

**양극해 해양생물 유래물질 면역조절  
활성 연구**

Immunomodulatory activities of biological extracts from

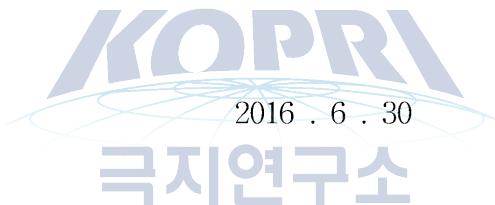


**성균관대학교 산학협력단**

## 제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “양극해 미래자원 탐사 및 활용기술 개발”과제의 위탁연구“양극해 해양생물 유래물질 면역조절 활성 연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.



총괄연구책임자 : 임 정 한

위탁연구기관명 : 성균관대학교 산학협력단

위탁연구책임자 : 표 석 능

위탁참여연구원 : 정 윤 주

“ : 김 진 육

## 보고서 초록

위탁연구과제명	양극해 해양생물 유래물질 면역조절 활성 연구				
위탁연구책임자	표석 능	해당단계 참여연구원수	2명	해당단계 연구비	45,000,000원
연구기관명 및 소속부서명	성균관대학교 약학대학		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 : 상대국연구기관명 :				
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)				보고서 면수	39면

이번 연구에서는 양극해 해양생물 유래물질인 lobaric acid를 이용하여 염증반응에 대한 조절효과를 확인하였다. 또한 극지생물에서 추출한 다양한 물질을 이용하여 면역조절에 있어서 어떤 효과가 있는지 확인하였다. 우선 lobaric는 대식세포주인 RAW 264.7세포에서 NO 그리고 여러 pro-inflammatory cytokine들을 감소시키는 것을 확인하였으며, 면역조절 작용에 관여하는 inflammatory mediator들을 감소시키는 면역조절 효과를 통하여 항염증 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 나아가 염증반응 과정에서 NLRP3 inflammasome과의 연관성을 확인하여 lobaric acid의 면역작용에서 분자면역학적 작용기전을 확인하였다. 이번연구에서 이용한 극지생물에서 추출한 다양한 물질들의 면역효과 측정에서는 일부 물질들에서 nitrite oxide가 감소하는 것을 확인하였고, 면역조절 효과가 있음을 확인하였다.

색인어 (각 5개 이상)	한글	면역반응, 항염증효과, 대식세포, 산화질소, 극지추출물
	영어	Immune response, Anti-inflammatory effects, Macrophagy, Nitrite Oxide, polar ocean extracts

## 요약문

### I. 제목

#### 양극해 해양생물 유래물질 면역조절 활성 연구

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

면역계는 외부병원체와 암으로부터 인지하고 방어하는 기능을 통해서 생명을 보호하는 정교하게 조절되는 방어체계이다. 이러한 면역계의 특징은 우리 몸속에 침투하여 자생할 수 있는 각종 암에 대한 방어를 담당하고, 죽거나 더 이상 불필요한 세포를 제거하는 역할도 담당하고 있다.

면역조절물질에 관한 연구의 궁극적인 응용 목표중의 하나는 기존의 약물로는 치료가 어려운 질병, 특히 바이러스 감염이나 암에 대한 치료제 또는 치료보조제를 개발하는 것이다. 면역조절물질은 우리가 갖고 있는 생체 방어능을 조절하였다는 점에서 다른 치료법과 근본적으로 구별된다. 즉, 암을 치료할 목적으로 현재 임상적으로 사용되고 있는 항암성 화학요법제의 대부분은 골수세포와 같이 활발하게 분열하는 세포에 대한 세포독성과 같은 근원적 부작용을 갖고 있는 반면, 면역조절물질은 자신이 갖고 있는 생체 방어능의 조절을 통하여 질병을 치료하는 것으로 골수세포에 대한 독성과 같은 근원적인 부작용이 없는 치료제로 개발될 수 있는 가능성을 갖고 있다. 뿐만 아니라, 대부분의 암환자는 면역기능이 저하되어 있는 사실은 암을 효과적으로 치료하기 위해서는 저하된 면역기능을 회복시켜 줄 수 있는 면역조절물질을 연구 개발하여 치료에 응용하는 것이 효과적일 것임을 보여 준다.

면역조절물질에 대한 연구의 또 다른 중요한 목표는 필요 이상으로 과다하게 일어나 오히려 우리에게 해를 끼치는 면역반응을 억제시키는 것이다. 면역반응은 생체방어에 필수적이면서도, 어떤 경우에는 오히려 우리 몸에 손상을 준다. 예를 들면, 염증반응, 과민반응, 알러지반응, 자가면역반응 등이다. 면역반응을 조절하는 물질은 그 효능에 따라서 면역증강제, 면역억제제, 면역회복제 등으로 크게 나누며, 이들을 총칭하여 면역조절제라 부른다.

현재 세계 의약품 산업은 꾸준히 성장하고 있으며 미국은 지속적으로 높은 성장세를 나타내었으며 유럽과 아시아 역시 높은 성장률을 기록하였다. 이 중 면역조절제의 기술개발동향을 살펴보면, 특히 새로운 사이토카인의 발견과 기능규명, 면역억제제, 백신의 개발이 두드러진다. 세계적인 제약회사들은 면역억제효과를 가지는 치료용 항체의 실용화에 박차를 가하고 있으며, 현재 알려져 있는 약들의 적용확대를 위한 연구들이 많이 이루어지고 있는데, 예방백신, 치료백신에 대하여는 난치성 질환 중에서도 AIDS와 암이 치료용 백신의 주요연구대상 질환이며, 최근에는 알러지, 천식, 당뇨병, 알츠하이머, 비만 등 삶의 질과 관련된 다양한 질환에의 적용도 기대되며 분자생물학과 인체면역학의 빠른 발전에 따라 좀더 효과적이고 안전한 백신개발이 가능해지고 있다.

남극해는 대기와 해양 사이의 열 교환과 해빙의 형성에 의해 표층수가 가라앉아 저층수가 형성되는 지역이고, 이는 대서양, 태평양, 인도양으로 퍼져나가기 때문에 전

세계 해양의 해류 순환에 중요한 역할을 하였다. 또한 최근 급속하게 일어나는 북극 해 해빙 현상으로 북극해의 산업적 이용에 대한 관심이 증가하고 있다. 남극해 및 북극해를 잘 이용하기 위해서는 과학적 연구가 선행되어야 하는데 기존의 육상동식물 기원물질에 대한 연구에 비하면 선진국에서도 매우 제한적으로 연구가 이루어지고 있어 극지생물의 무한한 자원의 중요성을 각국 연구자들이 인식하여 앞으로 활발한 연구가 이루어지게 될 것이라 생각된다. 이렇게 극지생물에서 기원한 물질을 이용하여 면역조절물질, 항비만, 항동맥경화 물질로써의 개발과 그에 대한 특성 및 작용기전을 연구하는 것은 미래의 신약개발에 큰 영향을 미칠 것이라 판단된다.

### III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 대식세포(RAW264.7)에서 양극해 해양생물 유래 물질인 Lobaric acid의 염증관련 물질 억제 확인
2. 대식세포(RAW264.7)에서 양극해 해양생물 유래 물질인 Lobaric acid에 의한 inflammatory mediators 생성억제 및 작용기전 확인
3. 대식세포(RAW264.7)에서 극지생물에서 추출한 다양한 물질들의 면역조절 효과 측정 및 확인

### IV. 연구개발결과

본 연구에서는 실험실에서 확립하고 진행하고 있는 *in vitro* system을 이용하여 양극해 생물 유래 물질인 Lobaric acid가 면역세포인 대식세포의 염증억제에 미치는 영향을 확인하였다.

- 대식세포주인 RAW264.7세포에서 Lobaric acid가 inflammatory mediators의 발현을 억제하는 것을 확인하여 염증억제제로서의 개발 가능성을 제시하였다. 또한 이를 바탕으로 면역작용에서 Lobaric acid가 염증조절에 있어서 분자면역학적 작용기전을 확인하였다.
- 대식세포주인 raw 264.7세포에서 극지생물에서 추출한 다양한 물질들의 면역조절 작용을 확인하였으며, 일부 물질에서 면역조절 효과가 나타남을 확인하였다.

### V. 연구개발결과의 활용계획

양극해 해양물질 유래 성분에서 발굴되는 유효 물질에 대한 면역반응 조절효과와 그 작용기전에 관한 본 연구결과는 세포내의 작용 기전을 구체적으로 제시하고 있다. 이러한 연구 결과를 기초 자료로 활용하여 *in vivo*의 동물임상 연구가 진행된다면 인체에 적용할 수 있는 유용한 성분으로 빠르게 개발될 수 있을 것이다. 특히 본 연구에서는 지금까지 효능 연구에 그쳤던 생리활성소재를 찾는 천연자원의 연구들과는 달리 세포 및 분자생물학적 수준에서의 작용 기전이 규명되고 극지 해양생물 유래 성분의 효능이 과학적이고 정확하게 검증됨으로써 이러한 작용 기전을 이용하여 만성 질환 치료 및 예방에 구체적으로 적용할 가능성이 매우 커 극지 산물을 이용한

신약개발에 중요한 정보를 제공할 수 있으리라 사료된다. 또한, 1차적 면역방어기전에서 대식세포의 역할은 매우 중요하고 다양함으로 대식세포의 활성을 조절할 수 있는 해양 생물 유래 성분은 생물학적 반응 조절 기능성을 부여하는 면역조절제등의 개발에 활용될 수 있다.



## S U M M A R Y ( 영 문 요 약 문 )

Our results evaluated that extracts from bi-polar biological resources including lobaric acid had significant effect on inhibition of inflammation mediators in mouse macrophage cells, RAW 264.7 cells. In addition, extracts from bi-polar biological resources were investigated for their in vitro immunomodulatory properties. Our data indicate that Lobaric acid alternated the production of nitric oxide (NO) and PGE2 and release of pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and IL-18 in Raw 264.7 macrophage cells. We also found that lobaric acid significantly attenuated LPS - induced expression of MAPK and NF- $\kappa$ B in macrophage cells. in addition, NLRP3 inflammasomes were suppressed by lobaric acid in LPS-induced RAW 264.7 cells.

Taken together, the present data indicate that components and extracts from polar biological resources have anti-inflammatory effect, anti-cancer effect, anti-obesity and anti-atherosclerosis These new finding might provide a new therapeutic strategy for treating pathological diseases.



## C O N T E N T S ( 영 문 목 차 )

1. Introduction .....	10
2. Trends in research .....	12
3. Results .....	14
4. Achievement of study and contribution of results to science .....	31
5. Perspective on the use of results .....	33
6. Scientific technology information .....	34
7. References .....	36



# 목 차

제 1 장 서론 ..... 10

제 2 장 국내외 기술개발 현황 ..... 12

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과 ..... 14

제 4장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 ..... 31

제 5 장 연구개발결과의 활용계획 ..... 33

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ..... 34

제 7 장 참고문현 ..... 36

# 제 1 장 서 론

## 제 1 절 연구개발의 목적 및 필요성

WTO 체제의 출범으로 지적 및 산업소유권 강화로 기술의 배타적 권리를 점차 엄격하게 보호하는 방향으로 전개됨으로써 천연물로부터 부가가치가 놓은 새로운 물질을 탐색하고 그 물질의 응용에 대하여 독자적인 기술 영역을 구축할 필요가 있다. 또한 기초식품과 의약품의 자체 공급능력 및 수산업 종사 국민들의 생존권 보호를 위해서 식품 또는 의약품의 자원으로써의 고부가가치 해양자원의 생산이 가능하도록 과학적인 신물질 창출연구가 필요하다.

모든 질환은 질병을 공격하는 인자와 방어하는 인자의 불균형으로 인해 유발되며 최근 분자생물학적의 발달로 인해 인체 내의 특이적 면역반응과 복잡하게 연결 되어 있는 신호체계들이 밝혀져 있다. 이에 따라 치료제 개발에 있어서도 신체 방어의 중요한 역할을 수행하는 면역계에 초점이 맞추어지고 있다. 면역계는 매우 다양한 기능의 세포들로 구성되어 있어 다양한 시험법들이 활용되고 있으며 특정기능의 면역세포에 대한 작용 기전을 세포 및 분자 수준에서 판단하기 위해 *in vitro* 시험법들이 신물질 탐색에 매우 다양하게 응용되고 있다. 면역조절제의 탐색은 기존의 화학적 합성 또는 육상 동식물에서, 미생물 및 해양생명체로 그 범위가 확대되고 있다. 특히 해양생명체를 기원으로 하는 면역조절제의 탐색은 아직도 기존의 육상동식물 기원물질에 대한 연구에 비하면 선진국에서도 매우 제한적으로 연구가 이루어지고 있어 해양의 무한한 자원의 중요성을 각국 연구자들이 인식하여 앞으로 활발한 연구가 이루어지게 될 것으로 예측된다.

면역 증강제는 병원체에 대한 방어기능을 증가시키거나 면역기능의 상승을 통해 항암작용 및 항바이러스 작용을 증가시킨다. 또한 암세포의 성장과 변형을 감소시키거나 변형된 암세포에 대한 면역기능을 증가시킨다. 이와 반대로 장기이식 시 면역반응에 관여하는 세포들의 증식을 억제하여 면역억제 기능을 나타내는 면역억제제가 있다. 특히 면역억제제 개발의 경우 선진국에서 관심을 가지고 있는 분야로, 이전에는 불가능하게 여겨져 왔던 장기이식을 가능하게 하는 혁명적인 의료기술을 가지고 왔다. 이들 중 가장 널리 사용되고 있거나 혹은 임상 시험중인 약물로는 cyclosporin A, FK-506, rapamycin 등이 있으며 이들은 모두 진균류(fungi)에서 기원하고 있는 약물로 천연물에서 면역조절제를 도출하는 것이 얼마나 중요한 것인가를 보여주고 있다.

면역조절제의 시장성도 매우 큰 것으로 판단되어 면역억제제인 cyclosporin A만 보더라도 1994년도 현재 전 세계적으로 약 10억불 규모의 시장이 형성되어, 그 제한적인 사용범위를 생각하면 면역억제제 시장이 매우 크다고 판단된다. 다양하게 응용되는 면역조절물질의 생물학

적 특성 및 작용기전을 연구하는 것은 효율적인 생체 반응조절제로서 새로운 면역조절제의 개발에 도움을 줄 것이라 생각된다.

#### ○ 기술적 측면

- 생명과학의 발달에 필요한 세포배양, 면역분석, 유전공학 및 합성기술의 증진 및 집약화
- 면역조절제의 유효성 검색기술 확립
- 면역계 질환의 치료 및 예방기술의 진전

#### ○ 경제·산업적측면

- 극지생물 및 해양생물로부터 면역조절제의 개발은 미개척지의 생물 산업화를 선점함으로써 미래적 가치를 극대화시키고 국제물질 특허 및 국내 제약 산업의 경쟁력 강화에 기여
- 기술 수입비 절감 및 면역질환 치료제의 세계시장 진출

#### ○ 사회·문화적측면

- 고도 산업 사회로의 발전과 소득수준의 향상에 따른 식생활 양식의 서구화와, 보건의료의 증진에 의한 수명연장에 따른 필연적 수반 질병인 암과 성인형 질환의 발병 및 이에 따른 치료제 수요의 급속한 증가는 불가피할 것이다. 따라서 국내의 시장성은 더욱 신장할 것이며 이에 따른 새로운 의약품의 개발이 필연적으로 요구된다.

## 제 2 절 연구개발의 범위

본 연구에서는 양극해 생물 유래 물질인 Lobaric acid를 이용하여 대식세포인 RAW264.7 세포에서 염증 억제 효과를 규명하였고, 이를 바탕으로 항염증 작용에 관여하는 다양한 면역관련 중재자들의 변화를 확인하였으며 면역작용에 따른 NO 그리고 다양한 cytokine들의 생성 변화를 확인하였다. 나아가 Lobaric acid물질의 항염증 작용에서 관여하는 작용기전을 확인하였다. 이를 통하여 본 연구 물질인 Lobaric acid가 염증억제제로서의 가능성을 확인하였다. 또한 극지생물에서 추출한 다양한 물질을 이용하여 면역조절에서의 효과를 측정하였다.

1. 양극해 해양생물 유래 물질의 염증반응 억제효과 측정
2. 양극해 해양생물 유래 물질의 염증반응 억제에 작용하는 작용기전 연구
3. 양극해 해양생물 유래 물질의 면역조절효과 확인

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

면역 작용의 조절은 암, 자가 면역 등 다양한 질병에 이용 될 수 있기 때문에 오래 전부터 면역 작용을 증강시키기 위하여 많은 물질들을 사용해 왔다. 최근에는 많은 유전 공학 기술의 발달, 대량 세포 배양, 단백질과 DNA 서열 분석을 통한 많은 기술의 발달로 인하여 면역 조절제에 대한 관심이 높아지고 있다. 새로운 기술 개발등으로 인하여 interferon, interlukin,tumor necrosis factor와 growth factor 등을 포함한 순도 높은 면역 조절제의 대량 생산이 가능하게 됨에 따라 면역 조절 작용 물질에 대한 연구가 빠르게 진행되고 있다. 또한 천연물로부터 기원하는 새로운 면역조절제의 발굴 연구가 활발하게 진행되고 있다.

요즘 사용되고 있는 면역조절제는 cytokines, 미생물에서 유래된 물질. 화학적으로 합성된 물질이 있으며 이 중 미생물에서 유래된 BCG, Picibabil, krestin, lentinan, bBiostim, Broncho-Vaxom등은 임상적으로 만성감염 및 gastric cancer에 사용되고 있다. Thymus에서 유래된 thymostimulin, T-activin과 thymomodulin은 암 치료에 이용되고 있으며, 화학적으로 합성된 MDP 유도체인 murabutide, peptide 계통인 thymosin  $\alpha$ ,tuftsin, thymomimetic drug인 ditiocarb, interferon 생성물질인 ampligen 등은 각각 HIV 감염과 암 치료에 이용되고 있다. 그 이외에 cyclosporin 과 FK506은 장기 이식에 필요한 면역 억제제 작용을 가지고 있다. corticosteroid, momsteroidal antiinflammatory agent, morphine, marijuana와 antibiotic 등도 면역조절작용이 있다고 보고 되고 있다.

미국 및 유럽국가를 중심으로 한 선진국에서 단일클론항체 생산기술, DNA 재조합기술, 대량세포 배양기술, 단백질합성기술 등 생명공학기술이 발전하여 면역조절제에 대한 관심이 높아지고 있으며, 새로운 기술을 이용한 여러 가지 면역조절제의 개발이 계속적으로 이루어지고 있다. 실제로 유전자 재조합기술을 이용하여 다양한 사이토카인 물질(TNF, 인터페론, 인터루킨, TGF 등)이 순도 높게 대량 생산되었고, 미생물의 병원성만을 제거한 백신이 개발되었으며, 세포배양기술 및 단백질 합성기술의 발전이 새로운 면역 조절제 개발에 박차를 가하고 있다. 인터페론, 인터루킨, 케모카인, EPO, G-CSF 등의 사이토카인류가 사업화된 대표적인 면역조절제이며, 미생물에서 유래된 다당체가 면역을 증강시키기 위한 보조제로 이용되고 있고, 사이클로스포린 A, FK506, 아자티오푸린 및 스테로이드 물질은 실험실에서 합성되어 장기를 이식한 환자들에게 면역억제제로 사용되고 있다. 그 밖에 해양자원을 포함한 천연물질로부터 추출한 생리활성물질이 면역조절효과를 가지는 새로운 면역조절제로서 보고되어 있으며, 이를 이용한 면역증강제 및 건강보조식품이 개발되고 있다.

국내에서는 1980년대 개발된 유전자 재조합기술, 세포배양기술을 토대로 1990년대부터 선진국의 모방제품들이 생산되기 시작하였으며 인터페론, EPO, 사람성장호르몬 등이 그 대

표적인 의약품이라고 할 수 있다. 동아제약 등 국내 제조사에 의해 만들어진 이들 모방제품들은 물질특허가 인정되지 않는 제 3세계로 수출되어 많은 외화획득을 이룩하고 있다. 현재 국내에서 유전자재조합 과정에서부터 세포배양, 정제, 제제화 등의 전체공정을 수행할 수 있는 곳은 약 10개 내외의 제조소 정도에 불과하며, 전반적인 생명공학 기술의 수준도 선진국의 60%로 크게 열세로, 기반기술은 어느 정도 확보되어 있으나 생산기술의 축적이 필요한 실정이다. 생산기술 중 미생물 개량 및 발효기술은 선진국 수준이나 분리·정제기술 등 생물공정기술이 낙후되어 있고 신물질 탐색이나 개발도니 신물질에 대한 안전성 평가기술 등의 하부 기반기술도 낙후되어 있어 경쟁력 있는 제품이 단시일 내에 생산되기를 기대하기는 어렵다. 그러나 국내 사이토카인의 시장은 매년 11%의 높은 성장률을 보이고 있다. 국내에서 면역증강제의 개발은 매우 활발하다. 화인코가 만든 양질의 베타글루칸( $\beta$ -glucan)을 함유하는 아가리쿠스 버섯을 이용한 면역증강제 외에 인삼 및 상황버섯 추출 면역다당체(코인텍), 생약성분의 면역증강제 이뮤넷스(씨트리), 강력한 림프구 생성작용이 있는 자생물질 테두리방귀버섯과 비단빛깔대기버섯 등이다. 또한 최근에 일양약품이 항암 효과를 갖고 있는 베타 이뮤난을 개발하였다.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구내용

극지 해양생물 성분인 Lobaric acid, Lobarin, Lobastin의 면역 조절효과를 측정하기 위하여 본실험에서는 실험실에서 확립한 *in vitro* 실험방법을 이용하여 면역조절 작용을 확인하였다. 평활근세포에서 세포부착물질 억제, 지방전구세포에서 지방분화 억제효과를 확인하였다.

### 제 2 절 실험재료 및 방법

#### 1. 실험재료

##### 가. 실험물질

(1) Lobaric acid

(2) 다수의 극지생물 유래 추출물



##### 나. 세포주

Raw264.7 : murine macrophage cell

##### 다. 시약

Agarose (SeaKem LE) : Biowhittaker Molecular Applications, USA

Ammonium persulfate : Sigma, Chemical Co., USA

Bovine serum : GibcoBRL, USA

Dexamethasone : Sigma, Chemical Co., USA

Dithiolthreitol (DTT) : Sigma, Chemical Co., USA

Dimethylsulfoxide (DMSO) : Sigma, Chemical Co., USA

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) : Lonza, USA

100 bp DNA ladder marker : Solgent, Korea

d-PBS : Invitrogen, USA

EDTA : Sigma, Chemical Co., USA

Fetal Bovine Serum (FBS) : Lonza, USA

G148 : A.G. Scientific, Inc, USA  
RPMI medium 1640 : Gibco, USA  
Hybond-ECL membrane : Amersham pharmacia biotech., UK  
Isobutylmethylxanthine (IBMX) : Sigma, Chemical Co., USA  
Isopropanol : Sigma, Chemical Co., USA  
Insulin : Sigma, Chemical Co., USA  
Kodak scientific imaging film : Kodak, USA  
MTT : Sigma, St Louis, MO, USA  
N,N,N',N'-tetramethylenediamine (TEMED) : Sigma, Chemical Co., USA  
NP-40 : Sigma, Chemical Co., USA  
Penicillin/streptomycin : Lonza, USA  
Protein assay kit : Bio-Rad Laboratories, Inc., USA  
Retinoic acid : Sigma, Chemical Co., USA  
Skim milk : BD, USA  
Sodium dodecylsulfate (SDS) : Sigma, Chemical Co., USA  
Trypsin-EDTA : Invitrogen, USA  
Tween-20 : Sigma, Chemical Co., USA  
Westzol Western Blotting Detection Reagent : INTRON, KOREA

## 라. 기기

Autoclave : Tuttnauer Co., Israel  
Clean bench : Vision Sci. Co., Korea  
Microcentrifuge : Sigma Laboratory Centrifuges, Germany  
Microplate reader : Molecular device, USA  
UV-Visible Spectrophotometer : SHIMADZU, JAPAN  
Xcell II<sup>TM</sup> Blot module : NOVEX, USA

## 2. 실험방법

### 가. 세포배양

RAW 264.7은 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin (10,000 U pen/mL, 10,000  $\mu$ g strep/mL)이 혼합된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)배지에서 배양하였으며 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건을 유지하였다. 세포는 세포배양판 (microplate 또는 petridish)에 세포를 분주한 후 12시간 이상 CO<sub>2</sub> 세포 배양기에서 안정시킨 후 다양한 실험에 이용하였다.

#### 나. 세포 생존도 (Cell viability)

RAW 264.7 세포를 96-well plate에 각각 well당 4×10<sup>5</sup> 세포로 분주하고 다양한 처리 조건으로 세포를 배양한 후에 세포 생존률을 측정하기 위해서 MTT (2mg/ml)를 25  $\mu$ l 첨가한 후 5% 조건에서 2시간동안 배양하였다. 상등액을 제거하고 150  $\mu$ l의 DMSO를 가하여 formazan 을 용해시킨 후 microplate reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존률을 비교하였다.

#### 나. NO (nitric oxide) 생성 측정

생쥐의 대식세포주인 RAW 264.7을 1×10<sup>6</sup> cells/well을 분주하여 바닥에 부착하도록 하였다. 세포가 부착된 것을 확인하고 d-PBS로 세척한 후 양극해 생물 유래 물질을 다양한 농도로 처리하였다. 20시간 이상 배양한 후 배양 상등액 중의 NO 생성농도를 Ding 등(1998)의 방법에 따라 측정하였다. 100  $\mu$ l 상등액을 취하여 96 well plate에 옮긴 후 각각의 well에 100  $\mu$ l의 Griess 시약을 가하여 Microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO농도는 NaNO<sub>2</sub>를 사용하여 작성한 표준 곡선으로부터 계산하였다. Griess 시약은 중류수에 녹인 0.1% naphthylethyl- enediamine dihydrochloride와 5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>용액에 녹인 1% sulfanilamide를 동량씩 혼합한 것으로 사용직전에 만들어 사용하였다.

#### 다. 총단백질의 분리 및 정량화 Western blot analysis

세포를 60 mm culture dish와 100mm culture dish에 plate당 1×10<sup>6</sup> ~ 2×10<sup>6</sup> 세포를 분주하고 다양한 처리조건으로 세포를 배양하였다. 배양된 세포를 회수하여 d-PBS를 이용하여 세척하고 세포침전물에 lysis buffer (20 mM Hepes pH 7.0, 2mM EGTA, 1mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol, 150mM NaCl, 20mM  $\beta$ -glycerophosphate, 5 ng/ml leupeptin, 0.1 TIU/ml aprotinin) 50~100  $\mu$ l 넣고 침전물을 녹인 후에 ice에 30~60분간 방치해 놓은 후

에 원심분리 (4°C, 13000 rpm, 10분)하여 상등액을 취해 protein assay kit (BioRad, USA)를 이용하여 단백질의 양을 정량하였다.

실험에 이용할 20~50 μg의 단백질을 적당한 농도의 SDS-PAGE gel에 전기 영동한 후 Hybond-ECL nitrocellulose membrane으로 overnight transfer하였다 단백질이 옮겨진 membrane은 1시간 동안 상온에서 5% skim milk in TBST (Tris Buffered Saline with Tween; 25 mM Tris, 140 mM NaCl, 3 mM KCl, 0.05% Tween-20, pH 8.0)를 blocking buffer로 만들어 처리한 후 primary Ab in blocking buffer를 1시간 동안 상온에서 처리하거나 혹은 4°C에서 12시간이상 처리하였다. TBST로 6회 세척 후 HRP-conjugated secondary Ab in blocking buffer를 1시간 동안 상온에서 처리하였다. TBST로 6회 세척 후에 detection reagent (ECL)를 가한 후 Kodak scientific imaging film에 노출시켜 각각의 단백질 발현을 확인하였다.

#### 라. Total RNA의 분리 및 정량

RAW 264.7 세포를 60 mm culture dish에 plate당 2×10<sup>5</sup> 세포를 분주하고 다양한 처리조건으로 세포를 배양하였다. 배양된 세포로부터 상등액을 제거하고 d-PBS를 이용하여 세척하고 Trizol reagent (Invitrogen, USA) 0.5 ml을 가하여 culture dish 바닥에 점도가 사라질 때 까지 pipetting하고 e-tube에 옮겼다. 5분 동안 다 녹을 정도로 inversion한 후에 chloroform을 200 μl를 가하고 15초 동안 흔들어주었다. 상온에서 10분 정도 방치한 후 11600rpm, 15분 동안 4°C 원심분리 하였다. 상등액을 새로운 e-tube에 옮긴 후 isopropanol을 상층액과 동량으로 가하고 inversion한 후 상온에서 15분 방치하고 11600rpm, 15분 동안 4°C 원심분리 하였다. 상층액을 버리고 pellet이 완전히 건조되지 않은 상태에서 20~40 μl DEPC가 처리된 멸균 3차 중류수에 용해시켰다. 이때 추출된 total RNA는 UV spectrophotometer를 이용하여 1 μg/ml 농도로 보정하고, -70°C에 냉동 보관 하였다.

#### 마. Quantitative Real-Time PCR

RT-PCR (Reverse transcription-polymerase chain reaction)을 이용하여 cytokines의 mRNA 발현량을 측정하였다. 추출된 total RNA는 RevertAidTM H Minus first strand cDNA synthesis kit (Fermentas, USA)를 이용하여 mRNA 발현량을 측정하였다. 먼저 reverse transcription step인 total RNA를 cDNA로 만드는 과정으로 추출한 total RNA를 2~5 μg과 oligo dT primer 1 μl, DEPC-treated water를 넣어서 total 10 μl가 되게 만든 후 65°C에서 5

분 동안 반응시킨 후 4°C에서 2분간 방치하였다. 여기에 5×reaction buffer (final 1×), 10mM dNTP Mixture 2  $\mu\text{l}$ , RNase inhibitor (20 units/ $\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$ , M-MuLV Reverse Transcriptase (200 units/ $\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$  를 첨가한 후에 42°C에서 60분, 70°C에서 5분간 반응시킨 후에 생성된 cDNA mixture 1  $\mu\text{l}$ 를 PCR 반응에 사용하였다. cytokines 발현을 확인하기 위한 PCR을 위하여 1  $\mu\text{l}$ 의 DNA와 PCR mixture (dNTP Mixture (final 300 uM), 10×EF taq buffer (final 1×), EF taq polymerase (final 2.5 units/100  $\mu\text{l}$ ), PCR primer, DW)를 혼합하여 총 25  $\mu\text{l}$ 의 반응액을 25~30회 반복하는 PCR cycle로 반응하였다. 이때 각각의 RT-PCR에서 동량의 RNA가 사용되었음을 확인하기 위하여 house keeping gene인 GAPDH를 사용하여 함께 PCR을 진행하였다.

real-time PCR을 통하여 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and IL-18 mRNA 발현량을 확인하였다. 추출된 total RNA는 RevertAidTM First Strand cDNA synthesis kit (Fermentas, USA)를 이용하여 cDNA로 변환하였다. SYBR Green과 특이적인 primers(Xenotech, USA)를 이용하여 real-time PCR을 수행하였다. 사용된 primer는 다음과 같다. TNF- $\alpha$  (forward, 5'-CCCTCACACTCAGATCATCTTCT-3'; reverse, 5'-GCTACGACGTGGGCTACAG-3'); IL-6 (forward, 5'-CCACGGCCTTCCCTACTTC-3'; reverse, 5'-TTGGGAGTGGTATCCTCTGTGA-3'); IL-1 $\beta$  (forward, 5'-TTGACGGACCCAAAAGATG-3'; reverse, 5'-TGGACAGCCCAGGTCAAAG-3'); IL-18 (forward, 5'-CTGAAGAAAATGGAGACCTGGAA-3'; reverse, 5'-TCCGTATTACTGCGGTTGTACAGT-3'); GAPDH (forward, 5'-TGC ATC CTG CAC CAC CAA-3'; reverse, 5'-TCC ACG ATG CCA AAG TTG TC-3').

#### 사. 핵 단백질의 분리 및 정량

세포를 100mm culture dish에 plate당 2×10<sup>6</sup> 세포로 분주하여 24시간동안 안정화시킨 후 다양한 처리 조건으로 세포를 배양하였다. 핵 추출물을 분리하기 위해 세포를 d-PBS로 세척하고 cell pellet에 buffer A (10 mM HEPES pH 7.9, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, 1mM DTT, 1mM PMSF, 0.1% NP-40)를 200 $\mu\text{l}$  넣고 ice에서 10분 동안 방치하여 세포막을 파괴하였다. 그 후 원심분리 (1,500× g, 4°C, 10분)하여 상등액을 취하여 세포질을 정량하였다. Pellet에 200  $\mu\text{l}$ 의 buffer A' (Buffer A without NP-40)를 넣고 혼탁하여 다시 원심분리 (1,500× g, 4°C, 10분) 하였다. 다시 상등액을 제거하고 50  $\mu\text{l}$ 의 buffer C (20mM HEPES pH 7.9, 0.2M NaCl, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM EDTA, 25% Glycerol, 1mM PMSF)를 넣고 핵으로부터 핵 단백질을 추출하기 위하여 40분 동안 ice에 방치하였으며 매 10분 간격으로 격렬하게 15초 동안 교반하

여 주었다. 그 다음 원심분리 (14,000rpm, 4°C, 10분)하고 핵 단백질이 포함된 상등액을 취하여 Bio-Rad protein assay kit를 이용하여 핵 추출물을 정량하였다.

#### 바. Immunofluorescence

6 well plate 위에 멸균시킨 slide를 넣고 그 위에 세포를  $1 \times 10^6$  cell/ml로 분주하여 12시간 동안 세포를 안정화 시킨 후 다양한 처리조건으로 세포를 배양하였다. PBS로 세포를 세척한 후 3.7% formaldehyde가 포함된 PBS로 상온에서 15분 동안 세포를 고정시킨다. 고정액을 버리고 PBS로 5번 세척한 후에 차가운 100% 메탄올을 이용하여 -20°C에서 10분동안 permeabilization 시킨 후 PBS로 세포를 1시간 동안 상온에서 blocking 한 후 p65 1차 항체를 처리하여 4°C에서 overnight 한다. 어두운 곳에서 fluorochrome이 conjugation 된 2차 항체를 1시간 동안 처리한 한다. 마운팅 배지를 첨가한 후 커버 글라스를 덮고 현미경으로 관찰하였다. 형광 염색 표본 당 세포 형태가 잘 유지된 곳에서 4회씩 p65 발현 강도를 Confocal microscope로 관찰하고 영상분석기를 이용하여 각각의 형광의 발현 정도를 측정하였다.



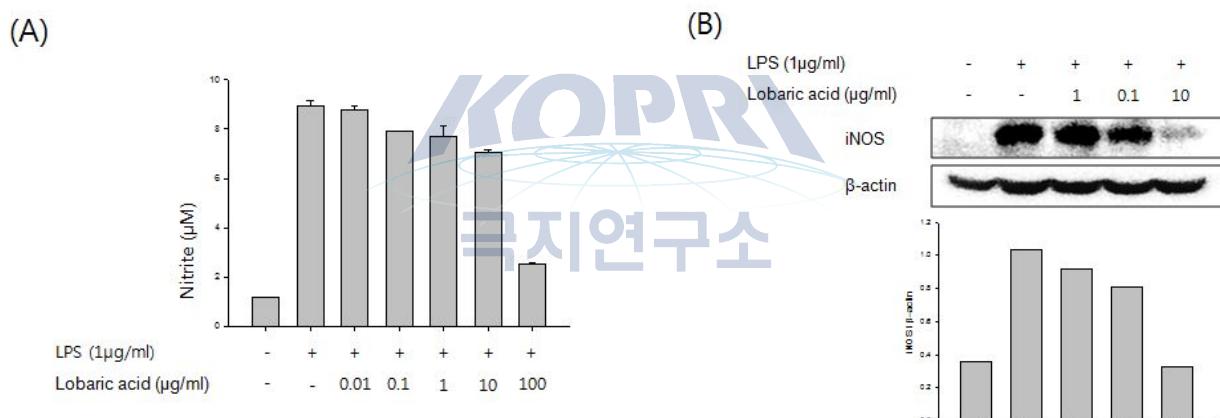
### 제 3 절 결과

#### 1. 양극해 생물 유래 물질의 면역세포 기능변화 및 분비물질 생성조절 연구

##### 가. 대식세포주 Raw 264.7에서 Lobaric acid에 의한 염증 매개 물질 변화 확인

###### (1) RAW 264.7 세포에서 Lobaric acid에 의한 nitrite 발현 확인

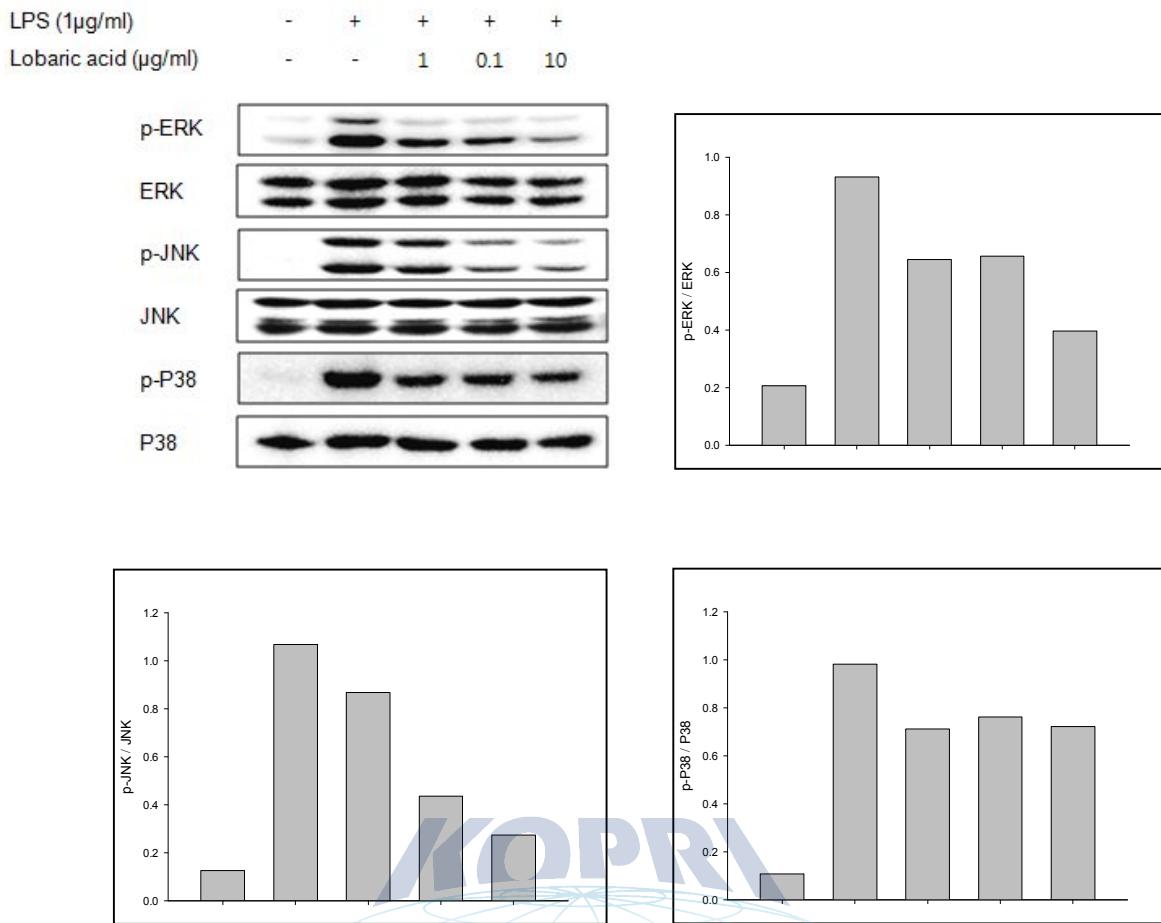
대식세포주 RAW 264.7 세포가 분비하는 독성물질의 하나인 nitric oxide 생성에 대한 Lobaric acid의 영향을 알아보기 위하여 대식세포주인 Raw 264.7 세포에 0.01, 0.1, 1, 10, and 100  $\mu$  g/ml의 농도로 Lobaric acid를 처리하여 nitrite 생성량을 확인하였다. lobaric acid를 처리한 구간에서 NO 생성이 농도 의존적으로 감소함을 확인하였다.



**Figure 1. The effect of Lobaric acid on the inhibition of nitrite production in macrophages.** Raw264.7 cells were pre-treated with various doses (0.01–100  $\mu$ g/ml) of Lobaric acid for 2 hrs, further incubated with medium alone or were treated with LPS 1  $\mu$ g/ml for 24hrs. The culture supernatants were collected and nitrite levels was measured using Griess reagent.

###### (2) RAW 264.7에서 Lobaric acid에 의한 MAPK 단백질발현 확인

대식세포주에서 MAP Kinase Lobaric acid에 의하여 영향을 받는지 알아보기 위하여 ERK, JNK, p38의 발현을 western blot assay를 통하여 확인하였다. ERK, JNK, p38 모두 activity를 가지는 phosphorylated form의 lobaric acid의 처리에 의해 발현이 감소하는 것을 확인할 수 있었다.



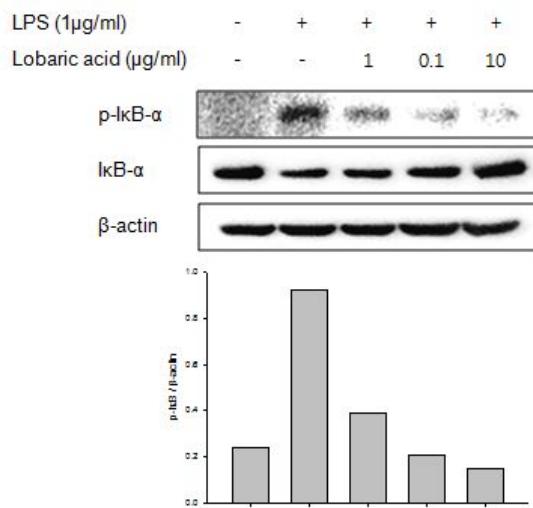
## 극지연구소

**Figure 2. Effect of lobaric acid on p-ERK, p-JNK and p-P38 in LPS-induced RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells were pre-treated with the indicated concentration of lobaric acid for 2 h and then incubated with LPS (1  $\mu$ g/ml) for 20 min. The whole cell lysates were analyzed by Western blot. A typical result from three independent experiments is shown.

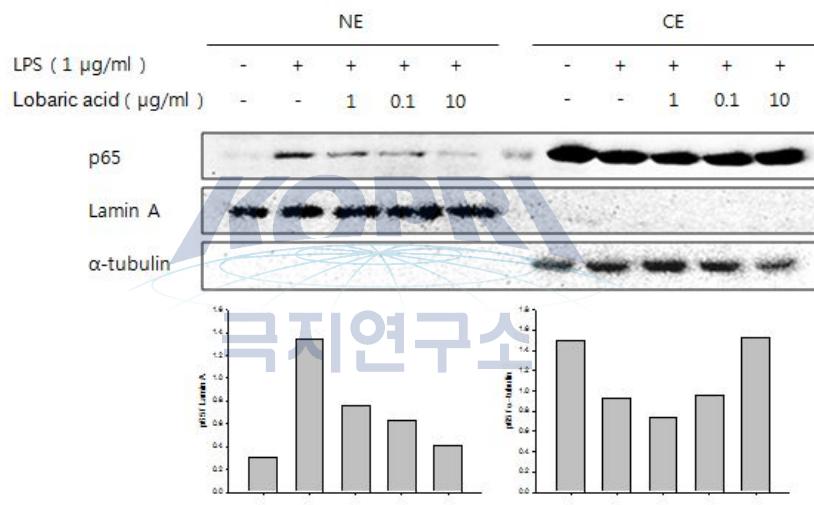
### (3) RAW 264.7에서 Lobaric acid에 의한 NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B $\alpha$ 변화 확인

대식세포주에서 NF- $\kappa$ B가 Lobaric acid에 의하여 영향을 받는지 알아보기 위하여 NF- $\kappa$ B와 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 발현을 western blot assay를 통하여 확인하였다. p-I $\kappa$ B $\alpha$ 는 lobaric acid 농도 의존적으로 감소하는 것으로 확인되었으며, 또한 nucleus 안으로 translocation된 NF- $\kappa$ B가 농도 의존적으로 감소되는 것으로 보아 lobaric acid가 NF- $\kappa$ B와 I $\kappa$ B $\alpha$  발현에 영향을 주는 것을 확인할 수 있었다.

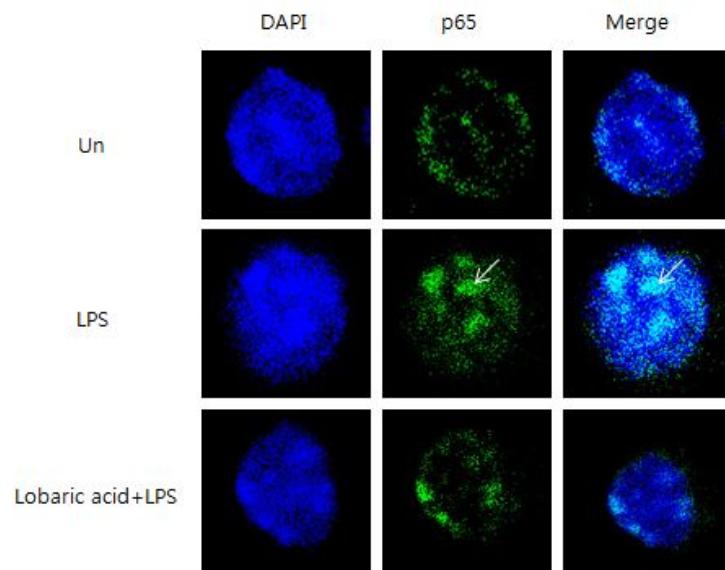
(A)



(B)



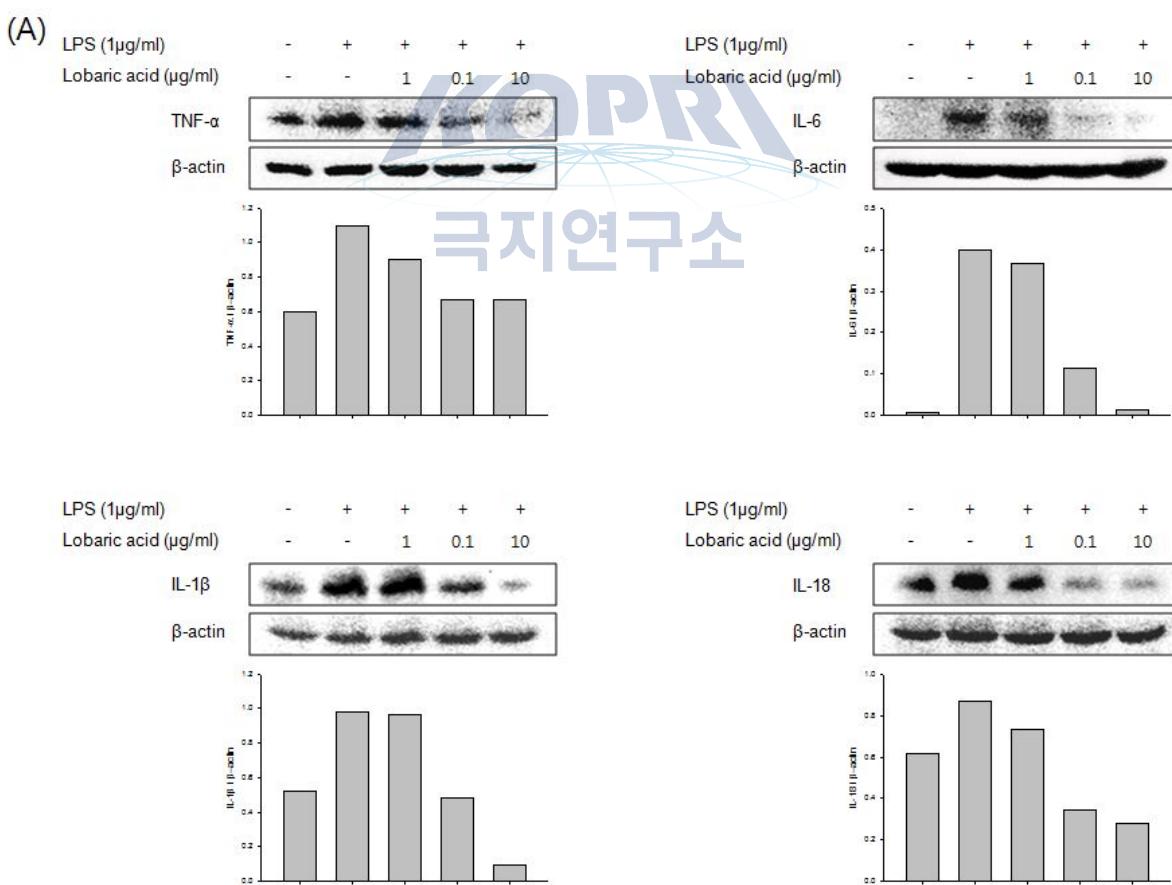
(C)

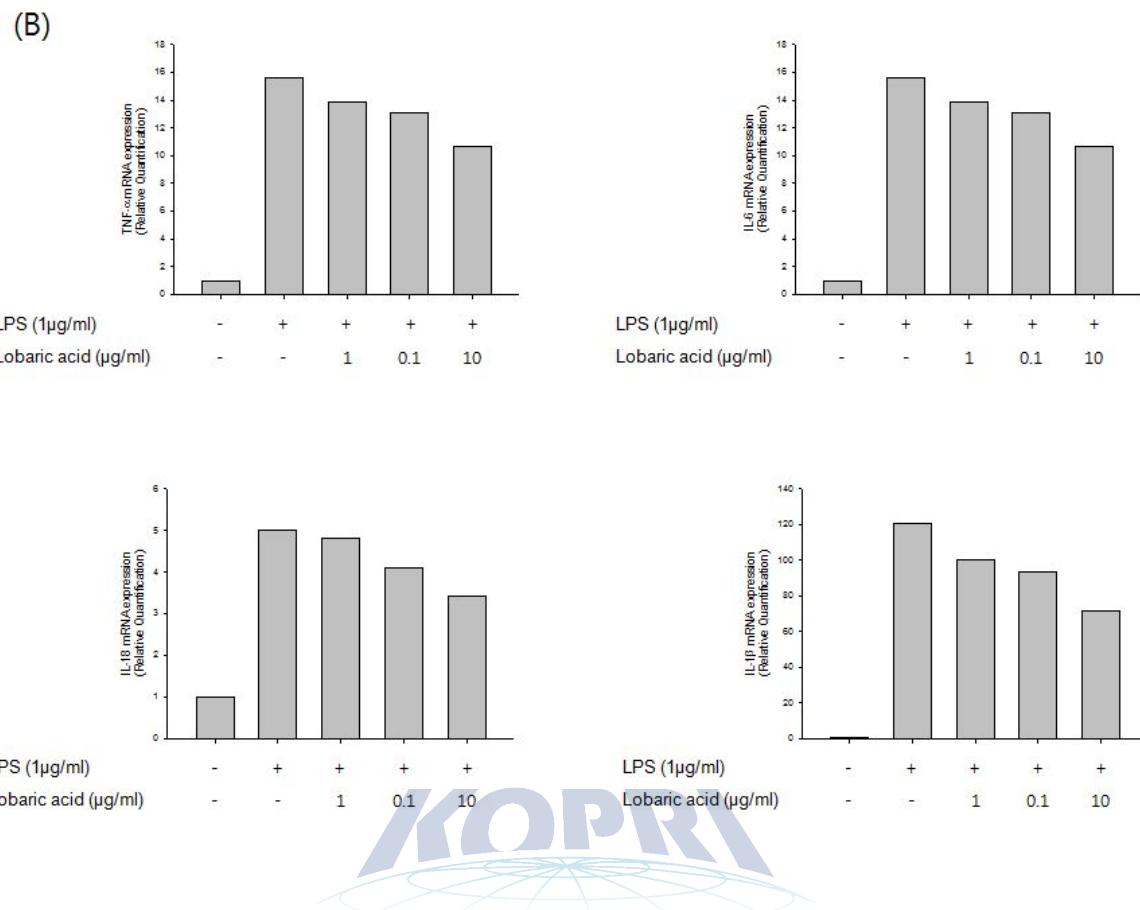


**Figure 3. Effect of lobaric acid on LPS-induced activation and translocation of NF- $\kappa$ B in RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells were pre-treated with the indicated concentration of lobaric acid for 2 h and then incubated with LPS (1  $\mu$ g/ml) for 4 h. The whole cell lysates were analyzed by Western blot

(4) RAW 264.7에서 Lobaric acid에 의한 proinflammatory cytokines 변화 확인 44

염증 매개 인자인 cytokine들의 생성에 Lobaric acid가 미치는 영향을 알아보기 위하여 대식 세포주인 Raw 264.7 세포에 다양한 농도 (0.1, 1, 10  $\mu$ g/ml)의 Lobaric acid를 2시간 동안 전처리한 후 LPS 1  $\mu$ g/ml을 24시간 처리하여 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  그리고 IL-18의 생성량을 확인하였다. 그 결과, Lobaric acid가 농도의존적으로 proinflammatory cytokines의 생성을 감소시키는 것을 확인하였다.

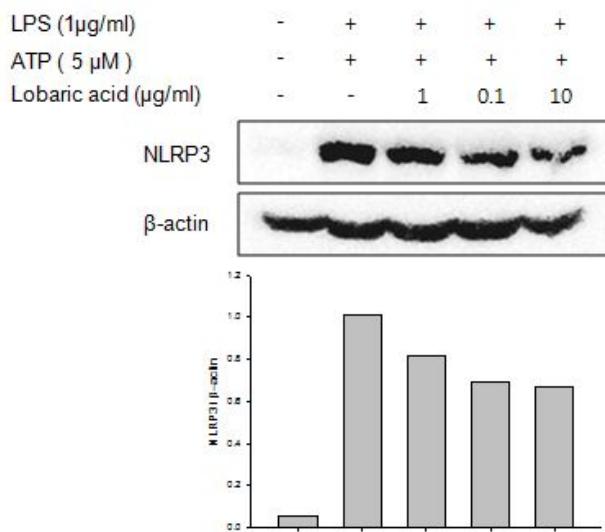




**Figure 4. Effect of lobaric acid on the production, expression and mRNA levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$  and IL-18 in LPS-induced RAW 264.7 cells.** RAW 264.7 cells were pretreated with lobaric acid for 2 h prior to stimulation of LPS (1  $\mu$ g/mL) for 24 h. (A) The protein levels of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , and IL-18 were measured by Western blot assay. (B) The mRNA expression of TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , and IL-18 was determined by RT-PCR.

(3) RAW 264.7에서 Lobaric acid에 의한 염증억제 반응에서 NLRP3 유전자와의 관련성 확인

NLRP3 inflammasome은 가장 널리 알려진 inflammasome으로 PAMPs, DAMPs, 또는 potassium efflux, ROS 생성 등을 유발하는 다양한 대사산물들에 의해 유도된다고 알려져 있다. lobaric acid가 LPS에 의해 유도되는 NLRP3 inflammasome에 미치는 영향을 알아보기 위하여 NLRP3의 발현을 western blot assay를 통하여 알아본 결과 lobaric acid에 의해 NLRP3의 발현이 감소되는 것을 확인할 수 있었다.



**Figure 5. Effect of lobaric acid on the NLRP3 expression in LPS-induced Raw 264.7 cells.** Cells were pretreated with indicated concentration of lobaric acid for 2 h, followed by treatment with LPS(1 $\mu$ g/ml) for 8 h. Cell lysates were prepared, and the level of NLRP3 was determined by Western blot analysis.



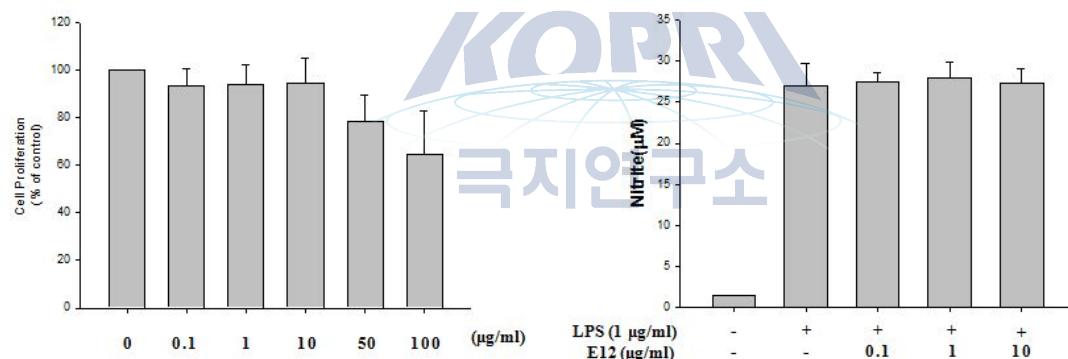
## 2. 극지생물 추출물의 면역조절 효과측정

### 가. 대식세포주 Raw 264.7 세포에서 극지생물 추출물에 의한 cell proliferation 및 nitrite 생성 확인

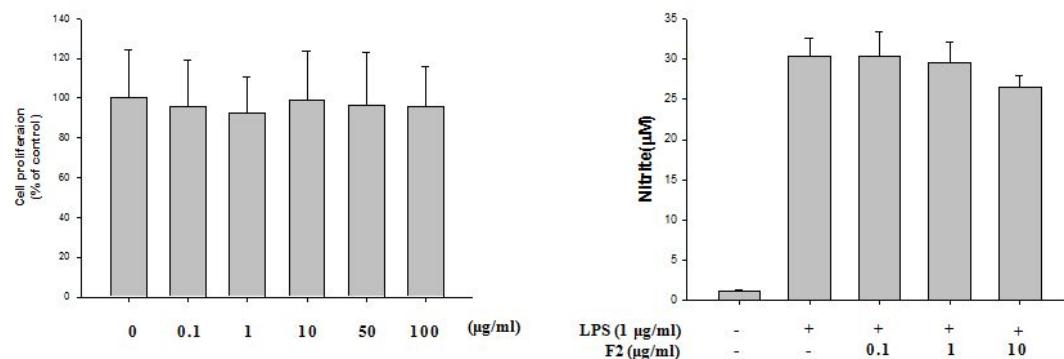
#### 1) RAW 264.7 세포에서 극지생물 추출물에 의한 cell proliferation 및 nitrite 생성 확인

대식세포가 분비하는 독성물질의 하나인 nitric oxide 생성에 대한 극지생물 추출물의 영향을 알아보기 위하여 대식세포주인 Raw 264.7 세포에 다양한 농도( $0.1, 1, 10 \mu\text{g}/\text{ml}$ )의 극지생물 추출물을 처리하여 nitrite 생성량을 확인하였다. 대부분의 추출물들이 nitrite 감소 효과가 없었으며, 일부 추출물에서만 약간의 감소 효과가 있었다.

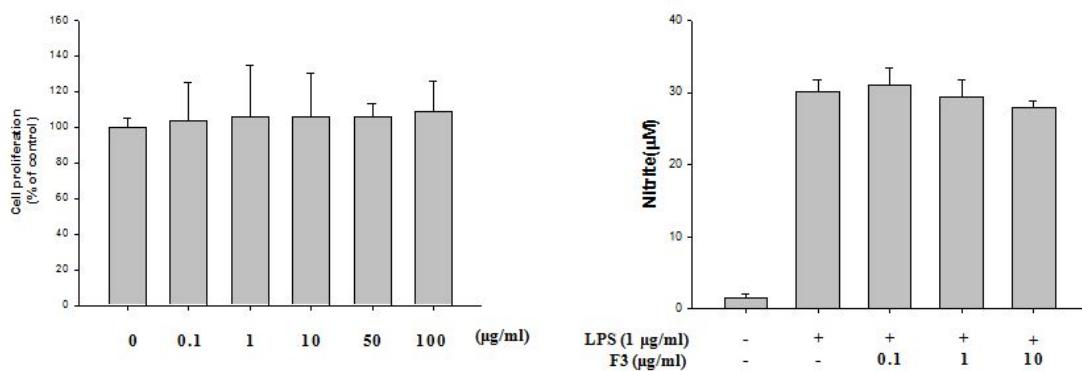
CTD1-E12



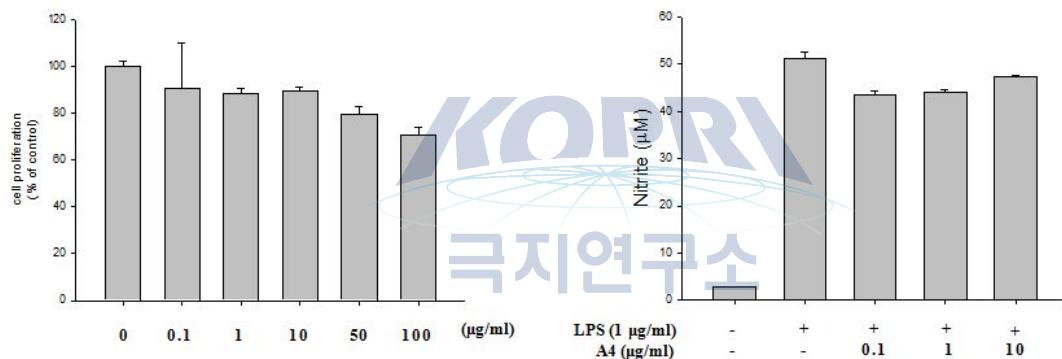
CTD1-F2



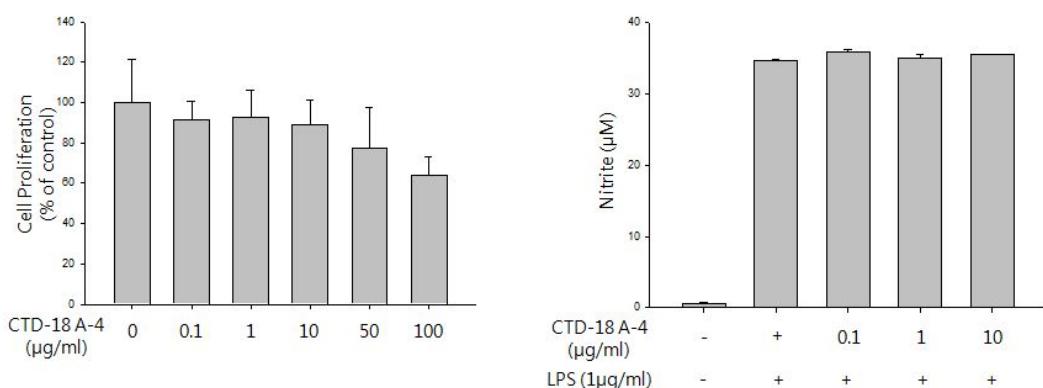
### CTD1-F3



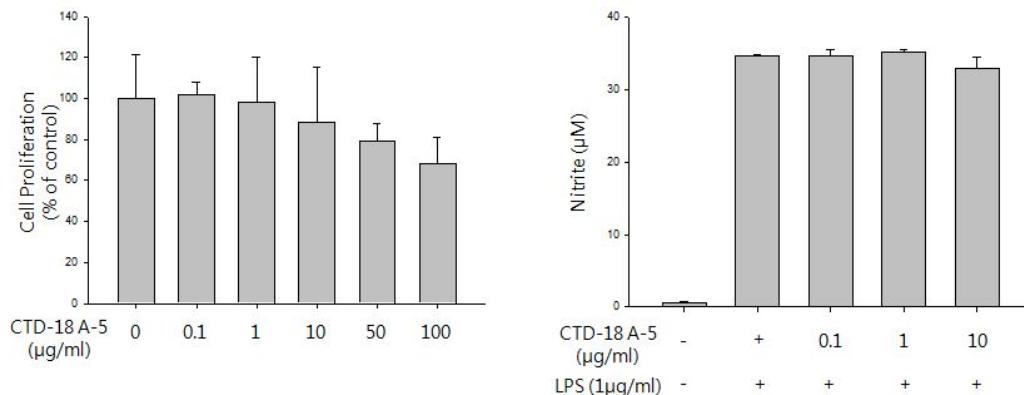
### CTD2-A4



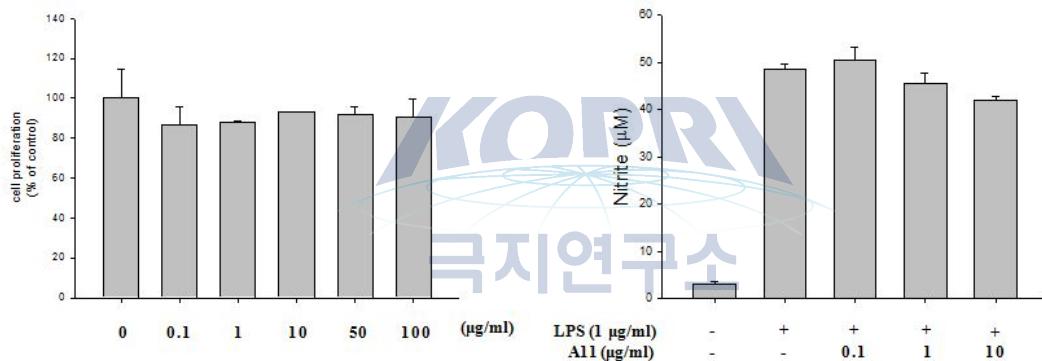
### CTD18-A4



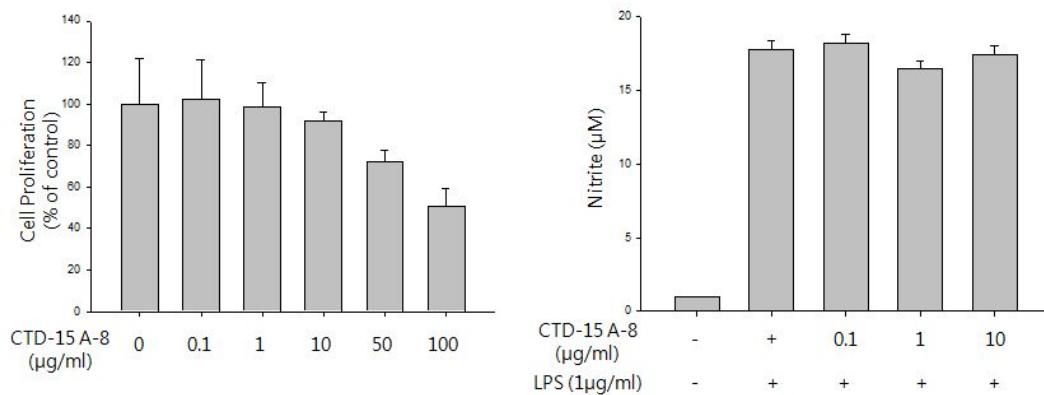
### CTD18-A5



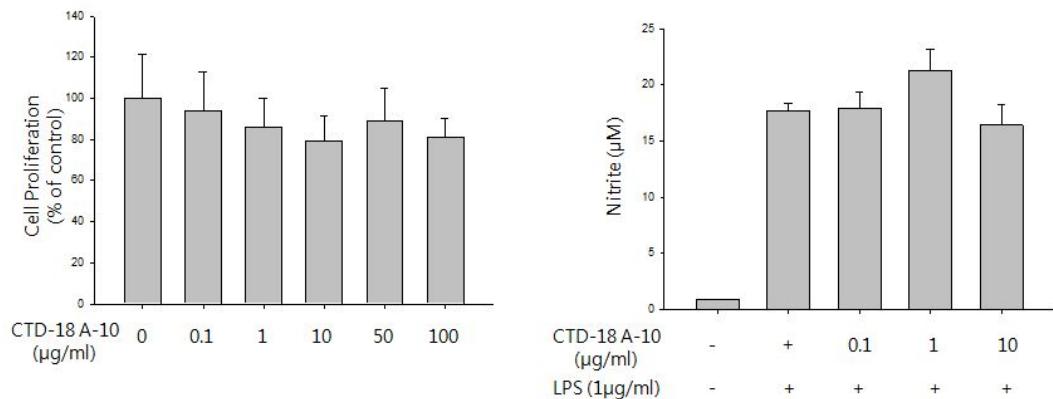
### CTD2-A11



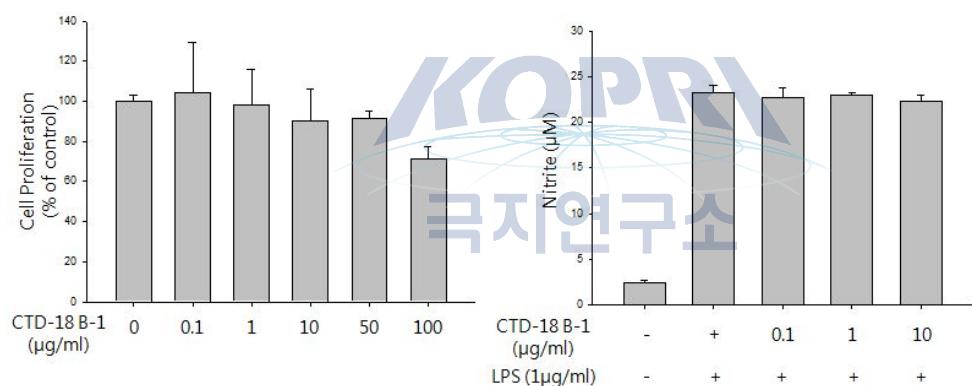
### CTD15-A8



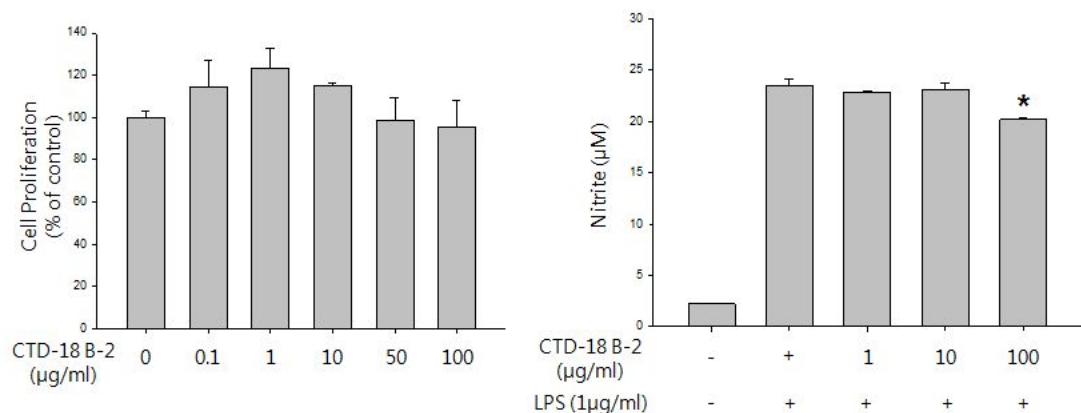
### CTD18-A10



### CTD18-B1



### CTD18-B2



**Figure 1. The Effect of lichen extracts on the Nitrite production in macrophages.**  
Raw 264.7 cells were pre-treated with indicated concentrations of lichen extracts for 2 hrs and then incubated with LPS ( $1\mu\text{g}/\text{ml}$ ) for 24 hrs. Culture supernatants were collected and the levels of Nitrite were obtained by the Griess method. Results are the means  $\pm$  S.E. of representative of three independent experiments. Cell viabilitys were measured by MTT assay. Results are the means  $\pm$  S.E. of representative of three independent experiments.



## 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

### 제 1 절 연구개발 목표 달성도

성과목표	세부목표	달성 주요내용	달성도(%)
1. 양극해 생물 유래 물질의 면역세포 기능변화 및 분비물질 생성조절 연구	1-1 대식세포주 Raw 264.7에서 양극해 해양 생물 유래 물질에 의한 염증 매개 물질 변화 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 대식세포(RAW 263.7)에서 Lobaric acid의 항염증작용 확인</li> <li>- Lobaric acid의 면역세포 활성 효과</li> <li>- 면역세포 기능변화 및 분비물질 생성조절 측정</li> <li>- 대식세포에서 극지 생물추출물의 proinflammatory cytokines 생성 및 작용 기전 확인</li> <li>- Lobaric acid의 처리에 따른 NLRP3의 발현 변화 확인</li> </ul>	100%
2. 극지 생물 추출물의 면역조절 효과측정	2-1 대식세포주 Raw 264.7 세포에서 극지 생물 추출물이 Nitrite 생성에 미치는 영향양극해 해양 확인	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 대식세포(RAW 264.7)에 극지 생물 추출물을 처리하여 Nitrite Oxide의 생성 증가 및 감소 확인</li> </ul>	100%

### 제 2 절 대외 기여도

최근 과학기술의 발달로 인하여 많은 질환들이 면역반응과 복잡하게 연결되어 있다고 밝혀짐에 따라 치료제 개발에 있어서도 면역계로 초점이 맞추어지고 있다. 유전공학기술의 발달과 대량 세포배양과 DNA염기서열 분석등으로 인하여 면역조절제 개발에 대한 관심이 더욱더 높아지고 있다. 따라서 의약품의 자체 공급능력을 위해서는 아직도 연구되지 않은 많은 천연자원을 이용하여 면역반응을 조절함으로서 조직이식, 암치료, 자가면역 질환치료

등 다양한 질병치료에 응용이 가능하다. 극지 생물 및 지의류의 연구는 의약품의 공급 능력 뿐 아니라 기능성식품등 고부가가치 자원의 생산 및 새로운 물질 창출을 위해 필요할 것으로 생각된다. 본 연구에서는 의약품 및 기능성 제품의 생리활성 소재로 개발될 수 있도록 하기 위하여 면역반응에 중요한 역할을 하는 대식세포의 면역조절작용에 대하여 연구하였다. 극지 생물 및 지의류 성분이 면역조절작용에 있어서 유의적으로 나타났다. 따라서 본 연구 결과는 극지 생물 및 지의류 성분의 면역조절제 및 항비만 치료제로서의 가능성과 염증관련치료제로서의 가능성을 제시하고 있다.

#### 가) 기술적인 측면

- 극지 생물 성분의 면역세포의 작용 기전 규명에 있어서 세포신호전달 연구의 기초 자료제공
- 극지생물 성분의 면역세포 기능 조절을 이용한 만성질환과 면역계 질환의 치료 및 예방기술의 진전
- 생명과학의 발달에 필요한 세포배양, 면역분석, 유전공학 및 합성기술의 증진 및 집약화
- 면역조절제의 유효성 검색기술 확립
- 면역계 질환의 치료 및 예방기술의 진전

#### 나) 경제 산업적인 측면

- 극지 생물 성분을 이용한 면역조절제의 개발은 국제물질 특허 및 국내 제약산업의 경쟁력강화에 기여
- 기술 수입비 절감 및 다양한 만성질환과 면역질환 치료제의 세계시장 진출

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

극지 생물 유래 성분에서 발굴되는 유효 물질에 대한 면역반응 조절효과와 그 작용기전에 관한 본 연구결과는 세포내의 작용 기전을 구체적으로 제시하고 있다. 또한 본 연구에서는 항비만, 항염증, 자가포식과 관련하여 연구하였다. 이러한 연구 결과를 기초 자료로 활용하여 *in vivo*의 동물임상 연구가 진행된다면 인체에 적용할 수 있는 유용한 성분으로 빠르게 개발될 수 있을 것이다. 특히, 본 연구에서는 지금까지 효능 연구에 그쳤던 생리활성소재를 찾는 천연자원의 연구들과는 달리 세포 및 분자생물학적 수준에서의 작용 기전이 규명됨으로써 극지 생물유래 성분의 효능이 과학적이고 정확하게 검증됨으로써 이러한 작용 기전을 이용한 관련 질환 치료 및 예방에 구체적으로 적용됨으로써 극지 산물을 이용한 신약개발에 있어서도 중요한 약물 작용기전 정보를 제공할 수 있으리라 사료된다. 또한, 극지 생물 유래 성분은 기능성을 부여하는 화장품, 식품첨가제 등의 개발에도 활용하고자 한다.



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

세계 의약품 산업은 전 세계적으로 어려운 경제상황에도 불구하고 꾸준히 성장하고 있는데 미국은 지속적으로 높은 성장세를 나타내었으며 유럽과 아시아 역시 높은 성장률을 기록하였다. 현재 제약업계의 동향은 합성 의약품에서 이제는 근본적인 유전적 요인을 이용한 바이오 의약품이나 식물과 같은 천연물 원료를 이용한 의약품들이 주목받고 있다.

이 중 면역조절제의 기술개발동향을 살펴보면, 특히 새로운 사이토카인의 발견과 기능규명, 면역억제제, 백신의 개발이 두드러진다. 특히 면역억제제에 대하여는 현재 장기이식거부반응과 자가 면역질환을 치료할 수 있는 대표적인 면역억제제는 전 세계적으로 스위스의 노바티스사가 만든 사이클로스포린 A가 가장 많이 사용되고 있고, 일본의 후지사와 Fujisawa사가 만든 FK506이 다음으로 많이 사용되고 있다. 그러나, 기존의 약물들은 부작용이 많아 다국적 제약회사들은 면역억제효과를 가지는 치료용 항체의 실용화에 박차를 가하고 있다. 관절염의 경우 이미 많은 치료제들이 시판되고 상용되어지고 있다. 현재 TNF 길항제 (휴미라, 레미케이드, 엔브렐), IL-1 수용체 길항제 (악템라), 항 IL-6 제제, Rituximab CTLA-5 Ig 등을 류마티스 관절염 치료에 시도하고 있다. 최근에는 이 밖에 다양한 항체 치료제들이 개발되고 있다.

대표적인 염증성 질환으로 알려진 비만이나 동맥경화 또한 이런 질병으로 인한 합병증 문제는 이제는 기름지고 육식 위주의 식습관을 가진 미국이나 유럽국가들 뿐만 아니라 아시아를 포함한 전 세계적으로 중요하게 다뤄지고 있는 문제이다. 하지만 비만 및 비만으로 유발되는 다양한 합병증들에 관한 위험성 문제는 전 세계적으로 관심의 대상이 되고 있지만, 효과적인 비만치료제 개발은 미비한 상태이다. 비만치료제로서 에너지흡수 감소 약물 (Amphetamines, Rimonabant, Sibutramine 및 Orlistat) 등이 사용되었으나 부작용이 심해 시판을 중단하였고 Orlistat가 미국에서 장기요법으로 허가 받은 유일한 비만 치료제이며 이 약물 또한 위장관 심장의 부작용으로 인하여 제한적으로 사용되고 있다. 최근 미국 FDA는 Belvig (Locaserin)과 Qsymia (Phentermine + Toiramide)라는 2개의 새로운 식욕 억제제를 허가하였다. 에너지 소모증가 약물로서 전임상 단계에 있는 Ember 사의 Irisin 관련 웨타이드, Zafgen사의 Belorinib과 MD Anderson 암센터에서 개발 중인 합성 웨타이드인 Adipotide, Obetat에서 개발 중인 웨타이드인 GST-TatdMt등이 있다. 이밖에 기존의 약물작용과는 새로운 작용기전을 갖는 약물들이 개발되고 있다.

동맥경화 또는 고지혈증의 예방 및 치료제인 스타틴계 약물, 피브레이트계 약물 등 고지혈증 치료제는 아직까지 다국적 제약기업들이 신약 개발 등으로 관련 치료제 시장을 주도하고 있다. 제품 개발에 어려움을 겪는 국내 기업들은 심혈관계 질환에 대한 인지도를 제고시켜 시장을 확대하기 위해 외국 제약사와 라이선스 계약을 체결하거나, 특히 만료 제품 출시를 통해 경쟁

하고 있는 실정이다

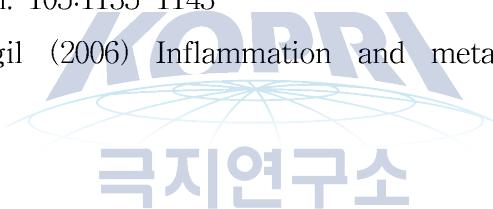
따라서 극지 생물 유래 유효성분을 이용하여 만성질환인 동맥경화 및 비만 등을 치료를 위한  
개발이 필요하다고 사료된다.



## 제 7 장 참고문헌

1. Klimetzek, V and Remold, H. G (1980) The murine bone marrow macrophage, a sensitive indicator cell for murine migration inhibitory factor and a new method for their harvest. *Cell Immunol* 53, 237-266
2. Mand, H. M and Vogel, S. N. (1991) Measurement of mouse and human TNF: In current protocols in Immunology eds. pp6.10.1-6.10.5 Greene Publishing and Willey-Interscience New York
3. Ding, A. H., Nathan, C.F. and Stuehr, D.J. (1988) Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen inter mediates from mouse peritoneal macrophages. Comparision of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol.* 141, 2407-2412
4. Institoris, L., Siroki, O., and Desi, I. (1995) Immunotoxicity study of repeated small doses of dimethoate and methylparathion administered to rats over three generations. *Human Exp. Toxicol.* 14:879-883.
- 5.Um SH, Rhee DK, Pyo S. (2002) Involvement of protein kinase C and tyrosin kinase in tumoricidal activation of macrophage induced by *Streptoccus pneumoniae* type II capsular polysaccharide. *Int Immunopharmacol.* 2:129-37
- 6.Cho SJ, Kang NS, Park SY, Kim BO, Rhee DK, Pyo S.(2003) Induction of apoptosis and expression of apoptosis related genes in human epithelial carcinoma cells by *Helicobacter pylori* VacA toxin. *Toxicon* 42(6):601-11.
- 7.Ando I, Tsukumo Y, Wakabayashi T, Akashi S, Miyake K, Kataoka T, Nagai K. (2002) Safflower polysaccharides activate the transcription factor NF-kappa B via Toll-like receptor 4 and induce cytokine production by macrophages. *Int Immunopharmacol.* 2:1155-62.
- 8.Huh JE, Yim JH, Lee HK, Moon EY, Rhee DK, Pyo S.(2007) Prodigiosin isolated from *Hahella chejuensis* suppresses lipopolysaccharide-induced NO production by inhibiting p38 MAPK, JNK and NF-kappaB activation in murine peritoneal macrophages.*Int Immunopharmacol.* Dec 15;7(13):1825-33.
- 9.Chi HS, Yim JH, Lee HK, Pyo S.(2009) Immunomodulatory effects of polar lichens on the function of macrophages in vitro. *Mar Biotechnol (NY)*. 2009 Jan-Feb;11(1):90-8
- 10.Russell L., Holman, Henry C., McGill, Jr., Jack P., (1960) Strong, Jack C.,Geer Arteriosclerosis – The Lesion. *Am. J. Clinical Nutrition*, Vol 8, 85-94

11. Peter Libby. (2002) Inflammation in atherosclerosis. *Nature*, Vol. 420, 6917:868–874 .
12. Li, H., Cybulsky, M. I., Gimbrone, M. A. Jr, Libby, P. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit endothelium. *Arterioscler. Thromb.* 13, 197–204 (1993).
13. Ailhaud, G., Grimaldi, P., Negrel, R. Cellular and molecular aspects of adipose tissue development. *Annu Rev Nutr* 12: 207–233, 1992.
14. Acuna UM, Atha DE, Ma J, Nee MH, Kennelly EJ. Antioxidant capacities of ten edible North American plants. *Phytother Res* 2002;16:63–5
15. Deretic, V., 2006. Autophagy as an immune defense mechanism. *Curr. Opin. Immunol.* 18, 375–382.
16. Kate Schroder, Rongbin Zhou, Jurg Tschopp (2010). The NLRP3 Inflammasome: A Sensor for Metabolic Danger?. *science* Vol. 327, Issue 5963, pp. 296–300
17. Vijay A K Rathinam, Sivapriya Kailasan Vanaja & Katherine A Fitzgerald (2012) Regulation of inflammasome signaling. *Nature Immunology* vol 13 : 333 - 342
18. Virginie Petrilli, Stéphanie Papin, Jürg Tschopp (2005) The inflammasome. *CELL* Vol 15 Pages R581
19. Peter Libby, Paul M. Ridker, Attilio Maseri (2002) Inflammation and Atherosclerosis. *American Heart Association*. 105:1135–1143
20. Gökhan S. Hotamisligil (2006) Inflammation and metabolic disorders. *nature*. 444, 860–867



## 주         의

1. 이 보고서는 극지연구소 위탁과제 연구결과 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지 연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.