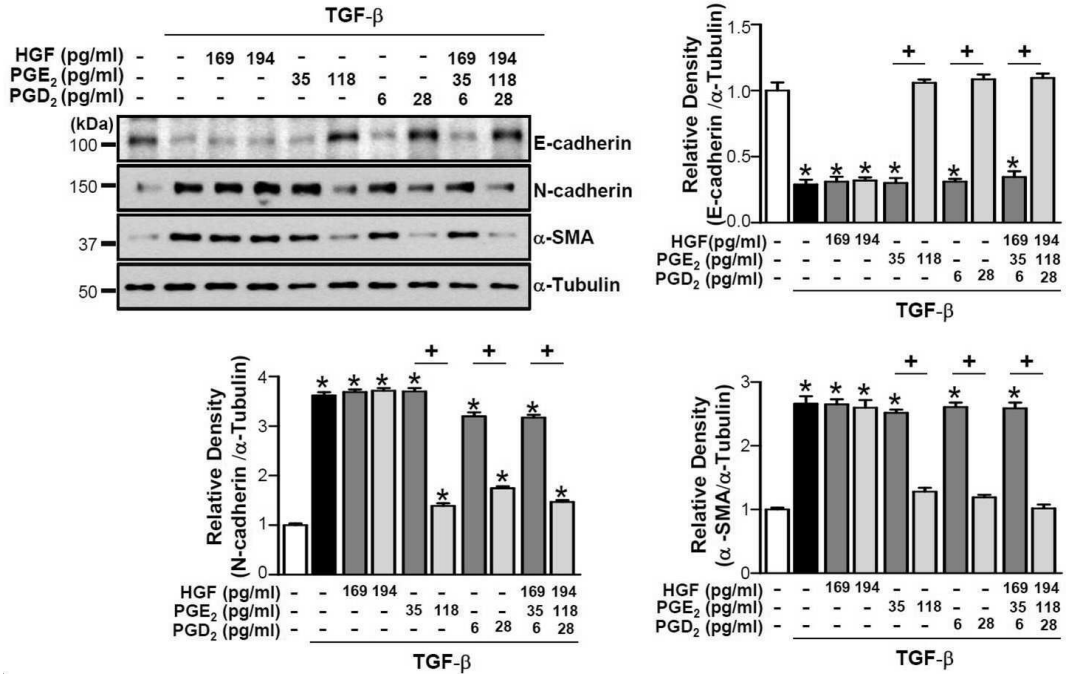
도면49


TGF-β
Gas6
PHA
(kDa)
100
150
37
50
E-cadherin
N-cadherin
α-SMA
α-Tubulin
Relative Density (E-cadherin/α-Tubulin)
Relative Density (N-cadherin/α-Tubulin)
Relative Density (α-SMA/α-Tubulin)

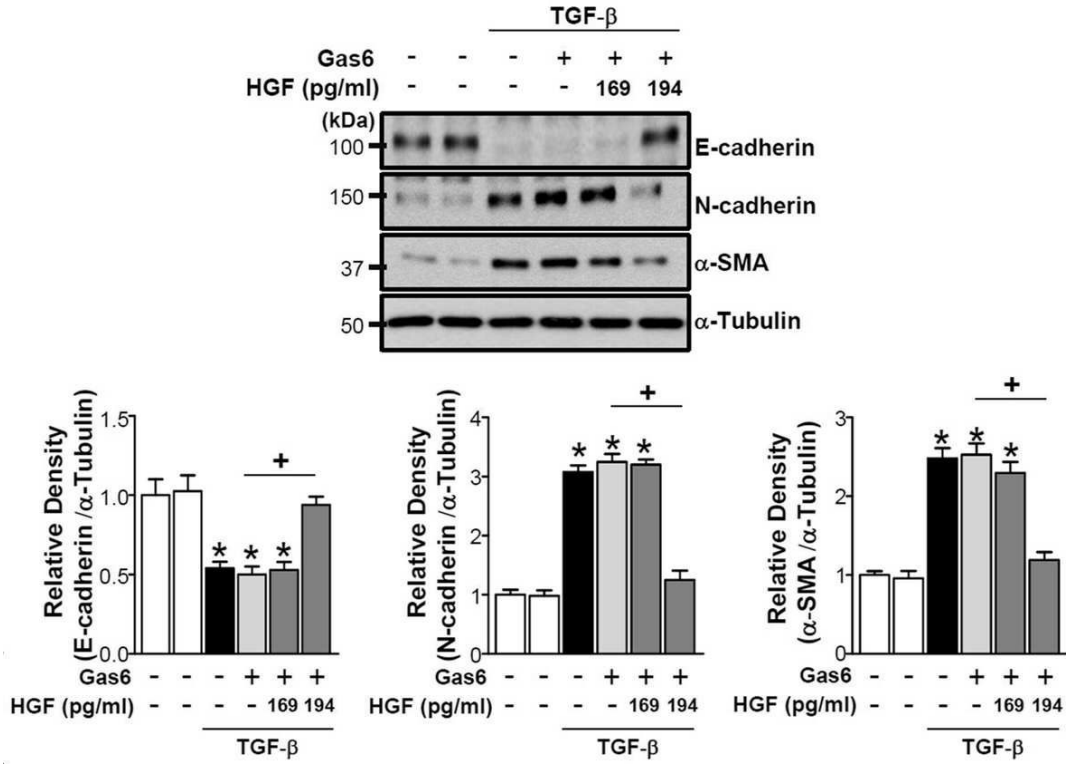
도면50


Relative mRNA (fold change)
Gas6
PHA
TGF-β
Snai1
Zeb1
Twist1

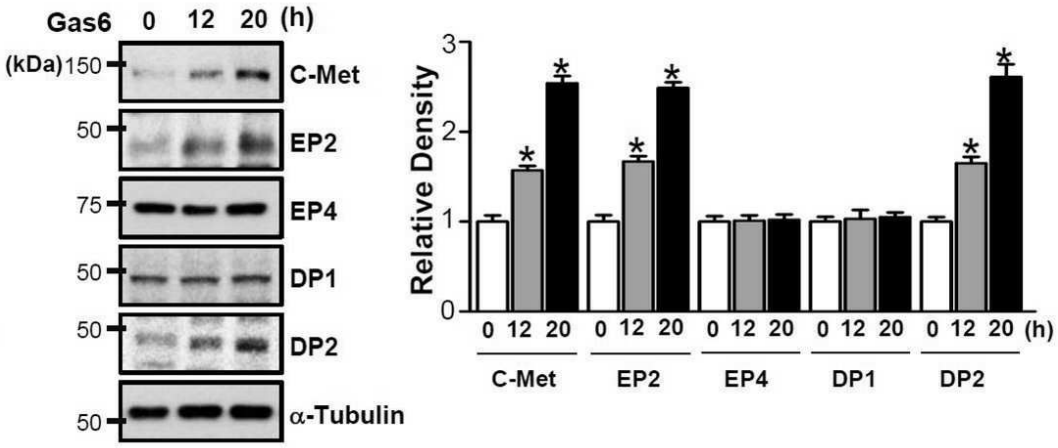
도면51


TGF-β
HGF (pg/ml)
PGE2 (pg/ml)
PGD2 (pg/ml)
(kDa)
100
150
37
50
E-cadherin
N-cadherin
α-SMA
α-Tubulin
Relative Density (E-cadherin /α-Tubulin)
Relative Density (N-cadherin /α-Tubulin)
Relative Density (α -SMA/α-Tubulin)

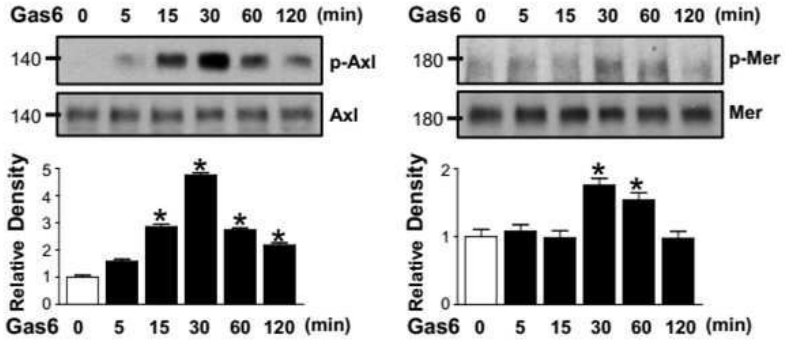
도면52


TGF-β
Gas6
HGF (pg/ml)
(kDa)
100
150
37
50
E-cadherin
N-cadherin
α-SMA
α-Tubulin
Relative Density (E-cadherin /α-Tubulin)
Relative Density (N-cadherin /α-Tubulin)
Relative Density (α-SMA /α-Tubulin)

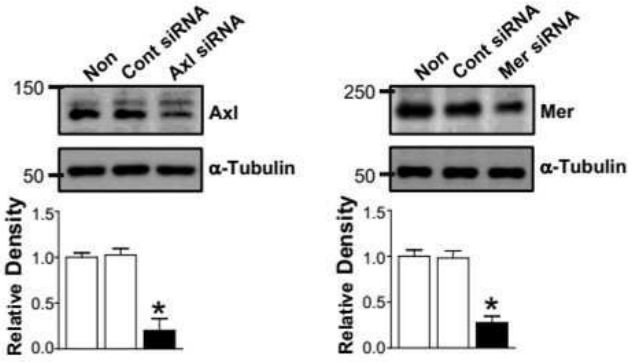
도면53



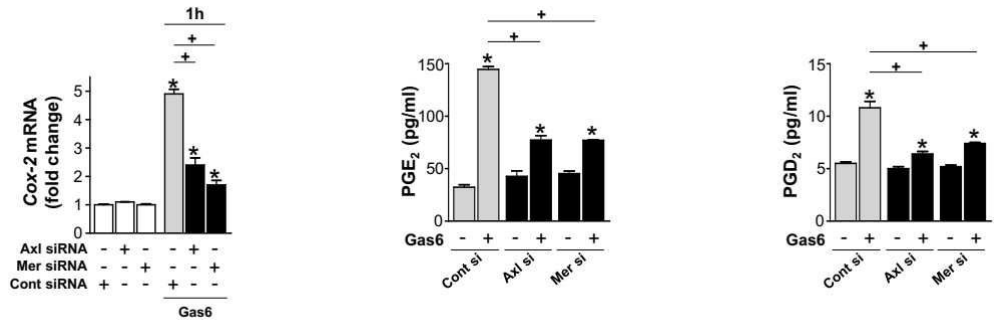
도면54



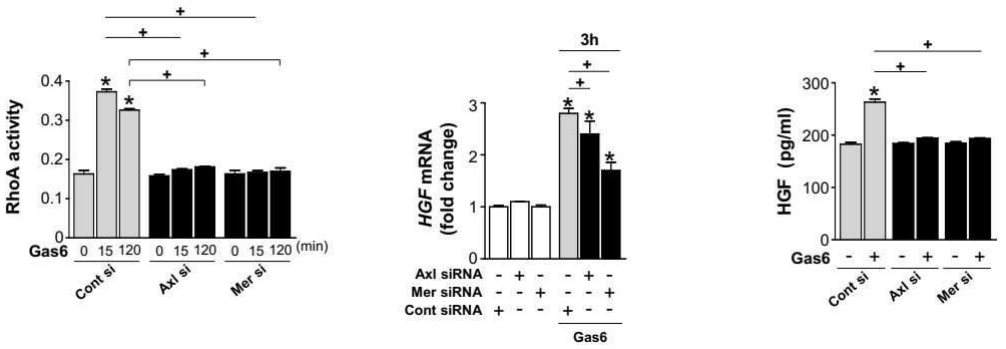
도면55



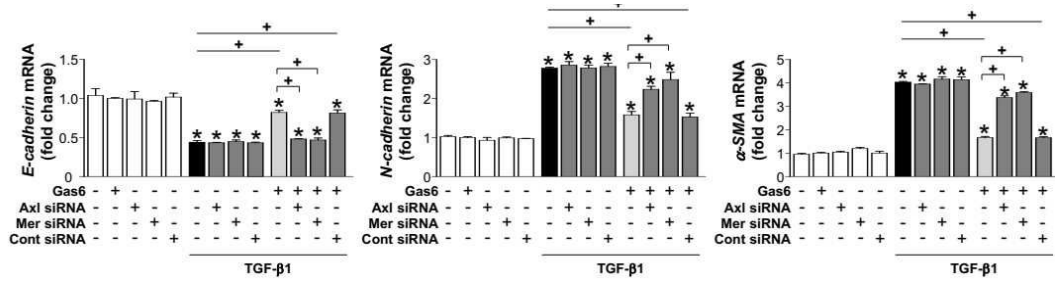
도면56



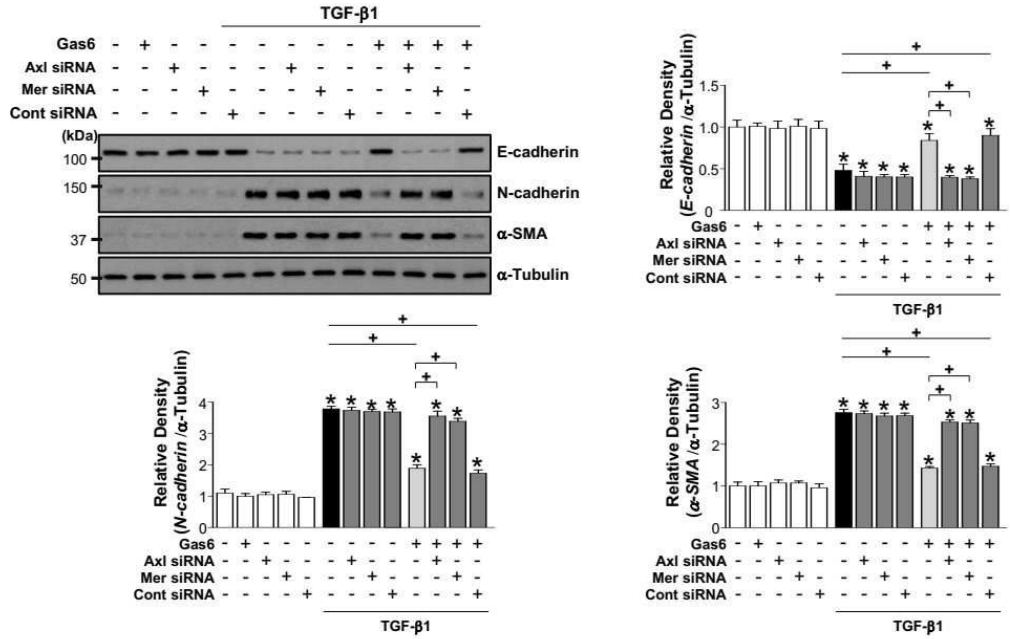
도면57



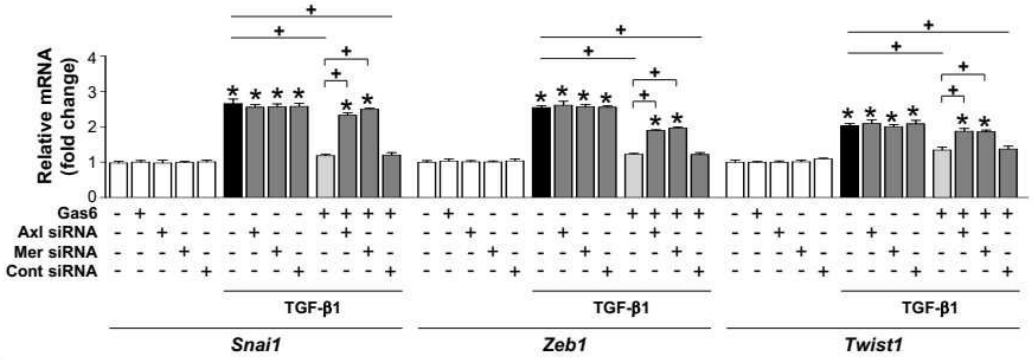
도면58



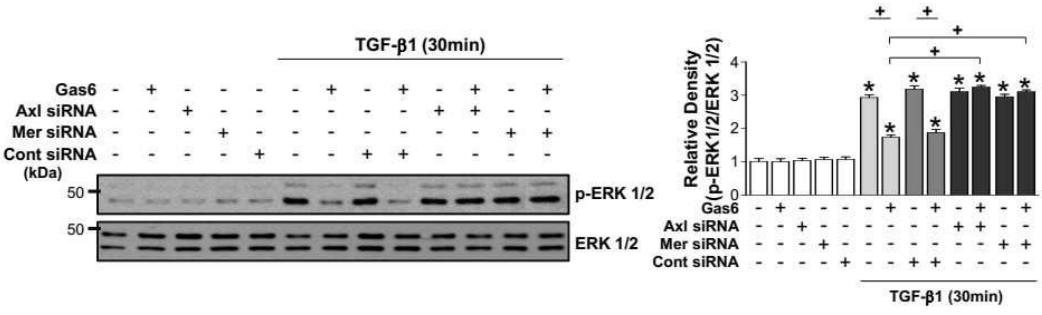
도면59



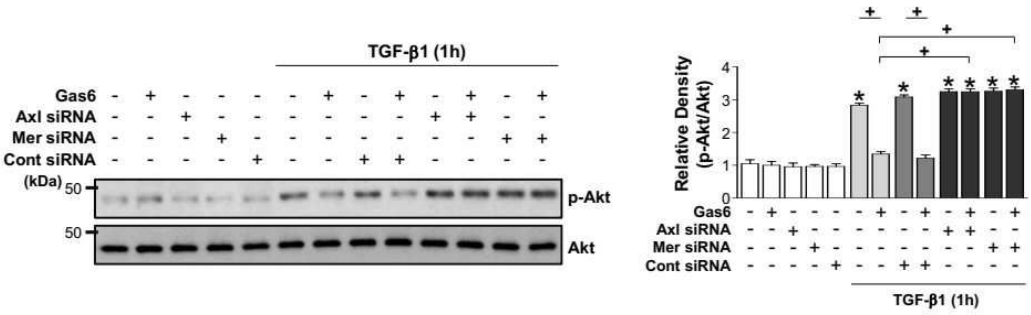
도면60



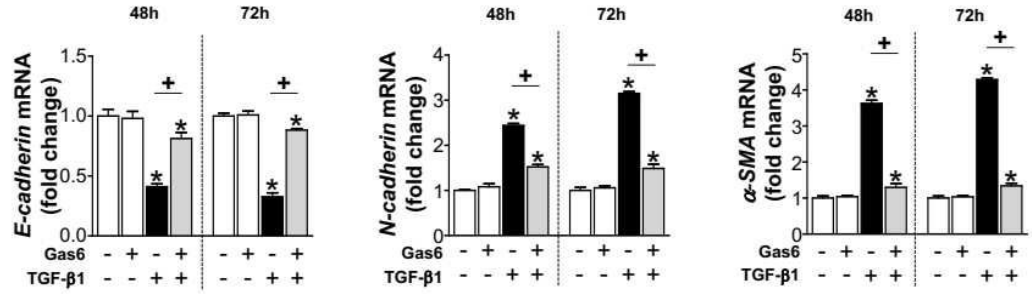
도면61



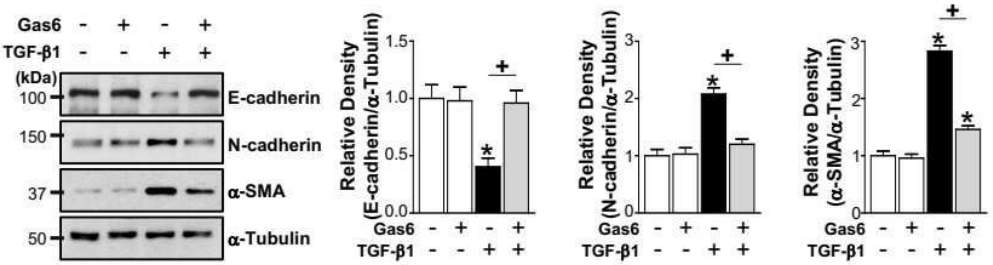
도면62



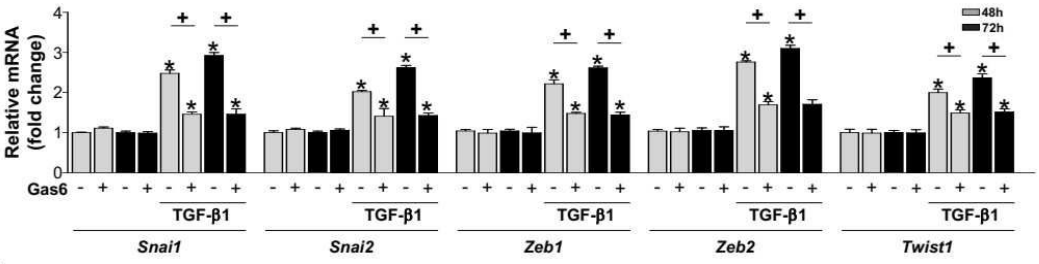
도면63



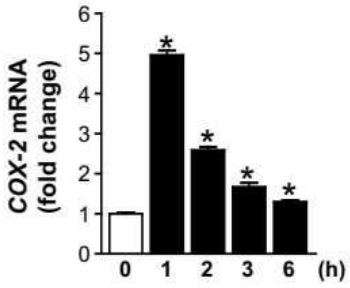
도면64



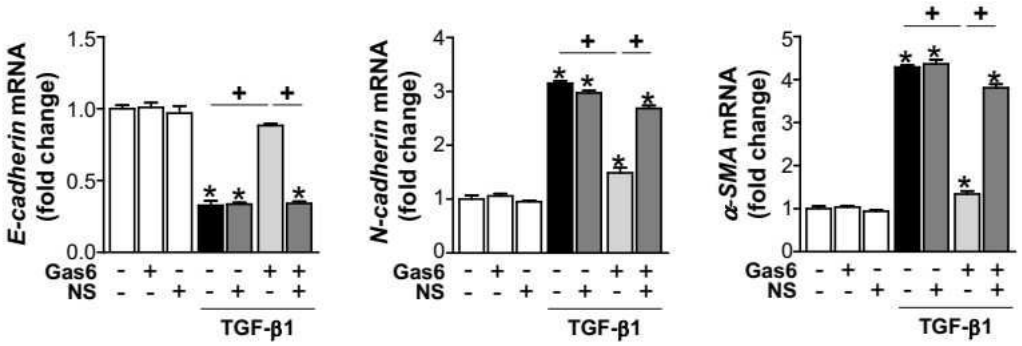
도면65



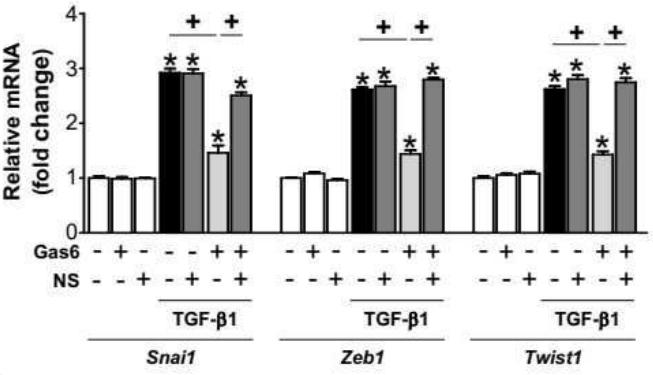
도면66



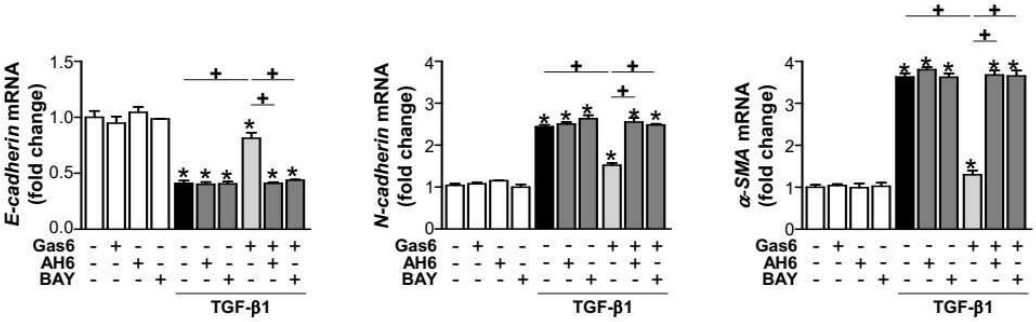
도면67



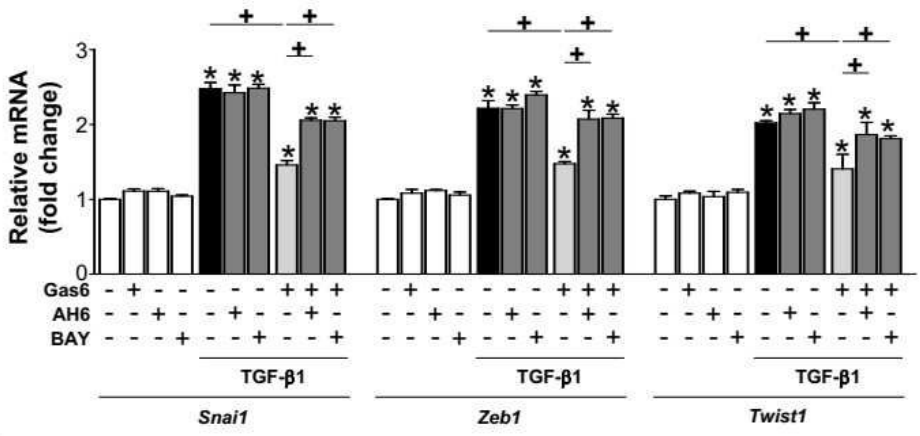
도면68



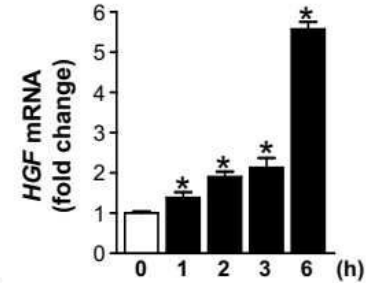
도면69



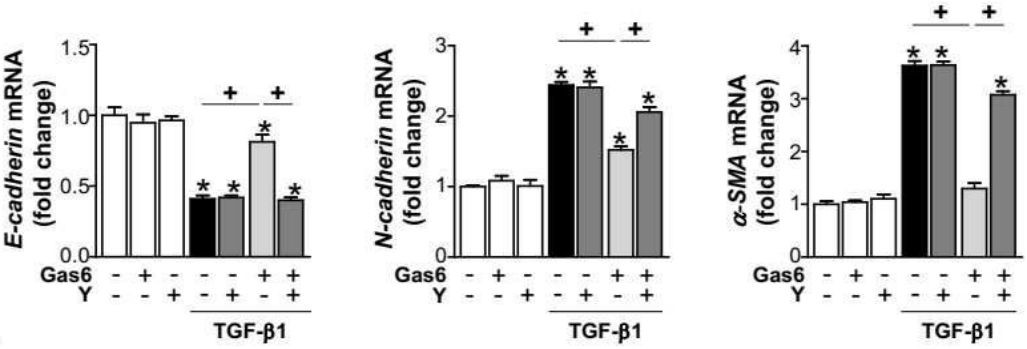
도면70



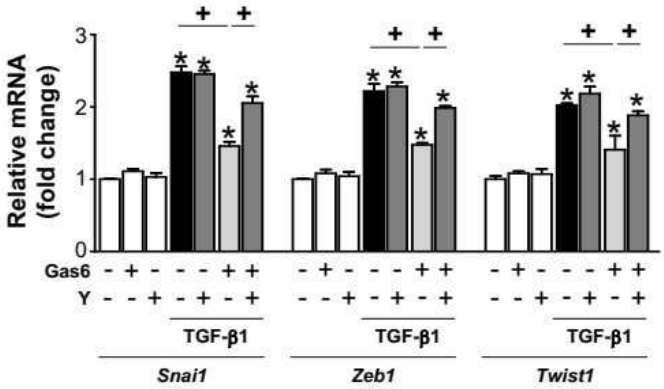
도면71



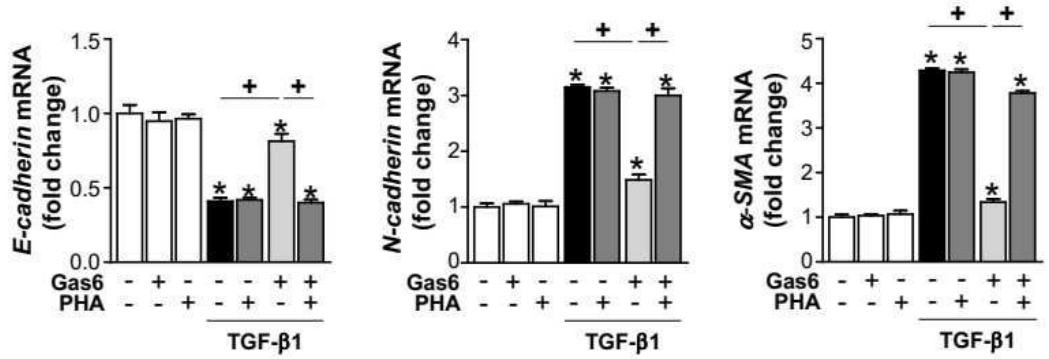
도면72



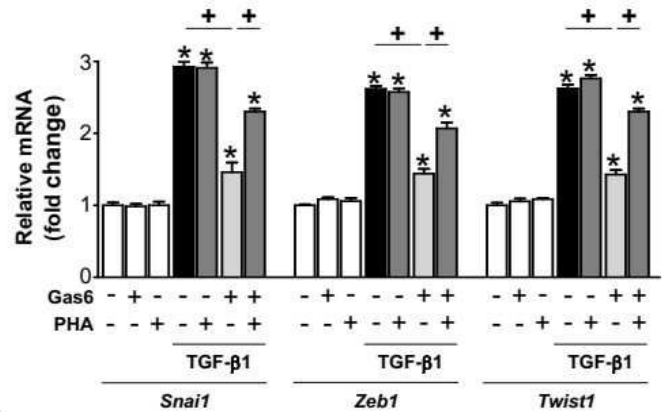
도면73



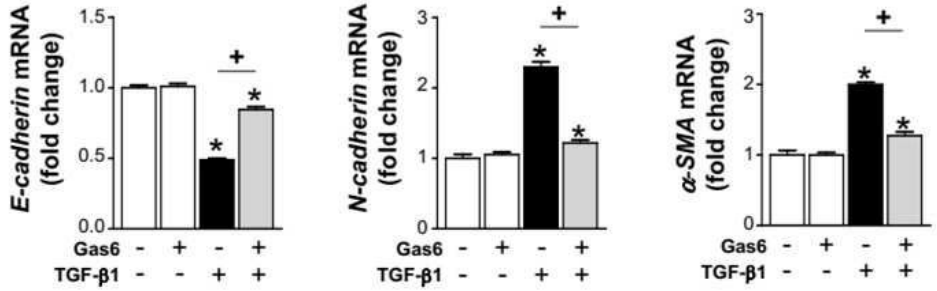
도면74



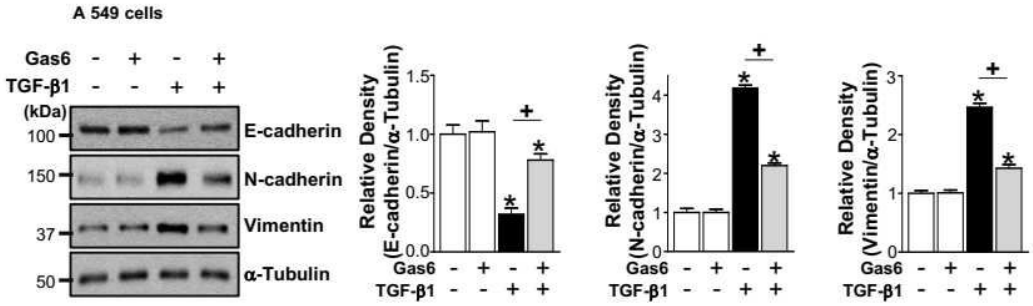
도면75



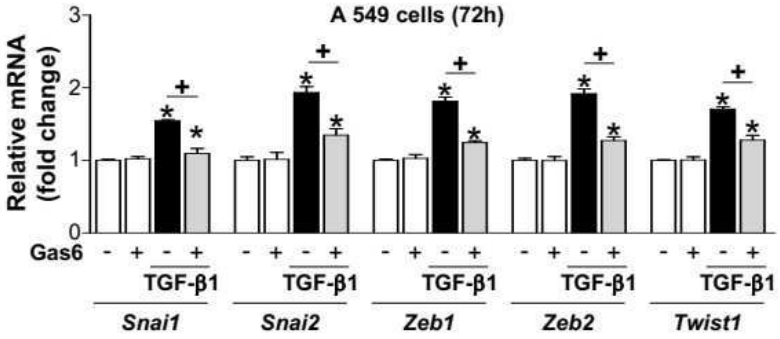
도면76



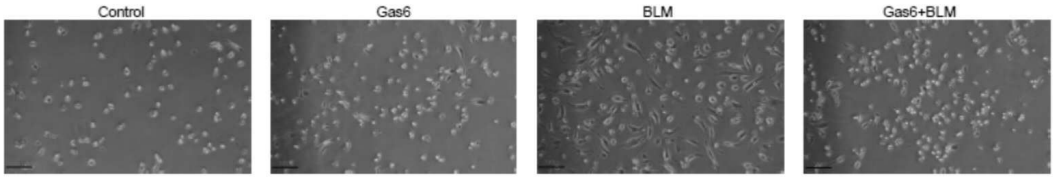
도면77



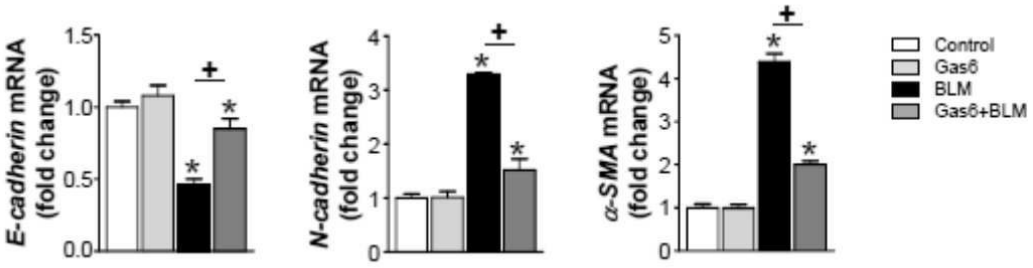
도면78



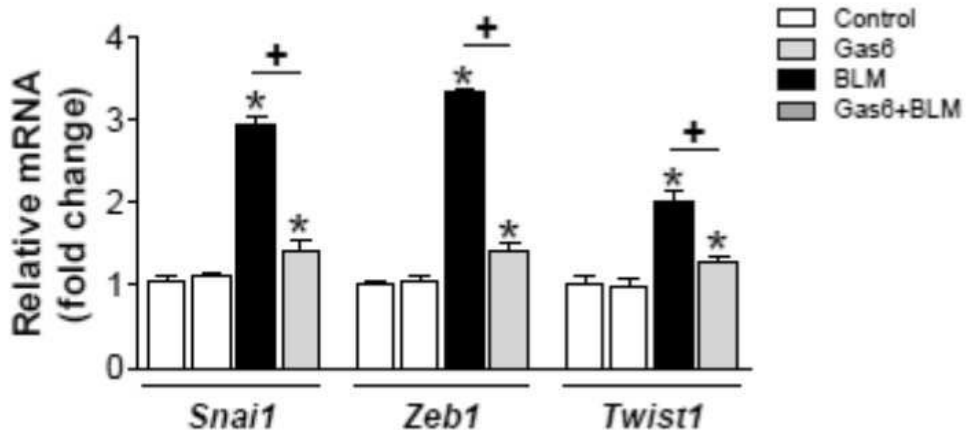
도면79



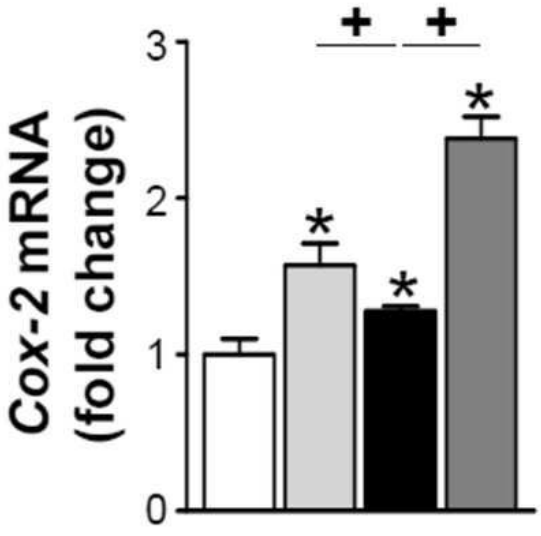
도면80



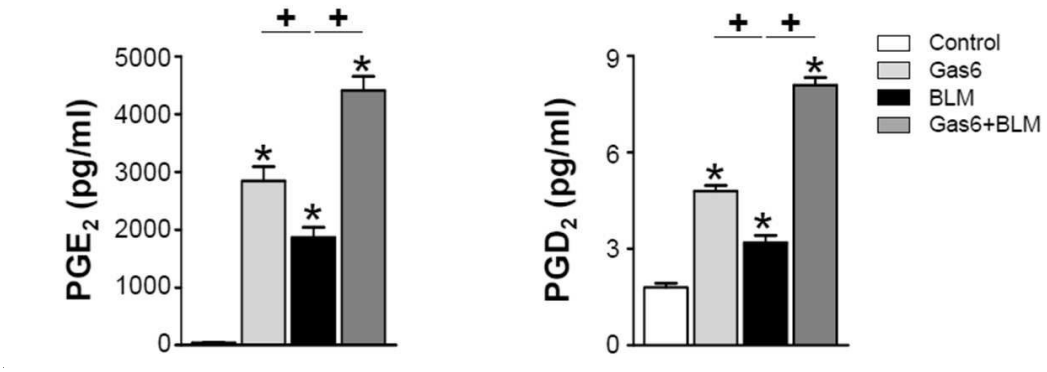
도면81



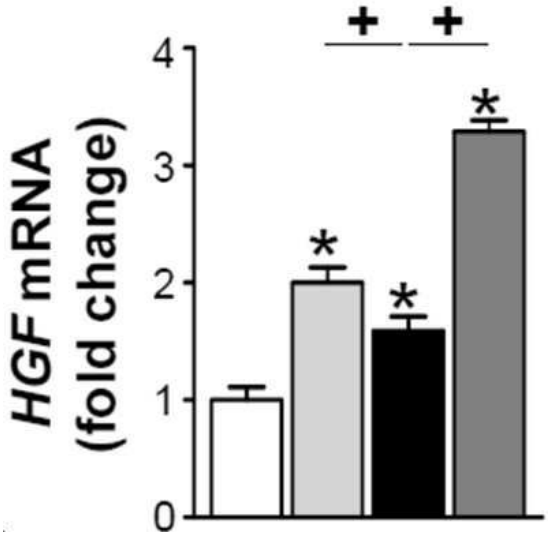
도면82



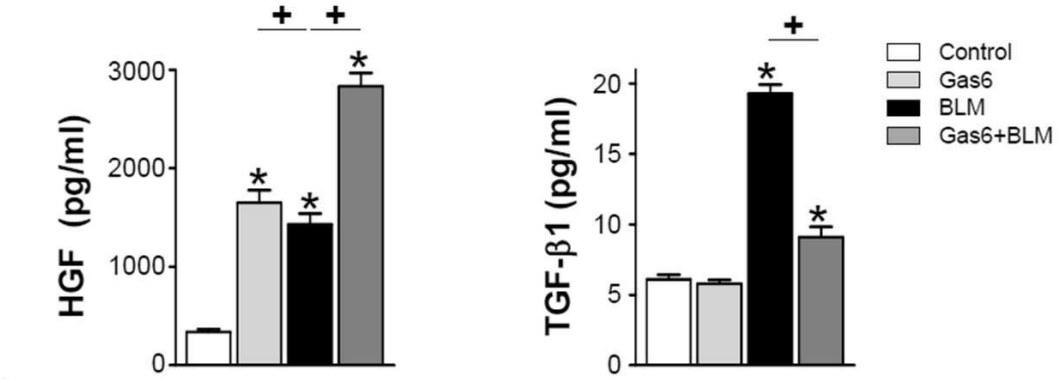
도면83



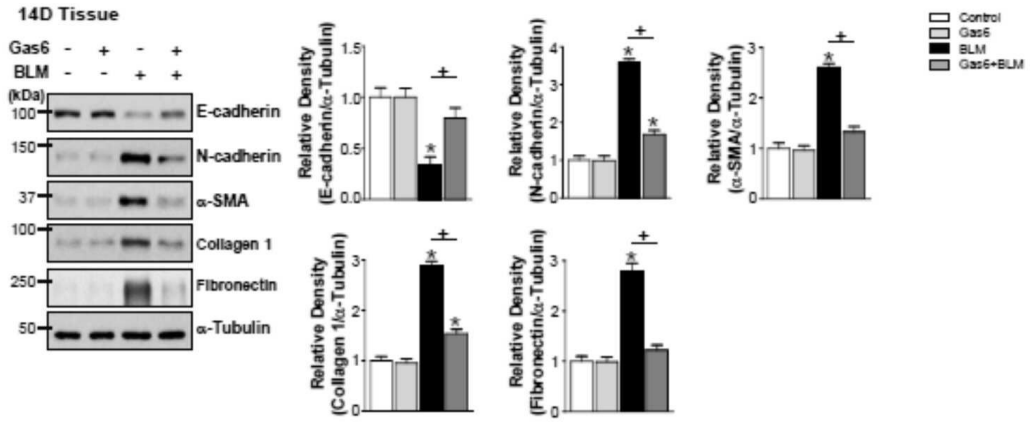
도면84



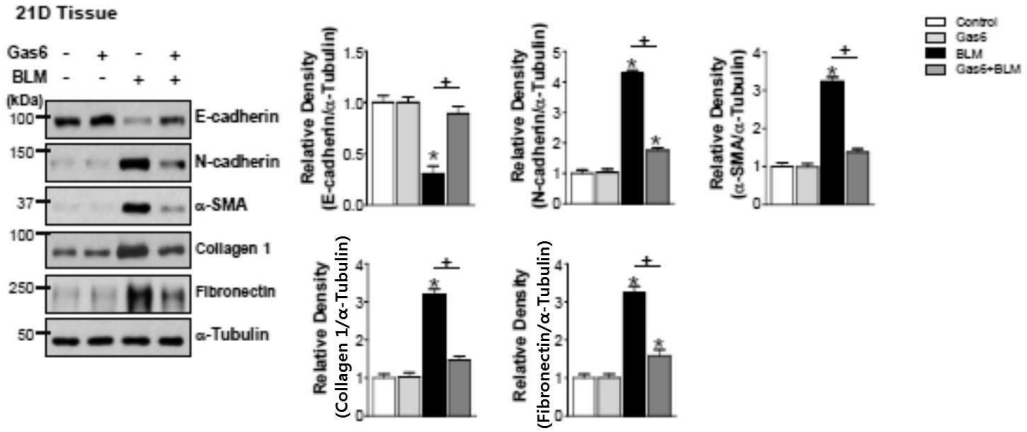
도면85



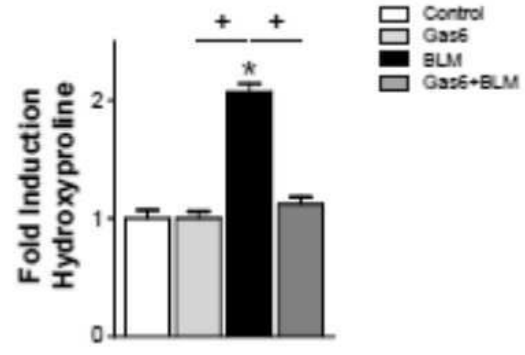
도면86



도면87



도면88



서 열 목 록

<110> EWHA UNIVERSITY - INDUSTRY COLLABORATION FOUNDATION

<120> A composition comprising a Gas6 protein or an receptor activator thereof for preventing or treating fibrosis

<130> P17-066-REA-EWHA

<150> KR 10-2017-0079974

<151> 2017-06-23

<160> 35

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX-2 siRNA-sense

<400> 1

cuaugauagg agcauguaa 19

<210> 2

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX-2 siRNA-antisense

<400> 2

uuacaugcuc cuaucauag 19

<210> 3

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RhoA siRNA-sense

<400> 3

gaagucaagc auuucugucu ua 22

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RhoA siRNA-antisense

<400

> 4

gacagaaaug cuugacuucu u 21

<210> 5

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Axl siRNA-sense

<400> 5

gagauggaca gauccuaga 19

<210> 6

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Axl siRNA-antisense

<400> 6

ucuaggaucu guccaucuc 19

<210> 7

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mer siRNA-sense

<400> 7

cacaguuuua uccugauga 19

<210> 8

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mer siRNA-antisense

<400> 8

ucaucaggau aaaacugug 19

<210> 9

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> control siRNA-sense

<400> 9

ccuacgccac caauuucgu 19

<210> 10

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> control siRNA-antisense

<400> 10

acgaaauugg uggcguagg 19

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> E-cadherin primer-F

<400> 11

gcactcttct cctggtcctg 20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> E-cadherin primer-R

<400> 12

tatgaggctg tgggttcctc 20

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-cadherin primer-F

<400> 13

cctccagagt ttactgccat gac 23

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N-cadherin primer-R

<400> 14

ccaccactga ttctgtatgc cg 22

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> alpha-SMA primer-F

<400> 15

ccaccgcaaa tgcttctaag t 21

<210> 16

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> alpha-SMA primer-R

<400> 16

ggcaggaatg atttggaaag g 21

<210> 17

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Snail primer-F

<400> 17

cccaaggccg tagagctga 19

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Snail primer-R

<400> 18

gcttttgcca ctgtcctcat c 21

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Snai2 primer-F

<400> 19

atcctcacct cgggagcata 20

<210> 20

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Snai2 primer-R

<400> 20

tgccgacgat gtccatacag 20

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Zeb1 primer-F

<400> 21

attcagctac tgtgagccct gc 22

<210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Zeb1 primer-R

<400> 22

cattctggtc ctccacagtg ga 22

<210> 23

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Zeb2 primer-F

<400> 23

gcagtgagca tcgaagagta cc 22

<210> 24

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Zeb2 primer-R

<400> 24

ggcaaaagca tctggagttc cag 23

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Twist1 primer-F

<400> 25

tcgacttcct gtaccaggtc ct 22

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Twist1 primer-R

<400> 26

ccatcttgga gtccagctcg 20

<210> 27

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX-1 primer-F

<400> 27

cgatctggct tcgtgaac 18

<210> 28

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX-1 primer-R

<400> 28

gagctgcagg aaatagcc 18

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX-2 primer-F

<400> 29

gggagtctgg aacattgtga 20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> COX-2 primer-R

<400> 30

gtgcacattg taagtaggtg 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HGF primer-F

<400> 31

caccccttgg gagtattgtg 20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HGF primer-R

<400> 32

gggacatcag tctcattcac 20

<210> 33

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HPRT primer-F

<400> 33

ccagtgtcaa ttatatcttc aac 23

<210> 34

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HPRT primer-R

<400> 34

cagactgaag agctactgta atg 23

<210> 35

<211> 674

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gas6

<400> 35

Met Pro Pro Pro Pro Gly Pro Ala Ala Ala Leu Gly Thr Ala Leu Leu
1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Ala Ser Glu Ser Ser His Thr Val Leu Leu Arg Ala
20 25 30

Arg Glu Ala Ala Gln Phe Leu Arg Pro Arg Gln Arg Arg Ala Tyr Gln
35 40 45

Val Phe Glu Glu Ala Lys Gln Gly His Leu Glu Arg Glu Cys Val Glu
50 55 60

Glu Val Cys Ser Lys Glu Glu Ala Arg Glu Val Phe Glu Asn Asp Pro
65 70 75 80

Glu Thr Glu Tyr Phe Tyr Pro Arg Tyr Gln Glu Cys Met Arg Lys Tyr
85 90 95

Gly Arg Pro Glu Glu Lys Asn Pro Asp Phe Ala Lys Cys Val Gln Asn

100 105 110

Leu Pro Asp Gln Cys Thr Pro Asn Pro Cys Asp Lys Lys Gly Thr His

115 120 125

Ile Cys Gln Asp Leu Met Gly Asn Phe Phe Cys Val Cys Thr Asp Gly

130 135 140

Trp Gly Gly Arg Leu Cys Asp Lys Asp Val Asn Glu Cys Val Gln Lys

145 150 155 160

Asn Gly Gly Cys Ser Gln Val Cys His Asn Lys Pro Gly Ser Phe Gln

165 170 175

Cys Ala Cys His Ser Gly Phe Ser Leu Ala Ser Asp Gly Gln Thr Cys

180 185 190

Gln Asp Ile Asp Glu Cys Thr Asp Ser Asp Thr Cys Gly Asp Ala Arg

195 200 205

Cys Lys Asn Leu Pro Gly Ser Tyr Ser Cys Leu Cys Asp Glu Gly Tyr

210 215 220

Thr Tyr Ser Ser Lys Glu Lys Thr Cys Gln Asp Val Asp Glu Cys Gln

225 230 235 240

Gln Asp Arg Cys Glu Gln Thr Cys Val Asn Ser Pro Gly Ser Tyr Thr

245 250 255

Cys His Cys Asp Gly Arg Gly Gly Leu Lys Leu Ser Pro Asp Met Asp

260 265 270

Thr Cys Glu Asp Ile Leu Pro Cys Val Pro Phe Ser Met Ala Lys Ser

275 280 285

Val Lys Ser Leu Tyr Leu Gly Arg Met Phe Ser Gly Thr Pro Val Ile

290 295 300

Arg Leu Arg Phe Lys Arg Leu Gln Pro Thr Arg Leu Leu Ala Glu Phe

305 310 315 320

Asp Phe Arg Thr Phe Asp Pro Glu Gly Val Leu Phe Phe Ala Gly Gly

325 330 335

Arg Ser Asp Ser Thr Trp Ile Val Leu Gly Leu Arg Ala Gly Arg Leu

340 345 350

Glu Leu Gln Leu Arg Tyr Asn Gly Val Gly Arg Ile Thr Ser Ser Gly

355 360 365

Pro Thr Ile Asn His Gly Met Trp Gln Thr Ile Ser Val Glu Glu Leu

370 375 380

Glu Arg Asn Leu Val Ile Lys Val Asn Lys Asp Ala Val Met Lys Ile

385 390 395 400

Ala Val Ala Gly Glu Leu Phe Gln Leu Glu Arg Gly Leu Tyr His Leu

405 410 415

Asn Leu Thr Val Gly Gly Ile Pro Phe Lys Glu Ser Glu Leu Val Gln

420 425 430

Pro Ile Asn Pro Arg Leu Asp Gly Cys Met Arg Ser Trp Asn Trp Leu

435 440 445

Asn Gly Glu Asp Ser Ala Ile Gln Glu Thr Val Lys Ala Asn Thr Lys

450 455 460

Met Gln Cys Phe Ser Val Thr Glu Arg Gly Ser Phe Phe Pro Gly Asn

465 470 475 480

Gly Phe Ala Thr Tyr Arg Leu Asn Tyr Thr Arg Thr Ser Leu Asp Val

485 490 495

Gly Thr Glu Thr Thr Trp Glu Val Lys Val Val Ala Arg Ile Arg Pro

500 505 510

Ala Thr Asp Thr Gly Val Leu Leu Ala Leu Val Gly Asp Asp Asp Val

515 520 525

Val Pro Ile Ser Val Ala Leu Val Asp Tyr His Ser Thr Lys Lys Leu

530 535 540

Lys Lys Gln Leu Val Val Leu Ala Val Glu Asp Val Ala Leu Ala Leu

545 550 555 560

Met Glu Ile Lys Val Cys Asp Ser Gln Glu His Thr Val Thr Val Ser

565 570 575

Leu Arg Glu Gly Glu Ala Thr Leu Glu Val Asp Gly Thr Lys Gly Gln

580 585 590

Ser Glu Val Ser Thr Ala Gln Leu Gln Glu Arg Leu Asp Thr Leu Lys

595 600 605

Thr His Leu Gln Gly Ser Val His Thr Tyr Val Gly Gly Leu Pro Glu

610 615 620

Val Ser Val Ile Ser Ala Pro Val Thr Ala Phe Tyr Arg Gly Cys Met
625 630 635 640
Thr Leu Glu Val Asn Gly Lys Ile Leu Asp Leu Asp Thr Ala Ser Tyr
645 650 655
Lys His Ser Asp Ile Thr Ser His Ser Cys Pro Pro Val Glu His Ala
660 665 670
Thr Pro