

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0087624
(43) 공개일자 2024년06월19일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) *A61K 31/7105* (2006.01)
A61K 8/60 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01) *G01N 33/68* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
A61K 31/7105 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-0070803(분할)
 (22) 출원일자 2024년05월30일
 심사청구일자 2024년05월30일
- (62) 원출원 특허 10-2021-0104042
 원출원일자 2021년08월06일
 심사청구일자 2021년08월06일

- (71) 출원인
 고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- (72) 발명자
 신욱
 서울특별시 마포구 토정로31길 23
- 이재경
 서울특별시 구로구 구로중앙로18길 68, 2동 1203호
- 오수진
 충청북도 청주시 상당구 중교개로 104, 204동 1104호
- (74) 대리인
 위병갑

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a를 이용한 피부 노화 측정용 바이오마커 또는 피부 노화 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 피부 노화를 효과적으로 예측 및 진단할 수 있는 바이오마커로 사용 가능한 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 본 발명은 피부 노화세포에서 특이적으로 과발현되는 엑소좀 유래 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a를 이용한 피부 노화 진단용 조성물 및 피부 노화 예측 또는 진단 방법을 제공하며, 상기 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상을 억제하는 억제제를 포함하는 피부 노화 개선용 약학 조성물, 화장품 조성물 또는 주름 개선용 화장품 조성물을 제공할 수 있다.

대표도 - 도3

TOP 20 UPREGULATED	FOLD CHANGE	TOP 20 DOWNREGULATED	FOLD CHANGE
hsa-miR-10a-5p	4166.373	hsa-miR-128-3p	0.000
hsa-miR-451a	4075.717	hsa-miR-184	0.000
hsa-miR-30c-5p	3223.545	hsa-miR-200c-3p	0.000
hsa-miR-432-5p	1881.045	hsa-miR-125a-5p	0.000
hsa-let-7d-3p	1825.483	hsa-let-9-5p	0.001
hsa-miR-320b	1740.058	hsa-miR-27a-3p	0.005
hsa-miR-7706	1696.998	hsa-miR-3126-3p	0.018
hsa-miR-937-3p	1613.656	hsa-miR-3064-3p	0.024
hsa-miR-320a	1591.431	hsa-miR-6780b-5p	0.026
hsa-miR-22-3p	1544.899	hsa-miR-6765-3p	0.030
hsa-miR-199a-3p	1482.392	hsa-miR-5701	0.033
hsa-miR-760	1423.358	hsa-miR-484	0.040
hsa-miR-485-5p	1412.246	hsa-miR-30e-5p	0.040
hsa-miR-134-5p	1204.586	hsa-miR-6891-3p	0.055
hsa-miR-4516	1187.223	hsa-miR-122-5p	0.068
hsa-miR-493-3p	918.445	hsa-miR-99a-5p	0.087
hsa-miR-199b-3p	779.541	hsa-miR-30a-5p	0.088
hsa-miR-126-5p	645.500	hsa-miR-378a-3p	0.102
hsa-miR-6735-5p	581.525	hsa-miR-1-3p	0.104
hsa-miR-26a-5p	548.267	hsa-miR-125b-5p	0.128

(52) CPC특허분류

A61K 8/606 (2013.01)

A61P 17/00 (2018.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

G01N 33/6881 (2013.01)

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/148 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

C12Q 2600/178 (2013.01)

G01N 2500/00 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

마이크로RNA-10a 또는 마이크로RNA-30c의 발현 수준을 측정하는 물질을 포함하는 피부 노화 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 마이크로RNA-10a 또는 마이크로RNA-30c는 엑소좀 유래인 것인 피부 노화 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 마이크로RNA-10a 또는 마이크로RNA-30c는 hsa-miR-10a-5p 또는 hsa-miR-30c-5p인 것인 피부 노화 진단용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 물질은 마이크로RNA-10a 또는 마이크로RNA-30c에 특이적인 프라이머, 프로브 또는 항체인 것을 특징으로 하는 피부 노화 진단용 조성물.

청구항 5

(a) 개체의 생물학적 시료로부터 마이크로RNA-10a 또는 마이크로RNA-30c의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 마이크로RNA-10a 또는 마이크로RNA-30c의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 마이크로RNA-10a 또는 마이크로RNA-30c의 발현 수준에 비해 증가된 것을 확인하는 단계를 포함하는, 피부 노화 예측 또는 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 측정은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 또는 실시간 중합효소 연쇄반응(quantitative real time-polymerase chain reaction)으로 수행하는 것을 특징으로 하는 피부 노화 예측 또는 진단을 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

마이크로RNA-10a 또는 마이크로RNA-30c의 억제제를 유효성분으로 포함하는, 피부 노화 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

마이크로RNA-10a 또는 마이크로RNA-30c의 억제제를 유효성분으로 포함하는, 피부 노화 억제 또는 개선용 화장품 조성물.

청구항 9

제7항 및 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 억제제는 마이크로RNA-10a 또는 마이크로RNA-30c의 발현, 전사 또는 활성을 억제하는 것인 조성물.

청구항 10

제7항 및 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 억제제는 MMP-1 효소의 발현, 전사, 분비 또는 활성을 억제함으로써 피부 노화를 억제 또는 개선하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 11

마이크로RNA-10a 또는 마이크로RNA-30c의 억제제를 유효성분으로 포함하는, 피부 주름 개선용 조성물.

청구항 12

(a) 마이크로RNA-10a 또는 마이크로RNA-30c이 발현되는 피부 세포에 분석하고자 하는 시료를 처리하는 단계;

(b) 상기 피부 세포 내에서 마이크로RNA-10a 또는 마이크로RNA-30c의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

(c) 상기 (b) 단계의 측정 결과, 마이크로RNA-10a 또는 마이크로RNA-30c의 발현량이 시료를 처리하지 않은 대조군에 비해 감소되는 경우에 상기 시료는 피부 노화 억제 또는 개선용 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 피부 노화 억제 또는 개선용 물질을 스크리닝 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 피부 노화를 효과적으로 예측 및 진단할 수 있는 피부 노화 진단용 바이오마커로서 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a에 관한 것으로, 이를 이용한 피부 노화 진단용 조성물 및 피부 노화 예측 또는 진단 방법, 상기 바이오마커의 억제제를 이용한 피부 노화 예방 또는 개선용 조성물, 피부 주름 개선용 조성물 및 이의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 노화란 나이 증가에 따른 신체의 기능 및 구조의 생리학적 기능 감소를 의미하며, 노화가 진행될 경우 외부 병원에 대한 방어기능 감소 및 종양 유전자 활성화 등 여러 감염병 및 질병에 대한 감수성이 증가한다. 외부의 자극에 쉽게 노출되는 피부는 노화 진행이 빠르며 노화 진행에 따른 주름 생성 및 탄력 감소가 잘 알려져 있다. 최근 외적인 요소들이 주목받음에 따라 노화의 정도 및 진행 상태가 잘 반영되는 피부의 노화 방지 및 억제를 위한 다양한 화장품 조성물이 요구되고 있다.

[0003] 노화에 따른 세포 대사 및 기능 변화는 다양한 세포 모델에서 수행되어 보고되었다. 정상세포에 비해 노화 세포는 세포 주기 억제를 유도하는 p16과 p21, p53의 발현 증가에 따른 세포 분열 속도 및 횟수가 감소되어 있다. p16과 p21, p53을 포함한 노화 관련 분비 표현형(senescence associated secretory phenotype, SASP)에 속하는 특정 사이토카인, 성장인자, 단백질분해효소들의 발현 및 분비량은 노화세포에서 증가되어 있다. 또한 정상 세포에 의해 크기가 비대해지는 형태학적 변화가 일어나며 세포내 불필요 물질을 분해하는 리소좀의 크기 증가와 정상 리소좀에 비해 높은 pH로 인한 리소좀의 기능 저하가 보고되었다. 이러한 리소좀의 기능 변화를 측정하는 실험 기법인 senescence associated(SA) β -gal staining이 노화 수준 측정에 이용되며 노화 세포의 경우 정상 세포에 비해 β -gal staining이 증가 되어있다.

[0004] 피부 노화의 경우 크게 외인성 노화와 내인성 노화로 구분된다. 외인성 노화(stress-induced senescence)란 시간에 관계없이 외부의 자극에 의한 노화를 의미하며, 자외선 혹은 활성산소와 같은 외부 스트레스에 의한 DNA 손상 및 염색체의 말단 부분에 존재하는 말단소체의 길이 단축의 경우 유도된다. 내인성 노화(replicative senescence)의 경우 시간에 흐름에 따라 자연스럽게 진행되는 나이 들 혹은 세포 수준에서의 세대배양을 통해 유도되는 노화를 의미한다.

[0005] 현재 외인성 피부 노화 방지를 위한 자외선 차단 기능성 화장품의 개발 등이 이루어지고 있으나, 내인성 피부 노화 방지를 위한 해결책은 아직 부족하며, 따라서 내인성 피부 노화를 예방하거나 노화된 피부를 개선시키기 위한 노력이 필요하다.

[0006] 최근 전 세계의 많은 연구기관들이 주목하고 있는 엑소좀(exosome)은 세포 내에서 분비되는 작은 소포체 extracellular vesicles의 일종으로, 크기가 30~200nm에 해당한다. 특히 세포 간의 신호 교환 수단이자 각종 질

병의 바이오마커로서, 최근 엑소솜에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 엑소솜 안에는 세포에서 유래된 다양한 단백질, 유전물질(DNA, mRNA, miRNA) 등이 포함되어 있고 세포 간의 정보 전달 등에 관여하기 때문에 생물학 및 병리학 연구의 새로운 도구로서 각광받고 있다.

[0007] 엑소솜은 그 안에 마이크로RNA(microRNA)라는 조절성 RNA를 가지고 있는데 이것이 세포간의 상호작용을 조절하는 중요한 역할을 한다. 최근 노화를 조절하는 주요 인자로 마이크로RNA에 대한 관심이 높는데 마이크로RNA는 약 22개의 염기서열로 이루어진 짧은 암호화되지 않은 non-coding RNA로서 전사 이후의 단계에서 상보적인 messenger RNA의 발현을 방해하거나 분해함으로써 30% 이상의 단백질 생산 유전자 발현을 조절하는 것으로 잘 알려져 있다. 따라서 이러한 노화와 관련된 마이크로RNA는 다양한 기관의 노화에 따른 질환 예방 및 치료를 위한 물질로 유용하게 활용될 수 있을 것으로 기대되고 있다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 사람 피부 섬유아세포로부터 분리된 엑소솜 유래의 특정 마이크로RNA가 피부 노화 특이적으로 발현이 증가됨을 확인하였고, 상기 마이크로RNA의 억제제에 의해 피부 노화가 감소됨을 확인함으로써, 상기 마이크로RNA를 피부 노화의 진단 및 치료를 위한 신규 타겟으로서 이용할 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2014-0018448호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 피부 노화 진단용 조성물 및 피부 노화 예측 또는 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 피부 노화 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 피부 노화 억제 또는 개선용 화장품 조성물 및 피부 주름 개선용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 피부 노화 억제 또는 개선용 물질을 스크리닝 하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0014] 본 발명은 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현 수준을 측정하는 물질을 포함하는 피부 노화 진단용 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a는 엑소솜 유래인 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a는 hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-30c-5p 및 has-miR-451a인 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 물질은 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상에 특이적인 프라이머, 프로브 또는 항체인 것일 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 (a) 개체의 생물학적 시료로부터 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a의 발현 수준에 비해 증가된 것을 확인하는 단계를 포함하는, 피부 노화 예측 또는 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 측정은 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 또는 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction)으로 수행하는 것일 수

있다.

- [0020] 나아가, 본 발명은 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 피부 노화 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 피부 노화 억제 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 억제제는 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현, 전사 또는 활성을 억제하는 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 억제제는 MMP-1 효소의 발현, 전사, 분비 또는 활성을 억제함으로써 피부 노화를 억제 또는 개선하는 것일 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 피부 주름 개선용 조성물을 제공한다.
- [0025] 더 나아가, 본 발명은 (a) 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상이 발현되는 피부 세포에 분석하고자 하는 시료를 처리하는 단계; (b) 상기 피부 세포 내에서 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 측정 결과, 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현양이 시료를 처리하지 않은 대조군에 비해 감소되는 경우에 상기 시료는 피부 노화 억제 또는 개선용 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 피부 노화 억제 또는 개선용 물질을 스크리닝 하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0027] 사람 정상 피부 섬유아세포의 기능적인 변화로 인해 발생하는 피부 노화를 엑소좀 유래 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 발현 변화 분석을 통해 미리 예측 및 진단할 수 있고 이의 억제제를 이용하여 피부 노화 예방 또는 개선 및 피부 주름 개선에 도움이 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 도 1은 정상 피부 섬유아세포에서 계대배양을 통한 세포노화 유도를 β -gal 염색, 웨스턴 블롯, ELISA 및 실시간 PCR을 통해 확인한 도이다.
- 도 2는 피부 정상 또는 노화가 유도된 섬유아세포 배양액에서 분리된 엑소좀의 특성을 분석한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 차세대 시퀀싱 기술을 통한 사람 피부 섬유아세포 유래 엑소좀 마이크로RNA 분석 기법에 의해 가장 유의미하게 변화된 마이크로RNA 발현양을 비교한 도이다.
- 도 4는 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 유사체 또는 억제제를 정상 피부 섬유아세포에 트랜스펙션 한 후, 이에 따른 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 유사체를 정상 피부 섬유아세포에 트랜스펙션 한 후, 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a의 타겟 유전자 발현 정도를 나타낸 도이다.
- 도 6은 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 유사체를 정상 피부 섬유아세포에 트랜스펙션 한 후, 세포내 노화 유도 효과를 β -gal 염색 및 MMP-1 발현분석(ELISA)을 통해 확인한 도이다.
- 도 7은 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 억제제를 노화가 유도된 피부 섬유아세포에 트랜스펙션 한 후, 세포 노화 개선 효과를 β -gal 염색 및 MMP-1 발현 분석(ELISA)을 통해 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.

- [0032] 본 명세서에서 miRNA 및 miR은 마이크로RNA(microRNA)를 나타내는 것으로, "miRNA", "miR", "microRNA" 및 "마이크로RNA"는 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 용어, "마이크로RNA(microRNA, miRNA, miR)"는 생물의 유전자 발현을 제어하는 역할을 하는 작은 RNA를 의미하며, 타겟 mRNA 3'UTR(untranslated region)과의 상보적인 염기쌍 배열에 의한 타겟 mRNA 번역의 억제를 통해, 유전자 발현 과정에서 중요한 조절 역할을 할 수 있는 20~25개의 뉴클레오타이드를 포함하는 작은 RNA이다. 상기 microRNA는 증식, 분화, 세포사멸 등을 포함하는 세포 기능에 있어서 중요한 역할을 하며, 모든 동물에 존재하는 진화적으로 보존된 조절물질로서, 일부 microRNA는 그 프로모터 부위와 관련된 후성유전학적 조절 기작(히스톤 변형, DNA 메틸화 등)을 통해 유전자 발현 조절을 일으킨다고 알려져 있다.
- [0034] 본 발명자들은 사람 정상 피부 섬유아세포에서 계대배양을 통해 세포노화를 유도한 후 특이적으로 분비되는 엑소좀 유래 마이크로RNA를 차세대 생명정보 시퀀싱 기술을 통해서 분석한 결과, 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a의 발현양이 노화 특이적으로 증가함을 확인하였고, 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 유사체 투여 시 사람 정상 피부 섬유아세포에서 피부 노화와 관련된 특이적인 특성이 유도됨을 확인하였으며, 반대로 사람 노화 피부 섬유아세포에서 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 억제제 투여 시 피부 노화와 관련된 특이적인 특성이 감소하는 것을 확인함으로써, 엑소좀 유래 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 중 어느 하나 이상을 피부 노화 진단 및 예측을 위한 마커로 사용할 수 있다는 사실을 확인하였고, 이들 억제제를 피부 노화 예방 또는 치료용 약학 조성물, 피부노화 억제 또는 개선용 화장품 조성물 또는 주름 개선용 화장품 조성물 등으로 사용할 수 있음을 확인하였다.
- [0036] 따라서, 본 발명은 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현 수준을 측정하는 물질을 포함하는 피부 노화 진단용 조성물을 제공한다.
- [0037] 본 발명에서 상기 피부 노화는 내인성 노화를 의미하는 것일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0038] 본 발명에서 상기 피부 노화는 피부 섬유아세포의 노화일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0039] 본 발명에서, 상기 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a는 엑소좀 유래인 것일 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 "엑소좀(exosome)"은 다양한 세포들로부터 분비되는 막 구조의 작은 소포체를 의미한다. 엑소좀은 직경이 대략 30-200 nm 로 알려져 있고 다낭체와 원형질막의 융합이 일어나 세포 밖 환경으로 방출되는 소낭을 의미한다. 엑소좀의 대표적인 발현 마커로는 CD9, ALIX, CD63 가 해당된다.
- [0041] 본 발명에서, 상기 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a는 hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-30c-5p 및 has-miR-451a인 것일 수 있다.
- [0042] 본 발명에서 상기 유전자의 발현 수준은, 바람직하게 상기 유전자가 발현된 mRNA 수준, 즉, mRNA의 양을 의미하는 것일 수 있다.
- [0043] 본 발명에서 상기 발현 수준을 측정할 수 있는 물질은 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상에 특이적인 프라이머, 프로브 또는 항체인 것일 수 있다.
- [0044] 본 발명에서 상기 프라이머 또는 프로브는 상기 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 전체 또는 특정 영역을 특이적으로 증폭할 수 있는 프라이머 또는 프로브일 수 있으며, 상기 프라이머 또는 프로브는 당업계에 알려진 방법을 통해 디자인할 수 있다.
- [0045] 본 발명에서 상기 "프라이머"란 용어는 적합한 온도 및 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 요소, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변화가 있을 수 있다. 또한, 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서 본 발명에서의 프라이머는 주형인 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 유전자 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 예를 들어, 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 각각의 프라이머는 서열 번호 1, 2 및 3으로 표시되는 염기서열을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 본 발명에 따른 프라이머는 유전자 증폭 반응에 이용될 수 있는 것이 바람직하다.
- [0046] 상기 "증폭 반응"은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 말하며, 이러한 유전자의 증폭 반응들에 대해서는 당업계에

잘 알려져 있고, 예컨대, 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction; PCR), 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction; RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(quantitative real time-polymerase chain reaction; qRT-PCR), 리가아제 연쇄반응(LCR), 전자 중재 증폭(TMA), 핵산 염기서열 기관 증폭(NASBA) 등이 포함될 수 있다.

[0047] 본 발명에서, 상기 "프로브"라는 용어는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타겟 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것을 말한다. 본 발명에 따른 프로브는 단일체일 수 있으며, 바람직하게는 올리고디옥시리보뉴클레오타이드일 수 있다. 본 발명의 프로브는 자연 dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 뉴클레오타이드 유사체 또는 유도체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 프로브는 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 프로브는 골격 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대, 펩타이드 핵산 (PNA) (M. Egholm et al., Nature, 365:566-568(1993)), 포스포로티오에이트 DNA, 포스포로디티오에이트 DNA, 포스포로아미데이트 DNA, 아마이드-연결된 DNA, MMI-연결된 DNA, 2'-O-메틸 RNA, 알파-DNA 및 메틸 포스포네이트 DNA, 당 변형된 뉴클레오타이드 예컨대, 2'-O-메틸 RNA, 2'-플루오로 RNA, 2'-아미노 RNA, 2'-O-알킬 DNA, 2'-O-알릴 DNA, 2'-O-알카이닐 DNA, 핵소스 DNA, 피라노실 RNA 및 안히드로핵시톨 DNA, 및 염기 변형을 갖는 뉴클레오타이드 예컨대, C-5 치환된 피리미딘(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 에틸릴-, 프로피닐-, 알카이닐-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜- 포함), C-7 치환기를 갖는 7-데아자퓨린(치환기는 플루오로-, 브로모-, 클로로-, 아이오도-, 메틸-, 에틸-, 비닐-, 포르밀-, 알카이닐-, 알켄일-, 티아조릴-, 이미다조릴-, 피리딜-), 이노신 및 디아미노퓨린을 포함할 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명에서 상기 단백질의 수준을 측정할 수 있는 물질로는 상기 단백질에 대해 특이적으로 결합할 수 있는 다클론 항체, 단일클론 항체 및 재조합 항체 등의 항체를 포함할 수 있다.

[0049] 상기 "항체"는 당해 기술분야의 일반적 기술자가 공지된 기술을 이용하여 제조된 것을 사용할 수 있는데, 상기 항체의 제조는 예컨대, 다클론 항체의 경우에는 상기 단백질의 항원을 동물에 주사하고 동물로부터 채혈하여 항체를 포함하는 혈청을 수득하는 당업계에서 널리 공지된 방법에 의해 생산할 수 있으며, 이러한 다클론 항체는 염소, 토끼, 양, 원숭이, 말, 돼지, 소, 개 등의 임의의 동물 중 숙주로부터 제조가능하다. 단일클론 항체의 경우에는 당업계에 널리 공지된 하이브리도마(hybridoma) 방법(Kohler et al., European Journal of Immunology, 6, 511-519, 1976)을 이용하여 제조할 수 있거나 또는 파지 항체 라이브러리(Clackson et al., Nature, 352, 624-628, 1991, Marks et al., J. Mol. Biol., 222:58, 1-597, 1991) 기술을 이용하여 제조할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라, 항체 분자의 기능적인 단편을 포함할 수 있다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 뜻하며, Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 있다.

[0051] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 피부 노화 진단용 조성물을 포함하는 피부 노화 진단용 키트를 제공한다.

[0052] 본 발명의 피부 노화 진단용 키트는 상기 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상 및 이의 표적 유전자의 mRNA 또는 이의 단백질 수준을 측정할 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA 또는 shRNA, 프라이머, 프로브 또는 항체를 포함할 수 있으며, 이들의 정의는 앞서 기술된 바와 같다.

[0053] 상기 표적 유전자는 마이크로RNA-10a의 타겟 유전자인 EPHA4와 마이크로RNA-30c 타겟 유전자인 RUNX2 및 마이크로RNA-451a의 타겟 유전자인 IL6R를 의미하는 것일 수 있다.

[0054] 본 발명의 피부 노화 진단용 키트가 만일 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소(예컨대, Thermus aquaticus (Taq), Thermus thermophilus (Tth), Thermus filiformis, Thermus flavus, Thermococcus litoralis 또는 Pyrococcus furiosus(Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있으며, 본 발명의 피부 노화 진단용 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다.

[0055] 나아가, 본 발명에 따른 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.

- [0057] 또한, 본 발명은 상기 본 발명에 따른 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현 수준을 측정하는 방법을 통해 피부 노화 예측 또는 진단을 위한 정보를 제공하는 방법을 제공할 수 있는데, 바람직하게 상기 방법은 (a) 개체의 생물학적 시료로부터 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현 수준이 정상 대조군 시료의 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a의 발현 수준에 비해 증가된 것을 확인하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.
- [0058] 상기에서 유전자의 발현 수준 또는 단백질의 양을 측정하는 방법은 공지의 기술을 이용하여 생물학적 시료로부터 mRNA 또는 단백질을 분리하는 공지의 공정을 포함하여 수행될 수 있다.
- [0059] 본 발명의 정보제공방법에 있어서, 용어 "개체"는 피부 노화가 발병될 가능성이 있거나 또는 발병된 인간, 침팬지를 포함한 영장류, 개, 고양이 등의 애완동물, 소, 말, 양, 염소 등의 가축동물, 마우스, 래트 등의 설치류 등의 포유동물을 포함하는 의미로 해석된다.
- [0060] 본 발명에서 상기 "생물학적 시료"란 피부 노화의 발생 또는 진행 정도에 따른 상기 유전자의 발현 수준 또는 단백질의 수준이 정상 대조군과는 다른, 생체로부터 채취된 시료를 말하며, 상기 시료로는 예를 들면, 이에 제한되지는 않으나, 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장, 타액 및 뇨 등이 포함될 수 있고, 바람직하게는 피부 세포일 수 있다.
- [0061] 상기 유전자의 발현 수준 측정은 바람직하게는 mRNA의 수준을 측정하는 것이며, mRNA의 수준을 측정하는 방법으로는 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소연쇄반응(qRT-PCR), RNase 보호 분석법, 노던 블롯 및 DNA 칩 등이 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 측정은 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 또는 실시간 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)으로 수행하는 것일 수 있다.
- [0062] 상기 단백질 수준의 측정은 항체를 이용할 수 있는데, 이러한 경우, 생물학적 시료 내의 상기 마커 단백질과 이에 특이적인 항체는 결합물, 즉, 항원-항체 복합체를 형성하며, 항원-항체 복합체의 형성량은 검출 라벨(detection label)의 시그널의 크기를 통해서 정량적으로 측정할 수 있다. 이러한 검출 라벨은 효소, 형광물, 리간드, 발광물, 미소입자(microparticle), 레독스 분자 및 방사선 동위원소로 이루어진 그룹 중에서 선택할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다. 단백질 수준을 측정하기 위한 분석 방법으로는, 이에 제한되지는 않으나, 웨스턴 블롯, ELISA, 방사선면역분석, 방사선 면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있다.
- [0063] 따라서 본 발명은 상기와 같은 검출 방법들을 통하여, 대조군 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현 양, 마커 유전자의 mRNA 발현 양 또는 단백질의 양과 확인 대상 개체의 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현 양, 마커 유전자의 mRNA 발현 양 또는 단백질의 양을 확인할 수 있고, 상기 발현 양의 정도를 대조군과 비교함으로써 피부 노화 여부, 진행단계 또는 예후 등을 예측 및 진단할 수 있다.
- [0064] 보다 구체적으로 상기 피부 노화를 예측 또는 진단하는 방법은 본 발명에 따른 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현 수준이 정상 대조군 시료에 비해 증가하고, 상기 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 각각의 표적 유전자인 EPHA4, RUNX2 및 IL6R 중 어느 하나 이상의 유전자 발현 수준 또는 단백질 발현 수준 또는 활성이 정상 대조군 시료에 비해 감소되었을 경우, 피부 노화가 유발된 것으로 판단할 수 있다.
- [0066] 나아가, 본 발명은 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 피부 노화 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0067] 또한, 본 발명은 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 억제제를 유효 성분으로 포함하는, 피부 노화 억제 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0068] 본 발명에서 상기 억제제는 세포 내에서 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현, 전사 또는 활성을 억제하는(감소시키는) 체제를 의미하는 것일 수 있고, 구체적으로는 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상에 직접적으로 작용하거나 또는 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 상위 조절자에 간접적으로 작용하여 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현을 전사 수준에서 감소시키거나, 발현

된 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 분해를 증가시키거나, 그 활성을 방해함으로써, 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현 수준 또는 그 활성을 감소시키는 제제를 의미한다.

[0069] 마이크로RNA는 대부분 염색체 상의 인트론 등에 끼어 들어가 있으며, 이는 전사가 일어난 후 드로sha(Drosha) 등에 의해 프로세싱되어 전구체 형태(pre-miRNA)로 바뀐 후 엑스포틴(exportin)에 의해서 핵을 빠져나와 다이스(Dicer)에 의해 약 22bp 내의 길이의 성숙된 형태로 바뀌게 되고 이는 RISC(RNA interference silencing complex)와 결합하여 기능을 나타내게 된다. 본 발명의 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 억제제는 이러한 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상이 활성화되어 기능하는 경로에 관여하여 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현 수준을 감소시키거나, 활성을 억제할 수 있다.

[0070] 본 발명에서 이용할 수 있는 억제제는 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 억제 활성을 가진 물질이라면 특별한 제한 없이 사용할 수 있으며, 당업계에 공지된 표준 기법을 통해 세포에 처리될 수 있는 핵산 또는 폴리펩티드와 같은 생물학적 분자, 화합물, 세균이나 식물 또는 동물로부터 분리된 추출물일 수 있다. 바람직하게는, 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 염기서열에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상에 특이적인 siRNA, RNA 앵타머, 리보자임 및 화합물 등을 사용할 수 있다.

[0071] 본 발명에서 용어, "siRNA"는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱(silencing)을 매개할 수 있는 핵산 분자로서, 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knockdown) 방법 또는 유전자치료 방법으로 사용된다. 상기 siRNA는 이중가닥의 RNA가 다이스에 의해 절단되어 생성되는 21-25 뉴클레오타이드 크기의 작은 RNA 조각으로 상보적인 서열을 갖는 mRNA에 특이적으로 결합하여 발현을 억제할 수 있다. 본 발명의 목적상 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상에 특이적으로 작용하여 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 분자를 절단하여 RNA 간섭(RNAi, RNA interference) 현상을 유도함으로써, 상기 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상을 억제할 수 있다. siRNA는 화학적으로 또는 효소학적으로 합성될 수 있다. siRNA의 제조방법으로는 특별히 한정되지 않으며, 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다. 예를 들면, siRNA를 직접 화학적으로 합성하는 방법, 시험관 내(in vitro) 전사를 이용한 siRNA의 합성법, 시험관 내(in vitro) 전사에 의해 합성된 긴 이중가닥 RNA를 효소를 이용하여 절단하는 방법, shRNA 발현 플라스미드나 바이러스성 벡터의 세포내 전달을 통한 발현법 및 PCR(polymerase chain reaction) 유도 siRNA 발현 카세트(cassette)의 세포 내 전달을 통한 발현법 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0072] 본 발명에서 용어, "앵타머(aptamer)"는 단일가닥 올리고 뉴클레오타이드로서, 20-60 뉴클레오타이드 정도의 크기이며, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 서열에 따라 다양한 3차원 구조를 가지며, 항원-항체 반응처럼 특정 물질과 높은 친화력을 가질 수 있다. 앵타머는 소정의 표적 분자에 대하여 결합함으로써, 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다. 본 발명의 앵타머는 RNA, DNA, 변형된(modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 또한 직쇄상 또는 환상의 형태일 수 있다. 바람직하게 상기 앵타머는 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상에 결합하여 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 활성을 저해하는 역할을 할 수 있다. 이와 같은 앵타머는 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 서열로부터 당업자가 공지의 방법에 의해 제조할 수 있다.

[0073] 본 발명에서 용어, "안티센스 올리고뉴클레오타이드"는 상기 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상에 상보적으로 결합하여 발현을 억제하는 염기서열을 의미한다. 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 세포 내의 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상 분자의 단일 가닥 단편에 상보적으로 결합하여 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 프로세스 효율을 감소시킴으로써, 이들의 발현을 억제하고 기능을 저해시킬 수 있다. 성숙된 miRNA 분자는 주로 단일 가닥으로 존재하지만, 전구체 miRNA 분자는 주로 이중가닥 부분을 형성할 수 있는 부분적으로 자가-상보적인 구조(예를 들어 스템-루프(stem-loop) 구조)를 가질 수 있다. 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 전구체 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 분자의 단일가닥 단편에 상보적이거나, 성숙된 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 분자에 상보적일 수 있다.

- [0074] 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 RNA-RNA, RNA-DNA, RNA-PNA(단백질 핵산) 상호작용에 의해 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 핵산에 결합하여 이들의 활성을 변이시키는 비효소적 핵산 화합물이며, 이들은 하나의 연속서열이 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 염기서열에 상보적일 수 있고, 이들 자체적으로 루프를 형성하여 루프를 형성하는 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상에도 결합할 수 있다. 또한, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 단일 가닥 염기서열에 상보적인 이중나선 또는 단일나선 DNA, 이중나선 또는 단일나선 RNA, DNA/RNA 하이브리드, DNA 및 RNA 아날로그 및 염기, 당 또는 백본 변형을 지닌 올리고뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 안정성을 증가시키고, 뉴클레아제 분해에 대한 저항성을 증가시키기 위해 당분야에 알려진 방법에 의해 변형될 수 있다.
- [0075] 본 발명의 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 염기서열에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 표준 분자 생물학 기술, 예를 들어 화학적 합성 방법 또는 재조합 방법을 이용하여 분리 또는 제조할 수 있다. 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 15 내지 40 뉴클레오타이드의 길이를 갖는 것이 바람직하다.
- [0076] 본 발명에서 용어, "리보자임(ribozyme)"은 효소 활성이 있는 RNA 분자를 의미하는 것으로서, 화학적 반응을 분자 내적으로나 또는 분자 사이에서 촉매할 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 본 발명에서 이용할 수 있는 리보자임으로는 천연 시스템에서 발견되는 리보자임을 토대로 한 뉴클레아제나 핵산 중합효소 타입 반응을 촉매하는 리보자임의 상이한 유형들 모두 가능하며, 생체 내 특이한 반응을 촉매하기 위해 공학적으로 처리되는 리보자임도 이용 가능하다. 리보자임은 RNA 또는 DNA 기질을 절단할 수 있으며, 본 발명의 목적상 RNA 기질을 절단할 수 있다. 리보자임은 전형적으로 표적 기질의 인식 및 결합과 이어지는 절단을 통하여 핵산 기질을 절단하게 되는데, 이러한 인식은 대부분 염기쌍 상호작용을 토대로 하므로, 표적 특이적 절단이 가능한 특징을 가질 수 있다.
- [0077] 본 발명의 일실시예에 따르면, 본 발명의 상기 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 억제제는, 예를 들어, 서열번호 7 내지 9로 표시되는 염기서열 중 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0078] 본 발명에 있어서, 상기 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 억제제의 세포 내로의 도입은 당업계에 알려진 일반적인 방법을 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나 미세 주입법, 칼슘 포스페이트 공동-침전법, 전기 천공법 및 리포솜 이용법 등을 이용하여 실시할 수 있다.
- [0079] 본 발명에서, 상기 억제제는 MMP-1 효소의 발현, 전사, 분비 또는 활성을 억제함으로써 피부 노화를 예방, 억제, 개선 또는 치료하는 것일 수 있다.
- [0080] 본 발명에 따른 상기 피부 노화 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등과 같은 경구 투여용 담체 및 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995).
- [0081] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 적합한 형태로 제형화될 수 있다. 즉, 본 발명의 약학적 조성물은 공지의 방법에 따라 다양한 비경구 또는 경구 투여용 형태로 제조될 수 있으며, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것으로는 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 주사용 제형은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜 주사용으로 제형화될 수 있다. 또한, 경구 투여용 제형으로는, 이에 한정되지는 않으나, 분말, 과립, 정제, 환약 및 캡슐 등이 있다.
- [0082] 상기와 같은 방법으로 제형화된 약학적 조성물은 유효량으로 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있는데, 상기 "투여"란 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을

의미하며 물질의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다.

- [0083] 또한, 상기에서 "유효량"이란 환자에게 투여하였을 때, 예방 또는 치료 효과를 나타내는 양을 말한다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 환자의 질환 종류 및 중증도, 연령, 성별, 체중, 약물에 대한 민감도, 현재 치료법의 종류, 투여방법, 표적 세포 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 종래의 피부 노화 억제제, 예방 또는 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 억제제, 예방 또는 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 바람직하게는 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 1~10000 μ g/체중kg/day, 더욱더 바람직하게는 10~1000mg/체중kg/day의 유효용량으로 하루에 수회 반복 투여될 수 있다.
- [0084] 본 발명에 따른 상기 피부 노화 억제 또는 개선용 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 화장수, 영양로션, 영양크림, 수분크림, 마사지크림, 에센스, 페이스트, 마스크팩, 패치, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 클렌저, 오일, 파운데이션, 메이크업 베이스, 왁스 및 스프레이로 구성된 군으로부터 선택되는 1종 이상의 제형인 것일 수 있다. 상기한 성분 이외의 다른 성분들은 기타 제형 또는 사용 목적 등에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있다.
- [0085] 상기 화장품 조성물은, 예를 들면 용액, 젤, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포솜), 비이온형의 소낭 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 오일, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 포말(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다.
- [0086] 또한, 상기 화장품 조성물은 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속 이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 이들 보조제는 화장품학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입된다.
- [0087] 본 발명의 화장품 조성물은 단독 또는 중복하여 사용하거나, 본 발명 이외의 다른 화장품 조성물과 중복하여 사용할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 화장품 조성물은 통상적인 사용방법에 따라 사용될 수 있으며, 사용자의 피부 상태 또는 취향에 따라 그 사용횟수를 달리할 수 있다.
- [0089] 또한, 본 발명은 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 억제제를 유효성분으로 포함하는, 피부 주름 개선용 조성물을 제공한다.
- [0090] 상기 피부 주름 개선용 조성물은 피부 주름 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 피부 주름 예방 또는 개선용 화장품 조성물일 수 있고, 각 용어의 정의는 앞서 기술된 바와 같다.
- [0091] 또한, 본 발명의 상기 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현을 억제시킴으로서, 피부 노화 또는 피부 주름을 예방, 억제, 개선 또는 치료하는 방법을 제공할 수 있다.
- [0093] 더 나아가, 본 발명은 (a) 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상이 발현되는 피부 세포에 분석하고자 하는 시료를 처리하는 단계; (b) 상기 피부 세포 내에서 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현 수준을 측정하는 단계; 및 (c) 상기 (b) 단계의 측정결과, 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현양이 시료를 처리하지 않은 대조군에 비해 감소되는 경우에 상기 시료는 피부 노화 억제 또는 개선용 물질로 판정하는 단계를 포함하는, 피부 노화 억제 또는 개선용 물질을 스크리닝 하는 방법을 제공한다.
- [0094] 본 발명의 스크리닝 방법에 따르면, 먼저 상기 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상, 유전자 또는 단백질을 포함하는 피부 세포에 분석하고자 하는 시료를 접촉시킬 수 있다. 여기서 상기 "시료"는 상기 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현양, 유전자의 발현양, 단백질의 양 또는 단백질의 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시료는 화학물질, 올리고뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, siRNA(small interference RNA), shRNA 또는 천연물 추출물을 포함할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 이후, 시료가 처리된 세포에서

상기 유전자의 발현양, 단백질의 양 또는 단백질의 활성을 측정할 수 있으며, 측정 결과, 상기 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현양, 유전자의 발현양, 단백질의 양 또는 단백질의 활성이 증가 또는 감소되는 것이 측정되면 상기 시료는 피부 노화를 억제 또는 개선시킬 수 있는 물질로 판단할 수 있다.

[0095] 상기에서 마이크로RNA-10a, 마이크로RNA-30c 및 마이크로RNA-451a 중 어느 하나 이상의 발현양, 유전자의 발현양, 단백질의 양 또는 단백질의 활성을 측정하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 수행될 수 있는데, 예를 들면, 이에 제한되지는 않으나, 역전사 중합효소 연쇄반응(reverse transcriptase-polymerase chain reaction), 실시간 중합효소 연쇄반응(real time-polymerase chain reaction), 웨스턴 블롯, 노던 블롯, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion) 및 면역침전분석법(immunoprecipitation assay) 등을 이용하여 수행할 수 있다.

[0097] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0099] 실시예 1. 사람 정상 피부 섬유아세포에서 계대배양을 통한 세포 노화 유도

[0100] 1-1. 사람 피부 섬유아세포의 계대배양

[0101] 사람 피부 섬유아세포(human dermal fibroblast, HDF)에 세포 노화를 유도하기 위해, 계대배양을 실시하였다.

[0102] 구체적으로, 사람피부 유래 섬유아세포는 ATCC(USA)에서 구입하여, RPMI-1640 Medium (Corning, NY, USA)에 10% 우태아 혈청(fetal bovine serum)과 1% Penicillin/Streptomycin solution이 첨가된 배양액 조건에서 배양하였다. 세포가 배양용 플라스크에 약 80% 찼을 때 0.25% Trypsin-EDTA (Invitrogen, USA)를 이용하여 세포를 떼어낸 후 1200 rpm에서 3분간 원심분리하였다. 새 배지를 이용하여 세포를 재현탁한 후, 1:3의 비율로 새 배지에 배양하였다.

[0104] 1-2. 사람 피부 섬유아세포의 노화 유도 여부 분석

[0105] 사람 피부 섬유아 세포 (HDF)모델에서 계대배양을 통한 세포 노화 유도 후, 정상 세포(NS)와 노화 세포(S)에서 다양한 세포 노화 지표를 통해 노화유도여부를 검증하였다.

[0106] 먼저, 노화 수준 측정 실험 기법 중 하나인 senescence associated β -gal staining(β -gal 염색)을 수행하였다. 정상(NS) 및 노화(S) HDFs를 PBS 500 μ L로 2회 세척한 다음 4% paraformaldehyde 고정액을 이용하여 15분간 상온에서 고정화하였다. 고정화한 HDFs는 PBS 500 μ L로 2회 세척하고 Senescence β -Galactosidase Staining Kit (Cell signaling, USA)를 이용하여 SA- β -gal staining buffer [40 mM citric acid/phosphate(pH 6.0), 5 mM $K_3Fe(CN)_6$, 5 mM $K_4Fe(CN)_6$, 160mM NaCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -d-galactopyranoside in dimethylformamide] 300 μ L를 첨가하여 CO_2 가 없는 37°C에서 HDFs를 16시간 염색 후 광학현미경으로 관찰하였다.

[0107] 분석 결과, 정상세포에 비해 노화세포에서 β -gal staining이 증가함을 확인하였고, 정상 세포에 비해 노화 세포의 크기가 증가하였다(도 1A).

[0109] 1-3. 웨스턴 블롯 분석

[0110] 정상(NS) 및 노화(S) HDFs를 프로티아제 및 포스파타이제 저해제를 첨가한 RIPA buffer(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 100 μ L로 용해한 세포 용해액을 4°C, 12,000 Xg, 15분간 원심분리하여 상층액을 취하였으며, BCA의 방법으로 동량의 단백질 20 μ g 을 포함한 시료를 10% SDS-PAGE에 전기영동하였다. Gel에 분자량 별로 분리된 단백질을 PVDF membrane에 이동시킨 후 5% skim milk가 함유된 TBS-T (tris-buffered saline, 0.1% Tween 20)로 상온에서 1시간 blocking 하고 TBS-T를 이용하여 10분씩 3회 세척하였다. 일차 항체 β -actin(Santa Cruz, Dallas, TX, USA), p21(Santa Cruz), p53(Santa Cruz)과 이차 항체(Santa Cruz)는 5%

Bovine serum albumin (BSA)가 함유된 TBS-T로 녹인 후 각각 4℃ 에서 16 시간, 상온에서 1시간 반응하였고 TBS-T를 이용하여 10분씩 3회 세척하였다. Membrane은 Pierce ECL Western Blotting Substrate (ThermoFisher, Waltham, MA, USA)을 이용하여 각 단백질을 검출한 다음 화상분석시스템(Fusion Solo S, Vilber, Collegien, France)으로 현상하고 분석하였다.

[0111] 정상 세포와 노화 세포에서 단백질 추출 후 웨스턴 블랏을 통해 단백질 발현률을 측정된 결과, 세포노화에 따라 증가한다고 알려진 p21과 p53 단백질이 노화세포에서 증가하였다(도 2B).

[0113] 1-4. 효소결합면역흡착검사

[0114] 정상 세포와 노화 세포에서 분비되는 사이토카인 및 케모카인 분비 수준을 효소결합면역흡착분석(Enzyme-linked Immunosorbent assay, ELISA)을 통해 측정된 결과, SASP에 속하는 염증유발성 인자(IL-6과 IL-8) 및 단백질분해효소인 MMP-1, MCP-1과 같은 케모카인 분비가 노화세포에서 증가함을 확인하였다(도 1C).

[0116] 1-5. 역전사 중합효소 연쇄반응 및 실시간 중합효소 연쇄반응 분석

[0117] 정상 세포와 노화 세포에서 RNA 추출 후 RNA 분리 키트(Qiagen, USA)를 사용해 RNA를 분리하고, cDNA 합성(Promega, USA)을 사용하여 분리된 RNA 1 μ g에 대해 cDNA를 합성하였다. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)(Promega, USA) 및 실시간 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)(Invitrogen, USA)을 통해 세포 노화 지표의 유전자(p16, SDHA 및 SDHB)의 발현정도를 측정하였다.

[0118] 세포 노화에 따라 증가한다고 알려진 p16과 노화에 따라 감소한다고 알려진 미토콘드리아 콤플렉스 II catalytic subunit인 SDHA와 SDHB의 유전자 발현 수준을 확인한 결과, 노화 세포에서 p16의 발현이 증가하고 SDHA와 SDHB의 발현이 감소함을 확인하였다(도 1D).

[0119] 상기 결과로부터, 사람 피부 섬유아 세포 모델에서 계대배양을 통해 노화가 유도됨을 확인하였다.

[0121] 실시예 2. 사람 피부 섬유아세포 유래 엑소좀 분리 및 특성 분석

[0122] 2-1. 사람 피부 정상 또는 노화 섬유아세포로부터 엑소좀의 분리

[0123] 초고속 원심 분리와 검증된 엑소좀 분리키트를 통하여 높은 순도와 함량의 엑소좀을 분리하였다. 구체적으로 초고속 원심분리를 통해 농축한 정상 세포 및 노화 피부 섬유아세포 배양액을 ExoSpin 키트 (Cell Guidance Systems, Cambridge, UK)를 이용하여 엑소좀을 분리 및 정제하였다. 정상 세포와 노화 세포를 RPMI-1640 Medium (Corning, NY, USA)에 5% Gibco exosome-depleted FBS (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)이 첨가된 배양액 조건에서 배양하였다. 48시간 후 배양액을 Pierce Protein Concentrator PES, 10K MWCO (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)를 사용해 6,000x g, 1시간 원심분리하여 농축하였다. 농축된 배양액을 16,000×g, 30분 원심분리하여 remaining cellular debris를 제거하였다. ExoSpin buffer를 1:2로 첨가해서 4℃에서 24시간 반응시킨 후 16,00×g, 1시간 원심분리하여 상층액을 제거한 후 침전물(엑소좀)을 100 μ L PBS를 첨가해 재현탁하였다. 재현탁시킨 엑소좀을 ExoSpin 컬럼에 로딩(loading)하여 100×g, 30초 원심분리하여 정제된 엑소좀을 용출하였다.

[0125] 2-2. 엑소좀의 농도, 크기 및 형태 측정

[0126] 상기 2-1의 방법으로 정상 세포 및 노화 피부 섬유아세포 유래 배양액에서 분리된 엑소좀에 대하여, Nanoparticle Tracking Analysis(NTA)를 통해 정제된 엑소좀의 농도 및 크기를 측정된 결과, 분리된 엑소좀 직경은 대부분 200 nm 이하의 크기이며 정상세포에 비해 노화세포에서 엑소좀의 농도가 증가함을 확인하였다(도 2A). 투과전자현미경(TEM)을 통해 엑소좀 입자의 크기 별 분포를 확인한 결과 정제된 엑소좀의 입자 크기 및 형태를 확인하였다(도 2B).

[0127] 또한, 정제된 엑소좀에서 단백질 추출 후 웨스턴 블랏을 통해 대표적인 엑소좀 표면 마커인 CD9, ALIX, CD63 및 Syntenin 단백질의 발현정도 여부를 확인한 결과, 도 2C에 나타난 바와 같이, CD9, ALIX, CD63 및 Syntenin이 발현함을 확인하였다. 한편, Endoplasmic reticulum 에서만 발현되는 Calnexin을 음성마커로 사용한 결과 엑소

좀 단백질 내에 발현양이 없는 것을 확인하였다.

[0128] 이를 통해 상기 정상 세포 및 노화 피부 섬유아세포 유래 배양액에서 분리된 엑소솜은 전형적인 엑소솜의 특성을 갖는 것을 확인하였다.

[0130] 실시예 3. 사람 피부 섬유아세포 유래 엑소솜 마이크로RNA 및 발현양 분석

[0131] 사람 피부 섬유아세포의 정상 세포 및 노화 세포 유래 엑소솜에서 RNA 추출 후 피부 노화의 분자적 기전을 도출하기 위하여 차세대 시퀀싱 기술을 통한 소형 리보핵산(small RNA) 서열 분석 시퀀싱을 진행하였다. 전체 유전체 마이크로RNA 프로파일링을 분석하고 비교하였다.

[0132] 구체적으로 제조업자의 프로토콜에 따라 mirVANA miRNA isolation kit(Ambion, Austin, TX)를 사용하여 사람 피부 섬유아세포의 정상 세포 및 노화 세포 유래 엑소솜에서 소형 리보핵산이 풍부한 토털 RNA를 추출하였고 miRNA 라이브러리는 illumina library preparation protocol 에 따라 준비하였다. 각각의 라이브러리는 Illumina 어댑터 bar barcode로 색인화 하였다. small RNA 라이브러리는 6% TBE 유레아 폴리아크릴아마이드 겔에서 크기별로 나누고 140 내지 160 염기 쌍(base pair) 부분(fraction)은 겔로부터 절개하여 얻고 정제하였다. 모든 색인화된 샘플은 Illumina GAIIx(36 bp 단편(reads))의 하나의 레인(lane)에서 풀링(pooling)하고 서열분석(sequencing)하였다.

[0133] 가공되지 않은 소형 리보핵산(raw small RNA) 서열분석 맵핑(mapping)전에 표준 유전체(reference genome)로 해독하고, 염기 서열의 질(quality)적 해독은 FastQC(<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>)로 평가하였으며, 3' 말단에 부착된 어댑터 시퀀스는 내부(in-house)의 펄 스크립트(PERL script)로 제거하였다. 어댑터 시퀀스 트리밍(trimming) 후, 단편 크기(read size) 분배(distribution)는 R(<http://www.r-project.org>) 스크립트로 분석하였다. 어댑터 시퀀스를 트리밍한(adapter-trimmed) 소형 리보핵산 단편(read)은 디폴트 옵션(default option)을 가진 BWA(<http://bio-bwa.sourceforge.net>) 소프트웨어를 따른 UCSC Genome Browser(<http://genome.ucsc.edu>)로부터 다운로드된 참조 표준 유전체 mm10에 맵화(mapped)하였다(Li & Durbin 2009). 맵화한 서열 단편을 RNA 계열(class)로 구분하기 위해, 마이크로RNA(microRNA; miRNA), 운반RNA(transfer RNA; tRNA), 리보솜 RNA(ribosomal RNA; rRNA) 및 다른 비번역 RNA(non-coding RNA)를 계열화 하기 위한 UCSC Genome Browser와 fRNAdb(<http://www.ncrna.org/frnadb>)로부터의 주석 파일(annotation file)에서 소형 리보핵산과 반복서열(repeats)의 게놈 위치 정보(genomic position information)를 사용하여 수행하였다. 맵핑 위치(mapping position)와 주석 정보(annotation information)를 비교하여, 모든 맵화된 서열 단편과 부합되는 RNA 타입으로 계열화하고, 각각의 RNA 타입의 발현에 대한 상대적 빈도는 지정한 서열 단편 수에 기초하여 평가하였다. 이미 알려진 miRNA(miRBase ver. 20)에 대해서는 파이썬(Python) 스크립트를 사용하여 맵화된 서열 단편으로부터 각각의 전구체(precursor)와 최종 miRNA(mature microRNA)에 대한 FPKM(fragments per kilobase of transcript per million fragments mapped)을 계산하였다. 새로운 miRNA 탐색을 위해, 디폴트 파라미터(default parameter)를 가진 mirDeep2 소프트웨어를 사용하였고, MiRBase는 알려진 miRNA를 배제하기 위해 사용하였다.

[0134] 분석 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 정상 세포 대비 노화 세포 유래 엑소솜에서 유의미하게 증가 또는 감소한 20개의 마이크로RNA를 확인하였으며, 특히, 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a(hsa-miR-10a-5p, hsa-miR-30c-5p 및 has-miR-451a)의 발현이 노화 세포 유래 엑소솜에서 특이적으로 발현이 증가함을 확인하였다. 이때, 상기 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 각각의 특이적 발현 증가를 확인한 프라이머의 염기서열은 하기 표 1에 나타난 바와 같다.

표 1

마이크로RNA	프라이머의 염기서열	서열번호
마이크로RNA-10a	5' UACCCUGUAGAUCCGAAUUUGUG 3'	1
마이크로RNA-30c	5' UGUAAACAUCUACACUCUCAGC 3'	2
마이크로RNA-451a	5' AAACCGUACCAUACUGAGUU 3'	3

[0137] 실시예 4. 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 유사체와 억제제의 세포효과 분석

[0138] 상기 실시예 3에서 정상 세포 대비 노화세포 유래 엑소솜에서 특이적으로 발현이 증가하는 것으로 확인된 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 에 대한 기능 분석을 위하여 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 각각의 특이적 유사체(mimic)와 억제제(inhibitor) 및 음성대조군으로 miRNA Negative Control (ctl) 를 바이오니아에서 구입하였다. 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 각각의 특이적 유사체와 억제제의 염기서열은 하기 표 2에 기재된 바와 같다.

표 2

마이크로RNA	유사체(mimic)		억제제(inhibitor)	
	염기서열	서열번호	염기서열	서열번호
마이크로RNA-10a	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	4	UACCCUGUAGAUCGAAUUGUG	7
마이크로RNA-30c	UACCCUGUAGAUCGAAUUGUG	5	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	8
마이크로RNA-451a	AAACCGCCAUUACUGAGUU	6	AAACCGUUAACAUUACUGAGUU	9

[0140] 준비된 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a의 유사체와 억제제를 각각 섬유아세포에 형질 주입(transfection) 방식으로 세포내 주입하였다. 마이크로RNA 유사체 또는 억제제 형질 주입 30시간 후, RNA를 추출하여 역전사 중합효소 연쇄반응 및 실시간 중합효소연쇄반응을 통해 마이크로RNA 발현 수준을 측정하였다.

[0141] 그 결과, 유사체로 인한 마이크로RNA의 발현 증가와 억제제로 인한 마이크로RNA의 발현 감소를 확인하였다(도 4). 이를 통해 제작한 마이크로RNA 유사체 및 억제제가 해당하는 마이크로RNA의 발현양을 특이적으로 조절하는 것을 확인하였다.

[0143] 실시예 5. 유사체로 인한 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a의 타겟 유전자 발현조절 효과 분석

[0144] 타겟스캔 알고리즘이라는 높은 예측 정확도를 보이는 마이크로RNA 표적 예측 프로그램을 통해 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a의 타겟 유전자를 분석하였다. 정상 피부 섬유아세포에 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 유사체와 miRNA Negative Control (ctl)를 각각 형질 주입(transfection) 방식으로 세포내 주입하였다. 24시간 후 세포에서 RNA를 추출하였다. 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR) 및 실시간 중합효소연쇄반응(qRT-PCR)을 통해 마이크로RNA의 타겟 유전자(EPHA4, RUNX2 및 IL6R)의 발현 수준을 측정하였다.

[0145] 그 결과, 마이크로RNA-10a의 타겟 유전자인 EPHA4와 마이크로RNA-30c 타겟 유전자인 RUNX2 및 마이크로RNA-451a의 타겟 유전자인 IL6R 각각의 발현 레벨이 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 유사체 주입으로 인해 음성대조군(ctl) 대비 감소하는 것을 확인하였다(도 5).

[0147] 실시예 6. 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 유사체에 의한 사람 정상 피부 섬유아세포 노화 유도 효과 분석

[0148] 6-1. β -gal staining을 통한 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 유사체 주입에 따른 피부 섬유아세포의 노화

[0149] 정상 피부 섬유아세포에 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 유사체와 miRNA Negative Control (ctl)를 각각 형질 주입(transfection) 방식으로 세포내 주입하였다. 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 유사체에 의한 세포노화 유도 효과를 다양한 실험 분석을 통해 검증하였다. 먼저, Senescence associated β -gal staining을 진행한 결과, 정상 세포에서 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 유사체 주입에 의하여, 음성대조군(ctl)에 비해 β -gal staining 이 유의미하게 증가함에 따라, 노화가 유도되었음을 확인하였다(도 6A).

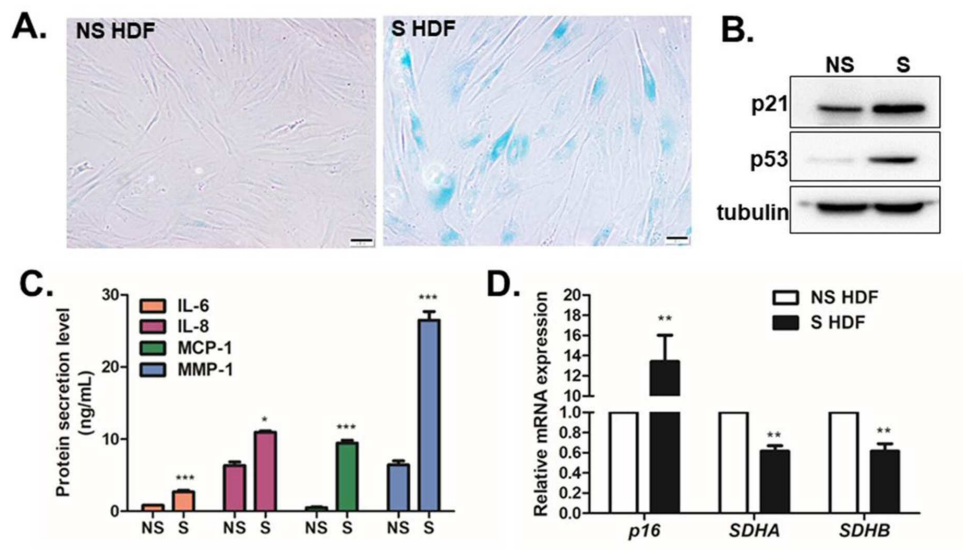
[0151] 6-2. ELISA를 통한 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 유사체 주입에 따른 피부 섬유아세포 노화 분석

[0152] MMP-1은 콜라겐분해효소로서 피부의 주요 형태인 제1형 콜라겐과 3형 콜라겐을 분해한다고 알려져 있고 자연적으로 노화된 피부와 광노화된 피부에서 콜라겐 합성이 감소되는 바가 알려져 있다. 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 유사체로 인한 노화가 유도되어 MMP-1 효소의 분비가 증가하는지를 확인하기 위하여 정상 피부 섬유아세포에 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 유사체 및 miRNA Negative Control (ctl)를 형질 주입(transfection) 방식으로 세포내 주입하였다. 48시간 후, 세포배양액을 분리하여 MMP-1 특이적 효소결합면역흡착분석(ELISA)을 실시하였다.

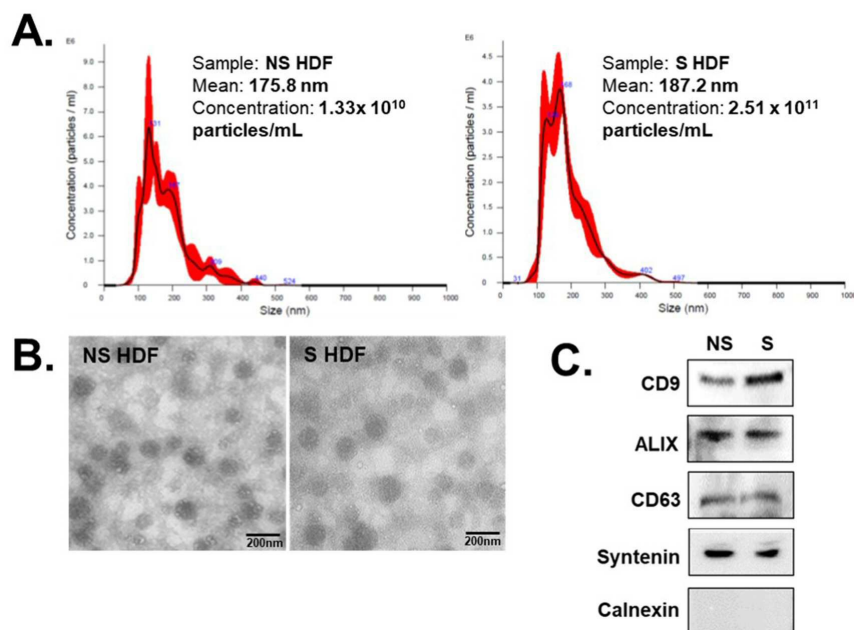
- [0153] ELISA 결과, 마이크로RNA 유사체를 주입한 정상세포에서 음성대조군(ct1) 대비 MMP-1 분비량이 증가함을 확인하였다(도 6B).
- [0154] 이를 통해 노화 세포 유래 엑소솜에서 특이적으로 발현이 증가한 것으로 확인된 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a의 유사체 주입으로 인하여, 섬유아세포의 노화 유도가 나타남을 확인하였으며, 이러한 결과로부터 상기 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a의 피부세포노화 바이오마커로서의 활용 가능성을 확인하였다.
- [0156] **실시예 7. 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 억제제에 의한 사람 노화 피부 섬유아세포 노화 개선 효과**
- [0157] 7-1. β -gal staining을 통한 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 억제제 주입에 따른 피부 섬유아세포의 노화 개선 효과 분석
- [0158] 노화 피부 섬유아세포에 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 억제제 또는 음성대조군으로 miRNA Negative Control (ct1)를 형질 주입(transfection) 방식으로 세포내 주입하였다. 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 억제제에 의한 세포노화 감소 효과를 다양한 실험 분석을 통해 검증하였다.
- [0159] 먼저, Senescence associated β -gal staining 진행한 결과, 노화세포에서 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 억제제 주입에 의하여, 음성대조군(ct1) 대비 β -gal staining 이 유의미하게 감소함을 확인하였다(도 7A).
- [0161] 7-2. ELISA를 통한 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 억제제 주입에 따른 피부 섬유아세포의 노화 개선 효과 분석
- [0162] MMP-1은 콜라겐분해효소로서 피부의 주요 형태인 제1형 콜라겐과 3형 콜라겐을 분해한다고 알려져 있고 자연적으로 노화된 피부와 광노화된 피부에서 콜라겐 합성이 감소되는 바가 알려져 있다. 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 억제제가 세포노화 제어효과를 통해 MMP-1 효소의 분비를 감소시키는지 여부를 확인하기 위하여 노화 피부 섬유아세포에 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 억제제 또는 음성대조군으로 miRNA Negative Control (ct1)를 형질 주입(transfection) 방식으로 세포내 주입하였다. 48시간 후, 세포배양액을 분리하여 MMP-1 특이적 효소결합 면역흡착분석(ELISA)을 실시하였다.
- [0163] ELISA 결과, 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a 억제제를 주입한 노화세포에서 MMP-1 분비량이 감소함을 확인하였다. 이를 통해 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a의 억제제 주입이 노화 관련 표현형을 감소시킴을 확인하였으며, 이러한 결과로부터 상기 마이크로RNA-10a, 30c 및 451a의 억제제를 피부 세포 노화 예방, 개선 또는 치료에 이용할 수 있음을 확인하였다.
- [0165] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

도면1



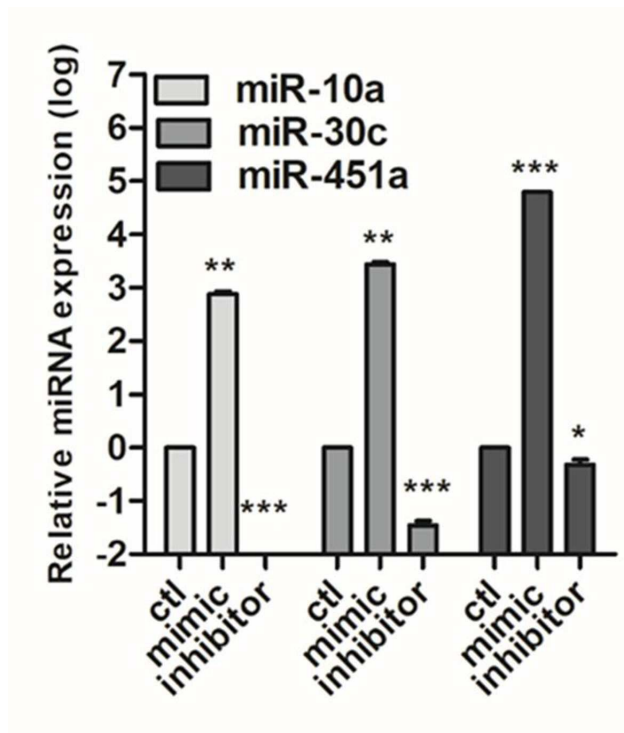
도면2



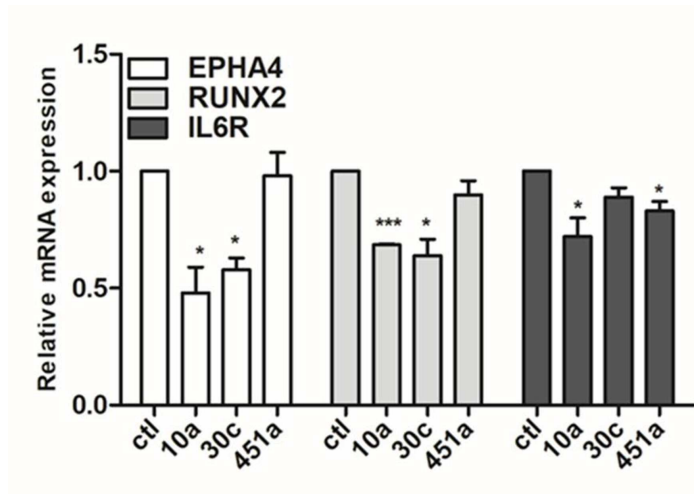
도면3

TOP 20 UPREGULATED	FOLD CHANGE	TOP 20 DOWNREGULATED	FOLD CHANGE
hsa-miR-10a-5p	4166.373	hsa-miR-128-3p	0.000
hsa-miR-451a	4075.717	hsa-miR-184	0.000
hsa-miR-30c-5p	3223.545	hsa-miR-200c-3p	0.000
hsa-miR-432-5p	1881.045	hsa-miR-125a-5p	0.000
hsa-let-7d-3p	1825.483	hsa-let-9-5p	0.001
hsa-miR-320b	1740.058	hsa-miR-27a-3p	0.005
hsa-miR-7706	1696.998	hsa-miR-3126-3p	0.018
hsa-miR-937-3p	1613.656	hsa-miR-3064-3p	0.024
hsa-miR-320a	1591.431	hsa-miR-6780b-5p	0.026
hsa-miR-22-3p	1544.899	hsa-miR-6765-3p	0.030
hsa-miR-199a-3p	1482.392	hsa-miR-5701	0.033
hsa-miR-760	1423.358	hsa-miR-484	0.040
hsa-miR-485-5p	1412.246	hsa-miR-30e-5p	0.040
hsa-miR-134-5p	1204.586	hsa-miR-6891-3p	0.055
hsa-miR-4516	1187.223	hsa-miR-122-5p	0.068
hsa-miR-493-3p	918.445	hsa-miR-99a-5p	0.087
hsa-miR-199b-3p	779.541	hsa-miR-30a-5p	0.088
hsa-miR-126-5p	645.500	hsa-miR-378a-3p	0.102
hsa-miR-6735-5p	581.525	hsa-miR-1-3p	0.104
hsa-miR-26a-5p	548.267	hsa-miR-125b-5p	0.128

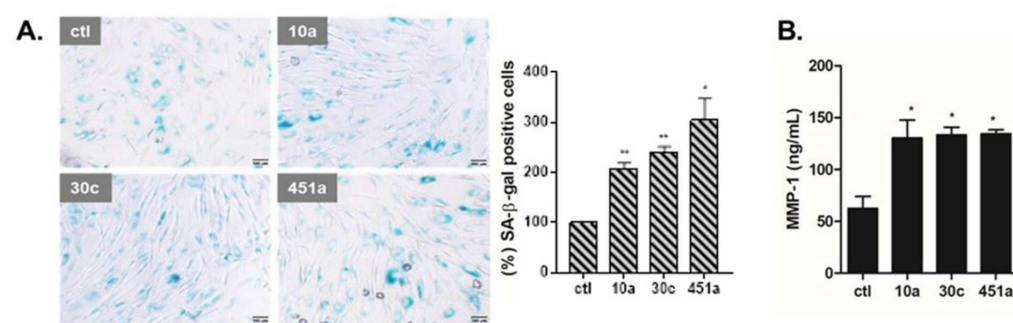
도면4



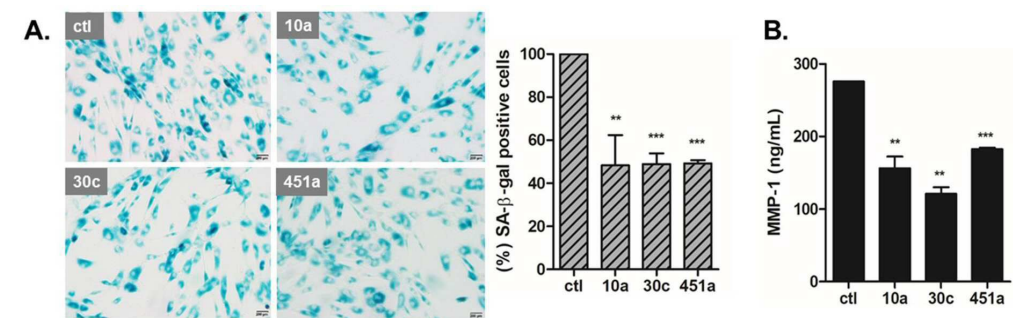
도면5



도면6



도면7



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.