



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0044667
(43) 공개일자 2018년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2018.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6883 (2013.01)

C12Q 1/6886 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2016-0138467

(22) 출원일자 2016년10월24일

심사청구일자 2016년10월24일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

조은경

대전광역시 유성구 봉명로 48, 805동 702호 (원신
홍동, 신안인스빌리베라)

이혜미

대전광역시 서구 가장로 106, 116-1501

김진경

대전광역시 서구 배재로 134, 114동 1206호 (도마
동, 경남아파트1단지)

(74) 대리인

김원준

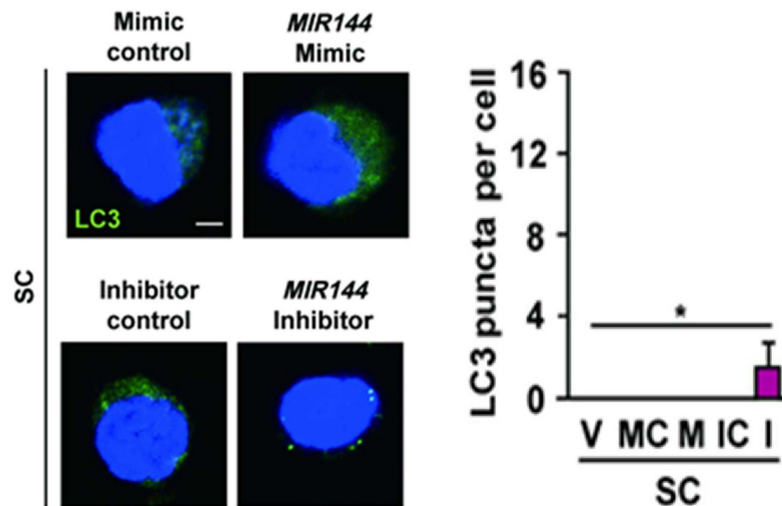
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 자가포식 조절제의 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 마이크로 RNA를 마커로 이용한 자가포식 조절제의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 (A) miRNA-144를 발현하는 세포 또는 조직에 시험물질을 처리하는 단계; 및 (B) 상기 시험물질이 처리된 세포 또는 조직에서 miRNA-144의 발현을 측정하는 단계; 및 (C) 상기 (B) 단계에서 측정된 miRNA-144의 발현수준이 시험물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 변화된 경우 자가포식 조절제로 판정하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 자가포식 조절제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/136 (2013.01)

C12Q 2600/178 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C0395

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 충남대학교 산학협력단

연구사업명 감염병위기대응기술개발

연구과제명 자가포식 기반 결핵 방어기전 규명 및 숙주표적 병합치료 후보물질 발굴

기 여 율 1/1

주관기관 보건복지부

연구기간 2016.07.01 ~ 2017.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

(A) miRNA-144를 발현하는 세포 또는 조직에 시험물질을 처리하는 단계; 및

(B) 상기 시험물질이 처리된 세포 또는 조직에서 miRNA-144의 발현을 측정하는 단계; 및

(C) 상기 (B) 단계에서 측정된 miRNA-144의 발현수준이 시험물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 변화된 경우 자가포식 조절제로 판정하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 자가포식 조절제의 스크리닝 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 (C) 단계에서 miRNA-144의 발현수준이 상향조절된 경우 자가포식 억제제로, miRNA-144의 발현수준이 대조군에 비해 하향조절된 경우 자가포식 활성제로 판단하는 것을 특징으로 하는 자가포식 조절제의 스크리닝 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 miRNA-144의 발현수준을 정량적으로 측정하여 자가포식 활성도를 평가하는 것을 특징으로 하는 자가포식 조절제의 스크리닝 방법.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 miRNA-144의 발현수준은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 마이크로어레이에 의해 측정되는 것을 특징으로 하는 자가포식 조절제의 스크리닝 방법.

청구항 5

miRNA-144의 발현수준을 측정하는 체제를 포함하는 것을 특징으로 하는 자가포식 관련 질환의 진단 키트.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 마이크로 RNA(mirco RNA, 이하 'miRNA'라 한다.)를 마커로 이용한 자가포식 조절제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 진핵세포에서의 세포사멸은 형태학적, 생화학적 특징에 따라 아포토시스(apoptosis), 자가포식(autophagy), 괴사(necrosis)로 나뉘어진다. 이 중 자가포식은 세포 내 소기관이 불필요하거나 기능하지 않는 단백질을 분해하여 세포의 에너지원으로 이용하는 현상으로, 세포 스스로의 생존을 위해 내부 단백질을 재활용하여 세포의 항상성을 유지하는 데 중요한 역할을 한다. 자가포식은 세포가 쓸 수 있는 영양분이 부족하거나 외부 미생물에

게 침입을 받는 등 생존에 위협적인 스트레스 상황에서 활성화된다.

[0003] 자가포식은 미세자가포식(microautophagy), 거대자가포식(macroautophagy), 샤페론 매개 자가포식의 3가지 유형으로 나누어지며, 이들에 대한 광범위한 연구들이 이루어져 왔다. 자가포식에 관여하는 단백질로는 베클린-1(Beclin-1), LC3, mTOR 단백질 등이 알려져 있다. 이 중 LC3(Light Chain 3)는 자가포식 시 발현이 증가하는 단백질로, 인간에서는 세가지 아이소폼(isoform)인 LC3A, LC3B 및 LC3C가 알려져 있고, 이들은 자가포식 과정 동안 전사후 변형의 과정을 거친다. LC3는 합성 직후 세포질성 형태인 LC3-I를 생성시키고, 자가포식 과정 동안 LC3-II로 변환된다. 따라서 자가포식소체에서 LC3의 존재와 LC3의 더 낮은 이동 형태인 LC3-II로의 변환은 자가포식의 지표로 사용된다.

[0004] 이러한 자가포식 현상이 세포성장, 분화, 신진대사 조절, 암, 뇌질환, 면역 등 다양한 생리적, 병리적 상태를 조절하는 데 중요한 역할을 담당한다는 사실이 보고되면서 자가포식에 대한 많은 관심이 집중되고 있다. 그러나 다양한 질환 모델에서 자가포식의 기능이 밝혀지고 있고, 주목을 받고 있음에도 불구하고 아직까지 정확한 매커니즘과 관여하는 분자의 기능에 대해서는 많이 알려져 있지 않다. 특정한 조건이 요구되는 아포토시스와는 달리 자가포식은 영양고갈의 조건만으로도 충분히 유발될 수 있기 때문에 자가포식의 유발을 조절할 수 있다면, 비정상적인 세포 및 단백질로 인하여 유발되는 각종 질환의 치료를 보다 용이하게 수행할 수 있을 것으로 기대된다.

[0005] 등록특허 10-1518461호(자가소화작용 조절 물질의 스크리닝 방법) 및 등록특허 10-1645359호(자가포식 활성화제 또는 억제제를 스크리닝하는 방법)는 각종 질환의 치료 모델로서 자가포식의 활성화제 또는 억제제가 주요한 역할을 할 수 있을 것으로 기대하며 각각 hnRNP-Q1과 RhoA 단백질 발현 또는 Beclin-1 단백질의 인산화 정도를 변화시키는 물질을 자가포식 조절 물질로 하는 스크리닝 방법을 개시하였다. 그러나 이들은 모두 LC3 단백질과 마찬가지로 분자량이 큰 단백질의 발현량을 측정하는 것이며, 보다 빠르고 높은 감도로 자가포식 조절제를 스크리닝 할 수 있는 방법이 필요하다.

[0006] miRNA는 소형의 비암호화(noncoding) RNA로 숙주세포에서 면역반응을 포함한 다양한 생리활성의 조절에 중요한 역할을 담당한다. 최근 들어, miRNA는 암, 심장질환, 임신, 당뇨, 정신질환 등 다양한 분야의 진단에서 새로운 형태의 바이오마커로서 심도 깊게 연구되어 지고 있다. 본 발명자들도 miRNA-302f와 miRNA-17-5p를 사용하여 결핵을 조기 진단할 수 있음을 확인하고 이를 등록특허 10-1643748호와 10-1476781호로 각각 등록받은 바 있다. miRNA-144는 22개의 핵산으로 이루어진 miRNA로 인간의 세포 및 조직에서 발견된다. 조현병과 양극성 정동 장애의 치료에 이용될 수 있는 잠재적인 miRNA 타겟의 하나로 분류되어 있으며, 허혈성 심장 질환에 대한 잠재적인 치료제로 알려져 있으나, 아직까지 그 역할에 대한 연구는 미흡한 상태이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 등록특허 제10-1518461호
(특허문헌 0002) 등록특허 제10-1645359호
(특허문헌 0003) 등록특허 제10-1643748호
(특허문헌 0004) 등록특허 제10-1476781호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 종래 자가포식 지표인 거대분자의 단백질에 비해 작은 분자를 마커로 사용하여 민감도가 향상된 자가포식 조절제의 스크리닝 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 (A) miRNA-144를 발현하는 세포 또는 조직에 시험물질을 처리하는 단계; 및 (B) 상기 시험물질이 처리된 세포 또는 조직에서 miRNA-144의 발현을 측정하는 단계; 및 (C) 상기 (B)

단계에서 측정된 miRNA-144의 발현수준이 시험물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 변화된 경우 자가포식 조절제로 판정하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 자가포식 조절제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0010] miRNA-144는 하기 서열번호 1의 서열을 갖는 마이크로 RNA로 자가포식에 대한 지표로 사용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다. miRNA-144는 인간의 세포와 조직에 광범위하게 존재하므로, 다양한 종류의 세포와 조직을 대상으로 자가포식 조절제를 스크리닝하는 데 사용될 수 있다.

[0011] 서열번호 1 : GGUAUACAUCUAUACUGUAAG

[0012] 상기와 같은 자가포식 조절제의 스크리닝은 각 세포 또는 조직에서의 시험물질이 자가포식 조절제로 작용하는지 여부를 확인하여 이와 관련된 각종 질환의 예방 또는 치료제 후보군을 선별하는데 이용될 수 있다.

[0013] 본 발명에서 상기 시험물질에 의해 세포 또는 조직에서 miRNA-144의 발현수준이 상향조절된 경우 자가포식 억제제로, miRNA-144의 발현수준이 대조군에 비해 하향조절된 경우 자가포식 활성화제로 판단할 수 있다. 이때 상기 발현 수준의 정도는 정성적으로 이루어질 수도 있으나, 정량적으로 비교하여 자가포식 활성도를 상대적으로 평가하거나 약물의 유효농도를 결정하는 데 이용될 수 있다.

[0014] miRNA-144의 발현수준은 당업계에서 사용되는 어떤 방법을 사용하여도 무방하다. 예로서 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 마이크로어레이를 활용할 수 있으며 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 발현 분석을 위하여 miRNA-144를 특이적으로 증폭시키거나 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 사용할 수 있다. miRNA-144를 특이적으로 증폭시킬 수 있는 프라이머로는 RNA-144와 동일한 서열번호 1의 서열을 갖는 프라이머를 예로 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 공지되어 있는 miRNA-144의 서열로부터 종래기술을 이용하여 이들 유전자 혹은 유전자의 특정영역을 특이적으로 증폭할 수 있도록 디자인하는 것은 당업자라면 용이할 것이다.

[0015] 본 발명은 또한 miRNA-144의 발현수준을 측정하는 제제를 포함하는 것을 특징으로 하는 자가포식 관련 질환의 진단 키트에 관한 것이다. 상기 자가포식 관련 질환은 신경퇴행성 질환, 자가면역 질환, 심혈관 질환, 대사 질환, 과오종 증후군, 유전성 근육 질환, 근 질환 또는 암을 예로 들 수 있다. 자가포식과 관련된 구체적인 질환은 당업계에서 널리 알려진 것으로, 이에 대한 구체적인 나열은 생략한다. 상기 진단 키트는 miRNA-144의 분석 방법에 따라 적절한 형태로 구성되며, 각 분석 방법에 적합한 한 종류 이상의 다른 구성을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, RT-PCR용 키트라면 테스트 튜브, 완충액, 데옥시 뉴클레오타이드(dNTPs), 각종 효소, 사용 매뉴얼 등을 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0016] 이상과 같이 본 발명의 스크리닝 방법에 의하면 22개의 염기로 이루어진 크기가 작은 miRNA의 발현을 지표로 사용하기 때문에 기존 단백질 지표에 비해 높은 민감도로 자가포식 조절제를 빠르게 스크리닝 할 수 있다.

[0017] 자가포식은 세포성장, 분화, 신진대사 조절, 암, 뇌질환, 면역 등 다양한 생리적, 병리적 상태의 조절에 관여하기 때문에, 본 발명은 이들과 관련된 질환의 예방 및 치료제 후보군의 효과적인 스크리닝에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 miRNA-144의 활성화제와 저해제가 자가포식에 미치는 영향을 보여주는 면역형광분석 이미지 및 그래프.

도 2는 miRNA-144의 활성화제와 저해제가 자가포식에 미치는 영향을 보여주는 웨스턴블롯 결과를 보여주는 전기영동 사진.

도 3은 miRNA-144의 활성화제 및 저해제에 존재 시 자가포식 활성화 약제가 자가포식에 미치는 영향을 보여주는 면역형광분석 결과 그래프.

도 4는 자가포식 활성화 약제에 의한 miRNA-144 발현 변화를 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

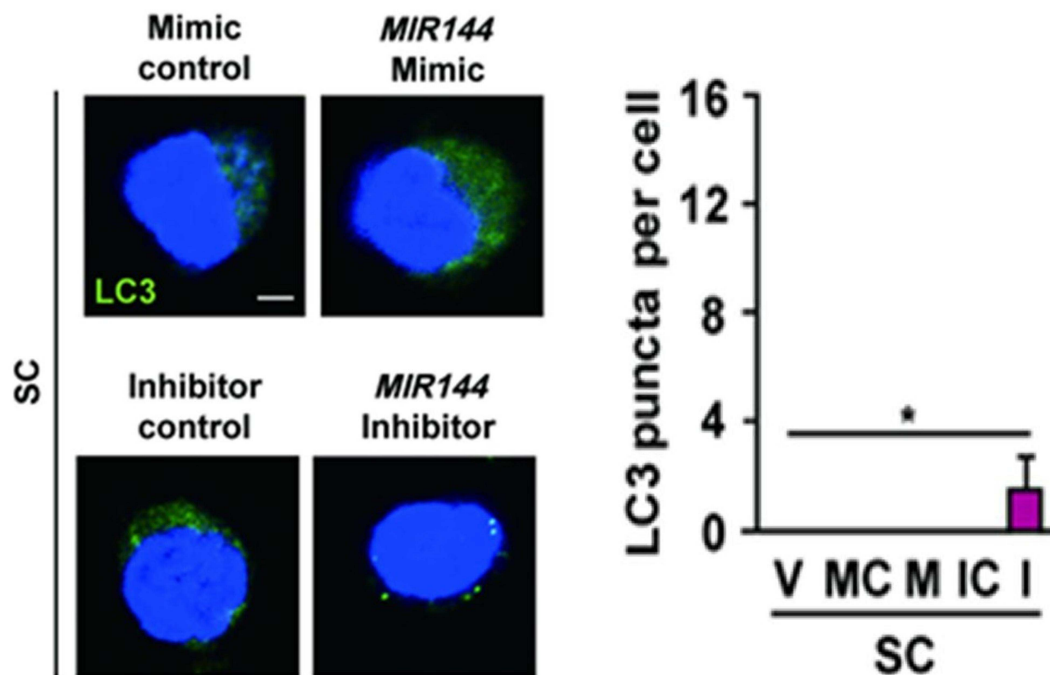
[0019] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

- [0020] **[실시예]**
- [0021] **실시예 1 : miRNA-144 저해제 및 활성화제에 의한 자가포식의 영향 분석**
- [0022] **1) 말초혈액 유래 단핵세포의 준비 및 배양**
- [0023] 정상인 정맥혈을 제공받아 Histopaque-1077(Sigma-Aldrich)을 이용한 밀도구배 원심분리로 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cells)를 수집하였다. 수집한 세포는 배양액 [RPMI 1640 (Gibco-BRL, 미국) with 10% human serum]에 2×10^6 /ml의 농도로 부유시켜 37℃, 5% CO₂ 조건에서 coverslip과 함께 24 well culture plate에 2시간 부착시킨 후 실험에 사용하였다. 분리된 단핵구의 순도는 항 CD14 항체를 이용한 유세포 측정으로 95% 이상임을 확인하였다.
- [0024] **2) miRNA-144의 저해제 및 활성화제에 의한 자가포식의 영향 분석(면역형광염색법)**
- [0025] miRNA-144이 자가포식에 미치는 영향을 분석하기 위하여 말초혈액 유래의 단핵세포에 miRNA-144의 활성화제 및 저해제를 각각 형질도입한 후 자가포식 관련 단백질의 발현을 관찰 및 정량하였다. miRNA-144 활성화제로는 miRNA-144와 동일한 서열번호 1을, miRNA-144 저해제로는 하기 miRNA-144의 상보서열인 서열번호 2를 이용하였다.
- [0026] 서열번호 2 : CUUACAGUAUAUGAUGAUUCC
- [0027] 구체적으로, 1)에서 준비한 말초혈액 유래 단핵세포에 lipofectamine 2000(Invitrogen)을 사용하여 제조사의 방법에 의해 miRNA-144 활성화제(Genolution Inc., 대한민국)와 저해제(Genolution Inc., 대한민국) 용액을 제조하고, miRNA-144의 활성화제 또는 저해제를 24시간 처리하여 일시적 형질감염하였다.
- [0028] Vehicle로는 PBS(Sigma, P4417)를 5 μ l 처리하였으며, 대조군(Control)으로는 miRNA-144 활성화제와 저해제의 제조사에서 제공받은 miRNA-144 활성화제 또는 저해제의 용액의 제조에 사용되는 용매만을 활성화제 또는 저해제의 처리 시의 양과 동일하게 처리하였다.
- [0029] 형질감염된 세포와 Vehicle 또는 Control의 세포 각각을 37℃의 세포 배양기에서 24시간 배양하고, 4% paraformaldehyde 및 0.25% Triton X-100로 각각 10분간 처리시킨 후 1차 항체 LC3B를 2시간 상온에서 반응하였다. 이후 PBS로 2회 세척 후 2차 항체를 1시간 상온에서 반응한 후 세포가 붙어있는 coverslip을 봉입하였다. 이후, 공초점현미경을 이용하여 자가포식 발현을 관찰 및 정량하였다.
- [0030] 도 1은 상기 공초점현미경 이미지와 LC3의 정량 결과를 보여준다. 도 1에서 V는 Vehicle, MC는 활성화제 대조군, M은 활성화제 처리군, IC는 저해제 대조군, I는 저해제 처리군을 나타낸다. 상기 결과는 miRNA-144의 저해제가 자가포식을 크게 활성화시키는 것을 보여준다.
- [0031] **3) miRNA-144의 저해제에 의한 자가포식의 영향 분석(웨스턴 블랏)**
- [0032] miRNA-144이 자가포식에 미치는 영향을 분석하기 위하여 웨스턴 블랏으로 다시 한번 검정하였다.
- [0033] 2)와 동일한 방법에 의해 정상인 말초혈액 유래 단핵세포를 서열번호 2의 miRNA-144의 저해제로 일시적 형질감염시켰다. 형질감염 후 24시간 배양한 세포와 Vehicle 또는 Control의 세포 각각을 PBS 완충액을 사용하여 3회 세척한 후 lysis 완충액으로 용균하였다. 일정량의 용균액을 SDS-PAGE에 용해시킨 후 PVDF 멤브레인으로 옮겨 Western-blot에 의해 자가포식 지표인 LC3 및 LC3-II 단백질을 정량하고 그 결과를 도 2에 도시하였다.
- [0034] 도 2에서 Vehicle이나, Control에 비해 miRNA-144의 저해제 처리군에서 LC3-II/LC3-I의 비율이 현저하게 증가하여 자가포식이 활성화된 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과는 miRNA-144의 발현이 자가포식의 지표로 사용될 수 있음을 나타낸다.
- [0035] **실시예 2 : 종래 자가포식 활성화제에 의한 검정**
- [0036] miRNA-144 발현 수준이 자가포식의 지표로 사용될 수 있음을 종래 자가포식 활성화제로 알려진 AICAR와 비타민 D3를 사용하여 확인하였다.
- [0037] 먼저 AICAR와 비타민D3에 의한 자가포식의 활성화와, miRNA-144 활성화제와 저해제가 자가포식에 미치는 영향을 확인하였다. 도 2와 도 3은 실시예 1에 기재된 방법에 따라 miRNA-144 활성화제와 저해제로 형질감염한 세포에서, 상기와 동일한 방법에 의해 AICAR 또는 비타민D3를 처리하고 24시간 배양한 후 웨스턴블랏과 면역형광염색법에 의해 자가포식 지표 단백질인 LC3의 발현을 분석한 결과이다.

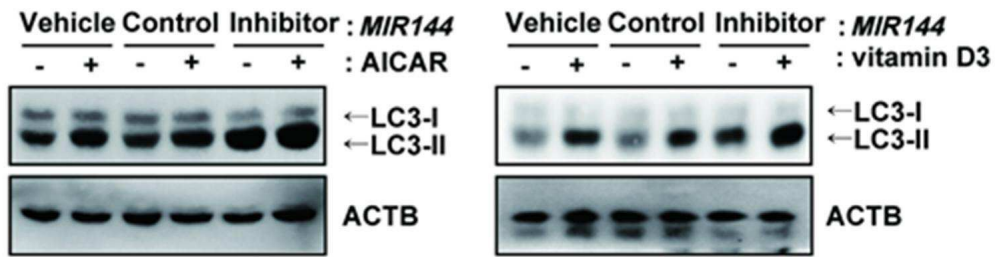
- [0038] 도 2와 도 3은 AICAR 또는 비타민D3의 처리에 의해 세포의 자가포식이 활성화되며, miRNA-144의 활성제로 형질 감염된 세포에서는 자가포식 활성화 정도가 감소하고, miRNA-144의 저해제로 형질감염된 세포에서는 자가포식 활성화가 더욱 증대되어 miRNA-144가 자가포식을 조절하는 것을 나타내었다.
- [0039] 이에 더 나아가, AICAR 또는 비타민D3의 처리에 의한 miRNA-144의 발현 수준 변화를 확인하였다. AICAR와 비타민D3의 처리는 자가포식을 활성화시키므로 miRNA-144의 발현수준을 하향조절할 것으로 예상할 수 있다.
- [0040] 이를 위하여 실시예 1의 1)에서 준비한 말초혈액 유래 단핵세포에 자가포식을 유도하는 약물인 AICAR 0.5mM 또는 비타민D3 20nM을 처리한 후, 37℃의 세포 배양기에서 6, 18, 24 및 48시간 배양하였다. 배양세포로부터 Qiazol lysis reagent 시약(Qiagen, USA)을 사용하여 miRNeasy mini kit(Qiagen)의 제조사 방법에 따라 전체 RNA를 분리하였다. 분리한 RNA를 제조사 방법에 따라 miScript II RT Kit(Qiagen)를 사용하여 mature miRNA를 합성하였다. 이후, miScript SYBR Green kit(Qiagen) 및 miRNA-144와 동일한 서열의 프라이머(Qiagen)로 real-time PCR에 의해 miRNA-144 발현을 정량하였다(normalization : small nuclear RNA(Rnu 6)).
- [0041] 도 4는 AICAR 및 비타민D3 처리 후 miRNA-144의 발현 수준을 배양 시간에 따라 도시한 그래프로, AICAR 또는 비타민D3의 처리에 따라 miRNA-144의 발현이 크게 감소하여 miRNA-144의 발현이 자가포식의 지표로 유용함을 확인할 수 있었다.

도면

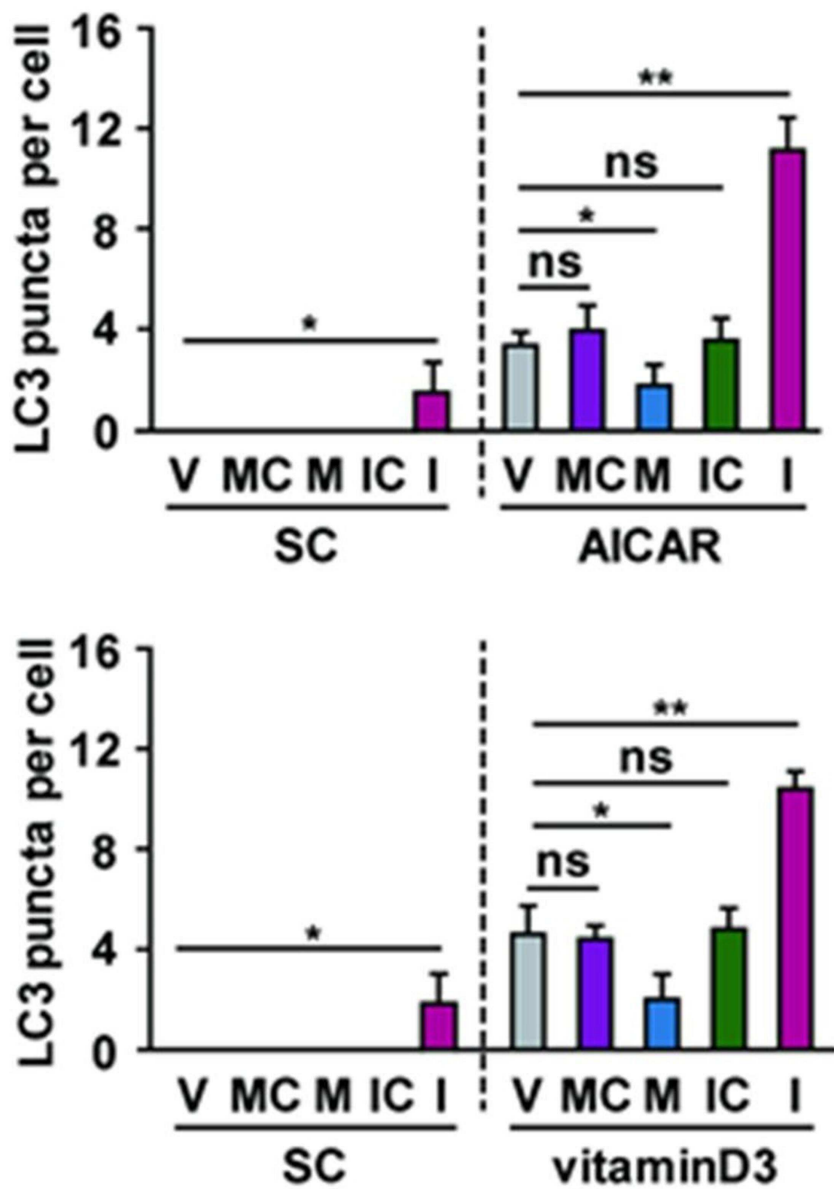
도면1



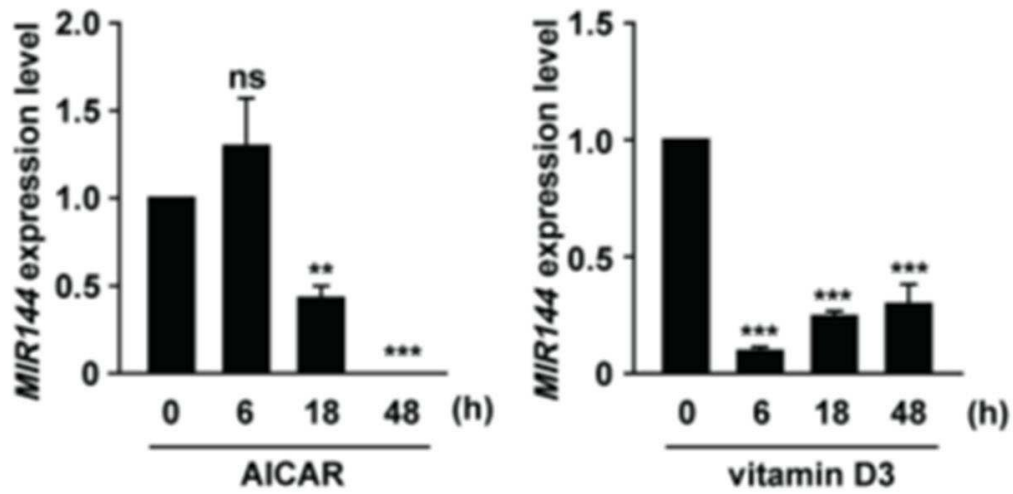
도면2



도면3



도면4



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Method for Screening Autophagy Regulator

<130> P1016-619

<160> 2

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

ggauaucauc auauacugua ag 22

<210> 2

<211> 22

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

cuuacaguau augaugauau cc 22