



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년05월28일

(11) 등록번호 10-1522965

(24) 등록일자 2015년05월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61P 31/00 (2006.01)

A61P 31/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0081411

(22) 출원일자 2013년07월11일

심사청구일자 2013년07월11일

(65) 공개번호 10-2015-0007465

(43) 공개일자 2015년01월21일

(56) 선행기술조사문헌

Marion Scharte, M.D. et al., Journal of Surgical Research., Vol. 135, pages 262-267 (2005.12.9. 공개)*

KR1020080043162 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한국생명공학연구원

대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

(72) 발명자

최인표

대전광역시 유성구 과학로 125

박영준

대전광역시 유성구 과학로 125

윤성진

대전광역시 유성구 과학로 125

(74) 대리인

이원희

전체 청구항 수 : 총 6 항

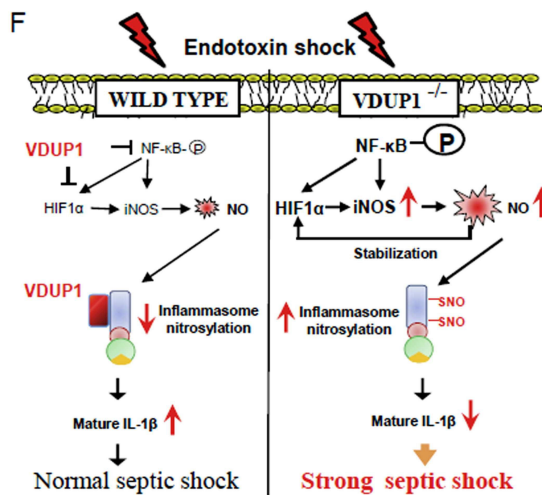
심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 VDUP 1을 유효성분으로 포함하는 패혈증 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 VDUP1(Vitamin D3 up-regulated protein 1)을 유효성분으로 포함하는 내독소 쇼크 억제용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 상기 VDUP1이 LPS 유발 염증 신호에 있어서 NF-κB/HIF-1α/iNOS 경로를 통해 NLRP3 의존적 IL-1 분비를 유의적으로 억제하는 효과를 나타내므로, 상기 VDUP1 유전자 또는 유전자를 포함하는 벡터는 내독소 쇼크 억제용 조성물, 및 패혈증 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도8f



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KGM1211332
 부처명 교육과학기술부
 연구관리전문기관 기초기술연구회
 연구사업명 주요사업(연구개발과제)
 연구과제명 조혈줄기세포 분화를 근거로 한 항암 NK 세포치료기술 개발
 기여율 50/100
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2013.01.12 ~ 2013.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20120009066
 부처명 교육과학기술부
 연구관리전문기관 한국연구재단(대전)
 연구사업명 원천기술개발사업
 연구과제명 항암제 타겟으로서 VDUP1의 기능규명
 기여율 50/100
 주관기관 한국생명공학연구원
 연구기간 2012.09.01 ~ 2013.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 VDUP1(Vitamin D3 up-regulated protein 1) 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는 패혈증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 벡터는 선형 DNA, 플라스미드 DNA, 또는 재조합 바이러스성 벡터인 것을 특징으로 하는 패혈증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 재조합 바이러스성 벡터는 레트로바이러스(Retrovirus), 아데노바이러스(Adenovirus), 헤스페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus) 및 렌티바이러스(Lentivirus)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 패혈증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 VDUP1은 NF- κ B 활성 및 HIF-1 α 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 패혈증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 패혈증은 내독소 쇼크(endotoxic shock)에 의해 유도되는 것을 특징으로 하는 패혈증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 내독소는 그람음성 세균 유래 지질다당류(Lipopolysaccharide, LPS)인 것을 특징으로 하는 패혈증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 VDUP1(Vitamin D3 up-regulated protein 1) 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 벡터를 유효성분으로 포함하는 내독소 쇼크(endotoxic shock) 억제용 조성물, 및 패혈증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 패혈성 쇼크(septic shock) 환자들은 발열, 혈압저하, 심근 억제, 탈수, 급성 신부전증 및 호흡정지 등의 증상을 동반한다. 패혈증으로 수반되는 높은 이환율 및 치사율은 대식세포 및 단핵세포로부터 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)인자 분비를 자극하는 박테리아성 내독소에 의하여 부분적으로 기인하다. 그람-음성 박테리아 외막의 리포폴리사카리드(Lipopolysaccharide; LPS)은 대식세포를 활성화시키고 내독성 쇼크(endotoxic shock) 도중에 상당한 양의 전염증성 사이토카인 및 일산화질소(NO) 자유 라디칼(free radical)의 일련의 분비를 촉진시킨다. 추가적으로, 혈중 박테리아성 LPS는 TNF- α (tumor necrosis factor- α), IL-1 β (interleukin-1 β), 일산화질소(NO, nitric oxide) 및 PGE2 (prostaglandin E2) 등과 같은 다양한 염증성 매개체들의 과발현을 유도한다.

[0003] Vitamin D3 upregulating protein 1(VDUP1)은 혈액종양세포인 HL-60 세포에서 비타민 D3(vitamin D3)에 의해 증가하는 유전자로 처음 알려졌다. 최근에는 VDUP1이 티오레독신(thioredoxin, Trx)과 반응하여 Trx의 기능을 억제하고, 다른 인자들과 Trx의 작용도 저해한다고 보고 되었다. 이는 VDUP1은 세포 내의 산화 환원반응을 조절하는 Trx에 음성 조절자(negative regulator)로 작용하여 산화적 스트레스(oxidative stress)에 세포를 더욱 민감하게 한다는 것을 의미한다. 또한, VDUP1 안티 센스(anti sense) DNA가 설치류 흑색종(murine melanoma) 세포에서 멜라닌 합성(melanin synthesis)이나 종양형성(tumorigenesis)을 조절하며, 암세포의 세포주기를 억제하여 항암효과를 나타내고 실제로 암 조직에서 VDUP-1의 발현이 정상조직에 비해 감소하여 있다고 알려져 있다. 이와 같이 VDUP1의 발현은 여러 면역세포들에서 현저한데 그 역할은 아직 정확하게 규명되지 않고 있다.

[0004] 일산화질소(Nitric oxide, NO)는 생리학적 작용 및 세포 내 병원균의 사멸에 관여하는 중요한 세포 내 또는 세포간 신호 물질이다. 일산화질소의 생성은 일산화질소 합성효소(nitric oxide synthases, NOSs)에 의해 조절되고 조직 유형에 따라 의존적으로 발현된다. 생물활성이 있는 일산화질소는 산성 불균화 반응과 같은 비효소적 메커니즘뿐만 아니라, 미토콘드리아 전자전달계 구성물(mitochondrial respiratory chain), 잔틴 산화효소(xanthine oxidase), eNOS(endothelial NO synthase), 및 시토크롬 P450(cytochrome P450)를 포함한 효소적 환원반응을 통해 생리학적으로 발생한다.

[0005] Hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α)는 저산소 반응의 중요한 조절자로 알려져 있다. HIF-1 α 전사 복합체의 안정화는 종양의 저산소 환경에서 자주 발생하고, 암의 진행 및 전이를 촉진하며, 인간의 암 종류에 따라 치료 실패 및 사망율을 증가시킨다. 최근, 염증성 자극, 호르몬, 및 성장인자 등 다양한 요인들은 HIF의 활성을 촉진시키고, NF- κ B는 염증 반응에 의한 HIF-1 α 의 전사 유도에 있어서 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다. 뿐만 아니라, 일산화질소는 PHD의 활성을 억제하고 HIF-1 α 의 S-나이트로실레이션을 유도하여 HIF-1 α 를 안정화시킨다. 그러나, VDUP1과 iNOS 및 HIF-1 α 사이의 관계는 잘 알려져 있지 않다.

[0007] NLRP3 염증조절복합체(inflammasome)는 카스파제 1(Caspase-1)의 활성을 매개하는 여러 개의 단백질로 구성되어 있는 복합체로서, 카스파제 1 활성을 통한 선천적 면역 반응의 중요한 매개체인 IL-1 β 프로세싱을 조절한다. VDUP1은 IL-1 β 의 생성에 관여하는 NLRP3 염증조절복합체와 결합한다고 보고되고 있다. 반면, 일산화질소는 NLRP3 염증조절복합체를 S-나이트로실레이션화 하여 IL-1 β 의 생성을 억제한다. 그러나 NO 매개 NLRP3 염증조절복합체 억제 조절 메커니즘 및 VDUP1의 역할에 대해 잘 알려져 있지 않다.

[0008] 이에, 본 발명자들은 LPS 유도 세포내 독소 유발 쇼크에 있어서 VDUP1의 역할을 규명하기 위하여 노력한 결과, LPS를 투여한 VDUP1 결핍 마우스에서 NO 및 iNOS의 생성량이 증가하고, 이로 인해 NLRP3 염증조절복합체의 S-나이트로실레이션화가 증가하여 IL-1 β 및 IL-18의 생성이 감소하여, LPS 유도 내독소 쇼크에 대한 민감성이 증가하는 것을 확인함으로써, 상기 VDUP1 유전자 또는 유전자를 포함하는 벡터를 내독소 쇼크 억제용 조성물, 및 패혈증 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 VDUP1(Vitamin D3 up-regulated protein 1) 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 벡터를 유효성분으로 포함하는 내독소 쇼크 억제용 조성물, 및 패혈증 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여,

[0011] 본 발명은 VDUP1(Vitamin D3 up-regulated protein 1) 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는 내독소 쇼크(endotoxic shock) 억제용 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 VDUP1 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는 패혈증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0013] 아울러, 본 발명은 VDUP1 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은 VDUP1(Vitamin D3 up-regulated protein 1) 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는 내독소 쇼크(endotoxic shock) 억제용 조성물에 관한 것으로, 상기 VDUP1을 LPS 유발 염증 신호에 있어서 NF- κ B/HIF-1 α /iNOS 경로를 통해 NF- κ B 및 HIF-1 α 를 하향조절하여, 과도한 NO 생성 및 이로 인한 NLRP3 염증조절복합체의 S-나이트로실레이션에 따른 NLRP3 의존적 IL-1 분비를 유의적으로 억제하는 효과를 나타냄으로, 상기 VDUP1을 내독소 쇼크 억제, 패혈증 예방 및 치료용 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

[0015]

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1a는 LPS(lipopolysaccharide)를 투여한 정상 마우스(VDUP1^{+/+}) 및 VDUP1(vitamin D3 up-regulated protein 1) 결핍 마우스(VDUP1^{-/-})의 생존율을 나타낸 도이다:

■ VDUP1^{+/+}: 정상 마우스

□ VDUP1^{-/-}: VDUP1 결핍 마우스.

도 1b는 LPS를 투여한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 혈액 내 글루코스(glucose) 농도를 나타낸 도이다.

도 1c는 LPS를 투여한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 체온을 나타낸 도이다.

도 1d는 LPS를 투여한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 간 내 지방 축적 정도(왼쪽) 및 폐의 염증세포 침윤 정도(오른쪽)를 나타낸 도이다:

CV: 중심정맥(왼쪽); 및

화살표: 혈관의 염증세포.

도 1e는 LPS를 투여한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 비장 크기를 나타낸 도이다.

도 1f는 LPS를 투여한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 비장세포의 사멸 정도를 나타낸 도이다:

화살표: 사멸세포;

WP: 백비수(white pulp); 및

RP: 적비수(red pulp).

도 2a는 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 분비하는 TNF- α (위) 및 IL-6(아래)의 농도를 나타낸 도이다.

도 2b는 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 골수 호중구에서 분비하는 TNF- α (위) 및 IL-6(아래)의 농도를 나타낸 도이다.

도 2c는 LPS를 투여한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 혈청, 간, 폐 및 비장조직에서 생성된 TNF- α 의 농도를 나타낸 도이다.

도 2d는 LPS를 투여한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 혈청, 간, 폐 및 비장조직에서 생성된 IL-6의 농도를 나타낸 도이다.

도 3a는 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 생성되는 NO의 변화량을 나타낸 도이다.

도 3b는 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 발현되는 iNOS mRNA의 변화량을 나타낸 도이다.

도 3c는 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 발현되는 iNOS 단백질의 변화량을 나타낸 도이다.

도 3d는 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 발현되는 iNOS 단백질의 변화량을 시각화한 도이다.

도 3e는 LPS를 투여한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 혈청, 간, 폐, 비장조직에서 생성되는 NO의 변화량을 나타낸 도이다.

도 3f는 LPS를 투여한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 간, 폐, 비장조직에서 발현되는 iNOS 단백질의 변화량을 나타낸 도이다.

도 3g는 LPS를 투여한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 간, 폐, 비장조직에서 발현되는 iNOS mRNA의 변화량을 나타낸 도이다.

도 4a는 LPS를 처리한 대조 RAW264.7 세포 및 VDUP1 녹다운 RAW264.7 세포에서 발현되는 단백질의 변화량을 나타낸 도이다:

con: 정상 RAW264.7 세포;

con-siRNA: 대조 siRNA를 트랜스펙션한 RAW264.7 세포; 및

VDUP1-siRNA: VDUP1 특이적인 siRNA를 트랜스펙션한 RAW264.7 세포.

도 4b는 LPS를 처리한 대조 RAW264.7 세포 및 VDUP1 녹다운 RAW264.7 세포에서 생성되는 NO의 변화량을 나타낸 도이다.

도 4c는 LPS를 처리한 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포 및 VDUP1 발현을 회복한 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 발현되는 iNOS 단백질의 발현량(위쪽) 및 생성되는 NO의 변화량을 나타낸 도이다:

con: VDUP1 결핍 마우스의 대식세포;

Mock: 대조-레트로바이러스를 감염시킨 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포; 및

Retro-VDUP1: VDUP1-레트로바이러스를 감염시킨 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포.

도 4d는 LPS를 처리한 대조 RAW264.7 세포(Mock) 및 VDUP1을 과발현시킨 RAW264.7 세포(Retro-VDUP1)에서 발현되는 iNOS 단백질의 변화량을 나타낸 도이다.

도 4e는 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 LPS 제거 후 분해되는 iNOS 단백질의 변화량을 나타낸 도이다.

도 4f는 LPS 및 프로테아좀 억제제(protease inhibitor)(MG-132)를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 LPS 제거 후 분해되는 iNOS 단백질의 변화량을 나타낸 도이다.

도 5a는 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 인산화되는 ERK, JNK, 및 p38 단백질의 변화량을 나타낸 도이다.

도 5b는 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 인산화되는 I κ B- α 및 p65 단백질의 변화량을 나타낸 도이다.

도 5c는 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 핵으로 이동하는 NF- κ B 단백질의 변화량을 나타낸 도이다.

도 5d는 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 핵으로 이동하는 NF- κ B 단백질을 시각화한 도이다.

도 5e는 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 핵으로 이동하는 NF- κ B 단백질과 DNA의 결합 활성을 나타낸 도이다.

도 5f는 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 핵으로 이동하는 NF- κ B 단백질과 iNOS 크로마틴 복합체 형성 활성을 나타낸 도이다.

도 6a는 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 발현되는 HIF- α mRNA의 변화량을 나타낸 도이다.

도 6b는 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포의 세포 기질 및 핵에서 발현되는 HIF- α 단백질의 변화량을 나타낸 도이다.

도 6c는 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포의 세포 기질 및 핵에서 발현되는 HIF- α 단백질을 시각화한 도이다.

도 6d는 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 발현되는 HIF- α 단백질과 DNA의 결합 활성을 나타낸 도이다.

도 6e는 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 발현되는 HIF- α 단백질의 안정성을 나타낸 도이다.

도 7a는 LPS 또는 E.coli를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 분비되는 IL-1 β 의 변화량을 나타낸 도이다.

도 7b는 LPS 또는 E.coli를 투여한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 혈청으로 분비되는 IL-1 β 의 변화량을 나타낸 도이다.

도 7c는 LPS 또는 E.coli를 투여한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 혈청으로 분비되는 IL-18의 변화량을 나타낸 도이다.

도 7d는 LPS 또는 E.coli를 투여한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 혈청으로 분비되는 NO의 변화량을 나타낸 도이다.

도 7e는 LPS 또는 E.coli를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 NLRP 염증조절복합체의 활성을 나타낸 도이다.

도 7f는 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 S-나이트로실레이션 되는 NLRP 염증조절복합체의 변화량을 나타낸 도이다.

도 7g는 E.coli를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 S-나이트로실레이션(S-

nitrosylation) 되는 NLRP 염증조절복합체의 변화량을 나타낸 도이다.

도 8a는 LPS 및 iNOS 억제제(L-NAME)을 투여한 VDUP1 결핍 마우스의 생존율을 나타낸 도이다:

- L-NAME: iNOS 억제제를 투여한 VDUP1 결핍 마우스 군;
- LPS alone: LPS를 투여한 VDUP1 결핍 마우스 군; 및
- LPS + L-NAME: iNOS 억제제를 포함한 LPS를 투여한 VDUP1 결핍 마우스 군.

도 8b는 LPS 및 iNOS 억제제(L-NAME)을 투여한 VDUP1 결핍 마우스의 혈액으로 분비되는 NO의 변화량을 나타낸 도이다.

도 8c는 LPS 및 iNOS 억제제(L-NAME)을 투여한 VDUP1 결핍 마우스의 혈액으로 분비되는 IL-1 β 의 변화량을 나타낸 도이다.

도 8d는 LPS를 투여한 골수 이식 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 생존율을 나타낸 도이다:

- WT→WT: 정상 마우스의 골수를 이식받은 정상 수신 마우스;
- KO→WT: VDUP1 결핍 마우스의 골수를 이식받은 정상 수신 마우스;
- WT→KO: 정상 마우스의 골수를 이식받은 VDUP1 결핍 수신 마우스; 및
- KO→KO: VDUP1 결핍 마우스의 골수를 이식받은 VDUP1 결핍 수신 마우스.

도 8e는 LPS 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 폐섬유아세포에서 발현되는 iNOS, HIF-1 α 단백질 및 인산화되는 p65 단백질의 변화량을 나타낸 도이다.

도 8f는 LPS 유발 염증 신호에 있어서 VDUP1의 조절 메커니즘을 나타낸 도이다.

도 9는 LPS 또는 NO 공여체(NONOate)를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 발현되는 iNOS 단백질의 변화량을 나타낸 도이다.

도 10은 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 호중구에서 인산화되는 ERK, JNK, 및 p38의 변화량을 나타낸 도이다.

도 11은 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 호중구에서 인산화되는 I κ B- α 및 p65의 변화량을 나타낸 도이다.

도 12a는 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 분비되는 IL-1 β , TNF- α , 및 IL-6의 변화량을 나타낸 도이다.

도 12b는 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1 결핍 마우스의 대식세포에서 발현되는 iNOS 단백질 및 NLRP 염증조절복합체의 변화량을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0018] 본 발명은 VDUP1(Vitamin D3 up-regulated protein 1) 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는 내독소 쇼크(endotoxic shock) 억제용 조성물을 제공한다.
- [0019] 상기 VDUP1 유전자는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0020] 상기 벡터는 선형 DNA, 플라스미드 DNA, 또는 재조합 바이러스성 벡터인 것이 바람직하고, 재조합 바이러스성 벡터인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 상기 재조합 바이러스성 벡터는 레트로바이러스(Retrovirus), 아데노바이러스(Adenovirus), 헤스페스 심플렉스 바이러스(Herpes simplex virus) 및 렌티바이러스(Lentivirus)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하고, 레트로바이러스인 것이 보다 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 상기 VDUP1은 NF- κ B 활성화 및 HIF-1 α 발현을 억제하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0023] 상기 내독소는 그람음성 세균 유래 지질다당류(Lipopolysaccharide, LPS), 또는 이의 유도체인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은VDUP1 결핍이 LPS 유도에 따른 내독소 쇼크에 미치는 영향을 확인하기 위하여, VDUP1 결손 마우스를 제작하고, 상기 VDUP1 결손 마우스로부터 복강 대식세포(peritoneal macrophages), 골수 호중구(neutrophils), 및 폐 섬유아세포(fibroblast)를 분리하였다(도 1 참조).
- [0025] 또한, VDUP1 결핍이 LPS 유도에 따른 세포내 독소 유발 쇼크에 대한 민감성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, LPS를 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스의 생존율, 글루코스 농도, 및 체온 측정, oil-Red-O 염색, 헤마톡실린-에오진(H&E) 염색, 및 TUNEL assay를 수행한 결과, 정상 마우스에 비해 LPS를 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스의 글루코스 수준 및 체온이 낮고, 폐에서 염증 세포의 침윤현상이 증가하고, 비장 세포의 사멸이 증가하는 것을 확인함으로써, VDUP1이 세포내 독소 유발 쇼크 조절에 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다(도 2 참조).
- [0026] 또한, LPS 유발 염증반응에 있어서 VDUP1 결핍이 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, ELISA 분석을 수행한 결과, LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 혈청, 간, 폐, 및 비장조직과 상기 마우스의 복강 대식세포 및 골수 호중구 모두에서 TNF- α 및 IL-6 수준이 비슷하게 증가하는 것을 확인함으로써, LPS 유도 반응에서 VDUP1 결핍으로 인한 세포내 독소 유발 쇼크의 민감성 증가는 LPS에 의한 염증성 사이토카인의 생성 증가와 관련이 없음을 확인하였다(도 3 참조).
- [0027] 또한, LPS 유발 염증반응에 있어서 VDUP1 결핍이 iNOS 발현 및 NO 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, Griess reagents 및 NO detection Kit를 이용한 NO 측정, 정량적 실시간 PCR(Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction), 면역 블러팅(immunoblotting), 및 면역염색(immunostaining)을 수행한 결과, 정상 마우스에 비해 LPS를 처리한 VDUP1^{-/-} 마우스의 혈청, 간, 폐 및 비장조직, 상기 마우스의 복강 대식세포에서 NO 생성, iNOS mRNA 및 단백질 발현량이 증가하는 것을 확인함으로써, VDUP1이 LPS 유도 반응에 있어서 NO 및 iNOS 발현의 하향조절자(negative modulator)로서 작용한다는 것을 확인하였다(도 4 참조).
- [0028] 또한, LPS 유발 염증반응에 있어서 VDUP1의 NO 생성 및 iNOS 발현 하향조절을 확인하기 위하여, Griess reagents를 이용한 NO 농도 측정, 및 웨스턴 블러팅(Western blotting)을 수행한 결과, 정상 세포에 비해 LPS를 처리한 VDUP1 녹다운(knockdown)된 RAW264.7 세포에서 iNOS 단백질의 발현량 및 NO 생성량이 증가하는 반면, 반대로 VDUP1 과발현 RAW264.7 세포에서 iNOS 단백질의 발현량이 감소하고, 정상 대식세포에 비해 LPS를 처리한 VDUP1 발현이 회복된 VDUP1^{-/-} 대식세포에서 iNOS 단백질의 발현량 및 NO 생성량이 감소함을 확인하였다. 또한, VDUP1^{-/-} 대식세포에 NO 공여체인 DETA-NONOate 및 LPS를 처리하고 웨스턴 블러팅을 수행한 결과, DETA-NONOate는 VDUP1 또는 iNOS의 발현 및 분해에 영향을 미치지 않음을 확인하였고, LPS를 처리한 VDUP1^{-/-} 대식세포에서 LPS를 제거하고 웨스턴 블러팅을 수행한 결과, 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 대식세포의 iNOS의 분해 속도가 유사하게 감소함을 확인하였으며, VDUP1^{-/-} 대식세포에 프로테아좀 억제제인 MG-132 및 LPS를 처리하고 웨스턴 블러팅을 수행한 결과, 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 대식세포에서 MG-132에 의한 iNOS 분해 억제 변화가 유사함을 확인함으로써, LPS 반응에 있어서 VDUP1은 NO 생성 및 iNOS의 발현 유도의 하향조절자로서 중요한 역할을 하지만 iNOS 분해에 영향을 미치지 않음을 확인하였다(도 5 참조).
- [0029] 또한, LPS 반응에 있어서 VDUP1의 NF- κ B 활성화 하향조절을 확인하기 위하여, VDUP1^{-/-} 대식세포 및 호중구에 LPS를 처리하고 웨스턴 블러팅을 수행한 결과, 정상 마우스의 대식세포 및 호중구에 비해 LPS를 처리한 VDUP1^{-/-} 대식세포 및 호중구에서 MAPKs 활성화에 관계없이 NF- κ B 활성화가 하향조절됨을 확인하였고, 웨스턴 블러팅, 면역조직화학염색법(IHC; Immunohistochemistry), EMSA(Electrophoretic Mobility Shift Assay) 분석, 및 ChIP assay를 수행한 결과, 정상 대식세포에 비해 LPS를 처리한 VDUP1^{-/-} 복강 대식세포의 NF- κ B p65의 핵으로 이동 및 핵 내의 iNOS 프로모터와의 결합이 현저히 증가하는 것을 확인함으로써, LPS 반응에 있어서 VDUP1이 NF- κ B p65 서브유닛(subunit)을 표적으로 하여 NF- κ B의 활성을 하향조절함을 확인하였다(도 6 참조).
- [0030] 또한, LPS 반응에 있어서 VDUP1의 HIF-1 α 발현 조절을 확인하기 위하여, 정량적 실시간 PCR, 면역블러팅, 면역

조직화학염색법, EMSA, 및 biotin switch assay를 수행한 결과, 정상 대식세포에 비해 LPS를 처리한 VDUP1^{-/-} 대식세포의 핵 추출물에서 HIF- α 단백질의 양이 유의적으로 증가하고, DNA와의 결합능력이 높으며, S-나이트로실레이션이 더욱 뚜렷함을 확인함으로써, LPS 반응에 있어서 VDUP1이 HIF-1 α 의 발현 및 안정화를 하향조절함을 확인하였다(도 7 참조).

[0031] 또한, VDUP1 결핍에 따른 NO 발현으로 인한 NLRP3 염증조절복합체(inflammasome) 활성 하향조절을 확인하기 위하여, ELISA를 수행한 결과, 정상 대식세포에 비해 LPS 또는 E.coli를 처리한 VDUP1^{-/-} 마우스에서 혈중 IL-1 β 및 IL-18 수준이 감소하고, NO 수준이 증가함을 확인하였다. 또한, Griess reagents를 이용한 NO 농도 측정, ELISA 및 면역블롯팅을 수행한 결과, 정상 대식세포에 비해 LPS 또는 E.coli를 처리한 VDUP1^{-/-} 대식세포에서 성숙 IL-1 β 분비량이 감소하고, iNOS 단백질 발현량, NLRP3 및 카스파제1의 S-나이트로실레이션이 증가함을 확인함으로써, VDUP1 결핍으로 인해 LPS 반응 시 NO의 생성이 증가하고, 이에 NLRP3 염증조절복합체의 S-나이트로실레이션이 증가하여 NLRP3 염증조절복합체의 활성이 억제됨으로써 IL-1 β 프로세싱이 저해됨을 확인하였다(도 8 참조).

[0032] 또한, LPS를 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스에서 iNOS 발현 억제를 통한 NO 수준 변화를 확인하기 위하여, iNOS 억제제(L-NAME)를 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스의 생존율 및 NO detection Kit를 이용한 NO 측정을 수행한 결과, LPS만 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스 군에 비해 L-NAME을 포함한 LPS를 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스 군의 혈중 NO 농도감소, IL-1 β 농도 증가, 및 생존율이 상승하는 것을 확인하였고, 골수 키메라를 제작 및 생존율 측정한 결과, LPS를 투여한 VDUP1^{-/-} 골수를 이식받은 VDUP1^{-/-} 수신 마우스(KO \rightarrow KO)에 비해 정상 골수를 이식받은 VDUP1^{-/-} 수신 마우스(WT \rightarrow KO)의 생존율이 증가하는 것을 확인함으로써, VDUP1이 LPS 반응에 의한 사망률을 감소시킴을 확인하였다. 또한, VDUP1^{-/-} 마우스의 폐섬유아세포를 이용해 웨스턴 블롯팅을 수행한 결과, VDUP1^{-/-} 폐섬유아세포 내의 iNOS, 인산화된 p65, 및 HIF-1 α 단백질의 발현량이 증가함을 확인함으로써, 세포에 관계없이 VDUP1에 의해 iNOS 경로가 조절됨을 확인하였다(도 9 참조).

[0033] 따라서, 본 발명의 VDUP1이 LPS 유발 염증 신호에 있어서 NF- κ B/HIF-1 α /iNOS 경로를 통해 NF- κ B 및 HIF-1 α 를 하향조절하여, 과도한 NO 생성 및 이로 인한 NLRP3 염증조절복합체의 S-나이트로실레이션에 따른 NLRP3 의존적 IL-1 분비를 억제함으로써 LPS 유도 세포내 독소 유발 쇼크를 조절한다는 것을 확인함으로써, 상기 VDUP1 유전자 또는 유전자를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는 내독소 쇼크 억제용 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0034]

[0035] 또한, 본 발명은 VDUP1 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는 패혈증 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0036] 상기 VDUP1 유전자는 서열번호 1로 기재되는 염기서열을 갖는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0037] 상기 VDUP1은 NF- κ B 활성 및 HIF-1 α 발현을 억제하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0038] 본 발명의 VDUP1은 LPS 유발 염증 신호에 있어서 NF- κ B/HIF-1 α /iNOS 경로를 통해 NF- κ B 및 HIF-1 α 를 하향조절하여, 과도한 NO 생성 및 이로 인한 NLRP3 염증조절복합체의 S-나이트로실레이션에 따른 NLRP3 의존적 IL-1 분비를 억제함으로써 LPS 유도 세포내 독소 유발 쇼크를 조절한다는 것을 확인함으로써, 상기 VDUP1 유전자 또는 유전자를 포함하는 벡터는 패혈증 예방 및 치료용 약학적 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명은 VDUP1 유전자 또는 상기 유전자를 포함하는 벡터를 유효성분으로 함유하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0040] 상기 염증성 질환은 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 견관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

- [0041] 본 발명의 VDUP1은 LPS 유발 염증 신호에 있어서 NF-κB/HIF-1α/iNOS 경로를 통해 NF-κB 및 HIF-1α를 하향 조절하여, 과도한 NO 생성 및 이로 인한 NLRP3 염증조절복합체의 S-나이트로시레이션에 따른 NLRP3 의존적 IL-1 분비를 억제함으로써 LPS 유도 세포내 독소 유발 쇼크를 조절한다는 것을 확인함으로써, 상기 VDUP1 유전자 또는 유전자를 포함하는 벡터는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0043] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 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.
- [0044] 또한, 상기 본 발명의 조성물은 상기 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.
- [0045] 또한, 본 발명의 조성물은 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 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0046] 또한, 본 발명의 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 상기 조성물의 투여량은 내독소 쇼크 억제, 및 패혈증을 예방 또는 치료하는 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 통상 성인(체중 60kg 기준)의 경우 비경구로 1일 1회 20~52mg으로 투여하는 것이 바람직하며, 본 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자의 경험에 의하여 적절히 결정될 수도 있다.
- [0047] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0048] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0049] <실시예 1> VDUP1(Vitamin D3 up-regulated protein 1) 결손 마우스(VDUP1^{-/-})의 생산 및 세포 배양
- [0050] <1-1> VDUP1 결손 마우스의 생산
- [0051] VDUP1 유전자가 결핍된 VDUP1 결손(knockout) 마우스를 생산하기 위해 우선 VDUP1 게놈을 분석하여 VDUP1의 엑손 8개 전체를 lacZ/neo 유전자와 바꾼 타겟 벡터를 제조하였다. 상기 벡터를 129Sv 마우스 배아세포에 넣은 후 G418 항생제, 및 칸시클로버(Gancyclovir)가 함유되어 있는 배지에서 배양하였다. 이 배지에서 살아남은 배아 세포 중 VDUP1 한쪽 대립유전자(allele)가 결손된 배아세포를 골라 C57BL/6 마우스의 배반포(blastocyst)에 넣어 VDUP1가 결손된 키메라 마우스를 얻었다. 상기 마우스는 계속 생식선(germ-line)으로 다음 세대로 번식하여 최종적으로 VDUP1 결손 마우스를 생산하였다.
- [0052] 본 발명자들은 상기 결손 마우스의 수정란을 2005년 4월 26일자로 한국 세포주연구재단에 기탁하였다(기탁번호: KCTC10794BP).
- [0053] <1-2> 마우스의 사육 및 구성
- [0054] 상기 실시예 <1-1>의 VDUP1 결손 마우스 및 정상 C57BL/6 마우스(코아텍, 한국)는 12 시간 밝은 조명, 12 시간

어두운 조명 일주기하에서 물과 사료가 자유롭게 주어지며 온도 22℃, 습도 55%가 유지되는 PF(pathogen free) 환경에서 사육되었다. 실험에 사용된 마우스 관련 진행과정은 한국생명공학연구원 동물시험 관련 위원회로부터 검토되고 승인받았다.

[0055] <1-3> 마우스로부터 복강 대식세포(Peritoneal macrophages)의 분리

[0056] 마우스로부터 복강 대식세포를 분리하기 위하여, 6 내지 9주령 된 상기 실시예 <1-1>의 VDUP1 결손 마우스 및 정상 C57BL/6 마우스에 3% 티오글리콜레이트(Thioglycollate)(Sigma-Aldrich, USA)를 복강 내 투여하고, 4일 후 1 × PBS로 10 ml씩 두 번 복강을 세척하는 방식으로 복강 대식세포를 수득하였다. 대식세포는 1 x PBS로 세척하고 24 웰 플레이트(24-well plate)(Becton and Dickinson Bioscience, San Diego, CA)에 0.5 x 10⁶ cell/well의 농도로 온도 37℃에서 2시간 동안 배양한 후 1 x PBS로 세 번 세척하여 플레이트에 붙어 있지 않은 모든 세포를 제거하고, 10% 우태혈청(fetal bovine serum, FBS), 피루부산나트륨(sodium pyruvate), 비필수 아미노산(nonessential amino acid), 100 IU/ml 페니실린 G(penicillin G) 및 100µg/ml 스트렙토마이신(Streptomycin)을 포함하는 RPMI 1640 배지로 교체해 주었다.

[0057] <1-4> 마우스의 골수로부터 호중구의 분리

[0058] 마우스 골수로부터 MACS 세포 분리 키트(MACS Cell Separation Kit)를 이용해 호중구를 분리하였다. 구체적으로, 6 내지 9주령 된 상기 실시예 <1-1>의 VDUP1 결손 마우스 및 정상 C57BL/6 마우스의 종아리뼈, 넓적다리뼈 및 골반뼈를 각각 분리한 후, 막자사발로 갈아서 분쇄한 분쇄물을 70 마이크로 세포 스트레이너(strainer)로 통과시킴으로써 총 골수 세포를 추출하였다. 상기 골수에서 추출한 세포에 아세실팜칼륨(Acesulfame Potassium, ACK) 용액을 처리하여 적혈구를 제거한 후, CD45R/B220(553086, BD Biosciences, California, USA), TER 119(116204, Bio Legend, San Diego, CA), F4/80(122604, Bio Legend, San Diego, CA), CD4(100404, Bio Legend, San Diego, CA) 및 CD5(100604, Bio Legend, San Diego, CA) 세포 표면 항체를 처리하여 4℃, 20분 동안 배양하고 항 바이오틴 마이크로비드(Microbead)(130-090-450, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)을 첨가하여, 각각에 해당하는 B 세포, T 세포, 적혈구, 단핵구 및 대식세포에 붙이고, 이를 MACS 세포 분리 키트(MACS Cell Separation Kit)(Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)를 이용하여 음성선택(negative selection)으로 제거함으로써, 상기 면역세포들이 제거된 호중구 세포 상층액을 수득하여 24 웰 플레이트(24-well plate)(Becton and Dickinson Bioscience, San Diego, CA)에 1 x 10⁶ cell/well의 농도로 배양하였다.

[0059] <1-5> 마우스로부터 폐섬유아세포(Fibroblast)의 분리 및 초대 배양

[0060] 마우스 폐로부터 섬유아세포 분리 및 초대 배양을 하기 위하여, 6 내지 9주령 된 상기 실시예 <1-1>의 VDUP1 결손 마우스 및 정상 C57BL/6 마우스로부터 폐 조직을 적출하고, 1 mm 조각으로 잘게 조각낸 후 p100 디쉬(dish)에 25조각의 폐 조직을 한 조각당 한 방울의 우태혈청으로 37℃에서 4시간 동안 배양하고, 10% 우태혈청, 100 IU/ml 페니실린 G(penicillin G) 항생제 및 100 µg/ml 스트렙토마이신(streptomycin)을 포함한 2 ml의 DMEM(dulbecco's modified Eagle's medium)으로 초대배양하여 분리하였다.

[0061] <실시예 2> VDUP1 결핍이 LPS 유도에 따른 세포내 독소 유발 쇼크에 대한 민감성에 미치는 영향 확인

[0062] <2-1> LPS를 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스의 생존율, 혈당 및 체온 변화 확인

[0063] 생체 내(in vivo) 상태에서 VDUP1 결핍이 세포내 독소 유발 쇼크에 대한 민감성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, LPS 투여에 따른 VDUP1^{-/-} 마우스의 생존율, 글루코스 농도 및 체온 변화를 측정하였다.

[0064] 구체적으로, 10 내지 12 주령 된 상기 실시예 <1-2>에 기재된 방법으로 획득한 정상 마우스(WT, VDUP1^{+/+}, n=17) 및 VDUP1 결손 마우스(VDUP1^{-/-}, n=17)에 10 mg/kg LPS(Sigma-Aldrich, USA)를 복강 내 투여한 후, 마우스의 생존율을 100시간 동안 10시간마다 측정하였다(도 1a). 또한, 글루코스 농도는 Roche에서 나온 혈당계(ACCU-

check active)를 이용하여 측정하고(도 1b), 체온은 시간별로 항문에서 디지털 체온계(UINS(YT305))를 이용하여 측정하였다(도 1c).

[0065] 그 결과, 도 1a에 나타난 바와 같이, 대부분의 정상 마우스(n=15)는 100%의 생존율을 보였지만, 모든 VDUP1^{-/-} 마우스는 LPS 투여 후 40시간 내에 사망하는 것을 확인하였다. 따라서, VDUP1^{-/-} 마우스의 현저한 사망률을 통해 VDUP1이 in vivo 상태에서 치명적인 세포내 독소 유발 쇼크의 조절에 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다(도 1a).

[0066] 또한, 도 1b 및 1c에 나타난 바와 같이, VDUP1^{-/-} 마우스의 글루코스 수준 및 체온이 VDUP1^{+/+} 마우스보다 낮은 것을 확인하였다. 특히, VDUP1^{-/-} 마우스의 혈액 내 글루코스 수준이 VDUP1^{+/+} 마우스에 비해 빠르게 감소하고, 또한, 24시간 후 VDUP1^{-/-} 마우스의 체온도 VDUP1^{+/+} 마우스에 비해 약 5℃ 정도 낮음을 확인하였다(도 1b 및 1c). 따라서, VDUP1 결손 마우스가 세포내 독소 유발 쇼크에 더욱 민감함을 확인하였다.

[0067] <2-2> LPS를 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스의 간 내 지방 축적 및 폐의 염증세포 침윤 확인

[0068] 상기 실시예 <2-1>의 LPS 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스에서 간 내 지방 축적 정도 및 폐의 염증세포 침윤현상을 확인하기 위하여, 중성 지방 특이적 염색법인 Oil-Red-O 염색 및 헤마톡실린-에오진(H&E) 염색을 수행하였다.

[0069] 구체적으로, 상기 실시예 <2-1>과 같이 정상 마우스 및 VDUP1 결손 마우스에 100mg/kg LPS를 18시간 동안 복강 내 투여한 후, 간조직 및 폐조직을 적출하였다. 적출한 간조직은 동결시키고, 동결된 간조직을 20℃에서 크라이오컷(cryocut)을 이용하여 20 μm로 자르고 이를 슬라이드에 부착하여 16시간 정도 건조하여 고정된 다음 100% 프로필렌 글라이세올에 2분 정도 담가 둔 다음 0.5% Oil red O 용액에 1시간 정도 염색하였다. 슬라이드를 85% 프로필렌 글라이세올 용액에 1분 정도 씻은 다음 탈이온수에 두 번 정도 간단히 씻고 커버 글라스를 덮어 400 배율로 현미경으로 관찰하고 촬영하였다(도 1d 왼쪽). 적출한 폐조직 일부를 이용해 헤마톡실린-에오진(H&E) 염색하여 현미경으로 관찰하고 촬영하였다(도 1d 오른쪽).

[0070] 그 결과, 도 1d에 나타난 바와 같이, LPS를 18시간 투여한 정상 마우스에 비해 VDUP1^{-/-} 마우스의 간에서 지방의 축적 정도가 증가하고(도 1d 왼쪽), VDUP1^{-/-} 마우스의 폐에서 염증 세포의 침윤현상이 증가하는 것을 확인하였다(도 1d 오른쪽).

[0071] <2-3> LPS를 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스의 비장 크기 변화 및 세포사멸 확인

[0072] 상기 실시예 <2-1>과 같이 LPS 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스의 비장 크기 및 비장세포의 세포사멸 정도를 확인하기 위하여, 상기 마우스의 비장 크기를 측정하고 헤마톡실린-에오진(H&E) 염색 및 TUNEL assay를 수행하였다.

[0073] 구체적으로, 상기 실시예 <2-1>과 같이 정상 마우스 및 VDUP1 결손 마우스에 100 mg/kg LPS를 시간별로 복강 내 투여한 후, 비장조직을 적출하여 비장 크기를 측정하였다(도 1e). 또한, 상기 실시예 <2-1>과 같이 정상 마우스 및 VDUP1 결손 마우스에 100 mg/kg LPS를 18시간 동안 복강 내 투여한 후 비장조직을 적출하고, 적출한 비장조직을 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정한 후 상기 실시예 <2-2>와 같이 헤마톡실린-에오진(H&E) 염색하고(도 1f, 왼쪽), TUNEL assay kit를 이용하여 제조사의 절차에 따라 TUNEL assay를 수행하여 사멸 세포를 현미경으로 관찰하고 촬영하였다(도 1f, 오른쪽).

[0074] 그 결과, 도 1e에 나타난 바와 같이, VDUP1^{-/-} 마우스의 비장 크기가 정상 마우스에 비해 현저히 증가하는 것을 확인하였다(도 1e).

[0075] 또한, 도 1f에 나타난 바와 같이, VDUP1^{-/-} 마우스의 비장에서 더 많은 수의 세포가 사멸하는 것을 확인하였다(도 1f). 따라서, 상기 <실시예 2>의 결과들을 통해 VDUP1이 세포내 독소 유발 쇼크 조절에 있어서 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다.

- [0076] <실시예 3> LPS 유발 염증반응에 있어서 VDUP1 결핍이 염증성 사이토카인 생성에 미치는 영향 확인
- [0077] <3-1> LPS를 처리한 VDUP1^{-/-} 복강 대식세포 및 호중구의 TNF- α 및 IL-6 생성 확인
- [0078] 전구염증 사이토카인(proinflammatory cytokines)은 치명적인 세포내 독소 유발 쇼크의 전사조절 매개체 중 하나로 잘 알려져 있다(Nishiyama A, Matsui M, Iwata S, Hirota K, Masutani H, et al. (1999) Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. J Biol Chem 274: 21645-21650.). 따라서, LPS에 의한 반응으로 전구염증 사이토카인을 생성하는 주된 세포인 복강 대식세포 및 골수 호중구에서 LPS에 의해 유도된 사이토카인의 생성 정도를 확인하기 위하여, 대식세포 및 호중구의 배양 상층액에 존재하는 TNF- α 및 IL-6의 농도를 ELISA 분석법을 이용하여 측정하였다.
- [0079] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3> 및 <1-4>에 기재한 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 복강 대식세포 및 골수 호중구에 100 ng/ml LPS를 시간별로 처리하여 염증 반응을 유도한 후 세포 배양액을 수득하였다. 수득한 세포 배양액에 존재하는 TNF- α 및 IL-6의 농도는 DuoSet ELISA kit(R&D Systems, Minneapolis, MN)를 이용하여 제조사의 절차에 따라 ELISA 분석을 수행하였다.
- [0080] 그 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이, 시간별로 LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 복강 대식세포 모두 생성되는 TNF- α 및 IL-6 수준이 비슷하게 변화하는 것을 확인하였다(도 2a).
- [0081] 또한, 도 2b에 나타난 바와 같이 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 골수 호중구도 복강 대식세포와 마찬가지로 비슷한 양상으로 TNF- α 및 IL-6 수준이 증가하는 것을 확인하였다(도 2b).
- [0082] <3-2> LPS를 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스의 TNF- α 및 IL-6 생성 확인
- [0083] in vivo 상태에서 VDUP1 결핍이 LPS에 의해 유도된 사이토카인의 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 혈청 또는 간, 폐 및 비장조직에 존재하는 TNF- α 및 IL-6의 농도를 ELISA 분석법을 이용하여 측정하였다.
- [0084] 구체적으로, 10 내지 12 주령 된 상기 실시예 <1-2>에 기재된 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스 각각 5마리씩 무작위로 선정하여 10 mg/kg LPS를 시간별로 복강 내 투여한 후 혈청 또는 간, 폐 및 비장조직을 분리하고, 프로테아제억제제 콕테일(protease inhibitor cocktail)(Promega Korea)을 포함한 1 × PBS를 이용해 파쇄하여 혈청 또는 간, 폐 및 비장조직 용해물(lysate)을 수득하였다. 수득한 혈청 및 각각의 조직 용해물에 존재하는 TNF- α 및 IL-6의 농도는 DuoSet ELISA kit(R&D Systems)를 이용하여 분석하였다.
- [0085] 그 결과, 도 2c 및 도 2d에 나타난 바와 같이, LPS를 투여하고 4시간 및 18시간 후 정상 마우스와 VDUP1^{-/-} 마우스의 혈청, 간, 폐, 및 비장조직 모두 TNF- α 및 IL-6의 농도가 비슷하게 증가하는 것을 확인하였다(도 2c 및 2d). 따라서, 상기 <실시예 3>의 결과들을 통해 LPS 유도 반응에서 VDUP1 결핍으로 인한 세포내 독소 유발 쇼크의 민감성 증가는 LPS에 의한 염증성 사이토카인의 생성 증가와 관련이 없음을 확인하였다.
- [0086] <실시예 4> LPS 유발 염증반응에 있어서 VDUP1 결핍이 iNOS 발현 및 NO 생성에 미치는 영향 확인
- [0087] <4-1> 대식세포에서 NO 생성량 확인
- [0088] NO는 치명적인 세포내 독소 유발 쇼크에 관여하는 염증성 매개체 중 하나이다(Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. Nat Immunol 2: 907-916.). 따라서, LPS 유도 반응에서 대식세포의 VDUP1 결핍으로 인한 세포내 독소 유발 쇼크의 민감성 증가에 있어서 NO 생성량의 변화를 확인하기 위하여, 세포 배양 상층액에 존재하는 NO의 양을 Griess reagents를 이용하여 측정하였다.
- [0089] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3>에 기재한 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 복강 대식세포에 100 ng/ml LPS를 시간별로 처리하여 염증 반응을 유도한 후 상기 실시예 <3-1>과 같이 세포 배양액을 수득하였다. 수득한 세포 배양액을 Griess reagent(G4410, Sigma)와 1:1로 섞어서 10분간 상온에서 방치한 후 540nm

과장으로 NO의 양을 측정하였다.

[0090] 그 결과, 도 3a에 나타난 바와 같이, 야생형 대식세포에 비해 LPS를 처리한 VDUP1^{-/-}의 대식세포의 NO 생성이 증가한 것을 확인하였다(도 3a).

[0091] <4-2> 대식세포에서 iNOS mRNA 발현량 확인

[0092] LPS 유도 반응에서 대식세포의 VDUP1 결핍으로 인한 iNOS mRNA 발현량의 변화를 확인하기 위하여, 정량적 실시간 PCR(Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction)을 수행하였다.

[0093] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3>에 기재한 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 복강 대식세포에 100 ng/ml LPS를 시간별로 처리하여 염증 반응을 유도한 후 대식세포를 회수하고 Trizol Reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA)를 이용하여 총 RNA를 분리하였다. 1 µg의 RNA를 2.5 U의 몰로니 마우스 백혈병 바이러스(Moloney murine leukemia virus, M-MLV) 역전사효소(reverse transcriptase)(Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)와 함께 37°C에서 1시간 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 상기 합성된 cDNA의 전사체는 SYBR Premix Ex Taq(Takara Bio, Tokyo, Japan)와 Real-time system TP 800(Takara Bio)를 이용하여 정량하였으며, 시료의 표준화를 위해 HPRT를 사용하였다. 마우스 iNOS 프라이머 정방향; 5' -ACATCGACCCGTCCACAGTAT-3' (서열번호 2), 역방향; 5' -CAGAGGGTAGGCTTGCTC-3' (서열번호 3), 및 마우스 HPRT 프라이머 정방향; 5' -GCCTAAGATGAGCGCAAGTTG-3' (서열번호 4), 역방향; 5' -TACTAGGCAGATGGCCACAGG-3' (서열번호 5)를 사용하였으며, 각각의 프라이머(primer)는 프라이머3 소프트웨어(Primer3 software)를 사용하여 제작하였다.

[0094] 그 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이, LPS를 처리한 정상 대식세포에 비해 VDUP1^{-/-} 대식세포에서 iNOS의 mRNA 발현량이 현저히 증가하며, 특히, LPS를 12시간 처리한 VDUP1^{-/-} 대식세포에서 가장 많은 양의 iNOS mRNA가 발현됨을 확인하였다(도 3b).

[0095] <4-3> 대식세포에서 iNOS 단백질 발현량 확인

[0096] LPS 유도 반응에서 대식세포의 VDUP1 결핍으로 인한 iNOS mRNA 단백질 발현량의 변화를 확인하기 위하여, 면역블롯팅(immunoblotting)을 수행하였다.

[0097] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3>에 기재한 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 복강대식세포에 100 ng/ml LPS를 시간별로 처리하여 염증 반응을 유도한 후 용해 완충용액(lysis buffer)(바이오세상, 한국)를 이용하여 용해시켰다. 총 세포 용해물에 존재하는 단백질의 농도는 BCA 단백질 분석 키트(Protein Assay Kit)(Pierce, Rockford, IL)를 이용하여 측정하였다. 30 ~ 60 µg의 단백질 시료를 12% SDS-PAGE 겔(gel)을 이용하여 분리한 후, Immobilon-P Transfer Membrane(Millipore Corporation, Billerica, MA)으로 전달시켰다. 5% 탈지분유(skim milk)로 30분간 블라킹(blocking)한 후, 각 인자의 일차 항체를 4°C에서 하루 동안 처리하였다. 상기 막에 붙은 일차 항체(primary antibody)에 HRP가 접합된 이차 항체(HRP-conjugated secondary antibody)를 붙이고, 이를 Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate(Millipore Corporation)을 이용하여 확인하였다. 일차 항체로 항 iNOS(SC-650) 및 항 β-actin(sc-47778)(Santo Cruz Biotechnology, USA)를 사용하였다.

[0098] 그 결과, 도 3c에 나타난 바와 같이 LPS를 처리한 정상 대식세포에 비해 VDUP1^{-/-} 대식세포에서 iNOS의 단백질 발현량이 증가하며, 특히, 12 내지 24시간 동안 LPS 처리한 VDUP1^{-/-} 대식세포에서 iNOS 단백질이 현저하게 발현되는 것을 확인하였다(도 3c).

[0099] <4-4> 면역염색을 통한 대식세포에서 iNOS 단백질 발현량 확인

[0100] 상기 실시예 <4-4>의 대식세포의 iNOS 단백질 발현량을 시각적으로 확인하기 위하여, 면역염색(immunostaining)을 수행하였다.

[0101] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3>에 기재한 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 복강대식세포를 원

형 유리 커버 슬립(cover slip)이 들어있는 24 웰 플레이트에서 1×10^5 cell/plate 농도로 24시간 동안 배양하고, 100 ng/ml LPS를 18시간 동안 처리한 후 차가운 1 x PBS로 세척하고 상온에서 20분 동안 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 고정하였다. 그 다음, 상기 대식세포를 0.2% TritonX-100(Sigma, USA)으로 상온에서 15분 동안 침투하고 4℃에서 하루 동안 iNOS(conjugated to the red fluorescent dye Alexa Fluor 546 (Alexa 546))(Santa Cruz Biotechnology, USA) 항체로 반응시킨 후, PBS로 세 번 세척하였다. 그 다음, 상온에서 2시간 동안 Alexa Fluor 546-conjugated goat-anti mouse IgG(Invitrogen, Korea)와 함께 반응시키고, PBS로 세척한 후 LSM510 confocal 현미경(Carl Zeiss)를 이용해 시각화하였다(Scale bar 20 μ m).

[0102] 그 결과, 도 3d에 나타낸 바와 같이, LPS를 처리한 정상 대식세포 내의 iNOS 단백질 발현량은 현저히 감소하는 반면, VDUP1^{-/-} 대식세포의 경우 현저히 많은 양의 iNOS 단백질이 발현되는 것을 확인하였다(도 3d).

[0103] <4-5> 마우스에서 NO 생성량 확인

[0104] LPS 유도 반응에서 VDUP1 결핍으로 인한 마우스의 혈청, 간, 폐 및 비장 내 NO의 생성량 변화를 확인하기 위하여, 총 NO detection kit를 이용해 조직 내 NO의 농도를 측정하였다.

[0105] 구체적으로, 10 내지 12 주령 된 상기 실시예 <1-2>에 기재된 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스에 10mg/kg LPS를 0, 4, 18시간 동안 투여하고 혈청, 간, 폐 및 비장을 수득한 후 즉시 얼린 다음, 1 mM 프로티아제 억제제(protease inhibitor) 카테일(Promega Korea)을 포함한 버퍼로 균질화하여 조직 용해물을 얻었다. 수득한 조직 용해물은 NO detection kit(ADI-917-020, Enzo life sciences)를 이용해 nitrite plus nitrate(NOx)를 측정하였다.

[0106] 그 결과, 도 3e에 나타낸 바와 같이, LPS를 투여하고 4시간 경과 된 정상 마우스와 VDUP1^{-/-} 마우스의 각각의 장기 및 혈청에서 NO의 생성이 비슷하게 증가하는 것을 확인하였다. 하지만, LPS를 투여하고 4시간 이상 경과 된 정상 마우스의 간, 폐, 비장 및 혈청별 NO의 농도는 동일한 수준으로 유지되는 반면, LPS를 투여하고 18시간 경과 후 VDUP1^{-/-} 마우스의 간, 폐, 비장 및 혈청은 지속적으로 NO의 농도가 증가하는 것을 확인하였다(도 3e). 따라서, 상기 실시예 <4-1> 내지 <4-5>의 결과들을 통해 LPS 유도 반응에서 VDUP1 결핍으로 인한 민감성 증가에 있어서 NO가 중요한 역할을 한다는 것을 확인하였다.

[0107] <4-6> 마우스에서 iNOS mRNA 및 단백질 발현량 확인

[0108] LPS에 의해 유도되는 VDUP1^{-/-} 마우스에서의 iNOS mRNA 및 단백질 발현량을 확인하기 위하여, 면역 블롯팅(immunoblotting) 및 정량적 실시간 PCR을 수행하였다.

[0109] 구체적으로, 상기 실시예 <4-5>와 같이 LPS를 처리하여 간, 폐 및 비장조직 용해물을 수득하고, 상기 실시예 <4-3>과 같은 방법으로 면역 블롯팅을 수행하고(도 3f), 상기 실시예 <4-2>와 같은 방법으로 정량적 실시간 PCR을 수행하였다(도 3g).

[0110] 그 결과, 도 3f에 나타낸 바와 같이, LPS 투여로 인해 도 3e의 결과에서 확인한 NO 발현량과 마찬가지로 정상 마우스의 장기에 비해 VDUP1^{-/-} 마우스의 간, 폐 및 비장에서 iNOS의 단백질량이 현저히 증가하는 것을 확인하였다(도 3f).

[0111] 또한, 도 3g에 나타낸 바와 같이, 각각의 VDUP1^{-/-} 마우스의 간, 폐 및 비장에서 iNOS의 mRNA 발현량이 증가하는 것을 확인하였다(도 3g). 따라서, 상기 <실시예 4>의 결과들을 통해 VDUP1이 LPS 유도 반응에 있어서 NO 및 iNOS 발현의 하향 조절자(negative modulator)로서 작용한다는 것을 확인하였다.

[0112] <실시예 5> LPS 유발 염증반응에 있어서 VDUP1의 NO 생성 및 iNOS 발현 하향조절 확인

[0113] <5-1> VDUP1이 녹다운된 세포에서 LPS에 의해 유도되는 iNOS 단백질 발현량 및 NO 생성량 확인

[0114] 상기 <실시예 4>를 통해 LPS를 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스 및 상기 마우스에서 분리한 복강 대식세포 및 골수 호중

구에서 NO의 생성 및 iNOS의 발현이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 따라서, RNA 간섭을 이용해 VDUP1이 녹다운(knock down)된 세포에서 LPS에 의해 유도되는 iNOS 단백질 발현량 및 NO 생성량의 변화를 확인하기 위하여, 웨스턴 블롯팅(Western blotting) 및 Griess reagents를 이용해 NO의 양을 측정하였다.

[0115] 구체적으로, ATCC에서 구매한 RAW264.7 세포를 10% FBS를 첨가한 RPMI 배지에서 배양하고 Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 이용하여 Invitrogen에서 제작한 VDUP1(1299003) 특이적인 siRNA 및 대조 siRNA를 트랜스펙션(transfection)하였다. 48시간 후 100ng/ml LPS를 6, 12시간 처리한 후 세포를 수득하고 상기 실시예 <4-3>과 같은 방법으로 항 VDUP1(1299003)(Invitrogen), 항 iNOS 및 항 β -actin 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 실시하고(도 4a), 또한, 수득한 상기 세포 배양 상층액을 이용하여 상기 실시예 <4-1>과 같은 방법으로 Griess reagents를 이용한 NO 생성량을 측정하였다(도 4b).

[0116] 그 결과, 도 4a 및 4b에 나타낸 바와 같이, VDUP1 침묵(silencing)으로 인해 대조 siRNA를 트랜스펙션시킨 RAW264.7 세포에 비해 VDUP1 siRNA를 트랜스펙션시킨 RAW264.7 세포에서 iNOS 단백질 발현량 및 NO 생성량이 증가하는 것을 확인하였다(도 4a 및 4b).

[0117] <5-2> VDUP1 발현 회복을 통한 iNOS 단백질 발현량 및 NO 생성량 변화 확인

[0118] VDUP1에 의한 iNOS의 발현 조절이 LPS 유발 반응에 의한 NO 생성에 직접적으로 관련이 있는지 확인하기 위하여, VDUP1 발현이 회복된 VDUP1^{-/-} 대식세포를 이용해 웨스턴 블롯팅 및 Griess reagents를 통한 iNOS의 단백질 발현 및 NO 생성량을 측정하였다.

[0119] 구체적으로, 마우스 VDUP1을 암호화하는 DNA 서열(서열번호 1) 및 pMYs-IRES-GFP 레트로바이러스 벡터(Cell Biolabs)를 이용하여 형질감염용 벡터(IRES-GFP 시스템)를 제작하였다. 바이러스 제작을 위하여, 리포펙타민(Lipofectamine)2000(Gibco-Invitrogen)을 사용하여 Platinum-E 패키징(packaging) 세포주(Cell biolabs)에 형질감염하였다. 200 PFU/cell 농도로 VDUP1-레트로바이러스 또는 대조-레트로바이러스를 이용하여 상기 실시예 <1-3>에 기재한 방법으로 획득한 VDUP1^{-/-} 마우스의 복강 대식세포에 감염시키고 10% FBS 및 8 μ g/ml 폴리브렌(polybrene)을 포함한 RPMI 1640 배지에서 유지 배양하여 VDUP1 발현을 회복한 후, 100 ng/ml LPS를 12, 18, 24시간 동안 처리하여 세포를 수득하였다. 수득한 세포 용해물은 상기 실시예 <4-3>과 같은 방법으로 항 VDUP1, 항 iNOS 및 항 β -actin 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 실시하고(도 4c 위), 또한, 수득한 상기 세포 배양 상층액을 이용하여 상기 실시예 <4-1>과 같은 방법으로 Griess reagents를 이용한 NO 생성량을 측정하였다(도 4c 아래).

[0120] 그 결과, 4c에 나타낸 바와 같이, VDUP1^{-/-} 대식세포에서 VDUP1 발현이 회복된 경우, iNOS 단백질의 발현량 및 NO의 생성량이 감소하는 것을 확인함으로써, VDUP1이 LPS 반응에 의한 iNOS 발현 및 NO 생성을 직접적으로 조절하는 것을 확인하였다(도 4c).

[0121] <5-3> RAW264.7 세포에서 VDUP1 과발현을 통한 iNOS 단백질 발현량 확인

[0122] VDUP1의 과발현을 통해 VDUP1에 의한 iNOS의 발현 조절이 LPS 반응에 의한 NO 생성에 직접적으로 관련이 있는지 확인하기 위하여, VDUP1 과발현된 RAW264.7 세포를 이용해 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

[0123] 구체적으로, 상기 실시예 <5-2>와 같은 방법으로 VDUP1 레트로바이러스를 이용하여 VDUP1이 과발현된 RAW264.7 세포를 제작한 후, 100 ng/ml LPS를 1, 4, 또는 8시간 동안 처리하여 세포를 수득하였다. 수득한 세포 용해물은 상기 실시예 <4-3>과 같은 방법으로 항 VDUP1, 항 iNOS 및 항 β -actin 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 실시하였다.

[0124] 그 결과, 도 4d에 나타낸 바와 같이, LPS를 처리한 VDUP1 과발현 RAW264.7 세포가 정상 세포에 비해 iNOS 단백질의 발현량이 감소하는 것을 확인함으로써, VDUP1이 LPS에 의한 반응에 따른 iNOS의 발현을 직접적으로 조절함을 확인하였다(도 4d).

[0125] <5-4> NO에 의한 VDUP1 및 iNOS의 안정성 변화 확인

- [0126] LPS 반응으로 증가된 NO가 VDUP1 및 iNOS의 발현 및 분해(degradation)에 기여하는지 확인하기 위하여, VDUP1^{-/-} 대식세포에서 NO 공여체 유무에 따른 VDUP1 및 iNOS의 안정성을 웨스턴 블롯팅을 통해 측정하였다.
- [0127] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3>에 기재한 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 복강대식세포에 NO 공여체인 DETA-NONOate(Sigma, USA)를 0.1, 0.5, 또는 1 mM 농도로 투여하고 100 ng/ml LPS를 4, 12시간 동안 처리한 후 상기 실시예 <4-3>과 같은 방법으로 항 VDUP1, 항 iNOS 및 항 β -actin 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 실시하였다.
- [0128] 그 결과, 도 9에 나타낸 바와 같이, DETA-NONOate를 처리한 정상 대식세포 및 VDUP1^{-/-} 대식세포 모두 iNOS 발현 양상이 동일한 것을 확인함으로써, DETA-NONOate는 VDUP1 또는 iNOS의 발현 및 분해에 아무런 영향을 미치지 않음을 확인하였다(도 9).
- [0129] **<5-5> E3 유비퀴틴 리가아제에 의한 iNOS의 안정성 변화 확인**
- [0130] iNOS는 세포 내에서 E3 유비퀴틴 리가아제에 의해 유비퀴틴화 되고 분해된다고 보고되고 있다(Kuang Z, Lewis RS, Curtis JM, Zhan Y, Saunders BM, et al. (2010) The SPRY domain-containing SOCS box protein SPSB2 targets iNOS for proteasomal degradation. J Cell Biol 190: 129-141., Kolodziejeki PJ, Koo JS, Eissa NT (2004) Regulation of inducible nitric oxide synthase by rapid cellular turnover and cotranslational down-regulation by dimerization inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A 101: 18141-18146). 따라서, iNOS의 발현 및 안정성이 VDUP1에 의해 변화되는지 확인하기 위해, LPS를 처리한 VDUP1^{-/-} 대식세포에서 LPS를 제거하고 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.
- [0131] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3>에 기재한 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 복강대식세포에 100 ng/ml LPS를 12시간 동안 처리하여 배양하고 1 x PBS로 세척한 후 새로운 배지로 교환하여 LPS를 제거하고 6, 12, 24, 또는 32시간 후에 세포를 수득하였다. 수득한 세포 용해물을 실시예 <4-3>과 같은 방법으로 항 iNOS 및 항 β -actin 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 실시하였다.
- [0132] 그 결과, 도 4e에 나타낸 바와 같이, LPS를 제거한 직후의 VDUP1^{-/-} 대식세포의 경우, iNOS 단백질의 발현량은 현저히 증가되어 있지만, 이후 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 대식세포에서 iNOS의 분해 속도는 유사하게 감소하는 것을 확인하였다(도 4e).
- [0133] **<5-6> VDUP1의 프로테아좀 경로를 통한 iNOS 분해 조절 확인**
- [0134] VDUP1이 프로테아좀 경로(proteasomal pathway)를 통한 iNOS 분해를 조절하는지 확인하기 위하여, 프로테아좀 억제제 및 LPS를 처리한 VDUP1^{-/-} 대식세포를 이용해 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.
- [0135] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3>에 기재한 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 복강대식세포에 100 ng/ml LPS 및 10 μ M의 프로테아좀 억제제인 MG-132(Sigma, USA)를 12시간 동안 처리하여 배양하고, 1 x PBS로 세척한 후 새로운 배지로 교환하여 LPS 및 MG-132를 제거하고, 6 및 12시간 후에 세포를 수득하였다. 수득한 세포 용해물을 실시예 <4-3>과 같은 방법으로 항 iNOS 및 항 β -actin 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 실시하였다.
- [0136] 그 결과, 도 4f에 나타낸 바와 같이, 정상 마우스와 VDUP1^{-/-} 마우스의 대식세포 모두 MG-132에 의한 iNOS 분해 억제 변화가 유사하다는 것을 확인함으로써, 프로테아좀에 의한 iNOS 분해는 VDUP1에 비의존적임을 확인하였다(도 4f). 따라서, 상기 <실시예 5>의 결과들을 통해 LPS 반응에 있어서 VDUP1은 NO의 생성 및 iNOS의 발현 유도에 하향조절자로서 중요한 역할을 하지만 iNOS 분해에는 영향을 미치지 않음을 확인하였다.
- [0137] **<실시예 6> LPS 반응에 있어서 VDUP1의 NF- κ B 활성 하향조절 확인**
- [0138] **<6-1> 대식세포 및 호중구에서 VDUP1이 MAPK 신호에 미치는 영향 확인**

[0139] LPS를 처리하면 대식세포 또는 호중구에서 MAPKs(예를 들어, JNK, ERK1/2, 및 p38)의 인산화가 일어난다고 보고되고 있다(Hsu HY, Wen MH (2002) Lipopolysaccharide-mediated reactive oxygen species and signal transduction in the regulation of interleukin-1 gene expression. J Biol Chem 277: 22131-22139.). 따라서, VDUP1이 LPS 반응에 따른 MAPK 신호에 영향을 미치는지 확인하기 위하여, LPS를 처리한 VDUP1^{-/-} 대식세포 및 호중구에서 MAPK 신호 관련 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

[0140] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3> 및 <1-4>에 기재한 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 복강 대식세포 및 호중구에 100 ng/ml LPS를 시간별로 처리하여 세포를 수득하고, 수득한 세포 용해물은 상기 실시예 <4-3>과 같은 방법으로 항 p-ERK(4370), p-JNK(4668), p-p38(9215)(Cell Signaling Technology) 및 β-actin 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 실시하였다.

[0141] 그 결과, 도 5a 및 10에 나타낸 바와 같이, LPS를 처리한 정상 마우스와 VDUP1^{-/-} 마우스의 복강 대식세포 및 골수 호중구 모두 ERK, JNK, 및 p38 단백질의 인산화 변화가 유사하게 나타나는 것을 확인함으로써, VDUP1이 LPS 반응에 따른 MAPKs 활성화에 영향을 미치지 않음을 확인하였다(도 5a 및 도 10).

[0142] <6-2> 대식세포 및 호중구에서 VDUP1에 의한 NF-κB 활성 조절 확인

[0143] LPS를 처리하면 NF-κB는 핵 내로 이동하고 타겟 유전자의 프로모터에 결합하여 타겟 유전자의 전사를 촉진한다고 보고되고 있고, VDUP1은 HDAC1 및 HDAC3와 결합을 통해 TNF-α에 의해 유도된 NF-κB의 활성을 억제한다고 보고되고 있다(Kwon HJ, Won YS, Suh HW, Jeon JH, Shao Y, et al. (2010) Vitamin D3 upregulated protein 1 suppresses TNF-α-induced NF-kappaB activation in hepatocarcinogenesis. J Immunol 185: 3980-3989.). 따라서, VDUP1이 LPS에 의해 유도된 NF-κB 활성을 조절하는지 확인하기 위하여, VDUP1^{-/-} 마우스의 복강 대식세포 및 호중구를 이용해 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

[0144] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3>에 기재한 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 복강대식세포에 100 ng/ml LPS를 시간별로 처리하여 세포를 수득하고, 수득한 세포 용해물은 상기 실시예 <4-3>과 같은 방법으로 항 IκB-α(4812), 항 p-IκB-α(2859), 항 NF-κB p65(4764), 항 pNF-κB p65(3033)(Cell Signaling Technology) 및 항 β-actin 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 실시하였다.

[0145] 그 결과, 도 5b에 나타낸 바와 같이, LPS를 30분 동안 처리한 VDUP1^{-/-} 대식세포에서 p65의 인산화가 현저히 증가하고, LPS를 처리하고 240분 후 p65의 인산화가 지속적으로 유지되는 것을 확인하였다. 반면, IκB-α의 분해 및 인산화의 경우, 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 대식세포 모두 유사한 양상을 보임을 확인하였다(도 5b).

[0146] 또한, 도 11에 나타낸 바와 같이, LPS를 처리한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 호중구도 상기 대식세포와 동일한 변화 양상을 보임을 확인함으로써, 세포에 관계없이 VDUP1에 의해 NF-κB 활성이 하향조절됨을 확인하였다(도 11).

[0147] <6-3> LPS 반응에 의한 NF-κB의 핵 내 이동 확인

[0148] LPS를 처리하면 NF-κB가 핵 내로 이동을 확인하기 위하여, VDUP1^{-/-} 마우스의 복강 대식세포를 이용해 웨스턴 블롯팅 및 면역조직화학염색법(IHC; Immunohistochemistry)을 수행하였다.

[0149] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3>에 기재한 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 복강 대식세포에 100 ng/ml LPS를 시간별로 처리하여 세포를 수득하고, nuclear extract kit(100946, active motif)를 이용하여 세포기질 및 핵 부분을 분리하였다. 즉, 상기 수득한 세포에 nuclear extract kit에 있는 저장성 완충용액(hypotonic buffer) 500 μl를 첨가하여 14,000 × g에서 30초간 원심분리하여 세포기질을 분리한 후, 50 μl 용해 완충용액(lysis buffer)을 첨가하여 30분간 4℃에서 혼합 후 14,000 × g에서 30초간 원심분리하여 핵 부분을 분리하고, 상기 실시예 <4-3>과 같은 방법으로 항 pNF-κB p65(3033)(Cell Signaling Technology) 및 항 β-actin 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 실시하였다(도 5c). 또한, 상기 수득한 대식세포를 상기 실시예

<4-4>와 같은 방법으로 red fluorescent dye Alexa Fluor 546(Alexa546))가 접합되어 있는 항 NF-κB p65 서브유닛(subunit)(stained with DAPI (blue)) 항체를 이용하여 면역조직화학염색(IHC; Immunohistochemistry)하고 p65의 핵 내 이동을 시각화하였다(도 5d).

[0150] 그 결과, 도 5c에 나타난 바와 같이, LPS를 처리하고 240분 동안 꾸준히 VDUP1^{-/-} 대식세포에서 핵 내로 이동하는 p65 단백질 수준이 증가하는 반면, 세포 기질 내 p65 단백질 수준은 감소하는 것을 확인하였다. 한편, 정상 대식세포의 경우, LPS를 처리하고 120분 동안 대부분의 p65 단백질이 세포 기질에 존재하는 것을 확인하였다(도 5c).

[0151] 또한, 도 5d에 나타난 바와 같이, LPS를 처리한 경우 정상 대식세포에 비해 VDUP1^{-/-} 대식세포의 NF-κB p65의 핵으로 이동이 현저히 증가하고, 이는 LPS 처리 240분 동안 지속적으로 유지됨을 확인하였다(도 5d).

[0152] <6-4> LPS 반응에 의한 NF-κB와 DNA 결합 활성 확인

[0153] LPS 반응에 의해 핵 내로 이동한 NF-κB의 DNA 결합 활성을 확인하기 위하여, VDUP1^{-/-} 마우스의 복강 대식세포를 이용해 EMSA(Electrophoretic Mobility Shift Assay) 분석을 수행하였다.

[0154] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3> 에 기재한 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 복강 대식세포에 100 ng/ml LPS를 시간별로 처리하여 세포를 수득하고, 수득한 세포는 상기 실시예 <6-3> 과 같이 nuclear extract kit(100946, active motif, California, USA)를 이용해 세포기질과 핵 부분으로 분리하였다. T4 키나아제(takara Shuzo, Otsu, Japan)를 이용해 2.5mM 감마-[32P] ATP로 이중 구조 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 말단을 표지한 NF-κB 컨센서스(consensus) 서열; 5' -AGTTGAGGGGACTTCCAGGC-3' (서열번호 6)을 제작하고 PROBER 컬럼(iNtRON bio, Seongnam, Korea)으로 정제하였다. 10 mM Tris-HCl(pH7.5), 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5% 글리세롤, 1 mg poly(dI-dC) 및 1 mg BSA를 포함한 결합 버퍼에 정제한 상기 방사능 표지 NF-κB 올리고뉴클레오타이드 및 수득한 핵 추출물 10 μg을 혼합하여 상온에서 20분간 반응시켰다. 단백질-올리고뉴클레오타이드 결합체를 5% 폴리아크릴아미드 겔 상에서 올리고뉴클레오타이드와 분리시켰다. TBE 버퍼(45 mM Tris, 45 mM boric acid, 1.25 mM EDTA)로 상온에서 10 V/cm으로 1시간 동안 전기영동하였다. 상기 겔을 진공건조하고 오토라디오그래피(autoradiography)를 수행하였다.

[0155] 그 결과, 도 5e에 나타난 바와 같이, LPS를 처리한 정상 대식세포의 핵 추출물에 비해 LPS를 처리한 VDUP1^{-/-} 대식세포의 핵 추출물에서 NF-κB 의 DNA 결합 활성이 증가하는 것을 확인하였다(도 5e).

[0156] <6-5> 대식세포에서 LPS 반응에 의한 NF-κB와 iNOS 크로마틴 복합체 형성 확인

[0157] LPS 반응에 의해 핵 내로 이동한 NF-κB의 iNOS 크로마틴 복합체 형성을 확인하기 위하여, VDUP1^{-/-} 마우스의 복강 대식세포를 이용해 ChIP assay를 수행하였다.

[0158] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3> 에 기재한 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 복강대식세포에 100ng/ml LPS를 시간별로 처리하여 세포를 수득하고, 수득한 세포를 포름알데하이드(formaldehyde)로 고정한 후, ChIP assay kit(17-295, Millipore)를 이용하여 제조사의 절차에 따라 ChIP 분석을 수행하였다. 이 때, 항 NF-κB p65(4764)(Cell Signaling Technology)를 1:100 비율로 사용하고, iNOS 프라이머는 iNOS 정방향; 5'-GTCCAGTTTTGAAGTACTACG-3' (서열번호 7), iNOS 역방향; 5'-GTTGTGACCCTGGCAGCAG-3' (서열번호 8)을 사용하였다.

[0159] 그 결과, 도 5f에 나타난 바와 같이, 정상 대식세포에 비해 VDUP1^{-/-} 대식세포에서 LPS 반응으로 인한 NF-κB p65와 iNOS 프로모터와의 결합이 현저히 증가하는 것을 확인하였다(도 5f). 따라서, 상기 <실시예 6>의 결과들을 통해 LPS 반응에 있어서 VDUP1이 NF-κB p65 서브유닛을 표적으로 하여 NF-κB의 활성을 하향 조절함을 확인하였다.

[0160] <실시예 7> LPS 반응에 있어서 VDUP1의 HIF-1α 발현 조절 확인

[0161] <7-1> LPS 반응에 따른 HIF-1 α mRNA 및 단백질 발현량 확인

[0162] 저산소 상태에서 HIF-1 α 서브유닛의 발현이 급격히 증가하고, 반대로, 충분한 산소가 존재하는 상태에서 von Hippel-Lindau protein(pVHL)과 HIF-1 α 가 결합하여 유비퀴틴에 의한 HIF-1 α 의 분해가 촉진된다고 보고되어 있다(Bruick RK, McKnight SL (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. Science 294: 1337-1340., Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, et al. (2001) C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. Cell 107: 43-54.). 뿐만 아니라, LPS 또는 TNF- α 와 같은 신호에 의해서도 HIF-1 복합체의 형성이 현저히 증가한다고 보고되어 있다(Blouin CC, Page EL, Soucy GM, Richard DE (2004) Hypoxic gene activation by lipopolysaccharide in macrophages: implication of hypoxia-inducible factor 1 α . Blood 103: 1124-1130.). 예를 들어, 정상(normoxic) 상태 하에서 TNF- α 에 의해 유도된 NF- κ B는 직접적으로 HIF-1 α 경로를 통해 HIF-1 α mRNA, 단백질 발현량, 및 활성을 증가시킨다(van Uden P, Kenneth NS, Rocha S (2008) Regulation of hypoxia-inducible factor-1 α by NF-kappaB. Biochem J 412: 477-484.). 구체적으로, NF- κ B가 핵 내로 이동하게 되면 HIF-1 α 프로모터와 결합하여 HIF-1 α 프로모터의 활성을 증가시키고, 상기 HIF-1 α 의 발현을 촉진시킨다고 보고되고 있다(Belaiba RS, Bonello S, Zahringer C, Schmidt S, Hess J, et al. (2007) Hypoxia up-regulates hypoxia-inducible factor-1 α transcription by involving phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor kappaB in pulmonary artery smooth muscle cells. Mol Biol Cell 18: 4691-4697.). 또한, 본 발명자들은 산소의 농도에 상관없이 VDUP1이 pVHL의 β -도메인과 결합하여 HIF-1 α 를 핵 외로 이동 및 분해를 촉진시킨다는 것을 확인하였다(Shin D, Jeon JH, Jeong M, Suh HW, Kim S, et al. (2008) VDUP1 mediates nuclear export of HIF1 α via CRM1-dependent pathway. Biochim Biophys Acta 1783: 838-848.). 따라서, LPS 반응에 있어서 VDUP1이 HIF-1 α 의 유도 및 안정화에 관여하는지 확인하기 위하여, VDUP1^{-/-} 마우스의 복강 대식세포를 이용해 정량적 실시간 PCR, 면역블롯팅 및 면역조직화학염색법(IHC; Immunohistochemistry)을 수행하였다.

[0163] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3>에 기재한 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 복강 대식세포에 100 ng/ml LPS를 0.5, 1, 2, 4, 또는 6시간 동안 처리하여 세포를 수득하고, 수득한 세포를 이용해 상기 실시예 <4-2>와 같이 정량적 실시간 PCR을 수행하였다. HIF-1 α 프라이머로 마우스 HIF-1 α 정방향; 5' - GGGGAGGACGATGAACATCAA-3' (서열번호 9), 역방향; 5' -GGGTGGTTCTGTACCCACA-3' (서열번호 10)를 사용하였다 (도 6a). 또한, 상기 실시예 <1-3>에 기재한 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 복강 대식세포에 100 ng/ml LPS를 30, 60, 120, 또는 240분 동안 처리하여 세포를 수득하고, 수득한 세포 용해물은 상기 실시예 <6-3>과 같이 nuclear extract kit(100946, active motif)를 이용해 세포기질과 핵 부분으로 분리하였으며, 상기 실시예 <4-3>과 같은 방법으로 항 HIF-1 α (NB100-479)(Novus) 및 항 β -actin 항체를 이용하여 면역 블롯팅을 실시하고(도 6b), 또한, 상기 수득한 대식세포는 상기 실시예 <6-3>과 같은 방법으로 red fluorescent dye Alexa Fluor 546(Alexa546))가 접합되어 있는 항 HIF-1 α (stained with DAPI (blue)) 항체를 이용하여 면역조직화학염색법(IHC; Immunohistochemistry)으로 HIF-1 α 의 수준을 시각화하였다(도 6c).

[0164] 그 결과, 도 6a에 나타낸 바와 같이, 정상 대식세포 및 VDUP1^{-/-} 대식세포 모두 HIF-1 α mRNA 발현량 변화 양상에 있어서 큰 차이가 없는 것을 확인하였다(도 6a).

[0165] 반면, 도 6b 및 6c에 나타낸 바와 같이, LPS를 처리한 VDUP1^{-/-} 대식세포에서 HIF-1 α 단백질의 발현량이 증가하는 것을 확인하였고, 특히, VDUP1^{-/-} 대식세포의 핵 추출물에서 HIF-1 α 단백질의 양이 유의적으로 증가하며, LPS 처리 2시간 후에 HIF-1 α 의 유도가 최대 수준에 도달하여 LPS 처리 4시간 이후까지 지속되는 것을 확인하였다(도 6b 및 도 6c).

[0166] <7-2> LPS 반응에 따른 HIF-1 α 의 DNA 결합 활성 확인

[0167] LPS 반응에 의해 상기 실시예 <7-1>에서 발현이 증가한 HIF-1 α 의 타겟 유전자 프로모터와의 결합 활성을 확인하기 위하여, LPS를 처리한 VDUP1^{-/-} 대식세포를 이용해 EMSA를 수행하였다.

[0168] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3>에 기재한 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 복강대식세포에

100ng/ml LPS를 30, 60, 120, 및 240분 동안 처리하여 세포를 수득하고, 수득한 세포에서 상기 실시예 <6-4>와 같은 방법으로 HIF-1 α 컨센서스 올리고뉴클레오타이드 서열; 5' -TCTGTACGTGACCACACTCACCTC-3' (서열번호 11)를 이용하여 EMSA를 수행하였다.

[0169] 그 결과, 도 6d에 나타낸 바와 같이, 정상 대식세포에 비해 VDUP1^{-/-} 대식세포의 핵 추출물에서 HIF-1 α 의 DNA 결합능력이 높다는 것을 확인하였다(도 6d). 따라서, 상기 실시예 <7-1> 및 <7-2>의 결과들을 통해 VDUP1가 LPS 반응에 의한 HIF-1 α 발현에 있어서 번역후 조절((posttranscriptional regulation)에 관여함을 확인하였다.

[0170] <7-3> LPS 반응에 따른 HIF-1 α 의 안정화 확인

[0171] 본 발명자는 이전에 HIF-1 α 가 NO 매개 S-나이트로실레이션(nitrosylation)에 의한 안정화를 통해 활성이 조절됨을 밝힌 바 있다(Li F, Sonveaux P, Rabbani ZN, Liu S, Yan B, et al. (2007) Regulation of HIF-1 α stability through S-nitrosylation. Mol Cell 26: 63-74). 따라서, LPS 반응으로 증가된 NO 수준이 HIF-1 α 의 S-나이트로실레이션을 통한 안정화에 기여하는지 확인하기 위하여, LPS를 처리한 VDUP1^{-/-} 대식세포를 이용해 biotin switch assay를 수행하였다.

[0172] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3>의 기재된 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 대식세포에 100 ng/ml LPS를 12, 및 16시간 동안 처리하고, 수득한 세포 용해액을 Neutravidin-agarose resin(29200, Thermo Scientific)을 이용해 상온에서 30분 동안 배양하여 S-나이트릴레이션 된 단백질을 분리하였다. S-Nitrosylated protein detection assay kit(cayman Chemical company, USA)를 이용해 제조사의 절차에 따라 상기 키트에 포함된 워싱 버퍼로 5번 반복해서 세척하고 상온에서 200 x g 로 1분 동안 원심분리한 후 상기 실시예 <4-3>과 같은 방법으로 웨스턴 블롯팅을 수행하여 S-나이트릴레이션 된 HIF-1 α 를 시각화하였다.

[0173] 그 결과, 도 6e에 나타낸 바와 같이, LPS를 처리한 정상 대식세포 및 VDUP1^{-/-} 대식세포에서 HIF-1 α 의 S-나이트로실레이션을 확인하였고, 특히, VDUP1^{-/-} 대식세포에서 상기 HIF-1 α 의 S-나이트로실레이션이 더욱 뚜렷함을 확인하였다(도 6e). 따라서, 상기 <실시예 7>의 결과들을 통해 LPS 반응에 있어서 VDUP1이 HIF-1 α 의 발현 및 안정화를 하향 조절함을 확인하였다.

[0174] <실시예 8> VDUP1 결핍에 따른 NO 발현으로 인한 NLRP3 염증조절복합체(inflammasome) 활성 하향조절 확인

[0175] <8-1> LPS 또는 E.coli를 처리한 VDUP1^{-/-} 대식세포에서 IL-1 β , IL-18 분비량 및 NO 생성량 확인

[0176] VDUP1^{-/-} 대식세포에서 증가된 NO 수준 및 HIF-1 α 의 S-나이트로실레이션을 통해 VDUP1 결핍이 NO-매개 NLRP3 활성 억제에 관여하는지 확인하기 위하여, LPS 또는 E.coli를 처리한 VDUP1^{-/-} 대식세포에서 IL-1 β , IL-18 분비량 및 NO 생성량을 ELISA 및 Griess reagents를 이용해 측정하였다.

[0177] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3>에 기재된 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 복강대식세포에 100ng/ml LPS 또는 10 감염다중도의 E.coli를 시간별로 처리하여 염증 반응을 유도한 후 세포 배양액을 수득하고, 상기 실시예 <3-1>과 같이 상층액에 존재하는 IL-1 β 의 농도를 측정하기 위해 ELISA 분석을 수행하였다(도 7a). 또한, 상기 실시예 <3-2>와 같이 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스 각각 5마리씩 무작위로 선정하여 10 mg/kg LPS 또는 10⁸ CFU 농도의 살아 있는 E.coli(DH5 α)(ATCC, Manassas, Virginia)를 시간별로 복강 내 투여한 후 혈청을 수득하고, ELISA 분석을 통해 수득한 혈청에 존재하는 IL-1 β 및 IL-18의 농도를 측정하고(도 7b 및 7c), 상기 실시예 <4-5>와 같이 nitrate reductase-based colorimetric assay kit를 이용해 혈청에 존재하는 IL-1 β , IL-18, 및 NO의 농도를 측정하였다(도 7d).

[0178] 그 결과, 도 7a에 나타낸 바와 같이, LPS 및 E.coli를 처리한 경우, 정상 대식세포에 비해 VDUP1^{-/-} 대식세포에서 성숙 IL-1 β 의 분비량이 현저히 감소하는 것을 확인하였다(도 7a). 뿐만 아니라, 도 7b, 7c 또는 7d에 나타낸 바와 같이, 정상 마우스와 VDUP1^{-/-} 마우스에 LPS 및 E.coli를 처리한 경우에도 VDUP1^{-/-} 마우스에서 혈중 IL-1 β

및 IL-18 수준이 현저히 감소하고, 혈중 NO 수준이 증가하는 것을 확인하였다(도 7b, 7c 또는 7d).

- [0179] **<8-2> LPS 또는 E.coli를 처리한 VDUP1^{-/-} 대식세포에서 NLRP3 염증조절복합체의 활성 억제 확인**
- [0180] NLRP3 염증조절복합체의 S-나이트로실레이션로 NLRP3 염증조절복합체의 활성이 억제되는지 확인하기 위하여, LPS 또는 E.coli를 처리한 대식세포를 이용해 면역블롯팅을 수행하였다.
- [0181] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3>에 기재된 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 복강 대식세포에 100 ng/ml LPS 또는 10 감염다중도의 E.coli를 시간대별로 처리하고 세포 용해물을 수득하였다. 수득한 용해물은 NLRC3 염증조절복합체의 구성물인 VDUP1, NLRP3, ASC 및 카스파제 1의 활성을 확인하기 위하여 상기 실시예 <4-3>과 같은 방법으로 카스파제(caspase)-1 P45 및 P10(Santa Cruz Biotechnology), IL-1 β p35(Cell signaling), NLRP3(AG-20B-0014)(Adipogen), ASC((sc-22514-R)(Santa Cruz Biotechnology) 및 β -actin 항체를 이용해 면역 블롯팅을 수행하고(도 7e), VDUP1, NLRP3, ASC 및 카스파제 1의 S-나이트로실레이션을 확인하기 위하여 상기 실시예 <7-3>과 같이 biotin switch assay를 수행하였다(도 7f 및 7g).
- [0182] 그 결과, 도 7e에 나타낸 바와 같이, 카스파제 1의 활성형의 경우 정상 대식세포에서 더욱 많이 발생하였지만, 나머지 미성숙 IL-1 β , NLRP3, 및 ASC의 경우 정상 대식세포와 VDUP1^{-/-} 대식세포 간 단백질량 변화에 큰 차이를 보이지 않음을 확인하였다(도 7e).
- [0183] 또한, 도 7f 및 7g에 나타낸 바와 같이, LPS 또는 E.coli 처리한 VDUP1^{-/-} 대식세포에서 NLRP3 및 카스파제 1의 S-나이트로실레이션이 증가하는 것을 확인하였다(도 7f 및 7g).
- [0184] **<8-3> LPS를 장기간 처리한 VDUP1^{-/-} 대식세포에서 사이토카인 및 iNOS 발현 확인**
- [0185] VDUP1이 결핍된 대식세포에서 LPS의 장기적인 자극이 사이토카인 및 iNOS 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, VDUP1^{-/-} 대식세포를 이용해 ELISA 분석법 및 면역블롯팅을 수행하였다.
- [0186] 구체적으로, 상기 실시예 <1-3>에 기재된 방법으로 획득한 정상 마우스 및 VDUP1^{-/-} 마우스의 대식세포에 100 ng/ml LPS를 72시간 동안 장기적으로 처리하고 세포 상층액 및 세포 용해물을 회수하였다. 수득한 세포 상층액을 이용해 상기 실시예 <3-1>과 같이 상층액에 존재하는 IL-1 β 의 농도를 측정하기 위해 ELISA 분석을 수행하였다(도 12a). 또한, 세포 용해물에 존재하는 iNOS 단백질량을 확인하기 위하여, 상기 실시예 <4-3>과 같은 방법으로 iNOS, 카스파제(caspase)-1 P45, NLRP3, ASC((sc-22514-R) 및 β -actin 항체를 이용해 면역 블롯팅을 수행하였다(도 12b).
- [0187] 그 결과, 도 12a 및 12b에 나타낸 바와 같이, TNF- α 및 IL-6의 경우, 장기간 LPS를 처리한 정상 대식세포와 VDUP1^{-/-} 대식세포 모두 분비량 변화에 차이가 없지만, IL-1 β 의 경우, LPS를 처리한 VDUP1^{-/-} 대식세포에서 분비량이 감소하고, iNOS의 단백질 발현량은 증가하는 것을 확인하였다(도 12a 및 12b). 따라서, 상기 <실시예 8>의 결과들을 통해 VDUP1 결핍으로 인해 LPS 반응 시 NO의 생성이 증가하고, 이에 NLRP3 염증조절복합체의 S-나이트로실레이션이 증가하여 NLRP3 염증조절복합체의 활성이 억제됨으로써 IL-1 β 프로세싱이 저해되는 것을 확인하였다.
- [0188] **<실시예 9> LPS 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스에서 iNOS 발현 억제를 통한 NO 수준 변화 확인**
- [0189] **<9-1> 마우스에서 iNOS 발현 억제에 의한 생존율 확인**
- [0190] VDUP1 결핍 마우스에서 LPS 반응으로 유도된 iNOS 발현에 따른 NO 생성 증가 및 세포내 독소 유발 쇼크로 인한 사망에 미치는 영향을 확인하기 위하여, iNOS 억제제(L-NAME)를 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스의 생존율을 측정하였다.
- [0191] 구체적으로, 상기 실시예 <1-2>에 기재한 방법으로 획득한 VDUP1^{-/-} 마우스를 iNOS 억제제(L-NAME)(Sigma, USA)만 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스 군(n=7), LPS를 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스 군(n=10), iNOS 억제제(LNAME)을 포함한

LPS를 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스 군(n=10) 각각 세 군으로 나누고, 해당 마우스 군에 30mg/kg 농도의 iNOS 억제제 (L-NAME)를 복강 내 투여하고 1시간 후 20 mg/kg 농도의 LPS를 투여하여 5시간 마다 생존율을 조사하였다.

[0192] 그 결과, 도 8a에 나타낸 바와 같이, L-NAME를 포함한 LPS를 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스 군의 생존율이 LPS만 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스 군의 생존율에 비해 약 50% 정도 상승하는 것을 확인함으로써, iNOS 억제제에 의해 iNOS 발현이 억제되어 LPS에 의한 VDUP1^{-/-} 마우스의 민감성 상승이 저해되는 것을 확인하였다(도 8a).

[0193] <9-2> 마우스에서 iNOS 발현 억제에 의한 NO 및 IL-1β 생성 정도 확인

[0194] LPS 반응에서 iNOS 발현 억제에 의한 NO 생성 변화를 확인하기 위하여, iNOS 억제제를 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스의 혈중 NO 및 IL-1β의 농도를 ELISA 분석 및 NO detection kit를 이용해 측정하였다.

[0195] 구체적으로, 상기 실시예 <1-2>에 기재된 방법으로 획득한 VDUP1^{-/-} 마우스 5마리를 무작위로 선별하여, 대조군, LPS 투여군, 및 L-NAME를 포함한 LPS 투여군으로 나누고, 해당 마우스 군에 30 mg/kg 농도의 L-NAME를 투여하고 1시간 후 20 mg/kg 농도의 LPS를 투여하고, 18시간 후 혈액을 수득하여, 상기 실시예 <3-2>와 같이 ELISA 분석을 통해 수득한 혈청에 존재하는 IL-1β의 농도를 측정하고(도 8b), 상기 실시예 <4-5>와 같이 NO detection kit를 이용해 혈청에 존재하는 NO의 농도를 측정하였다(도 8c).

[0196] 그 결과, 도 8b 및 8c에 나타낸 바와 같이, L-NAME 및 LPS를 투여하고 18시간 지난 VDUP1^{-/-} 마우스 군의 혈청 내 NO 농도가 감소하고, IL-1β 농도가 증가하는 것을 확인하였다. 따라서, in vivo 상태에서 VDUP1^{-/-} 마우스의 LPS 반응에 의해 유도된 iNOS 발현 상승으로 NO 생성이 증가하고, 이로 인해 NLRP3 염증조절복합체의 활성 및 IL-1β 분비를 억제함을 확인하였다(도 8b 및 8c).

[0197] <9-3> 마우스에서 VDUP1 결핍에 따른 생존율 확인

[0198] LPS를 투여한 VDUP1^{-/-} 마우스의 사망이 면역세포 내 VDUP1의 결핍에 의한 직접적인 결과인지 확인하기 위하여, 골수 키메라(bone marrow chimera)를 제작하여 생존율을 측정하였다.

[0199] 구체적으로, 상기 실시예 <1-2>에 기재된 방법으로 획득한 정상 수신 마우스에 VDUP1^{-/-} 골수를 이식하고(KO→WT), 정상 마우스 수신자에 정상 골수 이식(WT→WT)고, VDUP1^{-/-} 수신 마우스에 정상 골수 이식(WT→KO), VDUP1^{-/-} 수신 마우스에 VDUP1^{-/-} 골수를 이식(KO→KO)한 후 10 mg/kg 농도의 LPS를 시간대별로 복강 내 투여한 후 매시간 생존율을 기록하여, 카플란-메이어 생존곡선(Kaplan-Meier survival curve)로 표시하였다.

[0200] 그 결과, 도 8d에 나타낸 바와 같이, 정상 마우스에 VDUP1^{-/-} 골수를 이식(KO→WT)한 후 LPS를 처리한 경우, 정상 골수를 이식한 마우스(WT→WT)에 비해 생존율이 감소하는 반면, VDUP1^{-/-} 마우스에 정상 골수를 이식(WT→KO)한 경우, VDUP1^{-/-} 골수를 이식한 마우스(KO→KO)에 비해 생존율이 증가하는 것을 확인하였다. 하지만, 정상 골수를 VDUP1^{-/-} 마우스로의 이식(WT→KO)에 의한 생존율이 정상 골수의 정상 마우스의 이식(WT→WT)에 의한 생존율만큼 향상되지는 못함을 확인하였다. 따라서, LPS 반응에 의한 사망률은 공여자 골수 및 숙주 환경에 의존적임을 확인하였다(도 8d).

[0201] <9-4> LPS 처리한 비면역세포에서 VDUP1에 의한 iNOS, NF-κB, 및 HIF-1α 발현 조절 확인

[0202] 비면역세포에서도 VDUP1에 의해 iNOS, NF-κB, 및 HIF-1α 발현이 조절되는지 확인하기 위하여, VDUP1^{-/-} 마우스의 폐 섬유아세포를 이용해 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

[0203] 구체적으로, 상기 실시예 <1-4>와 같이 분리한 VDUP1^{-/-} 마우스의 폐섬유아세포에 100 ng/ml LPS를 시간대별로 처리한 후 세포를 수득하고, 수득한 세포 용해물을 상기 실시예 <4-3>과 같은 방법으로 iNOS, P-p65, HIF-1α,

VDUP1 및 β -actin 항체를 이용해 웨스턴블롯팅을 수행하였다.

[0204]

그 결과, 도 8e에 나타난 바와 같이, VDUP1^{-/-} 대식세포 및 호중구에서와 동일하게 VDUP1^{-/-} 폐섬유아세포 내의 iNOS, 인산화된 p65, 및 HIF-1 α 의 단백질 발현량이 증가하는 것을 확인함으로써, VDUP1에 의한 iNOS 경로 조절은 면역세포 및 비면역세포 모두에서 나타남을 확인하였다. 따라서, VDUP1은 면역세포 및 비면역세포의 NO 생성 및 내독소 반응에 영향을 미침을 확인하였다(도 8e).

[0205]

<9-3> LPS 유발 염증 신호에 있어서 VDUP1의 조절 메커니즘

[0206]

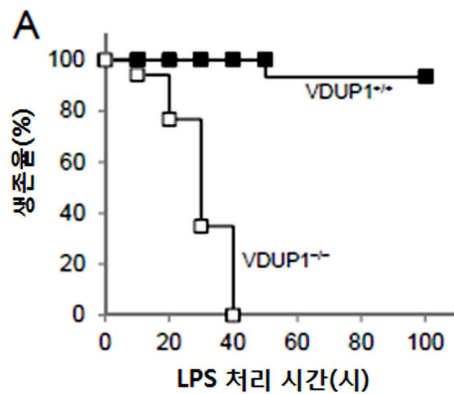
상기 <실시에 2> 내지 <실시에 9>의 결과들을 바탕으로 LPS 매개 염증 신호에 있어서 VDUP1의 역할에 관한 도식 모델을 완성하였다.

[0207]

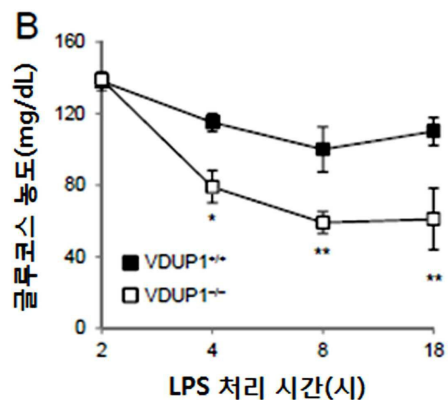
도 8f에 나타난 바와 같이, VDUP1이 LPS 유발 염증 신호에 있어서 NF- κ B/HIF-1 α /iNOS 경로를 통해 NF- κ B 및 HIF-1 α 를 하향조절하여, 과도한 NO 생성 및 이로 인한 NLRP3 염증조절복합체의 S-나이트로시레이션에 따른 NLRP3 의존적 IL-1 분비를 억제함으로써 LPS 유도 세포내 독소 유발 쇼크를 조절한다는 것을 확인하였다(도 8f).

도면

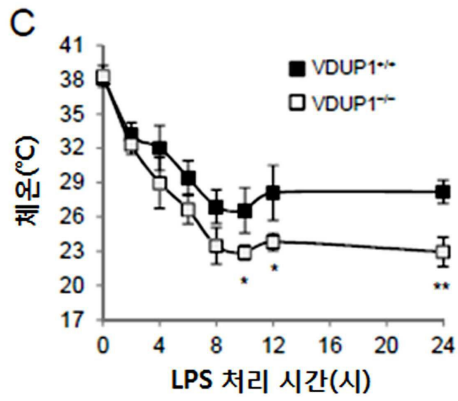
도면1a



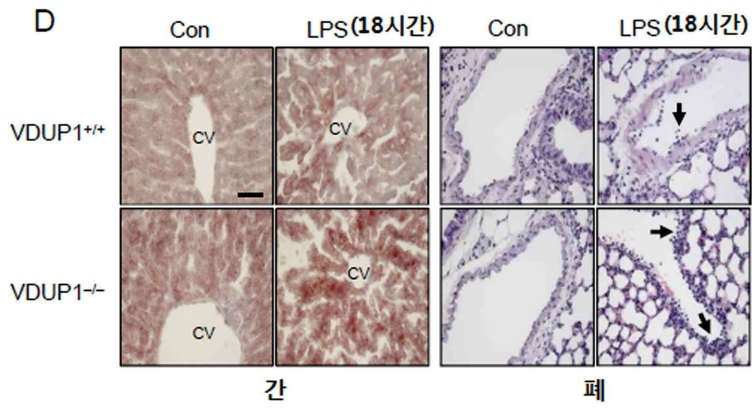
도면1b



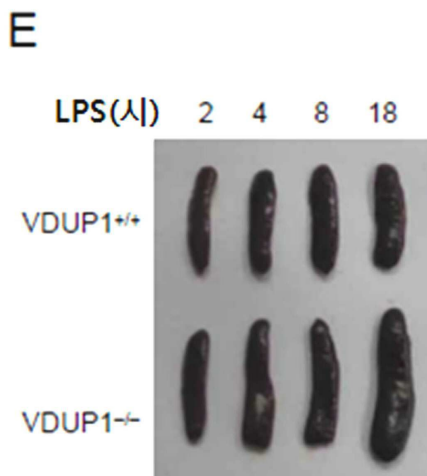
도면1c



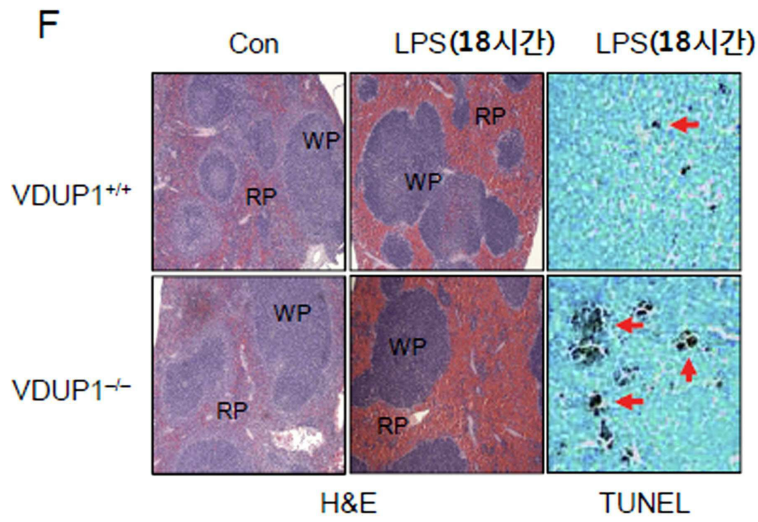
도면1d



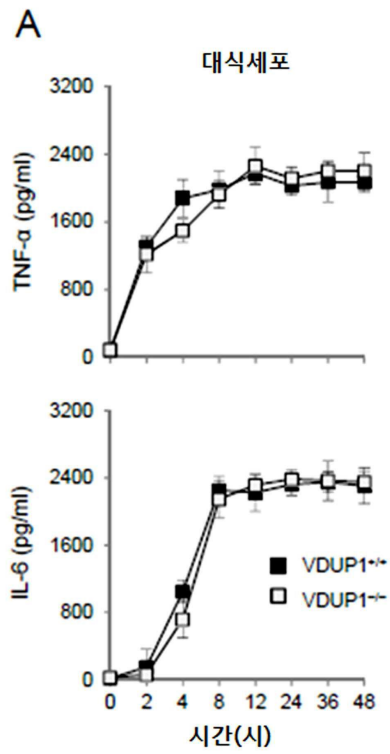
도면1e



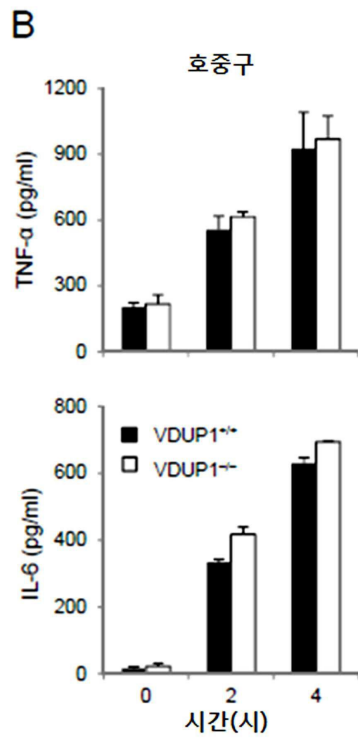
도면1f



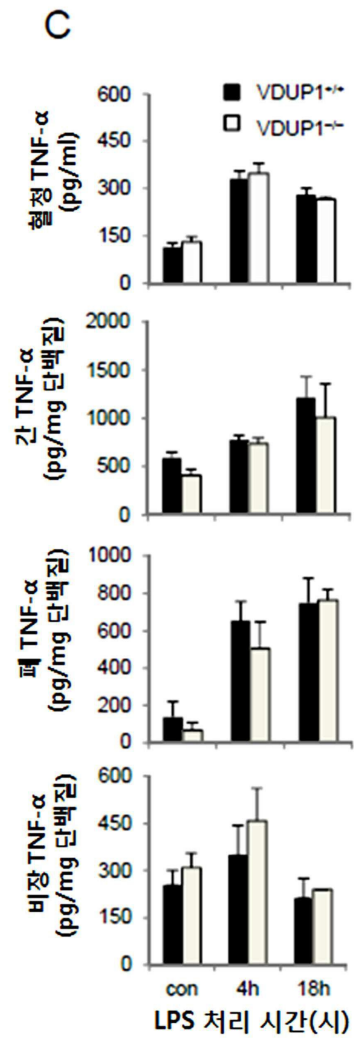
도면2a



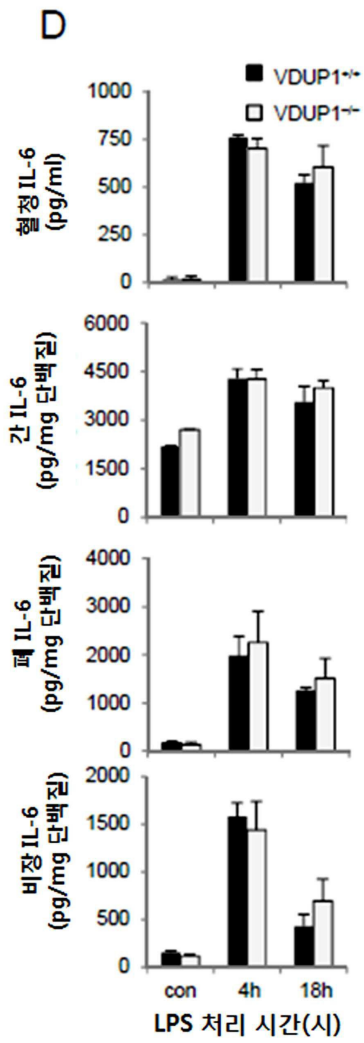
도면2b



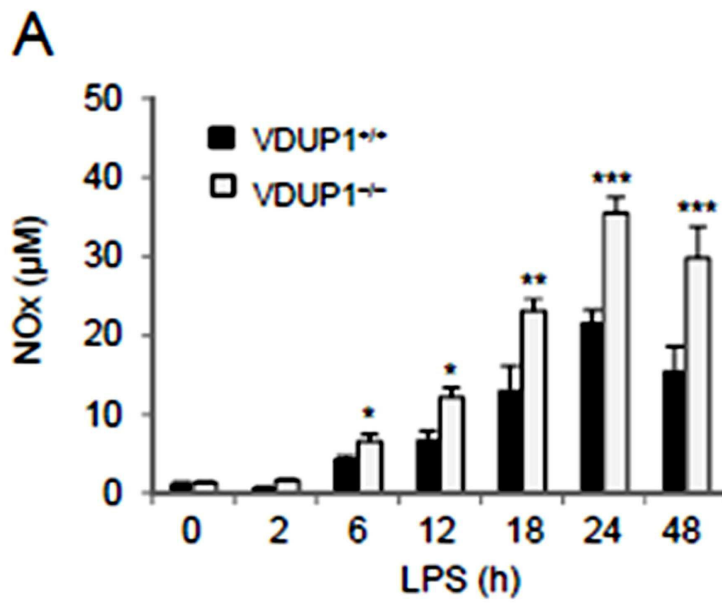
도면2c



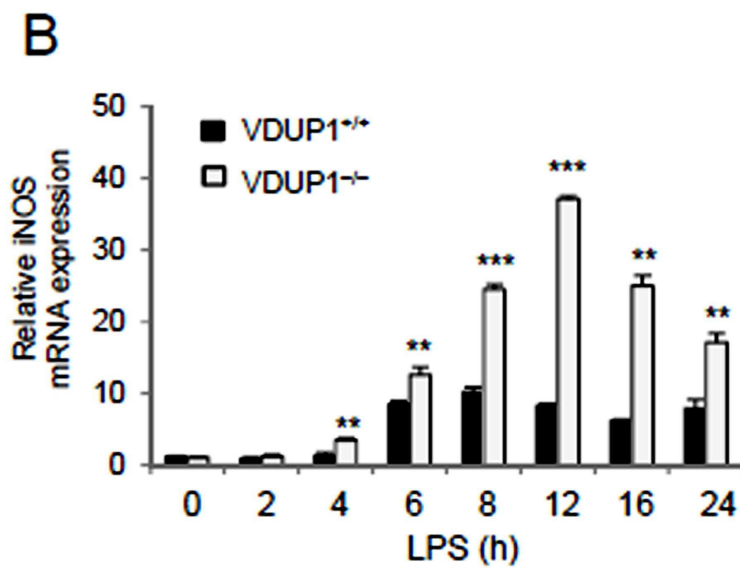
도면2d



도면3a

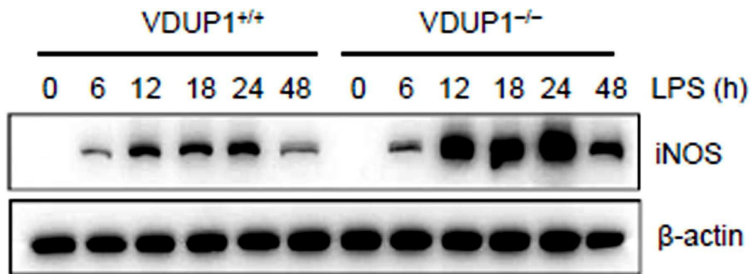


도면3b



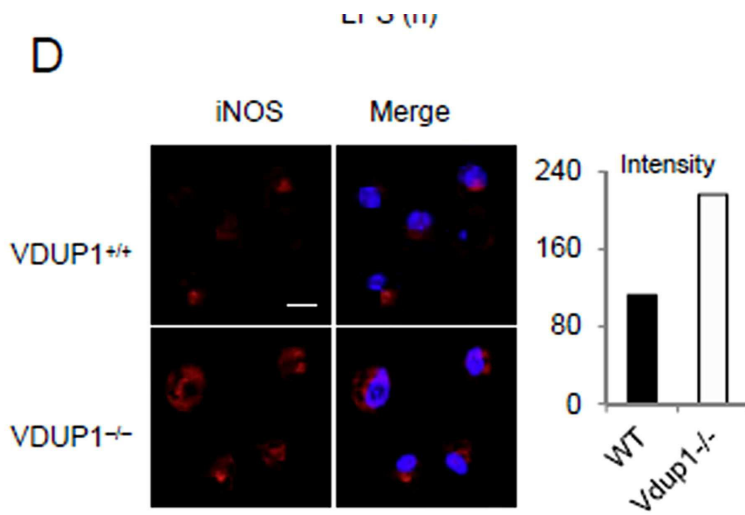
도면3c

C



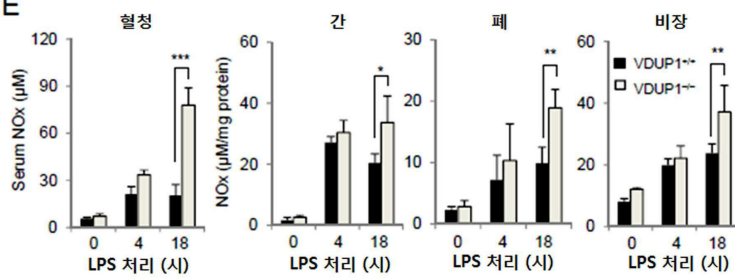
도면3d

D

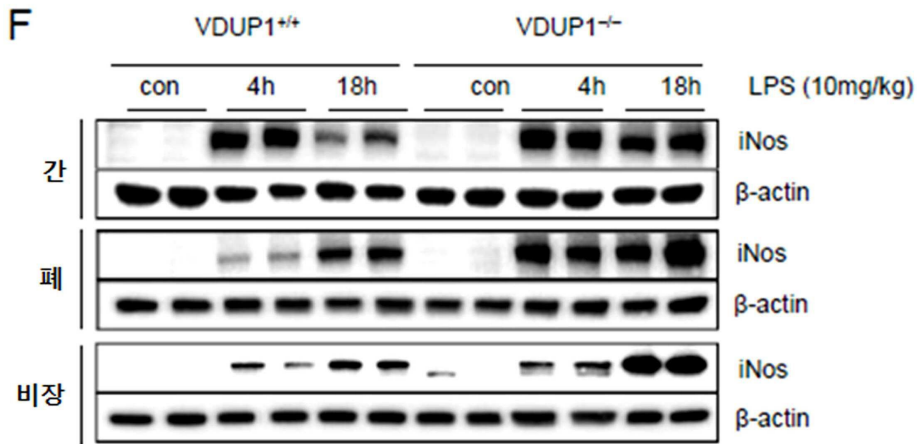


도면3e

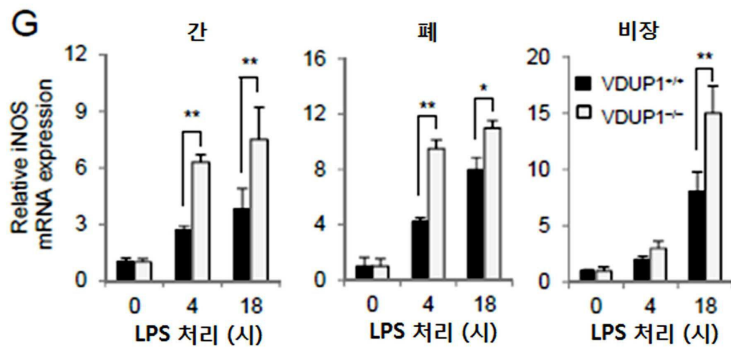
E



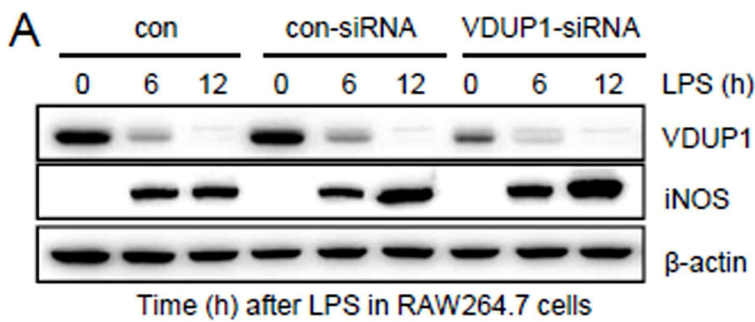
도면3f



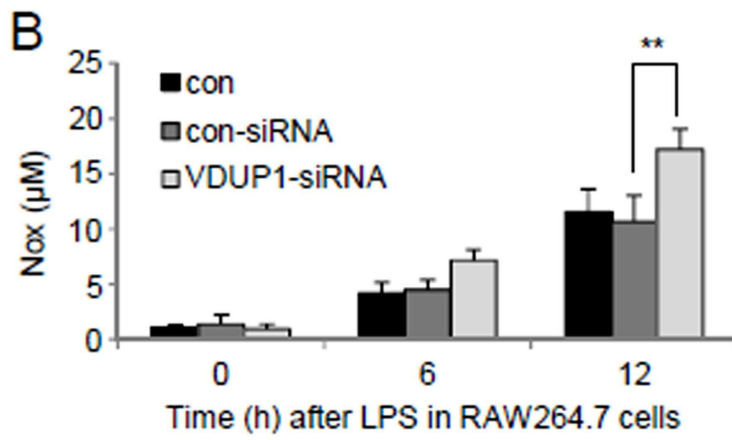
도면3g



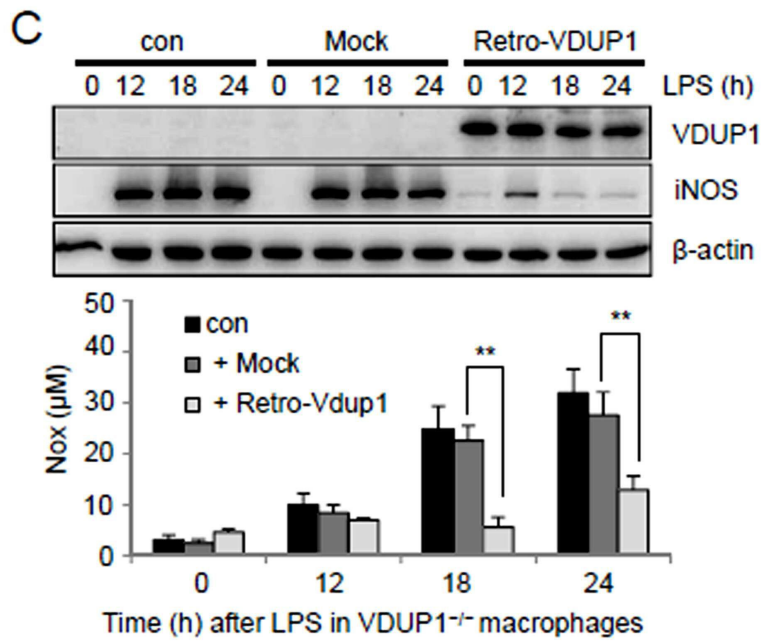
도면4a



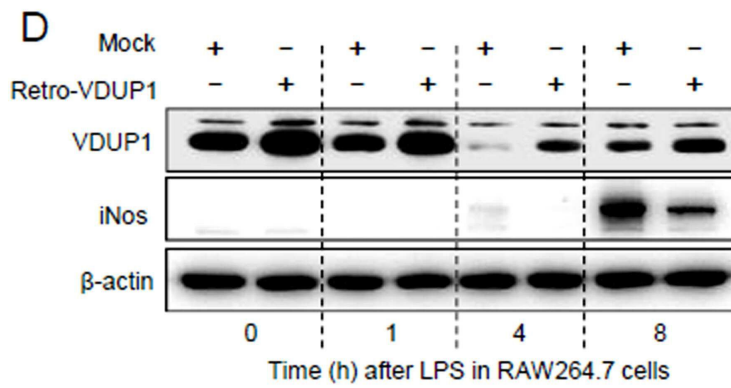
도면4b



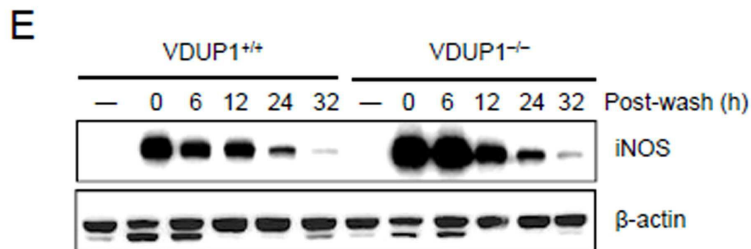
도면4c



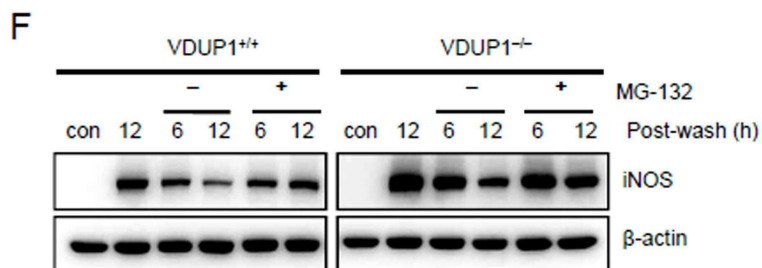
도면4d



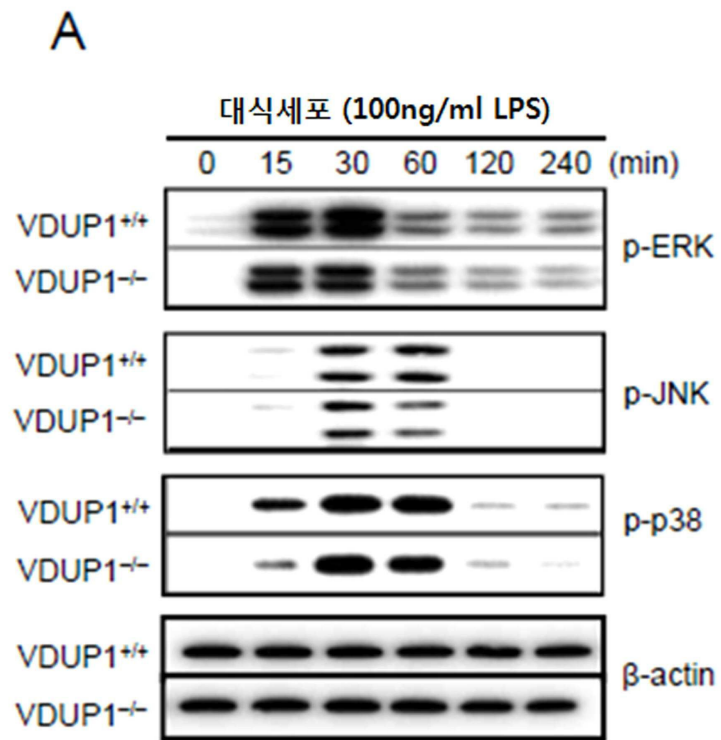
도면4e



도면4f

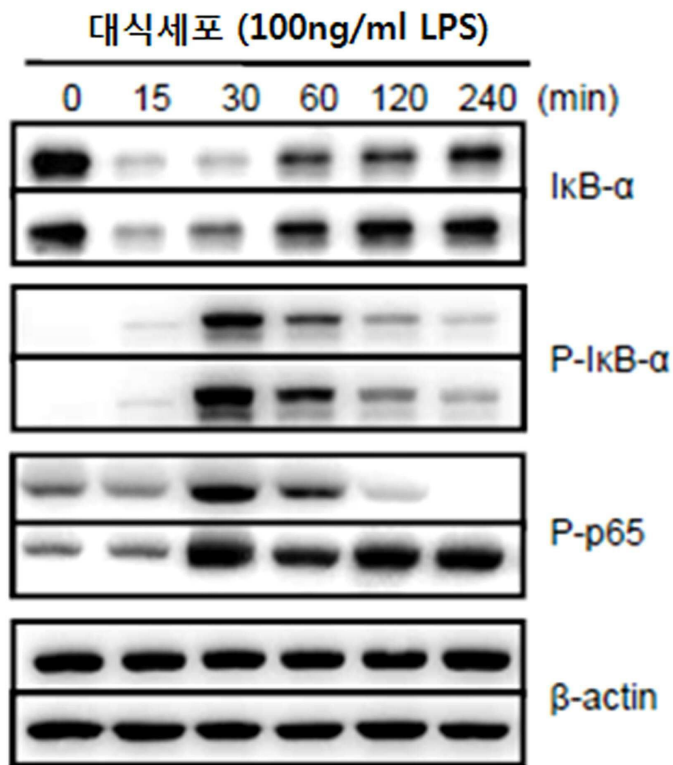


도면5a

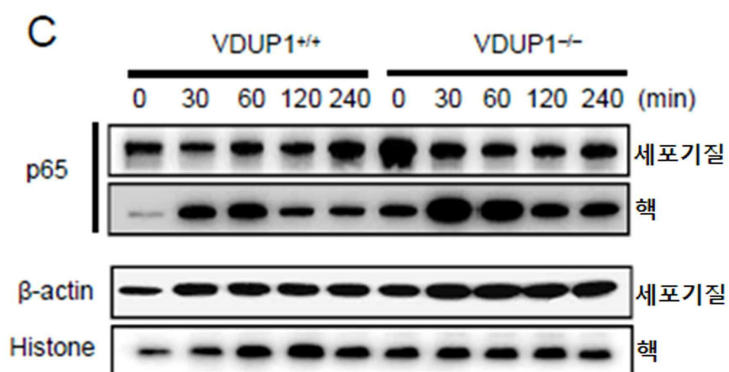


도면5b

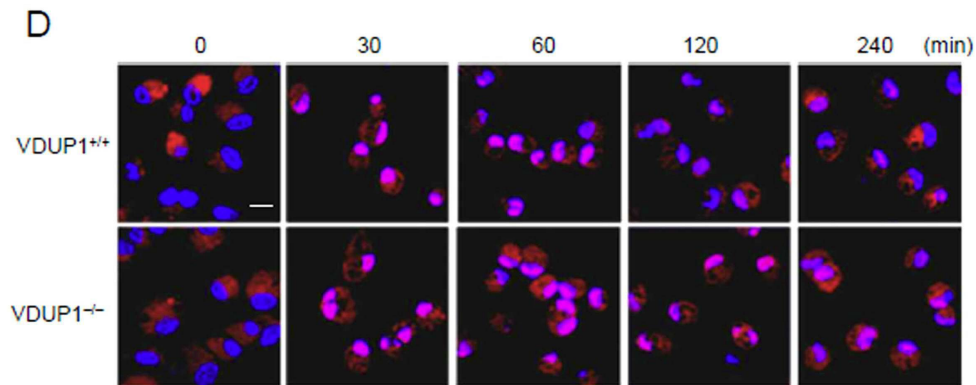
B



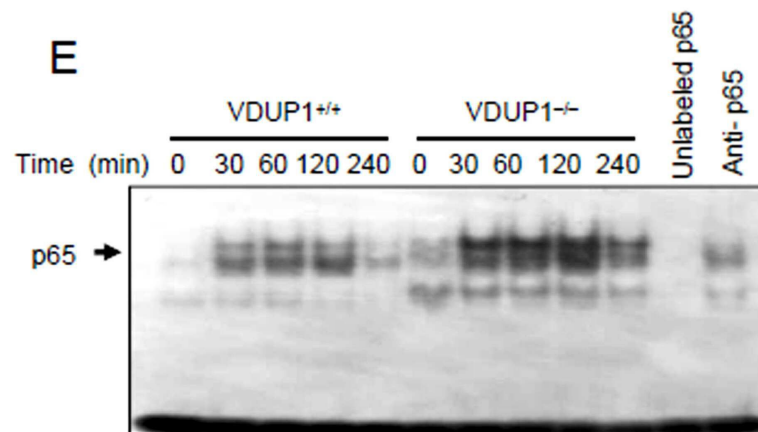
도면5c



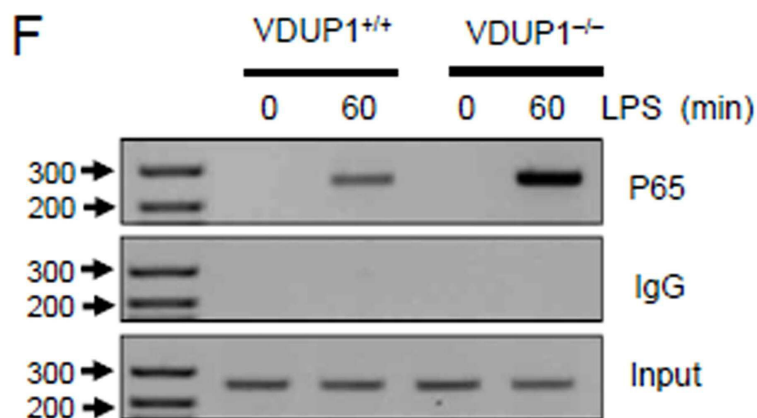
도면5d



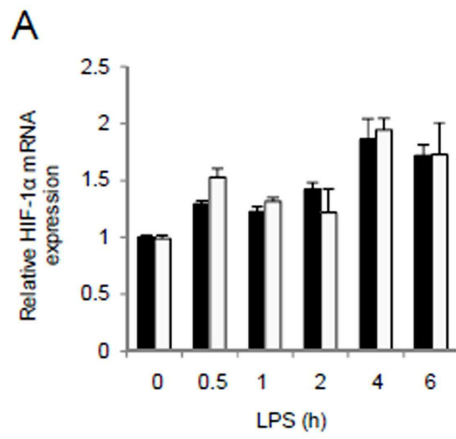
도면5e



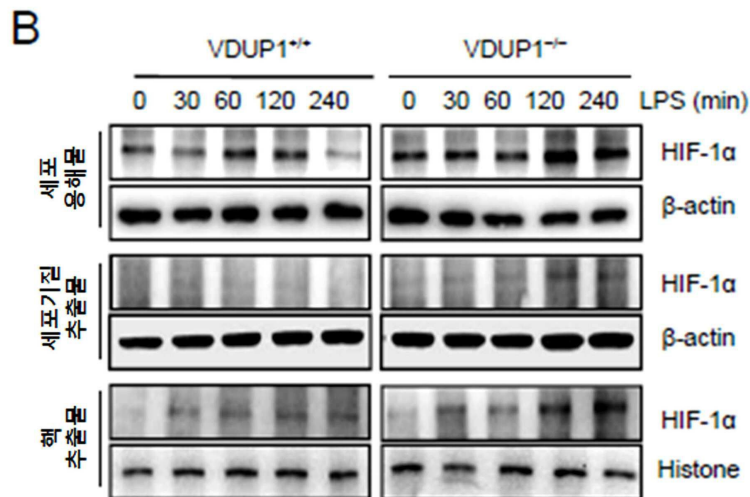
도면5f



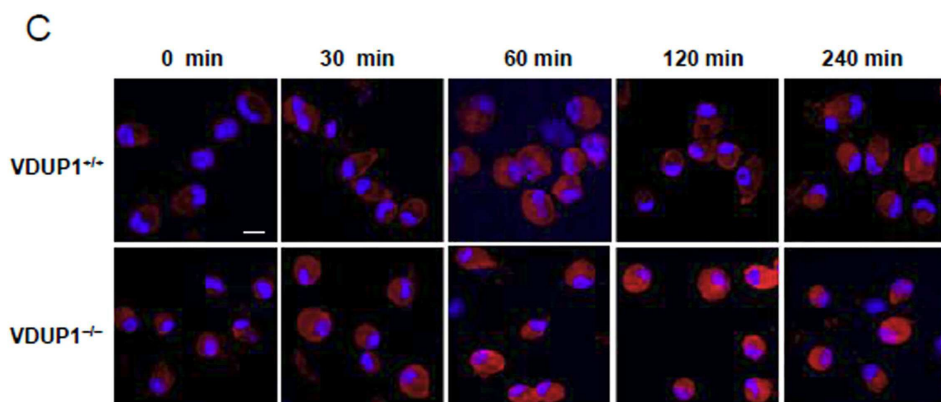
도면6a



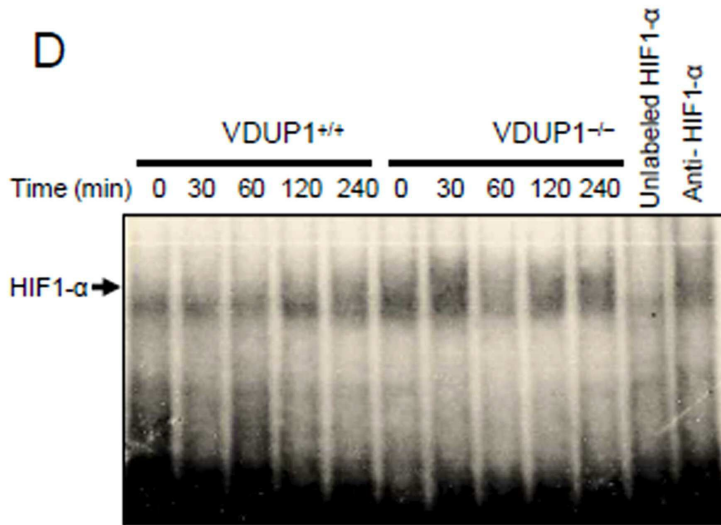
도면6b



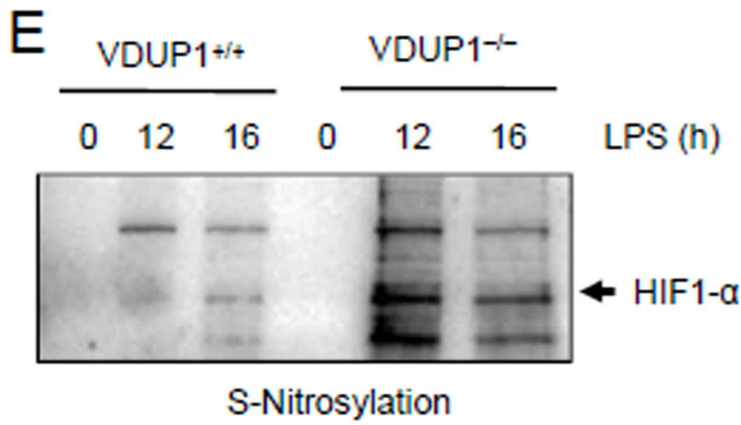
도면6c



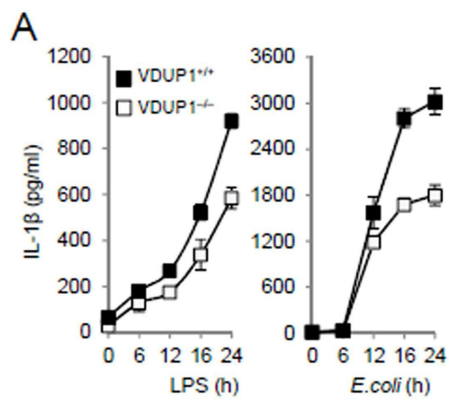
도면6d



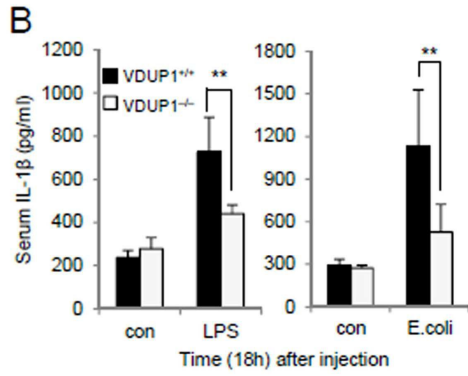
도면6e



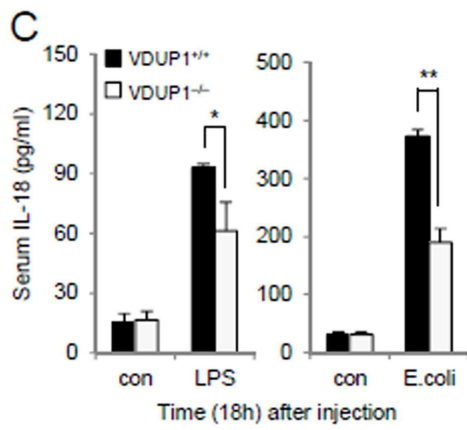
도면7a



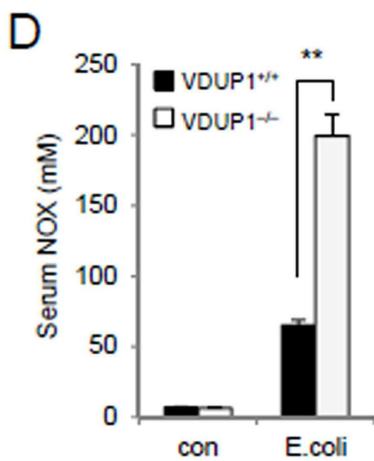
도면7b



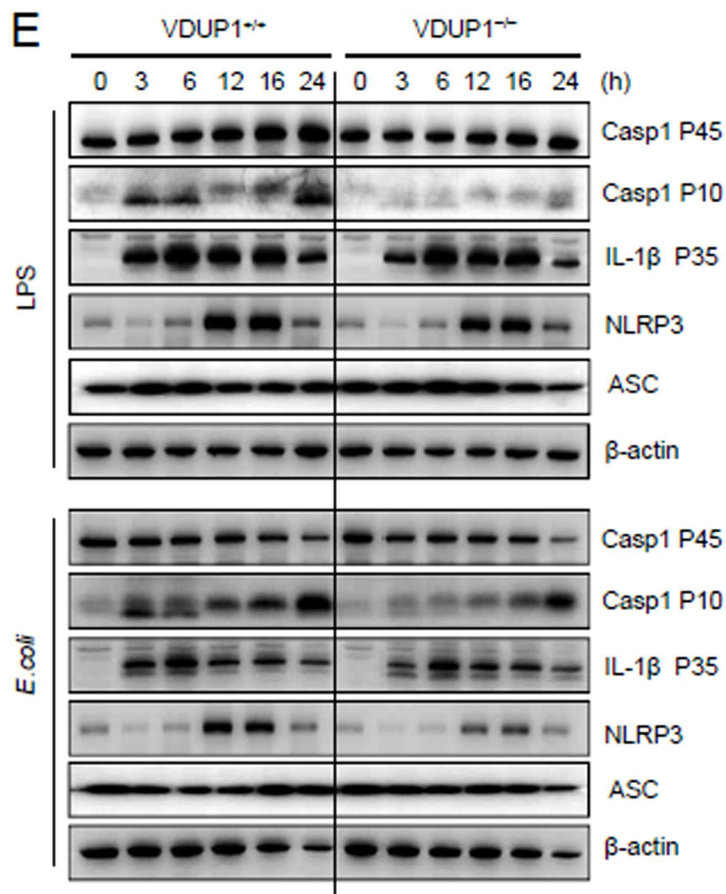
도면7c



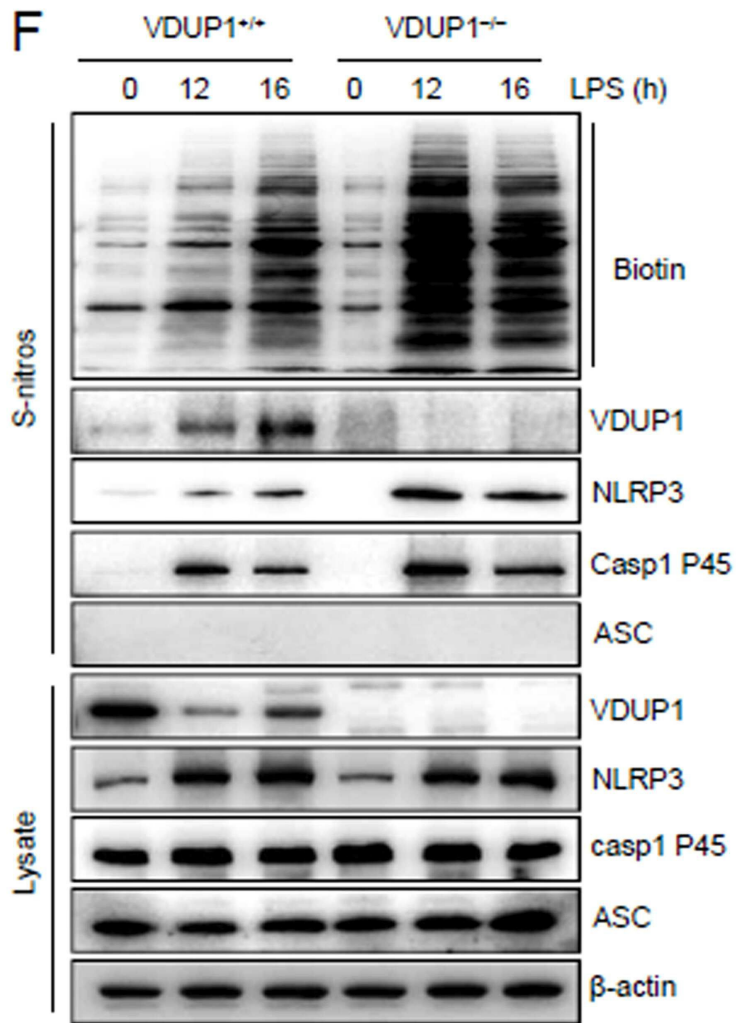
도면7d



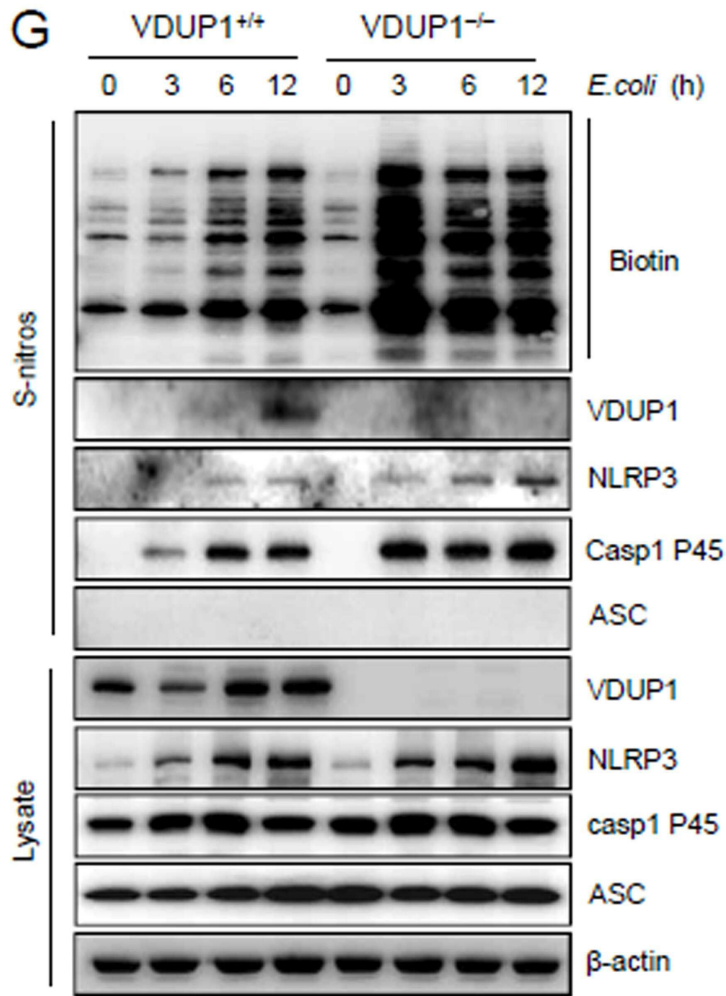
도면7e



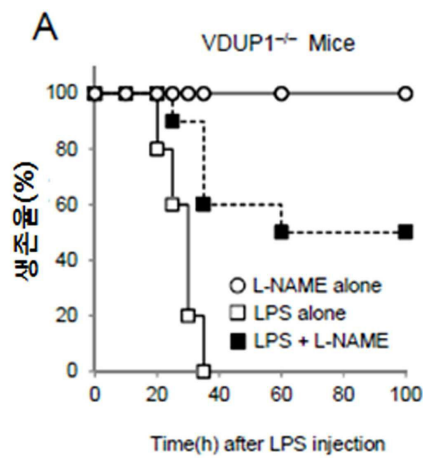
도면7f



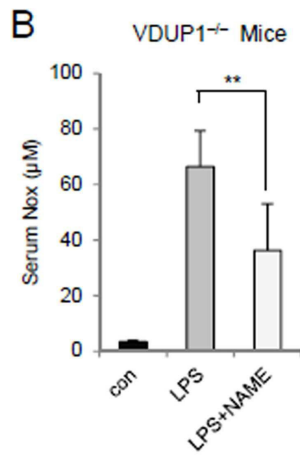
도면7g



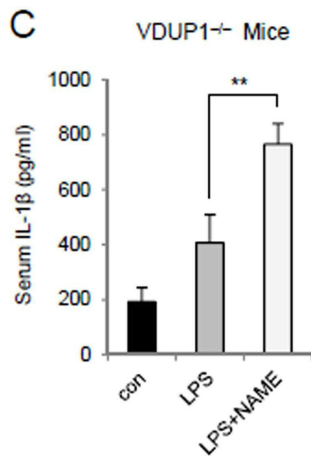
도면8a



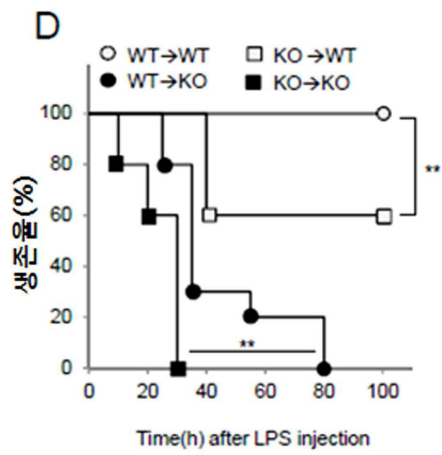
도면8b



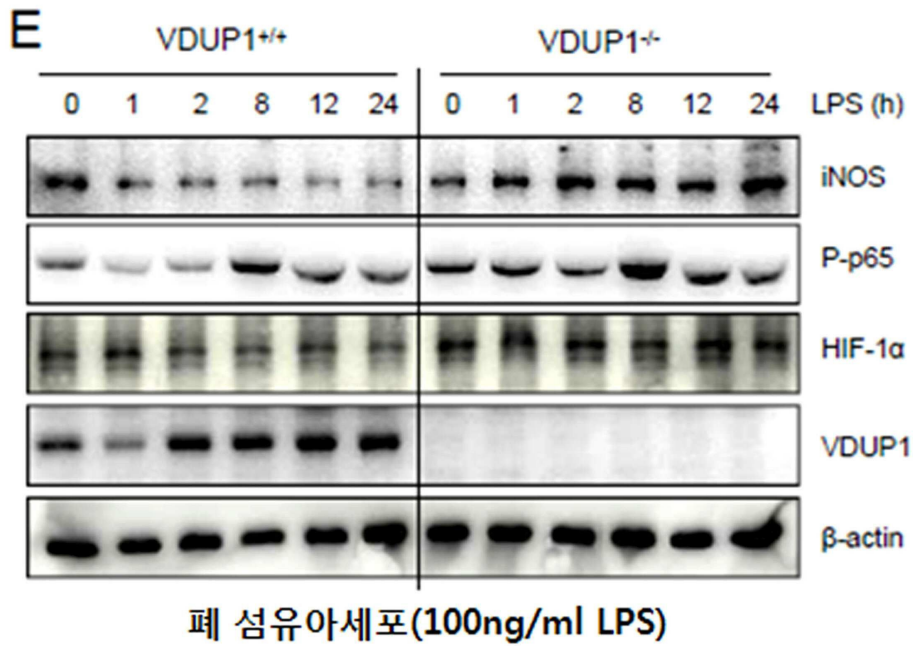
도면8c



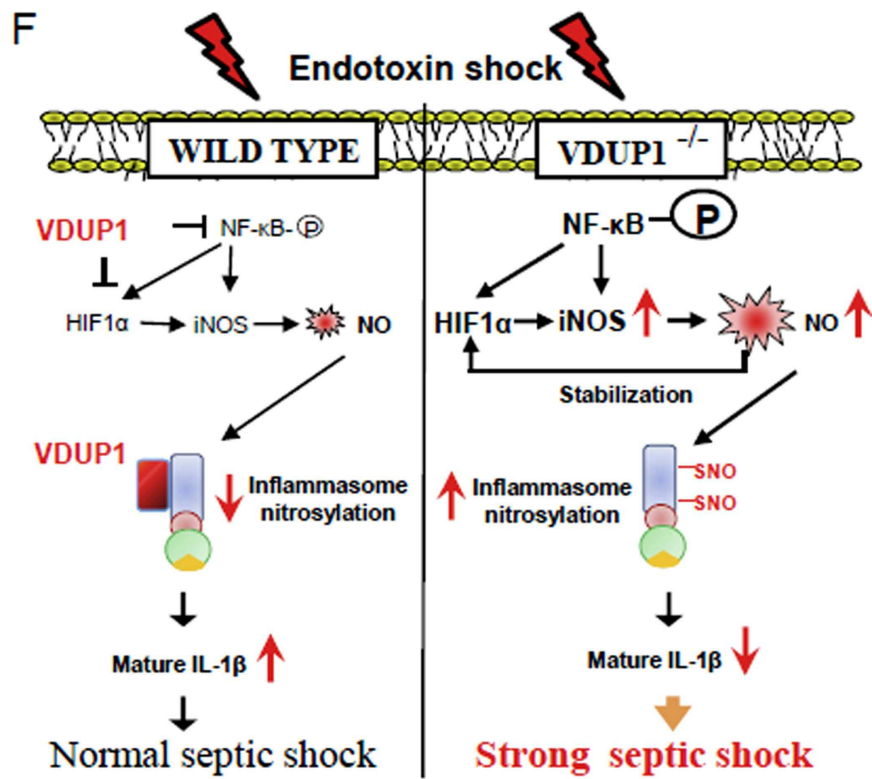
도면8d



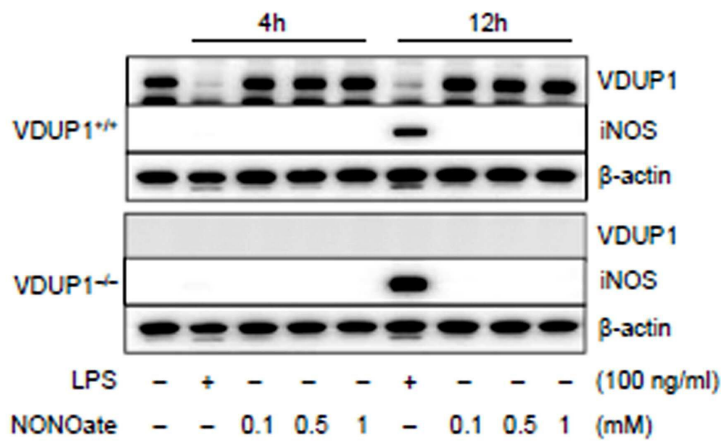
도면8e



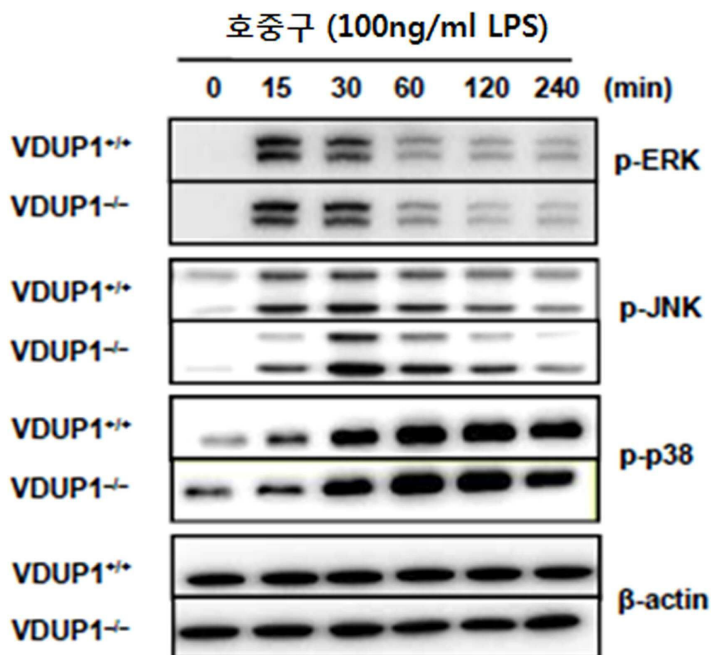
도면8f



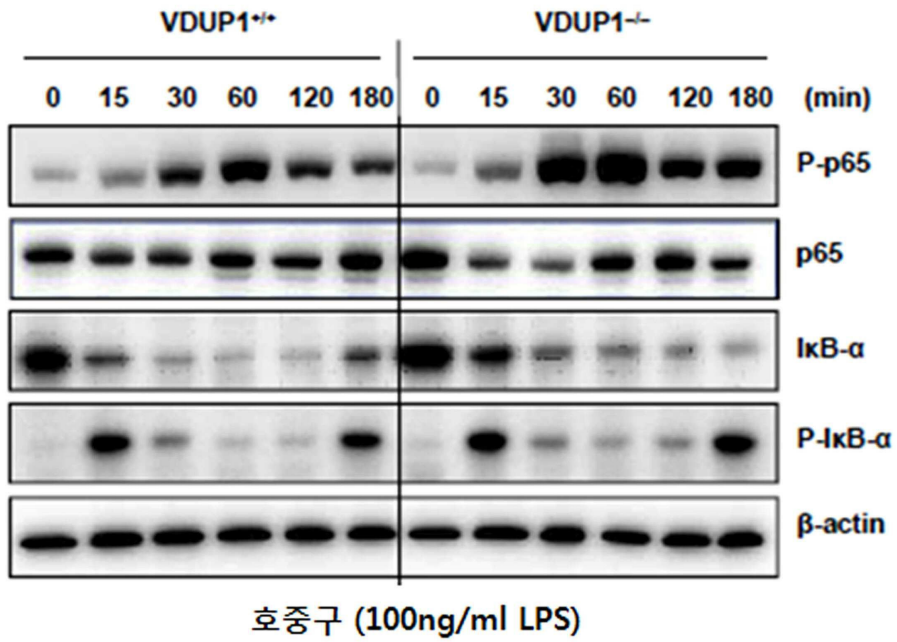
도면9



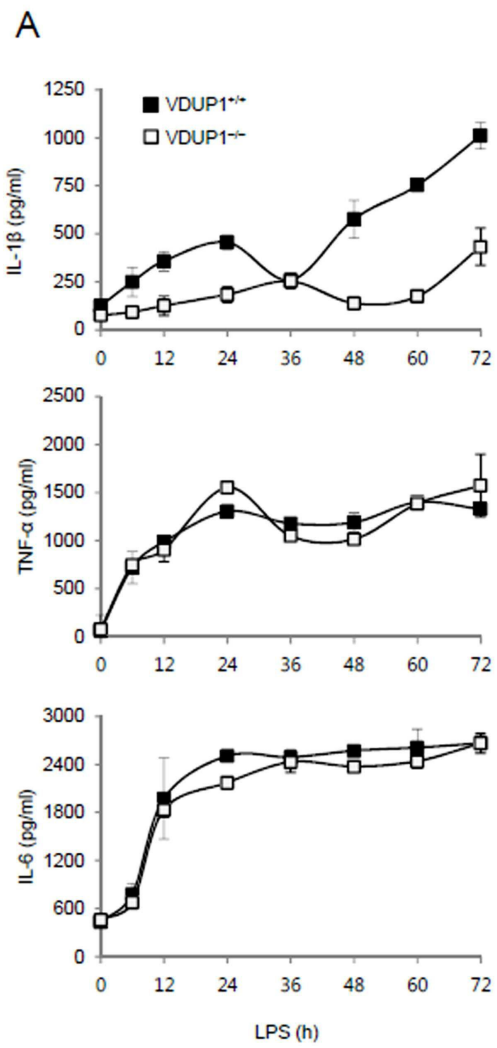
도면10



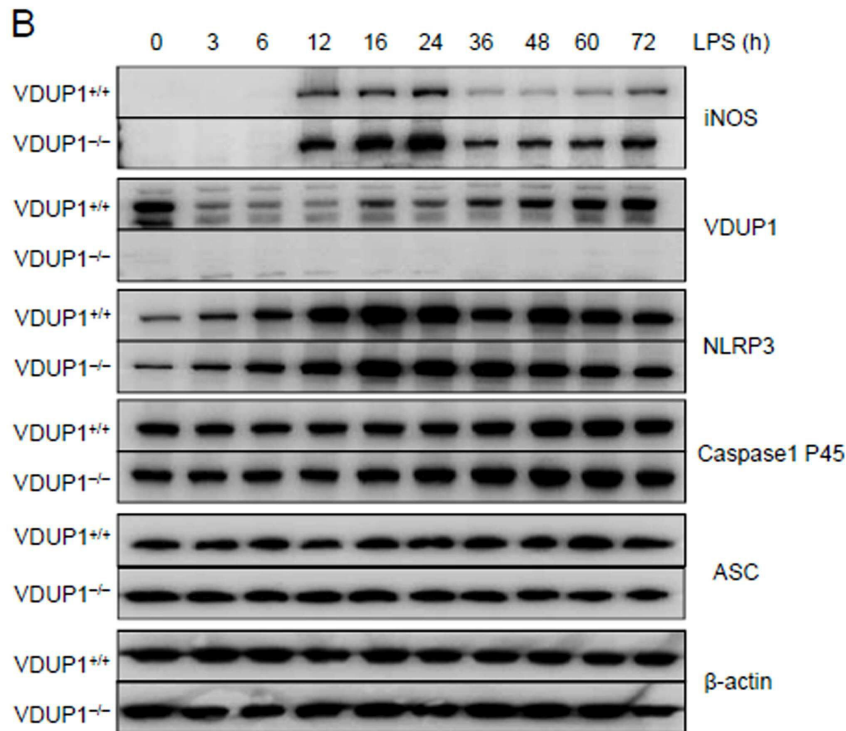
도면11



도면12a



도면12b



서열목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> Composition for inhibiting endotoxic shock comprising VDUP1
- <130> 13P-04-005
- <160> 11
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 1194
- <212> DNA
- <213> Mus musculus
- <400> 1

```

atggtgatgt tcaagaagat caagtctttt gaggtggtct tcaacgaccc cgagaagggtg      60
tacggcagcg gggagaaggt ggccggacgg gtaatagtgg aagtgtgtga agttaccgca      120
gtcaaagccg tcaggatcct ggcttgccggc gtggccaagg tcctgtggat gcaagggtct      180

cagcagtgca aacagacttt ggactacttg cgctatgaag acacacttct cctagaagag      240
cagcctacag caggtgagaa cgagatggtg atcatgaggc ctggaacaa atatgagtac      300
aagttcggtc tcgagcttcc tcaagggccc ctgggaacat cctttaaagg aaaatatggt      360
    
```

tgcgtagact actgggtgaa ggcttttctc gatcgcccca gccagccaac tcaaggaggca 420
 aagaaaaact tcgaagtgat ggatctagtg gatgtcaata ccctgacct aatggcacca 480
 gtgtctgccca aaaaggagaa gaaagtttcc tgcatgttca ttctgatgg acgtgtgtca 540
 gtctctgctc gaattgacag aaaaggattc tgtgaagggtg atgacatctc catccatgct 600

gactttgaga acacgtgttc ccgaatcgtg gtccccaag cggtattgt ggccccgacac 660
 acttaccttg ccaatggcca gaccaaagtg ttactcaga agctgtctc agtcagaggc 720
 aatcacatta tctcaggac ttgcgcatcg tggcgtggca agagcctcag agtcagaag 780
 atcagacat ccctctggg ctgcaacatc ctcaaagtcg aatactcctt gctgatctac 840
 gtcagtgtcc ctggctccaa gaaagtcatc cttgatctgc ccctagtgat tggcagcagg 900
 tctggtctga gcagccggac atccagcatg gccagccgga cgagctctga gatgagctgg 960
 atagacctaa acatcccaga taccagaa gctcctcctt gctatatgga catcattcct 1020

gaagatcaca gactagagag ccccaccacc cctctgctgg acgatgtgga cgactctcaa 1080
 gacagcccta tctttatgta cgccctgag ttccagttca tgccccacc cacttacact 1140
 gaggtggatc cgtgcgtcct taacaacaac aacaacaaca acaacgtgca gtga 1194

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse iNOS primer forward

<400> 2

acatcgacc gtccacagta t 21

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse iNOS primer reverse

<400> 3

cagaggggta ggcttgtctc 20

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223>	mouse HPRT primer forward	
<400>	4	
	gcctaagatg agcgcaagtt g	21
<210>	5	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	mouse HPRT primer reverse	
<400>	5	
	tactaggcag atggccacag g	21
<210>	6	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	NF-kappaB consensus oligonucleotide	
<400>	6	
	agttgagggg actttcccag gc	22
<210>	7	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	iNOS promoter primer forward	
<400>	7	
	gtcccagttt tgaagtgact acg	23
<210>	8	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	iNOS promoter primer reverse	
<400>	8	
	gttgtgaccc tggcagcag	19
<210>	9	
<211>	21	

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mouse HIF-1alpha primer forward
 <400> 9
 ggggaggacg atgaacatca a 21
 <210> 10
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> mouse HIF-1alpha primer reverse
 <400> 10
 gggtggttcc ttgtaccac a 21

 <210> 11
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HIF-1alpha consensus oligonucleotide
 <400> 11
 tctgtacgtg accacactca cctc 24