(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0089510
(43) 공개일자 2022년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) *A01K 67/027* (2006.01)
A23K 10/16 (2017.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
A01K 67/027 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0180210
(22) 출원일자 2020년12월21일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
오명숙
서울시 강남구 삼성로 151, 1동 305호
김동현
서울시 성북구 선잠로 92-24
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최은선

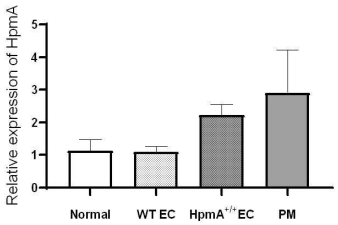
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 발명의 명칭 **HpmA를 이용한 퇴행성 뇌질환의 진단 방법**

(57) 요 약

본 발명은 피검체의 생물학적 시료로부터, 프로테우스 (Proteus), 쉬겔라 (Shigella), 클렙시엘라 뉴모니아 (Klebsiella pneumoniae), 또는 시트로박터 (Citrobacter)로부터, 바람직하게는 프로테우스 미라빌리스 (*Proteus mirabilis*) 균주로부터 유래된 물질인 hpmA를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 진단용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 hpmA의 양을 측정하여 파킨슨병, 뇌신경염 또는 알츠하이머병 질환 등의 퇴행성 뇌질환을 진단하기 위한 정보제공방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23K 10/16 (2016.05)
A01K 2207/25 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
(72) 발명자
최진규
경기도 부천시 소삼로 47, 105동 1302호

허유진
서울시 마포구 마포대로 24길 16, 109동 303호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711091738
과제번호	2017R1A5A2014768
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기초의과학분야(MRC)
연구과제명	뉴로바이오타 연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교
연구기간	2017.06.01 ~ 2024.02.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

hpmA를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 진단용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병 (Alzheimer's disease), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 치매 (dementia), 다발성 경화증 (multiple sclerosis), 헌팅턴병(Huntington's disease), 근위축성 측색 경화증 (Amyotrophic lateral sclerosis), 뇌신경염 (neuro-inflammation), 다발계위측증 (multiple system atrophy) 또는 픽병 (Pick's disease)인 것을 특징으로 하는 질환의 진단용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 파킨슨병 질환을 진단하는 것을 특징으로 하는, 질환의 진단용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 hpmA는 프로테우스 (Proteus), 쉬겔라 (Shigella), 클렙시엘라 뉴모니아 (Klebsiella pneumoniae), 또는 시트로박터 (Citrobacter)로부터 유래하는 것을 특징으로 하는, 질환의 진단용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 hpmA는 프로테우스 미라빌리스 균주 (*Proteus mirabilis*)로부터 유래하는 것을 특징으로 하는, 질환의 진단용 조성물.

청구항 6

피검체의 생물학적 시료로부터 hpmA의 양을 측정하는 단계를 포함하는, 퇴행성 뇌질환을 진단하기 위한 정보제공방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 피검체의 생물학적 시료로부터 측정된 hpmA의 양을 정상 대조군의 생물학적 시료로부터 측정된 hpmA의 양과 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 질환을 진단하기 위한 정보제공방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 피검체의 생물학적 시료로부터 측정된 hpmA의 양이 정상 대조군의 생물학적 시료로부터 측정된 hpmA의 양보다 많을 경우, 상기 피검체는 질병이 발병하거나 발병 가능성이 높은 것으로 분류되는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는, 질환을 진단하기 위한 정보제공방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병 (Alzheimer's disease), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 치매 (dementia), 다발성 경화증 (multiple sclerosis), 헌팅턴병(Huntington's disease), 근위축성 측색 경화증 (Amyotrophic lateral sclerosis), 뇌신경염 (neuro-inflammation), 다발계위측증 (multiple system atrophy) 또는 픽병 (Pick's disease)인 것을 특징으로 하는, 질환을 진단하기 위한 정보제공방법.

청구항 10

제6항에 있어서, 상기 정보제공방법은 파킨슨병 질환을 진단하는 것을 특징으로 하는, 질환을 진단하기 위한 정보제공방법.

청구항 11

제6항에 있어서, 상기 hpmA는 프로테우스 (Proteus), 쉬겔라 (Shigella), 클렙시엘라 뉴모니아 (Klebsiella pneumoniae), 또는 시트로박터 (Citrobacter)로부터 유래하는 것을 특징으로 하는, 질환을 진단하기 위한 정보제공방법.

청구항 12

제6항에 있어서, 상기 hpmA는 프로테우스 미라빌리스 균주 (*Proteus mirabilis*)로부터 유래하는 것을 특징으로 하는, 질환을 진단하기 위한 정보제공방법.

청구항 13

제6에 있어서, 상기 생물학적 시료는 조직, 혈액, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 뇨, 대장 조직 또는 대변인 것을 특징으로 하는, 질환을 진단하기 위한 정보제공방법.

청구항 14

제7항에 있어서, 정상 대조군은 퇴행성 뇌질환이 발병하지 않은 인간을 포함하는 동물인 것을 특징으로 하는, 질환을 진단하기 위한 정보제공방법.

청구항 15

hpmA 유전자를 포함하는 균주를 유효성분으로 포함하는, 퇴행성 뇌질환 동물모델의 제조를 위한 조성물.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 조성물은 사료 조성물인 것을 특징으로 하는, 퇴행성 뇌질환 동물모델의 제조를 위한 조성물.

청구항 17

제14항에 있어서, 상기 균주는 *E. coli*인 것을 특징으로 하는, 퇴행성 뇌질환 동물모델의 제조를 위한 조성물.

청구항 18

인간을 제외한 동물에 hpmA 유전자를 포함하는 균주를 투여하는 단계를 포함하는, 퇴행성 뇌질환 동물모델 제조 방법.

청구항 19

제18항의 제조방법에 의해 제조된 퇴행성 뇌질환 동물모델.

청구항 20

(a) 후보약물을 투여하는 단계;

(b) 피검체의 생물학적 시료로부터 hpmA의 양을 측정하는 단계; 및

(c) 후보약물의 치료효과를 판단하는 단계를 포함하는, 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 후보약물을 투여하기 전 및 후의 hpmA의 양을 측정하여 비교하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 피검체의 생물학적 시료로부터 hpmA를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 진단용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 hpmA의 양을 측정하여 파킨슨병, 뇌신경염 또는 알츠하이머병 질환 등의 퇴행성 뇌질환을 진단하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 노인 인구가 급증하면서 파킨슨병, 뇌신경염 또는 알츠하이머병 질환 등과 같은 다양한 신경퇴행성 뇌질환 환자가 증가하여 이에 대한 예방 및 치료에 관심이 고조되고 있다. 신경퇴행성 뇌질환은 신경의 퇴행성 변화로 인해 운동장애, 기억장애, 인지장애 등 여러 가지 병증을 유발하는 질병이며, 현재까지 발병기전이 완전히 밝혀지지 않았다.

[0004] 이러한 신경퇴행성 뇌질환 중 파킨슨병 (Parkinson's Disease)은 진전 (tremor), 운동완서 (bradykinesia), 근육경직 (rigidity), 비정상적 자세 (postural instability), 운동 불능(akinesia) 등의 증상을 동반하며, 과도한 활성산소종 생성, 산화 스트레스, 잘못 접힌 (misfolded) 단백질 및 손상된 미토콘드리아 기능과 같은 다양한 자극들을 통한 뇌 흑색질 (substantia nigra pars compactra; SNpc)에서의 멜라닌 색소를 함유한 도파민 (dopamine) 신경의 세포 사멸과 선조체 (corpus striatum)에서의 신경전달물질인 도파민 (dopamine)의 결핍으로 인해 나타나는 질환으로 알려져 있다.

[0005] 상기 도파민은 뇌의 흑색질에서 생성되는데, 흑색질의 신경세포는 뇌의 운동피질 및 기타 여러 부위와 복잡하게 연결되어 있어 인체의 운동을 부드럽고 정확하게 수행할 수 있도록 해주는 기저핵이라는 부위와 연결되어 있고, 도파민은 이러한 기저핵의 기능을 조절한다.

[0006] 현재까지의 파킨슨병 치료방법은 약물치료법, 수술치료법 및 물리치료법 등이 있으며, 주로 도파민 전구물질인 L-dopa를 투여하여 도파민을 보충하는 방법을 사용하였으나, 많은 임상 연구에서 지속적인 L-dopa의 사용이 심각한 부작용을 초래하는 것으로 알려져 있다.

[0007] 또한, 파킨슨병의 주요 증상이 처음 발현되어 진단받는 시기는 대개 흑색질 내 도파민성 신경세포가 이미 70% 이상 파괴된 상태로 이미 죽어버린 신경세포를 다시 살릴 수 없기 때문에 상기 약물들은 증상의 개선만을 목적으로 하므로 파킨슨병의 조기 진단, 예방 및 치료에 한계가 있었다.

[0008] 파킨슨병의 진단방법으로는 뇌 자기공명영상 (Magnetic Resonance Image, MRI) 검사, 양전자 방출 단층촬영술 (positron emission tomography, PET), 단광자 방출 컴퓨터 단층촬영술 (single photon emission computed tomography, SPECT), 내과적 질환에 대한 검사 (혈액검사, 소변검사, 심전도, 가슴 엑스선 검사) 등의 방법을 사용하여 뇌의 흑색질 또는 선조체 부위를 영상화하거나, 뇌 조직을 직접 채취하여 생물학적 마커를 검사하는 방법이 있다.

[0009] 그러나, 상기 진단방법들은 고가이고 진단 절차가 복잡하며, 얻어진 결과가 부정확하거나 뇌조직을 직접 채취해야 하기 때문에 환자에게 고통과 부담을 유발한다는 문제점이 있으며, 파킨슨병 진단 시장의 발전 또한 미진한 실정이다.

[0010] 따라서, 파킨슨병 등의 조기 발견을 통해 치료 효과를 개선하기 위하여, 파킨슨병 등의 신경퇴행성 뇌질환을 신속하게 진단할 수 있는 기술에 대한 개발이 시급한 상황이다.

[0011] 한편, 위장관 배출시간의 연장이나 변비는 파킨슨병의 초기 단계에서 대부분의 환자가 경험하는 증상으로, 파킨슨병과 장 기능 간의 연구는 파킨슨병의 진단 기술 개발에 유용한 정보를 제공할 수 있다.

[0012] 장내 미생물은 장내의 항상성을 유지하고 뇌의 신경전달물질의 생성에도 관여하는 것으로 알려져 있는데, 장내 미생물 변화는 비만, 당뇨병 등의 대사성 질환뿐만 아니라 우울증, 자폐증 등의 정신질환, 및 알츠하이머병, 파킨슨병 등의 퇴행성뇌질환과도 연관이 있음이 밝혀지고 있다.

[0013] 프로테우스 (Proteus), 쉬겔라 (Shigella), 클렙시엘라 뉴모니아 (Klebsiella pneumoniae), 시트로박터 (Citrobacter) 등의 균주는 hpmA의 virulence factors를 생성 및 분비하는 것으로 알려져 있으나, hpmA를 이용한 퇴행성 뇌질환의 진단방법에 대해서는 알려진 바가 없었다. 이 중에서, 특히 장내 미생물 중 프로테우스 미라빌리스 (*Proteus mirabilis*) 균주는 엔테로박테리아 계통 (*Enterobacteriaceae faimily*)에 속하는 그람음성 (Gram negative) 막대균으로, 인간의 위장관에서 주로 서식하며, 비뇨기나 상처, 폐에 들어가면 병균으로 활동하게 되는데 주로 비뇨기계통에 감염을 일으키고 신장석이나 요관석 등을 만들기도 하며, hpmA를 생성 및 분비한다.

[0014] 이에, 본 발명자들은 상기와 같은 종래의 문제점을 해결하기 위해 파킨슨병과 장내 미생물과의 연관성을 연구한 결과, 장내 미생물 유래 virulence factor 중 hpmA가 파킨슨병의 유발에 핵심적인 역할을 한다는 것을 최초로 발견하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0016] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1183620호

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제10-1081358호

(특허문헌 0003) 한국등록특허 제10-1860566호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 본 발명의 목적은 hpmA를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0018] 본 발명의 다른 목적은 피검체의 생물학적 시료로부터 hpmA의 양을 측정하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환을 진단하기 위한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0019] 본 발명의 또 다른 목적은 hpmA 유전자를 포함하는 균주를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 동물모델 제조용 조성물을 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 또 다른 목적은 hpmA 유전자를 포함하는 균주를 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환 동물모델 제조방법 및 이의 제조방법에 의해 제조된 퇴행성 뇌질환 동물모델을 제공하는 것이다.

[0021] 본 발명의 또 다른 목적은 치료제 후보약물을 투여하는 단계; 피검체의 생물학적 시료로부터 hpmA의 양을 측정하는 단계; 및 후보약물의 치료효과를 판단하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0023] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위하여 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0024] 본 발명은 hpmA를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0025] 본 발명의 용어, "퇴행성 뇌질환"이란 중추신경계의 신경세포에 퇴행성 변화가 나타나면서 여러 가지 증상을 유발하는 질환을 의미한다. 구체적으로, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병 (Alzheimer's disease), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 치매 (dementia), 다발성 경화증 (multiple sclerosis), 헌팅턴병(Huntington's disease), 근위축성 측색 경화증 (Amyotrophic lateral sclerosis), 뇌신경염 (neuro-inflammation), 다발계위측증 (multiple system atrophy) 또는 픽병 (Pick's disease)일 수 있다.

[0026] 본 발명에서 사용되는 용어, "진단"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것을 의미하고, 본 발명에서는 파킨슨병, 뇌신경염 또는 알츠하이머병 질환과 같은 퇴행성 뇌질환의 발병 여부를 확인하는 것을 의미하나, 상기 질환의 진단에만 한정되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명은 알츠하이머병 (Alzheimer's disease), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 치매 (dementia), 다발성 경화증 (multiple sclerosis), 헌팅턴병(Huntington's disease), 근위축성 측색 경화증 (Amyotrophic lateral sclerosis), 뇌신경염 (neuro-inflammation), 다발계위측증 (multiple system atrophy) 및 픽병 (Pick's disease)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 퇴행성 뇌질환의 진단용 조성물에 관한 것이며, 바람직하게는 파킨슨 질환의 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0028] 본 발명의 진단용 조성물은 프로테우스 (Proteus), 쉬겔라 (Shigella), 클렙시엘라 뉴모니아 (Klebsiella pneumoniae), 또는 시트로박터 (Citrobacter)에서 유래한 hpmA를 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0029] 바람직하게, 본 발명의 진단용 조성물은 프로테우스 미라빌리스 균주에서 유래한 hpmA를 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명의 프로테우스 미라빌리스 (*Proteus mirabilis*) 균주는 엔테로박테리아 계통 (*Enterobacteriaceae faimily*)에 속하는 그람음성 (Gram negative) 막대균으로, 염증을 유발하는 리포폴리사카라이드 (Lipopolysaccharide, LPS)를 생합성하는 균주이며, 대장균 다음으로 인간에게 요도감염을 많이 유발하는 병원균이다. 프로테우스 미라빌리스는 다양한 환경에 분포하는데 사람 또는 동물의 요로를 통하여 감염되는 것이 일반적이나, 호흡기, 피부, 또는 장관계를 통하여 감염될 수도 있다.

[0031] 특히, 프로테우스 미라빌리스 균주는 hpmA, ureC, mrpA 등 다양한 virulence factors를 생성 및 분비하는 것으로 알려져 있으며, 이 중 hpmA는 프로테우스 미라빌리스 균주가 생성하는 hemolysin으로 endotoxin 중 하나이다.

[0032] 본 발명은 프로테우스 미라빌리스 균주 (*Proteus mirabilis*)에서 유래하는 hpmA를 포함하는 파킨슨병 질환의 진단용 조성물에 관한 것이다.

[0033] 본 발명은 피검체의 생물학적 시료로부터 hpmA의 양을 측정하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환을 진단하기 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0034] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 상기 피검체는 인간을 포함한 동물일 수 있다.

[0035] 상기 본 발명의 hpmA은 프로테우스 (Proteus), 쉬겔라 (Shigella), 클렙시엘라 뉴모니아 (Klebsiella

pneumoniae), 또는 시트로박터 (Citrobacter)에서 유래한 것일 수 있다. 바람직하게, 본 발명의 hpmA은 미라빌리스 (*Proteus mirabilis*) 균주에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0036] 본 발명은 피검체의 생물학적 시료로부터 hpmA의 양을 측정하는 단계, 및 피검체의 생물학적 시료로부터 측정된 hpmA의 양을 정상 대조군의 생물학적 시료로부터 측정된 hpmA의 양과 비교하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환을 진단하기 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0037] 또한, 본 발명은 피검체의 생물학적 시료로부터 hpmA의 양을 측정하는 단계, 피검체의 생물학적 시료로부터 측정된 hpmA의 양을 정상 대조군의 생물학적 시료로부터 측정된 hpmA의 양과 비교하는 단계, 및 상기 피검체의 생물학적 시료로부터 측정된 hpmA의 양이 정상 대조군의 생물학적 시료로부터 측정된 hpmA의 양보다 많을 경우, 상기 피검체는 질병이 발병하거나 발병 가능성이 높은 것으로 분류되는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환을 진단하기 위한 정보제공방법을 제공한다.

[0038] 본 발명에서 사용되는 용어, "생물학적 시료"는 생체로부터 분리된 것일 수 있고, 피검체의 조직, 혈액, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 뇨, 대장 조직 또는 대변과 같은 시료 등을 포함하나 이에 제한되지 않으며, 상기 생물학적 시료는 환자의 병적 상태에 따라 선택될 수 있고 피검체에게 위해를 끼치지 않는 방법으로 얻어질 수 있다.

[0039] 본 발명에서 정상 대조군은 퇴행성 뇌질환이 발병하지 않은 인간을 포함하는 동물일 수 있고, 이러한 질환을 앓고 있지 않은 정상 대조군은 상기 질환을 나타내는 비교의 대상인 피검체에 대응된다. 구체적으로, 상기 정상 대조군은 파킨슨병을 앓고 있지 않은 피검체로서, 시험, 검사, 분석, 평가 등에 사용되는 상기 질환을 앓고 있지 않은 생물을 의미하며, 바람직하게는 파킨슨병을 앓고 있지 않은 인간, 마우스, 원숭이, 소, 말, 토끼, 개, 고양이, 양, 염소 등과 같은 포유동물일 수 있고, 더욱 바람직하게는 인간이다.

[0040] 본 발명은 hpmA 유전자를 포함하는 균주를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 동물모델을 제조하기 위한 조성물, 바람직하게는 파킨슨병 동물모델을 제조하기 위한 조성물을 제공한다.

[0041] 본 발명에서 사용되는 용어, "파킨슨병 동물모델"은 파킨슨 질환을 연구하기 위해 제작되는 파킨슨 질환 실험용 동물(인간은 제외)을 의미한다. 일반적으로, 파킨슨병 동물모델은 MPTP(1-methyl-4-phenyl-1,2,4,6-tetrahydropyridine), 6-OHDA(6-hydroxydopamine), 로테논(rotenone) 등을 설치류나 영장류 등과 같은 실험동물에 투여하여 제작된다.

[0042] 본 발명의 파킨슨병 동물모델의 제조를 위한 조성물의 균주는 *E. coli*일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.

[0043] 본 발명은 인간을 제외한 동물에 hpmA 유전자를 포함하는 균주를 투여하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환 동물모델 제조방법, 및 상기 제조방법으로 제조된 퇴행성 뇌질환 동물모델을 제공한다.

[0044] 상기 동물모델에서, 상기 동물은 인간을 제외한 마우스, 원숭이, 소, 말, 토끼, 개, 고양이, 양, 염소 등을 포함한다.

[0045] 본 발명은 치료제 후보약물을 투여하는 단계; 피검체의 생물학적 시료로부터 hpmA의 양을 측정하는 단계; 및 후보약물의 치료효과를 판단하는 단계를 포함하는, 퇴행성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0046] 상기 본 발명의 파킨슨병 치료제의 스크리닝 방법은 상기 후보약물을 투여하기 전 및 후의 hpmA의 양을 측정하여 비교하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0047] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료제 후보약물"은 공지된 화합물이거나 새롭게 합성된 화합물, 천연물, 생물학적 제제, 줄기세포 등을 포함하고, 파킨슨병의 예방 또는 치료에 효과가 있거나 효과를 나타낼 것으로 기대되는 물질을 제한 없이 포함하며, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

발명의 효과

[0049] 본 발명에서 hpmA이 운동능력 및 도파민신경세포 변화와 직접적으로 관련이 있는 것을 실험으로 확인하여, 본 발명의 hpmA를 포함하는 조성물은 파킨슨병, 뇌신경염 또는 알츠하이머병 질환 등의 퇴행성 뇌질환을 진단하는 데 사용할 수 있다.

[0050] 또한, 피검체의 생물학적 시료로부터 hpmA의 양을 측정하여, 이를 정상 대조군의 hpmA의 양과 비교하여 퇴행성

뇌질환을 매우 간단하고 신속한 방법으로 진단할 수 있다.

[0051] 또한, 본 발명의 hpmA를 포함하는 균주를 유효성분으로 포함하는 조성물을인간을 제외한 동물에 투여하여 파킨슨병 동물모델을 제조하고, 이를 이용하여 파킨슨병 치료제의 스크리닝 방법 등에 유용하게 사용할 수 있다.

[0052] 따라서 기존의 파킨슨병 질환의 진단방법과 비교하여, 신속하게 파킨슨병 등의 질환을 조기에 진단하여, 파킨슨병 환자의 질환 개선에 도움을 줄 수 있고, 파킨슨병 치료제의 스크리닝에 활용하여 우수한 효과를 갖는 신약의 개발에 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0054] 도 1은 정상군, EC 균주 투여군, HpmA EC 균주 투여군, PM 균주 투여군에서 분변 내 HpmA 함량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 정상군, EC 균주 투여군, HpmA EC 균주 투여군, PM 균주 투여군에서 행동 장애 유발 여부를 확인하기 위한 자발적 운동 활동을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 정상군, EC 균주 투여군, HpmA EC 균주 투여군, PM 균주 투여군에서 도파민신경세포 변화를 확인하기 위하여 선조체 (ST)에서 TH 발현양 (Optical density)을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 정상군, EC 균주 투여군, HpmA EC 균주 투여군, PM 균주 투여군에서 신경염증 유도를 확인하기 위하여 흑색질 (SNpc)에서 신경 아교 세포 (Iba-1 positive cells)를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 정상군, PM 균주 투여군, HpmA-/- PM 균주 투여군에서 행동 장애 유발 여부를 확인하기 위한 자발적 운동 활동을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 정상군, PM 균주 투여군, HpmA-/- PM 균주 투여군에서 도파민신경세포 변화를 확인하기 위하여 선조체 (ST)에서 TH 발현양 (Optical density)을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 정상군, PM 균주 투여군, HpmA-/- PM 균주 투여군에서 신경염증 유도를 확인하기 위하여 흑색질 (SNpc)에서 신경 아교 세포 (Iba-1 positive cells)를 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 정상군, PM 균주 투여군, HpmA-/- PM 균주 투여군에서 뇌내 단백질 이상 과응집 유도 여부를 확인하기 위하여 흑색질 (SNpc)에서 α-synuclein 응집체 (α-syn filaments)의 양을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 9는 정상군과 MPTP/p 투여군에서 분변 내 HpmA 함량을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0055] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본원의 실시태양 및 실시예를 상세히 설명한다. 그러나 본원은 여러 가지 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시태양 및 실시예에 한정되지 않는다.

[0056] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0057] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 하기의 실시예는 단지 설명의 목적을 위한 것이며 본원 발명의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다.

[0059] **[실시예 1]**

[0060] **HpmA EC 균주 제작**

[0062] HpmA의 active form으로 알려져 있는 HpmA265 sequence를 genomic DNA 형태로 취득하여 pGEM-T vector에 삽입하여 transformation을 통해 배양하였다. 이후 pGEM-T vector에서 HpmA gene을 추출한 후 제한효소를 이용하여 pET24a vector에 결찰 후 *Escherichia coli* (strain BL21(DE3))에 삽입하여 배양하였다. 이 때, 제조된 균주의 solubility 개선을 위해 ubiquitin을 추가하여 HpmA의 발현을 확인한 후 발현 균주를 사용하였다.

[0064] **실험 그룹**

[0065] 하기 표 1에 나타낸 바와 같이, PBS, *E.coli*, 제조된 HpmA gene cloned E.coli, 및 프로테우스 미라빌리스를 각각 마우스에 1일 1회 5일간 경구투여하여 총 4개군에 대하여 실험을 수행하였다.

표 1

[0066]

	Group	투여방법
1	Normal	PBS 투여
2	WT EC	E. coli 균주 (EC) 투여
3	HpmA EC	HpmA EC 균주 투여
4	WT PM	프로테우스 미라빌리스 균주 (PM) 투여

[0067] **[실시예 2]**

[0068] **HpmA 발현양 측정 실험**

[0070] 상기 실시예 1의 4개군의 마우스 분변에서 추출한 DNA와 HpmA sequence로 제조된 프라이머를 이용하여 실시간중합효소연쇄반응 (real time-qPCR)을 통해 HpmA 발현양을 측정하는 실험을 수행하여 그 결과를 하기 표 2 및 도 1에 나타내었다. 해당 결과는 16S 대비로 산정하여 대조군과 비교한 것이다.

표 2

[0071]

	Group	발현양 (%)
1	Normal	100±24.11
2	WT EC	97.59±14.38
3	HpmA EC	197.40±29.69
4	WT PM	258.39±104.09

[0072] 상기 표 2 및 도 1에 나타낸 바와 같이, EC 균주 투여군은 대조군과 유사한 반면, HpmA EC 균주 투여군 및 PM 균주 투여군은 HpmA 발현양이 각각 2배 및 2.5배로 증가한 것을 확인하였다.

[0074] **[실시예 3]**

[0075] **행동 평가: 자발적 운동 활동 측정 실험 (Locomotor activity test)**

[0077] 마우스의 운동장애 평가를 자발적 운동 활동 측정 실험 (Locomotor activity test)을 통해 수행하였다. 상기 실시예 1의 4개군의 마우스를 40X25X18 cm 박스 내부에 두고 25분 동안 움직임을 추적하여 총 움직인 거리 (Total length)를 계측함으로서 운동 장애 여부를 평가하여, 그 결과를 하기 표 3 및 도 2에 나타내었다.

표 3

[0078]

	Group	움직인 거리 (%)
1	Normal	100±3.43
2	WT EC	94.14±2.12
3	HpmA EC	87.71±1.92
4	WT PM	88.28±2.59

[0079] 상기 표 3 및 도 2에 나타낸 바와 같이, EC 균주 투여군은 대조군과 유사한 반면, HpmA EC 균주 투여군 및 PM 균주 투여군은 움직인 거리가 감소한 것을 확인하였다. 따라서, HpmA가 운동능력에 부정적인 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

[0081] **[실시예 4]**

[0082] **조직분석: 뇌 선조체에서 도파민 신경세포 변화 확인**

[0084] 실시예 1의 4개군의 마우스를 대상으로, 선조체 (ST) 부위에서의 TH 발현양 (Optical density of TH)을 면역화학염색을 통해 발색된 부위의 색의 밝기 정도로 측정하여, 그 결과를 하기 표 4 및 도 3에 나타내었다.

표 4

[0085]

	Group	TH 발현양 (%)
1	Normal	100±7.98
2	WT EC	97.74±7.97
3	HpmA EC	82.17±5.58
4	WT PM	65.22±5.97

[0086] 상기 표 4 및 도 3에 나타낸 바와 같이, EC 균주 투여군은 대조군과 유사한 반면, HpmA EC 균주 투여군 및 PM 균주 투여군은 TH 발현양이 감소한 것을 확인하였다. 따라서, HpmA가 뇌 내 도파민 신경세포 사멸을 유도함을 알 수 있다.

[0088] **[실시예 5]**

[0089] **조직분석: 뇌 흑색질에서 신경 염증 유도 여부 확인**

[0091] 흑색질 치밀부(SNpc) 부위에서 신경 염증 유도 여부를 확인하기 위하여, TH 양성 세포 (TH-positive cells)의 염색을 통해 부위를 규정하여, 신경 아교 세포 (Iba-1 positive cells)를 측정한 후, 조직의 두께를 고려하여 부피 대비로 계측하였다.

표 5

[0093]

	Group	신경 아교 세포 (%)
1	Normal	100±17.70
2	WT EC	152.29±17.54
3	HpmA EC	194.64±24.81
4	WT PM	196.88±34.10

[0094] 표 5 및 도 4에 나타낸 바와 같이, HpmA EC 균주 투여군 및 PM 균주 투여군은 대조군과 비교하여 신경 아교 세포의 수가 2배로 증가한 것을 확인하였다. 따라서, HpmA가 뇌 신경 염증을 유도하는 것을 알 수 있다.

[0096] **[실시예 6]**

[0097] **HpmA-/- PM 균주 제작**

[0099] HpmA-/- PM 균주는 TargeTron mutagenesis kit를 사용하여 제작하였다. TargeTron mutagenesis kit에 사용되는 pBR3220 기반 vector를 포함한 plasmid pAR1219는 특정 위치의 유전자의 전사를 억제하여 해당 단백질 발현을 저해시키는 특징을 갖는다. Plasmid에 삽입된 특정 항생제에 대한 내성을 유도하여 변이 균주를 선택적으로 배양하여 실험에 사용하였다.

[0101] **실험 그룹**

[0102] PBS, WT PM 균주, HpmA-/- PM 균주를 각각 마우스에 1일 1회 5일간 경구투여하여, 운동 능력, 뇌 흑색질에서 도파민 신경세포, 신경 아교 세포, 및 뇌 흑색질 내 α-synuclein 응집체 변화를 실험하였다.

표 6

[0103]

	Group	투여방법
1	Normal	PBS 투여
2	WT PM	프로테우스 미라빌리스 균주 (PM) 투여
3	hpmA-/- PM	hpmA 돌연변이 균주 (hpmA-/-) 투여

[0104] **[실시예 7]**

[0105] **행동 평가: 자발적 운동 활동 측정 실험 (Locomotor activity test)**

[0107] 마우스의 운동장애 평가를 자발적 운동 활동 측정 실험 (Locomotor activity test)을 통해 수행하였다. 실시예 6의 3개군의 마우스를 40X25X18 cm 박스 내부에 두고 25분동안 움직임을 추적하여 총 움직인 거리 (Total length)를 계측함으로서 운동 장애 여부를 평가하여, 그 결과를 하기 표 7 및 도 5에 나타내었다.

표 7

[0108]

	Group	움직인 거리 (%)
1	Normal	100±5.94
2	WT PM	79.32±2.44
3	hpmA-/- PM	111.65±5.04

[0109] 상기 표 7 및 도 5에 나타낸 바와 같이, PM 균주 투여군은 대조군과 비교하여 움직인 거리가 감소하였으나, hpmA-/- PM 균주 투여군은 대조군과 비교하여 움직인 거리가 유사한 것을 확인하였다. 따라서, HpmA가 운동능력에 부정적인 영향을 미치는 것을 알 수 있다.

[0111] **[실시예 8]**

[0112] **조직분석: 뇌 선조체에서 도파민 신경세포 변화 확인**

[0114] 선조체 (ST) 부위에서의 TH 발현양 (Optical density of TH)을 면역화학염색을 통해 발색된 부위의 색의 밝기 정도로 측정하여 그 결과를 하기 표 8 및 도 6에 나타내었다.

표 8

[0115]

	Group	TH 발현양 (%)
1	Normal	100±1.60
2	WT PM	75.97±4.51
3	hpmA-/- PM	92.29±3.23

[0116] 상기 표 8 및 도 6에 나타낸 바와 같이, PM 균주 투여군은 대조군과 비교하여 TH 발연양이 감소하였으나, hpmA-/- PM 균주 투여군은 대조군과 비교하여 TH 발현양이 유사한 것을 확인하였다. 따라서, HpmA가 균주 유도 뇌 내 도파민 신경세포 사멸에 영향을 미치는 요인인 것을 알 수 있다.

[0118] **[실시예 9]**

[0119] **조직분석: 뇌 흑색질에서 신경 염증 유도 여부 확인**

[0121] 흑색질 치밀부(SNpc) 부위에서 신경 염증 유도 여부를 확인하기 위하여, TH 양성 세포 (TH-positive cells)의 염색을 통해 부위를 규정하여, 신경 아교 세포 (Iba-1 positive cells)를 측정한 후, 조직의 두께를 고려하여 부피 대비로 계측하였다. 도 7에 나타낸 바와 같이,

표 9

[0122]

	Group	신경 아교 세포 (%)
1	Normal	100±17.02
2	WT PM	222.15±20.90
3	hpmA-/- PM	121.54±23.87 %

[0123] 표 9 및 도 7에 나타낸 바와 같이, PM 균주 투여군은 대조군과 비교하여 신경 아교 세포가 증가하였으나, hpmA-/- PM 균주 투여군은 대조군과 비교하여 신경 아교 세포 발현양이 유사한 것을 확인하였다. 따라서, HpmA가 균주 유도 뇌 신경염증에 영향을 미치는 요인인 것을 알 수 있다.

[0125] **[실시예 10]**

[0126] **조직분석: 뇌 흑색질에서 α-synuclein 응집 유도 여부 확인**

[0127] 흑색질 치밀부(SNpc) 부위에서 α-synuclein 응집 유도 여부를 확인하기 위하여, TH 양성 세포 (TH-positive cells)의 염색을 통해 부위를 규정하여, 응집된 α-synuclein (α-synuclein filaments)를 측정한 후, 조직의 두께를 고려하여 부피 대비로 계측하였다.

표 10

[0128]

	Group	응집된 α-synuclein (%)
1	Normal	100±8.83
2	WT PM	388.23±35.38
3	hpmA-/- PM	127.92±13.89

[0129] 표 10 및 도 8에 나타낸 바와 같이, PM 균주 투여군은 대조군과 비교하여 응집된 α-synuclein이 3배 이상 증가하였으나, hpmA-/- PM 균주 투여군은 대조군과 비교하여 응집된 α-synuclein이 유사한 것을 확인하였다. 따라서, HpmA가 균주 유도 뇌 내 α-synuclein 응집에 영향을 미치는 요인인 것을 알 수 있다.

[0131] **[실시예 11]**

[0132] **MPTP/p 유도 파킨슨병 조기 단계 마우스 모델 제조**

[0134] 파킨슨병 조기 단계 모델을 제작하기 위해 마우스에 주 2회 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydro-pyridine hydrochloride (MPTP)와 probenecid (MPTP/p)를 각각 3회 투여하였다. 해당 마우스는 운동 장애를 나타내지 않으나, 비운동성증상 (변비, 후각장애, 우울 등)을 나타내어, 파킨슨병 조기 단계의 동물 모델로 이용되고 있다.

[0136] **[실시예 12]**

[0137] **HpmA 발현양 측정**

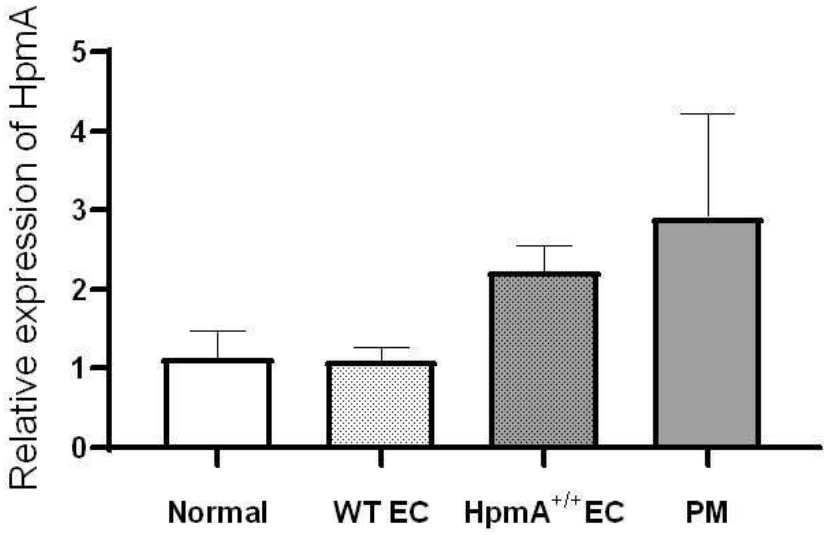
[0139] 상기 실시예 11의 마우스 분변에서 추출한 DNA와 HpmA sequence로 제조된 프라이머를 이용하여 실시간중합효소

연쇄반응(real time-qPCR)을 통해 HpmA 발현양을 측정하는 실험을 수행하여 그 결과를 도 9에 나타내었다. 해당 결과는 16S 대비로 산정하여 대조군과 비교하였다.

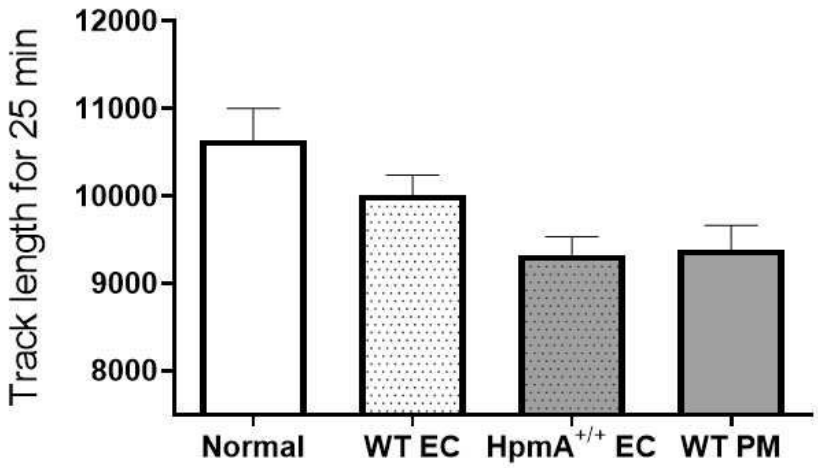
[0140] 도 9에 나타낸 바와 같이, MPTP/p 유도 파킨슨병 마우스 분변 내 HpmA 발현양은 대조군(100±61.78 %)과 비교하여 3배 이상(312.14±95.84 %)인 것으로 확인되었다. 따라서, HpmA가 파킨슨병과 직접적인 관련성을 갖는 것을 알 수 있다.

도면

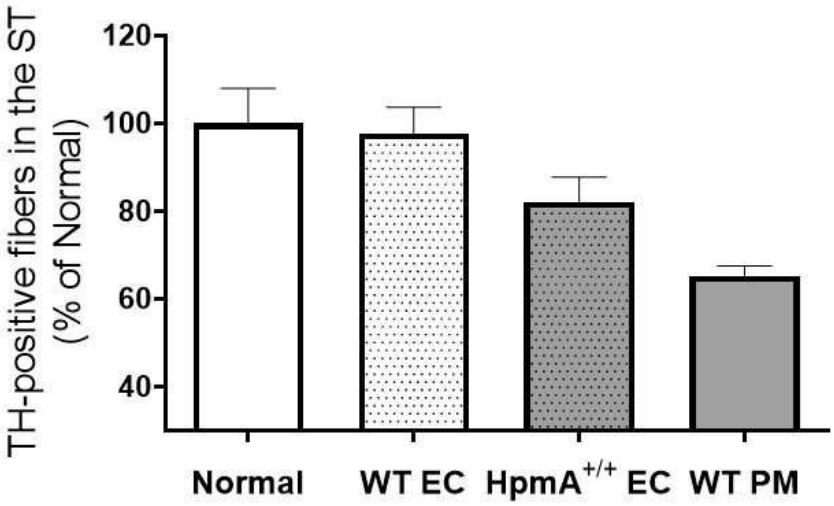
도면1



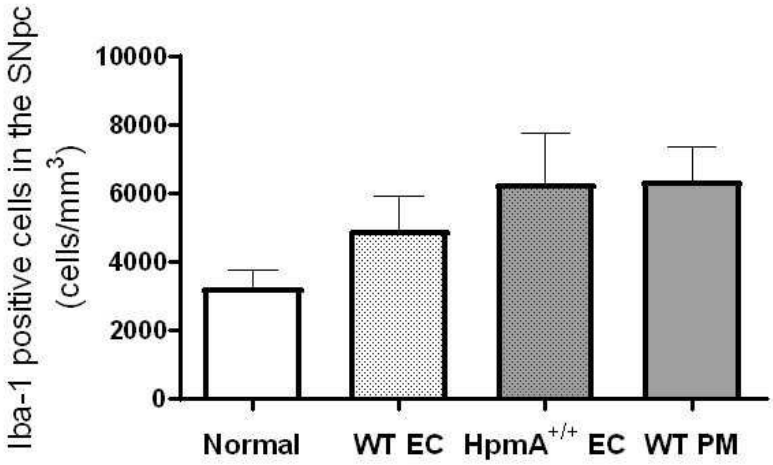
도면2


Track length for 25 min
12000
11000
10000
9000
8000
Normal
WT EC
HpmA+/+ EC
WT PM

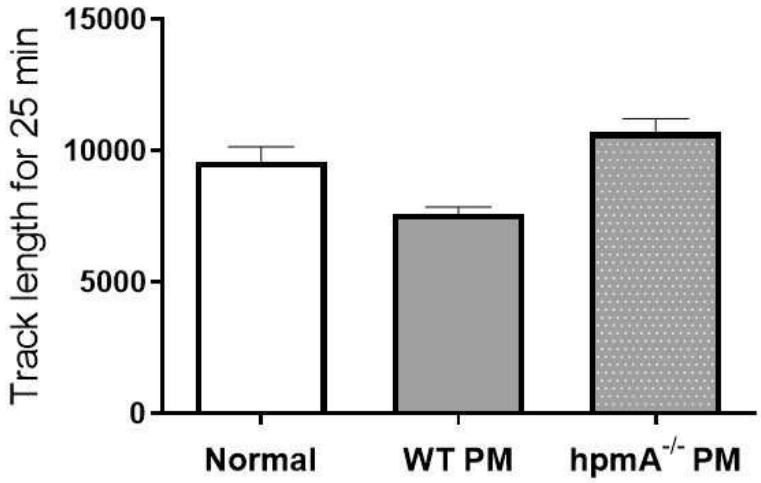
도면3


TH-positive fibers in the ST
(% of Normal)
120
100
80
60
40
Normal
WT EC
HpmA+/+ EC
WT PM

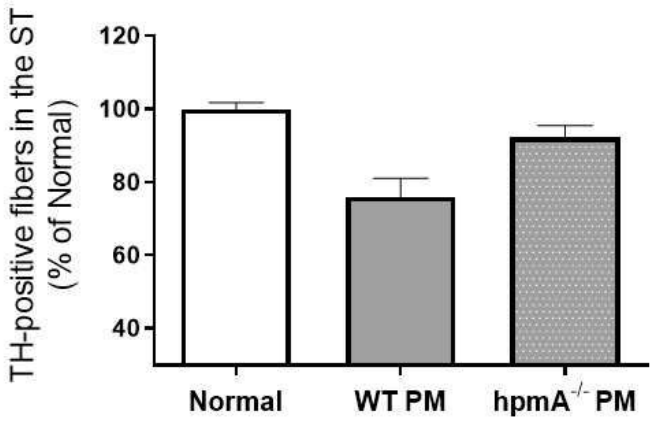
도면4


Iba-1 positive cells in the SNpc
(cells/mm3)
10000
8000
6000
4000
2000
0
Normal
WT EC
HpmA+/+ EC
WT PM

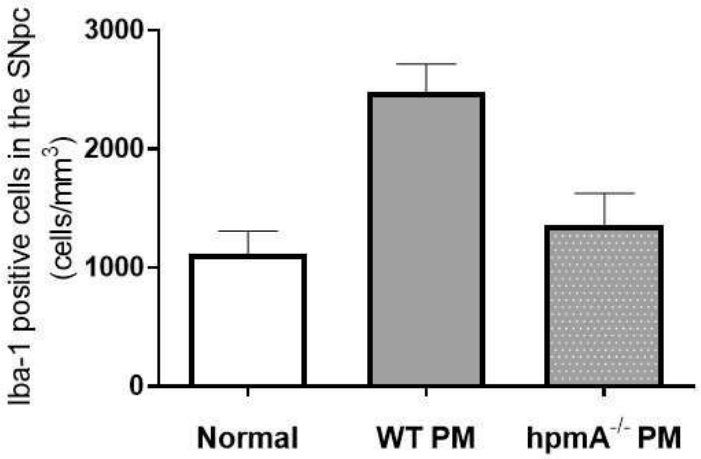
도면5


Track length for 25 min
15000
10000
5000
0
Normal
WT PM
hpmA-/- PM

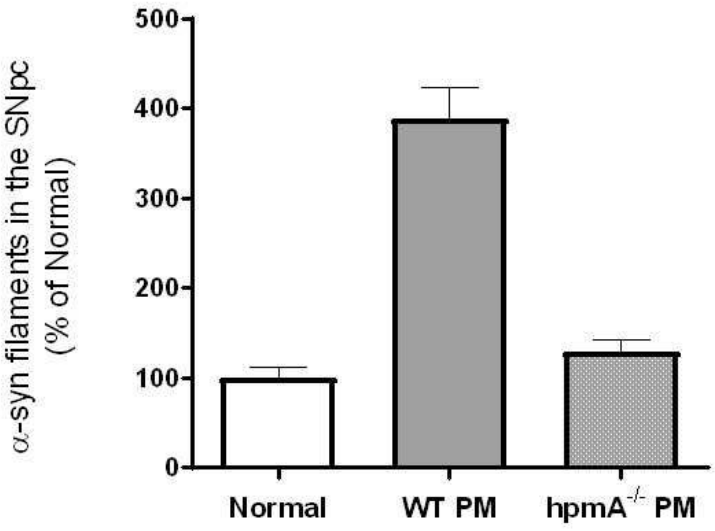
도면6


TH-positive fibers in the ST
(% of Normal)
120
100
80
60
40
Normal
WT PM
hpmA-/- PM

도면7


Iba-1 positive cells in the SNpc
(cells/mm3)
3000
2000
1000
0
Normal
WT PM
hpmA-/- PM

도면8


α-syn filaments in the SNpc
(% of Normal)
500
400
300
200
100
0
Normal
WT PM
hpmA-/- PM

도면9

