

## 명세서

### 발명의 명칭: HAPLN1을 이용한 피부 노화 측정 또는 예방 또는 개선용 조성물

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 히알루론산과 프로테오글리칸 연결 단백질 1(Hyaluronan and proteoglycan link protein 1, HAPLN1)을 이용한 피부 노화 측정용 바이오마커 조성물과 피부 노화 예방 또는 개선용 약학 조성물, 화장품 조성물 또는 건강기능식품에 대한 것이다.

#### 배경기술

- [2] 피부노화에 따른 가장 뚜렷한 현상 중의 하나는 진피층 세포외기질(extracellular matrix)의 감소이며 이로 인해 주름이 발생한다. 진피층 세포외기질은 콜라겐(collagen), 엘라스틴(elastin), 당단백질(glycoprotein) 등 다양한 단백질이 주요 성분으로 포함되어있다. 이들 단백질 중 90% 이상은 콜라겐이며, 그 중에서도 약 90% 정도가 타입 1 콜라겐(type 1 collagen)이다. 노화로 인해 진피층 세포외기질에서 타입 1 콜라겐의 양이 약 70% 감소하는 현상이 확인되었다.
- [3] 히알루론산(Hyaluronic acid)은 아미노당과 우론산으로 이루어진 다당류의 일종으로 생체의 모든 조직에 분포하며, 체내 총량의 50% 정도가 피부에 분포되어 있다. 히알루론산은 최대 1000배 질량의 물과 결합할 수 있으며, 진피조직 세포외기질을 채워주는 역할을 한다. 또한, 히알루론산은 여러 가지 당단백질과 프로테오글리칸(proteoglycan) 간의 응집(aggregate)을 형성하여 여러 성장 인자(growth factor)들을 저장하거나 보존하는 역할을 한다. 임상연구 결과에 따르면, 히알루론산은 진피 섬유아세포(dermal fibroblast)의 증식 및 콜라겐 생성, 성장 인자의 분비를 증가시키는데, 나이가 증가하면서 피부 중 40% 이상 감소하는 것으로 알려졌다.
- [4] 피부 노화는 크게 내인성 피부노화(intrinsic aging)와 외인성 피부노화(extrinsic aging)의 2가지로 나뉜다. 외인성 피부 노화는 자외선, 흡연 등 주로 외부 환경적인 요인에 의해 야기되며, 내인성 피부 노화는 나이를 먹음에 따라 동반되는 피부 노화이다. 현재 외인성 피부 노화를 방지하기 위해 자외선 차단 기능을 가진 화장품 등 여러 방법이 존재하지만 내인성 피부 노화를 방지하기 위한 방법은 아직 없는 실정이다. 따라서, 내인성 피부 노화를 예방하거나 노화된 피부를 개선시키기 위한 노력이 필요하다.

#### 발명의 상세한 설명

##### 기술적 과제

- [5] 본 발명의 목적은 피부 노화 측정용 바이오마커 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [6] 본 발명의 다른 목적은 피부 노화 측정용 키트를 제공하는 데에 있다.

- [7] 본 발명의 또 다른 목적은 피부 노화 개선제의 스크리닝 방법을 제공하는 데에 있다.
- [8] 본 발명의 또 다른 목적은 피부 노화 예방 또는 개선용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [9] 본 발명의 또 다른 목적은 피부 노화 예방 또는 개선용 화장품 조성물, 또는 주름 개선용 화장품 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [10] 본 발명의 또 다른 목적은 피부 노화 예방 또는 개선용 건강기능식품, 또는 주름 개선용 건강기능식품을 제공하는 데에 있다.

### 과제 해결 수단

- [11] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 생물학적 시료로부터 HAPLN1 단백질 또는 HAPLN1 유전자를 검출하는 제제를 포함하는 피부 노화 측정용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 생물학적 시료로부터 HAPLN1 단백질 또는 HAPLN1 유전자를 검출하는 제제를 포함하는 피부 노화 측정용 키트를 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 생물학적 시료에 임의의 화합물을 처리하는 단계; 상기 생물학적 시료로부터 HAPLN1 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 검출하는 단계; 및 상기 발현 수준을 임의의 화합물을 처리하지 않은 정상대조군에서의 동일 단백질 또는 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는 피부 노화 개선제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [14] 또한, 본 발명은 HAPLN1 단백질, 이를 코딩하는 유전자 및 HAPLN1 단백질 또는 유전자의 발현 촉진 또는 기능을 활성화하는 효능제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 피부 노화 예방 또는 개선용 약학 조성물을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 HAPLN1 단백질 또는 HAPLN1 단백질의 발현 촉진 또는 기능을 활성화하는 효능제 중 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 피부 노화 예방 또는 개선용 화장품 조성물, 또는 주름 개선용 화장품 조성물을 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 HAPLN1 단백질 또는 HAPLN1 단백질의 발현 촉진 또는 기능을 활성화하는 효능제 중 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 피부 노화 예방 또는 개선용 건강기능식품, 또는 주름 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [17] 상기 약학 조성물, 화장품 조성물 또는 건강기능식품은 히알루론산을 더 포함할 수 있다.

### 발명의 효과

- [18] 본 발명에 따르면, HAPLN1 단백질은 노화 개체에서 발현량이 감소하며, 투여 시 주름을 포함한 피부 노화를 개선 및 회복시키는 효과가 우수하므로, 본 발명은 HAPLN1 단백질 또는 HAPLN1 유전자를 검출하는 제제를 포함하는 피부

노화를 진단할 수 있는 피부 노화 측정용 바이오마커 조성물, 키트, HAPLN1 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 검출하는 단계를 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선제 스크리닝 방법, 피부 노화 예방 또는 개선용 약학 조성물, 화장품 조성물 또는 건강기능식품 및 주름 개선용 화장품 조성물 또는 건강기능식품으로 유용하게 제공될 수 있다.

#### 도면의 간단한 설명

- [19] 도 1은 노화 마우스(Old, O)와 어린 마우스(Young, Y)간의 비동시성 개체결합(Heterochronic parabiosis) 쌍에서 콜라겐의 생성을 확인한 결과이고,
- [20] 도 2는 노화 마우스(Old, O)와 어린 마우스(Young, Y)간의 노화 마우스(Old, O)와 젊은 마우스(Young, Y)간의 비동시성 개체결합(Heterochronic parabiosis) 쌍에서 히알루론산(Hyaluronic acid, HA)의 수준을 확인한 결과이고,
- [21] 도 3은 피부노화와 관련된 내인성 인자가 HAPLN1임을 확인한 결과이고,
- [22] 도 4는 노화 마우스와 어린 마우스 피부의 프로콜라겐의 mRNA 양 및 분포를 비교한 결과이고,
- [23] 도 5는 노화 마우스와 어린 마우스 피부의 히알루론산 농도 및 분포를 비교한 결과이고,
- [24] 도 6은 노화 마우스와 어린 마우스 피부의 HAPLN1 농도 및 분포를 비교한 결과이고,
- [25] 도 7은 노화 마우스에서 HAPLN1 투여로 인한 콜라겐 증가를 확인한 결과이고,
- [26] 도 8은 노화 마우스에서 HAPLN1 투여로 인한 히알루론산 증가를 확인한 결과이고,
- [27] 도 9는 사람 정상 피부 섬유아세포(NHDF)에서 HAPLN1 처리로 인한 TGF- $\beta$  유도 콜라겐 증가를 확인한 결과이고,
- [28] 도 10은 사람 정상 피부 섬유아세포에서 HAPLN1 처리로 인한 콜라겐 합성 신호 전달 경로 중 TGF- $\beta$  수용체 II의 단백질 발현량의 증가를 확인한 결과이고,
- [29] 도 11은 사람 정상 피부 섬유아세포에서 HAPLN1 처리로 인한 TGF- $\beta$  수용체 II의 안정성(stability) 증가를 확인한 결과이고,
- [30] 도 12는 사람 정상 피부 섬유아세포에서 HAPLN1 처리로 인한 TGF- $\beta$  유도 히알루론산 합성 효소(HAS2, hyaluronic acid synthase 2) 단백질 발현량의 증가를 확인한 결과이다.

#### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [31] 본 발명의 발명자들은 노화 마우스와 어린 마우스의 단백질 발현을 비교한 결과, 노화 마우스에서 HAPLN1의 발현이 감소된다는 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다. 상기 HAPLN1는 히알루론산을 프로테오글리칸에 연결하여 히알루론산을 안정화하는 단백질로서, HAPLN1의 피부 노화 개선 효과는 현재 보고된 바가 없다.

[32]

- [33] 본 발명은 생물학적 시료로부터 HAPLN1 단백질 또는 HAPLN1 유전자를 검출하는 제제를 포함하는 피부 노화 측정용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [34] 상기 HAPLN1 단백질은(mouse HAPLN1 accession: NP\_038528.3, Gene ID:12950; Human HAPLN1 accession: AAH57808.1, Gene ID: 1404)이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [35] 상기 제제는 항체, 안티센스 RNA(antisense RNA), 앵타머(Aptamer) 및 화합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [36] 상기 피부 노화는 피부 진피층의 세포외 기질 감소로 인해 발생한 주름일 수 있다.
- [37]
- [38] 더불어 본 발명은 생물학적 시료로부터 HAPLN1 단백질 또는 HAPLN1 유전자를 검출하는 제제를 포함하는 피부 노화 측정용 키트를 제공한다.
- [39] 상기 제제는 항체, 안티센스 RNA(antisense RNA), 앵타머(Aptamer) 및 화합물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나이나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [40] 상기 항체는 다클론성 항체(polyclonal antibody) 또는 단일클론 항체(monoclonal antibody)이다.
- [41] 상기 다클론성 항체는 당업자에 알려진 방법에 따라 면역원으로 상기 유전자에 의해 발현된 단백질 또는 그 단편을 외부 숙주에 주사함으로써 제조할 수 있다. 외부 숙주는 마우스, 랫트, 양 또는 토끼와 같은 포유동물을 포함한다. 면역원은 근내, 복강내 또는 피하 주사방법으로 주사되며, 일반적으로 항원성을 증가시키기 위한 보조제(adjuvant)와 함께 투여된다. 외부숙주로부터 정기적으로 혈청을 채취하여 향상된 역가 및 항원에 대한 특이성을 보이는 혈청을 수거하거나 이로부터 항체를 분리정제한다.
- [42] 상기 단일클론 항체는 당업자에 알려진 융합에 의한 불멸화된 세포주 생성기술에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 상기 유전자에 의해 발현된 단백질을 마우스에 면역화시키거나 펩타이드를 합성하여 소혈청 알부민과 결합시켜 마우스에 면역화시킨다. 마우스에서 분리된 항원-생산 B 림프구를 인간 또는 마우스의 골수종(myeloma)과 융합하여 불멸화된 하이브리도마(hybridoma)를 생성하며, 상기 하이브리도마 세포를 가지고 간접적인 효소 결합 면역흡착 분석법(enzyme-linked immunoabsorbent assays, ELISA)을 사용하여 모노클로날 항체의 생성 여부를 확인하고 양성 클론을 택하여 배양한 후 항체를 분리정제하거나 랫트의 복강에 주입한 후 복수를 채취함으로써, 단일클론 항체를 제조할 수 있다.
- [43] 상기 단일클론 항체는 일반적으로 알칼라인 포스파타아제(alkaline phosphatase, AP) 또는 호올스래디쉬 퍼옥시다제(horseradish peroxidase, HRP) 등의 효소가 결합된 2차 항체 및 이들의 기질을 사용하여 발색반응 시킴으로써 정량분석할 수도 있고, 또는 직접 상기 단백질에 대한 단일클론 항체에 AP 또는 HRP 효소 등이 결합된 것을 사용하여 정량분석할 수 있다.

- [44] 상기 단백질과 항체의 반응은 웨스턴 블랏(western blot), 면역침강법(Immunoprecipitation, IP), 효소 결합 면역흡착 분석법(enzyme-linked immunoabsorbent assays, ELISA) 및 면역염색법(Immunohistochemistry, IHC) 등의 단백질 확인 실험을 통해 확인할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [45] 상기 항체를 포함하는 키트는 전형적으로 동결건조 형태의 항체와 버퍼, 안정화제, 불활성 단백질 등을 포함할 수 있으며, 상기 항체는 방사종(radionuclides), 형광원(fluorescens), 효소(enzymes) 등에 의해 표지화될 수 있다.
- [46]
- [47] 또한, 본 발명은 생물학적 시료에 임의의 화합물을 처리하는 단계; 상기 생물학적 시료로부터 HAPLN1 단백질 또는 유전자의 발현 수준을 검출하는 단계; 및 상기 발현 수준을 임의의 화합물을 처리하지 않은 정상대조군에서의 동일 단백질 또는 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계를 포함하는 피부 노화 개선제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [48] 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈청 및 혈장으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다.
- [49]
- [50] 더불어 본 발명은 HAPLN1 단백질, 이를 코딩하는 유전자 및 HAPLN1 단백질 또는 유전자의 발현 촉진 또는 기능을 활성화하는 효능제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상을 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 피부 노화 예방 또는 개선용 약학 조성물을 제공한다.
- [51] 상기 약학 조성물은 히알루론산(hyaluronic acid, HA)을 더 포함할 수 있다.
- [52] 상기 약학 조성물은 통상적인 방법에 따라 겔제, 유제, 주사제, 산제, 과립제, 에어로솔제, 페이스트제, 경피흡수제 및 패치제로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 제형으로 제공될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [53] 본 발명의 다른 구체예에서, 상기 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제 및 결합제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [54] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할

수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[55]

[56] 상기 HAPLN1 단백질 및 효능제의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 노화의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[57] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[58]

[59] 또한, 본 발명은 HAPLN1 단백질 또는 HAPLN1 단백질의 발현 촉진 또는 기능을 활성화하는 효능제 중 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 피부 노화 예방 또는 개선용 화장품 조성물, 또는 주름 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[60] 상기 화장품 조성물은 히알루론산을 더 포함할 수 있다.

[61] 상기 화장품 조성물은 유효성분인 HAPLN1 단백질 및 효능제외에 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

[62] 상기 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 썬 크림, 유연 화장수, 수렴 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[63] 상기 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[64] 상기 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를

포함할 수 있다.

- [65] 상기 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해 화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [66] 상기 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [67]
- [68] 또한, 본 발명은 HAPLN1 단백질 또는 HAPLN1 단백질의 발현 촉진 또는 기능을 활성화하는 효능제 중 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 피부 노화 예방 또는 개선용 건강기능식품, 또는 주름 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [69] 상기 건강기능식품은 히알루론산을 더 포함할 수 있다.
- [70] 상기 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료의 형태로 제공될 수 있으며, 상기 건강기능식품은 유효성분인 본 발명에 따른 HAPLN1 단백질 및 효능제 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적, 예를 들어, 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [71] 상기 건강기능식품에 함유된 HAPLN1 단백질 및 효능제의 유효용량은 상기 약학조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있음은 확실하다.
- [72] 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한이 없고, 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있다.

#### 발명의 실시를 위한 형태

- [73] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [74]

- [75] <실시예 1> 피부노화 내인성 인자의 탐색
- [76] 비동시성 개체결합(Heterochronic parabiosis)은 같은 종의 노화 마우스와 젊은 마우스의 혈관을 연결하여 혈액을 공유하는 실험법으로, 비동시성 개체결합 실험모델을 이용하여, 신경, 심장 및 근육의 노화를 일으키는 생체 내부 인자들을 탐색, 규명하는데 이용된다.
- [77] 따라서, 생체 내부에서 피부노화와 관련된 인자의 존재 여부를 확인하기 위해, 한국기초과학지원연구원으로부터 얻은 20개월령의 노화 C57BL/6J 마우스와 중앙실험동물로부터 얻은 6주령의 어린 C57BL/6J 마우스를 마취한 후 각 마우스의 피부 및 복강근육을 절개하여 개체결합(parabiosis)하였다. 어린 마우스의 경우 우측 앞발에서 뒷다리까지의 피부를 약 5cm 정도 절개 후 우측 복강근육을 1cm 정도 절개하였고, 노화 마우스의 경우 좌측 앞발에서 뒷다리까지의 피부를 5cm 정도를 절개 후 좌측 복강근육을 1cm 정도 절개하였다. 절개한 복강근육 및 피부를 서로 연결 및 봉합하여 개체결합하였고 3주 동안 유지 후 안락사한 후, 각 실험군 마우스의 혈장 및 피부조직을 채취하였다. 안와채혈로 혈액을 전량 취해 에틸렌디아민사아세트산(ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)-코팅 채혈관에서 30분 정도 배양한 후 10,000 xg의 속도로 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 분리한 혈장은 -70°C에서 보관하였다. 피부 조직은 마우스 제모 후 목 경부의 피부(cervical skin)를 1cm × 1cm 사이즈로 채취하였다.
- [78] 면역형광법(Immunofluorescence)을 위해, 채취한 피부조직을 10% 포르말린(formalin)에 고정하여 파라핀 섹션(paraffin section)을 제작하였다. 제작한 슬라이드를 파라핀 제거(deparaffinization) 및 재수화(rehydration)하였고 고트 항-마우스 프로-콜라겐 타입 1 알파 2 IgG(goat anti-mouse pro-collagen type I  $\alpha 2$ (COL1A2) polyclonal IgG, Santa cruz biotechnology), 동키 항-고트 IgG(H+L) 알렉사 플루오르 594(donkey anti-goat IgG(H+L) Alexa Fluor 594, Life technologies)항체를 이용하여 면역형광염색을 하였다.
- [79] qRT-PCR을 하기 위해, 분리한 피부조직을 0.25% 트립신/EDTA(trypsin/EDTA)에서 4°C, 밤새 배양한 후 진피층을 분리하였고, 트리졸 시약(trizol reagent)을 이용해서 총 mRNA를 추출하였다. 추출한 mRNA를 cDNA 합성 키트(Life technologies)를 이용하여 cDNA로 합성 후 proCOL1A1, proCOL1A2, proCOL3A1 및 GAPDH를 qRT-PCR법으로 정량하였다.
- [80] 그 결과, 도 1 및 도 2와 같이, 노화 마우스(Old, O)와 젊은 마우스(Young, Y)간의 비동시성 개체결합 쌍 중의 노화 개체(YO-O)의 피부조직에서 콜라겐(collagen)(도 1)과 히알루론산(도 2)의 생성이 노화 마우스-노화 마우스 간의 비동시성 개체결합 쌍 중의 노화 개체(OO-O)보다 증가함을 확인하였다.
- [81] 따라서, 생체 내부에 피부노화와 관련된 내인성 인자가 존재할 수 있음을 확인하였다.
- [82] 더불어 각 실험 개체의 마우스로부터 혈장을 분리하고 프로테움

분석(SomaScan proteomics, 미국 SomaLogic사에 의뢰)을 통해 내인성 인자를 규명하였다. 그 결과 도 3과 같이, 노화와 관련성이 있는 단백질이 HAPLN1임을 확인하였다.

[83]

[84] <실시예 2> 피부노화 상태에서 **HAPLN1**의 양적 감소 확인

[85] 1. 피부노화 시 콜라겐 생성 감소

[86] C57BL/6J 수컷 20개월령 노화 마우스와 6주령 어린 마우스의 목 경부 부위의 피부조직을 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 1cm × 1cm 사이즈로 채취하고 이의 총 mRNA를 추출하였다. 추출한 mRNA를 cDNA 합성 키트를 이용하여 cDNA로 합성한 후 프로콜라겐 타입 I(proCOL1A1 및 proCOLIA2) 및 타입 III(proCOL3A1) mRNA의 양을 qRT-PCR 방법으로 정량하였다.

[87] 그 결과, 도 4 중 A와 같이, 노화 마우스에서 proCOL1A1, proCOLIA2 및 proCOL3A1의 mRNA 수준이 어린 마우스 대비 각 1/4.3, 1/4.2, 1/5.6 수준으로 감소하였다.

[88] 또한, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 노화 마우스와 어린 마우스의 목 경부 부위의 피부 조직을 파라핀 섹션으로 제조하고 면역형광법을 수행하였다. 이를 공초점 현미경으로 관찰한 결과, 도 4 중 B와 같이 노화 마우스 피부에서 프로콜라겐 타입 I의 분포 감소를 확인하였다.

[89]

[90] 2. 피부노화 시 히알루론산 양 감소

[91] C57BL/6J 수컷 20개월령 노화 마우스와 6주령 어린 마우스의 목 경부 부위의 피부 조직을 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 1cm × 1cm 사이즈로 채취하여 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)을 수행하였다. 먼저, 블레이드(blade)를 이용해 분리한 피부조직에서 피하지방을 제거 후 1X 프로테아제 억제제(protease inhibitor)를 첨가한 인산완충식염수(Phosphate buffer saline, PBS)용액에서 균질화(homogenization)하였다. 히알루론산 ELISA 키트(hyaluronic acid ELISA kit, CUSABIO)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 히알루론산을 정량하였다.

[92] 그 결과, 도 5 중 A와 같이, 노화 마우스에서 히알루론산의 농도가 어린 마우스 대비 1/4.2 수준으로 감소하였다.

[93] 또한, 노화 마우스와 어린 마우스의 피부 조직 절편을 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 면역형광염색하였다. 이때, 항-히알루론산 항체인 쉘 항-히알루론산 폴리클로날 항체(sheep anti-hyaluronic acid polyclonal antibody, abcam) 및 동키 항-쉘 IgG H&amp;L 알렉사 플루오르 488(donkey anti-sheep IgG H&amp;L Alexa Fluor 488, abcam)를 이용하였다. 이를 공초점 현미경으로 관찰한 결과 도 5 중 B와 같이, 노화 마우스 피부에서 히알루론산의 분포 감소를 확인하였다.

[94]

[95] 3. 피부 노화 시 **HAPLN1**의 발현 양 감소

- [96] 상기 실시예 2 중 2와 같은 방법으로 C57BL/6J 수컷 20개월령 노화 마우스와 6주령 어린 마우스의 목 경부 피부조직을 취해 PBS 용액에서 균질화한 후, 마우스 히알루론산 및 HAPLN1 ELISA 키트(mouse hyaluronan and proteoglycan link protein 1(HAPLN1) ELISA kit, CUSABIO)를 이용하여 HAPLN1의 농도를 측정하였다.
- [97] 측정 결과, 도 6 중 A와 같이 노화 마우스에서 HAPLN1의 농도가 어린 마우스 대비 1/4.2 수준으로 감소하였다.
- [98] 또한, 노화 마우스와 어린 마우스의 피부 조직 절편을 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 면역형광염색하였다. 이때, 고트 항-HAPLN1 폴리클로날 IgG(goat anti-HAPLN1 polyclonal IgG, santa cruz biotechnology) 및 동키 항-고트 IgG (H+L) 알렉사 플루오르 488(donkey anti-goat IgG(H+L) Alexa Fluor 594, Life technologies)를 이용하였다.
- [99] 이를 공초점 현미경으로 관찰한 결과, 도 6 중 B와 같이 노화 마우스 피부에서 HAPLN1의 분포가 감소된 것을 확인하였다.
- [100]
- [101] **<실시예 3> HAPLN1 투여로 인한 피부노화 개선 효과 확인**
- [102] 재조합 마우스 HAPLN1(Recombinant mouse HAPLN1, Cusabio biotech co.에서 구매)을 PBS에 녹여 C57BL/6J 수컷 20개월령 노화 마우스에 0.1 mg/kg의 용량으로 1일 1회 14일 동안 복강 투여하였다. 노화 마우스 및 어린 마우스(6주령)에 같은 양의 PBS를 투여하여 대조군으로 비교하였다.
- [103]
- [104] **1. 노화 마우스에서 HAPLN1 투여로 인한 콜라겐 증가 확인**
- [105] 투여 종료 후, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 각 실험군에서 피부 조직을 취해서 진피층을 분리하여 RNA를 추출 후 프로콜라겐 타입 I(proCOL1A1 및 proCOLIA2) 및 타입 III(proCOL3A1)를 qRT-PCR 방법으로 정량하였다.
- [106] 그 결과, 도 7 중 A와 같이, HAPLN1 투여군에서 proCOL1A1, proCOLIA2 및 proCOL3A1의 mRNA 수준이 비투여군 대비 각 2.6배, 2.5배, 2.8배 증가하여 어린 마우스와 비슷한 수준으로 회복하였음을 확인하였다. 또한, 피부조직 절편을 상기 실시예 2 중 1과 동일한 방법으로 항-프로콜라겐 타입 I 항체로 염색하고 공초점 현미경으로 관찰한 결과 도 7 중 B와 같이, HAPLN1 투여군에서 프로콜라겐 타입 I 분포 수준이 비투여군에 비해 어린 마우스와 비슷한 수준으로 증가하였음을 확인하였다.
- [107]
- [108] **2. 노화 마우스에서 HAPLN1 투여로 인한 히알루론산 증가 확인**
- [109] 투여 종료 후, 상기 실시예 2 중 2와 같은 방법으로 각 실험군의 목 경부 피부조직을 취해 PBS 용액에서 균질화한 후, 히알루론산 ELISA 키트(hyaluronic acid ELISA kit, CUSABIO)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 히알루론산을 정량하였다.

- [110] 그 결과, 도 8 중 A와 같이, HAPLN1 투여군에서 히알루론산 수준이 비투여군 대비 1.5배 증가하여 어린 마우스와 비슷한 수준으로 회복하였음을 확인하였다.
- [111] 또한, 피부조직 절편을 상기 실시예 2 중 2와 동일한 방법으로 히알루론산을 면역형광염색하고 공초점 현미경으로 관찰한 결과 도 8 중 B와 같이, HAPLN1 투여군에서 히알루론산 분포 수준이 비투여군에 비해 어린 마우스와 비슷한 수준으로 증가하였음을 확인하였다.
- [112]
- [113] <실시예 4> HAPLN1 처리로 인한 TGF- $\beta$ 1 수용체 II, TGF- $\beta$ 1 유도 콜라겐 생성 및 히알루론산 합성 효소(HAS2) 증가 확인
- [114] 1. NHDF 세포에서 HAPLN1 처리로 인한 TGF- $\beta$ 1 유도 콜라겐 생성 증가 확인
- [115] NHDF(normal human dermal fibroblasts, 정상 사람 피부 섬유아세포) 세포주에서 HAPLN1이 TGF- $\beta$ 1 유도 proCOL1 $\alpha$ 2 생성에 영향을 주는지를 확인하기 위해 웨스턴 블랏법을 이용하여 측정하였다. TGF- $\beta$ 는 콜라겐 생성을 유도하는 인자로서, NHDF 세포주에 각 농도별(0, 25, 50, 100 ng/ml) 재조합 인간 HAPLN1(rhHAPLN1)을 처리하고 30분 후, 1 ng/ml 재조합 인간 TGF- $\beta$ 1을 24시간 동안 처리하였다.
- [116] 그 결과, 도 9와 같이, TGF- $\beta$ 1 유도 proCOL1 $\alpha$ 2 생성이 HAPLN1 처리에 따라 증가하는 것을 확인하였다.
- [117]
- [118] 2. NHDF 세포에서 HAPLN1 처리로 인한 TGF- $\beta$  수용체 II 증가 확인
- [119] HAPLN1이 TGF- $\beta$ 의 신호전달에 관여하는지를 확인하기 위해, NHDF 세포주에 각 농도별(0, 25, 50, 100 ng/ml) 재조합 인간 HAPLN1(rhHAPLN1)을 처리하고 24시간 후, TGF- $\beta$  수용체의 단백질 발현량을 웨스턴 블랏법을 이용하여 측정하였다.
- [120] 그 결과, 도 10 중 A와 같이, 두 가지 수용체 중에 TGF- $\beta$  수용체 II의 단백질 발현량이 HAPLN1 처리에 따라 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 같은 실험 조건에서 TGF- $\beta$  수용체의 mRNA 발현량을 qRT-PCR을 통하여 확인한 결과, 도 10 중 B 및 C와 같이 HAPLN1 처리에 따른 변화가 없는 것을 확인하였다.
- [121] 따라서, HAPLN1이 전사적 조절이 아닌 안정성 조절을 통해 TGF- $\beta$  수용체 II의 양을 증가시켰는지를 확인하기 위해, 단백질 합성 억제제인 사이클로헥사마이드(cycloheximide)를 10  $\mu$ M의 농도로 1시간 동안 선처리하고, 100 ng/ml rhHAPLN1을 6시간 또는 24시간 동안 처리한 후, TGF- $\beta$  수용체 II의 단백질 발현 정도를 웨스턴 블랏법을 이용하여 확인하였다.
- [122] 그 결과, 도 11과 같이, 사이클로헥사마이드 존재 하에서도 rhHAPLN1 처리가 TGF- $\beta$  수용체 II의 양을 증가시키는 것을 확인하였다. 따라서, HAPLN1은 TGF- $\beta$  수용체 II의 안정성을 증가시킨다고 볼 수 있다.
- [123]

- [124]     **3. NHDF 세포에서 HAPLN1 처리로 인한 TGF- $\beta$ 1 유도 히알루론산 생성효소(HAS2) 발현 증가 확인**
- [125]     진피 섬유아세포에서는 히알루론산 생성효소 3가지(HAS1, HAS2 및 HAS3) 중 주로 HAS2가 존재하고 있다. NHDF 세포주에서 HAPLN1이 TGF- $\beta$ 1 유도 HAS2 발현에 영향을 주는지를 확인하기 위해, NHDF 세포주에 각 농도 별로(0, 25, 50, 100 ng/mL) 제조합 인간 HAPLN1(rhHAPLN1)을 처리하고 30분 후, 1 ng/mL의 제조합 인간 TGF- $\beta$ 1을 24시간 동안 처리한 뒤, 웨스턴 블랏법을 이용하여 HAS2의 단백질 발현량을 확인하였다.
- [126]     그 결과, 도 12와 같이, TGF- $\beta$ 1 유도 HAS2 발현이 HAPLN1 처리에 따라 증가하는 것을 확인하였다.
- [127]
- [128]     이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.