



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0143176
(43) 공개일자 2017년12월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) C01F 7/02 (2006.01)
G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/027 (2013.01)
C01F 7/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0077028
(22) 출원일자 2016년06월21일
심사청구일자 2016년06월21일

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

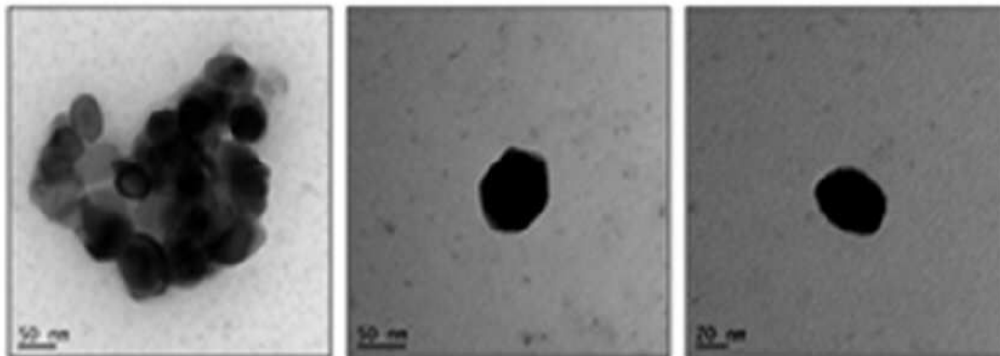
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 나노 알루미늄을 이용한 알츠하이머병 동물모델의 제작방법 및 이를 이용한 알츠하이머병 치료제 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 나노 알루미늄을 이용한 알츠하이머형 치매 동물모델의 제조방법 및 이를 이용한 알츠하이머병 치료제 스크리닝 방법에 관한 것으로, 본 발명의 제조방법에 의하여 제작된 알츠하이머형 치매 동물모델은 아밀로이드 베타 축적, 신경세포의 사멸 등과 같은 알츠하이머병 유사 증상을 발현하므로, 상기 동물모델은 알츠하이머병 치료제 스크리닝에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/5088 (2013.01)
A01K 2207/20 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/0312 (2013.01)
C01P 2004/64 (2013.01)
G01N 2333/4709 (2013.01)
G01N 2333/96413 (2013.01)
G01N 2333/96416 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016M3C7A1904391

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발사업

연구과제명 퇴행성 뇌질환 및 대사조절 신규 제어물질 개발 및 효과 검증 ; 에너지 대사 활성화 물질 개발을 통한 실용화 기반 확립

기 여 율 4/5

주관기관 경상대학교

연구기간 2016.06.01 ~ 2021.02.28

이 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 1/5

주관기관 경상대학교

연구기간 2015.04.27 ~ 2017.04.26

명세서

청구범위

청구항 1

나노 알루미늄을 인간을 제외한 동물에 투여하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 동물모델의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 나노 알루미늄은 30 내지 60 nm 크기인 것을 특징으로 하는 알츠하이머병 동물모델의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 나노 알루미늄은 10 내지 100 mg/kg의 농도로 투여되는 것을 특징으로 하는 알츠하이머병 동물모델의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 나노 알루미늄을 마우스에 투여하는 단계는 1 주 내지 5 주의 기간 동안 이루어지는 것을 특징으로 하는 알츠하이머병 동물모델의 제조방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제작된 알츠하이머병 동물모델에 후보 약물을 투여하는 단계; 및 상기 동물모델에서 알츠하이머병 증상의 개선 정도를 평가하는 단계를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 알츠하이머병의 개선 또는 치료용 약물의 스크리닝 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 알츠하이머병 증상의 개선 정도를 평가하는 단계는 생리식염수를 투여한 대조군과 비교하여 후보 약물을 투여한 약물처리군에서 하기 1) 내지 4)의 지표 중 어느 하나 이상의 수치가 증가한 경우 알츠하이머병 증상이 개선된 것으로 평가하는 것을 특징으로 하는 알츠하이머병의 개선 또는 치료용 약물의 스크리닝 방법:

- 1) 뇌 신경세포의 생존율;
- 2) 시냅토파이신(synaptophysin)의 발현;
- 3) 후시냅스 밀도 단백질 95(post-synapse density protein 95)의 발현; 및
- 4) 수용성 아밀로이드 전구체 단백질 알파(soluble amyloid precursor protein- α)의 발현.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 알츠하이머병 증상의 개선 정도를 평가하는 단계는 생리식염수를 투여한 대조군과 비교하여 후보 약물을 투여한 약물처리군에서 하기 1) 내지 5)의 지표 중 어느 하나 이상의 수치가 감소한 경우 알츠하이머병 증상이 개선된 것으로 평가하는 것을 특징으로 하는 알츠하이머병의 개선 또는 치료용 약물의 스크리닝 방법.

닝 방법:

- 1) 아밀로이드 전구체 단백질의 발현;
- 2) 활성산소의 생성;
- 3) 아밀로이드 베타 생성;
- 4) 카스파아제-3/7 활성; 및
- 5) 베타-사이트 아밀로이드 전구체 단백질 절단효소 1(β -site amyloid precursor protein cleavage enzyme)의 발현.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 나노 알루미늄을 이용한 알츠하이머병 동물모델의 제조방법 및 이를 이용한 알츠하이머병 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 알츠하이머병 (Alzheimer's disease; 이하 AD로 표기함)은 나이가 들어감에 따라 뇌에서 선택적으로 신경세포의 사멸이 일어나는 퇴행성 신경질환이다. AD 환자의 뇌에서 나타나는 조직병리학적 특징으로는 뇌 조직 내에서 세포 외부에 침착되는 노인 반점(senile plaque) 및 신경세포 내부에 실타래처럼 뭉쳐서 축적되는 신경섬유 덩어리(neurofibrillary tangle; NFT)가 있다. 노인 반점의 주요 구성성분으로는 아밀로이드 전구단백질(amyloid precursor protein; 이하 APP로 표기함)에서 단백질 분해효소들에 의해 잘려져 나온 아밀로이드 베타(amyloid β peptide; 이하 $A\beta$ 로 표기함)가 있으며, 최근의 여러 가지 보고들에 의하여 $A\beta$ 가 AD의 여러 가지 병리학적 증상들을 일으키는 주요 병인으로 생각되고 있다.

[0004] $A\beta$ 는 APP의 N-말단 단편이 베타 세크리테아제(β -secretase)라는 단백질 분해효소에 의하여 잘려진 후에 남아 있는 APP C-말단 단편이 다시 감마 세크리테아제(γ -secretase)라는 아스파르트산 단백질 분해효소에 의해 막을 관통하는 부분이 잘려서 만들어진다. 40개에서 42개 또는 43개의 아미노산을 가지는 형태로 나타나며, 이 중 $A\beta_{42}$ 가 노인 반점의 침착에 있어 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있다.

[0005] 현재까지 알츠하이머병 환자의 비정상적인 인지, 행동, 생화학적 및 조직병리학적 비정상 소견이 완전히 나타나는 동물모델은 없는 상태이나, 알츠하이머병의 신경병리 및 인지장애를 부분적으로 재현시키는 동물모델이 존재한다. 이러한 동물모델에는 콜린성 기능장애에 의한 동물모델, 아밀로이드 베타 펩타이드 관련 동물모델 및 신경원섬유 매듭(neurofibrillary tangles)에 의한 동물모델이 있다.

[0006] 나노입자(nanoparticles)는 적어도 한 차원의 크기가 10^{-9} m 이하인 초미세입자를 말하며, 전자, 제약, 화장품 산업 및 에너지 분야 등 폭넓게 이용되고 있다. 알루미늄(aluminum)은 주기율표 13족 3주기에 속하는 원소로, 가볍고 내구성이 커서 원자재 및 재료로 많이 사용된다. 알루미늄 성분이 체내에 들어오면 대부분 신장을 통해서 체외로 배출되지만, 신장에 문제가 생기거나 당뇨병에 걸린 경우 체내 알루미늄 성분의 축적이 심화될 수 있다.

[0007] 본 발명자들은 나노 알루미늄을 투여한 마우스가 기억력 및 학습 능력이 떨어지고, 뇌에서 아밀로이드 베타의 축적이 증가하여 알츠하이머병과 유사한 증상을 보이는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0009] (비특허문헌 0001) Brain&NeuroRehabilitation Vol. 4, No. 1, March, 2011 치매 동물 모델

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 일 양상은 나노 알루미늄을 인간을 제외한 동물에 투여하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 동물모델의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 다른 양상은 본 발명의 제조방법으로 제작한 알츠하이머병 동물모델에 후보 약물을 투여하는 단계; 및 상기 동물모델에서 알츠하이머병 증상의 개선 정도를 평가하는 단계를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 알츠하이머병의 개선 또는 치료용 약물의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명의 일 양상은 나노 알루미늄을 인간을 제외한 동물에 투여하는 단계를 포함하는, 알츠하이머병 동물모델의 제조방법을 제공한다.

[0014] 본 발명의 용어, "알루미늄(allumina)"은 알루미늄의 산화물을 의미하며, 화학식은 Al_2O_3 이고, 분자량은 101.96인 백색 분말로 육방정의 결정 구조를 갖는다. 기계적인 강도가 높기 때문에 여러 가지 실험 용기나 분쇄용 세라믹 볼, 구조 재료 등에 폭넓게 사용되고 있으며, 세라믹이기 때문에 내산성, 내부식성이 강한 편이다.

[0015] 일 구체예에 따르면 상기 인간을 제외한 동물은 설치류일 수 있으며, 구체적으로 마우스, 쥐, 다람쥐, 기니피그, 햄스터 등의 동물일 수 있다.

[0016] 일 구체예에 따르면 상기 나노 알루미늄은 10 내지 100 nm 크기인 것이 바람직하며, 30 내지 60 nm 크기인 것이 더욱 바람직하다. 나노 알루미늄의 크기가 상기 범위보다 큰 경우 뇌의 혈관장벽 통과에 문제가 발생하여 알츠하이머병의 증상을 유발하기 어려울 수 있다.

[0017] 일 구체예에 따르면 상기 나노 알루미늄은 10 내지 100 mg/kg의 농도로 투여하는 것이 바람직하며, 30 내지 70 mg/kg의 농도로 투여하는 것이 더욱 바람직하다. 나노 알루미늄을 상기 농도 범위보다 낮게 투여하는 경우 알츠하이머병의 증상을 유발하기 어려우며, 높게 투여하는 경우 알츠하이머병의 증상이 나타나기 전에 마우스가 사망할 수 있다.

[0018] 일 구체예에 따르면 상기 나노 알루미늄을 마우스에 투여하는 단계는 1 주 내지 5 주의 기간 동안 투여하는 것이 바람직하며, 2 주 내지 4 주의 기간 동안 투여하는 것이 더욱 바람직하다.

[0019] 본 발명의 다른 양상은 본 발명의 제조방법으로 제작한 알츠하이머병 동물모델에 후보 약물을 투여하는 단계; 및 상기 동물모델에서 알츠하이머병 증상의 개선 정도를 평가하는 단계를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 알츠하이머병의 개선 또는 치료용 약물의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0020] 일 구체예에 따르면 상기 알츠하이머병 증상의 개선 정도를 평가하는 단계는 생리식염수를 투여한 대조군과 비교하여 후보 약물을 투여한 약물처리군에서 뇌 신경세포의 생존율, 시냅토파이신, 후시냅스 밀도 단백질 95 및 수용성 아밀로이드 전구체 단백질 알파의 발현으로 이루어진 군에서 어느 하나 이상의 수치가 증가한 경우 알츠하이머병의 증상이 개선된 것으로 평가할 수 있다.

[0021] 일 구체예에 따르면 상기 알츠하이머병 증상의 개선 정도를 평가하는 단계는 생리식염수를 투여한 대조군과 비교하여 후보 약물을 투여한 약물처리군에서 아밀로이드 전구체 단백질의 발현, 활성산소의 생성, 아밀로이드 베타 생성, 카스파아제-3/7 활성 및 베타-사이트 아밀로이드 전구체 단백질 절단효소 1으로 이루어진 군에서 어느 하나 이상의 수치가 감소한 경우 알츠하이머병 증상이 개선된 것으로 평가할 수 있다.

[0022] 일 구체예에 따르면 상기 수치의 증가, 감소 여부를 판단하는 것은 면역분석법, 웨스턴 블롯팅 등 당업계에 공지된 방법을 사용할 수 있다.

[0023] 상기 면역분석법은 종래에 개발된 다양한 면역분석(immunoassay) 또는 면역염색(immunostaining) 프로토콜에 따라 실시될 수 있다. 상기 면역분석 또는 면역염색 포맷은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전,

ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁 분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0025] 본 발명의 제조방법에 의하여 제작된 알츠하이머형 치매 동물모델은 아밀로이드 베타 축적, 신경세포의 사멸 등과 같은 알츠하이머병 유사 증상을 발현하므로, 상기 동물모델은 알츠하이머병 치료제 스크리닝에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027] 도 1은 나노 알루미늄 입자의 크기를 투과 전자 현미경으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 나노 알루미늄을 처리한 세포에서 세포 생존율, 세포독성 및 활성화된 카스파아제-3/7의 수준을 측정된 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 로다민 또는 쿠마린이 표지된 나노 알루미늄을 이용하여 bEnd3 세포 내로 유입 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 로다민 또는 쿠마린이 표지된 나노 알루미늄을 이용하여 SH-SY5Y 세포 내로 유입 여부를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 HT22 세포 내로 나노 알루미늄 유입 여부를 확인하기 위하여 모린 염색을 수행한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 나노 알루미늄을 처리한 후 HT22 세포를 8-옥소-구아닌(8-Oxo-guanine; 8-OxoG)으로 염색한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 나노 알루미늄을 투여한 ICR 마우스에서 뇌 피질, 해마 및 치아이랑 부위를 모린 염색한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 나노 알루미늄을 투여한 ICR 마우스의 뇌에서 8-옥소-구아닌의 발현 정도를 확인할 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 수중 미로탈출 실험에서 나노 알루미늄을 투여한 후 마우스의 미로 탈출시간을 측정한 결과를 나타낸 도이다.

도 10은 수중 미로탈출 실험에서 나노 알루미늄을 투여한 마우스의 프로브 테스트 결과를 나타낸 도이다.

도 11은 나노 알루미늄을 투여한 마우스에서 아밀로이드 생성 경로의 변화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 12는 나노 알루미늄을 투여한 마우스의 뇌에서 수용성 $A\beta_{1-42}$ 의 생산 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 13은 나노 알루미늄을 투여한 마우스의 뇌 조직에서 $A\beta$ 의 응집 및 플라크 형성 여부를 $A\beta$ (6E10) 항체로 염색한 결과를 나타낸 도이다.

도 14는 나노 알루미늄을 투여한 마우스의 뇌 조직에서 $A\beta$ 의 응집 및 플라크 형성 여부를 티오플라빈 S로 염색한 결과를 나타낸 도이다.

도 15는 나노 알루미늄을 투여한 마우스의 뇌에서 과인산화된 타우 및 후시냅스 밀도 단백질 95의 발현을 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 16은 나노 알루미늄을 투여한 마우스의 뇌 조직에서 과인산화된 타우 단백질의 발현 변화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 17은 나노 알루미늄을 투여한 마우스의 뇌 분쇄액에서 AMPK의 발현 변화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 18은 나노 알루미늄을 투여한 마우스 뇌의 피질 및 해마 CA1 부위에서 p-AMPK의 발현 변화를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

나타낸 도이다.

도 19는 나노 알루미늄을 투여한 마우스 뇌의 피질 및 해마 부위에서 세포사멸 마커의 변화를 웨스턴 블롯으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 20은 나노 알루미늄을 투여한 마우스 뇌의 피질 및 해마 부위에서 신경세포의 사멸 정도를 FJB 염색으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 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.

[0030] 실험방법

[0031] 1. 화합물, 마우스 및 세포배양

[0032] 30 내지 60nm 크기의 나노 알루미늄(Al_2O_3 -NPs, Product Number: 642991), 모린 수화물(Morin hydrate, 3, 5, 7, 29, 49-Pentahydroxyflavone, Product Number: R8004), 로다민-123(Rhodamine-123, Product Number: M4008) 및 쿠마린-6(Coumarin-6, Product Number: 442631)은 시그마(Sigma Aldrich, 미국)에서 구입하였다.

[0033] 10 주령의 암컷 ICR(Institute of Cancer Research) 마우스는 샘타코 코리아(SAMTAKO Korea, 대한민국)에서 구입하여 25℃에서 12 시간 명암주기 및 임의 섭식 조건으로 사육하였다. 나노 알루미늄은 50 mg/kg 농도로 1 주일에 2번씩 3 주 동안 복강내(intraperitoneally, i.p.)에 투여하였다. 동물의 희생 및 고통을 최소화하기 위하여 모든 노력을 하였으며, 실험 과정은 경상대학교 동물 윤리 위원회의 승인을 받아 수행하였다.

[0034] 마우스 유래 해마세포인 HT22 세포는 경상대학교의 고필옥 교수님으로부터 받았고, 인간 신경모세포종(neuroblastoma)인 SH-SY5Y 세포는 한국 세포 은행(KOREAN CELL LINE BANK, 서울, 대한민국)에서 구입하였다. 두 세포 모두 높은 농도의 D-글루코스, 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, 이하 FBS로 표기함) 및 1% 항생제(penicillin-streptomycin)를 함유하고 있는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium) 배지를 이용하여 37℃ 및 5% CO_2 를 포함하는 가습 조건에서 배양하였다. 세포가 배양 접시의 최소 70%까지 성장하였을 때 96-웰 플레이트에 분주하였다.

[0036] 2. 나노 알루미늄(nano alumina) 결합 및 세포 유입 실험

[0037] 2-1. 형광물질이 표지된 나노 알루미늄 제작

[0038] 5 mg의 로다민-123/쿠마린-6를 아세톤 25 ml에 용해시키고, 나노 알루미늄 100 ml에 첨가하여 60℃에서 교반시켰다. 3 시간 동안 교반시킨 후, 실온까지 식히고 4,000 rpm에서 원심분리하여 나노 알루미늄과 부착하지 않은 형광 물질을 제거하였다.

[0040] 2-2. 나노 알루미늄의 세포 유입 실험

[0041] 로다민-123/쿠마린-6가 표지된 나노 알루미늄의 세포 유입을 확인하기 위하여 하기와 같이 실험하였다.

[0042] 뇌 혈관 장벽 모델인 bEnd3 세포와 SH-SY5Y 세포를 4-웰 커버 글래스 챔버에서 미리 배양한 후, 배양 배지와 혼합한 로다민-123/쿠마린-6가 표지된 나노 알루미늄을 첨가하여 24 시간 동안 배양하였다. 배양 후에 인산완충용액(phosphate buffered saline, 이하 PBS로 표기함)으로 세포를 두 번 세척하고, 4% NBP(neutral buffered paraformaldehyde)로 고정시킨 후 다시 PBS로 세척하여 DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole)와 5 분 동안 반응시켰다. 슬라이드를 PBS로 행군 후에 글래스 커버 슬립을 덮어 공초점 레이저-스캐닝 현미경(Fluoview FV 1000, Olympus, 일본)으로 이미지를 관찰하였다.

[0043] HT22 및 SH-SY5Y 세포를 각각 24 시간 및 48 시간 동안 배양한 후에 배지를 제거하고, 나노 알루미늄(100, 125 및 150 $\mu g/ml$)을 포함하고 있는 배지로 교체하여 12 시간 및 24 시간을 추가로 배양하였다. 대조군은 나노 알루미늄을 첨가하지 않은 배지로 배양하였다.

- [0045] **3. ApoTox-Glo™ Triplex assay 및 농도 분석**
- [0046] **3-1. ApoTox-Glo™ Triplex assay**
- [0047] 세포 생존율, 세포 독성 및 카스파아제-3/7 활성을 측정하기 위하여 ApoTox-Glo™ Triplex assay(Promega Corporation, 미국)키트를 이용하여 하기와 같이 실험하였다.
- [0048] 구체적으로, HT22 세포(2×10^4 세포/웰)를 10% FBS 및 1% 항생제가 함유된 200 μ l DMEM 배지로 96-웰 플레이트에 배양하였다. 이후 나노 알루미늄을 100, 125 및 150 μ g/ml 농도로 각각 처리하여 24 시간 동안 추가로 배양하였다. 배양 후에 세포 생존율(과장 400_{Ex}/505_{Em}), 세포독성(과장 485_{Ex}/520_{Em}) 및 카스파아제-3/7 활성을 제조사의 지시에 따라 측정하였다.
- [0050] **3-2. 농도 분석**
- [0051] 활성화된 AMPK 및 A β ₁₋₄₂ 수준을 각각 CycLex AMPK kinase(CysLex Co., 일본) 및 A β ₁₋₄₂ assay(Invitrogen, 미국) 키트를 이용하여 제조사의 지시에 따라 측정하였다.
- [0053] **4. 산화 스트레스(oxidative stress, ROS) 측정**
- [0054] 나노 알루미늄 투여에 의한 세포 내 스트레스를 확인하기 위하여 하기와 같이 실험하였다.
- [0055] 구체적으로, HT22 및 SH-SY5Y 세포를 각각 24 시간 및 48 시간 동안 배양한 후에 나노 알루미늄(100, 125 및 150 μ g/ml)를 포함하고 있는 배지로 교체하여 6 시간을 추가로 배양하였다. 이후 DMSO/PBS에 용해시킨 DCFDA(2', 7'-dichloroflourescein diacetate) 용액을 600 μ m 농도로 각 웰에 첨가하여 30 분 동안 방치하고, ApoTox-Glo™ (Promega)를 이용하여 488/530 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0057] **5. 모리스 수중 미로(Moris water maze, MWM) 실험**
- [0058] 공간 학습 및 기억 능력을 확인하기 위하여 하기와 같이 실험하였다.
- [0059] 행동 연구를 위하여 마우스(n=13/그룹)를 이용하여 모리스 수중 미로 실험을 수행하였다. 수중 미로 장치는 원형 물 탱크(100 cm 지름, 40 cm 높이) 및 흰색 잉크로 불투명하게 만든 15.5 cm 깊이의 물($23 \pm 1^\circ\text{C}$)로 이루어져 있다. 투명한 도피대(10 cm 지름, 20 cm 높이)가 물 표면의 1 cm 아래에 숨겨져 있으며, 한 사분면의 중앙 지점에 위치해 있다. 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.
- [0061] **6. 웨스턴 블롯팅**
- [0062] 나노 알루미늄 처리 또는 투여에 의한 단백질 발현 변화를 확인하기 위하여 하기와 같이 실험하였다.
- [0063] 뇌의 피질 및 해마를 분리하고 분쇄한 후 BioRad protein assay kit(BioRad Laboratories, 미국)를 이용하여 단백질 농도를 측정하였다. 20 μ g의 단백질을 4 내지 12% Bolt™ mini gel(Novex, Life Technologies, 이스라엘)을 이용하여 전기영동한 후 PVDF 막으로 트랜스퍼하였다. 이후 비특이적 결합을 줄이기 위하여 막을 5%(w/v) 스킵 밀크로 블로킹하고, 1차 항체와 4에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후 막을 세척하고, 2차 항체와

반응시킨 후 ECL 탐지 시약(Amersham Pharmacia Biotech, 업살라, 스웨덴)을 이용하여 제조사의 지시에 따라 단백질을 확인하였다. 모든 엑스-레이 필름은 스캔한 후 시그마 젤 프로그램 버전 1.0(Sigma Gel program, version 1.0, SPSS, 일리노이주, 미국)을 이용하여 밴드의 강도를 분석하였다.

[0064] 사용한 1차 항체는 항- β -actin, 항-PSD95, 항-카스파아제-3, 항-AMPK, 항-AMPK(Thr¹⁷⁷)(Cell Signaling, 미국), 항-아밀로이드 C-말단, 항-BACE-1, 항-total tau, 항-p-tau(Ser413), 항-PARP-1, 항-시냅토파이신(Santa Cruz Biotechnology, 미국) 및 항-APP(Millipore technologies, 미국)이다.

[0066] 7. 뇌 조직 수집 및 염색 실험

[0067] 7-1. 뇌 조직 수집

[0068] 조직 분석을 위하여 얼음으로 냉각시킨 4% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde)를 마우스에 경심관류로 관류시키고, 뇌를 4% 파라포름알데하이드로 72시간 동안 후고정(post-fix)시킨 후 20% 수크로오스에 72 시간 동안 보관하였다. 뇌를 O.C.T compound(A.O, 미국)로 얼리고, CM 3050C 크라이오스탯(Leica, 독일)을 이용하여 14- μ m 두께로 관상면(coronal sections)을 잘랐다. 자른 관상면은 probe-on plus charged slide(Fisher, 일리노이주, 미국)에 녹이면서 붙였다.

[0070] 7-2. 모린 염색(Morin staining)

[0071] HT22 세포 및 마우스의 뇌에서 알루미늄의 축적 정도를 확인하기 위하여 하기와 같이 실험하였다.

[0072] 구체적으로, 0.5% 빙초산(glacial acetic acid)이 포함되어 있는 85% 에탄올 용액에 0.2% 모린 용액을 혼합하여 모린 염색 시약을 제조하였다. 이후 1% 염산 수용액에 HT22 세포 또는 뇌 조직 슬라이드를 10 분 동안 담근 후 방치하고, 세척한 후 10 분 동안 모린 염색 시약을 처리하였다. 10 분 후에 DAPI를 이용하여 대조염색을 수행하고, 공초점 레이저 스캐닝 현미경(FV 1000, Olympus, 일본)으로 이미지를 관찰 및 획득하였다.

[0074] 7-3. 플루오르-제이드 B 염색(Fluoro-Jade B staining)

[0075] 신경세포 사멸을 확인하기 위하여 제조자의 지시(Millipore, 미국, cat #AG310, lot#2159662)에 따라 FJB 염색을 수행하였다.

[0076] 구체적으로, 뇌 조직 슬라이드를 하룻밤 동안 공기-건조시키고, 5분 동안 두 번 세척한 후에 1% 수산화나트륨(sodium hydroxide) 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 담겨 염색시켰다. 그 후 슬라이드를 증류수로 세척하고, 최소 10 분 동안 건조시켰다. DPX 비형광 마운팅 용액을 이용하여 슬라이드에 글래스 커버 슬립 및 DAPI 용액을 마운팅하였다. FITC 필터를 장착한 공초점 레이저-스캐닝 현미경(FV1000)을 이용하여 이미지를 획득하였다.

[0078] 7-4. 면역형광 염색

[0079] 뇌 조직 내의 단백질 발현을 확인하기 위하여 형광염색을 실시하였으며, 이중염색을 위하여 염색 과정은 병행하여 진행하였다.

[0080] 구체적으로, 세포 또는 뇌 조직 슬라이드를 0.01 M PBS로 15분씩 두 번 세척하고, 프로테이나아제-k 용액을 첨가하여 37에서 5분 동안 반응시켰다. 이후 5% 정상 염소 혈청, 0.3% 트리톤 X-100 및 PBS로 이루어진 블로킹 용액과 실온에서 1 시간 동안 반응시키고, 1:100으로 희석한 1차 항체를 처리하여 하룻밤 동안 반응시켰다. 다음 날 TRITC- 또는 FITC가 결합된 2차 항체(Santa Cruz)를 PBS로 1:50으로 희석하여 90 분 동안 반응시킨 후 슬라이드를 Prolong Antifade Reagent(Molecular Probe, 유진, 미국)로 마운팅하여 공초점 레이저-스캐닝 현미경(Fluoview FV 1000, Olympus, 일본)으로 관찰하였다.

[0081] 사용한 1차 항체는 항-p-AMPK, A β (6E10, BioLegends, 미국) 및 항-8-oxoguanine(Millipore, 미국)이다.

[0083] 7-5. 티오플라빈 S 염색(Thioflavin S staining)

[0084] 뇌에 있는 아밀로이드 플라크(amyloid plaques)를 확인하기 위하여 티오플라빈 S 염색을 실시하였다.

[0085] 구체적으로, 뇌 조직 슬라이드를 0.01 M PBS로 10 분씩 두 번 세척하고, 1% 티오플라빈 S 용액에 담근 후 실온에서 10 분 동안 방치하였다. 이후 70% 에탄올에 5 분 동안 담근 후 물로 2번 세척하고, 요오드화 프로피디움(propidium iodide, PI)으로 대조염색한 후 커버슬립을 덮어 관찰하였다.

[0087] 8. 통계 분석

[0088] 웨스턴 블랏의 엑스-레이 필름은 스캔하여 시그마 젤 프로그램 버전 1.0(Sigma Gel program, version 1.0, SPSS, 미국)을 이용하여 단백질 밴드의 밀도를 분석하였다. 단백질 밴드의 밀도는 3번 반복 실험의 값을 평균하여 평균±표준 평균 오차(standard error mean, SEM) 수치로 표기하였다. 형광 염색 결과 및 아밀로이드 반점에 대한 결과는 Image J software(미국 국립보건원에서 제공하는 공개 소프트웨어)를 이용하여 분석하였으며, Integral Optical Densities(IODs)로 표시하였다. Prism 5(graph Pad Software, 미국)를 이용하여 일원 분산 분석(one-way analysis of variance, ANOVA)을 수행하였고, 이어서 Prism 5(graph Pad Software, 미국)를 이용하여 Student's t-test를 실시하였다. 결과값이 p<0.05, 0.01 및 0.001일 경우 유의한 것으로 하였다.

[0090] 실험결과

[0091] 1. 나노 알루미늄의 특성

[0092] 나노 알루미늄 입자의 크기를 투과 전자 현미경(transmission electron microscope)으로 분석한 결과 입자는 타원 형태이고, 30 내지 60 nm의 크기를 가지고 있는 것을 확인하였다(도 1).

[0094] 2. 나노 알루미늄의 독성 확인 결과

[0095] 나노 알루미늄이 세포에 미치는 영향을 측정하였다.

[0096] 실험 결과, 대조군과 비교하여 나노 알루미늄은 세 농도(100, 125 및 150) 모두에서 인간 신경모세포종의 세포 생존율을 감소시키고, 세포 독성이 있는 것을 확인하였다. 또한, 나노 알루미늄이 처리된 세포에서는 활성화된 카스파아제-3/7의 수준이 현저하게 증가한 것을 확인하여 세포 사멸이 유도되는 것을 확인할 수 있었다(도 2).

[0098] 3. 나노 알루미늄의 세포 유입 확인 결과

[0099] 나노 알루미늄의 세포내 잔류를 확인한 결과, 로다민-123 표지된 나노 알루미늄 및 쿠마린 표지된 나노 알루미늄이 bEnd3 세포 및 SH-SY5Y 세포 내로 효과적으로 유입된 것을 확인하였다(도 4 및 도 5).

[0100] 또한, HT22 세포에서 나노 알루미늄 유입 여부를 확인하기 위하여 모린 염색을 수행한 결과, 상기 bEnd3 세포 및 SH-SY5Y 세포와 마찬가지로 나노 알루미늄이 세포 내로 효과적으로 유입되어 세포 내 알루미늄 농도가 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 6).

[0101] 상기 실험 결과는 나노 알루미늄이 24 시간 이내에 뇌 혈관 장벽을 통과하여 뉴런에 독성을 미칠 수 있음을 의미한다.

[0103] 4. 나노 알루미늄 투여에 의한 산화적 스트레스 유도 확인 결과

[0104] 산화적 스트레스 발생 여부를 확인하기 위하여 HT22 세포를 8-Oxo-guanine(8-OxoG)으로 염색한 결과 나노 알루미늄이 산화적 스트레스를 유도하여 ROS가 생성된 것을 확인하였다(도 7).

[0105] 또한, 나노 알루미늄을 투여한 ICR 마우스에서 뇌 피질 및 해마의 암몬자1(comu ammonis 1, CA1), 암몬자3(CA3)

및 치아이랑(dentate gyrus, DG) 부위를 모른 염색한 결과, 대조군 마우스와 비교하여 나노 알루미늄을 투여한 마우스에 알루미늄이 풍부하게 축적되어 있는 것을 확인하였다(도 8). 아울러, 8-OxoG의 발현 정도를 확인한 결과 나노 알루미늄을 처리한 경우 8-OxoG의 발현이 증가하여 산화적 스트레스가 유도된 것을 알 수 있었다(도 9).

5. 나노 알루미늄 투여에 의한 마우스의 행동 및 기억력 분석 결과

나노 알루미늄 투여가 마우스의 공간 학습 및 기억력에 미치는 영향을 확인하기 위하여 마우스의 미로 탈출시간(escape latency)을 비교하였다.

그 결과, 나노 알루미늄 투여 전에는 대조군 및 실험군 간에 유사한 탈출시간을 나타내었으나, 나노 알루미늄 투여 후에는 훈련 첫째 날에 대조군과 비교하여 실험군의 마우스가 현저한 기억력 손상 및 높은 탈출시간을 보이는 것을 확인하였다. 또한, 훈련 넷째 날에 나노 알루미늄을 다시 투여한 결과 탈출시간이 가파르게 증가하는 것을 확인하여 나노 알루미늄이 기억력 손상에 관여하고 있음을 알 수 있었다(도 10).

프로브 테스트에서는 대조군 마우스와 비교하여 나노 알루미늄을 투여한 마우스가 표적 사분면(도피대가 있던 사분면)에서 체류하는 시간이 감소한 것을 확인하였다(도 11).

6. 나노 알루미늄 투여에 의한 아밀로이드 생성 경로 분석 결과

마우스 뇌 분쇄액의 웨스턴 블롯 결과, 대조군 마우스와 비교하여 나노 알루미늄을 투여한 마우스에서 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein, APP)의 발현 및 BACE1(beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1)의 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 반면에, 비독성 $A\beta$ 펩티드를 생성하는 sAPP- α 의 발현은 감소하는 것을 확인하여 나노 알루미늄 투여에 의하여 아밀로이드 생성 경로가 활성화된 것을 확인할 수 있었다(도 12).

또한, 마우스 뇌의 분쇄액에서 수용성 $A\beta_{1-42}$ 의 수준을 측정된 결과, 나노 알루미늄 투여에 의하여 수용성 $A\beta_{1-42}$ 의 생산이 현저하게 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 13).

또한, 마우스의 뇌 조직에서 $A\beta$ (6E10) 및 티오플라빈 S 염색으로 확인한 결과 나노 알루미늄 투여에 의하여 $A\beta$ 의 응집 및 플라크 형성이 유도되는 것을 확인할 수 있었다(도 14 및 도 15).

또한, 마우스의 뇌에서 과인산화된 타우 단백질(Ser^{413}), 시냅토파이신(synaptophysin) 및 후시냅스 밀도 단백질 95(post-synapse density protein 95)의 발현을 확인한 결과 나노 알루미늄 투여에 의하여 전체 타우 단백질 수준은 변함이 없지만 과인산화된 타우 단백질의 수준이 증가하고, 시냅토파이신 및 PSD 95의 발현은 감소하는 것을 확인하였다(도 16 및 도 17).

7. 나노 알루미늄 투여에 의한 뇌의 에너지 대사 분석 결과

뇌 분쇄액에서 웨스턴 블롯을 수행한 결과, 전체 AMPK 발현은 변동이 없지만 나노 알루미늄을 투여한 마우스에서 AMPK(AMP-activated protein kinase)의 발현이 감소하는 것을 확인하였다(도 18).

또한, 피질 및 해마의 CA1 부위에서 p-AMPK의 발현 정도를 확인한 결과 나노 알루미늄을 투여한 마우스에서 p-AMPK의 발현이 현저하게 억제된 것을 확인하였다(도 19).

8. 나노 알루미늄 투여에 의한 신경세포 사멸 분석 결과

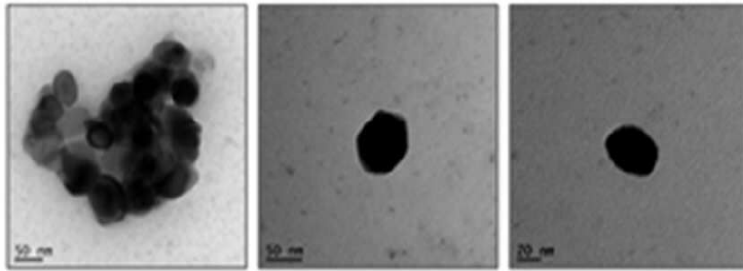
뇌의 피질 및 해마에서 웨스턴 블롯으로 확인한 결과, 나노 알루미늄 투여에 의하여 절단된 카스파아제-3 및 절단된 PARP-1과 같은 세포사멸 마커의 발현이 현저하게 증가한 것을 확인하였다(도 20).

또한, FJB 염색을 통하여 신경세포의 사멸 정도를 확인한 결과, 대조군 마우스에서는 FJB 염색 양성인 세포를 관찰할 수 없었으나, 나노 알루미늄을 투여한 마우스에서 뇌의 피질 및 해마의 CA1, CA3 및 DG 부위에 FJB 염색 양성인 세포의 수가 많은 것을 확인하여 뉴런의 사멸이 발생한 것을 알 수 있었다(도 21).

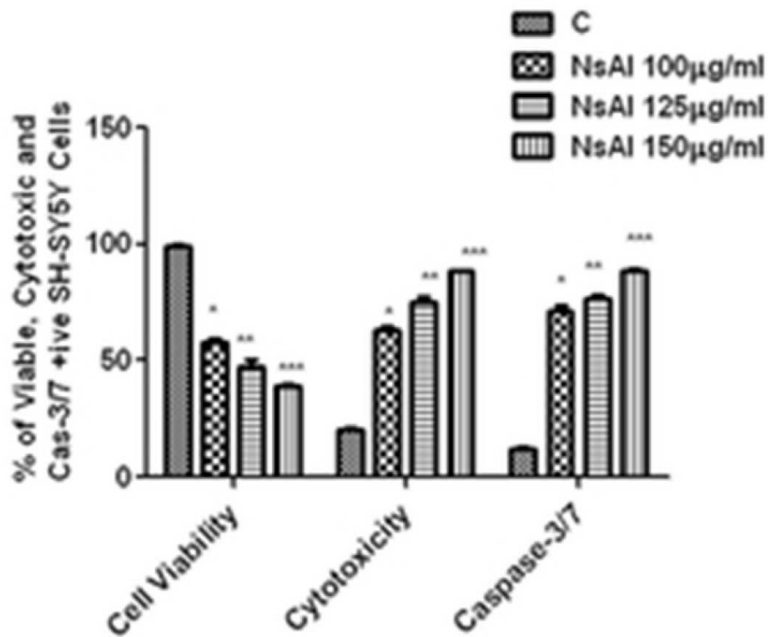
[0126] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

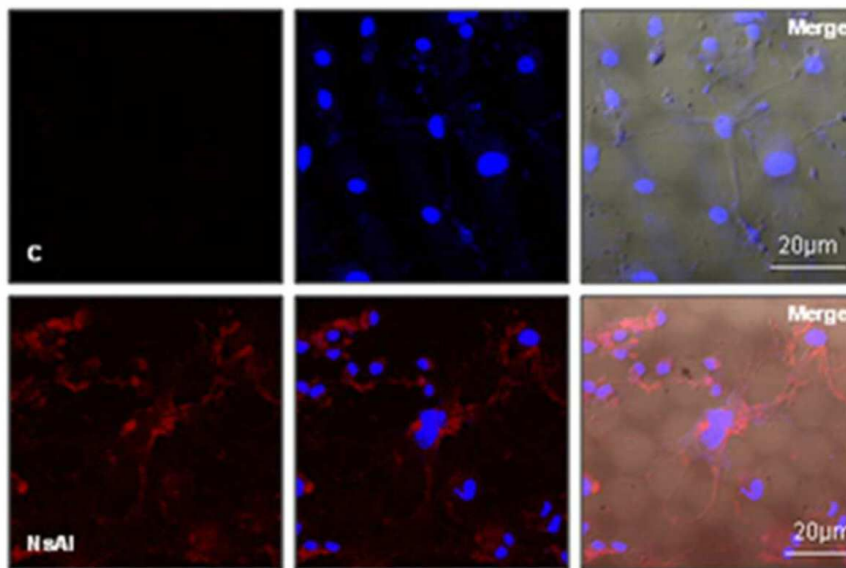
도면1



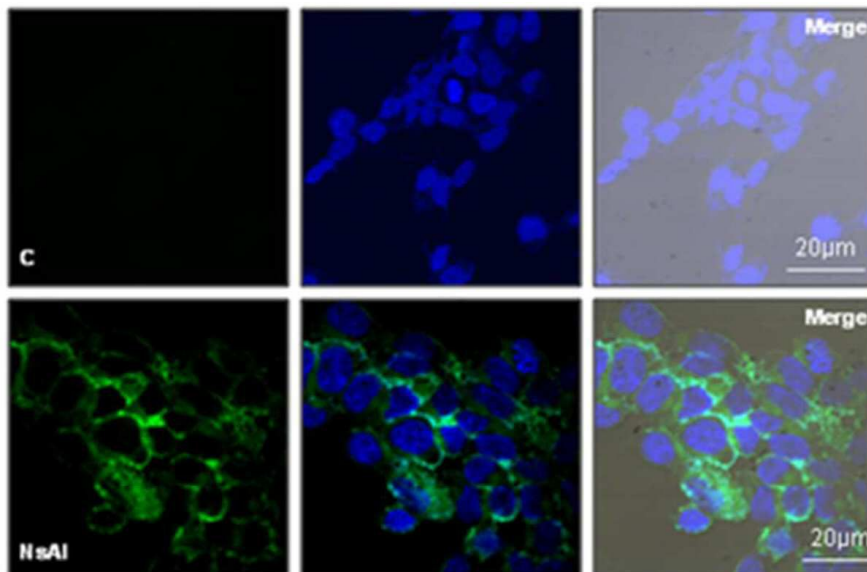
도면2



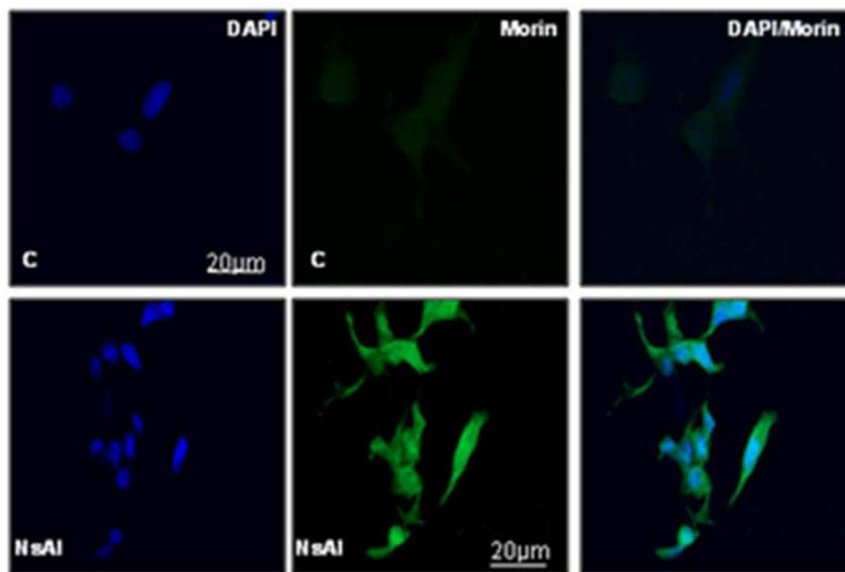
도면3



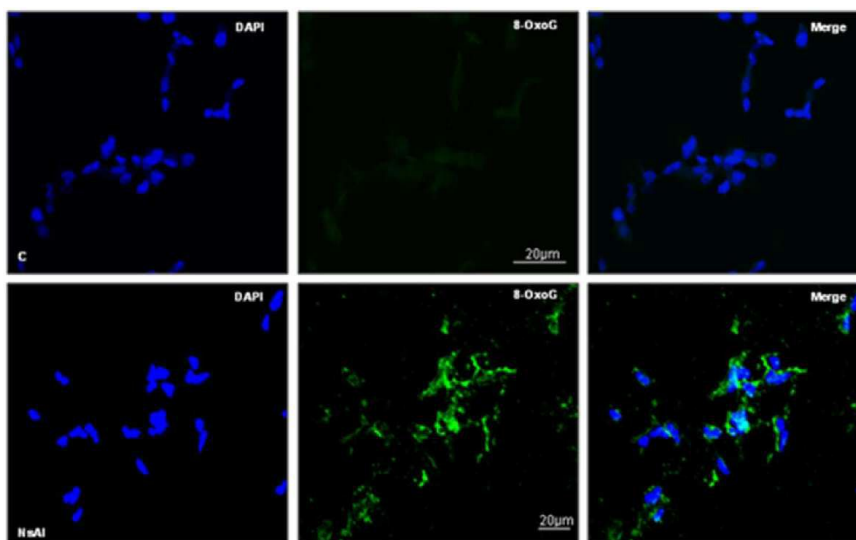
도면4



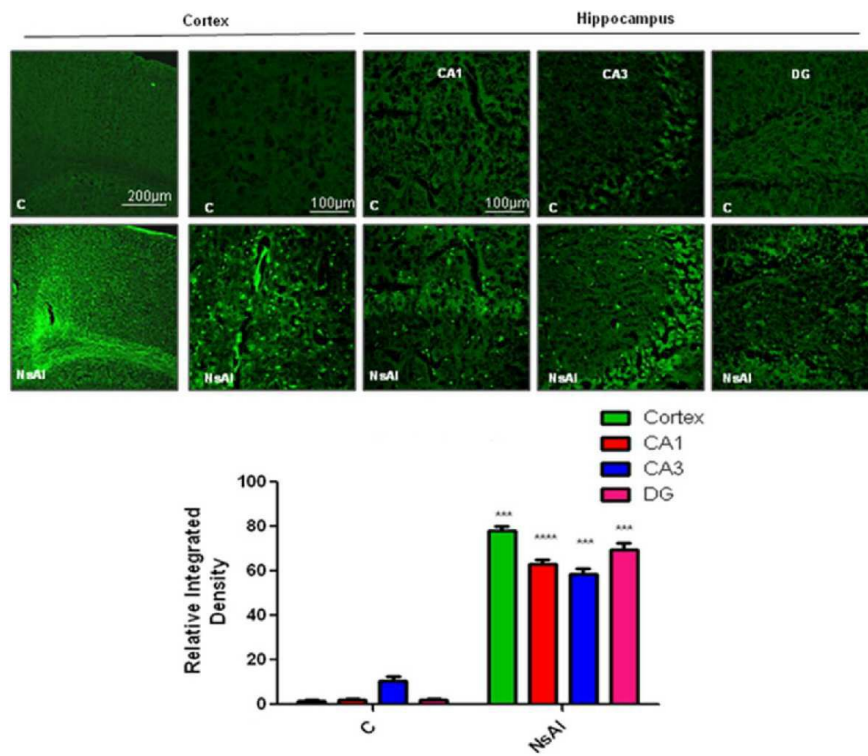
도면5



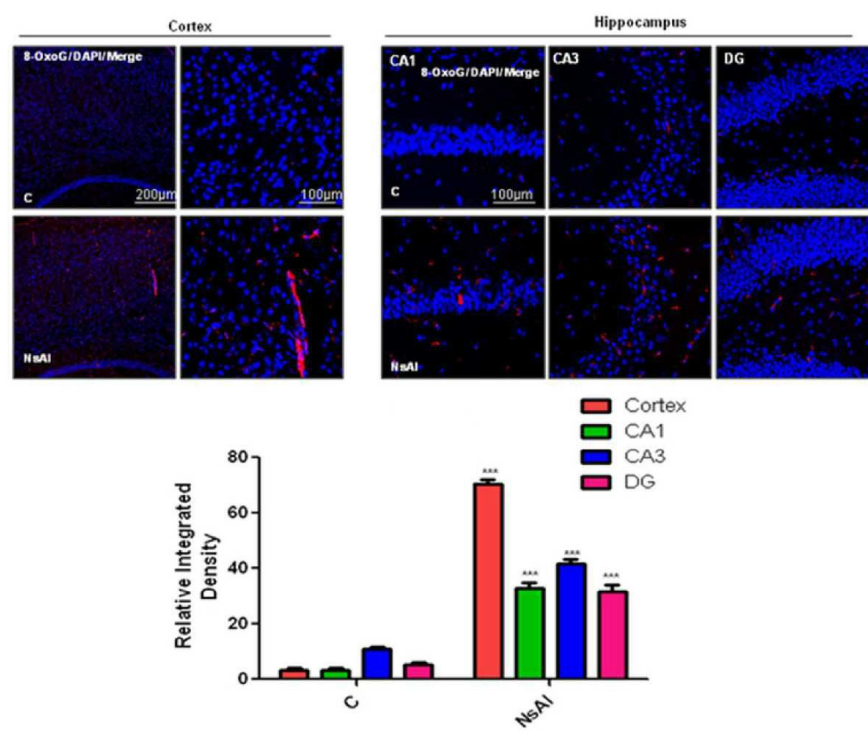
도면6



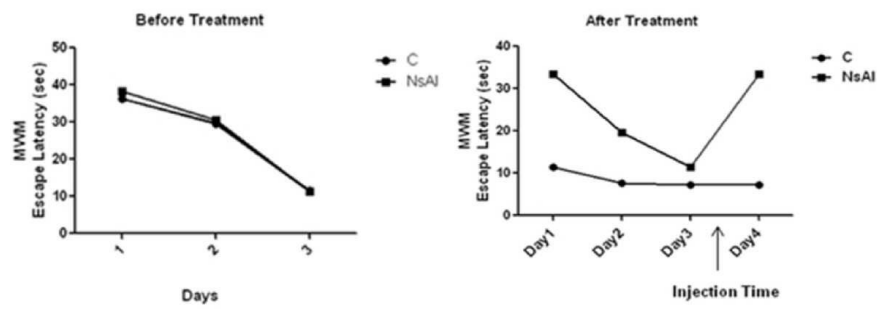
도면7



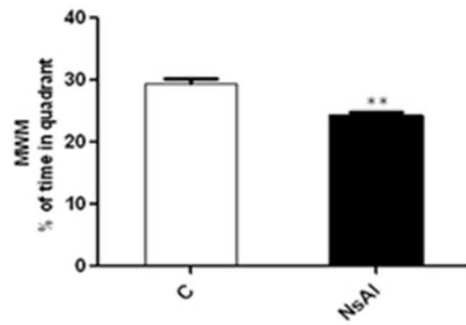
도면8



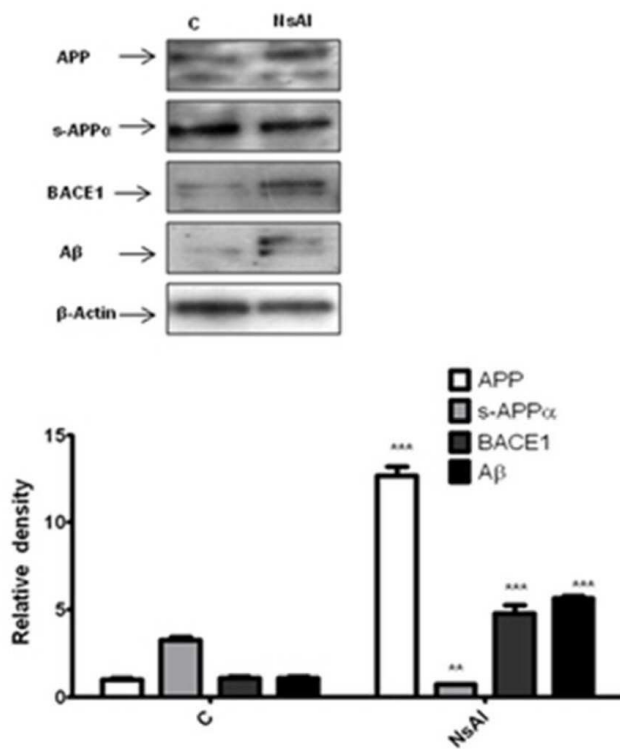
도면9



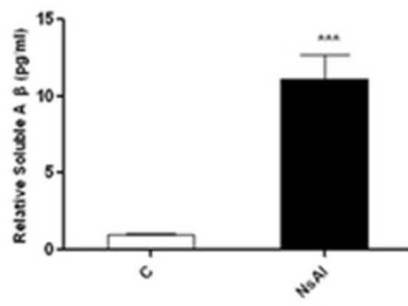
도면10



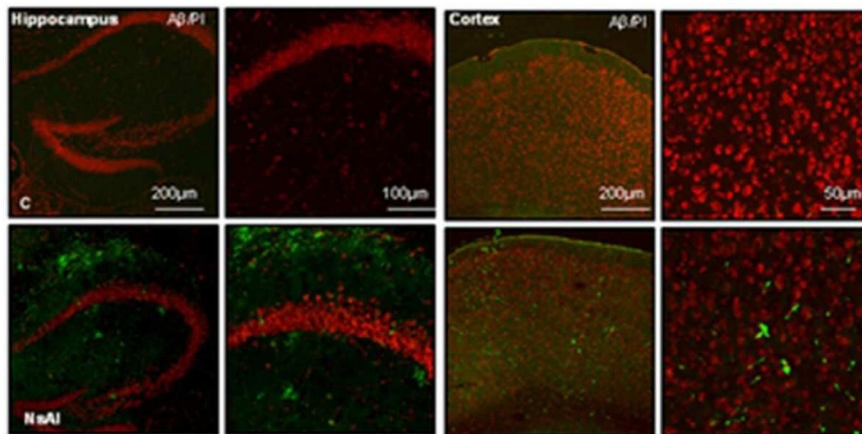
도면11



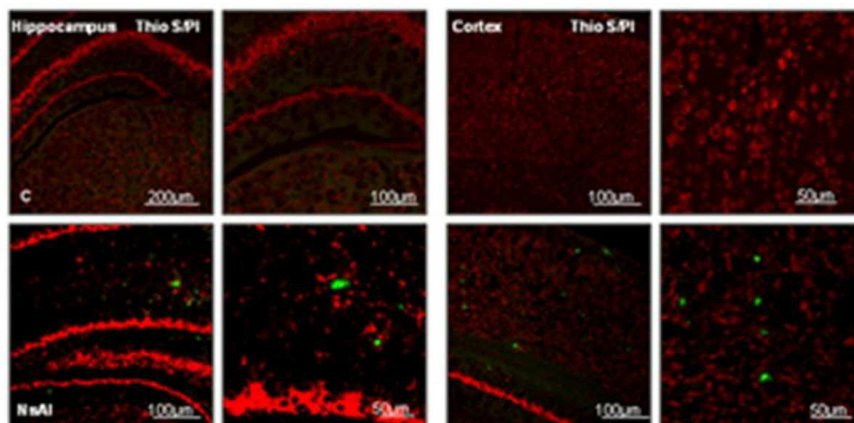
도면12



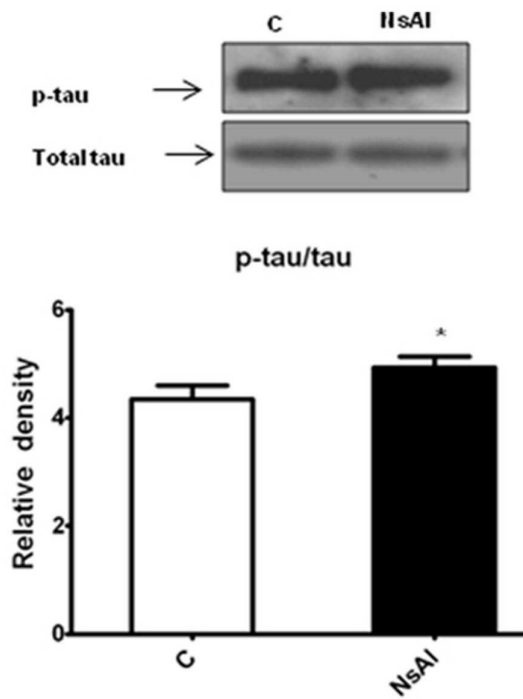
도면13



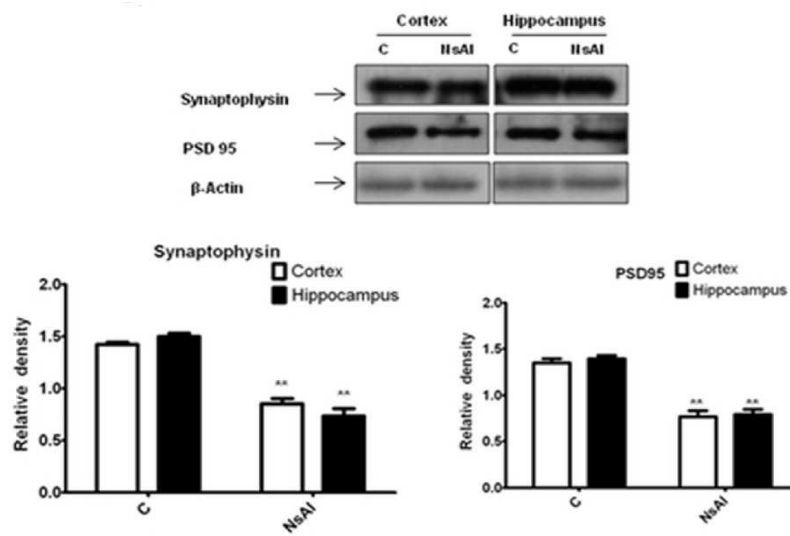
도면14



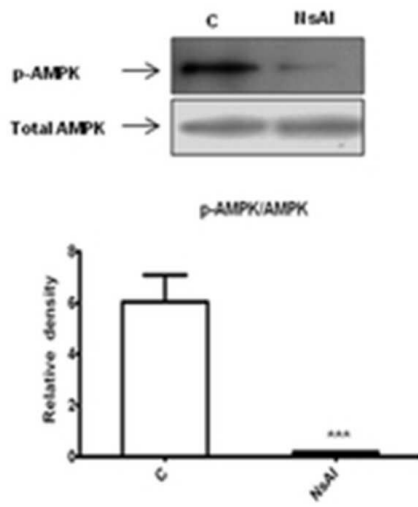
도면15



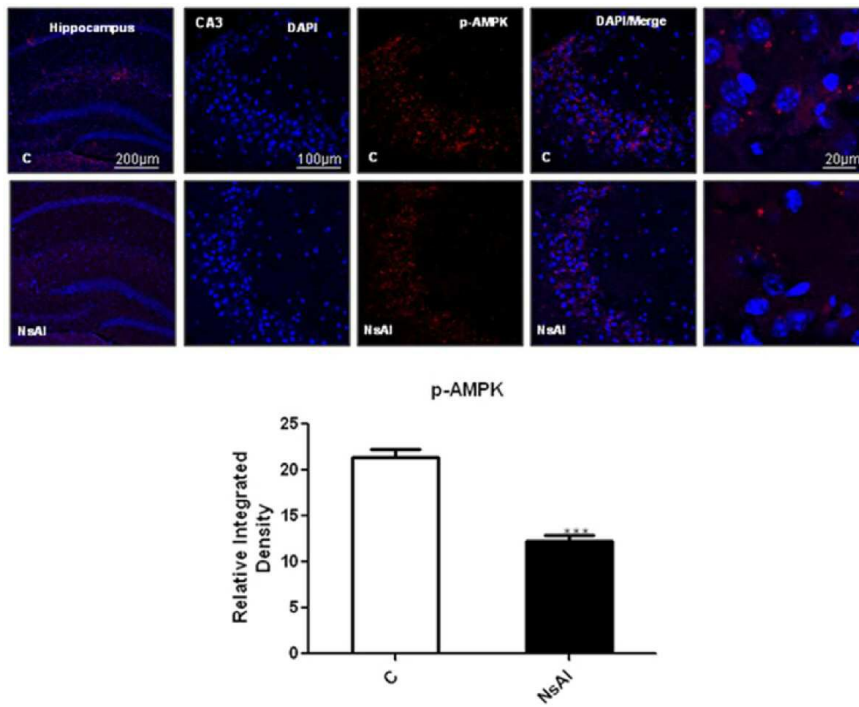
도면16



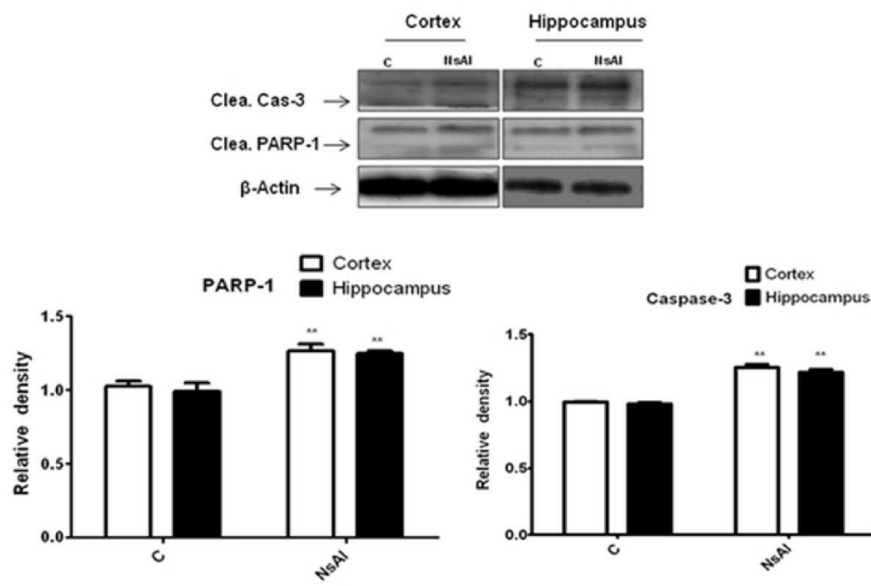
도면17



도면18



도면19



도면20

