



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0083145
(43) 공개일자 2021년07월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61N 5/06 (2006.01) A61M 21/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61N 5/0622 (2013.01)
A61M 21/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0036211
(22) 출원일자 2020년03월25일
심사청구일자 2020년03월25일
(30) 우선권주장
1020190175301 2019년12월26일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
박지현
서울특별시 강남구 영동대로114길 56, 301동 106호(삼성동, 래미안 삼성1차)
박결
서울특별시 성북구 보문로22길 36, 예영텔 404호(안암동3가)
정효원
부산광역시 해운대구 재송1로46번길 6, 204호(재송동)
(74) 대리인
윤귀상

전체 청구항 수 : 총 5 항

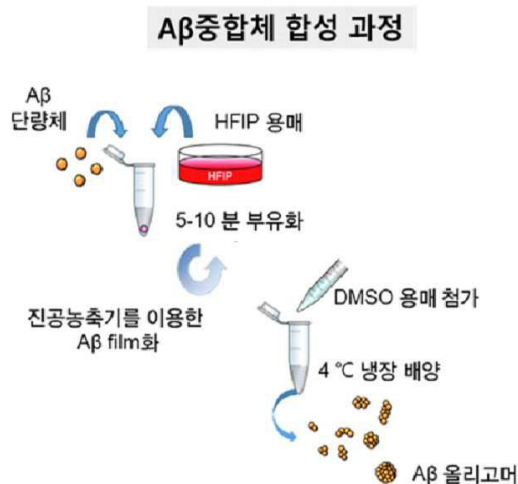
(54) 발명의 명칭 광유전학 기법을 이용한 알츠하이머 질환 뇌에서의 뇌파 손상 회복 방법

(57) 요약

본 발명은 광유전학 기법을 이용한 알츠하이머 질환 뇌에서의 뇌파 손상 회복 방법에 관한 것이다.

본 발명은 알츠하이머 질환 뇌에서 손상되었던 뇌파를 회복시키는 방법으로 전기 자극이 아닌 광자극을 통해 신경세포에 직접적으로 손상을 가하지 않으며, 광유전학(Optogenetics) 기법을 이용하여, 알츠하이머병의 뇌파 손상과 관련된 억제성 신경세포들을 특정한 후, 광유전학적 기법을 통해 손상된 신경세포들을 선택적으로 빛을 이용하여 활성을 조절함으로써 알츠하이머 질환 뇌에서 손상되었던 뇌파를 정상수준으로 회복시킬 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61N 5/0618 (2018.08)

A61M 2021/0005 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI19C0646010019
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	국가치매극복기술개발사업
연구과제명	해마-피질 신경회로 제어를 통한 초기 알츠하이머성 치매기억 치료기술개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교산학협력단
연구기간	2019.04.18 ~ 2019.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	HI17C0212010018
부처명	보건복지부
과제관리(전문)기관명	한국보건산업진흥원
연구사업명	보건의료기술연구개발사업
연구과제명	GABA성 시냅스의 광유전학적 조절을 통한 알츠하이머병 행동기억 및 뇌파 장애 치료
기 여 율	1/2
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2018.01.01 ~ 2019.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

억제성 신경세포에 CRE 유전자가 발현된 동물모델 제작단계,

상기 동물모델에, CRE 유전자가 발현된 억제성 신경세포를 표적으로 하도록 설계된 광수용체 유전자를 포함하는 바이러스 벡터를 주입하고 바이러스 벡터를 발현시키는 단계,

상기 바이러스 벡터가 주입된 동물모델에 전극 및 광섬유를 삽입하는 단계 및

상기 전극 및 광섬유를 통해 표적 신경세포에만 선택적으로 발현하도록 설계된 광수용체 유전자에 광자극을 전달하여 알츠하이머 질환 뇌에서의 손상 뇌파를 회복시키는 단계로 이루어진, 광유전학 기법을 이용한 알츠하이머 질환 뇌에서의 뇌파 손상 회복 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 알츠하이머 질환 뇌에서의 손상 뇌파를 회복시키는 단계 이후 손상 뇌파 회복효과를 정량화하는 단계를 더 수행하는 것을 특징으로 하는 광유전학 기법을 이용한 알츠하이머 질환 뇌에서의 뇌파 손상 회복 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 억제성 신경세포가 파르브알부민(parvalbumin) 또는 소마토스타틴(somatostatin)을 발현하는 신경세포인 것을 특징으로 하는 광유전학 기법을 이용한 알츠하이머 질환 뇌에서의 뇌파 손상 회복 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 광수용체가 450, 470, 565 및 590nm 파장영역의 광에 반응하는 광수용체인 것을 특징으로 하는 광유전학 기법을 이용한 알츠하이머 질환 뇌에서의 뇌파 손상 회복 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 광자극에 의해 손상 감마파 또는 손상 세타파가 선택적으로 손상 회복된 것을 특징으로 하는 광유전학 기법을 이용한 알츠하이머 질환 뇌에서의 뇌파 손상 회복 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 광유전학(Optogenetics) 기법을 이용한 알츠하이머 질환 뇌에서의 뇌파 손상 회복 방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 알츠하이머 질환 뇌에서 손상되었던 뇌파를 회복시키는 방법으로 전기 자극이 아닌 광자극을 통해 신경세포에 직접적으로 손상을 가하지 않으며 광유전학적 기법을 이용하여, 뇌파 생성에 중추적인 역할을 하는 억제성 신경세포들 중 파르브알부민(Parvalbumin, 이하 PV) 또는 소마토스타틴(Somatostatin, 이하 SST)에 선택적으로 광자극을 전달하여 해당 신경세포의 활성을 조절함으로써 알츠하이머 질환 뇌에서 손상되었던 세타파 및 감마파를 선택적으로 회복시키는, 광유전학 기법을 이용한 알츠하이머 질환 뇌에서의 뇌파 손상 회복 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 알츠하이머 질환은 대표적 퇴행성 뇌질환으로서, 독성물질인 베타-아밀로이드가 뇌에 비정상적으로 침착되어 학습 및 기억 저하를 초래하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 정상 뇌에서는 기억 형성을 위해, 다양한 억제성 신경세포의 활성으로 인해 델타파(0.1-3Hz), 세타파(3-12Hz), 알파파(8-15Hz), 베타파(16-30Hz) 및 감마파(20-120Hz) 등의 다양한 주파수 대역의 뇌파가 발생하는데, 알츠하이머 질환 뇌에서는 베타아밀로이드 침착으로 인한 억제성 신경세포의 기능 저하로 인하여 뇌파 생성이 저해되

며, 이는 알츠하이머 질환에서 나타나는 학습 및 기억 저하의 원인이 된다.

- [0004] 종래 알츠하이머 질환 뇌에서 손상된 뇌파를 회복시키고자 전극을 삽입하여 고주파수 대역의 전기 자극을 줌으로써 손상된 뇌파를 회복시키는 기술이 제안되고 있다.
- [0005] 그러나 이러한 전기적 자극은 신경세포에 직접적인 손상을 가할 수 있는 위험성을 내포하고 있을 뿐 아니라, 전기적 자극 기법은 그 자극의 대상이 비 선택적이므로, 실제 뇌의 억제성 신경세포의 다양한 기능 및 활성 패턴을 반영하여 선택적으로 활성 조절을 할 수 없다는 단점이 있다.
- [0006] 따라서 전기적 자극이 아닌, 광유전학을 통해 신경질환을 치료하는 기술이 제안되고 있다. 그 일례로, 특허문헌 1은 특정과장 빛에 민감한 감광성 채널 단백질로 표적 조직을 형질 감염시키는 단계; 광학 자극 장치를 통해 과장 범위의 광을 표적 조직으로 전달하는 단계; 목표 조직에 빛을 전달하는 것과 실질적으로 동시에 생체 신호를 감지하는 단계; 생체신호에 기초하여 환자 치료 상태를 결정하는 단계; 감지된 환자 치료 상태에 기초하여 표적 조직으로의 광의 전달 조정 단계;로 수행하는 광 자극 치료법을 개시하고 있으며 기능저하, 치매, 파킨슨 병, 경직, 간질 등의 신경장애에 적용된다고 기술하고 있다.
- [0007] 또한, 특허문헌 2에 따르면 최근에는 좌뇌 내측 전전두엽의 광유전적 자극을 통한 우울증 치료방법이 개시되어 있다.
- [0008] 구체적으로 스트레스에 따른 사회적 상호작용이 좌뇌 내측 전전두엽(left medial prefrontal cortex)과 밀접한 관련성이 있고, 상기 결과를 바탕으로 좌뇌 내측 전전두엽에 광자극을 통하여 사회적 상호작용을 조절할 수 있음을 확인하여, 좌뇌 내측 전전두엽에 채널로돕신을 발현시키고, 광자극을 주는 수단을 이용하여 상호작용(social interaction)의 조절 정보를 제공함으로써, 우울증의 치료에 유용하다고 기술하고 있다.
- [0009] 종래 발명들을 통해 광유전학 기술이 가진 신경질환 치료 방법으로서의 가능성에 대해서는 제기되어 왔으나, 아직까지 광유전학 기술을 활용한 알츠하이머 질환 치료 방법은 보고된 바 없으며 특히, 특정 과장 대역의 뇌파만을 선택적으로 회복시킬 수 있는 기술이 부재하다.
- [0010] 이에, 본 발명자들은 종래기술의 문제점을 개선하고자 노력한 결과, 알츠하이머 질환 뇌에서 손상되었던 뇌파를 회복시키는 방법으로 전기 자극이 아닌 광자극을 통해 신경세포의 활성을 조절하기 때문에 신경세포에 직접적으로 손상을 가하지 않으며, 뇌파 생성에 가장 직접적인 역할을 한다고 알려진 억제성 신경세포들인 PV 및 SST 억제성 신경세포에만 광수용체를 발현하여 선택적으로 활성을 조절함으로써 SST 억제성 신경세포의 광유전학적 활성으로 알츠하이머 질환 뇌에서 손상된 세타파를, PV 억제성 신경세포의 광유전학적 활성으로 알츠하이머 질환 뇌에서 손상된 감마파의 회복을 선택적으로 유도할 수 있는 기술을 제공하여, 알츠하이머 질환 치료 기술로서 적합함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 미국공개특허 제2011-0125078 (2011.05.26 공개)
(특허문헌 0002) 대한민국공개특허 제2014-0125659호 (2014.10.29 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 본 발명의 목적은 광유전학 기법을 이용한 알츠하이머 질환 뇌에서의 뇌파 손상 회복 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 억제성 신경세포에 CRE 유전자가 발현된 동물모델 제작단계,
- [0014] 상기 동물모델에, CRE 유전자가 발현된 억제성 신경세포를 표적으로 하도록 설계된 광수용체 유전자를 포함하는 바이러스 벡터를 주입하고 바이러스 벡터를 발현시키는 단계,
- [0015] 상기 바이러스 벡터가 주입된 동물모델에 전극 및 광섬유를 삽입하는 단계 및

- [0016] 상기 전극 및 광섬유를 통해 상기 광수용체 유전자에 설계된 신경세포별 반응하는 광자극을 전달하여 알츠하이머 질환 뇌에서의 손상 뇌파를 선택적으로 회복시키는 단계로 이루어진 광유전학 기법을 이용한 알츠하이머 질환 뇌에서의 뇌파 손상 회복 방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 상기 알츠하이머 질환 뇌에서의 손상 뇌파를 회복시키는 단계 이후 손상 뇌파 회복효과를 정량화하는 단계를 더 수행할 수 있다.
- [0018] 상기에서 억제성 신경세포는 PV 또는 SST를 발현하는 신경세포이고, 상기 광자극에 의해 선택적으로 손상 감마파 또는 손상 세타파를 회복시킬 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 광수용체는 450, 470, 565 및 590nm 파장영역의 광에 반응하는 광수용체를 사용하는 것이 바람직하다.

발명의 효과

- [0020] 본 발명의 광유전학 기법을 이용한 알츠하이머 질환 뇌에서의 뇌파 손상 회복 방법은 신경세포에 직접적인 손상을 가하는 종래의 전기적 자극을 통한 뇌파 치료 기술과는 달리 광자극을 사용하여 신경세포에 손상을 가하지 않으면서 신경세포의 활성 조절을 통해 알츠하이머 질환 뇌에서의 뇌파 회복이 가능하다.
- [0021] 또한, 종래기술이 비선택적으로 불특정 다수의 신경세포에 전기 자극을 가하였던 것과 달리, 본 발명의 광유전학 기법을 이용한 알츠하이머 질환 뇌에서의 뇌파 손상 회복 방법은 바이러스 벡터를 통해 특정 신경세포의 광수용체 유전자를 삽입하는 유전자 조작 기술을 활용하여, 뇌의 다양한 억제성 신경세포들 중 한 종류의 세포만 선택적으로 활성 조절이 가능하다.
- [0022] 또한, 본 발명은 다양한 광자극 패턴을 사용하여, 실제 정상 뇌 뇌파 생성시 나타나는 억제성 신경세포들의 활성 패턴과 유사한 신경세포 활성 패턴을 알츠하이머 질환 뇌에서 유도할 수 있으므로, 정상 뇌의 뇌파 생성 기전을 모사하여 알츠하이머 질환 뇌파 손상을 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0023] 도 1은 AB 중합체 합성과정을 도시한 것이고,
 도 2는 광유전학적 유전자 조작기법 및 정위방법을 이용한 바이러스 벡터 및 AB 주입기술을 나타낸 것이고,
 도 3은 알츠하이머성 질환 쥐 해마에서 AB 발현 및 SST/PV 신경세포 사진이고,
 도 4는 광유전학적 SST 신경세포 활성 조절을 통한 알츠하이머 질환 해마에서의 손상 세타파 회복 결과를 나타낸 것이고,
 도 5는 광유전학적 PV 신경세포 활성 조절을 통한 알츠하이머 질환 해마에서의 손상 감마파 회복 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0025] 본 발명은 다양한 광자극 패턴을 사용하여, 실제 정상 뇌 뇌파 생성시 나타나는 억제성 신경세포들의 활성 패턴과 유사한 신경세포 활성 패턴을 알츠하이머 질환 뇌에서 유도함으로써, 정상 뇌의 뇌파 생성 기전을 모사하여 알츠하이머 질환 뇌파 손상을 회복하는 방법에 관한 것이다.
- [0026] 구체적으로 본 발명은 1) 억제성 신경세포에 CRE 유전자가 발현된 동물모델 제작단계,
 [0027] 2) 상기 동물모델에, CRE 유전자가 발현된 억제성 신경세포를 표적으로 하도록 설계된 광수용체 유전자를 포함하는 바이러스 벡터를 주입하고 바이러스 벡터를 발현시키는 단계,
 [0028] 3) 상기 바이러스 벡터가 주입된 동물모델에 전극 및 광섬유를 삽입하는 단계 및
 [0029] 4) 상기 전극 및 광섬유를 통해 상기 광수용체 유전자에 설계된 신경세포별 반응하는 광자극을 전달하여 알츠하이머 질환 뇌에서의 손상 뇌파를 선택적으로 회복시키는 단계로 이루어진 광유전학 기법을 이용한 알츠하이머 질환 뇌에서의 뇌파 손상 회복 방법을 제공한다.

- [0030] 이하, 도면을 이용하여 각 단계별로 상세히 설명하고자 한다.
- [0031] 본 발명의 광유전학 기법을 이용한 알츠하이머 질환 뇌에서의 뇌파 손상 회복 방법에 있어서, 1) 단계는 알츠하이머 질환 동물모델 제작단계로서, 알츠하이머 질환 연구에서 주로 사용되는 Aβ 펩티드 중 가장 독성이 강하며 용해성 물질인 Aβ 중합체(oligomer)를 뇌에 직접적으로 주입하여 알츠하이머성 질환을 유도하는 방법 또는 종래에 유전자 조작 기술을 통해 발명된 알츠하이머성 질환 동물모델을 이용한다.
- [0032] 도 1은 Aβ 중합체 합성과정을 도시한 것으로서, Aβ 단량체(monomer)에 유기용매인 HFIP(Hexafluoro-2-propanol)를 처리하여 5 내지 10분동안 부유시켜 모노머화시킨 후, 진공농축기를 이용하여 Aβ 부유액에서 HFIP를 제거하여 필름화한다. 상기 필름화된 Aβ에 DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 처리하여 Aβ의 응집을 늦추면서 부유화하여 Aβ 부유액을 제조한다. 이때 실험에 사용할 Aβ 부유액은 인공 뇌척수액(artificial cerebrospinal fluid)을 처리하여 200nm로 희석시킨 후 약 12시간 냉장 배양함으로써 용해성 Aβ 형태인 중합체를 합성하여 사용한다. 위와 같이 합성된 Aβ 중합체를 정위방법을 통해 동물 뇌에 직접 주입하여 알츠하이머성 질환을 유도한다.
- [0033] 상기 1) 단계의 종래 발명된 알츠하이머 질환 동물모델에는 5xFAD mice, APP/PS1 mice 등과 같은 유전자 조작을 통해 제작된 알츠하이머 질환 동물모델들을 포함한다.
- [0034] 상기 1) 단계에서 억제성 신경세포는 PV 또는 SST 신경세포를 사용하고, 상기 특정 억제성 신경세포에 CRE 유전자가 발현되도록 한다.
- [0035] 상기 CRE란 CRE 재결합효소로서, 특정 서열의 DNA를 인식하여 잘라내고 이어 붙이는 기능을 하는데, 예를 들어 PV-CRE 동물모델은 CRE 유전자를 가진 동물모델이며, PV를 발현시키는 프로모터가 CRE 유전자 앞에 있어, PV를 발현하는 신경세포에서만 CRE 효소가 발현된다.
- [0036] 본 발명의 방법에 있어서, 2) 단계는 CRE 유전자가 발현된 억제성 신경세포를 표적으로 하도록 설계된 광수용체를 포함하는 바이러스 벡터 제조하고, 1) 단계의 CRE 형질전환 동물 모델의 뇌에, 광수용체 유전자를 포함한 바이러스 벡터를 주입하는 단계이다.
- [0037] 상기 바이러스 벡터란 EF1a-DIO, CAG-Flex, 및 Syn-Flex와 같은 프로모터를 가진 아데노 연관 바이러스(adenovirus)를 지칭하며, CRE 유전자를 발현하는 특정 신경세포만을 표적으로 하여 광수용체를 전달할 수 있다.
- [0038] 상기 광수용체는 빛에 의해 반응하여 광수용체를 발현하고 있는 신경세포의 활성을 증가시키는 모든 종류의 광수용체를 포함한다. 구체적인 예로는 450nm 파장의 빛에 의해 최대로 반응하는 ChIEF, 470nm 파장의 빛에 의해 최대로 반응하는 채널로돕신-2(channelrhodopsin-2, 이하 ChR2), 565 nm 파장의 빛에 의해 최대로 C1V1, 590 nm 파장의 빛에 의해 최대로 반응하는 Crimson 등을 포함한다. 2) 단계의 광수용체에는 상기 예시로 제시된 광수용체 외에도 신경세포를 활성화시킬 수 있는 모든 종류의 광수용체를 포함한다.
- [0039] 도 2는 광유전학적 유전자 조작기법 및 정위방법을 이용한 바이러스 벡터 및 Aβ 주입기술을 나타낸 것으로서, CRE 형질전환 동물 모델, 더욱 바람직하게는 본 발명의 바람직한 실시형태인 SST-CRE 및 PV-CRE 동물모델의 뇌에, 정위방법(stereotaxic)을 사용하여 주입하고자 하는 뇌의 위치를 설정한 후 미세주사기를 통하여 광수용체를 인코딩하는 바이러스 벡터를 주입하면, SST 및 PV 신경세포에만 선택적으로 광수용체를 발현시킬 수 있다.
- [0040] 상기 바이러스 벡터 주입 후, 주입된 바이러스 벡터가 CRE 유전자를 포함하는 특정 억제성 신경세포에 발현되어 유전자 변형을 일으키기 위해 2주 내지 3주간 바이러스 벡터를 발현시키는 단계가 수행된다.
- [0041] 이후 본 발명의 방법에 있어서, 3) 단계는 상기 바이러스 벡터가 주입된 동물모델에 전극 및 광섬유를 삽입하는 단계로서, 알츠하이머 질환 동물모델의 뇌에서의 뇌파 측정 및 광자극 전달을 위한 전극 및 광섬유를 삽입한다.
- [0042] 구체적으로, *In vitro* 상황의 경우, 알츠하이머 질환 동물모델의 뇌 절편에 미세유리전극을 삽입하여 뇌파를 측정 가능하며, 광원과 현미경렌즈를 통해 광전극을 전달할 수 있다.
- [0043] 또한, *In vivo* 상황의 경우, 마취된 동물의 두개골에 구멍을 뚫은 후 정위 방법을 통해 전극을 삽입하고자 하는 뇌의 위치를 설정한 후 광전극(전극 + 광섬유)을 주입하고, 그 후에는 덴탈 시멘트를 통하여 수술 부위를 덮어 마무리한다.
- [0044] 이후, 본 발명은 4) 단계를 통해 상기 전극 및 광섬유를 통해 광자극을 전달하여 알츠하이머 질환 뇌에서의 손

상 뇌파를 선택적으로 회복시키는 단계로 이루어진다.

- [0045] 상기 4) 단계는 450, 470, 565 및 590nm 등의 파장 대역의 빛을 알츠하이머 질환 뇌에 조사하는 광자극 단계로, 광자극을 활용하여 ChIEF, ChR2, C1V1, Crimson 외의 광수용체가 발현된 특정 억제성 신경세포의 활성을 조절한다.
- [0046] 도 3은 알츠하이머성 질환 쥐 해마에서 촬영된 AB 발현 및 SST/PV 신경세포 사진을 나타낸다. 즉, AB 및 바이러스가 주입된 SST-CRE 또는 PV-CRE 쥐 해마에 470nm 파장의 광자극이 주어질 경우 알츠하이머 질환 뇌의 ChR2 발현 SST/PV 신경세포를 선택적으로 활성화할 수 있고, 그에 따라, 광자극을 알츠하이머 질환 뇌에 조사하여 손상 세타파 및 감마파를 회복시킬 수 있다.
- [0047] 상기 광자극은 광수용체의 종류에 따라 달라지며, ChR2의 경우 470nm 대역의 파장을 이용하고, C1V1의 경우 565nm 대역 파장의 빛을 이용하며, 뇌에 삽입된 광전극을 통해 주어진다.
- [0048] 도 4는 광유전학적 SST 신경세포 활성 조절을 통한 알츠하이머 질환 해마에서의 손상 세타파 회복 결과를 나타낸 것으로서, 상기 손상된 세타파 회복은 광수용체가 발현된 SST 신경세포를 광자극을 통하여 활성화시켜 이루어진 것이다.
- [0049] 또한, 도 5는 광유전학적 PV 신경세포 활성 조절을 통한 알츠하이머 질환 해마에서의 손상 감마파 회복 결과를 나타낸 것으로서, 상기 손상된 감마파 회복은 광수용체가 발현된 PV 신경세포를 광자극을 통하여 활성화시켜 이루어진 것이다.
- [0050] 광자극의 세기 및 패턴은 정상 뇌에서 일어나는 억제성 신경세포 타입별 다양한 활성 패턴을 모사하는 방향으로 제공되는데, 예를 들어 470nm 파장의 빛을 5Hz 주파수 대역의 사인과 패턴으로 알츠하이머 질환 뇌의 ChR2 발현 파르브알부민성 신경세포에 조사하여 정상 뇌에서 감마파 대역으로 활성을 나타내는 파르브알부민성 신경세포의 활성 패턴을 모사하고 알츠하이머성 질환 뇌에서의 감마파 손상을 회복시킬 수 있다. 이때, 광자극의 세기는 알츠하이머 질환 뇌에서 나타나는 뇌파 손상의 정도에 비례하여 주어질 수 있음은 당연히 이해될 것이다.
- [0051] 또한, 상기 광자극의 패턴은 일정하고 지속적인(continuous) 자극 패턴, 사인과 패턴, 특정 주파수 패턴 등으로 주어질 수 있다.
- [0052] 이후, 본 발명의 광유전학 기법을 이용한 알츠하이머 질환 뇌에서의 뇌파 손상 회복 방법은 상기 알츠하이머 질환 뇌에서의 손상 뇌파를 회복시키는 4) 단계 이후 5) 손상 뇌파 회복여부를 검증하여 뇌파 회복효과를 정량화하는 단계를 더 수행할 수 있다.
- [0053] 즉, 알츠하이머 질환 뇌에서의 뇌파 손상 회복 여부는 관찰하고자 하는 파장 대역으로 뇌파를 밴드 패스 필터(band-pass filtering)한 후 고속 푸리에 변환(Fast Fourier Transform)등을 이용한 파워(power) 분석 기법을 통해 정량화 할 수 있다.
- [0054] 이상의 광유전학 기법을 이용한 알츠하이머 질환 뇌에서의 뇌파 손상 회복 방법은 광자극을 사용하여 신경세포에 손상을 가하지 않으면서 신경세포의 활성 조절을 통해 알츠하이머 질환 뇌에서의 뇌파 회복이 가능하다.
- [0055] 또한, 본 발명의 광유전학 기법을 이용한 알츠하이머 질환 뇌에서의 뇌파 손상 회복 방법에 의해, 종래기술이 비선택적으로 불특정 다수의 신경세포에 전기 자극을 가하였던 것과 달리, 특정 신경세포의 광수용체 유전자를 삽입하는 유전자 조작 술을 활용하여, 뇌의 다양한 억제성 신경세포들 중 한 종류의 세포만 선택적으로 활성 조절이 가능하다.
- [0056] 특히, 본 발명은 실제 알츠하이머 질환 뇌에서의 기억 손상과 밀접하게 연관되어 있는 것으로 알려진 세타파 및 감마파 손상 회복이 가능하다.
- [0057] 이상에서 본 발명은 기재된 구체예에 대해서만 상세히 설명되었지만 본 발명의 기술사상 범위 내에서 다양한 변형 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속함은 당연한 것이다.
- [0059] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다.
- [0060] 본 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0061] <실시예 1> 알츠하이머 질환 뇌에서의 세타파 손상 회복 방법

[0062] 1. 아밀로이드 베타 중합체 주입을 통한 알츠하이머 질환 동물 모델 확립

[0063] AB 단량체에 HFIP(Hexafluoro-2-propanol) 용매처리하여 1mM 농도로 부유시켜 모노머화(monomerization) 시킨 후, 진공농축기를 이용하여 AB 부유액에서 HFIP를 제거하여 필름화시켰다. 상기 필름화된 AB에 DMSO 용매처리하여 AB의 응집을 늦추면서 부유화하여 5mM의 AB 부유액을 제조하였다. 실험에 사용할 AB 부유액은 생리식염수를 처리하여 200nM로 희석시킨 후 약 12시간 냉장(4℃) 배양하여 용해성 아밀로이드 베타 중합체(AB oligomer)를 합성하였다.

[0064] 상기 합성된 AB 중합체를 정위방법을 이용하여 SST-CRE 쥐의 해마 CA1에 3μl 주입하였다. 이때, AB 중합체 주입은 미세주사기를 이용해 100nl/min 속도로 주입되었으며, AB가 잘 퍼질 수 있게 3분간 미세주사기를 고정시켜 놓았다.

[0065] 2. 광유전학 기법을 위한 바이러스 주입

[0066] SST 신경세포에 광수용체를 발현하기 위해, 광수용체 중 ChR2를 사용하였으며, 이를 위해 AB가 주입된 SST-CRE 쥐의 해마 CA1에 정위방법을 사용하여 AAV-EF1a-DIO-C1V1(E162T)-TS-p2A-EYFP-WPRE 바이러스(1μl)를 주입하였다.

[0067] 바이러스 주입은 미세주사기를 이용해 100nl/min 속도로 주입되었으며, 주입 후 바이러스가 잘 퍼질 수 있게 3분간 미세주사기를 고정시켜 놓고, 그 후 3주간의 회복 기간을 유지하였다.

[0068] 3. 바이러스 벡터가 주입된 동물모델에 전극 및 광섬유를 삽입하는 단계

[0069] 알츠하이머 모사 쥐 해마 CA1에서 뇌파를 측정하기 위하여 정위방법을 통해 마취된 쥐 뇌에 광전극을 삽입하였다.

[0070] 상기 광전극은 뇌파 측정용 전극과 광자극 전달용 광섬유를 포함하고 있으며 상기 전극을 통해 측정된 지역장 전위(local field potential)에 3-12Hz 대역으로 밴드 패스(band-pass) 필터를 걸어 세타파를 얻어냈고, 고속 푸리에 변환을 통해 세타파의 파워 값 및 주파수 대역 값을 구하였다.

[0071] 4. 알츠하이머 질환 동물모델 해마에 광자극을 통한 세타파의 뇌파 회복 검증

[0072] 세타파의 뇌파 회복을 위해서는 상기 AB 및 바이러스가 주입된 SST-CRE 쥐 해마에 광전극을 통해 470nm 파장이 조사되었다. 이때, 광자극은 일정한 세기로 3초간 지속적으로 전달하였다. 그 결과, 광유전학적 광자극을 활용하여 SST 억제성 신경세포를 활성화시켰을 때는 알츠하이머 질환 모사 쥐 해마에서 손상되었던 세타파가 다시 정상수준으로 회복되는 결과를 얻었다[도 4].

[0073] <실시예 2> 알츠하이머 질환 뇌에서의 감마파 손상 회복 방법

[0074] 상기 실시예 1의 단계 1과 동일하게 아밀로이드 베타 중합체(AB oligomer)를 합성하고, 상기 합성된 AB 중합체를 정위방법을 이용하여 PV-CRE 쥐의 해마 CA1에 3μl 주입하였다. 이때, AB 중합체 주입은 미세주사기를 이용해 100nl/min 속도로 주입되었으며, AB가 잘 퍼질 수 있게 3분간 미세주사기를 고정시켜 놓았다.

[0075] PV 신경세포에 광수용체를 발현하기 위해, 광수용체 중 ChR2를 사용하였으며, 이를 위해 AB가 주입된 PV-CRE 쥐의 해마 CA1에 정위방법을 사용하여 AAV-EF1a-DIO-C1V1(E162T)-TS-p2A-EYFP-WPRE 바이러스(1μl)를 주입하였다. 바이러스 주입은 미세주사기를 이용해 100nl/min 속도로 주입되었으며, 주입 후 바이러스가 잘 퍼질 수 있게 3분간 미세주사기를 고정시켜 놓고, 그 후 3주간의 회복 기간을 유지하였다.

[0076] 알츠하이머 모사 쥐 해마 CA1에서 뇌파를 측정하기 위하여 정위방법을 통해 마취된 쥐 뇌에 광전극을 삽입하고, 상기 전극을 통해 측정된 지역장 전위(local field potential)에 20-120Hz 대역으로 밴드 패스(band-pass) 필터를 걸어 감마파를 얻어냈고, 고속 푸리에 변환을 통해 감마파의 파워 값 및 주파수 대역 값을 구하였다.

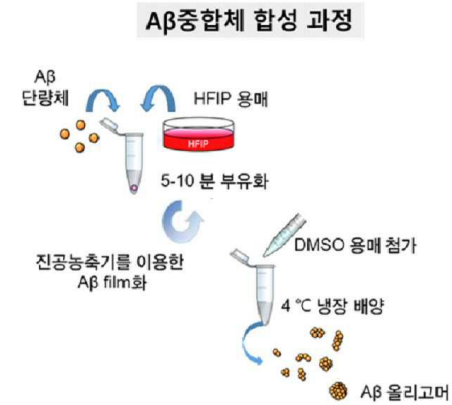
[0077] 감마파의 뇌파 회복을 위해서는 상기 AB 및 바이러스가 주입된 PV-CRE 쥐 해마에 광전극을 통해 470nm 파장이 조사되었다. 이때, 광자극은 일정한 세기로 3초간 지속적으로 전달하였다. 그 결과, 광유전학적 광자극을 활용하여 PV 억제성 신경세포를 활성화시켰을 때는 알츠하이머 질환 모사 쥐 해마에서 손상되었던 세타파가 다시 정상수준으로 회복되는 결과를 얻었다[도 5].

[0078] 이상에서 본 발명은 기재된 구체예에 대해서만 상세히 설명되었지만 본 발명의 기술사상 범위 내에서 다양한 변

형 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속함은 당연한 것이다.

도면

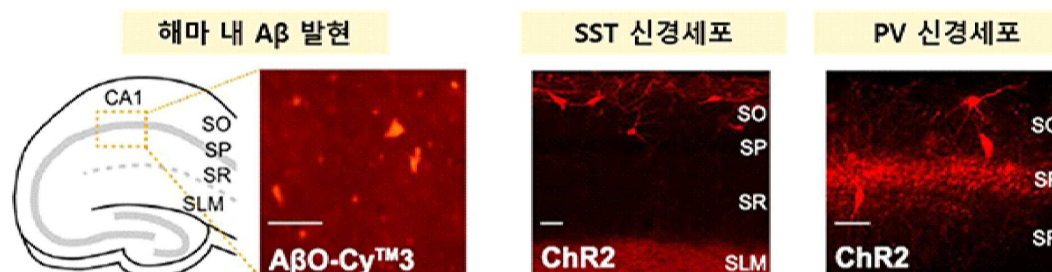
도면1



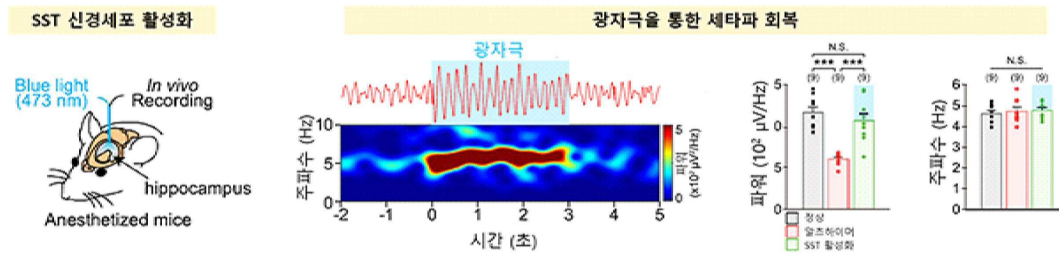
도면2



도면3



도면4



도면5

