

극지생물 유래대사체의 대사질환
치료효과 및 작용기전 연구

Immunomodulatory activities of biological extracts from
bi-polar ocean



성균관대학교 산학협력단
(위탁연구 책임자 : 표 석 능)

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지적응 고유생물 유래 대사체의 상용화 구축사업”과제의 위탁연구“극지생물 유래다사체의 대사질환 치료효과 및 작용기전 연구”과제의 최종보고서로 제출합니다.



총괄연구책임자 : 임 정 한

위탁연구기관명 : 성균관대학교 산학협력단

위탁연구책임자 : 표 석 능

위탁참여연구원 : 이 희 원

“ : 장 연 정

요 약 문

I. 제 목

극지생물 유래대사체의 대사질환 치료효과 및 작용기전 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 해류순환에 중요한 역할을 하였다. 또한 최근 급속하게 일어나는 북극해 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 ROSS SEA 해양미생물 추출물의 염증관련 물질 억제 확인
2. 대식세포(RAW264.7)에서 ROSS SEA 해양미생물 추출물에 의한 inflammatory mediators 생성억제 및 작용기전 확인
3. 대식세포(RAW264.7)에서 ROSS SEA 해양미생물에서 추출한 다양한 물질들의 면역조절 효과 측정 및 확인

IV. 연구개발결과

본 연구에서는 실험실에서 확립하고 진행하고 있는 in vitro system을 이용하여 ROSS SEA 해양미생물 추출물이 면역세포인 대식세포의 염증억제에 미치는 영향을 확인하였다.

· 대식세포주인 RAW264.7세포에서 ROSS SEA 해양미생물 추출물이 inflammatory mediators의 발현을 억제하는 것을 확인하여 염증억제제로서의 개발 가능성을 제시하였다. 또한 이를 바탕으로 면역작용에서 ROSS SEA 해양미생물 추출물이 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 vivo의 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 작용기전이 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 가능성을 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 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 biological extracts from bi-polar ocean alternated the production of nitric oxide (NO) and release of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6 in Raw 264.7 macrophage cells.

Taken together, the present data indicate that components and extracts from polar biological resources have anti-inflammatory effect. 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	9
2. Trends in research	11
3. Results	13
4. Achievement of study and contribution of results to science	33
5. Perspective on the use of results	35
6. Scientific technology information	36
7. References	38



목 차

제 1 장 서론	9
제 2 장 국내외 기술개발 현황	11
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	13
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도	33
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	35
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	36
제 7 장 참고문헌	38

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 높은 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 분자생물학적인 발달로 인해 인체 내의 특이적 면역반응과 복잡하게 연결 되어 있는 신호 체계들이 밝혀져 있다. 이에 따라 치료제 개발에 있어서도 신체 방어의 중요한 역할을 수행하는 면역계에 초점이 맞추어 지고 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. 다

양하게 응용되는 면역조절물질의 생물학적 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·산업적 측면

- 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·문화적 측면

- 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-Vaxom 등은 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 α , 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 면역 조절제로서 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 모방제 품들은 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 개발도나 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(β -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 ROSS SEA 해양미생물 추출물의 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

ROSS SEA 해양미생물 추출물

나. 세포주

Raw264.7 : murine macrophage cells

다. 시약

Agarose (SeaKem LE) : Biowhittaker Molecular Applications, USA

Ammonium persulfate : Sigma, Chemical Co., USA

Bovine serum : GibcoBRL, USA

Dexamethasone : Sigma, Chemical Co., USA

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

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

DMEM (Dulbeco'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 IITM Blot module : NOVEX, USA

2. 실험방법

가. 세포배양

RAW 264.7은 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin (10,000 U pen/mL, 10,000 μ g strep/mL) 이 혼합된 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)배지에서 배양하였으며 37°C, 5% CO₂ 조건을 유지하였다. 세포는 세포배양판 (microplate 또는 petridish)에 세포를 분주한 후 12시간 이상 CO₂ 세포 배양기에서 안정시킨 후 다양한 실험에 이용하였다.

나. 세포 생존도 (Cell viability)

RAW 264.7 세포를 96-well plate에 각각 well당 4×10⁵ 세포로 분주하고 다양한 처리 조건으로 세포를 배양한 후에 세포 생존률을 측정하기 위해서 MTT (2mg/ml)를 25 μ l 첨가한 후 5% 조건에서 2시간동안 배양하였다. 상등액을 제거하고 150 μ l의 DMSO를 가하여 formazan을 용해시킨 후 microplate reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하여 세포 생존률을 비교하였다.

나. NO (nitric oxide) 생성 측정

생쥐의 대식세포주인 RAW 264.7을 1×10⁶ 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 μ l 상등액을 취하여 96 well plate에 옮긴 후 각각의 well에 100 μ l의 Griess 시약을 가하여 Microplate reader로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO농도는 NaNO₂를 사용하여 작성한 표준 곡선으로부터 계산하였다. Griess 시약은 증류수에 녹인 0.1% naphthylethyl- enediamine dihydrochloride,와 5% H₃PO₄용액에 녹인 1% sulfanilamide를 동량씩 혼합한 것으로 사용직전에 만들어 사용하였다.

제 3 절 결과

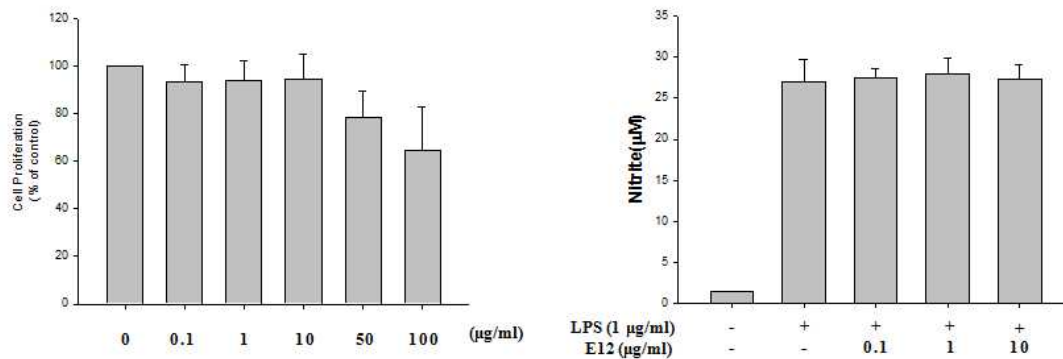
1. 극지생물 추출물의 면역조절 효과측정

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

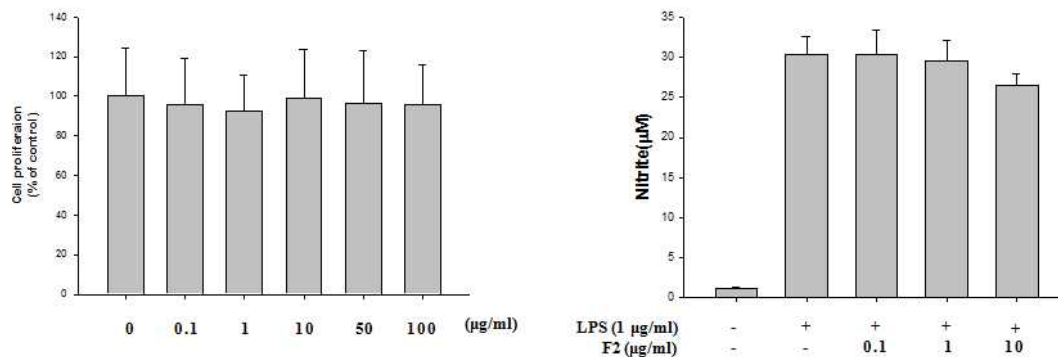
1) RAW 264.7 세포에서 극지생물 추출물에 의한 cell proliferation 및 nitrite 생성 확인

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

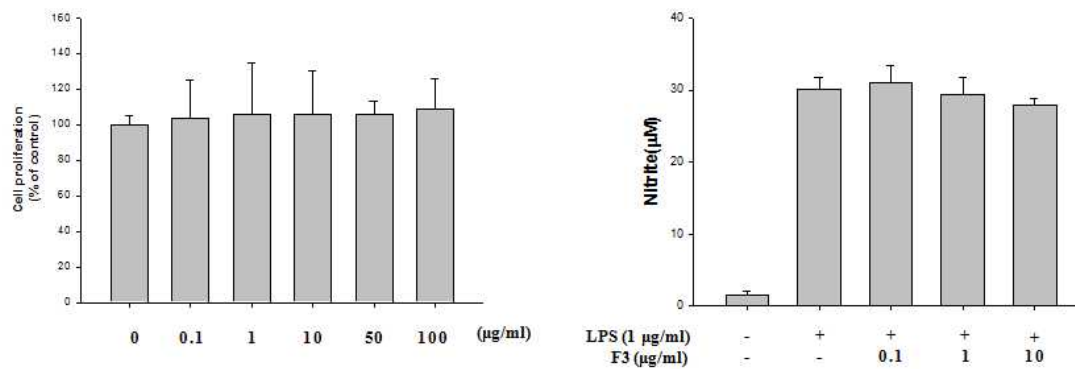
CTD1-E12



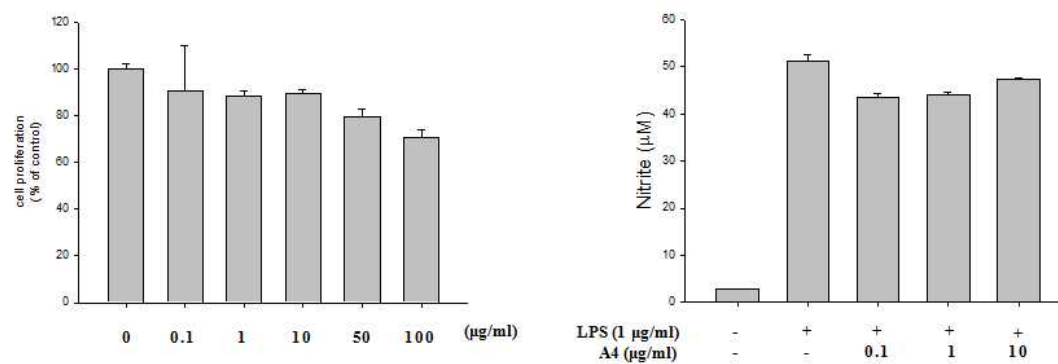
CTD1-F2



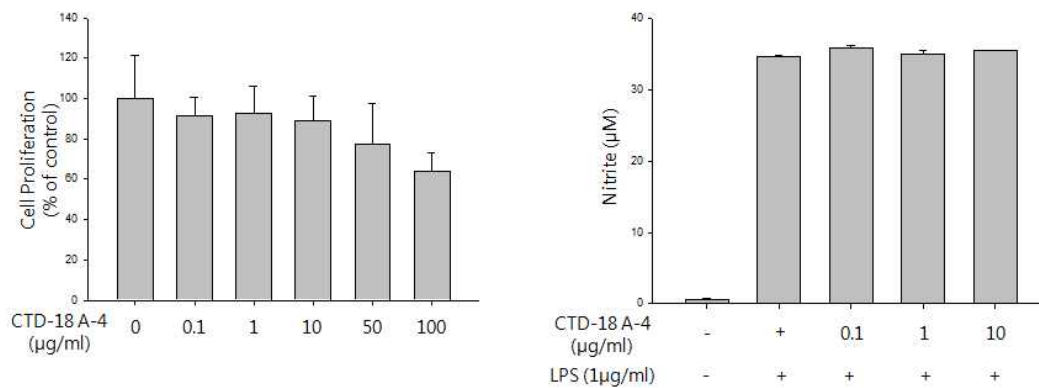
CTD1-F3



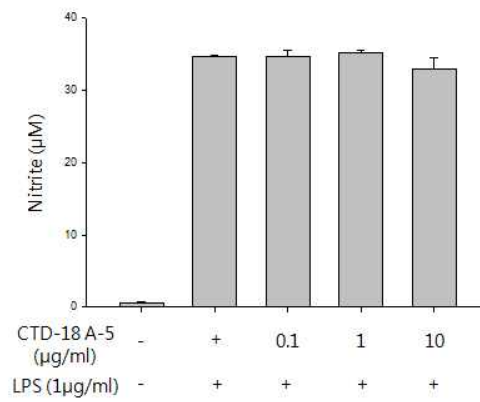
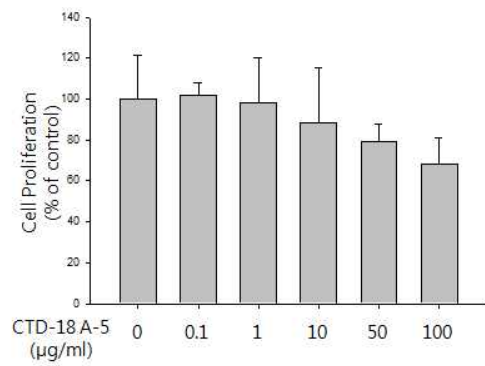
CTD2-A4



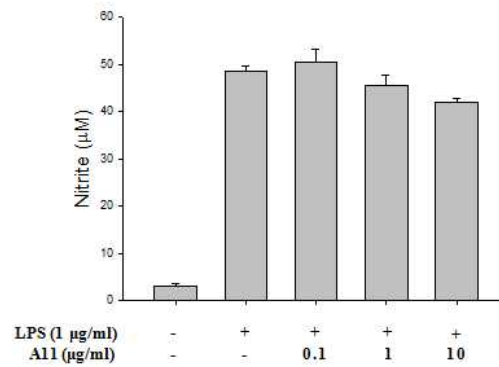
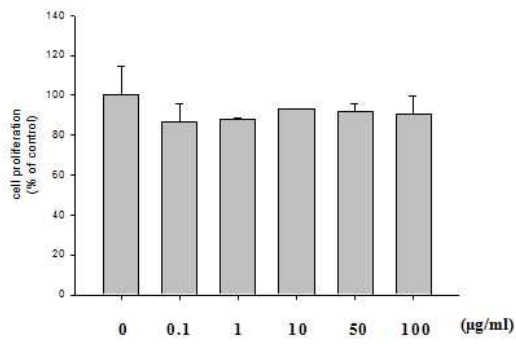
CTD18-A4



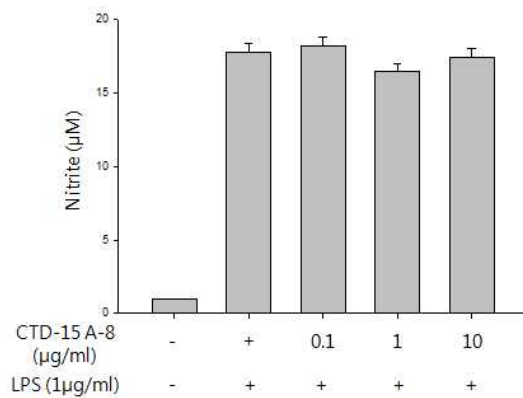
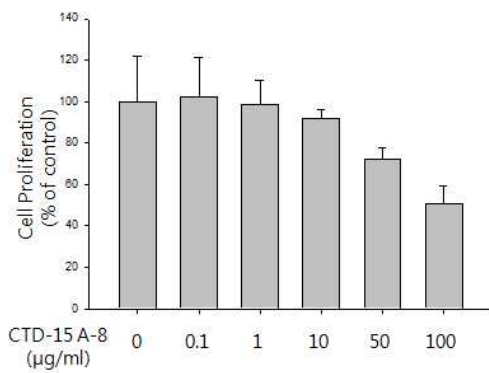
CTD18-A5



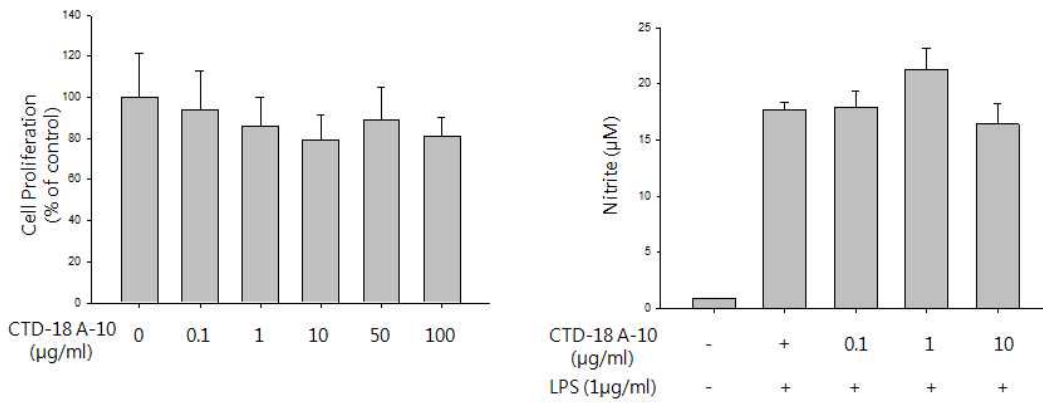
CTD2-A11



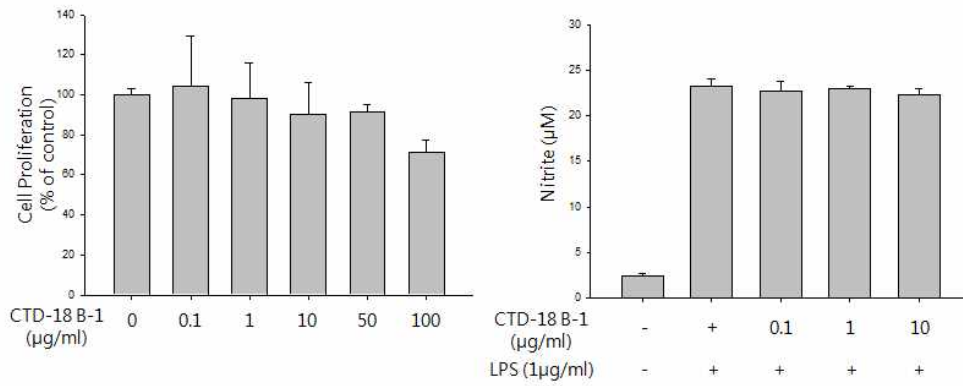
CTD15-A8



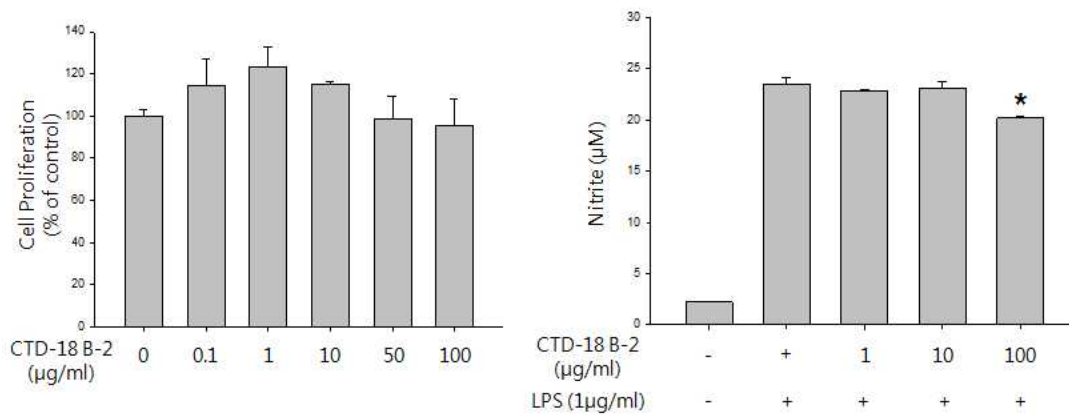
CTD18-A10



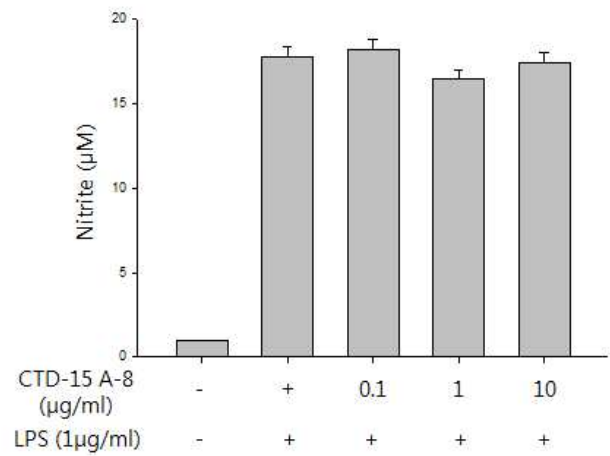
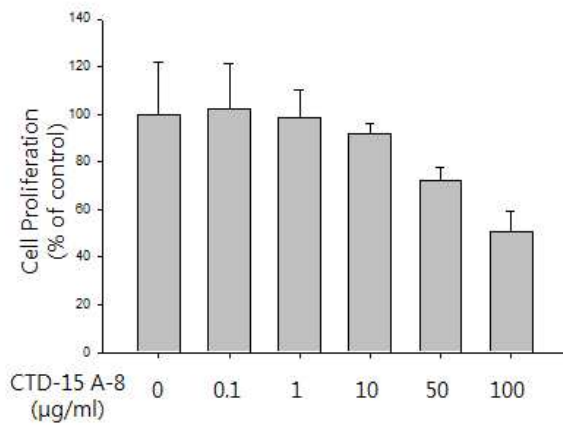
CTD18-B1



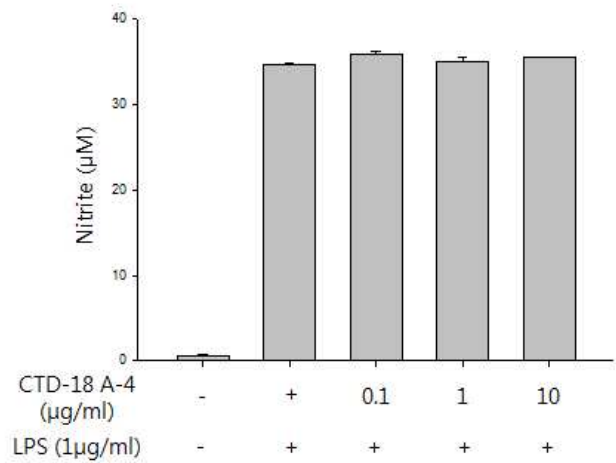
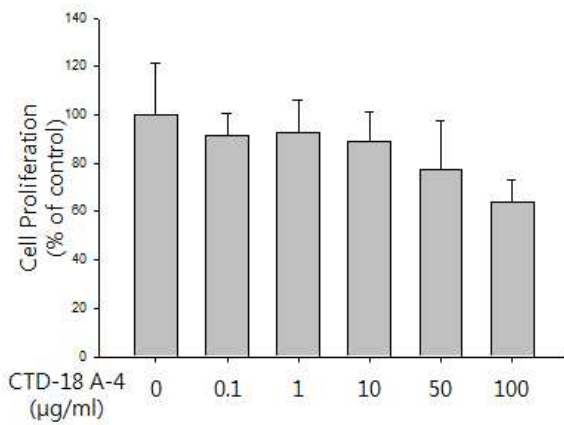
CTD18-B2



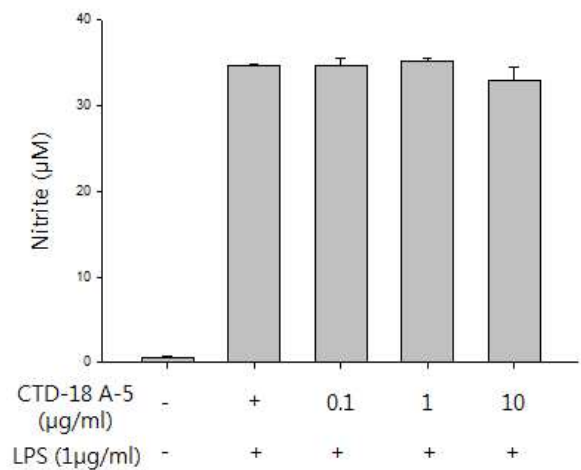
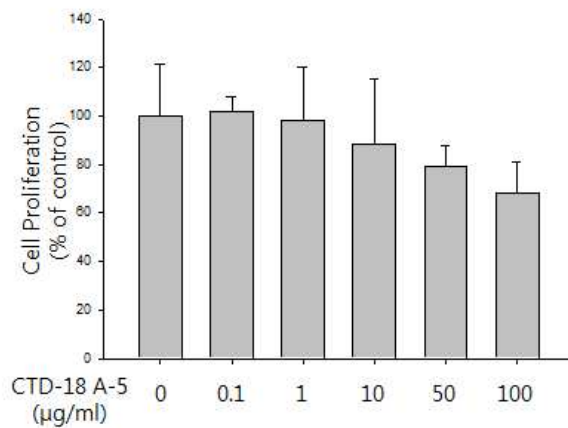
CTD-15 A-8



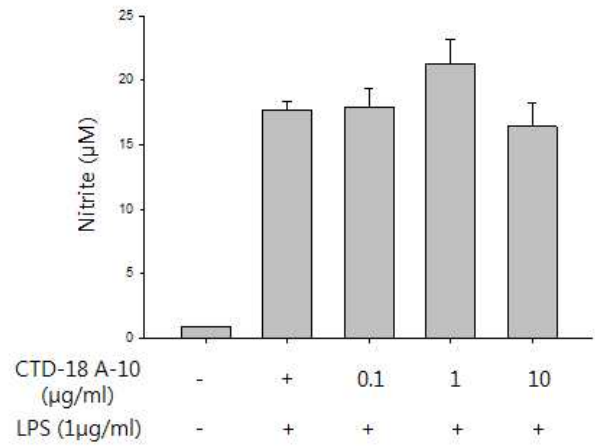
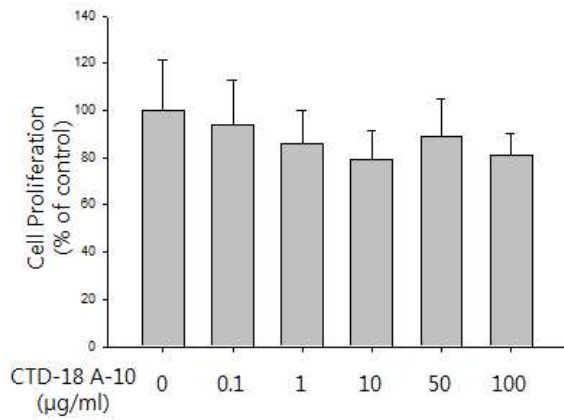
CTD-18 A-4



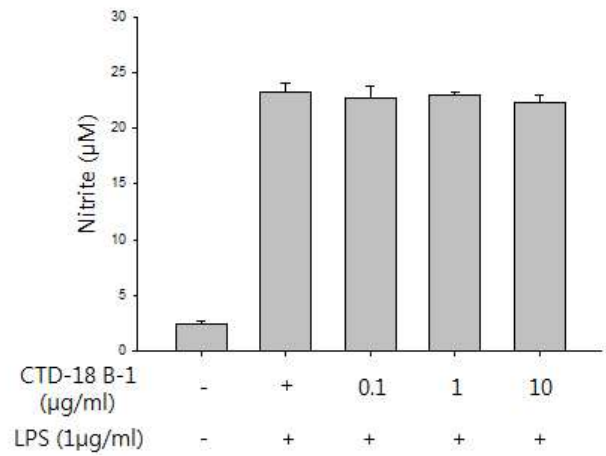
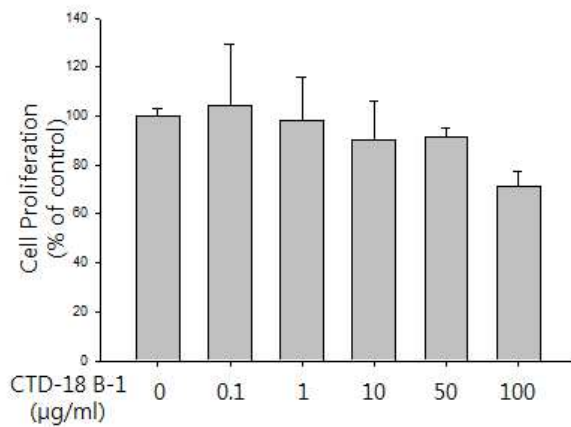
CTD-18 A-5



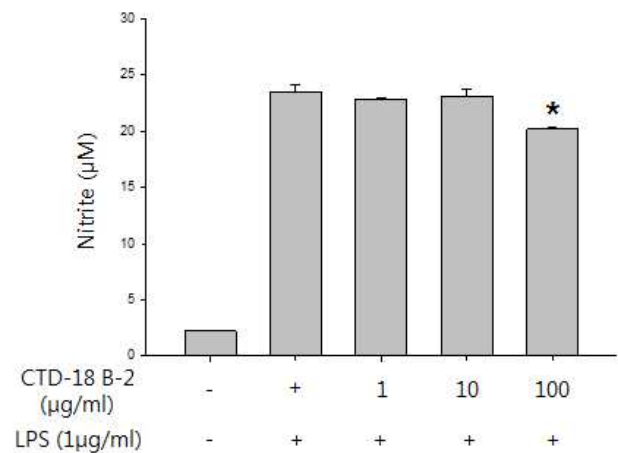
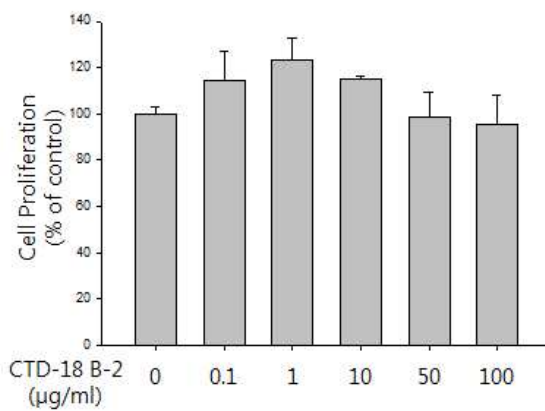
CTD-18 A-10



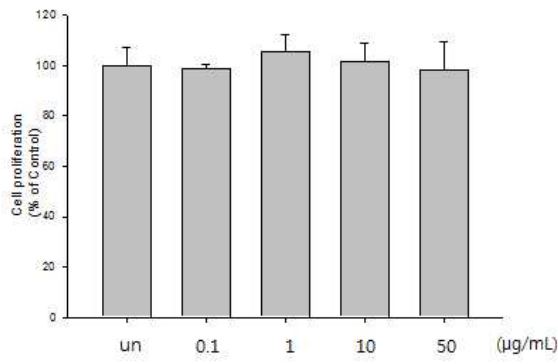
CTD-18 B-1



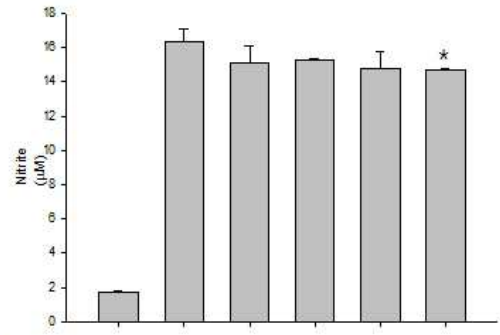
CTD-18 B-2



CTD-2 G-11



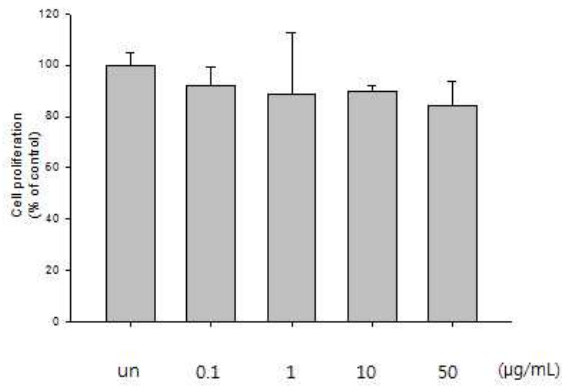
CTD-2 G-11



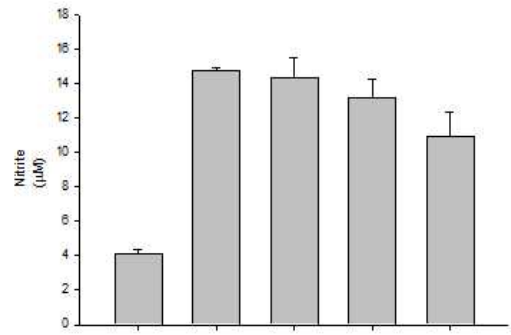
CTD-2 G-11

LPS (1µg/mL)

CTD-3 G-6



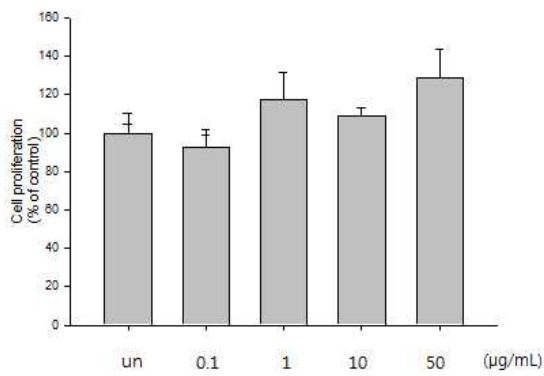
CTD-3 G-6



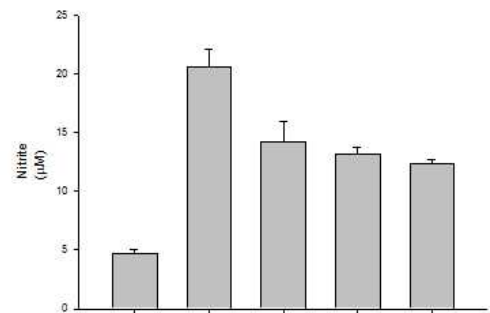
CTD-3 G-6

LPS (1µg/mL)

CTD-4 D-10



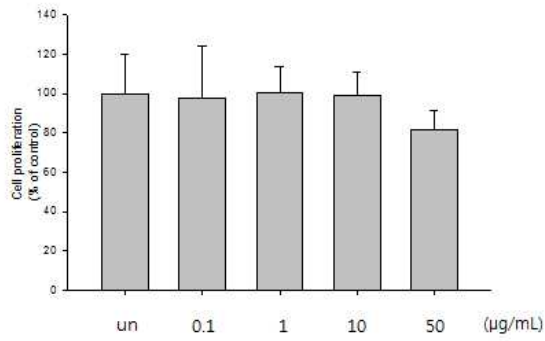
CTD-4 D-10



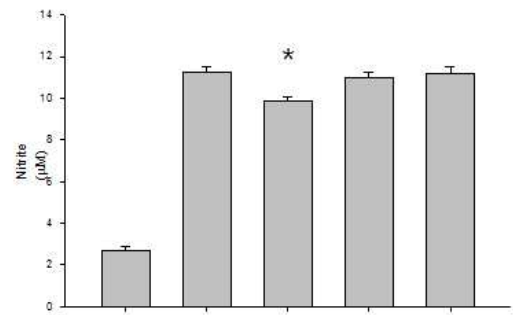
CTD-4 D-10

LPS (1µg/mL)

CTD-4 G-7

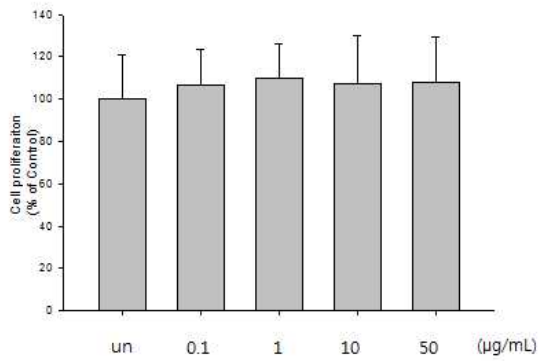


CTD-4 G-7

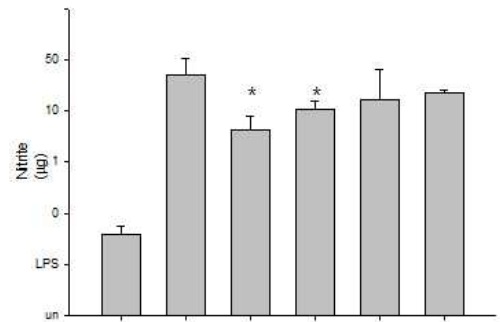


CTD-4 G-7	-	-	0.1	1	10	50 (µg/mL)
LPS (1µg/mL)	-	+	+	+	+	+

CTD-7 A-2



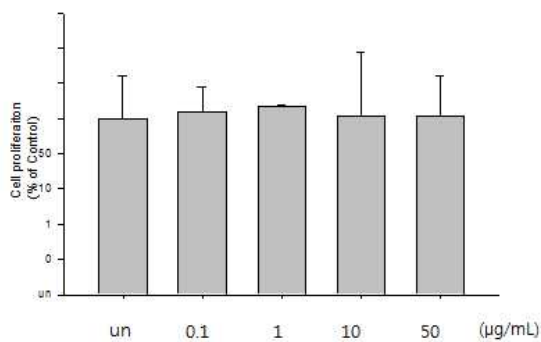
CTD-7 A-2



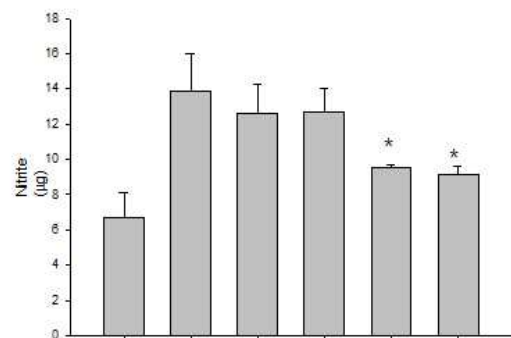
CTD-7 A-2	-	-	0.1	1	10	50 (µg/mL)
LPS (1µg/mL)	-	+	+	+	+	+



CTD-7 C-2

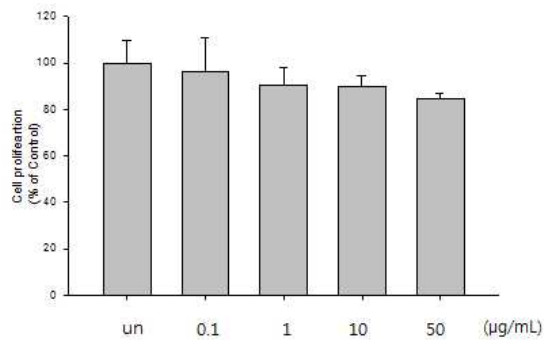


CTD-7 C-2

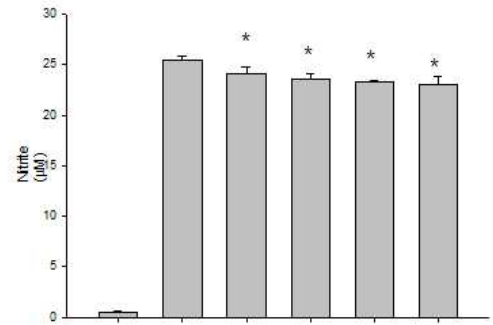


CTD-7 C-2	-	-	0.1	1	10	50 (µg/mL)
LPS (1µg/mL)	-	+	+	+	+	+

CTD-8 F-9

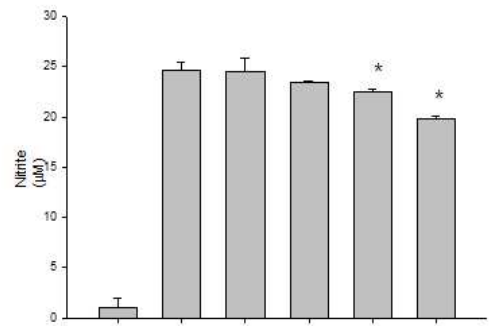
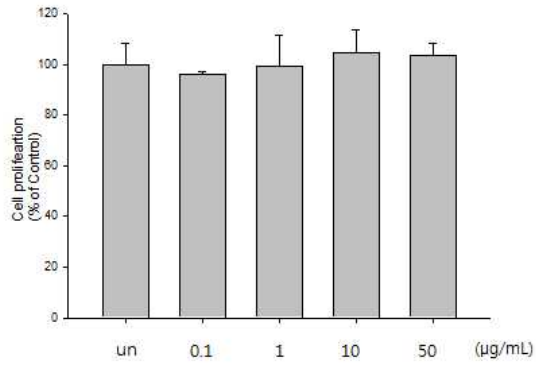


CTD-8 F-9



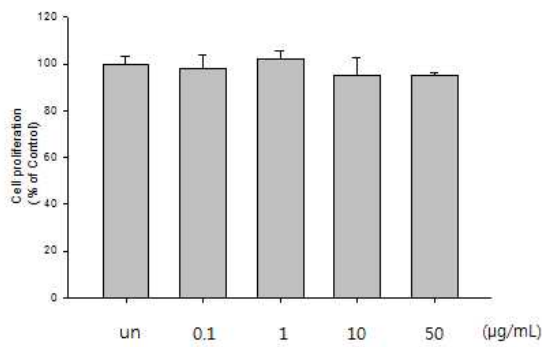
CTD-8 F-9	-	-	0.1	1	10	50 (µg/mL)
LPS (1µg/mL)	-	+	+	+	+	+

CTD-8 F-2

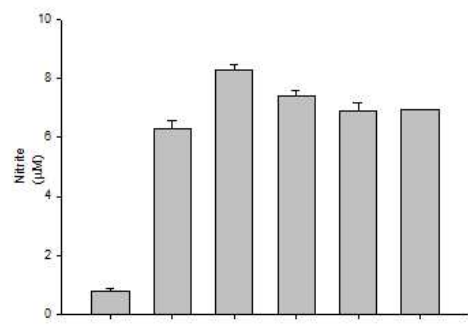


CTD-8 F-2	-	-	0.1	1	10	50 (µg/mL)
LPS (1µg/mL)	-	+	+	+	+	+

CTD-8 A-2

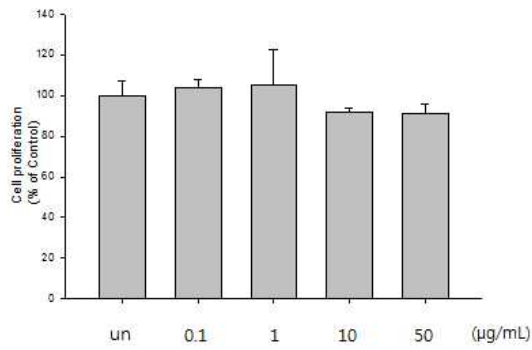


CTD-8 A-2

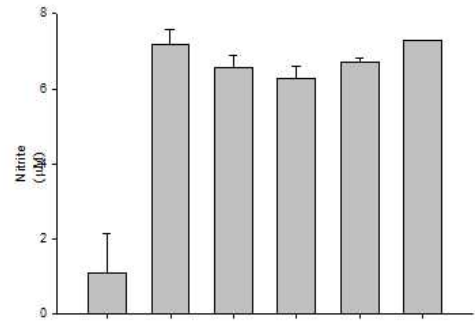


CTD-8 A-2	-	-	0.1	1	10	50 (µg/mL)
LPS (1µg/mL)	-	+	+	+	+	+

CTD-8 A-11

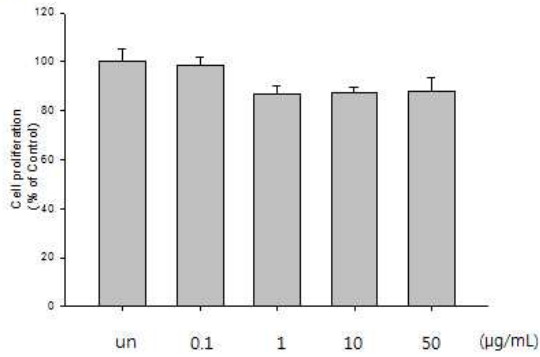


CTD-8 A-11

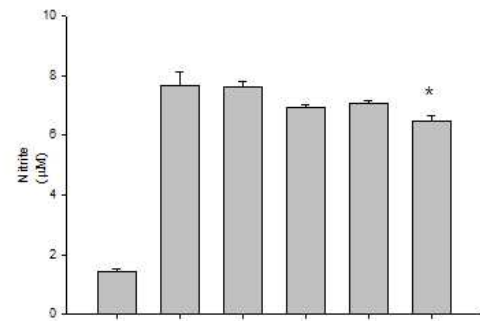


CTD-8 A-11	-	-	0.1	1	10	50
LPS (1µg/mL)	-	+	+	+	+	+

CTD-8 F-6

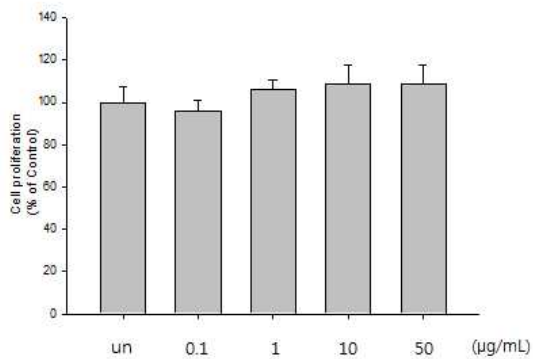


CTD-8 F-6

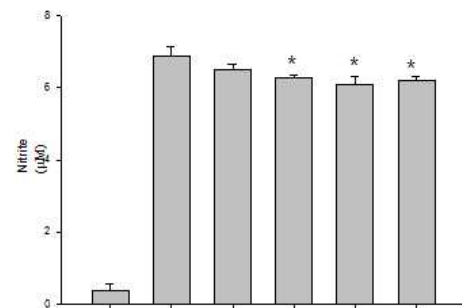


CTD-8 F-6	-	-	0.1	1	10	50
LPS (1µg/mL)	-	+	+	+	+	+

CTD-8 F-7

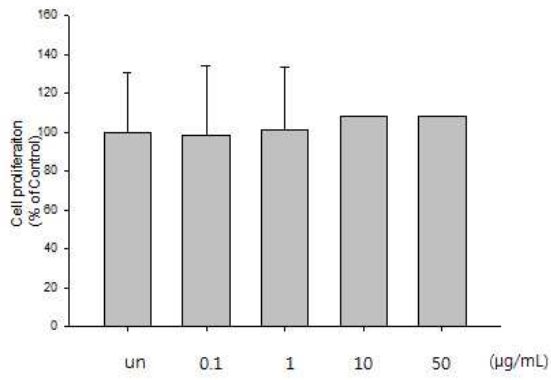


CTD-8 F-7

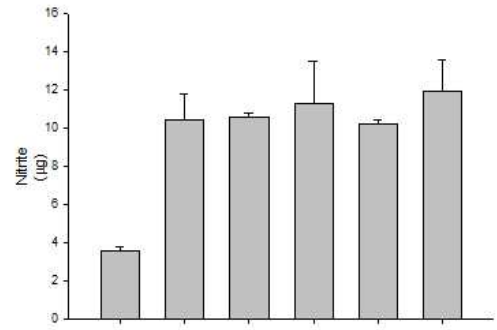


CTD-8 F-7	-	-	0.1	1	10	50
LPS (1µg/mL)	-	+	+	+	+	+

CTD-8 E-11

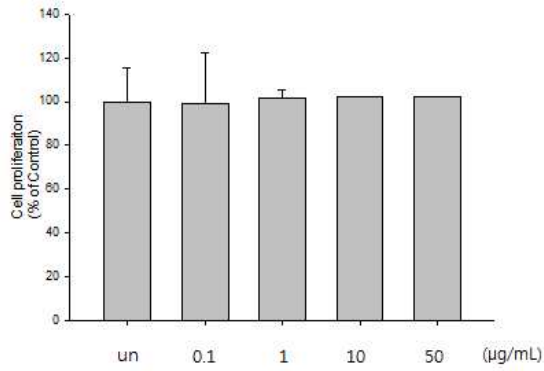


CTD-8 E-11

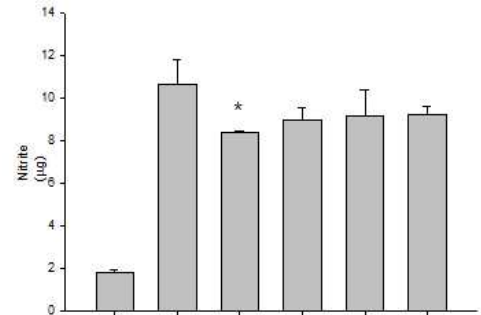


CTD-8 E-11
LPS (1µg/mL)

CTD-8 B-3

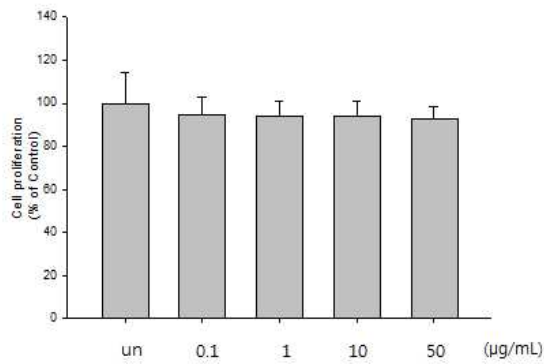


CTD-8 B-3

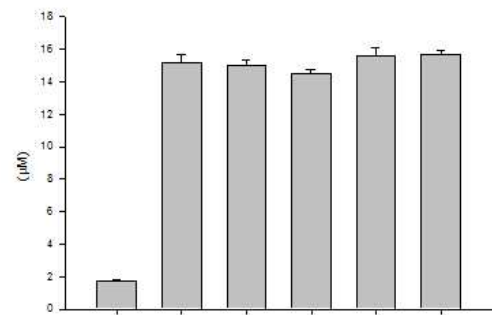


CTD-8 B-3
LPS (1µg/mL)

CTD-8 E-9

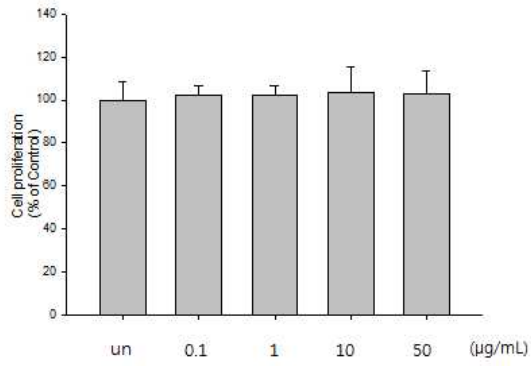


CTD-8 E-9

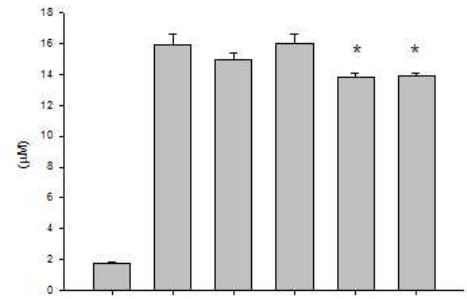


CTD-8 E-9
LPS (1µg/mL)

CTD-8 E-10

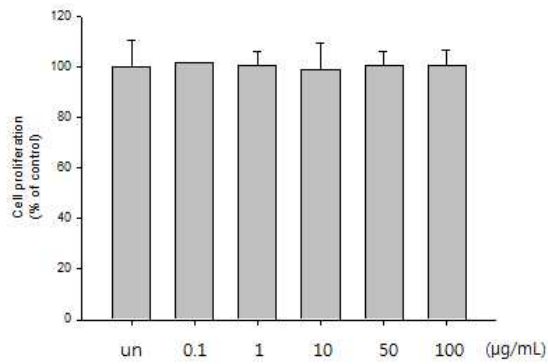


CTD-8 E-10

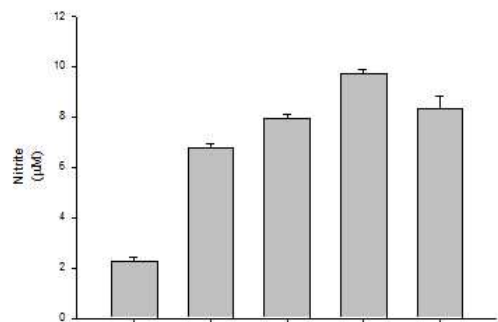


CTD-8 E-10 - - 0.1 1 10 50 (µg/mL)
LPS (1µg/mL) - + + + + +

CTD-8 F-3

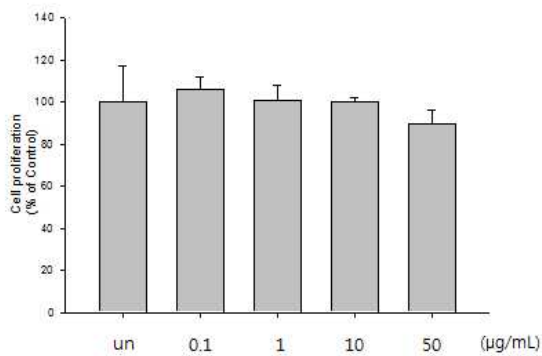


CTD-8 F-3

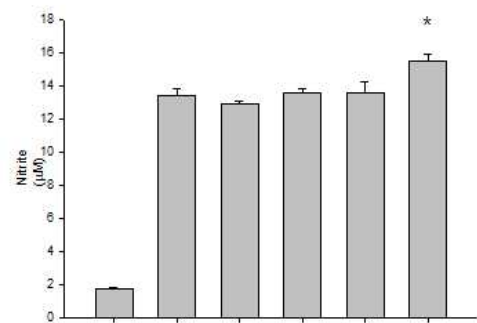


CTD-8 F-3 - - 10 50 100 (µg/mL)
LPS (1µg/mL) - + + + +

CTD-8 E-12

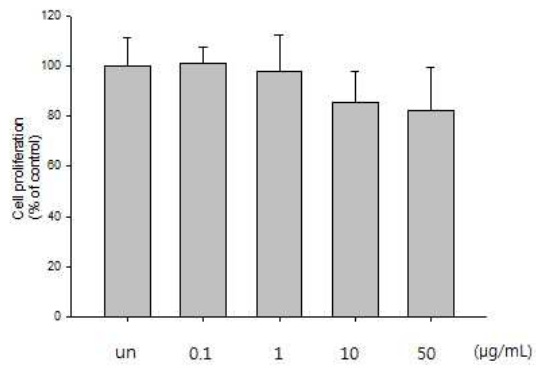


CTD-8 E-12

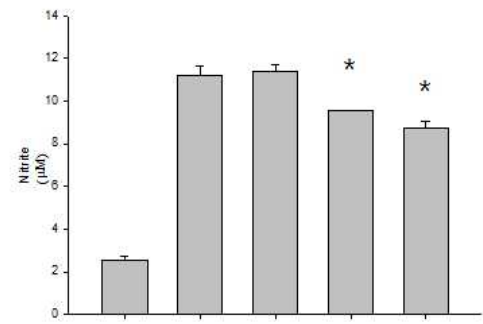


CTD-8 E-12 - - 0.1 1 10 50 (µg/mL)
LPS (1µg/mL) - + + + + +

CTD-8 H-2

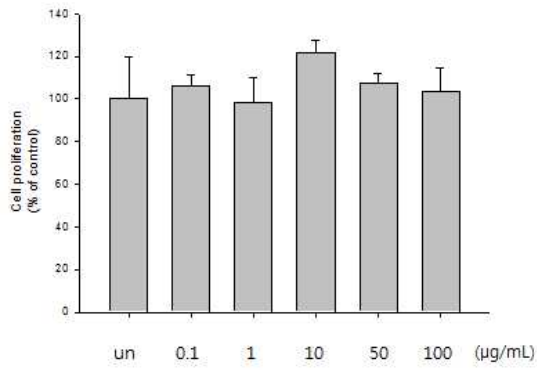


CTD-8 H-2

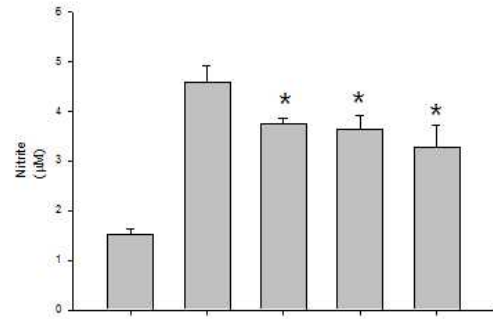


CTD-8 H-2	0	0.1	1	10	50	
(µg/mL)	-	-	0.1	1	10	50
LPS (1µg/mL)	-	+	+	+	+	+

CTD-15 A-10

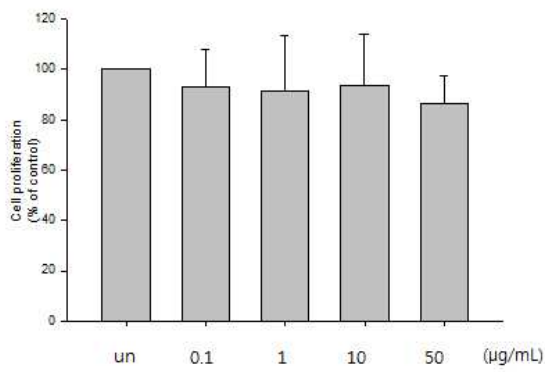


CTD-15 A-10

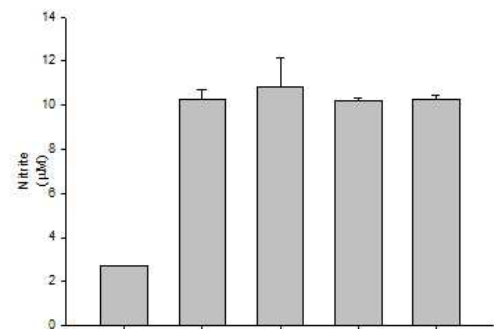


CTD-15 A-10	0	10	50	100	
(µg/mL)	-	-	10	50	100
LPS (1µg/mL)	-	+	+	+	+

CTD-15 A-6

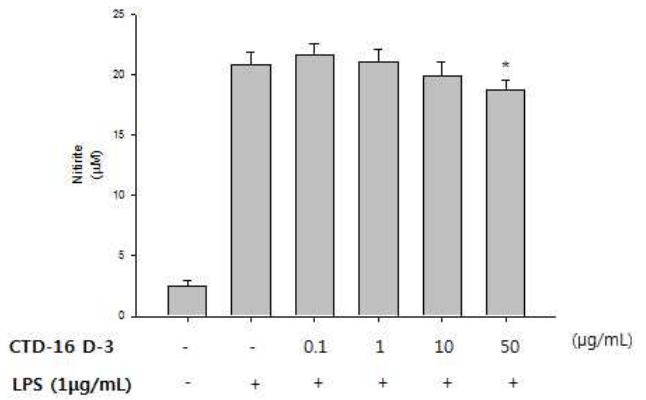
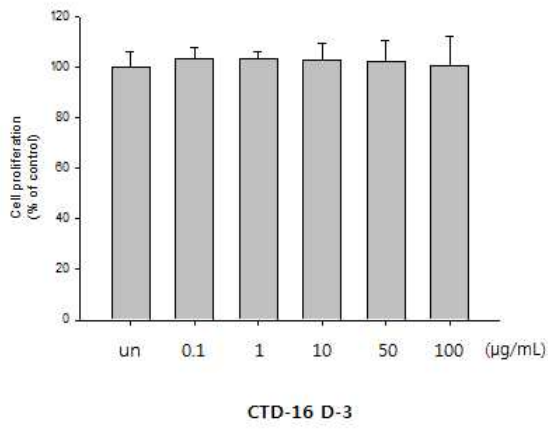


CTD-15 A-6

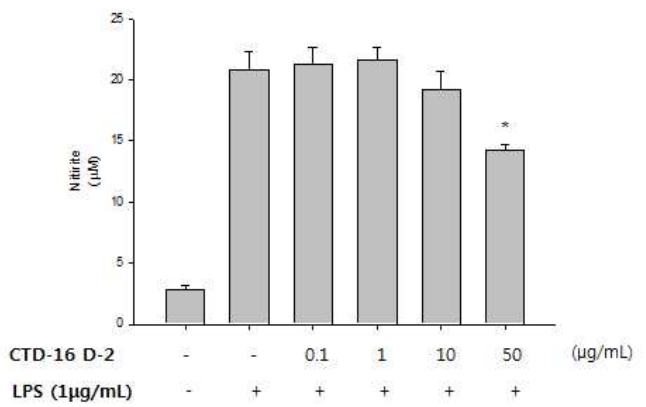
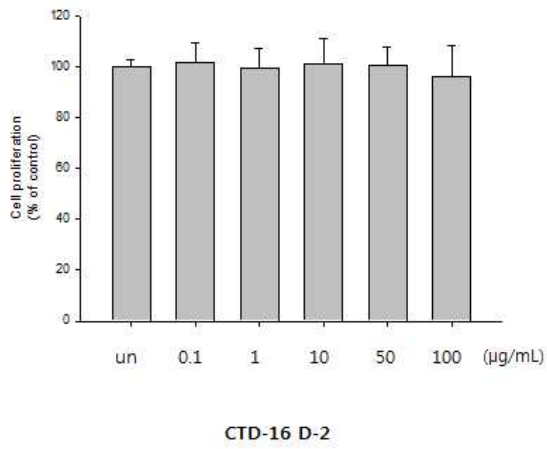


CTD-15 A-6	0	0.1	1	10	50	
(µg/mL)	-	-	0.1	1	10	50
LPS (1µg/mL)	-	+	+	+	+	+

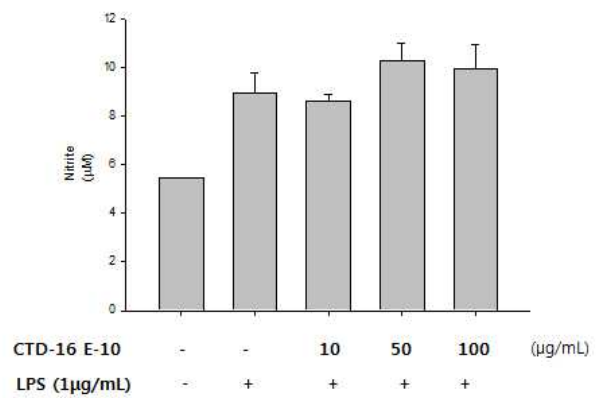
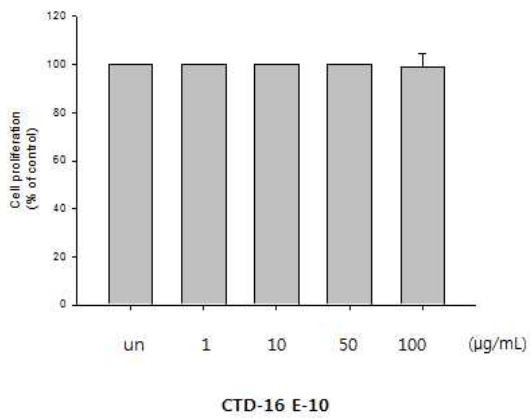
CTD-16 D-3



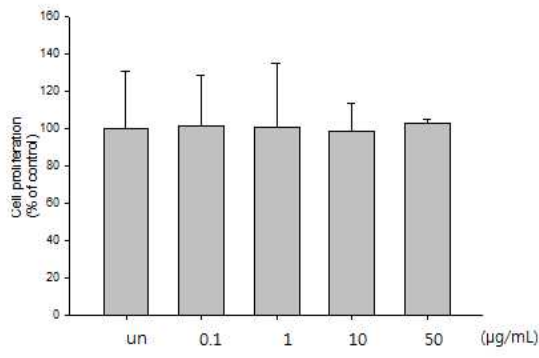
CTD-16 D-2



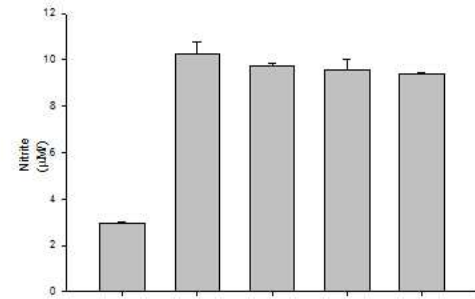
CTD-16 E-10



CTD-17 B-8

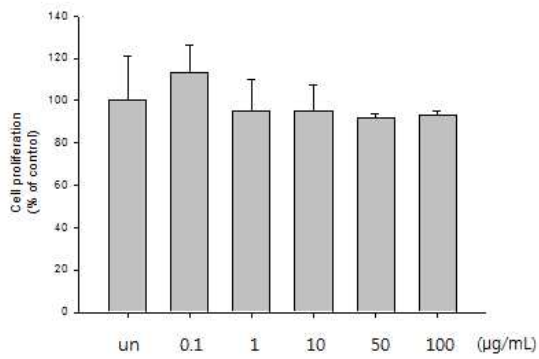


CTD-17 B-8

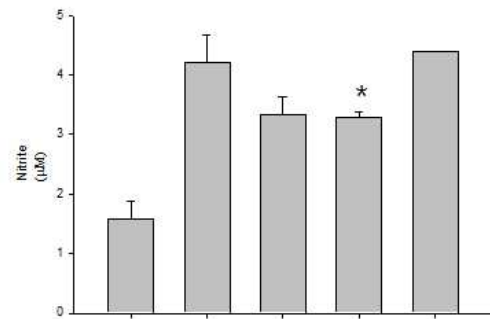


CTD-17 B-8 - - 0.1 1 10 50 (µg/mL)
LPS (1 µg/mL) - + + + + +

CTD-18 A-12

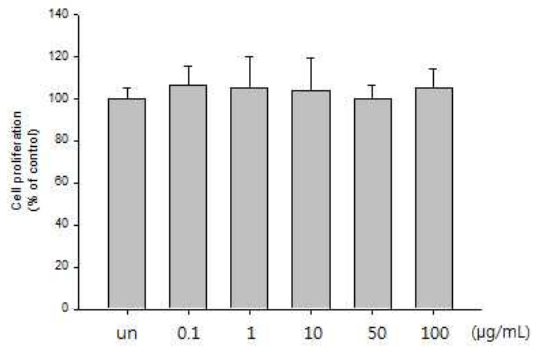


CTD-18 A-12

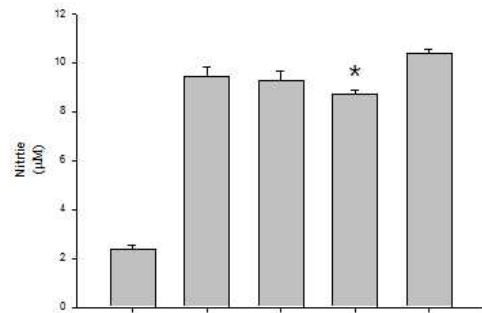


CTD-18 A-12 - - 10 50 100 (µg/mL)
LPS (1 µg/mL) - + + + +

CTD-18 B-6

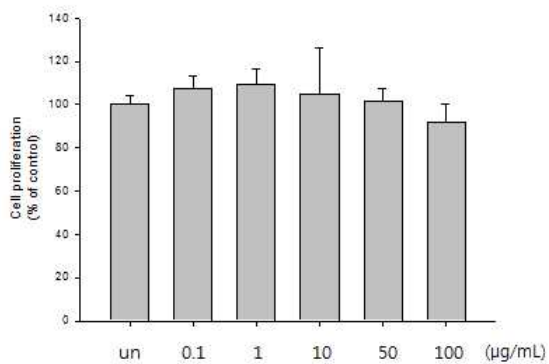


CTD-18 B-6

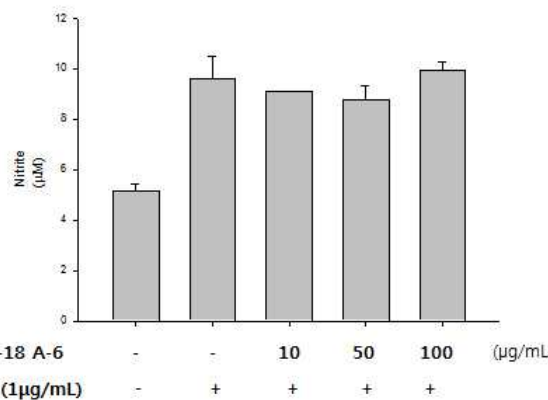


CTD-18 B-6 - - 10 50 100 (µg/mL)
LPS (1 µg/mL) - + + + +

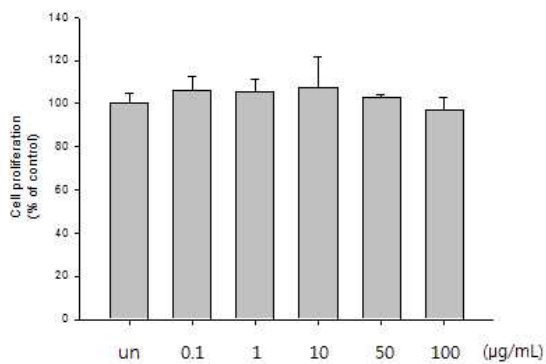
CTD-18 A-6



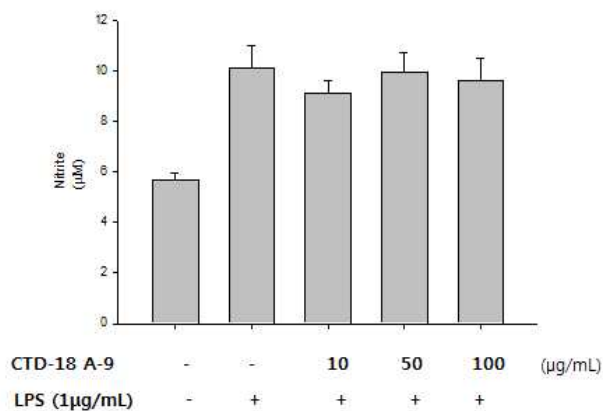
CTD-18 A-6



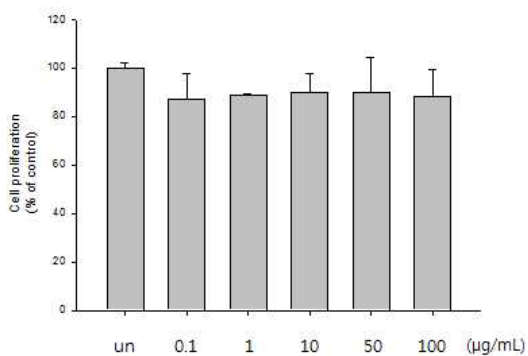
CTD-18 A-9



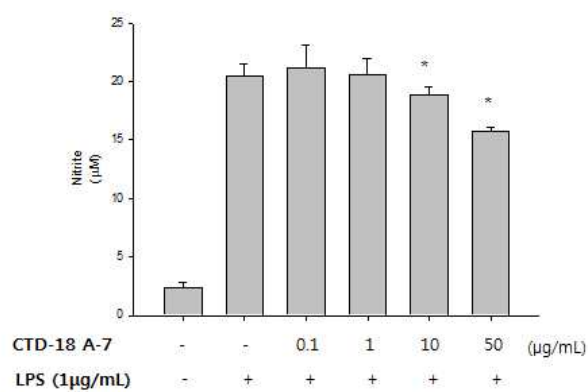
CTD-18 A-9



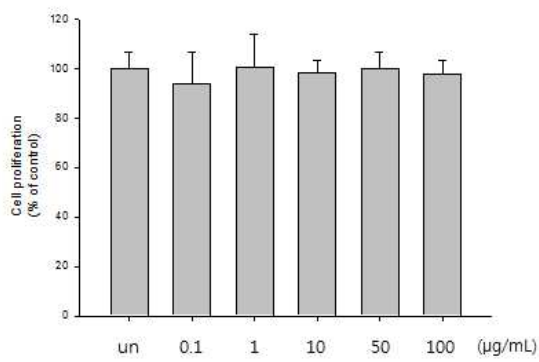
CTD-18 A-7



CTD-18 A-7



CTD-18 A-3



CTD-18 A-3

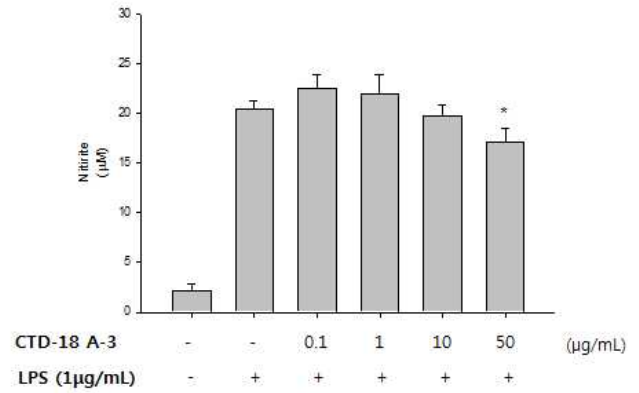


Figure 1. The Effect of lichen extracts on the Nitrite production in macrophages. Raw 264.7 cells were pre-treated with indicated concentrations of lichen extracts for 2 hrs and then incubated with LPS ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 hrs. Culture supernatants were collected and the levels of Nitrite were obtained by the Griess method. Results are the means \pm S.E. of representative of three independent experiments. Cell viabilities 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.극지생물 추출물의 면역조절 효과측정	1-1	대식세포의 기능변화 및 분비 물질생성 연구	- 대식세포에서 극지생물 유래대사체의 세포 활성화효과	100%
	1-2	대식세포의 면역조절 측정	- 면역세포 기능변화 및 분비물질 생성조절 측정	100%

KOPRI
극지연구소

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 조절함으로써 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 생물및 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 vivo의 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 장기이식 거부반응과 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 (Locarserin)과 Qsymia (Phentermine + Toiramide) 라는 2개의 새로운 식욕 억제제를 허가하였다. 에너지 소모증가 약물로서 전임상 단계에 있는 Ember 사의 Irisin 관련 펩타이드, Zafgen사의 Belorinib 과 MD Anderson 암센터에서 개발 중인 합성 펩타이드인 Adipotide, Obetat 에서 개발 중인 펩타이드인 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 체결

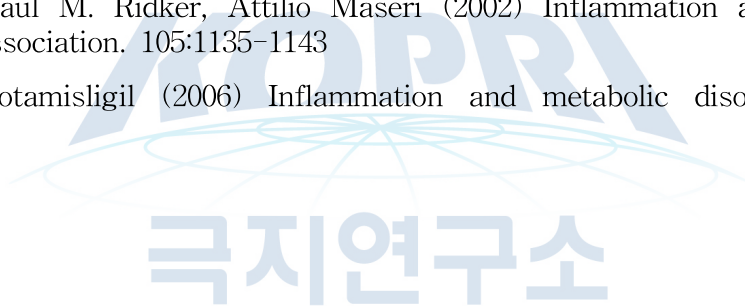
하거나, 특히 만료 제품 출시를 통해 경쟁하고 있는 실정이다
따라서 극지 생물 유래 유효성분을 이용하여 만성질환인 동맥경화 및 비만 등을 치료를 위한
개발이 필요하다고 사료된다.



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 intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison 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 *Streptococcus 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- κ 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- κ B activation in murine peritoneal macrophages. *Int Immunopharmacol.* Dec 15;7(13):1825-33.
9. Choi 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, Jürg 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 극지연구소에서 위탁연구과제로 수행한 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.