(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년10월31일
(11) 등록번호 10-1897493
(24) 등록일자 2018년09월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) *C12Q 1/68* (2018.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5064 (2013.01)
C12Q 1/6876 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2017-0101130
(22) 출원일자 2017년08월09일
심사청구일자 2017년08월09일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160022628 A
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
김국성
대전광역시 중구 충무로107번길 100, 109동 2302호 (대흥동, 센트럴자이)
박수옥
대전광역시 대덕구 대덕대로 1555, 101동 602호 (석봉동, 금강엑슬루타워)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김원준

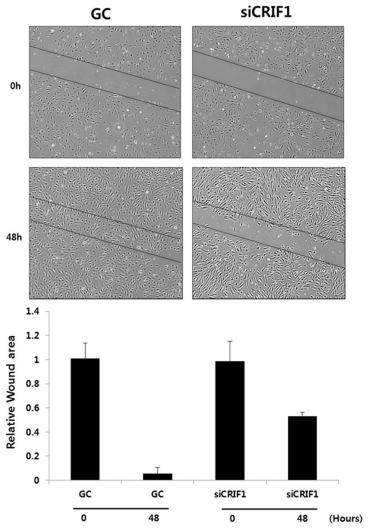
전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 이민영

(54) 발명의 명칭 **세포이동 촉진제 또는 억제제의 스크리닝 방법**

(57) 요 약

본 발명은 세포이동에 대한 표지자로서 CRIF1을 이용한 세포의 이동의 촉진제 또는 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 (A) CRIF1을 발현하는 조직 또는 세포에 시료를 처리하는 단계; (B) 상기 시료가 처리된 세포 또는 조직에서 CRIF1 단백질 또는 CRIF1을 암호화하는 유전자의 발현을 측정하는 단계; 및 (C) 상기 (B) 단계에서 측정된 CRIF1 또는 CRIF1을 암호화하는 유전자의 발현수준이 시험물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 증가한 경우 세포이동 촉진제로, 대조군에 비해 감소된 경우 세포이동 억제제로 판정하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포이동 촉진제 또는 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
G01N 33/6872 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)

(72) 발명자
김선희
인천광역시 서구 서곶로 818, 제116동 501호 (당하동, 영남탑스빌아파트)
최수정
서울특별시 강서구 초록마을로32길 11, 101호 (화곡동)

(56) 선행기술조사문헌
KR1020010084153 A
KR101213033 B1
J.H.Suh et al., Molecular Endocrinology, (2008), 22(1), pp. 33-46.
J Byun et al., Cell Death and Differentiation, (2015), 22, pp. 959-973.

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2014R1A6A1029617
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구지원사업
연구과제명 혈관염증제어 및 유효성평가기술개발
기 여 율 1/2
주관기관 충남대학교의과대학
연구기간 2014.09.01 ~ 2017.08.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2015R1D1A1A01061516
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구지원사업
연구과제명 혈관내피세포 미토콘드리아 기능장애에 의한 동맥경화증 발병기전 규명
기 여 율 1/2
주관기관 충남대학교의과대학
연구기간 2015.07.01 ~ 2018.06.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

(A) CRIF1을 발현하는 조직 또는 세포에 시료를 처리하는 단계; 및

(B) 상기 시료가 처리된 세포 또는 조직에서 CRIF1 단백질 또는 CRIF1을 암호화하는 유전자의 발현을 측정하는 단계;

(C) 상기 (B) 단계에서 측정된 CRIF1 또는 CRIF1을 암호화하는 유전자의 발현수준이 시료을 처리하지 않은 대조군에 비해 증가한 경우 세포이동 촉진제로, 대조군에 비해 감소된 경우 세포이동 억제제로 판정하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포이동 촉진제 또는 억제제의 스크리닝 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 CRIF1 단백질의 발현수준은 면역형광법, 웨스턴블랏 또는 유세포분석에 의해 측정되는 것을 특징으로 하는 세포이동 촉진제 또는 억제제의 스크리닝 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 CRIF1을 암호화하는 유전자의 발현수준은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 마이크로어레이에 의해 측정되는 것을 특징으로 하는 세포이동 촉진제 또는 억제제의 스크리닝 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 (A) 단계는 혈관내피세포를 대상으로 하는 것을 특징으로 하는 세포이동 촉진제 또는 억제제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 세포이동에 대한 표지자로서 CRIF1을 이용한 세포의 이동의 촉진제 또는 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 세포의 이동은 동물의 성장 및 생리 활동을 위해 필수적인 과정으로, 배아 발달, 물리적 자극, 상처의 치유와 회복, 면역 반응, 신생혈관의 생성과 같은 생명현상과 관련된 다양한 과정에서 조율된 세포의 이동을 요한다. 이러한 조율이 원활하게 이루어지지 않고 오류가 발생하는 경우에는 다양한 질환을 초래한다. 예를 들면 세포이동의 과활성화는 암전이 과정에서의 신생혈관 형성, 손상조직의 회복 과정에서의 면역세포들의 비정상적인 활성화에 의한 만성 질환이나 염증성 질환을 수반한다. 배아발달 과정에서 세포의 이동이 과억제되는 경우에는 발생과정에서 뇌신경 세포의 이동성 감소로 인하여 연결에 지장을 초래하기 때문에 학습 능력이 저하될 수 있으며, 심한 경우에는 사망에 이를 수 있다. 이와 같이 세포의 이동과 질병간의 연관성이 밝혀짐에 따라 세포의

이동을 조절하여 질병을 예방 또는 치료하기 위한 신약 개발의 접근 또한 관심을 받고 있다.

[0003] 표면에 부착된 배양 세포의 이동은 일반적으로 현미경을 사용하여 관측한다. 세포의 이동 속도는 수㎛/분 정도로 매우 느리기 때문에, 세포의 이동을 관측하기 위해서는 수시간 이상의 현미경 관측이 필요하며, 간헐촬영(time lapse)에 의해 이동을 관측하게 된다. 그러나 이러한 현미경 관측을 통하여 세포 이동의 억제 또는 촉진 효능을 확인하기 위하여 너무 많은 시간이 소요될 뿐 아니라, 신약 개발의 필수적인 공정인 라이브러리를 구성하는 다양한 후보물질로부터 세포 이동 억제제나 촉진제를 스크리닝 하기 어렵다는 문제가 있다. 따라서 보다 간단한 방법에 의해 여러 가지 후보물질에 대해 세포 이동 억제 또는 촉진 효능을 갖는 지 한꺼번에 스크리닝 할 수 있는 방법이 필요하다.

[0004] CRIF1(CR6 interacting factor 1)은 미토콘드리아에 존재하는 단백질로 CRIF1의 결핍은 미토콘드리아의 기능장애를 유도하고, ROS 생성을 자극하는 것으로 알려져 있다. 공개특허 10-2016-0022628호는 CRIF1의 결핍은 내피세포 기능장애와 혈관 염증을 유발시켜, 내피세포 기능장애 및 혈관 염증과 관련된 혈관질환의 진단 및 치료에 효과적으로 이용될 수 있음을 보고하였다. 공개특허 10-2009-0103763호는 CRIF1 단백질이 C-말단에 존재하는 cc-도메인을 통한 geminin의 기능조절을 통하여 DNA의 비정상적인 복제를 제어하는 것에 의해 암에 대한 치료효과가 있음을 보고하였다. 그러나, CRIF1이 세포의 이동에 영향을 미친다는 것에 대해서는 전혀 알려진 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 공개특허 10-2016-0022628호

(특허문헌 0002) 공개특허 10-2009-0103763호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 간단한 방법에 의해 동시에 다양한 후보 물질을 대상으로 스크리닝이 가능하여 신약 개발의 툴로 사용하기에 적합한 세포이동 촉진제 또는 억제제의 스크리닝 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 또한 본 발명은 새로운 세포이동 조절 기작에 기반한 세포이동 촉진제 또는 억제제의 스크리닝 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 (A) CRIF1을 발현하는 조직 또는 세포에 시료를 처리하는 단계; (B) 상기 시료가 처리된 세포 또는 조직에서 CRIF1 단백질 또는 CRIF1을 암호화하는 유전자의 발현을 측정하는 단계; 및 (C) 상기 (B) 단계에서 측정된 CRIF1 또는 CRIF1을 암호화하는 유전자의 발현수준이 시험물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 증가한 경우 세포이동 촉진제로, 대조군에 비해 감소된 경우 세포이동 억제제로 판정하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포이동 촉진제 또는 억제제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0009] CRIF1은 미토콘드리아에 존재하는 단백질로서, 하기 실시예에서 확인할 수 있듯이 siRNA에 의해 CRIF1을 넉다운시키면 세포의 이동이 감소한다. 또한 CRIF1의 발현수준에 따라 세포의 이동과 관련되어 있는 것으로 알려진 Rho GDI2의 발현을 조절하여, Rho GDI2의 발현을 조절하는 것에 의해 세포의 이동을 촉진 또는 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 CRIF1을 표지자로 사용하여 세포이동 촉진제 또는 억제제를 스크리닝할 수 있다. 즉, 시료의 처리에 의해 세포 또는 조직 내에서 대조군에 비해 CRIF1의 발현 수준이 상향조절 되었다면 세포이동 촉진제로, CRIF1의 발현 수준이 하향조절 되었다면 세포이동 억제제로 판단할 수 있다.

[0010] 상기 CRIF의 발현 수준은 CRIF1 단백질 자체 또는 CRIF1을 암호화하는 유전자의 발현수준으로 측정할 수 있으며, 단백질 또는 유전자의 발현수준을 측정하기 위하여 당업계에서 사용되는 어떤 방법을 사용하여도 무방하다. 예를 들면, CRIF1 단백질의 발현수준은 면역형광 이미지 분석이나 웨스턴블랏, 유세포분석 등의 방법을 이용하여 측정할 수 있으며, CRIF1 단백질을 암호화하는 유전자의 발현수준은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 마이크로어레이 등을 활용할 수 있다. 상기 유전자 분석을

위하여 종래 기술에 의해 알려진 PPAR-α를 암호화하는 유전자를 특이적으로 증폭시키는 프라이머나 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브를 사용할 수 있음은 당연하며, 종래 알려진 서열 이외에도 새로운 서열의 프라이머나 프로브를 디자인하는 것 역시 당업자라면 용이할 것이다.

[0011] 본 발명에서 사용되는 세포나 조직은 CRIF1을 발현하는 것이라면 어떤 것이라도 대상으로 할 수 있다. CRIF1은 미토콘드리아 단백질로서 대부분의 세포와 조직에서 발현된다. 하기 실시예에서는, 혈관 내피세포인 HUVEC와 Keloid Fibroblasts를 대상으로 하였으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 방법은 해당 세포의 이동과 관련된 질병의 예방 및 치료에 유효한 후보물질을 스크리닝 하는데 이용될 수 있는데, 대상 세포가 HUVEC인 경우에는 혈관신생과 관련된 질환에 대한 신약 개발에 이용될 수 있다. 예를 들면, 혈관신생을 차단하여야 하는 전이암, 당뇨병성 망막증, 건선, 류마티스 관절염과 같은 질환에 대해서는 세포이동 억제제를, 혈관신생이 부족하여 발병하는 심근경색이나 허혈사지증의 질환이나 혈관신생을 유도하는 것에 의해 빠른 효과를 기대할 수 있는 상처치유와 같은 경우에는 세포이동 촉진제를 신약의 후보물질로서 스크리닝할 수 있다. 이외에도, 암세포를 대상으로 세포이동 억제제를 스크리닝하여 암전이 예방에 효과적인 후보물질을 선발할 수 있으며, 줄기세포를 대상으로 한 세포이동 촉진제에 의해 줄기세포 치료에 효과적인 약물을 스크리닝할 수 있다.

발명의 효과

[0012] 이상과 같이 본 발명의 스크리닝 방법에 의하면 단백질과 유전자의 분석에서 종래 널리 사용되는 방법에 의해 세포이동 촉진제 또는 억제제를 스크리닝할 수 있어, 다양한 후보물질을 대상으로 동시에 스크리닝이 가능하므로 세포이동과 관련된 질병의 예방 및 치료를 위한 신약의 개발에 효과적으로 이용할 수 있다.

[0013] 또한 본 발명은 CRIF1을 매개로 하는 새로운 세포이동 조절 기작에 기반하여 세포이동과 관련된 질병의 예방 및 치료를 위한 신약 개발에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 siRNA 감염에 의한 CRIF1 발현 감소를 보여주는 전기영동 이미지.

도 2는 CRIF1 넉다운에 의한 Rho GDI2 발현 증가를 보여주는 전기영동 이미지 및 정량 그래프.

도 3은 HUVECs에서 CRIF1 넉다운에 의한 상처 회복능 평가 결과를 보여주는 이미지 및 정량 그래프.

도 4는 Keloid Fibroblasts에서 CRIF1 넉다운에 의한 상처 회복능 평가 결과를 보여주는 이미지 및 정량 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0016] **[실시예]**

[0017] **실시예 1 : 세포의 배양**

[0018] **1) HUVECs의 배양**

[0019] HUVECs(Human umbilical vein endothelial cells)는 Clonetics(USA)로부터 구입하여, Endothelial Growth Medium-2(Lonza, USA)에서 제조사의 지시에 따라 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 하기 실시예에서는 2~8계대(passages)에서 아융합(sub-confluent)의 증식성 HUVECs를 사용하였다.

[0020] **2) Keloid Fibroblasts의 배양**

[0021] Keloid Fibroblasts는 활동기의 켈로이드 환자로부터 수득한 켈로이드의 중앙 피부막으로부터 배양하였다. 보다 상세하게는 켈로이드의 중앙 피부막을 0.25% 디스파아제(Dipase)(Gibco)로 4℃에서 16시간 동안 처리하여 분리하였다. 섬유아세포를 포함하는 피부막을 조각낸 뒤, 100 U/ml페니실린, 100 ㎍/ml의 스트렙토마이신 및 10% 소태아혈청(fetal bovine serum)(FBS)이 보충된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지가 들어있는 플라스크에 외식(explant)하였다. 각 세포군을 콘플루언스(confluence) 전까지 유지한 뒤, 트립신으로 처리하

였다. 2~3회의 계대를 거친 Keloid Fibroblasts를 10% 소태아혈청(FBS)과 0.1% 젠타마이신(gentamycin)(Chemicon)이 보충된 DMEM 배지에서, 37℃, 5% CO_2 조건하에서 유지하며 사용하였다.

[0022] **실시예 2 : siRNA 감염에 의한 CRIF1 유전자의 넉다운**

[0023] 실시예 1에서 배양한 HUVECs 및 Keloid Fibroblasts는 Lipofectamine 2000(Invitrogen, USA)을 사용하여 제조자의 매뉴얼에 따라 하기 서열번호 1, 2의 CRIF1에 대한 siRNA로 각각 감염시켰다. 감염된 세포는 CRIF1 유전자의 넉다운(knowdown)을 위하여 37℃, 5% CO_2 조건에서 48시간 배양하였다. 대조군으로는 서열번호 1과 2의 siRNA 대신 Stealth RNAi Negative Control Duplexes, Medium GC Duplex(Invitrogen)를 사용하여 감염시켰다.

[0024] 센스 : 5'-UGGAGGCCGAAGAACGCGAAUGGUA-3' (서열번호 1)

[0025] 안티센스 : 5'-UACCAUUCGCGUUCUUCGGCCUCCA-3' (서열번호 2)

[0026] 상기 방법에 의해 siRNA를 감염시키고 배양한 세포를 RIPA(10mM Tris-HCl at pH 8.0, 1mM EDTA, 140mM NaCl, 0.1% SDS, 0.1% 200 sodium deoxycholate, and 1% Triton X-100)와 protease inhibitor cocktail (Roche)를 사용하여 용균(lysis)하였다. 30㎍의 용균액을 SDS-PAGE에 용해시킨 후 PVDF 멤브레인으로 옮겨 당업계에서 알려진 통상의 웨스턴 블럿 방법에 의해 CRIF1 단백질을 정량하였다. 웨스턴 블랏을 위한 항체로, Anti-CRIF1 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 분리된 단백질들의 시각화를 위해 perxosidase가 접합된 이차 항체(Santa Cruz)를 처리하고, Thermo Fisher Scientific 사의 Super Signal West Pico 또는 Femto Substrate를 사용하여 화학발광 신호를 현상하였다. 현상된 블랏과 밴드의 밀도는 Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 Gel Doc 2000 Chemi Doc system으로 정량하였다.

[0027] 도 1은 HUVECs의 웨스턴 블랏 결과를 보여주는 전기영동 이미지와 정량 그래프로 siRNA의 감염에 의해 CRIF1의 발현이 감소함을 보여준다. 별도로 데이터를 도시하지는 않았으나, Keloid Fibroblasts 역시 HUVECs와 마찬가지로 siRNA의 감염에 의해 CRIF1의 발현이 감소함을 확인할 수 있었다.

[0028] **실시예 3 : CRIF1 넉다운에 의한 Rho GDI2의 발현 수준 평가**

[0029] Rho GDI2는 세포의 이동을 조절하는 것으로 알려져 있다. 이에 CRIF1의 넉다운이 Rho GDI2의 발현에 영향을 미치는 지 siRNA에 의해 감염된 HUVECs를 사용하여 웨스턴 블랏에 의해 확인하였다. 웨스턴 블랏은 실시예 1과 동일한 방법으로 실시하였으며, 항체로는 anti-Rho GDI2 항체(Santa Cruz Biotechnology)를 사용하였다.

[0030] 도 2는 웨스텃 블랏 결과를 보여주는 전기영동 사진 및 정량 그래프이다. 도 2로부터 CRIF1은 Rho GDI2의 발현을 조절하는 것에 의해 세포의 이동성을 조절할 수 있음을 보여준다.

[0031] **실시예 4 : 상처 회복능 평가(Wound healing assasy)**

[0032] HUVECs 또는 Keloid Fibroblasts를 6-웰 플레이트에서 실시예 1에 기재된 방법에 따라 배양하고, CRIF1에 대한 siRNA로 감염시켰다. 이후 24시간 추가로 배양하고, 융합된 세포 단층에 살균된 200 ㎕ 피펫 팁을 사용하여 일정한 넓이로 상처를 내고, 잔해를 PBS를 사용하여 세척하였다. 이후 추가로 48시간 배양하고 배양 전,후의 사진으로부터 Image J software를 사용하여 상처 부위의 세포의 이동 거리를 측정하는 것에 의해 상처 회복능을 평가하였다.

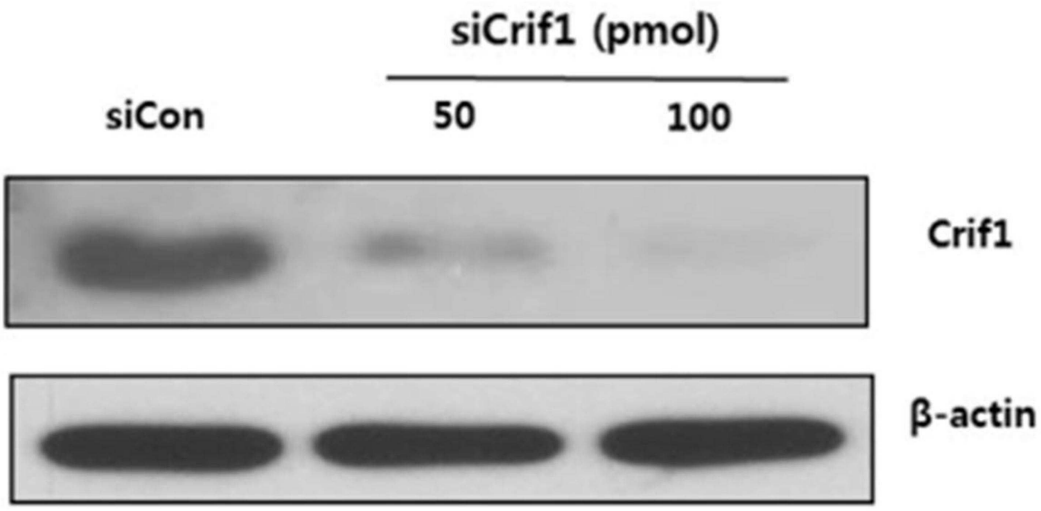
[0033] 도 3과 도 4는 각각 HUVECs와 Keloid Fibroblasts에서의 상처 회복능 평가 실험의 현미경 이미지와 상처 회복능을 정량화한 그래프이다.

[0034] 도 3은 HUVECs에서 CRIF1을 넉다운 시킨 경우 대조군에 비해 상처 회복능이 크게 감소하는 것을 보여주며, 이로부터 CRIF1의 발현이 억제되면 세포의 이동성이 저하됨을 알 수 있었다. 이는 실시예 3의 세포의 이동성을 억제하는 Rho GDI2의 발현이 증가한 것과 일치하는 것으로, CRIF1이 Rho GDI2의 발현을 조절하는 것에 의해 세포의 이동성에 영향을 주는 것을 시사한다.

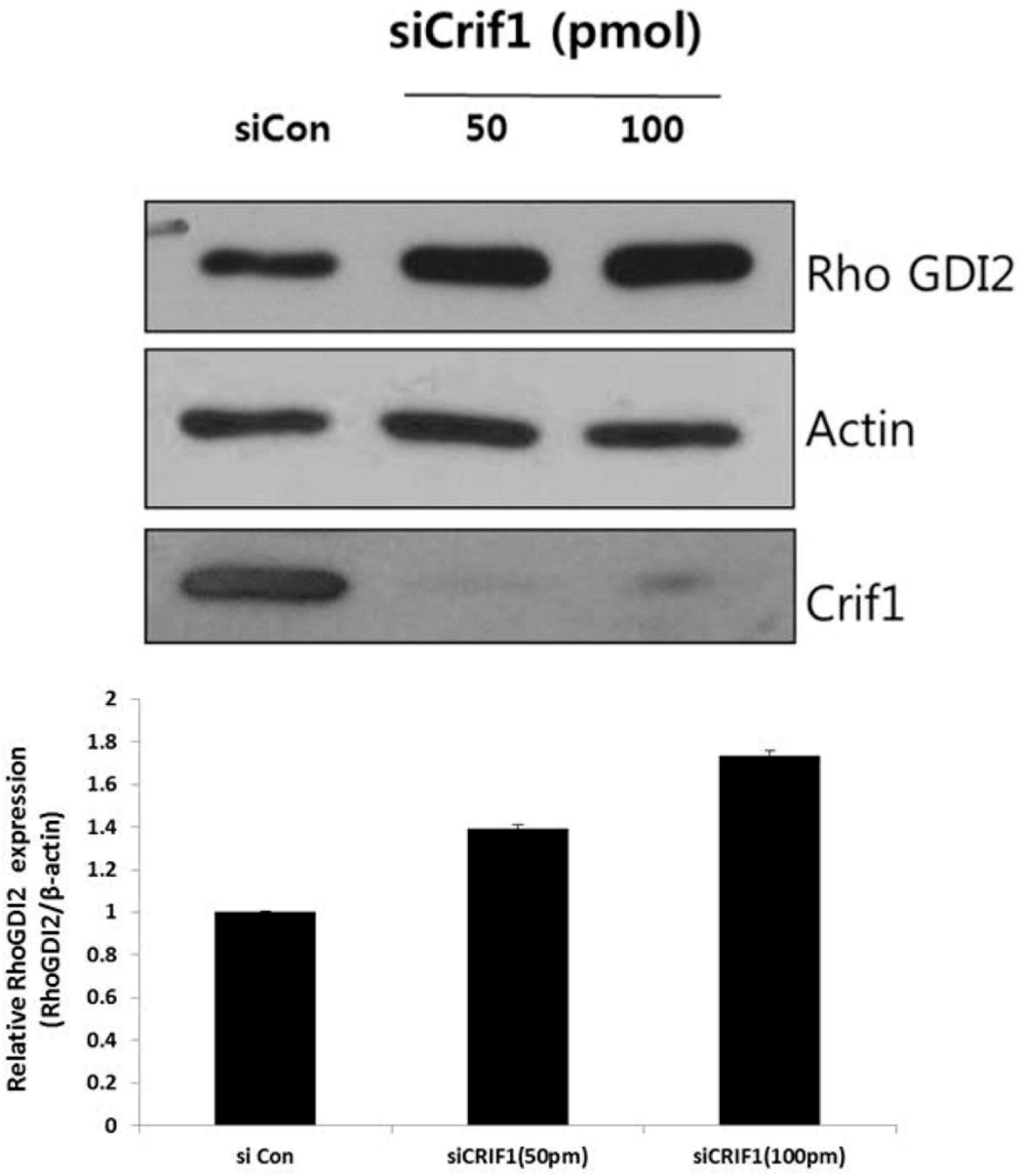
[0035] 도 4에서도 마찬가지로 Keloid Fibroblasts에서 역시 CRIF1을 넉다운 시킨 경우 대조군에 비해 상처 회복능이 크게 감소하였으며, 상처 회복능의 억제 정도는 처리된 siRNA의 농도에 의존하였다. 이는 도 3의 결과와 마찬가지로 CRIF1이 발현 억제에 의해 세포의 이동성이 저하됨을 의미한다.

도면

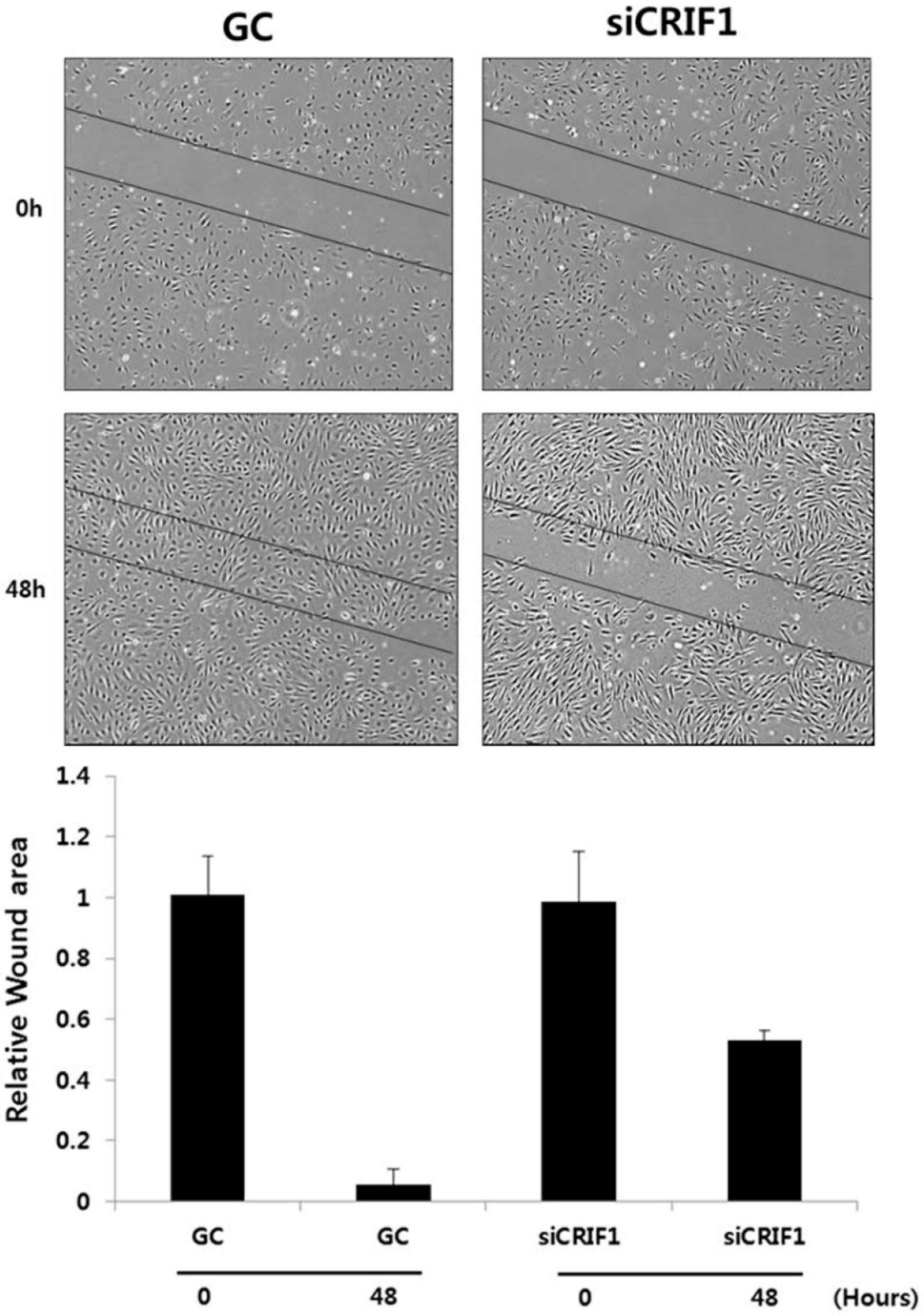
도면1



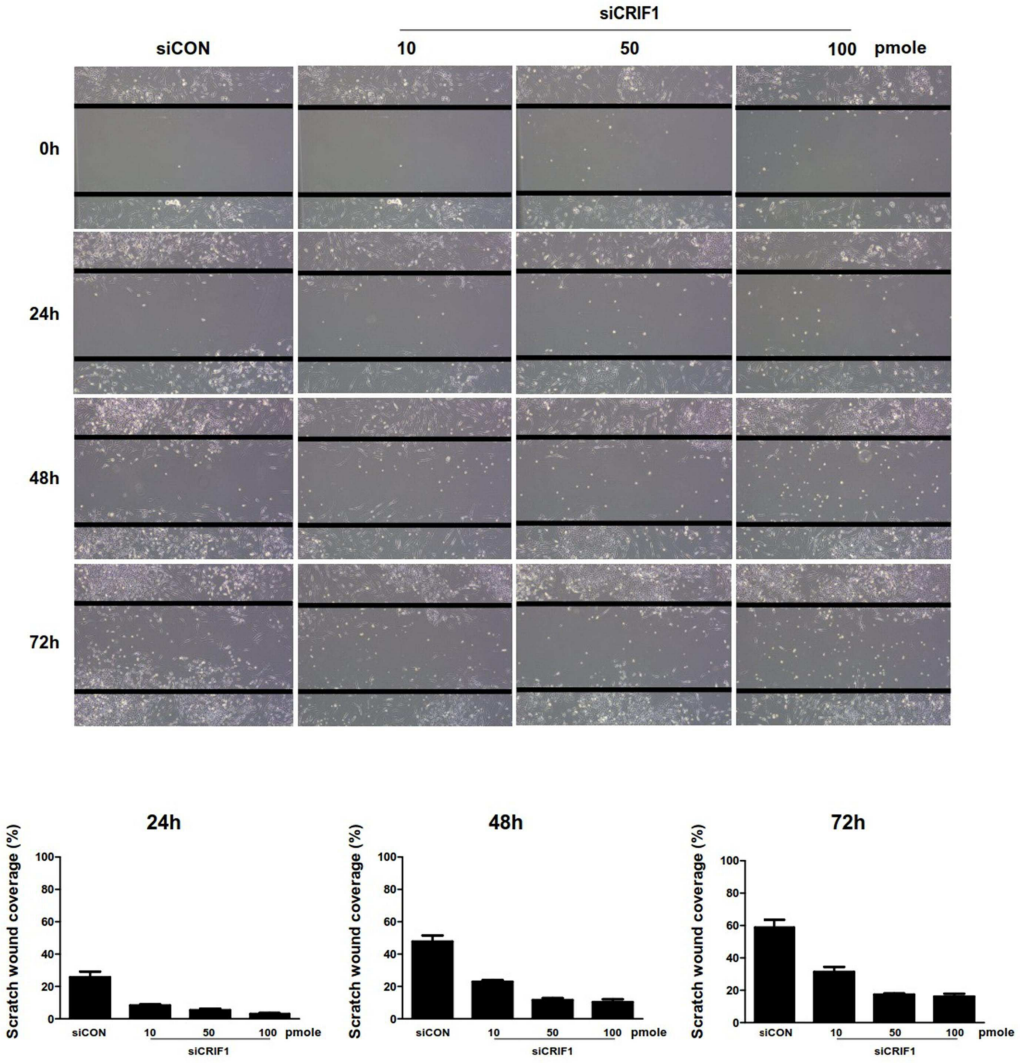
도면2


siCrif1 (pmol)
siCon
50
100
Rho GDI2
Actin
Crif1
Relative RhoGDI2 expression
(RhoGDI2/β-actin)
2
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
si Con
siCRIF1(50pm)
siCRIF1(100pm)

도면3


GC
siCRIF1
0h
48h
Relative Wound area
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
GC
GC
siCRIF1
siCRIF1
0
48
0
48
(Hours)

도면4



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Screening Method for Activator or Inhibitor of Cell Migration

<130> P0817-614

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense siRNA for CRIF1

<400> 1

uggaggccga agaacgcgaa uggua 25

<210> 2

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense siRNA for CRIF1

<400> 2

uaccauucgc guucuucggc cucca 25

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 발명(고안)의 설명

【보정세부항목】 식별번호 [0008]

【변경전】

CFIR1

【변경후】

CRIF1

【직권보정 2】

【보정항목】 요약서

【보정세부항목】 요약

【변경전】

CFIR1

【변경후】

CRIF1

【직권보정 3】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

CFIR1, 시험물질

【변경후】

CRIF1, 시료