



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0001272
(43) 공개일자 2019년01월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/11 (2006.01) C12Q 1/68 (2018.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/11 (2013.01)
C12Q 1/6881 (2018.05)
(21) 출원번호 10-2017-0080988
(22) 출원일자 2017년06월27일
심사청구일자 2017년06월27일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
임승순
대구광역시 달서구 월서로 51, 104동 1007호(월배
포스코더샵)
이준수
대구광역시 달서구 달구벌대로199길 38-17, 302
호(호산동)
(74) 대리인
위병갑

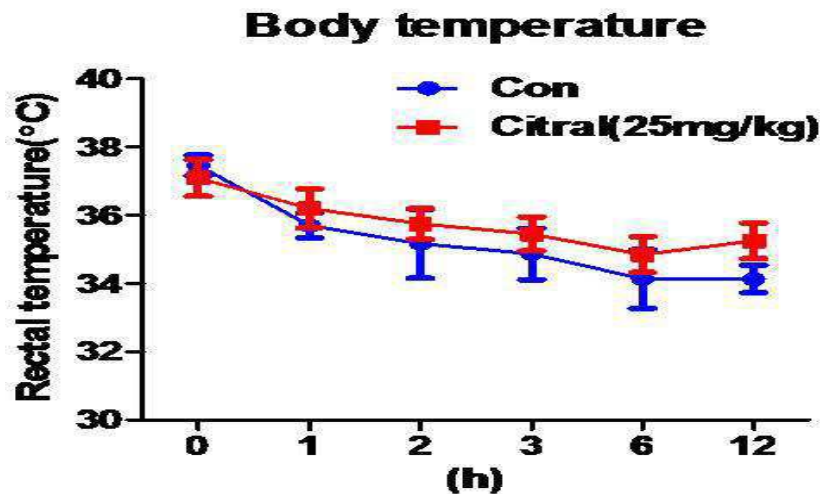
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 시트랄을 유효성분으로 함유하는 갈색지방세포 분화 촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 시트랄을 유효성분으로 함유하는 갈색지방세포 분화 촉진용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 시트랄은 갈색지방 표적 유전자인 PGC-1 α , UCP1, PPAR α , Sirt3, ERR α 및 Sirt1의 발현을 증가시키므로 갈색지방세포 분화를 촉진하는 것을 확인하였으므로 체온 유지 향상 및 저체온을 개선하는데 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12Q 2600/158 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A5A2010008
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 선도연구센터지원사업
 연구과제명 비만 매개 질환 연구센터
 기 여 율 1/2
 주관기관 계명대학교 산학협력단
 연구기간 2016.03.01 ~ 2018.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A2B4008516
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 중견연구자지원사업
 연구과제명 갈색지방조직에서 이소시트르산 탈수소효소-2 조절을 통한 비만 제어
 기 여 율 1/2
 주관기관 계명대학교 산학협력단
 연구기간 2016.06.01 ~ 2018.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

시트랄(citral)을 유효성분으로 함유하는 갈색지방세포 분화 촉진용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 저체온증의 예방 또는 치료에 사용되는 것인 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 조성물은 PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha), UCP-1(uncoupling protein-1), PPAR α (Peroxisome proliferator-activated receptor alpha), Sirt3(Sirtuin-3), ERR α (Estrogen-related receptor) 및 Sirt1(Sirtuin-1)의 발현을 증가시키는 것인 갈색지방 분화용 조성물.

청구항 4

제 1항의 조성물을 갈색지방세포주에 처리하여 갈색지방세포의 분화를 촉진시키는 방법.

청구항 5

하기의 단계를 포함하는 갈색지방세포 분화 촉진 물질 스크리닝 방법: a) in vitro 상에서 갈색지방세포에 갈색 지방세포 분화 촉진용 후보 물질을 처리하는 단계; b) 상기 갈색지방세포의 PGC-1 α , UCP1, PPAR α , Sirt3, ERR α 및 Sirt1의 유전자의 발현을 측정하는 단계; 및 c) 비처리군에 비해 PGC-1 α , UCP1, PPAR α , Sirt3, ERR α 및 Sirt1의 유전자의 발현을 증진시키는 물질을 갈색지방세포 분화 촉진 물질로 선정하는 단계.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 시트랄을 유효성분으로 함유하는 갈색지방세포 분화 촉진용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 지방세포(adipocyte)는 다량의 지방을 축적하는 원형의 대형세포이며, 세포체의 거의 모든 것은 하나의 지방조직으로 채워지고 얇은 세포질의 층이 그것을 감싸고 있으며 그 안에 편평한 하나의 핵이 포함된다. 지방세포는 소성(疎性) 결합조직내에 특히 소혈관을 따라서 산재 또는 소군을 만들어 존재한다.

[0003] 지방세포는 노르스름한 빛을 띠며, 백색 지방세포(white adipocyte)와 혈관에 많이 분포되어 갈색으로 보이는 갈색지방세포(brown adipocyte)로 나뉜다.

[0004] 우리가 일반적으로 지방세포라고 부르는 백색지방세포는 주로 피하와 장기 주위에 고루 퍼져 있으며 연료의 저장고와 같은 역할을 하는 반면에 갈색지방세포는 그 연료들 즉, 먹은 것을 에너지로 태워주는 역할을 한다.

[0005] 즉, 갈색지방세포는 열생산(thermogenesis)을 통하여 열의 형태로 에너지를 방출하고 그래서 비만에 대응한다. 갈색 지방이 갈색을 띠는 이유는 다량의 미토콘드리아를 보유함으로써 다량의 사이토크롬을 보유하기 때문이다. 갈색 지방의 미토콘드리아의 내막에는 서모제닌(thermogenin, uncoupling protein)이라는 독특한 단백질이 존재하는데, 이 단백질은 수소를 FOF1 복합체를 경유하지 않고 미토콘드리아의 기질로 통과시킨다. 따라서, 산화에너지는 ATP의 생성에 이용되지 않고 열로 방출되어 체온을 유지하는 데 사용된다. 동면동물도 갈색 지방의 미토콘드리아를 이용하여 동면기간 동안 체온을 유지한다. 백색 지방세포 및 갈색지방세포 둘 다 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells; MSCs)로부터 유래되지만, 발달의 형태에 있어서 두 가지 지방세포는 분명한 차이가 있다. 특히, 갈색지방세포의 분자적 기작에 대해서는 백색 지방세포에 비해서 정확히 연구되지 않고 있는 실정

이다.

[0006] 이에 본 발명자들은 체온 유지에 중요한 갈색 지방 세포의 분화에 영향을 주는 물질을 연구하던 중에 시트랄이 갈색지방세포 분화에 영향을 미치는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 KR10-1671675

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 따라서 본 발명은 시트랄(citral)을 유효성분으로 함유하는 갈색지방세포 분화용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 갈색지방세포주에 처리하여 갈색지방세포의 분화를 촉진시키는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 갈색지방세포 분화 촉진 물질 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 시트랄(citral)을 유효성분으로 함유하는 갈색지방세포 분화용 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 저체온증의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α), UCP-1(uncoupling protein-1), PPAR α (Peroxisome proliferator-activated receptor α), Sirt3(Sirtuin-3), ERR α (Estrogen-related receptor) 및 Sirt1(Sirtuin-1)의 발현을 증가시키는 것 일 수 있다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 조성물을 갈색지방세포주에 처리하여 갈색지방세포의 분화를 촉진시키는 방법을 제공한다.

[0015] 아울러 본 발명은 a) in vitro 상에서 갈색지방세포에 갈색지방세포 분화 촉진용 후보 물질을 처리하는 단계; b) 상기 갈색지방세포의 PGC-1 α , UCP1, PPAR α , Sirt3, ERR α 및 Sirt1의 유전자의 발현을 측정하는 단계; 및 c) 비처리군에 비해 PGC-1 α , UCP1, PPAR α , Sirt3, ERR α 및 Sirt1의 유전자의 발현을 증진시키는 물질을 갈색지방세포 분화 촉진 물질로 선정하는 단계를 포함하는 갈색지방세포 분화 촉진 물질 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 시트랄은 갈색지방 표적 유전자인 PGC-1 α , UCP1, PPAR α , Sirt3, ERR α 및 Sirt1의 발현을 증가시킴으로 갈색지방세포 분화를 촉진하는 것을 확인하였으므로 체온 유지 향상 및 저체온을 개선하는데 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 시트랄을 처리한 동물모델의 직장 내 온도 변화를 확인한 그래프이다.

도 2는 갈색지방의 중요한 기능적 표적 유전자인 PGC-1 α 와 UCP1의 발현량을 나타낸 그래프이다.

도 3은 시트랄이 갈색지방세포의 분화에 미치는 표적 유전자(PGC-1 α , UCP1, PPAR α , Sirt3, ERR α 및 Sirt1)의 발현량을 나타낸 그래프이다.

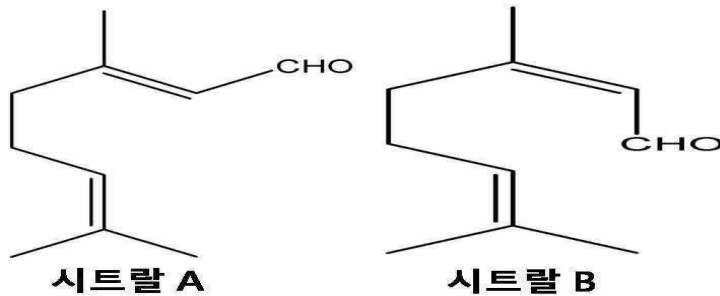
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0020] 본 발명은 시트랄(citral)을 유효성분으로 함유하는 갈색지방세포 분화 촉진용 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.

[0021] 시트랄은 3,7-디메틸-2,6-옥타디에날, 레모날은 분자식 $C_{10}H_{16}O$ 의 테르페노이드 한 쌍 혹은 그 혼합물이다. 이 쌍의 화합물은 이중 결합 이성질체이고, 하기 화학식에 기재한 바와 같이 E-이성질체는 게라니알 혹은 시트랄 A라고 하며, Z-이성질체는 네랄 혹은 시트랄 B라고 한다.

화학식 1



[0022]

[0023] 시트랄은 레몬 머틀 (90~98%), *Litsea citrata* (90%), *Litsea cubeba* (70~85%), 레몬그라스 (65~85%), *Leptospermum liversidgei* (70~80%), *Ocimum gratissimum* (66.5%), *Lindera citriodora* (약 65%), *Calypranthes parriculata* (약 62%), 페티그레인 (36%), 레몬버베나 (30~35%), *Eucalyptus staigeriana* (26%), 레몬밤 (11%), 라임 (6~9%), 레몬 (2~5%), 오렌지 등 여러 식물의 기름에 포함되어 있으며 일반적으로 레몬이나 오렌지향을 내는 재료로 쓰이고, 방충효과와 함께 곰팡이나 세균 등 미생물에 대한 항균활성을 가지고 있는 것으로 보고되어 있다.

[0024] 그러나 시트랄이 갈색지방세포 분화 촉진과의 관련성에 대해서는 전혀 알려진 바가 없다.

[0025] 본 발명에서 사용되는 용어, "분화(differentiation)"는 세포가 분열 증식하여 성장하는 동안에 서로 구조나 기능이 특수화하는 현상, 즉 생물의 세포, 조직 등이 각각에게 주어진 일을 수행하기 위하여 형태나 기능이 변해가는 것을 말한다. 일반적으로 비교적 단순한 계(系)가 둘 이상의 질적으로 다른 부분계(部分系)로 분리되는 현상이다. 예를 들면, 개체 발생에서 처음에 동질적이었던 알 부분 사이에 머리카나 몸통 등의 구별이 생기거나 세포에도 근세포 또는 신경세포 등의 구별이 생기는 것과 같이 처음에 거의 동질적이었던 어떤 생물계의 부분 사이에 질적인 차이가 생기는 것, 또는 그 결과로서 질적으로 구별할 수 있는 부역 또는 부분계로 나누어져 있는 상태를 분화라고 한다.

[0026] 본 발명에서 사용되는 용어, "갈색지방세포"는 지방을 에너지로 변환하는 기능을 갖는 세포로서, 육안으로 보면 황갈색 내지 적갈색을 띤다. 갈색 지방세포가 많을수록 체지방이 감소하며, 성인이 될수록 갈색 지방세포는 감소한다. 갈색 지방세포는 근육세포로 분화하는 줄기세포에 생성된다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어, "분화 촉진용 조성물"은 초기 단계의 세포가 각 조직으로서의 특성을 갖게 되는 과정을 유도된 다음 분화를 촉진시키는 조성물을 의미하며, 본 발명의 목적상 갈색지방세포의 분화를 촉진할 수 있는 조성물을 의미한다.

[0028] 본 발명자들은 시트랄을 주입한 동물모델에 한해 노출(Cold exposure)하여 체온이 유지되는 것을 확인하였으며, 갈색 지방 세포주에 시트랄을 처리하였을 때 갈색지방세포의 주된 표적 유전자인 PGC-1 α , UCP1, PPAR α , Sirt3, ERR α 및 Sirt1의 발현 모두 증가함을 확인함으로써 시트랄이 갈색지방세포 분화를 촉진됨을 최초로 규명하였다(도 1 내지 도 3 참조).

[0030] 본 발명의 갈색지방세포 분화 촉진용 조성물은 유효 성분인 상기의 시트랄을 적어도 1종 포함하나, 경우에 따라서는 2종 이상을 혼합하여 사용해도 좋다. 갈색지방세포 분화 촉진용 조성물은, 의약조성물 등의 제조에 사용할

수 있을 뿐 아니라, 예를 들면, 배양액에 첨가하여 갈색지방세포에 투여하여 분화를 촉진시키고, 피험 화합물이 분화 억제 능력을 갖는지 여부의 스크리닝 실험으로 사용할 수도 있다.

[0031] 본 발명의 갈색지방세포 분화 촉진용 의약조성물은, 본 발명의 시트랄을 필수 성분으로 하나, 생리학적 또는 약학적으로 허용될 수 있는 첨가제로서, 제제 기술 분야에서 공지된 다양한 성분(예를 들면 부형제, 붕괴제, 활택제 등)을 부가적으로 함유할 수 있다. 예를 들면, 부형제로서는, 유당, 자당, 글루코오스, 소르비톨, 락티톨; 콘스타치, 포테이토 스타치, 결정 셀룰로오스; 경질 실리카겔, 규산 알루미늄, 메타규산 알루미늄, 마그네슘, 인산수소 칼슘 등을 들 수 있다. 또한, 붕괴제로서는, 상기와 같은 전분류나, 카르복시 메틸 셀룰로오스(CMC), 히드록시 프로필 셀룰로오스(HPC), 폴리비닐 피롤리돈 등이 있다. 또한, 활택제로서는, 자당지방산 에스테르, 스테아린산 칼슘, 스테아린산 마그네슘 등을 들 수 있다.

[0032] 본 발명의 의약조성물의 투여 대상이 되는 것은, 인간을 비롯하여, 인간 이외의 포유류, 조류, 어류 등의 다양한 동물이다. 적용 대상으로서는, 각종 저체온증 및 체온 유지가 필요한 질환 등을 들 수 있다.

[0033] 본 발명의 의약조성물의 투여 경로는, 공지의 어느 쪽의 경로이어도 좋다. 예를 들면 경구, 경피, 주사, 경장, 직장 내, 복강 내 등의 임의의 경로를 선택할 수 있다. 바람직하게는 복강내 투여이다.

[0034] 본 발명의 의약조성물의 효과적인 투여량은, 투여되는 대상의 종류나 연령, 체중, 신체적인 상태 등에 따라 서로 다르며, 이들에 따라 각각에 적합한 양으로 투여할 수 있다. 포유류에 대하여 투여하는 경우, 예를 들면, 0.0001~1,000mg/kg/일, 바람직하게는 0.001~100mg/kg/일로 할 수 있다. 인간에게 투여하는 경우, 일반적으로는, 유효 성분량으로서, 1일당 0.001mg~5,000mg, 바람직하게는 0.01mg~500mg의 양이다. 이와 같은 1일당 용량을 한 번에 또는 분할하여 투여할 수 있다.

[0036] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예들은 본 발명을 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0038] <실시예 1> 한해 노출 분석

[0039] 동물모델에 시트랄을 처리한 다음 한해 노출(Cold exposure)하여 직장(rectal)의 온도를 측정하였다.

[0040] 구체적으로, C57B/6 계통의 수컷 마우스((주)중앙동물)을 한해 노출(Cold exposure, 4℃) 시작 2일 전에 1회 총 4회(8일) 시트랄(citral) 1회분 생성량 5.3ul((6.25M, 100mL, SIGMA, C83007)+ 2ml DPBS)을 복강내 주사(IP injection, 25mg/kg, 1g당 25ug/10ul)한 다음 4℃ 상태로 0, 1, 2, 3, 6, 12시간 간격으로 한해 노출된 동물모델 직장의 온도를 각각 확인하였다. 마우스의 직장 온도 측정은 설치류 온도계(Bio-TK982)의 프로브(probe)를 동물의 항문을 통해 삽입한 뒤 직장(Rectal) 내 심부온도를 측정하였다.

[0041] 그 결과, 시트랄을 처리한 동물모델의 직장 내 온도가 대조군보다 적게 떨어지는 것을 확인하여 시트랄이 체온을 유지하는데 효과가 있는 것을 확인하였다(도 1).

[0043] <실시예 2> 갈색지방의 표적 유전자의 발현에 미치는 영향 분석

[0044] 동물모델에 한해 노출(Cold exposure)를 실시한 후 갈색지방(BAT)을 적출하여 RNA를 분리하여 갈색지방의 중요한 기능적 표적 유전자인 PGC-1a와 UCP1의 발현을 측정하였다.

[0045] 구체적으로, 상기 실시예 1에서 시트랄을 복강 내 주입한 동물모델에서 갈색지방을 적출하고 분리한 1 ug의 RNA를 가지고 Bio-Rad의 cDNA 합성 kit를 이용하여 cDNA를 합성한 후 Tris-Cl (pH 7.2)에 1:5 희석한 뒤 2 ul를 사용하여 실시간중합효소연쇄반응(quantitative real-time PCR)을 실시하였다. 실시간중합효소연쇄반응은 Bio-Rad SYBR Green I 형광표지자를 이용하여 BIO-Rad CFX96 qPCR system으로 정량화하였다. 실시간중합효소연쇄반응의 반응조건은 95℃에서 30초간 분리시킨 후 어닐링(annealing) 및 extension을 59℃와 68℃에서 각각 10초간 40 cycle을 시행하였다.

[0046] 그 결과, 갈색지방의 중요한 기능적 표적 유전자인 PGC-1a와 UCP1의 발현이 시트랄이 처리한 실험군에서 증가하는 것을 확인하였다(도 2).

[0048] <실시예 3> 시트랄이 갈색지방세포의 분화에 미치는 영향 분석

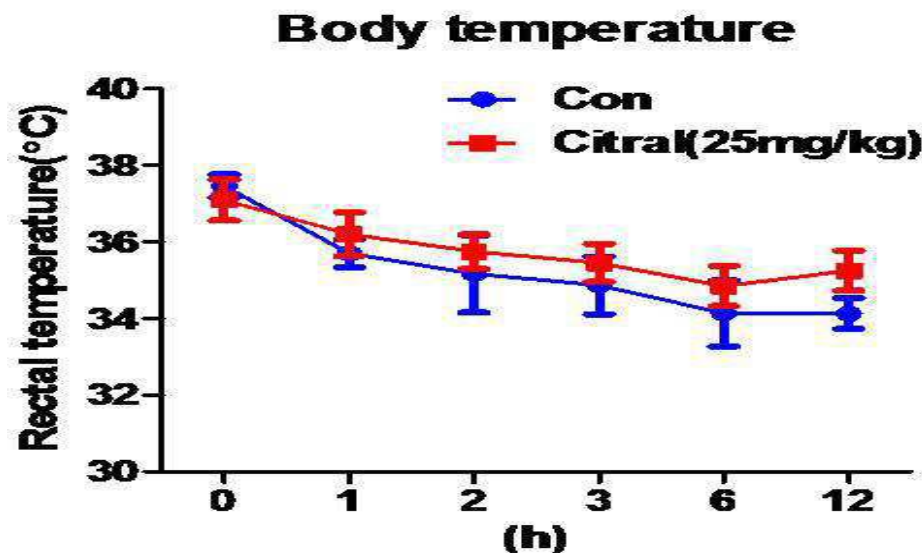
[0049] Immortalized brown adipocytes (IBA) 갈색 지방 세포주를 이용하여 시트랄이 갈색지방세포분화에 미치는 영향을 검증하였다.

[0050] 구체적으로, DMEM HG 배지(DMEM HG, 10% FBS, 1%P/S)에 갈색지방세포를 37℃, 5% CO₂ incubator에서 서로 인접하도록 배양한다. 배양된 갈색지방세포가 100%로 디쉬에 가득 차면 분화를 시작한다. 배양한지 0~2일째가 되면 DMEM HG 배지에서 10% FBS, 1% P/S, 20nM insulin, 0.5uM dexamethacine, 1nM Triiodothyronine(T3), 0.5mM 3-Isobutyl-1-methylxanthine(IBMx), 0.125mM indomethacine가 들어간 배지로 교체하여 갈색지방세포를 48시간 배양한다. 그런 다음 2~4 일 후에, DMEM HG 배지에 10% FBS, 1% P/S, 20nM insulin, 1nM Triiodothyronine(T3)가 들어간 배지로 교체하여 세포를 48시간 배양한다. 4~6일 후에, DMEM HG 배지에 10% FBS, 1% P/S가 들어간 배지로 교체하여 세포를 48시간 배양한다. 6~7일 후에, DMEM HG 배지에 10% FBS, 1% P/S가 들어간 배지로 교체한 뒤 100uM 시트랄(Citral, DMSO로 희석, 6.25M, 100mL, SIGMA, C83007)를 24시간 처리한다. 7일간 분화한 뒤 대조군과 시트랄을 처리한 실험군에서 RNA를 뽑아 실시간중합효소연쇄반응을 통해서 갈색지방세포의 주된 표적 유전자인 PGC-1 α , UCP1, PPAR α , Sirt3, ERR α 및 Sirt1의 발현을 측정하였다. 실시간 중합효소연쇄반응은 Bio-Rad SYBR Green I 형광표지자를 이용하여 BIO-Rad CFX96 qPCR system으로 정량화하였다. 실시간중합효소연쇄반응의 반응조건은 95℃에서 30초간 분리시킨 후 annealing 및 extension을 59℃와 68℃에서 각각 10초간 40 cycle을 시행하였다.

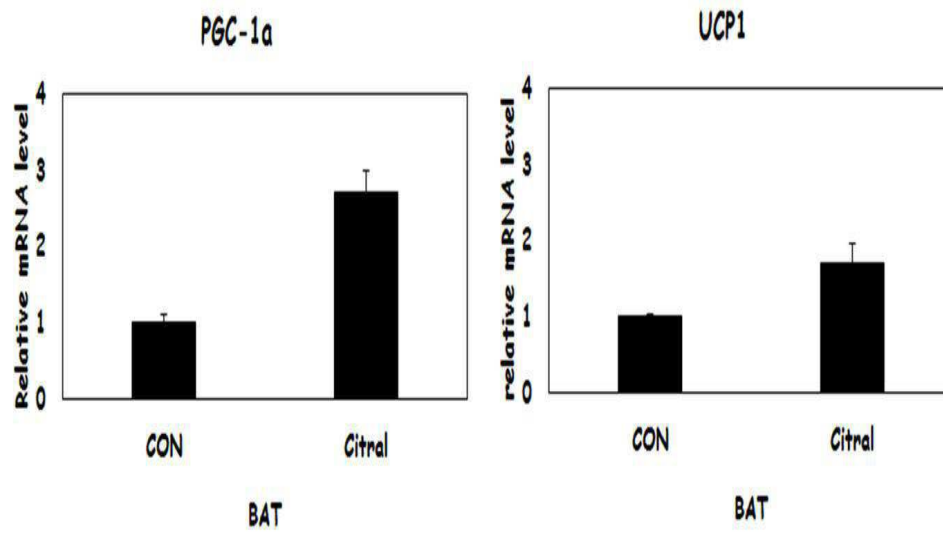
[0051] 그 결과, 시트랄에 의해 갈색지방 표적 유전자인 PGC-1 α , UCP1, PPAR α , Sirt3, ERR α 및 Sirt1의 발현이 시트랄을 처리하지 않는 대조군에 비하여 모두 증가함을 확인함으로써 시트랄이 갈색지방세포 분화를 촉진됨을 확인하였다(도 3).

도면

도면1



도면2



도면3

