



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0111939
(43) 공개일자 2021년09월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6893 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2020-0026720
(22) 출원일자 2020년03월03일
심사청구일자 2020년03월03일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
최윤희
서울특별시 서초구 명달로9길 57 (방배동, 방배아트자이) 102동 704호
박현주
서울특별시 강서구 강서로 348 102동 404호 (내발산동, 우장산힐스테이트아파트)
신정아
서울특별시 양천구 오목로 300 (목동, 현대하이페리온2) 204동 1902호
(74) 대리인
특허법인한얼

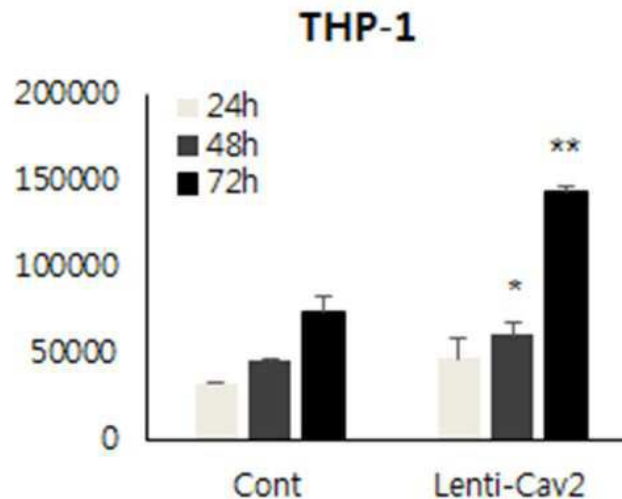
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 노화성 염증 진단용 조성물

(57) 요약

본 발명은 노화된 조직에서 발병되는 염증을 진단하기 위하여 노화된 조직의 혈관내피세포에서 발현되는 카베올린-2의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 노화성 염증 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 노화성 염증 진단용 키트 및 상기 조성물 또는 키트를 사용하여 노화된 조직의 혈관내피세포에서 카베올린-2의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는 노화성 염증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 노화성 염증 진단용 조성물을 이용하면, 노화에 의하여 유발되는 다양한 조직내 염증의 발병여부를 효과적으로 진단할 수 있으므로, 노화에 따른 다양한 질병의 효과적인 예방 및 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

대표도 - 도3b



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2800/7042 (2013.01)
G01N 2800/7095 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711095802
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)(R&D)
연구과제명	염증성 종양미세환경 개선을 통한 교모세포종 전이 제어 표적치료법 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2019.06.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

노화된 조직의 혈관내피세포에서 카베올린-2의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는, 노화성 염증 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 노화된 조직은 뇌조직, 간조직 또는 신장조직인 것인, 노화성 염증 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 카베올린-2의 발현수준은 카베올린-2 유전자로부터 발현되는 mRNA 수준 또는 카베올린-2 단백질 수준인 것인, 노화성 염증 진단용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제제는 카베올린-2 유전자로부터 발현되는 mRNA에 결합될 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머, 프로브, RNA 앵타머 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 제제인 것인, 노화성 염증 진단용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 제제는 카베올린-2 단백질에 결합될 수 있는 항체, 펩타이드, 상기 항체의 단편 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 제제인 것인, 노화성 염증 진단용 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는, 노화성 염증 진단용 키트.

청구항 7

(a) 노화성 염증의 발병이 의심되는 개체의 조직시료로부터 카베올린-2의 수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 측정된 카베올린-2의 수준이 정상 개체의 조직시료로부터 측정된 카베올린-2의 수준보다 높은 수준을 나타내는 경우, 노화성 염증이 발병한 것으로 판정하는 단계를 포함하는, 노화성 염증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 (a) 단계의 조직시료는 뇌조직, 간조직 또는 신장조직에서 유래된 혈관 또는 혈관내피세포인 것인, 노화성 염증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 (a) 단계의 카베올린-2의 수준은 카베올린 유전자로부터 발현된 mRNA의 수준 또는 카베올린-2의 단백질 수준인 것인, 노화성 염증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 노화성 염증 진단용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 노화된 조직에서 발병되는 염증을 진단하기 위하여 노화된 조직의 혈관내피세포에서 발현되는 카베올린-2의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 노화성 염증 진단용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 노화성 염증 진단용 키트 및 상기 조성물 또는 키트를 사용하여 노화된 조직의 혈관내피세포에서 카베올린-2의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는 노화성 염증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 뇌염증(brain inflammation)은 뇌졸중, 파킨슨병, 알츠하이머성 치매 등 다양한 뇌질환에서 나타나는 염증성 반응의 일종으로서, 뇌질환에 대한 자극을 증가시켜 신경세포 사멸에 관여함으로써 퇴행성 뇌질환을 비롯한 다양한 뇌질환의 진행 과정에 있어 주요한 발병원인으로 알려져 있다. 이러한 뇌염증은 뇌실질 부분의 염증성 질환인 뇌염, 뇌를 싸고 있는 뇌수막에 발생하는 뇌수막염, 상기 뇌염과 뇌수막염의 증상이 함께 나타나는 수막 뇌염 등을 포함한다. 이러한 뇌염증은 발병원인에 따라 감염성, 혈관염성, 종양성, 화학성 및 특발성 뇌염증으로 구분되고, 질환의 경과시간에 따라, 급성, 아급성 및 만성 뇌염증으로 분류할 수 있다.

[0003] 최근에는, 뇌염증의 주요 발병원인으로서 노화가 대두되고 있다. 노화는 나이가 들면서 신체의 구조와 기능이 점진적으로 저하되고 질병과 사망에 대한 감수성이 급격히 증가하면서 쇠약해지는 과정인데, 이러한 노화과정은 생체를 구성하는 다양한 장기와 조직의 기능상실을 수반한다. 특히, 면역반응에 의한 조직기능의 손상이 심화되며, 이에 의하여 손상된 조직에서는 염증 유발성 사이토카인의 생성이 증가되고 조직내에서 지속되는 시간이 증가하므로, 염증성 질환을 유발할 가능성이 높아진다. 실제로 뇌조직에서는 노화에 따라 신경 내분비계의 조절이 저해되고, 신경염증 반응이 증가된다고 알려져 있다(Barrientos et al, Neuroscience 309:84-99, 2015). 이처럼, 연령이 증가되면 뇌조직에서 노화에 따른 뇌염증이 발병되어 다른 질환을 유발할 가능성이 높아지기 때문에, 이러한 뇌염증의 발병을 억제할 수 있다면, 노화에 따른 신체약화를 최대한 지연시킬 수 있을 것으로 예상되고 있다.

[0004] 그러나, 뇌염증은 외부로는 나타나지 않는 뇌조직에서 발병되기 때문에 발병되었는지의 여부를 쉽게 확인할 수 없고, 발병원인과 질환의 경과시간에 따라, 다양한 증상을 나타내기 때문에, 뇌염증의 발병여부를 용이하게 진단할 수 없다는 문제점이 있어, 뇌염증의 발병을 조기에 진단하는 방법을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 예를 들어, 한국등록특허 제1875788호에는 뇌의 미세아교세포에서 TonEBP의 발현 수준을 측정하여 뇌염증의 발병을 진단하는 방법이 개시되어 있다. 상기 방법을 사용하면 미세아교세포에서 발병되는 뇌염증은 진단할 수 있으나, 그외의 뇌조직에서 발병되는 뇌염증은 진단할 수 없다는 문제점이 있으므로, 다양한 뇌조직에서 발병되는 뇌염증을 보다 효과적으로 진단하는 방법의 개발이 절실히 요구되고 있다.

[0005] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 다양한 뇌조직에서 발병되는 뇌염증을 보다 효과적으로 진단하는 방법을 개발하고 예의 연구노력한 결과, 노화된 뇌조직의 혈관내피세포에서는 카베올린-2의 발현이 증가되고, 이처럼 카베올린-2의 발현이 증가된 혈관내피세포는 혈액에 존재하는 염증세포를 조직으로 용이하게 유입시킬 수 있다는

점과, 상기 카베올린-2의 발현이 증가된 혈관내피세포는 노화된 뇌조직 뿐만 아니라 노화된 간조직, 신장 조직 등에서도 확인됨을 규명하였는 바, 상기 노화된 조직의 혈관내피세포에서 카베올린-2의 발현수준을 측정함으로써, 염증의 발병여부를 진단할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 본 발명의 주된 목적은 노화된 조직의 혈관내피세포에서 카베올린-2의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 노화성 염증 진단용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 노화성 염증 진단용 키트를 제공하는 것이다.
- [0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물 또는 키트를 사용하여 노화된 조직의 혈관내피세포에서 카베올린-2의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는 노화성 염증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 상술한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 실시양태는 노화된 조직의 혈관내피세포에서 카베올린-2의 발현수준을 측정할 수 있는 제제를 포함하는 노화성 염증 진단용 조성물을 제공한다.
- [0010] 본 발명의 용어 "노화"란, 나이가 들면서 신체의 구조와 기능이 점진적으로 저하되고 질병과 사망에 대한 감수성이 급격히 증가하면서 쇠약해지는 과정을 의미한다.
- [0011] 본 발명에 있어서, 상기 노화는 뇌, 간, 신장 등의 조직에서 염증이 발병되는 원인인 것으로 해석될 수 있다.
- [0012] 본 발명의 용어 "혈관내피세포(vascular endothelial cells, VECs)"란, 혈관내강이 배접하여 내막을 구성하는 중배엽기원의 한 층의 세포를 의미한다. 상기 혈관내피세포는 혈관이완을 매개하는 내피세포유래 평활근 이완인자나 혈관수축작용을 하는 엔도텔린 등의 생산에 의한 혈관긴장성 조절 외에 혈관내 혈액응고의 조절과 혈관투과성 조절, 물질교환, 백혈구세포와의 상호작용에 의한 생체방어 등의 다양한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다.
- [0013] 본 발명에 있어서, 상기 혈관내피세포는 본 발명에서 제공하는 노화성 염증의 발병여부를 진단하기 위한 노화된 조직으로부터 얻을 수 있는 생체내 시료인 것으로 해석될 수 있다.
- [0014] 본 발명의 용어 "카베올린-2(caveolin-2)"란, CAV2 유전자에 의해 발현되는 막결합단백질의 일종으로서, 카베올린-1과 함께 발현되어 이형이량체(heterodimer)를 형성하는데, N-말단의 소수성(hydrophobic) 도메인을 통해 서로 결합된 형태를 형성한다. 구조적으로는, N-말단쪽 막부착(membrane attachment) 도메인, 막통과(transmembrane) 도메인 및 C-말단쪽 막부착 도메인으로 구성된 헤어핀(hairpin) 구조를 나타낸다. 세포내에서 신호전달, 지질대사, 세포성장 조절, 세포사멸 등의 과정에 관여하며, 의학적으로는 종양억제인자로서 활성을 나타낸다. 상기 카베올린-2의 구체적인 염기서열 및 상기 유전자로부터 발현되는 단백질 정보는 NCBI 등의 데이터베이스에 공지되어 있다. 예를 들어, GenBank No. NM_001206747, NM_001206748, NM_001233, NM_198212, NM_001277756, NM_016900, NP_001193676, NP_001193677, NP_001224, NP_937855, NP_001264685, NP_058596 등에 공지되어 있다.
- [0015] 본 발명에 있어서, 상기 카베올린-2는 노화된 조직에서 염증의 발병여부를 진단하는데 사용되는 수단으로서 해석될 수 있다.
- [0016] 본 발명에 있어서, 노화된 조직으로부터 발생하는 염증은 다양한 합병증을 유발시키는 원인이 될 수 있다. 이처럼 노화된 조직으로부터 발생하는 염증의 예로는, 뇌염증, 간염증, 신장염증 등이 될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 용어 "뇌염증(brain inflammation)"이란, 뇌졸중, 파킨슨병, 알츠하이머성 치매 등 다양한 뇌질환에서 나타나는 염증성 반응의 일종으로서, 뇌질환에 대한 자극을 증가시켜 신경세포 사멸에 관여함으로써 퇴행성 뇌질환을 비롯한 다양한 뇌질환의 진행 과정에 있어 주요한 발병원인으로 알려져 있다. 이러한 뇌염증은 뇌실질 부분의 염증성 질환인 뇌염, 뇌를 싸고 있는 뇌수막에 발생하는 뇌수막염, 상기 뇌염과 뇌수막염의 증상이 함께 나타나는 수막 뇌염 등을 포함한다. 이러한 뇌염증은 발병원인에 따라 감염성, 혈관염성, 종양성, 화학성, 노화성 및 특발성 뇌염증으로 구분되고, 질환의 경과시간에 따라, 급성, 아급성 및 만성 뇌염증으로 분류할 수 있다.

- [0018] 본 발명의 용어 "카베올린-2의 발현수준을 측정할 수 있는 제제"란, 카베올린-2의 발현수준을 유전자 또는 단백질 수준에서 검출할 수 있는 제제를 의미한다.
- [0019] 본 발명에 있어서, 상기 카베올린-2의 발현수준을 측정할 수 있는 제제는 노화된 뇌의 혈관내피세포에서 카베올린-2의 mRNA 수준 또는 단백질 수준을 측정할 수 있는 제제인 것으로 해석될 수 있다.
- [0020] 상기 제제는 카베올린-2의 mRNA 수준 또는 단백질 수준을 측정하는데 사용될 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 카베올린-2의 mRNA 또는 단백질에 결합할 수 있는 화합물, 핵산, 앵타머, 펩타이드, 바이러스 또는 상기 핵산을 포함하는 벡터 등이 포함될 수 있다. 구체적으로 상기 제제는 카베올린-2 유전자로부터 발현되는 mRNA에 결합될 수 있는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 프라이머, 프로브, RNA 앵타머 등과 같은 폴리뉴클레오타이드, 또는 카베올린-2 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체, 펩타이드, 상기 항체의 단편, 저분자 화합물 등을 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 용어 "안티센스 올리고뉴클레오타이드"란, 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA내의 상보적인 서열에 결합할 수 있다.
- [0022] 본 발명에 있어서, 상기 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 카베올린-2 유전자에서 발현된 mRNA에 상보적으로 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA인 것으로 해석될 수 있다.
- [0023] 본 발명의 용어 "프라이머"란, 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트의 존재하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당업계에 공지된 것을 기초로 변형할 수 있다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 프라이머는 상기 카베올린-2 유전자를 PCR 방법으로 증폭시킬 수 있는 한 그의 염기서열이 특별히 제한되지 않는다.
- [0025] 본 발명의 용어 "프로브"란, 유전자 또는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧은 수 염기 내지 길게는 수백 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하는데, 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있고, 보다 용이하게 검출하기 위하여 라벨링될 수 있다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 프로브는 상술한 프라이머와 마찬가지로 상기 카베올린-2 유전자의 전체 또는 부분서열과 상보적으로 결합하여 상기 카베올린-2 유전자를 검출할 수 있는 한 그의 염기서열이 특별히 제한되지 않는다.
- [0027] 본 발명의 용어 "RNA 앵타머"란, 특정의 3차원 입체형태를 채택하는 능력에 의해 표적 mRNA와 결합하여 이에 대해 길항 효과를 갖는 핵산 리간드 분자를 의미한다. 전형적으로 앵타머는 규정된 이차 및 삼차 구조, 예컨대 스템-루프구조로 접혀지는 15-50 염기 길이의 작은 핵산일 수 있다. 앵타머는 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} , 또는 10^{-12} 보다 적은 kd로 표적 분자와 결합하는 것이 바람직하다. 앵타머는 매우 고도의 특이성을 가지는 표적 분자와 결합할 수 있다. 또한, 앵타머는 다수의 리보뉴클레오타이드 단위, 데옥시리보뉴클레오타이드 단위, 또는 두 가지 유형의 뉴클레오타이드 잔기의 혼합물로 구성될 수 있다. 앵타머는 하나 이상의 변형된 염기, 당 또는 포스페이트 주쇄 단위를 추가로 포함할 수 있다.
- [0028] 본 발명에 있어서, 상기 RNA 앵타머는 상기 카베올린-2 유전자로부터 발현된 mRNA에 결합할 수 있는 형태의 앵타머인 것으로 해석될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 용어 "항체"란, 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질성 분자를 의미하는데, 이러한 항체는, 각 유전자를 통상적인 방법에 따라 발현벡터에 클로닝하여 상기 마커 유전자에 의해 코딩되는 단백질을 얻고, 얻어진 단백질로부터 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있다. 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이면 그것의 일부도 본 발명의 항체에 포함되고 모든 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있다. 아울러, 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv 등이 될 수 있다.

- [0030] 본 발명에 있어서, 상기 항체는 일 예로서 카베올린-2에 특이적으로 결합할 수 있는 항체가 될 수 있고, 다른 예로서 카베올린-2의 펩타이드에 특이적으로 결합할 수 있는 폴리클로날 항체, 모노클로날 항체 또는 그의 일부가 될 수 있다.
- [0031] 본 발명의 용어 "진단"이란, 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 일체의 행위를 의미하는데, 질병 또는 질환에 대한 표적 개체의 감수성(susceptibility)을 판정하는 행위, 표적 개체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 행위, 특정 질병 또는 질환이 발병된 표적 개체의 예후(prognosis)를 판정하는 행위, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예컨대, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 개체의 상태를 모니터링하는 행위)를 포함할 수 있다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 진단은 노화된 조직에서 염증의 발병 여부를 확인하거나, 발병된 염증의 진행 수준을 확인하는 일체의 행위를 포함하는 것으로 해석될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 마우스의 연령이 증가할 수록, 뇌조직에서 발현되는 카베올린-2의 발현수준이 증가되고(도 1a 및 1b), 상기 카베올린-2는 뇌혈관의 혈관내피세포에서 발현됨을 확인하였다(도 1c).
- [0034] 또한, 혈관내피세포에서 카베올린-2의 발현수준이 감소되면, 상기 혈관내피세포에 대한 THP-1 단핵구 세포의 부착활성이 감소하는 반면, 상기 혈관내피세포에서 카베올린-2의 발현수준이 증가되면, 상기 혈관내피세포에 대한 THP-1 단핵구 세포의 부착활성이 증가되며(도 2a 내지 2d), 뿐만 아니라, 카베올린-2의 발현수준이 증가된 혈관내피세포에 대하여는 THP-1 단핵구 세포의 투과활성이 증가됨을 확인하였다(도 3a 및 3b).
- [0035] 끝으로, 이러한 노화성 뇌조직 뿐만 아니라, 노화된 간조직 및 노화된 신장조직의 혈관내피세포를 대상으로 카베올린-2의 수준을 측정한 결과, 노화된 간조직 및 노화된 신장조직의 혈관내피세포에서도 카베올린-2의 수준이 현저히 증가됨을 확인하였다(도 4).
- [0036] 상기 THP-1 단핵구 세포는 혈액내에 존재하는 염증세포의 일종이므로, 상기 THP-1 단핵구 세포가 혈관내피세포에 대한 투과활성이 증가된다는 결과는 혈관을 투과하여 혈관이 존재하는 조직으로 유입되어, 염증 증상을 유발할 가능성이 높다는 것으로 해석될 수 있다. 다시 말해서, 상기 실시예의 결과는, 혈액내 존재하는 염증세포가 노화에 의해 카베올린-2의 발현수준이 증가된 뇌조직, 간조직, 신장조직 등의 조직내 혈관을 투과하여 노화된 조직 내로 용이하게 유입되어, 각 조직에서 염증 증상을 유발할 수 있다는 것으로 해석될 수 있다.
- [0037] 이에 따라, 상기 카베올린-2의 발현수준을 측정하면, 이의 측정수준에 따라 노화성 염증질환이 발병될 가능성이 있는지를 진단할 수 있을 것으로 분석되었다.
- [0038] 본 발명의 다른 실시양태는 상기 조성물을 포함하는 노화성 염증 진단용 키트를 제공한다.
- [0039] 본 발명의 키트는 염증의 발병이 의심되는 개체의 노화된 조직으로부터 상기 카베올린-2의 유전자 또는 단백질 수준을 측정하여 노화성 염증의 발병여부를 진단하는데 사용될 수 있는데, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 카베올린-2의 유전자 또는 단백질을 검출하기 위한 프라이머, 프로브 또는 항체 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수도 있다.
- [0040] 구체적인 일례로서, 본 발명의 노화성 염증 진단용 키트는 PCR 분석 또는 multiplex-PCR 분석을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. 상기 키트는, 상기 카베올린-2 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액(pH 및 마그네슘 농도는 다양), 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다.
- [0041] 다른 일례로서, 본 발명의 키트는 DNA 칩 분석법을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함할 수 있다. DNA 칩 분석용 키트는, 상기 카베올린-2 유전자 또는 그의 단편과 상보적으로 결합할 수 있는 프로브가 부착되어 있는 기판과, 형광표식 프로브를 제작하기 위한 시약, 제제, 효소 등을 포함할 수 있다. 또한, 기판은 정량 대조구 유전자 또는 그의 단편에 해당하는 cDNA를 포함할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 또 다른 실시양태는 상기 조성물 또는 키트를 사용하여 노화된 조직의 혈관내피세포에서 카베올린-2의 발현수준을 측정하는 단계를 포함하는 노화성 염증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0043] 구체적으로, 본 발명의 노화성 염증 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법은 (a) 노화성 염증의 발병이 의심되는 개체의 조직시료로부터 카베올린-2의 수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 측정된 카베올린-2의 수준이 정상 개체의 조직시료로부터 측정된 카베올린-2의 수준보다 높은 수준을 나타내는 경우, 노화성 염증이 발병한 것으로

판정하는 단계를 포함한다.

[0044] 이때, 상기 조성물, 키트, 카베올린-2 등은 상술한 바와 동일하다.

[0045] 상기 방법에 있어서, 상기 조직시료로는 뇌조직, 간조직, 신장조직 등의 조직으로부터 수득한 혈관, 혈관내피세포 등이 될 수 있으나, 이에 특별히 제한되지는 않는다.

[0046] 상기 방법에 있어서, 상기 카베올린-2의 수준은 카베올린 유전자로부터 전사된 mRNA의 수준 또는 카베올린-2의 단백질 수준이 될 수 있다.

발명의 효과

[0047] 본 발명의 노화성 염증 진단용 조성물을 이용하면, 노화에 의하여 유발되는 염증의 발병여부를 효과적으로 진단할 수 있으므로, 노화에 따른 다양한 질병의 효과적인 예방 및 치료에 널리 활용될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1a는 3개월령(Young) 및 15개월령(Old)의 C57BL/6 마우스 및 B6C3F1 마우스의 대뇌피질(co)과 해마 조직(hi)에서 검출된 카베올린-2의 단백질 수준을 측정된 결과를 나타내는 웨스턴블롯 분석사진이다.

도 1b는 3개월령(3m) 및 15개월령(15m)의 마우스의 뇌조직에서 얻어진 카베올린-2의 정량값과 내부대조군인 α -튜불린의 정량값을 사용하여 산출된 α -튜불린 대비 카베올린-2의 비율을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 1c는 3개월령(Young) 및 15개월령(Old)의 C57BL/6 마우스 및 B6C3F1 마우스의 뇌조직을 대상으로 항-카베올린-2 항체를 이용하여 면역염색한 결과를 나타내는 현미경사진이다.

도 2a는 대조군(GFP siRNA)과 카베올린-2의 발현이 감소된 HUVECs(Cav2 siRNA)에서 발현된 카베올린-2의 수준을 나타내는 웨스턴블롯 사진이다.

도 2b는 대조군(Cont)과 카베올린-2의 발현이 증가된 HUVECs(Lenti-Cav2)에서 발현된 카베올린-2의 수준을 나타내는 웨스턴블롯 사진이다.

도 2c는 카베올린-2의 발현이 감소된 HUVECs(Cav2 siRNA)와 카베올린-2의 발현이 증가된 HUVECs(Lenti-Cav2)에 녹색형광염료가 표지된 단핵구 세포(THP-1/Calcein AM)이 결합된 결과를 나타내는 형광현미경 사진이다.

도 2d는 도 2c에서 측정된 녹색형광의 수준을 정량분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 3a는 단핵구 세포의 혈관내피세포 투과활성 분석을 수행하기 위한 실험장치의 개요를 나타내는 개략도이다.

도 3b는 배양시간의 경과에 따른, 혈관내피세포를 투과하여 하부 챔버로 이동한 단핵구 세포수의 변화를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 4는 3개월령(Young) 및 15개월령(Old)의 C57BL/6 마우스 및 B6C3F1 마우스의 간조직 및 신장조직을 대상으로 항-카베올린-2 항체를 이용하여 면역염색한 결과를 나타내는 현미경사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0050] 실시예 1: 개체의 연령에 따른 카베올린-2의 발현수준 변화

[0051] 실시예 1-1: 웨스턴블롯 분석

[0052] C57BL/6 마우스 및 B6C3F1 마우스 중에서, 3개월령(Young) 개체와 15개월령(Old) 개체를 각각 2개체씩 선발하고, 선발된 각 마우스로부터 대뇌피질과 해마 조직을 적출하여 수득하였다.

[0053] 상기 수득한 각각의 대뇌피질과 해마 조직을 RIPA 완충액(protease/phosphatase inhibitor cocktail이 포함)에 넣고, 초음파를 처리하여 균질화 한 다음, 100℃에서 10분간 가열하고, 원심분리(5,000g, 4℃, 30분)하여 상층액을 수득하였다.

[0054] 상기 수득한 상층액을 대상으로, 항-카베올린-2 항체를 이용한 웨스턴블롯 분석을 수행하였다(도 1a). 이때, 내부대조군으로는 α -튜불린을 사용하였다.

- [0055] 도 1a는 3개월령(Young) 및 15개월령(Old)의 C57BL/6 마우스 및 B6C3F1 마우스의 대뇌피질(co)과 해마 조직(hi)에서 검출된 카베올린-2의 단백질 수준을 측정된 결과를 나타내는 웨스턴블롯 분석사진이다.
- [0056] 도 1a에서 보듯이, 마우스의 종류에 상관없이, 3개월령 개체의 뇌조직에 비하여, 15개월령 개체의 뇌조직에서 카베올린-2가 상대적으로 높은 수준으로 발현됨을 확인하였다.
- [0057] 또한, 상기 웨스턴블롯 분석을 통해 얻어진 카베올린-2의 정량값과 내부대조군인 α -튜불린의 정량값을 사용하여, α -튜불린 대비 카베올린-2의 비율을 산출하고 이의 평균값을 비교하였다(도 1b).
- [0058] 도 1b는 3개월령(3m) 및 15개월령(15m)의 마우스의 뇌조직에서 얻어진 카베올린-2의 정량값과 내부대조군인 α -튜불린의 정량값을 사용하여 산출된 α -튜불린 대비 카베올린-2의 비율을 비교한 결과를 나타내는 그래프이다.
- [0059] 도 1b에서 보듯이, 3개월령 개체의 뇌조직에 비하여, 15개월령 개체의 뇌조직에서 카베올린-2가 상대적으로 높은 수준으로 발현됨을 확인하였다.
- [0060] **실시예 1-2: 면역염색 분석**
- [0061] 상기 실시예 1-1에서 수득한 각각의 대뇌피질 조직을 공지된 방법으로 가공하여 각각의 조직박편을 수득하였다. 상기 수득한 각 조직박편에 과산화 효소 차단 용액(Dako)을 가하고, 30분 동안 반응시킨 후, 무 혈청 용액(Dako)을 가하고 다시 1시간 동안 반응시켰다. 그런 다음, 항-카베올린-2 항체를 가하고, 4℃에서 하룻밤동안 반응시킨 다음, PBS로 3회 세척하였다. 이어, 상기 조직박편에 퍼옥시다아제가 결합된 염소유래 항-마우스IgG 2차 항체(1:200)를 가하고 2시간 동안 반응시킨 후, PBS로 세척하고, DAB+ Chromogen system(Dako)을 2분 동안 처리하였다. 끝으로, 상기 조직박편에 알코올과 자일렌을 처리하여 탈수시키고, 현미경으로 관찰하였다(도 1c).
- [0062] 도 1c는 3개월령(Young) 및 15개월령(Old)의 C57BL/6 마우스 및 B6C3F1 마우스의 뇌조직을 대상으로 항-카베올린-2 항체를 이용하여 면역염색한 결과를 나타내는 현미경사진이다.
- [0063] 도 1c에서 보듯이, 마우스 뇌조직을 항-카베올린-2 항체를 이용하여 면역염색한 결과, 뇌조직 중 뇌 혈관내피세포 영역(화살표)에서 카베올린-2가 검출되었고, 3개월령 개체의 뇌 혈관내피세포 영역(화살표)에 비하여, 15개월령 개체의 뇌 혈관내피세포 영역(화살표)에서 카베올린-2가 상대적으로 높은 수준으로 발현됨을 확인하였다.
- [0064] **실시예 2: 카베올린-2의 발현수준 변화에 따른 단핵구와의 상호작용**
- [0065] 상기 실시예 1을 통해, 카베올린-2가 혈관내피세포에서 발현됨을 확인하였으므로, 사람유래 체대혈관내피세포(human umbilical vascular endothelial cells, HUVECs)를 사용하여 카베올린-2의 작용효과를 분석하고자 하였다.
- [0066] **실시예 2-1: 단핵구 세포의 부착활성 분석**
- [0067] 먼저, HUVECs를 6-웰 플레이트에 웰당 3×10^5 개 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 카베올린-2의 발현을 억제하는 siRNA를 도입하고, 다시 24시간 동안 배양하여 카베올린-2의 발현이 감소된 HUVECs를 수득하고, 상기 HUVECs에서 발현된 카베올린-2의 수준을 웨스턴블롯 분석을 통해 확인하였다(도 2a). 이때, 대조군으로는 GFP의 발현을 억제하는 siRNA가 도입된 HUVECs를 사용하였고, 내부대조군으로는 α -튜불린을 사용하였다.
- [0068] 도 2a는 대조군(GFP siRNA)과 카베올린-2의 발현이 감소된 HUVECs(Cav2 siRNA)에서 발현된 카베올린-2의 수준을 나타내는 웨스턴블롯 사진이다.
- [0069] 도 2a에서 보듯이, 상기 수득한 HUVECs에서 카베올린-2의 단백질 수준이 감소됨을 확인하였다.
- [0070] 다음으로, HUVECs를 6-웰 플레이트에 웰당 3×10^5 개 분주하고 24시간 동안 배양한 후, 렌티바이러스를 감염시키고, 다시 24시간 동안 배양하여 카베올린-2의 발현이 증가된 HUVECs를 수득하고, 상기 HUVECs에서 발현된 카베올린-2의 수준을 웨스턴블롯 분석을 통해 확인하였다(도 2b). 이때, 대조군으로는 렌티바이러스가 감염되지 않은 HUVECs를 사용하였고, 내부대조군으로는 α -튜불린을 사용하였다.
- [0071] 도 2b는 대조군(Cont)과 카베올린-2의 발현이 증가된 HUVECs(Lenti-Cav2)에서 발현된 카베올린-2의 수준을 나타내는 웨스턴블롯 사진이다.
- [0072] 도 2b에서 보듯이, 상기 수득한 HUVECs에서 카베올린-2의 단백질 수준이 증가됨을 확인하였다.
- [0073] 끝으로, THP-1 단핵구 세포에 녹색형광염료(calcein-AM)를 가하고 37℃에서 30분 동안 반응시켜서, 표지된 THP-

1 단핵구 세포를 수득하였다.

[0074] 상기 수득한 카베올린-2의 발현이 감소/증가된 HUVECs를 96-웰 플레이트에 웰당 1×10^4 개 분주하고 24시간 동안 배양한 다음, 웰당 2.5×10^5 개의 상기 표지된 THP-1 단핵구 세포를 추가하고, 37℃에서 1시간 동안 배양하였다. 배양이 종료된 후, PBS로 3회 세척하여, HUVECs에 부착되지 않은 표지된 THP-1 단핵구 세포를 제거하고, 형광현미경으로 HUVECs를 관찰한 다음(도 2c), 상기 형광현미경으로 촬영된 녹색형광의 수준을 정량분석하였다(도 2d).

[0075] 도 2c는 카베올린-2의 발현이 감소된 HUVECs(Cav2 siRNA)와 카베올린-2의 발현이 증가된 HUVECs(Lenti-Cav2)에 녹색형광염료가 표지된 단핵구 세포(THP-1/Calcein AM)이 결합된 결과를 나타내는 형광현미경 사진이고, 도 2d는 상기 형광현미경에서 측정된 녹색형광의 수준을 정량분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0076] 도 2c 및 2d에서 보듯이, 대조군(GFP siRNA)에 비하여 카베올린-2의 발현이 감소된 HUVECs(Cav2 siRNA)에서는 녹색형광이 상대적으로 감소되었고, 대조군(Cont)에 비하여 카베올린-2의 발현이 증가된 HUVECs(Lenti-Cav2)에서는 녹색형광이 상대적으로 증가됨을 확인하였다.

[0077] 상기 결과로부터, HUVECs에 부착되는 THP-1 단핵구 세포의 수준은 HUVECs에서 발현되는 카베올린-2의 수준에 비례함을 알 수 있었다. 즉, HUVECs에서 카베올린-2의 발현수준이 증가되면, 이에 부착되는 THP-1 단핵구 세포의 수준이 증가되고, 반면 HUVECs에서 카베올린-2의 발현수준이 감소되면, 이에 부착되는 THP-1 단핵구 세포의 수준역시 감소됨을 알 수 있었다.

[0078] 실시예 2-2: 단핵구 세포의 혈관내피세포 투과활성 분석

[0079] 먼저, 상기 실시예 2-1에서 수득한 표지된 THP-1 단핵구 세포(1×10^6 개)에 FBS를 포함하지 않은 RPMI 배지를 가하여 현탁액을 수득하였다.

[0080] 또한, 상기 실시예 2-1에서 수득한 카베올린-2의 발현이 증가된 HUVECs(Lenti-Cav2)를 24웰 플레이트의 상부 챔버에 각 웰당 1×10^6 개 분주하고, 37℃에서 24시간 동안 배양하였다. 그런 다음, 상기 수득한 현탁액을 상부 챔버에 가하고, 하부 챔버에는 10% FBS를 포함한 RPMI 배양액을 넣은 다음, 37℃에서 72시간 동안 배양하였다(도 3a).

[0081] 도 3a는 단핵구 세포의 혈관내피세포 투과활성 분석을 수행하기 위한 실험장치의 개요를 나타내는 개략도이다.

[0082] 끝으로, 배양시작 시점으로부터 24시간, 48시간 및 72시간이 경과된 시점에서 하부 챔버에 존재하는 표지된 THP-1 단핵구 세포의 수를 계수하였다(도 3b). 이때, 대조군으로는 렌티바이러스가 감염되지 않은 HUVECs를 사용하였다.

[0083] 도 3b는 배양시간의 경과에 따른, 혈관내피세포를 투과하여 하부 챔버로 이동한 단핵구 세포수의 변화를 분석한 결과를 나타내는 그래프이다.

[0084] 도 3b에서 보듯이, 대조군(Cont)에 비하여 카베올린-2의 발현이 증가된 HUVECs(Lenti-Cav2)에서는 단핵구 세포의 투과활성이 시간의 경과에 따라 상대적으로 높은 수준으로 증가됨을 확인하였다.

[0085] 상기 실시예 1 및 2의 결과를 종합하면, 개체의 연령이 증가될 수록 뇌조직의 혈관내피세포에서 발현되는 카베올린-2의 발현수준이 증가하고, 카베올린-2의 발현수준이 증가된 혈관내피세포는 THP-1 단핵구 세포의 부착활성 및 투과활성이 증가됨을 알 수 있었다.

[0086] 상기 THP-1 단핵구 세포는 혈액내에 존재하는 염증세포의 일종이므로, 상기 THP-1 단핵구 세포가 혈관내피세포에 대한 투과활성이 증가된다는 결과는 혈관을 투과하여 혈관이 존재하는 조직으로 유입되어, 염증 증상을 유발할 가능성이 높다는 것으로 해석될 수 있다.

[0087] 다시 말해서, 상기 실시예의 결과는, 혈액내 존재하는 염증세포가 노화에 의해 카베올린-2의 발현수준이 증가된 뇌조직의 혈관을 투과하여 뇌조직 내로 용이하게 유입되어, 뇌조직에서 염증 증상을 유발할 수 있다는 것으로 해석될 수 있다.

[0088] 이에 따라, 상기 카베올린-2의 발현수준을 측정하면, 이의 측정수준에 따라 노화성 염증질환이 발병될 가능성이 있는지를 진단할 수 있을 것으로 분석되었다.

[0089] **실시예 3: 다른 조직의 면역염색 분석**

[0090] 상기 실시예 1 및 2의 결과에 따라, 개체의 연령이 증가될 수록 뇌조직의 혈관내피세포에서 발현되는 카베올린-2의 발현수준이 증가됨을 확인하였으므로, 뇌조직 이외의 다른 조직에서도 유사한 결과를 얻을 수 있는지 확인하고자 하였다.

[0091] 상기 실시예 1-1에서 수득한 각각의 대뇌피질 조직 대신에 동일한 개체의 간조직 및 신장조직을 대상으로 하는 것을 제외하고는, 상기 실시예 1-2의 방법으로 면역염색을 수행하였다(도 4).

[0092] 도 4는 3개월령(Young) 및 15개월령(Old)의 C57BL/6 마우스 및 B6C3F1 마우스의 간조직 및 신장조직을 대상으로 항-카베올린-2 항체를 이용하여 면역염색한 결과를 나타내는 현미경사진이다.

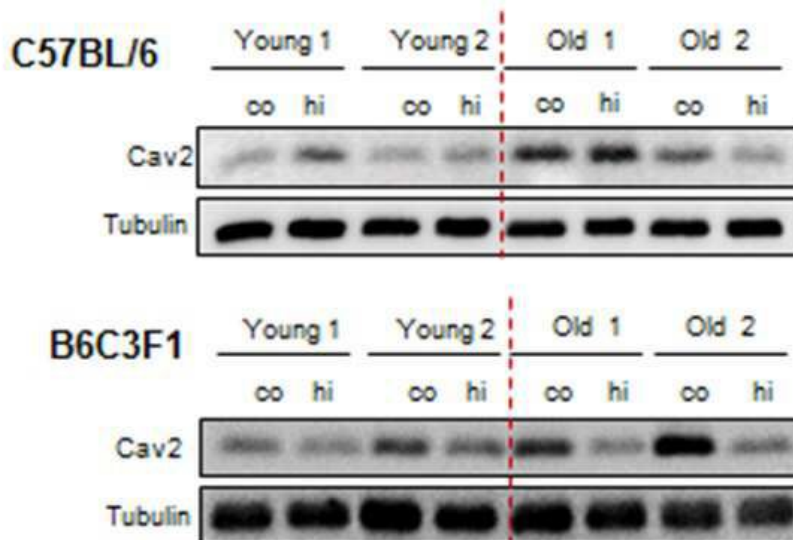
[0093] 도 4에서 보듯이, 마우스 뇌조직 뿐만 아니라 간조직 및 신장조직에서도, 혈관내피세포 영역에서 카베올린-2가 검출되었고, 3개월령 개체의 뇌 혈관내피세포 영역에 비하여, 15개월령 개체의 뇌 혈관내피세포 영역에서 카베올린-2가 상대적으로 높은 수준으로 발현됨을 확인하였다.

[0094] 따라서, 노화된 개체의 뇌조직 뿐만 아니라, 간조직 및 신장조직에서도 혈관내피세포 영역에서 카베올린-2의 발현수준이 현저히 증가되며, 이는 뇌조직 뿐만 아니라 다양한 노화조직에서도 염증이 유발될 수 있음을 시사하는 것으로 분석되었다.

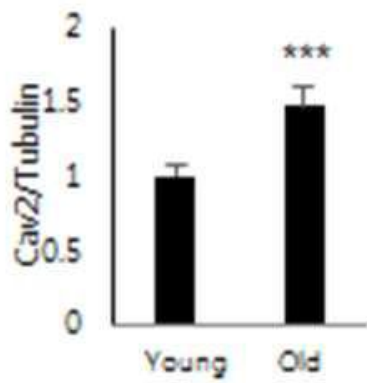
[0095] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

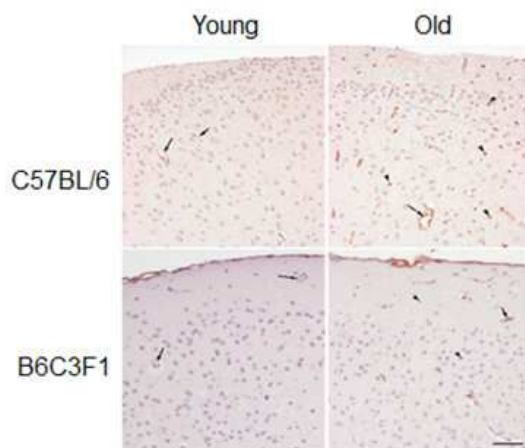
도면1a



도면1b



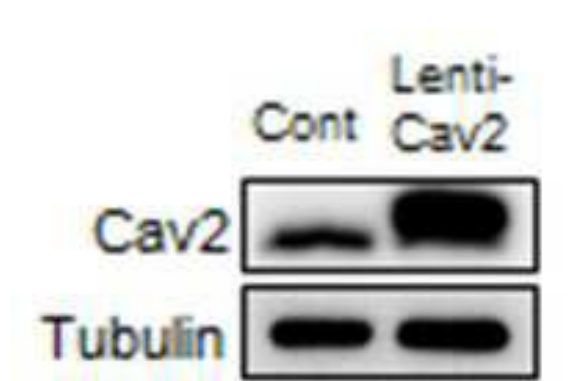
도면1c



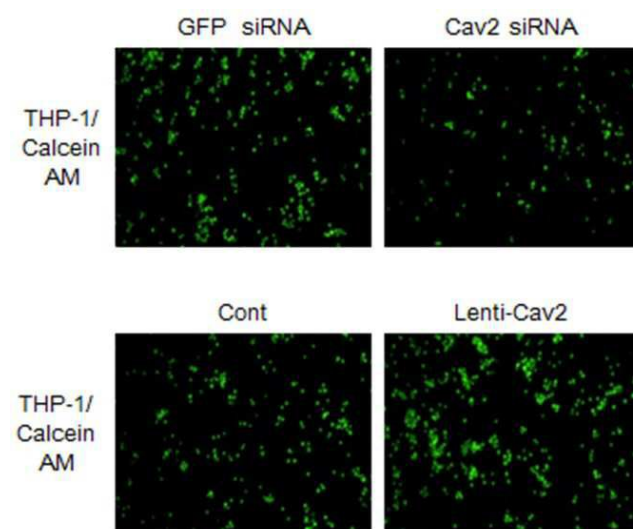
도면2a



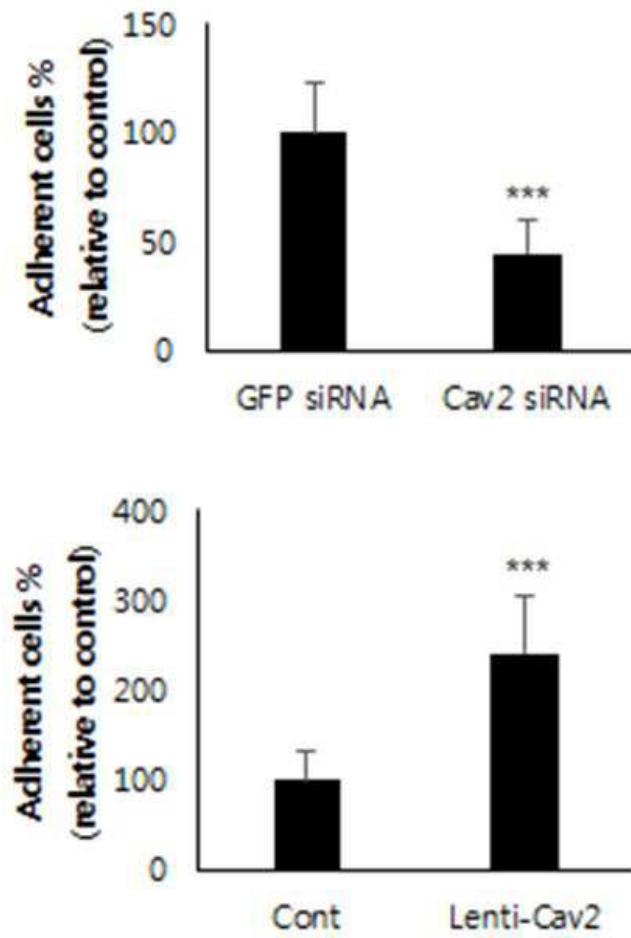
도면2b



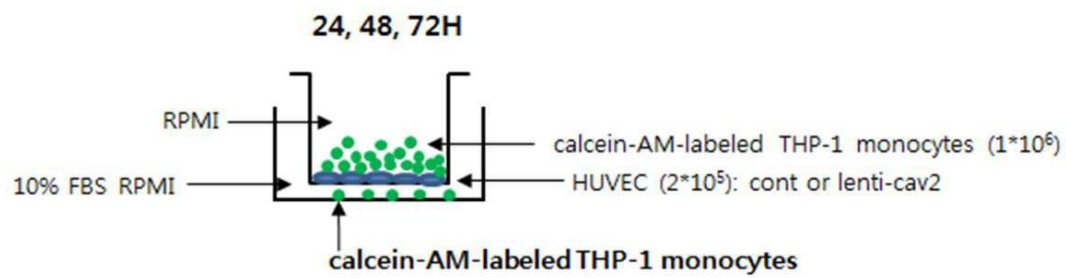
도면2c



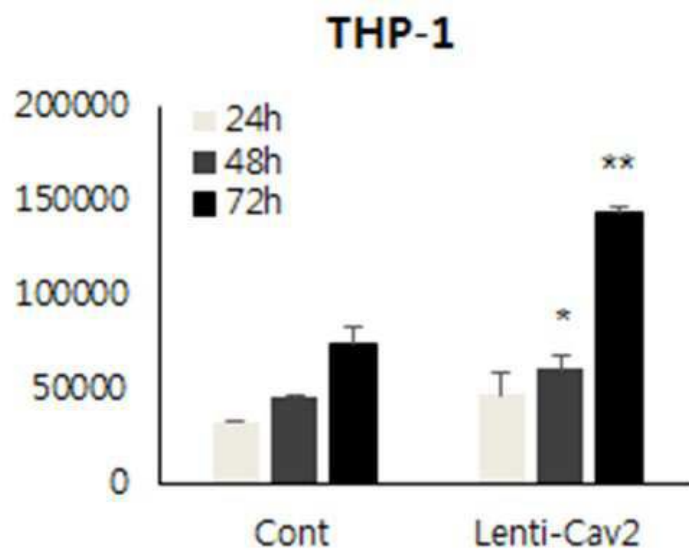
도면2d



도면3a



도면3b



도면4

