

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0130282 (43) 공개일자 2013년12월02일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 31/192 (2006.01) A61K 31/12 (2006.01) A61K 31/375 (2006.01) A61P 19/10 (2006.01)		(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(21) 출원번호 10-2012-0053953		(72) 발명자 강영희 강원도 춘천시 옥천동 한림대학교 생명과학관 8513호 김정례 강원도 춘천시 옥천동 한림대학교 생명과학관 8512호
(22) 출원일자 2012년05월22일 심사청구일자 2012년05월22일 기술이전 희망 : , 실시권하여, 기술지도		

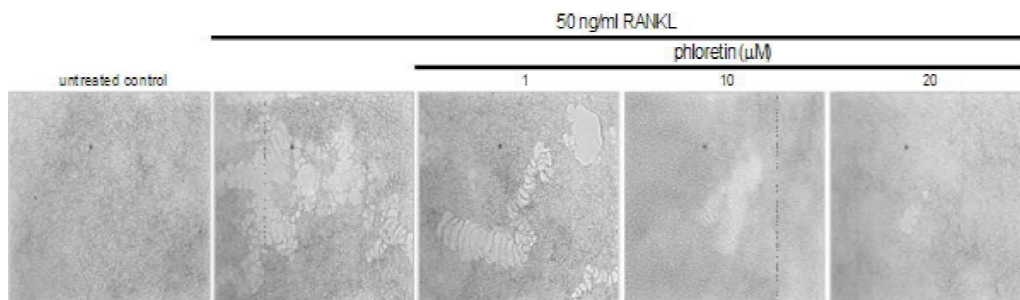
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 phloretin을 유효성분으로 하는 골량 저하질환의 치료 및 예방용 조성물

(57) 요약

본 발명은 골다공증으로 인한 골흡수를 도모하는 파골세포의 골흡수를 억제시키는 phloretin을 함유하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물에 대한 것이다. 보다 구체적으로, phloretin이 파골세포의 골흡수시 산성화 조건에 관여하는 Carbonic anhydrase 와 V-ATPase D2의 발현을 감소시키며 골흡수시 분비되는 MMP-9의 분비를 억제시키고, Cathepsin K 의 발현 및 분비를 감소시켜 파골세포의 골흡수를 억제시킨다. 또한 난소절제 골다공증 동물모델에서 난소절제로 인한 감소된 골밀도를 상승시켜주었다. 이로서 phloretin은 부작용이 없으면서 파골세포의 분화를 억제하여 골흡수를 억제시킬 수 있는 골다공증 치료 및 예방할 수 있는 조성물에 대한 것이다.

대 표 도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012012946

부처명 교육과학기술부

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 사과껍질에 함유되어 있는 플로레틴과 플로리진 성분의 꿀다공증을 포함한 꿀질환에 대한
억제효능 탐색 및 기전적 역할 규명 : 꿀재형성 중심으로

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2015.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

phloretin을 포함하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물

청구항 2

제 1항에 있어서,

phloretin을 유효성분은 파골세포의 골흡수시 산성화 조건을 억제하여 골흡수를 억제시키는 것을 특징으로 하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물

청구항 3

제 1항에 있어서,

phloretin을 유효성분은 난소절제한 생쥐 동물모델에서 골흡수로 인해 감소된 골밀도를 상승시키는 것을 특징으로 하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 파골세포의 골흡수를 억제하는 phloretin을 유효성분으로 하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물에 대한 것이다.

[0002] 보다 구체적으로, phloretin은 파골세포의 골흡수시 산성화 조건에 관여하는 Carbonic anhydrase 와 V-ATPase D2의 발현이 감소하였으며, 골흡수시 분비되는 MMP-9의 분비를 억제시키고, Cathepsin K 의 발현 및 분비를 감소시켜 파골세포의 골흡수를 억제시킨다. 또한 난소절제 골다공증 동물모델에서 감소한 골밀도를 상승시켜주었다.

[0003] 따라서, phloretin은 부작용이 없으면서 파골세포의 분화를 억제하여 골흡수를 억제시키며 골밀도를 상승시킬 수 있는 골다공증 개선, 치료 및 예방할 수 있는 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0004] 세계보건기구(WHO)는 골다공증을 골강도의 약화로 골질의 위험성이 증가하게 되는 골격계질환으로 정의하고 있으며, 골강도는 골량과 골질에 의해 결정된다. 골량은 20대 중반 또는 30대 초반의 청장년 시기에 일생 중 최대 골량이 형성되고 그 이후 연령 증가에 따라 골 손실이 진행된다. 30대에서 50대까지는 대체로 골량이 유지되며, 이는 오래된 뼈는 제거되는 골흡수와 새로운 뼈를 형성하는 골형성이 항상성이 이루어지기 때문이다.

[0005] 골(bone)은 형성과 흡수가 지속적으로 일어나는 역동적인 조직으로 여러 가지 종류의 자극에 반응한다. 이런 골대사는 조골세포(osteoblast)와 파골세포(osteoclast)의 활성정도에 따라 오래된 뼈가 파괴, 흡수되거나 새로운 뼈가 형성되는데, 정상적인 경우 이들 세포의 상호작용에 의해 골개조(bone remodeling)가 일어난다. 하지만, 골형성과 골흡수간의 균형이 깨지면서 뼈의 골량이 감소하기 때문에 골다공증이 일어나게 된다. 골량은 30세까지 조골세포와 파골세포의 균형을 이루며 최고치를 이루다가 30세 이후부터 지속적으로 감소하게 되며 폐경기 여성인 경우 호르몬의 변화로 인해 급격히 감소하게 된다. 골다공증은 초기에 급격히 진행되는 데 골흡수로 인해 골손실이 일어나게 되는데 이에 파골세포의 분화를 억제하거나 골흡수를 감소시키는 것이 필요하다.

[0006] 최근 급속한 경제성장과 의학의 발전은 고령화 사회로의 진입을 가속시키고 있으며, 이에 따른 관련된 만성질환으로 고통 받는 노인 인구가 빠르게 증가하고 있다. 노인인구의 증가에 따라 더불어 나타나는 대표적인 질환이 골다공증이다. 현재 골다공증의 예방과 치료 목적으로 식물성 에스트로겐이 폐경 후 골다공증의 예방을 위한 대안으로서의 기능성이 제시되고 있으며, 기타 스테로이드제제들을 병행해서 치료한다.

[0007] 파골세포(osteoclast)는 조혈모세포(hematopoietic stem cell)로부터 유래되는 단핵세포들이 서로 융

합되어 거대다핵세포로 골흡수에 관여한다. 파골세포의 분화에 있어 M-CSF(macrophage-colony stimulation factor)는 전구세포의 생존인자로 파골세포분화를 유도한다. M-CSF의 자극을 받게 되면 Akt, MAP kinase를 통해 cyclin D를 활성화시키게 되고 세포의 증식을 자극하게 되며, 이후 c-fos와 RANK 수용체가 나타난다. 파골세포를 활성화 하는 가장 중요한 RANKL은 조골세포 또는 활성화된 면역세포에서 생성된다. RANKL은 파골세포 및 전구세포에 위치한 수용체인 RANK와 결합하여 파골세포의 형성과 활성을 촉진한다. 즉, 단핵구의 전구체들이 융합하여 골흡수를 하는 다핵 파골세포로 분화할 수 있으며, 이러한 분화 과정은 RANKL이 RANK에 결합하여 MAP(mitogen-activated protein) 키나아제의 활성을 조절하고, 이는 NF-kB(nuclear factor kaapa-light-chain-enhancer of activated B cells)라는 전사인자가 핵내로 들어가서 파골세포분화와 관련된 주석산염저항성 산성인산분해효소(Tartrate-Resistant Acid Phosphatase, TRAP), MMP-9(matrix metalloproteinase-9), c-Src 티로신 키나아제(tyrosine kinase) 등의 발현이 증가하게 된다. 골흡수는 산성화에 의한 무기질의 용해와 효소에 의한 기질단백질의 용해과정으로 가수분해효소를 분비하여 무기질과 유기물을 용해시키고, 콜라겐 분해효소, 시스테인 단백 분해효소 등이 골흡수에 관여한다 (Boyle WJ. et al., Nature, 423, 337-342, 2003).

[0008] Matrix-metalloproteinase (MMP)는 세포의 기질을 용해하는 효소로, 현재까지 20여종 이상의 MMP가 발견되었다. MMP는 정상적인 생물학적 과정인 기관형성, 신경성장, 뼈형성, 혈관신생 및 세포사멸 뿐만 아니라 관절염, 피부 및 위과양 등의 다양한 병적인 과정에 관여한다 (Nagase H., et al., J Biol Chem., 274, 21491-21494, 1999). 이중 MMP-9는 gelatinase B 혹은 92 kDa gelatinase라고도 불리우며, gelatin과 collagen을 분해하는 능력을 가지고 있다. MMP-9은 파골세포 전구세포와 파골세포의 이동에 관여하며 파골세포분화를 유도하는 사이토카인(cytokine)의 활성화 과정에도 관여하는 (Sato T et al., J Bone Miner Res, 13, 59-66, 1998) 것으로 보고되었으며 골흡수 과정에도 중요한 역할을 담당한다. (Andersen TL., et al., Bone, 35, 1107-1119, 2004)

[0009] 골다공증의 예방 및 치료제로 골흡수 억제제의 발명은 많이 되어져있으나 골형성 촉진제의 발명은 아직 미미하며 또한 골흡수 억제제와 골형성 촉진제의 천연물 소재 발명은 미미한 실정이며, 폐경 여성에서는 에스트로겐 투여가 골다공증 치료에는 효과적이나 유방암의 발생을 증가시키고 동맥경화성 질환을 증가시킨다는 보고가 있으며, 장기간의 투여가 필요한 골다공증 치료제들은 부작용을 일으킬 가능성이 높다.

[0010] 골다공증의 예방 및 치료제로 합성물질의 이용한 골흡수 억제제의 발명은 많이 되어져 있으나 골흡수 억제제와 골형성 촉진제의 천연물 소재 발명은 미미한 실정이다.

[0011] Phloretin은 사과와 파피에 함유되어 있는 dihydrochalcone 성분으로 항산화 능력이 뛰어난 것으로 알려져 있다. phloretin이 파골세포의 분화억제에 대한 기전연구를 살펴본 결과 phloretin이 파골세포 생성시 TRAP 억제 효과에 대한 내용을 포함하는 논문은 발표 되었으나 (Liu Y et al., Biol Cell, 101, 133-40, 2009. Aharon R and Bar-Shavit Z, J Biol Chem, 218, 19305-9, 2006 그 논문에서는 phloretin에 대한 효능 논문이 아니며, 본 연구에서는 phloretin이 파골세포의 생성이 아니라 파골세포의 골흡수 과정을 억제하는 연구로 차별성이 있다고 본다.

[0012] 본 연구에서는 대식세포의 파골세포의 분화과정 동안 phloretin을 처리하여 파골세포의 골흡수에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 난소절제 동물모델에서 골밀도에 미치는 영향을 확인하였다. 이에 파골세포의 골흡수 시 산성화 조건에 관여하는 Carbonic anhydrase 와 V-ATPase D2의 발현이 감소하였으며, 골흡수에 관여하는 Cathepsin K의 발현 및 분비 억제와 또 다른 골흡수 지표인 MMP-9의 활성이 감소하고, 난소절제 동물모델에서 골밀도가 증가시키는 것으로 골다공증 치료 및 예방 물질로서 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 phloretin이 골흡수에 관여하는 파골세포의 골흡수를 감소시켜 골다공증과 같은 골질환의 치료와 예방을 위한 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 phloretin을 유효성분으로 파골세포의 골흡수를 억제시키며, 난소절제 동물모델에서 골밀도를 증가시켰다. 이로써 phloretin이 골다공증을 개선하고 예방할 수 있는 효능을 확인하였다.

발명의 효과

[0015] 본 발명으로 phloretin을 제공하여, phloretin이 파골세포의 골흡수시 산성화 조건에 관여하는 Carbonic anhydrase 와 V-ATPase D2의 발현이 감소하였으며, 골흡수 과정에서 MMP-9의 활성을 억제할 뿐만 아니라, Cathepsin K의 발현 및 분비를 억제시켜 최종적으로 골흡수능을 감소시키는 물론이며, 난소절제 골다공증 동물 모델에서 골밀도를 증가시켜 주어 골흡수로 인한 골다공증을 억제시켜 주는 효능으로 골다공증을 치료하고 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 phloretin이 RAW264.7 대식세포에서 파골세포로의 분화 후 골흡수시 산성화 조건에 관여하는 Carbonic anhydrase 와 V-ATPase D2의 억제효과를 나타낸 결과이다. 웨스턴블롯 분석결과이며, 이것을 덴시토미터(densitometer)로 측정하여 정량화하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 2는 phloretin이 RAW264.7 대식세포에서 파골세포로의 분화 후 골흡수에 관여하는 Cathepsin K의 분비 및 발현에 대한 phloretin의 억제효과를 나타낸 결과이다. 웨스턴블롯 분석결과이며, 이것을 덴시토미터(densitometer)로 측정하여 정량화하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 3은 RAW264.7 대식세포의 파골세포 분화 후 골흡수에 관여하는 MMP-9의 활성화에 대한 phloretin의 억제효과를 gelatin zymography 측정한 결과이며, 이것을 덴시토미터(densitometer)로 측정하여 정량화하여 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 RAW264.7 대식세포를 파골세포로 분화시킨 후 골흡수 정도를 골흡수 면적을 통해 phloretin이 골흡수를 억제하는 것을 나타낸 결과이다. 파골세포로 분화가 되면서 골흡수를 위해서 골분해 효소들을 분비하는 것을 칼슘과 인이 코팅되어진 배양기에서 골흡수 면적을 확인한 결과이다.

도 5는 난소절제 후 phloretin을 8주간 경구 투여한 후 골밀도를 측정한 결과이다. 난소절제로 인한 골밀도의 감소를 확인하였고 phloretin을 경구 투여시 감소한 골밀도가 증가하는 것을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 골흡수를 도모하는 파골세포의 골흡수를 억제하며 난소절제 동물모델에서 골밀도를 상승시켜 phloretin을 포함하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물을 제공한다.

[0018] 보다 상세하게는 pphloretin이 파골세포의 골흡수시 산성화 조건에 관여하는 Carbonic anhydrase 와 V-ATPase D2의 발현이 감소시키며, 골흡수시 분비되는 MMP-9의 분비를 억제시키고, Cathepsin K의 발현 및 분비를 감소시켜 파골세포의 골흡수를 억제시킨다. 또한 난소절제동물에서 난소절제로 인한 감소되어진 골밀도가 phloretin 투여시 증가함으로써 phloretin은 부작용이 없으면서 파골세포의 골흡수를 감소시키며, 골밀도를 증가시킬 수 있는 골다공증 개선, 치료 및 예방할 수 있는 조성물을 제공한다.

[0019] phloretin은 통상적인 방법에 따라 제조하여 사용하거나 시판되는 것을 구입하여 사용할 수 있다.

[0020]

[0021] 이하 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0022] 본 발명의 phloretin은 파골세포의 골흡수시 산성화 조건에 관여하는 Carbonic anhydrase 와 V-ATPase D2의 발현이 감소시키며 골흡수과정에서 MMP-9의 활성을 감소키며, Cathepsin K의 발현 및 분비를 감소시켜 골흡수를 억제시킴으로서 골다공증으로 인한 골흡수를 억제시키는 활성을 나타내는 것이다.

[0023] 본 발명에 의한 파골세포의 분화 억제용 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정되지 않지만, 구체적인 예로 음료, 분말, 농축, 캡슐 제형 또는 의약 제형으로 제조할 수 있다.

- [0024] 본 발명에 다음의 실시 예에 의거하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위를 제한하는 것이 아님은 당업자에게 있어서 명백한 사실이다. 즉, 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 당업자에 의하여 용이하게 실시될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.
- [0025] (실시 예1) 세포배양 실험
- [0026] (1-1) 마우스 대식세포(RAW264.7) 배양
- [0027] 마우스 대식세포(RAW264.7)는 ATCC(USA)에서 구입하여 배양하였다. RAW264.7은 10% FBS와 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin이 첨가되어 있는 Dulbecco's Modified Eagles's Medium (DMEM, Sigma co., St. Louis, MO, USA)배지를 이용하여 37, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 파골세포로 분화하기 위하여 50 ng/ml RANKL을 첨가한 배지에서 phloretin을 5일 동안 처리하였다.
- [0028] (실시 예2) phloretin에 의한 Cathepsin K의 분비 및 발현 감소
- [0029] (2-1) 웨스턴블롯
- [0030] 파골세포의 Cathepsin K의 분비 및 발현을 측정하기 위해 0.110⁴ 밀도의 RAW264.7 세포를 50 ng/ml RANKL을 첨가한 배지에 phloretin을 처리하였다. 세포배양이 끝난 후 수확한 세포배지 및 세포를 준비하였다. 세포배지 및 세포 추출물 단백질의 웨스턴블롯은 10% SDS-PAGE로 수행하였다. 전기영동으로 얻은 단백질 띠(bands)들은 nitrocellulose membrane으로 전이시키고, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 3% bovine serum albumin (BSA)에 3시간 동안 blocking하였다. Cathepsin K, Carbonic anhydrase 와 V-ATPase D2 단백질의 일차항체(polyclonal rabbit anti-mouse antibody, Santa Cruz Biotech., CA, USA)를 1,000배로 희석하여 교반하면서 반응시키고, goat anti-rabbit horseradish peroxidase (1:5000, Jackson ImmunoResearch Lab.)의 이차항체로 1시간 반응시켰다. Nitrocellulose membrane에 있는 Cathepsin K, Carbonic anhydrase 와 V-ATPase D2 단백질은 Supersignal West pico chemiluminescence (Pierce Biotech. NJ, USA)로 검출하여 X-ray 필름 (Konica Co., Tokyo, Japan)으로 촬영하였다.
- [0031] 그 결과는 도 1과 2에 나타내었다.
- [0032] 파골세포의 골흡수시 산성화 조건에 관여하는 Carbonic anhydrase 와 V-ATPase D2의 발현이 RANKL에 의해 증가하였으나 phloretin(도 1)을 처리한 세포에서는 발현이 억제되었다.
- [0033] 파골세포를 분화 후 골흡수에 관여하는 Cathepsin K의 분비 및 발현이 RANKL에 의해 증가하였으나 phloretin(도 2)을 처리한 세포에서는 분비 및 발현 수준이 현저히 감소되었다.
- [0034] (실시 예3) phloretin에 의한 MMP-9의 분비 감소
- [0035] (3-1) gelatin zymography
- [0036] 세포의 MMP-9의 활성을 측정하기 위해 1 10⁴ 밀도의 RAW264.7 대식세포에 RANKL와 함께 phloretin을 처리하였다. 배양이 끝난 세포의 배양액을 수집하였다. 0.1% gelatin이 첨가된 8% SDS-PAGE gel 상에서 전기영동 후 gel을 2.5% Triton X-100 넣고 37에서 한 시간 동안 배양하였다. 배양 후 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5)를 이용해 세척해 주고 200 mM NaCl, 10 mM CaCl₂와 0.05% Brij-35이 포함된 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 용액에서 20시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후 0.1% Coomassie brilliant Blue G-250, 2% acetic acid 와 45%

methanol이 첨가된 용액으로 gel을 염색한 후 30% methanol과 10% acetic acid 용액에 넣어 destain 해준다.

[0037] 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0038] 파골세포를 분화 후 골흡수에 관여하는 MMP-9의 활성이 RANKL에 의해 증가하였으나 phloretin(도 3)을 처리한 세포에서는 농도 의존적으로 감소하였다.

[0039] (실시 예4) phloretin의 골흡수 억제

[0040] (4-1) 골흡수 억제 측정

[0041] 파골세포의 골흡수 면적을 측정하기 위해 0.110⁴ 밀도의 RAW264.7 세포를 상아질 조각(dentine slice) 위에 놓고 RANKL을 첨가한 배지에 10⁵ phloretin을 처리하였다. 배양이 끝난 후, 파골세포를 제거하고 흡수된 부분을 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.

[0042] 그 결과는 도 4에 나타내었다.

[0043] 5일간 배양된 RAW264.7세포에서 RANKL을 처리하여 분화시키면 함께 처리된 phloretin에 의하여 증가된 골흡수 면적이 감소되었다.

[0044] (실시 예5) phloretin의 골밀도 상승

[0045] (5-1) 골밀도 측정

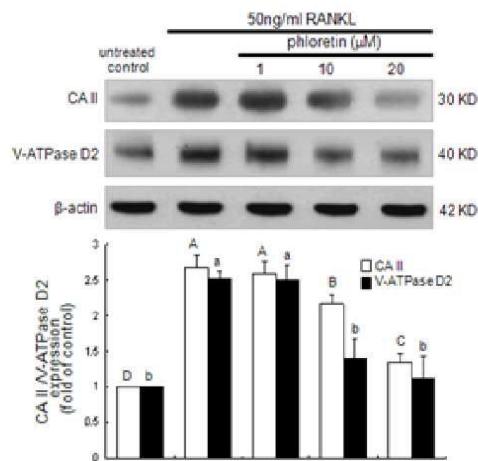
[0046] 12주령의 마우스(C57BL/6) 암컷을 한림대학교 실험동물부로부터 구입하여 한림대학교 동물실험실에서 키웠으며, 이곳의 온도는 23^oC, 습도는 40~60%, 명암주기는 12시간 조건으로 사육하였다. 상기 동물을 케타민 1ml/kg(체중) 복강 투여하여 마취 후 마우스의 복부를 개복한 후 양쪽 난소를 절개하였다. 정상군은 난소를 절제하지 않고 동일한 수술만 시행하였다. 수술 후 1주일간 회복기를 가졌으며, phloretin을 체중 kg당 10 mg 씩 8주간 경구투여하고 골밀도를 측정하였다.

[0047] 그 결과는 도 5에 나타내었다.

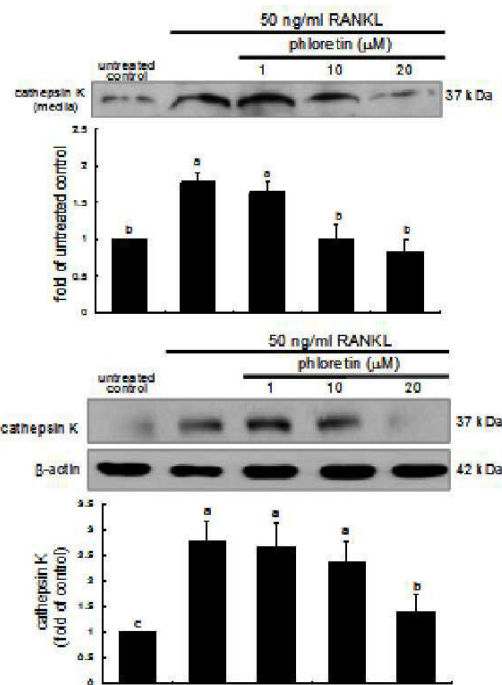
[0048] 난소절제후 골밀도의 감소를 확인하였고 여기에 phloretin을 투여한 경구 감소한 골밀도가 증가하는 것을 확인하였다.

도면

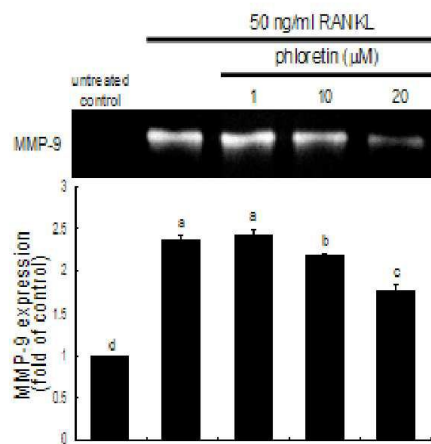
도면1



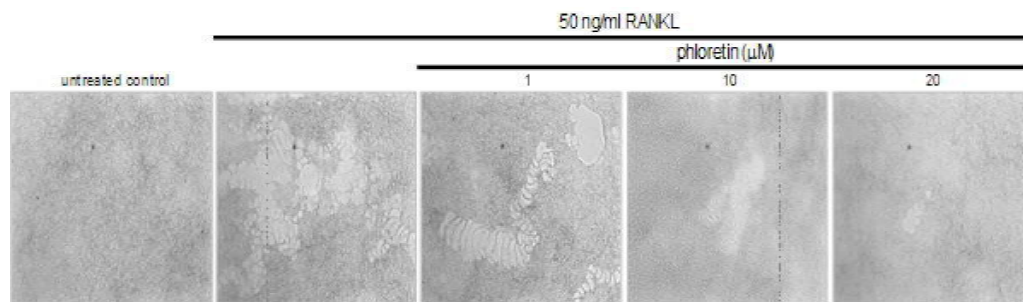
도면2



도면3



도면4



도면5

Parameters	sham	OVX	phloretin
BMD ¹⁾ (mg/cm ²)	74.4 ± 2.0 ^{a)}	61.0 ± 0.8 ^{c)}	70.1 ± 1.0 ^{b)}
BMC ²⁾ (g)	17.6 ± 0.4 ^{a)}	15.1 ± 0.2 ^{b)}	17.0 ± 0.4 ^{a)}
AREA ³⁾ (cm ²)	0.237 ± 0.003	0.250 ± 0.004	0.243 ± 0.004

1) BMD : Bone mineral density

2) BMC : Bone mineral concentration

3) AREA : Bone width

Values are means ± SD of 9 mice

* : Values in the same row not sharing the same superscript differ (p<0.05)