(19) 대한민국 지식재산처(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2026년10월12일
(11) 등록번호 10-3032079
(24) 등록일자 2026년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/488 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61P 19/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/488 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0009423
(22) 출원일자 2023년01월25일
심사청구일자 2023년01월25일
(65) 공개번호 10-2024-0117269
(43) 공개일자 2024년08월01일
(56) 선행기술조사문헌
Swaha Satpathy et al, PLoS One, 2021, Vol.16, No.1, pp.1-22](2021.01.14)
KR1020110086580 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
이상수
강원도 춘천시 후석로 459, 101동 1504호
나스 수다르시니
강원특별자치도 춘천시 삭주로70번길 16-1, 202호(교동)
(74) 대리인
특허법인본

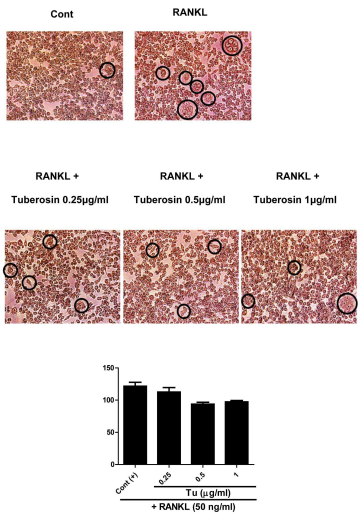
전체 청구항 수 : 총 13 항 심사관 : 곽희찬

(54) 발명의 명칭 **투베로신을 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 투베로신을 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 투베로신을 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명에 따르면, 투베로신은 조골세포의 분화를 촉진하고, 파골세포의 형성을 억제하여, 골다공증의 예방 또는 치료 효과가 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61P 19/10 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/306 (2013.01)
A23V 2250/2116 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345347415
과제번호	2020R1I1A3074575
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학학술연구기반구축
연구과제명	Sclerostin 억제를 통한 임플란트 주변 골용해증 신 치료기전 규명 및 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	한림대학교
연구기간	2020.06.01 ~ 2025.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

투베로신(tuberosin)을 유효성분으로 포함하는, 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 투베로신은 조골세포의 분화를 촉진하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 조골세포 분화의 촉진은 ALP의 활성 증가에 의한 것인, 약학적 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 조골세포 분화의 촉진은 Runx2, OSX, Col1α 및 OCN의 mRNA 발현 증가에 의한 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 투베로신은 WNT/β-카테닌 신호전달경로의 활성을 촉진하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 투베로신은 파골세포 형성을 억제하는 것인, 약학적 조성물.

청구항 7

투베로신(tuberosin)을 포함하는, 골다공증의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 투베로신은 조골세포의 분화를 촉진하는 것인, 식품 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 조골세포 분화의 촉진은 ALP의 활성 증가에 의한 것인, 식품 조성물.

청구항 10

투베로신(tuberosin)을 포함하는 골다공증의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 투베로신은 조골세포의 분화를 촉진하는 것인, 건강기능식품.

청구항 12

투베로신(tuberosin)을 포함하는 생체 외에서(in vitro)의 골형성 촉진용 조성물.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 투베로신은 조골세포의 분화를 촉진하는 것인, 생체 외에서(in vitro)의 골형성 촉진용 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 투베로신을 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 전 세계 인구의 고령화로 인해 골질환은 정부에 상당한 재정 및 의료 부담을 주기 때문에 성별에 관계없이 모든 사람의 관심사이다. 골질환은 또한 주요 글로벌 건강 문제로 부상하고 있다. 남성과 여성 모두의 건강에 영향을 미치는 가장 중요한 골 컨디션 중 하나는 폐경 후 여성에게 더 흔한 골다공증이다. 남성 5명 중 1명과 여성 2명은 평생 동안 골다공증성 골절이 발생하기 쉽다. WHO에 따르면 50세 인구의 20%가 골다공증을 앓고 있으며 30%는 대부분 노인이다. 골다공증의 병태생리학적 상태는 뼈 형성과 뼈 흡수 사이의 불균형을 특징으로 하며, 이는 뼈 흡수를 증가시키고 뼈 취약성과 골절을 증가시킨다. 조골 세포 분화와 파골 세포 활성화 사이의 상호 작용은 뼈 형성과 흡수를 조절한다. 나이가 들어감에 따라 균형은 뼈 형성보다 더 많은 뼈 흡수로 이동한다. 골다공증에 대한 지속적인 치료 격차는 지난 20년 동안 대체 작용 메커니즘, 치료 순응도 향상 및 골밀도(BMD)의 지속성 향상, 더 빠르고, 더 많이, 더 혁신적인 골절 위험의 개선 및 저렴한 제네릭 제제를 통한 접근성 향상 등 다양한 목표를 갖고 약물 요법의 발전을 장려했다. 따라서 새로운 뼈 형성을 자극하기 위한 이상적인 치료법은 안전해야 하며 주로 균형과 비용 효율성에 중점을 두어야 한다.

[0003] 증가된 뼈 흡수는 뼈 손실을 가속화하므로 이를 조절하는 것이 중요한 치료 목표이다. 실제로 현재 사용되고 있는 대부분의 골치료제는 항골흡수 효과가 있다. 그러나 이러한 요법의 효과는 뼈 흡수를 지연시키거나 유방암 및 자궁암(예: 에스트로겐)의 위험을 증가시키는 것에만 작용한다. 뼈 질환 중 뼈 손실의 양은 종종 재흡수 억제로 대체되는 양을 초과하기 때문에 뼈 형성 자극제는 매우 바람직한 보조 요법이다.

[0004] 골다공증의 주요 치료법에는 항흡수 약물, 선택적 에스트로겐 수용체 조절제(SERM), 비스포스포네이트(BP), 핵인자 카파-B 리간드 항체의 항수용체 활성화제(anti-receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand; RANKL), 단백 동화 약물, 또는 부갑상선 호르몬(PTH)과 같은 뼈 형성 약물 및 이들의 조합이 포함된다. Romosozumab(evenity)과 같은 약물과 Alendronate와 같은 BP가 골다공증 치료에 가장 널리 사용된다. 강력한 항흡수 작용에 의해 Denosumab은 골다공증 치료에 대한 승인을 받았다. RANKL에 결합하여 RANK 활성화를 차단하지만 반감기가 길고 항흡수 작용이 더 강하다는 점에서 osteoprotegerin과 다르다.폐경 후 여성에서 에스트로겐 결핍은 골다공증 발병과 관련이 있다.

[0005] 골다공증에 대한 약물 요법은 일반적으로 에스트로겐 또는 뼈 리모델링 수준을 조정하는 데 중점을 둔다. PTH 생성 촉진, OPG(osteoprotegerin) 발현 촉진, 인터루킨(IL)-1, 4, 6 및 대식세포 콜로니 자극 인자(M-CSF) 수준 감소, 에스트로겐 또는 에스트로겐 유사 화합물 증가, 뼈의 칼슘과 인 보충, 골아 세포 증식 및 분화 촉진을 포함하여 여러 요인이 메커니즘에서 역할을 한다. 가장 널리 사용되는 약물인 BP는 골 흡수를 방해하는 것으로부터 파골 세포 기능을 방지한다. BP는 시간이 지남에 따라 석회화와 골 흡수를 모두 감소시키기 때문에 골연화증의 위험을 증가시킨다. BP는 약물 안전 뉴스레터에서 FDA가 보고한 바와 같이 고용량을 정맥으로 투여하면 신장 기능이 손상될 수 있으므로 중증 신장애 환자에게는 사용하지 않는 것이 좋다. 부갑상선에서 분비되는 PTH는 칼슘과 인의 혈청 농도를 변화시킨다. 또한 조골세포에서 RANKL 발현을 증가시킨다. PTH는 조골 세포 분화를 향상시키는 능력으로 인해 뼈 리모델링에 필요하다. 그러나 고용량의 PTH는 또한 추가적인 광범위한 부정적인 영향을 미친다. 심혈관 질환(예: 심부전, 뇌혈관 질환 및 심장 허혈)의 부작용은 Romosozumab 약물에서 가장 흔했다. 동물 연구는 저골량 표현형에서 골량 회복 및 취약성 골절 예방을 위한 항-스클레로스틴 항체(Scl-Abs)의 치료 가능성을 입증했다. 골다공증은 현재 Scl-Ab Romosozumab으로 치료되지만 여전히 임상 실습에 의해 검증되어야 한다. 또한 Denosumab의 장기적 효과는 아직 보고되지 않았다. 다수의 골다공증 치료제는 많은 연구 결과

에 따르면 좋지만 장기간 사용하면 모두 상당한 부작용이 있다. 이로 인해 많은 골다공증 환자들은 부작용이 적은 신약이 필요하다.

[0006] 최근 몇 년 동안 플라보노이드는 다중 표적 작용과 적은 부작용으로 인해 만성 질환에 큰 수요가 있었다. 수많은 연구에서 식이 플라보노이드 섭취와 뼈 건강 사이의 연관성을 발견했다. 플라보노이드는 과일과 채소에 널리 존재하는 생체 활성 폴리페놀이며 항염증, 뼈 대사 및 항산화 특성을 가지고 있다. 플라보노이드가 골다공증을 예방하고 치료할 수 있음에도 불구하고 이러한 화합물의 제한된 부분만이 작용 방식을 포함하여 생리학적 및 약리학적 특성에 대해 철저히 조사되었다. 케르세틴 및 캠페롤과 같은 플라보노이드는 이전에 연구되었으며 골다공증 예방 및 치료에 긍정적인 효과를 나타냈다.

[0007] WNT 및 BMP와 같은 뼈 형성 신호는 조골 세포의 성장을 엄격하게 조절한다. WNT/β-카테닌 신호 전달 경로 활성화는 건강한 발달에 필요하며, 이를 억제하면 사람의 뼈 관련 질병이 발생한다. 또한 BMP는 골절 치유를 포함한 뼈 형성 과정에서 중요한 역할을 하며 골격 발달 및 성인 뼈 항상성 유지에 필요한다. 또한 WNT와 BMP 신호는 골 형성 세포에서 혼선과 상호 작용에 관여한다. 항상성 뼈 환경에서 이러한 경로에 대한 모든 수정은 골 형성 세포의 뼈 생성 능력에 영향을 줄 수 있습니다. 최근에 TNFα에 의한 WNT 길항제인 DKK1의 자극이 염증성 관절염의 마우스 모델과 인간 류마티스 관절염에서 뼈 손실 증가의 원인이 된다는 것이 밝혀졌습니다. WNT 및 BMP 신호 전달 경로가 뼈 형성 및 염증성 뼈 장애에 관여하는 중요한 역할은 임상 환경에서 뼈 손실을 예방하기 위한 전략을 만들 때 고려됩니다.

[0008] 가장 중요한 약초 중 하나는 인도 kudzu(vidari kand)로 널리 알려진 Pueraria tuberosa이다. 인도, 파키스탄, 네팔에서는 인기 있는 다년생 식물 등반가들의 Ayurveda에 대한 수요가 높습니다. 아유르베다에서는 비다리(vidari kand)라고 한다. Pueraria tuberosa의 Lianas는 히말라야 산맥의 4,000피트에서 자라는 것으로 알려져 있다[29]. 이 식물의 괴경은 먹을 수 있으며 피부 상태, 상처, 피부 병변, 황달 및 기관지 천식을 치료하는 데 널리 사용됩니다. 푸에라리아 투베로즈 추출물의 일부는 쥐의 난소 절제로 유발된 골다공증을 완화시키는 것으로 보고되었다.

[0009] 투베로신은 푸에라리아 투베로즈(Pueraria tuberose)에서 추출한 플라보노이드 중 하나로 항산화 및 항염증 잠재력이 풍부하고 인도의 열대 지역에서 널리 재배됩니다. 또한 쇠약, 소화 불량, 노화 방지, 항 당뇨병 및 유아 쇠약에 도움이 됩니다[30]. 다른 연구자들은 불임 치료 및 피부 관리에서 치료 가능성을 설명했다[32]. 투베로신의 항암, 항산화, 항스트레스, 항염증 작용은 에스트로겐과 화학적으로 유사하여 에스트로겐이 없거나 부족한 상태에서 뼈 형성을 자극하는 식물성 에스트로겐으로 작용할 수 있다고 보고되었다. 그러나 조골세포와 파골세포에 대한 투베로신의 역할은 아직 보고되지 않았다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 조골세포와 파골세포에 대한 투베로신의 효과와 잠재적 기전을 조사하는 것이다.

선행기술문헌

[0011] 1. De Luca d'Alessandro E, Bonacci S, Giraldi G: Aging populations: the health and quality of life of the elderly. La Clinica terapeutica 2011, 162(1):e13-18.

[0012] 2. Harvey N, Dennison E, Cooper C: Osteoporosis: impact on health and economics. Nature reviews Rheumatology 2010, 6(2):99-105.

[0013] 3. Kerschan-Schindl K: Prevention and rehabilitation of osteoporosis. Wien Med Wochenschr 2016, 166(1-2):22-27.

[0014] 4. van Staa TP, Dennison EM, Leufkens HG, Cooper C: Epidemiology of fractures in England and Wales. Bone 2001, 29(6):517-522.

[0015] 5. Sims SM, Panupinthu N, Lapierre DM, Pereverzev A, Dixon SJ: Lysophosphatidic acid: a potential mediator of osteoblast-osteoclast signaling in bone. Biochimica et biophysica acta 2013, 1831(1):109-116.

[0016] 6. Ukon Y, Makino T, Kodama J, Tsukazaki H, Tateiwa D, Yoshikawa H, Kaito T: Molecular-Based Treatment Strategies for Osteoporosis: A Literature Review. Int J Mol Sci 2019, 20(10).

[0017] 7. Khosla S, Cauley JA, Compston J, Kiel DP, Rosen C, Saag KG, Shane E: Addressing the Crisis in the Treatment of Osteoporosis: A Path Forward. J Bone Miner Res 2017, 32(3):424-430.

[0018] 8. Langdahl BL, Andersen JD: Treatment of Osteoporosis: Unmet Needs and Emerging Solutions. J Bone Metab 2018, 25(3):133-140.

[0019] 9. Rodan GA, Martin TJ: Therapeutic approaches to bone diseases. Science 2000, 289(5484):1508-1514.

[0020] 10. Kendler DL, Cosman F, Stad RK, Ferrari S: Denosumab in the Treatment of Osteoporosis: 10 Years Later: A Narrative Review. Adv Ther 2022, 39(1):58-74.

[0021] 11. Kostenuik PJ: Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. Curr Opin Pharmacol 2005, 5(6):618-625.

[0022] 12. Uebelhart D, Frey D, Frey-Rindova P, Goerres G, Michel BA: [Therapy of osteoporosis: bisphosphonates, SERM's, teriparatide and strontium]. Zeitschrift fur Rheumatologie 2003, 62(6):512-517.

[0023] 13. MÜller D, Pulm J, Gandjour A: Cost-effectiveness of different strategies for selecting and treating individuals at increased risk of osteoporosis or osteopenia: a systematic review. Value in Health 2012, 15(2):284-298.

[0024] 14. Ukon Y, Outani H, Nagata S, Konishi E, Imai R, Demizu Y, Okimoto T, Naka N, Araki N: Rectotumoral fistula formation occurring more than 5 years after carbon ion radiotherapy for sacral chordoma: A case report. Molecular and clinical oncology 2019, 10(5):487-491.

[0025] 15. Marini F, Giusti F, Palmini G, Brandi ML: Role of Wnt signaling and sclerostin in bone and as therapeutic targets in skeletal disorders. Osteoporos Int 2022.

[0026] 16. Rizzoli R, Akesson K, Bouxsein M, Kanis JA, Napoli N, Papapoulos S, Reginster JY, Cooper C: Subtrochanteric fractures after long-term treatment with bisphosphonates: a European Society on Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis, and International Osteoporosis Foundation Working Group Report. Osteoporos Int 2011, 22(2):373-390.

[0027] 17. Weaver CM, Alekel DL, Ward WE, Ronis MJ: Flavonoid intake and bone health. J Nutr Gerontol Geriatr 2012, 31(3):239-253.

[0028] 18. Tungmunnithum D, Thongboonyou A, Pholboon A, Yangsabai A: Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. Medicines (Basel) 2018, 5(3).

[0029] 19. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR: Flavonoids: an overview. J Nutr Sci 2016, 5:e47.

[0030] 20. Wilson JD, Robinson AJ, Kinghorn SA, Hicks DA: Implications of inflammatory changes on cervical cytology. BMJ 1990, 300(6725):638-640.

[0031] 21. Yamaguchi A, Komori T, Suda T: Regulation of osteoblast differentiation mediated by bone morphogenetic proteins, hedgehogs, and Cbfa1. Endocr Rev 2000, 21(4):393-411.

[0032] 22. Goldring SR, Goldring MB: Eating bone or adding it: the Wnt pathway decides. Nature medicine 2007, 13(2):133-134.

[0033] 23. Pinzone JJ, Hall BM, Thudi NK, Vonau M, Qiang YW, Rosol TJ, Shaughnessy JD, Jr.: The role of Dickkopf-1 in bone development, homeostasis, and disease. Blood 2009, 113(3):517-525.

[0034] 24. Gazzerro E, Canalis E: Bone morphogenetic proteins and their antagonists. Rev Endocr Metab Disord 2006, 7(1-2):51-65.

[0035] 25. Mbalaviele G, Sheikh S, Stains JP, Salazar VS, Cheng SL, Chen D, Civitelli R: Beta-catenin and BMP-2 synergize to promote osteoblast differentiation and new bone formation. J Cell Biochem 2005, 94(2):403-418.

[0036] 26. Diarra D, Stolina M, Polzer K, Zwerina J, Ominsky MS, Dwyer D, Korb A, Smolen J, Hoffmann M,

Scheinecker C et al: Dickkopf-1 is a master regulator of joint remodeling. Nat Med 2007, 13(2):156-163.

[0037] 27. Baker-LePain JC, Nakamura MC, Lane NE: Effects of inflammation on bone: an update. Curr Opin Rheumatol 2011, 23(4):389-395.

[0038] 28. Keung WM: Pueraria: the genus Pueraria: CRC Press; 2002.

[0039] 29. Bharti R, Chopra BS, Raut S, Khatri N: Pueraria tuberosa: A Review on Traditional Uses, Pharmacology, and Phytochemistry. Front Pharmacol 2020, 11:582506.

[0040] 30. Chopra RN: Glossary of Indian medicinal plants. 1956.

[0041] 31. Satpathy S, Patra A, Hussain MD, Kazi M, Aldughaim MS, Ahirwar B: A fraction of Pueraria tuberosa extract, rich in antioxidant compounds, alleviates ovariectomized-induced osteoporosis in rats and inhibits growth of breast and ovarian cancer cells. PLoS One 2021, 16(1):e0240068.

[0042] 32. Gacche R, Dhole NA: Antioxidant and possible anti-inflammatory potential of selected medicinal plants prescribed in the Indian traditional system of medicine. Pharmaceutical biology 2006, 44(5):389-395.

[0043] 33. Zhang C, Liu M, Wang X, Chen S, Fu X, Li G, Dong N, Shang X: ALP Inhibitors Inhibit Inflammatory Responses and Osteoblast Differentiation in hVIC via AKT-ERK Pathways. Altern Ther Health Med 2022.

[0044] 34. Feigenson K, Reid M, See J, Crenshaw IE, Grinspan JB: Canonical Wnt signalling requires the BMP pathway to inhibit oligodendrocyte maturation. ASN Neuro 2011, 3(3):e00061.

[0045] 35. Rachner TD, Khosla S, Hofbauer LC: Osteoporosis: now and the future. Lancet 2011, 377(9773):1276-1287.

[0046] 36. Barnsley J, Buckland G, Chan PE, Ong A, Ramos AS, Baxter M, Laskou F, Dennison EM, Cooper C, Patel HP: Pathophysiology and treatment of osteoporosis: challenges for clinical practice in older people. Aging clinical and experimental research 2021, 33(4):759-773.

[0047] 37. Marcellini S, Henriquez JP, Bertin A: Control of osteogenesis by the canonical Wnt and BMP pathways in vivo: cooperation and antagonism between the canonical Wnt and BMP pathways as cells differentiate from osteochondroprogenitors to osteoblasts and osteocytes. BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology 2012, 34(11):953-962.

[0048] 38. Sharma AR, Nam JS: Kaempferol stimulates WNT/beta-catenin signaling pathway to induce differentiation of osteoblasts. The Journal of nutritional biochemistry 2019, 74:108228.

[0049] 39. Guo AJ, Choi RC, Cheung AW, Chen VP, Xu SL, Dong TT, Chen JJ, Tsim KW: Baicalin, a flavone, induces the differentiation of cultured osteoblasts: an action via the Wnt/beta-catenin signaling pathway. The Journal of biological chemistry 2011, 286(32):27882-27893.

[0050] 40. Wu JB, Fong YC, Tsai HY, Chen YF, Tsuzuki M, Tang CH: Naringin-induced bone morphogenetic protein-2 expression via PI3K, Akt, c-Fos/c-Jun and AP-1 pathway in osteoblasts. European journal of pharmacology 2008, 588(2-3):333-341.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0051] 본 발명은 투베로신을 포함하는 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0052] 본 발명은 또한 투베로신을 포함하는 골다공증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0053] 본 발명은 또한 투베로신을 포함하는 골다공증의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한

다.

[0054] 본 발명은 또한 투베로신을 포함하는 골형성 촉진용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0055] 본 개시의 목적들은 이상에서 언급한 목적으로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 본 개시의 다른 목적 및 장점들은 하기의 설명에 의해서 이해될 수 있고, 본 개시의 실시 예에 의해 보다 분명하게 이해될 것이다. 또한, 본 개시의 목적 및 장점들은 특허 청구 범위에 나타낸 수단 및 그 조합에 의해 실현될 수 있음을 쉽게 알 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0056] 본 발명은 투베로신(tuberosin)을 포함하는, 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0057] 본 발명은 또한 투베로신(tuberosin)을 포함하는 골다공증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공할 수 있다.

[0058] 본 발명은 또한 투베로신(tuberosin)을 포함하는 골다공증의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공할 수 있다.

[0059] 본 발명은 또한 투베로신(tuberosin)을 포함하는 골형성 촉진용 조성물을 제공할 수 있다.

[0060] 상기 투베로신은 조골세포의 분화를 촉진하는 것일 수 있다.

[0061] 상기 조골세포 분화의 촉진은 ALP의 활성 증가에 의한 것일 수 있다.

[0062] 상기 조골세포 분화의 촉진은 Runx2, OSX, Col1α 및 OCN의 mRNA 발현 증가에 의한 것일 수 있다.

[0063] 상기 투베로신은 WNT/β-카테닌 신호전달경로의 활성을 촉진하는 것일 수 있다.

[0064] 상기 투베로신은 파골세포 형성을 억제하는 것일 수 있다.

[0065] 상기 투베로신은 조성물 총량에 대해 0.25~8㎍/ml, 바람직하게는 0.25~1 ㎍/ml, 더욱 바람직하게는 0.5~1 ㎍/ml의 농도로 포함될 수 있다.

발명의 효과

[0066] 본 발명은 투베로신(tuberosin)을 포함하는, 골다공증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0067] 본 발명은 또한 투베로신(tuberosin)을 포함하는 골다공증의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공할 수 있다.

[0068] 본 발명은 또한 투베로신(tuberosin)을 포함하는 골다공증의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공할 수 있다.

[0069] 본 발명은 또한 투베로신(tuberosin)을 포함하는 골형성 촉진용 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0070] 도 1은 투베로신 처리 조골세포의 세포 생존율 및 세포독성을 나나탠다. 다양한 투여량의 투베로신을 MC3T3-E1 세포에 24시간 동안 처리한 다음, 세포 생존력과 세포독성을 각각 (A) MTT 및 (B) LDH 분석으로 평가했다. 데이터는 세 번의 독립적인 실험의 평균 ±SD로 표시됩니다. Tu: 투베로신.

도 2는 RANKL 처리된 RAW 264.7 세포에 대한 투베로신의 항파골세포 생성 특성을 나타낸다. 파골 세포 생성을 유도하기 위해 RAW 264.7 세포에 RANKL(50 ng/ml)을 3일 동안 처리하였다. 그 후, 투베로신(0.25, 0.5, 1㎍/ml)을 RANKL 자극 RAW 264.7 세포로 4일 동안 처리하였다. 데이터는 세 번의 독립적인 실험의 평균 ±SD로 표시됩니다. *P < 0.05, ** P < 0.01 대조군과 비교. Cont: 대조군, Tu; 투베로신.

도 3a~3c는 투베로신 처리된 조골세포의 골형성 마커 발현을 나타낸다. (A)는 다양한 용량의 투베로신으로 48시간 동안 처리한 후 결정된 MC3T3-E1 세포의 ALP 활성을 나타낸다. (B)는 (a) Runx2, (b) OSX, (c) Col1α 및 (d) OCN의 mRNA 발현 수준을 투베로신으로 24시간 동안 처리한 후 실시간 RT-PCR 분석으로 확인한 것이다. (C)는 Runx2 및 Col1α의 단백질 발현 수준을 투베로신으로 48시간 동안 처리한 후 western blotting을 통해 검출한 것이다. MC3T3-E1 세포를 투베로신으로 7일 동안 처리하였다. (D)는 Alizarin Red S 염색법을 (E)는 Sirius red S 염색법을 사용하여 광물화와 콜라겐 침착을 현미경을 이용하여 관찰한 것이다. 광물화 및 콜라겐 합성의 정량화는 염색된 세포의 추출에 의해 결정되었다. 데이터는 세 번의 독립적인 실험의 평균 ±SD로 표시됩니다. 대조군과 비교하여 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. Cont: 대조군, Tu; 투베로신.

도 4a~4b는 투베로신이 조골세포에서 골형성을 유도하지만 BMP 신호전달에는 관여하지 않는 것을 나타낸

도이다. (A)는 MC3T3-E1 세포를 BRE 리포터 구조로 12시간 동안 형질감염시킨 후 24시간 동안 투베로신으로 처리하여 BRE 리포터 활성을 나타낸 것이다. BRE 루시퍼라제 활성은 광도계를 사용하여 측정하고 재료 및 방법에 설명된 대로 Renilla 루시퍼라제 활성으로 정규화했다. (B)는 smad의 인산화는 웨스턴 브로팅을 통해 검출한 smad의 인산화를 나타낸다. β-액틴은 로딩 컨트롤로 사용되었다. (C)는 MC3T3-E1 세포를 Axin-2 리포터 유전자로 일시적으로 형질감염시켜 측정한 Axin-2 리포터 활성을 나타낸다. Axin-2 루시퍼라제 활성은 루미노미터를 사용하여 측정되었고 재료 및 방법에 설명된 대로 레닐라 루시퍼라제 활성으로 정규화되었다. (D)는 투베로신을 Axin-2 리포터 유전자 형질감염된 세포에 24시간 동안 처리한 후, 투베로신 처리 후 β-카테닌의 안정화를 웨스턴 블롯팅에 의해 측정한 것을 나타낸다. Luciferase 분석은 luminometer를 사용하여 수행되었다. 데이터는 세 번의 독립적인 실험의 평균 ±SD로 표시됩니다. *P < 0.05, ** P < 0.01 대조군과 비교. Cont: 대조군, Tu; 투베로신.

도 5는 조골세포에서 투베로신에 의해 자극된 WNT/β-카테닌 신호전달 경로를 통한 골형성 유도를 나타낸다. (A)는 투베로신(0.5 μg/ml), Wnt3a(50 ng/ml) 및/또는 FH535(20 μM)로 48시간 동안 처리한 후 측정된 MC3T3-E1 세포의 ALP 활성을 나타낸다. (B)는 MC3T3-E1 세포를 Axin-2 리포터 유전자로 일시적으로 형질감염시키고, 투베로신(0.5μg/ml), Wnt3a(50ng/ml) 및/또는 FH535(20μM)를 48시간 동안 Axin-2 리포터 유전자로 형질감염시킨 MC3T3-E1 세포에 처리한 후 측정된 Axin-2 리포터 활성을 나타낸다. (C)는 웨스턴 블로팅에 의해 β-카테닌의 안정화를 검출한 것이다. β-액틴은 로딩 컨트롤로 사용되었다. 데이터는 세 번의 독립적인 실험의 평균 ±SD로 표시됩니다. 대조군과 비교하여 *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001. 투베로신과 비교하여 ##P < 0.01, ###P < 0.001. Cont: 대조군, Tu; 투베로신.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0071] 본 발명에서 사용된 용어 "치료"는 유익하거나 바람직한 임상 결과를 얻기 위한 접근법으로서, 본 발명의 목적을 위해 유익하거나 바람직한 임상적 결과를 감지 가능하거나 가능하지 않거나를 불문하고, 또한 부분적이든 전체적이든 상관없이 증상의 완화, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화된(즉, 더 나빠지지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 속도감소, 질환 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감을 포함한다.

[0072] 본 발명에서 사용된 용어 "예방"은 상기 약학적 조성물을 이용하여 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 따라서, 본 발명은 치료법적 치료 및 예방적인 차원의 것들 모두를 가리킨다.

[0073] 본 발명의 약학적 조성물은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양, 즉 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양인 치료상 유효량으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 통상의 기술자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 통상의 기술자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성 분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여시간, 투여 경로 및 조성 물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.

[0074] 본 발명에서 용어, "식품 조성물"은 그를 섭취하는 대상체에 제공되는 영양소에 관계없이, 그 생물의 하나 이상의 기능에 유리하게 작용하여 보다 나은 건강 상태를 제공하는 식품을 의미한다. 결과적으로, 상기 식품 조성물은 질병 또는 질병-유발 인자의 예방, 개선 또는 치료를 위해 사용될 수 있다.

[0075] 본 발명의 식품 조성물은 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 식품학적으로 허용 가능하거나 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 식품 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0076] 본 발명에서, "건강기능식품"이란, 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 포함하며, 영양 공급 외에도 본 발명의 목적상 골다공증 질환의 예방, 생체 방어, 면역, 회복 등의 생체 조절 기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료 효과가 높은 식품을 의미한다.

[0077] 투베로신 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 변경될 수 있음은 물론이며, 상기 투베로신은 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01~95중량%로 포함되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 1~80중량%로 포함되는 것이다. 그 함량이 0.01중량% 미만일 경우에는 복용 효율성이 떨어질 수 있으며, 95중량%를 초과할 경우에는 제형화의 어려움이 있을 수 있다.

[0078] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명의 목이버섯 추출물을 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, 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0079] 본 발명의 투베로신 조성물이 건강기능식품으로서 사용되는 경우, 투베로신의 골형성 촉진 또는 골다공증 개선 또는 예방 효과에 유해한 영향을 미치지 않는 추가 성분을 추가로 포함할 수 있다.

[0081] 이하 본원을 실시예 및 실험예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예 및 시험예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본원의 범위가 이들 실시예 및 시험예에 한정되는 것은 아니다.

[0083] **재료 및 방법**

[0084] **1. 세포 배양**

[0085] MC3T3-E1 세포주(Mice osteoblast cell line, CRL-2593, ATCC, USA)와 RAW 264.7 세포(Murine macrophage cell line, TIB-71, ATCC)를 각각 100 U/ml 스트렙토마이신(Invitrogen, USA), 10% 태아 소 혈청(FBS; Gibco, USA) 및 2mM L-글루타민이 보충된 α-minimum essential medium(α-MEM; Invitrogen) 및 DMEM에서 배양하였다. 모든 세포는 5% CO_2 가습 분위기에서 37°C로 유지되었다. 본 실험에서는 파골세포 전구체로서 RAW 264.7 세포를 사용하였다.

[0086] **2. MTT 분석**

[0087] 생존력을 평가하기 위해 3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸륨 브로마이드(MTT; Sigma, USA)를 사용하여 MTT 분석을 수행하였다. 성장하는 세포를 다양한 용량의 투베로신(Chemfaces, CFN95107, 중국)(대조군, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 및 8 μg/ml)을 37℃에서 2시간 동안 배양했다. 상등액을 제거한 후 불용성 formazan 결정을 DMSO(dimethyl sulfoxide) 200 μl에 녹인 후 파장 570 nm에서 광학밀도를 측정하였다.

[0088] **3. 젖산 탈수소효소 활성(LDH) 분석**

[0089] 세포독성 검출키트(Roche Diagnostics, USA)를 사용하여 세포독성 검출키트(Roche Diagnostics, USA)의 프로토콜에 따라 LDH 활성을 측정하였다. MC3T3-E1 세포를 다양한 용량(대조군, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 및 8 μg/ml)의 투베로신으로 $2x10^4$ 세포/웰에서 처리하였다. 10 μl의 세포 배양 배지를 수집하고 새로운 96-웰 플레이트로 옮겼다. 40 μl의 PBS를 각 실험 샘플로부터의 10 μl의 세포 배양 배지와 함께 첨가하였다. 이어서 LDH 시약 50 μl를 각 웰에 첨가했다. 정지 용액(50 μl)을 첨가하여 효소 반응을 정지시키기 전에 플레이트를 어두운 조건의 실온에서 45분 동안 인큐베이션하였다. 490nm 파장을 사용하여 흡광도를 측정했다.

[0090] **4. Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 염색**

[0091] 파골 세포 유사 세포의 형성을 확인하기 위해 24-웰 배양 플레이트의 RAW 264.7 세포(1×10^3 세포/웰)를 RANKL(50 ng/ml)로 3일 동안 처리하였다. 그런 다음 세포를 PBS로 두 번 세척하고 다양한 용량(0.25, 0.5 및 1 μg/ml)의 투베로신으로 4일 동안 처리했다. 제조업체의 프로토콜에 따라 TRACP 및 ALP 이중 염색 키트를 사용하여 세포를 고정하고 염색했다. 3개 이상의 핵을 가진 TRAP 양성 다핵 세포를 파골세포로 간주하여 광학현미경으로 계수하였다.

[0092] **4. 알칼리성 포스파타제(ALP) 활성**

[0093] ALP 활성은 조골 세포 분화를 나타내는 것으로 간주됩니다. ALP 활성을 분석하기 위해 MC3T3-E1 세포를 5×10^4 세포/웰의 밀도로 48-웰 플레이트에 파종하고 배양하였다. 투베로신을 다양한 용량(대조군, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 및 8μg/ml)으로 처리했다. 처리 48시간 후, 차가운 PBS를 사용하여 세포를 2회 세척하고, 60 μl의 차가운 RIPA 완충액을 각 웰에 첨가하였다. 전체 세포 용해물을 4℃에서 20분 동안 12,000 rpm으로 원심분리했다. 그 후, 20 μl의 상등액을 100 μl의 CSPD 기질에 혼합하고 실온에서 30분 동안 어두운 조건에 두었다. 발광 강도는 luminometer(Glomax, Promega, USA)로 평가하였다. 총 세포 용해물의 단백질 농도는 단백질 분석 키트를 사용하여 정규화되었다.

[0094] **5. RNA 분리 및 실시간 RT-PCR**

[0095] MC3T3-E1 세포는 6-웰 플레이트에서 5×10^5 세포/웰의 밀도로 배양하였다. 24시간 동안 배양한 후, RNA 수집을

위해 Trizol 시약(Invitrogen)을 세포에 처리하였다. 총 RNA 샘플의 순도 및 품질은 흡광도 비율(260/280)에서 큐벳 방법으로 결정되었다. 2㎍의 RNA를 SuperScript II Reverse Transcriptase(Invitrogen)와 혼합하여 cDNA의 첫 번째 가닥을 합성했다. 1 ㎕의 cDNA, 표적 프라이머 및 EXPRESS SYBR green qPCR Supermix(Bioneer, Korea)가 각 PCR 블렌드에 포함되어 있습니다. Real-Time PCR 분석은 Rotor-Gene 3000 real-time PCR(Corbett, Germany)을 이용하여 95℃에서 10분 수행하고, 95℃에서 20초, 60℃에서 20초 50회 사이클로 증폭하고, 72℃에서 25초 동안 연장하였따. GAPDH(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)를 사용하여 각 샘플을 정규화했다. 정량화는 ΔΔCT 방법으로 측정하였다. 프라이머 서열은 표 1에 기록되어 있다.

표 1

Gene	Primer sequence (5′-3′)
Runx2	F: AAGTGCGGTGCAAACTTTCT R: TCTCGGTGGCTGGTAGTGA
Osterix (OSX)	F: GGAAAGGAGGCACAAAGAAGCCAT R: AGTCCATTGGTGCTTGAGAAGGGA
Collagen1α (Col1α)	F: TTCTCCTGGCAAAGACGGAC R: AGGAAGCTGAAGTCATAACCGCCA
Osteocalcin (OCN)	F: TGCTTGTGACGAGCTATCAG R: GAGGACAGGGAGGATCAAGT
GAPDH	F: TCGTGGATCTGACGTGCCGCCTG R: CACCACCCTGTTGCTGTAGCCGTAT

[0096]

[0097] **6. 단백질 분리 및 웨스턴 블로팅**

[0098] MC3T3-E1 세포를 12-웰 플레이트에 $3x10^5$개 세포/웰의 밀도로 시딩하고 대조군 및 0.5 ㎍/ml의 투베로신으로 24시간 동안 처리하였다. 세포 용해물을 겔에 넣고 막으로 옮겼다. 멤브레인은 5% 탈지유에서 차단하여 실온에서 1시간 동안 유지되었다. 차단된 멤브레인을 Runt 관련 전사 인자 2(Runx2), Osterix(OSX), Collagen1α(Col1α), Osteocalcin(OCN), β-카테닌 및 β-actin에 대한 항체와 함께 실온에서 1시간 동안 배양한 다음 1X TBST(Tris-buffered saline with 0.1% Tween 20)로 10분마다 3번 세척했다. 그 후, 멤브레인을 상온에서 45분 동안 홀스래디쉬 퍼옥시다아제가 결합된 2차 항체와 반응시켰다. Chemiluminescence 시약을 사용하여 표적 단백질 밴드를 시각화하고 β-액틴을 로딩 컨트롤로 사용했다. 밴드 강도는 Image J 소프트웨어(NIH, USA)로 정량화되었다.

[0099] **7. Alizarin red S 염색 및 Sirius red S 염색**

[0100] Alizarin Red S 및 Sirius red S 염색은 각각 투베로신이 콜라겐 합성 및 무기화 매트릭스 침착에 미치는 영향을 분석했다. MC3T3-E1 세포를 48-웰 플레이트에 배양하고 투베로신을 7일 동안 처리하고 2일마다 배지를 교체하였다. Alizarin Red S 염색을 위해 세포를 4% 파라포름알데히드로 1시간 동안 고정하고 실온에서 30분 동안 40 mM Alizarin Red S 용액으로 염색하였다. 염색된 세포를 현미경(Carl Zeiss, Germany)으로 관찰하였다. 광물화를 정량화하기 위해 염색된 세포를 10% cethylpyridinium chloride로 1시간 동안 녹인 후 분광광도계로 570 nm에서 흡광도를 측정하기 위해 96-웰 플레이트로 옮겼다. 콜라겐 염색의 경우, 세포를 Bouin's 용액으로 1시간 동안 고정하고 포화 피크르산 수용액에 용해된 1 mg/ml Sirius red 염료로 1시간 동안 염색하였다. 정량화를 위해 염색된 세포를 0.1N 수산화나트륨에 30분 동안 용해시켰다. 용해된 용액의 광학 밀도는 블랭크로서 0.1N 수산화나트륨에 대해 550nm에서 분광 광도계를 사용하여 측정되었다.

[0101] **8. 루시페라아제 리포터 분석**

[0102] MC3T3-E1 세포는 Genefectine 시약(Genetrone Biotech, Korea)을 사용하여 제조업체의 지침에 따라 48-웰 플레이트에 리포터 구조물을 형질감염시킨 후 200 ㎍/ml의 투베로신으로 24시간 동안 처리하였다. Axin-2 및 BRE의 1㎍ 구조와 동일한 양의 Renilla luciferase thymidine kinase 구조를 사용하여 루시퍼라제 활성을 추정했다. 루시페라제 활성은 발광계로 평가하였다. 각 샘플에서 확인된 리포터 활동은 Renilla luciferase 활동으로 정규

화되었다.

[0103] **9. 통계분석**

[0104] 모든 데이터는 Prism 5.0 소프트웨어(Graphpad, USA)를 사용하여 통계적으로 분석되었으며 P-값은 양측 스튜던트 t-테스트(*P<0.05, **P<0.01, 및 ***P<0.001, ## P<0.01 및 ###P<0.001).

[0106] **결과**

[0107] **1. 조골세포에서 투베로신의 세포생존율 및 세포독성 평가**

[0108] 투베로신에 대한 MC3T3-E1 세포의 세포 생존력과 세포 독성을 확인하기 위해 세포를 다양한 용량의 투베로신으로 처리했다. 24시간 후, MTT 및 LDH 분석을 수행하였다. 투베로신으로 처리한 후 MC3T3-E1 세포의 세포 생존력과 세포 독성의 변화는 관찰되지 않았다(도 1의 A 및 B).

[0109] **2. 파골세포 형성에 대한 투베로신의 효과**

[0110] RANKL은 파골 세포 전구체의 분화를 유도하는 주요 요인으로 간주된다. 조골세포는 또한 RANKL을 분비하여 파골세포 형성을 유도한다. 푸에라리아 투베로즈 추출물은 난소 절제된 쥐 모델에서 골다공증을 완화할 수 있습니다. 따라서 투베로신이 파골세포에 미치는 영향을 확인하기 위해 RAW 264.7 세포에 RANKL(50 ng/ml)을 3일간 처리한 후 투베로신(0.5 μg/ml)을 처리하였다. 4일 후, 투베로신을 처리한 세포는 RANKL만 처리한 세포에 비해 유의미한 효과를 나타내지 않았다. 파골세포 형성에 대한 투베로신의 효과를 밝히기 위해 재료 및 방법에 기술된 바와 같이 TRAP 염색에 의해 TRAP-양성 세포를 검출하였다.

[0111] **3. 조골세포에 대한 투베로신의 골형성 유도 효과**

[0112] 조골세포에서 투베로신의 골형성 능력을 알아보기 위해 먼저 MC3T3-E1 세포에 투베로신 처리 48시간 후 ALP 활성을 검출하였다. 조골세포 분화의 표지자 중 하나는 ALP이다]. 투베로신의 효과는 대조군에 비해 0.25, 0.5, 1, 2, 4 μg/ml 투여량에서 증가하였다. 최대 활성은 0.5 μg/ml의 용량에서 관찰되었다(도 3의 A). 다음으로, MC3T3-E1 세포에 투베로신을 24시간 동안 처리한 후 Runx2, OSX, Col1α와 같은 초기 골형성 마커 및 말단 분화 마커인 OCN의 mRNA 및 단백질 발현 수준을 실시간 RT-PCR 및 웨스턴 블롯팅을 통해 측정하였다. 투베로신은 골형성 마커인 Runx2(~3배), OSX(~3배), Col1α(~2배) 및 OCN(~4배)의 mRNA 발현 수준을 유도했다(도 3의 B). Runx2 및 Col1α의 단백질 발현 수준도 증가했다(도 3의 C). 또한, 투베로신으로 7일 동안 처리된 MC3T3-E1 세포는 0.5 μg/ml 용량에서 알리자린 레드 및 시리우스 레드 S 염색에 의해 묘사된 바와 같이 광물화 및 콜라겐 침착을 유도했다(도 3의 D-E). 종합하면, 이들 결과는 투베로신이 조골세포에서 골형성 마커의 발현을 증가시킴으로써 골형성을 유도할 수 있음을 보여주었다.

[0113] **4. 투베로신은 조골세포에서 골형성을 유도하는 BMP 신호전달을 수반하지 않는다.**

[0114] WNT/β-카테닌 신호 전달 경로는 조골세포 분화와 골 형성 조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 골형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 또 다른 신호 경로는 BMP 신호 경로이다. 따라서 WNT와 BMP 신호전달 경로가 투베로신에 의한 골형성 유도 효과에 관여하는지 여부를 확인하는 것이 필요하다. MC3T3-E1 세포를 FuGENE 6를 사용하여 12시간 동안 BRE 루시퍼라제 리포터 구조로 형질감염시킨 다음, 투베로신(대조군 및 0.5μg/ml)으로 처리했다. 투베로신 처리 세포의 BRE 루시퍼라제 활성은 대조군과 비교하여 유의미한 차이가 없었다(도 4의 A). MC3T3-E1 세포를 FuGENE 6를 사용하여 12시간 동안 Axin-2 리포터 유전자로 형질감염시키고 24시간 동안 투베로신으로 처리하였다. 투베로신 처리 후 웨스턴 블로팅에 의한 단백질 정량화는 시간 의존적으로 유의미한 효과를 나타내지 않았다(도 4의 B). Axin-2 루시퍼라제 활성은 투베로신(0.5 μg/ml)에 의해 크게 증가했다(도 4의 C). 또한, MC3T3-E1 세포에 투베로신 처리 24시간 후 웨스턴 블롯팅에 의한 단백질 정량화는 β-카테닌의 증가된 안정화를 보여주었다(도 4의 D). 즉, BMP 시그널링이 중단되면 WNT 시그널링도 억제될 수 있다. 그러나 이 결과는 조골세포에 투베로신을 처리한 경우 BMP 신호전달이 활성화되지 않은 반면 WNT/β-카테닌 신호전달 경로는 투베로신에 의해 활성화되어 BMP 신호전달 이외의 다른 경로가 조골세포의 골 형성 능력 자극에 관여함을 시사한다.

[0115] **5. 투베로신은 조골세포에서 골형성을 유도하는 WNT/β-카테닌 신호전달 경로에 관여한다.**

[0116] 이전 결과에 따르면 투베로신은 WNT/β-카테닌 신호 전달 경로를 통해 골아세포의 골 형성 효과를 유도할 수 있다. WNT 신호의 활성화는 내인성 BMP의 기능에 따라 달라질 수 있다. 투베로신(0.5μg/ml), Wnt3a(50ng/ml) 및/또는 FH535(20μM)를 MC3T3-E1 세포에 처리한지 48시간 후에 ALP 활성이 검출되었다. 결과는 투베로신이 FH535

의 존재 하에서 ALP 활성을 유도할 수 없는 반면, 투베로신과 함께 Wnt3a가 처리되었을 때 ALP 활성을 더 증가시켰다는 것을 보여주었다(도 5의 A). Axin-2 루시페라제 활성은 Wnt3a와 함께 투베로신에 의해 크게 증가했다(도 5의 B). 또한, MC3T3-E1 세포에서 Wnt3a와 함께 투베로신을 24시간 처리한 후 웨스턴 블로팅으로 단백질을 정량화한 결과 β-카테닌의 안정화가 증가한 것으로 나타났다(도 5의 C). FH535(WNT 신호 전달 경로의 억제제) 처리는 ALP 활성에 대한 투베로신 유도 효과를 완전히 감소시켰다(도 5의 A-C). 종합하면, 투베로신은 WNT/β-카테닌 신호 전달 경로를 자극하여 골 형성을 유도할 수 있다.

[0118] **결론**

[0119] 본 연구는 골 세포의 골 형성 능력에 대한 튜베로신의 잠재적인 역할을 평가했다.

[0120] RANKL 유도 파골세포 형성에 대한 보호 효과에 대한 투베로신 치료의 초기 분석에서 0.5~1μg/ml 용량이 파골세포 형성을 효과적으로 감소시키는 것으로 나타났다(도 2). 이는 투베로신을 함유한 추출물이 난소 절제된 쥐 모델의 혈청에서 TRAP 수준을 감소시킨다는 발견을 확증한다.

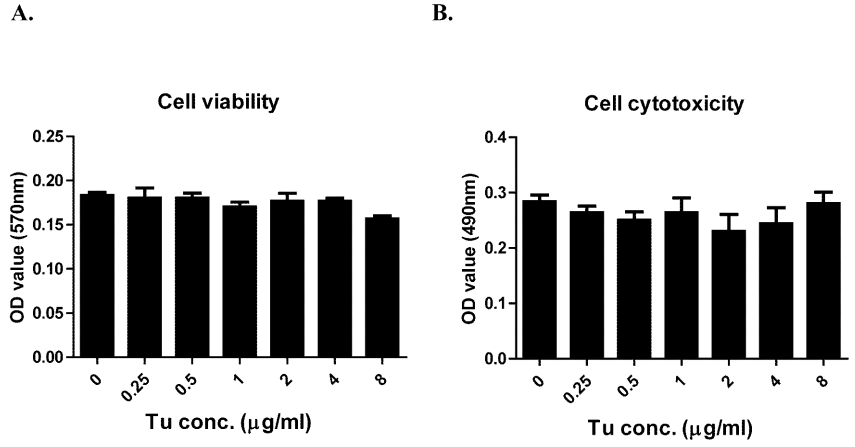
[0121] 다양한 용량의 투베로신 처리는 세포 생존력이나 독성에 영향을 미치지 않으면서 조골세포의 ALP 활성을 용량의존적으로 증가시켰다(도 3의 A, EH 1). 투베로신은 Runx2, OSX, Col1α 및 OCN의 mRNA 수준과 Runx2 및 Col1α의 단백질 수준과 같은 다양한 다른 골형성 마커에 유도 효과를 발휘했다(도 3의 B-C). 또한, 투베로신에 의한 조골세포의 콜라겐 합성 및 광물화 능력의 유도는 조골세포의 골 유도 특성을 향상시키는 데 있어서 투베로신의 자극 효과를 검증한다(도 3의 D-E).

[0122] 조골세포 분화 과정은 성숙한 조골세포를 형성하기 위해 다양한 단계를 거치며, WNT 및 BMP 신호 전달 경로에 의해 결정적으로 제어된다. 또한, 최근 연구에서는 flavonoid가 WNT 및 BMP 신호 전달 경로를 자극하여 골아세포에서 골 형성 능력을 발휘할 수 있음을 강조했다. 따라서 투베로신이 WNT 또는 BMP 신호 전달 경로를 조절할 가능성이 있는지 여부를 추가로 조사했다. 투베로신의 효과는 BRE 리포터 활성 및 smad 분자의 인산화의 경우에 분명하지 않았으며, 이는 BMP 신호 전달 경로에 대한 자극 효과가 없음을 의미한다(도 4의 A-B). 그러나 투베로신 처리는 MC3T3-E1 세포에서 Axin-2 리포터 활성과 β-카테닌의 안정성을 증가시켜 조골세포에서 WNT 신호 전달 경로의 활성화를 입증했다(도 4의 C-D). 얻은 결과는 투베로신이 BMP 신호 경로가 아닌 WNT 신호 경로를 통해 골아세포에서 골형성 특성을 매개한다는 것을 강조한다(도 4의 A-D). 또한, FH535(WNT 신호 전달 경로의 억제제)의 처리는 조골세포의 ALP 활성에 대한 투베로신 유도 효과를 완전히 없앴습니다(도 5의 A-C). 결과는 MC3T3-E1 세포에서 골 형성을 유도하기 위해 투베로신에 의한 WNT 신호 전달 경로의 역할을 검증하고 확인한다.

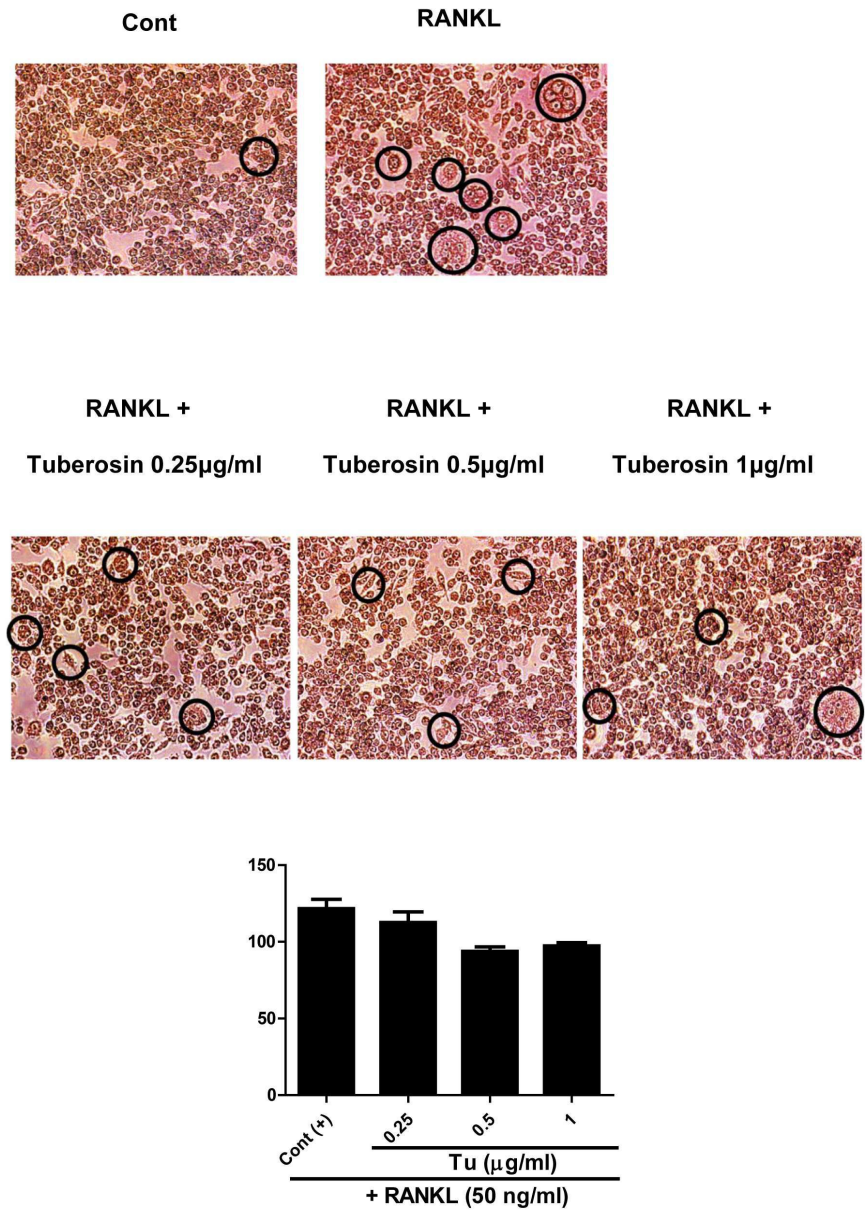
[0123] 결론적으로, 이 연구는 투베로신이 조골세포에서 골 형성 자극 특성을 발휘하기 위해 BMP 신호 전달이 아닌 WNT 신호 전달 경로를 포함함을 나타낸다. 또한, 투베로신은 파골 세포 형성에 대한 억제 효과를 입증했다. 투베로신은 조골세포에 대한 골 형성 촉진 능력과 파골 세포 형성 억제 효과를 가지고 있어 퇴행성 골격 질환과 관련된 골 소실 회복을 위한 약리학적 제제로 간주될 수 있다.

도면

도면1

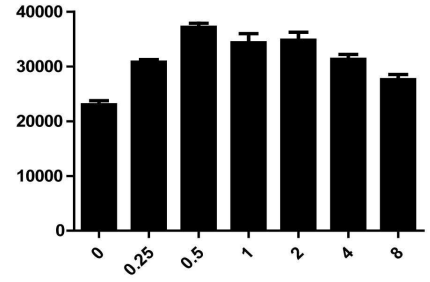


도면2

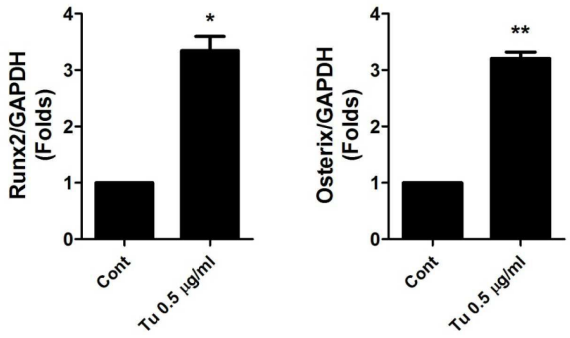

Cont
RANKL
RANKL +
Tuberosin 0.25μg/ml
RANKL +
Tuberosin 0.5μg/ml
RANKL +
Tuberosin 1μg/ml
150
100
50
0
Cont (+)
0.25
0.5
1
Tu (μg/ml)
+ RANKL (50 ng/ml)

도면3a

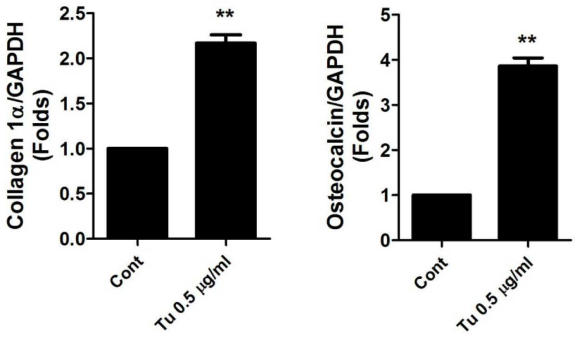
A


40000
30000
20000
10000
0
0
0.25
0.5
1
2
4
8

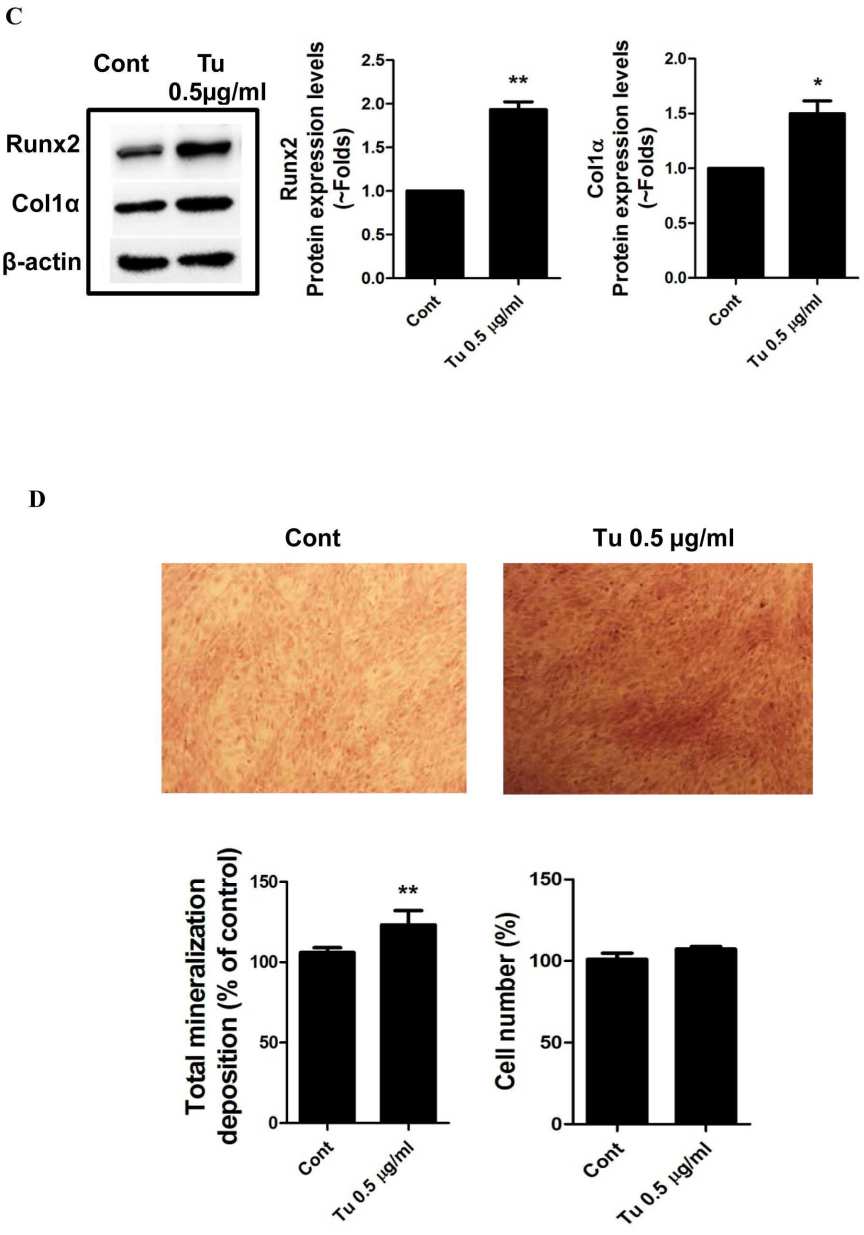
B


Runx2/GAPDH (Folds)
*
Cont
Tu 0.5 μg/ml
Osterix/GAPDH (Folds)
**
Cont
Tu 0.5 μg/ml

C

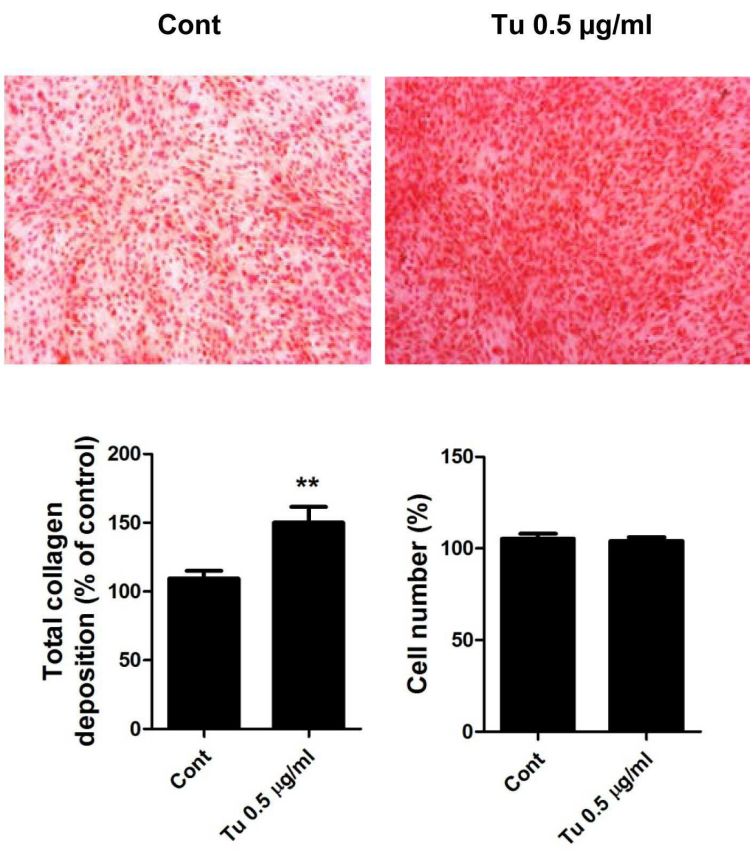

Collagen 1α/GAPDH (Folds)
**
Cont
Tu 0.5 μg/ml
Osteocalcin/GAPDH (Folds)
**
Cont
Tu 0.5 μg/ml

도면3b

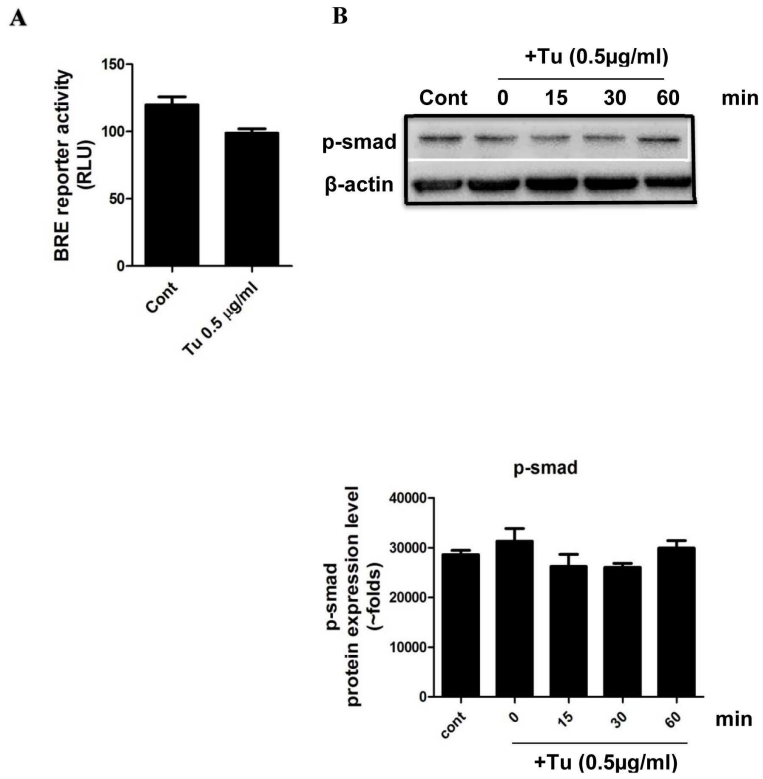

C
Cont
Tu 0.5μg/ml
Runx2
Col1α
β-actin
Runx2 Protein expression levels (~Folds)
Col1α Protein expression levels (~Folds)
Cont
Tu 0.5 μg/ml
D
Cont
Tu 0.5 μg/ml
Total mineralization deposition (% of control)
Cell number (%)

도면3c

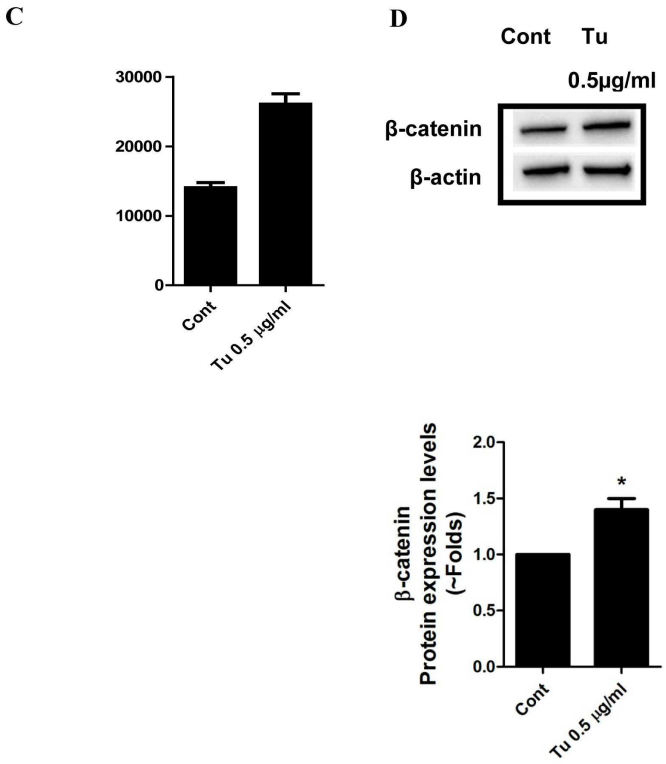
E


Cont
Tu 0.5 μg/ml
Total collagen deposition (% of control)
200
150
100
50
0
**
Cont
Tu 0.5 μg/ml
Cell number (%)
150
100
50
0
Cont
Tu 0.5 μg/ml

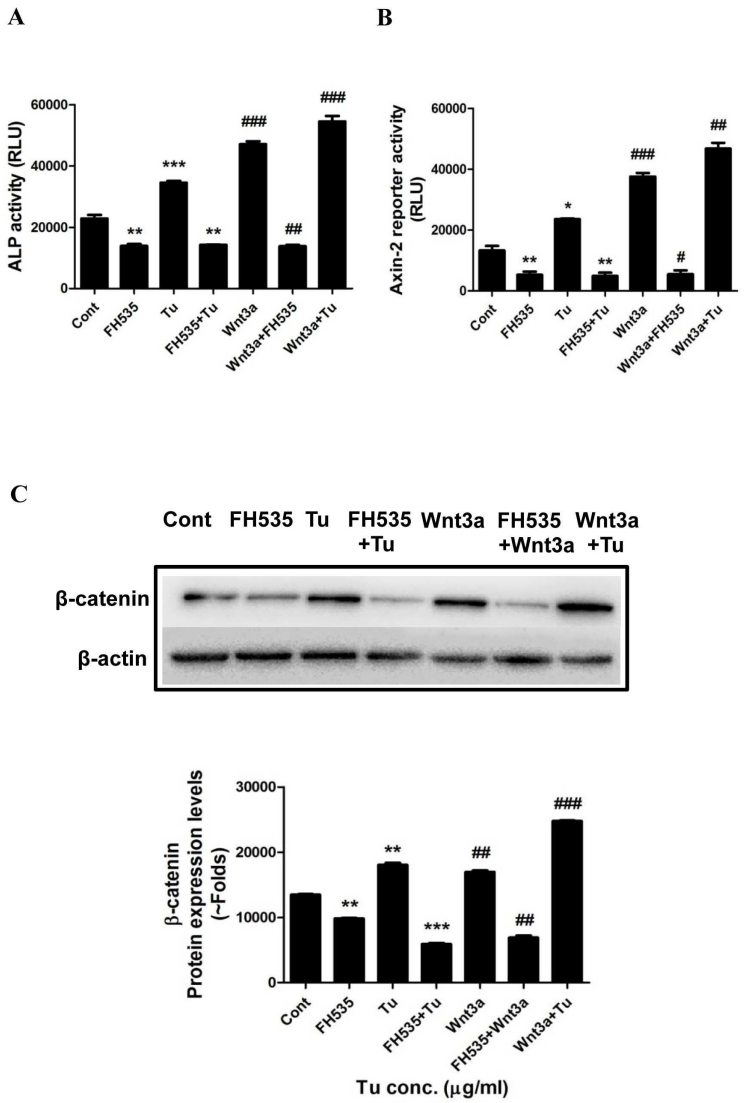
도면4a


A
BRE reporter activity (RLU)
150
100
50
0
Cont
Tu 0.5 μg/ml
B
+Tu (0.5μg/ml)
Cont 0 15 30 60 min
p-smad
β-actin
p-smad
p-smad protein expression level (~folds)
40000
30000
20000
10000
0
cont 0 15 30 60 min
+Tu (0.5μg/ml)

도면4b


C
30000
20000
10000
0
Cont
Tu 0.5 μg/ml
D
Cont Tu
0.5μg/ml
β-catenin
β-actin
β-catenin Protein expression levels (~Folds)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Cont
Tu 0.5 μg/ml

도면5


A
B
ALP activity (RLU)
Axin-2 reporter activity (RLU)
Cont
FH535
Tu
FH535+Tu
Wnt3a
Wnt3a+FH535
Wnt3a+Tu
C
Cont FH535 Tu FH535 +Tu Wnt3a FH535 +Wnt3a Wnt3a +Tu
β-catenin
β-actin
β-catenin Protein expression levels (~Folds)
Tu conc. (μg/ml)