

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2016년 11월 10일 (10.11.2016)



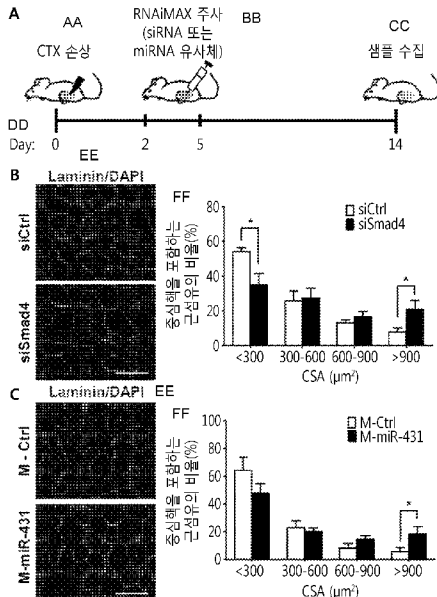
(10) 국제공개번호
WO 2016/178519 A1

- (51) 국제특허분류: A61K 48/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/004718
- (22) 국제출원일: 2016년 5월 4일 (04.05.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보: 10-2015-0063399 2015년 5월 6일 (06.05.2015) KR
- (71) 출원인: 한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 권기선 (KWON, Ki Sun); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 이광표 (LEE, Kwang Pyo); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 김선영 (KIM, Seon Young); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 권은수 (KWON, Eun Soo); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR). 신여진 (SHIN, Yeo Jin); 34141 대전시 유성구 과학로 125, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 손민 (SON, Min); 06302 서울시 강남구 양재대로 163 6층 한얼국제특허사무소, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[다음 쪽 계속]

(54) Title: COMPOSITION FOR INHIBITING MUSCLE AGING OR TREATING MUSCLE AGING RELATED DISEASES

(54) 발명의 명칭 : 근육 노화 억제용 또는 근육 노화 관련 질환 치료용 조성물



AA ... CTX damage
BB ... RNAiMAX injection (siRNA or miRNA mimic)
CC ... Sample collection
DD ... Day
EE ... Laminin/DAPI
FF ... Ratio of muscular fibers including central core (%)

(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for preventing or treating muscle aging related diseases, containing, as an active ingredient, miR-431 or a mimic thereof. In addition, the present invention relates to a cell therapeutic agent for treating muscle aging related diseases, containing miR-431 or a mimic thereof, and myoblasts, all of which are active ingredients. The present invention can inhibit muscle aging and treat muscle aging related diseases.

(57) 요약서: 본 발명은 miR-431 또는 이의 유사체(mimic)를 유효성분으로 포함하는 근육 노화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 miR-431 또는 이의 유사체, 및 근원세포를 유효성분으로 포함하는 근육 노화 관련 질환 치료용 세포치료제에 관한 것이다. 본 발명은 근육의 노화를 억제하고 근육 노화 관련 질환을 치료할 수 있다.



ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

— 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를
접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙
48.2(h))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

명세서

발명의 명칭: 근육 노화 억제용 또는 근육 노화 관련 질환 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 miR-431 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 근육 노화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 miR-431 또는 이의 유사체, 및 근원세포 또는 분화능이 증대된 근원세포를 유효성분으로 포함하는 근육 노화 관련 질환 치료용 세포치료제에 관한 것이다. 더 나아가, 본 발명은 상기 miR-431 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 노화된 근육 재생용 조성물, 근육 노화 억제용 조성물, 및 노화된 근육의 체외 근원세포 분화 촉진용 조성물에 관한 것이다. 또한, 근원세포의 miR-431 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 노화된 근원세포의 근육 분화능을 측정하는 방법, 및 miR-431의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는 노화된 근원세포의 근육 분화능 측정용 키트에 관한 것이다.

[2]

배경기술

- [3] 골격근은 근육의 노화 과정에서 근육의 부피와 기능이 감퇴하는 현상을 보이며, 이는 노화성 근감소증(age-related sarcopenia)이라고도 부른다(Narici and Maffulli 2010). 특히, 위성세포라고도 알려진 성인 근육 줄기 세포가 나이가 들어감에 따라 그 수가 점차 감소하며 분화능 역시 감소하는 것으로 알려져 있다(Brack et al. 2005; Shefer et al. 2006; Collins et al. 2007).
- [4] 지금까지의 근육 분화 및 재생에 관한 연구는 주로 MyoD, Mef2, Myogenin과 같은 근원성 조절 인자(myogenic regulatory factors, MRFs)의 조절에 관해 이루어졌다(Sabourin and Rudnicki 2000; Sartorelli and Caretti 2005; Wang and Rudnicki 2012). 최근 들어, 마이크로 RNA(microRNA)가 근분화 뿐 아니라, 골격근 비대를 포함하는 근육 질환에 관여되어있다는 다수의 연구가 발표되었다 (Eisenberg et al. 2007; Thum et al. 2007; Dey et al. 2012; Liu et al. 2012). 본 발명자들은 최근 노화에 관여하는 골격근의 miRNA-mRNA 조절 네트워크를 발견하였고, 이는 miRNA가 근육의 노화 과정에 관여하는 사실을 보여준다(Kim et al. 2014b).
- [5] 한편, 노화에 의해 분화능이 감소된 근원세포로 인하여 노화 개체에서 나타나는 노화성 근감소증은 자율 근육을 조절하는 신경세포의 손상에 의한 신경 근육 질환과 구별되는 질환이다. 구체적으로, 상기 신경 근육 질환의 대표적인 예로서 근이영양증(muscle dystrophy), 신경 근육 접합 질환, 운동 신경 질환 등이 있으며, 노화성 근감소증과 발병 기전 및 치료 방법에 있어서 차이가 있다.

[6]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[7]

본 발명자들은 근육의 노화를 억제하고, 근육 노화 관련 질환을 치료하고자 예의 연구 노력한 결과, miRNA 발현을 신생 근원세포 및 노화 근원세포간 비교하여 분석함으로써, 지연된 근육 분화 및 노화된 근육의 재생을 유도하는 신규한 miRNA를 밝혀내어 본 발명을 완성하였다.

[8]

과제 해결 수단

[9]

본 발명의 하나의 목적은 miR-431 또는 이의 유사체(mimic)를 유효성분으로 포함하는 근육 노화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[10]

본 발명의 다른 목적은 miR-431 또는 이의 유사체, 및 근원세포; 또는 miR-431 또는 이의 유사체로 분화능이 증대된 근원세포를 유효성분으로 포함하는 근육 노화 관련 질환 치료용 세포치료제를 제공하는 것이다.

[11]

본 발명의 또 다른 목적은 miR-431 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 노화된 근육 재생용 조성물을 제공하는 것이다.

[12]

본 발명의 또 다른 목적은 miR-431 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 근육 노화 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[13]

본 발명의 또 다른 목적은 miR-431 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 노화된 체외 근원세포 분화능 개선용 조성물을 제공하는 것이다.

[14]

본 발명의 또 다른 목적은 근원세포의 miR-431 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 노화된 근원세포의 근육 분화능을 측정하는 방법을 제공하는 것이다.

[15]

본 발명의 또 다른 목적은 miR-431의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는 노화된 근원세포의 근육 분화능 측정용 키트를 제공하는 것이다.

[16]

발명의 효과

[17]

본 발명은 miR-431이 노화 근원세포의 분화능을 증대시키는 것을 확인하고, 상기 miR-431 또는 이의 유사체가 근육 노화 관련 질환의 예방 또는 치료 효과를 가지며, 노화된 근육의 재생 효과 및 근육 노화 억제 효과를 가진다.

[18]

도면의 간단한 설명

[19]

도 1은 신생 근원세포 및 노화 근원세포의 miRNA 발현 양태(profile)를 나타낸 도이다. (A) 노화에 따른 118개의 다르게 조절되는 miRNA의 통제하지 않은 계층적 군집화(hierarchical clustering)를 보인다; 47개의 miRNA는 상향 조절(up-regulated) 되었고, 71개의 miRNA는 하향 조절(down-regulated) 되었다. 각 칼럼은 3개월령의 어린 마우스(n=3) 및 27개월령의 늙은 마우스(n=3)

각각으로부터 분리된 근원세포에서 miRNA 발현을 나타낸다. 강도는 서로 다른 정도를 나타낸다. 빨간색 및 녹색은 각각 높고 낮은 발현을 표시한다. (B) 표시된 miRNA 유사체로 감염시킨 후, 노화 근원세포는 분화 배지 내에서 분화하도록 유도되었다. MyHC(흰 bar, 각 그룹마다 n=3) 및 myogenin(검은색 bar, 각 그룹마다 n=3) 같은 분화 마커 유전자의 상대적인 발현은 qRT-PCR로 결정하였다. 상기 결과는 β -액틴 mRNA의 양에 표준화되었다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였다. $**P < 0.01$.

- [20] 도 2는 miR-431에 의해 촉진된 노화 근원세포의 근육 분화를 나타낸 도이다. (A) MyHC(녹색) 및 DAPI(청색)으로 염색한 면역형광법으로 측정한 결과, miR-431 억제자로 감염시킨 신생 근원세포(위 패널) 또는 miR-431 유사체로 감염시킨 노화 근원세포(아래 패널)는 각각 대조군에 비해 감소된 또는 증가된 수의 분화된 근관세포를 보인다. 스케일바는 200 μ m을 나타낸다. (B) 융합 인덱스는 전체 MyHC 양성 세포에 대한 두 개 이상의 핵을 가진 MyHC 양성 세포의 핵분율로 측정하였다. 여섯 개의 다른 관점이 무작위로 선택되어 융합 인덱스를 측정하였다. $*P < 0.05$ (C) 대조군-유사체 또는 miR-431 유사체로 감염시킨 후, 노화 근원세포는 분화 배지에서 분화하도록 유도하였고 myogenin이나 MyHC 같은 분화 마커 유전자의 mRNA 수준을 분석하였다. (D) miR-431 억제자로 감염시킨 신생 근원세포는 표시된 분화 마커 유전자의 감소된 mRNA 수준을 보였다. 상기 결과는 β -액틴 mRNA의 평균에 의해 표준화되었다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였다. $**P < 0.01$

- [21] 도 3은 Smad4의 녹다운으로 촉진된 노화 근원세포의 분화를 나타낸 도이다. (A, 위) 4개의 독립적으로 분리된 신생 근원세포 및 노화 근원세포의 용해물을 표시된 단백질에 대한 항체로 면역블랏 분석을 수행하였다. β -액틴은 로딩 대조군으로 사용하였다(아래). 웨스턴 밴드의 정량화는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. $*P < 0.05$. (B) 노화 근원세포를 si 대조군, siSmad3 또는 siSmad4로 감염시킨 후, 상기 세포는 분화배지에서 분화를 유도하였다. Smad4의 녹다운은 분화를 촉진하였고, 이는 myogenin이나 MyHC같은 분화 마커 유전자의 상향 조절을 유도하였다(아래). 반면, Smad3의 녹다운으로는 아무런 변화가 없었다(위). (C) MyHC(녹색) 및 DAPI(청색)의 면역형광 염색으로 확인한 결과, Smad4가 녹다운 된 노화 근원세포는 대조군 세포에 비해 분화된 근관세포(myotube)의 수가 증가하였다. 스케일 바는 200 μ m이다. (D) 융합 인덱스는 전체 MHC-양성 세포에 대한 2 이상의 핵을 가진 MHC-양성 세포의 핵분율로 계산하였다. 여섯 개의 다른 관점이 무작위로 선택되어 융합 인덱스를 측정하였다. $*P < 0.05$ (E) 최대 3일간(up to 3 days) 분화 배지에서 배양한 신생 근원세포 및 노화 근원세포에서 표시된 단백질의 발현 패턴은 웨스턴 블랏 분석으로 나타내었다. β -액틴이 로딩 대조군으로 사용되었다. GM은 배양 배지; DM은 분화 배지이다. (F)는 분화 동안 상기 세포 내의 상대적인 miR-431의 발현을 나타낸 도이다. 상기 데이터는 β -액틴 mRNA의 양에 표준화하였고, 성장

배지의 신생 근원세포에 대한 상대적인 표준화된 값으로 나타내었다.

- [22] 도 4는 Smad4의 3'UTR에 직접 결합하여 Smad4의 발현을 조절하는 miR-431을 나타낸 도이다. (A) 루시퍼라제 활성 어세이에서, miR-431은 Smad4의 WT 3'UTR을 억제하였고, Smad4 3'UTR 내 miR-431 결합 부위가 결실되었을 때, 상기 억제는 제거되었다. WT는 야생형을, MT는 변이체를 의미한다. (B) 마우스 Smad4 3'UTR 내 miR-431 결합 부위(1067 내지 1073 위치)는 인간 Smad4 3'UTR(1121 내지 1127 위치)에 보존되어있다. (C) miR-431 억제자가 감염된 신생 근원세포는 증가한 Smad4 단백질 수준을 나타내었다(왼쪽). 반면, miR-431 유사체로 감염된 노화 근원세포는 Smad4의 수준이 감소되었다. (D) 신생 근 조직 또는 노화 근 조직의 용해물(300 ug)을 비오티닐화된(Bi) miR431-5p 또는 Bi-cel-miR-67(대조군)으로 4°C에서 회전배양하였다. 4시간 후, RNA를 스트렙타비딘 비드를 이용하여 풀다운 물질(pulldown material)로부터 분리하였고, Smad4 mRNA 함량(enrichment)을 qRT-PCR로 분석하였다. 표준화는 신생 근 조직 또는 노화 근 조직에 대해 GAPDH mRNA를 이용하여 수행되었다. 데이터는 3번의 독립적인 실험의 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. * $P < 0.05$. (E)는 신생 근원세포로부터 얻은 용해물을 Smad4 mRNA에 상보적인 안티센스 올리고(ASO) 또는 음성 대조군 RNA(Gm14635 lincRNA)로 배양하였다. 스트렙타비딘 비드를 이용한 풀다운으로 분리된 상기 RNA를 Smad4 mRNA(GAPDH mRNA에 표준화)(왼쪽) 또는 miR431-5p(RNU6B에 표준화)(오른쪽)에 대해 qRT-PCR을 이용하여 분석하였다.
- [23] 도 5는 근 손상 후, 늙은 마우스의 재생하는 근조직의 급격히 증가한 Smad4 및 낮은 발현 수준의 miR-431을 나타낸 도이다. (A, 위) Smad4의 발현 패턴은 웨스턴 블랏 분석을 이용하여 CTX로 손상된 신생 TA 근 조직 및 노화 TA 근 조직에서 14일간 분석하였다. GAPDH는 로딩 대조군으로 사용하였다(아래). 정량화 RT-PCR 분석을 이용하여, CTX로 손상된 신생 TA 근 조직 및 노화 TA 근 조직의 miR-431을 분석하였다. 발현은 세 차례 측정하였고, 데이터는 U6 snoRNA의 양에 표준화하여 측정 당일의 신생 TA 근 조직의 표준화된 값에 상대값으로 표현하였다. (B) CTX 손상 후 14일차에 신생 TA 근 조직 섹션 및 노화 TA 근 조직 섹션을 Pax7(녹색) 및 Smad4(적색)에 대한 항체로 염색하여, 노화 근 조직에 있는 근원세포의 두 항원의 동일위치(colocalization)를 나타내었다. 스케일바는 20 μ m이다. 흰색 점선은 근 섬유를 나타낸다. Smad4 단백질을 발현하는 Pax7+ 근원세포의 비율은 CTX로 손상된 노화 TA 근 조직 내에서 상당히 증가하였다. *** $P < 0.001$
- [24] 도 6은 siSmad4 또는 miR-431 처리된 노화 근육은 강화된 재생능을 나타낸 도이다. (A)는 실험 절차를 나타낸 개략도이다. 카디오독신(Cardiotoxin, CTX, 20 μ M)을 0일차에 노화 마우스의 TA 근 조직에 주사하였다. 2일 및 5일이 지난 후, 손상된 근 조직에 siSmad4 또는 miR-431 유사체를 주사하였고, 대조군 siRNA 또는 miRNA 유사체를 대측성 근 조직에 주사하였다. (B)는 14일차에

라미닌(적색) 및 DAPI(청색)으로 siSmad4 처리된 재생하는 섬유(n=4)를 염색한 대표적인 IHC 이미지(왼쪽 패널)이다. 횡단면(CSA)는 ImageJ 소프트웨어를 이용하여 측정하였다. 6개의 관점을 CSA 측정을 위해 임의로 선택하였다. $*P < 0.05$. 스케일바는 100 μm 이다. (C)는 14일차에 라미닌(적색) 및 DAPI(청색)으로 miR-431 처리된 재생하는 섬유(n=4)를 염색한 대표적인 IHC 이미지(왼쪽 패널)이다. 횡단면(CSA)는 ImageJ 소프트웨어를 이용하여 측정하였다. 6개의 관점을 CSA 측정을 위해 임의로 선택하였다. $*P < 0.05$. 스케일바는 100 μm 이다.

- [25] 도 7은 miR-431의 억제로 감소된 인간 골격근 근원세포(HSMM)의 근육 분화를 나타낸 도이다. (A)는 HSMM를 miR-431의 억제자 또는 유사체로 감염 시킨 결과, 각각 Smad4 단백질 수준이 대조군에 비해 증가 또는 감소하였음을 나타낸 도이다. 상기 단백질 수준은 웨스턴 블랏 분석으로 분석하였고 β -액틴을 로딩 대조군으로 사용하였다. (B) 억제자-대조군 또는 억제자-miR-431로 HSMM을 감염 시킨 후, 분화 배지 내에서 상기 세포의 분화를 유도하였다. MyHC(녹색) 및 DAPI(청색)를 염색한 면역형광법으로 분석한 억제자-miR-431 감염된 HSMM은 대조군 세포에 비해 분화된 근관세포의 수가 감소하였다. 스케일 바는 200 μm 을 나타낸다. (C) 억제자-miR-431 감염된 HSMM의 미오게닌 및 MyHC와 같은 분화 마커 유전자의 mRNA 수준은 감소하였다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. $**P < 0.01$ (D)는 miR-431에 의한 근원세포의 노화에 따른 조절을 개략적으로 나타낸 도이다. 노화 Pax7⁺MyoD⁺ 근원세포 내 miR-431의 감소는 TGF- β 또는 BMP 신호 전달의 하류 인자(downstream effector)인 Smad4의 증가를 유발하여 정상적인 근육 분화를 방해한다.

- [26] 도 8은 신생 근원세포 및 노화 근원세포의 분리를 나타낸 도이다. (A) 신생 원시 근원세포 및 노화 근원세포를 3개월령 및 27개월령의 마우스의 뒷다리 근육으로부터 분리하였다. 상기 분리된 세포에 대해 Pax7(적색) 및 MyoD(녹색)에 대한 항체를 이용한 면역형광법을 수행하였고, DAPI(청색)로 핵을 염색하였다. 스케일 바는 200 μm 이다. (B) 염색된 신생 근원세포 및 노화 근원세포를 확대한 대표적인 이미지이다. 스케일 바는 20 μm 이다.

- [27] 도 9는 노화 근원세포의 지연된 분화를 나타낸 도이다. (A) DIC 이미지 및 (B) 분화 배지(DM, 36시간)에서 초기 분화동안 신생 근원세포 및 노화 근원세포를 MyHC(녹색) 및 DAPI(청색)로 염색한 면역염색 결과이다. 스케일바는 200 μm 이다. 융합 인덱스는 전체 MHC-양성 세포에 대한 두 개 이상의 핵을 가진 MyHC-양성 세포의 백분율이다. 여섯개의 다른 관점을 융합 인덱스를 측정하기 위해 임의로 선택하였다. $*P < 0.05$ (C) 36시간 동안 분화 배지에서 배양한 후, 네 개의 독립적으로 분리된 신생 근원세포 및 노화 근원세포의 MyHC의 단백질 수준을 면역블랏분석으로 결정하였다(왼쪽). β -액틴이 로딩 대조군으로 사용되었다. 오른쪽에 나타난 도는 MyHC에 특이적인 밴드의 정량화 그래프이다. $*P < 0.05$. (D) 노화 근원세포는 myogenin이나 MyHC같은 분화 마커 유전자의 mRNA 수준이 감소하였다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다.

*P<0.05, ***P<0.001

- [28] 도 10은 miR-431 유사체로 감염된 신생 근원세포 또는 miR-431 억제자 처리된 노화 근원세포에서는 분화능이 변하지 않는다는 사실을 보여주는 도이다. 대조군-유사체 또는 miR-431 유사체로 감염시킨 신생 근원세포는 분화배지에서 분화하도록 유도하였고 myogenin 및 MyHC와 같은 분화 마커 유전자의 mRNA 수준을 분석하였다. miR-431 억제자로 감염된 노화 근원세포는 비슷한 분화 마커 유전자의 mRNA 수준을 나타내었다. 결과는 β -액틴 mRNA의 평균에 표준화하였다. M은 유사체; I는 억제자를 나타낸다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다.
- [29] 도 11은 miR-431이 Smad4를 조절하는 miRNA로 추정된다는 사실을 보여주는 도이다. (A) 증가한 Smad4 단백질과 음의 상관관계를 보이는 하향 조절된 miRNA 중에서 miR-431(적색)을 포함한 4개의 miRNA가 Smad4 mRNA의 3'UTR의 조절 miRNA로 추정되었다. (B) 오직 miR-431만이 루시퍼라제 어레이에서 WT Smad4 3'UTR을 억제하였다. **P<0.01
- [30] 도 12는 miR-431이 C2C12 세포에서 Smad4 발현을 조절하는 사실을 보여주는 도이다. (A) miR-431 유사체로 감염된 C2C12 세포는 대조군에 비해 Smad4의 단백질 수준이 감소한 반면(왼쪽), miR-431의 억제자로 감염된 세포는 대조군에 비해 Smad4의 수준이 증가하였다. (B) 비오틴화된(Bi)-miR431-5p 또는 Bi-cel-miR-67(공지된 포유류 타겟을 가지지 않은 작은 대조군 RNA)으로 C2C12 세포를 감염시키고, 24시간 후, 스트렙타비딘 비드를 이용한 풀다운에 의해 RNA를 분리하였고, Smad4 mRNA 함량을 RT-qPCR을 이용하여 분석하였다. GAPDH mRNA를 이용하여 표준화를 수행하였다. 그래프는 3개의 독립적인 실험 결과를 평균 $\pm$ 표준편차(SEM)로 나타내었다(C, 왼쪽). C2C12 세포 용해물은 Smad4 mRNA에 상보적인 안티센스 올리고머(ASO) 또는 음성 대조군 RNA(Gm14635 lincRNA)와 함께 배양하였다. 상기 RNA는 스트렙타비딘 풀다운으로부터 분리되었고 Smad4 mRNA(GAPDH mRNA에 표준화) 또는 miR431-5p(RNU6B에 표준화)(오른쪽)를 탐지하기 위해 RT-qPCR로 분석하였다. 그래프는 3개의 독립적인 실험 결과를 평균 $\pm$ 표준편차(SEM)로 나타내었다.
- [31] 도 13은 CTX로 손상된 신생 TA 근육 조직 및 노화 TA 근육 조직을 나타낸 도이다. (A) 신생 재생 TA 근육 조직 및 노화 재생 TA 근육 조직의 CTX 손상 7일차 또는 14일차의 대표적 이미지이다. (B) CTX 손상된 신생 TA 근육 조직 및 노화 근육 조직의 Smad4의 발현 패턴은 14일간 웨스턴 블랏 분석을 사용하여 결정하였다. GAPDH을 로딩 대조군으로 사용하였다.

[32]

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [33] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 miR-431 또는 이의 유사체(mimic)을 유효성분으로 포함하는 근육 노화 관련 질환의 예방 또는

치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

- [34] 본 발명의 용어, "마이크로 RNA(microRNA, miRNA)"는, 약 22개 뉴클레오티드로 이루어진 번역되지 않는 소형 RNA 분자로서, mRNA 분해 또는 번역의 억제를 통해 개체의 유전자의 발현을 미세하게 조절하는 기능을 가진다. 본 발명에서는 miRAN가 근육의 노화 과정에 관여하는 사실에 주목하여, 근육 노화를 억제하고 근육 손상을 치료하는데 사용할 수 있는 miRNA를 찾고자 노력하였다.
- [35] 본 발명의 용어, "miR-431"은, 어린 근원세포에 다수 존재하는 miRNA로서, Smad4를 타겟으로 할 수 있으며, 구체적으로 Smad4 mRNA, 특히 3'UTR을 타겟으로 할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 miR-431은 서열번호 1의 서열(5'-UGUCUUGCAGGCCGCAUGCA-3')을 가질 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [36] 본 발명의 일 실시예에서는, 차세대 시퀀싱(NGS)을 이용하여 신생 근원세포 및 노화 근원세포 간 miRNA의 발현 양상을 비교 분석한 결과, 그 중 특히 118개의 miRNA의 발현량의 차이가 컸으며, 노화 근원세포에서 47개 miRNA의 발현량이 상향 조절된 반면, 71개 miRNA는 하향 조절되는 것을 확인하였고, 특히, miR-431의 분화능 강화 활성이 가장 강한 것을 확인하였다(실험예 1).
- [37]
- [38] 본 발명의 용어, "miR-431 유사체"는 체내에서 miR-431과 유사한 기능을 할 수 있으며, miR-431 시퀀스와 동일한 단일가닥 RNA일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 목적상, miR-431의 유사체는 노화된 근원세포의 근육 분화능을 특이적으로 증대시킬 수 있다.
- [39] 본 발명의 구체적인 일 양태에 의하면 miR-431은 서열번호 1 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [40] 본 발명의 일 실시예에서는 miR-431의 유사체가 노화 근원세포의 MyHC 및 Myogenin mRNA의 수준을 향상시키는 것을 확인하였다(실험예 2).
- [41]
- [42] 본 발명의 용어, "근육 노화"는, 노화에 따라 근육의 밀도와 기능이 점차적으로 약화되는 것을 의미하며, "근육 노화 관련 질환"은 노화에 의한 상기와 같은 근육의 상태 변화 및 이상으로 유발되는 질환을 의미 하는데, 특히, 노화로 인한 근육 감소를 노화성 근육감소증(age-related sarcopenia)이라고도 한다. 근육 노화를 경험하는 사람들은 낙상이나 골절이 쉽게 일어나는 것이 일반적이다.
- [43] 본 발명의 구체적인 일 양태에 의하면, 상기 근육 노화 관련 질환은, 노화성 근감소증(age related sarcopenia), 동작 뉴런 질병, 대사성 근육 질병, 염증성 근병증, 신경근 접합부 질병, 내분비성 근병증일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [44]
- [45] 상기와 같은 노화성 근감소증을 비롯한 근육 노화 관련 질환은

근이영양증(muscle dystrophy)이나 근위축증(muscle atrophy)과는 구별되는 질환이다.

- [46] 구체적으로, 근이영양증 환자는 근육 조직 검사에서 근육의 괴사를 보이며, 근섬유의 크기가 고르지 않고 다양하며 근섬유가 괴사된 자리에 지방 및 섬유화 조직으로 대체되는 증상을 보이며, 상기 근이영양증으로는 베커 근이영양증, 뒤센 근이영양증, 선천성 근이영양증(Congenital muscular dystrophy), 에머리 드라이푸스 근이영양증(Emery-Dreifuss muscular dystrophy) 등이 대표적인 것으로 알려져 있다(Alan E H Emery, Lancet. 2002 Feb 23;359(9307):687-95). 특히 상기 근이영양증은 DMD, EMD 등 특정 유전자의 결핍 또는 변이에 의해 유발되는 것으로서, 유전적 요인이 그 원인으로 알려져 있다.
- [47] 또한, 근위축증은 사지의 근육이 위축되는 것을 의미하며, 근위축성 측삭경화증과 척수성 진행성 근위축증이 대표적이며, 이는 척수에 있는 운동신경섬유 및 세포의 진행성 변성에 의한 질환으로 알려져 있다.
- [48] 구체적으로, 상기 척수성 근위축증은 척수의 운동신경 세포의 변성에 의한 유전적 장애로서, 영유아 및 소아에게 나타나는 신경 근육 질환으로 알려져 있다. 또한, 근위축성 측삭경화증은 대뇌와 척수의 상위 운동신경세포와 하위 운동신경 세포의 사멸에 의한 난치성, 비가역 신경퇴행성 변화가 특징이며, 신경성장인자의 부족 및 신경염증이 주원인인 것으로 알려져 있어, 노화에 따른 근감소를 증상으로 하는 노화성 근감소증과는 발병 원인 및 증상이 다르다.
- [49]
- [50] 현재, 노화에 따른 근감소증의 치료 방법으로는 유로코르틴 II(urocortinII)를 이용하는 방법, 호르몬 대체 치료법(hormone replacement therapy) 등이 있으나, 몇 가지 부작용이 보고되어 있어 근육 노화 관련 질환에 대한 근본적인 치료로서는 부족한 측면이 있다.
- [51]
- [52] 그러나, 본 발명자들은 miR-431 또는 이의 유사체가 노화된 근원세포의 분화능을 특히 효과적으로 증대시킬 수 있음을 확인하였고, 이를 통해, 상기와 같은 근육 노화 관련 질환의 예방 또는 치료에 miR-431 또는 이의 유사체가 효과적임을 발견하였다.
- [53] 본 발명의 일 실시예에서는 신생 근원세포에서는 miR-431의 과발현이 근원세포의 분화능을 증대시키지 않고, 노화 근원세포에서는 miR-431의 억제가 근원세포의 분화능을 감소시키지 않는 것을 확인하였다(실험예 2). 이는, 신생 근원세포에서는 miR-431의 기저수준이 포화되어 있으며, 노화 근원세포에서는 miR-431의 수준이 충분히 감소되어 있음을 시사한다.
- [54] 상기와 같은 실시예로부터, 본 발명의 miR-431은 노화된 근육의 재생 및 노화된 근육 관련 질환의 치료에 특히 효과가 있음을 확인하였다.
- [55]
- [56] 본 발명의 용어, "근원세포(myoblast)"는 분화되지 않은 상태에 있는 근육

세포이며, 단핵 세포인 위성 세포(satellite cell)가 활성화되면 근원세포로 증식한다. 근원세포의 분화가 진행되면 다른 세포와 융합하여 다핵의 가늘고 긴 근관(myotube)을 형성하여 근섬유(muscle fiber)를 만든다. 노화된 근원세포는 노화에 따라 분화능이 감소되어 상기와 같은 근섬유의 형성이 저해되며, 결과적으로 근감소의 증상이 나타나게 된다.

- [57] 본 발명의 용어, "근원세포 분화"란 단핵인 근원세포(myoblast)가 융합을 통해 다핵의 근관(myotube)을 형성하는 과정이다. 근육 전구체 세포에 해당하는 근원세포는 자기복제(self-renewal) 하는 경우에는 Pax7+마커를 나타내며, 증식하는 경우 Pax7+/MyoD+를 나타낸다. 근관을 형성하는 분화단계의 세포는 Pax7-MyoD+MyoG+마커를 이용하여 구분할 수 있다. 상기 근관을 형성하는 분화 초기단계의 세포는 마이오신 D(Myosin D)와 같은 근원성 전사인자(myogenic transcription factor)의 발현이 증가하며, 중기에는 마이오신 G(Myosin G)가 증가한다. 분화가 거의 끝나는 후기에는 마이오신 중쇄(Myosin Heavy Chain)의 발현이 증가한다.
- [58] 상기와 같은 근원세포의 분화는 골격근, 심근 및 평활근 내에서 유도될 수 있고, 가장 바람직하게는 골격근에서 유도될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [59] 본 발명의 miR-431 또는 이의 유도체는 근원세포, 특히 노화된 근원세포의 분화능을 증대시킴으로써 근관 및 근섬유를 형성하여 노화에 의해 감소된 근육량을 증가시킬 수 있다.
- [60]
- [61] 본 발명의 구체적인 다른 일 양태에 의하면, miR-431 또는 이의 유사체는 Smad4의 mRNA를 타겟으로 할 수 있고, 더욱 구체적으로는 Smad4의 mRNA의 3'UTR (untranslated region, 비번역부위) 을 타겟으로 할 수 있다.
- [62] 본 발명의 구체적인 다른 양태에 의하면, miR-431 또는 이의 유사체는 Smad4의 발현을 억제할 수 있다.
- [63] 본 발명의 일 실시예에서는 miR-431이 Smad4의 3'UTR을 통해 Smad4의 발현을 억제하는 것을 확인하였으며, 상기 Smad4의 억제를 통해 근원세포의 근육 분화능이 증대되는 것을 확인하였다(실험예 3 내지 실험예 4).
- [64] 본 발명의 다른 실시예에서는 Smad4가 근육의 재생능이 낮은 노화 근원세포에서 발현량이 증대되는 것을 확인하였으며, 상기 Smad4를 저해하는 miR-431 또는 siSmad4에 의해 근원세포의 근육 분화능이 회복되는 것을 확인하였다(실험예 5 내지 실험예 6).
- [65] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 인간 골격근 근원세포(HSMM)에서 miR-431 억제자가 근육의 분화를 감소시키는지 여부를 확인한 결과, miR-431 억제자로 감염시켜 HSMM에서 miR-431을 발현 저해시켰을 때, HSMM의 분화가 감소되는 것을 확인하였다(실험예 7).
- [66]
- [67] 본 발명의 용어, "예방"은, 본 발명의 억제학적 조성물의 투여로 근육 노화 관련

질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[68]

[69] 본 발명의 용어, "치료"는, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여로 근육 노화 관련 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경시키는 모든 행위를 의미한다.

[70]

[71] 본 발명의 구체적인 일 양태에 의하면, 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 상기 miR-431 또는 이의 유사체는 이를 발현하는 재조합 플라스미드 또는 바이러스 벡터의 형태로 포함되거나 비바이러스성 전달체와 함께 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[72]

상기 재조합 플라스미드, 바이러스 벡터, 또는 비바이러스성 전달체에 의해 전달되고 발현되는 miR-431 또는 이의 유사체로 인해 개체의 miR-431의 발현량이 증대됨에 따라, 노화된 근원세포의 분화능을 증대시킬 수 있다.

[73]

본 발명에서 제공하는 다양한 실시형태에서 사용되는 발명 miR-431 또는 이의 유사체는 생체 내 전달 효율을 높이기 위하여 당업계에 알려진 다양한 핵산 전달체(바이러스성 또는 비바이러스성 전달체)와 복합체 형태로 포함될 수 있다. 예컨대, miR-431을 발현하는 재조합 플라스미드 또는 바이러스 벡터로서 포함될 수 있다. 이를 위하여 사용 가능한 플라스미드로는 예를 들어, pSilencer (Ambion), pSiEx (Novagen), siXpress (Takara Bio), pBLOCK-iT™(Invitrogen), pcDNA3.1(Invitrogen), pCEP4(Invitrogen), SilenCircle™ (Allele), 등이 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 바이러스성 전달체로 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 알파바이러스 벡터, EB 바이러스 벡터, 파필로마바이러스 벡터, 포오미바이러스 벡터가 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 비바이러스성 전달체로서, 전달 시약으로 Mirus TrasIT-TKO 지질친화성 시약, 리포펙틴, 리포펙타민, 셀펙틴(cellfectin), G-fectin, 양이온성 인지질 나노입자, 양이온성 고분자, 양이온성 마이셀, 양이온성 에멀전 또는 리포솜, 리간드-DNA 복합체, 유전자총(genegun)이 사용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 리포솜의 형태로서는 양친매성 제제(amphipathic agent), 예를 들어 마이셀, 불용성 단일층, 액정, 또는 수용액에 존재하는 라멜라층으로 존재하는 지질과 조합된다. 리포솜 제형을 위한 지질은 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 설��파타이드, 리소레스틴, 레시틴 인지질, 사포닌, 담즙산, 리포펙틴 등을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다.

[74]

또한, miR-431의 체내 안정성을 높이기 위해 폴리에틸렌글리콜과 같은 생체적합성 고분자를 접합하여 세포 내 흡수를 증가시키는 등 당업계에 알려진 일반적인 리보핵산 세포 내 전달 기술을 이용하도록 제제화될 수 있다.

[75]

또한 전기천공법(electroporation)에 의해 세포를 microRNA가 든 용액에 현탁하여 직류 고전압의 펄스를 통과시켜 세포내로 도입되게 하는 방법도 포함한다. 생체에는 microRNA가 든 용액을 원하는 부위에 투여하고 전극을 통해

직류전압을 펄스로 주어 세포로 도입되게 할 수 있다.

[76]

[77] 본 발명의 용어, "개체"는 근육 노화 관련 질환을 가질 수 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미하고, 한편으로 인간을 제외한 동물일 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 miR-431 또는 이의 유사체를 포함하는 조성물을 개체에 투여함으로써, 상기 근육 노화 관련 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다. 본 발명의 조성물은 기존의 근육 관련 질환의 치료제와 병행하여 투여할 수 있다.

[78]

[79] 본 발명의 구체적인 일 양태에 의하면, 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[80] 본 발명에서 사용되는 용어, "약제학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않으면서, 투여되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미한다.

[81] 본 발명에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[82] 또한, 필요한 경우 항산화제, 완충액 및/또는 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가하여 사용할 수 있으며, 희석제, 분산제, 계면 활성제, 결합제 및/또는 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제 등으로 제제화하여 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 투여 방식이 경구 투여 방식인지 또는 비경구 투여 방식인지에 따라 다양한 제형으로 제작될 수 있다.

[83] 경구 투여용 제형의 비제한적인 예로는, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 정제, 수용성 현탁액, 유성 현탁액, 조제 분말, 과립, 에멀전, 하드 캡슐, 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭시르제 등을 들 수 있다.

[84] 상기 정제 또는 캡슐 등과 같은 경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여, 락토오스, 사카로오스 (Saccharose), 솔비톨 (Sorbitol), 만니톨(Mannitol), 전분, 아밀로펙틴 (Amylopectin), 셀룰로오스 (Cellulose) 또는 젤라틴 (Gelatin) 등과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트 (dicalcium phosphate) 등과 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분 등과 같은 붕괴제; 스테아르산 마그네슘 (magnesium stearate), 스테아르산 칼슘 (calcium stearate), 스테아릴 푸마르 산 나트륨(sodium stearyl fumarate) 또는 폴리에틸렌 글리콜 왁스 (polyethylene glycol wax) 등과 같은 윤활유 등을 포함할 수 있다. 나아가 캡슐 제형의 경우 상기 언급한 물질

외에도 지방유와 같은 액체 담체 등을 추가로 함유할 수 있다.

- [85] 비경구 투여를 위한 제형으로는, 예를 들어 피하 주사, 정맥 주사 또는 근육내 주사 등의 주사용 형태; 좌제 주입 방식; 또는 호흡기를 통하여 흡입이 가능하도록 하는 에어로졸제 등 스프레이용으로 제제화할 수 있으나 이에 제한되지 아니한다. 상기 주사용 제형으로 제제화하기 위해서는 본 발명의 조성물을 안정제또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고 이를 앰플(ampoule) 또는 바이알(vial)의 단위 투여용으로 제제화할 수 있다. 상기 에어로졸제 등의 스프레이용으로 제형화하는 경우, 수분산된 농축물 또는 습윤 분말이 분산되도록 추진제 등이 첨가제와 함께 배합될 수 있다.
- [86] 상기 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있는데, 본 발명의 용어 "약제학적으로 유효한 양"이란 의학적 치료 또는 예방에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료 또는 예방하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 질환의 중증도, 약물의 활성, 환자의 연령, 체중, 건강, 성별, 환자의 약물에 대한 민감도, 사용된 본 발명 조성물의 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율 치료기간, 사용된 본 발명의 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [87] 본 발명의 약제학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다.
- [88]
- [89] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 miR-431 또는 이의 유사체, 및 근원세포; 또는 상기 miR-431 또는 이의 유사체에 의해 분화능이 증대된 근원세포를 유효성분으로 포함하는 근육 노화 관련 질환 치료용 세포치료제를 제공한다.
- [90]
- [91] 본 발명의 용어, "miR-431", "miR-431의 유사체", "근원세포", 및 "근육 노화 관련 질환"은 상기에서 설명한 바와 같다.
- [92] 본 발명의 용어, "세포치료제"는, 인간으로부터 분리, 배양 및 특수한 조작을 통해 제조된 세포 및 조직으로 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품(미국 FDA 규정)으로서, 세포 혹은 조직의 기능을 복원시키기 위해 살아있는 자가, 동종, 또는 이종 세포를 체외에서 증식 선별하거나 다른 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 이러한 세포가 질병의 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 의미한다.
- [93] 본 발명의 세포치료제의 바람직한 투여량은 개체의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될

수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있으며, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[94]

[95] 본 발명의 세포치료제는 miR-431 또는 miR-431 유사체, 및 근원세포 또는 상기 miR-431에 의해 분화능이 증대된 근원세포를 포함함으로써, 노화된 근육의 재생을 촉진하고, 노화 관련 질환을 치료할 수 있는 것을 특징으로 한다.

[96]

[97] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 miR-431 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 노화된 근육 재생용 조성물을 제공한다.

[98] 본 발명의 용어, "miR-431", 및 "miR-431의 유사체"는 상기에서 설명한 바와 같다.

[99] 본 발명의 miR-431을 포함하는 노화된 근육 재생용 조성물은 노화된 근원세포의 줄기성을 유지하고 분화능을 증대시킴으로써 효과적으로 노화된 근육 조직을 재생·회복시킬 수 있는 것을 특징으로 한다.

[100]

[101] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 miR-431 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 근육 노화 억제용 조성물을 제공한다.

[102] 본 발명의 용어, "miR-431", 및 "miR-431의 유사체"는 상기에서 설명한 바와 같다.

[103] 본 발명의 miR-431을 포함하는 근육 노화 억제용 조성물은 근원세포의 줄기성을 유지함으로써 효과적으로 근육의 노화를 억제할 수 있는 것을 특징으로 한다.

[104]

[105] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 본 발명은 miR-431 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 노화된 체외 근원세포 분화능 개선용 조성물을 제공한다.

[106] 본 발명의 용어, "miR-431", 및 "miR-431의 유사체"는 상기에서 설명한 바와 같다.

[107] 본 발명의 miR-431을 포함하는 노화된 체외 근원세포 분화능 개선용 조성물은 노화된 근원세포의 분화능을 증대시킬 수 있는 것을 특징으로 한다.

[108]

[109] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 근원세포의 miR-431 발현량을 측정하는 단계; 및 상기 단계에서 측정한 miR-431의 발현량과 대조 근원세포의 miR-431 발현량을 비교하는 단계를 포함하는, 노화된 근원세포의 근육 분화능을 측정하는 방법에 관한 것이다.

[110] 상기 발현량을 측정하는 단계는, miR-431의 mRNA 발현 수준을 측정하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[111] 상기 miR-431의 mRNA 발현 수준을 측정하는 것은 상기 유전자의 mRNA에

특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 쌍, 프로브 또는 이들의 조합을 이용할 수 있고, 이는 역전사효소 중합효소반응, 경쟁적 역전사효소 중합효소반응, 실시간 역전사효소 중합효소반응, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 및 DNA 마이크로어레이 칩으로 구성된 군으로부터 선택되는 분석법을 이용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[112] 상기 대조 근원세포는 분화능이 손상되지 않은 근원세포로, 본 발명의 목적상 어린 포유류로부터 채취한 근원세포 또는 구입한 근원세포일 수 있으며, 특히 인간의 경우 만 20세 미만의 젊은 공여자의 근원세포일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[113] 상기 miR-431의 발현량을 비교하는 단계는 miR-431의 발현량이 대조 근원세포의 miR-431의 발현량 보다 감소하는 경우, 근원세포의 분화능이 감소한 것으로 판단할 수 있다.

[114] 상기 miR-431의 발현량을 비교하는 단계는 미오신 중쇄(MyHC) 또는 Myogenin의 발현량을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[115] 상기 MyHC 또는 Myogenin의 발현량은 MyHC 또는 Myogenin을 암호화하는 유전자의 mRNA 발현 수준 또는 단백질 발현 수준을 측정하는 것일 수 있다.

[116] 상기 mRNA 발현 수준을 측정하는 단계는 상기 설명된 바와 같다.

[117] 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 것은 MyHC 또는 Myogenin 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 앵타머 또는 이들의 조합을 이용할 수 있고, 이는 웨스턴 블랏팅, ELISA, 방사선면역분석법, 방사면역확산법, 오우크레로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석, 보체고정분석, FACS 및 단백질 칩으로 구성된 군으로부터 선택되는 분석법을 이용하여 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[118]

[119] 본 발명의 다른 양태에 의하면, 근원세포의 miR-431의 발현량을 측정하는 제제를 포함하는 노화된 근원세포의 근육 분화능 측정용 키트에 관한 것이다.

[120] 상기 miR-431의 발현량을 측정하는 제제는 miR-431을 암호화하는 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 쌍, 프로브, miR-431에 특이적으로 결합하는 항체, 앵타머 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[121] 상기 키트는 미오신 중쇄(MyHC) 또는 Myogenin의 발현량을 측정하는 제제를 추가로 포함할 수 있다.

[122] 상기 발현량을 측정하는 제제는 상기 설명한 바와 같다.

[123] 상기 근육 분화능 측정용 키트는 최적의 반응 수행 조건을 기재한 사용설명서를 추가로 포함할 수 있다. 사용설명서는 팜플렛 또는 전단지 형태의 안내 책자, 키트에 부착된 라벨, 및 키트를 포함하는 패키지의 표면에 설명을 포함한다. 또한, 안내서는 인터넷과 같이 전기 매체를 통해 공개되거나 제공되는

정보를 포함할 수 있다.

[124]

[125]

발명의 실시를 위한 형태

[126] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다

[127]

[128] 실시예 1. 마우스의 준비

[129]

[130] 어린 (3개월령) C57BL/6 마우스 및 늙은 (27개월령) C57BL/6 마우스를 Laboratory Animal Resource Center(한국생명공학연구원, KRIBB)에서 구입하였다. 모든 동물 실험은 한국생명공학연구원(KRIBB)의 동물의 관리 및 사용 위원회에서 승인한 프로토콜에 따라 수행되었다.

[131]

[132] 실시예 2. 원시 근원세포의 분리 및 세포 배양

[133]

[134] 이전의 연구에서 개시된 바대로(Rando and Blau 1994), 원시 근원세포(primary myoblast)를 야생형 및 Prx3 KO 마우스의 뒷다리 근육으로부터 분리하였다. 간략히 말하면, 상기 근육을 가위를 이용하여 얇게 다지고 20분간 37°C에서 해리 버퍼(dissociation buffer)로 배양하였다. 상기 해리 버퍼는 디스파아제 II(2.4 U/ml, Roche), 콜라게나제 D(1%, Roche) 및 2.5 uM 염화칼슘을 포함한다. 슬러리(slurry)는 혈청 피펫을 이용하여 분말화하였고, 잔해를 제거하기 위해 70- μ M 나일론 메쉬(BD Bioscience)를 통과시켰다. 세포는 3분간 1,000 rpm으로 원심분리하여 회수하였고, 20% FBS로 보충된 Ham's F-10(HyClone), 항생제 및 5 ng/ml bFGF를 포함하는 성장 배지에 재현탁하였다. 섬유아세포(fibroblast)를 제거하기 위해, 상기 세포를 코팅 되지 않은 플레이트 위에 1시간 동안 플레이팅하였고, 부유하는 세포는 콜라겐-코팅된 배양 접시로 옮겼다. 원시 근원세포를 유지하기 위해, 성장 배지는 이틀마다 교체하였다. 상기 근원세포의 분화는 5일간 항생제 및 5 % 말 혈청으로 보충된 DMEM(HyClone)이 포함된 분화 배지에서 세포를 배양함으로써 유도하였다.

[135] 17세 기증자로부터 얻은 인간 골격근 근원세포(Lonza)를 항생제, 인간 표피 성장 인자(human epidermal Growth Factor, hEGF), 덱사메타손(Dexamethasone), L-글루타민 및 10 % 소 태아 혈청으로 보충된 골격근 기본 배지 (basal medium) 2를 포함하는 성장 배지에서 배양하였다. DMEM/F12(Gibco), 항생제 및 2% 말 혈청을 함유한 분화 배지로 교체하여 시딩하고(seeding) 24 내지 48시간 후에 분화가 시작되었다.

- [136] C2C12 세포는 ATCC에서 구입하였고 항생제 및 10% 소 태아 혈청과 함께 상기 세포를 DMEM(Gibco)을 포함하는 성장 배지에서 배양하였다. DMEM/F12(Gibco), 항생제 및 5% 말 혈청을 함유한 분화 배지로 교체하여 시딩하고(seeding) 24 내지 48시간 후에 분화가 시작되었다.

[137]

[138] 실시예 3. miRNA 시퀀싱 및 데이터 분석

[139]

- [140] 소형 RNA가 풍부한 전체 RNA를 근원세포(n=12)로부터 제작자의 프로토콜을 따라 mirVana miRNA 분리 키트(Ambion, Austin, TX)를 이용하여 추출하였다. miRNA 라이브러리는 Illumina 라이브러리 제작 프로토콜(Illumina Inc, San Diego, Ca, USA)을 따라 준비하였다. 각 라이브러리는 Illumina 어댑터를 이용하여 색인하였고, 소형 RNA 라이브러리를 6 % TBE 요소 폴리악릴아미드 겔 상에서 크기대로 분류하였다. 이로부터 140-160 염기쌍(bp) 크기의 단편을 겔로부터 절단하였다. 정제된 miRNA 라이브러리를 Agilent DNA 1000 칩 상에서 정량화하였다. 색인된 모든 샘플들을 Illumina GAIIx(50 염기쌍 리드(read))의 한 레인에 모아서 시퀀싱하였다. 가공하지 않은 소형 RNA 시퀀싱 리드를 참조 게놈에 매핑(mapping)하기 전, FastQC(<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>)를 이용하여 리드의 염기의 질을 평가하였고, 인-하우스(in-house) PERL 스크립트를 이용하여 3'말단에 부착된 어댑터 시퀀스를 제거하였다. 어댑터로 다듬어진 소형 RNA 리드를 아무런 옵션 없는 bwa 소프트웨어(<http://bio-bwa.sourceforge.net>)를 이용하여 UCSC 게놈(<http://genome.ucsc.edu>)에서 다운로드한 참조 게놈 mm10 상에 매핑하였다. 공지된 miRNA(mirbase ver 20)에 대하여, 구입한(custom) 파이썬(python) 스크립트를 이용하여, 매핑 된 리드로부터 얻은 각 전구체 및 성숙한 miRNA의 FPKM을 계산하였다. Mirbase는 이미 공지된 miRNA를 필터링하기 위해 사용하였고, *Rattus norvegicus*는 연관된 종으로써 사용하였다. 상술한 분석의 결과로 얻은 데이터는 GSE66267의 번호로 Gene Expression Omnibus(GEO)에 저장하였다.

[141]

[142] 실시예 4. 정량화 RT-PCR 및 성숙한 miRNA 발현 분석

[143]

- [144] miRNA의 발현 수준을 알아보기 위해 정량화 RT-PCR을 수행하였다. RNA 준비 및 cDNA 합성은 표준 프로토콜대로 수행하였다. 정량화 RT-PCR 분석은 cDNA, 프라이머, SYBR 마스터 믹스(Master Mix, Applied Biosystems)를 함유한 20- μ l 반응 부피의 StepOnePlus™(Applied Biosystems)을 이용하여 수행하였다. 데이터는 각 반응에서 β -액틴 mRNA의 풍부한 정도(abundance)에 표준화되었다. 프라이머의 서열은 서열번호 2 내지 15로 나타내었고 표 1에 정리하였다.

[145]

[146] [표 1]

유전자명	정방향(Forward)	서열 번호	역방향(Reverse)	서열 번호
Myogenin	CTACAGGCCTTGCTCAGCTC	2	ACGATGGACGTAAGGGAGTG	3
MyHC	TCCAAACCGTCTCTGCACTGTT	4	AGCGTACAAAGTGTGGGTGTGT	5
β -액틴	GGCTGTATTCCCCTCCAT	6	CCAGTTGGTAACAATGCCATG	7
Smad3	CACGCAGAACGTGAACACC	8	GGCAGTAGATAACGTGAGGGA	9
Smad4	ACACCAACAAGTAACGATGCC	10	GCAAAGGTTTCACTTTCCCCA	11
인간 MyHC	CAAGAGTTCTCAGGATGGGAAG	12	GCCATGTCTTCGATCCTGTC	13
인간 Myogenin	GGGGAAACTACCTGCCTGTC	14	AGGCGCTCGATGTACTGGAT	15

[147]

[148] 성숙한 miRNA의 발현 분석을 위해 TaqMan MicroRNA 어세이를 제작자가 추천한 프로토콜(Applied Biosystems)에 따라 수행하였다. 간략히 말하면, 각 역전사 효소(RT) 반응에는 mirVana miRNA 분리 키트를 사용하여 분리한 총 10 ng의 RNA, 50 nM 스템 루프(stem-loop) RT 프라이머, 0.25 mM 각 dNTP, 3.33 units/ul MultiScribe RT 효소, 0.25 units/ul RNase 억제자 및 1 RT 버퍼(모두 Applied Biosystems 사에서 구입)가 포함되어 반응이 이루어진다. 상기 qRT-PCR 반응은 10분간 95°C에서 Applied Biosystem 사의 96-웰 플레이트에서 배양 후 95°C 15초, 60°C 1분을 40번 반복하는 것으로 수행되었다. 역치 주기(Ct)는 고정된 역치를 형광(fluorescence)이 통과하는 부분적인 주기 횟수로 정의된다. U6 snRNA는 표준화의 내생적 대조군으로 사용하였다.

[149]

[150] 실시예 5. 세포의 감염 및 루시퍼라제 어세이 수행

[151]

[152] 30 nM의 siRNA, miRNA 유사체, 및 miRNA-억제자를 제작자의 추천 프로토콜에 따라 RNAiMax(Invitrogen)을 사용하여 원시 근원세포, C2C12 또는 인간 근골격 근원세포에 감염시켰다. miRNA-유사체 및 miRNA-억제자는 *mir Vana*(Invitrogen) 또는 *AccuTarget™* Human miRNA 유사체(Bioneer)를 사용하였고, siRNA는 Dharmacon(Thermo Scientific)에서 구입하였다. 상기 유사체 및 억제자는 표 2부터 4에, siRNA는 표 5에 정리하였다.

[153]

[154] [표2]

Ambion microRNA 유사체 리스트

<i>microRNA</i>	<i>Assay ID</i>	<i>Cat. NO</i>
<i>In vitro</i> 세포 형질감염		
음성 대조군	-	AM17121
127	000452	MC10400
136	002511	MC12334
300	000191	MC10483
411	002238	MC13107
431	001979	MC10091
485	001036	MC10837
<i>In vivo</i> 올리고 주사(oligo injection)		
음성 대조군	-	4464061
431	001979	4464070

[155]

[156] [표3]

Ambion microRNA 억제자 리스트

<i>microRNA</i>	<i>Assay ID</i>	<i>Cat. NO</i>
음성 대조군	-	AM17101
431	001979	MH10091

[157]

[158] [표4]

Bioneer microRNA 유사체 리스트

<i>microRNA</i>	<i>Accession NO.</i>
134	MI0000474
369	MI0000777
381	MI0000789
409	MI0001735
410	MI0002465
494	MI0003134
543	MI0005565

[159]

[160] [표5]

siRNA 올리고 리스트

타겟 유전자	Cat. NO
<i>In vitro</i> 세포 형질감염	
음성 대조군	D-001810-10-05
Smad3	L-040687-00-0005
Smad4	L-040706-00-0005
<i>In vivo</i> 올리고 주사(oligo injection)	
음성 대조군	D-001810-10-50
Smad4	L-040706-00-0050

[161]

[162] miR-431 결합 부위를 포함한 Smad4의 3'UTR 단편(0 내지 1,265 bp 위치)을 다중 제한효소 클로닝 부위(multi cloning site) 내 HindIII 및 BamHI 사이에 luc를 코딩하는 서열이 위치한 pcDNA3-luc 벡터내로 복제하였다. 상기로부터 생성된 플라스미드 구성물은 강한 CMV 프로모터에 의해 구동되는 luc-3'UTR을 포함하고, 이는 mRNA를 번역으로 조절하는 miRNA의 기능을 분석할 수 있게 한다. 또한, 루시퍼라제 어세이를 위해 miR-431 결합 부위(1067 내지 1073 bp 위치)의 결실을 가진 Smad4 3'UTR 변이체(mutant)를 동일한 pcDNA 3-luc 벡터에 복제하였다.

[163]

[164] **실시예 6. 비오틴화된 miR431-5p 또는 안티센스 올리고를 베이트로 사용한 풀다운(pulldown) 어세이**

[165]

[166] C2C12 세포를 100-mm 플레이트에서 비오틴화(Bi)된 miR431-5p 또는 대조군 Bi-cel-miR-67(IDT, 각각 60 nM)으로 감염시켰다. 감염 24시간 후, 상기 세포를 PBS로 세척하였고 1 ml 용해 버퍼[20 mM 트리스(pH 7.5), 100 mM 염화칼륨, 5mM 염화마그네슘, 0.3 % NP-40, RNase OUT(Invitrogen)의 100 U, 프로테아제 억제제(Roche)]에서 용해시켰다. 이미 공지된 바 처럼(Lal et al. 2011), 10 분간 얼음에서 배양하였다. 세포질 용해물은 10분간 12,000g으로 원심분리하여 제거하였다. Dynabead(100 ul)을 첨가하여 회전시키면서 4°C 에서 4시간 동안 배양하였다. 상기 비드를 1 ml 냉각된(ice-cold) 용해 버퍼로 4차례 세척하였고, RNA를 TRIzol을 이용하여 분리하였으며, Smad4 mRNA의 함량(enrichment)을 qRT-PCR로 측정하여 Gapdh mRNA에 표준화하였다. 상기의 방법에 의한 풀다운

전에, 신생 근육 샘플 및 노화 근육 샘플에서 300 ug의 용해물을 4°C 에서 1ml 용해 버퍼 내에서 4시간 동안 비오틴닐화된(Bi)-miR431-5p 또는 Bi-cel-miR-67(대조군, ctrl) 100 pmol로 회전 배양하였다.

- [167] 베이트로 Smad4에 상보적인 안티센스 올리고를 사용하여, C2C12 세포(~70 % confluence 4개의 100-mm 플레이트)를 프로테아제 억제자(Roche) 및 RNase 억제자(Thermo Fisher)를 함유한 PEB로 용해시켰다. 용해물은 예전의 연구에서 설명한대로(Yoon et al. 2012), 1X TENT 버퍼(10 mM 트리스-염화수소[pH 8.0], 1 mM EDTA [pH 8.0], 250 mM 염화나트륨, 0.5% [v/v] 트리톤 X-100) 내 Smad4 mRNA 또는 lncRNA Gm14635에 상보적인 비오틴-표지된 올리고며 100 pmole, 프로테아제 및 RNase 억제자와 함께 1시간 동안 실온에서 회전 배양하였다. Dynabead(50 ul)를 첨가하고 실온에서 30분간 더 회전 배양하였다. 상기 비드는 냉각된 PBS 버퍼로 3차례 세척하였고, TRIzol을 이용하여 RNA를 분리하였으며, Smad4 mRNA의 함량(enrichment)은 GAPDH mRNA에 표준화된 qRT-PCR에 의해 분석하였다. Smad4 mRNA가 풍부해진 샘플 내 miR431-5p의 증가된 함량(abundance)을 QuantiMir 키트(SBI)를 이용하여 분석하기 위해 상기와 동일한 RNA를 사용하였다. 신생 근육 및 노화 근육에 대해, 상술한 방법을 이용한 풀다운에 600 ug의 용해물이 사용되었다.

[168]

[169] 실시예 7. 면역 블랏(immunoblot) 분석

[170]

- [171] 근육 조직 및 분리된 근원세포는 프로테아제 및 포스파타제 억제자를 포함한 PRO-PREP 용해 버퍼(Intron Biotech) 내에서 균질화하였다. 용해물은 15,000 g으로 4°C 에서 20분간 원심분리하였다. 생성된 상층액으로 SDS-PAGE, 이어서 면역 블랏 분석을 수행하였다. MyHC(Santa Cruz Biotechnology), Myogenin(Santa Cruz Biotechnology), β -액틴(Santa Cruz Biotechnology), Smad2/3(Cell Signaling Technology), Smad4(Santa Cruz Biotechnology), GAPDH(Santa Cruz Biotechnology)에 대한 항체가 면역 블랏팅에 포함되었다.

[172]

[173] 실시예 8. CTX 주사로 유도된 근육의 재생

[174]

- [175] 이전에 개시된 대로(Conboy and Rando 2012), CTX(Sigma)를 3개월령 및 27개월령 마우스의 전경골근(TA)에 주사하여 근육 재생을 유도하였다. 간략히 말하면, TA 근육에 50 ul의 20 uM CTX를 주사하였고, miR-431 또는 siSmad4를 TA 근육에서 과발현 시키기 위해, miRNA-유사체 또는 siRNA와 RNAiMAX 시약의 혼합물을 제조하였다(Dey et al. 2014). 3 ul의 1 mM miRNA-유사체 또는 siRNA 및 37 ul의 Nuclease 제거된 물을 40 ul RNAiMAX 시약(Invitrogen)과 혼합하고, 30분간 배양하였다. 최종적으로, 50 ul의 혼합물을 TA 근육에 CTX 주사 후 3일차 및 5일차에 주사하였다.

[176]

[177] 실시예 9. 면역조직화학(immunohistochemical analysis) 검사 및 면역형광법(immunofluorescence)

[178]

[179] 골격근 조직을 4 % 파라포름알데하이드에서 고정하고, 동결 섹션 샘플 또는 파라핀이 심어진 섹션 샘플을 준비하였다. 동결 섹션(10 μ m)을 표준 프로토콜대로 DAPI 및 항체로 염색하였다. 면역조직화학 분석을 위한 항체로는, Laminin(Sigma-Aldrich) Pax7(Developmental Studies Hybridoma Bank), Smad4(Abcam) 항체가 포함된다. 상기 파라핀 섹션 샘플은 H&E로 표준 프로토콜을 따라 염색하였다. 횡단면(CSA) 측정은 NIH ImageJ 소프트웨어(<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)로 수행하였다. 면역형광법을 위해, 원시 근원세포를 Laminin(Invitrogen)-코팅된 커버 슬립 상에서 성장 배지 또는 분화 배지로 성장시켰다. 상기 세포는 4 % 파라포름알데하이드에서 고정하였고, PBS 버퍼로 세척하였으며, PBS 버퍼 내 0.3 % 트리톤(Triton) X-100을 투과시켰다. 세포들은 PBS 버퍼 내 3 % 소 혈청 알부민으로 블라킹(block)하였고, 블라킹 용액에 희석된 1차 항체로 한 번 더 블라킹하였다. 상기 세포를 PBS 버퍼로 세척하고, 2차 항체와 배양하였다. PBS 버퍼로 세척 후, 커버 슬립을 VectoLab Mounting Medium을 사용하여 유리 슬라이드위에 올렸다(mount). 면역형광법을 위한 항체로는, MyHC(Santa Cruz Biotechnology), MyoD(Santa Cruz Biotechnology), 및 Pax7(Developmental Studies hybridoma Bank)를 포함한다. 융합 인덱스는 총 MyHC 양성 세포 수에 대한 다중 핵의 MyHC 양성 세포 수의 비율로 계산하였다.

[180]

[181] 실시예 10. 통계적 분석

[182]

[183] 정량화 데이터는 달리 설명이 없는 한, 평균 $\pm$ 표준편차로 표기하였다. 평균간의 차이는 student's unpaired t test로 평가하였다. p 값 < 0.05 인 경우 통계적으로 유의한 것으로 고려하였다.

[184]

[185] 상기 실시예 실험에 따른 결과는 하기 실험예와 같이 분석하였다.

[186]

[187] 실험예 1. 차세대 시퀀싱(NGS)를 이용한 신생 근원세포 및 노화 근원세포간 miRNA 발현 양상(profile)의 비교 분석

[188]

[189] 노화 근원세포의 감소된 분화능(myogenic capability)에 관여하는 miRNA의 역할을 규명하기 위해 차세대 시퀀싱(next-generation sequencing, NGS)을 이용하여 신생 근원세포 및 노화 근원세포에서 miRNA 발현 프로파일을 분석하였다.

- [190] 3개월령(이하 '신생'이라고 한다) 및 27개월령(이하 '노화'라고 한다) 마우스의 뒷다리 근육으로부터 원시 근원세포(primary myoblast)를 분리하여 배양하였다. Pax7 및 MyoD의 두 단백질을 원시 근원세포의 특이적 마커로서 사용하였다(Wang and Rudnicki 2012). 면역염색 분석(immunostaining analysis)에서, 약 99%의 분리된 근원세포가 Pax7 및 MyoD 두 단백질을 모두 발현하였다(도 8).
- [191] 신생 근원세포 및 노화 근원세포에서 분화능을 비교하였다. 그 결과, 노화 근원세포는 감소된 분화능을 보였고, 이는 이전의 보고(Schultz and Lipton 1982; Fulle et al. 2005; Wagers and Conboy 2005)와 일치하였다. 신생 근원세포와 비교하여, 노화 근원세포는 미오신 중쇄(Myosin heavy chain, MyHC) 양성의 분화된 근원세포의 수가 감소하였다(도 9A, 9B). 노화 근원세포 내 MyHC의 단백질 수준 역시 감소하였다. MyHC 및 미오게닌(Myogenin)과 같은 분화 마커 유전자의 mRNA 수준 역시 상당히 하향-조절(down-regulated)되었다(도 9D).
- [192] 신생 근원세포 및 노화 근원세포 간 상당한 차이(>2배)를 보인 성숙한 118개의 miRNA중에서(도 1A), 노화 근원세포에서 47개 miRNA가 상당히($P < 0.05$) 상향 조절(upregulated)되었고(표 6), 71개 miRNA는 하향 조절되었다(표 7).
- [193]

[194] [표6]

miRNA	배율 변화(fold change)	P-value			
mmu-miR-669m-5p	3.54	0.021059	mmu-miR-150-3p	1.92	0.029822
mmu-miR-6335-5p	3.41	0.008354	mmu-miR-5131	1.91	0.047924
mmu-miR-7647-5p	2.99	0.023431	mmu-miR-1900	1.87	0.049784
mmu-miR-6336-3p	2.94	0.002048	mmu-miR-5627-5p	1.85	0.001093
mmu-miR-10b-5p	2.87	0.02967	mmu-miR-874-3p	1.79	0.012448
mmu-miR-2137	2.58	0.028233	mmu-miR-7021-3p	1.78	0.034101
mmu-miR-467a-5p	2.48	0.02227	mmu-miR-7071-5p	1.75	0.031834
mmu-miR-103-2-5p	2.44	0.045885	mmu-miR-708-3p	1.74	0.020087
mmu-miR-6307-5p	2.38	0.02828	mmu-miR-5129-3p	1.71	0.006154
mmu-miR-3068-5p	2.27	0.044708	mmu-miR-874-5p	1.63	0.001817
mmu-miR-466b-3p	2.25	0.018165	mmu-miR-1231-3p	1.64	0.011123
mmu-miR-7036b-5p	2.24	0.048147	mmu-miR-466f-5p	1.5	0.01904
mmu-miR-466a-3p	2.20	0.018486	mmu-miR-669c-3p	1.49	0.008651
mmu-miR-5125	2.16	0.007634	mmu-miR-193b-3p	1.47	0.038665
mmu-miR-669p-3p	2.09	0.04923	mmu-miR-6960-5p	1.45	0.023119
mmu-miR-669a-3p	2.09	0.014054	mmu-miR-7003-5p	1.41	0.050187
mmu-miR-669d-5p	2.04	0.020533	mmu-miR-129-5p	1.37	0.021188
mmu-miR-467a-3p	2.04	0.015103	mmu-miR-1949	1.28	0.010824
mmu-miR-7028-3p	2.03	0.04433	mmu-miR-669c-5p	1.27	0.025308
mmu-miR-466c-3p	2.01	0.022785	mmu-miR-196b-3p	1.23	0.041578
mmu-miR-6387-5p	1.99	0.00474	mmu-miR-129b-3p	1.19	0.045904
mmu-miR-6311-3p	1.99	0.031518	mmu-miR-1931	1.17	0.048321

[195]

[196] [표 7]

miRNA	배율 변화(fold change)	P-value
mmu-miR-7212-5p	-5.78	0.020715
mmu-miR-6979-3p	-5.63	0.045156
mmu-miR-7001-3p	-5.43	0.014774
mmu-miR-666-3p	-5.31	0.034263
mmu-miR-543-5p	-5.29	0.010398
mmu-miR-380-3p	-5.01	0.037972
mmu-miR-433-5p	-4.91	0.002483
mmu-miR-412-3p	-4.84	0.001552
mmu-miR-494-3p	-4.64	0.009268
mmu-miR-7115-3p	-4.61	0.019192
mmu-miR-136-5p	-4.60	0.005565
mmu-miR-496a-3p	-4.58	0.02173
mmu-miR-770-5p	-4.47	0.0181
mmu-miR-379-3p	-4.40	0.009389
mmu-miR-487b-5p	-4.28	0.004591
mmu-miR-411-3p	-4.14	0.026343
mmu-miR-6997-5p	-4.13	0.033504
mmu-miR-381-5p	-4.10	0.012283
mmu-miR-679-3p	-4.10	0.000571
mmu-miR-323-3p	-4.05	0.036854
mmu-miR-3071-5p	-4.00	0.037211
mmu-miR-127-5p	-3.93	0.002906
mmu-miR-136-3p	-3.89	0.045724
mmu-miR-376a-5p	-3.85	0.002186
mmu-miR-539-5p	-3.84	0.026406
mmu-miR-431-5p	-3.79	0.016137
mmu-miR-329-5p	-3.79	0.028976
mmu-miR-758-3p	-3.78	0.003559
mmu-miR-369-5p	-3.77	0.025644
mmu-miR-495-3p	-3.75	0.011352
mmu-miR-382-5p	-3.68	0.001865
mmu-miR-381-3p	-3.65	0.046197
mmu-miR-433-3p	-3.63	0.046394
mmu-miR-344-3p	-3.61	0.047136
mmu-miR-7034-5p	-3.61	0.048469
mmu-miR-485-5p	-3.56	0.048683

mmu-miR-300-3p	-3.55	0.032466
mmu-miR-541-5p	-3.55	0.018197
mmu-miR-494-5p	-3.54	0.036919
mmu-miR-431-3p	-3.53	0.029777
mmu-miR-1193-3p	-3.52	0.017707
mmu-miR-323-5p	-3.52	0.004217
mmu-miR-1188-5p	-3.48	0.043702
mmu-miR-434-3p	-3.47	0.02596
mmu-miR-668-3p	-3.46	0.023088
mmu-miR-673-5p	-3.41	0.039084
mmu-miR-666-5p	-3.40	0.031627
mmu-miR-679-5p	-3.38	0.036022
mmu-miR-127-3p	-3.29	0.025096
mmu-miR-667-5p	-3.27	0.012473
mmu-miR-673-3p	-3.27	0.026454
mmu-miR-540-3p	-3.26	0.016015
mmu-miR-409-5p	-3.25	0.019062
mmu-miR-377-3p	-3.14	0.045477
mmu-miR-410-3p	-3.11	0.024808
mmu-miR-409-3p	-3.11	0.029103
mmu-miR-411-5p	-3.10	0.0163
mmu-miR-543-3p	-3.07	0.028155
mmu-miR-665-3p	-3.06	0.048904
mmu-miR-434-5p	-2.99	0.024427
mmu-miR-3544-3p	-2.88	0.023315
mmu-miR-337-5p	-2.88	0.023315
mmu-miR-134-5p	-2.82	0.031212
mmu-miR-377-5p	-2.79	0.050174
mmu-miR-412-5p	-2.78	0.046297
mmu-miR-344b-3p	-2.34	0.015913
mmu-miR-6925-3p	-2.31	0.032019
mmu-miR-5620-5p	-2.23	0.011863
mmu-miR-410-5p	-2.17	0.030804
mmu-miR-495-5p	-1.90	0.003459
mmu-miR-1668	-1.02	0.01336

[197]

[198]

본 발명자들은 노화 근육 조직에서 57%의 하향 조절된 miRNA가 염색체 12번상에 존재하는 Dlk-Dio3 지역에 위치하는 것을 보고한 바 있다(Kim et al. 2014a). 흥미롭게도, 71개의 하향 조절된 miRNA 중에서 63개(89%) 역시 노화 근원세포의 Dlk-Dio3 지역에 위치하였다.

- [199] 이러한 결과는 상기 계놈 지역에 위치한 miRNA가 근육 조직 및 근원세포의 노화에 있어서 중요한 역할을 할 수 있음을 시사한다. 이에, 본 발명자들은 상기 계놈 지역에 위치한 13 miRNA를 선별하여, 노화 근원세포에 감염시켜 두 분화 마커(MyHC 및 Myogenin)의 mRNA 수준을 분석하였다. miR-431이 노화 근원세포의 분화능을 강화시키는 데 있어서 가장 강력한 활성을 나타내었다(도 1B).
- [200]
- [201] 실험예 2. miR-431의 노화 근원세포의 근원성 분화 증대
- [202]
- [203] 분화 마커 유전자의 증가 외에도, MyHC-양성의 분화된 근관세포의 형태학 및 숫자에서 보여지듯이 외인성의 miR-431은 노화 근원세포의 분화를 증가시켰다. 반대로, miR-431의 억제제는 신생 근원세포의 분화능을 감소시켰다(도 2A 및 B). 노화 근원세포에서 MyHC 및 Myogenin의 mRNA 수준이 miR-431 유사체(mimic)로 감염하였을 때 모두 증가한 반면(도 2C), 신생 근원세포에서 miR-431 억제자로 감염하였을 때는 MyHC 및 Myogenin 모두 mRNA 수준이 감소하였다(도 2D).
- [204] 이러한 결과는, 노화 근원세포 내에서 감소하는 miRNA 중 하나인 miR-431이 노화에 따른 분화능의 조절에 있어서 중요한 역할을 한다는 사실을 시사한다.
- [205] 반면, 신생 근원세포에서 miR-431을 과발현 시켜도 분화능은 증가하지 않았고, 노화 근원세포에서 miR-431 억제자로 감염하더라도 분화능은 감소하지 않았다(도 10).
- [206] 이러한 결과는, 신생 근원세포 내 miR-431의 기저 수준은 정상의 분화 과정(program)에서 포화되어 있음을 시사한다. 반대로, 노화 근원세포에서는 miR-431은 지연된 분화를 유발하기에 충분할 정도로 감소되어 있음을 시사한다.
- [207]
- [208] 실험예 3. 노화 근원세포 내 Smad4의 녹다운(knockdown)에 의한 분화 증대
- [209]
- [210] 근육의 노화 동안 일어나는 miR-431에 의한 손상된 분화의 매커니즘을 이해하고자, miR-431의 추정되는 타겟을 TargetScan(www.targetscan.org) 및 miRanda(www.microRNA.org)를 이용하여 검색하였다. 그 결과, Smad4가 miR-431의 타겟 유전자로 추정되는 유전자 중 하나였다.
- [211] 기존의 여러 연구에 따르면, TGF- β 신호가 근육 분화를 억제시키는 사실을 보고하고 있으며, 이로 인해, 늙은 마우스는 지연된 근육 재생을 보인다(Carlson et al. 2008; Carlson et al. 2009). TGF- β 신호 경로에서 활성화된 TGF- β 수용체는 먼저 Smad2 또는 Smad3을 인산화한다. 이후, 인산화된 Smad2/3은 혼한 Smad 단백질인 Smad4와 이종삼량체 복합체(heterotrimeric complex)를 형성하여 타겟 유전자를 발현(turn on)시키기 위해 핵으로 이동한다(Schmierer and Hill 2007).
- [212] 이러한 보고들에 따라, 본 발명자들은 신생 근원세포 및 노화 근원세포에서

상기 세 가지 Smad 단백질(Smad2, 3, 및 4)의 발현을 조사하였다. TGF- β 신호 경로의 하류 인자(downstream effector)인 Smad3 및 Smad4의 단백질 수준은 노화 근원세포에서 상향 조절된 반면, Smad2의 단백질 수준은 변화하지 않았다(도 3A).

- [213] Smad3 및 Smad4의 상향 조절이 노화 근원세포에서 감소된 분화능과 연관있는지 여부를 확인하기 위해, 본 발명자들은 siRNA를 이용하여 노화 근원세포에서 Smad3 또는 Smad4를 녹다운(knockdown)시킨 후, 대조군 siRNA를 감염시킨 노화 근원세포와 근육 분화를 비교하였다.
- [214] 흥미롭게도, Smad4의 녹다운은 MyHC 및 Myogenin의 mRNA 수준을 증가시켰으며, 노화 근원세포의 지연된 근육 분화를 상당한 수준으로 회복(reverse)시켰다. 반면, Smad3의 녹다운은 그렇지 않았다(도 3B). 노화 근원세포의 MyHC-양성의 분화된 근관세포의 수는 대조군 siRNA 감염된 경우와 비교했을 때, siSmad4 감염된 근원세포에서 상당히 증가하였다(도 3C, D).
- [215] 신생 근원세포 및 노화 근원세포의 분화 동안, Smad4의 조절 miRNA로 추정되는 miR-431 및 Smad4의 발현 수준을 분석하였다. 분화하는 동안 노화 근원세포 내 Smad4의 단백질 수준은 신생 근원세포의 발현수준보다 높았으나, Smad4 단백질은 근육 분화가 유도되고 3일후까지 점진적으로 감소하였다(도 3E). 반면, miR-431의 발현수준은 노화 근원세포에서 낮은 수준에 머물렀음에도 불구하고, 분화하는 동안 miR-431은 신생 근원세포 및 노화 근원세포 모두에서 점진적으로 상향 조절되었다(도 3F). 이러한 결과는 Smad4 단백질 및 miR-431간 발현 수준은 음의 상관관계를 가진다는 것을 시사하였고, 이에 본 발명자들은 miR-431이 실제로 Smad4의 발현을 조절하는지 여부를 확인하였다.

[216]

[217] **실험예 4. miR-431의 3'UTR을 통한 Smad4 발현 조절**

[218]

- [219] Smad4 mRNA의 3'UTR에서 본 발명자들은 노화 과정에서 Smad4의 증가된 단백질 수준과 음의 상관관계를 보이는, miR-431을 포함한 네 개의 하향 조절된 miRNA를 발견하였다. 그 중에서, 오직 miR-431만이 Smad4 3'UTR의 루시페라아제(luciferase) 활성을 억제하였다(도 11). 변이 Smad4 3'UTR은 miR-431에 의해 억제되지 않았고, 이는 miR-431에 의한 Smad4의 억제는 특이적이라는 사실을 의미한다(도 4A).

- [220] 중요한 것은, miR-431이 결합하는 Smad4 3'UTR 부위는 인간과 마우스 사이에 보존되어 있다는 사실이다(도 4B). 예상한 것처럼, Smad4 단백질은 노화 근원세포에서 miR-431의 과발현으로 하향 조절된 반면, miR-431 억제자로 감염된 신생 근원세포에서는 상향 조절되었다(도 4C). miR-431 유사체 또는 억제자를 처리한 C2C12 세포에서도 비슷한 결과를 얻었다(도 12A).

- [221] miR-431과 내생의 Smad4 mRNA의 직접적인 상호작용은 바이오티닐화된(Bi) miR-431 또는 Smad4 안티센스 올리고(antisense oligo)를 베이트로 이용한

풀다운(pull-down) 실험에 의해 확인하였다. C2C12 세포를 먼저 Bi-miR-431 또는 Bi-cel-miR-67(대조군)으로 감염시킨 후, 스트렙타비딘(streptavidin) 커플링된 비드(bead)에 의해 RNA를 분리하였다. qRT-PCR을 사용하여 확인한 결과, Bi-miR-431 감염된 세포로부터 분리된 RNA 중 Smad4 mRNA가 풍부한 것을 확인하였다(도 12B).

[222] 신생 근육 조직 및 노화 근육 조직의 용해물을 배양한 후의 Bi-miR-431의 풀다운 실험에서도 Smad4 mRNA는 풍부하였다(도 4D). 또한, 바이오티닐화된 안티센스 올리고를 이용하여 내생적 Smad4 mRNA의 풀다운 실험에서도 miR-431이 풍부한지 여부를 확인하였다.

[223] 그 결과, miR-431은 Bi-Smad4 ASO 배양된 근원세포 및 C2C12 세포의 용해물에서 상당히 풍부하였다(도 4E; 도 12C). 종합하면, 이러한 결과들로부터 miR-431은 3'UTR에 직접적으로 작용하여 Smad4의 발현을 억제한다는 사실을 알 수 있다.

[224]

[225] 실험예 5. 노화된 근육 조직 재생에 있어서 Smad4 단백질의 급격한 증가

[226]

[227] 카디오톡신(cadiotoxin, CTX)을 전경골근(tibialis anterior, TA) 근육에 주사하여 유도한 골격근 조직 재생(Charge and Rudnicki 2004; Liu et al. 2012)에서 Smad4 및 miR-431의 발현수준을 조사하였다.

[228] 먼저, CTX를 어린 마우스 및 늙은 마우스의 TA 근육에 주사함으로써, 근육 손상 및 이의 재생을 유도하였다. 그 후, CTX 주사 후 14일 간 Smad4 단백질 및 miR-431 발현을 비교하였다.

[229] 그 결과, 이전의 연구대로(Conboy and Rando 2012), 노화 TA 근육은 CTX 주사 후, 손상된 재생능을 보인 반면, 신생 TA 근육은 재생에 문제가 없었다(도 13A). Smad4 단백질의 수준은 CTX 주사한 첫 날 이후, 노화 TA 근육 및 신생 TA 근육 모두에서 상향 조절되었음에도 불구하고, 노화 TA 근육은 Smad4 단백질이 급격히 증가하였고, 이는 14일간 지속되었다(도 5A). 이와는 반대로, miR-431의 발현은 신생 TA 근육에서보다 노화 TA 근육에서 낮은 수준으로 유지되었다(도 5A; 도 13B).

[230] 다음으로, CTX 주사 후 14일차에 조직을 면역조직화학염색 분석하여 Smad4가 상향 조절된 지역을 밝히고자 하였다. 흥미로운 것은, Smad4가 Pax7 양성의 근원세포에서 강하게 착색된다는 사실이다(도 5B).

[231] 종합적으로 상기와 같은 시험관 내 데이터는 상향 조절된 Smad4가 노화 근육에서 나타나는 손상된 재생의 원인 중 하나일 수 있다는 사실을 암시한다.

[232]

[233] 실험예 6. miR-431에 의한 TA 근육의 재생능 회복

[234]

[235] miR-431이 가지는 노화된 근육 재생능 회복을 위한 치료물질로서의 잠재력을

확인하고자, miR-431 또는 siSmad4가 생체 내에서 늙은 마우스의 손상된 근육 재생능을 개선시킬 수 있는지 실험하였다.

[236] CTX에 의해 손상된 노화 TA 근육에서 miR-431 또는 siSmad4를 과발현시키기 위해, 이전의 연구에 개시된 대로(Dey et al. 2014) RNAiMAX 혼합물을 CTX 손상 후 2차레, 2일차 및 5일차에 주사하였다(도 6A). 2주 후, 대조군 근육 조직의 횡단면과 재생하는 섬유의 횡단면을 비교하였다.

[237] 그 결과, 예측한대로, 중심핵을 가지는 새로 생성된 근섬유가 대조군 근육 조직에서 보다 Smad4가 녹다운된 TA 근육 조직에서 상당히 큰 것을 발견하였다(도 6B). 나아가, miR-431은 늙은 마우스에서 근육 재생능을 강화하였고, 그 결과로 대조군 근육에 비해 상당히 큰 재생 섬유가 생성되었다(도 6C).

[238] 종합하면, miR-431가 늙은 마우스에서 지연되거나 손상된 근육의 재생을 회복시킬 수 있다.

[239]

[240] 실험예 7. miR-431에 의한 인간 골격근 근원세포(HSMM)의 근육 분화 증가

[241]

[242] Smad4의 3'UTR 시드 서열(seed sequence)은 인간과 마우스 간 보존되어 있으므로(도 4B), miR-431이 인간 Smad4 단백질의 수준도 조절할 수 있을 것으로 기대하였다. 이를 확인하고자, miR-431 유사체 또는 억제제로 감염된 인간 골격근 근원세포(HSMM)의 Smad4 단백질 수준을 분석하였다.

[243] 그 결과, miR-431을 과발현하는 HSMM에서는 hSmad4 단백질 수준이 하향조절된 반면, miR-431의 억제자는 Smad4 단백질 수준을 증가시켰다(도 7A). 이는 마우스 근원세포로부터 얻은 결과와 일치하였다.

[244] miR-431이 HSMM의 분화를 증대시킬 수 있는지 여부를 확인하고자 miR-431 억제자로 HSMM을 감염시키고, 분화 정도(differentiation index)를 분석하였다.

[245] 그 결과, 마우스 근원세포의 경우와 동일하게, miR-431 억제자는 HSMM의 분화를 감소시켰다(도 7B 및 7C).

[246]

[247] 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 것으로서 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.

[248]

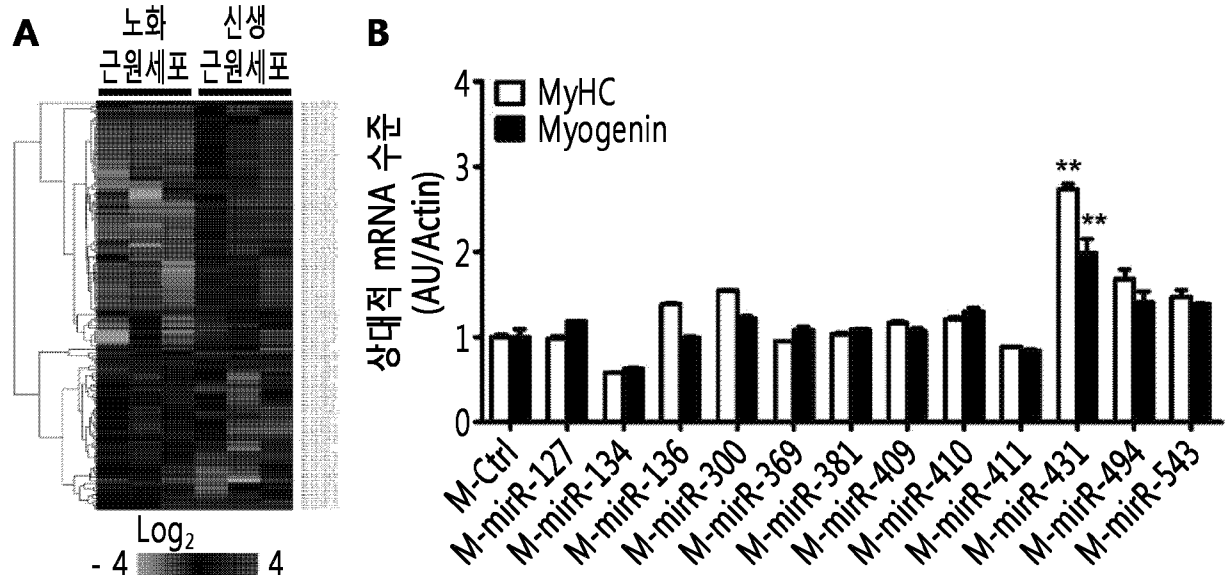
청구범위

- [청구항 1] miR-431 또는 이의 유사체(mimic)를 유효성분으로 포함하는 근육 노화 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 근육 노화 관련 질환은 노화성 근감소증(age related sarcopenia), 동작 뉴런 질병, 대사성 근육 질병, 염증성 근병증, 신경근 접합부 질병, 및 내분비성 근병증으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 약제학적 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 miR-431의 서열은 서열번호 1 인 것인, 약제학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 miR-431 또는 이의 유사체는 Smad4 mRNA를 타겟으로 하는 것인, 약제학적 조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 miR-431 또는 이의 유사체는 상기 Smad4 mRNA의 3'UTR (untranslated region, 비번역부위)을 타겟으로 하는 것인, 약제학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 miR-431 또는 이의 유사체는 Smad4를 억제하는 것인, 약제학적 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 조성물은 상기 miR-431 또는 이의 유사체를 발현하는 재조합 플라스미드 또는 바이러스 벡터를 포함하거나, 비바이러스성 전달체를 추가적으로 포함하는 것인, 약제학적 조성물.
- [청구항 8] 제1항에 있어서,
약제학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 것인, 약제학적 조성물.
- [청구항 9] (a) miR-431 또는 이의 유사체, 및 근원세포; 또는
(b) miR-431 또는 이의 유사체에 의해 분화능이 증대된 근원세포를 유효성분으로 포함하는 근육 노화 관련 질환 치료용 세포치료제.
- [청구항 10] miR-431 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 노화된 근육 재생용 조성물.
- [청구항 11] miR-431 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 근육 노화 억제용 조성물.
- [청구항 12] miR-431 또는 이의 유사체를 유효성분으로 포함하는 노화된 체외 근원세포 분화능 개선용 조성물.
- [청구항 13] (a) 근원세포의 miR-431의 발현량을 측정하는 단계;
(b) 상기 (a) 단계에서 측정한 miR-431의 발현량과 대조 근원세포의

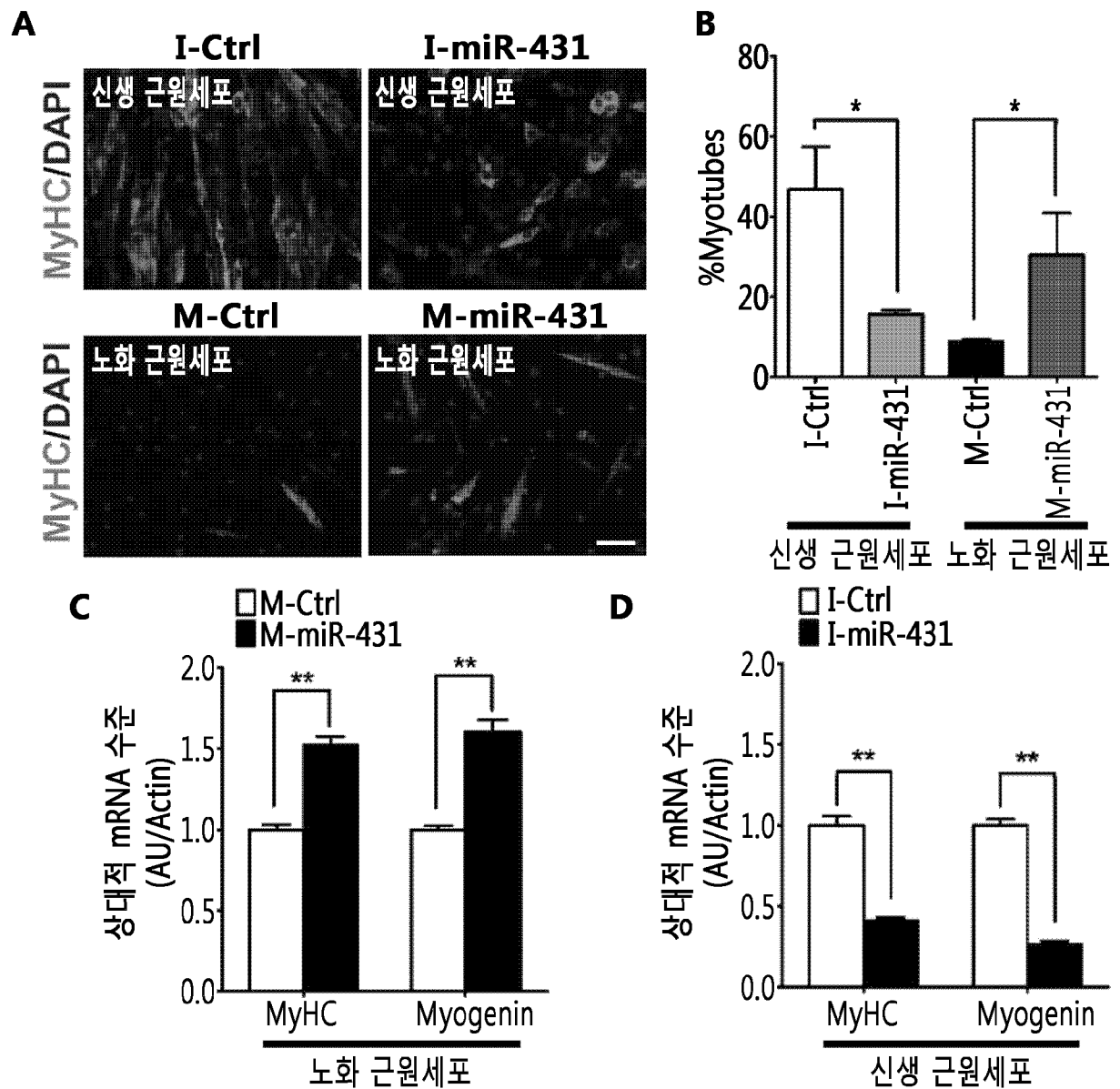
miR-431 발현량을 비교하는 단계를 포함하는, 노화된 근원세포의 근육 분화능을 측정하는 방법.

- [청구항 14] 제13항에 있어서,
상기 (b) 단계는 miR-431의 발현량이 대조 근원세포의 miR-431의 발현량보다 감소하는 경우, 노화된 근원세포의 분화능이 감소한 것으로 판단하는 것인, 근육 분화능을 측정하는 방법.
- [청구항 15] 근원세포의 miR-431 발현량을 측정하는 제제를 포함하는, 노화된 근원세포의 근육 분화능 측정용 키트.
- [청구항 16] 제15항에 있어서, 상기 miR-431의 발현량을 측정하는 제제는 miR-431을 암호화하는 유전자의 mRNA에 특이적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 프라이머 쌍, 프로브, miR-431에 특이적으로 결합하는 항체, 앵타머 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 것을 포함하는 것인, 노화된 근원세포의 근육 분화능 측정용 키트.

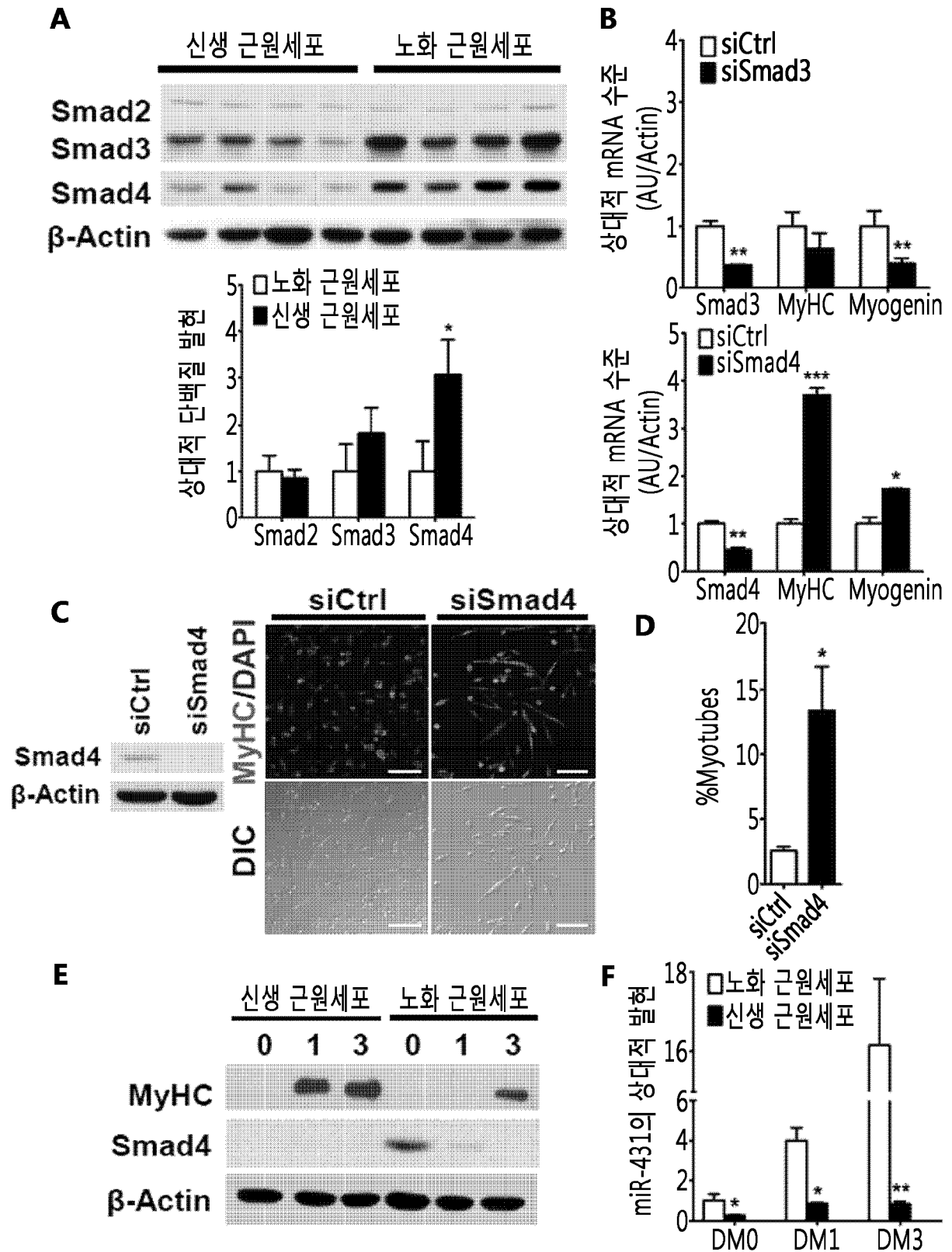
[도1]



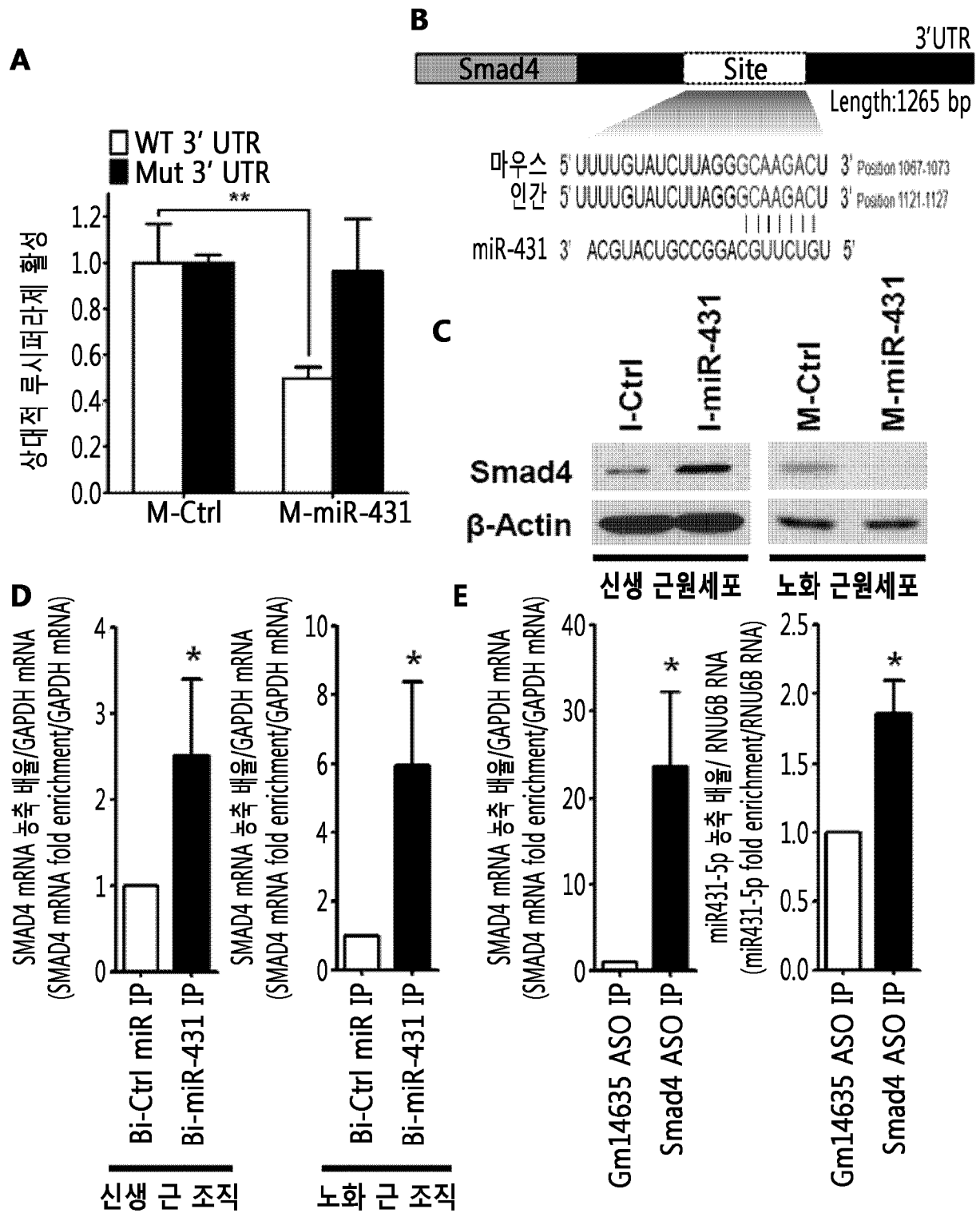
[도2]



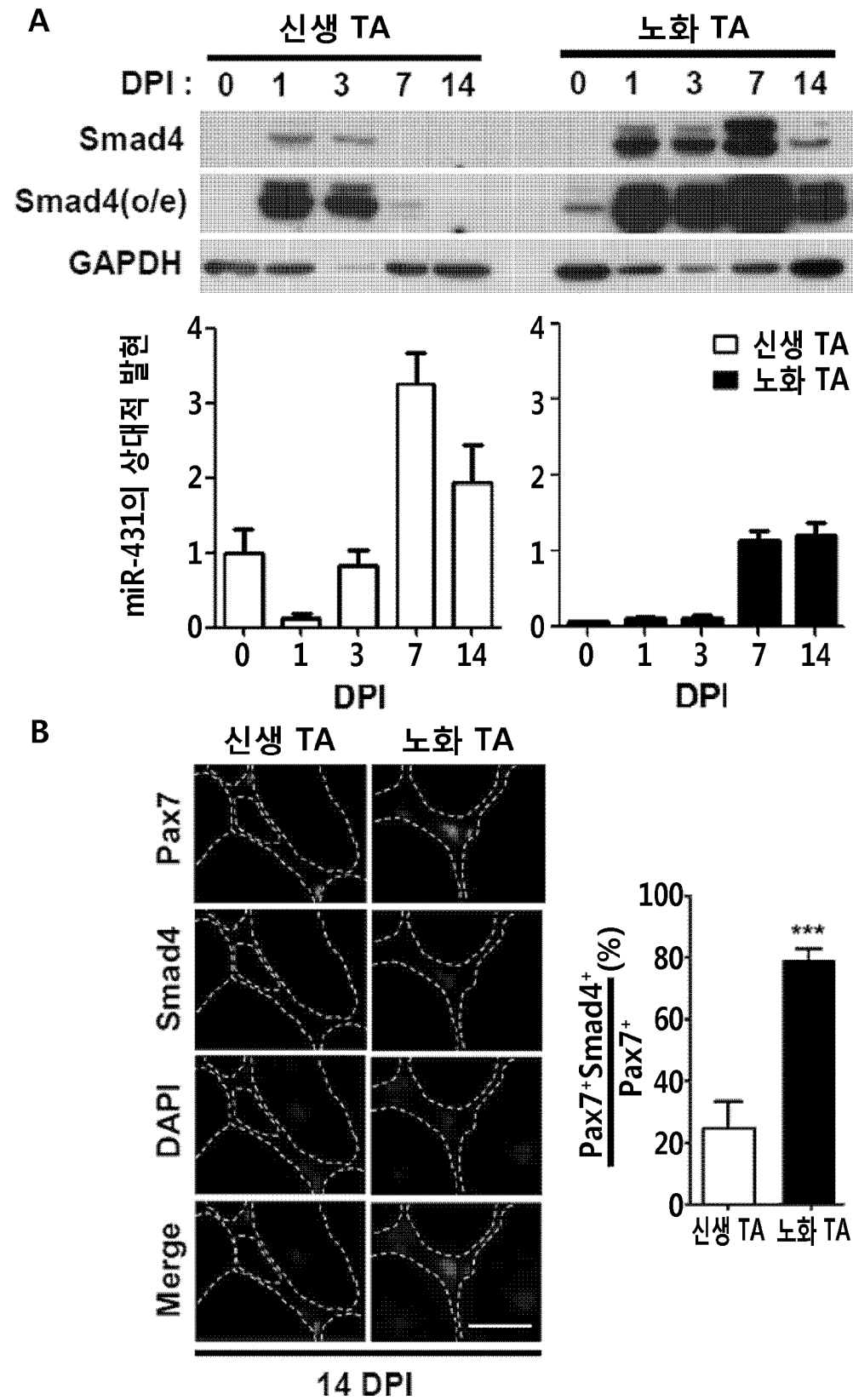
[도3]



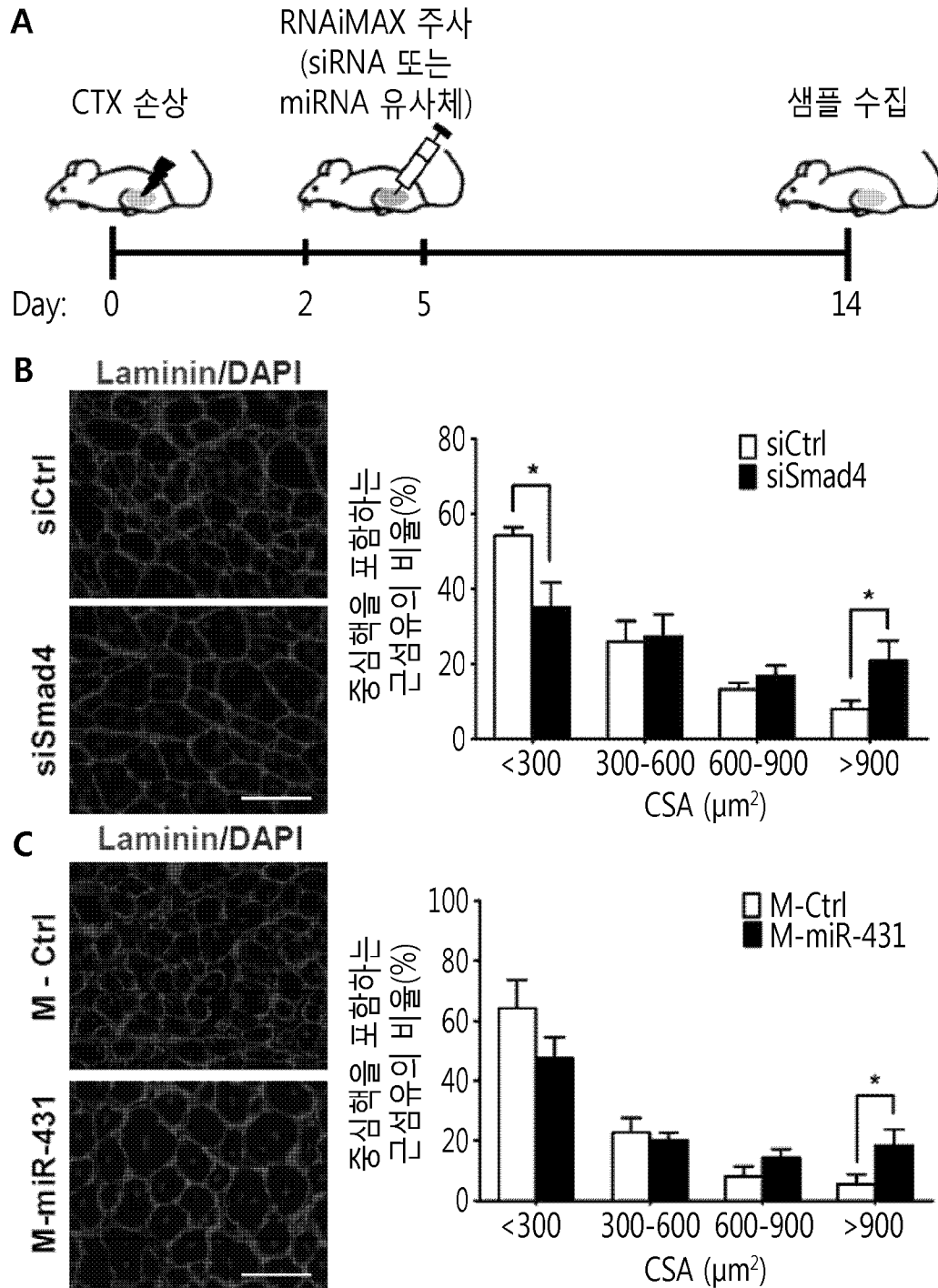
[도4]



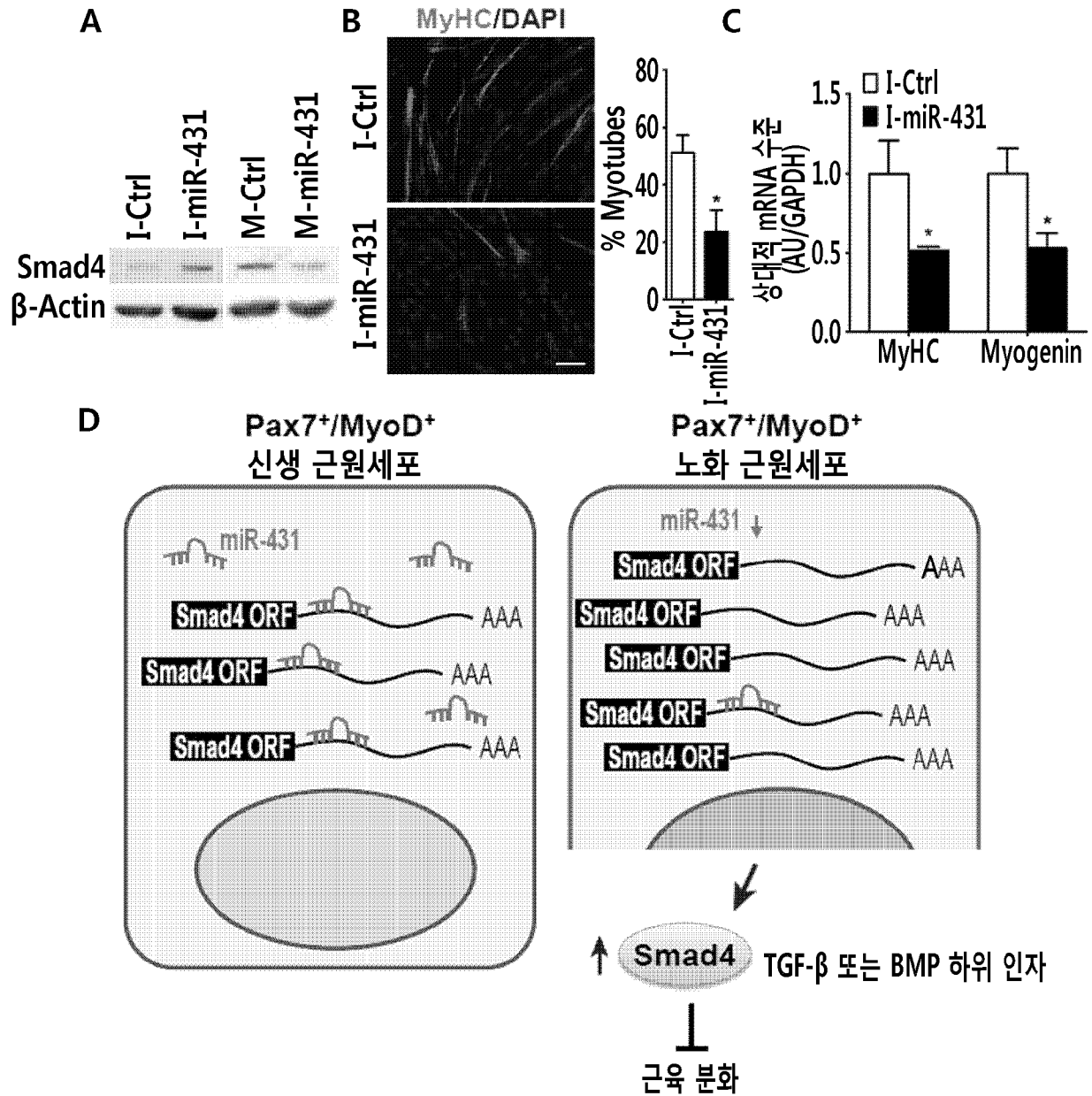
[도5]



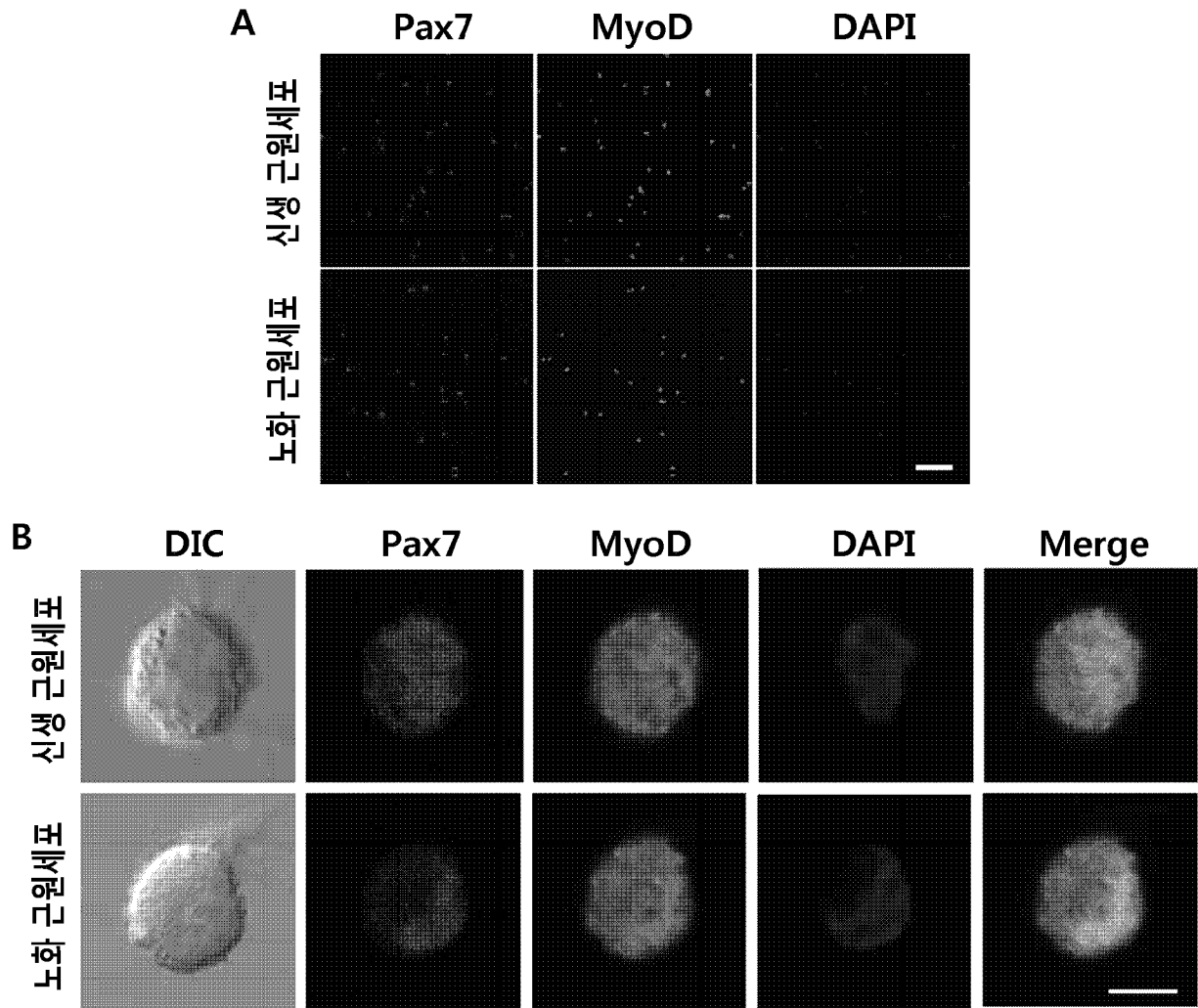
[도6]



[도7]



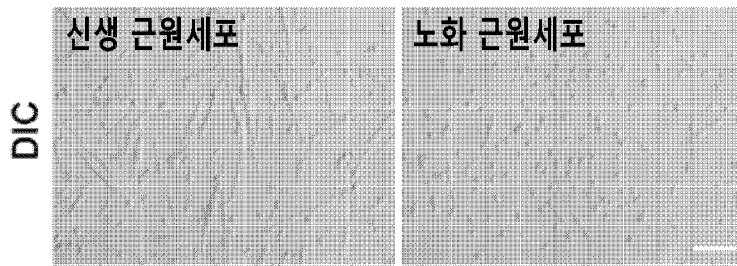
[도8]



[도9]

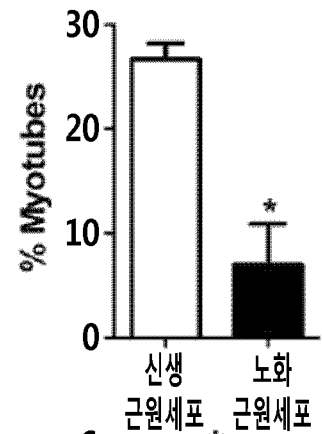
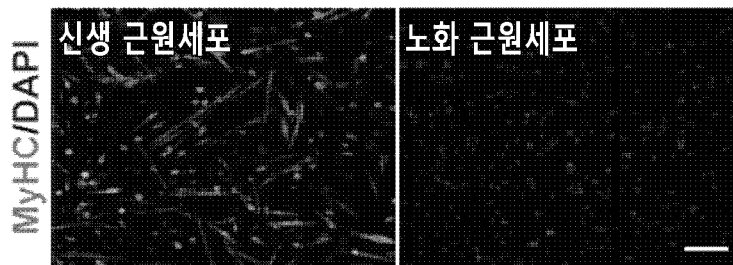
A

분화 배지(DM) 배양 (T=36시간)



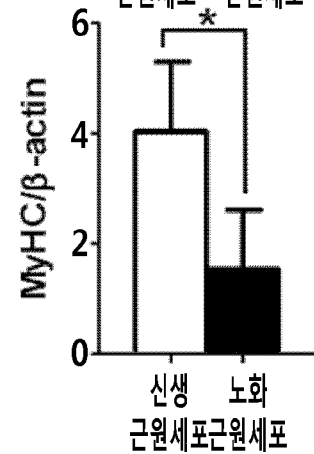
B

분화 배지(DM) 배양 (T=36시간)

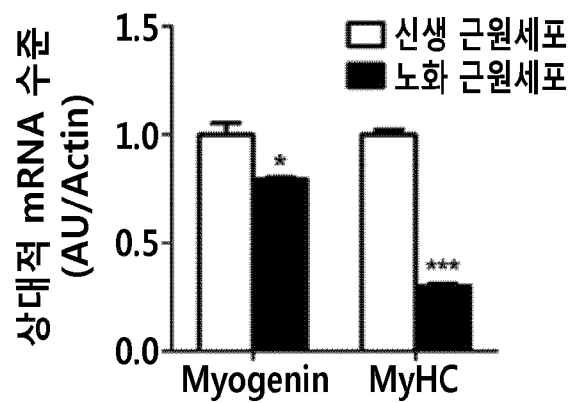


C

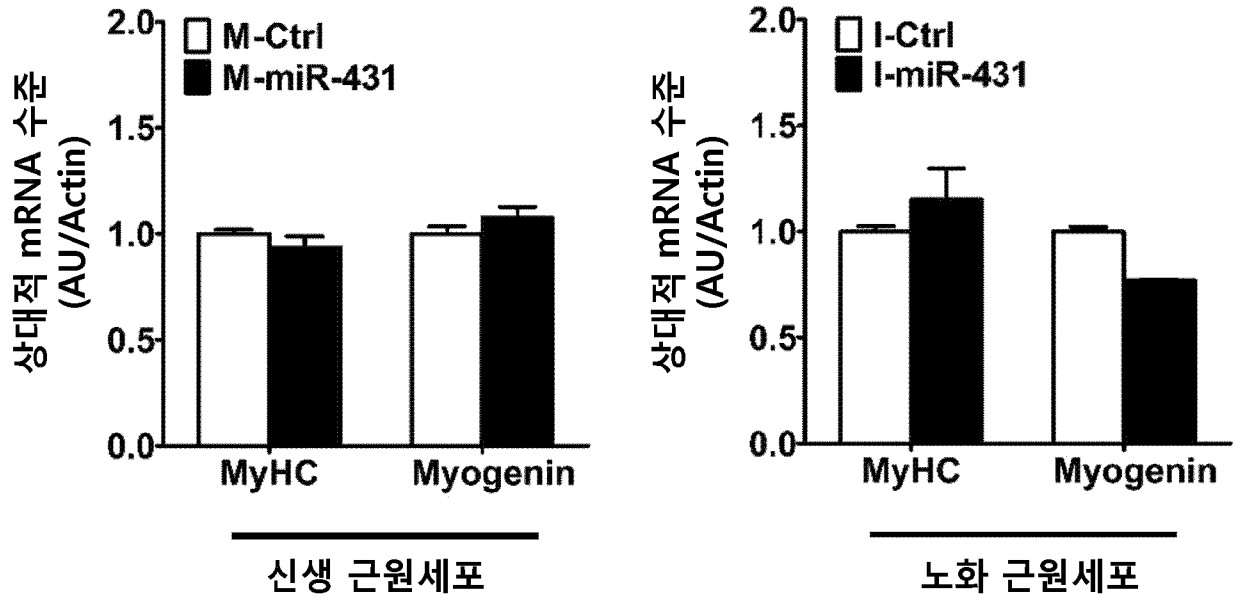
분화 배지(DM) 배양 (T=36시간)



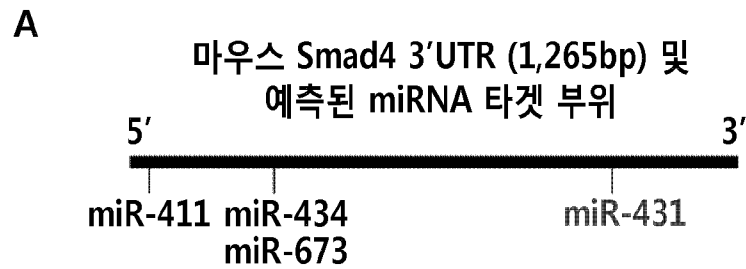
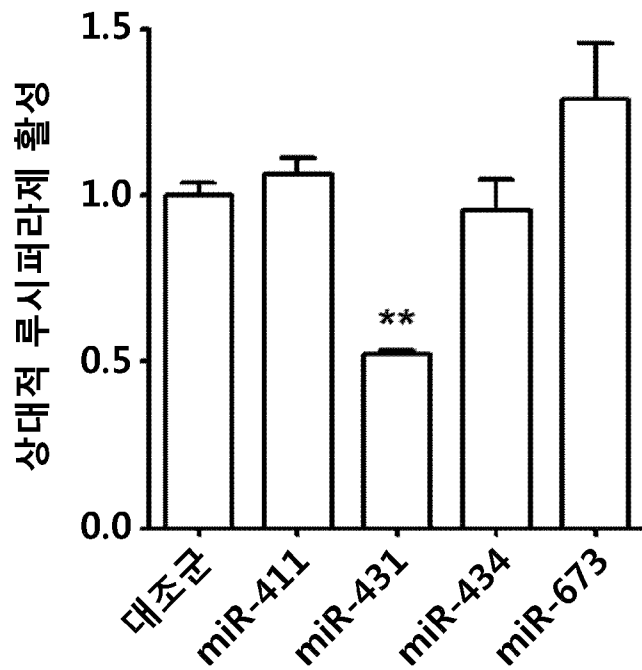
D



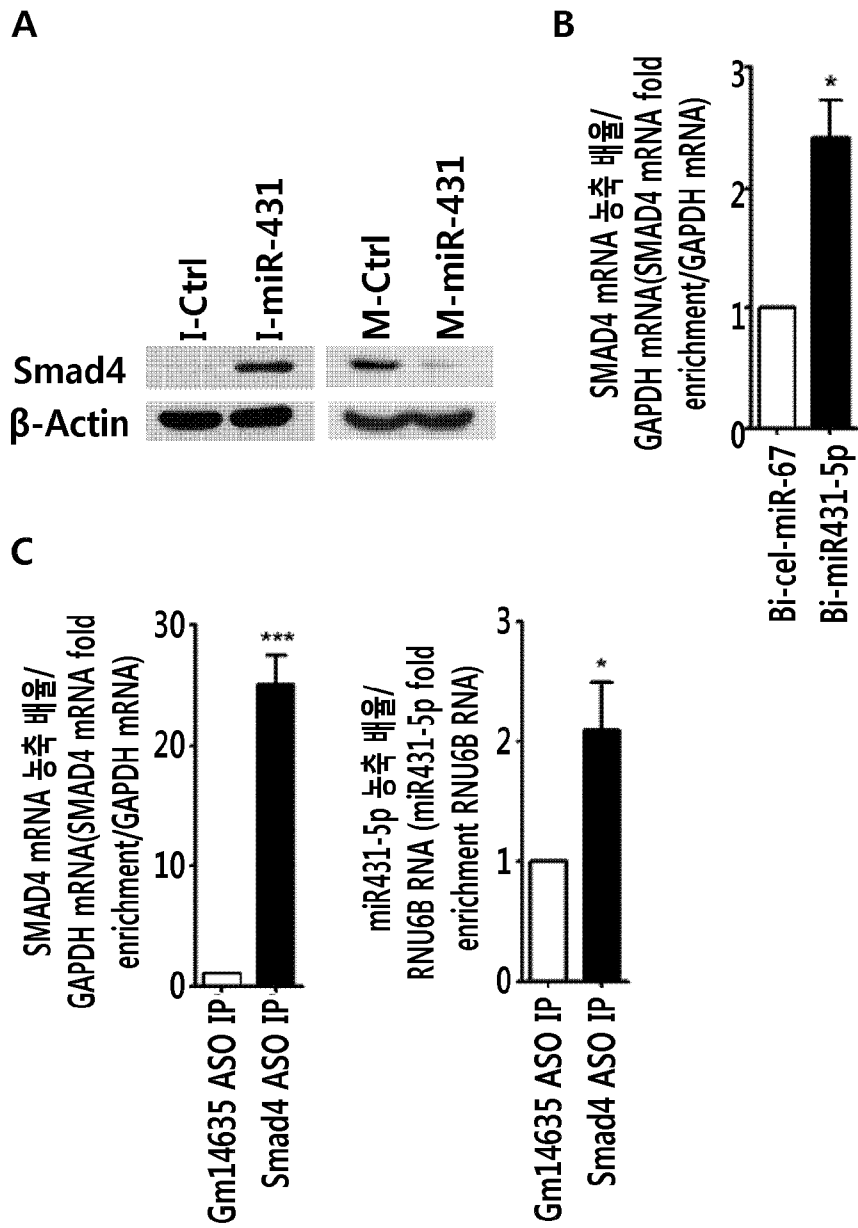
[도10]



[도11]

**B**

[도12]



[513]

A

7 DPI

14 DPI

신생 TA 근 조직

노화 TA 근 조직

B

신생 TA 근 조직

노화 TA 근 조직

DPI:

Day 0

1

3

7

14

Smad4

GAPDH

Smad4

GAPDH

Smad4

GAPDH

Smad4

GAPDH

Smad4

GAPDH

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/004718**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****A61K 48/00(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 48/00; A61P 21/00; C12N 15/11; C12Q 1/68; A61K 39/395

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: miR-431, muscle aging, myoblast

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 104306988 A (BASIC MEDICINE INST., CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) 28 January 2015 See claims 1-6; pages 10-11; figures 12-13; paragraph [0011]; abstract.	1-16
A	WU, Rimao et al., "Myostatin regulates miR-431 Expression via the Ras-Mek-Erk Signaling Pathway", Biochemical and Biophysical Research Communications, [Epub] 11 April 2015, vol. 461, no. 2, pages 224-229 See abstract.	1-16
A	JEANSON-LEH, Laurence et al., "Serum Profiling identifies Novel Muscle miRNA and Cardiomyopathy-related miRNA Biomarkers in Golden Retriever Muscular Dystrophy Dogs and Duchenne Muscular Dystrophy Patients", The American Journal of Pathology, [Epub] 03 September 2014, vol. 184, no. 11, pages 2885-2898 See abstract.	1-16
A	KR 10-2014-0115865 A (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY) 01 October 2014 See claims 1-2.	1-16
PX	LEE, Kwang - Pyo et al., "miR-431 promotes Differentiation and Regeneration of Old Skeletal Muscle by Targeting Smad4", Genes & Development, [Epub] 27 July 2015, vol. 29, no. 15, pages 1605-1617 See the entire document.	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 SEPTEMBER 2016 (30.09.2016)

Date of mailing of the international search report

30 SEPTEMBER 2016 (30.09.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/004718

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 104306988 A	28/01/2015	NONE	
KR 10-2014-0115865 A	01/10/2014	KR 10-1576179 B1	09/12/2015

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 48/00(2006.01)I, A61K 39/395(2006.01)I																				
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 48/00; A61P 21/00; C12N 15/11; C12Q 1/68; A61K 39/395 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: miR-431, 근육 노화, 근원세포																				
C. 관련 문헌 <table border="1"> <thead> <tr> <th>카테고리*</th> <th>인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재</th> <th>관련 청구항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 104306988 A (BASIC MEDICINE INST., CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) 2015.01.28 청구항 1-6; 페이지 10-11; 도면 12-13; 단락 [0011]; 요약 참조.</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WU, RIMAO 등, 'Myostatin regulates miR-431 expression via the Ras-Mek-Erk signaling pathway', Biochemical and Biophysical Research Communications, [Epub] 2015.04.11, 461권, 2호, 페이지 224-229 초록 참조.</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>JEANSON-LEH, LAURENCE 등, 'Serum profiling identifies novel muscle miRNA and cardiomyopathy-related miRNA biomarkers in Golden Retriever muscular dystrophy dogs and Duchenne muscular dystrophy patients', The American Journal of Pathology, [Epub] 2014.09.03, 184권, 11호, 페이지 2885-2898 초록 참조.</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>KR 10-2014-0115865 A (한국생명공학연구원) 2014.10.01 청구항 1-2 참조.</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>LEE, KWANG-PYO 등, 'miR-431 promotes differentiation and regeneration of old skeletal muscle by targeting Smad4', Genes & Development, [Epub] 2015.07.27, 29권, 15호, 페이지 1605-1617 문서 전체 참조.</td> <td>1-16</td> </tr> </tbody> </table>			카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항	X	CN 104306988 A (BASIC MEDICINE INST., CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) 2015.01.28 청구항 1-6; 페이지 10-11; 도면 12-13; 단락 [0011]; 요약 참조.	1-16	A	WU, RIMAO 등, 'Myostatin regulates miR-431 expression via the Ras-Mek-Erk signaling pathway', Biochemical and Biophysical Research Communications, [Epub] 2015.04.11, 461권, 2호, 페이지 224-229 초록 참조.	1-16	A	JEANSON-LEH, LAURENCE 등, 'Serum profiling identifies novel muscle miRNA and cardiomyopathy-related miRNA biomarkers in Golden Retriever muscular dystrophy dogs and Duchenne muscular dystrophy patients', The American Journal of Pathology, [Epub] 2014.09.03, 184권, 11호, 페이지 2885-2898 초록 참조.	1-16	A	KR 10-2014-0115865 A (한국생명공학연구원) 2014.10.01 청구항 1-2 참조.	1-16	PX	LEE, KWANG-PYO 등, 'miR-431 promotes differentiation and regeneration of old skeletal muscle by targeting Smad4', Genes & Development, [Epub] 2015.07.27, 29권, 15호, 페이지 1605-1617 문서 전체 참조.	1-16
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항																		
X	CN 104306988 A (BASIC MEDICINE INST., CHINESE ACADEMY OF MEDICAL SCIENCES) 2015.01.28 청구항 1-6; 페이지 10-11; 도면 12-13; 단락 [0011]; 요약 참조.	1-16																		
A	WU, RIMAO 등, 'Myostatin regulates miR-431 expression via the Ras-Mek-Erk signaling pathway', Biochemical and Biophysical Research Communications, [Epub] 2015.04.11, 461권, 2호, 페이지 224-229 초록 참조.	1-16																		
A	JEANSON-LEH, LAURENCE 등, 'Serum profiling identifies novel muscle miRNA and cardiomyopathy-related miRNA biomarkers in Golden Retriever muscular dystrophy dogs and Duchenne muscular dystrophy patients', The American Journal of Pathology, [Epub] 2014.09.03, 184권, 11호, 페이지 2885-2898 초록 참조.	1-16																		
A	KR 10-2014-0115865 A (한국생명공학연구원) 2014.10.01 청구항 1-2 참조.	1-16																		
PX	LEE, KWANG-PYO 등, 'miR-431 promotes differentiation and regeneration of old skeletal muscle by targeting Smad4', Genes & Development, [Epub] 2015.07.27, 29권, 15호, 페이지 1605-1617 문서 전체 참조.	1-16																		
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.																				
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌																				
국제조사의 실제 완료일 2016년 09월 30일 (30.09.2016)		국제조사보고서 발송일 2016년 09월 30일 (30.09.2016)																		
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 박정민 전화번호 +82-42-481-3516 																		

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호

PCT/KR2016/004718

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 104306988 A	2015/01/28	없음	
KR 10-2014-0115865 A	2014/10/01	KR 10-1576179 B1	2015/12/09