



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0103491
(43) 공개일자 2017년09월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4045 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/4045 (2013.01)
A23L 33/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0026472
(22) 출원일자 2016년03월04일
심사청구일자 2016년03월04일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김명옥
경상남도 진주시 가호로44번길 7 대동아파트 102
동 303호
(74) 대리인
특허법인 피씨알

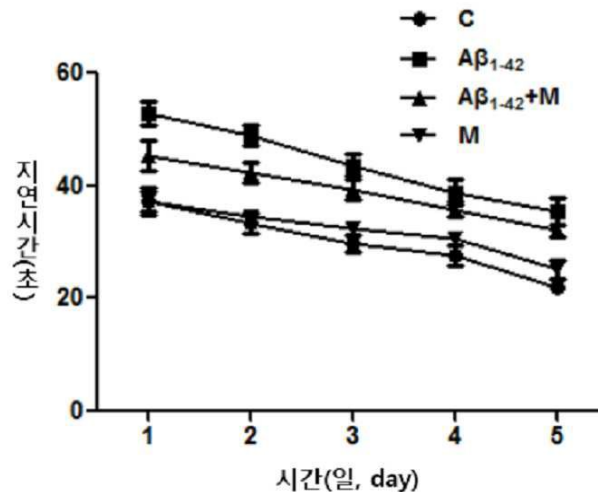
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 멜라토닌을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 멜라토닌을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 멜라토닌은 세포 독성은 없으면서, 아밀로이드 베타에 의해 유도된 기억 장애를 개선하고, A β 의 축적 및 타우 단백질의 인산화를 억제하며, 세포사멸 경로를 저해하는 효능이 있으므로 멜라토닌은 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/322 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-0009521

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 미래유망 융합기술 파이오니어사업

연구과제명 치매(뇌기능향진 조절) 치료 천연신물질 소재개발 ; 나노담체 적합형 약물 기술개발

기 여 율 7/10

주관기관 경상대학교

연구기간 2012.09.01 ~ 2018.02.28이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015K000129

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 연구성과실용화진흥원

연구사업명 2015년 연구성과사업화지원사업 기술업그레이드 R&D

연구과제명 오스모틴 치매치료제 상용화 위한 생산성의 극대화 및 권리권 확대

기 여 율 3/10

주관기관 경상대학교

연구기간 2015.04.27 ~ 2017.04.26

명세서

청구범위

청구항 1

멜라토닌(melatonin) 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 치매 또는 알츠하이머 병인 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 퇴행성 신경질환은 뇌세포 내 아밀로이드 베타 단백질에 의해 유도된 질환인 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 신경세포의 사멸을 억제하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

멜라토닌을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 멜라토닌을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 알츠하이머 병(Alzheimer's disease)은 진행성의 퇴행성 신경질환으로, 의학적으로 기억 및 인식의 장애로 정의된다. 알츠하이머 병의 신경병리학적 특징은 노인성 반점(senile plaque), 신경섬유 매듭(neurofibrillary tangles), 시냅스 이상(synaptic disorder) 및 뉴런 손실(neuronal loss)이 있다. 알츠하이머 병의 병리특성을 설명하려는 몇몇 이론들이 있지만, 아밀로이드 베타(amyloid beta, A β) 캐스캐이드 이론이 주요한 관심사이다. 이 이론에 따르면, 막관통 당단백질인 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein, APP)이 베타-세크

레타아제(β -secretase)에 의하여 N-말단이 절단되고, 감마-세크레타아제(γ -secretase)에 의해 C 말단이 절단되어 아밀로이드 베타 펩티드가 만들어진다. $A\beta_{1-42}$ 는 생체 내(*in vivo*) 및 생체 외(*in vitro*) 모델 모두에서 신경독성을 가지며, 알츠하이머 병의 기억 손상 증상과 관련이 있다. 그러나, $A\beta$ 가 유도하는 알츠하이머병의 발병에 관한 기작은 아직 확실하게 밝혀진 것이 없으며, $A\beta$ 가 알츠하이머 병에서 기억 손상을 유발시키는 시냅스 이상을 유도하기 때문에, 시냅스가 $A\beta$ 의 일차 표적인 것으로 예상된다. 응집된 $A\beta$ 가 축적되면 과인산화된 타우 단백질(hyperphosphorylated tau protein)로 이루어진 세포내 신경섬유 매듭이 형성되며, 산화적 스트레스 반응 및 신경퇴화를 활성화시킨다. 이런 이유로, $A\beta_{1-42}$ 유도성 시냅스 이상, 타우 과인산화 및 신경퇴화를 알츠하이머 병의 치료에 대한 기본 표적으로 볼 수 있다.

[0004] 멜라토닌(melatonin)은 N-acetyl-5-methoxytryptamine으로도 알려져 있으며, 인간을 포함한 포유동물의 송과선(pineal gland)에서 분비되는 주요 신경호르몬이다. 멜라토닌은 어두울 때 분비되어 수면의 생리적 리듬(circadian rhythms), 순환 기능 및 몇몇 다른 생리 기능들을 조절한다. 또한, 멜라토닌은 효과적인 자유 라디칼 제거제이며, 멜라토닌의 대사물질인 AFMK(N^1 -acetyl- N^2 -5-formyl-methoxykynuramine) 및 AMK(N^1 -아세틸-5-메톡시키누라민(N^1 -acetyl-5-methoxykynuramine)은 자유 라디칼 제거 기작을 활성화시켜 과산화수소(H_2O_2) 및 $A\beta$ -유도성 신경퇴화에 대하여 신경보호 활성을 가지고 있다.

[0005] 멜라토닌의 생산은 나이가 들면서 감소하며, 알츠하이머 환자에게서 멜라토닌의 수준이 낮아지는 것으로 알려져 있다. 최근에, Shukla 등은 멜라토닌이 A 디스인테그린(A disintegrin), 금속단백질분해효소(metalloprotease) 10 및 17을 조절하여 β APP(β amyloid precursor protein)의 비아밀로이드 경로를 활성화시켜 세포사멸을 억제할 수 있는지 연구하였다. 멜라토닌은 알츠하이머 동물모델에서 생존 경로(pro-survival pathway)를 촉진하고, 카스파아제(caspase)와 같은 세포사멸 중개자들을 억제하였다. 또한, 멜라토닌은 Akt의 활성을 지속적으로 유지시키고, 마우스 해마에서 자가소화작용 및 α -시뉴클레인(α -synuclein)의 응집을 억제하여 카인산(kainic acid)-유도성 신경퇴화를 억제하였다. 뇌 퇴화 동물 모델에서 지속적인 멜라토닌 투여가 인지 기능을 향상시킨다는 것이 알려져 있으며, 최근에 본 발명자들은 D-갈락토스를 투여한 노화 동물모델에서 지속적으로 멜라토닌을 투여(10mg/kg, 복강 내 30일 투여)하였을 때 기억 장애가 개선되는 것을 확인하였다.

[0006] 본 발명자들은 지속적인 멜라토닌 투여에 의한 신경세포 보호활성을 조사한 결과 멜라토닌 투여에 의하여 $A\beta$ 에 의해 유도된 기억 장애, 시냅스 이상, 타우 단백질 과인산화 및 신경퇴화가 감소하여, 멜라토닌이 신경보호 활성이 있는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 일 양상은 멜라토닌 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

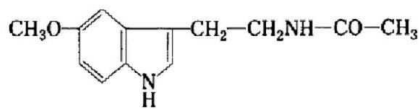
[0009] 본 발명의 다른 양상은 멜라토닌 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명의 일 양상은 멜라토닌 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 용어, "멜라토닌"은 [화학적식 1]의 구조로 이루어지는 물질로 동물, 식물 및 미생물 등에서 자연적으로 합성되며, 동물에서는 생체 리듬 조절에 관여한다. 일 구체예에 따르면 상기 멜라토닌은 천연 물질에서 분리된 것 또는 인공적으로 합성된 것을 사용하여도 무방하다.

화학식 1



[0013]

[0014]

본 발명의 용어, "퇴행성 신경질환"이란 중추신경계의 신경세포에 퇴행성 변화가 나타나면서 여러 가지 증상을 유발하는 질환을 의미하는 것을 의미한다. 대표적인 퇴행성 신경질환에는 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 진행성 핵상마비(Progressive supranuclear palsy), 다계통 위축증(Multiple system atrophy), 감람핵-뇌교-소뇌 위축증(Olivopontocerebellar atrophy: OPCA), 샤이-드래거 증후군(Shy-Drager syndrome), 선조체-흑질 퇴행증(Striatonigral degeneration), 헌팅톤병(Huntington's disease), 근위축성 측색 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 본태성 진전증(Essential tremor), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico-basal ganglionic degeneration), 미만성 루이 소체 질환(Diffuse Lewy body disease), 파킨스-ALS-치매 복합증(Parkinson-ALS-dementia complex of Guam) 및 픽병(Pick's disease)등이 있으나, 이에 본 발명의 멜라토닌의 치료 및 예방 효과가 있는 질병이 제한되는 것은 아니다. 일 구체예에 따르면 상기 멜라토닌은 치매 또는 알츠하이머병의 치료 또는 예방 효과가 있다.

[0015]

본 발명에서 개시한 퇴행성 신경질환인 치매는 사람의 정신(지적) 능력과 사회적 활동을 할 수 있는 능력의 소실을 말하며, 어떤 사람의 일상생활의 장애를 가져올 정도로 충분히 심할 때 이를 치매라고 한다. 즉 치매는 그 자체가 어떤 활동을 이야기하는 진단명이 아니라 단지 특정한 증상들이 나타나서 어떤 기준을 만족시키는 경우를 지칭하는 하나의 증후군이다. 치매는 여러 가지 질환들에 의해 나타나는 병적 증상으로, 미만성 루이소체 치매, 두부 외상성 치매 등 매우 다양한 질환들에 의해서 치매가 나타날 수 있는데, 알츠하이머병, 혈관성 치매, 미만성 루이소체 치매들은 치매의 증상으로만 나타날 수 있다. 또한 어떤 치매의 원인 질환들은 여러 가지 나타나는 증상들 중 한 가지로 치매가 나타나기 때문에 이런 경우는 치매 이외의 다른 증상들을 살펴보면 쉽게 진단을 내릴 수 있는 경우도 많다.

[0016]

알츠하이머병은 치매를 일으키는 많은 질환들 중에 가장 흔한 것으로, 노인 반점과 신경세포 안에서 신경원 섬유들이 비정상적으로 꼬여 있는 모습을 보인다. 이외에도 기억과 그 외에 다른 지적 능력을 유지하는데 중요한 뇌신경세포가 많이 없어지고, 이러한 뇌신경세포 사이에서 오가는 특정 화학물질의 양이 많이 떨어져 있는 모습을 보인다.

[0017]

일 구체예에 따르면 상기 퇴행성 신경질환은 뇌세포 내에 아밀로이드 베타 단백질이 축적되어 유도된 질환일 수 있다.

[0018]

본 발명의 용어, "아밀로이드 베타"는 아밀로이드 전구 단백질로부터 단백질 분해효소 작용에 의해 생성된 단백질로, 뇌 조직에 침착되면서 뇌세포의 사멸을 일으키는 것으로 알려져 있다. 대뇌의 신경세포가 변성하여 대량으로 사멸하는 경우 Aβ가 축적된 '노인 반점', '신경 원섬유 매듭'이라고 하는 섬유 모양의 구조가 신경 세포 내에서 보이며, 신경 세포는 세포사멸 기작에 의해 사멸하는 것으로 알려져 있다.

[0019]

일 구체예에 따르면 상기 멜라토닌은 Aβ가 침착된 뇌세포에서 아밀로이드 베타 단백질의 축적 및 타우 단백질의 인산화를 감소시키는 효과가 있으며, 세포사멸을 유도하는 카스파아제 단백질의 발현을 감소시켜 신경세포의 사멸을 억제할 수 있다.

[0020]

본 발명의 조성물은 약학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등과 같은 경구 투여용 담체 및 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜 등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995). 상기 본 발명에 따른 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 적합한 형태로 제형화 될 수 있다. 즉, 본

발명의 약학적 조성물은 공지의 방법에 따라 다양한 비경구 또는 경구 투여용 형태로 제조될 수 있다. 비경구 투여용 제형의 대표적인 것으로는 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현탁액이 바람직하다. 주사용 제형은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜 주사용으로 제형화될 수 있다. 또한, 경구 투여용 제형으로는, 이에 한정되지는 않으나, 분말, 과립, 정제, 환약 및 캡슐 등이 있다.

[0021] 상기와 같은 방법으로 제형화된 약학적 조성물은 유효량으로 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 상기에서 '유효량'이란 환자에게 투여하였을 때, 예방 또는 치료 효과를 나타내는 양을 말한다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 투여 경로, 투여 대상, 연령, 성별, 체중, 개인차 및 질병 상태에 따라 적절히 선택할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 약학적 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있으며, 일 구체예에 따르면 비경구 투여의 형태일 때 10 mg/kg/day의 유효량으로 투여할 수 있다.

[0023] 본 발명의 다른 양상은 멜라토닌을 유효성분으로 함유하는 퇴행성 신경질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0024] 본 발명의 건강식품은 상기 멜라토닌을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0025] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소세지, 빵, 비스킷, 떡, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0026] 본 발명에 따른 멜라토닌은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강식품 중의 상기 멜라토닌의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량으로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ml를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0027] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 멜라토닌을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0028] 상기 외에 본 발명의 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 멜라토닌 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0030] 본 발명의 다른 양상은 멜라토닌을 이용하여 시험관(*in vitro*) 상의 신경세포에서 포스포이노시티드 3-인산화효소(Phosphoinositide 3-kinase) 및 단백질 인산화 효소 B(protein kinase B)의 인산화를 억제하는 방법을 제공한다.

[0031] 본 발명에서 용어 '포스포이노시티드 3-인산화효소'는 포스파티딜이노시톨(phosphatidylinositol)에서 이노시톨 고리의 3번 위치의 -OH에 인산기를 첨가하는 효소로, 세포 내부의 신호전달에 관여하는 효소를 말한다.

[0032] 본 발명에서 용어 '단백질 인산화 효소 B'는 세포수용체 자극에 의해 포스포이노시티드 3-인산화효소를 개재하여 활성화하는 세린-트레오닌 인산화효소를 말하며, 바이러스성 암유전자인 v-akt의 암원유전자로서 동정된 점

에서 Akt 라고 부르기도 한다.

발명의 효과

[0034] 본 발명의 멜라토닌은 세포 독성은 없으면서, 아밀로이드 베타에 의해 유도된 기억 장애를 개선시키고, A β 의 축적 및 타우 단백질의 인산화를 억제하며, 세포사멸 경로를 저해하는 효능이 있으므로, 멜라토닌은 퇴행성 신경질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 멜라토닌 처리에 따른, 모리스 수중 미로 실험의 결과를 나타낸 것이다.
 도 2는 멜라토닌 처리에 따른, 모리스 수중 미로 실험에 대한 프로브 테스트 결과를 나타낸 것이다.
 도 3은 멜라토닌 처리에 따른, Y-미로 실험에서 자발적 변경 행동율의 변화를 나타낸 것이다.
 도 4는 멜라토닌 처리에 따른, A β 축적 여부 및 BACE-1 단백질의 발현 변화를 나타낸 것이다.
 도 5는 멜라토닌 처리에 따른, 해마의 치상회(dentate gyrus, DG) 및 암몬각3(Cornu ammonis, CA3)에서의 A β 축적 여부를 확인한 것이다.
 도 6은 멜라토닌 처리에 따른, 마우스의 뇌조직에서의 시냅토파이신 및 SNAP-25 단백질의 변화를 확인한 것이다.
 도 7은 멜라토닌 처리에 따른, 마우스 해마에서의 DG, CA3 및 CA1에서의 SNAP-25 단백질의 변화를 확인한 것이다.
 도 8은 멜라토닌 처리에 따른, 마우스의 뇌조직에서의 p-GluR1(Ser 845), SNAP-23, PSD95 및 p-CREB(Ser 133) 단백질의 변화를 확인한 것이다.
 도 9는 멜라토닌 처리에 따른, 마우스 해마에서의 DG 및 CA3에서 PSD95 단백질 발현 변화를 확인한 것이다.
 도 10은 멜라토닌 처리에 따른, 마우스의 뇌조직에서의 PI3K, Akt, GSK3 β 및 타우 단백질의 인산화 정도를 확인한 것이다.
 도 11은 멜라토닌 처리에 따른, 마우스 해마에서의 CA3에서 Akt 및 GSK3 β 의 인산화 정도를 확인한 것이다.
 도 12는 멜라토닌 처리에 따른, 마우스의 뇌조직에서의 카스파아제-9, 카스파아제-3 및 절단된 PARP-1 단백질의 변화를 확인한 것이다.
 도 13은 멜라토닌 처리에 따른, 마우스 해마에서의 DG, CA3 및 CA1에서 카스파아제-3 양성인 세포를 확인한 것이다.
 도 14는 멜라토닌 처리에 따른, 마우스 해마에서의 DG, CA3 및 CA1에서 신경세포의 사멸 정도를 확인한 것이다.
 도 15는 멜라토닌 처리에 따른, 마우스 해마에서의 DG, CA3 및 CA1에서 신경세포의 손상 정도를 확인한 것이다.
 도 16은 HT22 세포에서의 A β 및 멜라토닌 투여에 의한 세포 생존율, 세포독성 및 세포사멸 정도를 확인한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 실험 방법

[0040] 1. 아밀로이드 베타 펩티드(amyloid beta, A β ₁₋₄₂) 처리에 따른 마우스의 행동 분석

[0041] **1-1. 화합물 및 실험동물**

[0042] 아밀로이드 베타 펩티드(amyloid beta, $A\beta_{1-42}$) 및 멜라토닌(melatonin)은 시그마(Sigma Chemical Co., 세인트 루이스, 미국)에서 구입하였다. 수컷 야생형 C57BL/6N 마우스(20 g 내지 30 g, 8주령)는 샘타코 바이오(Samtako Bio, 오산, 대한민국)에서 구입하였고, 학교 내 실험 동물센터에서 23℃, 12시간 명암주기, 60±10% 습도 및 자유 섭식 조건에서 1주일간 적응기간을 거쳤다. 동물의 희생 및 고통을 최소화하기 위하여 모든 노력을 하였으며, 실험 과정은 경상대학교 동물 윤리 위원회의 승인(Approval ID: 125)을 받아 수행하였다.

[0044] **1-2. $A\beta_{1-42}$ 처리**

[0045] 인간 $A\beta_{1-42}$ 펩티드는 멸균된 식염수에 1 mg/ml의 농도로 준비하여 37℃에서 4일 동안 배양하여 응집을 유도하였다. 마우스를 림퐁(Rumpun, 0.5 ml/100g 체중) 및 졸레틸(Zolitel, 0.5 ml/100g 체중)을 복합사용하여 마취시킨 후, 응집된 $A\beta_{1-42}$ 또는 대조군(0.9% 염화나트륨, 3 ml/5분/마우스)을 해밀톤 미량주사기(-0.2 mm 전후방, 1 mm 내외사위 및 -2.4 mm 배복에서 브레그마)를 이용하여 정위 방식(stereotaxically)으로 뇌혈관 내(intracerebroventricular, i.c.v.)에 주사하였다. 상기 과정은 체온이 36℃ 내지 37℃로 유지될 수 있도록 고안된 별도의 방에서 수행하였으며, 마취 때문에 동물의 체온이 떨어져 타우 인산화(tau phosphorylation)를 유도할 수 있기 때문에 온도계를 통하여 주기적으로 온도를 확인하였다.

[0046] $A\beta_{1-42}$ 또는 식염수를 주사한 지 24시간 후에 마우스를 하기와 같은 그룹으로 나누었다: (1) 0.9% 식염수를 뇌혈관 내에 주사한 그룹(대조군, C), (2) $A\beta_{1-42}$ 를 뇌혈관 내에 주사한 그룹($A\beta_{1-42}$ 투여군, $A\beta_{1-42}$), (3) $A\beta_{1-42}$ 주사 및 3주 동안 복강 내(intraperitoneally, i.p.)에 멜라토닌(10 mg/kg)을 투여한 그룹($A\beta_{1-42}$ 및 멜라토닌 투여군, $A\beta_{1-42}+M$), 및 (4) 3주 동안 멜라토닌(10 mg/kg)만 투여한 그룹(멜라토닌 투여군, M).

[0047] 멜라토닌은 0.1 % DMSO(dimethyl sulfoxide)에 용해시키고 그 후에 0.9% 식염수로 주사 용액을 만들었다. $A\beta_{1-42}$ 또는 식염수를 주사한 지 24시간 후에 멜라토닌 또는 식염수를 3주 동안 정기적으로 오후에 복강 내에 주사하였다.

[0049] **1-3. 모리스 수중 미로 실험(Morris water maze, MWM)**

[0050] 행동 연구를 위하여 마우스(n=13/그룹)를 이용하여 모리스 수중 미로 및 Y-미로 실험을 수행하였다. 실험 장치는 원형 물 탱크(100 cm 지름, 40 cm 높이) 및 흰색 잉크로 불투명하게 만든 15.5 cm 깊이의 물(23±1℃)로 이루어져 있다. 투명한 도피대(10 cm 지름, 20 cm 높이)가 물 표면 1 cm 아래에 숨겨져 있으며, 한 사분면의 중앙 지점에 위치해있다. 마우스들은 한 사분면에 있는 하나의 도피대 및 다른 세 사분면에서 회전하여 출발하는 방식을 이용하여 5일 연속으로 날마다 훈련을 받았다. 수중 미로에서 탈출에 걸리는 시간(숨겨진 도피대를 찾는 시간)을 각 훈련마다 계산하였다. 5일째 날의 24시간 후에 기억의 응고화(memory consolidation)를 평가하기 위하여 프로브 테스트를 수행하였다. 프로브 테스트는 도피대를 제거하고 60초 동안 자유롭게 수영하는 방식으로 이루어졌다. 마우스가 표적 사분면(훈련 동안 도피대가 위치해 있던 곳)에 이르는 시간 및 표적 사분면을 가로지르는 횟수를 측정하였다. 표적 사분면에 이르는 시간은 기억의 응고화의 정도를 나타낸다. 모든 결과는 비디오-추적 소프트웨어(SMART, Panlab Harward Apparatus, Bioscience Company, 홀리스톤, 미국)로 기록하였다.

[0052] **1-4. Y-미로 실험(Y- Maze test)**

[0053] Y-미로는 검정색으로 칠해진 나무로 만들어졌으며, 미로의 각 가지는 50 cm 길이, 20 cm 높이, 10 cm 폭, 바닥이 10 cm 폭, 꼭대기가 10 cm 폭인 형태이다. 각 마우스들은 장치의 중앙에 놓아 미로를 자유롭게 이동하도록 허용하였으며, 각 8분 동안 세 번씩 수행하여, 가지 입구로 들어가는 것을 육안으로 관찰하였다. 자발적 변경(spontaneous alteration)은 마우스가 삼중 세트에서 세 개의 가지에 성공적으로 들어가는 것으로 정의하였다. 변경 행동율(alteration behavior percentage, %)은 [성공적인 트리플 세트(연속적으로 세 개의 다른 가지로 들어가는 것)/가지에 들어간 전체 횟수-2]*100으로 계산하였다. 자발적 변경 행동의 비율이 높은 것을 인지능력이 향상된 것으로 간주하였다.

[0055] **2. 아밀로이드 베타 펩티드($A\beta_{1-42}$) 처리에 따른 단백질 변화 분석**

[0056] **2-1. 단백질 추출**

[0057] 행동 분석 후에 타우 과인산화 촉진할 수 있는 저체온 상태를 피하기 위하여 마취 없이 마우스를 희생하였다. 뇌를 즉시 제거하고, 해마(hippocampus)를 분리하여 드라이아이스에 얼린 후 -80°C 에 보관하였다. 제조사의 지시(iNtRON Biotechnology Inc, 성남, 대한민국)에 따라 해마 조직을 pro-prepTM 단백질 추출 용액으로 균질화하였다. 그 후 10,000 g, 4 조건에서 25분 동안 샘플을 원심분리하고, 상층액만 모아서 -80°C 에 보관하였다.

[0059] **2-2. 조직 수집 및 샘플 준비**

[0060] 조직 분석을 위하여 각 그룹당 5마리의 마우스에 얼음으로 냉각시킨 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 경심관류로 관류시키고, 뇌를 4% 파라포름알데하이드로 72시간 동안 후고정(post-fix)시킨 후 20% 수크로스에 72시간 동안 보관하였다. 뇌를 O.C.T compound(A.O, 미국)로 얼리고, CM 3050C 크라이오스탯(Leica, 독일)을 이용하여 14- μm 두께로 관상면(coronal sections)을 잘랐다. 자른 관상면은 probe-on plus charged slide(Fisher, 일리노이주, 미국)에 녹이면서 붙였다.

[0062] **2-3. 면역블롯 실험(Immunoblot analysis)**

[0063] BioRad protein assay kit(BioRad Laboratories, 캘리포니아, 미국)를 이용하여 단백질 농도를 측정한 후, 동일한 양의 단백질(15 내지 25 μg)을 4 내지 12% BoltTM mini gel(Novex, Life Technologies, 키리야트 시모나, 이스라엘)을 이용하여 전기영동하였다. 비특이적 결합을 줄이기 위하여 막을 5%(w/v) 스킵 밀크로 블로킹하고, 1:1000으로 희석한 일차 항체와 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 다음날 HRP가 접합된 2차 항체(horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody)와 반응시킨 후에, ECL 탐지 시약을 이용하여 제조사(Amersham Pharmacia Biotech, 옘살라, 스웨덴)의 지시에 따라 단백질을 확인하였다. 덴시토메트리 및 시그마 젤 프로그램 버전 1.0(Sigma Gel program, version 1.0, SPSS, 일리노이주, 미국)을 이용하여 엑스-레이 필름을 스캔하고, 단백질 밴드의 광학밀도를 분석하였다. 실험에 사용한 일차 항체는 다음과 같다: 시냅토파이신, pAPMARs(GluR1)(Ser845), pAkt(Ser473), p-PI3K, 카스파아제-9 및 카스파아제-3 항체는 Cell Signaling Technology(매사추세츠, 미국)에서 구입하였고, $A\beta$, BACE-1, pGSK3 β (Ser9), pTau(Ser 404 및 Ser 413), PARP-1 및 β -actin 항체는 Santa Cruz Biotechnology(텍사스, 미국)에서 구입하여 사용하였다.

[0065] **2-4. 면역조직화학 염색(Immunohistochemistry staining)**

[0066] 슬라이드를 0.1 M 인산완충용액(PBS)으로 15분씩 두 번 세척하고, 프로테이나아제-k를 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 반응시켰다. 이후 30% 과산화수소(hydrogen peroxide)를 포함하는 메탄올 용액으로 10분 동안 퀀칭(quenching)하고, 5% 정상 염소 혈청 및 PBS에 녹인 0.3% 트리톤 X-100을 함유하는 블로킹 용액으로 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, 블로킹 용액으로 1:100으로 희석한 토끼 항-카스파아제-3 항체와 슬라이드를 하룻밤 동안 반응시켰다. 다음날, PBS로 1:500으로 희석한 바이오틴화된 염소 항-토끼 2차 항체(goat anti-rabbit secondary antibody)와 슬라이드를 1시간 동안 반응시키고, 이후 암실에서 ABC 용액(Standard Vectastain ABC Elite Kit; Vector Laboratories, 벵링게임, 미국)과 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 그 후, 슬라이드를 PBS로 두 번 세척하여, 3, 3'-디아미노벤지딘 테트라 염산염(Diaminobenzidine tetra hydrochloride, DAB)과 반응시키고, 증류수로 세척하여 에탄올(70%, 95% 및 100%)로 단계적으로 탈수시킨 뒤, 자일렌(xylene)으로 대체하고, 마운트 용액을 이용하여 커버슬립을 덮었다. 이미지가 프로브(ImageJ program)를 이용하여 해마의 DG, CA1 및 CA3 부위에서 활성화된 카스파아제-3 양성 세포를 확인하였다.

[0068] **2-5. 면역형광 염색(Immunofluorescence staining)**

[0069] 슬라이드를 0.01 M PBS로 각 15분씩 두 번 세척하고, 5% 정상 혈청 및 PBS에 녹인 0.3% Triton X-100을 함유하

는 블록킹 용액과 1시간 동안 반응시켰다. 그 후, 블록킹 용액으로 1:100으로 희석한 항체($A\beta$, SNAP25, PSD95, p-Akt(Ser 473) 및 p-GSK3 β (Ser 9))와 슬라이드를 하룻밤 동안 반응시켰다. 1차 항체와의 반응 후에, 1:50으로 희석한 당나귀 항-염소 TRITC-표지 항체(Santa Cruz Biotechnology, 달라스, 미국)와 슬라이드를 1.5시간 동안 반응시켰다. 이후, 슬라이드를 마우스 항- $A\beta$ (1:100) 항체와 하룻밤 동안 반응시킨 후에, 1:50으로 희석한 토끼 항-마우스 FITC-표지 항체(Santa Cruz Biotechnology, 달라스, 미국)와 1.5시간 동안 반응시켰다. 이후 슬라이드를 DAPI 및 Prolong Antifade Reagent(Molecular Probe, 유진, 미국)로 마운팅하였다. 염색 패턴은 공초점 레이저-스캐닝 현미경(Fluoview FV 1000)으로 관찰하였다.

3. 해마의 신경세포 분석

3-1. 플루오로-제이드 B 염색(Fluoro-jade B, FJB staining)

FJB 염색은 제조자의 방법(Millipore, 미국, cat #AG310, lot#2159662)에 따라 수행하였다. 구체적으로, 뇌 조직 슬라이드를 하룻밤 동안 공기-건조시키고, 5분 동안 두 번 세척한 후에 1% 수산화나트륨 및 80% 에탄올 용액에 담그고, 다시 70% 에탄올에 2분간 담근 후 물에 세척하였다. 이후 슬라이드를 0.06% 과망간산 칼륨 용액(potassium permanganate)으로 옮겨 10분 동안 담근 후, 증류수로 씻어내고 0.1% 아세트산 및 0.01% FJB 용액에 20분 동안 담귀 염색시켰다. 그 후 슬라이드를 증류수로 세척하고, 최소 10분 동안 건조시켰다. DPX 비형광 마운팅 용액을 이용하여 슬라이드에 글래스 커버 슬립 및 DAPI 용액을 마운팅하였다. FITC 필터를 장착한 공초점 레이저-스캐닝 현미경(FV1000, Olympus, 일본)을 이용하여 이미지를 획득하였다.

3-2. 니슬 염색(Nissl staining)

슬라이드를 0.01 M PBS로 각 15분씩 두 번 세척하고, 약간의 빙초산을 함유하고 있는 0.5% 크레실 바이올렛(cresyl violet) 용액으로 10분 내지 15분 동안 염색시켰다. 이후 증류수로 세척하고, 에탄올(70%, 95%, 및 100%)로 단계적으로 탈수시킨 후, 자일렌으로 대체하고, 마운팅 용액을 이용하여 커버슬립을 덮었다. 해마의 피질, CA1 및 CA3 지역의 세포들을 이미지 분석을 통하여 확인하였다.

4. 생체 외(in vitro)에서 아밀로이드 베타 펩티드($A\beta_{1-42}$) 처리에 따른 세포 분석: Apotox-GloTM triplex assay

마우스 해마 신경세포인 HT22 세포(2×10^4 세포)를 10% 소태아혈청(FBS) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신이 함유된 200 μ l DMEM 배지로 96-웰 플레이트에서 배양하였다. 37 $^{\circ}$ C 및 5% CO₂로 가습한 배양기에서 48시간 동안 배양한 후, 세포에 100 μ M $A\beta_{1-42}$ 및 0.2 μ M 멜라토닌을 처리하였다. 이후, GF-AFC(glycyl-phenylalanyl-aminofluorocoumarin) 기질 및 bis-AAF-R110(bis-alanylalanylphenylalanyl-rhodamine 110) 기질을 포함하고 있는 생존력 및 세포 독성 용액 20 μ l를 플레이트의 모든 웰에 첨가하여 500 rpm에서 30초 동안 교반한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다. GF-AFC 기질은 생존 세포에 들어가면, 단백질 분해효소에 의해 절단되면서 AFC를 방출하며, bis-AAF-R100 기질은 생존 세포로 들어가지 못하지만 사멸 세포의 단백질 분해효소에 의해 절단되어 R110을 방출한다. 형광은 400 nm/500nm(생존력) 및 485 nm/520nm(세포 독성)의 파장을 이용하였다.

카스파아제 활성화, 루시페라아제 활성화 및 세포 용해 정도를 측정하기 위하여 DEVD 서열을 포함하는 루미노제닉 카스파아제-3 기질(luminogenic 카스파아제-3 substrate)을 이용하였다. 카스파아제-글로^{3/7} 용액 100 μ l을 모든 웰에 첨가하여 500 rpm에서 30초 동안 교반한 후 30분 동안 실온에서 반응시키고, 이후 발광(luminescence) 정도를 측정하였다.

5. 통계 분석(Statistical analysis)

면역블롯의 밴드는 덴시토메트리 및 시그마 겔 프로그램을 이용하여 스캔 및 분석하였다. 밴드의 밀도는 평균 $\pm$ 표준 평균 오차(standard error mean, SEM)로 표기하였으며, 이미지제이 소프트웨어는 면역조직화적 정량 분석에 이용하였다. 일원 분산 분석(One-way analysis of variance, ANOVA) 후에 양측 독립 스튜던트 t-검정(two-

tailed independent Student's *t*-test) 및 터키의 다중 비교 검정(Tukey's multiple comparison test)을 이용하여 처리군과 대조군 사이를 비교하였다. 계산 및 그래프는 프리즘 5 소프트웨어(Graph-Pad Software, 샌 디에고, 미국)를 이용하였다. *P* 밸류가 0.05 이하인 것을 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다. #은 $A\beta_{1-42}$ 및 멜라토닌 처리군에서 유의적인 차이가 있는 것을 의미하며, *은 $A\beta_{1-42}$ 처리군에서 유의적인 차이가 있는 것을 나타낸다: **p*<0.05, ***p*<0.01 및 ****p*<0.001; #*p*<0.05, ##*p*<0.01 및 ###*p*<0.001.

[0085] 실험 결과

[0086] 1. 아밀로이드 베타(amyloid beta, $A\beta_{1-42}$) 처리에 따른 마우스의 행동 분석 결과

[0087] 멜라토닌이 $A\beta_{1-42}$ 투여에 의해 유도된 기억 손상을 회복시킬 수 있는지 확인하기 위하여, 모리스 수중 미로 및 Y-미로 실험을 수행하였다.

[0089] 1-1. 모리스 수중 미로 실험 결과

[0090] 모리스 수중 미로 실험은 숨겨진 도피대에 대한 훈련을 통하여 마우스(*n*=13/그룹)의 학습 능력을 확인하기 위한 것이다.

[0091] 실험 결과, 도 1에 나타난 바와 같이 $A\beta_{1-42}$ 투여군은 숨겨진 도피대에 두 번째 도착하는 시간이 더 오래 걸리고, $A\beta_{1-42}$ 및 멜라토닌(10 mg/kg, 3주) 투여군은 시간이 짧은 것을 확인하였다(도 1).

[0092] 또한 프로브 테스트 결과, 도 2에 나타난 바와 같이 $A\beta_{1-42}$ 투여군은 도피대에 도달하는 횟수 및 표적 사분면에서 소요하는 시간이 감소하여 $A\beta_{1-42}$ 에 의해 기억력이 손상된 증상을 보여주었다. 반면에, $A\beta_{1-42}$ 및 멜라토닌 투여군은 도피대에 도달하는 횟수 및 표적 사분면에서 소요하는 시간이 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 2; *P*<0.001).

[0094] 1-2. Y-미로 실험 결과

[0095] 모리스 수중 미로 실험 이후에, 자발적 변경 행동율(%)을 평가하기 위하여 Y-미로에서 가지에 들어가는 평균 전체 횟수 및 성공적인 트리플을 관찰하였다. 자발적 행동 변경율은 공간 작업 기억(spatial working memory)을 의미하며, 단기 기억(short-term memory)의 형태이다.

[0096] 미로실험 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 $A\beta_{1-42}$ 투여군은 대조군과 비교하여 자발적 변경 행동율이 감소하였고, 이는 $A\beta_{1-42}$ 가 기억 장애를 유도한 것을 의미한다. 반면에 $A\beta_{1-42}$ 및 멜라토닌 투여군은 $A\beta_{1-42}$ 투여군과 비교하여 유의적으로 증가한 자발적 변경 행동율을 나타냈으며, 이는 멜라토닌이 $A\beta_{1-42}$ 에 의해 유도된 기억 장애를 개선시킬 수 있음을 의미한다(도 3).

[0098] 2. $A\beta_{1-42}$ 처리에 따른 단백질 변화 분석 결과

[0099] 2-1. $A\beta$ 축적 확인 결과

[0100] $A\beta_{1-42}$ 투여에 의하여 해마 내에 $A\beta$ 축적이 촉진되는지 확인하기 위하여 면역블롯팅 및 면역형광 분석을 실시하였다.

[0101] 실험 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 대조군과 비교하여 $A\beta_{1-42}$ 투여군은 해마 내에 $A\beta$ 의 농도가 높고, $A\beta_{1-42}$ 및 멜라토닌 투여군은 $A\beta_{1-42}$ 투여군과 비교하여 $A\beta$ (*P*<0.001)의 농도가 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 또한, $A\beta_{1-42}$ 투여에 의하여 증가한 BACE-1 발현(*P*<0.01)이 $A\beta_{1-42}$ 및 멜라토닌 투여군에서 현저하게 감소한 것을 확인하였다(도 4).

[0102] 또한, 면역형광 분석 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 대조군과 비교하여 $A\beta_{1-42}$ 투여군은 해마의 DG 및 CA3 부위에서 $A\beta$ 가 증가하고, $A\beta_{1-42}$ 투여군과 비교하여 $A\beta_{1-42}$ 및 멜라토닌 투여군에서는 해마의 DG($P<0.001$) 및 CA3($P<0.001$) 부위 모두에서 $A\beta$ 가 유의적으로 감소한 것을 확인하였다(도 5).

[0104] 2-2. 전시냅스 단백질(presynaptic protein) 발현 확인 결과

[0105] $A\beta_{1-42}$ 투여에 의한 독성을 멜라토닌이 완화시키는지 확인하기 위하여 전시냅스 소포 막 단백질(presynaptic vesicle membrane protein)인 시냅토파이신(synaptophysin) 및 시냅토솜 관련 단백질(synaptosomal-associated protein)인 SNAP-25(synaptosomal associated protein-25)의 발현현을 확인하였다.

[0106] 실험 결과, 도 6에 나타난 바와 같이 대조군과 비교하여 $A\beta_{1-42}$ 투여군에서 시냅토파이신(synaptophysin) 및 SNAP-25의 발현이 감소한 것을 확인할 수 있었으며, $A\beta_{1-42}$ 및 멜라토닌 투여군은 $A\beta_{1-42}$ 투여군과 비교하여 시냅토파이신($P<0.001$) 및 SNAP-25($P<0.001$)의 발현이 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 6).

[0107] 또한, 도 7에 나타난 바와 같이 면역형광 실험을 통하여 동일한 결과를 확인할 수 있었으며, 대조군과 비교하여 $A\beta_{1-42}$ 투여군에서 SNAP-25는 감소하고, $A\beta_{1-42}$ 투여군과 비교하여 $A\beta_{1-42}$ 및 멜라토닌 투여군에서는 해마의 DG($P<0.001$), CA3($P<0.001$) 및 CA1($P<0.001$) 부위에서 SNAP-25가 현저하게 증가한 것을 확인하였다(도 7).

[0109] 2-3. 후시냅스 단백질(postsynaptic protein) 발현 확인 결과

[0110] $A\beta_{1-42}$ 에 의해 유도된 시냅스 이상은 AMPA 수용체(3-hydroxy-5-methylisoxazol-4-propionic acid receptors, AMPARs)의 감소와 관련이 있으며, 특히, AMPA 수용체 1에서 845번 세린의 인산화는 후시냅스 글루타메이트 수용체의 이동(trafficking)에 중요한 역할을 한다. 또한, 시냅토솜 관련 단백질인 SNAP-23은 AMPA 수용체의 이동에 관여하기 때문에, 후시냅스 장기 강화(post-synaptic long term potentiation, LTP)와 연관있는 단백질을 조사하였다.

[0111] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이 대조군과 비교하여 $A\beta_{1-42}$ 투여군은 해마에서 p-GluR1(Ser 845), SNAP-23, PSD95(postsynaptic density protein 95), 및 p-CREB(Ser 133)의 수준이 감소한 것을 확인하였다. 반면에, $A\beta_{1-42}$ 투여군과 비교하여 $A\beta_{1-42}$ 및 멜라토닌 투여군에서는 p-GluR1(Ser 845)($P<0.01$), SNAP-23($P<0.001$), PSD95($P<0.001$) 및 p-CREB(Ser 133)($P<0.001$)의 수준이 현저하게 증가한 것을 알 수 있었다(도 8).

[0112] 또한, 도 9에 나타난 바와 같이 대조군과 비교하여 $A\beta_{1-42}$ 투여군에서 PSD95의 수준이 감소한 것을 알 수 있었으며, $A\beta_{1-42}$ 및 멜라토닌 투여군은 $A\beta_{1-42}$ 투여군과 비교하여 해마의 DG($P<0.001$) 및 CA3($P<0.001$) 부위에서 현저하게 증가한 것을 확인하였다(도 9).

[0114] 2-4. PI3K 및 Akt의 인산화 확인 결과

[0115] 신호전달 경로에서 PI3K는 Akt를 활성화시키는 것으로 알려져 있기 때문에, PI3K의 인산화(p-PI3K) 및 Akt의 인산화(p-Akt(Ser473)) 정도를 면역블롯으로 확인하였다.

[0116] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이 대조군과 비교하여 $A\beta_{1-42}$ 투여군에서 p-PI3K가 현저하게 감소하고, 반면에 $A\beta_{1-42}$ 및 멜라토닌 투여군은 $A\beta_{1-42}$ 투여군과 비교하여 p-PI3K($P<0.001$)가 현저하게 증가한 것을 확인하였다(도 10).

[0117] Akt의 인산화도 유사한 형태를 보였으며, 대조군과 비교하여 $A\beta_{1-42}$ 투여군에서는 p-Akt(Ser473)의 수준이 현저하게 감소한 반면, $A\beta_{1-42}$ 및 멜라토닌 투여군은 $A\beta_{1-42}$ 투여군과 비교하여 p-Akt(Ser473)($P<0.01$)의 수준이 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 10).

[0119] **2-5. GSK-3 β 인산화(Ser9) 확인 결과**

[0120] 활성화된 GSK-3 β 의 인산화(p-GSK3 β (Ser 9))는 GSK-3 β 의 비활성화와 연관이 있기 때문에, GSK-3 β 의 인산화 정도를 확인하였다.

[0121] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이 대조군과 비교하여 A β ₁₋₄₂ 투여군에서 p-GSK3 β (Ser 9)의 수준이 현저하게 감소하고, 반면에 A β ₁₋₄₂ 및 멜라토닌 투여군은 A β ₁₋₄₂ 투여군과 비교하여 p-GSK3 β (Ser 9)($P<0.01$)가 증가한 것을 확인하였다(도 10).

[0122] 또한, 해마의 CA3 부위에서 p-Akt(Ser 473) 및 p-GSK3 β (Ser 9)의 수준을 확인하였다. 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이 대조군과 비교하여 A β ₁₋₄₂ 투여군에서는 p-Akt(Ser 473) 및 p-GSK3 β (Ser 9)의 수준이 감소하였으나, A β ₁₋₄₂ 및 멜라토닌 투여군은 A β ₁₋₄₂ 투여군과 비교하여 p-Akt(Ser 473)($P<0.001$) 및 p-GSK3 β (Ser 9)($P<0.001$)의 수준이 현저하게 증가한 것을 확인하였다(도 11).

[0124] **2-6. 타우 인산화 확인 결과**

[0125] 타우 단백질의 인산화에 대한 A β ₁₋₄₂의 효과를 확인하기 위하여, 타우 단백질의 Ser 404 및 Ser 413 위치의 인산화 정도를 면역블롯으로 조사하였다.

[0126] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이 대조군과 비교하여 A β ₁₋₄₂ 투여군은 Ser 404 및 Ser 413의 인산화가 증가하고, A β ₁₋₄₂ 투여군과 비교하여 A β ₁₋₄₂ 및 멜라토닌 투여군에서는 Ser 404($P<0.001$) 및 Ser 413($P<0.001$)의 인산화가 감소한 것을 확인하였다(도 10).

[0128] **2-7. 세포사멸(apoptosis) 관련 단백질 확인 결과**

[0129] A β 는 카스파아제를 통하여 세포사멸을 유도하기 때문에, 세포사멸 캐스케이드(apoptotic cascades)에 관여하는 카스파아제-9 및 카스파아제-3의 발현을 확인하였다.

[0130] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이 대조군과 비교하여 A β ₁₋₄₂ 투여군에서 카스파아제-9의 활성이 증가하고, A β ₁₋₄₂ 투여군과 비교하여 A β ₁₋₄₂ 및 멜라토닌 투여군에서는 A β ₁₋₄₂에 의해 유도된 카스파아제-9($P<0.01$)의 활성이 유의적으로 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 12).

[0131] 또한, 활성화된 카스파아제-3의 수준을 조사한 결과, 대조군과 비교하여 A β ₁₋₄₂ 투여군에서 카스파아제-3의 활성이 높고, 반대로 A β ₁₋₄₂ 투여군과 비교하여 A β ₁₋₄₂ 및 멜라토닌 투여군에서는 카스파아제-3의 활성이 감소하여 멜라토닌이 A β 에 의해 유도되는 카스파아제-3($P<0.001$)의 활성을 약화시키는 것을 확인할 수 있었다(도 12).

[0132] 또한, 면역조직 염색을 통하여 활성화된 카스파아제-3를 조사하였다. 그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이 대조군과 비교하여 A β ₁₋₄₂ 투여군에서는 해마의 CA1, CA3 및 DG 부위에서 활성화된 카스파아제-3 양성인 세포가 현저하게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이와 반대로 A β ₁₋₄₂ 투여군과 비교하여 A β ₁₋₄₂ 및 멜라토닌 투여군에서는 CA1($P<0.001$), CA3($P<0.001$) 및 DG($P<0.001$) 부위에서 활성화된 카스파아제-3 양성인 세포가 감소한 것을 확인하였다(도 13).

[0134] **2-8. 폴리 에이디피-리보오스 중합효소-1 확인 결과**

[0135] 폴리 에이디피-리보오스 중합효소-1(Poly ADP-ribose polymerase-1, PARP-1)은 DNA 손상에 관여하며, 흥분독성 물질에 의한 PARP-1의 과발현은 신경퇴화(neurodegeneration)를 유도하고, A β 펩티드는 성인 랫트의 해마에서 PARP-1의 과활성을 촉발하는 것으로 알려져 있기 때문에 PARP-1을 확인하였다.

[0136] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이 대조군과 비교하여 A β ₁₋₄₂ 투여군의 해마에서 PARP-1의 절단(cleavage)이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, A β ₁₋₄₂ 투여군과 비교하여 A β ₁₋₄₂ 및 멜라토닌 투여군의 해마에서는 PARP-

1의 수준이 감소한 것을 확인할 수 있었다(도 12).

[0138] 3. 해마 내의 신경세포 분석 결과

[0139] 3-1. FJB 염색 결과

[0140] 해마에서 신경세포의 사멸 정도를 확인하기 위하여 FJB 염색을 수행하였다.

[0141] 그 결과, 도 14에 나타난 바와 같이 대조군과 비교하여 $A\beta_{1-42}$ 투여군에서는 해마의 DG, CA1 및 CA3 부위의 FJB-염색 신경 세포가 크게 증가하여 신경세포의 사멸이 일어난 것을 확인할 수 있었다. 반면에, $A\beta_{1-42}$ 투여군과 비교하여 $A\beta_{1-42}$ 및 멜라토닌 투여군에서는 FJB-염색 신경세포가 감소한 것을 확인하여 해마의 DG($P<0.001$), CA1($P<0.001$) 및 CA3($P<0.001$)에서 신경세포의 사멸이 줄어든 것을 확인하였다(도 14).

[0143] 3-2. 니슬 염색 결과

[0144] 신경퇴화 정도를 확인하기 위하여 니슬 염색을 수행하였다.

[0145] 그 결과, 도 15에 나타난 바와 같이 대조군과 비교하여 $A\beta_{1-42}$ 투여군은 해마의 DG, CA1 및 CA3 부위에서 생존 뉴런의 수가 감소하고, $A\beta_{1-42}$ 투여군과 비교하여 $A\beta_{1-42}$ 및 멜라토닌 투여군에서는 DG($P<0.001$), CA1($P<0.01$) 및 CA3($P<0.001$) 부위에서 생존 뉴런의 수가 크게 증가한 것을 확인하였다(도 15).

[0146] 상기 결과들을 통하여, 멜라토닌이 $A\beta_{1-42}$ 를 투여한 마우스에서 세포사멸 및 신경퇴화를 억제하는 효과가 있음을 확인하였다.

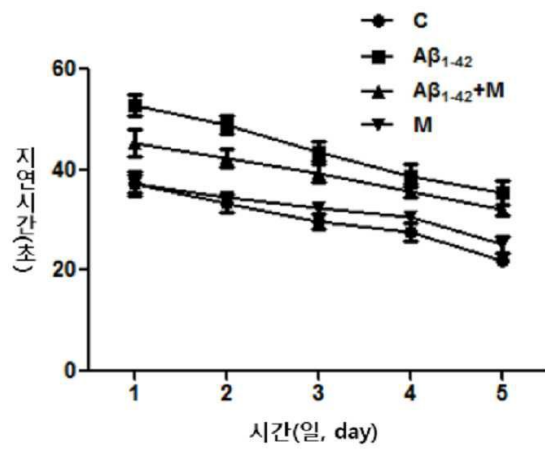
[0148] 4. 아포토스-글로TM 트리플렉스 실험(Apotox-GloTM triplex assay) 결과

[0149] 생체 외에서 $A\beta_{1-42}$ 에 의해 유도되는 신경독성을 확인하기 위하여, HT22 세포에서 Apotox-GloTM triplex assay를 수행하여, 세포 생존율, 세포독성 및 세포사멸(세포사멸 마커 카스파아제-^{3/7}) 정도를 조사하였다.

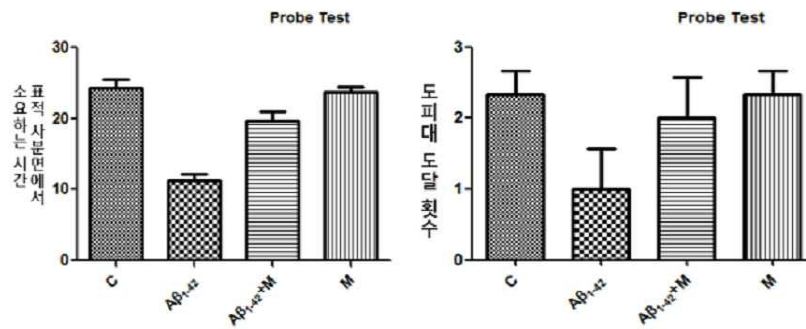
[0150] 그 결과, 도 16에 나타난 바와 같이 대조군(0.01% DMSO를 처리)과 비교하여 $A\beta_{1-42}$ (5 μ m)를 처리한 세포에서 세포의 생존율은 감소한 반면, 세포독성 및 카스파아제-^{3/7}의 활성은 증가한 것을 확인할 수 있었다. 반면, 멜라토닌을 각각 20, 50 및 100 μ m 처리한 세포에서는 $A\beta_{1-42}$ 처리의 효과가 감소하여, 세포 생존율은 증가하고, 세포독성 및 카스파아제-^{3/7}의 활성은 감소한 것을 확인하였다(도 16).

도면

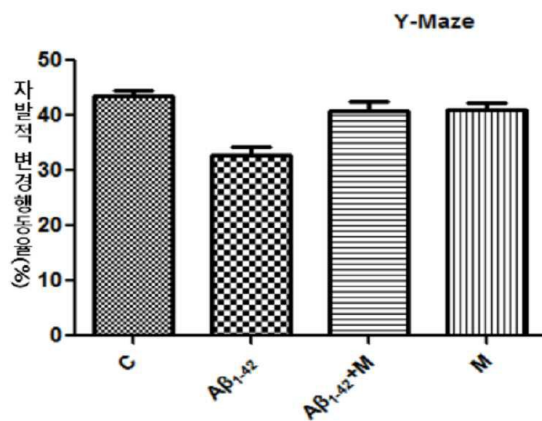
도면1



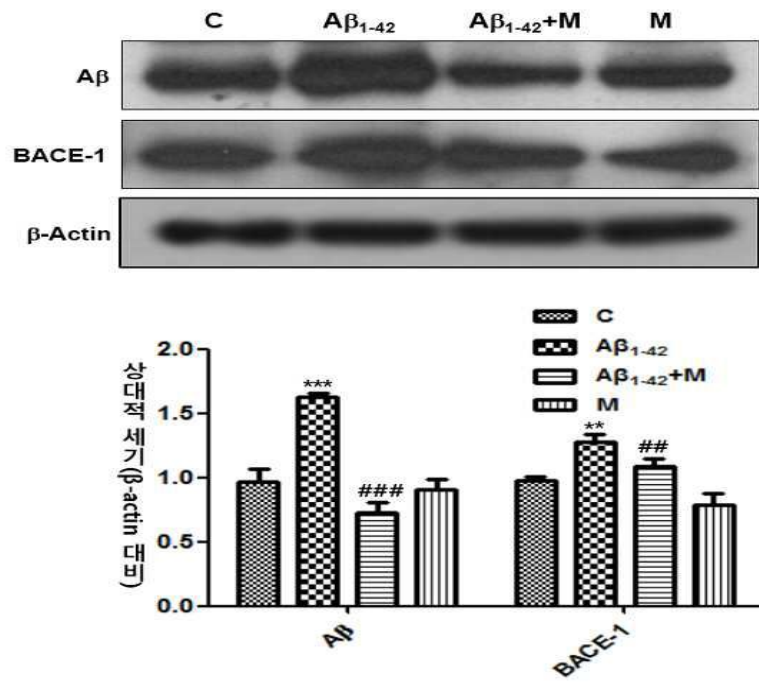
도면2



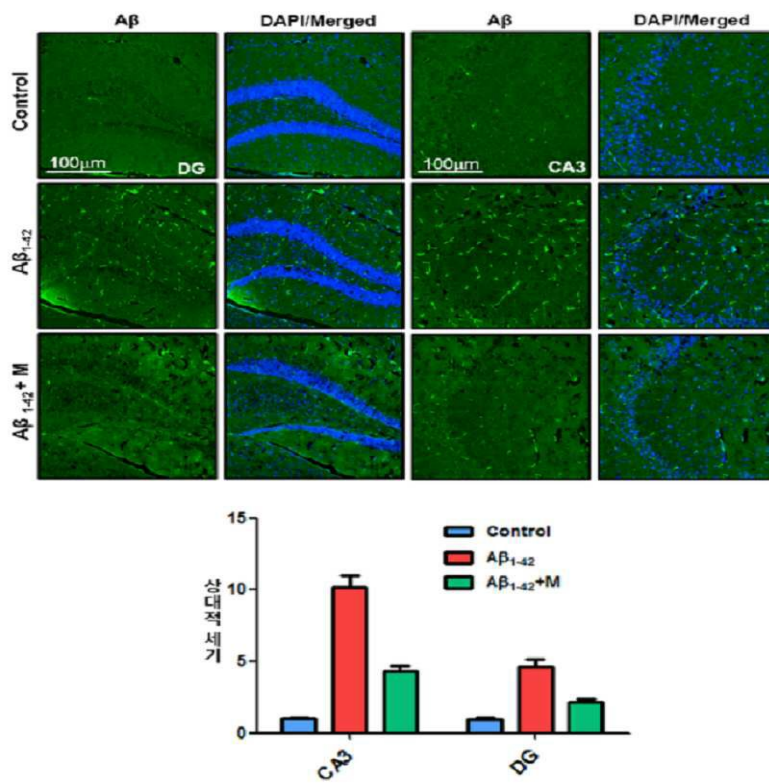
도면3



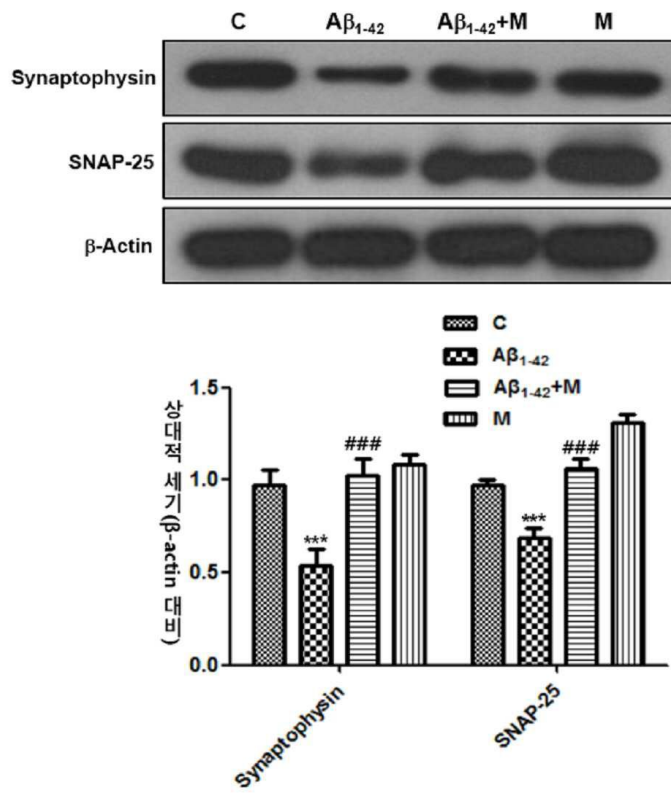
도면4



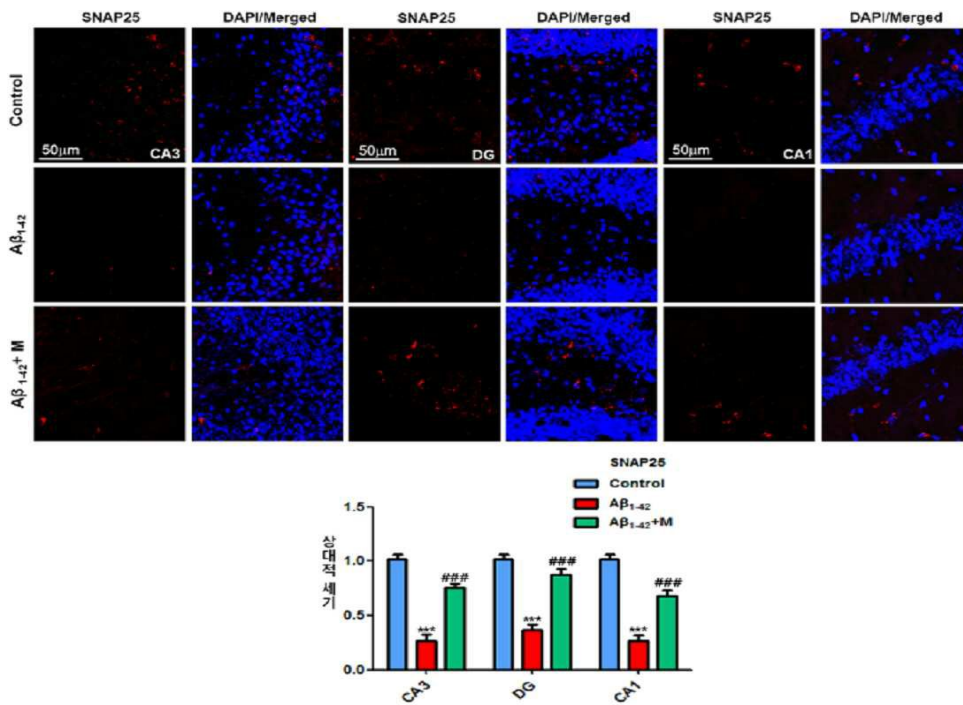
도면5



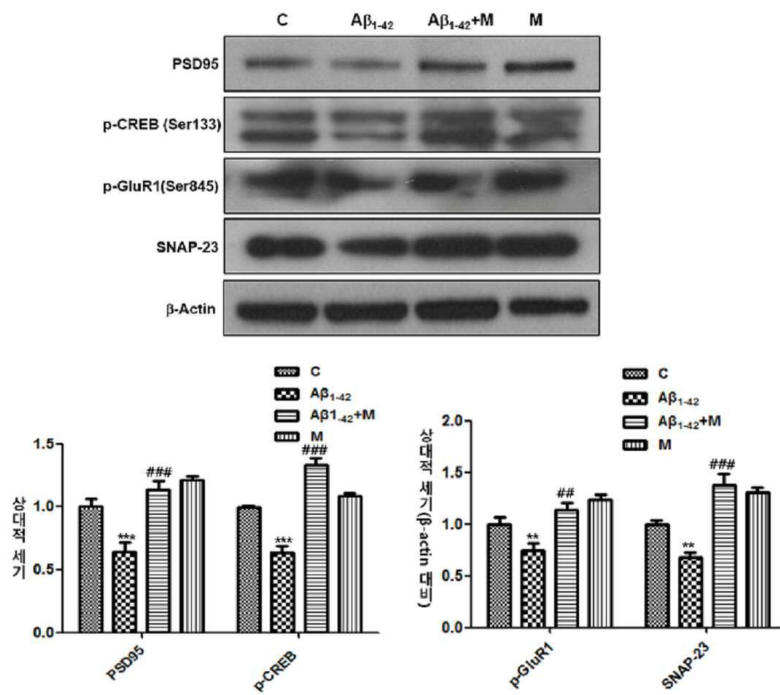
도면6



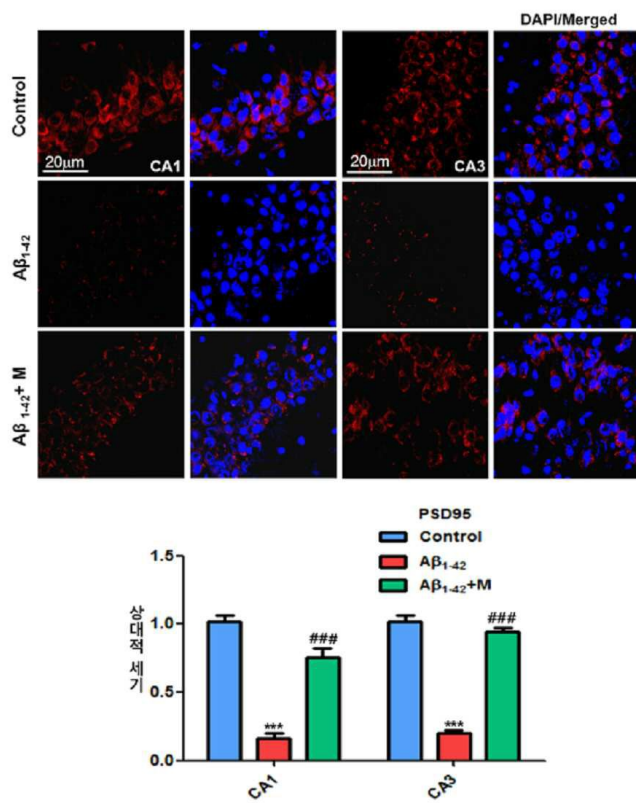
도면7



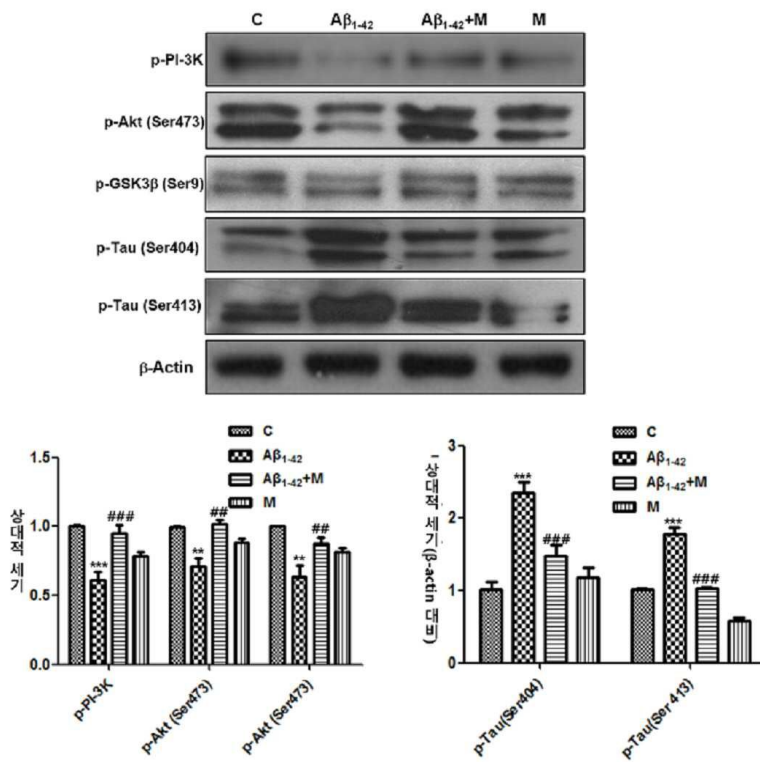
도면8



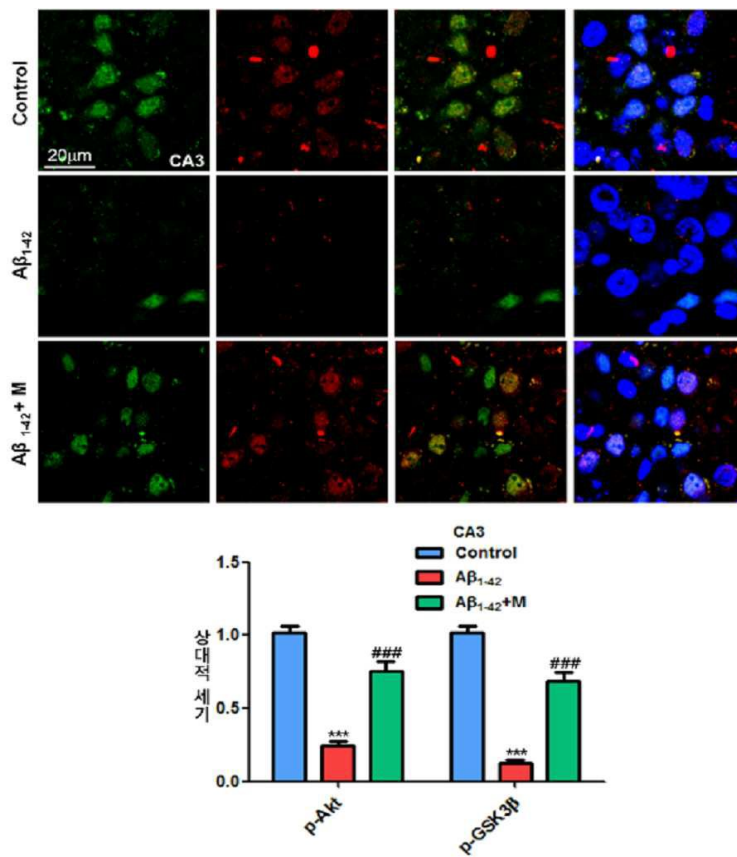
도면9



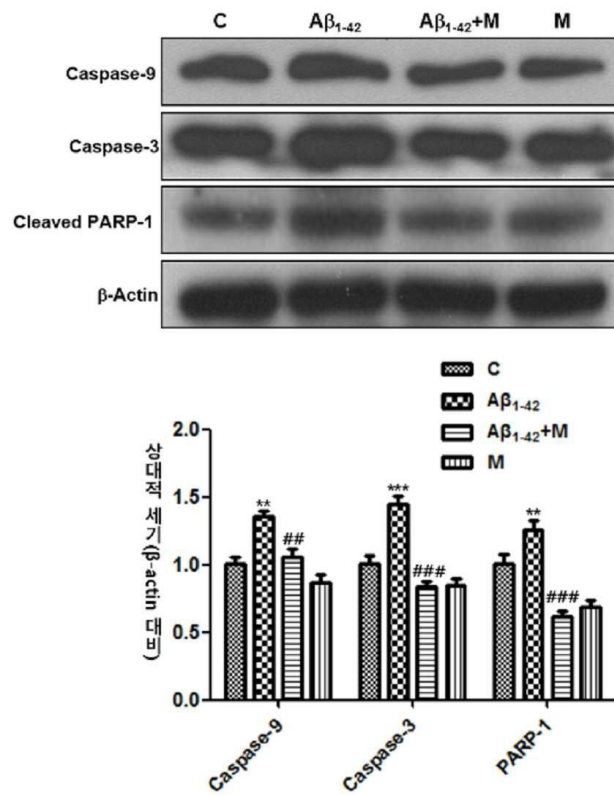
도면10



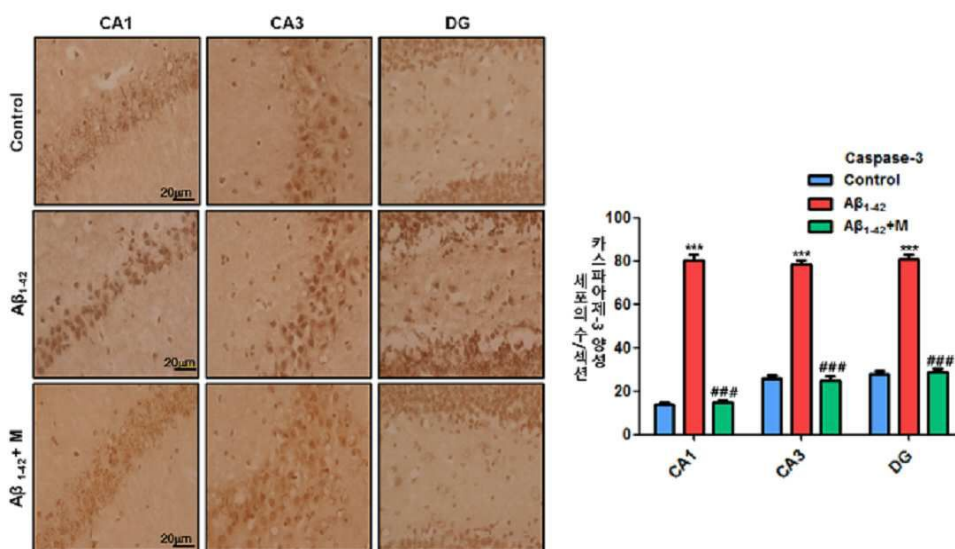
도면11



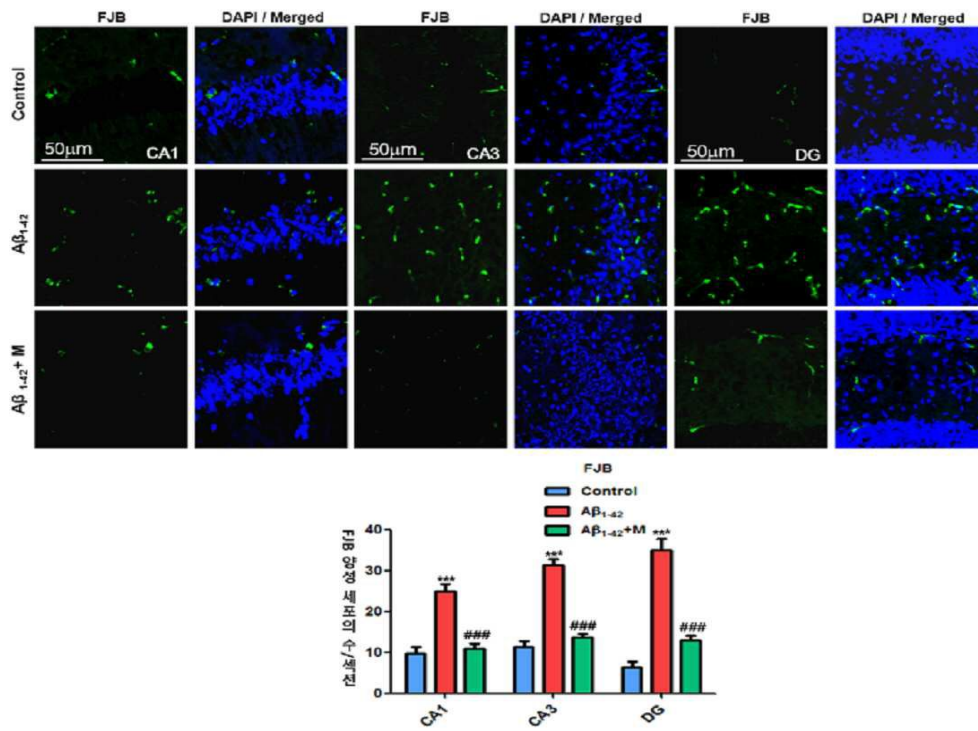
도면12



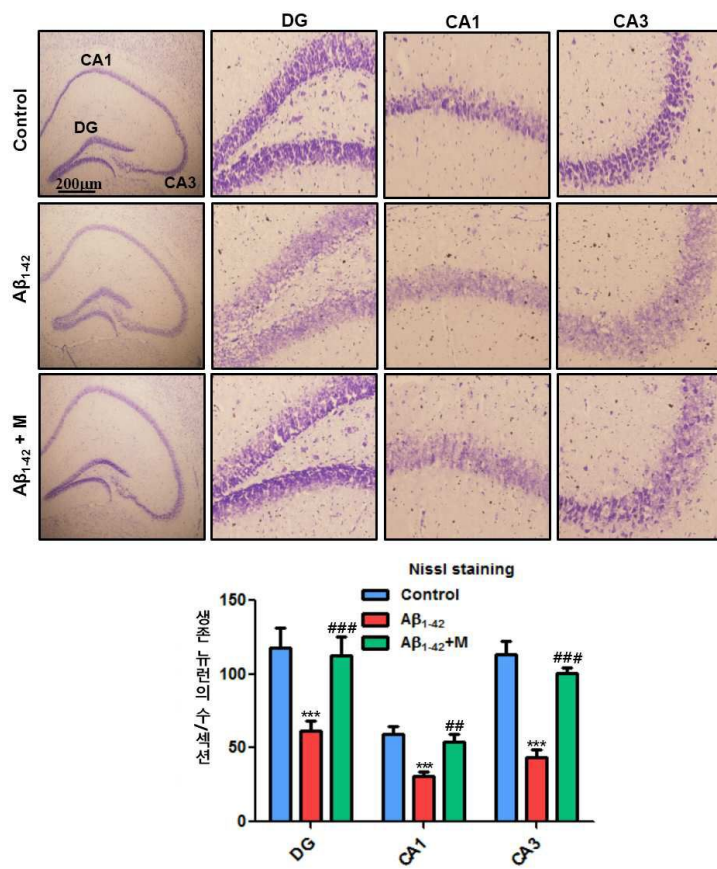
도면13



도면14



도면15



도면16

