



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0085291
(43) 공개일자 2021년07월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/92 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/92 (2013.01)
G01N 33/53 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2019-0178183
(22) 출원일자 2019년12월30일
심사청구일자 2019년12월30일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
최혜선
울산광역시 남구 북부순환도로 35, 108동 1005호
(무거동, 무거위브자이)
설옥주
울산광역시 울주군 범서읍 천상6길 6, 101동 120
4호 (천상그린코아아파트1단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 10 항

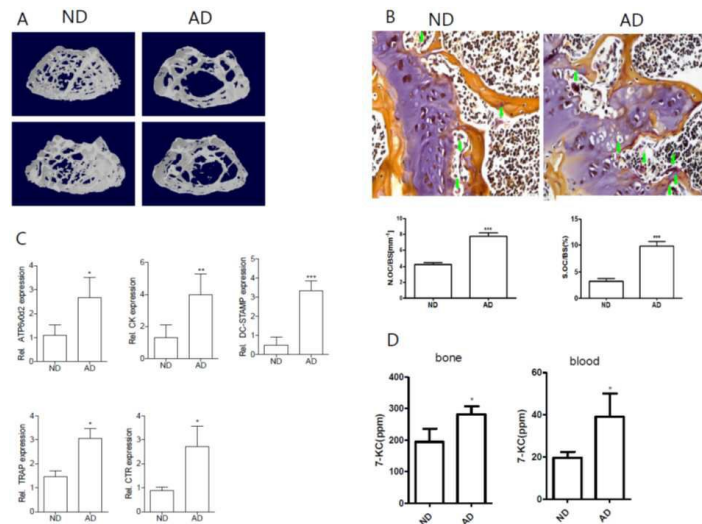
(54) 발명의 명칭 7-케토콜레스테롤의 의학적 용도

(57) 요약

본 발명은 7-케토콜레스테롤(7-ketocholesterol; 7-KC)의 의학적 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 7-케토콜레스테롤을 유효성분으로 포함하는 골 소실 진단용 바이오마커 조성물, 골다공증 진단용 바이오마커 조성물 및 파골세포 분화용 바이오마커 조성물을 제공한다.

상기 7-케토콜레스테롤(7-ketocholesterol; 7-KC)은 파골세포의 분화를 촉진하여 골 소실을 유도함으로써, 골 소실 또는 골다공증 등을 용이하게 진단할 수 있으며, 이러한 질환에 대해 유용한 정보를 제공하고 그에 맞는 적절한 대응으로 더욱 효과적으로 치료하는데 도움을 줄 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 2500/04 (2013.01)

G01N 2800/108 (2013.01)

(72) 발명자

김지은

울산광역시 중구 반구로 55, 101동 604호 (반구동,
e편한세상 강변)

서재희

울산광역시 동구 봉수로 250, 103동 1704호 (전하
동, 울산전하푸르지오)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018R1A2B6001276

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 산화스트레스에 의한 콜레스테롤 유도체, 7-Oxysterol에 의한 골대사 조절 기작 연

구

기 여 율 60/100

과제수행기관명 울산대학교

연구기간 2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI18C0375000019

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 연구자주도질환극복연구(R&D)

연구과제명 전사조절인자, transcription factor EB (TFEB)에 의한 autophagy조절을 통한 골소

실 완화 기작 규명

기 여 율 20/100

과제수행기관명 울산대학교 산학협력단

연구기간 2019.01.01 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A6A1030318

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)

연구과제명 메타염증연구센터

기 여 율 20/100

과제수행기관명 울산대학교

연구기간 2019.05.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

7-케토콜레스테롤(7-ketcholesterol; 7-KC)을 유효성분으로 포함하는 골 소실 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 7-케토콜레스테롤은,

파골세포의 분화를 촉진하여 골 소실을 유도하는 것을 특징으로 하는 골 소실 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 3

7-케토콜레스테롤(7-ketcholesterol; 7-KC) 측정 제제를 유효성분으로 포함하는 골 소실 진단용 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 제제는,

상기 7-케토콜레스테롤과 결합할 수 있는 화합물, 단백질, 뉴클레오타이드 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 골 소실 진단용 조성물.

청구항 5

제 3 항에 있어서,

상기 7-케토콜레스테롤은,

골 소실이 유발될 경우, 혈액 또는 골에서 함량이 증가되는 것을 특징으로 하는 골 소실 진단용 조성물.

청구항 6

제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 골 소실 진단용 키트.

청구항 7

생물학적 시료에서 7-케토콜레스테롤(7-ketcholesterol; 7-KC)의 수준을 측정하는 단계; 및

상기 7-케토콜레스테롤의 수준을 정상 대조군과 비교하는 단계;를 포함하는 골 소실 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 8

인체에서 분리된 생물학적 시료에 시험물질을 처리하는 단계;

상기 시험물질을 처리한 시료에서 7-케토콜레스테롤(7-ketcholesterol; 7-KC)의 수준을 측정하는 단계; 및

상기 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 상기 7-케토콜레스테롤의 수준이 감소된 시험물질을 선별하는 단계;를 포함하는 골 소실 예방 또는 치료용 약물 스크리닝 방법.

청구항 9

7-케토콜레스테롤(7-ketcholesterol; 7-KC)을 유효성분으로 포함하는 골다공증 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 10

7-케토콜레스테롤(7-ketocholesterol; 7-KC)을 유효성분으로 포함하는 파골세포 분화용 바이오마커 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 7-케토콜레스테롤의 의학적 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 7-케토콜레스테롤을 포함하는 골 소실 진단용 바이오마커 조성물, 골다공증 진단용 바이오마커 조성물 및 파골세포 분화용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 서구화된 식단 및 인구 고령화 등으로 인해 콜레스테롤 관련 질병의 발병률이 증가하고 있다. 콜레스테롤은 우리 몸을 이루는 기본 단위인 세포의 세포막, 신경세포의 수초, 그리고 지단백을 구성하는 성분 등으로 중요하지만, 다량의 콜레스테롤은 세포 시스템의 기능 장애를 유발하여 죽상동맥경화증, 심혈관 질환 등을 일으킨다.

[0003] 여러 가지 병리학적 증거는 혈장 지질과 골 질량(bone mass) 유지에 연관성을 보여주었다. 골 밀도(bone mineral density; BMD)가 낮은 환자는 총 콜레스테롤 수치가 더 높은 것으로 나타났고, 높은 저밀도 지단백질(low-density lipoprotein; LDL) 및 낮은 고밀도 지단백질(high-density lipoprotein; HDL) 콜레스테롤 수치 모두, 폐경 후 여성의 낮은 골 질량과 관련이 있는 것으로 나타났다. 콜레스테롤 합성 저해제인 스타틴(statins)의 투여는 BMD 증가와 관련이 있으며, 이는 고콜레스테롤혈증(hypercholesteremia)이 BMD 감소의 위험 인자임을 보여주었다.

[0004] 즉, 많은 양의 콜레스테롤은 골 항상성(bone homeostasis)에 영향을 줄 수 있음을 알 수 있다. 골 항상성은 골 형성 조골세포(osteoblast) 및 골 흡수 파골세포(osteoclast; OC)에 의한 골 형성 및 골 흡수의 균형에 의존한다. 골 흡수 및 형성 사이의 불균형은 골 재형성 질환(bone remodeling disease)을 초래한다.

[0005] 마우스를 이용한 실험에서 죽상동맥경화증(atherosclerosis) 민감성 종은 죽상동맥경화증 내성(resistant) 종에 비해 고지방 식이에 대해 더 많은 골 소실(bone loss)을 나타내며, 산화된 지질이 골 질량 유지에 대한 원인 분자임을 보여주었다. 큰 동맥에서 산화된 지단백질의 축적은 죽상동맥경화증의 특징으로 보고되고, 지단백질의 산화는 옥시스테롤(oxysterol)을 포함한 다양한 종류의 지질을 생성한다.

[0006] 옥시스테롤은 분해에 의한 콜레스테롤의 대사산물로, 효소적 또는 비효소적으로 산화 스트레스에 따라 분화된 대식세포에서 우세하게 합성된다. 일반적으로 이들 화합물은 이들의 모 화합물보다 반응성이 더 높기 때문에, 옥시스테롤은 산화 스트레스뿐만 아니라 염증이 특징인 만성 질환의 발병 및 발달에 기여하는 것으로 알려져 있다.

[0007] 임상 연구에서, 자유 라디칼 생성된 옥시스테롤이 우세하게 증가하였다. 콜레스테롤의 생체 내(in vivo) 자가 산화의 산물인 7 β -하이드록시콜레스테롤(7 β -hydroxycholesterol; 7 β -HC) 및 7-케토콜레스테롤(7-ketocholesterol; 7-KC)은 인간 죽상동맥경화증 플라크(plaque)에서 산화된 지단백질의 주요 성분으로 보고되었고, 가장 많은 7-케토콜레스테롤 수준을 가진 7-산소화된 스테롤의 혈장 수준은 정상 체중의 청소년에 비해 비만 여성 청소년에서 증가하였다.

[0008] 이렇듯 최근 많은 연구가 진행되고 있지만, 아직 골 항상성 및 파골세포에서의 옥시스테롤의 역할에 대해서는 알려진 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1088567호 (2011.12.05 공고)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 산화 콜레스테롤 유도체를 이용한 골 소실 진단용 바이오마커 조성물, 골 소실 진단용 조성물 및 진단용 키트를 제공하는 데에 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 산화 콜레스테롤 유도체를 이용한 골 소실 진단을 위한 정보 제공 방법 및 골 소실 예방 또는 치료용 약물 스크리닝 방법을 제공하는 데에 있다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 산화 콜레스테롤 유도체를 이용한 골다공증 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는 데에 있다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 산화 콜레스테롤 유도체를 이용한 파골세포 분화용 바이오마커 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명에 따른 골 소실 진단용 바이오마커 조성물은 7-케토콜레스테롤(7-ketocholesterol; 7-KC)을 유효성분으로 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명에 따른 골 소실 진단용 조성물은 7-케토콜레스테롤(7-ketocholesterol; 7-KC)을 유효성분으로 포함할 수 있다.
- [0016] 본 발명에 따른 골 소실 진단용 키트는 상기 골 소실 진단용 조성물을 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명에 따른 골 소실 진단을 위한 정보 제공 방법은 생물학적 시료에서 7-케토콜레스테롤(7-ketocholesterol; 7-KC)의 수준을 측정하는 단계; 및 상기 7-케토콜레스테롤의 수준을 정상 대조군과 비교하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명에 따른 골 소실 예방 또는 치료용 약물 스크리닝 방법은 인체에서 분리된 생물학적 시료에 시험물질을 처리하는 단계; 상기 시험물질을 처리한 시료에서 7-케토콜레스테롤(7-ketocholesterol; 7-KC)의 수준을 측정하는 단계; 및 상기 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 상기 7-케토콜레스테롤의 수준이 감소된 시험물질을 선별하는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명에 따른 골다공증 진단용 바이오마커 조성물은 7-케토콜레스테롤(7-ketocholesterol; 7-KC)을 유효성분으로 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명에 따른 파골세포 분화용 바이오마커 조성물은 7-케토콜레스테롤(7-ketocholesterol; 7-KC)을 유효성분으로 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명에 따른 7-케토콜레스테롤(7-ketocholesterol; 7-KC)은 파골세포의 분화를 촉진하여 골 소실을 유도함으로써, 골 소실 진단용 마커, 골다공증 진단용 마커 및 파골세포 분화용 마커 등으로 활용할 수 있다.
- [0022] 상기 마커 등을 활용하여 골 소실 또는 골다공증 등을 안전하고 용이하게 진단할 수 있으며, 상기 질환에 대해 유용한 정보를 제공하여 그에 맞는 적절한 대응을 통해 골 소실과 관련된 질환을 더 효과적으로 치료하는 데 도움이 될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 본 발명의 일 실험예에 따른 죽상동맥경화증 유발 식이 마우스에서 골 소실 유발을 확인한 결과로, 도 1A는 12주 동안 죽상동맥경화증 유발 식이(atherogenic diet; AD, n=8) 또는 일반 식이(normal diet; ND, n=4)를 진행한 마우스의 원위 대퇴골의 대표적인 마이크로-CT(μ CT) 이미지로, 생체 내 TRAP-양성 파골세포(TRAP-positive OCs)를 확인하기 위해, 마우스의 대퇴골을 절제하고 연조직으로 세척한 후, EDTA로 석회질을 제거하였다. 도 1B는 마우스의 원위 대퇴골 골간단의 대표적인 조직학적 절편을 TRAP로 염색하여 OC.N/BS(총 골 표면에 대한 파골세포 수)와 함께 파골세포(OCs)(원 배율 $\times$ 400)를 확인한 것이고, 도 1C는 OC-특이 유전자에 대해 qPCR에 의해 경골의 RNA를 측정된 것이며, 도 1D는 골 및 혈액에서 GC-MS로 7-케토콜레스테롤(7-KC) 확인한 것이다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시되고, 일반 식이(ND)와 비교하여 * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ 이며, 3번의 독립적인 실험에서 유사한 결과를 얻었다.

도 2는 본 발명의 일 실험예에 따른 7-케토콜레스테롤에 의한 파골세포형성(osteoclastogenesis) 증가를 확인한

결과로, 도 2A는 골수 유래 대식 세포(bone marrow-derived macrophages; BMMs)를 48시간 동안 M-CSF 및 RANKL와 함께 배양한 뒤, 24시간 동안 7-케토콜레스테롤(3, 5 μ M)과 함께 추가로 배양하고 72시간 후에 세포를 고정시켜 각 배양물에서 TRAP-양성 다핵세포(multinucleated cells; MNCs) 100개 이상을 무작위로 선택하여 형성된 파골세포의 면적, 최대 직경을 측정하였다. 융합 지수(fusion index)는 배양에서 형성된 TRAP-양성 다핵세포당 핵의 평균수로 나타내었다. 도 2B는 MTT 분석에 의해 측정된 세포 생존율(cell viability)을 나타낸 것이다. 데이터는 평균 $\pm$ SEM으로 표시되고, 비히클(vehicle; V)과 비교하여 * $P<0.05$; ** $P<0.01$; *** $P<0.001$ 이며, 3번의 독립적인 실험에서 유사한 결과를 얻었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명을 상세하게 설명하기로 한다.
- [0026] 본 발명자는 전술한 바와 같이 콜레스테롤이 골 소실(bone loss)에 관여한다는 사실을 바탕으로 골 소실에 대한 콜레스테롤의 책임 대사산물을 확인하고 파골세포(osteoclast; OC)에 미치는 영향을 평가한 결과, 죽상동맥경화증 유발 식이가 옥시스테롤, 특히, 7-케토콜레스테롤의 수준을 증가시키고 상기 7-케토콜레스테롤이 파골세포(OC)의 수를 증가시킴을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0028] 본 발명은 7-케토콜레스테롤(7-ketocholesterol; 7-KC)을 유효성분으로 포함하는 골 소실 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0029] 본 명세서에서, "진단"이란, 골 소실 발생 여부 또는 발생 가능성(위험성)을 확인하는 것으로, 골 소실 증상에 대한 대상(subject)의 감수성(susceptibility)을 판정하는 것, 대상이 골 소실을 현재 가지고 있는지 여부를 판정하는 것, 또는 테라메트릭스(therametrics)(예를 들어, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것)을 포함한다. 또한, 임상 상태의 일차 진단 또는 재발한 질병의 진단을 포함한다.
- [0030] 본 명세서에서, "바이오마커"란, 몸 안의 변화를 알아낼 수 있는 지표로서, 생명체의 정상 또는 병리적인 상태, 즉, 골 소실에 대한 진단, 약물에 대한 반응 정도 등을 정상 대조군과 구분하여 진단할 수 있는 물질을 의미하며, 정상 대조군에 비하여 골 소실 군에서 증가 또는 감소를 보이는 폴리펩타이드 또는 핵산(예컨대, mRNA 등), 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함한다.
- [0031] 본 명세서에서, "정상 대조군"이란, 골 소실이 발생하지 않은 정상 개체를 의미한다.
- [0032] 상기 7-케토콜레스테롤은 산화 콜레스테롤 유도체 중 대표적인 옥시스테롤(oxysterol)로, 상술한 바와 같이 콜레스테롤보다 동맥 경화 등에 더 심각한 영향을 미치는 것으로 알려져 있다.
- [0033] 본 발명에 있어서, 상기 7-케토콜레스테롤은 파골세포의 분화를 촉진하여 골 소실을 유도하는 효과를 가짐으로써, 골 소실 진단을 위한 바이오마커 조성물로서 활용될 수 있다.
- [0034] 상기 바이오마커는 유의성 있는 마커의 선택과 적용이 진단 결과의 신뢰도를 결정짓는데 매우 중요한 인자로 작용하는데, 유의성 있는 마커란, 진단하여 얻은 결과가 정확하여 타당도(validity)가 높고 반복 측정 시에도 일관된 결과를 나타내도록 신뢰도(reliability)가 높은 마커를 의미한다. 본 발명의 일 실험예에 따르면, 반복된 실험에서도 의미 있는 동일한 결과를 보이므로, 본 발명에 따른 바이오마커는 신뢰도가 높은 마커로 볼 수 있다. 그러므로 본 발명의 유의성 있는 마커에 따라 획득한 결과를 토대로 진단된 결과는 타당하게 신뢰될 수 있다.
- [0036] 본 발명은 7-케토콜레스테롤(7-ketocholesterol; 7-KC) 측정 재제를 유효성분으로 포함하는 골 소실 진단용 조성물을 제공한다.
- [0037] 상기 제제는 상기 7-케토콜레스테롤과 결합할 수 있는 화합물, 단백질, 뉴클레오티드 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있다. 예를 들어, 상기 7-케토콜레스테롤은 항체를 만들기 위해 흔히 사용되는 키홀 림펫 헤모시아닌(Keyhole Limpet Hemocyanin, KLH)과 같은 단백질과 결합될 수 있다.

- [0038] 상기 7-케토콜레스테롤은 골 소실이 유발될 경우, 혈액 또는 골에서 그 함량이 증가될 수 있다.
- [0040] 본 발명은 상기 골 소실 진단용 조성물을 포함하는 골 소실 진단용 키트를 제공한다.
- [0041] 상기 진단용 키트는 골 소실 진단을 위한 선택적으로 마커를 인지하는 제제 뿐만 아니라 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액, 또는 장치를 포함할 수 있다.
- [0043] 본 발명은 생물학적 시료에서 7-케토콜레스테롤(7-ketocholesterol; 7-KC)의 수준을 측정하는 단계 및 상기 7-케토콜레스테롤의 수준을 정상 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 골 소실 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0044] 상기 생물학적 시료는 7-케토콜레스테롤 수준에 있어서 정상 대조군과 차이가 나는 조직, 세포, 혈액, 혈청, 혈장 등의 시료를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 바람직하게는 혈액일 수 있다.
- [0045] 상기 생물학적 시료에서 측정된 7-케토콜레스테롤의 수준이 정상 대조군보다 높을 경우, 골 소실이 유발된 것으로 진단하여 그에 따른 정보를 제공할 수 있다.
- [0047] 본 발명은 인체에서 분리된 생물학적 시료에 시험물질을 처리하는 단계, 상기 시험물질을 처리한 시료에서 7-케토콜레스테롤(7-ketocholesterol; 7-KC)의 수준을 측정하는 단계 및 상기 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 상기 7-케토콜레스테롤의 수준이 감소된 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 골 소실 예방 또는 치료용 약물 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0048] 이는 치료 후보 물질의 존재 및 부재 하에서 상기 7-케토콜레스테롤 수준의 증가 또는 감소를 비교하는 방법으로, 골 소실 예방 또는 치료제를 스크리닝하는데 유용하게 사용될 수 있다.
- [0049] 상기 시험물질을 처리한 시료의 7-케토콜레스테롤의 수준이 시험물질을 처리하지 않은 대조군의 7-케토콜레스테롤 수준과 비교하여 감소되는 경우, 상기 시험물질은 골 소실 예방 또는 치료용 약물로 판단될 수 있다.
- [0051] 본 발명은 7-케토콜레스테롤(7-ketocholesterol; 7-KC)을 유효성분으로 포함하는 골다공증 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0052] 상기 "골다공증(osteoporosis)"은 뼈의 질량이 일정 수준 이하로 감소하고 뼈 조직의 미세구조의 퇴화로 골절 위험이 지속적으로 증가하는 질환으로, 폐경에 따른 급격한 호르몬의 변화에 의한 파골세포의 활성화에 따른 골 흡수 증가로 나타나는 폐경 후 골다공증, 노화가 되면서 조골세포의 기능이 감소하여 골 형성이 감소하는 노인성 골다공증을 포함할 수 있고, 바람직하게는 호르몬의 변화에 의한 파골세포의 활성화에 따른 폐경 후 골다공증일 수 있다.
- [0054] 본 발명은 7-케토콜레스테롤(7-ketocholesterol; 7-KC)을 유효성분으로 포함하는 골다공증 진단용 조성물 및 이를 포함하는 골다공증 진단용 키트를 제공한다.
- [0055] 본 발명은 생물학적 시료에서 7-케토콜레스테롤(7-ketocholesterol; 7-KC)의 수준을 측정하는 단계 및 상기 7-케토콜레스테롤의 수준을 정상 대조군과 비교하는 단계를 포함하는 골다공증 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.
- [0056] 본 발명은 인체에서 분리된 생물학적 시료에 시험물질을 처리하는 단계, 상기 시험물질을 처리한 시료에서 7-케토콜레스테롤(7-ketocholesterol; 7-KC)의 수준을 측정하는 단계 및 상기 시험물질을 처리하지 않은 대조군과 비교하여 상기 7-케토콜레스테롤의 수준이 감소된 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 약물 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0057] 이에 상응하는 특징들은 상술된 부분에서 대신할 수 있다.

- [0059] 또한, 본 발명은 7-케토콜레스테롤(7-ketocholesterol; 7-KC)을 유효성분으로 포함하는 파골세포 분화용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0060] 상기 "파골세포(osteoclast)"는 파골세포 전구체(osteoclast precursor)로부터 분화되는 세포로서, 파골세포 전구세포들은 M-CSF 및 RANKL 존재 하에서 파골세포로 분화되며, 융합을 통해 다핵 파골세포(multinucleated osteoclast)를 형성한다. 파골세포는 각종 콜라게네이즈(collagenase) 및 프로테아제(protease)를 분비하여 골흡수(bone resorption)를 일으킨다. 파골세포는 완전히 분화된 세포로 증식하지 않으며 약 2주간의 수명이 다하면 세포 사멸(apoptosis)을 일으킨다.
- [0061] 상기 7-케토콜레스테롤은 파골세포의 분화를 촉진하여 골 소실을 유도함으로써, 골 소실 관련 골 질환을 유발할 수 있다.
- [0064] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0066] <실험방법>
- [0067] 1. 실험준비
- [0068] 재조합 mouse M-CSF(macrophage colony stimulating factor) 및 RANKL(receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand)은 R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA)로부터 준비하였다. MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], 백혈구 산성 포스파타제 키트(leukocyte acid phosphatase (TRAP) kit), 톨루이딘 블루(toluidine blue), 클로로포름(choloroform), 메탄올(methanol), 헥세인(hexane), 톨루엔(toluene), 부티레이트드 하이드록시톨루엔(butyrate hydroxytoluene), 피리딘(pyridine), 헥사메틸디실라잔(hexamethyldisilazane) 및 7-케토콜레스테롤(7-ketocholesterol)은 Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA)로 부터 준비하였다. RatLaps EIA, osteocalcin EIA 및 알칼라인 포스파타제(alkaline phosphatase) 분석 키트는 각각 Immunodiagnostic Systems Inc. (Fountain Hills, AZ, USA), Biomedical Technologies Inc. (Stoughton, MA, USA), 및 BioAssay Systems (Hayward, CA, USA)로부터 준비하였다. M-MLV 역전사 효소(reverse transcriptase), SYBR Green Real-Time PCR Mater Mixes, 및 TRIzol 시약은 각각 Promega (Madison, WI, USA), Thermo-Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), 및 Invitrogen (Carlsbad, CA, USA)으로부터 준비하였다.
- [0070] 2. 동물 및 실험 설계
- [0071] Jackson Laboratory (Hana, Busan, Korea)로 부터 구매한 10주령 C57BL/6J 수컷 마우스는 12주 동안 죽상동맥경화증 유발 식이(atherogenic diet; AD) 또는 일반 식이(normal diet; ND)를 진행하였다. 마우스의 죽상동맥경화증 유발 식이(AD)는 Research Diets, Inc. (New Brunswick, NJ, USA)로부터 구매하였다. 상기 식이 기간 이후, 동물은 CO₂로 마취시켜 심장천자(cardiac puncture)로 혈액을 채취하고, 절개하여 조직을 수득하였다. 혈장 콜레스테롤은 AmplexR Red cholesterol assay kit (Invitrogen, Carlsbad, CA)에 의해 결정되었다. 모든 마우스는 특정 병원체가 없는 동물 시설에 수용되었다. 모든 동물 관리 및 절차는 울산대학교 동물 관리 및 사용 위원회(UOUACUC)가 승인한 프로토콜 및 가이드라인에 따라 수행되었다. 채택된 표준은 상기 위원회로부터 승인되었다 (UOU2011-009).
- [0072] 긴 뼈의 구조를 시각화하기 위해, 6.9μm 유효 검출기 픽셀 크기 및 77-255mg/cc threshold로 설정된 SkyScan 1072 System (SkyScan, Kontich, Belgium)에서 고해상도 마이크로 컴퓨터 단층 촬영(μCT) 이미지 시스템으로 대퇴골(femur)을 스캐닝 하여 분석하였다. 섬주주 골(trabecular bone)은 길이 1.6mm 및 원위 대퇴골 성장판(distal femur growth plate) 아래 1.6mm에 위치한 영역에서 분석되었다. 총 total of 75-125 tomographic slices를 이용한 CT volume software (ver. 1.11; SkyScan)로 3차원 분석이 수행되었다.

- [0073] 생체 내(in vivo) TRAP-양성 파골세포(TRAP-positive OCs)를 평가하게 위해, 마우스 대퇴골을 절제하고 연조직으로 세척한 후 EDTA로 석회질을 제거하였다. AD 또는 ND 섭취한 마우스의 원위 대퇴골 골간단(metaphysis)의 대표적인 조직학적 색선을 염색하여 OCs를 확인하였다(original magnification $\times 400$).
- [0074] 골 흡수의 생체 마커인 콜라겐 타입 1의 혈청 C-텔로펩티드(C-telopeptide) 단편은 제조사(Immunodiagnostic Systems Inc., Woburn, MA)의 지침에 따라 RatLaps 효소 면역 검정법(enzyme immunoassay; EIA)으로 분석되었다. 혈청 H_2O_2 는 OxiSelectTM 과산화수소(hydrogen peroxide) 분석 키트 (Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA)로 평가되었다.
- [0076] 3. 분석시료 준비
- [0077] 대퇴골 및 경골(tibiae)을 식염수로 오염시킨 혈액으로 세척하였다. 상기 방법에 따라 시료를 제조하고, 여과지를 두어 과잉의 액체를 흡수시킨 후 무게를 측정하고 $-80^{\circ}C$ 에서 저장하였다. 조직(대퇴골 및 경골, 150mg/시료; EDTA 항응고 혈액(anticoagulated blood)/시료로부터 혈장 500 μl)을 미세하게 다듬고, 0.01% 부티레이트 하이드록시톨루엔(v/w)을 포함하는 클로로포름/메탄올(2/1, v/v) 용액 5ml을 모르타르(mortar)로 트랜스퍼하였다.
- [0078] 균질화(Homogenization)는 얼음에서 10분 동안 수행되었다. 균질물은 0.9% NaCl 4ml로 행군 다음, $4^{\circ}C$ 에서 1800rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 유기상은 옥시스테롤 및 콜레스테롤 분석을 위해 처리되었다. 옥시스테롤 시료는 교반하에 실온에서 2시간 동안 KOH (0.35 M)로 알칼리 가수분해(alkaline hydrolysis) 하였다. 가수분해 후 반응 혼합물은 인산(phosphoric acid)을 이용하여 pH 7.0으로 적정하였고, 1800rpm으로 5분 동안 원심분리하였다. 생성된 유기상은 증발되었고, 잔여물은 1ml 톨루엔으로 용해되었다. 콜레스테롤은 고체상 추출에 의해 옥시스테롤로부터 분리되었다.
- [0079] 시료 로딩 전에 100mg 용질 실리카 카트리지는 2ml 헥세인으로 평형화하였다. 2ml 헥세인 세척 후, 콜레스테롤은 헥세인 중 0.5% 2-프로판올 9ml로 용출되었고, 옥시스테롤은 헥세인 중 30% 2-프로판올 8ml로 용출되었다. 100 μl 의 옥시스테롤 용출액은 질소하에서 건조되었고, 밀봉된 튜브에서 $70^{\circ}C$, 45분 동안 1% TMCS가 포함된 200 μl BSTFA로 배양한 후 질소 하에서 증발시켜 유도체화(derivatization)를 수행하였다.
- [0080] 잔여물은 100 μl 헥세인에 용해되었고 다음과 같이 분석되었다. GC 분석은 Triple-Axis Detector (Agilent Technologies, USA)이 연결되고 HP-5 capillary column (30cm $\times$ 0.32mm inner diameter, 0.25- μm film thickness)이 장착된 Agilent 7890A를 이용하여 수행되었다.
- [0081] 유도체화된 추출물의 1 μl 분취량은 가스크로마토그래피-질량분석계(gas chromatography-mass spectrometer; GC-MS)로 주입되었다. 스테로이드(steroid)의 정량화를 위한 GC-MS 조건은 다음과 같다: 운반 기체로 0.8 mL/min 유속의 헬륨(helium); 비분할(splitless) 주입; 주입 온도, $270^{\circ}C$; 및 검출기 전송 라인은 $280^{\circ}C$ 로 유지; 오븐 온도 프로그램, $180^{\circ}C$ 에서 1분 동안 유지; $20^{\circ}C/min$ 에서 $250^{\circ}C$ 로 및 $5^{\circ}C/min$ 에서 $300^{\circ}C$; 및 8분 동안 유지.
- [0082] 선택된 이온-모니터링 프로그램은 질량 분석에 사용되었고, 분석에 사용된 이온 및 전형적인 보유 시간(min)은 다음과 같다 : 7 α -hydroxycholesterol 456, 12.181; 7 β -hydroxycholesterol 456, 13.428; 7-ketocholesterol 472, 15.381.
- [0084] 4. OC 형성
- [0085] 골수 세포(Bone marrow cell)는 이전에 기술된 바와 같이, C57BL/6J 수컷 마우스로부터 분리되었다. 대퇴골 및 경골은 무균적으로 제거되고 부착성 연조직의 없이 절제되었다. 골수강(marrow cavity)은 뼈 끝을 해부한 후, 살균한 21-gauge 바늘을 사용하여 골의 한쪽 끝에서부터 α -MEM으로 세척되었고, 단일 셀 현탁액이 파스퇴르 피펫(Pasteur pipette)으로 제조되었다. 생성된 골수 현탁액은 2번 세척하고 플레이트에서 M-CSF (30ng/ml)와 함께 16시간 동안 배양되었다.
- [0086] 부유 세포는 수득되었고 Ficoll-hypaque 구배에 로딩되었으며, 계면에서 세포를 수득하였다. 이를 이상의 배양으로 배양 플레이트에 부착된 단핵구/대식세포-유사 세포의 대량 집단(populations)이 형성되었다. 부유 세포는 인산 완충 용액(phosphate-buffered saline; PBS)으로 디쉬를 세척함으로써 버려지고, 부착 세포인 골수 유래

대식 세포(bone marrow-derived macrophages; BMMs)는 수집되어 플레이트에 시드되었다. 이 세포들은 FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)로 분석되었고 CD3 및 CD45R에 대해 음성(negative), CD115에 대해 양성(positive)임이 확인되었다. 오염된 스트로마 세포(stromal cells)의 부재는 M-CSF의 추가 없이 성장의 결핍에 의해 확인되었다.

[0087] M-CSF (30 ng/ml) 및 RANKL (40 ng/ml)이 세포에 첨가되고, 세포는 지시된 시간 동안 배양한 후, 10% 포르말린(formalin)에 10분 동안 고정되었으며, 그리고나서 세포는 설명대로 TRAP(tartrate resistant alkaline phosphatase)에 대해 염색되었다.

[0088] OCs의 수는 $\times 100$ 배율에서 접안렌즈를 사용하여 웰당 TRAP-양성 다핵세포(multinucleated cells; MNCs)(three or more nuclei)를 계수함으로써 블라인드 평가되었다. 형성된 OCs의 영역 및 최대 직경이 측정되었고, 융합 지수(fusion index)는 TRAP-양성 다핵세포 당 평균 핵의 수로서 제시되었다.

[0090] 5. RNA 분리 및 qPCR

[0091] 전체 RNA는 랜덤 프라이머 및 M-MLV 역전사 효소 (Promega, Madison, USA)로 역전사 시켰다. qPCR은 SYBR Green 1 Taq polymerase (Qiagen, Hilden, Germany) 및 StepOnePlus® Real Time System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)에서 적절한 프라이머를 사용하였다. 프라이머 특이성은 용융 곡선 분석 및 아가로스겔 전기영동에 의해 확인되었다. 하우스키핑 유전자(housekeeping gene) 18S rRNA (RPS)는 관심 유전자와 병행하여 증폭시켰다. RPS와 비교한 상대적인 복제 수는 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 를 이용하여 계산될 수 있다.

[0092] 하기 프라이머가 사용되었다 : 5'-ttcagttgctatccaggactcgga-3' 및 5'-gcatgtcatgtaggtagagaaatgtgctca-3' (ATP6v0d2); 5'-gggccaggatgaaagttgta-3' 및 5'-cactgctctcttcagggtt-3' (Cathepsin K); 5'-agttgccctcttatgaaggagaag-3' 및 5'-ggagtgtcgtcccagcacat-3' (calcitonin receptor); 5'-tcctccatgaacaacagttccaa-3' 및 5'-agacgtggttttaggaatgcagctc-3' (DC-STAMP); 5'-aataacatgcgagccatcatc-3' 및 5'-tcaccctggtgttcttctc-3' (NFAT2); 5'-gaccaccttgcaatgtctctg-3' 및 5'-tggtctgaggaagtcattctgagttg-3' (TRAP); 5'-gcacacctcaccatcaatgct-3' 및 5'-ggtagcaagaggacagagtgacttta-3' (RANKL); 5'-tgagtgtgaggaaggcggtta-3' 및 5'-ccatctggacattttttgcaaa-3' (OPG); 5'-atcagagagttgaccgcagttg-3' 및 5'-aatgaaccgaagcacaccatag-3' (RPS).

[0094] 6. 통계적 분석

[0095] 값은 평균 $\pm$ 표준 평균 오차(SEM)로 표시되었다. Student's t-test는 시료 및 해당 대조군 간의 차이를 평가하기 위해 사용되었다. 그룹 간 차이는 Differences between groups were assessed by one-way ANOVA에 이어 Bonferroni post tests로 평가되었다. 0.05 미만의 P 값은 통계적으로 유의한 것으로 간주되었다.

[0097] <실험결과>

[0098] 1. 죽상동맥경화증 유발 식이가 옥시스테롤 증가를 통해 골 소실 유발함을 확인

[0099] 뼈에서 콜레스테롤의 영향을 조사하기 위해, 수컷 마우스는 12주 동안 동일한 칼로리는 발생하는 저 콜레스테롤 대조군 식이(normal diet; ND)와 함께 고 콜레스테롤 식이(죽상동맥경화증 유발 식이(atherogenic diet; AD, 1.25% cholesterol 및 0.5% Na cholate)를 하였다. 그리고 나서, 마우스는 μ CT에 의해 분석되었다.

[0100] 표 1은 ND 또는 AD 마우스의 섬유주(trabecular) 미세구조(microarchitecture) 및 생화학적 마커이다. 이를 참조하면, 12주 동안의 AD는 혈청 콜레스테롤을 유의하게 증가시켰다.

표 1

	Normal diet (ND)	Atherogenic diet (AD)
BMD [mg/cm^3]	269.26 $\pm$ 19.73	182.3 $\pm$ 16.51**
BV/TV [%]	30.63 $\pm$ 2.981	17.10 $\pm$ 1.295***
Tb. N [mm^{-1}]	3.652 $\pm$ 0.09680	2.556 $\pm$ 0.08700***
Tb. Sp. [μm]	206.5 $\pm$ 1.411	319.1 $\pm$ 13.80***

OC.N/BS [mm^{-1}]	4.250 $\pm$ 0.2500	7.749 $\pm$ 0.4209***
OC.S/BS [mm^{-1}]	3.180 $\pm$ 0.544	9.801 $\pm$ 0.918***
CTX-1 [ng/ml]	15.51 $\pm$ 1.398	28.57 $\pm$ 1.778***
Serum H ₂ O ₂	50.44 $\pm$ 1.708	77.56 $\pm$ 4.683***
Serum Cholesterol [mg/dL]	85.51 $\pm$ 1.653	123.3 $\pm$ 8.361 **

[0102] 상기 표 1에서, ND (n=4), AD (n=8)의 BMD, BV/TV, Tb.N, Tb. Sp. OC.N/BS, 및 OC.S/BS; ND (n=6), AD (n=6)의 CTX-1, 및 혈청 콜레스테롤(serum cholesterol) 값을 평균 $\pm$ SEM으로 나타내었다. 그룹 간 차이는 T-test에 이어 Bonferroni post tests에 의해 분석되었고, ND 마우스와 비교하여 $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ 이다.

[0104] AD 마우스는 ND 마우스에 비해 골 소실을 나타내었다(도 1A). 섬유주 골 밀도(bone mineral density; BMD), 섬유주 골 부피(trabecular bone volume; BV/TV) 및 섬유주 수(trabecular number; Tb. N.) 또한 감소하였고, 섬유주 공간(trabecular space; Tb.Sp.)의 확대가 유의하게 증가하였다(표 1).

[0105] AD 마우스에서 OCs의 더 큰 활성화 및 더 높은 수는 생체 내 흡수 마커, 콜라겐 타입 1의 혈청 C-텔로펩타이드(serum C-telopeptide of type 1 collagen; CTX-1)의 증가된 수준 및 생체 내 TRAP 염색에서 증가된 전체 골 표면에 대한 OC 표면(OC surface over total bone surface; OC. S/BS) 뿐만 아니라 전체 골 표면에 대한 OC의 수(OC number over total bone surface; OC. N/BS)로 추론될 수 있고(표 1 및 도 1B), 이는 OCs가 콜레스테롤 유도된 골 소실에 주된 원인임을 시사한다.

[0106] ND와 비교하여, AD는 경골에서 TRAP, 칼시토닌 수용체(calcitonin receptor), 카텡신 K(cathepsin K), NFAT2, DC-STAMP, 및 ATP6v0d2의 유전자 발현이 상향 조절되었고(도 1C), 이는 관찰된 AD 표현형에 대한 OCs의 영향을 뒷받침한다.

[0108] 그 다음, AD가 산화 스트레스의 유도와 관련이 있는지를 조사하였다.

[0109] 혈청 ROS의 상승된 수준이 AD 마우스에서 나타났고(표 1), 이는 고 콜레스테롤이 생리학적 혈청 ROS 수준을 증가시키는 것을 시사한다. 12주 동안의 죽상동맥경화증 유발 식이는 혈청 및 경골 모두의 혈청 콜레스테롤 및 옥시스테롤에서 유의한 증가를 보여주었다. AD는 뼈와 혈장에서 12주에 걸쳐, 7-케토콜레스테롤(7-KC)을 각각 거의 1.4배 및 2.0배로 증가시켰다(도 1D). 따라서 콜레스테롤의 상승 식이는 7-KC의 증가를 유도하여 골 밀도에 부정적인 영향을 나타내었고, 이를 통해 콜레스테롤의 생체 내(in vivo) 자가 산화(autooxidation)의 산물인 7-KC가 골 소실에 주요한 역할을 함을 보여준다.

[0111] 2. 7-KC의 파골세포형성(osteoclastogenesis) 향상 확인

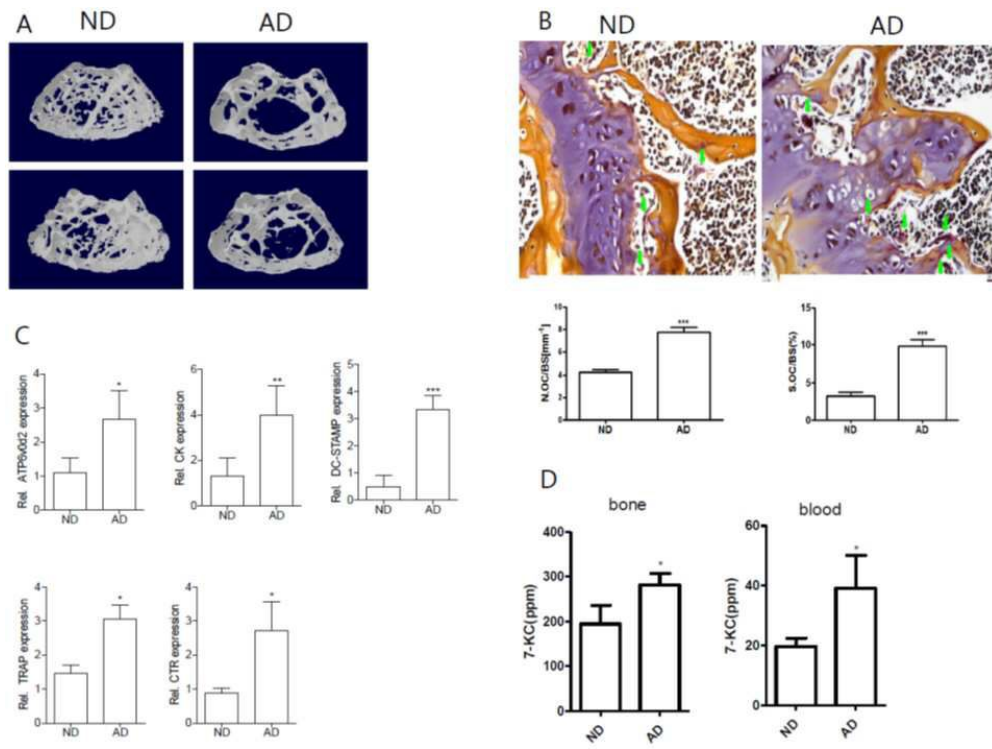
[0112] 생체 내 데이터는 OCs가 콜레스테롤 유도에 의한 골 소실에 주요 역할을 함을 제시하기 때문에, TRAP-양성 MNCs 카운팅에 의한 평가된 바와 같이 OC 형성에서 콜레스테롤의 생체 내 자가 산화의 산물인 7-KC의 영향을 조사하였다.

[0113] 7-KC는 OC 표면적, 최대 직경 및 융합 지수를 감소시켰다(도 2A). 7-KC는 분석된 조건 하에서 BMMs의 생존력에 해로운 영향을 미치지 않았다(도 2B).

[0115] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

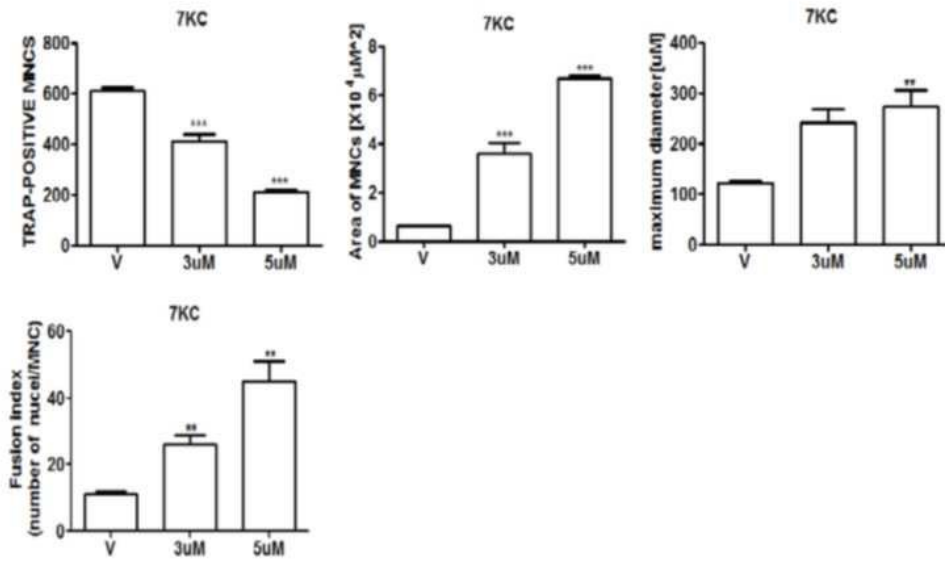
도면

도면1



도면2

A



B

