



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년11월16일

(11) 등록번호 10-2327082

(24) 등록일자 2021년11월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/6883 (2018.01) C12Q 1/689 (2018.01)

G01N 33/563 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12Q 1/6883 (2018.05)

C12Q 1/689 (2018.05)

(21) 출원번호 10-2020-0073467

(22) 출원일자 2020년06월17일

심사청구일자 2020년06월17일

(56) 선행기술조사문헌

Neurology (2016) 87:2324-2332*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 11 항

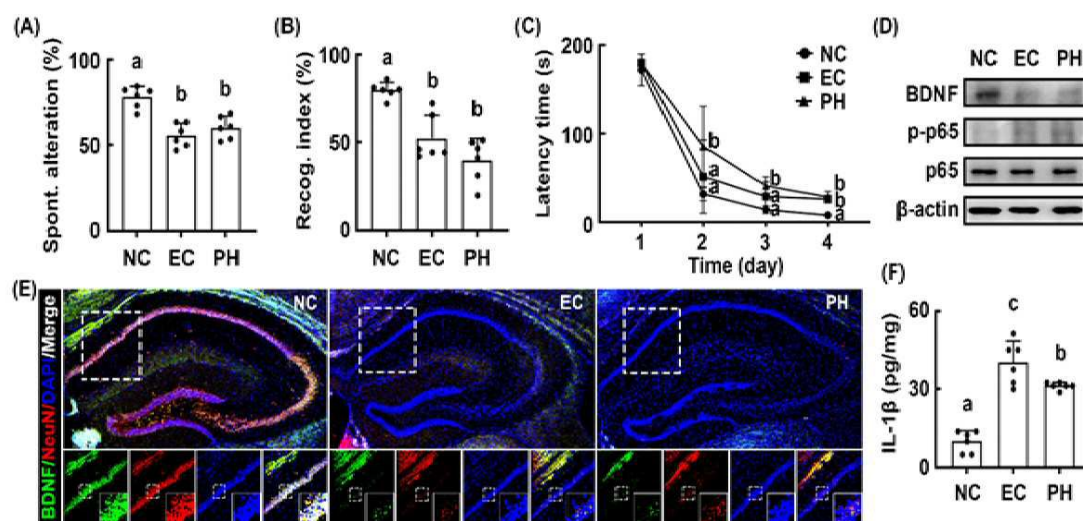
심사관 : 김승범

(54) 발명의 명칭 장내 마이크로바이옴을 이용한 인지장애 진단 방법

(57) 요약

본 발명은 대장균(*Escherichia coli*) 및 패날칼리진스 호미니스(*Paenaltcaligenes hominis*) 중 1종 이상의 미생물을 검출하는 제제를 포함하는, 인지기능 장애 진단용 조성물, 이를 포함하는 진단 키트, 인지기능 장애 진단에 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 또한, 대장균 및 패날칼리진스 호미니스 중 1종 이상의 검출 수준의 변화를 측정하는 단계를 포함하는, 인지기능 장애 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

G01N 33/563 (2019.05)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
G01N 2800/2821 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Frontiers in Cellular and Infection
 Microbiology (2017) 7:318*
 Journal of Inflammation (2010) 7:7(1-9)*
 Animal Model and Experimental Medicine (2018)
 1:180-188
 US20180196044 A1
 Journal of Neurogastroenterology and Motility
 (2019) 25:48-60
 Brain, Behavior, and Immunity (2019)
 80:633-643
 Microbiome (2020.07.) 8:107
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711112209
과제번호	2017R1A5A2014768
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	뉴로바이오타 연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

패널칼리진스 호미니스(*Paenalcaligenes hominis*)를 검출하는 제제를 포함하는, 인지기능 장애 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 인지기능 장애는 치매, 알츠하이머, 경도인지장애, 외상성 뇌손상, 파킨슨병, 뇌혈관성 치매증, 픽(pick)병, 크루츠펬트-야콥(Creutzfeldt-jakob)병, 두부손상에 의한 치매로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 인지기능 장애 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 제제는 패널칼리진스 호미니스에 특이적인 프라이머, 프로브, 안티센스 올리고 뉴클레오티드, 압타머 및 항체로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상; 또는

미생물 선택배지(selective medium)을 포함하는 것인, 인지기능 장애 진단용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 제제는 패널칼리진스 호미니스의 LPS(lipopolysaccharide) 또는 세포외 소포체(extracellular vesicle)를 검출하는 것인, 인지기능 장애 진단용 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 미생물 선택배지는 BL배지(blood liver medium) 및 DHL 배지(hydrogen sulfate lactose medium)를 포함하는 것인, 인지기능 장애 진단용 조성물.

청구항 6

제1항의 조성물을 포함하는, 인지기능 장애 진단용 키트.

청구항 7

a) 개체로부터 분리된 시료에서 패널칼리진스 호미니스(*Paenalcaligenes hominis*)를 검출하는 단계; 및

b) 상기 a) 에서 검출된 패널칼리진스 호미니스의 검출 수준을 정상 대조군의 시료와 비교하는 단계를 포함하는, 인지기능 장애 진단에 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 패널칼리진스 호미니스의 검출 수준이 정상 대조군에서의 검출 수준보다 증가한 경우, 인지기능 장애로 판단하는 단계를 더욱 포함하는, 인지기능 장애 진단에 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 a) 단계에서 패널칼리진스 호미니스의 LPS 또는 세포외 소포체가 검출되는 경우, 인지기능 장애로 판단하

는 단계를 더욱 포함하는, 인지기능 장애 진단에 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 인지기능 장애는 치매, 알츠하이머, 경도인지장애, 외상성 뇌손상, 파킨슨병, 뇌혈관성 치매증, 픽(pick) 병, 크루츠펔트-야콥(Creutzfeldt-jakob)병, 두부손상에 의한 치매로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것 인, 인지기능 장애 진단에 정보를 제공하는 방법.

청구항 11

- a) 개체로부터 분리된 시료에 인지기능 장애 치료제 후보물질을 처리하는 단계; 및
- b) 상기 시료에서 상기 후보물질을 처리하기 전과 처리한 후의 패날칼리진스 호미니스의 검출 수준의 변화를 측정하는 단계를 포함하는, 인지기능 장애 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 패날칼리진스 호미니스(*Paenaltcaligenes hominis*) 및 대장균(*Escherichia coli*) 중 1종 이상의 미생물을 검출하는 제제를 포함하는, 인지기능 장애 진단용 조성물, 이를 포함하는 진단 키트, 인지기능 장애 진단에 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다. 또한, 대장균 및 패날칼리진스 호미니스 중 1종 이상의 검출 수준의 변화를 측정하는 단계를 포함하는, 인지기능 장애 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 인류가 풍요로운 사회로 점점 발전해 감에 따라 생활습관이 급속하게 서구화되면서, 육식 및 지방 위주의 서구화된 식생활, 불규칙한 식사, 과음, 운동 부족, 과도한 스트레스, 유해 환경에의 노출 등으로 인한 장내세균군집의 교란 등의 질병이 증가하고 있다. 이러한 장내세균군집의 불균형의 증가는 치매, 알츠하이머, 파킨슨, 우울, 불안 등의 정신장애, 인지기능 장애 등을 급격하게 증가시킨다.
- [0003] 최근 치매, 알츠하이머 질환 등과 같은 인지기능 장애 관련 질환이 급속하게 증가하는 추세에 있어 조기진단, 예방 및 치료에 대한 필요성이 시급한 실정이나, 현재까지 알츠하이머 질환의 진단은 신경심리학적 검사(예를 들어, mini-mental state examination (MMSE))나 특화된 MRI 촬영과 같은 많은 시간과 경비가 소요되는 방법들만이 가능하였다.
- [0004] 예를 들어, 기존의 알츠하이머병 진단 방법으로, 고해상도 뇌영상 촬영장치를 이용한 뇌영상 촬영 기법이 있다. 뇌영상 촬영기법을 통하여 알츠하이머병의 조기 진단방법은 알츠하이머병 의심환자를 대상으로 뇌 촬영을 통해 베타 아밀로이드 단백질의 이상축적 정도를 측정하고 환자들의 사후 뇌조직 검시 결과와의 비교분석을 통해 뇌영상 촬영장치의 정밀도를 연구한다. 하지만 이러한 영상기반 진단방법은 환자에게 고비용을 요구할 뿐만 아니라, 이미 뇌수축 또는 손상이 진행된 상태에서 판별이 이루어지므로 병의 탐지가 늦게 된다.
- [0005] 또 다른 대표적 진단 방법으로는 척수액을 진단하는 것으로서 뇌척수 내의 베타 아밀로이드 단백질 양의 변화를 측정한다. 하지만 뇌척수 검사방법 자체가 환자에게는 너무나 고통스러운 방법이라고 알려져 있으며, 검사시 위험성이 동반된다는 점이 단점으로 지적되고 있다.
- [0006] 그 외 다른 진단 방법으로 tau 단백질의 농도를 측정하는 방법, 신경아교원섬유 산성 단백질(glial fibrillary acidic protein, GFAP)-항체를 검출하는 방법 등의 생화학적 방법들이 제안되었으나, 진단의 간편성과 정확도 등의 문제가 제기되고 있어, 직접적이면서도 비침습적인 방법으로 조기에 진단할 수 있는 기술의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제 10-2019-0041899 호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 미생물을 검출하는 제제를 포함하는, 인지기능 장애 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 조성물을 포함하는 인지기능 장애 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 미생물을 검출하는 단계를 포함하는, 인지기능 장애 진단에 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 치료제 후보 물질에 대한 미생물 검출 수준의 변화를 측정하는 단계를 포함하는, 인지기능 장애 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은 패날칼리진스 호미니스(*Paenaltcaligenes hominis*) 및 대장균(*Escherichia coli*) 중 1종 이상의 미생물을 검출하는 제제를 포함하는, 인지기능 장애 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0013] 본 발명에서, “인지기능 장애”는 기억력, 주의력, 언어능력, 시공간능력, 판단력 등이 저하된 상태를 말하며, 경미한 경우에서 심한 경우를 모두 포함한다. 인지기능이 정상적으로 행해지지 않으면 추론능력의 상실, 망각, 학습장애, 집중력 문제, 지능 저하, 이외 다른 정신 기능의 감소와 같은 인지기능 장애가 나타날 수 있다.

[0014] 본 발명에서, “진단”은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미한다. 본 발명에서의 진단은 인지기능 장애의 발병 여부를 확인하는 것을 목적으로 할 수 있다.

[0015] 구체적으로 상기 인지기능 장애는 치매, 알츠하이머, 경도인지장애, 외상성 뇌손상, 파킨슨병, 뇌혈관성 치매증, 픽(pick)병, 크루츠펠트-야콥(Creutzfeldt-jakob)병, 두부손상에 의한 치매로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.

[0016] 상기 질환들은 모두 인지기능 장애가 나타나는 것으로서, 본 발명은 상기 질환에 한정되는 것은 아니며 '인지기능 장애' 여부를 진단하기 위한 것이면 제한없이 적용될 수 있다.

[0017] 마이크로바이옴(microbiome)은 사람의 장, 호흡기, 피부 생식기 등의 인체 상피 세포에 주로 존재하는 모든 미생물들과 이들의 유전정보 전체를 말하는 것으로 단일생명체의 유전정보 전체를 뜻하는 게놈들의 집합체를 의미한다. 이러한 마이크로바이옴은 그 구성에 따라 인간의 건강에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 인체에 서식하는 미생물은 인체에 해를 끼치지 않는 공생균이 대부분이며 이중 일부는 병원균의 성장을 억제하거나, 인간 세포가 만들 수 없는 대사물질을 생성하는 등 유익균이다. 하지만 특정 신체부위에서는 일반 공생균으로 존재하지만 컨디션 및 신체 부위 등의 환경조건에 따라서 병원성을 나타내는 유해균(pathobiont) 역시 존재한다.

[0018] 본 발명에서는 장내 서식하는 미생물 중 인지기능 손상에 영향을 미치는 미생물을 확인하고, 이의 검출을 통해 인지기능 손상을 진단할 수 있음을 확인하였다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에서는 인지기능이 손상된 모델의 분변을 투여한 경우, 건강한 마우스 모델에서도 인지기능 손상이 확인됨에 따라 분변 내 인지기능을 손상시키는 미생물 또는 성분의 함유를 확인하였으며(표 2), 분변 내 대장균, 패날칼리진스 호미니스가 인지기능을 손상시키는 것을 확인하였으며(표 3), 또한, 상기 균주로부터 분리된 LPS(lipopolysaccharide) 또는 세포외 소포체(Extracellular Vesicle)에 의해서도 인지기능이 손상됨을 확인하였는 바(표 5), 상기 균주들의 검출 여부 및/또는 LPS, 세포외 소포체의 검출 여부를 확인함으로써 인지기능 장애를 진단할 수 있다.

[0020] 구체적으로, 상기 미생물을 검출하는 제제는 시료 내에서 인지기능 진단 마커 미생물인 패날칼리진스 호미니스(*Paenaltcaligenes hominis*) 및 대장균(*Escherichia coli*) 중 1종 이상에 특이적으로 존재하는 단백질, 핵산, 지질, 당지질, 당단백질 또는 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자를 특이적으로 검출할 수 있는 프라이머, 프로브, 안티센스 올리고 뉴클레오티드, 압타머 및 항체로 이루어진 군에선 선택되는 하

나 이상; 또는 미생물 선택배지(selective medium)를 포함하는 것일 수 있다.

- [0021] 또한 구체적으로, 상기 제제는 대장균 및 패넌칼리진스 호미니스 중 1종 이상의 미생물의 LPS(lipopolysaccharide) 또는 세포외 소포체(extracellular vesicle)를 검출하는 것일 수 있으며, 상기 제제는 미생물, 미생물 내 LPS, 세포외 소포체 등을 검출하기 위한 것이면 형태에 관계없이 적용될 수 있다.
- [0022] 상기 '마커'란 정상균 개체와 인지기능 장애를 가진 개체를 구분하여 진단할 수 있는 물질로, 구체적으로 본 발명의 인지기능 장애를 가지는 개체에서 증가 또는 감소를 보이는 미생물 군집을 구분하여 진단할 수 있는 물질을 말한다.
- [0023] 본 발명 일 실시예에서는 인지기능이 손상된 노화마우스 분변(Am) 및 인지기능이 손상된 노인 분변(Ah)에서 BL 선택배지에서 자라난 균주가 적었으나, DHL 배지에서 자라난 균주의 수가 매우 증가함을 확인하였는 바(도 4(A) 및 (B)), ~ 더욱 구체적으로, 상기 미생물 선택배지는 BL배지(blood liver medium) 및 DHL 배지(hydrogen sulfate lactose medium)를 포함하여 BL배지 및 DHL 배지에서의 균주 성장을 확인함으로써 인지기능 장애 여부를 판단할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 다른 측면은 상기 인지기능 장애 진단용 조성물을 포함하는, 인지기능 장애 진단용 키트에 관한 것이다.
- [0025] 상기 진단용 조성물은 진단 키트 형태로 구현되어 제공될 수 있다. 상기 키트는 해당 미생물을 검출하기 위한 프라이머, 프로브, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 압타머, 항체 또는 미생물 선택배지를 포함할 뿐만 아니라, 분석 방법에 적합한 1종 이상의 다른 구성성분 조성물, 용액, 또는 장치가 포함될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 측면은 a) 개체로부터 분리된 시료에서 대장균(*Escherichia coli*) 및 패넌칼리진스 호미니스(*Paenacaligenes hominis*) 중 1종 이상의 미생물을 검출하는 단계; 및 b) 상기 a)에서 검출된 대장균 및 패넌칼리진스 호미니스 중 1종 이상의 검출 수준을 정상 대조균의 시료와 비교하는 단계를 포함하는, 인지기능 장애 진단에 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0027] 상기 '개체'는 인지기능 장애가 의심되는 개체일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 상기 시료는 분변, 소변, 혈액, 혈장, 조직 등을 이용할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 구체적으로, 상기 대장균 및 패넌칼리진스 호미니스 중 1종 이상의 검출 수준이 정상 대조균에서의 검출 수준보다 증가한 경우, 인지기능 장애로 판단하는 단계를 더욱 포함할 수 있다.
- [0029] 더욱 구체적으로, 대장균의 경우 정상대조균 대비 DHL 배지에서 분변 그램당 1×10^6 CFU 이상 또는 qPCR로 0.02% 이상의 증가가 나타나면 인지기능 장애로 판단할 수 있으며, 패넌칼리진스 호미니스의 경우 정상대조균 대비 DHL 배지에서 분변 그램당 1×10^4 CFU 이상 또는 qPCR로 0.001% 이상의 증가가 나타나면 인지기능 장애로 판단할 수 있다.
- [0030] 또한 구체적으로, 상기 a) 단계에서 대장균 및 패넌칼리진스 호미니스 중 1종 이상의 미생물의 LPS또는 세포외 소포체가 검출되는 경우, 인지기능 장애로 판단할 수 있다.
- [0031] 본 발명 일 실시예에서는 대장균 및/또는 패넌칼리진스 호미니스가 증가된 경우 인지기능이 손상되었음을 확인하였으며, 나아가 내독소 LPS(lipopolysaccharide) 및/또는 세포외 소포체(extracellular vesicle)가 투여된 경우 인지기능 손상이 확인되었는 바, 상기 대장균 및/또는 패넌칼리진스 호미니스, LPS 또는 세포외 소포체의 검출 여부를 통해 인지기능 장애 진단에 활용할 수 있다.
- [0032] 또한 구체적으로, 상기 인지기능 장애는 치매, 알츠하이머, 경도인지장애, 외상성 뇌손상, 파킨슨병, 뇌혈관성 치매증, 픽(pick)병, 크루츠펠트-야콥(Creutzfeldt-jakob)병, 두부손상에 의한 치매로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 또 다른 측면은 a) 개체로부터 분리된 시료에 인지기능 장애 치료제 후보물질을 처리하는 단계; 및 b) 상기 시료에서 상기 후보물질을 처리하기 전과 처리한 후의 대장균 및 패넌칼리진스 호미니스 중 1종 이상의 검출 수준의 변화를 측정하는 단계를 포함하는, 인지기능 장애 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.
- [0034] 본 발명에서는 인지기능 장애 치료제 후보물질을 처리한 분리된 시료에 대하여 대장균 및 패넌칼리진스 호미니스 중 1종 이상의 검출 수준의 변화를 측정함으로써, 해당 인지기능 장애 치료제 후보물질의 치료 효과를 측정하여 인지기능 장애 치료제를 스크리닝 할 수 있다. 예를 들어, 인지기능 장애 치료제 후보물질의 처리에 따라

페널칼리진스 호미니스 및 대장균 중 1종 이상의 검출 수준이 감소되는 경우, 해당 후보물질을 인지기능 장애 치료제로 선별할 수 있다.

발명의 효과

[0035] 본 발명은 분변으로부터 검출되는 장내 균주의 종류 및 수준을 확인함으로써 인지 장애 여부를 진단 가능한 것으로서, 간편하면서도 비침습적인 방법으로 조기에 인지 장애를 진단할 수 있다.

[0036] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0037] 도 1은 인지기능이 손상된 노인 분변을 투여한 마우스에서의 분자마커 발현 세포의 변화를 나타낸 것이다.

도 2는 페널칼리진스 호미니스 또는 대장균을 투여한 마우스에서의 마우스에서의 분자마커 발현 세포의 변화를 나타낸 것이다(NC: 음성대조군(Negative Control, EC: 대장균, PH: 페널칼리진스 호미니스).

도 3은 페널칼리진스 호미니스로부터 수득된 LPS 및 EV 투여시의 분자마커 발현 세포의 변화를 나타낸 것이다(왼쪽: 복강절제 수술 마우스 모델, 오른쪽: Sham 마우스 모델).

도 4는 분변에서 분리한 세균 집락 및 분포 양상을 나타낸 것이다(Ym: 젊은 생쥐 분변, Am: 인지기능이 손상된 노화마우스 분변, Yh: 젊은 성인 분변, Ah: 인지기능이 손상된 노인 분변).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0039] <실험재료 및 방법>

[0040] 1. 장내세균의 배양 및 시료제조

[0041] 1-1. 분변 시료 제조

[0042] 젊은 생쥐(2개월령, 웅성 C57BL/6)의 분변, 인지기능이 손상된 노화마우스(20개월령, 웅성 C57BL/6)의 분변, 5XFAD 형질전환 생쥐(B6SJL-Tg (APPSwF1Lon, Psen1*M146L*L286V) 6799Vas/J) transgenic mice, 9개월령)의 분변, 젊은 성인(19-23세, 여성5인, 남성1인)의 분변 및 인지기능이 손상된 노인(64-82세, 여성 6인)의 분변을 즉시 약 0.5 그램 받고, 생리식염수를 10배(4.5mL) 희석하고, 원심분리(500 rpm, 5분)하고, 상등액을 분리한 후 이를 다시 원심분리(10,000 rpm, 20분)하여 분변 시료를 수득하였다. O. Westphal et al. Bacterial Lipopolysaccharides, Estraction with Phenol-Water and Further Applications of the Procedure, Meth. Carbohydr. Chem., Vol. V(1965) pp.83-91 문헌을 참고하였다.

[0043] 1-2. 분변에서의 장내세균 분리

[0044] 신선한 분변(0.1 - 1gram)을 혐기성배지(GAM general anaerobic medium; BD, USA) 액체배지(broth)로 10배씩 계열 희석하고, 이를 BL, DHL 한천배지에 이식하고, BL배지는 혐기적 조건으로 3일간 37℃에서 배양하였다. DHL 배지는 호기적 조건에서 1-2일간 37℃에서 배양하였다. 이후 성장한 콜로니의 수를 세고, 상기 콜로니를 GAM액체배지에 배양하였다. 그람염색, 당이용반응, 16S rDNA를 분석하여 균주를 동정하였고, GAM 반유동배지에 이식하여 보관하였다. 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*), 스태필로코커스 에피더미디스(*Staphylococcus epidermidis*), 페널칼리진스 호미니스(*Paenacaligenes hominis*), 유박테리아 리모섬(*Eubacterium limosum*), 대장균(*Escherichia coli*) 및 박테로이드 후라길리스(*Bacteroides fragilis*)가 분리되었다.

[0045] 1-3. 장내세균에서의 LPS(lipopolysaccharide) 수득

[0046] GAM배지에서 배양하여 집균한 장내세균 (2 g)을 생리식염수로 씻고, 60 mL의 증류수에 현탁하고, 1 mg의 RNase(Ribonuclease A, bovine pancreas, Sigma), 1 mg의 DNase(Dnase I, bovine pancreas, grade II, Sigma)을 넣고 실온에서 30 시간 동안 배양하였다. 이후 1 mg의 단백질 분해 효소 K(proteinase K)(Tritirachium album, Boehringer, Mannheim)를 첨가하여 12시간동안 배양하였다. 4 ℃에서 24시간동안 1 L의 증류수에 투석하고, 냉동 건조하였다. 내독소 LPS는 Limulus amoebocyte lysate (LAL) assay kit를 사용하여 측정하였다(LPS

수득물: 35 mg, 1.75 % m/m).

[0047] 1-4. 장내세균에서의 EV(Extracellular Vesicle, 세포외 소포체) 시료 수득

[0048] 배양한 장내세균을 1차 원심분리($5000 \times g$, $4^{\circ}C$, 20 min)하고, 그 상등액을 다시 수크로스(sucrose) 용액(0.8 and 2.5 mol/L)을 사용하여 원심분리($100,000 \times g$, $4^{\circ}C$, 2 h)을 하였다. 그 중간층을 다시 원심분리($150,000 \times g$, 2 h)하여 얻은 침전을 세포외 소포체(extracellular vesicle, EV)로 사용하였다. Park KS, Lee J, Lee C, Park HT, Kim JW, Kim OY, Kim SR, Radinger M, Jung HY, Park J, et al. Sepsis-like systemic inflammation induced by nano-sized extracellular vesicles from feces. Front Microbiol.2018;9:1735. 문헌을 참고하였다.

[0049] 2. 시료의 투여 및 실험방법

[0050] 분변, 배양장내세균, LPS 및 EV각 시료 0.1 mL를 매일 1회씩 5일간 마우스에 경구투여하였다. 6일 째에 행동실험(Y자형 미로 실험, 신물체인식실험, 반스 미로 실험) 및 인지기능 관련 분자마커 측정 실험을 수행하였다. 인지기능 관련 분자마커 측정 실험은 대장 및 히포캠퍼스를 분리하고, 대장에서는 TNF- α , myeloperoxidase activity, 히포캠퍼스에서는 BDNF, TNF- α , p65(NF- κ B), p-p65(phosphor-NF- κ B) 및 β -actin의 발현량을 측정하였다.

[0051] 2-1. 행동실험방법

[0052] Y자형 미로 실험(Y-maze task)

[0053] Y자형 미로 측정 장치는 3개의 통로 (arm)를 뻗어 알파벳 Y자 모양을 하고 있으며 각 가지는 길이 25 cm, 높이 14 cm, 폭 5 cm 이고 동일한 각도로 위치하게 하였다. Y자형 미로의 한 통로의 끝에 생쥐의 머리 부분이 향하도록 두고 8 분 동안 자유롭게 통로를 돌아다니도록 하였다. 동물의 움직임을 기록하고 동물의 뒷발까지 통로로 들어간 경우를 통과한 것(arm entry)으로 보았다. 동물의 움직임을 교차횟수(alternation)로 나타내는데, 교차 횟수란 동물이 연속적으로 3개의 통로를 통과하였을 때 한 번 교차한 것으로 정의하였다. 자발적인 교차행동량은 실제 교차횟수와 최대 가능한 교차횟수 (즉, 총 교차횟수에서 2를 뺀 값)의 백분율로 표시하였다.

[0054] 신물체 인지 실험(novel object recognition test)

[0055] 생쥐를 행동 관찰상자로 옮겨 5분간 적응시킨 뒤 3분의 노출시행에서는 상자에 동일한 물체 두 개(1 set)를 30 cm 간격으로 놓고, 동물이 3분 동안 물체를 탐색하는 시간을 측정하였다. 하루 후 동일한 상자에 원물체 한 개와 새로운 물체 한 개를 준비해 놓고, 동물이 탐색하는 시간을 측정하였다. 이를 비교하여 백분율로 표시하였다.

[0056] 반스 미로 실험(Barnes maze task)

[0057] 직경 5 cm의 회피용 구멍이 20개가 뚫려 있는 지름 89 cm, 높이 140 cm의 흰색 원판으로 구성되어 있으며, 하나의 회피용 구멍은 하단에 검정색의 안전지대(Safety zone)가 설치되어 실험용 생쥐의 회피장소로 이용될 수 있도록 제작하였다. 상기 제작된 반스 실험용 미로의 중앙에 생쥐를 놓고, 강력한 빛을 조사하여 생쥐가 빛을 피하여 어두운 안전지대를 찾아 가는 시간을 측정하였으며, 매일 1회씩 4일간 반복 시행을 통해 안전지대까지의 찾는 시간을 측정하였다. 4일째 결과를 비교하였다.

[0058] 2-2. 인지기능 관련 분자마커 측정

[0059] BDNF, p65(NF- κ B), p-p65(phosphor-NF- κ B) 및 β 의 발현량 측정

[0060] 생쥐에 1×10^9 CFU/mouse 살아있는 장내세균, 장내세균의 extracellular vesicle (1×10^9 CFUdp 분리한 EV/mouse), 장내세균의 LPS (100 ug/mouse)를 각각 5일간 매일 1회씩 투여하고, 행동실험을 완료하고, 생쥐에서 분리하여 얻은 히포캠퍼스에서 면역블로팅으로 BDNF, p65(NF- κ B), p-p65(phosphor-NF- κ B), TNF- α 는 ELISA(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) 키트(eBioscience, San Diego, CA, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다. 먼저 상등액 0.05 ml를 TNF- α 항체가 coating된 96 well-plate에 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후 phosphate buffered saline-Tween로 세척하고, 발색제를 넣고 20분 동안 발색시켜 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 계산하였다.

[0061] 또한, 대장에서는 myeloperoxidase 활성, 면역블로팅으로 p65, p-p65을 측정하였다.

[0062] 면역블로팅 측정

[0063] 구체적으로 상등액 50 μg 을 취해 SDS 10%(w/v) 폴리아크릴아마이드 겔(polyacrylamide gel)에서 1시간 30분동안 전기영동을 하였다. 전기영동한 샘플을 니트로셀룰로스에 100 V, 400 mA의 조건에서 1시간 10분간 트랜스퍼(transfer) 하였다. 샘플이 트랜스퍼된 니트로셀룰로스를 5% 탈지분유(stim milk)로 30분간 블로킹(blocking)한 후, 5분씩 3회에 걸쳐 PBS-Tween으로 세척하고, 1차 항체(Santa Cruz Biotechnology, 미국)을 1 : 100의 비율로 추가하여 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후, 10분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology, 미국)을 1 : 1000의 비율로 추가하여 1시간 20분간 반응시켰다. 이후, 15분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 형광발색 시킨 후 현상하고, 발색밴드의 강도(Intensity)를 측정하였다.

[0064] 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정

[0065] 대장조직 100mg에 0.5% 헥사데실트리메틸암모늄브로마이드(hexadecyl trimethyl ammonium bromide) 함유 10 mM 인산칼륨 버퍼(potassium phosphate buffer, pH 7.0) 200 μl 를 넣고 균질화(homogenization)하고, 4°C 및 10,000 g의 조건에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이후 상등액 50 μl 를 0.95 ml의 반응액(1.6mM 테트라메틸벤지딘(tetramethyl benzidine) 및 0.1mM H_2O_2 함유)에 넣고 37°C에서 반응시키면서 650 nm에서 경시적으로 흡광도를 측정하였다.

[0066] **3. 조직염색실험**

[0067] 행동실험이 끝난 생쥐를 3시간 후에 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)로 전신관류하고, 뇌를 분리하여 4% 파라포름알데하이드에서 4시간동안 고정하고, 30% 수크로스 용액에 담궈두었다가 섹션(section)하였다. 섹션한 조직은 BDNF (1:200, Santa Cruz)와 NeuN (1:200, Millipore)의 항체로 24시간 반응시키고, 이어서 Alexa Fluor 488 (1:200, Invitrogen) or Alexa Fluor 594 (1:200, Invitrogen) 이차항체로 반응시켰다. 세포의 핵염색은 4',6'-diamidino-2-phenylindole, dilactate (DAPI, Sigma)로 수행하고, confocal laser microscope로 관찰하였다.

[0068] **4. qPCR (Quantitative polymerase chain reaction)**

[0069] 장내미생물군집에서 대장균(*Escherichia coli*), 패널칼리진스 호미니스(*Paenaltcaligenes hominis*)의 점유율을 측정하기 위해 qPCR을 수행하였다. 먼저 분변의 DNA는 QIAamp DNA stool mini kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 분리하고, 하기 표 1의 프라이머를 이용하여 real time PCR을 수행하였다. PCR 반응은 먼저 95° C에서 30 초 처리하고, 이어서 95° C에서 5초, 72° C에서 30 초, 42회 반복 반응시켜 분석하였다.

표 1

종류	염기서열 (5' -3')		서열번호
대장균 (<i>Escherichia coli</i>)	정방향 (F)	5'-CAGCCACACTGGAAGTGA A-3'	1
	역방향 (R)	5'-GTTAGCCGGTCTTCTTCT G-3'	2
패널칼리진스 호미니스 (<i>Paenaltcaligenes hominis</i>)	정방향 (F)	5'-AAAACTTACCTACGCTTGA C-3'	3
	역방향 (R)	5'-ACCCAACATCTCACGACAC-3'	4
박테리아 16S rDNA	정방향 (F)	5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG GTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3'	5
	역방향 (R)	5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGA GACAGGGACTACHV GGGTWTCTAAT-3'	6

[0070]

[0071]

<실험결과>

[0072]

1. 분변 시료 투여에 따른 마우스 모델에서의 인지기능 손상 확인

[0073]

상기 1-1. 분변 시료 제조에서 제조된 각 분변 시료를 건강한 마우스에 0.1 mL를 매일 1회씩 5일간 마우스에 경구투여하고, 6일 째에 행동실험 및 인지기능 관련 분자마커 측정 실험을 수행하였다.

[0074]

그 결과, 하기 표 2에 나타난 바와 같이 건강한 마우스의 인지기능을 심각하게 손상시킨 것은 노화마우스 분변, 5XFAD 형질전환 생쥐 분변 및 인지기능이 손상된 노인 분변임을 확인하였다.

표 2

실험군	Y-maze T (%)	NOR T (%)	Barnes maze T (%)	TNF-α (ng/mg)	BDNF/ β-actin 발현강도
생리식염수	67.6	63.9	21.8	1.9	0.36
젊은 생쥐 분변 (Young mouse feces)	65.3	65.1	24.1	2.3	0.33
인지기능이 손상된 노화마우스 분변 (Aged mouse feces)	52.4	53.9	37.2	5.9	0.22
5XFAD 형질전환 생쥐 분변 (5XFAD tg mouse feces)	51.9	51.2	39.4	6.2	0.19
젊은 성인 분변 (Young adult feces)	68.2	65.4	22.9	2.5	0.39
인지기능이 손상된 노인 분변 (Elderly people feces)	53.0	49.2	43.5	6.8	0.21

[0075]

[0076] 또한, 도 1에 나타난 바와 같이 인지기능이 손상된 노인 분변을 투여한 마우스에서는 BDNF⁺/NeuN⁺세포가 감소하고, NF-κB⁺/Iba1⁺세포, LPS⁺/Iba1⁺세포가 증가된 것을 확인하였다. 이러한 결과로부터 인지기능 또는 기억력이 손상된 노인에는 내독소 LPS를 포함한 염증을 일으키는 미생물 및 이의 성분을 함유하고 있음을 확인하였다.

[0077] **2. 인지기능이 손상된 사람의 분변에서 분리한 장내세균 투여에 따른 마우스 모델에서의 인지기능 손상 확인**

[0078] 상기 1-2. 분변에서의 장내세균 분리에서 분리한 장내세균들을 건강한 마우스에 0.1 mL를 매일 1회씩 5일간 마우스에 경구투여하고, 6일 째에 행동실험 및 인지기능 관련 분자마커 측정 실험을 수행하였다.

[0079] 그 결과, 하기 표 3에 나타난 바와 같이 건강한 마우스의 인지기능을 심각하게 손상시킨 장내세균은 패널칼리진스 호미니스(*Paenalcogenes hominis*) 및 대장균(*Escherichia coli*)임을 확인하였다.

표 3

실험군	Y-maze T (%)	NOR T (%)	Barnes maze T (%)	TNF-α (ng/mg)	BDNF/ β-actin 발현강도
생리식염수	67.6	63.9	21.8	1.9	0.36
엔테로코커스 패칼리스 (<i>Enterococcus faecalis</i>)	59.6	62.2	24.6	3.9	0.35
스테필로코커스 에피더미디스 (<i>Staphylococcus epidermidis</i>)	63.2	61.5	22.8	2.1	0.31
패널칼리진스 호미니스 (<i>Paenalcogenes hominis</i>)	52.7	53.1	34.2	6.1	0.21
유박테리아 리모섬 (<i>Eubacterium limosum</i>)	64.3	63.7	25.2	2.2	0.34
대장균 (<i>Escherichia coli</i>)	53.7	54.0	31.2	5.2	0.24
박테로이드 후라길리스 (<i>Bacteroides fragilis</i>)	65.4	64.3	25.2	2.2	0.30

[0080]

[0081] 또한, 도 2에 나타난 바와 같이 패널칼리진스 호미니스 또는 대장균을 투여한 마우스에서는 뇌의 히포캠퍼스에서 BDNF⁺/NeuN⁺세포가 감소하고, IL-1β 발현 및 NF-κB 활성화가 증가한 것을 확인하였다(NC: 음성대조군 (Negative Control), EC: 대장균, PH: 패널칼리진스 호미니스).

[0082] **3. 사람의 분변에서 분리한 장내세균 투여에 대한 복강절제(Celiac vagotomy) 수술 마우스 모델에서의 인지기능 손상 억제 확인**

[0083] 먼저, 에테르(ether)로 마취하고 복부 중양을 절개하여 미주신경(vagus nerve)의 복강 가지(celiac branch)를 절단하고, 절단부위를 례매어 복강절제 수술 마우스 모델을 제작하였다. 또한, Sham 마우스 모델은 복부 중양을 절개하여 미주신경의 절단 없이 절단 부위를 례매어 제작하였다.

[0084] 이후 분변 시료를 상기 각 모델 마우스에 0.1 mL를 매일 1회씩 5일간 마우스에 경구투여하고, 6일 째에 행동실험 및 인지기능 관련 분자마커 측정 실험을 수행하였다.

[0085] 그 결과, 하기 표 4에 나타난 바와 같이 패널칼리진스 호미니스가 투여된 경우 복강 절제 수술에 의해 인지기능 손상이 강하게 억제되었으며, 대장균이 투여된 경우에도 인지기능 손상 억제 효과가 나타남을 확인하였다.

표 4

실험군	복강절제	Y-maze T (%)	NOR T (%)	Barnes maze T (%)	TNF-α (ng/mg)	BDNF/ β-actin 발현강도
생리식염수	X	67.6	63.9	21.8	1.9	0.36
	0	65.7	62.3	23.5	2.2	0.35
패널칼리진스 호미니스 (<i>Paenaltcaligenes hominis</i>)	X	52.7	53.1	34.2	6.1	0.21
	0	59.1	58.5	29.3	3.8	0.28
대장균 (<i>Escherichia coli</i>)	X	53.7	54.0	31.2	5.2	0.24
	0	54.1	55.2	33.5	4.3	0.25

[0086]

[0087]

4. 사람의 분변에서 분리한 패널칼리진스 호미니스의 LPS 및 EV 투여에 대한 복강절제(Celiac vagotomy) 수술 마우스 모델에서의 인지기능 손상 억제 확인

[0088]

복강절제 수술 마우스 모델 및 Sham 마우스 모델 각각에 사람의 분변에서 분리한 장내세균인 패널칼리진스 호미니스로부터 수득된 LPS 및 EV 각 0.1 mL를 매일 1회씩 5일간 마우스에 경구투여하고, 6일 째에 행동실험 및 인지기능 관련 분자마커 측정 실험을 수행하였다.

[0089]

그 결과, 표 5 및 도 3에 나타난 바와 같이 패널칼리진스 호미니스의 LPS 및 EV는 모두 인지기능을 손상시킴을 확인하였으며, 다만 LPS의 경우 복강절제 수술에 의해 인지기능 손상이 억제되지 않았으나, EV의 경우 복강절제 수술에 의해 인지기능 손상이 강하게 억제됨을 확인하였다.

표 5

실험군	복강절제	Y-maze T (%)	NOR T (%)	Barnes maze T (%)	TNF-α (ng/mg)	BDNF/ β-actin 발현강도
생리식염수	X	67.6	63.9	21.8	1.9	0.36
생리식염수	0	65.7	62.3	23.5	2.2	0.35
<i>Paenaltcaligenes hominis</i> LPS	X	54.7	54.1	31.5	5.2	0.24
<i>Paenaltcaligenes hominis</i> LPS	0	54.3	54.7	31.5	5.0	0.25
<i>Paenaltcaligenes hominis</i> EV	X	52.7	53.1	34.2	6.1	0.21
<i>Paenaltcaligenes hominis</i> EV	0	57.3	57.8	27.2	3.3	0.29

[0090]

[0091]

5. 분변에서 분리한 세균 집락 및 분포 양상 확인

[0092]

젊은 생쥐 분변(Young mouse feces, Ym), 인지기능이 손상된 노화마우스 분변(Aged mouse feces, Am), 젊은 성인 분변(Young adult feces, Yh) 및 인지기능이 손상된 노인 분변(Elderly people feces, Ah)의 분변을 각 0.2g씩 수집한 후 얼음 위에서 9부피의 희석 GAM 용액에 현탁하여 10배로 희석되도록 하였다. 이후 비피도박테리아 및 락토바실러스 선택 배지인 BL배지(blood liver medium, Nissui Pharm, Japan) 및 장내세균과(Enterobacteriaceae) 선택 배지인 DHL 배지(hydrogen sulfate lactose medium, Eiken Chem, Japan)에 접종하고 배양하였다. BL 한천(agar) 플레이트는 37° C에서 3일 동안 혐기성 배양하였으며, DHL 한천 플레이트는 37° C에서 1일 동안 호기성 배양을 하였다.

[0093]

이후, quantitative PCR을 수행하여 대장균 및 패널칼리진스 호미니스의 집락분포를 분석하였다.

[0094]

그 결과, 도 4(A) 및 (B)에 나타난 바와 같이 인지기능이 손상된 노화마우스 분변(Am) 및 인지기능이 손상된 노

인 분변(Ah)에는 BL 선택배지에서 자라난 균주가 적었으나, DHL 배지에서 자라난 균주의 수가 매우 증가함을 확인하였다.

[0095] 또한, 도 4(C) 및 (D)에 나타난 바와 같이 인지기능이 손상된 노화마우스 분변(Am) 및 인지기능이 손상된 노인 분변(Ah)에는 대장균 및 패넬칼리진스 호미니스가 현저히 증가하였음을 확인하였다.

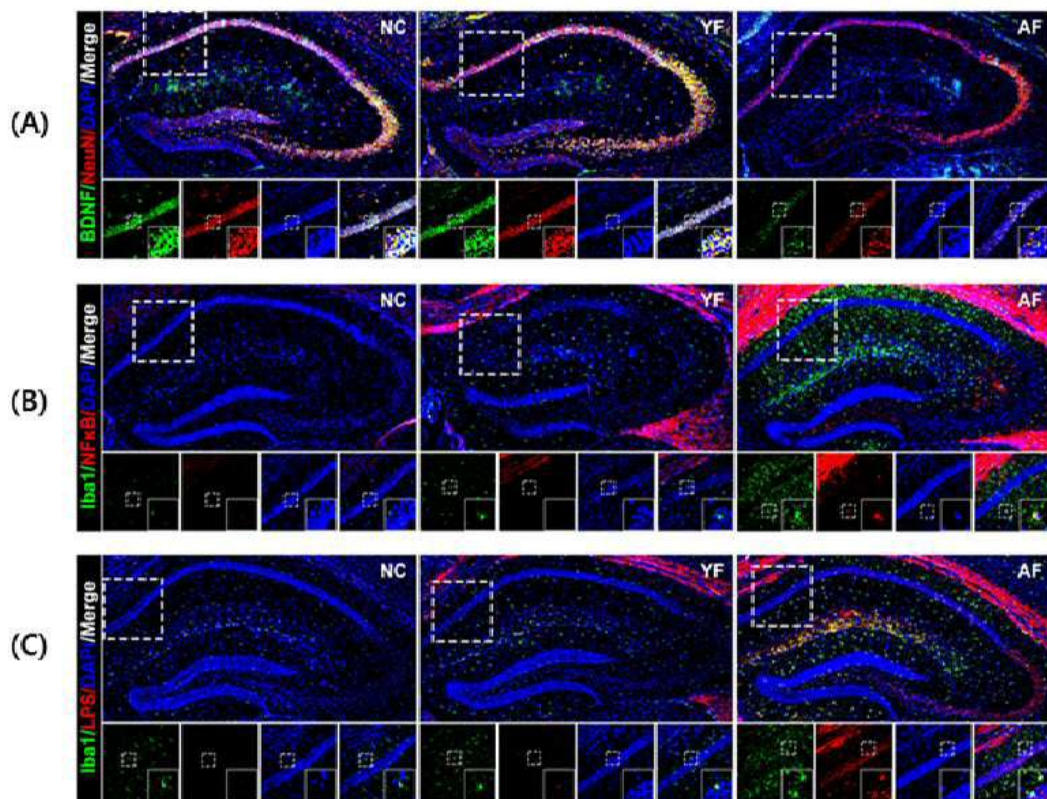
[0096] 상기와 같은 결과는 대장균 및/또는 패넬칼리진스 호미니스가 인지기능 장애를 유발함을 나타낸 것인 바, 장내 세균인 대장균 및/또는 패넬칼리진스 호미니스의 검출 여부 및 검출 수준을 측정함으로써 인지기능 장애 진단에 활용할 수 있다.

[0097] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

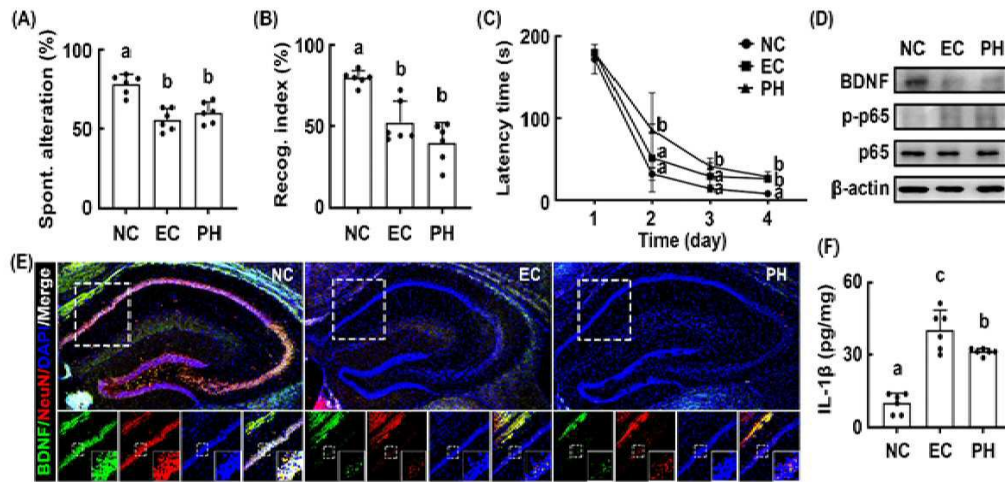
[0098] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

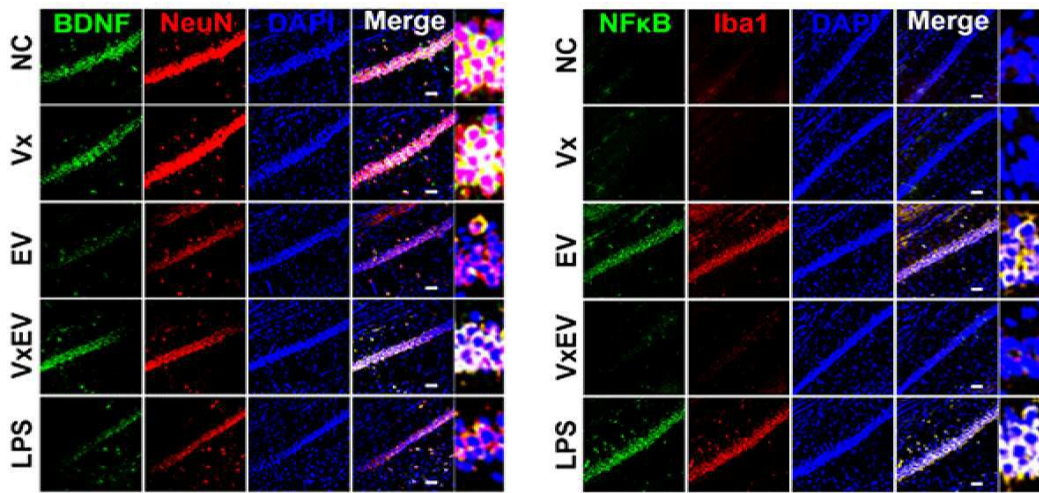
도면1



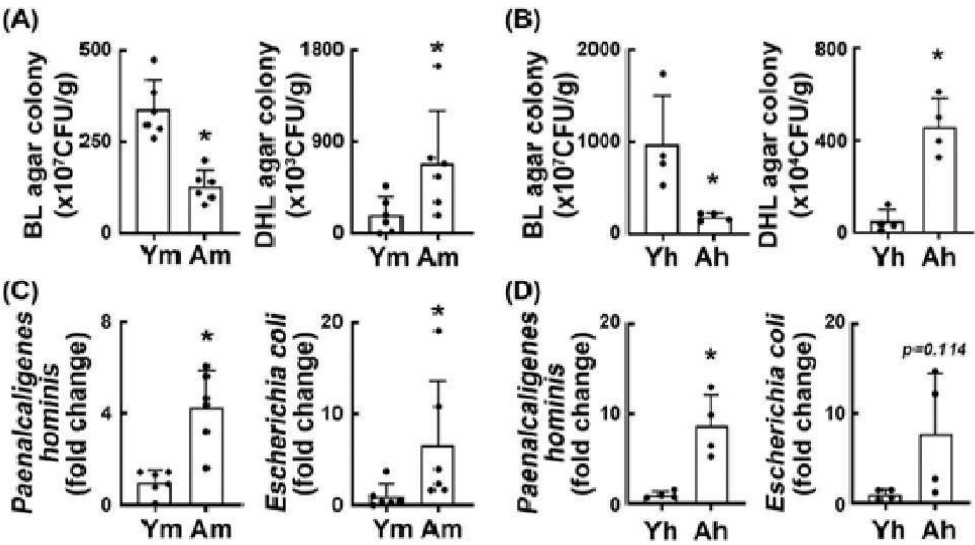
도면2



도면3



도면4



서열목록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> {METHOD FOR DIAGNOSING COGNITIVE DISORDER USING INTESTINAL
MICROBIOME

<130> 20PP30486

<160> 6

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> qPCR forward primer for Escherichia coli

<400> 1

cagccacact ggaactgaga 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> qPCR reverse primer for Escherichia coli

<400> 2

gttagccggt gcttcttctg 20

<210> 3
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> qPCR forward primer for *Paenaltcaligenes hominis*
 <400> 3
 aaaaccttac ctacgcttga c 21
 <210> 4
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> qPCR reverse primer for *Paenaltcaligenes hominis*
 <400> 4
 acccaacatc tcacgacac 19
 <210> 5
 <211> 52
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> qPCR forward primer for 16S rDNA
 <400> 5
 tcgtcggcag cgtcagatgt gtataagaga caggtgccag cmgccgcggt aa 52
 <210> 6
 <211> 54
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> qPCR reverse primer for 16S rDNA
 <400> 6
 gtctcgtggg ctcgagatg tgtataagag acagggacta chvgggtwtc taat 54