(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0141434
(43) 공개일자 2017년12월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 31/05 (2006.01) *A61K 31/352* (2006.01)
A61K 31/4184 (2006.01) *A61K 31/502* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A23L 33/13 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0074457
(22) 출원일자 2016년06월15일
심사청구일자 2016년06월15일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
김민선
서울특별시 송파구 양재대로 1218, 257동 308호(방이동, 올림픽선수촌아파트)
노은
서울특별시 성북구 정릉로 292, 103동 1802호(정릉힐스테이트)
김준섭
경기도 안양시 동안구 경수대로733번길 23, 103동 2403호
(74) 대리인
위병갑

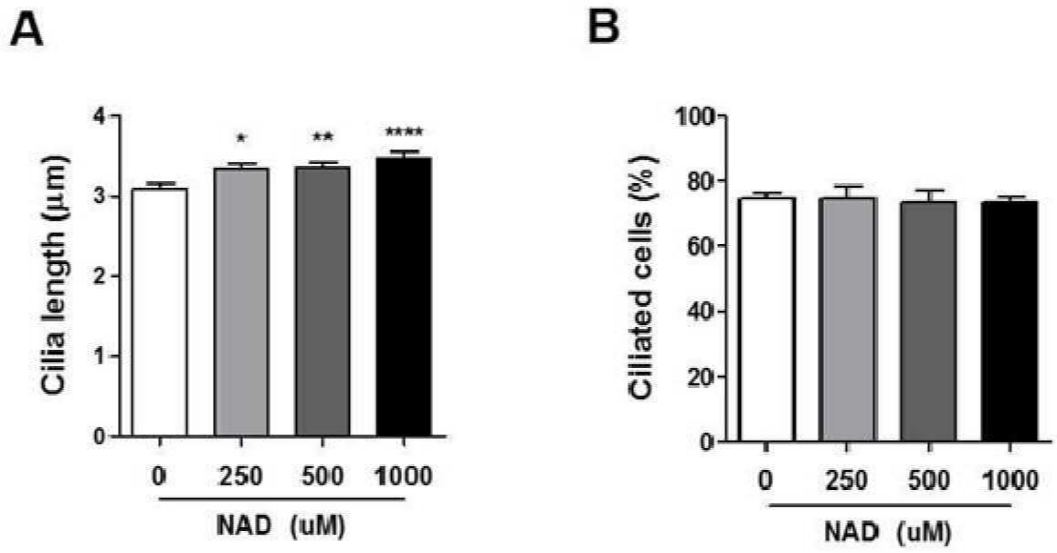
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **NAD 합성 조절제의 섬모 장애질환 예방 또는 치료에 대한 용도**

(57) 요 약

본 발명은 NAD 합성 조절제의 섬모 이상질환 예방 또는 치료에 대한 용도에 관한 것이다. 본 발명의 NAD 합성 촉진제, NAD 소모 억제제 또는 Sirt1 활성제의 투여가 다양한 세포의 섬모 길이를 증가시킴을 확인함으로써, 상기 NAD 합성 조절제를 이용하여 섬모 장애질환의 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 31/05 (2013.01)
A61K 31/352 (2013.01)
A61K 31/4184 (2013.01)
A61K 31/502 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2013M3C7A1056024
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 울산대학교
연구사업명 원천기술개발사업
연구과제명 뇌대사체 분석과 기능 연구를 통한 뇌질환 진단 및 치료 기술 개발
기 여 율 1/1
주관기관 울산대학교
연구기간 2013.08.01 ~ 2018.07.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

NAD(nicotinamide adenine dinucleotide) 합성 촉진제, NAD 소모 억제제 및 Sirt1(Sirtuin 1) 활성제로 이루어진 군중 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 섬모(cillia) 장애질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 섬모 장애질환은 알스트롬 증후군(Alstrom syndrome), 다낭성 신장질환(polycystic kidney diseas;PKD), 바뎃-비들 증후군(Bardet-Biedl Syndrom;BBS), 신장 낭종(renal cysts), 불임(infertility), 호흡기 질환(respiratory disorder), 내장역위증(situs inversus) 및 고혈압(hypertension)으로부터 선택된 1종 이상의 질환인 것인, 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 NAD 합성 촉진제는 NAD, NAD 전구체 및 NAD 생합성 관련 효소로 이루어진 군중 선택된 1종 이상인, 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 NAD 전구체는 NMN(nicotinamide mononucleotide), 또는 NR(nicotinamide riboside)인, 조성물.

청구항 5

제 3 항에 있어서, NAD 생합성 관련 효소는 Nampt(Nicotinamide phosphoribosyltransferase), Nmnat(nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase) 또는 Nrk(nicotinamide riboside kinase)인 것인, 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 NAD 소모 억제제는 PARP(Poly ADP ribose polymerase)억제제인 것인, 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 PARP 억제제는 AZD2281(올라파립, Olaparib), ABT888(벨리파립, Veliparib), G014699(루카파립, Rucaparib), MK-4827(니라파립, Niraparib), BMN-673(탈라조파립, alazoparib), BSI201(이니파립, Iniparib), GP15(O-(3-piperidino-2-hydroxy-1-propyl)nicotinic-amidoxime), NO1001(3-Aminobenzamide), ONO2231, 니코틴아미드(nicotinamide), 3-아미노벤즈아미드(3-amino benzamide), 3,4-디히드로-5-[4-(1-피페리디닐)부톡시]-1(2H)-이소퀴놀론(3,4-dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)butoxy]-1(2H)-isoquinolone), 벤즈아미드(benzamide), 퀴놀론(quinolone), 이소퀴놀론(isoquinolone), 벤조피론(benzopyrone), 사이클릭 벤즈아미드(cyclic benzamide), 벤즈이미다졸(benzimidazole), 인돌(indole) 및 펜안트리디논(phenanthridinone)로 이루어진 군중 선택된 1종 이상인 것인, 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 Sirt1 활성제는 레스베라트롤(resveratrol), 퀘르세틴(Quercetin), 부테인(Butein), 이미다조티아졸(imidazothiazole; SRT1720, SRT1460, SRT2183) 및 벤디이미다졸(benzimidazoles; STAC-5, STAC-9, STAC-10)로 이루어진 군중 선택된 1종 이상인 것인, 조성물.

청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 NAD 합성 촉진제, NAD 소모 억제제 또는 Sirt1 활성제는 세포 섬모길이를 증가시키는 것인, 조성물.

청구항 10

제 1 항에 있어서, 상기 약학적 조성물은 복강내 투여, 혈관내 투여 또는 경구 투여의 형태로 투여되는 것인, 조성물.

청구항 11

NAD(nicotinamide adenine dinucleotide) 합성 촉진제, NAD 소모 억제제 및 Sirt1 활성제로 이루어진 군중 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 섬모(cillia) 장애질환 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 NAD 합성 조절제의 섬모 이상질환 예방 또는 치료에 대한 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 섬모 (cilia)는 세포 표면에 머리카락과 같이 솟아있는 세포의 소기관으로, 섬모의 기본 구조는 9+2 혹은 9+0 구조로 배열된 미세관(microtubule)이 중심 골격(axoneme)을 이루고, 특수화된 형질막 (plasma membrane)으로 덮여 있는 구조를 가지고 있다. 거의 모든 진핵세포는 운동성이 없는 일차섬모(primary cilia)를 한 개 가지고 있다. 과거에는 일차섬모가 특별한 기능이 없는 진화 과정의 퇴화산물로 생각되었으나, 최근 일련의 연구를 통하여 일차 섬모가 외부에서 오는 다양한 감각(시각, 후각, 청각, 운동 감각, 삼투압 등)을 감지하는데 중요한 역할을 한다는 사실이 밝혀졌다. 또한 세포 내 중요한 신호전달과정이 일차섬모를 매개로 일어남이 알려지면서 세포 신호전달 체계를 통합하는 "신호전달의 허브"로서 일차섬모의 중요성이 부각되고 있다.

[0003] 섬모 장애질환은 사람의 유전성 섬모 장애 질환(ciliopathy)인 바뎃-비들 증후군(Bardet-Biedl Syndrom;BBS)이나 알스트롬 증후군(Alstrom syndrome)뿐 아니라 다낭성 신장질환(polycystic kidney diseas;PKD), 신장 낭종(renal cysts), 불임(infertility), 호흡기 질환(respiratory disorder), 내장역위증(situs inversus), 비만 및 고혈압(hypertension) 등 다양한 형태로 나타난다. 바뎃-비들 증후군과 알스트롬 증후군에서 비만증이 발생하고, 사람의 유전성 섬모장애질환과 유사하게 섬모 생성장애를 가진 생쥐에서도 비만증과 과식증이 발생하는데, 그 이유는 시상하부 뉴런에서 식욕억제 호르몬인 렙틴(leptin)의 작용이 저하되기 때문으로 생각된다.

[0004] 또한, 시상하부 뉴런의 섬모 길이를 인위적으로 짧게 하면, 렙틴, 인슐린(insulin), 포도당(glucose) 등 생리적 포만신호에 대한 시상하부 뉴런의 반응이 떨어져서 과식증이 발생한다. 이러한 연구 결과는 시상하부 뉴런의 일차 섬모의 적절한 길이가 시상하부 뉴런이 대사 신호를 정상적으로 인지하여 전신 대사의 항상성을 유지하는데 매우 중요함을 시사한다.

[0005] 한편, NAD(nicotinamide adenine dinucleotide)는 산화적 또는 환원적 대사반응에서 수소 전달을 매개하는 효소 보조인자(enzyme cofactors)로 기능을 한다. NAD는 글리세르알데히드 3-포스페이트 디하이드로게나아제(glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)에 의해 촉매되는 해당반응(glycolytic reaction) 및 TCA (tricarboxylic acid) 사이클의 네 단계에서 NADH 로 전환된다. 또한, NAD는 미토콘드리아에서 지방산과 아미노산의 산화 과정 동안에도 NADH로 전환된다. 적절한 산화환원 상태를 유지하기 위해서 NADH는 재산화되며, 미토콘드리아에서 산화적 인산화 및 ATP 합성 과정에서 전자공여자로 기능을 한다. 나아가, NAD는 시르투인(sirtuins) 및 CD38 체외효소(ectoenzymes)에 의해 촉매되는 생화학적 반응에서 중요한 보조기질(cosubstrate)로 작용한다. 시르투인(sirtuins)은 클래스 III-NAD+-의존적 탈아세틸화효소(class III-NAD+-dependent deacetylases)이며, 단식, DNA 손상, 및 산화적 스트레스와 같은 영양학적 및 환경적 스트레스에 대한 적응 반응에 있어서 중요한 역할을 한다. 시르투인은 기질이 되는 단백질의 라이신(lysine)에 결합되어 있는 아세틸 그룹을 제거하여 ADP-리보오스(ribose)로 전달한다. 시르투인에 의해 촉매되는 탈아세틸화 반응 과정 중 NAD는 nicotinamide로 분해된다. 니코틴산(nicotinic acid, NA)으로부터 시작되는 NAD 합성의 Preiss-Handler 경로는 단세포 생물에서 널리 관찰되며, NAD 합성효소에 의한 NA 부분(moiety)의 후속적인 아미드화 반응을 필요로 한다. 포유동물에서 NAD 생합성은 다음 네 개의 다른 경로를 통하여 이루어진다:

[0006] 1)트립토판으로부터의 드 노보(de novo) 합성, 2) NA 또는 니코틴아마이드(nicotinamide)로 부터의 전환, 3) 니코틴아마이드 리보시드(nicotinamide riboside, NR)로 부터 전환, 4) 재활용(salvage) 경로를 통한 니코틴아마

이드로 부터 재활용되어 합성된다. 포유류에서도 트립토판(tryptophan)으로부터 카이뉴레인(kynurenine) 경로를 통하여 NAD를 새로 합성할 수 있지만, 정상적인 NAD 수준을 유지하기에는 부족하다. 사람에서 대부분의 NAD는 니코틴아마이드로 부터 합성되며, 니코틴아마이드는 NAD+-의존적 효소 반응에서 방출된다.

[0007] 또한, 조직의 NAD 수준을 유지하기 위해 니코틴아마이드는 완전히 재활용될 필요가 있으며, 여기에는 니코틴아마이드 포스포리보실 전달효소(nicotinamide phosphoribosyl transferase, Nampt)라는 효소가 필요하다.

[0008] Nampt는 포스포리보실 그룹의 5-포스포리보실-1-피로포스페이트(PRPP)로 부터 포스포리보실-기를 니코틴아마이드로에 전달을 촉매하는 율속효소(rate-limiting enzyme)로서, 효소 반응 결과 니코틴아마이드 모노뉴클레오티드(nicotinamide mononucleotide, NMN)와 피로포스페이트(pyrophosphate)가 생성된다. 그 다음 단계로 NMN은 니코틴아마이드 모노뉴클레오티드 아데닐일 전달효소(nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase, Nmnat)에 의해 NAD로 전환된다.

[0009] PARP-1은 세포 안에서 주요한 NAD 소비자이므로, PARP의 약학적 억제는 생체 외 및 생체 내에서 세포의 NAD 수준을 증가시키고 SIRT1 활성을 강화시킬 수 있다. 따라서 PARP 억제제 개발은 대사조절장애를 동반한 질환의 한 가지 치료법으로 여겨지고 있다.

[0010] NQO1 (NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1)에 의해 매개되는 산화환원 반응이 NAD(P)H 를 NAD(P)+ 전환시켜, NAD(P)+/NAD(P)H 비율의 증가를 유도하는 방법이 있다. 비만, 당뇨병, 대사증후군, 및 퇴행성 질환과 같은 산화환원 경로의 에너지 과다섭취 또는 변화에 의해 야기되는, NAD(P)+/NAD(P)H 비율의 감소와 관련된 질병을 예방 및 치료하기 위하여, NQO1은 이러한 질병 모델들에서 NAD(P)/NAD(P)H 비율을 증가시키는 방법으로 개발될 수 있다. NQO1 활성인자의 하나인 피라노-1,2-나프토퀴논(Pyrano-1,2-naphthoquinone) 화합물(βL)은 NAD+, NAD+/NADH, 및 NADP+/NADPH 비율을 증가시키는 것으로 보고되었다.

[0011] NQO1 활성을 증가시키는, 이러한 화합물들의 대사적 효과는 더 연구될 필요가 있다. 생체 외(in vitro) 실험을 통해서 배양한 뉴런세포, 성상세포, 및 심장근육세포(cardiac myocytes)에 NAD 처리하면 산화적 스트레스에 의해 유도된 세포사멸을 감소시키는 것으로 알려져 있으며, 설치류를 이용한 생체 내(in vivo) 실험에서 외부로부터(exogenous) NAD 투여하면 허혈성 뇌손상과 심장비대증이 개선됨을 보고된 바 있다. 그러나, NAD 생합성 조절과 섬모길이와의 관계에 대한 연구는 전무하다.

[0012] 이에 본 발명자들은 NAD 합성 촉진제의 투여가 다양한 세포의 섬모의 길이를 증가시킴을 확인함으로써, NAD 합성 촉진제를 섬모 장애질환의 예방 또는 치료에 사용할 수 있다는 점을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) 대한민국등록특허 10-1604212

(특허문헌 0002) 대한민국등록특허 10-0917657

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 따라서, 본 발명의 목적은 NAD(nicotinamide adenine dinucleotide) 합성 촉진제, NAD 소모 억제제 및 sirt1 활성제로 이루어진 군 중 1 종 이상을 유효성분으로 포함하는 섬모(cillia) 장애질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공함에 있다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 NAD(nicotinamide adenine dinucleotide) 합성 촉진제, NAD 소모 억제제 및 sirt1 활성제로 이루어진 군 중 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 섬모(cillia) 장애질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공함에 있다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 NAD(nicotinamide adenine dinucleotide) 합성 촉진제, NAD 소모 억제

제 및 sirt1(Sirtuin 1) 활성제로 이루어진 군중 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 섬모 장애질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 섬모 장애질환은 상기 섬모 장애질환은 알스트롬 증후군(Alstrom syndrome), 다낭성 신장질환(polycystic kidney diseas;PKD), 바뎃-비들 증후군(Bardet-Biedl Syndrom;BBS), 신장 낭종(renal cysts), 불임(infertility), 호흡기 질환(respiratory disorder), 내장역위증(situs inversus) 및 고혈압(hypertension)으로부터 선택된 1종 이상의 질환으로부터 선택된 1종 이상의 질환일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 NAD 합성 촉진제는 NAD, NAD 전구체 및 NAD 생합성 관련 효소로 이루어진 군중 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 NAD 전구체는 NMN(nicotinamide mononucleotide) 또는 NR일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 NAD 생합성 관련 효소는 Nampt(Nicotinamide phosphoribosyltransferase), Nmnat(nicotinamide mononucleotide adenylyl transferase) 또는 Nrk(nicotinamide riboside kinase)일 수 있다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 NAD 소모 억제제는 PARP 억제제일 수 있다. 상기, PARP 억제제는 AZD2281(올라파립, Olaparib), ABT888(벨리파립, Veliparib), GO14699(루카파립, Rucaparib), MK-4827(니라파립, Niraparib), BMN-673(탈라조파립, alazoparib), BSI201(이니파립, Iniparib), GP15(O-(3-piperidino-2-hydroxy-1-propyl)nicotinic-amidoxime), NO1001(3-Aminobenzamide), ONO2231, 니코틴아미드(nicotinamide), 3-아미노벤즈아미드(3-amino benzamide), 3,4-디히드로-5-[4-(1-피페리디닐)부톡시]-1(2H)-이소퀴놀론(3,4-dihydro-5-[4-(1-piperidinyl)butoxy]-1(2H)-isoquinolone), 벤즈아미드(benzamide), 퀴놀론(quinolone), 이소퀴놀론(isoquinolone), 벤조피론(benzopyrone), 사이클릭 벤즈아미드(cyclic benzamide), 벤즈이미다졸(benzimidazole), 인돌(indole) 및 펜안트리디논(phenanthridinone)일 수 있다.

[0022] 상기 Sirt1 활성제는 레스베라트롤(resveratrol), 퀘르세틴(Quercetin), 부테인(Butein), 이미다조티아졸(imidazothiazole; SRT1720, SRT1460, SRT2183), 벤디이미다졸(benzimidazoles; STAC-5, STAC-9, STAC-10)일 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 NAD 합성 촉진제, NAD 소모 억제제 및 Sirt1 활성제는 세포 섬모길이를 증가시키는 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 약학적 조성물은 복강내 투여, 혈관내 투여 또는 경구 투여의 형태로 투여되는 것일 수 있다.

[0025] 본 발명은 또한, NAD(nicotinamide adenine dinucleotide) 합성 촉진제를 유효성분으로 포함하는 섬모(cillia) 장애질환 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0026] 본 발명의 NAD 합성 촉진제, NAD 소모 억제제 또는 Sirt1 활성제의 투여가 다양한 세포의 섬모 길이를 증가시킴을 확인함으로써, NAD 합성 촉진제를 섬모 장애질환의 예방 또는 치료에 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 NAD 투여가 N1 시상하부 뉴런 세포의 섬모길이(A) 및 섬모를 가진 시상하부 뉴런의 빈도(B)에 미치는 영향을 확인한 도이다(*means P<0.05, **means P<0.01, ***means<0.005, ****means<0.001).

도 2는 NMN(nicotinamide mononucleotide) 투여가 N1 시상하부 뉴런 세포의 섬모길이(A) 및 섬모를 가진 시상하부 뉴런의 빈도(B)에 미치는 영향을 확인한 도이다(*means P<0.05, **means P<0.01, ***means<0.005, ****means<0.001).

도 3은 Nampt(nicotinamide phosphoribosyltransferase) 투여가 N1 시상하부 뉴런 세포의 섬모길이(A) 및 섬모를 가진 시상하부 뉴런의 빈도(B)에 미치는 영향을 확인한 도이다(*means P<0.05, **means P<0.01, ***means<0.005, ****means<0.001).

도 4는 Nampt 활성저해제인 FK866의 투여가 N1 시상하부 뉴런 세포의 섬모길이(A) 및 섬모를 가진 시상하부 뉴

런의 빈도(B)에 미치는 영향을 확인한 도이다(*means P<0.05, **means P<0.01, ***means<0.005, ****means<0.001).

도 5는 Nampt 활성저해제인 FK866의 투여 또는 NMN을 함께 투여하는 경우, N1 시상하부 뉴런 세포의 섬모 길이에 미치는 영향을 확인한 도이다(*means P<0.05, **means P<0.01, ***means<0.005, ****means<0.001).

도 6은 NAD 생합성 조절과 망막색소상피세포의 섬모 길이와의 관계를 확인한 도이다(*means P<0.05, **means P<0.01, ***means<0.005, ****means<0.001).

도 7은 NAD 생합성 조절과 망막색소상피세포의 섬모 길이와의 관계를 확인한 도이다(*means P<0.05, **means P<0.01, ***means<0.005, ****means<0.001).

도 8은 PARP 억제제인 olaparib의 투여가 N1 시상하부 뉴런 세포의 섬모길이(A) 및 섬모를 가진 시상하부 뉴런의 빈도(B)에 미치는 영향을 확인한 도이다(*means P<0.05).

도 9은 Sirt1 활성제인 resveratrol의 투여가 N1 시상하부 뉴런 세포의 섬모길이(A) 및 섬모를 가진 시상하부 뉴런의 빈도(B)에 미치는 영향을 확인한 도이다(*means P<0.05).

도 10은 Sirt1 siRNA 처리를 통한 SIRT1 유전자 발현 억제가 N1 시상하부 뉴런 세포의 섬모길이(A) 및 섬모를 가진 시상하부 뉴런의 빈도(B)에 미치는 영향을 확인한 도이다(*means P<0.05).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명에서는 NAD, NAD의 전구체인 NMN(nicotinamide mononucleotide) 또는 NAD 합성관련 효소인 Nampt(nicotinamide phosphoribosyltransferase)의 투여가 N1 시상하부 뉴런 세포의 섬모길이(A) 를 증가시키나, 섬모를 가진 시상하부 뉴런의 빈도(B)에 영향을 미치지 않는다는 점을 확인하였고(도 1 내지 도 3 참조), Nampt 활성저해제인 FK866의 투여가 N1 시상하부 뉴런 세포의 섬모길이를 감축시키고(도 4 참조), NMN을 함께 투여하는 경우, N1 시상하부 뉴런 세포의 섬모 길이가 회복된다는 점을 확인하였다(도 5 참조).

[0029] 또한, NAD 생합성을 증가시키는 경우, 망막색소상피세포의 섬모 길이를 증가시킨다는 점을 확인하였다(도 6 및 도 7).

[0030] 또한, PARP 억제제인 olaparib의 투여가 N1 시상하부 뉴런 세포의 섬모길이를 증가시킨다는 점을 확인하였고(도 8), Sirt1 활성제인 resveratrol의 투여가 N1 시상하부 뉴런 세포의 섬모길이를 증가시킨다는 점을 확인하였다(도 9). 또한, SIRT1 유전자 발현 증가가 N1 시상하부 뉴런 세포의 섬모길이를 증가시킨다는 점을 확인하였다(도 10)

[0031] 따라서, 상기 결과 NAD의 생합성을 증가시키고, 소모를 억제하는 경우, 다양한 세포에서 섬모길이를 증가시킬 수 있으며, 상기 섬모길이를 증가시킴으로써, 섬모 장애질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0032] 따라서, 본 발명은 NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) 합성 촉진제, 소모 억제제 또는 sirt1 활성제를 유효성분으로 포함하는 섬모 장애질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0033] 본 명세서에 사용된 용어 "예방"은 요법제(예를 들면, 예방제 또는 치료제) 또는 요법제의 조합물을 투여하여 대상체에서 섬모 장애질환이 나타나거나 재발 또는 발전되는 것을 막는 것을 의미한다. 본 명세서에 사용된 용어 "치료"는 섬모 장애질환 환자의 증상이나 어느 하나 이상의 신체적 파라미터를 개선시키거나 조절하거나 그 발생이나 진전을 지연시키는 것을 의미한다.

[0034] 본 발명에서 NAD는 산화된 형태인 NAD+를 의미한다.

[0035] 본 발명의 약학적 조성물은 하나 이상의 약제학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0036] 또한, 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 사용하기에 적합한 담체로는 식염수, 인산염 완충 식염수, 최소 필수 배지(MEM) 또는 HEPES 완충액의 MEM을 포함하는 수성 매질을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀젼, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캅셀, 멸균 주사용액, 멸균 분말 등의 형태일 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 근육, 피하, 경피, 정맥, 비강내, 복강내 또는 경구 경로로 투여될 수 있고 바람직하게는 근육내 또는 피하 경로로 투여될 수 있다. 조성물의 투여량은 투여 경로, 동물의 연령, 성별, 체중 및 중증도 등의 여러 인자에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0038] 발명의 약학적 조성물은 하기의 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 우선, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 경질 또는 연질 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제를 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 있는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제가 포함될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 비경구 투여도 가능하며, 비경구 투여는 피하주사제, 정맥주사제, 근육 내 주사제 또는 흉부 내 주사제를 주입하는 방법 등에 의한다. 이 경우 비경구 투여용 제형으로 제제화하기 위하여 본 발명의 유효성분을 안정제 또는 완충제와 함께 물에서 혼합하여 용액 또는 현탁액으로 제조하고, 이를 앰플 또는 바이알의 단위 투여형으로 제조할 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 또는 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름 또는 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 마우스, 랫, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 그 예로는 경구, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사 등이 있다. 본 발명의 NAD 합성 촉진제는 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 적절한 방법을 선택하여 투여될 수 있다.

[0040] 다른 양태로서, 본 발명의 NAD 합성 촉진제는 기능성 식품 조성물로 이용될 수 있다. 본 발명에 따른 식품 조성물은 NAD의 섬모 장애질환의 개선 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 기능성 식품 조성물은 상기 효과를 배가시키기 위하여 다른 생리적 활성 성분, 즉 안전성이 검증된 천연의 항산화 물질 등을 추가적으로 배합하여 제조할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은, 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 정제, 과립, 분말, 캅셀, 액상의 용액 및 환으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 제형으로 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 그 형태에 있어서 특별히 제한은 없으며, 예를 들어 통상의 형태 이외에, 유동식품, 경장영양식품, 건강식품, 유소아 식품등의 형태로 제조될 수 있다. 계속적 섭취의 측면에서는 쌀밥이나 각종 조미료, 조합 유지나 마가린, 쇼트닝, 마요네즈, 드레싱 등의 유지 가공품이 가능하다. 또한, 형태는 고체 형상, 반고체 형상, 겔 형상, 액체 형상, 분말 형상 등 당업계에서 통상 사용되는 어떠한 형태도 이용가능하다. 또한, 본 발명의 식품 조성물은 과자, 가공식품, 조합 유지, 유제품, 음료, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등의 형태로 상품화할 수 있다. 추가로, 본 발명의 식품 조성물은 본 발명의 당단백질 이외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제 및 중진제, 펙트산, 알긴산, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린,알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0041] 나아가 본 발명은 섬모 장애질환 예방 또는 치료를 위한 새로운 방법으로서 NAD 자체, NAD 합성 촉진제, NAD 소모억제제 또는 Sirt1 활성제를 투여함으로써 섬모 길이증가 효과를 보았으며, 상기 물질을 투여하는 경로에 따른 최적의 투여량을 규명한 점에 특징이 있다.

[0042] 투여 경로에 따른 최적의 투여량은 앞서 기술한 바와 같이, 복강내 투여, 혈관내 투여 또는 경구투여를 사용할 수 있으며, 복강내 투여 및 혈관내 투여는 대상 개체 체중단위인 kg당 0.1 내지 100 mg의 양으로 투여하는 것이 바람직하며 경구투여 시 NAD의 투여량은 대상 개체 체중단위인 kg당 대상 개체의 체중단위인 kg당 0.1 내지 1000mg의 양으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0043] 특히 본 발명의 일실시예에 의하면, 마우스를 대상으로 NAD 합성 촉진제의 치료 효과를 규명하였는데, 이러한 효과를 도출할 수 있는 NAD의 투여량은 0.03 내지 1000mg/kg임을 확인하였는데, 이렇게 동물실험을 통해 확인한 약리물질의 처리농도는 당업계에 알려져 있는 하기 계산식을 통해 인간에게 적용할 수 있는 약리물질의 처리농도를 예상할 수 있다.

[0044] **Human 적용농도(mg/kg) = animal 적용농도(mg/[0047] kg) x animal 적용 Km지수**

[0045] 여기서, Km지수는 개체의 바디(body)에 대한 체표면적으로 환산되어진 정해진 수치로서, 성인 인간(human adult)은 37, 아이 인간(human child)은 25, mice는 3, rat는 6으로 정해져 있다. 따라서 이러한 수식을 통해 계산하면, 본 발명에서 mice를 대상으로 수행한 NAD의 처리 농도를 인간(성인) 적용 농도로 환산해 보면 0.1mg/kg ~ 3000mg/kg의 양으로 처리할 수 있음을 알 수 있는데, 인간(성인) 적용 시 복강 또는 혈관내 투여의 경우에는 0.1mg/kg ~ 300mg/kg의 양으로 처리하는 것이 바람직하고, 경구 투여의 경우에는 0.1mg/kg ~ 3000mg/kg의 양으로 처리하는 것이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 인간(성인) 적용 시 복강 또는 혈관내 투여의 경우에는 0.1mg/kg ~ 100mg/kg의 양으로 처리할 수 있고, 경구 투여의 경우에는 0.1mg/kg ~ 1000mg/kg의 양으로 처리할 수 있다.

[0046] 상기와 같이 각 투여 경로에 따른 NAD 합성 촉진제, 소모 억제제 또는 sirt1 활성제의 투여량은 상기 기술된 범위를 초과하게 되면 치료 효과가 미비할 뿐만 아니라 체내 다른 부작용을 초래할 수 있음으로 상기 기술된 범위 내에서 투여하는 것이 좋다.

[0048] 이하, 실시예에 의하여 본 발명을 상세히 설명한다. 하기 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명한 것이다.

[0049] 또한, 실시예의 실험결과는 평균 ± SEM으로 나타내었다. 통계분석은 IBM SPSS (Chicago, Iilinois)를 사용하여 수행하였다. 세 그룹 이상의 통계적 유의성은 one-way analysis of variance (ANOVA)와 post-hoc least-significant difference (LSD)테스트를 통해 검증하였다. 유의성은 $p < 0.05$ 로 정의하였다.

[0052] **[실시예 1]NAD^+ 투여와 N1 시상하부 뉴런 세포의 섬모 길이와의 관련성 확인**

[0053] **1. N1 시상하부 뉴런 세포주 배양**

[0054] N1 시상하부 뉴런 세포주를 배양하기 위하여, 10% FBS (Invitrogen)와 항생제인 penicillin/streptomycin (100 units/ml each)을 함유한 DMEM (Invitrogen) 배지를 사용하였으며, 37℃, 5% CO_2가 포함된 공기가 공급되는 CO_2 배양기 내에서 배양하였다. 실험에 앞서 12 well plate에 1×10^5 N1 세포를 폴리스티렌 (polystyrene) 세포배양 용기에 분주하였다. 섬모 생성을 유도하기 위하여 세포의 confluency가 90%에 이르렀을 때 FBS를 포함하지 않은 DMEM 배지로 바꾸어 12시간 동안 배양 후 약물을 처리하였다.

[0056] **2. 세포 내 NAD^+ 처리**

[0057] N1 시상하부 뉴런세포주에 세포내의 NAD+ 양에 영향을 주는 약물에 의한 섬모의 길이변화를 확인하기 위하여, 12 well plate에 세포를 배양 후 세포에 NAD (Sigma)를 250 내지 1000 mM의 농도로 6시간 동안 처리하였다. 각각의 약물은 한번에 두 well 이상 처리하였고, 세 번 이상의 독립적 실험을 통해 반복하였다.

[0059] **3. 섬모 면역염색**

[0060] 시상하부 뉴런세포에서 섬모 길이를 분석하기 위하여, 섬모의 염색 마커(marker)로 알려진 adenylyl cyclase-3 혹은 acetylated α-tubulin에 대한 일차항체를 사용하여 면역염색을 수행하였다. 배양된 세포를 PBS로 세척 후 세포를 4% paraformaldehyde로 상온에서 15분간 고정시키고, 1% Triton-X으로 투과 처리(permeabilization)한 후, blocking solution (3% normal goat serum)에 60 분간 처리하였다. 이 후, acetylated α-tubulin 항체 (1:1000 dilution; mouse; Sigma) 또는 adenylyl cyclase-3 항체 (1:500 dilution; rabbit; Santa Cruz Biotechnology)에 4℃에서 48시간 반응시켰다. 이후 Alexa Fluor 형광이 결합되어있는 이차항체 (1:1000; Invitrogen)로 상온에서 1시간 반응시킨 뒤 세포 형태 분석을 위해서 DAPI로 세포핵을 면역 염색 한 후, 마운팅을 하여 공초점 현미경으로 관찰하였다.

[0062] **4. 시상하부 뉴런 세포에서 섬모의 길이와 개수 분석**

[0063] 시상하부 뉴런 세포의 섬모의 개수와 길이는 Image-Pro Plus (Media Cybernetics Inc., Silver Spring, MD)로 측정하였다. 뉴런 세포의 섬모들은 well 당 100개 이상을 무작위적으로 선택하여 분석하였다. 섬모를 가진 세포의 비율은 10개의 선택된 영역에서 섬모의 개수를 DAPI로 염색된 핵들의 개수로 나누어 계산하였다.

[0065] **5. 결과**

[0066] 상기의 결과를 도 1에 나타내었다. 시상하부 뉴런 N1 세포에 250, 500, 1000μM 농도의 NAD를 6 시간 동안 처리하는 경우, 모든 농도의 NAD 처리군에서 대조군에 비하여 일차섬모의 길이가 유의하게 길어짐을 확인하였다(대조군 3.1 ± 0.06μm; 250μM NAD 처리군: 3.3 ± 0.07μm; 500μM 처리군: 3.4 ± 0.07μm; 1000μM NAD 처리군: 3.5 ± 0.08μm; 도 5의 A).

[0067] 또한, 섬모를 가진 시상하부 뉴런 세포의 빈도는 NAD 처리에 의하여 변하지 않았다(도 1의 B). 상기 결과는 NAD^+ 투여가 시상하부 뉴런 세포에서 일차 섬모의 새로운 생성을 촉진하기보다 이미 형성된 섬모의 길이를 증가시킴을 시사하였다.

[0069] **[실시예 2]NAD^+ 생합성 과정의 전구체인 NMN(nicotinamide mononucleotide)의 투여와 시상하부 N1 뉴런세포 섬유길이와의 관계 확인**

[0070] 실시예 1과 동일한 방법으로, 50, 100, 200 uM 농도로 6시간 동안 처리한 뒤 섬모의 길이와 섬모를 가진 세포의 빈도를 확인하였다. 이의 결과를 도 2에 나타내었다.

[0071] 도 2에 나타난 바와 같이, NMN 50μM의 농도부터 섬모의 길이가 대조군에 비해 길어짐을 확인하였다(대조군: 3.1 ± 0.06μm; 50μM NMN 처리군: 3.4 ± 0.07μm; 100uM NMN 처리군: 3.5 ± 0.08μm; NMN 200μM 처리군: 3.5 ± 0.07μm; 도 2의 A). 또한, NMN 50μM 또는 100μM의 농도로 처리한 경우, 섬모를 가진 세포의 빈도가 대조군에 비해 유의하게 높음을 확인하였다(대조군: 74 ± 1.7%; 50μM NMN: 83 ± 3.1%; 100 mM NMN: 3 ± 2.8%). 이상의 결과는 NAD 처리와 유사하게 NAD 전구체인 NMN 처리도 시상하부 뉴런 섬모 길이를 증가시킬 수 있음을 보여준다.

[0073] **[실시예 3]NAD^+ 생합성 과정의 효소인 Nampt(Nicotinamide phosphoribosyltransferase)의 투여와 시상하부 N1 뉴런세포 섬유길이와의 관계 확인**

[0074] 실시예 1과 동일한 방법으로, NAD 생합성과정의 중요한 효소인 Nampt (Nicotinamide phosphoribosyltransferase)를 시간별 또는 농도별로 처리한 후, 상기 효소의 투여가 일차 섬모에 미치는 영향을 확인하였다. 이의 결과를 도 3에 나타내었다.

[0075] 도 3에 나타난 바와 같이, N1 시상하부 뉴런세포에 10, 50 및 100μM 농도의 Nampt를 6시간 동안 처리한 경우, 50μM 이상의 농도에서 섬모의 길이가 유의하게 길어짐을 확인하였다(대조군: 2.8 ± 0.09μm; 10μM Nampt: 3.1 ± 0.09μm; 50μM Nampt: 3.2 ± 0.10μm; 100μM Nampt: 3.2 ± 0.11μm; 도 3의 A).

[0076] 또한, 시상하부 뉴런 세포 중 섬모를 가지고 있는 세포의 빈도는 Nampt 처리에 의해 유의한 차이를 보이지 않았다(도 3의 B). 이상의 결과는 Nampt 처리로 인한 세포 내 NAD^+ 양의 증가가 시상하부 뉴런의 알차섬모의 길이를 증가시키는 결과를 뒷받침한다.

[0078] **[실시예 4]Nampt 활성을 억제하는 FK866 투여와 시상하부 N1 뉴런세포 섬유길이와의 관계 확인**

[0079] **1. FK866 투여로 인한 시상하부 N1 뉴런세포 섬유길이 감소현상 확인.**

[0080] 실시예 1과 동일한 방법으로, Nampt 활성을 억제하는 FK866을 1, 10 및 100nM로 6시간 동안 처리하고 섬모의 길

이와 섬모를 가진 세포의 빈도에 미치는 영향을 확인하였다. 이의 결과를 도 4에 나타내었다.

[0081] 도 4에 나타난 바와 같이, 시상하부 뉴런 N1 세포에서 FK866을 1, 10 및 100nM을 6시간 동안 처리한 경우, 10nM 이상의 농도에서 섬모의 길이가 유의하게 짧아짐을 확인하였다(대조군: 2.2 ± 0.07㎛; 1nM FK866 2.2 ± 0.08 ㎛; 10nM FK866 1.9 ± 0.07㎛, 100nM FK866: 1.7 ± 0.06㎛; 도 4의 A).

[0082] 또한, 시상하부 뉴런 세포 중 섬모를 가지고 있는 세포의 빈도는 FK866 처리에 의하여 유의한 차이를 보이지 않음을 확인하였다. 상기의 결과는 Nampt 억제제 처리로 인해 세포 내 NAD^+ 생합성이 줄어들면 시상하부 뉴런의 일차섬모의 길이를 감소시키는 결과로, Nampt에 의한 세포 내 NAD^+ 양의 증가가 시상하부 뉴런의 일차섬모의 길이를 증가시키는 결과를 뒷받침한다.

[0084] **2. FK866와 NMN(NAD 전구체)를 동시 투여한 경우, 인한 시상하부 N1 뉴런세포 섬유길이 회복 확인.**

[0085] N1 시상하부 뉴런 세포주에 FK866과 NMN을 동시에 6시간 처리한 경우, 일차 섬모에 미치는 영향을 확인하였다. 이의 결과를 도 5에 나타내었다.

[0086] 도 5에 나타난 바와 같이, 시상하부 뉴런 세포에 FK866 100nM을 처리하였을 때 대조군에 비해 섬모의 길이가 유의하게 짧았고, FK866 100nM 와 NMN 100㎛M을 함께 처리한 경우, 섬모의 길이가 대조군만큼 길어짐을 확인하였다(대조군: 2.3 ± 0.17㎛; 100 nM FK866: 1.7 ± 0.11㎛; 100nM FK866 + 100uM NMN: 2.3 ± 0.10㎛; 도 5의 A).

[0087] 또한, 전체 세포 중 섬모를 가지고 있는 세포의 빈도는 FK866만 처리한 경우와 FK866과 NMN을 함께 처리한 경우, 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다(도 5의 B). 상기의 결과로부터 Nampt 활성 저해에 의한 세포내 NAD 감소가 섬모의 길이를 짧게 함을 알 수 있고, NAD 전구체인 NMN을 처리하여 NAD 양을 늘려주면 섬모의 길이가 다시 길어짐을 알 수 있다.

[0089] **[실시예 5]NAD 생합성 과정과 망막색소상피세포의 섬모길이와의 관계 확인.**

[0090] **1.NAD, NMN 및 Nampt의 투여와 망막색소상피세포의 섬모길이와의 관계 확인.**

[0091] **(1)세포 배양**

[0092] 망막색소상피세포의 배양은 하기와 같이 수행하였다. 먼저, 실시예 1의 뉴런세포의 배양과 동일한 방법을 이용하였으나, 배양 Smo-eGFP를 안정적으로 발현하는 hTERT-RPE 세포주 사용하였고, 10% FBS (Invitrogen)와 항생제인 penicillin/streptomycin (100 units/ml each)을 함유한 DMEM/F12 (1:1, Gibco) 배지를 사용하였다.

[0093] **(2)섬모 면역 염색**

[0094] 상기 배양된 세포를 PBS로 세척 후 세포를 100% Methanol로 -20℃에서 4분간 고정 시킨 후, blocking solution (5% FBS in PBS)을 상온에서 10분간 처리하였다. GFP가 발현이 되는 세포이기 때문에 1,2차 항체를 사용할 필요 없이 세포 형태 분석을 위해서 DAPI (1:10000)로 상온에서 15분간 세포핵을 면역 염색 한 후 마운팅을 하여 공초점 현미경으로 관찰하였다.

[0095] **(3) 결과**

[0096] 실시예 1과 동일한 방법으로 NAD 생합성과 세포의 섬유길이와의 관계를 확인하였다. 이의 결과를 도 6에 나타내었다.

[0097] 도 6에 나타난 바와 같이, NAD 1mM, NMN 100㎛M 또는 Nampt 50nM을 망막색소상피세포에 처리하는 경우, 대조군에 비하여 유의하게 섬모길이가 길어짐을 확인하였다(대조군: 3.7 ± 0.13㎛; 1mM NAD: 4.6 ± 0.18㎛; 100㎛M NMN: 5.1 ± 0.16㎛; 50nM Nampt 5.2 ± 0.14㎛). 상기의 결과는 망막색소상피세포 내의 NAD^+의 양적인 증가가 섬모의 길이를 증가시키는데 기여함을 시사한다.

[0099] **2. FK866 투여와 망막색소상피세포의 섬모길이와의 관계 확인.**

[0100] 망막색소상피세포에 Nampt 활성저해제인 FK866을 100nM 농도로 6시간동안 처리 또는 FK866과 함께 NMN 100μM를 처리하였을 경우, 섬모길이를 확인하였다. 이의 결과를 도 7에 나타내었다.

[0101] 도 7에 나타난 바와 같이, FK866을 100nM 농도로 6시간 동안 처리한 경우, 섬모의 길이가 대조군에 비해 유의하게 짧아짐을 확인하였고, FK866과 함께 NMN 100μM를 처리하였을 경우, 대조군보다 길어짐을 확인하였다(대조군: 4.7 ± 0.16μm; 100nM FK866: 3.8 ± 0.14nm; 100nM FK866 + 100μM NMN: 5.2 ± 0.16μm). 상기의 결과는 Nampt에 의한 NAD 생합성이 섬모길이 조절에 관여함을 뒷받침하는 결과이다.

[0103] **[실시예 6]PARP 억제제 투여에 의한 세포내 NAD 양의 증가가 시상하부 N1 뉴런세포 섬모길이에 미치는 영향 확인.**

[0104] 실시예 1과 동일한 방법으로 PARP 억제하는 olaparib을 이용하여, 세포 내 NAD+를 소모하는 효소인 PARP(poly ADP-ribose polymerase)를 억제하는 olaparib을 2.5, 5, 10μM로 16시간 처리하고 섬모의 길이와 섬모를 가진 세포의 빈도에 미치는 영향을 도 8에 나타내었다.

[0105] 도 8에 나타난 바와 같이, Olaprib 5μM의 농도부터 섬모의 길이가 대조군에 비해 길어짐을 확인하였다(대조군: 2.9 ± 0.07μm, olaparib 2.5μM: 3.0 ± 0.08μm, olaparib 5μM: 3.3 ± 0.08μm, olaparib 10μM: 3.5 ± 0.07μm; 도 8의 A).

[0106] 시상하부 뉴런 세포 중 섬모를 가지고 있는 빈도는 olaparib 처리에 의해 유의한 차이를 보이지 않았다(도 8의 B). 이상의 결과는 세포 내 NAD+ 소모를 억제하여 NAD+의 양을 늘렸을 때 시상하부 뉴런의 섬모의 길이를 증가시키는 결과를 뒷받침한다.

[0108] **[실시예 7]Sirt1 활성제 투여와 시상하부 N1 뉴런세포 섬모길이와의 관계 확인**

[0109] **1.Resveratrol의 투여와 시상하부 N1 뉴런세포 섬모길이와의 관계 확인.**

[0110] 세포 내 SIRT1 활성을 증가시키는 약물인 resveratrol이 시사하부 뉴런 N1 세포에 섬모의 길이에 시간, 농도 별로 미치는 영향을 본 결과를 도 9에 나타내었다.

[0111] Resveratrol을 N1 세포에 5, 10, 20μM로 16시간 처리하였을 때 10 uM의 농도부터 섬모의 길이가 대조군에 비해 길어짐을 확인하였다 (대조군: 2.7 ± 0.08μm, resveratrol 5μM: 2.8 ± 0.08μm, resveratrol 10μM: 3.2 ± 0.10μm, resveratrol 20μM: 3.6 ± 0.14μm; 도 9의 A).

[0112] 시상하부 뉴런 세포 중 섬모를 가지고 있는 빈도는 reveratrol 처리에 의해 유의한 차이를 보이지 않았다 (도 9의 B). 이러한 결과는 시상하부 NAD+ 양의 증가에 의한 SIRT1의 활성화가 시상하부 뉴런 섬모 길이의 증가에 기여할 것을 시사하는 결과이다.

[0114] **2. SIRT1 siRNA 투여와 시상하부 N1 뉴런세포 섬모길이와의 관계 확인.**

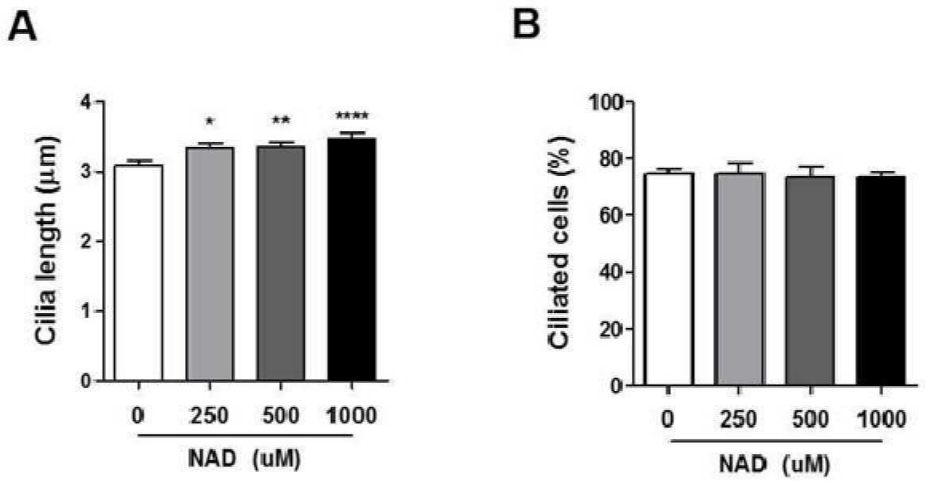
[0115] SIRT1 siRNA를 투여하여 SIRT1의 발현을 감소시키고 시사하부 뉴런 N1 세포에 섬모의 길이에 미치는 영향을 본 결과를 도 10에 나타내었다.

[0116] 먼저 SIRT1 siRNA를 N1 세포에 100 nM로 48시간 처리하여 SIRT1 유전자 발현을 억제한 후, NMN 또는 증류수를 6시간 처리하였다. NT siRNA 처리군에서는 대조군에 비해 NMN 투여가 섬모의 길이가 유의하게 증가시켰으나 (대조군: 2.9 ± 0.08μm, NMN 100μM: 3.5 ± 0.09μm; 도 10의 A), SIRT1 siRNA 처리군에서는 NMN 투여가 섬모의 길이에 미치는 영향이 상쇄되었다 (대조군: 2.9 ± 0.09μm, NMN 100μM: 2.8 ± 0.09μm; 도 10의 A).

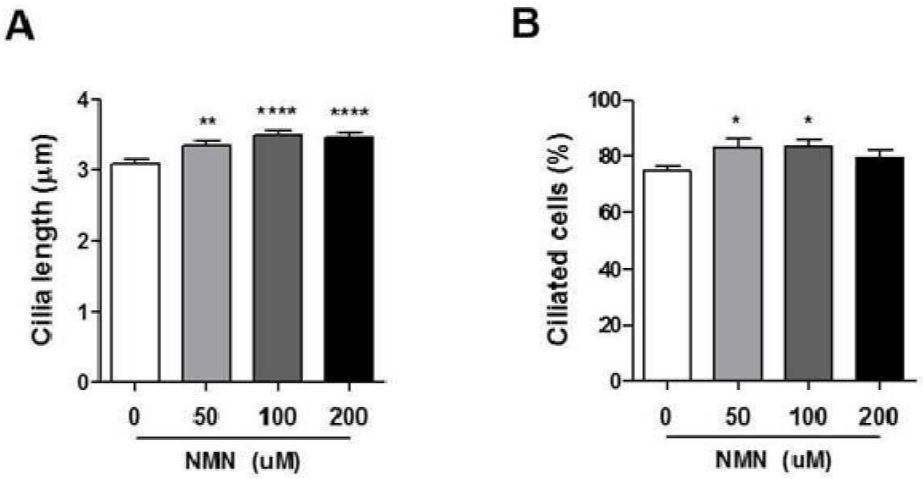
[0117] 시상하부 뉴런 세포 중 섬모를 가지고 있는 빈도는 NMN 또는 SIRT1 siRNA 처리에 의해 유의한 차이를 보이지 않았다 (도 10의 B). 이러한 결과는 시상하부 뉴런세포 내의 NAD 양에 증가에 의한 섬모 길이의 증가에 SIRT1 활성화가 필요함을 시사하는 결과이다.

도면

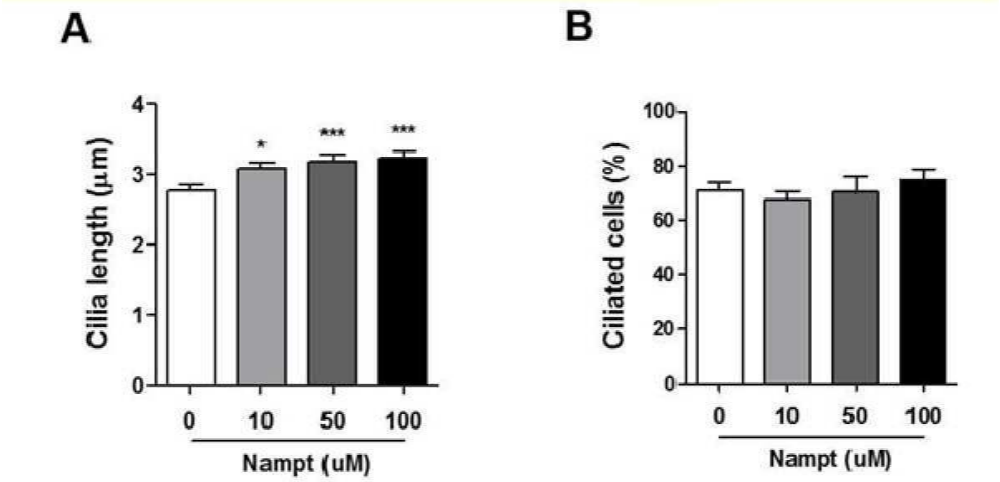
도면1


A
B
Cilia length (μm)
Ciliated cells (%)
0
250
500
1000
NAD (uM)
*
**
****

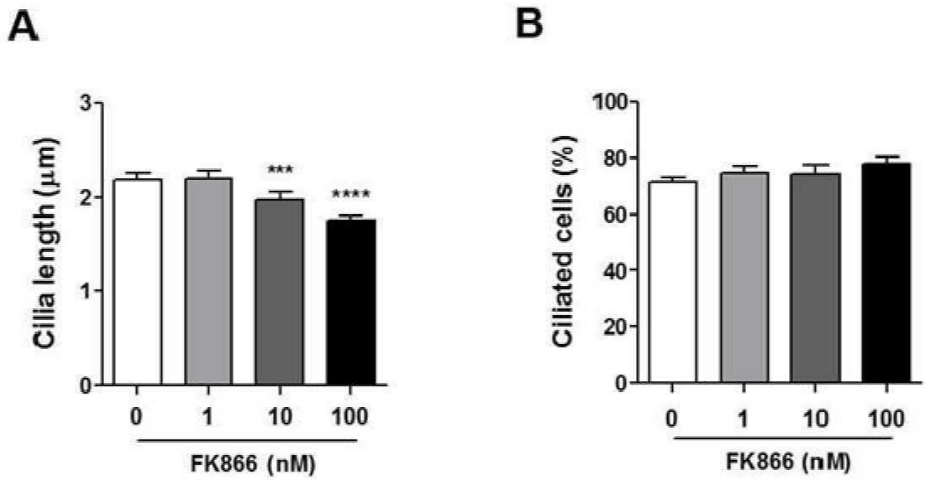
도면2


A
B
Cilia length (μm)
Ciliated cells (%)
0
50
100
200
NMN (uM)
**
****
*

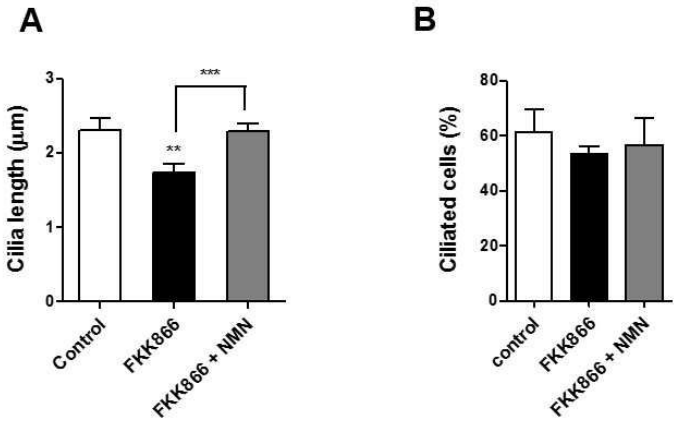
도면3


A
B
Cilia length (μm)
Ciliated cells (%)
*
***
***
0
10
50
100
Nampt (uM)

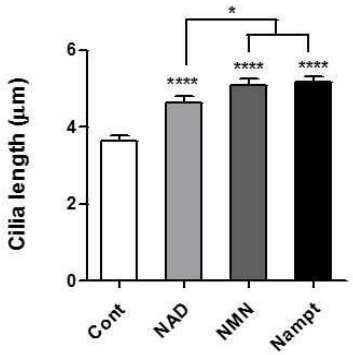
도면4


A
B
Cilia length (μm)
Ciliated cells (%)
***
****
0
1
10
100
FK866 (nM)

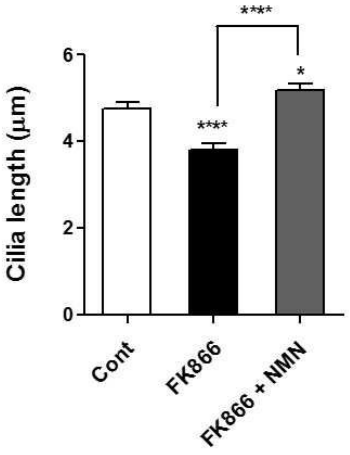
도면5


A
B
Cilia length (μm)
Ciliated cells (%)
***
**
Control
FKK866
FKK866 + NMN
control
FKK866
FKK866 + NMN

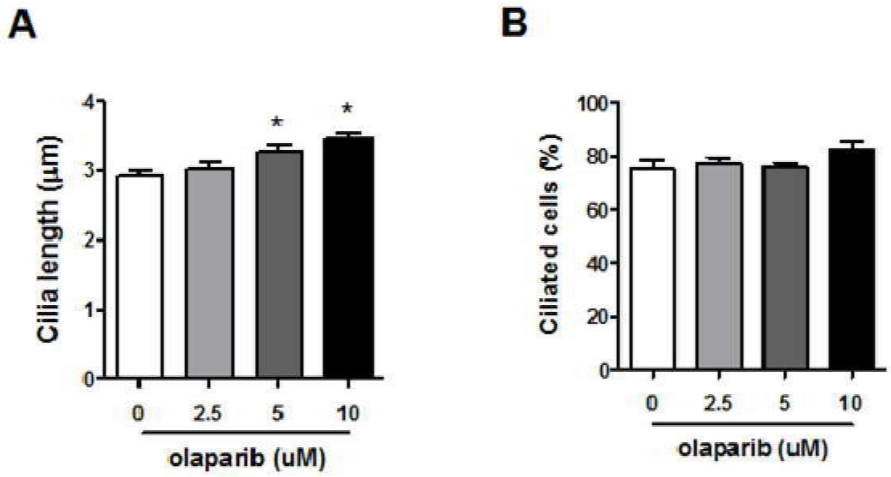
도면6


Cilia length (μm)
0
2
4
6
*
****
****
****
Cont
NAD
NMN
Nampt

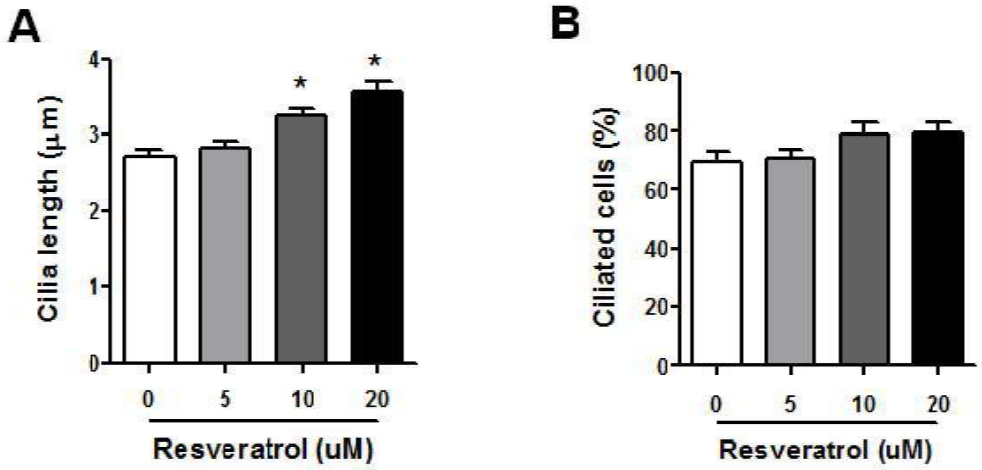
도면7


Cilia length (μm)
0
2
4
6
****
****
*
Cont
FK866
FK866 + NMN

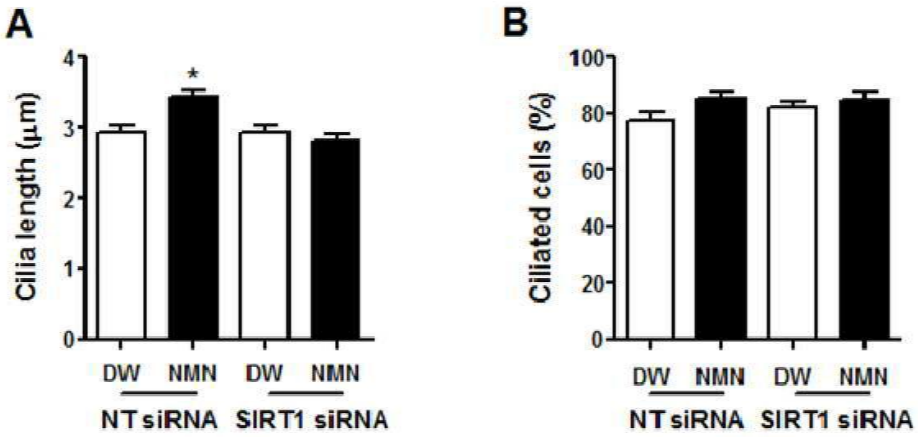
도면8


A
Cilia length (μm)
0
1
2
3
4
*
*
0
2.5
5
10
olaparib (uM)
B
Ciliated cells (%)
0
20
40
60
80
100
0
2.5
5
10
olaparib (uM)

도면9


A
Cilia length (μm)
0
1
2
3
4
*
*
0
5
10
20
Resveratrol (uM)
B
Ciliated cells (%)
0
20
40
60
80
100
0
5
10
20
Resveratrol (uM)

도면10


A
Cilia length (μm)
0
1
2
3
4
*
DW
NMN
DW
NMN
NT siRNA
SIRT1 siRNA
B
Ciliated cells (%)
0
20
40
60
80
100
DW
NMN
DW
NMN
NT siRNA
SIRT1 siRNA