

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2022-0045852
(43) 공개일자 2022년04월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/7105 (2006.01)

A61K 35/28 (2015.01) A61P 15/06 (2006.01)

A61P 15/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

A61K 31/7105 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0129006

(22) 출원일자 2020년10월06일

심사청구일자 2020년10월06일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

송권화

충청남도 천안시 서북구 충무로 124-24, 114동 803호

임화선

서울특별시 영등포구 63로 45, 9동 6층 61호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

정은열, 김태훈

전체 청구항 수 : 총 8 항

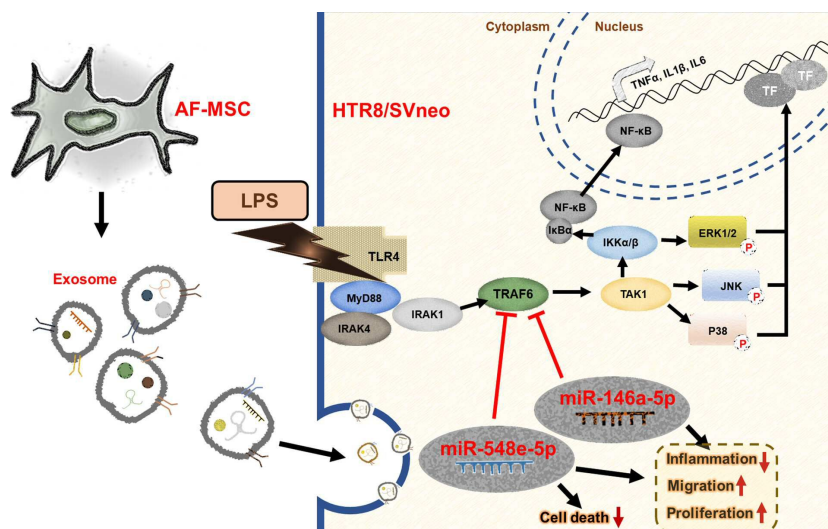
(54) 발명의 명칭 miR-146a, miR-548e 또는 이들의 혼합물을 포함하는 영양막 세포 내 염증 완화용 조성물

(57) 요약

본 발명은 miR-146a, miR-548e 또는 이들의 혼합물을 포함하는 영양막 세포 내 염증 완화용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 miR-146a, miR-548e 또는 이들의 혼합물을 포함하는 조성물은 NF- κ B 신호전달경로 내 단백질의 발현 억제를 통해 영양막 세포 내 염증 반응을 완화시킬 수 있는바, 염증성 태반 형성에 따른 임신기 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61K 35/28 (2013.01)

A61P 15/06 (2018.01)

A61P 15/08 (2018.01)

(72) 발명자

유승권

경기도 용인시 처인구 양지면 새실로 43-3

양창원

서울특별시 성북구 한천로 713, 501동 1202호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711075534

과제번호 2018R1C1B6009048

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구

연구과제명 엑소좀 유래 운반 RNA 소편을 이용하여 모체 영양불량에 의한 태반 형성, 태아 프로
그래밍의 후성유전학적 기전 규명 및 임신기 영양 평가를 위한 플랫폼 구축

기 여 율 1/1

과제수행기관명 국민대학교 산학협력단

연구기간 2018.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

miR-146a, miR-548e 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 영양막 세포 내 염증 완화용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 miR-146a 또는 miR-548e은 중간엽 줄기세포에서 분비되는 엑소솜에서 유래된 것을 특징으로 하는 영양막 세포 내 염증 완화용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 miR-146a 또는 miR-548e은 NF κ B 신호전달기전을 억제시키는 것을 특징으로 하는 영양막 세포 내 염증 완화용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 miR-146a는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 miR-146a-5p인 것을 특징으로 하는 영양막 세포 내 염증 완화용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 miR-548e는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 miR-548e-5p인 것을 특징으로 하는 영양막 세포 내 염증 완화용 조성물.

청구항 6

miR-146a, miR-548e 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 염증성 태반 형성에 따른 임신기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 임신기 질환은 자간전증, 자궁내성장지체, 유산, 조산 및 불임증으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 임신기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

miR-146a, miR-548e 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 영양막 세포의 염증 반응을 완화시키는 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 miR-146a, miR-548e 또는 이들의 혼합물을 포함하는 영양막 세포 내 염증 완화용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 영양막 세포는 태아와 모체 사이의 영양분 교환에 필수적인 세포로 영양막 세포 발달의 조절은 임신 초기 성공적인 착상과 임신 유지에 매우 중요한 요소이며(Terrade et al., Lab Invest, 2001), 영양막 세포의 정상적인 성장과 침투성 유지는 임신 초기 태반 형성을 위해 매우 중요한 것으로 보고된바 있다(Armant et al., Placenta, 2015).
- [0003] 또한, 임신 초기 태반을 구성하는 영양막 세포에서 발생하는 과도한 염증 반응은 조산을 비롯하여 자간전증, 자궁내성장지체 등의 질환을 야기하는 것으로 보고된바 있으며(Barrientos et al., Mol Hum Reprod., 2017; Sanchez-Aranguren et al., Front Physiol., 2014), 컴퓨터 모델을 이용한 분석을 통해 lipopolysaccharide (LPS)가 유도한 NF- κ B 기전의 활성화가 조산을 유도하는 중요한 신호전달기전임이 규명되었다(Sharp et al., PLoS One, 2013).
- [0004] 한편, 마이크로 RNA(miRNAs)는 짧은 (~22 뉴클레오티드), 단일가닥의, 비-코딩 RNA 분자이다. miRNA는 전사 후 유전자 조절에서 중요한 역할을 한다. miRNA는 상보적인 염기쌍 형성(base pairing)을 통해 메신저 RNA(mRNA) 분해 또는 번역 억제(translational repression)를 유도한다. 인간 게놈에서 1000개 이상의 miRNA가 동정되어 있다(miRBase). 대부분의 miRNA는 하나 이상의 mRNA를 동시에 표적한다. 또한, 여러 miRNA는 동일한 mRNA를 표적하며, 이는 상승적 효과를 유도할 수 있다. miRNA는 분화, 증식, 세포자살, 대사 항상성, 종양형성 및 DNA 메틸화와 같은 다양한 세포 과정들에서 중요한 역할을 한다 (Li H, et al., Hypertension 2003;42(5):895-900). 따라서 miRNA 발현의 프로파일링은 생리학적, 병리학적 상태의 조사에 대한 중요한 정보를 제공할 수 있다.
- [0005] 진술한 기술적 배경하에서, 본 발명자들은 영양막 세포 내 염증 완화를 통해 정상적인 태반을 형성하고, 염증성 태반에 따른 임신기 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 물질을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 중간엽 줄기 세포 유래 엑소솜 내 miR-146a와 miR-548e가 임신 초기 태반을 구성하는 영양막 세포에서 우수한 항염증효과를 나타냄을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명은 miR-146a, miR-548e 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 영양막 세포 내 염증 완화용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0007] 또한, 본 발명은 miR-146a, miR-548e 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 염증성 태반 형성에 따른 임신기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0008] 또한, 본 발명은 miR-146a, miR-548e 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 영양막 세포의 염증 반응을 완화시키는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여, miR-146a, miR-548e 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 영양막 세포 내 염증 완화용 조성물을 제공한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 miR-146a, miR-548e 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 염증성 태반 형성에 따른 임신기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 miR-146a, miR-548e 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 조성물을 이용하여 영양막 세포의 염증 반응을 완화시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0012] 본 발명에 따른 miR-146a, miR-548e 또는 이들의 혼합물을 포함하는 조성물은 NF- κ B 신호전달경로 내 단백질의 발현 억제를 통해 영양막 세포 내 염증 반응을 완화시킬 수 있는바, 염증성 태반 형성에 따른 임신기 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품과 관련된 분야에서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 도 1은 중간엽 줄기세포와의 공생배양에 따른 영양막 세포 내 염증 완화 효과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 중간엽 줄기세포와의 공생배양에 따른 영양막 세포와 엑소좀 내 miRNA 발현 변화 양상을 나타낸 것이다.
- 도 3은 miR-146a와 miR-548e의 영양막 내 NF- κ B 신호전달기전 조절 효과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀 처리에 따른 영양막 세포 내 항염증 효과를 나타낸 것이다.
- 도 5는 miR-146a, miR-548e 조절에 따른 영양막 세포 특성 변화를 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 miR-548e 조절에 따른 영양막 세포 내 산화 스트레스 및 미토콘드리아 막 전위 분석 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 염증성 조산 동물모델 내 중간엽 줄기세포 주입에 따른 질환 예방 및 치료 효과를 나타낸 것이다.
- 도 8은 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀 내 miR-146a, miR-548e에 의한 영양막 세포 내 항염증 반응 기전을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 일반적으로, 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술 분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.
- [0016] 본 발명에서 사용되는 용어에 대한 정의는 아래와 같다.
- [0017] 본 발명에서 사용된 용어 "핵산"은 임의의 DNA 또는 RNA, 예를 들어, 조직 샘플에 존재하는 염색체, 미토콘드리아, 바이러스 및/또는 세균 핵산을 포함하는 의미이다. 이중가닥 핵산 분자의 하나 또는 두개 모두의 가닥을 포함하고, 무순상 핵산 분자의 임의의 단편 또는 일부를 포함한다.
- [0018] 본 발명에서 사용된 용어 "유전자"는 단백질 코딩 또는 전사시에 또는 다른 유전자 발현의 조절시에 기능적 역할을 갖는 임의의 핵산 서열 또는 그의 일부를 의미한다. 유전자는 기능적 단백질을 코딩하는 모든 핵산 또는 단백질을 코딩 또는 발현하는 핵산의 일부만으로 이루어질 수 있다. 핵산 서열은 엑손, 인트론, 개시 또는 종료 영역, 프로모터 서열, 다른 조절 서열 또는 유전자에 인접한 특유한 서열 내에 유전자 이상을 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 사용된 용어 "유전자 발현"은 일반적으로 생물학적 활성이 있는 폴리펩티드가 DNA 서열로부터 생성되고 세포에서 생물학적 활성을 나타내는 세포 과정을 의미한다. 그런 의미로, 유전자 발현은 전사 및 해독 과정을 포함할 뿐만 아니라, 유전자 또는 유전자 산물의 생물학적 활성에 영향을 끼칠 수 있는 전사후 및 해독후 과정을 포함한다. 상기 과정들은 RNA 합성, 가공 및 수송뿐만 아니라, 폴리펩티드 합성, 수송 및 폴리펩티드의 해독후 변형을 포함하지만, 이들에 국한되는 것은 아니다. 단백질 산물을 암호화하지 않는 유전자, 예컨대, miRNA 유전자의 경우에, "유전자 발현"이란 용어는 전구체 miRNA가 유전자로부터 생성되는 과정을 의미한다. 통상, 상기 과정은, 단백질 암호 유전자에 대해 RNA 폴리머라제 II에 의해 유도되는 전사와는 달리, miRNA 유전자의 전사 산물이 해독되어 단백질을 생성하지 않지만, 전사로 언급된다. 그럼에도 불구하고, miRNA 유전자로부터 성숙 miRNA의 생성은 그 용어가 본원에 사용되는 대로 "유전자 발현"이란 용어에 의해 포함된다.
- [0020] 본 발명에서 사용된 용어 "miR" 또는 "마이크로 RNA"는 표적 RNA의 분해(degradation)을 촉진시키거나 또는 그들의 번역을 억제시킴으로써 유전자 발현을 전사 후에 조절하는 21 내지 23개의 비코딩 RNA를 말한다. 본원에 사용된 miRNA의 성숙 서열은 miRNA 데이터베이스 (<http://www.mirbase.org>)에서 얻을 수 있다. 일반적으로 마이크로 RNA는 pre-miRNA라 불리는 헤어핀 구조를 갖는 약 70-80 nt (nucleotide) 길이의 전구체로 전사된 후, RNase III 효소인 Dicer에 의해 잘려 성숙된 형태로 생성된다. 마이크로 RNA는 miRNP라 불리는 리보뉴클레오타이드 복합체를 형성하여 표적 부위에 상보적 결합을 통해 표적 유전자를 절단하거나, 번역을 억제한다. 30% 이상의 인간 miRNA는 클러스터로 존재하며, 하나의 전구체로 전사된 후, 절단과정을 거쳐 최종 성숙 miRNA가 형성된다.
- [0021] 본 발명에서 사용된 용어 "표적 유전자 (target gene)"란 본원에 개시되는 주제의 방법 및 조성물을 사용하여 조절하기 위해 표적으로 삼는 유전자를 의미한다. 따라서, 표적 유전자는 그 발현 레벨이 mRNA 또는 폴리펩티드 레벨로 miRNA에 의해 하향 조절되는 핵산 서열을 포함한다. 유사하게, "표적 RNA" 또는 "표적 mRNA"란 용어는 miRNA가 결합하여 표적 유전자의 발현의 조절을 유도할 표적 유전자의 전사체를 의미한다.

- [0022] 본 발명에서 사용된 용어 "전사 (transcription)"는 유전자의 암호 서열에 존재하는 구조 정보의 RNA로서 발현을 유도하는 유전자와 RNA 폴리머라제의 상호작용을 포함하는 세포 과정을 의미한다.
- [0023] 본 발명에서 사용된 "하향 조절(down-regulation)"이라는 표현은, 정상조직세포에 비하여, 활성화된 세포에서 세포내 전사(gene transcription) 또는 번역(gene translation)에 의해서 특정 유전자의 mRNA로의 발현 또는 단백질로 발현량이 현저하게 감소된 것을 의미한다.
- [0024] 본 발명에서 사용된 용어 "도입"은 형질감염(transfection) 또는 형질도입(transduction)에 의해 외래 DNA를 세포로 유입시키는 것을 의미한다. 형질감염은 칼슘 포스페이트-DNA 공침전법, DEAE-덱스트란-매개 형질감염법, 폴리브렌-매개 형질감염법, 전기충격법, 미세주사법, 리포좀 융합법, 리포펙타민 및 원형질체 융합법 등의 당분야에 공지된 여러 방법에 의해 수행될 수 있다. 또한, 형질도입은 감염(infection)을 수단으로 하여 바이러스 또는 바이러스 벡터 입자를 사용하여 세포 내로 유전자를 전달시키는 것을 의미한다.
- [0025] 본 발명에서 사용된 용어 "유효량"은, 이롭거나 바람직한 임상적 또는 생화학적 결과에 영향을 주는 적절한 양이다. 유효량은 한번 또는 그 이상 투여될 수 있다. 본 발명의 목적을 위하여, 저해제 화합물의 유효량은 질병 상태의 진행을 일시적으로 완화, 개선, 안정화, 되돌림, 속도를 늦춤 또는 지연시키는데 적절한 양이다. 만약, 수혜동물이 조성물의 투여에 견딜 수 있거나, 조성물의 그 동물에의 투여가 적합한 경우라면, 조성물은 "약학적으로 또는 생리학적으로 허용 가능함"을 나타낸다. 투여된 양이 생리학적으로 중요한 경우에는 상기 제제는 "치료학적으로 유효량"으로 투여되었다고 말할 수 있다. 상기 제제의 존재가 수혜 환자의 생리학적으로 검출가능한 변화를 초래한 경우라면 상기 제제는 생리학적으로 의미가 있다.
- [0026] 본 발명에서 사용된 용어 "치료"는 이롭거나 바람직한 임상적 결과를 수득하기 위한 접근을 의미한다. 본 발명의 목적을 위해서, 이롭거나 바람직한 임상적 결과는 비제한적으로, 증상의 완화, 질병 범위의 감소, 질병 상태의 안정화 (즉, 악화되지 않음), 질병 진행의 지연 또는 속도의 감소, 질병 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감 (부분적이거나 전체적으로), 검출가능하거나 또는 검출되지 않거나의 여부를 포함한다. 또한, "치료"는 치료를 받지 않았을 때 예상되는 생존율과 비교하여 생존율을 높이는 것을 의미할 수도 있다. 치료는 치료학적 치료 및 예방적 또는 예방조치 방법 모두를 가리킨다. 상기 치료들은 예방되는 장애뿐만 아니라 이미 발생한 장애에 있어서 요구되는 치료를 포함한다.
- [0027] 본 발명에서 사용된 용어 "예방"은 관련 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 본원의 조성물은 초기 증상, 또는 나타나기 전에 투여할 경우 관련 질환을 예방할 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이다.
- [0028] 본 발명에서 사용된 용어 "조성물"은 특정 성분을 포함하는 산물뿐만 아니라, 특정 성분의 배합에 의해 직접 또는 간접적으로 만들어지는 임의의 산물을 포함하는 것으로 간주된다.
- [0030] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0031] 본 발명에서는 miR-146a, miR-548e에 의한 영양막 세포 내 항염증 반응 기전을 밝혔다(도 8). 구체적으로, 본 발명의 miR-146a, miR-548e 또는 이들의 조합은 NF- κ B 신호전달경로 내 단백질의 발현 억제를 통해 영양막 세포 내 염증 반응을 완화시킬 수 있다.
- [0032] 따라서, 본 발명에서는 miR-146a, miR-548e 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 영양막 세포 내 염증 완화용 조성물을 제공한다.
- [0033] 이때, 상기 영양막 세포는 포유동물 유래의 세포일 수 있으며, 상기 포유동물은 설치목(예를 들어, 생쥐, 쥐, 햄스터, 게르빌루스 및 기니피그), 우제목(예를 들어, 소, 양, 돼지, 염소, 사슴, 기린 및 영양), 기제목(예를 들어, 말, 당나귀, 코뿔소 및 맥), 식육목(예를 들어, 개, 고양이, 호랑이, 늑대, 여우, 사자, 치타, 표범, 너구리, 오소리, 퓨마, 재규어 및 샴쌍이), 토끼목(토끼 및 우는 토끼), 식충목(예를 들어, 고슴도치, 두더지 및 슬래노돈) 및 영장목(예를 들어, 침팬지, 오랑우탄, 고릴라, 보노보노, 일본원숭이, 붉은털원숭이)일 수 있다.
- [0034] 본 발명에서 이용할 수 있는 마이크로RNA(이하, miRNA라 함)는 인간을 포함한 동물, 예를 들어 원숭이(monkeys), 돼지(pigs), 말(horses), 소(cows), 양(sheeps), 개(dogs), 고양이(cats), 생쥐(mice), 토끼(rabbits) 등으로부터 유래할 수 있으며, 바람직하게는 이들의 중간엽 줄기세포에서 분비되는 엑소솜에서 유래할 수 있으며, 바람직하게는 인간 유래의 miR-146a 및 miR-548e 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 miR이고, 더욱 바람직하게는 상기 miR-146a는 표 1의 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 miR-146a-5p이며, 상기

miR-548e는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어진 miR-548e-5p이다. 본 발명의 miRNA 핵산 분자는 18 내지 100 nt(nucleotide) 길이를 가질 수 있으며, 바람직하게는 성숙 miR-146a 및 miR-548e로서 19 내지 25nt 길이, 더욱 바람직하게는 22nt 길이를 가진다. 또한, 본 발명의 miR-146a 및 miR-548e 핵산분자는 50 내지 100nt, 바람직하게는 65-95nt 길이를 갖는 전구체 miR-146a 및 miR-548e 핵산분자로서 제공될 수도 있다.

표 1

miRNA	서열	서열번호
miR-146a	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU	서열번호 1
miR-548e	CAAAAGCAAUCGCGGUUUUGC	서열번호 2

[0035]

또한, 본 발명에서 사용되는 miR-146a 및 miR-548e는 이를 구성하는 핵산 분자의 작용성 등가물, 예를 들어, miR-146a 및 miR-548e 핵산 분자의 일부 염기서열이 결실(deletion), 치환(substitution) 또는 삽입(insertion)에 의해 변형되었지만, miR-146a 및 miR-548e 핵산분자와 기능적으로 동일한 작용을 할 수 있는 변이체(variants)를 포함하는 개념이다. 본 발명에서는 상기 변이체를 모방체(mimics)라고도 한다.

[0037]

또한, 본 발명의 miR-146a 및 miR-548e로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 miR는 단일 가닥 또는 이중 가닥 형태로 존재할 수 있다. 성숙 miRNA 분자는 주로 단일 가닥으로 존재하지만, 전구체 miRNA 분자는 주로 이중가닥 부분을 형성할 수 있는 적어도 부분적으로 자가-상보적인(예를 들어 스템- 및 루프-구조)이다. 또한, 본 발명의 핵산 분자는 RNA, DNA, PNA(peptide nucleic acids) 또는 LNA(locked nucleic acid) 같은 형태로 구성될 수 있다.

[0038]

본 발명의 상기 핵산분자는 표준 분자 생물학 기술, 예를 들어 화학적 합성 방법 또는 재조합 방법을 이용하여 분리 또는 제조하거나, 시판되는 것을 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 miRNA 핵산 분자 자체뿐만 아니라, 세포 내에서 본 발명의 miRNA의 발현율을 증가시킬 수 있는 기타의 물질, 예를 들어 화합물, 천연물, 신규 단백질 등을 포함할 수 있다.

[0039]

한편, 본 발명의 조성물 내 miR-146a 및 miR-548e로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 miR 분자는 세포 내 발현을 위한 벡터에 포함되어 제공될 수 있다.

[0040]

본 발명의 miR-146a 및 miR-548e로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 miR 분자는 DNA 및 DEAE-텍스트란의 복합체, DNA 및 핵 단백질의 복합체, DNA 및 지질의 복합체 등의 다양한 형질전환 기술을 이용하여 세포 내로 도입시킬 수 있는데, 이를 위해 상기 miR-146a 및 miR-548e 핵산 분자는 세포 내로의 효율적인 도입을 가능하게 하는 전달체 내에 포함된 형태일 수 있다. 상기 전달체는 바람직하게는 벡터이며, 바이러스 벡터 및 비바이러스 벡터 모두 사용 가능하다. 바이러스 벡터(viral vector)로서 예를 들면, 렌티바이러스(lentivirus), 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(adenovirus), 헤르페스바이러스(herpes virus) 및 아비폭스바이러스(avipox virus) 벡터 등을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 렌티바이러스 벡터이지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 렌티바이러스는 레트로바이러스의 일종으로 핵공(nucleopore)이나 완전한 핵막으로의 능동 도입을 가능하게 하는 사전-통합 복합체(바이러스 "셸(shell)")의 친핵성으로 인해 분열 세포 뿐만 아니라 미분열 세포도 감염시킬 수 있는 특징이 있다.

[0041]

또한, 상기 miR-146a 및 miR-548e로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 miR 분자를 포함하는 벡터는 선별마커를 추가로 포함하는 것이 바람직하다. 본 발명에서 용어 "선별마커(selection marker)"란 miR-146a 및 miR-548e 핵산분자가 도입되어 형질전환된 세포의 선별을 용이하게 하기 위한 것이다. 본 발명의 벡터에서 사용할 수 있는 선별마커로는 벡터의 도입 여부를 용이하게 검출 또는 측정할 수 있는 유전자라면, 특별히 한정되지 않으나, 대표적으로 약물 내성, 영양 요구성, 세포 독성제에 대한 내성 또는 표면 단백질의 발현과 같은 선택가능 표현형을 부여하는 마커들, 예를 들어 GFP(녹색 형광 단백질), 푸로마이신(puromycin), 네오마이신(Neomycin: Neo), 하이그로마이신(hygromycin: Hyg), 히스티딘올 디하이드로게나제(histidinol dehydrogenase gene: hisD) 및 구아닌 포스포리보실트랜스퍼라제(guanine phosphosribosyltransferase: Gpt) 등이 있으며, 바람직하게는 GFP(녹색 형광 단백질) 및 푸로마이신 마커를 사용할 수 있다.

[0042]

또한, 본 발명의 조성물 내 miR-146a 및 miR-548e 핵산 분자는 세포에 도입된 형태로 제공될 수 있다.

[0043]

또한, 본 발명은 miR-146a, miR-548e 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 염증성 태반 형성에 따른 임

[0044]

신기 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [0045] 이때, 상기 임신기 질환은 염증성 태반 형성에 따라 유발되는 것이라면 모두 가능하며, 예를 들어 자간전증, 자궁내성장지체, 유산, 조산 및 불임증으로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0046] 본 발명의 miR-146a 및 miR-548e로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 miR로 이루어진 핵산 분자를 포함하는 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함할 수 있으며, 담체와 함께 제제화될 수 있다. 본 발명에서 용어, "약학적으로 허용가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않고 투여 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 말한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용되는 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로오스 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 조성물은 miR-146a 및 miR-548e로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 miR의 핵산분자를 유효성분으로 포함하는 어떠한 제형으로도 적용가능하며, 경구용 또는 비경구용 제형으로 제조할 수 있다. 본 발명의 약학적 제형은 구강(oral), 직장(rectal), 비강(nasal), 국소(topical; 볼 및 혀 밑을 포함), 피하, 질(vaginal) 또는 비경구(parenteral; 근육내, 피하 및 정맥내를 포함) 투여에 적당한 것 또는 흡입(inhalation) 또는 주입(insufflation)에 의한 투여에 적당한 형태를 포함한다.
- [0048] 본원에 따른 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0049] 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설물 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 매우 다양하며, 적절한 투여량은 예를 들면 환자의 체내에 축적된 약물의 양 및/또는 사용되는 폴리뉴클레오타이드의 구체적 효능정도에 따라 달라질 수 있다. 일반적으로 인비보 동물모델 및 인비트로에서 효과적인 것으로 측정된 EC50을 기초로 계산될 수 있으며, 예를 들면 체중 1kg당 0.01 μ g 내지 1 g 일 수 있으며, 일별, 주별, 월별 또는 연별의 단위 기간으로, 단위 기간 당 일회 내지 수회 나누어 투여될 수 있으며, 또는 인퓨전 펌프를 이용하여 장기간 연속적으로 투여될 수 있다. 반복투여 횟수는 약물이 체내 머무는 시간, 체내 약물 농도 등을 고려하여 결정된다. 질환 치료 경과에 따라 치료가 된 후라도, 재발을 위해 조성물이 투여될 수 있다.
- [0050] 본원 조성물은 본원의 miR-146a 및 miR-548e로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 miR에 질환의 치료와 관련하여 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 또는 유효성분의 용해성 및/또는 흡수성을 유지/증가시키는 화합물을 추가로 함유할 수 있다. 또한 선택적으로, 화학치료제, 항염증제, 항바이러스제 및/또는 면역조절제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0051] 또한, 본 발명의 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.
- [0052] 또한, 본 발명은 시험관 내에서 miR-146a 및 miR-548e로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나의 miR을 이용하여 영양막 세포의 염증 반응을 완화시키는 방법을 제공한다.
- [0053] 또한, 본 발명은 miR-146a 및 miR-548e로 이루어진 군 중에서 선택되는 어느 하나 이상의 miR를 유효성분으로 포함하는 임신기 질환의 예방 또는 개선용 식품 주성분을 제공할 수 있으며, 본 발명에 따른 상기 식품 조성물은 임신성 질환 증상의 예방 또는 개선에 효과가 있는 식품, 예컨대, 식품의 주원료, 부원료, 식품 첨가제, 기능성 식품 또는 음료로 용이하게 활용할 수 있다.
- [0054] 본원에서 상기 식품이란, 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서,

식품, 식품 첨가제, 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 것을 말한다.

[0055] 본원발명에 따른 상기 식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본원발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 캔디류, 초코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0056] 또한, 상기 기능성 식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미하며, 구체적으로는 건강 기능성 식품일 수 있다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0057] 또한, 본원발명에서 상기 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함한다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 임신기 질환 증상의 예방 또는 개선용 조성물을 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0058] 나아가 상기 기술한 것 이외에 본원발명의 임신기 질환 증상의 예방 또는 개선을 위한 식품 조성물을 함유하는 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0059] 본원발명의 식품 조성물을 함유하는 식품에 있어서, 상기 본 발명에 따른 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.001중량% 내지 90중량%로 포함할 수 있으며, 바람직하게는 0.1중량% 내지 40중량%로 포함할 수 있고, 음료의 경우, 100ml를 기준으로 0.001g 내지 2g, 바람직하게는 0.01g 내지 0.1g의 비율로 포함할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효 성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있으므로 상기 범위에 한정되는 것은 아니다.

[0061] [실시예]

[0062] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0064] 실험방법

[0065] 세포배양 및 실험동물

[0066] 영양막 세포 (HTR8/SVneo)는 American Type Culture Collection에서 구매하여 사용하였으며, 세포의 단층배양을 위해서 2.05 mM L-Glutamine이 함유된 RPMI-1640 배지에 5%의 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)을 함께 혼합하여 사용하였다. 양수 유래 중간엽 줄기세포 (AF-MSC) 세포는 기존 문헌에서 기술한 대로 구축하였으며 분화, 증식, 면역표현형 등에서 중간엽 줄기세포의 특성을 검증하였다 (Yoon *et al.*, Stem Cells Dev., 2010; Jun EK *et al.*, J Mol Sci., 2014). AF-MSC 세포는 10%의 소태아혈청, 1% L-Glutamine, 4 ng/mL bFGF이 혼합된 DMEM 배지를 사용하였다. 모든 동물실험은 고려대학교의 동물실험윤리위원회(IACUC)의 승인 하에 실시되었다 (KOREA-2017-0060). 임신 17일째의 ICR 마우스(DBL)에 LPS 1 mg/kg을 주입한 즉시 중간엽 줄기세포를 복강내로 주입하였다. 마우스는 다음과 같이 세 그룹으로 구분되었다. 1) PBS를 주입한 대조군 그룹 (n=20), 2) LPS를 주입한 임신기 질환 모방 그룹 (n=20), 3) 임신기 질환 모방 그룹에 LPS와 함께 AF-MSC 세포를 주입한 그룹

(n=20). 그룹 3의 마우스 중 10마리가 임신기 질환을 나타냄을 확인하였다.

[0068] HTR8/SVneo 세포와 AF-MSC 세포의 공생 배양

[0069] HTR8/SVneo 세포는 6well plate에 분주되었으며 배양 접시의 70%를 채울 때까지 배양되었다. 한편 AF-MSC 세포를 transwell membrane의 위쪽 면에 분주하여 배양하였다. HTR8/SVneo는 혈청을 제거한 배지에서 24 시간 동안 배양되었으며 이후 AF-MSC가 배양된 transwell membrane을 6well plate로 옮겨 두 세포가 공생 배양될 수 있도록 하였다. 이 때 LPS를 1 µg/mL의 농도로 처리하여 HTR8/SVneo 세포에 염증 반응을 유발하였다.

[0071] 생명정보학을 이용한 miRNA의 표적 유전자 스크리닝

[0072] miRDB (<http://mirdb.org/>) 데이터베이스를 이용하여 miR-146a, miR-548e가 표적하는 유전자를 선정하였다. TRAF6 (GenBank Accession : NM_145803)와 IRAK1(GenBank Accession : NM_001025242)이 miR-146a에 대해 100의 Target score를 보였으며 TRAF6는 miR-548e에 대해 97의 Target score를 보임을 확인하였다.

[0074] mRNA 발현 분석 (qPCR)

[0075] Trizol reagent (Invitrogen)을 이용하여 전체 RNA를 추출하였다. 이후, 1 µg의 RNA를 AccuPower RT PreMix (Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 유전자 발현은 SYBR Green (Sigma)과 StepOnePlus Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA)를 이용하여 측정하였다. PCR 조건은 95°C에서 3분동안 인큐베이션 후 95°C 30초, 60°C 30초, 72°C 3분 조건을 40회 증폭하였으며 GAPDH 발현량에 기반하여 정규화하였다. ROX dye (Cat No: 12223012, Invitrogen)가 형광 측정에 대한 음성 대조군으로 사용되었다. 상대적인 유전자의 발현은 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 수식에 기반하여 정량화되었다. 실험에 사용된 프라이머의 서열은 표 2에 표기하였다.

표 2

유전자 (Gene)	종 (Species)	순방향 프라이머 (Sense primer) (5'→3')	역방향 프라이머 (Antisense primer)(5'→3')
<i>GAPDH</i>	<i>H. sapiens</i>	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	TGACAAAGTGGTCGTGAGG
<i>NF-κB</i>	<i>H. sapiens</i>	TCTGTGTTGTCCAGCTTCG	GCTTCTGACGTTTCCTCTGC
<i>TRAF6</i>	<i>H. sapiens</i>	TCAAACGAACCATTCGAACC	TCCAAAGTTGCCAATCTTCC
<i>IRAK1</i>	<i>H. sapiens</i>	GGGTGGTAGTGTAGAGACC	GTGCTTCTCAAAGCCACTCC
<i>IL1β</i>	<i>H. sapiens</i>	GCATCCAGCTACGAATCTCC	GCATCTTCTCAGCTGTGCC
<i>IL6</i>	<i>H. sapiens</i>	CACACAGACAGCCACTCACC	AGGTGTTTTCTGCCAGTGC
<i>IL8</i>	<i>H. sapiens</i>	TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG	GATAAATTTGGGGTGAAAGG
<i>GAPDH</i>	<i>M. musculus</i>	AACTTTGGCATTGTGGAAGG	ATGCAGGGATGATGTTCTGG
<i>NFκB</i>	<i>M. musculus</i>	CCAGAAGAGGGTGTGAGAGC	CAGTTCCTGAGGGATCATCG
<i>IRAK1</i>	<i>M. musculus</i>	GGACACAAGGTGCAAAGACC	ACACCCACCCACAGAGTAGG
<i>TRAF6</i>	<i>M. musculus</i>	AGAACTGCTTGCCCTTCAGC	GCGGGTAGAGACTTCACAGC
<i>TNFα</i>	<i>M. musculus</i>	GTTCTGCAAAGGAGAGTGG	CACCTCAGGGAAGAATCTGG
<i>IL1β</i>	<i>M. musculus</i>	TGTGGATCCCAAGCAATACC	TACCAGTTGGGGAATCTGC
<i>IL6</i>	<i>M. musculus</i>	CCGAGAGGAGACTTCACAG	TCCACGATTTCCAGAGAAC

[0078] microRNA 발현 분석

[0079] 영양막 세포 내 microRNA 발현 분석을 위한 cDNA 합성을 위해 miRNA first-strand cDNA syntehsis kit (Agilent Technologies)를 이용하였다. 또한 miRNA의 expression은 High-Specificity miRNA QPCR Core Reagent Kit (Agilent Technologies)를 이용하였다. miRNA 발현량은 U6 snRNA 발현량에 기반하여

정규화하였다. 상대적인 miRNA의 발현은 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 수식에 기반하여 정량화되었다. 실험에 사용된 프라이머의 서열은 표 3에 표기하였다.

표 3

miRNA	종 (Species)	프라이머 서열 (5'→3')	전구체 miRNA의 NCBI Gene ID
miR-146a-5p	<i>H. sapiens</i>	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU	406938
miR-146a-3p	<i>H. sapiens</i>	CCUCUGAAAUUCAGUUCUUCAG	406938
miR-146b-5p	<i>H. sapiens</i>	UGAGAACUGAAUCCAUGGCUG	574447
miR-548e-5p	<i>H. sapiens</i>	CAAAAGCAAUCGCGUUUUUGC	100313921
miR-146a-5p	<i>M. musculus</i>	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU	387164
miR-146a-3p	<i>M. musculus</i>	CCUGUGAAAUUCAGUUCUUCAG	387164
miR-146b-5p	<i>M. musculus</i>	UGAGAACUGAAUCCAUGGCU	751550

엑소좀 동정

대략 100 mL의 세포 배양배지는 $3,000 \times g$ 의 속도로 15분 동안 원심분리 되었다. 이후 상층액을 취한 후 Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter Units (Merck, catalog number: C7715)를 이용하여 다시 한번 $4,000 \times g$ 의 속도로 1시간 동안 원심분리하여 농축되었다. 농축된 배양 배지 내 엑소좀은 Total Exosome Isolation reagent (Thermo Fisher Scientific, catalog number: 4478359)와 함께 16시간 동안 인큐베이션 하였다. 이후 엑소좀을 $10,000 \times g$ 의 속도로 1시간 동안 원심분리한 후, Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, catalog number: 4478545)를 이용하여 전체 RNA와 단백질을 추출하였다. 엑소좀 추출을 확인하기 위하여 엑소좀 표면 단백질 HSP70 및 CD63에 대한 항체를 System Biosciences (Palo Alto, CA, USA)에서 구입하여 웨스턴 블롯 실험에 사용하였다.

단백질 발현 분석 (웨스턴블롯)

영양막 세포로부터 전체 단백질을 추출하여 Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)로 단백질을 정량하였다. 이후, 추출한 단백질을 95°C 에서 5분간 변성하였으며 10% SDS/PAGE 겔을 이용하여 전기영동 수행한 뒤, nitrocellulose membrane으로 옮겨주고, 1차 항체와 2차 항체를 차례로 인큐베이션 시킨 다음 chemiluminescence detection (SuperSignal West Pico, Pierce, Rockford, IL, USA) 시약 및 ChemiDoc EQ system과 Quantity One software (Bio-Rad) 기기를 사용하여 타겟 단백질의 발현을 분석하였다. α -tubulin (TUBA) 또는 전체 단백질 (total protein)의 발현이 타겟 단백질의 발현을 보정하기 위해 사용되었다. 모든 실험은 최소 3번 반복하여 수행되었다. 실험에 사용된 항체에 대한 정보는 표 4에 표기되었다.

표 4

1차 항체	희석 농도	제조사	제조 번호
HSP70	1:1000	System Biosciences	EXOAB-Hsp70A-1
CD63	1:1000	System Biosciences	EXOAB-CD63A-1
NF- κ B	1:1000	Cell Signaling Technology	8242
IKK α	1:1000	Cell Signaling Technology	11930
IKK β	1:1000	Cell Signaling Technology	2678
TAK1	1:1000	Cell Signaling Technology	5206
IRAK1	1:1000	Cell Signaling Technology	4504
IRAK4	1:1000	Cell Signaling Technology	4363
TRAF6	1:1000	Cell Signaling Technology	8028
MyD88	1:1000	Cell Signaling Technology	4283
TUBA	1:2000	Santa Cruz	sc-5286
Phosphor-AKT (Ser ⁴⁷³)	1:1000	Cell Signaling Technology	4060
AKT	1:1000	Cell Signaling Technology	9272

Phosphor-JNK (Thr ¹⁸³ /Tyr ¹⁸⁵)	1:1000	Cell Signaling Technology	4668
JNK	1:1000	Cell Signaling Technology	9252
Phosphor-ERK1/2 (Thr ²⁰² /Tyr ²⁰⁴)	1:1000	Cell Signaling Technology	9101
ERK1/2	1:1000	Cell Signaling Technology	4695
Phosphor-P38 (Thr ¹⁸⁰ /Tyr ¹⁸²)	1:1000	Cell Signaling Technology	4511
P38	1:1000	Cell Signaling Technology	9212

[0089] Transfection

[0090] HTR8/SVneo 세포를 6 well에 배양하고, 비특이적 miRNA 대조군, miR-146a, miR-548e에 대한 mimic 및 억제제, 또는 siRNA를 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용하여 transfection 하였다. LPS 처리를 위해 먼저 37℃ /5% CO₂ 인큐베이터 내에서 6시간 동안 oligonucleotide를 transfection한 후 배지를 제거하고 LPS를 18시간 동안 추가로 처리하였다. 모든 RNA oligonucleotide는 Bioneer (Daejeon, Korea)에서 합성되었다.

[0092] 세포 이주성 분석

[0093] 세포 이주성 변화는 Ibidi migration culture dish inserts (Ibidi, Munich, Germany)를 이용하여 분석되었다. HTR8/SVneo 세포는 culture inserts에 가득찰 때까지 배양되었고 이후 miRNA 대조군 및 miR-146a, miR-548e에 대한 억제제를 transfection 하였다. 24시간 동안 배양한 후 두 inserts 사이의 간격을 분석하기 위해 DM3000 광학현미경을 통해 이미지를 확보하였다.

[0095] 면역형광법

[0096] 3×10^4 개의 HTR8/SVneo 세포를 5% FBS가 포함된 배지 300 μ L와 함께 confocal dish (catalog number: 100350, SPL Life Science, Republic of Korea)에 분주하여 배양한 뒤, 40 nM의 miR-146a, miR-548e에 대한 억제제를 transfection 하였고 분석 전까지 48시간 동안 배양하였다. 이 후, 메탄올로 10분간 세포를 고정하고, 2 μ g/ml 로 희석된 PCNA 항체를 처리하였으며 대조군에는 mouse IgG를 처리하여 4℃에서 16시간 인큐베이션 하였다. 이 후, 0.1% BSA (bovine serum albumin)가 포함된 PBS로 2번의 워싱과정을 거쳐 2차 항체로는 goat anti-mouse IgG Alexa 488 (catalog number: A-11001, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 antibody dilution buffer에 1:200으로 희석하여 상온에서 1시간 동안 배양하였다. 세포를 0.1% BSA-PBS로 워싱한 다음 DAPI 염색을 추가적으로 시행하여 세포 내 타겟 단백질뿐만 아니라 핵을 동시에 관찰할 수 있도록 하였다. 실험 종료 후 LSM710 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA) 공초점 현미경을 이용하여 세포를 관찰 및 촬영하였다.

[0098] Annexin V와 propidium iodide 염색을 통한 세포사멸 분석

[0099] miR-146a, miR-548e 억제제에 의한 HTR8/SVneo 세포의 사멸 효과를 확인하기 위하여 FITC Annexin V 세포 사멸 진단 키트 I (BD Biosciences)를 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저 5×10^5 세포를 6 well에 배양하고 70 ~ 80% 배양 접시에 세포가 찼을 때 20, 40, 80 nM의 miR-146a, miR-548e 억제제를 transfection한 후 분석 전까지 48 시간 동안 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 PBS로 워싱을 진행하고 1 mL의 1× binding buffer를 사용하여 세포를 천천히 혼합하고 원심분리하여 세포 pellet을 얻었다. 다음으로, 200 μ L의 1× binding buffer으로 세포현탁 배양하여 브라운 1.5 mL 튜브에 100 μ L 넣고 Annexin V 5 μ L, PI 5 μ L를 함께 혼합하여 세포를 15분 동안 실온에 두어 염색하였다. 이후 1× binding buffer를 400 μ L 추가하여 5 mL FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 사멸된 세포의 수를 측정하였다.

- [0101] 세포 주기 분석
- [0102] miR-548e 억제제에 의한 HTR8/SVneo 세포의 세포주기 변화 양상을 확인하기 위하여 5×10^5 세포를 6 well에 배양하고 70 ~ 80% 배양 접시에 세포가 찼을 때 miR-146a, miR-548e 억제제를 transfection 하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 0.1% BSA/PBS로 워싱을 진행하고 70% Ethanol에서 24시간 동안 세포를 고정시켰다. 이후, 0.1% BSA/PBS로 워싱하고 RNase A (Sigma) 처리 하에서 PI 염색을 수행하였다. FACS 튜브에 염색된 용액을 옮겨 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하여 세포 주기를 분석하였다.
- [0104] DCFH-DA를 이용한 세포내 ROS 측정
- [0105] HTR8/SVneo 세포 내 ROS 생성에 miR-548e 억제제 및 TRAF6에 대한 siRNA (siTRAF6)가 미치는 영향을 확인하기 위하여 peroxide 존재 하에 2', 7'-dichlorofluorescein (DCF)로 변환되어 형광을 띠는 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, Sigma)를 사용하였다. HTR8/SVneo 세포에 miR-548e 억제제 또는 siTRAF6를 transfection한 후 분석 전 24시간 동안 배양하였다. 이후, 트립신을 통해 떼어내고 원심분리를 통해 세포 pellet을 얻었다. 이후, PBS로 한번 워싱하고 10 μ M의 DCFH-DA를 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터 내에서 30분 동안 인큐베이션 하였다. 처리된 세포를 PBS로 다시 워싱하고 유세포 분석기를 사용하여 DCF 형광 강도를 분석하였다.
- [0107] JC-1 염색을 통한 미토콘드리아 막전위 측정
- [0108] JC-1 미토콘드리아 막 전위 (MMP) 변화는 mitochondria staining kit (Cat No: CS0390, Sigma-Aldrich)를 사용하여 측정하였다. 5×10^5 개의 HTR8/SVneo 세포를 6 well에 배양하고 70 ~ 80% 배양 접시에 세포가 찼을 때 24시간 miR-548e를 transfection 하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 원심분리 하여 세포 pellet을 얻었다. 세포를 JC-1 staining solution 에 풀어준 후 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 20분 간 인큐베이션 하였다. 염색된 세포를 다시 원심분리하여 1x JC-1 staining buffer로 워싱한 후 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.
- [0110] Fluo-4와 Rhod-2를 이용한 세포내 칼슘 이온 농도 측정
- [0111] HTR8/SVneo 세포 내 칼슘 이온(Ca²⁺) 농도에 siTRAF6가 미치는 영향을 확인하기 위하여 먼저 5×10^5 세포를 6 well에 배양하고 70 ~ 80% 배양 접시에 세포가 찼을 때 20, 40, 80 nM의 siTRAF6를 transfection 한 후 48시간 동안 배양하였다. 이후, 트립신을 사용하여 세포를 배양 접시에서 떼어 Fluo-4 AM (Invitrogen)을 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터 내에서 20분 동안 인큐베이션 하였다. 염색된 세포를 PBS로 한 번 워싱하고 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다. 미토콘드리아 특이적 Ca²⁺ 농도 측정을 위해 Rhod-2 AM (Invitrogen)을 HBSS에 희석한 후 4 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 인큐베이션 하였다. 염색된 세포를 HBSS로 워싱하고 유세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 분석하였다.
- [0113] Transfection
- [0114] HTR8/SVneo 세포를 6 well에 배양하고, 비특이적 miRNA 대조군, miR-146a, miR-548e에 대한 mimic 및 억제제를 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용하여 transfection 하였다. LPS 처리를 위해 먼저 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 인큐베이터 내에서 6시간 동안 oligonucleotide를 transfection한 후 배지를 제거하고 LPS를 18시간 동안 추가로 처리하였다.
- [0116] 통계분석
- [0117] 본 실험결과는 SAS (statistical analysis system) 통계프로그램을 이용하여 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치분산분석 (one-way ANOVA)을 실시하였다. $P < 0.05$ 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

[0119] **결과 및 고찰**

[0120] 중간엽 줄기세포와의 공생배양에 따른 영양막 세포 내 항염증 효과 분석

[0121] 중간엽 줄기세포에 의해 분비된 용해성 물질이 영양막 세포 내 염증성 경로에 영향을 미칠 수 있는지 분석하기 위해 영양막 세포주인 HTR8/SVneo 세포와 양수 유래 중간엽 줄기세포인 AF-MSC 세포를 1 μ g/mL의 LPS와 함께 공생배양하였다. qPCR을 통해 발현을 분석한 결과, LPS는 NF- κ B, TRAF6, IRAK1 뿐만 아니라 IL1 β , IL6, IL8 과 같은 염증성 사이토카인의 발현을 증가시켰다 (도 1). AF-MSC 세포와의 공생배양은 LPS에 의해 증가했던 영양막 세포 내 NF- κ B, TRAF6, IRAK1의 mRNA 수준의 발현을 감소시켰다. 뿐만 아니라, AF-MSC 세포 공생배양은 LPS에 의해 증가한 IL1 β 의 발현 역시 감소시켰다. 하지만, IL6 또는 IL8의 발현은 AF-MSC 세포와의 공생배양에 따라 오히려 발현이 증가하는 경향을 보였다.

[0122] 공생배양 시스템에서 LPS는 HTR8/SVneo 세포 뿐만 아니라 AF-MSC 세포에까지 영향을 미칠 수 있다는 한계가 있다. 이러한 한계를 극복하기 위해 기아 상태에서 48시간 동안 AF-MSC를 배양한 배양접시의 배양액 (conditioned media, CM)을 회수하였다. 이후, HTR8/SVneo 세포에 LPS와 함께 AF-MSC CM을 병용처리 한 후 NF- κ B, TRAF6, IRAK1, IL1 β , IL6, IL8의 발현 변화를 확인하였다. AF-MSC와의 공생배양에서의 결과와 비슷하게 AF-MSC CM은 HTR8/SVneo 세포 내 NF- κ B, TRAF6, IRAK1, IL1 β 의 발현을 감소시켰다. 한편 IL6와 IL8의 발현은 AF-MSC CM 처리에 따라 발현이 증가하였다. 이러한 결과는 중간엽 줄기세포에 의해 분비된 물질이 영양막 세포 내에서 NF- κ B 경로를 조절할 수 있음을 암시한다.

[0124] 중간엽 줄기세포 공생배양에 따른 영양막 세포와 엑소솜 내 miRNA 발현 변화 분석

[0125] 다음으로, LPS에 의한 염증 반응 유도 시, HTR8/SVneo 내 miRNA의 발현 변화를 분석하였다. miR-146a-5p, miR-146b-3p, miR-146b-5p, miR-548e-5p 중 miR-146a-5p, miR-548e-5p 만이 LPS에 의해 발현이 증가함이 확인되었다 (도 2A). 다음으로 우리는 HTR8/SVneo 세포와 AF-MSC 세포 유래의 엑소솜을 대상으로 엑소솜 표면 단백질인 HSP70과 CD63에 대한 웨스턴 블롯을 수행하여 정상적으로 엑소솜이 추출되었음을 확인하였다. HTR8/SVneo 세포와 AF-MSC 세포 배양 배지로부터 추출한 엑소솜에서 각 miRNA의 발현을 분석한 결과 HTR8/SVneo 세포에서는 miR-548e-5p가, AF-MSC에서는 miR-146a-5p의 발현이 가장 높게 나타났다 (도 2B). 또한 AF-MSC 세포 공생배양 후 HTR8/SVneo 세포와 HTR8/SVneo 세포 유래 엑소솜 내에서 RNA를 추출하여 각 miRNA의 발현 변화를 규명하였다. 그 결과, AF-MSC 세포와의 공생배양 시 HTR8/SVneo 세포 내 miR-146a-5p, miR-146a-3p, miR-146b-5p, miR-548e-5p의 발현이 모두 증가하는 것으로 나타났다 (도 2C). 뿐만 아니라, AF-MSC 세포 공생배양 시 HTR8/SVneo 세포 유래 엑소솜 내에서도 miR-146b-5p를 제외한 나머지 miRNA가 높게 관측되었다 (도 2D). 이러한 결과는 LPS에 반응하여 miR-146a, miR-548e의 발현이 증가할 뿐만 아니라 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜을 통해 영양막 세포로 miR-146a, miR-548e가 전달될 수 있음을 암시한다.

[0127] miR-146a, miR-548e 발현 조절에 따른 영양막 세포 내 NF- κ B 기전 변화 양상

[0128] 다음으로, miR-146a와 miR-548e가 NF- κ B 염증 유도 신호전달 기전에 영향을 미칠 수 있는지 웨스턴 블롯을 통해 분석하였다. 먼저, LPS의 용량의존적 (0, 0.1, 1, 10 μ g/mL) 처리는 HTR8/SVneo 세포 내에서 NF- κ B, IKK α , IKK β , TAK1, IRAK1, IRAK4, TRAF6, MyD88의 발현을 증가시켰다 (도 3A). miR-146a의 특성을 모방하는 miR-146a mimic을 transfection 하였을 때 LPS에 의해 증가했던 NF- κ B 신호전달기전의 단백질들의 발현이 감소하는 것으로 나타났다 (도 3B). 반대로, miR-146a의 활성을 억제하는 억제제를 transfection 하였을 때는 HTR8/SVneo 세포 내 염증성 신호전달기전 단백질들의 발현이 유의적으로 증가하였다 (도 3C). 뿐만 아니라, miR-548e에 대한 mimic을 transfection 하였을 때 역시 LPS에 의해 증가하였던 NF- κ B 신호전달기전의 단백질들의 발현이 감소하였다 (도 3D). HTR8/SVneo 세포 내 miR-548e 억제제 transfection 시에는 반대로 NF- κ B 신호전달기전의 단백질들의 발현이 증가하였다 (도 3E). 이러한 결과를 통해, miR-146a, miR-548e가 영양막 세포 내에서 뛰어난 항염증 효과를 나타낼 수 있음을 확인하였다.

[0130] 중간엽 줄기세포 유래 엑소솜 처리에 따른 영양막 세포 내 NF- κ B 기전 변화 양상

[0131] 다음으로, AF-MSC 세포에서 유래한 엑소좀이 HTR8/SVneo 세포의 염증성 신호전달 기전을 조절할 수 있는지 분석하기 위해 LPS와 AF-MSC 세포 유래 엑소좀을 병용 처리한 후 NF- κ B, IKK α , IKK β , TAK1, IRAK1, IRAK4, TRAF6, MyD88의 발현을 웨스턴 블롯을 통해 분석하였다. 뿐만 아니라, miR-146a에 대한 mimic를 중간엽 줄기세포에 transfection한 후 엑소좀을 추출하여 miR-146a가 많이 포함된 엑소좀은 더욱 강화된 항염증 효과를 지닐 수 있는지 분석하였다. 먼저, miR-146a에 대한 mimic이 transfection된 AF-MSC 세포로부터 유래한 엑소좀에는 miR-146a가 높게 발현함을 확인하였다 (도 4A). LPS 처리에 의해 증가한 NF- κ B 신호전달 단백질 중 NF- κ B, IKK β , TAK1, TRAF6, MyD88의 발현은 AF-MSC 세포 유래 엑소좀과의 병용처리 시 발현이 감소하는 것을 확인하였다 (도 4B-4I). 또한 IRAK4의 경우 대조군 oligonucleotide를 처리한 AF-MSC 세포 유래 엑소좀과의 병용처리 시에는 큰 영향을 받지 않았으나 miR-146a에 대한 mimic이 transfection된 AF-MSC 세포 유래 엑소좀 처리 시에는 발현이 감소하였다. 뿐만 아니라 LPS의 처리는 세포 증식과 관련된 신호전달 단백질인 AKT, JNK, ERK1/2, P38의 인산화를 유도한다고 보고되었다. 본 연구에서도 LPS는 AKT, JNK, ERK1/2, P38 단백질의 인산화를 유도하였을 뿐만 아니라 이 중에서 AKT, JNK, P38 단백질의 인산화는 AF-MSC 세포 유래 엑소좀 처리에 의해 감소하였으며 miR-146a mimic이 형질주입된 AF-MSC 세포 유래 엑소좀에 의해서는 인산화가 더욱 감소하였다 (도 4J-4M). 이러한 결과는 중간엽 줄기세포 유래 엑소좀이 영양막 세포 내에서 항염증 효과를 지니며, miRNA 발현 조절을 통해 항염증 효과를 더욱 강화할 수 있음을 암시한다.

[0133] miR-146a, miR-548e 조절에 따른 영양막 세포 특성 변화 분석

[0134] 다음으로, miR-146a와 miR-548e가 영양막 세포의 특성에 미치는 영향을 분석하기 위해 miR-146a, miR-548e 억제제를 HTR8/SVneo 세포에 형질주입하였다. miR-146a, miR-548e 억제제는 HTR8/SVneo 세포의 이주성을 대조군과 비교하여 각각 18.2% ($p < 0.05$), 24.7% ($p < 0.01$) 만큼 유의적으로 감소시켰다 (도 5A). 뿐만 아니라 세포 증식에 필수적인 단백질인 PCNA의 발현을 면역형광법을 통해 분석하였다. miR-146a, miR-548e 억제제는 HTR8/SVneo 세포 내 PCNA의 발현을 각각 30.4% ($p < 0.01$), 35.2% ($p < 0.01$) 감소시켰다 (도 5B). 다음으로 두 miRNA가 HTR8/SVneo 세포의 사멸에 미치는 영향을 분석하기 위해 annexin V 및 propidium iodide 염색을 수행하였다. miR-146a 억제제가 형질주입된 HTR8/SVneo 세포는 세포 사멸 양상에 큰 영향을 받지 않았다. 하지만 miR-548e 억제제는 HTR8/SVneo 세포의 사멸을 용량의존적으로 증가시켰다. (도 5C). 이러한 결과는 miR-146a와 miR-548e가 모두 영양막 세포의 이주성을 유지하는데 관여하지만 그 중 miR-548e가 세포의 사멸과 더 밀접하게 관련되어 있음을 암시한다.

[0136] miR-548e 조절에 따른 영양막 세포 내 산화 스트레스 및 미토콘드리아 막 전위 분석

[0137] 다음으로 miR-548e 억제제를 HTR8/SVneo 세포에 transfection한 후 세포 주기 분포를 분석하였다. miR-548e 억제제의 transfection은 subG1 주기에 해당하는 HTR8/SVneo 세포의 비율을 증가시켰다 (도 6A). 또한 miR-548e 억제제는 HTR8/SVneo 세포 내에서 ROS의 생성을 증가시켰다 (도 6B). 이러한 결과는 miR-548e가 영양막 세포에서 산화 스트레스의 발생에 관여함을 암시한다. 미토콘드리아 막전위 (Mitochondrial membrane potential, MMP)의 감소는 산화 스트레스에 의해 유도되는 세포 사멸에서 나타나는 대표적인 생리적 변화이다. 우리는 JC-1 dye의 염색을 통해 miR-548e 억제제가 transfection된 HTR8/SVneo 세포에서는 미토콘드리아 막전위가 유의적으로 감소함을 확인하였다 (도 6C). 앞서 확인한 신호전달 단백질 중 JNK는 산화 스트레스에 의한 세포 사멸과 밀접하게 관련되어있다. 따라서 miR-548e 억제제를 transfection한 HTR8/SVneo 세포에 JNK에 대한 선택적 억제제인 SP600125 화합물을 처리한 후 미토콘드리아 막전위 변화를 확인하였다. 그 결과, SP600125를 처리한 HTR8/SVneo 세포에서는 miR-548e에 의해 감소한 미토콘드리아 막전위가 대조군 수준으로 회복됨을 확인하였다. NF- κ B 경로에 해당하는 단백질 중 TRAF6는 miR-548e의 잠재적인 표적으로 추측된다. 따라서 HTR8/SVneo 세포에 TRAF6에 대한 siRNA (siTRAF6)를 transfection한 후 ROS 생성 변화를 확인하였다. 그 결과, siTRAF6 transfection은 HTR8/SVneo 세포내 ROS의 생성을 유의적으로 감소시켰다 (도 6D). 칼슘 이온 (Ca^{2+})은 세포 내 산화 스트레스 발생시 세포질로 방출된다. 40 nM 이상의 siTRAF6 transfection은 HTR8/SVneo 세포 내 Ca^{2+} 농도를 유의적으로 감소시켰다. (도 6E). 뿐만 아니라 고농도 (80 nM)의 siTRAF6는 미토콘드리아에 특이적인 Ca^{2+} 농도 역시 유의적으로 감소시켰다. (도 6F). 이러한 결과는 miR-548e가 영양막 세포에서 산화 스트레스를 조절하며 TRAF6 발현은 정상적인 산화 환경을 유지하는데 관여함을 암시한다.

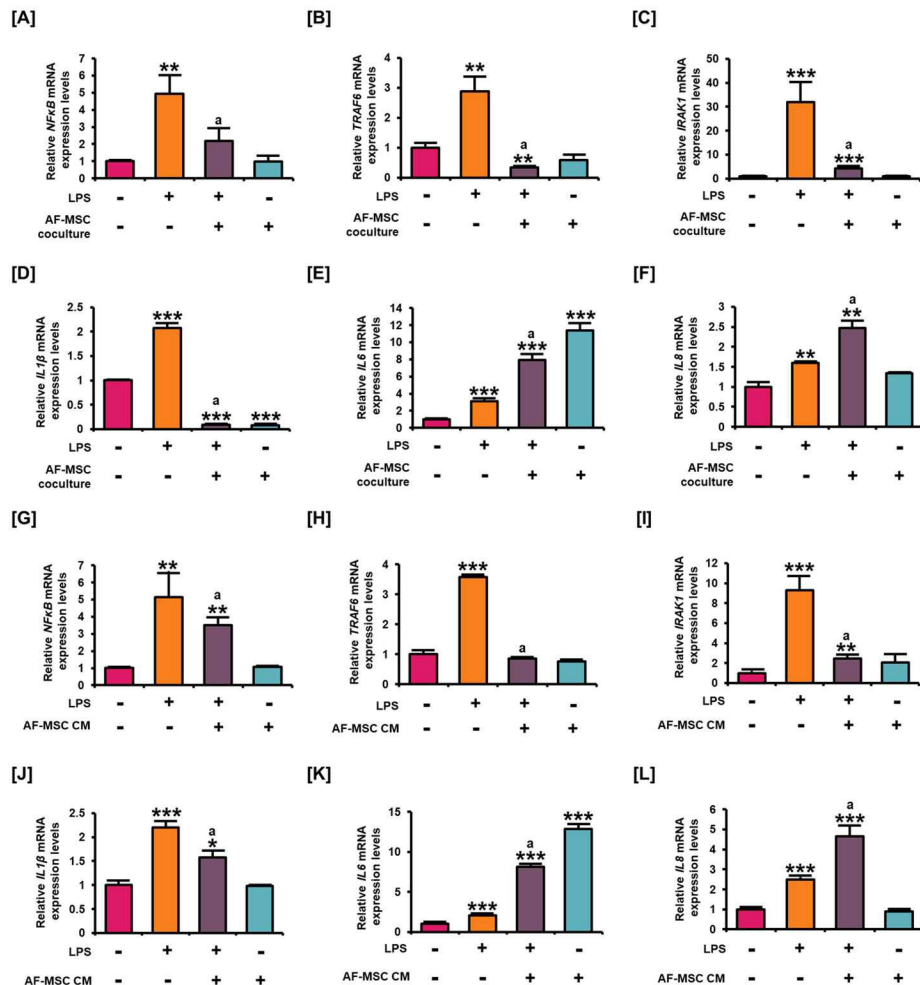
[0139] 염증성 조산 생체모방 동물모델 내 중간엽 줄기세포 주입에 따른 질환 예방 효과 분석

[0140] 다음으로, LPS에 의해 구축된 대표적인 임신기 염증성 질환인 염증성 조산 생체모방 동물모델을 이용하여 중간엽 줄기세포의 주입이 염증성 조산에 대한 예방 기능을 가질 수 있는지 분석하였다. 염증성 조산 동물모델의 태반과 자궁 내에서 miR-146a-5p의 발현은 증가하였으나 miR-146a-3p는 반대로 감소하였다 (도 7A, 7B). miR-146b-5p의 발현은 염증성 조산 동물모델의 태반 조직 내에서는 증가하였으나 자궁 조직 내에서는 큰 변화를 보이지 않았다 (도 7C). 다음으로, 염증성 조산 동물모델에 중간엽 줄기세포를 주입하였을 시 NF- κ B의 발현이 감소하는 것을 확인하였다 (도 7D). 염증성 조산 동물모델에 중간엽 줄기세포를 주입하였을 시 IRAK1의 발현은 태반 조직에서 감소하였으며 TRAF6의 발현은 자궁 조직에서 감소하였다 (도 5E, 5F). 뿐만 아니라, TNF α , IL1 β , IL6 등 염증성 사이토카인의 발현은 중간엽 줄기세포 주입시 감소하는 것으로 나타났다 (도 7G-7I). 이러한 결과는 AF-MSC의 주입이 염증성 조산을 예방하는데 효과가 있으며 이러한 효과는 miR-146a의 발현이 낮을 때 감소함을 암시한다.

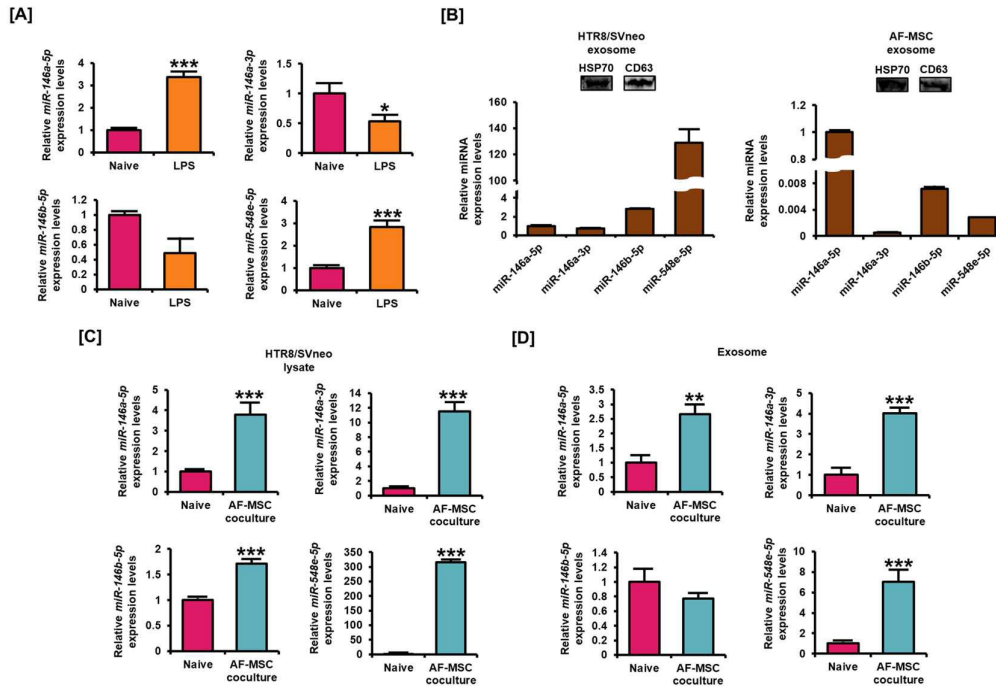
[0142] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시형태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

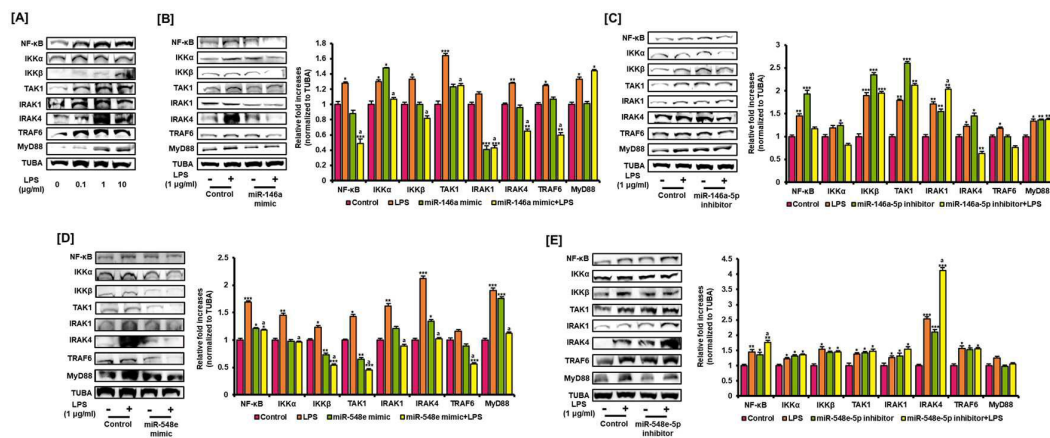
도면1



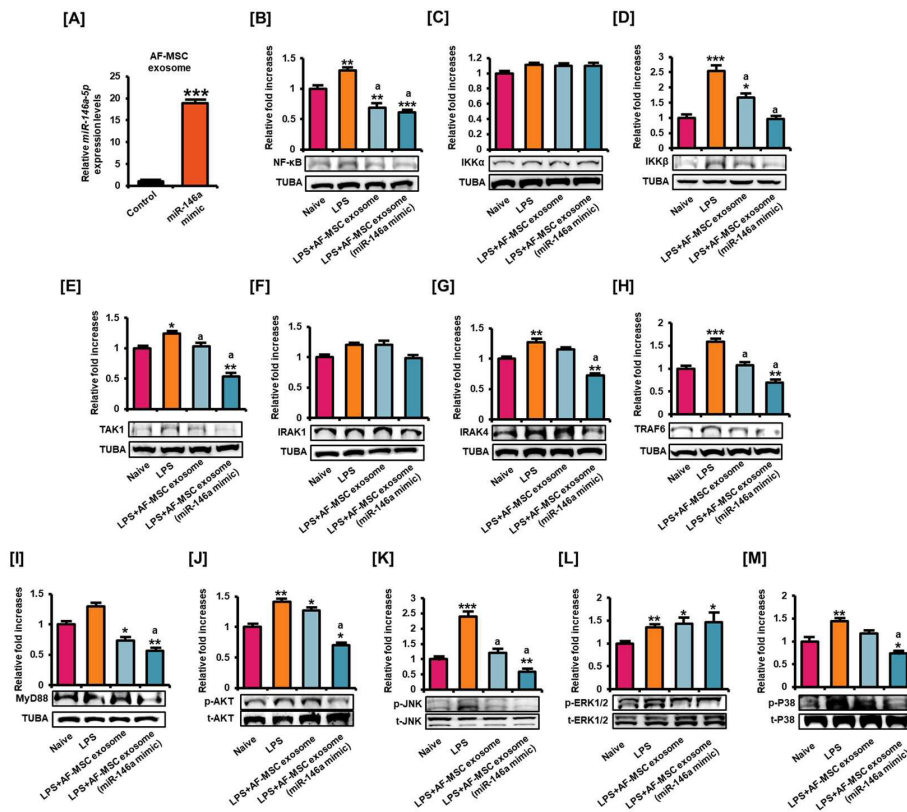
도면2



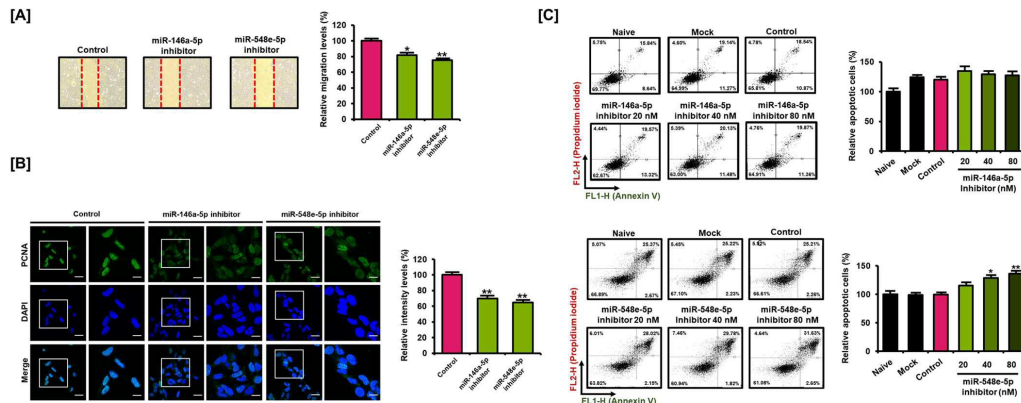
도면3



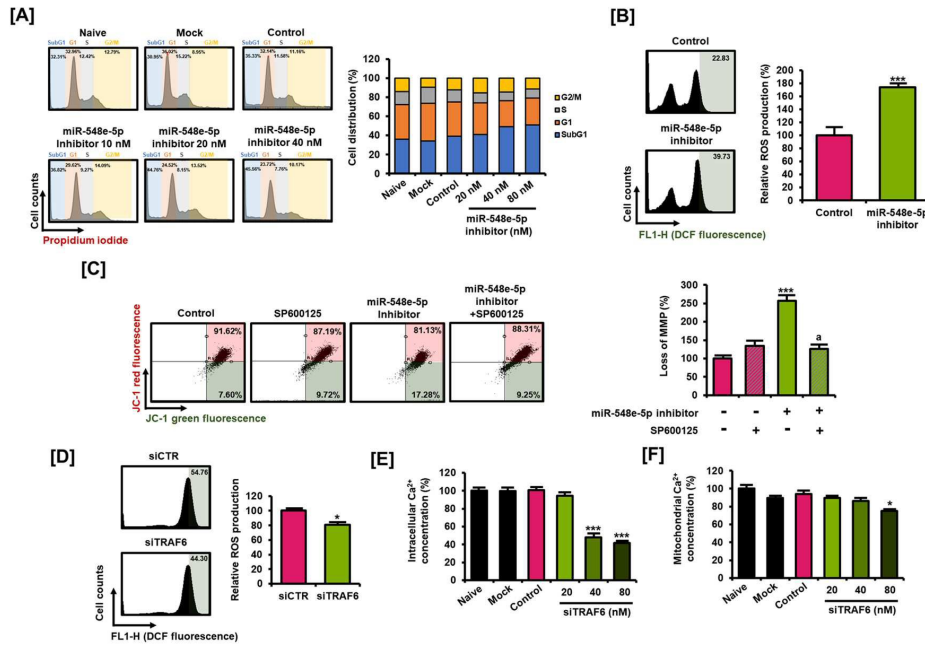
도면4



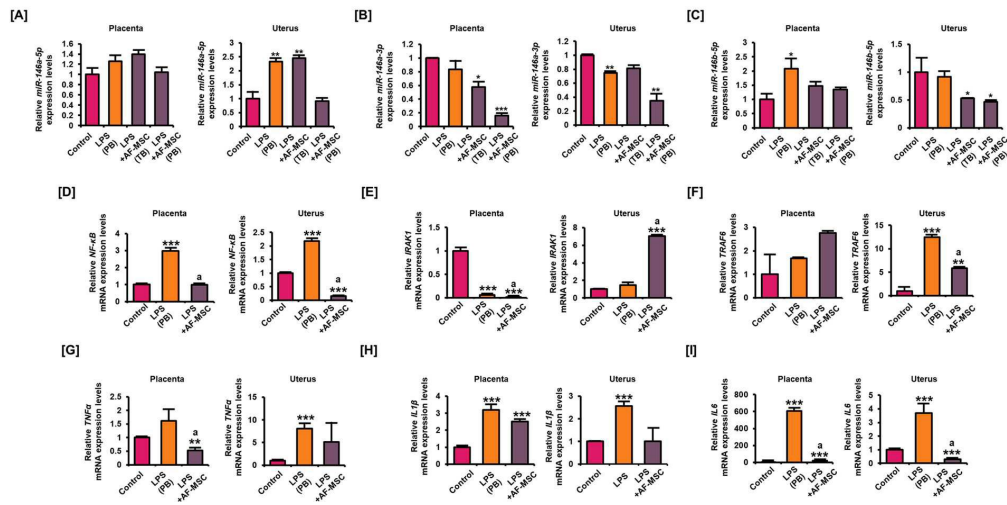
도면5



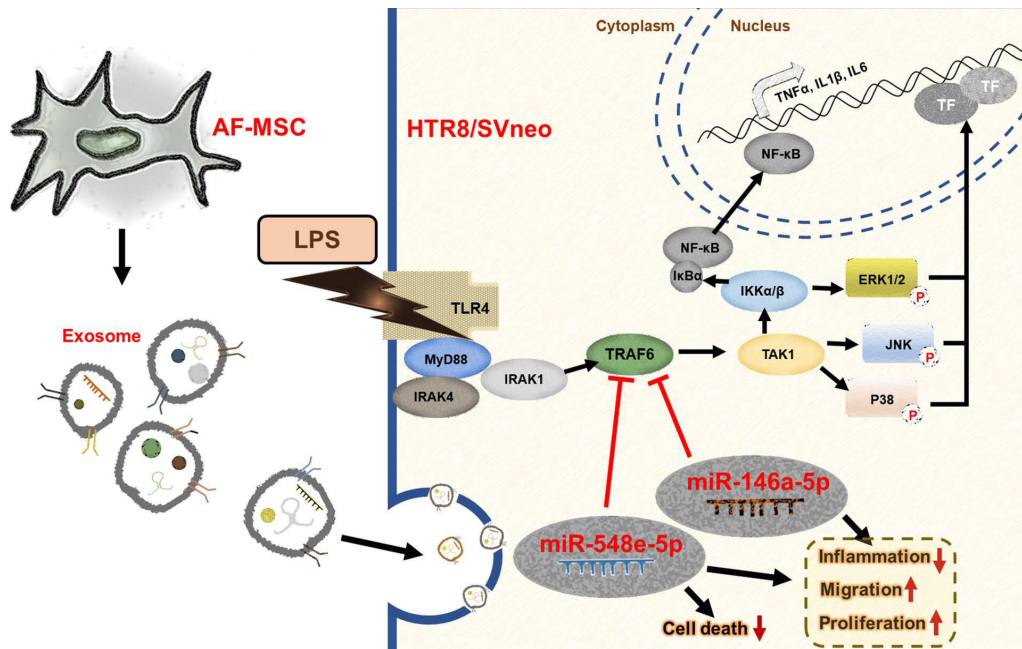
도면6



도면7



도면8



서열 목록

- <110> Korea University Research and Business Foundation
- <120> Composition for alleviating inflammation of trophoblastic cells comprising miR-146a, miR-548e or mixture thereof
- <130> JKP-1357
- <160> 2
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 22
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> miR-146a sequence
- <400> 1
- ugagaacuga auuccauggg uu
- <210> 2
- <211> 22
- <212> RNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> miR-548e sequence

<400> 2

caaaagcaau cgcgguuuuu gc

22