(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0036816
(43) 공개일자 2021년04월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/027 (2013.01)
C12Y 301/01007 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0119157
(22) 출원일자 2020년09월16일
심사청구일자 2020년09월16일
(30) 우선권주장
1020190118578 2019년09월26일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
설근희
서울특별시 동대문구 고산자로 534, 108동 1003호 (제기동, 한신아파트)
신유경
서울특별시 성북구 개운사2길 17, 208호 (안암동5가)
(74) 대리인
이처영, 장제환

전체 청구항 수 : 총 10 항

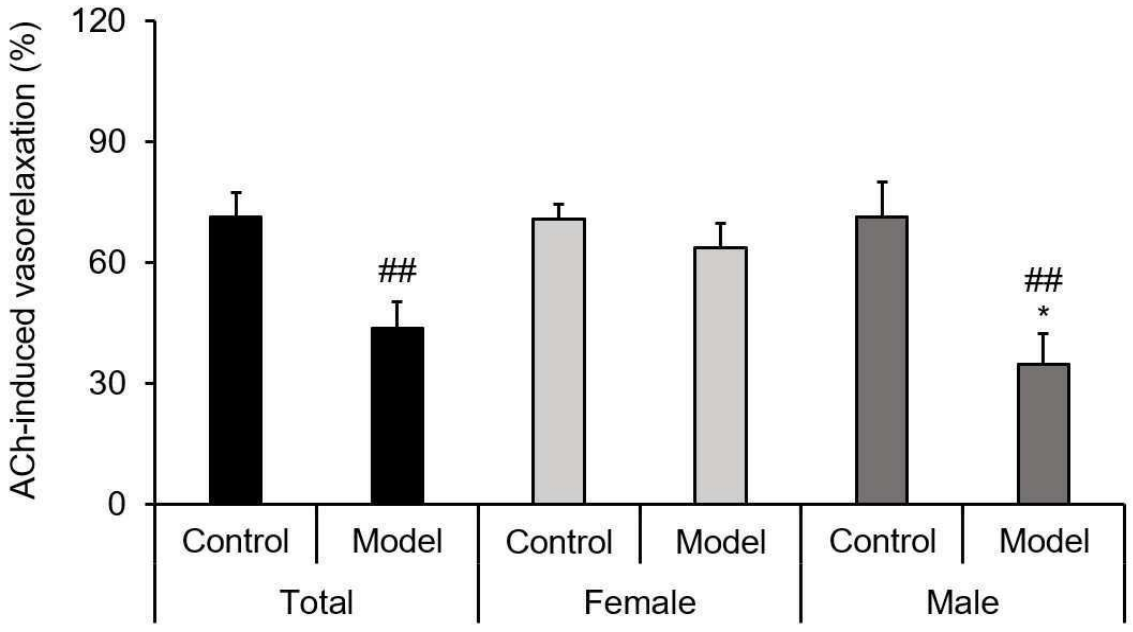
(54) 발명의 명칭 **수컷 특이적 치매 예측 지표를 특징으로 하는 치매 위험인자를 복합적으로 포함하는 치매 동물모델 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 수컷 특이적 치매 예측 지표를 특징으로 하는 치매 위험인자를 복합적으로 포함하는 치매 동물모델 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 형질전환과 같은 고난도의 기술 없이 간단하게 생리학적으로 치매 유도할 수 있으며, 그 표현형이 수컷 특이적 해마 조직의 아세틸콜린에스터레이즈 활성 증가, 수축기 혈압

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도5



증가, 혈당 증가, 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완률 감소, 혈중 고밀도 지단백질 감소로 나타나는 치매 위험인자를 복합적으로 포함하는 치매 동물모델에 관한 것이다. 본 발명에 따른 치매 동물모델은 치매의 주요 위험요인인 고혈당, 고혈압을 반영하고, 기존의 치매 동물모델에 비교하여 제조방법이 단순하여 비용 효율적이라는 장점을 가지고 있음과 동시에 그 표현형이 수컷 특이적 해마 조직의 Acetylcholinesterase 활성 증가, 수축기 혈압 증가, 혈당 증가, 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완률 감소, 혈중 고밀도 지단백질 감소로써 성별 특이적 치매 기전 연구 또는 성별 특이적 치매 예방 및 치료용 의약품을 개발하는 데 유용하다.

(52) CPC특허분류
A01K 2207/20 (2013.01)
A01K 2207/25 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/0306 (2013.01)
A01K 2267/0312 (2013.01)
A01K 2267/0318 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345293511
과제번호	2018R1D1A1B07050048
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학개인기초연구지원-기본연구
연구과제명	장운동과다증을 동반한 만성스트레스로 유발된 고혈압 동물모델에서 방향성 천연물 추출물의 제어기전 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

실험동물에 고지방 식이를 섭취시키고 L-NAME과 스코폴라민(scopolamine)을 처치하는 단계를 포함하는 수컷 특이적 해마 조직의 아세틸콜린에스터레이즈 활성 증가, 수축기 혈압 증가, 혈당 증가, 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완률 감소, 혈중 고밀도 지단백질 감소를 특징으로 하는 치매 위험인자를 복합적으로 포함하는 치매 동물 모델의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 실험동물은 인간을 제외한 포유동물인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 고지방 식이는 전체 열량 중 40 % 내지 60 %의 지방을 포함하는 것으로, 실험 전 기간 실험동물이 자유롭게 섭취할 수 있도록 하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 L-NAME은 25 mg/kg 내지 100 mg/kg의 용량으로 투여하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 L-NAME은 실험 시작 후, 1일 내지 15일 사이에 매일 1회 투여하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 스코폴라민(scopolamine)은 0.7 mg/kg 내지 2 mg/kg의 용량으로 투여하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 스코폴라민(scopolamine)은 실험 시작 후, 8일 내지 15일 사이에 매일 1회 투여하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 치매 질환은 알츠하이머병, 혈관성 치매, 노인성 치매, Lewy체 치매, 파킨슨병 치매, 헌팅턴병 치매, 전측두엽 치매로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법으로 제조되고, 다음 특성 중 하나 이상의 특징을 나타내는 치매 동물모델:

(i) 정상동물과 비교하여 해마 조직의 아세틸콜린에스터레이즈 활성 증가;

(ii) 정상동물과 비교하여 수축기 혈압 증가;

(iii) 정상동물과 비교하여 혈당 증가;

(iv) 정상동물과 비교하여 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완률 감소; 및

(v) 정상동물과 비교하여 혈중 고밀도 지단백질 감소.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법으로 제조되고, 수컷 특이적으로 다음 특성 중 하나 이상의 특징을 나타내는 치매 동물모델:

(i) 정상동물과 비교하여 해마 조직의 아세틸콜린에스터레이즈 활성 증가;

(ii) 정상동물과 비교하여 수축기 혈압 증가;

(iii) 정상동물과 비교하여 혈당 증가;

(iv) 정상동물과 비교하여 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완률 감소; 및

(v) 정상동물과 비교하여 혈중 고밀도 지단백질 감소.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 수컷 특이적 치매 예측 지표를 특징으로 하는 치매 위험인자를 복합적으로 포함하는 치매 동물모델 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 형질전환과 같은 고난도의 기술 없이 간단하게 생리학적으로 치매를 유도할 수 있으며, 그 표현형이 수컷 특이적 해마 조직의 Acetylcholinesterase 활성 증가, 수축기 혈압 증가, 혈당 증가, 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완률 감소 및 혈중 고밀도 지단백 감소로 나타나는 치매 위험인자를 복합적으로 포함하는 치매 동물모델에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 기대수명 증가 및 저출산으로 인한 인구 고령화가 전 세계적인 사회적 문제로 대두되고 있으며, 우리나라의 경우 65세 이상의 고령자 비율은 2060년 40.1%로서 OECD 국가 중 그 비율이 가장 높은 국가가 될 것으로 전망된다(보건복지부, 2017). 치매(Dementia)는 기억력 장애, 판단력 장애, 지남력 상실 등으로 인해 일상생활을 수행하는데 지장을 초래하는 상태를 의미하는데, 주로 65세 이상의 노인에게서 발생하기 때문에 인구 고령화와 더불어 치매 환자도 증가할 것으로 예상된다. 전 세계적으로 치매 환자는 2015년 4천 680만 명에서, 2030년 7천 470만 명, 2050년 1억 3150만 명으로 그 수가 35년간 약 3배가량 급속히 증가할 것으로 보고된 바 있으며(Alzheimer's disease international, 2015), 우리나라도 2015년 64만 8천 명이었던 65세 이상 치매 환자 수가 2050년에는 4.2배가 넘는 271만 명으로 증가할 것으로 추정된다(보건복지부, 2012). 치매로 인한 경제적 부담도 증가하여 2016년 총 치매 진료비는 약 2조 7061억으로 2012년 대비 1.68배 높아졌다(중앙치매센터, 2017). 이처럼 치매는 전 세계 인류가 해결해야 할 당면과제로 대두되고 있다.

[0004] 치매의 유형 중 알츠하이머병은 가장 중요하고 흔한 유형으로 치매의 60% 이상을 차지하며, 그 외에도 혈관성 치매, Lewy체 치매, 파킨슨병 치매 등으로 구분된다(융합연구정책센터, 2017). 알츠하이머병의 발병원인은 아직 정확하게 규명되진 않았으나, 가장 유력한 가설로 베타-아밀로이드 가설이 주목을 받았다(Henry & Frank, *New England Journal of Medicine.*, 362: 329-344, 2010). 그러나, 알츠하이머병 환자 뇌조직의 아밀로이드반 감소를 보였던 치료제들이 인지기능 감소를 회복시키는 데에는 실패함으로써 아밀로이드 가설에 의문이 제기되었다(Mullane & Williams, *Biochemical Pharmacology.*, 158: 369-375, 2018). 그 외에도 다양한 가설이 있지만, 그

중 아세틸콜린 가설은 신경전달물질의 결핍에 해당하는 것으로 알츠하이머병에서 아세틸콜린의 결핍이 베타-아밀로이드 및 타우의 축적과 관련 있다는 가설이다(Henry & Frank, *New England Journal of Medicine.*, 362: 329-344, 2010). 아세틸콜린에스터레이즈(Acetylcholinesterase)는 아테틸콜린을 콜린과 초산으로 분해하는 효소인데, 알츠하이머병 환자에서 콜린성 결핍이 관찰되며 아세틸콜린에스터레이즈 억제제는 현재 경증 및 중증 알츠하이머병 환자에서 가장 흔하게 처방되는 약물이기도 하다(Birks, *Cochrane Database of Systematic Reviews.*, 1: CD005593, 2006). 또한, 아세틸콜린에스터레이즈 억제제는 혈관성 치매 환자의 학습 및 기억 장애를 완화시키는 데에도 긍정적인 효과를 나타냈다(Black *et al., Stroke.*, 34: 2323-2330, 2003).

[0005] 이러한 치매의 원인을 밝히고, 예방 및 치료 물질을 개발하는 데 있어서 치매 동물모델의 개발은 필수적이라고 할 수 있다. 알츠하이머병은 크게 유전적 알츠하이머병과 특발성 알츠하이머병으로 구분되는데, 알츠하이머병 대부분이 특발성 알츠하이머병이라는 점을 고려할 때 형질전환 동물모델로는 실제 임상 환자의 위험요인을 충분히 반영하기 어려우므로 비유전적 동물모델에서 알츠하이머병의 위험요인에 관한 연구에 초점이 맞춰져야 한다(Newman *et al., Animal Models for the Study of Human Disease.*, 1031-1085, 2017). 알츠하이머병의 위험요인에는 당뇨, 중년기 고혈압, 중년기 비만, 우울, 신체활동 부족, 흡연, 낮은 교육수준 등이 있으며, 전 세계적으로 알츠하이머병 환자의 절반 정도가 이러한 변화 가능한 위험요인들에 기인하는 것으로 보고되었다(Barnes & Yeffe, *Lancet Neurology.*, 10: 819-828, 2011). 그러나, 실제 연구에 사용되고 있는 치매 동물모델의 대다수는 형질전환 동물모델로서, 이러한 유전적 소인은 전체 알츠하이머병의 1% 미만밖에 설명하지 못한다는 제한점이 있다(LaFerla & Green, *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.*, a006320, 2012).

[0006] 한편, 지난 10년간 의학 기술과 접근법의 발전은 알츠하이머병 치매의 병태생리에 대한 기초지식을 향상시켰고 중재의 발전에도 도움을 주었으나, 아직 환자의 성별은 이러한 접근법에 밀접하게 통합되어 있지 않은 실정이다(Nebel *et al., Alzheimer's & Dementia.*, 14: 1171-1183, 2018). 예를 들어, 당뇨를 포함하는 혈관합병증을 동반하는 알츠하이머병 환자는 정상 대상자보다 고밀도 지단백질 수준이 낮은 것으로 보고되었으나, 해당 연구에서 성별에 따른 차이를 확인하지 않고 있다(Irundika *et al., Jornal of Alzheimer's Disease.*, 40: 399-408, 2014).

[0007] 알츠하이머병의 진행과정과 위험요인은 성별에 따라 차이를 보인다. 예를 들어, 대규모 코호트 연구에서 정상 인지기능과 알츠하이머병의 중간 단계에 해당하는 경도인지장애를 가지는 남성에서 여성과는 달리 경도인지장애의 위험을 증가시키는 위험요인으로 뇌졸중과 당뇨가 포함된 것으로 보고된 바 있으며(Artero et al., Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, 79:979-984, 2008), 뇌졸중의 발생 위험은 수축기 혈압 상승(Chuang *et al., Stroke.*, 47:2262-2268, 2016) 및 경동맥 기능 부전(Chuang *et al., Stroke.*, 42:1338-1344, 2011)과 관련이 있다. 60세까지 고혈압 유병률은 여성보다 남성에서 더 높은데, 특히 수축기 혈압이 그러하며(Azad *et al., Gender medicine.*, 2:120-129, 2007), 공복 시 혈당 장애는 남성에서 일반적인 것으로 보고되었다(Mauvais-Jarvis, *Physiology & Behavior.*, 187:20-23, 2018). 반면, 폐경전 여성은 여성호르몬의 보호효과로 인하여 남성보다 혈압이 낮다(Colafella & Denton, *Nature Reviews Nephrology.*, 14: 185, 2018). 따라서, 위험요인을 복합적으로 가지고 있는 대상에서 성별 특이적으로 나타나는 핵심원인을 규명하고, 그에 따른 개별화된 예방 및 중재 전략을 세우는 것이 중요하다.

[0008] 치매 동물모델과 관련하여 APP/C-105 돌연변이 유전자를 발현하는 형질전환 치매마우스(대한민국 공개특허 제2006-0032012호), hNCTm 유전자를 발현하는 형질전환 치매 마우스(대한민국 공개특허 제2006-0032013호), Htau24 유전자를 발현하는 형질전환 치매 마우스 및 그 제조방법(대한민국 등록특허 제0734815호), PS2 돌연변이 유전자 및 APPsw 유전자를 발현하는 이중 형질전환 치매 마우스(대한민국 공개특허 제2005-0014993호), PS2 돌연변이 유전자 및 TAK 유전자를 발현하는 이중형질전환 치매 마우스(대한민국 공개특허 제2006-0032014호), TALEN을 이용하여 GRK5 넉아웃 마우스를 제조하는 방법(대한민국 공개특허 제2015-0145865호), Vps26b 유전자 결손에 의한 퇴행성 신경계 뇌질환 모델 마우스 및 이의 제조 방법(대한민국 공개특허 제2012-0043882호), 델타-tau 유전자를 발현하는 형질전환 알츠하이머형 치매 동물 및 이의 제조방법(대한민국 공개특허 제2011-0095067호), 치매 모델 형질전환 마우스 및 이를 이용한 스크리닝 방법(대한민국 공개특허 제 2018-0039471호)이 특허로 개시된 바 있다.

[0009] 상기 내용을 요약하자면, 기존의 형질전환 치매 동물모델은 연구 경비가 많이 들 뿐만 아니라, 성별 특이적인 치매 예방과 중재를 위한 기초자료를 제공하기에는 제한점이 따른다. 또한, 현대인들은 과도한 패스트푸드 섭취, 운동 부족, 만성적 스트레스 등의 사회환경적 유해인자에 과도하게 노출되어 있으며, 이로 인한 비만, 고혈당, 고혈압은 치매의 위험인자로써 치매 발생과 밀접한 연관성이 있으므로 치매 연구를 위해서는 이러한 위험인자를 반영한 치매 동물모델이 절실한 실정이다. 그러나 이러한 위험요인의 영향을 고려한 치매 질환 동물모델

은 아직 알려진 바 없다.

[0010] 이에, 본 발명자들은 기존 치매 질환 동물모델의 한계를 극복하고, 성별 특이적 치매 예측 지표를 특징으로 하는 새로운 동물모델을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 실험동물에 고지방 식이를 섭취시키고 L-NAME과 Scopolamine을 처치한 치매 동물모델의 경우, 수컷 특이적으로 해마 조직의 아세틸콜린에스터레이즈(acetylcholinesterase) 활성, 수축기 혈압 및 혈당이 증가할 뿐만 아니라, 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완률이 감소하고, 혈중 고밀도 지단백 또한 감소한 치매 동물모델을 제조할 수 있다는 것을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0012] 본 배경기술 부분에 기재된 상기 정보는 오직 본 발명의 배경에 대한 이해를 향상하기 위한 것이며, 이에 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가지는 자에게 있어 이미 알려진 선행기술을 형성하는 정보를 포함하지 않을 수 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 수컷 특이적 해마 조직의 아세틸콜린에스터레이즈(acetylcholinesterase) 활성 증가, 수축기 혈압 증가, 혈당 증가, 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완률 감소 및 혈중 고밀도 지단백 감소로 나타나는 치매 위험인자를 복합적으로 포함하는 치매 동물모델을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 다른 목적은 수컷 특이적 해마 조직의 아세틸콜린에스터레이즈 활성 증가, 수축기 혈압 증가, 혈당 증가, 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완률 감소 및 혈중 고밀도 지단백 감소로 나타나는 치매 위험인자를 복합적으로 포함하는 치매 동물모델의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 실험동물에 고지방 식이를 섭취시키고 L-NAME과 Scopolamine을 처치하는 단계를 포함하는 수컷 특이적 해마 조직의 Acetylcholinesterase 활성 증가, 수축기 혈압 증가, 혈당 증가, 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완률 감소 및 혈중 고밀도 지단백 감소를 특징으로 하는 치매 위험인자를 복합적으로 포함하는 치매 동물모델의 제조방법을 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 제조된 수컷 특이적 해마 조직의 Acetylcholinesterase 활성 증가, 수축기 혈압 증가, 혈당 증가, 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완률 감소 및 혈중 고밀도 지단백 감소로 나타나는 치매 위험인자를 복합적으로 포함하는 치매 동물모델을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명에 따른 동물모델은 치매의 주요 위험요인인 고혈당, 고혈압을 반영하고, 기존의 치매 동물모델에 비교하여 제조방법이 단순하여 비용 효율적이라는 장점이 있다.

[0021] 또한, 본 발명에 의한 치매 동물모델은 그 표현형이 수컷 특이적 해마 조직의 아세틸콜린에스터레이즈 활성 증가, 수축기 혈압 증가, 혈당 증가, 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완률 감소 및 혈중 고밀도 지단백 감소로써 성별 특이적 치매 기전 연구 또는 성별 특이적 치매 예방 및 치료용 의약품을 개발하는 데 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명의 치매 동물모델의 제조방법에 관한 모식도를 나타낸 것이다.

도 2는 정상군(Control)과 모델군(Model) 사이의 성별에 따른 해마 조직의 Acetylcholinesterase 활성 차이를

나타낸 것이다. ##P < 0.01 vs. respective control.

도 3은 정상군(Control)과 모델군(Model) 사이의 성별에 따른 수축기 혈압 차이를 나타낸 것이다. **P < 0.01 vs. respective female, ###P < 0.001 vs. respective control.

도 4는 정상군(Control)과 모델군(Model) 사이의 성별에 따른 혈당 차이를 나타낸 것이다. *P < 0.05 vs. respective female, #P < 0.05 vs. respective control.

도 5는 정상군(Control)과 모델군(Model) 사이의 성별에 따른 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완률 차이를 나타낸 것이다. *P < 0.05 vs. respective female, ##P < 0.01 vs. respective control.

도 6은 정상군(Control)과 모델군(Model) 사이의 성별에 따른 혈중 고밀도 지단백 차이를 나타낸 것이다. *P < 0.05 vs. respective female, ##P < 0.01 vs. respective control.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 다른 식으로 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어들은 본 발명이 속하는 기술분야에서 숙련된 전문가에 의해서 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 일반적으로 본 명세서에서 사용된 명명법은 본 기술분야에서 잘 알려져 있고 통상적으로 사용되는 것이다.

[0026] 본 발명에서 용어 "치매"는 기억력 장애, 판단력 장애, 지남력 상실 등으로 인해 일상생활을 수행하는데 지장을 초래하는 상태를 의미한다. 치매에는 매우 다양한 유형이 있는데 알츠하이머병이 가장 흔한 유형이며, 뇌졸중으로 인한 혈관성 치매는 두 번째로 흔한 유형이다. 알츠하이머병의 병태생리로 유력한 가설로는 아세틸콜린 가설, 타우 가설, 베타-아밀로이드 가설 등이 있다. 혈관성 치매의 원인인 뇌졸중은 식생활의 서구화에 따른 고열량, 고지방의 식단, 운동 부족, 당뇨, 스트레스, 과도한 음주 등으로부터 비롯되는 것으로 알려져 있다. 그 외에도 치매는 알코올 중독, 약물 중독, 우울증, 갑상선 기능 저하증, 매독 등에 의해서도 생길 수 있다. 본 발명에 있어서 상기 치매 질환은 알츠하이머병, 혈관성 치매, 노인성 치매인 것이 바람직하나, 이에 본 발명이 제한되는 것은 아니다.

[0028] 본 발명에서 용어 "수축기 혈압"이란 심장이 수축하여 혈관의 긴장도가 최고조에 이르렀을 때 혈관에 가해지는 압력을 의미한다.

[0029] 본 발명에서 용어 "혈당"이란 혈액 속에 포함된 포도당의 농도를 의미한다.

[0030] 본 발명에서 용어 "동물모델"이란 사람의 질병과 아주 유사한 형태의 질병을 가진 동물을 말한다. 사람의 질병 연구에 있어 질환모델 동물이 의미를 갖는 것은 사람과 동물들 간의 생리적 또는 유전적인 유사성에 의한다. 질병 연구에 있어 생체의학 질환모델 동물은 질병의 다양한 원인과 발병과정 및 진단에 대한 연구용 재료를 제공해주고, 질환모델 동물의 연구를 통해 질병에 관련된 유전자들을 알아내고, 유전자들 간의 상호작용을 이해할수 있게 하고, 개발된 신약후보물질의 실제 효능 및 독성 검사를 통해 실용화 가능성의 여부를 판단하는 기초자료를 얻을 수 있다.

[0031] 본 발명에서 용어 "동물" 또는 "실험동물"은 인간 이외의 임의의 포유류 동물을 의미한다. 상기 동물은 배아, 태아, 신생아 및 성인을 포함하는 모든 연령의 동물을 포함한다. 본 발명에서 사용하기 위한 동물들은, 예를 들어, 상업용 소스로부터 이용할 수 있다. 이런 동물들은 실험용 동물 또는 다른 동물, 토끼, 설치류(예를 들어, 생쥐, 쥐, 햄스터, 게르빌루스 및 기니피그), 소,양, 돼지, 염소, 말, 개, 고양이, 새(예를 들어, 닭, 칠면조, 오리, 거위), 영장류(예를 들어, 침팬지, 원숭이, 붉은털원숭이)를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0033] 본 발명에서는 고지방 식이를 섭취시키고 L-NAME과 Scopolamine을 처치하는 단계를 포함하는 치매 동물에서 실험 동물의 성별에 따라 표현형의 차이가 발생하는지 확인하고자 하였다.

[0034] 즉, 본 발명의 일 실시예에서는 4주령의 수컷과 암컷 흰 쥐를 정상군(Control)과 모델군(Model), 수컷과 암컷으로 분리하여 사육한 다음, Control 군은 정상식이(전체 열량 중 13%의 지방 포함)를, Model 군은 고지방 식이(전체 열량 중 60%의 지방 포함)를 2주간의 실험 전 기간 자유롭게 섭취하도록 하였다. 또한, Model 군에 해당하는 흰쥐에는 2주간의 실험 전 기간 L-NAME을 25mg/kg 용량으로 매일 1회 복강 내 투여하였으며, 실험 2주 차

1주일의 기간 동안 Scopolamine을 1mg/kg 용량으로 매일 1회 복강 내 투여하였다. 실험 마지막 날 혈압 및 혈당을 측정한 다음 안락사하였고, 분자 실험을 위하여 뇌에서 해마 조직을 분리하였으며, 혈관내피 의존성 이완률을 평가하기 위하여 경동맥을 적출하였다. 또한, 혈중 고밀도 지단백을 측정하기 위해 복부 대정맥에서 혈액을 채취하였다(도 1).

[0036] 먼저, 해마 조직의 Acetylcholinesterase 활성을 측정한 결과, Model 군에서 Control 군보다 유의하게 증가하고, 이러한 결과는 수컷에서 특이적으로 나타나는 것을 확인하였다(도 2). 수축기 혈압의 경우, 수컷과 암컷 모두 Control 군보다 Model 군에서 유의미하게 증가하였으나, 암컷보다 수컷에서 훨씬 더 많이 증가하는 것을 확인하였다(도 3). 혈당의 경우에도 암컷은 Control 군과 Model 군 간에 혈당 수준에 차이가 없는 반면, 수컷은 Control 군보다 Model 군에서 혈당 수준이 증가하는 경향을 보였으며, 암컷 Model 군보다 수컷 Model 군에서 혈당 수준이 유의미하게 높은 것을 확인하였다(도 4). 경동맥의 혈관내피 의존성 이완률을 평가한 결과, 수컷은 Control 군보다 Model 군에서 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완률이 유의미하게 감소하는 것을 확인하였고, 암컷 Model 군보다도 유의미하게 낮은 것을 확인하였다(도 5). 또한, 혈중 고밀도 지단백도 암컷은 Control 군과 Model 군 간에 차이가 없는 반면, 수컷은 Control 군보다 Model 군에서 혈중 고밀도 지단백이 유의미하게 감소하였다(도 6).

[0038] 따라서, 본 발명은 일 관점에서 실험동물에 고지방 식이를 섭취시키고 L-NAME과 Scopolamine을 처치하는 단계를 포함하는 수컷 특이적 해마 조직의 Acetylcholinesterase 활성 증가, 수축기 혈압 증가, 혈당 증가, 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완률 감소 및 혈중 고밀도 지단백질 감소를 특징으로 하는 치매 위험인자를 복합적으로 포함하는 치매 동물모델의 제조방법에 관한 것이다.

[0039] 본 발명에 있어서, 상기 실험동물은 인간을 제외한 포유동물일 수 있고, 바람직하게는 쥐, 생쥐 등 설치류, 개, 고양이, 토끼, 돼지, 소, 양, 염소로 구성된 군에서 선택될 수 있으며, 가장 바람직하게는 쥐(rat)일 수 있다.

[0040] 본 발명에 있어서, 상기 고지방 식이의 지방 함량은 당업계에서 당업자에 의해 통상적으로 사용될 수 있는 모든 함량을 선택할 수 있으나, 바람직하게는 전체 열량 중 40 % 내지 60 %의 지방을 포함하는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0041] 본 발명에 있어서, 상기 L-NAME의 투여는 투여시 25 mg/kg 내지 100 mg/kg 를 실험 1일 내지 15일 사이에 매일 1회 투여할 수 있다. 또한, 당업계에서 당업자가 통상적으로 사용 가능한 모든 주입경로를 포함할 수 있으나, 정맥내 또는 복강내 투여하는 것이 바람직하다.

[0042] 본 발명에 있어서, 상기 Scopolamine의 투여는 투여시 0.7 mg/kg 내지 2 mg/kg 를 실험 8일 내지 15일 사이에 매일 1회 투여할 수 있다. 또한, 당업계에서 당업자가 통상적으로 사용 가능한 모든 주입경로를 포함할 수 있으나, 정맥내 또는 복강내 투여하는 것이 바람직하다.

[0043] 본 발명에 있어서, 상기 치매 질환은 당업계에 알려진 모든 치매 질환을 의미하며, 바람직하게는 알츠하이머병, 혈관성 치매, 노인성 치매, Lewy체 치매, 파킨슨병 치매, 헌팅턴병 치매, 전측두엽 치매로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[0045] 본 발명은 다른 관점에서, 상기 방법으로 제조된 수컷 특이적 해마 조직의 Acetylcholinesterase 활성 증가, 수축기 혈압 증가, 혈당 증가, 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완률 감소 및 혈중 고밀도 지단백질 감소로 나타나는 치매 위험인자를 복합적으로 포함하는 치매 동물모델에 관한 것이다.

[0046] 즉, 본 발명은 상기 방법으로 제조되고, 다음 특성 중 하나 이상의 특징을 나타내는 치매 동물모델에 관한 것이다:

[0047] (i) 정상동물과 비교하여 해마 조직의 Acetylcholinesterase 활성 증가;

[0048] (ii) 정상동물과 비교하여 수축기 혈압 증가;

[0049] (iii) 정상동물과 비교하여 혈당 증가;

[0050] (iv) 정상동물과 비교하여 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완률 감소; 및

[0051] (v) 정상동물과 비교하여 혈중 고밀도 지단백질 감소.

[0053] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조되고, 수컷 특이적으로 다음 특성 중 하나 이상의 특징을 나타내는 치매 동물모델에 관한 것이다:

[0054] (i) 정상동물과 비교하여 해마 조직의 Acetylcholinesterase 활성 증가;

[0055] (ii) 정상동물과 비교하여 수축기 혈압 증가;

[0056] (iii) 정상동물과 비교하여 혈당 증가;

[0057] (iv) 정상동물과 비교하여 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완률 감소; 및

[0058] (v) 정상동물과 비교하여 혈중 고밀도 지단백질 감소.

[0060] 본 발명에 있어서 치매 동물모델은 치매에 대한 질병 모델로서, 치매 환자에 대한 치료물질의 탐색, 부작용 확인, 진단법의 개발 등에 다양하게 활용하여 치매 예방, 개선 또는 치료제를 개발하는데 기초자료를 제공함으로써 도움을 줄 수 있다.

[0061] 또한, 본 발명에 의한 치매 동물모델은 그 표현형이 수컷 특이적 해마 조직의 Acetylcholinesterase 활성 증가, 수축기 혈압 증가, 혈당 증가, 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완률 감소 및 혈중 고밀도 지단백질 감소로써 성별 특이적 치매 기전 연구 또는 성별 특이적 치매 예방 및 치료용 의약품을 개발하는 데 유용하다.

[0063] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0065] **<참조예> 통계 분석**

[0066] 실험 결과는 SPSS version 24.0 (SPSS, Chicago, IL)로 분석하였으며, 자료는 평균과 표준오차로 나타내었다. 실험 그룹간의 일원분산분석(사후분석, LSD test)을 수행하여 $P < 0.05$를 통계적으로 유의미한 값으로 보았다.

[0068] **실시예 1. 고지방식이 섭취, L-NAME 처치, Scopolamine 처치에 의한 치매 동물 모델의 확립**

[0069] **1-1. 실험 동물의 준비**

[0070] 4주령의 건강한 수컷과 암컷 흰쥐(Sprague-Dawley rat)를 샘타코(Osan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 모든 동물은 케이지에서 케이지당 4마리씩 사육되었고, 12시간 낮/밤 주기 및 온도 22-24℃를 유지하였다. 정상군(Control)과 모델군(Model)을 분리 사육하였으며, 수컷과 암컷도 각각 분리 사육하였다. 2주간의 실험 전 기간 Control 군은 정상식이(전체 열량 중 13%의 지방 포함)를 섭취하도록 하였고, Model 군은 고지방 식이(전체 열량 중 60%의 지방 포함)를 섭취하도록 하였다. 먹이와 물은 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였다.

[0072] **1-2. L-NAME 및 Scopolamine 처치**

[0073] 2주간의 실험 전 기간 Model 군에 해당하는 흰쥐에게 L-NAME을 25mg/kg 용량으로 매일 1회 복강 내 투여하였다. Control 군에는 동일한 부피의 증류수를 복강 내 투여하였다. 또한, 실험 2주 차 1주일의 기간 동안 Model 군에 해당하는 흰쥐에게 Scopolamine을 1mg/kg 용량으로 매일 1회 복강 내 투여하였으며, Control 군에는 동일한 부피의 생리식염수를 복강 내 투여하였다.

[0074] 실험 마지막 날 혈압 및 혈당을 측정한 다음 안락사하였다. Acetylcholinesterase의 활성을 확인하기 위해 뇌에서 해마 조직을 분리하였으며, 혈관내피 의존성 이완률을 평가하기 위하여 경동맥을 적출하였다.

[0076] **실시예 2. 해마 조직의 아세틸콜린에스터레이즈 (AChE) 활성 측정**

[0077] 해마 조직의 아세틸콜린에스터레이즈 활성은 Acetylcholinesterase assay kit (Abcam, Cambridge, UK)를 사용하여 측정하였으며, 제조사의 지침에 따라 시행하였다.

[0078] 그 결과, 도 2에 개시된 바와 같이, 해마 조직의 아세틸콜린에스터레이즈 활성은 Total control 군보다 Total model 군에서 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다(P = 0.008 vs. Control). 암컷과 수컷으로 구분하여 비교했을 때, 암컷은 Control 군과 Model 군 간에 해마 조직의 아세틸콜린에스터레이즈 활성에 차이가 없었다. 반면에 수컷은 Control 군보다 Model 군에서 해마 조직의 아세틸콜린에스터레이즈 활성이 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다(P = 0.008 vs. Control).

[0080] **실시예 3. 수축기 혈압 측정**

[0081] 심박동수는 쥐꼬리에서 비침습적인 방법으로 측정하였다(CODA HT-4, Kent Scientific Corporation, USA).

[0082] 그 결과, 도 3에 개시된 바와 같이, 수축기 혈압은 Total control 군보다 Total model 군에서 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다(P < 0.001 vs. Control). 암컷과 수컷으로 구분하여 비교했을 때, 암컷과 수컷 모두 수축기 혈압이 Control 군보다 Model 군에서 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다(P < 0.001 vs. Control). 수컷 Model 군의 수축기 혈압은 암컷 Model 군보다도 유의미하게 높은 것을 확인하였다(P = 0.011 vs. Female).

[0084] **실시예 4. 혈당 측정**

[0085] 혈당은 쥐꼬리에서 채취한 혈액에서 휴대용 혈당 측정기를 이용하여 측정하였다(BAROZEN, HANDOK, Korea).

[0086] 그 결과, 도 4에 개시된 바와 같이, 혈당 수준은 Total control 군보다 Total model 군에서 유의미하게 증가하는 것을 확인하였다(P = 0.021 vs. Control). 암컷과 수컷으로 구분하여 비교했을 때, 암컷은 Control 군과 Model 군 간에 혈당 수준에 차이가 없었다. 반면에 수컷은 Control 군보다 Model 군에서 혈당 수준이 증가하는 경향을 보였으며, 암컷 Model 군보다 수컷 Model 군에서 혈당 수준이 유의미하게 높은 것을 확인하였다(P = 0.020 vs. Female).

[0088] **실시예 5. 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완율 측정**

[0089] 적출한 경동맥은 즉시 Krebs solution (118.3mM NaCl, 25mM $NaHCO_3$, 1.22mM KH_2PO_4, 2.5mM $CaCl_2$, 4.78mM KCl, 11.1mM glucose, and 1.2mM $MgCl_2$)에서 주변 결합조직을 제거하였다. 2 mm로 나눈 경동맥 절편을 Krebs solution (온도 37℃, O_2 95%/CO_2 5%)이 들어있는 챔버에 담근 후 근수축변환기(DMT, Aarhus, Denmark)에 연결하였다. 초기 장력을 0.8 g으로 설정 및 50분 동안 안정화한 후 실험을 진행하였다. Phenylephrine (10㎛M)으로 20분동안 혈관을 수축시켜 고원기에 도달하였을 때 Acetylcholine (10㎛M)을 이완시켜 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완 능력을 평가하였다. 혈관 내피 의존성 이완률(%)은 {(Phenylephrine 최대 수축력-Acetylcholine 최대 이완력)/(Phenylephrine 최대 수축력-초기 장력)}*100 의 공식으로 계산하였다.

[0090] 그 결과, 도 5에 개시된 바와 같이, 경동맥의 혈관내피 의존성 이완률은 Total control 군보다 Total model 군에서 유의미하게 감소하는 것을 확인하였다(P = 0.003 vs. Control). 암컷과 수컷으로 구분하여 비교했을 때, 암컷은 Control 군과 Model 군 간에 경동맥의 혈관내피 의존성 이완률에 차이가 없었다. 반면에 수컷은 Control 군보다 Model 군에서 경동맥의 혈관 내피 의존성 이완률이 유의미하게 감소하는 것을 확인하였을 뿐만 아니라(P = 0.001 vs. Control), 암컷 Model 군보다도 유의미하게 낮은 것을 확인하였다(P = 0.031 vs. Female).

[0092] **실시예 6. 혈중 고밀도 지단백질(High-density lipoprotein) 측정**

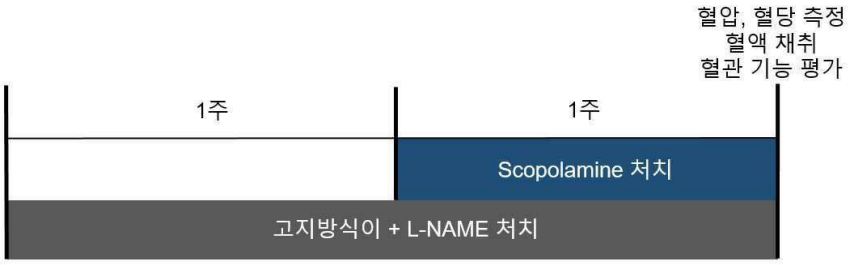
[0093] 혈중 고밀도 지단백질은 high-density lipoprotein/low-density lipoprotein cholesterol assay kit (Cell Biolabs, San Diego, California, USA)를 사용하여 측정하였으며, 제조사의 지침에 따라 시행하였다.

[0094] 그 결과, 도 6에 개시된 바와 같이, 혈중 고밀도 지단백질은 Total control 군보다 Total model 군에서 유의미하게 감소하는 것을 확인하였다(P = 0.029 vs. Control). 암컷과 수컷으로 구분하여 비교했을 때, 암컷은 Control 군과 Model 군 간에 혈중 고밀도 지단백질에 차이가 없었다. 반면에 수컷은 Control 군보다 Model 군에서 혈중 고밀도 지단백질이 유의미하게 감소하는 것을 확인하였다(P = 0.035 vs. Control).

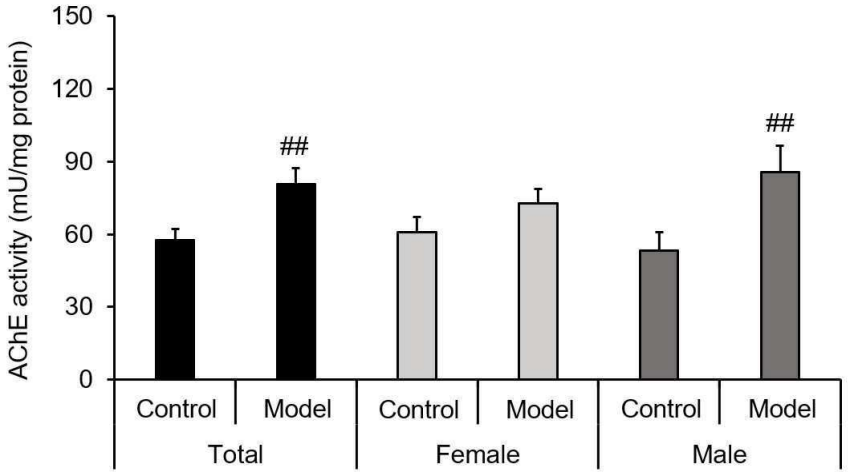
[0096] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

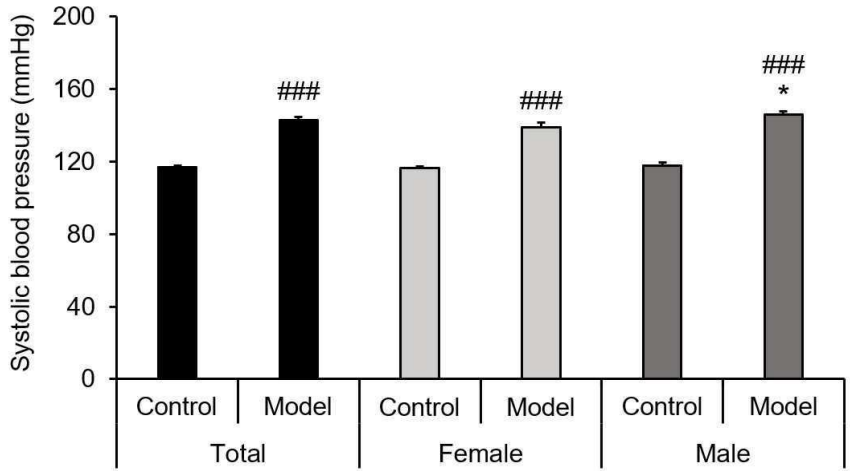
도면1



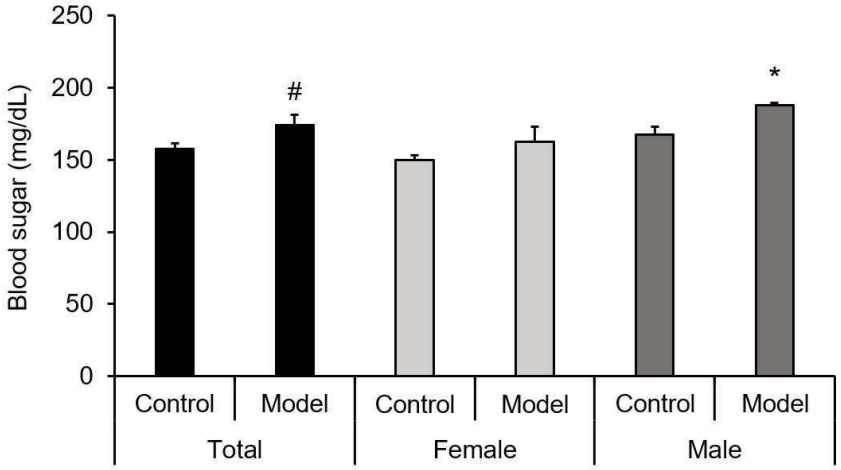
도면2



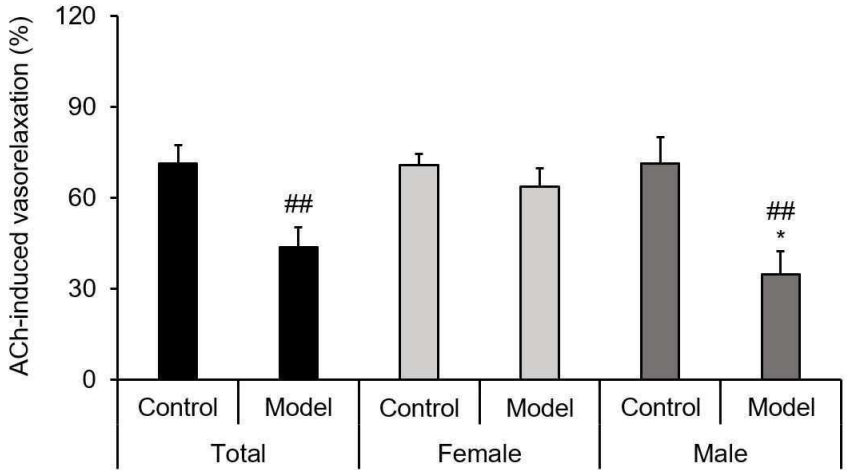
도면3


Systolic blood pressure (mmHg)
200
160
120
80
40
0
###
###
###
*
Control
Model
Control
Model
Control
Model
Total
Female
Male

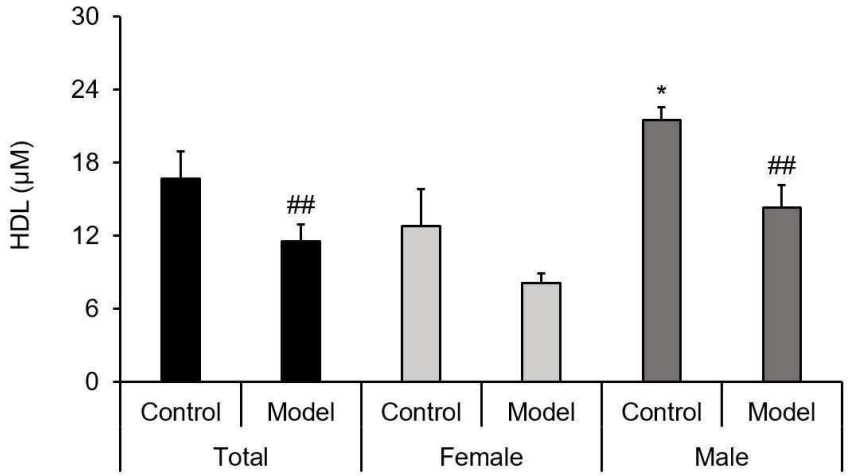
도면4


Blood sugar (mg/dL)
250
200
150
100
50
0
#
*
Control
Model
Control
Model
Control
Model
Total
Female
Male

도면5


ACh-induced vasorelaxation (%)
120
90
60
30
0
##
##
*
Control
Model
Control
Model
Control
Model
Total
Female
Male

도면6


30
24
18
12
6
0
HDL (μM)
##
*
##
Control
Model
Control
Model
Control
Model
Total
Female
Male