



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년12월29일
(11) 등록번호 10-1813324
(24) 등록일자 2017년12월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/113 (2010.01) C07K 16/22 (2006.01)
C12N 15/115 (2010.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/1135 (2013.01)
C07K 16/22 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0106936
(22) 출원일자 2015년07월29일
심사청구일자 2016년04월26일
(65) 공개번호 10-2017-0014106
(43) 공개일자 2017년02월08일
(56) 선행기술조사문헌
KR1019980703870 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
서울대학교병원
서울특별시 종로구 대학로 101(연건동)
한국해양과학기술원
경기도 안산시 상록구 해안로 787 (사동)
(72) 발명자
이서연
서울특별시 성북구 길음로 16, 609동 1504호 (길음동, 삼성래미안3차아파트)
이정현
경기도 성남시 분당구 불정로 219, 116동 101호 (정자동, 한솔마을청구아파트)
(74) 대리인
이명진

전체 청구항 수 : 총 1 항

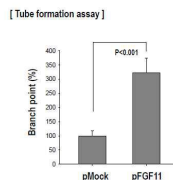
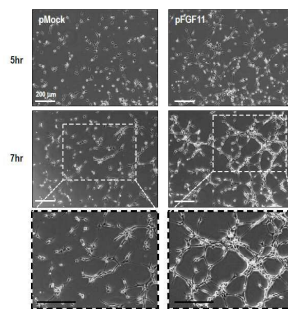
심사관 : 김정태

(54) 발명의 명칭 혈관신생에 관련된 인간 FGF11의 용도

(57) 요약

본 발명은 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 조절제를 포함하는 혈관신생 조절용 조성물에 관한 것으로, 저산소 조건 하에 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 mRNA와 단백질 발현이 증가하고, pFGF11로 형질감염된 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 과발현이 모세관-유사 관 형성 및 TJ 단백질을 증가시키나 세포 이동 활성에는 영향을 미치지 않으며, 인간 FGF11 프로모터 영역 내의 HREs가 저산소 상태에 민감하고, 인간 FGF11의 발현이 이의 프로모터 영역 내의 HIF-1 결합 부위를 통해 유도될 수 있으므로, 인간 FGF11은 종양 진행 또는 허혈성 질환과 같은 저산소증-유도 병리학적 과정의 조절자로 작용할 수 있을 것으로 예상된다. 따라서, 본 발명의 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 조절제는 혈관신생의 억제 또는 촉진에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2b



(52) CPC특허분류

- C12N 15/115 (2013.01)
- G01N 33/5008 (2013.01)
- C12N 2310/11 (2013.01)
- C12N 2310/141 (2013.01)
- C12N 2310/16 (2013.01)

이경원

경기도 안산시 상록구 충장로 533, 1104동 902호
(성포동, 주공11단지아파트)

(72) 발명자

임형순

서울특별시 영등포구 국제금융로 79, D동 102호 (여의도동, 한양아파트)

정재연

서울특별시 동작구 상도로 346-1, 101동 1005호 (상도동, 상도엠코타운 센트럴파크)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2013R1A1A3012024
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신진연구자지원사업
연구과제명 허혈 조직 재생을 위한 근혈관계로의 분화 촉진과 조절 기전 규명
기여율 1/2
주관기관 서울대학교병원
연구기간 2015.06.01 ~ 2016.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PE99314
부처명 해양수산부
연구관리전문기관 한국해양과학기술원
연구사업명 해양과학기술원 기관고유사업
연구과제명 해양극한 유전자의 신기능 발굴 및 활용기술 개발
기여율 1/2
주관기관 한국해양과학기술원
연구기간 2014.01.01 ~ 2016.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

인간 FGF(fibroblast growth factor) 11의 발현 촉진제를 포함하는 허혈성 질환 치료용 약학적 조성물로서, 상기 발현 촉진제는 HIF-1(hypoxia-inducible factor-1) 단백질이고, 상기 허혈성 질환은 뇌졸중, 동맥경화에 의한 말초혈관질환, 및 심근경색으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 인간 FGF(fibroblast growth factor) 11의 발현 또는 활성 조절제를 포함하는 혈관신생 조절용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 산소는 세포 호흡에 필수 영양소이고, 유기체는 항상성(homeostasis)을 유지하기 위해 산소 농도의 변동을 유심히 모니터링 해야 한다. 산소 농도의 변화는 배아 발생 시 시그널일 수 있고, 줄기세포의 운명을 결정할 수 있으며, 병리학적 상태에 기여할 수 있다.

[0003] 조직 세포에 불충분한 산소공급으로 인한 낮은 산소분압 상태, 즉 저산소증 (hypoxia)은 HIFs(hypoxia-inducible factors) 등과 같은 조절인자를 통해 적응반응을 유도한다. 저산소증은 고형암의 중심부에서 관찰되며, 악성 종양의 공통적인 특징이다. 종양 크기가 1-2mm³에 도달하면, 종양의 중심은 적절한 혈액 공급의 부족으

로 인해 저산소 상태로 되고, 종양 성장이 방해된다 (Folkman J: What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent, Journal of the National Cancer Institute 82: 4-6, 1990.).

- [0004] 이와 같은 저산소증은 기존의 혈관에서 새로운 혈관을 생성시키는 혈관신생의 강력한 자극 신호이다. 혈관신생을 통해 생성된 혈관은 영양소 및 산소를 제공하여 종양의 성장을 도울 수 있다. 저산소증에 대한 세포 반응은 신진대사, 항산화 유전자 발현, 세포 증식, 아포토시스, 및 혈관신생에 대한 변화를 포함하여 매우 다양하다.
- [0005] 혈관신생은 종양의 성장과 진행에 필수적인 요소로서, 혈관신생을 억제하면 종양 성장을 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 생각된다. 혈관신생은 다단계 과정으로 이루어져 있으며, 휴지상태의 내피세포가 허혈성 조직 또는 저산소 상태의 고형 종양으로부터의 신호에 의해 활성화되면서 시작된다. 활성화된 혈관내피세포는 세포의 기질을 분해하고, 증식 및 자극원 쪽으로 이동하여, 미성숙 혈관망을 형성한다. 새로 형성된 혈관망은 지지 혈관벽 세포의 소집, 및 새로운 기저막의 배치를 포함하는 혈관망의 성숙 및 안정화 과정을 겪는다. 혈관신생 과정은 혈관신생 인자 및 항-혈관신생 인자를 통해 정확하게 조절된다.
- [0006] 한편, 헤파린-결합 도메인을 함유하는 여러 인자들, 예를 들어 VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF/FGF-2 (basic fibroblast growth factor), 산성 FGF (aFGF/FGF-1), 및 HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor)는 혈관신생 기능을 가진다. 또한, HIF-1 (hypoxia-inducible factor-1) 전사인자는 저산소증-유도성 혈관신생의 주요 조절자로서, VEGF, 태반성장인자(PGF), 및 bFGF와 같은 혈관 형성에 영향을 미치는 유전자를 조절한다.
- [0007] 인간과 설치류에는 22 종류의 FGFs family (FGF1-FGF23)가 보고되어 있다. FGFs (Fibroblast growth factors)는 분비성 FGFs (FGF1-FGF10 및 FGF15-FGF23)와 세포내 비분비성 FGFs (FGF11-FGF14)로 분류될 수 있다. 대부분의 분비성 FGFs 및 이의 표면 FGF 수용체는 세포성장, 분화, 및 발생 과정에서 특징의 생물학적 역할이 잘 알려져 있는 반면, FGF 동종 인자들 (FGFs; FGF11-FGF14)로도 불리는 세포내 비분비성 FGFs는 이들의 기능에 대해서 명확하게 밝혀져 있지 않으며, 이에 대한 연구도 미미한 상태이다.
- [0008] 따라서, 저산소증에 민감한 혈관신생-관련 인자로서 세포내 비분비성 FGFs, 특히 인간 FGF 11의 기능에 대한 연구의 필요성이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 저산소증에 민감한 혈관신생-관련 인자로서 세포내 비분비성 FGFs, 특히 인간 FGF 11의 기능에 대해 연구하던 중, 저산소 조건 하에 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 mRNA와 단백질 발현이 증가하고, pFGF11로 형질감염된 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 과발현이 모세관-유사 관 형성 및 TJ 단백질을 증가시키나 세포 이동 활성화에는 영향을 미치지 않으며, 인간 FGF11 프로모터 영역 내의 HREs(hypoxia response elements)가 저산소 상태에 민감하고, 인간 FGF11의 발현이 HIF-1 전사인자에 의해 유도될 수 있어, 인간 FGF11은 종양 진행 또는 허혈성 질환과 같은 저산소증-유도 병리학적 과정의 조절자로 작용할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.
- [0010] 따라서, 본 발명은 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 조절제를 포함하는 혈관신생 조절용 조성물을 제공하고자 한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 혈관신생 조절제의 스크리닝을 위한 정보제공방법을 제공하고자 한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 조절제를 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는 혈관신생 조절 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명은 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 조절제를 포함하는 혈관신생 조절용 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 혈관신생 조절제의 스크리닝을 위한 정보제공방법을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 억제제를 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는 혈관신생 억제 방법을 제공한다.
- [0016] 또한, 본 발명은 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 촉진제를 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는 혈관신생 촉진

방법을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명은 저산소 조건 하에 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 mRNA와 단백질 발현이 증가하고, pFGF11로 형질감염된 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 과발현이 모세관-유사 관 형성 및 TJ 단백질을 증가시키나 세포 이동 활성화에는 영향을 미치지 않으며, 인간 FGF11 프로모터 영역 내의 HREs가 저산소 상태에 민감하고, 인간 FGF11의 발현이 이의 프로모터 영역 내의 HIF-1 결합 부위를 통해 유도될 수 있으므로, 인간 FGF11은 종양 진행 또는 허혈성 질환과 같은 저산소증-유도 병리학적 과정의 조절자로 작용할 수 있을 것으로 예상된다. 따라서, 본 발명의 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 조절제는 혈관신생의 억제 또는 촉진에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 저산소 조건 하에 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 mRNA 발현 정도 [(A) end-point PCR 및 (B) real-time PCR] 및 단백질 발현 정도 [(C)웨스턴 블롯]를 나타낸 도이다.

도 2a는 인간 FGF11 과발현 벡터를 제작하여 인간 혈관내피세포에 형질감염시켰을 때 인간 FGF11의 발현 정도를 나타낸 도이며,

도 2b는 pFGF11로 형질감염된 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 과발현이 매트릭셀 상에서 모세관-유사 관 형성에 미치는 영향을 나타낸 도이고,

도 2c는 pFGF11로 형질감염된 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 과발현이 세포 이동 활성화에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 3은 pFGF11로 형질감염된 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11 및 TJ 단백질인 occludin, ZO-1, claudin-5의 발현 정도를 웨스턴 블롯으로 관찰 및 정량화한 도이다.

도 4a는 HIF-1(hypoxia-inducible factor-1)이 결합할 수 있는 HRE(hypoxia response element)가 두 부위 존재하는 인간 FGF11의 프로모터 영역을 나타낸 도이고,

도 4b는 저산소 조건이 인간 FGF11 프로모터 루시퍼라제 활성화에 미치는 영향을 나타낸 도이며,

도 4c는 정상산소 조건 하에 HIF-1이 인간 FGF11 프로모터 루시퍼라제 활성화에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 본 발명은 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 조절제를 포함하는 혈관신생 조절용 조성물을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은

[0021] 1) 생물학적 시료에 후보물질을 처리한 후, 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계,

[0022] 2) 상기 1) 단계에서 얻은 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 수준을, 후보물질을 처리하지 않은 생물학적 시료에서의 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 수준과 비교하는 단계, 및

[0023] 3) 상기 1) 단계에서 얻은 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 수준이, 후보물질을 처리하지 않은 생물학적 시료에서의 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 수준보다 감소하면, 상기 후보물질을 혈관신생 억제제로 판단하는 단계를 포함하는, 혈관신생 조절제의 스크리닝을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은

[0025] 1') 생물학적 시료에 후보물질을 처리한 후, 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 수준을 측정하는 단계,

[0026] 2') 상기 1') 단계에서 얻은 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 수준을, 후보물질을 처리하지 않은 생물학적 시료에서의 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 수준과 비교하는 단계, 및

[0027] 3') 상기 1') 단계에서 얻은 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 수준이, 후보물질을 처리하지 않은 생물학적 시료에서의 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 수준보다 증가하면, 상기 후보물질을 혈관신생 촉진제로 판단하는 단계를 포함하는, 혈관신생 조절제의 스크리닝을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0028] 또한, 본 발명은 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 억제제를 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는 혈관신생 억제

방법을 제공한다.

- [0029] 또한, 본 발명은 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 촉진제를 피험자에게 투여하는 단계를 포함하는 혈관신생 촉진 방법을 제공한다.
- [0030] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0031] 본 발명의 조성물에서 인간 FGF 11의 조절제는, 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 억제제, 또는 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 촉진제를 포함한다.
- [0032] 상기 인간 FGF 11의 발현 억제제는, 인간 FGF 11의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA, microRNA 및 리보자임으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0033] 상기 인간 FGF 11의 활성 억제제 또는 촉진제는 인간 FGF 11에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 앵타머 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0034] 상기 인간 FGF 11의 발현 촉진제는 HIF-1(hypoxia-inducible factor-1) 단백질 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0035] 본 발명은 저산소 조건 하에 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 mRNA와 단백질 발현이 증가하고, pFGF11로 형질감염된 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 과발현이 모세관-유사 관 형성 및 TJ 단백질을 증가시키나 세포 이동 활성화에는 영향을 미치지 않음을 확인하였다. 또한, 저산소 조건 하에 리포터 유전자 활성화는 pGL3-FGF11-HREs (WT)로 형질감염된 세포에 대해 현저하게 증가하나, HRE-결실-단편인 pGL3-FGF11- Δ HREs (Δ HRE)로 형질감염된 세포에 대해서는 활성을 보이지 않음으로써, 인간 FGF11 프로모터 영역 내의 HREs가 저산소 상태에 민감하고, 인간 FGF11의 발현이 이의 프로모터 영역 내의 HIF-1 결합 부위를 통해 유도될 수 있다는 것을 알 수 있었다. 따라서, 인간 FGF11은 종양 진행 또는 허혈성 질환과 같은 저산소증-유도 병리학적 과정의 조절자로 작용할 수 있을 것으로 예상되므로, 본 발명의 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 조절제는 혈관신생의 억제 또는 촉진에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 조성물은 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 조절제와 함께 혈관신생의 억제 또는 촉진 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0037] 본 발명의 조성물은, 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함하여 제조할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체는 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로 오스 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구 투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 상기 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 조절제의 일일 투여량은 약 0.0001~100 mg/kg, 바람직하게는 약 0.001~10 mg/kg이며, 하루 일회 내지 수회에 나누어 투여하는 것이 바람직하다.
- [0039] 본 발명의 조성물은 혈관신생의 억제 또는 촉진을 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0040] 또한, 본 발명의 혈관신생 조절제의 스크리닝을 위한 정보제공방법은, 생물학적 시료에 후보물질을 처리한 후 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 수준을 측정하고, 이를 후보물질을 처리하지 않은 생물학적 시료에서의 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 수준과 비교하여, 후보물질을 처리한 생물학적 시료에서의 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 수준이 후보물질을 처리하지 않은 생물학적 시료에서의 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 수준보다 감소하면 상기 후보물질을 혈관신생 억제제로 판단하고, 또는 후보물질을 처리한 생물학적 시료에서의 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 수준이 후보물질을 처리하지 않은 생물학적 시료에서의 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 수준보다 증가하면 상기 후보물질을 혈관신생 촉진제로 판단함으로써, 혈관신생의 억제제 또는 촉진제를 용이하게 스크리닝할

수 있다.

- [0041] 상기 인간 FGF 11의 발현 또는 활성은 세포 내 또는 시험관 내에서 분석할 수 있다.
- [0042] 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액 및 뇨 등을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0043] 상기 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 수준은 중합효소반응(PCR), 역전사 중합효소반응(RT-PCR), 경쟁적 역전사 중합효소반응(Competitive RT-PCR), 실시간 역전사 중합효소반응(Realtime RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯팅(Northern blotting), DNA 칩, 웨스턴 블롯, ELISA(enzyme linked immunosorbent assay), 방사선 면역 분석(Radioimmunoassay, RIA), 방사 면역 확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로켓트 (rocket) 면역전기영동, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay) 및 단백질 칩 등의 방법을 통해 측정할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0044] 또한, 본 발명의 혈관신생 억제방법은 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 억제제를 피험자에게 투여함으로써, 혈관신생을 효과적으로 억제할 수 있다.
- [0045] 또한, 본 발명의 혈관신생 촉진방법은 인간 FGF 11의 발현 또는 활성 촉진제를 피험자에게 투여함으로써, 혈관신생을 효과적으로 촉진할 수 있다.
- [0046] 상기 피험자는 개과 동물, 고양이과 동물, 멧돼지과 동물, 소과 동물, 사슴과 동물, 기린과 동물, 페커리과 동물, 낙타과 동물, 하마과 동물, 말과 동물, 코뿔소과 동물, 족제비과 동물, 토끼과 동물, 설치류 및 영장류를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0047] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0049] **실시예 1: 저산소 조건 하에 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 발현 측정**
- [0050] 저산소 조건 하에 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 mRNA 및 단백질 발현 정도를 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0051] **실시예 1-1. 세포 배양 및 저산소 조건에서 배양**
- [0052] 인간 혈관내피세포 (HUVECs) (계대 5-8; Lonza)는 20% FBS (Lonza), bFGF (3 ng/ml, Invitrogen), 헤파린 (5 U/ml, Gibco) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신 (Gibco)을 함유한 M199 배지 (Gibco)에서 배양하였다. 인간 배아 신장 293 세포 (HEK293a cells, ATCC CRL-1573)는 10% FBS를 함유한 DMEM 배지 (Gibco)에서 배양하였다.
- [0053] 저산소 상태 조성을 위하여, 세포를 낮은 산소 분압 (1% O₂, 5% CO₂, N₂와의 균형 유지)을 유지하는 포르마 저산소 챔버 (Forma Scientific)에서 16시간 동안 배양하였다. 포르마 저산소 챔버는 폐쇄된 저산소 작업공간을 통하여 저산소 상태를 보다 엄격하게 조절하는 혐기성 시스템이다. 정상산소 상태의 산소 분압은 20% O₂이었다.
- [0054] **실시예 1-2. real-time PCR 및 end-point PCR**
- [0055] 총 RNA는 QIAshredder 및 RNeasyPlus Mini kits(Qiagen Inc.)를 이용하여 분리하였다. cDNA는 제조자의 지시에 따라, PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara)를 이용하여 1 µg의 총 RNA로부터 합성하였다.
- [0056] real-time PCR은 인간 FGF11의 프라이머 [정방향, 5'-TGTCGCTTAAGGAGTGCCT-3' 및 역방향, 5'-AGAGAAGGCTCCCGGTACAT-3']를 사용하여, SYBR Green PCR Master Mix (Roche)를 이용하여 수행하였다. real-time PCR 데이터는 ABI PRISM-7500 서열검출 시스템 (Applied Biosystems)을 이용하여 얻었다. 18S rRNA 유전자를 양성대조군으로 하여 표준화에 사용하였다. 인간 FGF11을 확인하기 위하여 end-point PCR도 수행하였다. GAPDH를 대조군으로 함께 반응시켜 표준화에 사용하였다. PCR에 대한 올리고뉴클레오티드 프라이머는 다음과 같다: 인간 FGF11 [정방향, 5'-GTCACCATCCAGAGTGCCAA-3'; 역방향, 5'-CACTGTGGAGAGAAGGCTCC-3']; GAPDH [정방향, 5'-CATGACAACCTTGGCATTGTG-3'; 역방향, 5'-GTTGAAGTCGCAGGAGACAAC-3']. PCR 산물은 1.2% 아가로오스 겔에서 전기영동으로 확인하였다.
- [0057] 저산소 조건 하에 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 mRNA 발현 정도는 도 1a 및 1b에 나타내었다 [(A) end-point PCR 및 (B) real-time PCR].

- [0058] 도 1a 및 1b에 나타난 바와 같이, 저산소 조건 하에 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 mRNA 발현이 증가함을 확인하였다.
- [0059] **실시예 1-3. 플라스미드 클로닝, 형질감염, 및 웨스턴 블롯 분석**
- [0060] 전장 인간 FGF11은 PCR을 통해 합성하였고, pcDNA3.1/HA 벡터 (Invitrogen)에 클로닝하였다. Metafectene Pro (Biontex)를 이용하여 형질감염을 수행하였다. 웨스턴 블롯팅을 위해, 세포를 수확하여 프로테아제 저해제 (Roche)가 함유된 라이시스 완충액에 넣고 용해하였다. 총 단백질(20~30 μ g)을 FGF11 (R&D)에 특이적인 1차 항체로 면역블롯팅 하였다. α -Tubulin (Calbiochem)은 내부 대조군으로 사용하였다. Image-J (NIH)를 이용하여 밴드의 세기를 정량화하고 표준화하였다.
- [0061] 저산소 조건 하에 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 단백질 발현 정도는 도 1c에 나타내었다.
- [0062] 도 1c에 나타난 바와 같이, 저산소 조건 하에 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 단백질 발현이 증가함을 확인하였다.
- [0063] 상기한 바와 같이, 저산소 조건 하에 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 mRNA와 단백질 발현이 증가함으로써, 인간 FGF11이 저산소증-매개 혈관신생 과정에 기능할 수 있을 것으로 예상된다.
- [0065] **실시예 2: 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 관 형성 효과 및 세포 이동 확인**
- [0066] 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11 과발현이 종양형성에 필수적인 혈관신생과 관련 있는지 여부를 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.
- [0067] **실시예 2-1. 관 형성 어세이**
- [0068] 관 형성 어세이(Tube formation assay)는 공지의 방법으로 수행하였다.
- [0069] 구체적으로는, 200 μ l의 성장인자-감소 매트릭셀 (BD Biosciences)을 24-웰 플레이트에 도포하고 37 $^{\circ}$ C에서 30분 동안 중합하였다. pFGF11 또는 pMock로 형질감염된 인간 혈관내피세포 (1×10^4 cells)를 중합된 매트릭셀 위에 씨딩하고, 2% FBS와 헤파린 (10 U/ml)을 함유한 M199 배지에서 16시간 동안 지속적으로 배양하면서 매시간 관찰하였다. 배양물을 Olympus TH4-200 광학현미경 (배율: $\times 100$)을 이용하여 관이 형성되는 것을 관찰하고 정량화하였다.
- [0070] 결과는 도 2a 및 도 2b에 나타내었다.
- [0071] 도 2a 및 도 2b에 나타난 바와 같이, 인간 FGF11 과발현 벡터를 제작하여 인간 혈관내피세포에 형질감염시켰을 때 인간 FGF11 단백질이 과발현됨을 확인하였으며, pFGF11로 형질감염된 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 과발현은 매트릭셀 상에서 대조군에 비해 유의하게 모세관-유사 관 형성을 증가시킴을 확인하였다.
- [0072] **실시예 2-2. 세포 이동 어세이**
- [0073] 인간 혈관내피세포를 pFGF11 또는 pMock로 24시간 동안 형질감염시키고, 세포를 60 mm 배양접시에 플레이팅한 다음, 90% 포화될 때까지 키운 후에 공지의 방법으로 세포 이동 어세이(cell migration assay)를 수행하였다.
- [0074] 구체적으로는, 인간 혈관내피세포를 면도날로 상처를 주고 긁어낸 다음, 2% FBS와 1 mM 티미딘을 함유한 M199 배지에서 배양하였다. 16시간 후에, 인간 혈관내피세포를 무수 메탄올로 2분 동안 고정하고, Giemsa 용액으로 3분 동안 염색한 다음, 광학현미경으로 관찰하였다. 이동 활성은 기준선 너머로 이동한 세포의 수를 세어 정량화하였다. 양성대조군으로 bFGF (basic FGF)를 사용하였다.
- [0075] 결과는 도 2c에 나타내었다.
- [0076] 도 2c에 나타난 바와 같이, pFGF11로 형질감염된 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11 과발현은 세포 이동 활성을 자극하지 않았으며, 양성대조군인 bFGF로 처리된 인간 혈관내피세포는 정상적으로 이동함을 확인하였다.
- [0077] 상기한 바와 같이, pFGF11로 형질감염된 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11 과발현은 모세관-유사 관 형성을 증가시키나, 세포 이동 활성에는 영향을 미치지 않음으로써, 인간 FGF11이 혈관의 관 구조를 안정화시키는데 관련이 있을 것으로 예상된다.
- [0079] **실시예 3: 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 발현이 TJ 단백질의 발현에 미치는 영향**
- [0080] 인간 혈관내피세포에서 인간 FGF11의 과발현이 혈관의 구조를 안정화시키는데 중요한 TJ(tight junction) 단백

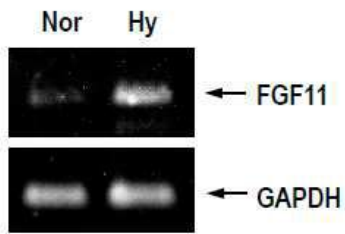
질의 발현에 영향을 미치는지 확인하기 위하여, 하기와 같은 실험을 수행하였다.

- [0081] 인간 혈관내피세포를 pFGF11 또는 pMock로 48시간 동안 형질감염시키고, 인간 FGF11 및 TJ 단백질인 occludin (Invitrogen), ZO-1 (Invitrogen), claudin-5 (Abcam)에 특이적인 1차 항체로 면역블롯팅 하여 이들 단백질의 발현을 관찰하고 정량화하였다.
- [0082] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, pFGF11로 형질감염된 인간 혈관내피세포에서 TJ 단백질인 occludin, ZO-1, claudin-5의 발현은 인간 FGF11의 과발현과 함께 증가하였다. 따라서, 인간 FGF11의 과발현이 혈관의 관 구조를 안정화시키는데 관련이 있을 것으로 예상된다.
- [0084] **실시예 4: 인간 FGF11 프로모터 루시퍼라제 어세이**
- [0085] 저산소 조건 하에 인간 FGF11의 발현이 증가하였으므로, 인간 FGF11의 프로모터 영역을 조사하였으며, 이들 프로모터 영역에서 저산소 상태에서 유전자 발현을 조절하는 대표적인 전사인자인 HIF-1(hypoxia-inducible factor-1)이 결합할 수 있는 HREs(hypoxia response elements, 5'-ACGTG-3')가 두 부위(-1254에서 -1250, -695에서 -691) 존재함을 발견하였다 (도 4a 참조). HIF-1은 세포 생존, 신진대사, 및 VEGF, 에리트르포이에틴, 태반성장인자 및 bFGF와 같은 중앙혈관형성에 영향을 미치는 유전자의 전사를 조절한다. 따라서, HIF-1이 인간 FGF11 프로모터에 실제로 결합하는지 확인하기 위하여, 하기와 같은 프로모터 루시퍼라제 어세이를 수행하였다.
- [0086] HRE로 추정되는 부위를 가지는 인간 FGF11 프로모터 영역을 포함하는 게놈 DNA의 일부 서열을 PCR을 통해 증폭시키고, 루시퍼라제 pGL3 프로모터 벡터 (Promega)에 클로닝하였다. 이때 PCR용 프라이머 서열은 다음과 같다: 정방향, 5'-CTGCTAGC CCAACCTCTCCTCTCTACC-3' (pGL3-FGF11-HREs); 정방향, 5'-GTGCTAGC GGGGCTGGTTAGATTGGAG-3' (pGL3-FGF11-ΔHREs); 및 역방향, 5'-ATAGATCT ACTAGGCATGCTCTTGACG-3'.
- [0087] 인간 배아 신장 293 세포 (HEK293a) 세포를 2×10^5 세포/웰의 밀도로 6-웰 플레이트에 플레이팅하고, pCMV-β-gal, pGL3-FGF11-HREs (WT) 또는 HRE-결실-단편인 pGL3-FGF11-ΔHREs (ΔHRE)를 함유하는 전장 프로모터 서열과 함께 24시간 동안 공-형질감염시킨 다음, 저산소 조건 하에서 16시간 동안 배양하였다. 또한, 정상산소 조건 하에서 pGL3-FGF11-HREs (WT) 또는 pGL3-FGF11-ΔHREs (ΔHRE), pCMV-β-gal, pEGFP-HIF-1α, 및 pEGFP-HIF-1β 플라스미드로 공-형질감염시켰다. 형질감염 후, 리포터 유전자 활성을 제조사의 지시에 따라, 루시퍼라제 어세이 시스템 키트 (Promega) 및 발광분석기 (GloMax luminometer, Promega)를 이용하여 루시퍼라제 어세이를 수행하였다. 상대적인 루시퍼라제 활성은 광도(light unit) 및 β-갈락토시다제 활성으로 표준화하였다.
- [0088] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 저산소 조건 하에 리포터 유전자 활성은 pGL3-FGF11-HREs (WT)로 형질감염된 세포에 대해 현저하게 증가하였으나, HRE-결실-단편인 pGL3-FGF11-ΔHREs (ΔHRE)로 형질감염된 세포에 대해서는 활성을 보이지 않았다 (도 4b). 또한, HIF-1에 의한 인간 FGF11의 발현을 검증하기 위하여 정상산소 조건 하에 HIF-1을 과발현시켰을 때, 역시 리포터 유전자 활성은 pGL3-FGF11-HREs (WT)로 형질감염된 세포에 대해 현저하게 증가하였으나, HRE-결실-단편인 pGL3-FGF11-ΔHREs (ΔHRE)로 형질감염된 세포에 대해서는 활성을 보이지 않았다 (도 4c).
- [0089] 상기한 바와 같이, 인간 FGF11 프로모터 영역 내의 HREs가 저산소 상태에 민감함을 알 수 있고, 인간 FGF11의 발현이 이의 프로모터 영역 내의 HIF-1 결합 부위를 통해 유도될 수 있다는 것을 알 수 있다. 따라서, 인간 FGF11은 중앙 진행 또는 허혈성 질환과 같은 저산소증-유도 병리학적 과정의 조절자로 작용할 수 있음을 예상할 수 있다.

도면

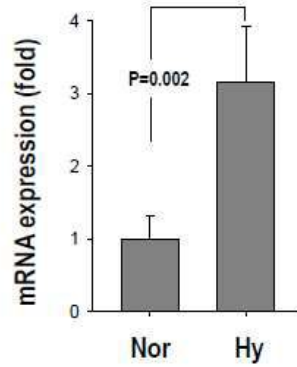
도면1

(A) end-point PCR

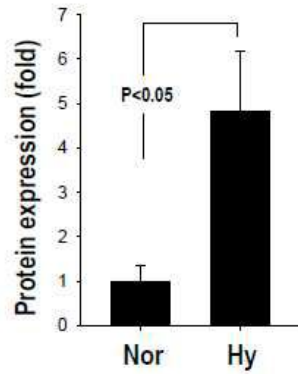
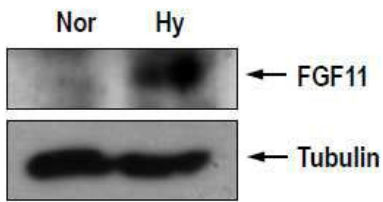


Nor: 정상산소 상태
Hy: 저산소 상태

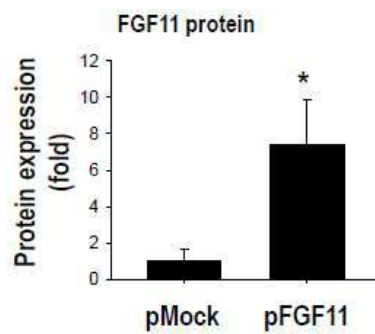
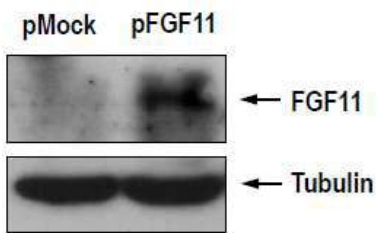
(B) [Real-time PCR for FGF11]



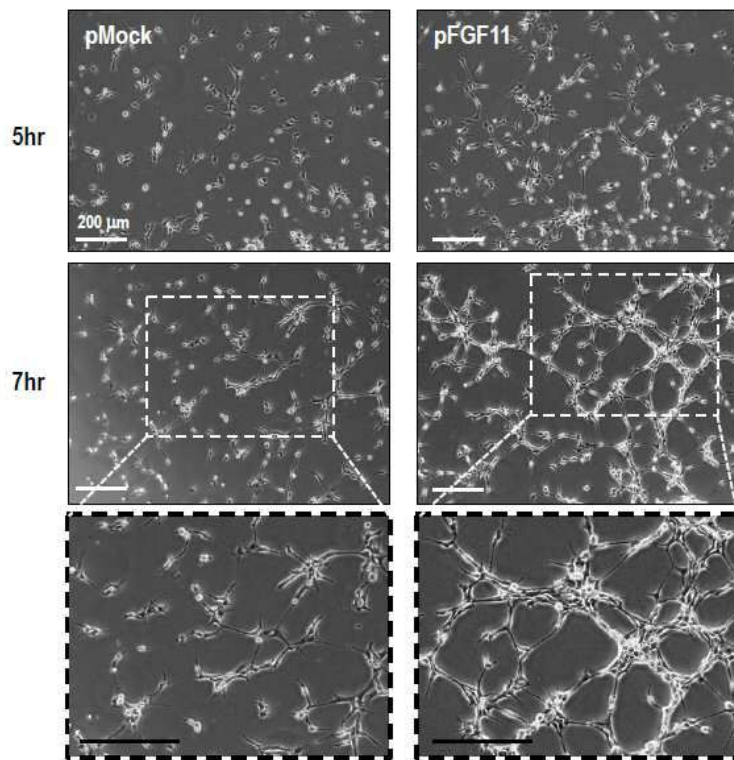
(C) 웨스턴 블롯



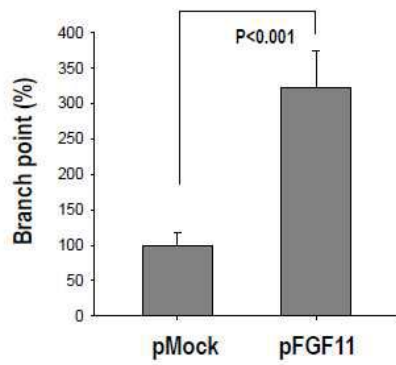
도면2a



도면2b

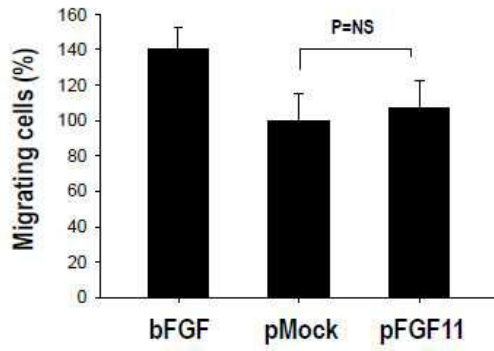


[Tube formation assay]



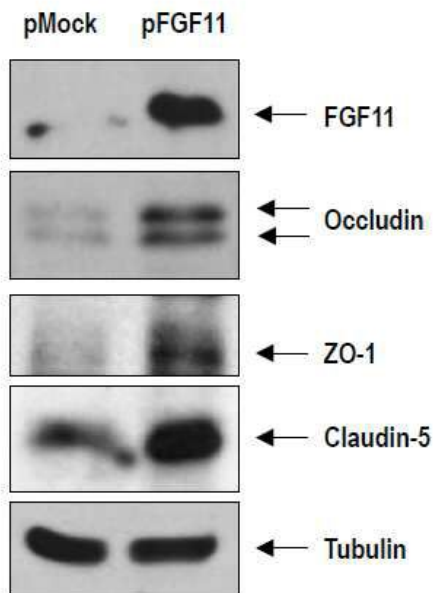
도면2c

[Migration assay]

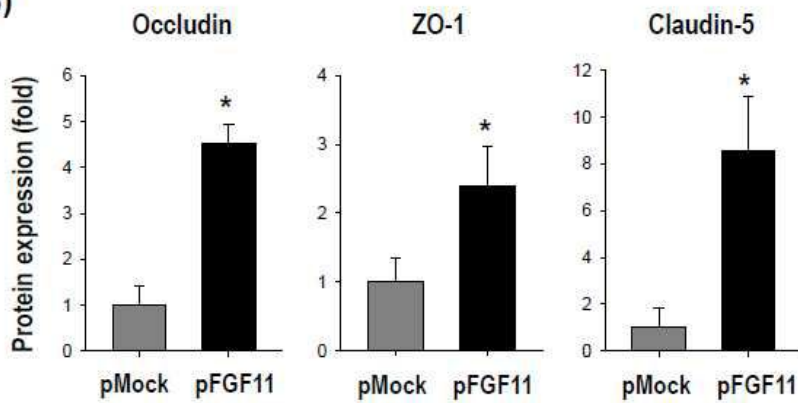


도면3

(A)



(B)



도면4a

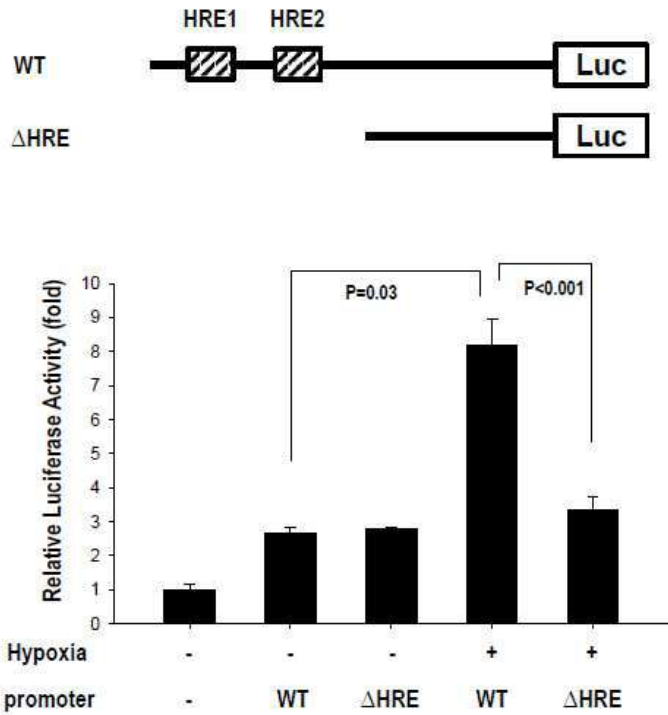
Homo sapiens FGF11 Promoter region



GCGTCGCGCCATTCCATCTCCCTTAGGCCCAACCTCTCCTTCCCTACCCAGG -1301
 GGTGCGTTTCCAGGAGGCCCTTCCCTGTCCCTCCTCCCTGAAGGCTGAG**ACGT** -1251
 GCGGCCTTGCCCTCGGCTTTGCCTGCTTGTAAGACACAGTCCGCACCTCTCT -1201
 ACCTCCAAGGAACCCCGGGTTCCCTCCTGCCCGGCTTACCCTCCTATTT -1151
 CCCAGCGTCTCCGCCCTTGCCTCCGCCCGGGCCGGCTCTCCGAGGAGG -1101
 GGGAACTGCTGTGCGCCGCCCGCCCGCCCTCAGCTTCCACAGCCGCT -1051
 GCCGTGCCCGCCCTTGCCTGGTCCAGCCACCGGCCAGTGCCTTGACT -1001
 TCGCCGGACCGGGAGCTCTGCAGAGACACCTCACTCCTTCCCGAGGGT -951
 CCGGGACGCCTAGCCGGGCTGGGGGAAGCTCCGTTTGGCGGGGACAGG -901
 GAGGGAGGAGCCTGGAGCCGAAGCCAGCGCCACCCGTCCCGGGATCAACA -851
 GGACAGGACAGGTTGAGGGGCTCGGAAAAGGAAGAGGGGGTCTATAG -801
 GCAATCCCGGGGAGGACGAGGAAGCCCTGTAGCAGGAAGCTGTGATCCGC -751
 TCTGACTTGTAGGGGCTGTTACATCTGGGGACTGGTGAC**ACGTGGG** -701
 TGCACCTCTCTTTGGGGGCTGGTTAGATTGGAGGGCTGGGATCTAAA -651
 CAGCACCAGTGTCCCCAAGAAAATTTAAGGGGAGCCAGGGGAGAAAAA -601
 AACAAAAACAAAACAAACACGGATGCTCCTCATTTTGAGGTGCGCGAAG -551
 GCCCTCCAGTCAACTACCTGGTGTATCCACTAGGAAGGGTGGATTTGGAG -501
 GTGACTTCAAAGGAGCGGAGGGTGTGAAGGTGAAGAAAGGGTCTTGGCC -451
 GCTAGAATTCTATGCTACTAGACATGGGGGGACTTGGTGAAAAGGTAT -401
 TATCCAGCCAGAGGGTCTGGGAGCCCTGTCTTACTGAACCTGGGCAACCT -351
 GGATATTCTGAGACATATTTTGGGGGATTTCAAGTGAAGAAAGTGGGGGA -301
 TCCCCCTCATTAGAGTGTAGCAAAGGAAAAACACCAAGGTTGGGTCC -251
 TTCTGACATTTGGCAGTGCCTCAGTAGGGGTGGGATGAGCGAATATCCC -201
 AAAGCTAAAGTCCCACACCTGTAGATTACAAGAGTGGATTTGGCAGGAG -151
 TGTGCCCCAAAATACAGTGGAAAGGTGCCTGAAGATATTTAAACCACGTC -101
 TTGGAATTTAGTGGTCTTGGCTTTGGGATAGGTGAAGTGAGGACAGAC -51
 ACTGGAGAGGAGGGAAAGGGACGTTTTCAATAGGAGGCAAAACTCGAGG -1
 GTGGGATCCACTGAGGAGTACATAGGCTGCTGGATCTGGTGGAGCCAGCA 49
 CTGGGCCCACGGGTGGTAACTGGCTGCTGTGGAGGGGGTACGTGAGGGG 99
 GGGGTCTGGGGCTTATCCTCAGGTCTGTGGGTGGGGCAGCGAGTGGG 149
 GCCTGAGCGTCAAGAGCATGCCCTAGTGAGCGGGCTCCTCTGGGGAGCC 199
 CAGCGGCTCCGGGCGCCTGCCGGTTTGGGGGTGTCTCCTCCCGGGGCGC 249
TATGGCGGCGCTGGCCAGTAGCCTGATCCGGCAGAAGCGGGAGGTCCGCG 299

도면4b

[FGF11-HREs-Luciferase]



도면4c

