2018년도 연구보고서

접골탕의 골다공증 개선 효능 검증 및 세포 기전연구

(JGT inhibits osteoclastogenesis and healing of OVX-induced osteoporosis)

경희대학교

정혁상

Guideline center for Korean Medicine
KoM
한의표준임상진료지침 개발사업단

NIKOM
한약진흥재단

제 출 문

본 보고서를 “한의표준임상진료지침 개발사업”의 위탁연구로 수행한 “공공자원화-V.접골탕의 골다공증 개선 효능 검증 및 세포 기전연구”의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 11. 30.

연구책임자 : 정혁상
연 구 원 : 손영주
연 구 원 : 김재현
연 구 원 : 김민선
연 구 원 : 최영진
연 구 원 : 황만기

요 약 문

Ⅰ. 제 목

접골탕의 골다공증 개선 효능 검증 및 세포 기전연구

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성

연구개발의 목적

본 연구개발은 골다공증 유발의 주요 원인인 폐경기 골다공증 동물 모델에 접골탕을 투약하여, 골다공증의 억제 효능을 골밀도 변화 및 파골세포의 분화 억제능을 분석하여 접골탕의 효능을 과학적으로 검증하려 함.

연구개발의 필요성

골다공증은 2018년 한국 보건 산업 진흥원에서 “인구 고령화에 따라 수요가 늘어나고 글로벌 시장 내 꾸준한 확대가 예상되는 질환”으로 선정됨. 현재 골다공증 치료제 시장은 Bisphosphonate 제제가 85% 이상 주를 이루고 있지만, 이 제제는 위장관 부작용, 신장독성, 악골괴사등 부작용을 유발할 수 있음. 이러한 상황에서 부작용이 없고 장기간 복용할 수 있는 한의학 임상 현실에 기반한 천연물 유래 한약재의 골다공증 예방 및 치료제의 개발이 필요함.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구개발에서는 난소 적출 골다공증 모델에 접골탕을 8주간 투약하여, 골다공증으로 인해 유도되는 골 손실 억제능을 평가하며, 그 효능을 객관적으로 증명함. 또한, 골다공증의 주요 원인인 파골세포 분화 억제능을 확인하고, 그 세부 기전을 연구함으로 접골탕의 파골세포 분화억제 효능을 과학적으로 검증함.

Ⅳ. 연구개발결과

생체 실험: 쥐의 난소를 제거하여 유사 폐경기 골다공증 모델에 접골탕을 투약하여 골밀도 감소에 대한 효과를 확인하였음.

1) 접골탕은 골다공증을 유발한 쥐의 대퇴골의 골밀도를 유의하게 증가시켰음.
2) 또한 혈청 내 골 흡수 지표 (TARP)와 골 순환 지표 (ALP)을 유의하게 감소시켰음.

세포 시험: 골다공증의 주요 원인인 파골세포 (뼈를 흡수하는)의 활성 억제를 확인하였음.

1) 접골탕의 처리는 파골세포 분화를 유의하게 억제하였음.

2) 접골탕의 처리는 파골세포 분화 필수 지표인 NFATc1과 c-Fos를 유의하게 억제하였음.
3) 접골탕의 처리는 파골세포의 기능인 골 흡수와 관련한 유전자인 MMP-9과 CTK를 유의하게 억제하였음.
4) 접골탕의 처리는 파골세포 분화에 필수적인 세포 융합과 관련한 유전자인 OSACR와 ATP6v0d2의 발현을 유의하게 억제하였음.

Ⅴ. 연구개발결과의 활용계획

본 연구는 접골탕의 폐경기 골다공증 동물 모델에서의 골질을 개선하고, 파골세포의 분화 억제 효능을 증명하여 접골탕의 골다공증 치료에 대한 과학적 근거를 마련하였음. 이러한 결과는 접골탕의 골다공증에 대한 전문화된 치료기술로서의 신뢰성을 확보하여 한의의료서비스 시장 활성화에 기여할 것임. 또한 접골탕은 현재의 골다공증 예방 및 치료제의 단점인 복용법 및 부작용의 문제를 극복하여, 안전한 임상적 활용에 대한 근거를 확보할 것으로 기대됨.

SUMMARY

Ⅰ. Title of research and development

JGT inhibits osteoclastogenesis and healing of OVX-induced osteoporosis

Ⅱ. Purpose of research and development

Purpose of research

This research was conducted to evaluate the effects of JGT on ovariectomy-induced osteoporotic rats. In addition, the osteoclast inhibitory effect of JGT was studied. By combining these results, we will scientifically validate the anti-osteoporotic effect of JGT.

Necessity of research

Osteoporosis is an important health problem for the elderly. The prevalence is increasing worldwide due to aging population, and diagnosis and treatment remain challenging. Currently, various drugs are used in the clinic to treat osteoporosis such as bisphosphonates, denosumab, teriparatide and estrogen-like drugs. However, these drugs are not suitable for long-term administration because they cause serious side effects such as breast cancer and endometrial cancer. Herbal medicine has relatively few side effects and are suitable for chronic diseases requiring long-term treatment. For this reason, this study examined the effect of JGT on osteoporosis.

Ⅲ. Contents of research and development

In this study, we examined whether JGT ameliorates ovariectomy (OVX)-induced osteoporosis in rats. We also investigated the effects of JGT on osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells and demonstrated its mechanism.

Ⅳ. Results of research and development

JGT significantly inhibited bone loss in postmenopausal osteoporosis model. In addition, JGT significantly suppresses osteoclasts differentiation and inhibits the expression of osteoclastogenesis-related protein and mRNA.

Ⅴ. Utilization of research and development

This research has proved JGT as a treatment for osteoporosis. These proof is the basis for clinical use. In addition, By securing the reliability of treatment technology, it will contribute to the revitalization of treatment of Korean medicine. Overcoming the side effects of osteoporosis treatment, JGT, a natural medicines, shows the potential for osteoporosis treatment.

CONTENTS

Ⅰ. Purpose of research and development ·····1

1. Purpose of research ·····1

2. Necessity of research ·····1

Ⅱ. Contents of research and development ·····3

1. Composition of JGT (extraction method) ·····3

2. The effect of JGT on ovariectomized osteoporosis ···3

3. The effect of JGT in RANKL-induced osteoclasts ·····5

4. The effect of JGT in osteoblastogenesis ·····6

5. Statistical analysis ·····7

Ⅲ. Results of research and development ·····9

1. JGT inhibits bone loss due to osteoporosis. ·····9

2. JGT suppresses osteoclastogenesis ·····12

3. JGT did not affect of osteoblastogenesis ·····16

Ⅳ. Utilization of research and development ·····18

Performance summary ·····20

목 차

Ⅰ. 연구개발의 목적 및 필요성 ·····1
1. 연구개발의 목적 ·····1
2. 연구개발의 필요성 ·····1
Ⅱ. 연구개발의 내용 및 범위 ·····3
1. 접골탕 조성 (추출 및 검액 제조) ·····3
2. 접골탕의 폐경기 유사 골다공증 내 효과 확인 ·····3
3. 접골탕의 파골세포 분화억제 효과 확인 ·····5
4. 접골탕의 조골세포 분화 효과 확인 ·····6
5. 통계분석 ·····7
Ⅲ. 연구개발결과 ·····9
1. 폐경기 유사 골다공증 모델에 대한 접골탕의 효과 ···9
2. 파골세포 분화억제에 대한 접골탕의 효과 ·····12
3. 조골세포 분화에 대한 접골탕의 효과 ·····16
Ⅳ. 연구개발결과의 활용 계획 ·····18
사업성과 요약서 ·····20

Ⅰ. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

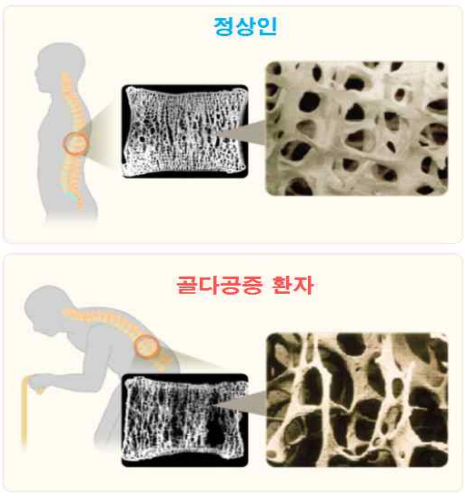
○ 접골탕의 골다공증 억제 효능검증 및 파골세포 억제 효능을 과학적으로 검증

- 접골탕 투약을 통한 폐경기성 골다공증 동물 모델의 골밀도 변화 및 혈중 골 관련 지표의 변화를 확인한다.
- 세포 내에서 파골세포 분화 억제 효과 확인을 통해, 접골탕이 골다공증 예방 치료에 적합한지 증명한다.

2. 연구개발의 필요성

○ 골다공증이란

- 골다공증은 골량의 감소와 미세구조의 이상을 특징으로 하는 전신적 골격계 질환으로 뼈가 약해져 부러지기 쉬운 상태가 되는 질환으로 정의된다 1).
- 뼈의 강도는 뼈의 양과 뼈의 질에 의해서 결정되는데, 뼈의 질에 영향을 주는 요소로는 뼈의 구조, 교체율(골의 형성과 흡수 속도), 무기질화, 미세 손상 등이 있다.
- 현재까지는 뼈의 질을 전체적으로 평가할 만한 만족스런 지표가 없기 때문에 뼈의 양을 측정하는 골밀도를 측정하여 골다공증 진단에 사용하며, 세계보건기구는 같은 성별에서 건강한 젊은 성인 평균 골밀도 수치와의 차이를 기준으로 하는 골다공증 진단 기준을 제시하고 있다.



<그림 Ⅰ.2.1>
골다공증이 유발된 뼈

○ 골다공증의 심각성

- 골다공증은 가벼운 충격에도 쉽게 골절이 일어날 수 있는 위험성을 안고 있으며, 골

1) Doherty et al, Lifetime and five-year age-specific risks of first and subsequent osteoporotic fractures in postmenopausal women. Osteoporosis Found. USA 12 (1), 16–23.

다공증으로 인해 손목, 척추, 대퇴골, 상완골절, 골반 골절이 주로 발생하며, 이러한 골절로 인해 사망에 이르기도 한다.

- 골다공증은 인구의 고령화가 진행되면서 점차 증가하는 추세로, WHO 보고서에 따르면 연도별 예상되는 65세 노인 인구는 2010년 5.2억 명에서 2050년 15억명 까지 증가할 것으로 전망된다. 2015년 통계 결과에 따르면, 전 세계는 노인 인구 비율이 2015년 8.27%에서 2050년 16.0%로 두 배 가까이 증가 될 것으로 예상된다.

<그림 Ⅰ.2.2>

골다공증 진료 인원 추이, 건강보험심사평가원

○ 골다공증의 사회적 측면

- 골다공증은 2018년 한국 보건 산업 진흥원은 인구 고령화에 따라 수요가 늘어나고 글로벌시장 내 꾸준한 확대가 예상되는 질환으로 선정되었다.
- 골다공증 치료제 시장은 Bisphosphate 제제가 85% 이상 주를 이루고 있음. Bisphosphate 제제의 다양한 성분들은 파골 세포에 의한 골 흡수를 억제하여 골량 손실을 예방하는 약제로써 골다공증이나 골절 등의 치료에 주로 사용되고 있지만, 호르몬 제제는 부작용에 대한 우려와 골 흡수 억제제의 부작용이 점점 증가하고 있으며, 이에 대한 우려 또한 높아지고 있다[2].
- Bisphosphate 제제가 치료제의 높은 비율을 차지하고 있음은 골다공증 치료제 선택에 다른 대안이 없음을 뜻하며[3], 그로 인해, 다른 치료기전을 가진 부작용이 없고 장기간 복용할 수 있는 천연물 유래 한약재의 골다공증 예방 및 치료제의 개발이 시급하다. 현재까지 한의학 임상 현실에 기반한 골다공증 치료제 개발은 미미한 실정이다. 따라서 본 연구에서 현재의 골다공증 예방 및 치료에 부작용으로 인한 현실을 고려할 때, 접골탕의 골다공증 예방 및 치료효능 탐색은 매우 중요하다.

○ 향후전망

- 접골탕의 골다공증에 치료에 대한 이해증진과 더불어 조기예방 그리고 성공적인 치료에 대한 기여를 할 것으로 기대된다.
- 가까운 장래에도 접골탕이 골다공증 시장의 주된 약제로서, 그 자리를 차지해 나갈 갈 것으로 기대된다.
- 이번 연구를 시작으로 국내 한약인 접골탕을 이용하여 부작용이 적고, 상대적으로 저비용의 새로운 골다공증 치료제로 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

---

2) Ther Adv Chronic Dis.Bisphosphonates for the treatment of osteoporosis: insights for clinicians, 2010 May; 1: 115–128.

3) The Korean Society of Bone Metabolism: Diagnosis and Treatment of osteoporosis. 2008.

Ⅱ. 연구개발의 내용 및 범위

1. 접골탕 조성 (추출 및 검액 제조)

<표 Ⅱ.1.1> 접골탕의 조성

한약명	학명	용량 (g)
當歸	Angelicae Gigantis Radix	20
川芎	Cnidii Thizoma	20
黃耆	Astragalus membranaceus	8
人蔘	Panax ginseng	8
枸杞子	Lycium chinense Miller	8
蔓蔘	Codonopsis pilosula	8
菟絲子	Cuscuta chinensis Lamark	4
續斷	Phlomis umbrosa	4
石斛	Dendrobium monile	4
補骨脂	Psoralea corylifolia L.	4
合歡皮	Albizia julibrissin Durazz	4
鹿茸	Cervi Parvum Cornu	4
합계		**96**

○ 본 연구에 사용된 접골탕의 조성은 다음과 같다.

- 접골탕 추출물은 한약물 10배의 증류수를 용매로 2시간 이상 전탕하였다. 종이 여과지에 여과를 진행한 후 감압 농축하였다. 농축액은 동결건조하여 실험 시까지 냉동 보관하였다 (수율: 33.5%). 실험 시 접골탕 추출물 (이하 JGT라 함)을 증류수에 녹여 pore size 0.22 mm 여과지를 이용해 멸균하여 사용하였다.
- 본 동물실험 경희의료원 동물실험윤리위원회 승인을 받고 진행하였다. (승인번호: KHMC-IACUC 18-016)

2. 접골탕의 폐경기 유사 골다공증 내 효과 확인

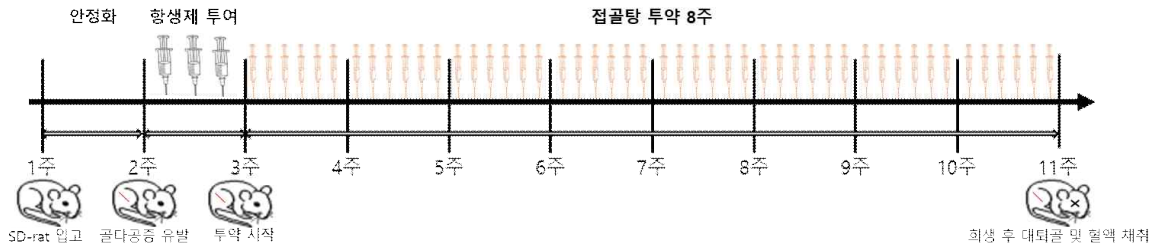
○ 난소 적출을 통한 골다공증 유발 모델 내 항 골다공증 효능 확인

- 12주령의 SD-rat 암컷의 양측 난소를 적출하여 폐경기성 골다공증을 유발하였다. 1주간의 수술회복 기간을 거친 후, 8주 동안 JGT 투약을 진행했다 [4]. 투약하는 기간 동안 매주 1회씩 무게를 측정하였다.

4) Kalu, D.N.,The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. Bone Min. 15 (3), 175–191.

- 골다공증 유발 실험을 위한 군 분류는 다음과 같다.
    - 비 난소절제 대조군 (Sham);
    - 난소 절제 군 (Ovariectomy);
    - 난소 절제 후 17β-estradiol (100 mg/kg) 투여 양성 대조군 (E_2);
    - 난소 절제 후 JGT 저농도 (536 mg/kg) 투여 군 (JGT-L);
    - 난소 절제 후 JGT 고농도 (2680 mg/kg) 투여 군 (JGT-H);

- 투약 농도는 다음과 같은 기준으로 결정되었다. 임상에서 성인 (60kg) 기준 1일 투여, 접골탕의 1첩 분량은 96g이다. 그리고 동결건조 후 접골탕의 수득율 33.5%이다. 이것을 1kg 당 투약무게로 환산하였다 (1첩*수율/무게). 계산한 결과 1kg 당 536 mg의 접골탕 추출물을 투약이 사람이 투약하는 농도였다. 이것을 저농도 기준으로 쥐의 대사가 사람보다 빠르기 때문에, 이에 5배 되는 농도를 고농도로 결정하였다.
- 투약 종료 후 희생을 진행했고, 적출한 간 무게 측정을 통해 간독성을 확인했으며, 또한 적출한 자궁 무게 측정을 통해 정상적으로 폐경이 유발되었는지 확인하였으며, 양측 대퇴골 무게를 측정하여 JGT이 대퇴골 무게에 영향을 주는지 확인하였다.



<그림 Ⅱ.2.1> 폐경기 골다공증 모델 스케줄 모식도

○ Micro-CT 촬영을 통한 대퇴골 내 골 미세구조 분석 및 유의성 확인

- 접골탕이 골밀도 감소에 미치는 영향 및 골 미세구조에 미치는 영향 또한 확인하였다.
- 적출한 대퇴골은, neutral buffered formalin (NBF)로 하루 동안 고정한 뒤, 수세 후 증류수에 보관한 상태로 Micro-CT 촬영하였다.
- 측정된 지표는 다음과 같다 [5].
    - Bone mineral density (BMD): 골밀도
    - Bone volume / total volume (BV/TV): 골밀도
    - Trabecular separation (Tb. Sp): 골소주 면적
    - Trabecular number (Tb. N): 골소주 개수

5) Genant HK et al. Advanced CT bone imaging in osteoporosis. Rheumatology 2008: iv9-16.

○ 혈청 내 골 흡수 및 골 대사 지표에 JGT이 미치는 영향 확인

- 희생시 채취한 혈청을 ELISA 분석을 통하여, JGT이 생체 내 골 대사에 미치는 영향을 확인하였다.
- 희생시 채취한 혈액은 30분간 상온에서 보관한 후, 3500rpm, 4°C에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 실험 시까지 80°C에서 보관하였다.
- 측정된 지표는 다음과 같다.
    - Alkaline Phosphatase (ALP): 골 대사 마커
    - C-terminal telopeptide of type 1 collagen (Ctx-1): 골흡수 특이마커
    - Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP): 파골세포 특이마커

3. 접골탕의 파골세포 분화억제 효과 확인

○ JGT의 파골세포 내 독성 평가

- JGT의 세포 내 독성을 파악하기 위하여, RAW 264.7 세포에 JGT을 처리하여, 1일간 처리했다. 처리 후, MTS 용액을 첨가하여, 2시간 동안 반응시켰다. 이후 ELISA reader를 이용하여 490nm에서 흡광도를 확인하였다. 세포 생존율은 아무것도 처리하지 않은 세포의 백분율로 표기하였다.

○ RAW 264.7 세포에 RANKL 처리로 파골세포 분화 모델 확립

- RAW 264.7 세포에 파골세포 유도 인자인 Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)을 처리하여, 다핵의 큰 세포로 분화함을 확인하였다 [6].

○ JGT의 파골세포 분화억제 효과 확인

- RAW 264.7 세포에 파골세포 유도 인자인 Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL)와 동시에 접골탕을 처리한 뒤 5일간 반응시켰다. 배지는 2일마다 동일한 배지로 교환하였다.
- 분화 종료 후, TRAP kit를 통하여 염색한 후, 광학현미경으로 관찰하였을 때 세포가 붉은색으로 염색되어 있고, 핵이 3개 이상으로 나타났을 경우 TRAP-positive 한 다핵세포로 판단하여 세포 개수를 통계에 이용하였다.

6) Teiji Wada et al. RANKL–RANK signaling in osteoclastogenesis and bone disease The Journal of TRENDS in Molecular Medicine 2006; 1 113-8510.

○ 접골탕의 파골세포 분화 필수 단백질 NFATc1/c-Fos에 미치는 영향 확인

- RAW 264.7 세포에 파골세포 유도 인자인 Receptor activator of nuclear factor kappa-*B* ligand (RANKL)와 동시에 JGT을 처리한 뒤, 1일간 반응시켰다.
- 반응 종료 후, RIPA buffer (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.5% Na-deoxycholate, 0.1% SDS, protease inhibitor cocktail, phosphatase inhibitor cocktail)를 처리하여, 세포를 용해하여 단백질을 추출했다.
- BCA protein assay kit로 단백질을 정량하였으며, 단백질 sample (30μg)을 10% SDS-PAGE로 분리하였다. 분리된 단백질을 Nitrocellulose membrane에 옮긴 다음 비특이 반응을 제거하기 위해 5% Skim milk가 함유된 TBST (TBS + 0.05% Tween 20)로 실온에서 1시간 동안 Blocking 한 후 1차 항체를 blocking buffer에 1:1000으로 희석된 항체를 넣고 overnight 시켰다. 반응 후 TBST로 5분 간격으로 3번 동안 세척한 뒤 1:10000으로 희석 한 2차 항체를 넣고 상온에서 1시간 동안 반응했다. TBST로 10분 간격으로 3번 세척 한 후 enhanced chemiluminescence (ECL) kit로 발색시켜 단백질의 발현 정도를 확인하였다.

○ 접골탕의 파골세포 분화 관련 유전자 발현에 미치는 영향 확인

- RAW 264.7 세포에 파골세포 유도 인자인 Receptor activator of nuclear factor kappa-*B* ligand (RANKL)와 동시에 JGT을 처리한 뒤, 4일간 반응시켰다. 배지는 2일에 동일한 배지로 교환하였다.
- 반응 종료 후, TRIzol을 처리하여, 세포를 용해하여 RNA를 추출했다. RNA는 nanodrop을 통해 정량하였으며, RNA (2 ng)을 reverse transcript하여, cDNA로 합성하였다.
- 합성된 cDNA는 중합효소 연쇄 반응 (Polymerase Chain Reaction)을 통해 증폭되었다. 본 실험에 사용된 primer의 sequence는 다음과 같다.

<표 Ⅱ.3.1> primer sequence

Genes	sequence	온도	cycle
TRAP	F: act tcc cca gcc ctt act acc g R: tca gca cat agc cca cac cg	58	30
CTK	F: agg cgg cta tat gac cac tg R: ccg agc caa gag agc ata tc	58	28
MMP-9	F: cga ctt ttg tgg tct tcc cc R: tga agg ttt gga atc gac cc	58	33
OSCAR	F: ctg ctg gta acg gat cag ctc ccc aga R: cca agg agc cag aac ctt cga aac t	53	40
ATP6v0d2	F: atg ggg cct tgc aaa aga aat ctg R: cga cag cgt caa aca aag gct tgt a	58	33
GAPDH	F: act ttg tca agc tca ttt cc R: tgc agc gaa ctt tat tga tg	58	30

4. 접골탕의 조골세포 분화 효과 확인

○ JGT의 조골세포 내 독성 평가

- JGT의 세포 내 독성을 파악하기 위하여, MC3T3-E1 세포에 JGT을 처리하여, 3일간 처리했다. 처리 후, MTS 용액을 첨가하여, 2시간 동안 반응시켰다. 이후 ELISA reader를 이용하여 490nm에서 흡광도를 확인하였다. 세포 생존율은 아무것도 처리하지 않은 세포의 백분율로 표기하였다.

○ MC3T3-E1 세포에 ascrobic acid와 β-glycerophosphate 처리로 조골세포 분화 모델 확립

- MC3T3-E1 세포에 조골세포 유도 인자인 ascrobic acid와 β-glycerophosphate 처리하여, 조골세포 분화함을 확인하였다.

○ JGT의 조골세포 분화 촉진 확인

- MC3T3-E1 세포에 조골세포 유도 인자인 ascrobic acid와 β-glycerophosphate 처리하고, 동시에 접골탕을 처리한 뒤 21일간 반응시켰다. 배지는 2일마다 동일한 배지로 교환하였다.
- 분화 종료 후, Alizarin S 염색을 통해 조골세포가 형성한 칼슘의 침착 정도를 파악했으며, 카메라를 통해 영상화하였다.

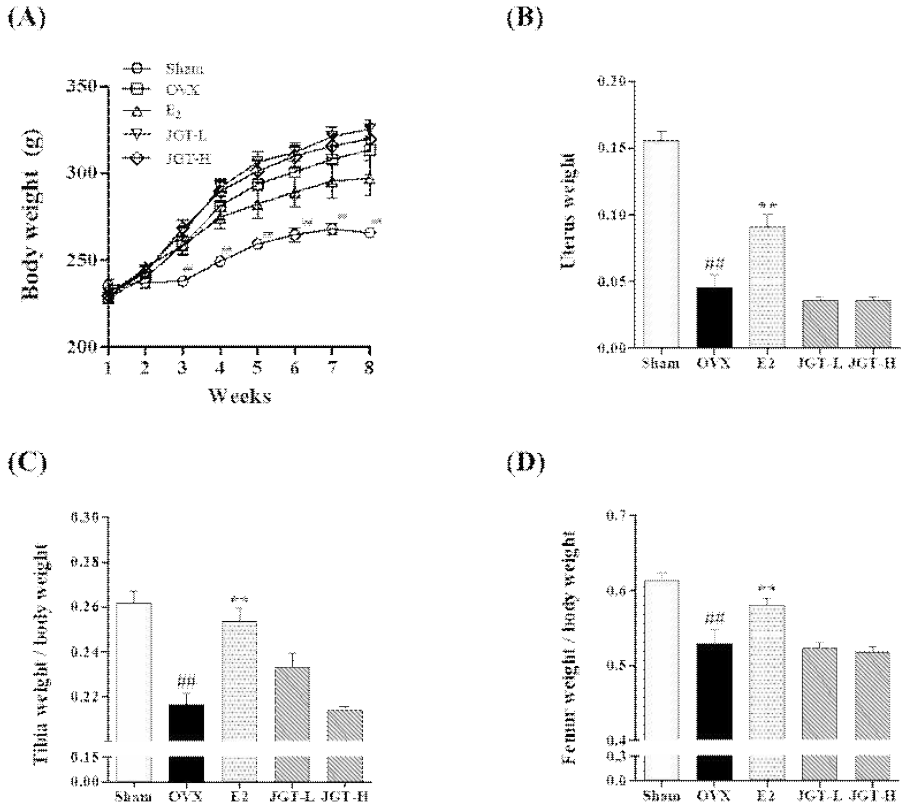
5. 통계분석

- 각 실험군의 결과는 GraphPad prism을 이용하여 평균 ±SEM으로 표시하였다. 결과에 대한 유의성 검증은 One-way ANOVA t-test를 이용하여, $p < 0.05$ 및 $p < 0.01$일 때 유의성이 있다고 판정하였다. 이후 Dunnett 검정법을 통해 사후 검증하였다.

Ⅲ. 연구개발결과

1. 폐경기 유사 골다공증 모델에 대한 접골탕의 효과

○ 접골탕이 폐경기 골다공증 모델에 미치는 무게 변화



<그림 Ⅲ.1.1> 몸무게 및 장기 무게 변화

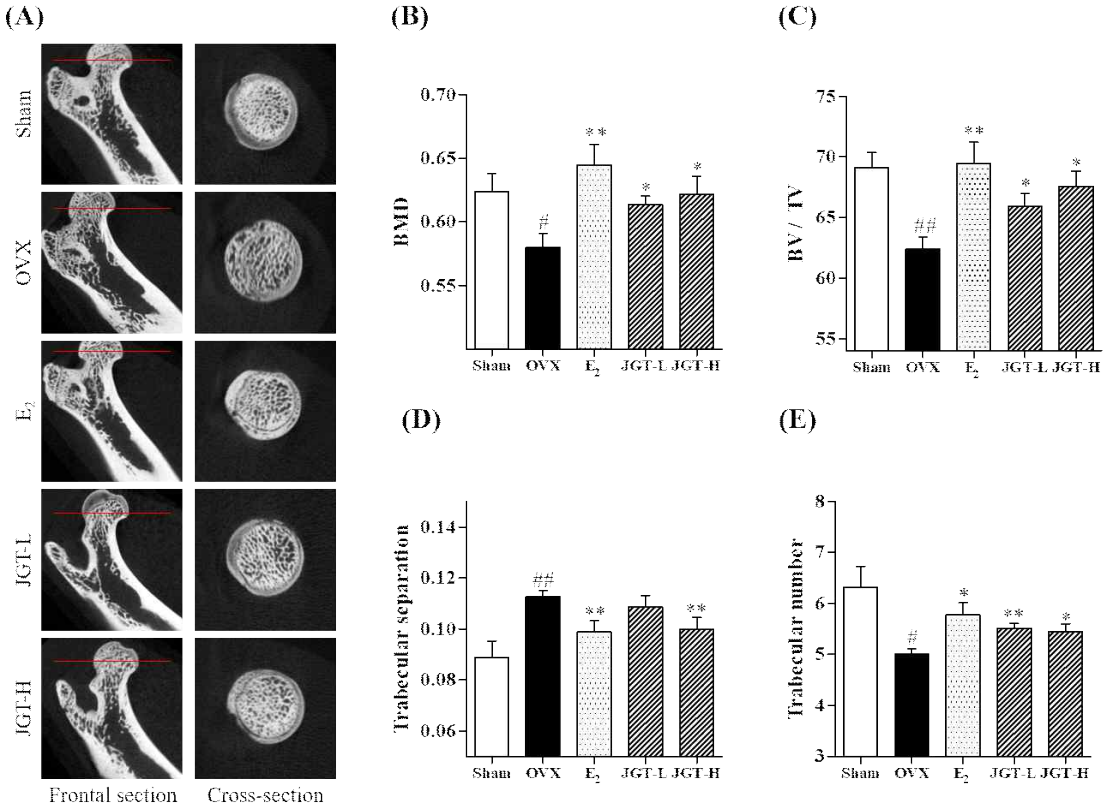
- Effect of JGT on the OVX-induced osteoporosis rat-model. (A) Weekly body weight of OVX-induced SD-rats, (B) Uterus weight, (C) Tibia weight, (D) Femur weight. Columns and error bars represent the mean ± S.E of eight independent experiments. ##p<0.01 compared with the sham and **p<0.01 compared with OVX.

- 난소 적출 후 골다공증이 유발되면, 에스트로겐의 결핍으로 인해 몸무게는 증가하고, 자궁 무게는 감소한다. 본 연구는 정상군과 비교하여 유발군이 몸무게가 증가하고, 자궁 무게가 증가한 것으로 보아, 정상적으로 골다공증이 유발되었음을 의미한다. JGT은 몸무게와 자궁무게 변화에 영향을 주지 않았다. 이는, 접골탕이 에스트로겐과 유사한 호르몬 관련 효과를 보이지 않았다는 것을 증명하였다.

- 또한 골다공증이 유발되면, 몸무게 대비 경골 및 대퇴골의 무게가 감소하게 되는데,

본 연구는 정상군과 비교하여 유발군의 경골 및 대퇴골의 무게가 감소함으로, 정상적으로 골다공증이 유발됨을 알 수 있었다. JGT은 경골 및 대퇴골의 무게 변화에는 영향을 주지 않았다.

○ 접골탕의 폐경기 골다공증 모델 대퇴골 내 골밀도에 미치는 영향



<그림 Ⅲ.1.2> 대퇴골 내 골밀도 변화

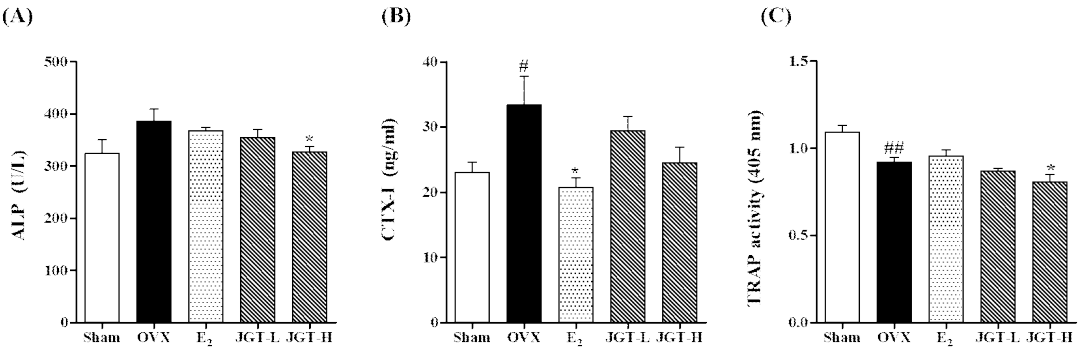
- (A) Effects of JGT on bone destruction in OVX model. JGT was administrated 8 weeks and the femurs were imaged micro-CT. (B) The bone mineral density (BMD) was determined using the micro-CT data and CT analyser software. (C) bone volume / total volume (BV/TV) was determined using the micro-CT data and CT analyser software. (D) Trabecular separation (Tb. Sp) was determined using the micro-CT data and CT analyser software. (E) Trabecular number (Tb. N) was determined using the micro-CT data and CT analyser software. Columns and error bars represent the mean ± S.E of eight independent experiments. #<0.05, ##p<0.01 compared with the sham and *p<0.05, **p<0.01 compared with OVX.

- 골다공증이 유발되면, 골밀도가 감소한다. 본 실험에서 난소 적출 후 8주 동안 JGT을 투약 후 희생하였다. 적출한 대퇴골을 micro-CT를 이용하여 촬영 후 분석하였다.

난소를 적출한 유발군은 정상군에 비하여 골밀도는 감소하였다. 또한 골질에 중요한 역할을 하는 골소주의 면적은 증가하였으며, 골소주의 개수는 감소하였다.

- JGT은 이 모든 지표의 변화 유의하게 억제하였다. micro-CT 촬영사진을 확인하면, JGT의 대퇴골두의 골량을 상승시켰다. 또한 미세구조를 분석한 결과 BMD 및 BV/TV의 감소를 유의하게 억제하였다.
- JGT은 골소주의 변화에도 유의한 효과를 보였다. 골량이 감소하면, 골소주의 면적이 증가하며, 개수는 감소한다. 이는 골질을 낮추며 골다공증으로 진행됨을 의미한다. JGT은 골소주의 밀도 감소를 억제하여, 면적의 증가 및 개수의 감소를 억제하였다.
- 이는 JGT은 골밀도를 감소를 억제시킴과 동시에, 골소주의 변화 또한 억제하여, 전반적인 골질을 상승시켜줌을 보여준다.

○ 접골탕의 폐경기 골다공증 모델 혈액 내 골 관련 지표 변화



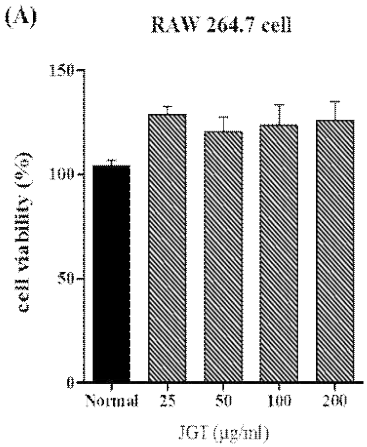
<그림 Ⅲ.1.3> 혈청 내 골 관련 지표 변화

- (A) The effects of JGT on level of ALP (B) Ctx (C) TRAP activity in serum. Columns and error bars represent the mean ± S.E of eight independent experiments. #<0.05, ##p<0.01 compared with the sham and *p<0.05 compared with OVX.

- ALP는 골대사 마커로써, 골의 순환이 증가하면 그 결과로 증가하게 된다. 난소 적출 후 골다공증이 유발되어 골 순환이 정상군에 비하여 많아져, 유발군에서 정상군에 비해 ALP가 증가하며, JGT 고농도 군에서 유의하게 감소함을 확인하였다.
- Ctx는 골 흡수와 관련한 마커로 난소 적출 후 증가하며, JGT은 이를 억제하는 경향을 보였지만, 그 차이가 유의하지는 않았다.
- TRAP은 파골세포 특이마커로, TRAP 활성은 파골세포의 활성을 의미한다. JGT은 유발군에 비해 고농도 군에서 유의하게 감소하였다.
- 이는 JGT이 난소 적출 골다공증으로 인한 혈청 내 골지표 변화를 유의하게 보완해 줌을 나타낸다.

2. 파골세포 분화억제에 대한 접골탕의 효과

○ 접골탕이 파골세포 전구세포 독성에 미치는 영향

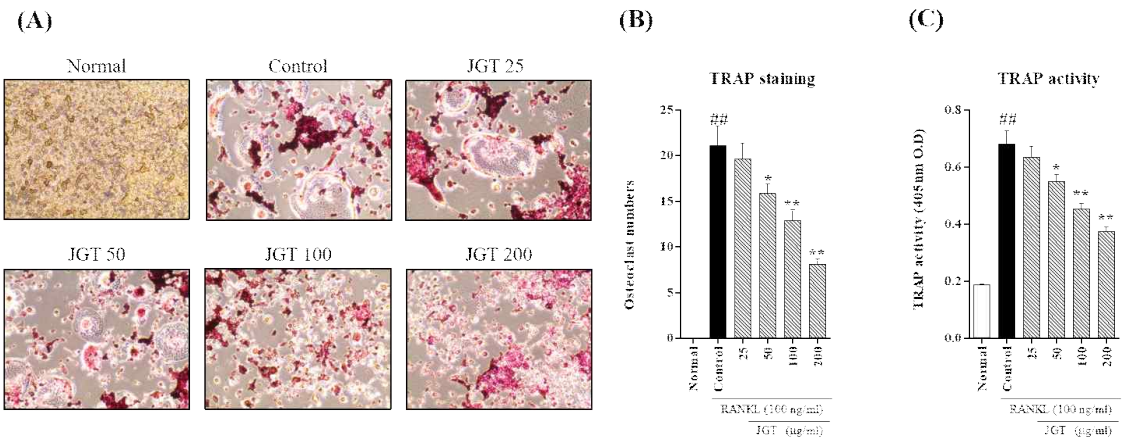


<그림 Ⅲ.2.1> RAW 264. 7 세포 생존율

- (A) The effect of JGT on cell viability in RAW 264.7 cells. Cell viability was measured by MTS assay. Cells were treated with various concentrations of JGT (25, 50, 100, 200 μg/mL) for 24 hours and then the cells were treated with MTS solution 20 μl. After 2 hours optical density was measured at 490 nm with an ELISA reader. Data represent the mean ± SE of three independent experiments.

- JGT 은 200 ug/ml 농도까지 RAW 264.7 세포 독성을 나타내지 않았다.

○ 접골탕이 파골세포 분화에 미치는 영향



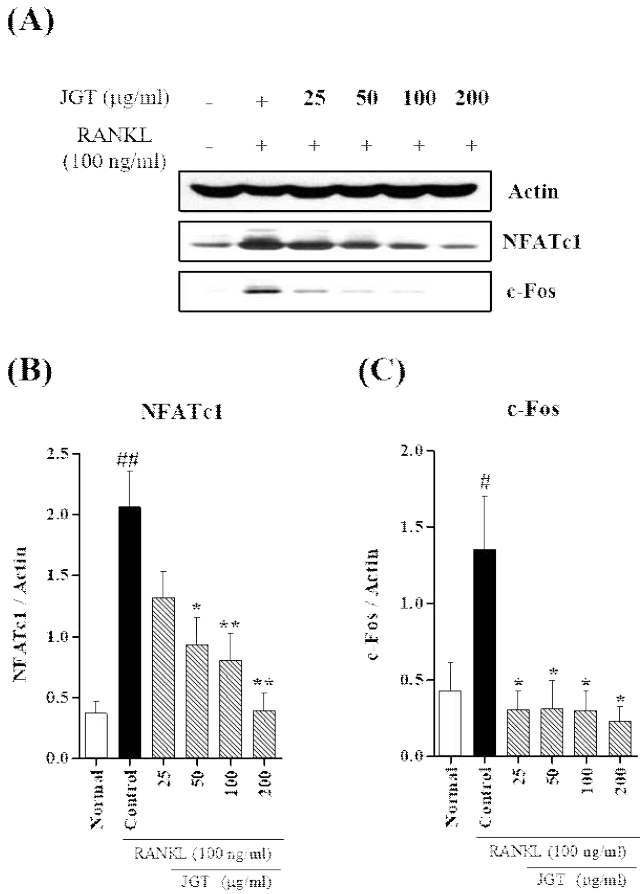
<그림 Ⅲ.2.2> 파골세포 분화 억제 효과 검증

- The effect of JGT on RANKL-induced osteoclast formation in RAW 264.7 cells. (A) TRAP-positive cells were stained with TRAP staining kit, and captured using

inverted microscope (x100). (B) TRAP-positive cells containing more than three nucleus were counted as osteoclasts. (C) TRAP activity were analyzed with ELISA reader (optical density, 405 nm). Data represent the mean ± SEM of three independent experiments. ##p<0.01 compared with the sham and *p<0.05, **p<0.01 compared with OVX.

- TRAP은 파골세포에서 특이적으로 발현하는 지표로써[7], 파골세포 분화를 검출하기 위해 사용한다. TRAP 염색 후 세포를 확인하였을 때, 붉은색의 다핵인 큰 세포가 파골세포이다.
- JGT의 처리는 붉은 다핵세포를 감소시켰으며, 그 수를 측정해 본 결과, 유발군에 비해 유의하게 파골세포 수가 감소함을 확인하였다. 또한 파골세포의 활성 측정에서도 유의한 억제효과를 나타내었다.

○ 접골탕이 파골세포 분화 필수 지표에 미치는 영향



<그림 Ⅲ.2.3> 파골세포 분화 필수 지표 발현 억제 검증

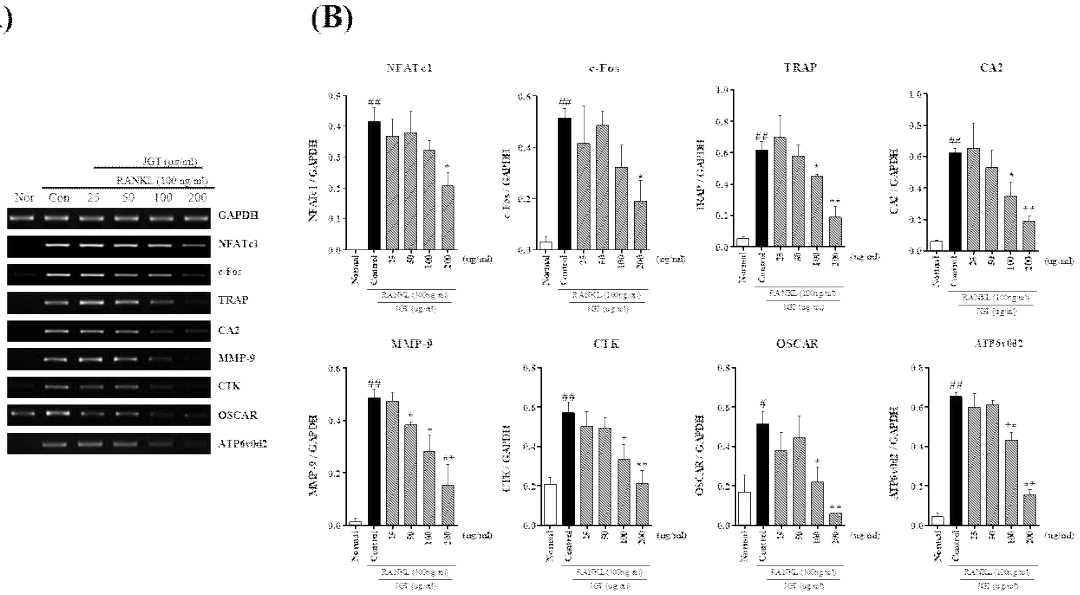
- Effect of JGT on NFATc1 and c-Fos protein expression. (A) RAW 264.7 cells were

7) HAYMAN AR et al . Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. Autoimmunity 2008; 3: 218-223.

co-cultured with RANKL (100 ng/ml) and the varing concentration of JGT. The protein level of NFATc1 (B), c-Fos (C) which were normalized to actin. The NFATc1 were measured using Image J. software. Values are expressed as means ± SE of triplicate experiments. #p<0.05, ##p<0.01 versus untreated cells. *p<0.05 and **p<0.01 versus control group.

- JGT 처리는 RANKL로 유도된 NFATc1[8] 및 c-Fos[9]의 발현을 억제시켰다.
- RANKL의 자극은 파골세포 내 다양한 지표를 발현시키는데, 이중 파골세포 분화에 가장 핵심적인 역할을 하는 지표는 NFATc1과 c-Fos이다.
- 이 전의 연구들에서, 이 두 지표의 유전자를 제거한 쥐는 파골세포를 아예 생성하지 못함이 확인되었다.
- JGT은 이 두 지표의 발현을 아주 강하게 억제함을 확인하였으며, 앞선 그림에서 파골세포의 억제는 NFATc1와 c-Fos의 발현 억제를 통함을 알 수 있다.

○ 접골탕이 파골세포 분화 관련 유전자 발현에 미치는 영향



<그림 Ⅲ.2.4> 파골세포 분화 관련 유전자 검증

- Effect of JGT on the mRNA expression of osteoclastogenesis marker genes by RANKL. (A) The mRNA expressions were detected by RT-PCR. (B) osteoclastogenesis genes were normalized to GAPDH. Columns and error bars represent the mean ± S.E of three independent experiments. ##p<0.01, #p<0.05 compared with normal and **p<0.01, *p<0.05 compared with the control.

8) Zhao Q, Wang X, Liu Y, He A and Jia R: NFATc1: functions in osteoclasts. Int J Biochem Cell Biol 42: 576-579, 2010.
9) Grigoriadis AE, et al, c-Fos: a key regulator of osteoclast- macrophage lineage determination and bone remodeling. Science 266: 443-448, 1994.

- JGT 처리는 RANKL로 유도된 NFATc1, c-Fos, TRAP, MMP-9, CTK, ATP6v0d2 그리고 OSCAR의 발현을 억제 시켰다.
- western blot 결과와 동일하게 NFATc1과 c-Fos의 발현은 유전자 수준에서도 감소함을 확인하였다.

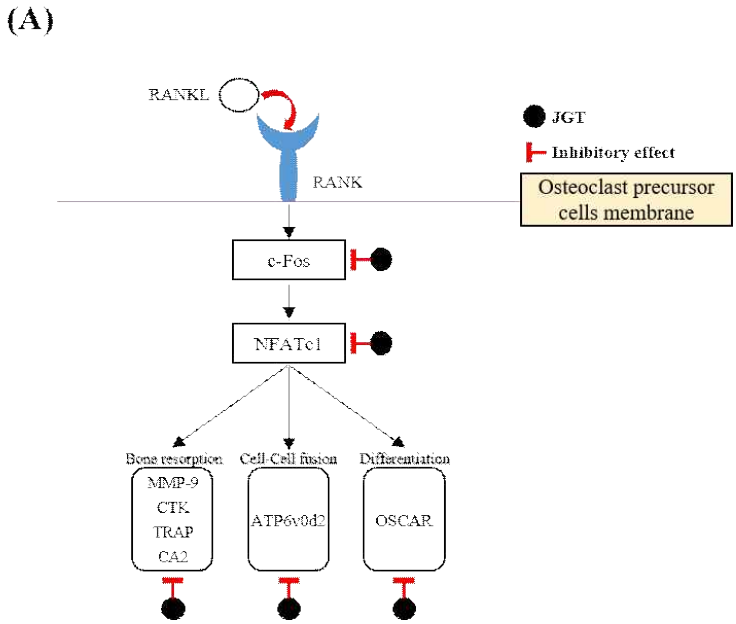
- RANKL의 자극은 파골세포 내 다양한 지표를 발현시킨다. TRAP은 앞서 말했듯이 파골세포 특이 마커로 TRAP 염색 및 활성과 동일하게 유전자의 발현 또한 JGT이 유의하게 억제하였다.
- cathepsin K (CTK)는 파골세포가 골을 흡수하기 위해 발현하는 많은 enzyme중 하나이며, CTK가 억제되면, 파골세포가 분화가 일어나더라도, 골을 흡수할 수 없다 [10].
- Carbonic anhydrase II는 c-Fos 발현을 통해 제어되며, 골 표면을 산성화 시켜, 골 흡수 효소들이 정상적인 역할을 할 수 있도록 돕는다[11].
- 또한 Matrix metallopeptidase 9 (MMP-9)도 골을 흡수하기 위해 필수적으로 발현되어야 하는 유전자이다. JGT은 이 두 유전자를 유의하게 억제하였고, 이는 파골세포의 분화 및 그 기능 중 하나인 골 흡수 또한 억제한다는 것을 알 수 있다[12].

- Osteoclast-associated immunoglobulin-like receptor (OSCAR) [13]와 ATPase H+ Transporting V0 Subunit D2 (ATP6v0d2)는 파골세포가 분화할 때 영향을 주며, 세포 사이의 융합과 관련한 지표로 [14], 이 또한 JGT 처리를 통하여 감소함을 확인하였다.

- 세포 실험을 종합하여 볼 때, JGT은 파골세포 분화를 억제하는데, 이는 NFATc1과 c-Fos의 발현을 억제함을 통함이 확인되었다. 또한 파골세포의 기능에 중요한 역할을하는 CTK, CA2 및 MMP-9의 발현을 억제하여, 파골세포가 제 역할을 할 수 없도록 만들었으며, 파골세포 분화시 필요한 융합단계에서의 유전자 발현인 OSCAR와 ATP6v0d2의 발현 또한 억제하였다. 이는 JGT이 파골세포 분화를 다양한 방면으로 억제하고 있으며, 골다공증의 주요 원인인 비정상적인 파골세포의 분화를 치료하기 위한 효과적인 약제가 될 수 있음을 의미한다.

10) Fujisaki K, et al,: Receptor activator of NF-kappaB ligand induces the expression of carbonic anhydrase II, cathepsin K, and matrix metalloproteinase-9 in osteoclast precursor RAW264.7 cells. Life sciences 80: 1311-1318, 2007.
11) Biskobing DM, et al,: Induction of carbonic anhydrase II expression in osteoclast progenitors requires physical contact with stromal cells. Endocrinology 138: 4852-4857, 1997.
12) Kim JH, et al,:Regulation of NFATc1 in Osteoclast Differentiation. Journal of bone metabolism 21: 233-241, 2014.
13) Kim JH, et al, Upstream stimulatory factors regulate OSCAR gene expression in RANKL-mediated osteoclast differentiation. Journal of molecular biology 383: 502-511, 2008.
14) Kim K, et al, NFATc1 induces osteoclast fusion via up-regulation of Atp6v0d2 and the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP). Mol Endocrinol 22: 176-185, 2008.

○ 접골탕의 파골세포 분화 억제 기전 모식도

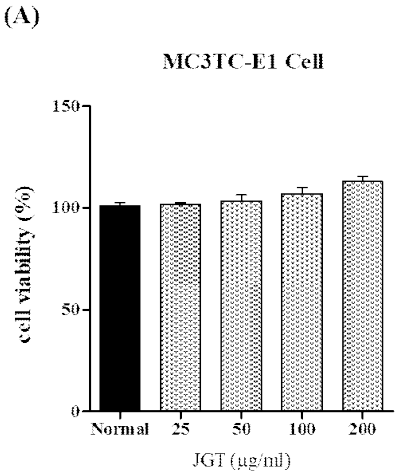


<그림 Ⅲ.2.5> 파골세포 분화 억제 기전 모식도

- (A) Scheme for JGT inhibition of RANKL-induced oateoclastogenesis
- JGT은 RANKL로 유도되는 파골세포 기전을 억제하였다. 기전을 모식도화 하면 다음과 같다. 파골세포 분화에 필수적인 NFATc1/c-Fos 기전을 억제함을 통하여 골 흡수와 관련된 유전자인 MMP-9, CTK 그리고 TRAP을 억제하였으며, 파골세포 분화를 위한 세포간 융합 유전자인 ATP6v0d2를 억제하였다. 또한 파골세포 분화에 보조 역할을 하는 OSCAR 또한 억제되었다.
- 본 연구를 통해, 접골탕은 파골세포 분화 억제를 바탕으로 파골세포의 기능인 골 흡수까지 억제하였고, 이 결과들은 접골탕이 골다공증의 주요 원인인 파골세포 과발현을 효과적으로 제어할 수 있는 억제제로써의 기전검증을 해냈다고 볼 수 있다.

3. 조골세포 분화에 대한 접골탕의 효과

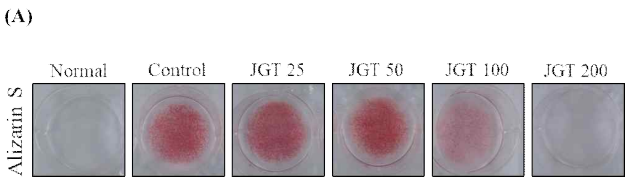
○ 접골탕이 조골세포 전구세포 독성에 미치는 영향



<그림 Ⅲ.3.1> MC3T3-E1 세포 생존율

- (A) The effect of JGT on cell viability in MC3T3-E1 cells
- JGT 은 200 ug/ml 농도까지 MC3T3-E1 세포 독성을 나타내지 않았다.

○ 접골탕이 조골세포 분화에 미치는 영향



<그림 Ⅲ.3.2> 조골세포 분화 효과 검증

- (A) The effect of JGT on the number of calcified nodules and the content of calcium
- Alizarin S는 칼슘을 적색으로 염색하는 염료로써, 조골세포가 분화하면서 침착한 칼슘을 염색하여 유발군에 비하여 상대적으로 더 많은 칼슘 침착 정도를 파악해 조골세포 분화에 촉진능이 있는지 확인해보는 실험이다.
- JGT의 처리는 조골세포의 칼슘 침착능을 증가시키지 못하며, 고농도로 갈수록 감소시킴을 확인하였다.

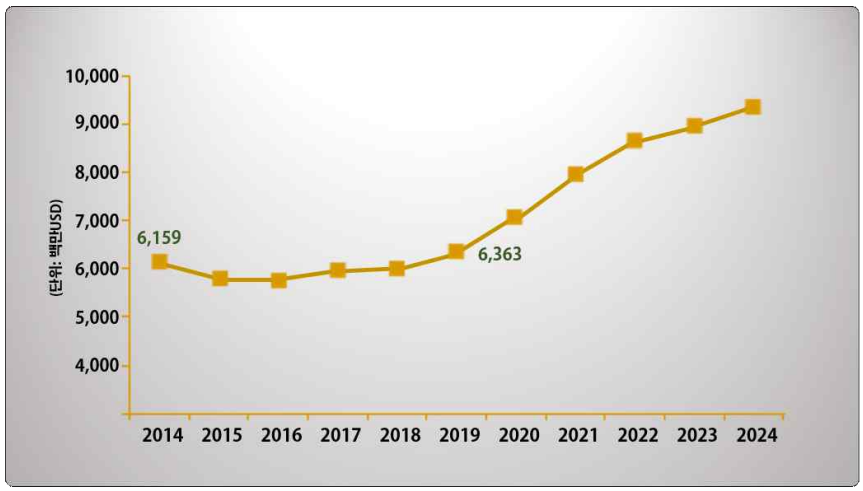
Ⅳ. 연구개발결과의 활용 계획

1. 활용 계획

○ 골다공증은 “2018년 정부 중요 노화 질병으로 선정”되어 관심도가 점점 높아지는 병이다.

○ 또한, 고령화 사회에 진입해, 골다공증 발병자의 수가 급증할 것으로 예상한다. 노년기 삶의 질과 건강 수명에 결정적인 영향을 줄 수 있는 질환인, 골다공증, 치매, 노인성 안질환, 전립선 비대증을 고령사회 글로벌 제약시장에서 주목해야 할 질환이다.

○ 국내외 골다공증 관련 시장의 동향을 살펴보면 7개 주요 시장에서 노화와 관련된 질환 중 하나인 골다공증 관련 의약품 시장은 2016년 111억 달러 규모로 전망되며, 2006년부터 2016년까지 5EU(영국, 프랑스, 독일, 이탈리아, 스페인)의 골다공증 치료제 시장의 연평균 성장률은 81%로 미국과 일본 시장보다 더 빠르게 성장하고 있다. (노화와 관련된 질환 연구의 현황 및 시사점, 김홍범 2012)



<그림 Ⅳ.1> 글로벌 골다공증 치료제 시장 전망(2014~2024)
*** 주요 시장 집계 (미국, 프랑스, 독일, 이탈리아, 스페인, 영국, 일본)**

○ 그 이유로 새로운 한약제제 개발로 골다공증 치료 보조제에 대한 수입 대체 효과 및 세계 의약품 시장 점유 가능성을 확보할 수 있을 것으로 기대된다.

○ 본 연구는 추후 접골탕 연구를 배경으로한 한약 제제 개발 및 추출된 유효성분을 포함한 한약 제제 개발을 통해 신약 및 건강기능식품 개발로 수입창출을 기대할 수 있다.

2. 산업화를 위한 전략

1) 특허 선행기술조사

○ 선행기술조사 : 임상정보 제공자가 이미 같은 처방 구성인 접골탕의 골절 치료 효과 특허를 보유하고 있음.

○ 특허회피전략 : 특허 범위 축소 (파골세포 분화억제)의 방법으로 특허 출원을 계획 중임.

2) 산업화 가능성

○ 우리나라 50세 이상 성인 4명 중 1명은 골다공증일 정도로 시장의 수요가 충분함.

○ 산업화단계에서는 특허 출원을 통한 지적 재산권 확보가 매우 중요할 것으로 보임. 한약 처방은 구성약재가 많은 편으로 산업화를 위해서는 효과가 높으면서 표준화가 쉬운 약재의 수가 최소화될 필요가 있음.

○ 산업화과정에서 한약을 제약회사를 통해 산업화하는 과정에서 다음 2가지 중 한 가지를 만족하지 못하면, 제제로 만들기 어렵다고 평가됨.

- 기존 질병에 사용하는 약보다 연구한 약물이 월등한 효과를 보이는 경우
- 기존 질병에 사용하는 약에 효과가 유사하게 좋으면서, 훨씬 값이 싼 경우

이와 관련하여 가격을 낮추기 위해서 방제를 간소화하는 작업이 필요함.

3) 산업화 추진전략

가. 한약제제를 위한 약물조합 최적화

○ 첫 단계로 접골탕에 포함된 개별 약재에 대한 파골세포 분화 및 흡수능을 평가.

○ 가장 좋은 활성을 갖는 단미를 탐색하여 2~3가지 이내로 후보를 선정.

○ 문헌조사를 통해 단미에 대한 지표성분을 선별하고 표준품을 구입.

○ 선별 후 활성을 높이고, 특허를 회피하기 위해 예비연구를 통한 한약재를 1~2개 가감할 수 있음.

나. 표준화

○ 산업화 대비 안정적인 공급이 가능한 약재인지 판별하고, 대량 구매 가능한 한약판매회사를 정하고, 표준품의 일관성을 유지하기 위해 판매회사와 수급계획을 도출.

○ 규격 한약재에 대한 지표성분을 확인. 한약진흥재단에서는 정량, 확인, 순도 시험을 할 수 있는 GMP 시설을 갖춘 제약회사나 안정적 수급이 가능한 한약판매회사에 대한 후보군을 설정해 주면 사업에 도움이 될 것으로 판단됨.

○ 최종 한약제제 처방에 대한 배합비율 확정 및 용매 조건별 추출물을 확보. 이에 대한 파골세포 분화 및 흡수능을 평가함.

○ 이를 통한 특허 출원 계획을 수립함.

사업성과 요약서

한의표준임상진료지침 개발사업

공공자원화-V.접골탕의 골다공증 개선 효능 검증 및 세포 기전연구

골다공증은 골량의 감소와 미세구조의 이상을 특징으로 하는 전신적 골격계 질환으로 **뼈가 약해져 부러지기 쉬운 상태가 되는 질환**으로 정의된다. 골다공증은 현재 2018년 정부 중요 노화 질병으로 선정되어 관심도가 점점 높아지는 중이다. 골다공증 치료제 시장은 Bisphospohate 제제가 85% 이상 주를 이루고 있지만, 이 제제는 부작용에 대한 우려와 골흡수 억제제의 부작용이 점점 증가하고 있으며, 이에 대한 우려 또한 높아지고 있다. 그로 인해 부작용이 적으며 골다공증을 미리 예방할 수 있는 치료제에 관한 관심이 증가 되고 있다.

본 연구는 골다공증에 대한 접골탕 추출물의 항 골다공증 효과를 검증하기 위한 실험이다. 연구는 크게 2가지로 나뉘어 진행되었다.

생체 실험으로 유사 폐경기 골다공증 모델을 흰쥐의 난소적출로 유도한 뒤 접골탕을 투약하여 골밀도 변화를 마이크로 시티 영상화 분석 결과 대퇴골의 골밀도, 골소주 등을 유의하게 증가시켰다. 혈액 내 골 흡수지표 등에도 영향을 미쳤다.

세포 실험으로 접골탕이 골다공증 유발에서 중요한 역할을 하는 파골세포에 미치는 영향을 연구하였다. 접골탕은 파골세포 분화와 활성을 억제하였다. 또한 파골세포의 분화와 관련한 유전자와 단백질의 발현을 감소시켜, 접골탕의 골다공증 개선에 대한 세포 기전을 확인할 수 있었다.

연구 결과를 종합한다면, **접골탕은 골다공증의 주요 원인인 파골세포의 분화 및 활성을 억제**하여, 폐경기 골다공증의 골다공증 진행을 유의미하게 억제하였다. 이는 **접골탕이 골다공증 억제에 효과적인 대안이 될 수 있음을 의미한다.**

이러한 결과는 향후 접골탕의 유성과 품질지표 확립을 통한 후속 연구를 통해 골다공증 치료 한약제제 개발에 의한 고령화시대 국민건강증진에 기여할 것으로 기대된다.

주 의

1. 이 보고서는 한약진흥재단이 발주한 위탁연구로 수행한 연구(또는 사업) 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한약진흥재단에서 발주한 위탁연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.