



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0082571
(43) 공개일자 2019년07월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61K 31/085 (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)

A61K 31/085 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0000338

(22) 출원일자 2018년01월02일

심사청구일자 2018년01월02일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

조은경

대전광역시 중구 계백로1716번길 87, 301동 2302호(문화동, 센트럴파크3단지아파트)

김태성

대전광역시 유성구 송강로 15, 101동 406호(송강동, 한솔아파트)

(74) 대리인

김원준

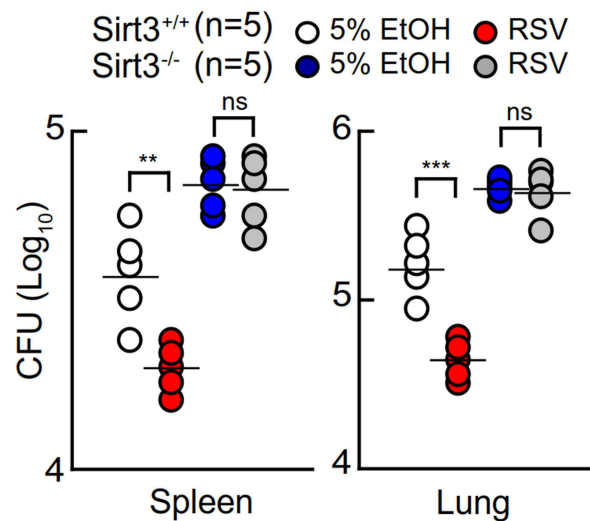
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 Sirt3를 유효성분으로 하는 항결핵 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 결핵균 감염 시 대식세포에서 자가포식을 활성화하고 면역능력을 향상시켜 결핵균의 성장을 저해하는 항결핵 약학 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 Sirt3(Sirtuin3)를 유효성분으로 포함하는 항결핵 약학 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61K 48/005 (2013.01)

A61P 31/06 (2018.01)

G01N 33/5008 (2013.01)

G01N 2500/04 (2013.01)

G01N 2500/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2017R1A5A2015385

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터사업

연구과제명 감염제어 컨버전스 연구센터

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2017.06.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

Sirt3(Sirtuin3)를 유효성분으로 포함하는 항결핵 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 Sirt3는 Sirt3를 코딩하는 유전자의 형태로 제공되는 것을 특징으로 하는 항결핵 약학 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 유전자는 발현벡터 내에 포함된 형태로 제공되는 것을 특징으로 하는 항결핵 약학 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

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

청구항 5

Sirt3(Sirtuin3)의 발현을 증가시키는 호노키올을 포함하는 항결핵 약학 조성물.

청구항 6

Sirt3(Sirtuin3)를 유효성분으로 포함하는 결핵 예방 및 증상 개선용 건강식품 조성물.

청구항 7

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

(B) 상기 시료의 처리에 의한 Sirt3의 발현수준의 변화를 측정하는 단계; 및

(C) 상기 (B) 단계에서 측정된 Sirt3의 발현수준이 상기 시료를 처리하지 않은 대조군에 비해 증가된 경우 항결핵 효능을 가질 것으로 판단하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 항결핵제의 스크리닝 방법.

청구항 8

(A) 결핵균 감염 환자의 혈액 시료에서 대식세포를 수집하는 단계;

- (B) 상기 대식세포에 항결핵제를 처리하는 단계;
 - (C) 항결핵제에 의한 Sirt3의 발현수준의 변화를 측정하는 단계; 및
 - (D) 상기 Sirt3의 발현수준의 변화로부터 항결핵제의 감응성을 예측하는 단계;
- 를 포함하는 것을 특징으로 하는 환자별 항결핵제 감응성 예측 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 항결핵 약학 조성물에 관한 것으로, 결핵균 감염 시 대식세포에서 자가포식을 활성화하고 면역능력을 향상시켜 결핵균의 성장을 저해하는 항결핵 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 결핵(tuberculosis)은 미코박테륨, 특히 결핵균의 감염에 의해 발생하는 전염성 질환이다. 세계적으로 전체 인구의 1/3이 결핵균에 감염되어 있는 것으로 추정되며 매년 약 800백만명의 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] 결핵으로 인한 사망률은 90년대 이후 다시 증가하고 있는데 이는 다약제내성(multi-drug resistant; MDR) 결핵균에 의한 감염 증가와 HIV/TB 동시감염의 증가가 주원인으로 판단된다. 현재 전세계적으로 약 5000만명의 다약제내성 결핵 환자가 있지만, 이에 대한 치료효율은 50% 정도 밖에 되지 않는다. 또한, 현재 전세계적으로 약 600만명의 HIV/TB 동시 감염환자가 있으며 대부분이 결핵으로 사망하는 것으로 추정되고 있다(비특허문헌 1). 따라서 기존 약제와 작용기전이 다르고 부작용이 상대적으로 적은 새로운 항결핵제의 개발이 매우 시급한 과제이다.
- [0004] Mycobacterium tuberculosis(Mtb)는 결핵의 주된 원인균으로 파고솜(phagosome)과 리소솜의 융합을 효과적으로 억제하여 숙주의 대식세포 내에서 생존하는 것으로 알려져 있다. 자가포식(Autophagy)은 세포 내 손상 기관, 노화된 단백질 및 응집체가 리소솜의 분해로 표적화되기 위한 필수적인 과정으로, 세포 내 항상성의 유지에 기여한다. 대식세포에서 자가포식을 증가시키면 다양한 세포의 병소, 특히 Mtb에 대하여 선천적인 숙주의 면역을 증가시킨다. 본 발명자들은 결핵균에 감염된 대식세포에서 항결핵제가 결핵균의 생존율을 감소시키고, 자가포식을 유도하며, 활성 산소종을 감소시키는 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 결핵균생존율의 감소 여부로 구성되는 군으로부터 선택된 하나 이상을 확인하는 단계;를 포함한 항결핵제의 스크리닝 방법에 대해 출원하여 제10-1344025호로 등록받은 바 있다.
- [0005] 시르투인(Sirt, Sirtuin)은 세포 내의 특정 부분에 존재하여 정해진 타겟 단백질에 대하여 주로 탈아세틸화 활성을 갖는다. 사람과 마우스에는 시르투인 1~7까지 존재하며, Sirt1은 핵과 세포질, Sirt2는 세포질에만, Sirt3~5는 미토콘드리아, Sirt6는 핵에만, Sirt7은 핵소체에 존재한다.
- [0006] 클래스 III 히스톤 디아세틸라제인 Sirt3는 미토콘드리아의 NAD^+ -의존적인 디아세틸라제로서, 미토콘드리아의 에너지 대사 및 항상성을 조절하는 데 필수적이다. Sirt3는 미토콘드리아에서 산화적 인산화에 관련된 여러 가지 대사 효소와 단백질의 아세틸화 상태의 조절에 필요하다. 또한 Sirt3는 MnSOD(manganese superoxide dismutase)와 활성산소종(ROS, reactive oxygen species)의 환원을 통한 카탈라아제(catalase)를 활성화시키기 때문에, DNA 손상과 산화 스트레스에 의한 세포 사멸로부터 미토콘드리아를 보호하는 데에도 필수적이다. Sirt3의 발현증가와 활성화는 신장의 기능을 향상시키고 미트콘드리아의 기능장애와 만성 신장 손상에서의 단열(fragmentation)을 개선한다. 노화 및 심장병과 당뇨병을 포함하는 다발성 병변(multiple pathologies), 추위에 대한 과민증, 폐 동맥 고혈압 등에서 Sirt3 활성화의 조절 장애가 보고되기도 하였다. 그러나 결핵균 감염 시 선천 면역의 조절에 대한 Sirt3의 역할에 대해서는 아직 알려진 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 등록특허 제10-1344025호

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) WHO Report 2011. Global Tuberculosis Control, World Health Organization. 2011.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 새로운 작용기작에 의한 항결핵제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 기작에 의거하여, 새로운 항결핵제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0011] 본 발명은 또한 상기 기작을 적용하여, 치료 전 환자들에게 감응성이 높은 항결핵제를 미리 선별할 수 있는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 Sirt3(Sirtuin3)를 유효성분으로 포함하는 항결핵 약학 조성물에 관한 것이다.

[0013] Sirt3를 특이적으로 결손시킨 마우스 또는 상기 마우스 유래의 대식세포는 결핵균의 감염시 정상 마우스 또는 정상 마우스 유래의 대식세포에 비해 결핵균의 생존율이 현저히 높았으며, 결핵균에 의한 병리적인 현상 역시 우세하여 Sirt3가 항결핵능이 있음을 시사하였다.

[0014] 또한 Sirt3의 발현을 증가시키는 작용제로 알려진 레스베라트롤과 호노키올은 대식세포를 이용한 in-vitro 시험과 동물실험 모두에서 항결핵능을 나타내었다. 이에 반해 Sirt3 결손 마우스 또는 상기 마우스 유래의 대식세포에서는 레스베라트롤과 호노키올의 항결핵 효능이 현저히 저하되었다. 이는 레스베라트롤과 호노키올의 항결핵능이 Sirt3의 발현증가에 주로 기인함을 나타낸다.

[0015] 본 발명에서 상기 Sirt3는 Sirt3를 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.

[0016] 또는 본 발명에서 상기 Sirt3는 체내에서 Sirt3의 발현을 증가시키는 약물의 형태로 제공될 수도 있다. 하기 실시예에서 항결핵능을 확인한 레스베라트롤과 호노키올은 물론 추후 Sirt3의 발현을 증가시키는 약물이라면, 역시 항결핵제로서 사용될 수 있다. 레스베라트롤에 대해서는 미국등록특허 US9539222호에서 레스베라트롤이 활성산소의 증가를 저해하여 박테리아의 식포활성을 증가시키고 성장을 저해하는 것으로 보고된 바 있으나, Sirt3와의 연관성은 밝혀진 바 없다.

[0017] 본 발명에서 상기 결핵은 다제내성 결핵, 폐결핵, 담결핵, 골결핵, 인후결핵, 임파선결핵, 폐허증, 유방결핵 또는 척추결핵 등을 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 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.

[0019] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 본 발명에서 상기 '약제학적으로 유효한 양'이란 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수해/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미한다. 유효 용량 수준은 환자의 질병 종류, 증정도, 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 치료제와

는 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.

[0020] 본 발명은 또한 Sirt3를 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.

[0021] 또한 본 발명은 Sirt3의 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 Sirt3의 발현수준의 변화를 측정하는 단계; 및 (C) 상기 (B) 단계에서 측정된 Sirt3의 발현수준이 상기 시료를 처리하지 않은 대조군에 비해 증가된 경우 항결핵 효능을 가질 것으로 판단하는 단계;를 포함한다.

[0022] Sirt3의 발현수준은 Sirt3 단백질 또는 Sirt3를 암호화하는 유전자의 발현수준으로 측정할 수 있으며, 단백질을 유전자의 발현수준을 측정하기 위하여 당업계에서 사용되는 어떤 방법을 사용하여도 무방하다. 예를 들면, Sirt3 단백질의 발현수준은 면역형광 이미지 분석이나 웨스턴블랏, 유세포분석 등의 방법을 이용하여 측정할 수 있으며, Sirt3 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 Sirt3를 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.

[0023] 본 발명은 또한 보다 안전하고 효율적으로 결핵을 치료할 수 있도록 환자별 항결핵제 감응성을 예측하는 방법을 제공한다. 환자의 개별 특성 상 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 선별하여 치료할 수 있다면, 효과적인 결핵의 치료가 가능할 것이다. 이를 위하여 본 발명은 (A) 결핵균 감염 환자의 혈액 시료에서 대식세포를 수집하는 단계; (B) 상기 대식세포에 항결핵제를 처리하는 단계; (C) 항결핵제에 의한 Sirt3의 발현수준의 변화를 측정하는 단계; 및 (D) 상기 Sirt3의 발현수준의 변화로부터 항결핵제의 감응성을 예측하는 단계;를 포함하는 환자별 항결핵제 감응성 예측 방법을 제공한다. 상기 항결핵제 예측방법에서 역시 Sirt3의 발현수준은 Sirt3 단백질 또는 Sirt3를 암호화하는 유전자의 발현수준으로 측정할 수 있다. 항결핵제의 처리에 의해 Sirt3의 발현수준의 변화가 클수록, (즉, 항결핵제를 처리하지 않은 대조군에 비해 Sirt3 발현수준이 크게 증가할수록) 해당 항결핵제에 대한 감응성이 높을 것으로 예측할 수 있다.

발명의 효과

[0024] 이상과 같이 본 발명의 조성물은 결핵균의 생존율을 현저하게 감소시킬 수 있어 새로운 결핵의 예방 및 치료/증상개선제로 사용될 수 있다.

[0025] 본 발명은 대식세포에서 Sirt3의 발현증가가 항결핵능과 직결된다는 것으로부터, 결핵균을 사용하지 않고도 대식세포에서 Sirt3의 발현의 변화만을 측정하는 것에 의해 안전하게 항결핵제를 스크리닝할 수 있다.

[0026] 또한 본 발명에 의하면 항결핵제에 대한 환자의 약물 감응성을 미리 예측할 수 있어 보다 효과적인 결핵의 치료가 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 *in-vitro* 시험에서 Sirt3의 결손이 결핵균 감염에 미치는 영향을 보여주는 그래프.

도 2는 *in-vivo* 시험에서 Sirt3의 결손이 결핵균 감염에 미치는 영향을 보여주는 그래프.

도 3은 Sirt3의 결손이 결핵균 감염 시 폐 조직에 미치는 영향을 보여주는 H&E 염색 이미지.

도 4는 Sirt3의 결손이 결핵균 감염 시 폐 조직에 미치는 영향을 보여주는 호중구의 면역조직염색 이미지.

도 5는 Sirt3의 결손이 결핵균 감염 시 폐 조직에 미치는 영향을 보여주는 호중구의 정량 그래프.

도 6은 *in-vitro* 시험에서 Sirt3의 발현증가가 결핵균 감염에 미치는 영향을 보여주는 그래프.

도 7은 *in-vivo* 시험에서 Sirt3의 발현증가가 결핵균 감염에 미치는 영향을 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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.

[실시예]

실시예 1 : 실험동물 및 대식세포의 준비

1) 실험동물의 준비

Sirt3 결핍이 결핵에 영향을 미치는 지 확인하기 위하여, Hirschey MD 등(Mol Cell. 21; 44(2): 177-90, 2011)의 방법에 따라 야생형(Sirt3^{+/+}) C57BL/6 마우스(Koatech, Korea)로부터 Sirt3 유전자를 표적 절단시킨 Sirt3 결핍마우스(Sirt3^{-/-})를 제작하였다. 하기, 모든 동물실험은 충남대학교 의과대학 동물실험윤리위원회에 의해 감독 및 승인되었다.

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

2) 대식세포의 수집 및 배양

Cell Host Microbe 11: 457-68, 2012에 기재된 방법에 따라 8주령의 Sirt3^{+/+} 및 Sirt3^{-/-} 마우스의 골수로부터 대식세포(macrophage)를 각각 수집하였다. 수집한 골수세포는 배양액[DMEM(Gibco-BRL, Grand Island, NY, USA) with 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL), penicillin G (100 IU/ml)-streptomycin (100 mg/ml)-Amphotericin B]에 1×10⁵/ml의 농도로 부유시켜 37℃, 5% CO₂ 조건에서 100파이 petri dish에 부착시켰다. 2 시간 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.

실시예 2 : Sirt3의 결손이 결핵 감염에 미치는 영향 평가

결핵균의 감염 시 Sirt3의 역할을 확인하기 위하여, Sirt3^{+/+} 및 Sirt3^{-/-} 마우스의 골수유래 대식세포에 결핵균을 감염시키고 감염에 의한 영향을 평가하였다.

1) Sirt3^{+/+} 및 Sirt3^{-/-} 마우스의 골수유래 대식세포에서의 영향 평가

실시예 1의 2)에서 준비한 Sirt3^{+/+} 및 Sirt3^{-/-} 마우스의 골수유래 대식세포 배지 내에 병원성 결핵균인 *Mycobacterium tuberculosis*(Mtb, *M. tuberculosis* H37Rv, 아리조나 대학 R L Friedmann으로부터 제공받아 사용) 또는 *Mycobacterium bovis* BCG(BCG)(결핵연구원, 대한민국 오송)를 배양세포 1개당 감염된 균의 개체 평균 수(multiplicity of infection, MOI)가 1:10이 되도록 첨가하고 4시간 배양하였다. 배양 후 세포 내 박테리아를 방출시키기 위하여 0.3% 사포닌(Sima)으로 대식세포를 터트리고, 7H9 배지로 10배 희석하였다. 7H10 아가 플레이트에 분주하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 14일 정도 배양하고 집락형성단위(CFU)를 측정하여 세포 내 균생존율(intracellular survival, ICS)을 확인하고 그 결과를 도 1에 도시하였다.

도 1에서 확인할 수 있듯이 Sirt3^{-/-} 마우스의 골수유래 대식세포에서는 Sirt3^{+/+} 마우스의 골수유래 대식세포에 비해 Mtb와 BCG의 세포 내 균생존율이 높은 것을 알 수 있다. 이는 Sirt3가 결핵균의 성장을 저해하는 효과가 있음을 시사한다.

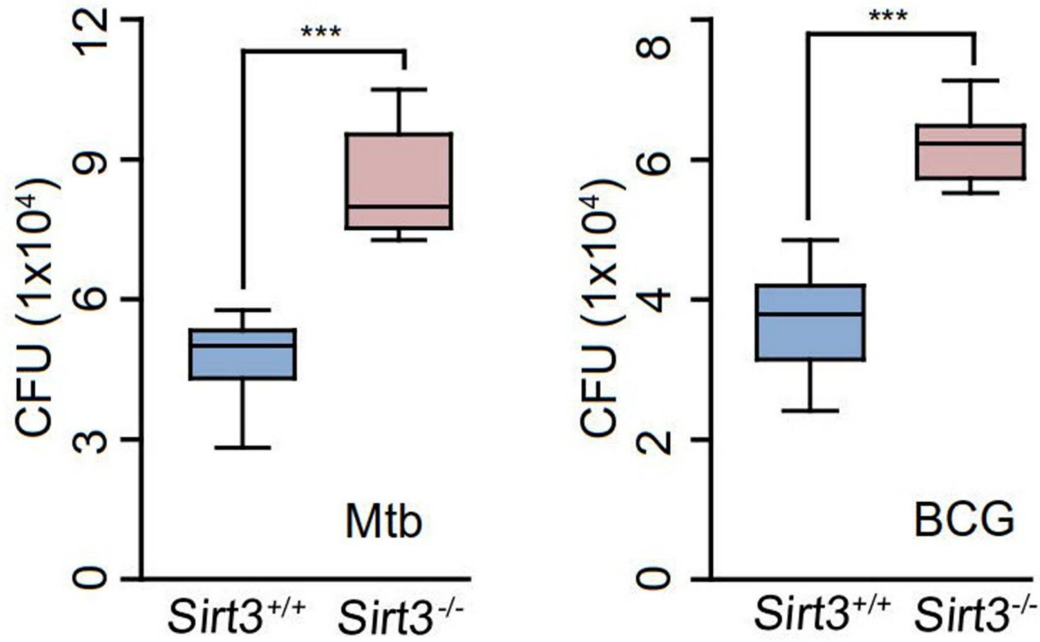
2) Sirt3^{+/+} 및 Sirt3^{-/-} 마우스에서의 영향 평가

- [0042] 실시예 1의 1)에서 준비한 Sirt3^{+/+} 및 Sirt3^{-/-} 마우스에 Mtb 또는 BCG를 1×10⁵ CFU의 농도로 비강을 통하여 감염시켰다. 결핵 감염 7일 또는 14일째에 마우스를 희생시킨 후 폐 조직을 채취하였다.
- [0043] 결핵균 감염 7일째 희생시킨 마우스의 폐 조직을 PBST(phosphate buffered saline with tween 20) 완충액에서 homogenizer를 이용하여 곱게 갈아주었다. 대식세포에서의 세포 내 생존을 측정방법과 동일한 방법에 의해 균 질화된 용액을 처리하여 7H10 아가 플레이트에 분주하고 21일간 배양한 후 결핵균의 생존율을 측정하고 그 결과를 도 2에 도시하였다.
- [0044] 도 2는 골수유래 대식세포를 이용한 *in-vitro* 시험과 마찬가지로 *in-vivo* 시험에서도 Sirt3가 결손된 마우스에서 결핵균의 생존율이 높음을 보여준다.
- [0045] 14일간 Mtb에 감염된 마우스에서 채취한 폐를 10% 포르말린에 고정하고 파라핀 왁스에 임베딩하였다. 이후 4 μm 두께로 파라핀 절편을 제조하여 H&E 염색한 후, Aperio digital pathology slide scanner(Leica, Germany)로 관측하였다. 도 3은 그 결과를 보여주는 이미지로 스케일바는 3 mm를 나타낸다. 결핵균에 감염된 Sirt3^{-/-} 마우스는 결핵균에 감염된 Sirt3^{+/+} 마우스에 비해 병리학적 반응(pathological response)과 육아종 장애(granulomatous lesion)가 더 심각한 것을 보여준다.
- [0046] 면역조직화학 분석을 위하여, 폐 조직의 파라핀 절편(4 μm)을 호중구(neutrophil)에 특이적인 항체(Abcam, ab2557)로 면역 염색하고, confocal laser-scanning microscope로 관측하였다. 관측된 이미지는 도 4에 도시하였으며, 도 4로부터 imageJ software를 사용하여 호중구의 수를 정량하고 그 결과는 도 5에 도시하였다. 정량을 위하여 슬라이드는 3회 분석하였으며, 웰 당 최소 200개의 세포가 측정되도록 하였다. 도 4 및 도 5로부터 결핵균에 감염된 Sirt3^{+/+} 마우스에 비해 결핵균에 감염된 Sirt3^{-/-} 마우스에서 호중구 침윤과 괴저성(necrotic) 세포가 더 많이 발생함을 확인할 수 있다.
- [0047] 도 3~도 5는 Sirt3가 결손된 마우스의 폐 조직에서 결핵균의 감염에 의한 병리적인 현상이 더욱 심각함을 보여주며, 이는 Sirt3가 결핵균 감염 시 결핵균에 대한 저항성에 관여함을 의미한다.
- [0048] **실시예 3 : Sirt3의 발현증가가 결핵 감염에 미치는 영향 평가**
- [0049] 실시예 2에서 Sirt3가 결핵균 감염시 항결핵능과 관련이 있는 것을 확인함에 따라, Sirt3의 발현증가가 결핵 감염에 미치는 영향을 Sirt3^{+/+} 및 Sirt3^{-/-} 마우스의 골수유래 대식세포에서 평가하였다. 레스베라트롤(RSV)은 Sirt1 및 AMPK와 함께 Sirt3의 활성화제로 알려져 있으며, 호노키올(HKL)은 최근 Sirt3에 특이적인 활성화제임이 보고된 바 있다(Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2015; 308: H424-34; Nat commun 2015; 6: 6656). 레스베라트롤과 호노키올은 모두 시그마에서 구매하여 사용하였다.
- [0050] **1) Sirt3^{+/+} 및 Sirt3^{-/-} 마우스의 골수유래 대식세포에서의 영향 평가**
- [0051] 실시예 1의 2)에서 준비한 Sirt3^{+/+} 및 Sirt3^{-/-} 마우스 대식세포 배지 내에 Mtb를 배양세포 1개당 감염된 균의 개체 평균수(MOI)가 1:10이 되도록 첨가하여 4시간 동안 감염시켰다. 이후, RSV 또는 HKL을 처리(2, 10 또는 20 μM)하여 3일간 배양하였다. 이후 실시예 2의 1)과 동일한 방법에 의해 세포 내 균생존율을 확인하고 그 결과를 도 6에 도시하였다.
- [0052] 도 6은 RSV와 HKL 모두가 Sirt3^{+/+} 마우스의 골수유래 대식세포에서는 용량 의존적으로 결핵균의 생존을 저해하지만, Sirt3^{-/-} 마우스의 골수유래 대식세포에서는 RSV와 HKL의 항결핵능이 크게 감소함을 보여준다. 이는 RSV와 HKL이 항결핵능을 나타내며, Sirt3의 발현증가가 RSV와 HKL의 항결핵능의 주된 요인임을 나타낸다.
- [0053] **2) Sirt3^{+/+} 및 Sirt3^{-/-} 마우스에서의 영향 평가**
- [0054] 실시예 1의 1)에서 준비한 Sirt3^{+/+} 및 Sirt3^{-/-} 마우스에 BCG를 1×10⁵ CFU의 농도로 비강을 통해 주입하여 결핵균에 감염시켰다. 7일 후 결핵균이 감염된 마우스에 RSV를 20 mg/kg의 용량으로 6일간 경구투여하였다. 대조군으로는 RSV 대신 PBS 버퍼를 투여하였다. 결핵 감염 14일째에 마우스를 희생시킨 후 비장 및 폐 조직을 채취하고 실시예 2의 2)와 동일한 방법에 의해 각 조직 내 결핵균의 생존율을 분석하였다.
- [0055] 도 7은 그 결과를 보여주는 그래프로, RSV는 Sirt3^{+/+} 마우스의 비장과 폐의 각 조직에서 결핵균의 성장을 크게

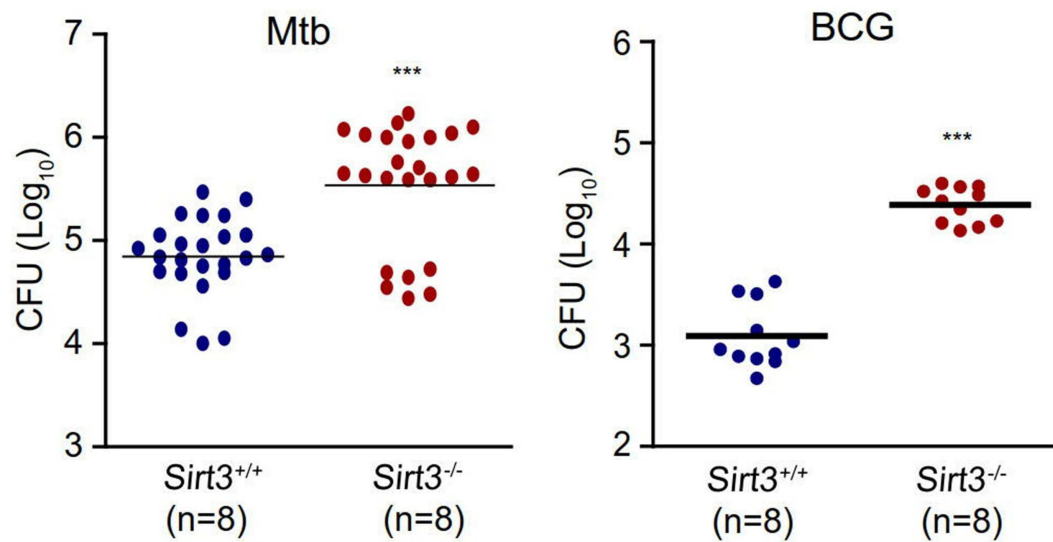
저해하지만, $Sirt3^{-/-}$ 마우스에서는 $Sirt3^{+/+}$ 마우스 정도의 항결핵능을 나타내지 않는다. 이는 *in-vitro* 실험결과와 마찬가지로 RSV의 항결핵능의 주된 부분이 Sirt의 발현증가에 의한 것임을 증명한다.

도면

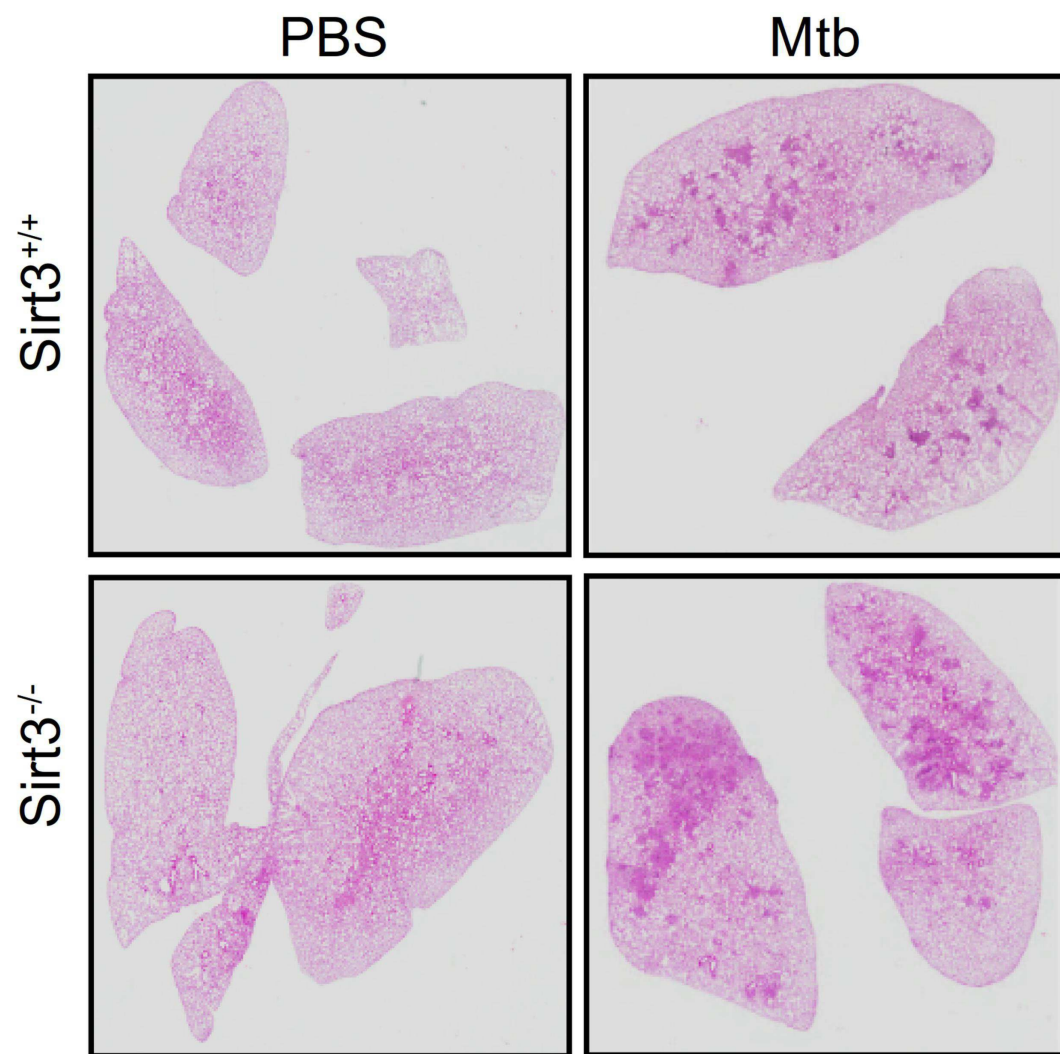
도면1



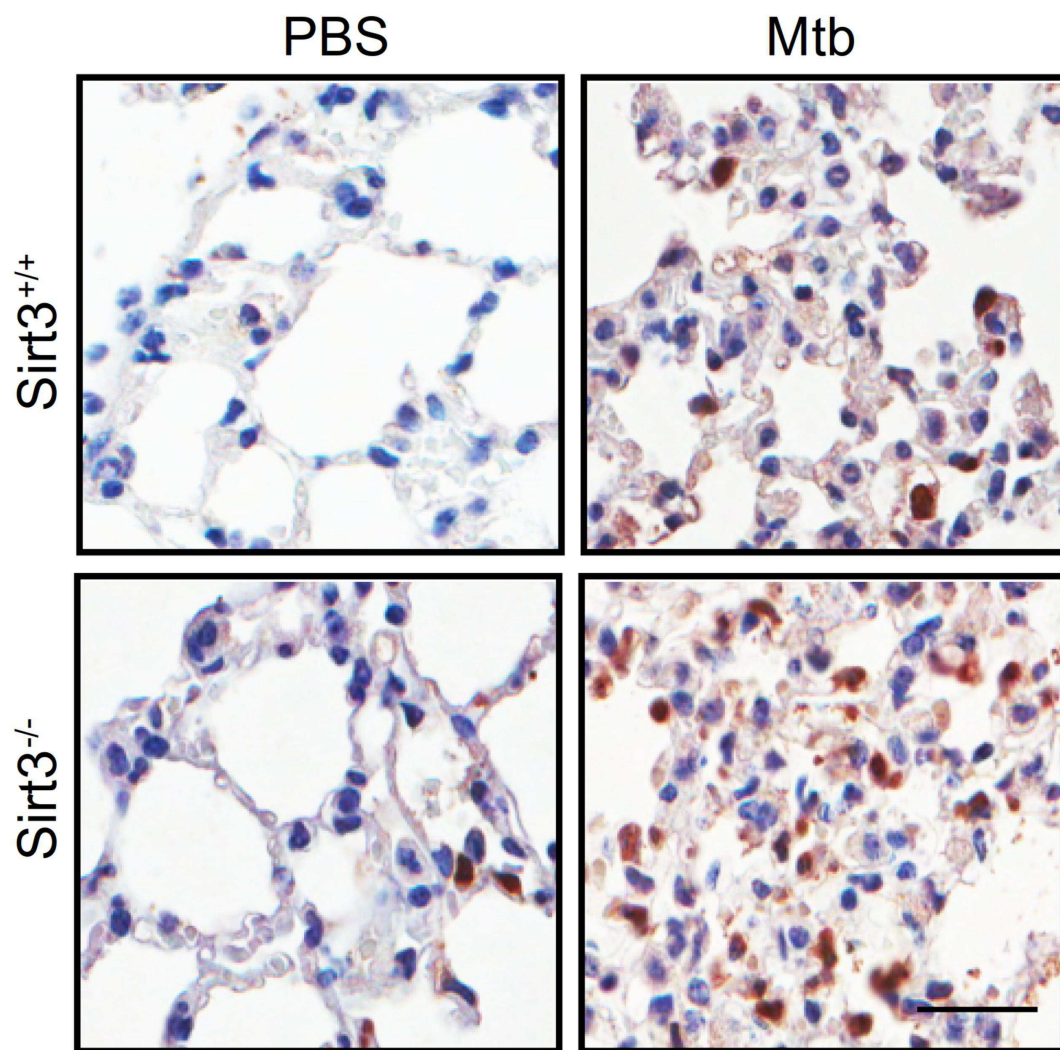
도면2



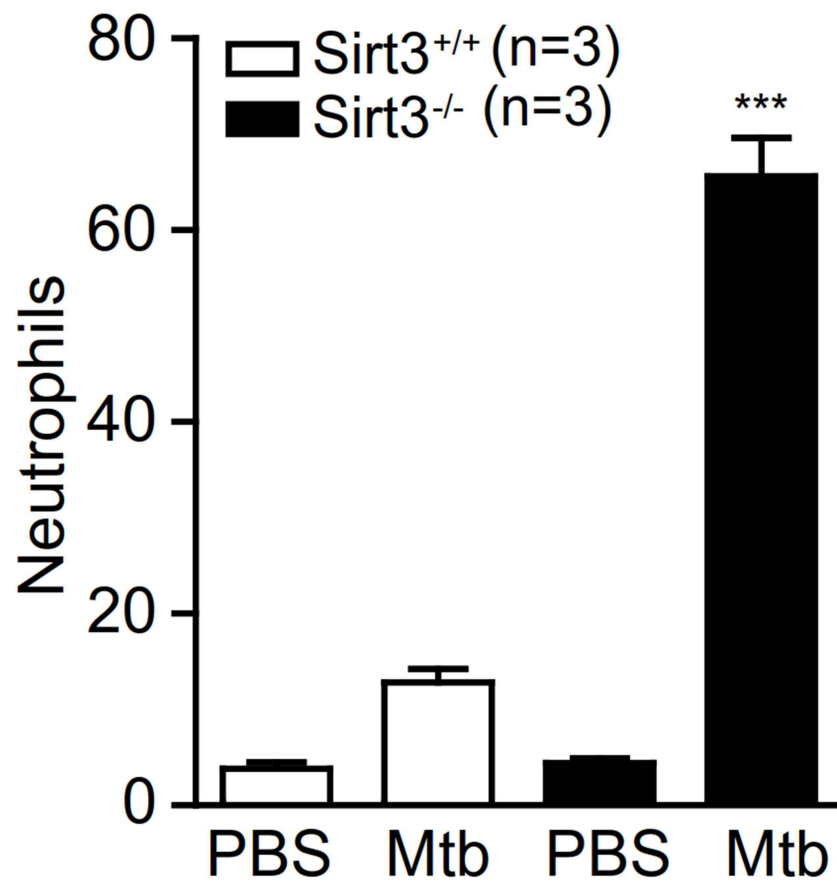
도면3



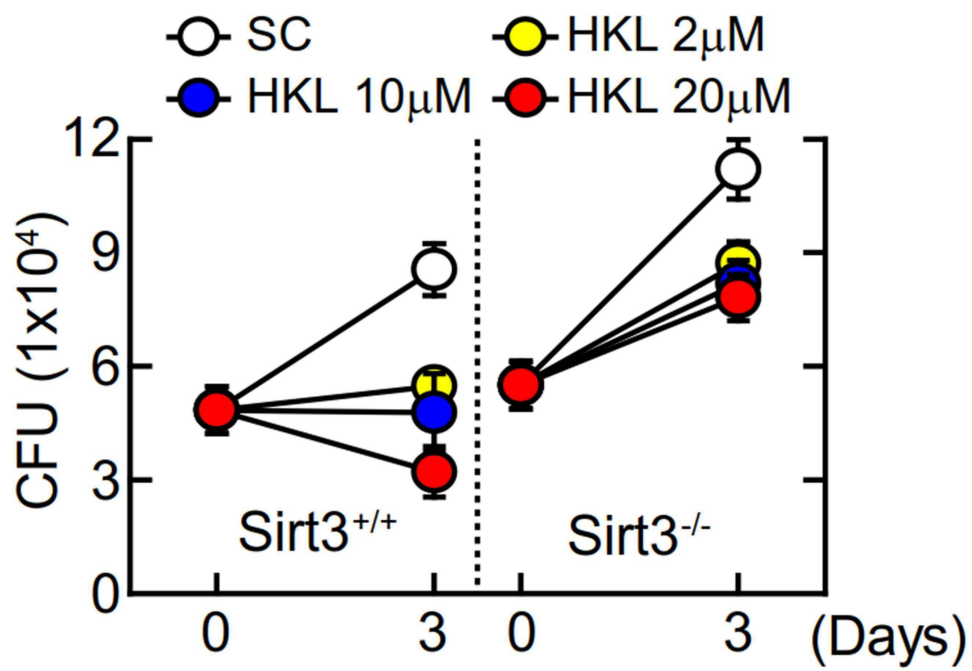
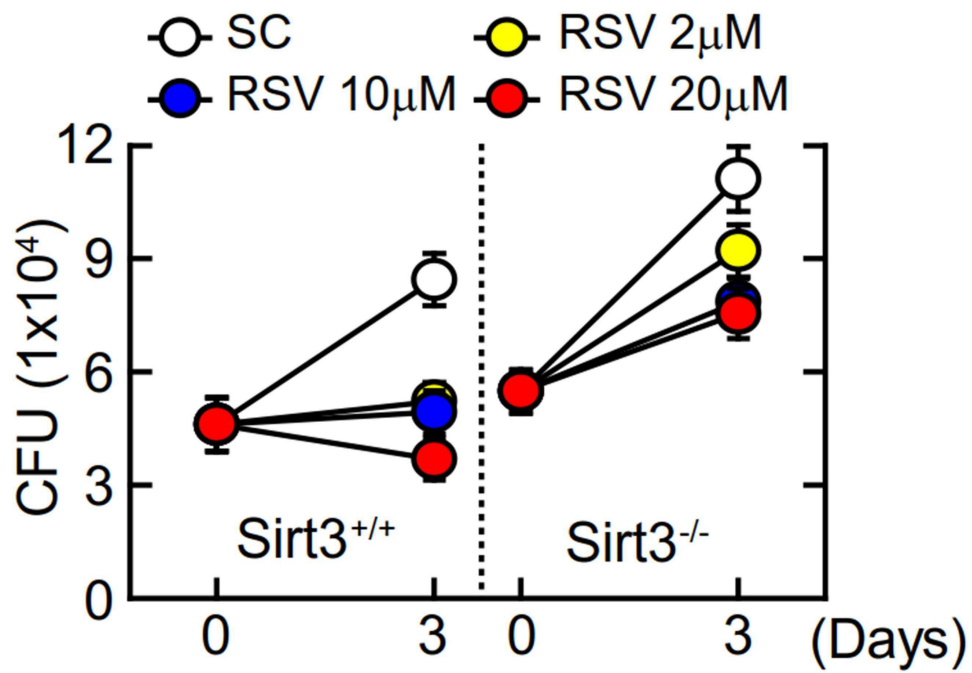
도면4



도면5



도면6



도면7

