(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0033966
(43) 공개일자 2024년03월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01) *A61P 43/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2024.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-0112940
(22) 출원일자 2022년09월06일
심사청구일자 2022년09월06일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
우성지
강원도 춘천시 지석로 29 517동 504호
홍지영
강원도 춘천시 동내면 외솔길19번길 80-7
이재준
강원도 춘천시 삭주로 77, 춘천성심병원 마취통증의학과
(74) 대리인
특허법인본

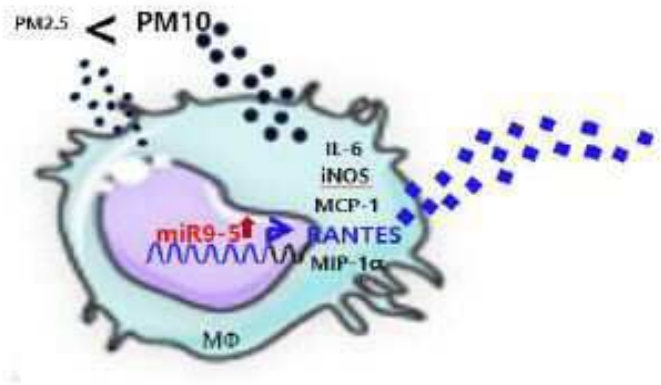
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **미세먼지에 의한 사이토카인 및 케모카인 발현을 억제하기 위한, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명에 따르면, 미세먼지 및 초미세먼지 자극에 의한 염증 반응을 감소 내지는 조절할 수 있는, 미세먼지 또는 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포 내에서 miR-9-5p의 발현을 억제하여 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제하기 위한, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염 및 이의 용도가 제공된다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
A61P 29/00 (2023.02)
A61P 43/00 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345350473
과제번호 2021R1I1A1A01060006
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 미세먼지에 의한 대식세포 내 miR9-5p/RANTES axis 활성화가 종양 미세 환경에 미치는 영향
기 여 율 1/1
과제수행기관명 한림대학교
연구기간 2021.06.01 ~ 2024.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

미세먼지 또는 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포 내에서 miR-9-5p의 발현을 억제하여 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제하기 위한, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 2

미세먼지 또는 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포 내에서 miR-9-5p의 발현을 억제하여 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제하기 위한, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물로서, 상기 miR-9-5p 억제제는 150 내지 250pmol의 농도로 상기 조성물에 포함되는 것을 특징으로 하는, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 3

미세먼지 또는 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포 내에서 miR-9-5p의 발현을 억제하여 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제하기 위한, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물로서, 상기 miR-9-5p 억제제는 450 내지 550pmol의 농도로 상기 조성물에 포함되는 것을 특징으로 하는, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 4

미세먼지 또는 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포 내에서 RANTES의 증가를 억제하여 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제하기 위한, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 miR-9-5p 억제제는 200pmol의 농도로 상기 조성물에 포함되는 것을 특징으로 하는, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 miR-9-5p 억제제는 500pmol의 농도로 상기 조성물에 포함되는 것을 특징으로 하는, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 7

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 miR-9-5p 억제제는 UCAUACAGCUAGAUAACCAAAGA의 염기 서열을 가지는 것을 특징으로 하는, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 8

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 미세먼지 또는 초미세먼지는 PM10 미세먼지인 것을 특징으로 하는, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 9

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 미세먼지 또는 초미세먼지는 PM2.5 초미세먼지인 것을 특징으로 하는, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 미세먼지 또는 초미세먼지는 PM10 미세먼지인 것을 특징으로 하는, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 미세먼지 또는 초미세먼지는 PM2.5 초미세먼지인 것을 특징으로 하는, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미세먼지에 의한 사이토카인(Cytokine) 및 케모카인(Chemokine)의 발현을 억제하기 위한 miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 미세먼지(PM10) 및 초미세먼지(PM2.5)의 자극에 의한 사이토카인 및 케모카인 발현을 억제하기 위한 miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 및 이의 용도로서, 대식세포 내에서 증가된 miR-9-5p의 발현을 억제하는 것을 통해 사이토카인 및 케모카인 발현을 억제하기 위한 miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 사이토카인은 체내에서 주로 혈액 중 함유된 면역 단백질의 일종으로, 대식세포의 증식을 유도하거나 분비세포의 분화를 촉진하기도 하는 등의 세포간 신호를 전달하는 신호 전달 단백질에 해당하며, 케모카인은 사이토카인의 하위 분류에 해당하는 신호 전달 단백질로서 특히 세포의 이동을 유발시키는 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 최근 문제되는 미세먼지 및 초미세먼지는 호흡기로 도입되어 최종적으로는 사이토카인 및 케모카인의 발현을 증대시켜 많은 불편함을 초래하고 있다. 특히, 미세먼지는 초미세먼지에 비해 사이토카인 및 케모카인 발현을 보다 높게 증가시키는 자극원으로서, RANTES(CCL5) 발현을 매우 높게 증가시키는 것으로 알려져 있다. 여기서, RANTES(CCL5) 조절의 주요 기전에는 miRNA-9-5p가 관여하는 것으로 알려져 있는데, 이는 즉 미세먼지의 자극에 의해 대식세포 내에서 miR-9-5p가 증가하면서 MAPK 신호체계가 활성화되고, 최종적으로 RANTES(CCL5)가 증가됨을 의미한다.

[0004] 따라서, 미세먼지 및 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포 내에서 miR-9-5p의 발현을 억제하는 것을 통해, RANTES(CCL5)의 발현을 감소시키고, 나아가 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제할 수 있는 방법이 절실하게 요구되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 미세먼지 및 초미세먼지에 의한 사이토카인 및 케모카인 발현을 억제하기 위한 miR-9-5p 억제제의 용도를 제공하고자 하는 목적을 가지며, 특히 miR-9-5p 억제제를 사용하여 미세먼지 및 초미세먼지의 자극에 의해 대식세포 내에서 증가된 miR-9-5p의 발현을 억제하여 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제하는 수단을 제공하고자 하는 목적을 가진다.

[0006] 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 이상에서 언급된 과제로 제한되는 것은 아니며, 언급되지 않은 본 발명이 해결하고자 하는 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술분야에서 보통의 지식을 가진 자("통상의 기술자")에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 전술한 기술적 과제를 달성하기 위하여 제공되는 본 발명에 따른 미세먼지에 의한 사이토카인 및 케모카인 발현을 억제하기 위한 조성물은,

[0008] 미세먼지 또는 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포 내에서 miR-9-5p의 발현을 억제하여 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제하기 위한, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.

[0009] 또한, 본 발명에 따른 미세먼지에 의한 사이토카인 및 케모카인 발현을 억제하기 위한 조성물은,

[0010] 미세먼지 또는 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포 내에서 miR-9-5p의 발현을 억제하여 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제하기 위한, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물로서, 상기 miR-9-5p 억제제는 200pmol의 농도로

상기 조성물에 포함되는 것을 특징으로 하는, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.

[0011] 또한, 본 발명에 따른 미세먼지에 의한 사이토카인 및 케모카인 발현을 억제하기 위한 조성물은,

[0012] 미세먼지 또는 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포 내에서 miR-9-5p의 발현을 억제하여 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제하기 위한, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물로서, 상기 miR-9-5p 억제제는 500pmol의 농도로 상기 조성물에 포함되는 것을 특징으로 하는, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.

[0013] 또한, 본 발명에 따른 미세먼지에 의한 사이토카인 및 케모카인 발현을 억제하기 위한 조성물은,

[0014] 미세먼지 또는 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포 내에서 miR-9-5p의 발현을 억제하여 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제하기 위한, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물로서, 상기 miR-9-5p 억제제는 UCAUACAGCUAGAUAACCAAAGA의 서열을 가지는 것을 특징으로 하는, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명에 따른 미세먼지에 의한 사이토카인 및 케모카인 발현을 억제하기 위한 조성물은,

[0016] 미세먼지 또는 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포 내에서 miR-9-5p의 발현을 억제하여 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제하기 위한, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물로서, 상기 미세먼지 또는 초미세먼지는 PM10 미세먼지 이고, 상기 miR-9-5p 억제제는 200pmol의 농도로 상기 조성물에 포함되는 것을 특징으로 하는, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명에 따른 미세먼지에 의한 사이토카인 및 케모카인 발현을 억제하기 위한 조성물은,

[0018] 미세먼지 또는 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포 내에서 miR-9-5p의 발현을 억제하여 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제하기 위한, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물로서, 상기 미세먼지 또는 초미세먼지는 PM2.5 미세먼지 이고, 상기 miR-9-5p 억제제는 200pmol의 농도로 상기 조성물에 포함되는 것을 특징으로 하는, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명에 따른 미세먼지에 의한 사이토카인 및 케모카인 발현을 억제하기 위한 조성물은,

[0020] 미세먼지 또는 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포 내에서 miR-9-5p의 발현을 억제하여 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제하기 위한, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물로서, 상기 억제는 상기 대식세포 내에서 RANTES의 발현을 억제하는 것인, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명에 의하면 미세먼지 또는 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포 내에서 miR-9-5p의 발현을 억제하는 것을 통해, RANTES의 발현을 감소시키고 나아가 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제할 수 있는 miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 및 이의 약제학적으로 허용되는 염이 제공될 수 있다.

[0022] 특히, 본 발명에 따른 miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물을 사용하여, 최근 환경보건적으로 문제되는 미세먼지 또는 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포가 발현시키는 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제하는 것을 통해, 궁극적으로는 미세먼지 또는 초미세먼지의 자극에 따른 염증 반응을 감소시킬 수 있는 우수한 효과가 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은, 대식세포 내에서 관찰되는 미세먼지 및 초미세먼지의 독성 및 세포의 성장을 나타낸 도이다.

도 2는, 미세먼지 및 초미세먼지에 의한 자극에 따라 발현된 사이토카인 및 케모카인을 나타낸 도이다.

도 3은, 대식세포 내에서 미세먼지 및 초미세먼지에 의한 사이토카인 및 케모카인 발현의 기전을 나타낸 도이다.

도 4는, 미세먼지 및 초미세먼지의 Long-term 자극에 대한 발현 양상을 나타낸 도이다.

도 5 및 도 6은, 미세먼지 및 초미세먼지에 의한 자극에 따른 miR-9-5p의 발현 및, miR-9-5p 억제제에 의한 사이토카인 및 케모카인 발현의 감소를 나타낸 도이다.

도 7은, miR-9-5p 억제제의 작용 기전을 나타낸 도이다.

도 8은, miR-9-5p 모방체의 처리 시 RANTES 증가 양상을 나타낸 도이다.

도 9은, 전체 연구를 흐름을 추상적으로 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

[0025] 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통용되는 사전적 의미로 한정하여 해석되도록 의도된 것이 아니며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 보통의 지식을 가진 자는 상기 용어 또는 단어를 본 명세서 및 특허청구범위가 자명하게 전달하고자 하는 관념을 표현하는 범위 내에서 본 발명이 의미하는 바를 전달하기 위한 범위의 의미로 사용된 것으로 명확하게 이해할 수 있을 것이다.

[0026] 또한, 본 명세서에 기재된 실시예 및 상기 실시예에 기재된 구성들은 통상의 기술자에게 본 발명이 이해되고 또 이를 재현할 수 있도록 하기 위해 단지 예시로 제시된 바람직한 실시예에 불과할 뿐이고, 본 발명을 이에 한정시키고자 하는 의도가 아님을 통상의 기술자는 명확하게 이해할 수 있을 것이다.

[0027] 또한, 본 명세서에서 기술되는 각각의 구성에 관한 설명 및 구체적인 실시 양태는 각각의 다른 설명 및 실시 양태에도 자명하게 적용될 수 있다. 즉, 본 명세서에서 개시되는 다양한 구성과 구체적인 실시 양태의 모든 조합은 본 발명이 개시하는 범위에 속하는 것으로 통상의 기술자는 명확하게 이해할 수 있을 것이다.

[0028] 본 명세서에서 사용되는 용어 '및/또는'은, 언급된 항목들의 각각 및 하나 이상의 모든 조합을 포함하는 용어이다. 또한, 단수형 용어는 별도로 언급되지 않는 한 복수형도 포함한다.

[0029] 본 명세서에서 사용하는 '포함한다(comprising)' 및/또는 '포함하는(comprising)'의 용어는 언급된 항목들 외의 다른 항목의 존재 또는 추가를 배제하지 않는 용어이다.

[0030] 본 명세서에서 용어 '내지'를 사용하여 나타낸 수치의 범위는, 상기 용어의 앞과 뒤에 기재된 값을 각각 하한값과 상한 값으로써 포함하는 수치의 범위를 나타낸다. 임의의 수치 범위의 상한과 하한으로서의 수치 값이 각각 복수 개로 개시된 경우, 본 명세서에서 개시하는 수치의 범위는 복수의 하한 값 중 임의의 하나의 값 및 복수의 상한 값 중 임의의 하나의 값을 각각 하한 값 및 상한 값으로 하는 임의의 수치의 범위로 이해될 수 있다.

[0031] 본 명세서에서 사용되는 용어 '약' 또는 '대략'은, 사용되는 경우, 상기 용어의 뒤에 기재된 값 또는 수치 범위의 10% 이내의 값 또는 수치 범위를 의미한다.

[0032] 본 명세서 및 특허청구범위에 사용된 용어 또는 단어는 통상적인 사전적인 의미로 한정해서 해석되어서는 안 되며, 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.

[0033] 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 발명의 범주에 속하고, 일 구현예에서 생략된 기재는 다른 구현예에서 기재된 바와 같은 방식으로 해석될 수 있다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0034] 본 발명의 일 실시 양태에 의하면, 본 발명에 따른 미세먼지에 의한 사이토카인 및 케모카인 발현을 억제하기 위한 조성물은,

[0035] 미세먼지 또는 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포 내에서 miR-9-5p의 발현을 억제하여 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제하기 위한, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.

[0036] 본 발명의 또 다른 일 실시 양태에 의하면, 본 발명에 따른 미세먼지에 의한 사이토카인 및 케모카인 발현을 억제하기 위한 조성물은,

[0037] 미세먼지 또는 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포 내에서 miR-9-5p의 발현을 억제하여 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제하기 위한, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물로서, 상기 miR-9-5p 억제제는 200pmol의 농도로

상기 조성물에 포함되는 것을 특징으로 하는, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.

[0038] 본 발명의 또 다른 일 실시 양태에 의하면, 본 발명에 따른 미세먼지에 의한 사이토카인 및 케모카인 발현을 억제하기 위한 조성물은,

[0039] 미세먼지 또는 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포 내에서 miR-9-5p의 발현을 억제하여 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제하기 위한, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물로서, 상기 miR-9-5p 억제제는 500pmol의 농도로 상기 조성물에 포함되는 것을 특징으로 하는, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.

[0040] 본 발명의 또 다른 일 실시 양태에 의하면, 본 발명에 따른 미세먼지에 의한 사이토카인 및 케모카인 발현을 억제하기 위한 조성물은,

[0041] 미세먼지 또는 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포 내에서 miR-9-5p의 발현을 억제하여 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제하기 위한, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물로서, 상기 miR-9-5p 억제제는 UCAUACAGCUAGAUAACCAAAGA의 서열을 가지는 것을 특징으로 하는, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.

[0042] 본 발명의 또 다른 일 실시 양태에 의하면, 본 발명에 따른 미세먼지에 의한 사이토카인 및 케모카인 발현을 억제하기 위한 조성물은,

[0043] 미세먼지 또는 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포 내에서 miR-9-5p의 발현을 억제하여 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제하기 위한, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물로서, 상기 미세먼지 또는 초미세먼지는 PM10 미세먼지 이고, 상기 miR-9-5p 억제제는 200pmol의 농도로 상기 조성물에 포함되는 것을 특징으로 하는, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.

[0044] 본 발명의 또 다른 일 실시 양태에 의하면, 본 발명에 따른 미세먼지에 의한 사이토카인 및 케모카인 발현을 억제하기 위한 조성물은,

[0045] 미세먼지 또는 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포 내에서 miR-9-5p의 발현을 억제하여 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제하기 위한, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물로서, 상기 미세먼지 또는 초미세먼지는 PM2.5 미세먼지 이고, 상기 miR-9-5p 억제제는 200pmol의 농도로 상기 조성물에 포함되는 것을 특징으로 하는, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.

[0046] 본 발명의 또 다른 일 실시 양태에 의하면, 본 발명에 따른 미세먼지에 의한 사이토카인 및 케모카인 발현을 억제하기 위한 조성물은,

[0047] 미세먼지 또는 초미세먼지에 의해 자극된 대식세포 내에서 miR-9-5p의 발현을 억제하여 사이토카인 및 케모카인의 발현을 억제하기 위한, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물로서, 상기 억제는 상기 대식세포 내에서 RANTES의 발현을 억제하는 것인, miR-9-5p 억제제를 포함하는 조성물 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염일 수 있다.

부호의 설명

[0048] **실시예 1: 대식세포 내 미세먼지 및 초미세먼지의 독성 및 세포 성장**

대식세포(mouse bone marrow-drived macrophage)에 미세먼지(PM10)와 초미세먼지(PM2.5)를 0-100㎍ 농도별로 처치하여 24시간 후 세포 독성을 확인하였다. 미세먼지(PM10)를 100㎍ 처치 시 대식세포에서 세포 독성이 관찰되었다. 초미세먼지(PM2.5)를 100㎍ 처치 시 대식세포에서는 세포 독성이 관찰되지 않았다. (도 1A 및 도1B). 미세먼지와 초미세먼지를 각각 50㎍씩 매 시간 처치하여 세포 증식을 관찰한 결과, 미세먼지를 24시간 동안 처치한 경우 대식세포 증식이 발생됨이 관찰되었고, 초미세먼지는 48시간 동안 처치한 경우 대식세포 증식이 활발하게 발생됨이 관찰되었다 (도 1C).

실시예 2: 미세먼지 및 초미세먼지 자극에 의한 사이토카인 및 케모카인 발현

대식세포에 미세먼지와 초미세먼지를 각각 50㎍씩 24시간 동안 처치 후 세포 내 염증관련 사이토카인 발현과 케모카인 발현을 확인하였다. 미세먼지 자극에 의해 사이토카인 IL-6, iNOS, IFN-γ, MCP-1 mRNA 발현이 증가됨이 관측되었고 (그림 2A), 케모카인 RANTES mRNA가 증가됨이 관측되었다 (그림 2B). 대식세포 배양액 내 사이토카인과 케모카인 각각의 발현량을 ELISA로 분석한 결과 IL-6, IFN-γ, MCP-1, RANTES가 증가됨이 관측되었다.

(도 2C 및 도 2D).

실시예 3: 대식세포 내 미세먼지 및 초미세먼지의 사이토카인 및 케모카인 발현

대식세포가 미세먼지 자극되는 경우 RANTES, MCP-1, IL-6, NOS2(iNOS) 단백질의 발현 역시 증가됨이 관측되었다 (도 3A). 사이토카인 및 케모카인 발현 증가에 대한 기전을 확인하고자 MAPK 신호 전달을 확인하였다. 그 결과 미세먼지 자극이 초미세먼지 자극에 비해 MAPK(ERK, JNK, pP38) 신호가 더욱 활성화되고 AKT 신호 역시 활성화됨이 관측되었다 (도 3B).

실시예 4: 미세먼지와 초미세먼지의 Long-term 자극에 대한 발현

도 1C에서 확인되는 바와 같이, 초미세먼지를 48시간 동안 자극 시 미세먼지 48시간 자극에 비해 대식세포 증식이 활발함이 관측되었다. 이에 초미세먼지를 48시간 동안 자극하는 경우 미세먼지 자극에 비해 사이토카인과 케모카인이 증가하는지를 확인하였다. 그 결과 48시간 동안의 자극의 경우 미세먼지에 의한 자극이 초미세먼지에 의한 자극에 비해 사이토카인 및 케모카인의 mRNA 발현 및 단백질 발현이 증가됨이 관찰되었다 (도 4). 이를 통해 사이토카인 및 케모카인의 발현이 대식세포의 세포증식에는 관여하지 않음을 확인하였다.

실시예 5: 미세먼지 자극에 따른 miR-9-5p 발현 및 miR-9-5p 억제제에 의한 사이토카인 및 케모카인 발현의 감소

대식세포에 미세먼지를 24시간 동안 자극한 후 miRNA를 분석한 결과, miR-9-5p가 미세먼지 자극에 의해 증가함이 확인되었다 (도 5A). 아무것도 처리하지 않은 group을 VEH로 표시하였다. PM10 (농도: 50ug) 미세먼지 처리한 group을 PM10으로 표시하였다. PM2.5 (농도: 50ug) 초미세먼지 처리한 group을 PM2.5로 표시하였다. miR-9-5p 억제제 (농도 : 200pmol) 처리 group을 miR-9-5p I로 표시하였다. 미세먼지 및 miR-9-5p 억제제한 처리 group을 PM10 + miR-9-5p I로 표시하였다.

미세먼지에 자극에 의한 사이토카인 및 케모카인의 증가가 miR-9-5p에 의해 조절되는지를 확인하고자 미세먼지 자극에 의해 증가하는 miR-9-5p를 억제시킨 다음, 사이토카인과 케모카인 발현 양상을 확인하였다. VEH 그룹과 PM2.5 그룹에 비해 PM10 그룹에서 miR-9-5p의 RNA발현이 증가하였다. 이는 PM10 자극에 의해 RANTES가 증가할 때 miR-9-5p가 관여함을 나타내고, RANTES 발현을 miR-9-5p가 조절함을 나타낸다. 이를 확인하고자 miR-9-5p 억제제를 사용하여 miR-9-5p 억제 시 RANTES 감소가 이루어지는지 확인하였다 (도 5B). miR-9-5p 억제제는 UCAUACAGCUAGAUAACCAAAGA 의 염기서열을 가지는 miR-9-5p 억제제로서 ㈜바이오니아로부터 상업적으로 입수하였다.

miR-9-5p 억제제는 200pmol 및 500pmol로 대식세포($2x10^6$/ml)에 대해 사용되었다. PolyPlus Transfection사의 reagent인 jetPRIME transfection를 사용하여 분화된 대식세포에 miR-9-5 억제제를 처치하고 24시간 후 배지를 갈아준 후 24시간동안 대식세포를 안정화시켰다. 분화된 대식세포에 miR-9-5p 억제제를 접종한 후 미세먼지로 24시간 동안 자극하였다. miR-9-5p 억제제를 대식세포에 접종하여 억제시킨 후 PM10과 PM2.5로 자극하여 RANTES 및 사이토카인의 발현을 비교하였다. VEH 그룹에 비해 PM10 그룹에서 RANTES 및 사이토카인의 발현이 증가하였다 (도 5C의 검정색 막대). miR-9-5p 억제제 접종 후 PM10 자극 시 PM10 단독에 의해 증가했던 RANTES 및 사이토카인의 발현이 감소함이 확인되었다 (도 5C의 줄무늬 막대). 그 결과 대식세포 내에서 miR-9-5p가 억제되면 PM10에 의해 증가한 사이토카인 및 케모카인이 현저히 감소되었음을 mRNA 발현을 측정하여 확인하였다 (도 5C). 또한, miR-9-5 억제제 500pmol보다 200pmol이 RANTES 감소효과가 보다 우수한 것으로 확인되었고, 두 가지 농도 모두 대조군에 비해 우수한 RANTES 억제 효과 및 사이토카인 및 케모카인 감소 효과를 나타냄이 확인되었다 (도 6).

실시예 6: miR-9-5p 억제제의 작용 기전

대식세포 내 미세먼지 자극에 의해 증가되는 사이토카인 및 케모카인 단백질 발현 또한 miR-9-5p 억제제에 의해 현저히 감소함이 확인되었다 (도 7A). 이를 통해 미세먼지가 사이토카인 및 케모카인 발현을 조절하는 기전인 MAPK 및 AKT 활성화가 miR-9-5p 억제제에 의해 감소함을 확인하였다 (도 7B). 나아가 세포 배양액 내의 사이토카인 및 케모카인 농도 역시 miR-9-5p 억제제의 접종에 따라 감소함이 확인되었다(도 7C). 이를 바탕으로 미세먼지에 의한 사이토카인 및 케모카인의 발현을 miR-9-5p가 조절함을 확인하였다.

실시예 7: miR-9-5p 모방체 처리 시 RANTES 증가 양상

초미세먼지는 대식세포 내에서 사이토카인 및 케모카인의 발현에 있어 대식세포에 비하여 상대적으로 미미하게

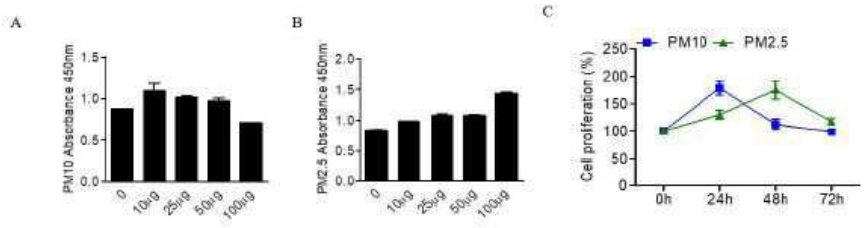
관여함이 확인되었다 (도 2). 즉 PM2.5 단독자극은 PM10 자극에 비해 miR-9-5p 발현에 관여하지 않으며, 사이토카인 발현에도 관여하지 않음을 확인하였다. 이를 확인하고자 초미세먼지에 의한 자극과 함께 대식세포에 miR-9-5p가 과발현되는 경우 사이토카인 및 케모카인이 증가하는지를 확인하고자 miR-9-5p 모방체를 사용하였고, 대식세포에 miR-9-5p 모방체를 통한 miR-9-5p 과발현이 용이하게 이루어지는지를 확인하였다 (도 8A).

그 결과 PM2.5 단독자극 시 사이토카인 발현은 VEH과 크게 차이가 없음이 확인되었고, miR-9-5p 모방체 단독처리에 의해 IL-6, MCP-1, RANTES 발현이 증가가 확인되었다 (도 8B의 줄무늬 막대). PM2.5 단독자극과 PM2.5+miR-9-5p 모방체 자극 비교 시 RANTES만 miR-9-5p 모방체에 의해 발현이 증가함이 확인되었다. 즉, 초미세먼지에 의한 자극과 함께 miR-9-5p가 과발현되는 경우 RANTES mRNA가 증가함이 관찰되었다 (도 8A). 이를 바탕으로 miR-9-5p가 케모카인 중 RANTES 발현에 깊게 관여함을 검증하였다.

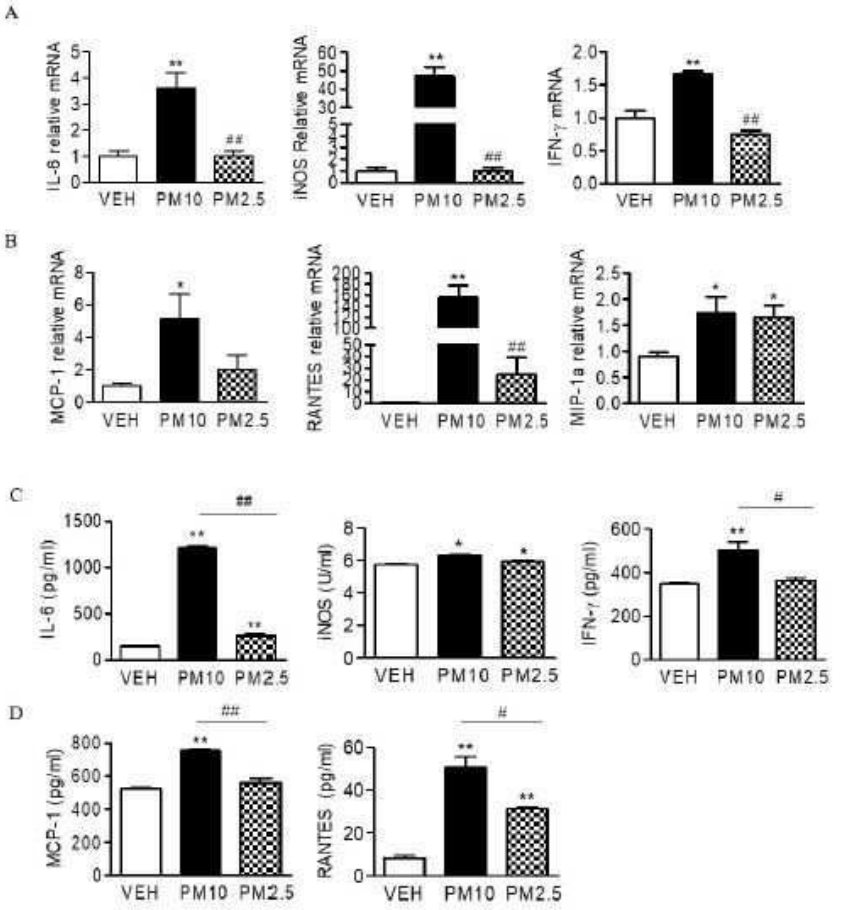
실험 결과, 대식세포에 미세먼지 자극 시 miR-9-5p가 증가하여 MAPK와 AKT 기전을 활성화시키고, 최종적으로 RANTES 및 사이토카인 발현을 증가시키는 원인이 됨이 확인되었다. 또한, 대식세포 내에서 miR-9-5p 발현을 억제시키면 단백질 활성화 기전이 억제되고, 나아가 이에 따른 RANTES 및 사이토카인도 함께 억제되어 미세먼지 및 초미세먼지, 즉 PM10 미세먼지 및 PM2.5 초미세먼지 자극에 의한 염증 반응을 감소 내지는 조절할 수 있는 우수한 효과를 나타냄을 확인하였다.

도면

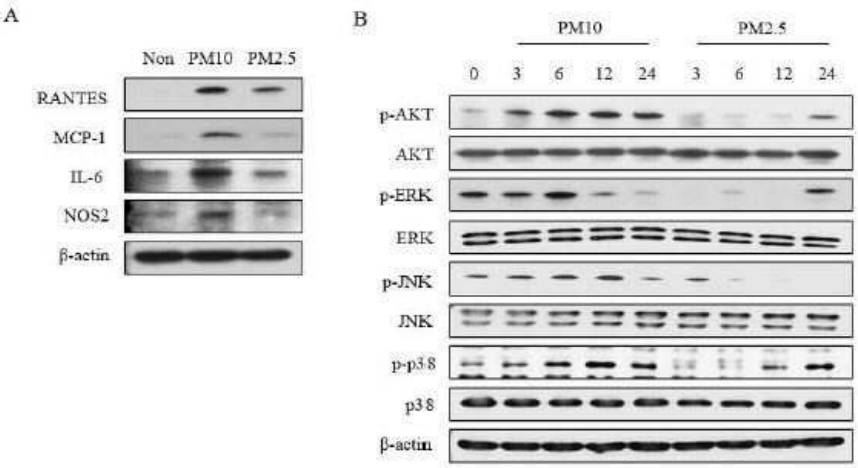
도면1



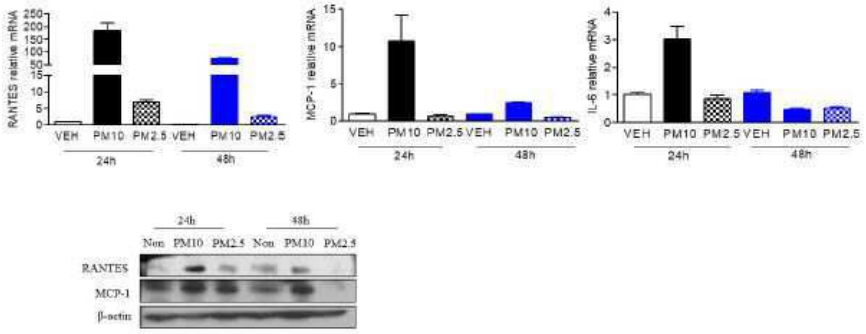
도면2


A
IL-6 relative mRNA
iNOS Relative mRNA
IFN-γ mRNA
VEH PM10 PM2.5
B
MCP-1 relative mRNA
RANTES relative mRNA
MIP-1a relative mRNA
C
IL-6 (pg/ml)
iNOS (U/ml)
IFN-γ (pg/ml)
D
MCP-1 (pg/ml)
RANTES (pg/ml)

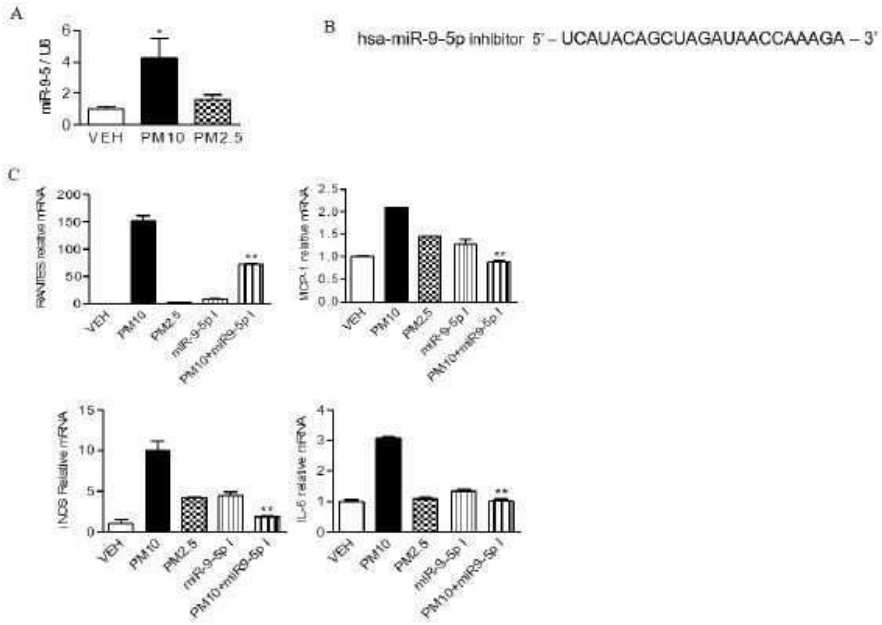
도면3


A
Non PM10 PM2.5
RANTES
MCP-1
IL-6
NOS2
β-actin
B
PM10
PM2.5
0 3 6 12 24 3 6 12 24
p-AKT
AKT
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK
p-p38
p38
β-actin

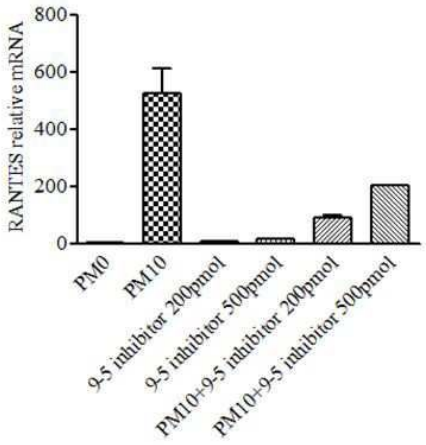
도면4


RANTES relative mRNA
MCP-1 relative mRNA
IL-6 relative mRNA
VEH PM10 PM2.5 VEH PM10 PM2.5
24h
48h
Non PM10 PM2.5 Non PM10 PM2.5
RANTES
MCP-1
β-actin

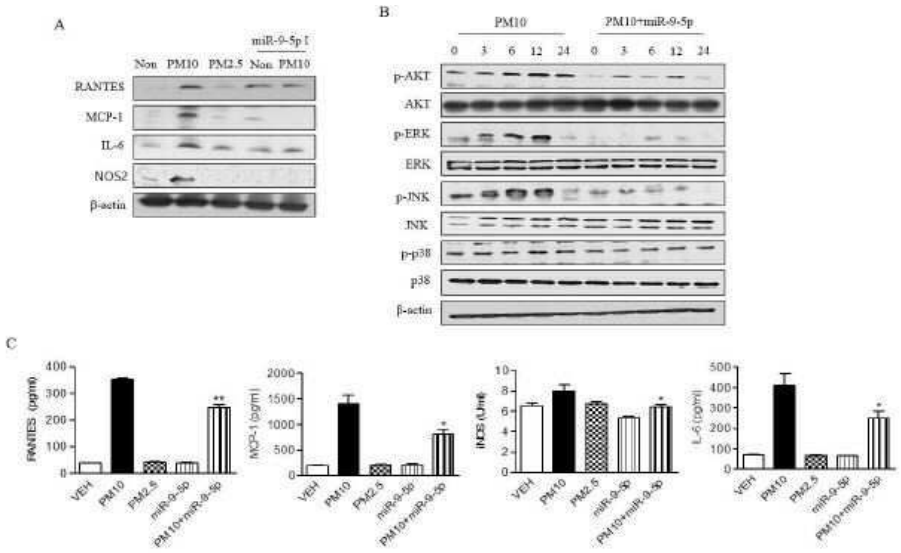
도면5


A
miR-9-5 / U6
VEH PM10 PM2.5
B
hsa-miR-9-5p inhibitor 5' – UCAUACAGCUAGAUAACCAAAGA – 3'
C
RANTES relative mRNA
MCP-1 relative mRNA
iNOS Relative mRNA
IL-6 relative mRNA
VEH
PM10
PM2.5
miR-9-5p I
PM10+miR9-5p I

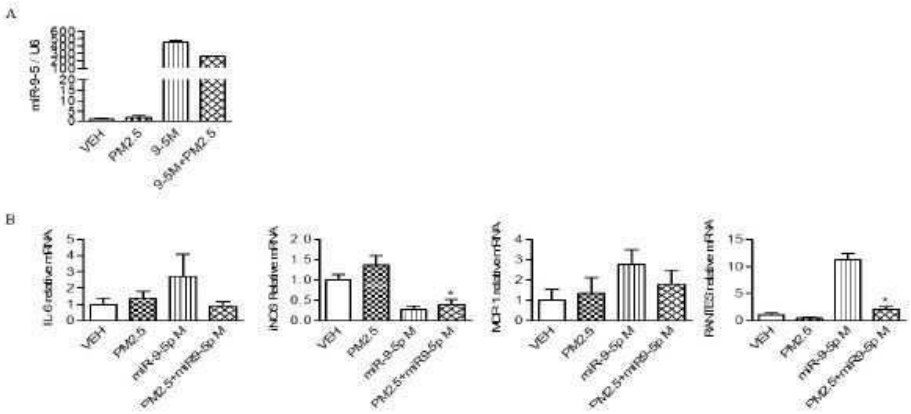
도면6


RANTES relative mRNA
PM0
PM10
9-5 inhibitor 200pmol
9-5 inhibitor 500pmol
PM10+9-5 inhibitor 200pmol
PM10+9-5 inhibitor 500pmol

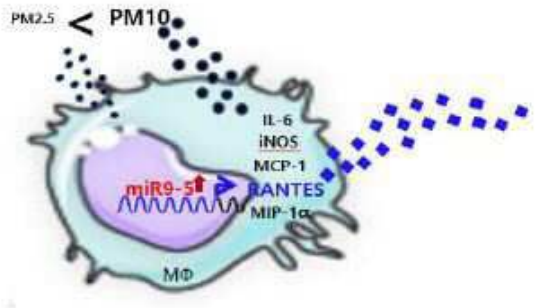
도면7


A
miR-9-5p
Non PM10 PM2.5 Non PM10
RANTES
MCP-1
IL-6
NOS2
β-actin
B
PM10
PM10+miR-9-5p
0 3 6 12 24 0 3 6 12 24
p-AKT
AKT
p-ERK
ERK
p-JNK
JNK
p-p38
p38
β-actin
C
RANTES (pg/ml)
MCP-1 (pg/ml)
iNOS (A.U/ml)
IL-6 (pg/ml)
VEH
PM10
PM2.5
miR-9-5p
PM10+miR-9-5p

도면8


A
miR-9-5 / U6
VEH
PM2.5
9-5M
9-5M+PM2.5
B
IL-6 relative mRNA
iNOS Relative mRNA
MCP-1 relative mRNA
RANTES relative mRNA
VEH
PM2.5
miR-9-5p M
PM2.5+miR9-5p M

도면9


PM2.5 < PM10
IL-6
iNOS
MCP-1
miR9-5
RANTES
MIP-1α
MΦ