(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0127089
(43) 공개일자 2017년11월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
G06F 19/18 (2011.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0056912
(22) 출원일자 2016년05월10일
심사청구일자 2016년05월10일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
송우근
광주광역시 북구 첨단과기로 123 E동 701호 (오룡동,광주과학기술원)
이건호
광주광역시 남구 노대실로 33, 510동 301호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이종승

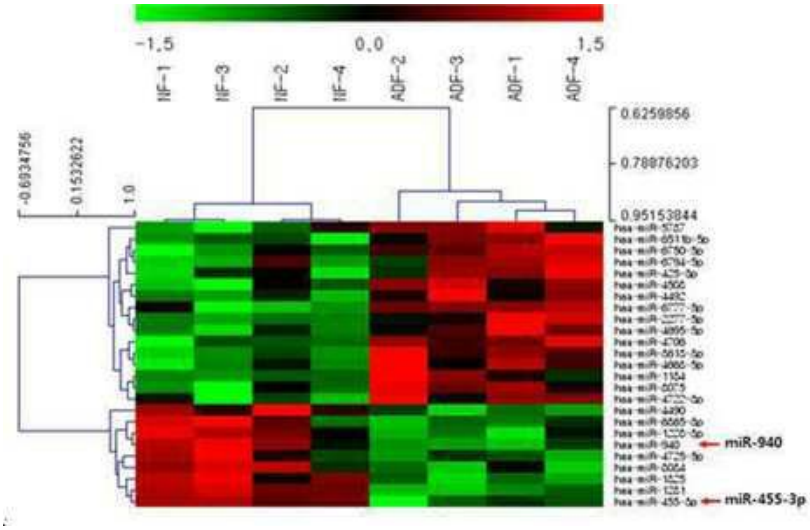
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **알츠하이머 질병의 진단을 위한 바이오마커**

(57) 요 약

본 발명은 알츠하이머성 치매를 진단하기 위한 신규한 바이오마커를 제공하는 것에 관한 것이다. 본 발명에 따른 miRNA 바이오마커를 이용하여 비침습적이고 간편하며 특이도와 민감도가 높은 진단방법을 제공할 할 수 있다. 이와 같이, 본 발명은 정확한 알츠하이머성 치매 진단을 가능하게 하며, 알츠하이머성 치매 치료제를 개발하는 타겟을 제공할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
G06F 19/18 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/156 (2013.01)
C12Q 2600/178 (2013.01)
(72) 발명자
이정훈
전라남도 영광군 대마면 고성산길2길 23-89 (성산리)
김소희
광주 북구 첨단과기로 123 광주과학기술원 대학원 생활관 6408호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014M3C7A1046041
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 조선대학교 산학협력단
연구사업명 뇌과학원천기술개발사업
연구과제명 MRI 기반 알츠하이머성 치매 특이 뇌 손상 규명 및 뇌지도 구축
기 여 율 1/2
주관기관 조선대학교
연구기간 2014.07.01 ~ 2019.06.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 NRF-2014N3C7A104
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 조선대학교 산학협력단
연구사업명 뇌과학원천기술개발사업
연구과제명 치매 조기예측을 위한 빅데이터 분석 융합기술 및 의료서비스 플랫폼 개발
기 여 율 1/2
주관기관 조선대학교
연구기간 2014.07.01 ~ 2019.06.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

i) 피험자로부터 분리된 miRNA를 함유하는 시료에서 miR-455-3p, miR-940 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 miRNA의 수준을 결정하고,

ii) 정상 대조군과 비교하여 하나 이상의 상기 miRNA 수준이 감소된 것으로 확인되면, 피험자가 알츠하이머 질병이 있는 것으로 판단하는, 생체외에서 알츠하이머 질병을 진단하는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,

하나 이상의 상기 miRNA 수준의 차이는 소프트웨어 분류화 알고리즘을 실행하여 결정되는, 생체외에서 알츠하이머 질병을 진단하는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 시료는 혈액, 림프, 소변 및 타액으로 구성된 군으로부터 선택되는, 생체외에서 알츠하이머 질병을 진단하는 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 시료는 무세포 (cell free) 시료, 혈청 또는 혈장인, 생체외에서 알츠하이머 질병을 진단하는 방법.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서,

인지심리검사, 뇌척수액검사, 혈액검사, 유전적표지, 및 뇌영상촬영으로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 검사를 추가로 수행하는 것을 포함하는, 생체외에서 알츠하이머 질병을 진단하는 방법.

청구항 6

i) 피험자로부터 분리된 miRNA를 함유하는 제 1 시료에서 miR-455-3p, miR-940 및 이들의 조합들로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 miRNA의 수준을 결정하고;

ii) 상기 miRNA를 함유하고 피험자로부터 분리된 제 2 시료에서 하나 이상의 상기 miRNA의 수준을 결정하는 것으로서, 상기 제 2 시료는 상기 제 1 시료 이후에 수득하며; 및

iii) 상기 i) 및 ii)에서 결정된 상기 miRNA 수준을 비교하는 것을 포함하여,

생체외에서 알츠하이머 질병의 진행을 모니터링하는 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 하나 이상의 상기 miRNA의 수준 차이가 검출되는 경우,

i) 피험자에게 알츠하이머 치료제 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 에스테르를 포함하는 약학 조성물의 치료적 유효량을 투여하고,

ii) 상기 약학 조성물 투여 후 피험자로부터 분리되고 miRNA를 함유하는 제 3 시료에서 miR-455-3p, miR-940 및 이들의 조합들로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 상기 miRNA의 수준을 결정하며; 및

iii) 상기 ii)에서 결정된 miRNA 수준을 상기 제 2시료 또는 제 1시료, 또는 둘 모두에서의 miRNA 수준과 비교

하는 것을 추가로 포함하여,

생체외에서 알츠하이머 질병의 진행을 모니터링하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 알츠하이머 치료제는 갈란타민, 리바스티그민 및 도네페질로 구성된 군으로부터 선택되는, 생체외에서 알츠하이머 질병의 진행을 모니터링하는 방법.

청구항 9

피험자에서 알츠하이머 질병을 진단하기 위한 키트로서,

(i) 피험자로부터 분리된 miRNA를 함유하는 시료에서 하나 이상의 miRNA를 선택적으로 검출하는 제제로서, 하나 이상의 상기 miRNA는 miR-455-3p, miR-940 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는, 제제; 및

(ii) 대조군과 비교하여 하나 이상의 상기 miRNA의 수준의 차이가 피험자가 알츠하이머 질병이 있음을 제시하는 지침:

을 포함하는, 생체외에서 알츠하이머 질병을 진단하기 위한 키트.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 제제는 하나 이상의 상기 miRNA와 특이적으로 혼성화되는 것인, 생체외에서 알츠하이머 질병을 진단하기 위한키트.

청구항 11

제 9항에 있어서, 상기 시료는 혈액, 림프, 소변 및 타액으로 구성된 군으로부터 선택되는, 생체외에서 알츠하이머 질병을 진단하기 위한 키트.

청구항 12

제 9항에 있어서, 상기 시료는 무세포 시료, 혈청 또는 혈장인 것인, 생체외에서 알츠하이머 질병을 진단하기 위한 키트.

청구항 13

miR-455-3p, miR-940 또는 둘 모두의 발현을 억제하는 것을 확인하여, 알츠하이머 질병을 치료하기 위한 약물을 스크리닝 하는 방법.

청구항 14

miR-455-3p, miR-940 또는 둘 모두의 발현의 억제하는 것으로서, siRNA, 앱타머(aptamer), 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 리보자임으로 구성된 군에서 선택된 것을 포함하는, 알츠하이머 질병의 예방 또는 치료를 위한 약학 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 알츠하이머성 치매를 진단하기 위한 신규한 바이오마커에 관한 것이다. 또한 본 발명은 알츠하이머성 치매를 치료하기 위한 약물을 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 알츠하이머 질병과 같은 신경퇴행성 질병은 신경축색 손상, 세포사멸 및 신경교증 (gliosis)를 포함하는, 신경퇴행으로 이어지는 만성적 진행 과정을 포함한다. 신경퇴행성 질병의 발병 및 병태생리는 매우 복잡하여 일부분만이 알려져 있다. 나이는 신경퇴행성 질병의 병태생리에서 중요한 역할을 하는 통상의 위험인자이다. 또한, 흥분독성 (excitotoxicity), 산화적 스트레스, 단백질 응집, 염증 및 세포사멸이 신경퇴행성 질병의 진행

에서 중요한 역할을 하는 병리학적 사건이라는 보고가 있다. 알츠하이머 질병의 신경병리학은 아밀로이드 플라크, 신경원섬유 매듭, 시냅스 소실 및 선택적 신경원성 세포사멸 등을 특징으로 한다. 신경원섬유 매듭은 세포 내 과인산화된 타우 (tau) 단백질의 존재와 연관된다. 알츠하이머 질병의 임상적 특징은 전형적으로 먼저 기억력 저하가 나타나고, 다른 인지 기능들에서 퇴화 및 비정상적 행동이 후속한다. 전세계적으로 약 2,400만명의 치매 환자가 있으며, 이들 중 약 60% 이상이 알츠하이머병에 기인한다 (Ferri C.P. et al. (2005) Lancet 366(9503): 2112-2117).

[0003] 현재 이용되고 있는 알츠하이머성 치매 검진기술로는 인지심리검사, 뇌척수액검사, 혈액검사, 유전적표지, 및 뇌영상촬영 등이 있다. 인지심리검사는 간이정신상태검사 (MMSE), 몬트리올 인지검사 (MoCA), 및 후각인지도검사 (UPSIT) 등이 치매 검사법으로 활용되고 있으며, 국내에서는 SNSB (Seoul Neuropsychological Screening Battery)가 널리 활용되고 있다. 뇌척수액 검사는 알츠하이머성 치매의 대표적 특이 물질인 베타-아밀로이드 (β-Amyloid) 또는 타우 (tau) 단백질의 뇌척수액 내 정량을 통한 진단을 수행하며, 최근 뇌척수액 내 miRNA (microRNA)의 변화를 측정하여 바이오마커로 사용하고자 하는 연구가 진행되고 있다. 혈액검사는 베타-아밀로이드가 "LRP1"이라는 단백질을 통해 뇌에서 혈액으로 이동한다는 사실에 착안하여, 베타-아밀로이드의 혈액 내 농도를 검사하는 방식으로 치매를 진단하는 방법이다. 유전적 표지를 이용한 진단방법의 경우, 아포리포프로틴 (oprotein) E4 (ApoE4) 대립유전자 (allele)의 유무 등 차세대 유전자서열분석기술 (NGS)을 이용한 인간 유전체 전체변이분석 (GWAS)을 통해 치매 특이적 변이들에 대한 연구 및 보고가 잇따르고 있으며, 이를 통한 치매발병 위험도 분석을 수행한다. PET/MRI 뇌영상 촬영은 MRI 영상을 통해 대뇌피질, 해마 위축 등 치매와 동반되는 뇌 손상 진단을 수행한다. 그러나, 신경심리검사 및 후각인지도검사는 신체적, 심리적, 인종학적 영향 등 주관성이 개입되기 때문에 정량화하기 어려운 단점이 있으며, 이는 장시간 검사 및 비용문제 등으로 범용적 적용이 어렵다. 또한, 초기 치매에서는 증상이 나타나지 않는 경우가 많아서 인지기능 검사만으로 치매를 예단하기 어렵다. 뇌척수액검사의 경우, 검사를 위한 척수천자시 수반되는 통증으로 인해 거부감이 크다. MRI/PET 뇌영상 촬영을 이용한 알츠하이머 진단은 병이 상당히 진행된 후에 비로소 분석이 가능하기 때문에 조기진단에 어려움이 있으며, 고비용이다.

[0004] 이에 따라, 종래 알츠하이머 질병 진단방법의 민감도와 특이도를 향상시키기 위한 추가적인 연구가 필요한 실정이다. 환자의 고통 및 거부감을 최소화 할 수 있도록, 혈액기반 miRNA 등 혈액검사만으로도 치매 진단이 가능한 바이오마커를 개발하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있으나, 환자 개인별 유전적, 생활습관 등의 차이 또는 실험기법, 분석기법 등의 차이로 인해 결과의 일관성이 부족하다. 현재 국내에서 시행되고 있는 치매진단은 대부분 외국에서 개발된 진단 기법을 활용하고 있으나, 서양인과 한국인의 치매 유발 유전적변이 및 뇌구조가 매우 다른 양상을 보인다는 보고가 있다. 그럼에도 불구하고, 한국인을 대상으로 한 데이터의 부족, 개인별 다양한 유전체변이에 대한 분석기술 미비 등으로 인해, 한국인에게 유의성 있는 적용 가능한 지표를 개발하지 못하고 있다. 혈액 내 베타-아밀로이드 측정법의 단점은 혈액 속 베타아밀로이드 농도가 매우 낮기 때문에 기존 병원에서 쓰고 있는 혈액분석장비로는 정확한 측정이 어렵다는 점이다. 미량의 베타-아밀로이드 정밀하게 분석할 수 있는 기술 개발이 필요성이 제기되고 있다. 알츠하이머 질병 진단의 확실성은 바이오마커 (biomarker)에 의해, 즉 충분한 특이성 및 감수성을 갖고 측정이 용이한 생물학적 변형체 (biological changes)에 의해서 보장될 수 있는 것으로 여겨지고 있다.

[0005] miRNA는 약 22개의 뉴클레오타이드로 구성된 작은 비발현 RNA 분자로, RNA 침묵과 전사이후의 유전자 발현조절 등의 기능을 하는 유전물질이다 (Ambros el al., *Nature*, 2004). miRNA는 혈액 등 여러 가지 체액에 존재하며, 소포체 등에 둘러싸여 있어 안정한 상태로 존재하는 것으로 알려져 있다 (Turchinovich et al., *Trends in biochemical science*, 2012). 이에 따라 혈액 내 존재하는 miRNA의 변화를 분석하여 질병의 바이오마커로 사용하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다 (Dorval et al., *Front. Mol. Neurosci.*, 2013). 본 발명자들은 miRNA의 혈액 내 발현패턴이상 또는 기능이상은 알츠하이머성 치매의 후성유전학적 요인으로서 작용할 것으로 예측하였으며, 치매 특이 miRNA는 유전정보를 활용한 획기적인 치매 진단 바이오마커가 될 것으로 기대하였다. 효과적이고 정확한 치매 조기예측을 위해 종래 치매진단법의 거부감을 낮출 수 있도록, 유의성 있는 miRNA 치매 바이오마커를 소형화된 슬라이드 위에 집적시켜 한 방울의 혈액만으로도 신속하고 용이하게 분석이 가능한 바이오칩 진단키트를 개발하고자 하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 피험자에서 알츠하이머 질병을 정확하게 진단하는 데 사용될 수 있는 신규한 바이오마커를 제공하는

것을 목적으로 한다. 본 발명은 피험자로부터 분리된 miRNA를 포함하는 시료에서 하나 이상의 상기 miRNA의 수준을 결정하여 피험자가 알츠하이머 질병을 갖고 있는지 여부를 진단한다. 본 발명에서 하나 이상의 miRNA는 miR-455-3p, miR-940 및 이들로 구성된 군으로부터 선택되고, 정상인과 비교하여 상기 하나 이상의 miRNA의 수준에서 발견되는 차이는, 피험자가 알츠하이머 질병에 걸려 있음을 나타낸다.

[0007] 또한, 본 발명은 피험자의 알츠하이머질병을 모니터링하는 방법을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 피험자의 알츠하이머 질병 유무를 진단하기 위한 키트를 제공한다.

[0009] 본 발명은 또한 알츠하이머 질병 치료제를 스크리닝 하는 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한 알츠하이머 질병을 치료하기 위한 약학 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위해 본 발명은, 신규한 miRNA 바이오마커들을 제공한다. 이들 바이오마커들은 miR-455-3p 및 miR-940를 포함한다.

[0012] 일 구현예에서, 본 발명은 혈액, 혈장, 혈청, 소변, 또는 타액을 포함하는 생체외로 분리된 시료로부터 miRNA 수준을 결정하는 것을 포함한다. 본 발명에서 상기 miRNA 수준의 결정은 공지된 임의의 방법, 예를 들어, 상기 miRNA와 특이적으로 혼성화하는 시약을 이용하는 혼성화 방법, 정량 PCR 및/또는 서열결정방법으로 수행될 수 있다.

[0013] 다른 일구현예에서, 본 발명의 방법은 피험자로부터 분리한 시료 내 상기 하나 이상의 miRNA의 수준이 정상인과 비교하여 감소된 것이 확인되는 경우, 피험자가 알츠하이머 질병을 갖는 것으로 판단한다. 구체적으로, i) 피험자로부터 분리된 miRNA를 함유하는 시료에서 miR-455-3p, miR-940 및 이들의 조합들로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 miRNA의 수준을 결정하고, ii) 정상 대조군과 비교하여 하나 이상의 상기 miRNA 수준이 감소된 것으로 확인되면, 피험자가 알츠하이머 질병이 있는 것으로 판단한다. 상기 시료는 혈액, 림프, 소변 및 타액으로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 무세포 (cell free) 시료, 혈청 또는 혈장일 수 있다. 하나 이상의 상기 miRNA 수준의 차이는 소프트웨어 분류화 알고리즘을 실행하여 결정될 수 있다.

[0014] 본 발명의 다른 일구현예는 알츠하이머 질병의 진단을 보다 더 정확하게 진단 하기 위해, 하나 이상의 추가적인 검사를 수행하는 것을 포함한다. 상기 추가적인 검사는 예를 들어, 인지심리검사, 뇌척수액검사, 혈액검사, 유전적표지, 및 뇌영상촬영 등이 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0015] 본 발명의 다른 일구현예는 i) 피험자로부터 분리된 miRNA를 함유하는 제 1 시료에서 miR-455-3p, miR-940 및 이들의 조합들로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 miRNA의 수준을 결정하고; ii) 상기 miRNA를 함유하고 피험자로부터 분리된 제 2 시료에서 하나 이상의 상기 miRNA의 수준을 결정하는 것으로서, 상기 제 2 시료는 상기 제 1 시료 이후에 수득하며; 및 iii) 상기 i) 및 ii)에서 결정된 상기 miRNA 수준을 비교하는 것을 포함하여, 생체외에서 알츠하이머성 치매의 진행을 모니터링 한다. 상기 모니터링하는 방법은 miR-455-3p 또는 miR-940의 수준을 측정하는 것을 추가로 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명의 다른 일구현예는, 상기 모니터링하는 방법에서, 하나 이상의 상기 miRNA의 수준에서 차이가 검출되는 경우, 피험자에게 알츠하이머 치료제 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염 또는 에스테르를 포함하는 약학 조성물의 치료적 유효량을 투여하는 것을 추가로 포함하는, 생체외에서 알츠하이머 질병의 진행을 모니터링하는 방법을 제공한다. 상기 알츠하이머 치료제는 갈란타민, 리바스티그민 및 도네페질로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명의 또 다른 일구현예는, 피험자에서 알츠하이머 질병을 진단하기 위한 키트를 제공한다. 구체적으로, i) 피험자로부터 분리된 miRNA를 함유하는 시료에서 하나 이상의 miRNA를 선택적으로 검출하는 제제로서, 하나 이상의 상기 miRNA는 miR-455-3p, miR-940 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 제제; 및 ii) 대조군과 비교하여 하나 이상의 상기 miRNA의 수준의 차이가 있는 경우 피험자가 알츠하이머 질병이 있음을 제시하는 지침을 포함하는, 생체외에서 알츠하이머 질병을 진단하기 위한 키트가 제공된다. 상기 제제는 상기 miRNA와 특이적으로 혼성화되는 것일 수 있고, 상기 시료는 혈액, 림프, 소변 및 타액으로 이루어진 그룹으로부터 선택될 수 있으며, 무세포 시료, 혈청 또는 혈장일 수 있다.

[0018] 본 발명의 다른 일 구현예에서, miR-455-3p 또는 miR-940의 발현을 억제하는 것을 확인하여, 알츠하이머 질병을 치료하기 위한 약물을 스크리닝할 수 있다. 상기, miR-455-3p 또는 miR-940 발현의 억제제는, miRNA에 특이적

인 siRNA, 앱타머 (aptamer), 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 리보자임으로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

[0019] 본 발명의 다른 일구현예에서, miR-455-3p 또는 miR-940의 발현을 억제하여 알츠하이머 질병을 예방 또는 치료하는 방법이 제시된다.

[0020] 본 발명의 또 다른 일구현예에서, miR-455-3p 또는 miR-940의 발현을 억제하여 알츠하이머 질병을 예방 또는 치료하기 위한 약학 조성물이 제공하며, 상기 약학 조성물은 siRNA, 앱타머 (aptamer), 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 리보자임으로 구성된 군에서 선택될 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 생체외 분리된 생물시료 예를 들어, 혈장 내 miR-455-3p 및 miR-940의 정량을 통해 알츠하이머성 치매 진단을 수행함으로써, 기존 치매 진단법보다 간편하고, 정확도가 증가된 치매 진단방법을 제공할 수 있다. 또한, 본 발명은 miRNA를 매개로 한 알츠하이머성 치매의 발병 메커니즘 규명을 통해, miRNA를 타겟으로 하는 신규한 알츠하이머성 치매 치료제 개발에 이용될 수 있다. 본 발명은 치매의 정확한 조기 진단을 가능하게 할 수 있으며, 이러한 조기 진단은 치매의 발병 및 중증도를 감소시킨다. 본 발명에 따라 구축되는 치매 특이적 혈장 miRNA 데이터베이스는 척수액 (CSF) 내 단백질 정량, 단일염기다형성 (SNP) 등의 복합적인 바이오정보와 더불어 치매관련 빅데이터를 이용한 미래 진단기술의 발전에 기여할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 피험자로부터 수득한 시료에서 분석한 25개의 miRNA의 양이 정상인의 혈장에서보다 1.5배 이상 증가하거나 감소한 것을 나타낸 것이다 (표준오차, $p<0.05$).

도 2는 치매환자와 정상인의 혈장 내 miR-455-3p 및 miR-940 함량을 비교한 것이다.

도 3은 miR-455-3p 및 miR-940 처리 후 배양액으로 배출되는 아밀로이드베타42의 양을 대조군과 비교한 것이다.

도 4는 miR-455-3p 및 miR-940을 치매 모델 세포주에 도입하고, 세포 주에서 발현하는 아밀로이드베타42의 양을 관찰한 결과이다.

도 5는 miR-455-3p 및 miR-940을 세포주에 도입 한 후 BACE1의 양의 변화를 관찰한 것이다.

도 6은 miR-455-3p 및 miR-29a-3p 세포주에 도입 한 후 BACE1의 양의 변화를 관찰한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 본 발명의 구현예에 기초하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 하기 구현예는 본 발명을 설명하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위가 이에 제한되는 것이 아님은 물론이다.

[0024] **실시예**

[0025] **샘플채취**

[0026] 임상 전문의의 진단을 통해 정상인, 알츠하이머성 치매로 진단된 환자 (각각 남자 4명, 여자 12명)의 혈액 채취하고 원심분리하여 혈장을 분리하였다. (병원 : 조선대학교, 수행시기: 2014년 4월 20일 ~ 2015년 1월 27일, 환자 연령 : 70세~90세). 4명의 혈장샘플을 하나로 풀링 (pooling) 하여 정상인 4개 샘플 및 알츠하이머성 치매 4개 샘플을 준비하였다. Qiagen 사의 RNeasy mini kit를 사용하고 제조사의 지시에 따라 혈장으로부터 miRNA를 분리하였다.

[0027] **miRNA 변화분석 및 바이오마커 선별**

[0028] Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 Array를 이용하여 miRNA 발현 변화 분석을 수행하였다. 분석결과 25개의 miRNA가 정상인의 혈장에서보다 1.5배 이상 증가하거나 감소하는 것 (표준오차, $p<0.05$)을 확인하였다. 도 1은 그 결과를 나타낸다. 25개 miRNA 중에서 알츠하이머성 치매환자에서 가장 많이 감소하는 것으로서 miR-455-3p (서열번호: 1) 및 miR-940 (서열번호: 2)를 확인하였고, 이를 치매진단을 위한 바이오마커 및 치료 타겟으로 사용하였다. 알츠하이머성 치매환자의 혈장 내 miR-455-3p 함량은 정상인 혈장 내의 함량과 비교하여 log2 비율이 약 1.71배 감소하였고, miR-940 함량은 정상인 혈장 내 함량과 비교하여 log2 비율이 약 1.68배 감소하였다 (도 2). 따라서, 피험자의 혈액 내 miR-940 및 miR-455-3p 정량분석으로 통해 일부 알츠하이머성 치매환자의 진단이 가능할 것으로 예상되었다.

[0029] **알츠하이머성 치매 치료제로서의 가능성**

[0030] 아밀로이드베타42는 알츠하이머성 치매환자의 뇌에서 발현이 증가하여, 아밀로이드 플라크를 형성하여 뇌의 기능을 저하시켜 환자의 기억력 감퇴, 비정상적 행동을 유발하는 원인인자이다 (Glenner and Wong, *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 1984). miR-455-3p mimic (Dharmacon, #C-301172-01-0005, 100) 및 miR-29a-3p mimic (Dharmacon, #C-301269-01-0005) 75 nM를 치매 모델 세포 주인 H4-APP-swe 세포 주 (APP swedish mutant (KM670/671NL) overexpressing H4 human neuroglioma cell line, 이화여자대학교 목동병원 생화학교실 안정혁 교수) 에 형질도입하였다. 2.5 x 10^5 개의 세포를 24시간 배양한 후 miRNA mimic 75 nM과 Dharmafect1 reagent (Dharmacon, #T-2001-02)의 복합체를 세포에 뿌려주었다. 음성대조군 (N.C.)으로서 cel-miR-67 (Dharmacon, #CN-001000-01-05) 75 nM을 동일한 세포 주 (H4-APP-swe 세포 주)에 형질도입하고, 형질 도입 후 24시간 후 소태아혈청이 첨가되지 않은 배지(Serum free media)로 바꿔 주고 24시간 배양 후 이 세포 배양액에 배출된 아밀로이드베타42의 양을 ELISA를 통해비교 관찰하였다 . 그 결과, 음성대조군과 비교하여, miR-455-3p mimic 및 miR-29a-3p mimic 을 도입한 세포주에서 보다 더 많은 양의 아밀로이드베타42가 배출되었다 (도 3). 이러한 결과는 알츠하이머성 치매환자의 세포에서 miR-455-3p 및 miR-29a-3p mimic의 양을 감소시킬 수 있는 상보적염기의 miRNA 억제제를 처리하게 되면 알츠하이머성 치매의 병변을 감소시킬 수 있음을 제시한다. 또한, miR-940 mimic 75 nM를 치매모델 세포주 (H4-APP-swe 세포 주)에 도입하였다. 그 결과 상기 세포주에서 과량 배출되는 아밀로이드베타42의 양이 현저히 줄어드는 것을 확인하였다 (도 4).

[0031] 데이터베이스 분석 (Targetscan)을 통해 miR-940의 타겟 단백질 중 하나로서 BACE1이 예측되었으며, 상기 단백질은 아밀로이드전구체 단백질을 비정상적으로 절단하여 아밀로이드베타의 양을 증가시키는 기능을 하는 것으로 보고된 바 있다 (Vassar R., *j. Mol. neurosci.*, 2004). 음성대조군 (N.C.) 75 nM, miR-940 mimic 75 nM, 양성대조군으로서 기존에 BACE1을 타겟으로 하는 것으로 알려진 miRNA인 miR-29a-3p (Hebert et al., *PNAS*, 2008) mimic 75nM 을 H4-APP-swe 세포 주 내 형질도입 후 48시간 후 세포내 단백질에 대한 웨스턴 블로팅을 통해 BACE1의 양의 변화를 관찰하였다. 그 결과, miR-940 mimic을 형질도입 한 경우 음성대조군에 비하여 BACE1의 양이 현저히 감소하는 현상을 관찰하였다. 또한 이러한 감소는 양성대조군인 miR-29a-3p mimic을 형질도입한 경우가 비슷한 정도로 관찰되었다 (도 5). 이는 miR-940이 BACE1의 양을 감소시킴으로써 아밀로이드베타의 발현을 감소시키는 것을 뒷받침하는 결과이다. 이에 따르면, miR-940이 알츠하이머성 치매환자의 혈장에서 양이 감소하는 것은 세포 내에서부터 그 양이 감소하여 BACE1의 양을 증가시는 역할과 연관이 되는 것으로 예측이 된다. 또한, 도 4에 제시된 것과 같이 기존에 BACE1을 타겟으로 하는 것으로 알려진 miRNA인 miR-29a-3p (Hebert et al., *PNAS*, 2008)75 nM를 H4-APP-swe 세포 주에 형질도입하여 과발현 시킨 후 아밀로이드베타42의 양을 분석한 결과와 비교 할 때, miR-940가 현저히 우수한 것으로 확인되었다 (도 4). 따라서, miR-940는 유력한 치매 치료제로서 개발될 수 있는 가능성이 있다.

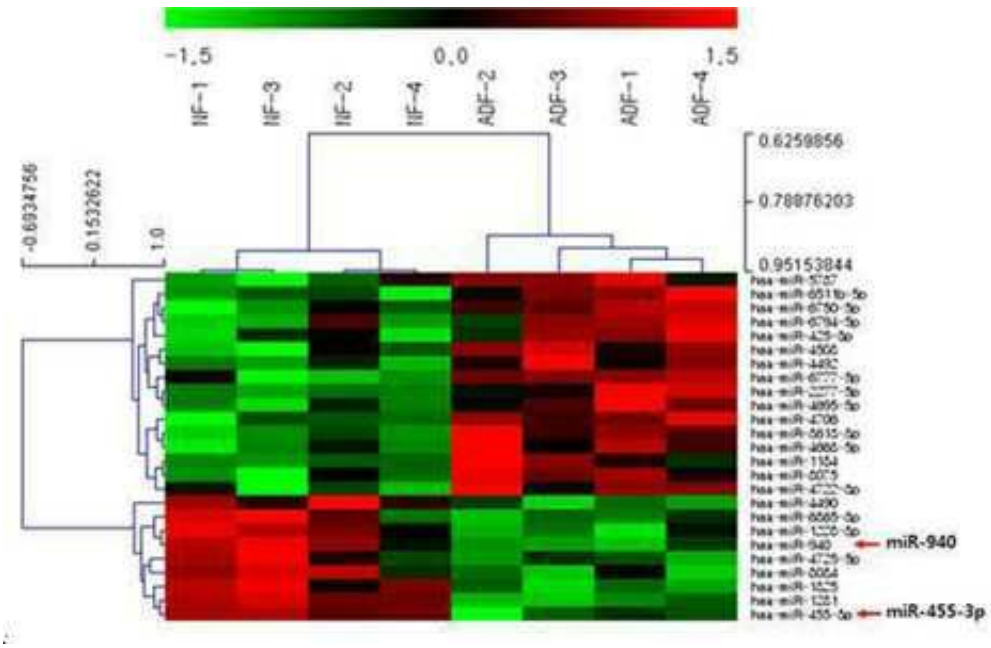
[0032] 반면, BACE1은 Target Scan 데이터베이스 상에서 miR-940의 타겟으로 예측되지 않았으며, miR-455-3p를 H4-APP-swe 세포 주에 형질도입하여 과발현 시킨 세포의 단백질에 대한 웨스턴 블로팅을 수행하였을 경우에는 BACE1이 감소되지 않는다는 것을 관찰하였다 (도 6). 이에 따라, miR-455-3p은 miR-940과는 다른 기작을 통해 작용을 할 것으로 예측된다. 본래 세포 외로 많이 배출되던 miR-455-3p가 알츠하이머성 치매의 경우 세포 내에 축적되는 양이 많아져 아밀로이드베타42배출 양을 증가시키고, 세포 외 혈장으로 배출되는 양은 감소되는 것으로 추정된다. 이는 환자의 뇌 조직을 이용한 실험을 통해 실제로 조직 내에서의 miR-455-3p의 양은 증가되지만 혈장으로 배출되는 miR-455-3p의 양은 감소된다는 것이 증명되어야 하지만, 환자 뇌조직 샘플 이용의 어려움으로 인해, 치매 동물모델 실험 등을 통해 추가연구가 필요하다.

산업상 이용가능성

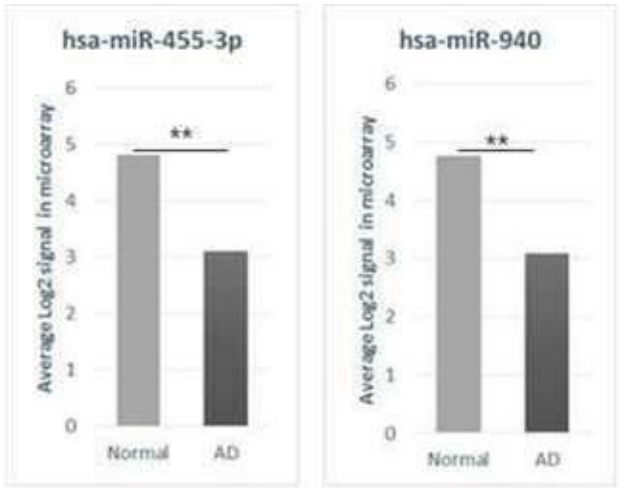
[0033] 치매 특이 miRNA는 진단지표로서 뿐만 아니라 정확한 발병원인이 알려져 있지 않은 알츠하이머성 치매에 대한 연구에 있어 발전을 가져올 수 있을 것으로 예상된다.

도면

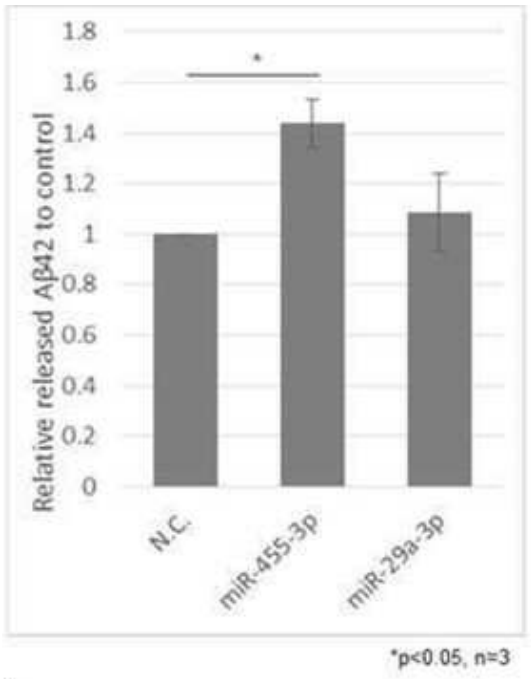
도면1


-1.5
0.0
1.5
NF-1
NF-3
NF-2
NF-4
ADF-2
ADF-3
ADF-1
ADF-4
0.6259856
0.78876203
0.95153844
-0.6934756
0.1532622
1.0
miR-940
miR-455-3p

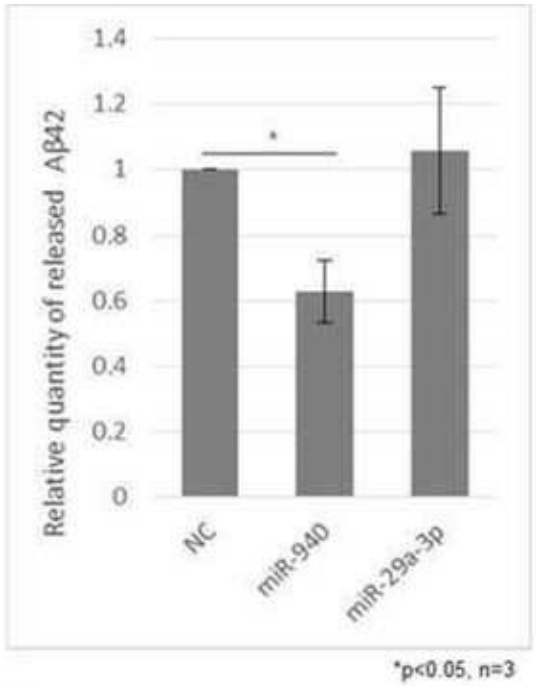
도면2


hsa-miR-455-3p
Average Log2 signal in microarray
**
Normal
AD
**p<0.05, n=4
hsa-miR-940
Average Log2 signal in microarray
**
Normal
AD
**p<0.05, n=4

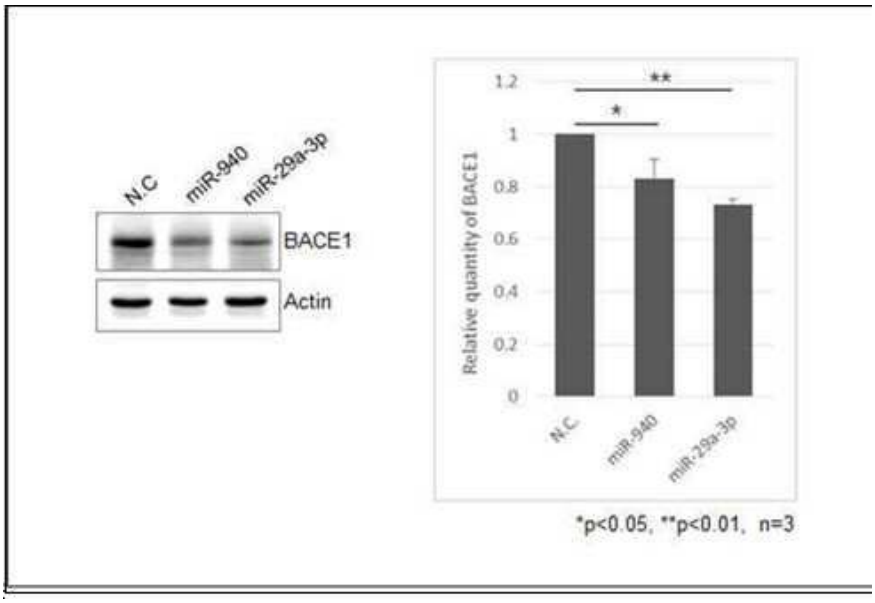
도면3


1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Relative released Aβ42 to control
*
N.C.
miR-455-3p
miR-29a-3p
*p<0.05, n=3

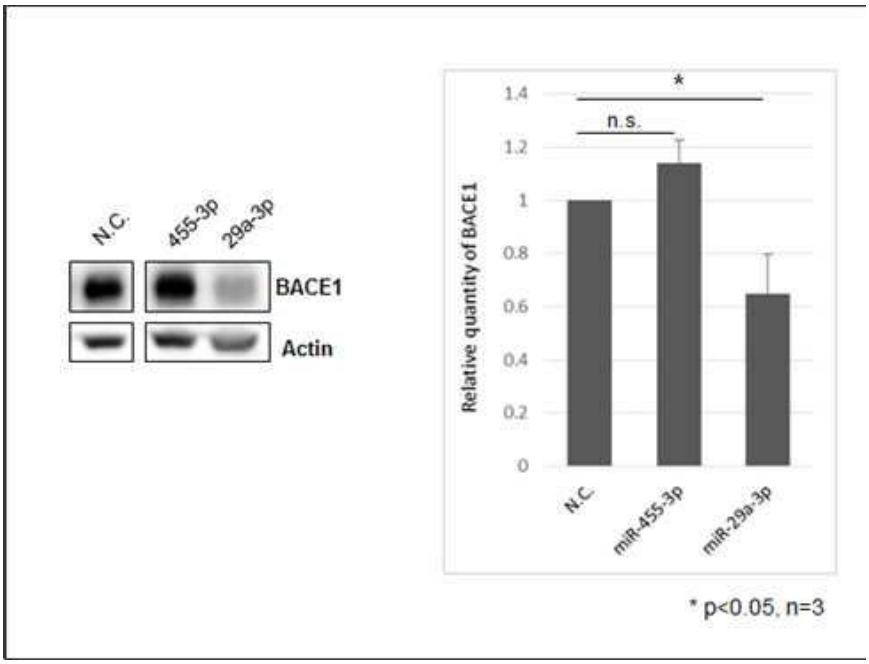
도면4


1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
Relative quantity of released Aβ42
*
NC
miR-940
miR-29a-3p
*p<0.05, n=3

도면5



도면6



서 열 목 록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation, Chosun University

<120> A biomarker for diagnizing alzheimers disease

<130> UKR0316P-0004-KR

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-455-3p

<400> 1

gcaguccaug ggcauauaca c 21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hsa-miR-940 mature sequence

<400> 2

aaggcagggc ccccgcuccc c 21