

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2022년 2월 3일 (03.02.2022)



(10) 국제공개번호
WO 2022/025456 A1

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/6883 (2018.01) *A61K 38/00* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2021/008404
- (22) 국제출원일: 2021년 7월 2일 (02.07.2021)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2020-0095891 2020년 7월 31일 (31.07.2020) KR
- (71) 출원인: 서울대학교병원 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY HOSPITAL) [KR/KR]; 03080 서울시 종로구 대학로 101, Seoul (KR). 서울대학교 산학협력단 (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 08826 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR). 청주대학교 산학협력단 (CHEONGJU UNIVERSITY INDUSTRY & ACADEMY COOPERATION FOUNDATION) [KR/KR]; 28503 충청북도 청주시 청원구 대성로 298, Chungcheongbuk-do (KR).
- (72) 발명자: 조현철 (JO, Hyun Chul); 05502 서울시 송파구 올림픽로 135, 259동 2801호, Seoul (KR). 황영일 (HWANG, Young-il); 01429 서울시 도봉구 해동로 241-14, 206동 1205호, Seoul (KR). 김진희 (KIM, Jin-Hee); 28502 충청북도 청주시 청원구 덕벌로23번길 18, D동 305호, Chungcheongbuk-do (KR). 김진홍 (KIM, Jin-

- Hong); 08797 서울시 관악구 인현12길 46-1, 203동 605호, Seoul (KR). 이재형 (LEE, Jae-Hyung); 06010 서울시 강남구 선릉로190길 72, 401호, Seoul (KR). 임현주 (LIM, Hyun-Ju); 55111 전라북도 전주시 완산구 원색장길 65-36, Jeollabuk-do (KR). 이아영 (LEE, Ah-Young); 14043 경기도 안양시 동안구 달안로 75, 305동 1306호, Gyeonggi-do (KR). 이승연 (LEE, Seung Yeon); 08354 서울시 구로구 개봉로3길 87, 105동 506호, Seoul (KR). 예지혜 (YEA, Ji-Hye); 18530 경기도 화성시 팔탄면 지월길 45-16, Gyeonggi-do (KR). 김예솔 (KIM, Yeasol); 06917 서울시 동작구 만양로8길 50, 101동 911호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 특허법인 충현 (CHUNG HYUN PATENT & LAW FIRM); 06779 서울시 서초구 동산로 23 베텔회관 8층, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(54) Title: COMPOSITION FOR DIAGNOSING MUSCULOSKELETAL DISEASES, COMPOSITION FOR PREVENTING OR TREATING MUSCULOSKELETAL DISEASES, AND USE THEREOF

(54) 발명의 명칭: 근골격계 질환의 진단용 조성물, 근골격계 질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 용도

E9-E10	E9-E11	E9-E12	E9-E13	E10-E11	E10-E12	E10-E13	E11-E12	E11-E13	E11-E14	E11-E15	E12-E13	E12-E14	E13-E15
GSE30138F	GSE30138F	GSE30138F	GSE30138F	GSE30138F	GSE30138F	GSE30138F	GSE30138F	GSE30138F			GSE30138F		
				GSE30138H	GSE30138H	GSE30138H	GSE30138H	GSE30138H			GSE30138H		
							GSE54207		GSE54207			GSE54207	
								GSE65180		GSE65180			GSE65180

(57) Abstract: The present invention relates to a composition for diagnosing musculoskeletal diseases and a composition for preventing or treating musculoskeletal diseases. Zkscan 8, which is presented in the present invention, is effectively usable as an excellent biomarker for obtaining exact information about the occurrence and progression stages of musculoskeletal diseases, in particular, tendon diseases or ligament diseases. In addition, a composition of the present invention can be effectively applied as a composition for preventing or treating musculoskeletal diseases through Zkscan 8 overexpression.

(57) 요약서: 본 발명은 근골격계 질환의 진단용 조성물, 근골격계 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에서 발굴된 Zkscan 8은 근골격계 질환, 구체적으로는 건 질환 또는 인대 질환의 발병 여부 및 진행 단계에 대한 정확한 정보를 얻을 수 있는 우수한 바이오 마커로 유용하게 이용될 수 있다. 또한 본 발명의 조성물은 Zkscan 8의 과발현을 통해 효율적으로 근골격계 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 적용될 수 있다.

[다음 쪽 계속]



WO 2022/025456 A1



(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, 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).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 근골격계 질환의 진단용 조성물, 근골격계 질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 용도

기술분야

- [1] 본 발명은 건(힘줄)(tendon), 인대(Ligament), 근육(muscle), 연골(cartilage), 신경(nerve) 및 골(bone)과 관련된 Zkscan 8 유전자에 관한 것으로, 근골격계 질환이 있는 대상에서 감소하며, 이의 과발현을 통해 근골격계 조직 및 세포의 회복을 촉진한다는 새로운 발견에 기반하여, Zkscan 8의 발현량 측정 및 이의 발현 억제를 통해 각각 근골격계 질환 진단 및 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 미국 통계에 따르면, 매년 2천만회 이상의 근골격계의 손상이 발생하고 있으며, 이의 원인으로는 염좌(sprains), 골절(fractures) 및 좌상(contusions) 등이 가장 흔한 것으로 알려져 있다. 이러한 근골격계 손상 또는 질환의 치료를 위해서 약 1500억 달러의 비용이 매년 지출되고 있다.
- [3] 이러한 근골격계의 노화(퇴행성 변화) 및 외상으로 인한 염증, 부분 파열 또는 완전 파열에 의해 손상된 경우, 이를 봉합하는 수술적 치료, 증상 완화에 그치는 스테로이드 주사와 같은 약물치료 및 물리치료법 외에는 특별한 치료법이 개발된 바 없다.
- [4] 특히, 약물 치료의 경우, 국소적인 염증을 완화시키고 전염증성 인자를 감쇄하여 완화시키는 정도에 한하며, 약물도 인도메타신, 케토프로펜, 이부프로펜, 아세틸살리실릭산 및 플루비프로펜과 같은 비스테로이드 항염증성 약물(NSAIDs)과 스테로이드 약물이 주로 사용되는데, 이러한 비스테로이드 항염증성 약물은 장기간 사용하면 위장 질환에 노출될 수 있다는 부작용이 있고, 스테로이드 약물 역시 장기간 사용시 골다공증, 고혈압, 신경학적 합병증 등의 부작용이 유발되는 것으로 알려져 있다.
- [5] 상술한 문제점을 해결하기 위하여, 보다 근본적인 조직 재생을 통해 건(힘줄)(tendon), 근육(muscle), 연골(cartilage), 신경(nerve) 및 골(bone) 등의 근골격계 질환 치료가 가능한 세포치료제가 각광받고 있다.
- [6] 이에 안지오텐신 II 타입 1 수용체 차단제(angiotensin II type1 receptor blocker) 및 지방조직 유래 줄기세포를 유효성분으로 하는 근육 치료제가 공지되었으나, 안지오텐신 수용체 차단제에 의해 줄기세포의 분화가 결정되는 것이 아니므로, 그 효과가 분명하지 않아, 효과를 장담할 수 없다는 문제가 있다.
- [7] 또한, 회전근개 손상 랫트 모델에서 건의 콜라겐 조직 및 콜라겐 섬유의 구조화를 향상시키고, 건의 인장 강도를 향상시킨 골수 유래 중간엽 줄기세포와 지방 조직 유래 중간엽 줄기세포를 유효성분으로 하는 치료제가 공지되었으나, 이렇게 재생된 건에 알칼리성 포스파타제 활성의 발현을 증가시키고 이소성

골을 형성을 유도하는 비정상적 조직변화가 관찰되었다. 이러한 비정상적 조직변화는 건의 재파열을 증가시키시며 회복을 더디게 하는 등의 부작용을 야기하는 문제가 있다.

- [8] 상술한 문제점을 해결하기 위해 정상적인 조직 재생을 유도할 수 있어야 하며, 이를 위해서는 물리적 자극, 다른 세포와의 공배양, 스케폴드, 생체활성 물질이나 분화 유도 유전자 형질 주입 등과 같이 중간엽 줄기세포를 우리가 원하는 방향으로 제어할 수 있어야 한다.
- [9] Zkscan 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8)은 C2H2-ZNF(zinc finger) 단백질 전사 인자의 한 분류로 N-말단 쪽에 KRAB(Kruppel-associated box) 도메인과 SRE-ZBP 및 SCAN(CTfin51, AW-1 and Number 18 cDNA) 도메인을 가지고 있는 전사인자이다(도 1a).
- [10] ZFP(zinc finger protein)는 다양한 생물학적인 활성이 보고되고 있으며, 특히 배아줄기세포(ESC)를 비롯한 다양한 초기 전구세포에서 발현되는 것으로 알려진 바 있다. ZNF 589, 268, 300은 조혈모세포 분화에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 그러나, Zkscan 8(ZNF 192, LD5-1, Zscan 40)은 아직 생물학적 특성이 보고된 바가 없으며, 특히 근골격계에서 Zkscan 8의 기능에 대해서는 연구가 이루어지지 않은 실정이다.
- [11] 이에, 본 발명은 종래기술들의 문제점을 극복하기 위하여, 근골격계의 질환 진단뿐만 아니라 치료에 있어서 Zkscan 8의 가능성을 확인하였고, 이로써 근골격계 질환 진단, 예방과 치료에 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [12]
- [13] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.
- [14] [선행기술문헌]
- [15] [특허문헌]
- [16] (특허문헌 1) 특허문헌 1. 한국등록특허 제1,219,624호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [17] 본 발명자들은 근골격계 질환, 구체적으로는 건(힘줄)(tendon), 근육(muscle), 연골(cartilage), 신경(nerve) 및 골(bone) 질환과 관련있는 바이오마커를 발굴하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, Zkscan 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8)이 건(힘줄)(tendon), 근육(muscle), 연골(cartilage), 신경(nerve) 및 골(bone) 질환에서 감소함을 확인하였을 뿐 아니라, Zkscan 8을 과발현하여 근골격계 질환의 예방, 개선 또는 치료가 가능함을 발견함으로써, 본

발명을 완성하게 되었다.

[18] 따라서 본 발명의 목적은 근골격계 질환의 진단용 조성물을 제공하는 데 있다.

[19] 본 발명의 다른 목적은 근골격계 질환의 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 데 있다.

[20] 본 발명의 또 다른 목적은 근골격계 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

[21] 본 발명의 또 다른 목적은 근골격계 질환의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

[22] 본 발명의 또 다른 목적은 근골격계 질환의 치료용 의약, 또는 동물용 의약 제조를 위한 Zkscan 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8) 유전자, 상기 유전자를 포함하는 벡터, 상기 벡터를 포함하는 세포 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 조성물의 신규 용도를 제공하는 것이다.

[23] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

기술적 해결방법

[24] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 Zkscan 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8)의 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 근골격계 질환 진단용 조성물을 제공한다.

[25] 본 발명자들은 근골격계 질환, 구체적으로는 건(힘줄)(tendon), 근육(muscle), 연골(cartilage), 신경(nerve) 및 골(bone) 질환의 진단을 위한 종합적이고 신뢰도 높은 정보를 제공하면서도 조직 시료 없이 체액 검사만으로 간단하게 측정할 수 있는 바이오 마커를 발굴하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, Zkscan 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8)가 근골격계에서 특이적으로 발현될 뿐 아니라 근골격계 손상이나 질환이 발생하면 감소되어 근골격계 질환의 발병 여부 및 진행 단계에 대한 정확한 정보를 제공함으로써 근골격계 질환 진단이 가능한 우수한 바이오마커로 기능할 수 있음을 발견하였다.

[26] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질환에 대한 개체의 감수성(susceptibility)의 판정, 특정 질환을 현재 개체가 가지고 있는지 여부의 판정, 및 특정 질환에 걸린 한 객체의 예후(prognosis)의 판정을 포함한다. 본 발명의 Zkscan 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8) 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준은 현재 발병 여부 뿐 아니라 발병 위험성에 대한 유전적 표지자가 되므로, 이를 측정함으로써 근골격계 질환이 현재 개체에서 발생되었는지 여부의 판정 및 현재 개체가 근골격계 질환에 걸리지는 않았으나 향후 발병할 가능성과 관련된 예후(prognosis)의 판정을 위한 정보를 제공한다. 따라서, 용어“근골격계 질환의 진단”은“근골격계 질환의 발병 위험성의

예측”으로 표현될 수도 있다.

- [27] 본 명세서에서 용어“근골격계 질환의 진단용 조성물”은 대상체의 근골격계 질환 발병 여부를 판단하기 위해 Zkscan 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8)의 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 수단을 포함하는 통합적인 혼합물(mixture) 또는 장비(device)를 의미하며, 이에“근골격계 질환의 진단용 키트”로 표현될 수도 있다.
- [28] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, Zkscan 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8)은 C2H2-ZNF(zinc finger) 단백질 전사 인자의 한 분류로 N-말단 쪽에 KRAB(Kruppel-associated box) 도메인과 SRE-ZBP 및 SCAN(CTfin51, AW-1 and Number 18 cDNA) 도메인을 가지고 있는 전사인자이다.
- [29] 상기 Zkscan 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8)의 유전자는 서열번호 1로 표시될 수 있으며, NCBI에서 Gene symbol은 ZKSCAN 8이며, Gene ID 7745로 등록된 염기서열일 수 있다. 이의 최적화된 서열은 서열번호 3으로 표시될 수 있다.
- [30] 상기 Zkscan 8 유전자가 코딩하는 단백질은 NCBI Accession number NP_001265048로 등록된 아미노산 서열일 수 있고, 서열번호 2로 표시될 수 있다.
- [31]
- [32] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 진단되는 근골격계 질환은 근골격계(건(힘줄)(tendon), 인대(Ligament), 근육(muscle), 연골(cartilage), 신경(nerve) 및 골(bone) 등) 부담작업으로 인하여 발생하는 질환으로 목과 허리, 상·하지의 신경, 근육 및 그 주변 신체조직 등에 나타나는 질환을 의미한다. 보다 구체적으로 상기 근골격계 질환은 건(힘줄)(tendon) 질환, 인대(Ligament) 질환, 근육(muscle) 질환, 연골(cartilage) 질환, 신경(nerve) 질환 및 골 질환으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이며, 바람직하게는 건 질환 또는 인대 질환이며, 보다 구체적으로는 건 질환일 수 있다.
- [33] 상기 건 질환은 과용 또는 노화로 인해 점차적으로 건에 마모가 일어나고, 인열이 일어나 발생하는 건의 만성 장애 또는 손상이거나, 건파열 또는 골로부터 건이 분리되어 발생하는 급성 건 손상에 의해 유발될 수 있다.
- [34] 상기 건 질환은 건 손상(Tendon injury), 건 파열(tendon rupture), 건염(tendinitis), 건병증(tendinosis) 및 건활막염(tendosynovitis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [35] 건 파열(tendon rupture)은 근육을 뼈에 붙이는 섬유성 끈인 건(힘줄)이 일부가 찢어지거나, 완전하게 파열되어 두 조각으로 나누어져 유발되는 질환으로, 아킬레스 건 파열(Acute achilles tendon rupture) 및 슬개건 파열(Patellar tendon rupture)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [36] 건염은 갑작스럽고 과도한 부하가 근건 단위(musculotendinous unit)에 가해졌을 때 건의 미세 파열(micro tear)에 의해 발생하는 건 자체의 염증에 의해 유발되는

질환으로, 오스굿 슬라터(Osgood schlatter), 건초염(Tenosynovitis), 석회성 건염(Calcific tendinitis), 슬개건염(Patellar tendinitis), 아킬레스 건염(Achilles' tendonitis), 상완 이두건염(Biceps tendinitis), 회전근개 건염(Rotator cuff tendinitis), 외측 상과염(lateral epicondylitis), 극상근 건염(Supraspinatus tendinitis), 팔꿈치 건염 (Triceps Tendonitis) 및 내측 상과염(medial epicondylitis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

- [37] 건병증은 만성적인 과사용(overuse)으로 인해 건 자체의 콜라겐의 퇴행성 변화에 의해 발생하는 비염증 또는 만성 염증에 의해 유발되는 질환으로, 아킬레스 건병증(achilles tendinopathy), 슬개 건병증(patella tendinopathy) 및 상완이두근건 병증(bicipital tendinopathy)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [38] 상기 인대 질환은 대퇴사두근인대 파열(knee quadriceps ligment rupture), 관상인대염좌(coronary ligment sprain), 측부 인대 손상(collateral ligament rupture), 전방십자인대 손상(anterior cruciate ligament injury), 후방뒤십자인대 손상(posterior cruciate ligament injury), 족관절 인대 손상(ankle ligament injury), 인대 파열(ligment rupture) 및 염좌(sprain)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [39] 상기 근육 질환은 근육의 직접적, 간접적 외상, 과부하 및 과사용에 의해 유도된 손상으로 발생한 질환으로, 이로 인한 근육 감소, 근육 위축, 근육 손상, 근육 긴장, 근육 파열, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인해 유발되는 질병의 범위를 포함한다. 상기 근육 질환은 허벅지 근육 긴장(근육 파열), 근육조직 손상, 회전근개 파열, 슬괵근 손상, 늑쇄 중후군(costoclavicular syndrome), 대퇴사두근건염(knee quadriceps tendinosis) 등이 있다.
- [40] 상기 연골 질환은 연골, 연골 조직 및/또는 관절조직(활막, 관절포, 연골하골 등)이 기계적 자극이나 염증 반응에 의해 상해됨으로써 발생하는 질환을 말하며, 연골손상 질환을 포함한다. 이러한 연골질환에는 퇴행성 관절염(degenerative arthritis), 슬개골 골절(patella fracture), 염증성 관절염(inflammatory arthritis), 슬개골 연골 연화증(patella chondromalacia), 골연골종증(osteochondromatosis), 염좌(distortion), 윤활낭염(bursitis), 반월상 연골 손상(menstruation), 원판형 반월상 연골파열(meniscal tear), 반월상 연골 낭포(meniscus cyst), 관절 내 유리체(intra-articular vitreous), 박리성 뼈연골염(exfoliation osteochondritis), 추벽 증후군(plica syndrome), 내반슬(genu varum), 외반슬(knock-knee) 및 발음성 슬관절(snapping knee)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [41] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 진단되는 근골격계 질환은 건 질환이다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 바이오 마커인 Zkscan 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8)은 인 실리코(in-silico) 기반을 이용해 분석한 결과, 근골격계(건, 인대, 근육, 골, 연골, 신경 등) 생성 및 발생에 관여함은 물론, 건병증 동물모델의 시료 분석 결과 건병증이 진행될수록, 발현이

감소함을 확인하였다(도 3 참조). 따라서, 본 발명의 Zkscan 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8)은 근골격계 질환의 발병 여부에 대한 정보를 제공할 수 있다.

- [42] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 Zkscan 8 유전자의 발현 수준을 측정하는 제제는 상기 Zkscan 8 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산 분자이다.
- [43] 본 명세서에서, 용어 “핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체(analogue)도 포함한다(Scheit, Nucleotide Analogs, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, Chemical Reviews, 90:543-584(1990)). “Zkscan 8 유전자에 특이적으로 결합하는 핵산 분자”는 본 발명의 Zkscan 8 유전자와 실질적으로 상보적인 염기서열을 가져 이에 특이적으로 혼성화될 수 있는 핵산 분자를 의미하며, 예를 들어 프라이머 및 프로브를 포함한다.
- [44] 본 명세서에서 용어“프라이머”는 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합제의 존재, 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용하는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 구체적으로는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.
- [45] 본 발명의 프라이머는 타겟 핵산에 어닐링 되어 주형-의존성 핵산 중합효소에 의해 타겟 핵산에 상보적인 서열을 형성하는 연장 프라이머(extension primer)일 수 있으며, 이는 고정화 프로브가 어닐링 되어 있는 위치까지 연장되어 프로브가 어닐링 되어 있는 부위를 차지한다.
- [46] 본 발명에서 이용되는 연장 프라이머는 타겟 핵산, 예를 들어 Zkscan 8 유전자의 특정 염기서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 용어“상보적”은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary)인 경우 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 경우를 모두 포괄하는 의미이며, 구체적으로는 완전히 상보적인 경우를 의미한다. 본 명세서에서 용어“실질적으로 상보적인 서열”은 완전히 일치되는 서열뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 프라이머 역할을 할 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함되는 의미이다.
- [47] 본 발명에서 프라이머는, 중합제의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, pH 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정되지만

전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다. 이러한 프라이머의 설계는 타겟 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업자가 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.

- [48] 본 명세서에서 용어“프로브”는 특정 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 자연 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 선형의 올리고머를 의미한다. 구체적으로, 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일가닥이며, 더욱 구체적으로는 디옥시리보뉴클레오타이드이다. 본 발명에 이용되는 프로브로서, 상기 Zkscan 8 유전자의 특정 염기서열에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 타겟 서열의 3'-말단 또는 5'-말단에 상보적인 프로브를 사용하는 것이 바람직하다.
- [49] 혼성화에 적합한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C.(1985)에 개시된 사항을 참조하여 결정할 수 있다.
- [50] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 Zkscan 8 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제는 Zkscan 8 유전자가 코딩하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머이다.
- [51] 본 명세서에서 용어 "항체"는 항원성 부위에 대하여 지시되는 특이적인 단백질 분자를 의미하며, 본 발명의 목적상 항체는 Zkscan 8 유전자가 코딩하는 단백질에 대해 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 의미하며, 다클론 항체, 단일클론항체 및 재조합 항체 등의 항체를 모두 포함할 수 있다. 뿐만 아니라 인간화 항체 등의 특수 항체도 포함될 수 있다. 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태를 비롯하여, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 될 수 있다. 상기 항체는 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진자가 공지된 기술을 이용하여 제조된 것이라면 모두 사용할 수 있다.
- [52] 본 명세서에서 용어 "앵타머"는 그 자체로 안정된 삼차 구조를 가지면서 표적 분자에 높은 친화성과 특이성으로 결합할 수 있는 특징을 가진 특별한 종류의 단일가닥 핵산(DNA, RNA 또는 변형핵산)으로 구성된 폴리뉴클레오타이드의 일종을 의미한다. 상술한 바와 같이, 앵타머는 항체와 동일하게 항원성 물질에 특이적으로 결합할 수 있으면서도, 단백질보다 안정성이 높고, 구조가 간단하며,

합성이 용이한 폴리뉴클레오티드로 구성되어 있으므로, 항체를 대체하여 사용될 수 있다.

- [53] 앱타머의 일반적인 내용은 Bock LC et al., Nature 355(6360):5646(1992); Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". J Mol Med. 78(8):42630(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R . "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". Proc Natl Acad Sci USA. 95(24):142727(1998)에 상세하게 개시되어 있다.
- [54] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 진단용 조성물은 소변, 타액, 정액, 눈물, 양수(Amniotic Fluid), 뇌척수액(Cerebrospinal Fluid), 활막액(Synovial Fluid), 심막액(pericardial fluid), 복수(Peritoneal Fluid), 혈액, 혈장 및 혈청로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 체액이거나, 근골격계로부터 분리한 조직 또는 세포일 수 있다. 가장 구체적으로는, 근골격계로부터 분리한 조직 또는 세포이다.
- [55] 본 발명에 따르면, 본 발명의 Zkscan 8의 농도 측정을 통해 근골격계 질환의 진단이 가능하다. 이를 통해 본 발명은 조직검사를 통해 신뢰도 높은 임상 정보를 제공함으로써 환자의 편의성 및 절차의 간편성과 경제성을 모두 달성할 수 있다.
- [56]
- [57] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 근골격계 질환의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다:
- [58] 1) 근골격계 질환이 의심되는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 Zkscan 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8)의 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [59] 2) 상기 측정된 Zkscan 8의 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 정상 대조군 시료의 발현 수준과 비교하는 단계.
- [60] 본 발명에서 진단하고자 하는 근골격계 질환에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [61] 본 발명에서 용어“생물학적 시료”는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, Zkscan 8을 발현하는 세포를 포함하고 있는 모든 시료로서, 조직, 기관, 세포 또는 세포 배양액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 보다 구체적으로는, 상기 Zkscan 8을 발현하는 세포는 근골격계를 구성하는 조직 또는 세포이며, 가장 구체적으로는 건 조직, 건 세포, 인대 조직, 인대 세포이다.
- [62] 상기 Zkscan 8 유전자 또는 이를 코딩하는 단백질의 발현 수준 검출은 Zkscan 8에 특이적인 프라이머, 프로브, 항체, 앱타머를 이용하여 수행되는 것일 수 있다.
- [63] 근골격계 질환이 의심되는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 Zkscan 8의 발현 수준을 측정하는 단계는 혼성화법, 면역분석 방법 또는 유전자 증폭방법과 같이 당업계에 공지된 다양한 발현 수준 측정방법에 의해 수행될 수 있다. 이에

특별히 한정되는 것은 아니다. 측정 결과, Zkscan 8의 발현 수준이 감소한 경우 상기 개체는 근골격계 질환이 발생하였다고 진단 및 판정에 필요한 정보를 제공할 수 있다.

[64] 본 발명에서 근골격계 질환이 의심되는 개체란 근골격계가 이미 발생하였거나 발생할 것으로 예상되는 개체 또는 조직의 시료로, 그 병증을 진단하고자 하는 대상 시료를 의미한다.

[65] 또한, 본 발명에서 "정상 대조군"은 검출하고자 하는 근골격계 질환에 이환되어 있지 않은 개체를 의미한다.

[66] 본 명세서에서 용어“발현 수준의 감소”는 근골격계 질환에 의해 Zkscan 8의 발현이 유의하게 감소된 것을 의미한다.

[67]

[68] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 ZKSCAN 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8) 단백질을 유효성분으로 함유하는 근골격계 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[69] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 Zkscan 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8) 유전자를 포함하는 벡터, 상기 벡터를 포함하는 세포 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 근골격계 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[70] 상기 조성물은 ZKSCAN 8 단백질의 새로운 용도로서, 상기 용도는 근골격계 질환을 예방 또는 치료하는 용도에 관한 것일 수 있다.

[71] 상기 Zkscan 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8)의 유전자는 서열번호 1로 표시될 수 있으며, NCBI에서 Gene symbol은 ZKSCAN 8이며, Gene ID 7745로 등록된 염기서열일 수 있다. 상기 Zkscan 8 유전자가 코딩하는 단백질은 NCBI Accession number NP_001265048로 등록된 아미노산 서열일 수 있고, 서열번호 2로 표시될 수 있다. Zkscan 8 유전자의 최적화된 서열은 서열번호 3으로 표시될 수 있다.

[72] 본 발명의 일 구현예에 따르면 Zkscan 8 과발현된 세포를 건 결손 래트에 처리하면, 아무것도 처리하지 않은 래트와 비교하여 건 조직 손상에 의한 비정상적 행동양상이 감소되었고, 건 조직의 회복이 촉진되는 것으로 확인되었다. 근골격계 질환에서 Zkscan 8의 발현이 증가됨에 따라 근골격계 질환의 병리과정을 해소하기 위한 일련의 보상작용으로서 콜라겐 배열 등이 회복되는 것을 볼 수 있으며, 따라서 Zkscan 8 유전자 또는 단백질을 포함하는 조성물은 근골격계 질환을 예방 또는 치료하는 효과를 나타낼 수 있다.

[73] 본 발명에서 상기 Zkscan 8 단백질에는 이의 변이체 또는 기능적 동등물이 포함되어 있을 수 있다. 상기 단백질 변이체 또는 기능적 동등물이란 아미노산의 부가, 치환 또는 결실의 결과, Zkscan 8 단백질의 아미노산 서열과 60%, 바람직하게는 70%, 보다 바람직하게는 80% 이상의 서열 상동성을 갖는 것으로서 본 발명의 Zkscan 8 단백질과 실질적으로 동질의 활성을 나타내는

폴리펩티드를 말한다. 상기 기능적 동등물에는, 예를 들어, Zkscan 8 단백질의 아미노산 서열의 아미노산 중 일부가 치환되거나, 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체가 포함될 수 있다. 아미노산의 치환은 바람직하게는 보존적 치환일 수 있으며, 천연에 존재하는 아미노산의 보존적 치환의 예는 다음과 같다; 지방족 아미노산(Gly, Ala, Pro), 소수성 아미노산(Ile, Leu, Val), 방향족 아미노산(Phe, Tyr, Trp), 산성 아미노산(Asp, Glu), 염기성 아미노산(His, Lys, Arg, Gln, Asn) 및 황 함유 아미노산(Cys, Met). 아미노산의 결실은 바람직하게는 본 발명의 Zkscan 8 단백질의 활성에 직접 관여하지 않는 부분에 위치할 수 있다. 또한 상기 기능적 동등물의 범위에는 Zkscan 8 단백질의 기본 골격 및 이의 생리 활성을 유지하면서 폴리펩티드의 일부 화학 구조가 변형된 폴리펩티드 유도체도 포함될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 Zkscan 8 단백질의 안정성, 저장성, 휘발성 또는 용해도 등을 변경시키기 위한 구조변경 및 생리활성을 유지하면서 다른 단백질과 융합으로 만들어진 융합단백질 등이 이에 포함될 수 있다.

- [74] 또한, 본 발명에 따른 Zkscan 8 단백질은 그 자체 또는 약학적으로 허용가능한 염의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명에서 "약학적으로 허용가능한"이란 생리학적으로 허용되고, 인간에게 투여될 때 활성성분의 작용을 저해하지 않으며, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 말한다. 상기 염으로는 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의하여 형성된 산 부가염이 바람직하며, 유리산으로는 유기산과 무기산을 사용할 수 있다. 상기 유기산은 이에 제한되는 것은 아니나, 구연산, 초산, 젖산, 주석산, 말레인산, 푸마르산, 포름산, 프로피온산, 옥살산, 트리플로오로아세트산, 벤조산, 글루콘산, 메타술폰산, 글리콜산, 숙신산, 4-톨루엔술폰산, 글루탐산 및 아스파르트산을 포함한다. 또한 상기 무기산은 이에 한되는 것은 아니나, 염산, 브롬산, 황산 및 인산을 포함한다.
- [75] 본 발명에서 상기 Zkscan 8 단백질 또는 이의 단편은 천연에서 추출하거나 합성(Merrifield, J. Amer. chem. Soc. 85:2149-2156, 1963), 또는 DNA 서열을 기본으로 하는 유전자 재조합 방법에 의해 제조될 수 있다(Sambrook et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA, 2판, 1989).
- [76] 본 발명에서 상기 벡터는 선형 DNA, 플라스미드 DNA 및 재조합 바이러스성 벡터로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으며, 상기 바이러스는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노 부속 바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 및 렌티바이러스로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.
- [77] 본 발명의 벡터를 숙주 세포 내로 운반하는 방법은 예를 들어 미세 주입법(Harland and Weintraub, J. Cell Biol. 101:1094-1099 (1985)), 칼슘포스페이트 침전법(Chen and Okayama, Mol. Cell. Biol. 7:2745-2752 (1987)),

전기천공법(Tur-Kaspa et al., Mol. Cell Biol., 6:716-718(1986)), 리포솜-매개 형질감염법(Nicolau et al., Methods Enzymol., 149:157-176(1987)), DEAE-텍스트란 처리법(Gopal, Mol. Cell Biol., 5:1188-1190(1985)), 및 유전자 밤바드먼트(Yang et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 87:9568-9572(1990))가 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [78] 상기 백터를 포함하는 세포는 줄기세포(stem cells), 수지상 세포(dendritic cells), 자가이식 종양세포.autologous tumor cells) 및 정착 종양세포(established tumor cells)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 특별히 이에 제한되지 않는다.
- [79] 본 발명에서 용어 "줄기세포"는 다양한 신체 조직으로 분화할 수 있는 능력을 갖는 미분화 세포로서, 이는 만능줄기 세포(totipotent stem cell), 전분화능 줄기세포(pluripotent stem cell), 다분화능 줄기세포(multipotent stem cell) 등으로 분류될 수 있다. 상기 줄기세포는 줄기체 세포(precursor cell), 전구세포(progenitor cells) 등의 용어와 혼용될 수 있다. 본 발명에서 줄기세포는 배아줄기세포(embryonic stem cell, ESC), 유도만능줄기세포(induced pluripotent stem cell, iPSC) 또는 중간엽 줄기세포(Mesenchymal stem cells, MSC)일 수 있고, 보다 구체적으로 중간엽 줄기세포일 수 있다.
- [80] 상기 중간엽 줄기세포는 골수, 지방, 탯줄 또는 제대혈 유래 중간엽 줄기세포일 수 있다. 바람직하게는, 상기 중간엽 줄기세포는 탯줄 유래 중간엽 줄기세포일 수 있다.
- [81] 본 발명에서 진단 또는 치료 등의 대상이 되는 근골격계 질환에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.
- [82] 본 명세서에서 용어“예방”은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다.
- [83] 본 명세서에서 용어“치료”는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 본 발명의 조성물이 대상체에 투여되면 Zkscan 8의 발현을 촉진 또는 활성화하여 근골격계의 분화를 촉진하고, 근골격계 조직의 회복과 콜라겐 형성을 유도하여 근골격계 질환 증상의 발전을 억제하거나, 이를 제거하거나 또는 경감시키는 역할을 한다. 따라서, 본 발명의 조성물은 그 자체로 근골격계 질환의 치료 조성물이 될 수도 있고, 혹은 다른 약리성분과 함께 투여되어 상기 질환에 대한 치료 보조제로 적용될 수도 있다. 이에, 본 명세서에서 용어“치료”또는“치료제”는“치료 보조”또는“치료 보조제”의 의미를 포함한다.
- [84] 본 명세서에서 용어“투여”또는“투여하다”는 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.
- [85] 본 발명에서 용어“치료적 유효량”은 본 발명의 조성물을 투여하고자 하는

개체에게 조성물 내의 약리성분이 치료적 또는 예방적 효과를 제공하기에 충분한 정도로 함유된 조성물의 함량을 의미하며, 이에 “예방적 유효량”을 포함하는 의미이다.

[86] 본 명세서에서 용어 “대상체”는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.

[87] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 pscAAV 벡터에 서열번호 1의 Zkscan 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8) 유전자를 삽입하여 발현벡터를 제조하고 이를 'pscAAV-Zkscan 8'로 명명하고, 이의 개열지도를 도 1b에 도시하였다. 상기 제조된 발현벡터를 인간탯줄 유래 중간엽 줄기세포(Umbilical cord matrix-derived Mesenchymal Stem Cells, UCMSC) 내로 형질감염하여 세포에 도입하였다. Zkscan 8를 과발현시킨 탯줄유래 중간엽 줄기세포를 처리하면, 건의 최대 파열 부하와 강성을 증가시켰다. 또한 Zkscan 8를 과발현시킨 탯줄유래 중간엽 줄기세포를 처리하면, 건 조직의 염증억제, 퇴행성 변화 방지, 콜라겐 섬유의 나열 회복 및 이소성 연골 형성 억제하는 효과를 나타내었다. 즉, Zkscan8를 과발현시킨 탯줄유래 중간엽 줄기세포를 전층 파열 손상에 적용하였을 때, 손상된 건의 결손 조직을 재생시키고 건의 기능을 손상을 예방하고, 회복 및 향상시킬 수 있음을 알 수 있다. 따라서 본 발명의 근골격계 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 Zkscan 8의 발현 또는 활성을 증가시킨다.

[88]

[89] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 근골격계 질환의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법을 제공한다:

[90] (a) 손상된 건(힘줄)(tendon), 인대(Ligament), 근육(muscle), 연골(cartilage) 또는 골(bone) 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및

[91] (b) 상기 시료 내 Zkscan 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8)의 발현 수준을 측정하는 단계.

[92] 상기 (b) 단계에서 Zkscan 8의 발현 수준이 정상 대조군에 비해 증가한 경우, 상기 시험물질은 근골격계 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 판정한다.

[93] 본 발명에서 예방 또는 치료하고자 하는 근골격계 질환에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

[94] 본 발명에서 용어 “손상된 건(힘줄)(tendon), 인대(Ligament), 근육(muscle), 연골(cartilage), 골(bone), 신경(nerve) 세포”는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, Zkscan 8의 발현이 저하된 근골격계 세포를 포함하고 있는 모든 시료이다. 상기 손상된 건(힘줄)(tendon), 인대(Ligament), 근육(muscle), 연골(cartilage), 골(bone) 또는 신경(nerve) 세포는 외부의 압력, 조작, 파열, 찢어짐, 골절 염증 등에 의하여 손상된 근골격계 조직 또는 기관에서 얻어진 것일 수 있고, 세포 또는 세포 배양액을 포함한다. 보다 구체적으로는, 상기

손상된 건(힘줄)(tendon), 인대(Ligament), 근육(muscle), 연골(cartilage), 골(bone) 또는 신경(nerve) 세포일 수 있고, 이 중에서 바람직하게는 건 세포 또는 인대 세포일 수 있다.

- [95] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어“시험물질”은 Zkscan 8을 발현하는 세포를 포함하는 시료에 첨가되어 Zkscan 8의 발현 수준에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화합물, 뉴클레오타이드, 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 시험물질을 처리한 생물학적 시료에서 Zkscan 8의 발현 수준을 측정하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 발현 수준 측정방법에 의해 수행될 수 있다. 측정 결과, Zkscan 8의 발현 수준이 증가한 경우 상기 시험물질은 근골격계 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 판정될 수 있다.
- [96] 본 명세서에서 용어“발현 수준의 증가”는 시험물질에 의해 Zkscan 8 유전자 발현이 유의하게 증가하여, 손상된 근골격계 조직의 회복 작용이 측정 가능한 수준이 될 정도로 Zkscan 8의 발현 수준 또는 생체 내 고유한 기능이 증가하는 것을 의미한다.

발명의 효과

- [97] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [98] (a) 본 발명은 근골격계 질환의 진단용 조성물, 근골격계 질환의 예방 또는 치료용 조성물 및 이의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [99] (b) 본 발명의 Zkscan 8은 근골격계 질환, 구체적으로는 건 질환 또는 인대 질환의 발병 여부 및 진행 단계에 대한 정확한 정보를 얻을 수 있는 우수한 바이오 마커로 유용하게 이용될 수 있다.
- [100] (c) 본 발명의 조성물은 또한 Zkscan 8의 과발현을 통해 효율적으로 근골격계 질환 예방 또는 치료용 조성물로 적용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [101] 도 1a는 ZSCAN family의 구조에 대한 모델을 도시한 것이다.
- [102] 도 1b는 pscAAV-Zkscan 8의 개열지도이다.
- [103] 도 1c는 pscAAV-GFP 벡터와 pscAAV-Zkscan 8 벡터의 구조를 보여주는 모식도이다.
- [104] 도 2는 배 발생의 단계별(E9.5 내지 E15.5)에서 데이터세트(dataset)의 분포를 정리한 표이다.
- [105] 도 3a는 배 발생 단계별 발현 유형에 따른 건 생성 마커와 Zkscan 8의 발현 양상을 분석하여 나타낸 그래프이다.
- [106] 도 3b는 인간 정상 건(Normal)과 회전근개 질환이 환자의 건(Tendinopathy)에서 건 생성 마커와 Zkscan 8의 발현 양상을 측정하여 나타낸 그래프이다.
- [107] 도 4a는 Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)을 현미경으로 촬영한 이미지이다.

- [108] 도 4b는 Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)의 증식능을 측정하여 정량적으로 나타낸 그래프이다.
- [109] 도 4c는 Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)에 대한 Zkscan 8 유전자 발현여부를 RT-PCR으로 측정하여 나타낸 그래프이다.
- [110] 도 4d는 Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)에서의 Zkscan 8 단백질 발현 여부를 웨스턴 블롯팅(western blotting)으로 분석한 결과이다.
- [111] 도 4e는 Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)에서의 Zkscan 8 단백질 발현 여부를 웨스턴 블롯팅(western blotting)으로 분석하여 정량화한 그래프이다.
- [112] 도 5는 Zkscan 8 과발현이 건 분화에 미치는 영향을 평가한 것이다. 도 5a는 태줄유래 중간엽 줄기세포 (UCMSC)을 건분화배지에서 2주간 배양한 후, 각 배양일별 Zkscan 8 발현 수준을 RT-PCR로 분석하여 정량화한 그래프이다.
- [113] 도 5b는 Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)을 7일 동안 배양한 후, 각 배양일별 건 발생 전사인자(Scx, Mlx, Egr-1, Egr-2) 발현 수준을 qRT-PCR로 분석한 그래프이다.
- [114] 도 5c는 Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)을 건분화배지에서 3차 배양법을 통해 3일간 배양한 후, 건 관련 마커(Scx, Egr-1, Egr-2, Thbs4) 발현 수준을 qRT-PCR로 분석한 그래프이다.
- [115] 도 5d는 Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)을 건분화배지에서 3차 배양법을 통해 3일간 배양하였을 때, 건 분화 유도에 따른 조직학적 특성을 분석한 결과이다.
- [116] 도 6은 Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)에서의 지방, 골, 연골, 건, 근육, 신경 세포 관련 마커 발현 양상을 분석한 결과이다.
- [117] 도 7a는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)에 대한 실험시작 2 주 및 4 주째 극상건의 거시적 모습이다.
- [118] 도 7b는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)에 대한 실험시작 2 주 및 4 주째 극상건에 대한 총 거시적점수(the total macroscopic score)를 분석하여 나타낸 결과이다. 모든 정량 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$).
- [119] 도 8a는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)에 대한 실험시작 2 주 및 4 주째 극상건을 H&E 염색한 사진(배율: $\times 100$)이다.

- [120] 도 8b는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)에 대한 실험시작 2 주 및 4 주째 극상건의 총 퇴행성 점수(the total degeneration score)를 분석하여 나타낸 결과이다. 모든 정량 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$).
- [121] 도 9a는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)에 대한 실험시작 2 주 및 4 주째 극상건을 PSR로 염색한 사진(배율: $\times 100$)이다.
- [122] 도 9b는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)에 대한 실험시작 2 주 및 4 주째 극상건의 콜라겐 섬유의 배열(collage fiber coherence)을 분석하여 나타낸 결과이다. 모든 정량 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$).
- [123] 도 10a 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)에 대한 실험시작 2 주 및 4 주째 극상건을 Saf-O로 염색한 사진(배율: $\times 100$)이다.
- [124] 도 10b는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)에 대한 실험시작 2 주 및 4 주째 극상건의 글리코 아미노 글리칸 풍부 영역(GAG-rich area)을 분석하여 나타낸 결과이다. 모든 정량 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$).
- [125] 도 11은 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)에 대한 실험시작 2 주 및 4 주째 극상건을 이소성골화 영역(area of ossification)을 분석하여 나타낸 결과이다. 모든 정량 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$).
- [126] 도 12는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)로부터 채취한 표본과 생리학 실험절차를 촬영한 이미지이다.
- [127] 도 13a는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)로부터 채취한 재생된 건에 대한 최대 파열 부하(the ultimate failure load)를 분석하여 나타낸 결과이다. 모든 정량 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$).
- [128] 도 13b는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8

- group)로부터 채취한 재생된 건에 대한 강성(the stiffness)을 분석하여 나타낸 결과이다. 모든 정량 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$).
- [129] 도 13c는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)로부터 채취한 재생된 건에 대한 최대 응력(ultimate stress)을 분석하여 나타낸 결과이다. 모든 정량 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$).
- [130] 도 13d는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)로부터 채취한 재생된 건에 대한 건의 단면적(cross-sectional area)을 분석하여 나타낸 결과이다. 모든 정량 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$).

발명의 실시를 위한 형태

- [131] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [132]
- [133] 실시예
- [134] 실험방법
- [135] 유전자 스크리닝 및 선정
- [136] 근골격계 질환과 관련된 바이오마커를 탐색하기 위하여, 건 재생 후보 유전자를 선별을 위해 National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 Gene Expression Omnibus(GEO) database(<http://www.ncbi.nlm.gov/geo/>)에서 마우스 다리(limb)의 건(tendon) 발생에 대한 whole transcriptome expression profiling microarray dataset GSE30138과 GSE54207 그리고 RNA sequencing dataset GSE65180을 다운받아 분석하였다.
- [137] GSE30138과 GSE54207의 플랫폼은 GPL1261(Affymetrix Mouse Genome 430 2.0 Array)을, GSE65180은 GPL13112[Illumina Hiseq 2000 (Mus musculus)]을 사용하였으며, 건 생성 마커(tenogenesis markers; Tgf- β 2, Scx, Mxk, Egr1, Tnmd, Thbs4, Col1, Gag, Tnc), 근 생성 마커(myogenesis markers; Pax3, Pax7, Myf5, Des, MyoD, Myogenin, MRF4, Myostatin, MHC2), 골 생성 마커(osteogenesis markers; Runx2, Osterix, Alp, Ocn, Opn) 및 연골 생성 마커(chondrogenesis markers; Comp, Sox9, Chad, Acan, Col2a1)들의 배 발생 단계(embryonic stage)별 발현 정도와 유사한 유전자를 1차적으로 선별하였다.
- [138] 단백질-단백질 상호작용(PPI, Protein-Protein Interaction) 네트워크 구축과 유전자들 간의 상호 작용을 파악하기 위하여 온라인 데이터베이스(database)

Cytoscape software(<http://www.cytoscape.org/>)의 TiCoNE와 ClueGo plugin을 이용하여 분석하였다(도 2). 다음으로, 상기 유전자들 중에서 핵심 유전자(hub genes)를 선별하기 위하여 PPI 네트워크에서 긴밀하게 연결되어 있는 중요한 모듈(module)을 Molecular Complex Detection(MCODE; degree cutoff=2.1, node score cutoff=0.2, k-core=2, max. depth=100)와 Markov Clustering(MCL)을 사용하였다. 선별된 클러스터(cluster)들은 Gene Ontology(GO)을 통해 건 재생에 대한 연관성을 분석하여 후보 유전자들을 선별하였다.

[139]

[140] **RNA-seq 분석**

[141] 정상 건(n=5)과 회전근개(n=6)의 총 RNA는 RNeasy Plus Universal Kit(cat. 73404, Qiagen, USA)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 추출하였다. 총 RNA 무결성(integrity)은 Agilent 2100 Bioanalyzer(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)로 확인하였으며 cDNA 라이브러리(library)는 TruSeq Stranded mRNA Library prep kit(cat. 20020594; Illumina, USA)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다. 풀링된 라이브러리는 2 nM의 농도로 HiSeq 2000에 로딩하였으며, v3 SBS chemistry, 76 cycle과 페어드 엔드(paired-end)로 시퀀싱을 수행하였다.

[142]

[143] **인간 태줄 유래 줄기세포 및 건 세포의 배양**

[144] 본 연구에 사용된 모든 조직은 환자의 동의하에 채취 및 사용되었다. 태줄과 건 조직은 혈액 등의 불순물을 제거하기 위하여, 항생제(100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin sulfate, and 0.25 µg/ml amphotericin B(antibiotic-antimycotic solution; Welgene, Daegu, Korea))가 첨가된 칼슘 및 마그네슘 부재 Dulbecco 인산염 완충 식염수(Ca²⁺, Mg²⁺-free Dulbecco's phosphate-buffered saline; DPBS, Gibco, NY, USA)로 2 내지 3 회 세척하였다.

[145]

제왕절개 환자로부터 태줄을 얻었으며, 태줄은 길이와 무게를 측정한 후 수술용 가위를 이용하여 약 2 내지 4 mm 길이로 잘게 자른 후, 1 g에 해당하는 양을 150 cm² 배양접시에 정렬하여 접종하였다. 태줄이 배양 접시에 완전히 부착된 다음 배양 배지(LG DMEM, 10% fetal bovine serum (FBS; Welgene, Daegu, Korea), and antibiotic-antimycotic solution)를 첨가하여 5% CO₂ 공급 하에 37 °C 조건에서 배양하였다.

[146]

회전근개 완전 파열 환자로부터 얻은 건 조직은 0.3% 제2형 콜라게나제(Gibco)와 항생제가 함유된 HG DMEM(high-glucose Dulbecco's modified Eagle medium, Welgene, Daegu, Korea) 내에서 가볍게 교반하면서 37 °C 2시간 동안 배양하였다. 이 후 동량의 배양배지(HG DMEM, 10% FBS)와 항생제(antibiotic-antimycotic solution)를 첨가한 후, 분해되지 않은 조직을 100-µm 세포 여과기를 이용하여 제거하였다. 20 °C 하에서 원심분리(500 g, 15 분)를 통해 세포를 회수하고, 배양배지로 2회 세척하였다. 회수한 세포는 트리판 블루 제외

방식(trypsin blue excluding)을 이용하여 세포 수를 계수하고 2×10^4 내지 5×10^4 cells/cm² 밀도로 배양접시에 넣은 후, 37 °C, 5% CO₂가 공급되는 배양기로 배양하였다.

- [147] 배양 용기의 60~80%로 정도로 세포가 자라면 DPBS로 두 번 세척을 해주고, 0.05% 트립신(trypsin)과 0.53 mM EDTA(ethylenediamine tetra acetic acid)를 포함하는 trypsin-EDTA(Welgene, Daegu, Korea)로 3 분간 처리하여 부착된 세포를 떼어낸 후, 세포를 트리판 블루 제외 방식(trypsin blue excluding)을 이용하여 염색한 다음, 계수하였다. 인간 태줄 유래 줄기세포는 3,333 cells/cm², 건세포는 1:3 비율로 지속적으로 배양하였다.

[148]

[149] **Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8) 제조**

- [150] 제조사(Cell Biolabs, CA, USA)에서 제공한 pscAAV-GFP 벡터 플라스미드(vector plasmid)를 대조군 벡터로 사용하였다. 제한효소 BamHI와 SalI으로 GFP 부분을 절단하고 그 부위에 BamHI와 SalI 제한효소를 포함하는 프라이머(FP: 5'-AAGGATCCATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATGGCGGAGGAAA GTCGG-3', RP: 5'-AAGTCGACCTAGACTGAGATAGACTC-3')를 이용하여 Zkscan8를 클로닝하여 제조하였다. pscAAV-Zkscan 8 벡터의 개열지도는 도 1b에 나타내었고, 제조된 pscAAV-GFP 벡터와 pscAAV-Zkscan 8 벡터의 구조는 개략적으로 도 1c에 나타내었다. 완성된 pscAAV-Zkscan8는 서열을 확인하기 위해 시퀀싱을 분석하였다. 바이러스 패키징 스택을 생산하기 위해 제조사의 방법에 따라 총 3가지의 벡터(타겟 발현 벡터, pAAV-RC, pHelper)를 293세포에 주입하였다. 72 시간 후에 세포를 포함한 배양배지를 수집하고 동결, 해동 과정을 반복하여 상기 Zkscan8 유전자를 포함한 아데노바이러스를 수확하고 저장하였다. 이렇게 제조된 바이러스는 인간 태줄 유래 줄기세포에 Zkscan 8 유전자 전달 시스템으로 이용하였다.

[151]

[152] **증식능 분석**

- [153] 증식능은 WST를 이용하여 살아있는 세포의 양을 측정하여 분석하였다. 유전자 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포를 배양용기에 5×10^4 /cm² 밀도로 접종한 후, 3, 5, 9, 12, 15 일에 배양배지에 Ez-Cytox(DoGEN, Guro, Korea) 10 μ l를 첨가하였다. 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 1 시간 반응시킨 다음, 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[154]

[155] **태줄유래 중간엽 줄기세포의 건 분화**

- [156] 태줄유래 중간엽 줄기세포(UCMSC)는 10% FBS가 포함된 DMEM-HG 배지에 3×10^4 /cm² 밀도로 배양 용기에 접종하였다. 2 일이 지난 후, 1% FBS 배양배지로 갈아주고, 다음날 50 μ g/ml 아스코르브산(ascorbic acid)과 10 ng/ml 결합조직

성장인자(connective tissue growth factor, CTGF)가 포함된 10% FBS가 들어있는 DMEM-HG 배지로 갈아주고 3, 7, 14일 동안 분화를 유도하였다.

- [157] 피브리노젠 기반 3차 배양법은 우선 35 mm 배양용기에 SYLGARD(Dow Corning, Midland, MI, USA)를 부어 1 내지 2주 동안 코팅시킨 다음, 5 mm 크기의 두 개 실크 봉합사(suture)를 SYLGARD 위에 박았다. 배양용기와 봉합사(suture)는 클린벤치에서 100% 에탄올과 UV를 이용하여 멸균하고 2 시간 동안 말린 후, DMEM을 37 °C CO₂ 배양기에 1 시간 동안 미리 담궈 놓았다. 유전자 도입 MSC, UCMSC 비율이 3:1이 되도록 각각 2.25×10^5 , 0.75×10^5 개의 혼합된 세포를 트롬빈 혼합 용액(thrombin mixture; DMEM supplemented with 10% 소태아혈청, 1% 항생제 용액, 1 U/ml 트롬빈(thrombin), 200 μ M 아미노카프론산(aminohexanoic acid) 및 10 mg/ml 아프로티닌(aprotinin))과 혼합한 후, 10 mg/ml 피브리노젠(fibrinogen) 용액을 첨가하였다. 상기 혼합액을 SYLGARD가 코팅된 배양접시의 표면에 빠르게 펴주고 37 °C에서 3 시간동안 방치하였다. 다음 DMEM-HG에 250 μ M 아스코르브산(ascorbic acid), 50 μ M L-프롤린(L-proline)이 포함되어 있는 건 세포 분화 배양액에서 3일 동안 배양하였다. 건 세포로의 분화 정도를 확인하기 위하여 헤마톡실린과 에오신(H&E), 피크로시리우스레드(picrosirius red) 및 면역조직화학 염색을 수행하였다. 또한 건 세포 마커 유전자 발현을 통해 분화 정도를 확인하였다. 세포를 4% 파라포름알데히드 용액에 24 시간 고정한 후 파라핀에 포매하여 6 μ m의 박절 표본으로 만들었고, 여기에 H&E 염색과 피크로시리우스레드(picrosirius red) 염색을 수행하였다. 면역조직화학 염색은 anti-Col I(ab34710, abcam)과 anti-Col III(ab7778, abcam)를 1:200으로 희석하여 냉장에서 하루 동안 반응시킨 다음, HRP가 결합되어 있는 2차 항체를 실온에서 30 분 반응시킨 후 관찰하였다.

[158]

[159] **Zkscan 8 도입 탯줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)로부터 RNA 분리**

- [160] Zkscan8 도입 시 다양한 유전자의 발현을 확인하고자 HiYield Total RNA mini kit(Real Biotech Corporation, Taiwan)을 이용하여 총 RNA를 추출하였고, 분광광도계(NanoDrop, DE, USA)를 사용하여 260 nm와 280 nm에서의 흡광도를 측정한 후, 유출액 내의 총 RNA를 정량하였다. 각각의 총 RNA 1 μ g을 Superscript II Reverse Transcriptase(Invitrogen, CA, USA)을 사용하여 cDNA를 합성하였다.

[161]

[162] **역전사-중합효소 연쇄반응(RT-PCR)**

- [163] 역전사-중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)을 진행하기 위해 Maxime™ PCR PreMix(i-StarTaq)(iNtRON, Sungnam, Korea)를 사용하였다. 총 부피 20 μ l에 RNase-free 증류수 16 μ l, cDNA 2 μ l 및 프라이머 각각 1 μ l씩 첨가하였고, 반응조건은 다음과 같이 수행하였다. 우선 전변성(pre-denaturation)은 95 °C에서 30 분, 변성(denaturation)은 95 °C 30초,

결합(annealing)은 55 °C 30 초, 연장(extension)은 72 °C 1 분동안 수행하였다. 상기 과정을 총 32 번 반복한 후, 72 °C에서 5 분동안 쿨링(cooling)하였다. 상기 과정을 통해 얻은 PCR 생성물은 1% 아가로스젤 상에서 밴드를 확인하였다.

[164] [표1]

Target gene		Primer sequence(5'→3')	Product length(bp)
Zkscan8	서열 4	CGGAGGAAAGTCGGAAACCA	198
	서열 5	CTTCCCGTGGACCAAGAGTC	
PPAR γ 2	서열 6	TTGGTGACTTTATGGAGCCC	311
	서열 7	CATGTCTGTCTCCGTCTTCT	
aP2	서열 8	AAGAAGTAGGAGTGGGCTTT	285
	서열 9	CCACCACCAGTTTATCATCC	
Osteopontin	서열 10	GAGACCCTTCCAAGTAAGTC	354
	서열 11	GATGTCCTCGTCTGTAGCAT	
ALP	서열 12	TGGAGCTTCAGAAGCTCAAC	454
	서열 13	ATCTCGTTGTCTGAGTACCA	
Sox6	서열 14	AACATGTGGCCTCCCATCTG	300
	서열 15	TCAGTGTGTCCACCACATCG	
Aggrecan	서열 16	TCAGGAGGGCTGGAACAAGT	350
	서열 17	GGAGGTGGTAATTGCAGGGA	
Mkx	서열 18	GGCCACGAACACTACCATGA	175
	서열 19	AGCTGCGCTTTCACCCTTAT	
Egr-1	서열 20	CCAGTGGAGTCCTGTGATCG	206
	서열 21	TCGCTCCTGGCAAACCTTCT	
Egr-2	서열 22	TCTTCCTCTCTGGCCTACCC	400
	서열 23	GTCTGTTGGGGTACTTGCGA	
COL1a1	서열 24	AGTGGTTTGGATGGTGCCAA	170
	서열 25	GCACCATCATTTCCACGAGC	
COL3a1	서열 26	CTTCTCTCCAGCCGAGCTT	191
	서열 27	CCAGTGTGTTTCGTGCAACC	
Desmin	서열 28	GAGGAAATCCGGCACCTCAA	253
	서열 29	CATCCCCGTGTCTCGATGGTC	
NEFL	서열 30	CTGGAAATCGAAGCATGCCG	363
	서열 31	GCGGGTGGACATCAGATAGG	

GAPDH	서열 32	AAATCCCATCACCATCTTCCAG	313
	서열 33	CATGAGTCCTTCCACGATACC	

[165]

[166] **정량적 역전사-중합효소 연쇄반응(quantitative RT-PCR)**

[167] 정량적 역전사-중합효소 연쇄반응(quantitative RT-PCR; qRT-PCR)은 Go Taq[®] probe qPCR and RT-qPCR systems(Promega, WI, USA), TaqMan[®] Gene Expression Assays(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 및 LightCycler 480(Roche Applied Science, Mannheim, Germany)을 이용하여 다음의 유전자 발현을 실시간으로 확인하였다; Scx(Hs03054634_g1), Mlx(Hs00543190_m1), Egr-1(Hs00152928_m1), Egr-2(Hs00166165_m1), Thbs4(Hs00170261_m1), GAPDH(Hs99999905_m1). 중합 효소 연쇄반응은 전변성(pre-denaturation) 95 °C에서 10 분, 변성(denaturation) 95 °C 15 초, 결합(annealing) 60 °C 1분, 연장(extension) 72 °C 4 초 수행하는 것을 1 사이클(cycle)로 하여, 50 사이클 반복한 후, 40 °C에서 30 초 동안 쿨링(cooling)하였다. 용융 곡선(Melting curve) 분석은 2-ΔCt 계산법을 사용하였으며, GAPDH의 발현을 참고치(reference)로 하여 qRT-PCR 결과를 분석하였다[Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-ΔΔCt method. Methods. 2001, 25:402-408].

[168]

[169] **단백질 분리 및 웨스턴 블롯팅(western blotting)**

[170] 건 세포로부터 건 세포 용해물(lysate)을 얻기 위해 하기와 같이 실험을 수행하였다. 건 세포의 펠렛(pellet)에 용해액(lysis)(PRO-PREPTM)(iNtRON, Sungnam, Korea)을 첨가한 후, 10 초간 10 회 이상 강한 외류(vortex)를 사용하여 파쇄하였다. 상기 용액을 4 °C, 13,000 rpm으로 20분간 원심분리를 하여 상층액을 회수하여 건 세포 용해물을 얻었다. 건 세포 용해물의 단백질 함량을 정량화하기 위해 BCA를 사용하였다. 동일 농도의 건 세포 용해물(10 μg)을 10% 아크릴아마이드 겔에 로딩한 후 전기영동(SDS-PAGE)으로 단백질 크기에 따라 분리하였다. 분리된 단백질들은 1X 전이 완충용액(transfer buffer)(20% 메탄올, 0.025 M 트리스 염(Tris base) 및 0.19 M 글리신(glycine))에 충분히 적시고, 100 V에서 90 분 동안 전류를 흘려 PVDF 막에 옮겼다. 상기 PVDF 막을 5% 탈지분유가 첨가된 1X TBS-T 용액(10 mM Tris pH7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20)에 1 시간 동안 블러킹(blocking)하였다. 다음, 1X TBS-T 용액에 1차 항체를 1:1000 비율로 희석한 후 4 °C에서 교반하며 반응시켰다. 사용한 1차 항체는 다음과 같다; Zkscan8 antibody(STJ26239, St John's Laboratory), β-actin antibody(ab170325, abcam). 1차 항체를 반응시킨 PVDF 막을 1X TBS-T로 10 분간 3 번 이상 충분히 세척한 다음, 1X TBS-T 용액에 2차 항체(1:20,000 희석)를 넣어 한 시간 동안 실온에서 교반하며 반응시켰다. 사용한 2차 항체는 다음과 같다; 항

취 면역글로불린-HRP(goat anti mouse IgG-HRP; SA001-500, GenDEPOT)과 항 토끼 면역글로불린-HRP(goat anti rabbit IgG-HRP; 7074S, Cell signaling). 1X TBS-T 용액으로 10 분씩 3 번 세척하고, ECL을 처리한 후, ImageQuant LAS4000 mini(GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) 기계로 촬영하였다.

[171]

[172] **동물실험 설계**

[173] 본 기관의 실험동물 연구위원회에 의해 승인되었고 승인된 절차에 따라 진행되었다(IACUC_2019_0044). 88마리의 수컷 Sprague-Dawley 랫트(12주, 340~360 g)를 4 개의 군(1) 정상군(Normal group); 2) 생리식염수군(Saline group); 3) 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group); 4) Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group))으로 나눠 제조하였다.

[174] 졸레틸(30 mg/kg) 및 럼폰(10 mg/kg)을 사용하여 마취를 유도하였고, 모든 실험에는 랫트의 왼쪽 어깨만을 사용했다. 먼저 랫트의 발바닥을 손톱으로 살짝 눌러 마취가 제대로 되었는지 확인한 후 수술을 수행하였다. 다음 왼쪽 어깨의 건봉을 축지하고 앞가쪽 피부를 2 cm 절개하였다. 건봉에 부착되어 있는 승모근과 삼각근을 절개하여 극상근의 건을 노출시킨 후, 극상근의 건과 상완골두와의 연결 부위에서 1 mm가 떨어진 곳에 2 mm 지름(건 넓이의 약 50% 이상)을 가진 생검 펀치(Biopsy Punch)(BP-20F, Kai Medical Europe GmbH, Bremen, Germany)로 둥근 모양의 전층 파열 건 손상을 만들었다. 그 후 30 G 바늘의 주사기를 이용하여 파열된 부위 양쪽에 남아있는 건에 2) 10 μ l의 생리식염수, 3) 태줄 유래 중간엽 줄기세포 (1×10^6 cells/10 μ l 생리식염수) 그리고 4) Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(1×10^6 cells/10 μ l 생리식염수)를 두 번에 나눠서 주입시켰다. 승모근과 삼각근을 4-0 Vicryl 봉합사(W9074, Ethicon, Cincinnati, OH, USA)로 봉합하고, 피부는 블랙실크(Black silk)(SK439, AILee, Busa, Korea)로 봉합한 후 상처 부위를 소독하였다. 수술이 완료된 후, 랫트에게 자유로운 케이지 활동을 허하였다.

[175] 각 그룹의 랫트는 수술 후 2 주와 4 주에 희생되었고 극상근의 건을 수확하여 거시적, 조직학적 그리고 생역학적 평가에 사용했다.

[176]

[177] **동물실험의 각 그룹에 대한 거시적 평가**

[178] 각 그룹의 랫트는 수술하고나서 2 주, 4 주가 지났을 때, 이산화탄소 챔버에서 희생시켰다. 상완골의 머리와 극상근을 제거하지 않고 랫트의 극상근의 건의 원래 모습을 유지하며 수확하였다. 건의 재생을 거시적으로 평가하기 위하여 Stoll의 수정된 반정량 평가 방법을 이용하였다[Stoll C, John T, Conrad C et al. Healing parameters in a rabbit partial tendon defect following tenocyte/biomaterial implantation. Biomaterials 2011;32(21):4806-4815]. 상기 평가방법은 총 12개의 변수가 있다; 건의 파열(tendon rupture; 결손 부위 건이 끊어진 상태), 염증(inflammation; 건이 붉거나 붉은 색으로 변하고 염증이 발생한 상태), 건의

표면(tendon surface; 건의 표면이 매끄럽지 않으며, 거칠고, 불통불통하게 변한 상태), 주위 건의 변화(neighboring tendon; 결손된 부분 주위 건의 색과 두께, 결표면이 비정상적으로 변한 상태), 결손 부위의 두께(level of the defect; 결손 부위가 매워진 것이 주위 건보다 오히려 튀어 나온 상태), 결손 크기(defect size; 결손의 크기가 3 mm 이상 늘어나서 결손 크기가 커진 상태), 건의 부기/발적(swelling/redness of tendon; 손상된 건이 붉게 변하거나 만졌을 때 붓기가 있는 상태), 주위 조직과의 유착(connection surrounding tissue and slidability; 손상된 건이 주위 조직과 매끄럽게 미끄러지지(분리되지) 않고 엉겨 붙어 있는 형태), 건의 두께(tendon thickness; 건의 두께가 원래 두께 보다 두꺼워진 상태), 건의 색(color of tendon; 빛나는 하얀색의 건이 불투명하고 탁하고 붉은 색으로 변한 상태), 하나의 근에서 연결됨(single strains of muscle; 극상근의 건이 극상근에서만 연결되지 않고 주위 근과 조직이 섞이듯 연결된 상태), 그리고 주위 건강한 조직과의 연결성(transition of the construct to the surrounding healthy tissue; 결손부위와 주위 건강한 건의 연결이 매끄럽지 않은 상태, 결손이 시작되는 부위가 확연히 구분되는 상태). 각 변수에 대해서 0점 또는 1점을 주었고, 건의 부기/발적은 0~2점 건의 두께는 0~3점을 주었다. 총 거시적 점수(total macroscopic score)은 정상과 가까울 때 0점 그리고 손상이 가장 심할 때 15점을 주었다.

[179]

[180] **동물실험의 각 그룹에 대한 조직학적 평가**

[181] 육안으로 평가한 후에, 수확한 조직은 즉시 4%(w/v)의 파라포름알데히드(paraformaldehyde, PFA; Merck, Germany)에 넣어 24 시간 동안 고정시키고 10% EDTA(ethylenediaminetetra acetic acid, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA)에 넣어 이틀동안 석회를 제거하였다. 그 후 점진적으로 농도가 증가하는 에탄올을 이용하여 탈수 과정을 진행하고, 클로로포름을 이용하여 탈지 과정을 수행하였다. 고정 과정이 완료된 조직은 파라핀블록으로 포매하고, 마이크로톰(microtome)을 이용하여 건의 중심 주위까지 조심스럽게 절단한 후, 중심부에서는 4 cm 두께로 연속하여 잘라 조직을 슬라이드에 부착시켰다.

[182] 조직을 분석하기 위하여 무작위로 슬라이드를 선택하여 헤마토실린과 에오신(hematoxylin and eosin, H&E)으로 염색하였고, 광학 현미경(U-TVO 63XC; Olympus Corp., Japan)을 이용하여 분석하였다. 각 슬라이드에 대한 건의 퇴행성 정도는 수정된 Astrom과 Movin의 반정량 평가 방법을 이용하여 평가하였다[Jo CH, Shin WH, Park JW et al. Degree of tendon degeneration and stage of rotator cuff disease [in English]. Knee Surg Sport Tr A 2017;25(7):2100-2108]. 상기 건의 퇴행성 정도 분석법은 총 7 개의 변수를 가지고 있다; 섬유 구조(fiber structure; 건 섬유모양의 콜라겐들이 작게 조각난 상태), 섬유의 배열(fiber arrangement; 평행하게 배열되어 있던 콜라겐 섬유들이 불규칙하게 배열되어 있는 상태), 핵의 둥그란 모양(rounding of the nuclei; 평소에 비활성화되어 납작했던 섬유아세포의

핵들이 손상 혹은 활성화 되면서 둥글게 모양이 변한 상태), 세포의 다양성(variations in cellularity; 건에 존재하는 세포의 숫자가 증가하고 군데군데 군집으로 모여 있는 상태), 증가된 혈관(increased vascularity; 건에 존재하는 혈관들의 숫자와 크기가 증가한 상태), 감소한 염색성 (decreased stainability; 건을 구성하고 있던 섬유들이 손상으로 인하여 적어지고 적어진 섬유들의 밀도에 의하여 염색성이 떨어진 상태) 및 유리질화(hyalinization; 섬유 형태의 콜라겐으로 이루어져 있던 건 조직들이 맨들맨들한 유리질로 바뀐 상태). 총 퇴행성 점수(Total degeneration score)는 정상과 가까울 때 0 점이고, 가장 심한 퇴행성 변화가 일어난 경우에는 21 점이었다.

- [183] 콜라겐 섬유의 배열(collagen fiber coherence; 건을 이루는 콜라겐 섬유들이 일관되게 평행한 상태)을 분석하기 위해서 슬라이드를 피크로시리우스레드(picrosirius red)로 염색했고, 원형 편광 광학 현미경을 사용하여 이미지를 얻었다. 콜라겐 섬유의 배열은 건의 주된 축에서 콜라겐 섬유(collagen fiber)들이 얼마나 틀어졌는지 Orientation J plug-in for image J라는 컴퓨터 프로그램을 이용하여 분석하였다. 각 슬라이드 마다 다섯개의 영역을 분석하였으며, 나온 평균값에 100을 곱하여 최종값으로 사용하였다[Degen RM, Carbone A, Carballo C et al. The Effect of Purified Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells on Rotator Cuff Tendon Healing in an Athymic Rat [in English]. Arthroscopy 2016;32(12):2435-2443].
- [184] 이소성 연골형성과 관련된 글리코아미노글리칸 풍부영역[glycoaminoglycan (GAG)-rich area; 건 조직내에 비특이적인 연골 조직이 발생한 상태]을 평가하기 위하여 슬라이드를 사프란인-O/패스트그린(safranin-O/fast green, Saf-O)을 염색하였으며, 광학 현미경을 이용하여 이미지를 얻었다. 얻은 이미지를 image J로 분석하여, 전체 건에서 글리코아미노글리칸 풍부영역인 붉은색으로 염색된 영역의 넓이를 평가하였다.
- [185] 이소성 골화(heterotopic ossification; 건 조직내에 비특이적인 골 조직이 발생한 상태)의 발생을 평가한다. 우리는 H&E로 염색된 슬라이드를 이용하여 전체 건 구조에서 분리, 군집 및 막대 모양의 병소(foci)가 관찰될 때, 이소성 골화가 발생했다고 평가하였고, 이소성 골화가 발생한 영역은 image J를 이용하여 영역의 넓이를 분석하였다.

[186]

[187] **동물실험의 각 그룹에 대한 생역학 평가**

[188] 각 그룹의 랫트는 수술하고나서 2 주, 4 주가 지났을 때, 이산화탄소 챔버에서 희생시켰다. 상완골에 극상근이 부착된 대로 건을 수확하고 근육을 조심스럽게 제거하여 건만 남겼다. 수확한 조직은 식염수로 적신 거즈에 싸서 -80 °C의 저장고에 보관하였고, 실험하기 24시간 전에 식염수 습식 거즈에 쌓은 상태로 천천히 해동하였다. 모든 실험동안 식염수 습식 거즈를 이용하여 조직의 상태를 유지하였다. 상완골의 원위부는 주문 제작된 시험 시스템의 하부 지그에서

폴리메틸메타크릴레이트(polymethylmethacrylate, PMMA)로 가득찬 알루미늄 튜브에 수직으로 고정하였다. 건의 근위부는 상단 지그에 고정되며 사포와 게이지 및 고무로 압박하여 미끄러움을 방지하고 시편의 손상을 최소화하였다. 본 실험은 재료 테스트 시스템(H5K5, Tinius Olsen, England, UK)을 이용하여 수행하였고, 조직과 당기는 힘은 90° 각도로 고정하여 진행하였다(도 13). 모든 시편은 0.1 mm/s의 일정한 속도로 수행하였다. 건의 미끄러짐 유무는 육안으로 확인하며 진행하였다. 건의 단면적(cross-sectional area)은 파열 영역 중심에서 측정되었고, 공식은 'formula Area = $ab\pi/4$ '를 이용하여 계산하였으며, 최대 파열 부하(ultimate failure load; 건이 끊어질 때 까지 버틸 수 있는 최대의 힘), 강성(stiffness; 건이 늘어나지 않고 그대로의 형태를 유지하며 버틸 수 있는 최대의 힘) 그리고 최대 응력(ultimate stress; 최대 파열 부하/단면적, 단면적당 건이 끊어질 때까지 버틸 수 있는 최대의 힘)은 하중-변위 곡선으로부터 계산하였다[Galatz L, Silva M, Rothermich S et al. Nicotine delays tendon-to-bone healing in a rat shoulder model. JBJS 2006;88(9):2027-2034.]

[189]

[190] **통계분석**

[191] 모든 데이터는 평균 $\pm$ SD로 표시하였다. 데이터는 일원 분산 분석(one-way analysis of variance, ANOVA)으로 분석하였고, 사후분석은 Bonferroni multiple comparison test를 사용하였으며, 두 군을 비교할 때는 T-test를 사용하였다. 모든 통계 분석은 SPSS 소프트웨어 버전 23(IBM)을 이용하여 진행하였다. $p < 0.05$ 이하의 유의값이 나왔을 경우 통계적으로 유의하다고 간주하였다.

[192]

[193] **실험결과**[194] **전반적인 Whole transcriptome profiling**

[195] 건, 근, 연골, 골 생성 마커들의 배 발생 단계(embryonic stages)별 발현 양상 분석을 위하여 whole transcriptome expression profiling dataset GSE30138, GSE54207, GSE65180 에서 총 25,070개의 발현된 유전자(total union of expressed genes)로 발생 단계 E9.5~E15.5까지의 발현 양상을 분석하였다. 도 2는 배 발생의 단계별(E9.5 내지 E15.5)에서 데이터세트(dataset)의 분포를 정리한 표이다.

[196] 도 2에 따르면, 배 발생 단계별 DEG(differentially expressed gene)는 총 9,163개로 확인되었으며, 그 중에서 건 생성(tenogenesis), 근 생성(myogenesis), 골 생성(bone genesis) 및 연골 생성(chondrogenesis)에 관여하는 것은, 28개의 마커들과의 발현 양상이 유사한 유전자 149개인 것으로 확인하였다.

[197]

[198] **배 발생 단계별 유전자 발현 양상 분석 및 PPI 네트워크 분석**

[199] 세 개의 데이터세트(dataset)로 분석을 하였기 때문에, 각 배 발생 단계별 마커 유전자들의 발현 양상과 일치하면 거리 점수 0점을, 발현 양상이 증가하는 시점에서 한 곳이 다르면 0.33점을, 두 곳이 다르면 0.67점을, 감소하는 시점에서

한 곳이 다르면 -0.33점을, 두 곳이 다르면 -0.67점등과 같이 거리 점수를 부여하여 각 유전자들의 거리 점수 총점으로 마커 유전자들과의 발현 양상 유사도를 비교 분석하였다. 총 9,163개의 DEG들 중에서 거리 총점이 ± 0.33 이하 즉, 전체 배 발생 단계 중 한 개의 배 발생 단계에서만 발현 양상이 일치하지 않는 149개의 유전자들을 1차로 선별하였다. 1차 선별된 후보 유전자들에 대해 degree cut-off를 조절하면서 PPI network, functional enrichment, module 분석을 수행하였다.

[200] 단백질-단백질 상호작용(PPI, Protein-Protein Interaction) 네트워크 분석결과, 이에 따르면 3개의 sub-cluster들이 구성되었음을 확인하였고, 여기서 이미 잘 알려져 있는 유전자를 제외하여 99개의 유전자를 2차 선별하였다. 다음으로 gene ontology(GO)를 통해 건 재생과 기능적으로 연관성이 있는 42개의 유전자를 3차 선별하였다. 3차 선별된 42개의 유전자는 건 재생과 관련된 최종 유전자 선별을 위해 스크리닝 실험에 사용되었다.

[201]

[202] *배 발생 단계별 건 생성 마커와 Zkscan8의 발현 양상 비교*

[203] 도 3a는 배 발생 단계별 발현 유형에 따른 건 생성 마커와 Zkscan8의 발현 양상을 분석하여 나타낸 그래프이다.

[204] 각 배 발생 단계별 Zkscan8 유전자와 건 생성 마커들의 발현 양상을 비교하여 어떤 마커들과 유사한지를 분석하였고, 그 결과 도 3a에 나타난 바와 같이 Scx와 Tgif1는 E9.5부터 계속 증가하다가 E13.5에서 감소하였고, Mxk는 E13.5까지 계속 증가하였고, Tgf- β 2는 E9.5부터 E13.5까지 계속 높은 수준의 발현 양을 보였다. Egr1과 Thbs4는 E9.5보다 E10.5~E11.5에서 감소하다가 E12.5에서부터 다시 증가하였고, Eph4는 E10.5에서부터 크게 증가하는 것을 확인하였다, 배 발생 단계 별 Zkscan8의 발현 양상을 살펴보면, E10.5에서 증가하고 유지하는 패턴을 보이고 전반적으로 건 마커들의 발현 양과 유사함을 알 수 있다.

[205]

[206] *인간의 정상 건과 회전근개 질환 건에서의 Zkscan8의 발현 양상 분석*

[207] 정상인 인간에서 얻은 정상적인 건과 회전근개 질환을 갖는 환자로부터 얻은 건에서 건 생성 마커들과 Zkscan8 유전자가 어떠한 발현 양상을 보이는지 확인하고자 하였다.

[208] 도 3b는 인간 정상 건(Normal)과 회전근개 질환이 환자의 건(Tendinopathy)에서 건 생성 마커와 Zkscan8의 발현 양상을 측정하여 나타낸 그래프이다.

[209] 도 3b에 나타난 바와 같이, 건 생성 마커로 알려져 있는 Tnmd와 Thbs4의 발현 정도가 회전근개 질환의 건에서 각각 5.4 배 및 2 배 정도로 현저하게 감소하는 것을 확인하였다. 회전근개 질환의 건에서의 Col3a1의 발현정도가 정상 건에 비하여 3.2 배 현저히 증가하였다. 또한 회전근개 질환의 건에서 MMP-9의 발현정도도 정상 건에 비하여 11.8 배 더 증가하였다. 그러나, 회전근개 질환의 건에서의 Zkscan8 유전자만 정상 건에 비하여 특이하게 감소하는 것을

확인하였다. 이를 통해 회전근개 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 유전자로 Zkscan8가 바람직함을 확인하였다. Zkscan8이 최종 선정되었다.

[210]

[211] **Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)의 특성 분석**

[212] 대조군 벡터인 pscAAV-GFP와 Zkscan8 삽입된 pscAAV 벡터의 모식도는 도 1c에 나타내었다. pscAAV-GFP와 pscAAV-Zkscan 8을 각각 도입한 태줄유래 중간엽 줄기세포를 상술한 바와 같이 제조하였고, Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)의 특성을 비교 분석하고자 하였다. 이를 위해 각각에 대한 세포 모양과 증식능을 분석하였다.

[213] 도 4는 Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)에 대한 특성(세포모양과 증식능)을 분석한 결과로, 도 4a는 Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)을 현미경으로 촬영한 이미지이고, 도 4b는 Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)의 증식능을 측정하여 정량적으로 나타낸 그래프이며, 도 4c는 Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)에 대한 Zkscan8 유전자 발현여부를 RT-PCR으로 측정하여 나타낸 그래프이며, 도 4d 및 도 4e는 Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)에서의 Zkscan8 단백질 발현 수준을 웨스턴 블롯팅(western blotting)으로 분석한 결과이다.

[214] 도 4a 및 4b에 나타난 바와 같이, Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)은 특징적인 줄기세포의 모양인 섬유아세포 형태가 관찰되었다. 즉, 두 세포의 증식능 차이는 없는 것으로 확인되었다.

[215] 도 4c 내지 4e에 나타난 바와 같이, Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)로부터 총 RNA와 단백질을 추출하여 시간별로 Zkscan8 발현수준을 분석하였다.

[216] RT-PCR 결과에 따르면, Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)은 유전자를 도입하고 2일이 지난 시점부터 과발현되었고, 3일이 지난 후부터는 발현이 감소되는 것을 알 수 있다.

[217] 웨스턴 블롯팅(western blotting) 결과에 따르면, Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)는 대조군(MSC-GFP)에 비해, Zkscan 8 단백질 발현이 1.5배 이상 증가하였음을 확인하였다. 본 발명으로부터 Zkscan 8 단백질을 과발현하는 인간 태줄 유래 중간엽 줄기세포가 성공적으로 제작되었음을 확인하였다.

[218]

[219] **Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)의 건 분화능에 대한 평가**

[220] Zkscan 8 유전자와 건 분화의 관계를 확인하기 위하여 태줄유래 중간엽 줄기세포(UCMSC)를 결합 조직 성장 인자(connective tissue growth factor, CTGF) 및 아스코르브산(ascorbic acid)이 포함된 건 분화 배지에서 2주 동안 배양하여 건

세포로의 분화를 유도하였으며, 배양 3, 7, 14일에 각 세포에서의 Zkscan 8 발현을 RT-PCR으로 확인하였다. 그리고 Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)을 단축 장력 하에서 3일 동안 3차 배양하여 건 분화를 유도하고, 이때 건 관련 유전자(Scx, Egr-1, Egr-2, Thbs4) 발현을 qRT-PCR과 조직학적 분석으로 확인하였다.

[221] 도 5는 Zkscan8 과발현이 건 분화에 미치는 영향을 평가한 것이다. 도 5a는 태줄유래 중간엽 줄기세포(UCMSC)를 건분화배지에서 2주간 배양한 후, 각 배양일별 Zkscan 8 발현 수준을 RT-PCR로 분석하여 정량화한 그래프이다.

[222] 도 5a에 나타난 바와 같이, 태줄유래 중간엽 줄기세포(UCMSC)는 건 분화 유도 14일차에 Zkscan 8 발현이 1.5배 이상 유의하게 증가함을 알 수 있다. 이는 건 분화와 Zkscan 8 발현이 연관성이 있음을 나타내는 것이다.

[223]

[224] 현재까지 Scx, Mxk 및 Egr-1/2와 같은 몇 가지 전사 인자가 건 발달에 관여한다고 알려져 있고 팔다리(limb)에서 Scx와 Sox9는 건 전구체 세포 개시를 위한 첫 번째 신호로 작용한다. 이에 반해 Mxk와 Egr-1/2는 건 분화와 성숙을 위한 두 번째 신호로 알려진 바 있다. 특히, Egr-1/2는 건 분화에 필요한 요소로 알려져 있으며, 타입 1 콜라겐 생성을 조절함으로써 척추동물 건 분화에 관여하는 새로운 DNA 결합 단백질이라고 밝혀진 바 있다. Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)에서 건 발생에 관련된 전사 인자들(Scleraxis; Scx, Mohawk ; Mxk, Early Growth Response-1/2; Egr-1/2)의 발현 양상을 시간별로 qRT-PCR를 통해 확인하였다.

[225] 도 5b는 Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)을 7일 동안 배양한 후, 각 배양일별 건 발생 전사인자(Scx, Mxk, Egr-1, Egr-2) 발현 수준을 qRT-PCR로 분석하여 정량화한 그래프이다. 이때, 대조군(MSC-GFP)의 2일을 기준으로 상대 발현 값을 그래프에 표시하였다.

[226] 도 5b에 나타난 바와 같이, Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)는 3일째부터 Scx 발현이 1.61배 증가하였고 2일차에서 Egr-1, Egr-2 발현이 각각 2.93배, 4배 이상 유의적으로 증가하였다. 이에 반해 대조군(MSC-GFP)은 배양 초기와 차이가 없음을 알 수 있다.

[227]

[228] 다음으로는 단축장력 하에서 세포를 3차 배양하여 건과 인대를 모방하는 분화 방법을 이용하였을 경우, Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)의 조직학적 양상, 건 분화 마커의 발현 변화를 확인하였다.

[229] 도 5c 및 도 5d는 Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)을 건분화배지에서 3차 배양법을 통해 3일간 배양한 후, 건 관련 마커(Scx, Egr-1, Egr-2, Thbs4) 발현 수준을 qRT-PCR로 분석하여 정량화한 그래프이다.

[230] 도 5c 및 도 5d에 나타난 바와 같이, Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽

줄기세포(MSC-Zk8)은 3차 배양 3 일 차에서 Scx(1.7배), Egr-1(2.7배), Egr-2(2.8배), Thbs4(1.5배)의 발현이 모두 증가하였음을 확인하였다.

[231]

[232] 도 5e는 Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)을 건분화배지에서 3차 배양법을 통해 3일간 배양하였을 때, 건 분화 유도에 따른 조직학적 특성을 분석한 결과이다.

[233] 도 5e에 나타난 바와 같이, Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)는 얇고 길쭉한 모양의 세포들이 일렬로 정렬되어 있는 모습인 것을 확인하였다. 또한, Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)의 기질이 피크로시리우스레드(picrosirius red) 염색을 통하여 노란색으로 염색되는 제1형 콜라겐임을 확인하였다. 또한 제1형 콜라겐 항체 및 제3형 콜라겐 항체를 이용하여 면역조직화화적 염색을 한 결과, 제1형 콜라겐 및 제3형 콜라겐의 발현을 확인하였다. 특히, Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)에서 제1형 콜라겐의 발현이 유의하게 더 많음을 확인하였다. 상술한 결과를 종합하면 Zkscan8이 직접적으로 건 세포 분화 유도에 관여하고 있음을 알 수 있다.

[234]

[235] **Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)에 대한 지방, 골, 연골, 건, 근육 및 신경 관련 마커 발현 양상 분석**

[236] 건 조직은 뼈, 연골 및 근육과 유사점이 많다. 따라서 Zkscan 8 역시 건 조직뿐만 아니라 근골격계를 구성하는 지방, 골, 연골, 건, 근육 및 신경 세포 관련 마커에도 영향을 주는지 확인하고자 하였다. 구체적으로 Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)를 제조하고 2 일 및 3 일 이 지난 후 근골격계 관련 마커를 포함한 다양한 유전자들의 발현 양상을 분석하였다.

[237] 도 6은 Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)와 대조군(MSC-GFP)에서의 지방, 골, 연골, 건, 근육, 신경 세포 관련 마커 발현 양상을 분석한 결과로, 이에 따르면 Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)에서 지방, 골, 연골, 근육 및 신경 관련 유전자들의 발현이 전반적으로 증가하였다. 특히, Zkscan 8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC-Zk8)는 대조군(MSC-GFP)에 비해 3 일 차에서 ALP(Alkaline phosphatase), Sox6(SRY-Box Transcription Factor 6), Egr-2, Col1A1, Desmin, NEFL(Neurofilament light polypeptide) 발현이 크게 증가함을 알 수 있다. 이는 Zkscan8의 과발현이 골, 연골, 근육 및 신경을 포함한 근골격계에 영향을 주고 있음을 의미하는 것이다.

[238]

[239] **동물실험의 각 그룹에 대한 거시적 평가**

[240] 도 7a는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8

group)에 대한 실험시작 2 주 및 4 주째 극상건의 거시적 모습이다. 이때 건의 결손 상태를 명확하게 관찰하기 위해, 결손 주위의 주변 조직들을 제거하였다.

[241] 도 7b는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 탯줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 탯줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)에 대한 실험시작 2 주 및 4 주째 극상건에 대한 총 거시적점수(the total macroscopic score)를 분석하여 나타낸 결과이다. 모든 정량 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$).

[242] 도 7a 및 도 7b에 나타난 바와 같이, 외형적으로 심한 손상을 평가하는 총 거시적 점수를 각 군별로 비교하였다. 2 주째일 때, Zkscan8 도입 탯줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)은 4.75 ± 0.46 이었으나, 생리식염수군과 탯줄유래 중간엽 줄기세포군은 각 10.75 ± 1.28 ($p < 0.000$), 7.25 ± 0.89 ($P < 0.000$)으로 손상 정도가 심각한 것을 알 수 있다. 특히 Zkscan8 도입 탯줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)은 염증, 주위 조직과의 유착, 건의 두께 변수에서 다른 군들에 비해 낮은 점수(낮은 손상)을 나타내는 것을 확인하였다.

[243] 4 주째일 때, Zkscan8 도입 탯줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)은 총 거시적 점수가 2.75 ± 0.46 이었다. 이에 반해 생리식염수군과 탯줄유래 중간엽 줄기세포군은 각 9.00 ± 0.00 ($P < 0.000$) 그리고 4.25 ± 0.89 ($P < 0.000$)으로 손상 정도가 MSC-Zk8에 비해 현저히 높은 것을 확인하였다. MSC-Zk8 군은 건의 부기 및 발적 변수에서 다른 군들에 비해 낮은 손상 정도를 갖는 것을 확인하였다.

[244] 상술한 실험을 통해 Zkscan8가 과발현될 경우, 탯줄유래 중간엽 줄기세포의 조직 손상 회복 능력이 현저히 상승함을 알 수 있다.

[245] 또한, 회전근개가 손상될 경우, 회전근개가 주위 조직과 유착이 발생되어, 건 손상을 악화시킴으로써, 환자의 움직임이 제한되고 극심한 통증을 유발한다. 그러나 Zkscan8 도입 탯줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)은 이를 억제함으로써, 건 손상에 의해 야기될 수 있는 환자의 고통과 증상을 예방 또는 치료할 수 있음을 알 수 있다.

[246]

[247] **동물실험의 각 그룹에 대한 조직학적 평가**

[248] 도 8a는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 탯줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 탯줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)에 대한 실험시작 2 주 및 4 주째 극상건을 H&E 염색한 사진(배율: $\times 100$)이고, 도 8b는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 탯줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 탯줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)에 대한 실험시작 2 주 및 4 주째 극상건의 총 퇴행성 점수(the total degeneration score)를 분석하여 나타낸 결과이다. 모든 정량 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$).

[249] 도 8a 및 도 8b에 나타난 바와 같이, 실험 수행 2주차에는 Zkscan8 도입 탯줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)의 총 퇴행성 점수가 $13.00 \pm$

1.20이었다. 이에 반해 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group)은 각 17.75 ± 0.46 ($P < 0.001$), 16.00 ± 0.93 ($P < 0.001$)인 것으로 확인되었다. 즉, Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)은 다른 군들에 비해 건 조직의 퇴행성 변화가 유의하게 낮음을 알 수 있다. 특히 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)은 손상된 섬유소의 배열과 증가된 혈관 변수에서, 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group)에 비하여 유의한 차이로 회복됨을 확인하였다.

[250] 4 주에서는, Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)의 총 퇴행성 점수가 7.00 ± 1.07 이었고, 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group)은 각각 16.25 ± 0.89 ($P < 0.01$), 8.75 ± 1.83 ($P = 0.05$)인 것으로 확인되었다. Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)은 다른 군들에 비해 건의 퇴행성 정도가 유의하게 낮음을 알 수 있다.

[251]

[252] 도 9a는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)에 대한 실험시작 2 주 및 4 주째 극상건을 PSR로 염색한 사진(배율:×100)이고, 도 9b는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)에 대한 실험시작 2 주 및 4 주째 극상건의 콜라겐 섬유소의 배열(collage fiber coherence)을 분석하여 나타낸 결과이다. 모든 정량 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$).

[253] 도 9a 및 도 9b에 나타난 바와 같이, 실험 수행 2주차에는 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)의 콜라겐 섬유소의 배열 값이 43.35 ± 8.35 이었다. 이에 반해 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group)은 각각 20.69 ± 4.88 ($P = 0.003$), 27.61 ± 6.97 ($P = 0.042$)인 것으로 확인되었다. Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)은 다른 군들에 비하여 유의하게 콜라겐 섬유 배열이 향상됨을 알 수 있다.

[254] 실험 수행 4주에서도, Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)의 콜라겐 섬유 배열 값은 47.76 ± 5.77 으로 다른 군에 비해 유의하게 높았다. 구체적으로 생리식염수군(Saline group)의 콜라겐 섬유 배열 값은 19.86 ± 2.97 ($P < 0.000$)이었다.

[255]

[256] 도 10a 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)에 대한 실험시작 2 주 및 4 주째 극상건을 Saf-O로 염색한 사진(배율:×100)이고, 도 10b는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)에 대한 실험시작 2 주 및 4 주째 극상건의

글리코 아미노 글리칸 풍부 영역(GAG-rich area)을 분석하여 나타낸 결과이다. 모든 정량 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$).

- [257] 도 10a 및 도 10b에 나타난 바와 같이, 실험 수행 2주차에는 글리코 아미노 글리칸 풍부 영역의 발생 정도 차이가 적은 것으로 확인되었다. 즉, 각 그룹 간의 차이가 없었다. 다만, 실험 수행 4주차에는, Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)이 $39.17 \pm 28.34 \text{ mm}^2$ 이었다. 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group)은 각각 $643.39 \pm 156.99 \text{ mm}^2$ ($P < 0.000$), $255.33 \pm 107.01 \text{ mm}^2$ ($P = 0.013$)인 것으로 확인되었다. 즉 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)은 다른 군들에 비해 이소성 연골 형성 정도가 현저히 적었다. 특히, Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)의 점수는 정상군과 유의한 차이가 없는 수준임을 알 수 있다.

[258]

- [259] 도 11은 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)에 대한 실험시작 2 주 및 4 주째 극상건을 이소성골화 영역(area of ossification)을 분석하여 나타낸 결과이다. 모든 정량 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$).

- [260] 도 11에 나타난 바와 같이, Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)을 비롯한 다른 모든 군에서 비특이적인 골형성은 발생하지 않은 것을 알 수 있다.

[261]

- [262] 상술한 실험결과를 통해, Zkscan8를 강화한 태줄 유래 중간엽 줄기세포는 임상 적용에 무리가 없고, 오히려 건 조직의 재생을 촉진하고, 건 조직의 회복을 도와 근골격계 질환의 예방 또는 치료에 활용이 가능함을 알 수 있다.

- [263] 건을 포함하는 근골격계 치료를 실패하는 대부분의 원인은, 손상 후 건이 원래 정상 조직으로 회복되지 않고 불규칙한 콜라겐 섬유와 많은 혈관으로 이루어진 반흔 조직(scar tissue)으로 대체되는 현상이 발생하기 때문이다. 그러나, Zkscan8를 과발현시킨 태줄유래 중간엽 줄기세포를 처리하자, 태줄유래 중간엽 줄기세포 만을 처리한 것보다 콜라겐 섬유의 정렬을 높임으로써, 건의 결손 부위가 반흔 조직으로 대체되지 않고 정상적인 건 조직으로 회복될 수 있도록 한다는 것을 확인하였다. 또한 근골격계 치료에 줄기세포를 적용할 경우, 이소성 연골 형성 및 골화가 유도되어, 어깨의 통증과 재파열 및 합병증의 빈도를 높이는 문제가 있어, 임상 적용에 한계가 있었다. 그러나 Zkscan8를 과발현시킨 태줄유래 중간엽 줄기세포는 오히려 이소성 연골 형성을 억제하였고, 정상군과 동일한 수준으로 유지함을 확인하였다. 즉 Zkscan8은 태줄유래 중간엽 줄기세포가 가지고 있던 부작용을 해소함으로써, 임상 적용이 가능하도록 하였고, 이외에도 건 조직의 손상을 예방, 완화, 치료 효과를 갖는바, 건 조직의

회복을 도와 근골격계 질환의 예방 또는 치료에 활용이 가능함을 알 수 있다.

[264]

[265] 동물실험의 각 그룹에 대한 생역학 평가

[266] 도 12 및 도 13은 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 텃줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 텃줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)에 대한 실험시작 2 주 및 4 주째 재생된 건의 생역학 실험에 관한 것이다.

[267] 도 12는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 텃줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 텃줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)로부터 채취한 표본과 생역학 실험절차를 촬영한 이미지이다.

[268] 도 13a는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 텃줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 텃줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)로부터 채취한 재생된 건에 대한 최대 파열 부하(the ultimate failure load)를 분석하여 나타낸 결과이다. 모든 정량 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$).

[269] 도 13a에 나타난 바와 같이, 수술하고나서 2 주가 지난 Zkscan8 도입 텃줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)은 17.54 ± 2.52 이었다. 생리식염수군(Saline group)은 10.93 ± 1.62 ($p < 0.001$)로, MSC-Zk8군이 유의한 수준으로 더 높은 최대 파열 부하를 가지고 있음을 확인하였다. 텃줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group)은 16.68 ± 3.01 으로, MSC-Zk8군과 유의한 차이가 없었다.

[270] 수술하고 4주가 지난 Zkscan8 도입 텃줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)은 22.84 ± 1.99 이었다. 생리식염수군(Saline group)은 18.51 ± 1.97 ($p = 0.016$), 텃줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group)은 22.14 ± 2.19 인 것으로 확인되었다. 즉, Zkscan8 도입 텃줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)은 생리식염수군(Saline group)보다 유의적으로 강화 및 회복되었음을 알 수 있다.

[271]

[272] 도 13b는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 텃줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 텃줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)로부터 채취한 재생된 건에 대한 강성(the stiffness)을 분석하여 나타낸 결과이다. 모든 정량 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$).

[273] 도 13b에 나타난 바와 같이, 수술하고 2주가 지난 Zkscan8 도입 텃줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)은 7.50 ± 0.60 이었다. 생리식염수군(Saline group), 텃줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group)은 각각 5.17 ± 0.55 ($p = 0.001$), 6.83 ± 0.99 인 것으로 확인되었다. 즉, Zkscan8 도입 텃줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)은 생리식염수군(Saline group)보다는 유의한 수준으로 강화되었음을 알 수 있다.

[274] 수술하고 4주가 지난 Zkscan8 도입 텃줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)은 9.04 ± 1.12 이었다. 생리식염수군(Saline group), 텃줄유래 중간엽

줄기세포군(MSC group)은 각각 7.22 ± 0.62 ($p = 0.013$), 7.38 ± 1.09 ($p = 0.029$)인 것으로 확인되었다. 즉, Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)은 생리식염수군(Saline group)과 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group)보다는 유의한 수준으로 증가하였음을 알 수 있다.

[275]

[276] 도 13c는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)로부터 채취한 재생된 건에 대한 최대 응력(ultimate stress)을 분석하여 나타낸 결과이다. 모든 정량 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$).

[277] 도 13d는 정상군(Normal group), 생리식염수군(Saline group), 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC group) 및 Zkscan8 도입 태줄유래 중간엽 줄기세포군(MSC-Zk8 group)로부터 채취한 재생된 건에 대한 건의 단면적(cross-sectional area)을 분석하여 나타낸 결과이다. 모든 정량 데이터는 평균 $\pm$ 표준오차(S.E.M)로 표시하였다(* $p < 0.05$).

[278] 도 13c 및 도 13d에 나타난 바와 같이, 최대 응력과 건의 단면적은 2주와 4주 모두 유의한 차이가 없음을 확인하였다.

[279]

[280] 건은 인체를 움직일 때 근육의 힘을 뼈에게 전달하는 기능을 하는 조직이다. 본 발명에서 "최대 파열 부하"는 건에 장력이 가해졌을 때 건이 버틸 수 있는 최대의 힘을 의미하고, "강성"은 건에 장력이 가해졌을 때 조직의 길이가 변하지 않고 주어진 장력에 버틸 수 있는 힘을 의미한다.

[281] 따라서, Zkscan8를 과발현시킨 태줄유래 중간엽 줄기세포를 처리한 건은 태줄유래 줄기세포를 단독으로 처리한 경우보다 최대 파열 부하와 강성이 증가하였음을 확인하였다. 이러한 결과는 Zkscan8를 과발현시킨 태줄유래 중간엽 줄기세포가 손상된 건에 처리되면, 건 조직의 염증억제, 퇴행성 변화 방지, 콜라겐 섬유의 나열 회복 및 이소성 연골 형성 억제하는 효과를 나타내는 앞선 결과들과 일치하는 것이라 할 것이다. 즉, Zkscan8를 과발현시킨 태줄유래 중간엽 줄기세포를 전층 파열 손상에 적용하였을 때, 손상된 건의 결손 조직을 재생시키고 건의 기능을 향상시킬 수 있음을 알 수 있다.

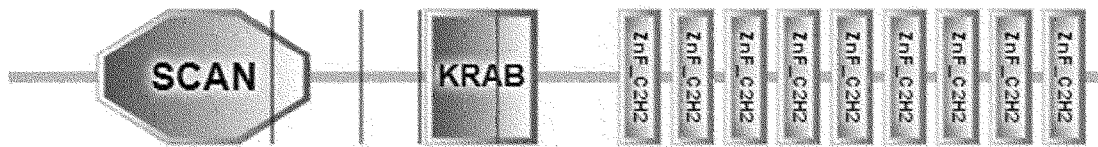
청구범위

- [청구항 1] Zkscan 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8)의 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 근골격계 질환 진단용 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 제제는 Zkscan 8 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 제제는 Zkscan 8 유전자가 코딩하는 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 근골격계 질환은 건 질환 또는 인대 질환인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 5] 1) 근골격계 질환이 의심되는 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 Zkscan 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8)의 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 2) 상기 측정된 Zkscan 8의 유전자 또는 상기 유전자가 코딩하는 단백질의 발현 수준을 정상 대조군 시료의 발현 수준과 비교하는 단계;를 포함하는 근골격계 질환의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.
- [청구항 6] Zkscan 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8) 단백질을 유효성분으로 함유하는 근골격계 질환의 예방 또는 치료용 조성물.
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서,
상기 Zkscan 8 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 8] 제 6 항에 있어서,
상기 근골격계 질환은 건 질환 또는 인대 질환인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 9] 제 8 항에 있어서,
상기 건 질환은 건 손상(Tendon injury), 건 파열(tendon rupture), 건염(tendinitis), 건병증(tendinosis) 및 건활막염(tendosynovitis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이고,
상기 인대 질환은 대퇴사두근인대 파열(knee quadriceps ligament rupture), 관상인대염좌(coronary ligament sprain), 측부 인대 손상(collateral ligament rupture), 전방십자인대 손상(anterior cruciate ligament injury), 후방십자인대 손상(posterior cruciate ligament injury), 족관절 인대 손상(ankle ligament injury), 인대 파열(ligament rupture) 및 염좌(sprain)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는

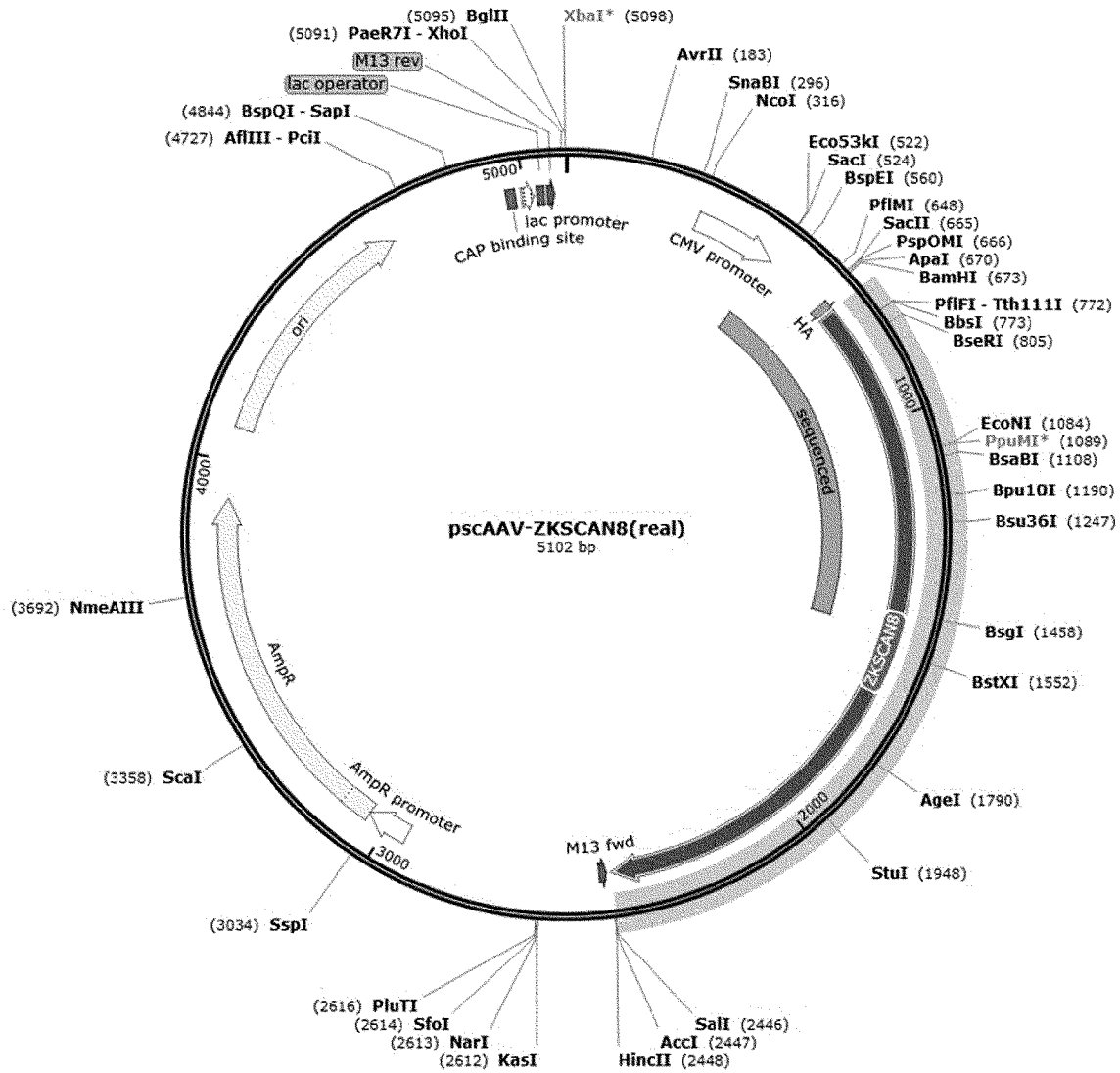
- 조성물.
- [청구항 10] Zkscan 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8) 유전자, 상기 유전자를 포함하는 벡터, 상기 벡터를 포함하는 세포 또는 이의 배양액을 유효성분으로 함유하는 근골격계 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제 10 항에 있어서, 상기 벡터는 선형 DNA, 플라스미드 DNA 또는 재조합 바이러스성 벡터인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 12] 제 11 항에 있어서, 상기 재조합 바이러스는 레트로 바이러스, 아데노 바이러스, 아데노 부속 바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스 및 렌티바이러스로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 13] 제 10 항에 있어서, 상기 세포는 줄기세포(stem cells), 수지상 세포(dendritic cells), 자가이식 종양세포(autologous tumor cells) 및 정착 종양세포(established tumor cells)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 14] 제 13 항에 있어서, 상기 줄기세포는 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 15] 제 14 항에 있어서, 상기 중간엽 줄기세포는 탯줄 유래 중간엽 줄기세포인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 16] 제 10 항에 있어서, 상기 근골격계 질환은 건 질환 또는 인대 질환인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 17] 제 16 항에 있어서, 상기 건 질환은 건 손상(Tendon injury), 건 파열(tendon rupture), 건염(tendinitis), 건병증(tendinosis) 및 건활막염(tendosynovitis)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상이고, 상기 인대 질환은 대퇴사두근인대 파열(knee quadriceps ligament rupture), 관상인대염좌(coronary ligament sprain), 측부 인대 손상(collateral ligament rupture), 전방십자인대 손상(anterior cruciate ligament injury), 후방십자인대 손상(posterior cruciate ligament injury), 족관절 인대 손상(ankle ligament injury), 인대 파열(ligament rupture) 및 염좌(sprain)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.
- [청구항 18] 제 10 항에 있어서, 상기 조성물은 Scx(scleraxis), Mlx(Mohawk), Egr-1(Early growth response-1), Egr-2(Early growth response-2)의 발현 또는 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

- [청구항 19] (a) 손상된 건(힘줄)(tendon), 인대(Ligament), 근육(muscle), 연골(cartilage) 또는 골(bone) 세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및
(b) 상기 시료 내 Zkscan 8(Zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8) 유전자 또는 단백질의 발현 수준을 측정하는 단계;를 포함하고,
상기 (b) 단계에서 Zkscan 8의 발현 수준이 정상 대조군에 비해 증가한 경우, 상기 시험물질은 근골격계 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 판정하는 것을 특징으로 하는 근골격계 질환의 예방 또는 치료용 조성물의 스크리닝 방법.
- [청구항 20] 제 19 항에 있어서,
상기 근골격계 질환은 건 질환 또는 인대 질환인 것을 특징으로 하는 방법.

[도 1a]



[도 1b]



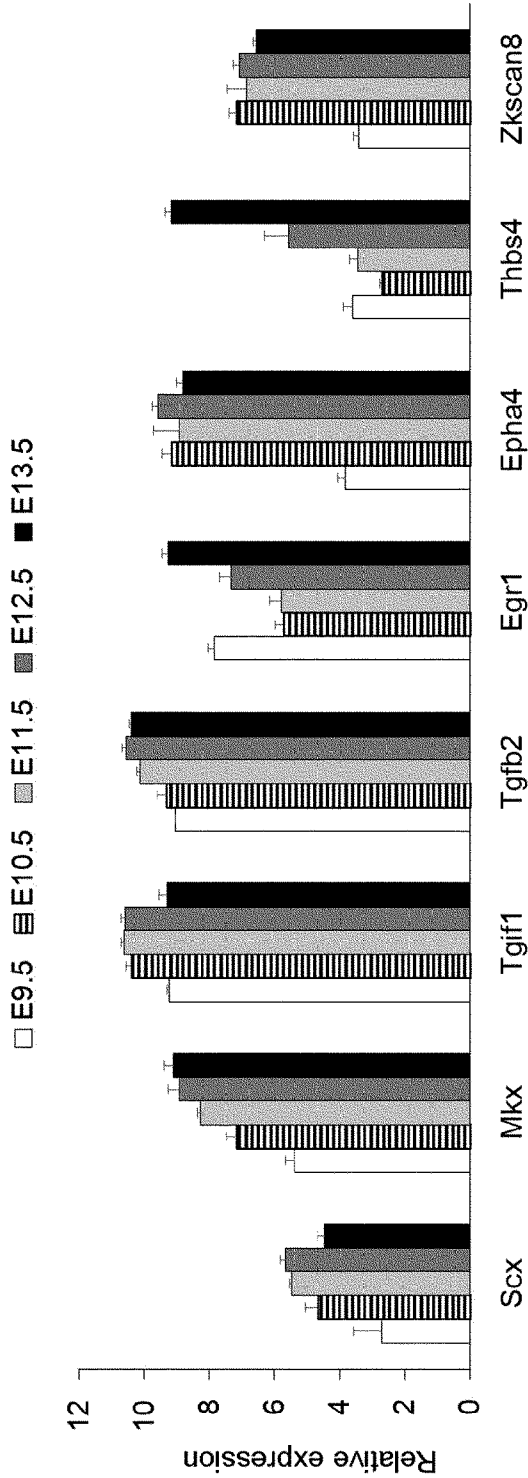
[도 1c]



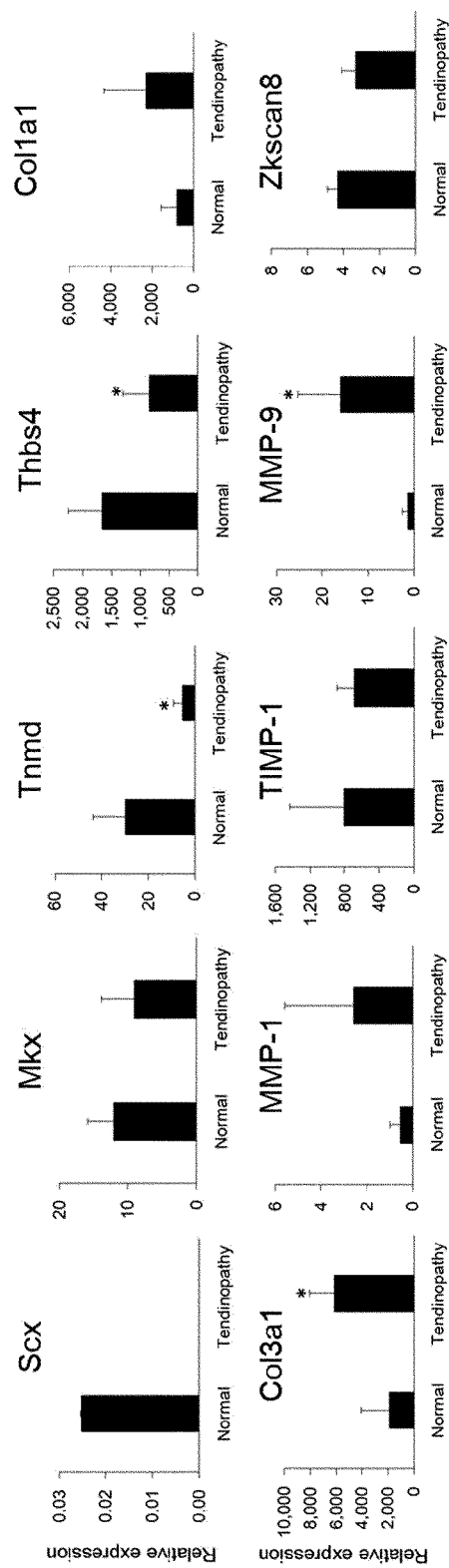
[도2]

E9-E10	E9-E11	E9-E12	E9-E13	E10-E11	E10-E12	E10-E13	E11-E12	E11-E13	E11-E14	E11-E15	E12-E13	E12-E14	E13-E15
GSE30138F	GSE30138F	GSE30138F	GSE30138F	GSE30138F	GSE30138F	GSE30138F	GSE30138F	GSE30138F	GSE30138F		GSE30138F		
				GSE30138H	GSE30138H	GSE30138H	GSE30138H	GSE30138H			GSE30138H		
							GSE4207		GSE4207			GSE4207	
								GSE65180		GSE65180			GSE65180

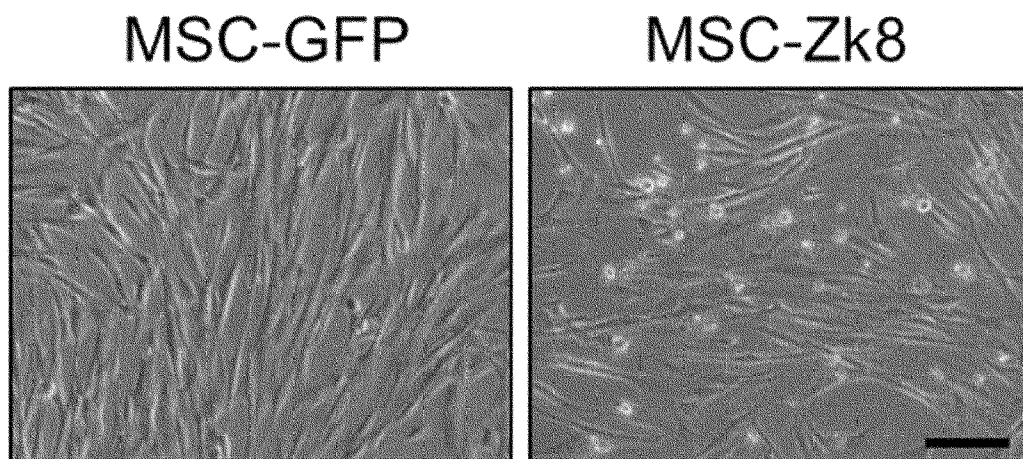
[도3a]



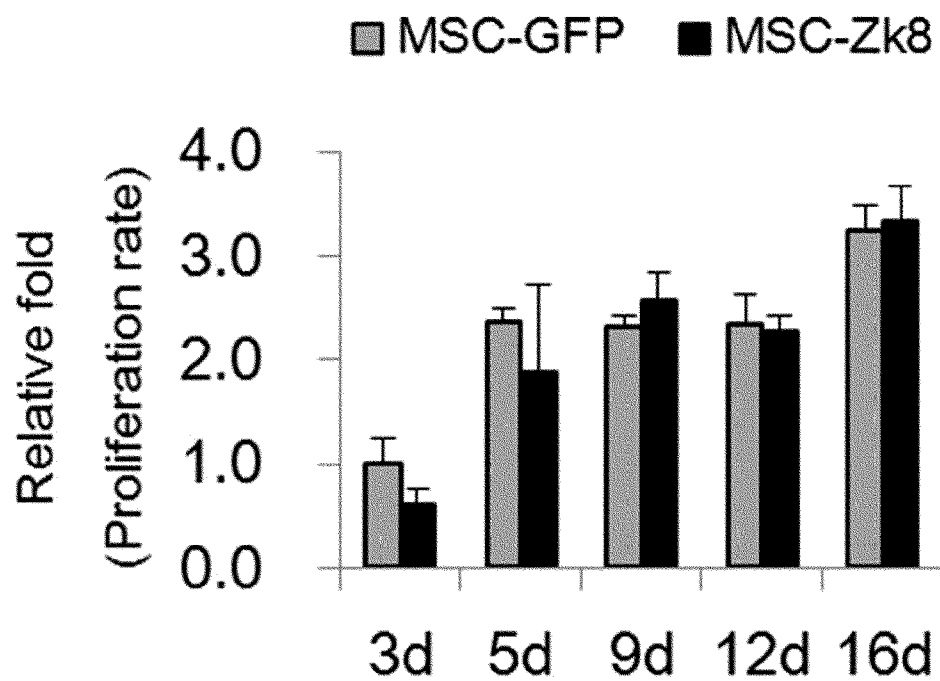
[도3b]



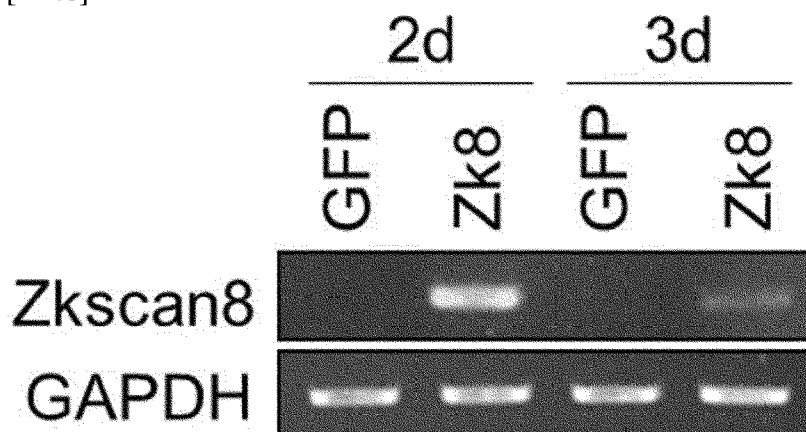
[도4a]



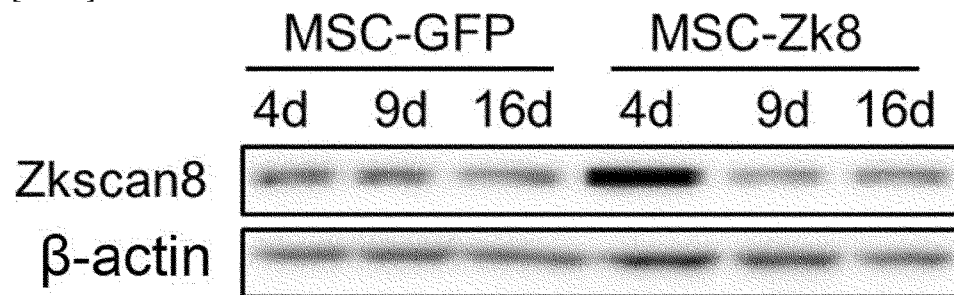
[도4b]



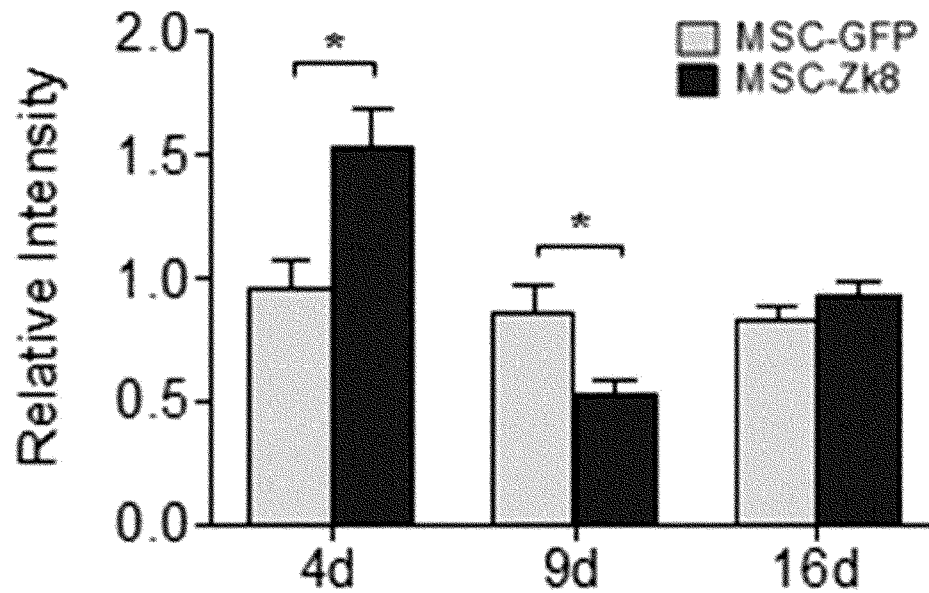
[도4c]



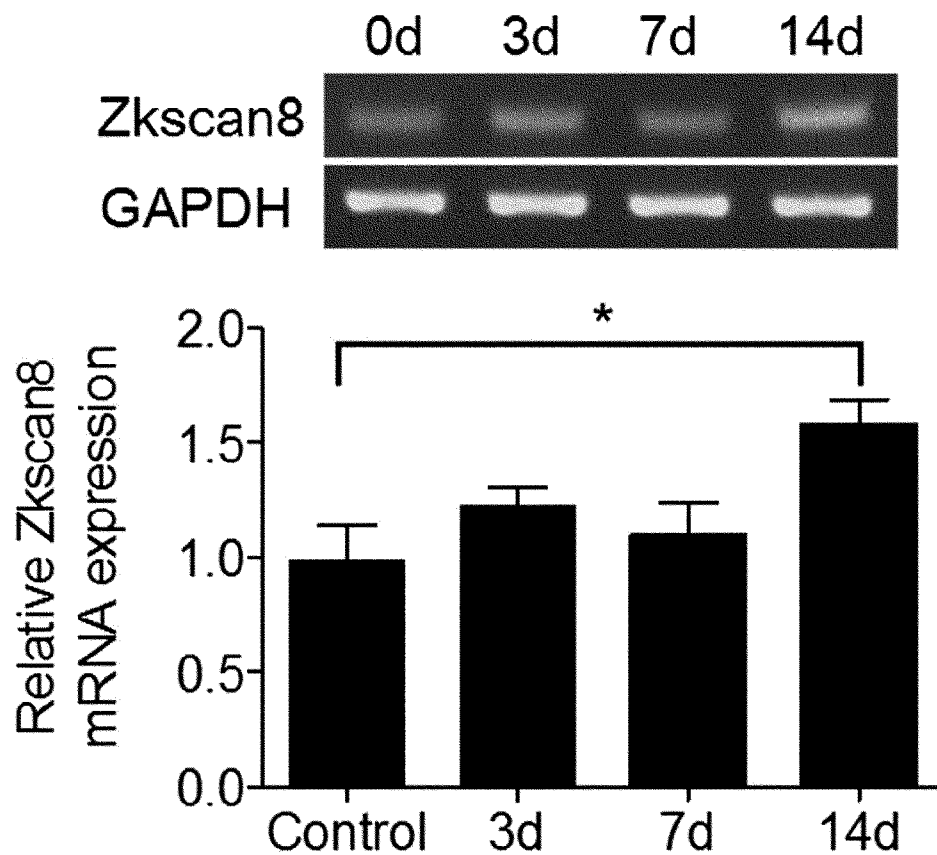
[도4d]



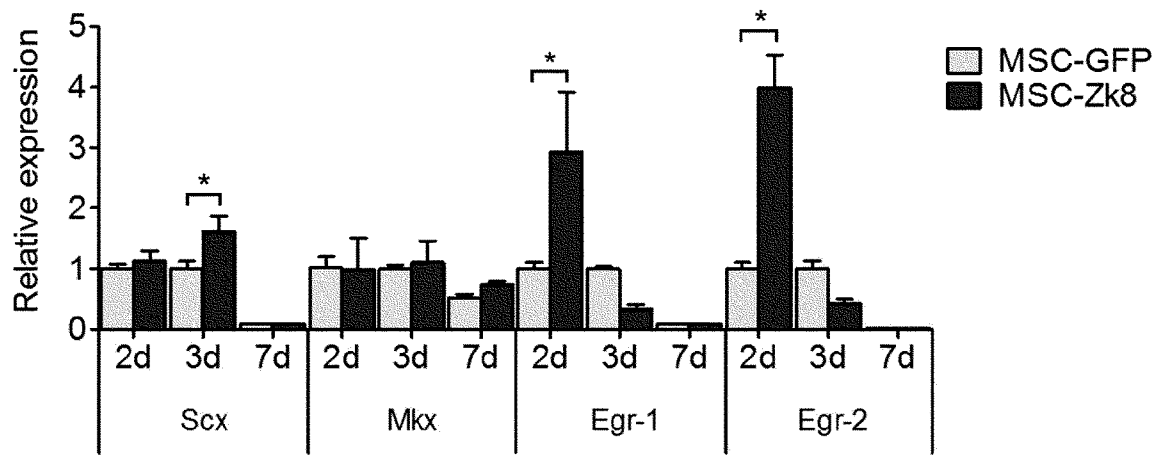
[도4e]



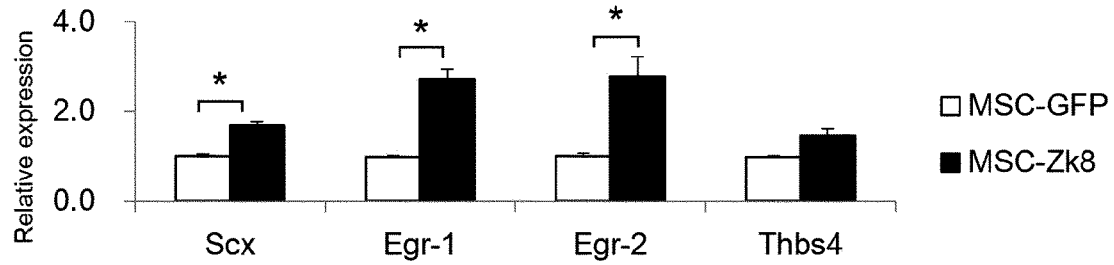
[도5a]



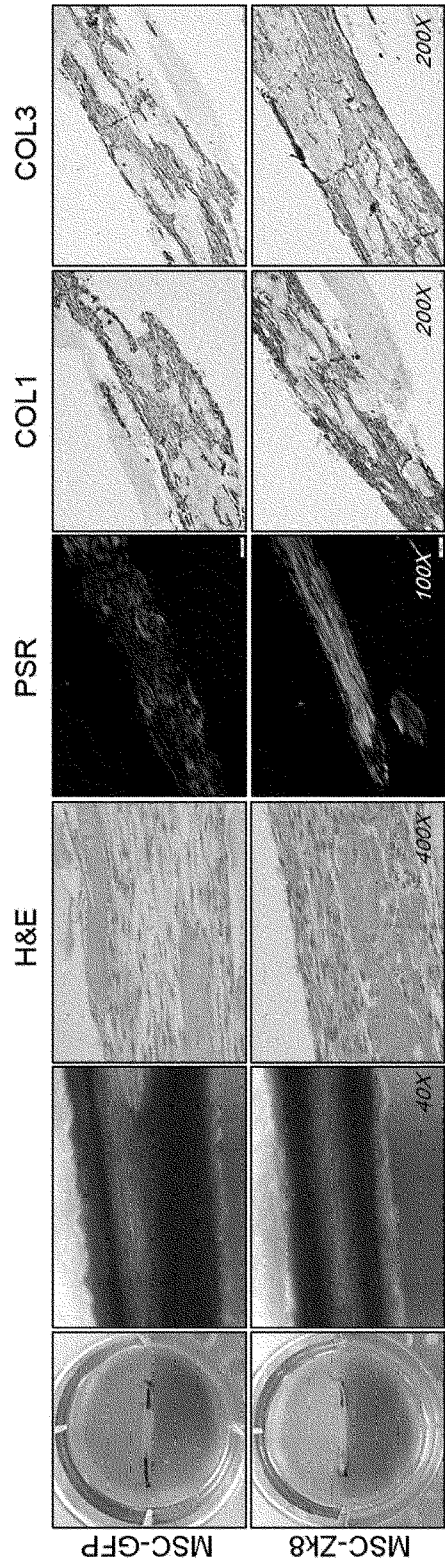
[도5b]



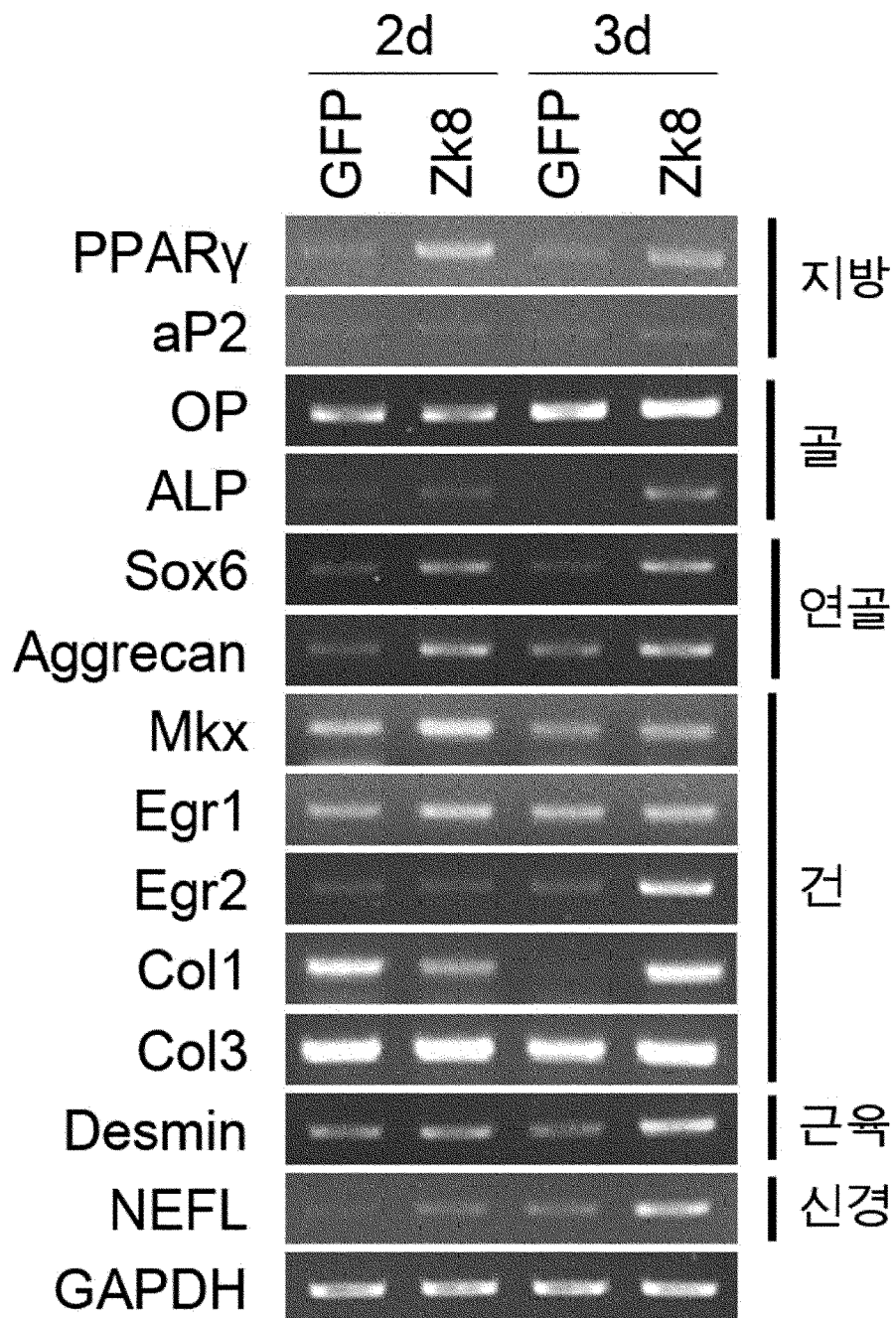
[도5c]



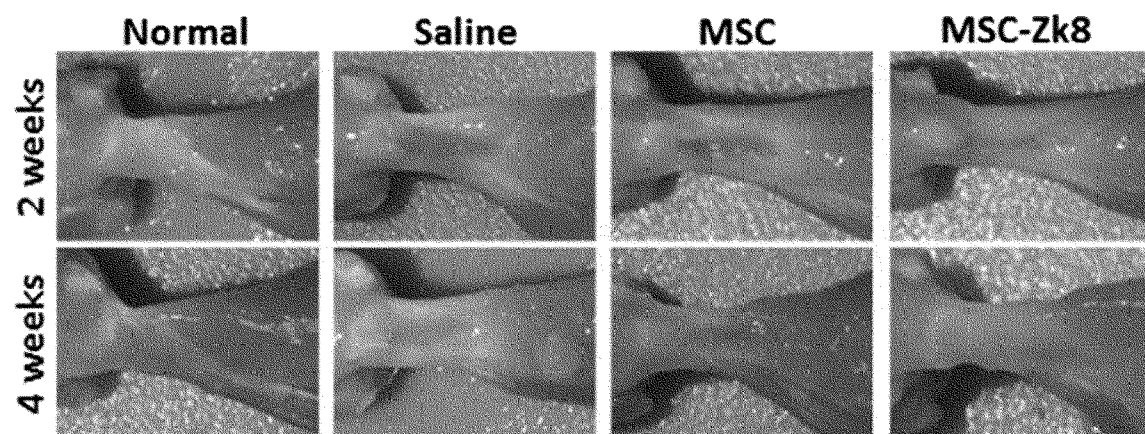
[도5d]



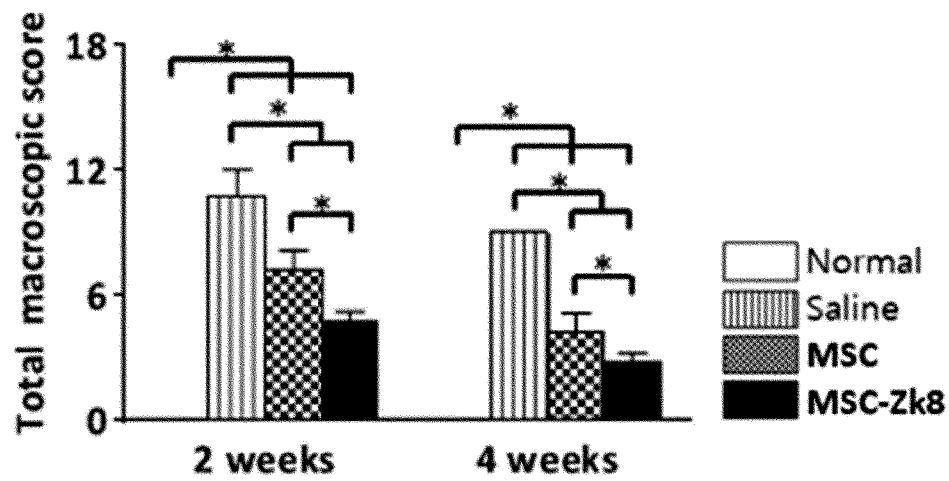
[도6]



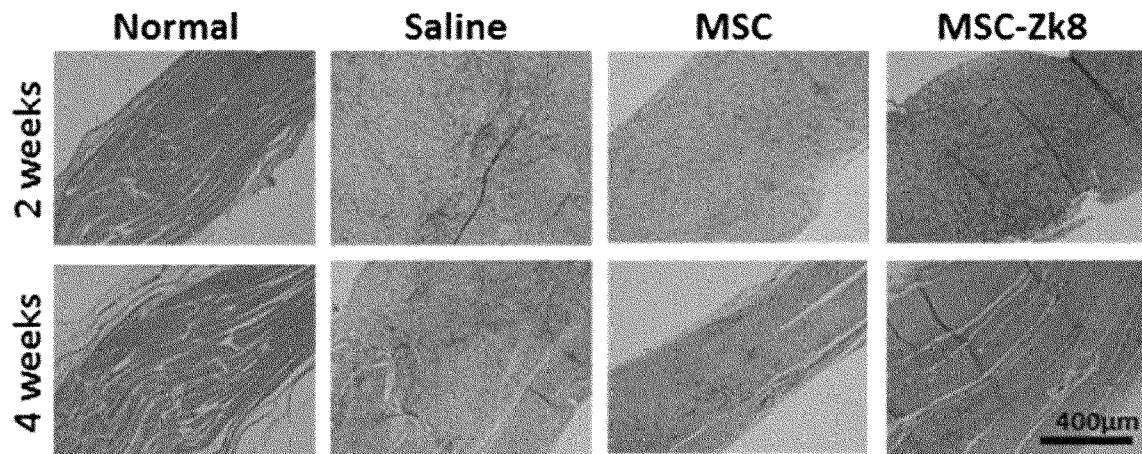
[도7a]



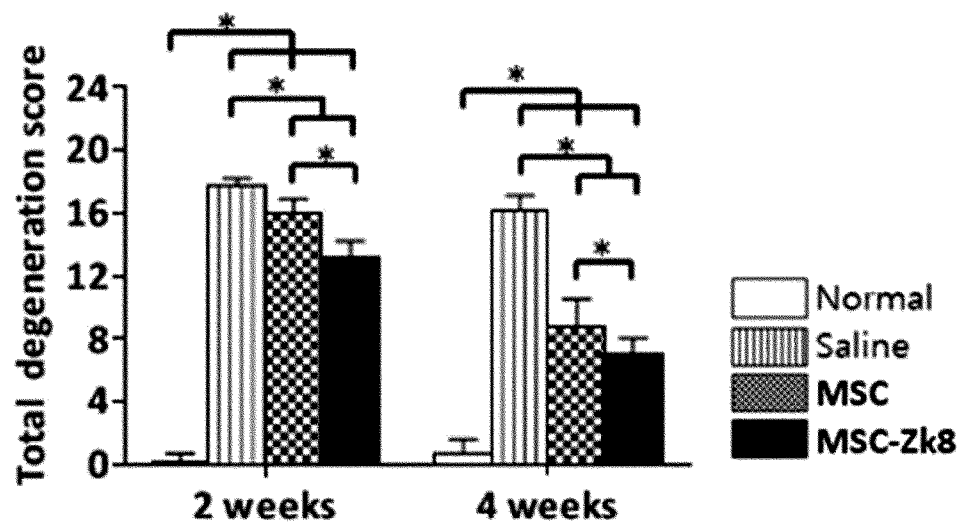
[도7b]



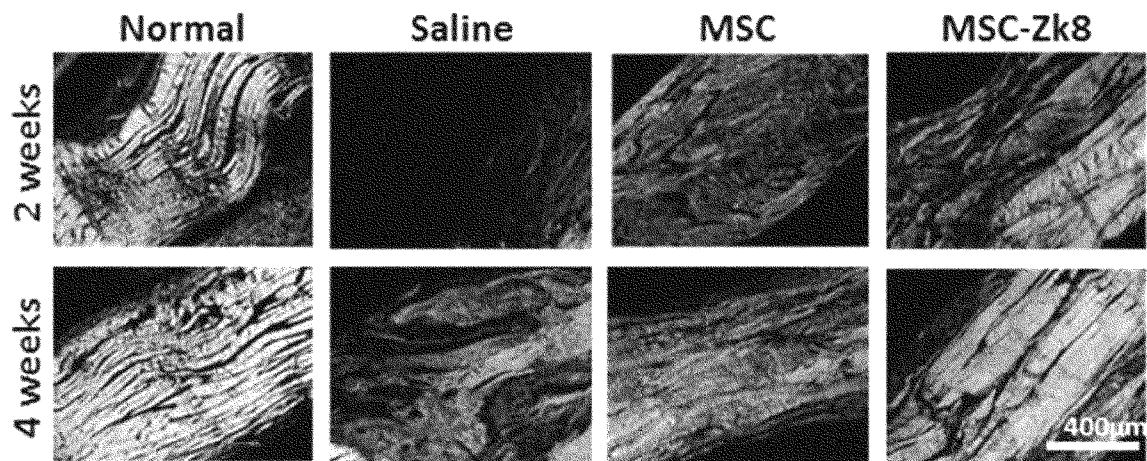
[도8a]



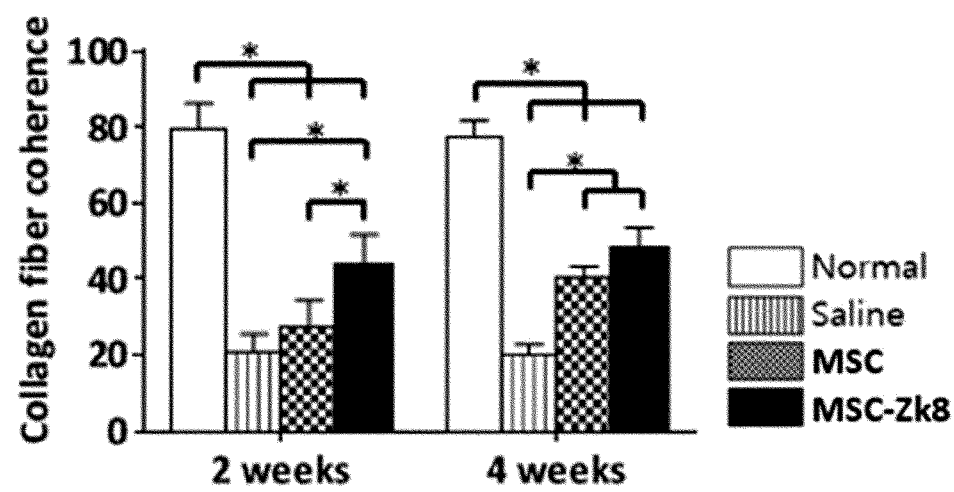
[도8b]



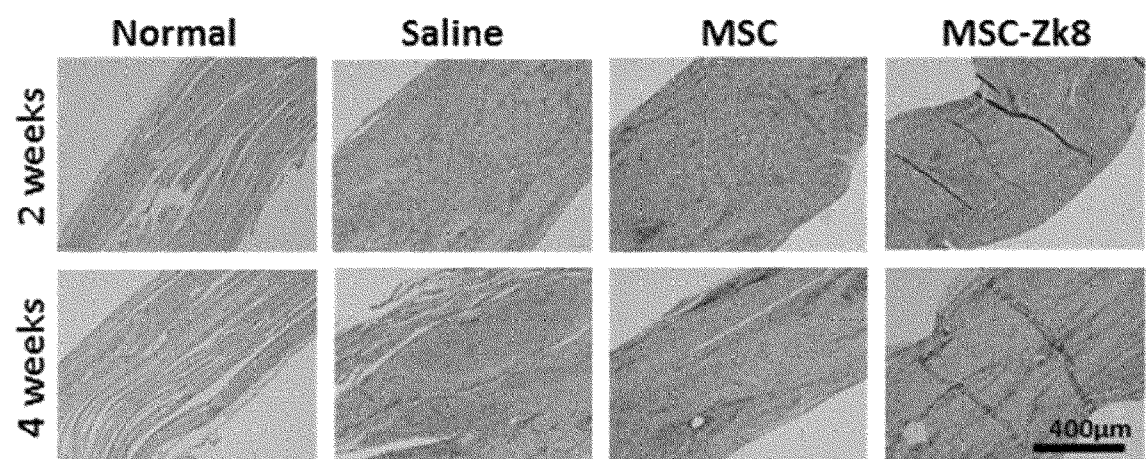
[도9a]



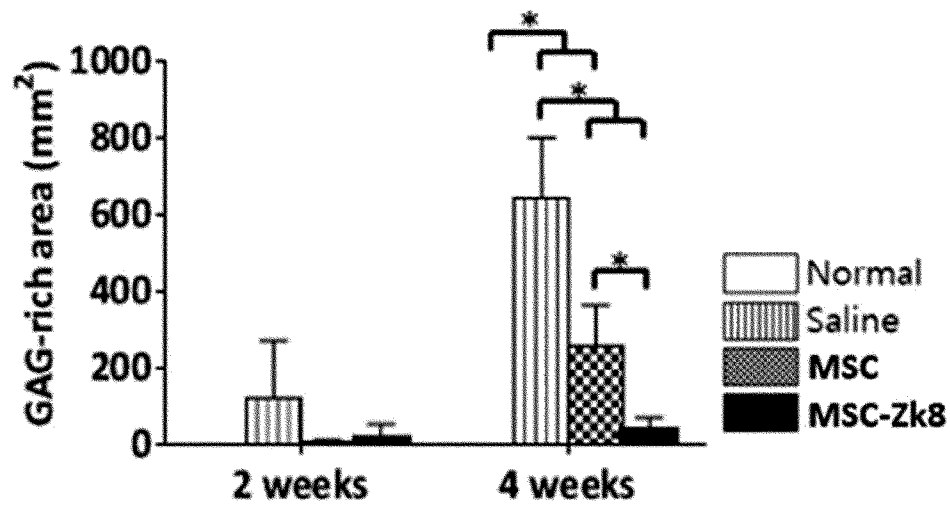
[도9b]



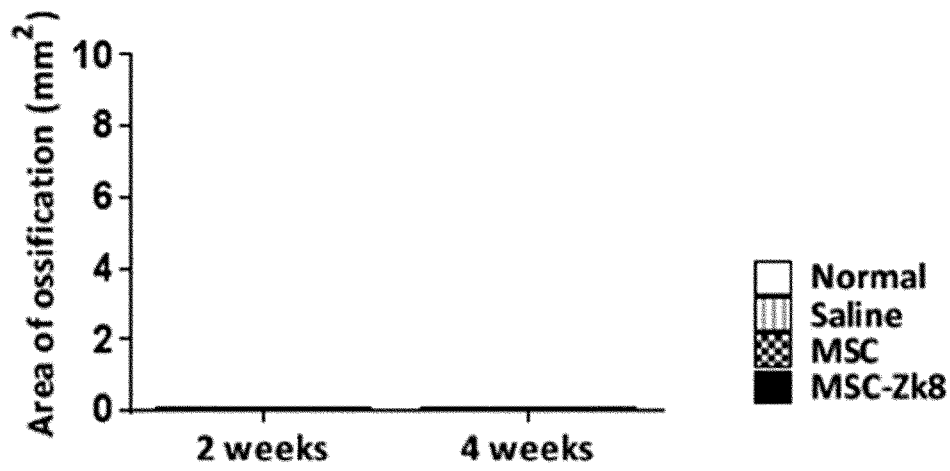
[도10a]



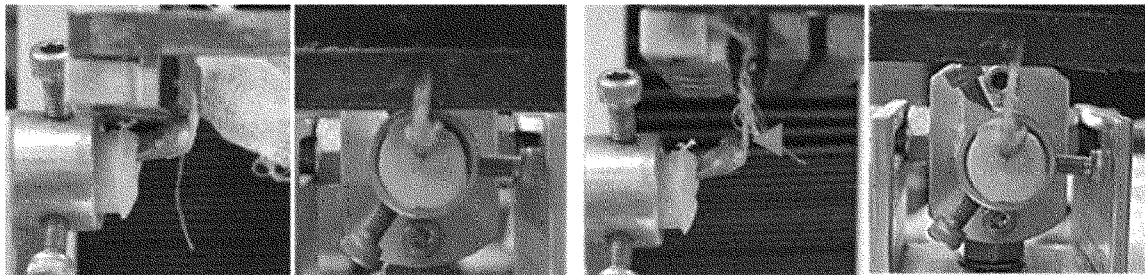
[도10b]



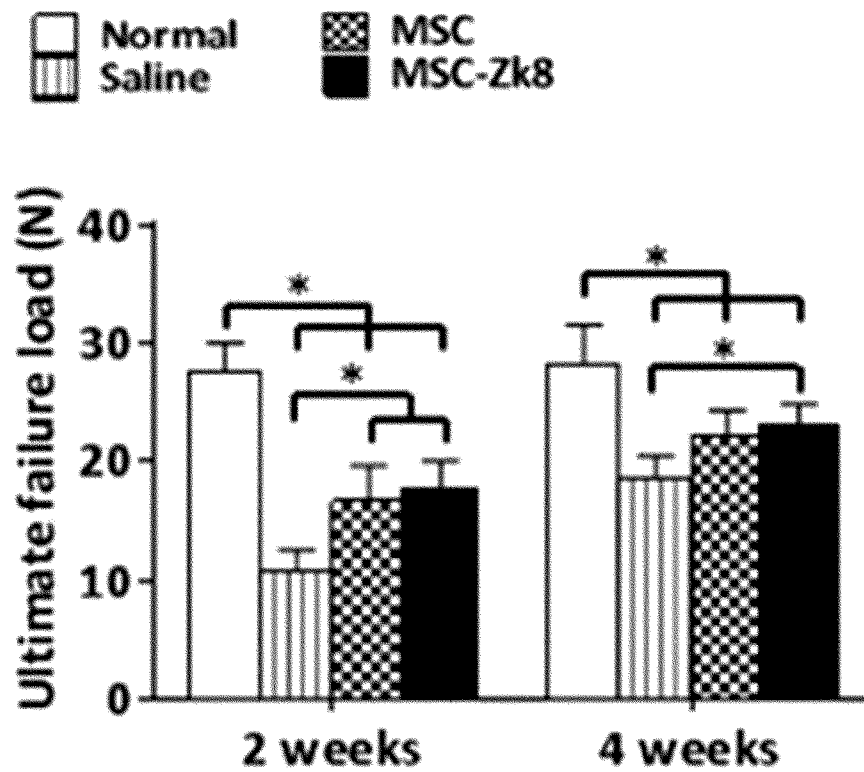
[도11]



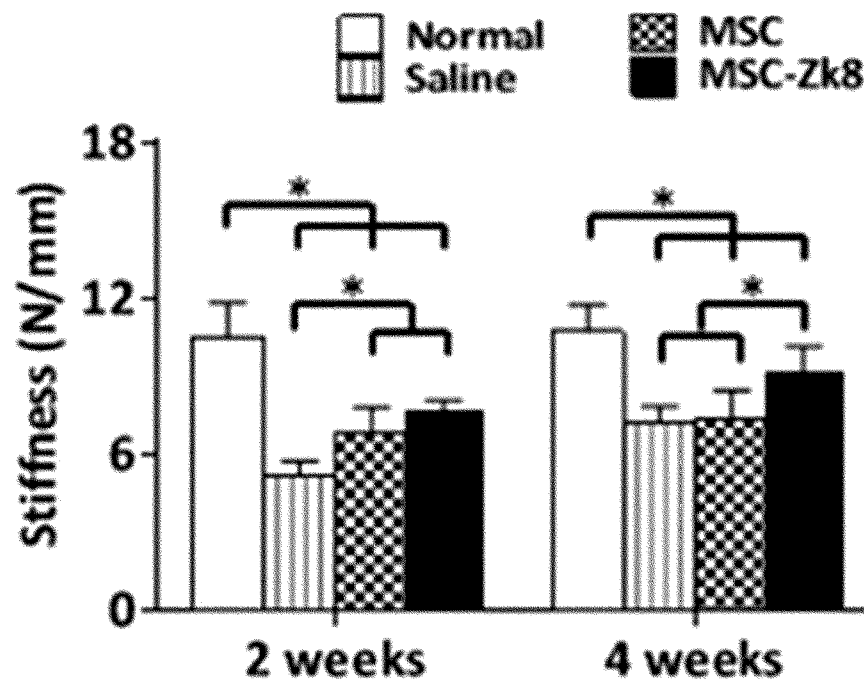
[도12]



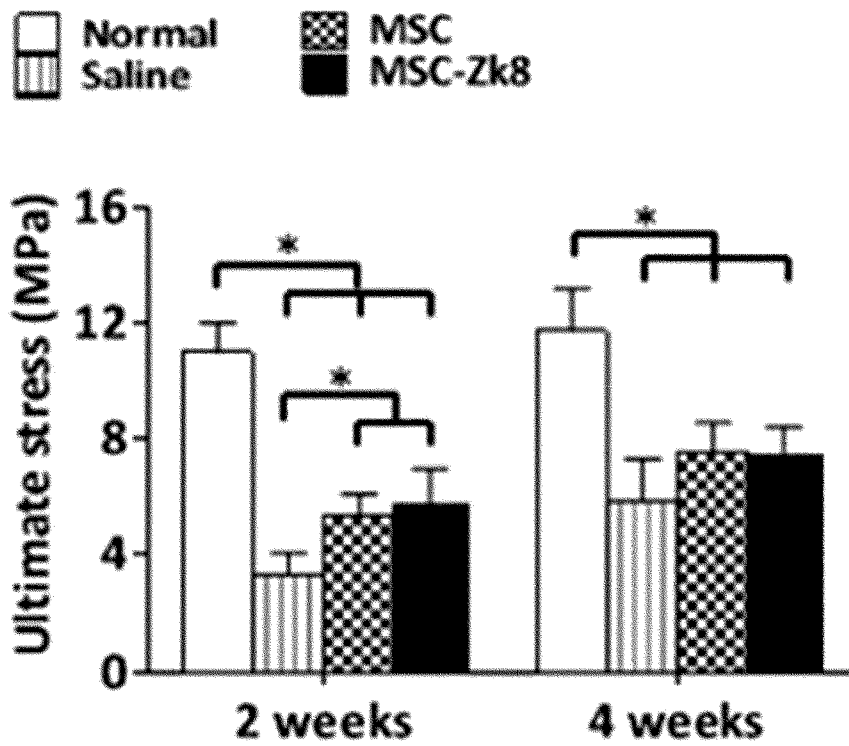
[도13a]



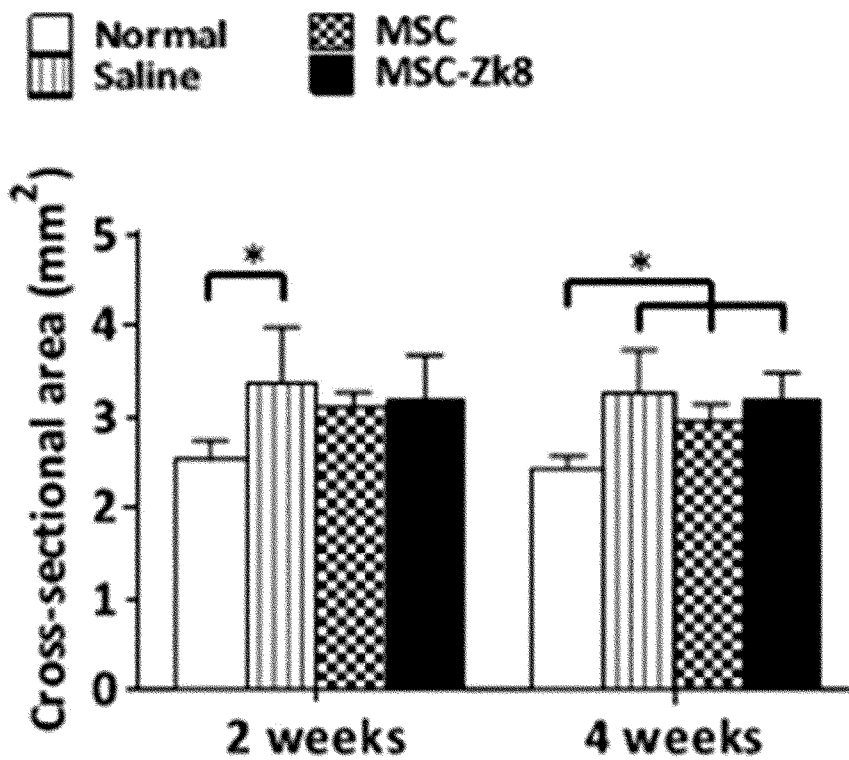
[도13b]



[도13c]



[도13d]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/008404

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q 1/6883(2018.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; A61P 21/00(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)

C12Q 1/6883(2018.01); A61K 39/00(2006.01); A61K 39/395(2006.01)

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: Zkscan 8, zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8, 근골격계 질환 (musculoskeletal diseases), 건(tendon), 근육(muscle), 연골(cartilage), 골(bone)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GUERQUIN, M. J. et al. Transcription factor EGR1 directs tendon differentiation and promotes tendon repair. The Journal of Clinical Investigation. August 2013, vol. 123, no. 8, pp. 3564-3576. See abstract; page 3564; and figures 1 and 2.	1-20
A	LEE, P. L. et al. Three Genes Encoding Zinc Finger Proteins on Human Chromosome 6p21.3: Members of a New Subclass of the Kru" ppel Gene Family Containing the Conserved SCAN Box Domain. Genomics. 1997, vol. 43, pp. 191-201. See entire document.	1-20
A	KR 10-2019-0084879 A (SEOUL NATIONAL UNIVERSITY R&DB FOUNDATION) 17 July 2019 (2019-07-17) See entire document.	1-20
A	NCBI. GenBank accession no. AAH96284.1 (04 October 2006). See entire document.	1-20
A	ELIASSON, P. et al. Influence of a single loading episode on gene expression in healing rat Achilles tendons. J. Appl. Physiol. 2012, vol. 112, pp. 279-288. See entire document.	1-20

☐ 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

"D" document cited by the applicant in the international application

"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

03 November 2021

Date of mailing of the international search report

03 November 2021

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2021/008404

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2021/008404

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
KR 10-2019-0084879 A	17 July 2019	KR 10-2179375 B1	16 November 2020

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) C12Q 1/6883(2018.01)i; G01N 33/68(2006.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; A61P 21/00(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/6883(2018.01); A61K 39/00(2006.01); A61K 39/395(2006.01) 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: Zkscan 8, zinc finger protein with KRAB and SCAN domains 8, 근골격계 질환(musculoskeletal diseases), 건(tendon), 근육(muscle), 연골(cartilage), 골(bone)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	GUERQUIN, M. J. 등, 'Transcription factor EGR1 directs tendon differentiation and promotes tendon repair', The Journal of Clinical Investigation, 2013.08., 123권, 8호, 페이지 3564-3576 초록; 페이지 3564; 및 도 1, 2	1-20
A	LEE, P. L. 등, 'Three Genes Encoding Zinc Finger Proteins on Human Chromosome 6p21.3: Members of a New Subclass of the Kru' ppe Gene Family Containing the Conserved SCAN Box Domain', Genomics, 1997, 43권, 페이지 191-201 전체 문헌	1-20
A	KR 10-2019-0084879 A (서울대학교산학협력단) 2019.07.17 전체 문헌	1-20
A	NCBI, GenBank accession no. AAH96284.1 (2006.10.04) 전체 문헌	1-20
A	ELIASSON, P. 등, 'Influence of a single loading episode on gene expression in healing rat Achilles tendons', J. Appl. Physiol., 2012, 112권, 페이지 279-288 전체 문헌	1-20
☐ 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 "D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 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 신규성 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 2021년11월03일(03.11.2021)		국제조사보고서 발송일 2021년11월03일(03.11.2021)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 정다원 전화번호 +82-42-481-5373

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.

- a. ☒ 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - ☒ 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일
- b. ☐ PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
- c. ☐ 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - ☐ 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - ☐ 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).

2. ☐ 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.

3. 추가 의견:

