



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월08일

(11) 등록번호 10-1508095

(24) 등록일자 2015년03월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 5/02 (2006.01) *A61K 31/352* (2006.01)

C07H 17/04 (2006.01) *C12N 5/0797* (2010.01)

(21) 출원번호 10-2014-0059755

(22) 출원일자 2014년05월19일

심사청구일자 2014년05월19일

(30) 우선권주장

1020140048951 2014년04월23일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020100048322 A

(73) 특허권자

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

김윤희

서울 강남구 압구정로29길 23, 210동 503호 (압구정동, 현대아파트)

정연지

서울 동대문구 이문로 135, 104호 (이문동, 아정오피스텔)

(74) 대리인

손민

전체 청구항 수 : 총 7 항

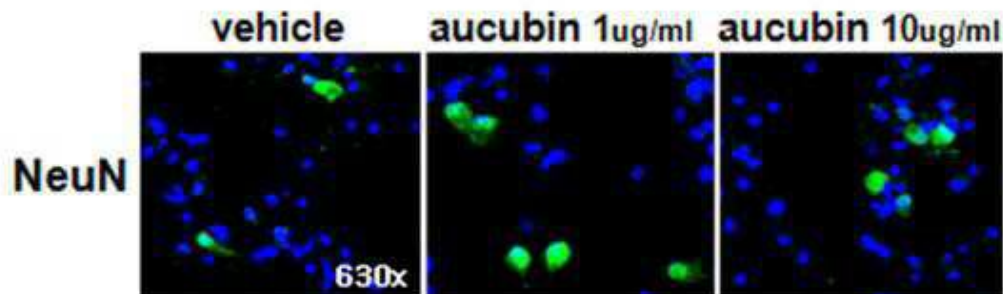
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 어큐빈을 포함하는 신경줄기세포 또는 신경전구세포 분화 촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 어큐빈을 포함하는 신경줄기세포 또는 신경전구세포 분화, 및 신경 축색돌기 성장 촉진용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화를 촉진하고 신경 축색의 성장 및 재생을 촉진하는 효과가 있어, 이를 통한 신경계 재생 및 이식용 신경줄기세포의 대량생산이 가능하며, 신경세포의 분화를 촉진하기 위한 세포배양용 조성물, 및 신경 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012M3A9C6049937

부처명 미래창조부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술개발사업

연구과제명 혈관세포 분비인자에 의한 신경줄기세포 재생기술

기 여 율 2/3

주관기관 고려대학교 의과대학

연구기간 2012.10.01 ~ 2017.09.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011-0019354

부처명 미래창조부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오의료기술개발사업

연구과제명 줄기세포 Niche에서 Heregulin 신호 전달에 의한 미세환경 변화연구 및 응용기술 개발

기 여 율 1/3

주관기관 가톨릭 의과대학

연구기간 2011.06.01 ~ 2016.05.30

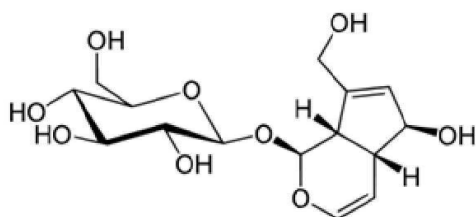
명세서

청구범위

청구항 1

하기의 화학식 1로 표시되는 어큐빈(aucubin)을 포함하는, 인비트로 세포 배양에서의 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화 촉진용 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 조성물은 추가로, 분화된 신경 축색의 성장 및 재생을 촉진하는 것인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 어큐빈은 질경이(*Plantago asiatica*), 식나무(*Aucuba japonica*), 두충(*Eucommia ulmoides*), 지황(*Rehmannia glutinosa*), 및 꽃머느리밥풀(*Melampyrum roseum*)으로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나의 식물에서 추출할 수 있는, 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 신경줄기세포 또는 신경전구세포는 체내에서 분리된 신경줄기세포 또는 신경전구세포인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 증식 또는 분화 유도제를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 유도제는 FGF, EGF, 및 레티노산(retinoic acid)으로 이루어지는 군에서 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것인, 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는, 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화 촉진용 배지 조성물.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 어큐빈을 포함하는 신경줄기세포 또는 신경전구세포 분화 촉진용, 및 신경 축색의 성장 및 재생 촉진용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 포유동물의 뇌는 신경줄기세포(neural stem cell) 또는 신경전구세포(neural precursor cell)가 증식한 후에 유전자 발현을 조절하여 성숙한 신경세포로 분화하게 되며 분화과정에서는 생존과 사멸 조절, 축색과 수상돌기 및 시냅스 형성 등의 과정을 거쳐 체계적인 신경회로망(neural network)을 발생함으로써 복잡한 기능을 수행할 수 있게 된다.

[0003] 정상동물에서는 성체 시기에도 해마 등 뇌의 일부 부위에는 신경전구세포가 증식하여 사멸한 세포를 대체하는데 (Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system(1999), Cell 96, 25-34), 퇴행성 뇌질환 또는 뇌손상을 받은 경우는 해당 부위에서 신경세포의 상실이 크게 일어나므로 신경전구세포의 증식(neurogenesis)과 분화가 촉진되어야 한다. 신경전구세포는 주로 측뇌실(lateral ventricle)과 맞닿는 줄무늬체(striatum)의 부뇌실 구역(subventricular zone)에서 발견되고 또한 해마(hippocampus)의 치상회에 있는 부뇌실 구역에서 신경줄기세포들이 분열하여 과립세포로 되며 이 세포들이 분화하여 기능을 가질 수 있다 (Functional neurogenesis in the adult hippocampus(2002) Nature 415, 1031-1034). 따라서 신경전구세포의 분화를 증진하면 신경재생을 촉진할 수 있다.

[0004] 신경세포는 세포분화하고 시냅스를 형성하는 과정에서 적합한 분화를 하지 못하면 세포사멸하며, 제대로 분화한 경우에만 표적 신경세포로부터 신경성장인자와 같은 표적유래 생존인자(target-derived survival factor)를 받아 생존하게 된다. 상기 생존인자를 받지 못하면 세포사멸하며, 스트레스와 세포독성물질(cytotoxic agent)에 의한 세포사멸은 퇴행성뇌질환의 주요원인이 될 수 있다.

[0005] 인간의 경우 중추신경계와 말초신경계에서 축색이 손상 또는 절단되는 경우, 축색의 성장 재개가 어렵거나 매우 느려서, 대부분의 다른 장기가 손상이 극복되어도 일반적으로 신경은 재생되지 않으며 재생을 촉진하는 약물도 아직 개발되지 않은 형편이다. 특히 현대사회에서는 젊은 나이에도 불구하고 산업재해, 교통사고, 운동 후 외상 등으로 외상성 신경손상이 많이 일어나나, 한번 손상된 신경계는 재생되지 않을 뿐 아니라 근육 퇴화까지 일어나서 환자가 다시 일어서고 걸을 수 없게 하므로 가정문제와 사회적 문제를 동반하게 된다.

[0006] 또한 포유동물의 뇌 발생과정에서는 생성된 신경세포의 반 이상이 세포사멸 하는데, 신경계 질환에서뿐만 아니라 정상 성인의 뇌에서도 매일 많은 숫자가 죽어가며 노화하는 신경계에서는 말할 나위도 없다. 알츠하이머 치매, 파킨슨씨병, 헌팅톤씨병, SCA(spino cerebellar ataxia) 등 신경계 질환은 특정 신경세포가 사멸을 시작한 후 결국 모든 신경세포가 사멸하게 된다. 그 외의 뇌질환 즉, 뇌졸중, 간질, 정신분열증, 뇌척수 손상 등도 대

부분 만성 신경세포 사멸을 동반하며 치매의 경우 정상인의 10배의 신경세포가 사멸하여 7-8년 후에는 뇌 부피가 크게 감소하고 죽음에 이른다. 따라서, 중추신경계의 퇴행성 뇌질환 뿐 아니라 척수손상 및 말초신경계 손상 등 거의 모든 신경계 질환에서 세포사멸을 극복하고 신경줄기세포의 분화에 의한 신경재생을 유도하는 것은 중요한 문제가 된다.

[0007] 또한, 정신지체, 발달장애 등 선천적 신경질환 외에도 당뇨병 등 대사성 질환에 따른 말초신경 손상이나 뇌졸중 등에 의한 허혈성 손상 후에도 신경이 한번 손상되면 다시 살아날 수 없으므로, 죽은 세포는 새로운 세포로 대체되어야 하고 세포가 죽지 않은 경우는 축삭이 다시 성장하여 시냅스를 형성하여야 한다.

[0008] 한편, 말초신경계의 재생과정은, 먼저 슈반세포가 절단된 축삭으로부터 분리되어 다시 분열능력을 획득하는 탈분화(dedifferentiation) 과정, 상처부위로 부터 신경세포의 축삭이 다시 자라나오는 과정, 다시 자라나온 축삭을 슈반세포가 미엘린 수초로 감싸는 재분화(redifferentiation) 과정, 및 축삭이 근육까지 자라서 다시 근육세포에 신경근 접합부(neuromuscular junction)를 만드는 과정으로 크게 나눌 수 있다(Kwon, Y. Kim, Bhattacharyya, W.V., Cheon, K., Stiles, C.D., and Pomeroy, S.L. (1997) Activation of ErbB2 during Wallerian degeneration of sciatic nerve, *J. Neurosci.* 17, 8293-8299). 신경이 다친 후 슈반세포는 즉시 급격한 분열을 하는데, 축삭이 재성장하는 동안에 슈반세포가 축삭에 접촉하면 다시 분화하여 수초를 재생한다. 세포 표면에서의 상호작용 이외에도 슈반세포는 멀리서도 재생하는 축삭에 영향을 줄 수 있다. 신경이 절단된 후 1cm만큼 떨어져 있어도 축삭은 신경말단 쪽의 축삭부분을 향해 재생한다. 이때의 축삭의 정향운동은 신경말단 쪽의 축삭부분에 살아있는 슈반세포가 존재해야 일어난다. 재생 후기에 슈반세포는 미엘린 수초를 생산하여 축삭을 감싸서 슈반세포의 분화가 완성된다.

[0009] 그러나, 신경발생이 끝난 성체에서, 말초신경이 손상된 경우에는 그 손상된 부위 중 신경말단 쪽의 축삭부분(distal stump)은 월러퇴행(Wallerian degeneration)이라고 알려진 과정을 통해 점차 퇴화하며, 중추신경계의 경우 세포의 기질 단백질과 같은 여러 가지 저해물질 때문에 축삭 재생은 거의 일어나지 않는다.

[0010] 따라서, 중추신경 및 말초신경의 손상 시 신경계를 재생하기 위한 기술이 여전히 요구되고 있다.

[0011] 한편, 최근 유럽에서는 퇴행성 뇌질환 환자 특히 파킨슨씨병 환자의 경우 태아에서 얻은 신경줄기세포를 이식하는 것이 임상적으로 적용되고 있는데 이식 후에 환자는 매우 빨리 회복되어 행동이 좋아지지만 3달 내지 1년 후면 대부분의 이식된 세포가 사멸하여 다시 이식해야 하며 환자가 많은 반면 신경줄기세포의 확보는 매우 어렵다는 문제가 있다 (Olanow C. W., Kordower J. H., Freeman T. B. (1996) Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease. *Trends Neurosci.* 19, 102109).

[0012] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 신경계 재생 및 이식용 신경줄기세포의 대량생산을 위하여 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 신경 분화 및 축삭돌기 성장을 촉진하는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 어큐빈이 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 신경 분화 및 축삭돌기 성장을 촉진함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 하나의 목적은 어큐빈(aucubin)을 포함하는 신경줄기세포 또는 신경전구세포 분화 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 어큐빈(aucubin)을 포함하는 분화된 신경 축삭의 성장 및 재생 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 세포 배양용 조성물을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는, 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화 및 증식 촉진에 의한, 신경 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는, 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화 및 증식 촉진에 의한, 신경 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

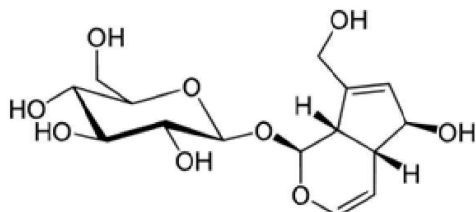
과제의 해결 수단

[0018] 상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 어큐빈(aucubin)을 포함하는 신경줄기세포 또는 신경전구세포 분화 촉진용 조성물을 제공한다.

[0019] 상기 조성물은 추가로, 분화된 신경 축색의 성장 및 재생을 촉진하는 것인, 조성물일 수 있다.

[0020] 본 발명에서 용어, 어큐빈은 하기의 화학식 1로 표시되는 화합물을 말한다.

[0021] [화학식 1]



[0022]

[0023] 하나의 구체예로서, 본 발명의 어큐빈은 일반적인 화학합성방법에 의해 합성될 수 있다.

[0024] 또 다른 구체예로서, 본 발명의 어큐빈은 질경이(*Plantago asiatica*), 식나무(*Aucuba japonica*), 두충(*Eucommia ulmoides*), 지황(*Rehmannia glutinosa*), 꽃머느리밥풀(*Melampyrum roseum*), 글랜빌 프리틸라리(*Glanville Fritillary*)로 구성되는 군에서 선택되는 어느 하나의 식물에서 추출되는 추출물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명의 용어, "추출물"이란, 목적하는 물질을 다양한 용매에 침지한 다음, 상온 또는 가온 상태에서 일정시간 동안 추출하여 수득한 액상성분, 상기 액상성분으로부터 용매를 제거하여 수득한 고형분 등의 결과물을 의미한다.

[0026] 이때, 사용되는 용매는 본 발명의 신경줄기세포 또는 신경전구세포 분화 및 증식 촉진 효과를 갖는 추출물을 수득할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 물, 극성용매 또는 비극성 용매가 될 수 있고, 보다 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올 또는 부탄올 등), 이들의 혼합용매 등이 될 수 있으며, 가장 바람직하게는 메탄올 또는 그의 혼합용매를 사용할 수 있다.

[0027] 또한, 상기 추출물을 수득하기 위한 방법 역시 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화 촉진 효과를 갖는 추출물을 수득할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로 상기 추출은 대두류의 분쇄물을 건조 중량의 약 5 내지 30배, 바람직하게는 약 10 내지 20배에 달하는 부피의 물, 메탄올, 에탄올 등과 같은 탄소수 1(C1) 내지 4(C4)의 저급 알코올과 같은 극성 용매 또는 이들의 약 1:0.1 내지 1:10의 혼합비를 갖는 혼합용매로 용출하여 이루어질 수 있으며, 추출 온도는 20 내지 100℃, 바람직하게는 60 내지 100℃에서, 추출기간은 약 1시간 내지 4일 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출, 여과 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여 추출한 추출물일 수 있다.

[0028] 그러나 상기 추출물은 본 발명의 신경줄기세포 또는 신경전구세포 분화 촉진 효과를 나타낼 수 있는 추출물인 한, 이에 제한되지는 않고, 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 이들 조정제물, 정제물, 또는 분획물을 모두 포함할 수 있다.

[0029] 본 명세서에서 사용된 용어, "분획물"은 상기와 같이 제조된 어큐빈을 포함하는 추출물로부터 특정 성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획방법에 의하여 얻어진 결과물을 의미한다.

[0030] 본 발명의 조성물에 포함된 상기 어큐빈을 포함하는 추출물 또는 그의 분획물의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 최종 조성물 총중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9 중량%, 보다 바람직하게는 0.01 내지 50 중량%의 함량으로 포함될 수 있다.

[0031] 본 발명에서 용어, 신경줄기세포 또는 신경전구세포는 서로 혼용되어 사용될 수 있으며, 경우에 따라서는 신경줄기세포로부터 유래된 세포를 신경전구세포라고 지칭할 수도 있다. 또한 상기 신경전구세포는 "Neural

precursor cell 및 "Neural progenitor cell"을 포함하는 개념으로 사용된다.

- [0032] 하나의 구체예로서, 본 발명에서 이용 가능한 신경줄기세포 또는 신경전구세포는 포유동물의 초기 배아에서 분리한 배아줄기세포(embryonic stem cell), 배아기의 원시 생식세포에서 분리한 배아생식세포(embryonic germ cell) 및 성체에서 분리한 다능성 성체줄기세포(multipotent adult progenitor cell)에서 유래한 것일 수 있으며, 상기 다능성 성체줄기세포는 체대혈, 골수, 지방, 뇌조직 등의 성체 조직 또는 혈액으로부터 유래된 모든 다능성 성체줄기세포일 수 있다. 또한, 위의 배아줄기세포, 배아생식세포, 및 성체줄기세포에 유전자 이입 또는 세포핵을 치환 또는 융합하여 제조된 줄기세포를 포함한다.
- [0033] 본 발명에서 용어, 분화는 초기 단계의 세포가 각 조직으로서의 특성을 갖게 되는 과정으로, 본 발명에 따른 조성물에 의하여 신경줄기세포 또는 신경전구세포는 그 장소에 적합한 신경전달물질을 분비하는 신경세포로 분화한다.
- [0034] 한편, 미성숙세포도 신경돌기를 포함한 모양을 가지나, 분화한 신경세포의 수상돌기 및 축색과는 달리 신경돌기가 수시로 생겼다가 없어지는 것을 반복하는 상태이다. 따라서, 분화과정을 통해 신경세포의 유전자 발현 패턴을 나타내도록 변화되어야 신경의 기능을 가지게 되므로, 신경세포의 유전자 발현 패턴을 나타내도록 변화된 세포만이 실제로 분화한 신경세포라 할 수 있다. 성숙한 신경세포는 분화표지자인 NeuN과 미세신경섬유(Neurofilament) 등을 발현하고, 그 신경돌기는 Map2와 같은 분화표지자를 발현해야 기능이 있는 분화된 신경세포로 인정받을 수 있다.
- [0035] 본 발명의 한 구체예에서, 어큐빈을 포함하는 조성물은, 항-NeuN 항체, 항-미세신경섬유 항체, 대뇌 유래 신경전구세포의 분화인자인 Pax6를 이용하여 흰쥐 대뇌 해마 유래 신경전구세포 및 신경줄기세포의 신경분화를 촉진함을 확인하였다(실험예 1, 3).
- [0036] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 하나의 양태로서, 본 발명에 따른 조성물은 추가로, 분화된 신경 축색의 성장 및 재생을 촉진할 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 용어, 신경 축색은 신경세포인 뉴런을 구성하는 부분으로, 다른 뉴런의 수상돌기에 접근하여 시냅스 구조를 이루며, 본 명세서에서 축색돌기와 서로 혼용되어 사용될 수 있다.
- [0038] 본 발명의 한 구체예에서, 어큐빈을 포함하는 조성물은, 축색돌기의 성장을 촉진하는 효과가 있음을 확인하였으며(실험예 2), 좌골 신경이 손상된 동물 모델을 통하여 신경 축색돌기의 재생을 촉진하는 효과가 있음을 확인하였다(실험예 4).
- [0039] 본 발명의 조성물은 손상된 신경계 축색의 재생을 촉진함으로써 효과적으로 신경계 재생을 유도할 수 있다.
- [0040] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 하나의 양태로서, 본 발명에 따른 조성물은 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화를 촉진하기 위한 세포 배양용 조성물로 사용할 수 있다. 상기 세포 배양용 조성물은 신경세포 부족, 손상과 관련된 각종 질환을 치료하기 위한 대량의 신경줄기세포의 수득을 위하여 이용될 수 있으며, 또한 세포치료에 있어서 세포이식을 위해 체내에서 분리된 신경줄기세포 또는 신경전구세포에 이식 직전에 처리될 수 있다.
- [0041] 상기 세포 배양용 조성물은 어큐빈 화합물, 어큐빈을 포함하는 식물 추출물 또는 분획물을 단독으로 포함할 수도 있고, 또는 다른 증식 또는 분화 유도제를 추가적으로 포함할 수 있다. 추가적으로 포함할 수 있는 분화 유도제는 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 증식 또는 분화 유도제로 알려진 어떠한 것도 가능하며, 이에 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어 FGF, EGF, 레티노산(retinoic acid) 등을 포함할 수 있다.
- [0042] 신경줄기세포 또는 신경전구세포를 배양하는 배양액에 상기 조성물을 투여할 경우, 세포 생존, 분화 관련 인자 및 전사인자와 같은 생성 또는 분비 단백질에 변화가 생기며 이로 인해 세포의 활성이 변화하게 되고, 특히 세포의 생존 및 특정 신경세포로의 분화가 활성화 된다. 따라서, 본 발명에 따른 세포 배양용 조성물에 의하여 생존 및 분화가 활성화된 세포를 체내의 질환 부위에 이식함으로써 신경세포의 생존 및 분화를 촉진시킬 수 있으며, 신경 관련 질환들을 효과적으로 치료하기 위한 약학 조성물로 사용할 수 있다. 또한 체내에 이식할 때 상기

어큐빈을 포함하는 조성물을 함께 포함할 수 있다.

- [0043] 상기 신경 관련 질환은 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병, 피크병, 헌팅톤병, 간질, 중풍, 뇌졸중, 허혈성 뇌질환, 퇴행성 뇌질환, 기억력 감퇴, 외상성 중추 신경계 질환, 척수 손상 질환, 말초신경손상, 근위축성 측색 경화증, 말초신경질환, 행동 장애, 발달장애, 정신 지체, 다운증후군 또는 정신분열증을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0044] 또한, 상기 신경 관련 질환은 신경세포의 세포 수 부족, 세포 손상 또는 세포 사멸 등을 원인으로 하는 질환일 수 있다.
- [0045] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 어큐빈을 포함하는 조성물을 유효성분으로 포함하는 신경 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물은 직접 체내에서 내재성 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화를 촉진할 수 있다.
- [0046] 상기 신경 관련 질환이란, 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병, 피크병, 헌팅톤병, 간질, 중풍, 뇌졸중, 허혈성 뇌질환, 퇴행성 뇌질환, 기억력 감퇴, 외상성 중추 신경계 질환, 척수 손상 질환, 말초신경손상, 근위축성 측색 경화증, 말초신경질환, 행동 장애, 발달장애, 정신 지체, 다운증후군 또는 정신분열증을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0047] 또한, 상기 신경 관련 질환은 신경세포의 세포 수 부족, 세포 손상 또는 세포 사멸 등을 원인으로 하는 질환일 수 있다.
- [0048] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란, 본 발명에 따른 미생물 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 개체에 투여하여 미생물 감염 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0049] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란, 본 발명의 상기 조성물을 미생물 감염 질환 발병 의심 개체에 투여하여 미생물 감염 질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0050] 본 발명에서 사용되는 용어, "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.
- [0051] 본 발명의 약학 조성물은 단일제제로도 사용할 수 있고, 공인된 신경 관련 질환 효과를 가진다고 알려진 약물을 추가로 포함하여 복합제제로 제조하여 사용할 수 있으며, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.
- [0052] 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않으면서, 투여되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미할 수 있다. 본 발명에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.
- [0053] 또한, 필요한 경우 항산화제, 완충액 및/또는 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가하여 사용할 수 있으며, 희석제, 분산제, 계면 활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제 등으로 제제화하여 사용할 수 있다.
- [0054] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양의 어큐빈을 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여할 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용을 유발하지 않으면서 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0055] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로

를 통하여 투여될 수 있다.

- [0056] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여 방식은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방식에 따를 수 있다. 상기 투여 방식의 비제한적인 예로, 조성물을 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 목적하는 투여 방식에 따라 다양한 제형으로 제작될 수 있다.
- [0057] 본 발명의 약학조성물의 투여량은 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물을 사람을 포함하는 포유동물에 하루 동안 1 내지 20 mg/kg, 보다 바람직하게는 1 내지 10 mg/kg으로 투여할 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.
- [0058] 본 발명자들은 어큐빈을 포함하는 조성물을 신경 축색이 절단된 좌골 신경 손상동물 모델에 투여한 결과, 축색 돌기의 재생을 촉진하고 슈반세포의 재 미엘린화를 촉진하여 신경세포의 재생을 도모함으로써, 어큐빈을 포함하는 조성물이 퇴행성 뇌질환 및 신경손상으로 인한 각종 신경 질환의 예방 및 치료에 사용될 수 있음을 확인하였다(실험예 4).
- [0059] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 신경 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0060] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 신경 관련 질환이 발병되었거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 상기 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0061] 본 발명의 상기 예방 또는 치료 방법은 구체적으로, 신경 관련 질환이 발병하였거나 발병할 위험이 있는 개체에 상기 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0062] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0063] 본 발명에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 상기 조성물의 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의 의해 결정될 수 있으며, 일반적으로 0.001 내지 1000 mg/kg의 양, 바람직하게는 0.05 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다.그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의학 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.
- [0064] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 신경 관련 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0065] 상기 어큐빈은 질경이, 식나무, 두충, 지황에 포함되어 오랫동안 식량자원으로서 사용되었고, 그의 추출물은 오랫동안 사용되어 그의 안전성이 입증되었으므로, 어큐빈을 포함하는 조성물은 상식할 수 있으면서도 신경 관련 질환의 예방 또는 개선을 도모할 수 있는 식품의 형태로 제조되어 섭취할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 식품 조성물은 식품학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0067] 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 어큐빈을 포함하는 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 종류에는 별다른 제한이 없으며, 예를 들어 각종 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다. 상기 식품 조성물에는 신경 관련 질환의 예방 또는 개선 효과에 방해가 되지 않는 다른 성분을 추가할 수 있으며, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 통상의 식품과 같이 여러 가지 생약 추출물, 식품학적으로 허용가능한 식품보조첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0068] 본 발명에서 사용된 용어 "식품보조첨가제"란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 건강기능식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의

예로는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조 첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[0069] 상기 천연 탄수화물의 예는 포도당, 과당 등의 단당류; 말토스, 수크로스 등의 이당류; 및 텍스트린, 시클로텍스트린 등의 다당류와, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0070] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어 "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 기능성이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능성 식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조 시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나 사용할 수 있다.

[0071] 본 발명의 조성물을 건강기능식품에 포함하여 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 건강기능식품 또는 건강기능식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품의 제조 시에 본 발명의 어큐빈을 포함하는 조성물은 원료 조성물 중 1 ~ 10 중량%, 바람직하게는 5 ~ 10 중량%의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하로도 사용될 수 있다.

[0072] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0073] 본 발명에서 사용되는 용어, "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.

발명의 효과

[0074] 본 발명에 따른 어큐빈을 포함하는 조성물은 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화를 촉진하고 신경 축색돌기의 성장을 촉진하는 효과가 있어, 이식부위에 적합한 신경세포의 재생을 도모하여 퇴행성 뇌질환 및 신경손상으로 인한 각종 신경 질환의 예방 및 치료에 사용될 수 있다.

[0075] 또한, 본 발명에 따른 어큐빈을 포함하는 조성물은 줄기세포 치료 또는 줄기세포를 이용한 약물 개발을 위한 연구 시, 신경세포의 분화를 촉진하기 위한 세포배양용 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0076] 도 1은 흰쥐 해마 유래 뇌신경줄기세포의 신경 분화에 미치는 어큐빈의 효과를 보여주는 것으로(실험예 1), 도 1a는 신경줄기세포를 NeuN 항체로 면역염색하여 나타낸 것이며, 도 1b는 NeuN 항체로 면역염색된 세포 수를 나타낸 것이고, 도 1c는 신경줄기세포를 항-신경미세섬유 항체와 항-베타튜블린 항체로 면역염색하여 나타낸 것이다. 대조군은 vehicle, 실험군은 aucubin으로 표시하였다.

도 2는 흰쥐 해마 유래 뇌신경줄기세포의 신경 축색돌기 성장에 미치는 어큐빈의 효과를 보여주는 것으로(실험예 2), 도 2a는 신경줄기세포를 MAP2 항체로 면역염색하여 나타낸 것이며, 도 2b는 신경 축색돌기의 평균 길이를 나타낸 것이고, 도 2c는 신경 축색돌기의 길이의 분포를 나타낸 것이다.

도 3은 Pax6을 발현하는 대뇌 유래 신경전구세포를 면역염색하여 나타낸 것이다(실험예 3).

도 4는 좌골 신경 손상된 동물 모델에서의 신경섬유의 절단부위에서 발쪽 방향(distal stump)의 신경다발까지의 축색돌기들, 기부(A), 중간(B), 말단(축색 성장 첨단부위, C)로 나누어 도시한 것이다(실험예 4).

도 5a 및 도 5b는 좌골 신경 손상된 동물 모델에서의 축색의 두께(diameter)를 나타낸 것으로, 신경섬유의 절단부위에서 발쪽 방향(distal stump)의 신경다발까지의 축색돌기들, 기부(A), 중간(B), 말단(축색 성장 첨단부위, C)로 나누어 도시한 것이다.

도 6a 내지 도 6d는 좌골 신경 손상된 동물 모델에서의 축색의 길이(length) 및 그 분포를 나타낸 것으로, 신경섬유의 절단부위에서 발쪽 방향(distal stump)의 신경다발까지의 축색돌기들, 기부(A), 중간(B), 말단(축색 성장 첨단부위, C)로 나누어 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0077] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0078] 실시예 1. 실험동물의 준비

[0079] 동물 다루는 법과 사육은 실험실 동물 관리의 원리(NIH publication No. 85-23, revised 1985)와 경희대학교 동물 관리와 사용 가이드라인을 따랐다. 동물 실험에서 한국의 찰스리버레보라토리즈의 분점인 오리엔트사 실험용 쥐 수컷(성인 250-270g)은 우리 당 2마리 또는 3마리를 보관하였으며 물과 음식이 자유로 공급되고(ad libitum) 일정한 온도($20-23\pm 1^{\circ}\text{C}$), 습도($60\pm 10\%$) 및 주/야(12h/12h) 주기 방식(빛 07:00-19:00시) 조건을 유지되도록 했다.

[0080] 실험예 1 내지 3에서 신경줄기세포를 배양하기 위해 사용한 임신 쥐는 SPF 스프라그 돌리(Sprague-Dawley) (CrjBgi:CD(SD) IGS, 오리엔트, 대한민국)로서, E16 쥐를 회사에서 공급 받아서 해마 신경줄기세포 배양에 사용하였다. 상기 형질전환 쥐는 Pax6 프로모터 하에 GFP를 발현하는 쥐로서, 동물 사육실에서 교배하여 E14일에 대뇌 신경줄기세포 배양에 사용하였다.

[0081] 실험예 4에서 신경수술 실험에 사용한 흰쥐는 6주령 된(190-240g) SPF 스프라그 돌리(CrjBgi:CD(SD) IGS, 오리엔트, 대한민국)로서, 실험동물 사육실에서 2주 적응 시킨 뒤 실험에 사용하였다.

[0082] 실험예 1. 해마 유래 신경전구세포의 신경분화 촉진 효과 확인

[0083] 어큐빈의 신경전구세포의 신경분화 촉진 효과를 확인하기 위하여, 아래와 같이 성숙한 뉴런의 핵을 표지하는 NeuN 항체를 이용하여 면역염색실험을 하였으며, 신경세포 분화 표지자로서, 성숙한 신경세포의 중간섬유 세포 골격인 신경미세섬유(Neuro filament)를 면역블로팅을 통하여 관찰하였다. 어큐빈(aucubin)은 Sigma에서 구입하여 사용하였다.

[0084] (1) 해마 유래 신경전구세포의 분리 및 배양

[0085] 본 실험에 사용한 해마 유래 신경줄기세포는 E16 쥐 배아의 뇌로부터 분리되었다. 해마의 융기는 해부현미경의 아래에서 무균상태의 가는 핀셋을 사용하여 E16 쥐의 배아 전뇌로부터 잘게 절단되었다. 이 조직들을 모아서 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -free HBSS(인비트로젠)용액에서 피펫을 사용하여 기계적으로 분리하였고 $15\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 폴리-L-오르니틴(poly-L-ornithine)과 $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 피브로넥틴(fibronectin, 시그마)으로 미리 코팅된 35mm 배양접시에 $19,000\ \text{cells}/\text{cm}^2$ 로 심었다. 세포들은 3일 동안 5% CO_2 의 조건에서 $10\text{ng}/\text{mL}$ bFGF (Invitrogen)이 첨가된 혈청이 없는 N2 배지에서 배양되었다.

[0086] 신경줄기세포를 3일 동안 증식한 후, 0.05% trypsin/EDTA을 사용해 세포를 떼어내고, 12mm 유리 커버글라스(벨코)에 신경줄기세포를 심어서 1일 동안 bFGF를 포함한 N2 배지에서 배양하였다.

[0087] 그 후, FGF를 포함하지 않는 배지로 바꾸고 대조군(vehicle)에는 생리식염수를, 실험군 1은 어큐빈 1 μ g/ml을, 실험군 2는 어큐빈 10 μ g/ml을 넣은 상태로 6일 동안 더 배양하였다.

[0088] **(2) 배양된 세포의 면역형광염색**

[0089] 상기 (1)에서 배양된 신경줄기세포를 항-NeuN을 이용하여 면역 염색하였다(1:1000, 시그마-올드리치). 1차 항체는 NeuN(1:1000, 코벤스)을 사용하고, FITC가 결합된 2차 항체(1:500, 잭슨랩, 미국) 및 DAPI(1 μ g/mL, 시그마)를 사용하여 검출하였다. 상기 방법은 Heo SR et al(Neurosci Lett, 2009) 및 Han AM et al(J Med Food, 2012)를 참조하였다.

[0090] 세포 수의 확인 및 데이터 분석의 경우, 이중(double) 촬영한 슬라이드에서 DAPI로 표지된 세포 핵 수를 세고 각 분화 표지자인 NeuN 및 이하의 MAP-2, 신경미세섬유(Neurofilament), GFP (Pax6) 각각의 FITC 세포의 수를 세어 각 분화 표지자의 수를 세포 핵 수로 백분율하였다. 이 때 모양과 위치가 정확히 일치되고 세포의 모양을 하고 있는 FITC의 수를 세었다.

[0091] NeuN 세포 수 측정은 대조염색된 신호의 핵 부위에 신호가 있는 세포를 세었고, NeuN은 핵 모양으로 둥근 형태를 띠고 있으며 슬라이드의 가장자리 부분에서 나타나는 비특이적 신호는 포함하지 않았다. 데이터분석은 일원 배치분산분석(Anova)을 통하여 대조군과 실험군을 비교하였다. 자료의 통계학적 의의는 p<0.05로 하였다.

[0092] NeuN 항체로 신경줄기세포를 면역 염색한 결과를 도 1a에 도시하였다.

[0093] 도 1a와 같이, 어큐빈을 처리한 실험군 1, 2는 대조군(vehicle로 표시)에 비해서 NeuN을 1.8배 많이 발현시켜, 어큐빈이 성숙한 뉴런의 수를 증가시켰음을 확인하였다. 도 1a의 결과를 수치화하여 도 1b에 도시하였다. 도 1b와 같이, 대조군에 비하여 어큐빈을 처리한 실험군의 NeuN을 발현하는 세포수가 급증하였다. 따라서, 어큐빈이 신경줄기세포의 신경 분화를 촉진하는 효과가 있음을 확인하였다.

[0094] **(3) 배양된 세포의 면역 블로팅**

[0095] 상기 (1)에서 배양된 신경줄기세포에 대한 면역 블로팅법에서는 1차 항체는 항-신경미세섬유 항체(anti-neurofilament, 1:1000, 코벤스)와 항-베타 튜블린 항체(anti- tubulin, 1:1000, 시그마)가 사용되었다.

[0096] 상기 면역 블로팅 결과를 도 1c에 도시하였다. 성숙한 신경세포의 중간섬유 세포골격인 신경미세섬유(Neurofilament) 단백질을 면역블로팅한 결과, 어큐빈 1 μ g/ml 첨가 시에도 신경미세섬유의 경쇄(light chain)가 많이 증가함을 확인하여 어큐빈이 신경분화를 촉진함을 확인하였다.

[0097] **실험예 2. 해마 유래 신경전구세포의 축색돌기 성장 촉진 효과**

[0098] 어큐빈의 신경전구세포의 축색돌기 성장 촉진 효과를 확인하기 위하여, 아래와 같이 성숙한 뉴런의 축색돌기를 표지하는 MAP2 항체를 이용하여 면역염색실험을 하였다.

[0099] **(1) 해마 유래 신경전구세포의 분리 및 배양**

[0100] 상기 실시예 3.(1)과 동일한 방법으로 신경전구세포를 분리, 배양하였다.

[0101] **(2) 배양된 세포의 면역형광염색**

[0102] 상기 (1)에서 배양된 신경전구세포를 항-MAP2 항체를 이용하여 면역 염색하였다(1:1000, 시그마-올드리치). 1차 항체는 MAP2(1:2000, Abcam)를 사용하고, FITC가 결합된 2차 항체(1:500, 잭슨랩, 미국) 및 DAPI(1 μ g/mL, 시

그마)를 사용하여 검출하였다. 상기 방법은 Heo SR et al(Neurosci Lett, 2009) 및 Han AM et al(J Med Food, 2012)를 참조하였다. LSM 510 이미지 분석 브라우저(독일, 칼 자이스)를 사용하여 9-12 공초점 현미경 범위에서 630X 오일 렌즈로 관찰하였다.

[0103] MAP2 항체로 면역염색한 결과를 도 2a 내지 도 2c에 도시하였다.

[0104] 도 2a와 같이, 어큐빈을 처리한 실험군 1, 2의 경우, 대조군(vehicle로 표시)에 비해서 MAP2 유전자를 발현하는 세포의 생존이 증가하였으며, 신경돌기의 길이뿐만 아니라 신경돌기의 수도 증가시킴을 확인하였다. 분화된 세포에서 MAP2 발현하는 축색돌기의 평균 길이는 어큐빈을 처리하지 않은 대조군(27 μ m) 보다 1 μ g/ml 어큐빈을 처리했을 때(약 47 μ m) 더 길게 나타났다(도 2b).

[0105] 분화된 세포에서 MAP2 발현하는 축색돌기의 길이의 분포를 도 2c에 도시하였다. 30 μ m 길이 이하의 작은 신경돌기는 대조군 세포에서 더 많이 관찰되었으나, 30~100 μ m의 긴 신경돌기는 어큐빈이 처리된 세포에서 더 많이 발견되었다.

[0106] 이러한 결과들은 어큐빈이 성숙한 신경표지자(MAP2)의 유전자 발현을 증가시키고 쥐 배아로부터 초대배양한 해마의 줄기 세포 뉴런의 축색돌기의 성장을 촉진함을 나타낸다.

[0107] 실험예 3. 대뇌 유래 신경전구세포의 분화인자인 Pax6 전사인자의 발현 촉진 효과

[0108] Pax6는 분화에 관여하는 전사인자이다. 어큐빈이 신경세포로의 분화를 촉진하는 효과가 있는지를 확인하기 위하여, Pax6를 발현하는 세포에서 GFP를 생산하는 형질전환 쥐에서 배양한 대뇌 유래 신경전구세포에서의 GFP 발현 변화를 아래와 같이 관찰하였다.

[0109] 실시예에서 기재한 흰쥐(스프라그 돌리)의 배아 14 일자의 척추 피질(dorsal cortex)로부터 분리한 대뇌 신경전구세포를 심은 후 FGF가 포함된 N2 배지에서 3일간 배양한 후 유리글라스에 심어서 FGF가 포함된 N2 배지에서 1일간 배양하였다.

[0110] 그 후, 다시 FGF없는 배지에서 대조군은 PBS를, 실험군은 어큐빈을 각각 0.01 μ M, 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M을 처리하고 2일간 배양하였다. 그 후 세포를 고정한 후 GFP 항체로 면역염색하였다.

[0111] 면역염색 결과를 도 3에 도시하였다. 도 3과 같이, 대조군에 비해 Pax6-GFP를 발현하는 세포의 크기 및 형광 발현 강도도 증가하였다. 상기 결과는 어큐빈이 신경전구세포의 분화를 촉진하는 효과가 있음을 나타낸다.

[0112] 실험예 4. 흰쥐의 손상된 좌골신경에서 어큐빈의 축색 재생 촉진 효과

[0113] (1) 좌골 신경 손상된 동물 모델 제작

[0114] 손상된 말초신경계에서 어큐빈이 축색 재생을 촉진할 수 있는가를 확인하기 위해 신경 축색이 절단된 좌골 신경 손상동물 모델을 만들었다.

[0115] 실시예에서 기재한 6주령된 스프라그 돌리 래트에 350mM 펜토바비탈 나트륨(sodium pentobarbital), 250mM 클로랄 하이드레이트(chloral hydrate), 85mM MgSO₄, 10% 에탄올에 용해된 40% 프로필렌 글리콜(propylene glycol)로 구성된 에퀴테신(Equithesin)을 2ml/kg으로 복강 내 주사하여 마취시켰다.

[0116] 근육사이의 좌측 좌골 신경에서 좌골절흔(sciatic notch)으로부터 1.0cm 떨어진 부분을 포셉을 사용하여 무균 기술로 노출시켰다. 상기 방법은 Kwon YK et al(J Neurosci, 1997) 및 Han AM et al(J Med Food, 2012)에 기재된 방법을 이용하였다.

[0117] 해부 현미경 하에서, 55번 포셉을 이용하여 주요 혈관을 신경 섬유로부터 조심스럽게 분리하였고, 이후 홍채절제 가위(iridectomy scissor)를 사용하여 좌골 신경 내의 동맥을 제외한 신경 섬유를 절단하였다.

- [0118] 상기 수술 후, 동물은 워패드(warm pad)에서 회복하였다.
- [0119] 좌골 신경 손상 3주 후, 상기 모델에 어큐빈을 2.5mg/kg의 농도로 1일 1회 일주일간 복강 주사하였다(실험군). 대조군에는 생리식염수를 주사하였다.
- [0120] **(2) 면역염색을 통한 축색 재생 촉진 효과 확인**
- [0121] 주사한지 2주 후, 면역조직화학 분석을 통하여 신경 재생 정도를 평가하였다. 상기 평가 방법은 Kwon YK et al(J Neurosci, 1997) 및 Han AM et al(J Med Food, 2012)에 기재된 방법을 이용하였다.
- [0122] 절단된 좌골 신경의 말초신경 잘린 끝 부분을 6시간 동안 고정시키고, 냉동 및 30% 수크로오스에서 탈수시킨 후, 7-10 μ m 간격으로 동결절편 하였다.
- [0123] 신경 절편을 0.1% Triton-X100에 15분 동안 투과시킨 후, 15% 정상 염소, 말, 당나귀 혈청 및 1% 소혈청알부민(BSA)으로 1시간 동안 블록하였다.
- [0124] 상기 신경 절편을 1차 항체와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이팅 하였고, 형광물질 FITC 또는 TRITC가 연결된 2차 항체와 1시간동안 인큐베이팅 하였다.
- [0125] 1차 항체로는 항-신경미세섬유 항체(NF-200, 1:200, Sigma)과 항-미엘린 염기 단백질 항체(MBP, 1:1000, Sigma)를 사용하였다. 항-신경미세섬유 항체는 신경 축색돌기의 성장 표지자(녹색)로, 항-미엘린 염기 단백질 항체는 슈반세포 미엘린화의 표지자(적색)로 사용하였다. 신경섬유의 절단부위에서 발쪽 방향(distal stump)의 신경다발까지의 축색돌기를, 기부(A), 중간(B), 말단(축색 성장 첨단부위, C)로 나누어 LSM 510 공초점 현미경(독일, 칼 자이스)으로 촬영하였다.
- [0126] 신경 손상 부위를 도시한 도 4의 A에서, 대조군(vehicle로 표시)의 경우, 축색돌기가 말단 기부에서 감소하였고(녹색), 슈반 세포의 미엘린 시트 또한 감소하였으며, 무작위로 흩어져 있었다(적색).
- [0127] 성장한 축색돌기의 중간 부분을 도시한 도 4의 B에서, 대조군의 경우, 축색돌기는 매우 얇고(녹색) 전체가 미엘린화 되지 않은 것으로 나타났다(적색). 이에 반해, 실험군(Aucubin으로 표시)의 경우, 축색돌기는 두꺼워졌고(녹색), 축색돌기가 슈반세포에 의해 다시 미엘린으로 둘러싸인 것으로 나타났다(적색). 다시 미엘린화된 굵은 축색돌기는 재생된 축색돌기로 볼 수 있다. 따라서, 어큐빈 처리 시 축색돌기의 재생이 촉진됨을 확인하였다.
- [0128] 한편, 성장한 축색돌기의 앞 부분을 도시한 도 4의 C의 경우, 현재 축색돌기가 성장하고 있는 부분이므로, 미엘린이 아직 연속적이지 않고 새로 자라고 있는 축색돌기를 둘러싸기 시작하는 것으로 나타났다.
- [0129] **(3) 성장한 축색의 두께 측정을 통한 축색 재생 촉진 효과 확인**
- [0130] 상기 (2)의 실험군 및 대조군에 대하여 면역염색한 축색의 두께를 측정하여 신경 재생 효과를 평가한 결과를 도 5a 및 도 5b에 도시하였다.
- [0131] 축색의 두께(diameter)를 측정한 결과, 도 5a에 도시한 것과 같이 대조군(vehicle로 표시)에서 평균 $2.7 \pm 1.1 \mu\text{m}$ 인 반면에 어큐빈 처리한 실험군에서는 $4.0 \pm 1.3 \mu\text{m}$ 로 나타났다. 한편, 어큐빈 처리한 실험군에서 미엘린화된 축색의 평균 두께는 $7.187 \pm 1.7318 \mu\text{m}$ 로 나타났다.
- [0132] 재생중인 축색을 기부(A), 중간(B), 말단(축색 성장 첨단부위, C)으로 나누어 신경다발의 두께를 측정하여 도 5b에 도시하였다. 성장하는 축색의 경우, 축색의 두께를 측정하면 기부(A)에서 가장 두껍고 점차 가늘어지다가 축색이 자라는 최첨단은 매우 가늘게 나타난다.
- [0133] 도 5b에 도시된 것과 같이, 대조군에서는 세 부위에서 평균 축색 두께 (diameter)에 크게 차이가 없으나, 어큐빈을 투여한 실험군은 대조군보다 기부에서 1.5배 이상 두껍고 축색이 자라고 있는 말단부위에서는 두께가 그보다 가는 것으로 나타났다. 따라서, 어큐빈이 축색돌기의 성장 및 재생을 촉진하는 것을 확인하였다.

[0134] (4) 성장한 축색의 길이 측정을 통한 축색 재생 촉진 효과 확인

[0135] 상기 (2)의 실험군 및 대조군에 대하여 면역염색한 축색의 길이를 측정하여 신경 재생 효과를 평가한 결과를 도 6a 및 도 6d에 도시하였다.

[0136] 축색돌기의 평균 길이(length)를 측정한 결과, 도 6a와 같이, 대조군에서는 15.3 ± 0.8 mm인 반면, 어큐빈을 투여한 실험군은 평균 55.5 ± 0.9 mm으로 나타나, 어큐빈 투여 시 축색돌기의 성장을 약 4배 증가시킴을 확인하였다.

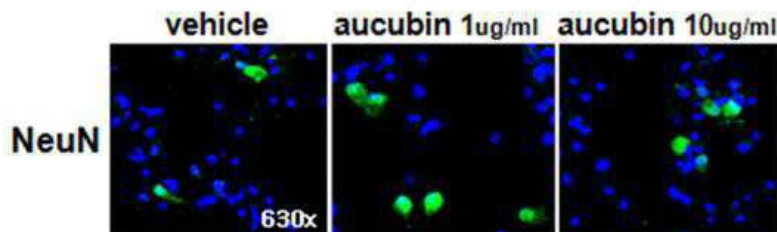
[0137] 또한, 재생 중인 축색을 기부(A), 중간(B), 말단(축색 성장 첨단부위, C)로 나누어 도 6b 내지 도 6d에 축색돌기의 길이 분포를 도시하였다. 도시된 것과 같이, 어큐빈은 좌골신경이 손상된 쥐 모델에서 축색돌기의 재생장과 슈반세포의 재 미엘린화를 촉진시킴을 확인하였다.

[0138] 이와 같이, 본 발명에 따른 어큐빈을 포함하는 조성물은 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화를 촉진하고 신경 축색돌기의 성장을 촉진하는 효과가 있어, 이식부위에 적합한 신경세포의 재생을 도모하여 각종 신경 질환의 예방 및 치료에 사용될 수 있다.

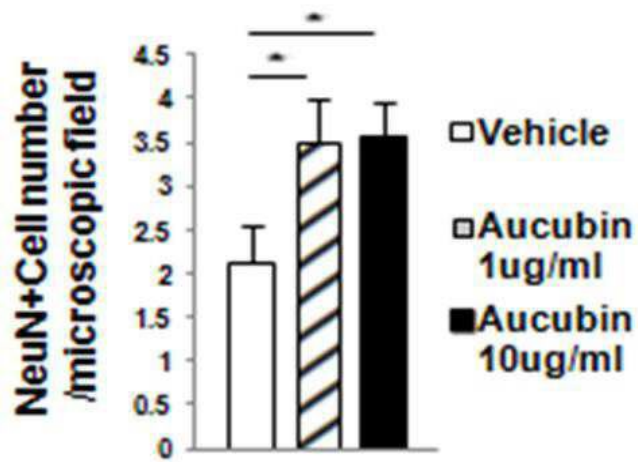
[0139] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

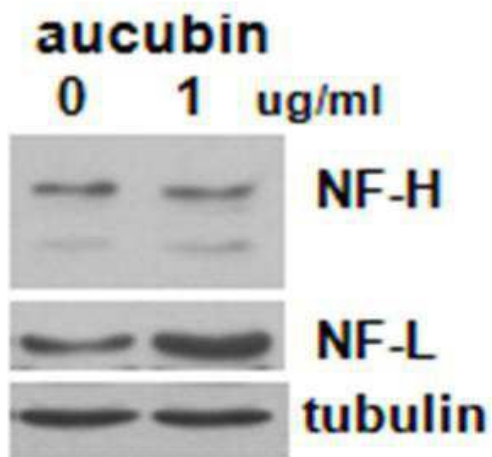
도면1a



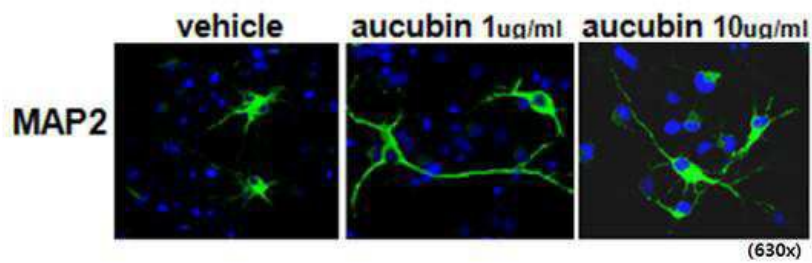
도면1b



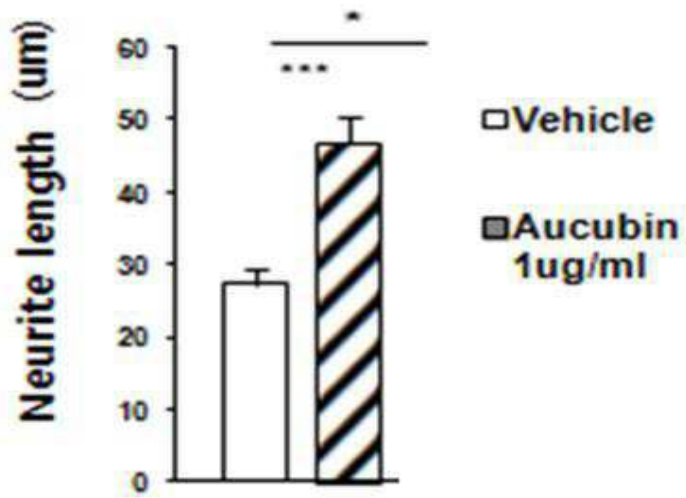
도면1c



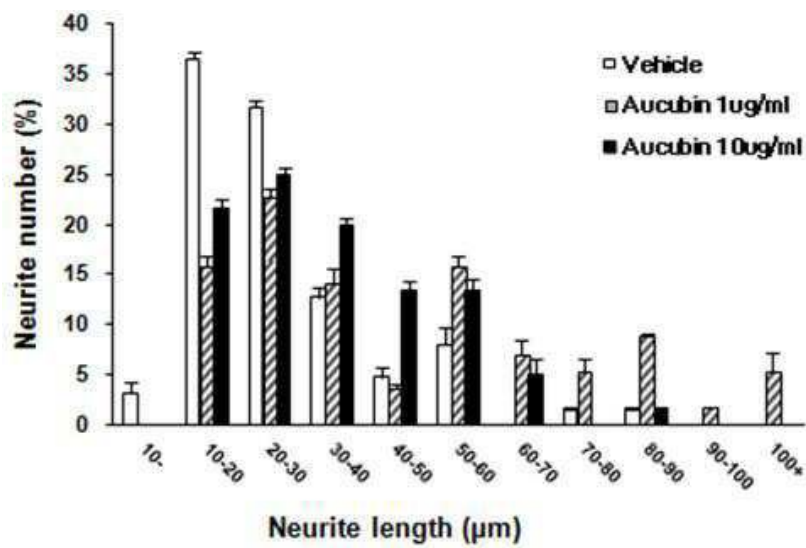
도면2a



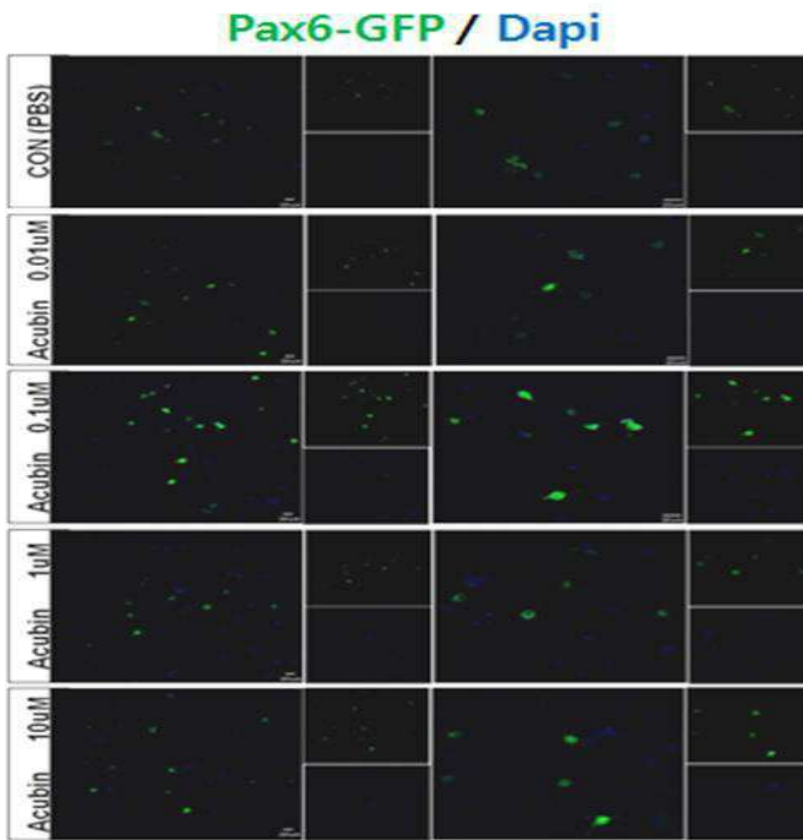
도면2b



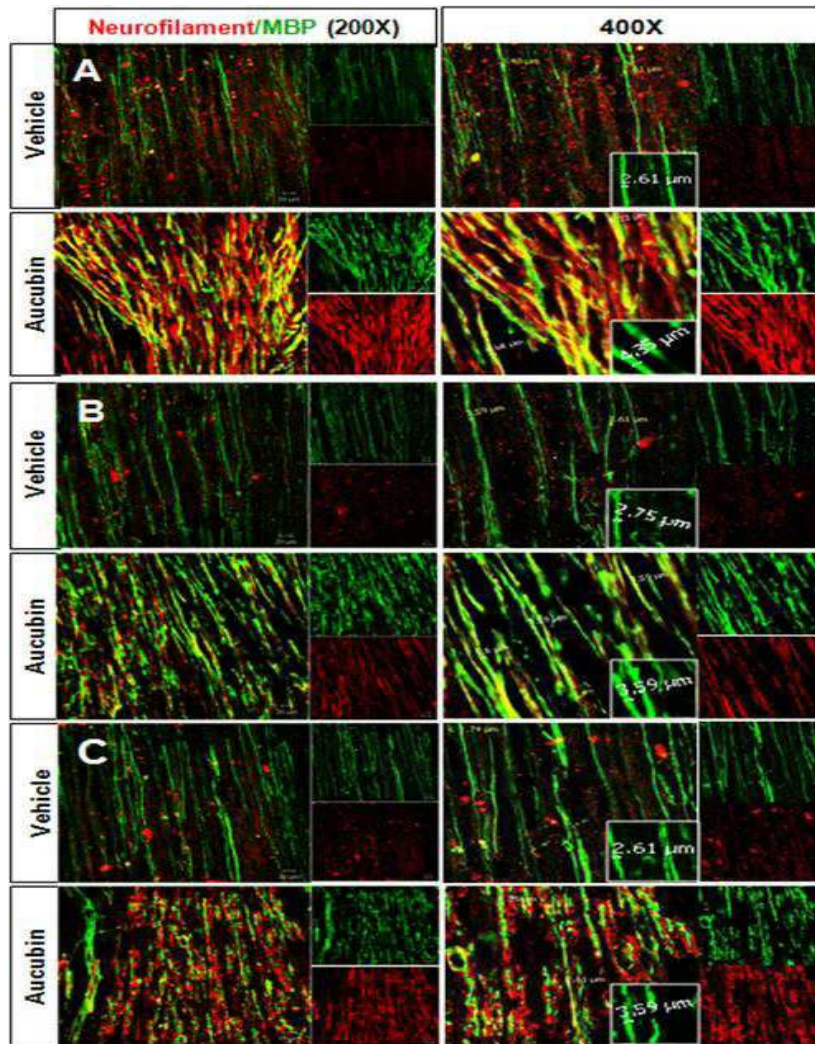
도면2c



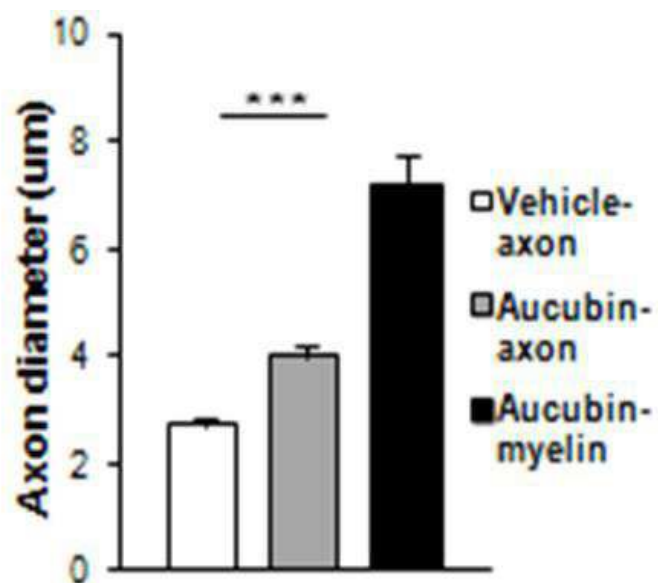
도면3



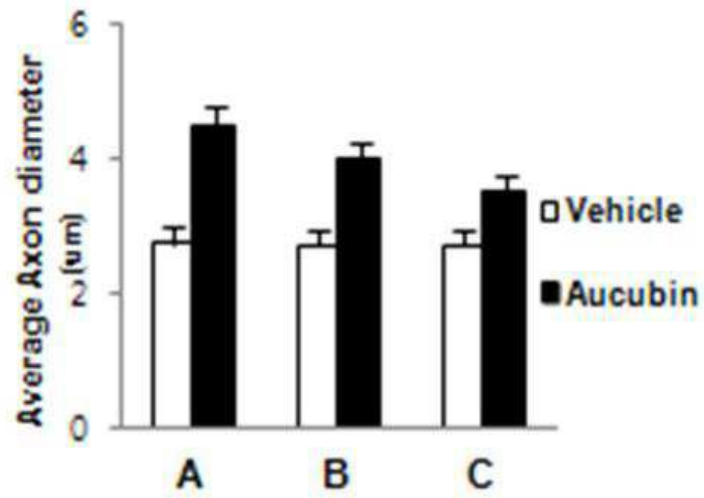
도면4



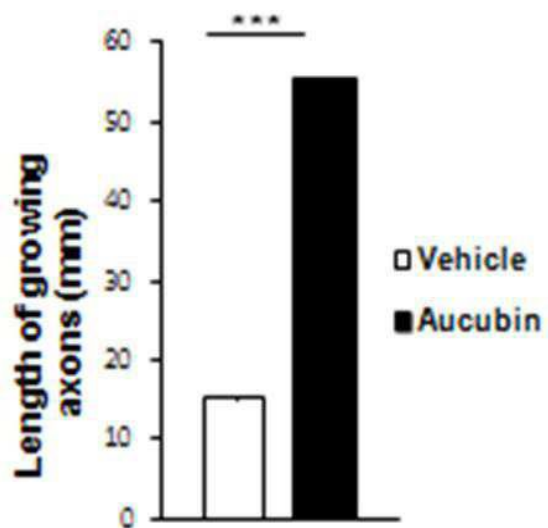
도면5a



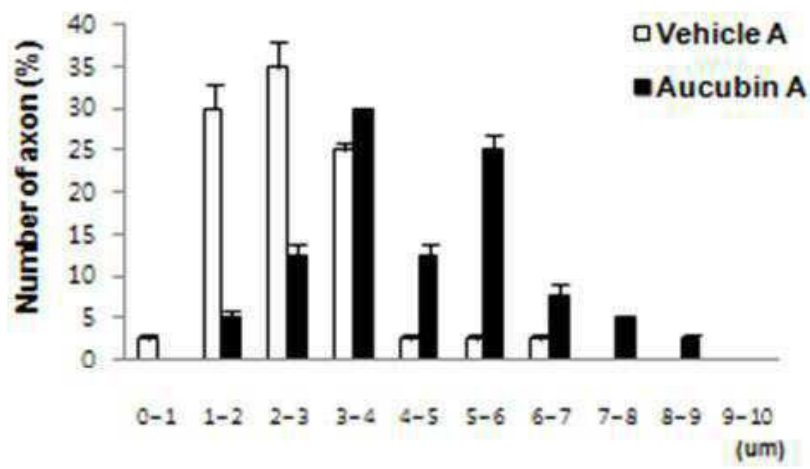
도면5b



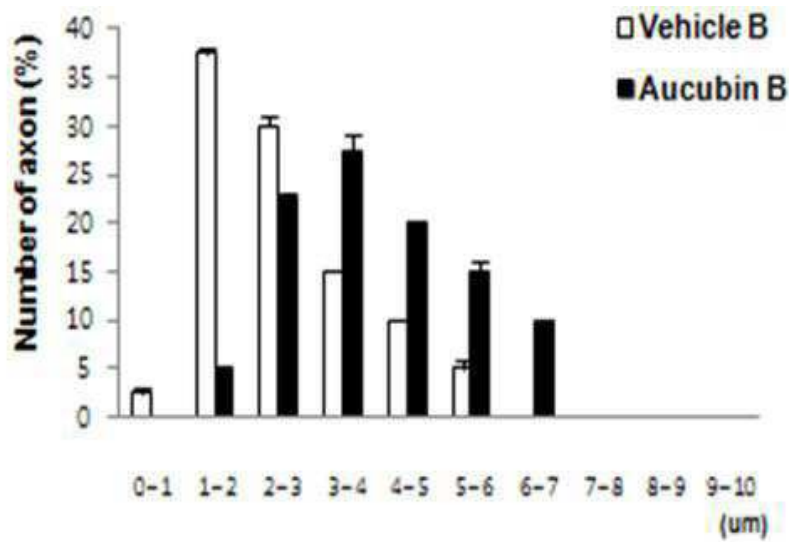
도면6a



도면6b



도면6c



도면6d

