



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0065129
(43) 공개일자 2013년06월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) A61D 7/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0131852
(22) 출원일자 2011년12월09일
심사청구일자 2011년12월09일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
서홍석
서울특별시 용산구 한강대로 211, 대우월드마크
101-2804 (한강로1가)
김응주
서울특별시 송파구 신천동 진주아파트 4동 801호
(74) 대리인
특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **염증 유도에 의해서 유발된 혈관 석회화를 수반하는 토끼 모델**

(57) 요약

본 발명은 정상 토끼에 대해서 염증 유발 물질을 주기적으로 투여함으로써 유도된 혈관 석회화 현상을 수반하는 토끼 모델에 관한 것이다.

본 발명에 따른 혈관 석회화 현상을 수반하는 토끼 모델은 간단하고, 단기간에 걸쳐서 수행될 수 있으며, 경제적인 방법에 의해서 제공될 수 있으며, 더욱이 질병 또는 병태생리적 변화를 나타내지 않는 정상 토끼로부터 유래되었기 때문에, 혈관 석회화의 발생 기전 및 관련 질병의 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1a



특허청구의 범위

청구항 1

정상 토끼에 대해서 염증 유발 물질을 주기적으로 투여함으로써 유도된 혈관 석회화 현상을 수반하는 토끼 모델.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 염증 유발 물질은 카라지난 (carrageenan) 또는 리포폴리사카라이드 (lipopolysaccharide)인 것을 특징으로 하는 혈관 석회화 현상을 수반하는 토끼 모델.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 카라지난은 요타-카라지난 (ι -carrageenan), 카파-카라지난 (κ -carrageenan) 및 람다-카라지난 (λ -carrageenan)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질인 것을 특징으로 하는 혈관 석회화 현상을 수반하는 토끼 모델.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 염증 유발 물질의 주기적 투여는, 체중 1 kg 당 0.05 mg 내지 0.1 mg 용량으로, 15일 내지 21일의 간격으로 피하주사 투여에 의해서 수행되는 것을 특징으로 하는 혈관 석회화 현상을 수반하는 토끼 모델.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 염증 유발 물질이 투여된 토끼는 19℃ 내지 23℃의 온도, 41% 내지 62%의 습도 조건 하에서 90일 내지 180일의 기간 동안 사육되는 것을 특징으로 하는 혈관 석회화 현상을 수반하는 토끼 모델.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 정상 토끼에 대해서 염증 유발 약물을 투여하여 유도된 인위적인 혈관 석회화를 수반하는 토끼 모델에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 혈관 석회화 (vascular calcification)는 정상적인 노화 과정에서 뿐만 아니라 당뇨병, 죽상경화증 및 만성 신장질환 등에서도 관찰되는데, 혈관 석회화 현상을 수반하는 환자의 경우, 심혈관 질환 (심장 돌연사, 심근경색, 협심증 및 허혈성 심부전 등)의 위험도가 정상인에 비해서 약 4배 정도 높은 것으로 많은 연구에서 발표된 바 있으며, 나아가 이러한 혈관 석회화 현상은 심혈관 질환 발생의 독립 위험인자로도 알려져 있다. 이러한, 혈관의 석회화는 크게 내막과 중막에 발생할 수 있으며, 내막의 경우는 죽상경화병소 부위에 직접 칼슘이 침착되어 발생되고, 중막의 경우는 당뇨, 칼슘 대사기전 이상 또는 신장 질환 등으로 인하여 골혈성 촉진 인자들이 혈관에 발현되어 발생하는 것으로 알려진 바 있다.

[0003] 혈관 석회화의 발생 기전에 대해서는 현재까지도 명확하게 알려진 바가 없으며, 과거에는 단순히 칼슘과 인의 과잉으로 인한 연조직 침착을 그 원인으로 생각하였으나, 최근에는 이러한 단순한 원인 때문이 아니라, 매우 정교하게 조절된 기전이 혈관 석회화에 기여할 것이라는 연구들이 속속 보고되고 있다. 현재까지 제시된 혈관 석회화 발생 기전에 대한 가설들은: i) 유전자 변이 동물 실험 모델로부터 유추해 볼 때, 일부 유전자의 돌연변이에 의해서 억제 기전이 소실됨으로써 혈관 석회화가 발생한다는 설; ii) 혈관의 특정 세포들이 조골세포 계통으로 분화됨으로써 혈관 석회화가 발생한다는 설; iii) 골 흡수 장소에서 형성되는 결정 핵이 혈관을 따라 이동하여 연조직 석회화를 일으킨다는 설; 및 iv) 사멸하는 세포에서 분비된 칼슘, 인 등의 성분들이 농축되어 혈관 석회화를 야기한다는 설 등이 있다.

[0004] 따라서, 혈관 석회화 현상의 발생기전을 명확히 이해하고, 관련 질병을 심도있게 연구하기 위해서는 혈관 석회

화를 수반하는 동물 모델을 다수 확보하고, 많은 양의 실험 데이터를 보유하는 것이 필수적이다. 그러나, 일반적인 동물 모델들에 있어서, 혈관의 중막 조직 등에 석회화를 유도하기 위해서는 실험실용 동물들로 하여금 장기간에 걸쳐서 당뇨 또는 신부전증 등의 질병을 앓게 하거나, 고농도의 비타민 D 및 칼슘 등과 같은 약물을 투여하여야 하는 등의 조작이 필요하다.

[0005] 관련하여, 대한민국 공개특허공보 제2009-12432호에서는, 고용량 비타민 D 투여에 의해 유도된 혈관 석회화의 마우스 동물 모델을 개시하고 있으며, 구체적으로는 0.1 내지 1000×10^4 IU/kg 체중의 용량으로 마우스 (*Mus musculus*)에 비타민 D 화합물류를 투여함으로써 제조된, (a) 대동맥, 신장동맥 또는 폐동맥에서 석회화 발생; (b) 혈중의 칼슘 및 ALP(alkaline phosphatase) 농도 증가; (c) 뼈에서 파골세포의 활성화도 증가; (d) 신장에서 타입 II 콜라겐의 발현 증가; 및 (e) 신장 및 폐에서 타입 X 콜라겐 및 오스테오칼신의 발현 증가 등의 병증을 나타내는 마우스 동물 모델을 개시하고 있다.

[0006] 그러나, 혈관 석회화는 당뇨 또는 신부전증과 같은 질병, 또는 대한민국 공개특허공보 제2009-12432호에 제시된 바와 같은 병태생리적 변화를 전혀 겪지 않는 정상인에서도 빈번하게 관찰되므로, 혈관 석회화 관련 연구를 더욱 폭 넓고 심도있게 진행하기 위해서는 질병 또는 병태생리적 변화를 겪지 않는 정상 동물에서 혈관 석회화를 유도할 필요성이 존재한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 따라서, 본 발명에서는 질병 또는 병태생리적 증상을 수반하지 않는 정상 토끼에 대해서 간단하고, 단기간에 걸쳐서 수행될 수 있으며, 경제적인 방법을 사용하여 혈관 석회화를 유도함으로써, 뚜렷한 혈관 석회화 현상을 수반하는 토끼 모델을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 상기 첫 번째 과제를 달성하기 위해서,

[0009] 정상 토끼에 대해서 염증 유발 물질을 주기적으로 투여함으로써 유도된 혈관 석회화 현상을 수반하는 토끼 모델을 제공한다.

[0010] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 염증 유발 물질은 카라지난 (carrageenan) 또는 리포폴리사카라이드 (lipopolysaccharide)이다.

[0011] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 카라지난은 요타-카라지난 (ι -carrageenan), 카파-카라지난 (κ -carrageenan) 및 람다-카라지난 (λ -carrageenan)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 물질이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 염증 유발 물질의 주기적 투여는, 체중 1 kg 당 0.05 mg 내지 0.1 mg 용량으로, 15일 내지 21일의 간격으로 피하주사 투여에 의해서 수행될 수 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 실시예에 따르면, 상기 염증 유발 물질이 투여된 토끼는 19℃ 내지 23℃의 온도, 41% 내지 62%의 습도 조건 하에서 90일 내지 180일의 기간 동안 사육될 수 있다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 혈관 석회화 현상을 수반하는 토끼 모델은 간단하고, 단기간에 걸쳐서 수행될 수 있으며, 경제적인 방법에 의해서 제공될 수 있으며, 더욱이 질병 또는 병태생리적 변화를 나타내지 않는 정상 토끼로부터 유래되었기 때문에, 혈관 석회화의 발생 기전 및 관련 질병의 연구에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1a 내지 1c는 염증 유발 물질을 3개월간 피하주사하여 피하 부위에 염증을 일으킨 토끼들에서 헤마톡실린 및 에오신 염색으로 관찰되는 저배율 대동맥 혈관 사진들이다.

도 2a 내지 2c는 도 1a 내지 1c에서와 동일한 토끼들에 대한 고배율 대동맥 혈관 사진들이다.

도 3a 및 3b는 염증 유발 물질을 3개월간 피하주사하여 피하 부위에 염증을 일으킨 다른 토끼들에서 헤마톡실린 및 에오신 염색으로 관찰되는 저배율 대동맥 혈관 사진들이다.

도 4a 및 4b는 도 3a 및 3b에서와 동일한 토끼들에서 폰 코사 염색으로 관찰되는 저배율 대동맥 혈관 사진들이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명에서는, 정상 토끼에 대해서 염증 유발 물질을 주기적으로 투여함으로써 유도된 혈관 석회화 현상을 수반하는 토끼 모델을 제공한다.

[0017] 혈관 석회화 (vascular calcification)는 심장 돌연사, 심근경색, 협심증 및 허혈성 심부전 등과 같은 다양한 심혈관 질환에 대한 위험도 지표가 되며, 그 자체로도 심혈관 질환 발생의 독립적인 위험인자임이 이미 공지되어 있다. 따라서, 혈관 석회화의 발생기전을 명확히 이해하고, 그와 관련된 질병을 진단, 예방 및 치료하기 위해서는 인위적으로 혈관 석회화가 유도된 동물 모델들을 다수 확보하고, 이에 대한 동물 실험을 수행함으로써 풍부한 데이터를 확보하는 것이 필수적이다. 그러나, 동물들에 인위적인 혈관 석회화를 유도하기 위해서 사용된 종래의 방법들은 대상 동물들에 장기간에 걸친 병태생리학적 변화를 유도하여야 한다는 한계점이 있었다.

[0018] 본 발명에서는 이러한 문제점을 해결하여 정상 토끼에 대해서 염증 유발 물질을 주기적으로 투여하는 간단한 방법에 의해서 혈관 석회화 현상을 수반하는 토끼 모델을 제공한다. 상기 염증 유발 물질은, 정상 토끼에 염증을 야기할 수 있는 약물이라면 제한없이 사용가능하며, 이에 제한되는 것은 아니지만, 카라지난 (carrageenan) 또는 리포폴리사카라이드 (lipopolysaccharide)가 사용될 수 있다. 다만, 염증 유발 물질로서 리포폴리사카라이드를 사용하는 경우에는 대상 동물에서 독성이 발현되는 문제점이 있지만, 카라지난의 경우에는 이러한 독성 발현의 문제점이 거의 없다.

[0019] 카라지난과 리포폴리사카라이드는 염증 유발의 기전에 있어서, 유사 톨 수용체 4 (toll-like receptor 4; TLR 4)의 리간드로 작용하며, 하기 실시예로부터도 알 수 있는 바와 같이, 토끼에 카라지난을 투여해주는 경우 TLR 4의 발현이 증가하고, 그에 따른 염증성 사이토카인들 (interleukin-1, 종양괴사인자- α 등)은 증가하였으며, 간에서 합성되는 염증 반응 물질인 c-반응성 단백질도 증가하였다. 따라서, 본 발명에서 염증 유발 물질을 투여해 줌으로써 유발되는 혈관 석회화는, 염증성 사이토카인들과 염증 반응 물질이 혈관에 작용하여 간엽 세포 (mesenchymal cell)에서 유래된 혈관 근육 세포를 골형성 분화 (osteogenic differentiation)시킴으로써 야기되는 것으로 추측된다.

[0020] 상기 염증 유발 물질은 정상 토끼에 대해서 주기적으로 투여되는데, 예를 들어 체중 1 kg 당 0.05 mg 내지 0.1 mg의 용량으로, 15일 내지 21일의 간격으로 피하주사 투여에 의해서 수행될 수 있다. 투여 용량이 상기 범위 미만이거나 또는 투여 간격이 상기 범위를 초과하는 경우에는 염증 유발 정도가 미약하여 혈관 석회화가 진행되지 않는다는 문제점이 있으며, 투여 용량이 상기 범위를 초과하거나 또는 투여 간격이 상기 범위 미만으로 빈번한 경우에는 대상 토끼에서 심한 염증을 야기하여 혈전 형성을 유도하거나, 더 나아가 사망을 야기하는 문제점이 있다.

[0021] 상기 염증 유발 물질이 투여된 토끼는 19℃ 내지 23℃의 온도, 41% 내지 62%의 습도 조건 하에서 90일 내지 180일의 기간 동안 사육될 수 있다.

[0022] 이하, 실시예 및 도면을 참조하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다.

실시예

[0024] 정상인에서 혈관 석회화가 일어나는 상황과 유사한 환경을 만들기 위해서, 유전자 조작이 없는 일반 실험동물 (12 주령의 토끼, New Zealand white rabbits) 12 마리를 대상으로 하여, 6 마리는 주기적으로 염증을 일으키는 물질을 피하에 주사를 하였고, 나머지 6 마리는 대조군으로 아무런 조치를 취하지 않았다. 염증 유발 물질이 투여된 토끼의 사육은 표준화된 조건 (21℃, 습도 41% - 62%)에서 규칙적인 낮/밤 (10/14 시간) 주기로 물과 일반 사료에 자유롭게 접근할 수 있게 하는 조건에서 수행었다. 염증 유발 물질로는 카라지난 (carrageenan)을 사용하였으며, 구체적으로는 0.1% 카라지난 0.5 mL을 3주 간격으로 토끼의 둔부에 피하 주사하였다.

평가예

[0026] 상기 실시예의 과정을 3 개월 동안 거친 후, 대상 토끼를 마취시키고, 복부를 절개한 후, 대동맥으로부터 혈액을 채취하고 안락사시켰다. 혈청 총 콜레스테롤, 저밀도 지단백 콜레스테롤, 고밀도 지단백 콜레스테롤, 중성지방, 염증 사이토카인 및 c-반응성 단백질의 함량을 측정하였다. 양측 경동맥을 포함해서 대동맥 근위부로부터 장골동맥 분지 지점까지 대동맥을 박리해서 4% 완충용액 포르말데히드 (pH 7.4)에 고정하였다. 혈관 절편은

파라핀 고정 후 일반적인 헤마톡실린 (hematoxylin) 및 에오신 (eosin) 염색과 석회화를 확인하기 위한 폰 코사 (von Kossa) 염색 등을 시행하였다. 현미경 분석을 통해서 실험동물 대동맥 벽에서의 혈관 상태 및 석회화 여부와 그 양상을 비교하였다. 실험 결과, 카라지난을 피하주사하여 염증을 일으킨 동물들에서 대동맥에 다양한 석회화가 확인되었다.

[0027] 즉, 도 1a 내지 1c는 염증 유발 물질을 3개월간 피하주사하여 피하 부위에 염증을 일으킨 토끼들에서 헤마톡실린 및 에오신 염색으로 관찰되는 저배율 대동맥 혈관 사진들이며, 도 2a 내지 2c는 도 1a 내지 1c에서와 동일한 토끼들에 대한 고배율 대동맥 혈관 사진들로서, 도 1a 내지 1c에서 짙은 보라색으로 염색된 석회화 부위 (화살표로 표시된 부위)와 더 흐린 분홍색 배경의 정상 혈관 근육 세포들을 관찰할 수 있으며, 도 2a 내지 2c에서는 정상 혈관에서는 관찰할 수 없는 골세포 및 연골 세포의 증식에 의해서 석회화 부위 (화살표로 표시된 부위)가 형성되었음을 알 수 있다.

[0028] 한편, 도 3a 및 3b는 염증 유발 물질을 3개월간 피하주사하여 피하 부위에 염증을 일으킨 다른 토끼들에서 헤마톡실린 및 에오신 염색으로 관찰되는 저배율 대동맥 혈관 사진들이며, 도 4a 및 4b는 도 3a 및 3b에서와 동일한 토끼들에서 폰 코사 염색으로 관찰되는 저배율 대동맥 혈관 사진들로서, 도 3a 및 3b에서는 헤마톡실린과 에오신 염색에 의해서 보라색으로 염색된 혈관 석회화 부위 (화살표로 표시된 부위)를 관찰할 수 있으며, 도 4a 및 4b에서는 폰코사 염색에 의해서 석회화가 진행된 부위 (화살표로 표시된 부위)가 검게 염색되어 있음을 알 수 있다. 도 3a 및 도 4a의 사진들을 대조해 보면, 도 3a에서 화살표로 표시된 각 부위들이, 도 4a에서 화살표로 표시된 부위들과 일치하며, 이로부터 헤마톡실린과 에오신으로 염색된 석회화 부위와 폰코사 염색에 의해서 구별되는 석회화 부위가 일치함을 알 수 있다. 그러나, 도 3b에서 분홍색으로 염색된 부위에서는 (화살표로 표시된 부위) 혈관 근육 세포만 관찰되므로 혈관 석회화가 없을 것으로 예상되었으나, 도 4b에서는 검은색으로 염색되어 혈관 석회화가 진행된 것으로 관찰되었다.

[0029] 또한, 하기 표 1 및 표 2에서 설명된 바와 같이, 염증 싸이토카인, c-반응성 단백질의 함량을 측정한 결과, 염증 유발 물질이 투여된 토끼에서 그 수치가 상승된 것을 확인하였으나 (표 2 참조), 혈청 지질수치들은 두 군간에 유의성 있는 차이점을 발견할 수 없었다 (표 1 참조).

표 1

[0030] <염증 유도군과 대조군의 혈액 내 지질 함량>

함량 단위 (mg/dL)	염증 유도군	대조군	P
TC	29±13.8	23.4±4.6	>0.05
LDL	6.8±4.7	4.4±3.2	>0.05
HDL	52.4±26.9	42.8±30.5	>0.05
TG	19.2±9.0	14.8±5.0	>0.05

[0031] (TC: 총 콜레스테롤, LDL: 저밀도 지단백 콜레스테롤, HDL: 고밀도 지단백 콜레스테롤, TG: 트리글리세라이드, P: Kruskal-Wallis test로 시행한 전체의 차이를 나타낸 것으로서, p>0.05인 경우 유의성 없음 (NS))

표 2

[0032] <염증 유도군과 대조군의 혈액 내 염증 표지자 농도>

	염증 유도군	대조군	P
IL-1 (pg/mL)	15.2±3.8	10.8±1.0	0.001
IL-6 (pg/mL)	32.3±15.4	11.8±5.1	NS
TNF-α (pg/mL)	104.6±46.5	59.0±40.9	0.004
CRP (mg/L)	23.3±13.8	5.5±3.4	0.002

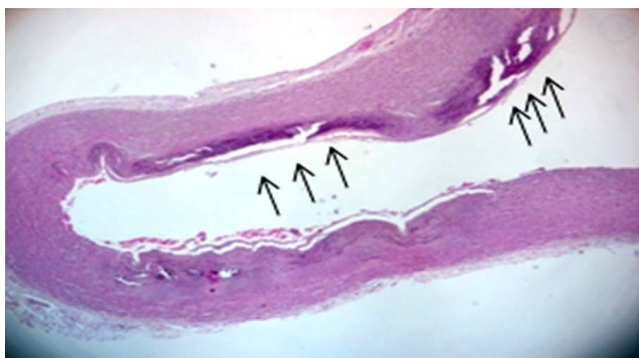
[0033] (IL-1: 인터루킨-1, IL-6: 인터루킨-6, TNF-α: 종양괴사인자-α (tumor necrotizing factor-α), CRP: c-반응성 단백질, NS: p>0.05)

도면

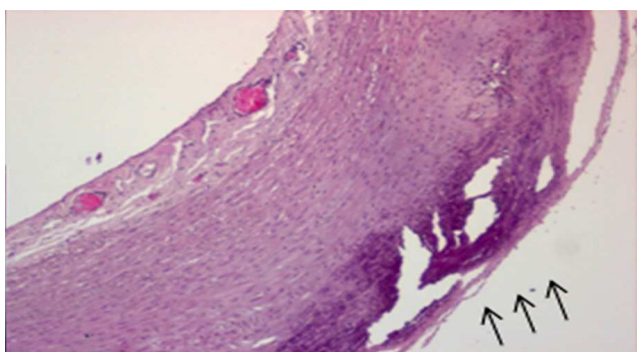
도면1a



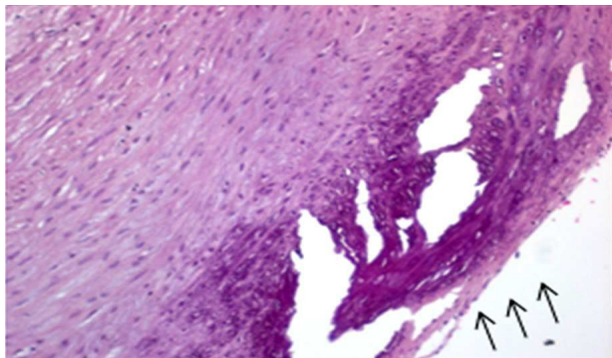
도면1b



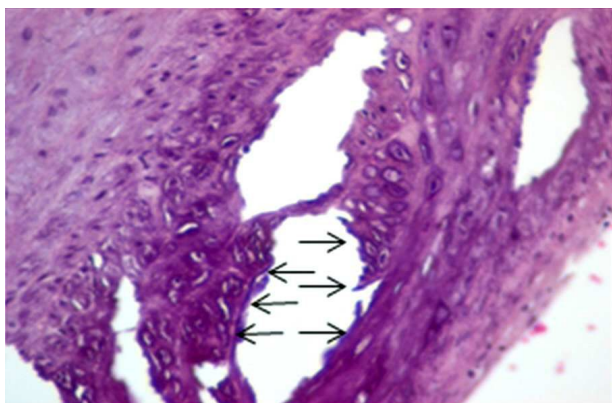
도면1c



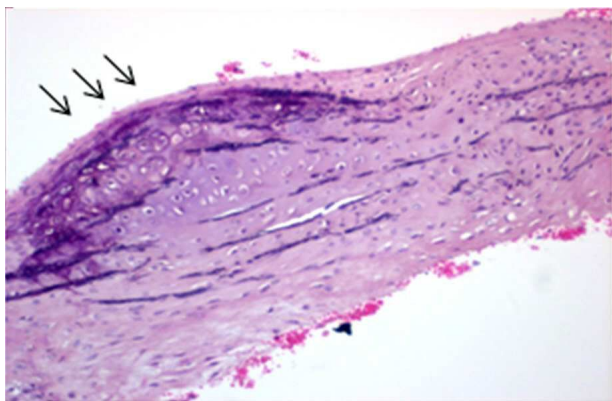
도면2a



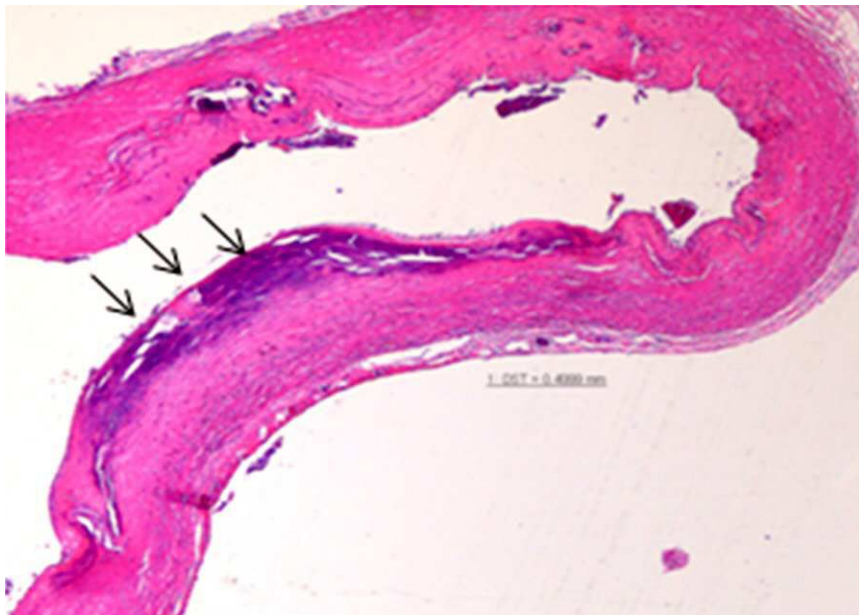
도면2b



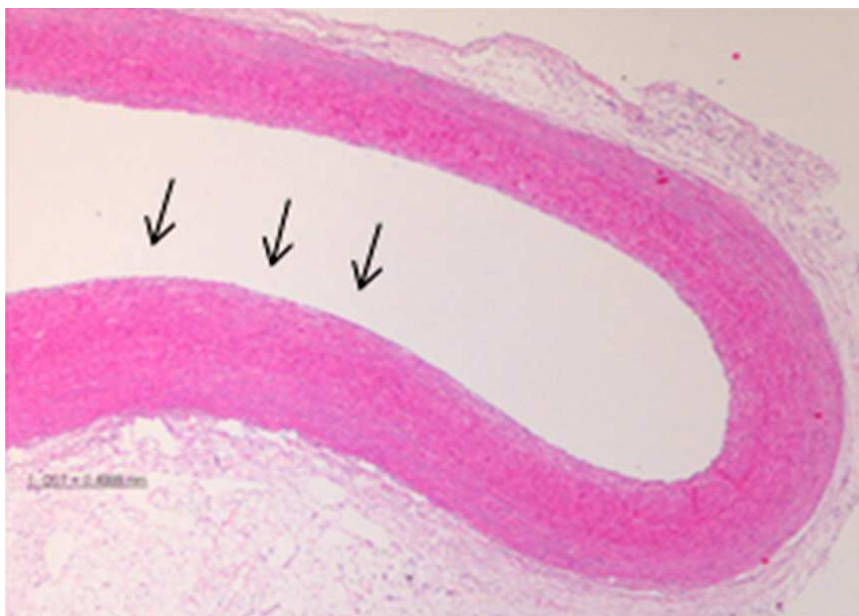
도면2c



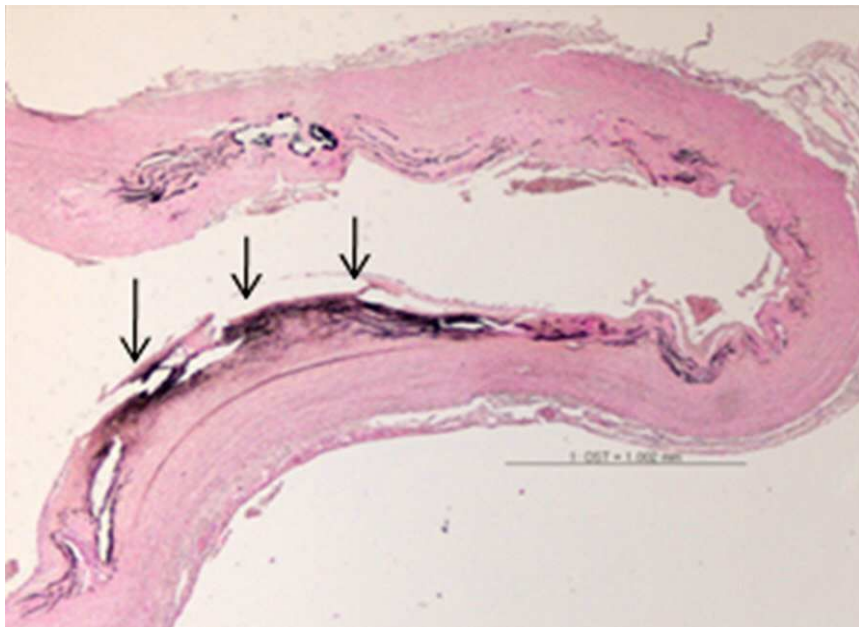
도면3a



도면3b



도면4a



도면4b

