(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0083198
(43) 공개일자 2012년07월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/553 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0076154
(22) 출원일자 2011년07월29일
심사청구일자 2012년01월20일
(30) 우선권주장
1020110004369 2011년01월17일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
한평림
서울특별시 양천구 목동서로2길 22, 한신청구아파트 109동 504호 (목동)
서지선
광주광역시 남구 군분로23번길 6-4 (주월동)
(74) 대리인
손민

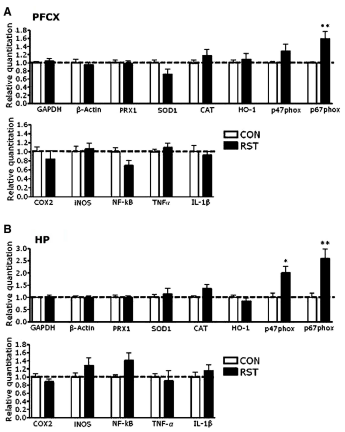
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 **p47phox 또는 p67phox를 표적으로 하는 스트레스 장애 치료제 및 이의 스크리닝 방법**

(57) 요 약

본 발명은 스트레스 민감 반응 완화제의 제조방법, 스트레스 민감 반응 완화제를 함유하는 스트레스 개선용 식품 또는 사료, 이의 제조방법, 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 이의 제조방법, 스트레스 장애의 예방 또는 치료방법, 스트레스 민감 반응 완화제의 스크리닝 방법, 및 스트레스 민감 반응 또는 만성 스트레스로 인해 발생하는 스트레스 장애 진단을 위한 정보제공방법에 관한 것이다. 본 발명에 의하면, p47phox 또는 p67phox 발현/활성/기능를 억제시키는 기전을 이용한 약물들을 개발할 수 있으며, 본 발명의 방법으로 스크리닝된 약물들은 스트레스, 특히, 만성 스트레스에 의해 그 증상이 촉발되거나 악화될수 있는 우울증, 퇴행성 뇌질환 등을 예방 또는 치료할 수 있다.

대 표 도 - 도4a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345098426
부처명	교육과학기술부
연구사업명	21세기 프론티어연구개발사업
연구과제명	만성스트레스 반응의 제어 및 응용 기술 연구
주관기관	이화여자대학교
연구기간	2009.04.01 ~ 2013.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

(1) 스트레스 민감 반응 완화제를 대량생산하는 단계; 및

(2) 상기 생산된 스트레스 민감 반응 완화제 중 일부를 추출하여, p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는지 여부를 확인하는 단계

를 포함하는, 스트레스 민감 반응 완화제의 제조방법.

청구항 2

(1) 시험물질이 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는지 여부를 확인하는 단계; 및

(2)상기 단계에서 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는 것으로 확인된 시험물질을 대량생산하는 단계

를 포함하는, 스트레스 민감 반응 완화제의 제조방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 스트레스 민감 반응은 스트레스에 의해 청반 노르에피네프린(LC-NE: locus ceruleus norepinephrine) 또는 부신피질 자극 호르몬 유리 호르몬(CRH: corticotropin releasing hormone)이 분비되어 직접 또는 간접적으로 발생되는 반응인 것인 스트레스 민감 반응 완화제의 제조 방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 스트레스 민감 반응은 스트레스에 의해 분비된 글루코코르티코이드(glucocorticoid) 호르몬에 의해 직접 또는 간접적으로 발생되는 반응인 것인 스트레스 민감 반응 완화제의 제조방법.

청구항 5

p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는 스트레스 민감 반응 완화제를 함유하는 스트레스 개선용 식품 또는 사료.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 스트레스 민감 반응 완화제는 제1항 또는 제2항에 기재된 제조방법에 의해 제조된 것인 스트레스 개선용 식품 또는 사료.

청구항 7

스트레스 개선용 식품 또는 사료가 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 것이 특징인 스트레스 개선용 식품 또는 사료의 제조 방법.

청구항 8

p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하는, 스트레스 장애 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는 물질은 p47phox 또는 p67phox에 대한 siRNA, shRNA, miRNA 또는 항체, 또는 폴리펩타이드인 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는 물질은 아포사이닌(apocynin), 4-하이드록시-3'-메톡시-아세토페논, N-바닐릴노난아미드(N-Vanillylnonanamide), 스타우로스포린 (Staurosporine), 네오프테린, 디페닐렌 아이도늄 또는 그 조합인 조성물.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 스트레스 장애는 정신적 또는 신체적 만성 스트레스로 인한, 우울증, 불안증, 공포기억, 정신적 공황, 강박장애, 외상후 스트레스 장애, 정신분열증, 스트레스로 인한 두통, 신경변성 질병, 피로 증후군, 식사장애, 신경성 식욕부진, 위염, 위궤양, 알츠하이머성 치매, 파킨슨병, 뇌졸중 및 ALS로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 질환인 조성물.

청구항 12

스트레스 장애 예방 또는 치료용 약학조성물 또는 이의 유효성분이 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 것이 특징인 스트레스 장애 예방 또는 치료용 약학 조성물의 제조 방법.

청구항 13

p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는 물질을 인간을 제외한 개체에 투여하여 스트레스 장애를 예방 또는 치료하는 방법.

청구항 14

(1) p47phox 또는 p67phox을 발현하는 세포를 제공하는 제1단계;

(2) 시험물질을 상기 세포에 접촉시키는 제2단계; 및

(3) 상기 시험물질과 접촉되지 않은 세포와 비교하여 상기 시험물질과 접촉된 세포에서 상기 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상이 억제된 시험물질을 후보물질로 선별하는 제3단계를 포함하는,

스트레스 민감반응 완화제의 스크리닝 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 제1단계는 글루코코르티코이드를 처리하여 세포의 p47phox 또는 p67phox의 발현을 증가시키는 것이 특징인, 스크리닝 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 또는 기능의 억제 여부는 ROS(Reactive Oxygen Species) 생성을 측정하여 확인하는 것이 특징인, 스크리닝 방법.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 제1단계의 세포는 실험동물의 형태로 제공되는 것이 특징인, 스크리닝 방법.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 실험동물에게 만성 스트레스를 가하는 단계를 추가로 포함하는 것이 특징인, 스크리닝 방법.

청구항 19

개체로부터 분리된 생체 시료의 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 어느 하나을 측정하는 단계를 포함하는, 스트레스 민감 반응 또는 만성 스트레스로 인해 발생하는 스트레스 장애 진단을 위한 정보제공방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 생체 시료는 혈액인 것인 정보제공방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 스트레스 민감 반응 완화제의 제조방법, 스트레스 민감 반응 완화제를 함유하는 스트레스 개선용 식품 또는 사료, 이의 제조방법, 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 이의 제조방법, 스트레스 장애의 예방 또는 치료방법, 스트레스 민감 반응 완화제의 스크리닝 방법, 및 스트레스 민감 반응 또는 만성 스트레스로 인해 발생하는 스트레스 장애 진단을 위한 정보제공방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 현대 산업 사회는 구조적으로나 기능적으로 빠르고 복잡하게 변화하고 있다. 뿐만 아니라 개인이 소화하기 어려울 정도의 엄청난 양의 정보가 매일 쏟아지고 있다. 새로운 기술, 새로운 환경에 계속 적응해 나가야 하는 현대인들의 대부분은 많은 신체적?심리적 부담감을 느끼게 된다. 이런 부담감을 일명 스트레스(stress)라 한다.

[0003] 인간이 내외적 환경의 자극에 의해 신체적?심리적인 스트레스를 받게 되면 인체는 스트레스에 적응하기 위해 뇌에서 청반 노르에피네프린(LC-NE: locus ceruleus norepinephrine)과 부신피질 자극 호르몬 유리 호르몬(CRH: corticotropin releasing hormone)을 분비한다. LC-NE는 교감 신경계를 활성화시키고 부교감 신경계의 작용을 억제하여 혈압, 심박동, 호흡을 증가시키며, 기관지를 확장시킬 뿐 아니라 피부에 소름이 끼치면서 털이 일어나는 발한 작용을 증가시킨다. 시상하부에서 분비된 CRH는 뇌하수체 전엽으로부터 부신피질 자극 호르몬 (Adrenocorticotropic hormone: ACTH)을 일반 체순환으로 방출한다. 이 ACTH가 혈액을 따라 옮겨가서 부신피질의 ACTH 수용체에 결합하게 되면, cAMP라고 불리는 2차 신호전달자를 합성하게 된다. cAMP에 의해 활성화된 단백질 인산화 효소 PKA(protein kinase A)는 미토콘드리아에 위치한 글루코코르티코이드(Glucocorticoid) 합성 단백질을 활성화시킨다. 그러면 글루코코르티코이드 합성 단백질이 콜레스테롤을 이용하여 스트레스 호르몬들을 만들어 낸다. 코르티졸(cortisol), 코르티코스테론(corticosterone), 코르티손(cortisone)등이 대표적인 글루코코르티코이드의 예이다. CRH-ACTH-글루코코르티코이드까지 연결되는 스트레스 경로를 일반적으로 시상하부-뇌하수체-부신(Hypothalamus-Pituitary gland-Adrenal gland: HPA) 축이라고 한다. 글루코코르티코이드는 간에서 포도당 신합성(gluconeogenesis)과 글리코겐의 저장, 혈당치 상승 등의 탄수화물 대사조절을 한다. 그밖에 글루코코르티코이드는 면역을 담당하는 면역세포의 각종 면역물질 생성 유전자의 발현을 억제함으로써 항염증 작용을 한다. 또한 혈액 내 이 호르몬 함량이 높아지면 음성 피드백(negative feedback)으로 뇌하수체에 작용하여 ACTH 분비를 억제한다.

[0004] 신체가 허용할 수 있는 수준의 스트레스는 우리 몸의 적절한 자극제로 작용을 하게 되지만, 허용 범위를 벗어난 강하고도 지속적으로 가해지는 심리적 육체적 스트레스는 글루코코르티코이드를 장시간 동안 과량 분비하게 유도한다. 이렇게 장기간 과량 분비되는 글루코코르티코이드는 몸의 면역력을 떨어뜨리게 되므로, 외부 감염에 의한 저항성을 떨어뜨리게 되고, 우리 몸에 다양한 질병을 유발하게 된다. 면역력 감퇴뿐만 아니라 특별히 뇌세포 손상 및 재생을 억제하여 불면증, 무기력증, 기억력 감퇴, 우울증 유발은 물론 자살 충동까지 일으킨다.

[0005] 한편, 우울증은 조울증과 함께 기분장애의 한 종류로 분류되며, 침체된 기분, 무쾌감증, 수면장애, 비사교성, 피로 및 집중력 저하(DSM-IV-TR)를 포함한 심리적이고 육체적인 증상을 갖는 정신질환의 가장 일반적인 형태 중 하나이다. 우울증은 평생 유병율이 15%, 특히 여자에서는 25% 정도에 이르며, 감정, 생각, 신체 상태, 그리고 행동 등에 변화를 일으키는 심각한 질환이다. 세계보건기구(WHO)는 2020년에 이르면 우울증이 모든 연령에서 나타나는 질환 중 1위를 차지할 것으로 내다보고 있다. 또한, 우울증은 자살로 이어지는 경우가 적지 않아, 만약 우울증이 2020년 '미래 질병 1위'로 급상한다면 암과 같은 육체적 질병으로 인한 사망률보다 우울증에 의한 사망률이 더 높아질 수 있을 것이라고 하였으나, 우울증의 정확한 병태생리는 밝혀지지 않았다.

[0006] 우울증의 주된 원인으로는 호르몬의 불균형을 주목하고 있는데 그중에서도 세로토닌을 주된 원인으로 보고 있다. 세로토닌은 뇌척수액에서 발견되는 신경대사물질로, 부족하면 근심, 걱정이 많아지고 충동적인 성향이 나타난다. 따라서 우울증 치료제는 세로토닌의 작용과 관련이 많다.

[0007] 현재 임상에서 사용하는 항우울제는 대부분 신경 시냅스 부위에서 모노 아민계 신경전달물질의 약리작용을 증가시키는 특성을 갖는 약물(SSRI, SNRI, SDRI, TCAs, MAOIs 계열 등)들이다. 이들 약물의 경우 환자에 따라

항우울 효과가 분명하게 나타나기도 하지만 역설적이게도 신경과학적 관점에서 이들의 약효는 대체로 2-3 주 이상 장기 투여시 나타나는 점을 고려하면 그 약리작용 기전이 불분명하다. 상기 약물들의 경우, 항염증제와 함께 투여할 경우, 항염증제제와 반응하여 항우울제 효과가 감소될 수 있다는 보고가 있다. 또한, 상기 약물들은 구토, 성욕 감소, 불면, 피로, 비만, 자살 충동 등의 부작용이 발생할 수 있으며, 우울증 환자의 30%의 경우에는 현재 사용 중인 약물이 전혀 효과가 없는 한계를 가지고 있다.

[0008] 모노 아민계 신경전달물질의 약리 작용을 증가시켜 우울증을 치료하는 기존의 치료제에서는 상기 살펴본 바와 같이 부작용이 다수 발생하고 있으며, 그 치료 효과에도 한계가 발생하는 바, 이와는 다른 새로운 기전의 우울증 치료 및 이에 기반을 둔 약물을 포함하는 치료 시스템의 개발이 절실히 요구된다.

[0009] 이에 본 발명자들은, 만성 스트레스를 받은 동물 모델 또는 스트레스 호르몬을 투여한 신경세포에서, 신경세포 또는 혈액에 존재하는 p47phox 또는 p67phox 유전자의 발현이 스트레스를 받지 않은 대조군에 비해 지속적으로 증가되어 나타남을 확인하여, 이를 바탕으로 p47phox 또는 p67phox를 타겟으로 하는 스트레스 민감 반응 완화제를 스크리닝 할 수 있고, 또한 p47phox 또는 p67phox의 발현, 기능, 또는 활성을 억제하는 물질을 사용하여 스트레스 장애 예방 또는 치료할 수 있다는 점을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 스트레스 민감 반응 완화제의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 목적은 스트레스 개선용 식품 또는 사료, 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물, 이의 제조방법, 및 스트레스 장애의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 스트레스 민감 반응 완화제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 스트레스 민감 반응 또는 만성 스트레스로 인해 발생하는 스트레스 장애 진단을 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 과제를 해결하기 위해, 하나의 양태로서 본 발명은 (1) 스트레스 민감 반응 완화제를 대량생산하는 단계; 및 (2) 상기 생산된 스트레스 민감 반응 완화제 중 일부를 추출하여, p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 스트레스 민감 반응 완화제의 제조방법을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 (1) 시험물질이 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는지 여부를 확인하는 단계; 및 (2)상기 단계에서 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는 것으로 확인된 시험물질을 대량생산하는 단계를 포함하는, 스트레스 민감 반응 완화제의 제조방법을 제공한다.

[0017] 다른 양태로서, 본 발명은 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는 스트레스 민감 반응 완화제를 함유하는 스트레스 개선용 식품 또는 사료를 제공한다.

[0018] 또 다른 양태로서, 본 발명은 스트레스 개선용 식품 또는 사료가 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성, 기능 중 하나 이상을 억제시키는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 것이 특징인 스트레스 개선용 식품 또는 사료의 제조방법을 제공한다.

[0019] 또 다른 양태로서, 본 발명은 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하는, 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0020] 또 다른 양태로서, 본 발명은 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물 또는 이의 유효성분이 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 것이 특징인 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0021] 또 다른 양태로서, 본 발명은 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는 물질을

개체에 투여하여 스트레스 장애를 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0022] 또 다른 양태로서, 본 발명은 (1) p47phox 또는 p67phox을 발현하는 세포를 제공하는 제1단계; (2) 시험물질을 상기 세포에 접촉시키는 제2단계; 및 (3) 상기 시험물질과 접촉되지 않은 세포와 비교하여 상기 시험물질과 접촉된 세포에서 상기 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상이 억제된 시험물질을 후보물질로 선별하는 제3단계를 포함하는, 스트레스 민감 반응 완화제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0023] 또 다른 양태로서, 본 발명은 개체로부터 분리된 생체 시료의 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 어느 하나을 측정하는 단계를 포함하는, 스트레스 민감 반응 또는 만성 스트레스로 인해 발생하는 스트레스 장애 진단을 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0024] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

[0025] 본 발명은 (1) 스트레스 민감 반응 완화제를 대량생산하는 단계; 및 (2) 상기 생산된 스트레스 민감 반응 완화제 중 일부를 추출하여, p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 스트레스 민감 반응 완화제의 제조방법에 관한 것이다.

[0026] 또한, 본 발명은 (1) 시험물질이 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는지 여부를 확인하는 단계; 및 (2)상기 단계에서 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는 것으로 확인된 시험물질을 대량생산하는 단계를 포함하는, 스트레스 민감 반응 완화제의 제조방법에 관한 것이다.

[0027] 본 발명의 p47phox는 NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate) 옥시다제의 일 서브유닛(subunit)으로, NCBI Accession No.가 마우스는 NM_010876.2, 인간은 NM_000265.4 인 것이 바람직하다

[0028] 본 발명의 p67phox는 NADPH 옥시다제의 일 서브유닛(subunit)으로, NCBI Accession No.가 마우스는 NM_010877.4, 인간은 NM_001127651.2 인 것이 바람직하다

[0029] 상기 NADPH 옥시다제는 생물막을 통해 전자를 전달하는 단백질 복합체로 NADPH로부터 전자를 산소분자로 전달하여 과산화물(superoxide, Reactive Oxygen Species, ROS)을 생성한다. NADPH 옥시다제 복합체는 Rho 구아노신 트리포스파타제(GTPase)(Rac1 또는 Rac2 (Rho-related C3 botulinum toxin substrate)와 5개의, "phox".(phagocytic oxidase) 영역을 포함하는 gp91-phox (Nox2), p22phox, p40phox, p47phox 및 p67phox로 구성되는 6개의 서브유니트로 이루어져 있다. 활성화를 위해서는 세포질에 존재하는 p40phox, p47phox 및 p67phox의 막으로의 이동이 필요하며, 이때 p47phox의 인산화가 필수적이며 막으로 이동 후 p67phox가 NOX2와 결합한다 (도 4b, C 참조).

[0030] 본 발명에서 용어, "스트레스 민감 반응"은 스트레스에 의해 발생할 수 있는 반응을 의미하며, 예를 들어서, 스트레스에 의해 청반 노르에피네프린(LC-NE: locus ceruleus norepinephrine) 또는 부신피질 자극 호르몬 유리 호르몬(CRH: corticotropin releasing hormone)이 분비되어 직접 또는 간접적으로 발생되는 반응 또는 스트레스에 의해 분비된 글루코코르티코이드(glucocorticoid) 호르몬에 의해 직접 또는 간접적으로 발생되는 반응을 의미한다. 또한, 스트레스로 인해서 최종적으로 발생할 수 있는 질환인, 우울증, 불안증, 공포기억, 정신적 공황, 강박장애, 외상후 스트레스 장애, 정신분열증, 스트레스로 인한 두통, 신경변성 질병, 피로 증후군, 식사장애, 신경성 식욕부진, 위염, 위궤양, 알츠하이머성 치매, 파킨슨병, 뇌졸중 또는 ALS이 발생되기 전에 나타나는, 상기 질환에 도달하기 전에 나타나는 스트레스 관련 반응을 모두 포함한다.

[0031] 상기 "스트레스 민감 반응 완화제"는 상기 설명한 "스트레스 민감 반응"을 감소시키고 완화시킬 수 있는 물질을 의미하며, 항스트레스제로 통칭될 수도 있다.

[0032] 본원에서 사용된 용어 "만성(적) 스트레스"란 중장기적인 기간동안 스트레스가 반복적으로 주어질 경우 그 영향으로 지속적인 신경적 및 정신적 뇌손상을 유발하는 신체 생리 반응 및 그 결과를 지칭하는 것이다.

[0033] 본 발명에서는, 반복적으로 주어지는 만성 스트레스가 우울증 및 불안증을 유발하고, 뇌신경 내에 다량의 산화성 스트레스가 축적되고 심한 미토콘드리아의 기능저하를 유발하는 원인이 스트레스에 의한 p47phox 또는 p67phox의 활성화라는 분자기전을 처음으로 규명하였다. 또한, p47phox 또는 p67phox를 제어함으로써 뇌신경계 내에 ROS의 과대 생성 및 우울증 유발을 억제할 수 있다는 것을 규명하였다.

[0034] 본 발명의 일 실시예에서는 마우스에 지속적인 스트레스를 가했을 때 뇌의 지질과산화 및 산화성 스트레스가 시간에 따라 축적되는 것을 확인하였고(실시예 3), 만성적 스트레스에 따라 p47phox 또는 p67phox의 발현이 증가되고(실시예 4, 5), p47phox 또는 p67phox의 발현/기능/활성을 억제하는 물질을 스트레스를 가하기 전에 미리 처리하거나 스트레스를 가한 후에 처리한 경우 만성적 스트레스에 의한 우울증적 행동이 사라진 것을 확인하였다(실시예 6, 7). 이를 바탕으로 본 발명은 스트레스에 의해 발생하는 반응, 또는 스트레스가 점차 축적됨으로써 유도되는 스트레스 장애가 발생하기 전 단계에서, p47phox 또는 p67phox의 발현, 기능, 또는 활성을 억제시킴으로써 스트레스 민감 반응을 완화시키고, 스트레스 장애의 발생을 미리 예방할 수 있을 뿐만 아니라, p47phox 또는 p67phox의 발현, 기능, 또는 활성을 억제시키는지 여부를 확인하는 단계를 포함하여 스트레스 민감 반응 완화제를 제조할 수 있다.

[0035] 본 발명은 스트레스 민감 반응 완화제를 대량생산한 후, 대량생산된 스트레스 민감 반응 완화제 중 일부를 추출하여, p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성, 기능 중 하나 이상을 억제하는지 여부를 확인하는, 즉, 상기 완화제가 스트레스 민감 반응을 완화시킬 수 있는 기능을 가지고 있는지를 확인하는 단계를 수행함으로써, 스트레스 민감 반응 완화제를 제조할 수 있다. 또는, 본 발명은 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성, 기능 중 하나 이상을 억제하는 것으로 확인된 시험물질을 선별하고, 이를 대량생산함으로써, 스트레스 민감 반응 완화제를 제조할 수 있다.

[0036] 본 발명에서 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성, 기능 중 하나 이상을 억제한다는 것에는 p47phox 또는 p67phox의 발현/활성/기능 증진 억제제 또는 증진된 p47phox 또는 p67phox의 발현/활성/기능을 억제시키는 물질도 포함한다.

[0037] 또한, 본 발명의 일 실시예에서는 만성 스트레스를 받은 동물의 혈액 내에서 p47phox 또는 p67phox의 발현이 상향조절됨을 확인하였는 바, 이를 기초로 상기 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성, 기능 중 하나 이상을 억제하는지 여부를 확인하는 단계 또는 시험물질의 p67phox의 발현, 활성, 기능 중 하나 이상을 억제하는지 여부는 동물의 혈액 내의 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성, 기능 중 하나 이상을 측정하여 수행될 수 있다.

[0038] 본 발명에서 "시험물질" 은 p47phox 및/또는 p67phox 또는 그 조합의 발현 및/또는 활성을 특이적으로 억제하는 물질로, 저분자량 화합물, 고분자량 화합물, 핵산분자(예컨대, DNA, RNA, PNA 및 앱타머), 단백질, 당 및 지질 등을 포함하나 이로 한정하는 것은 아니다. 상기 시험물질은 10 base 이상의 단일 또는 이중 가닥의 핵산, 예컨대, 10개, 11개, 12개, 14개, 15개 이상의 핵산 분자예를 들면 siRNA, shRNA 또는 miRNA를 포함한다. 또한 상기 시험물질은 잔기 2개 이상의 아미노산 잔기, 예컨대 6개, 8개, 10개, 12개, 20개 이하, 또는 20개 초과 예컨대 50개 아미산 잔기를 갖는 폴리펩타이드일 수 있다.

[0039] 본 발명에서 발현이란 유전자의 전사 및 전사체의 단백질로의 발현을 의미하며, 활성이란 발현된 단백질이 기능할 수 있도록 하는 생물학적 작용을 의미한다.

[0040] 본 발명에서 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성, 기능 중 하나 이상을 억제하는지 여부는 이에 제한되지는 않으나, p47phox 또는 p67phox의 발현량을 측정하여 판단할 수 있다. p47phox 또는 p67phox mRNA의 발현량 측정은 RT-PCR, 정량적 또는 반정량적 RT-PCR(Quentitative or semi-Quentitative RT-PCR), 정량적 또는 반정량적 리얼 타임 PCR(Quentitative or semi-Quentitative real-time PCR), 노던 블롯(northern blot) 및 DNA 또는 RNA 칩(chip)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법을 이용하여 측정될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, p47phox 또는 p67phox 단백질의 발현량 측정은 웨스턴 블롯, 조직면역염색법, 조직형광염색법으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법을 이용하여 측정될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 다른 양태로서, 본 발명은 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성, 기능 중 하나 이상을 억제시키는 특성을 나타내는 스트레스 민감 반응 완화제를 함유하는 스트레스 개선용 식품 또는 사료에 관한 것이다.

[0042] 또 다른 양태로서, 본 발명은 스트레스 개선용 식품 또는 사료가 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성, 기능 중 하나 이상을 억제시키는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는 것이 특징인 스트레스 개선용 식품 또는 사료의 제조방법에 관한 것이다.

[0043] 본 발명의 일 실시예에서는 만성적 스트레스를 가한 마우스에서 ROS 생성이 증가되고, 우울증적 행동이 나타나는 것을 확인하였고, 스트레스 호르몬인 글루코코르티코이드를 처리한 인간 뉴로블라스토마 세포주에서 ROS 생성이 증가되었으며, 상기 마우스 및 세포주에서 p47phox 또는 p67phox의 발현이 증가됨을 확인하였다(실시

예 4). 또한, p47phox 에 대한 siRNA을 주입한 결과, 글루코코르티코이드에 의해 유도된 ROS 생성 및 과산화물의 생성이 처리한 siRNA의 양에 의존적으로 감소하였으며(실시예 6), p47phox 또는 p67phox의 발현을 억제한다고 알려진 아포시아닌, 항우울제인 이미프라민을 만성 스트레스를 가하기 전 및 스트레스를 가하면서 투여한 결과, 우울증적 행동 및 지질과산화가 스트레스를 가하지 않은 군과 유사하게 감소됨을 확인하였다(실시예 7).

[0044] 상기 실험 내용을 바탕으로, 본 발명은 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성, 기능 중 하나 이상을 억제시키는 특성을 나타내는 스트레스 민감 반응 완화제를 함유하는, 스트레스 개선용 식품 또는 사료를 제공하는 것이다. 상기 스트레스 개선용 식품 또는 사료는 스트레스에 의해 발생하는 모든 반응, 또는 반복적인 스트레스로 인해 유도되는 스트레스 장애가 발생하기 전에 나타나는 증상을 개선시킬 수 있으며, 스트레스 장애를 예방할 수 있다. 상기 스트레스 민감 반응 완화제는 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성, 기능 중 하나 이상을 억제시키는 특성을 나타내는 물질이라면 화합물, 천연물, 신규 단백질 등 그 종류가 제한되지 않는다. 특히, p47phox 또는 p67phox가 세포막으로 이동하지 못하여 활성을 갖지 못하게 하는 물질도 포함한다.

[0045] 본 발명에서 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성, 기능 중 하나 이상을 억제시키는 물질은 p47phox, p67phox 유전자의 전사 및/또는 전사체의 단백질 합성을 특이적으로 억제할 수 있는 siRNA(small interfering RNA), shRNA (small hairpin RNA) 또는 miRNA (microRNA)일 수 있다. 이들은 RNA 간섭 (interference) 작용을 통해, 예를 들면 짧은 길이의 간섭 RNA (siRNA)가 서열 특이적으로 전사체에 결합하여, RISC(RNA Induced Silencing Complex)를 형성하여, 전사된 RNA가 세포내에 단백질로 발현될 수 없도록 (silencing) 한다. 한 구현예에서, siRNA, shRNA 또는 miRNA는 NADPH 옥시다제의 서브유니트 중 하나인 p47phox 유전자를 표적으로 한다. siRNA, shRNA 또는 miRNA는 그 표적 서열에 상당히 상보적인 서열을 갖는다. 상당히 상보적 서열이란, 표적 유전자의 적어도 연속적인 15 베이스 길이의 서열과 적어도 약 70% 상보성, 적어도 약 80% 상보성, 적어도 약 90% 상보성, 또는 약 100% 상보성을 의미한다. 한 구현예에서 p47phox siRNA 또는 shRNA는 본원의 실시예에서 p47phox 사일런싱(silencing)에 사용된 siRNA, shRNA 인 Lenti-p47phox-shRNA가 포함될 수 있으나 이로 한정하는 것으로 아니며, 표적 핵산에 결합하여 사일런싱의 기능을 하는 한 다양한 유래의 p47phox를 표적으로 하는 siRNA, shRNA 및/또는 miRNA가 사용될 수 있으며, 이들의 생물학적 동등체, 유도체 및 유사체도 포함하는 것이다. 한 구현예에서 siRNA, shRNA 및/또는 miRNA은 인간 p47phox 유전자 유래이다. 다른 구현예에서, siRNA, shRNA 및/또는 miRNA는 인간 유래 유전자 NM_000265.4 서열을 기준으로 약 600 내지 1200 base 사이, 약 700 내지 1200 base사이, 약 800 내지 1200base 사이, 약 900 내지 1200base 사이의 15 내지 35 base 길이이며, 시중의 siRNA, shRNA 또는 miRNA 표적 디자인 소프트웨어를 사용해서 디자인 할 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는 스트레스 민감 반응 완화제는, p47phox, p67phox 또는 그 조합을 인식할 수 있는 항체이다. 본원에서 사용된 용어 항체는 완전한 항체, 항체분자의 항원결합 단편 및 이들과 기능적으로 동등한 항체 또는 단편을 포함하는 것이다. 또한 본 발명의 항체는 IgG, IgM, IgD, IgE, IgA 또는 IgY 타입일 수 있으며, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 또는 IgA2 클래스 또는 그 하부클래스일 수 있다. 본 발명의 항체는 모노클로날, 폴리클로날, 키메라, 단쇄, 이특이성, 유인원화 및 인간화된 항체 및 이의 활성 단편을 포함하는 것이다.

[0047] 또한, 본 발명의 다른 구현예에서, 상기 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는 스트레스 민감 반응 완화제는 p47phox, p67phox의 활성 및/또는 작용/기능을 간섭, 방해 및 또는 억제할 수 있는 폴리펩타이드이다. 본원에서 사용된 용어 폴리펩타이드는 아미노산의 중합체를 일컫는 것으로 이러한 작용을 갖는 한 특정 길이를 지칭하는 것은 아니다. 따라서 예를 들면 펩타이드, 올리고펩타이드, 단백질, 효소도 본 범위에 포함된다. 폴리펩타이드는 자연적 또는 인위적으로 변형된 것, 예를 들면 글리코실화, 아세틸화, 인산화 등으로 변형된 것도 포함한다.

[0048] 또한, 상기 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는 스트레스 민감 반응 완화제는 아포사이닌, 4-하이드록시-3'-메톡시-아세토페논, N-바닐릴노난아미드(N-Vanillylnonanamide), 스타우로스포린 (Staurosporine), 네오프테린, 디페닐렌 아이도늄 또는 그 조합이 바람직하나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[0049] 상기 식품 또는 사료에 함유되는 스트레스 민감 반응 완화제는 상기 설명한 스트레스 민감 반응 완화제의 제조방법에 의해 제조된 것이 바람직하다.

[0050] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프,

음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다. 본 발명의 건강음료는 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ㎖당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

[0051] 상기 외에 본 발명의 식품에는 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 식품 100 중량부 당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일쥬스, 과일쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 과육의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 ~ 10 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다. 이들 성분들은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0052] 본 발명에서 상기 사료는 영양가, 주성분, 유통, 수분 함량 배합상태 및 가공형태 등에 따라 여러 가지로 분류할 수 있으며, 상기 사료는 조사료, 농후사료, 보충사료, 단백질사료, 녹말사료, 지방질사료 또는 섬유질사료가 사용가능하나, 이에 한정하지 않으며, 사료첨가제도 포함하는 개념이다. 또한 상기 사료에는 추가적으로 가금류 및 가축 등에 허용되는 담체를 함유할 수 있다. 본 발명에 있어서는 상기 사료를 그대로 또는 공지의 담체, 안정제 등을 가할 수 있으며, 필요에 따라 비타민, 아미노산류, 미네랄 등의 각종 양분, 항산화제, 항생물질, 항균제 및 기타의 첨가제 등을 가할 수도 있으며, 그 형상으로서는 분체, 과립, 펠릿, 현탁액 등의 적당한 상태일 수 있다. 본 발명의 사료를 공급하는 경우는 가금류 및 가축 등에 대하여 단독 또는 사료에 혼합하여 공급할 수 있으며, 상기 사료는 가금류 및 가축 등이 받은 스트레스를 감소시킬 수 있다.

[0053] 또 다른 양태로서, 본 발명은 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는 물질을 유효성분으로 포함하는, 스트레스 장애 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0054] 또 다른 양태로서, 본 발명에 따른 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 스트레스 장애의 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 이의 유효성분이 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는지 여부를 확인하는 단계를 포함하여 제조될 수 있다.

[0055] 또 다른 양태로서, 본 발명은 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는 물질을 개체에 투여함으로써, 스트레스 장애를 예방 또는 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0056] 본 발명의 일 실시에에서는 마우스에 지속적인 스트레스를 가했을 때 뇌의 지질과산화가 시간에 따라 축적되는 것을 확인하였고, 만성적 스트레스에 따라 p47phox 또는 p67phox의 발현이 증가되고, 이의 발현을 억제하는 p47phox 에 대한 siRNA을 주입한 결과, 글루코코르티코이드에 의해 유도된 ROS 생성 및 과산화물의 생성이 처리한 siRNA의 양에 의존적으로 감소하였음을 확인하였다(실시예 6). 또한, 스트레스를 받는 마우스에 p47phox 또는 p67phox의 발현을 억제하는 아포시아닌, 항우울제인 이미프라민을 처리한 결과 우울증적 행동이 감소되었으며, p47phox 유전자 적중 돌연변이 (+/-) 마우스에서도 대조군인 야생(+/+)의 경우와 달리 만성스트레스에 의해 우울증 행동이 생성되지 않는 것을 또한 확인하였다(실시예 7). 따라서, p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는 물질은 스트레스 장애가 발생하기 전 단계에서 상기 장애를 예방할 수 있고, 이미 스트레스 장애가 발생한 경우 PRX3 또는 TRX2의 발현을 증진시킴으로써 스트레스 장애를 치료할 수 있다.

[0057] 상기 조성물의 유효성분으로서, p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 또는 기능을 억제하는 물질이라면 화합물, 천연물, 신규 단백질 등 그 종류가 제한되지 않는다. 상기, p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 또는 기능을 억제하는 물질은 바람직하게는, 아포사이닌, 4-하이드록시-3'-메톡시-아세토페논, N-바닐릴노난아미드(N-Vanillylnonanamide), 스타우로스포린 (Staurosporine), 네오프테린, 디페닐렌 아이도늄 또는 그 조합을 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니다.

[0058] 본 발명에서 용어, 예방이란, 조성물의 투여에 의해 스트레스 관련 질환의 증상을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 또한, 본 발명에서 용어, 치료란, 조성물의 투여에 의해 스트레스 관련 질환의 증상이

호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

[0059] 상기 스트레스 장애는 정신적 및/또는 신체적 만성 스트레스에 의해 증상이 촉발되거나 악화될 수 있는 질환을 의미하며, 구체적으로는 정신적 및/또는 신체적 만성 스트레스로 인한, 우울증, 불안증, 공포기억, 정신적 공황, 강박장애, 외상후 스트레스 장애, 정신분열증, 스트레스로 인한 두통, 신경변성 질병, 피로 증후군, 식사장애, 신경성 식욕부진, 위염, 위궤양, 알츠하이머성 치매, 파킨슨병, 뇌졸중 및 ALS로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 질환이 포함되나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명의 조성물에는 상기 언급한 47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는 물질 이외에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 또는 유효성분의 용해성 및/또는 흡수성을 유지/증가시키는 화합물을 추가로 함유할 수 있다.

[0061] 또한 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 상기 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0062] 상기 약학 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[0063] 상기 본 발명의 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0064] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0065] 본원의 조성물의 투여방법은 특별히 이에 제한되는 것은 아니며, 공지된 47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상을 억제하는 물질의 투여방법을 적용할 수 있으며, 목적하는 방법에 따라 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)하거나 경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여의 경우 피부에 붙이는 패치형, 코/호흡기를 통해 투여할 수 있으며, 신속한 치료효과를 얻기 위하여 정맥내 주사에 의한 투여가 바람직할 수 있다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 매우 다양할 수 있다.

[0066] 또 다른 양태로서, 본 발명은 (1) p47phox 또는 p67phox을 발현하는 세포를 제공하는 제1단계; (2) 시험물질을 상기 세포에 접촉시키는 제2단계; 및 (3) 상기 시험물질과 접촉되지 않은 세포와 비교하여 상기 시험물질과 접촉된 세포에서 상기 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 하나 이상이 억제된 시험물질을 후보물질로 선별하는 제3단계를 포함하는, 스트레스 민감 반응 완화제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0067] 본 발명의 스크리닝 방법에서, 상기 제1단계에서 사용되는 세포는, 신경세포의 특성을 갖는 다양한 세포주가 사용될 수 있으며, 예를 들면, SH-SY5Y(인간 뉴로블라스토마 세포주), HT22(마우스 해마 세포주)가 사용될 수

있으나 이로 제한되는 것은 아니며, 비신경세포주인 A549(인간 폐 아데노카시노마 상피 세포주), KEK 293(인간 배아신장 유래 세포주)가 사용될 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다. p47phox 또는 p67phox가 정상적으로 발현되고 기능하는 세포는 그 자체로 사용될 수 있으며, 또한, 필요한 경우 예를 들면 이러한 세포주에 실시예에 기재된 바와 같이 글루코코르티코이드와 같은 호르몬을 처리하여p47phox 및/또는 p67phox 유전자를 발현, 과발현(비처리 세포와 비교) 및/또는 활성화시키거나, p47phox 및/또는 p67phox 유전자를 발현하는 플라스미드로 전달이입 후, 일정 시간, 예를 들면 48시간 경과 후에 세포를 시험물질과 접촉할 수 있다.

[0068] 또한, 상기 제1단계에서 사용되는 세포는 실험동물의 형태로 제공될 수 있으며, 이 경우 본 발명의 스크리닝 방법은 상기 실험동물에게 만성적 및/또는 지속적 스트레스를 가하는 단계를 추가로 포함하며, 시험물질과의 접촉은 비경구 또는 경구 투여, 정위주사를 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니며, 당업자라면 시험물질을 동물에게 테스트하기 위해 적절한 방법을 선택할 수 있을 것이다. 본원의 한 구현예에서 상기 실험동물은 래트, 마우스, 초파리, 꼬마선충을 들 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니다. 본원에서 사용된 만성적/지속적 스트레스란 앞서 정의한 것을 포함하며, 마우스나 래트의 경우, 예를 들면 본원 실시예에 기재된 방법, 전기충격 처치, 공격적 마우스에 노출, 저온보관, 강제수영, 음식/물 박탈, 고음의 소리 및 강한 점멸성 빛 노출, 수면 박탈, 일주기성 교란, 포르말린, 기타 약물을 이용한 화학적/통증 스트레스 처치, LPS 포함 미생물의 감염 처치, 고립 등이 가능하며, 초파리 및 꼬마선충의 경우는 배양세포시스템과 동일하게 뇌신경계 내에 ROS 증가를 탐지하는 리포터유전자 시스템을 활용하여, 시험물질 처리 후에 ROS의 증감을 리포터 유전자의 발현상태로 확인하여 후보물질을 선정할 수 있다. 실험동물 모델을 사용할 경우, p47phox 또는 p67phox 활성의 변화는 원칙적으로 뇌신경계 내지는 신경세포를 대상으로 할 것이나 글루코코르티코이드(예, 사람에서는 코티졸, 마우스/래트에서는 코티코스테론)와 같은 스트레스 호르몬의 특성상 모든 조직에 작용할 수 있기 때문에 모든 장기, 조직, 세포가 조사대상이 될 수 있다. 이 경우도 시험물질의 처리에 의한 p47phox 또는 p67phox 활성 증가/감소는 이에 의한 뇌신경계의 생화학적 변화 예를 들면 ROS의 생성여부로 측정할 수 있다.

[0069] 상기 제2단계는 시험물질을 p47phox 또는 p67phox을 발현하는 세포에 접촉시키는 단계이다.

[0070] 상기 시험물질은 p47phox 또는 p67phox의 발현 또는 활성을 억제시킬 수 있는 것은 물론, 시험물질의 특성상 억제할 것으로 기대되는 물질을 포함하는 것이다. 상기 시험물질은 p47phox 및/또는 p67phox 또는 그 조합의 발현 및/또는 활성을 특이적으로 억제할 것으로 기대되는 물질로, 저분자량 화합물, 고분자량 화합물, 핵산분자(예컨대, DNA, RNA, PNA 및 앱타머), 단백질, 당 및 지질 등을 포함하나 이로 한정하는 것은 아니다. 상기 시험물질은 10 base 이상의 단일 또는 이중 가닥의 핵산, 예컨대, 10개, 11개, 12개, 14개, 15개 이상의 핵산분자예를 들면 siRNA, shRNA 또는 miRNA를 포함한다. 또한 상기 시험물질은 잔기2개 이상의 아미노산 잔기, 예컨대 6개, 8개, 10개, 12개, 20개 이하, 또는 20개 초과 예컨대 50개 아미산 잔기를 갖는 폴리펩타이드일 수 있다.

[0071] 스트레스 관련 질환 약물의 스크리닝 목적을 위해서는 화합물은 저분자량의 치료효과를 갖는 것이 사용될 수 있다. 예를 들면 중량이 400 Da, 600 Da 또는 800 Da과 같은 약 1000 Da 내외의 화합물이 사용될 수 있다. 목적에 따라 이러한 화합물은 화합물 라이브러리의 일부를 구성할 수 있으며, 라이브러리를 구성하는 화합물의 숫자도 수십개부터 수백만개까지 다양하다. 이러한 화합물 라이브러리는 펩타이드, 펩토이드 및 기타 환형 또는 선형의 올리고머성 화합물, 및 주형을 기본으로 하는 저분자 화합물, 예컨대 벤조디아제핀, 하이단토인, 바이아릴, 카보사이클 및 폴리사이클 화합물 (예컨대 나프탈렌, 페노티아진, 아크리딘, 스테로이드 등), 카보하이드레이트 및 아미노산 유도체, 디하이드로피리딘, 벤즈하이드릴 및 헤테로사이클 (예컨대 트리아진, 인돌, 티아졸리딘 등)을 포함하는 것일 수 있으나, 이는 단지 예시적인 것으로 이로 한정되는 것은 아니다.

[0072] 시험물질의 양은 사용하는 구체적인 실험방법 및 시험물질의 종류에 따라 달라지며, 당업자라면 적절한 양을 선택할 수 있을 것이다. 후보물질은 실험결과 시험물질과 접촉되지 않은 대조군과 비교하여 ROS의 생성을 감소시킨 물질이다. 예를 들면 시험물질의 존재 하에서 대조군과 비교 약 99% 이하 감소, 약 95% 이하 감소, 약 90% 감소, 약 85% 감소, 약 80% 감소, 약 75% 감소, 약 70% 감소, 약 65% 이하 감소, 약 60% 이하 감소, 약 55% 감소, 약 50% 이하 감소, 약 45% 이하 감소를 의미하나, 이를 벗어나는 범위를 제외하는 것은 아니다. ROS의 생성여부는 예를 들면 실시예에 기재된 것과 같은 공지된 다양한 방법에 의해 검출할 수 있으며, 당업자라면 적절한 것을 선택할 수 있을 것이다.

[0073] 상기 제2단계에서 세포주를 사용하는 경우, 시험물질과의 접촉은 시험물질을 세포 배양 배지에 추가한 후 세포를 일정 시간 배양하는 것을 의미한다. 또는 상기 세포가 실험동물로 형태로 제공될 때, 시험물질과의 접촉은 비경구 또는 경구 투여, 정위주사를 포함하는 이로 제한되는 것은 아니며, 당업자라면 시험물질을 동물에

게 테스트하기 위해 적절한 방법을 선택할 수 있을 것이다.

[0074] 본 발명의 상기 제3단계에서는 시험물질을 접촉시킨 세포에서의 p47phox 또는 p67phox의 발현량과 시험물질을 접촉시키지 않은 세포에서의 p47phox 또는 p67phox의 발현량을 비교하는 단계를 포함한다. 시험물질의 처리에 의한 p47phox 또는 p67phox의 발현 및/또는 활성 증가/감소는 이에 의한 뇌신경계의 생화학적 변화를 대상으로 후보물질을 선별할 수 있다. 한 구현예에서 p47phox 또는 p67phox의 발현 또는 활성의 검출은 ROS(Reactive Oxygen Species) 생성여부로 측정할 수 있다. ROS 검출 방법은 공지되어 있으며, 당업자라면 적절한 방법을 선택할 수 있을 것이며, 예를 들면 실시예에 기재된 방법과 같이 지질 과산화 수준의 측정, DCF 및/또는 DHE와 같은 ROS 민감 약물을 사용할 수 있다. 본원의 실시예에 기재된 바와 같이, ROS의 생성의 감소는 p47phox 또는 p67phox 발현 또는 활성의 감소로 해석될 수 있다.

[0075] 상기 3단계의 47phox 또는 p67phox의 mRNA의 발현량 측정은 RT-PCR, 정량적 또는 반정량적 RT-PCR(Quentitative or semi-Quentitative RT-PCR), 정량적 또는 반정량적 리얼 타임 PCR(Quentitative or semi-Quentitative real-time PCR), 노던 블롯(northern blot) 및 DNA 또는 RNA 칩(chip)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법을 이용하여 측정될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 3단계의 47phox 또는 p67phox 단백질의 발현량 측정은 웨스턴 블롯, 조직면역염색법, 조직형광염색법으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방법을 이용하여 측정될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0076] 시험물질을 접촉시킨 세포에서의 p47phox 또는 p67phox의 발현량이 시험물질을 접촉시키지 않은 세포에서의 p47phox 또는 p67phox 발현량보다 낮은 시험물질을 스트레스 민감 반응 완화제로 선별하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0077] 또 다른 양태로서, 본 발명은 개체로부터 분리된 생체 시료의 p47phox 또는 p67phox의 발현, 활성 및 기능 중 어느 하나를 측정하는 단계를 포함하는, 스트레스 민감 반응 또는 만성 스트레스로 인해 발생하는 스트레스 장애 진단을 위한 정보제공방법에 관한 것이다.

[0078] 본 발명의 일 실시예에서는 반복적인 스트레스르 받은 마우스의 뇌 뿐만 아니라, 혈액에서도 p47phox 또는 p67phox의 발현이 증가되는 것을 확인하였다(실시예 5). 상기 실험결과를 바탕으로 본 발명은 스트레스 민감 반응 또는 만성 스트레스로 인해 발생하는 스트레스 장애 여부를 진단받고자 하는 개체를 대상으로, p47phox 또는 p67phox의 발현 레벨을 측정하여 스트레스 민감 반응 또는 스트레스 장애 여부를 진단할 수 있다. 상기 진단을 위한 정보제공방법에서는 이에 제한되지는 않으나, 진단받고자 하는 개체의 혈액을 채취하여, 혈액 내의 p47phox 또는 p67phox의 발현 레벨을 확인할 수 있다. 상기 방법에서는 진단받고자 하는 개체의 p47phox 또는 p67phox 발현 레벨이 스트레스를 받지 않은 개체의 p47phox 또는 p67phox 발현 레벨에 비해 증가된 경우, 스트레스 민감 반응이 발생하고 있거나, 스트레스 장애 질환으로 진단하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

[0079] 본 발명에서는 p47phox 또는 p67phox의 발현을 억제시키는 기전을 이용한 약물들을 개발할 수 있으며, 본 발명의 방법으로 스크리닝된 약물들은 스트레스, 특히 만성 스트레스에 의해 그 증상이 촉발되거나 악화될수 있는 우울증, 퇴행성 뇌질환 등을 예방 또는 치료할 수 있다. 아울러, 스트레스가 축적되면 비가역적인 메카니즘이 진행되나, p47phox 또는 p67phox의 발현을 잘 조절하면 스트레스 발생기전을 가역적으로 조절할 수 있는 특징을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0080] 도 1은 만성적 스트레스로 인한 우울증 및 불안증 유사 행동을 보이는 마우스 모델 확립을 만성적 행동 검사로 실험한 결과이다. 도 1a의 (A)는 실험 디자인으로 7주령의 수컷 C57BL/6 마우스에 반복적인 신체구금 스트레스(RST) (14일 동안 매일 2시간, 2h-14d)를 처치하는 동안 이미프라민 (30mg/kg/day) 투여한 후 일련의 행동 시험(SIT, NSF, OF, MBT, TST, FST 순서로 검사)을 수행하는 실험 과정을 설명한다. (B)는 세 그룹, 즉 대조군(CON), 2h-14d 스트레스를 처치한 마우스(RST), 이미프라민 투여한 RST 마우스 (RST+Imi)에 대한 SIT 검사 방법 및 비디오추적 결과의 예를 보여준다. (C)는 (B)의 결과를 그래프로 나타낸 것으로 스트레스를 받은

마우스는 상호작용 영역보다 회피 영역인 코너영역에서 더 많은 시간을 보내는 것을 나타낸다. 도 1b의 (D)는 TST 및 FST 결과를 보여주는 것으로 대조군과 비교하여 2h-14d 스트레스가 가해진 마우스 (RST)의 부동성이 증가하였으나 이미프라민 처리에 의해 이러한 부동성이 감소했음을 나타낸다. 도 1c의 (F)는 NSF 실험 결과로 먹이를 먹기까지 걸리는 시간이 RST 마우스에서 증가하였으나, 이미프라민 처리에 의해 감소하였음을 나타낸다. (G)는 5분간 섭취한 사료의 양이 이미프라민 처리에 의해 증가하였음을 나타낸다. (H)는 MBT (구슬 감추기 실험) 결과로 RST 마우스가 감춘 구슬의 수가 적으나 이미프라민 처리에 의해 감춘 구슬의 수가 증가하였음을 보여준다. (I)는 OFT 결과로 중앙 영역에서의 운동 활성이 RST 마우스에서 현저하게 감소하였으며, 이미프라민 처리에 의해 부분적으로 회복되었음을 보여준다. (J)는 개방공간에서의 총 누적 이동거리를 나타내고 (K)는 시간 경과에 따른 이동거리를 보여준다.

도 2는 스트레스를 가한 시간 및 반복횟수에 의존적으로 뇌의 해마에서 지질과산화 및 단백질 카르보닐화가 증가하였음을 보여주는 결과이다. (A)는 스트레스를 가한 시간에 따른 실험 디자인이고, (B) 및 (C)는 대조군 (CON) 및 스트레스를 일정시간 받은 마우스 (2h, 4h, 6h)의 해마에서 각 말론디알데하이드(MDA) 농도 및 단백질 카르보닐화 정도를 보여주고, (D)는 2h 스트레스를 일정 기간 반복해서 가한 횟수에 대한 실험 디자인을 나타내고, (E) 및 (F)는 해마에서 각 말론디알데하이드(MDA) 농도 및 단백질 카르보닐화 정도를 보여준다.

도 3은 SH-SY5Y 세포에서 스트레스 호르몬인 글루코코르티코이드의 투여량 및 투여기간에 의존적으로 ROS 스트레스가 증가하는 것을 보여주는 결과이다. (A)는 SH-SY5Y 세포를 글루코코르티코이드 (CORT: 400 또는 800 ng/ml)으로 2시간 동안 처리한 후, 제거하고 22시간 배양 후에 다시 처리하는 과정을 1(24h) 내지 3일(72h)간 반복하는 실험디자인을 나타내고, (B)는 SH-SY5Y 세포에서 MDA 농도 (24h 대조군에 대한 %로 나타냄)를 나타내고, (C) 및 (D)는 각각 실험 디자인과 같이 처리된 SH-SY5Y 세포의 ROS를 검출하기 위해 DCF (10μM) 및 DHE(10μM)로 염색한 결과이고, 각 사진 아래의 그래프는 형광의 양을 나타낸 것이다. CON: 대조군 세포; CORT: 글루코코르티코이드 처리세포 (800ng/ml, 48시간); 아래 패널: 고해상도, scale bar: 20μm.

도 4a는 반복적인 스트레스로 인해 마우스의 뇌에서 ROS 농도를 조절하는 유전자의 발현 양상이 변화되었음을 보여주는 결과이다. (A) 및 (B)는 스트레스가 가해진 마우스 (2h-14d) 및 대조군의 전전두엽 피질 (PFCX;A) 및 해마 (HP;B)에서 ROS 농도를 조절하는 유전자의 발현을 실시간 RNA 정량 분석으로 관찰한 결과이고, 4b의 (C)는 NADPH 옥시다제의 구성을 도식적으로 나타낸 것이고, (D)는 반복적 신체적 스트레스로 인해 NADPH 옥시다제 서브유니트의 발현이 상향 조절되었음을 보여주는 결과로 대조군(C) 및 스트레스를 가한 마우스 (2h-14d)(R)의 PFCX 및 HP 부위에서 NOX2 서브유니트 (p91phox, p22phox, p47phox, p67phox, and p40phox) 및 베타액틴에 대한 RT-PCR 결과이다.

도 5는 반복적인 구금 스트레스를 받은 마우스의 혈액에서 p47phox 및 p67phox의 발현이 상향 조절될 수 있음을 나타낸 것이다. 데이터는 평균± 표준오차 (n=4-6)로 표현했다. **은 표시된 그룹 사이에 $p<0.01$에서 유의한 차이를 의미한다(Student t-test).

도 6은 SH-SY5Y 세포에서 CORT에 의해 유도된 ROS 생성이 NADPH 옥시다제 억제제 처리에 의해 차단되었음을 보여주는 결과이다. 6a는 글루코코르티코이드(400ng/ml)로 48시간 동안 처리된 SH-SY5Y 세포에서의 ROS 농도 증가가 아포사이닌 (Apo, 500μM), RU486 (RU, 20μM), SOD 모방체 MnTBAP (Mn, 100μM), 또는 비타민 C (Vit C, 200 μM)에 의해 차단된 것을 DCF (10μM) 염색으로 관찰한 결과로, 대조군에 대한 %로 나타내었다. 도 6b는 아포사이닌이 NADPH 옥시다제 서브유니트 p47phox가 글루코코르티코이드에 의해 활성화되어 세포막으로 이동하는 것을 차단하는 것을 보여주는 결과로, 미처리 대조군, 글루코코르티코이드 (400ng/ml)로 48시간 동안 처리된 SH-SY5Y 세포, 처리 후 아포사이닌 처리 세포를 항-p47phox 항체 및 DAPI 염색으로 관찰하였다.

도 7은 SH-SY5Y 세포에서 글루코코르티코이드 처리로 인해 p47phox의 발현이 상향되었음을 보여주는 결과이다. (A)는 글루코코르티코이드 (400ng/ml) 또는 H_2O_2 (200μM)로 24시간 처리된 SH-SY5Y 세포에서 p47phox 발현을 실시간 정량 RNA 분석으로 관찰한 결과로 각 시료는 대조군에 대한 배수로 나타냈다. (B)는 글루코코르티코이드 (400ng/ml)로 유도된 ROS 생성이 단백질 합성 억제제인 사이클로헥사마이드 (CHX; 1 또는 10μM) 처리(48시간)에 의해 완전히 차단되었음을 보여주는, DCF (B) 및 DHE (C)염색으로 관찰한 결과이다. 각 수치는 24h 대조군에 대한 %로 나타내었다.

도 8은 SH-SY5Y 세포에서 p47phox 유전자의 발현을 siRNA를 사용하여 감소시킨 경우 글루코코르티코이드에 의해 유도되는 ROS 생성이 차단되었음을 보여주는 결과이다. (A)는 대조군으로 siGLO를 세포내에 전달 이입하여 대부분의 SH-SY5Y 세포가 그린 형광을 나타내는 것으로 보여주고, (B) 및 (C)는 SH-SY5Y 세포를

siRNA(50 또는 100μM)로 전달이입 한 후 72시간째에 글루코코르티코이드(400ng/ml)로 처리한 후, ROS의 생성을 DCF(B) 및 DHE (C) 염색으로 관찰한 결과이다.

도 9는 마우스에 NADPH 옥시다제 억제제인 아포사이닌을 투여한 경우, 뇌에서 스트레스로 인한 ROS 생성이 억제되었음을 보여주는 결과이다. (A)는 실험디자인을 나타내며, 구금 스트레스 (2h, 3 내지 14일)를 가하기 1시간 전에 이미프라민 (Imi; 20 mg/kg), 아포사이닌 (Apo; 15 mg/kg), 또는 비타민 C (Vit C; 15 mg/kg)를 복강에 투여하였다. (B) 상기 각 약물 투여에 의한 MDA 농도를 보여주는 결과이고, (C) 및 (D)는 각 약물 투여에 의한 행동검사 TST (C) 및 FST (D)결과이다.

도 10은 뇌에서 p47phox 발현을 낙다운(knockdown) 한 경우, 만성적 스트레스로 인한 우울증 행동을 차단하였음을 보여주는 결과이다. (A)는 GFP를 발현하는 Lenti-p47phox-shRNA로 감염시킨 후 8시간에 HeLa 및 A549 세포에서 GFP의 발현을 보여주는 결과이다 (B)는 실험디자인으로 뇌의 양측 해마의 치아이랑(DG)으로 Lenti-p47phox-shRNA (GFP도 발현) 또는 Lenti-GFP를 미세주입하고, 스트레스를 가한 기간 및 검사 시기를 보여준다. (C) 및 (D)는 스트레스가 가해진 마우스 (RST)와 대조군 (CON) 마우스에서 상기 각 바이러스로 감염된 경우 TST (C) 및 FST (D) 검사 결과를 보여준다.

도 11은 p47phox (p47phox+/-) 한 카피만을 갖는 마우스는 만성 스트레스 (2h-14d 스트레스)로 인한 우울증 유사 행동을 나타내지 않음을 보여주는 결과이다. (A)는 p47phox 유전자를 정상적으로 두 카피 (+/+)(젤 사진 레인 2-3) 갖는 마우스 및 한 카피(젤 사진 4-5 레인)만을 갖는 유전자 적중 마우스의 유전자형을, p47phox 유전자를 PCR로 증폭한 후 MspI 제한효소 절단으로 분석한 결과이다. M: 마커;100bp ladder, 레인 3 및 4는 p47phox 유전자 결손으로 추가의 밴드가 생성되었음을 보여준다. (B)는 실험디자인으로 p47phox 이형접합체 (heterozygote) 마우스 (+/-) 및 야생형 (+/+) 마우스에 2h-14d 스트레스를 가하였다. (C) 및 (D)는 마지막 스트레스 처치 다음 날 수행한 TST (C) 및 FST (D) 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0081] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0082] **실험재료 및 방법**

[0083] **동물**

[0084] 7주령의 수컷 C57BL6 마우스를 대한 바이오링크에서 구입했다. 마우스는 습도와 온도가 조절되는 환경에서 실험 전 1주일 동안 두 마리씩 우리(케이지)에서 키워 환경에 적응하도록 하였다. 모든 동물은 이화여자대학교 의과대학의 실험동물관리지침에 따라 다루었다. P47phox 유전자 적중 마우스(+/-)는 Huang et al., 2000에 기재된 바와 같으며, Jackson Laboratories(USA)에서 구입하였다. 유전자 적중 마우스의 유전자형은 마우스의 꼬리에서 게놈 DNA(genomic DNA)을 분리하여 다음의 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다; 5-TGG AAG AAG CTG AGA GTT GAG G -3(서열번호 1), 5-TCC AGG AGC TTA TGA ATG ACC-3(서열번호 2). PCR로 증폭한 후 MspI으로 절단하여 아가로스젤 전기영동으로 분석하였다.

[0085] **신체 구금 스트레스(Restraint Stress)**

[0086] 본 실험에 사용된 구금 스트레스 관련 실험은 종전에 기술된 바와 같이 수행하였다(Kim and Han, 2006; Lee et al., 2009). 요약하면, 약 20 내지 23g의 7주령 수컷 C57BL/6 마우스를 개별적으로 환기가 잘되는 50 ml 폴리프로필렌 원뿔형 튜브에 머리부터 넣고, 약 3 cm 길이의 중간 크기의 튜브로 막은 후, 50 ml 튜브의 뚜껑을 채워서 마우스를 이 기구 안에 완전히 구금시켰다. 이러한 구금 실험은 일정한 시각(오전 10)에 시작하여 하루에 2시간씩 수행하였으며 14일에 걸쳐 반복하였다. 구금 실험 후, 마우스는 케이지에 담아 평상시의 환경에서 사육하였으며 물과 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

[0087] **약물 투여**

[0088] 2 시간 감금 시작하기 1 시간 전에 관심 약물을 마우스에 복강 내 주사하였고, 이 과정을 구금 실험이 진행되는 동안 반복하였다. 사용된 약물의 명칭, 출처, 및 투여 경로는 다음과 같았다: 이미프라민 염산염

(Imipramine hydrochloride, Sigma (St. Louis, MO)), 투여량 20 mg/kg(i.p.); 아포사이닌(Apocynin, Sigma), 투여랑 15 mg/kg(i.p.); 비타민 C (L-Ascorbic acid, Sigma), 투여량 15 mg/kg(i.p.). 아포사이닌은 DMSO에 용해한 후, 식염수로 희석하였으며, 다른 약물은 식염수에 용해하여 사용하였다. 최종적으로 0.9% 식염수 100 ㎕로 희석된 각각의 약물은 상기 언급한 투여방법 및 투여량에 따라 투여하였다.

[0089] 행동실험을 위해서 주사에 의한 스트레스 발생을 배제하기 위해 위의 경우와 독립적으로 실험실 사료(Lab chow) 또는 30mg/kg/day 양의 이미프라민을 포함하는 실험실 사료를 섭취하는 방법도 병행하였다. 이러한 사료는 일반 실험실 사료를 분쇄하고 여기에 이미프라민을 혼합한 후, 모양을 만들고, 감마선을 조사하여 제조하였다. 대조군으로 사용된 사료도 이미프라민을 제외하고는 동일하게 제조하였다(Seo et al. 2010).

[0090] **행동 평가 실험**

[0091] 마우스는 각 행동 평가 시험을 시작하기 30분 전에 검사 방으로 옮겨와 시험하는 내내 같은 방에 머물도록 하였다. 시험은 도 1a (A)에 기재된 바와 같이 수행하였다. 행동 평가는 컴퓨터 비디오-추적 시스템 (SMART; Panlab S.I., Barcelona, Spain)을 사용하여 수행하였으며, 마지막 주사 1시간 후에 마우스를 분석하였다. 모든 회차에서 소리는 55-60 dB 백색소음(잡음)으로 차단하였다.

[0092] **사회적 상호작용 검사(Social Interaction Test, SIT)**

[0093] SIT는 약간의 변형을 제외하고는 기본적으로 종전에 기술된 바와 같이 수행하였다(Berton et al., 2006). 각 검사 대상 마우스를 개방 필드에 놓고 궤적을 2회 연속 추적하였다(각 회 5분, 최적의 민감도/처리량 비). 첫 번째 세션(비표적 조건)의 경우, 검사하고자 하는 마우스를 표적동물이 없는 빈 플렉시글라스 메시 케이지(15 x 8 x 17cm)를 둔 개방공간에 두어 적응하게 하였다. 두 번째 세션(표적 조건)은 첫 번째 세션과 동일한 조건이나 사회적 상호작용 표적 동물(주령이 적어도 시험대상 동물보다는 많은 공격성 B6/SJL 수컷 마우스)을 플렉시글라스 메시 케이지를 둔 개방공간에 넣어 사회적 상호작용을 조사하는 것이었다. 두 세션 사이에 실험 대상 마우스는 개방 필드로부터 홈 케이지로 옮겨놓고 약 1분간 두었다. 비-표적 및 표적의 각 세션에서는 비디오 추적 데이터를 사용하여 실험 대상 마우스가 상호작용 지역(표적 동물 케이지 주위로 8cm 폭 영역) 및 케이지가 위치한 반대편에 있는 코너 지역(18 x 18 cm)에서 보내는 시간(초단위)을 측정하였다. 이동도는 표적 동물 B6/SJL 마우스 없이 5분간 모니터링 한 후, 이어서 5분간은 케이지에 표적 동물을 넣어둔 상태에서 측정하였다. 측정치는 SMART 소프트웨어를 사용하여 얻은 값이다.

[0094] **꼬리 매달기 검사 (tail suspension test; TST)**

[0095] 조사하려는 마우스의 꼬리를 탁자 표면에서 50cm 위에 위치하는 금속 봉에 테이프로 고정시켜 마우스를 매달아 6분간 부동성을 측정하였다. 실험은 소음이 없는 방에서 수행하였으며 탁자에는 안전매트를 깔았다(Steru et al.,1985, Bilkei-Gorzo et al., 2002).

[0096] **강제 수영 검사 (forced swim test; FST)**

[0097] 플렉시글라스 실린더(높이; 27 cm, 지름; 15 cm)에 14 cm 깊이로 24℃의 물을 채운 통에 마우스를 넣어, 탈출하거나 바닥에 닿지 않도록 하는 조건에서 15분간 예비 수영을 하도록 두었다. 15분 후 마우스를 꺼내 수건으로 물기를 닦고, 홈케이지로 돌려보냈다. 하루 뒤 마우스를 6분간 강제로 수영하게 하였다. 처음 1분간 마우스들이 적응하도록 두고, 다음 5분간 행동을 관찰하였다. 부동성 시간은 모든 팔다리의 움직임 없이 동물이 떠있는 시간의 합으로 정의된다. 자세한 기록방법은 참조문헌(Kim et al., 2006)에 기재되어 있다.

[0098] **새로운 환경에서 먹이 섭취 억제성 검사(Novelty Suppressed Feeding, NSF)**

[0099] 본 실험은 스트레스로 인한 불안감을 측정하는 것으로, 비친화적 환경에서 동물이 종전에 섭취하던 먹이를 처음으로 섭취하기까지 망설이는 시간을 측정하는 것이다. 본 검사는 만성적 우울증 치료제의 약효 검사에 매우 민감하다. 검사 전에, 케이지에서 사료를 ~24시간 동안 제거하고, 물은 임의로 마시게 하였다. 이 기간 종료 후, 2 x 2.5cm 크기의 타원형 사료 펠렛 1개를 원형의 흰색 필터페이퍼(직경 150mm) 위에 놓아 개방 필드(45

x 45 x 40 cm)의 중앙에 두었다. 각 마우스를 홈케이지에서 꺼내 물과 사료 없이 대기 케이지에 30분간 둔 후, 1400 lux 조명이 비추는 개방 공간에 넣었다. 이때부터 먹이를 처음으로 먹기까지 소요되는 지체성 및 홈케이지에서 5분간에 걸친 섭취량을 기록하였다. 마우스가 먹이를 섭취하기 시작하자마자 동물은 홈케이지로 옮겨 미리 측정된 중량의 사료를 5분간 섭취하도록 하였다. 5분 종료시, 케이지에 넣어준 사료의 무게를 측정하여, 섭취한 사료의 양을 계산하였다.

[0100] **구슬 감추기 검사(Marble Burying Test, MBT)**

[0101] 구슬 감추기 검사는 불안감을 측정하기 위한 것으로 약간의 변형을 제외하고는 기본적으로 기존의 방법(Deacon, 2006, de Kloet ER et al, 2005)대로 수행하였다. 요약하면, 빈 홈케이지에 바닥으로부터 5cm 높이까지 깔개를 채우고, 여기에 12개의 구슬을 격자로 배치한 후, 마우스를 풀어놓고 30분 동안 자유롭게 두었다. 그 후 숨겨진 구슬의 수를 세었다. 구슬이 < 25% 보이면 숨겨진 것으로 간주하였다. 항우울제를 미리 투여한 마우스는 대조군 마우스와 비교하여 구술 숨기는 현상이 덜하였다.

[0102] **개방 공간 검사(Open Field, OF)**

[0103] 흰색 플렉시글라스 챔버(45 x 45 x 40; 70 lux)의 개방 공간 중앙에 시험 동물을 넣고 정해진 시간 동안 운동성을 측정하였다. 수평 이동도는 시험 동물이 움직인 이동거리로 판단하였다. 개방 공간의 30%를 차지하는 내부의 사각형 영역을 중앙부분으로 정하였다.

[0104] **지질 과산화의 측정**

[0105] 지질 과산화는 종전에 기술된(Im et al., 2006; Seo et al., 2010a-c; 2011a-b) 바와 같이, Bioxytech MDA-586 kit를 사용하여 말론디알데히드 (MDA) 수준을 측정하여 평가하였다.

[0106] 요약하면, 뇌 조직을 5 mM 부틸화 히드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene)을 포함하는, 4배 부피의 빙냉의 20 mM PBS(pH 7.4)로 균질화하였다. 이어 균질물은 4℃ 에서 3,000 g로 10분간 원심분리 했고, 상층액은 각각의 분석에 사용되었다. 각각의 반응에 10 ㎕의 프로부콜과 640 ㎕의 희석된 R1 시약 (1:3 메탄올:N-메틸-2-페닐인돌)을 첨가하고, 150 ㎕의 12N HCl과 혼합하였다. 45℃ 에서 60분간 반응시킨 후, 10,000 g로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 분리하여, 586 nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA 데이터는 단백질 농도에 대해 적정화(normalization)하였고, 값은 대조군(sham control)에 대한 백분율로 나타냈다. 단백질-결합된 MDA 함량은 차감하여 수득하였다.

[0107] **단백질 카르보닐화의 함량 측정**

[0108] 단백질 카르보닐 함량은 Lee et al. (2009)에 기재된 방법으로 정량화하였다. 뇌 균질물의 상층액 (500 ㎕)을 500 ㎕의 20% 트리클로르아세트산 (TCA)로 침전시켰다. 10,000g에서 15분간 원심분리 후, 펠렛을 50℃ 에서 2M HCl의 10 mM 2,4-디니트로페닐히드라진 0.5 ml로 재부유시켰다. 매 10분마다 주기적으로 교반하면서, 암실의 실온에서 한 시간 동안 반응시킨 후, 시료를 0.5 ml의 20% TCA로 침전시켰다. 이 과정을 10% TCA를 사용하여 3회 반복하였다. 결과로 얻은 침전물은 37℃ 에서 2 mM NaOH에 용해시켰다. 단백질 카르보닐 함량은 360 nm에서 흡광도를 측정하여 결정했고, nmol/mg 단백질의 단위로 표시했다.

[0109] **혈액 분리**

[0110] 1 ml 일회용 플라스틱 주사기로 마취한 쥐의 복부 대동맥에서 채취한 혈액으로부터 마우스 혈구를 준비하였다. 전혈을 튜브에 수집하고 1,500 rpm으로 15분간 실온에서 원심분리하여 얻어진 상층액과 펠렛을 각각 혈청과 혈구라 지칭했다.

[0111] **실시간 PCR에 의한 mRNA의 정량**

[0112] RNA 시료 준비와 실시간 PCR은 종전에 기술된 바와 같이 수행하였다 (Ha et al., 2008). RNA 정량을 위해, 만성적으로 RTS를 처리한 마우스의 상전 전두엽 피질(Superior prefrontal cortex)과 해마(Hippocampus), 혈구를 수집했다. 총 RNA 는 Trizol (Invitrogen Carlsbad, CA, USA) 시약을 이용하여 정제하였고, 유전자적 오염을 막기 위해 DNaseI을 처리하였다. 역전사는 역전사 시스템(Promega, Madison, WI, USA)을 사용하여 제조자의 지시에 따라 수행하였다. 첫-가닥 cDNA는 Promega RT PCR kit를 사용하여, 총 부피 20 ㎕에서 1 ㎍의 총 RNA로 합성하였다.

[0113] PCR 반응은 10 ㎕ 2X iQ SYBR Green supermix(Bio-Rad, Richmond, CA, USA), 5 pmol/㎕의 정방향과 역방향 프라이머 각각 1 ㎕, 및 5 ㎕ cDNA (1/100 희석)을 포함하는 최종 부피 20 ㎕에서, CFX 96 실시간 PCR 시스템 검출기(Real-Time PCR System Detector) 를 사용하여 수행하였다. 반응 주기는 다음과 같았다; 95℃ 에서 5분간 처리 후, 95℃ 에서 20초, 56℃ 에서 20초, 72℃ 에서 20초간 처리를 40회 반복. 증폭의 특이성은 장비에 내장된 소프트웨어를 사용하여 55℃ 에서 95℃ 까지 점진적인 온도증가 (0.5℃) 동안 담아낸 자동 형광 데이터에 대한 DNA 융해 곡선에 의해 결정하였다. 증폭 배수의 차이는 Bio-Rad CFX Manager에 대해 유전자 발현 분석(Gene Expression Analysis)이라는 내장된 소프트웨어를 사용하였고, 참고로 사용한 GAPDH 및 베타 액틴 (β-actin)에 대해 표적 유전자의 실시간 PCR 증폭을 기초로 하여 계산하였다. 실시간 PCR 분석은 표 1 (실시간 PCR 프라이머 세트(마우스: 서열번호 3 내지 28))및 2(실시간 PCR 프라이머 세트(인간: 서열번호 3 내지 6, 서열번호 29 내지 32))에 기재된 실시간 PCR 프라이머 세트의 사용하여 수행하였다. 실시간 PCR은 각각의 그룹과 각각의 부위에 대해 6번씩 시행하였다.

표 1

Table 1. Set of real-time PCR primers

Gene		Sequence (5' → 3')	length	Tm	Amplicon	NCBI No.
GAPDH	Forward	AGAAGGTGGTGAAGCAGGCATC	22	60.3	111	NM_008084
	Reverse	CGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG	23	60.6		
β-Actin	Forward	ATCGTGCGTGACATCAAAGAGAAG	24	59.6	199	NM_007393
	Reverse	TGCCACAGGATTCCATACCCAAG	23	60.2		
p47phox	Forward	ACCGGCTATTTCCCATCC	18	56	125	NM_010876.2
	Reverse	TGGATGCTCTGTGCGTTG	18	56		
p67phox	Forward	CATGAAGCACACCATCCAGTCC	22	55	91	NM_010877.4
	Reverse	GATTTCTCTTCCTGTTTGTCCATCTG	26	42		
COX-2	Forward	GCTTCAAACAGTTTCTCTACAACAA	25	36	111	NM_011198.3
	Reverse	CATTTCTTCCCCCAGCAAC	19	53		
iNOS	Forward	TGTGGCTACCACATTGAAGAA	21	43	105	NM_010927.3
	Reverse	TCATGATAACGTTTCTGGCTCTT	23	39		
NF-κb	Forward	TTGTCTGACATGGGTCTCCA	20	60	95	NM_019408.2
	Reverse	GCACTGTCTTCTTTCACCTCTGT	23	59		
TNF-α	Forward	TGCCTATGTCTCAGCCTCTTC	21	52	117	NM_013693.2
	Reverse	GAGGCCATTTGGGAACTTCT	20	50		
IL-1β	Forward	TGAGCACCTTCTTTTCCTTCA	21	59	101	NM_008361.3
	Reverse	TTGTCTAATGGGAACGTCACAC	22	59		
SOD1	Forward	TGCGTGCTGAAGGGCGAC	18	67	85	NM_011434.1
	Reverse	GTCCTGACAACACAACTGGTTC	22	50		
CAT	Forward	TCTACACAAAGGTGTTGAACGAG	23	43	125	NM_009804.2
	Reverse	AGGGTGGACGTCAGTGAAAT	20	50		
HO-1	Forward	CTGCTAGCCTGGTGCAAGA	19	58	120	NM_010442.1
	Reverse	CCAACAGGAAGCTGAGAGTGA	21	52		
PRX1	Forward	TGGATTCTCACTTCTGTCATCTGG	24	59	98	NM_011034.4
	Reverse	GCGCTTGGGATCTGATATTAAGGG	24	60		

[0114]

표 2

[0115]

Gene		Sequence (5'→3')	length	Tm	Amplicon	NCBI No.
GAPDH	Forward	AGAAGGTGGTGAAGCAGGCATC	22	60.3	111	NM_008084
	Reverse	CGAAGGTGGAAGAGTGGGAGTTG	23	60.6		
β-Actin	Forward	ATCGTGCGTGACATCAAAGAGAAG	24	59.6	199	NM_007393
	Reverse	TGCCACAGGATTCCATACCCAAG	23	60.2		
p47phox	Forward	CACGGACAACCAGACAAA	18	60	125	NM_000265.4
	Reverse	TCTTCTCGTAGTTGGCAATG	20	60		
p67phox	Forward	CCCCTTTCAGAAGACAGCAT	20	59	104	NM_000433.3
	Reverse	TCATCTGGAAAGCCTTGGTC	20	60		

[0116] **RT-PCR을 사용하여 cDNA 농도 측정**

[0117] cDNA의 양은 실시간 PCR을 사용하여 측정하였다. 실험에서 측정한 전사체의 특정 부위 증폭에 사용한 프라이머는 다음과 같다:

[0118] *gp91-phox*, 5'-GGTTTATGATGATGGGCCTAA-3' (서열번호 33) 및 5'-GCACTGGAACCCCTGAGAAA-3'(서열번호 34); *p22-phox*, 5'-CCCCGGGGAAAGAGGAAAAA-3' (서열번호 35) 및 5'-AGGACAGCCCGGACGTAGTA-3'(서열번호 36); *p67-phox*, 5'-GGGAACCAGCTGATAGACTA-3'(서열번호 37) 및 5'-TCCATTCCTCYTTCTTGGCA-3'(서열번호 38); *p47-phox*, 5'-CAGCCAGCACTATGTGTACA-3'(서열번호 39) 및 5'-GAACTCGTAGATCTCGGTGAA-3'(서열번호 40); 및 *p-40-phox*, 5'-TGGCCCAGCAGCTGCG-3'(서열번호 41) 및 5'-CGRTAGCGGCGGTAGATGAG-3'(서열번호 42). gp91-phox, p22-phox, p40-phox, p47-phox 및 p67-phox 프라이머는 종전(Tammariello et al., 2000)에 기술된 바와 같이 사용하였다. GAPDH 및 베타 액틴(β-actin)을 내부 대조군으로 사용하여 적정화를 하였다. PCR 반응은 3회 독립적으로 수행하였다.

[0119] **렌티바이러스를 포함하는 벡터(Lentiviral vector)의 생성과 농축**

[0120] 재조합 렌티바이러스는 종전 (Min et al., 2010)에 기술된 대로 생산하였다. 요약하면, 전이 벡터(Lenti-p47phox-shRNA, OpenBiosystems에서 구입, RMM4431-98723759), 막 당단백질 발현 렌티바이러스 벡터(Macrogene., Korea) 및 패키징(packaging) 벡터를 포함하는 3개의 플라스미드를 293T 세포에 1:1:1의 몰비율로 리포펙타민 플러스(Invitrogen Corp., CA, USA)와 함께 핵내 주입하였다. 바이러스 벡터 입자를 포함한 배양 상층액을 핵내 주입한 후 48시간에 수집하고, 0.45 μm 막으로 여과 후 -70℃ 냉동고에 보관했다. 렌티바이러스 벡터의 발현 정도는 RT-PCR, 웨스턴 블롯, 및 ELISA로 분석하였다. 역가(적정량)는 HeLA 세포에 감염 후 p24 ELISA에 의해 결정하였다. 이렇게 얻어진 값은 약 10^6-10^7 형질도입 단위 (transduction unit, TU)/ml 이었다. GFP 발현은 HeLA 세포 또는 A594 세포에 핵내주입 후 확인되었고, 형광 현미경(Nikone TE2000U, Japan)을 사용하여 사진으로 찍었다. 바이러스는 센트리콘(Centricon, Millipore Corp., Billerica, MA, USA)으로 여과하였다. 바이러스 입자를 80,000g에서 2시간 동안 초원심분리하여 보다 농축하였으며, 이러한 농축과정을 2번 반복했다. 마침내 약 10^{10}-10^{12} TU/ml의 양으로 얻어졌다.

[0121] **렌티바이러스-shRNA의 정위 주사 (stereotaxic injection)**

[0122] 수컷인 C57BL/6 마우스(20-25 g)에 케타민(50 mg/ml) 및 자일라진 염산염 (23.3 mg/ml)의 3.5:1 혼합물을 g 체중 당 1.0 ㎕의 양으로 복강내 주사하여 마취시키고, 종전 연구에서 기술된 바와 같이 정위 장치에 위치시켰다(Kim and Han, 2006). 3 ㎕ 부피의 렌티 shRNA를 28 G 바늘을 사용하여 0.5 ㎕/min의 속도로 각각의 치아 이랑으로 우측 측뇌실로 주입했다(정수리점(bregma)을 기준으로 한 mm 단위의 정위 좌표: 앞-뒤(anterior-posterior), -2.4; 측면중앙(midlateral), 2.0; 등-배(dorsal-ventral), -2.1) (Franklin and Paxinos, 1997). 5분 후 역류를 최소화 하기 위해 3분간 3단계를 거쳐 바늘을 제거하였고, 마우스는 깨지 않도록 따뜻한 패드에 계속 두었다. 마취에서 깨어난 마우스는 분석에 사용될 때까지 홈케이지에 두었다. 주사 14일 후 운동증 유사 행동 검사를 수행하였다. shRNA 대조군; 마우스 pGIPZ 렌티바이러스 shRNXmir (RMM4431), 렌티 shRNA-p47phox (RMM4431-98723759, V2LMM_3405)는 Open Biosystems, Inc. (USA)에서 구입하였다.

[0123] **조직면역화학**

[0124] 뇌는 경심관류로 4% 파라포름알데히드로 고정하였으며, 동일 용액에 4℃에서 하룻밤 후고정하였다. 종전의 연구에서 기술된 바와 같이(Lee et al., 2009), 바이브라톰(vibratome)을 이용하여 뇌를 40 μm 간격으로 잘라 뇌 절편을 준비했다. 일차항체로서 항-p47phox 항체 (Santa Cruz, USA), 항-HNE (HNE11-S) 항체 (Alpha Diagnostic Intl. Inc, USA)와 반응시킨 후, 마우스 IgG에 대한 Alexa Fluor 488-conjugated 항체 또는 토끼 IgG에 대한 Texas Red 594-conjugated 항체(Invitrogen Corp., USA) 및 FITC (Fluorescein isothiocyanate) 및 TRITC (tetramethylrhodamine isothiocyanate) (Jackson ImmunoResearch, USA)에 커플링된 제2항체를 사용하여 가시화하고, 발색은 바이오티닐화된 HRP (Vector Laboratories, USA)를 제조자의 지시대로 사용하여 수행하였다. 발색 후 슬라이드에 벡타쉴드용액 (Vector Laboratories)을 넣고 현미경으로 관찰 후 내장된 카메라 및 소프트웨어로 분석하였다 (Olympus BX 51 microscope equipped with a DP71 camera 및 DP-manager 및 DP-Controller software ,Olympus Co., Japan). 세포수는 염색부위를 촬영한 영상을 디지털이미지로 변환한 후 TOMORO ScopeEye 3.6 program (Techsan Community, Korea)을 사용하여 맹검방식으로 측정하였다.

[0125] **세포 배양과 약물 처리**

[0126] SH-SY5Y 뉴로블라스토마(neuroblastoma cell) 세포주의 세포 배양은 종전 연구에서 기재된 바와 같다(Seo et al., 2010b-c; 2011a). 요약하면, SH-SY5Y 세포를 10% 열-비활성화 FBS, 페니실린(20 units/ml)및 스트렙토마이신 (20 mg/ml)을 포함하는 Dulbeccos modified Eagles medium (DMEM)로 37℃에서 습식인큐베이터(95% 공기와 5% 이산화탄소)에서 배양하였다. 세포가 배양디쉬를 70-80% 채울 정도(confluence)로 자랐을 때, 실험에 사용하였다. 글루코코르티코이드 (CORT), H_2O_2. RU486 (mifepristone), MnTBAP, 아포시아닌 및 비타민 C는 Sigma에서 구입하였다. CORT, H_2O_2, MnTBAP, 및 비타민 C는 PBS에 100μM 농도로 용해하였다. 아포사이닌 및 RU486은 DMSO에 100μM 농도로 용해한 후 PBS로 희석하였다. 글루코코르티코이드 및 H_2O_2는 무혈청 DMEM에서 배양된 세포에 사용하였다.

[0127] **전달이입 및 siRNA (Small Interference RNA)**

[0128] p47phox를 낙다운(knockdown)하기 위해, SH-SY5Y 세포를 전달이입 24시간 전에 시딩(seeding)하여 전달이입시 배양 디쉬를 70% 정도 채울 정도(confluence)가 되도록 하였다. siRNA (siRNA-p47phox)는 바이오니어(한국)에서 합성하였다. 센스가닥의 siRNA-p47phox 서열: 5'-CUA UUU CCC AUC CAU GUA U-3'(서열번호 43); 및 안티센스 가닥: 5'-AUA CAU GGA UGG GAA AUA G-3'(서열번호 44). 각 siRNA 가닥의 3 ‘ 말단에는 4개의 데옥시리보스뉴클레오타이드 오버행(dTdT)을 추가하였다. 비표적 대조군 siRNA인 6-카복시플루오레신 플루오로포어로 표지된 올리고뉴클레오타이드 siGLO Green [D-001630-0105] 및 [D-001210-0205]은 Dharmacon Inc (USA)에서 구입하였다. 세포는 DMEM로 희석된 100nM siRNA의 농도로 Lipofectamine 시약 (Invitrogen)을 제조자의 지시대로 사용하여 전달이입하였다. p47phox 낙다운여부는 항-p47phox 항체를 이용한 면역세포화학법으로 확인하였다.

[0129] **배양된 세포에서 ROS 측정**

[0130] 96-웰 플레이트의 SH-SY5Y 세포를, 10 μM DCF를 포함한 배지에서 37℃ 로30분간 인큐베이션했다. 종전 기술에 기재된 바와 같이, 과산화수소 관련 ROS에 민감한 세포막투과성 형광 색소인 CM-H2DCFDA[5-(and-6)-chloromethyl-2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate]를 사용하여 ROS를 가시화하였다(Im et al., 2006; Seo et al., 2011a).

[0131] 요약하면, SH-SY5Y 세포를 HEPES 완충액으로(120 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.8 mM $MgCl_2$, 1.8mM $CaCl_2$, 20mM HEPES, 10mM NaOH, 15mM 글루코즈) 세척하여 형광 수준 분석에 사용하였다. 형광수준은 분광형광계(SpectraMaxM5, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA. USA)를 사용하여, DCF에 대해 488 nm에서 여기(excitation)와 510 nm에서 발광(emission)을, DHE에 대해 540nm에서 여기와 590nm에서 발광을 측정했다. 3회 측정하여 평균값을 내어, 하나의 데이터로서 사용하였다. 염색 영상은 DP71 카메라 및 DP-manager와 DP-

Controller 소프트웨어가 장착된 Olympus BX 51 현미경(Olympus Co.)을 사용하여 분석하였다. 콘포칼 영상은 Zeiss LSM510/META/NLO 레이저 스캐닝 현미경과 Zeiss Plan-Neofluar 소프트웨어 (Carl Zeiss, USA)로 분석하였다. 세포수는 염색부위를 촬영한 영상을 디지털이미지로 변환한 후 TOMORO ScopeEye 3.6 program (Techsan Community, Korea)을 사용하여 맹검방식으로 측정하였다. 각 시료의 형광은 막대그래프를 사용하여 24h 대조군(sham)의 퍼센트의 막대그래프로 나타냈다.

[0132] **면역세포화학법**

[0133] 세포를 실온에서 0.1M 인산완충액 (ph 7.4) 중의 4% 파라포름알데하이드로 10분간 고정한 후, 0.1M의 PBS 중의 0.2% Triton X-100로 10분간 처리하여 투과성있게 만든 후 5% 염소 혈청으로 1시간 동안 블락(block)하였다. 블락 후에, 세포를 실온에서 하룻밤 항-p47phox 항체 (1:1000)가 들어있는 3% BSA 용액에서 인큐베이션 하였다. 0.1 M PBS로 세포를 세척한 후 플루오레신-컨주게이트된 2차 항체 (TRITC, 1:100, Sigma)와 1시간 동안 인큐베이션한 후, 세척하고 플루오레신 마운팅 용액 (DAKO, Denmark)에서 30분간 마운팅하였다. 이어 염색된 영상을 DP71 카메라 및 DP-manager와 DP-Controller 소프트웨어가 장착된 Olympus BX 51 현미경(Olympus Co.)을 사용하여 촬영/분석하였다

[0134] **통계처리**

[0135] 일분량변이분석(ANOVA)과 Newman-Keuls 다중검사방법을 사용하여 수 개 시료의 결과를 비교분석 하였으며, 통계분석은 GraphPad PRISM software 4.0 (GraphPad Software Inc., USA)를 사용하였다. 모든 데이터는 평균± S.E.M.이고, 다른 언급이 없는 한 유의한 통계적 차이는 5% 수준을 사용하였다.

[0136] **실시예 1: 반복적인 구금 스트레스로 인한 지속적 우울증 관련 행동 관찰**

[0137] 반복적인 구금 스트레스(2h-14d, 실험 방법 참조)와 같은 만성적 스트레스가 가져오는 영향을 알아보기 위해, 도 1a의 (A)에 도식화된 내용으로 실험을 수행하였다. 구체적인 실험방법은 상기 실험방법에서 자세히 설명하였다.

[0138] 2h-14d 구금 개시 15일째 실시한 사회적 상호작용은 비디오 추적 시스템 (도 1a, B)을 사용하였으며, 실험결과 대조군 마우스는 총 300초의 관찰기간 중 125초를 표적 마우스에 근접하거나 상호작용을 하였으나, 스트레스가 가해진 마우스는 표적 마우스와 보내는 시간이 감소하였으며, 코너 지역에서 시간을 보냈다 (도 1a, C). 반면 표적 마우스가 없는 경우에는 대조군과 시험군간에 별차이가 없었다. 이러한 지속적 비사회적 행동이 사람에서 스트레스에 의해 유도되는 우울증과의 유사여부를 확인하기 위해 항우울증 치료제로 널리 사용되는 이미프라민을 구금이 가해진 마우스에 처리하고 위와 동일한 시험을 수행하였다. 마지막 구금 스트레스를 가한 다음 날부터 15일간 이미프라민을 투여한 결과 상호작용 지역에서 지내는 시간이 증가하였으며, 동시에 코너 지역에서 보내는 시간은 감소하였으며(도 1a, C). 이러한 결과는 구금에 의해 유도된 증상이 약물에 의해 개선된 것으로, 유도된 증상이 우울증에 의한 것임을 나타낸다.

[0139] 사회적 상호작용 결과는 아래에서 언급하는 다양한 행동 검사에서도 검증된다. 우선 TST (도 1b, D)의 경우, TST는 2h-14d 구금 스트레스 후 16일째 수행되었으며, 스트레스를 받은 마우스의 경우 대조군과 비교하여 부동성 시간이 유의적 ($p < 0.01$)으로 증가하였다. 이러한 증상은 2h-14d 구금 스트레스 후 15일간 이미프라민을 투여한 경우는 관찰되지 않았으며, 이는 상기 증상이 우울증과 관련된 것임을 제시한다. FST (도 1b, E)의 경우도 위와 일치하는 결과를 나타냈으며, FST는 2h-14d 구금 스트레스 후 17일째 수행되었으며, 스트레스를 받은 마우스의 경우 대조군과 비교하여 부동성 시간이 상당히 유의적 ($p < 0.01$)으로 증가하였다. 반면 이러한 증상은 2h-14d 구금 스트레스 후 16일간 이미프라민을 투여한 경우는 관찰되지 않았으며, 이는 상기 증상이 우울증과 관련된 것임을 제시한다. 이러한 결과는 2h-14d 구금 스트레스가 항우울증제인 이미프라민의 투여로 완화될 수 있는 지속적인 우울증 행동을 유발할 수 있음을 나타내는 것이다.

[0140] 스트레스로 인한 우울증은 지속적인 불안관련 행동 변이와 밀접한 관련이 있는 것으로 밝혀졌다 (Kim and Han, 2006). 따라서 2h-14d 구금 스트레스가 이러한 현상을 초래하는지를 조사하였다. 새로운 환경하에 먹이 섭취 망설임 시간을 측정하는 NSF 검사를 수행하였으며, 2h-14d 스트레스 후 16일째 수행한 NSF 검사 결과, 대조군 마우스와 비교하여 구금 스트레스가 가해진 마우스의 경우 사료를 섭취하기 까지 걸린 시간이 훨씬 길

었으며 ($p < 0.01$), 이는 구금 스트레스가 불안 장애를 초래하며, 이러한 장애가 스트레스를 가한 후 17일째까지 장기간 지속되는 것을 나타낸다. 이러한 불안 장애는 항우울제인 이미프라민을 스트레스를 가한 후 17일 동안 투여한 경우 대조군 수준으로 회복되었다 (도 1c, F 및 G).

[0141] 불안증과 관련된 다른 행동 검사로 MBT를 수행하였다. MBT는 2h-14d 스트레스 후 18일 경과 후 수행하였으며, 스트레스를 받은 마우스는 대조군과 비교하여 숨긴 구술의 갯수가 현저하게 낮았으며, 이는 마우스가 불안하다는 것을 나타내는 것이다. 이 경우도 이미프라민을 투여한 경우, MBT 결과가 대조군 수준으로 회복되었다 (도 1c, H). 개방 필드 검사의 경우도 스트레스를 받은 마우스는 개방 필드의 30%를 구성하는 중앙부위에서 이동거리가 대조군에 비하여 적었으며, 이는 불안 증상을 나타내는 것이며, 이러한 행동은 이미프라민의 투여에 의해 부분적으로 회복되었다 (도 1c, I). 개방 필드에서의 총 이동거리에는 차이가 없었다 (도 1c, J 및 K). 종합하면, 상기 결과는 구금 스트레스로 인해 지속적인 우울증 및 불안 행동이 유발되었음을 나타낸다. 도 1에서 데이터는 평균± SEM (n=20-22)로 나타내었으며, * 및 ** 는 각각 $p<0.05$ 및 $p<0.01$로 두 그룹간의 차이를 나타낸다. One-Way ANOVA< Newman-Keuls 멀티플 비교 테스트를 사용하였다.

[0142] **실시예 2: 구금 스트레스로 인한 뇌에서의 ROS(Reactive Oxygen Species) 증가**

[0143] 본 발명자들은 스트레스로 유도된 지속적인 우울증 관련 행동이 뇌의 ROS 조절 시스템과 관련되어 있는지를 확인해보았다.

[0144] 반복적 스트레스는 혈액 중 스트레스 호르몬인 글루코코르티코이드(glucocorticoid)를 통하여 뇌에서 높은 산화성 스트레스를 가져온다. 그러나 글루코코르티코이드가 ROS를 증가시키는 기전 및 ROS가 우울증 및 불안 유사 행동을 야기시키는지에 관하여는 알려진 바 없다.

[0145] 글루코코르티코이드로 인한 ROS 생성 기전을 밝히기 위해서, 우선 상이한 기간 동안 구금 스트레스에 노출된 마우스의 뇌에서 산화성 스트레스의 지표로 지질 과산화 및 단백질 카르보닐화 정도를 조사하였다. 구금 스트레스를 받은 시간을 2시간, 4시간, 6시간으로 나누어 실험하고(도 2A), 구금 스트레스를 1, 3, 5. 7, 10 또는 14일 동안 매일 2시간씩 행해진 그룹으로 나누어 실험하였다(도 2D).

[0146] 스트레스를 받은 시간(B,C) 및 반복횟수(E, F)에 의존적으로 해마에서 지질과산화 결과인 말론디알데하이드(MDA) 및 단백질 카르보닐화 정도가 증가하였으며, 특히 2h 구금 스트레스를 7회 가한 후부터 ROS가 현저히 증가하였다.

[0147] 도 2에서 데이터는 평균± SEM (n=4-8)로 나타내었으며, * 및 ** 는 각각 $p<0.05$ 및 $p<0.01$로 대조군과 그룹간의 차이를 나타낸다. One-Way ANOVA< Newman-Keuls 멀티플 비교 테스트를 사용하였다.

[0148] **실시예 3: SH-SY5Y 세포에서 글루코코르티코이드로의 농도 및 처치 시간 의존적인 ROS 농도 증가 유도**

[0149] 글루코코르티코이드로 인한 ROS 생성 기전을 밝히기 위해서, SH-SY5Y 인간 뉴로블라스토마 세포를 글루코코르티코이드(corticosterone; CORT)로 처리하고 ROS의 생성을 조사하였다. 투여하는 글루코코르티코이드의 용량 및 시간을 달리한 실험 디자인은 도 3, A에 기재되어 있다. 구체적으로, SH-SY5Y 세포를 글루코코르티코이드의 저농도(400ng/ml 또는 1.15 μM) 또는 고농도(800nm/ml)로 2시간 동안 처리한 후, 제거하고 22시간 배양 후에 다시 처리하는 과정을 1 내지 3일 반복하는 실험을 수행하였다.

[0150] 그 결과 도 3, B에서 보는 바와 같이 글루코코르티코이드의 양 및 처리 기간에 의존적으로 MDA 농도가 증가하였다. 다음으로 이에 관여하는 인자를 규명하기 위하여 글루코코르티코이드로 처리된 세포를 각 과산화수소에 민감한 염색제인 DCF 및 과산화물 음이온 특이적 염색제인 DHE로 염색한 후, 현미경 및 분광형광측정기로 관찰하였다. 결과는 각각 도 3, C 및 D에 있다. 처리되지 않은 대조군과 비교하여 고농도의 글루코코르티코이드로 3일간 반복 처리된 SH-SY5Y 세포에서 높은 DCF 반응성 형광이 검출되었다. 이러한 결과는 글루코코르티코이드의 농도 및 시간 의존적으로 세포에서 ROS 및 과산화물을 증가시킴을 나타내는 것이다. 도 3에서 데이터는 평균± SEM로 나타내었으며, * 및 ** 는 각각 $p<0.05$ 및 $p<0.01$로 대조군과 실험 그룹간의 유의적 차이를 나타낸다. One-Way ANOVA< Newman-Keuls 멀티플 비교 테스트를 사용하였다.

[0151] **실시예 4: 만성적 스트레스로 인한 뇌에서의 NADPH 옥시다제 발현 증가**

[0152] 앞서 언급한 바와 같이 구금 스트레스는 마우스에서 장기간 지속되는 우울증 및 불안 유사 행동을 야기하고, 뇌에서 ROS 농도 증가를 가져왔는데, 본 실험에서는 이에 관여하는 세포내 인자를 규명하였다. 인자 규명을 위해 ROS 생성에 중요한 것으로 알려진 인자를 구금을 가한 마우스와 비처리 대조군 마우스의 뇌조직에서 실시간 PCR 방법으로 조사하였다. 조사한 유전자는 퍼록시리독신(peroxiredoxin (PRX1)), 사이토플라즈믹 Cu/Zn 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(cytoplasmic Cu/Zn superoxide dismutase (SOD1)), 카탈라아제(catalase (CAT)), 헴 옥시게나아제-1(heme oxygenase-1 (HO-1)), p47phox, p67phox, 시클로옥시제네이즈-2(cyclooxygenase-2 (COX2)), 산화질소 합성효소(inducible nitric oxide synthase (iNOS)), 핵 인자-카파 B(nuclear factor-kappa B (NF-κB)), 종양 괴사인자-알파(tumor necrosis factor-alpha (TNF-α)), 및 인터루킨-1 베타(interleukin-1 beta (IL-1β))이었다. 결과는 도 4, A(전전두엽 피질, prefrontal cortex, PFCX) 및 B(해마, HP)에 나타내었다. 조사한 유전자의 발현 양상이 PFCX와 HP에서 서로 다르게 나타났으며, 특히 NADPH 옥시다제 서브유니트인 p47phox 및 p67phox의 경우 대조군과 비교하여 스트레스를 받은 마우스에서 발현양이 상당히 증가하였다. 데이터는 평균± SEM (n=6-9)로 나타내었으며, * 및 ** 는 각각 $p<0.05$ 및 $p<0.01$로 그룹간의 유의적 차이를 나타낸다 (Student's t-test).

[0153] NADPH 옥시다제는 "phox" 영역을 갖는 서브유니트 p47phox, p67phox, p40phox, gp91phox (NOX2), 및 p22phox을 포함한다. NOX2 및 p22phox는 세포막에 위치하고, p47phox는 세포질내 존재하다가 인산화되면 p67phox, p40phox와 함께 막으로 이동하여 활성 NOX2 복합체를 형성한다. 활성화된 복합체는 Rac의 GDP와 GTP의 교환을 수행하고 이 과정에서 NADPH로부터 산소로 전자를 전달하고 부산물로 H^+와 과산화물을 생성하며 반응식은 다음과 같다: $NADPH + 2O_2 \leftrightarrow NADP^+ + 2O_2^{\cdot -} + H^{+.}$ (도 4, C).

[0154] NADPH 옥시다제를 구성하는 5종류의 서브유니트의 구금 스트레스를 받은 마우스의 HP 및 PFCX에서의 발현여부를 RT-PCR로 조사한 결과, p47phox 및 p67phox 발현이 증가하였다 (도 4, D). 이러한 결과는 도 4의 A 및 B에서 관찰된 결과와 일치하는 것으로 만성적 스트레스로 인한 ROS의 생성에 NADPH 옥시다제가 관여하고 있음을 나타내는 것이다. 보다 자세한 기전 규명을 위해 이하에서는 p47phox의 인산화 및 막으로의 전이에 의한 NADPH 옥시다제 활성화를 조사하였다. 도 4에서 데이터는 평균± SEM(n=6-9)로 나타내었으며, * 및 ** 는 각각 $p<0.05$ 및 $p<0.01$로 그룹간의 유의적 차이를 나타낸다(Student's t-test).

[0155] **실시예 5: 만성 스트레스 받은 마우스의 혈액에서 p47phox 및 p67phox의 발현증가 확인**

[0156] 반복적인 스트레스가 마우스의 뇌 뿐만 아니라 혈액에서도 p47phox 및 p67phox의 발현을 증가시키는지 알아보았다.

[0157] 반복적인 구금 스트레스(2h-14d)를 가한 마우스와 구금 스트레스를 가하지 않은 마우스의 혈액으로부터 마우스 혈구를 얻어, 혈액 내 p47phox 및 p67phox의 발현 정도를 실시간 PCR으로 확인하였다.

[0158] 그 결과, 구금 스트레스를 가하지 않은 마우스의 혈액에 비하여, 반복적인 구금 스트레스를 받은 마우스의 혈액에서 p47phox 및 p67phox의 발현이 현저히 증가됨을 확인할 수 있었다(도 5).

[0159] 상기 결과로부터, 반복적인 스트레스가 뇌의 미토콘드리아 내 p47phox 및 p67phox의 발현을 증가시킬 뿐만 아니라, 혈액 내 혈구에서도 p47phox 및 p67phox의 발현을 증가시키며, 이로부터 혈액를 채취하여 p47phox 또는 p67phox의 발현을 측정하여 스트레스의 영향을 받았는지, 반복적인 스트레스로 인해 우울증과 같은 스트레스 장애를 진단할 수 있다. 또한, 혈액 내 p47phox 또는 p67phox의 발현 감소를 억제시키거나, 이의 활성을 촉진시킴으로써 스트레스 민감 반응을 완화시키고, 만성적 스트레스로 인해 발생하는 스트레스 장애를 치료할 수 있다.

[0160] **실시예 6: NADPH 옥시다제의 상향 발현에 의하여 글루코코르티코이드로 처리된 SH-SY5Y 세포에서의 ROS 증가.**

[0161] SH-SY5Y 세포를 글루코코르티코이드로 처리한 후, ROS 생성을 NADPH 옥시다제 억제제 중 하나인 아포사이닌의 존재 및 부재하에서 DCF 염색으로 조사하였다. 결과는 도 6a 및 6b에 나타내었다. 글루코코르티코이드에 의하여 증가된 ROS가 아포사이닌의 처리(Apo, 500 μM)에 의해서 완전히 차단되었음을 알 수 있다. 또한 글루코코르티코이드 수용체 길항제인 RU486 (RU, 20 μM), SOD 모방체 MnTBAP (Mn, 100 μM), 및 비타민 C (Vit C,

200 μM)에 의해서도 ROS 상승효과가 차단되었다. 데이터는 평균± SEM(n=6)로 나타내고, * 및 ** 는 각각 $p<0.05$ 및 $p<0.01$로 두 그룹간의 유의적 차이를 나타낸다. One-way ANOVA, Newman-Keuls 멀티플 비교 테스트를 사용하였다.

[0162] 이러한 결과는 NADPH 옥시다제의 활성이 글루코코르티코이드에 의해 유도된 ROS 생성에 중요한 인자임을 나타내는 것이다.

[0163] NADPH 옥시다제 활성에 있어 p47phox의 역할을 규명하기 위하여, 활성의 필수 전단계인 p47phox의 막으로의 전이(Suh et al., 2007; 2008)를 글루코코르티코이드로 처리된 SH-SY5Y 세포에서 항-p47phox 항체를 이용한 염색으로 조사하였다. 결과는 도 6b에 나타내었다. 비처리 세포의 경우 p47phox가 세포질에 머물러 있었으나, 글루코코르티코이드로 처리된 경우, 세포막으로 이동하였음을 알 수 있었으며, 이러한 현상은 아포시아닌의 처리에 의해 사라졌다.

[0164] 이러한 결과는 NADPH 옥시다제가 글루코코르티코이드에 의한 ROS 증가를 매개하였음을 증명하는 것이다.

[0165] 글루코코르티코이드에 의한 p47phox 증가가 간접적으로나마 ROS로 인한 것인지를 알아보기 위해 세포를 200 μM 과산화수소로 처리하였다. 그 결과 p47phox 발현량에는 변화가 없었으며, 이는 p47phox 발현 증가가 ROS와 독립적인 현상임을 나타내었다 (도 7, A). 도 6에서 데이터는 평균± SEM(n=5-6)로 나타내고, * 는 $p<0.05$로 CORT 단독처리군과 비교한 유의적 차이를 나타낸다. One-way ANOVA, Newman-Keuls 멀티플 비교 테스트를 사용하였다.

[0166] 글루코코르티코이드에 의한 ROS의 증가에 신규 단백질 합성이 필요한지, 또는 글루코코르티코이드 대사의 결과인지를 조사하였다. 이를 위해 글루코코르티코이드 처리과정에서 단백질 합성 억제제인 사이클로헥사마이드(CHX)를 처리하였으며, ROS에 민감성 염색제인 DCF 및 DHE로 염색한 결과, ROS 및 과산화물의 생성을 완전히 차단하였다 (도 7, B 및 C).

[0167] 이러한 결과는 글루코코르티코이드로 처리된 SH-SY5Y 세포에서 ROS 및 과산화물의 생성에 NADPH 옥시다제 서브유니트의 합성이 필요하다는 것을 암시하는 것이다. 또한 이러한 결과는 SH-SY5Y 세포에서 ROS 및 과산화물의 생성에 장기간 (>24h)의 글루코코르티코이드 처리가 필요하다는 결과(도 3)와, 마우스에서 높은 산화성 스트레스를 유도하기 위해 만성적 스트레스가 요구되는 결과(도 2)와 일치하는 것이었다.

[0168] 글루코코르티코이드에 의한 p47phox 증가와 ROS 증가 및 과산화물 생성과의 연관성을 재확인하기 위해서, p47phox 발현을 p47phox-siRNA를 사용하여 하향 조절하는 실험을 수행하였다. 결과는 도 8에 나타내었다. SH-SY5Y 세포를 si-GFP (100 μM siRNA 농도에서, 87.32 ± 1.73% 이상이 GFP-양성)로 전달이입 한 결과, 거의 모든 세포에 siRNA가 전달되었다(도 8, A). SH-SY5Y 세포를 p47phox-siRNA로 전달이입 72시간 후에 세포를 글루코코르티코이드 (400ng /ml)로 48시간 처리한 후, ROS를 DCF 및 DHE 염색으로 분석하였다. p47phox- siRNA (50 또는 100 μM)로 전달이입된 세포에서 글루코코르티코이드에 의해 유도된 ROS 생성 (도 8, B) 및 과산화물의 생성 (도 8, C)은 처리한 siRNA의 양에 의존적으로 감소하였으며, 이러한 현상은 p47phox의 상향 발현조절이 글루코코르티코이드에 의한 ROS 및 과산화물 생성에 있어 주요 인자임을 나타내는 것이다. 도 8에서 데이터는 평균± SEM(n=4-6)로 나타내고, * 및 ** 는 각각 $p<0.05$ 및 $p<0.01$로 두 그룹간의 유의적 차이를 나타낸다. One-way ANOVA, Newman-Keuls 멀티플 비교 테스트를 사용하였다.

[0169] **실시예 7: p47phox 에 의한 만성적 구금 스트레스에 반응한 행동 조절**

[0170] 뇌에서 스트레스에 의해 유도된 p47phox의 상향 발현 현상을 보다 자세히 이해하기 위하여, 뇌의 해마에서 p47phox 활성과 ROS 생성 및 우울증 행동의 관련성을 조사하였다. 실험 디자인은 도 9, A에 도식화하였다. 구금 스트레스 (2h, 3 내지 14일)를 가하기 1시간 전에 이미프라민 (Imi; 20 mg/kg), 아포사이닌 (Apo; 15 mg/kg), 또는 비타민 C (Vit C; 15 mg/kg)를 복강에 투여하였다.

[0171] 그 결과, 3, 7, 또는 14 일간 반복적으로 신체적 스트레스 (2-h 구금)를 가한 경우, 반복횟수에 따라

ROS가 증가하였다 (MDA 분석). 그러나 아포사이닌 (15 mg/kg)을 스트레스를 가하기 전에 매일 복강 투여할 결과, 대상 마우스의 뇌에서는 지질 과산화현상이 완전히 차단되었으며, 이미프라민(20 mg/kg)을 투여한 대상 마우스의 해마에서도 지질 과산화 현상이 차단되었다. 반면 비타민 C (15 mg/kg)는 ROS 생성을 부분적으로 억제하였다(도 9, B).

[0172] 행동 관찰 결과는 도 9, C 및 D에 나타내었다. 스트레스를 받은 마우스의 경우, TST 및 FST에서 부동성 시간의 증가가 나타났으나, 이러한 현상은 아포사이닌 (15 mg/kg) 및 이미프라민(20 mg/kg)의 투여에 의해 사라졌다. 이 경우 비타민 C(15 mg/kg)는 효과가 없었다. 이러한 결과는 아포사이닌이 스트레스로 인한 ROS 증가를 억제하였을 뿐 아니라, 동물모델에서 항우울증 효과가 있음을 보여주는 것이다. 또한, p47phox 또는 p67phox의 활성 또는 발현을 억제시킬 수 있는 물질을 투여하게 되면, 반복적인 스트레스에 의해 우울증이 형성되는 것을 방지할 수 있음을 알 수 있었다. 데이터는 평균± SEM(n=8-10)로 나타내고, * 및 ** 는 각각 $p<0.05$ 및 $p<0.01$로 두 그룹간의 유의적 차이를 나타낸다. One-way ANOVA, Newman-Keuls 멀티플 비교 테스트를 사용하였다.

[0173] 아포사이닌이 만성스트레스로 인한 우울증, 불안 증상을 해소하기는 하지만 이의 신경해부학적 표적 부위는 정확하게 알려지지 않았다. 따라서 렌티바이러스 벡터 시스템을 사용하여 특정 뇌영역에 있는 p47phox의 발현을 shRNA를 사용하여 특이적으로 차단하였다. 이를 위해 비바이러스성 벡터 대조군, Lenti shRNA-GFP 대조군, 및 Lenti-p47phox-shRNA 실험군을 사용하였다. Lenti-GFP 대조군 또는 Lenti-p47phox-shRNA 는 각각 독립적으로 치아이랑 부위로 침제(infusion)하였다.

[0174] 결과는 도 10에 나타내었다. A는 GFP를 발현하는 Lenti-p47phox-shRNA로 감염 후 8시간에 HeLa 및 A549 세포에서 GFP의 발현을 보여주는 결과이며, B는 실험디자인으로 스트레스를 가한 기간 및 검사 시기를 도식적으로 나타낸 것이고, 관상뇌 섹션의 양측의 해마의 치아이랑(DG)으로의 Lenti-p47phox-shRNA (GFP 발현) 또는 Lenti-GFP가 침제되었음을 보여준다. 침제 15일 후에 마우스에 2h-14d 구금 스트레스를 가한 후, 15일 후에 행동을 관찰하였다. Lenti-shRNA-GFP 대조군은 비바이러스성 벡터가 전달된 대조군과 비교하여 TST 및 FST에서 전형적인 우울증 유사 행동을 나타냈으나, Lenti-47phox-shRNA 실험군은 우울증 행동을 나타내지 않았다(도 10, C 및 D). 이러한 결과는 뇌의 특정 영역에서의 p47phox 발현 억제만으로도 스트레스로 인한 우울증 행동의 치료 및 예방이 가능함을 나타내는 것이다. 데이터는 평균± SEM(n=5-6)로 나타내고, * 및 ** 는 각각 $p<0.05$ 및 $p<0.01$로 24시간 대조군과의 유의적 차이를 나타낸다. One-way ANOVA, Newman-Keuls 멀티플 비교 테스트를 사용하였다.

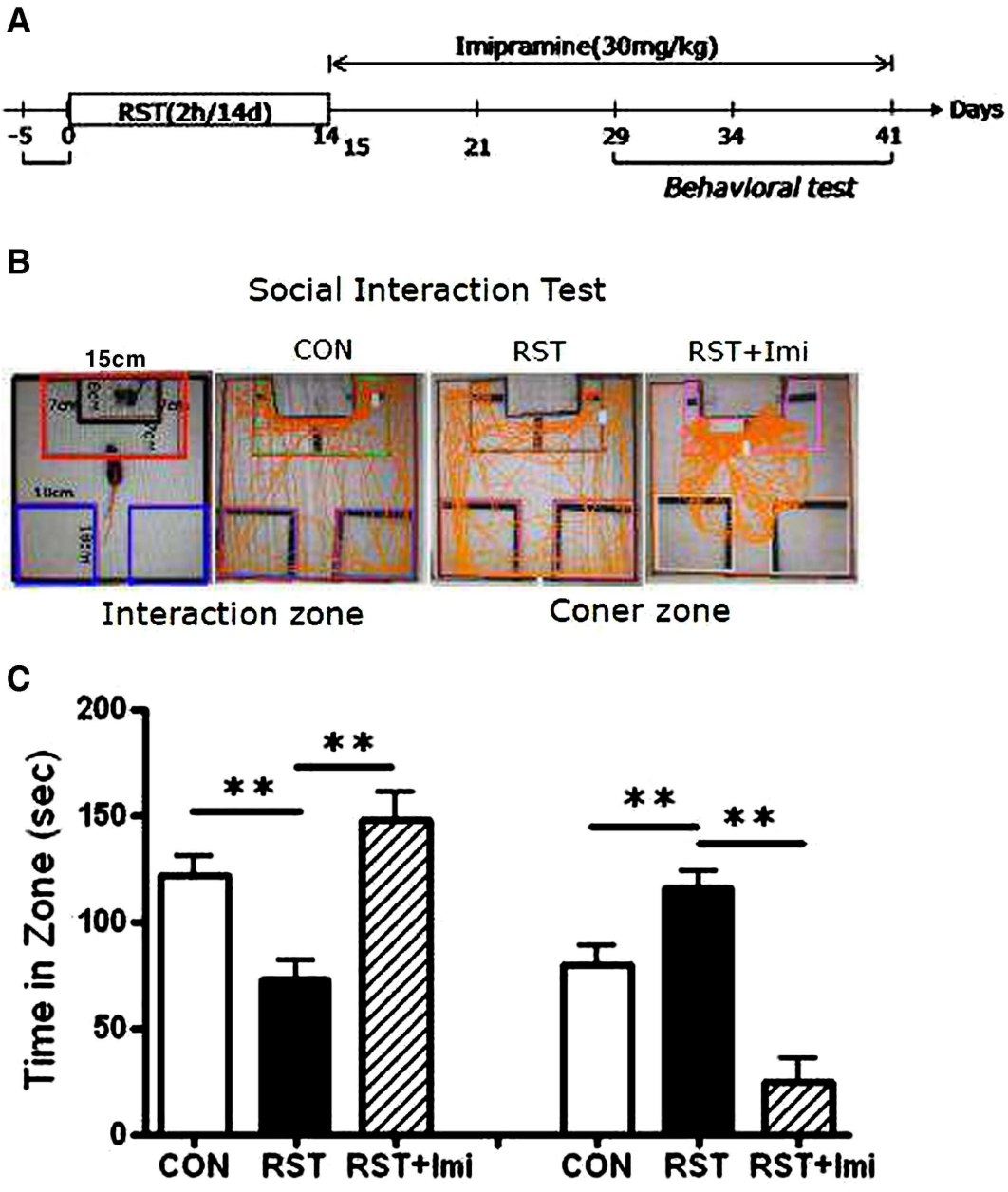
[0175] p47phox 유전자적중 마우스 (p47phox +/-)를 사용하여 위와 유사한 실험을 수행하였다. p47phox 유전자를 정상적으로 두 카피 (+/+) 갖는 마우스 및 한 카피만을 갖는 유전자 적중 마우스의 유전자형을, p47phox 유전자를 PCR로 증폭한 후 MspI 제한효소 절단으로 분석한 결과를 도 11, A에 기재하였다. 상기의 유전자형을 가지는 마우스에 2h-14d 스트레스를 가한 후, TST및 FST 행동평가를 수행하였다. 실험결과는 도 11,C(TST) 및 D(FST)에 나타내었다. TST 및 FST에서 비유전자변형 마우스는 우울증 유사 행동을 나타냈으나, 이러한 현상이 p47phox +/- 마우스에서는 관찰되지 않았다. 데이터는 평균± SEM(n=12-15)로 나타내고, ** 는 $p<0.01$로 대조군 마우스와의 유의적 차이를 나타낸다. One-way ANOVA, Newman-Keuls 멀티플 비교 테스트를 사용하였다. 이러한 결과는 모두 p47phox의 결손이 항 우울증 효과를 나타내는 것을 뒷받침하는 것이다.

[0176] 본 실시예의 실험결과를 요약하면 다음과 같다. 만성스트레스를 받은 동물모델에 아포시아닌을 처리한 결과 우울증 치료제인 이미프라민의 효과와 유사한 항스트레스 및 항우울증 효과를 확인하였다. 또한 Lenti-p47phox-shRNA를 해마에 미세주입한 결과 NADPH 옥시다제 활성을 억제하는 경우 대조군의 경우와 달리 만성스트레스에 의해 우울증 행동이 생성되지 않는 것을 확인하였다. p47phox 유전자 적중 돌연변이 (+/-) 마우스에서도 대조군인 야생(+/+)의 경우와 달리 만성스트레스에 의해 우울증 행동이 생성되지 않는 것을 또한 확인하였다. 뇌신경계 내에 산화성 스트레스의 증가 프로파일을 규명하였으며, 만성스트레스 동물모델에서 산화성스트레스의 유발 후보 유전자로서 NADPH 옥시다제 발현증가를 확인하였으며, SH-SY5Y 인간 신경세포주에 스트레스 호르몬인 글루코코르티코이드를 처리하는 in vitro 스트레스 모델에서 NADPH 옥시다제 발현증가, 산화성스트레스의 증가 및 미토콘드리아 기능 손상 증가를 확인하였으며, 새로운 단백질 합성을 억제하여 NADPH 옥시다제 발현 억제 및 산화성스트레스가 차단된다는 것을 확인하였다. 또한 뇌 뿐만 아니라 만성 스트레스를 받은 동물의 혈액 내 혈구에서도 NADPH 옥시다제 발현증가, p47phox 및 p67phox 의 발현증가를 확인하였다.

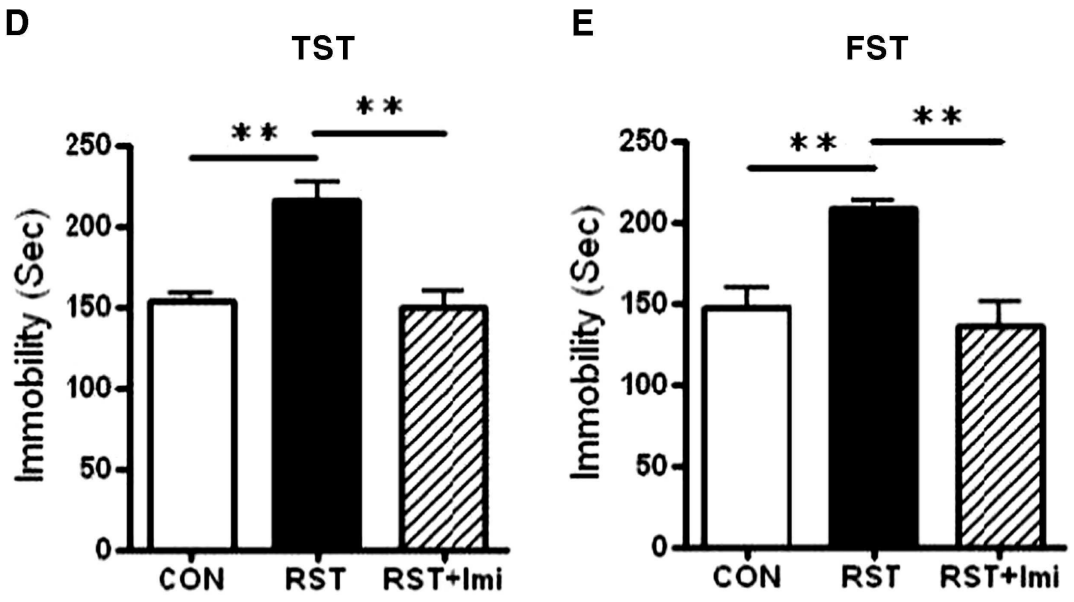
[0177] 또한 SH-SY5Y 인간 신경세포주에 글루코코르티코이드를 처리한 경우 아포시아닌에 의해 NADPH 옥시다제의 핵심 서브유니트인 p47phox의 세포막 이동 억제 (효소 활성화 억제) 현상을 규명하였다. 글루코코르티코이드 처리 조건에서 p47phox 유전자에 대한 siRNA에 의해 세포내 산화성 스트레스 증가가 억제되는 것을 확인하였다. 따라서 본 발명은 NADPH 옥시다제를 표적으로 하는 만성 스트레스에 의해 그 증상이 촉발되거나 악화될 수 있는 정신질환 중 주요우울증, 불안증, 공포기억, 정신적 공황, 강박장애, 외상후 스트레스장애, 정신분열증 또는 퇴행성 뇌질환 (알츠하이머성 치매, 파킨슨병, 뇌졸중, ALS 등) 치료제 또는 만성 스트레스에 의해 그 증상이 촉발되거나 악화될 수 있는 정신질환이 발병하기 전 단계에서 상기 질환을 예방할 수 있는 제제 개발에 유용하게 사용할 수 있다.

도면

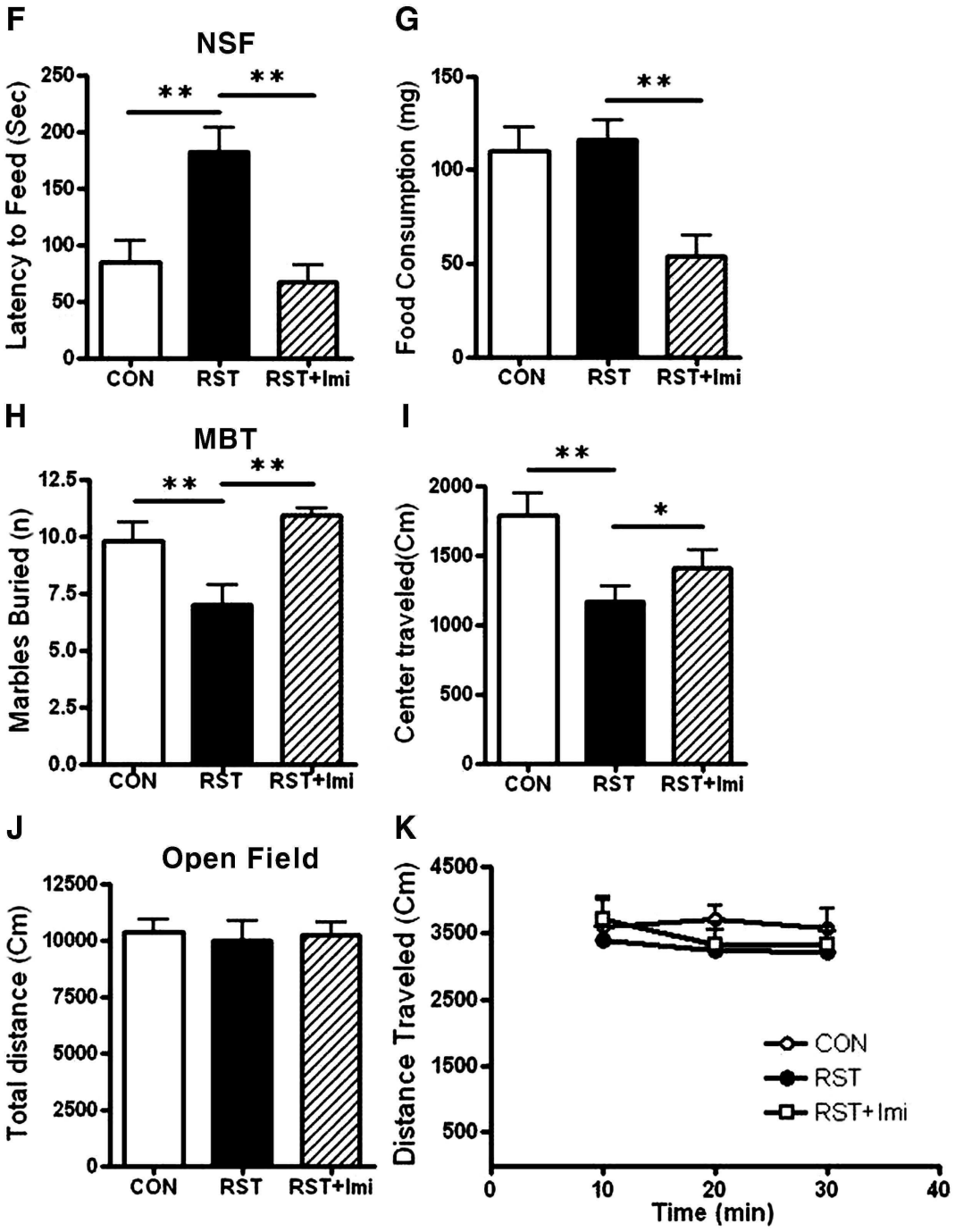
도면1a



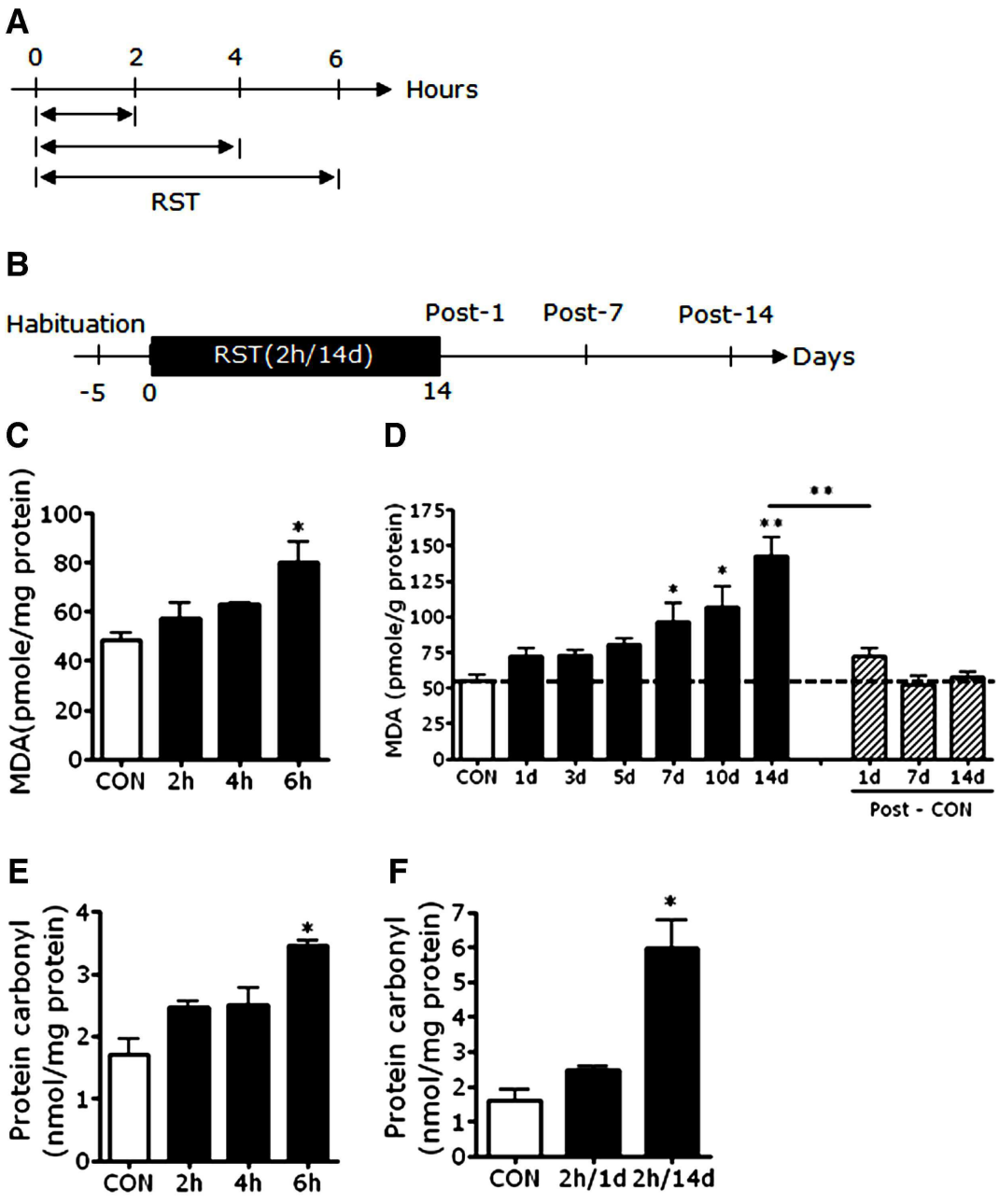
도면1b


D
TST
Immobility (Sec)
250
200
150
100
50
0
**
**
CON
RST
RST+Imi
E
FST
Immobility (Sec)
250
200
150
100
50
0
**
**
CON
RST
RST+Imi

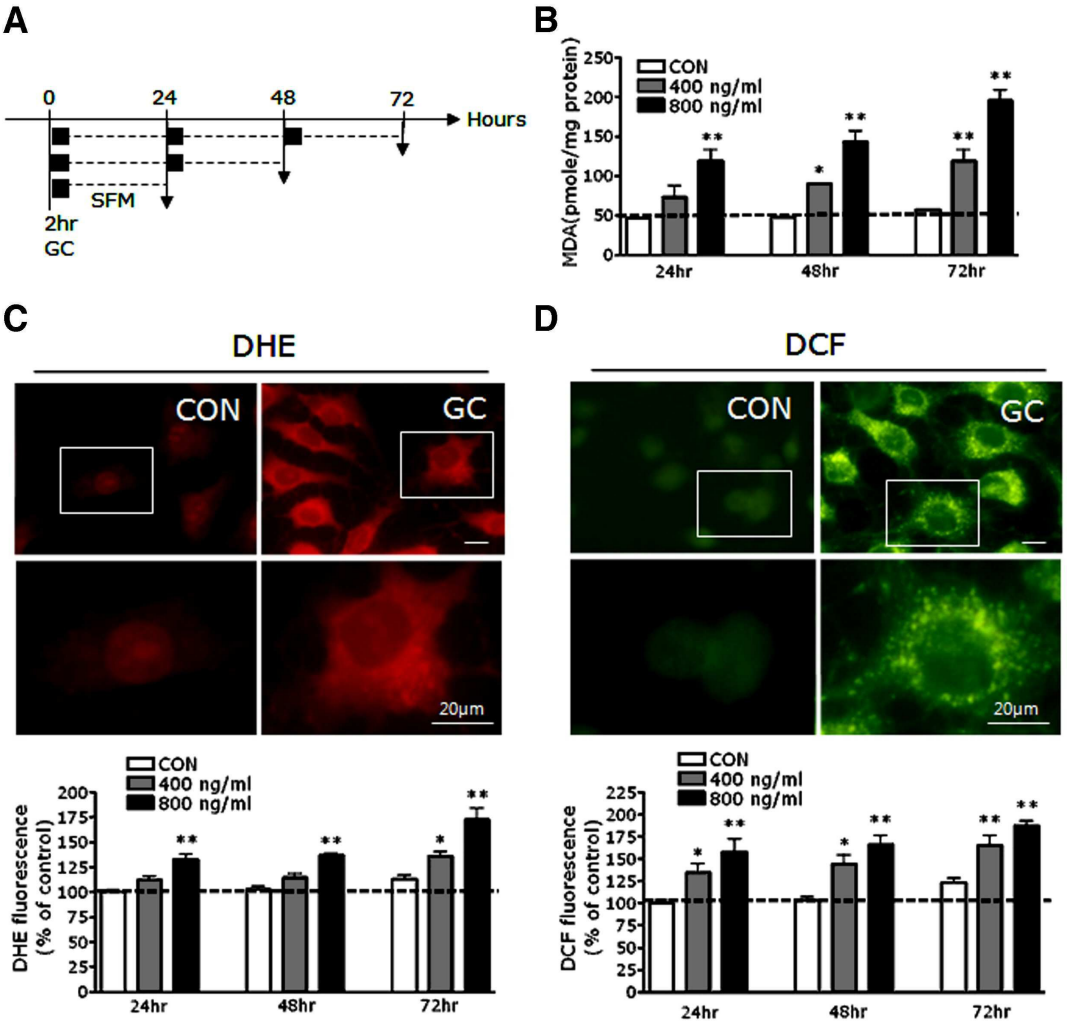
도면1c


F
NSF
Latency to Feed (Sec)
250
200
150
100
50
0
**
**
CON
RST
RST+Imi
G
Food Consumption (mg)
150
100
50
0
**
CON
RST
RST+Imi
H
MBT
Marbles Buried (n)
12.5
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
**
**
CON
RST
RST+Imi
I
Center traveled(Cm)
2000
1500
1000
500
0
**
*
CON
RST
RST+Imi
J
Open Field
Total distance (Cm)
12500
10000
7500
5000
2500
0
CON
RST
RST+Imi
K
Distance Traveled (Cm)
4500
3500
2500
1500
500
0
10
20
30
40
Time (min)
CON
RST
RST+Imi

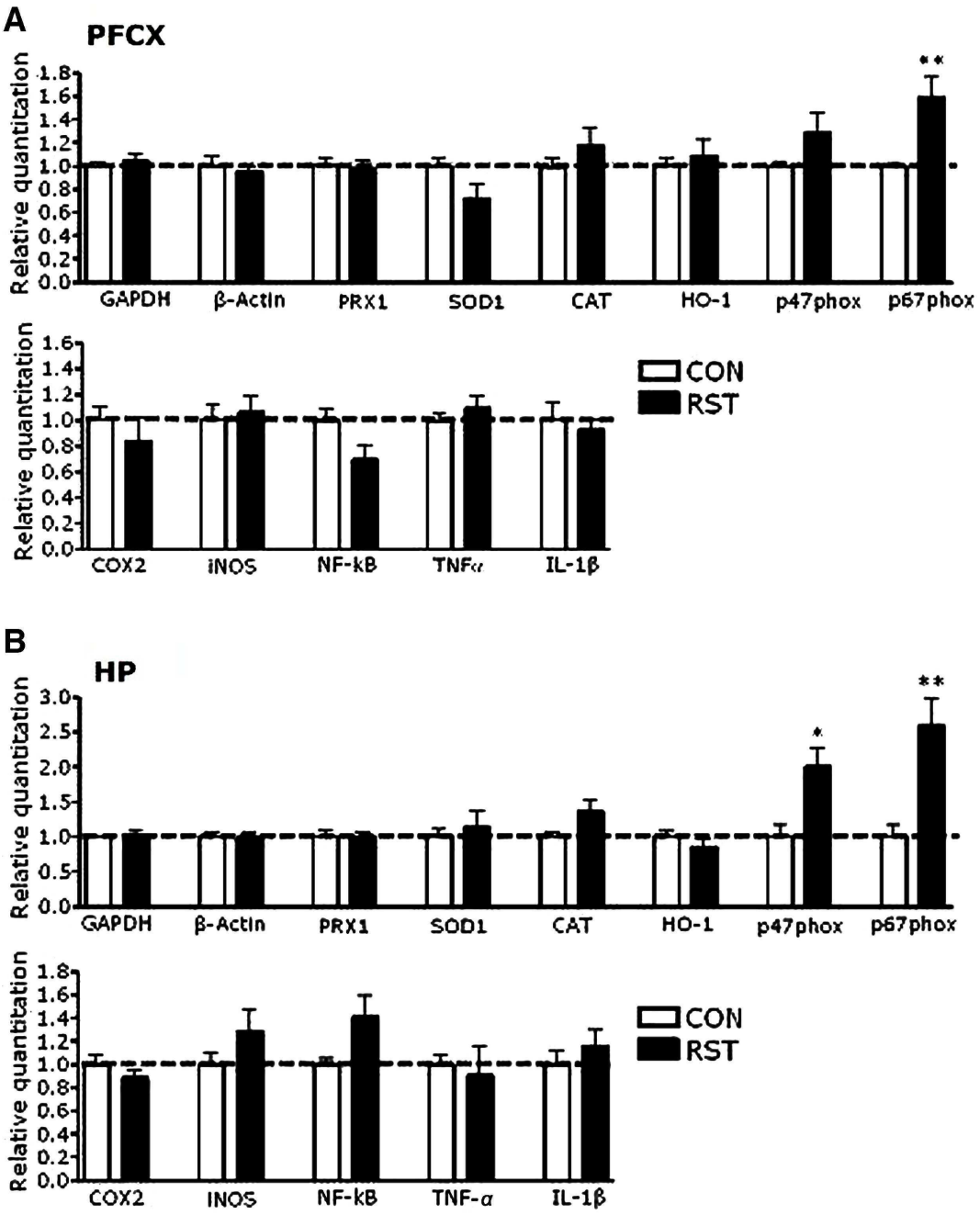
도면2


A
0
2
4
6
Hours
RST
B
Habituation
RST(2h/14d)
Post-1
Post-7
Post-14
Days
-5
0
14
C
MDA(pmole/mg protein)
CON
2h
4h
6h
D
MDA (pmole/g protein)
CON
1d
3d
5d
7d
10d
14d
1d
7d
14d
Post - CON
E
Protein carbonyl (nmol/mg protein)
CON
2h
4h
6h
F
Protein carbonyl (nmol/mg protein)
CON
2h/1d
2h/14d

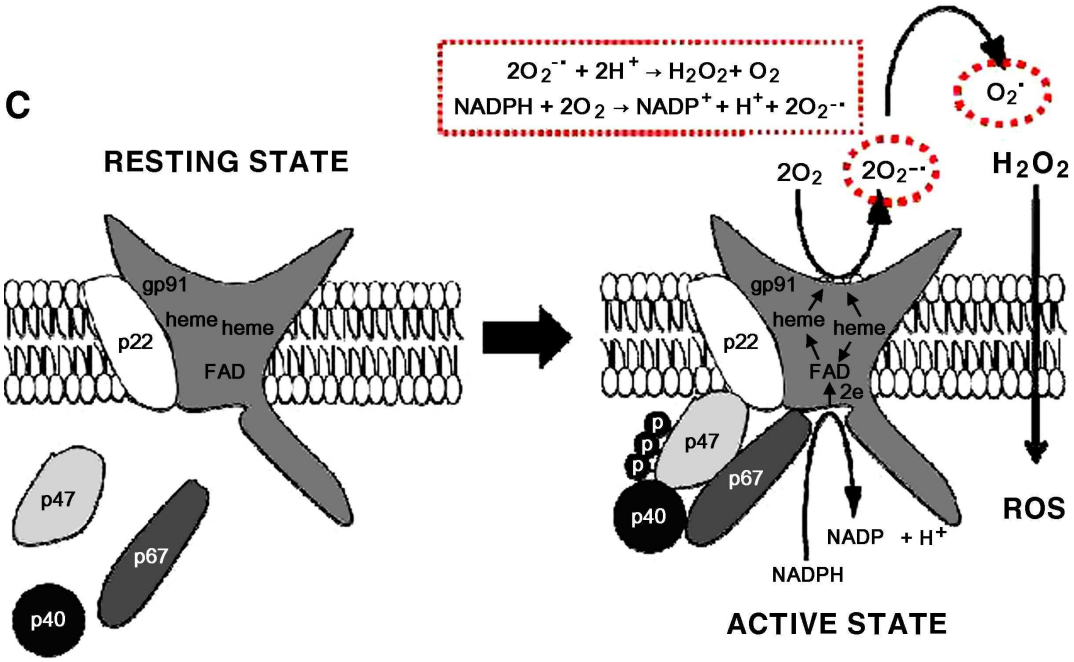
도면3

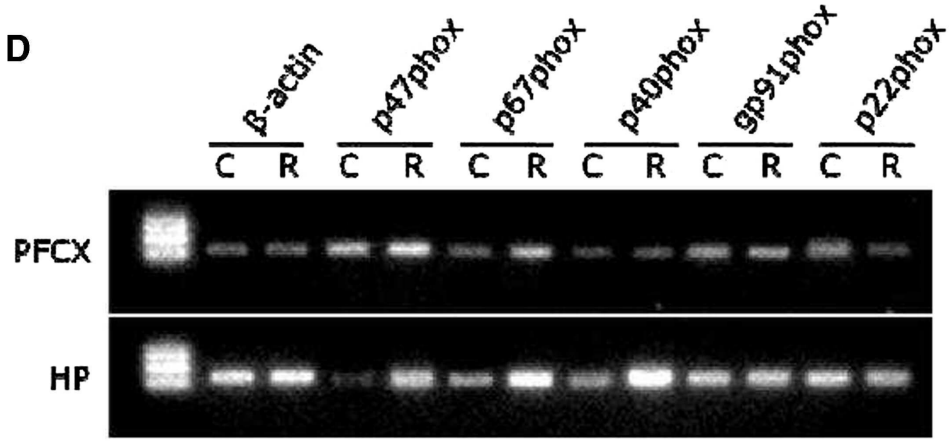

A
0
24
48
72
Hours
SFM
2hr
GC
B
MDA(pmole/mg protein)
CON
400 ng/ml
800 ng/ml
24hr
48hr
72hr
C
DHE
CON
GC
20μm
DHE fluorescence (% of control)
D
DCF
CON
GC
20μm
DCF fluorescence (% of control)

도면4a

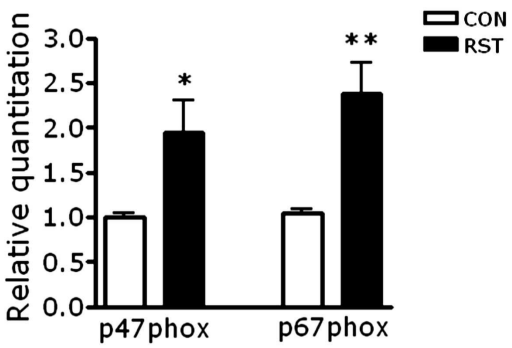

A
PFCX
Relative quantitation
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
GAPDH
β-Actin
PRX1
SOD1
CAT
HO-1
p47phox
p67phox
Relative quantitation
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
COX2
iNOS
NF-kB
TNFα
IL-1β
CON
RST
B
HP
Relative quantitation
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
**
GAPDH
β-Actin
PRX1
SOD1
CAT
HO-1
p47phox
p67phox
Relative quantitation
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
COX2
iNOS
NF-kB
TNF-α
IL-1β
CON
RST

도면4b

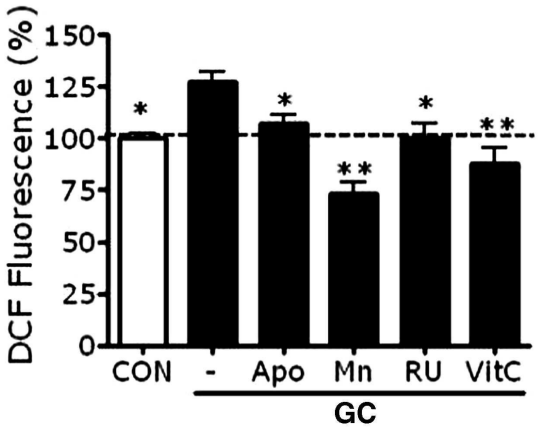

C
RESTING STATE
$2O_2^{-\cdot} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$
$NADPH + 2O_2 \rightarrow NADP^+ + H^+ + 2O_2^{-\cdot}$
$O_2^{\cdot}$
$2O_2$
$2O_2^{-\cdot}$
H_2O_2
gp91
heme
heme
p22
FAD
p47
p67
p40
2e
ROS
NADP + H^+
NADPH
ACTIVE STATE


D
β-actin
p47phox
p67phox
p40phox
gp91phox
p22phox
C R C R C R C R C R C R
PFCX
HP

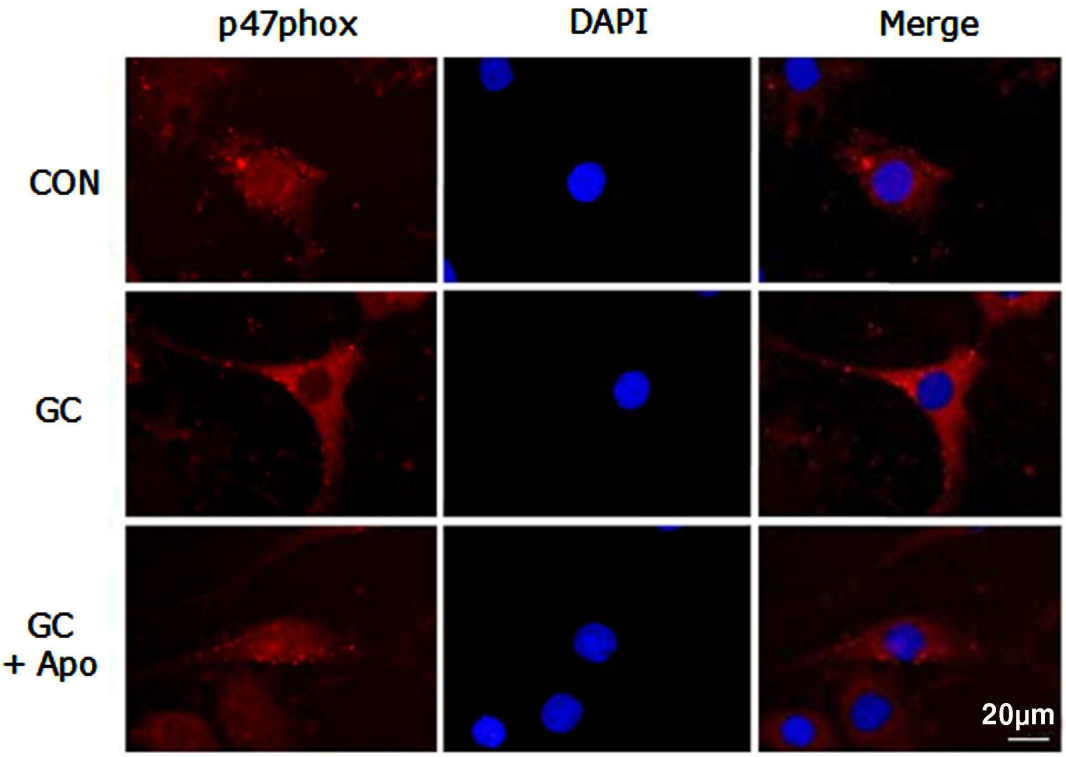
도면5


Relative quantitation
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
**
CON
RST
p47phox
p67phox

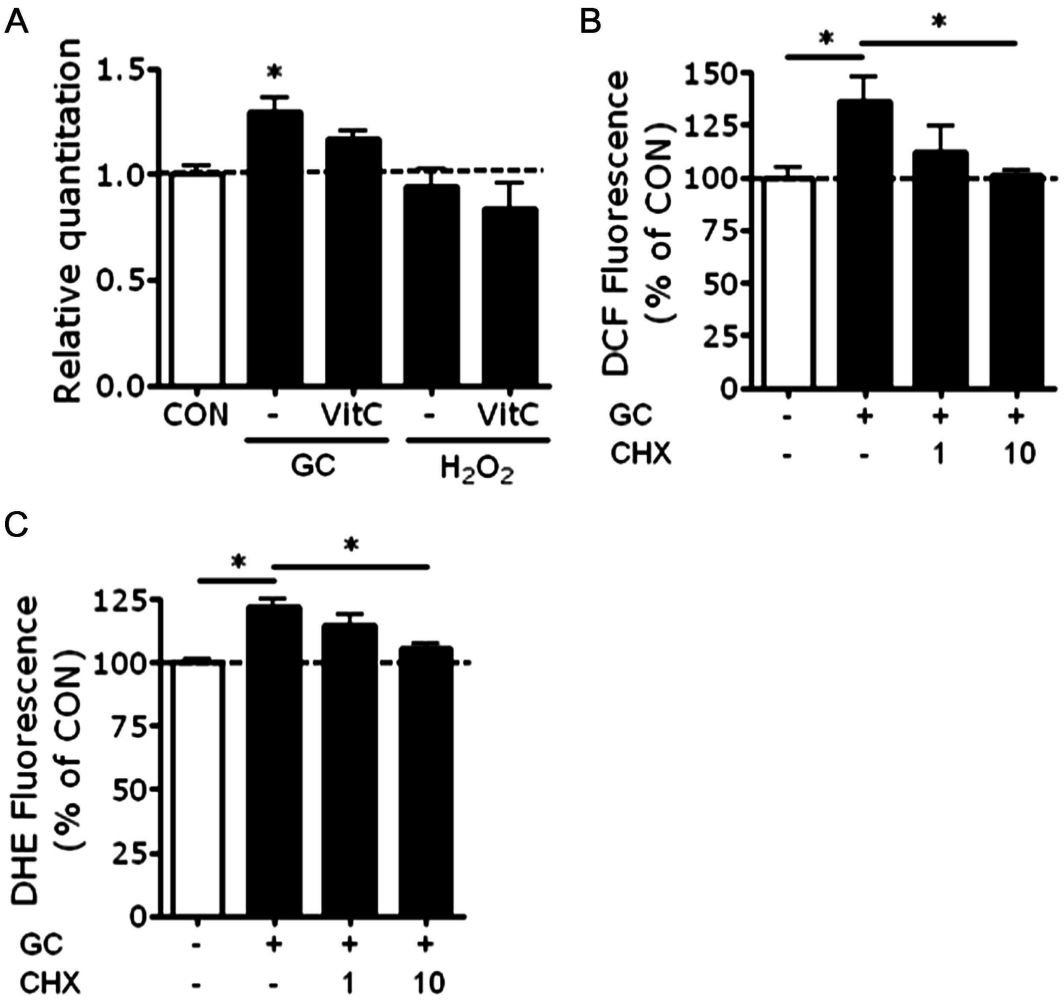
도면6a


DCF Fluorescence (%)
150
125
100
75
50
25
0
*
*
**
*
**
CON
-
Apo
Mn
RU
VitC
GC

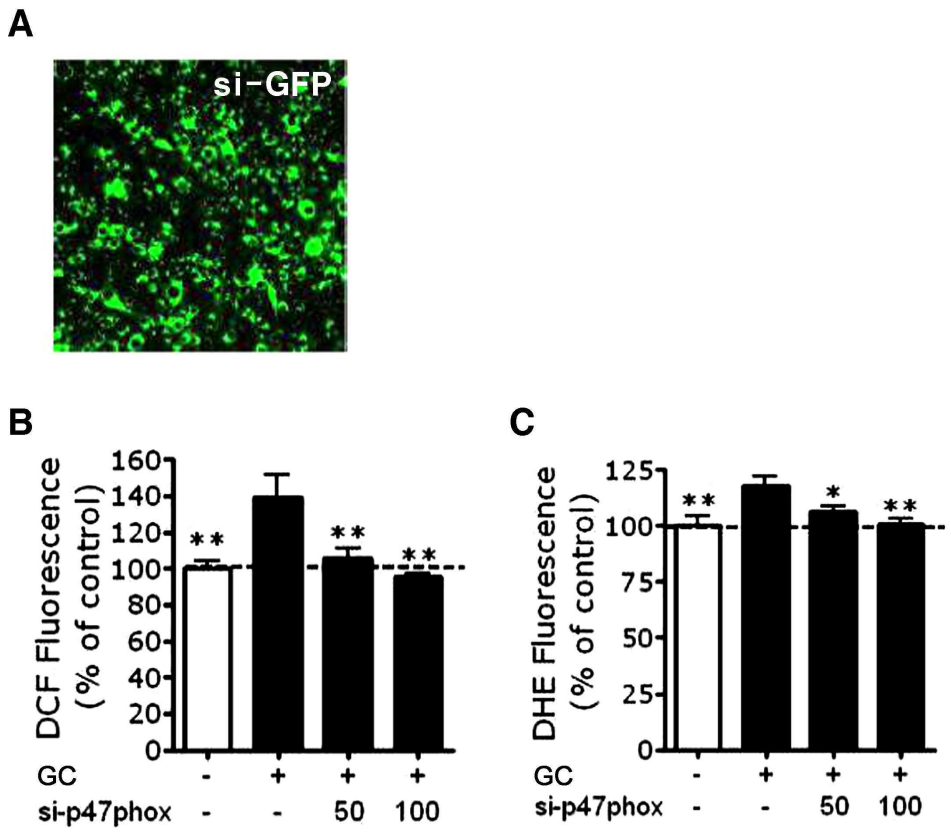
도면6b


p47phox
DAPI
Merge
CON
GC
GC
+ Apo
20μm

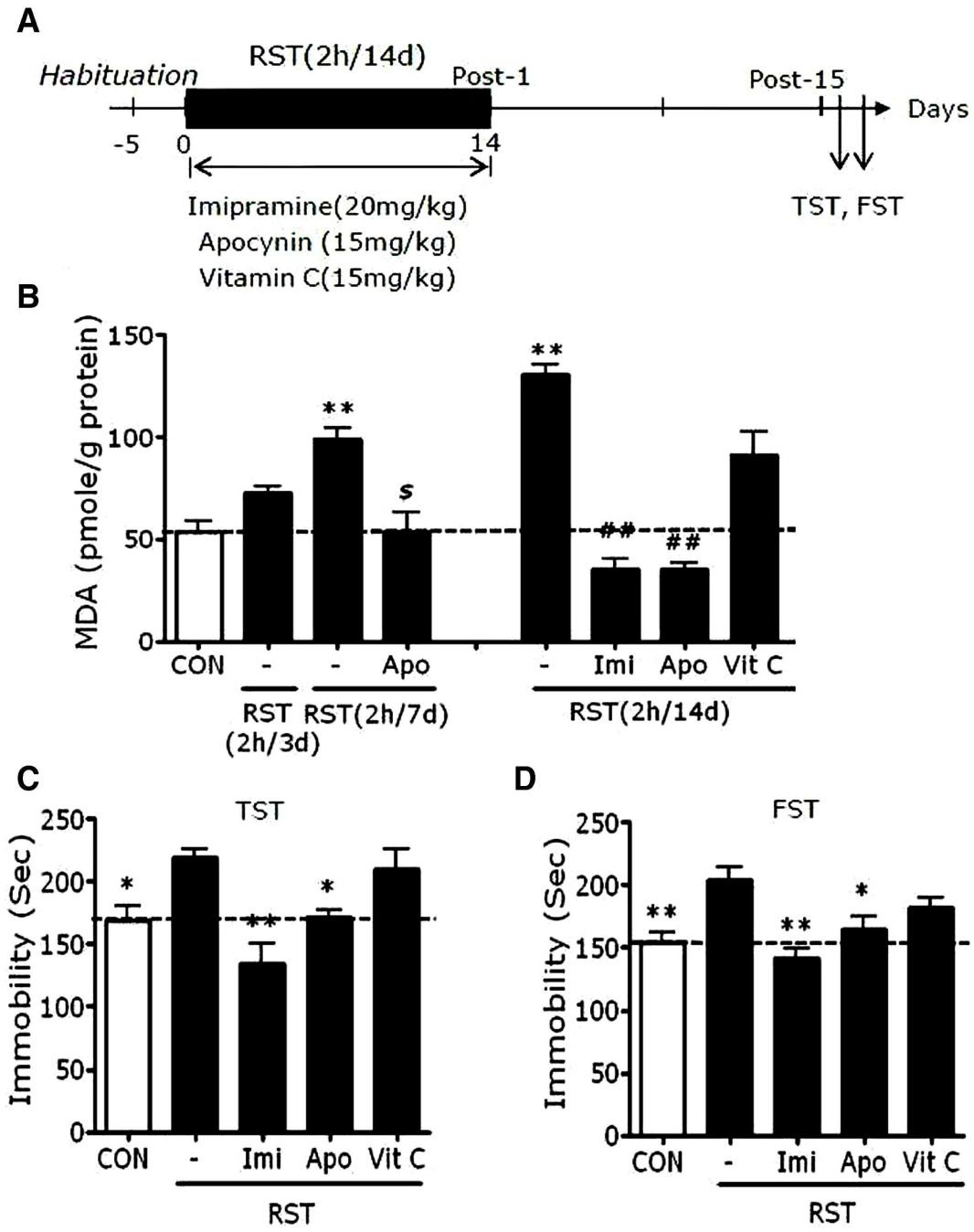
도면7


A
Relative quantitation
1.5
1.0
0.5
0.0
*
CON
-
VitC
-
VitC
GC
H2O2
B
DCF Fluorescence
(% of CON)
150
125
100
75
50
25
0
*
*
GC
-
+
+
+
CHX
-
-
1
10
C
DHE Fluorescence
(% of CON)
125
100
75
50
25
0
*
*
GC
-
+
+
+
CHX
-
-
1
10

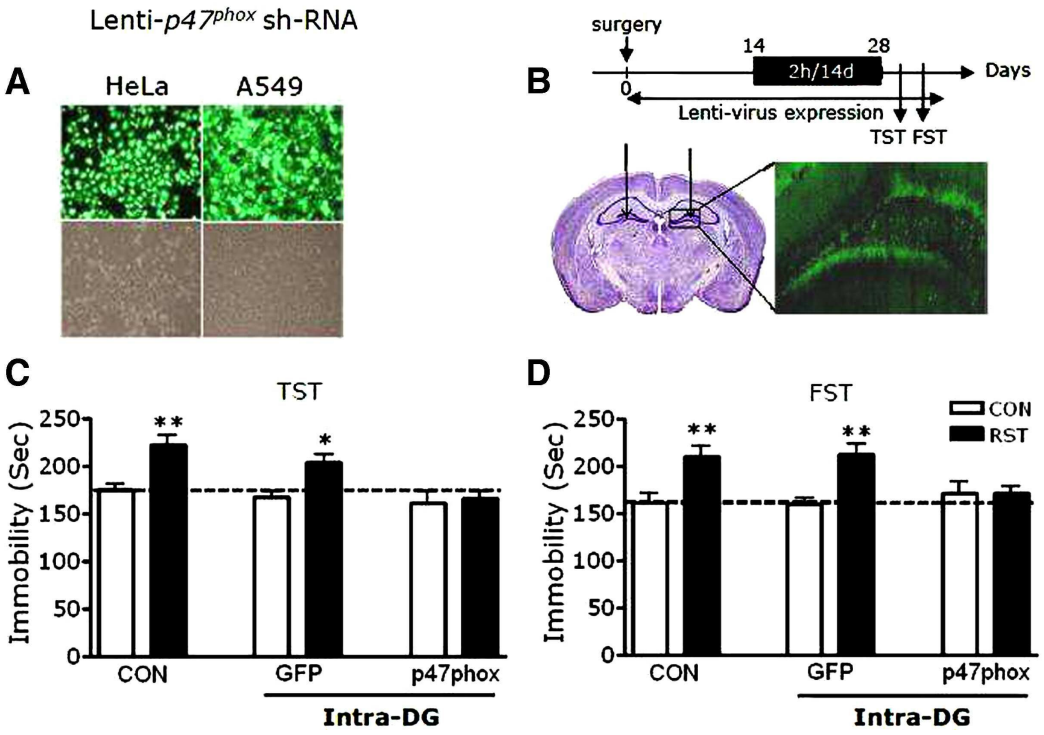
도면8


A
si-GFP
B
DCF Fluorescence (% of control)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
**
**
**
GC - + + +
si-p47phox - - 50 100
C
DHE Fluorescence (% of control)
125
100
75
50
25
0
**
*
**
GC - + + +
si-p47phox - - 50 100

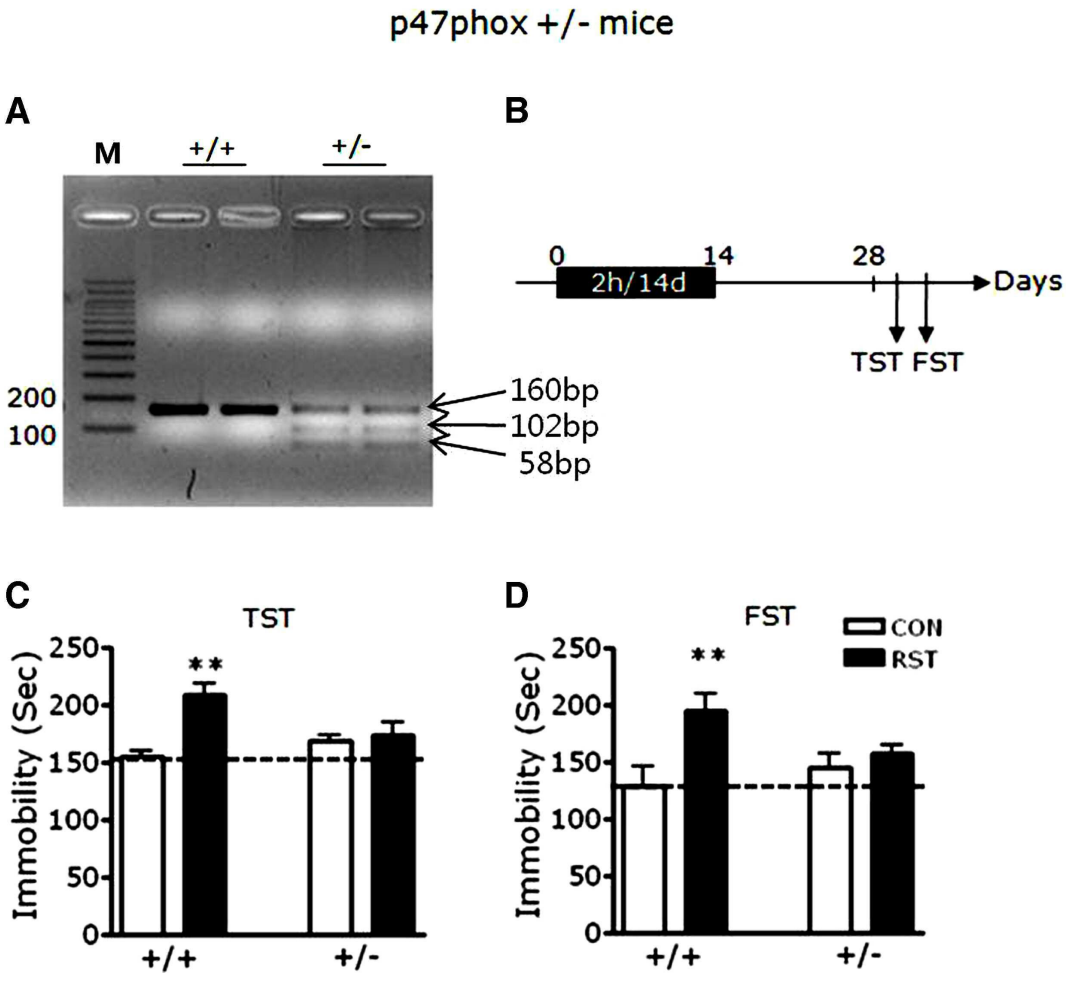
도면9


A
Habituation
RST(2h/14d)
Post-1
Post-15
Days
-5
0
14
Imipramine(20mg/kg)
Apocynin (15mg/kg)
Vitamin C(15mg/kg)
TST, FST
B
MDA (pmole/g protein)
150
100
50
0
CON
-
-
Apo
-
Imi
Apo
Vit C
RST (2h/3d)
RST(2h/7d)
RST(2h/14d)
C
TST
Immobility (Sec)
250
200
150
100
50
0
CON
-
Imi
Apo
Vit C
RST
D
FST
Immobility (Sec)
250
200
150
100
50
0
CON
-
Imi
Apo
Vit C
RST

도면10


Lenti-p47phox sh-RNA
A
HeLa
A549
B
surgery
14
28
2h/14d
Days
0
Lenti-virus expression
TST FST
C
TST
Immobility (Sec)
250
200
150
100
50
0
**
*
CON
GFP
p47phox
Intra-DG
D
FST
CON
RST
**
**
CON
GFP
p47phox
Intra-DG

도면11


p47phox +/- mice
A
M
+/+
+/-
200
100
160bp
102bp
58bp
B
0
14
28
2h/14d
Days
TST FST
C
TST
Immobility (Sec)
250
200
150
100
50
0
**
+/+
+/-
D
FST
CON
RST
**
+/+
+/-

서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Therapeutic agents targeting p47phox or p67phox for stress disorder and method of screening thereof

<130> PA110519KR

<150> KR10-2011-0004369

<151> 2011-01-17

<160> 44

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for genomic DNA from mouse

<400> 1

tggaagaagc tgagagttga gg 22

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for genomic DNA from mouse

<400> 2

tccaggagct tatgaatgac c 21

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for GAPDH

<400> 3

agaaggtggt gaagcaggca tc 22

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for GAPDH

<400> 4

cgaaggtgga agagtgggag ttg 23

<210> 5

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for beta-actin

<400> 5

atcgtgcgtg acatcaaaga gaag 24

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for beta-actin

<400> 6

tgccacagga ttccataccc aag 23

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for p47phox

<400> 7

accggctatt tcccatcc 18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for p47phox

<400> 8

tggatgctct gtgcgttg 18

<210> 9

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for p67phox

<400> 9

catgaagcac accatccagt cc 22

<210> 10

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for p67phox

<400> 10

gatttctctt cctgtttgtc catctg 26

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for COX-2

<400> 11

gcttcaaaca gtttctctac aacaa 25

<210

> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for COX-2

<400> 12

catttcttcc cccagcaac 19

<210> 13

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for NOS

<400> 13

tgtggctacc acattgaaga a 21

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for NOS

<400> 14

tcatgataac gtttctggct ctt 23

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for NF-kappa b

<400> 15

ttgtctgaca tgggtctcca 20

<210> 16

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for NF-kappa b

<400> 16

gcactgtctt ctttcacctc tgt 23

<210> 17

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for TNF-alpha

<400> 17

tgcctatgtc tcagcctctt c 21

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for TNF-alpha

<400> 18

gaggccattt gggaacttct 20

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for IL-1 beta

<400> 19

tgagcacctt cttttccttc a 21

<210> 20

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for IL-1 beta

<400> 20

ttgtctaatg ggaacgtcac ac 22

<210> 21

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for SOD1

<400> 21

tgcgtgctga agggcgac 18

<

210> 22

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for SOD1

<400> 22

gtcctgacaa cacaactggt tc 22

<210> 23

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for CAT

<400> 23

tctacacaaa ggtgttgaac gag 23

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for CAT

<400> 24

agggtggacg tcagtgaaat 20

<210> 25

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for HO-1

<400> 25

ctgctagcct ggtgcaaga 19

<210> 26

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for HO-1

<400> 26

ccaacaggaa gctgagagtg a 21

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for PRX1

<400> 27

tggattctca cttctgtcat ctgg 24

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for PRX1

<400> 28

gcgcttggga tctgatatta aggg 24

<210> 29

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for human p47phox

<400> 29

cacggacaac cagacaaa 18

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for human p47phox

<400> 30

tcttctcgta gttggcaatg 20

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for human p67phox

<400> 31

ccccttcag aagacagcat 20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for human p67phox

<400> 32

tcatctggaa agccttggtc 20

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for gp91-phox

<400> 33

ggtttatgat gatgggccta a 21

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for gp91-phox

<400> 34

gcactggaac ccctgagaaa 20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for p22-phox

<400> 35

ccccggggaa agaggaaaaa 20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for p22-phox

<400> 36

aggacagccc ggacgtagta 20

<210> 37

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for p67-phox

<400> 37

gggaaccagc tgatagacta 20

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for p67-phox

<400> 38

tccattcctc yttcttggca 20

<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for p47-phox

<400> 39

cagccagcac tatgtgtaca 20

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for p47-phox

<400> 40

gaactcgtag atctcggtga a 21

<210> 41

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> forward primer for p40-phox

<400> 41

tggcccagca gctgcg 16

<210> 42

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer for p40-phox

<400> 42

cgrtagcggc ggtagatgag 20

<210> 43

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> sense strand for siRNA-p47phox

<400> 43

cuauuuccca uccauguau 19

<210> 44

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> antisense strand for siRNA-p47phox

<400> 44

auacauggau gggaaauag 19