



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0052099
(43) 공개일자 2017년05월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/713 (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/115 (2010.01)
C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)

(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0154105
(22) 출원일자 2015년11월03일
심사청구일자 2015년11월03일

(71) 출원인
재단법인대구경북과학기술원
대구 달성군 현풍면 테크노중앙대로 333,

(72) 발명자
김은주
대구광역시 수성구 범안로 40 105동 508호
김정희
대구광역시 달서구 비슬로 538길22, 101동 2005호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
이원희

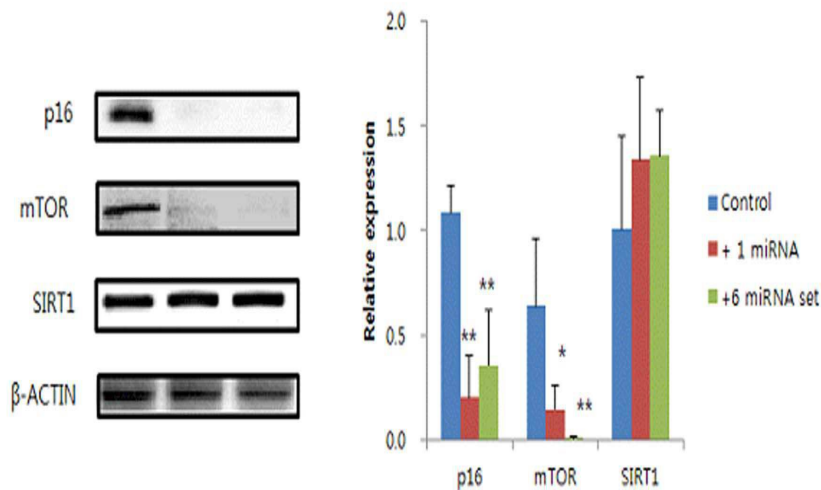
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 순환형 노화 마커를 이용한 역노화 유도 방법

(57) 요약

본 발명은 순환계에 존재하는 노화마커를 발굴하여 특정장기의 역노화를 유도하는 기술에 관한 것으로, 2, 6 및 12개월의 마우스 전혈에서 microRNA를 분리한 후 NGS 분석을 수행하여 연령에 따라 일관성 있게 변하는 27개의 microRNA를 선별하였으며, 상기 27개의 microRNA 중 암, 기관손상 및 이상, 생식기관 질환에 관여하는 네트워크에 포함되는 10개의 microRNA를 선별하고, 이들이 관여하는 조절 단백질을 분석한 결과, 6종의 microRNA를 선별하였으며, 상기 6종의 microRNA이 노화에 따라 발현이 유의하게 감소되며, 상기 microRNA를 유전자 조절 물질로 마우스에 투여한 결과, 간에서 상기 microRNA 발현이 증가하고, 노화 관련 표지 단백질의 발현이 증가함을 확인함으로써, 본 발명의 microRNA는 역노화용 약학적 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/115 (2013.01)
C12Q 1/6876 (2013.01)
G01N 33/5008 (2013.01)
C12Q 2525/205 (2013.01)

최은숙

대구광역시 북구 연암공원로 13길 2-27, 서당골 빌라501호

이보람

대구광역시 달성군 테크노중앙대로 333 DGIST 기숙사H101동 320호

(72) 발명자

전원배

대구광역시 달성군 테크노중앙대로 333 DGIST R2, 404호

이경민

대구광역시 달서구 달서대로 719, 110동 301호

최성균

대구광역시 달성군 테크노중앙대로 333 DGIST R2, 403호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	15-NB-01
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	대구경북과학기술원
연구사업명	대구경북과학기술원연구운영비지원(0.5)
연구과제명	동물 세포 노화 기전 연구
기여율	70/100
주관기관	대구경북과학기술원
연구기간	2015.01.01 ~ 2015.12.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	15-BD-06
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	대구경북과학기술원
연구사업명	대구경북과학기술원연구운영비지원(0.5)
연구과제명	신경세포 노화 재생 기전연구
기여율	30/100
주관기관	대구경북과학기술원
연구기간	2015.01.01 ~ 2015.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p 으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA를 유효성분으로 포함하는 역노화용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 microRNA-16-5p는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 역노화용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 microRNA-130b-3p는 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 역노화용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 microRNA-17-5p는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 역노화용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 microRNA-103-3p는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 역노화용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 microRNA-21a-5p는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 역노화용 약학적 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 microRNA-30a-5p는 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는 역노화용 약학적 조성물.

청구항 8

microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p 으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA를 유효성분으로 포함하는 노화형 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 노화형 질환은 간 지방증, 당뇨병, 고혈압 및 치매로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 노화형 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p 으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA에 상보적으로 결합하는 DNA 프로브 또는 앵타머를 포함하는 노화 또는 노화형 질환 진단 또는 모니터링용 키트.

청구항 11

microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p 으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA에 상보적이고, 증폭할 수 있는 DNA 프라이머를 포함하는 노화 또는 노화형 질환 진단 또는 모니터링용 키트.

청구항 12

- 1) 시험관 내에서 피검체에서 분리된 시료에서 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- 2) 상기 단계 1)의 발현 수준이 감소할수록 노화 정도가 증가하거나 노화형 질환에 걸릴 위험성이 높은 것으로 판단하는 단계;를 포함하는 노화 또는 노화형 질환의 진단 또는 모니터링 방법.

청구항 13

- 1) microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA를 발현하는 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;
- 2) 상기 세포주에서 상기 microRNA의 발현정도를 측정하는 단계; 및
- 3) 상기 microRNA의 발현정도가 피검물질을 처리하지 않는 대조군에 비해 증가한 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 노화 또는 노화형 질환의 예방용 후보물질의 스크리닝 방법.

청구항 14

제 13항에 있어서, 단계 1)의 피검물질은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 노화 예방용 후보물질의 스크리닝 방법.

청구항 15

microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p 으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA를 포함하는 세포의 역노화 유도제.

청구항 16

microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p 으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA를 생체 외의 세포에 처리하여 세포의 역노화를 유도하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 순환계에 존재하는 노화 바이오마커를 발굴하여 특정 장기의 역노화를 유도하는 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 노화란 나이가 들면서 신체의 구조와 기능이 점진적으로 저하되고 질병과 사망에 대한 감수성이 급격히 증가하면서 쇠약해지는 과정이다.

[0004] 노화 현상을 대변하는 노화 지표는 주로 당뇨병, 고혈압, 치매 등 노화형 질환에 대한 지표를 분석하고, 그 기작을 연구하는데 집중되어 왔다. 따라서, 노화를 유도하는 물질의 저해인자 등을 처리하여 노화를 지연하는 항노화 기술이 발전되어 왔으며, 노화를 예측하고, 진단하고자 하는 방법에 관한 연구가 많이 시도되고 있다.

[0005] 예컨대, 대한민국 특허 출원번호 10-2009-0058459에서는 단백질 발현을 지표로 평가하는 노화 진단방법 및 노화 진단용 바이오마커에 관해 개시하고 있으며, 대한민국 특허 출원번호 10-2013-0031124에서는 단백질을 이용한 근육 노화를 진단할 수 있음을 개시하고 있다. 그러나, 상기와 같은 종래의 진단 방법은 온도, pH와 같은 주변 환경에 불안정한 단백질을 이용한 진단 방법으로, 일관성있는 결과를 얻는데 어려움이 있다.

[0007] 항노화란 노화 기전에 대한 예방 및 관리와 노화로 인한 신체적 질병을 예방, 관리, 치료하는 것으로 의약품, 식품, 화장품, 의료기기와 같은 분야에 광범위하게 적용되고 있다. 이에 반해, 역노화 기술이란, 노화를 유도하는 유전인자의 발현을 원천적으로 조절하여 노화상태를 되돌리는 기술을 말한다.

[0008] 이러한 역노화 기술의 발전을 위해서는, 관련된 노화 유전인자에 대한 더 많은 정보를 확보하고, 그 기작에 대해서도 심층적인 이해가 바탕이 되어야 가능하다.

[0010] microRNA(miRNA, miRNA)는 21-25 nt의 단일가닥 RNA 분자로서 mRNA의 3'-UTR에 결합하여 진핵생물의 유전자 발현을 제어하는 물질이다(Bartel DP et al., Cell.2004.01.23;116(2):281-297). miRNA의 생성은 Drosha(RNase III type 효소)에 의해 스템-루프 구조의 전구체 micorRNA(pre-microRNA)로 만들어지고, 세포질로 이동하여 다이서(Dicer)에 의해 절단되어 성숙한 microRNA로 만들어진다[Kim VN et al., Nat Rev Mol Cell Biol. 2005. 05.;6(5):376-385]. 상술한 바와 같이 제조된 microRNA는 표적단백질의 발현을 조절함으로써 발생, 세포증식 및 사멸, 지방대사, 종양형성 등에 관여한다(Wienholds E et al.,Science, 309(5732): 310-311(2005); Nelson P et al., Trends Biochem Sci., 28: 534-540(2003); Lee RC et al., Cell, 75: 843-854(1993); 및 Esquela-Kerscher A et al., Nat Rev Cancer. 6:259-269(2006)).

[0012] 본 발명에서는 순환형 유전자에 의해 조절되는 노화 기작을 규명하고, 이러한 조절 물질을 생체내에 투여하여 역노화를 유도하는 기술에 관한 것이다. 이러한 기술은 전세계적으로 개념 단계에 있으며, 특정 유전인자 투여하여 특정 장기의 노화 유전자의 발현을 조절하여 역노화를 유도하는 기술로서 최초로 발명된 기술이며, 향후 노화 기전연구에서 확보되는 다양한 노화 유전자 조절물질을 이용하여 인체의 역노화를 유도하여 건강한 삶과 수명 연장에 기여하는 중요한 열쇠가 될 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 노화 관련 유전자 발현 조절 물질을 규명하고, 이를 이용하여 특정 장기의 역노화를 유도하는 기술을 제공하는 것이다. 이러한 방법은 노화로 인한 질병 치료에서 나아가 노화 유전자의 조절을 통하여 역노화를 유도하고, 이를 통한 노화형 질환의 치료 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA를 유효성분으로 포함하는 역노화용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA를 유효성분으로 포함하는 노화형 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA에 상보적으로 결합하는 DNA 프로브 또는 앵타머를 포함하는 노화 또는 노화형 질환 진단 또는 모니터링용 키트를 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA에 상보적이고, 증폭할 수 있는 DNA 프라이머를 포함하는 노화 또는 노화형 질환 진단 또는 모니터링용 키트를 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은,

[0021] 1) 시험관 내에서 피검체에서 분리된 시료에서 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및

[0022] 2) 상기 단계 1)의 발현 수준이 감소할수록 노화 정도가 증가하거나 노화형 질환에 걸릴 위험성이 높은 것으로 판단하는 단계;를 포함하는 노화 또는 노화형 질환의 진단 또는 모니터링 방법을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은,

[0024] 1) microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA를 발현하는 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;

[0025] 2) 상기 세포주에서 상기 microRNA의 발현정도를 측정하는 단계; 및

[0026] 3) 상기 microRNA의 발현정도가 피검물질을 처리하지 않는 대조군에 비해 증가한 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 노화 또는 노화형 질환의 예방용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명은 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA를 포함하는 세포의 역노화 유도제를 제공한다.

[0028] 또한, 본 발명은 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA를 생체 외의 세포에 처리하여 세포의 역노화를 유도하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0030] 본 발명은 순환계에 존재하는 노화마커를 발굴하여 특정장기의 역노화를 유도하는 기술에 관한 것으로서, 본 발명에서는 순환형 유전자에 의해 조절되는 노화 기작을 규명하고, 이러한 조절 물질을 생체내에 투여하여 역노화를 유도하는 기술을 개발하였다. 종래에는 당뇨병, 고혈압, 치매 등 노화형 질환에 대한 지표를 분석하고, 그 기작을 연구하는데 집중되어 왔고, 노화를 유도하는 물질의 저해인자 등을 처리하여 노화를 지연하는 항노화 기술에 대한 관심이 발전되어 왔다. 이에 반해, 역노화란, 노화를 유도하는 유전인자의 발현을 원천적으로 조절하여 노화상태를 되돌리는 기술을 말한다. 본 발명은 특정 유전인자 투여하여 특정 장기의 노화 유전자의 발현을 조절하여 역노화를 유도하는 기술로서 전세계적으로 최초로 발명된 기술이다. 이러한 기술은, 향후 노화 기전 연구에서 확보되는 다양한 노화 유전자 조절물질을 이용하여 인체의 역노화를 유도하여 건강한 삶과 수명 연장에 기여하는 중요한 열쇠가 될 것이다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 마우스 혈액에서 분리한 RNA의 next generation sequencing(NGS) 분석 방법을 모식도로 나타낸 도이다.
 도 2는 노화 마우스 혈액으로 분석한 miRNA DEGs로 관여하는 네트워크를 분석하여 나타낸 도이다.
 도 3은 노화 마우스 혈액에서 순환하는 miRNA DEGs를 기반으로 나타날 가능성이 높은 질병과 장애를 나타낸 도이다.
 도 4는 qPCR 방법을 이용하여 노화 마우스 혈액에서 miRNA 변화량을 나타낸 도이다.
 도 5는 노화 마우스의 조직학적인 결과를 나타낸 도이다.
 도 6은 노화 마우스 간의 miRNA 변화량을 qPCR 방법으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 7은 노화 마우스 간의 단백질 변화량을 웨스턴블랏(western blot)으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 8은 18개월 된 마우스에 유전자 조절 물질을 주입한 후 마우스 간과 폐의 miRNA 농도를 나타낸 도이다. miRNA(1)은 microRNA-21a-5p만 단독 주입한 것이고 miRNA(6)은 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p 6가지를 섞어서 한번에 주입한 것을 나타낸다.
 도 9는 18개월 된 마우스에 유전자 조절 물질을 주입한 후 마우스 간의 단백질 발현 변화를 나타낸 도이다. miRNA(1)은 microRNA-21a-5p만 단독 주입한 것이고 miRNA(6)은 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p 6가지를 섞어서 한번에 주입한 것을 나타낸다.
 도 10은 18개월 된 마우스에 유전자 조절 물질을 주입한 후 마우스 간의 노화 관련 표지단백질의 발현 변화를 나타낸 도이다. miRNA(1)은 microRNA-21a-5p만 단독 주입한 것이고 miRNA(6)은 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p 6가지를 섞어서 한번에 주입한 것을 나타낸다.
 도 11은 18개월 된 마우스에 유전자 조절 물질을 주입한 후 마우스 간의 텔로머레이즈 활성을 qPCR 방법으로 확인한 결과이다. miRNA(1)은 microRNA-21a-5p만 단독 주입한 것이고 miRNA(6)은 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p 6가지를 섞어서 한번에 주입한 것을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0035] 본 발명은 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA를 유효성분으로 포함하는 역노화용 약학적 조성물을 제공한다.

[0036] 상기 microRNA-16-5p는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하고, 상기 microRNA-130b-3p는 서열

번호 2의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하며, 상기 microRNA-17-5p는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하고, 상기 microRNA-103-3p는 서열번호 4의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하며, 상기 microRNA-21a-5p는 서열번호 5의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하고, 상기 microRNA-30a-5p는 서열번호 6의 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 한다.

[0037] 상기 microRNA는 쥐 및 인간의 신체 조직 및 조직, 전혈, 혈청, 혈구, 가래, 소변 등에서 분리할 수 있으며, 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면 전혈에서 분리하는 것이 가장 바람직하다. 전혈은 확보가 용이하고, 임상 조작이 간단하며, 상처가 작고, 환자가 받을 수 있는 고통 및 위험성이 작기 때문에 임상 시료로 가장 적합하다.

[0038] 상기 microRNA는 연령에 따라 발현 수준이 달라지는 것을 특징으로 하며, 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면, 상기 microRNA는 2, 6 및 12개월의 마우스에 일관성있게 변화하는 microRNA 중 암, 기관손상 및 이상, 생식기관 질환에 관여하는 네트워크에 포함되며 노화가 진행됨에 따라 발현이 감소된다.

[0039] 상기 역노화는 노화를 예방 및 치료하는 개념의 항노화 달리 노화를 유도하는 유전인자의 발현을 원천적으로 조절하여 노화 상태를 이전으로 되돌리는 것을 말한다.

[0040] 상기 역노화용 약학적 조성물은 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA인 것이 바람직하며, 상기 6종의 microRNA 혼합인 것이 가장 바람직하다.

[0042] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 2, 6 및 12개월의 마우스 전혈에서 microRNA를 분리한 후 NGS(next generation sequencing) 분석을 수행하여 연령에 따라 일관성 있게 변하는 27개의 microRNA를 선별하였으며(도 2 및 표 1 참조), 상기 27개의 microRNA 중 암, 기관손상 및 이상, 생식기관 질환에 관여하는 네트워크에 포함되는 10개의 microRNA를 선별하고, 이들이 관여하는 조절 단백질을 분석한 결과, 6종의 microRNA(microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p)를 선별하였으며(도 3 및 표 2 참조), 상기 6종의 microRNA이 노화에 따라 발현이 유의하게 감소되며(도 4 참조), 상기 microRNA를 유전자 조절 물질로 마우스에 투여한 결과, 간에서 상기 microRNA 발현이 증가하고(도 9 참조), 노화 관련 표지 단백질의 발현이 증가함을 확인함으로써(도 10 참조), 본 발명의 microRNA는 역노화용 약학적 조성물로 유용하게 이용될 수 있다.

[0044] 본 발명의 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA는 생체 내 전달 효율을 높이기 위하여 당 업계에 알려진 다양한 핵산 전달체(바이러스성 또는 비바이러스성 전달체)와 복합체 형태로 포함될 수 있다. 예컨대, 상기 microRNA를 발현하는 재조합 플라스미드 또는 바이러스 벡터로서 포함될 수 있다. 이를 위하여 사용 가능한 플라스미드로는 예를 들어, pSilencer (Ambion), pSiEx (Novagen), siXpress (Takara Bio), pBLOCK-iT™(Invitrogen), pcDNA3.1(Invitrogen), pCEP4(Invitrogen), SilenCircle™ (Allele), 등이 있으며 이로 제한되지 않는다. 바이러스성 전달체로 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터, 알파바이러스 벡터, EB 바이러스 벡터, 파필로마바이러스 벡터, 포오미바이러스 벡터가 사용될 수 있으며, 이로 제한되지 않는다. 또한, 비 바이러스성 전달체로서, 전달 시약으로 Mirus TrasIT-TKO 지질친화성 시약, 리포펙틴, 리포펙타민, 셀펙틴 (cellfectin), G-fectin, 양이온성 인지질 나노입자, 양이온성 고분자, 양이온성 마이셀, 양이온성 에멀전 또는 리포솜, 리간드-DNA 복합체, 유전자총(genegun)이 사용될 수 있으며, 이로 제한되지 않는다. 리포솜의 형태로서는 양친매성 제제(amphipathic agent), 예를 들어 마이셀, 불용성 단일층, 액정, 또는 수용액에 존재하는 라멜라층으로 존재하는 지질과 조합된다. 리포솜 제형을 위한 지질은 모노글리세라이드, 디글리세라이드, 실파타이드, 리소레시틴, 레시틴 인지질, 사포닌, 담즙산, 리포펙틴 등을 포함하지만 이로 제한되지 않는다.

[0045] 또한, 본 발명의 microRNA의 체내 안정성을 높이기 위해 폴리에틸렌글리콜과 같은 생체적합성 고분자를 접합하여 세포 내 흡수를 증가시키는 등 당 업계에 알려진 일반적인 리보핵산 세포 내 전달 기술을 이용하도록 제제화될 수 있다. 또한 전기천공법(electroporation)에 의해 세포를 microRNA가 든 용액에 현탁하여 직류 고전압의 펄스를 통과시켜 세포내로 도입되게 하는 방법도 포함한다. 생체에는 microRNA가 든 용액을 원하는 부위에 투여하고 전극을 통해 직류전압을 펄스로 주어 세포로 도입되게 할 수 있다.

- [0047] 본 발명의 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 본 발명의 약학적 조성물을 0.1 내지 99.9 중량%를 유효성분으로 함유하고, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다.
- [0049] 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 피부외용 또는 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사 방식을 선택하는 것이 바람직하다.
- [0051] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수해/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 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0052] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 본 발명의 약학적 조성물의 양을 기준으로 0.01 내지 2000 mg이고, 바람직하게는 30 내지 500 mg/kg이고, 더욱 바람직하게는 50 내지 300 mg/kg이며, 하루 1 내지 6 회 투여될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 조성물은 단독으로 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0055] 또한, 본 발명은 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA를 유효성분으로 포함하는 노화형 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0056] 상기 노화형 질환은 간 지방증, 당뇨병, 고혈압 및 치매인 것이 바람직하다.
- [0058] 또한, 본 발명은 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA에 상보적으로 결합하는 DNA 프로브 또는 앵타머를 포함하는 노화 또는 노화형 질환 진단 또는 모니터링용 키트를 제공한다.
- [0059] 또한, 본 발명은 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA에 상보적이고, 증폭할 수 있는 DNA 프라이머를 포함하는 노화 또는 노화형 질환 진단 또는 모니터링용 키트를 제공한다.
- [0060] 본 발명의 노화 또는 노화형 질환 진단 또는 모니터링용 키트는 생물학적 시료에서 microRNA-16-5p, microRNA-

130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA의 발현, 또는 이와 상보적으로 결합하는 DNA 프로브, 앵타머 또는 프라이머의 발현량 변화를 측정함으로써 진단 또는 모니터링 할 수 있다.

- [0062] 또한, 본 발명은,
- [0063] 1) 시험관 내에서 피검체에서 분리된 시료에서 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [0064] 2) 상기 단계 1)의 발현 수준이 감소할수록 노화 정도가 증가하거나 노화형 질환에 걸릴 위험성이 높은 것으로 판단하는 단계;를 포함하는 노화 또는 노화형 질환의 진단 또는 모니터링 방법을 제공한다.
- [0065] 상기 microRNA의 발현량 변화의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 실시될 수 있다. 예를 들어, RT-PCR, 노던 블롯팅, cDNA 마이크로어레이를 이용한 혼성화 반응 또는 인 시츄(in situ) 혼성화 반응을 이용하여 실시할 수 있다. 바람직하게는 실시간 PCR 또는 면역 블랏팅에 의해 측정하는 것일 수 있다.
- [0067] 또한, 본 발명은,
- [0068] 1) microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA를 발현하는 세포주에 피검물질을 처리하는 단계;
- [0069] 2) 상기 세포주에서 상기 microRNA의 발현정도를 측정하는 단계; 및
- [0070] 3) 상기 microRNA의 발현정도가 피검물질을 처리하지 않는 대조군에 비해 증가한 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 노화 또는 노화형 질환의 예방용 후보물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0071] 상기 스크리닝은 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA의 발현 정도 또는 활성에 영향을 미치는 미지의 후보 물질을 선별하기 위한 것으로, 상기 피검물질은 천연화합물, 합성화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사산물 및 생활성 분자로 구성된 군인 것이 바람직하다.
- [0073] 또한, 본 발명은 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA를 포함하는 세포의 역노화 유도제를 제공한다.
- [0074] 또한, 본 발명은 microRNA-16-5p, microRNA-130b-3p, microRNA-17-5p, microRNA-103-3p, microRNA-21a-5p, 및 microRNA-30a-5p으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 microRNA를 생체 외의 세포에 처리하여 세포의 역노화를 유도하는 방법을 제공한다.
- [0076] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해서 상세히 설명한다.
- [0077] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해서 한정되는 것은 아니다.
- [0079] <실시예 1> 노화 마우스 혈액에서 miRNA DEGs 분석
- [0080] 2, 6 및 12개월 C57/b16 마우스를 중앙실험동물(주)에서 구입하였으며, 개체의 전혈에서 RNA를 분리하여 next generation sequencing(NGS) 분석을 수행하였다.

[0081] 구체적으로, 도 1에 나타난 바와 같이, Illumina HiSeq2000/2500을 이용하고, TruSeq Small RNA Library Prep Kit을 사용하였으며, Agilent DNA 1000kit을 사용하였다. biotin labeled cRNA 합성, cRNA fragmentation, expression array hybridization, Genechip Fluidics Station 450을 이용한 washing, staining, Scanning through Genechip Array scanner 3000 7G, Data Analysis의 과정을 거쳐 수행하였다.

[0082] 그 결과 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 2개월령 및 6개월령을 비교하였을 경우와 6개월령 및 12개월령을 비교한 경우, 모두에서 일관성 있게 4개 이상 변화하는 총 27개의 microRNA를 선별하였다(표 1). 또한, 상기 differentially expressed genes(DEG)를 토대로 IPA(Ingenuity pathway analysis, Qiagen, <http://www.ingenuity.com/>)를 이용하여, 상기 표 1에 나열한 miRNA 목록을 IPA 프로그램에 input file로 업로드 하고, 프로그램에서 제공하는 “Core analysis” 를 수행한 결과 도 2와 같이 나타났다. 상기 네트워크는 암, 기관손상 및 이상, 생식기관 질환에 관여하는 네트워크로서, 27개 DEG 중 10개(miR-10b-5p, miR-29b-3p, miR-17-5p, miR-16-5p, miR-130b-3p, miR-103-3p, miR-21a-5p, miR-148a-3p, miR-30a-5p, miR-181b-5p)의 DEG가 이 네트워크에 포함된 것으로 분석되었다.

표 1

[0083]

microRNA	log ₂ (Fold change) (2 개월 vs 6 개월)	log ₂ (Fold change) (6 개월 vs 12 개월)
miR-6960-5p	-3,500	-6,000
miR-340-5p	-3,824	-5,368
miR-16-5p	-3,800	-5,000
miR-130b-3p	-2,284	-4,786
miR-17-5p	-2,937	-4,250
miR-132-3p	-2,720	-4,000
miR-92a-1-5p	-2,750	-4,000
miR-29b-3p	-7,500	-3,500
miR-103-3p	-2,546	-3,412
miR-194-5p	-2,765	-3,400
miR-181b-5p	-2,415	-3,188
miR-21a-5p	-2,231	-3,075
miR-30a-5p	-2,207	-3,029
miR-24-1-5p	-2,733	-3,000
miR-148a-3p	-2,158	-2,806
miR-144-5p	-2,310	-2,682
miR-5113	-2,875	-2,667
miR-451b	-2,522	-2,556
miR-10b-5p	-3,321	-2,545
miR-3082-3p	-2,300	-2,500
miR-421-3p	-2,148	-2,426
miR-7688-5p	-2,000	-2,308
miR-1839-5p	-2,367	-2,143
miR-3074-1-3p	-2,733	-2,143
miR-505-5p	-2,625	-2,000
miR-3077-3p	2,333	2,143
miR-5107-5p	12,000	2,833

[0086] <실시에 2> 노화 마우스 혈액에서 순환하는 miRNA DEGs에 따른 기능상의 주요 변화 분석

[0087] 상기 <실시에 1>에서 확인한 노화에 따라 발현이 변화되는 마우스 혈액의 miRNA DEG를 바탕으로 이들의 발현에 따른 생물의 주요한 변화를 도출하기 위하여 IPA 분석을 수행하였다.

[0088] 구체적으로, 상기 <실시에 1>에서 확인한 miRNA와 관련성이 높은 질병 및 장애를 확인하고자 IPA 분석을 수행하였다. 이를 위하여, 상기 표 1에 나열한 miRNA 목록을 IPA 프로그램에 input file로 업로드 하고, 프로그램에

서 제공하는 “Core analysis” 를 수행하였다.

[0089] 그 결과 도 3에 나타난 바와 같이, 노화에 따른 miRNA DEG(miR-16-5p, miR-130b-3p, miR-17-5p, miR-103-3p, miR-21a-5p, miR-30a-5p)의 관련된 생물의 주요 기능으로는 간 지방증에 연관성이 높은 것으로 분석되었다. 또한, 하기 표 2에 나타난 바와 같이, miRNA DEGs의 목록과 관계하는 조절 단백질(E2F2, PPARA, AKT)을 확인하였으며, miR-103-3p, miR-21a-5p는 간지방증에 연관되어 있다는 것이 알려져 있다.

표 2

microRNA	조절제
miR-16-5p	E2F2
miR-60b-3p	PPARA
miR-17-5p	PPARA, E2F2
miR-103-3p	PPARA
miR-21a-5p	AKT
miR-30a-5p	PPARA

[0092] <실시에 3> 노화에 따른 miRNA 발현 변화 분석

[0093] 상기 <실시에 1>에서 규명한 miRNA가 3, 8, 12 및 24 개월의 마우스에서 노화에 따른 혈액 내 miRNA 발현양상이 어떻게 변화하는지 확인하기 위해 실시간 정량적 PCR(Real-time quantitative PCR) 방법을 사용하여 분석하였다.

[0094] 구체적으로, 3, 8, 12 및 24 개월의 마우스 혈액 내에 포함된 RNA(total RNA)를 분리하여 Exiqon사(미국)의 miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR Kit 및 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System을 사용하여 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다. 하기 표 3의 Exiqon사의 프라이머 hsa-miR-16-5p, hsa-miR-17, hsa-miR-21, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-103, hsa-miR-130b를 사용하였으며, 제조사 프로토콜에 따라 실험을 수행하였다.

표 3

프라이머	서열
hsa-miR-16-5p (서열번호 1)	UAGCAGCACGUAAAUAUUGGCG
hsa-miR-130b (서열번호 2)	CAGUGCAAUGAUGAAAGGGCAU
hsa-miR-17 (서열번호 3)	CAAAGUGCUUACAGUGCAGGUAG
hsa-miR-103 (서열번호 4)	AGCAGCAUUGUACAGGGCUAUGA
hsa-miR-21 (서열번호 5)	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
hsa-miR-30a-5p (서열번호 6)	UGUAAACAUCUCGACUGGAAG

[0097] 그 결과 도 4에 나타난 바와 같이, 노화됨에 따라 miRNA 발현이 유의하게 감소되는 결과를 확인하였다(도 4).

[0099] <실시에 4> 노화에 의해 변화한 마우스 간의 조직학적인 변화 분석

[0100] 노화 마우스의 기능상의 주요 변화를 도출하기 위해 8, 12 및 24개월 마우스를 면역조직화학적염색법을 이용하여 분석하였다.

[0101] 구체적으로, 8, 12 및 24개월 마우스를 부검하여 손상되지 않게 간 조직을 분리한 후, 10% 중성 포르말린(formalin)에 고정한 다음, 파라핀 포매(paraffin embedding) 과정을 거쳐, 파라핀 마우스 간 조직을 3 내지 5 μl의 두께로 샘플링하여, H&E 염색을 시행하여 100배 및 200배의 비율에서 병변을 관찰하였다.

[0102] 그 결과 도 5에 나타난 바와 같이, 노화가 진행됨에 따라 간 지방증의 병변이 증가 발현됨을 확인하였다(도 5).

- [0104] <실시예 5> 노화에 따른 miRNA 발현 변화 분석
- [0105] 상기 <실시예 1>에서 확인한 노화 관련 miRNA가 3, 8 및 12개월의 마우스의 간 내에서 발현의 차이가 있는지 확인하였다.
- [0106] 구체적으로, 3, 8, 12 및 24 개월의 마우스 혈액 내에 포함된 RNA(total RNA)를 분리하여 qPCT 및 웨스턴블랏 방법을 통해 확인하였는데, qPCR은 상기 <실시예 3>과 동일한 프라이머 및 방법으로 수행하였다.
- [0107] 또한, <실시예 1>에서 확인한 노화 관련 miRNA가 상기 표 2에서 관계하는 것으로 확인된 조절 단백질의 노화에 따른 발현 변화를 웨스턴블랏 방법을 수행하였다, 웨스턴블랏은 이전의 연구(Lee K.M. et al. Acta. Biomater., 9:5600, 2013)를 참고하여 수행하였으며, 마우스 간 조직 내의 단백질은 RIPA buffer (Sigma-Aldrich)를 첨가하여 분쇄기로 분쇄한 후, 30분 동안 방치한 다음, 10,000 g로 30분 동안 원심분리하여 단백질을 얻었다. 1차 항체로는 미국의 Cell Signaling Technology에서 구매한 BCL-2, PPARA, E2F1, E2F2, AKT, CCND1, Smad2/3, beta-actin 항체를 사용하였으며, 2차 항체는 겨자무과산화효소가 결합된 항체(horseradish peroxidase conjugated secondary antibody)를 사용하였고, 단백질의 발현정도 확인을 위해, 웨스턴블랏을 수행한 막을 화학발광 키트(enhanced chemiluminescence kit; Thermo Scientific, 미국)을 사용하여 제조사 프로토콜에 따라 분석하였다.
- [0108] 그 결과 도 6에 나타난 바와 같이, <실시예 3>과 동일하게 노화가 진행됨에 따라 miRNA 발현이 유의하게 감소됨을 확인하였으며(도 6), 도 7에 나타난 바와 같이 관계된 조절 단백질이 노화에 따라 변화됨을 확인하였다(도 7).
- [0110] <실험예 1> 유전자 조절 물질의 투여 후 노화 지표 변화 분석
- [0111] 본 발명에서 규명한 노화에 따라 발현이 감소되는 miRNA를 유전자 조절 물질로 마우스에 투여한 후 변화를 확인하였다.
- [0112] 구체적으로, miR-16-5p, miR-130b-3p, miR-17-5p, miR-103-3p, miR-30a-5p, miR-21a-5p mimic을 (주)바이오니아(한국)로부터 제조하여 사용하였다. miR-21a-5p mimic을 10 nanomole의 농도를 단독으로 주입하는 군과, 상기 6개의 miRNA mimic 각각을 10 nanomole 씩으로 혼합하여 주입하는 군으로 나누어 실험을 진행하였다. 인위적 주입을 위해 Altogen Biosystems사의 liver in vivo Transfection Reagent를 사용하여 18개월 마우스 복강에 투여하고, 24시간 후 특정 장기에서 노화 지표들의 변화를 분석하였다. 유전자 조절 물질을 투여하지 않은 군과 6개의 유전자 조절 물질을 동시에 투여한 군과 miR-21a-5p를 단독으로 투여한 3개의 군에서 상기 <실시예 3> 및 <실시예 5>와 동일한 방법으로 qPCR 및 웨스턴블랏을 수행하였다.
- [0113] 그 결과 도 8 및 도 9에 나타난 바와 같이, 유전자 조절 물질을 넣지 않은 군에 비해 유전자 조절 물질을 투여한 군에서 miRNA 발현 양이 증가함을 확인하였으며(도 8), 웨스턴블랏을 수행한 결과 간에서 발현되는 단백질의 발현이 유전자 조절 물질에 의하여 조절됨을 확인하였다(도 9).
- [0115] <실험예 2> 노화 표지 단백질의 발현 변화 검증
- [0116] 상기 <실험예 1>에서 유전자 조절 물질이 투여된 마우스의 간에서 노화 관련 표지 단백질 발현 변화를 확인하였다.
- [0117] 구체적으로, 상기 <실험예 1>에서 유전자 조절 물질이 투여된 마우스의 간을 전처리하여, 상기 <실시예 5>와 동일한 방법으로 웨스턴 블랏을 수행하였다. 상기 웨스턴 블랏에 사용된 노화 관련 표지 단백질 항체는 미국의 Bioworld Technology, Inc사에서 mTOR를, abcam사의 SIRT1을 구매하여 사용하였다,
- [0118] 그 결과 도 10에 나타난 바와 같이, 노화 관련 표지 단백질 mTOR 및 SIRT1이 유전자 조절 물질의 주입으로 역노화적인 결과를 보여줌을 확인하였다(도 10).
- [0120] <실험예 3> 노화 표지 단백질의 발현 변화 검증
- [0121] 상기 <실험예 1>에서 유전자 조절 물질이 투여된 마우스에서 텔로미어(telomere)를 신장시키는 텔로머레이즈

(telomerase) 활성을 확인하였다.

[0122] 구체적으로, 상기 <실험예 1>에서 유전자 조절 물질이 주입된 마우스 간조직 내의 RNA(total RNA)을 분리한 다음, cDNA를 합성하여 qPCR을 수행하였다. mRNA의 발현량을 확인하기 위해 사용한 프라이머는 하기 표 4와 같으며, mMen1, mMrella, mTep1, mTerf2, mRert, mTnks로 (주)바이오니아(한국)로부터 제조하여 사용하였으며, Takara(일본) 사의 PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit 및 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System을 사용하여 매뉴얼에 따라 실험을 수행하였다.

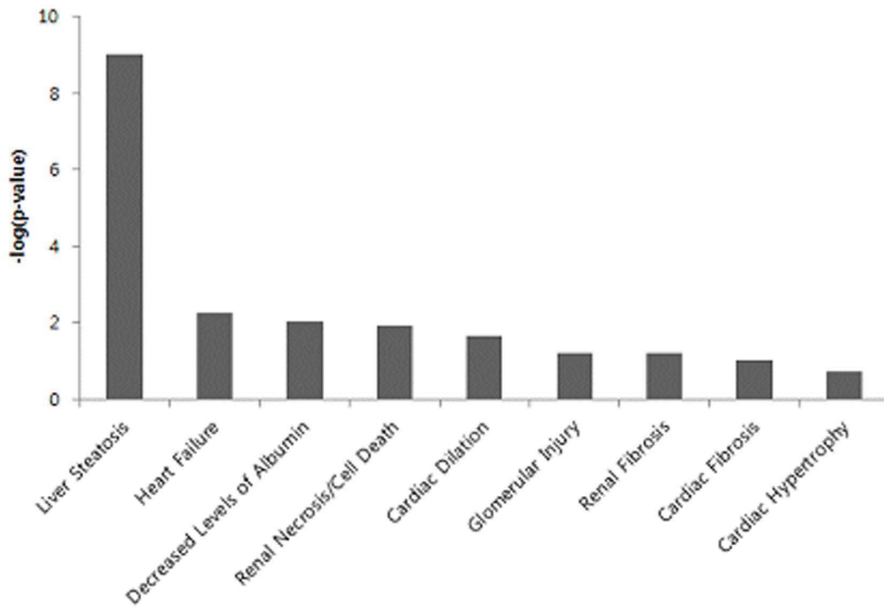
표 4

[0123]

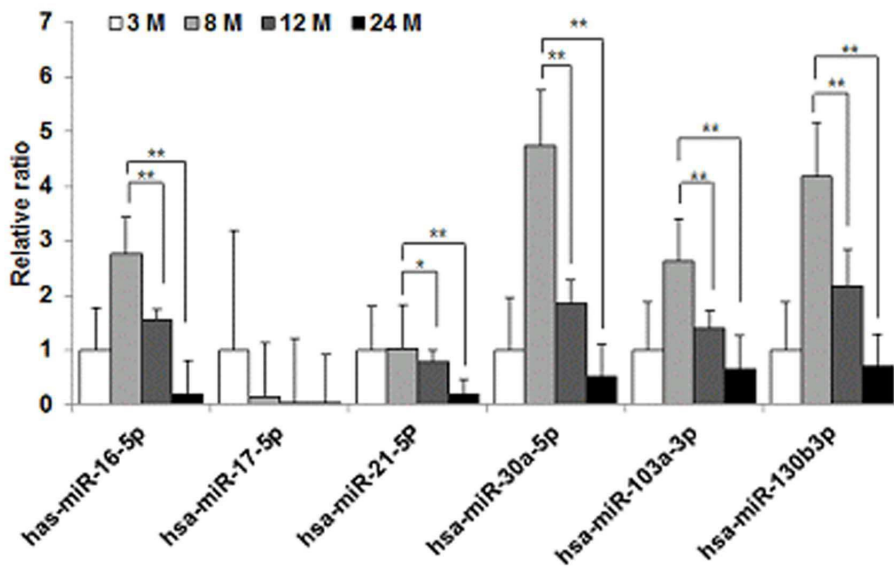
프라이머	서열	
Mus musculus multiple endocrine neoplasia 1 (Men1), transcript variant 1,	forward (서열번호 7)	GCTTCATCACAGGCACCAAA
	reverse (서열번호 8)	GACAGGGCCAGATGGACATC
Mus musculus meiotic recombination 11 homolog A (S. cerevisiae) (Mrella)	forward (서열번호 9)	CCAGGATGGCAATCTCAACA
	reverse (서열번호 10)	AGGGCACAGAGGGCATCTG
Mus musculus telomerase associated protein 1 (Tep1)	forward (서열번호 11)	CCTTTGGCCCTTAAAAATGA
	reverse (서열번호 12)	ACCGTGGTAGCCTGTTTTTCTC
Mus musculus telomeric repeat binding factor 2 (Terf2), transcript variant 2	forward (서열번호 13)	GAAGTGGCCACCCTGTGA
	reverse (서열번호 14)	GTAGGGCTCCGTGTCATCCA
Mus musculus telomerase reverse transcriptase (Tert)	forward (서열번호 15)	ACAAGCCCAGCTCCACATCT
	reverse (서열번호 16)	GGCCATCTCCCCTGGAGTAA
Mus musculus tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase (Tnks)	forward (서열번호 17)	GGCTGTCCCACACAAAAGA
	reverse (서열번호 18)	GCCATTTTCATGGTGCTGAA

[0125] 그 결과 도 11에 나타난 바와 같이, 노화에 따라 텔로머레이즈 활성이 증가한다는 보고와 달리 텔로머레이즈 활성이 노화에 따라 감소됨을 확인하였다(도 11). 이는 쥐의 간 조직에 한정된 결과이며, 기존의 보고와는 다른 양상을 보인 것으로 사료된다.

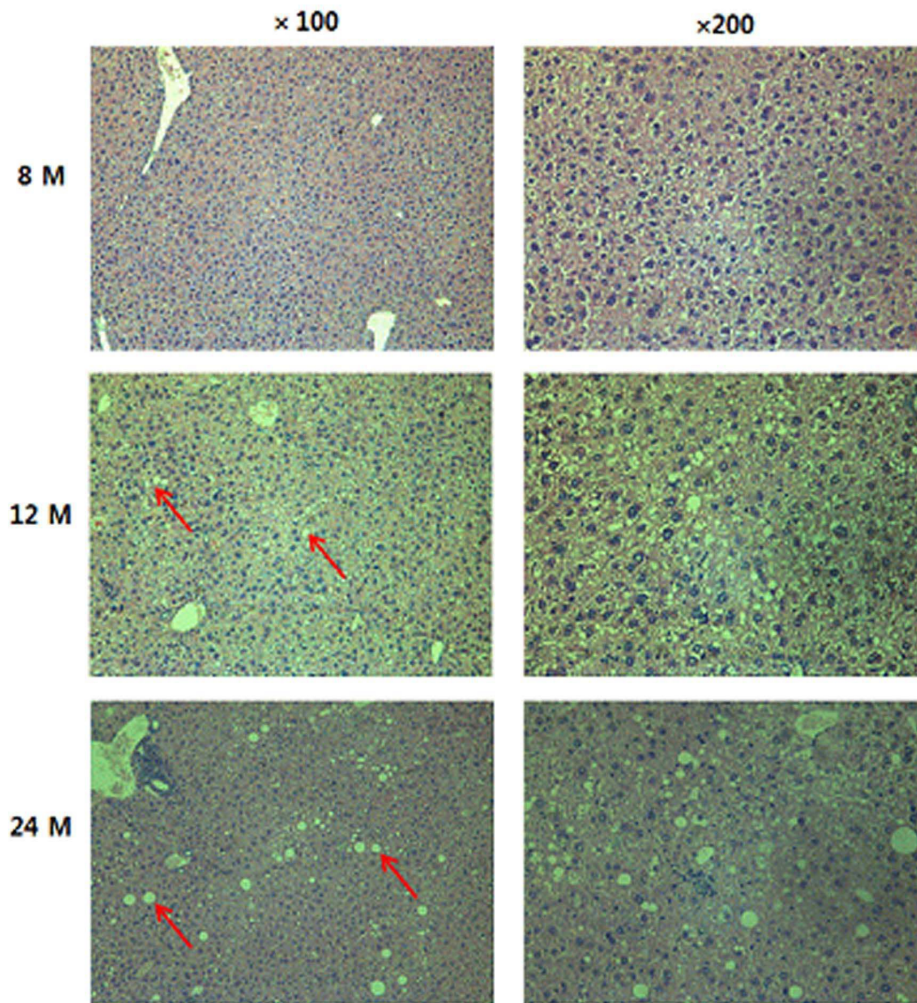
도면3



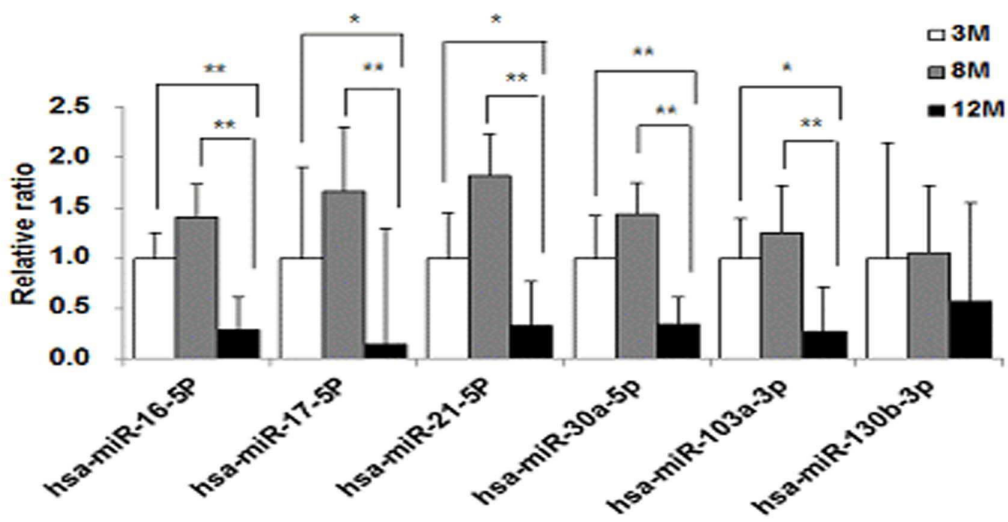
도면4



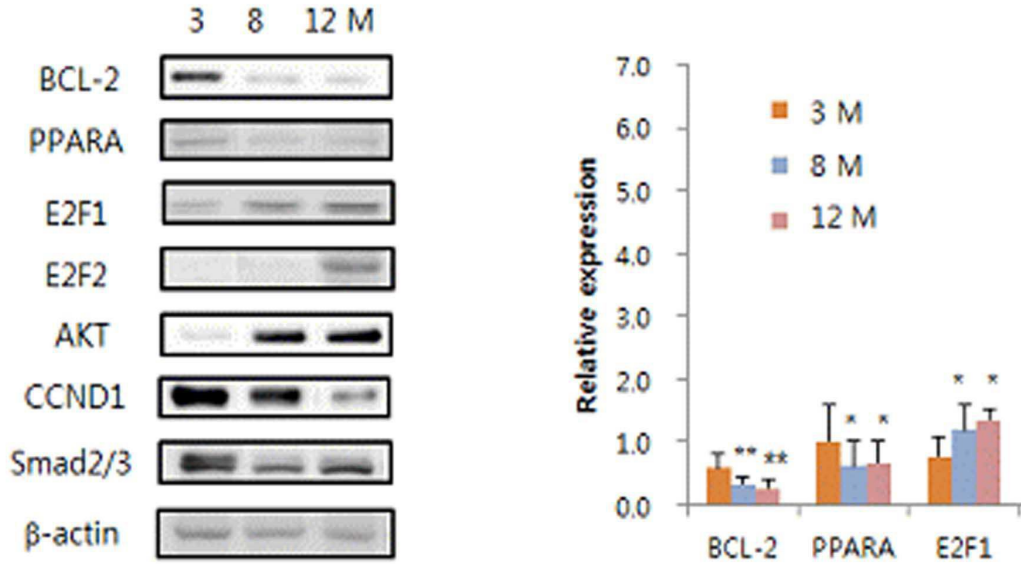
도면5



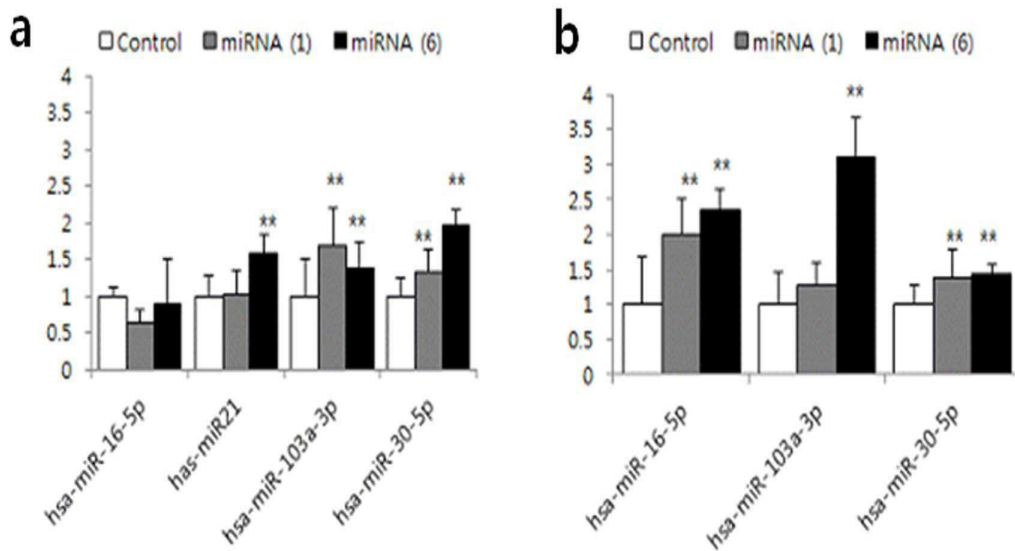
도면6



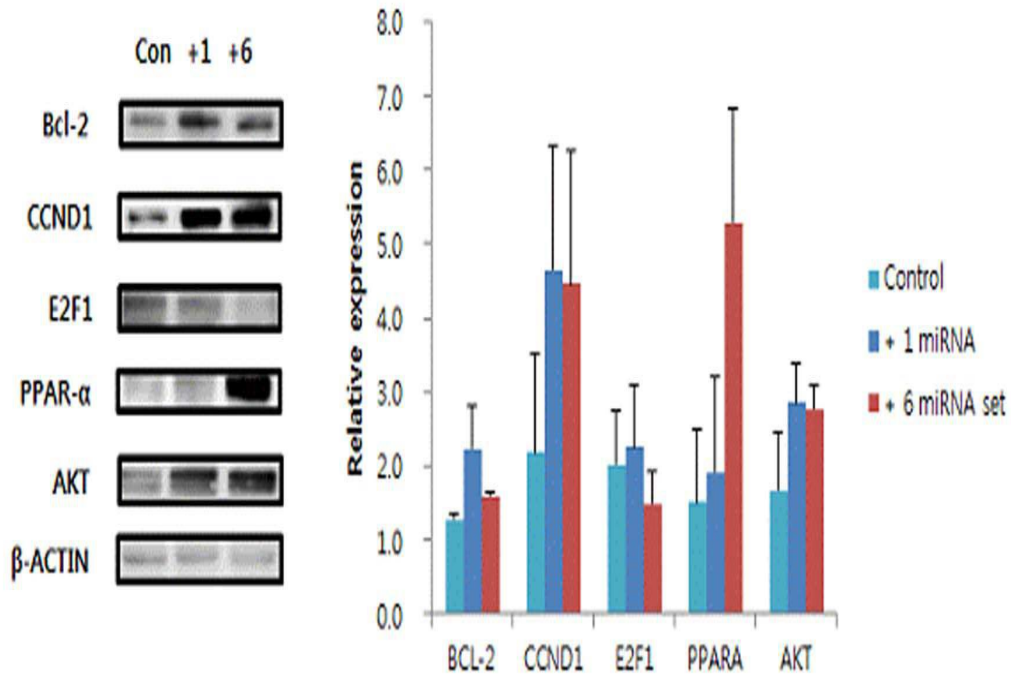
도면7



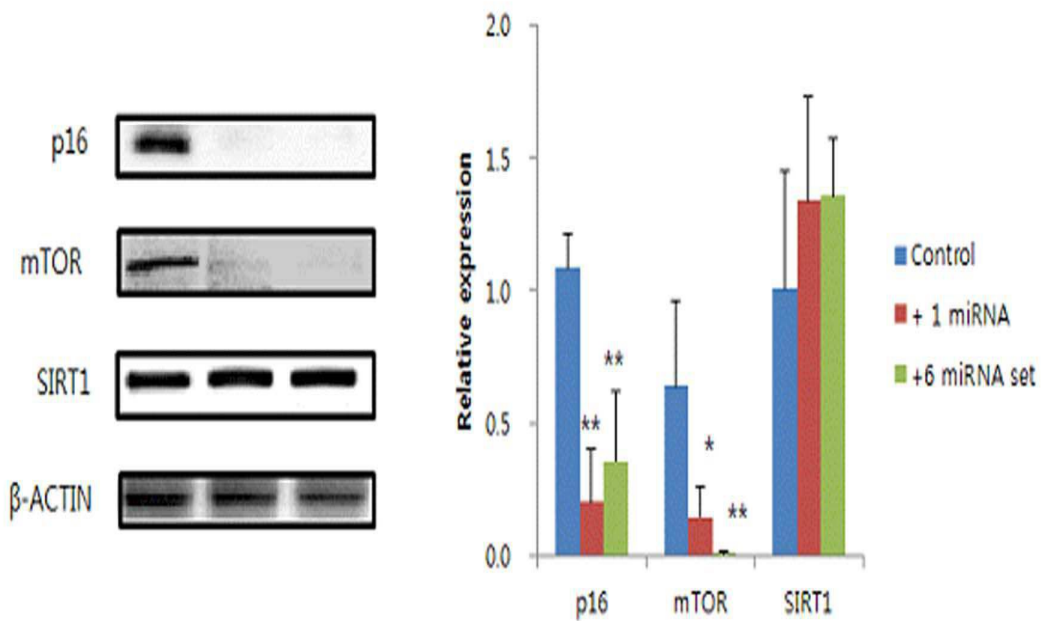
도면8



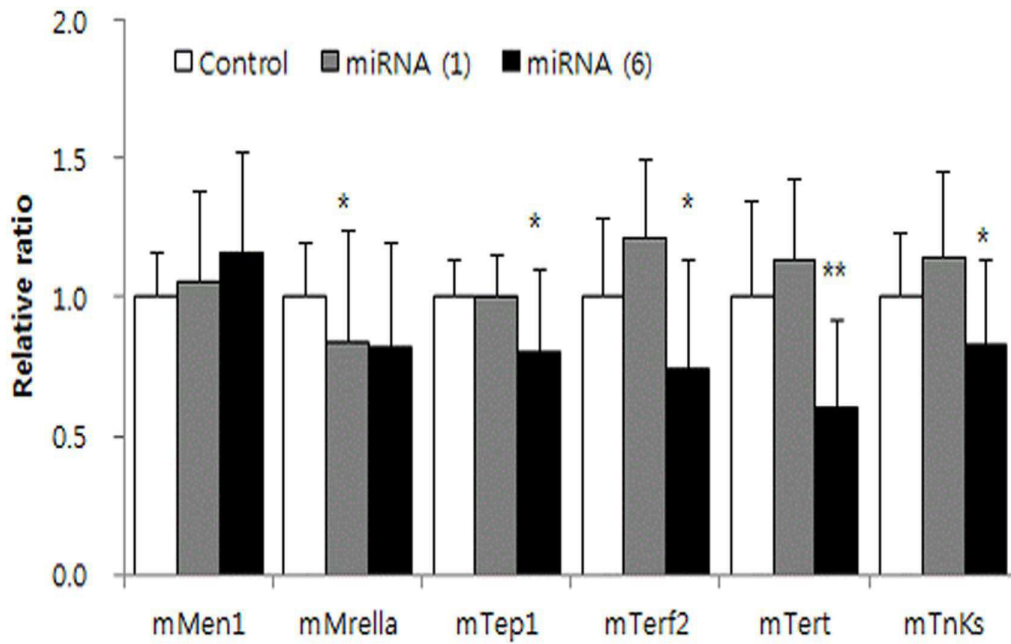
도면9



도면10



도면11



서열 목록

- <110> Daegu Gyeongbuk Institute of Science and Technology
- <120> Reverse-aging induced method using a circulating aging marker
- <130> 2015P-10-049
- <160> 18
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 22
- <212> RNA
- <213> Mus musculus
- <400> 1

- uagcagcacg uaaaauugg cg 22
- <210> 2
- <211> 22
- <212> RNA
- <213> Mus musculus
- <400> 2

- cagugcaaug augaaaggc au 22
- <210> 3

<211> 23
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <400> 3
 caaagugcuu acagugcagg uag 23
 <210> 4
 <211> 23
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <400> 4
 agcagcauug uacagggcua uga 23
 <210> 5
 <211> 22
 <212> RNA
 <213> Mus musculus
 <400> 5
 uagcuuauc gacugauguu ga 22
 <210> 6
 <211> 22
 <212> RNA

 <213> Mus musculus
 <400> 6
 uguaaacauc cucgacugga ag 22
 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mMen1 forward primer
 <400> 7
 gcttcatcac aggcaccaa 20
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> mMenI reverse primer
 <400> 8
 gacagggccca gatggacatc 20

<210> 9
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> mMreIIa forward primer
 <400> 9
 ccaggatggc aatctcaaca 20

<210> 10
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> mMreIIa reverse primer
 <400> 10
 agggcacaga gggcatctg 19

<210> 11
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> mTepI forward primer
 <400> 11
 cctttggccc cttaaaaatg a 21

<210> 12
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> mTepI reverse primer
 <400> 12
 accgtggtag cctgtttttc tc 22

<210> 13
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mTerf2 forward primer
 <400> 13
 gaacttgcc caccctgta 20
 <210> 14

 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mTerf2 reverse primer
 <400> 14
 gtagggctcc gtgcatcca 20
 <210> 15
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mTert forward primer
 <400> 15
 acaagcccag ctccacatct 20
 <210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mTert reverse primer
 <400> 16

 ggccatctcc cctggagtaa 20
 <210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mTnks forward primer
 <400> 17
 ggctgtcca cacacaaaga 20

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mTnks reverse primer

<400> 18

gccattttca tggtgctgaa

20