(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0099961
(43) 공개일자 2019년08월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/194 (2006.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61P 21/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/194 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0020070
(22) 출원일자 2018년02월20일
심사청구일자 2018년02월20일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
이성준
서울특별시 강남구 도산대로96길 39, 104동 402호 (청담동, 청담공원아파트)
(74) 대리인
이명진

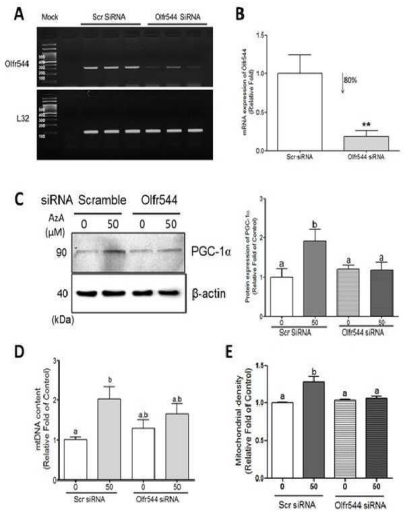
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **아젤라산을 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 합성을 통한 근육강화 촉진용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 아젤라산을 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 합성 촉진용 조성물 등에 관한 것으로서, 아젤라산은 밀, 귀리, 보리, 수수, 호밀 등 곡류와 크랜베리 등 천연물에 주로 함유되어 있는 화합물로서 부작용이 없거나 적다는 이점이 있으며, 세포 내 미토콘드리아의 자가소화작용 및 미토콘드리아 DNA 합성을 유도하여 궁극적으로 미토콘드리아의 밀도를 증가시키는 활성이 있음을 확인하였는바, 미토콘드리아 활성, 또는 미토콘드리아의 수 감소 등 미토콘드리아의 항상성(homeostasis) 조절 실패에 따른 미토콘드리아 기능 저하 관련 질환의 치료에 이용될 수 있다. 또한, 상기 활성을 이용하여 근육 기능 강화 및 근육 노화 방지를 위한 용도에 제공될 수 있으며, 이에 본 발명에 따른 아젤라산은 미토콘드리아 기능 저하 관련 질환 등의 치료, 근육 기능 강화, 또는 근육 노화 방지를 위한 식품소재, 의약조성물, 및 건강기능성 식품에 유용하게 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도4



(52) CPC특허분류
A61P 21/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/316 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017048677
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(교육부)
연구과제명 이소발현 후각수용체 활성조절을 통한 식품 향기성분의 지질대사 조절기작 규명
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교
연구기간 2017.06.01 ~ 2018.03.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

아젤라산을 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 합성 촉진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 Olfr544(Olfactory receptor 544)을 활성화 시키는 것을 특징으로 하는, 미토콘드리아 합성 촉진용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 조성물은 PGC1α(peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha)의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 미토콘드리아 합성 촉진용 조성물.

청구항 4

아젤라산을 유효성분으로 포함하는, 근육 기능 강화 또는 근육 노화 방지용 조성물로서,

상기 근육 기능 강화 및 근육 노화 방지는 미토콘드리아 기능 활성화를 통하여 이루어지는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 조성물은 세포 내 미토콘드리아의 자가소화작용(autophagy)를 유도하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 조성물은 세포 내 미토콘드리아의 생합성을 촉진하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 아젤라산을 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 합성 촉진용 조성물 및 미토콘드리아 기능 저하 관련 질환의 예방, 치료, 또는 개선용 조성물 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 후각인지는 향기성분 (odorant)가 후각수용체 (olfactory receptor, OR)와 결합해 신호전달과정을 거쳐서 대뇌에서 인지된다. 후각수용체는 G-protein coupled receptors (GPCR)중 가장 큰 단백질 군으로써 사람의 경우 약 400여종이 존재하며 후각 상피세포에서 향기성분과 결합하여 신호전달과정을 통해 후각 인지에 관여하는 단백질이다. 최근 연구결과에 의하면 후각세포 이외에도 신장, 간, 소장 등 여러 조직에서 OR이 광범위하게 이소발현)되는 것이 보고되고 있으나 그 기능에 시작단계로 극히 일부분 OR의 기능이 알려지고 있는 단계이다.

[0003] 식품 및 천연물에 포함되어 있는 화합물의 생물학적 효능 연구는 주로 극성/비극성 용매에 추출되는 비휘발성 물질에 집중이 되어 왔으며 휘발성 물질계열인 방향성 향기 성분의 생물학적 기능에 대한 연구는 일부 아로마테라피 관련 연구를 제외하곤 매우 미진한 실정이다. 최근 연구동향에 의하면 allium속 등 허브에서 분리된 방향성 에센셜 오일이 강력한 항산화 작용을 할 뿐 아니라 지질, 혈당, 체지방 조절에 효능이 있다는 연구보고가 되

고 있으나(Wenwick GR et al.) 단일 향기 성분의 분자표적에 대한 연구는 거의 보고된 바가 없다.

[0004] 아젤라산의 화학명은 노난디산(Nonanedioic Acid)으로 탄소수가 9개인 디카르복시산으로서 체내에서 오메가-산화과정이나 리놀레산의 과산화물로 생성되기도 하고, 천연물질로 밀, 보리, 오트밀, 수수 등 여러 가지 곡류나 크랜베리 등 식품에 존재하여 섭취된다. 인체내에서 지방산 오메가 산화 과정을 거쳐 자연적으로 생성되기도 한다. 지금까지 연구된 바에 의하면 아젤라산은 홍조, 여드름 등 염증성 피부질환에 효능이 알려져 있고, 동맥경화, 항암작용 등의 연구 내용이 일부 보고되어 있으나 표적 단백질 규명 등 상세 기전 연구는 수행된 바 없다.

[0005] 최근 여러 연구를 통해서 미토콘드리아 기능 저하는 당뇨, 고혈압을 비롯한 성인병과 파킨슨병, 치매와 같은 만성질병뿐만 아니라 노화에 영향이 있는 것으로 알려지면서 미토콘드리아 기능 유지의 중요성이 높아지고 있다.

[0006] 미토콘드리아는 주요 기능은 세포 내 에너지원인 ATP를 생성하는 것으로 신진대사, 신호전달, 세포자살, 분화 등 세포 내 다양한 기능을 수행하는 소기관이다. 미토콘드리아는 자체적인 핵 DNA와 분리되는 미토콘드리아 DNA(mtDNA)를 가진다. 미토콘드리아 mtDNA는 세포의 핵 DNA와는 달리 손상을 복구하는 수선(repair mechanism)이 없으며, DNA를 보호하는 역할을 하는 히스톤 단백질이 없기 때문에 상대적으로 손상되기 쉽다. 이러한 미토콘드리아 DNA(mtDNA)의 손상은 미토콘드리아의 기능 저하로 연결되어 세포 활동에 필요한 에너지원인 ATP 합성이 감소하게 되고, 생체 내 항상성 조절 능력이 감소되어 다양한 질환 발병의 원인이 된다.

[0007] 달리기, 수영과 같은 지구성 운동은 골격근 호흡 능력을 증가시키고 이는 미토콘드리아의 전자전달사슬, 구연산 회로, 지방산 산화와 관련된 효소의 증가에 영향을 준다. 또한 미토콘드리아 단백질의 분해대사 보다는 합성대사의 비율을 증가시켜 골격근 내 미토콘드리아의 크기와 수가 증가된다. 따라서 골격근 미토콘드리아에서 산소이용능력의 향상은 산화적 인산화를 통한 ATP 생산 능력을 향상시키기 때문에 운동능력 향상 연구에서 골격근 내 미토콘드리아 생합성 연구는 매우 중요하다.

[0008] 이러한 골격근 내 대사적응 반응은 다양한 유전자의 조절에 의해 이루어지게 되는데, 이 때 가장 핵심적인 역할을 하는 것이 peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator-1α(PGC-1α) 전사 보조인자이다. PGC-1α는 운동수행 시 Ca^{2+}-regulated CAMKIV-calcineurin/NFAT와 MEF2 axis, adrenergic/cholinergic signaling, AMP-activated protein kinase(AMPK)와 같은 상위 신호전달기전에 의해 활성화되어 에너지 대사와 미토콘드리아 생합성에 중심적인 역할을 한다. 또한 PGC-1α는 미토콘드리아 생합성뿐 아니라 혈당 수송체인 glucose transporter type 4와 당의 산화를 억제하는 pyruvate dehydrogenase kinase 4(PDK4)와 같은 당 대사에 관여하는 유전자의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 근세포에 Olfr544이 발현되고, 아젤라산이 근세포에서 Olfr544의 리간드로 작용하여 CREB-PCG1α 경로를 활성화 시키고, ERK1/2 신호전달 경로를 활성화 함에 따라 미토콘드리아의 자가소화작용이 유도되고, 미토콘드리아 DNA 및 미코콘드리아의 밀도가 증가함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0010] 이에, 본 발명의 목적은 아젤라산을 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 합성 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 아젤라산을 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 기능 저하 관련 질환의 예방, 치료, 또는 개선용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 또한, 본 발명의 다른 목적은 아젤라산을 유효성분으로 포함하는, 근육 기능 강화 또는 근육 노화 방지용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 기술적 과제를 해결하기 위하여, 아젤라산을 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아 합성 촉진용 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 조성물은 Olfr544을 활성화 시키는 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 조성물은 PGC1α의 발현을 증가시키는 것일 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 조성물은 ERK1/2를 활성화 시키는 것일 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 아젤라산을 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 기능 저하 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 아젤라산을 유효성분으로 포함하는, 미토콘드리아 기능 저하 관련 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 아젤라산을 유효성분으로 포함하는, 근육 기능 강화 또는 근육 노화 방지용 조성물을 제공하다.

[0021] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 조성물은 미토콘드리아 기능 활성화를 통하여 근육 기능 강화 및 근육 노화 방지를 달성하는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 조성물은 세포 내 미토콘드리아의 자가소화작용(autophagy)를 유도하는 것일 수 있다.

[0023] 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 조성물은 세포 내 미토콘드리아의 생합성을 촉진하는 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 또 다른 구현예에서, 상기 미토콘드리아의 자가소화작용 유도 및/또는 생합성 촉진은 Olfr544 및 ERK1/2 활성화에 따른 것일 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 아젤라산을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 미토콘드리아 기능 저하 관련 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 미토콘드리아 기능 저하 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제를 제조하기 위한 아젤라산의 용도를 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명은 아젤라산 또는 이의 약학적으로 허용가능함 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 근육 기능 강화 또는 근육 노화 방지 방법을 제공한다.

[0028] 또한, 본 발명은 아젤라산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 미토콘드리아 기능 저하 관련 질환의 치료방법을 제공한다.

[0029] 또한, 본 발명은 근육 기능 강화 또는 근육 노화 방지용 약제를 제조하기 위한 아젤라산의 용도를 제공하다.

[0030] 또한, 본 발명은 미토콘드리아 기능 저하 관련 질환의 치료용 약제를 제조하기 위한 아젤라산의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0031] 본 발명에 따른 아젤라산은 밀, 귀리, 보리, 수수, 호밀 등 곡류와 크랜베리 등 천연물에 주로 함유되어 있는 화합물로서 부작용이 없거나 적다는 이점이 있으며, 세포 내 미토콘드리아의 자가소화작용 및 미토콘드리아 DNA 합성을 유도하여 궁극적으로 미토콘드리아의 밀도를 증가시키는 활성이 있음을 확인하였는바, 미토콘드리아 활성, 또는 미토콘드리아의 수 감소 등 미토콘드리아의 항상성(homeostasis) 조절 실패에 따른 미토콘드리아 기능 저하 관련 질환의 치료에 이용될 수 있다. 또한, 상기 활성을 이용하여 근육 기능 강화 및 근육 노화 방지를 위한 용도에 제공될 수 있으며, 이에 본 발명에 따른 아젤라산은 미토콘드리아 기능 저하 관련 질환 등의 치료, 근육 기능 강화, 또는 근육 노화 방지를 위한 식품소재, 의약조성물, 및 건강기능성 식품에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0032] 도 1은 MTT assay을 이용하여 아젤라산의 세포독성을 평가한 도면이다.

도 2는 근육세포에서의 Olfr544 유전자의 발현을 확인한 도면이다 (A: Olfr544, Olfr545 플라스미드 발현 확인, B: myotube, myocyte, muscle에서 Olfr544, Olfr545의 발현 확인).

도 3은 아젤라산의 미토콘드리아 생합성 촉진 효과를 확인한 도면이다 (A: 아젤라산의 PGC-1α의 유전자 발현 분석, B: 아젤라산의 PGC-1α 단백질 발현 분석, C: 아젤라산의 mtDNA의 발현량 분석, D: 아젤라산의 미토콘드

리아 밀도 변화 분석, E: 아젤라산의 밀도 변화 분석 형광 이미지).

도 4는 아젤라산의 Olfr544 의존적 미토콘드리아 생합성 효과를 확인한 도면이다 (Olfr544 konck-down 세포와 정상세포의 A-B: Olfr544 konck-down 확인, C: PGC-1α 단백질 발현 분석, D: mtDNA 발현량 분석, E: 미토콘드리아 밀도 분석).

도 5는 아젤라산의 Olfr544 활성에 따른 미토콘드리아 합성 촉진 기전을 확인한 도면이다 (Olfr544 konck-down 세포와 정상세포에서 아젤라산 처리에 따른 A-B: pCREB, CREB 단백질 발현 분석 결과, C-D: pERK1/2, ERK1/2 단백질 발현 분석 결과, E-F: LC3 단백질 발현 분석 결과).

도 6은 마우스의 아젤라산 투여에 따른 미토콘드리아 합성 증대 효과를 확인한 도면이다 (Olfr544 KO세포와 정상세포에 아젤라산을 처리하였을 때 A: PGC-1α의 유전자 발현량 분석, B: Tfam의 유전자 발현량 분석, C: mtDNA 발현량 분석).

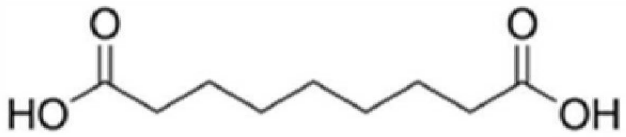
도 7은 마우스에서 아젤라산의 Olfr544 활성에 따른 미토콘드리아 합성 촉진 기전을 확인한 도면이다 (정상 쥐와 Olfr544 KO 쥐에 아젤라산을 복강 주사하고 30분, 120분 뒤 적출한 근육 조직의 A: pCREB, CREB, PGC-1α, ERK1/2, pERK1/2, LC3 단백질 발현 이미지, B: pCREB, CREB 단백질 발현량 분석, C: PGC-1α단백질의 아젤라산 처리 시간 별 단백질 발현 분석, D: pERK, ERK의 단백질 발현량 분석, F: LC3 단백질의 아젤라산 처리 시간 별 단백질 발현 분석).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0033] 본 발명자들은 밀, 귀리, 보리, 수수, 호밀 등 곡류와 크랜베리 등 천연물에 주로 함유되어 있는 아젤라산이 근육세포에서 미토콘드리아의 생합성을 증가시킴을 확인하고, 보다 구체적인 연구를 통해 아젤라산이 근육세포에서 G-protein coupled receptor(GPCR)인 Olfr544의 리간드(ligand)로 작용하여 Olfr544(Olfactory receptor 544)-CREB(cAMP response element binding protein)-PGC1α(peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha) 경로를 활성화 시키고, ERK1/2 신호전달 경로를 활성화 하여 세포 내 미토콘드리아의 생합성을 촉진시킴을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0034] 본 발명에서 “아젤라산 (azelaic acid, AzA)”이란 노난디산 (Nonanedioic Acid)이라고도 불리우며, 분자량 188.22 g/mol을 갖고 분자식은 $C_9H_{16}O_4$로 하기 화학식 1의 구조를 갖는다.

[0035] [화학식 1]

[0036] 

[0037] 상기 아젤라산은 밀, 귀리, 보리, 수수, 호밀 등 곡류와 크랜베리 등 천연물에 주로 함유되어 있는 화합물로서 인체내에서도 지방산의 오메가 산화과정을 통해 생성되는 것으로 알려져 있는바, 개체에 투여되는 경우 부작용이 없거나 적다는 이점이 있다. 연구된 바에 의하면 인체 내 존재하는 아젤라산의 농도는 10~50μM 정도로 섭취 시 안전함이 입증되었다. 본 발명의 일 실시예에서는 MTT assay를 통해 아젤라산의 세포독성을 평가한 결과, 고농도의 아젤라산을 처리한 경우에도 세포 생존률(cell vailability)에 변화가 거의 없는 것을 관찰하여 그 안전성을 재차 확인하였다. (실시예 1 참조).

[0038] 본 발명의 아젤라산은 천연물질이므로 독성이 없어 식품 또는 의약품의 유효성분으로서 지속적으로 다량 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 아젤라산은 밀, 귀리, 보리, 수수, 호밀 등 곡류와 크랜베리 등 천연소재에서 착즙 추출, 수증기 추출, 열수 추출, 초음파 추출, 용매 추출, 또는 환류냉각 추출 등 통상의 추출방법에 의해 수득할 수 있으며, 상기 추출에 물, 탄소 수 1 내지 4의 알코올, n-헥산, 에틸아세테이트, 아세톤, 부틸아세테이트, 1,3-부틸렌 글리콜, 메틸렌클로라이드, 및 이들의 혼합 용매로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 용매를 이용할 수 있으나, 이것으로 제한되는 것은 아니다.

[0040] 또한, 본 발명의 아젤라산은 합성 화합물일 수 있으나 이는 천연물로부터 획득된 것과 동일한 효능을 갖고 이로부터 동일한 용도에 이용될 수 있음은 자명하다.

[0041] 본 발명자들은 아젤라산이 근육세포에서 이소발현된 후각 수용체에 리간드로 작용하여 미토콘드리아 생합성을 촉진하는 효능을 확인하였다. 먼저 근육세포에서 후각수용체 Olfr544 발현을 확인하였고, 근육세포에 아젤라산 처리에 따른 미토콘드리아 생합성 관련 마커 증가를 확인하였다. 이후 Olfr544 siRNA를 처리한 세포와 Olfr544 knock-out 마우스를 이용하여 인위적으로 Olfr544 발현을 감소시킨 뒤 대조군과 비교를 통해 아젤라산의 미토콘드리아 생합성 효능이 Olfr544 의존적으로 나타나는지 확인하였다.

[0042] 보다 구체적으로, 본 발명자들은 근육세포에서 Olfr544 발현을 확인하고(실시예 2 참조), 근육세포에 아젤라산의 처리에 따라 미토콘드리아 DNA(mtDNA)와 밀도가 증가하고, 미토콘드리아 기능을 조절하는 PGC1α의 발현이 증가됨을 확인하였다 (실시예 3참조).

[0043] 또한, 본 발명자들은 Olfr544 siRNA를 형질감염시켜 Olfr 544의 발현이 감소된 Olfr544 knockdown 근세포와 정상세포에 아젤라산을 처리한 결과, 정상세포의 경우 PGC1α의 발현이 증가하고 미토콘드리아 DNA(mtDNA)와 밀도가 증가하지만 Olfr544 knockdown 세포의 경우 그러하지 아니함을 확인하여(실시예 4 참조), 아젤라산이 근세포에서 Olfr544의 리간드로 작용하여 Olfr544 의존적 미토콘드리아 생합성을 유도함을 확인하였다.

[0044] 한편, PGC1α(peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha)는 미토콘드리아 기능의 핵심 요소로서, 미토콘드리아 신생의 master regulator와, 전신의 골격근에서 지방산 산화 및 에너지 소비에 영향을 미치는 전사 인자 과잉의 강력한 보조 활성인자로 여겨지고 있다. 또한 PGC1α는 미토콘드리아의 유전자 발현과 게놈 복제에 필요한 nuclear respiratory factor-1 (NRF-1), 및 transcription factor A (TFAM)와 같은 핵전사인자의 보조 활성인자이다.

[0045] 또한, 본 발명자들은 근세포에서 아젤라산의 미토콘드리아 생합성 기작을 보다 구체적으로 확인하기 위하여 Olfr544 siRNA로 형질감염된 Olfr544 knockdown와 정상세포에 아젤라산을 처리하여 CREB/pCREB, EKR1/2, LC3II/LC3I의 발현량 변화를 확인한 결과, Olfr544 knockdown 세포와 달리 정상세포에 아젤라산 처리에 따른 pCREB, pERK1/2, 및 LC3II/LC3I의 발현이 증가함을 확인하여, 아젤라산이 골격근 조직에서 CREB-PGC-1α 신호전달 과정과 ERK1/2 활성을 촉진시킴으로 골격근 세포에서 자가소화작용(Autophagy)을 유도함을 알 수 있었다 (실시예 5 참조).

[0046] 한편, mitophagy는 미토콘드리아의 autophagy를 일컫는 것으로서, autophagy에 의한 미토콘드리아의 분해는 미토콘드리아의 생합성(mitochondrial biogenesis)과 더불어 미토콘드리아의 항상성 조절에 주요 기작이다. 이때 autophagy는 운동 중 골격근 세포에서 미토콘드리아의 손상을 방지하고 근육 조직의 적응 능력을 향상시키며, 미토콘드리아의 생합성에 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 즉, 적절한 Autophagy는 근세포의 노화를 억제하여 그 기능을 원활하게 수행할 수 있도록 하는 중요한 기작이다.

[0047] 따라서, 본 발명의 아젤라산은 근세포에서 미토콘드리아의 자가소화작용을 유도하여 운동 중 골격근 세포에서 미토콘드리아의 손상을 방지하고, 근육 수행력을 개선하고, 조직 ATP 수준을 증가시키며, 미토콘드리아의 생합성을 촉진할 수 있다.

[0048] 이에 따라, 본 발명의 아젤라산은 미토콘드리아 기능 저하 관련 질환의 예방, 치료, 또는 개선에 이용될수 있다.

[0049] 본 명세서에서 “미토콘드리아 기능 저하 관련 질환”이란 미토콘드리아의 활성 저하, 미토콘드리아의 기능 저하, 부적절한 미토콘드리아 활성, 또는 미토콘드리아의 수 감소 등 미토콘드리아의 항상성(homeostasis) 조절 실패에 따른 각종 퇴행성 질환, 뇌 질환, 신경 질환, 심장 질환, 간 질환, 신장 질환, 췌장 질환, 대사성 질환, 또는 근육 질환을 의미하는 것으로서, 상기 퇴행성 질환은 퇴행성관절염, 류마티스성 관절염 또는 골성관절염일 수 있으며, 상기 뇌 질환은 치매, 파킨슨병, 뇌졸증, 발달지연, 신경정신장애, 편두통, 자폐증, 정신지체, 발작, 또는 중풍일 수 있고, 상기 신경 질환은 안검하수, 시신경위축, 사시, 망막색소변성증, 실명, 청력손실, 눈근육마비, 반사작용 저하, 실신, 신경 통증 또는 자율신경실조증일 수 있으며, 상기 심장 질환은 심장마비 또는 심장근육병증일 수 있고, 상기 간 질환은 저혈당증 또는 간부전 일 수 있으며, 상기 신장 질환은 신세뇨관산증일 수 있고, 상기 췌장 질환은 췌장외분비기능부족증 또는 부갑상선부족증일 수 있으며, 상기 대사성 질환은 고혈압, 당뇨병, 또는 비만일 수 있고, 상기 근육 질환은 과민성 장 증후군, 근육통, 근이영양증, 위식도역류질환, 저혈압, 경련, 또는 운동장애일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명의 조성물은 세포 내 미토콘드리아의 항상성을 조절함에 따라 신경보호 (neuroprotective), 신경영양(neurotrophic), 및/또는 신경돌기(neurite) 증식을 촉진하여 궁극적으로 인지 기능을 개선할 수 있다.

[0051] 또한, 본 발명의 조성물은 세포 내 미토콘드리아의 항상성을 조절하여 대사율을 증가시키고, 지방률을 감소시키고, 근육량을 증가시키고, 체중의 증가를 억제하거나 그 감소를 유도하며, 정신 능력 (기억력 포함)을 개선시키고, 근육 수행력을 개선·유지 시키며, 기분을 개선하거나 스트레스를 관리할 수 있도록 하여 개체의 신체 및 정신의 건강 유지에 효과적일 수 있다.

[0052] 상기에 따라, 본 발명의 아젤라산은 미토콘드리아 활성화를 통하여 근육 기능을 강화하고 근육의 노화를 지연시킬 수 있음을 알 수 있다. 이에 본 발명은 아젤라산을 유효성분으로 포함하는 근육 기능 강화 또는 근육 노화 방지용 조성물을 제공하고, 상기 조성물에는 제한이 없으며, 약학적 조성물, 식물 조성물, 및 건강기능식품 조성물 등을 포함한다.

[0053] 본 발명에서 "근육 기능"이란 근육을 구성하는 근섬유의 수축성, 탄성, 흥분성, 및 전도성에 의하여 동작을 수행하기 위한 힘, 자세유지를 위한 힘, 또는 체온유지를 위한 열의 발생 등의 기능을 수행하는 것을 의미한다.

[0054] 또한, 본 발명에서 "근육 노화"란 근섬유 내의 미토콘드리아가 그 활성을 잃거나 미토콘드리아의 수가 감소됨에 따라 근육 기능이 약화되는 것으로서, 근감소증(sarcopenia)를 포함하는 의미이다.

[0055] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 Olfr544 Knockout 마우스와 정상 마우스를 고지방식이(HFD)로 비만을 유도하고 아젤라산을 경구 투여한 결과, 정상 마우스에서 아젤라산 투여에 따라 PGC-1α 및 Tfa의 발현이 증가하였고, mtDNA가 증가함을 확인하였다. 또한, 아젤라산을 복강 투여한 경우 대조군과 비교하여 pERK 및 LC3 II/LC3 I의 발현이 증가함을 확인하였다 (실시예 6 참조). 이에 따라, 본 발명의 조성물이 비만, 특히 고지방식이에 의해 유발된 비만의 예방, 치료, 또는 개선에 효과가 있음을 알 수 있었다.

[0056] 또한, 본 발명의 조성물은 아젤라산을 유효성분으로 포함하면서 미토콘드리아의 기능 저하 관련 질환의 예방 또는 치료를 위해 통상적으로 사용되는 1종 이상의 물질을 더 포함할 수 있다.

[0057] 본 발명에서 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 미토콘드리아의 기능 저하 관련 질환의 발병을 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 미토콘드리아의 기능 저하 관련 질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, "개선"이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 미토콘드리아의 기능 저하 관련 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.

[0058] 본 발명에서 아젤라산은 약학적으로 허용 가능한 염의 형태로 사용될 수 있으며, 염으로는 약학적으로 허용가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산부가염이 유용하다.

[0059] 본 발명에서 사용되는 용어 "염"은 약학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성된 산 부가염이 유용하다. 산 부가염은 염산, 질산, 인산, 황산, 브롬화수소산, 요드화수소산, 아질산 또는 아인산과 같은 무기산류와 지방족 모노 및 디카르복실레이트, 페닐-치환된 알카노에이트, 하이드록시 알카노에이트 및 알칸디오에이트, 방향족 산류, 지방족 및 방향족 설폰산류와 같은 무독성 유기산으로부터 얻는다. 이러한 약학적으로 무독한 염류로는 설페이트, 피로설페이트, 바이설페이트, 설파이트, 바이설파이트, 니트레이트, 포스페이트, 모노하이드로겐 포스페이트, 디하이드로겐 포스페이트, 메타포스페이트, 피로포스페이트 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드, 플루오라이드, 아세테이트, 프로피오네이트, 데카노에이트, 카프릴레이트, 아크릴레이트, 포메이트, 이소부티레이트, 카프레이트, 헵타노에이트, 프로피올레이트, 옥살레이트, 말로네이트, 석시네이트, 수베레이트, 세바케이트, 푸마레이트, 말리에이트, 부틴-1,4-디오에이트, 헥산-1,6-디오에이트, 벤조에이트, 클로로벤조에이트, 메틸벤조에이트, 디니트로 벤조에이트, 하이드록시벤조에이트, 메톡시벤조에이트, 프탈레이트, 테레프탈레이트, 벤젠설포네이트, 톨루엔설포네이트, 클로로벤젠설포네이트, 크실렌설포네이트, 페닐아세테이트, 페닐프로피오네이트, 페닐부티레이트, 시트레이트, 락테이트, β-하이드록시부티레이트, 글리콜레이트, 말레이트, 타트레이트, 메탄설포네이트, 프로판설포네이트, 나프탈렌-1-설포네이트, 나프탈렌-2-설포네이트 또는 만델레이트를 포함한다.

[0060] 본 발명에 따른 산 부가염은 통상의 방법, 예를 들면, 화학식 1로 표시되는 화합물을 과량의 산 수용액 중에 용해시키고, 이 염을 수혼화성 유기 용매, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 아세톤 또는 아세토니트릴을 사용하여 침전시켜서 제조할 수 있다. 또한 이 혼합물에서 용매나 과량의 산을 증발시킨 후 건조 시키거나 또는 석출된 염을 흡입 여과시켜 제조할 수도 있다.

[0061] 또한, 염기를 사용하여 약학적으로 허용 가능한 금속염을 만들 수도 있다. 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염은 예를 들면, 화합물을 과량의 알칼리 금속 수산화물 또는 알칼리 토금속 수산화물 용액 중에 용해하고, 비용

해 화합물 염을 여과하고, 여액을 증발, 건조시켜 얻는다. 이때, 금속염으로는 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 제조하는 것이 제약상 적합하다. 이에 대응하는 은염은 알칼리 금속 또는 알칼리 토금속 염을 적당한 음염 (예, 질산은)과 반응시켜 얻는다.

[0062] 또한, 본 발명의 화합물은 약학적으로 허용되는 염뿐만 아니라, 통상의 방법에 의해 제조될 수 있는 모든 염, 이성질체, 수화물 및 용매화물을 모두 포함한다.

[0063] 본 발명에서 약학적 조성물 (pharmaceutical composition)은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제, 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0064] 본 발명에서 "담체 (carrier)"란 비이클 (vehicle)이라고도 불리우며, 세포 또는 조직 내로의 화합물의 부가를 용이하게 하는 화합물을 의미하는 것으로서, 예를 들어, 디메틸술폭사이드 (DMSO)는 생물체의 세포 또는 조직 내로의 많은 유기 화합물들의 투입을 용이하게 하는 통상 사용되는 담체이다.

[0065] 본 발명에서 "희석제 (diluent)"란 대상 화합물의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 화합물을 용해시키게 되는 물에서 희석되는 화합물로 정의된다. 버퍼 용액에 용해되어 있는 염은 당해 분야에서 희석제로 사용된다. 통상 사용되는 버퍼 용액은 포스페이트 버퍼 식염수이며, 이는 인간 용액의 염 상태를 모방하고 있기 때문이다. 버퍼 염은 낮은 농도에서 용액의 pH를 제어할 수 있기 때문에, 버퍼 희석제가 화합물의 생물학적 활성을 변형하는 일은 드물다. 여기에 사용된 아젤라산을 함유하는 화합물들은 인간 환자에게 그 자체로서, 또는 결합 요법에서와 같이 다른 성분들과 함께 또는 적당한 담체나 부형제와 함께 혼합된 약제학적 조성물로서, 투여될 수 있다.

[0066] 또한, 본 발명에 따른 아젤라산을 포함하는 미토콘드리아의 기능 저하 관련 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 아젤라산을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0067] 본 발명의 아젤라산을 함유하는 화합물에 대한 치료적 유효량은 세포 배양 분석으로부터 초기에 측정될 수 있다. 예를 들어, 선량 (dose)은 세포 배양에서 결정된 IC50 (half maximal inhibitory concentration) 또는 C50 (half maximal effective concentration)를 포함하는 순환 농도 범위를 얻기 위하여 동물 모델에서 계산될 수 있다. 그러한 정보는 인간에서의 유용한 선량을 더욱 정확히 결정하는데 사용될 수 있다. 아젤라산의 투여량은 채용된 투여 형태와 이용된 투여 루트에 따라 상기 범위에서 변화될 수 있다.

[0068] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 약학적 조성물은 1일 0.0001 내지 1000mg/kg으로, 바람직하게는 0.5 내지 200mg/kg으로, 더욱 바람직하게는 0.5 내지 100mg/kg 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0069] 본 발명에 따른 약제학적 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 비경구, 경구 등의 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0070] 또한, 경구형 제형의 경우도 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 0.1 내지 100㎎/㎏의 양을 1일 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 또한 그 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0071] 본 발명에서 아젤라산 외에 다른 성분이 첨가된 혼합물로 제공되는 경우, 상기 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 아젤라산을 0.001 중량% 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.1 중량 % 내지 99.0 중량 %, 더욱 바람직하게는 30 중량% 내지 50 중량%로 포함할 수 있다.

[0072] 아울러, 본 발명은 아젤라산을 유효성분으로 포함하는 미토콘드리아의 기능 저하 관련 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 또한, 아젤라산은 미토콘드리아의 기능 저하 관련 질환 개선 또는 혈관질환 개선을 목적으로 식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 아젤라산을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 아젤라산을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 아젤라산은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0073] 본 발명에서 식품은 기능성 식품 및 건강기능식품을 포함하고, '기능성 식품'이란, 일반 식품에 본 발명의 아젤라산 (Azelaic Acid) 을 첨가함으로써 일반 식품의 기능성을 향상시킨 식품을 의미한다. 기능성은 물성 및 생리기능성으로 대별될 수 있는데, 본 발명의 아젤라산 (Azelaic Acid)을 일반 식품에 첨가할 경우, 일반 식품의 물성 및 생리기능성이 향상될 것이고, 본 발명은 이러한 향상된 기능의 식품을 포괄적으로 '기능성 식품'이라 정의한다.

[0074] 본 발명의 기능성 식품은 세포 내 미토콘드리아 생합성 및 분해를 조절하여 그 기능을 유지 또는 개선시키고, 미토콘드리아의 수를 증가시킴으로써 미토콘드리아의 기능 저하 관련 질환의 예방 또는 개선을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함한다.

[0075] 본 발명에 따른 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당 및 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스 및 수크로오스와 같은 디사카라이드, 덱스트린 및 시클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 및 자일리톨, 소르비톨 및 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 mL당 일반적으로 약 0.01-20g, 바람직하게는 약 5-12g 이다.

[0076] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01-0.20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0077] 본 발명은 다양한 변환을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는 바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 상세하게 설명하고자 한다. 그러나, 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변환, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 본 발명을 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0078] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0080] [실시예]

[0081] **실시예 1. 아젤라산의 세포독성 평가**

[0082] 아젤라산의 세포독성을 평가하기 위해 MTT assay를 수행하였다. MTT 어세이는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT 테트라졸륨 (tetrazolium)을 청자색을 띄는 비수용성의 MTT 포르마잔으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법이다. MTT 시약은 PBS (Phosphate bufferedsaline)에 2~5 mg/mL의 농도로 희석하여 준비하였다. 실험에 사용된 Hepa1c1c-7 세포는 한국세포주은행 으로부터 구매하였으며 minimum essential medium Eagle alpha modification medium (MEM-alpha, Hyclone) 에 10% FBS, 1% PEST를 추가하여 배양하였다. 실험을 위하여 96-웰 플레이트 (well plate)에 Hepa1c1c-7 세포를(4×10^4 cell/mL) 분주하고, 37℃, 5% CO_2 하에서 24시간 배양한 다음, 아젤라산을 0~500 μM 농도 구간에서 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 각 시료에 MTT 시약을 4 mg/mL 농도로 100 μL 첨가한 다음, 37℃, 5% CO_2 하에서 4시간 배양하고 DMSO (Dimethyl sulfoxide)을 100 μL 첨가한 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도 수치는 생존 세포 수와 비례하는 원리를 이용하여 독성에 의한 세포 사멸 효과를 정량한 것이다.

[0083] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 아젤라산 0~500 μM 농도로 Hepa1c1c-7 세포에 처리하였을 때 모든 농도에서 대조군 대비 독성을 나타내지 않음을 확인하였다.

[0085] **실시예 2. 근육세포 및 마우스 근육에서 Olfr544 발현 확인**

[0086] **2-1. 세포 배양**

[0087] 마우스의 근골격 세포(skeletal musclecell) C2C12 cell는 한국세포주은행에서 구입하였다. 상기 세포는 20% FBS(fetal bovine serum)(HyClone, 미국)와 1% 항생제(penicillin/streptomycin)가 혼합된 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium) 배지를 사용하였다. 5% CO_2(v/v), 37℃ 조건 하에서 50% 밀집도(증식정도, confluency)로 세포가 자랐을 때 계대배양하여 유지하였다.

[0088] 상기 세포를 분화시키기 위하여 2% horse serum(HyClone)이 함유된 DMEM으로 배지를 교체하고 7일 동안 분화과정을 거친 후 실험에 사용하였다.

[0090] **2-2. RT-PCR**

[0091] 쥐의 골격근 세포 C2C12 세포에서 추출한 RNA를 ReverTra Ace® qPCR RT Kit(TOYOBO, 오사카, 일본) 를 이용하여 cDNA합성을 진행하였다. 반응의 효율을 높이기 위해 미리 RNA를 65℃에서 5분간 히팅한 후, 바로 얼음에 보관하였다. 이 후 gDNA remover를 포함하는 2μl의 4x DN Master Mix와 0.5μg의 mRNA, Nuclease-freewater로 총 8μL의 시약을 만들어 37℃에서 5분 동안 증폭하였다. 반응을 끝낸 시약에 5x RT mater mix를 넣고 37℃에 15분, 50℃에 5분, 98℃에 5분 동안 증폭하여 cDNA를 합성하였다. 이 후 얻어진 PCR 산물은 전기영동으로 아가로오스 겔에 내려 Chemidoc을 이용해 밴드로 확인하였다. 대조군으로 L32를 사용하였으며, 양상 대조군으로는 Olfr544의 plasmid를 사용하였다.

[0093] **2-3. 결과 확인**

[0094] 근육에서 Olfr544가 발현하는지 확인하기 위하여 실시한 RT-PCR 결과를 도 2에 나타내었다.

[0095] 도 2에 나타낸 바와 같이, myotube(근관세포), myocyte(근세포)에서 Olfr544 유전자의 발현을 확인하였고, 마우스 근육 조직(muscle)에서도 Olfr544 유전자 발현이 확인되었다 (B 참조). 이어서, Olfr544와 비슷한 유전자 서열을 가진 Olfr545를 이용하여 근육세포 내 발현되는 후각수용체를 재검증한 결과 (A 참조), 근육에서 Olfr544가 발현됨을 확인할 수 있었다.

[0096] 상기 결과를 바탕으로, 근육세포와 마우스 근육 조직에서 아젤라산 처리에 따른 미토콘드리아 생합성 효능을 확인하였다.

[0098] **실시예 3. 근육 세포에서 아젤라산 처리에 따른 미토콘드리아 생합성 촉진 효과 확인**

[0099] **3-1. 세포 배양 및 물질 처리**

[0100] 실시예 3-1 방법과 같이 7일 동안 분화한 C2C12에 아젤라산을 12.5, 25, 또는 50 μM의 농도로 처리하고 24시간 뒤 아래의 방법대로 RNA와 단백질을 추출한 뒤 실험에 사용하였다. 대조군에는 아젤라산 대신 같은 양의 DMSO를 처리하였다.

[0102] **3-2. Quantitativereal-time RT-PCR**

[0103] qPCR은 세포를 준비하여 배양액을 처리한 뒤, 각 well당 300μL의 RNAiso plus 시약을 첨가하여 추출한 RNA를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 이후 합성된 cDNA와 Thunderbird TMSYBR® qPCR Mix reagent(Takara Bio Inc., 일본)을 이용하여 qPCR을 실시하였다. 유전자의 발현량은 The iQ5 Cycler System (Bio-Rad, 미국)으로 분석하였다.

[0105] **3-3. Immunoblotting**

[0106] 단백질 추출은 RIPA buffer(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% NP-40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, an=d 1 mM EDTA)와 HaltTM protease 및 phosphatase inhibitor reagent(Thermo, 미국)를 사용하여 실시했다. 1차 항체로 anti-α-tubulin (1:1000), anti-PGC-1α (1:500)(Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, 미국))을 사용하였다. Immunoblotting의 결과 이미지는 ChemiDoc™ touch imaging system와 Image Lab 5.2 software(Bio-Rad, PA, 미국)를 이용하여 분석하였다.

[0108] **3-4. Mitotracker**

[0109] 아젤라산 처리 후 미토콘드리아 밀도의 변화를 Mitotracker로 확인하였다. C2C12에 아젤라산을 24시간 처리한 후 PBS로 세척하였다. 이어서, Mitotracker 초록색 프로브(Probe)를 200 nM 포함하는 배지를 첨가하여 30분간 배양하였다. 탐색기와 결합한 부분은 490nm의 파장을 흡수하고 516nm의 파장을 방출하는 파장을 SpectraMax로 정량하여 미토콘드리아의 밀도를 측정하였다. 이미지는 confocal microscope(공 초점 현미경)과 Zeiss LSM700 version 3.2 software(Carl Zeiss, 독일)을 이용하여 확인하였다.

[0111] **3-4. 결과 확인**

[0112] 도 3에 나타낸 바와 같이, C2C12에 아젤라산을 처리하였을 때 50 μM 처리군에서 대조군 대비 PGC-1α 유전자와 단백질 발현이 증가하는 것을 확인하였다(A 및 B 참조). 이후 미토콘드리아 DNA(mtDNA)양과 미토콘드리아 밀도를 분석하였다. 그 결과 아젤라산 50 μM 처리군이 mtDNA 양을 대조군 대비 약 2.5배 증가시키고 미토콘드리아 밀도를 유의적으로 증가시키는 것을 확인하였다(C 및 D 참조). 공초점 현미경을 통한 이미지 분석에서도 아젤라산의 처리가 대조군 대비 형광이 높게 나타났다(E 참조). 상기 결과에 따라서, 근육 세포주에서 아젤라산의 처리는 미토콘드리아 기능 조절 주요 인자인 PGC-1α를 증가시키고, 미토콘드리아 합성을 증가시키는 것을 보아 아젤라산이 미토콘드리아 생합성 증가에 효능이 있는 것을 확인할 수 있다.

[0114] **실시예 4. Olfr544 의존적 미토콘드리아 생합성을 증가시키는 아젤라산 효과 확인**

[0115] **4-1. siRNA 형질 감염**

[0116] 분화된 골격근 세포 C2C12는 Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, 미국)을 사용하여 scramble(대조군, control)또는 Olfr544 siRNA(SantaCruz, 미국) 200 pmol을 6시간 동안 형질감염 (transfection)하였다. 이어서, 10-12 시간 동안 한 번 더 형질감염시켰다. 이렇게 형질감염시킨 세포를 RNA나 단백질 추출에 이용하였다.

[0118] **4-2. Quantitativereal-time RT-PCR**

[0119] qPCR은 세포를 준비하여 배양액을 처리한 뒤, 각 well당 300μL의 RNAiso plus 시약을 첨가하여 추출한 RNA를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 이후 합성된 cDNA와 Thunderbird TMSYBR® qPCR Mix reagent(Takara Bio Inc., 일본)을 이용하여 qPCR을 실시하였다. 유전자의 발현량은 The iQ5 Cycler System (Bio-Rad, 미국)으로 분석하였다.

[0121] **4-3. Immunoblotting**

[0122] 단백질 추출은 RIPA buffer(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% NP-40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 및 1 mM EDTA)와 HaltTM protease 및 phosphatase inhibitor reagent(Thermo, 미국)를 사용하여 실시했다. 1차 항체로 anti-α-tubulin (1:1000), anti-PGC-1α (1:500)(Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, 미국))을 사용하였다. Immunoblotting의 결과 이미지는 ChemiDoc™ touch imaging system와 Image Lab 5.2 software(Bio-Rad, PA, 미국)를 이용하여 분석하였다.

[0124] **4-4. mtDNA 발현 증가 확인**

[0125] 분화된 C2C12 세포에 아젤라산을 처리한 뒤, lysis buffer(20mM EDTA, 100mM Tris, 200 mM NaCl, 0.2% Triton X-100, 100 μg/mL)를 각 well당 300 μL씩 처리하고 37℃, 90분간 배양한 뒤 추출한 상층액을 동량의 isopeopanol과 25 μL의 4M Nacl 용액을 첨가하였다. 이후 -20℃에서 overnight 한 뒤 원심분리 (14,000 rpm, RT, 20분)하여 얻는 펠렛(pellet)에 증류수(D.W)를 넣어 mtDNA를 추출하고, 이후 DNA 2㎕, SYBR green PCR master mix 10㎕, 농도가 10 pmol인 순방향 프라이머와 역방향 프라이머를 각각 0.5μL, 멸균된 증류수 6.6 μL를 섞고 Thunderbird TMSYBR® qPCR Mix reagent(Takara Bio Inc., 일본)을 이용하여 qPCR을 실시하였다. 유전자의 발현량은 The iQ5 Cycler System (Bio-Rad, 미국)으로 분석하였다.

[0127] **4-5. Mitotracker**

[0128] 미토콘드리아 밀도의 변화를 Mitotracker로 확인하였다. Olfr544 siRNA를 형질 감염시킨 세포에 아젤라산을 50 μM 농도로 24시간 처리한 후 세포를 PBS에 세척하였다. 그 후, Mitotracker 초록색 Probe를 200 nM 포함하는 배지를 첨가하여 30분간 배양한다. 탐색기와 결합한 부분은 490nm의 파장을 흡수하고 516 nm의 파장을 방출하는 파장을 SpectraMax로 정량하여 미토콘드리아의 밀도를 측정하였다.

[0130] **4-6. 결과 확인**

[0131] 상기 실험 결과를 도 4에 나타내었다. 정상 세포와 Olfr544 knockdown 세포의 Olfr544 발현을 RT-PCR로 확인한 결과 Scr siRNA를 형질감염 시킨 대조군 대비 Olfr544 knockdown 세포에서 약 80%로 Olfr544 발현이 감소되는 것을 확인하였고(A 및 B 참조), 향후 실험을 진행하였다. 정상 세포와 Olfr544 knockdown 시킨 세포에서 아젤라산 처리에 따른 PGC-1α 단백질 발현을 확인한 결과, Scr siRNA를 형질감염 시킨 정상 세포에서 아젤라산 50 μM의 처리는 PGC-1α 단백질이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다(C 참조). 이 효과는 Olfr544 knockdown 시킨 세포에서 나타나지 않는 것을 확인하였다. 이후 mtDNA와 미토콘드리아 밀도를 확인한 실험에서도 Olfr544 Knockdown세포에서는 아젤라산을 처리해도 mtDNA와 미토콘드리아 밀도에 변화가 없었지만 정상세포에서는 mtDNA가 아젤라산 처리군에서 약 1.6배 증가하였고(D 참조), 미토콘드리아 밀도(density) 또한 아젤라산 처리군에서 증가하는 것으로 나타났다(E 참조). 상기 결과는 아젤라산이 Olfr544 의존적으로 미토콘드리아 생합성을 유도한다는 것을 확인시켜준다.

[0133] **실시예 5. 아젤라산의 Olfr544 활성화를 통한 미토콘드리아 합성 촉진 기전 규명**

[0134] 실시예 3 및 실시예 4에서 아젤라산의 Olfr544 활성이 미토콘드리아 생합성을 촉진시키는 것을 확인하였고, 이어서 본 실시예에서는 어떤 메커니즘을 통해 아젤라산이 상기와 같은 효과를 나타내는지 확인하고자 하였다.

[0135] PGC-1α 유전자는 CRE 프로모터에 의해 조절되며 CREB의 활성화는 PGC-1α의 번역(translation)을 양성 조절한다. 이하 실험은 아젤라산으로 활성화된 Olfr544가 PKA-CREB 신호전달과정을 촉진한다는 것을 전제로 수행되어, 아젤라산이 근골격 세포에서 PGC-1α 의 발현을 유도하는 지 확인하였다.

[0137] **5-1. siRNA 형질 감염**

[0138] 분화된 골격근 세포 C2C12는 Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, 미국)을 사용하여 scramble(대조군, control)과 Olfr544 siRNA(SantaCruz, 미국) 200 pmol을 6시간 동안 형질감염 (transfection)하였다. 이어서, 10-12 시간 동안 한 번 더 형질감염시켰다. 상기 형질감염된 세포에 아젤라산을 24시간 처리한 뒤 단백질 추출에 사용하였다.

[0140] **5-2. Immunoblotting**

[0141] 단백질 추출은 RIPA buffer(10mM Tris-HCl, pH 7.5, 1% NP-40, 0.1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, an=d 1 mM EDTA)와 HaltTM protease and phosphatase inhibitor reagent(Thermo, 미국)를 사용하여 실시했다. 1차 항체로 anti-CREB (1:250), anti-p-CREB (Ser133; 1:500), anti-β-actin (1:1000), anti-α-tubulin (1:1000), anti-ERK1/2 (1:500), anti-p-ERK1/2 (Thr53,54, 1:500), anti-PGC-1α (1:500)(Santa Cruz Biotechnology(Santa Cruz, 미국))을 사용하였다. 그리고 anti-LC3B (1:500)는 Novus Biologicals(Novus Biologicals, 미국)에서 구입 하였다. Immunoblotting의 결과 이미지는 ChemiDoc™ touch imaging system와 Image Lab 5.2 software(Bio-Rad, PA, 미국)를 이용하여 분석하였다.

[0143] **5-3. 결과 확인**

[0144] 상기 실험 결과를 도 5에 나타내었다. Olfr544 knockdown 세포와 정상세포에 아젤라산을 처리한 뒤 pCREB 단백질 발현으로 CREB 활성 효능을 확인한 결과, 정상세포에서는 아젤라산 처리 후 pCREB 발현이 약 2배 증가 했으나 Olfr544 knockdown 세포에서는 아젤라산 처리에도 변화가 없었다(A 및 B 참조). 또한, 골격근 세포에서 인산화된 ERK1/2 단백질 발현이 1.5배 증가한 것을 확인할 수 있었다(C 및 D 참조). ERK1/2 인산화는 자가소화작용이 증가하는 것으로 알려져 있기 때문에 autophagy마커인 LC3II/LC3I 단백질 발현을 확인하였다. 아젤라산의 처리는 대조군 대비 약 3배 LC3II/LC3I 단백질 발현 증가를 확인하였고 이 효과는 Olfr544 knockdown 세포에서 없어졌다(E 및 F 참조). Autophagy(자가소화작용)는 운동 중 미토콘드리아 생합성과 미토콘드리아 손상을 방지함으로써 장시간 운동에 대해 근육 조직의 적응과 능력에 중요한 역할을 한다.

[0145] 상기 결과에 따라서 아젤라산에 의한 Olfr544 활성은 골격근 조직에서 CREB-PGC-1α 신호전달 과정과 ERK1/2 활성을 촉진시킴으로 골격근 세포에서 자가소화작용을 유도함을 알 수 있다.

[0147] **실시예 6. 마우스의 아젤라산 투여에 따른 미토콘드리아 합성 증대 효과 확인**

[0148] 비만은 세포 산화 스트레스, 지방 독성 및 당뇨병 상태와 관련되어 있는 골격근에서의 미토콘드리아 복제 및 기능을 감소시키는 것으로 보고되었다. 따라서, 본 실시예에서는 HFD로 비만 유도된 마우스의 근육 조직에 대한 아젤라산 투여의 유익한 효과를 분석하고자 하였다.

[0150] **6-1. 동물 실험 모델**

[0151] 8주령의 ICR 수컷 쥐와 C57BL/6J를 샘타코(경기도, 서울)에서 구입하였고, CRISPR-Cas9 시스템을 사용하여 유전자 Olfr544의 exon 2(161-428 bp)를 제거한 Olfr544 Knock out쥐는 마크로젠(서울, 한국)에서 제작 구입하였다. 모든 동물 실험은 고려대학교 동물실험위원회에서 승인한 실험방법(Protocol No. KUIACUC-2016-97)에 따라 진행하였다. 사육환경은 12시간 광주기와 실내온도 31-25° C, 상대습도 60%-60% 를 유지했다. 쥐는 60% 고지방 사료를 자유 급식하였고, 무작위로 4그룹으로 나누었다(n=7, 2 그룹은 정상 쥐, 나머지 2 그룹은 KO(Knock Out)쥐. 정확한 Olfr544 활성화를 위해 하룻밤 동안 금식한 뒤 아젤라산(100 mg/kg 체중)을 복강 주사하였다. 대조군은 동일한 양의 PBS를 복강 주사하였다. 아젤라산의 장기 투여 실험에서는 100 mg/kg 체중 농도

로 경구 투여하였다. 실험 기간(6주)의 마지막 주에 16시간 동안 금식한 쥐는 마취된 뒤 희생되었다. 채취한 근육조직은 동결튜브에 넣은 뒤 바로 액체 질소에 넣었고, 이후에 -80° C에 보관하였다.

[0153] **6-2. Quantitativereal-time RT-PCR**

[0154] 마우스 근육세포에 RNAiso plus 시약을 첨가하여 추출한 RNA를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 이후 합성된 cDNA와 Thunderbird TMSYBR® qPCR Mix reagent(Takara Bio Inc., 일본)을 이용하여 qPCR을 실시하였다. 유전자의 발현량은 The iQ5 Cycler System (Bio-Rad, 미국)으로 분석하였다.

[0156] **6-3. mtDNA 발현 증가 확인**

[0157] 마우스 근육세포에 lysis buffer(20mM EDTA, 100mM Tris, 200 mM NaCl, 0.2% Triton X-100, 100 μg/mL)를처리하고 37℃, 90분간 배양한 뒤 추출한 상층액을 동량의 isopeopanol과 25 μL의 4M NaCl 용액을 첨가하였다. 이후 -20℃에서 overnight 한 뒤 원심분리 (14,000 rpm, RT, 20분)하여 얻는 펠렛(pellet)에 증류수(D.W)를 넣어 mtDNA를 추출하고, 이후 DNA 2㎕, SYBR green PCR master mix 10㎕, 농도가 10 pmol인 순방향 프라이머와 역방향 프라이머를 각각 0.5μL, 멸균된 증류수 6.6 μL를 섞고 Thunderbird TMSYBR® qPCR Mix reagent(Takara Bio Inc., 일본)을 이용하여 qPCR을 실시하였다. 유전자의 발현량은 The iQ5 Cycler System (Bio-Rad, 미국)으로 분석하였다.

[0159] **6-4. 결과 확인**

[0160] 아젤라산을 경구 투여한 실험 결과는 도 6에 나타내었고, 복강 투여한 결과는 도 7에 나타내었다.

[0161] 우선, HFD로 비만 유도된 쥐에게 6 주간 아젤라산을 경구 투여한 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 아젤라산 투여군에서 대조군 대비 체중, 혈당, 중성지방, 내당성이 증가하였으며, 대조군에 비해 아젤라산 투여군에서 PGC-1α mRNA 발현이 약 1.9배 정도 증가한 것으로 나타났다. 대조적으로, Olfr544 knockout 쥐에서는 아젤라산 투여에도 변화가 나타나지 않았다(A 참조). 또한, 미토콘드리아 PGC-1α 하위 신호전달과 관련된 Tfa 유전자 발현은 정상 쥐에서 아젤라산에 의해 약 3.3배로 증가되었으나(B 참조). knockout 마우스 에서는 차이가 나타나지 않았다. 또한 정상 쥐 그룹에서는 아젤라산을 투여한 쥐가 비투여 쥐에 비해 mtDNA가 증가했으나, Olfr544 knockout 쥐 그룹에서는 변화가 나타나지 않았다(C 참조).

[0162] 다음으로, 아젤라산을 복강 주사한 결과, 도 7에 나타낸 바와 같이, 복강 주사 후 30 분, 120 분 후와 대조군을 pERK/ERK를 비교해 봤을 때 30 분, 120 분 후에 각각 2.5 배, 2.8 배 증가한 것을 확인하였다. LC3 II/LC3 I 단백질 발현을 비율을 비교했을 때, 아젤라산 주입 후 30 분에서는 1.5 배 증가 했으나 120 분 후에서는 증가하지 않았고, Okfr544 knockout 쥐에서는 아젤라산 주입 여부와 관계없이 변화가 없었다. 상기 결과는, 아젤라산에 의한 Olfr544 활성화는 근조직에서 자가소화작용을 유도한다는 것을 시사한다.

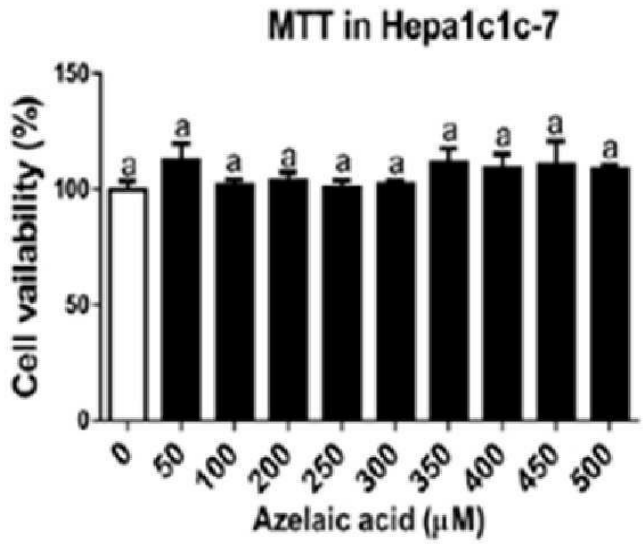
[0164] **실시예 7. 통계적 처리**

[0165] 통계분석은 두 그룹 간 유의성 검사는 t-test 검정법을 이용하였고, 대조군과 비교하여 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001을 의미한다. 각 그래프의 오차막대는 평균 ±SEM으로 나타내었다. 두 그룹 이상의 유의성 검사는 one-way ANOVA를 이용하였고, 각 그래프의 오차막대는 평균 ±SEM으로 나타내었다.

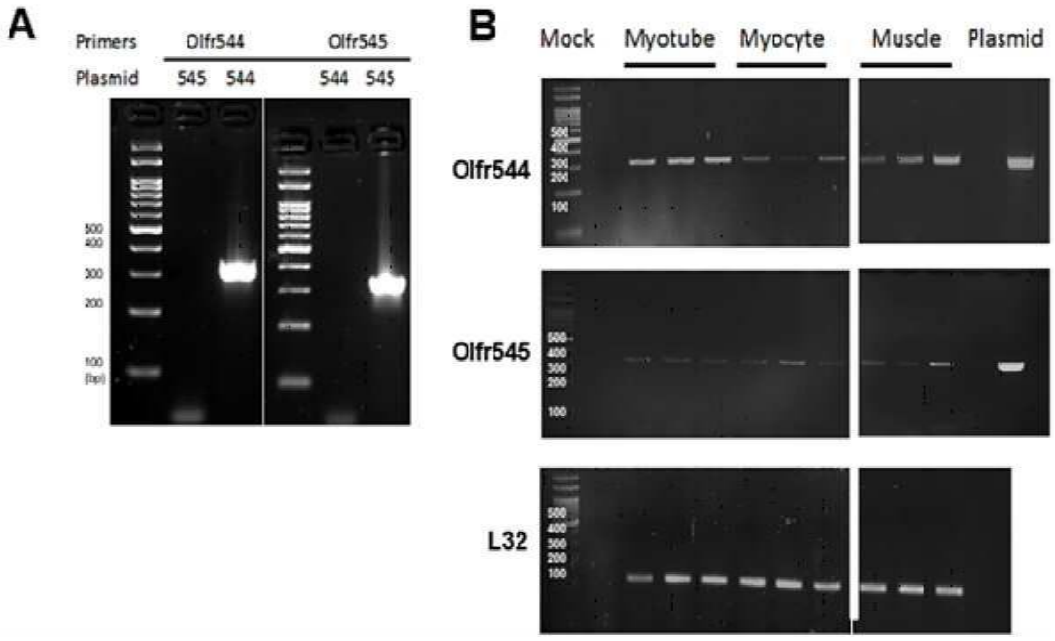
[0167] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가지는 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

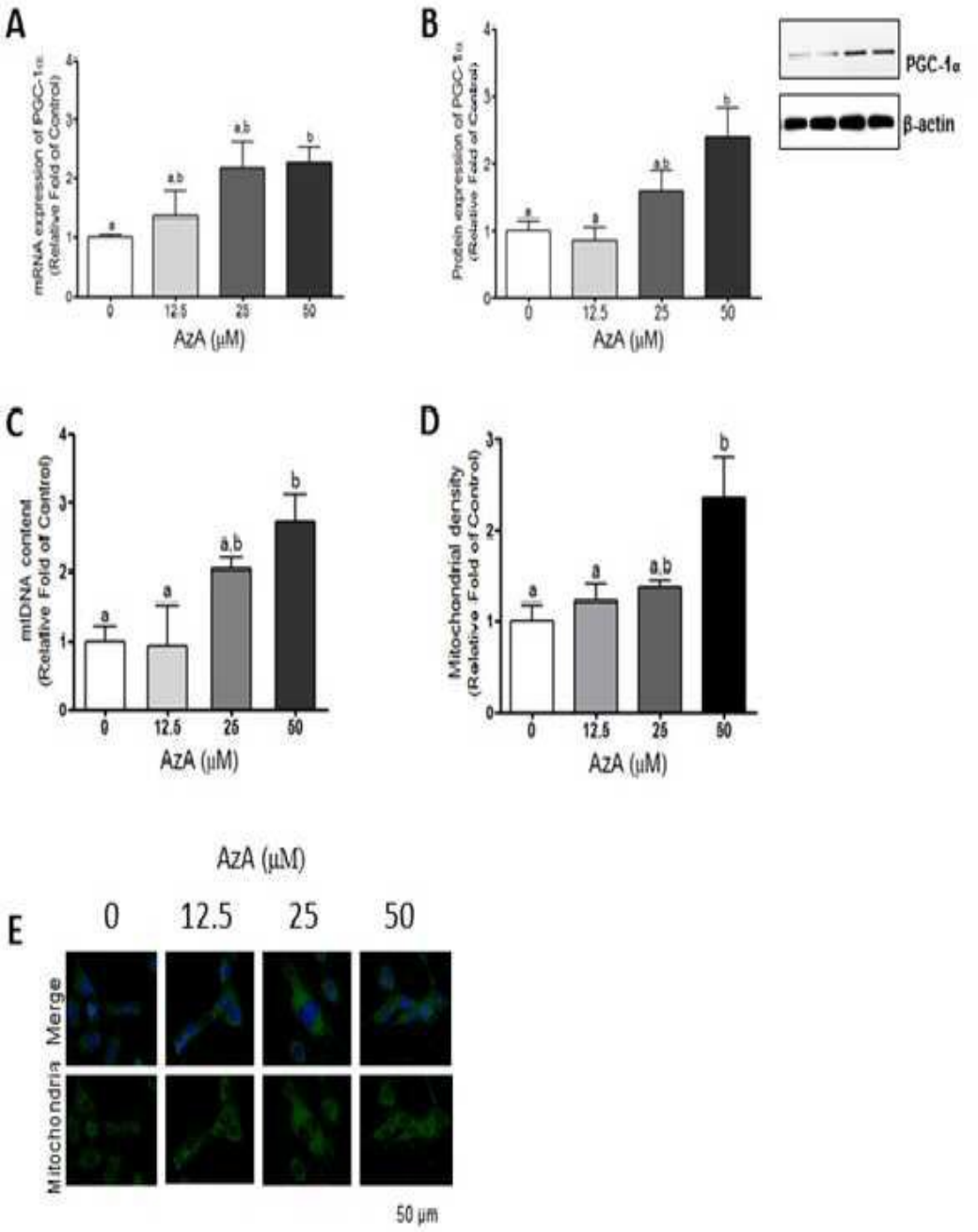
도면1


MTT in Hepa1c1c-7
Cell vailability (%)
150
100
50
0
a
0
50
100
200
250
300
350
400
450
500
Azelaic acid (μM)

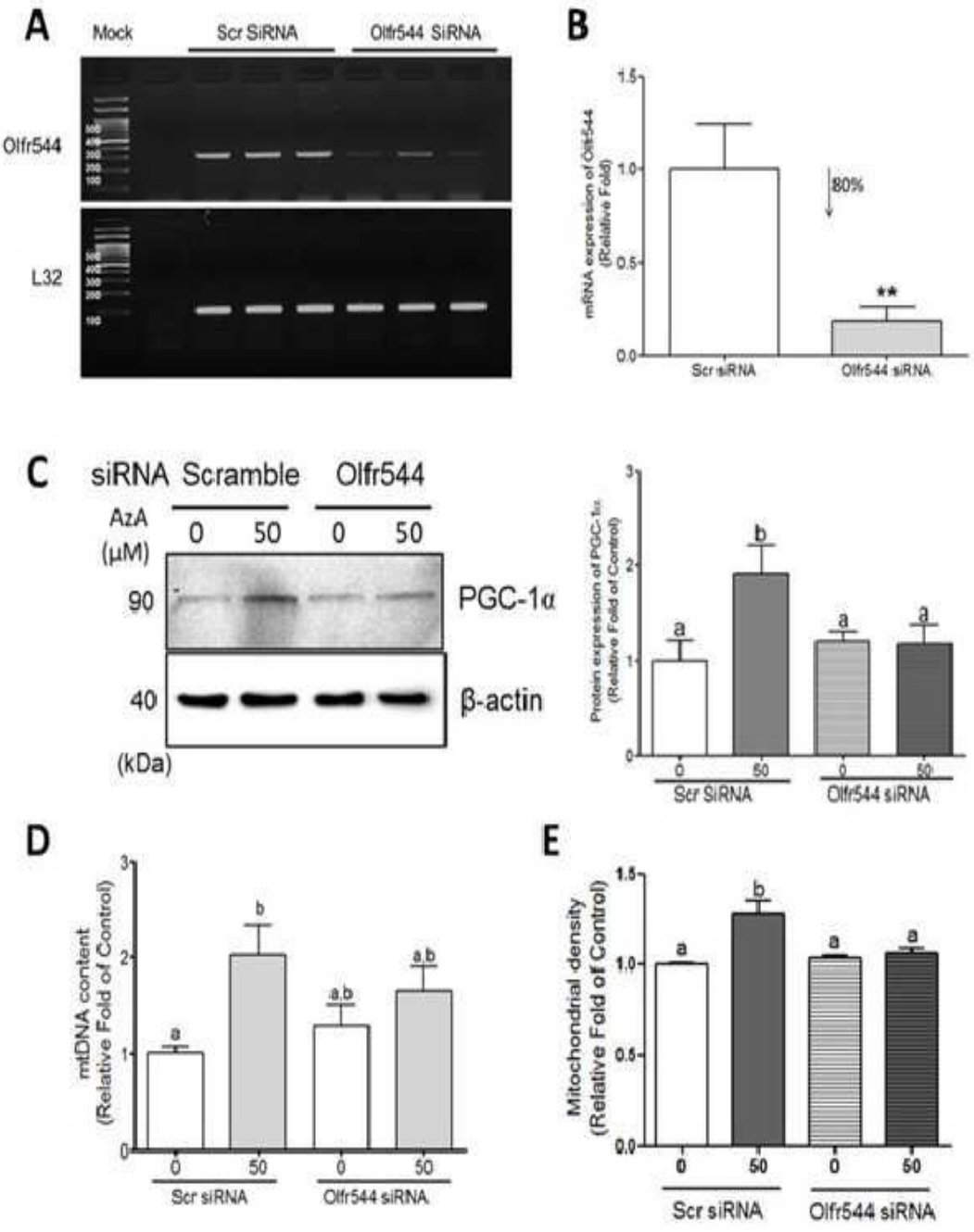
도면2


A
Primers
Olfr544
Olfr545
Plasmid
545
544
544
545
500
400
300
200
100
(bp)
B
Mock
Myotube
Myocyte
Muscle
Plasmid
Olfr544
Olfr545
L32

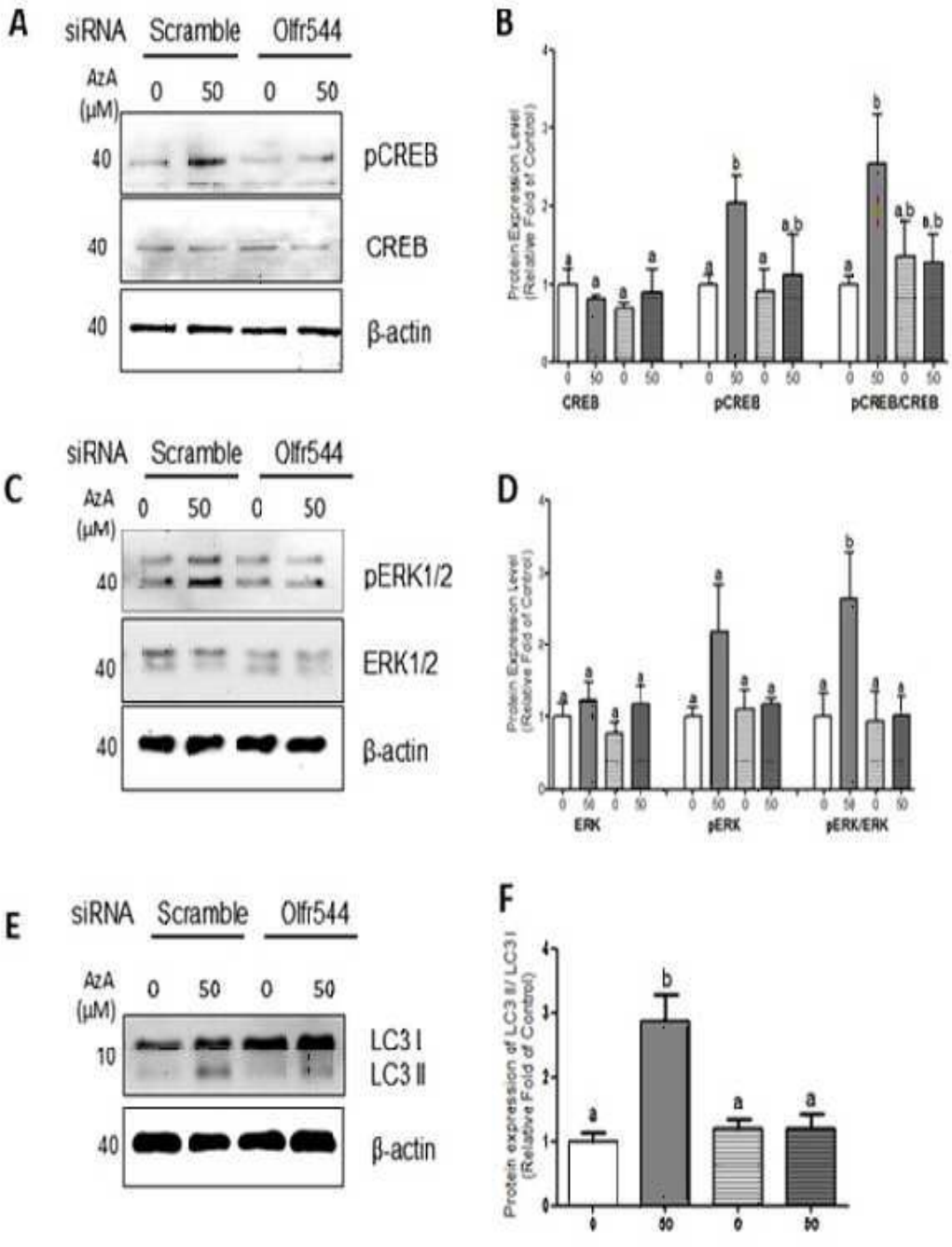
도면3


A
mRNA expression of PGC-1α
(Relative Fold of Control)
AzA (μM)
B
Protein expression of PGC-1α
(Relative Fold of Control)
PGC-1α
β-actin
AzA (μM)
C
mtDNA content
(Relative Fold of Control)
AzA (μM)
D
Mitochondrial density
(Relative Fold of Control)
AzA (μM)
E
AzA (μM)
0
12.5
25
50
Merge
Mitochondria
50 μm

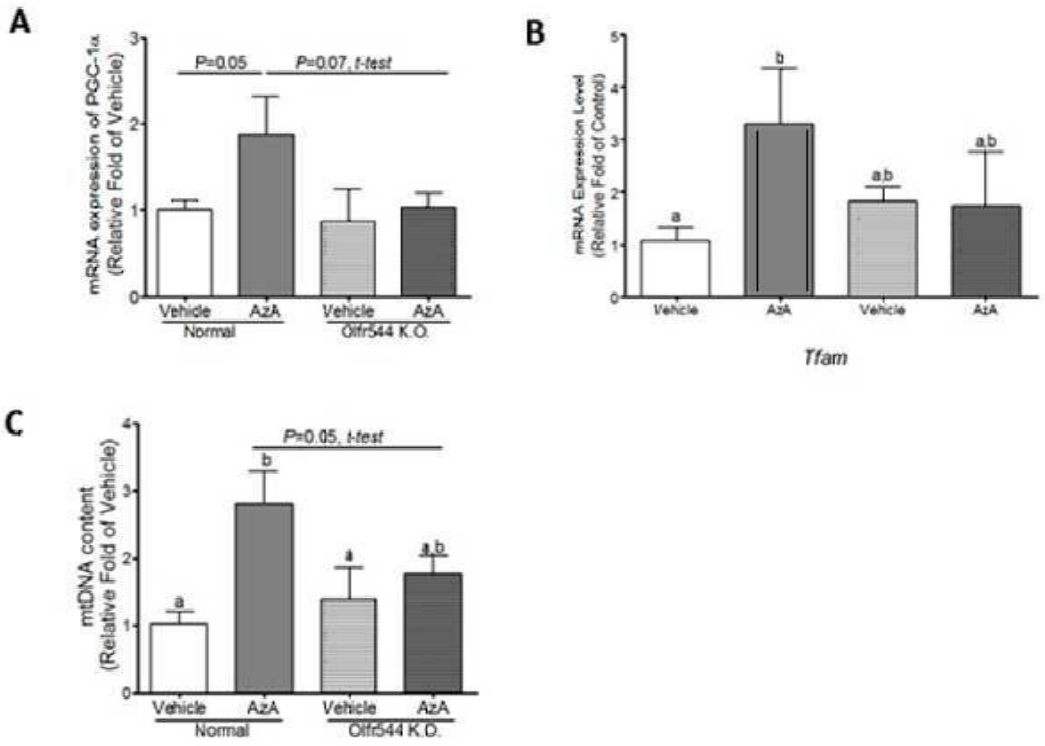
도면4


A
Mock
Scr SiRNA
Olfr544 SiRNA
Olfr544
L32
B
mRNA expression of Olfr544 (Relative Fold)
80%
**
Scr siRNA
Olfr544 siRNA
C
siRNA Scramble Olfr544
AzA (μM)
0 50 0 50
90
PGC-1α
40
β-actin
(kDa)
Protein expression of PGC-1α (Relative Fold of Control)
Scr SiRNA
Olfr544 siRNA
D
mtDNA content (Relative Fold of Control)
Scr siRNA
Olfr544 siRNA
E
Mitochondrial density (Relative Fold of Control)
Scr siRNA
Olfr544 siRNA

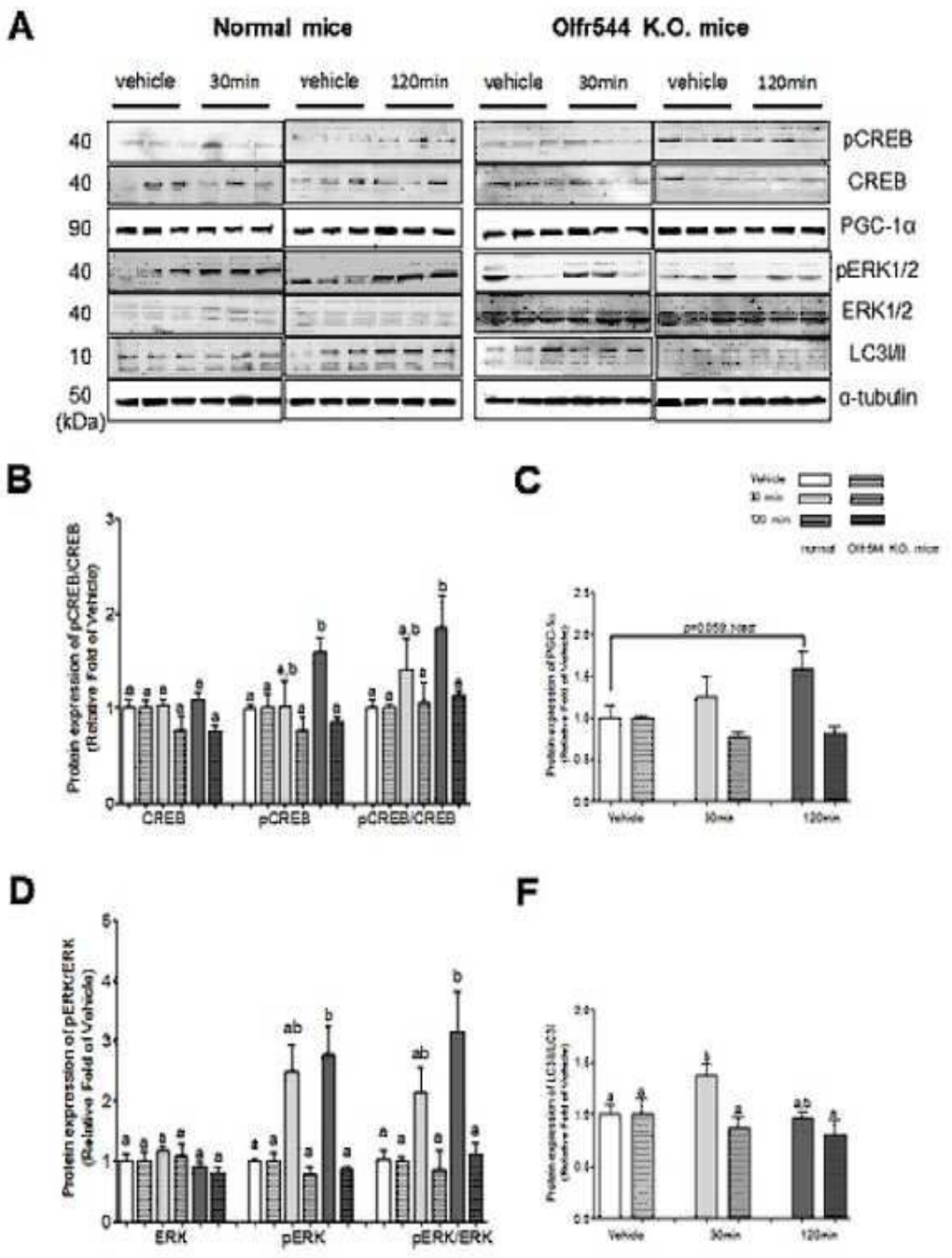
도면5


A
siRNA
Scramble
Olfr544
AzA (μM)
0
50
0
50
40
pCREB
CREB
β-actin
B
Protein Expression Level (Relative Fold of Control)
CREB
pCREB
pCREB/CREB
C
pERK1/2
ERK1/2
D
ERK
pERK
pERK/ERK
E
10
LC3 I
LC3 II
F
Protein expression of LC3 II/ LC3 I (Relative Fold of Control)

도면6


A
mRNA expression of PGC-1α
(Relative Fold of Vehicle)
P=0.05
P=0.07, t-test
Vehicle
AzA
Vehicle
AzA
Normal
Olfr544 K.O.
B
mRNA Expression Level
(Relative Fold of Control)
a
b
a,b
a,b
Vehicle
AzA
Vehicle
AzA
Tfam
C
mtDNA content
(Relative Fold of Vehicle)
P=0.05, t-test
a
b
a
a,b
Vehicle
AzA
Vehicle
AzA
Normal
Olfr544 K.D.

도면7


A
Normal mice
Olfr544 K.O. mice
vehicle
30min
vehicle
120min
vehicle
30min
vehicle
120min
40
40
90
40
40
10
50
(kDa)
pCREB
CREB
PGC-1α
pERK1/2
ERK1/2
LC3II
α-tubulin
B
Protein expression of pCREB/CREB
(Relative Fold of Vehicle)
CREB
pCREB
pCREB/CREB
C
Vehicle
30 min
120 min
normal
Olfr544 K.O. mice
p=0.059 trend
Vehicle
30min
120min
D
Protein expression of pERK/ERK
(Relative Fold of Vehicle)
ERK
pERK
pERK/ERK
F
Vehicle
30min
120min