(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년08월02일
(11) 등록번호 10-1884770
(24) 등록일자 2018년07월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A23L 33/13* (2016.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A23L 33/13 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0020631
(22) 출원일자 2017년02월15일
심사청구일자 2017년02월15일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020120004860 A
KR101344025 B1

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
조은경
대전광역시 유성구 봉명로 48, 805동 702호 (원신흥동, 신안인스빌리베라)
이혜미
대전광역시 서구 가장로 106, 116동 1501호 (가장동, 삼성 래미안아파트)
(74) 대리인
김원준

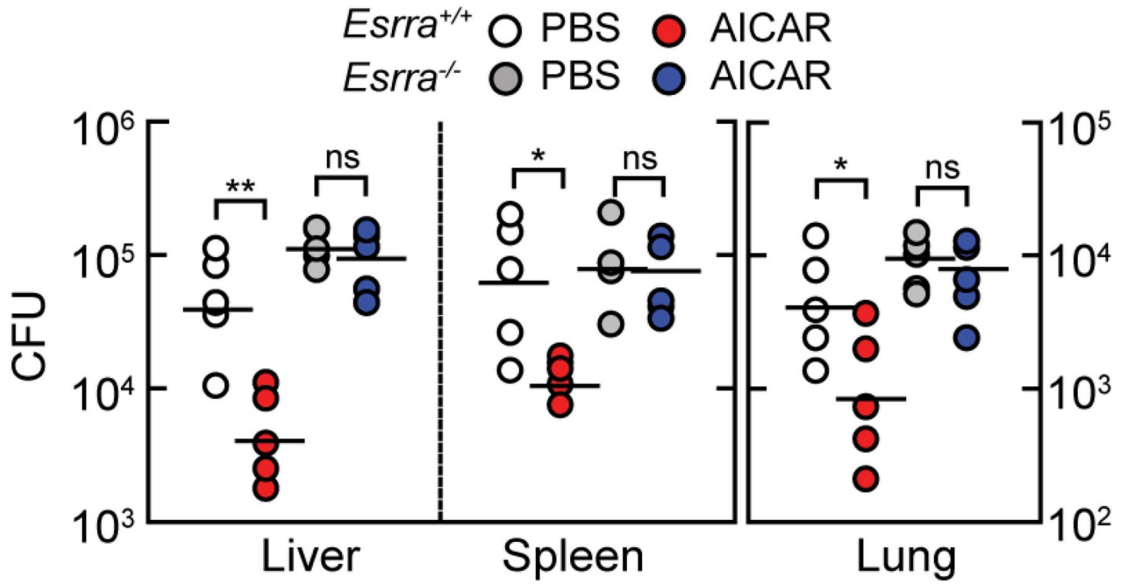
전체 청구항 수 : 총 7 항 심사관 : 정의준

(54) 발명의 명칭 **ERRα를 유효성분으로 하는 항결핵 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 결핵 예방 및 치료/증상 개선용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 ERRα(Estrogen related receptor α)를 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 및 치료/증상 개선용 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A61K 48/005 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2018.05)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
C12Q 2600/106 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
Y10S 514/924 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI15C0395
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 충남대학교 산학협력단
연구사업명 감염병위기대응기술개발
연구과제명 자가포식 기반 결핵 방어기전 규명 및 숙주표적 병합치료 후보물질 발굴
기 여 율 1/1
주관기관 보건복지부
연구기간 2016.07.01 ~ 2017.06.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

ERRα(Estrogen related receptor-α)를 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 ERRα는 ERRα를 코딩하는 유전자의 형태로 제공되는 것을 특징으로 하는 결핵 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 유전자는 발현벡터 내에 포함된 형태로 제공되는 것을 특징으로 하는 결핵 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 결핵은 다제내성 결핵, 폐결핵, 담결핵, 골결핵, 인후결핵, 임파선결핵, 폐허증, 유방결핵 또는 척추결핵인 결핵 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 5

ERR-α(Estrogen related receptor-α)를 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 및 증상 개선용 건강식품 조성물.

청구항 6

(A) 대식세포에 항결핵 효능을 측정하고자 하는 시료를 처리하는 단계;

(B) 상기 시료의 처리에 의한 ERRα 단백질 발현수준의 변화를 측정하는 단계; 및

(C) 상기 (B) 단계에서 측정된 ERRα 단백질의 발현수준이 대조군에 비해 증가된 경우 항결핵 효능을 가질 것으로 판단하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 항결핵제의 스크리닝 방법.

청구항 7

(A) 결핵균 감염 환자의 혈액 시료에서 대식세포를 수집하는 단계;

(B) 시험관 내에서 상기 대식세포에 항결핵제를 처리하는 단계; 및

(C) 항결핵제에 의한 ERRα 단백질의 발현수준의 변화를 측정하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 환자별 항결핵제 감응성 예측을 위한 정보 제공 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 새로운 작용기작에 의한 항결핵제에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 ERRα가 결핵균 감염 시 대식세포에서 자가포식을 활성화하고 결핵균의 성장을 저해한다는 새로운 사실에 기초한 ERRα를 유효성분으로 하는 항결핵 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 결핵(tuberculosis)은 미코박테륨, 특히 결핵균의 감염에 의해 발생하는 전염성 질환이다. 세계적으로 전체 인구의 1/3이 결핵균에 감염되어 있는 것으로 추정되며 매년 약 800만명의 새로운 환자가 발생한다. 대부분의 감염자들은 증상이 없고 그 중 1/10 정도가 발병하며, 발병 시 적절한 치료를 하지 않으면 그 중 절반 이상이 사망에 이르게 된다. 전형적인 증상은 피가 섞인 가래를 동반한 기침, 오한, 식은땀, 체중 감소로 몸의 어느 기관에나 감염될 수 있기 때문에 감염된 기관에 따라 다양한 증상을 초래한다.

[0003] Mycobacterium tuberculosis(Mtb)는 결핵의 주된 원인균으로 파고솜(phagosome)과 리소좀의 융합을 효과적으로 억제하여 숙주의 대식세포 내에서 생존하는 것으로 알려져 있다. 자가포식(Autophagy)은 세포내 손상 기관, 노화된 단백질 및 응집체가 리소좀의 분해로 표적화되기 위한 필수적인 과정으로, 세포 내 항상성의 유지에 기여한다. 대식세포에서 자가포식을 증가시키면 다양한 세포외 병소, 특히 Mtb에 대하여 선천적인 숙주의 면역을 증가시킨다. 본 발명자들은 결핵균에 감염된 대식세포에서 항결핵제가 결핵균의 생존율을 감소시키고, 자가포식을 유도하며, 활성 산소종을 분석시키는 것을 확인하고, (A) 대식세포에 결핵균을 감염시키는 단계; (B) 결핵균이 감염된 대식세포에 항결핵 효능을 측정하고자 하는 시료를 처리하는 단계; (C) 상기 시료의 처리에 의한 ① 자가포식의 유도 여부, ② 활성산소종의 증가 여부 및 ③ 결핵균 생존율의 감소 여부로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상을 확인하는 단계;를 포함한 항결핵제의 스크리닝 방법에 대해 출원하여 제10-1344025호로 등록받은 바 있다.

[0004] 핵 수용체는 다양한 호르몬과 리간드에 결합하며, 다양한 생리 과정에 관여하는 유전자의 전사 조절에 중요한 역할을 한다. 핵 수용체 중 특이적으로 결합하는 내인성 리간드가 밝혀지지 않은 수용체 그룹을 고아핵수용체(orphan nuclear receptors)로 분류하며, 이들은 세포 내 존재하는 다른 핵수용체 및 전사인자들과의 상호작용을 통해서 타깃 DNA에 결합 후, 전사효능의 조절을 통해서 다양한 기능을 수행한다. 에스트로겐 관련 수용체 α(ERRα, Estrogen related receptor α)는 ERRα(NR3B1), ERRβ (NR3B2) 및 ERRγ (NR3B3)로 구성된 ERR군에 속하는 고아핵수용체 중 하나이다. ERRα는 DNA 결합 영역이 인간 에스트로겐 수용체 α와 구조적으로 유사하다는 것에 기반하여 처음으로 확인되었지만, 천연 에스트로겐이나 에스트로겐 유사 분자에는 결합하지 않는다. ERRα는 다양한 세포, 조직 및 기관에서 포도당과 지질 대사, 미토콘드리아 생성 및 대사 적응을 포함하는 에너지 대사의 중요한 전사 조절인자로서 기능하는 것으로 보고되고 있다. ERR-α는 ERR-β나 ERR-γ와 같은 다른 ERRs와 마찬가지로 다양한 생리작용에 필요한 에너지 수요를 충족시키기 위하여 다양한 호르몬과 대사 신호를 특정 유전자의 발현 프로파일로 해석하는 공-조절단백질이다. 최근 ERRs가 대사질환과 암의 잠재적인 치료제가 될 수 있다는 증거들이 제시되고 있다. ERR-α는 효과 T 세포(effector T cell) 활성화와 분화에 필수적인 대사 조절에 관여한다. 최근의 연구는 ERR-α가 NF-κB 활성화와 염증 반응을 활성화시키는 것에 의해 간세포암종(hepatocellular carcinoma)을 촉진시킴을 보고하기도 하였다. 이들 보고들은 ERRs가 면역반응 및 감염에 잠재적인 역할을 담당할 것임을 시사하지만, 면역 및 감염 반응의 조절에서 각 ERR의 특정 역할에 대한 연구는 아주 미미하며 결핵과의 연관 또한 알려진 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 등록특허 제10-1344025호

(특허문헌 0002) 등록특허 제10-1498942호

(특허문헌 0003) 미국등록특허 제9539222호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 새로운 작용기작에 의한 항결핵제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 기작에 의거하여, 새로운 항결핵제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 본 발명은 또한 상기 기작을 적용하여, 환자들에게 감응성이 높은 항결핵제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 ERRα(Estrogen related receptor-α)를 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0010] 항결핵능을 가진 것으로 알려진 AICAR나 레스베라트롤은 대식세포에서 ERRα의 발현을 증가시켰으며, 결핵균이 감염된 마우스 또는 대식세포에 AICAR나 레스베라트롤을 처리할 경우 결핵균의 생존율과 면역병리적 반응이 감소하였다. 그러나 ERRα가 결핍된 마우스 또는 ERRα 결핍 마우스 유래의 대식세포에서는 상기와 같은 AICAR와 레스베라트롤의 항결핵능이 현저히 감소하였다. 이는 AICAR와 레스베라트롤의 항결핵능이 이들에 의해 대식세포에서 발현이 증가된 ERRα에 주로 기인함을 나타낸다. AICAR나 레스베라트롤의 항결핵능은 결핵균 감염 대식세포에서의 자가포식의 증가와 관련된 것으로 알려져 있다. ERRα 역시 결핵균 감염시 대식세포에서의 자가포식을 활성화시키는 것에 의해 항결핵 효능을 갖는 것을 시사하였다.

[0011] 본 발명에서 상기 ERRα는 ERRα를 코딩하는 유전자의 형태로 제공될 수 있다. 상기 유전자는 DNA, RNA 또는 PNA를 포함한다. 상기 유전자는 발현벡터 내에 포함된 형태로 상기 발현벡터를 당업계에서 공지된 다양한 방법으로 감염 또는 형질도입하여 발현형으로 표적 세포 내에 도입시킬 수 있다.

[0012] 또는 본 발명에서 상기 ERRα는 체내에서 ERRα의 발현을 증가시키는 약물의 형태로 제공될 수도 있다.

[0013] 본 발명에서 상기 결핵은 다제내성 결핵, 폐결핵, 담결핵, 골결핵, 인후결핵, 임파선결핵, 폐허증, 유방결핵 또는 척추결핵 등을 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 상기 약학 조성물은 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여, 그 자체 또는 약학적 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 분말, 과립, 정제, 캡슐제 또는 주사제 등의 제형으로 제조되어 사용될 수 있다.

[0015] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 발명에서 상기 '약제학적으로 유효한 양'이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 유효 용량 수준은 환자의 질병 종류, 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 단독 또는 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있을 것이다.

[0016] 본 발명은 또한 ERR-α를 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 및 증상 개선용 건강식품 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 조성물은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태로 가공될 수 있으며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성식품류 등이 있다.

[0017] 또한 본 발명은 ERRα의 활성화제가 항결핵효능을 갖는다는 것으로부터 결핵균을 사용하지 않고도 안전하게 항결핵제를 스크리닝하는 방법을 제공한다. 즉, 본 발명의 항결핵제 스크리닝 방법은 (A) 대식세포에 항결핵 효능을 측정하고자 하는 시료를 처리하는 단계; (B) 상기 시료의 처리에 의한 ERRα 단백질 발현수준의 변화를 측정하는 단계; 및 (C) 상기 (B) 단계에서 측정된 ERRα 단백질의 발현수준이 대조군에 비해 증가된 경우 항결핵 효능을 가질 것으로 판단하는 단계;를 포함한다.

[0018] ERRα의 발현수준은 ERRα 단백질 또는 ERRα를 암호화하는 유전자의 발현수준으로 측정할 수 있으며, 단백질 또는 유전자의 발현수준을 측정하기 위하여 당업계에서 사용되는 어떤 방법을 사용하여도 무방하다. 예를 들면, ERRα 단백질의 발현수준은 면역형광 이미지 분석이나 웨스턴블랏, 유세포분석 등의 방법을 이용하여 측

정할 수 있으며, ERRα 단백질을 암호화하는 유전자의 발현수준은 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, RNase 보호 분석법, 노던 블랏팅 또는 DNA 마이크로어레이 등을 활용할 수 있다. 상기 유전자 분석을 위하여 종래 기술에 의해 알려진 ERRα를 암호화하는 유전자를 특이적으로 증폭시키는 프라이머나 상기 유전자에 특이적으로 결합하는 프로브를 사용할 수 있음은 당연하며, 종래 알려진 서열 이외에도 새로운 서열의 프라이머나 프로브를 디자인하는 것 역시 당업자라면 용이할 것이다.

[0019] 본 발명은 또한 보다 안전하고 효율적으로 결핵을 치료할 수 있도록 환자별 항결핵제 감응성을 예측하여 방법을 제공한다. 환자의 개별 특성상 다양한 항결핵제에 대해 서로 다른 감응성을 나타낼 수 있으며, 통상은 경험적 치료에 의해 약물이 효과를 나타내지 않는 경우 다른 약물로 대체하여 치료하는 것이 일반적이다. 그러나 이러한 치료법은 환자의 부담을 증가시킬 뿐 아니라 결핵균에 다제내성을 유발할 수 있으므로 사전에 보다 감응성이 높은 항결핵제를 선택하여 치료하는 것이 필요하다. 이를 위하여 본 발명은 (A) 결핵균 감염 환자의 혈액 시료에서 대식세포를 수집하는 단계; (B) 상기 대식세포에 항결핵제를 처리하는 단계; (C) 항결핵제에 의한 ERRα 단백질의 발현수준의 변화를 측정하는 단계; 및 (D) 상기 ERRα 발현수준의 변화를 비교하여 항결핵제의 감응성을 예측하는 단계;를 포함하는 환자별 항결핵제 감응성 예측 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 이상과 같이 본 발명의 조성물은 자가포식의 활성화에 의해 결핵균의 생존율을 현저하게 감소시킬 수 있어 새로운 결핵의 예방 및 치료/증상개선제로 사용될 수 있다.

[0021] 본 발명은 대식세포에서 ERRα의 발현 증가가 항결핵능과 직결된다는 것으로부터, 결핵균을 사용하지 않고도 대식세포에서 ERRα의 발현의 변화만을 측정하는 것에 의해 안전하게 항결핵제를 스크리닝할 수 있다.

[0022] 또한 본 발명에 의하면 항결핵제에 대한 환자의 약물 감응성을 미리 예측할 수 있어 보다 효과적인 결핵의 치료가 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 AICAR와 레스베라트롤이 ERRα의 발현에 미치는 영향을 보여주는 웨스턴 블랏의 전기영동 이미지.

도 2는 골수유래 대식세포에서 ERRα의 항결핵 효능을 보여주는 그래프.

도 3은 결핵균 감염 마우스에서 ERRα의 항결핵 효능을 보여주는 그래프.

도 4는 결핵균 감염 조직의 병리학적 반응에 대한 ERRα의 영향을 보여주는 H&E 염색 이미지.

도 5는 결핵균 감염 시 ERRα의 대식세포에서의 자가포식 활성화에 대한 영향을 보여주는 웨스턴 블랏의 전기영동 이미지 및 정량 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0025] **[실시예]**

[0026] **실시예 1 : 실험동물 및 대식세포의 준비**

[0027] **1) 실험동물의 준비**

[0028] ERR-α 결핍이 패혈증에 영향을 미치는 지 확인하기 위하여, Luo 등(Mol. Cell. Biol. 23, 7947-7956, 2003)의 방법에 따라 야생형($ERR\alpha^{+/+}$) C57BL/6 마우스(Koatech, Korea)로부터 Esrra 유전자를 표적 절단시킨 ERR-α 결핍마우스($ERR\alpha^{-/-}$)를 제작하였다. 하기, 모든 동물실험은 충남대학교 의과대학 동물실험윤리위원회에 의해 감독 및 승인되었다.

[0029] 실험동물들은 6~8주령으로 성별을 매치시켜 실험하였으며, 특정 무병소 조건(specific pathogen-free condition)에서 유지하였다.

[0030] **2) 대식세포의 수집 및 배양**

[0031] 8주령의 ERRα$^{+/+}$ 및 ERRα$^{-/-}$ 마우스의 골수로부터 대식세포(macrophage)를 각각 수집하였다. 수집한 골수세포는 배양액[DMEM(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) with 10% fetal bovine serum (Gibco- BRL), sodium pyruvate, nonessential amino acids, penicillin G (100 IU/ml) 및 streptomycin (100 mg/ml)]에 1×10^5/ml의 농도로 부유시켜 37℃, 5% CO_2 조건에서 100파이 petri dish에 부착시켰다. 2시간 후에 세포를 수집하고 원심분리하였다. 세포 배지에 대식세포 집락 인자(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)를 25 ng/ml의 농도로 첨가하여 배양액에 4~5일 동안 대식세포로 분화하여 실험에 사용하였다. 분화한 대식세포가 아닌 림프구들은 기계적인 파괴로 제거하였다.

[0032] **실시예 2 : 항결핵제가 대식세포에서 ERRα의 발현에 미치는 영향 평가**

[0033] ERRα의 항결핵 효능을 평가하기에 앞서, 먼저 최근 항결핵 효능이 알려진 AICAR(5-aminoimidazole-4-carboxamide-1-β-D-ribofuranoside)(등록특허 1498942호)와 레스베라트롤(resveratrol)(US9539222)이 대식세포에서 ERRα의 발현에 미치는 영향을 평가하였다.

[0034] 이를 위하여, 실시예 1에서 준비한 마우스 대식세포 배지 내에 AICAR(Sigma) 0.5mM 또는 레스베라트롤 10μM의 농도를 처리하고 시간의 경과에 따른 ERRα의 수준을 웨스턴 블랏에 의해 평가하였다. 도 1의 (A)는 AICAR, (B)는 레스베라트롤에 대한 결과를 보여주는 이미지이다. 하기 도면에서 Esrra$^{+/+}$는 ERRα$^{+/+}$ 마우스를, Esrra$^{-/-}$는 ERRα$^{-/-}$ 마우스를 의미하며, RSV는 레스베라트롤을 의미한다.

[0035] 도 1에서 확인할 수 있듯이, ERRα$^{+/+}$ 마우스의 골수유래 대식세포에서는 ERRα의 발현이 AICAR 또는 레스베라트롤의 처리에 의해 시간의 경과에 따라 점점 증가하는 것을 알 수 있다. 반면 ERRα$^{-/-}$ 마우스의 골수유래 대식세포에서는 ERRα의 발현이 관측되지 않았다.

[0036] **실시예 3 : ERRα 단백질의 항결핵 효능 검정**

[0037] **1) 결핵균 감염 대식세포에서의 항결핵능 평가**

[0038] AICAR와 레스베라트롤의 항결핵능이 ERRα 단백질의 발현 증가와 관련이 있는 지 확인하기 위하여 ERRα$^{+/+}$ 및 ERRα$^{-/-}$ 마우스의 골수유래 대식세포에서 AICAR와 레스베라트롤의 항결핵능을 평가하였다.

[0039] 보다 상세하게는 실시예 1의 2)에서 준비한 ERRα$^{+/+}$ 및 ERRα$^{-/-}$ 마우스 대식세포 배지 내에 병원성 결핵균인 *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis* H37Rv, 아리조나 대학 R L Friedmann으로부터 제공받아 사용)를 배양 세포 1개당 감염된 균의 개체 평균수(multiplicity of infection, MOI)가 1:1 또는 1:10이 되도록 첨가하여 4시간 동안 감염시켰다. 이후, AICAR(0.1, 0.5 또는 1mM) 또는 레스베라트롤(0.1, 1 또는 10μM)을 처리하여 3일간 배양하였다. 배양 후 세포내 박테리아를 방출시키기 위하여 0.3% 사포닌(Sima)으로 대식세포를 터트리고, 7H9 배지로 10배 희석하였다. 7H10 아가 플레이트에 분주하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 14일 정도 배양하고 집락형성단위(CFU)를 측정하여 세포내 균 생존율(intracellular survival, ICS)을 확인하고 그 결과를 도 2에 도시하였다.

[0040] 도 2는 AICAR와 레스베라트롤 모두가 ERRα$^{+/+}$ 마우스 유래의 대식세포에서는 용량 의존적으로 결핵균의 생존을 저해하지만, ERRα$^{-/-}$ 마우스 유래의 대식세포에서는 AICAR와 레스베라트롤의 항결핵능이 크게 감소함을 보여준다. 이는 ERRα의 발현 증가가 AICAR와 레스베라트롤의 항결핵능의 주된 요인임을 시사한다.

[0041] **2) 결핵균 감염 마우스에서의 항결핵능 평가**

[0042] 실시예 1의 1)에서 준비한 ERRα$^{+/+}$ 및 ERRα$^{-/-}$ 마우스에 *M. tuberculosis*(Mtb)를 1×10^6 CFU의 농도로 정맥주사하여 결핵균에 감염시켰다. 3주 후 결핵균이 감염된 마우스에 아이카를 500mg/kg의 용량으로 7일간 복강투여하였다. 대조군으로는 아이카 대신 PBS 버퍼를 투여하였다. 결핵 감염 4주째에 마우스를 희생시킨 후 간, 비장 및 폐 조직을 채취하고 각 조직 내 결핵균의 생존율을 분석하였다. 각 조직은 적출 후 homogenizer를 이용하여 곱게 갈았다. 이후 대식세포에서의 세포내 생존율 측정방법과 동일한 방법에 의해 각 조직에서의 결핵균의 생

존율을 측정하고 그 결과를 도 3에 도시하였다.

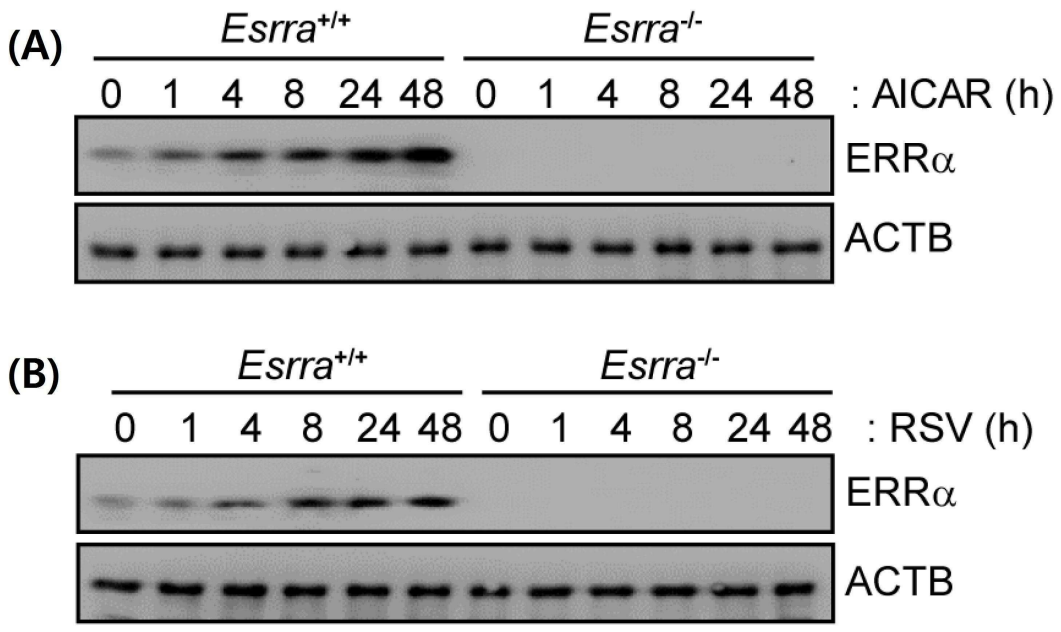
[0043] 도 3에 의하면, AICAR는 ERRα$^{+/+}$ 마우스의 간, 비장, 폐의 각 조직에서 결핵균의 성장을 크게 저해하지만, ERRα$^{-/-}$ 마우스에서는 항결핵능을 나타내지 않는다. 이는 *in-vitro* 실험결과와 마찬가지로 AICAR의 항결핵능이 ERRα의 발현을 유도하는 것에 의한 것임을 증명한다.

[0044] 한편, ERRα가 결핵균 감염에 의한 면역병리적 반응에 미치는 역할을 확인하기 위하여, 상기 실험과정에서 채취한 폐를 10% 포르말린에 고정하고 파라핀 왁스에 임베딩하였다. 이후 4㎛ 두께로 파라핀 절편을 제조하여 H&E 염색한 후, Aperio digital pathology slide scanner(Leica, Germany)로 관측하였다. 도 4는 그 결과를 보여주는 이미지로 스케일바는 100㎛를 나타낸다. 결핵균에 감염된 ERRα$^{-/-}$ 마우스는 결핵균에 감염된 ERRα$^{+/+}$ 마우스에 비해 병리학적 반응(pathological response)과 육아종 장애(granulomatous lesion)가 더 심각한 것을 보여준다. 레스베라트롤의 투여는 결핵균에 감염된 ERRα$^{+/+}$ 마우스에서는 이러한 병리학적 반응을 감소시키나 ERRα$^{-/-}$ 마우스에서는 그렇지 않았다. 이는 결핵균의 수 뿐 아니라 장기 조직에서의 병리학적 반응 역시 ERRα 단백질에 의해 감소됨을 의미한다.

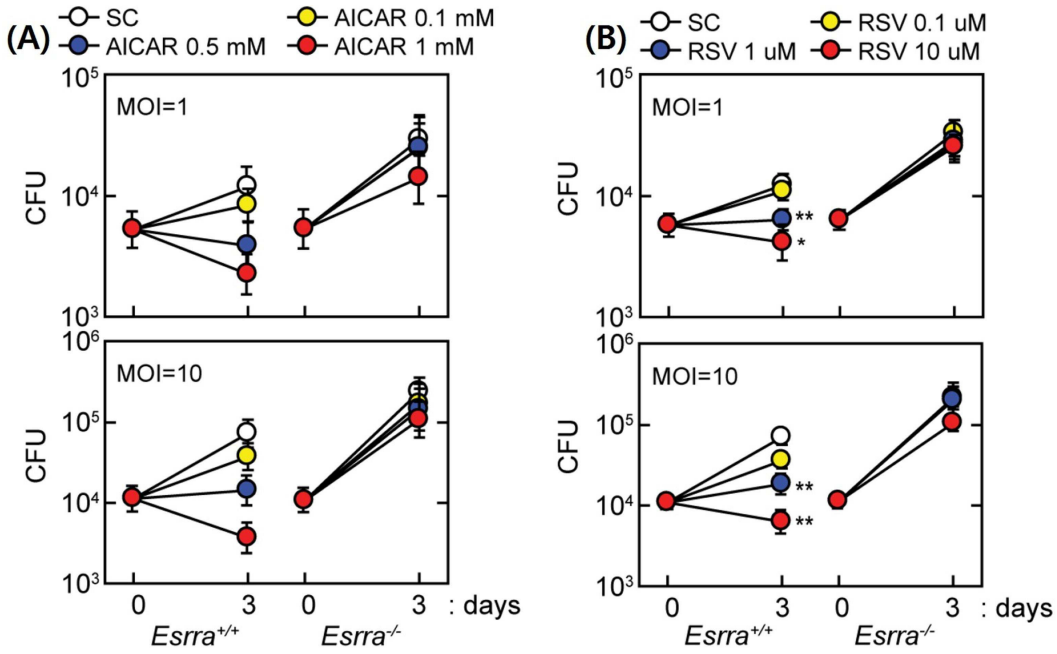
[0045] AICAR나 레스베라트롤의 항결핵능은 대식세포에서의 자가포식의 증가와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 이에 ERRα가 자가포식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 상기 실험과정에서 채취한 폐의 용균액(lysate)으로부터 웨스턴블랏에 의해 자가포식의 표지자인 LC3I과 LC3II의 발현량을 정량하고, 그 결과를 도 5에 도시하였다. 도 5에서 확인할 수 있듯이, ERRα$^{+/+}$ 마우스에서는 결핵균의 감염에 의해 면역작용이 활성화되면서 자가포식이 활성화되고, 레스베라트롤에 의해 자가포식이 더욱 활성화되었으나, ERRα$^{-/-}$ 마우스에서는 결핵균의 감염이나 레스베라트롤의 투여가 자가포식에 큰 영향을 미치지 못하였다. 이는 ERRα가 결핵균 감염 대식세포에서 자가포식을 활성화하여 면역작용을 강화하는 것에 의해 항결핵능을 나타내는 것을 보여준다.

도면

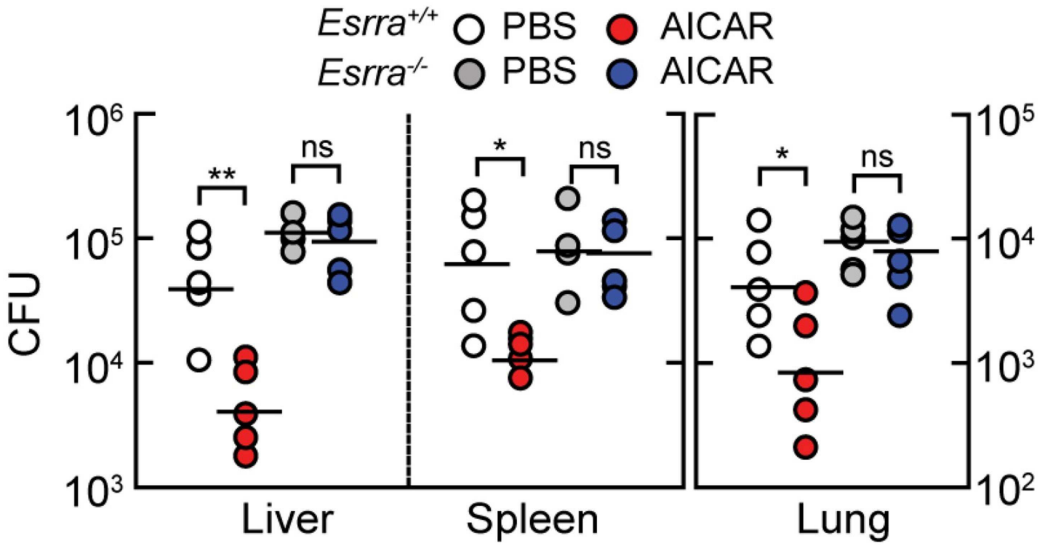
도면1



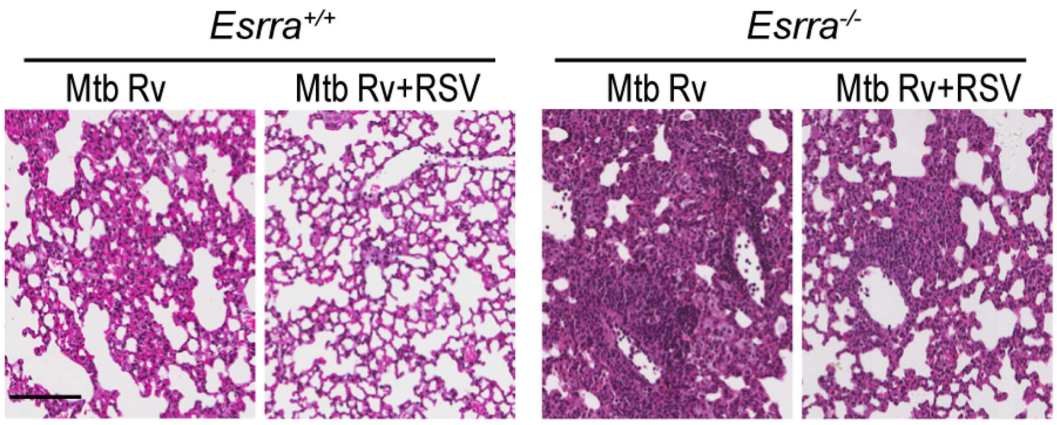
도면2


(A)
SC
AICAR 0.5 mM
AICAR 0.1 mM
AICAR 1 mM
MOI=1
MOI=10
CFU
: days
Esrra+/+
Esrra-/-
(B)
SC
RSV 1 uM
RSV 0.1 uM
RSV 10 uM
MOI=1
MOI=10
CFU
: days
Esrra+/+
Esrra-/-

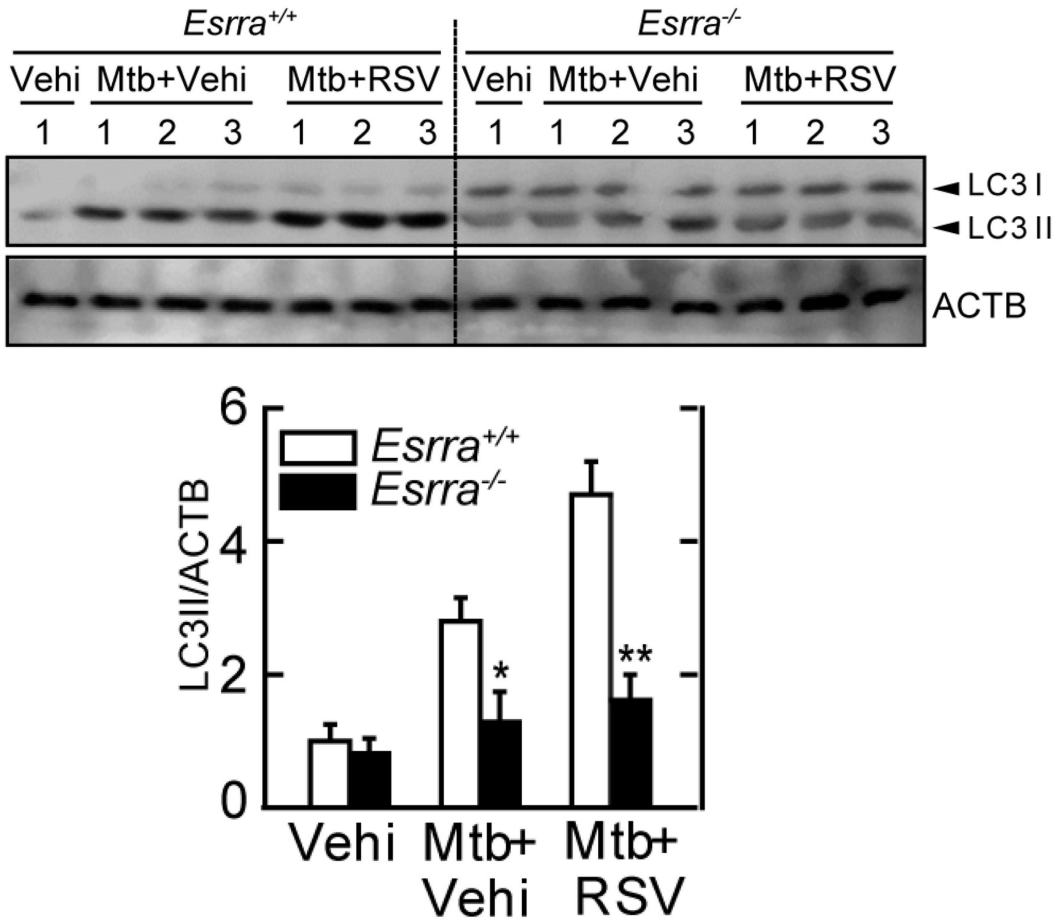
도면3


Esrra+/+ PBS AICAR
Esrra-/- PBS AICAR
CFU
**
ns
*
ns
*
ns
Liver
Spleen
Lung

도면4


Esrra+/+
Esrra-/-
Mtb Rv
Mtb Rv+RSV
Mtb Rv
Mtb Rv+RSV

도면5


Esrra+/+
Esrra-/-
Vehi
Mtb+Vehi
Mtb+RSV
Vehi
Mtb+Vehi
Mtb+RSV
1 1 2 3 1 2 3 1 1 2 3 1 2 3
LC3 I
LC3 II
ACTB
LC3II/ACTB
6
4
2
0
Esrra+/+
Esrra-/-
*
**
Vehi
Mtb+ Vehi
Mtb+ RSV