



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년09월05일
(11) 등록번호 10-1774274
(24) 등록일자 2017년08월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7088 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61K 8/60* (2006.01)
A61K 8/64 (2006.01) *C07K 16/00* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/7088 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-0045756
 (22) 출원일자 2015년03월31일
 심사청구일자 2015년03월31일
 (65) 공개번호 10-2016-0117090
 (43) 공개일자 2016년10월10일
 (56) 선행기술조사문헌
 Journal of biomolecular Screening. 2002,
 7(4), 325-332.*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자
 동국대학교 산학협력단
 서울특별시 중구 필동로1길 30 (필동3가, 동국대학교)
 대한민국 (식품의약품안전처장)
 충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187
- (72) 발명자
 이애영
 서울특별시 종로구 사직로 102, 신동아 블루아 아파트 801호
- (74) 대리인
 이명진

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 이민정

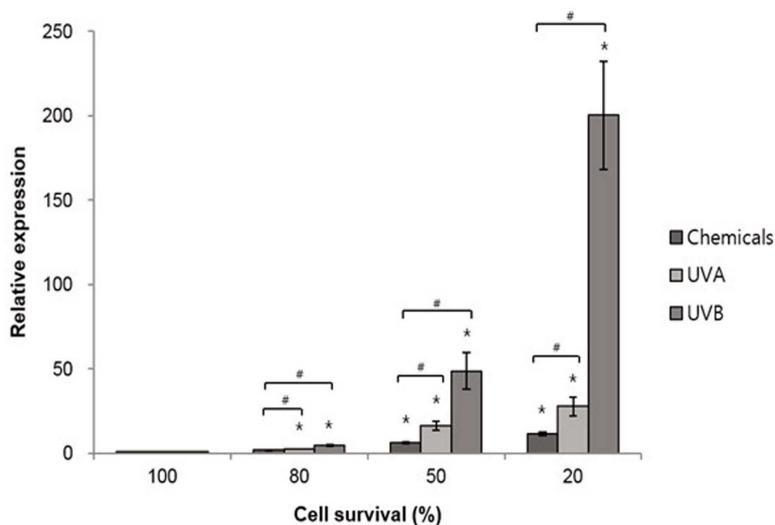
(54) 발명의 명칭 자외선에 의한 피부독성 진단용 마커 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 자외선에 의한 피부독성 진단용 마커 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 자외선에 의한 세포독성 유발시 세포사멸 기전인 아포토시스(apoptosis)를 유발하는 elafin의 발현 또는 활성을 저해하기 위한 elafin 억제제를 유효성분으로 포함하는 자외선에 의한 각질세포(keratinocyte)의 세포사멸 억제용 조성물에

(뒷면에 계속)

대표도 - 도3



관한 것이다.

본 발명의 엘라핀(elafin)은 자외선에 의한 세포독성 유발시 발현이 증가하여 피부세포에서 세포사멸 기전인 아포토시스(apoptosis)를 유발하므로 elafin을 포함하는 조성물은 자외선에 의해 유도되는 피부독성 유발 여부를 진단하기 위한 마커로 사용될 수 있다. 또한 elafin의 발현 또는 활성을 저해하는 elafin 억제제는 자외선에 노출시 PI3K, AKT, ERK, NF- κ B의 인산화를 증가시키고 미토콘드리아를 통한 카스파제 의존적 경로(caspase-dependent pathway) 활성화를 저해하여 피부세포의 아포토시스(apoptosis)를 억제하므로 자외선으로부터 피부세포 손상 및 피부질환을 억제하는 피부 보호제 또는 치료제로서 유용하게 이용할 수 있다.

(52) CPC특허분류

- A61K 39/395* (2013.01)
- A61K 8/606* (2013.01)
- A61K 8/64* (2013.01)
- C07K 16/00* (2013.01)
- C12N 15/113* (2013.01)
- C12Q 1/686* (2013.01)
- G01N 33/53* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1475008222
부처명	식품의약품안전처
연구관리전문기관	식품의약품안전평가원
연구사업명	화장품 안전성평가 동물대체기술개발 연구사업단
연구과제명	광과민 반응 평가기술 연구
기여율	1/1
주관기관	서울대학교 산학협력단
연구기간	2013.02.15 ~ 2015.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

엘라핀(elafin) 억제제를 유효성분으로 포함하고, 상기 엘라핀 억제제는 엘라핀 siRNA인 것인, 자외선에 의한 피부 손상 보호용 화장품 조성물.

청구항 7

엘라핀(elafin) 억제제를 유효성분으로 포함하고, 상기 엘라핀 억제제는 엘라핀 siRNA인 것인, 자외선에 의한 피부 손상 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

엘라핀(elafin)을 포함하는, 자외선에 의해 유도된 세포사멸에 의한 피부독성 유발 여부 진단 마커용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자외선에 의한 피부독성 진단용 마커 및 이의 용도에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 자외선에 의한 세포독성 유발시 세포사멸 기전인 아포토시스(apoptosis)를 유발하는 elafin의 발현 또는 활성을 저해하기 위한 elafin 억제제를 유효성분으로 포함하는 자외선에 의한 각질세포(keratinocyte)의 세포사멸 억제용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 체내의 근육과 기관을 보호하는 다수의 상피조직으로 이루어진 피부는 외부환경의 병원균으로부터 신체를 보호하며, 단열과 체온조절 기능, 감각기능, 비타민 B의 합성, 및 비타민 B 엽산염의 보호기능 등을 수행하는 조직이다. 또한 피부의 색소를 형성하는 멜라닌 세포(melanocyte)는 햇빛 안의 위험할 수 있는 자외선의 일부를 흡수함으로써 자외선으로부터 피부를 보호하는 기능을 수행한다.

[0003] 자외선(ultraviolet; UV)은 사람의 육안으로는 관찰되지 않는 10-400 나노미터(nm) 파장영역을 가지는 태양광으로, 지속적으로 자외선에 피부가 노출되면 단기 및 장기적으로 피부에 광독성(phototoxicity)을 유발한다. 자외

선은 A, B, C로 구분할 수 있는데, UVA(ultraviolet A)는 오존층에 흡수되지 않는 320-400 nm의 파장대로, UVB에 비하여 에너지 양이 적지만 피부의 진피 하층까지 침투할 수 있다. 또한 피부 그을림을 유발하며 피부의 면역체계에 작용하여 피부노화에 따른 장기적인 피부손상을 일으킬 수 있다. UVB(ultraviolet B)는 대부분이 오존층에 흡수되고 일부는 지표면에 도달하며 280-320 nm의 파장영역을 가진다. UVB는 UVA보다 고에너지 광선으로 훨씬 세기가 강하므로 짧은 시간에 피부에 화상을 입힐 수 있다. 또한 피부조직을 침투하여 피부암을 유발할 수 있으므로 피부암의 발생원인은 대부분 UVB와 관련이 있다고 알려져 있다. UVC(ultraviolet C)는 200-280 nm의 파장대로, 오존층에 완전히 흡수되지만 사람이 쏘일 경우에는 염색체 변이를 유발하고 눈의 각막을 손상시키는 등 심각한 문제를 유발한다.

[0004] UV에 의한 세포사멸은 UV 조사에 의해 야기되는 세포독성(cytotoxicity)의 결과이다. DNA 손상과 더불어 세포막 사멸 수용체(death receptor)의 활성화, 산화적 스트레스(oxidative stress) 등에 의해 매개된다. UVA와 UVB 조사에 의해 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)은 간접적인 DNA 손상을 유발하여 세포사멸을 일으킨다고 알려져 있다. 또한 AKT(Protein kinase B; PKB)와 MAPK(mitogen-activated protein kinase)의 활성화, PKC- δ 의 인산화, 및 AMPK(AMP(adenosine monophosphate)-activated protein kinase)의 활성화와 같은 다양한 신호전달 경로들이 UV 조사에 따른 과산화수소(H₂O₂)에 의해 각질세포(keratinocyte)의 세포사멸 즉, 아포토시스(apoptosis) 유도에 작용한다고 알려져 있다. TNF- α (Tumor necrosis factor alpha)와 IL-1 β (interleukin 1 beta)와 같은 사이토카인(cytokine)은 UV 조사에 의해 각질세포에서 분비되어 AKT와 MAPK의 활성화를 유도하는 것으로 보고되었다. 그러나 아직까지 UV 매개 세포사멸 기전에 대한 명백한 이해가 더욱 필요한 실정이다.

[0005] 한편, elafin(peptidase inhibitor 3; PI3)은 SKALP(skin-derived antileukoproteinase)라고도 하며, 세포 내에 존재하는 세린 프로테아제 뉴트로필 엘라스타아제(serine proteases neutrophil elastase)와 프로테이나아제 3(proteinase 3)의 억제제로 알려져 있다. Elafin은 프로테아제 억제 활성(protease inhibitory activity)과 독립적으로 항염증, 면역반응 조절, 항균작용에 관여하는 것으로 알려져 있다. 대부분의 정상 상피조직에서는 낮은 수준으로 발현되나, IL-1 β 및 TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인에 의해 발현이 증가된다(Pfundt R et al., Arch Dermatol Res. 2000 Apr;292(4):180-7). 또한 다양한 암에서 elafin에 대한 연구가 진행되고 있는데 예를 들면, 유방암 및 악성피부암인 흑색종 세포에서 elafin의 발현이 억제되어있으며, 과발현시키는 경우 아포토시스(apoptosis)를 유도함이 보고되었다. 사람의 상피성 난소암에서는 elafin이 높게 발현되며, 다양한 화학약물에 대한 상피성 난소암세포의 민감성을 감소시키는 역할을 한다고 보고된 바 있다.

[0006] 그러나 정상 피부 표피조직의 각질세포에서는 UV 조사에 의해 elafin의 발현이 증가된다고 알려져 있을 뿐 세포의 생존 또는 사멸에 있어서 어떠한 기전으로 작용하는지 보고된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은, 상기와 같은 종래의 문제점 해결을 위하여 각질세포(keratinocyte)와 사람 피부조직에 UVA 또는 UVB를 조사한 결과 elafin의 발현이 증가하며, 각질세포에서 elafin의 발현조절을 통해 UV 조사에 의한 세포독성 유발시 세포사멸 기전인 아포토시스(apoptosis)를 유도하는 elafin의 역할을 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0008] 이에, 본 발명은 엘라핀(elafin) 억제제를 유효성분으로 포함하는 자외선에 의한 각질세포(keratinocyte)의 세포사멸 억제용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 엘라핀(elafin) 억제제를 유효성분으로 포함하는 자외선에 의한 피부 손상 보호 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 엘라핀(elafin)을 포함하는 자외선에 의해 유도된 피부독성 유발 여부 진단 마커용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 엘라핀(elafin) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 자외선에 의한 각질세포(keratinocyte)의 세포사멸 억제용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 일 구현예로, 상기 엘라핀(elafin) 억제제는 엘라핀의 발현 또는 활성을 억제하는 핵산, 펩타이드, 항체, 및 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 핵산은 siRNA, shRNA, microRNA, 안티센스 RNA, 앵타머(aptamer), LNA(locked nucleic acid), PNA(peptide nucleic acid), 및 모폴리노(morpholino)로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 자외선은 UVA(Ultraviolet A) 또는 UVB(Ultraviolet B)일 수 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 구현예로, 상기 조성물은 PI3K(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase), AKT(Protein kinase B; PKB), ERK(Extracellular signal-regulated kinases), NF-κB(nuclear factor kappa B)의 인산화를 증가시킴으로써 미토콘드리아를 통한 카스파제 의존적 경로(caspase-dependent pathway)를 저해하여 각질세포(keratinocyte)의 아포토시스(apoptosis)를 억제하는 것일 수 있다.
- [0017] 또한, 본 발명은 엘라핀(elafin) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 자외선에 의한 피부 손상 보호용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 엘라핀(elafin) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 자외선에 의한 피부 손상 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 엘라핀(elafin)을 포함하는, 자외선에 의해 유도된 피부독성 유발 여부 진단 마커용 조성물을 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 자외선에 의한 피부 손상 보호 또는 치료방법을 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 조성물의 자외선에 의한 피부 손상 보호 또는 치료 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명의 엘라핀(elafin)은 자외선에 의한 세포독성 유발시 발현이 증가하여 피부세포에서 세포사멸 기전인 아포토시스(apoptosis)를 유발하므로 elafin을 포함하는 조성물은 자외선에 의해 유도되는 피부독성 유발 여부를 진단하기 위한 마커로 사용될 수 있다. 또한 elafin의 발현 또는 활성을 저해하는 elafin 억제제는 자외선에 노출시 PI3K, AKT, ERK, NF-κB의 인산화를 증가시키고 미토콘드리아를 통한 카스파제 의존적 경로(caspase-dependent pathway) 활성화를 저해하여 피부세포의 아포토시스(apoptosis)를 억제하므로 자외선으로부터 피부세포 손상 및 피부질환을 억제하는 피부 보호제 또는 치료제로서 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은, 각질세포(keratinocyte)에 각각 70-80%(subcytotoxic), 50%(cytotoxic), 20-30%(lethal)의 세포 생존율을 유발할 수 있는 UVA 또는 UVB 각각의 조사량을 결정하기 위해 각질세포에 UVA 또는 UVB를 다양하게 조사한 후 MTT assay를 통하여 세포생존능을 분석한 결과이다.
- 도 2는, 각질세포(keratinocyte)에 각각 80%(subcytotoxic), 50%(cytotoxic), 20%(lethal)의 세포 생존율을 유발하도록 UVA 또는 UVB를 조사한 후 real-time PCR과 western blotting을 통해 elafin의 mRNA(A)와 단백질(B)의 발현이 증가함을 보여주는 결과이다.
- 도 3은, 각질세포(keratinocyte)에 각각 80%(subcytotoxic), 50%(cytotoxic), 20%(lethal)의 세포 생존율을 유발하도록 UVA 또는 UVB를 조사하거나 화학물질(chemical)을 처리한 후 real-time PCR을 통해 화학물질처리에 비하여 UV 조사에 의한 elafin mRNA의 발현증가가 현저히 높음을 나타낸 결과이다.
- 도 4A는, 10명의 지원자에 UVA 또는 UVB를 조사한 후 피부상태를 보여주는 사진이며, 도 4B는, real-time PCR을 통해 각 지원자의 피부조직에서 UVA 또는 UVB 조사에 의한 elafin의 발현증가를 보여주는 결과이다.
- 도 5는, UV를 조사하지 않은 피부조직과 UVA 또는 UVB를 조사한 피부조직으로 면역화학조직염색법(immunohistochemistry)을 수행하여 elafin이 UV가 조사된 피부 표피의 상층부위에서 발현함을 보여주는 결과이다.

다.

도 6은, 각질세포(keratinocyte)에 elafin을 과발현시키고 1, 2, 4, 6일 후에 MTT와 LDH assay를 수행한 결과로서, 도 6A는, elafin 과발현에 의해 세포생존능이 감소함을 보여주는 결과이고, 도 6B는, elafin 과발현에 의해 세포독성이 증가함을 보여주는 결과이다.

도 7은, 각질세포(keratinocyte)에 elafin을 과발현시킨 후 western blotting을 수행함으로써 분자적 수준에서 apoptosis 유도과 그 기전을 확인한 결과이다.

도 8은, 각질세포(keratinocyte)에 80%와 50%의 생존율을 유발하도록 UVA 또는 UVB를 조사한 후 control siRNA 또는 elafin siRNA를 처리한 후 MTT와 LDH assay를 수행한 결과로서, 도 8A는, elafin의 발현 저해에 의해 세포생존능이 증가함을 보여주는 결과이고, 도 8B는, elafin의 발현 저해에 의해 세포독성이 감소함을 보여주는 결과이다.

도 9는, 각질세포(keratinocyte)에 UVA 또는 UVB를 조사하여 elafin의 발현을 증가시킨 상태에서 elafin siRNA를 처리하여 elafin의 발현을 저해한 후 western blotting을 수행함으로써 분자적 수준에서 apoptosis 억제과 그 기전을 확인한 결과이다.

도 10은, UV 조사에 의해 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)이 elafin 발현 증가에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각질세포(keratinocyte)에 N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine; NAC)을 처리하고 한시간 후 UVA 또는 UVB를 다양하게 조사하여 세포독성을 유발하였을 때 elafin mRNA의 발현감소를 보여주는 결과이다.

도 11은, UV 조사에 의해 생성되는 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)이 elafin 발현 증가에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각질세포(keratinocyte)에 N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine; NAC)을 처리하고 한시간 후 UVA 또는 UVB를 다양하게 조사하여 세포독성을 유발하였을 때 elafin 단백질의 발현감소를 보여주는 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 발명은 각질세포(keratinocyte)와 사람 피부조직에서 자외선 매개 세포독성 유발에 의한 elafin의 발현증가가 세포사멸 기전인 아포토시스(apoptosis)를 유발함을 규명함으로써, 각질세포에서 자외선 노출에 의한 세포독성 유발시 elafin의 역할을 규명하였다.
- [0025] 본 발명의 일 실시예에서는, 사람 복부 피부조직과 사람으로부터 얻어 배양한 각질세포에 UVA 또는 UVB를 조사하여 세포독성을 유발한 결과 elafin의 mRNA와 단백질이 증가함을 확인하였으며, 이러한 elafin의 증가수준은 화학물질(chemical)을 처리하여 세포독성을 유발한 경우보다 현저히 높음을 확인하였다(실시예 2 참조).
- [0026] 본 발명의 다른 실시예에서는, elafin의 발현증가가 자외선에 의한 세포독성 유발에 미치는 영향을 알아보기 위해 elafin을 과발현시키거나 siRNA 처리를 통해 발현을 억제시킨 후 각질세포의 세포생존능, 세포독성, 및 분자적 수준에서 세포사멸 여부를 검증하였다. 그 결과, 각질세포에서 elafin을 과발현시킨 경우 시간의 경과와 비례하여 세포생존능이 감소하고 세포독성이 증가하였다. 또한 분자적 수준에서 caspase-9과 caspase-3의 활성화 형태의 발현증가를 통해 세포사멸 기전인 아포토시스(apoptosis)가 유발되는 것을 확인하였으며, 이는 caspase-9의 상위 신호전달경로에서 apoptosis를 억제하는데 관여하는 PI3K, AKT, ERK, NF- κ B의 인산화형태 단백질들의 발현 감소를 통해 매개됨을 확인하였다. 반면 각질세포에 elafin siRNA를 처리하여 elafin의 발현을 저해한 경우에는 상기 elafin을 과발현시킨 경우와 반대의 결과를 얻었다(실시예 3 참조).
- [0027] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 자외선 조사에 의해 증가한다고 알려진 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)이 elafin의 발현증가에 미치는 영향을 검증하기 위해 각질세포에 ROS를 제거하는 N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine; NAC)을 처리한 후 UVA 또는 UVB를 조사하여 세포독성을 유발하였다. 그 결과 NAC를 처리하여 ROS를 제거한 경우에는 elafin의 발현이 억제됨을 관찰함으로써 자외선 조사에 의해 생성된 ROS가 elafin 발현증가를 유도함을 확인하였다(실시예 4 참조).
- [0028] 따라서 본 발명은 엘라핀(elafin) 억제제를 유효성분으로 포함하는 자외선에 의한 각질세포(keratinocyte)의 세포사멸 억제용 조성물을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 상기 엘라핀(elafin)은 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0030] 또한 본 발명의 상기 엘라핀(elafin)은 서열번호 2의 염기서열로 이루어진 mRNA일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 본 발명의 상기 elafin 억제제는 elafin의 발현 또는 활성을 억제하는 핵산, 펩타이드, 항체, 및 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있으며, 상기 핵산은 siRNA, shRNA, microRNA, 안티센스 RNA, 앵타머(aptamer), LNA(locked nucleic acid), PNA(peptide nucleic acid), 및 모폴리노(morpholino)에서 선택되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0032] 본 발명에서 사용되는 용어, “발현 또는 활성 억제”란 표적 유전자 또는 표적 단백질의 기능 저하를 야기하는 것을 의미하며, 바람직하게는 이에 의해 표적 유전자 발현 또는 표적 단백질의 기능이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 것을 의미한다.
- [0033] 본 발명에서 사용되는 용어, “siRNA(small interfering RNA)”란 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. siRNA는 타겟 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knock-down) 방법으로서 또는, 유전자치료(gene therapy)의 방법으로 제공된다.
- [0034] 본 발명에서 용어, “shRNA(small hairpin RNA)”란 단일 가닥으로 50-60개로 구성된 뉴클레오타이드(nucleotide)를 의미하며, in vivo상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를 이루고 있다. 즉, shRNA는 RNA 간섭을 통해 유전자 발현을 억제하기 위한 타이트한 헤어핀 구조를 만드는 RNA 서열이다. 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 15-30개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성한다. shRNA는 언제나 발현되도록 하기 위하여 U6 프로모터를 포함하는 벡터를 통해 세포 내로 형질도입되며 대개 딸세포로 전달되어 유전자 발현억제가 유전되도록 한다. shRNA 헤어핀 구조는 세포 내 기작에 의하여 절단되어 siRNA가 된 후 RISC(RNA-induced silencing complex)에 결합한다. 이들 RISC는 mRNA에 결합하여 이를 절단한다. shRNA는 RNA 폴리머레이즈(polymerase)에 의해 전사된다.
- [0035] 본 발명에서 사용되는 용어, “microRNA”란 약 22개의 염기서열로 이루어진 짧은 non-coding RNA를 의미한다. 유전자의 발현 과정에서 전사 후 조절인자(post-transcriptional regulator)로서 기능을 한다고 알려져 있다. 상보적인 염기 서열을 가진 표적(target) mRNA에 상보적으로 결합함으로써 표적 mRNA들을 분해시키거나 단백질로 번역되는 것을 억제한다.
- [0036] 본 발명에서 사용되는 용어, “자외선”은 전자기파 스펙트럼에서 보라색 띠에 인접한 10-400 nm의 파장 영역을 가지는 태양광을 의미한다. 일반적인 가시광에 비해 에너지가 높으므로 자외선에 지속적인 노출은 인간의 피부에 영향을 미칠 수 있다. 본 발명에서 자외선은 320-400 nm 파장대의 UVA(ultraviolet A) 또는 280-320 nm 파장대의 UVB(ultraviolet B)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0037] 본 발명의 상기 조성물은 PI3K(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase), AKT(Protein kinase B; PKB), ERK(Extracellular signal-regulated kinases), NF- κ B(nuclear factor kappa B)의 인산화를 증가시킴으로써 미토콘드리아를 통한 카스파제 의존적 경로(caspase-dependent pathway)를 저해하여 각질세포의 아포토시스(apoptosis)를 억제할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명에서 사용되는 용어, “아포토시스(apoptosis)”는 다세포 생물체에서 볼 수 있는 세포예정사(programmed cell death)로서, 세포의 형태와 내부의 생화학적 변화로 세포가 죽는 세포사멸을 의미하며, 일반적으로 세포의 수축, 핵의 응축, 및 세포막 기포형성 등을 특징으로 한다. Apoptosis는 사멸 수용체(death receptor)를 통한 외인성경로(extrinsic pathway)와 미토콘드리아로부터 시토크롬 C(cytochrome C) 방출에 의한 내인성경로(intrinsic pathway)인 두 가지 주요경로를 통해 일어날 수 있다. 상기 내인성 경로는 DNA 손상, 사이토카인(cytokine), 활성산소종(reactive oxygen species; ROS) 등의 자극에 의해 유발되며, 이러한 자극은 미토콘드리아 투과도 전이 미세공(mitochondrial permeability transition pore)을 열리게 하여 미토콘드리아 막의 전위조절 능력 파괴를 유발하여 시토크롬 C(cytochrome C)가 방출된다. 시토크롬 C는 APAF1(apoptotic protease activating factor 1) 및 caspase-9과 결합하여 ‘아포토솜(apoptosome)’을 형성한 후 caspase-3를 활성화시켜 세포사멸을 유도한다.
- [0039] 본 발명의 상기 조성물은 자외선에 의한 피부화상, 피부염, 색소침착, 흑색종, 및 비흑색종 피부암으로부터 피부를 보호할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0040] 또한, 본 발명은 엘라핀(elafin) 억제제를 유효성분으로 포함하는 자외선에 의한 피부 손상 보호용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0041] 본 발명의 조성물이 화장품 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 조성물은 상술한 elafin 억제제뿐만 아니라, 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료, 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.
- [0042] 또한, 본 발명의 조성물은 상술한 elafin 억제제 이외에, elafin 억제제와 반응하여 피부보호 효과를 손상시키지 않는 한도에서 종래부터 사용되어오던 유기 자외선 차단제를 혼합하여 사용할 수도 있다. 상기 유기 자외선 차단제로는 글리세릴과바, 드로메트리졸트리실록산, 드로메트리졸, 디갈로일트리올리에이트, 디소뉘페닐디벤즈이미다졸테트라실포네이트, 디에칠헥실부타미도트리아존, 디에칠아미노하이드록시벤조일헥실벤조에이트, 디이에이-메톡시신나메이트, 로우손과 디하이드록시아세톤의 혼합물, 메칠렌비스-벤조트리아졸테트라메칠부틸페놀, 4-메칠벤질리덴캠퍼, 멘틸안트라닐레이트, 벤조페논-3(옥시벤존), 벤조페논-4, 벤조페논-8(디옥시페벤존), 부틸메톡시디벤조일메탄, 비스에칠헥실옥시페놀메톡시페닐트리아진, 시녹세이트, 에칠디하이드록시프로필과바, 옥토크릴렌, 에칠헥실디메칠과바, 에칠헥실메톡시신나메이트, 에칠헥실살리실레이트, 에칠헥실트리아존, 이소아밀-p-메톡시신나메이트, 폴리실리콘-15(디메치코디에칠벤잘말로네이트), 테레프탈릴리덴디캠퍼설포닉애씨드 및 그 염류, 티이에이-살리실레이트, 및 아미노벤조익애씨드(과바)로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다.
- [0043] 본 발명의 화장품 조성물을 첨가할 수 있는 제품으로는, 예를 들어, 수렴화장수, 유연화장수, 영양화장수, 각종 크림, 에센스, 팩, 파운데이션 등과 같은 화장품류와 클렌징, 세안제, 비누, 트리트먼트, 미용액 등이 있다.
- [0044] 본 발명의 화장품 조성물의 구체적인 제형으로는 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 마사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 립스틱, 메이컵 베이스, 파운데이션, 프레스파우더, 루스파우더, 및 아이새도 등의 제형을 포함한다.
- [0045] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 elafin 억제제의 함량은 조성물 총 중량에 대하여 0.00001-30 중량%이며, 바람직하게는 0.5-20%이며, 보다 바람직하게는 1.0-10중량%이다. 상기 elafin 억제제의 함량이 0.00001중량% 미만이면 elafin 억제제에 의한 피부 보호 효과가 크게 감소되고, 30중량%를 초과하는 경우에는 피부 자극을 초래할 수 있으며, 제형상의 문제점이 발생할 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명은 엘라핀(elafin) 억제제를 유효성분으로 포함하는 자외선에 의한 피부 손상 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0047] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 elafin 억제제를 유효성분으로 포함하며, 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용 가능한 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 사이클로텍스트린, 텍스트로즈 용액, 말토텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 리포솜 등을 포함하지만 이에 한정되지 않으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액 등 다른 통상의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제화에 관해서는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 제형에 특별한 제한은 없으나 주사제, 흡입제, 피부 외용제 등으로 제제화할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 피부, 비강, 기도에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.
- [0049] 본 발명에 따른 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, “약학적으로 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 발명에 따른 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 결

정될 수 있다.

[0050] 구체적으로, 본 발명에 따른 조성물의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1kg 당 0.001 내지 150 mg, 바람직하게는 0.01 내지 100 mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 비만의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0051] 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 엘라핀(elafin)을 포함하는 자외선에 의해 유도된 피부 독성 유발 여부 진단 마커용 조성물을 제공한다.

[0052] 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 자외선에 의한 피부 손상 보호 또는 치료방법을 제공한다.

[0053] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0054] **[실시예]**

[0055] **실시예 1. 실험 준비**

[0056] **1-1. 지원자 모집 및 UV 조사**

[0057] 동국대학교 일산병원의 임상시험심사위원회로부터 승인을 받은 후 33세에서 58세의 성인 남성 6명과 여성 4명을 모집하여 각 지원자들로부터 동의서를 받은 후 실험을 진행하였다. 각 지원자들의 복부 피부 2 x 2 cm² 영역에 UVA(ultraviolet A)와 NB-UVB(narrowband ultraviolet B)를 3 MED(minimal erythematol dose)로 조사하였다. UV 조사 2일 후 UVA와 NB-UVB의 광독성(phototoxicity) 유발 조사량(dose)에 의한 반응부위 피부조직을 채취하였으며, 음성대조군으로써 UV가 조사되지 않은 부위의 피부조직을 함께 채취하였다. 이후 각 지원자들로부터 얻은 피부조직들을 이용하여 마이크로어레이(microarray), 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR), 면역형광법(immunofluorescence) 등을 수행하였다.

[0058] **1-2. 각질세포(Keratinocyte) 배양**

[0059] 각질세포(keratinocyte)를 얻기 위해 제왕절개 수술(caesarean section)로부터 얻어진 성인들의 피부 조직으로부터 표피를 분리하고, 분리된 각 개인의 표피세포를 소 뇌하수체 추출물(bovine pituitary extract; BPE), 소 인슐린(bovine insulin), 히드로코르티손(hydrocortisone), 사람 표피성장인자(epidermal growth factor; EGF) 및 소 트랜스페린(bovine transferrin)(HKGS; Invitrogen)이 첨가된 EpiLife 배지(Invitrogen, Carlsbad, CA)에서 배양하였다. 배양된 각질세포를 배양배지에 7.5 x 10⁴ cells/ml로 재현탁한 후 6well plate에 각 well마다 1.5 x 10⁵개의 세포를 분주하였다. 24시간 후 각 6well plate와 15 cm 떨어진 거리에서 single dose로 UVA 또는 NB-UVB를 조사하였다. UV를 조사하는 동안 EpiLife 배지는 PBS(phosphate-buffered saline)로 갈아주었다. UV조사 2일 후에 세포를 회수한 후 세포생존능(cell viability) 분석, 세포독성(cytotoxicity) 분석, 실시간 PCR(real-time PCR), 및 western blotting을 수행하였다.

[0060]

[0061] **1-3. UV(ultraviolet) 조사**

[0062] 상기 실시예 1-1 및 1-2에서처럼, 지원자들의 복부 피부 또는 배양된 각질세포에 조사한 NB-UVB(narrowband-ultraviolet B)는 COSMOLUX N-UVB 1000 U(Choyang Medical)를 사용하였다. 그러나 UVA(narrowband-ultraviolet A)의 경우, 지원자들에게는 COSMOLUX N-UVA 1000 U(Choyang Medical, Seongnam, South Korea)를 이용하여 UVA를 조사하였으며, 배양된 각질세포의 경우에는 TL-K 40W lamps(Philips)가 장착된 UVA chamber(DBL, DAE HAN BIOLINK CO. LTD)를 이용하여 조사하였다.

[0063] **1-4. 시약 준비 및 N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine; NAC) 처리**

[0064] 하기 실시예에서 사용한 화학물질(chemical)은 하이드로퀴논(Hydroquinone, Sigma-Aldrich), 작약 추출물(Paeonia Albiflora Root Extract), 삼백초 추출물(Saururus Chinensis Baill Extract), 및 감초 추출물(Glycyrrhiza Glabra (Licorice) Root Extract)(Amore Pacific Co. South Korea에서 기증)을 디메틸설폭사이드(Dimethyl sulfoxide; DMSO)에 용해시켜 사용하였다. 상기 각 물질들의 농도는 3명의 다른 기증자로부터 얻어 배양된 각질세포(keratinocyte)에서 각각 대략적으로 70-80%, 50% 그리고 20-30%의 세포 생존율을 나타내는 범위에서 결정하였다.

[0065] **1-5. 세포생존능(cell viability) 및 세포독성(cytotoxicity) 분석**

[0066] 세포생존능 분석은 MTT assay를 이용하여 수행하였으며 570 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

[0067] 세포독성은 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase; LDH) 방출법을 이용하여 분석하였다. LDH 활성은 제조사의 프로토콜에 따라 cytotoxicity detection kit(Roche, Penzberg, Germany)를 이용하여 측정하였다.

[0068] **1-6. 실시간 증합효소연쇄반응(Real-time PCR)**

[0069] 실시예 1-1에서 얻은 사람 피부조직 또는 실시예 1-2의 방법으로 배양된 각질세포(keratinocyte)로부터 total RNA를 추출한 후 First Strand cDNA Synthesis Kit를 이용하여 역전사증합효소연쇄반응(reverse transcription polymerase chain reaction; RT-PCR)을 수행하여 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA에 대하여 타겟 mRNA의 양을 정량적으로 확인하기 위해 Light Cycler real-time PCR machine(Roche, Penzberg, Germany)을 이용하여 real-time PCR을 수행하였다. 각각의 타겟 mRNA 양은 동일한 샘플에서의 글리세르알데히드 3-인-탈수소효소(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GAPDH)의 양으로 보정한 후 비교하였다. 상기 real-time PCR에서 사용한 elafin과 GAPDH의 프라이머(primer) 서열은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

유전자	방향	서열
Elafin	Forward(순방향)	5'-TGATCGTGGTGGTGTTCCT-3'
	Reverse(역방향)	5'-ACGGCCTTTGACAGTGTCTT-3'
GAPDH	Forward(순방향)	5'-TCCACTGGCGTCTTACC-3'
	Reverse(역방향)	5'-GGCAGAGATGATGACCCTTT-3'

[0071] **1-7. Elafin의 과발현 및 발현저해(Elafin overexpression and knockdown)**

[0072] 각질세포(keratinocyte)에서 elafin을 과발현(overexpression)시키기 위해 실시예 1-2의 방법으로 6well plate에 배양한 각질세포에 elafin(peptidase inhibitor 3; PI3) 유전자가 포함된 pCMV 플라스미드(OriGene Technologies, Rockville, USA)를 Lipofectamine 2000을 이용하여 트랜스펙션(transfection)하였다. 반면, elafin의 발현을 저해(knockdown)하기 위해서 elafin 특이적인 siRNA를 이용하였다. 각질세포에 elafin siRNA(On-TARGETplus SMARTpool, Thermo, Rockford, IL, USA) 또는 대조군으로 negative control siRNA(Non-targeting siRNA, Thermo, Rockford, IL, USA)를 TransIT-siQUEST transfection reagent(Mirus Bio, Madison, WI, USA)를 이용하여 트랜스펙션하였다.

[0073] **1-8. 웨스턴 블롯팅(Western blotting)**

[0074] 실시예 1-1에서 얻은 사람 피부조직 또는 실시예 1-2의 방법으로 배양된 각질세포(keratinocyte)로부터 단백질을 분리하여 샘플을 준비한 후 소듐 도데실 설페이트-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)을 수행하였다. 전기영동이 끝난 겔을 떼어낸 후 니트로셀룰로오스 멤브레인(nitrocellulose membrane) 상으로 단백질들이 전기적인 흐름에 따라 이동되도록 트랜스퍼(tranfer) 과정을 수행하고, 1차 항체의 비특이적인 반응을 방지하기 위해 블로킹(blocking) 과정을 수행한 후 발현을 확인하고자 하는 단백질에 특이적인 1차 항체와 반응시켰다. 본 발명의 실시예에서 사용한 1차 항체는 다음과 같다. 카스파제-9(caspase-9), 카스파제-3 절편(cleaved caspase-3), 핵인자 카파 B(nuclear factor kappa B; NF-κB) p65,

포스파티딜이노시톨-4,5-이인산 3-인산화효소(phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase; PI3K), 단백질 인산화효소 B(Protein kinase B; PKB, AKT), 세포외 신호 조절 인산화효소(extracellular signal-regulated kinase; ERK), phospho-NF- κ B p65, phospho-PI3K, phospho-AKT, 및 phospho-ERK 항체들은 cell signaling Technology사에서 구입하였고, 엘라핀(elafin) 항체는 Santa Cruz Biotechnology에서 구입하였다. 1차 항체와 반응시킨 membrane을 Tris-buffered saline-T(Tween-20)로 3회 수세한 후 상온에서 홀스레디쉬 페록시다아제가 접합되어있는 2차 항체(horseradish peroxidase-conjugated antibody, Thermo)와 반응시켰다. 이후 membrane을 ECL(enhanced chemiluminescence) solution(Thermo)과 반응시키고 Image Reader(LAS-3000; Fuji Photo Film, Tokyo, Japan)를 이용하여 감광하여 각 단백질의 발현정도를 확인하였다. 또한 상기방법과 동일하게 β -actin(Sigma, St Louis, MO, USA) 항체를 사용하여 β -actin의 발현량을 비교함으로써 각 샘플이 동일한 양으로 로딩 되었는지 확인하였다.

[0075] **1-9. 면역형광법(Immunofluorescence)**

[0076] 실시예 1-1에서 지원자로부터 얻은 피부조직을 4% 파라포름알데히드(4% paraformaldehyde)에 고정시키고 탈수 과정을 거쳐 조직에 남아있는 수분을 제거한 후 파라핀 포매(paraffin embedding)과정을 거쳐 조직을 파라핀 내에 굳혀 파라핀 블록을 만들고 5 μ m 두께의 절편으로 박절하였다. 이후 박절한 조직 절편에 탈파라핀(deparaffinization) 과정을 수행하고, 시트르산 용액(citric acid solution)(100mM citrate, pH 6.0)과 0.5% Triton X-100을 처리한 후 3% BSA를 처리하여 블로킹(blocking)을 수행하였다. 이후 조직 절편을 elafin에 대한 1차 항체(1:100 희석; rabbit polyclonal; Santa Cruz Biotechnology)와 반응시키고, Alexa Fluor-labeled goat anti-rabbit IgG(1:200 dilution; 488; Molecular Probes, Eugene, OR) 2차 항체와 반응시킨 후 형광현미경(Dp Manager 2.1; Olympus Optical, Tokyo, Japan) 하에서 elafin의 발현 정도를 관찰하였다.

[0077] **1-10. 통계분석**

[0078] 실험 데이터들의 통계적 분석은 Student's t-test를 이용하여 수행하였다. 분석결과는 평균±표준편차(means \pm SD)로 표현하였고, P-value < 0.05이면 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

[0079] **실시예 2. UV 매개 세포독성 유발에 의한 elafin의 발현증가 확인**

[0080] **2-1. 각질세포에서 UV 매개 세포독성 유발에 의한 elafin 발현 증가 확인**

[0081] 각질세포(keratinocyte)에 UV를 조사하여 세포독성을 유발하였을 때 elafin의 발현이 증가하는지 확인하는데 앞서 각질세포에 각각 70-80%(subcytotoxic), 50%(cytotoxic), 20-30%(lethal)의 세포 생존율을 유발할 수 있는 UVA(ultraviolet A)와 NB-UVB(narrowband-ultraviolet B)의 조사량을 결정하고자 하였다.

[0082] 실시예 1-2의 방법으로 배양한 각질세포에 UVA는 2~20 J/cm², UVB는 100~1400 mJ/cm² 범위의 조사량으로 실시예 1-3의 방법에 따라 조사하였다. 그 결과, 도 1에 나타낸 바와 같이, UVA는 3-4, 10, 및 12 J/cm², UVB는 500, 1000, 및 1200 mJ/cm²의 양을 조사하였을 때 각질세포에서 각각 70-80%, 50%, 20-30%의 세포 생존율이 나타남을 확인하였다.

[0083] 이후 상기 실험에서 결정된 조사량대로 UVA와 UVB를 각질세포에 조사한 후 real-time PCR과 western blotting을 통하여 elafin의 mRNA와 단백질의 양을 확인하였다.

[0084] 그 결과, 도 2A 및 도 2B에 나타낸 바와 같이, 세포생존율이 감소할수록 즉, UVA와 UVB의 조사량이 증가할수록 elafin의 mRNA와 단백질의 발현량이 증가하였다. 또한, 도 3에 나타낸 바와 같이, 동일한 조건에서 실시예 1-4의 방법으로 준비한 화학물질(chemical)을 처리하여 각질세포에 80%, 50%, 20%의 세포생존율을 유도한 후 elafin의 mRNA의 양을 비교한 결과, 화학물질을 처리에 비하여 UV 매개 세포독성 유발의 경우에 elafin의 mRNA가 현저히 증가함을 확인하였다.

[0085]

[0086] **2-2. 사람 피부조직에서 UV에 의한 elafin 발현 증가 확인**

[0087] 실시예 1-1의 방법으로 10명의 지원자로부터 채취한 UVA 또는 UVB를 조사한 피부조직과 조사하지 않은 일반 피

부조직으로 real-time PCR을 수행하여 elafin mRNA의 발현량을 확인하였다.

[0088] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, UVA를 조사한 경우에는 10명의 지원자 중 7명의 피부조직에서 elafin mRNA가 증가하였고, UVB를 조사한 경우에는 9명 중 8명에서 elafin의 mRNA가 증가하였다. 또한 UV가 조사되지 않은 피부조직, UVA가 조사된 피부조직, 및 UVB가 조사된 피부조직을 이용하여 면역화학조직염색법(immunohistochemistry)을 통하여 elafin 단백질의 발현 정도를 관찰하였다. 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, UV가 조사되지 않은 피부조직(Normal)에서는 elafin 발현이 관찰되지 않은 반면, UVA 또는 UVB가 조사된 표피의 상층부위에서 초록색 형광을 통하여 강하게 염색된 elafin 단백질을 확인하였다.

[0089] **실시예 3. Elafin의 발현량에 따른 각질세포의 아폽토시스(apoptosis) 여부 검증**

[0090] **3-1. Elafin 과발현에 따른 각질세포의 아폽토시스(apoptosis) 증가 확인**

[0091] 실시예 2의 결과를 통해 UV 조사량에 의존적으로 각질세포(keratinocyte)에서 세포독성이 유발되며, elafin의 mRNA와 단백질의 발현이 증가함을 확인하였으므로, elafin의 발현수준에 따른 세포의 생존 및 사멸에 대한 영향을 알아보기 위해 실시예 1-7의 방법으로 각질세포에서 elafin을 과발현시킨 후 1, 2, 4, 6일(Days)에 MTT와 LDH assay를 통하여 세포생존능과 세포독성을 분석하였다.

[0092] 그 결과, 도 6A에 나타낸 바와 같이, elafin을 과발현시킨 경우 대조군(control) 세포에 비하여 시간이 지날수록 세포생존능이 감소하였다. 또한 도 6B에 나타낸 바와 같이, 세포독성은 시간이 지날수록 증가하는 것을 확인하였다.

[0093] 상기 세포생존능의 감소가 아폽토시스(apoptosis)인 세포사멸에 의한 것인지 검증하기 위해 western blotting을 통하여 apoptosis 관련 단백질인 caspase-9과 cleaved caspase-3의 발현을 확인하였으며, caspase-9의 상위 신호전달경로에서 일반적으로 apoptosis를 억제하는데 관여하는 PI3K, AKT, ERK, 및 NF-κB와 각각이 인산화되어 활성화된 형태인 p-PI3K, p-AKT, p-ERK, 및 p-NF-κB의 발현수준을 확인하였다.

[0094] 그 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 활성화된 caspase-9(Cas9)과 cleaved caspase-3(Cleaved Cas3) 단백질의 증가를 통해 elafin 과발현에 의해 apoptosis가 유도됨을 확인하였다. 또한 신호전달 상위단계의 PI3K, AKT, ERK, 및 NF-κB의 total form인 T-PI3K, T-AKT, T-ERK, T-NF-κB의 발현은 elafin의 발현수준에 관계없이 일정한 반면, 인산화된 p-PI3K, p-AKT, p-ERK, 및 p-NF-κB의 발현은 모두 감소함을 확인하였다.

[0095] **3-2. Elafin 발현 저해에 따른 각질세포의 아폽토시스(apoptosis) 감소 확인**

[0096] 실시예 3-1과 상반된 방법으로 elafin 특이적 siRNA를 처리하여 elafin의 발현을 저해시킨 후 MTT와 LDH assay를 통하여 각질세포의 세포생존능과 세포독성을 분석하였다. 실시예 2-1의 결과를 통해 각질세포에서 80%와 50%의 생존율을 유발하는 UV 조사량 즉, UVA는 4, 10 J/cm², UVB는 500, 1000 mJ/cm²을 각질세포에 조사하여 elafin의 발현을 증가시킨 후 elafin siRNA를 처리하였다.

[0097] 그 결과, 도 8에 나타낸 바와 같이, UVA 또는 UVB를 조사하고 control siRNA를 처리한 경우 UV를 조사하지 않고 control siRNA를 처리한 경우에 비하여 세포생존능이 감소하고 세포독성이 증가한 반면, UVA 또는 UVB를 조사하고 elafin siRNA를 처리하여 elafin의 발현을 저해한 경우에는 통계적으로 유의하게 세포생존능이 증가하고 세포독성이 감소함을 확인하였다. 또한 도 9에 나타낸 바와 같이, UVA 또는 UVB를 조사한 후 elafin siRNA를 처리하여 elafin의 발현을 저해한 경우 활성화된 caspase-9(Cas9)과 cleaved caspase-3(Cleaved Cas3) 단백질의 감소를 통해 아폽토시스(apoptosis)가 감소됨을 확인하였다. 또한 신호전달 상위단계의 PI3K, AKT, ERK, 및 NF-κB의 total form인 T-PI3K, T-AKT, T-ERK, T-NF-κB의 발현은 elafin의 발현수준에 관계없이 일정한 반면, 인산화된 p-PI3K, p-AKT, p-ERK, 및 p-NF-κB의 발현은 모두 증가함을 확인하였다.

[0098] **실시예 4. Elafin의 발현에 대한 ROS의 영향 검증**

[0099] 상기 실시예 2 및 3의 결과를 통해 UVA 또는 UVB 매개 세포독성 유발시 elafin의 발현이 증가하며 이를 매개로 각질세포의 아폽토시스(apoptosis)가 유도됨을 확인하였다. 또한 UVA 또는 UVB 조사에 의해 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)이 생성되는 기전은 많은 연구들을 통해 알려져 있으므로 본 실시예에서는 UV

조사에 의해 생성되는 ROS가 elafin의 발현에 어떠한 영향을 미치는지 확인해보고자 하였다.

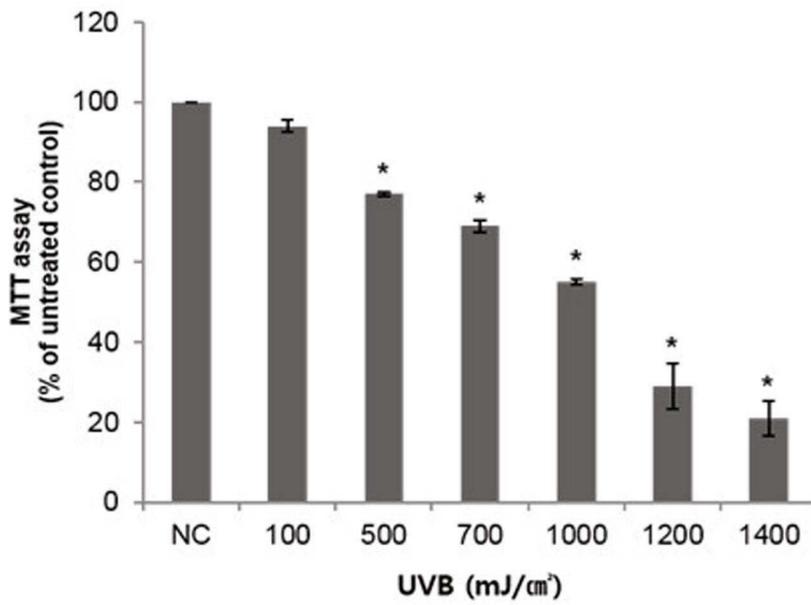
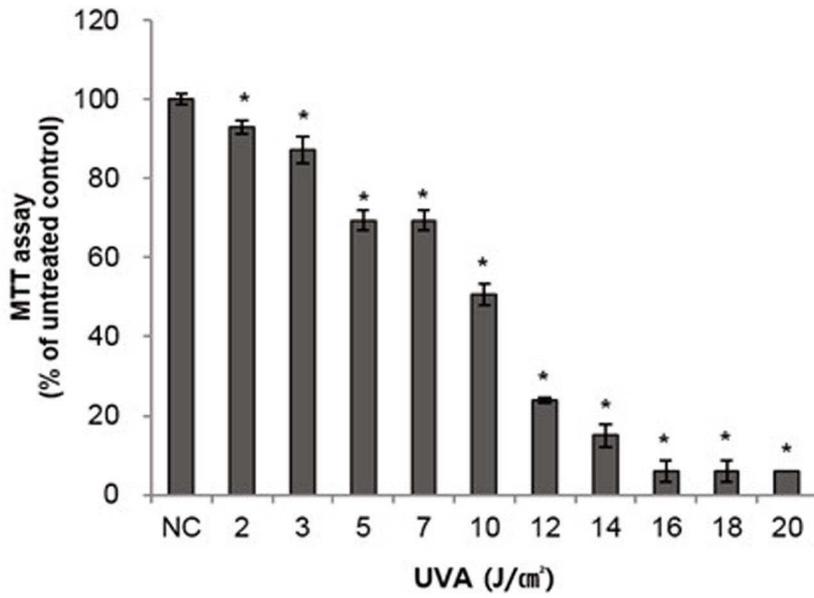
[0100] 실시예 1-2의 방법으로 배양된 각질세포에 UV조사에 의한 ROS 생성을 억제하기 위해 N-아세틸-L-시스테인(N-acetyl-L-cysteine; NAC)을 처리하고, 1시간 후 실시예 2-1에서처럼 80%, 50%, 20%의 세포 생존율을 유발하도록 UVA(ultraviolet A) 또는 NB-UVB(narrowband-ultraviolet B)를 조사하였다.

[0101] 그 결과, 도 10에 나타낸 바와 같이, real-time PCR을 통해 UVA 또는 UVB를 조사하기 전 NAC를 처리한 경우 처리하지 않은 군(control)에 비하여 elafin mRNA의 발현증가가 억제됨을 확인하였다. 또한 도 11의 western blotting 결과를 통해서도 NAC 처리에 의해 elafin 단백질의 발현이 억제됨을 알 수 있었다. 따라서 상기 결과를 통해 UV 조사에 의한 elafin의 발현증가가 ROS 증가에 의해 유도되는 것임을 확인하였다.

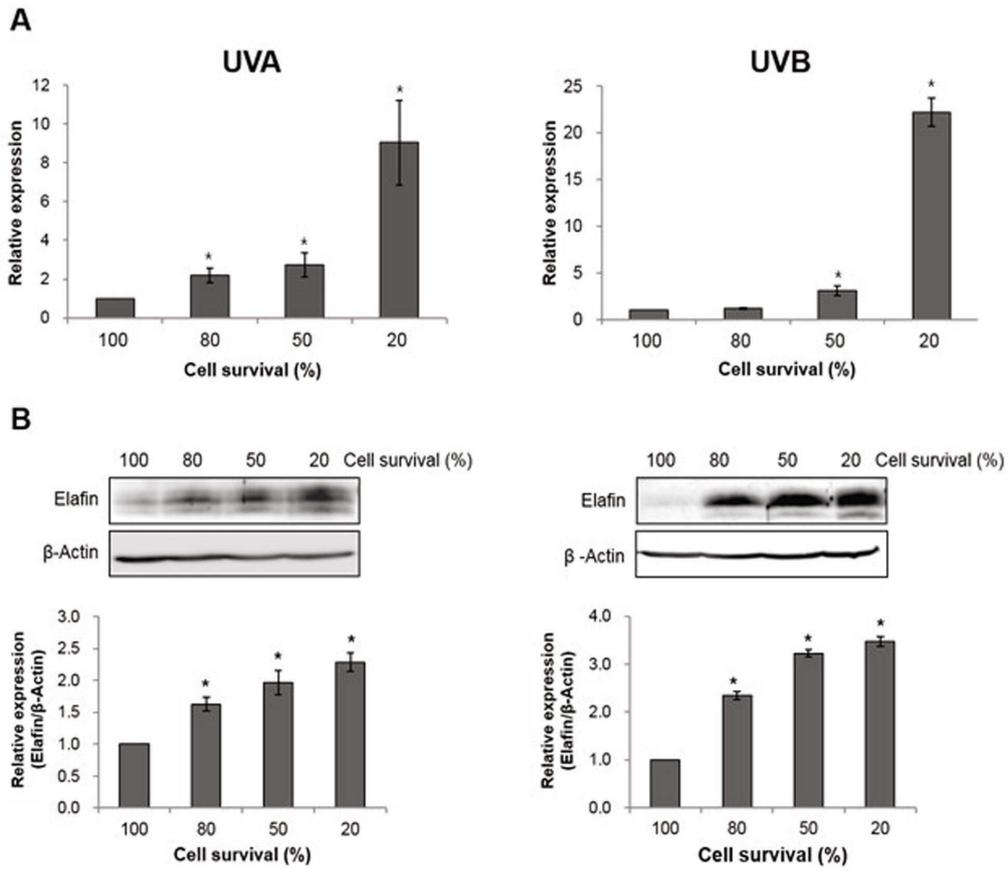
[0102] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

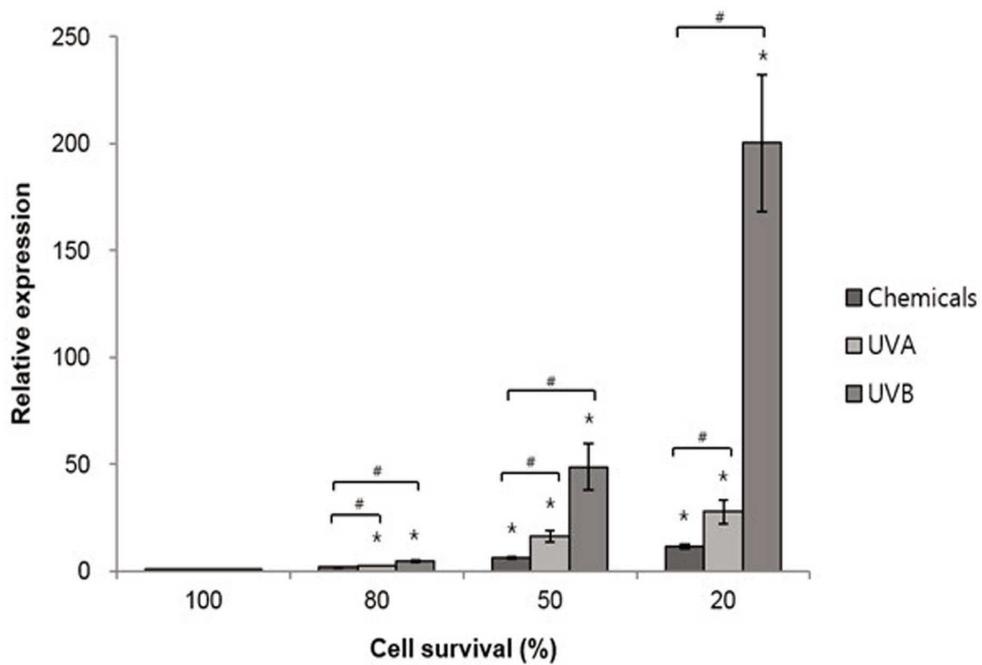
도면1



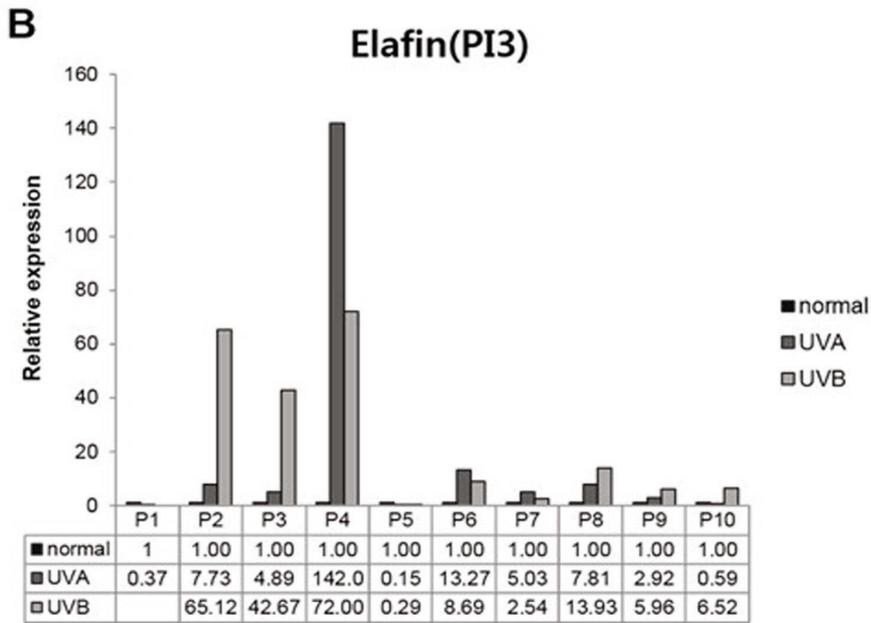
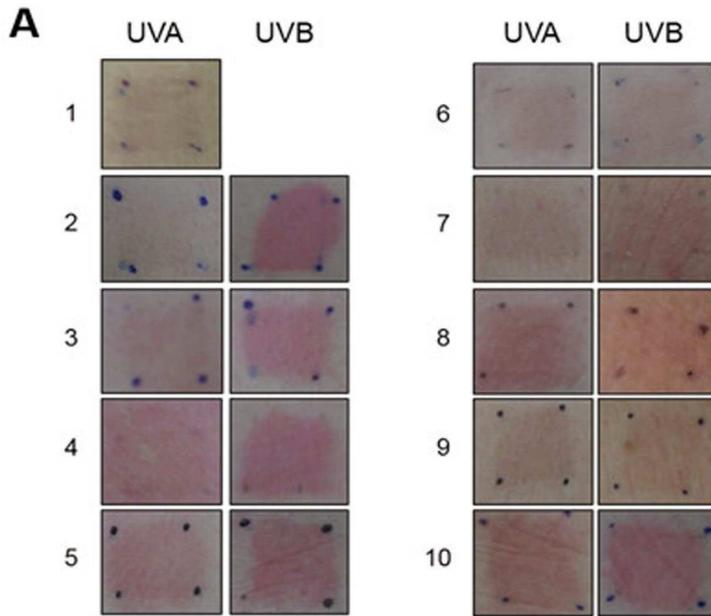
도면2



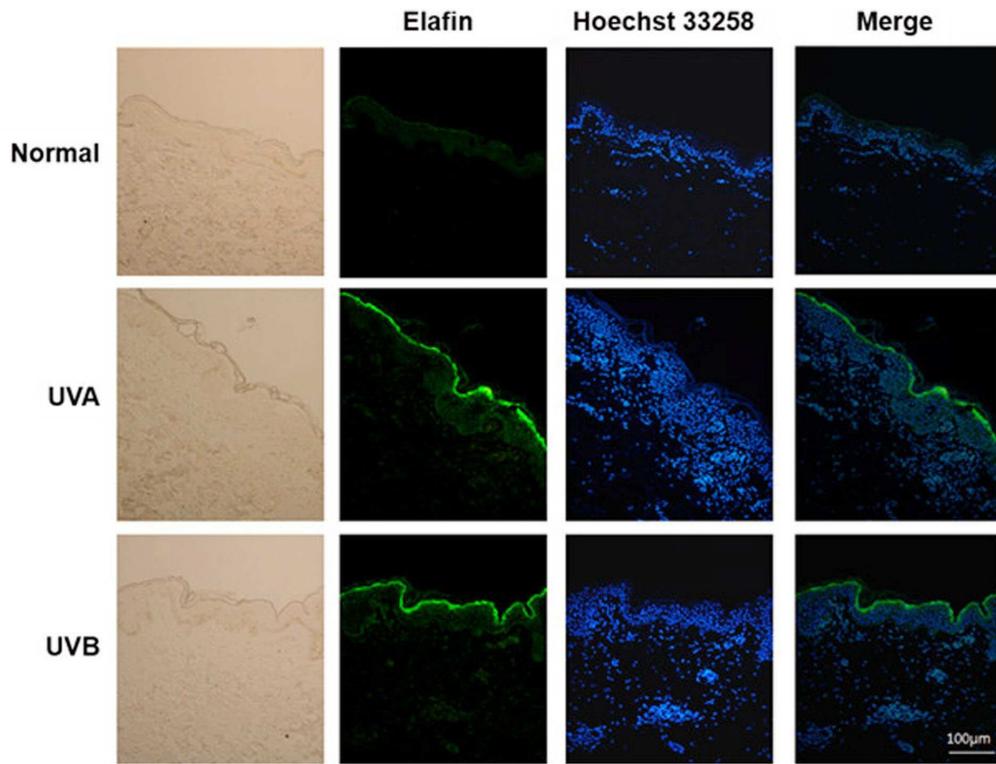
도면3



도면4

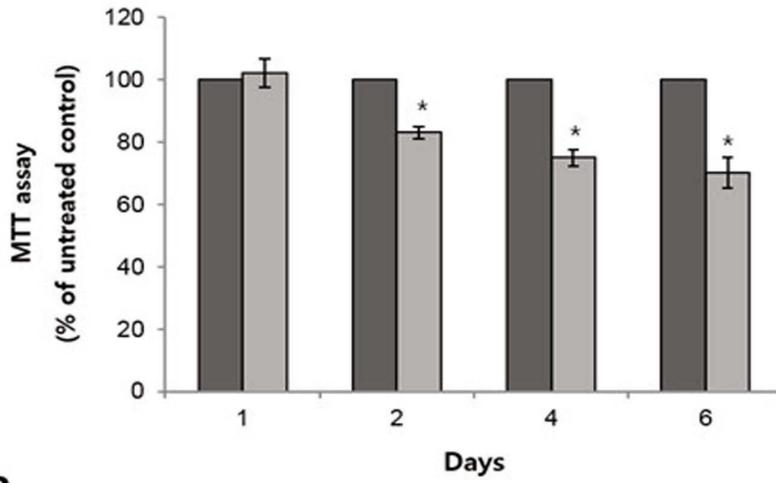


도면5

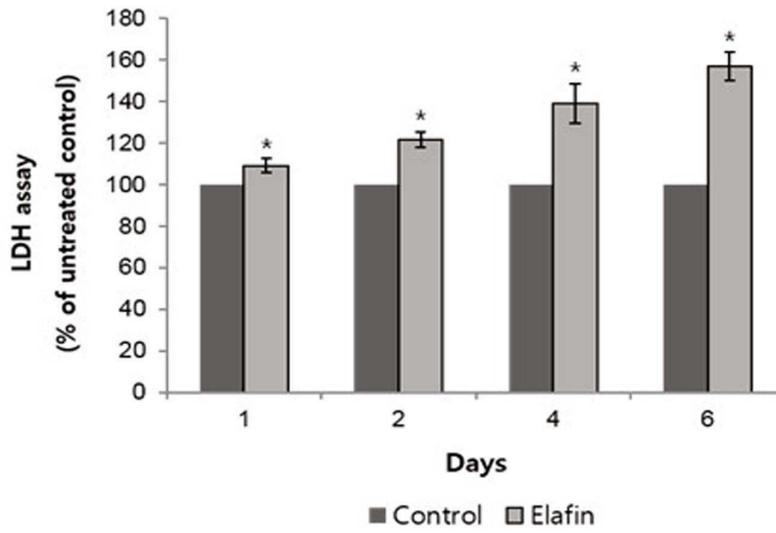


도면6

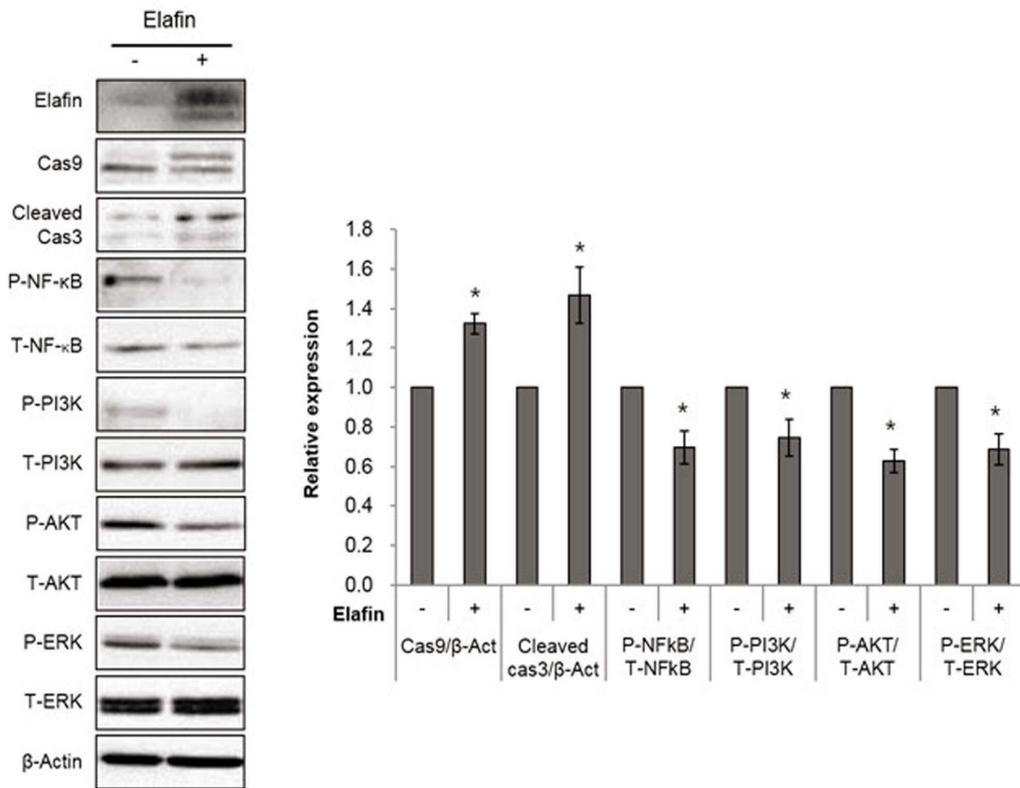
A



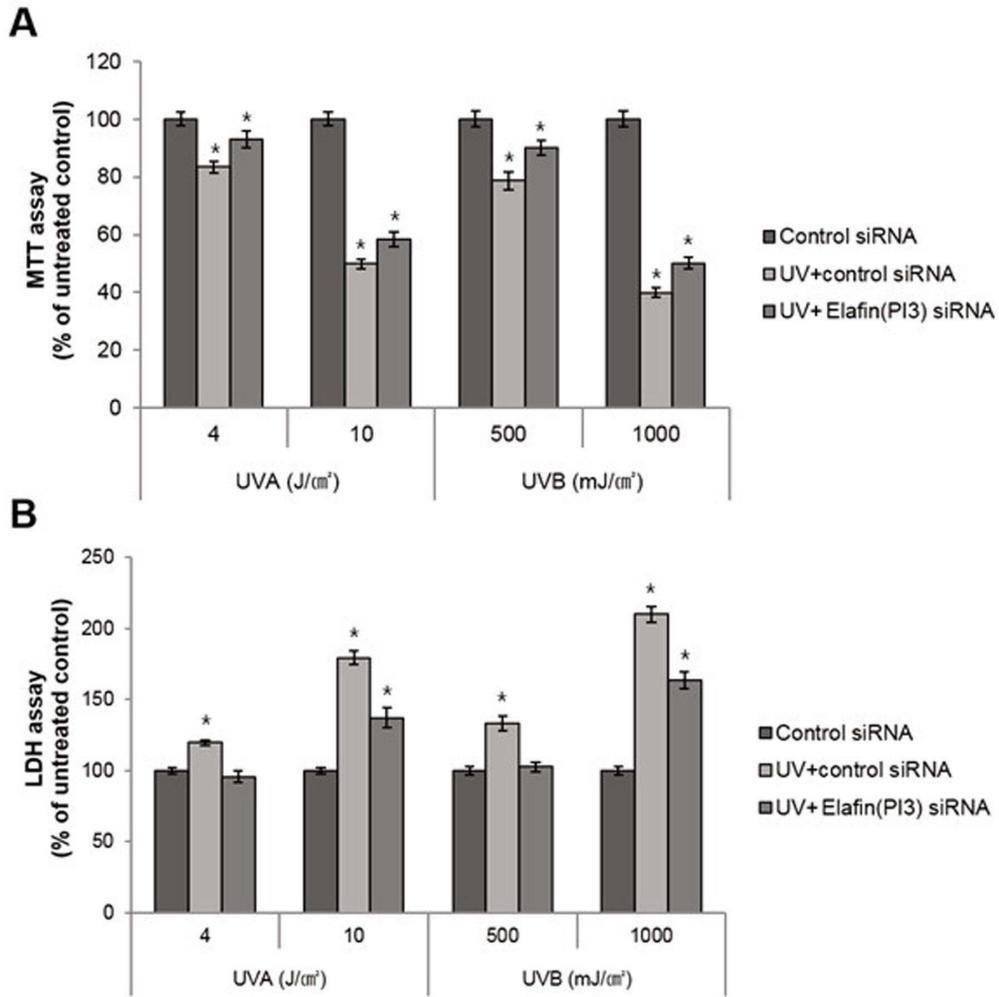
B



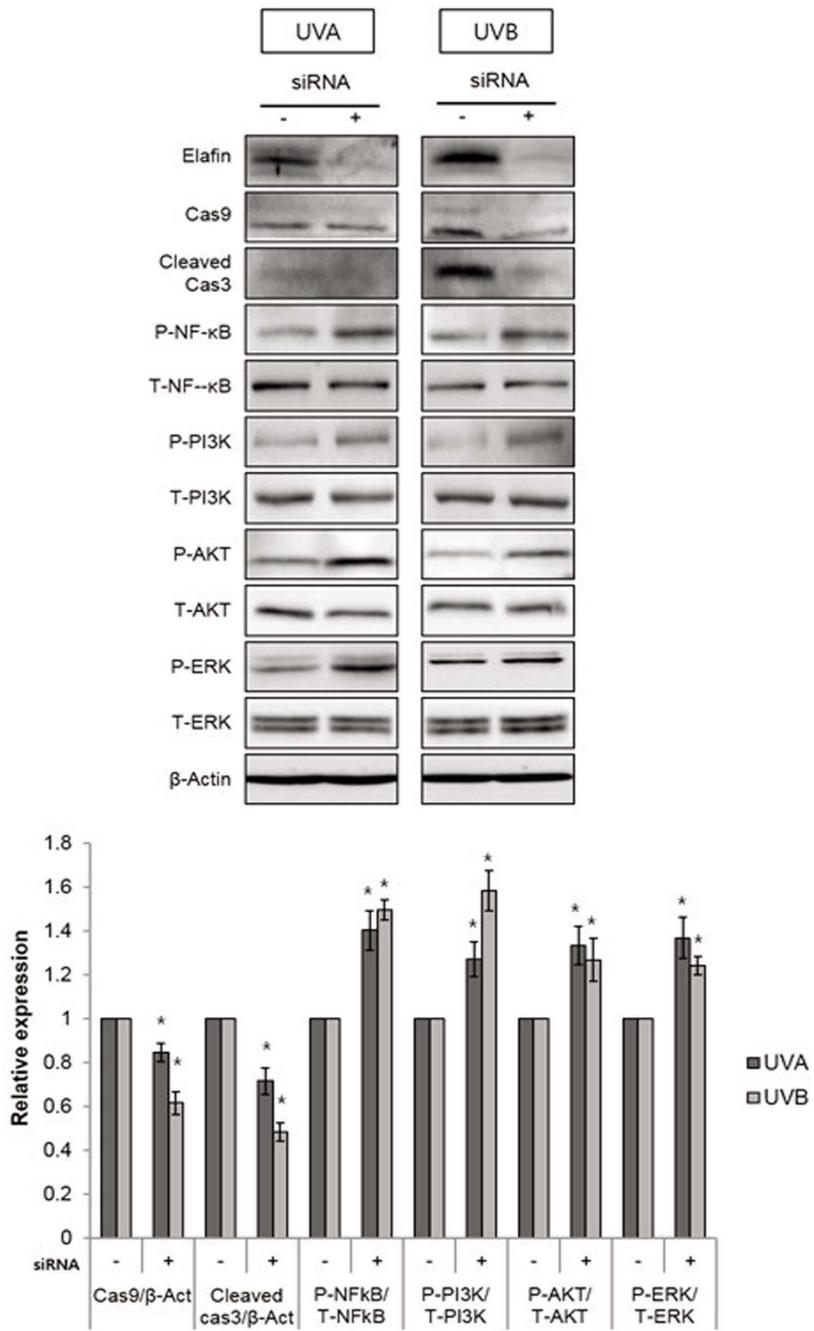
도면7



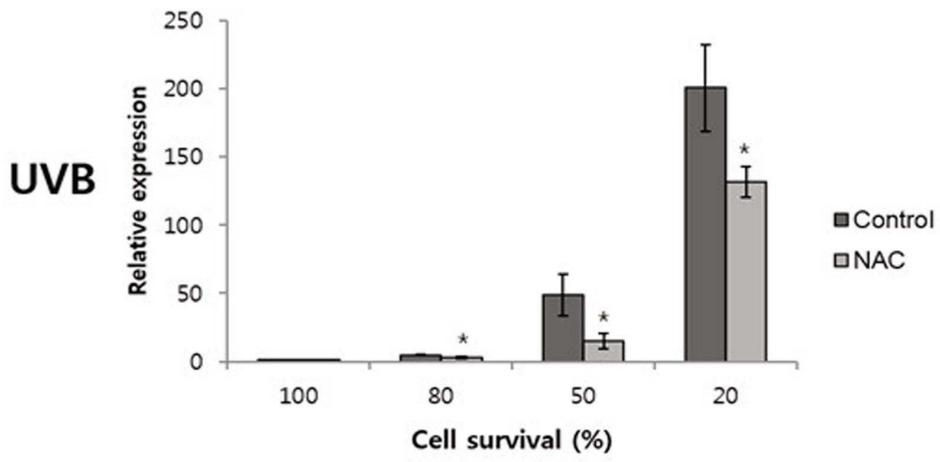
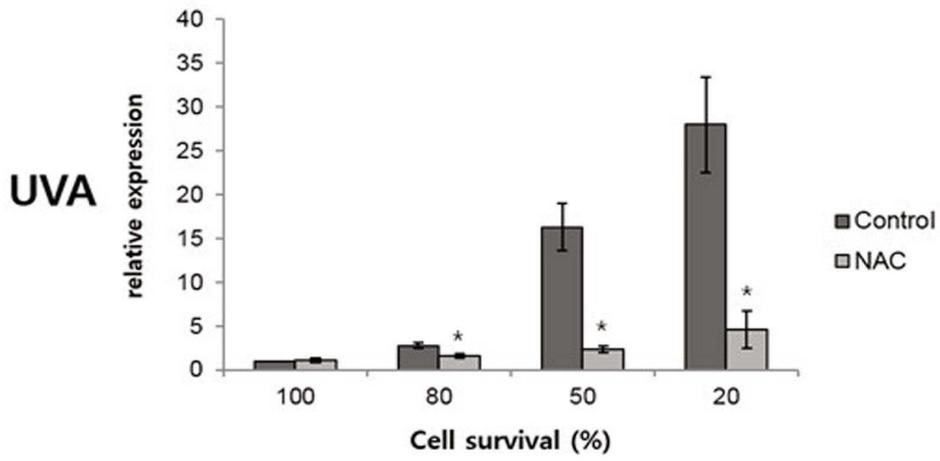
도면8



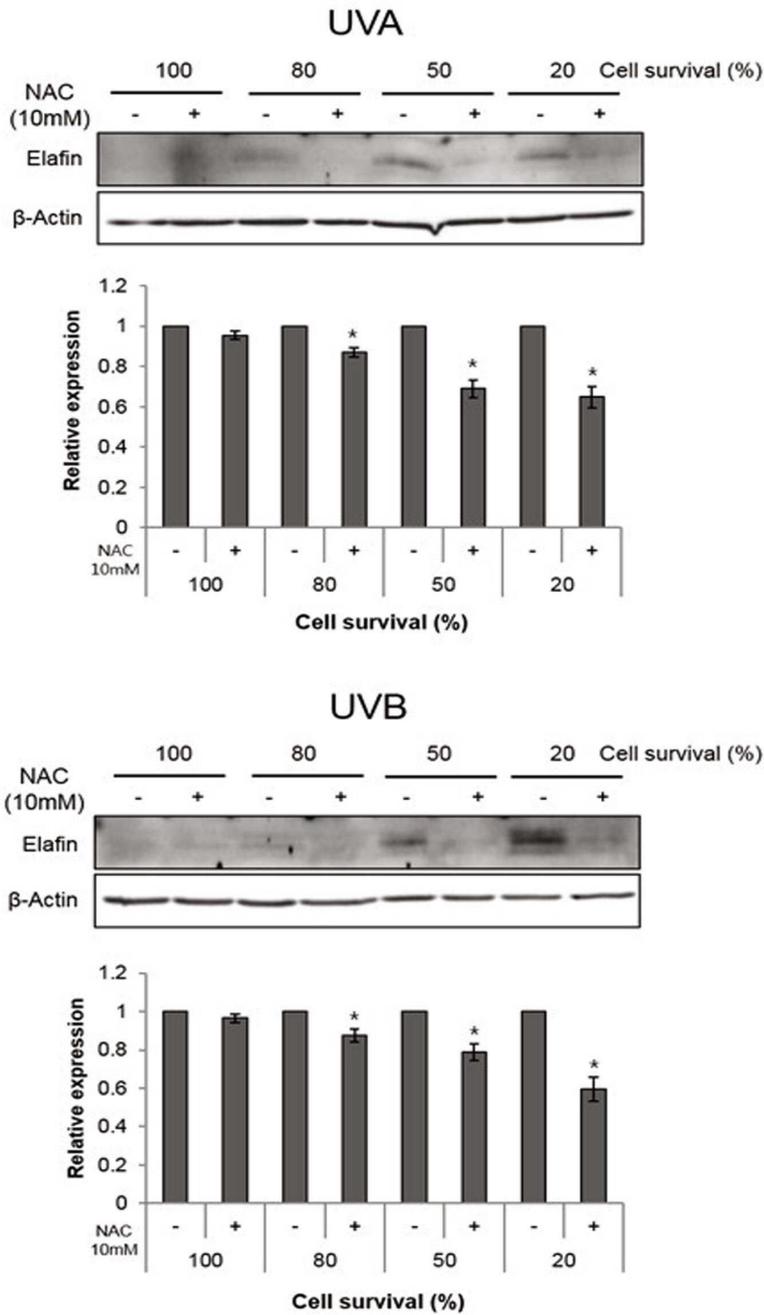
도면9



도면10



도면11



서열목록

- <110> Dongguk University Industry-Academic Cooperation Foundation
- <120> Marker for the diagnosis of UV-induced skin toxicity and use thereof
- <130> PB15-12526
- <160> 2
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens_elafin amino acid seq.

<400> 1

Met Arg Ala Ser Ser Phe Leu Ile Val Val Val Phe Leu Ile Ala Gly

1 5 10 15

Thr Leu Val Leu Glu Ala Ala Val Thr Gly Val Pro Val Lys Gly Gln

20 25 30

Asp Thr Val Lys Gly Arg Val Pro Phe Asn Gly Gln Asp Pro Val Lys

35 40 45

Gly Gln Val Ser Val Lys Gly Gln Asp Lys Val Lys Ala Gln Glu Pro

50 55 60

Val Lys Gly Pro Val Ser Thr Lys Pro Gly Ser Cys Pro Ile Ile Leu

65 70 75 80

Ile Arg Cys Ala Met Leu Asn Pro Pro Asn Arg Cys Leu Lys Asp Thr

85 90 95

Asp Cys Pro Gly Ile Lys Lys Cys Cys Glu Gly Ser Cys Gly Met Ala

100 105 110

Cys Phe Val Pro Gln

115

<210> 2

<211> 354

<212> RNA

<213> Homo sapiens_elafin mRNA seq.

<400> 2

atgagggcca gcagcttctt gatcgtggtg gtgttcctca tcgctgggac gctggttcta 60

gaggcagctg tcacgggagt tctgtttaa ggtcaagaca ctgtcaaagg cegtgttcca 120

ttcaatggac aagatcccg taaaggacaa gtttcagtta aaggtcaaga taaagc aaa 180

gcgcaagagc cagtcaaagg tccagtctcc actaagcctg gctcctgccc cattatcttg 240

atccggtgcg ccatgttgaa tcccctaac cegtgcttga aagatactga ctgcccagga 300

atcaagaagt gctgtgaagg ctcttgccgg atggcctgtt tcgttccca gtga 354