(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0112870
(43) 공개일자 2019년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 31/713* (2006.01)
C12Q 1/6883 (2018.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
A61K 31/713 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0033732
(22) 출원일자 2018년03월23일
심사청구일자 2018년03월23일
(30) 우선권주장
1020170041091 2017년03월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
(72) 발명자
이희란
경기도 남양주시 와부읍 덕소로 180, 111동 1204호 (덕소두산위브아파트)
우하나
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 224동 302호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

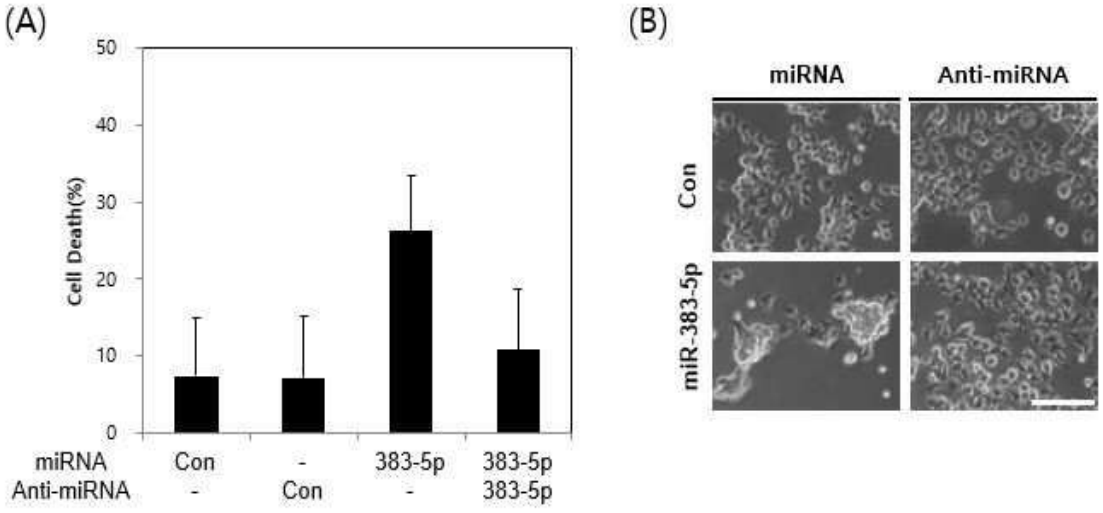
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **신경줄기세포 사멸 억제 효과를 가지는 miR-383-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 신경줄기세포 사멸 억제 효과를 가지는 miR-383-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명자들은 HCN 세포 유래 총 RNAs를 사용하여, 인슐린 존재 유무에 따른 조건하에서 마이크로어레이 기반 게놈 와이드(genome-wide) miRNA 분석을 수행하여 miRNAs의 특성을 확인하였다. 그 결과, miR-383-5p를 억제시킬 경우, 해마 유래 신경 줄기세포의 생존을 조절하여, 신경줄기세포 생착율을 향상시킬 수 있다는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 miR-383-5p 억제제는 퇴행성 뇌신경질환의 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도8



(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2018.05)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/178 (2013.01)
(72) 발명자
이원일
서울특별시 강동구 성안로31길 64-11, 2층 (천호동)
박수정
서울특별시 도봉구 도봉산길 13-6, 101호
김지현
서울특별시 송파구 풍성로22길 21, 301호
김유겸
서울특별시 성동구 독서당로 191, 3동 1407호 (옥수동, 옥수동극동아파트)
김승후
서울특별시 송파구 오금로31길 28, 103동 1312호 (방이동, 코오롱아파트)
이현준
서울특별시 송파구 양재대로 1218, 228동 106호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016-0635
부처명 미래부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 신진연구자지원사업
연구과제명 miRNA를 이용한 해마 유래 성체 신경 줄기세포 생존 조절 연구(2)
기 여 율 50/100
주관기관 울산대학교 산학협력단
연구기간 2016.07.01 ~ 2017.06.30
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016-0637
부처명 미래부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 선도연구센터 (ACE)육성사업 기초의약학분야 (MRC)
연구과제명 세포기능장애 연구센터(4)
기 여 율 50/100
주관기관 울산대학교 산학협력단
연구기간 2016.09.01 ~ 2017.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

miR-383-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 신경줄기세포 사멸 억제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 miR-383-5p 억제제는 안타고미르(antagomir), 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotide) 또는 RNA 억제 분자(inhibitoy RNA molecule)인 것을 특징으로 하는 신경줄기세포 사멸 억제용 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 miR-383-5p 억제제는 서열번호 1로 표시되는 anti-miR-383-5p인 것을 특징으로 하는 신경줄기세포 사멸 억제용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 조성물은 신경줄기세포의 생착율을 향상시키는 것을 특징으로 하는 신경줄기세포 사멸 억제용 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신경줄기세포는 해마 유래 신경줄기세포인 것을 특징으로 하는 신경줄기세포 사멸 억제용 조성물.

청구항 6

miR-383-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 miR-383-5p 억제제는 서열번호 1로 표시되는 anti-miR-383-5p인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌신경질환은 치매, 알츠하이머(Alzheimer's disease), 뇌졸중, 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 피크병(Pick's disease), 근위축성 측색 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease; CJD), 진행성 핵상마비(Progressive supranuclear palsy), 다계통 위축증(Multiple system strophy), 감람핵-뇌교-소뇌 위축증(Olivopontocerebellar atrophy; OPCA), 샤이-드래거 증후군(Shy-Drager syndrome), 본태성 진전증(Essential tremor), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico-basal ganlionic degeneration), 미만성 루이 소체 질환(Diffuse Lewy body disease) 및 선조체-흑질 퇴행증 (Striatonigral degeneration)으로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 9

신경줄기세포에 시험물질을 접촉시키는 단계;

상기 시험물질을 접촉한 신경줄기세포에서 miR-383-5p의 발현 정도를 측정하는 단계; 및

대조구 시료와 비교하여 상기 miR-383-5p의 발현 정도가 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌신경질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 10

miR-383-5p를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경질환 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 11

miR-383-5p를 유효성분으로 포함하는 신경줄기세포 사멸 검출용 바이오마커 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신경줄기세포 사멸 억제 효과를 가지는 miR-383-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, miR-383-5p를 억제시킬 경우, 해마 유래 신경 줄기세포의 생존을 조절하여, 신경줄기세포 생착율을 향상시킬 수 있다.

배 경 기 술

[0002] 손상된 조직을 재생하기 위한 줄기세포 기반 치료는 중추신경의 영구적 손상으로 인한 여러 신경질환을 가진 환자에게는 새로운 희망이 되고 있다. 이에, 측뇌실(lateral ventricle)의 부뇌실 구역(subventricular zone) 및 해마의 치아이랑(dentate gyrus)과 같은 성체 뇌에서 발견되는 다능성 줄기세포가 주목을 받고 있다. 성체 신경줄기세포는 성인의 뉴런을 기능적으로 성숙시키고, 정상 인지 기능을 포함한 다양한 뇌 활동을 유지하는데 기여한다. 또한, 성체 쥐의 뇌 유래 해마 신경(hippocampal neural; HCN) 줄기세포는 다능성 성체 신경줄기세포의 특성을 유지하고 있는 것으로 보고되었다. 또한, HCN 세포는 자기재생능력 뿐만 아니라, 뉴런, 성상세포(astrocytes) 또는 희소돌기아교세포(oligodendrocytes)로도 분화할 수 있다. 이는 성체 신경줄기세포 또는 HCN 세포는 퇴행성 신경질환의 재생 치료에 활용 가능성이 높다는 것을 나타낸다.

[0003] MicroRNAs (miRNAs or miRs)는 약 22-25개의 뉴클레오티드(nucleotides; nts)를 가진 이중 나선의 암호화 되지 않은 RNA 분자이다. 이는 표적 mRNA 분해 또는 표적 mRNA 번역을 억제함으로써, 전사 후 수준에서 유전자 발현을 하향-조절한다. MiRNAs는 RNA polymerase II에 의해 70-100 nts의 긴 1차 전사체를 만드는데, 이를 pri-miRNAs라고 한다. 이후 ribonuclease Drosha 및 Dicer에 의해 성숙 miRNA duplexes가 만들어진다. 이렇게 생성된 miRNA는 표적 mRNA에 상보적으로 결합하여 번역 억제와 mRNA 불안정화를 유도하여, 주로 세포 증식, 사멸, 세포 대사, 세포 내 신호전달 및 세포 이동과 관련 있는 유전자 발현을 조절한다. 또한, miRNA 발현 패턴은 조직-특이적이고, 특정 유전적 또는 환경적 상황에서 세포의 생리적 특성으로 정의할 수 있다. 또한, miRNA의 이상 발현은 정상 생리 활동을 붕괴시키고, 불가피하게 세포를 병리적 상태로 유도하게 된다. 따라서, miRNA에 대한 연구는 다양한 인간 질병에 있어서 miRNAs의 기능적 특성을 규명하는 방향으로 점차 초점이 맞춰지고 있다. 그럼에도 불구하고, HCN 줄기세포의 세포 사멸 유도에 있어 miRNA(s)의 역할은 아직까지 밝혀진 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 미국공개특허 US2015-0037299 (2015.02.05)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 miR-383-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 신경줄기세포 사멸 억제용 조성물을 제공하는데 있다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 miR-383-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 또 다른 목적은 신경줄기세포에서 miR-383-5p의 발현 정도를 측정하여 퇴행성 뇌신경질환 치료제 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 miR-383-5p를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 miR-383-5p를 유효성분으로 포함하는 신경줄기세포 사멸 검출용 바이오마커 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 miR-383-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 신경줄기세포 사멸 억제용 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 miR-383-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 신경줄기세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; 상기 시험물질을 접촉한 신경줄기세포에서 miR-383-5p의 발현 정도를 측정하는 단계; 및 대조구 시료와 비교하여 상기 miR-383-5p의 발현 정도가 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌신경질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 miR-383-5p를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 miR-383-5p를 유효성분으로 포함하는 신경줄기세포 사멸 검출용 바이오마커 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 신경줄기세포 사멸 억제 효과를 가지는 miR-383-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명자들은 HCN 세포 유래 총 RNAs를 사용하여, 인슐린 존재 유무에 따른 조건하에서 마이크로어레이 기반 게놈 와이드(genome-wide) miRNA 분석을 수행하여 miRNAs의 특성을 확인하였다. 그 결과, miR-383-5p를 억제시킬 경우, 해마 유래 신경 줄기세포의 생존을 조절하여, 신경줄기세포 생착율을 향상시킬 수 있다는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 miR-383-5p 억제제는 퇴행성 뇌신경질환의 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 miRNA 어레이를 위한 세포 배양 결과이다. (A) 지정된 시간 동안 인슐린 존재하는 경우, (B) 지정된 시간 동안 인슐린이 결핍된 경우.

도 2는 miRNA 어레이를 위한 샘플 준비 과정을 나타낸다. (A) 인슐린 (+) 실험군은 24시간 샘플로 준비하고, 인슐린 (-) 실험군은 시간에 따라 12, 24, 48 시간 동안 Insulin이 없는 배지에서 배양한 세포를 재료로 준비하였고, 각 실험군 당 triple 샘플 준비하였다(n=3). (B) 총 RNA 샘플 분석 결과로서, 아가로스 젤 전기영동(1%) 결과를 나타낸다. (C) 총 RNA 샘플 분석 결과로서, 분광광도계를 이용한 Nanodrop 분석 결과[(+) 24H]를 나타낸다.

도 3은 miRNA 어레이를 위해 선택된 총 RNA 샘플 리스트를 나타낸다.

도 4는 miRNA 어레이에 사용된 Affimetrix Genechip 4.0 version 정보를 나타낸다.

도 5는 miRNA 어레이 분석 결과를 나타낸다. (A) Box plot 결과로서, miRNA 어레이에 사용된 12 세트의 샘플에서 얻어지는 신호 세기(signal intensity)의 범위를 나타내는 것으로, 모든 실험 세트에서 유사한 정도의 신호 세기를 나타낸다. (B) Pearson correlation plot 결과로서, 어레이 칩(array chip) 간의 상관관계 분석하여, 수치가 1에 가까우면 양의 상관관계를 의미한다. (C) 어레이 분석을 요약한 결과이다.

도 6은 인슐린 결핍 조건하에서, RT-qPCR을 통한 miR-383-5p의 정량 결과를 나타낸다.

도 7은 rHCN 세포의 세포사멸에 있어, miR-383-5p 처리의 효과를 나타낸다. (A) 정량적 세포사멸 분석(miRNA 농도: 50 nM), (B) 형태학적 특성(48시간 처리).

도 8은 miR-383-5p에 의한 세포 사멸에 있어, anti-miR-383-5p 처리의 효과를 나타낸다. (A) 정량적 세포사멸 분석(miRNA 농도: 50 nM, anti-miRNA 농도: 100 nM, 24시간 처리), (B) 형태학적 특성.

도 9는 자가포식 특이 세포 사멸에 있어, miR-383-5p 처리의 효과를 나타낸 것이다. (A) 정량적 카스파제-3 활

성 분석(miRNA 농도: 50 nM, Dox 농도: 1 μM, 24시간 처리), (B) 면역블로팅 분석. *: 0.05> p.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 본 발명은 miR-383-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 신경줄기세포 사멸 억제용 조성물을 제공한다.

[0018] 바람직하게는, 상기 miR-383-5p 억제제는 miRNA를 억제시킬 수 있는 어떠한 억제제도 사용 가능하나, 안타고미르(antagomir), 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotide) 또는 RNA 억제 분자(inhibitoy RNA molecule)일 수 있고, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 바람직하게는, 상기 miR-383-5p 억제제는 서열번호 1 (5'-ccacaaucaccuucugaucug-3')로 표시되는 anti-miR-383-5p일 수 있다.

[0019] 바람직하게는, 상기 조성물은 신경줄기세포의 생착율을 향상시킬 수 있다.

[0020] 바람직하게는, 상기 신경줄기세포는 해마 유래 신경줄기세포일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 상기 안타고미르(antagomir)나 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotide)는 miR-383-5p의 염기서열에 상보적인 서열을 갖는 것을 특징으로 한다. 이러한 miRNA에 상보적인 서열을 갖는 억제제는 miR-383-5p에 결합하여 이들 miRNA가 작용하지 못하도록 하는 역할을 한다.

[0022] 한편, 상기 miR-383-5p는 서열번호 2 (5'-c**agaucag**aaggugacugugg-3'; miRBase Accession # MIMAT0003114)로 표시는 랫트(rat) 유래 miR-383-5p 또는 서열번호 3 (5'-**agaucag**aaggugauuguggcu-3'; miRBase Accession # MIMAT0000738)으로 표시되는 인간(human) 유래 miR-383-5p일 수 있다. 상기 서열의 밑줄 친 부분(굵은 글씨)은 seed로 miRNA의 targeting에 중요한 부분이며, 이는 Targetscan 정보를 이용하였다.

[0023] 상기와 같이, miR-383-5p는 인간(human)과 랫트(Rat)에서 공통적인 서열을 가지고 있으며, 상기 공통적인 서열은 miRNA의 targeting에 중요한 부분이므로, 이로 인해 miR-385-5p 억제제가 인간에서도 적용 가능하여 퇴행성 뇌신경질환 치료에 효과가 있다는 것을 예측할 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명은 miR-383-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0025] 바람직하게는, 상기 miR-383-5p 억제제는 miRNA를 억제시킬 수 있는 어떠한 억제제도 사용 가능하나, 안타고미르(antagomir), 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotide) 또는 RNA 억제 분자(inhibitoy RNA molecule)일 수 있고, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 바람직하게는, 상기 miR-383-5p 억제제는 서열번호 1 (5'-ccacaaucaccuucugaucug-3')로 표시되는 anti-miR-383-5p일 수 있다.

[0026] 바람직하게는, 상기 퇴행성 뇌신경질환은 치매, 알츠하이머(Alzheimer's disease), 뇌졸중, 파킨슨병(Parkinson's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 피크병(Pick's disease), 근위축성 측색 경화증(Amyotrophic lateral sclerosis; ALS), 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease; CJD), 진행성 핵상마비(Progressive supranuclear palsy), 다계통 위축증(Multiple system strophy), 감람핵-뇌교-소뇌 위축증(Olivopontocerebellar atrophy; OPCA), 샤이-드래거 증후군(Shy-Drager syndrome), 본태성 진전증(Essential tremor), 피질-기저핵 퇴행증(Cortico-basal ganlionic degeneration), 미만성 루이 소체 질환(Diffuse Lewy body disease) 및 선조체-흑질 퇴행증 (Striatonigral degeneration)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 본 발명의 약학 조성물은 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스, siRNA 올리고뉴클레오타이드 및 천연물 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물 또는 복합 제제는 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 포함하여 약학 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0028] 본 발명의 약학 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유

제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 예방 또는 치료 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 이에 제한되는 것은 아니나, 예컨대, 성인의 경우, 1일 1회 내지 수회 투여시, 본 발명의 저해제는 1일 1회 내지 수회 투여시, 화합물일 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 폴리펩타이드, 단백질 또는 항체일 경우 0.1ng/kg~10g/kg, 안티센스 뉴클레오타이드, siRNA, shRNAi, miRNA일 경우 0.01ng/kg~10g/kg의 용량으로 투여할 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 신경줄기세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; 상기 시험물질을 접촉한 신경줄기세포에서 miR-383-5p의 발현 정도를 측정하는 단계; 및 대조구 시료와 비교하여 상기 miR-383-5p의 발현 정도가 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌신경질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0030] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "시험물질"은 유전자의 발현량에 영향을 미치거나, 단백질의 발현 또는 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 후보 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화학물질, 뉴클레오타이드, 안티센스-RNA, miRNA, siRNA(small interference RNA) 및 천연물 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 또한, 본 발명은 miR-383-5p를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0032] 또한, 본 발명은 miR-383-5p를 유효성분으로 포함하는 신경줄기세포 사멸 검출용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0033] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.

[0034] **<실험예>**

[0035] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0036] **1. HCN 세포 배양**

[0037] 성체 쥐의 뇌 유래 해마 신경(hippocampal neural; HCN) 줄기세포는 이전에 보고된 바에 따라 분리하였다(STEM CELLS 2008;26:2602-2610). 모든 배양 플레이트는 poly-L-ornithine (플라스틱 플레이트 10 μg/ml 및 유리 슬라이드 50 μg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 및 mouse laminin (5 μg/ml; BD Pharmingen, San Diego, CA)으로 코팅하였다. Ham's F-12 medium (Invitrogen), 1 mM L-glutamine (Invitrogen), 100 μg/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin (Invitrogen), 20 ng/ml b-FGF (PeproTech, Rocky Hill, NJ) 및 5 mg/L insulin (Sigma-Aldrich)이 함유된 자체-제조한 N2 supplement가 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen, Carlsbad, CA), 16 mg/L putrescin dihydrochloride (Sigma-Aldrich), 100 mg/L transferrin (Sigma-Aldrich), 30 nM sodium selenite (Sigma-Aldrich) 및 20 nM progesterone (Sigma-Aldrich)이 포함된 무혈청 배지에 HCN 세포를 배양하였다. 상기 배지는 sodium bicarbonate (1.27 g/L, Sigma-Aldrich)를 이용하여, pH 7.2로 조절하였다. 인슐린이 제거된 무-인슐린 배지를 제조하였다. 세포는 1:4-6의 비율로 계대배양하였다. 세포는 5% CO_2 조건으로, 37℃에서 배양하였다. 인슐린 포함 배지는 I (+)로 표시하고, 인슐린이 포함되지 않은 배지는 I (-)라고 표시하였다.

[0038] **2. miRNAs 및 세포 감염**

[0039] miRNA mimics는 내재성 miR-383-5p와 동일한 서열 및 동일한 기능을 하는 이중 나선 RNA 분자이다. 관련된 miR mimics를 억제하기 위해서, Anti-miRs는 이중 나선 핵산을 화학적으로 합성하였고, 형질감염을 통해 세포 내로 도입하였다. 음성 대조군(miR-Con 및 anti-miR-Con)은 Genolution (Seoul, Korea) 및 Dharmacon (Lafayette, CO)으로부터 구입하였다. 일시적인 형질감염을 위해, HCN 세포를 접종하였고, Lipofectamine 2000 (Invitrogen)을 사용하여 miRNAs를 형질감염시켰다.

[0040] **3. 총 RNA 추출**

[0041] 총 RNA는 인슐린 존재 유무에 따라 12, 24, 48시간 동안 배양된 HCN 세포로부터 추출하였다(도 1 및 도 2). RNA-free microcentrifuge tube에서, 약 2×10^6 세포를 0.5 ml Trizol reagent (Invitrogen)로 처리하였다. 4℃에서 15분 동안 12,000 g로 원심분리한 후, 상등액을 0.2 ml 클로로포름이 포함된 새로운 튜브로 옮겼다. 상기 튜브를 강하게 흔들고, 상온에서 5분 동안 반응시켰다. 원심분리 후, 상등액을 순수 이소프로필 알콜이 동량으로 포함된 새로운 튜브로 옮겼고, 상온에서 30분 동안 반응시켰다. 원심분리 후, 상등액을 버리고, 세척을 위해 1.0 ml의 70 % 에탄올을 RNA 펠렛에 첨가하였다. 원심분리하여 에탄올을 제거하고, 잔여 RNA 펠렛은 DEPC-처리된 RNase-free water에 현탁시켰다. 얻어낸 총 RNA 양 및 품질은 각각 NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) 및 아가로스 젤 전기영동을 통해 측정하였다(도 2).

[0042] **4. miRNA 마이크로어레이 및 데이터 분석**

[0043] miRNA 마이크로어레이 분석을 위한 총 RNA 샘플은 DNALink (Seoul, Korea)로 보냈다(도 3). 총 RNA 샘플의 품질 및 농축도는 각각 Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) 및 NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)을 통해 확인하였다. RNA 무결성(integrity) 정도를 나타내는 총 RNA의 RIN 수치는 9.8 내지 10.0이었고, 마이크로어레이 분석을 위해 요구되는 최소 수치 >8.0은 충분히 충족시켰다. 또한, 초기 전기영동도 (electropherogram) 프로파일에서도, RNA 샘플은 충분한 저분자량 RNA를 포함하는 것으로 나타났다. 그 후, Affymetrix GeneChip miRNA 4.0 Arrays (Santa Clara, CA)를 사용하여 마이크로어레이를 수행하였는데, 탐침-표지를 위해 FlashTag Labeling Kit를 사용하고, 데이터 분석을 위해 Affymetrix Expression Console Software를 사용하였다(도 4). 어레이 당 성숙 miRNA 탐침의 총 수는 728 랫트 성숙 miRNA를 포함하여 30,324 였다. 배경 제거, 표준화 및 검출 평가 후, 신호를 나타냈다(도 5). 통계적 유의성은 P-value <0.05으로, fold-change cutoff는 >1.3으로 진행하였다.

[0044] **5. miRNA에 대한 실시간 역전사 정량적 PCR(RT-qPCR) 분석**

[0045] 선택된 성숙 miRNA 발현 수준의 정량 분석은 RT-qPCR을 통해 수행하였다. RT는 mir-X miRNA first-strand synthesis kit (Clontech, Mountain View, CA)을 사용하여 수행하였다. miRNA 발현을 정량하기 위한 Q-PCR은 IQ SyBr Green I mix (Bio-Rad, Hercules, CA)를 사용하여 수행하였다. miRNAs와 상보적인 포워드 5' 특이적 PCR 프라이머 및 3' mRQ 프라이머를 사용하였다. PCR 조건은 다음과 같다. 95℃, 10초(초기 변성) 이후, 95℃, 5초 및 60℃, 20초로 40 사이클을 수행하였다. U6 RNA는 내재성 대조군으로 사용하였다.

[0046] **6. Hoechst 33342/propidium iodide (PI) 염색 후, 세포 사멸 측정**

[0047] HCN 세포의 세포 생존/사멸은 광현미경 하에서 형태학적으로 관측하였고, 세포사멸 정도는 Hoechst 33342/PI 염색(Thermo Fisher Scientific)을 통해 측정하였다. 지정된 시간에, 5 ㎍/ml Hoechst 33342 및 PI 용액을 배양 배지에 첨가하였고, 세포들은 5% CO_2 조건으로, 37℃에서 1시간 동안 유지하였다. 형광현미경 하에서 임의로 5 필드를 촬영한 후, PI-양성 및 Hoechst 33342-양성 세포의 비율을 계산하여 세포 사멸율을 측정하였다.

[0048] 세포 사멸 (%) = [PI-양성 세포수 (빨강) / Hoechst33342-양성 세포수 (파랑)] × 100

[0049] **<실시예 1> HCN 줄기세포 배양 과정 중 microRNA 발현 패턴에 있어 인슐린 결핍의 영향**

[0050] HCN 세포는 인슐린 결핍 후 1일 이내에, 세포 증식 지연과 함께 세포 수축(cell shrinkage), 세포 과정 손상, 세포 사멸이 일어난다. 세포 사멸 정도는 2-3일째에 가장 극심해지고, 세포는 결국 배양 플레이트로부터 분리되었다(도 1). 인슐린 결핍에 따라 세포 사멸 과정 중 miRNA 발현에 있어 특이적인 특징이 나타나는지 확인하기 위해서, miRNA 마이크로어레이 분석을 수행하였다(도 2 및 도 4). 실험 편차를 최소화하기 위해서, 인슐린 존재 유무에 따른 배양 조건 당 3번의 독립적인 시험을 수행하였다. 각 어레이에 대한 신호 세기 편차는 box plot에서 나타낸 바와 같이 quantile 표준화 이후 상당히 감소되었다(도 5A). 마이크로어레이 데이터 세트 사이의 상관계수는 correlation scatter plot에서 나타낸 바와 같이, 우수한 재현성을 나타내는 0.97 이상이었다(도 5B). 총 miRNA 수치는 p-value cutoff 0.05를 기준으로 필터링하였다. 728개의 랫트 성숙 miRNAs를 시험한 결과, 인슐린이 첨가된 경우에 비해 인슐린이 없을 경우, 총 175개의 miRNAs가 발현 수준에 있어 상당한 차이를 나타냈다. 인슐린 결핍 이후, 30개의 miRNAs는 상향-조절되었고, 145개의 miRNAs는 하향-조절되었다(fold-change > 1.3, 도 5C). 상기 결과를 종합하면, 인슐린 결핍 후, HCN 세포 사멸 과정 중에 miRNA 발현 프로파일에 차이가 발생한다는 것을 나타낸다.

[0051] miRNA 어레이 결과, 1.5 이상 증가한 증가군은 시간별로 6~21 종이며, 0.66 보다 더 감소한 표적(target)들은 시간별로 57~109 종으로 확인되었다. 이 중, miR-383-5p를 선택하여 추가적인 실험을 진행하였다.

[0052] 본 발명에 사용한 miR-383-5p에 대한 자세한 정보는 아래 표와 같다.

[0053]

Transcript ID (miRNA)	Absolute fold change			p value			Ortholog (HMR)	Sequence: human / rat	miRBase Accession #
	12H	24H	48H	12H	24H	48H			
rno-miR-383-5p	1.620	1.355	2.199	0.2830	ND	0.0467	HMR	aga uca gaa ggu gau ugu ggc u	MIMAT0000738
								c aga uca gaa ggu gac ugu gg	MIMAT0003114

[0054] * 파란 글씨 부분: seed로 miRNA의 targeting에 중요한 부분 (Targetscan 정보 이용)

[0055] * Human/Rat 사이에 다른 서열 부분은 빨간색으로 표시함.

[0056] * 전체 sequence 부분은 miRBase 정보를 이용함.

[0057] **<실시예 2> 인슐린 결핍 조건하에서, RT-qPCR을 통한 miR-383-5p의 정량**

[0058] qPCR을 통해 상기 어레이에서 확인한 증가 현상을 재확인하였다. rHCN 세포는 인슐린 존재 유무에 따라 24시간 또는 48시간 동안 배양하였고, 표시된 miRNAs에 특이적으로 RT-qPCR을 수행하였다($n \geq 3$). miR-383-5p의 발현 수준은 인슐린 결핍 조건에서 향상되었다(도 6). 각각의 수치는 mean ± SD로 나타냈다. U6 RNA는 내재성 대조군으로 사용하였다.

[0059] **<실시예 3> HCN 세포 생존능에 있어, 상향-조절된 miR-383-5p 처리의 효과**

[0060] HCN 세포 상에서, 상향-조절된 miR-383-5p의 생리학적 역할을 규명하기 위해, 인슐린 존재하에서 합성 miRNA mimics로 세포들을 형질감염시키고 관찰하였다. 대조 miRNA mimic을 첨가한 대조군과 달리, 상향-조절된 miRNA mimics 존재하에서 세포들은 생존능을 크게 상실하였는데, 이는 PI-양성 세포의 현저한 증가를 통해 확인하였다.

[0061] miR-383-5p에 의한 세포 사멸 정도는 인슐린 결핍의 경우와 유사하게 나타났다(도 7). 상기 결과는 인슐린이 존재하지 않을 경우 상향-조절된 miR-383-5p가 HCN 세포 생존능의 조절에 관여할 수 있다는 것을 나타낸다.

[0062] **<실시예 4> miR-383-5p-유도 세포 사멸을 억제하고, 인슐린 결핍으로 유도된 세포 사멸을 보호하는 anti-miR-383-5p**

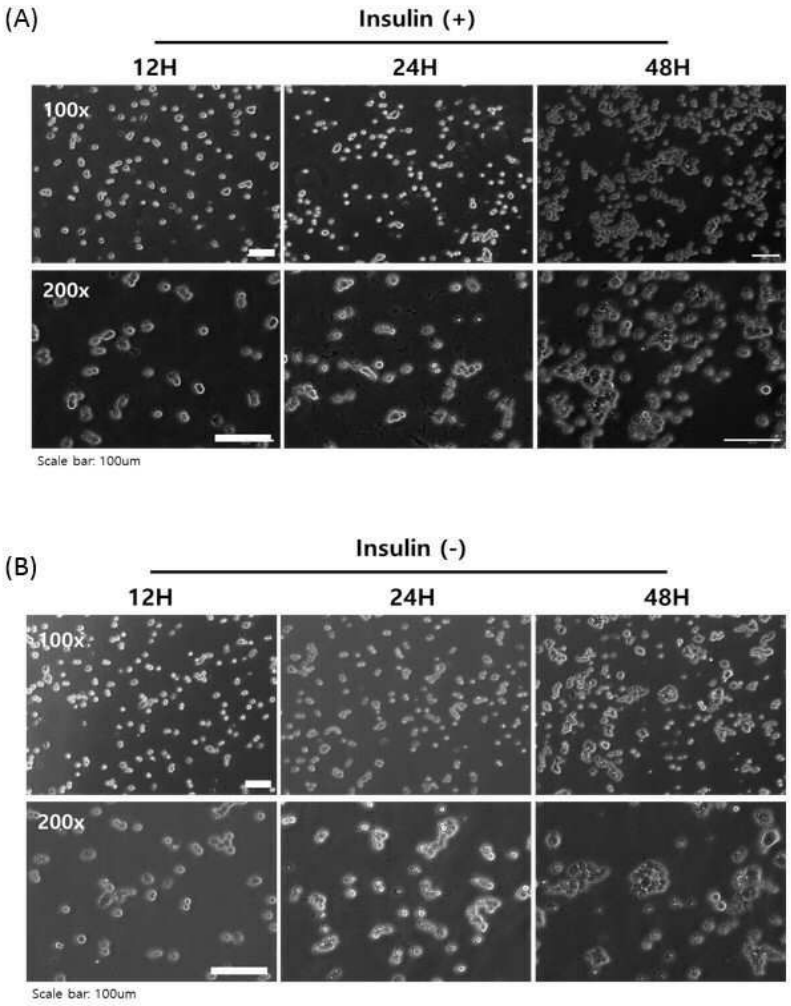
[0063] HCN 세포 사멸에 있어 miR-383-5p의 특이성을 검증하기 위해서, 본 발명자들은 miR-383-5p 억제제로서 miR-383-5p와 상보적 서열을 갖는 anti-miR-383-5p를 사용하였는데, 이는 miR-383-5p의 생리학적 활성을 녹다운(knockdown)시킨다(도 8). anti-miR-383-5p 및 miR-383-5p를 동시에 처리하면, 세포 사멸은 현저하게 감소하였다. 비특이적 혼합 서열을 가진 Anti-miR-Con는 miR-383-5p mimic에 의해 유도된 세포 사멸에 영향을 미치지 않았다.

[0064] **<실시예 5> 자가포식(autophagy) 특이 세포 사멸을 유도하는 anti-miR-383-5p**

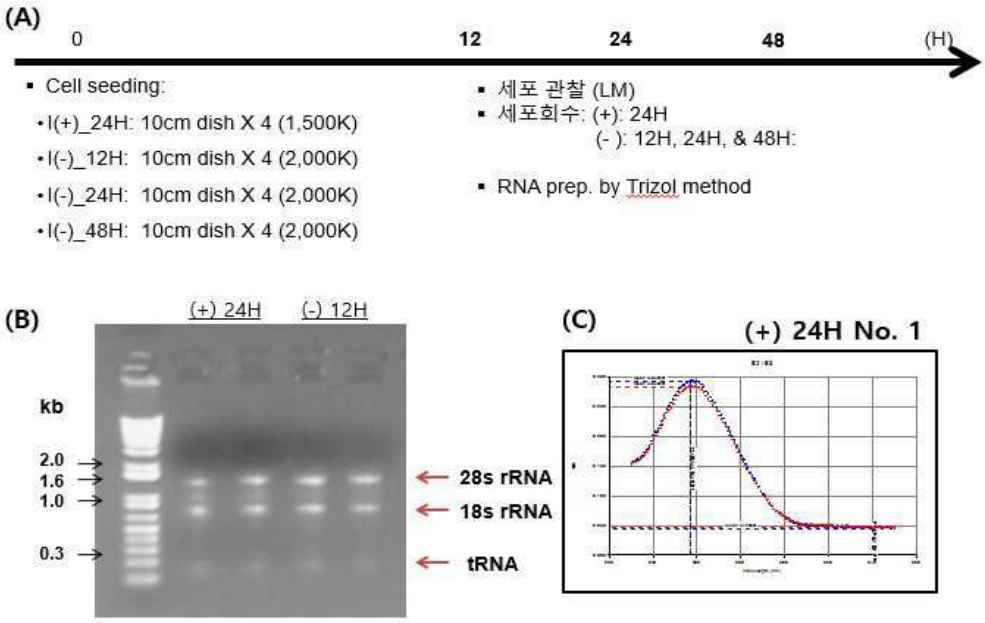
[0065] miR-383-5p 처리에 의한 rHCN 세포의 사멸 유도 효과에 있어서, 신호 전달 경로를 분석하기 위해 카스파제-3 활성 (A)와 면역블로팅 (B) 분석을 수행하였다. 그 결과, 도 9를 참조하여 보면, miR-383-5p 처리가 카스파제-3 활성에 영향을 미치지 않는 반면, 대조군 독소루비신(Dox) 처리에 의해 카스파제-3 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 또한, miR-383-5p의 처리는 자가포식 작용의 대표적인 마커인 LC3-I에서 LC3-II로의 전환을 효과적으로 유도하는 것을 확인함으로써 miR-383-5p에 의한 세포 사멸이 apoptosis에 의한 것이 아닌 자가포식 특이 세포 사멸임을 확인하였다.

도면

도면1


(A)
Insulin (+)
12H
24H
48H
100x
200x
Scale bar: 100um
(B)
Insulin (-)
12H
24H
48H
100x
200x
Scale bar: 100um

도면2



도면3

ID	Name	Conc. (ng/ul)	Vol. (ul)	T Amount (ug)	260/280	260/230	샘플타입	입고일자	메모	Orig. 샘플 ID	최종 ID (101215)
1	rHCN_24H (+)_no 1	186.8	15.0	2.8	2.0	1.9	total RNA	2015-10-01	n=3 (Control)	(1-1)	
2	rHCN_24H (+)_no 2	411.5	15.0	6.2	2.0	2.1	total RNA	2015-10-01		(2-1)	2
3	rHCN_24H (+)_no 3	419.1	15.0	6.3	2.0	2.0	total RNA	2015-10-01		(3-1)	3
4	rHCN_12H (-)_no 1	225.3	15.0	3.4	2.0	1.7	total RNA	2015-10-01	n=3	(5-1)	4
5	rHCN_12H (-)_no 2	130.0	15.0	2.0	1.8	1.7	total RNA	2015-10-01		(6-1)	
6	rHCN_12H (-)_no 3	269.6	15.0	4.0	2.0	1.6	total RNA	2015-10-01		(7-1)	6
7	rHCN_24H (-)_no 1	349.4	15.0	5.2	2.1	1.6	total RNA	2015-10-01	n=3	(9-1)	7
8	rHCN_24H (-)_no 2	362.0	15.0	5.4	2.0	2.0	total RNA	2015-10-01		(10-1)	8
9	rHCN_24H (-)_no 3	250.5	15.0	3.8	1.9	1.9	total RNA	2015-10-01		(12-1)	9
10	rHCN_48H (-)_no 1	567.9	15.0	8.5	2.0	1.9	total RNA	2015-10-01	n=3	(13-1)	10
11	rHCN_48H (-)_no 2	575.6	15.0	8.6	2.1	1.9	total RNA	2015-10-01		(14-1)	11
12	rHCN_48H (-)_no 3	636.0	15.0	9.5	2.0	2.1	total RNA	2015-10-01		(15-1)	12

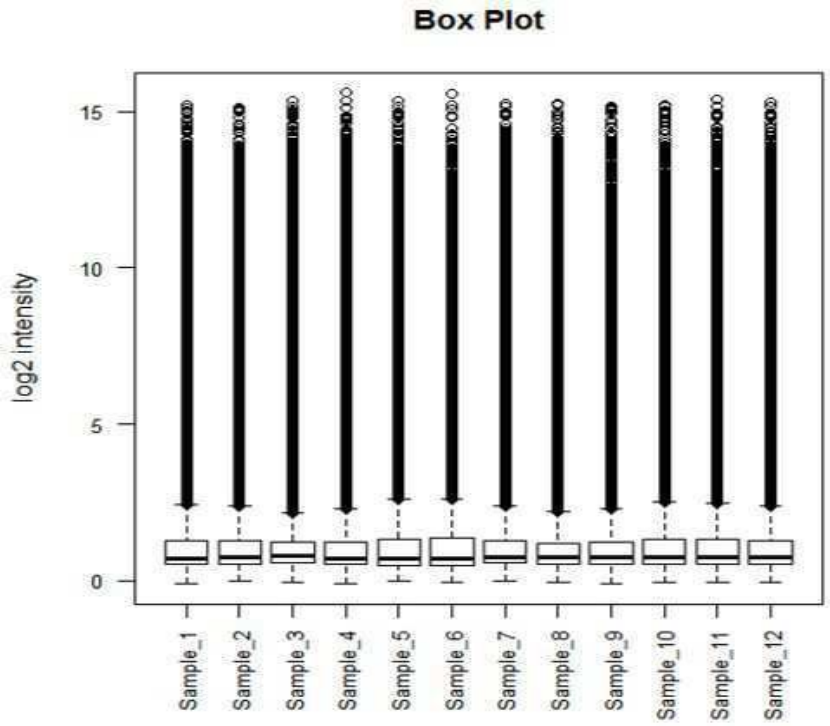
100715 샘플보냄

ID	Name	Conc. (ng/ul)	Vol. (ul)	T Amount (ug)	260/280	260/230	샘플타입	입고일자	메모	Orig. 샘플 ID	최종 ID
1	rHCN_24H (+)_no 2	475.9	15.0	7.1	2.0	1.7	total RNA	2015-10-07		(2-2)	
2	rHCN_24H (+)_no 4	459.9	15.0	6.9	2.0	1.8	total RNA	2015-10-07		(4-1)	1
3	rHCN_12H (-)_no 2	198.8	15.0	3.0	1.9	1.7	total RNA	2015-10-07		(6-2)	5
4	rHCN_12H (-)_no 4	240.7	15.0	3.6	2.0	1.7	total RNA	2015-10-07		(8-2)	

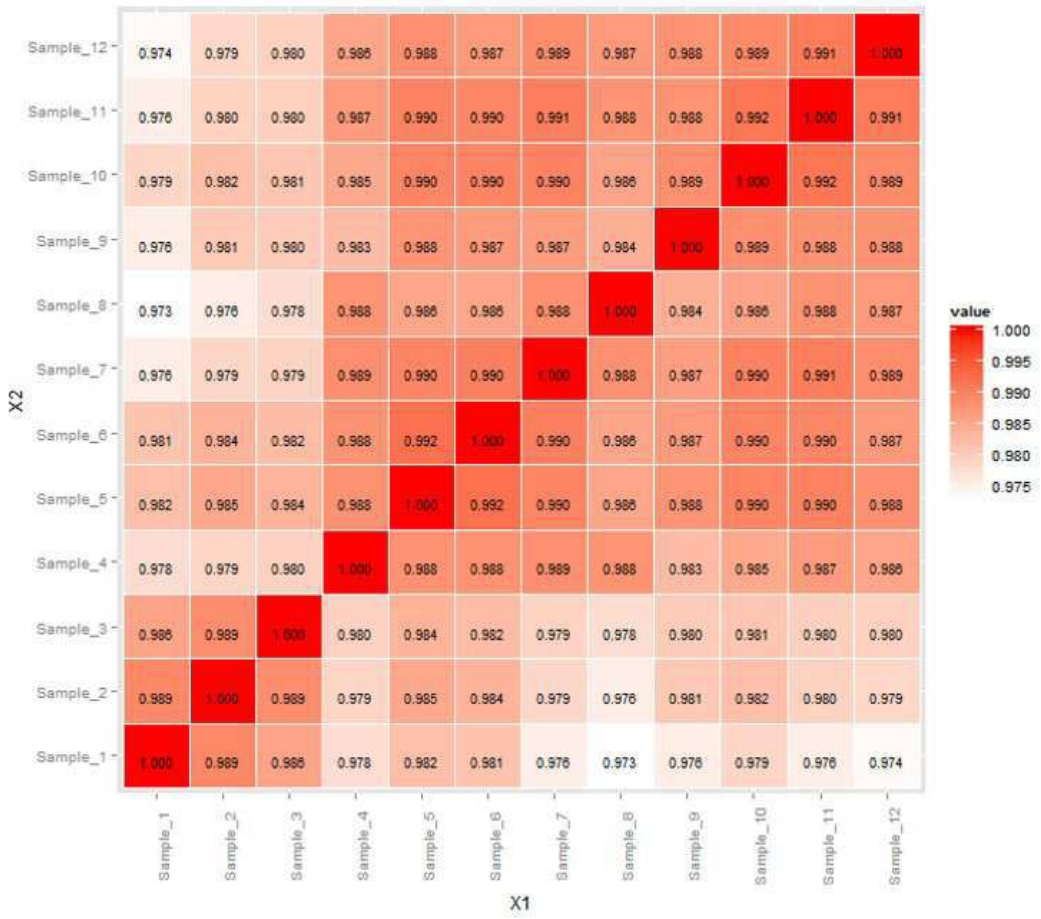
도면4

Array contents	miRNA 1.0	miRNA 4.0
Organisms	71	203
Total mature miRNA probe sets	7,815	30,324
Human mature miRNA		2,578
Mouse mature miRNA		1,255
Rat mature miRNA	351	728
snoRNA, CDBox RNA, scaRNA	922	1,996
Human pre-miRNA	—	2,025
Mouse pre-miRNA	—	1,255
Rat pre-miRNA	—	490

도면5a



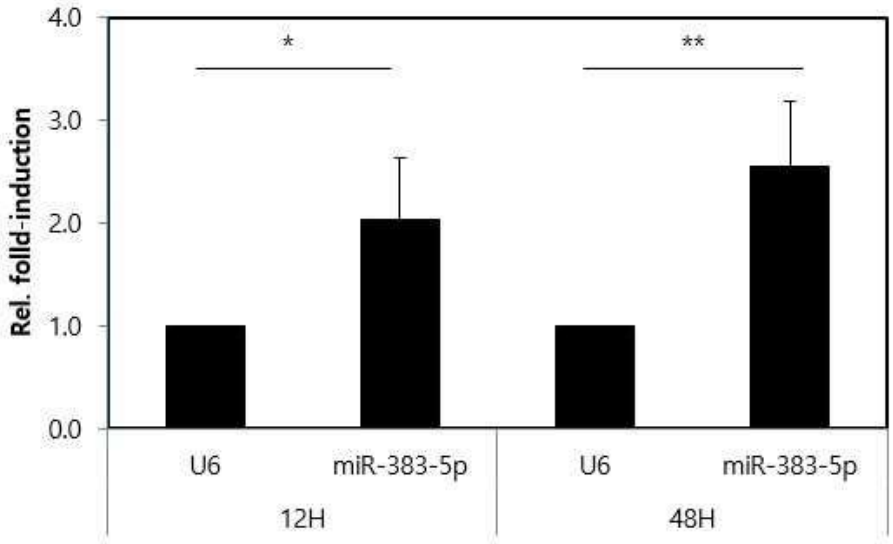
도면5b



도면5c

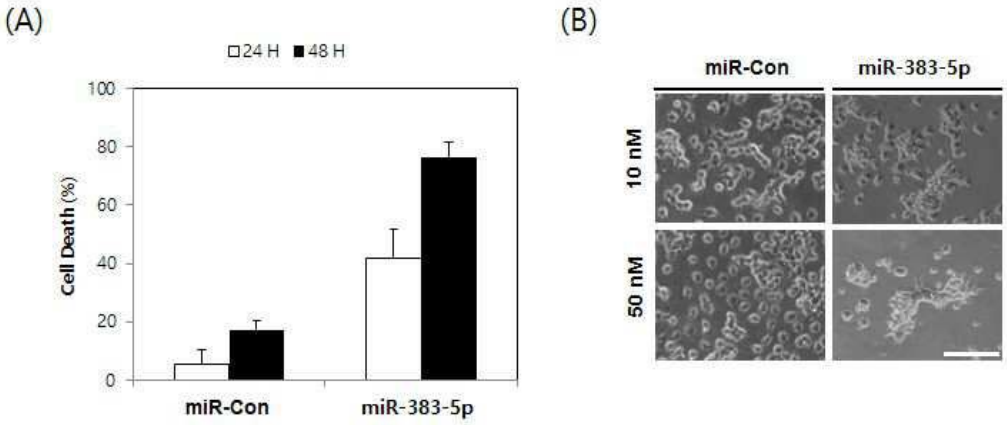
비교항목	Up Regulation	Down Regulation
1. Average(1, 2, 3) vs Average(4, 5, 6)	11	57
2. Average(1, 2, 3) vs Average(7, 8, 9)	6	109
3. Average(1, 2, 3) vs Average(10, 11, 12)	21	108

도면6

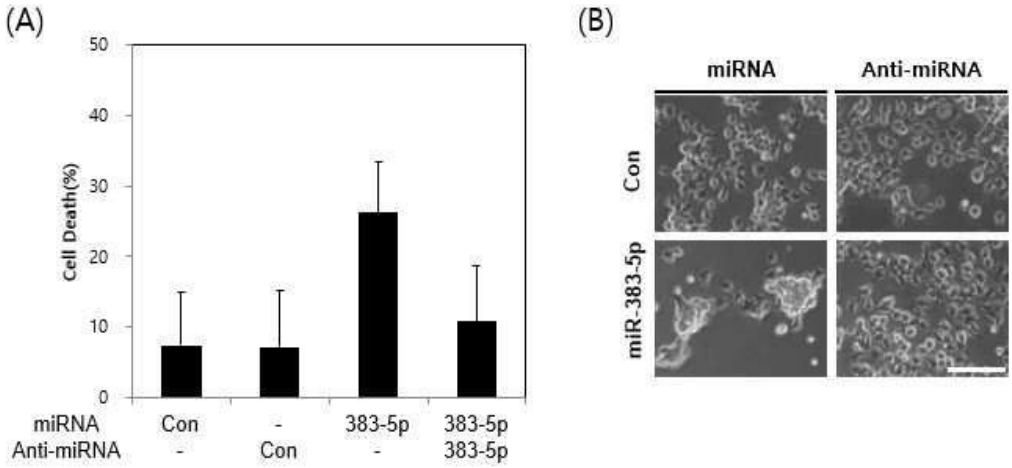


sample 1	sample 2		p value	비고
miR-383-5p	U6	12H	0.0941	
		48H	0.005	**
	miR-383-5p	12H : 48H	0.214	

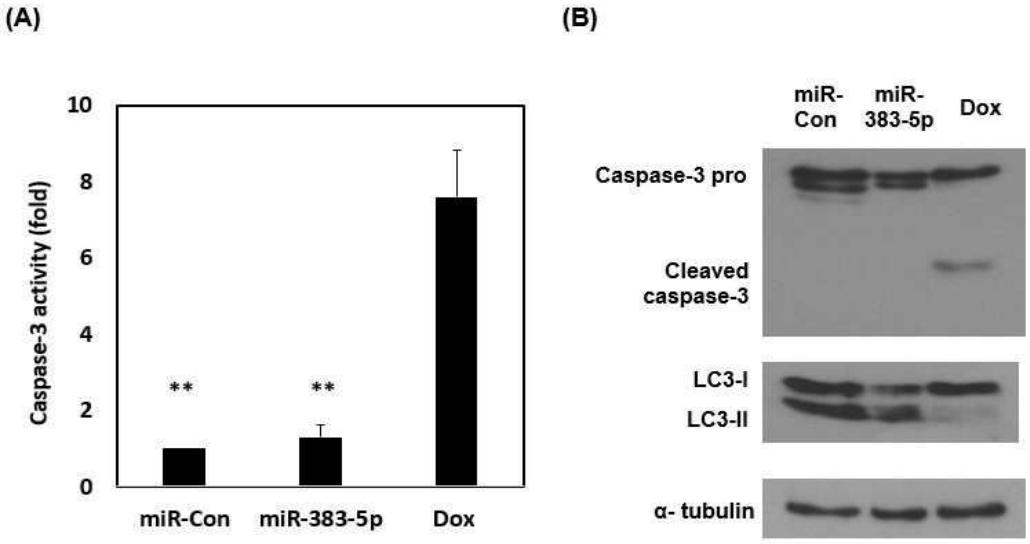
도면7



도면8



도면9



서 열 목 록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
THE ASAN FOUNDATION

<120> Composition for preventing or treating neurodegenerative disease comprising miR-383-5p inhibitor with inhibitory effect of cell death in hippocampal neural stem cells

<130> ADP-2018-0081

<160> 3

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-miR-383-5p

<400> 1

ccacaaucac cuucugaucu g 21

<210> 2

<211> 21

<212> RNA

<213> rat

<400> 2

cagaucagaa ggugacugug g 21

<210> 3

<211> 22

<212> RNA

<213> human

<400> 3

agaucagaag gugauugugg cu 22