



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0013666
(43) 공개일자 2013년02월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/26 (2006.01) A61K 9/16 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01) A61P 19/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0075404
(22) 출원일자 2011년07월28일
심사청구일자 2011년07월28일

(71) 출원인
건양대학교산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121, 건양대학교 산학협
력단 (내동)
(72) 발명자
김병준
대전광역시 유성구 배울2로 61, 테크노밸리 10단
지 1016동 1802호 (관평동)
김주영
대전광역시 서구 관저동 1216번지 202호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유병선

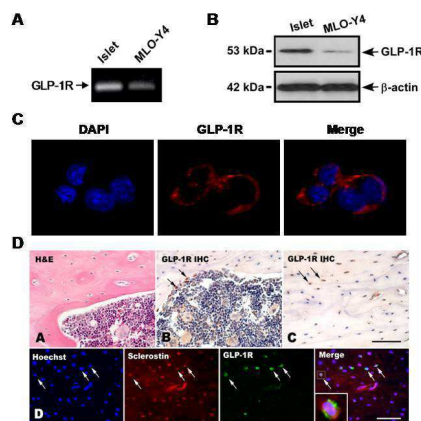
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 G L P-1 작용제를 유효성분으로 하는 골형성 촉진을 위한 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 골형성 촉진제에 관한 것으로, 특히 골세포에서 스크레로스틴(sclerostin)을 억제하여 골형성을 유도하는 물질에 관한 것이다. 본 발명에서는 현재 당뇨 치료제로 쓰이는 GLP-1의 골형성제로서의 역할과 기전을 밝힘으로써 GLP-1의 새로운 용도를 제공한다. 본 발명에 따르면, GLP-1 작용제를 이용하여 골다공증과 당뇨병의 상호 관련된 두 질병을 동시에 치료 및 예방할 수 있으며, 골다공증의 예방 및 치료에 있어서 GLP-1 작용제를 효과적으로 이용할 수 있다. 또한, 골다공증에 있어서 골세포가 관여된 새로운 약물 작용기전을 밝힘으로써 이와 비슷한 새로운 약물의 개발을 유도할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

임동미

대전광역시 유성구 배울2로 61, 테크노밸리 10단지
1001동 1501호 (관평동)

김지현

경상북도 안동시 북후면 하양지길 56-1

조경진

대전광역시 중구 동서대로1403번길 51-7, 대현빌라
304호 (목동)

이성규

대전광역시 유성구 노은로426번길 15, 송림마을아
파트 605-1802 (하기동)

박해룡

경상남도 창원시 마산합포구 월영마을로 52, 505동
604호 (월영동, 현대아파트)

송대용

대전광역시 동구 옥천로 38, 104동 601호 (신흥동,
신흥마을아파트)

박근용

대전광역시 서구 관저북로 52, 대자연아파트 108동
1205호 (관저동)

특허청구의 범위

청구항 1

골세포에서 스크레로스틴의 분비를 억제하는 유효성분으로 GLP-1 작용제(glucagon like peptide-1 analoge)를 포함하는, 골형성 촉진을 위한 약학적 조성물.

청구항 2

골형성 촉진을 위한 유효성분으로 GLP-1 작용제(glucagon like peptide-1 analoge)를 포함하는, 골다공증 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 골흡수 억제제를 더 포함하는 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 골흡수 억제제는 비스포스포네이트 계열의 약물; SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator) 계열의 약물; 칼시토닌; 에스트로겐; 장기간 사용 가능한 고용량의 비스포스포네이트 계열의 약물; 비스포스포네이트와 비타민 D 복합제; 데노수맙(Denosumab); 새로운 SERM 계열의 약물로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 약물인 약학적 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 골형성 촉진제에 관한 것으로, 특히 골세포에서 스크레로스틴(sclerostin)을 억제하여 골형성을 유도하는 물질에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 정상적인 뼈는 골 재형성 과정을 통해 일정한 골량을 유지하게 된다. 골 재형성은 새로운 뼈가 만들어지는 골 생성과정과 오래된 뼈가 흡수되는 골 파괴과정이 반복적으로 일어나는데, 골 재형성에 관여하는 세포에는 골 형성세포인 조골세포(osteoblast), 골 흡수작용을 하는 파골세포(osteoclast), 그리고 완성된 골 조직 내에 존재하는 골세포(osteocyte)가 있다. 성호르몬, 부갑상선호르몬, 갑상선호르몬, 비타민 D, 프로락틴 등의 호르몬, 수많은 사이토카인, 최근에는 교감신경계 및 렙틴 등 신경계 펩타이드까지 골 재형성 과정을 조절한다고 알려지고 있다. 골 재형성의 기전은 정확히 밝혀져 있지는 않지만, 골세포가 세포 표면에 특정 신호를 보냄으로써 시작된다는 연구보고가 있다.

[0003] 골다공증(Osteoporosis)은 세계보건기구(WHO)의 정의에 따르면 "골량의 감소와 미세구조의 이상을 특징으로 하는 전신적인 골격계질환으로, 결과적으로 뼈가 약해져서 부러지기 쉬운 상태가 되는 질환"이다. 골다공증은 연령증가에 비례하여 발병률이 상승되는 대표적인 질환으로, 노령인구가 증가하는 현재 골다공증 유병률은 크게 증가되고 있고, 골다공증 골절에 의한 연간 사회적 손실도 계속 증가하고 있다.

[0004] 파골세포의 생성과 활성 및 사멸이 상세히 연구되고 골 재형성 과정에서의 파골세포의 역할 및 작용기전이 알려지면서, 각 단계에서 파골세포의 작용을 억제하는 약제들이 최근 개발되어 실용화를 앞두고 있다. 또한, 조골세포의 증식 및 분화, 세포 사멸에 관한 연구는 파골세포의 경우만큼 알려져 있지는 않지만, BMP, RUNX-2, osterix 등의 물질들이 연구되고 있다.

[0005] 골 재형성에 있어서 조골세포와 파골세포의 역할 및 작용기전이 연구되고 알려진 것에 비해, 골세포의 기능은 잘 알려져 있지 않다. 그러나 골세포는 칼슘 항상성을 조절하는데 중요한 역할을 수행하며, 칼시토닌(calcitonin)을 촉진하고 PTH (parathyroid hormone)을 저해함으로써 골 형성과 흡수의 신호를 보내는 능력을 가지고 있으므로, 골 재형성에 있어서 그 역할이 클 것으로 생각되고 있다.

[0006] 최근에는 골세포에서 SOST유전자를 통하여 높게 발현되는 스크레로스틴(sclerostin)이라는 단백질이 알려졌고,

이는 조골세포의 증식과 분화를 억제한다고 보고되었다. 스크레로스틴을 억제하면 골형성이 유도되며, 대표적인 골형성 촉진제인 부갑상선 호르몬의 간헐적인 투여로 스크레로스틴이 억제된다는 연구결과가 나오면서 최근에는 이러한 기전을 이용한 약제들이 개발되고 있다.

[0007] 현재 개발되어 있는 골다공증 치료 약제는 아래 표 1과 같다.

표 1

골다공증의 치료 약제

약 물	효 과
Bisphosphonate계열 Alendronate Risedronate	과거의 골흡수 억제제 (FDA 승인-치료, 예방)
SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator)계열 Raloxifene	과거의 골흡수 억제제 (FDA 승인-치료, 예방)
Calcitonin	과거의 골흡수 억제제 (FDA 승인-치료)
Estrogen CEE 17b-estradiol	과거의 골흡수 억제제 (FDA 승인-예방)
장기간 사용 가능한 고용량의 Bisphosphonate계열 Ibandronate Zoledronate	최근의 골흡수 억제제
Bisphosphonate와 Vitamin D 복합제	최근의 골흡수 억제제
Denosumab	최근의 골흡수 억제제 (RANKL에 대한 단세포 항체)
새로운 SERM 제제 Arzoxifene Lasofloxifene Bazedoxifene	최근의 골흡수 억제제
부갑상선호르몬 (PTH(1-34))	최근의 골형성 촉진제 (FDA 승인-치료)
Strontium Ranelate	최근의 골형성 촉진제

[0008]

[0009] 인크레틴(Incretin)은 음식 섭취 후 위장관에서 분비되어 췌장에서 포도당 자극에 의한 인슐린 분비를 촉진하는 호르몬이다. 인크레틴 효과를 보이는 호르몬으로는 장의 L 세포에서 분비되는 글루카곤양 펩티드-1 (glucagon like peptide-1; GLP-1)과 장의 K 세포에서 분비되는 포도당 의존형 인슐린분비자극 펩티드(glucose dependent insulintropic polypeptide; GIP)가 있다. GLP-1과 GIP는 다양한 췌장 외 효과가 있어서 간과 근육, 심장, 신경, 체세포, 뼈 등에 영향을 미친다. GIP 수용체는 조골세포에서 발현되고, osteoblast-like cells에서 collagen type 1 발현과 alkaline phosphatase 활성화를 증가시키고, 세포사멸로부터 조골세포를 보호한다는 보고가 있다. 최근 GIP 수용체는 파골세포에도 발현되고, GIP는 PTH에 의해 유도된 골 흡수를 저해한다고 보고되었다. 관련 보고에 따르면, GIP 수용체 녹아웃(GIP^{-/-}) 쥐는 골 형성의 감소와 골 흡수 증가 때문에 낮은 골량을 보이고, GIP 과발현 형질전환 쥐는 골량이 증가한다.

[0010] GLP-1의 작용은 짧은 반감기에 비해 다양한 것으로 알려져 있다. 대표적인 작용으로는, 베타세포의 인슐린 분비를 자극하고, 베타세포에서 인슐린의 생합성을 증가시키며, 베타세포의 증식에 관여하고, 식욕억제 중추에 작용하여 식욕을 감소시키고 장운동을 감소시키며, 당뇨병으로 증가된 글루카곤의 분비를 감소시키는데, 이러한 작용에 의하여 현재 당뇨병의 치료에 좋은 치료제로 사용되고 있다. 또한, GLP-1 수용체는 갑상선 C세포에서 발현

되고, GLP-1은 갑상선 C세포로부터 칼시토닌 분비를 증가시키고 파골세포를 억제하여 골 재흡수를 감소시키는 것으로 보고 되었다. GLP-1이 제2형 당뇨병 혹은 인슐린 내성 상황에서 골밀도에 미치는 영향에 대한 연구는 있었으나, 아직까지 확실한 관련성은 규명되지 않은 상태이며, 그에 관한 작용기전도 밝혀지지 않은 상태이다. 또, 최근 골세포가 골 재형성의 조절에 중요한 역할을 한다는 보고가 있었으나, GLP-1 수용체가 골세포에 존재하는지 여부와 GLP-1이 골세포에 미치는 영향은 아직까지 전혀 알려져 있지 않다.

[0011] [참고자료]

[0012] 1. Oh KW. (2009) Diabetes and osteoporosis. Korean Diabetes J. **33**, 169-177.

[0013] 2. Byun DW. (2008) Recent drugs of osteoporosis treatment. J. Soonchunhyang Med. Coll. **14**, 689-694.

[0014] 3. Raggatt LJ, Partridge NC. (2010) Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling. J. Biol. Chem. **285**, 25103-25108.

[0015] 4. Aarden EM, Burger EH, Nijweide PJ. (1994) Function of osteocytes in bone. J. Cell Biochem. **55**, 287-299.

[0016] 5. Li X, Ominsky MS, Niu QT, Sun N, Daugherty B, D'Agostin D, Kurahara C, Gao Y, Cao J, et al. (2008) Targeted deletion of the sclerostin gene in mice results in increased bone formation and bone strength. J. Bone Miner. Res. **23**, 860-869.

[0017] 6. Zhao S, Zhang YK, Harris S, Ahuja SS, Bonewald LF. (2002) MLO-Y4 osteocyte-like cells support osteoclast formation and activation. J. Bone Miner. Res. **17**, 2068-2079.

[0018] 7. Bollag RJ, Zhong Q, Phillips P, Min L, Zhong L, Cameron R, Mulloy AL, Rasmussen H, et al. (2000) Osteoblast-derived cells express functional glucose-dependent insulinotropic receptors. Endocrinology **141**, 1228-1235.

[0019] 8. Zhong Q, Itokawa T, Sridhar S, Ding KH, Xie D, Kang B, Bollag WB, Bollag RJ, et al. (2007) Effects of glucose-dependent insulinotropic peptide on osteoclast function. Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. **292**, E543-E548.

[0020] 9. Xie D, Cheng H, Hamrick M, Zhong Q, Ding KH, Correa D, Williams S, Mulloy A, et al. (2005) Glucose-dependent insulinotropic polypeptide receptor knockout mice have altered bone turnover. Bone **37**, 759-769.

[0021] 10. Xie D, Zhong Q, Ding KH, Cheng H, Williams S, Corea D, Bollag WB, Bollag RJ, et al. (2007) Glucose-dependent insulinotropic peptide-overexpressing transgenic mice have increased bone mass. Bone **40**, 1352-1360.

[0022] 11. Yamada C, Yamada Y, Tsukiyama K, Yamada K, Udagawa N, Takahashi N, Tanaka, K, Drucker DJ, et al. (2008) The murine glucagon-like peptide-1 receptor is essential for control of bone resorption. Endocrinology **149**, 574-579.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0023] 최근 골세포에서 SOST유전자를 통하여 높게 발현되는 스클레로스틴(sclerostin)이라는 단백질이 알려지고, 이 단백질이 조골세포의 증식과 분화를 억제한다고 보고됨에 따라, 골세포에서 스클레로스틴을 억제하여 골형성을 유도하는 물질을 찾고 기전을 밝히는 연구가 요구되고 있다.

[0024] 본 발명은 골세포에서 SOST/스클레로스틴을 억제하여 골형성을 유도하는 물질을 찾고자 하는 것이며, 아울러 기존에 당뇨병 치료제로 알려져 있는 GLP-1 (glucagon like peptide-1)의 새로운 용도를 제공하고자 하는 것이다. 본 발명에서는 GLP-1 수용체가 골세포에 존재함을 밝히며, GLP-1 작용제가 골세포에 미치는 영향, 특히 SOST/스

클레로스틴의 분비를 억제하는 효과를 밝혀 GLP-1 작용제의 골형성제로서의 새로운 용도를 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0025] 본 발명에서는 GLP-1 수용체가 골세포에 존재함을 밝히며, GLP-1 작용제가 골세포에 작용하여 SOST/스클레로스틴의 분비를 억제하는 것을 밝힌다. 이러한 실험결과를 토대로, 본 발명에서는,
- [0026] 골세포에서 스클레로스틴의 분비를 억제하는 유효성분으로 GLP-1 작용제(glucagon like peptide-1 analogue)를 포함하는 골형성 촉진을 위한 약학적 조성물을 제공한다.
- [0027] 또한, 본 발명에서는,
- [0028] 골형성 촉진을 위한 유효성분으로 GLP-1 작용제(glucagon like peptide-1 analogue)를 포함하는 골다공증 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명은 현재 당뇨 치료제로 쓰이는 GLP-1의 골형성제로서의 역할과 기전을 밝힘으로써 GLP-1의 새로운 용도를 제공한다. 본 발명에 따르면, GLP-1 작용제를 이용하여 골다공증과 당뇨병의 상호 관련된 두 질병을 동시에 치료 및 예방할 수 있으며, 골다공증의 예방 및 치료에 있어서 GLP-1 작용제를 효과적으로 이용할 수 있다. 또한, 골다공증에 있어서 골세포가 관여된 새로운 약물 작용기전을 밝힘으로써 이와 비슷한 새로운 약물의 개발을 유도할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 골세포(MLO-Y4)에 GLP-1 수용체가 존재하는 것을 보여주는 실험결과이다.
- 도 2는 골세포에서 GLP-1 작용제를 처리한 결과, SOST mRNA와 스클레로스틴 단백질의 발현이 시간경과에 따라 억제되는 것을 보여주는 실험결과이다.
- 도 3은 골세포에서 고농도의 포도당조건(당뇨병조건의 세포모델)에서도 GLP-1 작용제가 SOST/ 스클레로스틴의 발현을 억제시키는 것을 보여주는 실험결과이다.
- 도 4는 SD정상 쥐에서 GLP-1 작용제가 혈청에서 발현되는 스클레로스틴을 억제시키고, 골밀도를 증가시키는 것을 보여주는 실험결과이다.
- 도 5는 제2형 당뇨병모델에서 GLP-1 작용제가 골밀도를 증가시키는 것을 보여주는 실험결과이다.
- 도 6은 제2형 당뇨병모델에서 GLP-1 작용제가 스클레로스틴과 오스테오칼신(osteocalcin)의 발현을 증가시키는 것을 보여주는 실험결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 본 발명의 일 측면은, 골세포에서 스클레로스틴의 분비를 억제하는 유효성분으로 GLP-1 작용제(glucagon like peptide-1 analogue)를 포함하는, 골형성 촉진을 위한 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0032] GLP-1은 인크레틴 효과를 보이는 장의 L 세포에서 분비되는 호르몬으로, 다양한 체장 외 효과가 있어서 간과 근육, 심장, 신경, 췌도세포, 뼈 등에 영향을 미친다. 대표적으로 베타세포의 인슐린 분비를 자극하고, 베타세포에서 인슐린의 생합성을 증가시키며, 베타세포의 증식에 관여하고, 식욕억제 중추에 작용하여 식욕을 감소시키고 장운동을 감소시키며, 당뇨병으로 증가된 글루카곤의 분비를 감소시킨다. 또한 GLP-1 수용체는 갑상선 C세포에서 발현되고, GLP-1은 갑상선 C세포로부터 칼시토닌 분비를 증가시키고 파골세포를 억제하여 골 재흡수를 감소시키는 것으로 알려져 있다.
- [0033] 본 발명에서는 GLP-1 수용체가 골세포에 존재함과 GLP-1 작용제가 골세포에 작용하여 SOST/스클레로스틴의 분비를 억제하는 것이 실험을 통해 밝혀진다.

- [0034] 본 발명의 또 다른 측면은, 골형성 촉진을 위한 유효성분으로 GLP-1 작용제(glucagon like peptide-1 analog e)를 포함하는 골다공증 예방 및 치료를 위한 약학적 조성물을 제공하는 것이다. 이 조성물은 상승 또는 상가적인 효과를 위해, 작용기전이 다른 골다공증 치료제인 골흡수 억제제를 더 포함할 수 있다.
- [0035] 골흡수 억제제로는 비스포스포네이트(bisphosphonate) 계열의 약물(alendronate, risedronate), SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator) 계열의 약물(Raloxifene), 칼시토닌(calcitonin), 에스트로겐(estrogen), 장기간 사용 가능한 고용량의 비스포스포네이트(bisphosphonate) 계열의 약물(Ibandronate, zoledronate), 비스포스포네이트와 비타민 D 복합제, 데노수맙(Denosumab), 새로운 SERM 계열 약물(arzoxifene, lasofoxifene, bazedoxifene)로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상의 약물이 사용될 수 있다. 그러나 사용 가능한 골흡수 억제제가 이에 한정되는 것은 아니고, 골흡수 억제 기능을 갖는 약물, 앞으로 골흡수 억제 기능을 갖는 것으로 밝혀지는 약물이 모두 사용 가능하다.
- [0036] 본 발명의 약학적 조성물은, 통상의 약제학적 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액 등의 형태로 제공될 수 있으며, 필요에 따라 담체, 부형제, 희석제 등을 더 포함할 수 있다. 담체, 부형제 및 희석제로는, 예를 들어, 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 광물유 등이 사용될 수 있다. 제제화할 경우 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제가 조성물에 포함될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 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, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 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.
- [0037] 본 발명의 약학적 조성물에서 GLP-1 (glucagon like peptide-1)의 바람직한 함유량 및 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 약학적 조성물은 GLP-1 작용제를 기준으로 1일 5 ~ 40 $\mu\text{g/kg}$ 으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0038] 본 발명의 상기 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 교미제, 착향료 등에 대한 용어 정의는 당업계에 공지된 문헌에 기재된 것으로 그 기능 등이 동일 내지 유사한 것들을 포함한다.
- [0039] 이하, 본 발명을 하기 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0040] **실험방법**
- [0041] 1. 생후 11주령의 수컷 정상동물 SD (Sprague-Dawley) 레트(rat)에 3주 동안 Exendin-4 (GLP-1 수용체 작용제; 10 nmol/kg)를 투여함으로써 골밀도에 미치는 영향을 확인하였다.
- [0042] exendin-4 외에 골밀도에 미치는 영향을 배제하기 위하여, 체중의 변화, 혈당 및 인슐린 분비 정도를 비교하였다. 골밀도 변화에 따른 기전 연구를 위하여, ELISA를 이용하여 혈청에서 조골세포 대표 인자(osteocalcin) 및 파골세포 대표 인자(TRAP5b), 골세포에서 발현되는 스크레로스틴의 발현 변화를 확인하였다. 골밀도는 골밀도

기계(GE Lunar Piximus; GE Healthcare, Madison, WI, USA)를 이용하여 분석하였다.

2. 생후 30주령의 제2형 당뇨병 모델동물인 수컷 OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) 레트 (당뇨유발)에 3주 동안 Exendin-4 (GLP-1 수용체 작용제; 10 nmol/kg)를 투여함으로써 골밀도에 미치는 영향을 확인하였다.

골밀도와 체중의 관계를 배제할 수 없으므로, 체중의 변화를 확인하였다. 경구 또는 복강 당부하 검사를 통한 혈중 당과 인슐린의 분비 정도를 비교하였다 (골밀도와 혈당, 인슐린의 관계를 배제할 수 없음). 골밀도는 골밀도 기계(GE Lunar Piximus; GE Healthcare, Madison, WI, USA)를 이용하여 분석하였다.

3. 제2형 당뇨병 모델 동물인 수컷 OLETF에 exendin-4를 투여했을 때의 골밀도 변화에 따른 기전을 연구하였다.

ELISA방법을 통한 혈청에서 조골세포 대표 인자(osteocalcin) 및 파골세포 대표 인자(TRAP5b)의 발현정도를 확인하였다. 골세포에서 발현되는 스크레로스틴의 발현변화를 혈청을 이용해 ELISA분석하였다.

4. 골세포인 MLO-Y4에서 고농도의 포도당(30 mmol)을 처리했을 때 exendin-4처리 여부에 따른 SOST mRNA 및 스크레로스틴 단백질의 발현 변화를 확인하였다.

실시간(Real-time) RT-PCR방법과 웨스턴블롯(western blot) 분석을 통해 변화를 확인하였다(스크레로스틴은 골세포에서 분비되므로 세포뿐만 아니라 배지에서의 단백질을 분해해서 확인하였음). GLP-1 수용체 길항제(Exendin-(9-39), 500 nmol)를 함께 처리함으로써 GLP-1 수용체를 경유하는지를 확인하였다. PKA 저해제 H89를 처리하여 GLP-1이 스크레로스틴 발현에 미치는 영향이 PKA 신호와 관련되는지를 확인하였다.

5. 당뇨병 치료제로 알려진 TZDs (Thiazolidinediones)에 의한 골밀도 감소에 exendin-4를 투여함으로써 골밀도 증가에 효과가 있는지를 확인하였다.

정상 SD쥐에 TZDs를 투여한 후, exendin-4 투여 여부에 따른 체중변화, 혈당, 인슐린 분비정도를 비교하였다. 또, 정상 SD쥐에 TZDs를 투여한 후, exendin-4 투여 여부에 따른 골밀도 변화를 관찰하였다. 정상 SD쥐에 TZDs를 투여한 후, exendin-4 투여 여부에 따른 혈청에서 조골세포 대표 인자(osteocalcin) 및 파골세포 대표 인자(TRAP5b), 골세포에서 발현되는 스크레로스틴의 발현변화를 확인하였다. 골세포 MLO-Y4에서 TZDs 처리 후, exendin-4 처리 여부에 따른 SOST mRNA 및 스크레로스틴 단백질의 발현 변화를 확인하였다.

실험결과

1. 골세포인 MLO-Y4 세포와 쥐 뼈 조직의 골세포에서 GLP-1 수용체가 발현되었다.

결과는 도 1과 같다. 골세포(MLO-Y4 cells)에서 GLP-1이 작용하는지 확인하기 위해서 GLP-1 수용체가 존재하는지 RT-PCR (A)과 western blot (B), confocal microscopy (C) 실험을 통해 확인한 결과, 골세포에서 GLP-1 수용체가 존재함을 확인할 수 있었다(Islet: GLP-1수용체 존재 - Positive control). 면역염색반응을 통해 쥐 뼈 조직의 골세포에 GLP-1수용체가 존재함을 확인할 수 있었다(D).

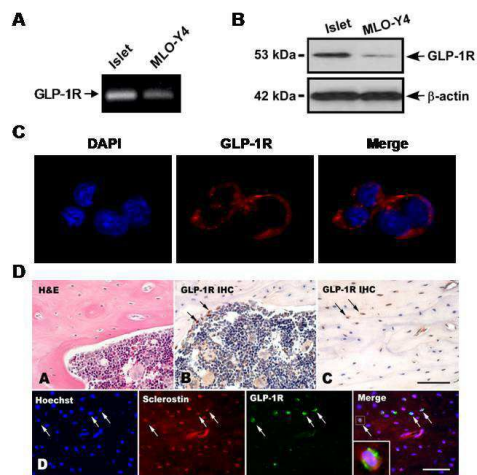
2. 골세포에서 GLP-1을 처리한 결과, SOST mRNA와 스크레로스틴 단백질의 발현이 시간경과에 따라 억제되었다.

GLP-1 수용체 작용제로서의 Exendin-4를 처리하여 SOST/sclerostin의 발현변화를 확인한 결과는 도 2와 같다. A는 Exendin-4 처리 후 real-time PCR 방법을 사용하여 SOST mRNA발현변화를 확인한 결과로, 시간경과에 따라 감소함을 확인할 수 있었다. B는 Exendin-4 처리 후 웨스턴블롯(western blot) 방법을 사용하여 세포와 배지(스크레로스틴은 분비되는 물질이므로 배지에서도 확인하였음)에 발현되는 스크레로스틴의 변화를 확인한 결과로, 시간경과에 따라 감소함을 확인할 수 있었다. Exendin-4 처리 후 감소한 SOST mRNA와 sclerostin 단백질은 H89 (PKA 저해제; GLP-1작용기전과 관련)와 Exendin-(9-39) (GLP-1 수용체 길항제)를 처리함으로써 다시 회복됨을 C와 D로부터 확인할 수 있었다.

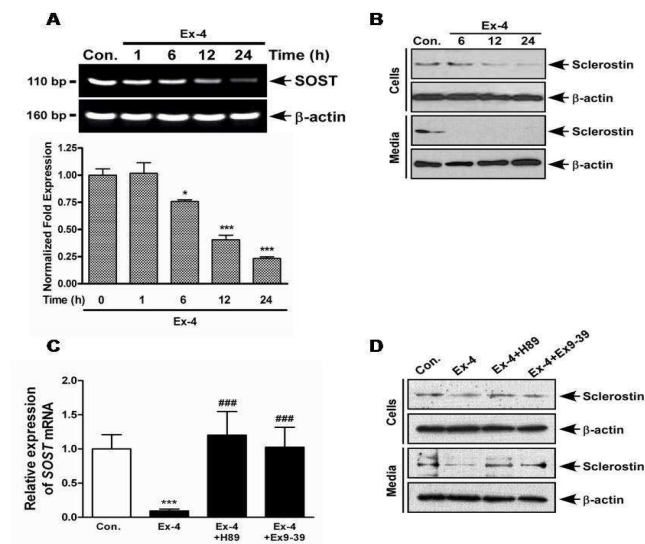
- [0056] 3. 골세포에서 고농도의 포도당조건 시(당뇨병조건의 세포모델)에서도 GLP-1은 SOST/ sclerostin의 발현을 억제시켰다.
- [0057] 당뇨병과 골다공증의 관련성을 연구하기 위해서, 당뇨병의 세포모델로서 골세포에 고농도의 포도당을 처리한 후 GLP-1이 SOST/sclerostin의 발현에 미치는 영향을 실험하였으며, 결과는 도 3과 같다. 실험결과, 기저포도당농도(5.5 mmol)에 비해 고농도의 포도당(30 mmol) 처리 시 SOST/sclerostin의 발현이 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 이 증가된 SOST/sclerostin은 exendin-4를 처리함으로써 감소하였다. GLP-1 기전과 관련된 H89과 Ex9-39를 처리함으로써 이러한 작용이 GLP-1 수용체를 통하여 PKA에 작용하여 일어남을 알 수 있었다.
- [0058] 4. SD정상 쥐에서 GLP-1은 혈청에서 발현되는 스크레로스틴을 억제시키고, 골밀도를 증가시켰다.
- [0059] SD정상 쥐를 이용하여 골밀도와 혈청에서의 스크레로스틴의 발현변화를 확인한 결과는 도 4와 같다. A는 SD정상 쥐-대조군과 exendin-4 실험군 사이의 몸무게 변화를 측정한 결과로, 변화가 없는 것으로 나타나 정상적인 체중 증가를 확인하였다. B는 대조군과 실험군의 혈당을 측정한 결과로, 변화가 없는 것으로 나타나 혈당에 영향을 받지 않음을 확인하였다. C는 대조군에 비해 exendin-4 실험군에서 혈청 스크레로스틴의 발현이 감소됨을 확인하는 결과이다. D는 골밀도 측정결과로, exendin-4 실험군에서 골밀도가 증가함을 확인하였다.
- [0060] 5. 제2형 당뇨병모델에서 GLP-1은 골밀도를 증가시켰다.
- [0061] 제2형 당뇨병 모델쥐인 OLETF를 이용하여 GLP-1이 골밀도에 미치는 영향을 실험한 결과는 도 5와 같다. A는 체중을 측정한 결과로, LETO (OLETF의 대조군-정상쥐)과 OLETF (제2형 당뇨병 모델쥐)는 정상적으로 체중이 증가함을 확인하였고, OLETF쥐는 exendin-4를 처리하면서 체중이 감소하는 것을 확인하였다(골밀도는 체중이 증가할수록 증가함.) B는 혈당을 비교해본 결과로, 혈당은 LETO에 비해 OLETF에서 증가하고, exendin-4 처리 군에서는 감소하는 경향을 보였지만, 통계적으로 유의성을 갖지는 못했다. C는 골밀도 측정결과로, GLP-1처리군에서 몸무게가 감소하는데도 불구하고 골밀도가 감소하는 것을 확인하였다.
- [0062] 6. 제2형 당뇨병모델에서 GLP-1은 스크레로스틴과 오스테오칼신(osteocalcin)의 발현을 증가시켰다.
- [0063] GLP-1에 의해 증가된 골밀도의 기전을 확인하기 위하여, 조골세포의 인자인 오스테오칼신(osteocalcin), 파골세포 인자인 TRAP 5b와 골세포의 인자인 스크레로스틴의 발현변화를 확인하였으며, 그 결과는 도 6과 같다. 오스테오칼신은 OLETF군에서 감소하지만 exendin-4 처리 군에서는 증가하였고, OLETF군에서 증가된 스크레로스틴은 exendin-4의 처리에 의해 감소하는 것을 확인하였다.
- [0064] 이상의 결과로부터 당뇨병 모델에서도 exendin-4는 골세포를 통해 스크레로스틴을 감소시키고, 이는 결국 조골세포의 오스테오칼신의 발현을 증가시킴으로써 골밀도 증가에 관여하는 것으로 판단할 수 있었다.

도면

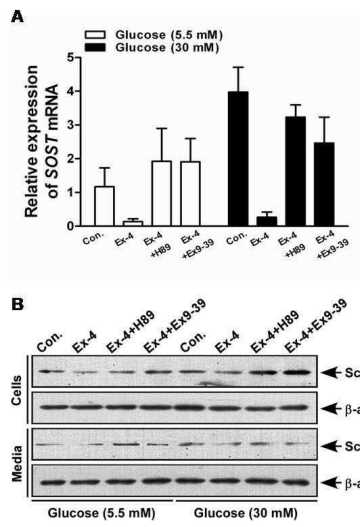
도면1



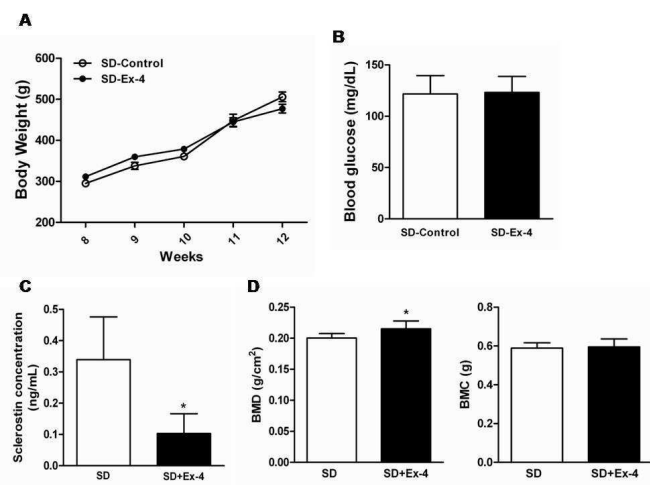
도면2



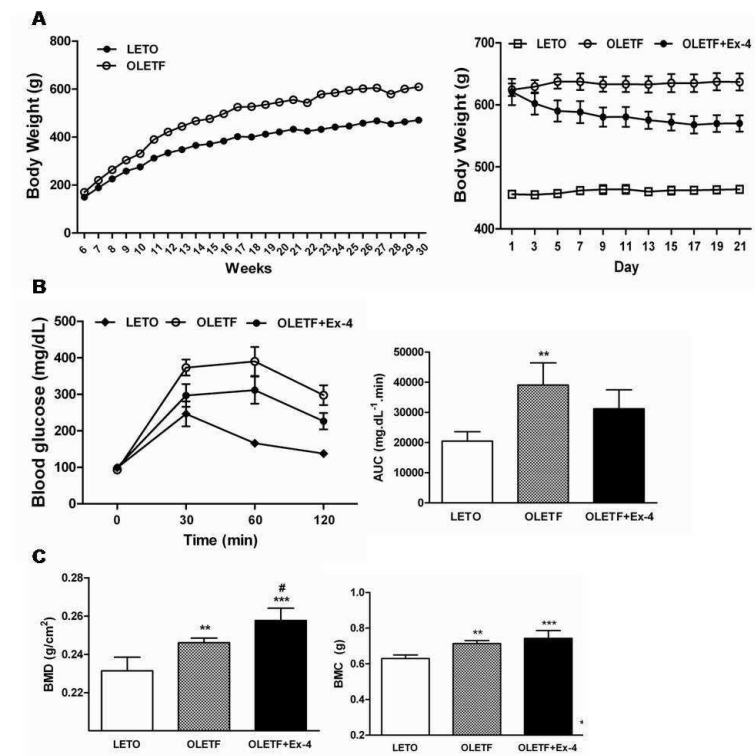
도면3



도면4



도면5



도면6

