

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0119581 (43) 공개일자 2016년10월14일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/122 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01) A61K 9/70 (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)	
(52) CPC특허분류 A61K 31/122 (2013.01) A23L 33/10 (2016.08)	(72) 발명자 이성준 서울특별시 강남구 도산대로96길 39, 104동 402호 (청담동, 청담공원아파트)	
(21) 출원번호 10-2015-0048442	우춘연 서울특별시 동대문구 약령시로3길 18-6 (제기동) (뒷면에 계속)	
(22) 출원일자 2015년04월06일 심사청구일자 2015년04월06일	(74) 대리인 이처영, 장제환	

전체 청구항 수 : 총 9 항

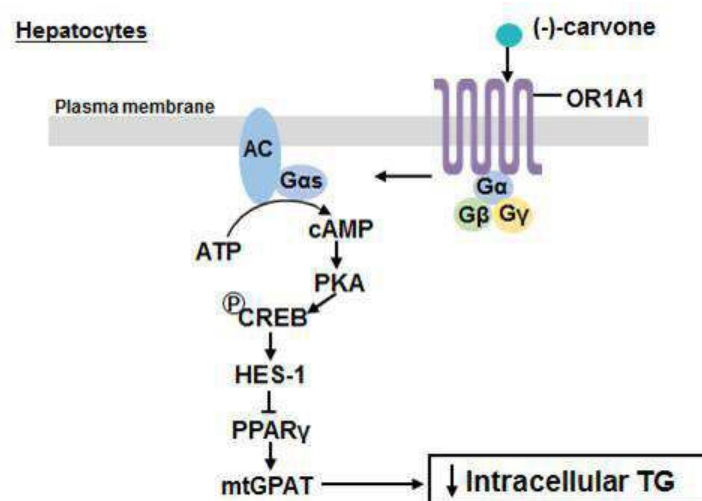
(54) 발명의 명칭 (-)-카르본을 함유하는 간 지질대사 개선용 조성물

(57) 요약

본 발명은 방향성 정유인 (-)-카르본((-)-Carvone)을 유효성분으로 함유하는 의약조성물 또는 기능성 식품에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 후각 상피세포에서 향기성분과 결합하여 신호전달 과정을 통해 후각 인지에 관련이 있는 후각수용체(olfactory receptor, OR)를 활성화시킴으로써 간내 중성지질, 간내 지질 농도를 효과적으로 저하시키고 지방간을 개선하는 (-)-카르본을 유효성분으로 함유하는 의약조성물 또는 기능성 식품에 관한 것이다.

본 발명에 따른 (-)-카르본((-)-Carvone)을 함유하는 조성물은 간내 지질 축적 및 간 지질대사 개선에 효과가 우수한 바, 간 지질대사 개선을 위한 식품소재, 의약조성물 및 건강기능성 식품에 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 9/70 (2013.01)

(72) 발명자

목보람

경기도 성남시 분당구 서판교로 165, 1203동 1001호 (판교동, 판교원마을12단지아파트)

가요요

서울특별시 용산구 후암로 71-1, 2동 403호 (후암동, 라이프미주아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014030013

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (이공)중견연구자지원_핵심연구

연구과제명 [2차년도] 이소발현 후각수용체 활성조절을 통한 식품 향기 성분의 지질대사 조절기작 규

명

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2014.06.01 ~ 2017.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

(-)-카르본((-)-Carvone)을 유효성분으로 함유하는 지질대사 개선용 의약조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 지질대사 개선은 간내 중성지질 감소, 간내 지질 축적 억제 또는 지방간 개선 효과인 것을 특징으로 하는 지질대사 개선용 의약조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (-)-카르본((-)-Carvone)은 후각수용체(olfactory receptor, OR)의 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 지질대사 개선용 의약조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 후각수용체는 OR1A1(olfactory receptor 1A1, OR17-7)인 것을 특징으로 하는 지질대사 개선용 의약조성물.

청구항 5

(-)-카르본((-)-Carvone)을 유효성분으로 함유하는 지질대사 개선용 기능성 식품.

청구항 6

제5항에 있어서, 지질대사 개선은 간내 중성지질 감소, 간내 지질 축적 억제 또는 지방간 개선 효과인 것을 특징으로 하는 지질대사 개선용 기능성 식품.

청구항 7

(-)-카르본((-)-Carvone)을 유효성분으로 함유하는 지질대사 개선용 접촉식 패치.

청구항 8

제7항에 있어서, 지질대사 개선은 간내 중성지질 감소, 간내 지질 축적 억제 또는 지방간 개선 효과인 것을 특징으로 하는 지질대사 개선용 접촉식 패치.

청구항 9

제7항에 있어서, 코 밑에 붙이는 지질대사 개선용 접촉식 패치.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 방향성 정유인 (-)-카르본((-)-Carvone)을 유효성분으로 함유하는 의약조성물 또는 기능성 식품에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 후각 상피세포에서 향기성분과 결합하여 신호전달 과정을 통해 후각 인지에 관련이 있는 후각수용체(olfactory receptor, OR)를 활성화시킴으로써 간내 중성지질, 간내 지질 농도를 효과적으로 저하시키고 지방간을 개선하는 (-)-카르본을 유효성분으로 함유하는 의약조성물 또는 기능성 식품에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 후각수용체(Olfactory receptor, OR)는 G단백질결합수용체(G-protein coupled receptors, GPCR) 중 하나로서, 후각 상피세포에서 향기성분과 결합하여 신호전달 과정을 통해 후각 인지에 관여하는 단백질이다.
- [0003] 후각수용체는 쥐와 같은 설치류의 경우 1,000여 개 이상의 유전자를 지닌 것으로 밝혀졌으며, 인간에서는 약 350여종의 후각수용체 유전자가 발현된다. 이는 전체 게놈 유전자의 1% 이상에 달하는 큰 유전자군으로 GPCR 중에서도 가장 거대한 군에 해당되는 유전자이다.
- [0004] 후각수용체는 후각각능된 외 다른 조직에서도 이소발현(ectopic expression)된다고 알려져 있으나, 많은 연구가 진행되지 않고 있다. 현재까지 연구결과에 의하면 고환, 근육, 신장 및 피부 등에서 후각수용체의 발현 및 그에 대한 기능이 보고된 바 있다(Feldmesser *et al.*, *BMC Genomics*, 7:121-139, 2006; Pluznick *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 110:4410-4415, 2013). 고환에서 발현된 인간 후각 수용체 OR17-4는 화학주성 매개 수용체로 정자가 미수정 난자로 이동하는 과정에 기여한다. 근육에서 발현된 마우스 후각수용체 MOR23은 백합향 분자와 결합했을 시 근육세포 재생에 관여한다. 또한, 신장에 존재하는 마우스 후각 수용체 Olfr78은 장내 미생물에 의해 생성된 단쇄지방산과 결합하여 혈압조절에 관여하며, 사람의 피부에 존재하는 후각수용체 OR2AT4는 백단향 분자와 결합하여 손상된 피부세포의 재생을 촉진하는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 후각수용체의 이소 발현성은 단순히 후각을 인지하는 것 이상으로 냄새분자를 인지하여 생리학 및 약리학적 효능을 보일 수 있다는 사실이 제시되고 있다.
- [0005] (-)-카르본((-)-Carvone) 화합물은 모노테르페케톤류의 일종으로 꿀풀과 *Mentha viridis* L.의 정유(스피아민트 유)의 주성분이며, 식품과 향미산업계에서는 주로 에센셜 오일의 제조에 사용되고 있다. 뿐만 아니라 방충제, 향균제, 향산화제 및 향염 효과의 효능이 있는 것으로 알려졌다.
- [0006] 후각수용체 1군의 아형A로 동정된 동형단백질인 OR1A1(olfactory receptor 1A1, OR17-7)은 (-)-카르본으로 발현이 유도되며, 상기 (-)-카르본의 활성유효농도(EC₅₀)는 0.5 μ M로 보고된 바 있다(Glusman G *et al.*, *Genomics*, 63(2):227-245, 2000; Schmiedeberg K *et al.*, *J. Struct Biol.*, 159(3):400-412, 2007; Jingyi Li *et al.*, *J Neurochem*, 121:881-890, 2012)
- [0007] 인체에서 간은 중성지방의 합성 장소로서 지질 대사와 관련한 인슐린, 글루카곤 및 아드레날린 등의 호르몬 대사 경로와 다양한 수용체의 신호전달 경로는 밝혀졌으나, 간조직 지질대사에 관한 기작은 아직 일부분만이 규명된 상태이다.
- [0008] 이러한 기술적 배경 하에서, 본 발명자들은 간내 지질 축적을 효과적으로 저하시키고 간 지질대사를 개선하는 식물유래 성분을 개발하고자 예의 노력한 결과, (-)-카르본((-)-Carvone)이 간조직 세포에 발현된 후각수용체 OR1A1과 결합하여, OR1A1의 활성화로 중성 지방 합성 저해 및 지질 축적 감소 효과를 나타내는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 간 지질대사 개선 효과가 있는 간내 중성지질 농도 감소 및 지질 축적 억제 효능을 갖는 (-)-카르본((-)-Carvone)을 함유하는 간 지질대사 개선용 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (-)-카르본((-)-Carvone)을 유효성분으로 함유하는 지질대사 개선용 의약조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명은 또한, (-)-카르본((-)-Carvone)을 유효성분으로 함유하는 지질대사 개선용 기능성 식품을 제공한다.
- [0012] 본 발명은 또한, (-)-카르본((-)-Carvone)을 유효성분으로 함유하는 지질대사 개선용 접착식 패치를 제공한다.

발명의 효과

- [0013] 본 발명에 따른 (-)-카르본((-)-Carvone)을 함유하는 조성물은 간내 지질 축적 및 간 지질대사 개선에 효과가 우수한 바, 간 지질대사 개선을 위한 식품소재, 의약조성물 및 건강기능성 식품에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0014] 도 1은 (-)-카르본((-)-Carvone)이 OR1A1의 활성을 통해 cAMP-PKA 경로 활성을 촉진함을 나타낸 것이다. 도 1A는 사람의 간세포인 HepG2 세포에서 OR1A1이 발현하는 것을 RT-PCR을 통해 확인하였고, 도 1B는 HepG2 세포의 세포막에 OR1A1이 발현하는 것을 IB(immuno blotting)기법을 통해 확인한 것이다. 도 1C는 면역조직염색법으로 사람의 간조직 절편 상의 세포막에 OR1A1이 발현한 것을 나타낸 것이다. 도 1D, 1E 및 1F는 각각 HepG2 세포 내 cAMP 농도, PKA 활성도 및 CREB 활성도(인산화된 CREB(p-CREB)과 p-CREB 및 CREB의 상대적 비율)를 나타낸 것이다. 또한, 도 1G는 (-)-카르본 자극에 따른 HepG2 세포 내 칼슘 농도를 나타낸 것이다.

도 2는 (-)-카르본((-)-Carvone)에 의한 OR1A1 활성이 HepG2 세포의 중성지질 농도 및 지질 축적을 감소시키는 것을 나타낸 것이다. 도 2A는 (-)-카르본 처리에 따른 HepG2 세포 내 중성지질 및 콜레스테롤 농도를 측정한 것이고, 도 2B는 인위적으로 HepG2 세포 내 지질 축적을 유도한 다음, BODIPY(boron dipyrromethene) 염색과 Oil Red O 염색을 한 것으로, 이미지는 200배 배율로 염색된 HepG2 세포를 촬영한 것을 나타낸 것이다. 도 2C는 qPCR을 통해 HES-1, PPAR γ , mtGPAT, DGAT2의 유전자 발현을 나타낸 것이다. 도 2D는 IB(immuno blotting)기법을 통해 mtGPAT와 DGAT2의 단백질 발현을 나타낸 것이다.

도 3은 OR1A1의 발현이 없는 HepG2 세포에서는 (-)-카르본((-)-Carvone) 자극에도 cAMP-PKA 신호전달 경로와 세포 내 지질 농도 변화가 없음을 나타낸 것이다. 도 3A는 IB(immunoblotting)기법을 통해 OR1A1 특이적인 siRNA를 주입한 HepG2 세포에서의 OR1A1 단백질 발현의 감소를 나타낸 것이고, 도 3B는 siRNA 주입에 따른 CREB 및 p-CREB 단백질 발현을 나타낸 것이다. 도 3C 및 3D는 각각 HepG2 세포 내 중성지질 및 콜레스테롤 농도를 나타낸 것이고, 도 3E는 mtGPAT 및 DGAT2의 유전자 발현과 단백질 발현을 나타낸 것이다.

도 4는 (-)-카르본((-)-Carvone) 처리에 따른 간세포에서의 PKA 활성 경로를 도시한 것이다. (-)-카르본이 간조직에 발현된 OR1A1 단백질과 결합하여 PKA 경로를 활성화한 다음, HES-1 단백질의 발현을 증가시킨다. 이는 주요 지방생성 촉진인자인 PPAR- γ 의 억제제를 통해 중성지질 합성 효소인 mtGPAT 발현을 억제하여 중성지질 축적을 완화시키는 효과가 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0015] 본 발명에서는 식물성 정유 성분인 (-)-카르본((-)-Carvone)이 사람의 간세포인 HepG2 세포에서 지질 대사조절에 관여함으로써 중성지방 농도 저하 및 지질 축적 감소 효과를 확인할 수 있었다.
- [0016] 본 발명에서는 (-)-카르본((-)-Carvone)이 OR1A1(Olfactory receptor 1A1, OR17-7)이 발현하는 간세포 내에서 중성지질 합성을 저해하는 효능을 밝혀내었으며, 구체적 기전을 규명하고자 (-)-카르본으로 활성화된 OR1A1의 신호전달 경로를 연구하였다. 결과적으로 G단백질결합수용체의 2차 전령인 cAMP를 통한 PKA(protein kinase A) 및 인산화된 CREB(p-CREB)의 신호전달 경로를 확인하였고, 중성지질 합성 저해 관련 유전자 및 단백질의 발현을 확인하였다.
- [0017] 따라서, 본 발명은 일 관점에서, (-)-카르본((-)-Carvone)을 유효성분으로 함유하는 지질대사 개선용 의약조성물에 관한 것이다.

- [0018] 본 발명에서 (-)-카르본((-)-Carvone)은 착즙 추출, 수증기 추출, 열수 추출, 초음파 추출, 용매 추출, 또는 환류냉각 추출로 수득한 것을 이용할 수 있으며, 상기 용매 추출은 에탄올, 메탄올, 아세톤, 헥산(hexane), 에틸아세테이트, 메틸렌클로라이드, 물 또는 이들의 혼합물로 추출한 것일 수 있다. 상기 (-)-카르본((-)-Carvone)은 통상의 천연 (-)-카르본((-)-Carvone)의 제조방법에 사용되는 다양한 방법에 따라 추출된 것일 수 있다.
- [0019] 본 명세서에서 사용되는 용어 "(-)-카르본((-)-Carvone)"은 동의어인 (R)-(-)-카르본((R)-(-)-Carvone), (R)-5-이소프로페닐-2-메틸-2-시클로헥세논((R)-5-Isopropenyl-2-methyl-2-cyclohexenone), p-멘사-6,8-디엔-2-온(p-Mentha-6,8-dien-2-one) 또는 카볼(Carvol)과 혼용해서 사용할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 (-)-카르본((-)-Carvone)은 천연물질이므로 독성이 전혀 없어서 의약품으로 지속적으로 다량 사용할 수 있다.
- [0021] 본 발명의 (-)-카르본((-)-Carvone)을 포함하는 조성물은 이미 사용되고 있는 항히스타민제, 소염진통제, 항암제 및 항생제 등의 약제와 함께 제제화하거나 병용하여 사용될 수 있다.
- [0022] 본 명세서에서 사용되는, "치료하는"이란 용어는, 달리 언급되지 않는 한, 상기 용어가 적용되는 질환 또는 질병, 또는 상기 질환 또는 질병의 하나 이상의 증상을 역전시키거나, 완화시키거나, 그 진행을 억제하거나, 또는 예방하는 것을 의미한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "치료"란 용어는 "치료하는"이 상기와 같이 정의될 때 치료하는 행위를 말한다.
- [0023] 용어 "약제학적 조성물(pharmaceutical composition)" 또는 "의약조성물"은 본 발명의 (-)-카르본((-)-Carvone)을 함유하는 화합물과 희석제 또는 담체와 같은 다른 화학 성분들의 혼합물을 의미한다.
- [0024] 용어 "약리학적으로 허용되는(physiologically acceptable)"은 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는 담체 또는 희석제로 정의된다.
- [0025] 용어 "담체(carrier)" 또는 "비이클(vehicle)"은 세포 또는 조직 내로의 화합물의 부가를 용이하게 하는 화합물로 정의된다. 예를 들어, 디메틸설폭사이드(DMSO)는 생물체의 세포 또는 조직 내로의 많은 유기 화합물들의 투입을 용이하게 하는 통상 사용되는 담체이다.
- [0026] 용어 "희석제(diluent)"는 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.
- [0027] 여기에 사용된 (-)-카르본((-)-Carvone)을 함유하는 화합물들은 인간 환자에게 그 자체로서, 또는 결합 요법에서와 같이 다른 활성 성분들과 함께 또는 적당한 담체나 부형제와 함께 혼합된 약제학적 조성물로서, 투여될 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 사용에 적합한 의약조성물 또는 약제학적 조성물에는, 활성 성분들이 그것의 의도된 목적을 달성하기에 유효한 양으로 함유되어 있는 조성물이 포함된다. 더욱 구체적으로, 치료적 유효량은 치료될 객체의 생존을 연장하거나, 질환의 증상을 방지, 경감 또는 완화시키는데 유효한 화합물의 양을 의미한다. 치료적 유효량의 결정은, 특히, 여기에 제공된 상세한 개시 내용 측면에서, 당업자의 능력 범위 내에 있다.
- [0029] 본 발명의 (-)-카르본((-)-Carvone)을 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 EC₅₀(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.
- [0030] (-)-카르본((-)-Carvone)의 투여량은 채용된 투여 형태와 이용된 투여 루트에 따라 상기 범위에서 변화될 수 있다. 정확한 산정, 투여 루트 및 투여량은 환자의 상태를 고려하여 개개의 의사에 의해 선택될 수 있다(예를 들어, Fingl *et al.*, 1975, "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p. 1 참조).
- [0031] 본 발명의 (-)-카르본((-)-Carvone)의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 통상적으로, 환자에게 투여되는 조성물의 선량 범위는 환자 체중의 약 0.5 내지 1000 mg/kg 일 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의

(-)-카르본은 1일 0.0001 내지 200mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 100mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 경구 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [0032] 본 발명의 (-)-카르본((-)-Carvone)은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 (-)-카르본((-)-Carvone) 외에 다른 성분이 첨가된 혼합물로 제공되는 경우, 상기 조성물은 조성물 총 중량에 대하여 상기 방향성 정유를 함유하는 (-)-카르본을 0.001 중량% 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 99 중량 %, 더욱 바람직하게는 1 중량% 내지 50 중량%로 포함할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 조성물의 약학적 투여 형태는 이들의 약제학적 허용 가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 타 약학적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- [0035] 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은, 화합물이 투여되는 유기체에 심각한 자극을 유발하지 않고 화합물의 생물학적 활성과 물성들을 손상시키지 않는, 화합물의 제형을 의미한다. 용어 "수화물", "용매화물" 및 "이성질체" 역시 상기와 같은 의미를 가진다. 상기 약제학적 염은, 본 발명의 (-)-카르본((-)-Carvone)을 함유하는 화합물을, 염산, 브롬산, 황산, 질산, 인산 등의 무기산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, p-톨루엔술폰산 등의 술폰산, 타타르산, 포름산, 시트르산, 아세트산, 트리클로로아세트산, 트리플루오로아세트산, 카프릭산, 이소부탄산, 말론산, 석신산, 프탈산, 글루콘산, 벤조산, 락트산, 푸마르산, 말레인산, 살리실산 등과 같은 유기 카르복산과 반응시켜 얻어질 수 있다. 또한, 본 발명의 (-)-카르본을 함유하는 화합물을 염기와 반응시켜, 암모니움 염, 나트륨 또는 칼륨 염 등의 알칼리 금속염, 칼슘 또는 마그네슘 염 등의 알칼리 토금속염 등의 염, 디시클로헥실아민, N-메틸-D-글루카민, 트리스(히드록시메틸) 메틸아민 등의 유기염기들의 염, 및 아르기닌, 리신 등의 아미노산 염을 형성함으로써 얻어질 수도 있다.
- [0036] 본 발명에 따른 (-)-카르본((-)-Carvone)을 포함하는 약학 조성물 또는 의약조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. (-)-카르본을 포함하는 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 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.
- [0037] 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 (-)-카르본((-)-Carvone)에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 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, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 60, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 지질대사 개선은 간내 중성지질 감소, 간내 지질축적 억제 또는 지방간 개선 효과인 것을 특징으로 할 수 있으며, 상기 (-)-카르본((-)-Carvone)은 후각수용체(olfactory receptor, OR)의 활성을 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있고, 상기 후각수용체는 OR1A1(olfactory receptor 1A1, OR17-7)인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0039] 본 명세서에서 사용되는 용어 “지방간”은 간의 지방대사 장애로 지방이 간세포에 과도한 양으로 축적된 상태를 말하며, 이는 협심증, 심근경색, 뇌졸중, 동맥경화, 지방간 및 췌장염 등과 같은 다양한 질병의 원인이 된다.
- [0040] 본 발명의 (-)-카르본((-)-Carvone)을 함유하는 화합물 또는 약제학적으로 허용 가능한 그의 염은 다양한 기능성

식품 및 건강 기능성 식품의 제조시 식품의 주성분 또는 첨가제 및 보조제로 사용될 수 있다.

- [0041] 따라서, 본 발명은 다른 관점에서, (-)-카르본((-)-Carvone)을 유효성분으로 함유하는 지질대사 개선용 기능성 식품에 관한 것이다.
- [0042] 본 발명에서 '기능성 식품'이란, 일반 식품에 본 발명의 (-)-카르본((-)-Carvone)을 첨가함으로써 일반 식품의 기능성을 향상시킨 식품을 의미한다. 기능성은 물성 및 생리기능성으로 대별될 수 있는데, 본 발명의 (-)-카르본을 일반 식품에 첨가할 경우, 일반 식품의 물성 및 생리기능성이 향상될 것이고, 본 발명은 이러한 향상된 기능의 식품을 포괄적으로 '기능성 식품'이라 정의한다.
- [0043] 본 발명의 (-)-카르본((-)-Carvone)은 지질대사 질환의 예방 및 개선 효과를 위하여 다양한 식품에 첨가될 수 있다. 상기 (-)-카르본을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다.
- [0044] 본 발명의 기능성 식품은 식품 또는 음료의 형태일 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 유효성분의 양은 일반적으로 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 100 중량%, 바람직하게는 0.00001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 음료 조성물의 경우 바람직하게는 0.01~100중량%, 보다 바람직하게는 1~10중량%로 포함될 수 있으며, 구체적으로는 식품 전체의 부피 100ml를 기준으로 0.01g 내지 100g, 바람직하게는 1g 내지 10g의 비율로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0045] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 (-)-카르본((-)-Carvone)을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml당 일반적으로 약 1~20g, 바람직하게는 약 5~12g이다.
- [0046] 상기 외에 본 발명의 (-)-카르본((-)-Carvone)은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 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 (-)-카르본은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 (-)-카르본 100 중량부 당 0.01~20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0047] 본 발명에 있어서, 지질대사 개선용 기능성 식품의 지질대사 개선은 간내 중성지질 감소, 간내 지질축적 억제 또는 지방간 개선 효과인 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0048] 본 발명은 또 다른 관점에서, (-)-카르본((-)-Carvone)을 유효성분으로 함유하는 지질대사 개선용 접착식 패치에 관한 것이다.
- [0049] 본 발명에 있어서, 지질대사 개선은 간내 중성지질 감소, 간내 지질축적 억제 또는 지방간 개선 효과인 것을 특징으로 할 수 있으며, 코 밑에 붙이는 지질대사 개선용 접착식 패치임을 특징으로 할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 일 실시예에서는, 사람의 간세포인 HepG2 세포에서 OR1A1 유전자의 발현 양상 및 OR1A1 단백질의 세포막에서의 발현을 확인하고자 하였다. 그 결과, 도 1A에 나타난 바와 같이, OR1A1 유전자가 유의적으로 전사(transcription) 단계에서 발현되는 것을 확인하였다. 또한, 도 1B에 나타난 바와 같이, 단백질 수준에서도 HepG2 세포의 세포막 분획에서 35KDa 크기의 OR1A1 단백질이 발현되는 것을 확인하였다. 또한, 도 1C에 나타난 바와 같이, 면역조직염색법에서는 사람의 간조직 절편 상의 세포막과 OR1A1 항체 분석 이미지를 통해, 녹색부분(OR1A1)과 적색부분(세포막)이 중첩(코로컬라이제이션, co-localization)되어 세포막에서 OR1A1 단백질이 발현되었음을 확인하였다.
- [0051] 본 발명의 다른 실시예에서는, 사람의 간세포인 HepG2 세포에서 (-)-카르본((-)-Carvone) 처리에 따른 신호전달 경로를 확인하였다. 그 결과, 도 1D에 나타난 바와 같이, cAMP 농도는 유의적으로 증가했지만, 도 1G에 나타난 바와 같이, 칼슘이온 농도는 세포질 내에서 아무런 변화가 없음을 확인하였다. 또한, 도 1E 및 도 1F에 나타난

바와 같이, (-)-카르본으로 활성화된 OR1A1이 2차 전령으로 cAMP의 농도를 증가시켰고, cAMP/PKA 신호전달 경로에 관여함을 표적 단백질인 CREB의 인산화를 통해 확인하였다.

[0052] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 사람의 간세포인 HepG2 세포에서 (-)-카르본((-)-Carvone) 처리에 따른 중성지방 발현 양상을 확인하였다. 그 결과, 도 2A에 나타난 바와 같이, OR1A1을 (-)-카르본으로 활성화한 경우, 대조군인 지질 축적 유도과정만 거친 HepG2 세포의 중성지방 농도와 비교하였을 때, 10 μ M의 (-)-카르본을 처리한 HepG2 세포의 중성지방 농도는 양성대조군인 1 μ M의 forskolin을 처리한 HepG2 세포의 중성지방 농도와 유의적으로 유사한 감소 효과를 보였지만, 세포 내 콜레스테롤 함량에는 유의성을 나타내지 않았다. 또한, 도 2B에 나타난 바와 같이, 지질 염색법을 통해 육안으로 관찰한 중성지방구의 농도는 처리한 (-)-카르본의 양과 비례하여 농도 의존적으로 감소함을 보였다.

[0053] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 사람의 간세포인 HepG2 세포에서 (-)-카르본((-)-Carvone) 처리에 따른 중성지방 합성 유전자 발현 양상을 확인하였다. 그 결과, 도 2C에 나타난 바와 같이, 음성대조군(VC)에 비해, 10 μ M의 (-)-카르본을 처리한 HepG2 샘플군(CV 10)과 1 μ M의 forskolin을 처리한 양성대조군(FSK)에서 유의성 있게 HES-1 유전자 발현이 증가하였다. 또한, 음성대조군(VC)에 비해, 10 μ M (-)-카르본 농도로 처리된 HepG2 샘플군(CV 10)에서 효소 mtGPAT 유전자만이 유의적으로 발현량이 감소하였으나, 효소 DGAT2의 유전자 발현량에는 영향을 주지 않았다.

[0054] 또한, 도 2D에 나타난 바와 같이, OR1A1의 활성화로 중성지방 합성 효소의 감소 양상을 IB(immunoblotting)기법을 통해 단백질 수준에서 재차 확인한 결과, 대조군(VC)에 비해, (-)-카르본을 처리한 HepG2 샘플군(CV 0.5, CV 1, CV 10)에서 효소 mtGPAT 단백질만이 유의적으로 발현량이 감소하였다. 특히 10 μ M의 (-)-카르본을 처리한 경우는 1 μ M의 forskolin을 처리한 양성대조군(FSK)과 유사한 mtGPAT 단백질 발현 감소율을 나타내었다.

[0055] 본 발명의 또 다른 실시예에서는, 사람의 간세포인 HepG2 세포에서 (-)-카르본((-)-Carvone)의 지질 강하 효과에 대한 OR1A1 의존성을 확인하였다. 그 결과, 유전자 간섭을 행하지 않은 HepG2 세포 대비 79%의 억다운 효과를 보여주었으며, 이는 실시예 2에서 확인한 (-)-카르본으로 활성화된 OR1A1의 CREB 인산화 기능을 상쇄하였음을 보였다.

[0056] 또한, OR1A1 유전자가 결핍된 세포에서는 실시예 3에서 도출된 결과와 달리, HepG2 세포 내 중성지질 농도의 감소 효과를 보이지 않았으며, 실시예 4에서 감소 효과를 보인 중성지방 합성효소 mtGPAT의 유전자 발현 또한 대조군 대비 유의성이 없었다. 이는 단백질 수준에서도 mtGPAT의 감소 효과를 보여주지 않았다. 따라서, OR1A1의 발현을 억제할 경우, (-)-카르본의 지질 감소 효과가 소멸된 것으로 나타나, (-)-카르본의 지질 강하 효과는 OR1A1의 발현에 의존적임을 확인하였다.

[0057] 실시예를 참조하면, (-)-카르본((-)-Carvone)이 사람의 간세포인 HepG2 세포에서 후각수용체 중 하나인 OR1A1의 리간드로 작용하여, 주요 2차 전령인 cAMP(cyclic AMP)의 농도를 유의적으로 증가시켰으며, 이에 따라 PKA(protein kinase A)의 활성이 증가하였고(cAMP-PKA 신호전달 경로 활성화), 연이어 PKA의 표적 단백질인 CREB(cAMP response element binding protein)의 인산화를 증가시켰다. 더불어 CREB의 인산화는 간내 지질 축적을 유도하는 전사조절인자인 PPAR- γ (peroxisome proliferator-activated receptor- γ) 핵 수용체의 발현을 억제시키는 보조전사인자인 CREB의 표적 유전자인 HES-1(hairy and enhancer of split-1)을 자극(HES-1 발현 증가)하고, 궁극적으로 중성지방의 합성을 촉진하는 효소인 mtGPAT(mitochondrial glycerol-3-phosphatate acyltransferase)의 감소를 유발하여 중성 지방 감소 및 중성지질 축적 감소를 확인하였다. 따라서, (-)-카르본을 간조직에 처리하면 일련의 신호전달 과정을 조절하여 중성지질 합성이 저해되는 것으로 확인되었다. 결론적으로 (-)-카르본으로 활성화된 OR1A1은 cAMP-PKA 신호전달 경로를 통해 간내 지질 대사에 관여하는 유전자 발현을 조절하여 간조직 내 지질 축적을 억제하고 중성지질 농도를 효과적으로 감소시키는 것을 확인하였다.

[0058] 현재 지질 저하제로서 스타틴(statin) 및 피브레이트(fibrate) 계열의 약물이 사용되고 있는데, 스타틴의 경우 간 질환 및 신경병증에 영향을 줄 수 있는 것으로 알려져 있는데 비해 에센셜 오일의 주성분인 (-)-카르본((-)-Carvone)은 대체제로서 부작용이 거의 없는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 발명은 식물성 정유 성분인 (-)-카르본을 활용하면 간조직 내 지질 축적을 억제하여 지방간 발생 위험을 감소시키고 건강 증진에 도움이 되는 것으로 평가된다.

[0059] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위

한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

- [0060] **실시예 1: 사람의 간세포인 HepG2 세포에서 OR1A1 유전자의 발현 양상 및 OR1A1 단백질의 세포막에서의 발현 확인**
- [0061] 본 발명에서 사용된 시약 및 배지 성분들은 시그마사(Sigma, USA), BD사(BD Biosciences, USA), Gibco사(Gibco Life Technologies, USA) 및 Molecular Probes사(USA)로부터 구입하여 사용하였다.
- [0062] 실시예 1~5에서 사용된 간세포는 사람의 간세포암종(hepatocellular carcinoma, HCC) 유래 HepG2 세포(ATCC HB-8065TM, 미국)로, 10% FBS(fetal bovine serum)이 첨가된 MEM(Minimum essential medium), 25mM HEPES 및 25mM NaHCO₃을 함유하는 배지에서 배양하였다(Aden DP *et al.*, *Nature*, 282(5739):615-6, 1979; Knowles BB *et al.*, *Science*, 209(4455):497-9, 1980).
- [0063] HepG2 세포에서 OR1A1의 유전자 수준 분석을 위해 qPCR(quantitative real-time PCR)기법을 사용하였다. 먼저, 배양된 HepG2 세포에서 RNA를 추출하여 ReverTra Ace qPCR RT kit(TOYOBO, Osaka, Japan)을 이용하여 cDNA 합성을 진행하였다. 그 다음, qPCR(quantitative real-time PCR)을 수행한 다음, 상기 산물을 전기영동하여 OR1A1의 발현 양상을 조사하였다.
- [0064] 또한, 세포막에서의 OR1A1 단백질의 발현 유무를 확인하기 위해 HepG2 세포의 총단백질을 초원심분리를 통해 세포질과 세포막 분획으로 분리한 다음, OR1A1 항체를 이용하여 IB(immunoblotting)기법을 수행하였고, 사람의 간조직 절편(Abnova, Taiwan) 상에서 OR1A1 단백질 발현을 추가적으로 확인하기 위해 OR1A1 항체를 이용하여 면역조직염색법(immunohistochemistry)을 수행하였다. 이는 DAPI 염색법으로 핵을 청색으로 염색하였으며, 세포막 염색을 위해서는 CellMaskTM Plasma Membrane Stains(Invitrogen, CA, USA)를 사용하였다. 상기 염색된 세포의 이미지는 공초점형광현미경(confocal fluorescent microscope, LSM700, Carl Zeiss)을 이용하여 촬영하였다.
- [0065] 그 결과, 도 1A에 나타난 바와 같이, OR1A1 유전자가 유의적으로 전사(transcription) 단계에서 발현되는 것을 qPCR 및 전기영동을 통해 확인하였다. 또한, 도 1B에 나타난 바와 같이, 단백질 수준에서도 HepG2 세포의 세포막 분획에서 35KDa 크기의 OR1A1 단백질이 발현되는 것을 확인하였다. 또한, 도 1C에 나타난 바와 같이, 면역조직염색법에서는 사람의 간조직 절편 상의 세포막과 OR1A1 항체 분석 이미지를 통해, 녹색부분(OR1A1)과 적색부분(세포막)이 중첩(코로컬라이제이션, co-localization)되어 노란색으로 나타남을 확인하였는데, 이로 인해 세포막에서 OR1A1 단백질이 발현되었음을 확인하였다.
- [0066] **실시예 2: 사람의 간세포인 HepG2 세포에서 (-)-카르본((-)-Carvone) 처리에 따른 신호전달 경로 확인**
- [0067] 후각수용체 OR1A1이 1차 전령인 리간드 (-)-카르본((-)-Carvone)에 의해 활성화되었을 때, 대표적인 2차 전령인 cAMP와 칼슘이온 중 어떤 신호전달 경로를 따르는지 확인하기 위해 cAMP와 칼슘이온 농도를 측정하였다. 먼저, HepG2 세포에 (-)-카르본을 0.5, 1, 10 μ M 농도로 처리하였고, 양성대조군으로는 세포 내 cAMP 수치 상승 및 지방분해를 유도한다고 알려진 forskolin 1 μ M을 처리하였다. HepG2 세포 내 cAMP 농도를 측정을 위해 cAMP activity assay kit(Enzo Life Sciences, NY, USA)를 사용하였고, 칼슘이온의 방출량 확인은 Fluo-4 DirectTM Calcium Assay Kit(Invitrogen, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.
- [0068] 또한, 활성화된 OR1A1이 cAMP/PKA 경로를 따르는지 추가적으로 확인하기 위해, PKA activity assay kit(Enzo Life Sciences, NY, USA)를 이용하여 PKA 활성을 측정하였고, 표적 단백질인 CREB의 인산화를 IB(immunoblotting)기법을 통해 확인하였다.
- [0069] 도 1의 A-23187은 칼슘 이오노포어로 양성대조군으로 사용되었고, VC는 vehicle을 처리한 음성대조군 세포, FSK는 1 μ M forskolin으로 자극한 양성대조군 세포, CV는 0.5, 1, 10 μ M의 (-)-카르본((-)-Carvone)(Cat.No. 12493, Sigma, USA)으로 자극한 HepG2 세포를 표시한 것이다. 모든 실험은 세 번 반복하여 수행하였으며, Tukey's HSD test에 의한 one-way ANOVA 분석을 통해 여러 그룹 간 통계적 유의성 분석을 수행하였다. 각기 다른 알파벳은 통계적으로 유의함(P<0.05)을 나타낸 것이다.
- [0070] 그 결과, 도 1D에 나타난 바와 같이, cAMP 농도는 유의적으로 증가했지만, 도 1G에 나타난 바와 같이, 칼슘이온 농도는 세포질 내에서 아무런 변화가 없음을 확인하였다. 이는 (-)-카르본((-)-Carvone)이 OR1A1 수용체와 결합

했을 때, G 단백질 및 아데닐레이트 사이클라아제(adenylate cyclase)와 작용하여 cAMP 농도를 증가시킨 결과이다.

[0071] 또한, 도 1E 및 도 1F에 나타난 바와 같이, (-)-카르본으로 활성화된 OR1A1이 2차 전령으로 cAMP의 농도를 증가시켰고, cAMP/PKA 신호전달 경로에 관여함을 표적 단백질인 CREB의 인산화를 통해 확인하였다.

[0072] **실시예 3: 사람의 간세포인 HepG2 세포에서 (-)-카르본((-)-Carvone) 처리에 따른 중성지방 발현 양상 확인**

[0073] 사람의 간세포에서 발현된 후각수용체의 지질 대사와 관련한 효능을 알아보고자 하였다. 먼저, HepG2 세포 내 지질 축적을 유도하기 위해 유리지방산인 팔미트산(palmitic acid)과 올레산(oleic acid)을 임의로 축적시켰다. 24시간 경과 후, OR1A1의 활성화를 위해 OR1A1 리간드인 (-)-카르본((-)-Carvone)을 0.5, 1, 10 μ M 농도로 처리하였다. 양성대조군으로는 세포 내 cAMP 수치 상승 및 지방분해를 유도한다고 알려진 forskolin 1 μ M을 처리하였다. 축적된 중성지방 및 콜레스테롤의 세포 내 측정은 세포 내 지질을 hexane/iso-propanol(2:1) 용매를 이용해 추출한 다음, Cobas C111 자동분석기(Roche Diagnostic Systems Inc., Indianapolis, IN, USA)를 이용하여 분석하였고, 중성지방구의 축적 확인을 위해 지질 염색시료인 Oil red O와 Bodipy-lipid 염색을 통해 지질 염색을 수행하였다.

[0074] 도 2의 VC는 지질 축적이 유도되지 않은 HepG2 세포에 vehicle을 처리한 음성대조군 세포, VCL은 지질 축적을 유도한 HepG2 세포에 vehicle을 처리한 음성대조군 세포, FSK는 지질 축적을 유도한 HepG2 세포에 1 μ M forskolin으로 자극한 지질 축적을 유도한 양성대조군 세포, CV는 지질 축적을 유도한 HepG2 세포에 0.5, 1, 10 μ M의 (-)-카르본((-)-Carvone)을 처리한 실험군 세포를 표시한 것이다. 모든 물질 처리는 24시간 동안 수행하였다. 모든 실험은 세 번 반복하여 수행하였으며, Tukey's HSD test에 의한 one-way ANOVA 분석을 통해 여러 그룹 간 통계적 유의성 분석을 수행하였다. 각기 다른 알파벳은 통계적으로 유의함(P<0.05)을 나타낸 것이다.

[0075] 그 결과, 도 2A에 나타난 바와 같이, OR1A1을 (-)-카르본((-)-Carvone)으로 활성화한 경우, 대조군인 지질 축적 유도과정만 거친 HepG2 세포의 중성지방 농도와 비교하였을 때, 10 μ M의 (-)-카르본을 처리한 HepG2 세포의 중성지방 농도는 양성대조군인 1 μ M의 forskolin을 처리한 HepG2 세포의 중성지방 농도와 유의적으로 유사한 감소 효과를 보였지만, 세포 내 콜레스테롤 함량에는 유의성을 나타내지 않았다. 또한, 도 2B에 나타난 바와 같이, 지질 염색법을 통해 육안으로 관찰한 중성지방구의 농도는 처리한 (-)-카르본의 양과 비례하여 농도 의존적으로 감소함을 보였다.

[0076] **실시예 4: 사람의 간세포인 HepG2 세포에서 (-)-카르본((-)-Carvone) 처리에 따른 중성지질 합성 유전자 발현 양상 확인**

[0077] 실시예 3에서의 간세포인 HepG2 세포에 (-)-카르본((-)-Carvone) 처리에 따른 중성지방 감소 효과를 실시예 2에서 확인한 OR1A1의 HepG2 세포 내에서의 PKA-CREB 신호전달 경로를 토대로 지질 대사와 관련된 표적 유전자를 규명하고자 qRT-PCR 실험을 수행하였다.

[0078] CREB는 세포 내 주요 유전자 전사조절인자로서 다양한 대사 과정에 관여하는 유전자 발현을 조절한다고 알려져 있는데, 중성지질 대사와 관련하여 인산화되면 간에서 지방합성 전사인자로 알려진 PPAR- γ 의 발현을 억제한다고 알려져 있다. PPAR- γ 의 발현 억제에는 HES-1의 발현량으로 조절되는데, qRT-PCR을 통해 (-)-카르본((-)-Carvone)을 처리한 HepG2 세포의 mRNA를 분리하여 HES-1의 발현량을 측정하였다.

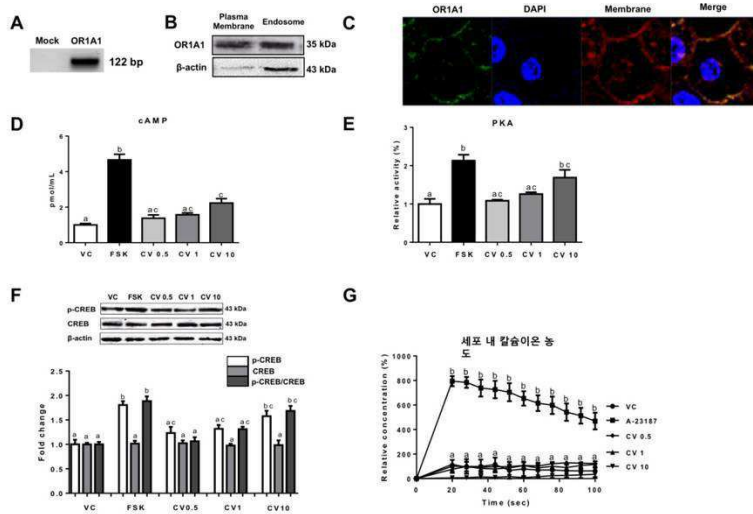
[0079] 또한, CREB는 중성지질 대사와 관련하여 중성지방 합성과정의 주요 효소인 mtGPAT과 DGAT2(diacylglycerol acyltransferase 2)는 CREB 활성화에 따라 억제된다고 밝혀져 있다. 실시예 1에서 CREB의 인산화 활성도를 단백질의 발현 수준으로 확인하였으므로, 중성지방합성 관련 효소의 유전자의 발현 여부를 순차적으로 확인하였다.

[0080] 도 2의 VC는 지질 축적이 유도되지 않은 HepG2 세포에 vehicle을 처리한 음성대조군 세포, VCL은 지질 축적을 유도한 HepG2 세포에 vehicle을 처리한 음성대조군 세포, FSK는 지질 축적을 유도한 HepG2 세포에 1 μ M forskolin으로 자극한 지질 축적을 유도한 양성대조군 세포, CV는 지질 축적을 유도한 HepG2 세포에 0.5, 1, 10 μ M의 (-)-카르본((-)-Carvone)을 처리한 실험군 세포를 표시한 것이다. 모든 물질 처리는 24시간 동안 수행하였다. 모든 실험은 세 번 반복하여 수행하였으며, Tukey's HSD test에 의한 one-way ANOVA 분석을 통해 여러 그룹 간 통계적 유의성 분석을 수행하였다. 각기 다른 알파벳은 통계적으로 유의함(P<0.05)을 나타낸 것이다.

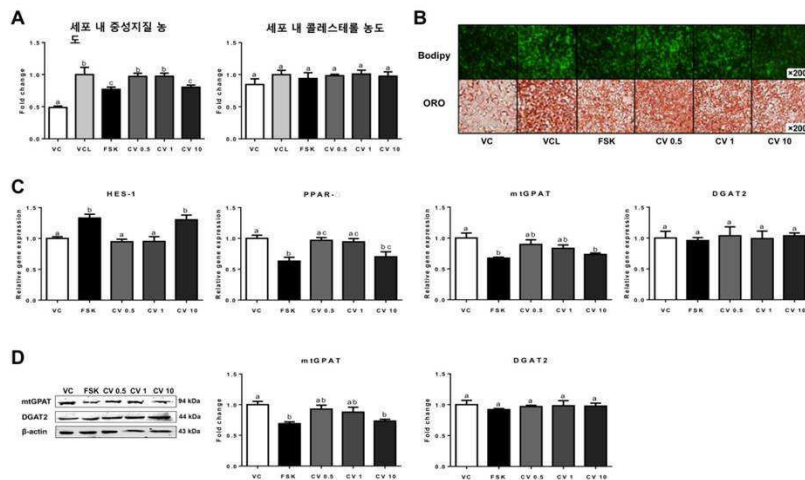
- [0081] 그 결과, 도 2C에 나타난 바와 같이, 음성대조군(VC)에 비해, 10 μ M의 (-)-카르본((-)-Carvone)을 처리한 HepG2 샘플군(CV 10)과 1 μ M의 forskolin을 처리한 양성대조군(FSK)에서 유의성 있게 HES-1 유전자 발현이 증가하였다. 또한, 음성대조군(VC)에 비해, 10 μ M (-)-카르본 농도로 처리된 HepG2 샘플군(CV 10)에서 효소 mtGPAT 유전자만이 유의적으로 발현량이 감소하였으나, 효소 DGAT2의 유전자 발현량에는 영향을 주지 않았다.
- [0082] 또한, 도 2D에 나타난 바와 같이, OR1A1의 활성화로 중성지방 합성 효소의 감소 양상을 IB(immunoblotting)기법을 통해 단백질 수준에서 재차 확인한 결과, 대조군(VC)에 비해, (-)-카르본을 처리한 HepG2 샘플군(CV 0.5, CV 1, CV 10)에서 효소 mtGPAT 단백질만이 유의적으로 발현량이 감소하였다. 특히 10 μ M의 (-)-카르본을 처리한 경우는 1 μ M의 forskolin을 처리한 양성대조군(FSK)과 유사한 mtGPAT 단백질 발현 감소율을 나타내었다.
- [0083] 결국, OR1A1 활성화에 따른 CREB의 인산화의 증가가 최종적으로 중성지방 대사에 관여하는 mtGPAT의 유전자 및 단백질의 발현을 감소시켰으며, 이 결과는 간세포에서 OR1A1의 활성화를 통해 PKA 신호전달 과정이 활성화되어, 이를 통해 인산화된 CREB 전사조절인자가 지질합성전사인자인 PPAR- γ 의 활성억제인자인 HES-1의 발현을 촉진하여 억제된 PPAR- γ 가 순차적으로 중성지방 합성에 관여하는 mtGPAT의 활성을 감소시켜 간조직 세포 내 축적된 중성지방 농도를 저하시키는 효과로 나타난 것이다.
- [0084] **실시예 5: 사람의 간세포인 HepG2 세포에서 (-)-카르본((-)-Carvone)의 지질 강하 효과에 대한 OR1A1 의존성 확인**
- [0085] OR1A1 발현을 킥다운(knockdown)하는 유전자 간섭기술을 이용하여, LOF(loss-of-function) 연구를 수행하였다. 실시예 2~4에서 사용된 (-)-카르본((-)-Carvone)이 세포 내 다른 경로로 지질대사 조절을 할 수 있는 가능성도 배제할 수 없으므로, 배양된 HepG2 세포에서 OR1A1을 표적으로 삼은 siRNA duplex(sc-93567, SantaCruzBio, USA)를 10~100nM 중 적절한 농도로 Fugene HD reagent(Promega, USA)을 이용하여 세포에 주입하여 유전자 간섭을 유도한 다음, 24~72시간 중 최적의 킥다운 시간대에, 실시예 2~4에 나타난 바와 같이, VC(vehicle only), (-)-카르본(1, 10 μ M), forskolin 1 μ M을 24~72시간 동안 처리하고, HepG2 세포의 OR1A1 킥다운에 따른 세포 내 지질, 콜레스테롤 및 지질대사와 관련된 표적 유전자들의 발현 양상을 확인하고자 하였다.
- [0086] 도 3의 VC는 지질 축적이 유도되지 않은 HepG2 세포에 vehicle을 처리한 음성대조군 세포, VCL은 지질 축적을 유도한 HepG2 세포에 vehicle을 처리한 음성대조군 세포, FSK는 지질 축적을 유도한 HepG2 세포에 1 μ M forskolin을 처리한 양성대조군 세포, CV는 지질 축적을 유도한 HepG2 세포에 1, 10 μ M의 (-)-카르본((-)-Carvone)을 처리한 실험군 세포를 표시한 것이다. 모든 물질 처리는 24시간 동안 수행하였다. 모든 실험은 세 번 반복하여 수행하였으며, Tukey's HSD test에 의한 one-way ANOVA 분석을 통해 여러 그룹 간 통계적 유의성 분석을 수행하였다. 각기 다른 알파벳은 통계적으로 유의함(P<0.05)을 나타낸 것이다.
- [0087] 그 결과, 유전자 간섭을 행하지 않은 HepG2 세포 대비 79%의 킥다운 효과를 보여주었으며, 이는 실시예 2에서 확인한 (-)-카르본((-)-Carvone)에 의해 활성화된 OR1A1의 CREB 인산화 기능을 상쇄하였음을 보였다. 또한, OR1A1 유전자가 결핍된 HepG2 세포에서는 실시예 3에서 도출된 결과와 달리, 세포 내 중성지방 농도의 감소 효과를 보이지 않았으며, 실시예 4에서 감소 효과를 보인 중성지방 합성효소 mtGPAT의 유전자 발현 또한 대조군 대비 유의성이 없었다. 이는 단백질 수준에서도 mtGPAT의 감소 효과를 보여주지 않았다. 따라서, OR1A1의 발현을 억제할 경우, (-)-카르본의 지질 감소 효과가 소멸된 것으로 나타나, (-)-카르본의 지질 강하 효과는 OR1A1의 발현에 의존적임을 확인하였다.
- [0088] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

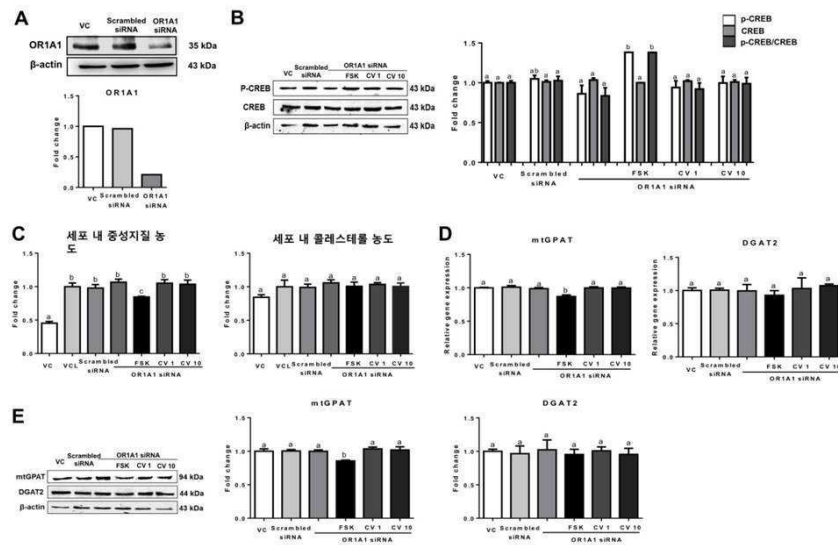
도면1



도면2



도면3



도면4

