(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0061935
(43) 공개일자 2021년05월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7072 (2006.01) *A61K 8/60* (2006.01)
A61P 17/10 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/7072 (2013.01)
A61K 8/602 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0143357
(22) 출원일자 2020년10월30일
심사청구일자 2020년10월30일
(30) 우선권주장
1020190149751 2019년11월20일 대한민국(KR)

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
최종원
경기도 용인시 수지구 신봉3로 25 신봉마을동일하이빌3단지 306동 1302호
김창덕
대전광역시 중구 계백로1716번길 40 문화마을아파트 101동 101호
유진귀
경기도 안산시 단원구 신촌3길 8
(74) 대리인
특허법인주원

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **지도부딘을 유효성분으로 포함하는 여드름 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 지도부딘을 포함하는 여드름 질환 치료 및 예방용 약학적 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 피지세포에서 지질합성 감소, 지질합성 관련 신호전달 시스템 억제, 지질 합성 관련 전자인자들의 발현 감소, 지질 합성 관여 효소들의 발현 감소 또는 미토파지(mitophagy)를 억제하여 미토콘드리아 생합성을 감소시켜, 피지의 분비를 조절할 수 있어, 여드름 질환 치료 및 예방용 약학적 조성물 또는 피지 감소 및 여드름 개선을 위한 화장료 조성물로 유용하게 활용 될 수 있다.

(52) CPC특허분류
A61P 17/10 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A61Q 19/008 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

지도부딘(Zidovudine)을 유효성분으로 포함하는 여드름 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 여드름 질환은 모낭의 과다 증식, 피지 과다 분비, 여드름 균 존재, 염증의 징후 또는 증상으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 여드름 질환은 피지 과다 분비로 유발되는 경우인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 지도부딘은 피지세포에서 지질합성 감소 또는 지질합성 관련 신호전달 시스템 억제를 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 지도부딘은 피지세포에서 지질 합성 관련 전자인자들의 발현 감소 또는 지질 합성 관여 효소들의 발현 감소를 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 지도부딘은 피지세포에서 미토파지(mitophagy)를 억제하여 미토콘드리아 생합성을 감소시키는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

제 4항에 있어서, 상기 지질합성 관련 신호 전달은 IGF-1R/mTOR, p-IGF-1R/mTOR, IGF-1R/p-mTOR으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 지질 합성 관련 전자인자들은 스테롤 조절인자 결합단백질-1 (sterol regulatory element-binding protein-1, SPEBP-1), 스테롤 조절인자 결합단백질-2 (sterol regulatory element-binding protein-2, SPEBP-2), 퍼옥시좀 증식체 활성화 수용체 감마(Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR-γ), p-SPEBP-1, p-SPEBP-2, n-SPEBP-2, n-SPEBP-1 으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 9

제 5항에 있어서, 상기 지질 합성 관여 효소는 FDFT-1, FASN, SCD, p21, ACC, FADS2으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 10

제 1항에 있어서, 상기 약학 조성물은 연고제, 산제, 정제, 캡슐제, 분말제, 용액제, 젤, 페이스트, 첩포제 및 과립제로 구성되는 군으로부터 선택되는 제형인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 11

지도부딘을 유효성분으로 포함하는 피지 감소 및 여드름 개선용 화장료 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 화장료는 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 파우더, 비누, 계면활성제 함유 클렌징, 오일 및 스프레이로 구성된 군으로부터 선택되는 제형을 갖는 화장료 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 지도부딘을 유효성분으로 포함하는 여드름 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물, 여드름 개선용 화장료 조성물 또는 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 여드름은 털피지샘의 만성 염증성 질환이다. 여드름의 병변학적인 원인은 모낭의 과다한 증식, 피지의 과다한 분비, 여드름 균의 존재와 염증 반응으로 알려져 있다.

[0003] 여드름은 하나의 원인이 아니라 여러 가지 원인이 복합적으로 관여하는데, 피지 분비의 증가가 여드름 발생의 주요 원인이라 알려져 있다.

[0004] 피지선(sebaceous gland)의 피지세포(sebocytes)에서 분비되는 피지는 피부 외부의 유해 물질의 침투를 막아주고 유수분을 조절하는 순기능을 한다. 그러나 사춘기 호르몬의 변화, 스트레스 등에 의해 피지(sebum)가 과잉으로 분비될 경우, 역기능을 초래하여 다양한 피부장애를 야기하게 된다. 피지 과다분비(seborrhea)는 피지의 과도한 분비를 특징으로 하는 피지선의 질환 또는 피부 트러블(skin troubles)로서, 피부 상에 번들거림(oily coating), 피딱지(crusts 혹은 scales) 등을 야기한다. 또한, 피지 과다분비는 지루성 습진(seborrheic eczema)으로도 칭해지는 지루성 피부염(seborrheic dermatitis)을 야기한다.

[0005] 한편, 피지의 생성은 피지선 세포의 증식과 분화에 영향을 미치는 인자들에 의하여 조절된다. 보고에 따르면, 남성호르몬, 여성호르몬, IGF-1(insulin-like growth factor), PPAR(peroxisome proliferator activated receptor) 등과 같은 인자들에 의해 피지의 생성이 조절된다 알려져 있다. 피지선 세포에 의해서 생성된 피지는 모낭관을 거쳐 피부 표면으로 분비되며, 과생성된 피지는 피부 표면에서 각질 세포간 지질의 구조를 변화시켜 피부 장벽 기능을 저하시키는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 이유로, 과생성된 피지의 적절한 제거와 과생성되는 피지의 억제는 피부 장벽 기능과 건강한 피부의 유지를 위하여 중요하다.

[0006] 이러한 피지 분비를 조절할 수 있는 몇몇 치료제가 존재한다. 그 중 이소트레티노인 (Isotretinoin)이라는 약물이 있지만, 탈모, 가려움증, 아토피피부염, 구순염, 피부 및 안구건조, ALT를 비롯한 간수치 상승 등의 부작용이 존재하기 때문에 피지 분비를 조절하는 새로운 약물 개발의 필요성이 대두되고 있다.

[0007] 상기 피지 분비를 조절하는 새로운 약물을 탐색 하던 중, AIDS 치료제로 시판되어지고 있는 약물이며, 뉴클레오시드 계열 역전사효소 저해제(Nucleoside reverse transcriptase inhibitor, NRTI)계열의 지도부딘(Zidovudine, 3'-아지도-3'-데옥시티미딘, 3'-azido-3'-deoxythymidine; AZT)의 여드름 질환의 피비 분비 조절 효능 또는 인간 피지 세포에서의 지질 양 감소 효과를 확인함으로서, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 지도부딘을 포함하는 여드름 질환 치료 및 예방용 약학적 조성물을 제공하는 것이다. 본 발명의 다른 목적은 지도부딘을 포함하는 피지 감소 및 여드름 개선을 위한 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 지도부딘(Zidovudine)을 포함하는 여드름 질환 치료 및 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 상기 여드름 질환은 모낭의 과다한 증식, 피지의 과다한 분비, 여드름 균 존재, 염증의 징후 또는 증상으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 가장 바람직하게는 피지의 과다한 분비가 유발되는 경우에 현저한 효과를 발휘한다.

[0012] 상기 지도부딘은 피지세포에서 지질합성 감소 또는 지질합성 관련 신호전달 시스템 억제를 할 수 있으며, 상기 지질합성 관련 신호 전달은 IGF-1R/mTOR, p-IGF-1R/mTOR, IGF-1R/p-mTOR으로 구성된 군으로부터 선택 될 수 있다.

[0013] 상기 지도부딘은 피지세포에서 지질 합성 관련 전자인자들의 발현 감소 또는 지질 합성 관여 효소들의 발현 감소를 할 수 있으며, 상기 지질 합성 관련 전자인자들은 스테롤 조절인자 결합단백질-1 (sterol regulatory element-binding protein-1, SPEBP-1), 스테롤 조절인자 결합단백질-2 (sterol regulatory element-binding protein-2, SPEBP-2), 퍼옥시좀 증식체 활성화 수용체 감마(Peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPAR-γ), p-SPEBP-1, p-SPEBP-2, n-SPEBP-2, n-SPEBP-1 으로 구성된 군으로부터 선택 될 수 있고, 또한 상기 지질 합성 관여 효소는 FDFT-1, FASN, SCD, p21, ACC, FADS2으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0014] 상기 지도부딘은 피지세포에서 미토파지 (mitophagy)를 억제하고 미토콘드리아 생합성을 감소시킬 수 있다.

[0015] 본 발명의 상기 약학 조성물은 연고제, 산제, 정제, 캡슐제, 분말제, 용액제, 젤, 페이스트, 첩포제 및 과립제로 구성되는 군으로부터 선택되는 제형인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0016] 본 발명의 약학 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 또한 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0017] 또한 본 발명은 지도부딘을 포함하는 피지 감소 및 여드름 개선을 위한 화장료 조성물을 제공한다.

[0018] 상기 화장료는 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 파우더, 비누, 계면활성제 함유 클렌징, 오일 및 스프레이로 구성된 군으로부터 선택될 수 있다.

[0019] 상기 화장료는 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함한다.

[0020] 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라가칸타, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0021] 본 발명의 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.

[0022] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 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.

[0023] 본 발명의 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, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라가칸타 등이 이용될 수 있다.

[0024] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0026] 본 발명에 따르면, 피지세포에서 지질합성 감소, 지질합성 관련 신호전달 시스템 억제, 지질 합성 관련 전자인자들의 발현 감소, 지질 합성 관여 효소들의 발현 감소 또는 미토파지(mitophagy)를 억제하고 미토콘드리아 생

합성을 감소시켜, 피지의 분비를 조절할 수 있는 지도부딘을 포함하는 여드름 질환 치료 및 예방용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0027] 또한 상기 지도부딘을 포함하는 피지 감소 및 여드름 개선을 위한 화장료 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 지도부딘이 IGF-1 처리된 사람 피지세포에서 세포내 지질 억제 결과를 나타낸 것이다. (A) 세포내 지질은 얇은층 크로마토그래피로 분석하였다. 세포내 지질은 IGF-1 처리 후 증가되었지만, 지도부딘은 IGF-1 처리된 사람 피지세포에서 세포내 지질을 감소시켰다. (B) 세포내 지질은 오일 레드 O 염색으로 염색되었다. IGF-1은 사람 피지세포에서 지질 액적의 수를 증가시켰고, 지도부딘 처리는 사람 피지세포에서 지질 액적의 수를 감소시켰다. CTL: control, 대조군; AZT: azidothymidine, 지도부딘. Scale bar = 20 μm.

도 2는 지도부딘이 IGF-1 처리된 사람 피지세포에서 지질 합성 억제 결과를 나타낸 것이다. (A) IGF-1 처리 12시간 후 피지세포에서 피지세포의 분화-관련 전사 인자의 분석. (B) IGF-1 처리 24시간 후 피지세포에서 지질합성-관련 효소의 분석. (C) IGF-1 처리 24시간 후 피지세포에서 지질합성-관련 mRNA 분석. *P<0.05, **P<0.01.

도 3은 지도부딘이 사람 피지세포에서 IGF-1으로 유도한 Akt/mTOR 신호 억제 결과를 나타낸 것이다. IGF-1은 인슐린-유사 성장인자 1 수용체(insulin-like growth factor 1 receptor, IGF-1R)와 하위 효과인자인 Akt 및 mTOR의 인산화를 증가시켰다. 반대로, 지도부딘은 IGF-1으로 유도한 IGF-1R, Akt 및 mTOR의 인산화를 감소시켰다.

도 4는 지도부딘이 사람 피지세포에서 IGF-1으로 유도한 미토콘드리아 생합성 및 미토파지(mitophagy) 억제 결과를 나타낸 것이다. (A) IGF-1은 사람 피지세포에서 PGC-1α 및 mtTFA의 수준을 증가시켰고, 이는 IGF-1이 미토콘드리아 생합성을 유도한다는 것을 나타내는 것이다. 반대로, 지도부딘은 IGF-1 처리한 피지세포에서 PGC-1α 및 mtTFA 수준을 감소시켰고, 이는 지도부딘이 IGF-1으로 유도한 미토콘드리아 생합성을 감소시키는 효과를 나타내는 것이다. (B) IGF-1은 미토파지-관련 단백질(LC-3, p62 및 Parkin)의 수준을 증가시켰고, 이는 IGF-1이 피지세포에서 미토파지를 유발한다는 것을 나타내는 것이다. 그러나, 지도부딘 처리는 Parkin 수준을 감소시켰고, LC-3 및 p62의 수준을 증가시켰고, 이는 지도부딘이 피지세포에서 IGF-1으로 유도한 PINK1/Parkin-매개 미토파지를 억제하는 효과가 있다는 것을 나타내는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0030] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0032] **<실시예1> 세포 배양(Cell culture)**

[0033] 불멸화된 사람 피지세포를 실험에 사용하였다. 세포주는 이전 연구에서 기재된 바와 같이 수립하였다. 모든 과정은 충남대학교 병원 기관위원회에서 승인되었다. 불멸화된 사람 피지세포는 sebomed 배지(biochrom, Berlin, Germany)에 10% 우태아 혈청(Gibco BRL, Rockvile, MD, USA)과 5ng/mL의 재조합 사람 EGF(Invitrogen, Grand Siland, NY, USA)를 보충하여 세포 배양에 사용하였다.

[0035] **<실시예2> 얇은막 크로마토그래피(Thin-layer chromatograph, TLC)**

[0036] 세포내 지질의 정량적 분석을 위하여 본 발명에서는 이전의 연구에서 사용한 바와 같이 TLC 방법을 사용하였다. 간략하면, 불멸화된 사람 피지세포를 2 μCi의 ^{14}C-아세테이트와 소듐 염(PerkinElmer, Boston, MA, USA)이 함유된 배지로 배양하였고, 4시간 동안 반응시켰다. 세포내 지질은 클로로포름과 메탄올(2:1, v/v)로 추출하였다. 용매를 증발시키고, 지질은 클로로포름에 재현탁되었다. TLC (TLC 실리카겔 60 F_{254}, Merck KgaA)는 세포내 지질을 분리하는데 사용되었다. 헥산과 에틸 아세테이트(6:1, v/v)로 현상한 후, 방사능 측정법으로 세포내 지질을 시각화하였다.

[0038] **<실시예3> 오일 레드 O 염색(Oil red O staining)**

[0039] 불멸화된 사람 피지세포에서 세포내 지질을 측정하기 위하여 세포를 커버글래스에서 배양하였다. 처리의 종료시점에 세포를 PBS로 세척하였고, 10% 포름알데히드로 실온에서 1 시간 동안 고정하였다. 증류수로 세척한 후, 고정된 세포를 필터한 오일 레드 O 용액으로 30-60 분간 염색하였다. 세포를 증류수로 세척한 후 헤마톡실린으로 대조염색하였다.

[0041] **<실시예4> 웨스턴 블로팅(Western blotting)**

[0042] 수거 후, 세포를 단백질 추출 용액(Intron, Daejeon, Korea)으로 용해하였다. 동량의 단백질을 로딩하여 SDA-PAGE로 분리하였고, 단백질을 니트로셀룰로스 멤브레인(Pall Crop, Port Washington, NY, USA)으로 이동시켰다. 5% 탈지분유로 블로킹한 후, 멤브레인을 다양한 1차 항체로 반응시켰다. 블롯은 퍼옥시다아제가 결합된 2차 항체로 반응시켜 ECL(BIOMAX, Seoul, Korea)로 특정 단백질을 시각화하였다. 웨스턴 블로팅에 사용한 일차 항체는 다음과 같다: 액틴(actin), SREBP-1(Santa Cruz, CA), SREBP-2, FDFT-1, PGC-1α, mtTFA, p62, Parkin(Abcam, Cambridge, UK), FASN, PPAR-γ, IGF-1R, phospho-IGF-1R, Akt, phospho-Akt, mTOR, phospho mTOR(Cell Signaling Technology, Dnavers, MA), SCD(Thermo Scientific, Rockford, IL) 및 LC3(Sigma, St. Louis, MO)

[0044] **<실시예5> 실시간 PCR(Real-time PCR, RT-PCR)**

[0045] 전체 RNA는 Easy-blue RNA 추출 키트(Intron, Daejeon, Korea)를 사용하여 불멸화된 사람 피지세포에서 추출하였다. 전체 RNA (2 μg)를 M-MLV 역전사 효소(ELPIS Biotech, Daejeon, Korea)를 사용하여 제조자의 지침에 따라 상보적 DNA로 역전사하였다. RT-PCR은 SYBR Green 실시간 PCR 마스터 믹스(Applied Biosystems, Waltham, MA)를 사용하여 수행하였다. 각 유전자의 발현 수준은 GAPDH 수준으로 정규화하여 배수 변화로 나타내었다. RT-PCR을 위한 프라이머는 하기와 같다:

[0046] FDFT1: 5'-CATTGGGATGGCAGAGTTTT-3' 및 5'-TGGTGCAGTGCATTGGTTAT-3'

[0047] FASN: 5'-CCCACCTACGTACTGGCCTA-3' 및 5'-CTTGGCCTTGGGTGTGTACT-3'

[0048] SCD: 5'-CGACGTGGCTTTTTCTTCTC-3' 및 5'-GGGGGCTAATGTTCTTGTCA-3'

[0049] GAPDH: 5'-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3' 및 5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3'

[0051] **<실시예6> 통계 분석(Statistical analysis)**

[0052] 결과는 평균 ± 표준 편차로 나타내었다. 결과 세트 사이의 차이는 SPSS (version 24.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA)를 사용하여 Student's *t*-test로 분석하였다. 통계적 유의성은 $P<0.05$ 였다.

[0054] **<시험예1> 지도부딘은 불멸화된 사람 피지세포에서 세포내 지질 수준을 감소시켰다.**

[0055] 이전 연구에서 수립된 불멸화된 사람 피지세포주를 사용하여 IGF-1으로 유도한 지질합성에 대한 지도부딘의 효과를 측정하였다. 불멸화된 사람 피지세포에 지도부딘 10 또는 25 μM을 처리하였다. 1시간 동안 지도부딘을 처리한 후 IGF-1 50 ng/mL을 피지세포에 처리하여 분화 및 지질 합성을 유도하였다. IGF-1 처리 48 시간 후에 수행한 TLC의 결과를 통해 IGF-1 처리가 불멸화된 사람 피지세포에서 지질 축적을 증가시킨다는 것을 확인하였고, 지도부딘은 용량의존적으로 세포내 지질 축적을 감소시켰다(도1A). IGF-1은 불멸화된 사람 피지세포에서 콜레스테롤, 트리글리세라이드, 왁스 에스터 및 스쿠알렌과 같은 세포내 지질의 합성을 증가시켰다. 반면에, 지도부딘 처리는 IGF-1으로 유도한 지질 합성을 감소시켰다. 다양한 지질 가운데 스쿠알렌과 왁스 에스터의 합성이 지도부딘에 의해 현저하게 감소되었다. 오일 레드 O 염색을 통해 IGF-1이 불멸화된 사람 피지세포에서 지질 액적의 수를 증가시킴을 확인하였고, 지도부딘의 처리는 불멸화된 사람 피지세포에서 지질 액적의 수를 감소시켰다(도1B).

[0057] **<시험예2> 지도부딘은 불멸화된 사람 피지세포에서 IGF-1으로 유도한 지질 합성을 감소시켰다.**

[0058] 지도부딘의 불멸화된 사람 피지세포에서 IGF-1으로 유도한 지질 합성에 대한 효과를 검색하기 위하여 피지세포 분화와 지질 합성에 관한 전사 인자 및 효소를 조사하였다. 불멸화된 사람 피지세포에 IGF-1을 처리한 군에서 SREBP-1, SREBP-2 및 PPAR γ와 같은 피지세포 분화와 관련된 다양한 전사 인자의 수준이 증가되었지만, 지도부딘은 용량의존적으로 그들의 수준을 감소시켰다(도2A).

[0059] 전사인자의 결과가 지질합성과 관련된 효소의 발현에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 스쿠알렌 합성을 위한 FDFT1, 지방산 합성을 위한 FASN 및 SCD를 포함하는 효소의 발현을 살펴보았다. 예상대로, 지도부딘은 IGF-1 처리에 의해 증가된 FDFT1, FASN 및 SCD를 용량의존적으로 하향조절하였다(도2B). 더욱이, 이들 효소의 IGF-1에 의해 증가된 mRNA 표현은 지도부딘 처리후 하향조절되었다(도2C). 이 결과는 지도부딘이 IGF-1으로 유도한 피지세포의 지질합성을 피지세포 분화 및 지질 합성 억제를 통해 감소시킨다는 것을 나타내는 것이다.

[0060] 이전 연구에서 본 발명자들이 IGF-1으로 유도한 지방 합성에서 피지세포의 Akt/mTOR 신호 경로의 역할을 보고한 바와 같이, 지도부딘이 Akt/mTOR 신호 경로를 조절하는지 검사하였다. 본 발명에서 IGF-1은 IGF-1R과 하위 효과 인자인 Akt 및 mTOR의 인산화를 증가시켰다(도3). 반면에, 지도부딘은 현저하게 IGF-1R, Akt 및 mTOR의 인산화를 용량의존적으로 감소시켰다.

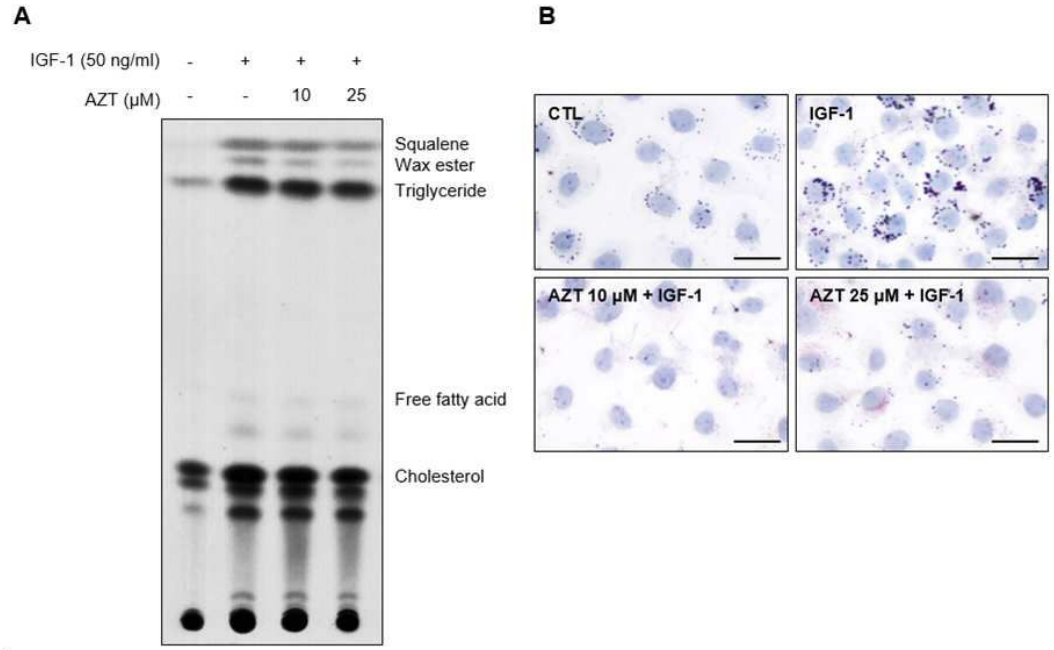
[0062] **<시험예3> 지도부딘은 IGF-1으로 유도한 미토콘드리아 생합성(mitochondria biogenesis) 및 미토파지(mitophagy)를 감소시킨다.**

[0063] 지도부딘이 지방세포에서 미토콘드리아 기능장애를 유발하고 자가포식을 감소시킨다는 내용이 알려져 있었으므로, 본 발명에서는 불멸화된 사람 피지세포에서 IGF-1과 지도부딘의 미토콘드리아 생합성과 미토파지에서의 역할을 연구하였다.

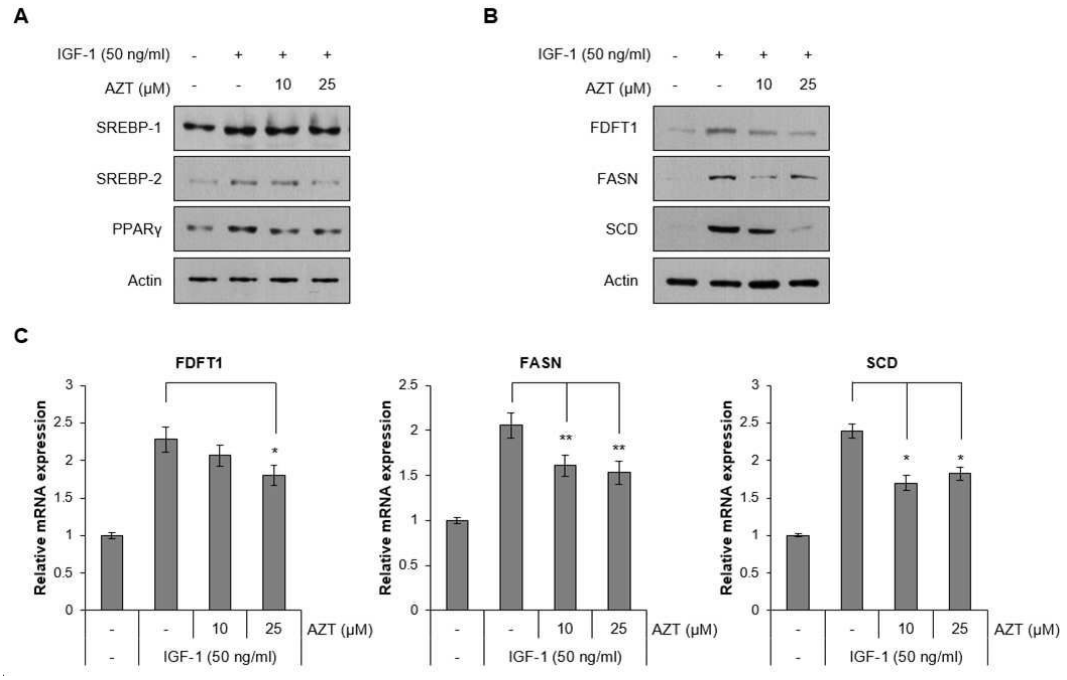
[0064] 예상한 바와 같이, IGF-1은 주요 미토콘드리아 생합성 조절인자인 PGC-1α를 증가시켰다(도4A). 게다가, 미토콘드리아 DNA 전사의 핵심적 조절자인 mtTFA의 발현은 IGF-1 처리를 통해 상향조절되었다. 반면에, 지도부딘은 불멸화된 사람 피지세포에서 PGC-1α와 mtTFA의 발현을 감소시켰다. 불멸화된 사람 피지세포에서 미토파지를 평가하기 위하여, 미토파지와 연관된 단백질의 수준을 조사하였고, IGF-1이 LC-3, p62 및 Parkin의 발현을 증가시킨다는 것을 발견하였다(도4B). 그러나, 지도부딘은 Parkin을 감소시킨 반면 LC-3 및 p62 수준을 증가시켰고, 이는 IGF-1 처리된 불멸화된 사람 피지세포에서 지도부딘의 피토파지 조절 장애를 나타내는 것이고, 지도부딘이 피지세포에서 IGF-1으로 유도한 PINK1/Parkin-매개 미토파지를 억제하는 효과가 있다는 것을 나타내는 것이다. 이상의 결과는 지도부딘이 IGF-1으로 유도한 미토콘드리아 생합성 및 미토파지를 피지세포에서 억제한다는 것을 나타내는 것이다.

도면

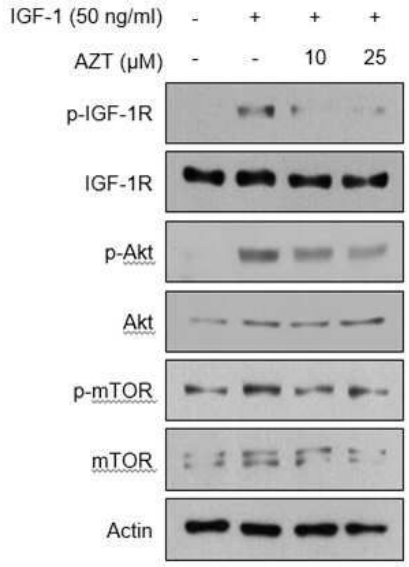
도면1


A
IGF-1 (50 ng/ml) - + + +
AZT (μM) - - 10 25
Squalene
Wax ester
Triglyceride
Free fatty acid
Cholesterol
B
CTL
IGF-1
AZT 10 μM + IGF-1
AZT 25 μM + IGF-1

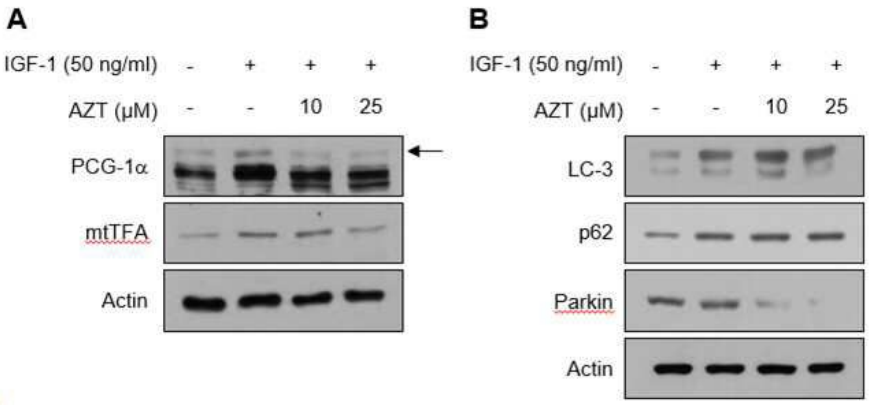
도면2


A
IGF-1 (50 ng/ml) - + + +
AZT (μM) - - 10 25
SREBP-1
SREBP-2
PPARγ
Actin
B
IGF-1 (50 ng/ml) - + + +
AZT (μM) - - 10 25
FDFT1
FASN
SCD
Actin
C
FDFT1
FASN
SCD
Relative mRNA expression
AZT (μM)
IGF-1 (50 ng/ml)

도면3


IGF-1 (50 ng/ml) - + + +
AZT (μM) - - 10 25
p-IGF-1R
IGF-1R
p-Akt
Akt
p-mTOR
mTOR
Actin

도면4


A
IGF-1 (50 ng/ml) - + + +
AZT (μM) - - 10 25
PCG-1α
mtTFA
Actin
B
IGF-1 (50 ng/ml) - + + +
AZT (μM) - - 10 25
LC-3
p62
Parkin
Actin