(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0075449
(43) 공개일자 2009년07월08일

(51) Int. Cl.
A61K 31/165 (2006.01) *A61K 31/16* (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0001305
(22) 출원일자 2008년01월04일
심사청구일자 2008년01월04일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산 남구 무거2동 산29
(72) 발명자
유리나
울산 남구 무거동 931-1 협성현대아파트 401호
강지혜
울산 동구 전하1동 544-224번지
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 신규한 항비만 약제와 비만-유도 염증 관련 당뇨병 및심혈관계 질환 치료제

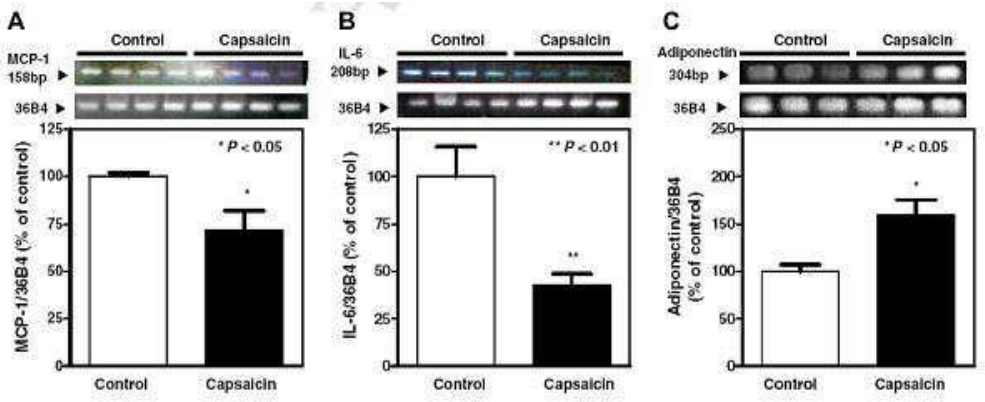
(57) 요 약

본 발명은 비만, 비만으로 유도된 염증 및 합병증 관련 당뇨병 및 심혈관계 질환 치료제로의 캡사이신 및 디하이드로캡사이신의 용도, 치료제, 기능성 식품 또는 건강 식품, 치료 또는 예방하는 방법을 개시한다.

본 발명은 캡사이신 및/또는 디하이드로캡사이신은 아디포넥틴 유전자의 발현과 단백질 분비를 증가시키는데 반해, 비만 지방 조직 및 분리된 지방세포로부터 IL-6 및 MCP-1 유전자의 발현과 단백질 분비를 감소시키고, 캡사이신 및/또는 디하이드로캡사이신은 비만 장간막 지방 조직배양액 혹은 MCP-1에 의해 유도된 대식세포 이동을 억제하고, 대식세포의 활성을 억제하여 염증전구 매개인자 분비를 억제할 수 있음을 규명하고 있다.

본 발명에 따르면, 비만 지방질 조직으로부터 아디포카인 생성의 조절이상 및 조직내 대식세포 이동을 개선시킬 수 있음을 입증하여 의약품으로서 투여할 수 있으며, 건강 식품 (기능성 식품 또는 건강기능성 식품) 형태로도 제공할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

김추숙

울산 남구 신정2동 문수로 아이파크 105동 801호

한인섭

울산 남구 무거2동 울산대학교 생명과학부

가와다 테루오

일본 우지시 쿄토대학 우지 캠퍼스 식품생명공학과

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R01-2005-000-10408-0

부처명 한국과학재단

연구사업명 특정기초연구

연구과제명 비만시 복부/내장지방조직의 adipocytokine 유전자 발현특성 및 분비 단백질 기능제어를 위한 식이성분capsaicinoids의 분자세포영양학적 연구:-복부/내장형비만및 관련대사질환 제어를 위한 새로운 전략-

주관기관 울산대학교

연구기간 2005년 03월~2008년 02월

특허청구의 범위

청구항 1

비만, 비만으로 유도된 염증 및 합병증 관련 당뇨병 및 심혈관계 질환 치료제로의 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신의 용도

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신은 포유동물의 비만 지방질 조직 및 분리된 지방세포로부터 아디포카인 또는 아디포사이토카인의 생성 조절을 통하여 비만으로 유도된 염증과 합병증을 개선시키는 작용을 수행하는 것을 특징으로 하는 용도

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 포유동물은 인간을 제외한 것을 특징으로 하는 용도

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 아디포카인 또는 아디포사이토카인은 IL-6, TNF-α, MCP-1, COX-2, 및 아디포넥틴이며, 상기 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신의 PPAR gamma에 대한 리간드 작용에 의해 제4항의 아디포카인 또는 아디포사이토카인 중 비만 지방 조직 및 분리된 지방세포로부터 방출된 IL-6, TNF-α 및 MCP-1, COX-2의 발현을 억제하고, 아디포넥틴의 분비를 증가시키는 작용을 수행하는 것을 특징으로 하는 용도

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신은 지방세포내에서 NF-kB 경로를 불활성화시키고 비만 지방 조직내 대식세포 이동을 억제시켜 대식세포의 염증 반응을 개선시키는 작용을 수행하는 것을 특징으로 용도

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 활성화는 장간막 지방 조직 배양액에 의해 유도된 염증전구 매개인자인 질소 산화물, TNF-α, MCP-1의 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 용도

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신은 대식세포 활성을 억제하는 작용을 수행하는 것을 특징으로 하는 용도

청구항 8

비만, 비만으로 유도된 염증 및 합병증 관련 당뇨병 및 심혈관계 질환 치료제에 있어서,

상기 치료제는 캡사이신 및/또는 디하이드로캡사이신을 유효성분으로 함유하여 포유동물의 비만 지방질 조직 및 분리된 지방세포로부터 아디포카인 또는 아디포사이토카인의 생성 조절을 통하여 비만으로 유도된 염증과 합병증을 개선시키는 것을 특징으로 하는 비만, 비만으로 유도된 염증 및 합병증 관련 당뇨병 및 심혈관계 질환 치료제

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 아디포카인 및/또는 아디포사이토카인은 IL-6, TNF-α, MCP-1, COX-2, 및 아디포넥틴인 것을 특징으로 하는 치료제

청구항 10

제8항에 있어서, 퍼옥시좀-증식 활성화된 수용체 감마(PPAR gamma) 항진제를 유효 성분으로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 치료제

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 퍼옥시좀-증식 활성화된 수용체 감마(PPAR gamma) 항진제로는 트로글리타존, 피오글리타존, 로지글리타존으로 이루어진 티아졸린디온계로부터 선택된 1종 이상을 사용하는 것을 특징으로 하는 치료제

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 캡사이신 및/또는 디하이드로캡사이신과 퍼옥시좀-증식 활성화된 수용체 감마 항진제는 치료제의 전체 부피 기준으로 1~5:1 부피비로 사용하는 것을 특징으로 하는 치료제

청구항 13

제8항 내지 제12항중 어느 한항에 있어서, 상기 치료제는 인간을 제외한 포유동물의 생체에 2-6 mg/kg 범위내로 투여되는 것을 특징으로 하는 치료제

청구항 14

비만 및 비만-유도 염증과 관련된 당뇨병과 심장혈관질환의 개선 기능을 부여한 기능성 식품 또는 건강 식품에 있어서,

상기 식품은 캡사이신 및/또는 디하이드로캡사이신을 유효성분으로 함유하여 포유동물의 비만 지방질 조직 및 분리된 지방세포로부터 아디포카인 또는 아디포사이토카인의 생성 조절을 통하여 비만으로 유도된 염증과 합병증을 개선시키는 것을 특징으로 하는 비만 및 비만-유도 염증과 관련된 당뇨병과 심장혈관질환의 개선 기능을 부여한 기능성 식품 또는 건강 식품

청구항 15

캡사이신 및/또는 디하이드로캡사이신을 비만 및 비만-유도 염증과 관련된 당뇨병과 심장혈관질환의 치료 또는 예방이 필요한 대상에게 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 비만 및 비만-유도 염증과 관련된 당뇨병과 심장혈관질환을 치료 또는 예방하는 방법

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 투여 유효량은 2-6 mg/kg 범위내인 것을 특징으로 하는 방법

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 비만, 비만으로 유도된 염증 및 합병증 관련 당뇨병 및 심혈관계 질환 치료제로의 캡사이신 및 디하이드로캡사이신의 용도, 치료제, 비만 및 비만-유도 염증과 관련된 당뇨병과 심장혈관질환의 개선 기능을 부여한 기능성 식품 또는 건강 식품, 비만 및 비만-유도 염증과 관련된 당뇨병과 심장혈관질환을 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 비만은 만성 염증 상태로 특징지어지며, 비만-유도 염증은 타입 II 당뇨병 및 심혈관 질환계과 같은 비만-관련 질환발생과 밀접하게 연관있는 것으로 여겨진다. 지방 조직 혹은 지방세포로부터 분비된 생물학적 활성 분자인 아디포카인 (또는 아디포사이토카인)은 식욕조절, 인슐린 민감성, 에너지 대사 및 혈관 미세환경 제어에 주된 역할을 수행한다. 아디포카인중 가운데, 종양 괴사 인자-α (TNF-α), 인터루킨-6 (IL-6, MCP-1(단핵세포 주화성 단백질) 및 아디포넥틴 등은 비만-유도 염증과 비만-관련 질환 발생과 밀접하게 관련되어 있다. TNF-α, IL-6 및 MCP-1의 혈중 레벨과 C-반응성 단백질과 같은 염증 마커의 레벨이 양의 상관성을 나타내는 반면, 항염증성 인자, 아디포넥틴은 이들과 역상관 관계를 나타낸다.

<3> 아디포카인 분비조절 이상은 비만내 관찰되는 만성 염증 상태를 유도하고, 비만-관련 질병의 발생을 촉진할 수 있다. 예를 들면, TNF-α와 IL-6는 인슐린-민감성 글루코스 운반체 4 발현 및 인슐린 수용체 기질-1의 인산화를 감소시켜 인슐린 신호전달을 저해한다. MCP-1은 인슐린으로 자극에 따른 글루코스의 지방세포내로 유입과 지방형성에 관여하는 유전자의 발현을 저해한다. MCP-1-결핍 마우스에서는 동맥경화 병변 발생이 억제되고, 인슐린

민감성이 개선된다.

<4>

<5> 최근의 연구 결과, 지방조직에서 유래한 MCP-1은 지방조직내로 대식세포의 이주를 유도하였고 이에 따라 지방조직내 염증 반응을 증폭시켰다. 이에 반해, 아디포넥틴은 골격 근육내 인슐린 수용체 기질-1의 발현을 증가하여 인슐린 민감성을 향상시키고, 혈관 내피 세포내 부착성 분자의 발현을 억제하고, 혈관 내벽 단핵세포/대식세포-유래 거품세포의 축적을 방해하여 동맥경화 병변과정을 저해한다.

<6> 이 같은 발견은 아디포카인 분비 조절이상이 비만성 질환의 진행에 중요한 역할을 하고; 따라서 이 같은 아디포카인 분비 조절은 비만-유도 염증 뿐 아니라 비만성 질환의 진행을 제어하는데 유용한 타켓임을 제시한다.

<7> 식물생리활성 물질(phytochemical)을 포함한 항염증제는 류마티즘, 천식, 동맥경화, type II 당뇨병 및 암과 같은 만성 염증 상태의 예방 혹은 치료에 효과적임이 밝혀져 있다. 그러나, 항염증성 생리활성 물질(phytochemical) 이 비만으로 유도된 염증을 제어할 수 있는지에 대하여는 알려져 있지 않다.

<8> 캡사이신은 카르기난(carrageenan)으로 유도된 염증과 어주번트(adjuvant)로 유도된 관절염 뿐 아니라 염증성 매개자의 분비 저해를 통해 에탄올로 유도된 염증의 발생을 억제한다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<9> 이에 본 발명자들은 캡사이신의 항염증 활성이 비만으로 유도된 염증을 개선시킬 수 있을 것이라는데 착안하고 연구를 계속한 결과, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

<10>

<11> 즉, 본 발명의 목적은 캡사이신의 항비만약 및 비만으로 유도된 염증과 당뇨병, 심혈관질환 치료제로의 용도를 입증하려는데 있다.

<12> 본 발명의 다른 목적은 캡사이신을 유효 성분으로 하는 항비만약 및 비만으로 유도된 염증과 당뇨병, 심혈관질환의 치료약 및 기능성, 건강식품, 건강기능성 식품을 제공하려는데 있다.

<13> 본 발명의 다른 목적은 캡사이신을 유효 성분으로 하는 비만, 비만으로 유도 염증과 당뇨병, 심혈관질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공하려는데 있다.

과제 해결수단

<14> 본 발명의 일 견지에 따르면,

<15> 비만, 비만으로 유도된 염증 및 합병증 관련 당뇨병 및 심혈관계 질환 치료제로의 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신의 용도를 제공한다.

<16> 본 발명의 제2 견지에 따르면,

<17> 비만, 비만으로 유도된 염증 및 합병증 관련 당뇨병 및 심혈관계 질환 치료제에 있어서,

<18> 상기 치료제는 캡사이신 및/또는 디하이드로캡사이신을 유효성분으로 함유하여 포유동물의 비만 지방질 조직 및 분리된 지방세포로부터 아디포카인 또는 아디포사이토카인의 생성 조절을 통하여 비만으로 유도된 염증과 합병증을 개선시키는 것을 특징으로 하는 비만, 비만으로 유도된 염증 및 합병증 관련 당뇨병 및 심혈관계 질환 치료제를 제공한다. 참고로, 고추의 매운맛 성분중 80-90%가 캡사이신과 디히드로캡사이신에 해당되고, 캡사이신/디히드로캡사이신은 46~77/21~40% 정도의 비율로 포함되어 있는 것으로 알려져 있으며, 본 발명자들이 *in vitro* 실험결과에 따르면 동일농도에서의 효과를 비교하는 경우 디히드로캡사이신이 항염증 효능이 더 우수한 것을 확인하였다.

<19> 본 발명의 제3 견지에 따르면,

<20> 비만 및 비만-유도 염증과 관련된 당뇨병과 심장혈관질환의 개선 기능을 부여한 기능성 식품 또는 건강 식품에 있어서,

<21> 상기 식품은 캡사이신 및 디하이드로캡사이신으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유

하여 포유동물의 비만 지방질 조직 및 분리된 지방세포로부터 아디포카인 또는 아디포사이토카인의 생성 조절을 통하여 비만으로 유도된 염증과 합병증을 개선시키는 것을 특징으로 하는 비만 및 비만-유도 염증과 관련된 당뇨병과 심장혈관질환의 개선 기능을 부여한 기능성 식품 또는 건강 식품을 제공한다.

<22> 본 발명의 제4 견지에 따르면,

<23> 캡사이신 및 디하이드로캡사이신으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상을 비만 및 비만-유도 염증과 관련된 당뇨병과 심장혈관질환의 치료 또는 예방이 필요한 대상에게 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 비만 및 비만-유도 염증과 관련된 당뇨병과 심장혈관질환을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다.

<24> 이하, 본 발명에 대하여 상세하게 설명한다.

<25> 우선, 본 발명에서는 비만, 비만으로 유도된 염증 및 합병증 관련 당뇨병 및 심혈관계 질환 치료제로의 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신의 용도를 개시한다. 상기 비만으로 유도된 염증과 관련있는 질환으로는 타입 II 당뇨병 및 심혈관계 질환 등을 들 수 있다.

<26> 이때 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신은 포유동물의 비만 지방질 조직 및 분리된 지방세포로부터 아디포카인 또는 아디포사이토카인의 생성 조절을 통하여 비만으로 유도된 염증과 합병증을 개선시키는 작용을 수행한다.

<27> 구체적으로, 상기 아디포카인 또는 아디포사이토카인은 비만으로 유도된 염증과 비만-관련 질병과 강하게 연관있는 인터루킨-6 (IL-6), MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1:단핵구 주화성 단백질), COX-2, 및 아디포넥틴, 종양 괴사 인자-α (TNF-α) 을 대상으로 한다. 즉, 본 발명에서는 상기 비만 지방 조직 및 분리된 지방세포로부터 분비된 IL-6, TNF-α 및 MCP-1, COX-2의 발현을 억제하고, 비만 지방 조직 및 지방 세포로부터 분비된 아디포넥틴의 발현을 증가시키는 이중 작용을 수행하게 되는데, 이 같은 이중 작용은 PPAR gamma에 대한 캡사이신의 리간드 작용에 의한 것이다. 이같은 캡사이신의 작용은 인슐린 저항성 혹은 동맥경화에서 염증전구 물질 및 항염증 아디포카인간 조절의 정상화를 통하여 아디포카인 분비의 조절이상을 향상시키는데 있어 유리하다.

<28> 본 명세서에서 용어 「포유동물」은 인간을 제외한 동물을 의미하는 것으로 사용한다. 또한, 상기 포유동물에 대한 유효 투여량은 2mg/kg/체중으로 사용하면 염증성 매개자 생성 억제 효과를 극대화하는 측면에서 바람직하다.

<29> 또한, 상기 캡사이신은 비만 지방 조직내 대식세포 이주를 억제시켜 대식세포의 염증 반응을 개선시킨다. 상기 대식세포내에서 캡사이신은 NF-kB 경로의 비활성화를 통해, 장간막 지방 조직 배앵액에 의해 유도된 염증전 매개인자 생성을 감소시킨다. 이때 장간막 지방 조직 배양액은 대식세포를 자극하여 질소 산화물, TNF-α, MCP-1 생성을 유도하는 것을 특징으로 한다.

<30> 또한, 상기 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신은 대식세포내에서 NF-kB 경로를 통해 활성화되어 비만 지방 조직내 대식세포 이동을 증가시켜 대식세포의 염증 반응을 개선시키는 작용을 수행하며, 구체적으로 상기 활성화는 질소 산화물, TNF-α, MCP-1의 장간막 지방 조직 배양액에 의해 유도된 염증전구 매개인자를 생성시키는 것을 특징으로 한다.

<31> 나아가, 상기 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신은 대식세포 활성을 억제하는 작용을 수행하는 것을 특징으로 한다.

<32>

<33> 한편, 본 발명에서는 비만, 비만으로 유도된 염증 및 합병증 관련 당뇨병 및 심혈관계 질환 치료제로서, 캡사이신 및 디하이드로캡사이신으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하여 포유동물의 비만 지방질 조직 및 분리된 지방세포로부터 아디포카인 또는 아디포사이토카인의 생성 조절을 통하여 비만으로 유도된 염증과 합병증을 개선시키는 것을 개시한다.

<34> 이때 상기 아디포카인 또는 아디포사이토카인은 IL-6, TNF-α, MCP-1, COX-2, 및 아디포넥틴인 것을 특징으로 한다.

<35> 나아가, 퍼옥시좀-증식 활성화된 수용체 감마(PPAR gamma) 항진제를 유효 성분으로 더 포함하면 상승 작용을 수행할 수 있어 더욱 바람직하다. 이때 퍼옥시좀-증식 활성화된 수용체 감마(PPAR gamma) 항진제로는 트로글리타존, 피오글리타존, 로지글리타존으로 이루어진 티아졸린디온계로부터 선택된 1종 이상을 사용하며, 상기 캡사이신 및/또는 디하이드로캡사이신과 상기 리간드간 배합비는 특히 한정하는 것은 아니나 약 1~5:1 몰비로 사용하

면 염증성 매개자 생성 억제 효과를 극대화하는 측면에서 볼 때 바람직하다. 또한, 이같이 하여 얻어진 치료제는 인간을 제외한 포유동물의 생체에 2-6 mg/kg 범위내로 투여되면 충분하다.

<36> 또한, 본 명세서에 있어서의 「비만 치료제」에는 비만 환자의 치료를 위해 사용하는 약제 및 비만 경향이 있는 대상에게 예방적으로 사용하는 약제가 모두 포함된다. 또한, 본 명세서에 있어서의 「당뇨병 치료제」에는 당뇨병 환자의 치료를 위해 사용하는 약제 및 당뇨병 경향이 있는 대상에게 예방적으로 사용하는 약제가 둘다 포함된다. 또한, 본 명세서에 있어서의 「심장혈관 질환 치료제」에는 심장혈관 질환있는 환자의 치료를 위해 사용하는 약제 및 심장혈관 질환이 있는 대상에게 예방적으로 사용하는 약제가 둘다 포함된다.

<37> 본 발명의 치료제 투여 방법으로는 예를 들면 정제, 환제, 캡슐제, 과립제, 세립제, 산제 또는 경구 용액제등에 의한 경구 투여, 또는 정맥 주사 또는 근육 주사 등의 주사제, 좌제, 경피 투여제, 또는 경점막 투여제 등에 의한 비경구 투여를 들 수 있다.

<38> 상기 캡사이신 (또는 디하이드로캡사이신) 단독 혹은 PPAR gamma과의 배합을 유효 성분으로 하는 제제는 제제화에 통상적으로 이용되는 약리학상 허용되는 담체나 부형제, 그 밖의 첨가제를 이용하여 의약 조성물로서 제조될 수 있다.

<39> 비경구 투여를 위한 주사제로서는 무균의 수성 또는 비수성의 용액제, 현탁제 또는 유탁제를 포함한다. 수용성 용액제나 현탁제에는 희석제로서 예를 들면 주사용 증류수 또는 생리용 식염수 등이 포함된다. 비수용성 용액제 또는 현탁제의 희석제로서는 예를 들면 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브유와 같은 식물유, 에탄올과 같은 알코올류 또는 폴리소르베이트 80 등을 포함한다. 상기 조성물은 습윤제, 유화제, 분산제, 안정화제, 용해 또는 용해 보조제, 또는 방부제 등을 더 포함할 수 있다. 조성물은, 예를 들면 박테리아 보류 필터를 통과시키는 여과, 살균제의 배합 또는 조사에 의해서 무균화된다. 또한, 무균의 고체 조성물을 제조하여 사용시에 무균수 그 밖의 무균용 주사용 매개인자에 용해시켜 사용할 수도 있다.

<40> 본 발명의 치료제에는 비만, 비만으로 유도된 염증 관련 당뇨병 및/또는 심혈관 질환의 치료 또는 예방에 있어서 의도되는 효과를 발휘하는데 충분한, 즉 치료적 유효량 또는 약리학적 유효량의 캡사이신 단독 혹은 PPAR gamma과의 배합물이 포함된다. 실제 투여에 있어서의 유효량의 확인은 예를 들면 표적 질환의 회복 정도를 측정함으로써 행할 수 있다. 실제로 투여되어야 되는 양은 처치되는 개체의 증상, 연령, 체중 등의 다양한 요인에 의존하고, 바람직하게는 원하는 효과가 현저한 부작용을 수반하지 않고 발휘되는 양이 결정되어 투여된다. 이러한 유효량 또한 독성 등에 대하여는 당업자라면 공지된 모델 동물을 이용하여 용이하게 결정할 수 있다. 예를 들면, 통상적으로 성인에 있어서 유효 성분의 양이 1 일 1~200 ㎍, 더욱 바람직하게는 1 일 1 ㎍ 내지 200 mg 이다.

<41> 상기 비만, 혹은 비만으로 유도된 염증 관련 당뇨병 치료제 또는 심혈관 질환 치료제는 직접 체내로 도입을 행하는 생체내(in vivo)법에 의해서 투여할 수 있다. 상기 생체내 투여를 위한 제제 형태로서는 주사나 점적에 사용할 수 있는 액제를 들 수 있다.

<42> 액제의 제조는 구체적으로는, 예를 들면 인산 완충 생리 식염수(PBS) 등의 완충액, 생리 식염수 또는 멸균수 등의 용제에 용해시킨 후, 필요에 따라서 필터 여과 등에 의해 멸균하여 무균적인 용기에 충전한다. 필요에 따라서 현탁제, 동결제 또는 원심 분리 농축 동결제 등의 형태로 할 수도 있다.

<43> 또한, 상기 캡사이신 및/또는 디하이드로캡사이신은 예를 들면 지방, 지방유, 라놀린, 바셀린, 왁스, 유동 파라핀, 경고제, 플라스틱, 글루콜류, 고급 알코올, 수지, 글리세린, 유화제 또는 현탁제를 포함하는 반고형의 연고로서 환부에 국소 투여할 수 있다. 이러한 연고는 필요에 따라서 친수성 중합체와 혼합하여 시트상으로 성형하여 환부에 대하여 접착시켜 이용할 수도 있다.

<44> 상기 캡사이신 및/또는 디하이드로캡사이신을 포함하는 항비만약, 당뇨병 치료약 또는 고지혈증 치료약의 투여는 질환의 종류, 증상에 따른 적당한 방법·부위를 선택하여 행해진다. 투여 방법으로서는 비경구 투여가 바람직하다. 구체적으로는, 예를 들면 피하, 피내, 혈관내, 근육내 및 연고 등에 의한 표층으로의 투여가 가능하다. 피하, 피내, 혈관, 근육 등으로의 투여는 주사나 카테터 등에 의해 행할 수 있다.

<45> 본 발명의 치료제에는 비만, 당뇨병 및/또는 고지혈증의 치료 또는 예방에 있어서 의도되는 효과를 발휘하는 데 충분한, 즉 치료적 유효량 또는 약리학적 유효량의 상기 캡사이신 및/또는 디하이드로캡사이신 혹은 PPAR gamma와의 배합이 포함된다. 실제 투여에 있어 유효량의 확인은 예를 들면 표적 질환의 회복 정도를 측정함으로써 행할 수 있다. 실제로 투여되어야 하는 양은 처치되는 개체의 증상, 연령, 체중 등의 다양한 요인에 의존하고, 바람직하게는 원하는 효과가 현저한 부작용을 수반하지 않고 발휘되는 양이 결정되어 투여된다. 이러한 유효량 또

한 독성 등에 대해서는 당업자라면 공지된 모델 동물을 이용하여 용이하게 결정할 수 있다. 예를 들면 통상적으로 성인에 있어서 유효 성분의 양이 1 일 0.1 ㎍ 내지 200 ㎍, 더욱 바람직하게는 1 일 0.1 ㎍ 내지 20 mg이다.

<46> 한편, 본 발명에서는 비만 및 비만-유도 염증과 관련된 당뇨병과 심장혈관질환의 개선 기능을 부여한 기능성 식품 또는 건강 식품으로서, 캡사이신 및 디하이드로캡사이신으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상을 유효 성분으로 함유하여 포유동물의 비만 지방질 조직 및 분리된 지방세포로부터 아디포카인 (또는 아디포사이토카인, 이하 아디포카인으로 칭함)의 생성 조절을 통하여 비만으로 유도된 염증과 합병증을 개선시키는 것을 개시한다.

<47> 구체적으로는, 다양한 형태, 즉 건강 식품(바람직하게는 기능성 식품 또는 건강기능성 식품) 또는 사료로서 음식물의 형태로 제공하는 것도 가능하다. 또한, 상기 식품에는 음료가 포함된다.

<48> 본 명세서에 있어서 「건강 식품」이란, 건강하게 어떠한 효과를 제공하거나 또는 효과를 기대할 수 있는 식품을 의미하고, 「기능성 식품」이란, 상기 「건강 식품」중에서도 다양한 생체 조절 기능(예를 들면, 소화기계, 순환기계, 내분비계,

<49> 면역계 또는 신경계 등의 생리 계통의 조절 기능)을 충분히 발현할 수 있도록 설계 및 가공된 식품을 의미한다. 본 발명의 건강 식품으로는 비만, 비만으로 유도된 염증 관련 당뇨병 및/또는 심혈관계 질환의 치료 기능을 갖는 것이 바람직하다. 일예로는 「캡사이신 또는 디하이드로캡사이신 함유 식품용 조성물」및 「캡사이신 또는 디하이드로캡사이신 함유 기능성 식품 소재」「고추 추출물 함유 식품 조성물」 「캡사이시노이드 함유 조성물」 등이 포함된다. 상기 캡사이신 및/또는 디하이드로캡사이신 함유 식품용 조성물은 식품에 사용 가능한 담체, 그 밖의 첨가제를 포함할 수 있다.

<50> 본 발명의 건강 식품 (또는 기능성 식품, 건강기능성 식품)은 유효 성분으로서 상기 캡사이신 및/또는 디하이드로캡사이신 혹은 PPAR gamma와의 배합물을 함유하는 것 이외에는 일반적인 건강 식품과 동일하게 제조할 수 있다. 예를 들면, 식품으로서 섭취 가능한 물질에 유효량의 상기 유효 성분을 함유시킴으로써 본 발명의 건강 식품을 제조할 수 있다. 상기 유효량은 식품의 형상 또는 종류, 또는 그것을 섭취하는 개체의 증상, 연령, 체중 등의 다양한 요인에 따라서 적절하게 결정할 수 있다. 예를 들면, 통상적으로 성인에 있어서 유효 성분의 양이 1 일 1㎍ 내지 200 ㎍이 바람직하다. 더욱 바람직하게는 1 일 1 ㎍ 내지 200 mg이다.

<51> 이뿐 아니라, 본 발명에서는 캡사이신 및 디하이드로캡사이신으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상을 비만 및 비만-유도 염증과 관련된 당뇨병과 심장혈관질환의 치료 또는 예방이 필요한 대상에게 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 비만 및 비만-유도 염증과 관련된 당뇨병과 심장혈관질환을 치료 또는 예방하는 방법을 개시한다. 이때, 상기 캡사이신 및 디하이드로캡사이신으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 1종 이상의 투여 유효량은 2-6 mg/kg 범위내인 것을 특징으로 한다.

<52> 즉, 본 발명에 따르면, 하기 실시예에서 규명한 바와 같이, 캡사이신 및/또는 디하이드로캡사이신에 의한 작용 효과로서 다음과 같은 사항을 입증한다.

<53> 첫째, 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신은 비만 마우스의 장간막 지방 조직내에서 MCP-1 및 IL-6 mRNA의 발현을 현저하게 억제하였다(도 1a,b, 2a,b 참조).

<54> 둘째, 캡사이신은 장간막 지방 조직내 아디포넥틴 mRNA의 발현 및 단백질 분비를 현저하게 증가시켰다(도 1c,2c, 실시예 5 참조).

<55> 셋째, 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신은 비만 마우스의 지방 조직으로부터 분리된 지방세포내 MCP-1 및 IL-6의 분비를 현저하게 억제하였다(도 3a 및 3b, 14 참조).

<56> 넷째, 캡사이신은 트로글리타존(troglitazone) 작용과 유사하게 PPAR gamma 리간드로 작용하여 지방세포로부터 아디포넥틴 분비를 현저하게 증강시켰다(도 3c 참조).

<57> 다섯째, 캡사이신 (50 μM)과 트로글리타존 (10 μM)을 처리한 결과 지방세포로부터 MCP-1 및 IL-6의 생성에 있어 보다 개선된 억제율 (58%, 90%) 을 확인하였다.

<58> 여섯째, 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신은 장간막 지방 조직 배양액으로 유도된 RAW264.7 대식세포 이동을 현저하게 감소하였다(도 4a,13 참조).

<59> 일곱째, 캡사이신은 농도 의존적으로 MCP-1 유도 된 대식세포 이동을 억제하였다(도 4b, 실시예 7 참조).

<60> 여덟째, 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신은 장간막 지방 조직 배양액으로 유도된 대식세포로부터 염증성 전구매개자 생성을 현저하게 억제하였다(도 5, 11, 실시예 8 참조).

<61> 아홉째, 지방세포모델계를 사용하여 대식세포 배양액 또는 장간막 지방조직 배양액으로 유도된 NF-kB 활성화에 대한 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신의 영향을 조사한 결과, 대식세포배양액 및 장간막 배양액은 NF-kB 서브유닛 p65의 DNA 결합 활성을 증가시킴을 확인하였고, 캡사이신은 이를 유의적으로 저해한다는 것을 확인하였다(도 6, 12, 실시예 9참조)을 확인하였다.

<62> 열 번째, 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신은 아디포카인 분비를 조절하고 지방조직내로 대식세포 이주를 억제하여 비만으로 유도된 염증 phenotype을 개선할 수 있음을 확인하였다. 즉, 캡사이신을 처리한 비만 마우스의 지방 조직내에서 MCP-1 및 IL-6 레벨이 억제되었다(도 7a,b 참조).

<63> 열한 번째, 염증상태에서 증가하는 시클로옥시게나제-2(COX-2)의 발현 레벨은 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신-처리된 비만 마우스의 지방 조직내에서 현저하게 감소되었다(도 7c 참조).

<64> 열두 번째, 아디포넥틴, 항염증 아디포카인의 발현 수준은 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신 처리된 비만 마우스의 지방조직에서 현저하게 증가되었다(도 7d 참조).

<65> 열세 번째, FACS는 비만 마우스의 지방조직내에서 증가된 대식세포 수 (F4/80+/CD11b+)가 캡사이신으로 처리된 비만 마우스의 지방 조직내에서 현저하게 감소되었다(도8 참조).

<66> 이같은 발견으로부터 캡사이신 및/또는 디하이드로캡사이신은 항비만, 비만으로 유도된 염증과 관련된 당뇨 및/또는 심혈관질환 치료제의 유효 성분이 되는 것을 명백히 확인할 수 있었다.

효 과

<67> 본 발명에 따르면, 캡사이신 및/또는 디하이드로캡사이신은 비만, 비만-유도 염증 관련 당뇨병 및/또는 심장혈관질환 치료제의 유효 성분으로 유용하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<68> 이하, 실시예에 의해 본 발명을 구체적으로 설명하지만, 이들은 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 또한, 시판용 시약이나 키트를 이용하는 경우에는 시판품의 지시서에 따라서 실시 가능하다.

<69>

<70> **실시예 1. 지방질 조직 배양**

<71> 3달간 45% 고지방 다이어트식을 공급한 비만 마우스(Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ)로부터 지방 조직을 분리하였다. 얻어진 지방 조직을 10mg 중량 이하로 잘게 썰고 공지된 방법[Yu, R., KIM, C.S.,Kwon, B.S. and Tawada,T(2006), Mesenteric adipose tissue-derived monocyte chemoattractant protein-1 plays a crucial role in adipose tissue macrophage migration and activation in obese mice. Obesity (Silver Spring), 14, 1353-1362]에 따라 배양하였다.

<72> 공지된 방법을 요약하면, 후속 전체 공정은 라미나 플로우 후드내에서 수행되었다. 즉, 잘게 썬 지방조직 단편 50mg을 3시간동안 6웰 플레이트의 각 웰내에 지방산 없는 알부민 1% 함유 M199 배양액 2ml내에서 분주시켜 조직 표면으로부터 혈액 세포와 가용성 인자를 제거하였다. 상기 조직 단편 함유 플레이트를 37℃에서 5% CO2 환경하 가습 인큐베이터내에서 배양하였다. 30분후, 조직 단편 (50 mg/well)을 24시간동안 혈청을 함유하지 않은 M199 내에서 캡사이신 (Tocris, CA, USA) 유무하에 처리하였다. 배양 분획을 사용전까지 -80℃하에 보관하였으며, 상기 지방 조직 단편은 액체 질소에서 즉시 동결후 RNA 추출을 위하여 -80℃에서 저장하였다.

<73> **실시예 2. Primary 지방세포 배양**

<74> 지방 조직을 가위로 자르고 1시간동안 37℃에서 1 mg/ml 타입 2 콜라게나제 타입 (Sigma, NY, USA) 로 소화시켰다. 얻어진 소화물을 100㎛ 나일론 메쉬로 거르고 지방세포를 1500rpm에서 5분간 원심분리하여 분리해내었다. 분리된 지방세포 50㎕를 24웰 플레이트의 각 웰내 M199 배지 2ml에 분주하였다. 지방세포 함유 플레이트를 37℃에서 5% CO2로 가습된 인큐베이터내에 배양하였다. 상기 지방세포를 혈청을 함유하지 않은 M199 배지내에 24시간동안 캡사이신 및/또는 트로글리타존 (Cayman, MI, USA) 유무 하에 처리하였다.

<75> **실시예 3. 장간막 지방질 조직-조절 배지 준비**

<76> 수컷 C57BL/6 마우스 (8 weeks, Hyochang Ltd., Daegu, Korea)을 3달간 45% 고열량 다이어트식을 공급하고 장간막 지방 조직 (n = 6)을 분리하였다. 모든 후속 공정은 라미나 플로우 후드하에 수행하였다. 지방 조직을 10mg 중량이하로 잘게 썰고 공지된 방법으로 배양하였다. 요약하면, 잘게 썬 지방질 조직 단편 50mg을 6웰 플레이트중 각 혈청이 함유되지 않는 배지 2ml를 분주하였다. 조직 단편 함유 플레이트를 37℃에서 5% CO_2에서 가습화된 인큐베이터내에 배양하였다. 상기 배양액에 글루타민, 25mM HEPES, 50 ㎍/ml 젠타마이신 및 0.5 ㎍/ml 암포테리신 B를 첨가하였다. 상기 조직 배양을 72시간동안 배양하였다. 배양 배지 분획을 사용전까지 -80℃에서 저장하였다.

<77> **실시예 4. RAW264.7 및 3T3-L1 지방세포 배양**

<78> 마우스 대식세포 세포주 RAW 264.7을 Korean cell Line Bank (KCLB40071, Seoul, Korea)으로부터 분양받았다. 상기 세포를 10% 소 혈청, 10 mg/l 페니실린트렙토마이신 (Gibco BRL, NY, USA), 및 2 mg/l 젠타마이신 (Gibco BRL, NY, USA)이 함유된 DMEM 배양액 내에서 37℃에서 5% CO2하에서 배양하였다. 3T3-L1 전구지방세포 (ATCC, USA)를 200 μM 아스코르브산, 10% 소 혈청, 10 mg/l 페니실린트렙토마이신 및 2mg/l 젠타마이신이 첨가된 DMEM으로 이루어진 기본 배양액 내에서 37℃내에서 5% CO2 분위기하에 배양하였다. 컨플루언시 도달 2일후 세포를 기본 배양액 내 촉진 혼합물(0.25 lM 덱사메타손, 10 lg/ml 인슐린, 및 0.5 mM 1-메틸-3-이소부틸크산틴)을 함유한 다른 배앵약 내에서 배양하였다.

<79> 40-42 시간 후, 세포 배양 배지를 5 ㎍/ml 인슐린 첨가하여 기본 배지인 숙성 배양액으로 변환하였다. 상기 숙성 배지를 6일동안 2일째마다 갈아주었다.

<80> **실시예 5. MCP-1, IL-6, 아디포넥틴, 및 TNF-α 농도 측정**

<81> 배양 상청층액의 MCP-1, IL-6, 아디포넥틴, 및 TNF-α 레벨 농도를 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)로 검정하였다. 상기 검정은 OptEIA 마우스 MCP-1 셋트, 마우스 TNF-α 셋트 (BD Biosciences Pharmingen, CA, USA), 마우스 IL-6 셋트 (R&D systems, MN, USA), 혹은 마우스 아디포넥틴 set (R& D systems, MN, USA)를 사용하여 수행되었다.

<82> 상기 샘플을 해동시키고 검정 희석액으로 적당히 희석시키고 검정하였다. MCP-1, IL-6, 아디포넥틴, 및 TNF-α 레벨은 SOFTmax curve-fitting 프로그램 (Molecular Devices, CA, USA)을 사용하여 얻어진 표준 곡선으로부터 수치화하였다.

<83> **실시예 6. RT-PCR 분석**

<84> 총 RNA를 trireagent 킷트 (MCR Inc., USA)를 사용하여 조직 샘플 100mg으로부터 추출하였다. 총 RNA (0.5 ug)를 역전사에 사용하였으며; TaKaRa Thermal cycler (TaKaRa Biomedicals, Tokyo, Japan)내 제조업자의 지시에 따라 Access RT-PCR system 를 사용하여 단일 반응내 폴리머라제 사슬 반응(PCR)을 사용하여 증폭하였다. 대략적인 정량 분석을 위하여, MCP-1, IL-6, 아디포넥틴, COX-2, 및 36B4 cDNAs의 증폭 길이는 예비 실험으로 설정하였다. 다음 프라이머 셋트를 PCR 증폭에 사용하였다: MCP-1 (GeneBank accession number: NM011333), forward 50-TCAGCCAGATGCAGTTAACGC-30, reverse 50-TGGATGCATTAGCTTCAGATTCAGATTTACG-30, IL-6 (NM011333), forward 50-CATGTTCTCTGGGAAATCGTGG-30, reverse 50-ACTGATATGCTTAGGCATAACGCAC-30, 아디포넥틴 (NM011333), forward 50-TACAACCAACAGAATCATTATGACGG-30, reverse50-GAAAGCCAGTAAATGTAGAGTCGTGTTGA-30, 36B4(BC011291),forward 50-TGTGTGTCTGCAGATCGGGTAC-30, reverse 50- CTTGGCGGGATTAGTCGAAG-30, COX-2 (M94967), forward 50-CAGTTTTTCAAGACAGATCATAAGCG-30, reverse 50-TGCTCCTGCTTGAGATGTCG-30.

<85> 타겟 유전자에 대한 PCR 조건은 다음과 같다: MCP-1 유전자: 40 cycles at 85 C for 1 min, 58 C for 1 min, and 72 C for 1 min; IL-6 유전자: 38 cycle at 85 C for 30 s, 51 C for 30 s, and 72 C for 30 s; 아디포넥틴 유전자: 40 cycles at 85 C for 1 min, 64 C for 1 min, and 72 C for 1 min; COX-2 유전자: 30 cycle at 85 C for 1 min, 42 C for 1 min, and 72 C for 1 min.

<86> PCR에 의해 얻어진 증폭 산물은 2% 아가로스 겔상에 전기영동법으로 분리하였다. 타겟 유전자 및 36B4에 상응하는 SYBR 그린-염색 밴드를 DS-34 폴라로이드 카메라로 찍었다. 밴드의 세기는 densitometrically 측정하였다. 모든 MCP-1, IL-6, COX-2, 및 아디포넥틴 신호를 housekeeping 유전자 36B4 의 mRNA 레벨로 표준화하고 비로서 표현하였다.

<87> **실시예 7. 세포주화성 검정**

<88> 대식세포의 이주, 즉, 주화성은 다중웰 미세주화성 챔버 (Neuro Probe Inc., Gaithersburg, MD, USA)내에서 검정하였다.

<89> 즉, 상기 실시예에서 제조된 RAW264.7세포를 $1x10^6$ 세포/ml에서 M199 배지에 분주시키고 캡사이신 및/또는 MCP-1 (R&D systems, MN, USA) 유무하에 지방 조직- 배양액에 함유 8uM-polycarbonate 필터에 의해 하부측 웰부터 분리되는 96웰 챔버의 상부측 웰내에 27 ㎛를 분주하였다.

<90> 37℃에서 6시간동안 배양후, 이동되지 않은 세포를 제거하고 필터를 통해 이동된 세포는 고정시키고 Diff-Quick (Merck Corp, Darmstadt, Germany)로 염색하였다. 염색된 세포를 3군데 임의 선택된 high-power fields (HPF; 400 x)에서 light microscopy하에 계수하였다. 얻어진 결과를 3가지 샘플의 평균 ± 표준편차로 나타내었다.

<91> **실시예 8. 질소 산화물 함량 측정**

<92> 세포-프리 배양 상층액내 질소 산화물의 함량은 Griess 시약을 사용하여 측정하였다. 즉, 상층액 100㎕를 96웰 편평한 바닥 플레이트상에서 동량의 Griess 시약과 혼합하였다. 570 nm에서 흡광도를 마이크로 ELISA 판독기를 사용하여 10분후 판독하였다. 함량은 $NaNO_2$ 표준 곡선을 사용하여 측정하였다.

<93> **실시예 9. NF-κB 결합 활성 측정**

<94> 처리된 3T3-L1 지방세포로부터 핵 추출물을 Nuclear Extract 킷트 (Active Motif, Rixensart, Belgium)로 준비하고 핵 용해물내 단백질 함량을 BCA 단백질 킷트(Pierce, Rockford IL, USA)를 사용하여 측정하였다. 핵 단백질 추출물내 제조업자의 프로토콜에 따라 NF-κB p65 TransAM 검정에 의해 측정하였다. 즉, NF-κB consensus 서열 함유 올리고뉴클레오티드를 96웰 플레이트에 고정시켰다. 상기 플레이트를 1시간동안 실온에서 가볍게 교반하면서 핵 단백질 추출물 (15 ㎍/샘플)로 배양하고 수세하고 1시간동안 교반없이 p65에 대한 항체를 접종하였다. 연속 수세후, 플레이트를 1시간동안 희석된 horseradish 퍼옥시다제-컨쥬게이트 2차 항체로 접종하였다. 상기 퍼옥시다제 활성은 5분간 플레이트의 웰내 분주된 용액을 사용하여 가시화하고 450nm에서 흡광도를 마이크로-ELISA 판독기를 사용하여 판독하였다.

<95> **실시예 10. 동물 처치**

<96> 수컷 C57BL/6 마우스 (8 주령)에 6주간 45% 고열량 다이어트식을 제공하였다. 고열량 식단을 공급받은 마우스에 캡사이신 (2 mg/kg, BW, 2% 에탄올을 갖는 0.9% 염수, 10% tween 80에 용해됨) 혹은 비히클 (2% 에탄올을 갖는 0.9% 염수, 10% tween 80) 단독을 대조군으로서 10일간 5회 복강 주사하였다.

<97> **실시예 11. 플로우 혈구 계산 분석**

<98> 기질 혈관 세포를 지방 조직으로부터 분리하였다. 즉, 지방 조직을 가위로 잘게 절단하고 37℃에서 1시간동안 타입 2 콜라게나제 1 mg/ml로 digest하였다. 상기 digest를 100 ㎛-나일론 메쉬에 여과하고 기질 혈관 분획 세포를 1500 rpm에서 5분간 원심분리하여 분리하였다. 상기 기질 혈관 세포를 암실에서 5℃하에 bidirectional 교반기 상에서 40분간 Fc blocking solution (eBioscience, CA, USA)내에서 배양한 다음, 피코에리틴-컨쥬게이트된 항마우스 F4/80 (eBioscience, CA, USA) 및/또는 플루오로세인 이소티아시아네이트-컨쥬게이트 항마우스 CD11b (eBioscience, CA, USA)로 염색하였다. 상기 항체로 배양 후, 플로우 혈구 계산 분석 (FACS) 버퍼 1ml를 상기 세포에 첨가하였다. 세포를 5분간 1200rpm에서 원심분리하고 FACS 버퍼 1ml에 재부유시켰다. 수세를 2회 반복하였다. 세포를 CellQuest software (BD Biosciences, CA, USA)를 갖는 FACSCalibur (BD Biosciences, CA, USA)로 분석하였다.

<99> **실시예 12. 통계학적 분석**

<100> 결과를 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 통계학적 분석은 ANOVA 및 Duncans multiple-range test를 사용하여 수행하였다. $P < 0.05$일 때 현저하게 유의성을 갖는 것으로 판단한다.

<101> **실시예 13. 동물 사육**

<102> 수컷 C57BL/6 마우스 (8 주령, n=6)를 정상식이군, 고지방식이군 (45% 고지방 식이)으로 나누어 10주간 사육한 후, 고지방식이군을 두 그룹으로 나누어, 고지방식이 대조군과 캡사이신을 0.015% 첨가한 고지방식이군으로 구분하여 3주간 pair-feeding 하였다.

<103> **실시예 14. 공복시 혈당측정 및 경구당 부하검사**

<104> 공복혈당의 측정은 사육한 비만마우스를 12시간 이상 절식시킨 후 꼬리정맥에서 얻은 전혈을 혈당측정기(Accu-Chek Sensor, Roche, Germany)를 이용하여 측정하였다. 경구 당부하 검사(OGTT: oral glucose tolerance test): 경구 당부하 검사를 시행하기 전에 12시간 절식시킨 다음 꼬리정맥에서 채혈하여 공복시 혈당 수준을 측정하여 초기혈당으로 한 후 20% glucose 용액(100ul glucose/10g mouse BW)을 intubation tube를 사용하여 경구투여하고 15, 30, 60, 90, 120, 150분에 꼬리정맥으로부터 채혈하여 정맥혈의 혈당농도 변화를 혈당측정기 (Accu-Chek Sensor, Roche, Germany)로 측정하였다.

<105> **<결과>**

<106> **첫째, 비만 마우스의 장간막 지방 조직으로부터 아디포카인 mRNA의 발현 및 단백질 분비에 있어 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신이 미치는 효과**

<107> 비만 마우스의 체중은 40.1 ± 0.56 g이었고, 장간막 및 고환(epididymal) 지방 조직 중량은 각각 1.05 ± 0.10 g 및 2.21 ± 0.06 g이었다. 내장 지방은 다른 지방 저장소보다 증가된 지방 분해 활성 및 염증 표현형을 나타내며, 따라서 다른 지방 조직보다 비만-관련 합병증의 발생과 더 밀접히 관련되어 있다].

<108> 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신이 아디포카인 (MCP-1, IL-6 및 아디포넥틴)의 생성에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 비만 마우스로부터 장간막 지방 조직을 캡사이신 유무하에 배양하고 이들 아디포카인을 인코딩하는 유전자의 발현 수준과 단백질 분비를 RT-PCR 혹은 ELISA에 의해 측정하였다.

<109> 그 결과, 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신은 비만 마우스의 장간막 지방 조직내에서 MCP-1 및 IL-6 mRNA의 발현 또는 단백질 분비를 현저하게 억제하였으며 (도 1a,b, 2a,b, 14 참조), 이에 반해, 장간막 지방 조직내 아디포넥틴 mRNA의 발현 및 단백질 분비를 현저하게 증강시켰다(도 1c 및 2c, 14 참조).

<110> **둘째, 비만 마우스로부터 분리된 지방세포로부터 아디포카인 단백질의 분비에 있어 캡사이신이 미치는 효과**

<111> 캡사이신이 지방세포로부터 아디포카인 (IL-6, MCP-1, 및 아디포넥틴) 분비를 바꾸는지를 검사하기 위하여, 본 발명자들은 비만 마우스의 지방질 조직으로부터 지방세포를 분리하고 상기 지방세포를 캡사이신 유무하에 처리하였다. 퍼옥시좀 증식제-활성화된 수용체 감마 (PPAR gamma) 항진제, 트로글리타존은 MCP-1 및 IL-6 생성을 현저하게 억제하였고, 지방세포로부터 아디포넥틴 생성을 증가하였다 (도 3a, b,c 참조). 캡사이신은 비만 마우스의 지방질 조직으로부터 분리된 지방세포내 MCP-1 및 IL-6의 분비를 현저하게 억제하였으며 (도 3a 및 3b 참조), 이에 반해 트로글리타존 작용과 유사하게 지방세포로부터 아디포넥틴 분비를 현저하게 증가되었다 (도 3c 참조). 캡사이신 (50 μM)과 트로글리타존 (10 μM)으로 유사한 처리 결과 동일 농도에서 캡사이신 (24%, 18%) 혹은 트로글리타존 (27%, 26%) 단독으로 처리시와 비교해볼 때 지방세포로부터 MCP-1 및 IL-6의 생성에 있어 보다 개선된 억제율(58%, 90%) 을 확인할 수 있었다.

<112> **셋째, 비만 마우스 장간막 지방 조직-조절된 매개인자 혹은 MCP-1에 의해 유도된 대식세포 이동에 있어 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신이 미치는 효과**

<113> 선행 연구에서 지방 조직-유래 MCP-1이 비만 마우스의 지방 조직내로 대식세포가 이동하는데 결정적인 역할을 수행하며; 따라서 MCP-1는 비만 마우스의 지방질 조직내 염증 반응을 증강시키는데 밀접하게 연관되는 것을 보인 바 있다. 캡사이신이 지방 조직 유래 MCP-1 작용을 변화할 수 있는지를 시험하기 위하여, 본 발명자들은 MCP-1과 같은 화학주성 인자를 함유하는 장간막 지방 조직 배양액를 제조하고, 이를 대식세포에 처리하여 대식세포 이동을 유도하는지를 살펴보았다. 상기 장간막 지방 조직 배양액는 RAW264.7 대식세포 이동을 증가시켰으며, 캡사이신은 장간막 지방 조직배양액 의해 유도되는 RAW264.7 대식세포 이동을 현저하게 감소하였다 (도 4a 참조). 부가하여, 캡사이신은 또한 농도량 의존 방식으로 MCP-1 유도 대식세포 이동을 억제하였다 (도 4b 참조). 또한, 디하이드로캡사이신도 대식세포의 이주를 억제하였다 (도 13 참조).

<114> **넷째, 장간막 지방 조직 배양액으로 처리함에 따라 자극받은 대식세포 활성에 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신이 미치는 효과**

<115> 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신이 지방 조직 배양액으로 유도된 대식세포 활성을 감소하는지를 시험하기 위하여, 대식세포를 캡사이신 유무하에 장간막 지방 조직 배양액으로 처리하고 ELISA로 염증전구 매개인자(질소 산화물, TNF-α, 및 MCP-1)의 생성을 측정하였다.

<116> 그 결과, 상기 장간막 지방 조직-조절 배양액은 RAW264.7 대식세포를 현저하게 유도하여 질소 산화물, TNF-α

및 MCP-1를 분비하였으며, 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신은 장간막 지방 조직 배양액으로 처리된 대식세포로부터 염증전구 매개인자 생성을 현저하게 감소시켰다(도 5, 11 참조).

<117> RT-PCR 분석 결과, 저산소증(hypoxia)의 마커인 저산소증 유도가능한 인자-1 알파 (HIF-1a)의 발현이 24시간동안 지방 조직 배양액의 배양시 지방 조직내에서 변화되지 않았음을 확인하였으며, 이는 본 배양 과정이 저산소 쇼크를 개시하는 것은 아님을 지시한다.

<118> **다섯째, 지방 조직 배양액 혹은 대식세포 배양액에 의해 유도된 3T3-L1 지방세포내 NF-κB 활성에 있어 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신의 억제 효과**

<119> 염증 유전자, TNF-α, IL-6, 및 아디포넥틴의 유도는 전사 인자 NF-κB에 의해 제어된다.

<120> 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신의 작용이 NF-κB 경로와 연관있는지를 확인하기 위하여, 본 발명자들은 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신이 대식세포-조절된 매개인자 혹은 지방질 조직 배양액으로 처리된 지방세포내에서 NF-κB 서브유닛 p65의 DNA 결합 활성을 억제하는지를 조사하였다.

<121> 도 6, 12에서 보듯이, 지방세포 핵 단백질 추출물내 NF-κB 서브유닛 p65의 DNA 결합 활성은 대식세포 배양액 및 지방 배양액에 의해 증가 되었고 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신으로 처리된 지방세포내에서 현저하게 감소되었으며, 이는 캡사이신 또는 디하이드로캡사이신이 NF-κB의 DNA 결합 활성을 억제함을 보여준다.

<122> **여섯째, 비만 마우스의 장간막 지방 조직으로부터 아디포카인 유전자 및 대식세포 마커의 발현에 있어 캡사이신이 미치는 효과**

<123> 본 발명자들은 나아가 생체내(in vivo) 캡사이신이 지방 조직내로 아디포카인 생성을 조절하고 대식세포 이동을 억제하는지를 조사하였다. C57BL/6 마우스 (수컷, 8 주령)를 6주간 고열량 식이요법을 공급하고 10일간 캡사이신 (주입량, 2 mg/kg, BW)로 처리하였다.

<124> 그 결과, 캡사이신으로 투여한 비만 마우스의 지방 조직내에서 MCP-1 및 IL-6 레벨이 감소된 것을 확인하였다(도 7a,b 참조). 염증 상태에서 증가하는 시클로옥시게나제-2(COX-2)의 발현 레벨은 캡사이신 투여한 비만 마우스의 지방 조직내에서 현저하게 감소되었다(도 7c 참조). 아디포넥틴, 항염증 아디포카인의 발현 수준은 캡사이신 투여 비만 마우스의 지방 조직에서 현저하게 증가되었다(도 7d 참조). 더욱이, FACS는 대식세포수(F4/80+/CD11b+)가 캡사이신으로 투여된 비만 마우스의 지방 조직내에서 현저하게 감소된 것을 확인하였다(도8 참조).

<125> 상기 결과로부터 캡사이신은 아디포카인 분비를 조절하고 지방 조직내로 대식세포 이주를 억제하여 비만으로 유도된 염증 phenotype을 개선할 수 있음을 확인하였다.

<126> 상술한 본 발명의 데이터는 캡사이신이 MCP-1 및 장간막 지방 조직 배양액에 의해 유도된 대식세포 이동을 현저하게 억제하고, 또한 캡사이신 및/또는 디하이드로캡사이신이 대식세포 활성을 현저하게 감소시켜 질소 산화물, TNF-α, 및 MCP-1와 같은 비만 마우스 장간막 지방 조직 배양액에 의해 유도된 염증 매개인자를 억제하는 것을 입증하였다. 이같은 발견은 캡사이신 및/또는 디하이드로캡사이신이 비만내 지방 조직내 대식세포에 의해 증폭되는 염증 반응을 감소시키는 가능성 있는 후보 물질임을 입증한다.

<127> **일곱째, 비만 마우스의 장간막 지방 조직으로부터 아디포카인 유전자 및 대식세포 마커의 발현에 있어 식이 캡사이신이 미치는 효과**

<128> 본 발명자들은 생체내 (in vivo) 캡사이신 첨가식이가 비만쥐의 지방 조직의 아디포카인 생성을 조절하고 지방 조직으로의 대식세포 침윤을 억제하는지를 조사하였다. C57BL/6 마우스 (수컷, 8 주령)를 10주간 고지방 식이를 공급하고, 이어서 3주간 0.015% 캡사이신을 포함한 고지방 식이를 공급하였다. 대조군으로는 고지방식이군을 설정하였다.

<129> 그 결과, 고지방 식이 대조군에 비해 캡사이신 첨가식이를 섭취한 비만 마우스의 지방 조직내에서 MCP-1 및 IL-6 mRNA수준이 유의적으로 감소됨을 확인하였다(도 9 a,b 참조). 반면, 아디포넥틴, 항염증 아디포카인 mRNA 발현 수준은 캡사이신 공급한 비만 마우스의 지방 조직에서 현저하게 증가되었다 (도 9c 참조). 더욱이, FACS 로 대식세포수 (F4/80+/CD11b+)를 조사한 결과 고지방식이 대조군에 비해 캡사이신 첨가식이를 섭취한 비만 마우스의 지방 조직내에서 대식세포 수가 현저하게 감소된 것을 확인하였다 (도 9d 참조).

<130> **여덟째, 비만 마우스내 인슐린 저항성에 있어 식이 캡사이신이 미치는 효과**

<131> 본 발명자들은 비만 마우스에서 손상된 내당능 (glucose tolerance)을 식이 캡사이신이 개선할 수 있는지 조사하였다. 16시간 절식한 마우스로부터 공복시 혈당을 재고, 20% 포도당용액을 투여한 후, 150분간 혈당을 측정하였다. 공복시 초기 혈당은 캡사이신 첨가한 고지방식이군에서 76mg/dL로 대조군 (93.5 mg/dL) 보다 낮은 것으로 나타났다. 또한, 당부하 실험결과, 캡사이신 첨가 고지방식이군의 혈중 내당능은 고지방식이 대조군보다 유의적으로 개선되어 있는 것으로 나타났다 (첨가도 10a, 10b).

<132> 결과적으로, 식이 캡사이신이 비만으로 유도된 인슐린 저항성을 개선시킬 수 있음을 확인하였다.

산업이용 가능성

<133> 본 발명에 따르면, 비만, 당뇨병 및/또는 심혈관계 질환의 치료 및/또는 예방의 용도에 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

<134> 도 1은 비만 마우스의 장간막 지방 조직으로부터 얻어진 아디포카인 mRNA의 발현에 있어 캡사이신이 미치는 영향을 도시한 그래프로서, (a) 는 MCP-1, (b)는 IL-6, 그리고 (c)는 아디포넥틴에 대하여 실험한 결과이다.

<135> 도 2는 비만 마우스의 장간막 지방 조직으로부터 아디포카인 발현 및 단백질 분비에 있어 캡사이신이 미치는 영향을 도시한 그래프로서, (a) 는 MCP-1, (b)는 IL-6, 그리고 (c)는 아디포넥틴에 대하여 실험한 결과이다.

<136> 도 3은 비만 마우스의 내장 지방 조직으로부터 분리된 지방세포로부터 아디포카인의 분비에 있어 캡사이신이 미치는 영향을 도시한 그래프로서, (a) 는 MCP-1, (b)는 IL-6, 그리고 (c)는 아디포넥틴에 대하여 실험한 결과이다.

<137> 도 4는 비만 장간막 지방 조직 배양액(MT-CM) 혹은 MCP-1에 의해 유도된 대식세포 이동에 있어 캡사이신의 억제 효과를 입증하는 그래프이다.

<138> 도 5는 비만 장간막 지방 조직 배양액에 의해 유도된 대식세포 활성에 있어 캡사이신의 억제 효과를 입증하는 그래프이다.

<139> 도 6은 3T3-L1 지방세포내 지방 조직 배양액에 의해 유도된 NF-κB 활성에 있어 캡사이신의 억제 효과를 입증하는 그래프이다.

<140> 도 7은 비만 마우스의 지방 조직내 MCP-1, IL-6, COX-2, 및 아디포넥틴 유전자의 발현에 있어 캡사이신의 효과를 도시한 그래프이다.

<141> 도 8은 캡사이신으로 처리된 비만 마우스의 지방질 조직내 감소된 대식세포 수를 입증하는 그래프이다.

<142> 도 9는 비만 마우스의 장간막 지방 조직으로부터 아디포카인 유전자 및 대식세포 마커의 발현에 있어 식이 캡사이신이 미치는 효과를 도시한 그래프이다.

<143> 도 10은 비만 마우스내 인슐린 저항성에 있어 식이 캡사이신이 미치는 효과를 도시한 그래프이다.

<144> 도 11은 비만 마우스 장간막 지방 조직-조절된 매개인자에 의해 유도된 대식세포 활성화에 대한 디하이드로캡사이신의 저해 효과를 도시한 그래프로서, (A)는 MCP-1 단백질 분비, (B) TNF-단백질 분비, (C) 질소 산화물 분비량을 각각 나타낸다.

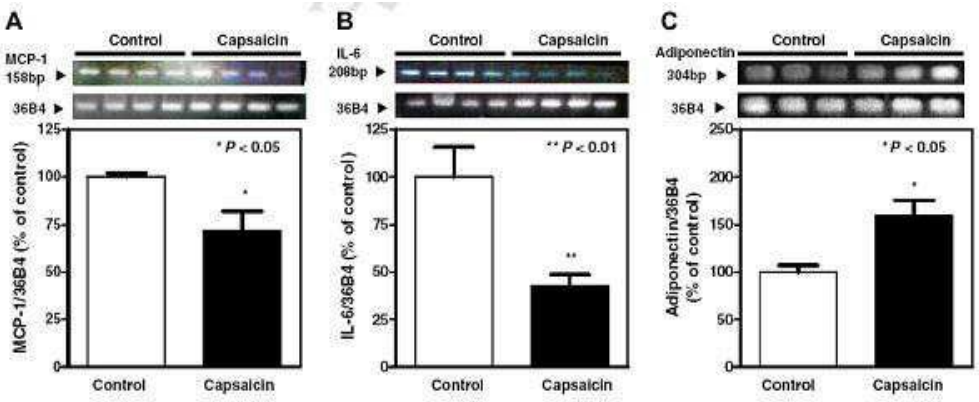
<145> 도 12는 지방질 조직 조절 매개인자에 의해 유도된 3T3-L1 지방세포내 NF-κB 활성에 있어 디하이드로캡사이신이 미치는 억제 효과를 보이는 그래프이다.

<146> 도 13은 비만 마우스 장간막 지방 조직-조절된 매개인자에 의해 유도된 대식세포 이주활성에 대한 디하이드로캡사이신의 저해 효과를 도시한 그래프이다.

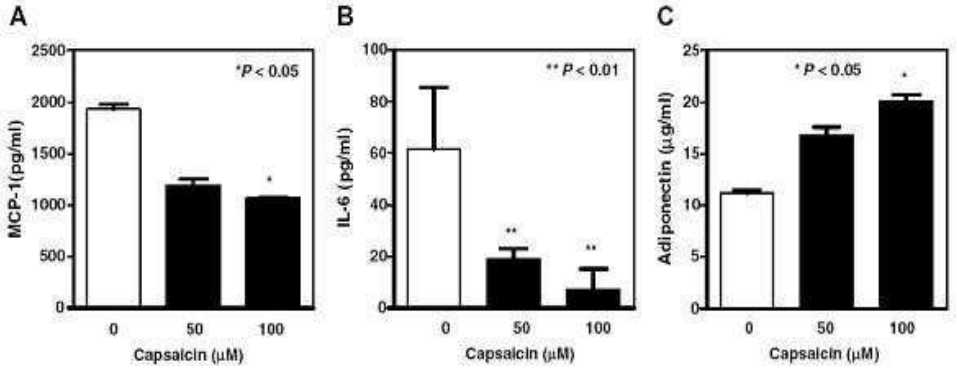
<147> 도 14는 지방조직으로부터 아디포사이토카인 분비를 조절하는 디하이드로캡사이신의 효과를 도시한 그래프이다.

도면

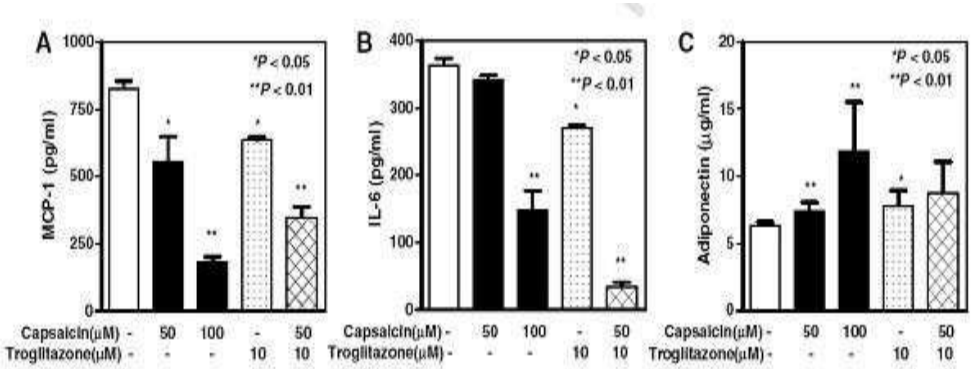
도면1



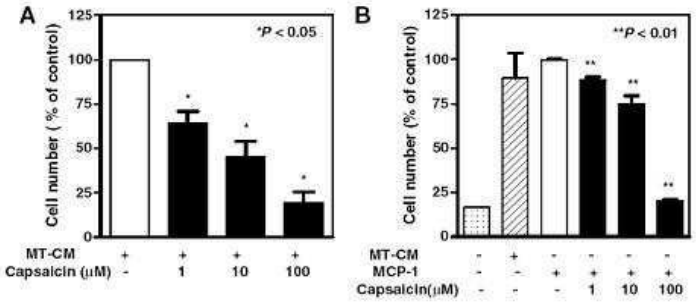
도면2



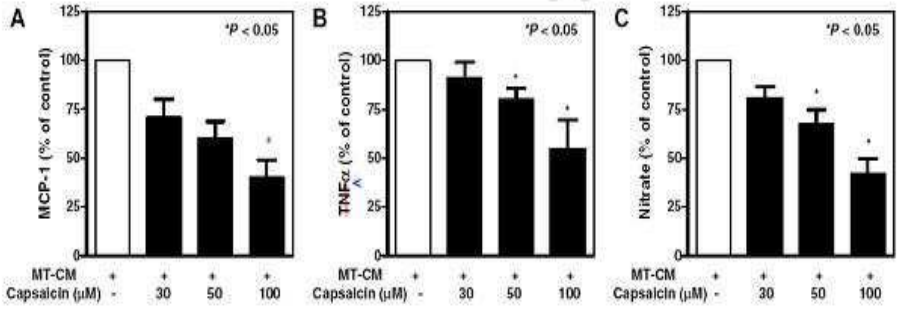
도면3



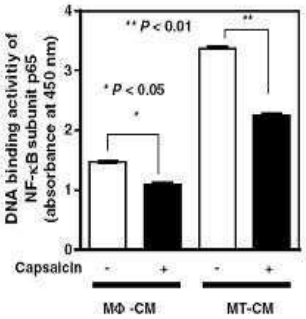
도면4


A
Cell number (% of control)
*P < 0.05
MT-CM
Capsaicin (μM)
B
Cell number (% of control)
**P < 0.01
MT-CM
MCP-1
Capsaicin(μM)

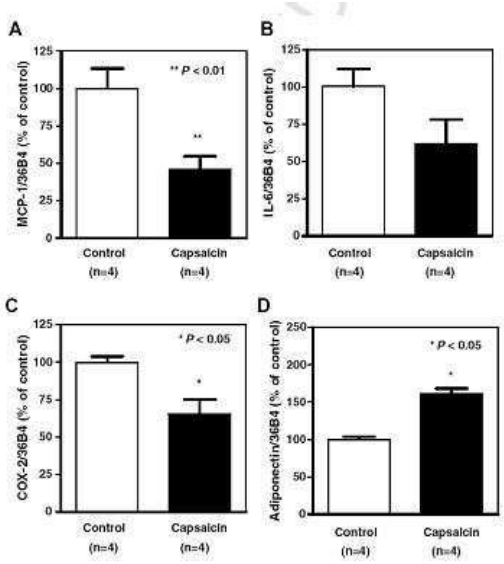
도면5


A
MCP-1 (% of control)
*P < 0.05
MT-CM
Capsaicin (μM)
B
TNFα (% of control)
*P < 0.05
MT-CM
Capsaicin (μM)
C
Nitrate (% of control)
*P < 0.05
MT-CM
Capsaicin (μM)

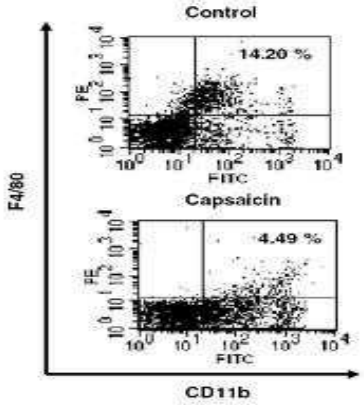
도면6


DNA binding activity of NF-κB subunit p65 (absorbance at 450 nm)
** P < 0.01
* P < 0.05
Capsaicin
MΦ -CM
MT-CM

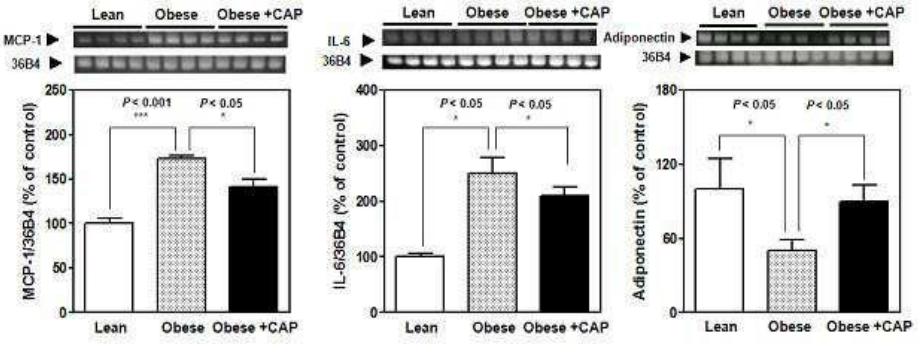
도면7



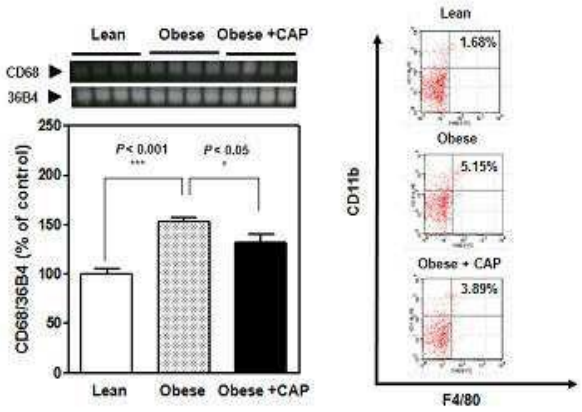
도면8



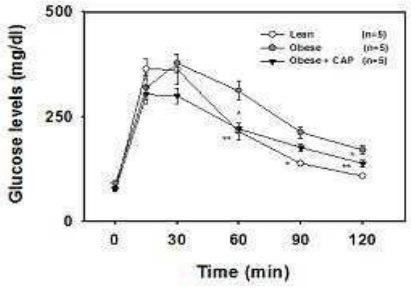
도면9abc



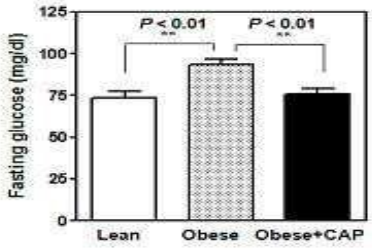
도면9de



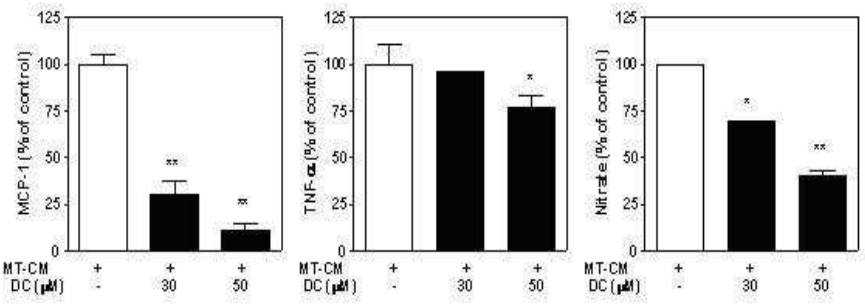
도면10a



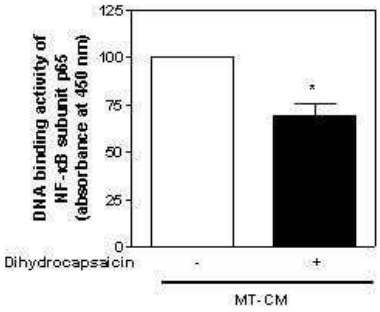
도면10b



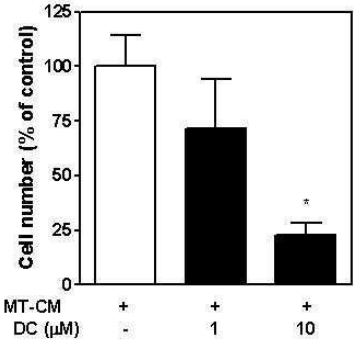
도면11



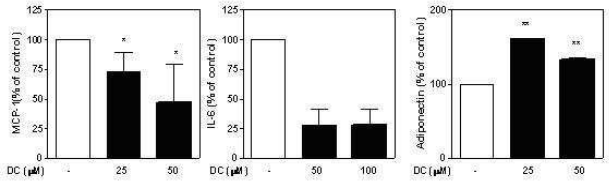
도면12



도면13



도면14



서 열 목 록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
<120> Therapeutic agent for obesity and obesity-induced inflammation-associated diabetes/insulin resistance and cardiovascular diseases/atherosclerosis

<130> dp20070155

<160> 10

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer for MCP-1

<400> 1
tcagccagat gcagttaacg c 21

<210> 2
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer for MCP-1

<400> 2
tggatgcatt agcttcagat tcagatttac g 31

<210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> forward primer for IL-6

<400> 3
catgttctct gggaaatcgt gg 22

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer for IL-6

<400> 4
actgatatgc ttaggcataa cgcac 25

<210> 5
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer for adiponectin

<400> 5
tacaaccaac agaatcatta tgacgg 26

<210> 6
<211> 29
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer for adiponectin

<400> 6
gaaagccagt aaatgtagag tcgtgttga 29

<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer for 36B4

<400> 7
tgtgtgtctg cagatcgggt ac 22

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer for 36B4

<400> 8
cttggcggga ttagtcgaag 20

<210> 9
<211> 26
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> forward primer for COX-2

<400> 9
cagtttttca agacagatca taagcg 26

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> reverse primer for COX-2

<400> 10
tgctcctgct tgagatgtcg 20