



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0153136
(43) 공개일자 2022년11월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/17 (2006.01) A23L 33/17 (2016.01)
A61P 1/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/1703 (2020.05)
A23L 33/17 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2021-0059780
(22) 출원일자 2021년05월10일
심사청구일자 2021년05월10일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암
동5가)
(72) 발명자
서연석
서울특별시 강남구 논현로116길 16, 301호 (논현
동, 파라곤빌)
이한아
서울특별시 서초구 남부순환로 2614, 604호 (양재
동, 한솔로지엔트)
(74) 대리인
특허법인 피씨알

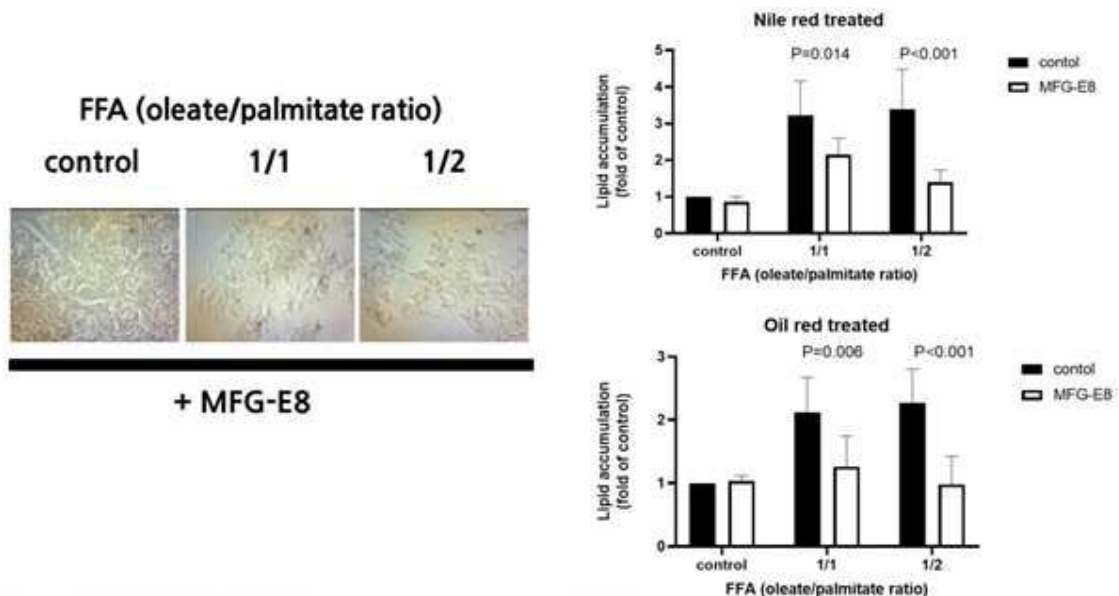
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 MFG-E8 (Milk fat globule-EGF factor 8) 단백질을 포함하는 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 MFG-E8 (Milk fat globule-EGF factor 8) 단백질을 포함하는 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물에 관한 것으로, 상기 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물은 MFG-E8 (Milk fat globule-EGF factor 8) 단백질을 포함하여 간세포의 지방축적을 억제하고, 염증 인자 (NF- κ B, IL-6)의 발현 감소 및 세포사멸 인자의 (cleaved caspase-3, Bcl-2) 감소 효과가 있어 비알코올성 지방간을 예방, 치료 또는 개선시킬 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61P 1/16 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

MFG-E8 (Milk fat globule-EGF factor 8) 단백질을 포함하는 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 MFG-E8은 125 내지 500 $\mu\text{g/mL}$ 포함되는 것인 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 NF- κ B 및 IL-6 활성 수준을 감소시키는 것인 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 조성물은 cleaved caspase-3 및 Bcl-2 활성 수준을 감소시키는 것인 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

Milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) 단백질을 포함하는 비알코올성 지방간 개선용 식품 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 MFG-E8은 125 내지 500 $\mu\text{g/mL}$ 포함되는 것인 비알코올성 지방간 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 MFG-E8 (Milk fat globule-EGF factor 8) 단백질을 포함하는 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 비알코올성 지방간질환(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 유병률이 높고 최근 급속도로 증가 추세에 있어 국내에서도 30%에 가까운 유병률을 보이고 있다 (Kang Y. et al., J Korean Med Sci 2018;33:e109). 비알코올성 지방간질환 환자 중 중등도 이상의 염증이 발생한 경우를 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)라고 명명하며 국내 유병률은 1.5~6.45% 정도이다. 지방간염 단계를 거쳐 간섬유화나 간경변증, 간세포암종으로 진행될 수 있으며 이외에도 당뇨병 등 다양한 합병증 발생 및 심혈관질환으로 인한 사망률 증가와 관련되어 있어 적극적인 치료가 필요하다 (Chalasani N. et al., Hepatology 2018;67:328-357).
- [0004] 비알코올성 지방간 질환의 주요 발생기전은 인슐린 저항성, 그리고 축적된 지질로 인한 지질독성 및 선천 면역 체계의 활성화이다 (Fuchs M. et al., Journal of hepatology 2012;56:291). 지질 축적에 의해 염증 반응이 활성화되며 대식세포나 수지상세포, 림프구 등의 면역 세포들이 염증 반응 진행에 관여한다. 특히 포화지방산인 palmitate는 직접적인 세포독성 및 종양괴사인자(tumor necrosis factor- α , TNF- α), 인터루킨-6(interleukin-6, IL-6)와 같은 사이토카인 생성 촉진을 통해 염증반응과 인슐린 저항성을 유도한다 (Ajuwon, K.M. and Spurlock, M.E., The Journal of nutrition, 135:1841, 2005). 유리 지방산은 간에서 JNK (c-Jun N-terminal kinase 3), NF- κ B (Nuclear factor-kappa B), ERK (Extracellular signal-regulated kinase)을 인산화시켜 소포체 (ER) 와 미토콘드리아 기능장애와 염증 반응을 통해 NAFLD 의 발생을 유도한다 (Wei, Y. et al., American journal of physiology. Endocrinology and metabolism 291:E275, 2006).
- [0005] 하지만 아직까지 비알코올성 지방간의 발생기전은 충분히 밝혀지지 못하였으며 비알코올성 지방간질환의 치료제로 국내에서 승인을 받은 약제 또한 없는 상태이다. 또한 현재 임상시험중인 약제들도 간섬유화를 개선하는 효과만을 보였을 뿐 간내의 지방도나 염증도를 완화시키지 못하였으며 일부 섬유화 개선효과를 보인 약제들도 임상 적용에 수년 이상 소요될 것으로 보인다. 이러한 치료제 개발의 실패 및 부재는 비알코올성 지방간 질환의 진행에 대한 분자생물학적 매커니즘이 완전히 밝혀지지 않은 상태로 기존의 치료제들이 질환 진행 과정을 막거나 호전시키는데 충분한 작용을 하지 못했기 때문으로 생각되며, 따라서 치료 타겟 발굴 및 이를 통한 효과적인 비알코올성 지방간질환 치료제의 도입이 필요하다.
- [0006] 한편, Milk fat globule-epidermal growth factor VIII (MFG-E8) 은 척추동물에서 발견되는 다양한 기능을 가지는 당단백질로 대식세포와 자가사멸세포 사이의 분자 다리(molecular bridge) 의 역할을 하여 대식세포의 식세포 작용(phagocytic engulfment)을 활성화 시키는 물질로 알려져 있다. 따라서 MFG-E8 은 염증반응 및 염증성 질환의 중요한 조절자(regulator) 로 인식되고 있으며 염증성 질환, 자가면역질환, 그리고 암종 등 다양한 질환에서 MFG-E8 의 기능에 대한 연구가 이루어지고 있는 물질이다.
- [0007] MFG-E8은 대식세포에 의한 자가사멸세포의 식세포 작용 중 유도되는 lipopolysaccharide (LPS)-toll-like receptor 4 (TLR4) 매개 염증반응에서 항염증 기능을 나타내었으며 NF- κ B 신호전달 과정의 저해를 통해 LPS 유도 염증반응을 억제하였다 (Miksa, M. et al., Maturation-induced down-regulation of MFG-E8 impairs apoptotic cell clearance and enhances endotoxin response. International journal of molecular medicine, 2008). 또한 패혈증 및 허혈/재관류 손상 마우스 모델에서 염증성 사이토카인의 생성을 저해함으로써 LPS-TLR4 매개 염증반응을 억제하였고 장염 마우스 모델에서는 TLR4 신호전달 과정을 직접적으로 저해함으로써 장염 증상을 억제하였다 (Aziz, M.M. et al., MFG-E8 attenuates intestinal inflammation in murine experimental colitis by modulating osteopontin-dependent alphavbeta3 integrin signaling. J Immunol, 2009, Matsuda, A. et al. Milk fat globule-EGF factor VIII in sepsis and ischemia-reperfusion injury. Mol Med, 2011). 또한 MFG-E8은 LPS-TLR4 신호전달의 음성 조절분자 (negative regulator)로 알려진 suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3)의 활성을 STAT-3 분자를 통해 활성화 시킴으로써 염증반응을 억제하기도 하였다 (Aziz, M. et al., Pre-treatment of recombinant mouse MFG-E8 downregulates LPS-induced TNF-alpha production in macrophages via STAT3-mediated SOCS3 activation. PloS one, 2011).
- [0008] 한편, MFG-E8^{-/-} 마우스의 배중심과 비장에서 자가사멸세포의 식세포 작용이 현저히 줄어들며 전신성 염증성 자가면역 질환 증상이 발생하였고 인간 대상 연구에서도 루푸스 환자군에서의 MFG-E8 혈중 농도가 정상군에 비해 현저히 높았으며, 루푸스 치료를 받은 환자군에서 현저하게 농도가 낮아짐이 관찰되었다 (Hanayama, R. et al. Science, 2004, Yamaguchi, H. et al., Milk fat globule EGF factor 8 in the serum of human patients of systemic lupus erythematosus. Journal of leukocyte biology, 2008).
- [0009] 염증성 관절질환 마우스 모델의 혈액에서도 MFG-E8 는 감소되어 있었으며 MFG-E8 투여시 염증성 사이토카인 생성이 저해되면서 염증반응이 억제되었다 (Albus, E. et al. Milk Fat Globule-Epidermal Growth Factor 8 (MFG-E8) Is a Novel Anti-inflammatory Factor in Rheumatoid Arthritis in Mice and Humans. Journal of

bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research, 2016). 패혈증 동물 모델에서도 MFG-E8 의 발현과 apoptosis 가 현저히 감소하였고 MFG-E8 투여시 생존율이 크게 증가되었으며 MFG-E8을 결핍시킨 마우스의 생존율은 정상에 비해 크게 감소하였다 (Miksa, M. et al., Dendritic cell-derived exosomes containing milk fat globule epidermal growth factor-factor VIII attenuate proinflammatory responses in sepsis. Shock, 2006, Miksa, M. et al., Immature dendritic cell-derived exosomes rescue septic animals via milk fat globule epidermal growth factor-factor VIII [corrected]. J Immunol, 2009).

[0010] 여러 장기에서 다량의 자가사멸세포의 세포사가 발생한 후 사멸 된 세포가 적절히 제거되지 못하는 질환인 허혈/재관류 손상 마우스 모델에서도 MFG-E8의 발현은 현저히 감소되어 있었고 MFG-E8을 투여했을 경우 염증성 사이토카인 및 조직 손상 마커들의 생성이 감소되며 허혈/재관류 손상 증상이 호전되었으며, 그 결과 마우스의 생존율이 증가되었다 (Cui, T., et al. American journal of respiratory and critical care medicine, 2010).

[0011] 하지만, 종래의 기술에서는 MFG-E8의 비알코올성 지방간 질환의 치료 효과에 대해서 전혀 보고된바 없다. 이에, 본 발명에서는 효과적인 비알코올성 지방간의 치료를 위한 타겟 물질을 발굴하기 위해 노력한 결과, MFG-E8 이 비알코올성 지방간 질환에 의한 염증 감소, 비알코올성 지방간 진행 억제, 간 내 지질축적 억제, 항세포사멸효과 및 지방 축적된 간세포의 자식작용(autophagy) 활성을 촉진하는 기능을 가지고 있어 비알코올성 지방간 질환의 치료용 조성물로 활용될 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) 1. KR 10-2018-0009630 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명은 MFG-E8 (Milk fat globule-EGF factor 8) 단백질을 포함하는 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0015] 또한, 본 발명은 Milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) 단백질을 포함하는 비알코올성 지방간 개선용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명은 MFG-E8 (Milk fat globule-EGF factor 8) 단백질을 포함하는 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명의 '비알코올성 지방간 질환(NAFLD)' 은 예후가 양호한 비알코올성 간지방증(nonalcoholic fatty liver; NAFL)과 간경변, 간암으로 진행 가능성이 있는 비알코올성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis; NASH)을 모두 포함하는 개념으로 간내 지방침착, 염증반응, 섬유화라는 중요한 세가지 질병 진행기전을 가지고 있다.

[0019] 상기 MFG-E8은 천연형 또는 MFG-E8, 또는 이들과 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 단백질을 포함한다. 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 단백질에는 천연형/제조합 MFG-E와 그 기능적 동등물(functional equivalent) 및 기능적 유도체(functional derivative)가 포함된다.

[0020] 상기 "기능적 동등물"에는 천연형 단백질 아미노산 중 일부 또는 전부가 치환되거나, 아미노산의 일부가 결실 또는 부가된 아미노산 서열 변형체로서 천연형 MFG-E8과 실질적으로 동등한 생리활성을 갖는 것을 말한다.

[0021] 상기 "기능적 유도체"는 상기 MFG-E8 단백질의 물리 화학적 성질을 증가 또는 감소시키기 위한 변형을 가한 단백질을 천연형 MFG-E8과 실질적으로 동등한 생리 활성을 갖는 것을 의미한다.

- [0022] 상기 MFG-E8의 일 실시예로 Mouse myeloma cell line, NS0에서 배양하고 정제하여 제조된 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 구체예로, 상기 약학적 조성물은 MFG-E8은 125 내지 500 $\mu\text{g/mL}$, 더욱 구체적으로, 125, 250 또는 500 $\mu\text{g/mL}$, 가장 구체적으로는 500 $\mu\text{g/mL}$ 포함되는 것일 수 있다. 상기 MFG-E8 함량 범위 외로 포함할 경우, 목적하는 비알코올성 지방간의 예방, 치료 또는 개선 효과를 얻을 수 없거나, 독성이 나타날 수도 있다.
- [0024] 본 발명의 일 구체예에 따르면, MFG-E8 (Milk fat globule-EGF factor 8) 단백질은 간세포의 지방축적을 억제하고, 염증 인자 (NF- κB , IL-6)의 발현 감소 및 세포사멸 인자의 (cleaved caspase-3, Bcl-2) 감소효과를 확인하였다.
- [0025] 따라서, MFG-E8 (Milk fat globule-EGF factor 8) 단백질은 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용으로 활용할 수 있다.
- [0026] 본 발명에 있어서, "예방"이란 상기 조성물의 투여로 비알코올성 지방간의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 포함한다.
- [0027] 본 발명에 있어서, "치료"란 치료 또는 증상의 경감을 의미하고, 구체적으로는 비알코올성 지방간의 치료 또는 증상의 경감을 의미한다.
- [0028] 본 발명의 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다.
- [0029] 상기에서 "약제학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 말한다.
- [0030] 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 의약 분야에서 통상 사용되는 담체 및 비히클을 포함하며, 구체적으로 이온 교환 수지, 알루미늄, 알루미늄 스테아레이트, 레시틴, 혈청 단백질(예, 사람 혈청 알부민), 완충 물질(예, 각종 인산염, 글리신, 소르브산, 칼륨 소르베이트, 포화 식물성 지방산의 부분적인 글리세라이드 혼합물), 물, 염 또는 전해질(예, 프로타민 설페이트, 인산수소이나트륨, 인산수소칼륨, 염화나트륨 및 아연염), 고질성 실리카, 마그네슘 트리실리케이트, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈계 기질, 폴리에틸렌 글리콜, 나트륨 카르복시메틸셀룰로즈, 폴리아릴레이트, 왁스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 양모지 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 유화제, 현탁제, 또는 보존제 등을 추가로 포함 할 수 있다.
- [0032] 한 양태로서, 본 발명에 따른 조성물은 비경구 투여를 위한 수용성 용액으로 제조할 수 있으며, 바람직하게는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 완충 용액을 사용할 수 있다. 수용성 주입(injection) 현탁액은 소듐 카르복시메틸셀룰로즈, 솔비톨 또는 텍스트란과 같이 현탁액의 점도를 증가시킬 수 있는 기질을 첨가할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 조성물은 전신제 또는 국소적으로 투여될 수 있으며, 이러한 투여를 위해 공지의 기술로 적합한 제형으로 제제화될 수 있다. 예를 들어, 경구 투여 시에는 불활성 희석제 또는 식용 담체와 혼합하거나, 경질 또는 연질 젤라틴 캡슐에 밀봉되거나 또는 정제로 압형하여 투여할 수 있다. 경구 투여용의 경우, 활성 화합물은 부형제와 혼합되어 섭취형 정제, 협착 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭시르, 서스펜션, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용될 수 있다.
- [0034] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경/연질 캡셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제, 엘릭시르제 등이 있는데, 이들 제형은 상기 유효성분 이외에 통상적으로 사용되는 충전제, 증량제, 습윤제, 붕해제, 활택제, 결합제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 1종 이상 사용할 수 있다. 붕해제로는 한천, 전분, 알긴산 또는 이의 나트륨염, 무수인산일수소 칼슘염 등이 사용될 수 있고, 활택제로는 실리카, 탈크, 스테아르산 또는 이의 마그네슘염 또는 칼슘염, 폴리에틸렌 글리콜 등이 사용될 수 있으며, 결합제로는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로오스, 나트륨카르복시메틸셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 저치환도 하이드록시프로필셀룰로오스 등이 사용될 수 있다. 이외에도 락토즈, 텍스트로오스, 수크로오스, 만니톨, 소르비톨, 셀룰로오스, 글리신 등을 희석제로 사용할 수 있으며, 경우에 따라서는 일반적으로 알려진 비등 혼합물, 흡수제, 착색제, 향미제, 감미제 등을 함께 사용할 수 있다.
- [0035] 주사용, 비경구 투여용 등의 각종 제형은 당해 기술 분야 공지된 기법 또는 통용되는 기법에 따라 제조할 수 있다. MFG-E8은 식염수 또는 완충용액에 잘 용해되므로 냉동 건조 상태로 보관한 후, 유효량의 MFG-E8을 정맥내

주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등에 적합한 형태로 식염수 또는 완충액에 투여 직전에 용액으로 제제화하여 투여할 수도 있다.

- [0036] 본 발명의 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 예컨대, 본 발명의 조성물의 투여량은 성인에게 1일에 0.1 내지 1000 mg/kg의 양을, 바람직하게는 10 내지 100 mg/kg의 용량을, 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.
- [0038] 본 발명은 Milk fat globule-EGF factor 8 (MFG-E8) 단백질을 포함하는 비알코올성 지방간 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0039] 상기 식품 조성물은 비알코올성 지방간 개선에 효과가 있는 식품, 예컨대, 식품의 주원료, 부원료, 식품 첨가제, 건강기능식품 또는 기능성 음료로 용이하게 활용할 수 있으나, 이에 한정되지는 않는다.
- [0040] 상기 식품이란, 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 건강기능식품 및 기능성 음료를 모두 포함하는 것을 말한다.
- [0041] 본 발명에 따른 상기 식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 상기 식품으로는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 빵류, 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 캔디류, 초코렛류, 껌류, 아이스크림류, 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일 음료, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.
- [0042] 상기 건강기능식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명에서 상기 기능성 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며, 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 장 질환 증상의 개선 또는 예방용 조성물을 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0044] 나아가 상기 기술한 것 이외에 본 발명의 식품 조성물을 함유하는 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 상기 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0045] 본 발명의 일 구체예로, 상기 식품 조성물은 MFG-E8은 125 내지 500 $\mu\text{g/mL}$, 더욱 구체적으로, 125, 250 또는 500 $\mu\text{g/mL}$, 가장 구체적으로는 500 $\mu\text{g/mL}$ 포함되는 것일 수 있다. 상기 MFG-E8 함량 범위 외로 포함할 경우, 목적하는 비알코올성 지방간의 개선 효과를 얻을 수 없거나, 독성이 나타날 수도 있다.

발명의 효과

- [0047] 본 발명의 MFG-E8 (Milk fat globule-EGF factor 8) 단백질을 포함하는 비알코올성 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물은 MFG-E8 (Milk fat globule-EGF factor 8) 단백질을 포함하여 간세포의 지방축적을 억제하고, 염증 인자 (NF- κ B, IL-6)의 발현 감소 및 세포사멸 인자의 (cleaved caspase-3, Bcl-2) 감소 효과가 있어 비알코올성 지방간을 예방, 치료 또는 개선시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0049] 도 1은 MFG-E8 농도에 따른 세포 생존율을 확인한 결과이다.
- 도 2는 Oleate/palmitate 의 농도에 따른 HepG2 cell의 세포 생존율과 세포내 지질축적 정도를 Nile red stain 및 Oil red stain 로 확인한 결과이다.
- 도 3은 Oleate/palmitate 의 농도를 달리하여 처리한 HepG2 cell에 MFG-E8을 처리하였을 때, 세포내 지질축적 정도를 Nile red stain 및 Oil red stain 으로 확인한 결과이다.
- 도 4는 Oleate/palmitate 의 농도를 달리하여 처리한 HepG2 cell에 MFG-E8을 처리하였을 때, NF- κ B, IL-6 의 활성 정도를 비교한 결과이다.
- 도 5 및 6은 Oleate/palmitate 의 농도를 달리하여 처리한 HepG2 cell에 MFG-E8 처리에 의한 세포사멸 정도를 확인하기 위해, cleaved caspase-3, Bcl-2 의 활성 정도를 웨스턴 블랏으로 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0050] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 실험예 1: MFG-E8의 세포독성 확인

- [0053] MFG-E8의 세포독성을 농도별로 확인하였다.

- [0054] 인간 간암 세포주인 HepG2 cell은 3×10^4 개의 세포가 되도록 6웰에 접종한 다음, plating 배지(cat.no, A1217601 및 CM3000, invitrogen, 미국)를 이용하여 37℃, 5% CO₂ 조건으로 24시간 동안 배양하였다. 그 다음, MFG-E8의 농도가 125 μ g/mL, 250 μ g/mL, 500 μ g/mL 이 되도록 1 μ l 씩 첨가하고 24시간 동안 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였으며, 세포 생존율은 당업계에 공지된 트리판 블루 배제 분석 방법(trypan blue exclusion assay)을 사용하여 측정하였다.

- [0055] 그 결과 도 1에서 확인되는 바와 같이 MFG-E8은 실험한 모든 농도에서 세포 독성이 높지 않은 것으로 확인되어, MFG-E8의 안전성을 확인하였다.

[0057] 실험예 2: 비알코올성 지방간 세포 모델 제조

- [0058] MFG-E8의 비알코올성 지방간 예방, 치료, 개선 효과를 확인하기 위하여 비알코올성 지방간 세포 모델을 제조하였다.

- [0059] 세포 내 지질 축적과 염증 유도를 위해 palmitate 와 oleate를 이용하였으며, palmitate 와 oleate 는 간세포 내 지질 축적, 염증성 사이토카인 생성 촉진을 통한 염증 및 인슐린 저항성을 유도하는 것으로 알려져 있다.

- [0060] 먼저, 인간 간암 세포주인 HepG2 cell은 3×10^4 개의 세포가 되도록 6웰에 접종한 다음, plating 배지(cat.no, A1217601 및 CM3000, invitrogen, 미국)를 이용하여 37℃, 5% CO₂ 조건으로 24시간 동안 배양하였다. Oleate (0.5 mM, O1257, Sigma-Aldrich, 미국) 와 palmitate (0.5 mM, P9767, Sigma-Aldrich, 미국) 의 비율을 1:1, 1:2 로 처리한 후, 24 시간 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양한 다음, MFG-E8의 농도가 500 μ g/mL, 1mM 이 되도록 1 μ l 씩 첨가하고 24시간 동안 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

- [0061] 세포내 지방 염색 방법(Nile red, Oil-red-O)은 지방 염색 키트 (Nile red staining kit, ab228553, abcam, 영국) (Oil Red O Staining kit, K580-24, BioVision, 미국)를 이용하여 관찰하였다. 모든 방법은 제조회사의 매뉴얼에 따라 하였으며, 염색한 다음 세포 내 지질 축적정도를 파악하기 위해 광학 현미경(Nikon microscope, Nikon, 일본)을 사용하였다.

[0062] 그 결과 도 2에서 확인되는 바와 같이 비알코올성 지방간 세포 모델을 제조하였다.

[0064] 실험예 3: MFG-E8의 세포 지질 축적 저해능 확인

[0065] 실험예 2에서 제조된 비알코올성 지방간 세포 모델을 이용하여 MFG-E8의 세포 지질 축적 저해능을 확인하였다.

[0066] 실험예 2에서 제조된 세포 모델을 기준으로 아무것도 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였으며, MFG-E8 처리군, oleate/palmitate 1:1 처리군, oleate/palmitate 1:2 처리군, oleate/palmitate 1:1/MFG-E8 처리군, oleate/palmitate 1:2/MFG-E8 처리군으로 나누어 실험을 수행하였다.

[0067] 세포내 지방 염색 방법은 실험예 2와 같다.

[0068] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 oleate/palmitate만 처리한 그룹은 세포 내 지질축적이 대조군에 비해 급격히 증가한 반면, MFG-E8을 함께 처리한 그룹은 세포 내 지질축적이 현저하게 감소한 것을 확인하였다.

[0069] 이는 MFG-E8가 세포내 지질축적을 억제하여 비알코올성 지방간질환의 진행을 억제할 수 있다는 것을 의미한다.

[0071] 실험예 4: MFG-E8의 염증 인자 (NF- κ B 및 IL-6) 감소 효과 확인

[0072] 실험예 2에서 제조된 비알코올성 지방간 세포 모델을 이용하여 MFG-E8의 NF- κ B, IL-6활성 감소 효과를 확인하였다.

[0073] 구체적으로, 실험예 2에서 제조된 모델 중 oleate/palmitate를 1:1 또는 1:2의 비율로 처리한 모델에 MFG-E8을 처리하였으며, 효소면역분석법시 1차 항체는 항-IL-6 (Anti-IL-6 antibody [EPR21710], ab229381, abcam, 영국), 항-NF- κ B p65 (Anti-NF- κ B p65 antibody [E379], ab32536, abcam, 영국)를 사용하였다.

[0074] IL-6 과 NF- κ B의 발현 정도를 확인하는 실험에서는 아무것도 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였으며, MFG-E8 처리군, oleate/palmitate 1:1 처리군, oleate/palmitate 1:2 처리군, oleate/palmitate 1:1/MFG-E8 처리군, oleate/palmitate 1:2/MFG-E8 처리군으로 나누어 실험을 수행하였다.

[0075] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 oleate/palmitate에 의해 염증이 유도된 세포에 MFG-E8을 처리하면 IL-6 과 NF- κ B 발현량이 감소하는 것을 확인하였다. 이는 재조합 MFG-E8가 IL-6 및 NF- κ B 활성을 억제하여 비알코올성 지방간질환에 의한 염증을 억제할 수 있다는 것을 의미한다.

[0077] 실험예 5: MFG-E8의 세포사멸 (cleaved caspase-3 및 Bcl-2) 억제 효과 확인

[0078] 실험예 2에서 제조된 비알코올성 지방간 세포 모델을 이용하여 MFG-E8의 cleaved caspase-3 및 Bcl-2활성 감소 효과를 확인하였다.

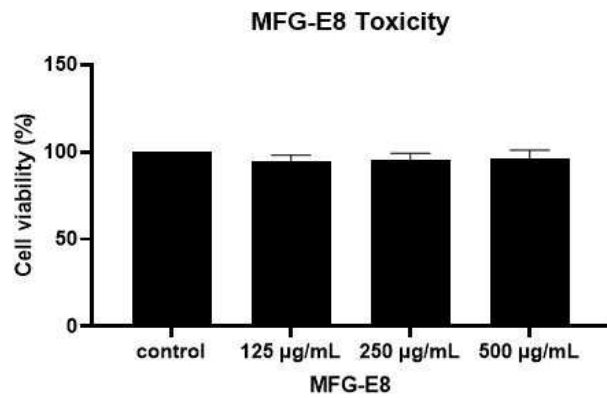
[0079] 구체적으로, 실험예 2에서 제조된 모델 중 oleate/palmitate를 1:1 또는 1:2의 비율로 처리한 모델에 MFG-E8을 처리하였으며, 단백질을 분리하여 웨스턴블랏을 수행하였다. 웨스턴블랏 수행시 1차 항체는 항-caspase-3 (Anti-active Caspase-3 antibody, ab2302, abcam, 영국), 항-Bcl-2 (Bcl-2 Monoclonal Antibody (100/D5), MA511757, Invitrogen, 미국)를 사용하였다.

[0080] 아무것도 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였으며, MFG-E8 처리군, oleate/palmitate 1:1 처리군, oleate/palmitate 1:2 처리군, oleate/palmitate 1:1/MFG-E8 처리군, oleate/palmitate 1:2/MFG-E8 처리군으로 나누어 실험을 수행하였다.

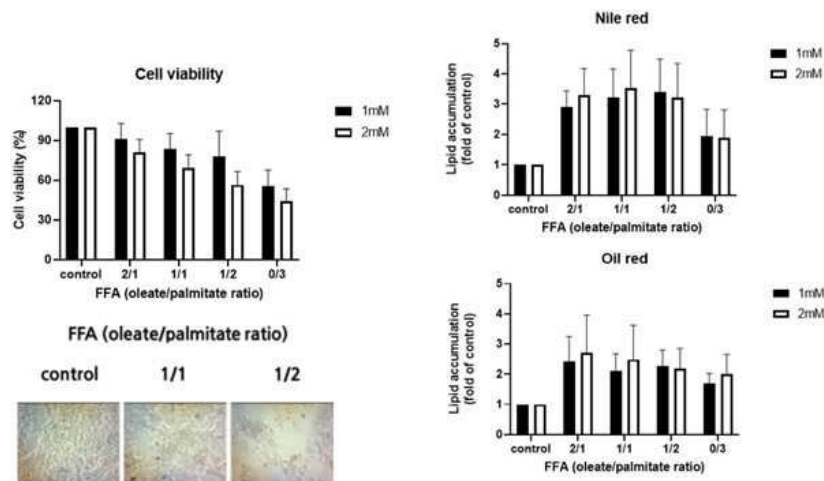
[0081] 그 결과, 도 5 및 6에 나타난 바와 같이 재조합 MFG-E8에 의해 절단된 caspase-3(cleaved caspase-3)의 생성과 Bcl-2의 발현이 현저하게 감소하는 것을 확인하였으며, 이는 재조합 MFG-E8가 caspase-3의 절단과 Bcl-2의 활성을 억제하여 비알코올성 지방간질환에 의한 세포사멸을 억제할 수 있는 것을 의미한다.

도면

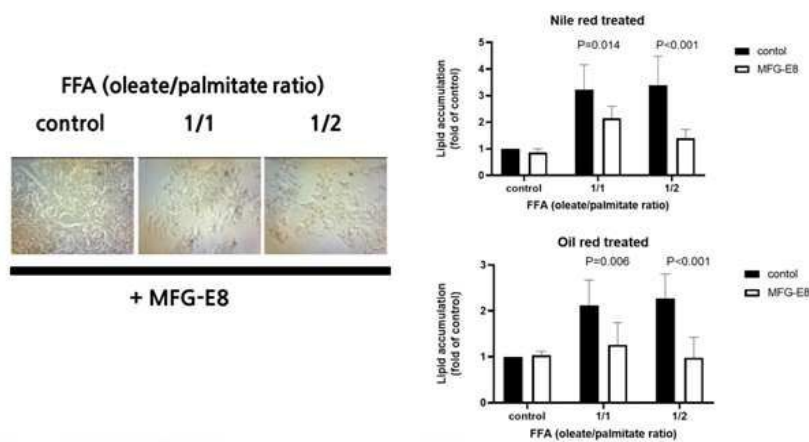
도면1



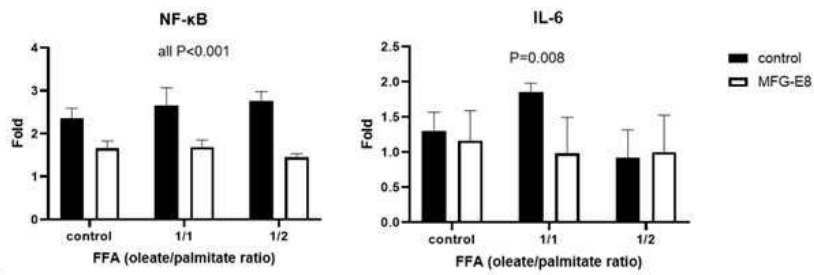
도면2



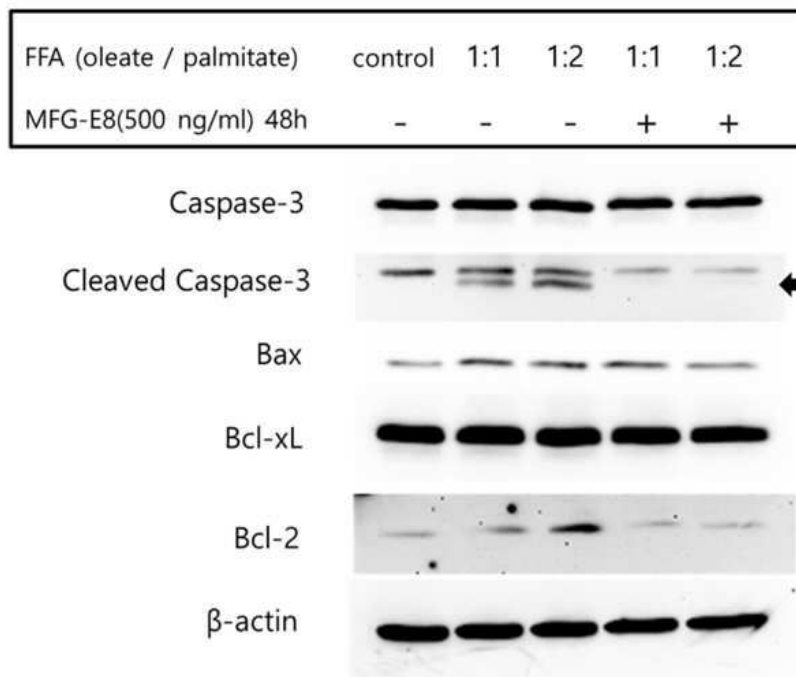
도면3



도면4



도면5



도면6

