(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0009028
(43) 공개일자 2025년01월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/593 (2006.01) *A23L 33/155* (2016.01)
A61P 13/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/593 (2013.01)
A23L 33/155 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0088770
(22) 출원일자 2023년07월10일
심사청구일자 2023년07월10일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
임형은
서울특별시 서초구 서초중앙로 220, 102동 403호
(74) 대리인
위병갑

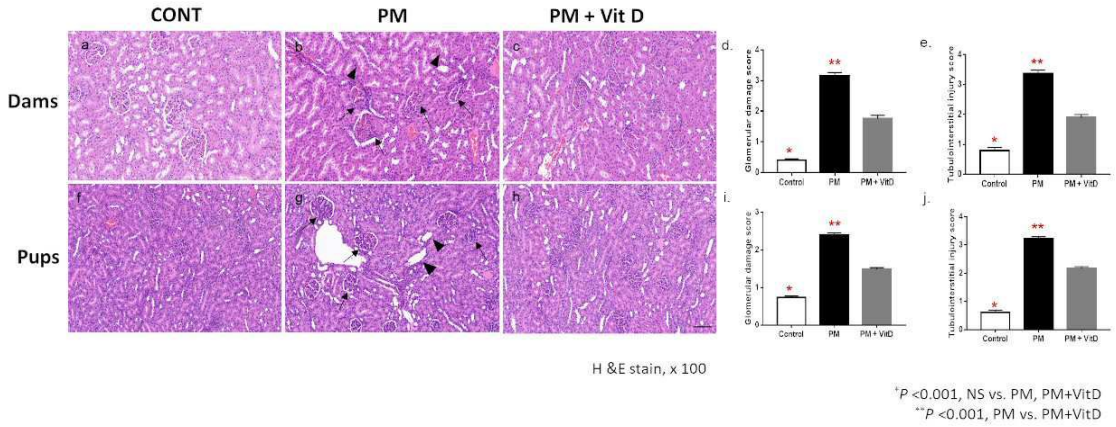
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **미세먼지에 의한 신장 질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 미세먼지 노출에 의해 발생되는 신장 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 미세먼지 노출에 의해 신장 손상이 발생하며, 특히, 모체가 임신한 기간 또는 수유하는 기간 동안 미세먼지에 노출되면 그의 자손 (태아 또는 수유기의 자손)에게서 신장 손상이 발생하고, 비타민 D를 임신 또는 수유 중의 모체에게 투여하면 모체뿐만 아니라 그 자손의 신장 손상도 예방 또는 치료하는 효과가 있으므로, 이를 미세먼지에 의한 신장 질환의 예방 또는 치료 용도로 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61P 13/12 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/30 (2013.01)
A23V 2250/7106 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711164449
과제번호	2020R1F1A1049554
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	임신 중 미세먼지노출이 신생아 신장 발달에 미치는영향 및 비타민 D 보호효과 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2020.06.01 ~ 2023.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

비타민 D를 유효 성분으로 포함하는 미세먼지에 의한 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 비타민 D3(Cholecalciferol)를 유효 성분으로 포함하는, 미세먼지에 의한 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 미세먼지는 평균 입경 2.5㎛ 이하의 초미세먼지($PM_{2.5}$)인, 미세먼지에 의한 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 임신(pregnancy) 또는 수유(lactation) 중인 모체(maternal)의 미세먼지 노출에 의해 모체 또는 이의 자손에서 발생한 신장 질환인, 미세먼지에 의한 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 신장 질환은 만성 신장 질환(chronic kidney disease, CKD), 급성 신장 손상, 신장 섬유증, 말기 신장 질환(end-stage kidney disease; ESKD), 당뇨병성 신장 질환(DN), 사구체 신염, 신우 신염, 간질성 신염, 루프스 신장염, 다낭성 신장 질환, 신부전증, 사구체 경화증, IgA 신장염(IgAN), 고혈압성 신증, 비 당뇨병성 만성 신장 질환, 국소분절사구체경화증(focal segmental glomerulosclerosis; FSGS), 미세변화형 신증후군(MCD) 또는 크산틴 옥시다아제 결핍증인, 미세먼지에 의한 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 임신 또는 수유 동안 모체에 투여되는, 미세먼지에 의한 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 태아(fetal) 시기 또는 수유(lactation) 시기의 자손의 신장 손상을 예방 또는 치료하기 위한, 미세먼지에 의한 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제 1항에 있어서, 사구체 및 세뇨관 기형 유발, 사구체 손상 및 세뇨관 간질성 손상, 사구체 간질 확장(Glomerular mesangial expansion), 세뇨관 캐스트 형성 또는 변성(tubular cast formation or degeneration), 및 간질성 변형(interstitial alterations)을 억제하는, 미세먼지에 의한 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제 1항에 있어서, 모체의 미세먼지 노출에 의해 모체의 신장에서 상향 조절된 VDR, Klotho 또는 TNF-α의 발현을 증가시키는, 미세먼지에 의한 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제 1항에 있어서, 모체의 미세먼지 노출에 의해 자손의 신장에서 하향 조절된 VDR(vitamin D receptor), ACE(angiotensin-converting enzyme) 또는 NF-κB(nuclear factor-kB) p50 발현을 증가시키는, 미세먼지에 의

한 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

제 1항에 있어서, 대식세포의 신장 피질 침윤을 억제하는, 미세먼지에 의한 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제 11항에 있어서, 대식세포는 CD68-양성 세포인, 미세먼지에 의한 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 13

비타민 D를 유효 성분으로 포함하는 미세먼지에 의한 신장 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 14

제 1항의 조성물을 인간을 제외한 동물 모체(dam)에 투여하는 단계를 포함하는, 미세먼지에 노출된 모체의 자손(offspring)에서 신장 손상을 예방 또는 치료하는 방법.

청구항 15

제 14항에 있어서, 임신 또는 수유 중인 모체에 투여하는, 미세먼지에 노출된 모체의 자손에서 신장 손상을 예방 또는 치료하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미세먼지 노출에 의해 발생되는 신장 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 미세먼지 (Particulate Matter, PM)는 우리 눈에 보이지 않는 아주 작은 물질로서, 대기 중에 오래 떠다니거나 흩날리는 직경 10㎛ 이하의 입자상 물질을 지칭한다. 미세먼지는 황사와 달리, 공장, 자동차 등에서 사용하는 화석연료에 의한 인위적인 오염물질로서, 질산염(NO_3^-), 암모늄(NH_4^+), 황산염(SO_4^{2-}) 등의 이온 성분과 탄소화합물, 금속화합물 등을 포함하며, 우리나라 및 동북아시아 국가들의 급격한 산업화가 미세먼지의 주요 발생 원인으로 보고되고 있다 (Myung, 2016). 오랜시간 미세먼지에 노출될 경우 면역력이 급격히 저하하여, 감기, 천식, 기관지염 등의 호흡기 질환을 불러일으키며, 이외에 심혈관질환, 피부질환, 안구질환 등의 각종 질병을 유발한다. 특히나, 직경 2.5㎛ 이하의 초미세먼지($PM_{2.5}$)는 공기역학적 지름이 2.5 μm 이하인 미세먼지를 의미하며, 대기 오염 발생원에서 직접 배출 되어지는 1차 오염물질과 대기에서 반응하여 생성되는 2차 대기오염 물질 (NO_3^-, SO_4^-, NH_4^-, polyacromatichydrocarbon(PAH), quinone 등)이 주를 이룬다 (Kim 등, 2017, Lippmann 등, 2003).

[0003] 세계보건기구(World Health Organization, 2013)에 의하면, PM_{10}(공기역학적 지름이 10 μm 이하인 미세먼지)에 장기 노출될 경우 호흡기관 관련 질환과 사망률이 증가하게 되는데, $PM_{2.5}$는 이보다 더 강한 위험 인자로 작용한다고 보고하였다 (Block 등, 2009). 지름 5~10 μg/m^3 이하의 먼지는 코 점막을 통해 체내에 흡수가 가능하며 2~5 μg/m^3 이하는 기도(호흡기)를 통과하고, 0.1~1 μg/m^3은 폐포 손상까지 유발하게 된다. 미세먼지가 인체에 흡입되었을 경우, 충돌·중력침강·확산·정전기적 흡착 등과 같은 다양한 기전에 의해서 조직에 침착될 수 있으며, 일부는 혈액을 따라서 전신을 순환하기도 한다. 특히, 체내에 침착된 미세먼지는 산화적 스트레스와 염증반응을 유도하고 호흡계 및 순환계 질환의 급성 악화 등을 유발하는 것으로 보고되었으며 (Myung, 2016), 세계

보건기구(WHO; World Health Organization)의 2006년 보고서는 미세먼지 농도가 10 μg/m^3 증가할 때마다, 일 일사망률이 0.5% 씩 증가하는 것으로 보고하였다.

[0004] 최근 미세먼지의 농도가 증가하고 지속기간이 증가됨에 따라 미세먼지에 의한 인체영향성에 대한 관심이 증가되고 있는 추세이며 (Kim 등, 2017), 언론에 의해 미세먼지에 대한 보도가 많아지면서 미세먼지에 대한 국민들의 경각심이 높아지고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 미세먼지에 의한 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 또한, 본 발명의 목적은 미세먼지에 의한 신장 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 아울러, 본 발명의 목적은 미세먼지에 노출된 모체의 자손에서 신장 손상을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 비타민 D를 유효 성분으로 포함하는 미세먼지에 의한 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 비타민 D를 유효 성분으로 포함하는 미세먼지에 의한 신장 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0010] 아울러, 본 발명은 상기 조성물을 인간을 제외한 동물 모체에 투여하는 단계를 포함하는, 미세먼지에 노출된 모체의 자손에서 신장 손상을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따르면, 미세먼지 노출에 의해 신장 손상이 발생하며, 특히, 모체가 임신한 기간 또는 수유하는 기간 동안 미세먼지에 노출되면 그의 자손 (태아 또는 수유기의 자손)에게서 신장 손상이 발생하고, 비타민 D를 임신 또는 수유 중의 모체에게 투여하면 모체뿐만 아니라 그 자손의 신장 손상도 예방 또는 치료하는 효과가 있으므로, 이를 미세먼지에 의한 신장 질환의 예방 또는 치료 용도로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 $PM_{2.5}$ 현탁액(suspension)의 WOSC(water soluble organic carbon) 및 무기 이온의 평균 농도를 확인한 도이다.

도 2는 미세먼지 노출에 대한 동물실험 과정을 나타낸 도이다.

도 3은 미세먼지에 노출된 랫 모체 및 그들의 자손의 체중을 나타낸 도이다:

TP: 임신 후 일수;

D: 출산 후/생후 일수;

Dam: 랫 모체;

Pup: 랫 모체의 자손;

PM: 미세먼지 노출군; 및

PM + VitD: 미세먼지 노출 및 비타민 D 처리군.

도 4는 모체와 자손 (생후 21일)의 혈액 (혈장) 내 NGAL, 25(OH)D 및 칼슘 이온 수준을 확인한 도이다:

Dam: 랫 모체;

Pup: 랫 모체의 자손;

Control: 식염수 처리한 대조군;

PM: 미세먼지 노출군; 및

PM + VitD: 미세먼지 노출 및 비타민 D 처리군.

도 5는 임신 및 수유 중 모체의 미세먼지 노출과 비타민 D 처리에 따른 모체 및 자손의 신장 조직 변화를 확인한 도이다:

Dam: 랫 모체;

Pup: 랫 모체의 자손;

CONT: 식염수 처리한 대조군;

PM: 미세먼지 노출군; 및

PM + VitD: 미세먼지 노출 및 비타민 D 처리군.

도 6은 임신 및 수유 중 모체의 미세먼지 노출과 비타민 D 처리에 따른 모체의 신장에서의 비타민 D 신호전달의 변화를 확인한 도이다:

CONT: 식염수 처리한 대조군;

PM: 미세먼지 노출군; 및

PM + VitD: 미세먼지 노출 및 비타민 D 처리군.

도 7은 임신 및 수유 중 모체의 미세먼지 노출과 비타민 D 처리에 따른 자손의 신장에서의 비타민 D 신호전달의 변화를 확인한 도이다:

CONT: 식염수 처리한 대조군;

PM: 미세먼지 노출군; 및

PM + VitD: 미세먼지 노출 및 비타민 D 처리군.

도 8은 임신 및 수유 중 모체의 미세먼지 노출과 비타민 D 처리에 따른 모체의 신장에서의 RAS(renin-angiotensin system) 신호전달의 변화를 확인한 도이다:

CONT: 식염수 처리한 대조군;

PM: 미세먼지 노출군; 및

PM + VitD: 미세먼지 노출 및 비타민 D 처리군.

도 9는 임신 및 수유 중 모체의 미세먼지 노출과 비타민 D 처리에 따른 자손의 신장에서의 RAS(renin-angiotensin system) 신호전달의 변화를 확인한 도이다:

CONT: 식염수 처리한 대조군;

PM: 미세먼지 노출군; 및

PM + VitD: 미세먼지 노출 및 비타민 D 처리군.

도 10은 임신 및 수유 중 모체의 미세먼지 노출과 비타민 D 처리에 따른 모체의 신장 염증 및 산화 손상을 확인한 도이다:

CONT: 식염수 처리한 대조군;

PM: 미세먼지 노출군; 및

PM + VitD: 미세먼지 노출 및 비타민 D 처리군.

도 11은 임신 및 수유 중 모체의 미세먼지 노출과 비타민 D 처리에 따른 자손의 신장 염증 및 산화 손상을 확인한 도이다:

CONT: 식염수 처리한 대조군;

PM: 미세먼지 노출군; 및

PM + VitD: 미세먼지 노출 및 비타민 D 처리군.

도 12는 임신 및 수유 중 모체의 미세먼지 노출과 비타민 D 처리에 따른 모체 및 자손에서 신장 피질의 단핵구(monocyte)/대식세포(macrophage)의 침윤(infiltration)을 확인한 도이다.

Dam: 랫 모체;

Pup: 랫 모체의 자손;

CONT: 식염수 처리한 대조군;

PM: 미세먼지 노출군; 및

PM + VitD: 미세먼지 노출 및 비타민 D 처리군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

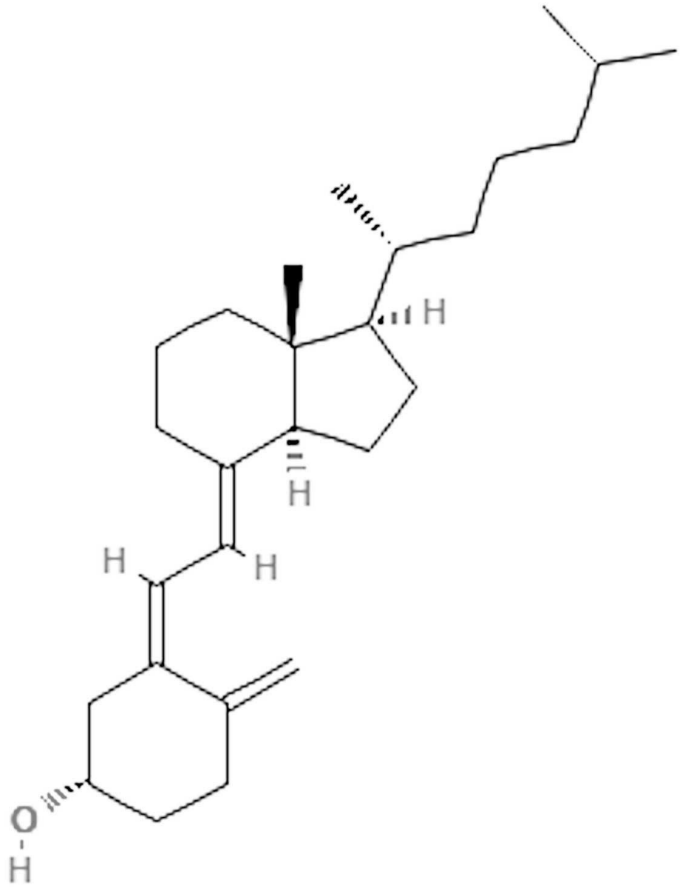
[0014] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0015] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 통합된다.

[0017] 일 측면에서, 본 발명은 비타민 D를 유효 성분으로 포함하는 미세먼지에 의한 신장 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0018] 일 구현예에서, 상기 비타민 D는 비타민 D3(Cholecalciferol)일 수 있으며, 하기 화학식 1로 표시될 수 있다:

화학식 1



[0019]

[0020] 일 구현예에서, 미세먼지는 평균 입경 2.5㎛ 이하의 초미세먼지($PM_{2.5}$)일 수 있다.

[0021] 일 구현예에서, 상기 신장 질환은 임신(pregnancy) 또는 수유(lactation) 중인 모체(maternal)의 미세먼지 노출에 의해 모체 또는 이의 자손에서 발생한 신장 질환일 수 있으며, 만성 신장 질환(chronic kidney disease, CKD), 급성 신장 손상, 신장 섬유증, 말기 신장 질환(end-stage kidney disease; ESKD), 당뇨병성 신장 질환(DN), 사구체 신염, 신우 신염, 간질성 신염, 루프스 신장염, 다낭성 신장 질환, 신부전증, 사구체 경화증, IgA 신장염(IgAN), 고혈압성 신증, 비 당뇨병성 만성 신장 질환, 국소분절사구체경화증(focal segmental glomerulosclerosis; FSGS), 미세변화형 신증후군(MCD) 또는 크산틴 옥시다아제 결핍증일 수 있다.

[0022] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 임신 또는 수유 동안 모체에 투여될 수 있다.

[0023] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물을 임신 또는 수유 중인 모체에 조성물을 투여함으로써 임신 또는 수유 중인 모체의 미세먼지 노출에 의해 모체의 태아(fetal) 시기 또는 수유(lactation) 시기의 자손에서 발생한 신장 손상을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0024] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 사구체 및 세뇨관 기형 유발, 사구체 손상 및 세뇨관 간질성 손상, 사구체 간질 확장(Glomerular mesangial expansion), 세뇨관 캐스트 형성 또는 변성(tubular cast formation or degeneration), 및 간질성 변형(interstitial alterations)을 억제할 수 있다.

[0025] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 모체의 미세먼지 노출에 의해 모체의 신장에서 상향 조절된 VDR(vitamin D receptor), Klotho 또는 TNF-α의 단백질 발현을 감소/회복시킬 수 있다.

[0026] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 모체의 미세먼지 노출에 의해 자손의 신장에서 하향 조절된 VDR(vitamin D receptor), ACE(angiotensin-converting enzyme) 또는 NF-κB(nuclear factor-kB) p50 발현을 증가/회복시킬 수 있으며, 자손이 아닌 임신 또는 수유 중인 모체에 투여함으로써 자손의 신장에서 상기 단백질의 발현을 증가/회복시킬 수 있다.

[0027] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 대식세포의 신장 피질 침윤을 억제할 수 있으며, 대식세포는 CD68-양성 세포일 수 있다.

[0028] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 경구용 약학 조성물일 수 있다.

[0029] 일 구현예에서, 수유는 모체의 가슴으로부터 수유하는 것 (예, 너싱(nursing)) 및 자손에게 병으로 모유를 수유하는 것 (예, 바틀 피딩(bottle feeding))을 포함하나 이에 한정하지 않으며, 이는 그 아이에게 모유 수유 및 유아용 분유 공급 둘 다 하는 것 (예, 부분적인 모유 수유)을 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명에서 사용된 용어, "임신"은 수정에서 태아 출산까지의 기간을 말한다.

[0031] 본 발명에서 사용된 용어, "수유" 및 "생후"는 태아의 출산으로부터 출산 후 이유(weaned)될 때까지의 기간을 말한다.

[0032] 본 발명에서 사용된 용어, "자손/새끼"는 출산시 내지 출산 후 모유 수유 중인 때의 임의의 성별의 개인 또는 개체를 포함하나 이에 한정된 것은 아니다. 이용어는 이유기 전의 태아, 신생아 및 영유아(toddler)를 포함하며, 특히 태아 또는 신생아로부터 발달하는 이유기 전의 신생아인 것이 더욱 바람직하다.

[0033] 본 발명에서 사용된 용어, "모체/어미"는 태아 또는 이유기 전의 자손의 생물학적 어머니, 태아의 대리모(surrogate carrier) 및 자손에게 모유 수유하는 개인 또는 개체를 포함하나 이에 한정된 것은 아니다.

[0034] 본 발명에서, 용어 "예방"이란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 신장 질환의 발생, 확산 및 재발을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미하고, "치료"란 본 발명의 조성물의 투여로 신장 질환의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

[0035] 본 발명에서 유효성분과 결합하여 사용된 "치료학적으로 유효한 양"이란 용어는 신장 질환을 예방 또는 치료하는데 유효한 양을 의미하며, 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은, 예를 들면 Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martin ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.에 기술되어있다.

[0036] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분하며 부작용을 일으키지 않을 정도의 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 건강상태, 신장 질환의 종류, 신장 질환의 발병 원인, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 방법, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 배합 또는 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여, 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0037] 본 발명의 약학적 조성물은 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용가능한"이란 상기 조성물에 노출되는 세포나 인간에게 독성이 없는 특성을 나타내는 것을 의미한다. 상기 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc. 에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로스 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적정한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0038] 일 구현예에서, 상기 약학적 조성물은 경구형 제형, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 및 분무제를 포함하는 군으로

부터 선택되는 하나 이상의 제형일 수 있으며, 경구형 제형이 더욱 바람직하다.

[0039] 본 발명에서 사용되는 용어, "투여"란, 임의의 적절한 방법으로 개체 또는 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 목적하는 방법에 따라 비 경구 투여(예를 들어 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 주사 제형으로 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 조성물의 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 다양한 부형제, 예컨대 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 함께 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제 등이 포함된다. 본 발명의 약학적 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수도 있다. 바람직한 투여방식 및 제제는 정맥 주사제, 피하 주사제, 피내주사제, 근육 주사제, 점적 주사제 등이다. 주사제는 생리식염액, 링겔액 등의 수성 용제, 식물유, 고급 지방산 에스테르(예, 올레인산에칠 등), 알코올 류(예, 에탄올, 벤질알코올, 프로필렌글리콜, 글리세린 등) 등의 비수성 용제 등을 이용하여 제조할 수 있고, 변질 방지를 위한 안정화제(예, 아스코르빈산, 아황산수소나트륨, 피로아황산나트륨, BHA, 토코페롤, EDTA 등), 유화제, pH 조절을 위한 완충제, 미생물 발육을 저지하기 위한 보존제(예, 질산페닐수은, 치메로살, 염화벤잘코늄, 페놀, 크레솔, 벤질알코올 등) 등의 약학적 담체를 포함할 수 있다.

[0040] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 상기 신장 질환이 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함한 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함한 모든 동물을 의미하고, 본 발명의 약학적 조성물을 모체에게 투여함으로써 자손의 신장 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 기존의 치료제와 병행하여 투여될 수 있다.

[0041] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이달실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 덱스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 중량부 내지 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 일 측면에서, 본 발명은 비타민 D를 유효 성분으로 포함하는 미세먼지에 의한 신장 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0043] 일 구현예에서, 상기 비타민 D는 비타민 D3일 수 있다.

[0044] 일 구현예에서, 미세먼지는 평균 입경 2.5㎛ 이하의 초미세먼지($PM_{2.5}$)일 수 있다.

[0045] 일 구현예에서, 상기 신장 질환은 임신 또는 수유 중인 모체의 미세먼지 노출에 의해 모체 또는 이의 자손에서 발생한 신장 질환일 수 있으며, 만성 신장 질환, 급성 신장 손상, 신장 섬유증, 말기 신장 질환, 당뇨병성 신장 질환, 사구체 신염, 신우 신염, 간질성 신염, 루프스 신장염, 다낭성 신장 질환, 신부전증, 사구체 경화증, IgA 신장염, 고혈압성 신증, 비 당뇨병성 만성 신장 질환, 국소분절사구체경화증, 미세변화형 신증후군 또는 크산틴 옥시다아제 결핍증일 수 있다.

[0046] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물은 임신 또는 수유 동안 모체에 투여될 수 있다.

[0047] 일 구현예에서, 본 발명의 조성물을 임신 또는 수유 중인 모체에 조성물을 투여함으로써 임신 또는 수유 중인 모체의 미세먼지 노출에 의해 모체의 태아(fetal) 시기 또는 수유(lactation) 시기의 자손에서 발생한 신장 손상을 예방 또는 개선할 수 있다.

[0048] 본 발명의 조성물을 식품 조성물로 사용하는 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상의 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 상기 조성물은 유효성분 이외에 식품학적으로 허용가능한 식품보조첨가제를 포함할 수 있으며, 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0049] 본 발명에서 사용되는 용어 "식품보조첨가제"란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 건강기능식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의 예로는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충진

제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 사용되는 용어 "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 '기능성'이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 기술분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 통상의 기술분야에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 건강기능식품의 제형 또한 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 비타민을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다.

[0051] 또한, 본 발명의 조성물이 사용될 수 있는 건강식품의 종류에는 제한이 없다. 아울러 본 발명의 조성물은 당업자의 선택에 따라 건강기능식품에 함유될 수 있는 적절한 기타 보조 성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림 류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 추출물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다.

[0052] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 조성물을 인간을 제외한 동물 모체(dam)에 투여하는 단계를 포함하는, 미세먼지에 노출된 모체의 자손(offspring)에서 신장 손상을 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0053] 일 구현예에서, 임신 또는 수유 중인 모체에 투여하여 자손의 신장 손상을 예방 또는 치료할 수 있다.

[0054] 일 구현예에서, 상기 신장 손상은 임신 또는 수유 중인 모체가 미세먼지에 노출되어 자손에게서 발생한 신장 손상일 수 있다.

[0056] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0058] **실시예 1. 미세먼지 특징 분석 및 투여량 결정**

[0059] 1-1. 미세먼지 수집

[0060] 미세먼지(Particulate Matter, PM)를 모체에 처리하기 위해, 이를 수집하고 특징을 분석하였다. 구체적으로, $PM_{2.5}$에 대한 WHO기준 (일간 평균 25 μg/m^3 이상)을 넘는 날, 즉, 대기(ambient) $PM_{2.5}$가 38 μg/m^3인 2019년 12월 22일에 두 개의 필터에서 미세먼지 샘플을 수집하였다. 0.2μm 주사기 필터를 사용해 여과하여 $PM_{2.5}$ 샘플의 추출하였다.

[0062] 1-2. PM 노출량 결정

[0063] PM 노출량은, 미국 환경보호청(U.S. Environmental Protection Agency)의 평균 일간 투여량(average daily dose, ADD) 계산에서 채택한 하기 수학식 1을 사용해 결정하였으며, 일간 인간 노출량을 동물 실험에 적용하기 위해, 랫 모체에 노출하기 위한 샘플인 PM 현탁액의 투여량 및 농도를 결정하였다. 구체적으로, 평균적인 인간(60kg)의 일호흡량 및 호흡율은 (각각) 500 mL 및 14(회)/min이며, 23시간 동안의 호흡 부피는 9,660 L/일이고 (https://www.epa.gov/expobox/exposure-assessment-tools-routes), 공기 샘플러의 흡입 부피(suction volume) (inhalation flow)는 1,380,000 L/일 (1,000 L/분 × 23 시간)이다. 공기 샘플러가 1시간 유지하고 23시간 동안 공기 중의 입자를 수집하므로, 23시간 동안의 부피를 계산하면, 2일 동안 공기 샘플러에서 추출된 공기 흐름량(airflow mass)이 286일 동안 한 사람이 호흡한 부피에 해당한다 (1,380,000 L/일 ×2일 / 9,660 L/일 =286일). 하루에 수집된 두개의 필터를 50 mL 식염수 버퍼에 추출하였으므로, 0.175 mL 의 PM 현탁액이 일간 인간 노출량으로 가정되었다 (50 mL/286 일=0.175 mL/일). 따라서, PM 현탁액 70 uL을 랫 모체에 매일 1회

주기로 총 21회 투여하는 총량 1.47 mL이 인간이 8.4일 또는 201.6시간 동안 PM에 노출된 것과 동일한 조건인 것으로 결정되었다 (1.47 mL/0.175 mL/일=8.4일; 8.4 일×24시간/일=201.6시간).

수학식 1

[0064]

$$ADD\ (mg/kg{\cdot}day) = \frac{Cair \times InhR \times ET \times EF \times ED}{BW \times AT}$$

[0065] C_{air}: 공기중 오염물질(contaminant)의 농도 (mg/m3); InhR: 흡입률 (m^3/일); ET: 노출 시간 (시간/일); EF: 노출 빈도 (일/년); ED: 노출 기간 (년); BW: 체중 (kg); 및 AT: 평균 시간 (일).

[0067] 1-3. PM 분석

[0068] 상기 실시예에서 동물실험에 사용하기 위해 제작한 $PM_{2.5}$ 현탁액(suspension)의 WOSC(water soluble organic carbon) 및 무기 이온의 평균 농도를 한국기초과학지원연구원 서울센터에서 분석하였으며, 공기 샘플러의 흡입 부피 (inhalation flow)가 1,380,000 L/일 (1,000 L/min [유량] X 23 시간 [수집 시간])일 때 적용되는 이온 및 WSOC의 대기 농도를 도출하였다.

표 1

[0069]

Ion	Liquid phase concentration (ppm)	Atmospheric concentration ($\mu g/m^3$)	%
WSOC	406	5.33	14.4
NO_3^-	848	11.1	30.1
NH_4^+	472	6.20	16.8
Na^+	402	5.27	14.3
SO_4^{2-}	374	4.91	13.3
Cl-	112	1.47	3.98
Ca^{2+}	97.2	1.28	3.45
K^+	69.0	0.91	2.45
Mg^{2+}	28.1	0.37	1.0
F^-	6.19	0.08	0.22
Br^-	0.47	0.01	0.02
PO_4^{3-}	-	-	0.00

[0070] 그 결과, NO^{3-}가 가장 풍부한 이온으로 나타났고, NH_4^+, WSOC, Na^+ 및 SO_4^{2-} 등이 뒤를 이었다 (도 1 및 표 1).

[0072] **실시예 2. 모체의 미세먼지 노출에 의한 영향 분석**

[0073] 2-1. 체중 및 주요 수치 변화 분석

[0074] 9 마리의 임신 10일차 Sprague-Dawley 랫 (라온바이오, 용인, 한국)들을 표준 수용 조건인 온도 범위 22-25℃, 평균 습도 40-60%, 12 시간 빛/어둠 주기, 표준 연구실 먹이 및 물에 대한 자유로운 접근의 조건으로 유지하였다. 임신한 랫들을 대조군, $PM_{2.5}$ 투여군, 및 $PM_{2.5}$ 및 비타민 D 투여군 (각각 N=3)의 3 그룹으로 나누었고, 임신 21-22일차에 새끼(pup)들을 자연분만하도록 하였다. 각 그룹의 랫 모체의 임신 11일부터 수유 21일까지 식염수

(NS) (70 uL, 5 회/주), $PM_{2.5}$ 현탁액 (NS에 용해된 $PM_{2.5}$ 70 uL, 5 회/주), 또는 $PM_{2.5}$ (NS에 용해된 $PM_{2.5}$ 70 uL, 5 회/주) 및 비타민 D (Cholecalciferol, 1000 IU/kg, 3 회/주)를 입위관(orogastric tube)으로 투여하였다 (도 2). 자손들(offspring)을 아무런 개입 없이 유지하였으며 생후 21일에 이유(weaned)되었다. 모체의 소변 샘플을 수집하였으며, 각 그룹의 모체와 자손 (생후 21일)을 2% 이소플루란으로 마취하고 심장 천자를 사용해 혈액을 수집하였다. 혈액에서의 25(OH)D, Ca^{2+} 및 NGAL(neutrophil gelatinase-associated lipocalin) 농도 및 소변에서의 NGAL, 알부민(albumin) 및 크레아틴(creatinine) 농도를 25(OH)D ELISA kit (MyBioSource, San Diego, CA), calcium assay kit (colorimetric) (Abcam), rat NGAL ELISA kit (BioPorto, Needham, MA), rat albumin ELISA kit (MyBioSource) 및 creatinine parameter assay kit (R&D systems, Minneapolis, MN)로 측정하였으며, NGAL 및 알부민의 소변에서의 수준은 소변 크레아틴으로 조정되었다. 상기 기간 동안, 랫 모체 및 그들의 자손의 체중을 2 내지 3일마다 측정하였다.

표 2

[0075]

Parameter	Subject	Time	Control	$PM_{2.5}$	$PM_{2.5}$ + Vit D	*P* value
Weight (g)	Dam	Pregnancy day 11	289±8.00	284±25.0	289±16.4	NS
		Post-partum day 3	293±13.0	308±18.0	314±23.9	NS
		Post-partum day 21	279±8.29	286±13.5	313±14.3	NS
	Offspring	Postnatal day 3	8.69±0.12	9.28±0.13	8.79±0.15	NS
		Postnatal day 21	49.0±0.56	49.1±1.59	54.1±0.96	NS
Serum 25(OH)D (ng/mL)	Dam	Pregnancy day 11	56.1±3.39	55.5±2.47	52.6±1.17	NS
		Post-partum day 21	45.8±1.82	44.8±4.58	40.0±1.40	NS
	Offspring	Postnatal day 21	45.5±1.49	44.8±2.09	49.7±2.03	NS
Serum Ca^{2+} (mmol/L)	Dam	Pregnancy day 11	3.10±0.07	3.21±0.06	3.31±0.14	NS
		Post-partum day 21	3.10 ±0.04	3.34±0.20*	2.86±0.04	*$P < 0.05$ vs. PV
	Offspring	Postnatal day 21	3.08±0.05	2.93±0.04*	3.06±0.04	*$P < 0.05$ vs. control
Serum NGAL (ng/mL)	Dam	Pregnancy day 11	67.7±9.74	66.1±5.20	52.8±2.32	NS
		Post-partum day 21	206±34.2	232.5±43.0	162±11.1	NS
	Offspring	Postnatal day 21	35.2±6.16*	43.1±3.18	53.0±3.36	*$P < 0.05$ vs. PV
Urine NGAL (ng/mL)	Dam	Post-partum day 21	748±184	1,121±280	719±66.0	NS
Urine NGAL/Cr(ng/mg)	Dam	Post-partum day 21	0.0012 ± 0.0002	0.0035 ±0.0014	0.0044 ±0.0013	NS
Urine albumin (ug/mL)	Dam	Post-partum day 21	6.28±1.19*	6.00±0.92*	2.62±0.25	*$P < 0.05$ vs. PV
Urine albumin/Cr	Dam	Post-partum day 21	0.011±0.0018	0.013±0.001	0.013±0.002	NS

[0076] PM: particulate matter; Vit D: vitamin D; NGAL: neutrophil gelatinase-associated lipocalin; Cr: creatinine; NS: not significant.

[0077] 체중 변화를 관찰한 결과, 랫 모체(dams) 및 자손(pups)들은 산후 또는 출생후 21일에 그룹 간에서 유사하게 나

타났다 (도 3). 혈청 25(OH)D 수준 역시 그룹 간에 유사하게 나타났다 (도 4). 그러나, 모체의 $PM_{2.5}$ 노출에 의해 그의 자손에서 칼슘 수준이 대조군에 비해 감소된 것으로 나타났으며, 모체의 칼슘 농도는 $PM_{2.5}$ 및 비타민 D 투여군에 비해 $PM_{2.5}$ 투여군에서 더 높은 것으로 나타났고 (도 4). 소변의 NGAL 및 알부민은 그룹 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다 (표 2).

[0079] 2-2. 신장 조직 변화 분석

[0080] 임신 및 수유 중 모체의 미세먼지 노출과 비타민 D 처리에 따른 모체 및 자손의 신장 조직 변화를 분석하기 위해, 상기 실시예 2-1의 3 그룹에서 모체와 생후 21일의 수컷 자손 (각 n=5)을 희생시키고 신장을 적출하였다. 좌측 신장을 10% 포르말린 (다나 코리아, 인천, 한국)에 고정하고, 우측 신장은 다른 실험을 위해 액체 질소에 냉동하여 -80℃에 보관하였다. 고정된 신장 샘플들을 파라핀 임베딩하고 4 um 두께로 섹션하였다. 모체와 자손 (각 3마리)의 신장 구조를 헤마톡실린 및 에오신 염색으로 분석하였으며, 신장 당 무작위로 선택된 10개의 필드에서 이중 맹검 방법을 사용해 x200 배율에서 관찰된 사구체 손상(glomerular damage) 정도를 하기의 기준으로 0 내지 4점으로 점수매겼다: 0 = 사구체 손상 없음; 1 = 최대 25% 사구체 손상; 2 = 최대 50% 사구체 손상; 3 = 최대 75% 사구체 손상; 및 4 = 최대 100% 사구체 손상. 세뇨관 간질성(tubulointerstitial, T-I) 손상의 중증도는 모체 3마리 및 자손 5마리의 각 신장 섹션 당 피질의 무작위로 선택된 겹치지 않는 10개의 필드에서 맹검 방식으로 평가하였으며 (X200), 세뇨관 간질성 손상 (세뇨관 팽창(tubular dilation) 또는 위축(atrophy), 세뇨관 캐스트 형성(tubular cast formation), 세뇨관 세포 평평화(tubular cell flattening) 또는 액포화(vacuolization))을 하기의 기준으로 점수매겼다: 0 = 세뇨관 손상 없음; 1 = 최대 25% 세뇨관 손상; 2 = 최대 50% 세뇨관 손상; 3 = 최대 75% 세뇨관 손상; 및 4 = 75% 이상 세뇨관 손상. 모든 염색된 슬라이드들을 Pannoramic Scan II (3DHISTECH, Sysmex, Budapest, Hungary)을 사용해 디지털화하였으며 디지털화된 이미지에서 정성되었다 (CaseViewer, 3DHISTECH, version 2.2.0).

[0081] 분석 결과, 모체의 $PM_{2.5}$ 노출에 의해 모체와 자손 모두의 신장에서 사구체 및 세뇨관 기형을 유발했으며 (도 5a 내지 j), 조직학적 분석 결과, $PM_{2.5}$ 처리된 모체 및 자손에서 사구체 손상 및 세뇨관 간질성 손상을 나타냈다 (도 5d, e, i 및 j, 모두 $p < 0.05$). 특히, 사구체 간질 확장(Glomerular mesangial expansion), 세뇨관 캐스트 형성 또는 변성(tubular cast formation or degeneration), 및 간질성 변형(interstitial alterations)이 모체의 $PM_{2.5}$ 노출 후 모체 및 자손의 신장에서 명확하게 관찰되었다 (도 5b 및 g). 이러한 신장 조직의 변화들은 모체에 비타민 D 처리함에 따라 모체와 자손 모두에서 개선되었다 (도 5c 및 h).

[0083] **실시예 3. 신장 내 비타민 D 신호전달 변화 분석**

[0084] 임신 및 수유 중 모체의 미세먼지 노출과 비타민 D 처리에 따른 모체 및 자손의 신장에서의 비타민 D 신호전달의 변화를 확인하기 위해, 모체 및 이유기 자손의 신장 조직에서 VDR, Klotho, CYP27B1 및 CYP24A1의 단백질 발현을 웨스턴 블롯 및 IHC(Immunohistochemistry) 분석으로 확인하였다. 구체적으로, 상기 실시예에서 적출해 놓은 신장 조직을 조직분쇄기(OMNI International, Waterbury, CT)를 이용하여 T-PER™ Tissue Protein Extraction Reagent (Thermo Scientific, Rockford, IL) 및 Xpert Protease Inhibitor Cocktail Solution (100X) (GenDEPOT, Katy, TX)에서 파쇄하였다. BCA 분석으로 단백질 농도를 결정하여 동일한 양의 단백질 추출물 (20 μg)을 10% SDS-PAGE로 분리하였으며, 그 후 PVDF 멤브레인으로 트랜스퍼하였다 (ATTO, Tokyo, Japan). 맴브레인을 5% 탈지유로 상온에서 1시간 동안 블로킹한 뒤 VDR(vitamin D receptor) (Abcam, Cambridge, MA), klotho (Invitrogen, Carlsbad, CA), CYP(cytochrome P450 mixed-function oxidase)27B1 (Abcam) 및 CYP24A1 (Invitrogen)에 대한 1차 항체와 각각 4℃에서 밤새도록 인큐베이션하였다. 그 후, 2차 항체인 HRP-결합된 항-래빗 또는 항-마우스 IgG (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)와 함께 상온에서 2시간 동안 인큐베이션하고, ChemiDoc Touch Imaging System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 이용하여 웨스턴 블랏을 이미징하였다. 판별된 밴드의 강도는 덴시토메트리(densitometry) (Image Lab, Bio-Rad Laboratories)를 사용해 정량하였다. 각 단백질 밴드의 상대적 발현 비율은 각각의 로딩 대조군 (GAPDH, Santa Cruz)과 비교하여 확인하였다. 또한, IHC 분석을 위해, 대조군, $PM_{2.5}$ 투여군, 및 $PM_{2.5}$ 및 비타민 D 투여군에서 각각 3개의 신장 조직을 파라핀 섹션한 뒤, pH 8.0 버퍼를 사용해 항원 회수하였고, 슬라이드들을 Dako AutoStainer™ (Dako, Carpinteria, CA) 로 염색하였다. VDR (Santa Cruz), Klotho (Invitrogen) 및 CYP24A1 (Invitrogen)에 대한 1

차 항체를 사용하여 상온에서 40분 동안 인큐베이션하고 TBS로 5분씩 3회 세척하고 Novolink™ polymer detection system (RE7150-K)를 이용하여 IHC 분석을 수행하였다.

[0085] 그 결과, $PM_{2.5}$ 노출에 의해 모체 신장에서 VDR 및 Klotho의 발현이 증가되었으며, 이러한 상향조절(upregulations)은 비타민 D 처리에 의해 약화되는 것으로 나타났다 (도 6a 및 b). IHC 분석 결과에서도 VDR 및 Klotho의 상향조절이 PM에 노출된 모체 랫 신장의 세뇨관 세포(tubular cells) 및 일부 사구체에서 나타났으며, 이는 비타민 D 처리에 의해 감소되는 것으로 나타났다 (도 6e 내지 j). 모체에서의 CYP27B1 및 CYP24A1의 발현은 그룹 간 차이가 없었다 (도 6c 및 d). 반면, VDR 발현은 $PM_{2.5}$에 노출된 모체의 자손의 신장에서 현저히 억제되어 있었으며, 이는 비타민 D 처리에 의해 회복되었다 (도 7a 및 도 7e 내지 g). 신장 내의 CYP24A1 발현은 $PM_{2.5}$에 노출된 모체의 자손에서 상향조절되었으나, 이러한 변화는 모체 비타민 D 처리에 의해 유의미하게 감소되지는 않았다 (도 7d 및 도 7h-j). 또한, 자손의 신장에서 Klotho 및 CYP27B1 단백질 발현은 차이가 없었다 (도 7b 및 c).

[0087] **실시예 4. 신장 내 RAS 신호전달의 변화 분석**

[0088] 임신 및 수유 중 모체의 미세먼지 노출과 비타민 D 처리에 따른 자손의 신장에서의 RAS(renin-angiotensin system) 신호전달의 변화를 확인하기 위해, 모체 및 이유기 자손의 신장 조직에서 Renin, ACE(angiotensin-converting enzyme) 및 AT1(angiotensin receptor-1)의 단백질 발현을 웨스턴 블롯 및 IHC 분석으로 확인하였다. 이 때, 웨스턴 블롯 분석에는 renin (Santa Cruz biotechnology, Santa Cruz, CA), ACE (Invitrogen) 및 AT1 (Invitrogen)에 대한 1차 항체를 사용하였으며, IHC 분석에는 renin (Santa Cruz) 및 ACE (Invitrogen)에 대한 1차 항체를 사용하였다.

[0089] 그 결과, 모체가 $PM_{2.5}$에 노출된 후 신장 내 Renin 수준이 모체 (도 8a 및 도 8d 내지 i) 및 자손 (도 9a 및 도 9d 내지 f) 모두에서 억제되었다. 또한, ACE 및 AT1의 발현은 모체군 간에 차이가 없었으나 (도 8b 및 c), $PM_{2.5}$ 투여군의 자손에서 ACE 발현이 현저히 감소되었으며, 이는 비타민 D 처리에 의해 회복되는 것으로 나타났다 (도 9b 및 도 9g 내지 i). AT1 발현은 자손 그룹에서 유의미한 차이가 없었다 (도 9c).

[0091] **실시예 5. 신장 염증 및 산화 손상 분석**

[0092] 임신 및 수유 중 모체의 미세먼지 노출과 비타민 D 처리에 따른 자손의 신장 염증 및 산화 손상(oxidative damage)에 대한 효과를 확인하기 위해, 모체 및 이유기 자손의 신장 조직에서 Nrf2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2), NF-κB(nuclear factor-kB) p50 및 TNF(tumor necrosis factor)-α의 단백질 발현을 웨스턴 블롯 및 IHC 분석으로 확인하였다. 이 때, 웨스턴 블롯 분석에는 Nrf2 (Abcam), NF-κB p50 (Santa Cruz) 및 TNF-α (Invitrogen)에 대한 1차 항체를 사용하였으며, IHC 분석에는 Nrf2 (Novus, Centennial, CO), NF-κB p50 (Santa Cruz) 및 TNF-α (Invitrogen)에 대한 1차 항체를 사용하였다.

[0093] 그 결과, 모체의 $PM_{2.5}$ 노출에 의해 모체 및 자손의 신장 모두에서 Nrf2 및 NF-kB p50의 단백질 수준이 감소되었으며, 모체 신장에서 TNF-α 발현이 증가하였다 (도 10 및 도 11). 또한, 모체의 $PM_{2.5}$ 노출에 의해 모체 (도 10a 및 b) 및 자손 (도 11a 및 b) 모두에서 대조군에 비해 신장 내 Nrf2 및 NF-kB p50의 발현이 하향조절되었다. Nrf2 및 NF-kB p50 발현은 주로 대조군 신장의 세뇨관 세포(tubular cells)에서 높았으나 $PM_{2.5}$-노출 군에서는 약하게 감지되었다. 또한, 모체의 비타민 D 섭취에 의해 모체 (도 10a 및 도 10d 내지 f) 및 자손 (도 11a 및 도 11d 내지 f)의 신장 모두에서 Nrf2 발현이 유의미하게 변화하지는 않았으나, 자손의 신장에서 감소된 NF-kB p50 발현은 회복시켰다 (도 11b 및 도 11g 내지 i). $PM_{2.5}$ 노출에 의해 모체 신장에서 TNF-α의 발현이 증가되었으나, 이는 비타민 D에 의해 다시 원래 수준으로 감소되었다 (도 10c 및 도 10j 내지 l). 또한, 모체의 $PM_{2.5}$ 노출은 자손의 신장에서 TNF-α 발현에 영향을 주지 않았다 (도 11c).

[0095] **실시예 6. 신장에서의 대식세포 연관 염증 분석**

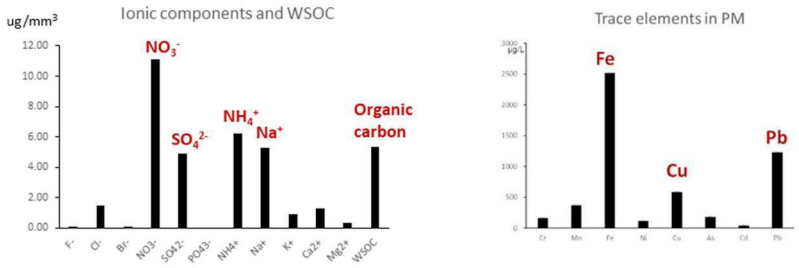
[0096] 임신 및 수유 중 모체의 미세먼지 노출과 비타민 D 처리에 따른 자손의 신장 피질의 단핵구(monocyte)/대식세포

(macrophage)의 침윤(infiltration)을 확인하기 위해, 모체 및 자손의 신장 조직에서 대식세포 계통의 세포와 연관된 염증의 마커로 널리 사용되는 CD68의 발현을 IHC 분석으로 확인하였다.

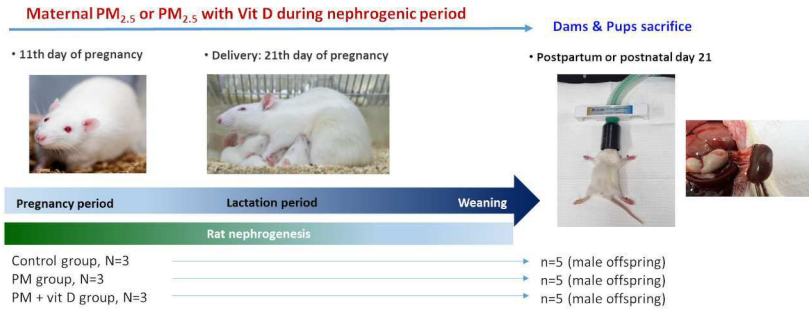
[0097] 그 결과, 모체의 $PM_{2.5}$ 노출에 의해 모체 및 자손 모두에서 CD68-양성 세포수가 현저히 증가되었으며, CD68-양성 대식세포들은 주로 세뇨관간질(tubulointerstitium), 사구체 간질(glomerular mesangium) 및 손상된 혈관 영역의 세포질에서 발현되는 것으로 나타난 반면 (도 12), 이와 같은 대식세포의 침윤이 비타민 D 투여에 의해 현저히 감소되는 것으로 나타났다.

도면

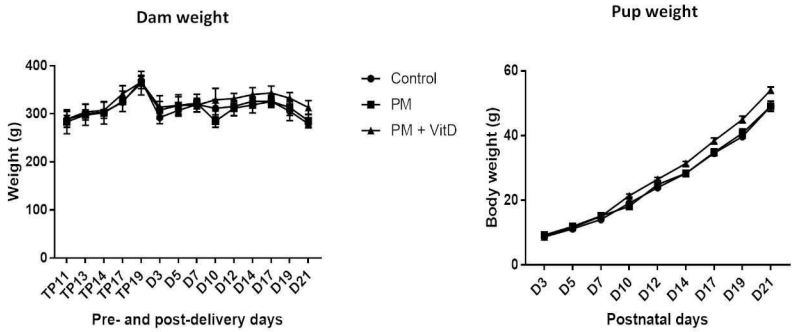
도면1



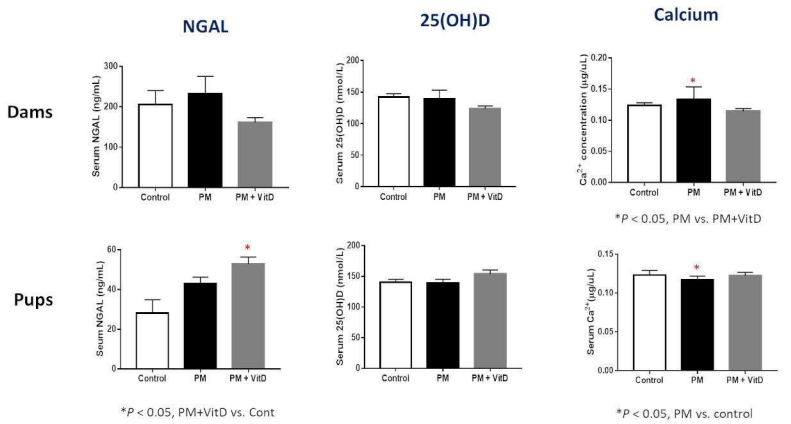
도면2



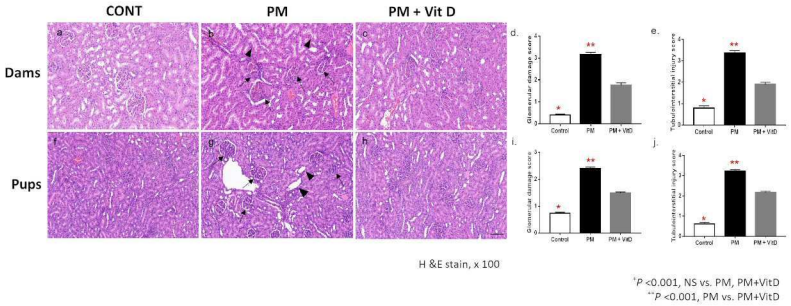
도면3



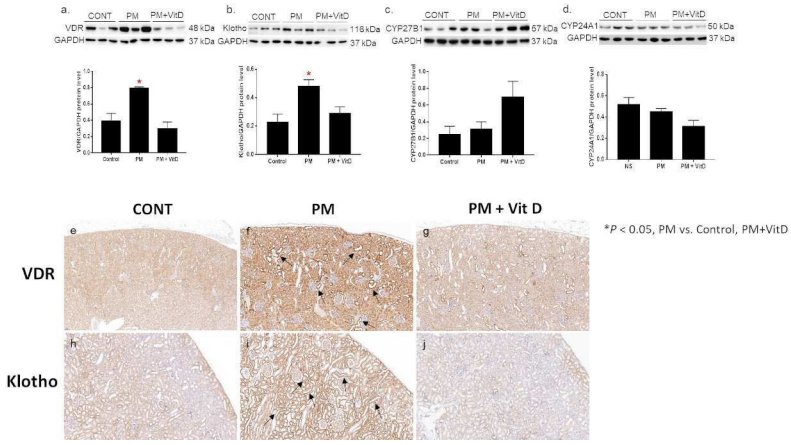
도면4


NGAL
25(OH)D
Calcium
Dams
Pups
Control
PM
PM + VitD
*P < 0.05, PM vs. PM+VitD
*P < 0.05, PM+VitD vs. Cont
*P < 0.05, PM vs. control

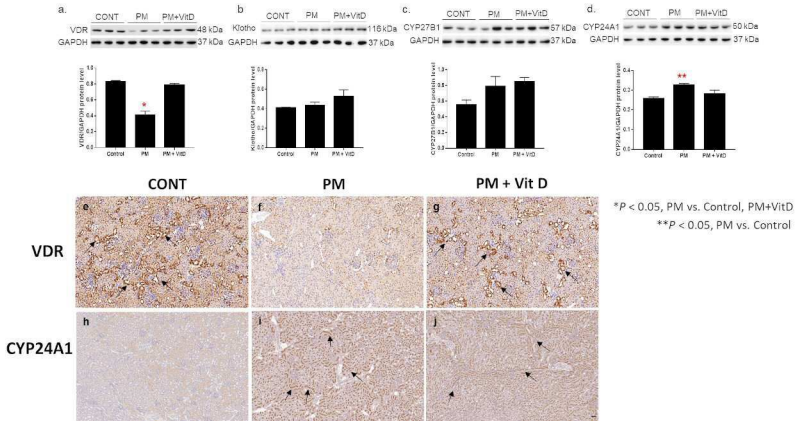
도면5


CONT
PM
PM + Vit D
Dams
Pups
H &E stain, x 100
*P <0.001, NS vs. PM, PM+VitD
**P <0.001, PM vs. PM+VitD

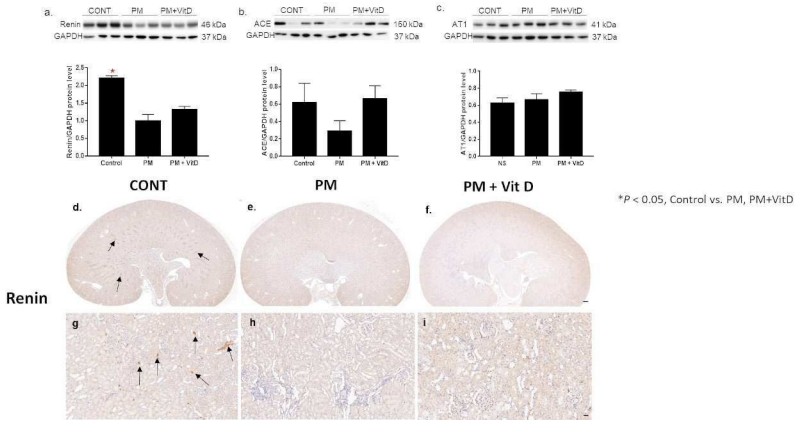
도면6


CONT
PM
PM+VitD
VDR
Klotho
CYP27B1
CYP24A1
GAPDH
CONT
PM
PM + Vit D
VDR
Klotho
*P < 0.05, PM vs. Control, PM+VitD

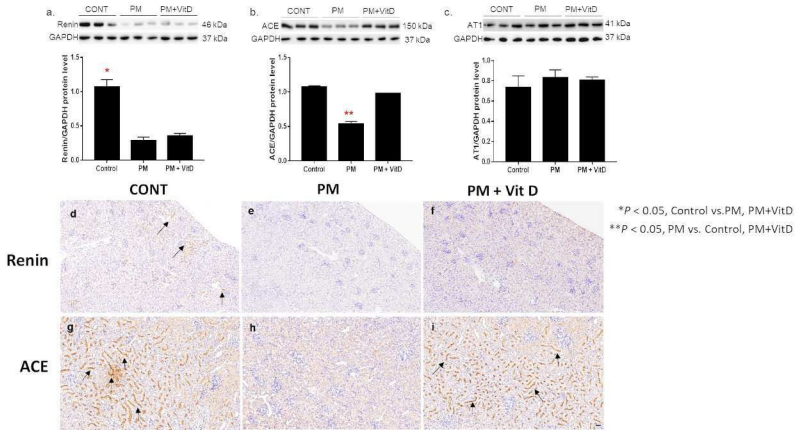
도면7


CONT
PM
PM + Vit D
VDR
CYP24A1
*P < 0.05, PM vs. Control, PM+VitD
**P < 0.05, PM vs. Control

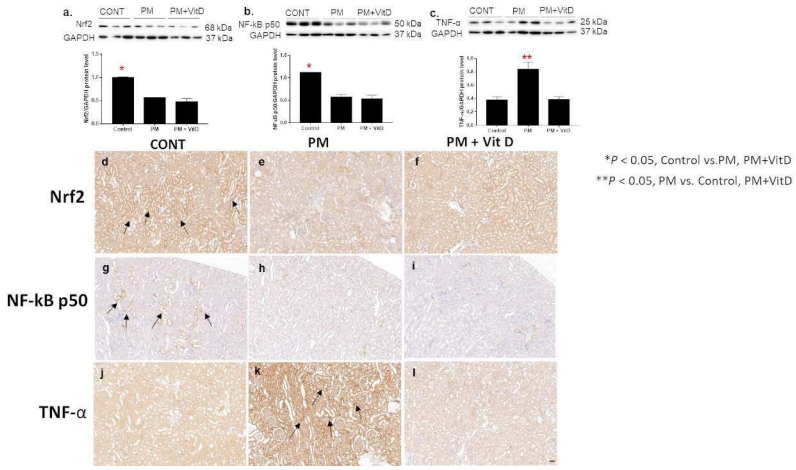
도면8


CONT
PM
PM + Vit D
Renin
*P < 0.05, Control vs. PM, PM+VitD

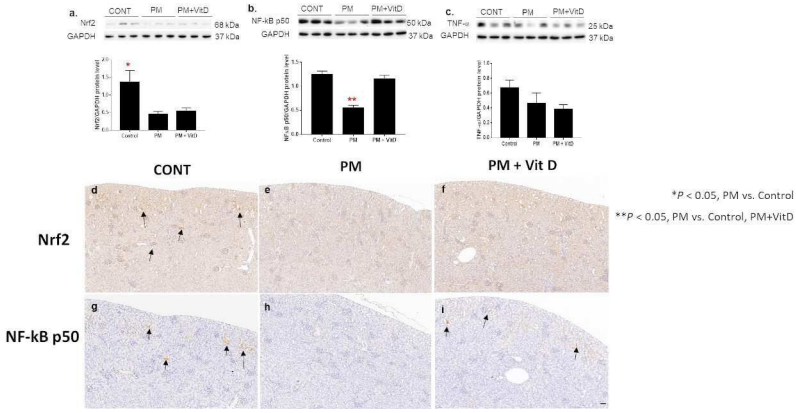
도면9


CONT
PM
PM + Vit D
Renin
ACE
*P < 0.05, Control vs.PM, PM+VitD
**P < 0.05, PM vs. Control, PM+VitD

도면10



도면11



도면12

