



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0003550
(43) 공개일자 2021년01월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/19 (2006.01) *A61P 15/08* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 38/195 (2013.01)

A61P 15/08 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2019-0079483

(22) 출원일자 2019년07월02일

심사청구일자 2020년10월06일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

국민대학교산학협력단

서울특별시 성북구 정릉로 77 (정릉동, 국민대학교)

(72) 발명자

송권화

충청남도 천안시 동남구 문암1길 68, 105동 1402호

임화선

서울특별시 영등포구 63로 45, 9동 6층 61호

배효철

서울특별시 동대문구 무학로 193, 103호

(74) 대리인

정은열

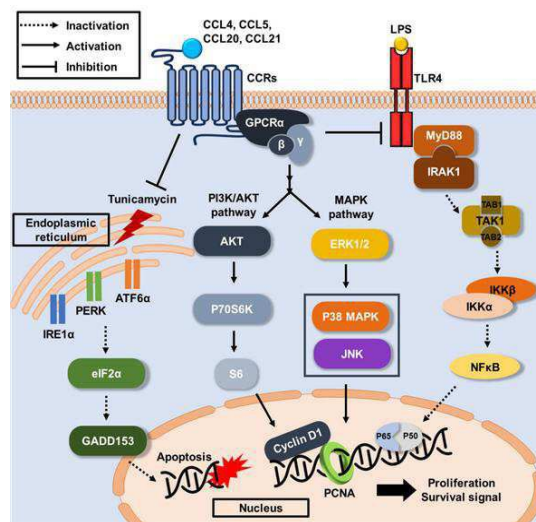
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 CCL4, CCL5, CCL20, 및 CCL21을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 CCL4(C-C motif chemokine ligand 4), CCL5(C-C motif chemokine ligand 5), CCL20(C-C motif chemokine ligand 20), 및 CCL21(C-C motif chemokine ligand 21) 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 CCL4, CCL5, CCL20, 및 CCL21 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 약학적 조성물 및 식품 조성물, CCL4, CCL5, CCL20, 및 CCL21 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 불임증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도11



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018R1C1B6009048
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	신진연구자지원사업
연구과제명	엑소좀 유래 운반 RNA 소편을 이용하여 모체 영양불량에 의한 태반 형성, 태아 프로그래밍의 후성유전학적 기전 규명 및 임신기 영양 평가를 위한 플랫폼 구축
기 여 율	1/1
과제수행기관명	국민대학교
연구기간	2018.03.01 ~ 2021.02.28

청구범위유예 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

CCL4(C-C motif chemokine ligand 4), CCL5(C-C motif chemokine ligand 5), CCL20(C-C motif chemokine ligand 20), 및 CCL21(C-C motif chemokine ligand 21) 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 CCL4, CCL5, CCL20 및 CCL21은 PI3K/AKT 및 MAPK 신호전달기전을 활성화시키는 것을 특징으로 하는 임신촉진용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 CCL4, CCL5, CCL20 및 CCL21은 소포체 스트레스 유도 단백질의 발현을 감소시키는 것을 특징으로 하는 임신촉진용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 소포체 스트레스 유도 단백질은 GRP78, IRE1 α , ATF6 α , p-PERK, p-eIF2 α 및 GADD153로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상인 것을 특징으로 하는 임신촉진용 약학적 조성물.

청구항 5

CCL4(C-C motif chemokine ligand 4), CCL5(C-C motif chemokine ligand 5), CCL20(C-C motif chemokine ligand 20), 및 CCL21(C-C motif chemokine ligand 21) 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 식품 조성물.

청구항 6

CCL4(C-C motif chemokine ligand 4), CCL5(C-C motif chemokine ligand 5), CCL20(C-C motif chemokine ligand 20), 및 CCL21(C-C motif chemokine ligand 21) 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 사료첨가제 조성물.

청구항 7

CCL4(C-C motif chemokine ligand 4), CCL5(C-C motif chemokine ligand 5), CCL20(C-C motif chemokine ligand 20), 및 CCL21(C-C motif chemokine ligand 21) 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 착상 장애에 의한 불임증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

CCL4(C-C motif chemokine ligand 4), CCL5(C-C motif chemokine ligand 5), CCL20(C-C motif chemokine ligand 20), 및 CCL21(C-C motif chemokine ligand 21) 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 착상 장애에 의한 불임증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

CCL4(C-C motif chemokine ligand 4), CCL5(C-C motif chemokine ligand 5), CCL20(C-C motif chemokine ligand 20), 및 CCL21(C-C motif chemokine ligand 21) 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 조성물을

이용하여, 인간을 제외한 포유동물 유래 자궁내막 상피세포의 증식 능력을 향상시키는 방법.

청구항 10

CCL4(C-C motif chemokine ligand 4), CCL5(C-C motif chemokine ligand 5), CCL20(C-C motif chemokine ligand 20), 및 CCL21(C-C motif chemokine ligand 21) 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여, 인간을 제외한 포유동물 유래 영양외배엽 세포의 증식 능력을 향상시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 CCL4(C-C motif chemokine ligand 4), CCL5(C-C motif chemokine ligand 5), CCL20(C-C motif chemokine ligand 20), 및 CCL21(C-C motif chemokine ligand 21) 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 CCL4, CCL5, CCL20, 및 CCL21 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 약학적 조성물 및 식품 조성물, CCL4, CCL5, CCL20, 및 CCL21 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 불임증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 고령화 사회와 함께, 출산을 하는 산모의 나이가 높아지면서 불임이 증가하고 있다. 또한, 산업화로 인한 환경오염과 여성의 사회진출 등으로 인해 여성이 받는 스트레스가 증가하면서, 임신율이 크게 낮아지고 있는 실정이다. 일반적으로 알려진 여성 불임의 원인으로는 배란장애, 수정란의 이송장애 및 착상 장애 등이 있다. 배란장애와 수정란의 이송장애에 의한 불임 문제는 시험관아기시술법(IVF)을 통해 대부분 해결되고 있으나, 착상 장애에 의한 불임은 아직까지 명확한 해결 방법이 없는 실정이다. 성공적인 임신을 유지시키기 위해서는 배아의 발달, 자궁 내막의 발달, 착상, 태반형성, 호르몬 조절, 모체와 태아 간 영양소 및 가스의 교환이 필요시 된다 (Spencer TE et al, Reproduction, 128(6):657-668, 2004).

[0003] 임신 초기 태아는 자궁내막에 착상하기 위해 구형태의 배반포에서 필라멘트 모양으로 형태학적 변화를 겪으며, 성공적인 비침투성 태반을 형성한다(Bazer FW and Johnson GA, Differentiation, 2014).

[0004] 착상 전 기간(perimplantation period) 중 수태산물로부터 분비되는 에스트로젠은 프로스타글란딘 F_{2α}의 분비를 막음으로써 황체용해(luteolysis)를 막고 자궁 내막 조직을 리모델링하여 착상을 위한 자궁 환경을 형성한다(Bazer FW and Johnson GA, Differentiation, 87(1-2):52-65, 2014).

[0005] 착상(implantation)이란, 수정되어 배아로 발달중인 배반포(blastocyst)가 모체의 자궁내막 층에 부착되는 임신 초기의 현상으로, 탈락막화(decidualization)가 유발된 모체의 자궁내막 층과 배아의 세포영양막세포(cytotrophoblast)와의 세포 융합(cell fusion)에 의하여 합포영양막세포(syncytiotrophoblast)를 형성하면서 착상이 이루어지게 된다.

[0006] 한편, 여성 생식기관 내 소포체 스트레스에 의한 세포사멸은 비정상적인 생식기관의 발달과 임신을 방해하는 요소로 작용하는데, 특히 소포체 스트레스는 마우스 내 비정상적 태반 발달을 야기시키고 여성에서는 태아 성장 지연과 임신중독증, 유산을 야기시키는 것으로 알려져 있다(Mizuuchi et al., J Pathol, 2016; Yung et al., Am J Pathol, 2008; Gao et al., Mol Biol Rep, 2012). 따라서, 성공적인 착상을 위해서는 자궁내막 세포가 충분히 증식, 분화, 발달되어야 할 뿐만 아니라 소포체 스트레스를 감소시킬 필요성이 있다.

[0007] 진술한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 자궁내막 세포의 증식성을 향상시키고 동시에 소포체 스트레스를 감소시킴으로써, 임신 초기 착상 효율과 임신 유지 능력을 증진시킬 수 있는 물질을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, CCL4(C-C motif chemokine ligand 4), CCL5(C-C motif chemokine ligand 5), CCL20(C-C motif chemokine ligand 20), 및 CCL21(C-C motif chemokine ligand 21)이 PI3K/AKT와 ERK1/2 MAPK 신호전달 경로를 활성화시켜 자궁내막 세포의 증식을 향상시키고, 소포체 스트레스 유도 단백질의 발현을 감소시키는 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 CCL4(C-C motif chemokine ligand 4), CCL5(C-C motif chemokine ligand 5), CCL20(C-C motif chemokine ligand 20), 및 CCL21(C-C motif chemokine ligand 21) 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 본 발명은 또한, CCL4, CCL5, CCL20, 및 CCL21 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 본 발명은 또한, CCL4, CCL5, CCL20, 및 CCL21 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 불임증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 본 발명은 또한, CCL4, CCL5, CCL20, 및 CCL21 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 불임증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0012] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 이용하여 자궁내막 세포의 증식 능력을 향상시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명은 CCL4(C-C motif chemokine ligand 4), CCL5(C-C motif chemokine ligand 5), CCL20(C-C motif chemokine ligand 20), 및 CCL21(C-C motif chemokine ligand 21) 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 또한, CCL4, CCL5, CCL20, 및 CCL21 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 임신촉진용 식품 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명은 또한, CCL4, CCL5, CCL20, 및 CCL21 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 불임증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명은 또한, CCL4, CCL5, CCL20, 및 CCL21 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 불임증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 또한, 상기 조성물을 이용하여 자궁내막 세포의 증식 능력을 향상시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명에 따른 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21를 포함하는 조성물은 내분비 물질로 체내 독성 내지 부작용의 문제가 없으며, 성장인자 및 호르몬 혼합 조성물 제작이 가능한 장점이 있다. 특히, CCL4, CCL5, CCL20, CCL21 수용체 (CCR3, CCR5, CCR6, CCR7)의 발현이 임신 초기 착상 기간에 증가함에 따라 착상효율 증대와 밀접한 연관이 있을 것으로 확인된다. 본 발명에서 사용된 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21 조성물의 자궁내막 상피세포 증식 향상 및 소포체 스트레스에 의한 세포사멸 양상 완화에 대한 효과는 세포 증식에 관여하는 PI3K/AKT, MAPK 신호전달기전 및 소포체 스트레스 센서 단백질(GADD153, IRE1 α , ATF6 α , p-PERK, p-eIF2 α 및 GRP78)의 발현 불활성화를 통해서 확인된다. 본 발명에서 사용된 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21 조성물의 자궁내막 상피세포 염증 완화 효과 확인에는 TLR4 신호전달 단백질(p-NF- κ B, p-IKK α/β , p-IRAK4, p-TAK1 및 MyD88)의 발현 불활성화를 통해서 확인된다. 케모카인리간드가 세포 내 신호전달시 통과하는 CCR5를 길항제(antagonist)를 사용하여 억제할 경우 세포증식 관련 신호전달경로인 PI3K, MAPK 경로가 불활성화되며 자궁내막 상피세포의 증식이 감소된다. 본 발명에서 사용된 CCL4 조성물은 자궁내막 상피세포와 영양막세포 사이 상호작용을 증진시키며 transwell migration assay와 cell migration assay를 통해 수태산물의 착상시 발생하는 이주능력을 향상시키고 착상관련 유전자들의 발현을 증가시킨다. 따라서 본 발명에 따라 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21을 포함한 조성물은 임신 초기 돼지의 자궁내막상피세포와 영양막세포의 증식, 세포 이주 개선시키며, 소포체 스트레스와 염증을 조절하여 자궁 수용력과 착상률을 향상시켜 임신 효율 및 그 가능성을 증가시킴으로서 기능성 임신 촉진 조성물로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 발정주기, 임신기 동안 돼지 자궁 내막에서 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21 발현 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 발정주기, 임신기 동안 돼지 자궁 내막에서 케모카인리간드 수용체의 발현 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 3은 케모카인리간드에 의한 임신 초기 자궁내막 내강상피세포, 영양외배엽세포의 증식 양상 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 케모카인리간드에 의한 임신 초기 자궁내막 내강상피세포, 영양외배엽세포의 세포주기 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 pLE, pTr 세포 내 케모카인리간드에 의한 세포증식 관련 단백질의 활성 양상 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 PI3K, MAPK 억제제와 CCL21의 혼합조성물에 의한 pLE, pTr세포 내 세포증식, 단백질 인산화효소 발현 변화 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 pLE, pTr세포에서 소포체 스트레스 유도과 CCL21의 효과 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 임신 초기 pTr, pLE 세포 내 염증 유도와 케모카인리간드에 의한 항염증 효과 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 CCL4에 의한 모체-태아 간 상호작용 향상 효과 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 CCR5 길항제에 의한 pLE 세포 내 증식 및 신호경로 변화 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 CCL4, CCL5, CCL20, 및 CCL21의 작용 기전을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0022] 본 발명자들은 임신 초기 자궁내막 발달 및 임신능력을 증진시킬 수 있는 물질을 발굴하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 in vitro 실험을 통해 돼지의 자궁내막에서 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21과 그 수용체인 CCR3, CCR5, CCR6, CCR7 의 발현이 임신초기 착상 기간에 증가하는 것을 확인하였다. 이를 바탕으로 호르몬, 성장인자, 영양물질 등 다양한 조직 영양소에 따른 모체-배아 간 상호작용을 통해 상피용모막태반을 형성하기 위한 비침습적 착상과정을 연구하는데 있어 유용한 in vitro 모델인 돼지의 자궁내막상피 세포와 영양막세포를 이용하였으며 케모카인리간드 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21이 세포증식 관련 신호전달 메커니즘 및 세포 주기를 조절하여 자궁내막상피세포의 증식 증가시킴을 확인하였으며, 이들이 소포체 스트레스와 LPS에 의한 염증에 대해 완화효과를 가지고 있는 것을 확인하였다. 또한 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21은 영양막세포의 세포증식을 증가시켰으며, 자궁내막세포와 영양막세포의 세포이주 능력을 향상시키는 것을 확인하였다. 뿐만 아니라, 네가지 케모카인리간드가 자궁내막세포와 영양막세포에 임신관련 유전자의 발현을 증가시키는 것을 확인하였다.

[0024] 본 발명은 CCL4, CCL5, CCL20 및 CCL21 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 임신 초기 돼지 자궁내막 상피세포와 영양외배엽 세포의 발달 촉진용 조성물을 제공한다.

[0025] 또한, 본 발명은 CCL4, CCL5, CCL20 및 CCL21 중 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 임신 초기 돼지 자궁내막 상피세포와 영양외배엽 세포의 발달 촉진용 배합 사료 조성물을 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 임신 초기 착상 전 돼지의 자궁내막 상피세포와 영양외배엽 세포에 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21 함유 조성물을 이용하여 타겟 세포의 증식과 세포 이주능력을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명은 임신기 내/외부 요인에 의한 소포체 스트레스-유발 임신성 질환(전치태반, 자궁 내 성장제한, 태아성장제한, 임신성 고혈압, 조산, 사산 등)을 완화시키기 위한 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21 기반 조성물을 제공한다.

[0028] 또한, 본 발명은 임신기 내/외부 요인에 의한 염증 유발 임신성 조산 및 질환을 완화시키기 위한 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21 기반 조성물을 제공한다.

[0029] 또한, 본 발명은 임신 전(수정 전) 또는 임신 초기 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21를 포함한 조성물을 통해 자궁 내막 발달, 착상효율 증진, 태반형성을 향상시키는 방법을 제공한다.

[0030] 본 발명은 상기 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21에 의해 돼지의 자궁내막 상피 세포의 증식을 향상시키는 것은 세포의

증식과 연관된 PI3K/AKT, MAPK 기전을 활성화 시키는 것을 특징으로 한다.

[0031] 본 발명에서 임신 초기 소포체 스트레스를 완화시키는 것은 소포체 스트레스 센서인 GRP78, IRE1 α , ATF6 α , p-PERK, p-eIF2 α 및 GADD153을 매개로 야기되는 것을 특징으로 한다.

[0032] 본 발명에서 임신 중 염증을 완화시키는 것은 LPS에 의해 자극된 TLR4 신호전달 경로인 p-NF- κ B, p-IKK α/β , p-IRAK4, p-TAK1 및 MyD88의 증가를 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21를 추가적으로 처리함에 따라 감소시키는 것을 특징으로 한다.

[0034] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0035] **실시예**

[0036] **<실험 방법>**

[0037] 실험동물 및 세포배양

[0038] 수정 이 후 12일째 되는 임신한 암태지로부터 수태산물, 자궁내막 내강상피세포를 분리하였으며 이로부터 자궁내막 상피 세포주를 레트로바이러스 (SV40) vector를 이용하여 불멸화 동정하였으며, 동일한 수태산물로부터 영양막세포도 동정하여 DME/F12 1:1 배지에 10%의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)과 항생제인 ZellShield를 함께 혼합하여 일차배양하였으며, 자궁내막 상피세포의 경우, 형태학적 분석과 상피세포 특이 항체인 시토허라틴에 염색되는 것을 확인하였다.

[0040] 실험 재료

[0041] 케모카인리간드 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21 재조합단백질 R&D systems로부터 구매하여 사용하였으며, 케모카인리간드에 의한 신호전달메커니즘을 확인하기 위하여 phospho-AKT, ERK1/2, P70S6K, JNK, S6, P38, Cyclin D1, NF- κ B, IKK α/β , IRAK4, TAK1, MyD88 단백질 및 total-AKT, ERK1/2, P70S6K, JNK, S6, P38, Cyclin D1, NF- κ B, IKK α/β , IRAK4, TAK1 단백질을 Cell Signaling Technology사로부터 구매하였다. phospho-PERK, total-PERK, ATF6 α , GRP78 단백질에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology사로부터 구매하였다. 또한 타겟 신호전달과정을 억제함에 따른 효과를 규명하기 위하여 PI3K 억제제인 wortmannin을 Cell Signaling Technology사로부터, ERK1/2 억제제인 U0126, JNK 억제제인 SP600125를 Enzo Life Science사로부터 구매하여 사용하였다.

[0043] Quantitative RT-PCR

[0044] 임신 초기와 발정주기의 자궁내막 조직으로부터 합성한 cDNA를 대상으로 quantitative RT-PCR을 수행하였음. 프라이머는 Primer 3 프로그램을 이용하여 약 80-150 bp로 디자인하였으며, SYBR green (Sigma-Aldrich)을 이용한 real-time PCR 검출 시스템 (Applied Biosystems)을 실시함. 각 유전자 및 GAPDH 유전자의 분석은 세 번에 걸쳐서 반복 수행되었으며 발현량을 확인하기 위해 표준 곡선 및 Ct 값을 GAPDH 유전자의 발현량으로 표준화시켜 분석함. PCR 조건: 94℃, 3분 (변성 단계) 및 40 사이클 (94℃, 20초-변성; 60℃, 40초-어닐링; 72℃, 1분-연장하는 것으로 구성된 사이클)을 실시하는 단계. 온도가 10초 당 0.5℃의 속도로 55℃에서 95℃까지 증가시켜 연속적인 형광 측정을 획득함으로써 용해곡선 프로그램 분석을 실시함. Ct 값에 의해 얻어진 용해곡선에 따라 quantitative RT-PCR 산물을 동정하였고 상대적인 유전자 발현양상을 $2^{-\Delta \Delta Ct}$ 방법에 따라 분석하였다.

[0046] 세포증식 분석

[0047] 96-well plate에 세포를 3×10^3 cells/well로 분주하여 배양한 다음 serum-free DME/F12 1:1 medium으로 24시간 동안 배양하여 starvation을 진행한 다음 유용물질을 처리하고 48시간을 배양하여 10 μ M BrdU를 첨가해 2시간 배양한 뒤 Cell Proliferation ELISA, BrdU kit (Cat No. 11647229001, Roche)를 사용하여 세포 증식 정도를

확인하였다.

[0049] 세포주기 분석

[0050] 임신 초기 자궁내막 상피세포(pLE), 영양외배엽세포(pTr)를 6-well plate에 배양하여 serum-free DME/F12 1:1 medium 배지로 24시간동안 starvation을 진행하고 농도 의존적으로 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21를 처리하여 48시간 동안 배양한 뒤 세포를 원심분리 하여 모아주고 0.1% BSA-PBS로 세포를 두 차례 씻어주고 70% 에탄올로 4℃에서 24시간동안 세포 고정을 해준 다음 세포를 원심분리 하여 모아주고 0.1% BSA-PBS로 세포를 두 차례 씻어주고 RNase A (Sigma-Aldrich)가 100 µg/mL 포함 된 propidium iodide (PI; BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)으로 빛이 들어오지 않는 조건에서 30분 동안 염색한 뒤 Cytometer (BD Biosciences)를 이용하여 형광을 측정하였으며, 각 세포 주기의 변화를 관찰하였다.

[0052] 단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

[0053] pTr, pLE세포에 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21 또는 세포신호전달 억제제와의 혼합물을 처리한 다음 세포로부터 전체 단백질을 추출하여 Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 단백질을 정량하였다. 이 후, 추출한 단백질을 95℃에서 5분간 변성하였으며 10% SDS/PAGE 젤을 이용하여 전기영동 수행한 뒤, nitrocellulose membrane으로 옮겨주고, 1차 항체와 2차 항체를 차례로 인큐베이션 시킨 다음 chemiluminescence detection (SuperSignal West Pico, Pierce, Rockford, IL, USA) 시약을 사용하여 ChemiDoc EQ system과 Quantity One software (Bio-Rad) 기기를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다.

[0055] Transwell migration assay

[0056] Serum-free DME/F12 1:1 배지에 100ml당 1×10^5 cells의 자궁내막 상피세포 또는 영양외배엽세포를 Transwell inserts (Corning, Inc., Corning, NY, USA)에 배양하여 각 well에 농도 의존적으로 CCL4를 처리 하고 6시간 추가 배양한 뒤, 하부 membrane으로 이동한 세포를 관찰 하기 위해 10분 동안 메탈올에서 고정시키고, hematoxylin (HHS32, Signal-Aldrich, Inc)을 사용하여 30분 동안 염색하였다. membrane을 UPW로 3차례 세척한 뒤 슬라이드 위에 membrane을 올리고 DM3000 (Leica) 현미경을 이용해 세포를 관찰하였다.

[0058] Cell migration assay

[0059] 본 실험결과 Ibidi migration culture dish (Ibidi, Germany)에 70ml당 2×10^5 cells의 자궁내막상피세포 또는 영양외배엽세포를 각 well에 배양하여, well에 100%까지 배양한뒤, 24동안 serum free-medium 조건에서 추가 배양하여 culture insert를 제거하고 500 µM의 추가 공간을 확보한다. 농도 의존적인 CCL4가 포함된 배지에서 12시간을 배양한뒤, DM3000 (Leica) 현미경을 이용해 세포를 관찰한다.

[0061] 통계분석

[0062] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0064] <결과 및 고찰>

[0065] 발정주기 및 임신 초기 동안 돼지 자궁내막에서 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21과 그 수용체의 발현 변화 분석

[0066] 돼지의 발정주기 및 임신 초기 동안 자궁내막 조직을 대상으로 케모카인리간드와 그 수용체 CCL4-CCR5, CCL5-CCR3, CCL20-CCR6, CCL21-CCR7와 그 수용체의 mRNA 발현 양상을 확인하기 위해 실시간 PCR을 수행하였으며, 비임신기와 비교하였을 때 그 발현이 임신 초기에서 증가하는 것을 확인하였다. 이는 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21과 그 수용체가 임신기에 중요한 역할을 한다는 것을 증명한 결과이다 (도면 1, 2).

- [0068] 임신 초기 돼지 자궁내막 상피, 영양외배엽 세포의 증식에 케모카인리간드가 미치는 영향
- [0069] 임신 초기 돼지 자궁내막 내강상피세포(pLE), 수태산물의 영양외배엽세포(pTr)를 대상으로 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21을 처리하여 세포증식 분석을 진행한 결과, 자궁내막 내강상피세포, 영양외배엽세포의 증식이 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21의 처리량에 비례하여 함께 증가하는 것을 확인하였다 (도면 3).
- [0070] 뿐만 아니라 세포주기 분석에서 G2/M 기를 유의적으로 증가시키는 것을 확인하였다 (도면 4).
- [0072] 케모카인리간드의 용량의존적 투여에 따른 자궁내막 상피세포, 영양외배엽세포 내 신호전달기전 변화 분석
- [0073] CCL4, CCL5, CCL20, CCL21 재조합단백질의 용량의존적 투여 결과에 따라 임신 초기 자궁내막 내강상피세포 (pLE), 영양외배엽세포(pTr)로부터 단백질을 추출하여 세포증식 및 세포주기조절 단백질인 PDNA, Cyclin D1과 세포증식관련 신호전달기전인 PI3K, MAPK 메커니즘의 주요 신호전달매개 단백질인산화효소 AKT, P70S6K, S6, ERK1/2, JNK, P38의 인산화 양상 모두 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21을 인큐베이션 하였을 때 대조군에 비해 증가하는 양상을 나타내는 것으로 확인하였다 (도면 5).
- [0075] PI3K/AKT, MAPK 신호전달경로 억제시 케모카인리간드에 의한 세포 증식 및 단백질 활성화 조절 양상 분석
- [0076] 임신 초기 돼지 자궁내막 내강상피세포, 영양외배엽세포 내 케모카인리간드에 의한 PI3K, MAPK 신호전달경로 조절양상을 확인하기 위하여 PI3K 억제제 wortmannin과 ERK1/2 억제제 U0126, JNK 억제제 SP600125, P38 억제제 SB203580을 먼저 인큐베이션 시켜 타겟 신호전달기전을 억제시킨 이 후, 케모카인리간드 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21을 추가적으로 처리함에 따라 케모카인리간드에 의해 활성화 되었던 세포증식과 AKT, P70S6K, S6, ERK1/2, JNK, P38단백질의 인산화가 감소하는 것을 확인하였다 (도면 6, 대표그림 CCL21대상).
- [0078] 케모카인리간드가 자궁내막 상피세포의 소포체 스트레스에 미치는 영향 분석
- [0079] 자궁내막 내강상피세포, 영양외배엽세포를 대상으로 소포체 스트레스 유도물질인 튜니카마이신(tunicamycin)을 처리한 결과, 세포 증식이 감소하였으나 튜니카마이신과 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21 혼합물에서 다시 70%이상으로 세포증식 감소가 회복되는 것을 확인하였다 (도면 7, 대표그림 CCL21대상). 또한, 소포체 스트레스 유발 시에 발현되는 GRP78, IRE1 α , ATF6 α , p-PERK, p-eIF2 α 및 GADD153 단백질의 발현이 증가하였다가, 튜니카마이신과 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21 혼합물에서 다시 감소되는 것을 확인하였다. 소포체 스트레스 유발시 자궁내막 세포, 영양외배엽세포의 사멸이 발생되며 케모카인리간드를 추가적으로 처리하였을 때 완화되는 양상을 나타내었다. 이는 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21가 임신 초기 자궁내막 상피세포에서 소포체 스트레스를 감소시키며 세포 사멸을 억제하고 세포 증식을 유도한다는 것을 확인한 결과이다.
- [0081] 케모카인리간드가 임신 초기 모체-태아 간 상호작용 내 항염증 효과 분석
- [0082] 임신 초기 모체-태아 간 상호작용 분석 시 pLE, pTr세포를 대상으로 염증 유도물질인 LPS(lipopolysaccharide)를 처리한 결과, TLR4 수용체 하위 염증 단백질인 NF- κ B, IKK α/β , IRAK4, TAK1 및 MyD88 단백질의 인산화 및 활성화가 증가하였다가, LPS와 CCL4, CCL5, CCL20, CCL21 혼합물에서 다시 감소되는 것을 확인하였다 (도면 8, 대표그림 CCL5대상).
- [0084] CCL4가 임신 초기 모체-태아 간 상호작용 증진을 위해 세포 간 이동성 증진 및 착상관련 유전자 변화 양상 분석
- [0085] 영양외배엽세포를 대상으로 CCL4를 용량 의존적으로 처리하였을 때, 50 ng의 농도에서 160%까지 세포증식이 증가하는 것을 확인하였다. 영양외배엽세포와 자궁내막상피세포를 대상으로 CCL4를 처리하였을 때, 세포 이동능력이 영양막세포에서는 10 ng 농도에서 150%까지 증가하는 것을 확인하였으며, 자궁내막상피세포에서는 50 ng의 CCL4 농도에서 300%이상 증가하는 것을 확인하였다. 또한 영양막세포와 자궁내막상피세포를 Ibidi migration culture dish 에 배양하여 CCL4를 농도 의존적으로 처리하였을 때, 100 ng의 CCL4 농도에서 영양막세포와 자궁

내막세포 사이에 넓이가 70%까지 감소하는 것을 확인하였다. 이는 곧 CCL4에 의한 모체-태아 간 상호작용 증가로 각 세포가 서로를 향해 이동하는 양상을 나타낸다. 착상 및 임신 초기 발현이 증가하는 유전자를 대상으로 정량적 PCR을 수행한 결과, 자궁내막상피세포와 영양외배엽세포에 CCL4를 처리하였을 때, 용량 의존적으로 *ADIPOR1*, *ADIPOR2*, *EGFR*, *FGFR1*, *VEGFR*의 mRNA 발현이 증가하는 것을 확인하였다 (도면 9).

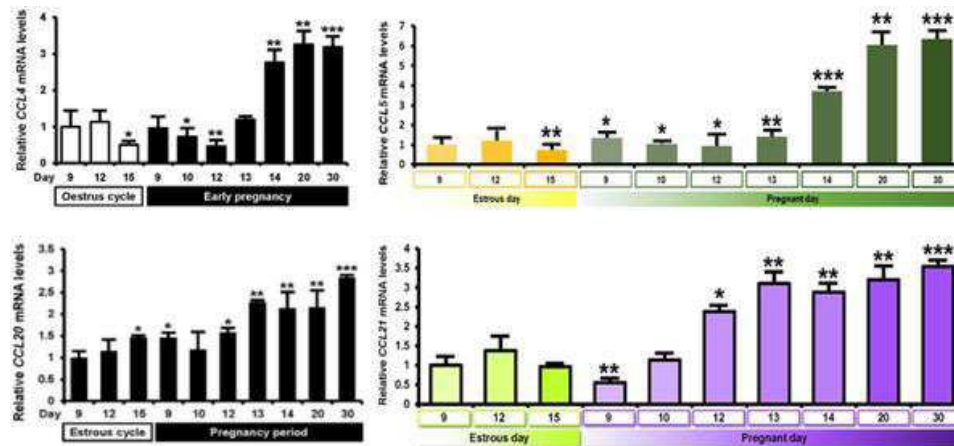
[0087] 케모카인리간드와 수용체 길항제에 의한 자궁내막 상피세포 증식 변화 분석

[0088] 임신 초기 자궁내막 상피세포 내 CCL4에 의하여 증가하였던 세포 증식 양상은 CCL4와 상호작용하는 CCR5 길항제를 사용하여 CCR5를 차단하였을 때 그 효과가 감소하는 양상을 나타내었다 (도면 10A). 뿐만아니라 CCL4에 의해 활성화되었던 PI3K, MAPK 신호전달경로 역시 CCR5 길항제에 의해 Control 그룹과 같이 기저레벨로 떨어지는 양상을 확인함에 따라 케모카인리간드는 각 수용체를 통해 임신 초기 자궁내막 상피세포 내로 신호를 전달하며 착상 촉진 및 임신을 유지한다는 사실을 검증하였다 (그림 10B-G).

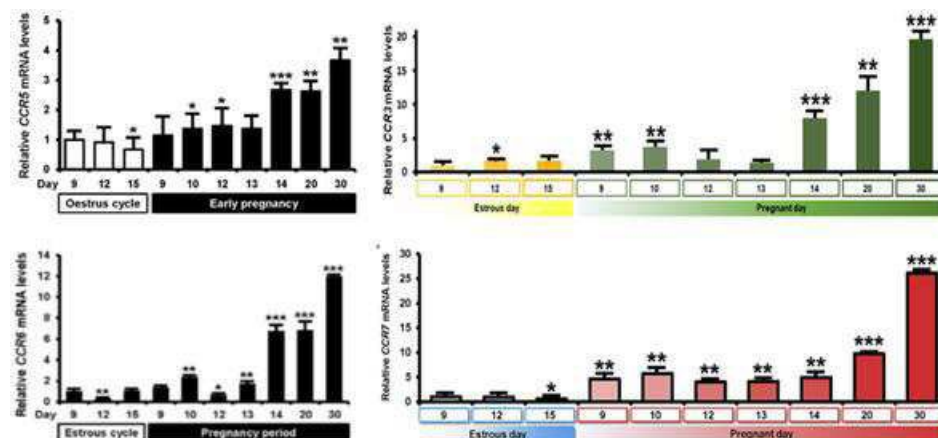
[0090] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시태양일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

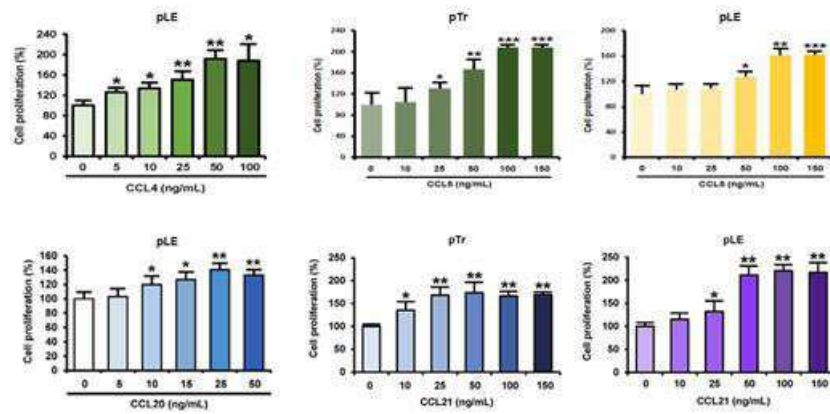
도면1



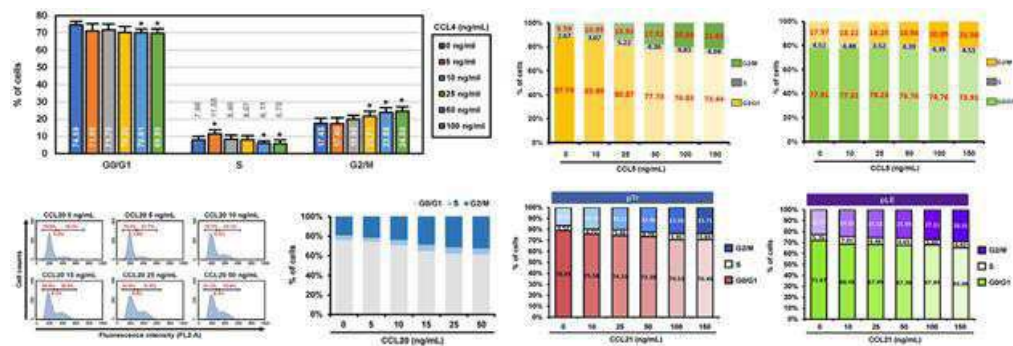
도면2



도면3



도면4



도면5

