(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0137222
(43) 공개일자 2018년12월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A23L 33/13* (2016.01)
A61K 39/395 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A23L 33/13 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0076612
(22) 출원일자 2017년06월16일
심사청구일자 2017년06월16일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박종선
대전광역시 서구 둔산로 201, 204동 301호(둔산동, 국화아파트)
박지수
대전광역시 서구 둔산로 201, 204동 301호(둔산동, 국화아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

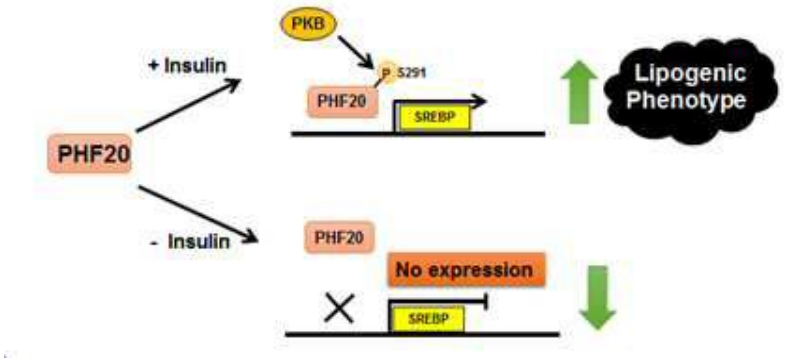
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **PHF 20 억제제를 포함하는 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 PHF 20 (PHD finger protein 20) 억제제를 포함하는 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 PHF20 억제제는 PHF20 에 의한 SREBP1c 프로모터 활성화를 억제함으로써, 지방 합성 기전에 관여하는 SREBP1c 의 억제를 달성할 수 있고, 이를 통해 간에서의 지방 합성 및 축적을 억제하여 지방간의 예방 또는 치료용 약학, 식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도12



(52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
Y10S 514/893 (2013.01)
(72) 발명자
김선환
대전광역시 서구 둔산남로 127, 105동 1306호(둔산동, 목련아파트)
공계영
경기도 평택시 팽성읍 안정로48번길 27-5
이현지
대전광역시 서구 정림서로 162-18, 104동 104호(정림동, 강변들보람아파트)
홍영은
대전광역시 중구 충무로6번길 27, 303호 (대사동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2012M3A9B6055302
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오·의료기술개발사업
연구과제명 폐암에서 멀티모달 오믹스 기법을 이용한 미토콘드리아 혹은 골지체 특이적 자가포식에 대한 핵심단백질 발굴 및 기반 연구
기 여 율 40/100
주관기관 충남대학교
연구기간 2015.12.01 ~ 2017.11.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2015R1A2A2A01003597
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 핵심개인연구사업
연구과제명 두경부암에서 Warburg effect의 새로운 조절자로서 CTMP와 LETM1의 분자적 제어 기술 발굴
기 여 율 30/100
주관기관 충남대학교
연구기간 2015.05.01 ~ 2018.04.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2014R1A1A3050752
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 여성과학자지원사업
연구과제명 대사성 질환에서 PHF20 기능 및 작용기전에 관한 연구
기 여 율 30/100
주관기관 충남대학교
연구기간 2014.11.01 ~ 2017.07.03

명 세 서

청구범위

청구항 1

PHF 20 (PHD finger protein 20) 억제제를 포함하는, 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 PHF 20 억제제는 PHF20 에 의한 SREBP1c 프로모터 활성화를 억제하는 것을 특징으로 하는, 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 PHF 20 억제제는 PHF 20의 유전자 발현 억제제 또는 PHF20 단백질 활성 억제제인 것을 특징으로 하는, 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 PHF 20 억제제는, PHF 20 유전자에 대한 안티센스 뉴클레오티드, 앱타머, 작은 간섭 RNA (siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 마이크로 RNA (miRNA) 및 RNA 간섭(RNAi)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것; 또는 PHF 20 억제제에 대한 항체인 것을 특징으로 하는, 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 PHF20 억제제는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 뉴클레오타이드 쌍, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 뉴클레오타이드 쌍 및 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 뉴클레오타이드 쌍으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 siRNA 쌍인 것을 특징으로 하는, 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 PHF 20 억제제는 스테로이드 합성을 억제하는 것인, 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 지방간은 알코올성 지방간 또는 비 알코올성 지방간인 것을 특징으로 하는, 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

PHF 20 (PHD finger protein 20) 억제제를 포함하는, 지방간 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 PHF20 억제제는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 뉴클레오타이드 쌍, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 뉴클레오타이드 쌍 및 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 뉴클레오타이드 쌍으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 siRNA 쌍인 것을 특징으로 하는, 지방간 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 PHF 20 (PHD finger protein 20) 억제제를 포함하는 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 우리나라 간질환 사망률은 인구 십만명 당 23.5명(남자 37.8명, 여자 9.0명)으로 매우 높으며, 40대 사망원인 1위(41.1명/10만명), 50대 사망원인 2위(72.4명/10만명), 30대 사망원인 3위(10명/10만명)를 차지하는 등 현재 한국 중년층 인구의 주요 사망원인이다. 이러한 지방간은 과도한 지방이나 알코올 섭취, 간의 지방 합성 증가, 중성지방 배출 및 연소 감소 등으로 인하여 간에 지방이 축적되어 발생하며 일반적으로 간에서 축적된 지방의 비중이 5%이상일 때 지방간으로 정의한다. 지방간에서 축적된 지방의 대부분은 트리글리세라이드(triglyceride)이다. 한편 지방간은 크게 과음으로 인한 알코올성 지방과 간과 비만, 당뇨병, 고지혈증 또는 약물 등으로 인한 비 알코올성 지방간으로 나눌 수 있다. 알코올성 지방간은 알코올을 과다 섭취하여 간에서 지방 합성이 촉진되고 정상적인 에너지 대사가 이루어지지 않아 발생하게 된다. 반면 비 알코올성 지방간은 비만, 인슐린 과민증, 당뇨병 등을 앓고 있는 사람들에게서 많이 발생한다. 이러한 현상은 인슐린 저항성이나 과도한 지방 분해에 의해 혈액 내 유리 지방산의 농도가 높아지는 것에 의하여 비 알코올성 지방간이 발생될 수 있음을 시사한다.

[0003] 일부에서는 지방간이 단순히 간에 지방이 축적되는 현상 정도로 생각하고 있으나, 알코올성 지방간으로 판명된 환자의 50%, 비 알코올성 지방간으로 판명된 환자의 30%는 간경변으로 발전한다는 사실을 고려할 때, 지방간은 매우 심각한 간질환의 하나라고 보아야 할 것이다. 이처럼 지방간은 심각한 문제로서 대두되고 있지만 아직까지 이를 치료하기 위한 유용한 약제는 부족하며, 운동과 식이요법만이 권장되고 있는 실정이다. 또한 실제로 이러한 방법에 의한 지방간의 치료효율은 매우 낮아 유효한 새로운 지방간 치료제의 개발이 요구된다.

[0004] 한편 PHD finger protein20 (PHF20)은 GLEA2 (glioma-expressed antigen 2) 로도 알려진 단백질로, GBM (glioblastoma) 환자 중 혈액에 이에 대한 항체가 많은 환자가 생존율이 비교적 더 높다는 임상보고를 통해 처음으로 알려지게 된 단백질이다. 또한 후생학적으로 이 단백질을 제거한 마우스는 95% 이상이 태어나서 곧 죽게 되거나, 살아남은 마우스도 몸의 크기가 매우 작고, 척추 마지막 뼈가 없다는 것이 보고된 바 있다. 그러나 이와 같은 PHF20 의 중요성에도 불구하고 지방간과의 관계, 대사와의 관계, 또는 이의 기전 등에 대해서는 알려진 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명자들은 PHF20 유전자 및 이의 기전에 대하여 연구하던 중, PHF20 이 지방합성의 대표적인 유전자인 SREBP1c를 통해서 간에 지방축척을 한다는 것을 확인하였으며, PHF20 를 억제하는 경우 지방 합성과 관련된 경로를 억제할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서 본 발명의 목적은, PHF20 억제제를 포함하는 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 PHF 20 (PHD finger protein 20) 억제제를 포함하는, 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공

한다.

[0010] 또한 본 발명은 PHF 20 (PHD finger protein 20) 억제제를 포함하는, 지방간 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명의 PHF20 억제제는 PHF20 에 의한 SREBP1c 프로모터 활성화를 억제함으로써, 지방 합성 기전에 관여하는 SREBP1c 의 억제를 달성할 수 있고, 이를 통해 간에서의 지방 합성 및 축적을 억제하므로, 지방간의 예방 또는 치료용 약학, 식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 PHF 20 과발현에 의한 지방축적 유전자 SREBP1c, FAS, ACC1, ACC2, SCD1 발현량의 변화를 마우스의 간에서 확인한 결과를 나타낸 도이다 ($p < 0.05$ (*), $p<0.01$ (**)).

도 2는 PHF20 과발현에 따른 SREBP1c, ACC, 인슐린 수용체 베타 (Insulin receptor beta; IRβ) 의 발현 증가 및 글루코오스 전달체 단백질인 Glut4 단백질 발현 감소를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3a 는 인간 간 정상 세포 (Chang cell) 에서 독시사이클린(Doxycyclin; Dox) 의 첨가에 따른 PHF20 유전자 발현의 증가 및 PHF20 과발현에 따른 지방 축적 유전자 SREBP1c, INSIG 발현의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다 ($p < 0.05$ (*), $p<0.01$ (**)).

도 3b는 간암 세포주 (HepG2) 에서 PHF20 의 형질간염에 의한 PHF20 의 과발현 및 이에 따른 지방 축적 유전자 SREBP1c, FASN, LXRs, INSIG 발현의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다 ($p < 0.05$ (*), $p<0.001$ (***)).

도 4는 PHF20 siRNA 또는 shPHF20 에 의한 PHF20 넉다운 및 이에 따른 지방축적 단백질 SREBP1c, LXRa 의 발현 감소를 확인한 결과를 나타낸 도이다 ($p < 0.05$ (*), $p<0.01$ (**), $p< 0.001$(***)).

도 5는 PHF20 넉다운에 따른 탄소 대사 (A) 및 지방산 대사 (B) 에 관여하는 유전자 발현의 변화를 DNA 어레이를 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 HepG2 세포주에서 PHF20 넉다운 및 이에 따른 스테로이드 생합성 유전자 EBT, FTDT 의 발현 감소를 확인한 결과를 나타낸 도이다 ($p < 0.05$ (*), $p<0.01$ (**), $p<0.001$ (***)).

도 7은 GFP-PHF20 도입과 shPHF20 처리에 의한 PHF20 억제를 통해, PHF20 발현에 의한 SREBP1c 프로모터 활성 증가 효과를 루시퍼라아제 활성 측정으로 확인한 결과를 나타낸 도이다 ($p < 0.05$ (*), $p<0.01$ (**)).

도 8 의 A 는 인슐린 자극에 의한 PKB(protein kinase B) 활성화에 따라 SREBP1c 의 프로모터가 활성화되는지 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이며, 도 8의 B 는 PHF20 의 291 번째 Ser 변이에 따른 SREBP1c 의 프로모터 활성의 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 PHF20 S291 부위와 결합하는 SREBP1c의 프로모터 결합자리 및 인슐린 추가에 따른 PHF20의 발현 증가를 나타낸 도이다.

도 10은 인슐린 (A), 메트포르민 (B) 처리에 따른 PHF20 유전자 발현의 변화를 확인한 결과 및 인슐린, 메트포르민, EPA 처리에 따른 PHF20의 단백질의 변화를 확인한 결과 (C) 를 나타낸 도이다 ($p<0.01$ (**), $p<0.001$ (***)).

도 11의 A 및 B는 야생형, 알코올성 지방간(ASH), 비 알코올성 지방간(NASH) 모델에서의 PHF20 단백질 발현량 확인 (A) 및 이의 정량 분석 결과 (B) 를 나타낸 도이다. 또한 도 11의 C는 정상 식이군 (WT-NCD) 와 60% 고지방 식이군 (WT-HFD) 모델의 간에서 PHF20 유전자의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다 ($p < 0.05$ (*), $p<0.01$ (**)).

도 12은 PHF20 에 의한 간에서의 지방 축적 기전을 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명은 PHF 20 (PHD finger protein 20) 억제제를 포함하는, 지방간 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0016] 상기 PHF20은 PHD finger protein의 패밀리로, 인간 PHF20의 유전자 서열은 NM_016436.4. [UniGene 907791 - Hs.517044] 에 밝혀져 있다. PHF20 은 고지방 식이 또는 인슐린에 의해 S291 위치가 인산화될 수 있으며, 인산화된 PHF20 은 SREBP1c의 431/-258 자리에 결합하여 지방합성에 관여하는 SREBP1c의 프로모터를 활성화시킬 수 있다.

[0017] 본 발명의 SREBP1c는 SREBPs (sterol regulatory element binding proteins) 의 하나로, 간에서의 지방과 콜레스테롤의 합성 양을 결정하는 전사인자를 의미한다. SREBP1c가 활성화되면 지방산 생합성 과정을 조절하는 효소인 acetyl-CoA carboxylase (ACC)와 fatty acid synthase (FAS)의 발현을 유도하게 되므로, 이를 통해 지방산의 합성을 유도할 수 있다.

[0018] 따라서 본 발명에 따른 PHF 20 (PHD finger protein 20) 억제제는 PHF20 에서 SREBP1c로 이어지는 간에서의 지방 합성 및 지방 축적 경로를 효과적으로 억제할 수 있으므로 지방간의 예방, 치료 또는 개선 효과를 나타낼 수 있다.

[0019] 본 발명에 있어, “PHF20 억제제”는 PHF20 발현 또는 활성억제를 통해, PHF20에 의한 SREBP1c 프로모터 활성화를 억제하고, 이를 통해 지방 합성 및 축적을 억제하는 목적을 달성할 수 있는 물질을 제한 없이 포함할 수 있다. 보다 구체적으로 본 발명의 PHF20 억제제는 PHF20의 유전자 발현 억제제 또는 PHF20 단백질 활성 억제제일 수 있으며, 바람직하게 상기 PHF20 억제제는 PHF 20 유전자에 대한 안티센스 뉴클레오티드, 앱타머, 작은 간섭 RNA (siRNA), 짧은 헤어핀 RNA (shRNA), 마이크로 RNA (miRNA) 및 RNA 간섭(RNAi)으로 이루어진 군으로부터 선택된 것; 또는 PHF 20 억제제에 대한 항체인 것을 특징으로 할 수 있다.

[0020] 본 발명의 PHF20 억제제 바람직하게는 PHF20 유전자에 대한 작은 간섭 RNA (siRNA) 일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 서열번호 1 및 서열번호 2로 표시되는 뉴클레오타이드 쌍, 서열번호 3 및 서열번호 4로 표시되는 뉴클레오타이드 쌍 및 서열번호 5 및 서열번호 6으로 표시되는 뉴클레오타이드 쌍으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 siRNA 쌍일 수 있다.

[0021] 본 발명에 있어서 상기 siRNA 는 생체 내 핵산 분해효소에 의한 빠른 분해를 막기 위하여 당업계에 알려진 일반적인 방법으로 화학적으로 변형되는 것을 모두 포함할 수 있다. 예를 들어 siRNA에 포함되는 적어도 하나의 뉴클레오티드의 당(ribose ring)의 2'-위치의 수산기를 수소 원자, 할로겐 원자, -O-알킬기, -O-아실기 또는 아미노기, 구체적으로는 H, OR, R, R'OR, SH, SR, NH2, NHR, NR2, N3, CN, F, Cl, Br, I 등으로 수식하거나 (이 때 R 은 알킬 또는 아릴, 바람직하게는 탄소수 1~6의 알킬기, R'은 알킬렌, 바람직하게는 탄소수 1~6의 알킬렌일 수 있다), 인산 백본을 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 알킬포스포네이트, 포스포로아미데이트, 또는 보라노포스페이트 등으로 수식할 수 있다.

[0022] 또한, 상기 화학적 변형은, 본 발명의 siRNA에 포함되는 적어도 하나의 뉴클레오티드가 LNA (locked nucleic acid), UNA(unlocked nucleic acid), 몰포리노(morpholino), PNA (peptide nucleic acid) 중 어느 하나의 핵산 유사체 형태를 가지도록 치환된 것임을 특징으로 할 수 있다. 이들 LNA, UNA, PNA, 몰포리노 등의 제조는 본 발명에서 제공하는 siRNA 서열 정보를 바탕으로 당업계에 알려진 지식에 의하여 제조할 수 있으며, 기존의 문헌을 참고할 수 있다 (Veedu RN, Wengel J.Chem Biodivers. 7(3):536-42, 2010; Demidov VV. Trends Biotechnol. 21(1):4-7, 2003; Shantanu Karkare, et al., Appl Microbiol Biotechnol, 71:575-586, 2006).

[0023] 또한, 본 발명의 siRNA 는 이의 활성을 저하시키지 않는 변화를 갖는 기능적 등가물인, 하나 이상의 치환, 삽입, 결실 및 이들의 조합을 갖는 변형체를 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 siRNA는 각 해당 서열번호의 siRNA 와 80% 이상의 상동성을 나타낼 수 있으며, 바람직하게는 90%, 보다 바람직하게는 95% 이상의 상동성을 나타내는 것을 포함할 수 있다. 이러한 상동성은 당 분야에 널리 공지된 컴퓨터 알고리즘, 예를 들어 Align 또는 BLAST 알고리즘을 이용하여 뉴클레오타이드의 서열을 표적 유전자의 상응하는 부분과 비교하여 용이하게 결정할 수 있다.

[0024] 본 발명의 PHF20 억제제는 특히 간에서의 지방 합성 및 축적을 억제하기 위한 기전으로 PHF20 에 의해 유도되는 스테로이드 생합성을 억제하는 것일 수 있다. 바람직하게 상기 PHF20 억제제는 PHF20 에 의해 스테로이드 생합성 유전자인 EBT, FTDT 유전자의 발현을 억제함으로써 간에서 스테로이드의 생합성을 저해하고 지방간을 효과적으로 예방, 치료 또는 개선할 수 있도록 할 수 있다.

[0025] 본 발명에 있어, “지방간”은 알코올성 지방간 및 비 알코올성 지방간을 모두 포함할 수 있으며, 바람직하게는 비 알코올성 지방간일 수 있고, 보다 바람직하게는 고지방 식이에 의해 유도되는 비 알코올성 지방간일 수 있다.

[0026] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약학적 조성물에 포함되며 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘, 미네랄 오일, 식염수, PBS(phosphate buffered saline) 또는 배지 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여될 수 있다.

[0029] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.

[0030] 또한 본 발명은 지방간 질환을 가지고 있는 또는 지방간 질환이 유병될 가능성이 높은 개체에 PHF20 억제제를 투여하는 단계; 를 포함하는 지방간 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0031] 상기 개체는 인간을 포함한 포유류인 것이 바람직하며, 지방간 치료를 필요로 하는 환자로 지방간 치료 중인 환자, 지방간 치료를 받은 적이 있는 환자, 지방간 치료를 받을 필요가 있는 환자를 모두 포함할 수 있다.

[0032] 또한 본 발명은 PHF20 억제제를 포함하는 지방간 예방 또는 개선용 식품 또는 건강기능식품에 관한 것이다.

[0033] 본 발명에서, 건강기능식품이란 질병의 예방 또는 개선, 생체방어, 면역, 병후의 회복, 노화 억제 등 생체조절 기능을 가지는 식품을 말하는 것으로, 장기적으로 복용하였을 때 인체에 무해하여야 한다.

[0034] 본 발명의 PHF20 억제제는 지방간 예방 또는 개선의 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 PHF20 억제제를 식품 첨가물로 사용할 경우, 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 PHF20 억제제는 원료에 대하여 15 중량 % 이하, 바람직하게는 10 중량 % 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0035] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0036] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g 이다.

[0037] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0039] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽

게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0041] **실험 방법 및 재료**

[0042] **1. PHF20 과발현 마우스의 확립 및 고지방 식이 방법**

[0043] PHF20(PHD finger protein 20) 유전자를 포함하는 벡터를 동물에 주입하여 만든 PHF20 과발현 마우스의 3개 라인을 3세대 교배하여 8 주령 수컷 마우스를 얻었으며, 12주간 60% 고지방 식이를 시행하였다.

[0045] **2. PHF20 과발현 세포주 확립과 세포주 배양**

[0046] PHF20 과발현 세포주 확립을 위하여 정상 간세포인 Chang 세포를 10cm 플레이트 2 x 10^6개로 배양하였다. 그 후 pTet-3G 렌티 바이러스를 배지 5ml에 500㎕를 넣어 세포를 감염시켰다. 24시간 후 배지를 걷어내고 새로운 배지 6ml 를 넣어주었다. 24시간 후 10cm 플레이트에 있던 세포들을 2 x 10^5개로 나누어 각각 6cm 플레이트 4개로 배양하였다. 세포가 안정화되면 G418을 각기 다른 농도 (500ug/ml 내지 2mg/ml) 로 처리하여 감염이 된 세포와 감염이 되지 않은 세포를 선택적으로 선별하였고 바이러스에 감염, 형질주입이 모두 된 세포만 선택적으로 걸러내어 세포를 생장시켰다. 세포 배양을 위해서 우태아 혈청 10%, 항생제 10%가 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지를 이용하였으며, 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다.

[0048] **실시예 1. PHF20 과발현 마우스 간에서의 지방합성 유전자 SREBP1c, FAS 및 SREPB1c의 하위 조절 인자 mRNA 발현량의 증가**

[0049] SREBP1c 는 SREBP (sterol regulatory element-binding proteins) 의 아형이며, 콜레스테롤 합성과 흡수 및 지방 합성, 지방 생성 유전자를 조절하는 것으로 알려져 있다. 또한 FAS 유전자 역시 지방합성에 관여하는 유전자인 것으로 알려져 있다. 따라서, PHF20 과발현 마우스에서 PHF20 에 영향으로 지방합성 유전자인 SREBP1c 와 FAS 유전자 등의 발현이 변화되는지 여부를 확인하기 위하여, SREBP1c, FAS, ACC1, ACC2, SCD1 유전자의 mRNA 발현량이 변화되는지 여부를 확인하기 위한 실험을 다음과 같이 수행하였다. 먼저, PHF20 과발현 마우스에 12주 동안 60% 고지방식이를 한 후 간을 적출한 후, PureHelix RNA Extraction Solution (Nanohelix Co., South Korea)을 이용하여 제공된 프로토콜에 따라 mRNA를 추출하였다. 그 뒤 GE Nano vue로 정량 후, cDNA합성 Kit-5x rt premix (reverse transciption-elips biotech)를 이용하여 1ug cDNA를 합성하고, 각 유전자/GAPDH로 보정하였다. Q-PCR 에서, GAPDH와 ACTIN은 cDNA 2ug, 나머지 프라이머는 4ug로 하고, low ROX (enzynomic)10ul를 이용한 SYBR green Kit-SYBR green, 나머지는 H2O 로 총 20ul로 첨가하여, StepOne Plus real-time PCR system (AB Applied biosystems) 기계를 이용하여 실험을 수행하였다. PCR Cycle은 다음 표 1 과 같은 조건으로 진행하였다.

[0050] [표 1]

Initial denaturation	95C	10~15분
Denaturation	95C	10초
Annealing	60C	15초
Elingation	72C	15~30초
Number of Cycles	40회	

[0051]

[0052] 사용한 프라이머 세트의 정보와 그 결과를 각각 표 2 및 도 1에 나타내었다.

[0053] [표 2]

[0054] 마우스 프라이머 세트

이름	프라이머	서열 (5' 에서 3')
ACTIN	F	GAGGTATCCTGACCCTGAAGTA
	R	GCTCGAAGTCTAGAGCAACATAG
PHF20	F	CATTGACTACGAAGAAGGGAGAG
	R	CTTCTCTAAAGGGCGCAGATAA
SREBP1c	F	TCA GGT CAT GTT GGA AAC CA
	R	TAC TTC TTG TGG CCC GTA CC
ACC1	F	AAGGCTATGTGAAGGATG
	R	CTGTCTGAAGAGGTTAGG
ACC2	F	CTTGCTTCTCTTTCTGACTTG
	R	GGCTTCCACCTTACTGTTG
FAS	F	GCTGCGGAAACTTCAGGAAAT
	R	AGAGACGTGTCACTCCTGGACTT
SCD1	F	GTCAGGAGGGCAGGTTTC
	R	GAGCGTGGACTTCGGTTC

[0055]

[0056] 도 1에 나타낸 바와 같이, PHF20 이 과발현된 마우스에서의 SREBP1c, FAS, ACC1, ACC2, SCD1 유전자들의 발현량은 야생형과 비교하여 현저히 증가되어 있는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 PHF20의 과발현에 의하여 SREBP1c 의 발현이 증가되고, 이의 하위 조절인자인 ACC1, ACC2, SCD1 이 모두 발현 증가한다는 것을 나타낸다.

[0058] **실시예 2. PHF20 과발현에 따른 SREBP1c 단백질 발현 증가 확인**

[0059] PHF20 과발현에 의하여 SREBP1c 및 이의 하위 조절인자의 mRNA 발현이 증가하는 것을 확인하였으므로, SREBP1c와 ACC 의 단백질 발현 역시 증가하는지를 검증하기 위한 실험을 수행하였다. 또한 인슐린 신호전달에 작용하는 인슐린 수용체 베타 (Insulin receptor beta; IRβ)의 단백질 발현량과 글루코오스 전달체 단백질인 Glut4 의 발현의 변화도 함께 확인하였다. 보다 구체적으로 다음과 같다. 60% 고지방 먹이를 12주 동안 PHF20 과발현 마우스에 식이한 후 간을 적출하여 차가운 1XPBS에 세척하고 조직을 갈은 다음, 50 mM Tris-HCl, pH7.5, 1% Triton X-100, 300mM NaCl, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1 mM sodium vanadate, 20 mM β-glycerol phosphate, 2mM DTT, 1mM Leupeptin, 10mM PNPP가 든 용액으로 단백질을 용해시켰다. 4℃, 13,000rpm 조건으로 한 시간 동안 원심 분리한 다음, 상층액을 단백질 정량하고, 웨스턴 블랏 기법을 통하여 단백질 발현량을 확인하였다. 구체적으로 Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA)로 용해시킨 단백질 농도를 잰 다음 10ug를 정량하여 Laemmli sample buffer를 농도에 맞게 섞어 끓인 후 SDS-PAGE에 로딩하였으며, transfer, milk blocking, TBS-T washing하고 1차 항체 LC3에 넣고 하룻밤 동안 배양하였다. 다음 날 TBS-T 세척 후 Rabbit 2차 항체와 1시간 인큐베이터 한 뒤, 20분간 3차례 TBS-T 세척하고 필름으로 현상하였다. 1차 항체로 PHF20(#3934), Glut4(#2213), ACC(#3676)는 cell signaling 으로부터 구입하여 사용하였고, IRb(G2910), SREBP1c(#13551)는 Santa Cruz, actin(A5316)은 Sigma, 2차 항체 mouse, rabbit은 Komabiotech로부터 구입하여 사용하였다. 각 실험의 통계는 ± S.D를 사용하였고, $p < 0.05$ (*), $p<0.01$ (**)로 기록하고, 이를 도 2에 나타내었다.

[0060] 도 2에 나타낸 바와 같이, SREBP1c 와 ACC 의 단백질 발현은 야생형과 비교하여 PHF20 과발현 마우스에서 뚜렷하게 증가되어 있는 것을 확인하였다. 또한 IRβ 의 단백질 발현 역시 PHF20 과발현 마우스에서 현저하게 증가되어 있었고, Glut4 는 야생형 마우스에 비하여 PHF20 과발현 마우스에서 감소되어 있는 것을 확인하였다.

[0062] **실시예 3. 인간 정상 세포 및 간암 세포주에서의 PHF20 과발현에 따른 지방 축적 유전자 발현량의 변화 확인**

[0063] 콜레스테롤이나 인슐린에 의해서 SREBP는 핵 수용체인 (nuclear receptor) 인 LXRs를 활성화 시키게 되고, SREBP, SCAP, Insig는 소포체(ER)에서 단단하게 붙어있다가 스테롤이 부족하게 되면 단단하게 붙어있던 Insig이 분해되면서, SREBP가 핵 속으로 이동하여 지방합성에 관련된 유전자의 발현을 증가시키게 된다. 따라서 PHF20의 과발현에 의한 지방 축적 관련 유전자 발현의 변화를 확인하기 위하여 인간 간, 간암 세포주에 PHF20 과발현을 유도하고, 지방 합성을 조절하는 SREBP1c 및 SREBP1c의 활성화에 관련되는 유전자의 발현 변화를 확인하였다. 6 웰 플레이트에 각각 $0.5X10^6$ 정상 간세포 (Chang 세포)를 2 웰에 깐 후, 24시간 후 새 배지 2ml을 넣고 한 개의

웰에만 50nM 독시사이클린(Doxycyclin) 을 넣고 24시간 배양한다. 24시간 후 PureHelix RNA Extraction Solution (Nanohelix Co., South Korea)을 이용하여 제공된 프로토콜에 따라 mRNA를 추출하였다. GE Nano vue로 정량 후, cDNA합성 Kit- 5x rt premix (reverse transciption -elips biotech)를 이용하여 1ug으로 합성하였다. 또한 간암 세포주인 HepG2 세포주를 $0.5X10^{6}$를 2 웰에 깐 후, 24시간 후 새 배지 2ml에 adeno virus LacZ와 adeno PHF20 virus를 각각 처리하고 24시간 배양한 후, 동일한 방법으로 mRNA를 추출하였다. GE Nano vue로 정량 후, cDNA합성 Kit- 5x rt premix (reverse transciption -elips biotech)를 이용하여 1ug으로 합성하고, Primer 별/GAPDH로 보정하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었으며, 사용된 프라이머 정보를 표 3에 나타내었다.

[0065] [표 3]

[0066] 인간 프라이머 세트

[0067]

이름	프라이머	서열 (5'에서 3')
GAPDH	F	GATTCCACCCATGGCAAATTC
	R	GTCATGAGTCCTTCCACGATAC
PHF20	F	GACCCAAGCAGCCTGATAAA
	R	CCTTGTCTTCCTTCTCGTTCTT
SREBP1c	F	ACACAGCAACCAGAAACTCAAG
	R	AGTGTGTCCTCCACCTCAGTCT
ACC1	F	GGTCTATCCGTAGGTGGTCTTA
	R	CATCCTGGCTGTACAGGTATTC
ACC2	F	CGTCCTGCCTACTTTCTTCTATC
	R	GTGATTCGTCGGAGTCCATAAT
FAS	F	CTAGGTTTGATGCCTCCTTCTT
	R	GATGGCTTCATAGGTGACTTCC
Insig	F	CCTTGACTTTAGCAGCCCTATC
	R	GCTAACTGTCGTCCTATGTTCC

[0069] 도 3a에 나타낸 바와 같이, 인간 정상세포인 Chang 세포는 독시사이클린 (Doxy) 첨가에 의하여 PHF20 mRNA의 발현량이 증가하였으며, SREBP1c의 mRNA 발현량 역시 증가하였다. 그러나 INSIG mRNA 발현량은 감소하였다.

[0070] 도 3b 에 나타낸 바와 같이, 간암 세포주인 HepG2 세포주는 adeno PHF20 바이러스 도입에 의하여 PHF20 의 mRNA 발현량이 증가하였으며 SREBP1c 의 발현량과 FASN, LXRs 의 발현량 역시 유의하게 증가함을 확인하였다. 반면, INSIG 의 발현량은 AdLacZ 도입군과 비교하여 유의하게 감소하였다.

[0071] 상기와 같이, 정상 간세포 및 간암 세포주 모두 PHF20 과발현에 의하여 SREBP1c 및 SREBP를 활성화 시키는 LXRs의 유전자 발현은 증가되었고, 반면, SREBP 시 발현이 증가되어야 하는 Insig은 현저히 감소되는 것으로 나타났으므로, 이를 통해 PHF20 유전자의 증가는 간에서 지방 축적 유전자인 SREBP1c의 발현 및 관련 유전자를 조절함을 확인하였다.

[0073] **실시예 4. 인간 간암 세포주 (HepG2 cells)에서 PHF20 넉다운 후 지방축적 단백질 발현량의 변화 확인**

[0074] HepG2 세포주 $0.5X10^{6}$를 2 웰에 분주한 후, 24시간 후 siNS, siPHF20 를 Dharmafect를 이용하여 형질감염시키고, 24시간 배양하였다.

[0075] 사용된 siPHF20 서열정보는 다음과 같다.

[0076] [표 4]

[0077]

이름	siPHF20	서열 (5'에서 3')	서열번호
siPHF20 1	Sense	GUAUCCAGCUCACAUAGAAtt	1
	Antisense	UUCUAUGUGAGCUGGAUACtt	2
siPHF20 2	Sense	CAAGCAGCCUGAUAAAGAAtt	3
	Antisense	UUCUUUAUCAGGCUGCUUGtt	4
siPHF20 3	Sense	CUACUGCUGUGGAUUCAAAtt	5
	Antisense	UUUGAAUCCACAGCAGUAGt	6

[0079] 이 후 새 배지로 교체하고 다시 24시간 배양 한 후에 PureHelix RNA Extraction Solution (Nanohelix Co., South Korea)을 이용하여 제공된 프로토콜에 따라 mRNA를 추출하였다. GE Nano vue로 정량 후, cDNA합성 Kit-5x rt premix (reverse transciption-elips biotech)를 이용하여 1ug으로 합성하였고, Primer 별/GAPDH로 보정하였다. 유사하게 HepG2 세포주 $0.5X10^6$를 2 웰에 분주하고 24시간 후, 새 배지 2ml에 lenti-shRNA와 lenti-shPHF20 (5'-ATGACTCTGTGACGTTGAATG:CATTCAACGTCACAGAGTCAT-3') 바이러스를 각각 처리하고 24시간 배양하였다. 24시간 후 PureHelix RNA Extraction Solution (Nanohelix Co., South Korea)을 이용하여 제공된 프로토콜에 따라 mRNA를 추출하였다. GE Nano vue로 정량 후, cDNA합성 Kit- 5x rt premix (reverse transciption -elips biotech)를 이용하여 1ug으로 합성하였으며, Primer 별/GAPDH로 보정하였다. 상기 결과를 도 4에 나타내었다.

[0080] 도 4에 나타낸 바와 같이, PHF20이 siRNA 또는 shRNA 로 넉다운된 간암 세포에서는 PHF20 의 발현량이 감소하였을 뿐만 아니라 이에 따라, SREBP1c, LXRa 의 발현량 역시 감소하였다. 이러한 결과는 지방 축적에 있어 SREBP1c, LXRa 를 발현시키고 경로를 조절하는 주요 인자가 PHF20임을 다시 한번 입증하는 것이다.

[0081] 이러한 결과는 DNA 어레이 결과를 통해서도 확인된다. HepG2 세포주를 $0.5X10^6$를 2 웰에 깔고 24시간 후, 새 배지 2ml에 adeno virus LacZ와 adeno PHF20 virus, ShRNA와 shPHF20 virus를 각각 처리하고 24시간 배양하였다. 그 후 PureHelix RNA Extraction Solution (Nanohelix Co., South Korea)을 이용하여 제공된 프로토콜에 따라 mRNA를 추출하여 마크로젠에 DNA array를 의뢰하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0082] 도 5에 나타낸 바와 같이, PHF20 넉다운 간암 세포주에서 탄소 대사 (A) 및 지방산 대사 (B) 에 관여하는 유전자 발현 변화 분석 결과, PHF20의 넉다운은 간에서 지방 축적 유전자인 SREBP1c 의 발현 및 관련 유전자의 발현에 영향을 주는 것으로 나타났다.

[0084] **실시예 5. PHF20 넉다운 인간 간암 세포주의 스테로이드 합성 유전자 발현 변화 확인**

[0085] 실시예 4의 PHF20 넉다운 간암 세포주 (HepG2 cells)의 DNA 어레이 결과, 스테로이드 생합성 유전자인 EBT (cholestenol Delta-isomerase), FTDT(farnesyltransferase) 유전자의 발현이 변화됨을 확인하였으므로, 넉다운 세포에서 EBT, FTDT 유전자의 발현의 변화를 다시 한번 검증하였고, 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0086] 도 6에 나타낸 바와 같이, PHF20 이 넉다운된 shPHF20, siPHF20 세포주에서 스테로이드 생합성 유전자 EBT, FTDT 의 발현량이 siNS, shRNA 실험군과 비교하여 유의하게 감소되어 있는 것을 확인하였다. 이러한 결과는 PHF20이 간에서의 지방 합성에 관여함을 분명하게 보여준다.

[0088] **실시예 6. PHF20 의 SREBP1c 프로모터 조절 활성 확인**

[0089] **6.1 PHF20 에 의한 STEBP1c 프로모터 활성화 확인**

[0090] PHF20의 STEBP1c 조절 기전을 확인하기 위하여 PHF20 발현에 따른 STEBP1c 프로모터 조절 활성을 확인하였다. 먼저 6 웰 플레이트에 HepG2 세포주를 $1X10^5$ 수의 세포를 분주 한 후, 다음날 beta-gal (0.25ug), pEGFP, pEGFP-PHF20, SREBP1c-루시퍼라아제 플라스미드 (각 1ug)를 JetPEI 시약으로 형질감염시켰다. 다음 날 새 배지로 교체하고, 24시간 후 reporter lysis buffer (25mM Tris-phosphate, 2 mM DTT, 2 mM trans-1,2-cyclohexanediamine-N,N,N′ ,N′ -tetraacetic acid, 10% (v/v) glycerol, 1% (v/v) Triton X-100 (Promega)을 이용하여 녹인 다음, 4℃ 13,000rpm 조건에서 30분간 원심 분리하였다. luciferase Substrate (Promega)

50ul와 원심 분리시킨 상층액 25ul넣고, luminometer (Berthold Technologies Lumat LB 9507) 를 이용하여 10초간 2회씩 루시퍼라아제 활성을 측정하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0091] 도 7에 나타낸 바와 같이, pEGFP-PHF20 가 형질감염된 군에서는 루시퍼라아제 활성이 매우 증가되어 있으므로, PHF20 발현에 의하여 SREBP1c 프로모터의 활성이 증가되어 있는 것을 확인하였다. 또한 이는 shPHF20 군에서 유의적으로 감소하였다.

[0093] **6.2 SREBP1c 프로모터 활성 조절 기전 확인**

[0094] STEBP1c 프로모터 활성 조절과 인슐린 신호전달 기전을 확하기 위하여, PKB (protein kinase B) 활성에 따른 STEBP1c 프로모터 활성 및 PHF20 활성에 의한 STEBP1c 프로모터 활성을 상기 루시퍼라아제 활성 측정법을 통해 확인하였다.

[0095] 6 웰 플레이트에 HepG2 세포주를 $1X10^5$ 수의 세포를 분주 한 후, 다음날 beta-gal (0.25ug/ul), HA-PKB WT, PKB active form 인 HA-PKB mp CA, dominant negative form인 HA-PKB KD (각 1ug/ul), SREBP1c-루시퍼라아제 플라스미드 (각 1ug)를 JetPEI 시약으로 형질감염시켰다. 다음 날 새 배지로 교체하고, 24시간 후 reporter lysis buffer (25mM Tris-phosphate, 2 mM DTT, 2 mM trans-1,2-cyclohexanediamine-N,N,N′ ,N′ -tetraacetic acid, 10% (v/v) glycerol, 1% (v/v) Triton X-100 (Promega) 을 이용하여 녹인 다음, 4℃ 13,000rpm 조건에서 30분간 원심 분리하였다. luciferase Substrate (Promega) 50ul와 원심 분리시킨 상층액 25ul넣고, luminometer (Berthold Technologies Lumat LB 9507) 를 이용하여 10초간 2회씩 루시퍼라아제 활성을 측정하였으며, 그 결과를 도 8의 A 에 나타내었다.

[0097] 또한 6 웰 플레이트에 HepG2 세포주를 $1X10^5$ 수의 세포를 분주 한 후, 다음날 beta-gal (0.25ug/ul), 인슐린 투여시 PKB에 의해 인산화되는 자리인 PHF20 의 291 번째 Ser 을 변이시킨 유전자를 JetPEI 시약으로 형질감염시킨 후 PKB 활성에 따른 측정과 동일한 방법으로 루시퍼라아제 활성을 측정하여 그 결과를 도 8 의 B에 나타내었다.

[0098] PHF20 변이체는 pENTR-Flag-PHF20 WT 를 주형으로 한 QuickChangeTM site-directed mutagenesis kit (Stratagene) 을 이용하여 제조하였다.

[0099] 도 8 의 A 에 나타낸 바와 같이, 인슐린 자극에 의해 HA-PKB WT의 SREBP1c 프로모터 활성이 활성화 되고, PKB active form 인 HA-PKB mp CA 인슐린자극 에 상관없이 SREBP1c 프로모터 활성이 활성화 되어, 인슐린 자극에 의해 PKB가 활성화 될 때, SREBP1c의 프로모터 활성이 활성화 되는 것을 확인하였다.

[0100] 도 8의 B 에 나타낸 바와 같이, PHF20에 변이를 가하지 않은 과발현 실험군 (PHF20 WT) 에서는 인슐린 투여에 의하여 SREBP1c 프로모터의 활성이 현저하게 증가하였으나 PHF20 S291A 에서는 인슐린 추가, 비추가 모든 군에서 SREBP1c 프로모터 활성이 거의 사라지는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과를 통해 인슐린에 의해 PKB (pS473) 가 활성화되면 PHF20 의 S291이 인산화 및 활성화되어 SREBP1c의 프로모터에 결합함으로써 프로모터 활성을 증가시키고, 이를 통해 SREBP1c의 합성 및 지방합성에 관련된 유전자의 발현을 증가시킨다는 것을 확인하였다.

[0102] **6.3 SREBP1c Chromatin-IP 을 통한 STEBP1c 프로모터 결합 자리 확인**

[0103] 10cm 플레이트에 HepG2 세포주를 5X105 수의 세포를 각각 분주 한 다음 날, FBS가 없는 배지로 교체 8시간 후 인슐린 100nM을 15분간 처리한 후, 다음과 같이 진행하였다.

[0104] 1일차 프로토콜은 다음과 같다: 먼저 100mm dish에 6 ml의 배지가 있을 경우, 고정 용액을 600 ul 씩 첨가하여 잘 섞어 준 후, 실온에서 천천히 5~10분 동안 교반을 수행하였다. 1.5 M 글리신 100 ul 첨가 후, 실온에서 3분간 교반을 수행하고 Cold PBS로 2회 세척해 주었으며, Cold PBS 1 ml 분주 후, 스크래퍼로 긁어 15 ml 튜브로 이동시켰다. 튜브를 2500 rpm, 4℃, 7 분 조건으로 원심분리시켰으며, SDS-lysis bf. 500 ul 첨가 후, 재현탁 (resuspension) 하여 EP 튜브로 이동하였다. 7 내지 10 분간 ice 에서 정치한 후 30s, on 및1min off, 10분 정도 음파 처리를 7 내지 12 사이클로 수행하였다. 13000 rpm, 4℃ 조건으로 20분간 원심분리하였으며, 상층액을

새로운 15 ml 튜브에 옮기고 ice 상에서 분주하고자 하는 총량에 맞추어 희석 완충액을 첨가하였다. 4℃에서 하룻밤동안 배양하였다.

[0105] 2일차 프로토콜은 다음과 같다: Sepharose A&G 를 50 ul씩 첨가한 후, 인버팅 (inverting) 하였으며, 4℃ 에서 4시간 동안 배양을 수행하였다. 이 후 10,000 rpm, 4℃ 조건으로 1분간 원심분리를 수행한 후 상층액을 제거하였고, 1X RIPA / 150mM NaCl 500 ul ~ 1 ml 첨가 후, 15회 인버팅하였다. 10,000 rpm, 4℃ 조건으로 1 분간 원심분리를 수행하고 상층액을 제거한 후 1X RIPA / 350mM NaCl 500 ul ~ 1 ml 첨가 후, 10분간 4℃ 교반하였다. 10,000 rpm, 4℃ 조건으로 다시 1 분의 원신분리를 수행 후 상층액을 제거하고 LiCl 세척 완충액 500 ul ~ 1 ml 첨가 후, 10분간 4℃ 교반하였다. 10,000 rpm, 4℃ 조건으로 1 분간 원심분리를 수행하고 상층액 제거하였다. TE 세척완충액 500 ul ~ 1 ml를 첨가 후, 15회 인버팅을 수행하였으며 10,000 rpm, 4℃, 1 분간 원심분리 수행 및 상층액 제거, 다시 TE 세척완충액 500 ul ~ 1 ml를 첨가 후 4℃ 교반 과정을 반복하였다. 그 후 직접 용출 완충액을 200ul 첨가하고 65℃ 에서 하룻밤동안 배양하였다.

[0106] 3일차 프로토콜은 다음과 같다: RNase A (4 mg/ml) 를 1 ul 씩 첨가하고 볼텍싱 및 spin down 을 수행하였으며 37℃에서 30 분간 배양을 수행하였다. 프로테아제 K (10 mg/ml) 를 1 ul씩 첨가하고 다시 볼텍싱 및 spin down 을 수행하였다. 55℃ 에서 1시간 배양을 수행하고 페놀 클로로포름 (Phenol/cIAA = 1:1)을 200 ul씩 첨가한 후, 볼텍싱을 수행하였다. 15000rpm, 27℃ 조건에서 5 분간 원심분리를 수행하고 상층액을 새 튜브로 이동시켰으며 TE/ 200mM NaCl 을 동량 첨가한 후 볼텍싱을 수행하고 글리코겐을 2 ul씩 첨가하고 다시 한번 볼텍싱 및 원심분리를 수행하였다. 100 % EtOH 을 800 ul 첨가 후, -70℃에서 2h ~ 하룻밤동안 배양하였다. 15,000 rpm, 4℃ 조건으로 15 분 원심분리를 수행한 후, 상층액을 제거하였으며 Cold 75 % EtOH 1ml 첨가 후 볼텍싱 수행후 상기 조건의 원심분리를 반복하였다. 상층액을 제거한 후 공기 건조를 수행하고 오토클레이브 DDW 50 ul 로 용해시킨 후 PCR을 수행하였다.

[0107] 실시예 6.2 에서 PHF20 S291 부위의 인산화 및 활성화가 SREBP1c의 프로모터 활성화에 관여함을 확인하였으므로, PHF20 S291 부위와 결합하는 SREBP1c의 프로모터 결합자리를 SREBP1c Chromatin-IP 실험을 통해 확인하였다.

[0108] 그 결과 도 9에 나타낸 바와 같이, PHF20 과발현 HepG2 세포에 인슐린을 처리하였을 때, PHF20은 SREBP1c -431/-258 자리에 결합함을 확인하였다.

[0110] **실시예 7. 인슐린 신호전달**

[0111] 3.5mm 플레이트에 HepG2 세포주를 $1X10^5$ 수의 세포를 각각 분주하고 다음날, adeno LacZ와 adeno PHF20 를 이용하여 PHF 20의 과발현을 유도하였다. 다음날 FBS가 없는 배지로 교체 8시간 후 인슐린 100nM을 15분간 처리하여 위와 동일한 방법으로 mRNA추출, cDNA 합성 후 Q-PCR로 PHF20의 발현을 확인하였다.

[0112] 또한 3.5mm 플레이트에 HepG2 세포주를 $1X10^5$ 수의 세포를 분주하고 다음날, 메트포르민 24시간 처리 후 위와 동일한 방법으로 mRNA추출, cDNA 합성 후 Q-PCR로 PHF20 유전자의 발현을 확인하였다.

[0113] 6웰 플레이트에 HepG2 세포주를 $1X10^5$ 수의 세포를 분주하였다. 다음날 대조군은 새 배지로 교체하여 24시간 배양하였고, 인슐린 처리 예정 실험군만 FBS가 없는 배지로 교체하였으며 8시간 후 인슐린 100nM을 15분간 처리하였다. EPA (eicosapentaenoic acid), 메트포르민은 분주한 다음날 각각 24시간 처리하였다. FBS 비처리군은 세포 분주 다음날 FBS가 없는 배지로 24시간 배양하였으며 FBS 처리군은 세포 분주 다음날 FBS가 든 새 배지로 교체 후 24시간 배양하여 위 6개 샘플군(대조군, 인슐린, EPA, 메트포르민, -FBS, +FBS)을 라이시스하여 웨스턴 블랏 방법으로 PHF20 단백질 발현을 확인하였다. PHF20은 아데노 바이러스를 통해 형질감염 시켰으며, 이는 실시예 3 에 기재된 방법에 따라 수행하였다. 인슐린, EPA, 메트포르민, FBS 처리에 따른 PHF20 발현량의 변화를 확인한 결과를 도 10에 나타내었다.

[0114] 도 10의 A에 나타낸 바와 같이 아데노 바이러스를 이용한 PHF20 형질감염에 의하여 HepG2 세포에서는 PHF20 의 mRNA 발현이 증가되었고, 인슐린 추가에 의하여 더욱더 현저한 발현 증가를 나타내었다. 그러나 도 10의 B에 나타낸 바와 같이 PHF20 과발현 세포주에 메트포르민 2.5mM 을 처리한 실험군에서는 PHF20 의 발현이 약 1/4 수준으로 현저하게 감소함을 확인하였다. 이는 단백질 발현에서도 확인되었다. 도 10 의 C 에 나타낸 바와 같이, 인슐린 100nM 처리군에서 PHF20의 단백질 발현은 대조군에 비해 증가하였으나, EPA 50uM 및 메트포르민 2.5mM 처

리시 PHF20의 단백질 발현은 거의 관찰되지 않았다.

[0116] **실시예 8. 지방간 모델에서의 PHF20 발현량 비교**

[0117] 일련의 실험을 통해 PHF20이 인슐린 투여에 의해 그 발현이 증가되며, 활성화된 PHF20 은 SREBP1c 프로모터에 결합하여 지방 축적 관련 유전자를 조절할 수 있음을 확인하였으므로, PHF20 발현량과 알코올성 지방간, 비 알코올성 지방간 모델에서의 PHF20의 발현량을 비교하였다. 또한 비 알코올성 지방간과 관련하여 정상 식이군 (NCD) 과 60% 고지방식이군 (HFD) 마우스의 간에서의 PHF20 유전자 발현량을 비교하였다. 상기 결과들을 도 11에 나타내었다.

[0118] 도 11에 나타낸 바와 같이, WT 마우스 간, 알코올성 지방간(ASH)와 비 알코올성 지방간(NASH)에서의 PHF20 단백질 발현량을 확인한 결과 알코올성 지방간, 비 알코올성 지방간 군 모두에서 야생형과 비교하여 증가한 PHF20 단백질 발현량 증가가 확인되었다 (A, B). 또한 정상 식이군과 60%고지방식이 군 마우스 간에서의 PHF20 유전자 발현량을 비교한 결과 고지방 식이군에서 현저히 증가된 PHF20 발현량이 확인되었다.

[0120] 상기와 같은 결과를 모두 종합하면, PHF20이 인슐린에 의해 S291이 인산화되고, SRBP1c 프로모터에 결합하여 프로모터 활성을 증가시킴으로써 지방 합성에 관여하는 유전자의 발현들을 증가시키고 이를 통해 간에서 지방 축적을 유도하게 됨을 알 수 있다. 이와 같은 모식도를 도 12에 나타내었다. 따라서 PHF20을 억제하거나, 이를 통한 SREBP1c 프로모터의 활성화를 억제하는 경우 지방간, 특히 고지방 식이에 의한 비 알코올성 지방간의 예방 또는 치료에 유용하게 활용할 수 있음을 알 수 있다.

[0122] **제제예 1. 의약품의 제조**

[0123] 1.1 산제의 제조

[0124] PHF20 억제제 100mg

[0125] 유당 100mg

[0126] 탈 10mg

[0127] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

[0129] **1.2 정제의 제조**

[0130] PHF20 억제제 100mg

[0131] 옥수수전분 100mg

[0132] 유당 100mg

[0133] 스테아린산 마그네슘 2mg

[0134] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0136] **1.3 캡슐제의 제조**

[0137] PHF20 억제제 100mg

[0138] 옥수수전분 100mg

[0139] 유당 100mg

[0140] 스테아린산 마그네슘 2mg

[0141] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 정제를 제조한다.

[0143] **1.4 주사제의 제조**

[0144] PHF20 억제제 100mg

[0145] 주사용 멸균 증류수 적량

[0146] pH 조절제 적량

[0147] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0149] **제제예 2. 식품의 제조**

[0150] **2.1 건강 음료의 제조**

[0151] PHF20 억제제 1,000 ㎎, 구연산 1,000 ㎎, 올리고당 10 g, 매실농축액 10 g, 타우린 1 g, 정제수 적량을 혼합하여 통상의 건강 음료의 제조방법에 따라 제조한다.

[0152] **2.2. 과자의 제조**

[0153] PHF20 억제제 4 g, 코코넛오일 62 g, 설탕 30 g, 계란 12 g, 소금 0.5 g, 밀가루 96 g을 혼합하고, 이 혼합물을 이용하여 쿠키, 크래커 및 스낵류를 제조한다.

[0155] **2.3. 양갱의 제조**

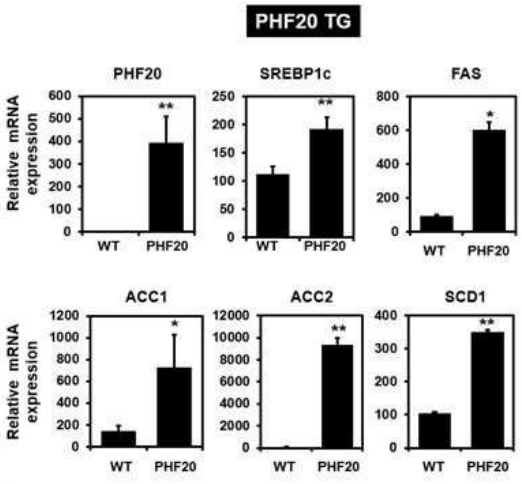
[0156] PHF20 억제제 5 g, 설탕 30 g, 한천 4 g, 앙금 100 g, 정제수 100 g을 혼합하고, 이 혼합물을 이용하여 양갱을 제조한다.

[0158] **2.4. 유제품의 제조**

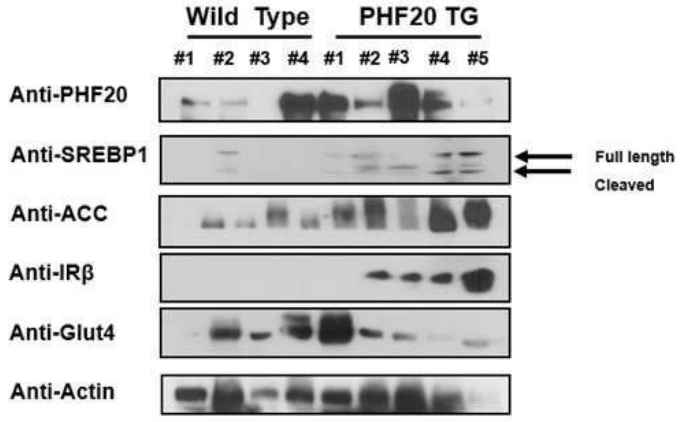
[0159] PHF20 억제제 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조한다.

도면

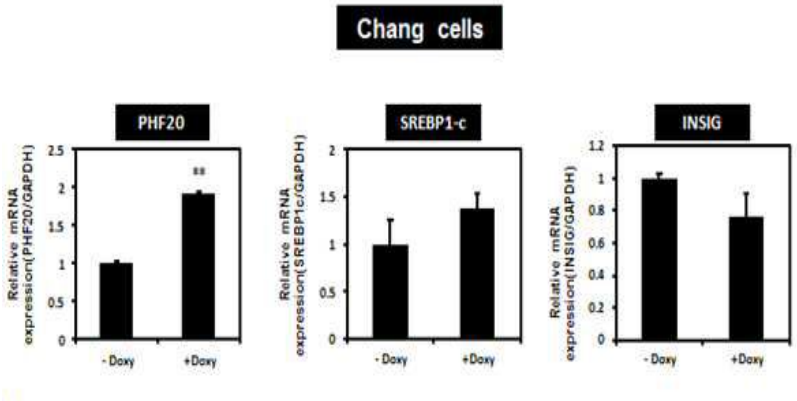
도면1



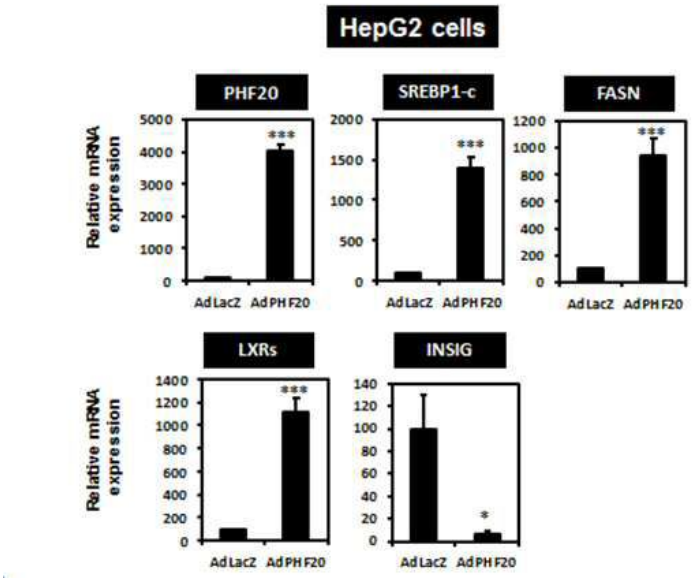
도면2



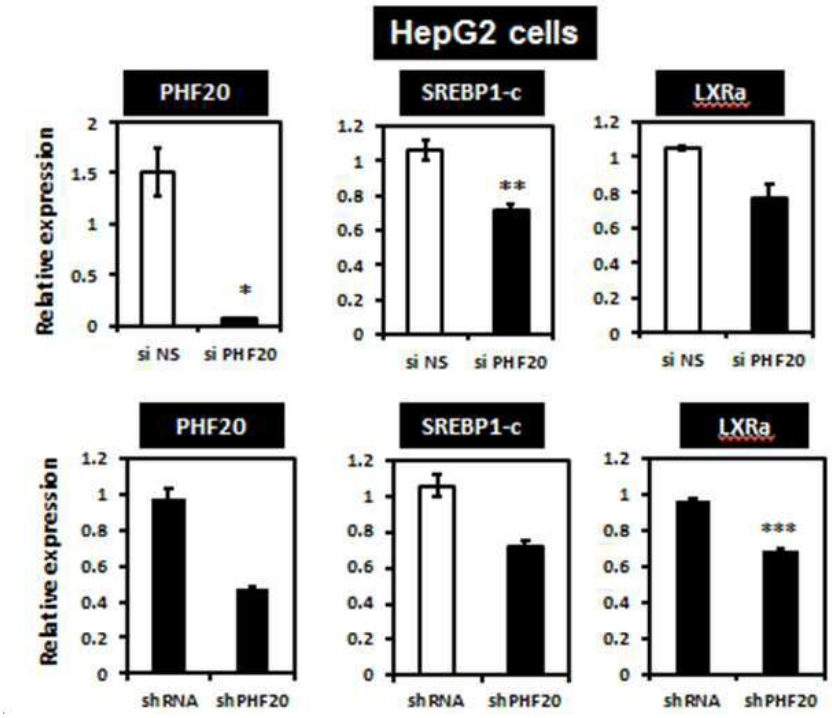
도면3a



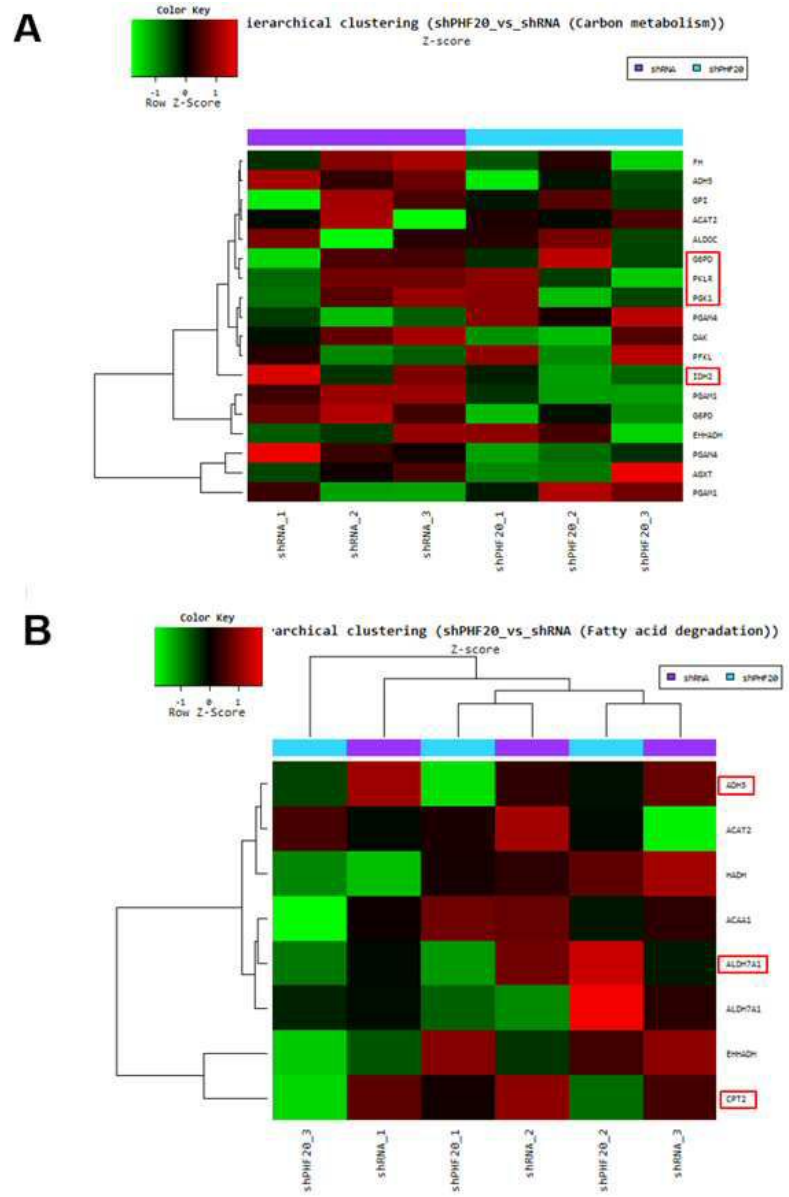
도면3b


HepG2 cells
PHF20
SREBP1-c
FASN
LXRs
INSIG
Relative mRNA expression
AdLacZ
AdPHF20

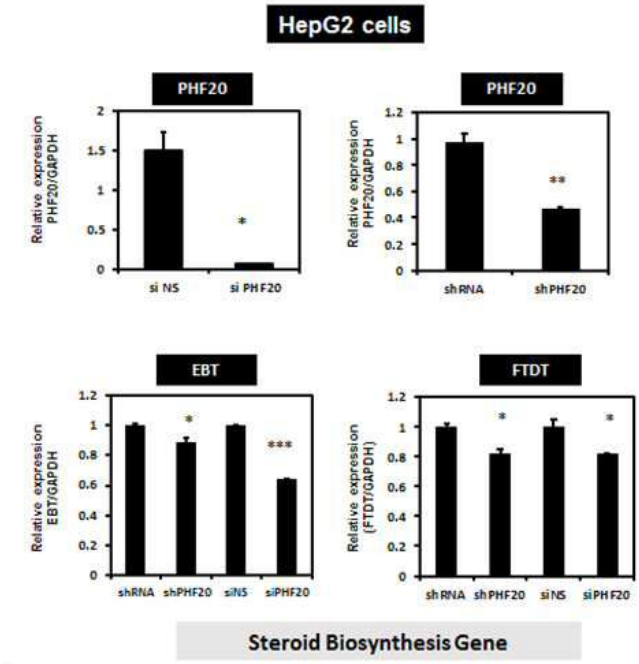
도면4


HepG2 cells
PHF20
SREBP1-c
LXRa
Relative expression
si NS
si PHF20
shRNA
shPHF20

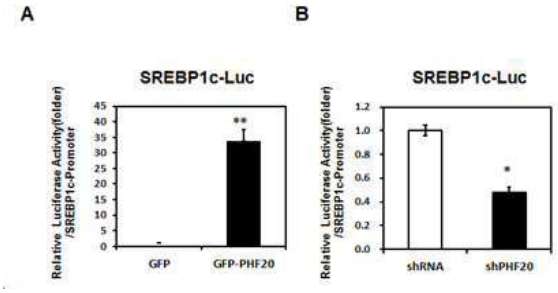
도면5


A
Color Key
Row Z-Score
ierarchical clustering (shPHF20_vs_shRNA (Carbon metabolism))
Z-score
shRNA
shPHF20
FH
ADH5
GPI
ACAT2
ALDOC
G6PD
PKLR
PGK1
PGAM4
DAK
PFKL
IDH2
PGAM1
G6PD
EHHADH
PGAM4
AGXT
PGAM1
shRNA_1
shRNA_2
shRNA_3
shPHF20_1
shPHF20_2
shPHF20_3
B
Color Key
Row Z-Score
archical clustering (shPHF20_vs_shRNA (Fatty acid degradation))
Z-score
shRNA
shPHF20
ADH5
ACAT2
HADH
ACAA1
ALDH7A1
ALDH7A1
EHHADH
CPT2
shPHF20_3
shRNA_1
shPHF20_1
shRNA_2
shPHF20_2
shRNA_3

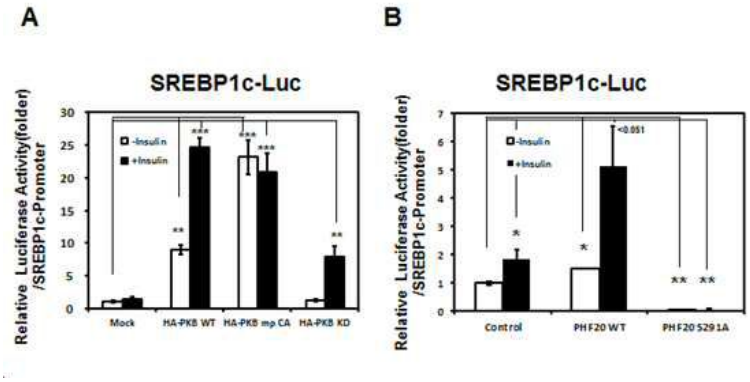
도면6


HepG2 cells
PHF20
Relative expression PHF20/GAPDH
si NS
si PHF20
PHF20
Relative expression PHF20/GAPDH
shRNA
shPHF20
EBT
Relative expression EBT/GAPDH
shRNA
shPHF20
siNS
siPHF20
FTDT
Relative expression (FTDT/GAPDH)
shRNA
shPHF20
siNS
siPHF20
Steroid Biosynthesis Gene

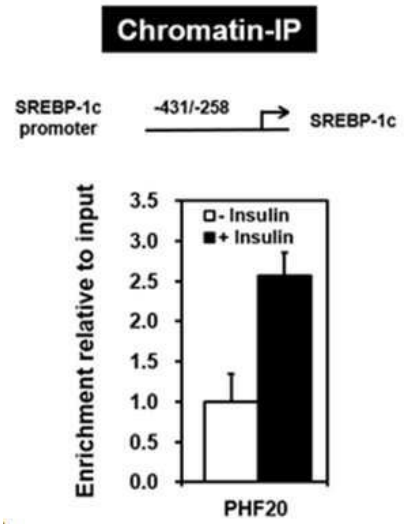
도면7


A
B
SREBP1c-Luc
Relative Luciferase Activity(folder) /SREBP1c-Promoter
GFP
GFP-PHF20
SREBP1c-Luc
Relative Luciferase Activity(folder) /SREBP1c-Promoter
shRNA
shPHF20

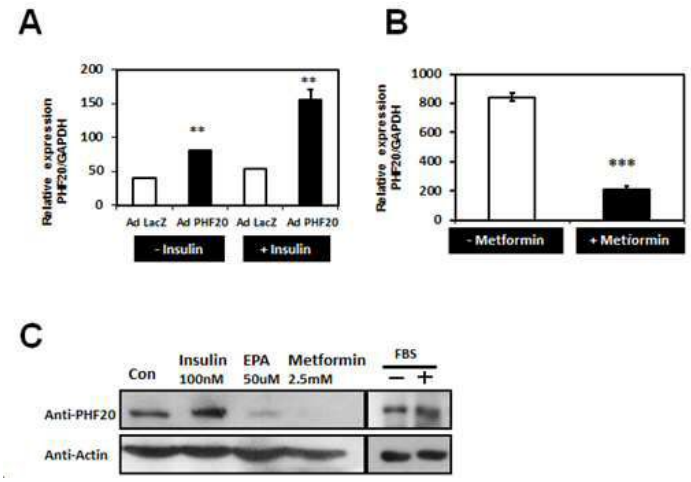
도면8


A
B
SREBP1c-Luc
Relative Luciferase Activity(folder) /SREBP1c-Promoter
-Insulin
+Insulin
Mock
HA-PKB WT
HA-PKB mp CA
HA-PKB KD
SREBP1c-Luc
Relative Luciferase Activity(folder) /SREBP1c-Promoter
-Insulin
+Insulin
Control
PHF20 WT
PHF20 S291A

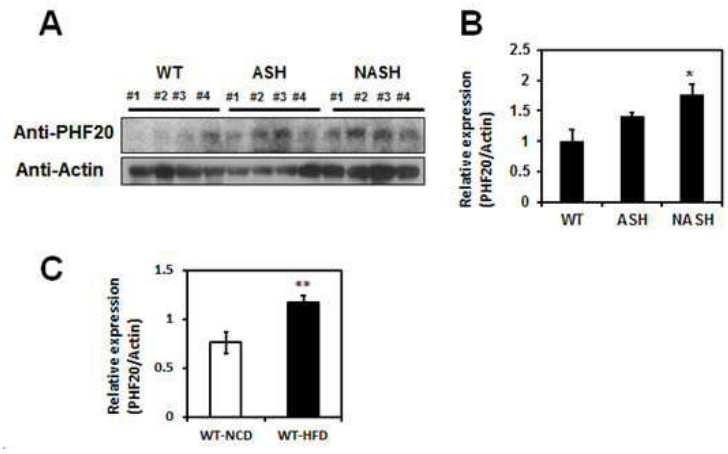
도면9



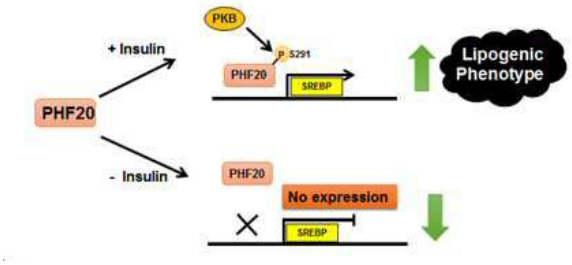
도면10



도면11



도면12



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> A composition comprising PHF20 inhibitor for preventing or treating fatty liver disease

<130> CNU1-47P

<160> 6

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 25

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siPHF20 1 Sense

<400> 1

guauccagcu cacauagaat tbast 25

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siPHF20 1 Antisense

<400> 2

uucuauguga gcuggauact t 21

<210> 3

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siPHF20 2 sense

<400> 3

caagcagccu gauaaagaat t 21

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siPHF20 2 Antisense

<400> 4

uucuuuauca ggcugcuugt t 21

<210> 5

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siPHF20 3 sense

<400> 5

cuacugcugu ggauucaaat t 21

<210> 6

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> siPHF20 3 Antisense

<400> 6

uuugaaucca cagcaguagt 20