(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0062738
(43) 공개일자 2010년06월10일

(51) Int. Cl.
C12N 5/071 (2010.01) *C12N 5/02* (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0121506
(22) 출원일자 2008년12월02일
심사청구일자 2008년12월02일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산 남구 무거2동 산29
(72) 발명자
김동호
서울특별시 서초구 양재동 우성아파트 112동 101호
윤승용
서울특별시 송파구 석촌동 288-18 402호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

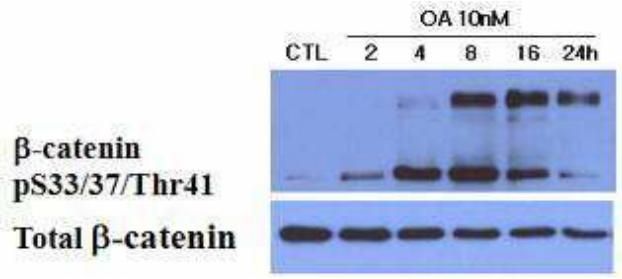
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 알츠하이머 질환에서 ＧＳＫ－３β 억제제 스크리닝을 위한오카다익산 유도성 신경세포 퇴행모델

(57) 요 약

본 발명은 알츠하이머 질환에서 GSK-3β 억제제 스크리닝을 위한 오카다익산 유도성 신경세포 퇴행모델으로, 보다 상세하게는 신경세포를 배양하는 단계; 상기 배양된 신경세포에 시료 화합물을 첨가하는 단계; 오카다익산(Okadaic acid)을 첨가하는 단계; 및 β-카테닌의 인산화 수준을 측정하는 단계를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 알츠하이머 질환에서 GSK-3β 억제제 스크리닝을 위한 오카다익산 유도성 신경세포 퇴행모델에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

임용환

광주광역시 북구 운암동 운암아파트 89동 404호

최정은

경기도 파주시 파주읍 백석리 4리 153-12

최한석

서울특별시 송파구 석촌동 156번지 501호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2008-0315
부처명	한국보건산업진흥원
연구사업명	기타사업
연구과제명	세포모델을 이용한 알쯔하이머병 병인기전연구와 GSK-3β를타켓으로 한 치료제 개발 연구
주관기관	울산대학교 산학협력단
연구기간	2008년 05월 01일 ~ 2009년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

신경세포를 배양하는 단계;

상기 배양된 신경세포에 시료 화합물을 첨가하는 단계;

오카다익산(Okadaic acid)을 첨가하는 단계; 및

β-카테닌의 인산화 수준을 측정하는 단계

를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 알츠하이머 질환에서 GSK-3β 억제제 스크리닝을 위한 오카다익산 유도성 신경세포 퇴행모델.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 신경세포 퇴행모델은 β-카테닌의 인산화 수준을 측정 후, LDH 유리 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 알츠하이머 질환에서 GSK-3β 억제제 스크리닝을 위한 오카다익산 유도성 신경세포 퇴행모델.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 시료 화합물은 오카다익산 처리 30분 전에 전처리 하는 것을 특징으로 하는 알츠하이머 질환에서 GSK-3β 억제제 스크리닝을 위한 오카다익산 유도성 신경세포 퇴행모델.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 β-카테닌의 인산화 수준은 Ser-33, Ser-37 및 Thr-41에서의 인산화 정도를 측정하는 것을 특징으로 하는 알츠하이머 질환에서 GSK-3β 억제제 스크리닝을 위한 오카다익산 유도성 신경세포 퇴행모델.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 알츠하이머 질환에서 GSK-3β 억제제 스크리닝을 위한 오카다익산 유도성 신경세포 퇴행모델에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 알츠하이머 환자 뇌의 주요한 병인적 특징 중 하나는 tau 과인산화의 결과물인 PHFs(paired helical filaments)로 이루어진 신경섬유엉킴(neurofibrillary tangles)이다.

[0003] tau 단백질의 과인산화는 단백질 포스파테이즈2A(PP2A) 및 사이클릭 AMP-의존성 단백질 카이네이즈(PKA), 글리코겐 합성 카이네이즈-3β(Glycogen synthase kinase-3β; GSK-3β), 미토젠-활성화된 단백질 카이네이즈(MAPK), 사이클린 의존성 카이네이즈2(CDK2), 사이클린 의존성 카이네이즈5(CDK5), C-jun N-말단 카이네이즈(JNK)를 포함한 몇가지 단백질 카이네이즈와 관련되는 것으로 알려져 있다.

[0004] PP2A 저해제인 오카다익산은 생체외 및 생체내에서 tau 단백질의 과인산화, 신경변성 및 세포사를 유도한다. 그러나, 이러한 변화는 PP2A의 억제에 의해 유도될 뿐 아니라, 알츠하이머 질환과 관련된 어떤 카이네이즈의 활성화에 의해 유도된다.

[0005] 이러한 카이네이즈 중, GSK-3β는 염증, 암, 당뇨병 및 알츠하이머 질환과 같은 신경변성 질환을 포함한 여러 질환의 병리적 과정과 관련된다. 그러나, 신경에서 이의 역할이 분명하게 이해되지 않았지만, 몇몇 연구에서 β-카테닌을 포함한 기질을 밝혀내었고, 여러 측면에서 신경 구조를 유지하는 데 관여되었다.

[0006] 이러한 측면으로 인해, GSK-3β는 알츠하이머 질환의 치료 표적일 수 있고, 지난 몇 년 동안 많은 GSK-3β 억제제가 연구되어 왔다.

[0007] 뇌에서 GSK-3β를 과발현하는 조건부 형질전환 마우스에서 tau가 과인산화되었고, 이러한 형질전환 마우스 모델이 GSK-3β 억제제 개발에 이용되어 왔다. 그러나, 형질전환 마우스 모델은 매우 고가이며 많은 인자들에 의해 영향을 받아 GSK-3β 억제제 개발에 문제가 있었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0008] 상기 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명자는 오카다익산 유도성 신경세포 변성모델에서, GSK-3β의 다운스트림 표적인 β-카테닌이 Ser-33/37 및 Thr-41 부위에서 눈에 띄게 인산화된 후, 분해되는 것을 확인하였고, 염화리튬(LiCl) 및 6-브로모인디루빈-3'-모노옥심(6-BIO)과 같은 GSK-3β 억제제가 β-카테닌 인산화 및 분해를 억제하여 신경세포를 보호하는 것을 발견함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 목적은 보다 경제적이면서도 여러 인자들에 의해 영향을 적게 받으며, 쉽게 적용가능한 알츠하이머 질환에서 GSK-3β 억제제 스크리닝을 위한 오카다익산 유도성 신경세포 퇴행모델을 제공하는 데에 있다.

과제 해결수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 신경세포를 배양하는 단계; 상기 배양된 신경세포에 시료 화합물을 첨가하는 단계; 오카다익산(Okadaic acid; OA)을 첨가하는 단계; 및 β-카테닌의 인산화 수준을 측정하는 단계를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 알츠하이머 질환에서 GSK-3β 억제제 스크리닝을 위한 오카다익산 유도성 신경세포 퇴행모델을 제공한다.

[0011] 상기 신경세포 퇴행모델은 β-카테닌의 인산화 수준을 측정 후, LDH 유리 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0012] 상기 시료 화합물은 오카다익산 처리 30분 전에 전처리 하는 것이 바람직하며, 상기 β-카테닌의 인산화 수준은 Ser-33, Ser-37 및 Thr-41에서의 인산화 정도를 측정하는 것이 바람직하다.

[0013] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0014] 본 발명에서는 종래 알려진 바와 같이, OA-유도성 신경세포 변성모델에서 GSK-3β가 정말로 불활성화 되었는지를 검토하기 위하여, 본 발명자들은 GSK-3β의 기질로 잘 알려진 β-카테닌 수준 및 이의 인산화 상태를 검토하였다. 뜻밖에도, β-카테닌은 OA-유도성 신경세포 변성모델에서 크게 인산화된 후 분해되었다. 이는 GSK-3β가 여전히 활성화되어 있음을 암시한다.

[0015] 따라서, 오카다익산 유도성 신경세포 변성모델이 GSK-3β 억제제의 신경보호 효과를 검증하기 위한 바람직한 세포 시스템임을 확인하였다.

효 과

[0016] 본 발명은 종래 사용해 오던 GSK-3β 억제제 스크리닝 방법인 형질전환 마우스보다 경제적이면서도 여러 인자들에 의한 영향을 적게 받으며, 손쉽게 적용할 수 있는 GSK-3β 억제제 스크리닝을 위한 신경세포 퇴행모델을 개발함으로써 알츠하이머 질환 치료제 발굴에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0018] **<실시예 1> 신경세포 배양**

[0019] 랫트 대뇌피질 신경세포의 초대배양은 태생 16일이 되는 랫트의 뇌로부터 준비되었다. 즉, 랫트의 대뇌피질을 칼슘 및 마그네슘 프리 HBSS(Hank's balanced salt solution)에서 절개하고 37℃에서 10분 동안 0.125% 트립신 용액에서 배양하였다. 트립신을 20% 태아소혈청을 함유한 DMEM으로 불활성화하고, 대뇌피질 조직을 파스퇴르 피펫을 이용하여 시리얼 마쇄에 의해 추가로 분리하였다.

[0020] 얻어진 세포 현탁액을 B27 구성요소(GibcoBRL, Grand Island, NY)로 보강된 NB 배지(neurobasal medium)에서 희석하였고, 폴리-D-라이신-(Sigma, 50㎍/ml) 및 라미닌-(1㎍/ml, GibcoBRL, Grand Island, NY) 코팅된 48웰

플레이트에 웰 당 $5X10^4$ 세포의 밀도로 분주하였다.

[0021] 신경세포는 오카다익산의 첨가 전 12시간 동안 37℃, 5% CO_2 분위기에서 유지되었다. 오카다익산(1μM, Boehringer Mannheim, Germany)은 0.1% 디메틸설폭사이드(DMSO)에서 용해되었다.

[0022] **<실시예 2> 항체 준비**

[0023] GSK-3 활성 분석을 위하여, 불활성 GSK-3β[pS-9] 및 GSK-3α/β[pS-21/9] (Cell Signaling Technology, Beverly, MA), 및 활성-인핸스 pY-279/216-GSK-3α/β (BioSource International, Camarillo, CA)에 대한 인산 특이적 항체를 사용하였다.

[0024] 활성화-의존성 항체(Cell Signaling Technology)는 총 GSK-3β를 가시화 하기 위해 사용되었다. 인산 특이적 PKB[pS-473] 및 PKB[pS-308] 항체는 Cell Signaling Technology에서 구매하였다.

[0025] Ser-199/Ser-202 (Tau-1; Roche, Indianapolis, IN)에서 탈인산화된 tau 및 Ser-396 (tau[pS-396]에서 인산화 특이적 tau에 대한 모노클론 항체가 사용되었고, PHF-1 항체를 Dr. Peter Davies (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY)로부터 제공받았다.

[0026] **<실시예 3> 면역세포화학**

[0027] 면역형광 조사를 위해, 유리 커버슬립에서 자란 실시예 1에 따라 배양된 세포를 0.1M 인산 완충액에 용해된 4% 파라포름알데히드에서 실온, 30분 동안 고정하고, 세포막을 0.1% 트립톤 X-100, 2% BSA 및 2% 노말 말혈청을 함유한 0.05M 트리스 완충액(pH 7.4)에서 30분 동안 배양하여 퍼미어블라이즈(permeablize) 하였다.

[0028] 배양물을 제1차 항체에서 4℃, 밤새도록 배양한 후, FITC 또는 Cy3-표식 제2차 항혈청(1:300, Jackson Laboratories)으로 배양하였다. 커버슬립을 PBS로 세정하고, 공급자의 지시에 따라 Antifade 키트(Dako)로 배양하였다.

[0029] **<실시예 4> 웨스턴 블롯 분석**

[0030] 실시예 1에서 얻어진 배양물은 62.5mM 트리스-HCl(pH 6.8), 1% SDS, 2.5% 글리세롤 및 0.5% 2-β-메르캅토에탄올로 이루어진 시료 완충액에서 직접 용해되고, 100℃에서 5분 동안 끓였고, 사용 전까지 -20℃에서 저장하였다. 동량의 단백질을 일정한 전압(130V)에서 SDS-PAGE로 옮긴 후, 200mA에서 2시간 동안 폴리비닐리덴 디플루오라이드 멤브레인(포어 사이즈, 0.2 μm Biorad)로 전이시켰다.

[0031] 5% 비지방유를 지닌 2% 소혈청알부민(BSA)을 함유한 블로킹 TTBS 완충액(10mM 트리스, pH 7.4, 100mM NaCl 및 0.1% 트윈20)에서 1시간 동안 배양한 후, 4℃에서 밤새도록 제1차 항체와 배양하였다.

[0032] 얻어진 블롯을 TTBS 완충액에서 세정하고, 실온에서 1시간 동안 horseradish peroxidase에 커플된 제2차 항체에서 배양하였고, ECL 시약(enhanced chemiluminescence; Amersham, Arlington Heights, IL) 및 x-레이 필름을 이용하여 가시화하였다. 밀도 측정은 각 밴드로부터 얻어진 신호를 정량하였다.

[0033] 그 결과, 도 1에 도시된 바와 같이, 오카다익의 처리에 의해 β-카테닌의 인산화가 점차적으로 증가함에 따라 β-카테닌의 총량이 감소되었다. 이러한 결과가 GSK-3β 활성화에 의한 것인지 확인하기 위하여 GSK-3β 저해제에 의한 β-카테닌의 인산화 및 분해에 대한 효과를 검토하였다.

[0034] 즉, GSK-3β 저해제인 6-BIO를 OA 처리 30분 전에 전처리하고, tau 인산화, β-카테닌 인산화 및 분해에 관한 효과를 조사하였다. 도 2에 도시된 바와 같이, 탈인산화된 tau인 tau-1은 OA 처리에 의해 감소되었고, 이러한 감소가 6-BIO 전처리에 의해 농도의존적으로 역전되었다. 인산화된 tau인 PHF-1은 OA 처리에 의해 증가되었고, 6-BIO 전처리에 의해 농도의존적으로 감소되었다.

[0035] tau 병인을 위한 가장 완전한 평가를 위하여, 다양한 에피토프에 대한 인산화된 tau 항체를 조사하였고, 도 3에 도시된 바와 같이 Ser 202, Ser 396, Thr 181에서의 인산화가 6-BIO 전처리에 의해 농도의존적으로 감소되었다. 이러한 결과로부터 OA-유도성 신경세포에서 GSK-3β는 활성화 되어 있으며, OA-유도성 신경세포 모델이 GSK-3β 저해제 효과를 평가하기 위한 좋은 모델인 것으로 판단되었다.

[0036] 또한, 도 3에 도시된 바와 같이 tau 인산화에서 LiCl 및 6-BIO의 역할을 비교하였다.

[0037] 또한, LDH 유리를 측정하여 GSK-3β 억제제의 OA-유도성 신경세포에서 신경보호 효과를 검토하였다. 그 결과, 도 4에 도시된 바와 같이 OA-유도성 신경세포에서 LDH 유리가 증가하였고, LiCl 또는 6-BIO 전처리에 의해 감소

하였다.

도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 오카다익산 처리 후 β-카테닌의 인산화 및 분해의 변화를 나타낸 것이고,

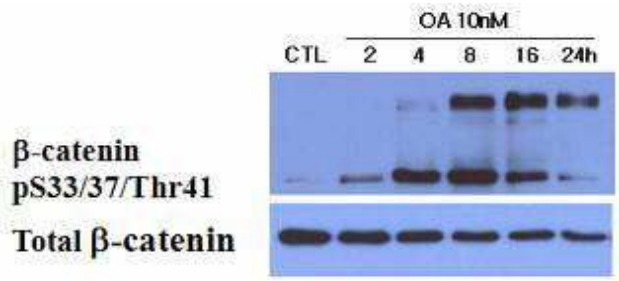
[0039] 도 2는 tau 및 β-카테닌의 인산화에 대한 GSK-3β 저해제인 6-BIO의 영향을 나타낸 것이고,

[0040] 도 3은 GSK-3β 저해제인 LiCl 및 6-BIO 간의 tau 인산화에 미치는 영향을 비교한 것이고,

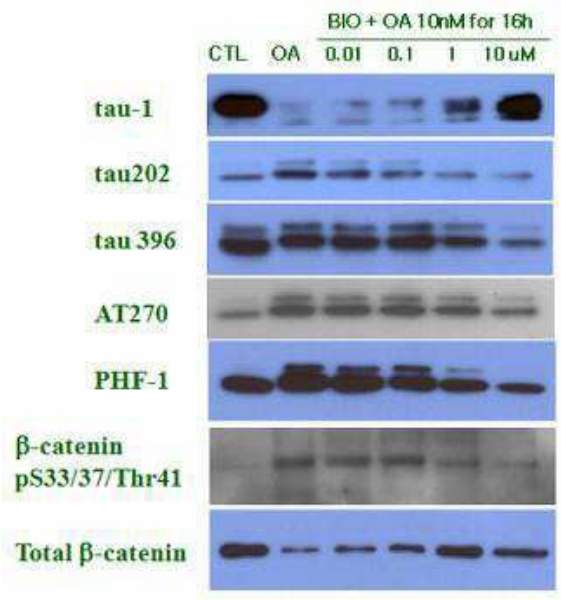
[0041] 도 4는 GSK-3β 저해제의 신경세포 보호효과를 LDH 유리로 검토한 것이다.

도면

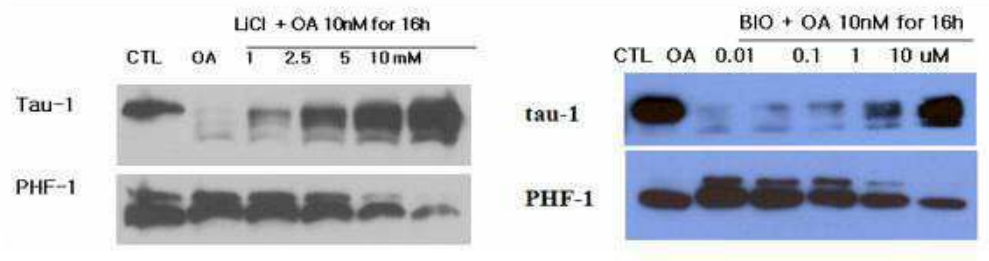
도면1



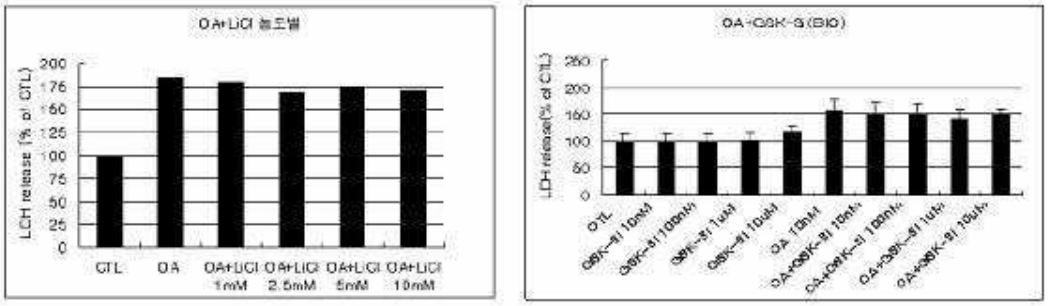
도면2



도면3


LiCl + OA 10nM for 16h
CTL OA 1 2.5 5 10mM
Tau-1
PHF-1
BIO + OA 10nM for 16h
CTL OA 0.01 0.1 1 10 uM
tau-1
PHF-1

도면4


OA+LiCl 농도별
LDH release (% of CTL)
CTL
OA
OA+LiCl 1mM
OA+LiCl 2.5mM
OA+LiCl 5mM
OA+LiCl 10mM
OA+GSK-3(BIO)
LDH release(% of CTL)