(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0064401
(43) 공개일자 2019년06월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/1709 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0102801
(22) 출원일자 2018년08월30일
심사청구일자 2018년08월30일
(30) 우선권주장
1020170163527 2017년11월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
박태주
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
송은경
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
특허법인 무한

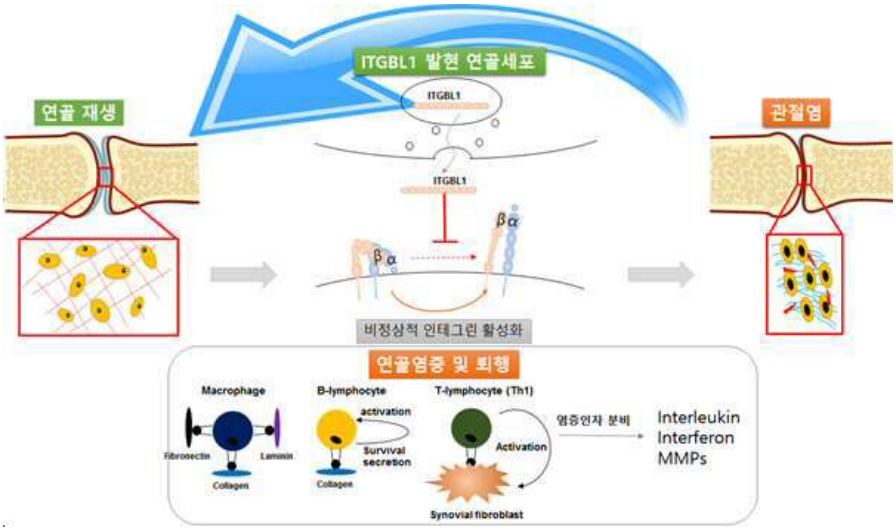
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **연골질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 ITGBL1 (Integrin beta-like protein 1) 단백질, 및 상기 단백질을 코딩하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 연골질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 약제학적 제제에 관한 것이다.

대 표 도 - 도10



(52) CPC특허분류
Y10S 514/825 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711065669
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 ITGBL1 유전자의 연골발생 촉진 및 인테그린 활성 제어 기능 연구
기 여 율 1/1
주관기관 울산과학기술원
연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

ITGBL1 (Integrin beta-like protein 1) 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터로 형질 전환된 재조합 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 연골질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 ITGBL1 단백질은 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 것인, 연골질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 21의 염기서열을 포함하는 것인, 연골질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 연골질환은 퇴행성 관절염, 외상 후 관절염, 또는박리성 골 연골염인, 연골질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 재조합 벡터는 바이러스성 또는 비바이러스성 벡터인 것인, 연골질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 바이러스성 벡터는 아데노바이러스, 아데노-부속 바이러스, 및 헬퍼-의존형 아데노바이러스 및 레트로바이러스 벡터로 이루어진 군에서 선택된 것인, 연골질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 세포는 포유동물의 세포인, 연골질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 ITGBL1 유전자 또는 단백질은 ECM과 인테그린의 상호작용을 저해하는 것을 특징으로 하는 것인, 연골질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 조성물은 연골질환의 염증을 억제하는 것을 특징으로 하는 것인, 연골질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 조성물은 연골생성을 촉진하는 것을 특징으로 하는 것인, 연골질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제1항의 조성물을 유효성분으로 함유하는 약제학적 제제.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 약제학적 제제는 담체, 부형제 및 희석제로 이루어진 군에서 선택된 1종이상을 추가로 포함하는 것인, 약제학적 제제.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 약제학적 제제는 정제, 환제, 분제, 새세이 (sachet), 엘릭시르 (elixir), 현탁제, 유제, 용액제, 시럽제, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캅셀제, 멸균 주사제, 및 멸균 분제로 이루어진 군에서 선택된 제형인 것을 특징으로 하는 것인, 약제학적 제제.

청구항 14

ITGBL1 (Integrin beta-like protein 1) 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터로 형질 전환된 재조합 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는, 인테그린 단백질 활성 저해제.

청구항 15

제1항의 조성물의 약학적 유효량을 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계를 포함하는, 연골질환의 예방 또는 치료 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 연골질환은 퇴행성 관절염, 외상 후 관절염, 또는박리성 골 연골염인, 연골질환의 예방 또는 치료 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 ITGBL1 (Integrin beta-like protein 1) 단백질 및 상기 단백질을 코딩하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 연골질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 약제학적 제제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 퇴행성 연골질환은 손상된 연골부위의 염증으로 인한 통증과 추가적인 연골의 유실로 인해 발생한다. 초기 연골질환의 환자에 대해서는 염증 및 통증을 억제하는 진통소염제를 사용한 치료가 주로 이루어지며, 중기 환자의 경우 진통소염제와 히알루론산을 주기적으로 투입하는 치료 및 연골재생을 촉진하기 위한 유전자치료제 또는 세포치료제를 사용하며, 말기 환자의 경우 인공관절 수술이 주로 사용되고 있다.

[0004] 연골의 재생을 촉진하는 세포치료제와 병행하여 사용되는 유전자치료제로는 TGF-β가 알려져 있으며, 최근 출시된 코오롱 제약의 Invossa 제품이 유전자치료제인 TGF-β를 포함하고 있는 것으로 알려져 있다.

[0005] 연골재생효과를 보유한 것으로 알려진 치료법에는 줄기세포치료제 또는 자가세포치료제를 사용하는 것이 있으나, 상기 두 치료제는 연골재생 효과가 미흡하고 시술 비용이 높아 현재까지 성공적인 시장진입에 실패하고 있다.

[0006] 따라서, 연골질환을 근본적으로 치료하기 위해서 염증에서 비롯된 추가적인 연골손상을 억제하고 손상된 연골을 재생시키는 치료가 병행되어야 할 필요가 있으나, 현재까지 염증에서 비롯된 추가적인 연골손상을 억제하고 손상된 연골을 재생시키는 치료가 병행되는 방법을 사용한 치료법은 개발되어 있지 않은 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 이에, 본 발명의 하나의 목적은 ITGBL1 (Integrin beta-like protein 1) 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터로 형질 전환된 재조합 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종이상을 유효성분으로 함유하는 연골질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은, ITGBL1 (Integrin beta-like protein 1) 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터로 형질 전환된 재조합 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종이상을 유효성분으로 함유하는 인테그린 단백질 활성 저해제 및 in vitro 인테그린 단백질 활성 저해용 시약 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 약제학적 제제를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은, 상기 조성물의 약학적 유효량을 투여하는 단계를 포함하는 연골질환의 예방 또는 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 연골세포가 분화되는 과정에서 발현되어 연골세포 주위로 분비되는 ITGBL1 단백질을 동정하였다 (실시예 1, 도 1).

[0014] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, ITGBL1 유전자를 연골세포에 주입하여 ITGBL1 단백질의 발현을 증가시키는 경우, 연골조직이 증가되는 효과를 확인하여, ITGBL1 단백질이 연골세포의 연골생성을 촉진하는 효과가 있음을 확인하였다 (실시예 2, 실시예 3, 도2, 도3).

[0015] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, ITGBL1 유전자를 관절염이 유발된 연골세포에 주입하여 발현을 증가시키는 경우 연골의 생성을 촉진 (Col2a1, Sox9)하는 효과가 있음을 확인하였다 (실시예 4, 도 4).

[0016] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, ITGBL1 유전자를 연골세포에 주입하여 ITGBL1 단백질의 발현을 증가시키는 경우, 관절염이 유발된 연골세포에서 염증인자 (MMP-3, MMP-13 등)의 생성이 감소하는 효과가 있음을 확인하여, ITGBL1 단백질이 염증을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다 (실시예 5, 도 4).

[0017] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 마우스 동물모델을 사용하여 ITGBL1 유전자의 발현을 저해시키는 shRNA 벡터를 무릎 연골조직에 주입하여 ITGBL1 단백질의 발현을 억제시킬 경우, 퇴행성 관절질환이 유발되는 것을 확인

하였다 (실시예 8, 도 9).

[0018] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 반월판절개술을 시행한 마우스 동물모델의 관절에 ITGBL1 유전자를 주입하여 ITGBL1 단백질의 발현을 증가시킨 경우, 관절의 재생이 촉진되는 것을 확인하였다 (실시예 4, 도 4).

[0019] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, ITGBL1 단백질은 인테그린 단백질, 특히 인테그린-베타1(Integrin-beta 1)의 활성을 억제하는 것을 확인하였다(실시예 6 및 도 5, 6).

[0020] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 연골세포에서의 ITGBL1 발현을 증가시키면 연골세포의 연골형성인자(Sox9, Col2a1)의 발현이 증가하는 현상이 ITGBL1 단백질의 인테그린 활성억제 기능에서 기인한다는 것을 확인하였다. (실시예 7, 도 7).

[0021] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 연골세포에 연골퇴행의 원인으로 알려진 Fragmented Fibronectin(Fn-f 29kDa)을 처리하여 연골 분해를 촉진하는 MMP3, MMP13의 발현을 증가시킨 다음 ITGBL1의 발현을 증가시키면 MMP-3, MMP-13의 발현이 감소하며, 다시 Mn^{2+} 또는 DTT를 처리하여 인테그린을 활성화시키면 MMP3, MMP13의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(실시예 8, 도 8).

[0022] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서, 마우스의 무릎관절강에 ITGBL1의 발현을 저해시키면 관절염이 발병되며, ITGBL1의 발현이 저해된 무릎관절강에 인테그린-베타1 저해제인 ATN-161을 주입하면 관절염이 회복되는 것을 확인하였다 (실시예8, 도 9)

[0023] 따라서, 본 발명의 ITGBL1 (Integrin beta-like protein 1) 단백질은 연골질환의 염증을 억제하고 동시에 연골생성을 촉진하는 효과가 있으므로, 상기 ITGBL1 단백질을 포함하는 조성물은 연골질환 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[0024] 이하, 본 발명을 더욱 자세히 설명하고자 한다.

[0025] 하나의 양태로서, 본 발명은 ITGBL1 (Integrin beta-like protein 1) 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터로 형질 전환된 재조합 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종이상을 유효성분으로 함유하는 연골질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0026] 상기 ITGBL1 유전자는 전이암의 마커, 또는 WNT/PCP 신호를 조절하는 역할을 함이 종래에 알려져 있다.

[0027] 본 발명에서 ITGBL1 단백질은 연골질환의 염증을 억제하고 동시에 연골생성을 촉진하는 효과가 있으며, 이 효과는 ITGBL1의 인테그린 활성억제 기능에 의해 일어나는 현상이라는 것을 입증하였다. 따라서, 상기 ITGBL1 단백질을 포함하는 조성물은 연골질환 예방 또는 치료효과가 있을 수 있으며, 또한 ITGBL1 유전자 및 단백질은 인테그린의 활성을 억제하는 저해제로서 활용할 수 있기 때문에 인테그린의 과도한 활성에 의해 유발되는 것으로 알려진 질환에 사용될 수 있다. 상기 ITGBL1 단백질은 서열번호 20의 아미노산 서열을 포함하는 것 일 수 있으며, 상기 단백질을 코딩하는 유전자는 서열번호 21의 염기서열을 포함하는 것 일 수 있다.

[0028] 본 발명에 사용된 용어 "단백질"은 펩타이드 결합(들)에 의해 함께 연결된 아미노산의 중합체를 포함하는 분자를 의미한다. 단백질은 2개 이상의 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드 일 수 있다.

[0029] 상기 ITGBL1 (Integrin beta-like protein 1) 단백질은 인간, 마우스 등의 포유류, 개구리 등의 양서류 등의 척추 동물 유래의 것일 수 있으며, 예컨대, 인간 ITGBL1 (e.g., GenBank Accession Nos. NP_001258683.1 (코딩 mRNA (cDNA): NM_001271754.1), NP_001258684.1 (코딩 mRNA (cDNA): NM_01271755.1), NP_001258685.1 (코딩 mRNA (cDNA): NM_001271756.1), P_004782.1 (코딩 mRNA (cDNA): NM_004791.2), XP_005254157.1 (코딩 mRNA (cDNA): XM_005254100.4) 등), 마우스 NP_663442.2 (코딩 mRNA (cDNA): NM_145467.2), XP_006518984.1 (코딩 mRNA (cDNA): XM_006518921.3), 개구리 ITGBL1 (e.g., GenBank Accession No. NP_001084310.1 (코딩 mRNA (cDNA): NM_001090841.1) 등) 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0030] 상기 용어 "벡터(vector)"는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 상기 벡터는 목적 유전자 발현을 위한 요소 (elements)를 포함하는 것으로, 복제원점(replication origin), 프로모터, 작동 유전자 (operator), 전사 종결 서열(terminator) 등을 포함할 수 있고, 숙주 세포의 게놈 내로의 도입을 위한 적절한 효소 부위(예컨대, 제한 효소 부위) 및/또는 숙주 세포 내로의 성공적인 도입을 확인하기 위한 선별 마커 및/또는 단백질로의 번역을 위한 리보좀 결합 부위 (ribosome binding site; RBS), IRES (Internal Ribosome Entry Site) 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 벡터는 프로모터로서 상기한 융합 폴리뉴클레오타이드(융합 프

로모터)를 갖도록 통상적인 유전공학적 방법으로 조작된 것일 수 있다. 상기 벡터는 상기 프로모터 이외의 전사 조절 서열(예를 들어, 인핸서 등)을 추가로 포함할 수 있다.

[0031] 상기 재조합 벡터는 바이러스성 또는 비바이러스성 벡터일 수 있으며, 상기 바이러스성 벡터는 아데노바이러스, 아데노-부속 바이러스, 헬퍼-의존형 아데노바이러스, 레트로바이러스 벡터 등 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0032] 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.

[0033] 본 발명은 또 다른 하나의 양태로서 상기 재조합 벡터로 형질전환된 세포를 제공한다.

[0034] 상기 세포는 포유동물의 세포 일 수 있으며, 상기 포유동물 세포는 인간 (예를 들어, 지방유래 줄기세포, 골수유래 줄기세포, 태반유래 줄기세포, 기타 만능유도줄기세포, 연골세포, 섬유아세포 등) 등에서 선택된 것일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0035] 상기 재조합 벡터의 세포 내로의 운반(도입)은, 당업계에 널리 알려진 운반 방법을 사용할 수 있다. 상기 운반 방법은 예컨대, 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 침전법, 전기 천공법, 리포좀-매개 형질감염법, 유전자 밤바드먼트 (gene bombardment) 등을 사용할 수 있으며, 예를 들어 리포좀-매개 형질감염법 (Lipofector reagent사용) 일 수 있으나 이에 한정되지 않는다.

[0036] 상기 연골질환은 퇴행성 관절염, 외상 후 관절염, 또는 박리성 골연골염 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명에서 상기 ITGBL1는 DNA, RNA 또는 단백질의 형태로 사용될 수 있으며, 어류, 양서류, 조류, 포유류 동물 유래의 유전자를 포함할 수 있으며, 자연형의 ITGBL1 염기서열 및 아미노산 서열의 변이체를 포함할 수 있다.

[0038] 상기 ITGBL1 단백질의 변이체 또는 아미노산 서열의 변이체는 ITGBL1 아미노산 서열의 변화, 결손 및 삽입 등의 변화를 의미하며, 단백질의 생리활성 및 안정성 등을 변형시킨 화학적 성질 변화를 포함할 수 있다.

[0039] 본 발명에서 ITGBL1 유전자 또는 단백질의 발현을 증가시키는 수단은 인위적으로 ITGBL1 유전자를 세포 내부로 전달하는 모든 기법을 포함할 수 있다.

[0040] 본 발명에서 ITGBL1 단백질 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터로 형질 전환된 재조합 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상만을 사용할 수 있지만, 상기 ITGBL1 단백질 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터로 형질 전환된 재조합 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상에 더하여 연골의 재생 유도 및 염증 억제를 위한 치료제인, 소염제, 히알루론산, 세포치료제, 줄기세포치료제를 복합적으로 사용할 수 있다.

[0041] 본 발명의 세포치료제에서 상기 세포 치료에 사용하는 세포는 연골세포를 의미할 수 있고, 연골질환과 연관되는 다양한 세포를 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명의 줄기세포치료제에서 상기 줄기세포는 골수유래 줄기세포, 지방유래 줄기세포, 태반유래 줄기세포, 유도만능 줄기세포, 배아유래 줄기세포등 모든 형태의 다분화능을 포함한 줄기세포를 포함할 수 있다.

[0043] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은, 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 약제학적 제제에 관한 것이다.

[0044] 본 발명에 따른 약제학적 제제는 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 연고제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 또는 경피제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태의 비경구 제형 등으로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명의 약제학적 제제는 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제 및 희석제 등의 보조제를 추가로 함유하는 것 일 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용할 수 있다

[0046] 본 발명에 따른 약제학적 제제를 비경구용으로 제공하는 경우, 일 예로 액제, 겔(gel)제, 세정 조성물, 삽입용

정제, 좌제 형태, 크림, 연고, 드레싱 용액, 분무제, 기타 도포제등의 국소 투여제, 용액형, 현탁형, 유제형 등의 액상 제형일 수 있으며, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제, 크림, 연고, 젤리, 거품, 세척제 또는 삽입물, 바람직하게는 액제, 겔(gel)제, 세정 조성물, 삽입용 정제 등의 피부 외용제가 포함될 수 있다. 상기 제형은 일 예로 멸균수에 용해보조제, 유화제, pH 조절을 위한 완충제 등을 첨가하여 제조할 수 있다. 상기 비수성용제 또는 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol), 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0047] 보다 상세하게, 상기 약제학적 제제는 상기 조성물에 추가하여 이를 제형화하기 위한 담체를 포함할 수 있다. 상기 담체는 결합제, 활탁제, 현탁용제, 가용화제, 완충제, 보존제, 윤활제, 등장제, 부형제, 안정화제, 분산제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있다.

[0048] 본 발명의 약제학적 제제를 인간에게 적용하는 구체예에 있어서, 본 발명의 약제학적 제제는 단독으로 투여될 수 있으나, 일반적으로 투여방식과 표준 약제학적 관행(standard phamaceutical practice)을 고려하여 선택된 약제학적 담체와 혼합되어 투여될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 약제학적 제제는 전분 또는 락토오즈를 함유하는 정제 형태로, 또는 단독 또는 부형제를 함유하는 캡슐 형태로, 또는 맛을 내거나 색을 띄게 하는 화학 약품을 함유하는 엘릭시르 또는 현탁제 형태로 경구, 구강 내 또는 혀 밑 투여될 수 있다.

[0049] 상기 연골질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 대한 사항은 약제학적 제제에 대하여 동일하게 적용될 수 있다.

[0050] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 ITGBL1 (Integrin beta-like protein 1) 단백질, 상기 단백질을 코딩하는 유전자, 상기 유전자를 포함하는 재조합 벡터, 및 상기 재조합 벡터로 형질 전환된 재조합 세포로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 인테그린 단백질 활성 저해제에 관한 것이다.

[0051] 상기 "인테그린(integrin) 단백질"은 세포와 세포외 기질(ECM)을 연결하는 단백질로, α쇄, β쇄의 두 가닥의 쇄로 구성되어 있으며, 이들의 조합에 따라 24개 이상의 인테그린이 존재한다.

[0052] 특히, 본 발명의 인테그린 단백질 활성 저해제는 인테그린 베타의 활성 저해에 우수한 효과를 나타낸다. 따라서, 본 발명의 저해제는 인테그린 베타 단백질의 활성에 의해 발병하는 질병의 기전 연구, 치료제 개발 등에 이용될 수 있다. 인테그린의 과도한 활성에 의하여 유도되는 질병의 예시로는 암, 과민성 대장증후군 건선, 혈전증, 류마티스성 관절염, 골다공증이며, 이에 국한되지는 않는다.

[0053] 또 다른 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 조성물의 약학적 유효량을 연골질환의 예방 또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 연골질환의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다.

[0054] 상기 대상은 인간 등의 포유류, 마우스 등의 설치류, 개구리 등의 양서류 등을 포함하는 척추동물로부터 선택된 개체(예컨대, 인간을 제외한 동물) 또는 이로부터 분리된 기관, 조직, 세포 또는 이의 배양물일 수 있으며, 바람직하게는, 인간을 제외한 동물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 상기 연골질환은 퇴행성 관절염, 외상 후 관절염, 또는 박리성 골연골염 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0056] 상기 연골질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 대한 사항은 연골질환의 예방 또는 치료 방법에 대하여 동일하게 적용될 수 있다.

발명의 효과

[0058] 본 발명은 ITGBL1 (Integrin beta-like protein 1) 단백질, 및 상기 단백질을 코딩하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 연골질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 인테그린 단백질 활성 저해제 및 상기 조성물을 유효성분으로 함유하는 약제학적 제제에 관한 것으로서, 상기 ITGBL1 (Integrin beta-like protein 1) 단백질, 및 상기 단백질을 코딩하는 유전자로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물은 ITGBL1 단백질의 인테그린 단백질 활성 저해 기능에 따른 염증억제 및 연골생성 촉진 효과를 가지고 있어서 연골질환의 효과적인 치료제로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1의 A는 ITGBL1 유전자가 Xenopus laevis 배아 발생과정의 연골조직에서 발현함을 확인하기 위한 실험 모식도를 나타내고, B 및 C는 본 발명의 일 실시예에 따라서 Xenopus laevis 배아의 연골세포에서 ITGBL1 유전자가 발현하는지 여부를 확인한 결과를 나타낸다. 도 1D는 연골조직 마커 유전자인 Col2a1의 발현패턴과 ITGBL1의 발현 패턴을 비교하여 ITGBL1 유전자가 연골조직에서 발현됨을 확인한 것이고, E는 ITGBL1 유전자 발현이 연골조직 생성 시기(stage30)에 강하게 발현됨을 확인한 것이다.

도 2의 A 및 C는 본 발명의 일 실시예에 따라서 Xenopus laevis 배아의 연골세포에서 ITGBL1 유전자의 발현을 저해할 경우 연골조직의 크기가 줄어들고, 연골 조직생성이 현저하게 저해되며, ITGBL1 유전자의 발현을 증가시킨 경우 연골이 정상적으로 형성되며 연골의 크기가 증가함을 확인한 결과로, B 및 D는 각각 A와 C에서의 연골 크기를 그래프로 나타낸 것이다. 한편, 도 2의 E는 ITGBL1 유전자의 발현을 증가시킨 배아에서 연골조직의 마커인 Sox9과 Col2a1 유전자의 발현이 증가함을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 3의 A 및 B는 각각 골수 유래 줄기세포(BM-MSC)의 연골세포 분화과정에서 ITGBL1의 발현이 증가하고, 뼈조직 형성과정에서는 ITGBL1의 발현이 감소하는 것을 보여주는 것이고, C 및 D는 인간의 연골세포에서 ITGBL1 단백질의 발현을 감소시키면 연골조직의 형성이 저해됨을 확인한 것이다. 도 3의 E는 쥐의 연골세포주에서 ITGBL1의 발현을 점진적으로 증가시키면 이에 따라 연골 형성을 촉진시키는 유전자인 Col2a1 및 Sox9의 발현이 점진적으로 증가하는 것을 확인한 것으로, F는 E의 발현을 qPCR로 정량분석 한 것이다. 도 3의 G는 쥐 배아의 팔과 다리가 되는 부분으로서 연골세포로 분화하는 Limb bud mesenchyme의 ITGBL1 발현을 증가시키는 경우 연골 분화가 촉진됨을 확인, H는 G의 연골세포에서 Glycosaminoglycan (GAG) 양을 측정한 결과로, ITGBL1의 과발현 만으로 연골화가 촉진됨을 확인한 것이다.

도 4의 A~F는 본 발명의 일 실시예에 따라서 IL-1β를 처리하여 염증을 유발한 마우스의 연골세포에 ITGBL1 단백질의 발현을 증가시킨 경우 연골생성인자인 Sox9과 Col2a1의 발현이 회복되며, 염증 인자인 MMP-3, MMP-13의 발현이 감소됨을 확인한 결과를 나타낸다. 도 4의 H, I는 쥐의 무릎 반월판 연골 (medial meniscus)을 손상시켜 관절염을 유도한 쥐의 무릎관절강 내부에 ITGBL1을 함유한 아데노바이러스를 주입하여 ITGBL1의 발현을 증가시킬 경우 관절염이 발생되지 않는 결과를 나타낸다.

도 5의 A 및 C는 PC3 세포주에서 ITGBL1의 발현을 ITGBL1-siRNA를 사용하여 저해한 결과, 세포기질과 인테그린이 결합하는 부위에 생성되는 Focal adhesion complex의 양이 현저히 증가하는 결과를 나타낸 것으로, B는 A의 Focal adhesion complex의 마커인 FAK puncta의 수와 강도를 그래프로 나타낸 것이고, D는 C의 Focal adhesion complex의 다른 마커인 인테그린-베타1 puncta의 수와 강도를 그래프로 나타낸 것이다. 도 5의 E는 ITGBL1의 발현을 억제할 경우 활성화된 인테그린-베타1의 양이 증가하고, 반대로 ITGBL1의 발현을 증가시킬 경우 활성화된 인테그린-베타1의 양이 감소하는 결과를 나타낸 것으로, F는 ITGBL1의 발현을 감소시키는 경우 활성화된 인테그린-베타1이 증가함을 형광염색으로 확인한 것이다. G는 인테그린-베타1과 ITGBL1이 서로 결합한다는 것을 co-immunoprecipitation 실험 기법을 사용하여 확인한 것이다.

도 6의 A는 ITGBL1 유전자의 발현을 증가시킬 경우 (Itgbl1-O.E.) PC3 세포가 Fibronectin이 코팅된 표면에 잘 부착되지 못하나, Mn^{2+} 이온으로 인테그린의 활성을 높여주면 다시 표면에 잘 부착됨을 확인한 것으로, B는 A의 세포 면적을 측정하여 나타낸 것이며, E, F는 A의 실험을 인간의 연골세포에서 진행한 결과를 나타낸 것이다. 도 6의 C, D는 골수 유래 줄기세포에 ITGBL1의 발현을 증가 경우 세포의 부착이 저해되는 것을 확인한 것이다. 도 6의 E, F는 인간의 연골세포에 ITGBL1의 발현을 증가시킬 경우 세포의 부착이 저해되며, Mn^{2+} 이온으로 인테그린의 활성을 높여주면 다시 표면에 잘 부착됨을 확인한 것이다.

도 7의 A는 연골세포에서 ITGBL1 유전자의 발현을 증가시키면 Sox9 및 Col2a1의 발현이 증가하나, Mn^{2+} 또는 DTT를 처리하여 인테그린의 활성을 증가시키면 두 유전자의 발현이 다시 감소함을 확인한 것으로, B는 qPCR 기법을 사용하여 A의 결과를 정량분석한 것이다. 도 7의 C는 ATDC5 연골세포주를 사용하여 연골조직을 만드는 과정에서 ITGBL1의 과발현에 의해 증가된 연골의 크기가 Mn^{2+} 또는 DTT의 첨가에 의하여 감소되며, D ~ E는 C의 결과를 연골 크기(D) 및 연골 구성성분인 GAG의 양(E)으로 분석하여 나타낸 것이다. F는 표에 표기된 인테그린 알파와 베타의 발현을 저해할 경우 Sox9의 발현이 증가하며, G는 ITGBL1을 과발현 시킨 상태에서 인테그린 알파와 베타의 발현을 감소시키면 Sox9의 발현이 더욱 증가한다는 결과를 확인한 것이다.

도 8의 A~C는 관절염 환자의 연골퇴행의 원인으로 알려진 Fragmented Fibronectin (Fn-f 29kDa)을 처리한 연골세포에서 연골의 분해를 촉진하는 MMP-3, MMP-13의 발현이 증가하나, ITGBL1 유전자의 발현을 증가시키면, 두 유전자의 발현이 다시 감소하고, 다시 Mn^{2+} 또는 DTT를 처리하여 인테그린을 활성화시키면 두 유전자의 발현이 증가함을 확인한 것으로, D, E는 Fn-f 29 kDa가 연골세포에 부착한 정도를 측정하여 나타낸 것이다.

도 9의 A~C는 ITGBL1 유전자의 발현을 저해한 다음 인테그린의 한 타입만을 저해하는 저해제를 처리한 경우 MMP-3, MMP-13의 발현이 저해되지 않으나, 여러 종류의 인테그린 저해제를 함께 처리하면, 두 유전자의 발현이 저해되며, 인테그린 저해제 중 ATN-161이 가장 효과적임을 확인한 것이다. 도 9의 D, E는 마우스의 무릎관절강 내부에 ITGBL1-shRNA를 함유한 아데노바이러스를 주입하여 ITGBL1의 발현을 저해할 경우 관절연골의 상태가 나빠지고, ITGBL1의 발현을 저해한 무릎관절강에 인테그린-베타1 저해제인 ATN-161을 주입하면 무릎연골이 다시 회복되는 결과를 나타낸다.

도 10은 ITGBL1 유전자의 발현이 인테그린 활성을 억제함으로써 연골질환 염증을 억제하고 및 연골생성을 촉진시키는 작용기전임을 도식화한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0063] **참고예1. Xenopus laevis 배아의 배양**

[0064] 암컷 Xenopus laevis는 16℃ 배양기 (JSR, JSBI-150C)에서 배양하고, 한 마리당 hCG 호르몬(대성 HCG 주) 800 units을 암컷 Xenopus laevis에 주입하여 산란을 유도하고, 호르몬에 의해 알을 낳기 시작하면 인위적으로 squeeze하여 수컷의 정소와 체외 수정시킨 후 30분 기다렸다. 육안으로 수정의 유무를 확인한 후 3% (w/v) cysteine(pH7.8, Sigma:C7880)를 이용하여 젤리층을 제거(dejellying)하고, 그리고 나서 1/3 MMR(Marc's Modified Ringers)에서 Xenopus laevis 배아를 배양했다.

[0066] **참고예2. 세포 배양**

[0067] 인간 PC3 세포, HEK293T 세포 또는 hBMSC를 1% L- 글루타민, 10 % 소태아혈청 (FBS), 1% 페니실린 - 스트렙토마이신, RPMI 1640 배지, Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 및 α-MEM에서 배양하였다. hBMSC의 연골형성을 평가하기 위해 pellet, micromass 또는 Transwell 배양 시스템을 사용했다.

[0068] 관절 연골세포는 출생 후 5일이 지난 마우스의 대퇴골과(femoral condyles)와 경골 고평부(tibial plateaus)로부터 분리하였고, 연골 조직을 0.2% II형 콜라겐분해효소로 분해하였다. 연골세포를 10% FBS, 페니실린 및 스트렙토마이신을 함유하는 DMEM에서 유지시켰다.

[0069] 인간 연골세포는 Cell Application, Inc. (San Diego, CA, USA)에서 구입하였고, 인간 골수 유래 줄기세포는 ATCC에서 구입하였다.

[0070] ICR 마우스의 태아로부터 얻은 간엽세포를 1% 트립신 및 0.2%의 II형 콜라겐분해효소로 분해하고, 연골 형성 및 비대화 성숙을 유도하도록 유지했다. 총 2 X 10^7 cells/ml 를 10% (v/v) FBS를 함유하는 DMEM / F-12 배지 (2 : 3)에 현탁시켰다. 세포를 배양 디쉬에 20㎕의 방울로 떨어뜨리고 연골 형성을 유도하기 위해 6일 동안 유지하였다.

[0072] **실시예1. ITGBL1 유전자의 연골세포 발현 확인**

[0073] **1-1. ITGBL1 유전자의 발현 부위 확인**

[0074] Xenopus laevis 배아의 안면발생 부위(아가미궁: pharyngeal arches)에서 발현되는 유전자를 분석하기 위해서 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0075] 구체적으로, 배아의 안면이 형성되는 단계인 배아 단계 37 Xenopus laevis 배아의 안면발생 부위를 적출한 후,

상기 적출부위를 머리-꼬리방향으로 3등분, 등-배 방향으로 2등분한 후 Trizol Reagent (Sigma)를 사용하여 RNA를 추출하고, Illumina TruSeq RNA Library Prep Kit를 사용하여 상기 추출된 RNA로부터 RNAseq 용도의 Library를 제작한 후, 미국 Stanford 염기서열 분석센터에 서열 분석을 의뢰하였다.

[0076] 상기 분석결과는 과정은 도 1의 A에 나타냈으며, 분석결과는 표 1에 기재하였다.

표 1

[0077]

SeqID	log2FC	Arch1	Arch2	Arch3	ArchD	ArchV
LOC100491886.L|HS=TLL2|40|Xelaev18021897m	7.943	32.731	0.133	0.238	2.657	4.3
sst.S|HS=SST|100|Xelaev18029613m	7.869	43.723	0.611	0.187	1.929	8.099
clec19a.S|HS=CLEC19A|93|Xelaev18047527m	7.825	0.012	0.073	2.722	0.013	1.884
fstl3.L|HS=FSTL3|86|Xelaev18006463m	7.311	0.065	1.509	10.318	0.383	8.008
LOC100493098.L|HS=DNASE1L2|94|Xelaev18045463m	7.21	5.923	0.04	0.124	0.138	1.051
unnamed|HS=CA14|77|Xelaev18042787m	7.102	10.163	0.425	0.074	0.131	0.89
unnamed|HS=HGFAC|84|Xelaev18005068m	6.664	0.179	0.184	18.148	19.627	14.491
unnamed|HS=C4orf48|46|Xelaev18005037m	6.647	3.908	0.111	0.039	0.24	0.179
unnamed|HS=FETUB|74|Xelaev18029648m	6.635	0.115	1.254	11.427	46.345	10.328
unnamed|HS=FETUB|66|Xelaev18027506m	6.349	0.144	1.23	11.735	56.671	8.782
dct.L|HS=DCT|97|Xelaev18013152m	6.202	4.713	0.196	0.064	3.466	0.307
tyr.S|HS=TYR|100|Xelaev18016340m	6.135	2.178	0.048	0.031	1.507	0.117
unnamed|HS=TLL2|42|Xelaev18021894m	5.989	26.165	0.608	0.412	1.347	3.602
fgfbp3.L|HS=FGFBP3|86|Xelaev18034766m	5.668	6.202	0.122	0.593	0.229	0.735
c17orf67.L|HS=C17orf67|80|Xelaev18043803m	5.557	2.543	0.253	0.054	0.544	0.415
serpinc1.L|HS=SERPINC1|93|Xelaev18023232m	5.493	0.746	2.766	33.603	28.227	27.363
unnamed|HS=C4orf48|46|Xelaev18008874m	5.407	3.395	0.228	0.08	0.352	0.233
Xetrov90010415m.S|HS=NA|00|Xelaev18024389m	5.366	0.079	3.257	2.948	1.784	3.945
LOC101733976.S|HS=EDN3|55|Xelaev18046257m	5.293	6.859	0.175	0.198	1.025	1.698
unnamed|HS=CRISP3|77|Xelaev18028198m	5.239	2.115	0.056	0.19	0.222	0.451
unnamed|HS=AGR3|85|Xelaev18044817m	5.171	31.098	5.1	0.863	2.592	19.559
gbp6.1|HS=GBP1|70|Xelaev18001671m	5.037	0.095	0.636	3.119	0.55	2.308
LOC100490489.L|HS=NA|00|Xelaev18027216m	4.89	7.381	0.756	0.249	0.983	0.864
pcdh8.2.S|HS=PCDH8|70|Xelaev18015747m	4.856	0.334	2.276	9.672	3.254	6.536
npb.L|HS=NPB|84|Xelaev18043747m	4.783	3.552	0.285	0.129	0.153	0.208
slurp1l.L|HS=NA|00|Xelaev18023882m	4.659	5.888	0.233	0.287	0.34	1.482
LOC100485272-like.S|HS=ANGPT2|97|Xelaev18015134m	4.625	0.169	2.106	4.171	0.465	4.39
Xetrov90021952m.L|HS=TLL2|43|Xelaev18040194m	4.555	27.59	1.174	3.595	1.248	5.305
gdf7.L|HS=GDF6|85|Xelaev18028105m	4.507	0.239	1.846	5.436	6.902	0.795
pmel-like.S|HS=PMEL|58|Xelaev18015875m	4.109	22.369	4.832	1.296	7.076	4.256
tyrp1.L|HS=TYRP1|97|Xelaev18006806m	4.076	3.525	0.562	0.209	2.119	0.427
vwde.L|HS=VWDE|78|Xelaev18030909m	3.993	4.473	1.18	0.281	0.756	1.698
mcam-like.1|HS=MCAM|96|Xelaev18000065m	3.986	1.822	28.877	4.827	12.698	5.902
sfrp1.L|HS=SFRP1|88|Xelaev18018658m	3.951	3.629	14.22	56.137	21.051	53.337
apoc1-like.L|HS=NA|00|Xelaev18036025m	3.926	396.083	124.121	26.058	112.828	124.842
mxra5.L|HS=MXRA5|43|Xelaev18011748m	3.876	3.993	1.212	0.272	0.62	1.325
unnamed|HS=TLL1|44|Xelaev18021890m	3.871	80.83	17.585	5.526	18.007	37.359
fstl3.S|HS=FSTL3|87|Xelaev18009939m	3.871	0.41	1.178	6	0.503	5.87
hebp2.L|HS=HEBP2|79|Xelaev18026611m	3.862	7.083	0.976	0.487	0.71	1.197
apoe.L|HS=APOE|85|Xelaev18036024m	3.792	53.004	16.025	3.827	5.81	16.975
slc8a1-like.S|HS=SLC8A1|100|Xelaev18028910m	3.791	0.553	0.749	7.653	0.558	6.617
cpn1.S|HS=CPN1|87|Xelaev18037048m	3.728	20.386	2.279	1.539	6.064	4.589
LOC100496022.1|HS=PRSS27|92|Xelaev18001642m	3.708	21.708	7.858	1.661	3.825	13.988
c8b.L|HS=C8B|93|Xelaev18023028m	3.61	0.502	1.028	6.13	14.667	7.128
unnamed|HS=RBP4|89|Xelaev18037044m	3.608	17.786	15.571	1.459	9.927	4.092
itga7-like.L|HS=ITGA7|95|Xelaev18013342m	3.573	0.694	0.799	8.258	0.479	5.348
lrrn4.S|HS=LRRN4|97|Xelaev18028812m	3.506	0.337	0.967	3.828	1.595	5.497
LOC100487362.L|HS=LY9|32|Xelaev18040478m	3.505	2.838	1.656	0.25	0.178	0.367
rspo2.L|HS=RSPO2|100|Xelaev18032283m	3.424	6.911	2.565	0.644	1.476	1.476

pyy.S|HS=NPY|96|Xelaev18046061m	3.418	0.355	0.218	2.33	0.794	0.257
f2.S|HS=F2|98|Xelaev18024485m	3.414	0.39	0.933	4.157	4.675	3.267
sel1l3.S|HS=SEL1L3|95|Xelaev18008974m	3.29	2.298	0.685	0.235	0.336	1.208
unnamed|HS=LCN15|99|Xelaev18038205m	3.213	19.124	3.417	2.063	4.538	6.52
unnamed|HS=ANGPT1|101|Xelaev18032282m	3.155	0.28	0.597	2.494	1.191	1.104
nrn1.S|HS=NRN1|75|Xelaev18033414m	3.09	2.291	0.584	0.269	0.787	0.153
fibin.S|HS=FIBIN|100|Xelaev18024379m	3.049	1.484	12.282	3.127	6.681	3.054
olfml2a.S|HS=OLFML2A|96|Xelaev18041818m	3.046	7.192	1.606	0.871	1.836	2.419
tgfb2.S|HS=TGFB2|100|Xelaev18028671m	3.035	1.73	6.055	14.175	6.469	18.302
unnamed|HS=GP1BB|57|Xelaev18010547m	3.032	0.354	0.441	2.895	3.358	2.148
unnamed|HS=TECPR1|7|Xelaev18036521m	3	4.055	2.121	0.507	0.423	2.221
LOC100489571.S|HS=MMP8|97|Xelaev18016259m	2.96	1.139	8.863	4.084	0.027	3.147
itgbl1.S|HS=ITGBL1|95|Xelaev18015636m	2.952	2.569	0.842	0.332	0.565	0.789
unnamed|HS=SCN4B|90|Xelaev18035439m	2.871	0.958	2.188	7.008	2.412	5.981
unnamed|HS=TMEM213|58|Xelaev18002504m	2.865	3.455	13.317	25.166	26.303	16.039
unnamed|HS=TNNT3|67|Xelaev18024361m	2.857	1.944	6.248	14.083	4.678	8.964
unnamed|HS=CRISP3|79|Xelaev18030177m	2.852	6.094	1.635	0.844	1.303	2.18
unnamed|HS=ANGPTL5|64|Xelaev18021227m	2.835	5.622	1.554	0.788	0.778	1.391
unnamed|HS=LOXL4|96|Xelaev18034711m	2.823	2.066	0.468	0.292	0.698	0.539
prrt3-like.L|HS=PRRT3|67|Xelaev18024053m	2.819	3.727	1.313	0.528	0.91	0.589
Xetrov90018420m.1|HS=ROBO4|99|Xelaev18003883m	2.79	2.325	3.695	16.082	8.331	10.299
Xetrov90024887m.L|HS=NA|00|Xelaev18043270m	2.786	6.387	1.799	0.926	0.743	2.384
fgf3.S|HS=FGF3|78|Xelaev18024490m	2.763	4.625	0.833	5.655	8.273	3.668
unnamed|HS=APELA|100|Xelaev18003936m	2.747	3.911	8.978	26.249	11.39	22.66
Xetrov90018420m.L|HS=ROBO1|17|Xelaev18035307m	2.712	2.853	3.26	18.696	13.616	8.351
nov.S|HS=NOV|88|Xelaev18033972m	2.691	0.99	3.13	6.393	6.832	2.166
unnamed|HS=NELL2|93|Xelaev18017595m	2.688	3.539	0.549	1.623	1.913	1.051
cdh15.S|HS=CDH15|96|Xelaev18024865m	2.654	6.662	15.01	2.384	5.413	7.229
igdcc3.L|HS=IGDCC3|89|Xelaev18018436m	2.64	4.418	2.005	0.709	2.334	1.009
fgf8.L|HS=FGF8|79|Xelaev18034665m	2.609	19.454	3.188	9.32	11.654	11.125
unnamed|HS=ATP6AP1|92|Xelaev18017668m	2.608	0.643	1.909	3.919	4.359	2.667
c6.2.L|HS=C6|100|Xelaev18008334m	2.588	0.925	1.463	5.56	6.348	4.378
unnamed|HS=CA4|90|Xelaev18010514m	2.569	2.391	0.566	0.403	0.673	0.462
clec19a.L|HS=CLEC19A|83|Xelaev18045207m	2.558	0.525	1.552	3.091	0.9	2.85
unnamed|HS=CACNA2D4|93|Xelaev18003010m	2.556	1.986	1.461	8.592	6.055	3.817
unnamed|HS=NELL2|93|Xelaev18021119m	2.541	2.218	0.381	0.39	1.124	0.573
unnamed|HS=KDR|96|Xelaev18009068m	2.525	1.047	5.879	6.025	3.959	7.705
fam132a.S|HS=FAM132A|107|Xelaev18037500m	2.514	0.426	0.895	2.433	0.411	2.035
LOC101733976.L|HS=EDN3|53|Xelaev18043542m	2.449	2.544	1.992	0.466	2.728	1.195
nog2.S|HS=NOG|95|Xelaev18047671m	2.448	2.93	1.76	0.537	0.86	0.411
npr3-like.L|HS=NPR3|90|Xelaev18008385m	2.429	8.499	3.773	1.578	2.862	2.916
unnamed|HS=LY86|82|Xelaev18031614m	2.396	2.379	0.482	0.452	0.929	0.547
Xetrov90000623m.L|HS=SHISA3|93|Xelaev18005242m	2.381	7.436	6.743	1.428	1.119	4.449
ramp2.L|HS=RAMP2|61|Xelaev18043825m	2.377	1.44	3.696	7.482	5.008	3.22
igfbpl1.L|HS=IGFBPL1|74|Xelaev18006653m	2.372	4.945	8.355	1.614	6.356	4.638
stc2.L|HS=STC2|104|Xelaev18017248m	2.37	42.763	18.002	8.272	11.249	12.744
LOC100496170-like.1|HS=IZUMO1R|68|Xelaev18000799m	2.37	11.898	2.97	2.301	3.944	4.662
prtn3-like.1.L|HS=PRTN3|85|Xelaev18006264m	2.367	0.524	1.797	2.704	0.556	1.014
fgfbp2.L|HS=FGFBP2|99|Xelaev18005148m	2.359	15.019	14.741	2.928	0.936	12.958
unnamed|HS=CFI|105|Xelaev18005652m	2.32	3.237	7.08	16.167	28.023	12.637
mmp11.S|HS=MMP11|92|Xelaev18010511m	2.316	3.304	2.639	13.137	1.768	11.177

[0078] 또한, Xenopus laevis 배아의 연골세포에서 ITGBL1 유전자가 발현되는지 여부를 확인하기 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0079] 구체적으로, ITGBL1 mRNA와 상보적인 염기서열의 탐침자 RNA를 Ambion Megascript T7 RNA Transcription kit

(Promega, P2077)를 사용하여 제작한 후, 상기와 같은 방법으로 적출하여 고정한 배아 단계 37 Xenopus laevis 배아의 머리조직 절편에 65℃에서 12시간 동안 prehybridization buffer (formamide 1.13g/ml, Biosesang, F1014)를 처리하고, 상기 처리가 끝난 절편을 65℃ 2X SSC 용액(0.3M NaCl-Biosesang, 30mM Sodium citrateBiosesang, C1029)으로 30분간 2번씩 세척하고, RNase를 처리한 후, 0.2X SSC 용액으로 30분간 2번의 세척 후 Anti-Digoxigenin 항체 (Sigma)를 12시간 동안 처리하고, TBST로 3번 세척하고 BM purple (Sigma)을 사용하여 발색을 유도했다.

[0080] 탐침자 RNA를 만들기 위한 프라이머 서열은 하기 표 2에 기재하였다.

표 2

[0081]

명명	서열 (5'→ 3')	서열번호
ITGBL1 5'	augcacgcuggagccuu	1
ITGBL1 3'	aggauauucgcuuccaagcca	2

[0082] 상기 분석결과는 도 1의 B, C에 나타냈다.

[0083] 그 결과 도 1의 B, C 나타난 것과 같이, Xenopus laevis 배아의 연골세포에서 ITGBL1 유전자가 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

[0085] **1-2. Col2a1 유전자의 발현패턴과 ITGBL1 유전자의 발현패턴 비교**

[0086] 고정한 배아 단계 37 Xenopus laevis를 vibratome(Leica, VT 1000S)기계를 이용하여 100um 두께로 절편을 만든다. 그리고 ITGBL1 mRNA와 상보적인 염기서열의 탐침자 RNA와 Col2a1 mRNA와 상보적인 염기서열의 탐침자 RNA을 제작한 후 고정한 배아 단계 37 Xenopus laevis의 머리조직 절편에 65℃에서 12시간 동안 prehybridization buffer(formamide 1.13g/ml, Biosesang, F1014)(w/v)를 처리한 후 제작한 탐침자 RNA 각각을 Prehybridization에 희석하여 머리 조직 절편에 65℃에서 하루 동안 처리한다. 상기 처리가 끝난 절편에 65℃ 2X SSC 용액(0.3M NaCl-Biosesang, 20mM Sodium citrate-Biosesang, C1029)으로 30분간 2번씩 세척하고, RNase를 처리한 후, 0.2X SSC 용액으로 30분간 2 번의 세척 후 Anti-Digoxigenin 항체 (Sigma)를 12시간 동안 처리하고, TBST로 3번 세척하고 BM purple (Sigma)을 사용하여 발색을 유도했다. 또 다른 방법으로는 100um 두께의 절편에 연골 특이적 기질의 발현을 확인할 수 있는 Col2a1 antibody(DSHB, II-II6B3)를 처리한 면역염색법인 DAB staining을 실시하였다.

[0087] 도 1의 D에 나타난 것과 같이, Col2a1 유전자의 발현패턴과 ITGBL1 유전자의 발현 패턴이 유사하여, ITGBL1 유전자는 연골조직에서 발현됨을 확인할 수 있었다.

[0089] **1-3. ITGBL1 유전자의 발현 시기 확인**

[0090] 수정된 Xenopus laevis를 각 단계 20, 24, 27, 30, 33, 35, 41의 배아를 PureLink RNA Mini Kit(Invitrogen, 12183018A)을 이용하여 RNA를 추출한 후, GoScript Reverse Transcriptase(Promega, A5004A)로 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 Taq polymerase(Coregen, CE-500U)로 RT-PCR(BIO RAD, T100 Thermal Cycler)을 수행하였다.

[0091] 도 1의 E에 나타난 것과 같이, ITGBL1 유전자의 발현량은 연골조직이 생성되는 시기인 stage 30에 가장 강하게 발현됨을 확인할 수 있었다.

[0093] **실시예2. ITGBL1 유전자의 연골조직의 생성 촉진 기능**

[0094] **2-1. ITGBL1 유전자 발현을 억제한 경우**

[0095] ITGBL1 유전자의 연골조직의 생성 촉진 기능을 확인하기 위해서 하기와 같은 방법으로 ITGBL1 유전자 발현을 억제하였다.

[0096] 우선, Xenopus laevis 배아의 연골세포에서 ITGBL1 유전자의 발현을 억제하는데 사용하기 위해서 splicing

blocking anti-sense Morpholino를 Gene Tools, LLC에 제조를 의뢰하였고, 그 서열을 하기 표 3에 기재하였다.

표 3

[0097]

명명	서열 (5'→ 3')	서열번호
ITGBL1 MO	AGTAGGGAAGATATACAGACCTGCA	3

[0098] 상기 제작한 splicing blocking anti-sense Morpholino를 2 세포기 상태의 Xenopus laevis 배아의 등-배 축에 주입하여 연골세포에 ITGBL1 유전자의 발현을 억제하고, 상기 Morpholino가 주입된 배아를 배아 단계 45까지 배양하고 이를 MEMFA(4% Formaldehyde, Biosesang, F1012) 로 고정한 후, Alcian blue(1% Alcian Blue 8GX, Georgiachem, AB1082)를 이용해 연골을 특이적으로 염색하고 trypsin을 이용하여 연골 이외의 조직을 제거한 후, 10% (v/v) Methanol 용액을 이용하여 비특이적인 염색을 제거하였다. 이를 Olympus(SZX16-ILLB) 현미경을 이용하여 관찰하였다.

[0099] 대조구는 상기와 동일하게 실험을 수행하되, Xenopus laevis 배아의 연골세포에서 ITGBL1 유전자의 발현을 억제하는 Morpholino를 주입하지 않은 것을 사용하였다.

[0100] 상기 실험결과는 도 2의 A 및 B에 나타냈다.

[0101] 그 결과 도 2의 A 및 B에 나타난 것과 같이, Xenopus laevis 배아의 연골세포에서 ITGBL1 유전자의 발현을 억제한 경우, ITGBL1 유전자의 발현을 억제하지 않은 대조군에 비해서 연골의 크기 및 형태가 비정상적으로 축소, 발생 되었음을 확인할 수 있었다.

[0103] **2-2. ITGBL1 유전자 발현을 증가시킨 경우**

[0104] ITGBL1 유전자의 연골조직의 생성 촉진 기능을 확인하기 위해서 하기와 같은 방법으로 ITGBL1 유전자 발현을 증가시켰다.

[0105] 구체적으로, Xenopus laevis 배아의 안면 연골세포에서 얻은 cDNA를 mMESSAGE mMACHINE SP6 kit(Ambion, AM1340)에 적용하여 ITGBL1 유전자의 mRNA를 합성하였고, 상기 ITGBL1 mRNA를 실시예 2-1과 같은 방법으로 Xenopus laevis 배아에 주입하여 연골세포에 ITGBL1의 발현을 증가시킨 후 실시예 2-1과 동일한 방법으로 Alcian blue 염색을 수행하고, Sox9, Col2a1 유전자의 발현을 WISH 기법으로 확인하였다.

[0106] 대조구는 상기와 동일하게 실험을 수행하되, Xenopus laevis 배아의 연골세포에서 ITGBL1 유전자의 발현을 증가시키는 ITGBL1 유전자의 mRNA를 주입하지 않은 것을 사용하였다.

[0107] 상기 실험결과는 도 2의 C, D, E에에 나타냈다.

[0108] 그 결과 도 2의 C 및 D에 나타난 것과 같이, Xenopus laevis 배아의 안면 연골세포에 ITGBL1 유전자의 mRNA(mMESSAGE mMACHINE SP6 kit, Ambion, AM1340)를 주입하여 ITGBL1의 발현을 증가시킨 경우, ITGBL1 유전자의 발현을 증가시키지 않은 대조군에 비해서 연골의 크기가 1.2 내지 1.3배 증가하였음을 확인할 수 있으며, E에 나타낸 바와 같이 대조군에 비해 연골조직의 마커인 Sox9, Col2a1의 유전자 발현이 증가하였음을 확인하였다.

[0110] **실시예 3. 인간 및 쥐의 연골세포에서 ITGBL1 단백질에 의한 연골생성의 촉진 효과**

[0111] **3-1. 골수유래 줄기세포의 분화과정 중 연골세포와 뼈 조직에서의 ITGBL1 유전자 발현 비교**

[0112] 인간 골수유래 줄기세포(hBMSC) 분화과정에서 ITGBL1 단백질에 의한 연골생성의 촉진 여부를 확인 하기 위하여, 하기와 같은 방법으로 실험을 수행하였다. 구체적으로, 분리 배양된 인간의 골수유래 줄기세포(ATCC)를 α-MEM(Welgene, LM008-01, 10%(v/v)FBS, 1%(v/v) antibiotics 첨가)배지에서 배양한 후, 상기 세포를 micromass 방법으로 덩어리 형태로 만들고 상기 세포 덩어리에 상기 배양액과 함께 연골형성 유도제 (TGF-β, dexamethasome, Ascorbate-2-phosphate)를 처리하여 연골조직 형성을 유도하였다. 12일 동안 연골 조직을 형성을 유도한 후 PureLink RNA Mini Kit(Invitrogen, 12183018A)을 이용하여 RNA를 추출한 후, GoScript Reverse Transcriptase(Promega, A5004A)로 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR

System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 qRT-PCR를 수행하였다. 모든 반응은 96-well plate에서 수행되었고, 평균값을 mRNA 발현의 계산에 사용되었다. 상기 실험의 결과를 도 3의 A, B에 나타냈다.

[0113] 도 3의 A에 나타난 것과 같이, 골수유래 줄기세포의 연골세포 분화 중 ITGBL1의 발현이 증가하고, B에 나타난 것과 같이 골수유래 줄기세포의 뼈조직 형성 과정에서 ITGBL1의 발현이 감소함을 확인할 수 있었다.

[0115] **3-2. 골수유래 줄기세포의 연골분화 과정 중 ITGBL1 유전자의 발현을 억제시킨 경우와 연골세포에서 ITGBL1의 발현을 증가시킨 경우**

[0116] 인간 연골세포에서 ITGBL1 단백질에 의한 연골생성의 촉진 여부를 확인하기 위해서, 하기와 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

[0117] 구체적으로, 분리 배양된 인간의 연골세포 (Human chondrocyte, Cell Application, Inc. San Diego, CA, USA)를 α-MEM (Welgene, LM008-01, 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) antibiotics 첨가)배지에서 배양하고, 상기 세포에 ITGBL1 siRNA(Genolution 1)를 이용하여 제조사가 제공하는 프로토콜의 방법으로 트랜스펙션하고, 상기 트랜스펙션한 세포를 micromass 방법으로 덩어리 형태로 만들고 상기 세포 덩어리에 상기 배양액과 함께 연골형성 유도제 (TGF-β, dexamethasone, ascorbate-2-phosphate)를 처리하여 연골조직 형성을 유도하였다. 7일 동안 연골 조직의 형성을 유도한 후 4% (w/v) paraformaldehyde를 처리하여 연골조직을 고정하고 상기 고정된 연골조직을 OCT 용액(Cell Path, KMA-0.00-00A)에 넣고 cryotome 기계(Bright, OTF5000) 로 15 um 두께로 얇게 자른 후, Col2a1 유전자 발현을 확인하기 위해 면역형광염색을 수행하였다. 연골형성 촉진여부를 확인하기 위해 실시예 2-1과 동일한 방법으로 Alcian blue 염색을 수행하였다.

[0118] ITGBL1 단백질의 발현을 억제한 경우의 대조구로는 ITGBL1 siRNA를 트랜스펙션하지 않은 것을 사용하였다.

[0119] 한편, ITGBL1 DNA를 트랜스펙션한 연골세포에서 PureLink RBA Mini Kit (Invitrogen, 12183018A)을 이용하여 RNA를 추출하였고, cDNA는 GoScript Reverse Transcriptase(Promega, A5004)을 이용하여 합성하고 QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 qRT-PCR를 수행하였다. 모든 반응은 96-well plate에서 수행되었고, 평균값을 mRNA 발현의 계산에 사용되었다. qRT-PCR에 사용한 프라이머 서열은 하기 표 4에 기재하였다.

표 4

[0120]

명명	서열 (5'→ 3')	Tm (℃)	서열번호
SOX9-F	AAGGAGAGCGAGGAGGACAAGTTC	62	4
SOX9-B	TGTTCTTGCTGGAGCCGTTG	57.4	5
MMMP3-F	GATGCGCAAGCCCAGGTGTG	64.13	6
MMP3-B	GCCAATTTCATGAGCAGCAACGA	59.57	7
MMP13-F	AGGAGCATGGCGACTTCTACCC	62.88	8
MMP13-B	TTTGTCTGGCGTTTTTGGATGTTT	56.23	9
Col2a1-F	CAGTTGGGAGTAATGCAAG	58	10
Col2a1-B	GCCTTGAGCAGTTCACCTTC	58	11

[0121] 상기 실험결과는 도 3의 C, D, E에 나타냈다.

[0122] 그 결과 도 3의 C 및 D에나타난 것과 같이, ITGBL1 단백질의 발현을 억제한 경우 연골 조직의 형성이 저해됨을 확인할 수 있었다.

[0123] 도 3의 E 및 F에 나타난 것과 같이, ITGBL1 단백질의 발현을 점진적으로 증가시킨 경우 연골 생성 인자인 Sox9, Col2a1 유전자의의 발현이 함께 점진적으로 증가함을 확인하여, 연골 조직의 형성이 촉진됨을 확인할 수 있었다.

[0124] 또한, 쥐 배아의 팔과 다리가 되는 부분 (Limb bud)에서 연골세포로 분화하는 Limb bud mesenchyme을 분리한 후 ITGBL1 유전자를 삽입하여 제작한 아데노바이러스 벡터 (Ad-ITGBL1) (Vector Biolabs, Malvern, PA 19355 USA, 회사에 주문 제작) 를 트랜스덕션하여 ITGBL1의 발현을 증가시키고, 연골의 분화를 유도한 후 Alcian blue 염색기법을 사용하여 연골 분화가 촉진됨을 확인하였다. 상기 실험의 결과는 도3의 G, H에 나타냈다.

[0125] 도3의 G, H에 나타낸 것과 같이 ITGBL1의 발현이 증가된 연골세포에서 Glycosaminoglycan (GAG) 양이 증가되고

연골생성이 촉진되었다.

[0127] **실시예 4. 관절염 유도 마우스에서 ITGBL1 단백질의 연골 생성 촉진 효과**

[0128] 관절염 유도 마우스에서 ITGBL1 단백질이 연골 생성을 촉진하는지 여부를 확인하기 위해서 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0129] 구체적으로, 생후 5일 된 마우스 무릎 연골에서 분리한 연골 세포를 2일 동안 배양하고, 염증을 유도하기 위하여 5 ng/ml의 IL-1 β (GenScript, 201-LB)를 72 시간 동안 처리하고, 상기 염증이 유도된 마우스 연골 세포에 Ad-ITGBL1 아데노바이러스 벡터를 트랜스덕션한 후, 연골생성인자 (Sox9, Col2a1)의 발현의 변화를 실시예 3과 같은 방법으로 qRT-PCR를 수행하였다. qRT-PCR에 사용한 프라이머 서열은 하기 표 5에 기재하였다.

[0130] 대조군은 상기와 동일하게 실험을 수행하되, 아데노바이러스 벡터를 트랜스덕션하지 않고 IL-1 β도 처리하지 않은 것 (None)을 사용하였다.

표 5

[0132]

명명	서열 (5'→ 3')	Tm (℃)	서열번호
Col2a1-F	CACACTGGTAAGTGGGGCAAGA	55	16
Col2a1-B	GGATTGTGTTGTTTCAGGGTTCG	55	17
SOX9-F	CATCAGCAGCACCGCACCCA	58	18
SOX9-B	CGGGTGATGGGCGGGTAGGA	58	19

[0133] 상기 실험결과는 도 4의 A~D에 나타냈다.

[0134] 그 결과 도 4의 A에 나타난 것과 같이, 마우스 무릎 연골에서 분리한 연골 세포에 IL-1 β를 처리하여 염증을 유발할 경우 ITGBL1의 발현이 현저히 감소하였으며, 도 4의 B~D에 나타낸 것처럼 ITGBL1의 발현을 증가시킬 경우 연골생성인자 (Sox9, Col2a1)의 발현이 증가하였다.

[0135] 또한, 마우스 무릎관절의 반월판 (Medial meniscus)을 절개하여 관절염을 유도하는 반월판절개술을 시술 (Destabilization of medial meniscus, DMM) 하여 관절염을 유도한 마우스의 관절에 Ad-ITGBL1 아데노바이러스 벡터를 트랜스덕션하여 ITGBL1 단백질의 발현을 증가시킨 후, 6주 뒤에 마우스 관절을 분리하여 safranin-O 염색 및 Col2a1, Sox9의 발현량을 immunohistochemistry 기법을 수행하여 비교하였다. 상기 실험의 결과를 도 4의 H, I에 나타냈다.

[0136] 대조구는 상기와 동일하게 실험을 수행하되, 반월판절개술을 시술하지 않은 것 (Sham)을 사용하였다.

[0137] 그 결과 도 4의 H, I에 나타난 것과 같이, 관절염을 유도한 마우스의 관절에 ITGBL1 단백질의 발현을 증가시킬 경우 관절염 지수(OARSI;Osteoarthritis Research Society International)가 감소하고, Col2a1 및 Sox9의 발현이 증가하는 등, 관절염이 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[0139] **실시예 5. 관절염 유도 마우스에서 ITGBL1 단백질의 염증 억제 효과**

[0140] 관절염 유도 마우스에서 ITGBL1 단백질의 염증 억제 효과를 확인하기 위해서 하기와 같은 실험을 수행하였다.

[0141] 구체적으로, 실시예 4에서 설명한 바와 같이 마우스의 연골 세포에 염증을 유도하기 위하여 5 ng/ml의 IL-1 β를 72 시간 동안 처리하고, 상기 염증이 유도된 마우스 연골 세포에 ITGBL1 유전자를 삽입하여 제작한 아데노바이러스 벡터를 트랜스덕션한 후, 염증인자인 MMP-3, MMP-13의 발현의 변화를 실시예 3과 같은 방법으로 qRT-PCR를 수행하였다. qRT-PCR에 사용한 프라이머 서열은 하기 표 6에 기재하였다.

[0142] 대조군은 상기와 동일하게 실험을 수행하되, ITGBL1 유전자를 삽입하지 않은 아데노바이러스 벡터를 트랜스덕션한 것 (Mock), 아데노바이러스 벡터를 트랜스덕션하지 않고 IL-1 β도 처리하지 않은 것 (None)을 사용하였다.

표 6

[0143]

명명	서열 (5'→ 3')	Tm (℃)	서열번호
MMP-3-F	TCCTGATGTTGGTGGCTTCAG	58	12
MMP-3-B	TGTCTTGGCAAATCCGGTGTA	58	13
MMP-13-F	ACCACATCGAACTTCGA	58	14
MMP-13-B	CGACCATACAGATACTG	58	15

[0144] 상기 실험결과는 도 4의 E, F에 나타냈다.

[0145] 그 결과 도 4의 E, F에 나타난 것과 같이, IL-1 β를 처리하여 관절염 상황이 유도된 마우스의 연골세포에 ITGBL1 단백질의 발현을 증가시킬 경우 염증인자 (MMP-3, MMP-13)의 발현이 현저하게 저해됨을 확인할 수 있었다.

[0146] 또한, 반월판절개술을 시술 (Destabilization of medial meniscus, DMM)_하여 관절염을 유도한 마우스의 관절에 Ad-ITGBL1 아데노바이러스 벡터를 트랜스덕션하여 ITGBL1 단백질의 발현을 증가시킨 후, 6주 뒤에 마우스 관절을 분리하여 Immunohistochemistry 염색을 수행하여 MMP3 및 MMP13의 발현을 측정하였다. 그 결과를 도 4의 H, I에 나타냈다.

[0147] 대조구는 상기와 동일하게 실험을 수행하되, 반월판절개술을 시술하지 않은 것 (Sham)을 사용하였다.

[0148] 그 결과 도 4의 H, I에 나타난 것과 같이, 관절염을 유도한 마우스의 관절에 ITGBL1 단백질의 발현을 증가시킬 경우 관절퇴행 및 염증인자인 MMP3, MMP13이 감소함을 확인하였다.

[0150] **실시예6. ITGBL1 단백질의 인테그린 단백질 활성 억제 효과**

[0151] **6-1. ITGBL1 유전자 발현 억제에 따른 Focal adhesion complex의 변화 분석.**

[0152] ITGBL1 단백질에 의한 Focal adhesion complex의 변화를 확인하기 위하여, 하기와 같은 방법으로 실험을 수행하였다.

[0153] 구체적으로, 분리 배양된 PC3 세포를 RPMI 1640(gibco 22400-099, 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) antibiotics 첨가)배지에서 배양하여 6-wells plate에 $2x10^5$개의 세포를 깐 후, 상기 세포에 ITGBL1 siRNA(Genolution 1) 또는 ITGBL1 DNA를 jetPRIME(Polyplus, 114-15)를 이용하여 제조사가 제공하는 프로토콜의 방법으로 트랜스펙션하고, 0.25% Trypsin EDTA(gibco, 25200-072)를 이용하여 상기 트랜스펙션한 세포를 바닥에서 뗀 후 Fibronectin이 코팅된 coverslip에 상기 세포를 4시간 동안 붙인 후 4% (w/v) paraformaldehyde에 고정시킨다. Focal adhesion complex의 변화를 알기 위해 anti-FAK(abcam, ab40794)와 anti-β1 integirn(DSHB, AIIB2)를 이용하여 면역형광염색 분석을 수행하였다. 상기 실험결과는 도 5의 A~D에 나타냈다.

[0154] 도 5의 A~D에 나타난 것과 같이, PC3 세포주에서 ITGBL1의 발현을 ITGBL1-siRNA를 사용하여 저해한 결과, 세포기질과 인테그린이 결합하는 부위에 생성되는 Focal adhesion complex의 양이 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0156] **6-2. ITGBL1 유전자의 발현과 활성화된 인테그린의 상관 관계 분석**

[0157] ITGBL1 단백질과 인테그린 활성의 상관 관계를 확인하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다.

[0158] 구체적으로, 분리 배양된 PC3 세포를 RPMI 1640(gibco 22400-099, 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) antibiotics 첨가)배지에서 배양하여 6wells plate에 $2x10^5$에 세포를 깐 후, 상기 세포에 ITGBL1 siRNA(Genolution 1) 또는 ITGBL1 DNA를 jetPRIME(Polyplus, 114-15)를 이용하여 제조사가 제공하는 프로토콜의 방법으로 트랜스펙션하고 4mM EDTA로 상기 트랜스펙션한 세포를 뗀 후 FACS buffer(1XPBS, 2%FBS)에 활성화된 β1-integrin에 결합하는 antibody (MILLIPORE, MAB2079Z)를 이용하여 면역형광염색 한 후 BD LSRFORTESSA를 이용하여 분석을 수행하였다.

[0159] 도 5의 E~F에 나타난 것과 같이, ITGBL1의 발현을 억제할 경우 활성화된 인테그린의 양이 증가하고, 반대로

ITGBL1의 발현을 증가시킬 경우 활성화된 인테그린의 양이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0160] 또한, ITGBL1과 인테그린 베타1과의 상호결합을 확인하기 위하여 co-immunoprecipitation 실험을 실행하였다.

[0161] 구체적으로, HEK 293T 세포에 ITGBL1-HA 벡터와 ITGB1-flag(인테그린 베타1) 벡터를 트랜스펙션한 후 세포의 단백질을 추출하였다. 추출한 세포단백질을 HA 항체가 부착된 paramagnetic bead (Dynabeads, ThermoFisher)를 사용하여 co-immunoprecipitation 실험을 진행하였다. 상기 실험의 결과는 도 5의 G에 나타냈다.

[0162] 도 5의 G에 나타낸 것 과 같이 ITGBL1은 칼슘이온이 존재하는 상황에서 ITGB1 과 결합함을 확인할 수 있었다.

[0164] **6-3. ITGBL1 유전자 발현 증가에 따른 인테그린 활성도와 세포 부착 정도 확인**

[0165] 구체적으로, 분리 배양된 PC3 세포는 RPMI 1640(gibco 22400-099, 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) antibiotics 첨가)배지에서, 연골세포는 α-MEM(Welgene, LM008-01, 10%(v/v)FBS, 1%(v/v) antibiotics 첨가)배지에서 배양하여 6wells plate에 $2x10^5$개의 세포를 깐 후, 상기 세포에 ITGBL1 siRNA(Genolution 1) 또는 ITGBL1 DNA를 jetPRIME(Polyplus, 114-15)를 이용하여 제조사가 제공하는 프로토콜의 방법으로 트랜스펙션하고, 0.25% Trypsin EDTA(gibco, 25200-072)를 이용하여 상기 트랜스펙션한 세포를 바닥에서 뗀 후 Fibronectin이 코팅된 coverslip에 상기 세포를 각 세포들의 배지에 Mn^{2+}를 농도별로 처리하여 4시간 동안 붙인 후 4% (w/v) paraformaldehyde에 고정시킨다. 이를 Olympus(IX73) 현미경을 이용하여 관찰하였다.

[0166] 도 6에 나타난 것과 같이, PC3세포 (도 6의 A,B) 및 인간의 중간엽 줄기세포 (도 6의 C,D) 인간의 연골세포 (도 6의 E,F)에서 모두 ITGBL1의 발현을 증가시키는 경우 세포 부착이 저해되나, Mn^{2+}를 처리하여 인테그린 단백질의 활성을 높여주면 다시 부착 정도가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 ITGBL1 단백질이 인테그린의 활성을 저해하여 세포의 부착을 저해함을 입증한다.

[0168] **실시예7. ITGBL1 단백질의 인테그린 활성 억제기능과 연골세포의 연골형성인자 발현 조절의 상관관계 분석**

[0169] **7-1. ITGBL1 유전자 발현을 증가시키는 경우**

[0170] 연골의 형성과정에서 ITGBL1의 인테그린 억제기능이 연골형성에 미치는 영향을 분석하기 위하여 다음과 같은 실험을 실시하였다. 연골세포는 α-MEM(Welgene, LM008-01, 10%(v/v)FBS, 1%(v/v) antibiotics 첨가)배지에서 배양하여 6-wells plate에 $2x10^5$개의 세포를 깐 후, 상기 세포에 ITGBL1 DNA를 jetPRIME(Polyplus, 114-15)를 이용하여 제조사가 제공하는 프로토콜의 방법으로 트랜스펙션 한 후, 배지에 Mn^{2+}와 DTT를 처리하여 37℃에 incubation한다. 그 다음, 상기 세포를 PureLink RNA Mini Kit((Invitrogen, 12183018A)을 이용하여 RNA를 추출한 후, GoScript Reverse Transcriptase(Promega, A5004A)로 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 Taq polymerase(Coregen, CE-500U)로 RT-PCR(BIO RAD, T100 Thermal Cycler)을 수행하였고, QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 qRT-PCR를 수행하였다. 모든 반응은 96-well plate에서 수행되었고, 평균값을 mRNA 발현의 계산에 사용되었다. 상기 실험의 결과를 도 7의 A, B에 나타냈다.

[0171] 도 7의 A 및 B 나타난 것과 같이, 연골세포에서 ITGBL1 유전자의 발현을 증가시키면 Sox9 및 Col2a1의 발현이 증가하나, Mn^{2+} 또는 DTT를 처리하여 인테그린의 활성을 증가시키면 두 유전자의 발현이 다시 감소함을 확인할 수 있었다.

[0172] 이는 ITGBL1의 인테그린 활성 억제기능이 연골형성 유전자의 발현을 촉진시키는 작용기전임을 입증한다.

[0173] 또한, 연골의 형성과정에서 ITGBL1의 인테그린 억제기능이 연골형성에 미치는 영향을 분석하기 위하여 다음과 같은 micromass culture 실험을 진행하였다. 연골세포 (Mouse chondrocyte) (Sigma, 402-05f)를 DMEM/F12 (gibco, 10565-018, 10% (v/v) FBS, 1% (v/v) antibiotics 첨가)배지에서 배양하고, 상기 세포에 ITGBL1 DNA를 jetPRIME(Polyplus, 114-15)를 이용하여 제조사가 제공하는 프로토콜의 방법으로 트랜스펙션하고, 상기 트랜스펙션한 세포를 micromass 방법으로 덩어리 형태로 만들고 상기 세포 덩어리에 상기 배양액과 함께 연골형성 유도제 (TGF-β, dexamethasone, ascorbate-2-phosphate)를 인테그린을 활성화시키는 Mn^{2+}과 DTT를 같이 처리하여

연골조직 형성을 유도하였다. 7일 동안 연골 조직의 형성을 유도한 후 4% (w/v) paraformaldehyde를 처리하여 연골조직을 고정하고 상기 고정된 연골조직을 OCT 용액(Cell Path, KMA-0.00-00A)에 넣고 cryotome 기계(Bright, OTF5000) 로 15 um 두께로 얇게 자른 후, Alcian blue 염색을 수행하고, Glycosaminoglycan (GAG) 양을 측정하였다. 상기 실험의 결과는 도 7의 C~E에 나타냈다.

[0174] 도 7의 C~E에 나타난 것과 같이, ITGBL1의 과발현에 의해 증가된 연골의 크기가 Mn^{2+} 또는 DTT의 첨가에 의하여 감소되며, 이에 따라 연골의 크기와 연골 구성성분인 GAG의 양이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

[0175] 이는 ITGBL1의 인테그린 활성 억제기능이 연골조직 형성을 촉진시키는 작용기전임을 입증한다.

[0177] **7-2. 인테그린 알파 및 베타의 발현을 저해시키고, ITGBL1의 발현을 함께 증가시키는 경우의 연골형성 유전자의 발현 분석**

[0178] 연골의 형성과정에서 인테그린과 ITGBL1의 상관관계를 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 연골세포는 α-MEM(Welgene, LM008-01, 10%(v/v)FBS, 1%(v/v) antibiotics 첨가)배지에서 배양하여 60mm plate에 $2x10^5$개의 세포를 깐 후, 상기 세포에 인테그린 베타1, 알파1, 알파3, 알파5, 알파10 siRNA를 jetPRIME(Polyplus, 114-15)를 이용하여 제조사가 제공하는 프로토콜의 방법으로 도 7의 F 및 G의 하기 표에 표시한 경우와 같이 트랜스펙션 하여 표기된 인테그린의 발현을 저해하였다. 또한, ITGBL1의 발현과 인테그린의 발현저하를 동시에 실행하기 위하여 인테그린의 발현을 저해한 후 ITGBL1 DNA를 같이 트랜스펙션하여 37℃에 배양하였다. 그 다음, 상기 세포를 PureLink RNA Mini Kit((Invitrogen, 12183018A)을 이용하여 RNA를 추출한 후, GoScript Reverse Transcriptase(Promega, A5004A)로 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 Taq polymerase(Coregen, CE-500U)로 RT-PCR(BIO RAD, T100 Thermal Cycler)을 수행하였고, QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 qRT-PCR를 수행하였다. 모든 반응은 96-well plate에서 수행되었고, 평균값을 mRNA 발현의 계산에 사용되었다.

[0179] 도 7의 F, G에 나타난 것과 같이, 인테그린 알파 및 베타의 발현을 함께 저해할 경우 Sox9의 발현이 증가하였으며, ITGBL1을 발현을 증가시킨 상태에서 인테그린 알파와 베타의 발현을 감소시키면 Sox9의 발현이 더욱 증가한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0180] 상기 실시예 6, 7에 나타난 실험 결과를 통해, ITGBL1 단백질은 인테그린 단백질의 활성을 저해하며, ITGBL1의 인테그린 활성 억제기능이 연골세포의 연골 형성 인자의 발현과 연골조직 형성을 촉진하는 분자 기전임을 알 수 있다.

[0182] **실시예8. ITGBL1의 인테그린 활성억제 기능과 염증반응 및 연골퇴행 억제 효과의 상관관계 분석**

[0183] **8-1. ITGBL1 유전자의 발현을 증가시키고 인테그린을 활성화시킬 경우 연골퇴행인자의 발현 분석**

[0184] 연골세포는 α-MEM(Welgene, LM008-01, 10%(v/v)FBS, 1%(v/v) antibiotics 첨가)배지에서 배양하여 60mm plate에 $2x10^5$개의 세포를 깐 후, 연골분해를 촉진하는 것으로 알려진 Fibronectin의 분해산물인 Fn-f 29kDa를 처리하였다. 상기 세포에 ITGBL1 벡터를 jetPRIME(Polyplus, 114-15)을 이용하여 제조사가 제공하는 프로토콜의 방법으로 트랜스펙션 한 후, 인테그린을 활성화시키는 Mn^{2+} 또는 DTT를같이 처리하여 37℃에 incubation한다. 그 다음, 상기 세포를 PureLink RNA Mini Kit((Invitrogen, 12183018A)을 이용하여 RNA를 추출한 후, GoScript Reverse Transcriptase(Promega, A5004A)로 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 Taq polymerase(Coregen, CE-500U)로 RT-PCR(BIO RAD, T100 Thermal Cycler)을 수행하였고, QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 qRT-PCR를 수행하였다. 모든 반응은 96-well plate에서 수행되었고, 평균값을 mRNA 발현의 계산에 사용되었다. 상기 실험의 결과는 도8의 A~C에 나타냈다.

[0185] 도 8의 A~C에 나타난 것과 같이, Fn-f 29kDa를 처리하여 증가된 MMP-3, MMP-13 유전자의 발현량이 ITGBL1 유전자의 발현을 증가시키면 다시 감소하였으며, 다시 Mn^{2+} 또는 DTT를 처리하여 인테그린을 활성화시키면 MMP-3, MMP-13 유전자의 발현이 증가하였다. 이는 ITGBL1 유전자의 인테그린 활성억제 효과가, 연골퇴행 및 염증을 촉진하는 MMP-3, MMP-13 유전자 발현을 감소시키는 분자작용기전임을 의미한다.

[0186] 또한, ITGBL1 단백질이 연골분해를 촉진하는 Fn-f 29kDa와 연골세포 사이의 결합을 저해하는지 확인하기 위하여

다음과 같은 실험을 진행하였다. 60mm plate에 $2x10^5$에 세포를 깐 후, 상기 세포에 ITGBL1 siRNA 또는 DNA를 jetPRIME(Polyplus, 114-15)를 이용하여 제조사가 제공하는 프로토콜의 방법으로 트랜스펙션 한 다음 상기 세포에 형광물질을 연결한 Fn-f 29kDa(sigma, F9911을 처리한 후 4% paraformaldehyde로 고정하였다. 이 세포를 Confocal(Zeiss, LSM880) 현미경을 이용하여 관찰하였다. 상기 실험의 결과를 도 8의 D, E에 나타냈다.

[0187] 도 8의 D, E에 나타낸 것과 같이, ITGBL1의 발현을 증가시킬 경우 Fn-29kDa와 연골세포의 결합이 현저히 저하되었으며, 이는 Mn^{2+} 또는 DTT를 처리할 경우 다시 증가되었다. 따라서, ITGBL1은 인테그린 활성을 저해하여 Fn-29kDa와 연골세포의 결합을 저해하며, 연골퇴행인자의 발현을 억제한다고 할 수 있다.

[0189] **8-2. ITGBL1 유전자의 발현을 저해하고, 인테그린의 활성을 억제할 경우 연골퇴행 인자의 변화 분석**

[0190] ITGBL1 단백질의 인테그린 활성억제 기능과 연골퇴행인자 발현의 상관관계를 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 진행하였다. 연골세포는 α-MEM(Welgene, LM008-01, 10%(v/v) FBS, 1%(v/v) antibiotics 첨가)배지에서 배양하여 60cm plate에 $2x10^5$개의 세포를 깐 후, 상기 세포에 ITGBL1-siRNA를 jetPRIME(Polyplus, 114-15)를 이용하여 제조사가 제공하는 프로토콜의 방법으로 트랜스펙션 한 후, 배지에 인테그린의 활성을 억제하는 인자 Bio 1211(TOCRIS, 3910), Obtustatin(TOCRIS, 4664), ATN-161(TOCRIS, 6058)들을 첨가하여 37℃에 배양하였다. 그 다음, 상기 세포를 PureLink RNA Mini Kit((Invitrogen, 12183018A)을 이용하여 RNA를 추출한 후, GoScript Reverse Transcriptase(Promega, A5004A)로 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 Taq polymerase(Coregen, CE-500U)로 RT-PCR(BIO RAD, T100 Thermal Cycler)을 수행하였고, QuantStudio 6 Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 사용하여 qRT-PCR를 수행하였다. 모든 반응은 96-well plate에서 수행되었고, 평균값을 mRNA 발현의 계산에 사용되었다. 상기 실험의 결과를 도 9의 A~C에 나타냈다.

[0191] 도 9의 A~C에 나타난 것과 같이, ITGBL1 유전자의 발현을 저해할 경우 MMP-3, MMP-13 유전자의 발현이 증가되었으며, 이 세포에 여러 종류의 인테그린 저해제를 함께 처리하면 다시 MMP-3, MMP-13 유전자의 발현이 저해되며, 인테그린 저해제 중 ATN-161이 가장 효과적임을 확인할 수 있었다.

[0192] 또한, ITGBL1의 발현을 저해할 경우 무릎관절의 연골퇴행 및 염증반응을 확인하고, ITGBL1의 발현이 억제된 무릎관절강에 인테그린-베타1 저해제인 ATN-161을 처리할 경우의 무릎연골 상태를 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 실행하였다.

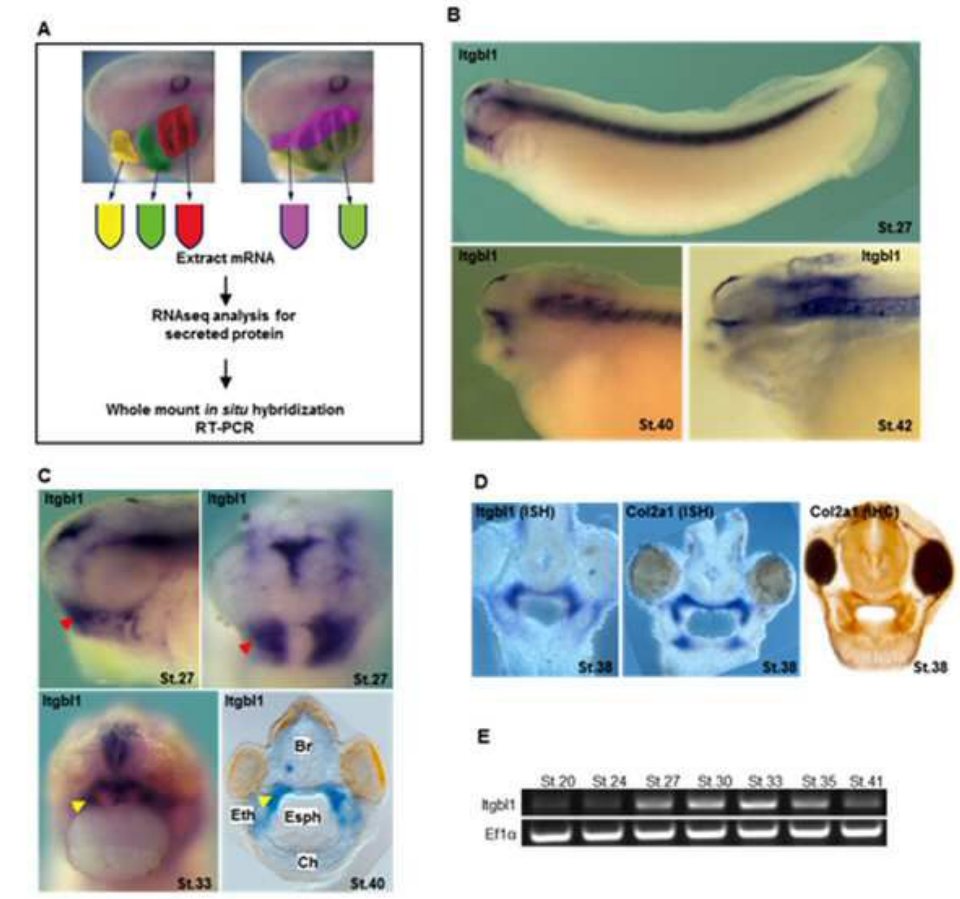
[0193] ITGBL1-shRNA를 함유한 아데노바이러스벡터 (Ad-ITGBL1 shRNA)를 무릎관절강 내부에 주입하여 ITGBL1의 발현을 저해한 후, 무릎관절 연골의 퇴행 및 염증 상태를 확인하였다. 또한, ITGBL1-shRNA를 함유한 아데노바이러스벡터 (Ad-ITGBL1 shRNA)를 무릎관절강 내부에 주입하여 ITGBL1의 발현이 저해된 관절강에 인테그린-베타1 저해제인 ATN-161을 주입한 후 무릎 관절 조직을 적출하여 Safranin-O 염색 및 immunohistochemistry 기법을 수행하여 Col2a1 및 Sox9의 발현을 확인하였다.

[0194] 이때, 대조군은 상기와 동일하게 실험을 수행하되, ITGBL1-shRNA 를 포함하지 않은 아데노바이러스 벡터 (Ad-C)를 트랜스덕션한 것을 사용하였다. 상기 실험의 결과를 도 9의 D, E에 나타냈다.

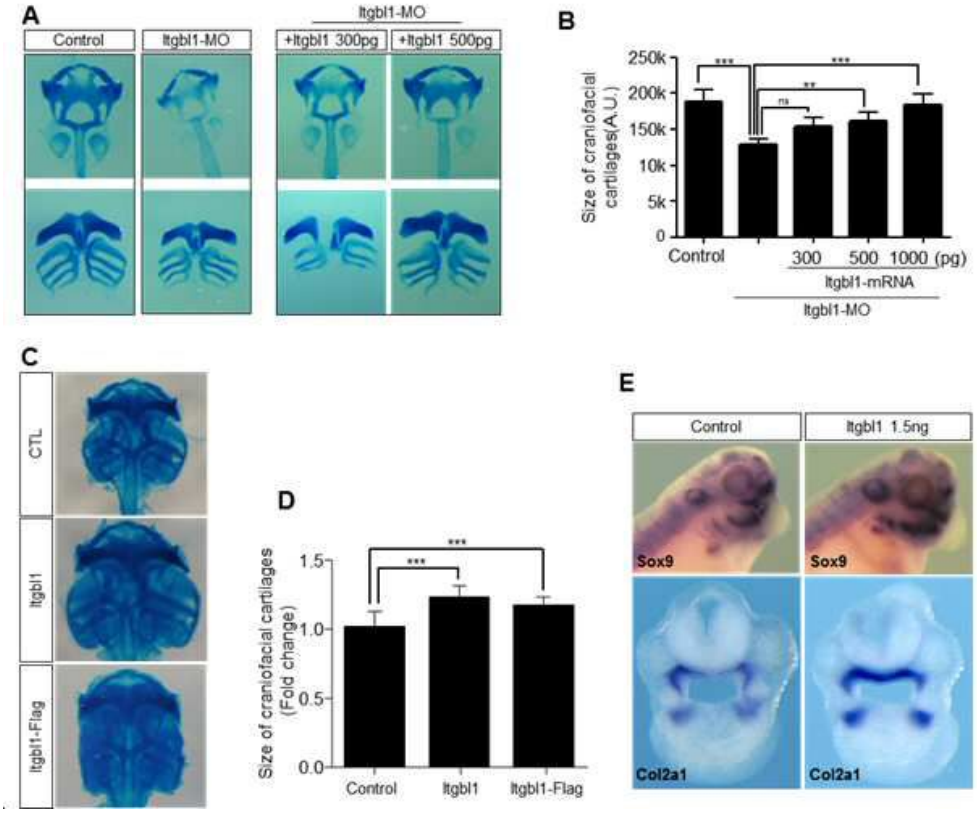
[0195] 그 결과 도 9의 D, E에 나타낸 것과 같이, 마우스의 무릎 관절강 내부에 ITGBL1-shRNA를 함유한 아데노바이러스를 주입하여 ITGBL1의 발현을 저해할 경우 무릎연골의 건강상태가 악화되고, ITGBL1-shRNA를 함유한 아데노바이러스를 주입하여 ITGBL1의 발현을 저해한 관절강에 인테그린-베타1 저해제인 ATN-161을 주입하면 무릎연골의 건강상태가 다시 회복되는 결과를 확인할 수 있었다.

도면

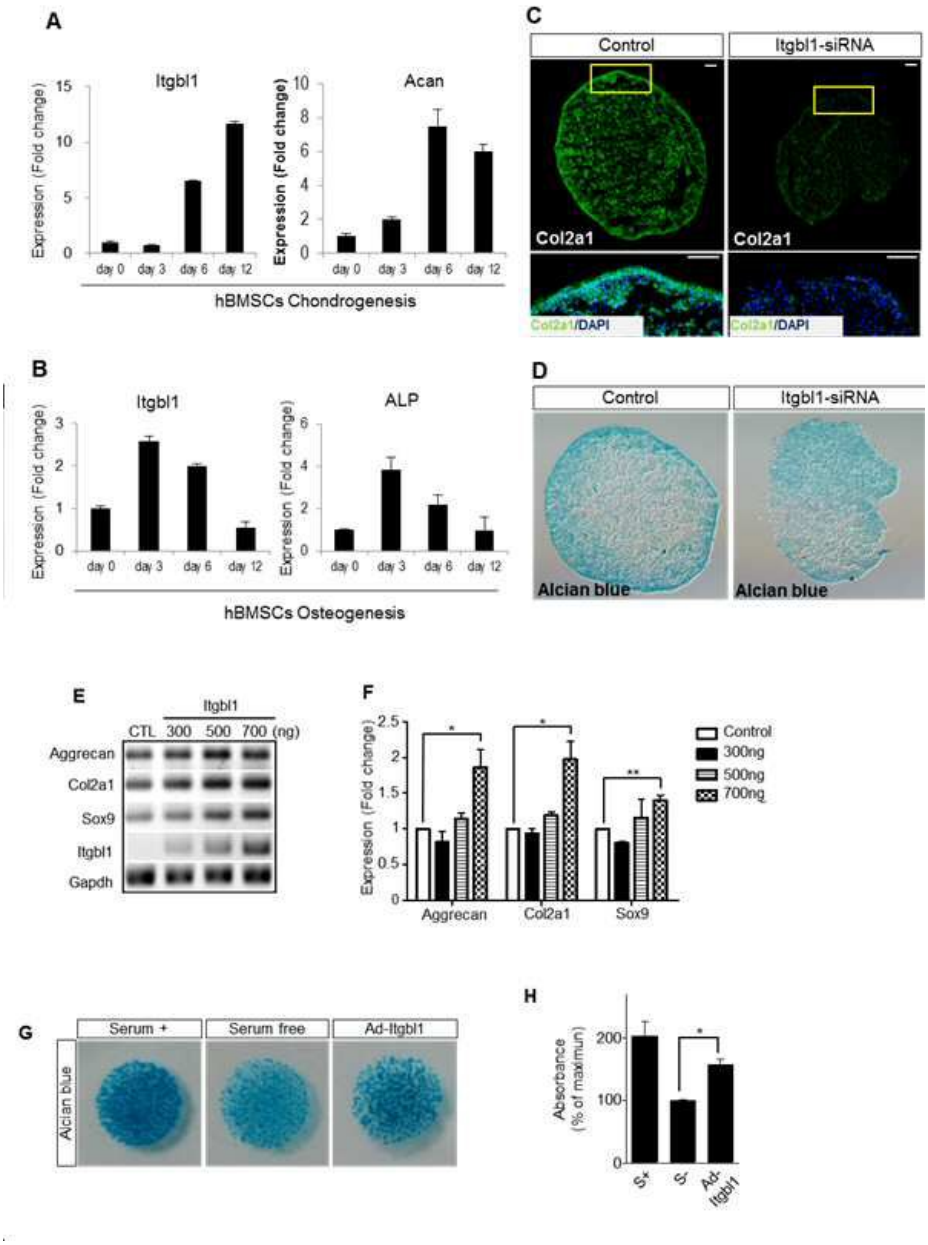
도면1


A
Extract mRNA
RNAseq analysis for secreted protein
Whole mount in situ hybridization
RT-PCR
B
Itgbl1
St.27
Itgbl1
St.40
Itgbl1
St.42
C
Itgbl1
St.27
Itgbl1
St.27
Itgbl1
St.33
Itgbl1
Br
Eth
Esph
Ch
St.40
D
Itgbl1 (ISH)
St.38
Col2a1 (ISH)
St.38
Col2a1 (IHC)
St.38
E
St.20
St.24
St.27
St.30
St.33
St.35
St.41
Itgbl1
Ef1α

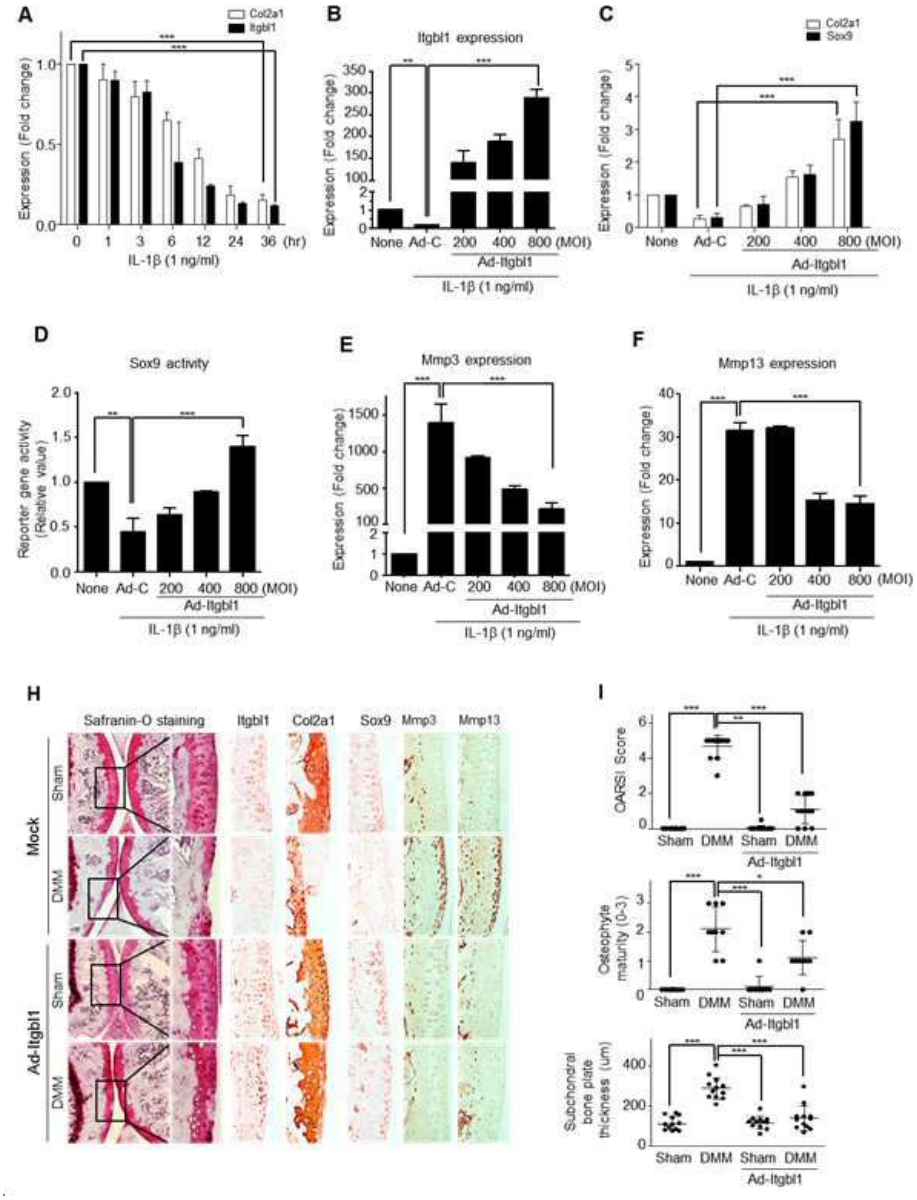
도면2


A
Control
Itgbl1-MO
Itgbl1-MO
+Itgbl1 300pg
+Itgbl1 500pg
B
Size of craniofacial cartilages(A.U.)
250k
200k
150k
10k
5k
0
***
***
**
ns
Control
300
500
1000 (pg)
Itgbl1-mRNA
Itgbl1-MO
C
CTL
Itgbl1
Itgbl1-Flag
D
Size of craniofacial cartilages (Fold change)
1.5
1.0
0.5
0.0
***
***
Control
Itgbl1
Itgbl1-Flag
E
Control
Itgbl1 1.5ng
Sox9
Sox9
Col2a1
Col2a1

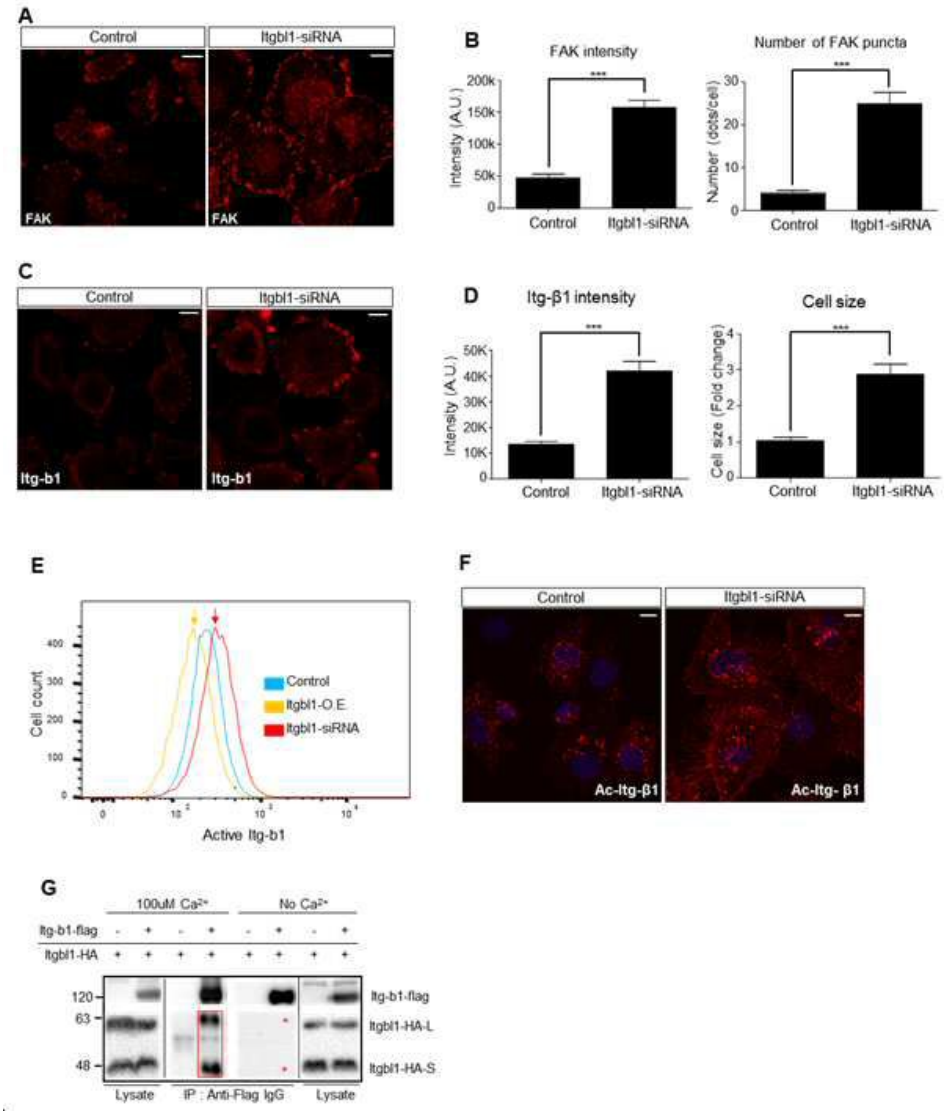
도면3


A
Itgbl1
Acan
Expression (Fold change)
day 0
day 3
day 6
day 12
hBMSCs Chondrogenesis
B
Itgbl1
ALP
hBMSCs Osteogenesis
C
Control
Itgbl1-siRNA
Col2a1
Col2a1/DAPI
D
Alcian blue
E
Itgbl1
CTL
300
500
700 (ng)
Aggrecan
Col2a1
Sox9
Gapdh
F
Control
300ng
500ng
700ng
G
Serum +
Serum free
Ad-Itgbl1
H
Absorbance (% of maximun)
S+
S-
Ad-Itgbl1

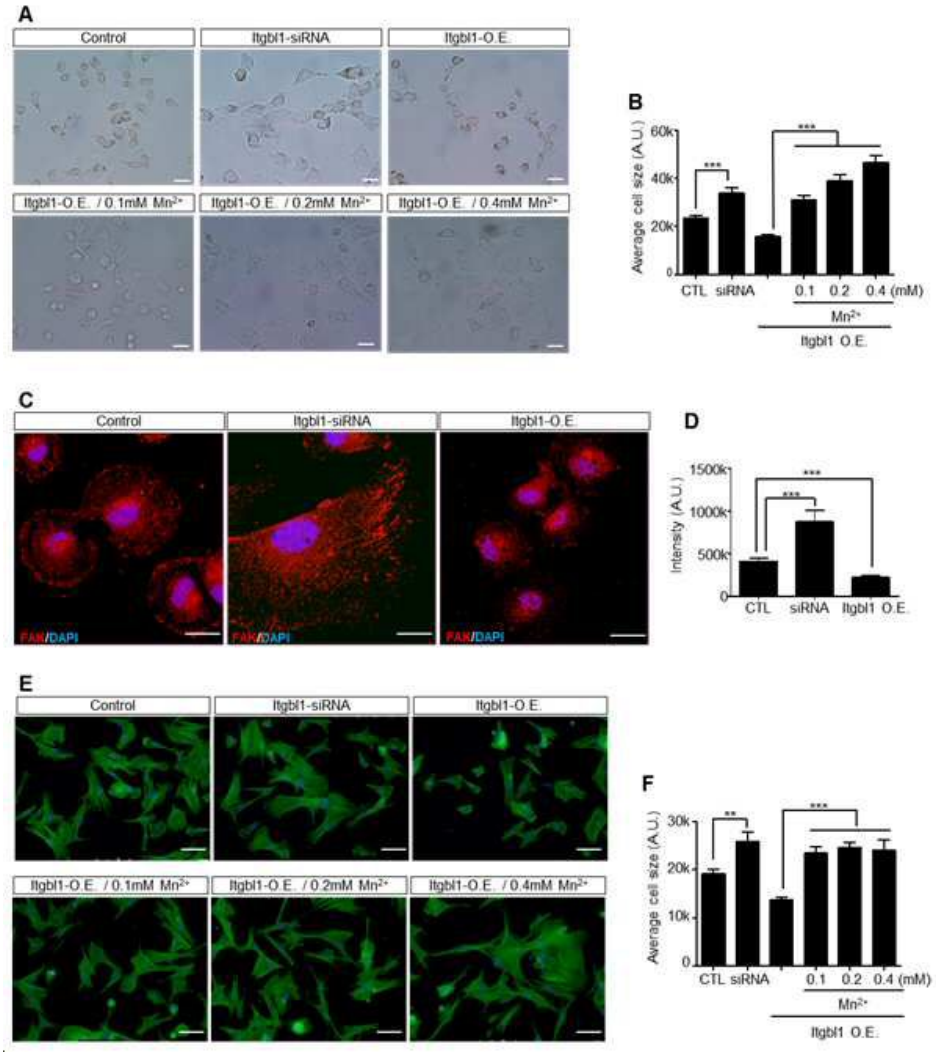
도면4


A
Col2a1
Itgbl1
Expression (Fold change)
IL-1β (1 ng/ml)
0 1 3 6 12 24 36 (hr)
B
Itgbl1 expression
None Ad-C 200 400 800 (MOI)
Ad-Itgbl1
IL-1β (1 ng/ml)
C
Col2a1
Sox9
D
Sox9 activity
Reporter gene activity (Relative value)
E
Mmp3 expression
F
Mmp13 expression
H
Safranin-O staining
Itgbl1
Col2a1
Sox9
Mmp3
Mmp13
Mock
Ad-Itgbl1
Sham
DMM
I
OARSI Score
Osteophyte maturity (0-3)
Subchondral bone plate thickness (um)
Sham DMM Sham DMM
Ad-Itgbl1

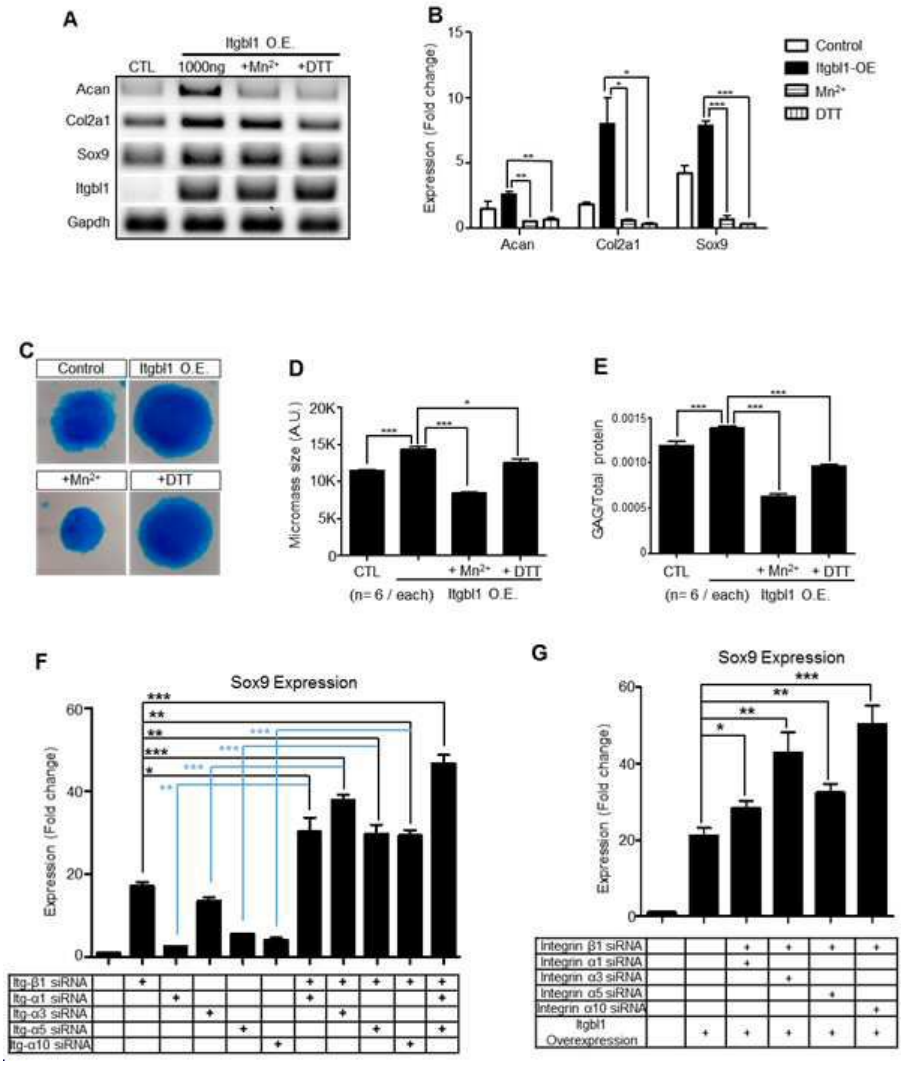
도면5


A
Control
Itgbl1-siRNA
FAK
FAK
B
FAK intensity
Intensity (A.U.)
200k
150k
100k
50k
0
***
Control
Itgbl1-siRNA
Number of FAK puncta
Number (dots/cell)
30
20
10
0
***
Control
Itgbl1-siRNA
C
Control
Itgbl1-siRNA
Itg-b1
Itg-b1
D
Itg-β1 intensity
Intensity (A.U.)
50K
40K
30K
20K
10K
0
***
Control
Itgbl1-siRNA
Cell size
Cell size (Fold change)
4
3
2
1
0
***
Control
Itgbl1-siRNA
E
Cell count
400
300
200
100
0
Control
Itgbl1-O.E
Itgbl1-siRNA
Active Itg-b1
F
Control
Itgbl1-siRNA
Ac-Itg-β1
Ac-Itg- β1
G
100uM Ca2+
No Ca2+
Itg-b1-flag
Itgbl1-HA
120
63
48
Itg-b1-flag
Itgbl1-HA-L
Itgbl1-HA-S
Lysate
IP : Anti-Flag IgG
Lysate

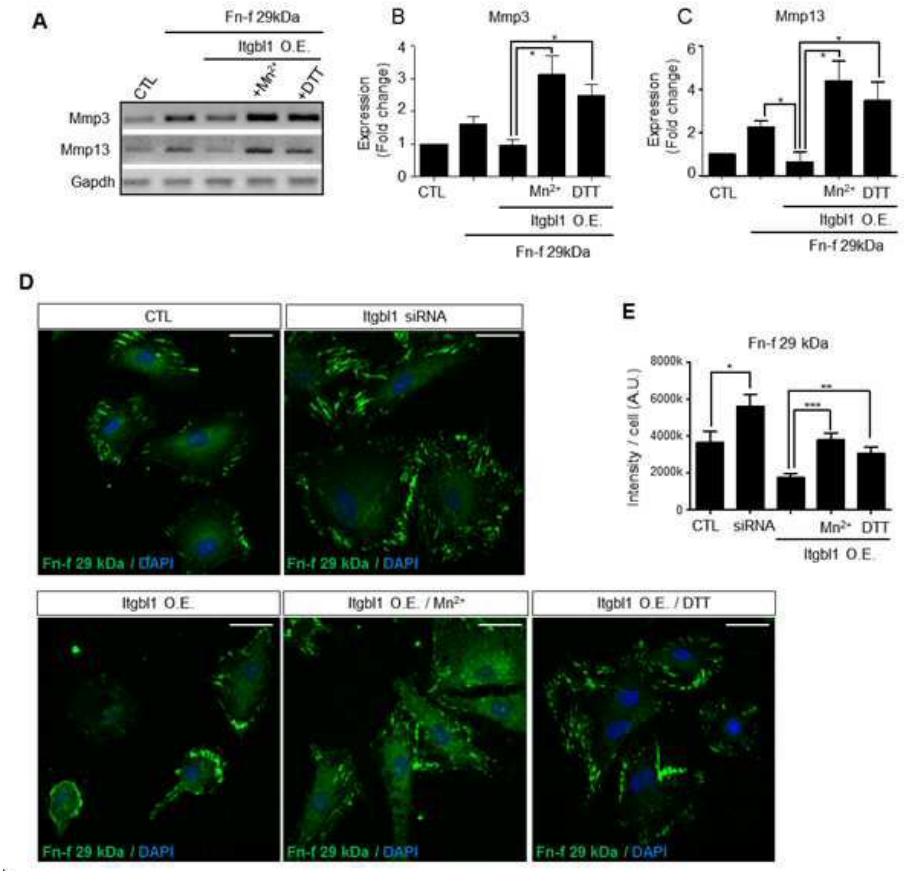
도면6


A
Control
Itgbl1-siRNA
Itgbl1-O.E.
Itgbl1-O.E. / 0.1mM Mn2+
Itgbl1-O.E. / 0.2mM Mn2+
Itgbl1-O.E. / 0.4mM Mn2+
B
Average cell size (A.U.)
60k
40k
20k
0
***
***
CTL siRNA
0.1 0.2 0.4 (mM)
Mn2+
Itgbl1 O.E.
C
Control
Itgbl1-siRNA
Itgbl1-O.E.
FAK/DAPI
D
Intensity (A.U.)
1500k
1000k
500k
0
***
***
CTL siRNA Itgbl1 O.E.
E
Control
Itgbl1-siRNA
Itgbl1-O.E.
Itgbl1-O.E. / 0.1mM Mn2+
Itgbl1-O.E. / 0.2mM Mn2+
Itgbl1-O.E. / 0.4mM Mn2+
F
Average cell size (A.U.)
30k
20k
10k
0
**
***
CTL siRNA
0.1 0.2 0.4 (mM)
Mn2+
Itgbl1 O.E.

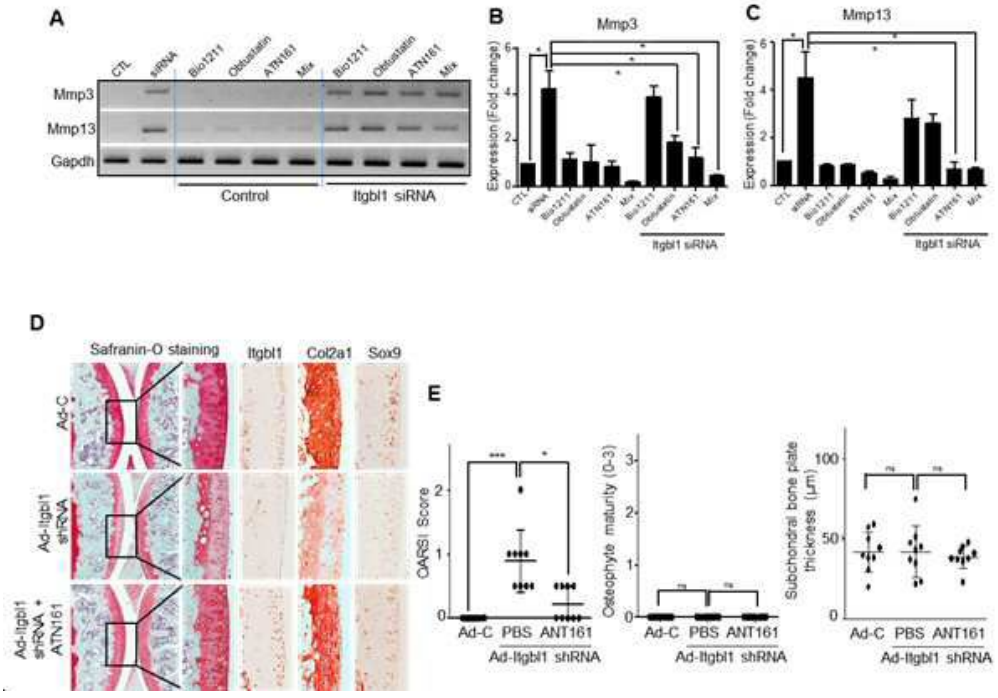
도면7


A
Itgbl1 O.E.
CTL
1000ng
+Mn2+
+DTT
Acan
Col2a1
Sox9
Itgbl1
Gapdh
B
Expression (Fold change)
Control
Itgbl1-OE
Mn2+
DTT
Acan
Col2a1
Sox9
C
Control
Itgbl1 O.E.
+Mn2+
+DTT
D
Micromass size (A.U.)
CTL
+ Mn2+
+ DTT
(n= 6 / each)
Itgbl1 O.E.
E
GAG/Total protein
CTL
+ Mn2+
+ DTT
(n= 6 / each)
Itgbl1 O.E.
F
Sox9 Expression
Expression (Fold change)
Itg-β1 siRNA
Itg-α1 siRNA
Itg-α3 siRNA
Itg-α5 siRNA
Itg-α10 siRNA
G
Sox9 Expression
Expression (Fold change)
Integrin β1 siRNA
Integrin α1 siRNA
Integrin α3 siRNA
Integrin α5 siRNA
Integrin α10 siRNA
Itgbl1 Overexpression

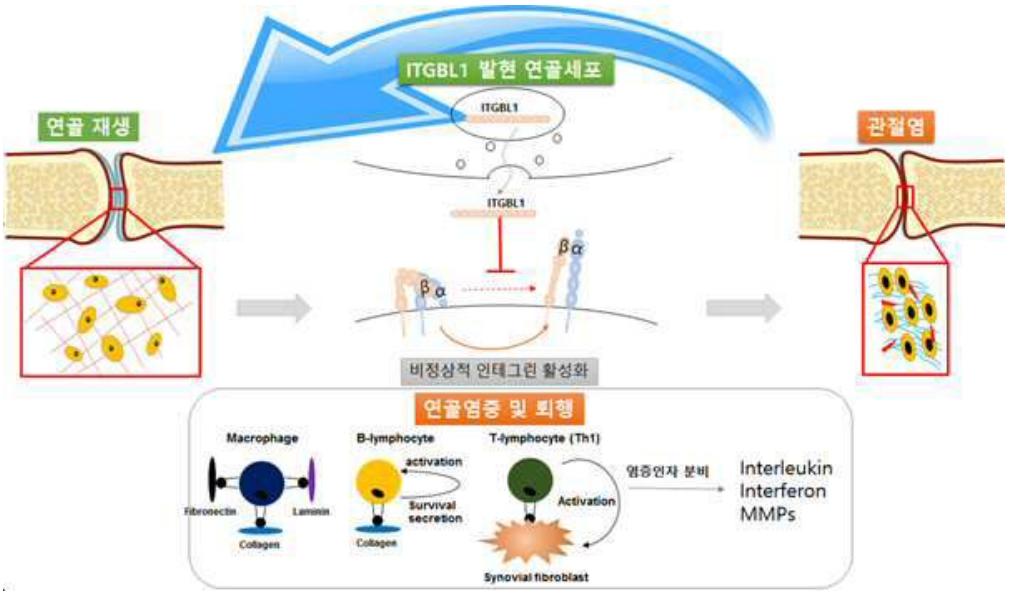
도면8


A
Fn-f 29kDa
Itgbl1 O.E.
CTL
+Mn2+
+DTT
Mmp3
Mmp13
Gapdh
B
Mmp3
Expression (Fold change)
CTL
Mn2+
DTT
Itgbl1 O.E.
Fn-f 29kDa
C
Mmp13
Expression (Fold change)
CTL
Mn2+
DTT
Itgbl1 O.E.
Fn-f 29kDa
D
CTL
Itgbl1 siRNA
Fn-f 29 kDa / DAPI
E
Fn-f 29 kDa
Intensity / cell (A.U.)
CTL
siRNA
Mn2+
DTT
Itgbl1 O.E.
Itgbl1 O.E.
Itgbl1 O.E. / Mn2+
Itgbl1 O.E. / DTT

도면9


A
CTL
siRNA
Bio1211
Obtustatin
ATN161
Mix
Mmp3
Mmp13
Gapdh
Control
Itgbl1 siRNA
B
Mmp3
Expression (Fold change)
Itgbl1 siRNA
C
Mmp13
Expression (Fold change)
Itgbl1 siRNA
D
Safranin-O staining
Itgbl1
Col2a1
Sox9
Ad-C
Ad-Itgbl1 shRNA
Ad-Itgbl1 shRNA + ATN161
E
OARSI Score
Osteophyte maturity (0-3)
Subchondral bone plate thickness (μm)
Ad-C
PBS
ANT161
Ad-Itgbl1 shRNA

도면10



서 열 목 록

<110> UNIST(ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)

<120> Pharmaceutical compositions for preventing or treating cartilage diseases

<130> APC-2018-0367

<150> KR 10-2017-0163527

<151> 2017-11-30

<160> 21

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ITGBL1 5'

<400> 1

augcacgcug gagccuu 17

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ITGBL1 3'

<400> 2

aggauauucg cuuccaagcc a 21

<210> 3

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ITGBL1 MO

<400> 3

agtagggaag atatacagac ctgca 25

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SOX9-F

<400> 4

aaggagagcg aggaggacaa gttc 24

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SOX9-B

<400> 5

tgttcttgct ggagccgttg 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMMP3-F

<400> 6

gatgcgcaag cccaggtgtg 20

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP3-B

<400> 7

gccaatttca tgagcagcaa cga 23

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP13-F

<400> 8

aggagcatgg cgacttctac cc 22

<210> 9

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP13-B

<400> 9

tttgtctggc gtttttggat gttt 24

<210> 10

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Col2a1-F

<400> 10

cagttgggag taatgcaag 19

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Col2a1-B

<400> 11

gccttgagca gttcaccttc 20

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-3-F

<400> 12

tcctgatgtt ggtggcttca g 21

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-3-B

<400> 13

tgtcttggca aatccggtgt a 21

<210> 14

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-13-F

<400> 14

accacatcga acttcga 17

<210> 15

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-13-B

<400> 15

cgaccataca gatactg 17

<210> 16

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Col2a1-F

<400> 16

cacactggta agtggggcaa ga 22

<210> 17

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Col2a1-B

<400> 17

ggattgtgtt gtttcagggt tcg 23

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SOX9-F

<400> 18

catcagcagc accgcaccca 20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SOX9-B

<400> 19

cgggtgatgg gcgggtagga 20

<210> 20

<211> 353

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Cys Lys Asn Ser Gln Asp Ile Ile Cys Ser Asn Ala Gly Thr Cys
1 5 10 15

His Cys Gly Arg Cys Lys Cys Asp Asn Ser Asp Gly Ser Gly Leu Val
20 25 30

Tyr Gly Lys Phe Cys Glu Cys Asp Asp Arg Glu Cys Ile Asp Asp Glu
35 40 45

Thr Glu Glu Ile Cys Gly Gly His Gly Lys Cys Tyr Cys Gly Asn Cys

50 55 60

Tyr Cys Lys Ala Gly Trp His Gly Asp Lys Cys Glu Phe Gln Cys Asp

65 70 75 80

Ile Thr Pro Trp Glu Ser Lys Arg Arg Cys Thr Ser Pro Asp Gly Lys

85 90 95

Ile Cys Ser Asn Arg Gly Thr Cys Val Cys Gly Glu Cys Thr Cys His

100 105 110

Asp Val Asp Pro Thr Gly Asp Trp Gly Asp Ile His Gly Asp Thr Cys

115 120 125

Glu Cys Asp Glu Arg Asp Cys Arg Ala Val Tyr Asp Arg Tyr Ser Asp

130 135 140

Asp Phe Cys Ser Gly His Gly Gln Cys Asn Cys Gly Arg Cys Asp Cys

145 150 155 160

Lys Ala Gly Trp Tyr Gly Lys Lys Cys Glu His Pro Gln Ser Cys Thr

165 170 175

Leu Ser Ala Glu Glu Ser Ile Arg Lys Cys Gln Gly Ser Ser Asp Leu

180 185 190

Pro Cys Ser Gly Arg Gly Lys Cys Glu Cys Gly Lys Cys Thr Cys Tyr

195 200 205

Pro Pro Gly Asp Arg Arg Val Tyr Gly Lys Thr Cys Glu Cys Asp Asp

210 215 220

Arg Arg Cys Glu Asp Leu Asp Gly Val Val Cys Gly Gly His Gly Thr

225 230 235 240

Cys Ser Cys Gly Arg Cys Val Cys Glu Arg Gly Trp Phe Gly Lys Leu

245 250 255

Cys Gln His Pro Arg Lys Cys Asn Met Thr Glu Glu Gln Ser Lys Asn

260 265 270

Leu Cys Glu Ser Ala Asp Gly Ile Leu Cys Ser Gly Lys Gly Ser Cys

275 280 285

His Cys Gly Lys Cys Ile Cys Ser Ala Glu Glu Trp Tyr Ile Ser Gly

290 295 300

Glu Phe Cys Asp Cys Asp Asp Arg Asp Cys Asp Lys His Asp Gly Leu

305 310 315 320

Ile Cys Thr Gly Asn Gly Ile Cys Ser Cys Gly Asn Cys Glu Cys Trp

325 330 335

Asp Gly Trp Asn Gly Asn Ala Cys Glu Ile Trp Leu Gly Ser Glu Tyr

340 345 350

Pro

<210> 21

<211> 4901

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 21

actctccact gaggggtttg gcaccagcac cccgcccaga gcagtgccgc tgcccaaatc 60

ctcgcaggca gctcatcaac gcaattgcaa ctccggctgg agccccggac ctgcaagcct 120

gggtgtccgt gggtccgtct gcccagccat ctgctggtgg cacctctccc tcctgccgcc 180

tccctcggtg aaccccacct tgcagaagtg cagctcgccc ggagcagccc aggagctcag 240

catgcgtccc ccaggcttca ggaacttctt gctgctggcg tcctcccttc tctttgctgg 300

gttgtcagct gttcctcaaa gcttctcgcc atctctgagg ccatggtaag tgtgactgtg 360

gcaagtgcaa gtgtgaccag ggatggtatg gggatgcttg ccagtaccca actaactgtg 420

acttgacaaa gaagaaaagt aaccaaatgt gcaagaattc acaagacatc atctgctcta 480

atgcaggtac atgtcactgt ggcaggtgta agtgtgataa ttcagatgga agtggacttg 540

tgtatggtaa attttgtgag tgtgacgata gagaatgcat agacgatgaa acagaagaaa 600

tatgtggagg ccatgggaag tgttactgtg gaaactgcta ctgcaaggct ggttggcatg 660

gagataaatg tgaattccag tgcgatatca ccccctggga aagcaagcga agatgcacgt 720

ctccagatgg caaaatctgc agtaacagag ggacttgtgt atgtggtgaa tgtacctgtc 780

acgatgttga tccgactggg gactggggag atattcatgg ggacacctgt gaatgtgatg 840

agagggactg tagagctgtc tatgaccgat attctgatga cttctgttca ggtcatggac 900

agtgtaattg cggaagatgt gactgcaaag caggctggta tgggaagaag tgtgagcacc 960

cacagtcctg cacgctgtca gctgaggaga gcatcaggaa gtgccaggga agctcggatc 1020

tgccttgctc tgggaggggt aaatgtgaat gtggcaaatg cacctgctat cctccaggag 1080

atcgccgggt gtatggcaag acttgtgagt gtgatgatcg ccgctgtgaa gacctcgatg 1140

gtgtggtctg tggaggccac ggcacatgtt cctgtggtcg ctgtgtttgt gagagaggat 1200
ggtttggaaa gctctgccaa catccgcgga agtgtaacat gacggaagaa caaagcaaga 1260
atctgtgtga atcagcagat ggcatattgt gctcggggaa gggttcttgt cattgtggga 1320
agtgcatttg ttctgctgaa gagtggtata tttctgggga gttctgtgac tgtgatgaca 1380
gagactgcga caaacatgat ggtctcattt gtacagggaa tggaatatgt agctgtggaa 1440
actgtgaatg ctgggatgga tggaatggaa atgcatgtga aatctggctt ggctcagaat 1500
atccttaaca attacatgag agagcaattt tgatgacgta ttcgctgatg cacagacatt 1560

ggaattcatt acattatcta gccatcgtaa tacaaatgac ctttggattt ctctatcacg 1620
gcgcttatcc tcctattaag gatcagaaag ttaaacttta cggaccacgt acgtccctgt 1680
ctcatattct tctttgttgg tttctgttta atactttaaa gctgtaaaaa aaatttaaaa 1740
aattccttct gagctcccag gccatacaaa agcaacttaa gggtggattt ggctggcagc 1800
tgggcagtac tttgtcagcc tcagctccac tggaactgcc cttgattctc tatagctcat 1860
cacaaaacct caggtatgtc ttatttttct tataatcctc tgtatgttat tatccttttt 1920
attaacaaca acaactacaa caaaagtgct gctctttttc atagtctcat gtaagaagag 1980

tgtcaaaaat gtcctcggca tttgttttct cagaaaaaga atttagatat tggagaaatt 2040
atcataccat aaaaagttca aaatgtgatt catctaaaat tttggacaaa gatgaaaata 2100
tagtcagctc tgttctagtg ttcatttagt tagaaaccat agtaccggaa ctgtattata 2160
gtagaagtta atggtaccta aactctaagg aatgcttttt ctttgaaaac agaaatattt 2220
ttacttattt ctgtccacta tgtttgtgtg tatgtgtgtg tttgtgtgtg tatgtgtggt 2280
tttgatgcca gcaatgcaaa caccaatata tctattaaga agtgattgaa tttagattgg 2340
aaaaaataaa atagttacat gtaaagacat aaactctttc cttcttaaat gtgattttca 2400

actctatgat agaaactccc tctaaaaaac aagcagggca agaacaaact tacttgtaat 2460
gggtgagaga aaataagcaa atctcattgg ctcattcctg tttttaggaa gttgcagtgg 2520
gattaatgtc aattggaagg gatgcagcaa gtttagagaa ggtgttggca ctaacgctgc 2580
ttgtttggca aatcatcatc actgaggtat tccacccaga gacttttca aaaaagtcaa 2640
ctaaagtgct aagtcataag aggagagcca ttatacccgt tgtctttctg ggctccttga 2700
gtttatctgg attccaacag cacttggaaa gtaccgccct ccactacctc aaatgcaaac 2760
acaatctctg ccagtagaca ttggaattag acttagtgaa aaccaggaaa aaaaaaaaaa 2820

actaaaatat aactcagcct tagtttgcag actcaactgt caacactttg aaaccctact 2880

ccatattcaa gagagtcaac aggccctatg tcacattgta ggctaagaaa cctcagctat 2940

gactactatt tcactcaaag taagaccatg tacatcctgg attttgatat gcctgcattt 3000

tggaaaaaaa aattgaggat ttagcccagt cgctttccct tgatatagcc ttgttctgaa 3060

ttaaaatgga aaaaatattt caattatttt catcttgttc tcaactggat gttagtcaat 3120

gtggtctctt tttgaatatg tatcaaatat taatgatcca taatattagg gagataattt 3180

taaatgaagt gatacgtgtc taacttactt aaagaataag tttttggttt ttgcttttaa 3240

agacaaccaa atctgatatt gttcatcctg ataaaaataa caacttttag tgcttaaagc 3300

attaattaag caagtggcta ggtatgataa agaacttctg cttgctcccc aagaggcaaa 3360

ctattagaag aactggagcg ggagtccttt ggacccatcg tggatctctt taagccactg 3420

ctacccaaaa acattcagga caagcaaaca tttagagcaa gaatctccaa attcttcagg 3480

atttgtaatg aaatgatgtt cagttccatt ttgctcttta catagggtgg agaattgtca 3540

tgtcttctct aatttttcca agtaaagtgg tagcaaaatg ttttaaaaag caatcttata 3600

ttagaaaaca aaaatgttgt cacttgaaat accaaaacaa catttctgag cgttgttgag 3660

ggactggcaa agcaatcagc tactataaca aatcagtaga aataaccctc ccacaccaga 3720

tatgcatgca gaaggaatgg agtattatag agacttgata caatggacat atgcacatgg 3780

aggtacaaaa cacacagtct aaatacaaat gaattccatc agatttacta tacggaacat 3840

cagtagtgac agattgcact tcttacttaa taacagcaaa cttaatttct gaggggaaaa 3900

aaatggcgaa gtcttatccc aaacaaatag caagagaggt atcatcaaag agctaaaatt 3960

ttctttggca tggtaaaggg ggaaattgag tttaccaact tatttacatg acatttctct 4020

atattggtga gtaatgcaat gccattttgt tacataaagt tgtttgatgt tttttaatat 4080

gccttcatat aaatatttta ttcaatatgt tgtatttgtg aatttaacaa atgatattaa 4140

acacaaacta caatgcagac agacaaactc tttgtatgca aattagcaat acataccaac 4200

agttcttgat acacaggtac ctactacatg cagctcatca ttgctgtcct cttcccatgc 4260

tacaggtgag accagacaca aagtaaatga cctaactcaa ttacaaataa caaggacccc 4320

tctgcaatat gtctaaacat atattagaag aaagtatttg acatccttca tagggataaa 4380

tgcccttata gacaccccat atataaaaca caacagagat acacatttac ataaatctca 4440

gtcatttaca aaaataaatc ttgtcttaat ttaaaccaat aaacagactt gcaggggaaa 4500

aagaaaccag caagtagggc taattatcag taacaaatag atgggggtgt ttgctctgtg 4560

tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg tatatgtgtg tgtttgtgtg aagtgaagtg 4620

ttgctgctgt aagtagtgtc cataagccca tttgactgta ttacaagtta gttaattact 4680

catatagttg gccacatatt atgggatcta tgttttctga aaataattgg ttaatggaag 4740

ttatctaata tattttaact gttcctgtta aaaacaatag gcttcaagat gacataacac 4800

caaatcaaaa atgaccaaag gaatcatttt gtttgttaga tttgtaattt agcatcattg 4860

gcaataaatc tactcaaacg ttcaaaaaaa aaaaaaaaaa a 4901