

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0136611 (43) 공개일자 2014년12월01일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A61K 36/30 (2006.01) A61P 19/10 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01) (21) 출원번호 10-2013-0056811 (22) 출원일자 2013년05월21일 심사청구일자 2013년05월21일 기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도		(71) 출원인 한림대학교 산학협력단 강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동) (72) 발명자 강영희 강원도 춘천시 충열로 32 동부아파트 103-1102 이은정 경기도 남양주시 경춘로 1265-32 성운빌라 다동 201호 (뒷면에 계속) (74) 대리인 강성혜

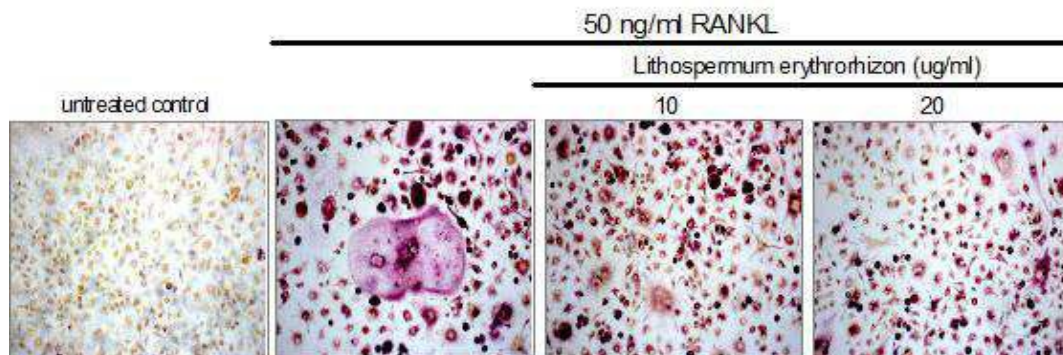
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 지치 추출물을 함유하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물

(57) 요약

본 발명은 골흡수를 도모하는 파골세포의 분화 및 골흡수를 억제시키는 지치 추출물을 함유하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물에 대한 것이다. 지치 추출물은 대식세포(마우스 대식세포인 RAW264.7)를 파골세포로 분화시키는 과정에서 파골세포의 형성과정에서 촉진되는 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)를 감소시키며 골흡수를 감소시킨다. cathepsin K가 분비되어 골과 연골의 단백질을 분해시키고, 탄산탈수효소Ⅱ(carbonic anhydraseⅡ)가 분비되어 resorption lacuna 부위를 산성화 시킨다. 이들은 지속적인 골흡수를 가능하게 되는데 지치 추출물이 이를 억제한다. 이로서 지치 추출물이 파골세포의 분화를 억제하고 골흡수를 억제시킬 수 있는 골다공증 치료 및 예방할 수 있는 조성물에 대한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이용진

강원도 춘천시 퇴계로 220-20 현대3차아파트
308-1505

이재연

경기도 수원시 장안구 대평로51번길 56 (정자동,
꽃피노을마을한국아파트) 252-604

특허청구의 범위

청구항 1

지치 추출물을 포함하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물

청구항 2

지치 추출물을 유효성분으로 포함한 골다공증 치료 및 예방용 조성물

청구항 3

지치 추출물은 대식세포의 파골세포 분화단계에서 파골세포 분화를 억제시키고 TRAP의 활성을 감소시키며 골흡수 관련 효소의 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 골흡수를 도모하는 파골세포의 분화 및 골흡수를 억제시키는 지치 추출물을 함유하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물에 대한 것이다. 지치 추출물은 대식세포(마우스 대식세포인 RAW264.7)를 파골세포로 분화시키는 과정에서 파골세포의 형성과정에서 촉진되는 tartrate-resistant acid phosphatase(TRAP)을 감소시키며 골흡수를 감소시킨다. cathepsin K가 분비되어 골과 연골의 단백질을 분해시키고, 탄산탈수효소 II(carbonic anhydrase II)가 분비되어 resorption lacuna 부위를 산성화 시킨다. 이들은 지속적인 골흡수를 가능하게 되는데 지치 추출물이 이를 억제한다. 이로써 지치 추출물이 파골세포의 분화를 억제하고 골흡수를 억제시킬 수 있는 골다공증 치료 및 예방할 수 있는 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 세계보건기구(WHO)는 골다공증을 “골강도의 약화로 골질의 위험성이 증가하게 되는 골격계질환”으로 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.

[0003] 골(bone)은 형성과 흡수가 지속적으로 일어나는 역동적인 조직으로 여러 가지 종류의 자극에 반응한다. 이런 골 대사는 조골세포(osteoblast)와 파골세포(osteoclast)의 활성 정도에 따라 오래된 뼈가 파괴, 흡수되거나 새로운 뼈가 형성되는데, 정상적인 경우 이들 세포의 상호작용에 의해 골개조(bone remodeling)가 일어난다. 하지만, 이러한 골흡수와 골형성의 항상성은 여성의 경우 폐경 이후 급격한 골 손실이 더 일어나게 되어 균형이 깨지기 쉬우며, 노화로 골 형성 기능이 퇴화됨에 따라 골손실이 지속됨에 따라 골다공증이 일어나게 된다. 골다공증은 초기에 급격히 진행되는데 골흡수로 인해 골 손실이 일어나게 되지만, 골형성이 불충분하여 일어나기도 하므로 조골전구세포가 조골세포로 분화하는 능력에 의해서도 결정된다. 이에 조골세포의 분화를 촉진하거나 파골세포의 분화를 억제하여 골흡수를 감소시키는 것이 필요하다.

[0004] 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 스테로이드제제 등을 병행해서 치료한다.

[0005] 뼈를 생성하는 역할은 조골세포(osteoblast)가, 뼈를 파괴하는 역할은 파골세포(osteoclast)가 담당하게 된다. 성숙된 파골세포는 다핵세포이며, 조혈모세포에서 기원이 된다. 파골세포의 분화는 조골세포에 의해서 이뤄지며, 조골전구세포는 다양한 인자, 즉 뼈 형성 단백질(Bone Morphogenetic Protein; BMP) 및 전환성장인자 베타(transforming growth factor- β ; TGF- β)들에 의해서 분화된 조골세포는 단백질 및 비단백질 성분을 분비하고 미네랄을 유도하여 뼈세포로 존재한다.

[0006] 뼈에서 발현이 되는 염기성 인산분해효소의 활성화는 석회화하는 연골과 함께 빠르게 성장하는 골에 있

어서 초기 석회화에 관여하는 칼슘 수송에 요구되며, 석회화를 위해 이용되는 칼슘은 염기성 인산분해효소에 의해 조절된다는 보고가 있다(Halech, J., et al., Phil. Trans. Royal Soc. Lond., 302, 91-98, 1983). 조골세포는 콜라겐과 같은 결합성유나 오스테오칼신 등의 골기질을 합성하고, 석회화는 인산과 칼슘을 농축하여 결정을 형성하게 되면서 일어난다(Fleish H., et al., AmJ Physiol., 200, 1296-1300, 1961).

[0007] 조골세포는 파골세포의 분화에 필수적인 대식세포 콜로니 자극인자 (macrophage-colony stimulation factor, M-CSF)와 receptor activator of nuclear factor- κ B ligand (RANKL)을 생성하며, 핵을 하나 가진 파골전구세포는 M-CSF와 RANKL에 의해 자극을 받아서 연속적인 분화과정으로 거대다핵세포로 분화한다. 분화된 파골세포는 뼈의 표면으로 단백질분해효소 등을 분비하여 뼈 표면을 산성화를 유도함으로써 뼈의 구성성분인 단백질과 미네랄을 분해하여 뼈를 파괴한다.

[0008] 파골세포(osteoclast)를 가장활성화 하는 가장 중요한 RANKL은 파골전구세포 및 파골세포에 위치한 수용체인 RANK와 결합하여 파골세포의 형성과 활성을 촉진한다. 즉, 다핵세포의 전구체들이 융합하여 골흡수를 담당하는 다핵 파골세포로 분화할 수 있으며, 골흡수는 산성화에 의한 무기질의 용해와 단백질 분해효소에 의한 기질단백질의 용해과정으로 가수분해효소를 분비하여 골조직에 존재하는 무기질과 유기물을 용해시키고, 콜라겐 분해효소, 시스테인 단백 분해효소 등이 골흡수에 관여한다 (Boyle WJ. et al., Nature, 423, 337-342, 2003).

[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 골흡수 억제제의 발명은 많이 되어져 있으나 골형성 촉진제의 발명은 아직 미미하며 또한 골흡수 억제제와 골형성 촉진제의 천연물 소재 발명은 미미한 실정이다. 지치에 대한 생리활성물질로서의 골다공증 치료를 위한 용도에 대해서는 보고된 바 없다.

[0011] 본 발명자들은 지치 추출물이 대식세포의 파골세포 분화과정에서 골흡수에 관여하는 TRAP 활성의 억제와 골흡수를 감소시킴으로서 지치 추출물이 골흡수를 억제시키는 골다공증 치료제로서 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 지치 추출물이 골흡수에 관여하는 파골세포의 분화를 억제시키고 골흡수와 관련 있는 효소 발현을 감소시켜 골다공증과 같은 골질환의 치료와 예방을 위한 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 지치 추출물에 노출된 파골세포의 분화 단계에서 TRAP 활성과 골흡수 관련 효소인 carbonic anhydrase II와 cathepsin K 발현을 억제시켜 골다공증을 치료하고 예방할 수 있는 효능을 확인하였다.

발명의 효과

[0014] 본 발명으로 지치 추출물을 제공하여 골흡수를 억제시켜 주는 효능으로 골다공증을 치료하고 예방할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 제 1도는 지치 추출물이 RAW264.7 대식세포에서 파골세포로의 분화를 억제하여 파골세포의 생성을 억제시키는 것을 나타낸 결과이다. 그림은 파골세포의 생성정도를 측정하는 TRAP 염색결과이다.

제 2도는 지치 추출물이 RAW264.7 대식세포에서 파골세포로의 분화과정 중 파골세포의 TRAP 활성을 억제시키는 것을 흡광도로 측정하여 나타낸 결과이다.

제 3도는 지치 추출물이 파골세포의 골흡수 단계에서 발현되는 carbonic anhydrase(탄산탈수효소) II을 웨스턴블롯 방법을 통해 나타낸 것이다. 이 blot 을 덴시토미터(densitometer)로 측정하여 정량화하여 그래프로 나타낸 것이다.

제 4도는 지치 추출물이 파골세포의 골흡수 단계에서 나타나는 카텝신 K를 웨스턴블롯 방법을 통해 나타낸 것이다. 이 blot을 덴시토미터(densitometer)로 측정하여 정량화하여 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 골흡수를 도모하는 대식세포에서 파골세포의 분화를 일차적으로 억제시켜 지치 추출물을 포함하는 골다공증 치료 및 예방용 조성물을 제공한다.
- [0017] 보다 상세하게는 지치 추출물은 대식세포의 파골세포로 분화과정에서 파골세포의 분화를 억제하고, TRAP 활성을 억제하고 골흡수와 관련된 cathepsin K와 carbonic anhydrase II 효소 발현을 억제시킨다. 이로써 지치 추출물은 부작용이 없으면서 파골세포의 분화를 억제하여 골흡수를 감소시킬 수 있는 골다공증 치료 및 예방할 수 있는 조성물을 제공한다.
- [0018] 지치 추출물은 통상적인 방법에 따라 제조하여 사용하거나 시판되는 것을 구입하여 사용할 수 있다.
- [0019] 상기 유효성분은 조성물 총 중량에 대하여 0.001~3%의 양으로 함유되는 것을 특징으로 한다.
- [0020] 이하 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0021] 본 발명의 지치 추출물이 대식세포의 파골세포로 분화과정에서 파골세포의 TRAP 활성을 억제시키고 골흡수 관련 효소의 발현을 억제시킴으로서 골흡수로 인한 골다공증을 감소시키는 것을 나타내는 것이다.
- [0022] 본 발명에 의한 파골세포의 분화 억제 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정되지 않지만, 구체적으로 음료, 분말, 농축, 캡슐 제형 또는 의약 제형일 수 있다. 지치 추출물은 전체 조성물 총 중량에 대하여 0.001에서 5중량%의 범위로 사용된다. 이는 0.001중량% 미만에서는 그 효과를 기대할 수 없고, 5중량% 초과에서는 안정성, 또는 제형상의 제조에 어려움이 있기 때문이다. 유효한 효과와 안정성 및 제형 안정성을 고려하면 0.01~3.0 중량%가 바람직하다.
- [0023] 본 발명에 다음의 실시 예에 의거하여 더욱 상세히 설명되나, 본 발명이 이에 의해 제한되지는 않는다.
- [0024] (실시 예1) 세포배양 실험
- [0025] (1-1) 마우스 대식세포(RAW264.7) 배양
- [0026] 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 지치 추출물을 5일 동안 처리하였다.
- [0027] (실시 예2) 지치 추출물의 파골세포 생성 억제
- [0028] (2-1) TRAP 염색법
- [0029] TRAP 염색을 위해 0.1×10^4 밀도의 RAW264.7 세포를 50 ng/ml RANKL을 첨가한 배지에 지치 추출물을 처리하였다. 배양이 끝난 Triton x-100 을 10초간 처리하였다. Triton x-100을 제거한 후 PBS로 세척한 후 Leukocyte Acid Phosphatase Assay Kit (Sigma Co.)를 이용하여 37℃에서 30분간 염색시킨 후 TRAP 양성인 파

골세포 형성을 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.

[0030]

[0031]

그 결과는 도 1에 나타내었다.

[0032]

도 1에 나타난 바와 같이 RANKL로 대식세포를 파골세포로 분화시키는 과정에서 지치 추출물을 처리하게 되면 파골세포의 생성(multi-nucleated cells, 다핵세포)이 억제되는 것으로 나타났다.

[0033]

(2-2) TRAP 활성 측정

[0034]

TRAP 활성 측정을 위해 0.1×10^4 밀도의 RAW264.7 세포를 50 ng/ml RANKL을 첨가한 배지에 지치 추출물을 처리하여 5일을 배양하였다. 4% 포르말린 용액으로 10분 고정 후 10 mM sodium tartrate 와 5 mM *p*-nitrophenylphosphate가 포함 된 10 mM citrate buffer (pH 4.6)를 넣어 37℃에서 1시간 인큐베이션 후 0.1 N NaOH를 넣어 405 nm 흡광도에서 측정하였다.

[0035]

그 결과는 도 2에 나타내었다.

[0036]

TRAP 양성반응이 있는 파골세포에서의 TRAP 활성이 지치 추출물에 의해 억제 되는 것을 확인 할 수 있다.

[0037]

(실시 예3) 지치 추출물의 골흡수 관련 효소의 발현 억제

[0038]

(3-1) 탄산탈수효소II(carbonic anhydraseII)의 웨스턴블롯

[0039]

파골세포의 골흡수를 돕고 resorption lacuna 부위에 산성화 시키는 탄산탈수효소II를 측정하기 위해 파골전구세포(raw 264.7)에 50 ng/ml 농도의 RANKL과 지치 추출물을 처리하였다. 세포 추출물 단백질의 웨스턴블롯은 10% SDS-PAGE로 수행하였다. 전기영동으로 얻은 단백질 띠(bands)들은 nitrocellulose membrane으로 전이시키고, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 5% Skim milk 에 3시간 동안 blocking 하였다. 탄산탈수효소II 단백질의 일차항체(rabbit polyclonal antibody, abcam, cambridge, UK)를 1,000배로 희석하여 교반하면서 반응시키고, goat anti-rabbit horseradish peroxidase (1:10000, Jackson ImmunoResearch Lab.)의 이차항체로 1시간 반응시켰다. Nitrocellulose membrane에 있는 탄산탈수효소II 단백질은 Supersignal West pico chemiluminescence (Pierce Biotech. NJ, USA)로 검출하여 X-ray 필름 (Konica Co., Tokyo, Japan)으로 촬영하였다.

[0040]

그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0041]

RAW 264.7 파골전구세포를 분화하는 과정에서 5일간 지치 추출물을 함께 처리하면, 분화된 파골세포에서 carbonic anhydrase II의 발현을 감소시킨다.

[0042]

(3-2) 카텡신 K (Cathepsin K) 의 웨스턴블롯

[0043]

파골세포에만 특징적으로 많이 발현되는 단백분해효소로서 제1형 콜라겐과 같은 기질단백을 분해하는 카텡신 K를 측정하기 위해 파골전구세포(raw 264.7)에 50 ng/ml 농도의 RANKL과 지치 추출물을 처리하였다. 세포 추출물 단백질의 웨스턴블롯은 10% SDS-PAGE로 수행하였다. 전기영동으로 얻은 단백질 띠(bands)들은 nitrocellulose membrane으로 전이시키고, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 5% Skim milk 에 3시간 동안 blocking 하였다. 카텡신 K 단백질의 일차항체(goat polyclonal antibody, abcam, SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, USA)를 1,000배로 희석하여 교반하면서 반응시키고, rabbit anti-goat horseradish peroxidase (3:10000, Jackson ImmunoResearch Lab.)의 이차항체로 1시간 반응시켰다. Nitrocellulose membrane에 있는 카텡신 k 단백질은 Supersignal West pico chemiluminescence (Pierce Biotech. NJ, USA)로 검출하여 X-ray 필름 (Konica

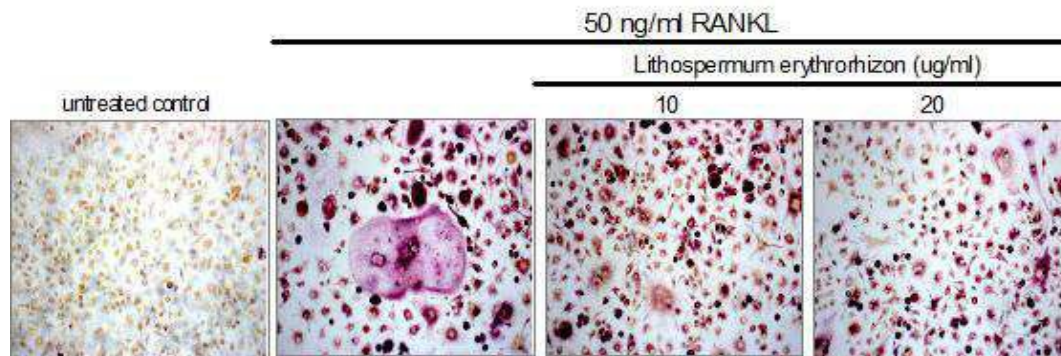
Co., Tokyo, Japan)으로 촬영하였다.

[0044] 그 결과는 도 4에 나타내었다.

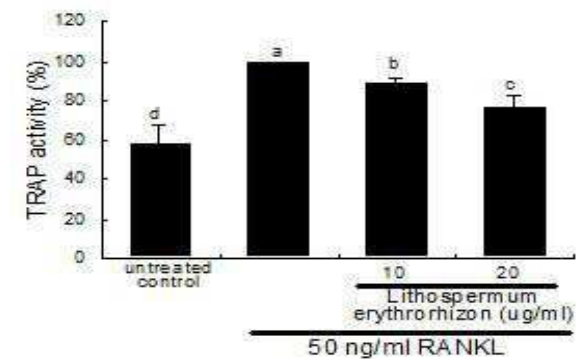
[0045] RAW 264.7 파골전구세포를 분화하는 과정에서 5일간 지치 추출물을 함께 처리하면, 분화된 파골세포에서 cathepsin K의 발현을 감소시킨다.

도면

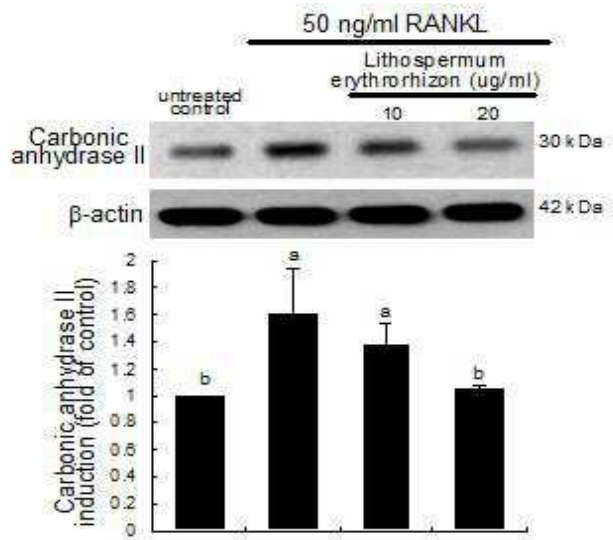
도면1



도면2



도면3



도면4

