

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0123943

(43) 공개일자 2019년11월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61H 23/00 (2006.01) A61B 17/22 (2006.01)

A61K 31/436 (2006.01) A61K 31/65 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01) A61P 17/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61H 23/008 (2013.01)

A61K 31/436 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0047885

(22) 출원일자 2018년04월25일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

서정훈

서울 영등포구 버드나루로7길 12, 한림대학교 한강성심병원 재활의학과

주소영

서울특별시 강남구 언주로 107, 210동 107호 (개포동, 현대2차아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

강성혜

전체 청구항 수 : 총 12 항

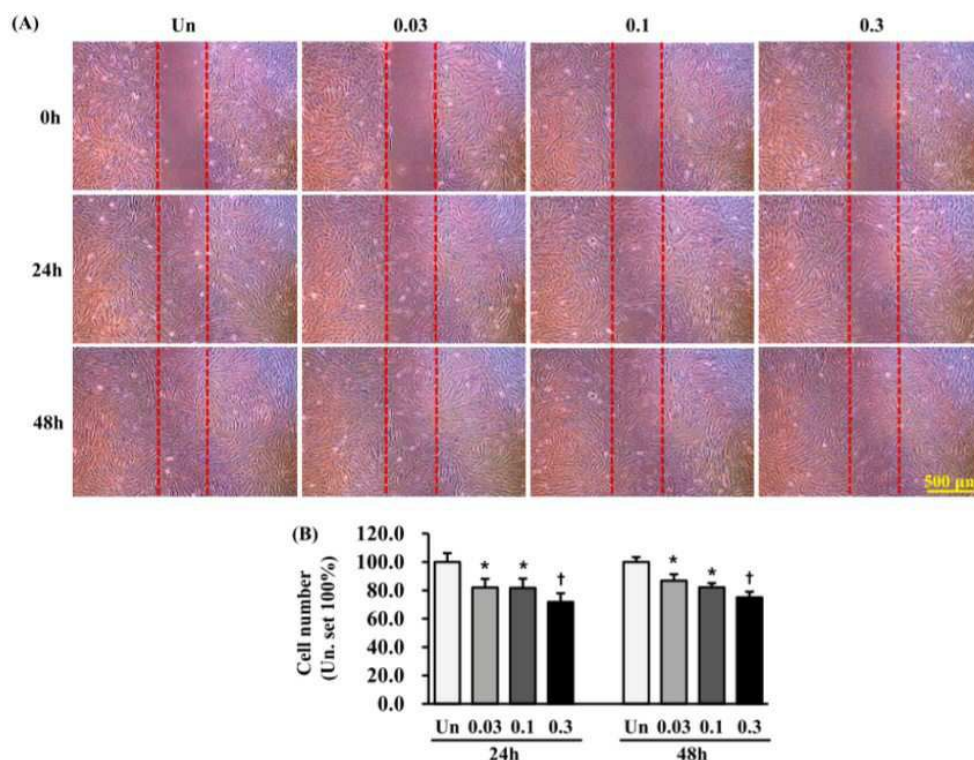
(54) 발명의 명칭 체외 충격과 처리 또는 상피간엽이행 저해제를 이용한 비후성 반흔 개선방법

(57) 요약

본 발명자들은 인간 비후성 반흔 유래 일차 진피 섬유아세포(primary dermal fibroblast)를 배양하고 이 세포를 0.03, 0.1 및 0.3 mJ/mm²의 1000 임펄스에 노출하였다. 처리 24시간 및 72시간 후, 실시간 PCR과 웨스턴 블롯팅으로 mRNA와 단백질 발현을 각각 탐지하고, 세포 생존율과 이동성을 평가하였다. 체외 충격과 치료에 의해 비후

(뒷면에 계속)

대표도 - 도7



성 반흔 섬유아세포(HTSF)의 생존율은 영향을 받지 않았으며, 세포의 이동은 감소하였다. 체외 충격과 치료 이후 TGF- β 1(Transforming growth factor beta 1) 발현은 감소하였고, α -SMA(alpha smooth muscle actin), 콜라겐-I, 피브로넥틴 및 트위스트-1의 발현은 현저히 감소하였다. E-카데린 발현은 증가하였으나, N-카데린 발현은 감소하였다. DNA 결합 저해제 1과 2의 발현은 증가하였다. 결론적으로, 상피간엽이행(epithelial-mesenchymal transition; EMT) 저해가 체외 충격과 치료의 반흔억제 효과에 중요한 역할을 하는 것으로 보이며, 상피간엽이행 저해, 세포의 기질 형성 저해를 이용하여 화상후 반흔을 치료할 수 있을 것으로 예상된다.

(52) CPC특허분류

최혜송

서울시 동작구 신대방14길 18, 201호

A61K 31/65 (2013.01)

A61K 48/00 (2013.01)

A61P 17/02 (2018.01)

A61B 2017/22025 (2013.01)

A61H 2201/105 (2013.01)

(72) 발명자

조윤수

서울특별시 서초구 신반포로33길 30, 904호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 H15C1486

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료기술 개발사업

연구과제명 소외계층 화상 환자를 위한 재활프로그램 구축

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2017.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

비후성 반흔의 가려움과 통증을 완화하고 비후성 반흔의 크기를 억제하기 위하여 비후성 반흔에 체외 충격파를 처리하는 방법에 있어서,

체외 충격파는 $0.03 \sim 0.3 \text{ mJ/mm}^2$ 의 1000 임펄스/cm²로 처리함을 특징으로 하는 체외 충격파 처리방법

청구항 2

청구항 1에 있어서,

체외 충격파 처리는 전자기 원통형 코일의 집중 충격파 공급원을 갖춘 체외 충격파 장치를 이용하여 수행함을 특징으로 하는 체외 충격파 처리방법

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 비후성 반흔은 화상으로 인하여 형성된 비후성 반흔임을 특징으로 하는 체외 충격파 처리방법

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 체외 충격파 처리는 상피간엽이행을 억제함을 특징으로 하는 체외 충격파 처리방법

청구항 5

상피간엽이행 저해제를 포함하는 비후성 반흔 개선용 약학 조성물

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상피간엽이행 저해제는 라파마이신, 17-AAG 및 LY294002 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 하는 비후성 반흔 개선용 약학 조성물

청구항 7

TGF- β 1 유전자 발현 억제제 또는 TGF- β 1 단백질 발현 억제제를 포함하는 비후성 반흔 개선용 약학 조성물

청구항 8

청구항 7에 있어서,

TGF- β 1 유전자 억제제는 TGF- β 1 유전자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드임을 특징으로 하는 비후성 반흔 개선용 약학 조성물

청구항 9

청구항 7에 있어서,

TGF- β 1 단백질 발현 억제제는 TGF- β 1 단백질에 대한 모노클론 항체임을 특징으로 하는 비후성 반흔 개선용 약학 조성물

청구항 10

세포외 기질 형성 억제제를 포함하는 비후성 반흔 개선용 약학 조성물

청구항 11

청구항 10에 있어서,

세포외 기질 형성 억제제는 독시사이클린(doxycycline)임을 특징으로 하는 비후성 반흔 개선용 약학 조성물

청구항 12

ID 단백질(inhibitor of DNA binding protein)을 포함하는 비후성 반흔 개선용 약학 조성물

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 체외 충격과 처리 또는 상피간엽이행 저해제, 세포외 기질 형성 저해제를 이용한 비후성 반흔 개선방법 또는 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 화상후 비후성 반흔(Post-burn hypertrophic scars; HTSs)은 화상의 가장 흔한 합병증이며 장기간의 잘못된 상처 치료 동안 과도한 반흔 조직 형성으로부터 유래하며, 유리화된 콜라겐 섬유다발(hyalinized collagen bundles)로 특징지어진다. 화상후 비후성 반흔은 기능적으로 관절 변형, 증상에 있어서는 가려움과 통증 및 미용에 있어서 환자의 삶의 질에 영향을 미칠 수 있다. 상처의 정도에 따라 비후성 반흔은 화상에서 최대 91%까지 일어난다[1]. 비후성 반흔 형성의 병리생리학은 상처 치유 중 과도하게 활발한 증식 단계와 관련되어 있다[2]. 대식세포, 섬유아세포, 각질세포와 같은 다양한 세포들, 사이토카인 및 성장인자들이 이 과정에 관여한다. 활성화된 T 세포, 대식세포 및 랑게르한스 세포는 정상적인 상처 치유와 조직 리모델링을 교란하고, 증가한 세포 활성으로 비정상적 세포외 기질 축적에 기여한다[3,4].

[0004] 특히, TGF- β 1(transforming growth factor beta 1)은 세포외 기질 단백질 합성, 그리고 섬유아세포 증식 및 분화에서 강력한 촉진 효과를 나타낸다[3]. 선행 임상연구는 화상환자의 혈청 내 TGF- β 수준이 대조군 환자에 비해 약 두 배라고 밝혔다[5]. 이뿐만 아니라, TGF- β 1과 2 수용체는 비후성 반흔 조직의 섬유아세포에서 과발현되었다[6].

[0005] 사람 비후성 반흔 조직에서 콜라겐 타입 I, α -SMA, 비멘틴, FSP-1(fibroblast specific protein 1) 및 N-카데린과 같은 섬유증 마커의 증가와 E-카데린의 감소에 대해서 명확한 증거가 있으나, 비후성 반흔 유래 섬유아세

포(HTSFs)에서는 그렇지 않다[7].

[0006] TGF- β 1의 mRNA 및 단백질 발현은 대조군인 정상 세포와 비교하여 비후성 반흔 유래 섬유아세포(HTSFs)에서 현저히 증가하였고[8], 정상적인 흉터 또는 정상 피부와 비교하여 비후성 반흔에서 총 섬유아세포 및 α SMA-양성 근섬유아세포의 수가 현저히 많았다[9]. 근섬유아세포는 TGF- β 및 다른 성장인자들에 의해 활성화되는 섬유아세포이며, 병리학적 비후성 반흔 형성에 결정적인 세포의 기질의 합성과 분비에 중요한 세포이다[2].

[0007] 피부에서 확인된 최소 세 개의 섬유아세포들 즉, 외부 섬유아세포, 망상 섬유아세포 및 모낭과 관련된 섬유아세포 중 깊은 진피에서 유래하는 망상 섬유아세포가 비후성 반흔 형성에 관여한다[10,11]. 동시에, 망상 섬유아세포는 다른 피부층 유래 섬유아세포와 비교할 때 큰 세포 크기, 배양시 느린 증식 속도, 높은 TGF- β 1 및 콜라겐 생성, 그리고 높은 α -SMA 발현을 포함하여 독특한 성질을 나타낸다[10]. 그러나, 비후성 반흔 섬유아세포의 병리학적 특성은 알려지지 않았다.

[0008] 체외 충격파 치료(Extracorporeal shockwave therapy; ESWT)는 신장결석의 쇄석술에 처음 사용되었던 비침습적 물리치료 요법이다[12]. 이 치료법은 점차 족저근막염(plantar fasciitis) 및 만성 외측상과염(테니스 엘보) 같은 근골격계 질환의 치료에 응용되고 있고, 미국 FDA에서 승인받았다[13]. 몇몇 실험 결과들에서 체외 충격파 치료가 시험관내 모델에서 산화질소 생성을 유도하고 NF- κ B 활성화를 억제한다고 밝혀진 바 있고[14], 정상 마우스 또는 난치성 당뇨병성 케양 마우스에서 84개의 혈관신생 유전자의 발현을 현저히 유도하는 것으로 밝혀졌다[15]. 나아가, 체외 충격파 치료는 관절에서 산화질소 합성효소(eNOS), 혈관 내피 성장인자(VEGF) 및 PCNA(proliferating cell nuclear antigen)와 같은 혈관 신생 및 증식 성장인자를 유도하여 새로운 모세혈관과 근육화된 혈관의 생성을 자극하고, 그리하여 동물 모델에서 혈액 공급과 힘줄 재생을 개선한다[16,17]. 이뿐만 아니라, 임상 시도들은 체외 충격파 처리가 상처 크기에 따라 치유 속도 개선과 완전한 상피화와 밀접하게 관련되어 있음을 밝혔다[18]. 어떤 임상 연구 결과는 화상후 비후성 반흔을 가진 환자에게 체외 충격파를 처리한 경우 반흔이 부드러워지고 외관이 개선되었음을 보여주었다[19]. 최근 본 발명자들은 체외 충격파 처리가 재활기간 동안 화상 환자의 반흔 통증과 가려움을 현저히 감소시켰음을 보고한 바 있다[20,21].

선행기술문헌

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) Gauglitz, G.G. et al., Mol. Med. 2011, 17, 113-125.
- (비특허문헌 0002) Aarabi, S. et al., PLoS Med. 2007, 4, e234.
- (비특허문헌 0003) Armour, A. et al., Wound Repair Regen. 2007, 15 (Suppl.1), S6-S17.
- (비특허문헌 0004) Wynn, T.A. Nat. Rev. Immunol. 2004, 4, 583-594.
- (비특허문헌 0005) Tredget, E. et al., Plast. Reconstr. Surg. 1998, 102, 1317-1328.
- (비특허문헌 0006) Schmid, P. et al., Am. J. Pathol. 1998, 152, 485-493.
- (비특허문헌 0007) Yan, C. et al., Am. J. Pathol. 2010, 176, 2247-2258.
- (비특허문헌 0008) Wang, R. et al., Wound Repair Regen. 2000, 8, 128-137.
- (비특허문헌 0009) Nedelec, B. et al., Surgery 2001, 130, 798-808.
- (비특허문헌 0010) Garner, W.L. et al., J. Investig. Dermatol. 1993, 101, 875-879.
- (비특허문헌 0011) Honardoust, D. et al., J. Burn Care Res. 2012, 33, 668-677.
- (비특허문헌 0012) Notarnicola, A. et al. Muscles Ligaments Tendons J. 2012, 2, 33-37.
- (비특허문헌 0013) Wang, C.J. J. Orthop. Surg. Res. 2012, 20, 11.
- (비특허문헌 0014) Mariotto, S. et al., Nitric Oxide 2005, 12, 89-96.
- (비특허문헌 0015) Zins, S.R. et al., Angiogenesis 2010, 13, 293-304.
- (비특허문헌 0016) Wang, C.J. et al., J. Foot Ankle Surg. 2002, 41, 16-22.
- (비특허문헌 0017) Wang, C.J. et al., J. Orthop. Res. 2003, 21, 984-989.

- (비특허문헌 0018) Schaden, W. et al., J. Surg. Res. 2007, 143, 1-12.
- (비특허문헌 0019) Fioramonti, P. et al., Dermatol. Surg. 2012, 38, 778-782.
- (비특허문헌 0020) Cho, Y.S. et al., Medicine 2016, 95, e4575.
- (비특허문헌 0021) Joo, S.Y. et al., Burns 2017.
- (비특허문헌 0022) Je, Y.J. et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014, 444, 81-85.
- (비특허문헌 0023) Yang, J. et al., Am. J. Pathol. 2015, 185, 1001-1011.
- (비특허문헌 0024) Barriere, G. et al., Clin. Transl. Med. 2015, 14, 4.
- (비특허문헌 0025) Weber, C.E. et al., J. Burn. Care Res. 2012, 33, 311-318.
- (비특허문헌 0026) Kalluri, R. et al., J. Clin. Investig. 2003, 112, 1776-1784.
- (비특허문헌 0027) Song, R. et al., Braz. J. Med. Biol. Res. 2011, 44, 402-410.
- (비특허문헌 0028) Penn, J.W. et al., Int. J. Burns Trauma 2012, 2, 18-28.
- (비특허문헌 0029) Vetrano, M. et al., Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. 2011, 19, 2159-2168.
- (비특허문헌 0030) Hofmann, A. et al., J. Trauma 2008, 65, 1402-1410.
- (비특허문헌 0031) Saggini, R. et al., Ultrasound Med. Biol. 2016, 42, 185-195.
- (비특허문헌 0032) Arno, A. et al., Burns 2010, 36, 844-849.
- (비특허문헌 0033) Linge, C. et al., J. Investig. Dermatol. 2005, 125, 72-82.
- (비특허문헌 0034) Albanna, M. et al., Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 1st ed.; Academic Press: London, UK, 2016; pp. 23-32. ISBN 9780128016541.
- (비특허문헌 0035) Lee, C.G. et al., J. Exp. Med. 2001, 194, 809-821.
- (비특허문헌 0036) Zeisberg, M. et al., J. Clin. Investig. 2009, 119, 1429-1437.
- (비특허문헌 0037) Derycke, L.D. et al., Int. J. Dev. Biol. 2004, 48, 463-476.
- (비특허문헌 0038) Bhowmick, N.A. et al., Mol. Biol. Cell 2001, 12, 27-36.
- (비특허문헌 0039) Hwang, S. et al., J. Biol. Chem. 2012, 287, 22227-22240.
- (비특허문헌 0040) Benezra, R. et al., Cell 1990, 6, 49-59.
- (비특허문헌 0041) Lasorella, A. et al., Nat. Rev. Cancer 2014, 14, 77-91.
- (비특허문헌 0042) Hecker, L. et al., Exp. Cell Res. 2011, 317, 1914-1921.
- (비특허문헌 0043) Garamszegi, N. et al., Oncogene 2010, 29, 2368-2380.
- (비특허문헌 0044) Cui, H.S. et al., Arch. Biochem. Biophys. 2017, 630, 9-17.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010]

본 발명은 체외 충격과 치료에 의하여 비후성 반흔 섬유아세포에서 유도되는 분자의 변화를 시험하여 체외 충격과 치료의 이로운 효과를 나타내는 기작을 밝히고, 이를 응용하여 비후성 반흔의 통증과 가려움, 비후성 반흔 형성 등을 억제 또는 완화하는 방법을 제공하려는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 체외 충격과 치료(Extracorporeal shock wave therapy; ESWT)는 화상후 비후성 반흔(post-burn hypertrophic scars; HTS)의 형성과 증상을 상당히 개선한다. 그러나, 관찰되는 효과의 기작은 충분히 알려지지 않았다. 본 발명의 목적은 반흔 조직 유래 섬유아세포의 체외 충격과 치료에 의해 유도되는 세포 및 분자의 변화 기작을 밝히려는 것이다.
- [0013] 본 발명자들은 인간 비후성 반흔 유래 일차 진피 섬유아세포(primary dermal fibroblast)를 배양하고 이 세포를 0.03, 0.1 및 0.3 mJ/mm²의 1000 임펄스에 노출하였다. 처리 24시간 및 72시간 후, 실시간 PCR과 웨스턴 블롯팅으로 mRNA와 단백질 발현을 각각 탐지하고, 세포 생존율과 이동성을 평가하였다.
- [0014] 체외 충격과 치료에 의해 비후성 반흔 섬유아세포(HTSF)의 생존율은 영향을 받지 않았으며, 세포의 이동은 감소하였다. 체외 충격과 치료 이후 TGF-β1(Transforming growth factor beta 1) 발현은 감소하였고, α-SMA(alpha smooth muscle actin), 콜라겐-I, 피브로넥틴 및 트위스트-1의 발현은 현저히 감소하였다. E-카데린 발현은 증가하였으나, N-카데린 발현은 감소하였다. DNA 결합 저해제 1과 2의 발현은 증가하였다. 결론적으로, 상피간엽이행(epithelial-mesenchymal transition; EMT) 저해가 체외 충격과 치료의 반흔억제 효과에 중요한 역할을 하는 것으로 보이며, 상피간엽이행 저해를 이용하여 화상후 반흔을 치료할 수 있을 것으로 예상된다.
- [0016] 화상 흉터에 체외 충격과 처리가 임상적으로 효과적이라는 것은 선행 연구들을 통해 잘 알려졌다[19-21]. 그러나, 체외 충격과 처리의 분자적 기작에 대해서는 거의 알려진 바가 없다. 본 발명에서는 이와 같은 치료 기작을 밝혔다. 실험 결과는 비후성 반흔 조직 유래 섬유아세포에 체외 충격과를 처리한 경우 세포 생존율에는 변화가 없고, 세포의 이동은 감소하며, 전형적인 상피간엽이행 마커들의 발현이 억제되었음을 보여주었고, 이들이 반흔 억제에 관여하는 것으로 예상된다. 본 발명의 실험 결과들은 상피간엽이행이 비후성 반흔 형성 동안 섬유화에 중요한 역할을 하는 상처 치유에 필수적인 과정임을 제시한다[6,24,25]. 상피간엽이행은 상피세포가 자신의 특성을 소실하고 간엽세포의 전형적인 특징을 발전시키는 과정이다[26]. 상피간엽이행 동안, 상피세포는 세포간 연결(cell-cell connections)을 잃고 E-카데린과 같은 상피세포 마커를 저하조절하는 반면, α-SMA, N-카데린 및 피브로넥틴과 같은 간엽세포 마커를 상향조절하며, 이동 활성을 나타낸다[25]. 본 발명자들은 섬유아세포가 매우 다양한 다중기능을 나타내며, 심부 상피 섬유아세포가 심부 피부화상의 비후성 반흔 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 여겨지기 때문에 연구 모델로서 "비정상" 세포로 여겨지는 비후성 반흔 조직 유래 섬유아세포를 사용하였다[11]. 이뿐만 아니라, 비후성 반흔 조직 유래 섬유아세포(HTSFs)는 정상 섬유아세포와 비교하여 상피간엽이행-유사 표현형을 나타낸다. 예를 들어, HTSFs는 근섬유아세포-유사 특성을 나타내는 것으로 보고되었는데 [27]; TGF-β1 및 그 수용체 농도가 높고; CTGF, IL-6 및 IL-8과 같은 성장인자 및 염증성 사이토카인의 발현이 증가하며; 피브로넥틴 및 콜라겐 같은 세포의 기질 요소들이 증가하였다[28]. 본 발명자들은 본 연구에서 유사한 특성들을 관찰하였으며, 이는 HTSFs가 시험관 내에서 비후성 반흔 병리학 연구에 적합한 모델을 제시한다. 그러나, 흥미롭게도 본 연구 결과, HTSF는 다양한 간엽세포의 특성들을 발현하였는데, 예컨대 TGF-β1, α-SMA, 콜라겐-I, 콜라겐-III, 피브로넥틴, 비멘틴, FSP-1, E-카데린 및 트위스트1을 포함하는 상피간엽이행(EMT) 마커들의 발현이 증가한 것과, N-카데린의 발현이 감소한 것이다. 이것은 HTSF의 특성이 더 연구되어야 함을 암시한다. 체외 충격과 처리의 이용에 관한 최근 문헌들을 보면, 각 연구에 이용한 변수들이 다를 뿐만 아니라, 최대 효율을 얻는 방법에 대한 합의도 없다. 시험관 연구에서, 체외 충격과 처리는 사람 체대정맥 내피세포에서 0.03mJ/mm²로 500~1500 펄스를 이용하였고[14], 사람 건세포(tenocyte)에서는 0.14mJ/mm²로 1000 임펄스[29], 사람 골아세포에서는 0.06~0.50mJ/mm²로 1000 임펄스[30]를 이용하였다. 생체 연구에서 체외 충격과 처리는 개의 힘줄 뼈에 0.18 mJ/mm²로 1000 임펄스[16], 토끼 힘줄 뼈에 0.12 mJ/mm²로 500 임펄스[17], 그리고 토끼 상처에 0.1 mJ/mm²로 200 임펄스를 적용하였다[15]. 임상 적용에서는, 화상 소양증과 통증에 0.05~0.15 mJ/mm²로 100 임펄스를[20,21], 손 화상에 0.13 mJ/mm²로 500 임펄스를[31], 전층 화상(full-thickness burns)에 0.15 mJ/mm²로 500 임펄스[32] 및 화상 반흔에 0.037 mJ/mm²로 100 임펄스[19]를 적용한 보고들이 있다. 본 발명에서는 체외 충격과 처리의 분자적 치료 기작을 알아내기 위하여 HTSFs에 0.03, 0.1 및 0.3mJ/mm²로 1000 impulses/cm²를 적용하였고, 이러한 실험 조건에서 신뢰할 만한 결과를 얻었다. 따라서, 이와 같은 실험 조건은 동물 및 임상 연구에서 참고자료로 이용할 수 있다. 선행 연구들은 HTSFs가 반흔 형성의 원인 중 하나인 세포자사멸에 대해 저항성을 나타낸다고 보고하였다[11,33]. 본 발명의 실험 결과는 0.03, 0.1 및 0.3 mJ/mm²의 에너지 플럭스 밀도로 1000 impulses/cm²의 체외 충격과 처리 24시간 후 HTSFs의 생존율에 변화가 없음을 보여주

었다. HTSF에서는 체외 충격과 처리에 의하여 GAPDH 및 β -액틴뿐만 아니라, 세포자기사멸-관련 인자들인 bax와 bcl-2의 mRNA 발현이 영향을 받지 않았으며(도 8, 도 9), 이는 체외 충격과 처리의 항 반흔 효과가 세포자기사멸과 관련이 없음을 제시한다. 상처 치유 과정에서 섬유아세포는 상처의 주변부로부터 상처 중심으로 이동하여 증식을 통하여 재상피화 및 육아조직 형성에 참여한다. 리모델링 국면에서, 섬유아세포는 높은 α -SMA 발현에 의해 규명되는 바와 같이, 근섬유아세포로 분화한다. 이들 근섬유아세포는 세포외 기질 요소를 합성하고 축적하는데, 이는 육아세포 수축 및 성숙한 반흔 조직 발달의 원인이 된다. 동시에, MMPs(matrix metalloproteinases)와 콜라게네이즈는 세포외 기질의 기능적 분해 및 리모델링에 관여한다[34]. IL-13에 의해 유도되는 MMP들이 비활성 TGF- β 1을 활성화된 형태로 바꾼다고 제안된 바 있다[35]. 불균형한 염증 반응 또는 심한 염증 하에서, TGF- β 1의 과다 생산은 섬유아세포의 과활성화 및 과증식을 유도하고, 이것은 다시 과도한 세포외 기질의 축적을 유도하여 결국 비후성 반흔 형성을 일으킨다[34]. 이 연구는 TGF- β 1, TGF- β 1에 의해 직접 조절되는 상피간엽이행의 세포골격 마커인 α -SMA 및 비멘틴의 발현 저해가 항-반흔 치료효과와 관련된 것임을 나타낸다. TGF- β 1은 강력한 상피간엽이행의 유도인자로서 상처 치유 및 비후성 반흔의 병리학적 성장에 중요한 역할을 한다. 이뿐만 아니라, 본 발명의 결과는 체외 충격과 처리가 콜라겐-I 및 피브로넥틴을 포함하는 세포외 기질 요소를 분명하게 감소시킴을 보여준다. 이러한 결과들은 간엽상피이행(MET) 유도와 상피간엽이행(EMT) 억제에 체외 충격과 처리의 항-반흔 효과와 연관되어 있음을 가리킨다. 세포 이동은 배아 발달단계부터 시작하여 생애주기 동안 계속하여 일어난다. 일반적으로 세포가 이동하기 위해서는 셀렉틴, 인테그린 및 카데린과 같은 세포 접착 분자들과 반응하거나 결합을 통하여 세포외 기질에 부착하여야 한다. 카데린이 세포 이동에 중요하다는 증거들이 증가하고 있다. 특히, N- 및 E-카데린의 발현 수준이 상피간엽이행에 밀접하게 관련되어 있으며[36], E-카데린의 감소는 N-카데린의 상향조절과 관련되어 있다[37]. 근섬유아세포의 침투 또는 이동의 증가는 종양 또는 상처 치유에서 N-카데린에 의존적이다[38]. 이뿐만 아니라, E-카데린은 상피 상처치유에서 세포 이동에 필수적인 것으로 나타났다[39]. 카데린 발현과 세포 이동의 관계를 감안하여 본 발명자들은 카데린 발현의 변화가 HTSFs의 이동의 변화와 관련되어 있는지를 평가하였다. qRT-PCR과 웨스턴 블롯팅 결과는 체외 충격과 처리 24시간 및 72시간 후 0.03 mJ/mm^2 에너지 플럭스 밀도 조건만 제외하고 모든 처리 조건 하에서 E-카데린과 N-카데린 발현이 각각 증가하고 감소하였음을 보여주었다. 이뿐만 아니라, 본 발명자들은 체외 충격과 처리 24시간 및 72시간 후 HTSF의 이동이 감소하였음을 관찰하였다. E-카데린 발현 증가와 세포 이동 감소 두 과정은 모두 간엽상피이행(MET)과 관련이 있으며, 이것은 간엽상피이행과 체외 충격과 처리의 항-섬유증 효과 사이에 관련이 있음을 제시한다.

[0017] ID 단백질(inhibitor of DNA binding protein) 패밀리에는 네 개의 패밀리 멤버(ID1~4)가 있는데, 이들은 bHLH(basic helix-loop-helix) 전사인자에 결합하여 이종이형체(heterodimer)를 형성하여 전사인자와 DNA의 결합을 저해한다[40,41]. 따라서, 이 단백질들은 세포 분화와 증식을 조절하며, 종양 유전자 또는 종양 억제자로서 작동할 수 있다[41]. ID 단백질들은 근조직에서 생긴 bHLH 전사인자인 Myo D 단백질과 반응할 수 있어, 근원성 분화를 음의 방향으로 조절할 수 있다[40]. 선행 연구들은 TGF- β 1-유도 섬유아세포의 근섬유아세포로 분화가 부분적으로 Myo D에 의존적임을 밝혔다. 나아가, 근섬유아세포에서 shRNA-매개 Myo D 발현 녹다운이 TGF- β 1-유도에 의한 반응을 반전시킴을 밝혔다[42]. 특히, 한 시험관 내 연구에서는 ID-1 과발현이 TGF- β 1-유도 Smad 2/3 신호전달을 억제하여, 사람 피부 섬유아세포에서 콜라겐 발현을 감소시킴을 밝혔다[22]. ID-2 단백질 또한 폭넓은 항-섬유증 효과를 나타내는데, ID2 트랜스제닉 마우스는 부분적으로는 하향 조절된 트위스트에 의하여 블레오마이신-유도 폐 섬유증에 저항성을 나타낸다. 그럼에도 불구하고 트위스트에 의한 폐포 상피세포 결손은 블레오마이신 처리 후 섬유증을 일으켰다[23]. 나아가, 어떤 보고에서는 수용성 세포외 기질 펩타이드가 상피세포인 MCF-10A 상에 ID1과 ID2의 mRNA 발현을 저하조절하는 반면, TGF- β 신호전달을 유도한다고 밝혔다[43]. 본 발명에서는 체외 충격과 처리가 ID-1 및 ID-2의 단백질 발현은 현저히 상향조절하는 반면, 트위스트-1 단백질 발현은 감소시킴을 밝혔다. 본 발명자들의 실험 결과는 상기 선행 연구들의 결과에 의하여 뒷받침되며, 비록 다른 ID 단백질인 ID3 및 ID4의 발현은 탐지하지 못했지만, 체외 충격과 처리의 항-반흔 효과 또는 간엽상피이행(MET) 활성 유도가 ID 및 트위스트-1 단백질 발현을 조절을 통해 이루어짐을 가리킨다. 본 발명자들은 전사인자 트위스트-1이 HTSF에서 체외 충격과 처리에 의하여 증가하였음을 밝혔다.

[0019] 본 발명은 비후성 반흔의 가려움과 통증을 완화하고 비후성 반흔의 크기를 억제하기 위하여 비후성 반흔에 체외 충격과를 처리하는 방법에 있어서, 체외 충격과를 $0.03 \sim 0.3 \text{ mJ/mm}^2$ 의 1000 임펄스/cm로 처리함을 특징으로 하는 체외 충격과 처리방법에 관한 것이다.

- [0020] 또한, 본 발명은 상기 체외 충격과 처리장치로서 전자기 원통형 코일의 집중 충격과 공급원을 갖춘 체외 충격과 장치를 이용함을 특징으로 하는 체외 충격과 처리방법에 관한 것이다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 비후성 반흔이 화상으로 인하여 형성된 비후성 반흔임을 특징으로 한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 체외 충격과 처리가 상피간엽이행을 억제함을 특징으로 한다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상피간엽이행 저해제를 포함하는 비후성 반흔 개선용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상피간엽이행 저해제가 라파마이신, 17-AAG 및 LY294002 중 선택된 1종 이상임을 특징으로 한다.
- [0025] 또한, 본 발명은 TGF- β 1 유전자 발현 억제제 또는 TGF- β 1 단백질 발현 억제제를 포함하는 비후성 반흔 개선용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0026] 또한, 본 발명은 TGF- β 1 유전자 억제제가 TGF- β 1 유전자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드임을 특징으로 한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 TGF- β 1 단백질 발현 억제제가 TGF- β 1 단백질에 대한 모노클론 항체임을 특징으로 한다.
- [0028] 또한, 본 발명은 세포외 기질 형성 억제제를 포함하는 비후성 반흔 개선용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0029] 또한, 본 발명은 세포외 기질 형성 억제제가 독시사이클린(doxycycline)임을 특징으로 한다.
- [0030] 또한, 본 발명은 ID 단백질(inhibitor of DNA binding protein)을 포함하는 비후성 반흔 개선용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0031] 상피간엽이행 저해제, TGF- β 1 유전자 발현 또는 단백질 발현 억제제, 세포외 기질 형성 억제제 또는 ID 단백질을 유효성분으로 함유하는 약제학적 조성물은 약제학적 분야에서 통상적으로 허용되는 담체와 함께 배합하여 통상적인 방법에 의해 경구 또는 주사 형태로 제형화할 수 있다. 경구용 조성물로는 예를 들면 정제 및 젤라틴 캡슐이 있으며, 이들은 활성 성분 이외에도 희석제(예: 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활착제(예: 실리카, 탭크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 함유하고, 정제는 또한 결합제(예: 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리돈)를 함유하며, 경우에 따라서 붕해제(예: 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨염) 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유하는 것이 바람직하다. 주사용 조성물은 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하고, 언급한 조성물은 멸균되고/되거나 보조제(예: 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제 용액 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염/또는 완충제)를 함유한다. 또한, 이들은 기타 치료적으로 유용한 물질을 함유할 수 있다.
- [0032] 이와 같이 제조된 약제학적 제제는 목적하는 바에 따라 경구로 투여하거나, 비경구 방식 즉, 정맥 내, 피하, 복강 내 투여 또는 국소적용할 수 있다. 용량은 일일 투여량 0.0001~100mg/kg을 1 내지 수회에 나누어 투여할 수 있다. 특정 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 투여시간, 투여방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 변화될 수 있다.
- [0033] 나아가, 본 발명은 상기 상피간엽이행 저해제, TGF- β 1 유전자 발현 또는 단백질 발현 억제제, 세포외 기질 형성 억제제 또는 ID 단백질을 유효성분으로 하고 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는, 비후성 반흔 개선용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0035] 본 발명의 비후성 반흔 개선용 체외 충격과는 0.03 ~ 0.3 mJ/mm²의 1000 임펄스/cm² 조건으로 처리함으로써 세포 생존율에 영향을 미치지 않고, 상피간엽이행 및 세포외 기질의 형성을 억제하여 비후성 반흔을 개선할 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명에서 체외 충격과 처리가 비후성 반흔 조직 유래 섬유아세포에 미치는 분자적 기작을 밝힌 결과, 체외 충격과 처리가 상피간엽이행을 저해하고, 세포외 기질 형성을 저해하는 것으로 나타났으며, 이를 이용하여 상피간엽이행 저해제 또는 세포외 기질형성 저해제를 이용하여 비후성 반흔 개선용 약제를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0038]

도 1은 비후성 반흔 조직 유래 섬유아세포(HTSFs)의 특징을 나타낸다. 짝지은 인간 정상 섬유아세포(HNF)와 비후성 반흔 조직 유래 섬유아세포(HTSF)는 화상 후 비후성 반흔 조직을 가진 환자 네 명으로부터 추출하여 배양하였다.

TGF- β 1, α -SMA(alpha smooth muscle actin), COL-I(collagen type I), COL-III(collagen type III), FN(fibronectin), 비멘틴(Vimentin), 섬유아세포 특이적 단백질 1(fibroblast specific protein 1; FSP-1), 트위스트-1 및 N-카데린의 단백질 발현은 진피에서 추출한 HNF와 비교하여 HTSFs에서 현저히 높았다. E-cad(E-cadherin), ID-1(inhibitor of DNA binding protein 1) 및 ID-2(inhibitor of DNA binding protein 2)는 진피에서 추출한 HNF와 비교하여 HTSFs에서 낮았다. 이 단백질들의 발현은 특이적 항체에 대한 웨스턴 블롯팅으로 측정하였다. 각 밴드의 강도는 로딩 대조군인 β -액틴 또는 라미닌 B1과 비교하여 각각 표준화하였다. HNF, 사람 정상 피부 유래 섬유아세포(Human normal skin derived fibroblast); HTSF, 사람 비후성 반흔 유래 섬유아세포(human hypertrophic scar derived fibroblast). * $p < 0.05$ 는 대응하는 HNF와 비교한 것이다.

도 2는 실험 개요도와 HTSFs의 생존율을 나타낸다. 사람 비후성 반흔 조직에서 디스페이즈(dispass)로 피부를 분리하고, 타입 IV 콜라게네이즈로 처리하였다. 비후성 반흔 조직 유래 섬유아세포(HTSF)를 분리하여 모으고 배지에 현탁한 다음 배양하였다. 배지에서 세포를 떨어뜨린 후 HTSF를 17mL 코니칼 튜브에 넣어 현탁하였다. 체외 충격과 치료는 0.03, 0.1 및 0.3 mJ/mm²의 에너지 플럭스 밀도에서 1000 impulse/cm²로 수행한다. 이후, HTSFs를 96웰 배양접시에 시드하고 생존율을 측정하고, μ -디쉬에 넣어 이동률을 측정하고, T75 배양 접시에 넣어 RT-PCR 및 웨스턴 블롯을 수행한다 (0 h). 24시간 후, HTSF 생존율을 측정했다. μ -디쉬의 삽입물을 일단 제거하면 HTSF가 움직이기 시작하며, 24시간 및 48시간 (체외 충격과 처리 이후 48시간 및 72시간) 후 이동을 분석하였다. RT-PCR 및 웨스턴 블롯은 플레이팅 후 각각 24시간과 72시간에 수행하였다(A). 체외 충격과 처리는 HTSFs의 생존율에 영향을 미치지 않았다(B). 세포 생존율은 Cell Titer-Glo® 발광 세포 생존율 측정키트로 체외 충격과 처리 24시간 후 측정했다. 각 군은 여섯 번 측정하였고, 실험은 독립적으로 세 번씩 수행하였다. HTSF 생존율은 미처리 세포에 대하여 백분율로 나타내었다. Un: 미처리 세포(untreated cells).

도 3은 비후성 반흔 조직 유래 섬유아세포(HTSF)에서 체외 충격과 처리가 TGF- β 1과 α -SMA 발현을 감소시킴을 보여준다. HTSF는 화상후 비후성 반흔 조직이 있는 네 명의 환자에게서 추출하여 배양하였다. TGF- β 1 (A) 및 α -SMA (C)의 mRNA 발현은 Light Cycler 실시간 PCR 시스템을 이용하여 체외 충격과 처리 24시간 및 72시간 후 측정하였다. 각 시료는 두 번씩 분석하였고, 실험은 최소한 세 번씩 독립적으로 수행하였다. mRNA 발현은 $\text{ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 로 표준화하였고, 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타났다. * $p < 0.05$ 및 $\dagger p < 0.01$ 은 대응하는 미처리 대조군과 비교한 값이다. TGF- β 1 (B) 및 α -SMA (D)의 단백질 발현은 체외 충격과 장치 처리 24시간 및 72시간 후 웨스턴 블롯 분석으로 측정하였다. 단백질 발현은 β -액틴으로 표준화하였고, 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타났다. * $p < 0.05$ 는 대응하는 미처리 대조군과 비교한 값이다. Un: 미처리 세포(Untreated cells).

도 4는 HTSFs에서 체외 충격과 처리가 세포의 기질 단백질 발현을 감소시킴을 보여준다. HTSF는 화상후 비후성 반흔 조직이 있는 네 명의 환자에게서 추출하여 배양하였다. 콜라겐-I(A)과 피브로넥틴(B)의 mRNA 발현은 Light Cycler 실시간 PCR 시스템을 이용하여 체외 충격과 치료 24시간 및 72시간 후 측정하였다. 각 시료는 두 번 측정하였고, 실험은 독립적으로 적어도 세 번 수행하였다. mRNA 발현은 $\text{ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 로 표준화하였고, 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타났다. * $p < 0.05$ 와 $\dagger p < 0.01$ 은 대응하는 미처리 대조군과 비교한 것이다. 콜라겐-I(C)과 피브로넥틴(D)의 단백질 발현은 체외 충격과 장치 처리 24시간 및 72시간 후 웨스턴 블롯 분석으로 측정하였다. 단백질 발현은 β -액틴으로 표준화하였고, 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타났다. * $p < 0.05$ 는 대응하는 미처리 대조군과 비교한 것이다. Un: 미처리 세포.

도 5는 HTSFs에서 N-카데린과 E-카데린의 발현에 대한 체외 충격과 치료의 효과를 나타낸다. HTSF는 화상후 비후성 반흔 조직이 있는 네 명의 환자에게서 추출하여 배양하였다. 체외 충격과 처리는 N-카데린의 mRNA 발현은 감소시켰고(A), E-카데린 mRNA 발현은 증가시켰다(B). mRNA 발현은 Light Cycler 실시간 PCR 시스템을 이용하여 체외 충격과 치료 24시간 및 72시간 후 측정하였다. 각 시료는 두 번 측정하였고, 실험은 독립적으로 적어도 세 번 수행하였다. mRNA 발현은 $\text{ratio} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ 로 표준화하였고, 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타났다. * $p < 0.05$ 및 $\dagger p < 0.01$ 은 대응하는 미처리 대조군과 비교한 것이다. 체외 충격과 처리는 N-카데린의 단백질 발현은 감소시켰고(C), E-카데린 단백질 발현은 증가시켰다(D). N-카데린(C)과 E-카데린(D)의 단백질 발현은 체외

충격과 장치 처리 24시간 및 72시간 후 웨스턴 블롯 분석으로 측정하였다. 단백질 발현은 β -액틴으로 표준화하였고, 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타났다. * $p < 0.05$ 는 대응하는 미처리 대조군과 비교한 것이다. Un: 미처리 세포.

도 6은 체외 충격과 처리가 HTSFs에서 ID-1, ID-2 및 트위스트-1의 발현을 조절함을 나타낸다. HTSF는 화상 후 비후성 반흔 조직이 있는 네 명의 환자에서 추출하여 배양하였다. ID-1 (A), ID-2 (B) 및 트위스트-1(C)의 단백질 발현은 체외 충격과 장치 처리 24시간 및 72시간 후 웨스턴 블롯 분석으로 측정하였다. 단백질 발현은 라민 B1으로 표준화하였고, 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타났다. * $p < 0.05$ 는 대응하는 미처리 대조군과 비교한 것이다. Un: 미처리 세포.

도 7은 체외 충격과 처리가 HTSFs의 이동을 감소시킴을 나타낸다. HTSF는 화상 후 비후성 반흔 조직이 있는 네 명의 환자에서 추출하여 배양하였다. (A) HTSF 세포를 체외 충격과 처리 후 35 mm μ -디쉬 내의 배양 삽입물 내에 시드한 다음 24시간 후 배양 삽입물을 제거하고, 세포가 없는 간격(cell-free gap)을 만들고, 24시간 및 48시간 동안 세포가 이동할 수 있도록 하였다. 사진은 광학 현미경 하에서 촬영하였다(크기 막대, 500 μ m). (B) 이동 정량분석은 미처리 세포에 대한 상대 백분율로 나타내었다. 미처리 세포를 대조군으로 이용하였고, 100%로 잡았다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타났다. * $p < 0.05$ 및 † $p < 0.01$ 은 대응하는 미처리 대조군과 비교한 것이다. Un: 미처리 세포.

도 8은 체외 충격과 처리 후 비후성 반흔 조직 유래 섬유아세포에서 β -액틴과 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate)의 mRNA 발현을 나타낸다. 비후성 반흔 조직 유래 섬유아세포에서 β -액틴과 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate)의 mRNA 발현은 체외 충격과 처리에 의해 영향을 받지 않았다. (A) GAPDH의 mRNA 발현; (B) β -액틴의 mRNA 발현. Un: 미처리 세포.

도 9는 체외 충격과 처리 후 비후성 반흔 조직 유래 섬유아세포에서 세포자기사멸 관련 인자들의 mRNA 발현을 나타낸다. 비후성 반흔 조직 유래 섬유아세포에서 세포자기사멸 관련 인자들인 bax(bcl-2 associated X protein) 및 bcl-2(B-cell lymphoma 2)의 mRNA 발현은 체외 충격과 처리에 의해 영향을 받지 않았다. (A) bax의 mRNA 발현; (B) bcl-2의 mRNA 발현. Un: 미처리 세포.

도 10은 체외 충격과 처리 후 비후성 반흔 조직 유래 섬유아세포에서 비멘틴의 발현을 조직화학분석한 것이다. 체외 충격과 처리는 비후성 반흔 조직 유래 섬유아세포에서 비멘틴 발현을 감소시키고 형태 변화를 유도한다. 비후성 반흔 조직 유래 섬유아세포에서 비멘틴에 대한 형광 면역조직화학(녹색) 및 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole) 핵 염색(청색)은 각각 체외 충격과 처리 24시간 및 72시간 후에 수행하였다(A와 B). 사진은 40 배 배율이며, 크기 막대 = 50 μ m이다. C와 D는 비멘틴을 정량한 형광 강도를 나타낸다. 실험은 세 개의 독립적인 비후성 반흔 조직 유래 섬유아세포에 대하여 수행하였다. 데이터는 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. * $p < 0.05$ 는 대응하는 미처리 대조군과 비교한 값이다. Un: 미처리 세포.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039] 아래에서는 구체적인 실시예를 들어 본 발명의 구성을 좀 더 자세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것이 아님은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 자명하다.

[0041] 재료와 방법

[0042] 1. 일차 세포 배양

[0043] 본 발명에서 사용한 사람 정상 섬유아세포(HNFs)는 피부 생검에서 유래한 것이며, 사람 비후성 반흔 유래 섬유아세포(HTSFs)는 화상 후 비후성 반흔 조직에서 외과적 방법으로 분리한 것이고, HNFs와 HTSFs는 환자 네 사람에게서 얻었다. 반흔은 1년 내지 2년 된 것이다. 본 연구는 한림대학교 한강성심병원 연구심의위원회가 승인한 것이다(2014년 7월 2일, 등록번호 2014-062). 간단히 설명하면, 피부와 반흔 조직을 작은 조각으로 자르고, 디스페이즈 II (Gibco, Waltham, MA, USA) 용액에 적시고, 4℃로 유지하며 밤새 배양하였다. 다음날, 표피를 진피로부터 분리하고, 진피는 타입 IV 콜라게네이즈 용액 (500U/mL)(Gibco, Waltham, MA, USA)으로 37℃에서 30분간 처리하였다. 시료는 10% 우태혈청 (FBS)과 페니실린, 스트렙토마이신 및 암포테리신 B가 포함된 1% 항생제-항진균제 (Gibco, Waltham, MA, USA)를 함유한 DMEM 완전배지로 불활성화하고, 여과한 후 300×g로 5분간 원심 분리하였다. 침전물은 완전배지에 재현탁하고, 37℃에서 5% CO₂ 조건으로 배양하였다. 두 번째 계대배양한

HTSFs를 이후 실험에 사용하였다[44].

2. 체외 충격과 처리

HTSFs는 0.1% FBS로 24시간 처리하여 혈청 공급을 제한한 다음 세포 분리 용액 Accutase® (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 이용하여 세포 배양 플라스크에서 제거하였다. 세포를 4.5cm 길이의 코니칼 튜브에 담긴 17mL의 절식 배지 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에 1.0×10^5 /mL로 넣었다. 체외 충격과 처리는 전자기 원통형 코일의 집중 충격과 공급원을 갖춘 Duolith SD-1® 장치 (StorzMedical, Tagerwilen, Switzerland)를 이용하여 수행하였다 (도 1). 세포는 0.03, 0.1 및 0.3 mJ/mm^2 의 1000 임펄스/cm에 4Hz 과장으로 노출하였다. 체외 충격과 처리 후, HTSFs는 96웰 배양 플레이트, μ -디쉬 및 T75 배양 플레이트의 절식 배지(0.1% FBS, 1% 항생제-항진균제)에서 24시간 또는 72시간 동안 유지하여 다음 실험에 이용하였다.

3. 세포 생존율 분석

HTSF 생존율은 CellTiter-Glo® 발광 세포 생존율 분석 키트(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 평가하였다. 체외 충격과 처리 후, 세포를 세포 배양 플레이트(Corning, New York, NY, USA) 상에 1.0×10^4 /well로 시드하였다. 배양 24시간 또는 72시간 후, 100 μ L의 Cell Titer-Glo® 시약을 배지에 가하여 잘 혼합하고 상온에서 10분간 배양하였다. 발광은 마이크로플레이트 판독기(Brea, CA, USA)를 이용하여 기록하였다. 생존율은 다음과 같이 계산하였다: 생존율(%) = (시료 발광/바탕(background) 발광)/(대조 시료 발광/바탕 발광) $\times$ 100.

4. HTSF 이동성 분석

세포 이동성은 35-mm μ -디쉬(Ibidi, GmbH, Planegg, Germany) 내의 배양 삽입물을 이용하여 제조자의 지시에 따라 분석하였다. 체외 충격과 처리 후, 세포를 2.0×10^4 /삽입물로 시드하였다. 24시간 후, 배양 삽입물을 제거하고, 500 $\pm$ 50 μ m의 세포가 없는 공간을 만들었다. 이동 중 세포의 증식에 의한 영향을 제거하기 위하여, 마이토신 C(mitomycin C, 5 μ g/mL) (Sigma, St. Louis, MO, USA)를 배지에 가하였다. 광학 현미경(IX 70, Olympus, Tokyo, Japan) 하에서 24시간 및 48시간 후 세포를 촬영하고, 세포가 없는 공간으로 이동한 세포 수를 Image J 소프트웨어(NIH, Bethesda, MD, USA)로 분석하였다. 체외 충격과 처리한 세포를 대조군으로서 미처리 세포와 비교하였고, 미처리 세포의 이동을 100%로 잡았다. 각 분석은 세 번씩 수행하였다.

5. qRT-PCR

재배양 24시간 또는 72시간 후 HTSFs를 모았다. 총 RNA를 ReliaPrep™ RNA Miniprep Systems(Promega)를 이용하여 제조자의 지시에 따라 분리하였다. RNA 농도는 나노드롭 분광기(BioTek, Winooski, VT, USA)로 측정하였고, 2 μ g의 RNA를 이용하여 고품질 cDNA 역전사 키트(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 cDNA를 합성하였다. qPCR은 LightCycler 480 system(Roche, Basel, Switzerland)으로 50ng의 cDNA, 0.5 μ M의 프라이머(Table S1) 및 PCR 프리믹스(Takara, Siga, Japan)를 이용하여 수행하였다. 반응 조건은 다음과 같다: 개시 변성은 95°C로 10분, 이후 95°C로 10초, 60°C로 30초 및 72°C로 20초간 연장을 40회 반복하여 증폭한다. 표적 유전자 mRNA 수준은 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 방법을 이용하여 GAPDH 수준으로 표준화하였다[45]. 각 qPCR은 최소 세 개의 다른 HTSF 배양물에서 추출한 cDNA로 두 번씩 수행하였다.

아래 표 1은 본 발명의 qRT-PCR에 이용한 프라이머 서열이다. 표 1의 서열은 서열목록에 순서대로 1~20번으로 나타내었다.

표 1

Gene	Forward (5' → 3')	Reverse (5' → 3')
TGF-β1	CACTCCCGTGGCTTCTAGTG	GTCTTGCAGGTGGAGAGTCC
α-SMA	CCGACCGAATGCAGAAGGA	ACAGAGTATTTGCGCTCCGAA
COL1A1	ATGTTTCAGCTTTGTGGACCTC	CTGTACGCAGGTGATTGGTG
Fibronectin	CCAGTCCACAGCTATTCCTG	ACAACCACGGATGAGCTG
E-cadherin	GCAGACCTTCCTCCCAATAC	TGGGTCGTTGTACTGAATGG
N-cadherin	CCACCTTA AAATCTGCAGGC	GTGCATGAAGGACAGCCTCT
Bax	CCTTTTGCTTCAGGGTTTCA	CCATGTTACTGTCCAGTTCCG
Bcl-2	TGCGGCCTCTGTTTGATTT	AGGCATGTTGACTTCACTTGT
β-actin	AGAGCTACGAGCTGCCTGAC	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
GAPDH	CATGAGAAGTATGACAACAGCCT	AGTCCTTCCACGATACCAAAGT

TGF-β1: Transforming growth factor beta 1; α-SMA: alpha smooth muscle actin; COL1A1: Collagen1A1; Bax: Bcl-2-associated X protein; Bcl-2: B-cell lymphoma 2; GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

[0057]

[0059]

6. 웨스턴 블롯팅

[0060]

재배양 24시간 또는 72시간 후 HTSFs를 모았다. 세포를 차가운 PBS로 세척하고 완전 포스파테이즈 저해제 (Roche,Basel,Switzerland) 및 프로테이즈 저해제 혼합물(Sigma, St. Louis, MO, USA)을 함유한 차가운 RIPA 완충액(Biosesang, Seongnam, Korea)에 재현탁하고, 30분간 4℃에서 교반하였다. 시료를 20분간(15,000×g, 4℃) 원심분리하고, 상층액의 단백질 농도를 BCA 키트(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 측정하였다. 시료는 5배의 시료 완충액과 혼합하고 70℃로 10분간 가열하였다. 그 후 시료(30μg protein/well)를 7.5% 또는 15% SDS-PAGE 겔에서 전기영동하고, 공극 크기 40 또는 20 μm의 PVDF 막(Merck Millipore, Billerica, MA, USA)에 전기이동하였다. 막은 5% 소 혈청 알부민(BSA)으로 상온에서 1시간 블로킹한 다음 폴리클론 토끼 항-TGFβ1 항체(1:500, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), 폴리클론 마우스 항-α SMA 항체(1:500, Abcam, Cambridge, UK), 모노클론 토끼 항-피브로넥틴 항체(1:2000, Abcam, Cambridge, UK), 폴리클론 토끼 항-콜라겐-I 항체(1:100, Abcam, Cambridge, UK), 모노클론 토끼 항-콜라겐-III 항체(1:2000, Abcam, Cambridge, UK), 모노클론 토끼 항-비멘틴 항체(1:1000, Abcam, Cambridge, UK), 폴리클론 토끼 항-FSP-1 항체(1:1000, Merck Millipore, Billerica, MA, USA), 모노클론 항 E-카데린 항체(1:1000, Cell Signaling, Danvers, MA, USA), 모노클론 마우스 항 N-카데린 항체(1:1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 모노클론 마우스 항-ID1 항체(1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 모노클론 마우스 항-ID2 항체(1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) 및 항-β-액틴 항체(1:5000, Cell Signaling, Danvers, MA, USA)로 16시간 동안 배양하였다. 막은 TBST 완충액으로 세 번(10min/wash) 세척한 다음, 퍼옥시테이즈-결합한 항-토끼 IgG 항체(1:5000, Merck Millipore, Billerica, MA, USA)로 상온에서 두 시간 배양하였다. 세 번 세척(10min/wash)한 다음, ECL 탐지 키트(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 현상하였다. 화학발광 이미징 시스템(WSE-6100; Atto, Tokyo, Japan)을 이용하여 촬영하였다. 밴드 강도는 CS Analyzer 4 소프트웨어 (Atto, Tokyo, Japan)로 측정하고, β-액틴 강도로 표준화하였다.

[0062]

7. 통계 분석

[0063]

모든 결과는 평균 ± 표준편차로 나타냈다. 두 군 간의 비교에는 Mann-Whitney U 시험법을 이용하였다. 통계 분석은 PASW statistics 18 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)로 수행하였고, p < 0.05는 유의성 있는 것으로 판단된다.

[0065]

결과 1: 비후성 반환 유래 섬유아세포(HTSFs) 특성 규명

[0066]

HTSFs의 특성을 규명하기 위해 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. EMT(epithelial-mesenchymal transition, 상피

간엽이행) 마커는 동일 계대의 사람 정상 섬유아세포(HNFs)보다 비후성 반흔 유래 섬유아세포(HTSFs)에 의해 현저히 강하게 발현되었다. TGF- β 1, α -SMA, 콜라겐-I, 콜라겐-III, 피브로넥틴, 비멘틴, FSP-1, E-카데린 및 트루스트 1 단백질 발현은 HNF보다 HTSF에서 현저히 높았다(도 1). 이와 대조적으로, N-카데린은 HNF보다 HTSF에서 발현이 현저히 낮았다(도 1). 이러한 결과들은 상피간엽이행이 비후성 반흔 형성의 병리학에 밀접하게 관여함을 나타낸다.

[0068] **결과 2: HTSF 생존율에 미치는 체외 충격과 처리의 효과**

[0069] 본 발명자들은 HTSF를 0.03, 0.1 및 0.3 mJ/mm²의 1000 임펄스/cm²에 노출하는 체외 충격과 처리 24시간 후 생존율 분석 키트를 이용하여 HTSF의 생존율을 분석하였다(도 2A). 체외 충격과 처리(ESWT)는 미처리 세포와 비교하여 HTSF의 생존율에 영향을 주지 않았다. ESWT-HTSFs는 정상적인 성장 패턴을 보여 성장률에 ESWT의 영향이 없음을 보여준다(도 2B). GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) 및 β -액틴의 mRNA 수준은 ESWT에 의해 영향을 받지 않았다. 이뿐만 아니라, 세포자기사멸 관련 인자들인 bax(bcl-2-associated X protein) 및 bcl-2(B-cell lymphoma 2)의 mRNA 발현 수준은 HTSF에서 체외 충격과 처리 24시간 및 72시간 후 영향이 없었다(도 8, 도 9).

[0071] **결과 3: HTSF에서 TGF- β 1, α -SMA 및 비멘틴 발현에 미치는 체외 충격과 처리의 효과**

[0072] 비후성 반흔 형성에서 TGF- β 1이 강력한 상피간엽이행 유도인자로서 결정적 역할을 하기 때문에, 본 발명자들은 먼저 체외 충격과 처리의 항-반흔 효과가 부분적으로 TGF- β 1 발현 억제에 의해 매개되는지를 조사하였다. TGF- β 1 mRNA 수준은 0.03, 0.1 및 0.3 mJ/mm²의 1000 임펄스/cm²에 노출하는 체외 충격과 처리 24시간 후 미처리 세포와 비교하여 현저히 감소하였다($p < 0.05$)(도 3A). 반면, 체외 충격과 처리 72시간 후에는 더 이상의 변화가 없었다. TGF- β 1 단백질 발현도 0.03, 0.1 및 0.3 mJ/mm²의 1000 임펄스/cm²에 노출하는 체외 충격과 처리 24시간 후 및 72시간 후에 미처리 세포와 비교하여 현저히 감소하였다($p < 0.05$)(도 3B). 다음으로, 본 발명자들은 TGF- β 1에 의해 직접적으로 조절되는 상피간엽이행 마커인 α -SMA의 발현을 조사하였다. α -SMA mRNA 발현은 0.03, 0.1 및 0.3 mJ/mm²의 1000 임펄스/cm²에 노출하는 체외 충격과 처리 24시간 및 72시간 후 미처리 세포와 비교하여 감소하였다($p < 0.05$ 또는 0.01)(도 3B). TGF- β 1 단백질 발현과 유사하게, α -SMA 단백질 발현도 모든 체외 충격과 처리 24시간 및 72시간 후 미처리 세포에 비하여 현저히 감소하였다($p < 0.05$)(도 3D). 마지막으로, 다른 상피간엽이행의 마커인 비멘틴의 발현을 측정하였다. 비멘틴 발현 또한 미처리 세포와 비교하여 체외 충격과 처리 24시간 및 72시간 후 현저히 감소하였다($p < 0.05$)(도 10). 반면, 미처리 세포는 더 크고, 세포체의 비멘틴 발현 수준은 더 높았다. 체외 충격과 처리 후, 에너지 플럭스 강도에 따라, HTSFs는 다발 모양 또는 별 모양 섬유아세포 유사 형태를 나타냈다(도 10A,B).

[0074] **결과 4: HTSFs에서 세포의 기질 관련 단백질 발현에 미치는 체외 충격과 처리의 효과**

[0075] 체외 충격과 처리 24시간 및 72시간 후 상피간엽이행의 마커인 콜라겐 1a1 및 피브로넥틴의 발현을 조사하였다. 콜라겐 1a1 mRNA 발현은 0.03 및 0.1 mJ/mm²에서 1000 impulses/cm²로 체외 충격과 처리한 24시간 후 및 72시간 후 미처리 세포와 비교하여 현저히 감소하였다($p < 0.05$ 또는 0.01)(도 4A). 따라서, 콜라겐-I 단백질 발현은 체외 충격과 처리 24시간 및 72시간 후 현저히 감소하였다($p < 0.05$)(도 4C). 피브로넥틴 mRNA 발현은 0.03, 0.1 및 0.3mJ/mm²에서 1000 impulses/cm²로 체외 충격과 처리한 24시간 후 및 72시간 후 미처리 세포와 비교하여 현저히 감소하였다($p < 0.05$ 또는 0.01)(도 4B). 놀랍게도, 피브로넥틴 단백질은 0.03, 0.1 및 0.3mJ/mm²에서 1000 impulses/cm²로 체외 충격과 처리한 24시간 후 현저히 증가하였고($p < 0.05$)(도 4D), 그러나 같은 조건의 체외 충격과 처리 72시간 후에는 현저히 감소하였다($p < 0.05$)(도 4D).

[0077] **결과 5: HTSFs에서 N-카데린과 E-카데린 발현에 미치는 체외 충격과 처리의 영향**

[0078] 상피간엽이행의 세포 표면 마커인 N-카데린과 E-카데린 발현을 측정하였다. N-카데린의 mRNA 발현은 모든 체외

충격과 처리에서 24시간 및 72시간 후 현저히 감소하였다($p < 0.05$ 또는 0.01)(도 5A). 반면, E-카데린의 mRNA 발현은 0.1 및 0.3mJ/mm^2 에서 $1000\text{ impulses/cm}^2$ 로 체외 충격과 처리한 24시간 및 72시간 후 현저히 증가하였다($p < 0.01$)(도 5B). mRNA 발현과 유사하게, 체외 충격과 처리 24시간 및 72시간 후, N-카데린은 현저히 감소하였고($p < 0.05$)(도 5C), 반면 E-카데린은 0.1 및 0.3mJ/mm^2 에서 $1000\text{ impulses/cm}^2$ 로 체외 충격과 처리한 24시간 및 72시간 후 현저히 증가하였다($p < 0.05$)(도 5D).

[0080] **결과 6: HTSF에서 전사인자 발현에 미치는 체외 충격과 처리의 효과**

[0081] 체외 충격과 처리가 항-섬유증 효과에 관련된 것으로 알려진 전사인자 ID-1(inhibitor of DNA binding 1) 및 ID-2(inhibitor of DNA binding 2)[22,23]의 발현을 조절하는지를 조사하였다. ID-1 단백질 발현은 0.03mJ/mm^2 에서 $1000\text{ impulses/cm}^2$ 로 체외 충격과 처리한 24시간 후 및 0.03 , 0.1 및 0.3mJ/mm^2 에서 $1000\text{ impulses/cm}^2$ 로 체외 충격과 처리한 72시간 후 현저히 유도되었다($p < 0.05$)(도 6A). 이와 대조적으로, ID-2 단백질 발현은 0.03 , 0.1 및 0.3mJ/mm^2 에서 $1000\text{ impulses/cm}^2$ 로 체외 충격과 처리한 24시간 후 및 0.03mJ/mm^2 에서 $1000\text{ impulses/cm}^2$ 로 체외 충격과 처리한 72시간 후 현저히 유도되었다($p < 0.05$)(도 6B). 이뿐만 아니라, 트위스트-1 단백질 발현은 체외 충격과 처리 24시간 및 72시간 후 각각 현저히 감소하였다($p < 0.05$)(도 6C). 이러한 결과는 전사인자 ID-1, ID-2 및 트위스트-1의 발현이 체외 충격과 처리의 항-반흔 효과에 관련되어 있음을 암시한다.

[0083] **결과 7: HTSF 이동성에 미치는 체외 충격과 처리의 효과**

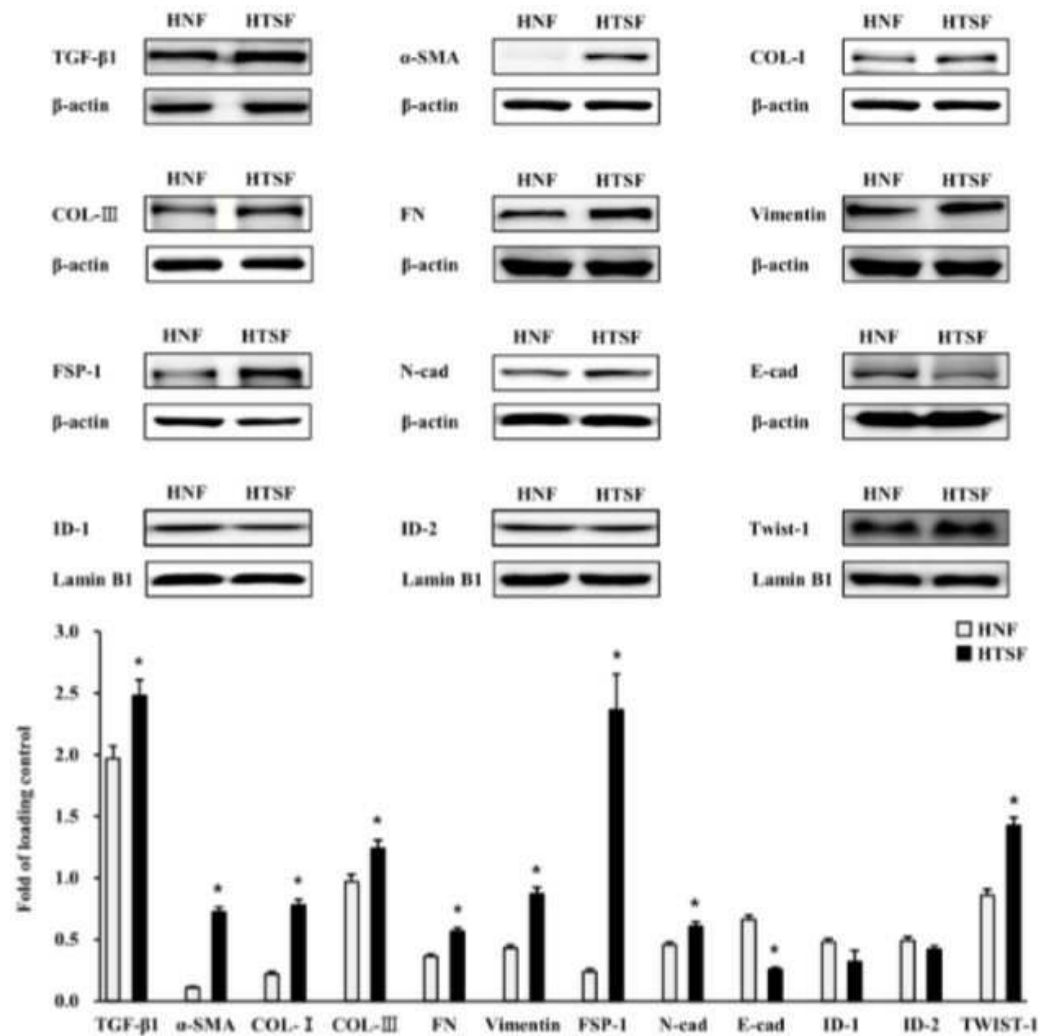
[0084] 이동성 분석을 위해 HTSFs를 체외 충격과 처리 후 삽입 배양 시스템에 시드하였다. 이것은 디쉬에 배양된 세포에 체외 충격과를 처리하는 경우 세포가 디쉬에서 분리되기 때문이다. HTSF 이동은 0.03 및 0.1mJ/mm^2 에서 $1000\text{ impulses/cm}^2$ 로 체외 충격과 처리하고 삽입물로 옮긴 24시간 후(체외 충격과 처리 48시간 후) 및 48시간 후(체외 충격과 처리 72시간 후) 미처리 세포와 비교하여 현저히 감소하였다($p < 0.05$)(도 7). 에너지 플럭스 밀도 0.3mJ/mm^2 에서는 이동이 더 많이 감소하였다($p < 0.01$)(도 7).

[0086] **결론**

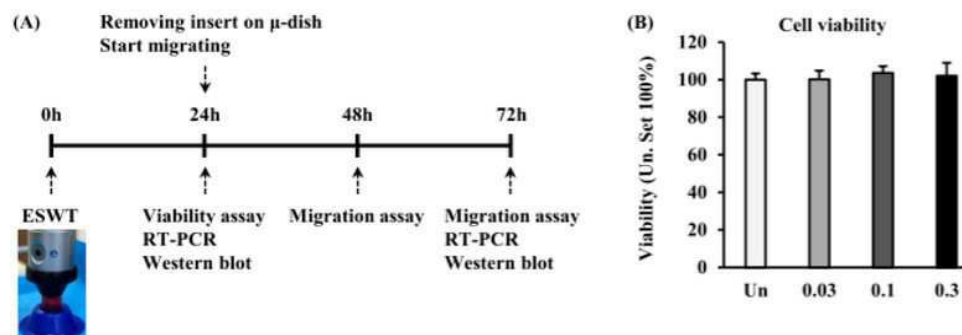
[0087] 본 발명에서는 체외 충격과 처리가 비후성 반흔 조직 유래 섬유아세포에서 α -SMA, 콜라겐-I, 피브로넥틴 및 N-카데린의 발현뿐만 아니라, 상피간엽이행의 강력한 유도인자인 TGF- β 1의 발현을 저해하고, E-카데린을 상향조절함으로써 상피간엽이행을 억제함을 밝혔다. 이뿐만 아니라, 체외 충격과 처리는 비후성 반흔 조직 유래 섬유아세포의 이동성을 저해한다. 이러한 분자적 변화는 비후성 반흔 조직 유래 섬유아세포에서 체외 충격과 장치의 항-섬유증 효과에 기여한다.

도면

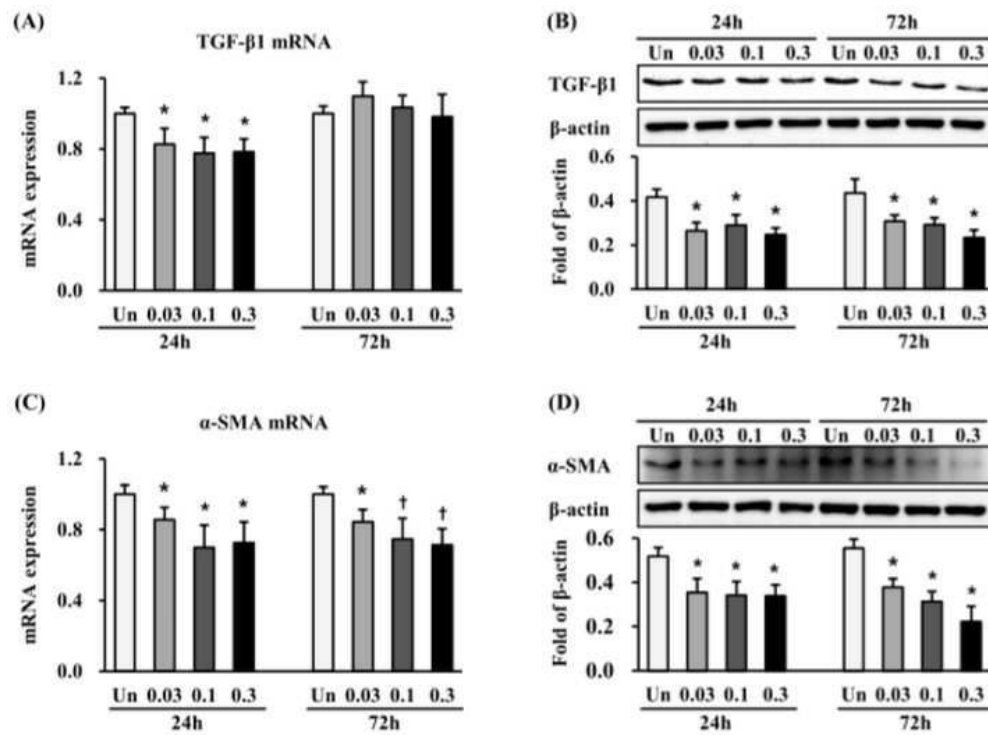
도면1



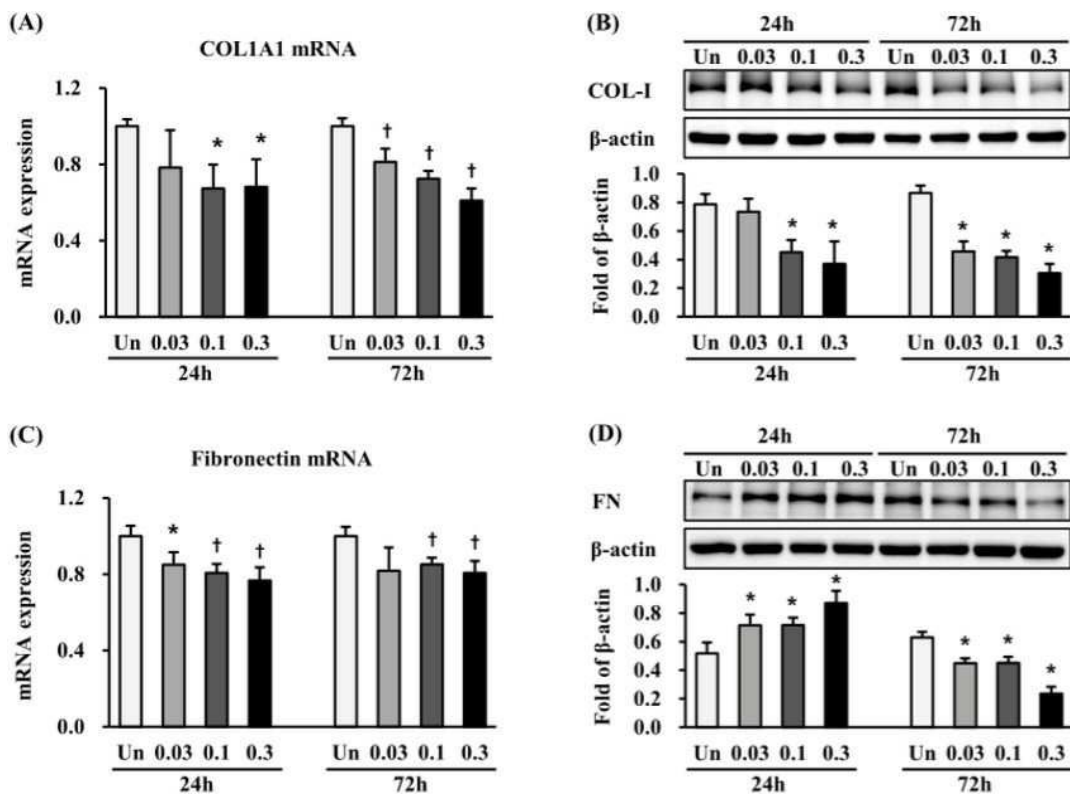
도면2



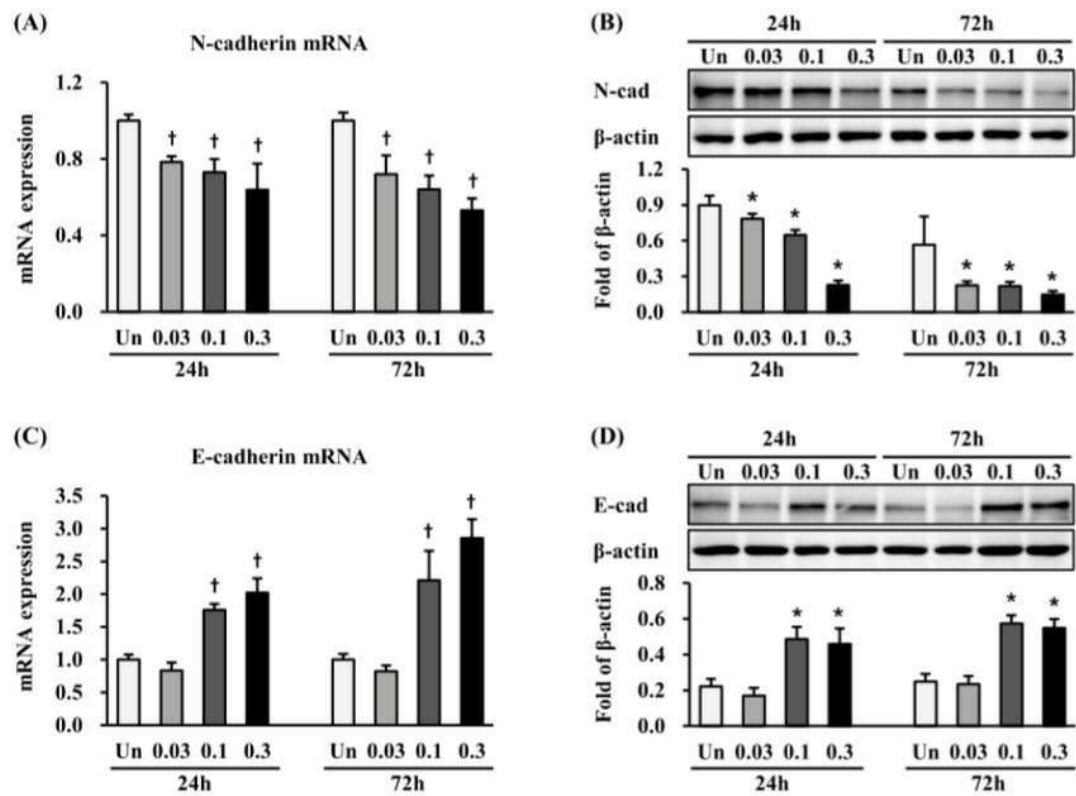
도면3



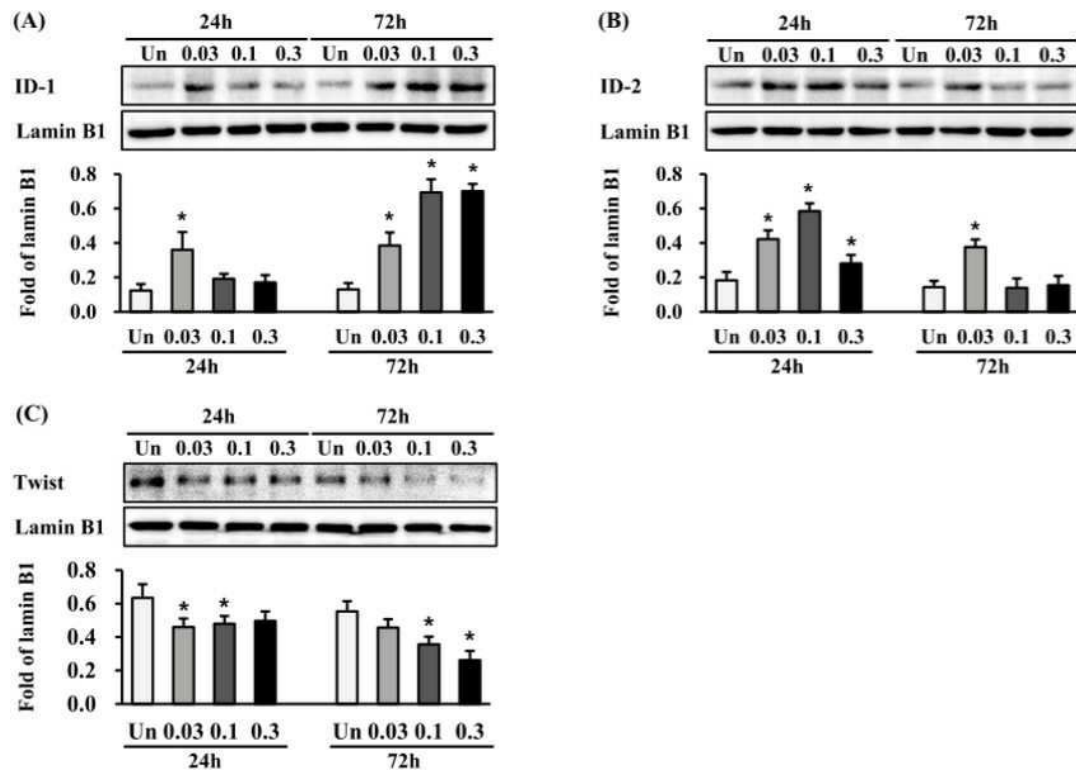
도면4



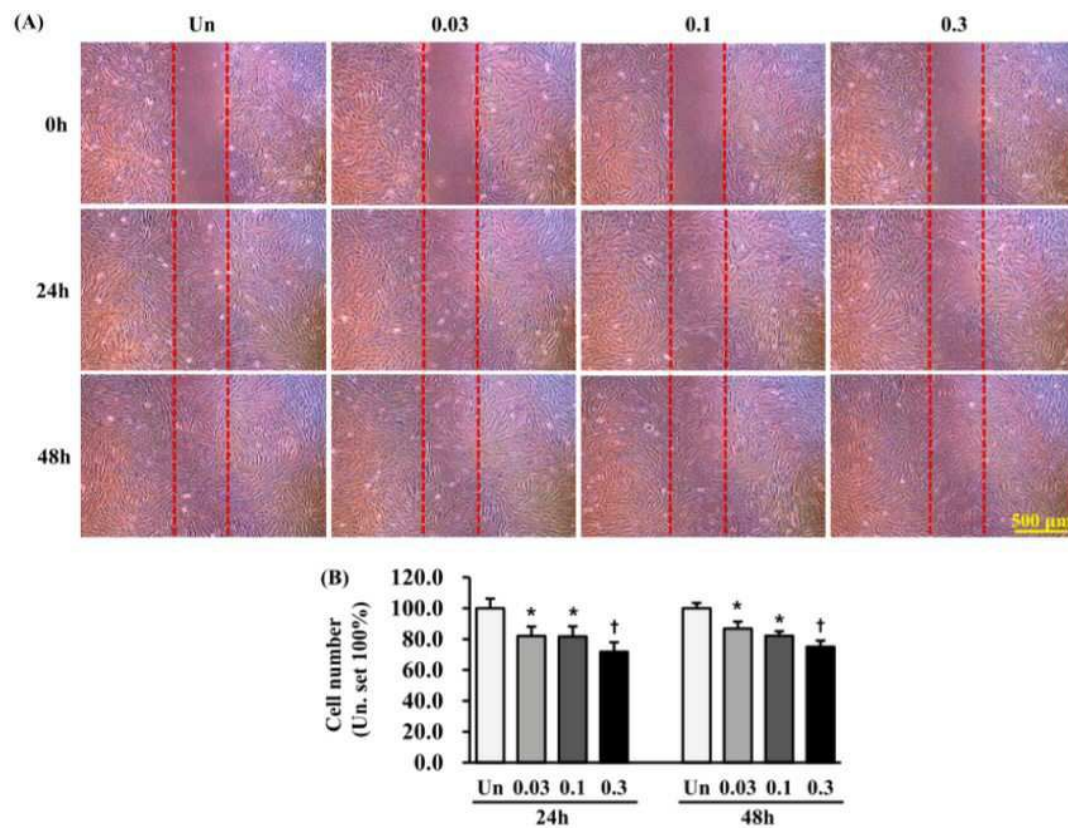
도면5



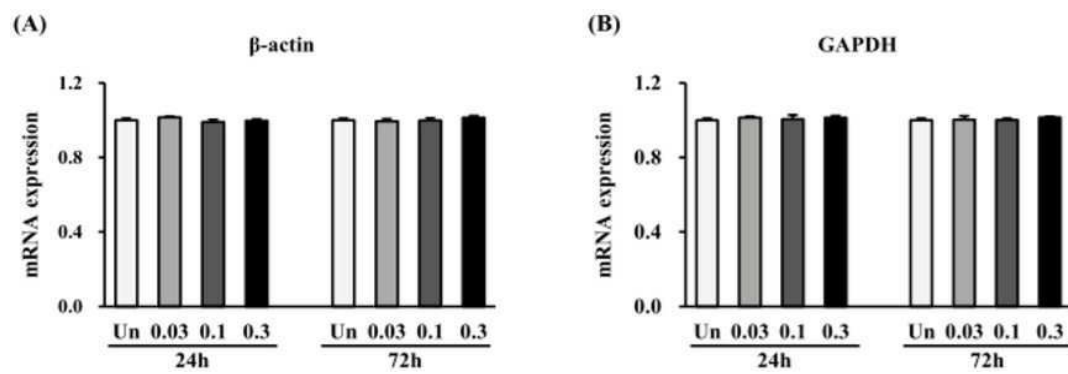
도면6



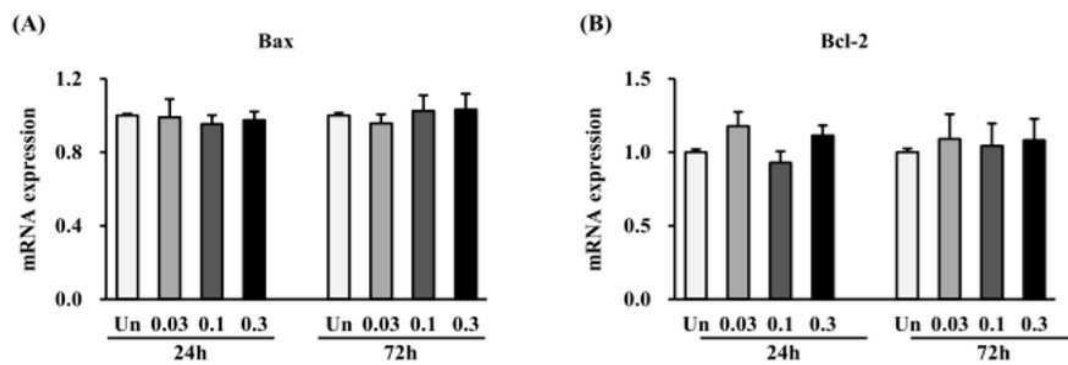
도면7



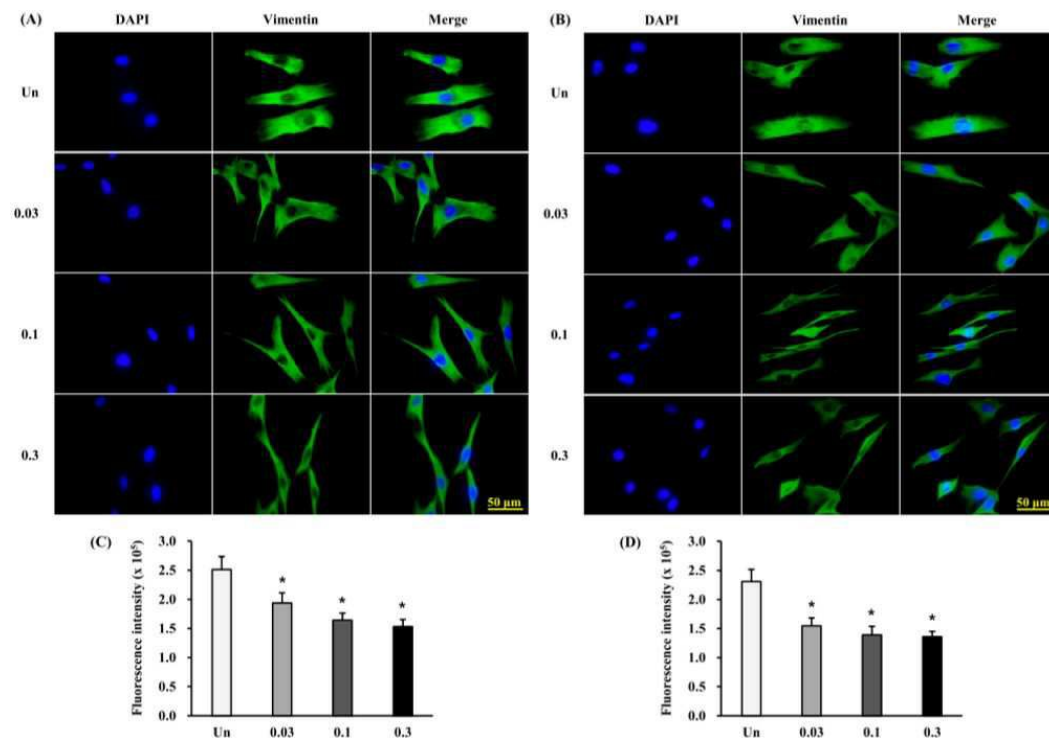
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> Industry Academic Cooperation Foundation, Hallym University
- <120> Treating Methods for Human Hypertrophic Scar using Extracorporeal Shock Wave Therapy or Inhibitors for Epithelial-Mesenchymal Transition
- <130> HallymU-DheongHoonSeo-ESWT
- <160> 20
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> primer
- <400> 1
- cactcccggtg gcttctagtg 20
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> primer
 <400> 2
 gtcttgcagg tggagagtcc 20
 <210> 3
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 3
 ccgaccgaat gcagaagga 19
 <210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 4
 acagagtatt tgcgtccga a 21

 <210> 5
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 5
 atgttcagct ttgtggacct c 21
 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> primer
 <400> 6
 ctgtacgcag gtgattggtg 20
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 7

ccagtccaca gctattcctg

20

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 8

acaaccacgg atgagctg

18

<210> 9

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 9

gcagaccttc ctccaatac

20

<210> 10

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 10

tgggtcgttg tactgaatgg

20

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 11

ccaccttaaa atctgcaggc

20

<210> 12

<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	12	
gtgcatgaag gacagcctct		20
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	13	
ccttttgctt cagggtttca		20
<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	14	
ccatgttact gtccagttcg		20
<210>	15	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	15	
tgcggcctct gtttgattt		19
<210>	16	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	16	

aggcatgttg acttcacttg t	21
<210> 17	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 17	
agagctacga gctgcctgac	20
<210> 18	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 18	
agcactgtgt tggcgtacag	20
<210> 19	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 19	
catgagaagt atgacaacag cct	23
<210> 20	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> primer	
<400> 20	
agtccttcca cgatacaaaa gt	22