



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0043671
(43) 공개일자 2025년03월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/34 (2006.01) A61K 31/047 (2006.01)
A61P 1/02 (2006.01) A61P 29/00 (2023.01)
A61P 31/04 (2006.01) A61Q 11/00 (2006.01)
A61Q 17/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/345 (2013.01)
A61K 31/047 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0126693

(22) 출원일자 2023년09월22일

심사청구일자 2023년09월22일

(71) 출원인

건양대학교산학협력단

충청남도 논산시 대학로 121 (내동)

(72) 발명자

노의정

광주광역시 서구 시청로 60, 1019호

이성기

대전광역시 서구 관저동로 190-14

(74) 대리인

특허법인도담

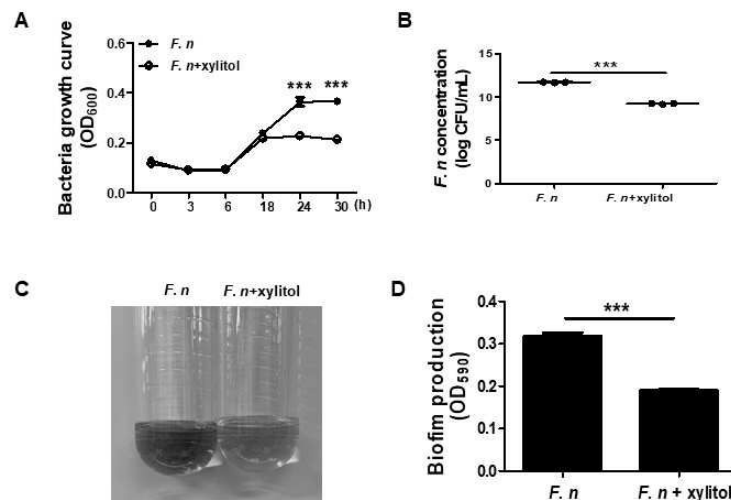
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 자일리톨을 포함하는 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)에 대한 항균 조성물 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 자일리톨을 포함하는 항균 조성물에 관한 것으로, 상기 항균 조성물은 자일리톨을 유효성분으로 포함하고, 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)의 성장을 억제하고, 상기 균에 의한 염증을 예방하거나 치료할 수 있는 항균 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따르면 자일리톨이 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)의 감염에 의해 증가된 NLRP3 inflammasome 활성화에 직접적으로 관여하여 염증을 억제하는 효과가 있다는 것을 확인하였다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 1/02 (2018.01)
A61P 29/00 (2023.02)
A61P 31/04 (2018.01)
A61Q 11/00 (2013.01)
A61Q 17/005 (2013.01)
A61K 2800/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345353791
과제번호	2022R1I1A1A01073882
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	창의도전연구기반지원
연구과제명	Fusobacterium nucleatum 감염으로 인한 조산 예측 진단 키트 개발
기 여 율	1/4
과제수행기관명	건양대학교
연구기간	2022.06.01 ~ 2025.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345315469
과제번호	2017R1A6A1A03015713
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중점연구소지원
연구과제명	명국의과학연구소
기 여 율	1/4
과제수행기관명	건양대학교
연구기간	2017.06.01 ~ 2026.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465035687
과제번호	HI17C1238010022
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	공공보건기술개발
연구과제명	염증 조절을 기반으로 한 유산 및 조산의 새로운 치료법 개발
기 여 율	1/4
과제수행기관명	건양대학교
연구기간	2017.05.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1465038750
과제번호	HI22C1318000023
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	저출산 극복연구
연구과제명	고위험임신 관리를 위한 비침습적 면역마커 개발
기 여 율	1/4
과제수행기관명	건양대학교
연구기간	2022.07.01 ~ 2024.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

자일리톨(xylitol)을 유효성분으로 포함하고, 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)에 대해 항균 활성을 갖는 향균용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은 구강질환을 예방 또는 완화하기 위한 것을 특징으로 하는, 향균용 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 구강질환은 구치, 플라그 형성, 충치, 치주질환 또는 치아우식증 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는, 향균용 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 조성물은 치약, 가글제품, 껌, 사탕류, 카라멜류, 젤리류, 구강 스프레이, 구강연고, 구강세정제, 구강청정제 및 치아미백제로 이루어지는 군 중에서 선택되는 어느 하나에 포함될 수 있는 것을 특징으로 하는, 향균용 조성물

청구항 5

제 1 항 내지 제 4 항에 있어서,

상기 자일리톨은 조성물 전체 총 중량에 대하여 2 내지 20 중량 %로 함유하는 것을 특징으로 하는 향균용 조성물.

청구항 6

상기 향균용 조성물을 유효성분으로 포함하고, 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)에 의해 유발되는 염증을 예방 또는 치료하기 위한 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 자일리톨을 포함하는 향균 조성물에 관한 것으로, 상기 향균 조성물은 자일리톨을 유효성분으로 포함하고, 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)의 성장을 억제하고, 상기 균에 의한 염증을 예방하거나 치료할 수 있는 향균 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 그람 음성 혐기성 구강 세균인 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)은 치주염 발병과 관련이 있다. 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)은 구강 내 편재하여 치주질환을 유발하고 잠재적으로 혈액 투과성을 증가시킨다. 또한, 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)은 치주질환 뿐만 아니라 알츠하이머병, 뇌농양, 심혈관 질환, 유산 및 염증성 장 질환을 포함한 다양한 인간 질병과 관련이 있다. 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)을 임신한 쥐에 정맥주사(i.v.)하면 태반, 양수, 심지어 태아까지 검출되어 임신과 출산에 악영향 (사산 및 조산)을 초래하기도 한다. 이는 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)이 혈액을 통해 태반으로 퍼질 수 있음을 시사한다.
- [0004] 자연적으로 생산되는 5탄당 알코올인 자일리톨은 박테리아의 성장과 대사를 억제하는 항균 효과가 있는 식품이다. 자일리톨은 천연의 당알콜계 감미료로, 츄잉검, 제과, 의약품 및 구강 위생제품 등 다양한 무설탕 제품에 사용될 수 있다. 자일리톨은 설탕과 유사한 감미도를 지니며 입안에서 녹을 때 뛰어난 휘산 작용을 나타낸다. 자일리톨은 채소나 야채 중에 함유되어 있으며 인체 내에서는 포도당 대사의 중간물질로 생성된다. 상업적으로는 자작나무나 떡갈나무 등에서 얻어지는 자일란, 헤미셀룰로즈 등을 주원료로 하여 생산되고 있으며 그 주산지는 임산 자원이 풍부한 핀란드이다. 자일리톨은 충치 발생을 현저히 감소시키는 작용이 있어 세계적으로 치의학계에서 자일리톨 사용 권고가 증가하고 있으며, 임상실험을 통하여 자일리톨을 함유한 츄잉검이나 제과류의 꾸준한 섭취가 충치 발생률을 35 내지 100 % 까지 감소시킨다는 사실이 밝혀졌다.
- [0005] 많은 연구에서 자일리톨의 항균 효과가 보고되었고, 일부 논문에서는 항염증 효과도 연구되었다. 살아있는 *Porphyromonas gingivalis* 에 감염된 THP-1은 자일리톨에 의해 사이토카인과 케모카인 생성이 억제되었다. 자일리톨은 Raw 264.7 세포에서 *P. gingivalis* lipopolysaccharide (LPS)에 의해 유도된 THF- α 및 IL-1 β 생성을 억제했다. 또한, 자일리톨은 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 에 감염된 THP-1에서 inflammasome 활성화를 통해 IL-1 β 생성을 억제했다. 치주염과 관련된 대표적인 구강세균 중 *P. gingivalis*와 *A. actinomycetemcomitans*에 대한 자일리톨의 항염증 효과를 조사하였으나, 구강질환뿐만 아니라 다양한 염증을 일으키는 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)에 대해서는 그 효과가 밝혀지지 않았다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제 10-2502242 호
(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제 10-1219513 호

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) (연구논문 0001) Signat B, Roques C, Poulet P, Duffaut D: *Fusobacterium nucleatum* in periodontal health and disease. *Curr Issues Mol Biol.* 2011;13(2):25-36.
- (비특허문헌 0002) (연구논문 0002) Park E, Na HS, Kim SM, Wallet S, Cha S, Chung J: Xylitol, an anticaries agent, exhibits potent inhibition of inflammatory responses in human THP-1-derived macrophages infected with *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontol.* 2014;85(6):e212-223.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 자일리톨은 많은 연구를 통해 구강내 다양한 미생물에 대한 항균효과에 대해 검증되었으나 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)에 의해 유발되는 항염증 효과에 대해서는 아직 밝혀진 바가 없다. 후소박테리

움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)은 구강질환뿐만 아니라 알츠하이머병, 뇌농양, 심혈관 질환, 유산 및 염증성 장 질환과도 밀접한 관련이 있는 세균이다.

[0010] 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 자일리톨이 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)에 의해 유발된 NLRP3 inflammasome 활성화로 인한 염증을 조절하는지 여부를 조사한 결과, 자일리톨이 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)의 성장억제와 NLRP3 inflammasome 신호 메커니즘에 직접적으로 관여하여 항균 및 항염증 활성을 갖는다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0011] 본 발명은 구강질환뿐만 아니라 다양한 염증반응의 원인균인 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)의 성장을 효과적으로 억제하여 염증을 예방하고 치료할 수 있는 방법을 제공하는데 목적이 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 과제를 달성하기 위하여, 본 발명은 자일리톨(xylitol)을 유효성분으로 포함하고, 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)에 대한 항균활성을 갖는 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명에서 자일리톨은 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)에 의해 유발된 NLRP3 inflammasome 활성화로 인한 염증을 억제할 수 있다. 본 발명에서 ‘후소박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*)’은 인간의 구강에 공생하는 그람 음성 세균으로 치주염을 유발하는 대표적인 세균 중 하나로, 구강 내 다른 박테리아 종과 응집하는 능력으로 인해 치주 플라크를 구성하는 주요 요소가 된다. 이 외에도 많은 연구에서 태아의 조산, 결장직장암과 연관성이 입증되었다.

[0015] 상기 조성물은 후소박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*)의 감염에 의한 항균 또는 항염 조성물일 수 있다. 상기 조성물은 구강질환을 예방 또는 치료하기 위한 것으로, 상기 구강질환은 구치, 플라그형성, 충치, 치은염(gingivitis), 치주염(periodontitis), 치아우식증(dental caries), 구취(halitosis), 시린이(sensitive teeth), 구강 칸디다증(oral candidiasis), 상부도 호흡기 질환(upper respiratory tract disease) 및 치근단 질환(periapical disease)으로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 구강질환은 구강 내 또는 상부도 호흡기 내 병원균 또는 진균의 감염으로 유발될 수 있으며, 본 발명의 조성물은 항균, 항염 활성을 통하여 상기 구강질환을 예방 또는 개선할 수 있다.

[0016] 본 발명의 조성물은 치약, 가글링 제품, 껌, 사탕류, 카라멜류, 젤리류, 구강 스프레이, 구강용 연고, 구강세정제, 구강 청정제 및 치아미백제로 이루어지는 군 중에서 선택되는 하나로 제품화될 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 또한, 본 발명은 자일리톨을 유효성분으로 하는, 후소박테리움 뉴클레아툼(*Fusobacterium nucleatum*)에 의해 유도되는 질환, 예를 들어 자궁, 태반, 장, 뇌 등의 염증을 예방 또는 치료하기 위한 항염증 약학적 조성물을 제공한다.

[0018] 상기 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 액제, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토즈, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 상기 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 말토덱스트린, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0019] 본 발명은 자일리톨을 포함하는 구강질환을 예방 또는 개선하기 위한 건강기능성 식품용 조성물을 제공한다. 상기 건강기능성 식품용 조성물은 정제, 캡슐제, 분말, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성식품류 등이 있다.

[0020] 본 발명에서 상기 자일리톨은 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.01 ~ 50 중량 %, 바람직하게는 0.1 ~ 30 중량 %, 가장 바람직하게는 2.5 ~ 20 중량%로 하여 첨가될 수 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명은 자일리톨(xylitol)을 유효성분으로 하는 항균 조성물에 관한 것으로, 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)에 대한 항균활성 및 항염활성을 갖는 조성물에 관한 것이다. 자일리톨은 그동안 많은 연구를 통해 다양한 세균에 대한 항균활성이 입증되어 있지만, 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)에 대한 항균활성에 대해서는 밝혀진 바가 없다. 본 발명에 따르면 자일리톨이 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)의 감염에 의해 증가된 NLRP3 inflammasome 활성화에 직접적으로 관여하여 염증을 억제하는 효과가 있다는 것을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)에 대한 자일리톨의 항균 효과를 검증한 결과이다.
 도 2는 자일리톨이 단핵구에서 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*) 감염에 의해 유도된 염증 매커니즘을 억제하는 결과를 보여준다.
 도 3은 자일리톨이 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*) 감염에 의한 NLRP3 inflammasome 활성화를 조절하는지 조사한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명은 자일리톨을 유효성분으로 포함하는 조성물이 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)에 의해 유발된 NLRP3 inflammasome 활성화로 인한 염증을 억제함을 입증했다. 많은 연구에서 구강 미생물이 구강 질환뿐만 아니라 혈액순환에 의해 구강 이외의 부위(자궁, 장, 뇌 등)에 감염을 일으킬 수 있다고 밝혀졌다. 따라서 본 발명에서는 구강 박테리아인 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)에 의해 유발되는 선천성 면역기전과 염증 활성화의 매커니즘인 TLR 및 NLRP3 inflammasome 활성화를 확인하고, 자일리톨이 이들 반응에 직접적으로 관여하여 염증반응을 억제하는 것을 확인하였다.

[0027] 이하 실시예를 바탕으로 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명에 사용된 용어, 실시예 등은 본 발명을 보다 구체적으로 설명하고 통상의 기술자의 이해를 돕기 위하여 예시된 것에 불과할 뿐이며, 본 발명의 권리범위 등이 이에 한정되어 해석되어서는 안 된다.

[0028] 본 발명에 사용되는 기술 용어 및 과학 용어는 다른 정의가 없다면 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 나타낸다.

[0030] [시험예]

[0031] 미생물 및 세포배양

[0032] 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*) (ATCC 25586)은 American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA)에서 구입했다. 박테리아는 5% 탈섬유화된 sheep blood (KisanBio, Seoul, Korea)가 보충된 hemin과 비타민 K1 (Sigma-Aldrich, MO, USA)이 함유된 Brucella Agar (Sigma-Aldrich, MO, USA)에 72시간 동안 도말하였다. 그런 다음 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)의 단일 콜로니를 BHI (Brain Heart Infusion) 배양 배지 (Sigma-Aldrich)에서 박테리아가 대수기 끝에 도달할 때까지 24시간 동안 배양했다. 배양물은 혐기성 지표 가스 팩 (BD)을 사용하여 혐기성 병 (BD, NJ, USA)에서 37 ° C로 배양했다. 배양 후 박테리아를 세척하고, PBS를 사용하여 현탁시켰다. 이어서 마이크로플레이트 분광광도계 (BioTek® Instruments, VT, USA)를 사용하여 600 nm(광학 밀도 = 0.6)에서 측정하여 박테리아 수를 평가했다. 이것은 1×10^9 콜로니 형성 단위 (CFU)/mL의 농도에 해당한다.

[0034] 인간 단핵구 세포주인 THP-1 세포는 ATCC (TIB-202™)에서 구입하여 10 % FBS (Corning, NY, USA) 및 100 U/mL 페니실린-스트렙토마이신 (Gibco, MD, USA)가 보충된 RPMI-1640 배지 (Welgene Inc., 대구, 한국)에서 유지하

었다. 세포를 0.5×10^5 내지 2×10^5 세포/웰의 농도로 48-웰 플레이트에 시딩하고 37 °C에서 5 % CO₂ 농도하에 인큐베이터에서 배양하였다. 세포를 2시간 동안 다양한 용량 (조성물 총 중량대비 0.1 - 2.5 중량%)의 자일리톨로 전처리한 다음 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)을 감염 다중도 (MOI) 10으로 감염시켰다.

[0036] Real-Time qPCR

[0038] mRNA는 easy-BLUE™ Total RNA Extraction Kit (iNtRON Biotechnology, Seongnam, Korea)를 이용하여 추출하였다. cDNA는 0.1μg의 RNA와 ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO Bio-Technology, 오사카, 일본)를 사용하여 합성했다. cDNA 샘플은 SYBR Green PCR Kit (TOYOBO Bio-Technology)를 사용하여 측정하였다. 발현 수준을 정규화하기 위해서 GAPDH를 사용하였다. 올리고뉴클레오티드 프라이머는 다음과 같다. hTLR2: 5'-CTGGACAATGCCACATAC-3'(정방향), 5'-CTAATGTAGGTGAT CCTG-3'(역방향), hTLR4: 5'-GGAATGTGCAACACCTTCAG-3'(정방향), 5'-TTT ATGCAGCCAGCAAGAAG-3'(역방향), hβ- 액틴: 5'-CACCAACTGGGACGACAT-3'(정방향), 5'-ACAGCCTGGATAGCAACG-3'(역방향).

[0040] Western blot

[0042] 단백질은 프로테아제 억제제 콕테일 및 포스파타제 억제제 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)를 함유하는 ice-cold RIPA buffer에서 용해하였다. 세포 용해물의 단백질을 6 ~ 15 % SDS-PAGE로 분리한 다음 polyvinylidene difluoride microporous membrane (Millipore, Bedford, MA, USA)으로 전기 이동시켰다. 멤브레인을 MyD88, caspase-1, IL-1β, β-actin, total 및 phospho-ERK, JNK, p-38 (Cell Signaling Technology, MA, USA)에 대한 1차 항체를 넣어 4 °C에서 밤새 배양한 후 실온에서 2시간 동안 항토끼 및 항마우스에 대한 2차 항체(Santa Cruz biotechnology, Texas, USA)와 함께 배양하였다. 단백질은 화학발광 키트 (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 검출하였고, Fusion solo S chemidoc (Vilber, Collégien, France)으로 이미지를 얻었다.

[0044] ELISA

[0045]

[0046] 인간 THP-1 세포를 자일리톨로 2시간 동안 전처리한 후 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)을 24시간 동안 감염시켰다. hIL-6, hTNF-α, hIL-8 및 hCCL2는 THP-1의 상층액에서 측정하였다. 모든 실험은 R&D Systems의 ELISA 키트를 사용하여 수행되었으며 450 nm 플레이트 판독기 (Bio Tek, VT, USA)에서 측정되었다.

[0048] Confocal

[0050] 세포를 35 mm 공초점 접시 (hole size; 20 mm, SPL Life Science, Kyongki, Korea)에서 4% paraformaldehyde로 10분간 고정하고 0.1 % Triton X-100으로 10분간 투과시켰다. 실온에서 1시간 동안 0.1 % BSA로 블로킹한 다음 항-토끼 ASC (Cell Signaling Technology)를 사용하여 4°C에서 밤새 1차 항체와 함께 배양했다. 2차 항체는 Alexa Fluor 488 donkey anti-rabbit IgG(H+L)였으며 실온에서 1시간 동안 배양했습니다. DAPI (Invitrogen, NY, USA)가 포함된 마운팅 용액으로 세포를 염색하고 공초점 현미경 (LSM 700; Zeiss, Jena, Germany) 및 ZEN 2012 블랙 에디션 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0052] Cell viability

[0054] 자극된 THP-1의 세포 생존율은 제조사의 지시에 따라 EZ-CyTox 키트 (대일연구소, 서울, 한국)를 사용하였다. 플레이트 판독기 (BioTek Instruments, Inc., VT, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율 (%)은 실험군을 대조군으로 나눈 후 100을 곱하여 계산하였다.

[0056] 통계 분석

[0058] Tukey의 절차에 따라 GraphPad Prism 버전 5.00 (GraphPad Software, Inc., CA, USA)을 사용하여 일원 분산 분석 (one-way ANOVA)에 따라 통계 분석을 수행했습니다. 모든 결과는 평균±표준편차로 표현되었으며 P<0.05 미만의 값은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

실시예 1

[0062] 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)에 대한 자일리톨의 항균 효과

[0064] 본 발명자는 자일리톨이 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)에 대해 직접적인 항균 효과가 있는지 조사하였다. 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)을 단독으로 또는 자일리톨과 함께 30시간 동안 배양한 결과 자일리톨과 함께 배양된 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)은 18시간부터 박테리아 성장 곡선을 향상시키지 않았다 (그림 1A). 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)의 농도와 생물막 형성은 자일리톨과 함께 배양된 24시간 샘플에서 감소했다(그림 1B-D). 우리는 자일리톨이 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*) 성장억제에 직접적으로 기여한다는 것을 입증했다.

실시예 2

[0066] 자일리톨은 단핵구에서 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*) 감염에 의한 염증 메커니즘을 억제한다.

[0068] 본 발명자는 먼저 THP-1 세포에서 NLRP3 inflammasome의 프라이밍에 관여하는 signal-1과 관련된 메커니즘인 TLR 신호 메커니즘을 조사했다. 대부분의 TLR은 MyD88을 통해 신호를 보내 선천성 면역 반응의 결과를 결정하는 전사 인자인 MAPKs의 활성화를 유도한다. 자일리톨이 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*) 감염에 의해 NLRP3 inflammasome의 signal-1을 조절하는지 확인했다. THP-1에서 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*) 감염은 TLR2 및 4의 발현을 유의하게 증가시켰고, MyD88의 발현도 상당히 증가되었으나 다양한 농도의 자일리톨을 전처리한 경우 이들 단백질의 발현이 상당히 감소되었다 (그림 2A, B).

[0069] 또한, 자일리톨이 MyD88의 하위 신호인 MAPKs를 조절하는지 여부를 조사했다. 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)에 감염된 세포는 ERK와 p38을 15분, 30분, 60분에 인산화시켰고 JNK는 30분과 60분에 인산화시켰으나 자일리톨을 전처리 한 경우 ERK, JNK 및 p38의 인산화가 감소 되었음을 확인했다 (도 2C).

[0070] 다음으로 자일리톨이 MAPK 활성화에 의해 증가되는 염증성 사이토카인 및 케모카인 생성에 영향을 미치는지 조사하였다. 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*)에 감염된 세포는 IL-6, TNF- α , IL-8 및 CCL2가 큰 폭으로 증가하였으나, 자일리톨로 전처리된 세포는 농도 의존적으로 사이토카인과 케모카인의 생성이 감소되었음을 확인하였다(그림 2D). 따라서 본 발명자들은 자일리톨이 THP-1에서 NLRP3 inflammasome 신호-1 관련

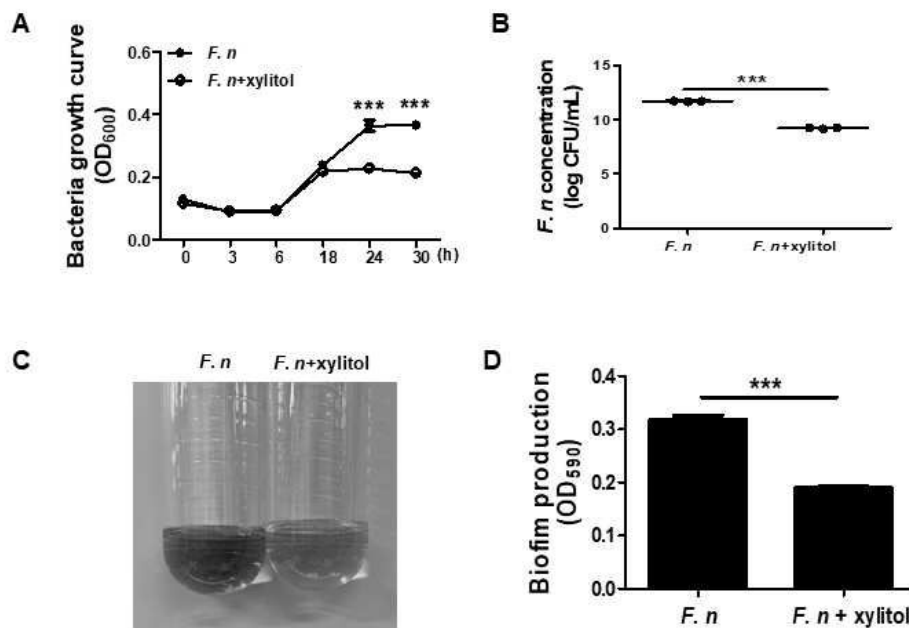
메커니즘을 억제한다는 것을 입증했다.

실시예 3

- [0072] 자일리톨은 단핵구에서 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*) 감염에 의한 NLRP3 inflammasome 활성을 억제한다.
- [0074] NLRP3 inflammasome은 signal-2에 의해 활성화되고 NLRP3, ASC, pro-caspase-1이 복합체를 형성한 후 pro-caspase-1이 절단되어 활성 caspase-1이 된다. Caspase-1 활성화는 pro-IL-1 β 를 절단하고 IL-1 β 를 세포 밖으로 방출한다. 본 발명자는 자일리톨이 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*) 감염에 의한 NLRP3 inflammasome 활성화를 조절하는지 여부를 조사했다. THP-1에서 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*) 감염은 caspase-1과 IL-1 β 의 발현을 증가시켰다. 특히, 세균 감염은 pro-IL-1 β 의 발현을 증가시켰지만, 자일리톨은 절단된 카스파제-1 및 IL-1 β 의 발현을 감소시켰다 (도 3A).
- [0075] ASC는 inflammasome 활성화 후 "speck"이라고 하는 큰 단백질 복합체로 조립된다. 본 발명자는 ASC speck이 세균 감염에 의해 형성되는지 조사했다. ASC 반점은 THP-1에서 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*) 감염에 의해 형성되는 것이 관찰되었으나, 자일리톨이 처리된 경우 관찰되지 않았다 (도 3B).
- [0076] 또한, 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*) 감염은 inflammasome을 활성화시켜 IL-1 β 를 생성시켰고, 이는 자일리톨 농도 의존적 방식으로 감소됨을 확인하였다 (그림 3C). NLRP3 inflammasome 활성화는 pyroptotic cell death를 유도하는 것으로 알려져 있기 때문에 pyroptosis가 발생했는지를 조사하였다. 후소박테리움 뉴클레아툼 (*Fusobacterium nucleatum*) 감염에 의해 inflammasome 활성화가 유도되었지만, 세포 사멸은 관찰되지 않았다 (그림 3D). 따라서 자일리톨이 THP-1에서 NLRP3 inflammasome의 신호-2 관련 메커니즘을 억제한다는 것을 확인할 수 있었다.

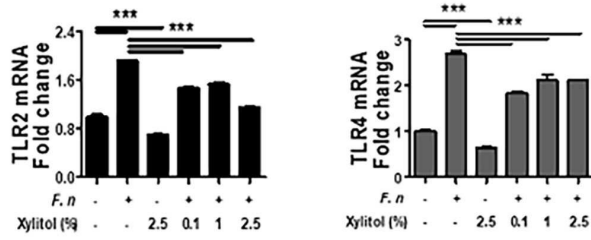
도면

도면1

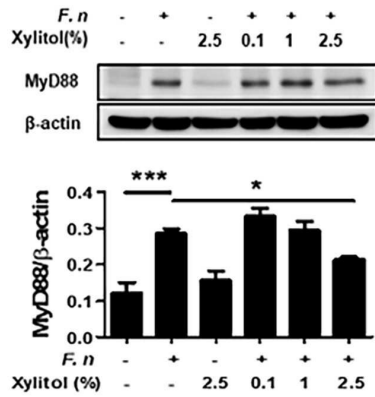


도면2

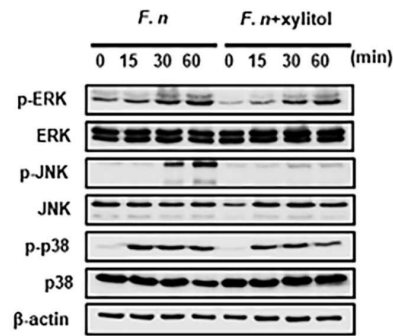
A



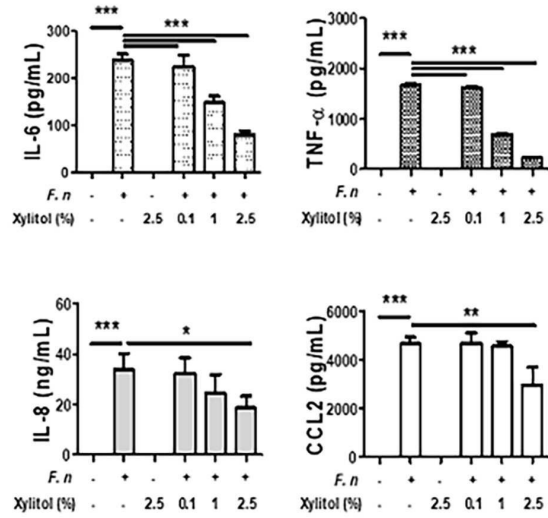
B



C



D



도면3

