

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0082271 (43) 공개일자 2012년07월23일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>A01K 67/027</i> (2006.01) <i>C12N 15/85</i> (2006.01) <i>G01N 33/15</i> (2006.01) <i>G01N 33/53</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0003666 (22) 출원일자 2011년01월13일 심사청구일자 2011년01월13일	(71) 출원인 이화여자대학교 산학협력단 서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교) (72) 발명자 황은숙 서울특별시 양천구 목동서로 340, 목동APT 909동 303호 (신정동) 홍정호 서울특별시 양천구 목동서로 340, 목동APT 909동 303호 (신정동) (74) 대리인 이원희

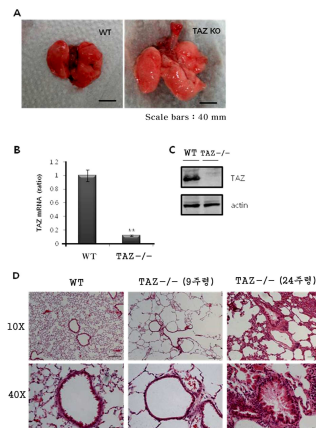
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **과산화 노출에 의한 폐손상 모델 동물, 및 TAZ 마커를 이용한 과산화 노출에 의한 폐손상 진단용 키트**

(57) 요약

본 발명은 과산화 노출에 의한 폐손상 모델 동물, 및 TAZ 마커를 이용한 과산화 노출에 의한 폐손상 진단용 키트에 관한 것으로서, TAZ 유전자가 결핍된(TAZ^{-/-}) 마우스는 심각한 폐섬유증 증상이 유도되었고, 이는 과산화 노출된 정상군 마우스 폐에서 유발된 폐섬유증과 유사하였으며, TAZ는 산화적 스트레스 관련 신호 경로에 작용하여 신호분자들을 억제함으로써, 폐의 항상성 조절에 기능하므로, 상기 TAZ^{-/-} 마우스는 과산화 노출에 의한 폐섬유증 모델 마우스로서 유용하게 사용할 수 있을 뿐 아니라, 과산화 노출에 의한 폐섬유증 모델 마우스의 제조, 및 이를 이용한 치료제 후보물질의 스크리닝에 유용하게 이용할 수 있고, TAZ 유전자 또는 단백질의 발현을 확인함으로써 과산화 노출에 의한 폐섬유증 진단 및 진단용 키트에 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20100027739

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업(중견핵심)

연구과제명 만성폐쇄성 폐질환/폐기종의 유전적 발병 기전 연구

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2010.09.01 ~ 2011.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

TAZ(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) 유전자가 녹아웃(TAZ^{-/-})된, 과산소 노출에 의한 폐손상 모델 마우스.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 TAZ 유전자는 서열번호 1로 기재되는 것을 특징으로 하는 과산소 노출에 의한 폐손상 모델 마우스.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 과산소 노출에 의한 폐손상은 폐섬유증(fibrosis), 기관지폐이형성증(bronchopulmonary dysplasia) 및 만성폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 과산소 노출에 의한 폐손상 모델 마우스.

청구항 4

- 1) TAZ 유전자 녹아웃 카세트를 제조하는 단계;
- 2) 단계 1)의 TAZ 유전자 녹아웃 카세트를 배아줄기세포에 형질감염시키는 단계;
- 3) 단계 2)의 배아줄기세포를 포배아의 포배강에 주입하여 키메라 마우스를 얻는 단계,
- 4) 단계 3)의 키메라 마우스로부터 TAZ^{+/-} 유전형질을 갖는 이형접합체 마우스를 얻는 단계; 및
- 5) 단계 4)의 이형접합체 마우스를 상호교배시켜 TAZ^{-/-} 유전형질을 갖는 동형접합체 마우스를 얻는 단계를 포함하는, TAZ 유전자가 녹아웃된 마우스의 제조방법.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 단계 1)의 TAZ 유전자 녹아웃 카세트는 도 1의 B에 도시된 개열지도를 갖는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

- 1) 실험군으로서, 제 1항의 과산소 노출에 의한 폐손상 모델 마우스에 피검화합물 또는 조성물을 처리하는 단계;
- 2) 단계 1)의 피검화합물 또는 조성물이 처리된 실험군 마우스 및 피검화합물 또는 조성물이 처리되지 않은 대조군 마우스로부터 각각 과산소 노출에 의한 폐손상의 증상을 측정하는 단계; 및
- 3) 대조군에 비하여 실험군에서 과산소 노출에 의한 폐손상의 증상이 감소된 피검화합물 또는 조성물을 선별하는 단계를 포함하는, 과산소 노출에 의한 폐손상 치료제 후보물질의 스크리닝 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 단계 1)의 피검화합물 또는 조성물은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 단계 2)의 과산소 노출에 의한 폐손상 증상의 측정은 계면활성제 단백질-A(surfactant protein-A), SP-B, SP-C, SP-D, 클라라세포 분비 단백질(clara cell secretory protein, CCSP), β -카테닌, VEGF, FGF-2, HNF3, FOXA2, HIF2- α , IL-6, TNF- α , MCP-1, 세포증식, 세포생존률, 술피레독신(sulfiredoxin, Srx) 및 퍼록시레독신 술피닐화로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 측정하는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 9

TAZ 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 상기 TAZ 단백질을 암호화하는 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 과산소 노출에 의한 폐손상 진단용 키트.

청구항 10

- 1) 실험군인 과산소 노출에 의한 폐손상이 의심되는 개체와 대조군인 과산소 노출에 의한 폐손상에 걸리지 않은 개체로부터 유래한 각각의 임상시료에서 TAZ 유전자 또는 단백질의 발현수준을 측정하는 단계; 및
- 2) 단계 1)의 실험군과 대조군의 TAZ 발현수준을 비교하여 실험군의 TAZ 발현수준이 대조군에 비해 감소하는 경우 과산소 노출에 의한 폐손상 발병가능성이 있는 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 과산소 노출에 의한 폐손상의 정보를 제공하기 위한 단백질 검출 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 단계 1)의 TAZ 유전자의 발현수준은 RT-PCR법, 실시간 RT-PCR법, 마이크로어레이법, 노던 블랏(northern blotting), 유전자 발현의 연속 분석법(SAGE, serial Analysis of Gene Expression) 및 RNase 보호분석법(RNase protection assay)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 10항에 있어서, 단계 1)의 TAZ 단백질의 발현수준은 웨스턴블랏(Western blotting), 효소-면역화학 검출법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 면역조직화학 염색법(immunohistochemical staining), 면역침강(immunoprecipitation) 및 면역형광법(immunofluorescence)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제 10항에 있어서, 단계 1)의 임상시료는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액 및 뇨로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술 분야

본 발명은 과산소 노출에 의한 폐손상 모델 동물, 및 TAZ 마커를 이용한 과산소 노출에 의한 폐손상 진단용

키트에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 전사 조절자 1을 포함하는 WW-도메인(WW-domain containing transcription regulator 1, Wwtr1)으로 알려진, TAZ(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif)는 14-3-3 및 PDZ 도메인 단백질의 상호작용에 의해 중간엽 줄기세포에서 전사 조절제로서의 기능을 담당한다(Kanai, F. et al., The EMBO Journal, 19(24): 6778-6791, 2000; Hong, J. et al., Science 309(5737): 1074, 2005). 특히, TAZ 단백질은 뼈세포의 생성을 증가시키는 역할을 하고, Cbfa1(core-binding factor-1)/Runx2(runt-related transcription factor-2), TTF-1(thyroid transcription factor-1), Ctgf(connective tissue growth factor), smad2/3 및 Pax3(paired box gene-3)와 같은 다양한 전사인자의 조절자로서도 기능하는 것으로 알려져 있다.
- [0003] TAZ의 C 말단은 유전자 발현을 조절하기 위한 코어 전사 기구(core transcriptional machinery)를 통해 다양한 상호작용을 수행한다. TAZ는 세포막에 위치하며, 이는 TAZ가 세포막 및 액틴 세포골격(actin cytoskeleton)으로부터 핵으로의 신호전달과 관련되어 있음을 나타낸다(Hong, J. et al., Cell cycle (Georgetown, Tex.) 5(2): 176, 2006). 또한, TAZ는 smad 핵-세포질 셔틀링(nucleocytoplasmic shuttling)과 연관되어 있다고 보고되었다.
- [0004] 마우스에서 TAZ 유전자의 결핍은 다양한 신체 기관의 비정상적인 형태 및 병리적 증상을 유도하는 것으로 알려지고 있다. TAZ 녹아웃 마우스의 신장에서는 피층 수질 다낭 형성(corticomedullary multicystic formation)이 나타났고, 인간 다낭성신질환(polycystic kidney disease)과 다소 유사한 증상이 유도되었다(Makita, R. et al., American Journal of Physiology- Renal Physiology: 00201.02007, 2008). 또한, 이전 연구에서는 TAZ 결핍이 폐 발생의 기형을 유발하고, 성체에서는 인간 폐기종(emphysema)과 유사한 표현형이 나타났음을 보고하였다. 그러나, 아직까지 활성산소에 의한 기관의 손상과 TAZ와의 관련성을 확인한 연구는 거의 없을 뿐만 아니라, 산소에 직접적으로 노출되어 산소의 영향을 많이 받는 호흡기관인 폐의 산화적 스트레스로 인한 손상에 대한 TAZ의 연관성은 보고된 바 없다.
- [0005]
- [0006] 폐섬유증(pulmonary fibrosis)은 폐에서의 과도한 섬유상 연결조직 발달 또는 형성을 말하는 것으로서, 폐의 손상을 의미한다. 이러한 폐섬유증은 호흡곤란, 피로, 쇠약함, 가슴 통증, 식욕감퇴, 체중감소와 같은 전형적인 증상을 나타낸다(Crouch, E, American Journal of Physiology- Lung Cellular and Molecular Physiology 259(4): L159, 1990). 폐섬유증은 TGF- β 신호, 실리카에 대한 노출, 사이토카인 조사 후의 계속되는 케스케이드, 흡연, 항암제 주사 및 과도한 산소 노출과 같은, 다양한 원인에 의해 발생한다. 특히, 폐섬유증이 다른 질환의 이차적 영향인 것으로 밝혀짐에 따라, 폐섬유증의 대부분은 바이러스 감염, 다른 미세한 상처, 자가면역질환과 같은, 간질성폐질환(interstitial lung disease)로서 분류된다. 그러나, 원인을 알 수 없이 발생하는 특발성 폐섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis)도 있다.
- [0007] 폐섬유증을 유발하는 다양한 원인 중에서, 폐는 호흡기관이라는 것에서 산화적 스트레스가 가장 중요한 원인이 된다(Thet, L. et al., Experimental lung research 11(3): 209-228, 1986; Oreffo, V. et al., Environmental Health Perspectives 85: 51, 1990). 고농도의 산소(90% 이상)에 노출되면 마우스의 폐는 점진적인 손상을 입게 되고 3 내지 7일 뒤 사망에까지 이른다는 보고가 있고(Crapo, J. et al., The American review of respiratory disease 122(1): 123, 1980; O'Reilly, M, American Journal of Physiology- Lung Cellular and Molecular Physiology 281(2): 291, 2001; Olivera, W. et al., American journal of respiratory and critical care medicine 152(4): 1229, 1995), 이러한 폐의 손상은 활성산소종(ROS)의 증가에 의한 결과인 것으로 여겨진다(Barazzzone, C. et al., American journal of respiratory cell and molecular biology 19(4): 573, 1998; Boveris, A. et al., Biochemical Journal 134(3): 707, 1973; Lakshminrusimha, S. et al., American journal of respiratory and critical care medicine 174(12): 1370, 2006; Freeman, B. et al., The Journal of biological chemistry 256(21): 10986, 1981).
- [0008] 따라서, 과산소에 의해 유도되는 폐섬유증과 같은 폐손상에 대한 근본적인 치료를 위하여, 효과적으로 과산소 조건하에서 발병되는 폐손상을 치료할 수 있는 신규한 치료제의 개발이 요구된다. 이에 따라, 신규한 치료제의 개발을 위해서는 과산소에 의한 폐섬유증을 치료할 수 있는 효과적인 약물을 발굴하기 위한 전략이 필요하

다. 이를 위해서는 과산소 상태에 노출된 인간의 폐섬유증과 유사한 모델 동물의 개발이 필수적이다. 고농도의 산소 조건하의 산화적 스트레스에 의해 발병되는 폐손상의 병인 기전을 규명하고, 이를 치료하기 위한 약물의 발굴 및 효능을 검증하는데, 과산소 노출에 의한 폐섬유증에 대한 모델 동물이 유용하게 활용될 것이다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 TAZ 유전자가 결핍된 형질전환 모델 마우스를 제조하였고, 상기 마우스의 폐는 과산소에 의해 유도되는 폐섬유증의 증상과 유사함을 최초로 확인하였으며, TAZ와 과산소 노출에 의한 산화적 스트레스 기전의 관련성을 규명함으로써, 상기 TAZ^{-/-} 마우스는 과산소 노출에 의한 폐섬유증 모델 마우스로서 유용하게 사용할 수 있고, 이를 이용하여 치료제 후보물질의 스크리닝에 유용하게 이용할 수 있을 뿐만 아니라, TAZ의 발현 수준을 확인함으로써 과산소 노출에 의한 폐섬유증 진단 및 진단용 키트에 유용하게 이용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 과산소 노출에 의한 폐손상 모델 동물, 및 TAZ 마커를 이용한 과산소 노출에 의한 폐손상 진단용 키트를 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 TAZ(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) 유전자가 녹아웃(TAZ^{-/-})된, 과산소 노출에 의한 폐손상 모델 마우스를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 TAZ 유전자가 녹아웃된 마우스의 제조방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 과산소 노출에 의한 폐손상 모델 마우스를 사용한 과산소 노출에 의한 폐손상 치료제 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 TAZ 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 상기 TAZ 단백질을 암호화하는 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 과산소 노출에 의한 폐손상 진단용 키트를 제공한다.

[0015] 아울러, 본 발명은 과산소 노출에 의한 폐손상 진단의 정보를 제공하기 위한 단백질 검출 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 TAZ 유전자를 녹아웃(TAZ^{-/-})시킨 형질전환 마우스는 과산소 노출에 의해 유발되는 폐산화증과 유사한 폐손상이 유도되고 상기 TAZ^{-/-} 마우스에서 유도된 폐손상은 활성산소에 의한 폐손상 기작과 관련되어 있으므로, 상기 형질전환 마우스는 과산소 노출에 의한 폐손상의 모델 동물로서 이용하여 새로운 치료 후보물질의 스크리닝이 가능할 뿐만 아니라, TAZ의 과산소 노출에 의한 폐손상 억제(suppressor) 유전자로서의 생리적 기능을 밝히는 데도 효과적으로 이용될 수 있으며, 상기 TAZ의 발현수준을 통해 과산소 노출에 의한 폐손상의 진단 또는 예후 예측용 마커로서 이용가능하다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 TAZ 유전자(A). 및 TAZ^{-/-} 마우스를 제조하기 위한 TAZ 유전자 녹아웃 카세트(B)의 개열지도를 나타내는 그림이다.

도 2는 TAZ^{-/-} 마우스에서 유도된 폐섬유화증을 나타내는 그림이다:

- A: 정상군(WT) 및 TAZ^{-/-} 마우스의 폐 조직;
- B: 정상군 및 TAZ^{-/-} 마우스 폐에서 TAZ 유전자의 발현;
- C: 정상군 및 TAZ^{-/-} 마우스 폐에서 TAZ 단백질의 발현; 및
- D: H&E 염색을 통한 정상군 및 TAZ^{-/-} 마우스 폐 조직 분석.

도 3은 정상군 및 TAZ^{-/-} 마우스 폐에서의 다양한 외피 계면활성제 단백질 및 염증성 사이토카인 유전자의 발현을 확인한 그림이다:

- A: 상피세포 발생 관련 유전자(SP-A, B, C 및 D, CCSP)의 발현;
- B: 세포 발생 인자(VEGF, FGF2, 베타-카테닌, HNF3- α , FOXA2, HIF-1 α 및 HIF-2 α)의 발현; 및
- C: 염증성 사이토카인(IL-6, TNF α 및 MCP-1)의 발현.

도 4는 과산소 노출에 의해 폐섬유화증이 유도된 정상군 마우스의 조직학적 분석(A) 및 유전자 발현 변화(B)를 나타낸 그림이다.

도 5는 과산소 노출에 의한 TAZ의 발현 변화를 나타낸 그림이다:

- A: TAZ 단백질의 발현;
- B: 과산소에 72시간 동안 노출된 정상군 마우스 폐에서의 TAZ 유전자 발현; 및
- C: 과산소에 48시간 동안 노출된 A549 세포에서의 TAZ 단백질 발현.

도 6은 정상군 마우스, TAZ^{-/-} 마우스, 및 과산소에 노출된 정상군 또는 TAZ^{-/-} 마우스 폐에서의 외피 계면활성제 단백질(A 및 B) 및 염증성 사이토카인(C 및 D) 유전자의 발현량을 확인한 그림이다:

도 7은 과산소에 노출된 A549 세포의 형태(A) 및 이의 세포수 측정(B)을 나타낸 그림이다.

도 8은 과산소에 노출된 정상군 또는 TAZ^{-/-} 세포의 세포증식을 나타낸 그래프이다:

- A: 과산소 또는 정상 상태에 노출된 A549 세포;
- B: 정상 상태에서의 A549 대조군(BP) 세포 및 Ti 세포(TAZ가 녹다운된 A549 세포); 및
- C: 정상 상태에서의 정상군 마우스의 MEF(MEFs WT) 및 TAZ^{-/-} 마우스의 MEF(MEFs TAZ^{-/-}).

도 9는 TAZ^{-/-} 마우스 폐에서 술피레독신(sulfiredoxin, Srx) 발현 및 Prx 술피닐화(sulfinylation)를 나타낸 그림이다.

- A: 과산소에 노출된 정상군 마우스 및 정상상태에서의 정상군 마우스 폐의 Srx 및 Prx-PO₃ 단백질의 발현;
- B: TAZ^{-/-} 마우스 또는 정상군 마우스 폐에서의 Nrf2 및 Srx 유전자의 발현; 및
- C: TAZ^{-/-} 마우스 또는 정상군 마우스 폐에서의 Nrf2 및 Srx 단백질의 발현.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 TAZ(transcriptional coactivator with PDZ-binding motif) 유전자가 녹아웃(TAZ^{-/-})된, 과산소 노출에 의한 폐손상 모델 마우스를 제공한다.

- [0020] 상기 TAZ 유전자는 서열번호 1의 핵산 서열로 기재되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0021] 상기 과산소 노출에 의한 폐손상은 폐섬유증(fibrosis), 기관지폐이형성증(bronchopulmonary dysplasia) 및 만성폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않고, 과산소 노출에 의한 산화적 스트레스로 인해 발병되는 모든 폐손상에 이에 포함된다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 폐손상 모델 마우스의 제조방법을 제공한다.
- [0023] 상기 제조방법은 하기의 단계를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:
- [0024] 1) TAZ 유전자 녹아웃 카세트를 제조하는 단계;
- [0025] 2) 단계 1)의 TAZ 유전자 녹아웃 카세트를 배아줄기세포에 형질감염시키는 단계;
- [0026] 3) 단계 2)의 배아줄기세포를 포배아의 포배강에 주입하여 키메라 마우스를 얻는 단계,
- [0027] 4) 단계 3)의 키메라 마우스로부터 $TAZ^{+/-}$ 유전형질을 갖는 이형접합체 마우스를 얻는 단계; 및
- [0028] 5) 상기 단계 4)의 이형접합체 마우스를 상호교배시켜 $TAZ^{-/-}$ 유전형질을 갖는 동형접합체 마우스를 얻는 단계.
- [0029] 상기 TAZ 유전자는 서열번호 1의 핵산 서열로 기재되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0030] 상기 TAZ 유전자가 녹아웃된 마우스는 TAZ 유전자의 결손이 상동 염색체 1쌍에서 모두 일어난 것으로서, $TAZ^{-/-}$ 의 유전형질을 갖는 동형접합체(homozygote)이며, 정상적으로 출생하지만, 과산소 노출에 의해 유도되는 폐손상을 갖는 특징이 있다.
- [0031] 상기 제조방법에 있어서, 단계 1)의 TAZ 유전자 녹아웃 카세트는 도 1의 B에 도시된 개열지도를 갖는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0032] 상기 단계 1)에서 제조한 TAZ 유전자 녹아웃 카세트를 배아줄기세포에 형질감염하기 위하여 전기천공법(electroporation), 미세주사법(microinjection) 또는 칼슘포스페이트법(calcium phosphate treatment)을 이용하여 마우스의 배아줄기세포에 도입시킬 수 있다.
- [0033] 상기 단계 3)에 있어서, 상기 형질전환된 배아줄기세포를 포배아의 포배강에 주입하기 위하여, 배아줄기세포 클론을 도너(donor) 마우스의 배반포(blastocyst)에 주사하고 이를 추후 자궁으로 옮길 수 있다.
- [0034] 상기 단계 4)에 있어서, 상기 키메라 마우스로부터 생식계열전달을 가지는 이형접합체를 유도하고 이를 상호교배시켜 동형접합체인 TAZ 녹아웃($TAZ^{-/-}$) 마우스를 제조할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 구체적인 실시예에 있어서, TAZ 유전자를 결손시키기 위하여, TAZ 유전자의 일부를 네오(neo) 유전자로 치환시킨 TAZ 유전자 녹아웃 카세트(도 1 참조)를 벡터 내에 포함시켜 TAZ 유전자 결손 벡터를 제작하였다. 상기 벡터로 배아줄기세포에 존재하는 TAZ 유전자를 결손시키고, 유전자 결손이 확인된 배아줄기세포를 정상적으로 발생중인 배반포의 포배강 내에 주입하여 키메라(chimera) 생쥐를 생산하였다. 생산된 키메라 생쥐는 정상 마우스와의 역교배를 통하여 배아줄기세포 유래의 F1 마우스가 출생하였고, 한쪽 유전자가 결손된 이형접합체($TAZ^{+/-}$) 마우스 간의 교배에 의하여 TAZ 유전자가 녹아웃된 동형접합체($TAZ^{-/-}$) 마우스를 제조하였다.
- [0036] 본 발명자들은 본 발명에서 제조한 $TAZ^{-/-}$ 마우스의 폐 조직을 확인한 결과, 과산소 노출에 의한 산화적 스트레스로 인하여 심각한 폐섬유증이 유도되는 것을 확인하였고, 나이가 증가할수록 증상이 악화되는 것으로 나타남으로써(도 2 참조), 노화에 의해 폐섬유증이 심화되는 것을 확인하였다. 또한, 과산소 노출에 의해 폐손상 발생시 감소하는 것으로 잘 알려져 있는 폐 상피세포 마커인, 계면활성제 단백질(surfactant protein, SP), 클라라세포 분비 단백질(Clara cell secretory protein, CCSP), 여러 성장 인자 단백질과, 염증시 발현이 증가하는 사이토카인 유전자의 발현량을 $TAZ^{-/-}$ 마우스 폐에서 측정한 결과, SP-C, 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF) 및 CCAP 유전자의 발현량이 정상군에 비해 현저히 감소하는 것

으로 나타났고, 염증성 사이토카인의 발현을 증가하였다(도 3 참조). 한편, 과산소에 노출된 정상군의 마우스에서도 TAZ^{-/-} 마우스의 폐 조직과 유사한 폐섬유증이 유도되는 것으로 나타났고, SP-C, VEGF, FGF-2 및 CCAP 유전자의 발현량도 감소하였으며(도 4 참조), TAZ 유전자 및 단백질의 발현량이 과산소에 노출되지 않은 대조군에 비해 현저히 감소되는 것을 확인하였다(도 5 참조). 또한, TAZ^{-/-} 마우스를 과산소 상태에 노출한 경우 폐섬유증이 가장 현저하게 유도되는 것으로 나타났(도 6 참조). 이에, 상기의 결과들을 종합하면, 과산소 노출로 인해 유도되는 폐손상과 TAZ의 결핍으로 인해 일어나는 폐손상 사이에는 유사한 관계가 있음을 알 수 있었다.

[0037] 본 발명자들은 시험관 내(in vitro) 실험을 통해 과산소 노출에 대한 상피세포의 세포생존률 및 세포증식을 확인한 결과, 과산소에 노출된 선암 인간 폐포 기저 상피세포(A549)에서는 TAZ 단백질 발현이 감소하였고(도 5의 C 참조), 세포생존률 및 세포증식 또한 대조군에 비해 현저히 감소하였다(도 7 참조). 반면에, TAZ 유전자가 녹다운된 A549 세포(Ti 세포)는 세포증식에 유의적인 변화가 나타나지 않았는데, 이는 TAZ가 녹아웃된 것이 아닌 녹다운(knock-down)된 것이므로, TAZ 단백질이 낮은 수준으로도 발현되었기 때문이다. TAZ^{-/-} 마우스 유래의 마우스배아섬유아세포(mouse embryonic fibroblast, MEF)를 정상 상태에 노출시킨 경우에는, 정상군 마우스 유래의 MEF에서보다 세포증식이 감소된 것으로 나타났다(도 8 참조).

[0038] 본 발명자들은, 과산소 노출로 인해 술폰닐화(sulfenylation)된 퍼옥시레독신(peroxiredoxin, Prx)이 증가하고, 핵 인자 적혈구 2-관련 인자 2(Nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2)에 의존하는 술폰레독신(sulfiredoxin, Srx)의 양도 증가한다는 최근 연구 결과에 착안하여, TAZ^{-/-} 마우스 폐에서의 Srx 및 Nrf2 발현량, 및 Prx의 술폰닐화에 대하여 분석하였다. 산화적 스트레스에 노출된 세포는 하이드로퍼옥사이드(hydroperoxide)를 제거함으로써 상기 Prx를 보고하는 것으로 알려져 있고, Prx는 가역적으로 시스테인 술폰산(cystein sulfinic acid)에 과산화된다. 이러한 상황에서 상기 Srx는 과산화를 전환하기 위한 효소로서 작용하므로, 실제 과산소에 노출된 폐에서는 Srx 수준이 증가하게 된다. Srx, Nrf2, 및 Prx-PO₃ 분석 결과, TAZ^{-/-} 마우스는 과산소 자극이 없는 상황에서도 정상군에 비해 폐에서의 Srx 및 술폰닐화된 Prx가 증가되어 있음을 알 수 있었다(도 9 참조). 이러한 결과는 TAZ가 산화적 스트레스를 증가시키는 신호 분자를 억제한다는 것을 나타낸다.

[0039] 따라서, 상기 결과를 통해 TAZ가 정상 상태에서 산화적 스트레스에 관계되는 신호분자의 발현을 조절하고, 폐의 항상성을 조절하는데 기능한다는 것을 알 수 있으며, 이러한 TAZ 유전자를 결핍시킴으로써 과산소에 의해 유도되는 폐손상과 유사한 표현형을 유발한다는 것을 확인하였다.

[0040] 이에, TAZ^{-/-} 마우스는 과산소 노출에 의한 폐손상 기전연구 및 치료제 개발을 위한 모델 마우스로서 유용하게 사용될 수 있고, 이러한 모델 마우스의 제조에 유용하게 활용될 수 있다.

[0041] 또한, 본 발명은

[0042] 1) 실험군으로서, 상기 과산소 노출에 의한 폐손상 모델 마우스에 피검화합물 또는 조성물을 처리하는 단계;

[0043] 2) 단계 1)의 피검화합물 또는 조성물이 처리된 실험군 마우스, 및 피검화합물 또는 조성물이 처리되지 않은 대조군 마우스로부터 각각 과산소 노출에 의한 폐손상의 증상을 측정하는 단계; 및

[0044] 3) 대조군에 비하여 실험군에서 과산소 노출에 의한 폐손상의 증상이 감소된 피검화합물 또는 조성물을 선별하는 단계를 포함하는, 과산소 노출에 의한 폐손상 치료제 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0045] 상기 방법에 있어서, 상기 과산소 노출에 의한 폐손상은 폐섬유증(fibrosis), 기관지폐이형성증(bronchopulmonary dysplasia) 및 만성폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0046] 상기 단계 1)의 피검화합물 또는 조성물은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자일 수 있다.

[0047] 상기 단계 1)의 투여 방법은 경구 투여 또는 비경구 투여를 통해 수행될 수 있으며, 상기 비경구 투여시 피내 주사, 피하주사, 정맥주사, 복강주사, 근육주사로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 주사 투여;

직장 투여; 국소도포; 철폐; 및 이온토포레시스(Iontophoresis)로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법으로 수행될 수 있다.

[0048] 상기 단계 2)의 과산소 노출에 의한 폐손상 증상의 측정은 조직병리학적 방법, ELISA, 유세포분석법 또는 중합효소연쇄반응 방법을 사용할 수 있고, 계면활성제 단백질-A(surfactant protein-A), SP-B, SP-C, SP-D, 클라라세포 분비 단백질(clara cell secretory protein, CCSP), β -카테닌, VEGF, FGF-2, HNF3, FOXA2, HIF2- α , IL-6, TNF- α , MCP-1, 세포증식, 세포생존률, 술피레독신(sulfiredoxin, Srx) 및 퍼옥시레독신 술피닐화로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 측정하는 것이 바람직하나, 과산소 노출에 의한 폐손상을 측정할 수 있는 지표라면 무엇이든 측정가능하다.

[0049] 상기 스크리닝 방법을 통해 수득한, 과산소 노출에 의한 폐손상 억제 활성을 나타내는 피검화합물 또는 조성물은 과산소 노출에 의한 폐손상 치료제 후보물질이 될 수 있다. 이와 같은 후보물질은 이후의 과산소 노출에 의한 폐섬유증과 같은 폐손상 치료제 개발 과정에서 선도물질로서 작용하게 되며, 선도물질이 과산소 노출에 의한 폐손상 억제 효과를 나타낼 수 있도록 그 구조를 변형시키고 최적화함으로써 산화적 스트레스로 인해 기인하는 폐손상을 위한 신규한 치료제를 개발할 수 있다.

[0050] 본 발명의 TAZ^{-/-} 마우스의 폐 조직에서 유도된 폐섬유증(lung fibrosis) 증상은 과산소 노출에 의해 발생하는 폐섬유증과 매우 유사한 것으로 나타났고, 과산소 노출에 따른 폐손상시 발현이 변화한다고 알려진 상피 발생 관련 유전자, 성장 인자 및 염증성 사이토카인의 발현 또한 변화하였다. 이는 과산소 노출에 의해 폐손상이 유발된 정상군 마우스 폐에서의 경향과 유사하였으므로, TAZ의 결핍은 과산소 노출 효과와 같은 산화적 스트레스 관련 신호에 영향을 주는 것을 알 수 있다. 또한, TAZ가 Prx의 과산화와 관련되어 산화적 스트레스를 증가시키는 신호 경로에 작용하여 신호 분자들을 억제시킴으로써, 폐의 항상성 조절 기능을 갖는 것을 확인하였으므로, TAZ^{-/-} 마우스는 과산소 노출에 의한 폐손상 치료제의 탐색 및 개발을 위해 유용하게 사용될 수 있다.

[0051] 또한, 본 발명은 TAZ 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 상기 TAZ 단백질을 암호화하는 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 과산소 노출에 의한 폐손상 진단용 키트를 제공한다.

[0052] 상기 TAZ 단백질은 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0053] 상기 TAZ 단백질에 특이적으로 결합하는 항체는 TAZ 단백질의 주입을 통해 제조된 것 또는 시판되어 구입한 것이 모두 사용 가능하고, 상기 항체는 다클론 항체, 단클론 항체 및 에피토프(epitope)와 결합할 수 있는 단편 등을 포함할 수 있다.

[0054] 상기 다클론 항체는 상기 TAZ 단백질을 동물에 주사하고 해당 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 종래의 방법에 의해 생산할 수 있다. 이러한 다클론 항체는 당업계에 알려진 어떠한 방법에 의해서든 정제될 수 있고, 염소, 토끼, 쥐, 래트, 닭, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 종 숙주로부터 만들어질 수 있고, 토끼를 숙주로 하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0055] 상기 단클론 항체는 연속 세포주의 배양을 통한 항체분자의 생성을 제공하는 어떠한 기술을 사용하여도 제조할 수 있다. 이러한 기술로는 이들로 한정되는 것은 아니지만 하이브리도마 기술, 사람 및 쥐 B-세포 하이브리도마 기술 및 EBV-하이브리도마 기술이 포함된다(Kohler G *et al.*, *Nature* 256:495-497, 1975; Kozbor D *et al.*, *J Immunol Methods* 81:31-42, 1985; Cote RJ *et al.*, *Proc Natl Acad Sci* 80:2026-2030, 1983; 및 Cole SP *et al.*, *Mol Cell Biol* 62:109-120, 1984).

[0056] 또한, 상기 TAZ 단백질에 대한 특정 결합 부위를 함유한 항체 단편이 제조될 수 있다. 예를 들면 이들로 한정되는 것은 아니지만 F(ab')₂ 단편은 항체분자를 펩신으로 분해시켜 제조할 수 있으며, Fab 단편은 F(ab')₂ 단편의 디설파이드 브릿지를 환원시킴으로써 제조할 수 있다. 다른 방법으로서, Fab 발현 라이브러리를 작게 하여 원하는 특이성을 갖는 단클론 Fab 단편을 신속하고 간편하게 동정할 수 있다(Huse WD *et al.*, *Science* 254: 1275-1281, 1989).

[0057] 상기 항체는 세척이나 복합체의 분리 등 그 이후의 단계를 용이하게 하기 위해 고형 기질(solid substrate)에 결합될 수 있다. 고형 기질은 예를 들어 합성수지, 니트로셀룰로오스, 유리기관, 금속기관, 유리섬유, 미세구체 및 미세비드 등이 있다. 또한, 상기 합성수지에는 폴리에스터, 폴리염화비닐, 폴리스티렌, 폴리프로필렌, PVDF 및 나일론 등이 있다.

- [0058] 상기 키트는 항원-항체 결합반응, 또는 단백질-리간드 결합반응을 통하여 결합 반응을 정량 또는 정성적으로 분석함으로써 폐암을 진단할 수 있으며, 상기 결합 반응은 통상의 효소면역분석법(ELISA), 방사능면역분석법(radioimmunoassay, RIA), 샌드위치 측정법(sandwich assay), 웨스턴 블랏, 면역침강법, 면역조직화학염색법(immunohistochemical staining), 형광면역법, 효소기질발색법, 항원-항체 응집법 등의 방법을 이용하여 측정할 수 있다.
- [0059] 상기 TAZ 단백질을 암호화하는 핵산에 특이적으로 결합하는 프라이머를 TAZ 유전자 검출 시, PCR 증폭반응에 적용하는 경우, 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermusfiliformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litalis* 또는 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다. 본 발명의 상기 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0060] 상기 키트의 프로브는 엄격한 혼성화 조건하에서 TAZ 핵산 서열에 특이적으로 결합하도록 제작된 것이 바람직하며, 연속적인 15 내지 25 핵산 길이의 센스 및/또는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 바람직하게는 15 내지 30 핵산 길이의 길이, 더욱 바람직하게는 18 내지 25 핵산 길이의 센스 및/또는 안티센스 올리고뉴클레오티드인 것은 모두 사용 가능하다.
- [0061] 상기 특이적 결합은 비특이적인 혼성체가 형성되지 않고, 특이적인 혼성체가 형성되는 것을 의미하고, 상기 엄격한 혼성화 조건은 통상적인 방법에 따라 혼성체를 형성하는 핵산의 용해 온도(T_m) 등에 기초하여 결정할 수 있다. 구체적인 혼성화 상태를 유지할 수 있는 세정 조건으로는 통상 「 $1\times$ SSC, 0.1% SDS, 37℃」 정도의 조건, 더욱 엄격하게는 「 $0.5\times$ SSC, 0.1% SDS, 42℃」 정도의 조건, 더욱더 엄격하게는 「 $0.1\times$ SSC, 0.1% SDS, 65℃」 정도의 조건을 들 수 있다.
- [0062] 상기 프로브는 임의의 고정 기질에 고정화해 이용할 수도 있다. 상기 고정기질로는 유전자 칩 cDNA 마이크로 어레이, 올리고 DNA 어레이, 멤브레인 필터(membrane filter) 등이 포함된다.
- [0063] 상기 키트의 프라이머는 서열번호 4로 기재되는 센스 프라이머 및 서열번호 5로 기재되는 안티센스 프라이머로 구성된 프라이머쌍인 것이 바람직하나, 서열번호 1로 기재되는 핵산 서열을 증폭할 수 있는 15 내지 50 핵산 길이, 바람직하게는 15 내지 30 핵산 길이, 더욱 바람직하게는 18 내지 25 핵산 길이의 센스 및 안티센스 올리고뉴클레오티드는 모두 사용 가능하다:
- [0064] 이때, 상기 키트는 PCR 반응의 요소로써 디옥시뉴클레오티드 혼합물(dNTP mixture) 및 완충용액을 추가로 포함할 수 있으며, Taq DNA 중합효소와 같은 열안정성 DNA 중합효소를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 키트에는 PCR 결과를 확인하는데 필요한 6-FAM, NED 또는 HEX 등의 형광물질, 아가로스 및 전기영동 완충용액 등이 추가로 포함될 수 있다. 또한, 본 발명의 키트는 상기 증폭반응 요소가 상기 프라이머와의 사전혼합물(premix) 형태로 제공될 수 있다.
- [0065] 상기 키트는 추가로 정상 폐 세포를 포함할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 키트의 분석대상이 되는 임상시료는 생검시료 또는 혈액시료일 수 있고, 상기 생검시료는 과산소 노출에 의한 폐손상 진단의 경우 외과적 수술 도중 개체로부터 적취된 폐 조직일 수 있고, 과산소 노출에 의한 폐손상 진단의 경우 상기 폐손상이 의심되는 개체의 폐로부터 적취된 조직일 수 있다.
- [0067] 본 발명의 TAZ^{-/-} 마우스의 폐 조직에서 유도된 폐섬유증(lung fibrosis) 증상은 과산소 노출에 의해 발생하는 폐섬유증과 매우 유사한 것으로 나타났고, 과산소 노출에 따른 폐손상시 발현이 변화한다고 알려진 상피 발생 관련 유전자, 성장 인자 및 염증성 사이토카인의 발현 또한 변화하며, 이는 과산소 노출에 의해 폐손상이 유발된 정상군 마우스 폐에서의 경향과 유사하였다. 또한, TAZ가 산화적 스트레스를 증가시키는 신호 경로에 작용하여 신호 분자들을 억제시킴으로써, 폐의 항상성 조절 기능을 갖는 것을 확인하였으므로, TAZ 유전자 또는 단백질은 과산소 노출에 의한 폐손상 진단 및 예후 예측용 키트에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0068] 아울러, 본 발명은 과산소 노출에 의한 폐손상 진단의 정보를 제공하기 위한 단백질 검출 방법을 제공한다.
- [0069] 상기 검출 방법은 하기 단계를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:
- [0070] 1) 실험군인 과산소 노출에 의한 폐손상이 의심되는 개체와 대조군인 과산소 노출에 의한 폐손상에 걸리지 않

은 개체로부터 유래한 각각의 임상시료에서 TAZ 유전자 또는 단백질의 발현수준을 측정하는 단계; 및

2) 단계 1)의 실험군과 대조군의 TAZ 발현수준을 비교하여 실험군의 TAZ 발현수준이 대조군에 비해 감소하는 경우 과산소 노출에 의한 폐손상 발병가능성이 있는 것으로 판정하는 단계.

상기 방법에 있어서, 상기 과산소 노출에 의한 폐손상은 폐섬유증(fibrosis), 기관지폐이형성증(bronchopulmonary dysplasia) 및 만성폐쇄성폐질환(chronic obstructive pulmonary disease)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 방법에 있어서, 상기 단계 1)의 TAZ 유전자의 발현수준은 RT-PCR법, 실시간 RT-PCR법, 마이크로어레이법, 노던블랏(northern blotting), 유전자 발현의 연속 분석법(SAGE, serial Analysis of Gene Expression) 또는 RNase 보호분석법(RNase protection assay)을 통해 측정할 수 있고, 상기 TAZ 단백질의 발현수준은 웨스턴블랏(Western blotting), 효소-면역화학 검출법(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 면역조직화학 염색법(immunohistochemical staining), 면역침강(immunoprecipitation) 또는 면역형광법(immunofluorescence)을 통해 측정할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

본 발명이 적용가능한 개체는 인간을 포함한 척추동물이고 바람직하게는 포유동물이며, 그보다 바람직하게는 인간 또는, 쥐, 토끼, 기니아피그, 햄스터, 개, 고양이와 같은 실험동물이고, 가장 바람직하게는 인간 또는 침팬지, 고릴라와 같은 유인원류 동물이다.

상기 임상시료는 생검시료 또는 혈액시료일 수 있고, 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 뇌척수액 또는 뇨일 수 있으며, 상기 생검시료는 과산소 노출에 의한 폐손상이 의심되는 개체의 폐로부터 적취된 조직일 수 있다.

본 발명의 TAZ^{-/-} 마우스의 폐 조직에서 유도된 폐섬유증(lung fibrosis) 증상은 과산소 노출에 의해 발생하는 폐섬유증과 매우 유사한 것으로 나타났고, 과산소 노출에 따른 폐손상시 발현이 변화한다고 알려진 상피 발생 관련 유전자, 성장 인자 및 염증성 사이토카인의 발현 또한 변화하며, 이는 과산소 노출에 의해 폐손상이 유발된 정상군 마우스 폐에서의 경향과 유사하였다. 또한, TAZ가 산화적 스트레스를 증가시키는 신호 경로에 작용하여 신호 분자들을 억제시킴으로써, 폐의 항상성 조절 기능을 갖는 것을 확인하였으므로, TAZ 유전자 또는 단백질은 과산소 노출에 의한 폐손상을 진단하고 예후를 예측하는데 유용하게 사용될 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

TAZ^{-/-} 마우스 제조 및 유전자형 분석

<1-1> TAZ 유전자가 결핍된 마우스의 제조

TAZ 유전자가 녹아아웃된 마우스를 제조하기 위해, 도 1에 나타낸 TAZ 유전자 녹아아웃 카세트를 포함하는 TAZ 유전자 결손 벡터를 제조하여, 이를 전기천공법(electroporation)을 통해 C57BL/6j(Jackson Laboratory(Bar Harbor, ME) 마우스 유래의 배아줄기세포(ES)에 형질감염시켰다. 상기 ES 세포의 DNA에 대하여 서던 블랏(Southern blot) 분석을 실시하여 상기 벡터가 배아줄기 세포의 게놈(genome) 내에 삽입된 배아줄기세포만을 선별하였고, TAZ 유전자 녹아아웃 카세트의 도입이 확인된 ES 세포 클론을 C57BL/6j 암컷 마우스로부터 수득한 배반포(blastocyst)의 포배강(blastocoel)에 미세주입(microinjection)하여 이를 대리모 자궁에 이식하였다. 대리모로부터 출생한 키메라 생쥐는 배아줄기세포가 생식선으로 이행(germ line transmission)되었는지 여부를 확인하기 위해 다시 정상 마우스와 역교배시켰다. 그런 다음, TAZ 유전자 결손이 확인된 마우스 간의 교배를 통하여 완전하게 양쪽 유전자가 모두 결손된 동형접합체(TAZ^{-/-}) 마우스를 제조하였다.

<1-2> 마우스의 유전자형 분석

실험에 사용된 마우스의 유전자형을 분석하기 위해, 2.5 내지 3주령의 마우스로부터 수득한 꼬리를 55℃의 꼬

리용해버퍼(tail lysis buffer)(Tris 100 mM, NaCl 200 mM, SDS 0.2%, EDTA 5 mM, 및 100 μ g/ml proteinase K)에서 용해시켰다. 하룻 밤 뒤, 이를 원심분리하여(12000 rpm, 4°C, 10분) 상층액을 새로운 튜브에 옮기고, DNA 침전을 위해 여기에 동량의 아이소프로판올(isopropanol)을 첨가하였다. 그런 다음, 부드럽게 위아래로 뒤집어 섞어주었다. DNA 침전물을 70% 에탄올로 옮기고 혼합한 후, DNA를 TE로 용출하였다. 용출된 DNA는 55°C에서 2 내지 3시간 동안 방치한 뒤 유전자형 분석을 위한 PCR에 사용하였다. TAZ^{-/-} 마우스를 확인하기 위해, PCR은 KS-Neo-R: 5'-GGAGAACCTGCGTGCAATCCATC-3'(서열번호 3), TAZ-GP2: 5'-ATGGGACAGTCCGGGAG-3'(서열번호 4), 및 TAZ-GP3: 5'-GTGCAAGTCAGAGGAGG-3'(서열번호 5) 프라이머를 사용하여, 94°C에서 3분 수행한 후, 94°C에서 30초, 59°C에서 1분 및 72°C에서 30초를 34 사이클 반복한 다음, 72°C에서 10분간 수행하였다. 증폭된 유전자 단편의 크기는 1× TAE 버퍼(Tris/Acetate/EDTA)에서 1% 아가로스 겔로 확인하였다(정상군: 510 bp, TAZ^{-/-}: 800bp).

[0084] <1-3> 마우스 사육

[0085] 상기 실시예 <1-1>에서 제조한 TAZ 녹아웃 마우스(TAZ^{-/-}), 및 정상군 마우스를 사료 및 물을 자유롭게 섭취하도록 하여 사육하였다. 모든 실험은 성별 및 나이가 일치하는 마우스를 이용하여 실시하였다.

[0086] <1-4> 마우스의 과산소 노출

[0087] TAZ 녹아웃 마우스(TAZ^{-/-}) 또는 정상군 마우스를, 충분한 유속의 95% O₂로 포화된 챔버에서 24, 48 또는 72시간 동안 등압의 과산소에 노출시켰고, 대조군 마우스는 실내공기에 노출시켰다. 모든 동물 실험은 이화여자대학교의 이화 실험동물유전체센터의 가이드라인에 따라 실시되었고, IACUC의 승인을 받았다.

실시예 2

[0088] TAZ^{-/-} 마우스 폐에서 TAZ 발현의 확인

[0089] <2-1> TAZ 유전자의 발현 확인

[0090] TAZ^{-/-} 마우스 폐에서의 TAZ 유전자의 발현을 확인하기 위해, 실시간 중합효소연쇄반응(real time polymerase chain reaction)을 실시하였다. TAZ^{-/-} 마우스 또는 정상군 마우스의 폐 조직으로부터 TRIzol 시약을 사용하여 총 RNA를 분리하였고, 이를 superscript II reverse transcriptase(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용한 cDNA 합성에 사용하였다. 합성된 cDNA 및 TAZ 유전자에 대한 프라이머쌍(TAZ-F: 5'-GTCACCAACAGTAGCTCAGATC-3'(서열번호 6) 및 TAZ-R: 5'-AGTGATTACAGCCAGGTTAGAAAG-3'(서열번호 7)을 사용하여 ABI 7000 amplification system(Applide Biosystems)을 통해 실시간 PCR을 실시하였다. 각각의 mRNA의 상대적인 발현량은 β -액틴의 발현 정도로 표준화한 후 측정하였다.

[0091] 그 결과, 도 2의 B에 나타난 바와 같이, TAZ^{-/-} 마우스 폐에서 TAZ 유전자의 발현량은 정상군 마우스 폐에서의 발현량보다 현저히 감소한 것으로 나타났다(도 2의 B)

[0092] <2-2> TAZ 단백질의 발현 확인

[0093] TAZ^{-/-} 마우스 폐에서의 TAZ 단백질의 발현을 확인하기 위해, 웨스턴 블랏팅을 실시하였다. TAZ^{-/-} 마우스 또는 정상군 마우스의 폐 조직으로부터 분리한 세포 용해물은 10% 글리세롤(glycerol), 50 mM 헤페스(Hepes)(pH 7.5), 0.1% 트리톤 X-100, 150 mM NaCl, 50 mM β -글리세롤 포스페이트(β -glycerol phosphate), 25 mM NaF, 20 mM EGTA(pH 8.0), 15 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 1 mM Na₃VO₄, 1 mM PMSF, 및 프로테아제 억제제(protease inhibitor)가 포함된 버퍼에서 제조하였다. 단백질 함량은 브래드포드 분석(Bradford assay)을 통해 측정하였다. 하나의 레인당 30 μ g의 동일한 양의 단백질을 7.5% 및 15% SDS-PAGE 겔에 로딩하였고, 나이트로셀룰로스 막(nitrocellulose membranes)(whatman international)으로 단백질을 옮긴 후, 3% 소혈청알부민(bovine

serum albumin, BSA)-TBST(1 M Tris (pH 7.4), 4 M NaCl 및 20% 트윈 20)으로 1시간 동안 상온에서 블로킹하였다. TAZ 단백질에 대한 항체는 1% BSA-TBST에 희석하여 사용하였고, 상기 막은 4℃ 조건에서 하룻밤 동안 일차 항체와 함께 방치하였다. 막을 배양한 후 TBST로 3회 세척한 다음, 1시간 동안 상온에서 이차 항체(TBST에 1:10,000으로 희석)와 함께 방치하였다. 그런 다음, ECL 용액(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)을 사용하여 단백질 밴드를 현상하였다.

[0094] 그 결과, 도 2의 C에 나타난 바와 같이, 정상군 마우스 폐에서는 TAZ 단백질이 발현되는 것으로 나타났으나, TAZ^{-/-} 마우스 폐에서는 TAZ 단백질의 발현이 거의 확인되지 않았다(도 2의 C).

실시예 3

[0095] TAZ^{-/-} 마우스 폐의 폐섬유화증 분석

[0096] <3-1> TAZ^{-/-} 마우스 폐 조직 슬라이드의 제작

[0097] 상기 실시예 <1-1>의 TAZ^{-/-} 마우스, 및 정상군 마우스로부터 각각 폐를 분리하여, 폐 조직을 4℃에서 18시간(또는 하룻밤) 동안 4% 파라포름알데하이드 용액에 고정하였다. 그런 다음, 폐 조직을 카세트에 옮기고, 5시간 동안 수돗물로 세척하여 건조한 후, 자일렌으로 교체하고 파라핀으로 교체하는 단계를 거친 다음, 폐 조직을 파라핀에 포매하여 5 μm의 절편 슬라이드를 제작하였다.

[0098] <3-2> 헤마톡실린 및 에오신 염색(Hematoxylin and eosin staining)을 통한 폐 조직의 분석

[0099] 상기 실시예 <2-1>에서 제작한, 폐 조직이 고정된 슬라이드를 60℃에서 20분간 배양하였다. 그런 다음, 파라핀을 제거하기 위해 각각 10분씩 3회에 걸쳐 상기 슬라이드를 자일렌에 담가 두었다. 그 후, 100% 에탄올에 5분, 90% 에탄올에 5분, 80% 에탄올에 5분, 및 증류수에 5분간 방치하여 재수화 단계를 실시하였다. 염색은 헤마톡실린에서 10분간 수행한 후, 10분간 수돗물에서 세척하였고, 몇 초간 1% 염화수소가 담긴 70% 에탄올에 방치한 후, 5분간 수돗물에서 다시 세척한 다음, 1분간 에오신을 처리하였다. 그 후, 80% 에탄올에 2분, 90% 에탄올에 2분, 100% 에탄올에 2분, 및 자일렌에 3분간 3회 방치하여 탈수 단계를 실시하였다. 그런 다음, 마운팅 용액(mounting solution) 및 캐나다 발삼(Canada balsam)(Fluka chemika, Buchs, Switzerland)을 사용하여 20분 이상 공기 중에 건조시키고, 커버 글라스로 덮어주었다.

[0100] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, TAZ^{-/-} 마우스의 폐는 정상군 마우스에 비해 부피가 크고 표면 및 조직구조의 손상이 나타나는 폐섬유화증의 증상이 확인되었다(도 2의 A). 또한, H&E 염색을 통해 폐 조직을 확인한 결과, 기도 상피세포에 염색된 정도는 TAZ^{-/-} 마우스와 정상군 마우스에서 유의적인 차이가 나타나지 않았으나, TAZ^{-/-} 마우스 폐의 폐포벽(alveolar walls)은 심하게 파괴된 것으로 나타났다. 이때, 24주령 TAZ^{-/-} 마우스의 폐는 9주령 마우스의 폐에서보다 염증이 더욱 심하게 나타난 것으로 확인되어 나이가 많을수록 폐섬유화증이 심화되는 경향을 나타냈다(도 2의 D).

[0101] <3-3> 상피 구조 관련 마커 유전자 및 염증성 사이토카인 발현의 확인

[0102] 상기와 같이, TAZ^{-/-} 마우스 폐의 표현형에 기초하여, 인간의 말단부 전달기도(distal conducting airway)의 정상 상피의 유지에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려진 다양한 상피 구조 관련 마커 유전자들의 발현과 염증성 사이토카인의 발현을 확인하기 위해, 정량적 실시간 PCR을 실시하였다. 9주령의 TAZ^{-/-} 마우스 또는 정상군 마우스 폐 조직으로부터 TRIzol 시약을 사용하여 총 RNA를 분리하였고, 올리고(dT) 프라이머를 사용하여 역전사를 실시하여 상기 RNA로부터 cDNA를 합성하였다. SYBR Green PCR Master Mix를 사용하여 ABI 7000 amplification system(Applied Biosystems)을 통해 정량적 실시간 PCR을 실시하였다. 이때, 하기 표 1에 기재된 상피 계면활성제 단백질 및 염증성 사이토카인에 대한 프라이머쌍을 사용하였다.

표 1

프라이머	서열(5'-3')	서열번호
TAZ forward	GTCACCAACAGTAGCTCAGATC	6
TAZ reverse	AGTGATTACAGCCAGGTTAGAAAG	7
SP-A forward	GCTGTCAGTGGGGGATAAAG	8
SP-A reverse	CTTTGTAATGCTTGCGATGG	9
SP-B forward	CTTGTCCTCCGATGTTCCAC	10
SP-B reverse	GGCCTGGTTGATCACAGACT	11
SP-C forward	CAGCTCCAGGAACCTACTGC	12
SP-C reverse	GCTTAGAGGTGGGTGTGGAG	13
SP-D forward	GAGGTTGCCTTCTCCCACTA	14
SP-D reverse	AGCCTGTTTGACATCTCCT	15
CCSP forward	CATCATGAAGCTCACGGAGA	16
CCSP reverse	GAGACACAGGGCAGTGACAA	17
VEGF forward	TCACCAAAGCCAGCACATAG	18
VEGF reverse	AATGCTTTCTCCGCTCTGAA	19
FGF2 forward	CCAACCGGTACCTTGCTATGA	20
FGF2 reverse	TTCGTTTCAGTGCCACATACCA	21
beta-catenin forward	GGCAGCAGCAGTCTTACTTG	22
beta-catenin reverse	AAGGACTGGGAAAAGCCTTG	23
HNF3a forward	CCCTTTCTCCCTTTCCTCC	24
HNF3a reverse	GTGGTGGGCCAACAACAAC	25
FoxA2 forward	GCCAGCGAGTTAAAGTATGC	26
FoxA2 reverse	TCATGTTGCTCACGGAAGAG	27
HIF-1a forward	GTTTACTAAAGGACAAGTCACC	28
HIF-1a reverse	TTCTGTTTGTGAAGGGAG	29
HIF-2a forward	GTCACCAGAACTTGTC	30
HIF-2a reverse	CAAAGATGCTGTTTCATGG	31
IL-6 forward	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	32
IL-6 reverse	AAGTGATCATCGTTGTTTCATACA	33
TNFa forward	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	34
TNFa reverse	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	35
MCP1 forward	CTTCTGGGCCTGCTGTTCA	36
MCP1 reverse	CCAGCCTACTATTGGGATCA	37
Nrf2 forward	CTCCAGGTTGCCACATTC	38
Nrf2 reverse	CCTGCCAACTTGCTCCATG	39
Srx forward	TCACCATGTGTGGAAGTGT	40
Srx reverse	GTGCCACAGAGCCTAGAAG	41
beta-actin forward	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	42
beta-actin reverse	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	43

그 결과, 도 3a, b, 및 c에 나타낸 바와 같이, TAZ^{-/-} 마우스 폐에서의 대부분의 상피 구조 관련 마커 유전자들은 정상군에 비해 발현이 감소되는 것으로 나타났다. 계면활성제 단백질 A, B, C, 및 D, 클라라 세포 분비 단백질(clara cell secretory protein)의 발현량은 정상군 마우스 폐에 비해 TAZ^{-/-} 마우스 폐에서 감소하는 것으로 나타났고(도 3a), TAZ^{-/-} 마우스 폐에서의 혈관내피성장인자(Vascular Endothelial growth factor, VEGF), 섬유아세포 성장인자-2(Fibroblast growth Factor-2, FGF-2), 베타-카테닌(β -catenine), 간세포핵인자 3(Hepatocyte Nuclear Factor 3, HNF3), 포크헤드 박스 A2(Forkhead box A2, FOXA2) 및 저산소증 유도성 인자(Hypoxia inducible factor 2-a, HIF2-a)의 발현도 정상군에서보다 감소하였다(도 3b). 한편, TAZ^{-/-} 마우스 폐에서의 염증성 사이토카인인 인터루킨-6(interleukin-6, IL-6), 종양괴사인자- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 및 인간 단핵구 화학주성 단백질-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)의 발현량은 정상군에 비해 유의적으로 감소하였다(도 3c).

실시예 4

[0105] 과산소 노출된 마우스의 폐섬유화증과 TAZ와의 관련성 확인

[0106] <4-1> 과산소 노출된 정상군 마우스 폐의 조직학적 분석

[0107] 상기 실시예 <1-4>의 방법에 따라 과산소가 노출된 정상군 마우스의 폐 조직을 상기 실시예 <3-2>의 H&E 염색을 실시하여 조직학적으로 분석하였다.

[0108] 그 결과, 도 4의 A에 나타난 바와 같이, 과산소에 72시간 동안 노출됨으로써, 9주령의 정상군 마우스는 폐섬유화증의 표현형을 나타내는 것으로 확인되었다(도 4의 A).

[0109] <4-2> 과산소 노출에 의한 상피 구조 관련 마커 유전자 및 염증성 사이토카인 발현 변화의 확인

[0110] 상기 실시예 <3-3>의 방법에 따라, 72시간 동안 과산소에 노출된 TAZ^{-/-} 마우스 또는 정상군 마우스 폐에서의 위피세포 발생 단백질(CCSP 및 SP-C), 및 세포 발생 인자(FGF-2 및 VEGF)의 유전자 발현을 확인하였다.

[0111] 그 결과, 도 4의 B 및 도 5에 나타난 바와 같이, 과산소 노출되지 않은 대조군에 비해 과산소에 노출되어 폐섬유화증이 유도된 정상군 마우스에서 CCSP, SP-C, FGF-2 및 VEGF의 발현이 감소된 것으로 나타났고(도 4의 B), 과산소에 노출된 TAZ^{-/-} 마우스 폐에서의 CCSP, SP-C, FGF-2 및 VEGF의 발현량은 과산소에 노출되지 않은 TAZ^{-/-} 마우스 또는 과산소에 노출된 정상군 마우스의 폐에서보다 현저히 낮은 것을 확인하였다(도 6).

[0112] <4-3> 과산소 노출된 정상군 마우스 폐에서 TAZ 발현의 확인

[0113] 과산소 노출된 정상군 마우스 폐에서의 TAZ의 발현을 확인하기 위해, 상기 <실시예 2>의 방법에 따라, 실시간 PCR 및 웨스턴 블랏을 실시하였다.

[0114] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 과산소 노출된 정상군 마우스 폐에서는 TAZ 단백질 및 유전자의 발현이 감소한 것을 확인하였다. 이때, 단시간(24 또는 48시간) 동안 과산소에 노출된 경우에는 TAZ 단백질의 발현이 대조군 마우스와 유의적인 차이가 없었으나, 과산소에 72시간 동안 노출된 경우에는 TAZ 단백질의 발현이 대조군 마우스에 비해 유의적으로 감소하는 것으로 확인되었다(도 5의 A 및 B).

[0115]

실시예 5

[0116] 과산소 노출된 세포와 TAZ의 관련성 확인

[0117] <5-1> 세포 배양

[0118] 폐섬유화증과 같은 폐 상피 병원체 연구에 사용되는, 선암 인간 폐포 기저 상피세포인(adenocarcinomic human alveolar basal epithelial cell) A549 세포를 미국 타입 컬처 콜렉션(American Type Culture Collection, ATCC, Rockville, MD, U.S.A.)으로부터 구입하여, 100 U/ml 페닐실린(penicillin), 100 mg/ml 스트렙토마이신(streptomycin) 및 10% 우태아혈청이 첨가된 RPBI 1640(GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 배양하였다. TAZ가 녹다운된 A549 세포(Ti)는 TAZ를 녹다운시키기 위해 설계된 siRNA 올리고뉴클레오티드를 형질도입하여 제작하였다. 마우스 배아 섬유아세포(Mouse embryo fibroblasts, MEFs)는 TAZ^{-/-} 마우스 또는 정상군 마우스로부터 분리한 일차 MEF를 불멸화하여 제작하였고(MEFs TAZ^{-/-}, MEFs WT), 100 U/ml 페닐실린, 100 mg/ml 스트렙토마이신 및 10% 우태아혈청이 첨가된 DMEM(Dulbecco's modified Eagles medium, GIBCO)에서 배양하였다.

[0119] <5-2> 과산소 노출된 A549 세포의 TAZ 단백질의 발현 확인

[0120] A549 세포를 1.5×10^5 세포수/ml의 농도로 6 웰 배양 접시에서 37℃의 95% O₂ 조건하에서 배양하였다. 세포를

37°C의 5% CO₂ 및 95% O₂ 환경하에서 48시간 동안 과산소에 노출시킨 뒤, 세포 용해물에 대해 TAZ 항체를 이용한 웨스턴 블랏을 실시하여 TAZ 단백질 발현을 확인하였다. 이때, 대조군은, 세포를 37°C의 5% CO₂ 및 95% 대기 환경하에서 배양하였다.

[0121] 그 결과, 도 5의 C에 나타난 바와 같이, 과산소 노출된 A549 세포는, 과산소에 노출되지 않은 대조군 세포에 비해 TAZ 단백질의 발현이 감소하는 것으로 나타났다(도 5의 C).

[0122] <5-3> 과산소 노출된 세포의 세포증식 변화 확인

[0123] 상기 실시예 <5-1>에서 배양한 A549, Ti, MEFs WT 또는 MEFs TAZ^{-/-} 세포를 3×10⁵ 세포수/웰의 농도로 6 웰 배양 접시의 10% 우태아혈청이 포함된 RPMI 배지에서 배양하여, 37°C의 95% O₂ 조건하에서 24 또는 48시간 동안 과산소에 노출시켰다. 그런 다음, 트립신/EDTA를 사용하여 A549 세포를 배양 접시로부터 수득하여 헤마토피아이트로미터(hemocytometer)로 세포수를 측정하였다. 또한, 세포증식을 분석하기 위해, CFSE 염색을 실시하였다. 0.1% BSA가 포함된 PBS에 A549 세포를 1×10⁷ 세포수/ml의 농도로 준비하고, 이를 37°C에서 10분간 5 μM 카르복시플루오레세인 디아세테이트(carboxyfluorescein diacetate) 및 숙신이미딜 에스터(succinimidyl ester, CFSE)와 함께 배양하였다. 배양 후 반응을 종결하기 위해, PBS를 첨가하고 10% FBS가 포함된 RPMI로 세척하였다. 그런 다음, 세포를 과산소 또는 정상 상태하에서 배양하였다. 배양 후 24, 48 및 72시간 후, 세포를 수득하여 CFSE의 검출을 위해 유세포분석(flow cytometry)을 실시하였다. 형광 활성화 세포분석(fluorescence activated cell sorting, FACS) 결과는 CellQuest software(Becton Dickinson, CA, USA)를 사용하여 분석하였다.

[0124] 그 결과, 도 7 및 8에 나타난 바와 같이, A549 세포의 세포수 측정을 통해, 과산소에 노출된 A549 세포는 세포수가 급격히 감소한 것으로 확인되었고(도 7의 A 및 B), CFSE 염색을 통해, 과산소에 의해 유도된 폐섬유화증은 상피세포 증식을 감소시키는 것으로 확인되었다(도 8의 A). 한편, 과산소에 노출된 TAZ 녹다운 Ti 세포(도 8의 D)는 대조군인 BP 세포에 비해 유의적인 상피세포 증식 감소가 나타나지 않았으나(도 8의 B), 정상상태에 노출된 MEFs TAZ^{-/-} 세포의 세포증식은 정상군의 MEF 세포에 비해 감소하였다(도 8의 C). 즉, TAZ 결핍에 의한 폐섬유증은 과산소에 노출되어 유도된 폐섬유증은 같이, 상피세포 증식이 억제됨을 확인하였다.

실시예 6

[0125] 과산소 노출된 정상군 마우스 및 TAZ^{-/-} 마우스의 폐섬유화증 비교

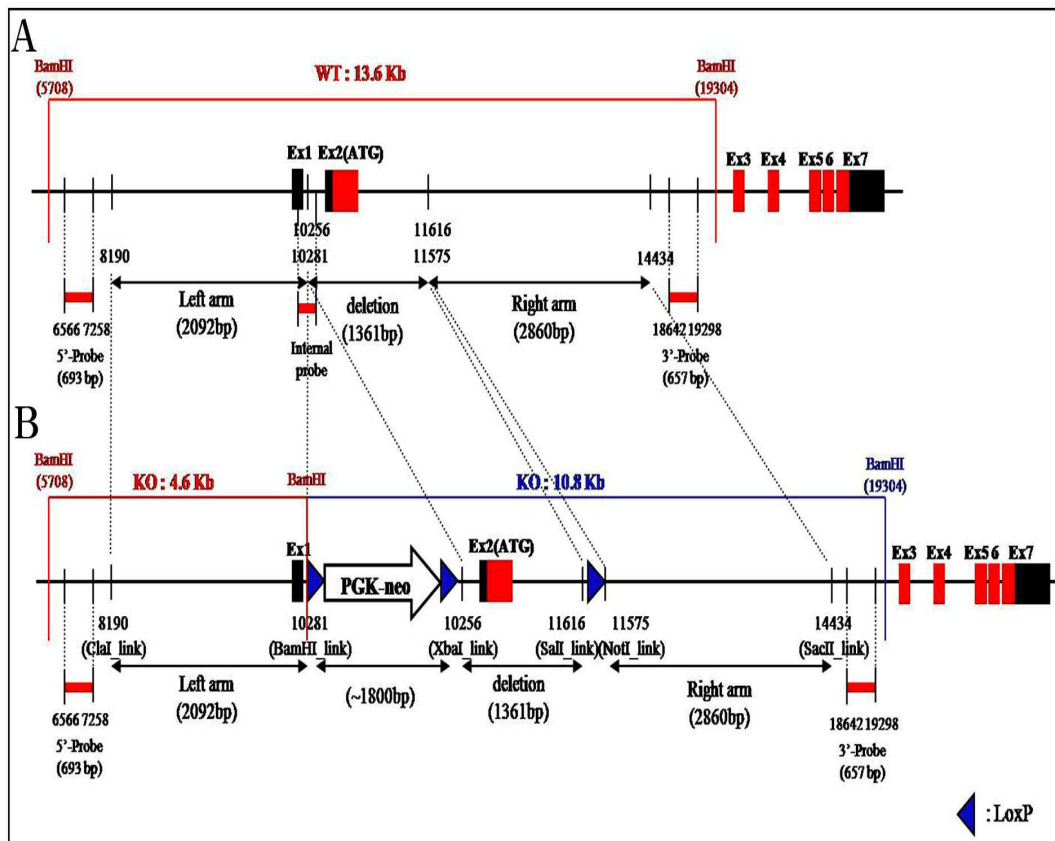
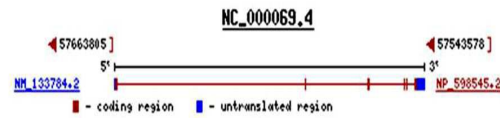
[0126] 과산소는 퍼옥사이드(peroxide)의 세포내 수준을 증가시킴으로써 Nrf-2 의존적인 술폰레독신(sulfiredoxin, Srx) 발현 유도를 증가시킨다고 보고되었고, 이는 과산소 노출된 폐에서 퍼옥시레독신 III(PrxIII)가 분해되어 술폰화 형태의 산화를 통한 것이라고 알려져 있으므로, TAZ^{-/-} 마우스의 폐에서의 Srx 발현 및 Prx 술폰화(sulfinylation)를 확인하고자 하였다. 먼저, 3일 동안 과산소에 노출된 정상군 마우스와 정상 상태의 정상군 마우스의 폐 조직으로부터 분리된 50 μg의 단백질과, Srx, 2-Cys Prx-SO₃ 및 β-액틴에 특이적인 각각의 항체를 사용하여 면역블랏 분석을 실시하였다. 또한, TAZ^{-/-} 마우스 또는 정상군 마우스의 폐로부터 총 RNA를 분리하여, Nrf2, Srx 및 β-액틴 mRNA에 특이적인 각각의 프라이머쌍을 사용하여 실시간 PCR을 실시하였고, TAZ^{-/-} 마우스 또는 정상군 마우스의 폐로부터 50 μg의 단백질을 분리하여 상기와 같이, 면역블랏 분석을 실시하여 Srx 및 Prx-SO₃의 발현을 확인하고자하였다.

[0127] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 과산소 상태에서 유도된다고 알려진 Srx 및 Prx-SO₃ 발현 수준은, 대조군에 비해 과산소에 노출된 정상군 마우스 폐에서 증가한 것으로 나타났고(도 9의 A), 과산소에 노출되지 않은 TAZ^{-/-} 마우스의 폐에서도 Srx 및 Prx-SO₃ 유전자 및 단백질의 발현이 정상군 마우스에서보다 증가하였으며, (도 9의 C 및 D), Nrf2의 발현 역시 정상군보다 TAZ^{-/-} 마우스의 폐에서 증가하였다(도 9의 B).

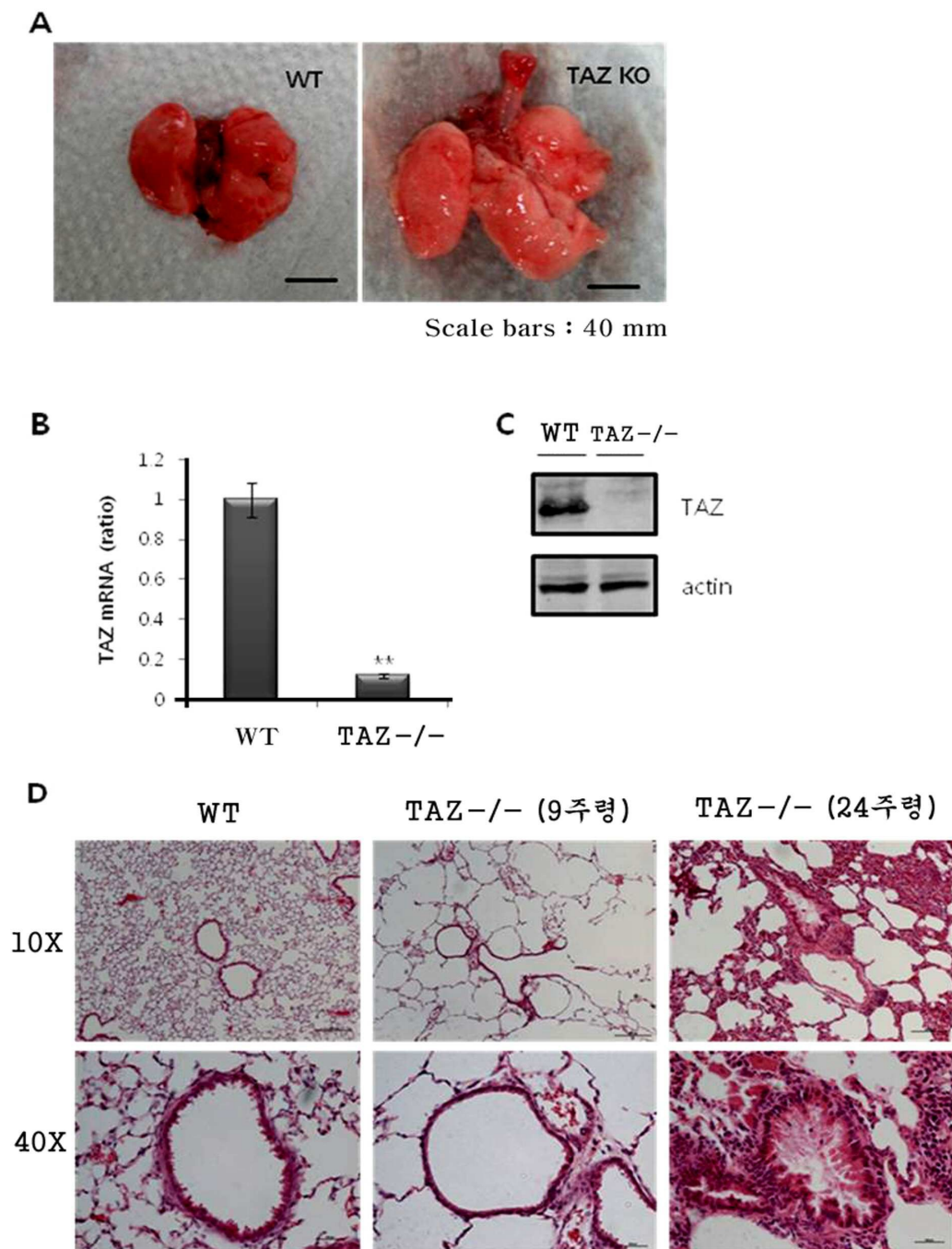
도면

도면1

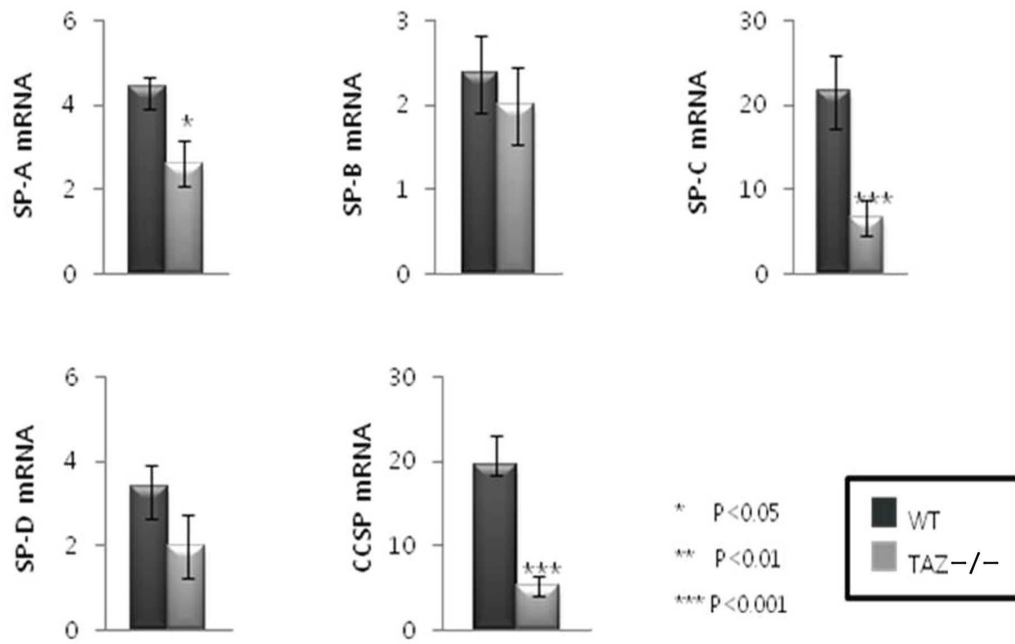
TAZ (*Wwtr1*)
(chromosome 3)



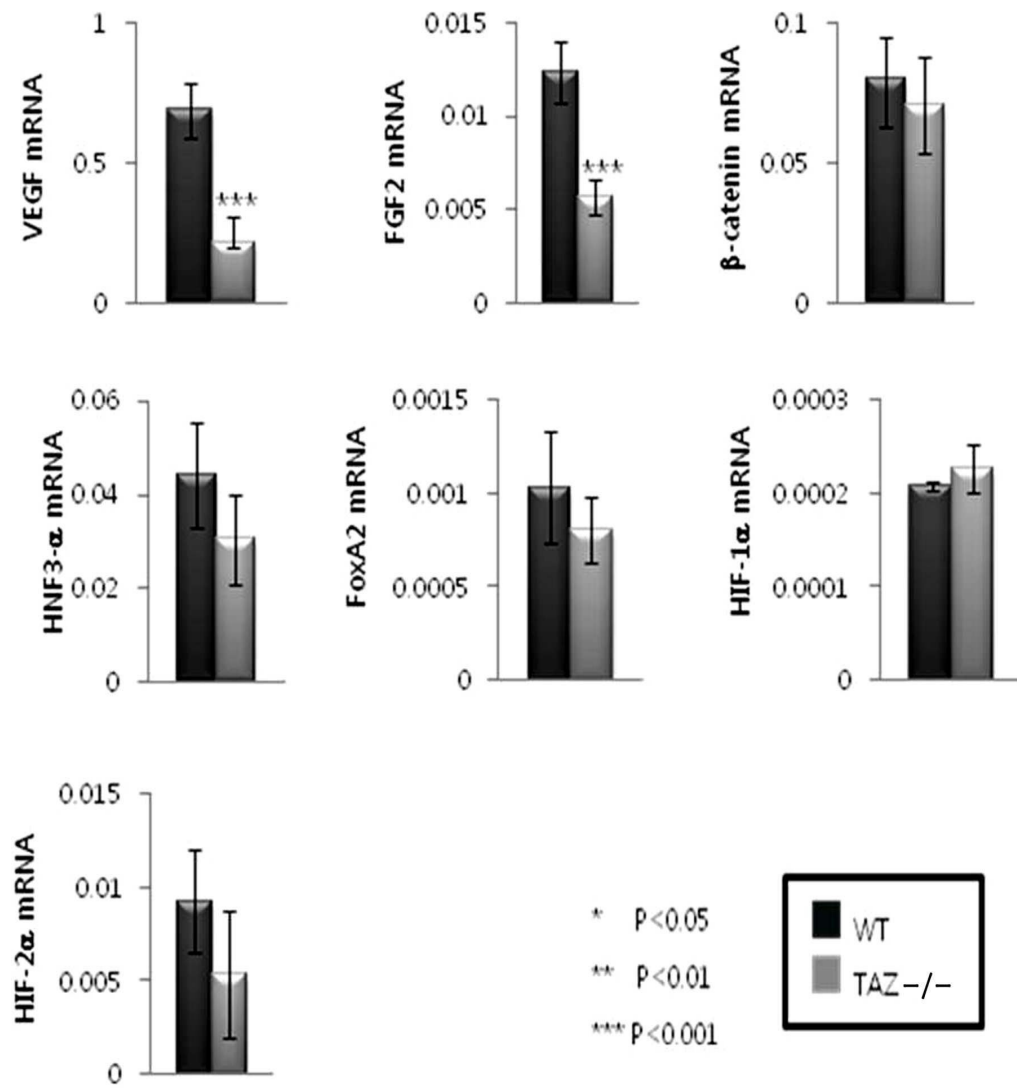
도면2



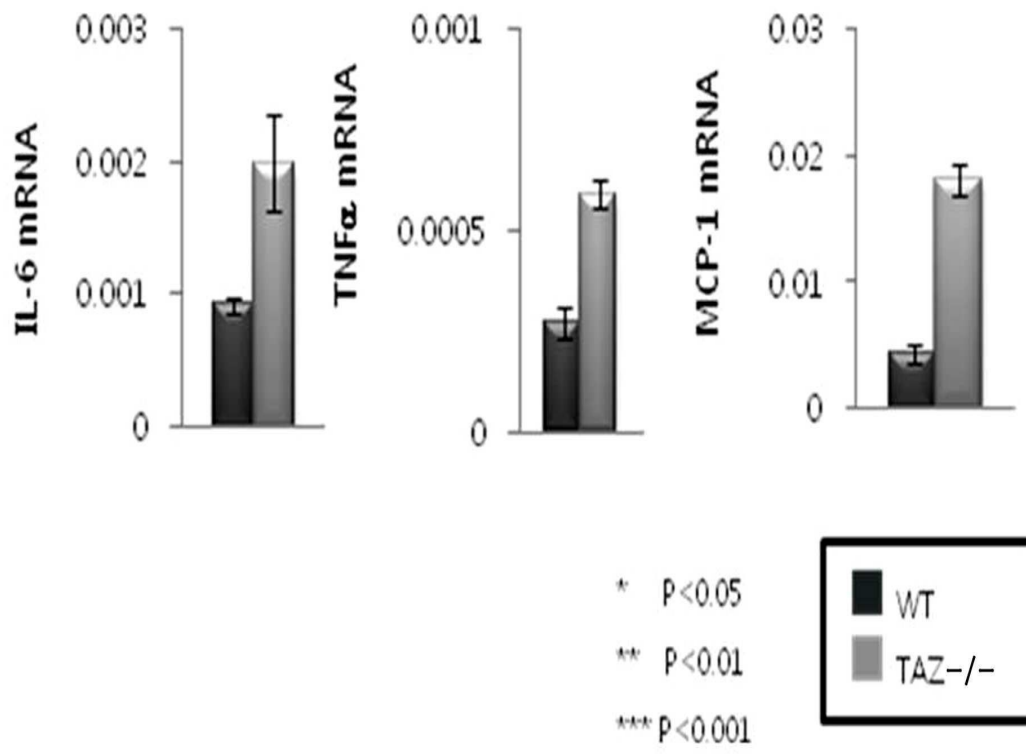
도면3a



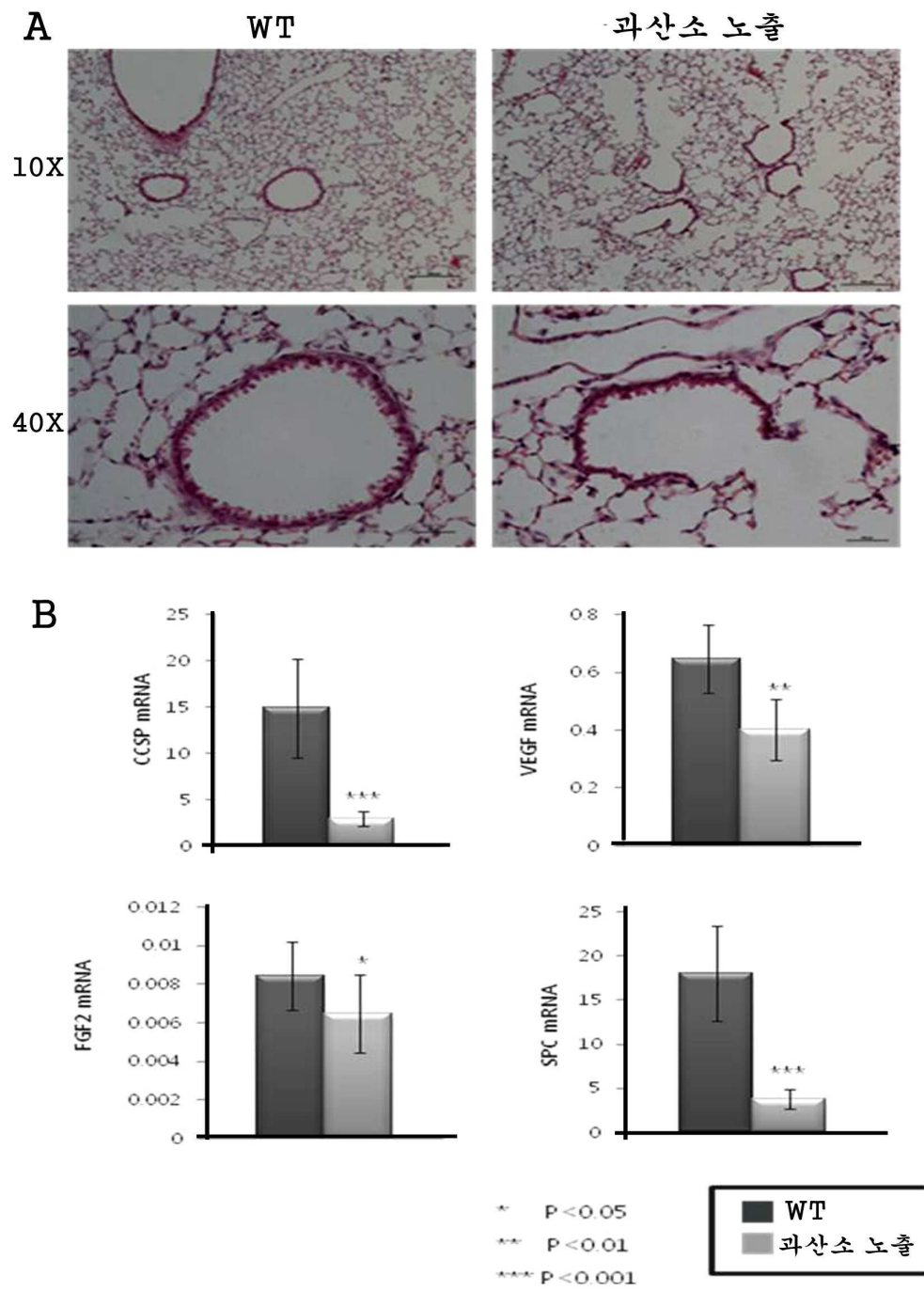
도면3b



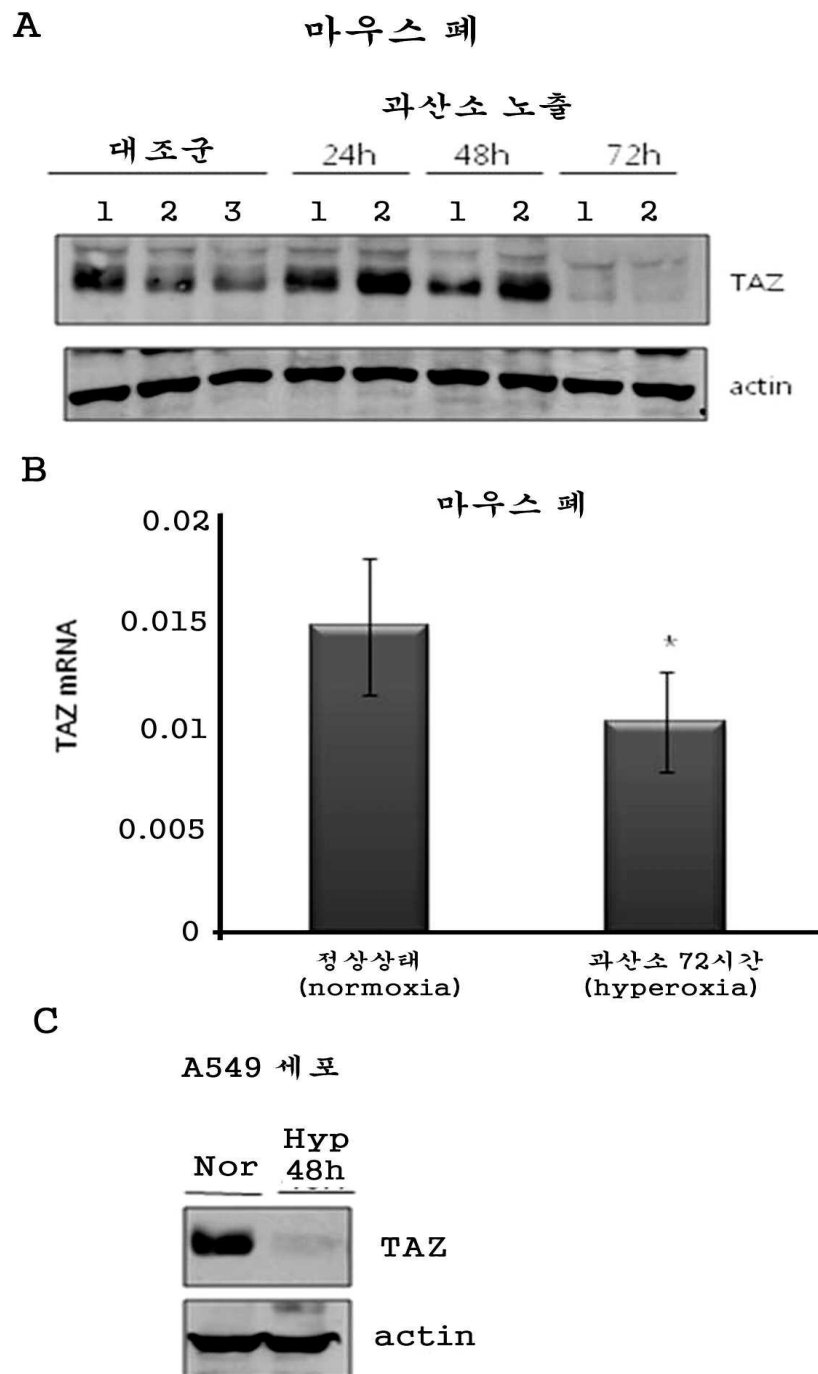
도면3c



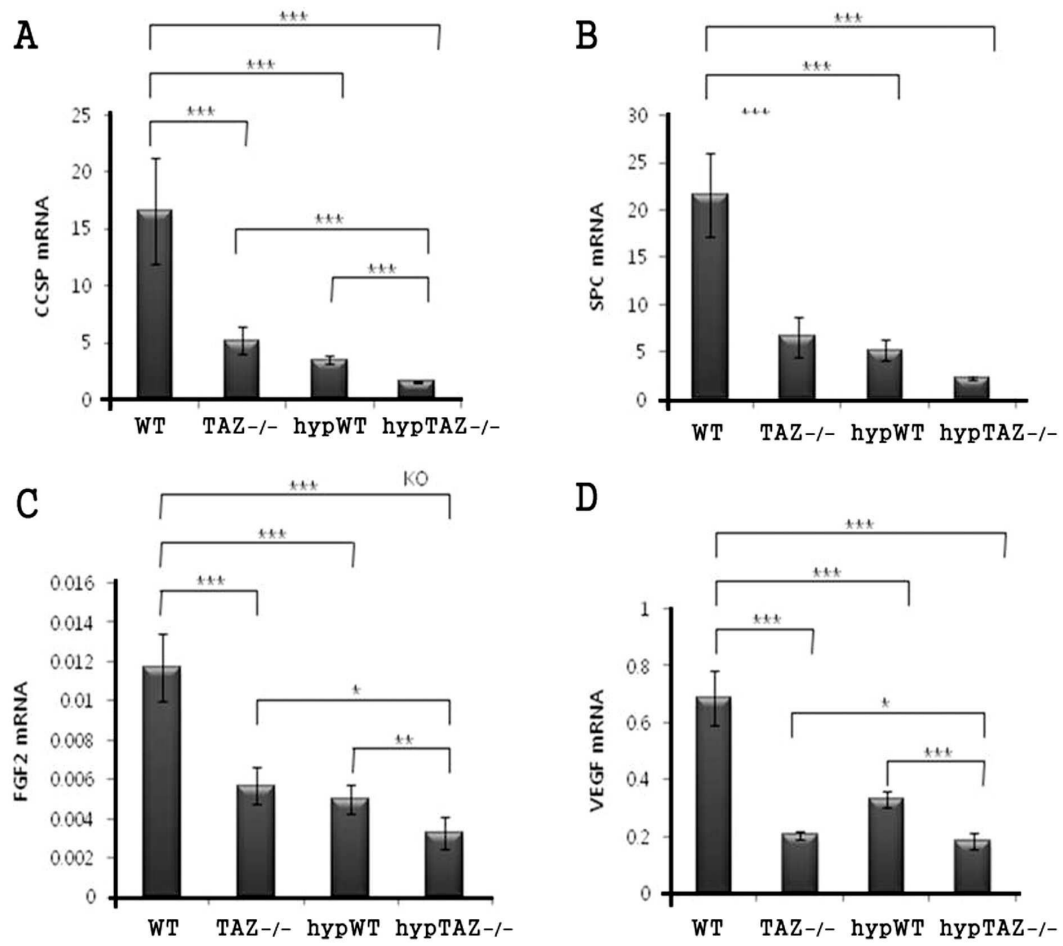
도면4



도면5

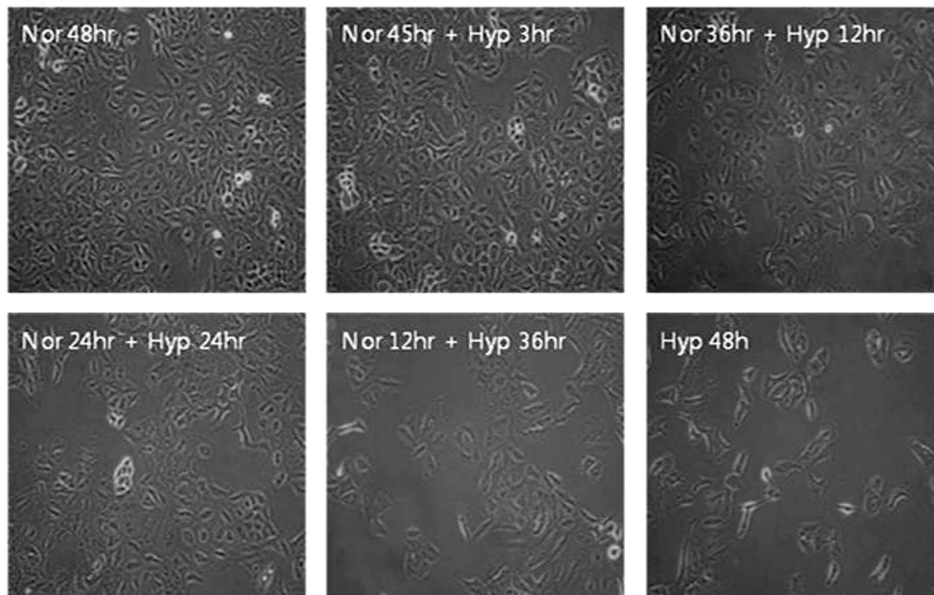


도면6

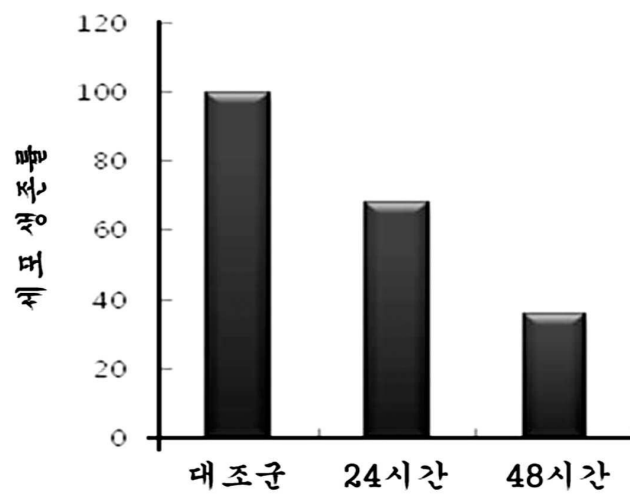


도면7

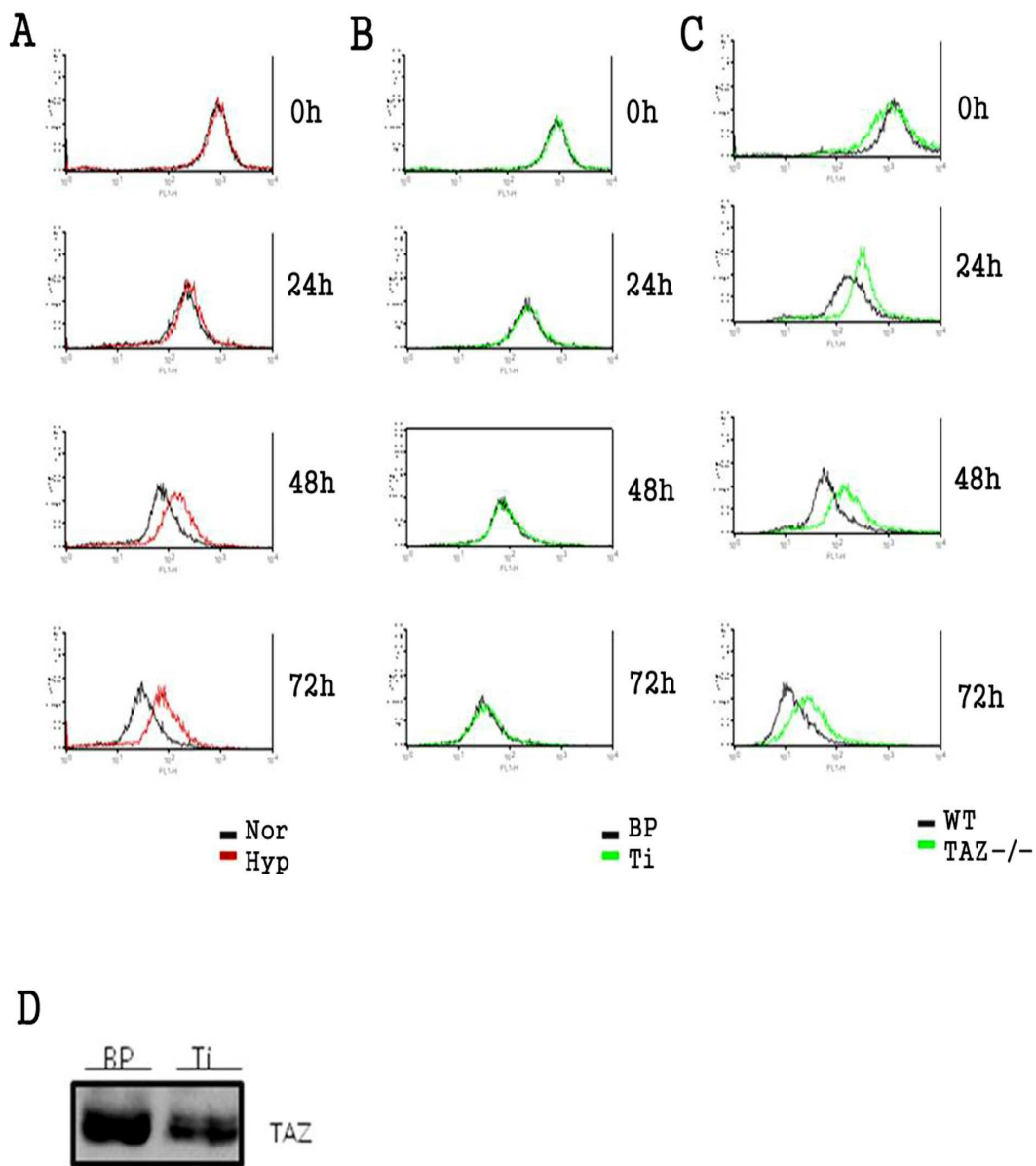
A
과산화 처리



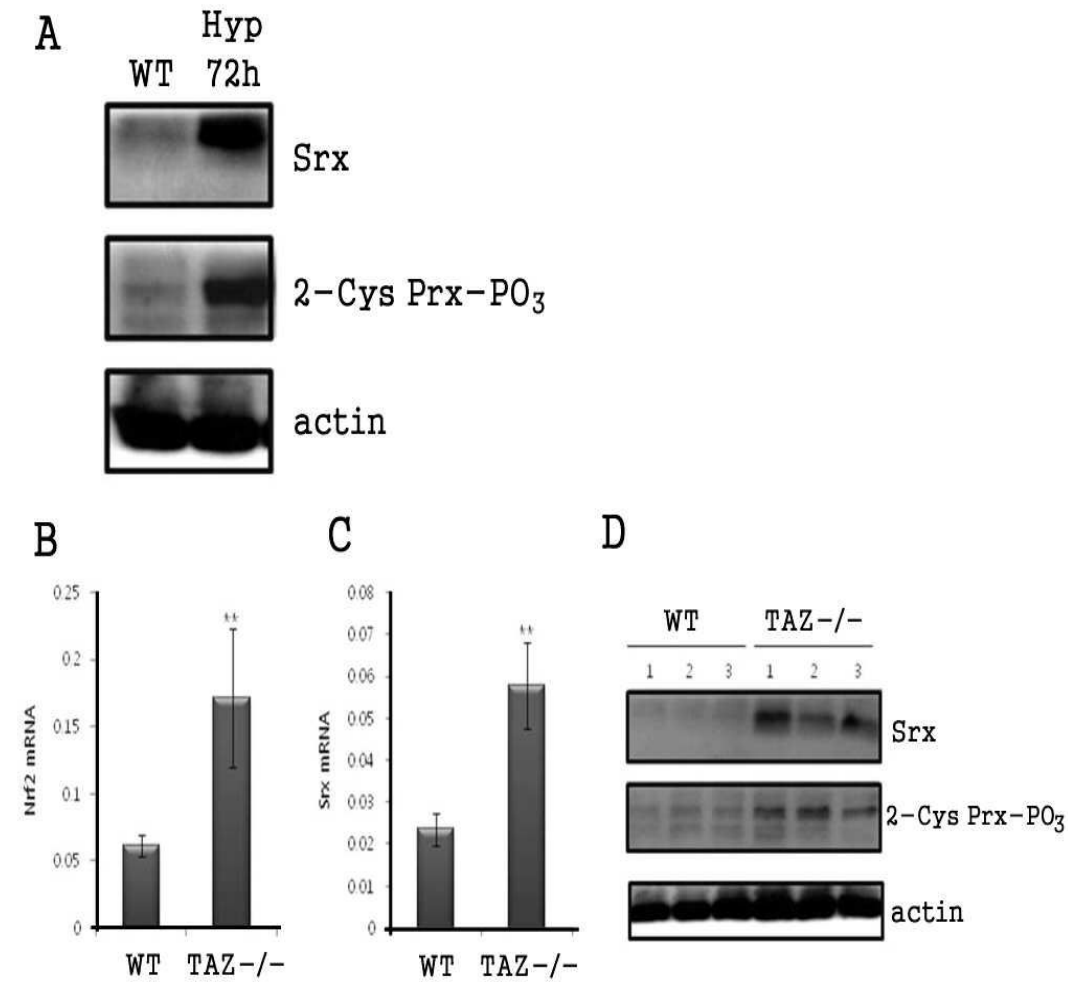
B
과산화 노출된 A549 세포의 세포수



도면8



도면9



서열 목록

- <110> Ewha University Industry Collaboration Foundation
- <120> Lung injury model mouse exposed hyperoxia, and a kit for diagnosis of lung injury model mouse exposed hyperoxia using TAZ marker
- <130> 10p-12-58
- <160> 43
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 4688
- <212> DNA
- <213> Mus musculus
- <400> 1

gtggggcagg ctggctccgg ccaggaggtc atgcataatt caacagctcc actttcggcc 60

cgcctctttc ctaagggtgg gagtttgctt caaactttgt ttatgggaca gtccgggagc 120

cgcgcgcgct gcgtcgtct acgtcttctc tgcgcctcc tcgcgcagt ggagcgcccc	180
aggccggttc cggggataaa gatgaatccg tctcgggtgc cccatccgct cccgcccga	240
gggcagcaag tcatccacgt cagcgaggac ctggacaccg acctcgaagc cctcttcaac	300
tctgtcatga accccaagcc cagctcatgg cggaaaaaga tctcccga gtcttcttt	360
aaggagcccc attccggctc gcactcgcgc caatccagca cagactcatc aggcggccac	420
ccggggcctc gactagctgg cggcgcgcag cacgtccgct cgcactcgtc gcccgcattc	480
ctgcagctgg gcaccgggtc gggagccgct ggaggccctg cacagcagca tgcacatctc	540
cgccagcagt cctatgacgt gaccgacgag ctgccgttgc cccccgggtg ggagatgacc	600
ttcacggcca ctggccagag atacttctt aatcacatag agaaaatcac cacatggcaa	660
gacccaggga aggtgatgaa tcagcctctg aatcatgtga acctccacc gtccatcact	720
tccacctcgg tgccacagag gtccatggca gtgtccagc cgaatctcgc aatgaatcac	780
caacaccagc aagtctggc cactagcctg agtccacaga accaccgac tcagaaccaa	840
cccacagggc tcatgagtg gcccaatgca ctgaccctc agcagcagca gcagcagaaa	900
ctgcggcttc agaggatcca gatggagaga gagaggatta ggatgcgtca agaggagctc	960
atgaggcagg aagctgcctt ctgccgacag ctccccatgg aaaccgagac catggccctt	1020
gtcaacacgc ctgccatgag cacagatatg agatctgtca ccaacagtag ctgagatcct	1080
ttctcaatg gagggcccta tcattcacgg gagcagagca cagacagtgg cctggggtta	1140
gggtgtaca gtgtccccc aactccagaa gacttctca gcaacatgga cgagatggat	1200
acagtgaaa attccggtca gacacccatg accgtcaatc cccagcagac ccgttccct	1260
gatttcttg actgccttc aggaacaaat gttgacctc ggactttgga gtctgaagat	1320
ctgatccctc tttcaatga tgtagagtct gctctgaaca aaagcgagcc ctttctaacc	1380
tggtgtaat cactactgtt gtaacgtgat gcagctgtga gctgacgca gtcttgggcc	1440
ttgcggacca agtgatgagg cagagcgggc ctgcagctgc accacgttct gcctttgtac	1500
tcacactcct tgtccgtgtg gccacttaat catgacctgg tgttgattcg caggaacttg	1560
cgttacacag aaataaatac tctcttttca ttttctgcaa gccatgctt ctgtggcaga	1620
taaagcagga tgggttgtgc agaatactt tagagaatgt ctgcagccct atggctgggt	1680
tttattacag ttagcttaaa ttcatatac aactgattct aagccataca aagctgacct	1740
caggcagtga attctgatag gcagcttggc ccaggaagtg atttacagtt tcaaaagctg	1800
tattgataac agtagtaaca aatgctttta aacttattta acttgagctt caaaaaaaaa	1860
aatcattgt atagatagta attttctcct gtagggaata cagtgtagtt tggaatccat	1920

gctggctctg atggcttctc tcattctgtg tttaacaaggg cacagagtac caatgttgcc	1980
accgttcacg attttccctg ttagcagctc cattctgtga gcaggagagt aacttcaaca	2040
tctgtcacia ttcttgcacg acagatcgtg tgaagagac cagtttggtc acaatatgaa	2100
tgattacaga acaaaattgt ttgtttttt tttaattgca gcttgggttt tttttcaaaa	2160
tcagccttag aatttgatgt ttgttatata tatatatata tatatatata tatatatata	2220
tatatatata aactctgtaa tttttagctg attacagagg gtagccaaat gtttttgata	2280
aatcagtggc aactatattt ttatcttttg gacctgattc tgaaaacacg aggccaaacta	2340
ggctgcagcc tgatgaacca tgaattttgt gtgctgtttt gtattctgag gcattattaa	2400
ttctgctttc aagatttcaa gtgttttaaa taatcctgtc tatgaaactg ttggaagaat	2460
gaagccgacg tctgattaac acatacagaa aggcctcctg caggacatga gctgtagatt	2520
tgtacgtctg aattcagtaa aattgtttcc taagtatact atcctaattc ttttgctaaa	2580
ttggtaagaa aaaaagtcca aggtatgtac tcaatgcctc ttatgtaacc aacatattat	2640
ttgtttcgtt agcttttaag gaccgagagc ttcattgttc tctggcaggc aggccgcctg	2700
cacttggcaa tgacgtcctt agctgttttag tattttgaac tgacattatt tataatctat	2760
gaatttaacg tcttttttta atttttattt tgaagacat caagaagctg gaaggaagct	2820
tttagttgcc gtgaggggtg aggccttctg gttgaggatc ttcagtaaga tcccttttga	2880
tccattgaaa tagaaacgca cagagtacat ttgatcttgg tgggaagagg caagttgaaa	2940
ggtcagaggc aaagtagcag agccagggaa ggtggcggaa aggccagggt atgtgaaatt	3000
aagtagacat gtcagaacct ctcaaagaca aggcaagcaa gacgtgtgag aagtgcacca	3060
aagtgtccg ctgcctttat gccaaaagac accgtgttta gagagaagag ggtcagggtg	3120
cactttactg ggaagggcag aggaggaagg agtggggctg tgacattgtc catgtattgg	3180
cagacgagaa catggactgc tgttgccttc agcactctta aagtatctc tctttttctg	3240
aaggaacccc aatttatgtc cacgttaatt ccttgctctc tctctgagca cttaagaga	3300
gacaagtagg aattttttgt tgatactagg ttgaaaggga gcactcttc gtttcctctt	3360
ttgttagcaa aagttgcaa aaagagttgt acattcttc tgaggaaaac caaaaacaag	3420
ccaaaaacac aaggaccta acaaaacttg acagtgttac tataatttaa aatattttta	3480
tagatgcatt gcaggttatt aagtgtaaaa aacaaaagat actccttttt ttaaaaaaaa	3540
attagttaag tcatctatga ttatgttac caagtttttag aagcaatttt ctaataagct	3600
tgtggcatta tgaataacta gaataatttt cttagtaaat tagtttaaaa ctttttaatt	3660
aatatagtat ttttctagag tgaaatatgg cccttgactg tttaactaata gataaagcca	3720
gatattataa ttgttgttgt tgtttttaag aacataaaat atggtttgtt acagaacact	3780

aaagctagaa gccagacctt ttcccccta gttctgagtg aactcaagag ttcattgtgtg 3840
caagtggagc gccatctcca gccctcagag cagtctctca gtggttcttt gctgttataa 3900

gtattaatat ttctaagaa ttcataataa ggtgctattc atatacatca tactataagc 3960
caactgtcag actatctagt cttcttagtc ctaaatcaac aaattttacc atgtcatctc 4020
caaattttgt cataggatag acacattttt ttaaaaagtt ggattcaaaa cacgtttttc 4080
ttgataagat acacttcact gaagcattta aatagctaca caccctgtca ttgtttaaca 4140
gcaggtggtta tttaggcctt gttttactgt agtatgtagg atataaagtg tatttctttc 4200
agtgtattct cagtgcataa gaagtgcata agtctcagcc gcctgggcat tgctcagcag 4260
aaaggaatct gcagatgggtg acgtgacttg tccgtgatgg acatgtcacg gagtactgcg 4320

ttcttacgat gtcattagaa gcaccttggtg aaagtgtaac ttctgtggaa caaaacaagc 4380
catttgaaaa ggaaaacggt tattttaaaa tgggtattga cagagacccc ttccctgac 4440
cctgtattat acagtgtgct aatactttaa cttaattttt tttttacact tctacgtttt 4500
accaaataaa cgtttacctg tgttgttgat tataatccag tatgtgttac atacaggaac 4560
tgtgccgcca aatccatcag atgaaccat tttatctaga gtctggtaca gggtttactt 4620
ctcaattcta tatataaaaa aaataataaa tacgattgag cttccacttg gaaaaaaaaa 4680
aaaaaaaaa 4688

<210> 2

<211> 452

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 2

Met His Asn Ser Thr Ala Pro Leu Ser Ala Arg Leu Phe Pro Lys Gly

1 5 10 15

Gly Ser Leu Leu Gln Thr Leu Phe Met Gly Gln Ser Gly Ser Arg Gly

20 25 30

Gly Cys Ala Arg Leu Arg Leu Leu Cys Arg Leu Leu Ala Gln Trp Glu

35 40 45

Arg Pro Arg Pro Val Pro Gly Ile Lys Met Asn Pro Ser Ser Val Pro

50 55 60

His Pro Leu Pro Pro Pro Gly Gln Gln Val Ile His Val Thr Gln Asp

65 70 75 80

Leu Asp Thr Asp Leu Glu Ala Leu Phe Asn Ser Val Met Asn Pro Lys
 85 90 95
 Pro Ser Ser Trp Arg Lys Lys Ile Leu Pro Glu Ser Phe Phe Lys Glu
 100 105 110
 Pro Asp Ser Gly Ser His Ser Arg Gln Ser Ser Thr Asp Ser Ser Gly
 115 120 125

 Gly His Pro Gly Pro Arg Leu Ala Gly Gly Ala Gln His Val Arg Ser
 130 135 140
 His Ser Ser Pro Ala Ser Leu Gln Leu Gly Thr Gly Ala Gly Ala Ala
 145 150 155 160
 Gly Gly Pro Ala Gln Gln His Ala His Leu Arg Gln Gln Ser Tyr Asp
 165 170 175
 Val Thr Asp Glu Leu Pro Leu Pro Pro Gly Trp Glu Met Thr Phe Thr
 180 185 190
 Ala Thr Gly Gln Arg Tyr Phe Leu Asn His Ile Glu Lys Ile Thr Thr
 195 200 205
 Trp Gln Asp Pro Arg Lys Val Met Asn Gln Pro Leu Asn His Val Asn
 210 215 220
 Leu His Pro Ser Ile Thr Ser Thr Ser Val Pro Gln Arg Ser Met Ala
 225 230 235 240
 Val Ser Gln Pro Asn Leu Ala Met Asn His Gln His Gln Gln Val Val
 245 250 255
 Ala Thr Ser Leu Ser Pro Gln Asn His Pro Thr Gln Asn Gln Pro Thr
 260 265 270

 Gly Leu Met Ser Val Pro Asn Ala Leu Thr Thr Gln Gln Gln Gln Gln
 275 280 285
 Gln Lys Leu Arg Leu Gln Arg Ile Gln Met Glu Arg Glu Arg Ile Arg
 290 295 300
 Met Arg Gln Glu Glu Leu Met Arg Gln Glu Ala Ala Leu Cys Arg Gln
 305 310 315 320
 Leu Pro Met Glu Thr Glu Thr Met Ala Pro Val Asn Thr Pro Ala Met
 325 330 335

Ser Thr Asp Met Arg Ser Val Thr Asn Ser Ser Ser Asp Pro Phe Leu

340 345 350
 Asn Gly Gly Pro Tyr His Ser Arg Glu Gln Ser Thr Asp Ser Gly Leu
 355 360 365
 Gly Leu Gly Cys Tyr Ser Val Pro Thr Thr Pro Glu Asp Phe Leu Ser
 370 375 380
 Asn Met Asp Glu Met Asp Thr Gly Glu Asn Ser Gly Gln Thr Pro Met
 385 390 395 400
 Thr Val Asn Pro Gln Gln Thr Arg Phe Pro Asp Phe Leu Asp Cys Leu
 405 410 415

Pro Gly Thr Asn Val Asp Leu Gly Thr Leu Glu Ser Glu Asp Leu Ile
 420 425 430
 Pro Leu Phe Asn Asp Val Glu Ser Ala Leu Asn Lys Ser Glu Pro Phe
 435 440 445
 Leu Thr Trp Leu
 450

<210> 3
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> KS-Neo-R
 <400> 3

ggagaacctg cgtgcaatcc atc

23

<210> 4
 <211> 17
 <212> DNA

<

213> Artificial Sequence

<220><223> TAZ-GP2

<400> 4

atgggacagt ccgggag

17

<210> 5
 <211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TAZ-GP3

<400> 5

gtgcaagtca gaggagg 17

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TAZ forward primer

<400> 6

gtcaccaaca gtagtcaga tc 22

<210> 7

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TAZ reverse primer

<400> 7

agtgattaca gccaggtag aaag 24

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SP-A forward primer

<400> 8

gctgtcagtg ggggataaag 20

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SP-A reverse primer

<400>

> 9

ctttgtaatg cttgcgatgg 20

<210> 10

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SP-B forward primer
 <400> 10
 ctgtgcctcc gatgttcac 20
 <210> 11
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SP-B reverse primer
 <400> 11
 ggcttggttg atcacagact 20
 <210> 12
 <211>
 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SP-C forward primer
 <400> 12
 cagctccagg aacctactgc 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SP-C reverse primer
 <400> 13
 gcttagaggt ggggtgtggag 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SP-D forward primer
 <400> 14
 gaggttgctt tctccacta 20

<210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SP-D reverse primer
 <400> 15
 agcctgtttg cacatctcct 20
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CCSP forward primer
 <400> 16
 catcatgaag ctcacggaga 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CCSP reverse primer
 <400> 17
 gagacacagg gcagtgacaa 20
 <210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VEGF forward primer
 <400> 18
 tcaccaaagc cagcacatag 20
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> VEGF reverse primer
 <400> 19
 aatgctttct ccgctctgaa 20

<210> 20

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF2 forward primer

<400> 20

ccaaccggta ccttgctatg a

21

<210> 21

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> FGF2 reverse primer

<400> 21

ttcgtttcag tgccacatac ca

22

<210> 22

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta-catenin forward primer

<400>

> 22

ggcagcagca gtcttacttg

20

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> beta-catenin reverse primer

<400> 23

aaggactggg aaaagccttg

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HNF3a forward primer

<400> 24

ccctttctcc ctttcaactcc	20
<210> 25	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> HNF3a reverse primer	
<400> 25	
gtggtgggcc taacaacaac	20
<210> 26	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> FoxA2 forward primer	
<400> 26	
gccagcgagt taaagtatgc	20
<210> 27	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> FoxA2 reverse primer	
<400> 27	
tcattgtgct cacggaagag	20
<210> 28	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> HIF-1a forward primer	
<400> 28	
gtttactaaa ggacaagtca cc	22
<210> 29	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> HIF-1a reverse primer	

<400>	29	
ttctgtttgt tgaaggag		19
<210>	30	
<211>	17	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HIF-2a forward primer	
<400>	30	
gtcaccagaa ctgtgc		17
<210>	31	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	HIF-2a reverse primer	
<400>	31	
caaagatgct gttcatgg		18
<210>	32	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IL-6 forward primer	
<400>	32	
gaggatacca ctccaacag acc		23
<210>	33	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	IL-6 reverse primer	
<400>	33	
aagtgcacatca tcgtgttca taca		24
<210>	34	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> TNFa forward primer

<400> 34

catcttctca aaattcgagt gacaa

25

<210> 35

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TNFa reverse primer

<400> 35

tgggagtaga caaggtacaa ccc

23

<210> 36

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MCP1 forward primer

<400> 36

cttctgggcc tgctgttca

19

<210> 37

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MCP1 reverse primer

<400> 37

ccagcctact cattgggatc a

21

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nrf2 forward primer

<400> 38

ctcccagggtt gccacattc

20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Nrf2 reverse primer	
<400>	39	
cctgccaaac ttgctccatg		20
<210>	40	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Srx forward primer	
<400>	40	
tcaccattgt ggcaagtgtt		20
<210>	41	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Srx reverse primer	
<400>	41	
gtgcccacag agcctagaag		20
<210>	42	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta-actin forward primer	
<400>	42	
agagggaat cgtgcgtgac		20
<210>	43	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	beta-actin reverse primer	
<400>	43	
caatagtgat gacctggccg t		21