(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0065156
(43) 공개일자 2013년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) *A61D 7/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0131890
(22) 출원일자 2011년12월09일
심사청구일자 2011년12월09일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
서홍석
서울특별시 용산구 한강대로 211, 대우월드마크 101-2804 (한강로1가)
김응주
서울특별시 송파구 신천동 진주아파트 4동 801호
(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 6 항

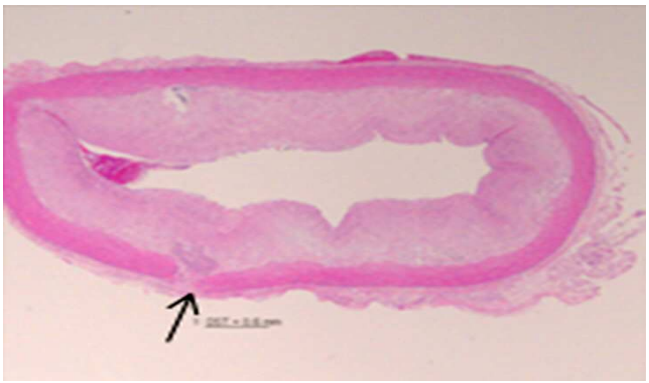
(54) 발명의 명칭 **콜레스테롤 식이요법 및 염증 유도에 의해서 유발된 진행성 죽상동맥경화 병변을 수반하는 토끼 모델**

(57) 요 약

본 발명은 콜레스테롤 식이요법 하에서 사육되는 토끼에 대해서 염증 유발 물질을 주기적으로 투여함으로써 유도된 진행성 죽상동맥경화 병변을 수반하는 토끼 모델에 관한 것이다.

본 발명에 따른 진행성 죽상동맥경화 병변을 수반하는 토끼 모델은 간단하고, 단기간이 소요되며, 경제적인 방법에 의해서 제공될 수 있으며, 더욱이 인간의 죽상동맥경화 병변과 매우 유사한 특징을 나타내기 때문에, 진행성 죽상동맥경화의 발생 기전 및 관련 질병의 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1a



특허청구의 범위

청구항 1

콜레스테롤 식이요법 하에서 사육되는 토끼에 대해서 염증 유발 물질을 주기적으로 투여함으로써 유도된 진행성 죽상동맥경화 병변을 수반하는 토끼 모델.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 콜레스테롤 식이요법은 중량 기준으로 0.5 중량% 내지 1.5 중량%의 콜레스테롤을 함유한 사료를 상기 토끼에 공급함으로써 수행되는 것을 특징으로 하는 진행성 죽상동맥경화 병변을 수반하는 토끼 모델.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 염증 유발 물질은 카라지난 (carrageenan) 또는 리포폴리사카라이드 (lipopolysaccharide)인 것을 특징으로 하는 진행성 죽상동맥경화 병변을 수반하는 토끼 모델.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 카라지난은 요타-카라지난 (ι-carrageenan), 카파-카라지난 (κ-carrageenan) 및 람다-카라지난 (λ-carrageenan)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질인 것을 특징으로 하는 진행성 죽상동맥경화 병변을 수반하는 토끼 모델.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 염증 유발 물질의 주기적 투여는, 체중 1 kg 당 0.05 mg 내지 0.1 mg 용량으로, 15일 내지 21일의 간격으로 피하주사 투여에 의해서 수행되는 것을 특징으로 하는 진행성 죽상동맥경화 병변을 수반하는 토끼 모델.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 염증 유발 물질이 투여된 토끼는 19℃ 내지 23℃의 온도, 41% 내지 62%의 습도 조건 하에서 90일 내지 180일의 기간 동안 사육되는 것을 특징으로 하는 진행성 죽상동맥경화 병변을 수반하는 토끼 모델.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 콜레스테롤 식이요법 및 염증 유도에 의해서 유발된 진행성 죽상동맥경화 병변을 수반하는 토끼 모델에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 죽상동맥경화 (artherosclerosis)는 혈관 내막 (endothelium)에 콜레스테롤이 침착되고 내피세포가 증식하여 죽상종 (atheroma)이 형성되는 혈관질환을 말한다. 과거에는 죽상동맥경화를 혈관 벽에 단순히 지질이 축적되는 질환으로 판단한 적도 있으나, 최근에는 그 생성과 진행, 불안정화, 그리고 죽상반의 파열에 이르기까지 죽상동맥경화에 의한 혈관벽의 병태생리에 있어서, 죽상경화 부위의 염증이 핵심적인 역할을 한다는 것이 밝혀져 있다.

[0003] 기존의 연구자들은 대부분 죽상경화를 일으키는 유전자가 조작된 고콜레스테롤 혈증 실험동물을 이용하여 동맥죽상경화에 대한 병인론과 병태생리를 연구하였다. 그러나, 대부분의 기존 연구에서 선택한 유전자 조작에 의한 동물 모델은 사람의 실제 상황과는 차이점을 보인다. 즉, 가장 흔히 사용하는 유전자 조작 모델인 아포지방단백질 E 결여 (apolipoprotein E deficient) 생쥐는 콜레스테롤의 대사 자체가 사람과 전혀 다르기 때문에 연구에 한계가 있다. 따라서, 많은 경우 식이 섭취로 고콜레스테롤 혈증이 유도되는 토끼를 죽상동맥경화 연구에

널리 이용하게 된다.

[0004] 그러나, 이러한 종래 방법들에 의해서 유도된 토끼의 죽상경화 병변의 특징은 인간과 달리, 혈관 내막의 증식은 많이 나타나지만 죽상종 (atheroma)의 형성은 잘 되지 않는 초기 죽상경화의 특징을 주로 지니며, 따라서 인간에 있어서 특징적인 죽상종 파열에 대한 연구는 수행하기가 어렵다는 문제점이 있었다. 또한, 혈관 내에 도자를 넣고 내피에 상처를 주어 만든 병소는 비교적 진행성의 병변과 유사하지만, 이것 또한 정상적인 생리적 상태에서 형성된 병소와는 다르다는 문제점이 있었다. 한편, 유인원을 이용한 연구의 경우에도 인간과 가장 병변의 특성이 비슷하지만, 유인원 자체를 구하기가 어렵고, 죽상경화병소를 만들기 위해서는 많은 시간이 소요된다는 문제점이 있었다. 따라서, 인간에서 흔히 발생되는 죽상동맥경화성 심혈관 질환의 연구에 많은 한계점이 있었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 따라서, 본 발명에서는 인간의 죽상동맥경화 병변과 매우 유사한 특징을 나타내면서도, 간단하고, 단기간에 걸쳐서 수행될 수 있으며, 경제적인 방법을 사용하여 진행성 죽상동맥경화 병변을 수반하는 토끼 모델을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 상기 첫 번째 과제를 달성하기 위해서,

[0007] 콜레스테롤 식이요법 하에서 사육되는 토끼에 대해서 염증 유발 물질을 주기적으로 투여함으로써 유도된 진행성 죽상동맥경화 병변을 수반하는 토끼 모델을 제공한다.

[0008] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 콜레스테롤 식이요법은 중량 기준으로 0.5 중량% 내지 1.5 중량%의 콜레스테롤을 함유한 사료를 상기 토끼에 공급함으로써 수행될 수 있다.

[0009] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 염증 유발 물질은 카라지난 (carrageenan) 또는 리포폴리사카라이드 (lipopolysaccharide)이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 카라지난은 요타-카라지난 (ι-carrageenan), 카파-카라지난 (κ-carrageenan) 및 람다-카라지난 (λ-carrageenan)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 염증 유발 물질의 주기적 투여는, 체중 1 kg 당 0.05 mg 내지 0.1 mg 용량으로, 15일 내지 21일의 간격으로 피하주사 투여에 의해서 수행될 수 있다.

[0012] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 염증 유발 물질이 투여된 토끼는 19℃ 내지 23℃의 온도, 41% 내지 62%의 습도 조건 하에서 90일 내지 180일의 기간 동안 사육될 수 있다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에 따른 진행성 죽상동맥경화 병변을 수반하는 토끼 모델은 간단하고, 단기간이 소요되며, 경제적인 방법에 의해서 제공될 수 있으며, 더욱이 인간의 죽상동맥경화 병변과 매우 유사한 특징을 나타내기 때문에, 진행성 죽상동맥경화의 발생 기전 및 관련 질병의 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1a 내지 1c, 도 2a 내지 2c, 도 3a 내지 3c 및 도 4a 내지 4c는 콜레스테롤 식이요법을 병행하며 염증 유발 물질을 3개월간 피하주사한 4 마리의 토끼들에서 헤마톡실린 (hematoxylin) 및 에오신 (eosin) 염색으로 관찰되는 대동맥 혈관들을 저배율, 중배율 및 고배율로 관찰한 사진들이다.

도 5a 내지 5c는 정상 사료를 공급하며 아무런 조치를 취하지 않은 대조군 토끼 (C 군)의 대동맥 혈관에 대해서 헤마톡실린 (hematoxylin) 및 에오신 (eosin) 염색을 수행한 후 관찰되는 사진 (5a) 및 1 중량%의 콜레스테롤을 함유한 사료만을 투여한 대조군 토끼 (B 군)의 대동맥 혈관에 대해서 동일한 염색을 수행한 후 관찰되는 사진 (5b 및 5c)들이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명에서는, 콜레스테롤 식이요법 하에서 사육되는 토끼에 대해서 염증 유발 물질을 주기적으로 투여함으로써 유도된 진행성 죽상동맥경화 병변을 수반하는 토끼 모델을 제공한다.

[0016] 인간의 죽상동맥경화는 초기에는 내막에 콜레스테롤 침착 및 내피 세포 증식을 수반하며, 더욱 진행되면 죽상종(atheroma)의 형성을 수반한다. 이러한 죽상동맥경화의 발생 및 진행에 대한 원인에 대해서는 아직까지 명확히 밝혀진 바가 없으며, 혈관 협소화 부위에 따라서 다양한 증상들이 야기된다. 따라서, 죽상동맥경화는 협심증 또는 심근경색과 같은 허혈성 심장질환, 뇌경색 또는 뇌출혈과 같은 뇌졸중, 신장 기능 저하를 수반하는 신부전증, 및 허혈성 사지 질환 등과 같은 다양한 질병의 원인이 된다.

[0017] 따라서, 인간 죽상동맥경화의 발생기전을 명확히 이해하고, 그와 관련된 질병을 진단, 예방 및 치료하기 위해서는 인위적으로 인간의 죽상동맥경화와 유사한 특징을 갖는 죽상동맥경화가 유도된 동물 모델들을 다수 확보하고, 이에 대한 동물 실험을 수행함으로써 풍부한 데이터를 확보하는 것이 필수적이다. 그러나, 동물들에 인위적인 죽상동맥경화를 유도하기 위해서 사용된 종래의 방법들은 인간에 특징적인 죽상종 형성을 수반하지 않고, 정상적인 생리적 상태에서 형성된 병소와 다르다는 문제점이 있었다.

[0018] 본 발명에서는 이러한 문제점을 해결하여 콜레스테롤 식이요법 하에서 사육되는 토끼에 대해서 염증 유발 물질을 주기적으로 투여함으로써 유도된 진행성 죽상동맥경화 병변을 수반하는 토끼 모델을 제공한다.

[0019] 상기 콜레스테롤 식이요법은 중량 기준으로 0.5 중량% 내지 1.5 중량%의 콜레스테롤을 함유한 사료를 상기 토끼에 공급함으로써 수행될 수 있는데, 식이요법 중 콜레스테롤의 함량이 상기 범위를 초과하는 경우에는 의도하는 투여 대상이 되는 토끼가 진행성 죽상동맥경화 병변을 발생시키기 이전에 사육 기간 도중 죽을 수도 있다는 문제점이 있고, 상기 범위 미만인 경우에는 의도하는 진행성 죽상동맥경화 병변을 야기할 수 없다는 문제점이 있다.

[0020] 상기 염증 유발 물질은, 정상 토끼에 염증을 야기할 수 있는 약물이라면 제한없이 사용가능하며, 이에 제한되는 것은 아니지만, 카라지난 (carrageenan) 또는 리포폴리사카라이드 (lipopolysaccharide)가 사용될 수 있다. 다만, 염증 유발 물질로서 리포폴리사카라이드를 사용하는 경우에는 대상 동물에서 독성이 발현되는 문제점이 있지만, 카라지난의 경우에는 이러한 독성 발현의 문제점이 거의 없다.

[0021] 카라지난과 리포폴리사카라이드는 염증 유발의 기전에 있어서, 유사 톨 수용체 4 (toll-like receptor 4; TLR 4)의 리간드로 작용하며, 하기 실시예로부터도 알 수 있는 바와 같이, 토끼에 카라지난을 투여해주는 경우 TLR 4의 발현이 증가하고, 그에 따른 염증성 싸이토카인들 (interleukin-1, 종양괴사인자-α 등)은 증가하였으며, 간에서 합성되는 염증 반응 물질인 c-반응성 단백질도 증가하였다. 염증 유발 물질의 피하지방 주사시 혈액 내에 콜레스테롤이 증가하지 않아도 혈관 죽상동맥경화의 악화로 인한 진행성 병변이 발생되는 기전은, 염증 유발 물질을 피하주사로 투여함으로써, 염증성 싸이토카인들과 염증 반응 물질이 혈류를 타고 혈관에 도달하게 되며, 이후 죽상경화 부위에 분포되어 있는 거식세포에 이들 물질이 작용하여 거식세포 작용을 강화 (priming)시킴으로써 보다 진행된 죽상경화 병변을 초래하는 것으로 추측된다.

[0022] 상기 염증 유발 물질은 정상 토끼에 대해서 주기적으로 투여되는데, 예를 들어 체중 1 kg 당 0.05 mg 내지 0.1 mg의 용량으로, 15일 내지 21일의 간격으로 피하주사 투여에 의해서 수행될 수 있다. 투여 용량이 상기 범위 미만이거나 또는 투여 간격이 상기 범위를 초과하는 경우에는 염증 유발 정도가 미약하여 혈관 석회화가 진행되지 않는다는 문제점이 있으며, 투여 용량이 상기 범위를 초과하거나 또는 투여 간격이 상기 범위 미만으로 빈번한 경우에는 대상 토끼에서 심한 염증을 야기하여 혈전 형성을 유도하거나, 더 나아가 사망을 야기하는 문제점이 있다.

[0023] 상기 염증 유발 물질이 투여된 토끼는 19℃ 내지 23℃의 온도, 41% 내지 62%의 습도 조건 하에서 90일 내지 180일의 기간 동안 사육될 수 있다.

[0024] 이하, 실시예 및 도면을 참조하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다.

[0025] **실시예**

[0026] 유전자 조작이 없는 12 주령의 일반 토끼 (New Zealand white rabbits) 18 마리를 대상으로 하여, 6 마리는 1 중량%의 콜레스테롤을 함유한 사료를 투여하면서 주기적으로 염증 유발 물질을 피하에 주사를 하였고 (A 군), 6 마리는 1 중량%의 콜레스테롤을 함유한 사료만을 투여하였으며 (B 군), 나머지 6 마리는 대조군 (C 군)으로 정상 사료를 공급하며 아무런 조치를 취하지 않았다.

[0027] 토끼의 사육은 표준화된 조건 (21℃, 습도 41% - 62%)에서 규칙적인 낮/밤 (10/14 시간) 주기로 물과 일반 사료

에 자유롭게 접근할 수 있게 하는 조건에서 수행였다. 염증 유발 물질로는 카라지난 (carrageenan)을 사용하였으며, 구체적으로는 0.1% 카라지난 0.5 mL을 3주 간격으로 토끼의 둔부에 피하 주사하였다.

[0028] **평가예**

[0029] 상기 실시예의 과정을 3 개월 동안 거친 후, 대상 토끼를 마취시키고, 복부를 절개한 후, 대동맥으로부터 혈액을 채취하고 안락사시켰다. 혈청 총 콜레스테롤, 저밀도 지단백 콜레스테롤, 고밀도 지단백 콜레스테롤, 중성지방, 염증 싸이토카인 및 c-반응성 단백질의 함량을 측정하였다. 양측 경동맥을 포함해서 대동맥 근위부로부터 장골동맥 분지 지점까지 대동맥을 박리해서 4% 완충용액 포름알데히드 (pH 7.4)에 고정하였다. 혈관 절편은 파라핀 고정 후 일반적인 헤마톡실린 (hematoxylin) 및 에오신 (eosin) 염색과 죽상경화의 진행상태를 확인하기 위한 매트릭스 메탈로프로티네이즈-2 (matrix metalloproteinase-2) 염색 등을 시행하였다. 현미경 분석을 통해서 실험동물 대동맥 벽에서의 혈관 상태 및 죽상종의 존재 여부와 그 양상을 비교하였다. 실험 결과, 콜레스테롤 식이요법을 수행하면서 카라지난을 피하주사하여 염증을 일으킨 동물들 (A 군)에서 진행성 죽상동맥경화가 확인되었다.

[0030] 즉, 도 1a 내지 1c, 도 2a 내지 2c, 도 3a 내지 3c 및 도 4a 내지 4c는 콜레스테롤 식이요법을 병행하며 염증 유발 물질을 3개월간 피하주사한 4 마리의 토끼들에서 헤마톡실린 (hematoxylin) 및 에오신 (eosin) 염색으로 관찰되는 대동맥 혈관들을 저배율, 중배율 및 고배율로 관찰한 사진들이다. 도 1a 내지 1c에 도시된 토끼의 대동맥 혈관 사진의 경우는, 연분홍의 내막 증식과 진분홍의 중막이 관찰되며, 특히 화살표 부위에서 중막의 손상이 관찰되었다. 도 2a 내지 2c에 도시된 토끼의 대동맥 혈관 사진의 경우 역시, 화살표 부위에서 진분홍의 중막층의 파열과 더불어, 별표로 표시된 부위에서 콜레스테롤이 가득 차 있는 진행성 죽상종 (박편 형성 과정에서 콜레스테롤이 빠져나가 사진 상에서는 텅빈 공간으로 표시됨)과 내부 보라색의 석회화 병변도 관찰되었다. 도 3a 내지 3c 및 4a 내지 4c에서도 진행성 죽상종 및 석회화 병변이 관찰됨을 알 수 있지만, 도 1a 내지 1c 및 도 2a 내지 2c와는 달리 중막층의 파열이 관찰되지는 않았다.

[0031] 한편, 도 5a 내지 5c에는 정상 사료를 공급하며 아무런 조치를 취하지 않은 대조군 토끼 (C 군)의 대동맥 혈관에 대해서 헤마톡실린 (hematoxylin) 및 에오신 (eosin) 염색을 수행한 후 관찰되는 사진 (5a) 및 1 중량%의 콜레스테롤을 함유한 사료만을 투여한 대조군 토끼 (B 군)의 대동맥 혈관에 대해서 동일한 염색을 수행한 후 관찰되는 사진 (5b 및 5c)을 도시하였다. 이를 참조하면, C 군 토끼의 경우 연분홍의 내막 증식이 없이 진분홍의 중막층만 관찰되며, B 군 토끼의 경우 연분홍의 내막 증식 특성만을 나타내고 죽상종이나 석회화 또는 중막 파열이 나타나지 않는 초기 죽상경화 병변이 관찰되었다.

[0032] 또한, 하기 표 1 및 표 2에서 설명된 바와 같이, 염증 싸이토카인, c-반응성 단백질의 함량을 측정한 결과, C 군 토끼 (콜레스테롤 식이요법 미수행)에 비해서 A 및 B 군 토끼 (콜레스테롤 식이요법 수행)에서 그 수치가 높았으며, 특히 콜레스테롤 식이요법에 병행하며 염증 유발 물질을 투여한 토끼 (A 군)에서 그 수치가 더욱 상승된 것을 확인하였다. 그러나, 혈청 지질 수치들의 경우에는 C 군에 비해서 A 및 B 군에서 높았으나, 염증 유발 물질을 투여한 토끼보다 높지는 않았다.

표 1

[0033] <A ~ C 군의 혈액 내 지질 함량>

함량 단위 (mg/dL)	A 군	B 군	C 군	*P*
TC	1779.2 ± 657.0^{B}	2491.2 ± 882.5^{B}	23.4 ± 4.6^{A}	0.002
LDL-C	1704.4 ± 633.9^{B}	2394.0 ± 845.0^{B}	4.4 ± 3.2^{A}	0.002
TG	203.4 ± 219.5^{A}	163.4 ± 254.1^{A}	42.8 ± 30.5^{A}	0.429
HDL-C	301.0 ± 157.2^{B}	605.4 ± 268.4^{B}	14.8 ± 5.0^{A}	0.002

[0034] (TC: 총 콜레스테롤, LDL: 저밀도 지단백 콜레스테롤, HDL: 고밀도 지단백 콜레스테롤, TG: 트리글리세라이드, *P:* Kruskal-Wallis test로 시행한 전체의 차이를 나타낸 것, A,B: Mann-Whitney test에서 통계적 차이가 없음을 나타냄)

표 2

[0035] <A ~ C 군의 혈액 내 염증 표지자 농도>

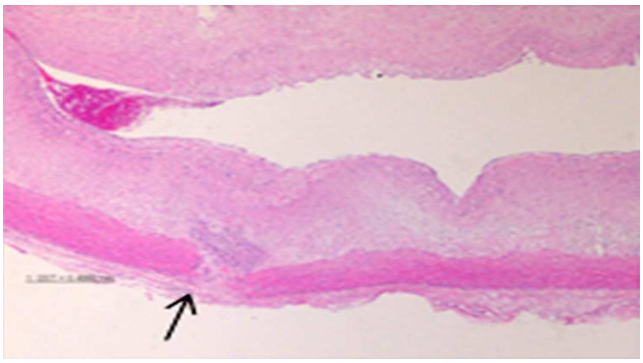
	A 군	B 군	C 군	*P*
IL-1 (pg/mL)	32.3 ± 15.4^{C}	24.1 ± 8.1^{C}	10.8 ± 1.0^{A}	0.001
IL-6 (pg/mL)	63.5 ± 23.5^{B}	69.6 ± 15.6^{B}	11.8 ± 5.1^{A}	0.016
TNF-α(pg/mL)	209.5 ± 61.2^{C}	$159.7\pm34.1^{B,C}$	59.0 ± 40.9^{A}	0.004
CRP (mg/L)	102.0 ± 111.0^{C}	87.9 ± 74.7^{C}	5.5 ± 3.4^{A}	0.002

[0036] (IL-1: 인터루킨-1, IL-6: 인터루킨-6, TNF-α: 종양괴사인자-α(tumor necrotizing factor-α), CRP: c-반응성 단백질, *P*: Kruskal-Wallis test로 시행한 전체의 차이를 나타낸 것, A,B: Mann-Whitney test에서 통계적 차이가 없음을 나타냄)

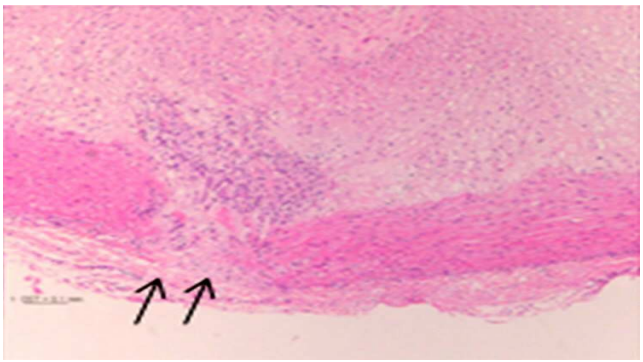
도면

도면1a

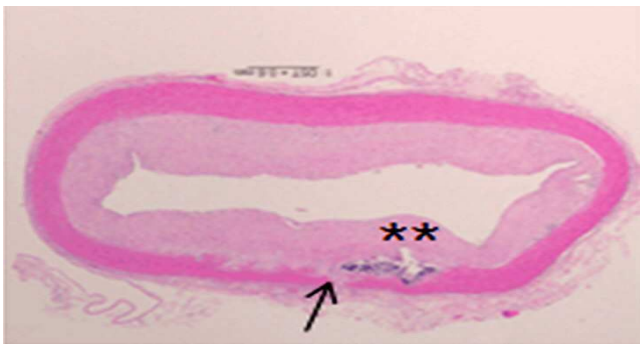
도면1b



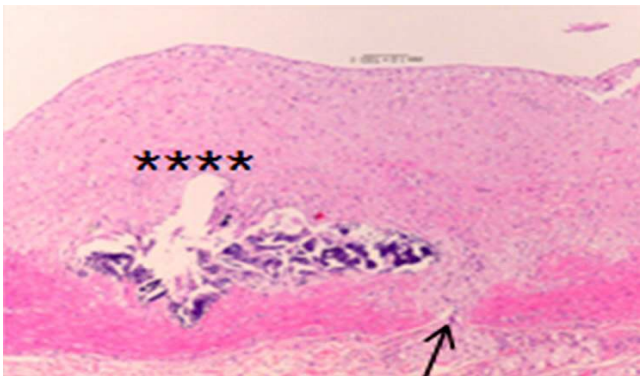
도면1c



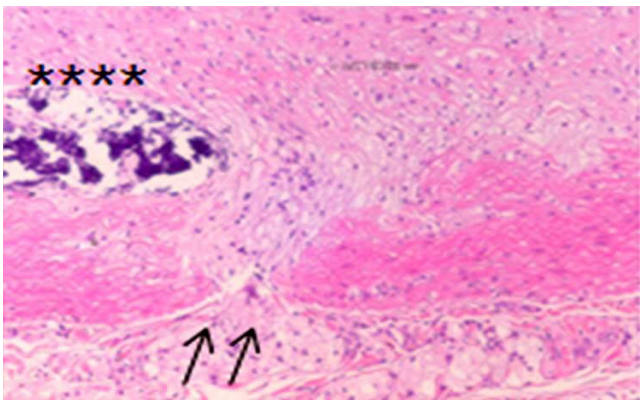
도면2a



도면2b

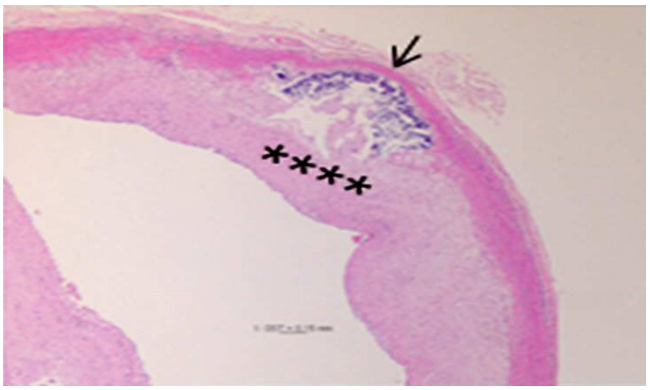


도면2c

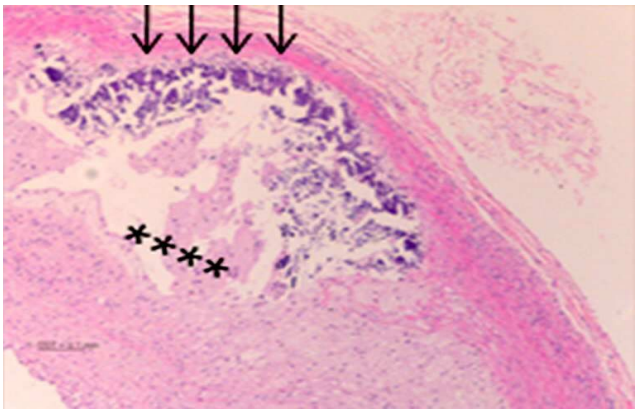


도면3a

도면3b

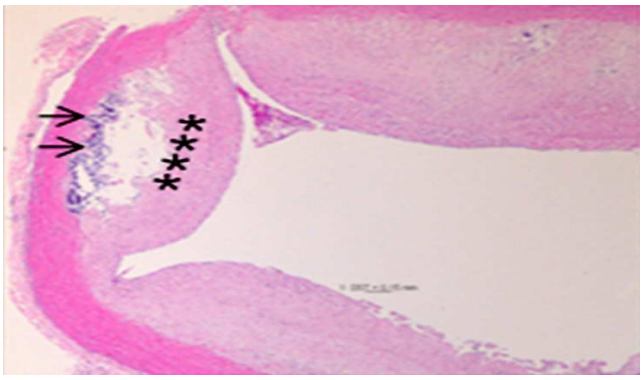


도면3c

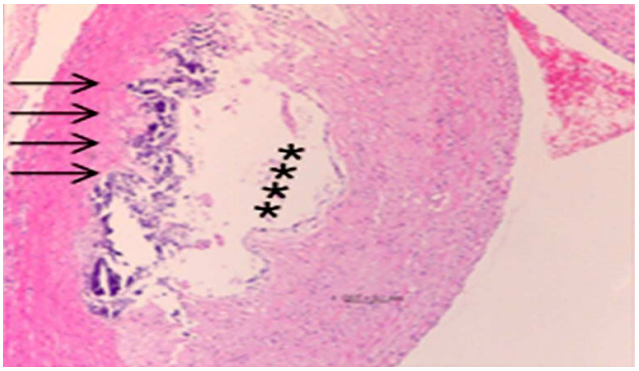


도면4a

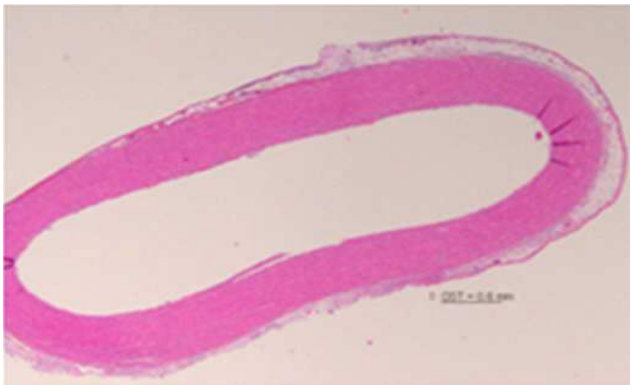
도면4b



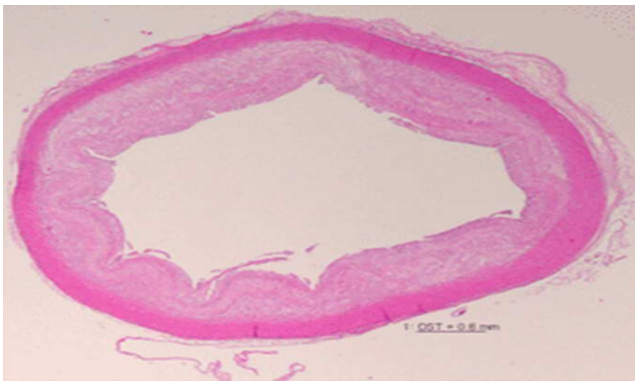
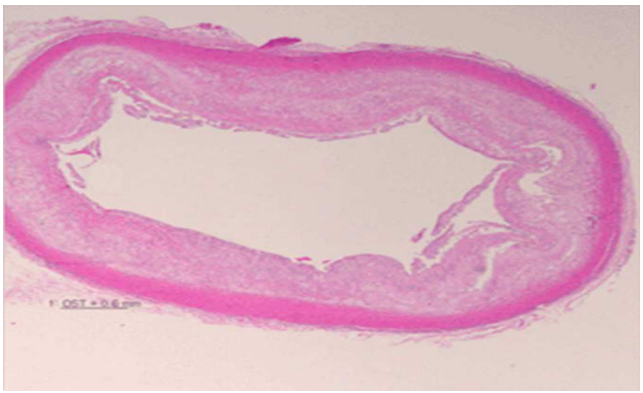
도면4c



도면5a



도면5b



도면5c