(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0080710
(43) 공개일자 2023년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/079 (2010.01) *A61K 35/30* (2015.01)
A61P 27/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 5/0621 (2013.01)
A61K 35/30 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0168124
(22) 출원일자 2021년11월30일
심사청구일자 2021년11월30일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
신영주
서울특별시 강남구 도산대로70길 25, 201동 801호(청담동, 청담2차 e편한세상아파트)
(74) 대리인
김남혁

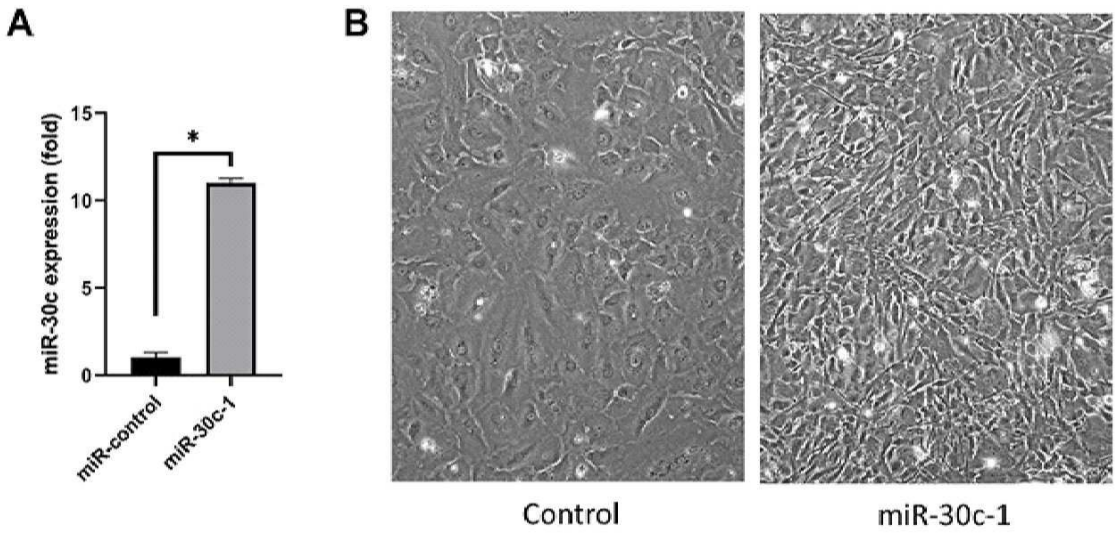
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **miR-30c-1 발현 수준을 증가시키기 위한 제제를 사용하는 각막 내피 세포 배양 방법 및 각막 내피 세포 질환 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 각막 내피 세포 질환을 예방 또는 치료하기 위한 방법 및 각막 내피 세포 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 세포에서 miR-30c-5p 또는 miR-30c-1-3p의 염기서열을 포함하는 RNA를 형질감염 시켜 발현 수준을 증가시키는 단계를 포함하는 세포 배양 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 세포를 유효성분으로 포함하는 각막 내피 세포 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 27/02 (2018.01)
C12N 2310/141 (2013.01)
C12N 2510/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711146727
과제번호	2018R1A2B6002251
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구
연구과제명	각막내피세포 질환 특이적인 유전자 치료제 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교 산학협력단
연구기간	2018.03.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

세포에서 miR-30c-5p 또는 miR-30c-1-3p의 염기서열을 포함하는 RNA의 발현 수준을 증가시키는 단계를 포함하는, 세포 배양 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 발현 수준을 증가시키는 단계는 상기 세포에 핵산 염기서열을 형질감염 시키는 과정을 포함하는 것인, 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 세포는 각막 내피 세포인, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 세포를 유효성분으로 포함하는, 각막 내피 세포 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 각막 내피 세포 질환은 안구 외상, 안구 수술 후유증, 바이러스 감염, 안구 염증, 노화, 당뇨, 산화 스트레스, 컨택트 렌즈 착용으로 인한 산소 부족, 안압 증가 및 리소좀 축적으로부터 선택된 어느 하나 이상이 원인인, 약학적 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 각막 내피 세포 질환은 수포성 각막병증, 폭스 디스트로피, 각막 디스트로피 및 각막 내피염에서 선택된 어느 하나 이상인, 약학적 조성물.

청구항 7

miR-30c-5p 또는 miR-30c-1-3p의 염기서열을 포함하는 RNA의 발현 수준을 증가시키는 제제를 유효성분으로 포함하는, 각막 내피 세포 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 발현 수준을 증가시키는 단계는 상기 세포에 핵산 염기서열을 형질감염 시키는 과정을 포함하는 것인, 약학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 각막 내피 세포 질환을 예방 또는 치료하기 위한 방법 및 각막 내피 세포 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 세포에서 miR-30c-5p 또는 miR-30c-1-3p의 염기서열을 포함하는 RNA를 형질감염(transfection) 시켜 발현 수준을 증가시키는 단계를 포함하는 세포 배양 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 세포를 유효성분으로 포함하는 각막 내피 세포 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 사람 각막 내피 세포는 소디움-포타슘 아데노신 트리포스파타아제 (sodium-potassium adenosine triphosphatase; Na+/K+ ATPase)를 사용하여 각막기질 내 수분을 퍼내는데, 이에는 많은 양의 에너지가 소비된다. 사람 각막 내피 세포의 이행대에는 줄기세포가 있다는 보고가 있으나, 생체 내에서는 제한적 증식능을 가져 한번 다치면 재생되지 않는다. 최소한 400~500 cell/㎟의 세포 밀도가 각막내피의 펌프 기능을 유지하는데 필요한데, 유전 또는 노화 등으로 상기 각막 내피 세포의 수가 적어질 수 있다.

[0003] 한편, 각막 이영양증은 대부분 유전성인 질환이며 원인불명으로 알려져 있다. 보통 10-20대에 양안으로 발병하며 서서히 진행하거나 진행을 멈추는 것이 특징이고, 치료를 위해서는 레이저 표층 각막 절제술 또는 각막 이식술을 시행하기도 하지만 주로 인공 눈물, 안대 및 윤활제 등 대증치료에 그치고 있어, 상기 각막 내피 세포를 재생하는 것과 같이 근원적인 치료의 필요성이 대두되고 있다.

[0004] 한편 miRNA는 18-25 뉴클레오티드(nucleotide, nt)로 구성된 작은 비-암호화 RNA로서, 표적 유전자의 3'-비번역 부위(untranslated region, UTR)에 결합하여 유전자 발현을 조절하고, 인트론(intron), 엑손(exon) 또는 유전자 간 부위(intergenic region)로부터 공정된다. 첫째로, miRNA는 수천 개의 뉴클레오티드를 포함하는 초기 miRNA(pri-miRNA) 분자 내로 RNA 폴리머라아제에 의해 전사된다. 그런 다음, pri-miRNA는 miRNA 전구체로 알려진 대략 70 nt 줄기 고리 중간체를 형성하기 위해 DGCR8에 의해 연속적으로 공정된다. 그런 다음, pre-miRNA는 엑소폴틴-5(Exportin-5, EXP5)와 공동인자 Ran-GTP를 통해 핵으로부터 세포질로 이동되고, 여기서 pre-miRNA는 RNase 엔도뉴클레아제 다이서에 의해 18-25 nt 성숙 miRNA 듀플렉스(duplexe)로 공정된다. 성숙 miRNA 듀플렉스는 RNA-유도 침묵 복합체(RNA-induced silencing complex, RISC) 내로 아르고노트(Argonaute) 단백질과 단일 가닥 RNA로서 통합되고, 이는 표적 mRNA의 절단 또는 번역 억제 중 어느 하나를 유도한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기한 실정을 고려하여 상기 각막 이영양증등의 예방 또는 치료에 사용될 수 있는 세포 치료제 또는 유전자 치료제를 제공하는 것을 그 목적으로 한다.

[0006] 또한, 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 이상에서 언급된 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명의 일 실시예에 의하면, 세포에서 miR-30c-5p 또는 miR-30c-1-3p의 염기서열을 포함하는 RNA의 발현 수준을 증가시키는 단계를 포함하는, 세포 배양 방법에 관한 것이다.

[0008] 또한 본 발명에서, 상기 발현 수준을 증가시키는 단계는 상기 세포에 핵산 염기서열을 형질감염 시키는 과정을 포함하는 것일 수 있다.

[0009] 또한 본 발명에서, 상기 세포는 각막 내피 세포인 것일 수 있다.

[0010] 본 발명의 다른 실시예에 의하면, 본 발명의 방법에 의해 제조된 세포를 유효성분으로 포함하는, 각막 내피 세포 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공하는 것일 수 있다.

[0011] 또한 본 발명에서, 상기 각막 내피 세포 질환은 안구 외상, 안구 수술 후유증, 바이러스 감염, 안구 염증, 노화, 당뇨, 산화 스트레스, 컨택트 렌즈 착용으로 인한 산소 부족, 안압 증가 및 리소좀 축적으로부터 선택된 어느 하나 이상이 원인인 것일 수 있다.

[0012] 또한 본 발명에서, 상기 각막 내피 세포 질환은 수포성 각막병증, 폭스 디스트로피, 각막 디스트로피 및 각막 내피염에서 선택된 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 실시예에 의하면, miR-30c-5p 또는 miR-30c-1-3p의 염기서열을 포함하는 RNA의 발현 수준을 증가시키는 제제를 유효성분으로 포함하는, 각막 내피 세포 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물에 관한 것일 수 있다.

[0014] 또한 본 발명에서, 상기 발현 수준을 증가시키는 단계는 상기 세포에 핵산 염기서열을 형질감염 시키는 과정을 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 조성물에 의하여 각막 내피 세포를 회복할 경우, 노화 또는 리소좀 축적에 의한 각막 내피 세포 질환의 예방 또는 치료 효과를 기대할 수 있다.

[0016] 본 발명의 효과들은 이상에서 언급된 효과로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본 발명의 일 실시예에서 miR-30c-1의 hCEC의 증식 촉진 효과를 확인하기 위하여, 세포 생존 및 증식을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에서 CCK-8 분석을 수행하여 대조군 및 miR-30c-1 처리 세포에서의 세포 생존율을 확인한 것 및 BrdU 증식 분석에 의해 측정된 대조군 및 miR-30c-1 처리 세포에서의 세포 증식을 확인한 것이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에서 세포 주기 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에서 hCEC의 증식 확인을 위하여, RNA 시퀀싱을 수행하여 분석한 결과를 확인하였다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에서 miR-30c-1에 의해 변화된 산화 스트레스 수준과 미토콘드리아 막 전위, 디클로로플루오레신 디아세테이트 염색의 대표적인 이미지를 확인하였고, DCF 형광 강도를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에서 MitoSOX 프로브의 형광 강도를 Muse 세포 분석기로 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에서 미토콘드리아 막 전위를 Muse® MitoPotential 키트를 사용하여 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에서 세포 주기 분석을 통하여 miR-30c-1 처리된 세포 및 대조군 세포에서 노화 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에서 세포 크기 및 YAP 단백질 수준을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에서 세포 노화 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에서 p-p38, p38, p38의 활성화, p63 수준 확인 및 p63 수준을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에서 노화 관련 분비 표현형(SASP) 요인을 확인하기 위한 인터루킨-6(IL-6), 종양괴사 인자-α(TNF-α), 대식세포 이동 억제 인자 수준(MIF) 및 활성화된 B 세포의 핵 인자 카파-경쇄 인핸서

(NF-κB)의 발현 수준을 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에서 SMAD2/3, pERK1/2, 인슐린 유사 성장 인자-1(IGF-1) 및 혈소판 유래 성장 인자-BB(PDGF-BB) 수준을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에서 미토콘드리아 막 전위를 MitoPotential 키트에 의해 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에서 절단된 카스파제 9, 절단된 폴리 ADP 리보스 폴리머라제(PARP) 및 절단된 카스파제 3 수준을 나타낸 것이다.

도 16은 본 발명의 일 실시예에서 미토콘드리아(빨간색)와 리소좀(녹색)을 염색시키고 미세소관 관련 단백질 1A/1B-경쇄 3(LC3) 중 LC3I 및 LC3II 수준을 정량화 한 결과를 나타낸 것이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에서 hCEC에 miR-30c-1-3p 억제제와 miR-30c-5p 억제제를 각각 투여하여 세포 노화에 대한 분석을 수행한 결과를 확인한 것이다.

도 18은 본 발명의 일 실시예에서 hCEC에 miR-30c-1-3p 억제제와 miR-30c-5p 억제제를 각각 투여하여 세포 생존율 및 증식 속도에 대한 분석을 수행한 결과를 확인한 것이다.

도 19는 본 발명의 일 실시예에서 TGF-β1를 투여할 때 세포 주기 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 20은 본 발명의 일 실시예에서 TGF-β1를 투여할 때 세포 주기 분석을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 21은 본 발명의 일 실시예에서 SA-β-gal 양성 세포의 백분율을 정량화 한 결과를 나타낸 것이다.

도 22는 본 발명의 일 실시예에서 TGF-β1 처리 후 미토콘드리아에 대한 TGF-β1의 효과를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 23은 본 발명의 일 실시예에서 세포 내 산화 스트레스 수준이 높은 세포의 비율을 나타낸 것이다.

도 23은 본 발명의 일 실시예에서 세포 내 산화 스트레스 수준이 높은 세포의 비율을 나타낸 것이다.

도 24는 본 발명의 일 실시예에 따라 미토콘드리아 막 전위를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 25는 본 발명의 일 실시예에 따라 미토콘드리아 막 전위를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 대하여 상세히 설명하기로 한다. 이에 앞서, 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적이거나 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 아니되며, 발명자는 그 자신의 발명을 가장 최선의 방법으로 설명하기 위해 용어의 개념을 적절하게 정의할 수 있다는 원칙에 입각하여 본 발명의 기술적 사상에 부합하는 의미와 개념으로 해석되어야만 한다. 따라서, 본 명세서에 기재된 실시예에 기재된 구성은 본 발명의 가장 바람직한 일 실시예에 불과할 뿐이고 본 발명의 기술적 사상을 모두 대변하는 것은 아니므로, 본 출원시점에 있어서 이들을 대체할 수 있는 다양한 균등물과 변형예들이 있을 수 있음을 이해하여야 한다.

[0019] 한편, 본 명세서에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 명세서에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 출원의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0020] 본 발명에서, “miR-30c-1”은 하기 표 1과 같이 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 miR-30c-5p와 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 miR-30c-3p를 포함하는 miRNA일 수 있다.

표 1

[0021]

유전자	서열	서열번호
miR-30c-5p	UGUAAACAUCCUACACUCUCAGC	1
miR-30c-1-3p	CUGGGAGAGGGUUGUUUACUCC	2

[0022] 본 발명에서, “각막 내피 세포(cornea endothelial cell; CEC)”는 각막 후면의 데스메막 위에 존재하며, 각막의 탈수를 조절하여 투명성을 유지하는 역할을 하는 세포이다.

[0023] 본 발명에서, “벡터(vector)”는 외래 유전자를 세포로 전달하여 발현할 수 있는 수단으로, 본 발명의 상기 벡터는 플라스미드(plasmids), 코스미드(cosmids), 인공 염색체(artificial chromosomes), 리포솜(liposomes)과 같은 비바이러스성 벡터이거나, 레트로바이러스(retrovirus), 아데노바이러스(Adenovirus), 아데노-관련 바이러스(Adenovirus-associated virus; AAV)와 같은 바이러스성 벡터일 수 있으며, 바람직하게는 리포솜(liposomes)일 수 있다.

[0024] 본 발명에서 상기 “플라스미드(plasmids)”는 염색체와 분리되어 있고 자신의 복제기점을 소유하여 독립적으로 증식 가능한 에피솜 DNA 분자이다. 상기 플라스미드는 제한효소에 의해 재조합된 후 숙주 세포에 전달되어 벡터의 기능을 할 수 있다.

[0025] 본 발명에서 상기 “코스미드(cosmids)”는 파이 파지의 점착성 말단(cohesive ends)인 cos 부위를 이용한 플라스미드로, 삽입할 수 있는 유전자의 크기가 커서 유전자 라이브러리를 만드는데 주로 사용된다.

[0026] 본 발명에서 상기 “인공 염색체(artificial chromosomes)”는 벡터로 사용하기 위하여 인위적으로 구조를 변화시킨 염색체로, 박테리아 인공염색체, 효모 인공염색체, 인간 인공염색체 등이 있다.

[0027] 본 발명에서 상기 “리포솜(liposomes)”은 인위적으로 만든 1개 이상의 지질 2중층으로 되어 있는 소낭 구조물로, 세포막의 형태와 유사하고 다양한 물질을 혼입하는 능력 때문에 핵산뿐만 아니라 펩티드, 항체, 앱타머 등을 전달하는 약물 운반체 시스템이다. 상기 리포솜의 효능은 막과 성분의 특성에 따른 표적 전달 및 침투 능력에 달려 있다.

[0028] 본 발명에서 상기 “레트로바이러스(retrovirus)”는 역전사(reverse transcription)를 통한 DNA 중간체를 필수로 하는 단일가닥의 양성 센스(positive-sense) RNA를 게놈으로 가지는 바이러스로, 레트로바이러스 벡터는 숙주 세포의 염색체에 삽입되어 세포분열을 하여도 바이러스 벡터가 안정적으로 유지되므로 유전자 치료에 많이 사용된다.

[0029] 본 발명에서, 상기 “렌티바이러스(Lentivirus)”는 레트로바이러스의 일종으로, 숙주에 내인성인 바이러스(endogenous retrovirus; ERV)이다. 비리온 입자는 약간 다형성의 직경 80 내지 100nm 구형이고, 뉴클레오캡시드(코어)는 등척성이며, 뉴클레오티드는 동심 막대 형상 또는 원추 형상이다.

[0030] 본 발명에서 상기 “아데노바이러스(Adenovirus)”는 약 36kb DNA를 가지는 바이러스로, 50가지 이상의 유전자를 가지고 있어 몇 가지의 바이러스 유전자를 발현하려는 유전자로 치환하여 벡터를 생성할 수 있다.

[0031] 본 발명에서 상기 “아데노바이러스-관련 바이러스(Adenovirus-associated virus; AAV)”는 DNA 유전체가 매우 작고, 아데노바이러스가 필요한 인공위성바이러스(Satellite virus)로, 벡터로 사용할 경우 사람 염색체의 특정한 부위에 삽입되어 잠복감염(latent infection)을 일으킨다.

[0032] 본 발명에서, “형질감염(transfection)”은 진핵세포에 핵산을 주입하는 것을 의미하고, 상기 형질감염은 유전자총(gene gun), 미세주입법(microinjection), 전기천공법(electroporation) 또는 리포펙션(lipofection)의 방법에 의할 수 있다.

[0033] 본 발명에서 상기 “유전자총(gene gun, particle bombardment gun)”은 적당한 크기의 유전물질을 적정 속도로 가속시켜 살아 있는 세포 내로 생물학적인 물질을 도입하는 방법이다.

[0034] 본 발명에서 상기 “미세주입법(microinjection)”은 현미주입법 혹은 미량주입법이라고 하며 세포 또는 핵 등에 극미량의 유전물질, 단백질 또는 리포솜 등의 고분자 물질을 주입하는 방법이다.

[0035] 본 발명에서 상기 “전기천공법(electroporation)”은 세포를 DNA용액에 현탁한 후 직류고전압의 펄스를 통과시켜 세포 내에 DNA를 도입시키는 방법이다.

[0036] 본 발명에서 상기 “리포펙션(Lipofection)”은 리포솜 형질주입(liposome transfection)이라고도 하며, 리포솜을 통해 세포에 유전자 물질을 주입하는 데 사용되는 기술로, 약간의 열 충격으로 세포를 처리하여 효율을 높일 수 있다.

[0037] 또한, 본 발명에서는 상기 벡터에 삽입된 유전자의 정제를 용이하게 하기 위하여 태그 서열을 상기 벡터 상에 삽입하여 융합시킬 수 있다. 상기 태그로는 헥사-히스티딘 태그, 헤마글루티닌 태그, myc 태그 또는 flag 태그

를 포함하나 이에 한정되는 것은 아니며 당업자에게 알려진 정제를 용이하게 하는 태그는 모두 본 발명에서 이용 가능하다.

[0038] 본 발명에서, “각막 디스트로피(corneal dystrophy)”는 “각막 이영양증”이라고도 하며, 폭스 디스트로피, 상피성 각막 디스트로피, 과립성 각막 디스트로피, 격자형 각막 디스트로피 및 반점형 각막 디스트로피에서 선택된 어느 하나 이상을 포함하고, 각막에 물질이 이상 축적되는 희귀 유전병들의 그룹일 수 있다. 이 경우 상기 물질들로 인해 시야가 흐려질 수 있다.

[0039] 본 발명에서, “폭스 디스트로피(Fuchs Endothelial Corneal Dystrophy; FECD)”는 폭스 각막 이영양증이라고도 하며, 특별한 이유가 없이 각막내피세포 수가 감소하게 되면서 손상을 발생시키는 질환으로, 각막기질이나 상피에 부종을 유발시켜 시력의 저하가 발생할 수 있는 질환이다.

[0040] 본 발명에서, “수포성 각막병증(Bullous keratopathy; BK)”은 각막이 수포처럼 부어오르는 눈 장애인 것일 수 있다.

[0041] 본 발명에서, “각막 내피염(corneal endotheliitis)”은 기질의 침윤을 동반하지 않은 채 각막기질의 부종을 일으키는 것을 특징으로 하고, 감염 또는 지연성 과민반응에 의한 것이고, 원반각막내피염, 광범위각막내피염, 선상각막내피염 등의 형태로 나타나는 것일 수 있다.

[0042] 본 발명에서, "예방"은 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 본 발명에 기재된 질환들의 증상을 차단하거나, 그 증상을 억제 또는 지연시키는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.

[0043] 본 발명에서, "치료"는 본 발명의 약학적 조성물을 이용하여 상기 열거된 질환들의 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위라면 제한없이 포함할 수 있다.

[0044] 본 발명에서, "약학적 조성물"은 캡슐, 정제, 과립, 주사제, 연고제, 분말 또는 음료 형태임을 특징으로 할 수 있으며, 상기 약학적 조성물은 인간을 대상으로 하는 것을 특징으로 할 수 있다. 상기 약학적 조성물은 이들로 한정되는 것은 아니지만, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 캡슐, 정제, 수성 현탁액 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0045] 본 발명의 약학적 조성물은 약제적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 담체는 경구 투여 시에는 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소, 향료 등을 사용할 수 있으며, 주사제의 경우에는 완충제, 보존제, 무통화제, 가용화제, 등장제, 안정화제 등을 혼합하여 사용할 수 있으며, 국소투여용의 경우에는 기제, 부형제, 윤활제, 보존제 등을 사용할 수 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 제형은 상술한 바와 같은 약제학적으로 허용되는 담체와 혼합하여 다양하게 제조될 수 있다. 예를 들어 용액, 현탁액, 정제, 캡슐, 서방형 제제 등으로 제형할 수 있다.

[0046] 한편, 제제화에 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말디톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등이 사용될 수 있다. 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0047] 본 발명의 약학적 조성물은 사용된 특정 화합물의 활성, 연령, 체중, 일반적인 건강, 성별, 정식, 투여시간, 투여경로, 배출율, 약물 배합 및 예방 또는 치료될 특정 질환의 중증을 포함한 여러 요인에 따라 다양하게 변할 수 있고, 상기 약학적 조성물의 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약무형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 0.0001mg/kg 내지 50mg/kg 또는 0.001mg/kg 내지 50mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 환제, 당의정, 캡슐, 액제, 겔, 시럽, 슬러리, 현탁제로 제형될 수 있고 이들 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0048] 본 발명에서 “개체”란, 각막 내피 세포 질환에 대하여 예방 또는 치료가 필요한 개체로서, 포유동물 및 비-포유동물을 모두 포함할 수 있다. 여기서, 상기 포유동물의 예로는 인간, 비-인간 영장류, 예컨대 침팬지, 다른 유인원 또는 원숭이 종; 축산 동물, 예컨대 소, 말, 양, 염소, 돼지; 사육 동물, 예컨대 토끼, 개 또는 고양이; 실험 동물, 예를 들어 설치류, 예컨대 래트, 마우스 또는 기니아 피그 등을 포함할 수 있으나, 본 발명의 목적상 상기 개체는 인간, 개 또는 고양이일 수 있다.

[0049] 본 발명에서 “투여”란, 임의의 적절한 방법으로 개체에게 본 발명의 유효성분을 도입하는 과정을 의미하는 것으로서, 본 발명의 상기 치료 방법에서 투여 방법은 피부를 통해 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0050] 본 발명의 목적상, 목적하는 개체에 대한 구체적인 약학적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 상기 유효성분을 포함하는 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 상기 유효성분을 포함하는 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의약 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.

[0051] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 세포에서 miR-30c-5p 또는 miR-30c-1-3p의 염기서열을 포함하는 RNA의 발현 수준을 증가시키는 단계를 포함하는, 세포 배양 방법에 관한 것일 수 있고, 바람직하게는 miR-30c-5p를 포함하는 염기서열의 발현 수준을 증가시키는 것일 수 있다.

[0052] 본 발명에서, 상기 발현 수준을 증가시키는 단계는 상기 세포에 핵산 염기서열을 형질감염 시키는 과정을 포함하는 것일 수 있고, 상기 형질감염은 벡터에 의한 것일 수 있다.

[0053] 본 발명에서, 상기 세포는 각막 내피 세포인 것일 수 있다.

[0054] 본 발명에서, 상기 세포에서 miR-30c-5p 또는 miR-30c-1-3p의 염기서열을 포함하는 RNA의 발현 수준을 증가시키는 단계는 생체외(in vitro)에서 수행되는 것으로, 이 경우 배양되는 상기 각막 내피 세포는 그 밀도 및 크기가 대조군에 비해 현저히 높고, 사이토카인에 저항성을 보이는 효과를 가질 수 있으며, 상기 사이토카인은 IL-6, TNF-α, MIF 및 TGF-β1인 것일 수 있으며, 상기 단계는 상기 세포가 S-기(S-phase)에 속하는 것을 억제하는 것일 수 있다.

[0055] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 본 발명의 방법에 의해 제조된 세포를 유효성분으로 포함하는, 각막 내피 세포 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물을 제공하는 것일 수 있다.

[0056] 본 발명에서, 상기 각막 내피 세포 질환은 안구 외상, 안구 수술 후유증, 바이러스 감염, 안구 염증, 노화, 당뇨, 산화 스트레스, 컨택트 렌즈 착용으로 인한 산소 부족, 안압 증가 및 리소좀 축적으로부터 선택된 어느 하나 이상이 원인인 것일 수 있고, 특히 본 발명의 약학적 조성물에 의해 각막 내피 세포를 회복함으로써, 노화 또는 리소좀 축적에 의한 각막 내피 세포 질환의 예방 또는 치료 효과를 기대할 수 있다.

[0057] 본 발명에서, 상기 각막 내피 세포 질환은 수포성 각막병증, 폭스 디스트로피, 각막 디스트로피 및 각막 내피염에서 선택된 어느 하나 이상인 것일 수 있다.

[0058] 본 발명에서, 상기 조성물은 세포 치료제일 수 있고, 상기 세포 치료제란 세포와 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가(autologous), 동종(allogenic), 이종(xenogenic) 세포를 체외에서 증식 또는 선별하거나 여타한 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 행위를 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 말한다. 이러한 세포 치료제는 크게 두 분야로 분류할 수 있으며 그 첫 번째는 조직재생 혹은 장기기능 회복을 위한 줄기세포 치료제이며, 두 번째는 생체 내 면역반응의 억제 혹은 면역반응의 항진 등 면역반응 조절을 위한 면역세포 치료제로 분류할 수 있다.

[0059] 본 발명의 세포 치료제 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 비경구 투여의 경우 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여 및 피내 투여에서 선택된 어느 하나 이상을 제한없이 포함할 수 있으나, 본 발명의 목적 상 안내로 투여하는 것일 수 있다.

[0060] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 앞서 기재된 바와 마찬가지로 해석될 수 있다.

[0061] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, miR-30c-5p 또는 miR-30c-1-3p의 염기서열을 포함하는 RNA의 발현 수준을 증가시키는 제제를 유효성분으로 포함하는, 각막 내피 세포 질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물에 관한 것일 수 있다.

[0062] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 앞서 기재된 바와 마찬가지로 해석될 수 있다.

[0063] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명의 약학적 조성물을 목적하는 개체에 약학적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 각막 내피 세포 질환을 예방 또는 치료하기 위한 방법에 관한 것이다.

[0064] 본 발명에서, 생략된 나머지 기재들은 앞서 기재된 바와 마찬가지로 해석될 수 있다.

[0065] 이하, 본 발명의 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상술하나 하기 실시예에 의해 본 발명이 제한되지 아니함은 자명하다.

[0066] **실시예**

[0067] 1.1. 세포 배양 및 형질감염

[0068] 본 연구는 한림대학교 강남성심병원 윤리심의위원회/윤리위원회의 심의 및 승인을 받았으며 헬싱키 선언에 따라 수행되었다. 세포는 당업자에게 공지된 방법에 따라 배양되었고, 6명의 기증자의 각막이 사용되었다. hCEC는 10분 동안 트립신 처리하여 데스메 막에서 분리되었다. 세포는 fibronectin-collagen 조합(FNC) 코팅 혼합물(Athena Environmental Sciences, Inc., Baltimore, MD)이 적용된 6웰 플레이트에서 배양되었고 1:3 비율로 계대되었다.

[0069] hCEC는 Lipofectamine™ RNAiMAX 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA). 세포를 48~72시간 동안 처리한 다음 실험을 위해 수집되었다. miR-30c-1의 발현은 형질감염 후 48시간에 RT-qPCR에 의해 확인되었다. 또한, hCEC를 TGF-β1(10ng/mL) 및 miR-30c-1 또는 miR-대조군으로 72시간 동안 처리하거나 처리하지 않고 TGF-β1 처리된 세포에 대한 hsa-miR-30c-1의 효과를 평가했다.

[0070] 1.2. 세포 생존 및 증식 분석

[0071] 웰당 세포 1 x 10^4를 96웰 플레이트에 접종하고 48~72시간 동안 miRNA로 처리하였다. 세포 생존율은 세포 계수 키트-8(CCK-8; Dojindo, Kumamoto)을 사용하여 평가하였다. CCK-8 용액과 1~2시간 동안 배양한 후 Synergy HTX(BioTEK, Winooski, VT) 다중 모드 판독기를 사용하여 450nm에서 광학 밀도(OD)를 측정하여 세포 생존력을 평가하였다. bromodeoxyuridine(BrdU) 통합 분석 키트(Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Germany)는 제조업체의 프로토콜에 따라 세포 증식 속도를 평가하기 위해 사용되었다.

[0072] 1.3. 세포 주기 분석

[0073] Muse 세포 분석기(Merck Millipore, Burlington, MA) 및 propidium iodide(PI) 염색을 사용하여 세포 주기 분석을 평가하였다.

[0074] 1.4. 면역형광 염색

[0075] 토끼 항인간 핵인자 카파 경쇄 인핸서 활성화 B 세포(NF-κB) 항체(sc-372; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 1차 항체로 적용하고 fluorescein isothiocyanate-conjugated goat anti- 토끼 IgG 항체를 2차 항체로 적용하였다. 핵 대조염색은 Hoechst 33342 염료로 수행되었다. 사진은 형광 현미경(DMi8; Leica)을 사용하여 촬영되었다.

[0076] 1.5. ELISA

[0077] 조건 배지를 얻고 SASP 분비 수준을 평가하는 데 사용할 때까지 -70° C에서 보관하였다. 인터루킨-6(IL-6), 종

양 괴사 인자-α(TNF-α), 대식세포 이동 억제 인자(MIF), 인슐린 유사 성장 인자 1(IGF-1) 및 혈소판 유래 성장 인자-BB의 수준 (PDGF-BB)는 상업용 인간 IL-6, TNF-α, MIF, IGF-1 및 PDGF-BB ELISA 키트(R&D Systems, Minneapolis, MN)를 사용하여 측정되었다. 요약하면, 포획 항-인간 IL-6, TNF-α, MIF, IGF-1 및 PDGF-BB 항체를 25℃에서 밤새 96-웰 플레이트의 각 웰에 적용하였다. 웰을 1%(w/v) BSA를 함유하는 차단 완충액과 함께 25℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 상업적으로 제조된 인간 IL-6, TNF-α, MIF, IGF-1 및 PDGF-BB의 표준 희석액 100μL를 실험 샘플과 함께 각 웰에 적용하였다. 25° C에서 2시간 동안 배양한 후 플레이트를 25° C에서 2시간 동안 양고추냉이 퍼옥시다제(HRP)에 접합된 염소 항-인간 IL-6, TNF-α, MIF, IGF-1 및 PDGF-BB 항체로 처리하였다. 그런 다음, 플레이트를 착색 시약인 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘(TMB)으로 20분 동안 처리하여 파란색을 얻었다. 그런 다음, 1M H_2SO_4 정지 용액을 적용하였다. OD는 Synergy HTX 다중 모드 판독기를 사용하여 450nm에서 평가되었다.

[0078] 1.6. 웨스턴 블로팅

[0079] 포스파타제(PhosSTOP; Roche, Basel) 억제제 칵테일 및 프로테아제(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)가 보충된 Radioimmunoprecipitation assay buffer(Biosesang, Seoul)를 사용하여 총 단백질을 얻었다. SDS-PAGE 전기영동 및 웨스턴 블롯팅은 표준 프로토콜에 따라 수행되었다.

[0080] 요컨대, 비특이적 결합을 억제하기 위해 5% 탈지유를 적용하였다. 1차 항체는 다음과 같았다: 토끼 항-세포외 신호 조절 단백질 키나제 1 및 2(ERK1/2) 항체(ab17942, Abcam); 토끼 항-포스포-ERK1/2(pERK1/2) 항체(ab4819, Abcam); 마우스 항-SMAD2/3 항체(sc-133098, Santa Cruz); 토끼 항-p38 항체(sc-535, Santa Cruz); 마우스 항-p-p38 항체(sc-7973, Santa Cruz); 토끼 항-p63 항체(ab124762, Abcam); 마우스 항-YAP 항체(sc-376830, Santa Cruz); 토끼 항-카스파제 3 항체(sc-7148, Santa Cruz); 마우스 항-카스파제 9 항체(sc-56076, Santa Cruz); 마우스 항-LC3 항체(M186-3, MBL); 토끼 항-PARP 항체(sc-9542, Santa Cruz); 또는 토끼 항-GAPDH 항체(LF-PA0212, Abfrontier).

[0081] 세척 후 단백질 밴드 검출을 위해 HRP 결합 이차 항체와 WEST-Queen™ western blot detection kit(iNtRON Biotechnology, 경기도 성남시)를 적용하였다. 비디오 이미지 분석(Luminograph II, Atto, Tokyo)을 사용하여 데이터를 정량화하였다.

[0082] 1.7. RT-qPCR

[0083] ReliaPrep™ RNA Miniprep 시스템(Promega Cooperation, Madison, WI)을 사용하여 총 RNA를 추출하였다. Nanodrop 방법을 사용하여 RNA 농도를 측정하였다. GoScript™ 역전사 시스템(Promega Cooperation)을 사용하여 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 0.2μg의 총 RNA에서 첫 번째 가닥 cDNA를 합성하였다. AccuPower® 2X GreenStar™ qPCR Master Mix(Bioneer)와 RT-qPCR 프라이머를 사용하여 RT-qPCR을 수행하였다. 증폭을 위한 열순환 매개변수는 다음과 같다: 95° C에서 10분, 95° C에서 15초, 60° C에서 1분.

[0084] SYBR 녹색 형광 강도를 취하였다. β-액틴 유전자는 참조 유전자로 사용되었다. 증폭된 산물의 순도를 확인하기 위해 용융 곡선 분석을 사용하였다. ΔΔCq 방법을 사용하여 RT-qPCR을 분석하였다.

표 2

[0085]

유전자	정방향 프라이머	서열 번호	역방향 프라이머	서열 번호
miR-30c-1	TGTGTAAACATCCTACACTCTCAG	3	GAGTAAACAACCCTCTCCCA	4

[0086] 역전사 프라이머는 상기 표 2에 나타내었다.

[0087] 1.4. RNA 시퀀싱 분석

[0088] ReliaPrep™ RNA Miniprep 시스템(Promega Cooperation)을 사용하여 배양된 hCEC에서 RNA를 추출하였다. RNA 농도는 Nanodrop 장비로 측정하였다. RNA 시퀀싱 분석은 Macrogen, Inc에서 수행하였다. (서울,

http://www.macrogen.com/). 본 연구에서는 Homo sapiens의 전사체 시퀀싱(transcriptome sequencing)을 통해 유전자 발현 값을 얻었다. NEBNext® Ultra™ DNA Library Prep Kit for Illumina®(NEB, USA)는 RNA 샘플의 라이브러리 준비에 사용되었다. 시퀀싱 라이브러리는 cDNA 샘플을 무작위로 단편화한 후 PCR 증폭하여 준비하였다. Illumina Hiseq 2500 플랫폼은 Macrogen, Inc에서 수행한 시퀀싱에 사용되었다. 개별 유전자 발현 수준을 해석하기 위해 매핑된 백만 당 전사체의 킬로베이스당 단편(TPM) 값이 사용되었다.

[0089] 1.5. 노화 관련-β갈락토시다아제(SA-β-gal) 분석

[0090] 노화-β갈락토시다아제(SA-β-gal) 염색 키트(Biovision)를 사용하였다. 세포에서 배지를 제거한 후, 각 웰을 고정 용액에서 25° C에서 10~15분 동안 배양하였다. 다음으로 SA-β-gal 염색 용액은 건조 배양기에서 밤새 37° C에서 처리되었다.

[0091] 1.6. 세포내 및 미토콘드리아 산화 스트레스 평가

[0092] Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate(DCFH-DA; Invitrogen, Carlsbad, CA)를 사용하여 세포 내 ROS 수준을 평가하였다. 세포를 덮개 유리 바닥 접시에 플레이팅하고 miR-control 또는 miR-30c-1로 처리하였다. 세포를 DCF-DA(10μM)와 함께 37° C에서 1시간 동안 인큐베이션하고, 세척하고, 형광 현미경(DMi8; Leica)으로 관찰하였다.

[0093] 또한 MitoSOX™ Red(Invitrogen)를 사용하여 미토콘드리아 과산화물 생성을 평가하였다. 세포를 37° C에서 10분 동안 MitoSOX™ 시약(5μM)으로 염색하였다. 뮤즈 세포 분석기를 사용하여 형광 강도를 평가하였다.

[0094] 1.7. 통계처리

[0095] 데이터는 평균 ± 표준 편차로 표시되었다. 실험은 3회 반복하였으며 대표적인 실험을 제시하였다. 두 그룹을 비교하기 위해 독립 t-검정을 적용하였다. 통계 분석에는 GraphPad Prism 8이 사용되었다.

[0096] **평가예**

[0097] 2.1. hCEC의 증식 확인(1)

[0098] miR-30c-1의 hCEC의 증식 촉진 효과를 확인하기 위하여, 세포 생존 및 증식을 분석한 결과, 도 1에서 나타난 것처럼 miR-30c 수준은 miR-대조군에 비해 miR-30c-1 처리된 세포에서 상승하였다($p < 0.001$). 또한 hCEC 크기는 대조군과 비교하여 miR-30c-1 처리로 감소하였다($p < 0.001$). 세포주기 분석에서 TGF-β1은 생체 내 hCEC와 유사한 G0/G1 세포 주기 중단을 유발하였다. hCEC는 TGF-β 신호 전달 경로가 중요한 역할을 할 수 있는 세포 크기를 증가시켜 상처 치유에 반응한다. 따라서, 상기 실험 결과를 통하여 TGF-β1에 의해 유도된 세포 주기 정지와 TGF-β1에 의해 유도된 세포 비대를 miR-30c-1를 통하여 개선할 수 있음을 확인하였다.

[0099] 또한, CCK-8 분석을 수행하여 대조군 및 miR-30c-1 처리 세포에서의 세포 생존율을 확인하였고, BrdU 증식 분석에 의해 측정된 대조군 및 miR-30c-1 처리 세포에서의 세포 증식을 확인하였다. 그 결과 도 2에 나타난 것처럼, miR-대조군에 비해 miR-30c-1 처리 세포에서 세포 생존율과 증식 속도가 증가하였다($p < 0.001$ 및 0.040).

[0100] 또한, 세포 주기 분석을 수행한 결과, 도 3에 나타난 것처럼, 세포 주기의 S-phase서 세포 풍부도는 miR-대조군에 비해 miR-30c-1 처리된 세포에서 더 높은것으로 확인되었다($p = 0.001$).

[0101] 2.2. RNA 시퀀싱 분석

[0102] hCEC의 증식 확인을 위하여, RNA 시퀀싱을 수행하여 분석한 결과를 확인하였다.

표 3

[0103]

유전자	폴드 변화(FC) (miR-30c-1/miR-control)	Log2(FC)	p-값
IFIT2	0.0099863	-6.6458342	0.0001552
BST2	0.0174225	-5.8429032	0.0002403
IFI27	0.0365895	-4.7724258	0.0013726
OAS1	0.0395716	-4.6593894	5.41E-05
ALK	0.0468338	-4.4163052	0.0004983
IFNB1	0.0488735	-4.3548048	0.0004183
SLC8A2	0.0612903	-4.0281969	0.0025017
HLA-F	0.0840182	-3.5731542	0.000448
IFI44	0.0879615	-3.5069838	1.52E-05
STAT1	0.0918394	-3.4447428	3.58E-05
PARP9	0.1054564	-3.245281	2.91E-05
IFI35	0.1171023	-3.0941583	7.45E-06
IFNB1	0.1278718	-2.9672301	0.0001676
TNFSF10	0.1417435	-2.8186455	0.0014769
IFNA1	0.2279793	-2.1330254	0.0397558
CASP1	0.260129	-1.9427008	0.0065726
STAT2	0.3039028	-1.7183184	1.16E-05
IFI16	0.3461232	-1.5306425	3.40E-05
CD7	0.3552655	-1.4930304	0.0017694
CASP3	0.4122607	-1.2783713	0.0001307
CD34	0.4330144	-1.2075132	0.0011659
CASP10	0.5226783	-0.936005	6.75E-06
TGIF2	0.5345843	-0.9035108	7.35E-05
NOTCH1	0.5389247	-0.8918443	0.0094308
IFNGR2	0.5688129	-0.8139739	5.28E-05
CASP4	0.6067611	-0.7207996	0.0005647
CASP7	0.6100666	-0.7129612	0.0002713
CIP2A	0.620878	-0.6876182	0.0123176
ATG12	0.6714314	-0.574688	0.000519
ACP2	0.6991534	-0.516319	0.0004251
WNT11	0.7069583	-0.5003031	0.0078715
ATG5	0.7276916	-0.4586009	0.0007922
SMAD1	0.737237	-0.4397997	0.0010524
CASP8	0.7388248	-0.4366958	0.0077211
CDKN2A	0.7620468	-0.3920485	0.0317108
WNT5B	0.7692308	-0.3785116	0.000321
WNT5A	0.7734093	-0.370696	0.0008211
CDKN2B	0.7921014	-0.336243	0.0068403
IGF2R	0.8032468	-0.3160849	0.0092538
SMAD3	0.8175286	-0.2906589	4.86E-05
NOTCH2	0.8281981	-0.2719522	0.018508
BECN1	0.8411694	-0.2495317	0.006372
CASP9	0.8435622	-0.2454336	0.0077383
PDGFA	0.8585895	-0.2199595	0.0460734
MAPK1	0.893772	-0.1620212	0.0311704

표 4

[0104]

유전자	폴드 변화(FC) (miR-30c-1/miR-control)	Log2(FC)	p-값
COL8A1	1.0841073	0.1165076	0.0492557
SIRT1	1.1383886	0.1869932	0.0403678
MFF	1.200156	0.2632219	0.0073113

CCNG1	1.2523403	0.3246267	0.0001706
COL8A2	1.2644785	0.3385425	0.0206073
CCNG2	1.2872408	0.364282	0.0006619
CDC25B	1.4089818	0.494653	0.0064732
CCNA2	1.4467974	0.5328629	0.0382018
CCND2	1.4973629	0.5824239	0.0018972
CEMIP	1.502362	0.5872325	0.0174476
CDK6	1.5484987	0.6308702	0.0041804
COL4A4	1.5797686	0.6597133	0.0199125
SOD2	1.7181873	0.7808874	0.0058297
SLC4A11	1.7909408	0.8407176	0.0041401
SLC25A15	1.8435085	0.8824541	2.93E-05
CEMIP2	1.8807528	0.9113102	0.000163
MTFP1	1.8954822	0.9225649	0.0119586
FOXO3	1.9359241	0.9530224	0.0002565
COL17A1	2.0654762	1.0464744	0.0044258
SOX7	2.1077586	1.0757097	0.0342846
AQP7	2.2103896	1.1443007	0.0256781
HTR2A	2.3896723	1.2568128	0.0018409
GPR20	4.5950413	2.2000778	0.0123495
GPR158	8.34	3.0600474	0.0244592
COL5A3	16.64	4.0565835	0.0360859

[0105] 도 4, 상기 표 3 및 표 4에 나타난 것처럼, miR-대조군에 비해 miR-30c-1 처리된 세포에서 세포 증식 관련 유전자의 상대적 발현이 증가하고 억제제 유전자의 상대적 발현이 감소하였다(모두에 대해 $p < 0.05$). 인터페론(IFN) 관련 유전자, TGF-β 관련 유전자, 카스파제 유전자 및 자가포식(Autophagy) 관련 유전자는 miR 대조군과 비교하여 miR-30c-1 처리 세포에서 감소하였다(모두에 대해 $p < 0.05$).

[0106] 2.3. 산화 스트레스 수준과 미토콘드리아 막 전위 측정

[0107] miR-30c-1에 의해 변화된 산화 스트레스 수준과 미토콘드리아 막 전위, 디클로로플루오레신 디아세테이트 염색의 대표적인 이미지를 확인하였고, DCF 형광 강도를 측정하였다. 그 결과 도 5에 나타난 것처럼, DCF 형광 강도는 miR-대조군과 비교하여 miR-30c-1 처리된 세포에서 감소하였다($p < 0.001$).

[0108] 또한, MitoSOX 프로브의 형광 강도를 Muse 세포 분석기로 측정하였다. 그 결과 도 6에 나타난 것처럼, Muse 분석기로 측정한 세포 내 산화 스트레스 수준은 miR-대조군에 비해 miR-30c-1 처리된 세포에서 감소하였다($p = 0.006$).

[0109] 또한, 미토콘드리아 막 전위를 Muse® MitoPotential 키트를 사용하여 측정하였다. 그 결과, 도 7에 나타난 것처럼, miR-대조군에 비해 miR-30c-1 처리된 세포에서 미토콘드리아 막 전위가 증가하였다($p < 0.001$).

[0110] 2.4. TGF-β1에 의한 세포 노화 분석(1)

[0111] 세포 주기 분석을 통하여 miR-30c-1 처리된 세포 및 대조군 세포에서 노화 정도를 확인하였다. (A) DNA 함량, (B) S상 세포의 백분율, (C) G0/G1 단계에서 세포의 백분율 및 (D) G2/M 단계에서 세포의 백분율 사용하여 세포 주기를 분석하였다. 그 결과 도 8에 나타난 것처럼, TGF-β1 처리 후 G0/G1 단계의 세포 풍부도가 상승했지만 miR-30c-1 처리에서는 상승하지 않고($p = 0.010$), S-기 및 G2/M-기의 세포 존재비는 miR-30c-1 처리와 비교하여 TGF-β1 처리로 감소하였다($p = 0.001$).

[0112] 또한, 도 9에 나타난 것처럼, TGF-β1 자극은 세포 크기($p = 0.017$)를 유의하게 증가시켰고, 여기에 miR-30c-1을 처리할 경우 TGF-β1 자극으로 인한 세포 크기를 억제하는 것을 확인할 수 있었다($p = 0.001$). 또한, TGF-β1 자극은 YAP 단백질 수준을 상승시켰고, 여기에 miR-30c-1을 처리할 경우 TGF-β1 자극으로 인한 YAP 단백질 수준 상승을 억제하는 것을 확인할 수 있었다(각각 $p = 0.041$ 및 $p = 0.033$). 또한, miR-30c-1 및 TGF-β1을 처리한 경우 miR-30c-1 단독으로 처리한 것에 비하여 miR-30c의 발현 수준이 감소한 것을 확인할 수 있었다($p =$

0.041). 여기서 YAP는 세포 노화를 제어하는 Hippo 신호 전달 경로의 구성원이다. Hippo-YAP 경로는 LATS 유도 인산화를 통해 장기 크기를 증가시킨다.

[0113] 2.5. TGF-β1에 의한 세포 노화 분석(2)

[0114] 세포 노화 분석을 위하여, (A) 노화-β갈락토시다아제(SA-β-gal) 염색, (B) SA-β-gal 양성 세포의 백분율, (C) MitoSOX 프로브에 의해 측정된 세포내 산화 스트레스 수준을 확인하였다. 그 결과 도 10에 나타난 것처럼, SA-β-gal로 염색된 세포의 비율은 TGF-β1 처리(p = 0.008)로 증가했으며, 이는 miR-30c-1이 존재할 때에는 발생하지 않았다(p = 0.007). 또한, 세포 내 산화 스트레스는 TGF-β1 처리(p = 0.035) 후 증가했지만 miR-30c-1에 의해 개선되었다(p = 0.002).

[0115] 또한, (D) p-p38 및 p38, (E) p38의 활성화 및 (F, G) p63 수준을 확인하였다. 그 결과 도 11에 나타난 것처럼, 또한, TGF-β1 처리는 p-p38 및 p63의 수준도 증가시켰지만(각각 p = 0.013 및 p = 0.019), miR-30c-1이 존재할 때 증가하지 않았다(p = 0.047 및 p = 0.043).

[0116] 따라서, 본 발명의 miR-30c-1 처리로 TGF-β1에 의해 유도된 노화 및 세포 내 산화 스트레스 수준을 개선시킬 수 있는 것을 확인하였다. 이때, TGF-β1 자극은 세포 내 산화 스트레스 수준을 증가시켜, 이는 p38 및 p53 성장 정지 경로를 활성화시키는데, 세포주기 정지는 축적된 SA-β-gal과 관련이 있으며 p63은 노화 및 노화의 매개체로 알려져 있다. ROS에 의한 DNA 손상은 AMPK 및 시르투인 1(SIRT1) 활성의 p63 조절을 활성화하고 미토콘드리아 기능 장애를 유도한다. TGFβR2는 TGFβR2의 3'-UTR에 결합하고 CHD7 및 TNRC6A의 억제를 통해 p16INK4A 및 DNA 손상 경로를 억제하여 노화를 방해하는 miR-30c-1-3p의 검증된 표적이다. TGF-β1 신호전달은 miR-30c 유전자에 의해 억제된다.

[0117] 2.6. SASP 인자 확인을 통한 세포 노화 분석

[0118] 노화 관련 분비 표현형(SASP) 요인을 확인하기 위하여, (A) 인터루킨-6(IL-6), (B) 종양 괴사 인자-α(TNF-α), (C, D) 대식세포 이동 억제 인자 수준(MIF), (D, E) 활성화된 B 세포의 핵 인자 카파-경쇄 인핸서(NF-κB)의 발현 수준을 확인하였다. 그 결과 도 12에 나타난 것처럼, IL-6, TNF-α 및 MIF의 수준이 TGF-β1 처리 후 증가하였으며(각각 p = 0.030, p < 0.001 및 p < 0.010), 이는 miR-30c-1 처리 후에는 발생하지 않았다(각각 p = 0.005, p < 0.001 및 p = 0.021). 핵에 위치한 NF-κB의 비율은 TGF-β1에 의해 증가했지만 miR-30c-1에 의해 개선되어(각각 p = 0.001 및 p = 0.002), miR-30c-1에 의해 SASP이 개선된 것을 확인하였다.

[0119] 또한, (F-G) SMAD2/3 수준은 웨스턴 블롯팅으로 평가되었고, (H-I) pERK1/2 수준은 웨스턴 블롯팅으로 평가되었으며, (J) 인슐린 유사 성장 인자-1(IGF-1) 수준은 ELISA로 평가되었고, (K) 혈소판 유래 성장 인자-BB(PDGF-BB)는 ELISA로 평가되었다. 그 결과 도 13에 나타난 것처럼, TGF-β1은 또한 pERK1/2 및 SMAD2/3(각각 p = 0.003 및 p = 0.012)의 수준을 증가시켰지만 miR-30c-1이 존재할 때는 증가하지 않았다(p = 0.048 및 p = 0.013). 또한 IGF-1 및 PDGF-BB 수준도 TGF-β1 처리로 증가했지만(각각 p = 0.001 및 p = 0.032) miR-30c-1이 있는 경우에는 증가하지 않았다(p = 0.183 및 0.044).

[0120] 따라서, TGF-β1은 hCEC에서 노화를 유도한다는 것을 보여주었다. 노화는 세포 주기의 정지이며 세포 모양의 변화, 대사 재프로그래밍 및 SASP의 방출을 동반한다. SA-β-gal의 염색은 노화의 징후로 널리 사용되는 마커인데, 본 발명에서 TGF-β1 처리 후 SA-β-gal 염색된 세포의 비율이 상승한 반면, TGF-β1 처리 후에는 세포 확대, ROS 수준의 증가 및 미토콘드리아 막 전위의 탈분극과 같은 기타 노화 관련 변화가 발생하는 것을 확인하였다. TGF-β1은 세포 증식을 억제하고 세포 비대를 유도했는데, 이는 생체 내 hCEC의 상처 치유 과정과 유사하다. TGF-β1은 cyclin D 생성을 방지하고 INK4를 증가시켜 CDK4/6에 결합하여 p27을 CDK2-cyclin E로 재분배하여 RB 인산화를 억제함으로써 세포 주기 진행을 차단한다. TGF-β1은 또한 유도하여 세포 내 산화 스트레스 수준을 증가시킨다. NADPH 산화효소와 항산화 시스템을 억제하여 산화환원 불균형을 초래한다. 과도한 ROS는 미토콘드리아 막 전위의 손실을 통해 세포사멸을 유발하며, 이는 세포사멸 인자의 분비와 에너지 생산 감소에 의해 세포사멸을 향상시킨다.

[0121] IL-6, TNF-α, MIF를 포함한 SASP 인자는 TGF-β1 자극에 의해 증가되었다. 대부분 전염증성 단백질인 SASP 인자는 노화 세포에서 방출되어 면역계와 EMT를 활성화시킨다. NF-κB는 SASP 생성을 자극하는 면역학적 과정의 조절에 참여하는데, SMAD2는 TGF-β1 신호전달 경로의 한 성분으로 TGF-β1에 의해 활성화된 후 핵으로 들어가

EMT를 촉진하는 표적 유전자를 활성화시킨다. miR-30c는 NF-κB 신호 전달을 억제하여 SASP 인자를 억제한다. 여기서 NF-κB 활성의 녹다운은 SASP 인자의 분비를 감소시키는 것으로 알려져 있다.

[0122] 한편, TGF-β1은 IGF-I와 PDGF-BB의 분비를 유의하게 자극하였다. IGF-1은 노화를 유도하는 물질로 유기체의 노화와 관련이 있는데, 상향 조절된 IGF-1 신호전달은 Ras-mitogenactivated protein(MAP) 키나제 경로를 통해 p21 수준을 유지하여 증식을 감소시키고 세포 노화를 증가시키며 노화 표현형을 촉진하였다. IGF 신호전달은 miR-30c에 의해 억제된다. 여기서 PDGF-BB는 세포막 티로신 키나제 수용체에 결합하여 상처 치유, 세포 증식 및 EMT를 촉진하는데, PDGF-BB 수용체의 수는 노화 세포에서 증가하지만, TGF-β 신호전달이 PDGF-B 생성을 유도하는 것으로 알려져 있다.

[0123] 2.7. TGF-β1 또는 miR-30c-1에 의한 세포사멸사 확인

[0124] TGF-β1 또는 miR-30c-1에 의한 세포사멸사를 확인하기 위하여 미토콘드리아 막 전위를 MitoPotential 키트에 의해 측정한 결과, 도 14에서와 같이, TGF-β1 처리는 미토콘드리아 막 전위의 탈분극을 촉진했지만($p = 0.014$), 이 효과는 miR-30c-1 처리로 제거되는 것을 확인하였다($p = 0.003$).

[0125] 본 발명의 miR-30c-1은 세포 내 산화 스트레스를 감소시키고 미토콘드리아 막 전위를 증가시키는 것을 확인하였다. 여기서 산화 스트레스는 FECD 또는 hCEC 질병의 발병에 관여하는데, 활성산소종(ROS)은 미토콘드리아에서 생성되며 과도한 ROS는 세포 기능의 붕괴, 노화, 염증 및 세포자멸사(apoptosis)를 초래한다. miR-30c-5p는 산화 스트레스로 인한 심근 세포의 세포 사멸과 p53 발현 수준을 억제하는 것으로 설명되었다. 미토콘드리아 막 전위는 생리학적 및 병리학적 기능을 수행하는 미토콘드리아 생성의 강력한 조절자이며 미토콘드리아의 품질 관리 기계의 구성 요소이다. miR-30c 모방체는 미토콘드리아 막 전위를 유의하게 보존하는 것으로 나타났다. 결론적으로, miR-30c-1은 세포 생존력과 증식을 증가시키고 신호 전달 경로를 조절하며 산화 스트레스를 감소시키므로, 본 발명의 miR-30c-1은 hCEC 재생의 표적이 될 수 있는 것을 확인하였다.

[0126] 또한, 절단된 카스파제 9 및 절단된 폴리 ADP 리보스 폴리머라제(PARP) 수준을 웨스턴 블롯팅으로 평가하고 정량화하였고, 절단된 카스파제 3을 웨스턴 블롯팅으로 평가하고 정량화 하였다. 그 결과 도 15에 나타난 것처럼, TGF-β1은 절단된 카스파제 9, 절단된 PARP 및 절단된 카스파제 3의 수준을 상승시켰지만(각각 $p = 0.034$, $p = 0.012$ 및 $p = 0.049$), miR-30c-1의 존재는 이러한 효과를 개선시켰다($p = 0.047$, $p = 0.019$, $p = 0.011$).

[0127] 본 발명에서, miR-30c-1은 TGF-β1에 의해 유도된 미토콘드리아 막 전위의 탈분극을 제거함을 보여주었다. 절단된 카스파제 3, 절단된 카스파제 9 및 절단된 PARP의 수준은 TGF-β1에 의해 증가되었으며, 이 효과는 miR-30c-1 처리에 의해 개선되었다. 미토콘드리아 막 전위는 세포 스트레스와 세포 사멸의 신뢰할 수 있는 척도이며 세포 사멸 동안 감소하는데, 미토콘드리아 투과성 전이 기공의 개방은 미토콘드리아 막 전위의 손실, 사이토크롬 c의 방출, ATP의 손실 및 증가된 자유 라디칼 형성을 야기한다. 카스파제 3은 세포 구조의 분해를 조정하기 때문에 세포 사멸의 수행자이다. 카스파제 9는 세포자멸사 실행자인 카스파제 3, 6, 7을 절단할 뿐만 아니라 자가포식 조절에 참여하여 autophagosome 형성을 촉진할 수 있다. PARP는 카스파제의 여러 기질 중 하나이며 PARP 절단은 세포자멸사 동안 괴사를 억제하고 적절한 카스파제 매개 세포 사멸을 보장한다. miR-30c는 미토콘드리아 막 전위를 유지하고 세포 사멸 인자의 발현 수준을 감소시켰다. 노화는 유전독성 스트레스에 의해 유도된 세포 자멸사에 저항력이 있으나 과도한 세포 내 ROS는 DNA 손상과 미토콘드리아 기능 장애를 일으켜 노화 또는 세포 사멸을 초래할 수 있다.

[0128] 2.8. TGF-β1 또는 miR-30c-1에 의한 오토파지 확인

[0129] TGF-β1 또는 miR-30c-1에 의한 자가포식을 확인하기 위하여, 미토콘드리아(빨간색)와 리소좀(녹색)을 염색시키고 미세소관 관련 단백질 1A/1B-경쇄 3(LC3) 중 LC3I 및 LC3II 수준을 정량화 하였다. 그 결과, 도 16에 나타난 것과 같이, 리소좀(녹색)은 TGF-β1 처리 후 확대되고 두드러진 반면, 이 효과는 miR-30c-1 처리로 제거되었다. 한편, LC3II의 수준은 TGF-β1 처리 후에도 증가했지만($p < 0.001$) miR-30c-1이 존재할 때는 증가하지 않았다($p < 0.001$).

[0130] 자가포식은 단백질 응집체와 손상된 세포 소기관을 분해 및 재활용하는 것을 특징으로 하는 세포 프로그램으로, 노화 표현형으로의 전환을 중재할 수 있다. miR-30의 억제는 과도한 자가포식을 통해 심근 비대를 조장한다. miR-30 계열은 BECN1 발현과 자가포식을 억제한다. 본 발명에서는 miR-30c-1 처리가 TGF-β1에 의해 유도된 자

가포식을 제거함을 보여주었다. TGF-β1은 SMAD 및 JNK 경로를 통해 자가포식을 유도한다. 리소좀은 신호 전달, 신진 대사 및 품질 관리를 위한 세포 중심이며, 여기서 자가포식은 세포질 구성 요소와 세포 소기관을 소화하는 조절 경로로 작용한다. LC3는 자가포식 경로의 중심 분자이며, 자가포식 동안 LC3-I(LC3의 세포질 형태)는 autophagosomal 마커인 LC3-II(LC3-phosphatidylethanolamine conjugate)로 변경된다. 에너지 대사에 관여하는 사이토크롬 P450 3A4의 발현은 miR-30c-1에 의해 변화된다. miR-30c는 BECN1을 직접 표적화하여 자가포식 조절에 참여한다.

[0131] 2.9. hCEC의 증식 확인(2)

[0132] miR-30c-1-3p와 miR-30c-5p의 효과 차이를 비교하기 위하여, hCEC에 miR-30c-1-3p 억제제와 miR-30c-5p 억제제를 각각 투여하여 세포 노화, 세포 생존율 및 증식 속도에 대한 분석을 수행하였다. 그 결과 도 17에 나타난 것처럼, SA-β-gal 양성 세포의 수는 miR-30c-1-3p 억제제 또는 miR-30c-5p 억제제로 처리된 경우 증가하였고(모두에 대해 $p < 0.001$), 세포 내 산화 스트레스 수준은 miR-30c-1-3p 억제제 또는 miR-30c-5p 억제제로 치료할 때 증가하였다(모두에 대해 $p < 0.001$).

[0133] 또한 도 18에 나타난 것처럼, miR-30c-1-3p 억제제 또는 miR-30c-5p 억제제로 처리한 경우 세포 생존율이 감소하였고($p = 0.004$ 및 <0.001), 증식 속도 역시 감소하였다($p = 0.001$ 및 <0.001). 특히, miR-30c-5p를 처리한 경우 세포 생존율과 증식 속도가 매우 감소한 바, miR-30c-5p가 miR-30c-1-3p에 비하여 hCECs의 세포 생존과 증식에 더 큰 효과를 보이는 것을 알 수 있었다.

[0134] 2.10. TGF-β1에 의한 세포 노화 분석(3)

[0135] 세포 주기 정지 및 노화에 대한 TGF-β1의 효과를 확인하기 위하여 TGF-β1를 투여할 때 (A) BrdU 증식 분석, (B) DNA 함량 측정에 의한 세포 주기 분석을 수행하였다. 그 결과 도 19에 나타난 것처럼, TGF-β1를 투여할 경우 시간이 흐를수록 BrdU 증식이 낮아진 것을 확인할 수 있었다.

[0136] 또한 TGF-β1를 투여할 때 (C-E) G0/G1기(C), S기(D) 및 G2/M기(E)의 세포 비율을 분석한 결과, 도 20에 나타난 것처럼 TGF-β1를 투여한 후 24시간이 도과한 때부터 S-phase의 세포 비율이 급격히 낮아진 것을 확인할 수 있었다.

[0137] 또한 노화-β갈락토시다아제(SA-β-gal) 염색을 수행하여 SA-β-gal 양성 세포의 백분율을 정량화 한 결과, 도 21에 나타난 것처럼 TGF-β1를 투여한 후 24시간이 도과한 때부터 SA-β-gal 양성 세포 비율이 급격히 높아진 것을 확인할 수 있었고, 48시간이 도과한 때부터 세포의 크기가 급격히 커진 것을 확인할 수 있었다.

[0138] 2.11. TGF-β1에 의한 세포 노화 분석(3)

[0139] TGF-β1 처리 후 미토콘드리아에 대한 TGF-β1의 효과를 확인하기 위하여 산화 스트레스 수준을 확인하였다. 그 결과 도 22에 나타난 것처럼, TGF-β1를 투여한 후 48시간이 도과한 때부터 산화 스트레스가 상승한 것을 확인할 수 있었다.

[0140] 또한 도 23에 나타난 것처럼, 세포 내 산화 스트레스 수준이 높은 세포의 비율은 시간이 지남에 따라 증가하였고, 시간이 지남에 따라 ERK의 활성화가 증가하였다.

[0141] 또한 도 24 및 도 25에 나타난 것처럼, 미토콘드리아 막 전위를 측정한 결과 탈분극된 세포의 비율은 시간이 지남에 따라 증가하였다.

[0142] 앞서 살펴본 바와 같이, miR-30c-1은 TGF-β1에 의해 유도된 노화를 개선하고 hCEC의 세포 사멸을 감소시켜 hCEC의 증식을 촉진하였다. 따라서 본 발명의 miR-30c-1, 특히 miR-30c-5p는 hCEC 재생에 유용한 치료 표적이 될 수 있음을 확인하였다.

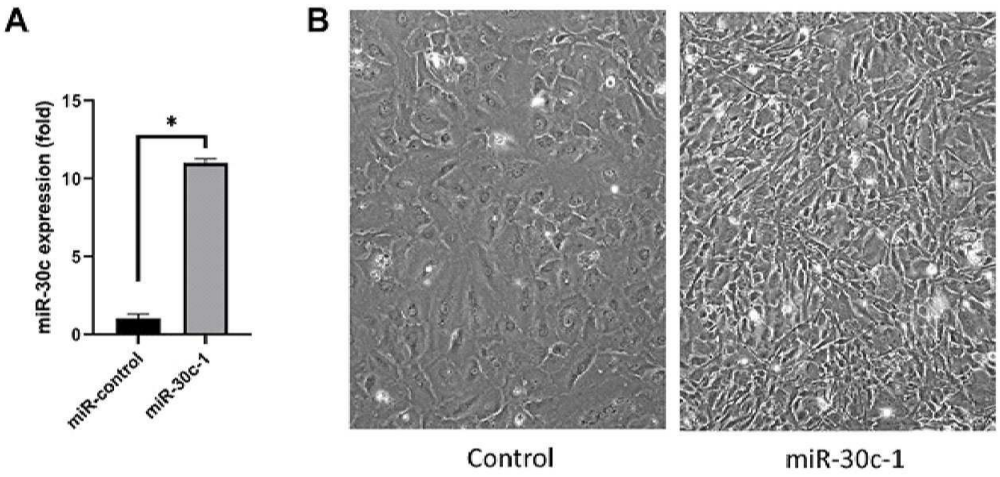
[0143] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명

의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

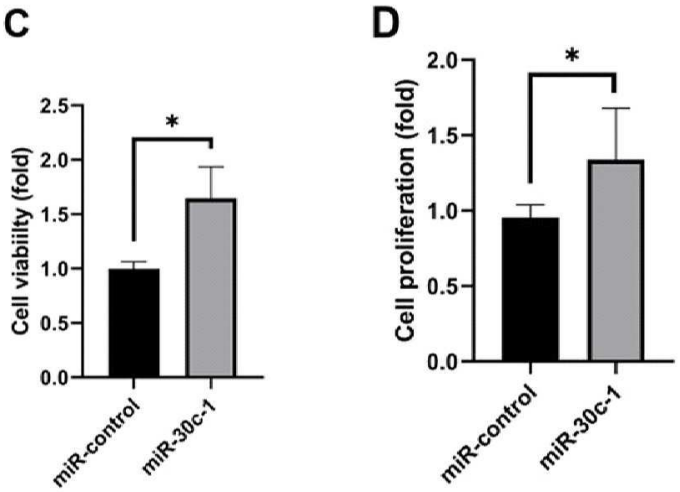
[0144] 본 발명의 범위는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

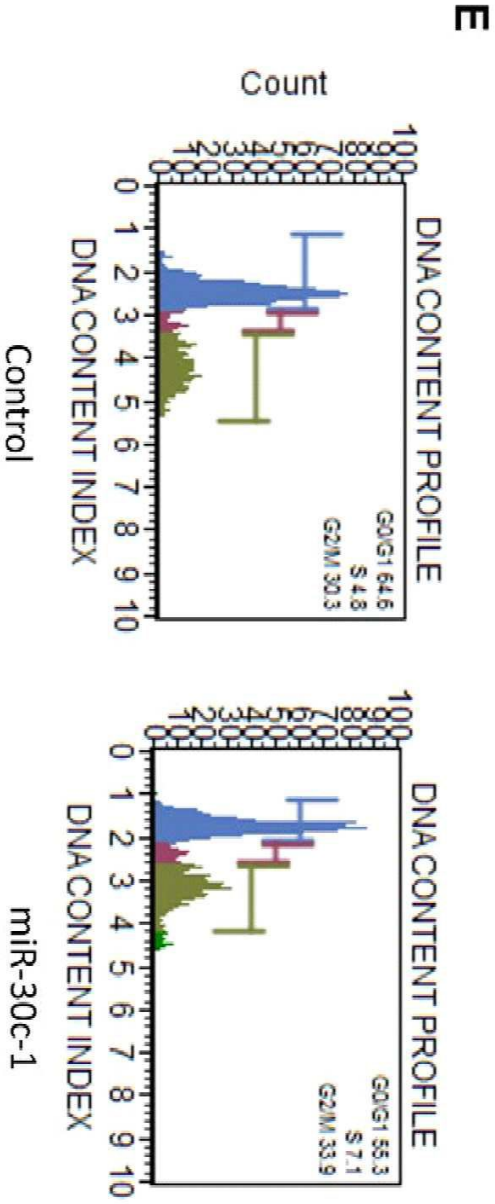
도면1



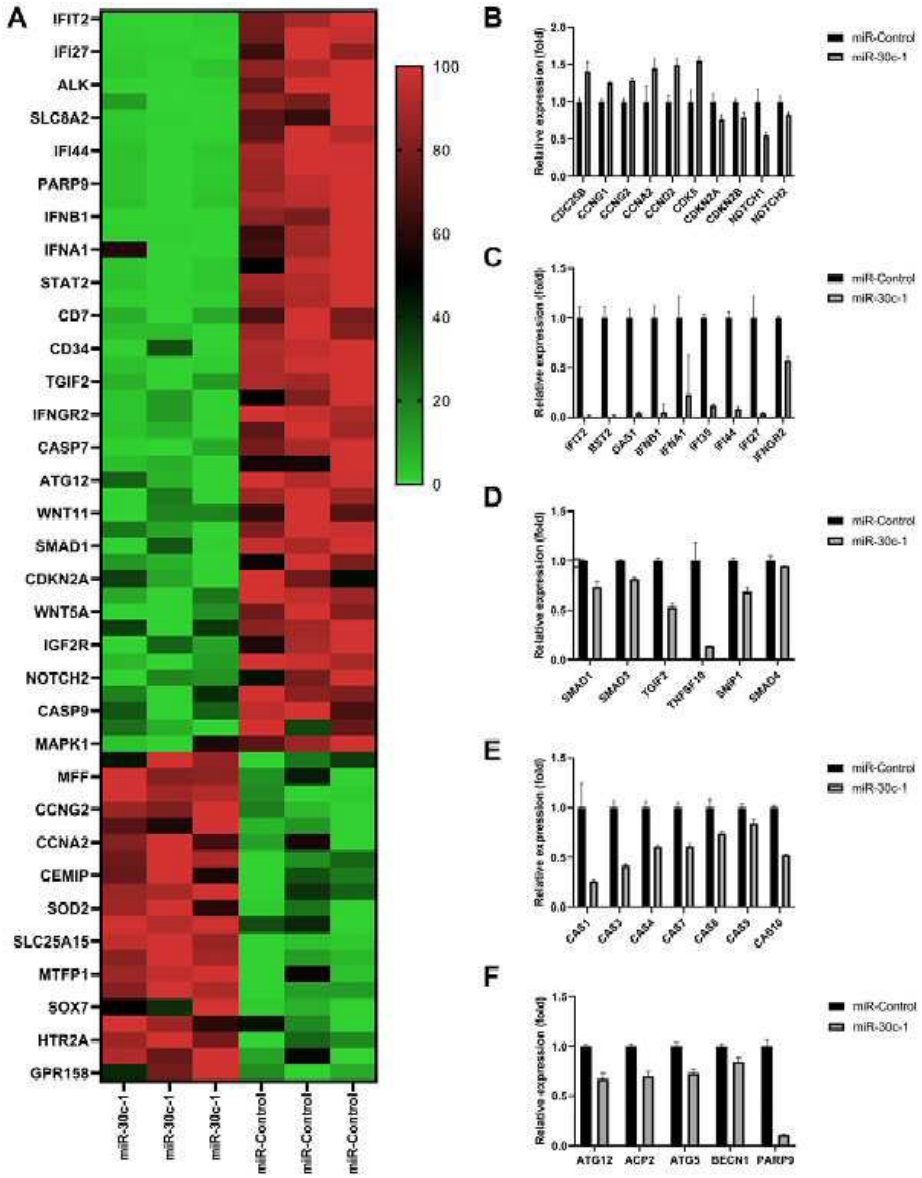
도면2



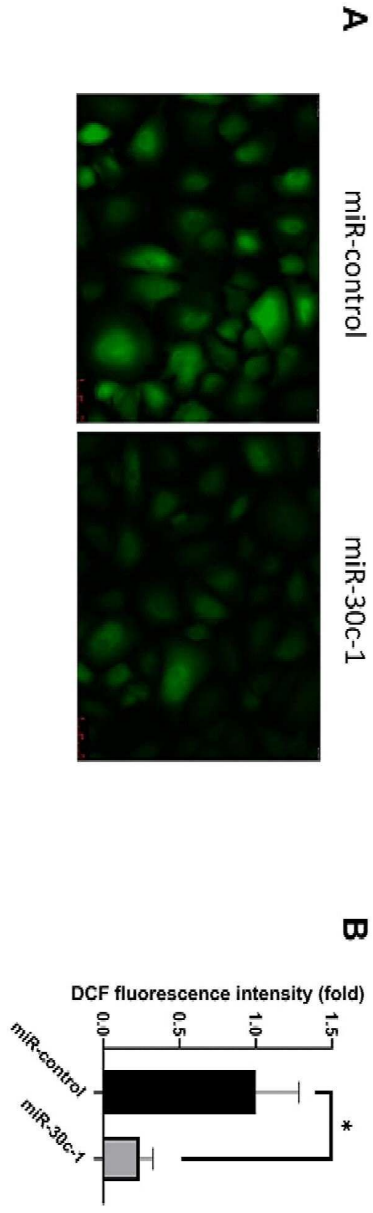
도면3


E
Count
DNA CONTENT PROFILE
G0/G1 64.6
S 4.8
G2/M 30.3
DNA CONTENT INDEX
Control
DNA CONTENT PROFILE
G0/G1 55.3
S 7.1
G2/M 33.9
DNA CONTENT INDEX
miR-30c-1

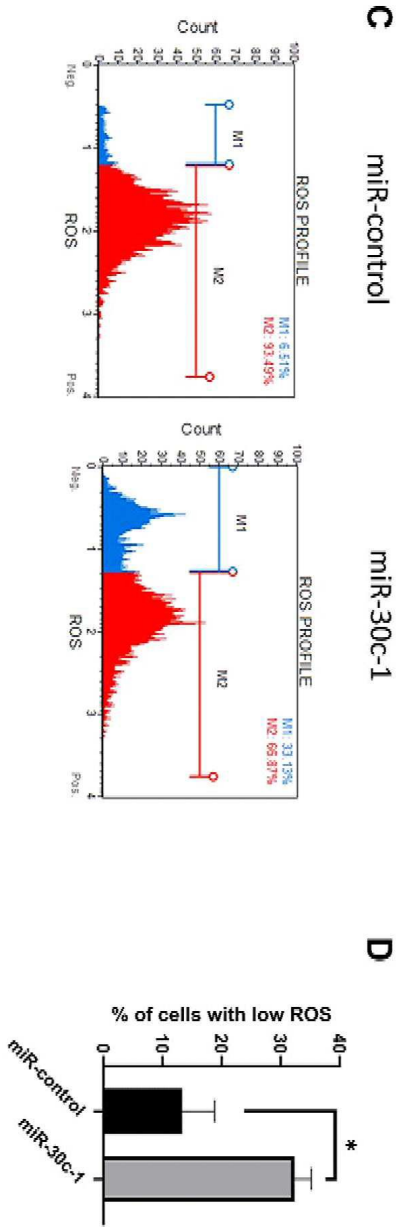
도면4


A
IFIT2
IFI27
ALK
SLC8A2
IFI44
PARP9
IFNB1
IFNA1
STAT2
CD7
CD34
TGIF2
IFNGR2
CASP7
ATG12
WNT11
SMAD1
CDKN2A
WNT5A
IGF2R
NOTCH2
CASP9
MAPK1
MFF
CCNG2
CCNA2
CEMIP
SOD2
SLC25A15
MTFP1
SOX7
HTR2A
GPR158
miR-30c-1
miR-30c-1
miR-30c-1
miR-Control
miR-Control
miR-Control
100
80
60
40
20
0
B
C
D
E
F
miR-Control
miR-30c-1
Relative expression (fold)
ATG12
ACP2
ATG5
BECN1
PARP9

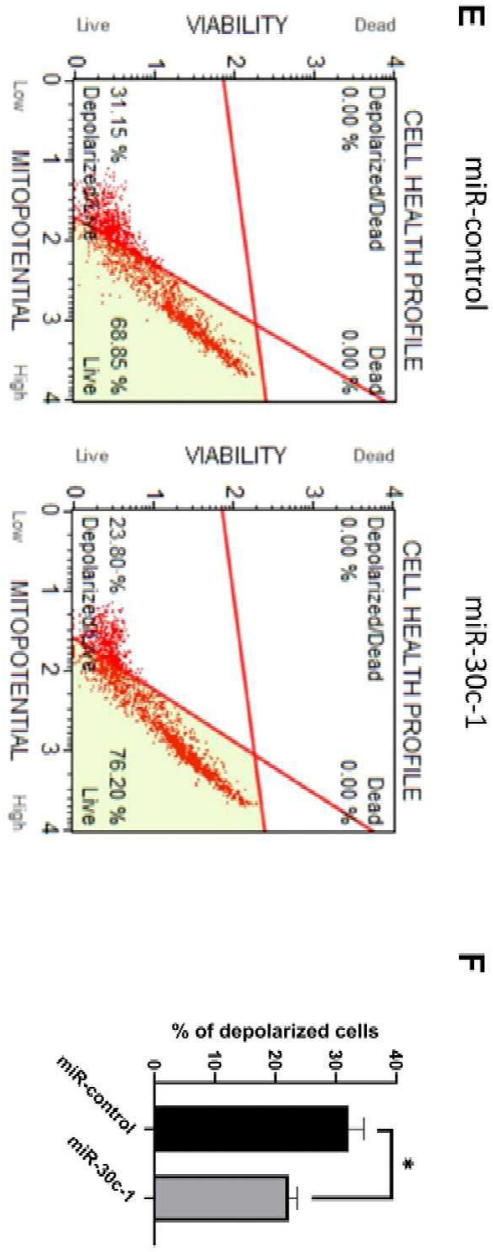
도면5


A
miR-control
miR-30c-1
B
DCF fluorescence intensity (fold)
0.0
0.5
1.0
1.5
miR-control
miR-30c-1
*

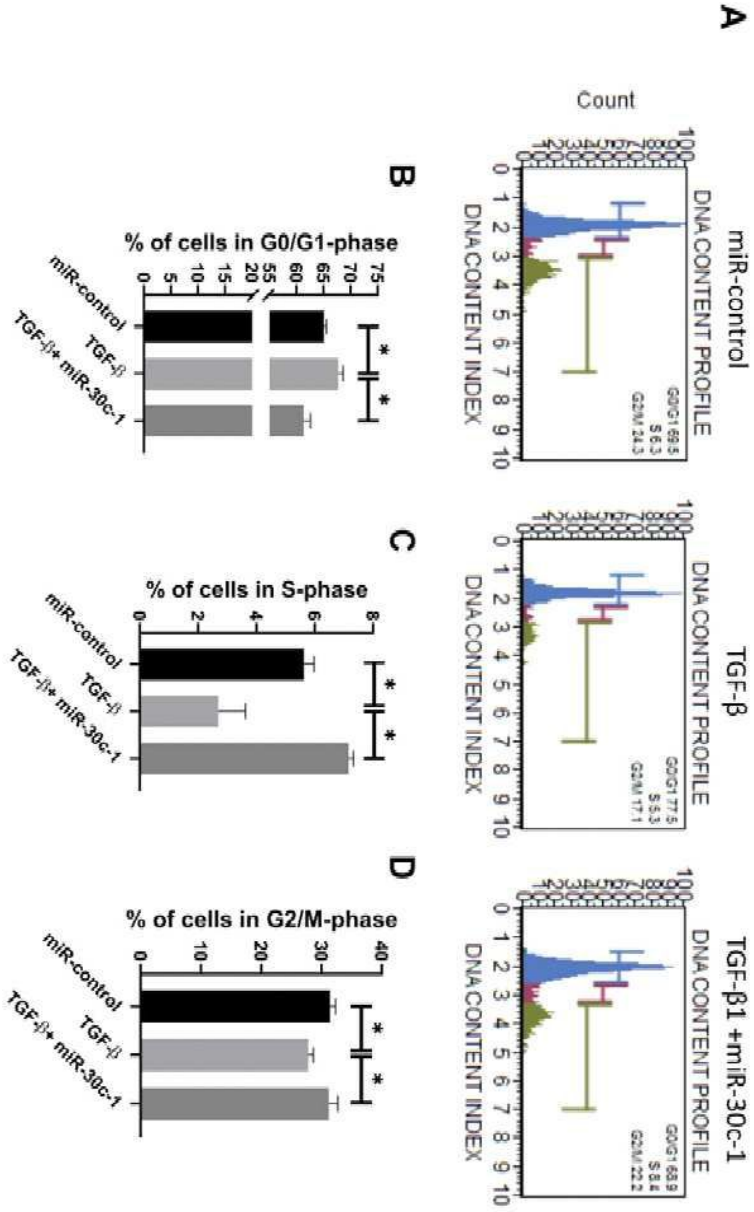
도면6


C
miR-control
Count
ROS
ROS PROFILE
M1
M2
M1: 6.51%
M2: 93.49%
miR-30c-1
Count
ROS
ROS PROFILE
M1
M2
M1: 33.13%
M2: 66.87%
D
% of cells with low ROS
0
10
20
30
40
miR-control
miR-30c-1
*

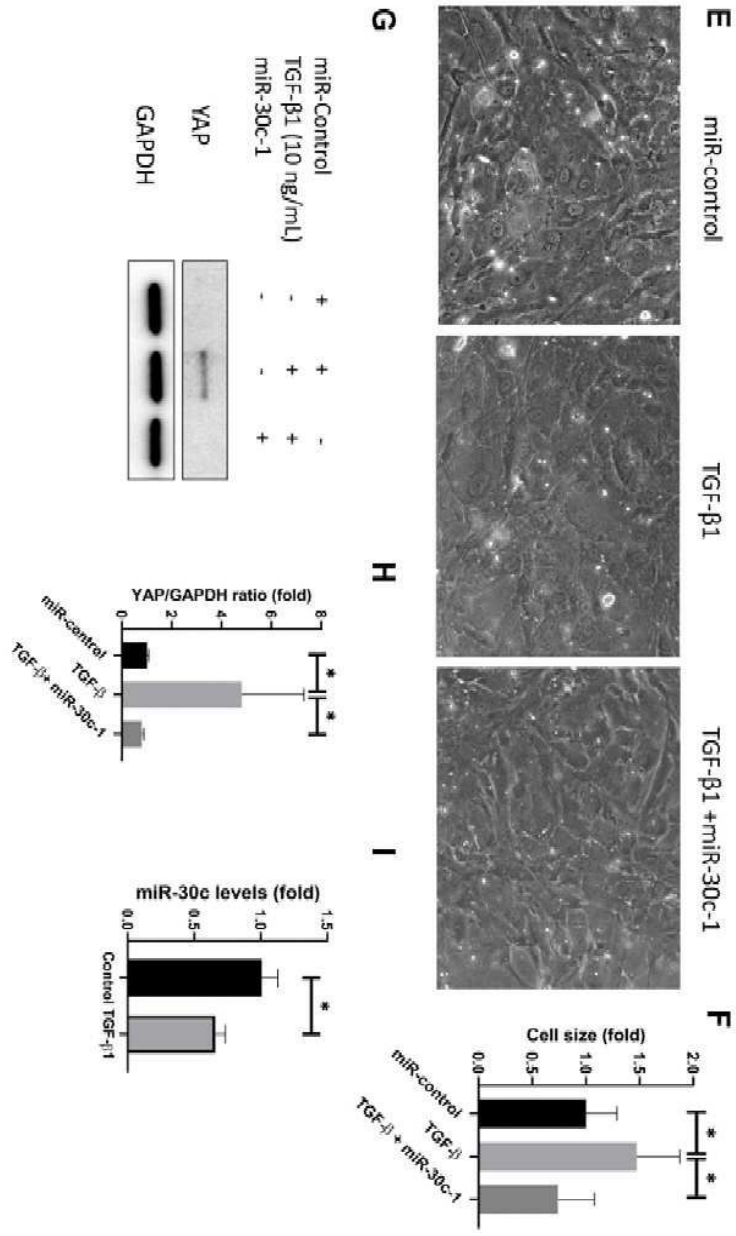
도면7


E
miR-control
Live
VIABILITY
Dead
CELL HEALTH PROFILE
Depolarized/Dead
0.00 %
31.15 %
Depolarized/Live
68.85 %
Live
Dead
0.00 %
Low
MITOPOTENTIAL
High
miR-30c-1
23.80 %
76.20 %
F
% of depolarized cells
0
10
20
30
40
miR-control
miR-30c-1
*

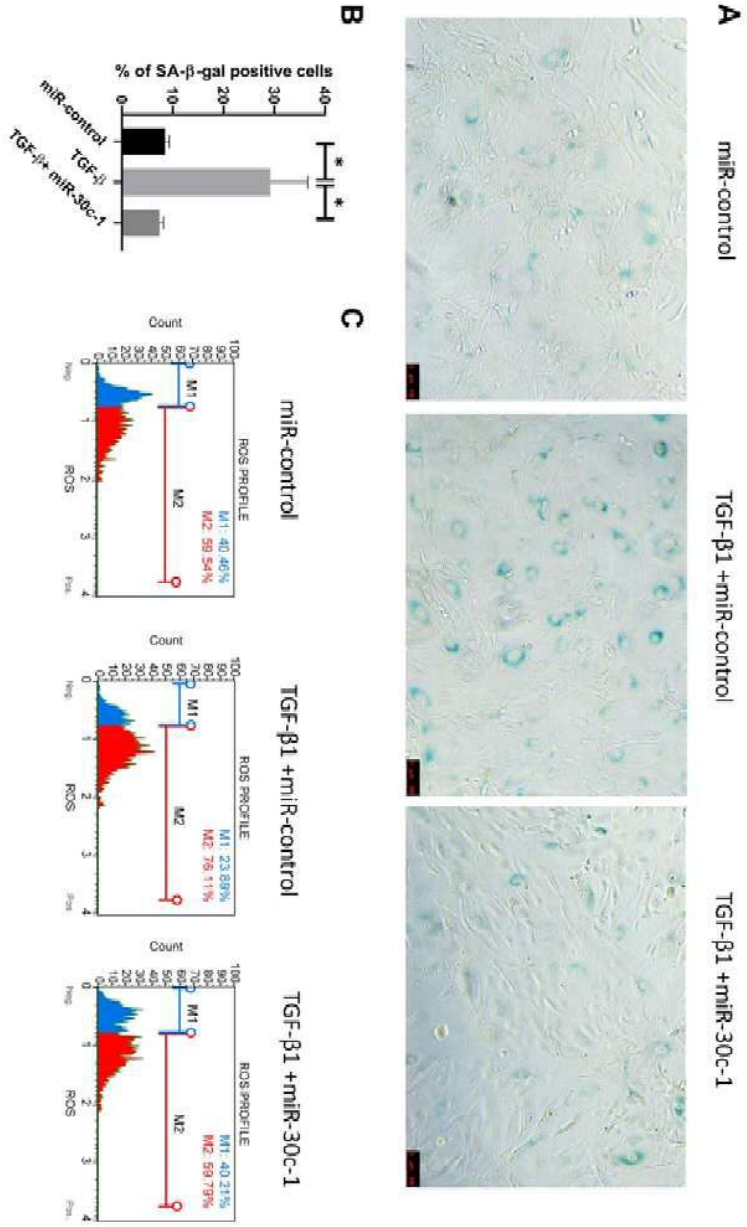
도면8


A
miR-control
TGF-β
TGF-β1 +miR-30c-1
Count
DNA CONTENT PROFILE
DNA CONTENT INDEX
G0/G1 68.5
S 6.3
G2/M 24.3
G0/G1 77.5
S 5.3
G2/M 17.1
G0/G1 69.9
S 8.4
G2/M 22.2
B
% of cells in G0/G1-phase
C
% of cells in S-phase
D
% of cells in G2/M-phase
miR-control
TGF-β
TGF-β+ miR-30c-1
*
*

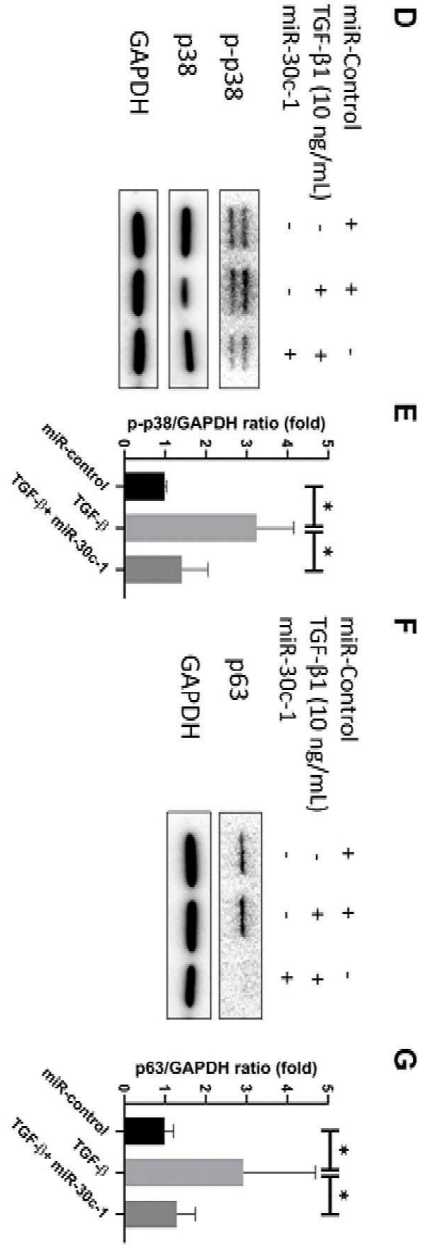
도면9


E
miR-control
TGF-β1
TGF-β1 +miR-30c-1
F
Cell size (fold)
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
miR-control
TGF-β
TGF-β + miR-30c-1
*
*
G
miR-Control
TGF-β1 (10 ng/mL)
miR-30c-1
YAP
GAPDH
H
YAP/GAPDH ratio (fold)
0
2
4
6
8
miR-control
TGF-β
TGF-β+ miR-30c-1
*
*
I
miR-30c levels (fold)
0.0
0.5
1.0
1.5
Control
TGF-β1
*

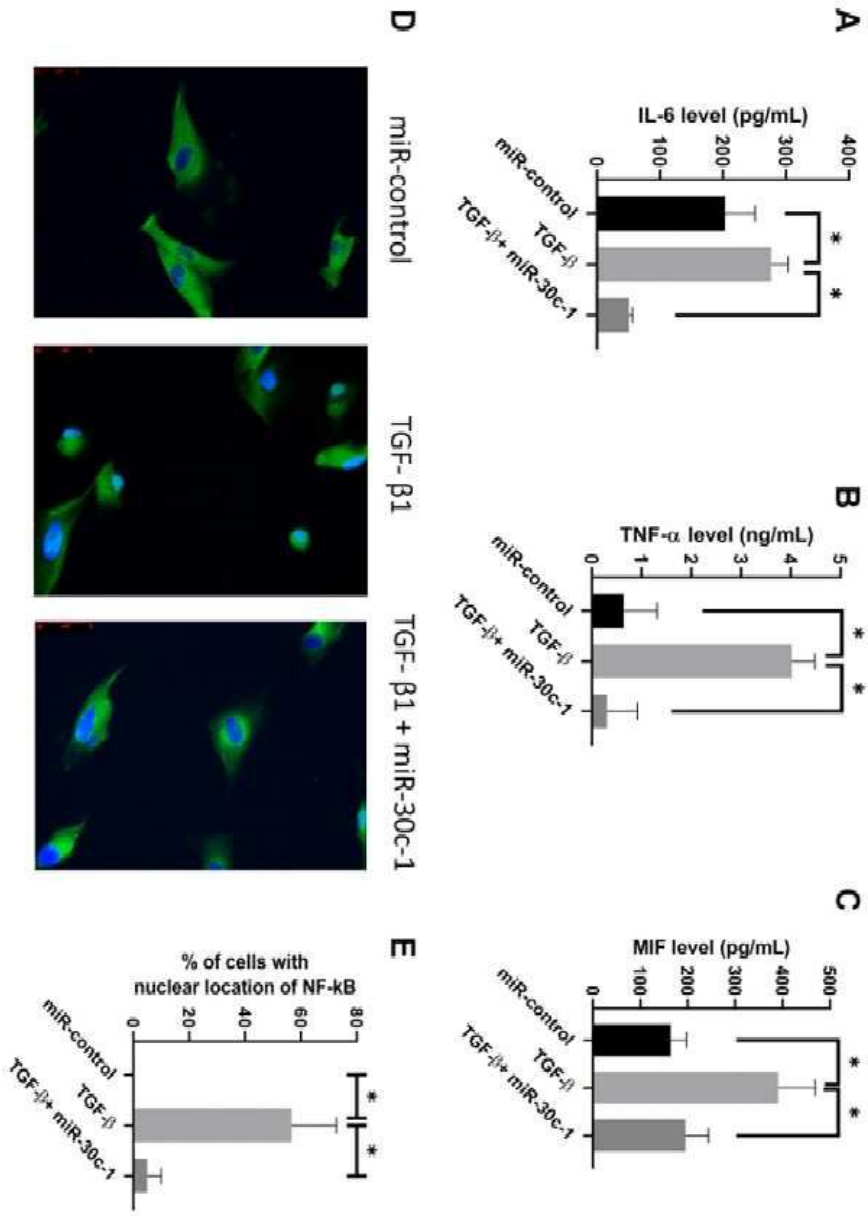
도면10


A
miR-control
TGF-β1 +miR-control
TGF-β1 +miR-30c-1
B
% of SA-β-gal positive cells
0
10
20
30
40
miR-control
TGF-β
TGF-β+ miR-30c-1
*
*
C
miR-control
TGF-β1 +miR-control
TGF-β1 +miR-30c-1
Count
ROS
M1
M2
ROS PROFILE
M1: 40.46%
M2: 59.54%
M1: 23.89%
M2: 76.11%
M1: 40.21%
M2: 59.79%

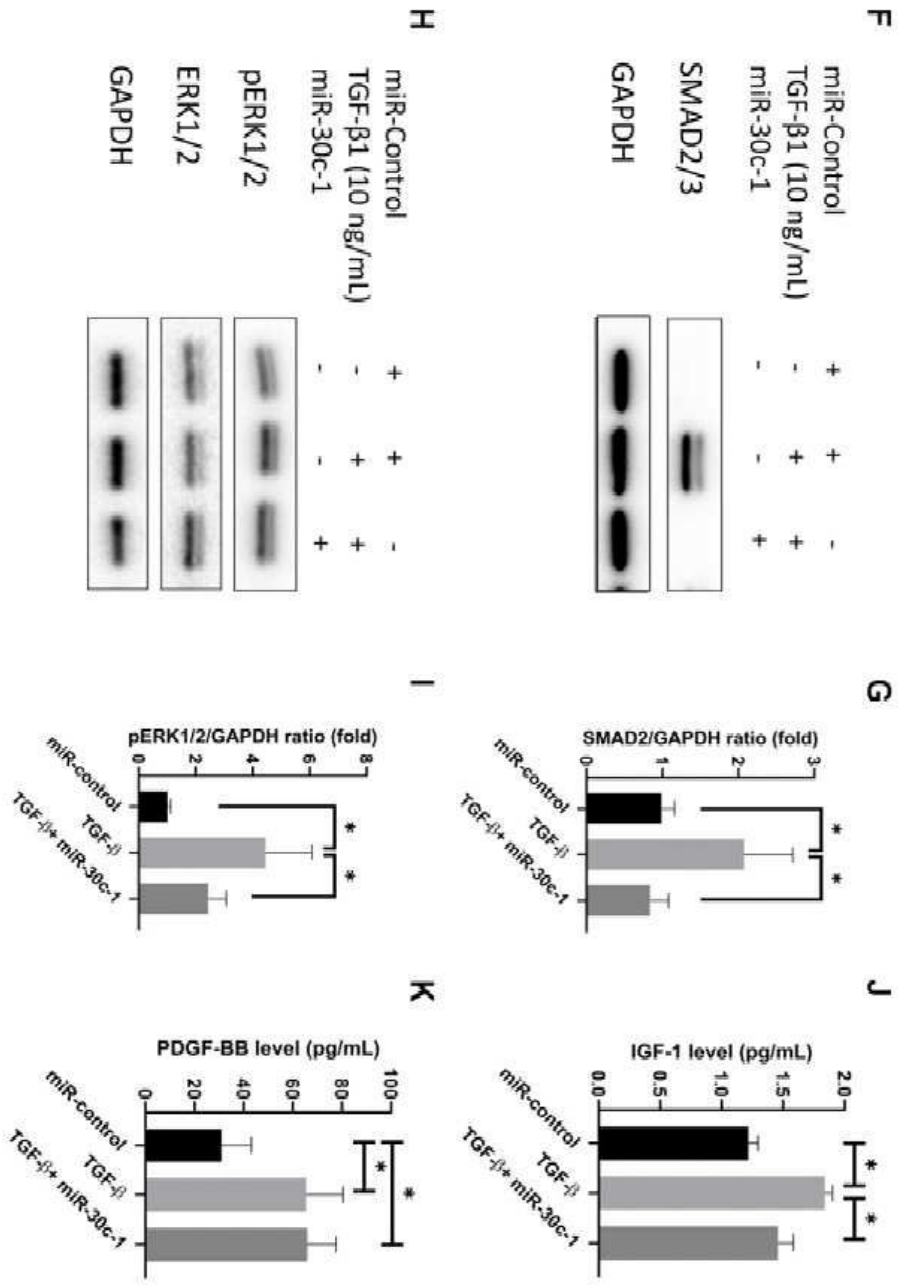
도면11


D
miR-Control
TGF-β1 (10 ng/mL)
miR-30c-1
p-p38
p38
GAPDH
E
p-p38/GAPDH ratio (fold)
miR-control
TGF-β
TGF-β+ miR-30c-1
F
miR-Control
TGF-β1 (10 ng/mL)
miR-30c-1
p63
GAPDH
G
p63/GAPDH ratio (fold)
miR-control
TGF-β
TGF-β+ miR-30c-1

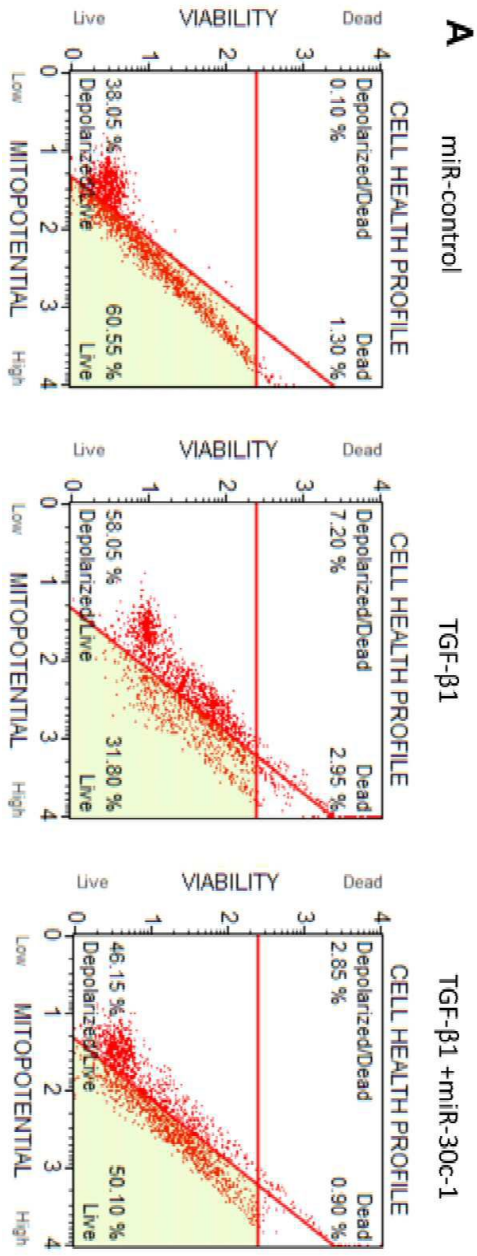
도면12


A
IL-6 level (pg/mL)
0
100
200
300
400
miR-control
TGF-β
TGF-β+ miR-30c-1
*
*
B
TNF-α level (ng/mL)
0
1
2
3
4
5
miR-control
TGF-β
TGF-β+ miR-30c-1
*
*
C
MIF level (pg/mL)
0
100
200
300
400
500
miR-control
TGF-β
TGF-β+ miR-30c-1
*
*
D
miR-control
TGF- β1
TGF- β1 + miR-30c-1
E
% of cells with
nuclear location of NF-kB
0
20
40
60
80
miR-control
TGF-β
TGF-β+ miR-30c-1
*
*

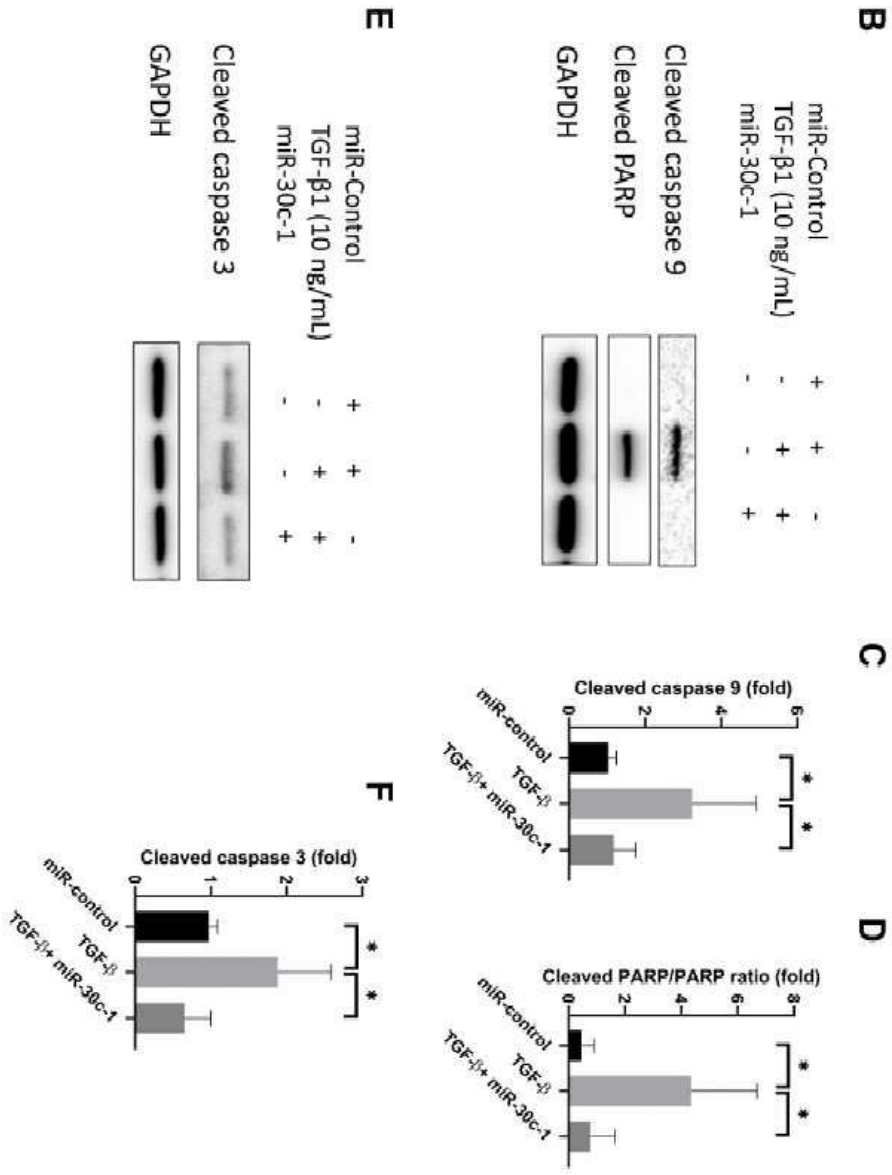
도면13


F
miR-Control
TGF-β1 (10 ng/mL)
miR-30c-1
SMAD2/3
GAPDH
G
SMAD2/GAPDH ratio (fold)
miR-control
TGF-β
TGF-β+ miR-30c-1
H
miR-Control
TGF-β1 (10 ng/mL)
miR-30c-1
pERK1/2
ERK1/2
GAPDH
I
pERK1/2/GAPDH ratio (fold)
J
IGF-1 level (pg/mL)
K
PDGF-BB level (pg/mL)

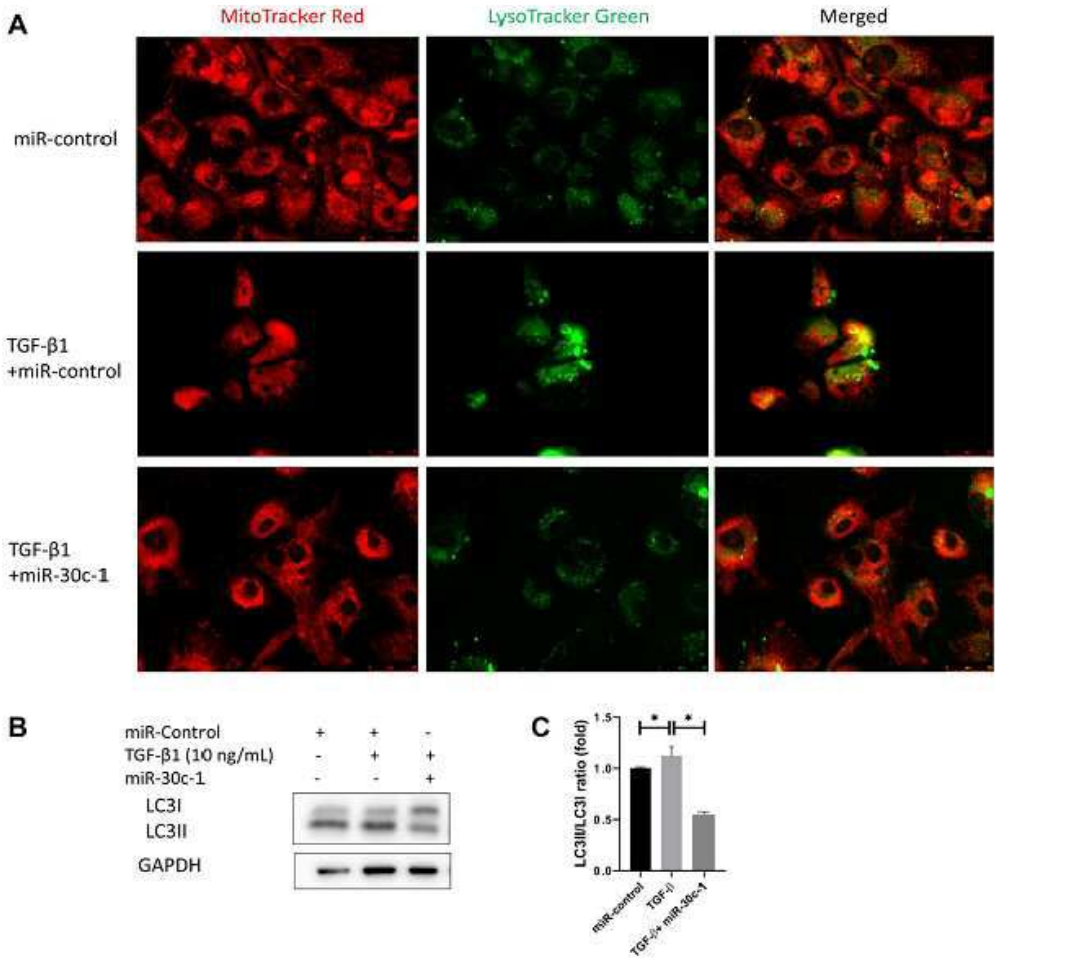
도면14


A
miR-control
TGF-β1
TGF-β1 +miR-30c-1
CELL HEALTH PROFILE
VIABILITY
Live
Dead
MITOPOTENTIAL
Low
High
Depolarized/Dead
0.10 %
1.30 %
38.05 %
Depolarized/Live
60.55 %
Live
7.20 %
2.95 %
58.05 %
31.80 %
2.85 %
0.90 %
46.15 %
50.10 %

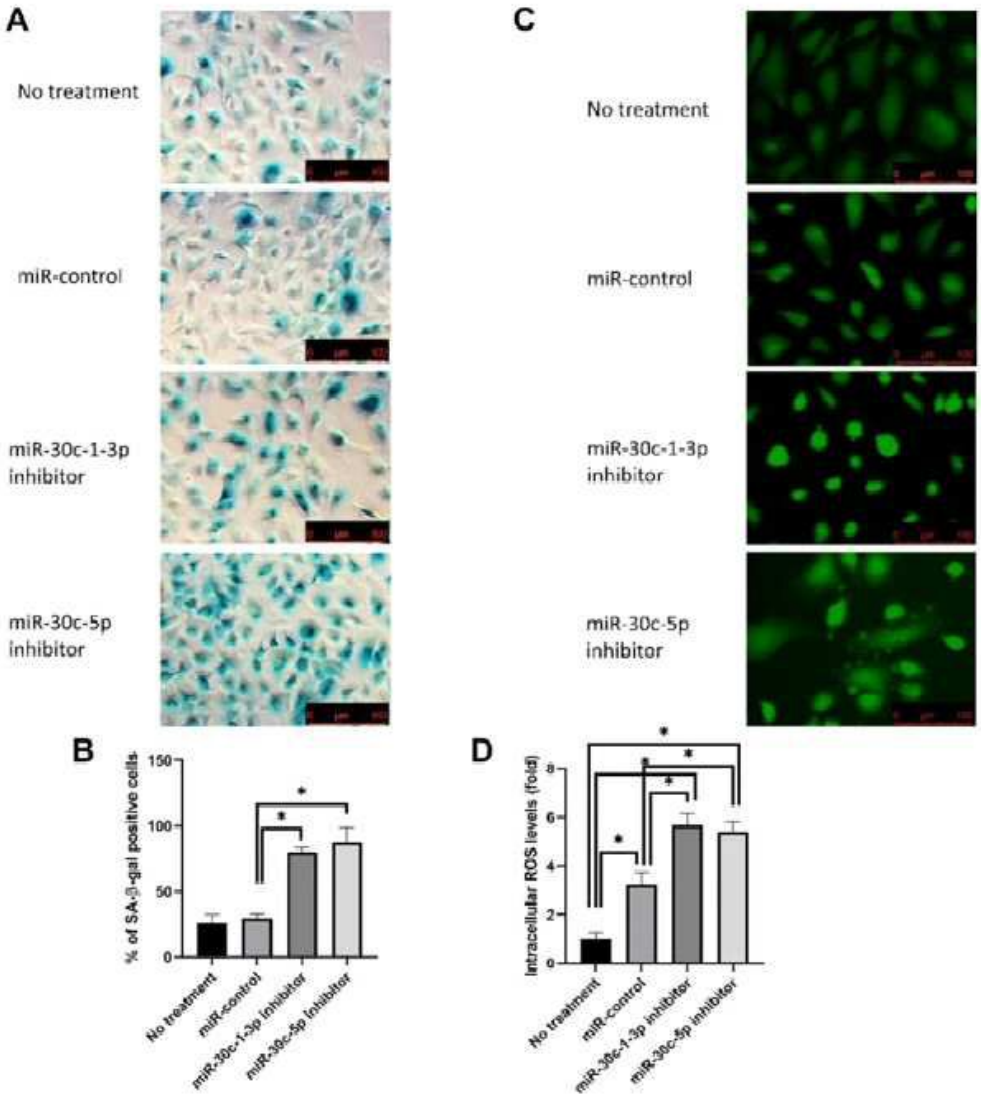
도면15


B
miR-Control
TGF-β1 (10 ng/mL)
miR-30c-1
Cleaved caspase 9
Cleaved PARP
GAPDH
C
Cleaved caspase 9 (fold)
miR-control
TGF-β
TGF-β+ miR-30c-1
D
Cleaved PARP/PARP ratio (fold)
E
miR-Control
TGF-β1 (10 ng/mL)
miR-30c-1
Cleaved caspase 3
GAPDH
F
Cleaved caspase 3 (fold)

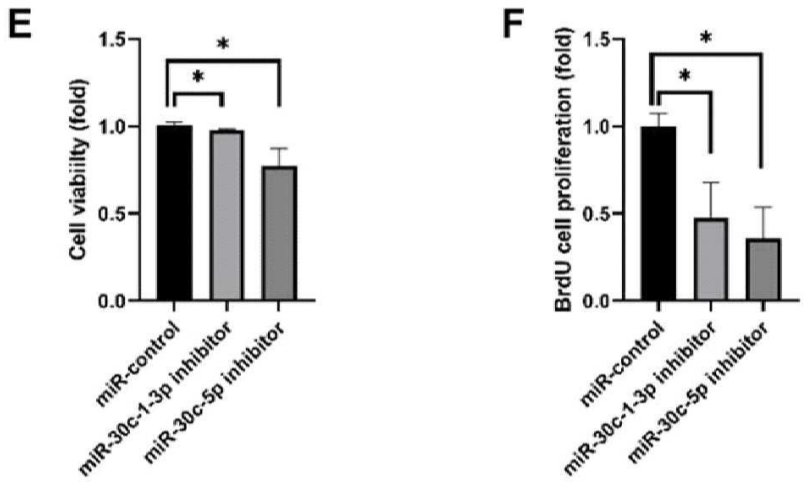
도면16


A
MitoTracker Red
LysoTracker Green
Merged
miR-control
TGF-β1
+miR-control
TGF-β1
+miR-30c-1
B
miR-Control + + -
TGF-β1 (10 ng/mL) - + +
miR-30c-1 - - +
LC3I
LC3II
GAPDH
C
LC3II/LC3I ratio (fold)
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*
miR-control
TGF-β
TGF-β+ miR-30c-1

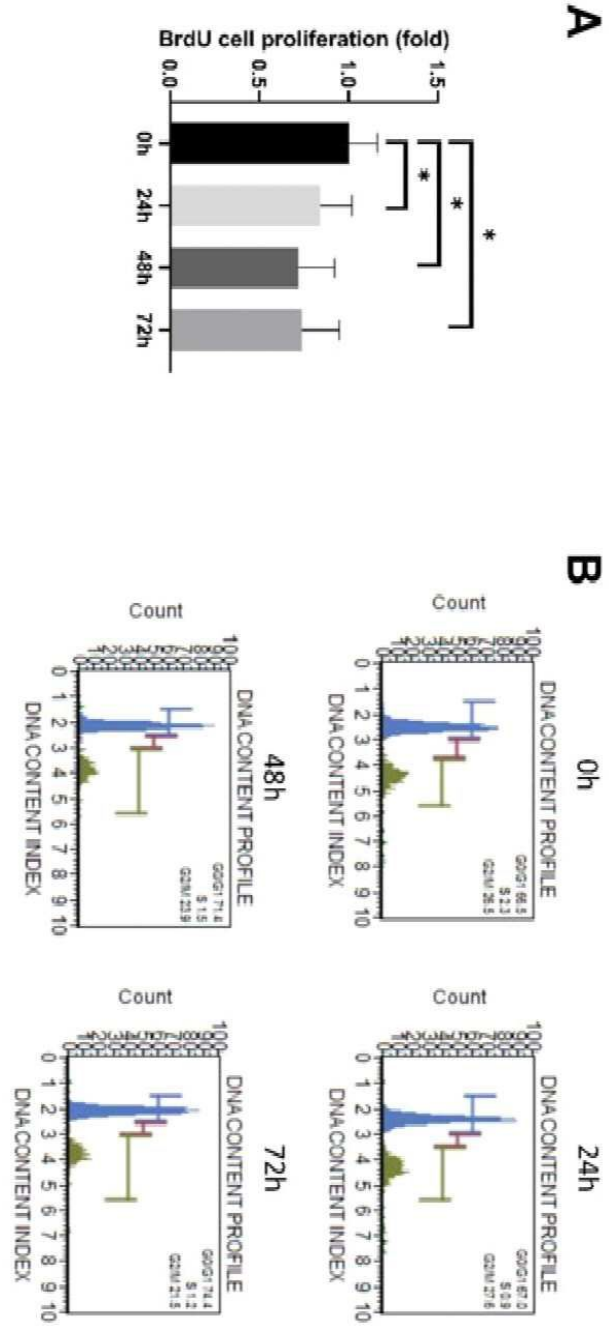
도면17


A
No treatment
miR-control
miR-30c-1-3p inhibitor
miR-30c-5p inhibitor
C
No treatment
miR-control
miR-30c-1-3p inhibitor
miR-30c-5p inhibitor
B
% of SA-β-gal positive cells
150
100
50
0
No treatment
miR-control
miR-30c-1-3p inhibitor
miR-30c-5p inhibitor
D
Intracellular ROS levels (fold)
8
6
4
2
0
No treatment
miR-control
miR-30c-1-3p inhibitor
miR-30c-5p inhibitor

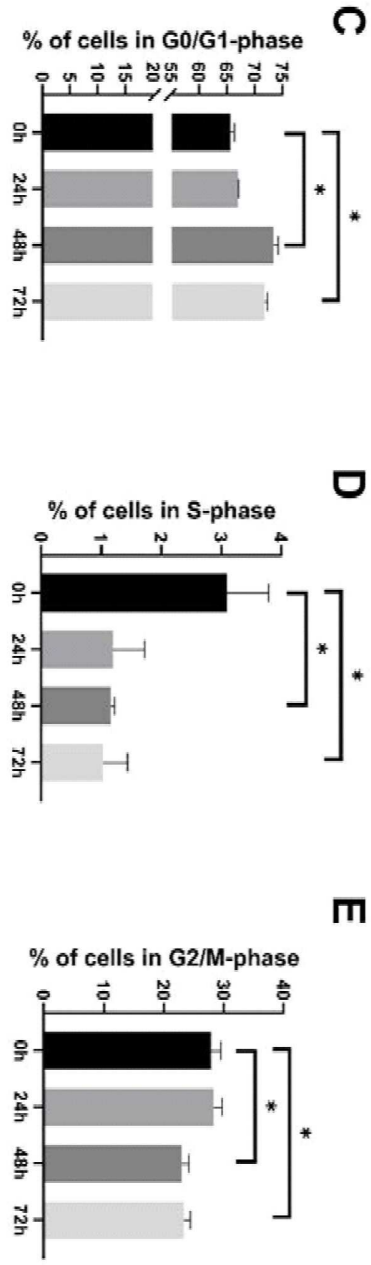
도면18


E
Cell viability (fold)
1.5
1.0
0.5
0.0
miR-control
miR-30c-1-3p inhibitor
miR-30c-5p inhibitor
F
BrdU cell proliferation (fold)
1.5
1.0
0.5
0.0
miR-control
miR-30c-1-3p inhibitor
miR-30c-5p inhibitor

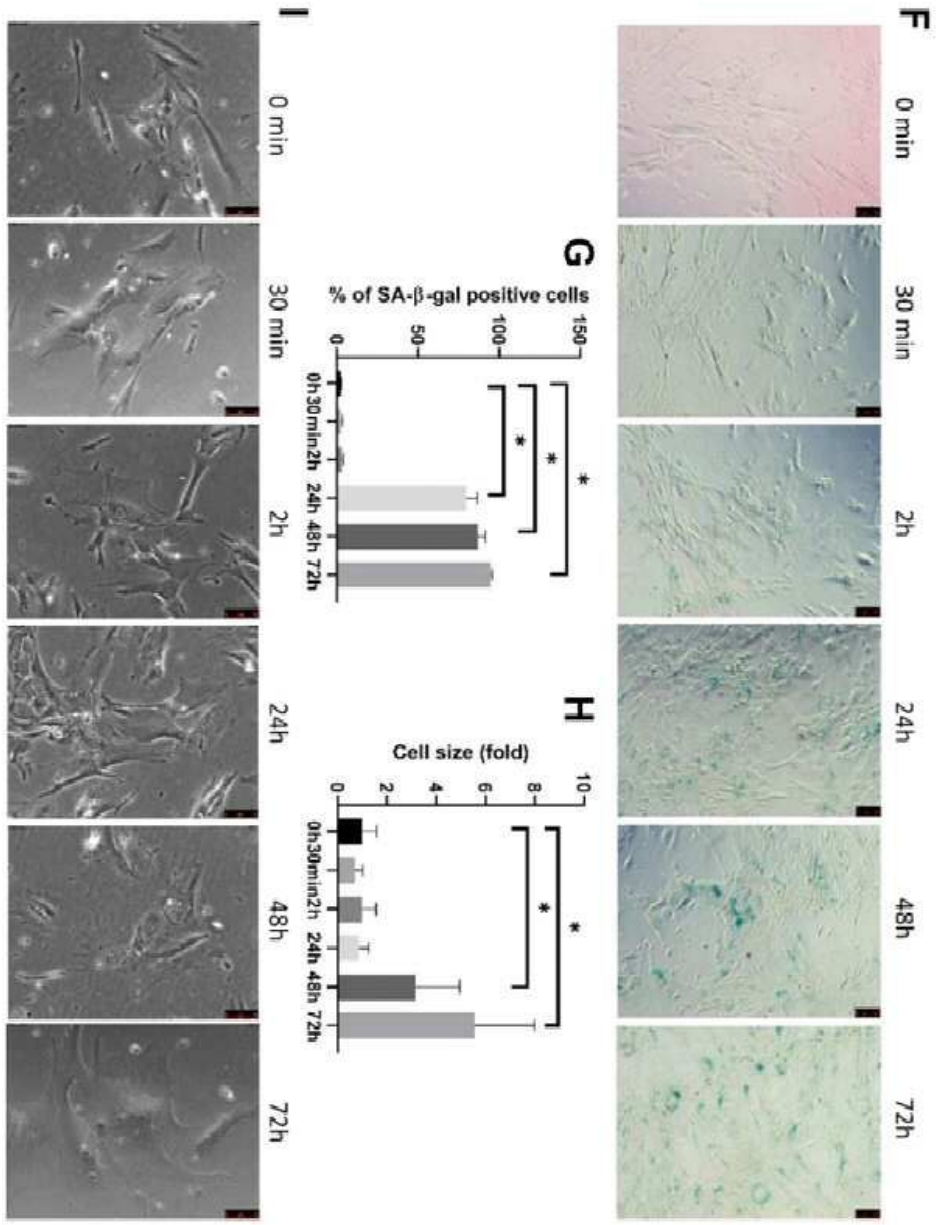
도면19


A
BrdU cell proliferation (fold)
0.0
0.5
1.0
1.5
0h
24h
48h
72h
*
*
*
B
0h
24h
48h
72h
Count
DNA CONTENT PROFILE
DNA CONTENT INDEX

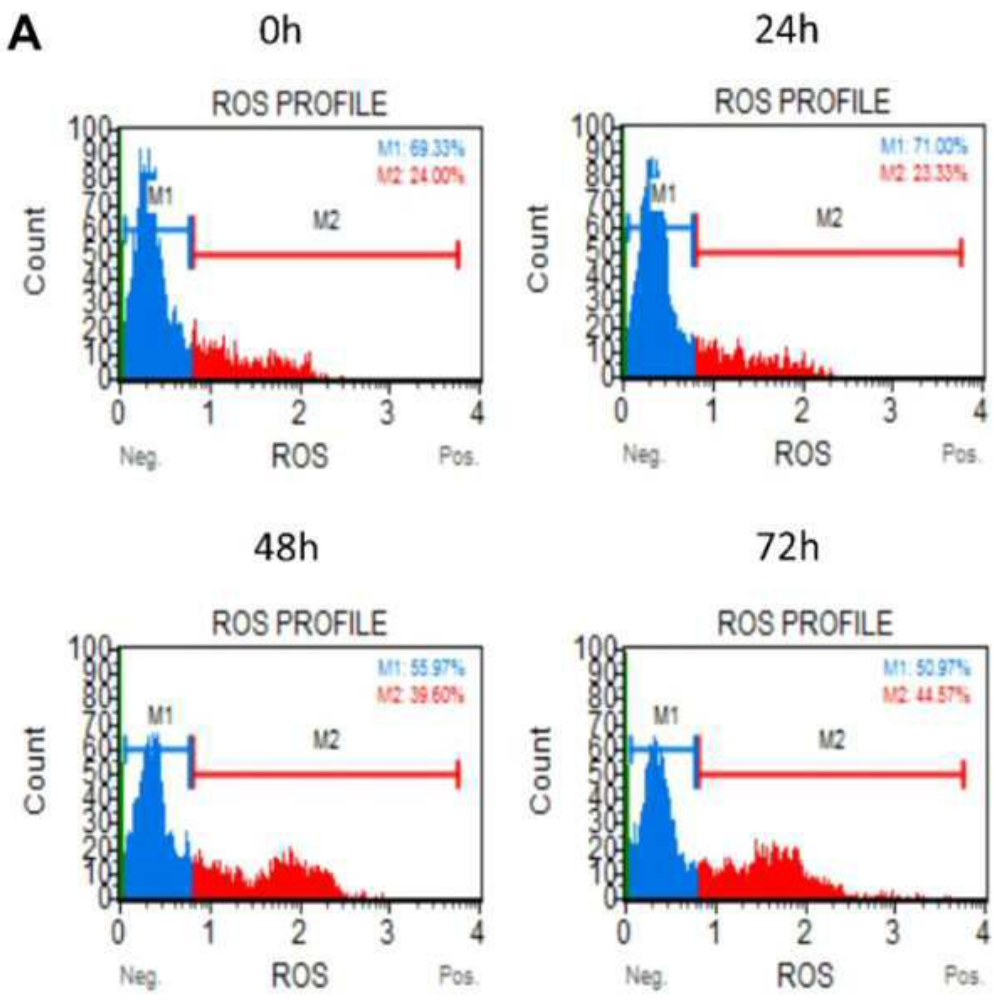
도면20


C
% of cells in G0/G1-phase
0
5
10
15
20
55
60
65
70
75
0h
24h
48h
72h
*
*
D
% of cells in S-phase
0
1
2
3
4
0h
24h
48h
72h
*
*
E
% of cells in G2/M-phase
0
10
20
30
40
0h
24h
48h
72h
*
*

도면21

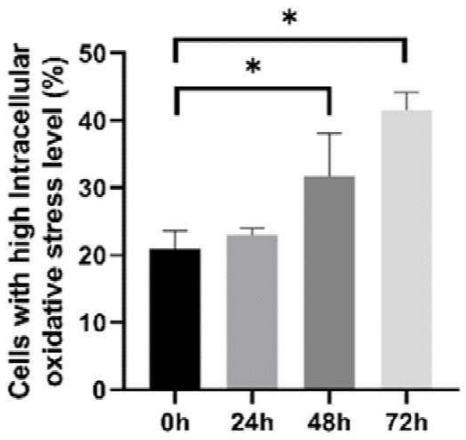

F
0 min
30 min
2h
24h
48h
72h
G
% of SA-β-gal positive cells
0
50
100
150
0h 30min 2h 24h 48h 72h
H
Cell size (fold)
0
2
4
6
8
10
0h 30min 2h 24h 48h 72h
I
0 min
30 min
2h
24h
48h
72h

도면22

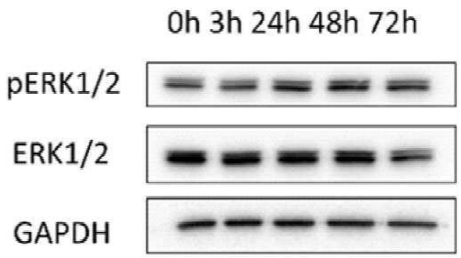

A
0h
ROS PROFILE
M1: 69.33%
M2: 24.00%
M1
M2
Count
ROS
Neg.
Pos.
24h
ROS PROFILE
M1: 71.00%
M2: 23.33%
48h
ROS PROFILE
M1: 55.97%
M2: 39.60%
72h
ROS PROFILE
M1: 50.97%
M2: 44.57%

도면23

B

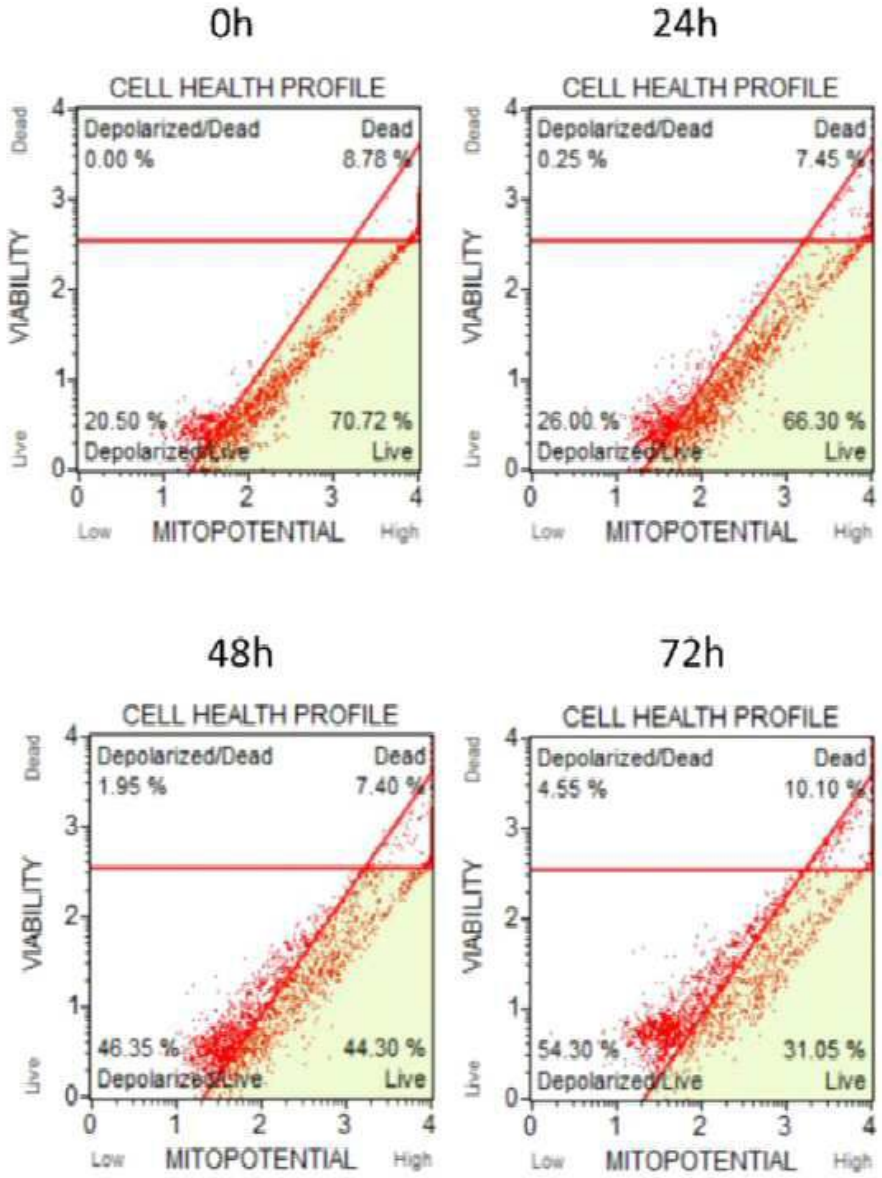

*
*
Cells with high Intracellular oxidative stress level (%)
50
40
30
20
10
0
0h
24h
48h
72h

C

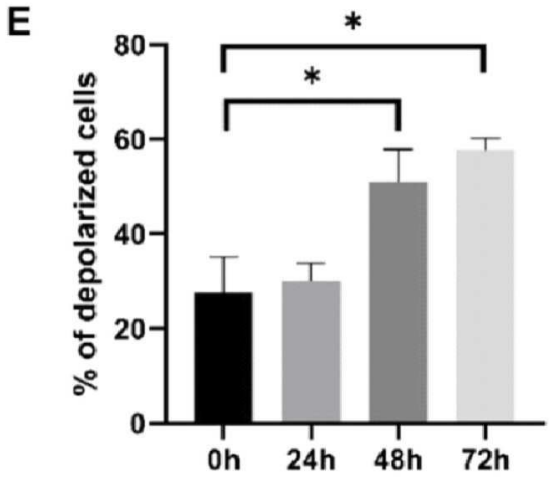

0h 3h 24h 48h 72h
pERK1/2
ERK1/2
GAPDH

도면24

D


0h
CELL HEALTH PROFILE
Depolarized/Dead
0.00 %
Dead
8.78 %
20.50 %
Depolarized/Live
70.72 %
Live
VIABILITY
Dead
Live
MITOPOTENTIAL
Low
High
24h
CELL HEALTH PROFILE
Depolarized/Dead
0.25 %
Dead
7.45 %
26.00 %
Depolarized/Live
66.30 %
Live
48h
CELL HEALTH PROFILE
Depolarized/Dead
1.95 %
Dead
7.40 %
46.35 %
Depolarized/Live
44.30 %
Live
72h
CELL HEALTH PROFILE
Depolarized/Dead
4.55 %
Dead
10.10 %
54.30 %
Depolarized/Live
31.05 %
Live

도면25



서 열 목 록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation Hallym University

<120> Corneal endothelial cell culture method using agent for increasing miR-30c-1 expression level and composition for treating corneal endothelial cell disease

<130> P213390

<160> 4

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 23

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-30c-5p

<400> 1

uguaaacauc cuacacucuc agc 23

<210

> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-30c-1-3p

<400> 2

cugggagagg guuguuuacu cc 22

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer

<400> 3

tgtgtaaaca tcctacactc tcag 24

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 4

gagtaaacaa ccctctccca 20