(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0119463
(43) 공개일자 2019년10월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61K 8/49 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5044 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0042941
(22) 출원일자 2018년04월12일
심사청구일자 2018년04월12일

(71) 출원인
(주)아모레퍼시픽
서울특별시 용산구 한강대로 100(한강로2가)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
최현정
경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원
김형준
경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영철, 임희택, 김 순 영

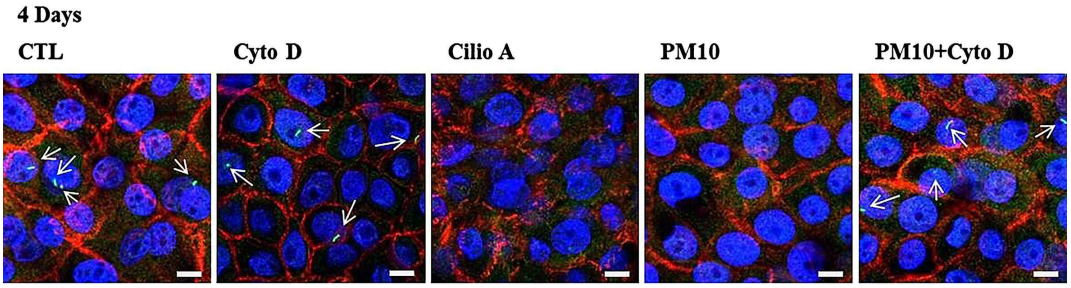
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포의 분화 억제를 회복할 수 있는 물질의 스크리닝 방법 및 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포 분화 억제의 회복용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 피부각질 형성 세포의 일차 섬모(primary cilia)의 상대적 형성 정도를 확인하는 단계를 포함하는 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포의 분화 억제를 회복할 수 있는 물질의 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 본 발명의 일 측면을 통하여 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포의 분화 억제를 회복할 수 있는 물질의 효과적인 스크리닝 및 발굴이 가능하며, 이를 통해 미세먼지에 의한 피부 건강 관련 사업의 발달을 도모할 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61K 8/492 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
G01N 33/5076 (2013.01)
G01N 33/6881 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)
G01N 2333/4742 (2013.01)

(72) 발명자
이태룡
경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽 기술연구원
조동형
경기도 용인시 기흥구 한보라2로 167, 903동 1403호
조두신
경기도 수원시 영통구 매영로 400, 205호

명 세 서

청구범위

청구항 1

피부각질 형성 세포(keratinocyte)에 시험 물질을 처리하는 단계;

상기 시험 물질을 처리한 피부각질 형성 세포에서, 시험 물질 처리 전과 후의 일차 섬모(primary cilia)의 상대적 형성 정도를 확인하는 단계; 및

상기 시험 물질 처리 후의 일차 섬모의 상대적 형성 정도가 처리 전에 비하여 클 경우 상기 시험 물질을 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포 분화 억제의 회복용 물질로 판단하는 단계를 포함하는, 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포의 분화 억제를 회복할 수 있는 물질의 스크리닝 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 일차 섬모의 상대적 형성 정도는, 일차 섬모가 발현된 피부각질 형성 세포의 수의 비교 및 일차 섬모의 길이의 비교 중 하나 이상을 통하여 판정하는 것인, 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포의 분화 억제를 회복할 수 있는 물질의 스크리닝 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 일차 섬모의 상대적 형성 정도는, 인볼루크린(involucrin), 로리크린(loricrin), 필라그린(filaggrin) 및 케라틴(keratin) 중 선택되는 적어도 어느 하나 이상의 발현 정도로 확인하는 것인, 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포의 분화 억제를 회복할 수 있는 물질의 스크리닝 방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 케라틴은, 케라틴 1(keratin 1) 및 케라틴 10(keratin 10) 중 선택되는 적어도 어느 하나 이상을 포함하는, 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포의 분화 억제를 회복할 수 있는 물질의 스크리닝 방법.

청구항 5

사이토칼라신 D(cytochalasin D)를 유효성분으로 포함하는, 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포 분화 억제의 회복용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 사이토칼라신 D는, 일차 섬모(primary cilia)가 발현된 피부각질 형성 세포의 수 또는 상기 일차 섬모의 길이를 증가시키는, 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포 분화 억제의 회복용 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 사이토칼라신 D는, 인볼루크린(involucrin), 로리크린(loricrin), 필라그린(filaggrin) 및 케라틴(keratin) 중 선택되는 적어도 어느 하나 이상의 발현을 증진시키는 것인, 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포 분화 억제의 회복용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 케라틴은, 케라틴 1(keratin 1) 및 케라틴 10(keratin 10) 중 선택되는 적어도 어느 하나 이상을 포함하는, 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포 분화 억제의 회복용 조성물.

청구항 9

제5항에 있어서,

상기 조성물은, 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포의 분화 억제의 회복에 의한 피부 보습용 또는 피부장벽기능 강화용 조성물인, 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포 분화 억제의 회복용 조성물.

청구항 10

제5항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 조성물은, 화장료 조성물 또는 건강식품 조성물인, 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포 분화 억제의 회복용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포의 분화 억제를 회복할 수 있는 물질의 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 구체적으로 세포의 소기관인 일차 섬모의 길이와 수를 조절하여 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포의 분화 억제를 회복할 수 있는 물질을 스크리닝 하는 방법 및 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포 분화 억제의 회복용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 피부는 외부로부터 개체를 보호하는 장벽기능이라는 매우 중요한 역할을 수행한다. 장벽기능은 외부로부터의 다양한 자극(화학물질, 대기오염물질, 건조한 환경, 자외선 등)에 대한 방어와 피부를 통한 체내 수분의 과도한 발산을 막는 보호 기능이며, 이러한 보호 기능은 각질형성세포로 구성된 각질층이 정상적으로 형성되어 있을 경우에만 그 기능을 유지할 수 있다.

[0003] 표피 중에서도 가장 바깥쪽에 존재하는 각질층(Stratum corneum, horney layer)은 각질형성세포로부터 형성되며, 분화가 완결된 각질세포와 그를 둘러싼 지질층으로 구성되어 있다(Marcelo C. L. et al., J. Invest. Dermatol., 80, pp37-44, 1983).

[0004] 각질세포는 표피 최하층에서 지속적으로 증식(proliferation)하는 기저세포(basal cell)가 단계적으로 형태 및 기능상의 변화를 거치며, 피부 표면까지 상승한 특징적인 세포이며, 일정 기간이 경과하면 오래된 각질세포는 피부에서 탈락되고 새로운 각질세포가 그 기능을 대신하게 되는데, 이러한 반복적인 일련의 변화 과정을 "표피세포의 분화(differentiation)" 또는 "각화(ekratinization)"라고 부른다.

[0005] 또한 분화 과정 중에 각질형성세포(keratinocytes)는 천연보습인자(Natural moisturizing factor; NMF)와 세포간 지방질(세라마이드, 콜레스테롤, 지방산)을 생성하면서 각질층을 형성하여 각질층이 견고함과 유연성을 가지게 하여 피부 장벽(skin barrier)으로서의 기능을 보유하게 한다.

[0006] 이러한 각질층은 과도한 세안이나, 목욕 등의 생활 습관적 요소나, 아토피성 피부나 노인성 피부 같은 내인성 질환 등으로 인해 쉽게 그 기능이 손실될 수 있다.

[0007] 한편, 미세먼지는 눈에 보이지 않을 만큼 미세한 입자의 먼지로, 지름 10㎛ 이하의 먼지를 말하며 입자 크기에 따라 각각 지름 10㎛ 이하, 2.5㎛ 이하, 1.0㎛ 이하인 PM10(미세먼지), PM2.5(초미세먼지), PM1.0(극초미세먼지)로 구분한다. 여기서 PM(particulate matter)이란 '입자상 물질(대기 중에 떠다니는 고체 또는 액체 상태의 미세 입자)'이라는 뜻이다.

[0008] 유해물질인 미세먼지는 호흡기와 폐 질환을 비롯하여 피부 및 안구 질환 등의 원인이 되며 일반 먼지와 달리 코, 구강, 기관지에서 걸러지지 않고 신체에 축적된다. 특히, 현대에 들어서 이러한 미세먼지에 의한 피부 장벽 기능 손상에 따른 피부 건조 증상이 점점 증가하고 있는 추세이다.

[0009] 한편, 사이토칼라신 D는 사이토칼라신으로 알려진 마이코톡신의 한 종류로 알려져 있으며, 미세먼지로 인한 피부장벽기능 손상과 사이토칼라신 D와의 관련성에 대해서는 아직 알려진 바가 없다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) EZRATTY, E. J. et al., A Role for the Primary Cilium in Notch Signaling and Epidermal Differentiation duringSkin Development (Cell, 2011.04.24, 145, pp. 1129-1141)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 피부각질 형성 세포의 일차 섬모(primary cilia)의 수와 길이의 조절을 통해 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포의 분화 억제를 회복할 수 있는 물질을 효과적으로 스크리닝하는 새로운 방법 및 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포 분화 억제의 회복용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 실시예는 피부각질 형성 세포(keratinocyte)에 시험 물질을 처리하는 단계;

[0013] 상기 시험 물질을 처리한 피부각질 형성 세포에서, 시험 물질 처리 전과 후의 일차 섬모(primary cilia)의 상대적 형성 정도를 확인하는 단계; 및

[0014] 상기 시험 물질 처리 후의 일차 섬모의 상대적 형성 정도가 처리 전에 비하여 클 경우 상기 시험 물질을 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포 분화 억제의 회복용 물질로 판단하는 단계를 포함하는, 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포의 분화 억제를 회복할 수 있는 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0015] 본 발명의 다른 실시예는 사이토칼라신 D(cytochalasin D)를 유효성분으로 포함하는, 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포 분화 억제의 회복용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 의한 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포의 분화 억제를 회복할 수 있는 물질의 스크리닝 방법은 피부각질 형성 세포 내 일차 섬모(primary cilia)의 상대적 형성 정도를 확인하는 단계를 포함함으로써 보다 효과적으로 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포의 분화 억제를 회복할 수 있는 물질을 스크리닝할 수 있도록 하고, 기존의 방법으로 발견하지 못했던 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포의 분화 억제를 회복할 수 있는 물질의 확인이 가능하게 하므로, 관련 분야의 산업발전에 크게 기여할 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명에 의한 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포 분화 억제의 회복용 조성물은 피부각질 형성 세포에서 미세먼지에 의한 일차 섬모의 생성 억제를 회복시키고 그 결과 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포의 분화 억제를 효과적으로 회복할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 인간 정상 피부각질 형성 세포가 분화됨에 따라 일차 섬모(primary cilia)의 길이와 수가 증가함을 공초점 현미경으로 관찰한 것이다(스케일바는 10㎛).

도 2는 인간 정상 피부각질 형성 세포에 미세먼지(PM10) 및/또는 사이토칼라신 D를 처리할 경우 일차 섬모의 길이와 수의 변화를 공초점 현미경으로 관찰한 것이다(스케일바는 10㎛).

도 3a는 인간 정상 피부각질 형성 세포에 미세먼지(PM10) 및/또는 사이토칼라신 D를 처리할 경우 인볼루크린(involucrin)의 발현 변화를 RT-PCR을 통해 확인한 것이다.

도 3b는 인간 정상 피부각질 형성 세포에 미세먼지(PM10) 및/또는 사이토칼라신 D를 처리할 경우 로리크린

(loricrin)의 발현 변화를 RT-PCR을 통해 확인한 것이다.

도 3c는 인간 정상 피부각질 형성 세포에 미세먼지(PM10) 및/또는 사이토칼라신 D를 처리할 경우 필라그린(filaggrin)의 발현 변화를 RT-PCR을 통해 확인한 것이다.

도 3d는 인간 정상 피부각질 형성 세포에 미세먼지(PM10) 및/또는 사이토칼라신 D를 처리할 경우 케라틴 1(keratin 1)의 발현 변화를 RT-PCR을 통해 확인한 것이다.

도 3e는 인간 정상 피부각질 형성 세포에 미세먼지(PM10) 및/또는 사이토칼라신 D를 처리할 경우 케라틴 10(keratin 10)의 발현 변화를 RT-PCR을 통해 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0020] 본 명세서에서 "미세먼지"는 눈에 보이지 않을 만큼 미세한 입자의 먼지로서, 지름 10㎛ 이하의 먼지를 말하며 입자 크기에 따라 각각 지름 10㎛ 이하, 2.5㎛ 이하, 1.0㎛ 이하인 PM10(미세먼지), PM2.5(초미세먼지), PM1.0(극초미세먼지)로 구분하고, 이들 모두를 포함하는 광의의 개념이다. 여기서 PM(particulate matter)이란 '입자상 물질(대기 중에 떠다니는 고체 또는 액체 상태의 미세 입자)'이라는 뜻이다.

[0021] 본 명세서에서 "피부" 라 함은, 동물의 체표를 덮는 조직을 의미하는 것으로서, 얼굴 또는 바디 등의 체표를 덮는 조직뿐만 아니라, 두피와 모발을 포함하는 최광의의 개념이다. 한편, 본 명세서에서 피부는, 생체 피부뿐만 아니라, 생체 피부의 상태를 구현한 인공 피부 또는 피부 모사체를 포함할 수 있다.

[0022] 본 명세서에서, "피부 세포 분화"는, 각질 형성 세포(keratinocyte)가 피부 최하층인 기저층에서부터 기능적으로 분화하여 점차 유극층, 과립층, 각질층을 형성하는 과정을 의미할 수 있다.

[0023] 본 명세서에서 "일차 섬모"는, primary cilium(복수일 경우 primary cilia)라고도 하며, 세포체에서 돌출된 소기관으로서, 화학적 자극, 물리적 자극, 빛, 삼투압, 유체 흐름, 및 중력 신호 등을 포함하는 다양한 외부자극을 감지하는 세포 소기관을 말한다.

[0024] 본 명세서에서 "상대적 형성 정도"는, 어떠한 조건에 처하거나 처하지 않은 세포에서의 일차 섬모(primary cilia)의 형성 또는 발현 정도를 비교하였을 때, 형성 또는 발현의 여부, 수, 양, 질(quality)의 차이를 나타내는 정도일 수 있다. 또한, 상기 형성 정도는, 예컨대, 일차 섬모를 형성 또는 발현하는 세포의 수나 양, 또는 일차 섬모의 길이를 포함할 수 있다.

[0025] 본 명세서에서 "사이토칼라신 D"는 cytochalasin D 또는 cyto D로 표현될 수 있다.

[0026] 본 발명은, 일 측면에서, 피부각질 형성 세포(keratinocyte)에 시험 물질을 처리하는 단계; 상기 시험 물질을 처리한 피부각질 형성 세포에서, 시험 물질 처리 전과 후의 일차 섬모(primary cilia)의 상대적 형성 정도를 확인하는 단계; 및 상기 시험 물질 처리 후의 일차 섬모의 상대적 형성 정도가 처리 전에 비하여 클 경우 상기 시험 물질을 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포 분화 억제의 회복용 물질로 판단하는 단계를 포함하는, 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포의 분화 억제를 회복할 수 있는 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0027] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 일차 섬모의 상대적 형성 정도는 일차 섬모가 발현된 피부각질 형성 세포의 수의 비교 및 일차 섬모의 길이의 비교 중 하나 이상을 통하여 판정하는 것일 수 있다.

[0028] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 일차 섬모의 상대적 형성 정도는 인볼루크린(involucrin), 로리크린(loricrin), 필라그린(filaggrin) 및 케라틴(keratin) 중 선택되는 적어도 어느 하나 이상의 발현 정도로 확인하는 것일 수 있다. 예컨대, 인볼루크린, 로리크린, 필라그린 또는 케라틴이 발현된 피부각질 형성 세포의 수를 비교하거나, 한 세포 내에 발현된 인볼루크린, 로리크린, 필라그린 또는 케라틴의 양을 비교하여 판정하는 것일 수 있고, 상기 시험 물질 처리 후의 인볼루크린, 로리크린, 필라그린 또는 케라틴이 발현된 피부각질 형성 세포의 수나 한 세포 내에 발현된 인볼루크린, 로리크린, 필라그린 또는 케라틴의 양이 시험 물질 처리 전보다 적을 경우, 형성된 일차 섬모의 발현 양 또는 그 길이가 증가된 것으로 볼 수 있고 상기 시험 물질을 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포 분화 억제의 회복용 물질로 판정할 수 있다.

[0029] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 케라틴은, 케라틴 1(keratin 1) 및 케라틴 10(keratin 10) 중 선택되는 적어도 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0030] 한편, 상기 일차 섬모의 상대적 형성 정도를 측정하는 방법은, 공지의 기술, 예컨대, 면역 형광 분석, 웨스턴

블롯(western blot), 닷 블록(dot blot), 효소면역분석(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA), 노던 블롯(northern blot), PCR, RT-qPCR, GC-MS, LC-MS, NMR 등 당업자가 적절히 선택할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명은, 다른 측면에서, 사이토칼라신 D(cytochalasin D)를 유효성분으로 포함하는, 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포의 분화 억제 회복용 조성물을 제공한다.

[0032] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 사이토칼라신 D는, 일차 섬모(primary cilia)가 발현된 피부각질 형성 세포의 수 또는 상기 일차 섬모의 길이를 증가시킬 수 있다.

[0033] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 사이토칼라신 D는, 인볼루크린, 로리크린, 필라그린 및 케라틴 중 선택되는 적어도 어느 하나 이상의 발현을 증진시킬 수 있으며, 상기 케라틴은, 케라틴 1 및 케라틴 10 중 선택되는 적어도 어느 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0034] 즉, 상기 사이토칼라신 D는 피부각질 형성 세포의 일차 섬모의 발현을 증가시킴으로써, 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포의 분화 억제를 회복시키는 것일 수 있다.

[0035] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 조성물은, 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포 분화 억제의 회복에 의한 피부 보습용 또는 피부장벽기능 강화용 조성물일 수 있다. 피부 세포 분화가 잘 이루어지지 않으면 피부 각질층이 정상적인 기능을 할 수 없으므로, 피부의 수분 보유력이 떨어지고, 피부장벽기능이 저하된다. 따라서 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포 분화 억제를 회복시키는 물질은 미세먼지에 대하여 피부 보습 및 피부장벽기능 강화 효과를 나타낼 수 있다.

[0036] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 사이토칼라신 D의 함량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 당업자가 용이하게 선정 가능하며, 예컨대, 조성물 총 중량 대비 0.0001 내지 30중량%일 수 있다. 또한, 상기 함량은 상기 조성물 총 중량 대비 0.0001 중량% 이상, 0.0005 중량% 이상, 0.001 중량% 이상, 0.005 중량% 이상, 0.01 중량% 이상, 0.05 중량% 이상, 0.1 중량% 이상, 0.3 중량% 이상, 0.5 중량% 이상, 0.8 중량% 이상, 1 중량% 이상, 3 중량% 이상, 5 중량% 이상, 8 중량% 이상, 10 중량% 이상, 12 중량% 이상, 15 중량% 이상, 또는 18 중량% 이상일 수 있다. 또한, 상기 함량은 상기 조성물 총 중량 대비 30 중량% 이하, 28 중량% 이하, 25 중량% 이하, 22 중량% 이하, 20 중량% 이하, 18 중량% 이하, 15 중량% 이하, 12 중량% 이하, 10 중량% 이하, 8 중량% 이하, 5 중량% 이하, 3 중량% 이하, 1 중량% 이하, 0.8 중량% 이하, 0.5 중량% 이하, 0.3 중량% 이하, 0.1 중량% 이하, 0.05 중량% 이하, 0.01 중량% 이하, 0.005 중량% 이하, 0.001 중량% 이하, 또는 0.0005 중량% 이하일 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 조성물은 화장료 조성물일 수 있다.

[0038] 상기 화장료 조성물은, 국소 적용에 적합한 모든 제형으로 제공될 수 있다. 예를 들면, 용액, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀젼, 유상에 수상을 분산시켜 얻은 에멀젼, 현탁액, 크림, 고체, 겔, 분말, 페이스트, 포말(foam) 또는 에어로졸 조성물의 제형으로 제공될 수 있다. 이러한 제형의 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0039] 상기 화장료 조성물은 상기한 물질 이외에 주 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서, 바람직하게는 주 효과에 상승 효과를 줄 수 있는 다른 성분들을 함유할 수 있다. 상기 화장료 조성물은 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당 및 스핑고 지질로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함할 수 있다. 또한 상기 화장료 조성물은 보습제, 에몰리언트제, 계면 활성제, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, pH 조정제, 유기 및 무기 안료, 향료, 냉감제 또는 제한(制汗)제를 포함할 수 있다. 상기 성분의 배합량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 당업자가 용이하게 선정 가능하며, 그 배합량은 조성물 전체 중량을 기준으로0.01~5 중량%, 구체적으로 0.01~3 중량%일 수 있다.

[0040] 본 발명의 일 실시상태에 있어서, 상기 조성물은 건강식품 조성물일 수 있다.

[0041] 상기 건강식품은, 일상 식사에서 결핍되기 쉬운 영양소나 인체에 유용한 기능을 가진 원료나 성분(기능성원료)을 사용하여 제조한 것으로, 인체의 정상적인 기능을 유지하거나 생리기능 활성화를 통하여 건강을 유지하고 개선하는 식품을 의미할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 건강식품은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조, 가공될 수 있으나 이에 한정되지 않으며, 법률에 따라 어떤 형태로든지 제조, 가공될 수 있다.

[0042] 각 제형의 건강식품 조성물은 유효성분 이외에 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목

적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승 효과가 일어날 수 있다.

[0043] 본 명세서에 개시된 유효성분 외에 함유할 수 있는 액체 성분에는 특별한 제한점이 없으며, 통상의 음료와 같이 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가성분으로 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 포도당, 과당 등의 디사카라이드, 말토스, 슈크로스 등의 폴리사카라이드, 덱스트린, 시클로덱스트린 등의 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당 알코올 등이 있다. 상기의 향미제로는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(예를 들어 사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 명세서에 개시된 조성물 100ml 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 일측면에서 약 5 내지 12g일 수 있다.

[0044] 상기 식품 조성물은 일 측면에서 여러가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그 염, 알긴산 및 그 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 다른 측면에서 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 상기 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 사용될 수 있다. 상기 첨가제의 비율은 다양할 수 있으나, 본 명세서에 개시된 조성물 100 중량부당 0.001 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0045] 이하, 본 발명의 내용을 실시예 및 시험예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 이러한 실시예 및 시험예는 본 발명의 내용을 이해하기 위해 제시되는 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 이러한 실시예 및 시험예로 한정되는 것은 아니고, 당업계에서 통상적으로 주지된 변형, 치환 및 삽입 등을 수행할 수 있으며, 이에 대한 것도 본 발명의 범위에 포함된다.

[0046] [실시예 1]

[0047] 인간 표피 정상 각질 형성 세포 준비

[0048] 신생아의 인간 표피 정상 각질 형성 세포(Neonatal Normal HumanEpidermal Keratinocytes, NHEK-Neo)를 LONZA 社로부터 입수하고, 소뇌하수체 추출물(bovine pituitary extract, BPE), 인슐린, 인간 표피성장인자, 젠타마이신/암포테리신 B(gentamicine/amphotericin B), 에피네프린(epinephrine), 트랜스페린(transferrin), 히드로코르티손(hydrocortisone)을 포함하는 보충물을 첨가한 KGM-Gold 배지(LONZA 社)를 사용하여 LONZA 社의 지침서에 따라 36℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 시험물질 처리 시에는 상기 보충물을 첨가하지 않은 KGM-Gold 배지에 처리하였다.

[0049] 공초점 레이저 현미경(confocal microscopy)을 이용한 면역 형광 분석

[0050] 상기 인간 표피 정상 각질 형성 세포를 Lab-TexTM 2 well 유리 챔버 슬라이드(Tnermo Scienticific 社, Waltham, MA, USA)에 well 당 세포수를 $0.5X10^5$으로 옮긴 후, 세포가 90-100% 정도로 자란 시점을 0 day로 하고, 이때부터 시험 물질 cytochalasin D 0.2μM, ciliobrevin A1 5 μM, 미세먼지 PM10 100㎍/ml을 각각 배지에 포함하여 2일, 4일, 6일 동안 키운 후, 세포를 고정하고 일차 섬모를 염색하였다. 대조군(control)은 시험물질을 녹인 DMSO를 사용하였다. cytochalasin D 및 cilibrevin A1은 sigma 社에서 구입하였으며, 미세먼지 PM10(ERM-CZ100, Sample No:0504)는 ERM(European Reference Materials) 社에서 구입하였다. 일차 섬모 염색은 구체적으로, 1% (v/v) BSA 및 0.1% (v/v) triton™ X-100 (PBS-T)을 함유하는 PBS로 희석한 항 ARL13B 항체(1/500 희석, Proteintech 社, green으로 염색) 및 항 E-cadherin 항체(1/1000 희석, Invitrogen 社, red로 염색)와 함께 4℃에서 하룻밤 동안 배양하였다. 그 후 Invitorgen 社의 Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG와 Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG를 상기 PBS를 사용하여 1/1000으로 희석한 것을 2차 항체로 사용하여 상온에서 2시간 동안 배양시켰고, 핵은 2㎍/ml의 DAPI(blue)로 10분 동안 염색하였다. 공초점 레이저 현미경은 LSM510(Carl Zeiss Microimaging Inc., Thornwood, NY)을 사용하였다.

[0051] Q-RT-PCR (Quantitative real-time reverse transcriptional polymerase chain reaction) 분석

[0052] 모든 RNA는 Trizol쪠 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하여 제조사의 지시에 따라 분리하였다. RNA의 농도를 분광광도계로 측정하고 RNA의 무결성(integrity)을 Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하여 평가하였다. 2㎍의 RNA를 SuperScript®III 역전사 효소(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 cDNA로 역전사 시키고 분취액을 -20℃에 보관하였다. 각 cDNA 샘플에서 각질 형성 세포분화와 관련된 마커들의 정량 측정은 Assays-on-DemandTM 유전자 발현 키트(Applied Biosystems, Foster City,

CA, USA)를 사용하여 수행되었다. cDNA 샘플을 합성하고, 인볼루크린(involucrin), 로리크린(loricrin), 필라그린(filaggrin), 케라틴 1(keratin 1) 및 케라틴 10(keratin 10)에 대해 각각의 프라이머를 이용하여 mRNA양의 변화를 분석하였다. 또한, mRNA 발현 수준을 평균화하기 위하여, RPL13A 프라이머를 이용하여 RPL13A의 상대 발현을 분석하였다. 선택된 타겟 유전자의 발현 수준을 결정하기 위하여 Q-RT-PCR(Quantitative real-time TaqMan RT-PCR technology) (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 기술을 사용하였다. 사이클링 조건은 95℃에서 10분 동안의 변성 단계 및 95℃에서 15초 및 60℃에서 1분 동안의 50사이클을 포함한다. 각 PCR 사이클의 FAM 형광은 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)으로 측정되었다. Q-RT-PCR 데이터의 결과는 임계 사이클(threshold cycle, Ct) 값으로 표시하였다. 프라이머는 ThermoFisher Scientific 社에서 입수한 제품으로 각각 다음과 같다: 인볼루크린(제품번호: Hs00846307_s1), 로리크린(제품번호: Hs01894962_s1), 필라그린(제품번호: Hs00856927_g1), 케라틴 1(제품번호: Hs00196158_m1), 케라틴 10(제품번호: Hs00166289_m1), RPL13A(제품번호: Hs04194366_g1).

[0053] 통계 분석

[0054] 각 데이터는 적어도 3회의 독립적인 실험을 거쳐서 얻었고, 평균±SE(표준오차)로 나타내었다. 결과의 통계적 평가는 일원분산분석(1-way ANOVA)를 이용하여 수행하였다(* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

[0055] [실험예 1] 일차 섬모(primary cilia) 형성에 의한 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포 분화 억제의 회복

[0056] 일차 섬모는 양극화된 구조를 가진 세포내 기관인데, 섬모의 결합(섬모 형성) 및 분해가 세포주기, 극성, 척추 발달, 및 유전적 질환 등 다양한 원인에 의해 상호연결 되어있다. 상기 실시예 1의 면역 형광 분석을 통하여 인간 정상 피부각질 형성 세포가 분화됨에 따라 일차 섬모(화살표로 표시)의 길이와 수가 증가함을 확인하였다(도 1).

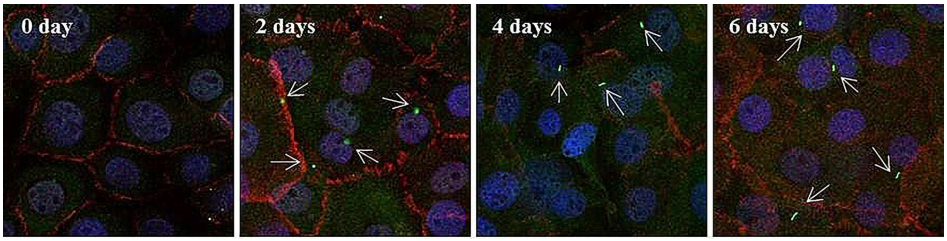
[0057] 이에 미세먼지가 피부각질 형성 세포의 일차 섬모에 미치는 영향을 확인하기 위하여 피부각질 형성 세포에 미세먼지(PM10)를 처리하고 4일 뒤 관찰한 결과, 일차 섬모의 생성을 억제하는 물질로 알려진 ciliobrevin A1을 처리한 경우와 같이 일차 섬모가 생성되지 않음을 확인할 수 있었으며, 이때 cytochalasin D를 미세먼지와 함께 처리할 경우, 일차 섬모의 생성 억제가 다시 회복되어 cytochalasin D만 처리한 경우나, 아무것도 처리하지 않은 대조군의 경우와 동등하거나 높은 수준으로 일차 섬모(화살표로 표시)의 수 또는 길이가 증가하는 것을 확인하였다(도 2).

[0058] 또한, 미세먼지를 피부각질 형성 세포에 처리할 경우, ciliobrevin A1을 처리한 경우와 동등하거나 더 심한 수준으로 피부각질 형성 세포의 분화 마커들인 인볼루크린(도 3a), 로리크린(도 3b), 필라그린(도 3c), 케라틴 1(도 3d) 및 케라틴 10(도 3e)의 발현량이 크게 감소하였으나, cytochalasin D를 미세먼지와 함께 처리할 경우, 각 피부각질 형성 세포의 분화 마커들의 발현 감소가 유의한 수준으로 다시 회복되는 것을 실시예 1의 Q-RT-PCR 분석으로 확인하였다(도 3a 내지 도 3e).

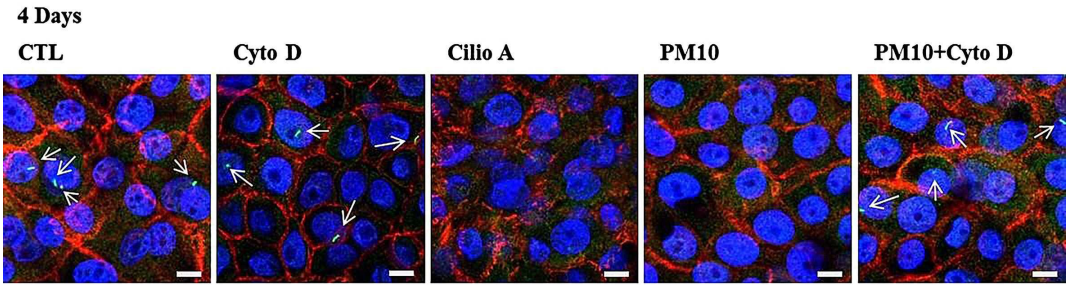
[0059] 종합하면, 미세먼지는 피부각질 형성 세포의 일차 섬모 및 분화 과정에 영향을 미친다는 것을 확인한 것이다. 즉, 미세먼지를 피부각질 형성 세포에 처리하였을 때, 피부각질 형성 세포의 분화 과정에 중요한 역할을 하는 일차 섬모(primary cilia)의 수와 길이가 감소하고, 분화 마커인 보습 인자들의 발현 또한 함께 감소함을 규명한 것이고, 이로부터, 미세먼지에 의하여 분화가 억제된 피부각질 형성 세포에 대하여 일차 섬모의 발현을 증가시키는 물질인 사이토칼라신 D의 처리를 통해 일차 섬모의 발현을 증가시킬 경우 피부각질 형성 세포의 분화 마커들의 발현이 증가하고 결과적으로 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포 분화의 억제가 회복됨을 확인한 것이다. 이러한 점을 활용하여, 미세먼지에 의한 피부각질 형성 세포 분화의 억제를 회복할 수 있는 물질을 스크리닝할 수 있다.

도면

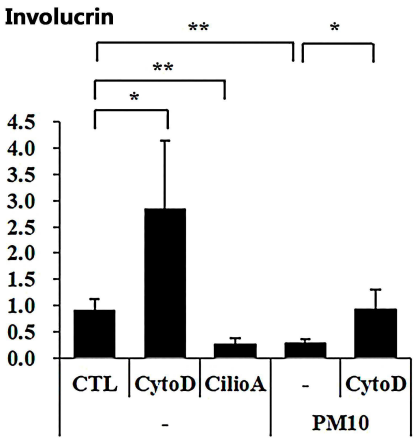
도면1



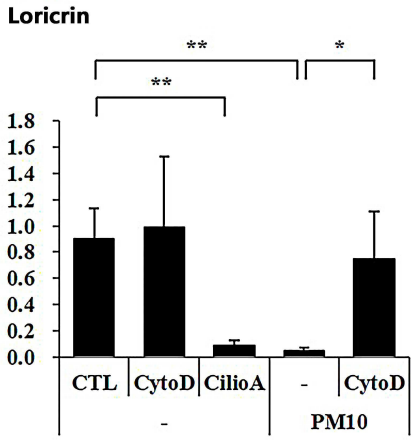
도면2



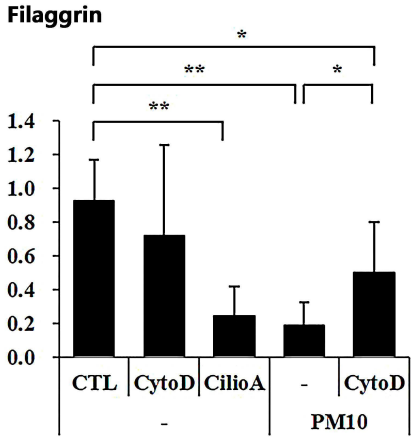
도면3a



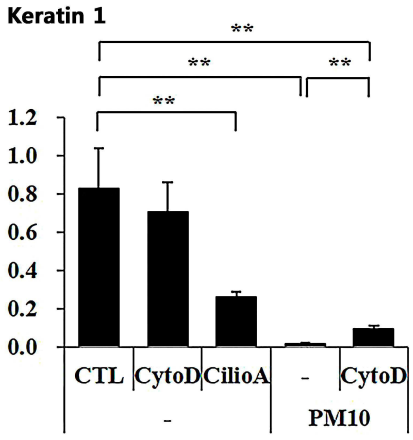
도면3b



도면3c



도면3d



도면3e

