



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0109019
(43) 공개일자 2012년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/28 (2006.01) A61K 31/02 (2006.01)

A61K 33/24 (2006.01) A61P 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0026216

(22) 출원일자 2011년03월24일

심사청구일자 2012년05월31일

기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산 남구 무거2동 산29

(72) 발명자

최혜선

울산광역시 남구 대학로1번길 18-16, 일와그린빌라 401호 (무거동)

설옥주

울산광역시 남구 남산로 150, 3층 (무거동)

관반티엔

울산 남구 무거동 울산대학교 기린 504호

(74) 대리인

특허법인 충정

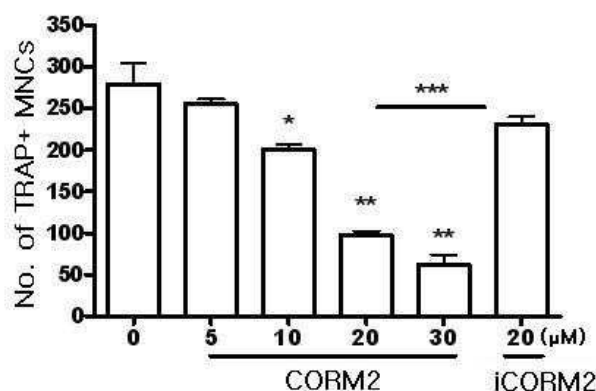
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 골 손실 억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 골 손실 억제용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체는 RANKL의 자극에 의해 유발되는 파골세포 분화를 억제하는 효과가 있으며, 이렇게 파골세포 분화를 억제시킴으로써 궁극적으로 파골세포에 의한 골 흡수를 억제하는 효과를 갖게 된다. 더욱 자세하게는, 본 발명에 따른 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체는 RANKL의 자극에 의해 유도된 분자적 신호경로(signal pathway)에서 파골세포 분화를 조절할 수 있는 핵심 전사인자인 NFAT2와 c-fos의 발현 억제 및 NF- κ B의 활성화를 억제하는 기전을 통하여 파골세포의 분화를 억제시키는 효과를 갖는다. 또한, 본 발명에 따른 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체는 난소절제술을 시행하여 인위적으로 폐경을 유도한 마우스 모델에 일산화탄소 공급체(CORM2)를 투입한 경우 골밀도, 뼈의 무기질함량을 증가시키는 효과가 있었다. 따라서 상기와 같은 효과를 갖는 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 골 손실로 일어나는 골대사 질환 예방 또는 치료에서 유용하게 사용될 수 있으며, 특히 폐경기 후 골 손실에 따른 골 다공증 개선 및 치료하기 위한 용도로 널리 사용할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	A090080
부처명	보건복지부
연구사업명	보건의료연구개발사업
연구과제명	TLR4자극에 의한 골대사연구
주관기관	울산대학교 산학협력단
연구기간	2010.04.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 골 손실 억제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 일산화탄소 공급체는 CORM2(CO releasing molecular 2)인 것을 특징으로 하는 골 손실 억제용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체는 폐경기로 인해 유발되는 골 손실을 감소시키는 것을 특징으로 하는 골 손실 억제용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체는 과골세포의 분화를 조절하는 핵심 전사인자인 NFAT2와 c-fos의 발현 억제 및 NF- κ B의 활성화를 억제하는 기전을 통해 골 손실을 감소시키는 활성을 갖는 것을 특징으로 골 손실 억제용 조성물.

청구항 5

일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 골 손실 억제를 위한 건강기능식품.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 일산화탄소 공급체는 CORM2(CO releasing molecular 2)인 것을 특징으로 하는 골 손실 억제를 위한 건강기능식품.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체는 폐경기로 인해 유발되는 골 손실을 감소시키는 것을 특징으로 하는 골 손실 억제를 위한 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 폐경기 후 나타나는 골 손실을 효과적으로 개선시킬 수 있는 조성물에 관한 것으로서, 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 포함하는 골 손실 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 뼈(bone)는 인체의 연조직과 체중을 지탱해주고 내부기관을 둘러싸서 내부 장기를 외부의 충격으로부터 보호한다. 또한 근육이나 장기를 구조적으로 지탱할 뿐만 아니라 체내의 칼슘이나 다른 필수 무기질 즉 인이나 마그네슘과 같은 물질을 저장하는 인체의 중요한 부분 중 하나이다. 따라서 성장이 끝난 성인의 뼈는 멈추지 않고 죽는 날까지 오래된 뼈는 제거하고 새로운 뼈로 대체하는 생성과 흡수과정을 매우 역동적, 지속적으로 반복 재생하면서 균형을 유지하게 된다. 이를 뼈의 재형성(bone remodeling)이라고 한다. 이러한 뼈의 재형성은 성장과

스트레스에 의해서 일어나는 뼈의 미세한 손상을 회복시키고 적절히 뼈의 기능을 유지하는데 필수적이다.

- [0003] 뼈의 재형성에는 크게 두 종류의 세포가 관여하는 것으로 알려져 있다. 두 세포 중 하나는 뼈를 생성하는 조골세포(osteoblast)이고, 다른 하나는 뼈를 파괴하는 파골세포(osteoclast)이다. 조골세포는 RANKL(receptor activator of NF- κ B ligand: 이하 간략하게 'RANKL'이라 함)과 이것의 유도 수용체(decoy receptor)인 OPG(osteoprotegerin)를 생성한다. RANKL이 파골 전구세포(osteoclast progenitor cells) 표면에 있는 수용체인 RANK(receptor activator of NF- κ B: 이하 간략하게 'RANK'라 함)에 결합하면 파골 전구세포가 파골세포로 분화되어 골 흡수(resorption)가 일어난다. 자세하게는 RANKL 자극에 의한 세포내 칼슘 신호 전달로 파골 전구세포에서 파골세포의 분화를 조절하는 핵심 전사인자로 알려져 있는 NFAT(nuclear factor of activated T cells: 이하 간단하게 'NFAT'라 함)의 발현이 유도되고, 그 후 세포의 신호조절인산화효소(extracellular signal-regulated kinase: 이하 간단하게 'ERK'라 함), NF- κ B, p38 MAP kinase 등의 활성화가 NFAT의 자가증폭(autoamplification)을 유발하여 활성이 지속되는 것이다.
- [0004] 따라서 오래된 뼈의 흡수 또는 파괴는 상기와 같은 기작을 통해 파골세포에 의해 이루어지며, 이는 뼈에 구멍을 내어 적은 양의 칼슘이 혈류로 방출되어 신체기능을 유지하는데 사용된다(William J. et al., NATURE., 423, pp.337342, 2033). 파골세포는 실제적인 뼈의 흡수작용을 할 때는 다핵세포로 융합된 후 그 구조가 변하여 주름진 테두리를 형성하며, 골 기질 표면에 흡착하여 산성화 환경에서 카텝신(cathepsin) K 나 H⁺-ATPase 등 많은 효소의 작용으로 뼈를 흡수한다. 이에 반해, 조골세포는 교원질로 구멍을 채우고 칼슘과 인의 침적물(hydroxyapatite)을 덮어서 단단한 새로운 뼈를 만들어 골격을 재건하게 된다.
- [0005] 성인의 경우 매년 골격의 약 10-30%가 이런 과정을 통하여 재형성되며, 파골속도와 조골 속도가 동일해야만 전과 같은 골밀도를 유지할 수 있다. 정상 성인에서는 골흡수 양과 골형성 양 사이에는 항상 균형이 유지되고 있다. 이와 같이 중요한 뼈에 균형이 깨질 경우 많은 질병이 야기될 수 있는데, 이러한 질환을 골대사 질환이라 한다.
- [0006] 골대사 질환 중 고령사회에서 큰 문제로 대두되고 있는 골다공증은 골의 화학적 조성에는 큰 변화 없이 단위 용적내의 골량(bone mass)이 감소하여 경미한 충격에도 쉽게 골절을 일으킬 수 있는 질환이다. 특히 폐경 후 여성들의 경우 에스트로겐의 분비부족으로 인하여 가장 그 발생빈도가 높게 나타난다고 알려져 있다.
- [0007] 일반적으로 여성이 폐경기에 접어들면 에스트로겐을 생성하지 못하게 되는데, 에스트로겐의 분비 감소는 여성의 비뇨생식계통 뿐만 아니라 신체전반에 걸쳐 큰 영향을 미치게 되며, 배란이 중단되어 월경이 사라지는 것을 폐경이라 한다. 또한, 40세 이전에 발생하는 미숙 폐경은 원인 미확인의 난소 부전으로 통칭되며, 이는 다량의 장기간에 걸친 흡연이나, 고해발 고도에서의 거주, 영양 불량 등과 관련이 있는 것으로 믿어지고 있다. 한편, 인위적 폐경은 난소절제술, 화학요법, 골반에 대한 방사선 조사, 또는 난소에 대한 혈액 공급을 저하시키는 임의의 과정으로부터 초래될 수 있다. 이렇게 폐경이 일어나게 되면, 여러 가지 폐경기 증상이 나타나게 되는데 그중에 하나가 골 손실에 의한 골다공증인 것이다.
- [0008] 상기와 같이 폐경에 의한 에스트로겐 농도의 급속한 감소는, B-림파구(B-lymphocyte)가 다량 생성되어 골수(bone marrow)에 B 세포 전구체(pre-B cell)가 축적을 야기하고, 이로 인해 IL-6의 양이 증가하여 파골세포의 활성을 증가시키므로 결국 골량이 감소하게 되어 골다공증이 나타나게 된다.
- [0009] 한편, 이러한 폐경기 증후군의 치료를 위해 가장 널리 사용되고 있는 방법으로 에스트로겐 대체 요법(estrogen replacement therapy)이 사용되고 있으나, 에스트로겐 요법의 경우 유방암과 같은 특정 암의 발생률이 증가되는 부작용이 있고, 또한 특정 자궁암 발생과도 관련이 있다는 내용이 보고되고 있다. 따라서 이러한 부작용을 감소시키기 위해 프로게스테틴(progestin)을 이용하는 치료가 사용되고 있으나, 에스트로겐-프로게스테틴 투약과 같은 치료를 받은 폐경 후 여성들은 자주 불쾌한 자궁내의 출혈을 경험하고 있어 부작용 없이 효과적으로 폐경기 증상을 치료할 수 있는 새로운 치료제의 개발이 시급한 실정이다.
- [0010] 이에 본 발명자들은 부작용 없이 폐경기로 인해 발생하는 증상을 효과적으로 억제할 수 있는 연구를 진행하던 중, 일산화탄소가 폐경기 후 발생하는 골 손실 증가를 억제할 수 있다는 사실을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 파골세포의 분화 억제효과가 우수한 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 골 손실 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 또한, 본 발명의 다른 목적은 파골세포의 분화 억제효과가 우수한 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 골 손실 억제용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 골 손실 억제용 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 일산화탄소 공급체는 CORM2(CO releasing molecular 2)일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체는 폐경기로 인해 유발되는 골 손실을 감소시킬 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체는 파골세포의 분화를 조절하는 핵심 전사인자인 NFAT2, c-fos의 발현 억제 및 NF-κB의 활성화 억제 기전을 통하여 골 손실을 감소시킬 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명은 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 골 손실 억제를 위한 건강기능식품을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 일산화탄소 공급체는 CORM2(CO releasing molecular 2)일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체는 폐경기로 인해 유발되는 골 손실을 감소시킬 수 있다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 따른 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체는 RANKL의 자극에 의해 유발되는 파골세포 분화를 억제하는 효과가 있으며, 이렇게 파골세포 분화를 억제시킴으로써 궁극적으로 파골세포에 의한 골 흡수를 억제하는 효과를 갖게 된다.

[0021] 더욱 자세하게는, 본 발명에 따른 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체는 RANKL의 자극에 의해 유도된 분자적 신호경로(signal pathway)에서 파골세포 분화를 조절할 수 있는 핵심 전사인자인 NFAT2, c-fos의 발현 억제 및 NF-κB의 활성화를 억제하는 기전을 통하여 파골세포의 분화를 억제시키는 효과를 갖는다.

[0022] 또한, 본 발명에 따른 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체는 난소절제술을 시행하여 인위적으로 폐경기를 유도한 마우스 모델에 일산화탄소 공급체(CORM2)를 투입한 경우 골밀도, 뼈의 무기질함량을 증가시키는 효과가 있다.

[0023] 따라서 상기와 같은 효과를 갖는 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 골 손실로 일어나는 골대사 질환 예방 또는 치료에서 유용하게 사용될 수 있으며, 특히 폐경기 후 골 손실에 따른 골다공증 개선 및 치료하기 위한 용도로 널리 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명의 일산화탄소 공급체(CORM2)의 처리에 따른 파골세포 분화의 억제정도를 TRAP+ 세포의 개수를 측정하여 나타낸 그래프이다(* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001, n=3)

도 2는 본 발명의 일산화탄소 공급체(CORM2)의 처리에 따른 파골세포 특이적 마커 유전자(TRACP 및 칼시토닌 수용체)의 발현량을 quantitative PCR로 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명의 일산화탄소 공급체(CORM2)의 시간대별 처리에 따른 파골세포 분화의 억제정도를 나타낸 그래프이다(0-4D : 0일 투입후 96 h 지속, 0-2D : 0일 투입후 48 h에 제거, 3-4D: 49h 투입후 96 h 지속).

도 4는 본 발명의 일산화탄소 공급체(CORM2)의 처리에 따른 파골세포 분화 조절 핵심전사인자(c-fos 및 NFAT2)의 발현량을 quantitative PCR로 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 일산화탄소 공급체(CORM2)의 처리에 따른 파골세포 분화 조절 핵심전사인자인 NF-κB의 활성화에 미치는 영향을 EMSA 방법을 이용하여 측정한 것이다(lane 1: RANKL 무첨가군, lane 2: RANKL 첨가군, lane

3: RANKL+CORM2 20 μ M 첨가군, lane 4: RANKL+CORM2 50 μ M 첨가군, lane 5: mutant competitor probe 사용군).

도 6은 본 발명의 일산화탄소 공급체(CORM2)의 처리에 따른 NFAT2 활성을 가시적으로 확인하기 위하여 면역형광 염색법을 이용하여 다핵 성숙 파골세포로의 핵 이동을 나타낸 이미지이다.

도 7은 난소절제술을 시행한 마우스 모델에 본 발명의 일산화탄소 공급체(CORM2)를 처리한 후 골량의 변화를 확인하기 위하여 대퇴골을 micro CT를 이용하여 단층 촬영한 사진이다.

도 8은 난소절제술을 시행한 마우스 모델에 본 발명의 일산화탄소 공급체(CORM2)를 처리한 후 대퇴부의 해면골의 골밀도(BMD : Bone Mineral Density)를 수치로 나타낸 그래프이다.

도 9는 난소절제술을 시행한 마우스 모델에 본 발명의 일산화탄소 공급체(CORM2)의 처리한 후 뼈의 무기질함량(BMC : bone mineral content)을 수치로 나타낸 그래프이다.

도 10은 난소절제술을 시행한 마우스 모델에 본 발명의 일산화탄소 공급체(CORM2)를 처리한 후 전체 조직 볼륨의 퍼센트로써 표현된 해면골 부피(BV/TV %)를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 본 발명은 폐경기 후 나타나는 골 손실 증가를 효과적으로 개선시킬 수 있는 신규한 치료제에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 본 발명은 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 골 손실 억제용 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.
- [0026] 일반적으로 폐경기는 여성에게 있어 월경출혈의 최종 현상으로서 정의된다. 그러나 이 용어는 생식기까지와 월경출혈의 최종 현상을 경과하는 사이의 이행 기간을 포함하여 여성 갱년기의 시기로 언급되는데 통상 사용된다. 또한 이 시기는 폐경기 근처 또는 갱년기로서도 언급되기도 한다. 이러한 시기 동안에는 각종 내분비, 체세포 및 생리적 변화 및 난소 기능의 손실이 점차적으로 진행된다.
- [0027] 또한, 폐경기 근처에서 쇠퇴하는 에스트로겐 수준과 관련된 증상으로는 전신열감 및 발한, 위축질환, 두통, 현기증, 관절통, 불면증, 무감정, 권태, 근육약화, 심계항진 및 분위기 변화, 우울, 기억 및 집중력 저하, 이상감응 및 성적 기능과 관련된 문제와 같은 심리적 증상이 포함되며, 특히 에스트로겐 농도의 급속한 감소는 파골세포의 활성을 증가시켜 골 흡수(골 손실)가 증가하게 되며, 중국에는 골다공증과 같은 골대사 질환을 초래하게 된다.
- [0028] 한편, 일산화탄소(CO)는 생물에서 독성 및 치사율을 갖는 기체 분자로 알려져 있다(Haldane, *Biochem. J.* 21: 1068-1075; 및 Chance 등, 1970, *Ann. NY Acad Sci.* 174: 193-204). 그러나 최근 보고되고 있는 자료들에 의하면, 일산화탄소가 세포내 및 생물학적 과정에서 여러 반응에 조절 인자로서 작용하며, 특히 뉴런 전송을 매개하고(Verma 등, supra 및 Xhuo 등, *Science* 260: 1946-1950), 혈관운동 긴장을 조절하는 등(Morita & Kourembanas, 1995, *J. Clin. Invest.* 96: 2676-2682.; Morita 등, 1995 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 1479; 및 Goda 등, 1998, *J. Clin. Inv.* 101: 604-12)의 역할을 담당하는 것으로 밝혀지고 있다. 따라서 이러한 일산화탄소에 대한 생체 내에서의 생리학적 활성에 대한 연구가 현재 활발히 진행되고 있는데, 본 발명에서는 이러한 일산화탄소가 우수한 파골세포의 분화 억제활성을 가지고 있다는 사실을 확인함으로써, 파골세포의 분화에 의해 유발될 수 있는 골 손실 억제에 유용하다는 사실을 최초로 규명하였다.
- [0029] 보다 구체적으로, 본 발명에 따른 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체는 RANKL의 자극에 의해 유도된 분자적 신호경로(signal pathway)에서 파골세포 분화를 조절할 수 있는 핵심 전사인자인 NFAT2, c-fos의 발현 억제 및 NF- κ B의 활성화를 억제하는 기전을 통하여 파골세포의 분화를 효과적으로 억제할 수 있는 특징이 있다.
- [0030] 하기 실시예<1-3>에서는 파골세포 분화인자인 RANKL를 마우스 골수세포에 처리하여 파골세포 분화를 유도하는 과정에서, 본 발명의 일산화탄소 공급체(CORM2)를 처리한 경우 파골세포 분화가 억제되는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 일산화탄소가 파골세포 분화를 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었다.
- [0031] 또한, 하기 실시예<2-1>에서는 파골세포 분화인자인 RANKL를 마우스 골수세포에 처리하여 파골세포 분화를 유도하는 과정에서, 일산화탄소가 파골세포의 분화를 조절하는 핵심 전사인자인 NFAT2 및 c-fos의 발현을 억제할 수 있는지 실험하였는데, 그 결과 본 발명의 일산화탄소 공급체(CORM2)를 처리한 처리군에서 NFAT2 및 c-fos의 발현량이 확실히 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 일산화탄소가 NFAT2 및 c-fos의 발현을 억제하는 기작을 가지며, 이러한 기작으로 파골세포 분화가 억제되는 것을 유추할 수 있었다.
- [0032] 또한 하기 실시예<2-2>에서는 파골세포 분화인자인 RANKL를 마우스 골수세포에 처리하여 파골세포 분화를 유도

하는 과정에서, 일산화탄소가 파골세포의 분화를 조절하는 핵심 전사인자인 NF- κ B의 활성화를 억제할 수 있는 지 실험하였는데, 그 결과 본 발명의 일산화탄소 공급체(CORM2)를 처리한 처리군에서 NF- κ B의 활성이 감소하는 것으로 나타났다. 따라서 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 일산화탄소가 NF- κ B의 활성화를 억제하는 기작을 가지며, 이러한 기작으로 파골세포 분화가 억제되는 것을 유추할 수 있었다.

- [0033] 뿐만 아니라, 하기 실시예 3에서는 난소절제술을 시행하여 인위적으로 폐경기를 유도한 마우스 모델에 일산화탄소 공급체(CORM2)를 투입한 경우 골밀도, 뼈의 무기질함량 및 해면골 부피를 증가시키는 것으로 나타났으며, 이를 통해 in vivo 상에서도 일산화탄소가 골손실 감소를 효과적으로 억제할 수 있음을 증명하였다.
- [0034] 따라서 상기와 같은 특징을 갖는 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 파골세포의 분화 억제를 통하여 골 손실로 인해 발생하는 골대사 질환 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 조성물로 예방 또는 치료할 수 있는 골대사 질환으로는 골다공증, 파제트 골질환, 구루병, 골연화증, 퇴행성 골질환등과 같은 질환일 수 있으나, 가장 바람직하게는 폐경기 후 골 손실에 따른 골다공증일 수 있다.
- [0036] 그러므로 본 발명은 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 포함하는 골 손실 억제용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 상기 “일산화탄소(CO)”는 액체 형태로 압출된 또는 수용액에 용해된 기체상인 분자 일산화탄소로 정의할 수 있으며, “일산화탄소를 함유하는 조성물”은 이를 필요로 하는 개체에 처리 또는 투여되어질 수 있는 일산화탄소를 함유하는 기체 또는 액체 조성물을 말한다.
- [0038] 또한, 본 발명의 조성물에 포함되는 유효성분은 일산화탄소 이외에도 일산화탄소 공급체를 포함한다.
- [0039] 본 발명에서 사용할 수 있는 상기 일산화탄소 공급체는 이에 제한되지는 않으나, RuCO(Ruthenium Carbon Monoxide), CORM1(Mn₂CO₁₀:manganese decacarbonyl), CORM2([Ru(CO)₃Cl₂]₂), CORM3(Ru(CO)(3)Cl(glycinate)) 및 CORM-A1(sodium boranocarbonate)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종일 수 있으며, 바람직하게는 CORM2([Ru(CO)₃Cl₂]₂)일 수 있다.
- [0040] 본 발명에 따른 조성물은 약제학적 조성물이나 식품 조성물로 사용될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0042] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0043] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 향산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨

가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[0045] 본 발명의 식품 조성물은 유효성분인 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0046] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0047] 본 발명은 또한 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 함유하는 골 손실 억제제를 위한 건강기능식품을 제공한다.

[0048] 본 발명의 건강기능식품은 골강화 촉진을 목적으로, 정제, 캡셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[0049] 본 발명에서 “건강기능식품” 이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제672호에 따른 인체에 유용한 기능을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0050] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0051] 상기 “식품 첨가물 공전” 에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.

[0052] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.

[0053] 캡셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캡셀제는 통상의 경질 캡셀에 본 발명의 유효성분인 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡셀제는 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0054] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체와 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.

[0055] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체와 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0056] 본 발명의 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 포함하는 건강기능식품은 골 손실을 억제하므로 골 손실로 야기되는 골대사 질환 예방 또는 개선에 효과적이다. 본 발명의 골대사 질환은 골다공증, 파제트 골질환, 구루병, 골연화증, 퇴행성 골질환등과 같은 질환일 수 있으나, 가장 바람직하게는 폐경기 후 골 손실에 따른 골다공증일 수 있다.

- [0057] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.
- [0058] 본 발명은 또한 골 손실 억제용 의약 또는 식품의 제조를 위한 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도를 제공한다. 상기한 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 골 손실과 관련된 질환의 예방 또는 치료용 의약 또는 식품의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.
- [0059] 또한 본 발명은 포유동물에게 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 투여하는 것을 포함하는 골 손실에 의한 골 대사 질환 예방 또는 치료방법을 제공한다.
- [0060] 여기에서 사용된 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.
- [0061] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 치료 방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체의 바람직한 전체 용량은 1일당 환자 체중 1 kg 당 약 0.01 μ g 내지 1,000 mg, 가장 바람직하게는 0.1 μ g 내지 100 mg일 수 있다.
- [0062] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 일산화탄소 또는 일산화탄소 공급체를 유효성분으로 포함하는 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.
- [0063] 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.
- [0064] <실시예 >
- [0065] 통계처리
- [0066] 실험결과는 평균±표준편차로 표기하였고, Student's t-test로 분석하여 p 값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판단하였다.
- [0067] <실시예 1>
- [0068] 일산화탄소에 의한 파골세포 분화 억제 효과 (in vitro)
- [0069] <1-1> 마우스 골수세포의 배양
- [0070] 4-5주령의 C57BL/6J 마우스를 경추 탈골한 후 70% 에탄올로 소독하였다. 대퇴골 및 경골부분의 피부를 절개하여 부착 근육을 떼어냈다. 경골 원심부를 절단하고 슬개골을 탈골시켜 경골을 적출하였다. 뼈 양끝을 조금 잘라 한 쪽 끝에 21-gauge 주사바늘을 꽂고 α -MEM을 흘려보내 골수세포를 시험관에 모았다. 원심 분리한 후 α -MEM에 현탁하고 2배의 Gey's solution을 가해 적혈구를 제거했다. 원심 분리한 후 모아진 골수세포를 10% FBS가 함유된 α -MEM으로 재현탁한 후 배양하여 사용하였다.

- [0071] <1-2> 파골세포의 분화유도 및 분화된 파골세포 판정
- [0072] 상기 실시예<1-1>에 따라 초기 배양된 골수세포에 대식세포증식자극인자(macrophage colony stimulating factor : 이하 간략하게 ‘M-CSF’ 이라 함) 20ng/ml를 첨가하여 16시간 동안 배양하였다. 부유세포들을 수득하여 M-CSF 20ng/ml로 2일 이상 추가 배양하여 골수유래 대식세포(bone marrow-derived macrophage: BMM: 이하 간략하게 ‘BMM’ 라 함)를 생성시켰고, 생성된 BMM를 회수한 다음 1×10^5 cells/well에 파골세포분화인자 RANKL(receptor activator of NF- κ B ligand) 40ng/ml과 M-CSF 20ng/ml를 포함하는 배지를 첨가한 후 배양하였으며, 3일째 배지를 교체하였다. 배양이 끝난 세포는 10% 포르말린으로 10분간 고정한 후 에탄올-아세톤 (1:1)로 1분간 재고정하여 TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase, 이하 간략하게 ‘TRAP’ 라 함) 염색하였고, TRAP-양성 다핵세포 (MNC)의 세포수를 측정하였다.
- [0073] <1-3> 일산화탄소 공급체 처리에 따른 파골세포 분화 억제 효과
- [0074] 본 발명의 유효성분인 일산화탄소가 파골세포 분화에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위하여, 파골세포 분화 과정에 일산화탄소를 공급할 수 있는 일산화탄소 공급체를 처리한 후 파골세포 분화 억제 정도를 TRAP+(TRAP 양성 다핵세포) 세포의 개수 측정을 통해 확인하였다. 파골세포의 분화가 있을 경우 다핵세포의 개수가 늘어날 것이므로 TRAP+ 세포의 수가 증가하기 때문이다.
- [0075] 상기 실시예<1-1>에 따라 초기 배양된 골수세포를 M-CSF 20ng/ml로 16시간 배양한 후 부유세포를 M-CSF 20ng/ml로 3일간 추가 배양하고, 생성된 BMM를 회수한 다음 1×10^5 cells/well에 RANKL 40ng/ml 과 M-CSF 20ng/ml 존재 하에 일산화탄소 공급체인 CORM2(Tricarbonyldichlororuthenium(II) dimmer, $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$)를 농도별(5, 10, 20, 30 μM)로 첨가하여 4일간 배양시킨 후, TRAP+ 다핵세포(multinucleate cell: MNC) 수를 측정하였다. 대조군으로는 일산화탄소를 공급하지 못하는 비활성 일산화탄소 공급체(iCORM2)를 사용하였다.
- [0076] 그 결과 도 1에서는 본 발명의 일산화탄소 공급체(CORM2)를 투입한 군에서 TRAP+ 세포가 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 반면에 일산화탄소를 방출할 수 없는 비활성 일산화탄소 공급체(iCORM)를 투입한 군에서는 TRAP+ 세포수를 거의 감소시키지 못하는 것으로 나타났다.
- [0077] <1-4> 일산화탄소 공급체 처리가 파골세포 특이적 마커 유전자의 발현에 미치는 영향
- [0078] 일산화탄소가 파골세포 분화를 억제할 수 있음을 더욱 확실히 증명하기 위하여, 일산화탄소의 처리 후 파골세포 특이적 마커 유전자인 TRAP 및 칼시토닌 수용체의 발현을 quantitative PCR을 이용하여 조사하였다.
- [0079] 상기 실시예<1-1>에 따라 초기 배양된 골수세포를 M-CSF 20ng/ml로 16시간 배양한 후 부유세포를 M-CSF 20ng/ml로 3일간 추가 배양하였다. 생성된 BMM를 회수한 다음 1×10^5 cells/well에 RANKL 40ng/ml 과 M-CSF 20ng/ml 존재 하에 일산화탄소 공급체인 CORM2(Tricarbonyldichlororuthenium(II) dimmer, $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$)를 30 μM 농도로 첨가하여 48시간 배양시킨 후, TRAP 및 칼시토닌 수용체(calcitonin receptor)의 발현량을 quantitative PCR를 이용하여 측정하였다. 이때 상기 PCR을 위해 배양된 세포로부터 총 RNA를 추출하였고(인비트로젠사의 제공방법으로 수행함), 총 RNA는 제조사의 지시에 따라 올리고-dT 및 Superscript I enzyme(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 역전사하였다. qPCR은 SYBR Green 1 Tag polymerase(Qiagen, Hilden, Germany) 및 DNA Engine Opticon Continuous Fluorescence detection system(MJ Research Inc., Waltham, MA) 상에 적절한 프라이머를 이용하여 이행하였고, 이때 각각의 특정 프라이머 세트는 melting curve 분석 및 아가로스젤 전기영동으로써 확인하여 특이성을 확인하였으며, 사용한 프라이머 서열은 표 1에 기재하였다. 또한 housekeeping 유전자인 GAPDH 유전자를 대조군으로 사용하였다. GAPDH와 비교하여 상대적인 카피 수는 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 를 이용하여 계산되었다(Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-Ctmethod.Methods.25:402-408.). 프라이머 서열은 아래의 서열을 이용하였다.

[0080]

PCR에서 사용한 프라이머의 서열

	프라이머 서열(5' →3')	서열번호
칼시토닌 수용체 (calcitonin receptor)	포워드-ctgctcctagttagcccaac	1
	리버스-cagcaatcgacaaggagtga	2
TRAP	포워드-gaccaccttggaatgtctctg	3
	리버스-tggctgaggaagtcatctgagttg	4
GAPDH	포워드-accagaagactgtggatgg	5
	리버스-cacattggggtaggaacac	6

[0081]

그 결과 도 2에서 나타난 바와 같이, TRAP 및 칼시토닌 수용체의 전사체(transcripts)는, 본 발명의 일산화탄소 공급체인 CORM2를 투입한 군에서 상당히 감소되는 것으로 나타났다. 이를 통해 파골세포 특이적 마커 유전자의 발현은 일산화탄소에 의해 발현이 억제됨을 확인할 수 있었으며, 궁극적으로 파골세포 분화를 감소시킬 수 있음을 의미하는 것이다.

[0082]

<1-5> 일산화탄소의 파골세포 형성 활성 분석

[0083]

본 발명의 유효성분인 일산화탄소가 파골세포의 형성을 억제하는 것을 상기의 실험을 통해 증명하였다. 이러한 일산화탄소의 파골세포의 형성 억제 기작이 파골세포의 형성 초기단계에 일어나는지 아니면 성숙한 파골세포에서도 일어날 수 있는지 규명하기 위해 파골세포 형성 단계별 일산화탄소 공급체(CORM2)를 투입하여 파골세포 억제 정도를 실험하였다.

[0084]

상기 실시예<1-1>에 따라 초기 배양된 골수세포를 M-CSF 20ng/ml로 16시간 배양한 후 부유세포를 M-CSF 20ng/ml로 2일간 추가 배양하였다. 생성된 BMM을 회수한 다음 1×10⁵ cells/well에 RANKL 40ng/ml 과 M-CSF 20ng/ml 존재 하에 일산화탄소 공급체인 CORM2(Tricarbonyldichlororuthenium(II) dimer, [Ru(CO)₃C₁₂]2)를 30 μM농도로 시간대별(0-4D : 0일 투입후 96 h 지속, 0-2D : 0일 투입후 48 h에 제거, 3-4D: 49h 투입후 96 h 지속)로 투입하였다. 막대그래프위의 수는 각 처리군의 TRAP-positive MNC를 CORM2로 처리하지 않은 세포의 TRAP-positive MNC로 나눈 수치이다(CORM2에 의한 억제에 반비례).

[0085]

그 결과 도 3에서 나타난 바와 같이 CORM2는 파골세포형성 초기단계에서 일산화탄소 형성의 저해가 더 효율적인 것으로 나타났다.

[0086]

그러므로 CORM2의 파골세포 분화 억제 효과는 분화의 초기단계에서 더 효과적일 수 있음을 알 수 있었다.

[0087]

<실시예 2>

[0088]

일산화탄소의 파골세포 분화 억제 기전 규명 (in vitro)

[0089]

파골세포 분화에 관한 RANKL 자극을 매개하는 다양한 신호전달 경로가 밝혀진바 있다. 특히 RANKL의 자극은 파골전구세포에서 파골세포의 분화를 조절하는 핵심 전사인자로 알려져 있는 NFAT(nuclear factor of activated T cells)의 발현을 유도한다. NFAT는 RANKL 자극에 의한 세포내 칼슘 신호 전달로 초기 유도되며, 그 후 ERK(extracellular signal-regulated kinase), NF-κB, MAPK(p38 MAP kinase), c-Fos 등의 활성화가 NFAT의 자가증폭(autoamplification)을 유발하여 활성이 지속된다. 핵심 전사인자인 NFAT 단백질은 현재까지 5 종류가 확인되었다. 즉, NFAT family는 NFAT1 (NFATp 또는 NFATc2), NFAT2 (NFATc 또는 NFATc1), NFAT3 (NFATc4), NFAT4 (NFATx 또는 NFATc3) 및 NFAT5으로 구성되어 있다.

[0090]

본 발명의 일산화탄소가 RANKL에 의한 파골세포 분화와 이에 따른 골 흡수 억제할 수 있음을 상기 실시예를 통해 밝혔으므로, 본 실험에서는 일산화탄소가 파골세포 전구인자에서 RANKL의 자극에 의해 유도된 신호 경로의 활성화에 영향을 주는지를 실험하였다.

[0091]

따라서 작용기전을 규명하기 위하여 첫 번째, 일산화탄소의 처리가 파골세포의 분화를 조절하는 핵심 전사인자인 NFAT2의 발현 및 c-fos의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 또한 두 번째, NF-κB의 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. 마지막으로 세 번째, NFAT2 활성을 면역형광 염색(항-NEAF2 항체)법을 수행하여 측정하였다.

[0092] <2-1> 일산화탄소 공급체 처리에 따른 NFAT2 및 c-fos의 발현 측정

[0093] 본 발명의 일산화탄소의 처리가 파골세포의 분화를 조절하는 핵심 전사인자인 NFAT2의 발현 및 c-fos의 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

[0094] BMM 세포를 RANKL 40ng/ml 과 M-CSF 20ng/ml 존재 하에 일산화탄소 공급체인 CORM2(Tricarbonyldichlororuthenium(II) dimmer, $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$)를 30 μM 농도로 첨가하여 48시간 배양시킨 후, NFAT2 및 c-fos의 발현량을 quantitative PCR를 이용하여 측정하였다. qPCR은 하기의 프라이머 서열을 사용하여 실시하였으며, 상기 실시예<1-4>와 동일한 방법으로 수행되었다.

표 2

[0095] PCR에서 사용한 프라이머의 서열

	프라이머 서열(5' →3')	서열번호
c-Fos	포워드-agcctttctactaccattcccc	7
	리버스-tggcactagagacggacaga	8
NFAT2	포워드-aataacatgcgagccatcatc	9
	리버스-tcacctgggtgttcttctctc	10
GAPDH	포워드-accagaagactgtggatgg	5
	리버스-cacattggggtaggaacac	6

[0096] 그 결과 도 4에서 나타난 바와 같이, c-Fos 및 NFAT2 전사체(transcripts)는, 본 발명의 일산화탄소 공급체인 CORM2를 투입한 군에서 상당히 감소되는 것으로 나타났다. 이상의 결과를 통해 일산화탄소는 NFAT2 및 c-Fos의 발현 감소를 통하여 파골세포 분화를 억제한다는 사실을 알 수 있었다.

[0097] <2-2> 일산화탄소 공급체 처리에 따른 NF- κ B의 활성화 측정

[0098] 본 발명의 일산화탄소 처리가 파골세포의 분화를 조절하는 핵심 전사인자인 NF- κ B의 활성화에도 영향을 미치는 지 조사하였다. NF- κ B는 RANKL 자극에 의해 활성화된 후 핵 내로 들어가 필요한 유전자의 프로모터에 결합하여 해당 유전자 발현을 유도한다. 이때 생성된 각종 단백질은 외부자극에 대한 세포 반응 유발에 관여하게 된다. 따라서 본 발명자들은 일산화탄소에 의한 NF- κ B의 활성도를 측정하기 위해 electrophoretic mobility shift assay (EMSA) 방법을 수행하였다.

[0099] BMM 세포를 RANKL 40ng/ml, M-CSF 20ng/ml 존재 하에서 일산화탄소 공급체인 CORM2(Tricarbonyldichlororuthenium(II) dimmer, $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$)를 농도별(20 μM , 50 μM)로 첨가하여 1시간 동안 배양하였으며, 이렇게 배양된 세포로부터 핵 추출물을 수득하였다. 또한 NF- κ B 결합 실험은 NF- κ B 일치 결합부위를 포함하는 하기 표 3의 서열번호 11의 이중가닥 올리고뉴클레오타이드(Santa Cruz Biotechnology, San Diego, CA)를 이용하여 수행하였다. 상기 서열번호 11의 NF- κ B의 결합 특이성은 하기 표 3의 서열번호 12의 변이체 서열을 사용하여 경쟁 에세이를 통하여 확인할 수 있었다. 서열번호 11의 올리고뉴클레오타이드 또는 서열번호 12의 변이체는은 T4 폴리뉴클레오타이드 키나아제(Promega, Madison, WI)를 이용하여 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ 로 말단을 표지화시켰다. 각각의 핵 추출물 5 μg 은 1 μg poly(dIdC), 15mM HEPES, pH7.6, 80mM NaCl, 1mM EGTA, 1mM DTT(dithio threitol) 및 10% 글리세롤을 함유하는 결합 버퍼 10 μl 에 ^{32}P -표지화된 프로브 1ng과 함께 20분 동안 30℃에서 반응시켰다. DNA-단백질 결합체들은 native 5% 폴리아크릴아마이드 겔 상에서 전기영동한 후, 진공-건조시키고 80℃에서 identifying screen을 이용하여 자기방사법으로 가시화하였다.

[0100] 그 결과 도 5에서 나타난 바와 같이, 본 발명의 CORM2를 처리한 군에서는 NF- κ B와 DNA의 결합체가 감소된 것을 확인할 수 있었고, 이때 처리한 CORM2의 농도에 비례하여 감소하는 것으로 나타났다(라인 3, 4). 이를 통해 본 발명자들은 CORM2의 처리에 의해 발생하는 일산화탄소는 NF- κ B의 활성을 감소시켜 핵 내로의 NF- κ B의 이동을 억제하며, 이로 인해 종국에는 NF- κ B에 의한 세포신호 전달을 억제하여 파골세포 분화를 억제한다는 것을 알 수 있었다.

표 3

[0101] NF- κ B 일치 결합부위 올리고뉴클레오타이드 및 이들의 변이체 서열

올리고뉴클레오타이드	염기서열(5' → 3')	서열번호
NF-B 일치 결합부위 올리고뉴클레오타이드	agttgaggggactttcccaggc	11
돌연변이 올리고뉴클레오타이드(MUTANT)	agttgaggcgactttcccaggc	12

[0102] <2-3> 일산화탄소 공급체 처리에 따른 NEAF2 활성 실험

[0103] 또한 본 발명의 일산화탄소 처리에 따른 RANKL에 의해 유도된 파골세포 분화 과정에서 NFAT2 활성을 가시적으로 확인하기 위하여 면역형광 염색(항-NFAT2 항체)에 의하여 실험하였다.

[0104] BMM 세포를 RANKL 40ng/ml, M-CSF 20ng/ml 존재 하에서 일산화탄소 공급체인 CORM2(Tricarbonyldichlororuthenium(II) dimmer, $[\text{Ru}(\text{CO})_3\text{Cl}_2]_2$)를 30 μM 농도로 첨가하여 3일 동안 배양하였다. 이 세포들을 수득하여 10%의 중성 버퍼 포르말린으로 고정하였으며, 0.1% 트리톤 X-100을 이용하여 침투시켰다. 면역형광 염색은 FITC-컨쥬게이티드 항-마우스 IgG(eBioscience)를 따라서 마우스 항-NFAT2 항체(Santa Cruz Biotechnology)를 이용하여 수행되었다. FITC-라벨링된 NFAT2의 subcellular localization은 공초점 레이저 현미경(Olympus FV500)을 이용하여 확인되었다.

[0105] 그 결과 도 6에서 나타난 바와 같이, RANKL 무처리 군에서는 NFAT2 염색은 거의 없는 것을 발견할 수 있었으며(왼쪽), 반면에 RANKL만을 처리한 군에서는, NFAT2는 다핵 성숙 파골세포로의 핵 이동이 관찰되었다(오른쪽). 또한 본 발명의 일산화탄소 공급체인 CORM2를 함께 처리한 파골세포에서 NFAT2 염색은, RANKL만을 처리한 군(CORM2 무처리)과 비교하여 낮은 수준을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(중간).

[0106] 상기의 실험 결과를 통해 BMM(골수유래 대식세포)에 본 발명의 일산화탄소 공급체인 CORM2를 처리하였을 때 감소된 파골세포형성은 RANKL의 자극에 의해 유도된 신호 경로에서 NFAT2와 c-fos의 발현 억제 및 NF- κ B의 감소된 활성화와 연계된 것으로 판단하였다. 이는 일산화탄소의 골 대사에서의 특별한 역할을 규명한 것이다.

[0107] <실시예 3>

[0108] 일산화탄소의 파골세포 분화에 대한 효능 검증 (in vivo)

[0109] 일산화탄소가 in vitro에서 파골세포 분화 억제 효과를 보였으므로 난소절제술을 시행한 마우스 모델을 이용해 일산화탄소의 in vivo 효능을 검사하였다.

[0110] 본 발명자들은 일산화탄소가 폐경기 이후에 발생하는 골 손실을 개선시킬 수 있는지 확인하기 위해, 폐경기의 증상이 나타나는 마우스 모델을 제조하기 위해 난소가 적출된 마우스를 제조하였다. 이러한 마우스 모델을 위해 6주령의 C57BL/6J(B/6) 마우스를 대상으로 수술(난소절제술)후 2일째에 일산화탄소 공급체CORM2(5mg/kg), 비활성 일산화탄소 공급체 iCORM2(5mg/kg), 및 베히클(대조군) 각각을 복강에 주입시키고 8주 동안 사육하였다. 모든 마우스들을 대상으로 하는 실험들은 동물보호협회, 울산대학교 협회 및 면역조절 리서치 센터에서 승인된 방법에 따라 수행하였다. 상기의 방법으로 준비된 마우스들은 분석 전에 희생되었으며, 마우스들의 대퇴골은 micro CT로 단층 촬영하여 골 손실의 정도를 확인하였다. 실험동물의 대퇴골은 GE xPlore Locus SP system에 의해 수행되어지는 Micro CT scanning에 의하여 분석되었다. 3차원 histomorphometry 및 긴 뼈 구조의 가시화를 위하여 마우스들의 대퇴골은 high resolution micro-CT 이미지 시스템(0.008-mm 효율적인 탐지기 픽셀 사이즈가 탑재된)에서 스캔되었는데, 3D 마이크로구조 분석의 소프트웨어 프로그램은 explore MicroView 2.2.로부터 제공되었다.

[0111] 그 결과는 하기 도 7 내지 도 10에서 나타내었다.

[0112] 도 7은 실험대상 마우스들의 대퇴골을 micro CT를 이용하여 단층 촬영한 사진으로, 이를 자세히 살펴보면 상부

와 하부는 각각 마우스 대퇴골의 성장판으로부터 0.7mm 및 2.3mm 부분과 일치하는 부분으로, 사진에서 보이는 바와 같이 베히클을 투입한 군과 비교하여 본 발명의 CORM2를 투입한 군에서 높은 골량을 나타내는 것을 육안으로 확인할 수 있었다.

[0113] 또한 도 8은 실험대상 마우스들의 대퇴부의 해면골의 골량 증가를 수치로 나타낸 그래프로, 이 때 골량 증가는 대퇴골 원위(distal femur)의 secondary spongia의 수치로 평가되었다. 도 8에서 나타는 바와 같이 베히클을 투입한 군과 비교하여 본 발명의 CORM2를 투입한 군에서 골밀도(BMD:Bone Mineral Density)가 상당히 높은 것을 확인할 수 있었다.

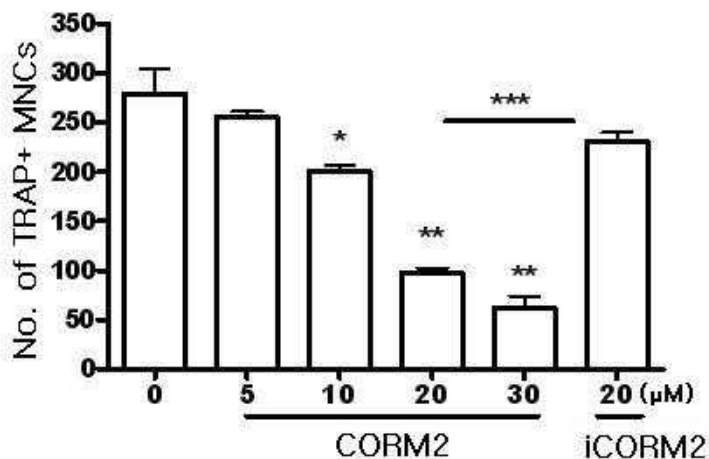
[0114] 또한 도 9는 뼈의 무기질함량(BMC: bone mineral content)을, 도 10은 전체 조직 볼륨의 퍼센트로서 표현된 해면골 부피(BV/TV %)를 나타낸 것으로, 상기 도 8과 유사한 패턴으로 나타났다. 즉 여기에서도 베히클을 투입한 군과 비교하여 본 발명의 CORM2를 투입한 군에서 뼈의 무기질함량 및 해면골 부피가 상당히 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0115] 상기의 실시예 1 내지 3을 종합해 보면, 파골세포로 분화 과정 중인 세포에 본 발명의 일산화탄소를 처리한 경우 파골세포로의 형성이 억제되는 것이 증명되었으며; 이러한 파골세포의 형성을 억제하는 기작은 RANKL의 자극에 의해 유도된 분자적 신호경로(signal pathway)에서 파골세포 분화를 조절할 수 있는 핵심 전사인자인 NFAT2와 c-fos의 발현 억제 및 NF- κ B의 감소된 활성화와 연계되어 있으며; 마지막으로 난소절제술을 시행한 마우스 모델에 일산화탄소 공급체(CORM2)를 투입한 경우 골밀도, 뼈의 무기질함량 등의 증가를 확인함으로써 상기 in vitro 실험과 동일한 결과를 도출할 수 있었다. 따라서 상기와 같은 특징을 가진 일산화탄소를 이용하는 경우 폐경기 이후에 발생하는 골 손실을 개선에 효과적일 것으로 판단되었다.

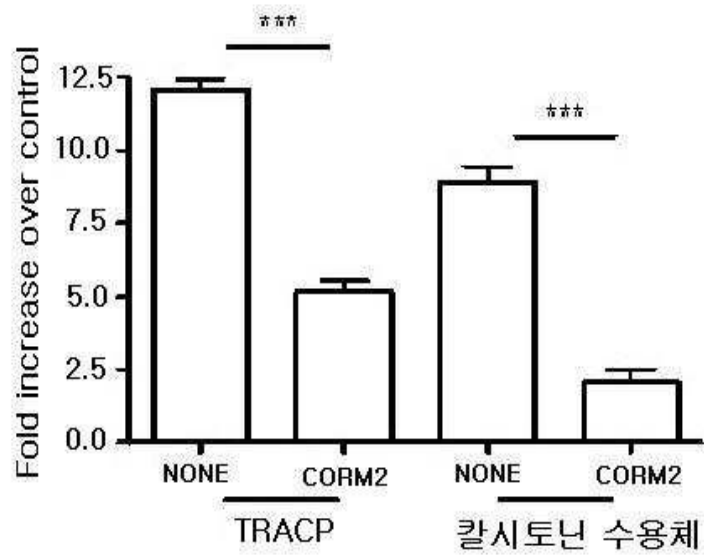
[0116] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

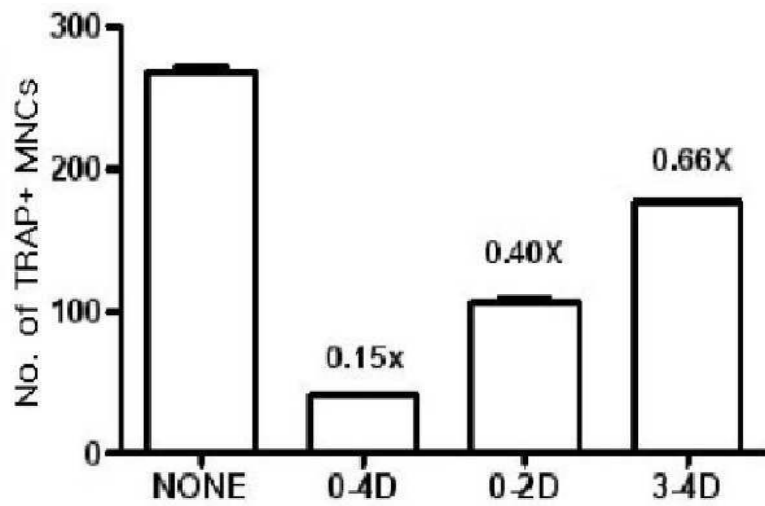
도면1



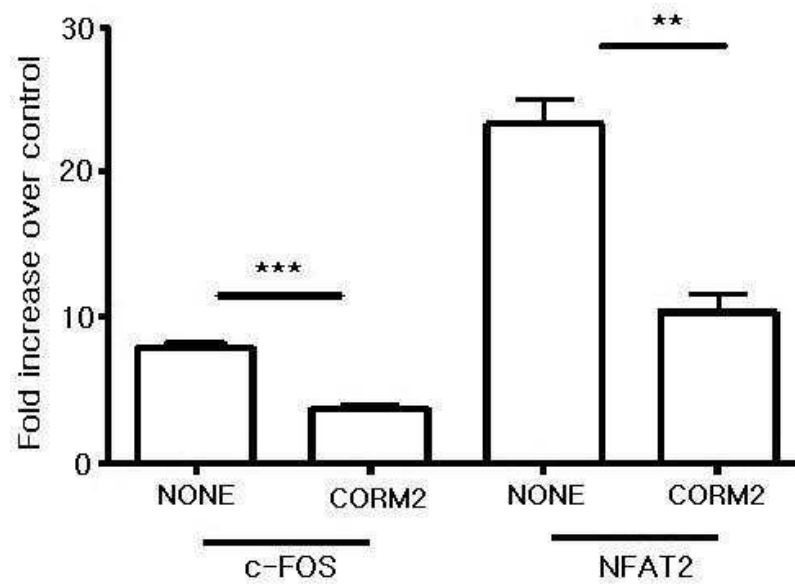
도면2



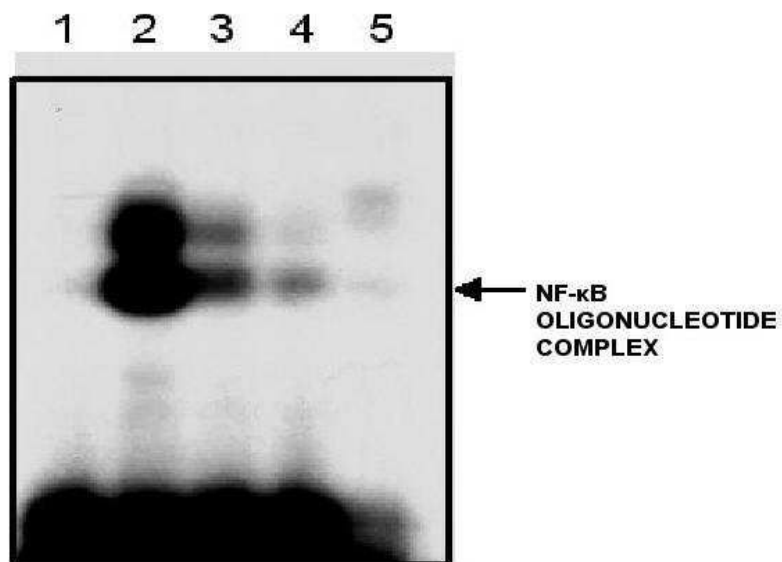
도면3



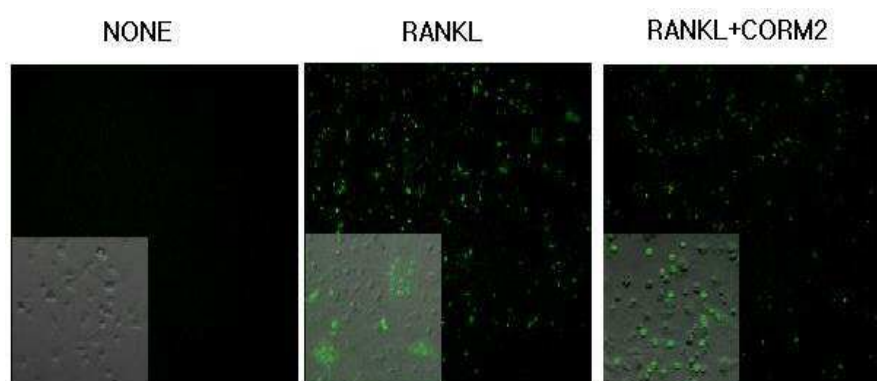
도면4



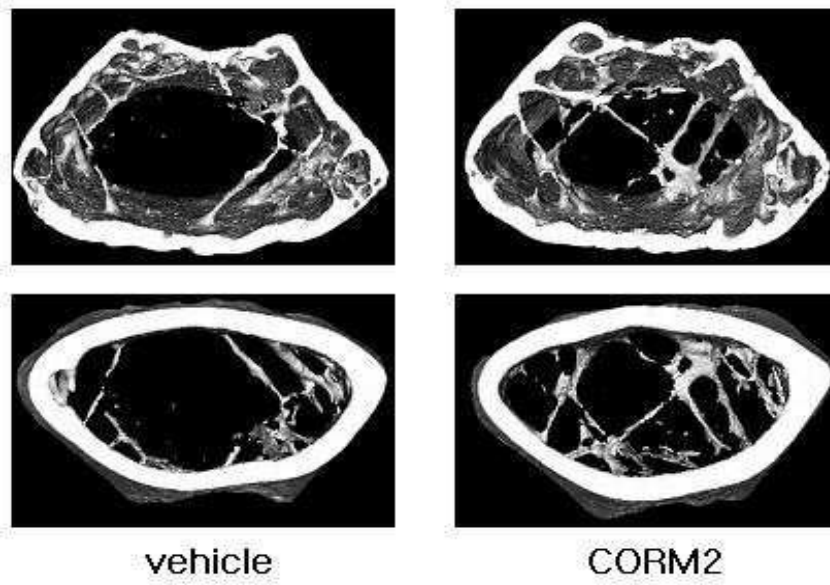
도면5



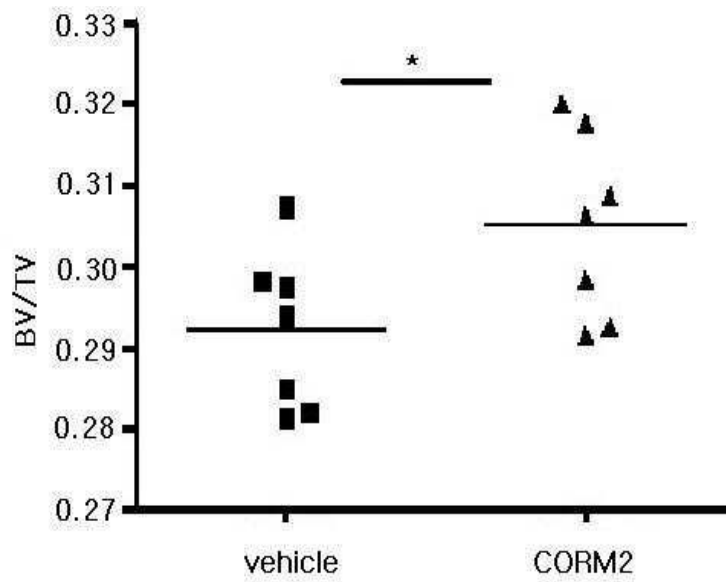
도면6



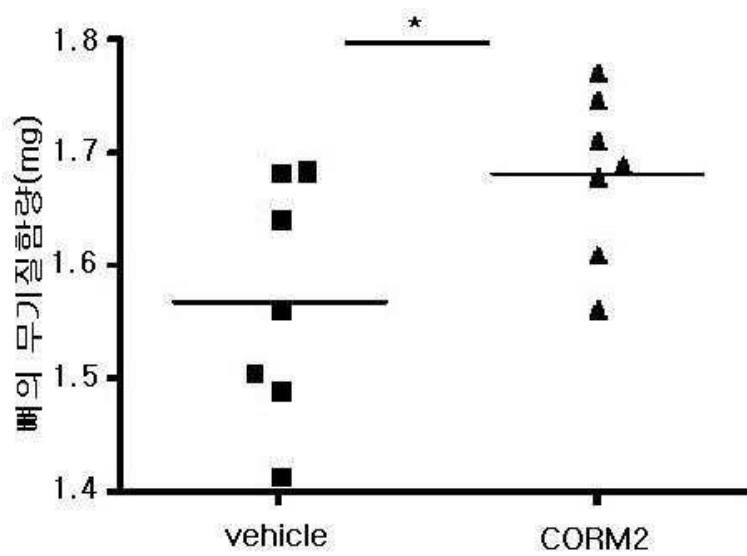
도면7



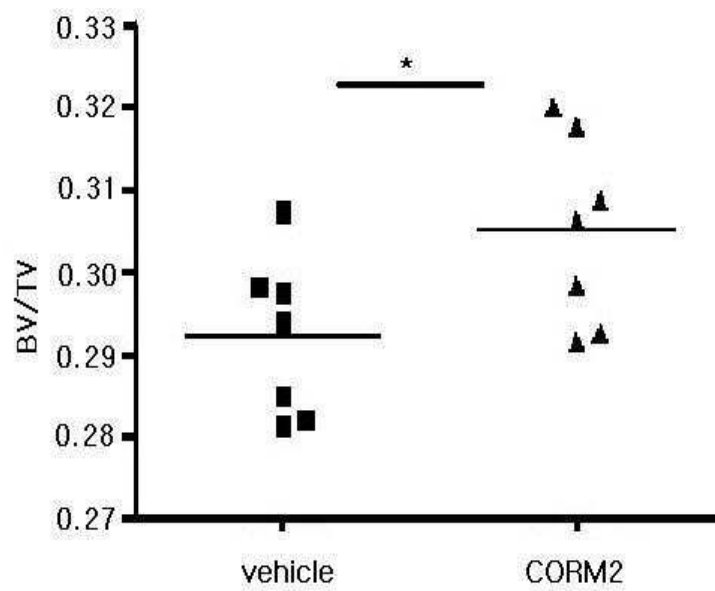
도면8



도면9



도면10



서열 목록

- <110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
- <120> Composition Comprising Carbon Monoxide or Carbon Monoxide Donor
for Inhibition of Bone Loss
- <160> 12
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> calcitonin receptor forward primer

<400> 1

ctgctcctag tgagcccaac 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> calcitonin receptor reverse primer

<400> 2

cagcaatcga caaggagtga 20

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TRAP forward primer

<400> 3

gaccaccttg gcaatgtctc tg 22

<210> 4

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TRAP reverse primer

<400> 4

tggtgagga agtcactcga gttg 24

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH forward primer

<400> 5

acccagaaga ctgtggatgg 20

<210> 6

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH reverse primer
 <400> 6
 cacattgggg gtaggaacac 20
 <210> 7
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> c-fos forward primer

 <400> 7
 agcctttcct actaccattc cc 22
 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> c-fos reverse primer
 <400> 8
 tggcactaga gacggacaga 20
 <210> 9
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NFAT2 forward primer
 <400> 9
 aataacatgc gagccatcat c 21
 <210> 10
 <211
 > 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NFAT2 reverse primer
 <400> 10

tcaccctggg gttcttcctc	20
<210> 11	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> NF-kB specific binding oligonucleotide	
<400> 11	
agttgagggg actttcccag gc	22
<210> 12	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> mutant of NF-kB specific binding oligonucleotide	
<400> 12	
agttgaggcg actttcccag gc	22