

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2015년 6월 4일 (04.06.2015)



(10) 국제공개번호
WO 2015/080441 A1

- (51) 국제특허분류:
A61K 38/17 (2006.01) A61P 19/10 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/011299
- (22) 국제출원일: 2014년 11월 24일 (24.11.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0144272 2013년 11월 26일 (26.11.2013) KR
- (71) 출원인: 서울대학교산학협력단 (SNU R&DB FOUNDATION) [KR/KR]; 151-742 서울시 관악구 관악로 1, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 박주철 (PARK, Joo-Cheol); 136-751 서울시 성북구 성북로 4길 52, 113동 304호, Seoul (KR). 이동철 (LEE, Dong-Seol); 136-041 서울시 성북구 삼선교로 8길 50, 301호, Seoul (KR).
- (74) 대리인: 박원미 (PARK, Weonmee); 135-921 서울시 강남구 논현로 412, 601호, Seoul (KR).
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO,

AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

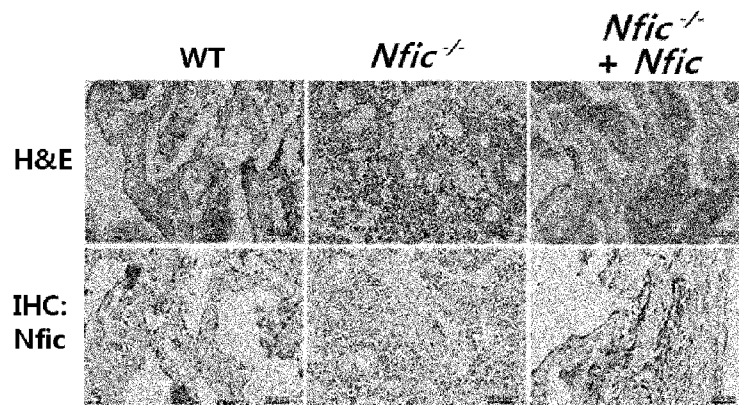
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION, FOR PREVENTION OR TREATMENT OF BONE DISEASES, COMPRISING NFI-C AS EFFECTIVE COMPONENT

(54) 발명의 명칭 : NFI-C를 유효성분으로 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물



(57) Abstract: Disclosed are a pharmaceutical composition, for prevention or treatment of bone diseases, comprising nuclear factor I-C (NFI-C) protein or a gene thereof as an effective component, and a cell therapeutic agent overexpressing the gene. The composition or the cell therapeutic agent according to the invention can be usefully used for treatment or prevention of bone diseases including osteoporosis since the composition or the cell therapeutic agent can inhibit bone loss by inhibiting adipocyte differentiation while promoting osteoblast differentiation.

(57) 요약서: 본원은 NFI-C (Nuclear factor I-C) 단백질 또는 그 유전자를 유효성분으로 포함하는, 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 상기 유전자를 과발현하는 세포 치료제를 개시한다. 본원에 따른 조성물 또는 세포 치료제는 골모세포 분화를 촉진함과 동시에 지방세포의 분화 억제를 통해 골감소를 억제할 수 있는 골다공증을 포함하는 골질환 치료 또는 예방에 유용하게 사용될 수 있다.



WO 2015/080441 A1

명세서

발명의 명칭: NFI-C를 유효성분으로 포함하는 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 골질환 치료제 분야이다.

배경기술

- [2] 골다공증은 일반적으로 골 밀도가 감소하고 골 조직의 미세구조에 문제가 발생하여 쉽게 부러지는 특성을 나타내는 질환이다 (Raisz LG. J Clin Invest. 2005; 115(12): 3318-3325). 또한 골다공증은 대표적인 노인성 질환으로 제4차 국민영향 조사에 따르면 50세 이상 우리나라 여성의 약 35%가 골다공증 환자인 것으로 조사 되었고 골다공증을 앓고 있는 노인은 그렇지 않은 노인에 비해 치아 손실 경험률이 3배 이상 높다고 알려져 있다.
- [3] 성인의 골은 골을 형성하는 골모세포와 골을 흡수하는 파골세포 사이의 균형에 의해 유지된다 (Deng ZL, et al. Front Biosci. 2008;13:2001-2021). 그러나 노화가 일어나면 호르몬 또는 성장인자의 항상성이 파괴되거나 산화 스트레스 (oxidative stress)의 증가에 의해 골수에서 골 형성이 감소하고 지방세포가 증가하여 결국 골다공증의 위험도가 증가한다 (Kim M, Kim C, Choi YS, Kim M, Park C, and Suh Y. Mech Ageing Dev. 2012;133(5):215-225.; Manolagas SC. Endocr Rev. 2010;31(3):266-300; Wauquier F, Leotoing L, Coxam V, Guicheux J, and Wittrant Y. Trends Mol Med. 2009;15(10):468-477).
- [4] 아울러 노인의 치과치료 중 많은 부분이 치아 상실에 대한 치료이며, 이러한 치아의 상실은 상하악골 및 치아를 둘러싸고 있는 치조골의 뼈밀도와 연관성이 있다. 상하악골의 치조골의 골밀도가 낮은 노인은 의치가 헐겁거나 잘 맞지 않고, 치아 상실로 인한 임플란트 시술에도 어려움을 겪는 문제점을 가지고 있다.
- [5] 현재까지 골다공증 치료는 파골세포 분화 및 기능을 억제하여 골 흡수를 감소시켜 골 밀도를 유지하도록 하는 방법이 이용되고 있다. 대표적인 골다공증 치료제인 비스포스포네이트는 골모세포의 분화를 유도하여 새로운 뼈의 재생을 촉진하는 하는 것이 아니라 파골세포의 기능을 억제하여 골 밀도가 감소하지 않게 유지하도록 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이 약물을 장기간 복용할 경우 치조골이 약해지고 턱 뼈가 괴사하는 부작용을 나타낸다는 보고가 있어, 새로운 골다공증 치료제 개발이 요구된다.
- [6] 대한민국 특허 출원번호 제2011-0060319호에는 줄기세포에서 SMOC1의 발현을 조절하여 골모세포로의 분화를 촉진하는 방법에 대하여 개시되어 있다.
- [7] 또한 국제특허출원 공개번호 제2009/087213호에는 성장인자 조합을 사용하는 골수줄기 세포 및 간엽 줄기세포의 골발생 분화에 대하여 개시되어 있다.

- [8] 골모세포 분화를 촉진함과 동시에 지방세포의 분화 억제를 통해 골감소를 억제할 수 있는 보다 효과적인 골다공증 치료제의 개발이 요구된다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [9] 본원은 골모세포 분화를 촉진함과 동시에 골감소를 억제할 수 있는 보다 효과적인 골다공증 치료제를 제공하고자 한다.

과제 해결 수단

- [10] 한 양태에서 본원은 NFI-C (Nuclear factor I-C) 단백질 또는 그 유전자를 유효성분으로 포함하는, 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [11] 본원에 따른 조성물은 골모세포 분화를 촉진하고, 지방세포 분화를 억제하여 그 효과를 나타낸다. 나아가, 골모세포 분화 촉진은 NFI-C 단백질 또는 유전자에 의한 전사인자인 Osteirx 발현 촉진에 의한 것이고, 상기 지방세포 분화 억제는 PPAR γ 의 발현의 억제에 의한 것이다.
- [12] 본원에 따른 조성물은 골질환 예를 들면 골다공증, 골연화증, 구루병, 골감소증, 섬유성 골염, 무형성 골질환, 골형성 부전증, 골위축, 파제트(Paget's disease), 또는 암세포의 골전이에 의해 유발되는 뼈의 손상에 사용될 수 있으며, 병리학적 손상 또는 물리적 뼈의 손상으로 인한 것을 포함한다.
- [13] 다른 양태에서 본원은 NFI-C를 과발현하는 중간엽줄기세포; 상기 중간엽줄기세포로부터 유래된, 연골세포 또는 골세포로 분화될 수 있는 전구세포; 또는 상기 중간엽줄기세포로부터 분화된 연골세포 또는 골세포를 유효성분으로 포함하는, 골질환 예방 또는 치료용 세포 치료제를 제공한다.
- [14] 본원에 따른 세포 치료제에 사용되는 세포는 자가세포, 타가세포 또는 이종세포를 포함한다.
- [15] 본원에 따른 세포 치료제는 골질환 예를 들면 골다공증, 골연화증, 구루병, 골감소증, 섬유성 골염, 무형성 골질환, 골형성 부전증, 골위축, 파제트(Paget's disease), 또는 암세포의 골전이에 의해 유발되는 뼈의 손상에 사용될 수 있으며, 병리학적 손상 또는 물리적 뼈의 손상으로 인한 것을 포함한다.
- [16] 본원에 따른 세포 조성물 또는 세포 치료제는 골수강 및/또는 손상된 골주위에 국소 투여될 수 있으며, 본원의 조성물 및/또는 세포 치료제의 투여에 의해 상기 투여 부위의 골모세포 분화를 촉진하고, 지방세포 분화를 억제할 수 있다.
- [17] 다른 양태에서 본원은 또한 NFI-C (Nuclear factor I-C) 단백질 또는 그 유전자를 유효성분으로 포함하는, 지방세포 분화 억제용 조성물을 제공한다.
- [18] 또 다른 양태에서 본원은 또한 NFI-C (Nuclear factor I-C) 단백질 또는 그 유전자를 유효성분으로 포함하는, 골모세포 분화 촉진용 조성물을 제공한다.
- [19] 또다른 양태에서 본원은 치료적으로 유효한양의 NFI-C (Nuclear factor I-C) 단백질 또는 그 유전자를 골질환 예방 또는 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 골질환 예방 또는 치료 방법을 개시한다.

[20] 또다른 양태에서 본원은 NFI-C (Nuclear factor I-C) 단백질 또는 그 유전자를 이용한 인비보 및 인비트로 지방세포 분화 억제 방법을 제공한다.

[21] 또다른 양태에서 본원은 NFI-C (Nuclear factor I-C) 단백질 또는 그 유전자를 이용한 인비보 및 인비트로 골모세포 분화 촉진 방법을 제공한다.

발명의 효과

[22] 본원에 따른 NFI-C 단백질 또는 유전자를 포함하는 골다공증 치료제는 골모세포 분화를 촉진함과 동시에 지방세포의 분화 억제를 통해 골감소를 억제하여, 골질환 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[23] 본원에 따른 골형성 촉진 및 골감소 억제에 관여하는 NFI-C는 또한 골다공증 세포치료제로서도 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[24] 도 1은 NFI-C가 결손되면 생후 골형성 과정 동안 골형성에 이상을 초래하는 결과를 보여준다: (a) 나이 든 생쥐에게서 얻은 BMSCs에서의 NFI-C 발현을 실시간 PCR 분석으로 평가하였다. $n = 3$; $*P < 0.05$.; (b) MC3T3-E1 세포를 분화 배지에서 최대 3주간 배양하였다. 웨스턴 블랏 분석을 이용하여 NFI-C, Runx2 및 Osx를 평가하였다; (C) 하악골의 대표적 마이크로-CT 이미지; (D) 대퇴골 원위부의 대표적 마이크로-CT 이미지; (E) 대퇴골 원위부에 있는 소주골 및 피질골의 3D 마이크로-CT 이미지; (F) 대퇴골 원위부의 마이크로-CT 정량화. 골 무기질 밀도(BMD); 소주골 부피(BV/TV); 소주골 두께(Tb.Th); 소주골 수(Tb.N); 소주골 분리(Tb.SP); 피질골 부피(Ct.BV/TV); 피질골 두께(Ct.Th). $n = 5$; $*P < 0.05$. (G) 6주령 정상 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 대퇴골 원위부의 H&E 염색(a-f) 및 본 코사 염색(a'-f'). c-f 및 c'-f'는 각각 a-b 및 a'-b'를 더 확대하였다. c-d 및 c'-d', 소주골. e-f 및 e'-f', 피질골. 스케일 바, a-b 및 a'-b', 500 μm ; c-d 및 c'-d', 200 μm ; e-f 및 e'-f', 100 μm .; (H) 6주령 정상 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 대퇴골 원위부 골간단에 대한 조직형태학적 분석. 조직 면적당 골모세포 수(N.Ob/T.Ar); 골 파라미터 당 골모세포 수(N.Ob/B.Pm); 골 표면 당 골모세포 면적(Ob.S/BS). $n = 5$; $*P < 0.05$.; (I) 6주령 정상 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 대퇴골에 있는 대표적 칼세인 이중 라벨링 부분. 흰색 화살표는 무기질 침착 비율(MAR). $n = 5$; $*P < 0.05$.

[25] 도 2는 골다공증 환자에게서 나타나는 바와 같이 NFI-C가 결핍되면 골수 지방이 증가한다는 것을 보여준다: (A) 6 및 28주령의 정상 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 대퇴골의 H&E 염색. 스케일 바, 50 μm ; (B) 오일 레드 O 염색. 정상 및 *NFIC*^{-/-} BMSCs를 지방세포화 유도 배지에서 7일간 배양하였다. 정상 및 *NFIC*^{-/-} BMSCs에서 PPAR γ 발현을 실시간 PCR을 사용하여 분석하였다. $n = 3$; $*P < 0.05$; (C) 골다공증 환자의 골 시료의 H&E 염색; (D) 골다공증 환자의 골 시료의 IHC 염색; (E) NFI-C mRNA 발현을 GEO에 기탁되어 있는 유전자 발현 데이터세트 GSE35959를 이용하여 분석하였다. $*P < 0.05$; (F) hBMSCs에서의 NFI-C 발현에 대한 H₂O₂의 영향. H₂O₂의 존재 또는 부존재하에서 5일간 처리한 hBMSCs에서의

NFI-C 발현 레벨을 실시간-PCR 및 웨스턴 블랏 분석을 사용하여 정하였다. $n = 3$; $*P < 0.05$.

- [26] 도 3은 NFI-C가 골모세포 분화를 촉진시키고 지방세포 분화를 억제한다는 것을 나타낸다: (A) *NFIC*^{-/-} BMSCs를 NFI-C 발현 벡터로 감염시킨 후 골형성 유도 배지에서 7일(ALP 염색) 및 14일(알리자린 레드 S 염색)동안 배양하였다. (B) Alp 발현을 실시간 PCR을 사용하여 분석하였다. $n = 3$; $*P < 0.05$; (C) 오일 레드 O 염색. *NFIC*^{-/-} BMSCs를 NFI-C 발현 벡터로 감염시킨 후 지방세포화 유도 배지에서 7일동안 배양하였다; (D) Ppar γ 발현을 실시간 PCR을 사용하여 분석하였다. $n = 3$; $*P < 0.05$; (E) pGL3-Luc-Ppar γ 및 NFI-C 발현 벡터로 48시간동안 감염시킨 C2C12 세포에서 Ppar γ 프로모터 활성을 평가하였다. $n = 3$; $*P < 0.05$; (F) 대퇴골 원위부의 대표적 마이크로-CT 이미지 및 마이크로-CT 정량화. 소주골 부피 (BV/TV); 소주골 수 (Tb.N); 소주골 분리 (Tb.SP). $n = 3$; $*P < 0.05$; (G) NFI-C 과발현 BMSCs를 이식한 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 대퇴골 원위부의 조직학적 분석. 스케일 바, 50 μm ; (H) *NFIC*^{-/-} 생쥐와 비교한, NFI-C 과발현 BMSCs를 이식한 *NFIC*^{-/-} 생쥐에서의 지방세포의 수. $n = 3$; $*P < 0.05$.
- [27] 도 4는 NFI-C가 결핍되면 골모세포 분화가 손상되고 파골세포 활성이 감소한다는 것을 보여준다: (A) ALP 염색 및 활성; (B) 알리자린 레드 S 염색(ARD)과 알리자린 레드 S 염색된 무기질화 결절의 정량화. 정상 및 *NFIC*^{-/-} BMSCs를 골형성 유도 배지에서 7일(ALP) 및 14일(ARS) 동안 배양하였다. $n = 3$; $*P < 0.05$; (C) 7일간 분화한 후 정상 및 *NFIC*^{-/-} BMSCs에서의 Runx2, Osx, Alp, Oc, 및 Bsp 발현을 실시간 PCR을 사용하여 분석하였다. $n = 3$; $*P < 0.05$; (D) 6주령의 정상 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐 대퇴골의 TRAP 염색. 오른쪽 패널은 박스친 왼쪽 패널을 더 확대한 것이다. 스케일 바, 오른쪽 패널, 200 μm ; 왼쪽 패널, 100 μm ; (E) 6주령의 정상 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐 대퇴골 골간단부의 조직형태학적 분석. 조직면적당 파골세포수(N.Oc/T.Ar); 골 파라미터 당 파골세포 수 (N.Oc/B.Pm); 골 표면적 당 파골세포 표면적(Oc.S/BS). $n = 5$; $*P < 0.05$. (F) Vit D₃ 및 PGE₂ 존재 또는 부존재하에서 정상 BMMs을 정상 및 *NFIC*^{-/-} 1차 골모세포와 함께 6일동안 공배양하여, 고정한 후 TRAP 염색을 하였다; (G) TRAP-양성 다핵 세포(MNCs)를 D에서 카운트하였다. $n = 3$; $*P < 0.05$; (H) TRAP 활성을 세포 용해물로 정량하였다. $n = 3$; $*P < 0.05$; (I) sRankl 레벨을 ELISA 키트를 사용하여 세포 배양 배지에서 측정하였다. $n = 3$; $*P < 0.05$; (J) 1차 골모세포에서 Rankl 및 Opg 발현을 실시간 PCR을 이용하여 분석하였다. $n = 3$; $*P < 0.05$.
- [28] 도 5는 NFI-C가 BMP2-Runx2로 유도한 Osx 발현을 매개한다는 것을 보여준다: (A) 6주령의 정상 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐 대퇴골 골간단부의 소주골에 있는 Osx의 면역형광 염색(붉은 색). 스케일 바, 100 μm . 정상 및 *NFIC*^{-/-} BMSCs의 Runx2, Osx, 및 NFI-C의 웨스턴 블랏 분석; (B) NFI-C 및 Runx2 발현 벡터로 전달이입하고 48시간 동안 BMP-2(300 ng/ml)로 처리한 MC3T3-E1 세포에서의 Osx 발현을 평가하기 위한 실시간 PCR 및 웨스턴 블랏 분석. $n = 3$; $*P < 0.05$; (C)

pGL3-Luc-Osx (-1269~+91) 및 NFI-C 발현 벡터로 전달이입하고 48시간 동안 BMP-2(300 ng/ml)로 처리한 MC3T3-E1 세포에서의 Osx 프로모터 활성을 평가하였다. n = 3; *P < 0.05; (D) 48시간 동안 BMP-2(300 ng/ml)로 처리한 MC3T3-E1 세포에서 Osx 프로모터에 결합한 NFI-C를 ChIP (chromatin immunoprecipitation) 분석을 사용하여 검출한 것; (E) *NFIC*^{-/-} 골모세포를 BMP-2(300 ng/ml)로 처리하거나 및/또는 NFI-C 발현 벡터로 감염시켰다. Osx 발현을 실시간 PCR을 사용하여 분석하였다. n = 3; *P < 0.05; (F) 대퇴골 원위부의 대표적 마이크로-CT 이미지 및 마이크로-CT 정량화. 소주골 부피 (BV/TV); 소주골 수 (Tb.N); 소주골 분리 (Tb.SP). n = 3; *P < 0.05; (G) Osx 과발현 BMSCs를 이식한 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 대퇴골 원위부의 조직학적 분석. 스케일 바, 50 μ m; (H) *NFIC*^{-/-} 생쥐와 비교한, Osx 과발현 BMSCs를 이식한 *NFIC*^{-/-} 생쥐에서의 지방세포 수. n = 3; *P < 0.05.

- [29] 도 6은 Runx2가 BMP-2로 유도된 NFI-C 발현을 매개한다는 것을 보여준다; (A 및 B) pGL3-Luc-NFI-C (-2520~+88) 및 Runx2 발현 벡터로 전달이입하고 48시간 동안 BMP-2(300 ng/ml)로 처리한 MC3T3-E1 세포에서의 NFI-C 프로모터 활성 및 mRNA 발현을 프로모터 분석 및 실시간 PCR을 사용하여 측정하였다. n = 3; *P < 0.05; (C) Runx2 발현 벡터로 전달이입하고 48시간 동안 BMP-2(300 ng/ml)로 처리한 MC3T3-E1 세포에서의 NFI-C 발현을 평가하기 위한 웨스턴 블랏 분석; (D) 48시간 동안 BMP-2 존재시 또는 부존재시에 pGL3-Luc-NFI-C (-2520~+88) 및 Runx2 siRNA로 전달이입한 MC3T3-E1 세포에서의 NFI-C 프로모터 활성을 평가하였다. n = 3; *P < 0.05. 대조군 및 Runx2가 불활성화된 MC3T3-E1 세포에서의 NFI-C 및 Runx2 발현을 웨스턴 블랏을 사용하여 분석하였다; (E) 48시간동안 BMP-2(300 ng/ml)로 처리한 MC3T3-E1 세포에서 NFI-C 프로모터에 결합한 Runx2를 ChIP 분석을 이용하여 검출하였다; (F) E18.5의 정상 및 *Runx2*^{-/-} 생쥐에서 얻은 대퇴골에서의 NFI-C의 면역형광 염색(붉은 색). 스케일 바, 100 μ m. 정상 및 *Runx2*^{-/-} 생쥐의 calvarial 뼈에서 분리한 총 RNA 및 단백질. Runx2 및 NFI-C 발현을 실시간 PCR 및 웨스턴 블랏 분석을 사용하여 평가하였다. n = 3; *P < 0.05; (G) 골형성 분화 동안 BMP2-Runx2에 의해 유도된 Osx 발현에서의 NFI-C 역할의 모델.

- [30] 도 7은 P16의 *NFIC*^{-/-} 생쥐에게서 소주골량이 감소하였다는 것을 보여준다; (A) P16 및 6주령의 정상 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 체중을 측정한 것이다. 상기 생쥐는 이유기 3일전부터 시작하여 6주까지 부드러운 도우 식이를 섭취하였다. n = 10; (B) P16의 정상 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 대퇴골 원위부의 정량적 마이크로-CT 분석을 나타낸다. n = 5. 대퇴골 원위부의 소주골의 3D 마이크로-CT 이미지를 나타낸다; (C) 대퇴골 원위부의 마이크로-CT 정량화를 나타낸다. 골 무기질 농도 (BMD); 소주골 부피 (BV/TV); 소주골 두께, Tb.Th (mm); 소주골 수 (Tb.N); 소주골 분리 (Tb.SP); 피질골 부피 (Ct.BV/TV); 피질골 두께 (Ct.Th). n = 5; *P < 0.05; (D) P16의 정상 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 대퇴골 원위부의 조직학적 부분을 H&E 염색한 것이다.

하부 패널은 박스한 상부 패널을 더 확대한 것이다. 스케일 바, 상부 패널, 500 μm ; 하부 패널, 100 μm ; (E) P16의 정상 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 대퇴골 원위부 골간단을 조직형태학적 분석을 한 것이다. 조직 면적 당 골모세포 수(N.Ob/T.Ar); 골 파라미터 당 골모세포 수(N.Ob/B.Pm); 골 표면적 당 골모세포 표면적 (Ob.S/BS).n = 5; *P < 0.05.

- [31] 도 8은 태아기 골형성동안 NFI-C 결핍되었을 때의 영향을 나타낸다; (A) E18.5의 정상 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 정량적 마이크로-CT 분석을 나타낸다. 무기질화 골의 마이크로-CT 이미지(상부 패널) 및 골 부피(BV/TV, 하부 패널); (B) 정상 및 *NFIC*^{-/-} 신생 생쥐의 골격 표현형태를 알리자린 레드 및 알시안 블루 염색을 사용하여 분석한 것이다; (C) E18.5의 정상 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 하악골 첫 번째 어금니의 화삭모양부분을 H&E 염색한 것이다. 스케일 바, 200 μm ; (D) E18.5의 정상 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐 대퇴골의 H&E 염색(상부 패널), 본 코사 염색(중간 패널), 및 PCNA 면역염색(하부 패널). 스케일 바, 200 μm ; (E) 오일 레드 O 염색. 정상 및 *NFIC*^{-/-} BMSCs를 7일동안 지방세포화 유도 배지에서 배양하였다. 정상 및 *NFIC*^{-/-} BMSCs에서의 Ppar γ 발현을 실시간 PCR을 사용하여 분석하였다. n = 3; *P < 0.05.

- [32] 도 9는 P16의 *NFIC*^{-/-} 생쥐에서 파골세포 활성 및 파골세포 수가 감소하였다는 것을 보여준다; (A) P 16의 정상 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 대퇴골을 TRAP 염색한 것이다. 하부 패널은 박스한 상부 패널을 더 확대한 것이다. 스케일 바, 상부 패널, 200 μm ; 하부 패널, 100 μm ; (B) P 16의 정상 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 대퇴골 원위부 골간단을 조직형태학적으로 분석한 것이다. 조직 면적당 파골세포 수 (N.Oc/T.Ar); 골 파라미터 당 파골세포 수 (N.Oc/B.Pm); 골 표면적 당 파골세포 표면적 (Oc.S/BS).n = 5; *P < 0.05; (C) 정상 및 *NFIC*^{-/-} BMMs를 3일간 M-CSF (60 ng/ml) 및 RANKL (100 ng/ml)와 함께 배양하고, 고정하여 TRAP 염색하였다.

- [33] 도 10은 *NFIC*^{-/-} 골모세포에서 NFI-C-독립적 Dlx5 및 Msx2 경로에 의해 Osx 발현이 조절된다는 것을 보여준다; (A) 7일동안 분화한 후 정상 및 *NFIC*^{-/-} BMSCs에서의 Dlx5 및 Msx2 발현을 실시간 PCR을 사용하여 분석하였다. n = 3; *P < 0.05; (B) *NFIC*^{-/-} 골모세포를 Dlx5 및 Msx2 발현 벡터로 전달이입하였다. 내인성 Osx 발현을 실시간 PCR을 사용하여 분석하였다. n = 3; *P < 0.05.

- [34] 도 11a 및 11b는 NFI-C가 하악골 형성을 촉진시킨다는 것을 나타내는 것으로 전자는 하악골 원위부의 대표적 엑스레이 및 마이크로-CT 이미지이고, 후자는 상기 마이크로-CT 정량화한 그래프로 세로축은 소주골 부피 (BV/TV)이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [35] 본원은 NFI-C가 중간엽 줄기세포에서 골모세포로의 분화를 촉진하고 지방세포로의 분화를 억제하여 궁극적으로 골형성을 증가시킨다는 발견에 근거한 것이다.

- [36] 한 양태에서 본원은 NFI-C (Nuclear factor I-C) 단백질 또는 그 유전자를

- 유효성분으로 포함하는, 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [37] 본원의 조성물에 유효성분으로 포함되는 "NFI-C"는 CTF/NF-I 패밀리에 속하는 프로모터의 CCAAT-결합 전사인자로 DNA 복제에서 복제인자로 기능하는 것으로 알려져 있으나, 골질환의 예방 또는 치료 기능에 대하여는 전혀 알려진 바가 없다.
- [38] 본원에 따른 NFI-C는 결손시 골모세포 분화 및 골 형성이 손상되고, 골수 지방세포가 증가하여, 골질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다. 본 이론으로 한정하는 것은 아니지만, Runx2에 의해 NFI-C의 발현이 증가하고, NFI-C는 골모세포 분화를 조절하는 전사인자인 Osteirx 발현을 증가시켜 골모세포의 분화를 증가시키며, 아울러 지방세포 분화 조절 전사인자인 PPAR γ 의 발현을 억제시켜 지방세포 분화를 억제하게 되어, 결과적으로 골형성이 증가되어, 골질환 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [39] 따라서, 본원 발명의 목적 달성을 위해, 본원 발명의 효과를 달성하는 한, 다양한 유래 및/또는 형태의 NFI-C 유전자 및/또는 단백질이 사용될 수 있다. 야생형 서열은 물론, 세포내에서의 발현 또는 단백질의 안정성 등과 같은 특징이 유리하도록 염기서열의 일부가 인위적으로 변형된 유전자, 및 자연적으로 발견되는 염기서열 일부가 변형된 유전자 또는 이들의 모두의 단편을 포함하는 것이다. 유전자 염기서열의 변형은 상응하는 아미노산의 변형을 수반하거나 하지 않을 수 있으며, 아미노산의 변형을 수반하는 경우에는 이러한 변형이 유발된 유전자는 이에 의해 코딩되는 단백질에서 하나 이상의 아미노산이 치환, 결실, 부가 및/또는 삽입된 아미노산 서열로 이루어지는 단백질을 암호화하는 것으로, 돌연변이체(mutants), 유도체(derivatives), 대립유전자(alleles), 변형체(variants) 및 동질체(homologues)를 포함하는 것이다. 유전자 염기서열의 변이가 단백질 중의 아미노산의 변형을 수반하지 않는 경우는 예를 들어 축중변이가 있고, 이러한 축중변이체(degeneracy mutants)도 본 발명의 상기 유전자에 포함된다.
- [40] 인위적 유전자 염기서열의 변형은 당업자에게 잘 알려져 있는 방법, 예를 들어, 부위-유도성 돌연변이법(site-directed mutagenesis, Kramer et al, 1987), 에러유발 PCR(Cadwell, R.C. and G.F. Joyce. 1992. *PCR methods Appl.*, 2:28-33.), 점돌연변이법(Sambrook and Russel, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed. 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press.) 등에 의해 제조될 수 있다.
- [41] 본원에 따른 일 구현예에서 상술한 유전자는 약학조성물이 투여되는 대상체의 세포내에서 발현이 가능하도록 프로모터에 작동가능하게 연결된 벡터의 형태로 제공될 수 있다.
- [42] 본원에 사용되는 단백질은 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 일 구현예에서는 단백질의 제조방법은 유전자 재조합 기술을 이용하는 것이다. 예를 들면 상기 단백질을 코딩하는 상응하는 유전자를 포함하는 벡터를 원핵 또는 진핵세포 세포 예를 들면 곤충세포, 포유류 세포에 전달하여 발현 시킨 후

정제하여 사용할 수 있다. 상기 플라스미드는 예를 들면 pET28b(Novagen)과 같은 발현 벡터에 해당 유전자를 클로닝하여 세포주에 전달이입한 후, 발현된 단백질을 정제하여 사용할 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 합성된 단백질은 침전, 투석, 이온교환 크로마토그래피, 겔-퍼미에이션 크로마토그래피, HPLC, 역상-HPLC, 프랩용 SDS-PAGE, 항-스크리닝 단백질 항체를 이용한 친화성 컬럼 등을 포함하는 컬럼 크로마토그래피로 분리 정제될 수 있다.

[43] 본원에 따른 일 구현예에서, NFI-C 유전자 및 단백질은 유인원, 사람 등과 같은 포유동물 유래이며, 특히 사람 유래이다. NFI-C 유전자 및 단백질은 그 전장 또는 본원의 효과를 달성하는 한 그 단편이 또한 사용될 수 있으며, 전장 서열은 예를 들면 GenBank 접근번호 NM_005597, NP_005588를 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다. 본원에 따른 일 구현예에서는 전장의 NFI-C 유전자 또는/및 단백질이 사용된다.

[44] 본원에서 사용된 용어 "골질환"은 병리학적 및/또는 물리적 골 손상에 의한 질환을 모두 포함하는 것으로, 예를 들면 골절, 골다공증, 골연화증, 구루병, 골감소증, 섬유성 골염, 무형성 골질환, 골형성 부전증, 골위축, 파제트(Paget's disease), 및 암세포의 골전이에 의해 유발되는 뼈의 손상을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 본원에 따른 일 구현예에서는 골다공증에 유용하게 사용될 수 있다.

[45] 본원에 사용된 용어 "치료"란 본원에 따른 조성물의 투여로 관련 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본원이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

[46] 본 명세서에서 사용된 용어 "예방"은 본원에 따른 조성물의 투여로 관련 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 골모세포 분화 및 골 형성 손상으로 인한 골형성 이상에 효과가 있는 본원 조성물은 골형성 이상으로 인한 질환의 초기 증상, 또는 증상이 나타나기 전에 복용할 경우 이러한 질환을 예방할 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이다.

[47] 골수의 중간엽 줄기 세포는 골모세포, 지방세포와 같은 다양한 세포로 분화 할 수 있다(Prockop DJ. Science. 1997; 276 (5309):71-74 ; Tuli R, Tuli S, Nandi S, Wang ML, Alexander PG, Haleem- Smith H, Hozack WJ, Manner PA, Danielson KG, and Tuan RS. Stem Cells. 2003;21(6):681-693). 골모세포 분화는 BMP-2, TGF- β , Wnt, IGF와 같은 성장 인자와 Runx2, Osterix(Osx)와 같은 전사인자에 의해 조절된다. 반면에 지방세포 분화는 전사인자인 과산화소체 증식 활성화 수용체(peroxisome proliferator-activated receptor gamma(PPAR γ))에 의해 조절 된다. 나이가 들수록 골수에서 중간엽 줄기세포는 골모세포로의 분화가 감소하고, 지방세포로의 분화 능력은 증가하여, 결국 골량이 감소하고 골질환이 발생하게 된다.

[48] NFI-C를 포함하는 본원에 따른 조성물은, 본 이론으로 한정하는 것은

아니지만, Runx2에 의해 NFI-C의 발현이 증가하고, NFI-C는 골모세포 분화를 조절하는 전사인자인 Osteirx 발현을 증가시켜 골모세포의 분화를 증가시키며, 아울러 지방세포 분화를 조절 전사인자인 PPAR γ 의 발현을 억제시켜 지방세포 분화를 억제하여, 결과적으로 골형성이 증가되어, 골질환 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

[49] 이에 본원의 조성물은 약학 조성물로 제조될 수 있다. 약학 조성물은 동시에 또는 연속적으로 투여가능하며, 단독으로, 또는 수술, 상기 질환 치료를 위한 다른 약학적 활성성분 및 생물학적반응조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[50] 본원에 따른 치료제 또는 약학 조성물은 일반적으로 사용되는 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. '약학적으로 허용되는'이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 예로서 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 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. 또한 본 발명에 따른 조성물은 그 투여방법이나 제형에 따라 필요한 경우, 현탁제, 용해보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성화제, 희석제, 부형제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 산화방지제 등을 적절히 포함할 수 있다. 상기에 예시된 것들을 비롯하여 본 발명에 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 최신판]에 상세히 기재되어 있다.

[51] 본원의 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 분말, 과립, 정제 또는 캡슐 형태일 수 있다.

[52] 본원의 약학 조성물의 투여방법은 제형에 따라 용이하게 선택될 수 있으며, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 예를 들면, 산제, 정제, 환제, 과립제, 당의정, 경질 또는 연질의 캡슐제, 액, 에멀전, 현탁액, 시럽제, 엘릭서, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화되어 전신 또는 국소적으로 경구 또는 비경구 투여될 수 있으며, 특히 비경구 투여가 바람직할 수도 있다.

[53] 비경구 투여를 위한 제형에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사

가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔 (witepsol), 마크로콜, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[54] 본원의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 특히 비경구 투여가 바람직하다. 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본원에 따른 일 구현예에서 조성물은 골수장 및 물리적 및/또는 병리학적으로 손상된 골주위에 국소투여된다.

[55] 본 발명에 따른 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적 또는 치료적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[56] 본원의 약학 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양할 수 있으나, 유효 투여량은 통상적으로 성인(60 kg)의 경우, 약 1 ng 내지 10 mg/일, 특히 약 1 µg 내지 1mg/일이다. 투여량은 여러 가지 조건에 따라 변동가능하기 때문에, 상기 투여량에 가감이 있을 수 있다는 사실은 당업자에게 자명하며, 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[57] 투여횟수는 원하는 범위 내에서 하루에 1회, 또는 수회로 나누어 투여할 수 있으며, 투여 기간도 특별히 한정되지 않는다.

[58] 다른 양태에서 본원은 또한 NFI-C를 과발현하는 중간엽줄기세포; 상기 중간엽줄기세포로부터 유래된, 연골세포 또는 골세포로 분화될 수 있는 전구세포; 또는 상기 중간엽줄기세포로부터 분화된 연골세포 또는 골세포를 유효성분으로 포함하는 골질환 치료용 조성물 또는 세포 치료제에 관한 것이다.

[59] 본원에서 "세포치료제"란 세포와 조직의 기능을 복원시키기 위하여 살아있는 자가 (autologous), 동종 (allogenic), 이종 (xenogenic) 세포를 체외에서 증식 또는 선별하거나 기타 방법으로 세포의 생물학적 특성을 변화시키는 등의 일련의 방법을 통하여 치료, 진단 및 예방의 목적으로 사용되는 의약품을 말한다. 미국은 1993년부터, 우리나라는 2002년부터 세포치료제를 의약품으로 관리하고 있다. 이러한 세포치료제는 조직재생 혹은 장기기능 회복을 위한 줄기세포

치료제를 포함하는 것이나, 이로 제한하는 것은 아니다.

- [60] 본원에서 중간엽 줄기세포(Mesenchymal Stem Cell; MSC)'는 제대혈, 지방, 골수(bone marrow), 혈액, 진피 또는 골막에서 분리되는 줄기세포로서, 다양한 세포 예컨대 지방세포, 연골세포 및 골세포 등으로 분화할 수 있는 전능성(pluripotent) 또는 다능성(multipotent) 세포를 의미한다. 또한, 중간엽 줄기세포는 면역억제제의 사용 없이도 동종 또는 이종 수혜자에서 효과적으로 생착될 수 있는 특징이 있다.
- [61] 본원의 치료용 조성물에 사용되는 세포는 자가 (autologous), 동종 (allogenic), 이종 (xenogenic) 세포이며, 특히 자가 세포이다.
- [62] 일 구현예에서 본원의 세포치료제에 포함되는 중간엽 줄기세포는, 동물의 중간엽 줄기세포일 수 있으며, 바람직하게는 포유동물, 보다 바람직하게는 인간의 중간엽 줄기세포일 수 있다. 또한 본 발명의 중간엽 줄기세포는 골수, 지방조직, 말초혈액, 간 유래 일 수 있다.
- [63] 다른 구현예에서, 본원의 세포치료제에 포함될 수 있는 세포는 중간엽줄기세포로부터 유래된, 연골세포 또는 골세포로 분화될 수 있는 전구세포를 포함하며, 예를 들면 미성숙 골전구세포, 골모세포, 연골모세포를 포함한다.
- [64] 또다른 구현예에서 본원의 세포치료제에 포함될 수 있는 세포는 중간엽줄기세포로부터 분화된 연골세포 또는 골세포를 포함한다.
- [65] 중간엽 줄기세포는 골수 등에 매우 적은 양으로 존재하지만, 이를 분리 및 배양하는 과정은 당업계에 잘 알려져 있으며 예를 들면 미국특허 제5,486,359호를 참조할 수 있다. 또한, 본원의 중간엽 줄기세포는 공지된 방법에 따라 골수의 조혈모세포로부터 부착특성에 의해 분리한 후 분화능력을 잃지 않은 상태에서 증식시켜 얻을 수 있다.
- [66] 예를 들면 중간엽 줄기세포를 얻는 과정을 구체적으로 설명하면 다음과 같다: (1) 인간 또는 마우스를 포함하는 포유동물, 바람직하게는, 인간의 중간엽 줄기세포, 예컨대, 혈액 또는 골수로부터 중간엽 줄기세포를 분리하는 단계(상기 골수는 경골, 대퇴골, 척수 또는 장골로부터 추출할 수 있다.); 분리된 세포를 적합한 배지에서 배양하는 단계 및 배양과정에서 부유 세포를 제거하고 배양 플레이트에 부착된 세포들을 계대 배양하여, 최종적으로 구축된 중간엽 줄기세포를 수득하는 단계를 통하여 얻을 수 있다.
- [67] 상기 과정에서 이용되는 배지로는, 줄기세포의 배양에 이용되는 일반적인 어떠한 배지도 이용할 수 있다. 바람직하게는, 혈청(예컨대, 우태아 혈청, 말 혈청 및 인간 혈청)이 함유된 배지이다. 본 발명에서 이용될 수 있는 배지는, 예를 들어, RPMI 시리즈, Eagles's MEM (Eagle's minimum essential medium, Eagle, H. Science 130:432(1959)), α -MEM (Stanner, C.P. et al., Nat. New Biol. 230:52(1971)), Iscove's MEM (Iscove, N. et al., J. Exp. Med. 147:923(1978)), 199 배지(Morgan et al., Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 73:1(1950)), CMRL 1066, RPMI 1640 (Moore et al., J.

Amer. Med. Assoc. 199:519(1967)), F12 (Ham, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 53:288(1965)), F10 (Ham, R.G. Exp. Cell Res. 29:515(1963)), DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's medium, Dulbecco, R. et al., Virology 8:396(1959)), DMEM과 F12의 혼합물(Barnes, D. et al., Anal. Biochem. 102:255(1980)), Waymouth's MB752/1 (Waymouth, C. J. Natl. Cancer Inst. 22:1003(1959)), McCoy's 5A (McCoy, T.A., et al., Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 100:115(1959)) 및 MCDB 시리즈(Ham, R.G. et al., In Vitro 14:11(1978))을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 배지에는, 다른 성분, 예를 들어, 항생제 또는 항진균제(예컨대, 페니실린, 스트렙토마이신) 및 글루타민 등이 포함될 수 있다.

- [68] 다른 예에서 중간엽 줄기세포의 확인은 유세포 분석을 통하여 할 수 있다. 이러한 유세포 분석은, 중간엽 줄기세포의 특이한 표면 마커를 이용하여 실시된다. 예컨대, 중간엽 줄기세포는 CD44, CD29 및/또는 MHC 클래스 I에 대하여 양성 반응을 나타내므로, 이를 통해 중간엽 줄기세포를 확인할 수 있다.
- [69] 본원에 따른 세포 치료제에 포함되는 세포는 NFI-C를 과발현한다. 세포에서 단백질을 과발현하는 방법은 공지되어 있다. NFI-C 유전자를 적절한 진핵세포 발현벡터 예를 들면 파아지, 바이러스 또는 레트로바이러스 유래의 벡터 또는 플라스미드에 발현 프로모터에 작동가능하도록 연결되도록 클로닝 하여, 발현 벡터를 구축한 후, 이를 본원에 따른 세포에 도입할 수 있다. 도입 방법은 공지되어 있으며 예를 들면 칼슘포스페이트법, DEAE-덱스트란 매개 전달입, 양하전 지질 매개 전달입법, 전기천공, 파아지 시스템을 이용한 트랜스덕션 또는 바이러스를 이용한 감염 방법 등을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다.
- [70] 본원에 따른 세포 치료제 또는 세포를 포함하는 약학 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 비경구 투여, 예를 들어, 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [71] 본원에 따른 치료제 또는 조성물은 일반적으로 사용되는 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 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. 또한 본 발명에 따른 세포치료용 조성물은 그 투여방법이나 제형에 따라 필요한 경우, 현탁제, 용해보조제, 안정화제, 등장화제, 보존제, 흡착방지제, 계면활성화제, 희석제, 부형제, pH 조정제, 무통화제, 완충제, 산화방지제 등을 적절히 포함할 수 있다. 상기에 예시된 것들을 비롯하여 본 발명에 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, 최신판]에 상세히 기재되어 있다.

- [72] 본 발명의 세포치료용 조성물은 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [73] 또한 상기 조성물은 세포치료제가 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 본 발명의 세포치료제 조성물은 질환의 치료를 위하여 치료학적으로 유효한 양의 세포치료제를 포함할 수 있다. 용어 '치료적으로 유효한 양'은 연구자, 의사, 또는 기타임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 조성물에 포함되는 세포치료제는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다.
- [74] 그러므로 최적의 세포치료제 함량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본원에 따른 일 구현예에서 세포치료제는 골수장 및 물리적 및/또는 병리학적으로 손상된 골주위에 국소투여된다.
- [75] 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 포함하는 것이 중요하다. 예컨대, 본 발명의 조성물의 투여량은 유효성분인 줄기세포로부터 분화된 골모세포를 기준으로 1.0×10^7 내지 1.0×10^8 세포/kg(체중), 보다 바람직하게는 1.0×10^5 내지 1.0×10^8 세포/kg(체중)일 수 있다. 다만, 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성별, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있고, 당업자라면 이러한 요인들을 고려하여 투여량을 적절히 조절할 수 있다. 투여 횟수는 1회 또는 임상적으로 용인가능한 부작용의 범위 내에서 2회 이상이 가능하고, 투여 부위에 대해서도 1개 부위 또는 2개 부위 이상에 투여할 수 있다. 인간 이외의 동물에 대해서도, kg당 인간과 동일한 투여량으로 하거나, 또는 예를 들면 목적의 동물과 인간과의 허혈기관(심장 등)의 용적비(예를 들면, 평균값) 등으로 상기의 투여량을 환산한 양을 투여할 수 있다. 본 발명에 따른 치료의 대상동물로서는, 인간 및 그 밖의 목적으로 하는 포유동물을 예로 들 수 있고, 구체적으로는 인간, 원숭이, 마우스, 래트, 토끼, 양, 소, 개, 말, 돼지 등이 포함된다.
- [76] 본원에 따른 NFI-C는 지방세포의 분화 억제와 골모세포의 분화를 촉진하여, 지방세포 분화 억제가 필요하거나, 골모세포의 분화 촉진이 필요한 다양한 용도로 사용될 수 있다.
- [77] 이런 측면에서 본원은 또한 NFI-C 단백질 또는 그 유전자를 유효성분으로 포함하는 지방세포 분화 억제제 또는 골모세포 분화 촉진용 조성물로 제공될 수

있다.

- [78] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해서 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[79] 실 시 예

[80] 실험 재료 및 방법

[81] 1. 시약 및 항체

- [82] 본 발명에서 인간유래 재조합 BMP-2(Bone Morphogenic Protein-2)는 R&D Systems에서 구입하였다. NFI-C 항체는 (아미노산 잔기 NH₂-RPTRPLQTVPLWD-COOH) 펩타이드를 합성하여 토끼에서 제작하였다. Runx2 (sc-398), PCNA (sc-400), 그리고 Osx (sc-22538) 항체는 Santa Cruz Biotechnology에서 구입하였다.

[83] 2. 실험동물

- [84] 쥐를 포함한 모든 동물 실험은 서울대학교 치의학 연구소 지침에 따라 수행하였다. *NFIC*^{-/-} 생쥐는 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 암컷과 수컷의 교배로 제작하였다. *Runx2*^{-/-} 생쥐는 Dr. Toshihisa Komori(Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki, Japan)에게서 제공 받았다.

[85] 3. 마이크로-CT와 조직형태학적 분석

- [86] 생후 6주 정상 생쥐 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 상악, 하악, 그리고 대퇴골을 분리하여 4% 파라포름 알데하이드에 밤새 4°C에서 고정하였다. 마이크로-CT는 스카이스캔 스캐너와 소프트웨어로 분석하였다. 상기 기계의 동위원소 해상도는 10 μm였다. 죽이기 7일 및 2일 전에 생후 6주 생쥐에게 10 mg/kg의 칼세인은 투여하였다. OsteoMeasure histomorphometry system (OsteoMetrics)을 제조자의 방법대로 이용하여 조직학적 분석을 수행하였다.

[87] 4. 조직학적 분석 및 면역화학조직 분석

- [88] 생쥐의 대퇴골은 4% 파라포름알데하이드에서 밤새 4°C에서 고정하였다. 비탈회 대퇴골은 불안정화 메틸메타크릴레이트 레진(destabilized methyl methacrylate resin)에 포매하여 5 μm 두께로 대퇴골을 절단하여 본 코사 (von Kossa) 염색을 수행하였다. 탈회 대퇴골 표본은 10% 에틸렌 디아민 테트라-아세트산(ethylene diamine tetra-acetic acid)(EDTA)-1% 파라포름알데하이드(pH 7.4) 용액에서 2주간 탈회하고 수세, 탈수 등의 과정을 거친 다음 파라핀 포매하여 5 두께로 절단하여 헤마톡시린-에오신(hematoxylin-eosin) 염색, 면역화학조직 염색, 그리고 파골세포 확인을 위한 TRAP 염색을 수행하였다. TRAP 염색은 키트(sigma)를 사용하여 제조자의 지침에 따라 수행하였다.

- [89] 골다공증 환자의 골 조직 슬라이드는 인제대학교 백인제기념 임상의학 연구소 양영일 교수님께 제공 받았고, 헤마톡시린-에오신 염색과 NFI-C 면역화학조직 염색을 수행하였다.

[90] **5. 생쥐의 골격 분석**

[91] 갓 태어난 생쥐 (P0)에게 연골 염색을 위한 알시안 블루와 뼈를 염색하기 위한 알리자린 레드 S 염색을 시행하였다. 생쥐는 95% 에탄올에서 2시간 고정한 후 피부와 근육을 제거하였다. 그런 다음 생쥐의 골격은 5일간 95% 에탄올에서 다시 고정한 후 2일간 아세톤에서 다시 고정하였다. 다음으로, 생쥐의 골격은 5% 빙초산과 70% 에탄올에 0.015% 알시안 블루 와 0.005% 알리자린 레드 S가 포함된 용액에서 3일간 염색하였다. 염색된 샘플은 1% KOH 용액에서 수세한 후 100% 글리세린에 보관하였다.

[92] **6. 플라스미드 제작.**

[93] pCH-NFI-C 발현 플라스미드와 pSuper-retro NFI-C siRNA 플라스미드는 이전에 보고하였다 (Lee DS, Yoon WJ, Cho ES, Kim HJ, Gronostajski RM, Cho M-I, and Park JC. PLoS One 2011, 6(12):e29160, 2011). *Runx2*, *Dlx5*, *Msx2*, 와 *Ppary* 프로모터 플라스미드는 서울대학교 치과대학 류현모 교수님께 제공 받았다. NFI-C 프로모터(-2520~+88)는 생쥐의 유전체 DNA로부터 PCR를 수행하여 2.6-kb 유전체 절편을 증폭하였고, *Osx* 프로모터(-1269~+91) 또한 생쥐의 유전체 DNA로부터 PCR를 수행하여 1.36-kb 유전체 절편을 증폭하였다. NFI-C와 *Osx* 프로모터의 염기서열의 GenBank accession numbers는 다음과 같다. NFI-C, NC000076. *Osx*, DQ229136. 각각의 프로모터의 증폭을 위해 생쥐의 유전체 DNA (1 µl)를 사용하여 PCR를 수행하였고 반응 조건과 프라이머 염기서열은 아래와 같다. PCR 반응 조건: 94°C, 1 min; 60°C, 1 min; 72°C, 1 min 총 35 주기. 프라이머 염기서열: NFI-C Fw 5'-CTC GAG AGT GAA TGG ATT GGG GGT GT-3', NFI-C Rv 5'-AAG CTT CAG AGC GGG GAG GAA TAC AT-3', *Osx* Fw 5'-CTC GAG CAC ACA TAC ACG AAC ACA CAT-3', 및 *Osx* Rv 5'-AAG CTT TGG GGA CCG GGT CCC AAG GAG-3'. 증폭된 유전체 DNA 절편은 PCRR®2.1 T 벡터에 삽입한 후 제한효소 XhoI 및 Hind III로 절단하여 pGL3 루시퍼라제(LUC) 발현 벡터(Promega)에 삽입하였다.

[94] **7. 세포배양 및 전달이입 (transfection).**

[95] 중간엽 줄기세포는 생후 6주 생쥐의 대퇴골에서 1ml 주사기를 이용하여 분리하였다. 분리된 세포는 적혈구제거 용액을 이용하여 적혈구를 제거하고, 100mm 배양 접시에서 100 IU/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신 (Gibco BRL), 그리고 10% 우태아혈청이 첨가된 α -MEM 배지에서 배양하였다. 생쥐의 일차 두개관 (Primary calvarial) 골모세포를 생후 5일의 정상과 *NFIC*^{-/-} 생쥐에서 분리하였다. 두개관 뼈를 자른 후 피부조직을 제거하고 잘게 자른 다음 PBS로 3번 수세하였다. 뼈 조각은 1% 콜라게나아제 타입 I (Gibco BRL) 과 1.6% 디스파아제 II (Gibco BRL)가 포함된 α -MEM 배지에서 한 시간 동안 반응한 후 calvarial 골모세포를 분리하였다. 골모세포 분화는 배양접시에 세포가 80~90% 자라면 5% 우태아혈청, 아스코르빈산 (50 µg/ml), 그리고 베타 글리세로포스페이트 (β -glycerophosphate, 10 mM)가 첨가된 α -MEM 배지에서

2주간 배양하여 골모세포 분화를 유도하였다. 지방세포는 배양접시에서 세포가 80~90% 자라면 10% 우태아혈청, 인슐린 (10 µg/ml), 덱사메타손 (1 µM), 그리고 3-이소부틸-1-메틸잔틴(IBMx, 0.5 mM)이 포함된 DMEM 배지에서 7일간 배양하여 지방세포 분화를 유도하였다.

- [96] 생쥐의 골모세포주인 MC3T3-E1 세포는 α-MEM 에 10% 우태아혈청과 항생제가 포함된 배지에 배양하였다. 생쥐의 근육세포주 C2C12 세포는 100 IU/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신 (Gibco BRL), 그리고 10% 우태아혈청이 첨가된 DMEM 배지에서 배양하였다. 도3, 도5, 도6, 도8, 그리고 도10 에 기재된 발현 플라스미드 (2 µg)는 MC3T3-E1 과 C2C12 세포에 리포펙타민(Lipofectamine) Plus™ reagent (Invitrogen)을 이용하여 유전자를 전달이입하였다.

- [97] 인간유래 중간엽줄기세포는 칼브렉스(Cambrex)에서 구입하여 100 IU/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신 (Gibco BRL), 그리고 10% 우태아혈청이 첨가된 저포도당 DMEM 배지에서 배양하였다.

- [98] **8. 중간엽 줄기세포의 골수 이식**

- [99] *NFIC*^{-/-} 중간엽줄기세포는 생후 6주 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 대퇴골에서 1ml 주사기를 이용하여 분리하였다. *NFIC*^{-/-} 중간엽줄기세포에 NFI-C를 다시 발현시키기 위하여 NFI-C 과발현 레트로바이러스를 첨가하여 24 시간 동안 배양하였다. NFI-C-과발현 중간엽 줄기세포는 헤밀튼 주사기를 이용하여 (1 × 10⁶ cells/femur in 10 µl of α-MEM) 생쥐의 왼쪽 대퇴골의 골수강에 주입하였다. 이식 4주 후 대퇴골을 분리하여 마이크로-CT와 조직학적 분석을 시행하였다.

- [100] **9. 시험관에서 파골세포 분화**

- [101] 골수세포를 10% 우태아혈청 및 항생제, 30 ng/ml M-CSF (R & D Systems)가 포함된 α-MEM 배지에서 1일간 배양하여 골수 단핵구(bone marrow monocytes (BMMs))를 얻었다. BMMs (5 × 10⁴ cells/well)은 M-CSF(60 ng/ml)와 RANKL(100 ng/ml)이 포함된 α-MEM 배지에서 3일간 배양하여 파골세포 분화를 유도하였다. 동시배양을 할 때, BMMs (5 × 10⁵ cells/well)와 calvarial 골모세포 (2.5 × 10⁴ cells/well)는 48-웰 플레이트에 함께 넣어 10% 우태아혈청, 10⁻⁸ M 1,25-디히드록시바이타민 D3 (Vit D₃), 그리고 10⁻⁶ M 프로스타글란딘 E2 (PGE₂)가 포함된 α-MEM 배지에서 6일간 배양하여 파골세포 분화를 유도하였다. 파골세포의 확인은 TRAP 염색 키트(Sigma)를 사용하여 분석하였다.

- [102] **10. 리포터 분석**

- [103] 루시퍼라제 분석은 MC3T3-E1 또는 C2C12 세포를 24-웰 플레이트에 5 × 10⁴ 세포/웰로 플레이트하고, 24시간 후 리포펙타민 Plus™ 시약으로 형질전환하였다. 각 형질전환에서, 각각 0.4 µg의 pGL3basic (대조군), pGL3 Pparγ 프로모터 (-1000~+1), pGL3 Osx 프로모터(-1269~+91), pGL3 NFIC 프로모터(-2520~+88), pCMV empty, Runx2, 및 NFI-C 발현 플라스미드를 사용하였다. Runx2 siRNA와 대조군 siRNA는 Dharmacon에서 구입하여

사용하였다. 형질전환된 세포는 48시간 후에 루시페라제 활성을 측정하였다.

[104] **11. cDNA 합성과 실시간 중합효소 연쇄반응**

[105] 각 세포에서 TRIzol 시약을 이용하여 총 RNA를 분리하였다. 2 µg 의 총 RNA와 역전사효소(Superscript III enzyme(Invitrogen)) 1 µl와 0.5 µg 의 oligo (dT)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 실시간 중합효소 연쇄반응에 이용하였다. 실시간 중합효소 연쇄반응은 SYBR GREEN PCR Master Mix (Takara, Japan)를 이용하여 ABI PRISM 7500 sequence detection system (Applied Biosystems)에서 진행되었다. 실시간 중합효소 연쇄반응은 94°C에서 1분, 이어 9°C 15초, 60°C 34초 조건에서 40주기 수행되었다. 결과의 분석은 CT (comparative cycle threshold, ABI PRISM 7500 장비와 함께 제공됨) 방법을 이용하여 평가하였고, 프라이머 염기서열은 표 1에 기재되어 있다.

[106] [표 1]

[107]

Gene		Primer (5'-3')
<i>Nfic</i>	forward	GACCTGTACCTGGCCTACTTTG
	reverse	CACACCTGACGTGACAAAGCTC
<i>Bsp</i>	forward	CAGGGAGGCACTGACTCTTC
	reverse	AGTGTGGAAGTGTGGCGTT
<i>Oc</i>	forward	CTGACAAAGCCTTCATGTCCAA
	reverse	GCGCCGGAGTCTGTTCACTA
<i>Alp</i>	forward	CCAACTCTTTTGTGCCAGAGA
	reverse	GGCTACATTGGTGTGAGCTTTT
<i>Runx2</i>	forward	TTCTCCAACCCACGAATGCAC
	reverse	CAGGTACGTGTGGTAGTGAGT
<i>Osx</i>	forward	CCCAACCTTCCCTCACTCAT
	reverse	CCTTGTACCAAGAGCCATAGG
<i>Opg</i>	forward	GCTGAGTGTTTTGGTGGACAGTT
	reverse	GCTGGAAGGTTTGCTCTTGTG
<i>Rankl</i>	forward	TGGAAGGCTCATGGTTGGAT
	reverse	CATTGATGGTGAGGTGTGCA
<i>Fpary</i>	forward	CCATTCTGGCCCAACCAAC
	reverse	AATGCGAGTGGTCTTCCATCA
<i>Dlx5</i>	forward	TCTCTAGGACTGACGCAAACA
	reverse	GTTACACGCCATAGGGTCGC
<i>Msx2</i>	forward	TTCACCAATCCAGCTTCTA
	reverse	TTGCAGTCTTTTCGCCTTAGC
<i>Hprt</i>	forward	CCTAAGATGAGCGCAAGTTGAA
	reverse	CCACAGGGACTAGAACACCTGCTA

[108] **12. 웨스턴블랏**

[109] 단백질을 분리하기 위하여 세포를 PBS로 세척하고, 1,000 x g 에서 5분간 저온에서 원심분리하여 세포를 모았다. 상청액을 제거한 후 펠렛은 용해(lysis) 버퍼(100 mM Tris, pH 7.4, 350 mM NaCl, 10% glycerol, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM 디치오스레이톨(dithiothreitol), 1x 프로테아제 저해제(SigmaAldrich,

St. Louis, Mo, USA))에 녹여 얼음에서 15분간 반응하였다. 세포 잔해(Cell debris)는 16,000 x g, 15분간 저온에서, 원심분리하여 제거하고 상청액만 취하였다. 30 µg의 단백질을 전기영동으로 분리하여 PVDF 멤브레인으로 옮겼다. 멤브레인을 0.1% 트윈 20이 포함된 PBS(PBS-T)에 5% 탈지유(nonfat dry milk)로 블락킹하고 PBS-T로 세척한 후 안티 NFI-C, Runx2, Osx, 그리고 GAPDH 항체에 1:1000으로 반응시켰다. 세척 후 멤브레인은 anti-rabbit IgG conjugated horseradish peroxidase (1:5000) (Santa Cruz Biotechnology)에 한 시간 반응한 후 증강 화학발광 시스템(Amersham Biosciences)으로 밴드를 확인하였다.

[110] **13. ChIP assays**

[111] MC3T3-E1 세포는 BMP-2 (300 ng)를 48시간 동안 첨가하여 배양하였다. 이어 세포를 PBS로 세척한 후 수거하여 초음파기기를 이용하여 세포의 크로마틴을 약 1,000bp 크기로 분쇄하였다. 크로마틴 면역침강은 NFI-C 항혈청 (30 µl) 과 Runx2 (10 µl, Santa Cruz) 항혈청을 첨가하여 4°C 에서 4시간 동안 반응 시킨 후 DNA 펠렛을 수거한 후 PCR을 이용하여 각 단백질이 프로모터 지역에 결합되었는지를 확인 하였다. PCR 프라이머 염기서열은 표 2에 나타내었다. PCR 조건은 아래와 같다: 94°C for 30s; 60°C for 30s; 및 72°C for 30s (총 35 cycles). PCR 산물은 2% 아가로스 겔에서 전기영동하여, 에티디움 브로마이트(ethidium bromide)로 염색하여 자외선에서 확인하였다.

[112] [표 2]

Gene		Primer (5'-3')
Osx promoter	Forward (-359)	GACTGCCCACAGATGCCTAT
	Reverse (-117)	CAATGAGGAAGGCGAGAGAG
Nfic promoter	Forward (-423)	ACCCCATACCTGCTGCTAGA
	Reverse (-246)	CCACATCCCACCTGAGTCC

[114] **14. 레트로 바이러스 생산 및 바이러스 인젝션**

[115] Platinum-E 세포는 pMXs NFI-C, Osx, 그리고 대조군 벡터를 리포펙타민 Plus™ 시약(Invitrogen)을 이용하여 전달이입 하였다. 48시간 후, 바이러스가 포함된 배지를 수거하여 원심분리 후 0.45-µm 주사기 필터로 필터한 후 -80°C에 보관하여 사용하였다.

[116] **15. 유전자 발현 프로파일링**

[117] 유전자 프로파일링은 정상과 골다공증 환자의 중간엽 줄기세포를 이용한 mRNA 마이크로 어레이 데이터 베이스를 이용하여 분석하였다. 마이크로 어레이 데이터는 NCBI의 GEO 데이터 베이스 (accession number GSE35959)에서 다운로드받았고, NFI-C mRNA 발현은 상기 탐침자 (Probeset ID 213198_at)를 이용하여 분석하였다.

[118] **16. 중간엽줄기세포의 하악골 이식**

- [119] *NFIC*^{-/-} 중간엽줄기세포는 생후 6주 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 대퇴골에서 1ml 주사기를 이용하여 분리하였다. *NFIC*^{-/-} 중간엽줄기세포에 NFI-C를 다시 발현시키기 위하여 NFI-C 과발현 레트로바이러스를 첨가하여 24 시간 동안 배양하였다. NFI-C-과발현 중간엽 줄기세포는 헤밀튼 주사기를 이용하여 (10 μ l α -MEM 중의 1x10⁶ cells/mandible) 생쥐의 왼쪽 하악골에 주입하였다. 이식 4주 후 하악골을 분리하여 엑스레이(X-ray) 및 마이크로-CT 분석을 시행하였다.

[120] 실험예

[121] 실험예 1. NFI-C의 결손에 의한 출생 후 골형성 손상

- [122] 첫 번째로, 나이가 들어감에 따른 NFI-C 유전자 발현의 패턴을 조사하기 위하여, 배아 18.5일(E18.5)부터 생후 60주의 생쥐로부터 얻은 골수기질세포(BMSCs)에서의 NFI-C mRNA 발현을 분석하였다. 출생 후 16일부터 6주까지는, NFI-C 발현이 유의하게 증가하였고, 이어서 60주까지는 감소하였다(도 1A). 생체 외 골모세포 분화에서는, NFI-C는 배양 0일째부터 발현되었으며, 4일에서 10일까지는 발현이 증가하였고(초기 골모세포 분화), 10일에서 21일까지는 감소하였다(후기 골모세포 분화 및 석화작용). Runx2 발현은 4일에서 7일까지 증가하였고, 그후 10일부터 21일까지는 점차적으로 감소하였는데, 이는 후기 골모세포 분화 및 석화작용에 상응하는 것으로, 배양동안 이 시기에 Osx 발현이 최고조였다(도 1B).
- [123] *NFIC*^{-/-} 생쥐는 정상적인 수명기간을 가지지만, 치아뿌리의 발달이 늦어서 딱딱한 정상적인 설치류 사료를 섭취하는 능력이 결핍되어 있어 성장이 더딘 것이 관찰되었다(16). 따라서, *NFIC*^{-/-} 생쥐에서의 섭식장애를 완화시키기 위하여 이유식기(weaning) 3일 전으로부터 부드러운 도우 식이 보충제를 첨가하였고 이를 6주까지 크는 동안 계속 주었다. 정상(WT) 생쥐 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 체중을 측정하였다. 16일째 및 6주째의 정상(WT) 생쥐 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 총 체중 차이는 크기 않았다(도 7A). 부드러운 도우 식이를 사용하여 섭식-의존성 성장지연으로부터 *NFIC*^{-/-} 생쥐를 회복시킨 후, 6주 때에 마이크로-CT(micro-computed tomography)를 사용하여 하악골에 대한 NFI-C 손실의 영향을 측정하였다. 그 결과, 이전에 측정한 치아뿌리 결핍이외에도, *NFIC*^{-/-} 생쥐의 하악골에서는 피질 골 부피 및 골 두께가 정상 생쥐에 비해 현저히 감소하였다(도 1C). 이러한 결과는 NFI-C가 결핍되면 골 부피가 현저히 감소하며, 골 부피 감소가 기아에 의한 영향이 아님을 의미한다.

- [124] 뼈에 대한 NFI-C의 역할을 연구하기 위하여, 6주째 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 대퇴골에서의 골 마이크로구조(micro-architecture)를 조사하였다. 대퇴골의 마이크로씨티 이미지를 보면, *NFIC*^{-/-} 생쥐의 골소주 부피(trabecular bone volume) 및 골피질 두께가 정상 생쥐와 비교할 때 현저히 감소한 것을 볼 수 있었다(도 1, D 및 E). 조직학적 분석을 보면, *NFIC*^{-/-} 생쥐의 골밀도(BMD, 32%), 골소주 부피(BV/TV, 34%), 골소주량(Tb.N, 41%), 피질골 부피(Ct. BV/TV, 24%), 및 피질골 두께(Ct. Th, 20%)가 상당히 감소한 것으로 나타났으나, 골소주

분리(Tb.SP, 34%; 도 1F)는 상당히 증가한 것으로 나타났다. 또한 섭식장애가 일어나지 않은 때인 생후 16일(P16)부터 수유시기동안 샘플링한 골에 대한 *NFI-C* 결핍의 영향을 조사하였다. 예상한 바와 같이, P16 및 6주의 생쥐는 서로 골 특성이 매우 유사한 것으로 나타났는데(도 7 B 및 C), 이는 *NFI-C*가 결핍되면 생후 골형성 시기에 골 형성이 손상받는다라는 것을 나타낸다. 그러나 *NFI-C* 결핍이 태아기 골 및 치아 발달에는 영향을 미치지 않았다(도 8, A-D). 전체적으로 이러한 결과는, *NFI-C*가 생후 골 형성 및 치아 뿌리 발달을 조절하지만 태아기 골 발달에는 영향을 미치지 않는다는 것과 일치한다.

- [125] *NFIC*^{-/-} 생쥐의 골량이 감소되는 것이 골형성 능력이 손상되었기 때문인지를 알아내기 위하여, 6주령 생쥐의 대퇴골을 조직학적 분석을 하여 골모세포 기능을 측정하였다. 조직학적 분석 및 본 코사 염색에 기초하여 보면, 정상 생쥐에 비해 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 해면 및 피질 골 부피가 현저하게 감소하였다(도 1G). 정상 생쥐에 비해 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 조직당 골모세포 수(N.Ob/T.Ar), 골 파라미터 당 골모세포 수(N.Ob/B.Pm), 및 골 표면당 골모세포 표면(Ob.S/BS)이 상당히 감소하였다(도 1H). P16일째의 *NFIC*^{-/-} 생쥐도 유사하게 6주령 생쥐보다 골모세포 활성의 파라미터가 감소한 것으로 나타났다(도 7 D 및 E). 정상 생쥐에 비해 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 두 개의 칼세인 라벨링의 거리가 감소하였는데, 이는 무기질 침착 속도(MAR)가 *NFIC*^{-/-} 생쥐에서는 상당히 감소(대략 ~30%)하였다(도 1i). 이러한 실험결과는, 생쥐에게 *NFI-C*가 손실되면 골모세포 수가 감소하고 뼈에서의 골모세포 기능이 손상된다는 것을 말한다.

- [126] 실험예 2. *NFI-C*의 결핍에 의한 골수 지방 증가

- [127] *NFIC*^{-/-} 생쥐에게서 골량이 감소하는 것이 골수 지방세포가 증가하였기 때문인지를 알아보기 위하여, H&E 염색을 사용하여 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 대퇴골에서의 골수 지방세포를 측정하였다. *NFIC*^{-/-} 생쥐의 골수 공간에 지방세포가 많이 축적되어 있었는데, 이는 나이에 비례하여 증가하였다(도 2A). 정상 및 *NFIC*^{-/-} 골수기질세포를 배양한 후, 골수 기질세포에서의 지방세포 분화에 대한 *NFI-C* 결핍의 영향을 오일 레드 O 염색을 사용하여 평가하였다. 대조군 및 지방세포 분화배양액의 정상 골수기질세포에 비해 *NFIC*^{-/-} 골수기질세포에서 오일 레드 O-양성 세포가 급격히 증가하였다(도 2B, 왼쪽 패널). *NFIC*^{-/-} 골수기질세포에서 지방세포 분화 마커인 Pparg의 발현이 상당히 증가하였다(도 2B, 오른쪽 패널). 그러나, E18.5에서 오일 레드 O 양성 또는 Pparg 발현에 대하여 정상 및 *NFIC*^{-/-} 골수기질세포 사이에 차이는 없었다(도 8E).

- [128] *NFIC*^{-/-} 생쥐에게서 관찰된 바와 같이 골다공증 환자의 뼈 부분에서 골수 지방세포 또한 증가하였다(도 2C). 따라서 IHC 분석을 이용하여 골다공증 환자의 뼈에서의 *NFI-C* 발현을 측정하였다. *NFI-C*는 정상 뼈의 골모세포에서는 강하게 검출되었지만, 골다공증 뼈에서는 급격히 감소하였다(도 2D). 다음으로, 유전자 발현 옴니버스(GEO, accession no. GSE35959)로 골다공증 hBMSCs (hBMSCs-OP) 및 대조군 hBMSCs (hBMSCs-Cont)사이의 유전자 발현 패턴

차이를 비교하기 위하여, 마이크로어레이 데이터 세트를 사용하여 NFI-C mRNA 발현을 분석하였다. 상기 데이터세트에서, hBMSCs-Cont와 비교하여 hBMSCs-OP에서 NFI-C 유전자 발현이 급격히 감소하였다(도 2E). ROS 또한 타겟 유전자 발현을 조절함으로써 나이에 따른 골다공증에 영향을 미친다(Kim M, Kim C, Choi YS, Kim M, Park C, and Suh Y. Mech Ageing Dev. 2012;133(5):215-225).

- [129] 따라서, NFI-C 발현에 대한 ROS의 영향을 연구하기 위하여, hBMSCs에 H₂O₂를 처리한 후 실시간-PCR 및 웨스턴 블랏을 실시하여 NFI-C 발현을 측정하였다. 대조군 세포와 비교하여 H₂O₂-처리된 hBMSCs에서 NFI-C mRNA 및 단백질 레벨이 급격히 감소하였다(도 2F). 이러한 결과는, NFI-C가 나이 증가에 따른 골다공증과 연관이 있는 유력한 후보유전자라는 것을 의미한다.
- [130] 실험예 3. NFI-C에 의한 골모세포 분화 촉진 및 지방세포 분화 억제
- [131] *NFIC*^{-/-} BMSCs에 대한 NFI-C 과발현의 효과를 연구하기 위하여, *NFIC*^{-/-} BMSCs에 NFI-C 발현 플라스미드를 일시적 전달이입한 후 골형성 분화 배지에서 14일 동안 또는 지방세포화 분화 배지에서 7일간 세포를 배양하였다. 실시간-PCR, 알칼라인 포스파타제 염색, 알리자린 레드 S 무기질화 및 오일 레드 O 염색을 시행하여 골모세포 및 지방세포 분화를 평가하였다. NFI-C가 과발현되었을 때 *NFIC*^{-/-} BMSCs에서 ALP 활성 및 무기질화 결절이 증가하였다(도 3A). Alp mRNA 발현 또한 *NFIC*^{-/-} BMSCs에서 NFI-C가 과발현됨에 따라 증가하였다. 그러나 NFI-C가 과발현되면서 *NFIC*^{-/-} BMSCs에서 오일 레드 O-양성 지방세포의 수는 감소하였다. 게다가, Ppar γ 발현 또한 *NFIC*^{-/-} BMSCs에서 NFI-C가 과발현됨에 따라 급격히 감소하였다(도 3D). 더욱이 NFI-C-과발현 세포는 대조군 세포와 비교하여 대략 20배 정도 감소된 Ppar γ 프로모터 활성을 가지고 있었다(도 3E). 이러한 결과는 NFI-C가 BMSCs에서 Ppar γ 발현을 억제함으로써 골모세포 분화를 촉진하고 지방세포 분화를 저해한다는 것을 의미한다. BMSCs에서 NFI-C가 발현되면 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 골다공증-유사 표현형을 구제할 수 있는지를 알아보기 위하여, 레트로바이러스 감염을 통해 *NFIC*^{-/-} BMSCs에서 NFI-C를 과발현시키고 이러한 세포를 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 대퇴골 골수강내로 이식하였다. 대퇴골 마이크로-CT 이미지를 보면, NFI-C-과발현된 BMSCs가 이식된 *NFIC*^{-/-} 생쥐에게서 *NFIC*^{-/-} 생쥐와 비교하여 골소주 부피가 현저히 증가하여 있었다(도 3F, 왼쪽 패널). 조직학적 분석을 보면, NFI-C-과발현된 BMSCs가 이식된 *NFIC*^{-/-} 생쥐에게서 골소주 부피(BV/TV) 및 골소주 수(Tb. N)가 현저히 증가한 것으로 나타났으나, 골소주 분리는 현저히 감소하였다(도 3F, 오른쪽 패널). 이식 4주 후, 이식된 BMSCs를 NFI-C 항체를 사용하여 IHC로 분석하였다. 골소주 골표면에 따라 NFI-C-양성 세포가 관찰되었는데, 이는 이식된 BMSCs에서 골모세포가 분화된 것을 의미한다(도 3G). 조직학적 분석을 보면, *NFIC*^{-/-} 생쥐와 비교하여 NFI-C-과발현 BMSCs를 이식하면 골소주 골량은 증가하였으나(도 3G) 골수 지방세포는 감소하였다(도

3H). 이러한 결과는 NFI-C-과발현에 의하여 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 골다공증-유사 표현형을 구제할 수 있으므로, NFI-C가 골다공증 치료에서 새로운 타겟이 될 수 있다는 것을 의미한다.

[132] 실험예 4. NFI-C 결핍에 의한 파골세포 활성을 감소시키는 골모세포 분화 억제

[133] BMSCs의 골모세포 분화에 대한 NFI-C 결핍의 효과를 알아보기 위하여, 정상 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐로부터 얻은 BMSCs를 배양한 후 실시간 PCR, ALP 염색 및 알리자린 레드 S 무기질화를 실시하여 골모세포 분화의 발현을 평가하였다. 정상 세포와 비교하여 *NFIC*^{-/-} BMSCs에서, ALP 활성 및 알리자린 레드 S 염색에서의 무기질화 결절 양이 대략 2배정도 감소하였다(도 4, A 및 B). 골모세포 분화 마커인 *Runx2*의 발현은 NFI-C 결핍에 의해 영향을 받지 않았다. 그러나, *Osx*, *Alp*, 오스테오칼신(*Oc*) 및 *Bsp*(bone sialoprotein) 발현은 *NFIC*^{-/-} BMSCs에서 상당히 감소하였다(도 4C). 이러한 결과는, NFI-C가 결핍되면 BMSCs의 골모세포 분화가 손상된다는 것을 의미한다.

[134] 소주골 골 부피가 감소되는 것이 *NFIC*^{-/-} 생쥐에게서 파골세포 활성이 증가하였기 때문인지를 알아보기 위하여, 6주령의 정상 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐에게서의 타르트레이트-저항 산성 포스파타제(TRAP) 활성을 측정하였다. 정상 생쥐와 비교하여 *NFIC*^{-/-} 생쥐에게서 TRAP-양성 파골세포의 수가 현저히 감소하였다(도 4D). 조직 형태학적 분석에서, P16(도 9 A 및 B) 뿐만 아니라 6주령(도 4E)에서도 정상 생쥐와 비교하여 *NFIC*^{-/-} 생쥐에게서 조직 면적당 파골세포 수(N.Oc/T.Ar), 골 둘레당 파골세포수(N.Oc/BPM) 및 골 표면적당 파골세포 면적(Oc.S/BS)이 현저히 감소하였다. 파골세포로 분화하는 타고난 능력이 *NFIC*^{-/-} 생쥐에게는 손상되어 있는지를 알아보기 위하여, 정상 및 *NFIC*^{-/-} 생쥐에게서 얻은 배양된 골수에서 유래된 마크로파아지(BMMs)에 마크로파아지 콜로니-자극 인자(M-CSF) 및 NF-κB 리간드의 수용체 활성인자(RANKL)를 처리하여 파골세포를 유도하였고, 이들을 TRAP 염색하여 평가하였다. 다핵 TRAP-양성 파골세포가 형성되는 것은 생쥐 두 가지 타입 모두에게 동일하였는데(도 9C), 이는 파골세포는 NFI-C 결핍에 대해 직접적으로 영향을 받지 않는다는 것을 의미한다.

[135] *NFIC*^{-/-} 생쥐에게 있어서 골모세포 분화가 손상되면 파골세포 형성이 감소하게 되는지를 알아보기 위하여, 비타민 D3(Vt D₃) 및 프로스타글란딘 E2(PGE₂) 존재하에서 정상 또는 *NFIC*^{-/-} calvarial 골모세포를 정상 BMMs와 함께 공배양하였고, TRAP 염색을 하여 얻은 파골세포를 분석하였다. 정상 골모세포와 비교하여볼 때 정상 BMMs를 *NFIC*^{-/-} 골모세포와 함께 공배양하였을 때 TRAP-양성 다핵 세포 수가 상당히 감소하였다(도 4, F 및 G). *NFIC*^{-/-} 생쥐에게서 얻은 골모세포는 파골세포형성이 덜되도록 하며, 결과적으로 TRAP 활성을 감소시켰다(도 4H). *NFIC*^{-/-} 골모세포 공배양 그룹에서 용해성 *Rankl* (sRankl) 발현 또한 감소하였다(도 4I). 실시간 PCR을 시행하여, *NFIC*^{-/-} 생쥐에서 얻은 골모세포에서는 오스테오프로테게린(*Opg*)이 정상적으로 발현되었지만

Rankl 발현은 감소한 것을 관찰하였다(도 4J). 이러한 결과는, *NFIC*^{-/-} 생쥐의 골골세포 활성이 감소되는 것이, *Rankl*-매개 시그널링이 감소함으로써 정상적 골모세포 분화가 실패하는 것에 기인하는 것일 수 있다는 것을 의미한다.

[136] 실험예 5. *NFI-C*의 *BMP2-Runx2* 경로를 통한 *Osx* 발현 유도

[137] 아연집게(zinc finger)를 함유하는 전사인자인 *Osx*는 골모세포 분화에 있어 중요한 역할을 한다(Nakashima K, Zhou X, Kunkel G, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, and de Crombrughe B. Cell. 2002;108(1):17-29). 골모세포 분화에서의 *NFIC*의 정확한 역할을 알아보기 위하여, *NFI-C* 및 *Osx*사이의 연관성에 대하여 조사하였다. 정상 BMSCs에 비하여 *NFIC*^{-/-} BMSCs에서는 *Osx* mRNA 발현이 감소하는 것으로 나타났다(도 4C). 웨스턴 블랏 분석뿐만 아니라 대퇴부 지주골의 면역형광에 근거하여 볼 때, 정상에 비교하여 *NFIC*^{-/-} 골모세포에서 *Osx* 단백질의 발현이 현저하게 감소하였다(도 5A, 왼쪽 패널). 따라서 *Osx* 조절에 대한 *NFI-C*의 역할을 조사하기 위하여, MC3T3-E1 세포에서 *NFIC*를 과발현시킨 후 실시간 PCR 및 웨스턴 블랏으로 *Osx* 발현을 측정하였다. *NFI-C* 과발현 세포에서 *Osx* mRNA 및 단백질 레벨이 증가하였다(도 5B). *Osx* 프로모터의 전사 활성에 대한 *NFI-C*의 영향을 평가하기 위하여, *BMP-2*의 존재 또는 부존재시에 MC3T3-E1 세포에서 *NFI-C*를 과발현한 후의 *Osx* 프로모터 활성을 측정하였다. *NFI-C*-과발현 또는 *BMP-2* 처리된 세포에서 *Osx* 프로모터 활성이 증가하였다. 게다가, *BMP-2*를 처리한 후 항-*NFIC* 항체를 사용하여 크로마틴 면역침강(ChIP) 분석으로 측정한 바와 같이 *Osx* 프로모터 부분에 직접적으로 결합하는 것을 포함하는 메커니즘을 통해, *BMP-2* 존재시에 *NFI-C*가 과발현되면 *Osx* 프로모터 활성이 강하게 증가하였다(도 5C). *BMP-2* 시그널링 존재시에 *Osx* 프로모터의 -359 및 -117 사이의 부분에 있는 것으로 추정되는 *NFI-C*-결합 모티프를 확인하였다. 또한, *NFIC*^{-/-} 골모세포에서 *BMP-2*를 처리하거나 및/또는 *NFI-C*를 과발현시킴으로써 *Osx* 발현을 증가시켰다(도 5E). 이러한 결과는, 골모세포가 분화하는 동안 *BMP-2* 시그널링 경로를 통해 *NFI-C*가 직접적으로 *Osx* 발현을 조절한다는 것을 의미한다.

[138] *NFIC*^{-/-} 생쥐에서 *Osx*가 과발현됨으로써 손상된 골 형성이 회복되는 것인지를 알아내기 위하여, 레트로바이러스로 감염시킨 후 이를 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 대퇴골 공간에 이식하는 것을 통해 *NFIC*^{-/-} BMSCs에서 *Osx*를 과발현시켰다. 대퇴부 마이크로-CT 이미지를 보면, 소주골 부피가 감소되는 것이 *Osx* 과발현에 의하여 부분적으로만 회복되었다(도 5F, 왼쪽 패널). 조직형태학적 분석에서, *Osx*-과발현 BMSCs가 이식된 *NFIC*^{-/-} 생쥐에게서 소주골 부피(BV/TV) 및 소주골 수(Tb.N)가 상당히 증가하여 나타났으나, 소주골 분리(Tb.SP)는 상당히 감소한 것으로 나타났다(도 5F, 오른쪽 패널). 이식 4주후에 *Osx* 항체를 사용하여 면역형광함으로써 이식된 BMSCs를 분석하였다. *NFIC*^{-/-} 생쥐에서는 소주골 표면의 골모세포에서 *Osx*-양성 BMSCs가 발견되었다(도 5G). 조직학적 분석에서, *Osx*-과발현 BMSCs를 이식하면 소주골 양이 증가하였으나, 골수

지방축적은 변하지 않았다(도 5G). *Osx*가 과발현되는 BMSCs가 이식된 *NFIC*^{-/-} 생쥐에서는 *NFIC*^{-/-} 생쥐와 비교하여 지방세포수가 변하지 않았다(도 5H). 이러한 결과는, *Osx*는 BMSCs에서 골모세포 분화를 촉진시키지만 지방세포 분화에는 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다.

[139] 실험예 6. *Runx2*에 의한 *NFI-C* 발현 조절

[140] *Runx2*, *Dlx5*, *Msx2*, 및 *Osx*를 포함하는 골형성 전사 인자는 대체로 BMP-2에 의해 조절된다(Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Wakabayashi M, and Yoneda T. J Biochem. 2012;151(3):247-254). *NFI-C*가 BMP-2에 의해 조절되는지 알아보기 위하여, MC3T3-E1 세포에서 BMP-2 자극을 한 후 *NFI-C* 발현 및 프로모터 활성을 실시간 PCR 및 웨스턴 블랏을 사용하여 측정하였다. BMP-2는 *NFI-C* mRNA 및 단백질 레벨 뿐만 아니라 *NFI-C* 프로모터 활성도 상당히 증가시켰다(도 6, A 및 C). 또한 BMP-2에 의해 자극받는 *Runx2*가 골형성시기동안 *NFI-C*를 조절하는지를 조사하였다. *Runx2*가 과발현되면 *NFI-C* 프로모터 활성 및 *NFI-C* mRNA 및 단백질 발현이 상당히 증가하였다(도 6, B 및 C). *Runx2*를 녹다운시키면 *NFI-C* 프로모터 활성 및 *NFI-C* 단백질 발현이 대략 10배 정도 감소하였고 *NFI-C* 프로모터 및 발현에 대한 BMP-2의 영향이 증가하는 것을 저해하였다(도 6D). 다음으로, *Runx2*가 *NFI-C* 프로모터 부분에 직접 결합하는지를 알아내기 위하여 BMP-2를 처리한 다음 *Runx2* 항체를 사용하여 ChIP 분석을 수행하였다. *NFI-C* 프로모터의 -423 및 -246 사이 부분에서 *Runx2* 공통염기서열로 추정되는 부분을 확인하였다. *Runx2*는 BMP-2가 존재할 때 *NFI-C* 프로모터와 직접적으로 상호작용하였다(도 6E). 또한 *Runx2*^{-/-} 생쥐에서의 *NFI-C* 발현을 조사하였다. 면역형광 연구 결과를 보면, *NFI-C* 단백질 발현이 관찰되었지만 이는 *Runx2*^{-/-}가 발달되고 있는 뼈 및 연골에서는 급격히 감소하였다(도 6F, 위쪽 패널). 실시간 PCR 및 웨스턴 블랏 실험에서, 정상과 비교하여 *Runx2*^{-/-} 생쥐에서는 *NFI-C* mRNA 및 단백질 발현 레벨이 상당히 감소하였다(도 6F, 아래쪽 패널). 이러한 결과는, *Runx2*가 *NFI-C*의 업스트림에서 작용하며 BMP-2 시그널링 경로를 통해 *NFI-C* 발현을 조절한다는 것을 의미한다.

[141] 실험예 7. *NFI-C*에 의한 하악골 형성 촉진

[142] BMSCs에서 *NFI-C*가 발현되면 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 골다공증-유사 표현형을 구제할수 있는지를 알아보기 위하여, 본 실험에서는 레트로바이러스 감염을 통해 *NFIC*^{-/-} BMSCs에서 *NFI-C*를 과발현시키고 이러한 세포를 *NFIC*^{-/-} 생쥐의 하악골내로 이식하였다. 결과는 도 11a 및 11b에 기재되어 있다. 하악골 엑스레이 및 마이크로-CT 이미지에 나타난 바와 같이, *NFI-C*-과발현된 BMSCs가 이식된 *NFIC*^{-/-} 생쥐에게서 *NFIC*^{-/-} 생쥐와 비교하여 골소주 부피가 증가하였다 (도 11a). 조직학적 분석을 보면, *NFI-C*-과발현된 BMSCs가 이식된 *NFIC*^{-/-} 생쥐에게서 골소주 부피(BV/TV)가 현저히 증가한 것으로 나타났으나, 골소주 분리는 현저히 감소하였다(도 11b). 이러한 결과는 본원에 따른 *NFI-C*에 의해 하악골 형성이

촉진되는 것을 나타낸다.

[143]

[144] 본 연구는 미래창조과학부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업 (NRF-2013M3A9B2076480)에 의해 수행되었다.

[145]

[146] 이상에서 본원의 예시적인 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본원의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본원의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본원의 권리범위에 속하는 것이다.

[147]

본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

청구범위

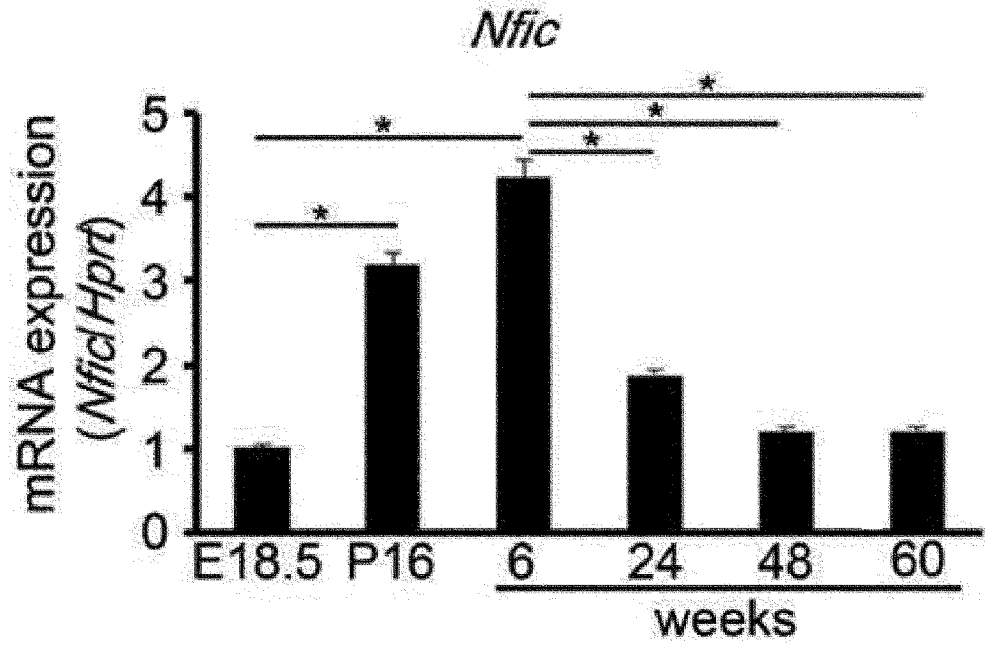
- [청구항 1] NFI-C (Nuclear factor I-C) 단백질 또는 그 유전자를 유효성분으로 포함하는, 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 NFI-C 단백질 또는 유전자는 골모세포 분화를 촉진하고, 지방세포 분화를 억제하는 것인, 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 3] 제 2 항에 있어서,
상기 골모세포 분화 촉진은 NFI-C 단백질 또는 유전자에 의한 전사인자인 Osteirx 발현 촉진에 의한 것이고, 상기 지방세포 분화 억제는 PPAR γ 의 발현의 억제에 의한 것인, 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 조성물은 골수강 또는 손상된 골주위에 국소 투여되는, 골질환 예방 또는 치료용 약학 조성물.
- [청구항 5] 제 1 항 내지 제 4 항 중 어느 한 항에 있어서,
상기 골질환은 골다공증, 골연화증, 구루병, 골감소증, 섬유성 골염, 무형성 골질환, 골형성 부전증, 골위축, 파제트(Paget's disease), 또는 암세포의 골전이에 의해 유발되는 뼈의 손상인, 골질환 예방 또는 치료용 세포 치료제.
- [청구항 6] NFI-C를 과발현하는 중간엽줄기세포; 상기
중간엽줄기세포로부터 유래된, 연골세포 또는 골세포로 분화될 수 있는 전구세포; 또는 상기 중간엽줄기세포로부터 분화된 연골세포 또는 골세포를 유효성분으로 포함하는, 골질환 예방 또는 치료용 세포 치료제.
- [청구항 7] 제 6 항에 있어서,
상기 세포는 자가세포, 타가세포 또는 이종세포인, 골질환 예방 또는 치료용 세포 치료제.
- [청구항 8] 제 6 항에 있어서,
상기 골질환은 병리학적 손상 또는 물리적 뼈의 손상으로 인한 것인, 골질환 예방 또는 치료용 세포 치료제.
- [청구항 9] 제 6 항에 있어서,
상기 골질환은 골다공증, 골연화증, 구루병, 골감소증, 섬유성 골염, 무형성 골질환, 골형성 부전증, 골위축, 파제트(Paget's disease), 또는 암세포의 골전이에 의해 유발되는 뼈의 손상인, 골질환 예방 또는 치료용 세포 치료제.
- [청구항 10] 제 6 항에 있어서, 상기 세포 치료제는 골수강 또는 손상된 골주위

국소 투여용으로, 상기 투여에 의해 상기 투여 부위의 골모세포 분화가 촉진되고, 지방세포 분화가 억제되는 것인, 골질환 예방 또는 치료용 세포 치료제.

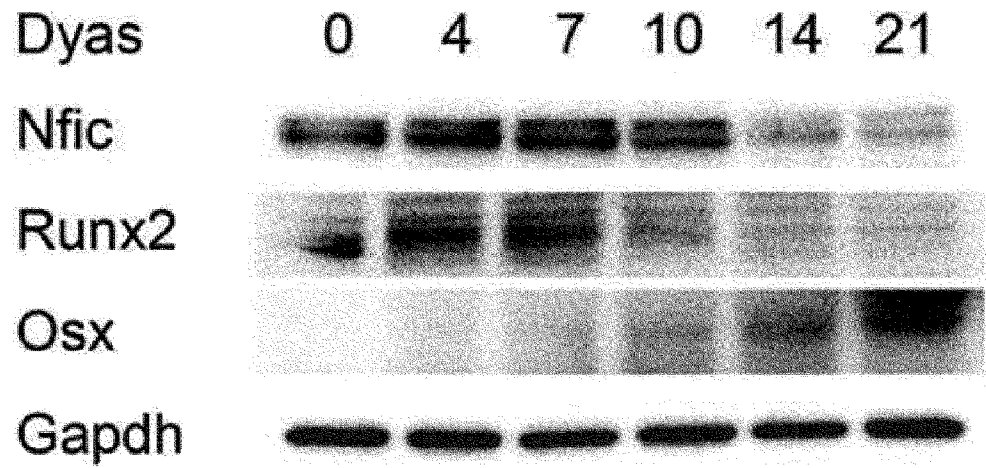
[청구항 11] NFI-C (Nuclear factor I-C) 단백질 또는 그 유전자를 유효성분으로 포함하는, 지방세포 분화 억제용 조성물.

[청구항 12] NFI-C (Nuclear factor I-C) 단백질 또는 그 유전자를 유효성분으로 포함하는, 골모세포 분화 촉진용 조성물.

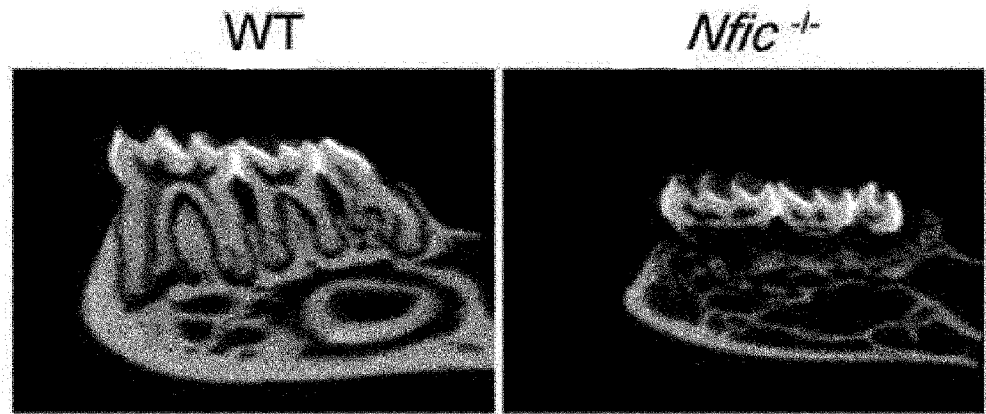
[Fig. 1a]



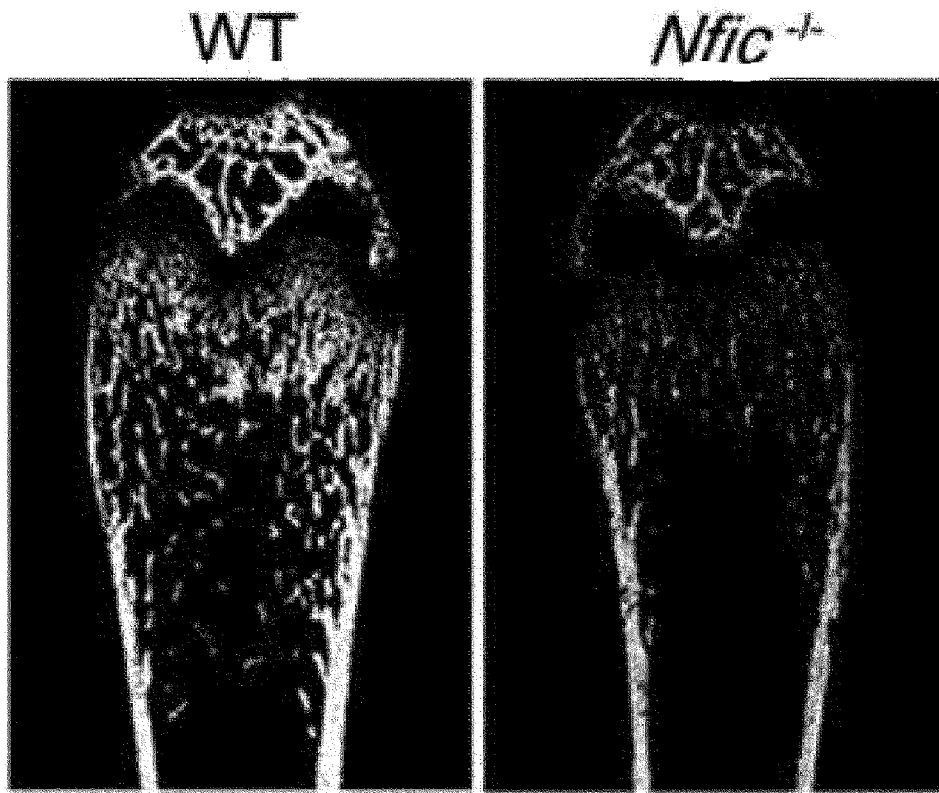
[Fig. 1b]



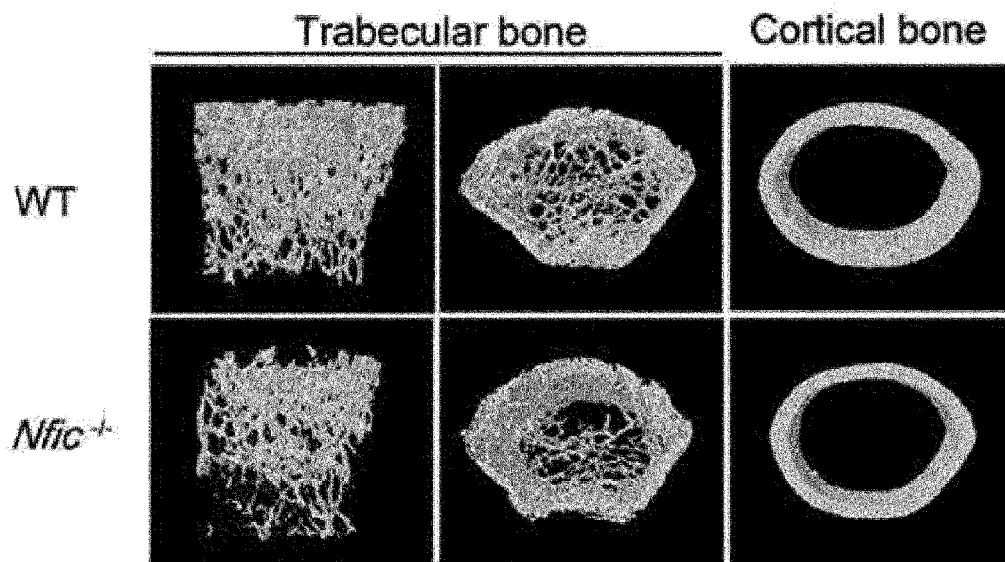
[Fig. 1c]



[Fig. 1d]



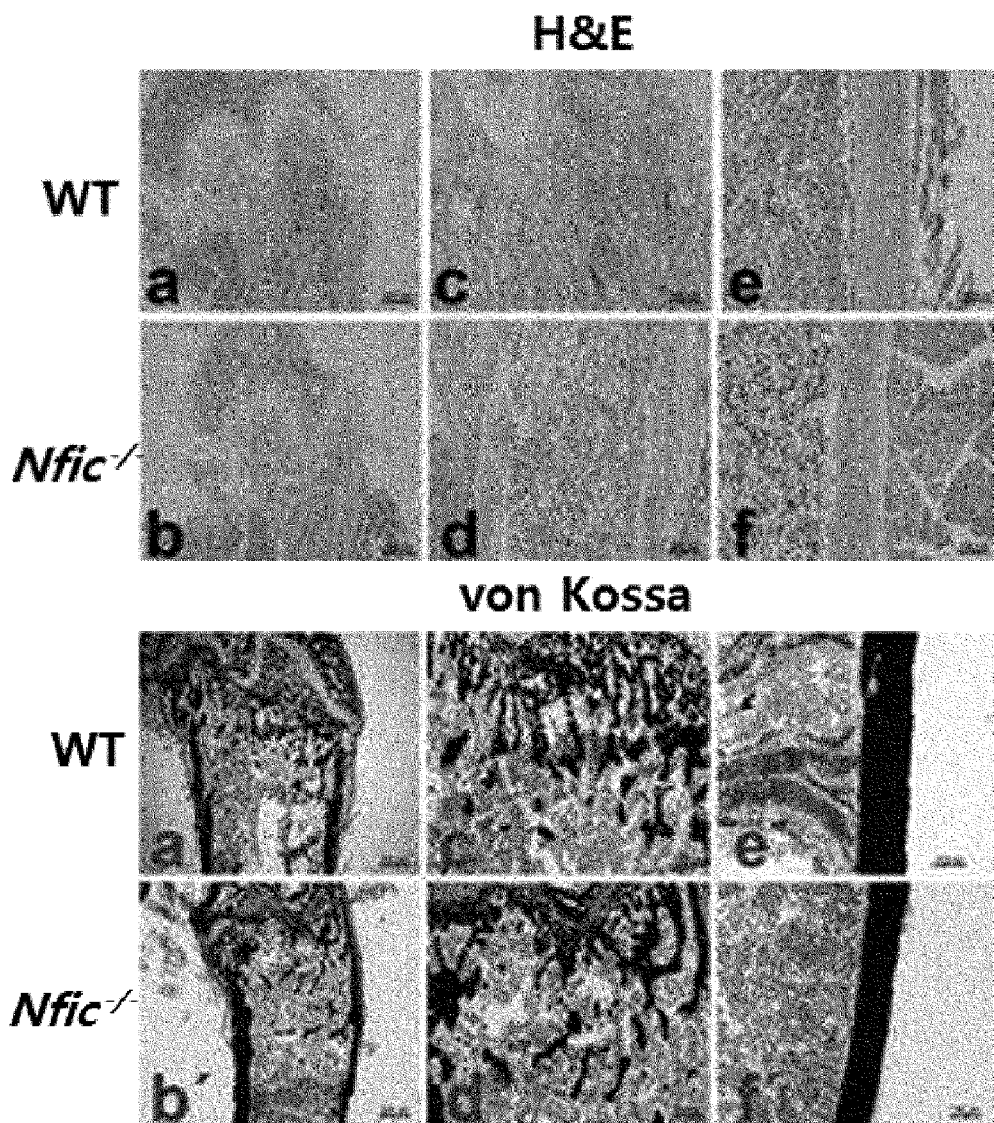
[Fig. 1e]



[Fig. 1f]

	WT	<i>Nfic</i> ^{-/-}
BMD (g/cm ³) ± SD	0.36 ± 0.0316	0.23 ± 0.029*
BV/TV (%) ± SD	10.23 ± 0.15	6.73 ± 1.21*
Tb.Th (mm) ± SD	0.051 ± 0.009	0.044 ± 0.002
Tb.N (1/mm) ± SD	2.92 ± 0.77	1.69 ± 0.25*
Tb.Sp (mm) ± SD	0.205 ± 0.036	0.275 ± 0.031*
Ct. BV/TV (%)	4.28 ± 0.72	3.39 ± 0.32*
Ct.Th (mm)	0.15 ± 0.014	0.12 ± 0.0049*

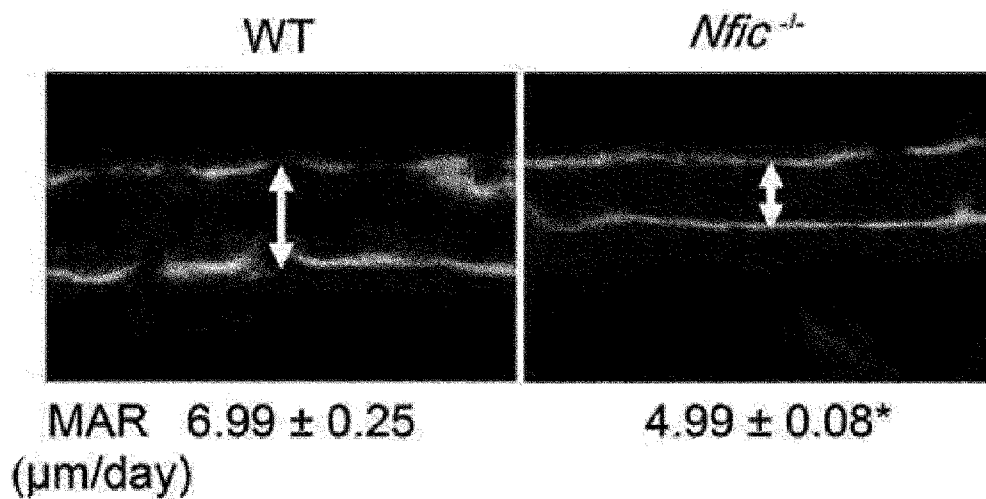
[Fig. 1g]



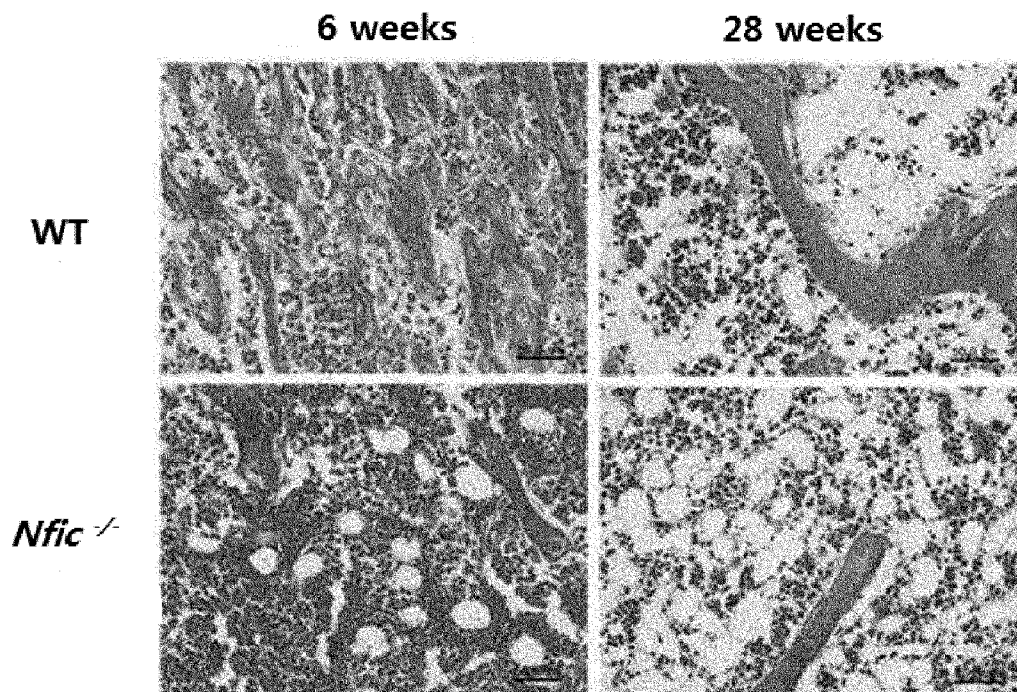
[Fig. 1h]

	WT	<i>Nfic</i> ^{-/-}
N.Ob/T.Ar (%) $\pm$ SD	51.02 $\pm$ 2.24	28.42 $\pm$ 3.09*
N.Ob/B.Pm (Ob/mm) $\pm$ SD	9.56 $\pm$ 1.28	6.4 $\pm$ 1.69*
Ob.S/BS (%) $\pm$ SD	42.92 $\pm$ 4.02	32.19 $\pm$ 2.74*

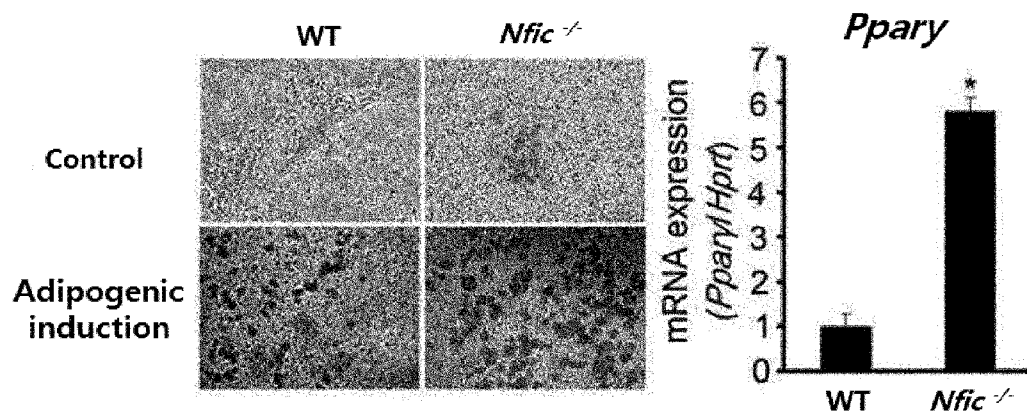
[Fig. 1i]



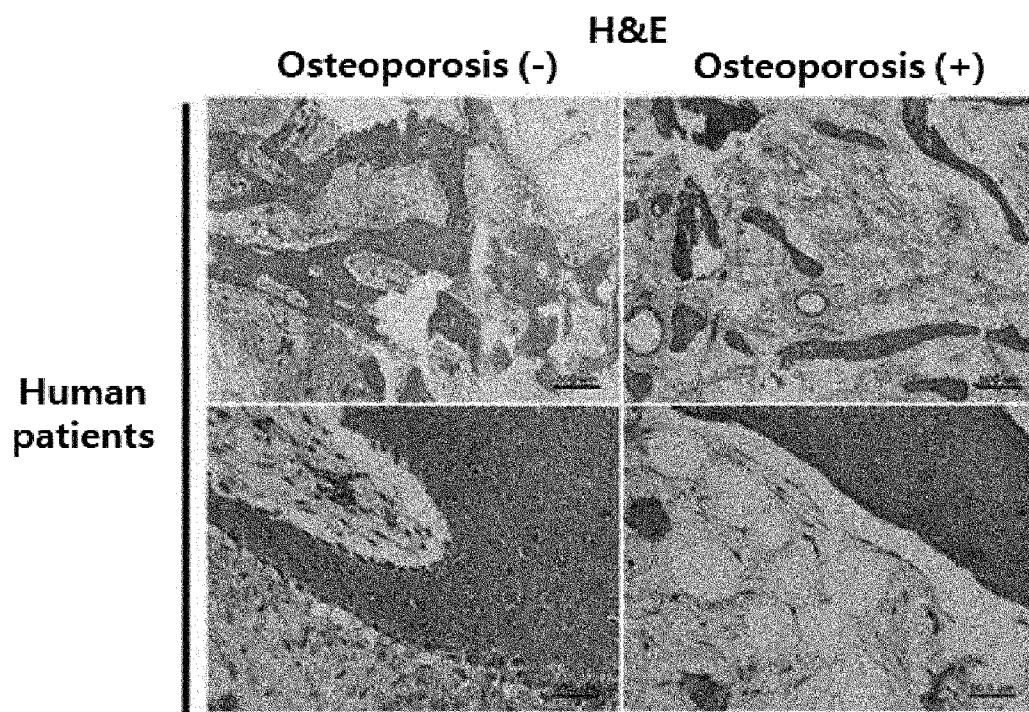
[Fig. 2a]



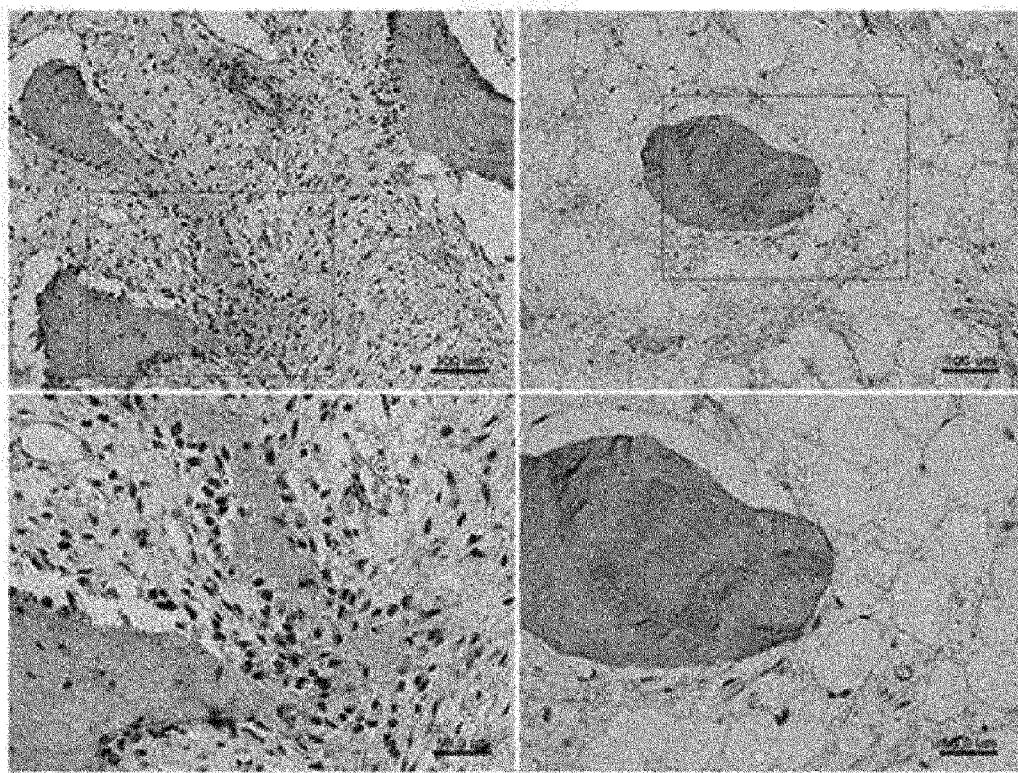
[Fig. 2b]



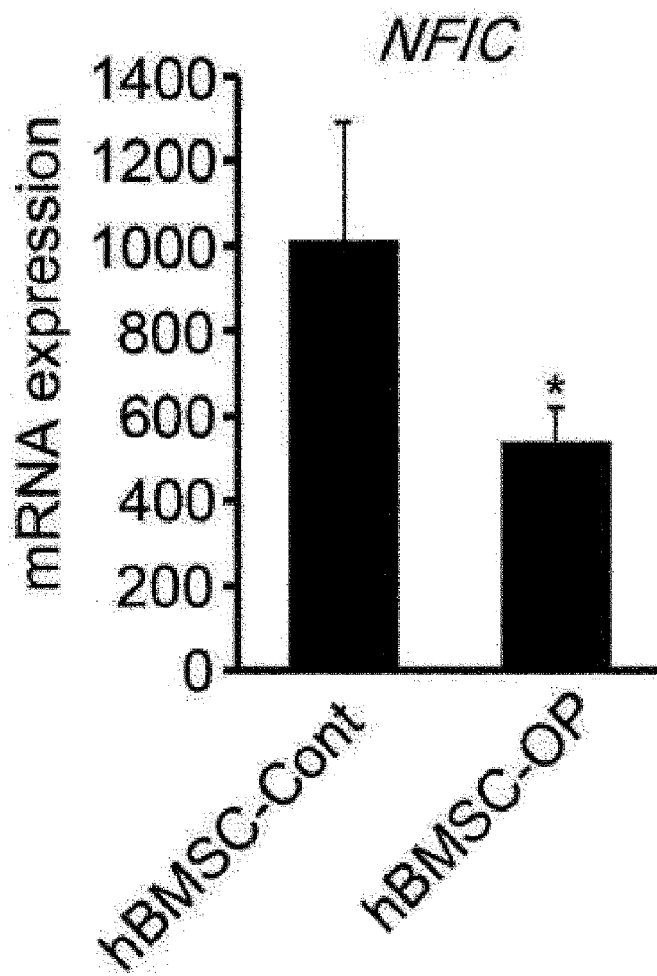
[Fig. 2c]



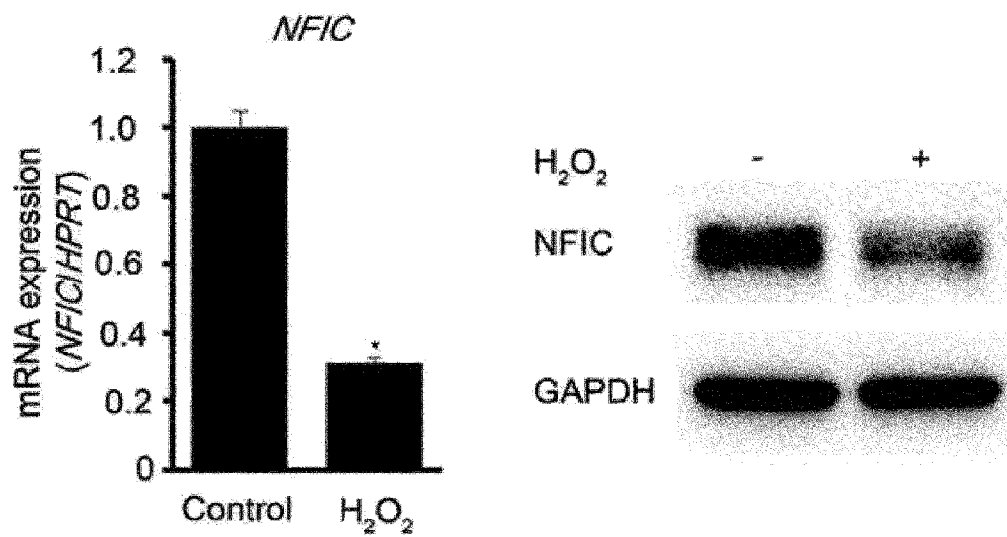
[Fig. 2d]

IHC: NFIC**Osteoporosis (-)****Osteoporosis (+)**

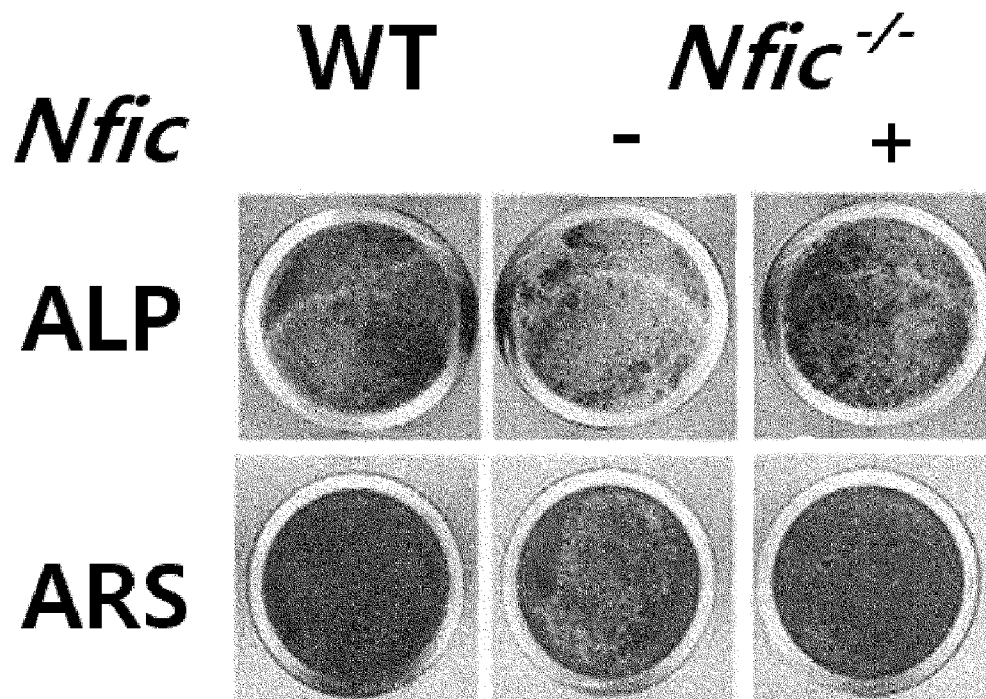
[Fig. 2e]



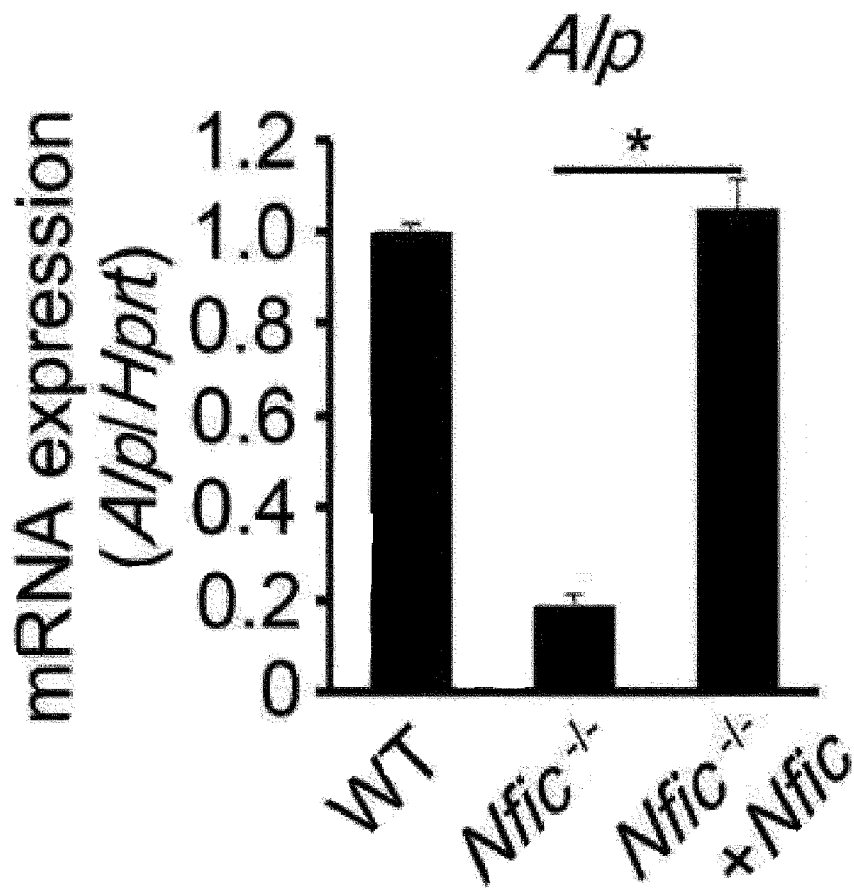
[Fig. 2f]



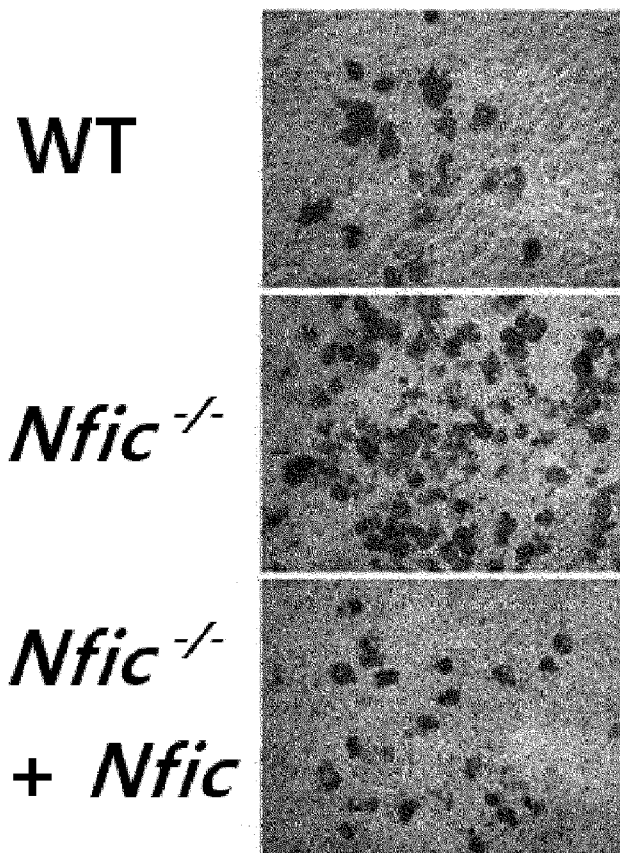
[Fig. 3a]



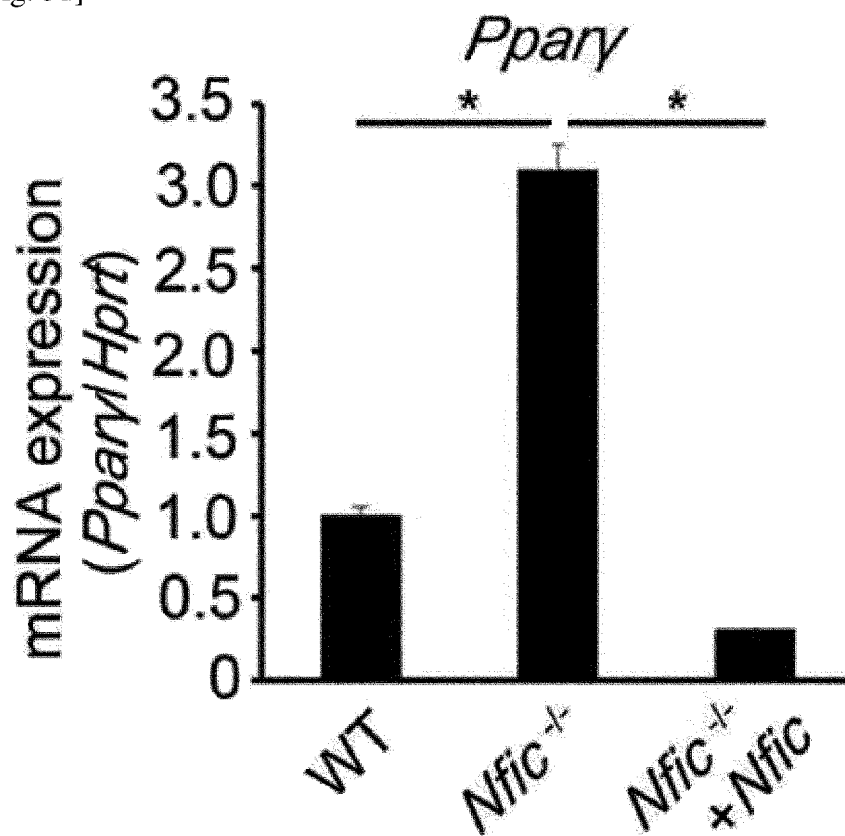
[Fig. 3b]



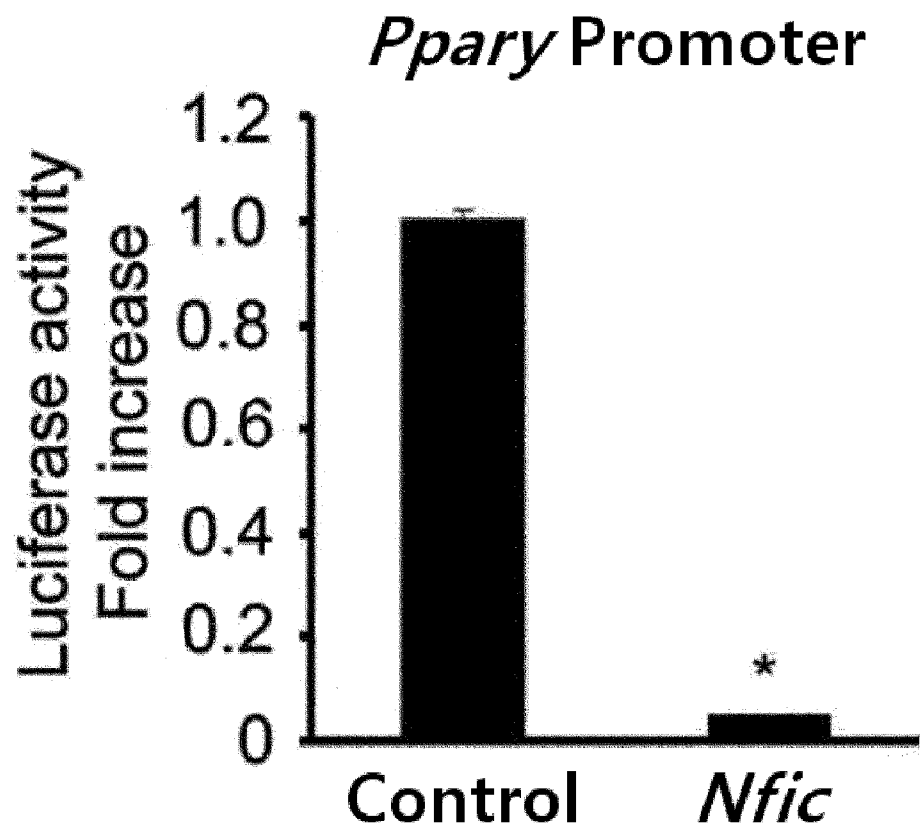
[Fig. 3c]



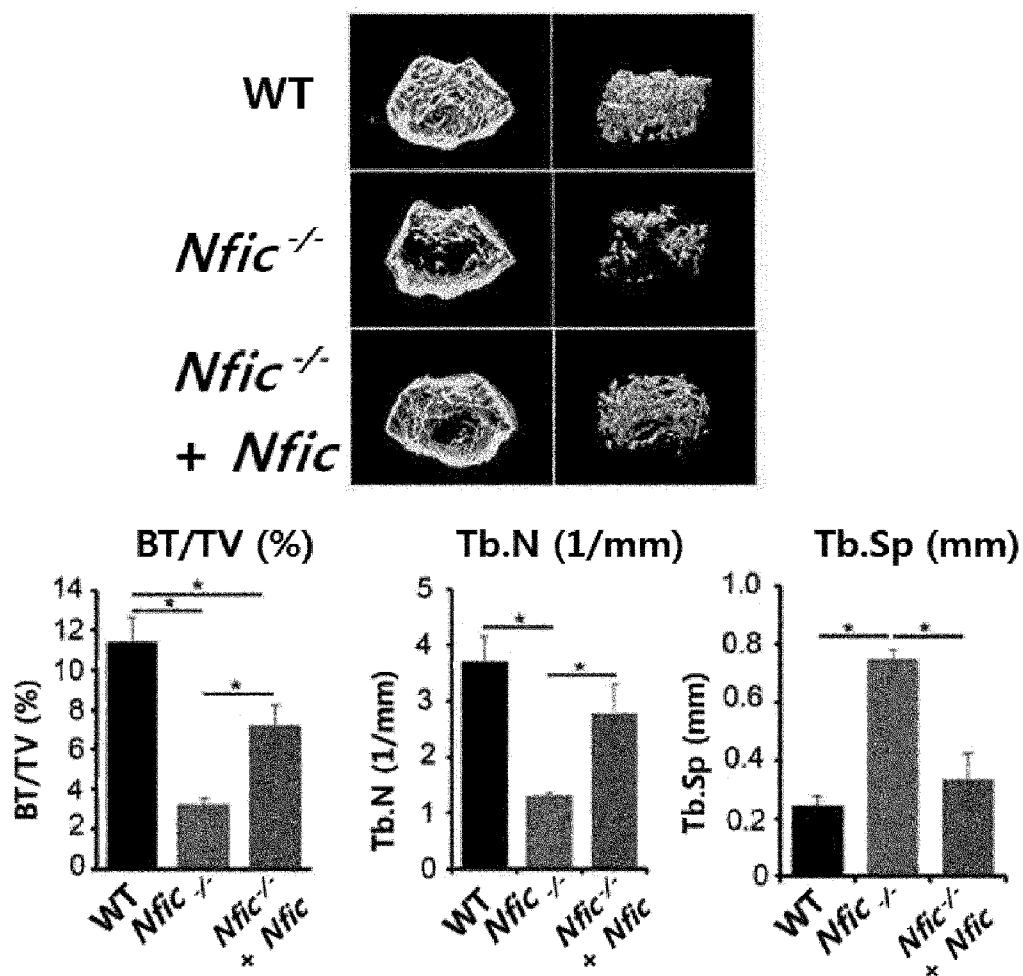
[Fig. 3d]



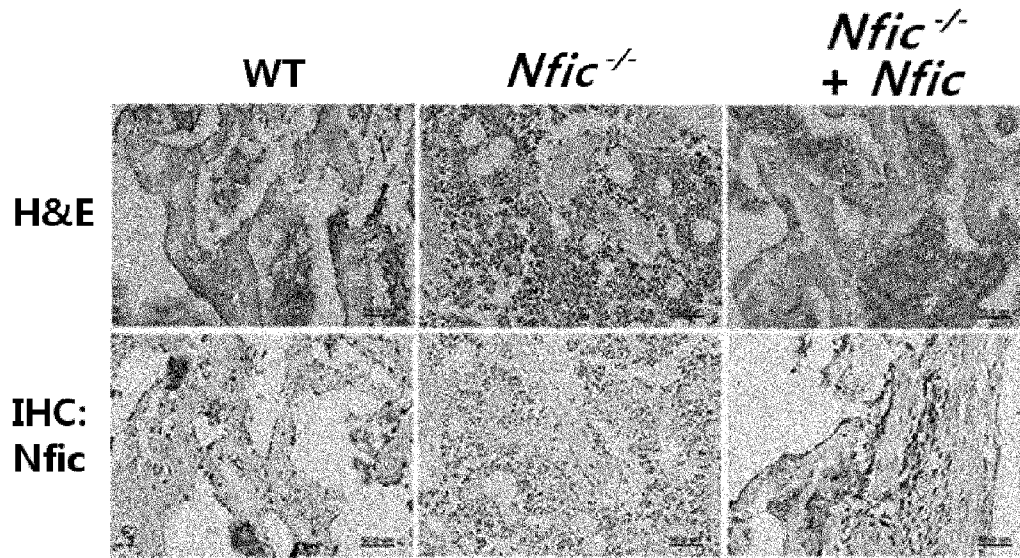
[Fig. 3e]



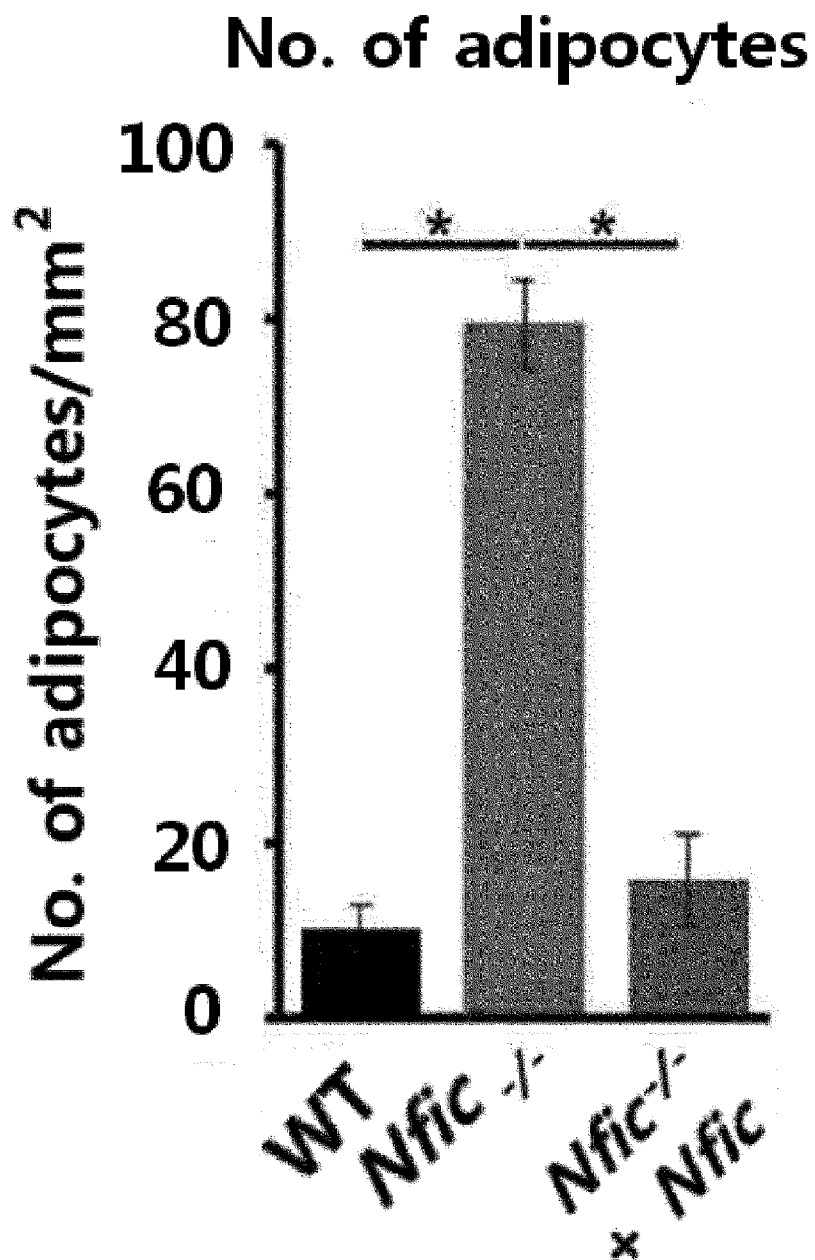
[Fig. 3f]



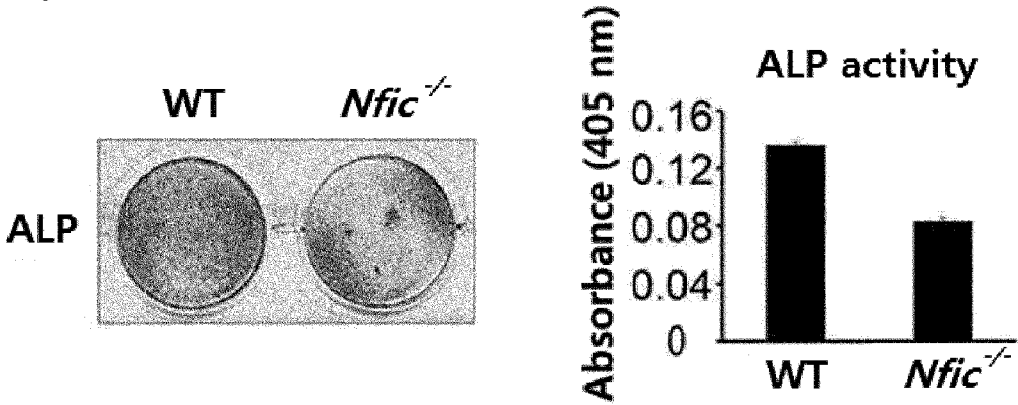
[Fig. 3g]



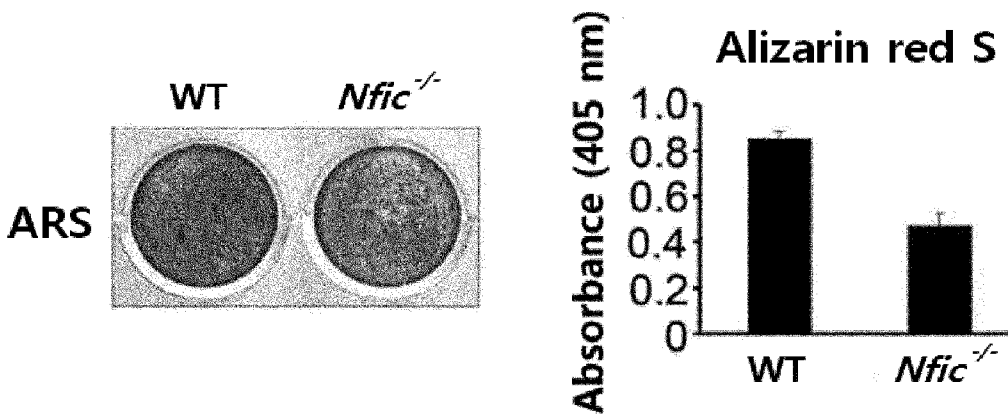
[Fig. 3h]



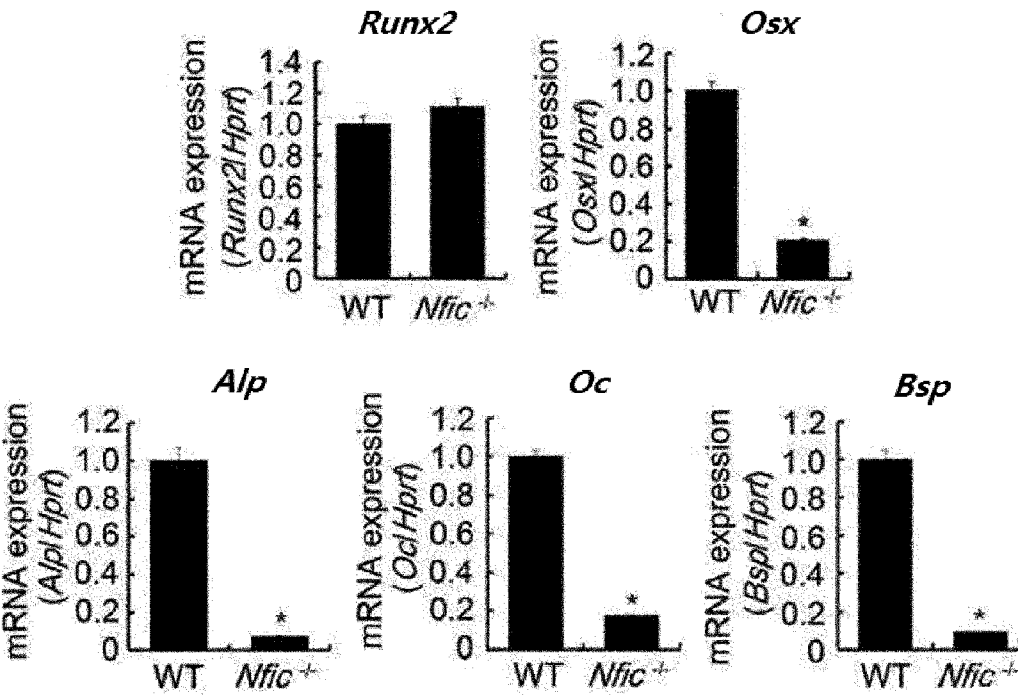
[Fig. 4a]



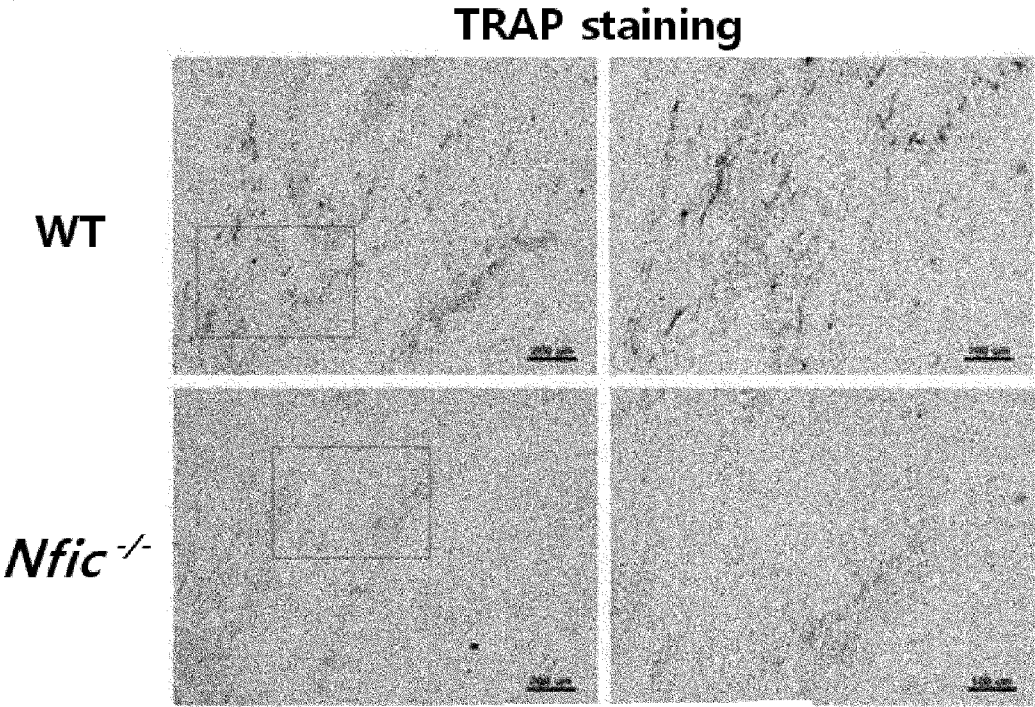
[Fig. 4b]



[Fig. 4c]



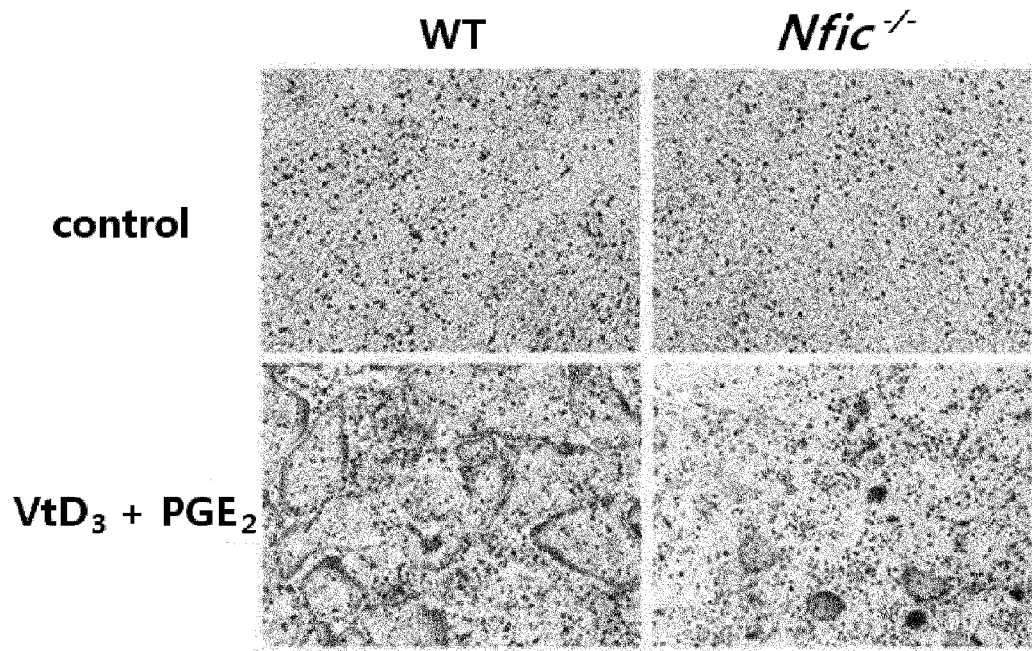
[Fig. 4d]



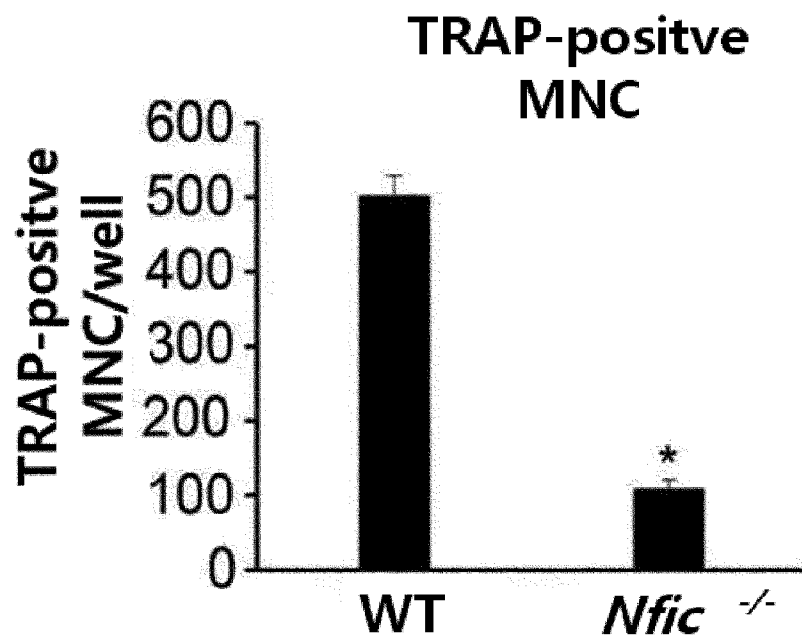
[Fig. 4e]

	WT	<i>Nfic</i> ^{-/-}
N.Oc/T.Ar (%) ± SD	10.39 ± 2.66	3.94 ± 0.62*
N.Oc/B.Pm (Oc/mm) ± SD	4.76 ± 0.19	1.76 ± 0.39*
Oc.S/BS (%) ± SD	22.84 ± 2.22	10.96 ± 1.79*

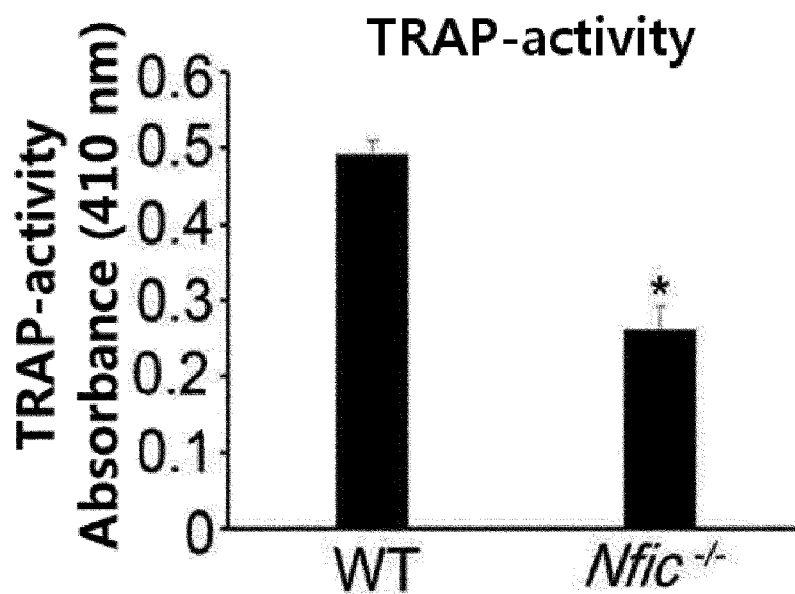
[Fig. 4f]



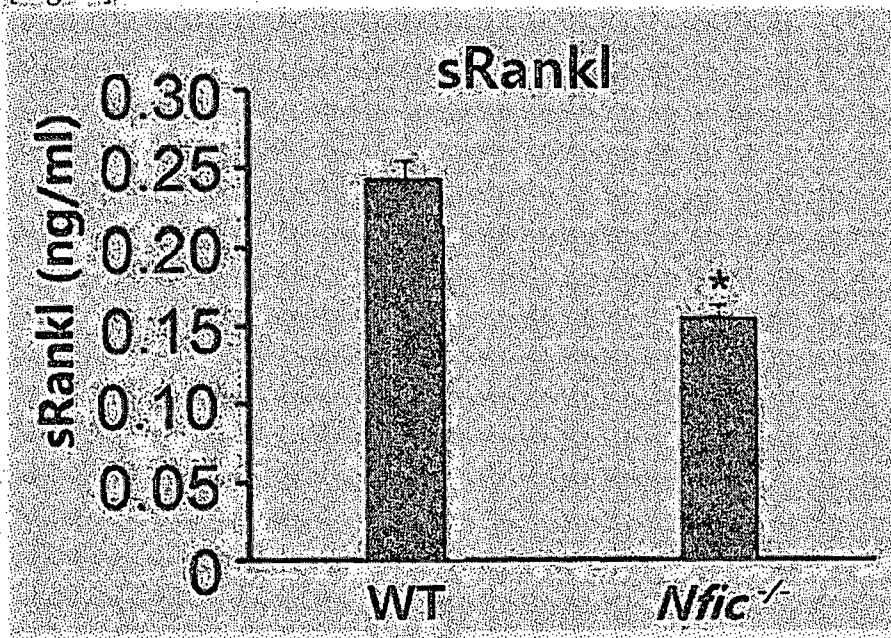
[Fig. 4g]



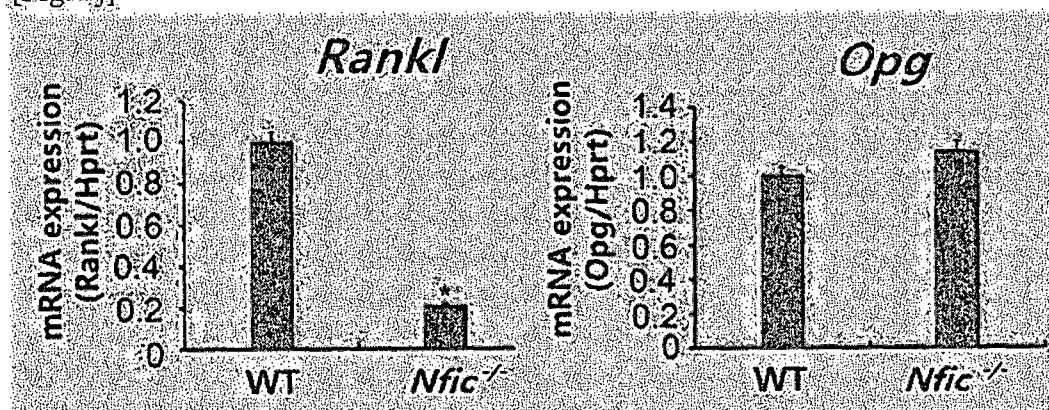
[Fig. 4h]



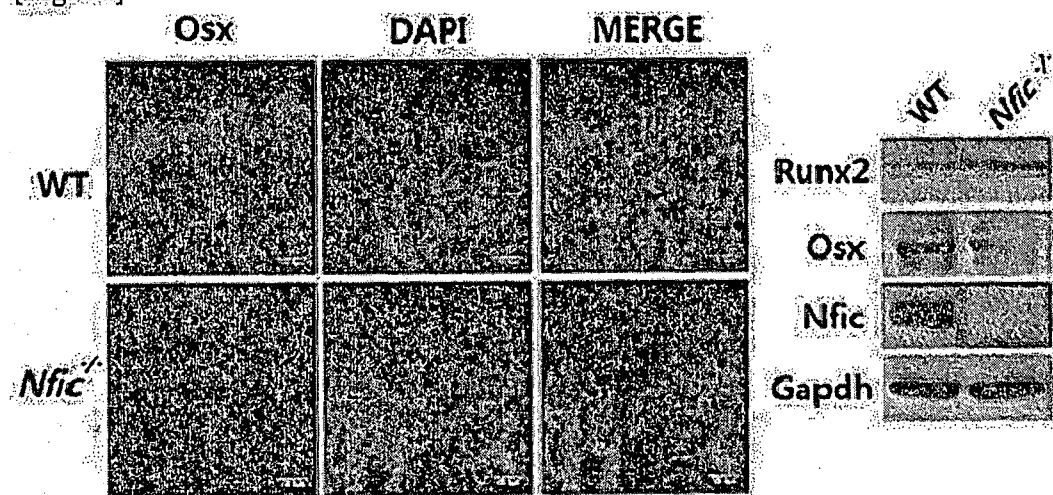
[Fig. 4i]



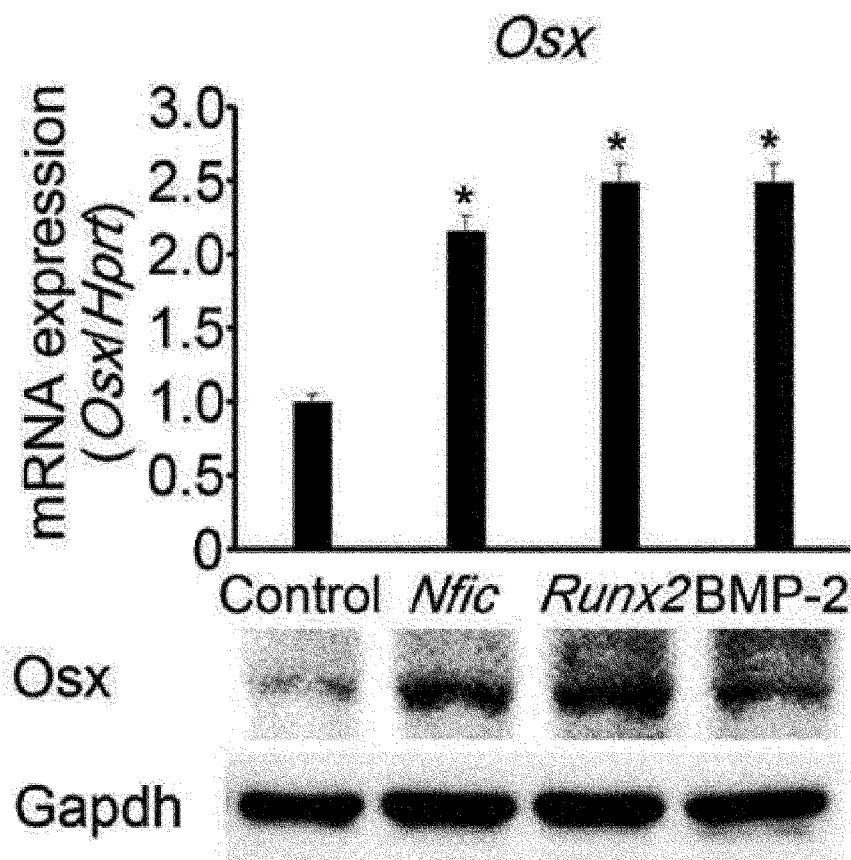
[Fig. 4j]



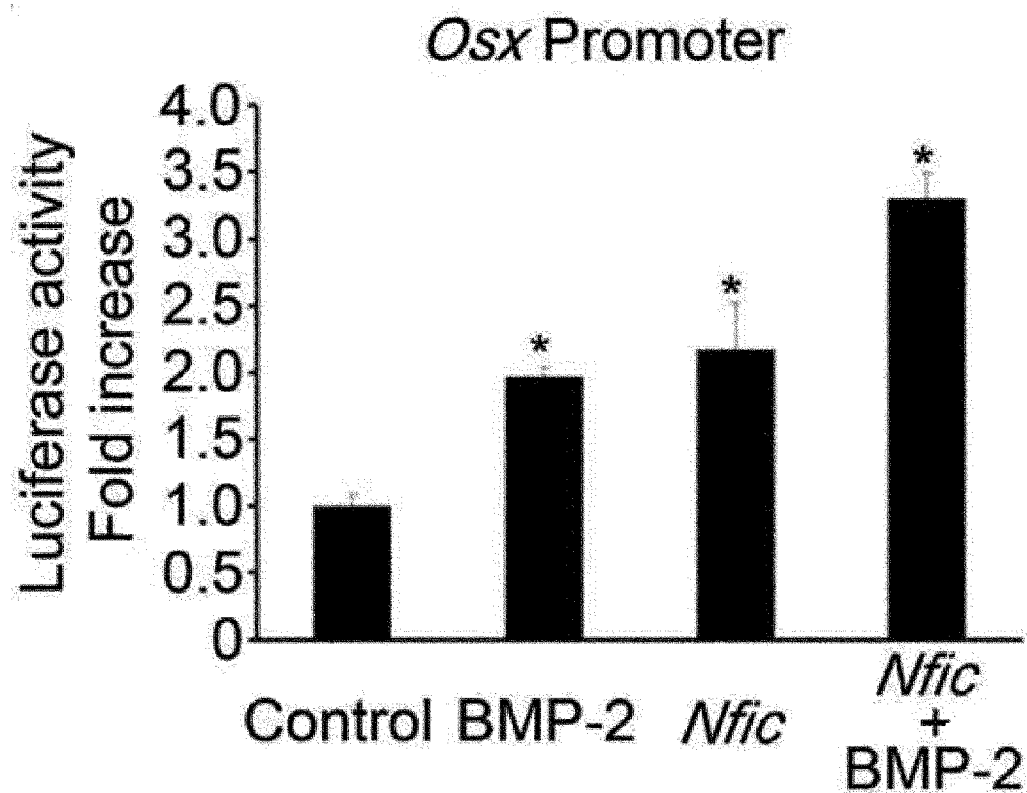
[Fig. 5a]



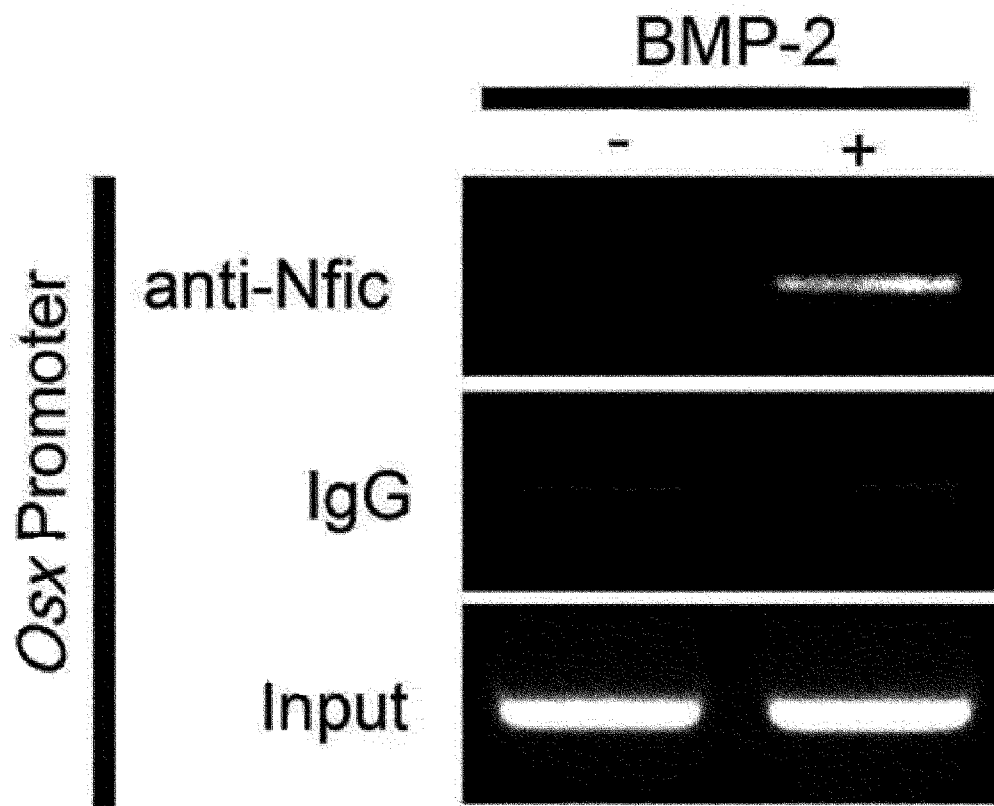
[Fig. 5b]



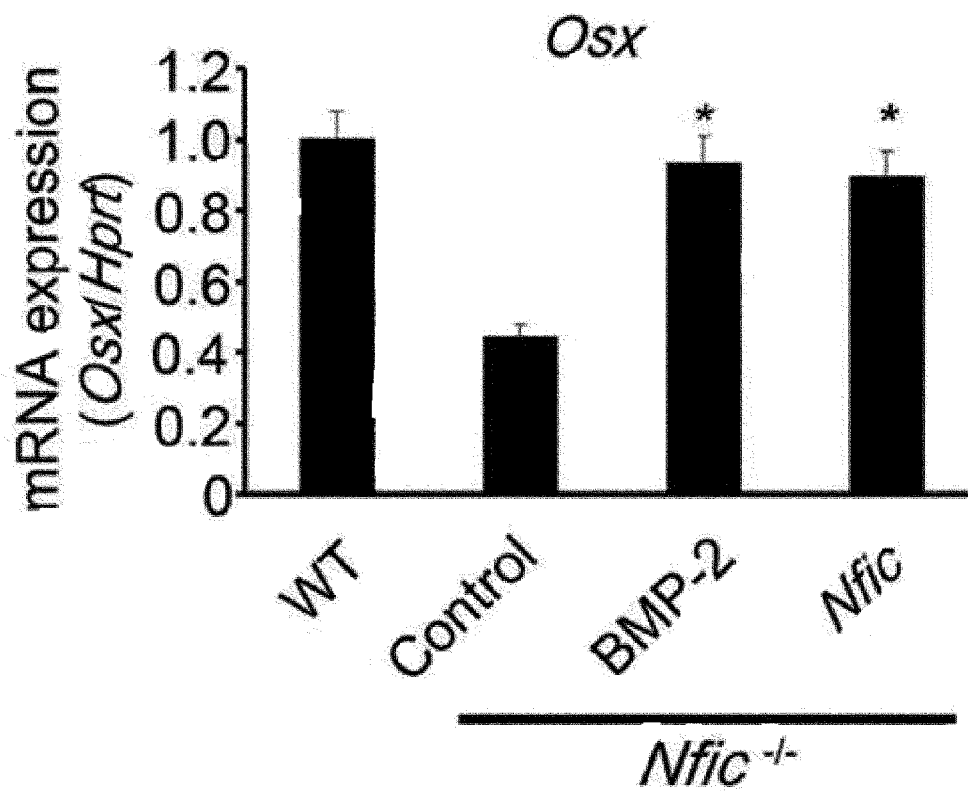
[Fig. 5c]



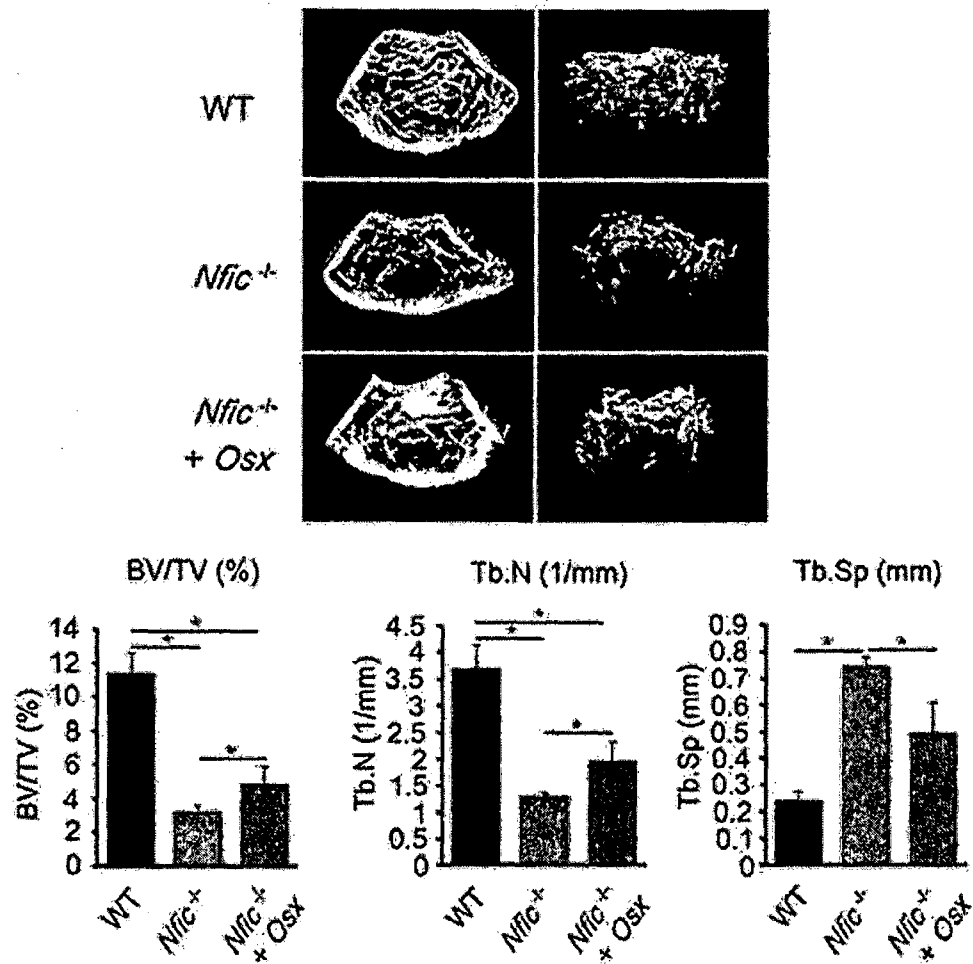
[Fig. 5d]



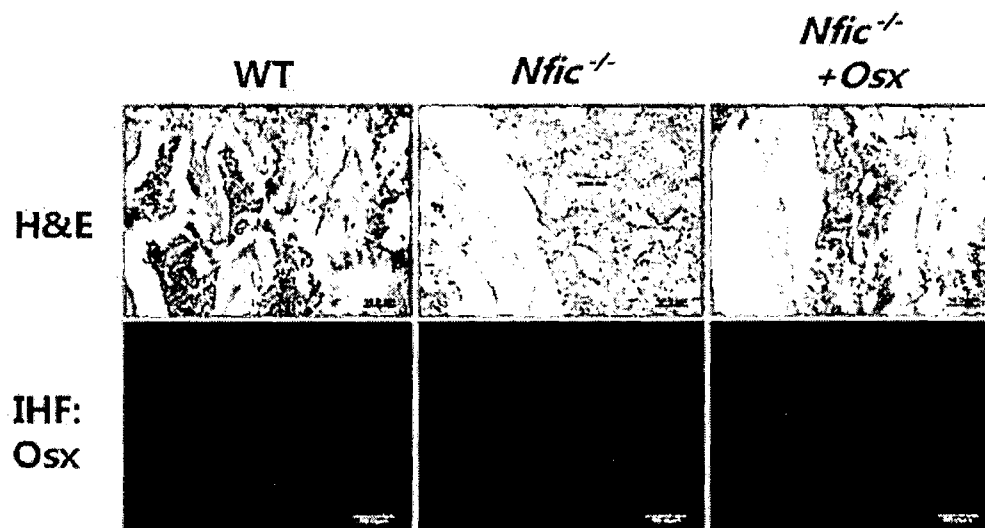
[Fig. 5e]



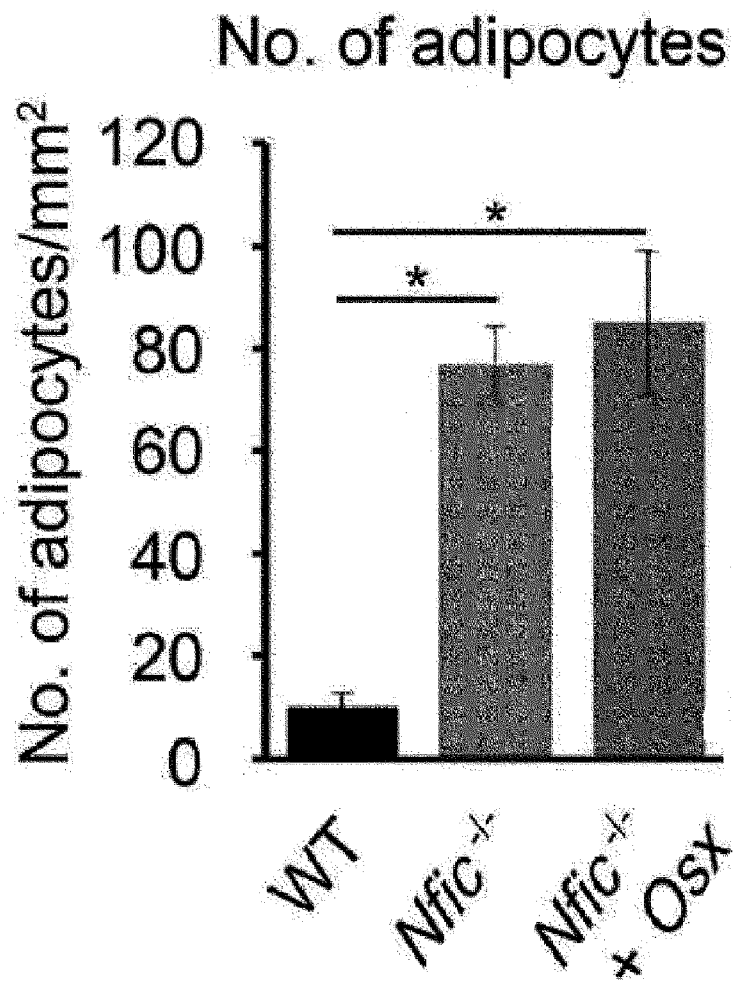
[Fig. 5f]



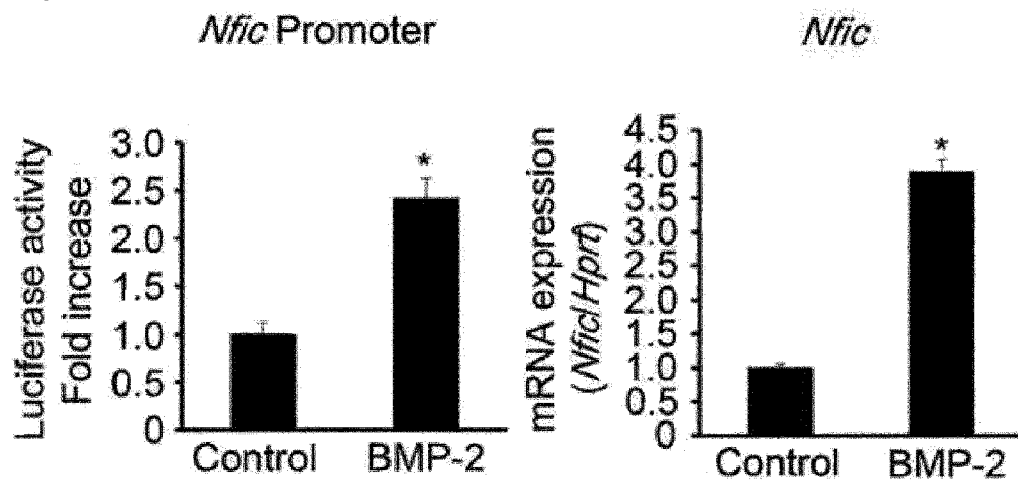
[Fig. 5g]



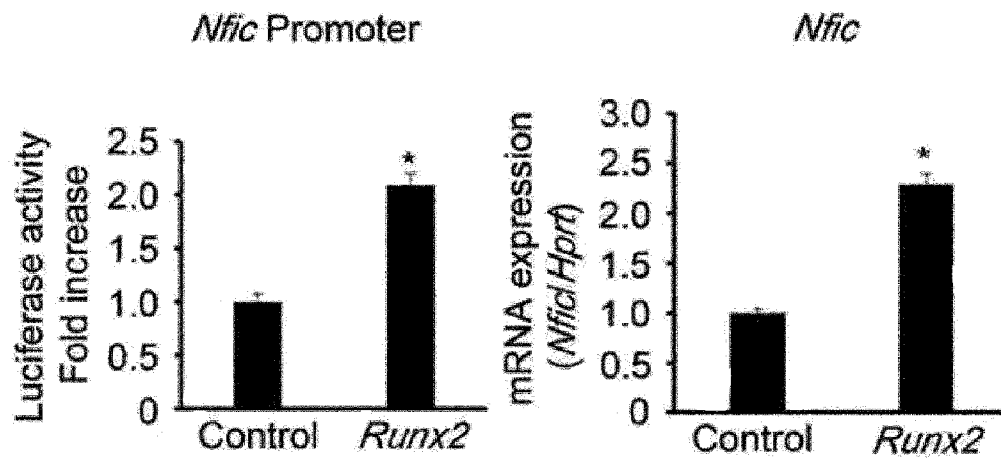
[Fig. 5h]



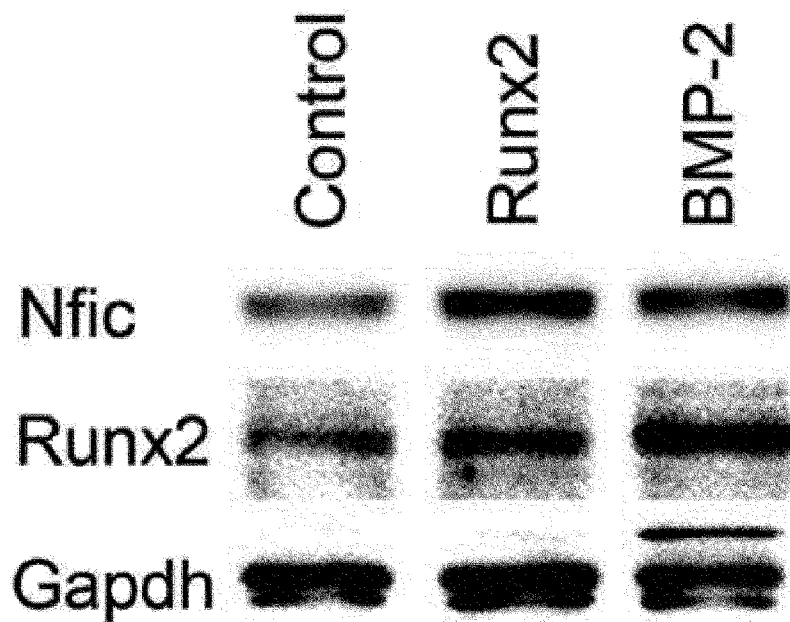
[Fig. 6a]



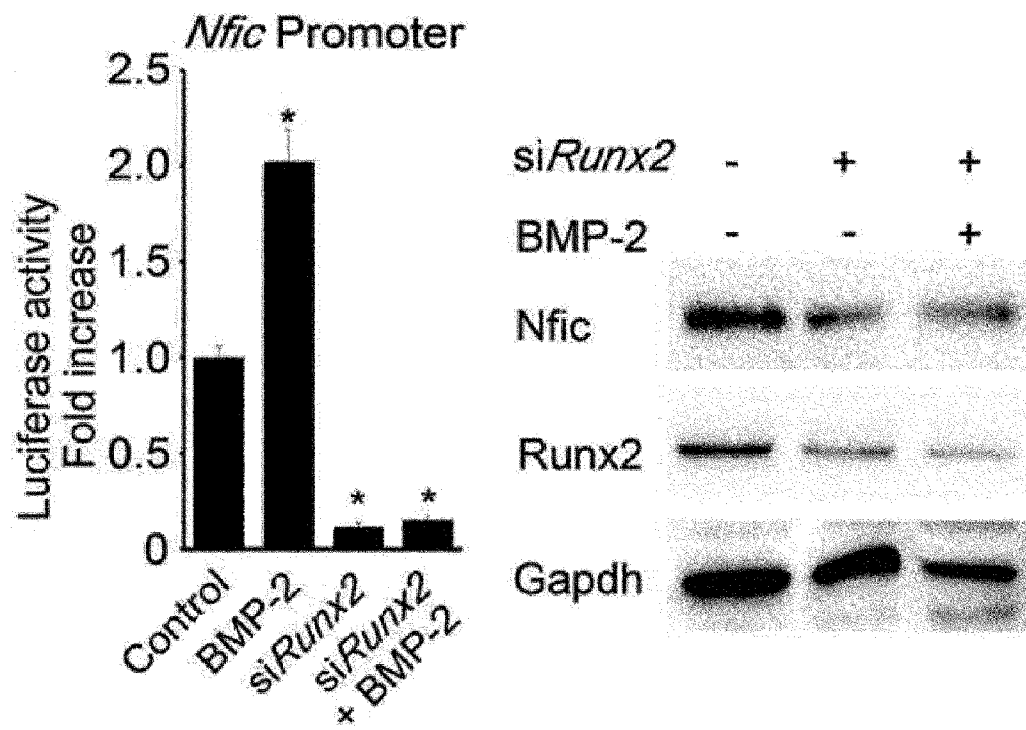
[Fig. 6b]



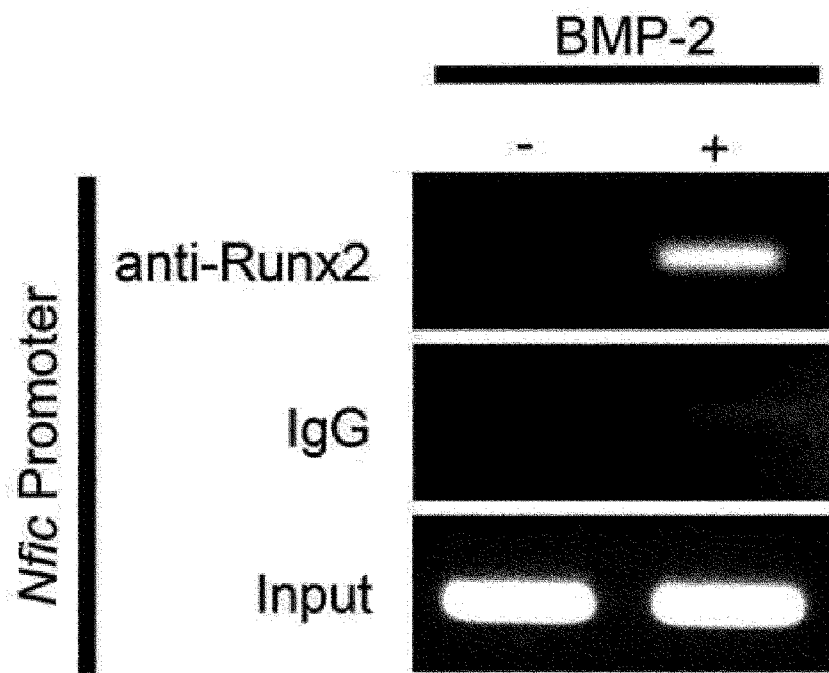
[Fig. 6c]



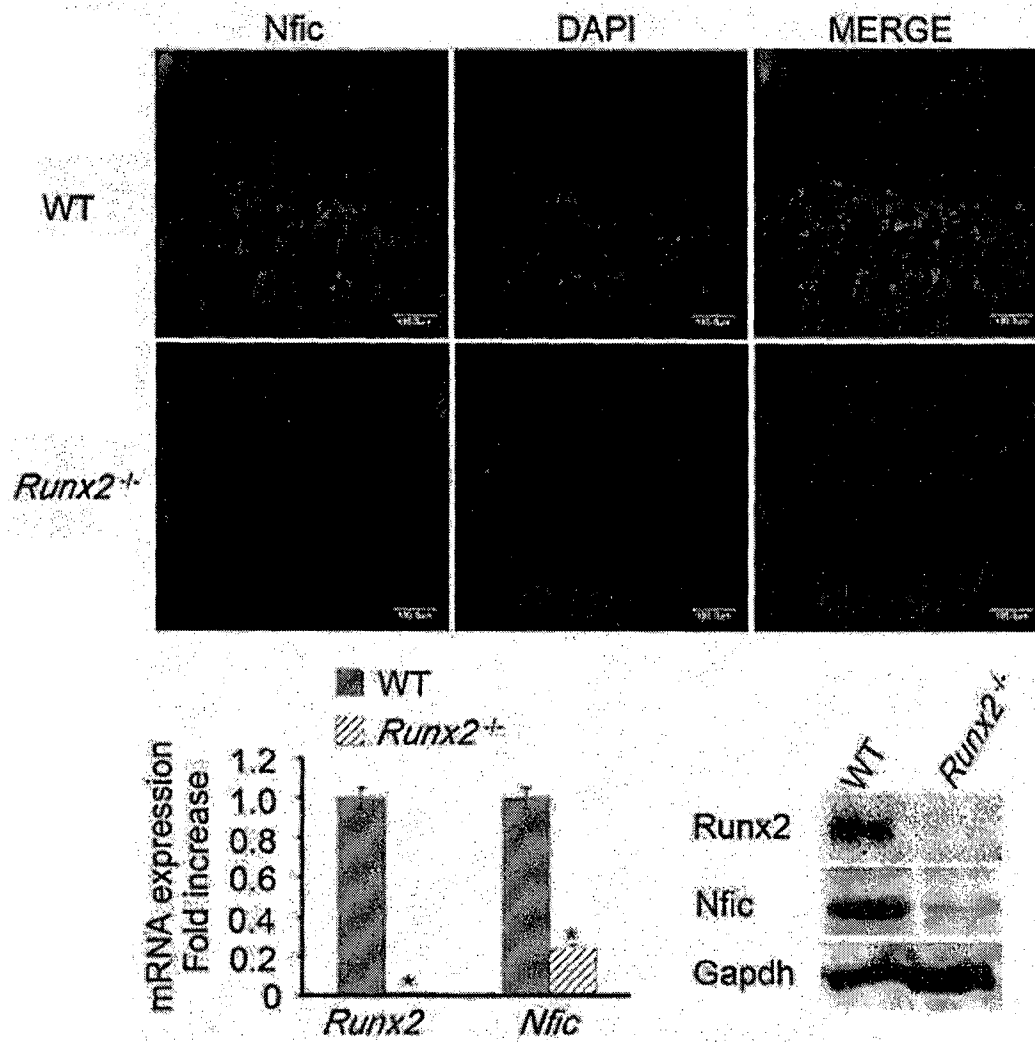
[Fig. 6d]



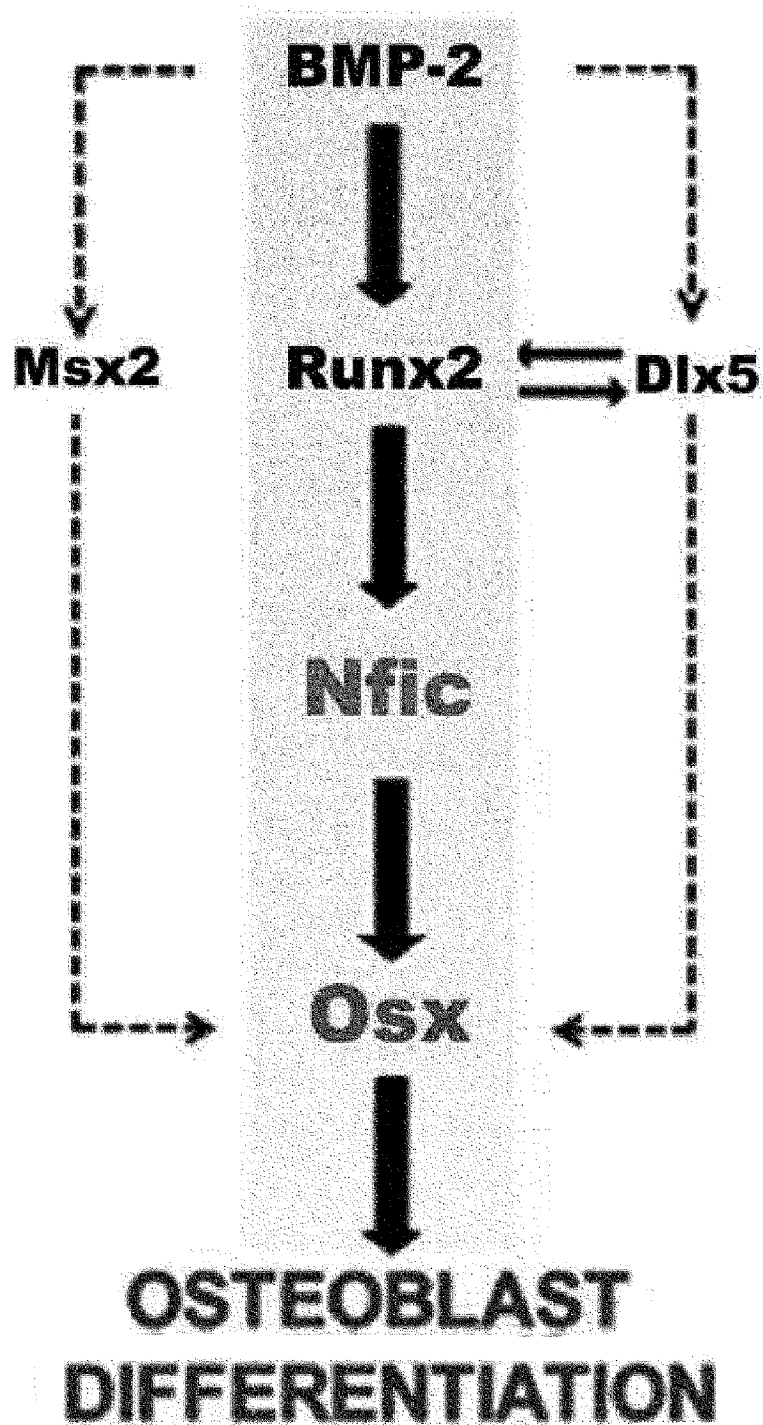
[Fig. 6e]



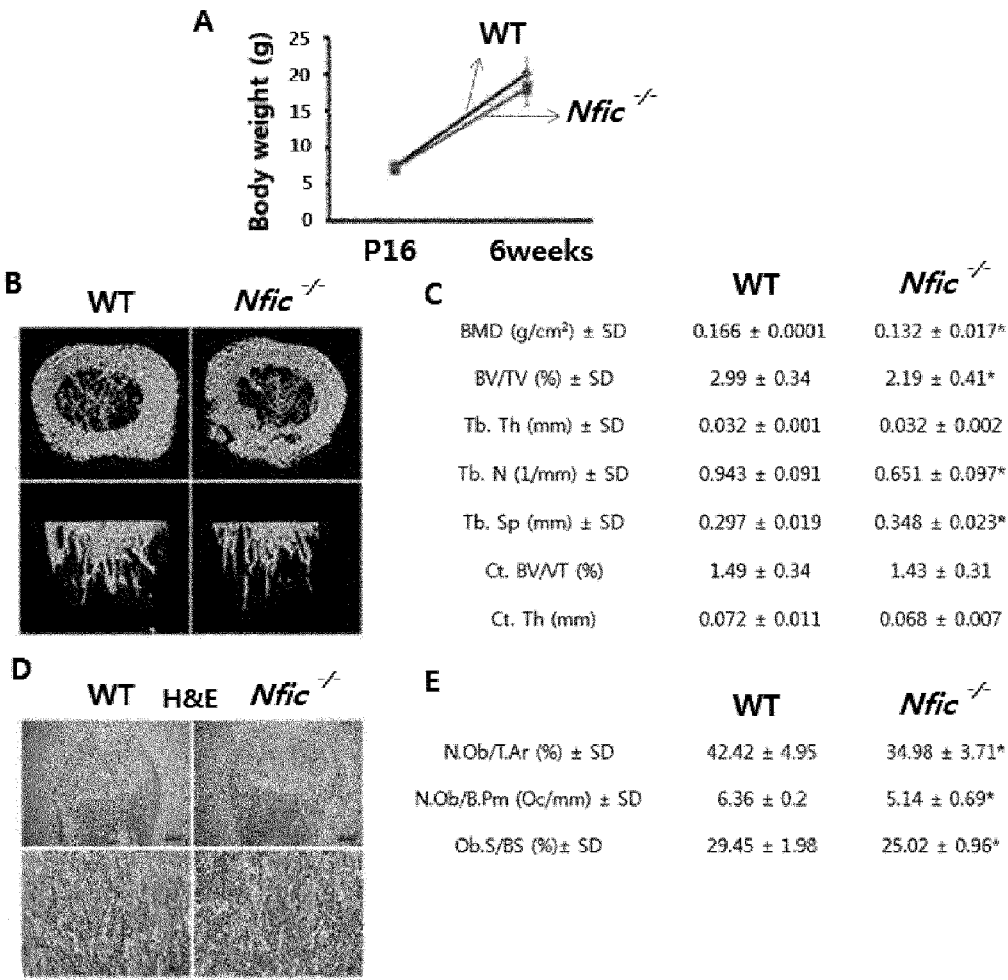
[Fig. 6f]



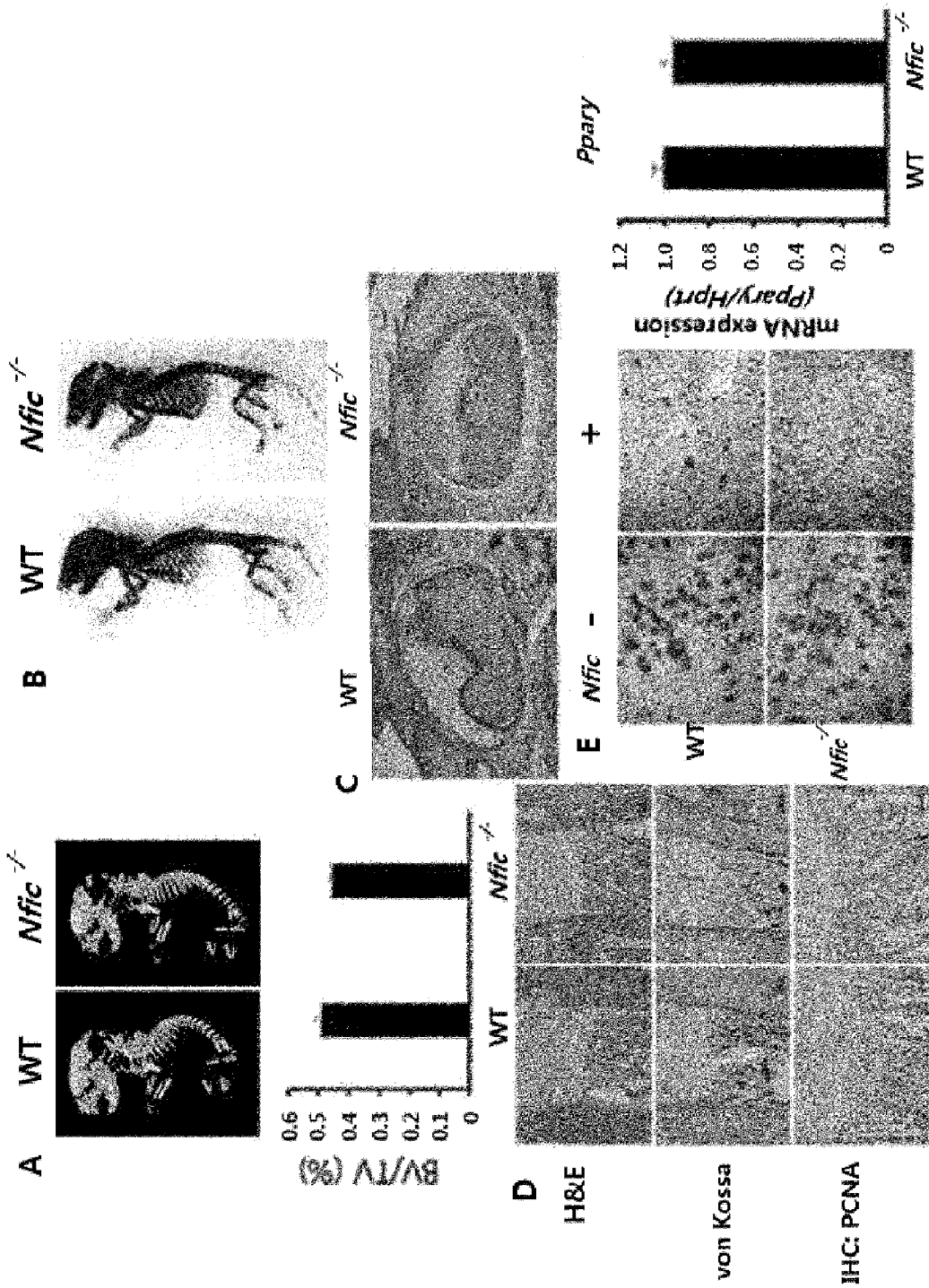
[Fig. 6g]



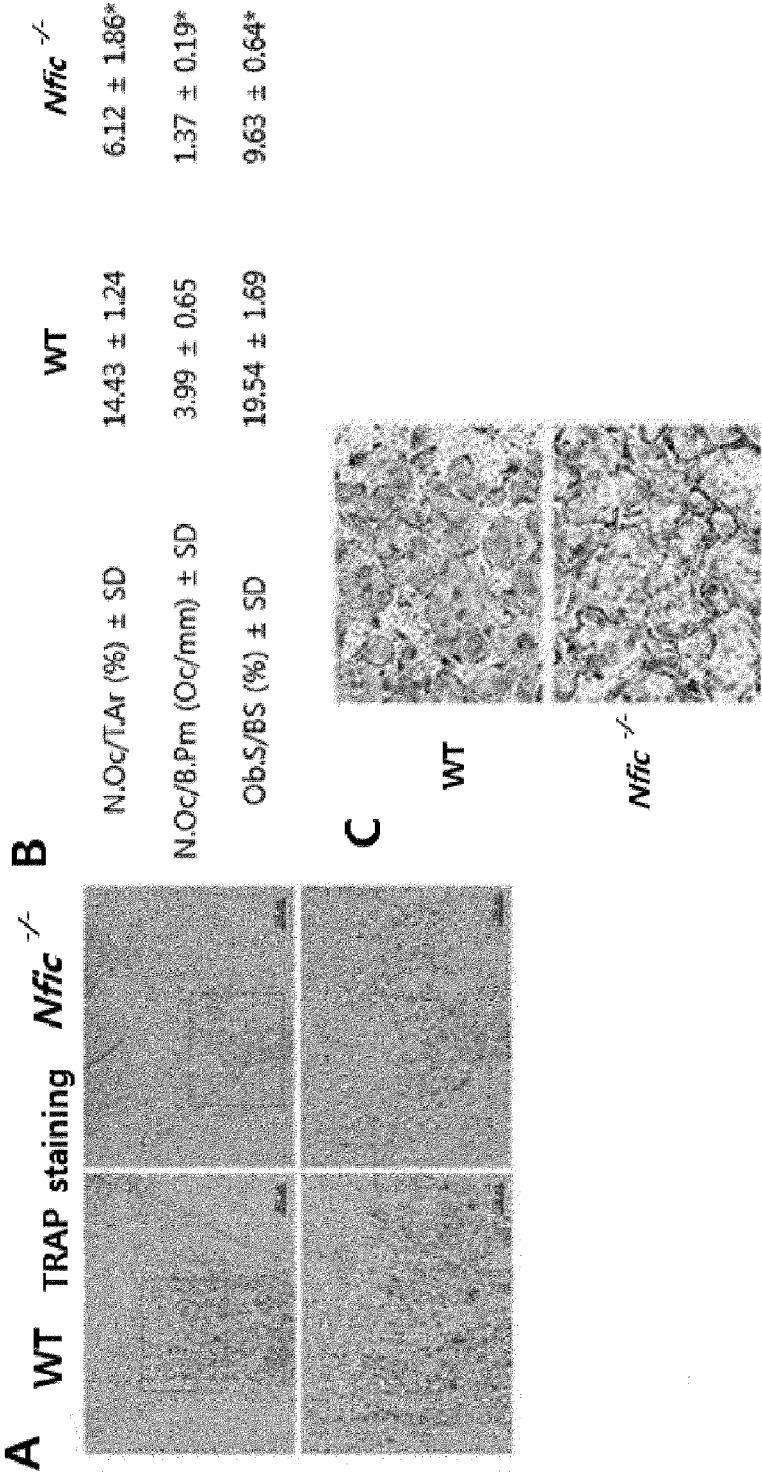
[Fig. 7]



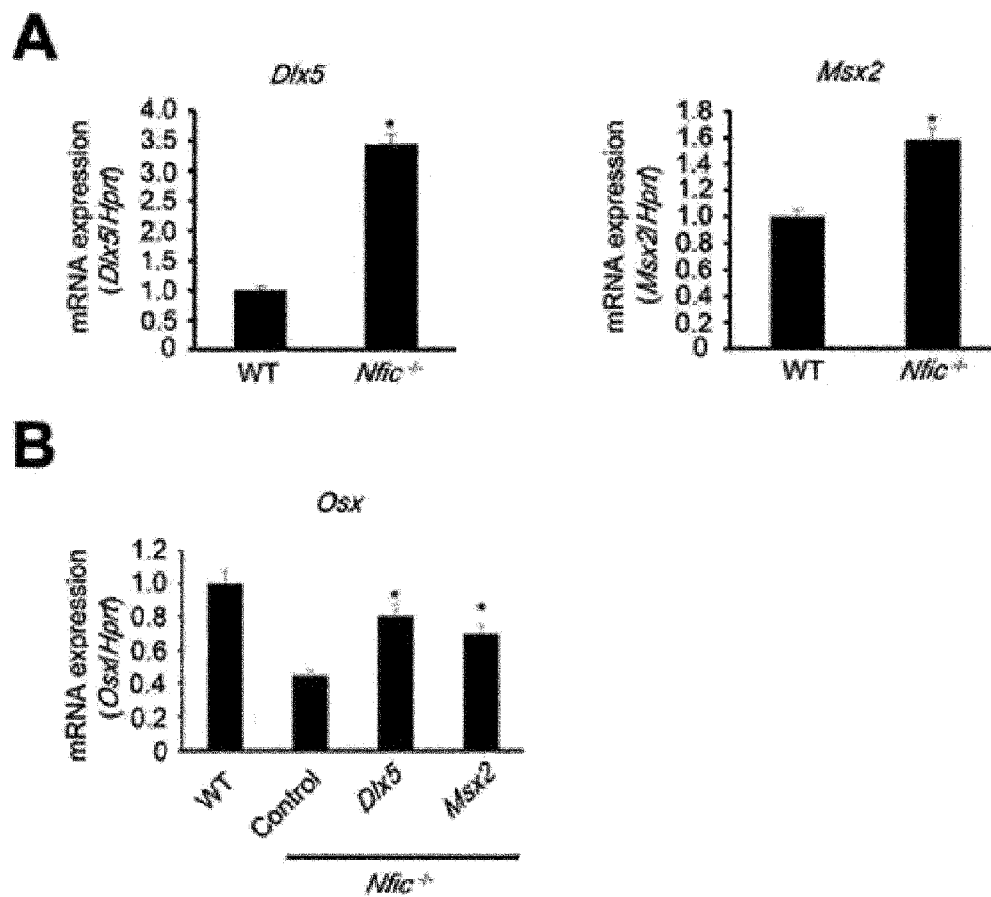
[Fig. 8]



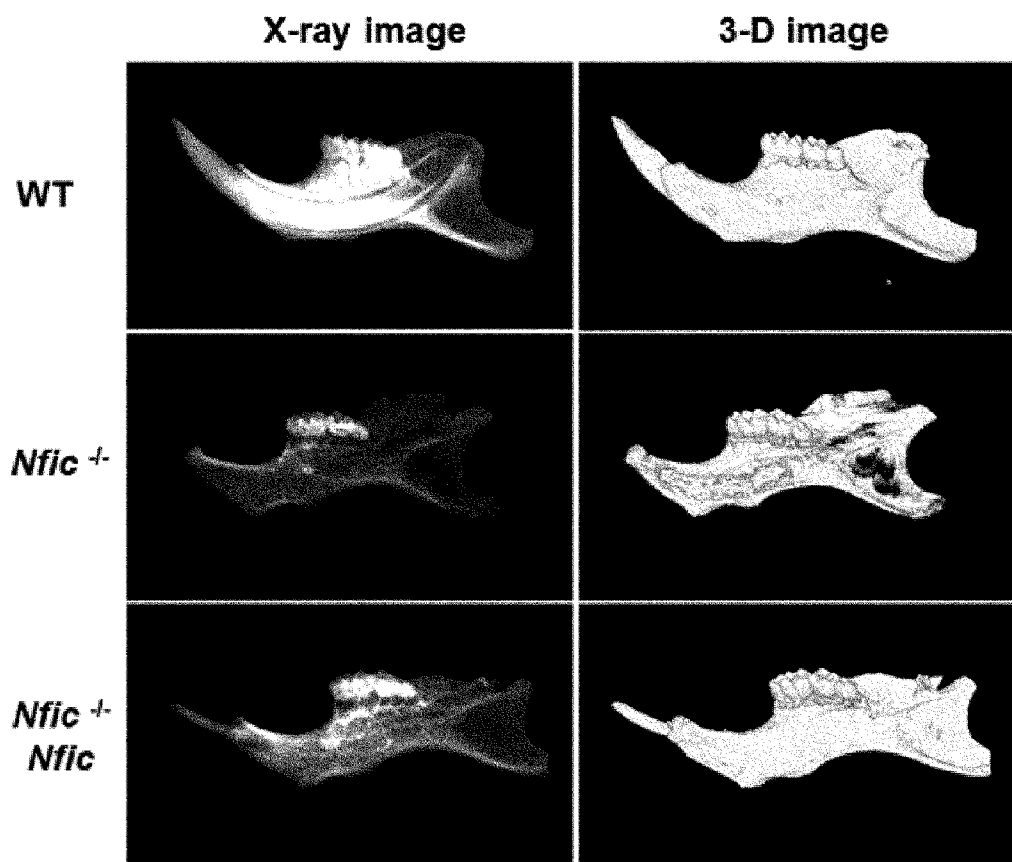
[Fig. 9]



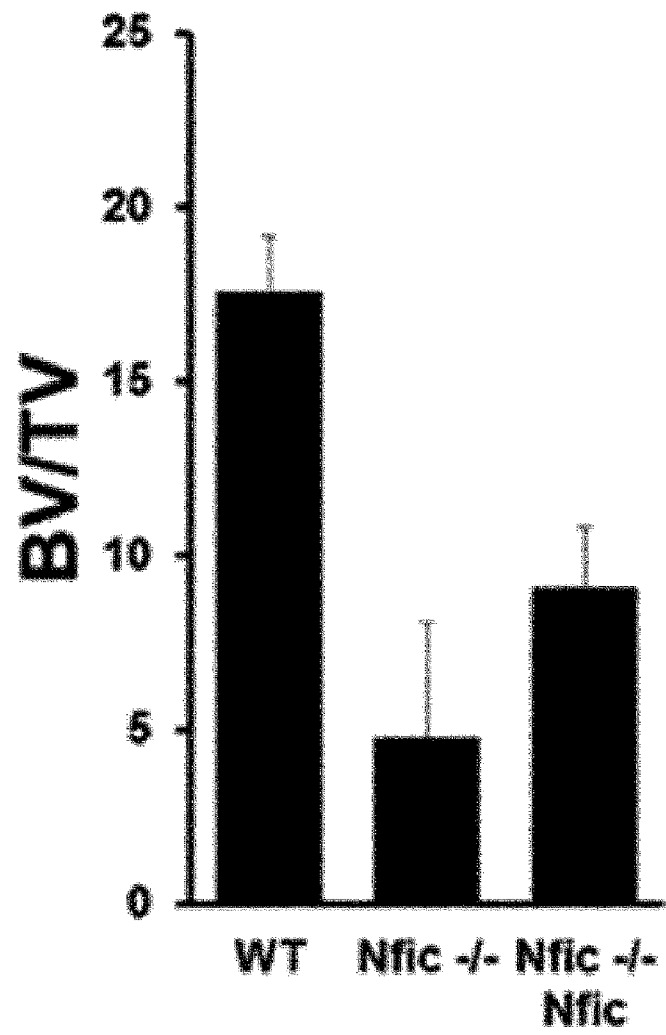
[Fig. 10]



[Fig. 11a]



[Fig. 11b]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/011299

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/17(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 19/10(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/17; A61K 48/00; A61P 19/10; A61Q 19/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: NFI-C, osteoblast

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LEE, D. et al., "541 Role of NFI-C during osteoblast differentiation and osteogenesis", IADR(The International Association for Dental Research)/ LAR(Latin America Region) GENERAL SESSION, Iguacu falls, BRAZIL, Published on Poster, 21 June 2012, https://iadr.confex.com/iadr/2012rio/webprogram/Paper162523.html See abstract.	1-10,12
Y		11
Y	GIMBLE, J. M. et al., Playing with bone and fat, JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, 2006 vol. 98, pages 251-266. See abstract.	11
A		1-10,12
X	STEELE-PERKINS, G., et al., Essential Role for NFI-C/CTF Transcription-Replication Factor in Tooth Root Development, MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, February 2003, vol. 23, no. 3, pages 1075-1084. See pages 1079-1080.	1-10,12
Y		11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 MARCH 2015 (13.03.2015)

Date of mailing of the international search report

20 MARCH 2015 (20.03.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/011299

Patent document
cited in search report

Publication
date

Patent family
member

Publication
date

NONE

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/17(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 19/10(2006.01)i, A61Q 19/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 38/17; A61K 48/00; A61P 19/10; A61Q 19/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: NFI-C, Osteoblast

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	LEE, D. 외 3인, '541 Role of NFI-C during osteoblast differentiation and osteogenesis', IADR(The International Association for Dental Research)/LAR(Latin America Region) GENERAL SESSION, Iguacu falls, BRAZIL, 포스터 발표, 2012. 06. 21, https://iadr.confex.com/iadr/2012rio/webprogram/Paper162523.html 초록 참조.	1-10,12
Y		11
Y	GIMBLE, J. M. 외 4인, Playing with bone and fat, JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY, 2006년, 제98권, 251-266면. 요약 참조.	11
A		1-10,12
X	STEELE-PERKINS, G., 외 6인, Essential Role for NFI-C/CTF Transcription-Replication Factor in Tooth Root Development, MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY, Feb. 2003, 제23권, 제3호, 1075-1084면. 1079-1080면 참조.	1-10,12
Y		11

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 03월 13일 (13.03.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 03월 20일 (20.03.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

대한민국 특허청
(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 ++82 42 472 7140

심사관

이수정

전화번호 +82-42-481-8158



국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음