(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0173871
(43) 공개일자 2024년12월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) *C12Q 1/6883* (2018.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6896 (2013.01)
C12Q 1/6883 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0072929
(22) 출원일자 2023년06월07일
심사청구일자 2023년06월07일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
김신
대구광역시 수성구 청호로84안길 33-5, 102동 (범어동)
임지선
경상북도 구미시 박정희로 599, 105동 1502호 (송정동, 푸르지오캐슬 A단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

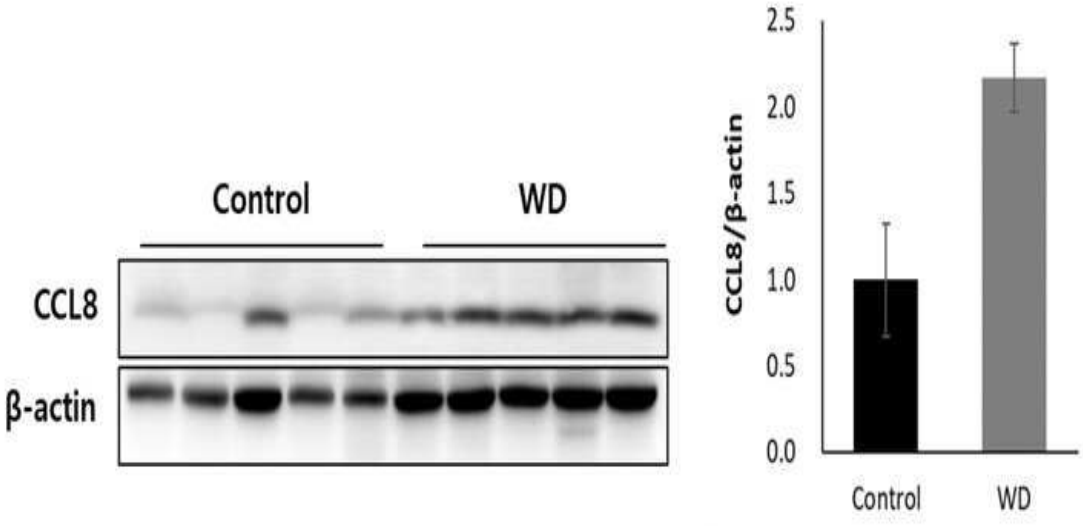
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **CCL8 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 진단용 바이오마커 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 CCL8(C-C Motif Chemokine Ligand 8) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것에 관한 것으로, 고지방 식이(내장지방염증)에 의해 인지기능이 감소한 동물 모델에서 정상 동물 모델에 비해, 상기 단백질 발현이 증가하는 것을 확인함으로써, 퇴행성 뇌질환 진단 용도로서 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
G01N 2333/521 (2013.01)
G01N 2800/2821 (2013.01)
G01N 2800/2835 (2013.01)
(72) 발명자
김해원
대구광역시 수성구 들안로60길 17, 104동 402호 (
수성동3가, 수성3가 화성파크드림 1단지)

홍정호
대구광역시 수성구 달구벌대로 2435, 106동 5201호
(범어동, 두산위브더제니스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711165802
과제번호 2020R1F1A1076041
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 심정지 자발순환 후 장기적 인지기능 장애에 대한 저체온치료의 효과
기 여 율 30/100
과제수행기관명 계명대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711161348
과제번호 2020R1F1A1070405
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구(과기정통부)
연구과제명 뇌미세혈관질환이 알츠하이머병 발생에 미치는 영향분석 및 기전규명
기 여 율 30/100
과제수행기관명 계명대학교
연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345362412
과제번호 2021R1I1A3A04037479
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 유방암 doxorubicin 저항성에 있어서 스핑고지질 대사 연관 유전자와 염증조절복합체의 연관성 규명
기 여 율 30/100
과제수행기관명 계명대학교
연구기간 2023.03.01 ~ 2023.05.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345358580
과제번호 2022R1A6A3A01086081
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 알츠하이머병 발생에 대한 내장지방염증 유래물질의 영향평가 및 작용기전 규명
기 여 율 10/100
과제수행기관명 계명대학교
연구기간 2022.09.01 ~ 2023.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

CCL8(C-C Motif Chemokine Ligand 8) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자는 고지방 식이 또는 내방지방염증에 의해 유도된 퇴행성 뇌질환 환자군에서 발현이 증가하는 것을 특징으로 하는 바이오마커 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 전측두치매(Frontotemporal dementia), 파킨슨병(Parkinson's disease), 근위축성측색경화증(Amyotrophic lateral sclerosis), 진행성핵상마비(Progressive supranuclear palsy), 피질기저핵변성(Corticobasal degeneration), 피크병(Pick's disease), 경도인지장애(MCI) 및 치매로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 바이오마커 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 바이오마커 조성물은 Aβ oligomer, APP(Amyloid Precursor Protein) 및 p-Tau로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오마커 조성물.

청구항 5

CCL8(C-C Motif Chemokine Ligand 8) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 확인할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 진단용 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 발현 수준을 확인할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앱타머 또는 화합물; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 조성물은 Aβ oligomer, APP(Amyloid Precursor Protein) 및 p-Tau로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 확인할 수 있는 제제를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

청구항 5 내지 청구항 7 중 어느 한 항의 조성물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 진단용 키트.

청구항 9

개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계(제1단계); 및

상기 분리된 생물학적 시료에서 CCL8(C-C Motif Chemokine Ligand 8) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계(제2단계)를 포함하는 퇴행성 뇌질환 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 혈청, 타액, 객담, 뇌척수액 및 뇨로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 정보 제공 방법.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 제2단계는 Aβ oligomer, APP(Amyloid Precursor Protein) 및 p-Tau로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 정보 제공 방법.

청구항 12

청구항 9에 있어서, 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent asay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 정보 제공 방법.

청구항 13

청구항 9에 있어서, 상기 유전자 발현 수준을 측정하는 방법은 마이크로어레이(microarray), 차세대 염기서열분석(Next generation sequencing; NGS), 중합효소연쇄반응(PCR), RT-PCR(Reverse transcription PCR), 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 정보 제공 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 CCL8(C-C Motif Chemokine Ligand 8) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 진단용 바이오마커 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 퇴행성 뇌질환은 나이가 들어감에 따라 발생하는 퇴행성 질환 중에서도 뇌에서 발생하는 질환을 뜻하며, 주요 증상과 침범되는 뇌 부위를 고려해 구분할 수 있는데, 대표적으로 알츠하이머병(alzheimer's disease), 전측두치매(frontotemporal dementia), 루이소체치매(lewy body dementia), 파킨슨병(parkinson's disease), 헌팅턴병(huntington's disease), 근위축성측색경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 등이 포함된다. 퇴행성 뇌질환은 노화에 따른 신경퇴화와 유전적·환경적 요인들로 인해 질환별 특정 단백질이 응집되어 신경세포가 사멸해 야기되는 것으로 알려져 있으나, 아직까지 정확한 병적 기전이 밝혀지지 않아 이를 규명하기 위한 기초 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0003] 알츠하이머병은 기억력 감퇴로 서서히 발병하여 시공간능력 소실, 언어 장애, 실행능력 장애 등 점진적·광범위한 인지기능의 소실로 진행되어 독립적인 일상생활 수행이 불가능한 치매 증상을 나타낸다. 아직까지 병적 기전이 정확하게 규명되진 않았지만 노화, 유전적 위험인자, 환경인자 간의 상호작용에 기인하는 것으로 보고되고 있다.

[0004] 보건복지부, 국민건강보험공단, 건강보험심사평가원, 사회보장정보원, 통계청 등 치매 유관기관이 분석한 결과에 의하면 2017년 말 치매 환자 수는 약 70만 명 이상으로 추정되며, 치매환자 1인당 연간 관리비용은 약 2,074만원, 국가 치매 관리비용은 약 14조 6천억 원이다. 현재 치매의 예방, 진단, 관리는 임상적인 문진과 같은 설문 조사 또는 PET-CT와 같은 고가의 비용을 지불하는 검진이 이용되고 있으며, 발병 후 진단 및 관리를 위해서 뇌척수액 등의 생체 시료를 요구하기 때문에 환자가 받는 고통이 관리비용의 부담에 가중되고 있다. 더군다나 고령화 사회에 따라 환자 수와 비용은 지속적으로 늘어날 전망이며, 이로 인해 추가로 손실되는 사회적 비용까지 감안하면 국가적으로도 큰 부담이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 제10-1873971호(2018.06.27. 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 CCL8(C-C Motif Chemokine Ligand 8) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 CCL8(C-C Motif Chemokine Ligand 8) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 확인할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 진단용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 퇴행성 뇌질환 진단용 조성물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 진단용 키트를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계; 및 상기 분리된 생물학적 시료에서 CCL8(C-C Motif Chemokine Ligand 8) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 CCL8(C-C Motif Chemokine Ligand 8) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 CCL8(C-C Motif Chemokine Ligand 8) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 확인할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 진단용 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 퇴행성 뇌질환 진단용 조성물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 진단용 키트를 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계; 및 상기 분리된 생물학적 시료에서 CCL8(C-C Motif Chemokine Ligand 8) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌질환 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따르면, 고지방 식이(내장지방염증)에 의해 인지기능이 감소한 동물 모델에서 정상 동물 모델에 비해, CCL8(C-C Motif Chemokine Ligand 8)의 발현이 증가하는 것을 확인함으로써, 퇴행성 뇌질환 진단 용도로서 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 행동시험을 통해 내장지방염증 마우스 모델의 인지기능을 분석한 결과이다. 구체적으로, 도 1A는 오픈필드 시험, 도 1B는 Y-미로 실험 및 도 1C는 모리스 수중미로 시험 결과이다.

도 2는 내장지방염증 마우스 모델의 복부지방 및 혈장을 이용한 RNA 시퀀싱 및 사이토카인 array 분석에 대한 모식도이다.

도 3은 내장지방염증 마우스 모델의 복부지방 내 염증반응 지표 단백질 발현을 분석한 결과이다.

도 4는 내장지방염증 마우스 모델의 뇌 조직 내 알츠하이머 병변을 분석한 결과이다.

도 5는 내장지방염증 마우스 모델의 뇌 조직 내 내장지방염증 유래인자 단백질(CCL8; C-C Motif Chemokine Ligand 8) 발현을 분석한 결과이다.

도 6은 마우스 해마 유래 신경세포에서 CCL8 단백질이 세포사멸에 미치는 영향을 분석한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0018] 본 발명은 CCL8(C-C Motif Chemokine Ligand 8) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0019] 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자는 고지방 식이 또는 내방지방염증에 의해 유도된 퇴행성 뇌질환 환자군에서 발현이 증가할 수 있다.

[0020] 상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 전측두치매(Frontotemporal dementia), 파킨슨병(Parkinson's disease), 근위축성측색경화증(Amyotrophic lateral sclerosis), 진행성핵상마비(Progressive supranuclear palsy), 피질기저핵변성(Corticobasal degeneration), 피크병(Pick's disease), 경도인지장애(MCI) 및 치매로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 상기 바이오마커 조성물은 Aβ oligomer, APP(Amyloid Precursor Protein) 및 p-Tau로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 본 명세서에서, "진단(diagnosis)"은 병리 상태의 존재 또는 특징을 확인하는 것으로, 본 발명의 목적상 퇴행성 뇌질환의 발병 여부 또는 발병 가능성을 확인하는 것을 의미하며, 퇴행성 뇌질환 또는 이의 적어도 하나 이상의 증상에 대한 대상의 감수성을 판정하는 것, 테라메트릭스(therametrics)(예를 들어, 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링하는 것) 등을 포함한다. 또한, 임상 상태의 일차 진단 또는 재발한 질병의 진단을 포함한다.

[0023] 본 명세서에서, "바이오마커(biomarker)"란 몸 안의 변화를 알아낼 수 있는 지표로서, 생명체의 정상 또는 병리적인 상태, 이의 변화 여부 등을 확인할 수 있는 물질로, 폴리펩타이드, 핵산, 지질, 당지질, 당단백질, 당(단당류, 이당류, 올리고당류 등) 등과 같은 유기 생체 분자 등을 포함할 수 있고, 이를 이용하여 본 발명과 같이 퇴행성 뇌질환 여부를 진단할 수 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 CCL8(C-C Motif Chemokine Ligand 8) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 확인할 수 있는 제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 진단용 조성물을 제공한다.

[0026] 상기 발현 수준을 확인할 수 있는 제제는 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 펩타이드, 앱타머 또는 화합물; 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0027] 상기 조성물은 Aβ oligomer, APP(Amyloid Precursor Protein) 및 p-Tau로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 확인할 수 있는 제제를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0028] 본 명세서에서, "프라이머(primer)"는 짧은 자유 3말단 수산화기(free 3' hydroxl group)를 가지는 핵산 서열로, 상보적인 주형과 염기쌍을 형성할 수 있고, 주형 가닥 복사를 위한 시작 시점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다. 프라이머는 적절한 완충용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA polymerase 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오타이드 트리포스페이트(nucleotide triphosphate)의 존재 하에서 DNA 합성을 개시할 수 있다. PCR 조건, 센스 및 안티센스 프라이머의 길이는 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0029] 본 명세서에서, "프로브(probe)"는 유전자 또는 miRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 수 개 내지 수백 개의 염기서열의 단편을 의미하며, 라벨링 되어있어서 상기 유전자의 존재 유무 및 발현량을 확인할 수 있다. 적절한 프로브 및 혼성화 조건은 당해 기술 분야에 공지된 기술에 따라 적절히 선택될 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 상기 퇴행성 뇌질환 진단용 조성물을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환 진단용 키트를 제공한다.

[0032] 상기 키트는 퇴행성 뇌질환이 의심되는 개체로부터 분리된 시료에서 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하여 퇴행성 뇌질환 발병 여부를 진단하는 데 사용될 수 있다.

[0033] 또한, 상기 키트는 상기 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자 발현 수준을 측정하는 제제뿐만 아니라, 분석 방법에 적합한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치를 포함할 수 있다.

[0034] 예를 들어, 본 발명에 따른 키트는 PCR을 수행하기 위해 분석하고자 하는 시료로부터 유래된 게놈 DNA, 본 발명의 마커 유전자에 대해 특이적인 프라이머 세트, 적당량의 DNA 중합 효소, dNTP 혼합물, PCR 완충용액 및 물을 포함하는 키트일 수 있다. 상기 PCR 완충용액은 KCl, Tris-HCl 및 $MgCl_2$를 포함할 수 있다. 이외에 PCR 산물의 증폭 여부를 확인할 수 있는 전기영동 수행에 필요한 구성 성분들이 본 발명의 키트에 추가로 포함될 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명에 따른 키트는 RT-PCR을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 키트일 수 있다. RT-PCR 키트는 마커 유전자에 대한 특이적인 각각의 프라이머 쌍 외에도 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오티드(dNTPs), Taq-폴리머레이즈 및 역전사 효소와 같은 효소, DNase, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함할 수 있다. 또한, 정량 대조군으로 사용되는 유전자에 특이적인 프라이머 쌍을 포함할 수 있다.

[0037] 또한, 본 발명은 개체로부터 생물학적 시료를 분리하는 단계(제1단계); 및 상기 분리된 생물학적 시료에서 CCL8(C-C Motif Chemokine Ligand 8) 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계(제2단계)를 포함하는 퇴행성 뇌질환 진단을 위한 정보 제공 방법을 제공한다.

[0038] 상기 생물학적 시료는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 혈청, 타액, 객담, 뇌척수액 및 뇨로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 상기 제2단계는 Aβ oligomer, APP(Amyloid Precursor Protein) 및 p-Tau로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 단백질 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 추가로 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 상기 단백질 발현 수준을 측정하는 방법은 웨스턴블랏, ELISA(enzyme linked immunosorbent asay), 방사선면역분석(Radioimmunoassay; RIA), 방사면역확산법(radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케이트(rocket) 면역전기영동, 조직면역염색, 면역침전 분석법(Immunoprecipitation assay), 보체고정분석법(Complement Fixation Assay), FACS 및 단백질 칩으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0041] 상기 유전자 발현 수준을 측정하는 방법은 마이크로어레이(microarray), 차세대 염기서열 분석(Next generation sequencing; NGS), 중합효소연쇄반응(PCR), RT-PCR(Reverse transcription PCR), 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(Real-time RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블랏팅(Northern blotting) 및 DNA 칩으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0043] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0045] **[실험예 1] 동물모델 제작**

[0046] 5주령의 C57BL/6 마우스에 서양식 식이(western diet; 콜레스테롤 1.5%)를 20주 동안 급여하여 내장지방염증 모델을 제작하였다. 실험동물은 대한바이오링크(충북 음성)에서 구매하여 사용하였고, 마우스에 급여한 사료는 Research diets사의 D12079B 제품을 구매하여 사용하였으며, 상기 제품의 성분은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0047]

D12079B			
		g%	kcal%
Protein		20	17
Carbohydrate		50	43
Fat		21	41
	Total		100
	kcal/g	4.7	
Ingredient		g	kcal
Casein, 80 Mesh		195	780
L-cystine		3	12
Corn starch		50	200
Maltodextrin 10		100	400
Sucrose		341	1364
Cellulose		50	0
Milk Fat, Anhydrous		200	1800
Corn Oil		10	90
Mineral mix S10001		35	0
Calcium carbonate		4	0
Vitamin Mix V10001		10	40
Choline Bitartrate		2	0
Cholesterol, USP		1.5	0
Ethoxyquin		0.04	0
Total		1001.54	4686

[0049] **[실시예 1] 인지기능 평가**

[0050] 행동시험(Y-미로 시험, 모리스 수중미로 시험 및 오픈 필드 시험)을 통해 상기 실험예 1에서 제작한 내장지방염증 모델의 인지기능을 평가하였다. 일반 식이를 급여한 마우스군을 대조군(Control)으로 설정하였다. 행동시험 결과는 Panlab사의 Smart 3.0 video tracking software를 이용하여 분석하였다.

[0051] 오픈 필드 시험(Open field test)은 동물의 행동양상 및 특성을 관찰하여 활동성, 정서, 행동패턴 등을 측정하였다. 20주 동안 서양식 식이를 급여한 마우스를 사각형 모양의 개방된 상자에 넣고, 10분 동안 동물의 운동수준 및 불안성을 평가하였다.

[0052] Y-미로 시험(Y-maze test)은 20주 동안 서양식 식이를 급여한 마우스를 Y자형 미로에 놓고 일정 시간(10분) 동안 횟수 및 가지를 이동하는 패턴을 측정하여 지각능력을 평가하였다.

[0053] 모리스 수중미로 시험(Morris water maze test)은 수조(직경 90cm 및 높이 45cm)에서 마우스가 목표물을 찾는 훈련을 시킨 후, 물 아래로 숨긴 목표물을 찾아가는 시간을 측정하였다. 시험은 총 6일에 걸쳐 진행하였고, 실험 1일 차에는 1분간 자유 수영을 통해 물에 적응하도록 하고, 실험 2~5일 차에는 1분간 수면 1cm 위에 있는 목표물의 위치를 기억하도록 훈련하였다. 마지막 6일 차에는 목표물을 수면 1cm 아래로 숨겨 마우스가 목표물을 찾는 시간을 기록하였다.

[0054] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 대조군(Control)과 비교해서 내장지방염증 모델(서양식 식이 급여군; WD)의 인지기능이 유의하게 감소한 것을 확인하였다. 상기 결과로부터, 마우스 모델에서 서양식 식이(내장지방염증)에 의해 인지기능이 감소되었음을 확인하였다.

[0056] **[실시예 2] 염증반응 지표 단백질 발현, RNA 시퀀싱 및 사이토카인 array 분석**

[0057] 도 2에 나타난 바와 같이, 마우스를 마취시켜 복부지방(부고환지방)을 적출하고, 이바이오젠(ebiogen)사의 QuantSeq 3' mRNA-Seq 분석을 통해 서양식 식이 여부에 따른 복부지방 내 염증반응 지표 단백질(IL-1β, NLRP3,

TNF-α 및 p-NKκB) 및 RNA 발현패턴을 측정하였다.

[0058] 또한, 도 2에 나타난 바와 같이, 마우스를 마취시켜 안구혈관에서 혈액을 수집하고, 수집한 혈액을 헤파린(heparin)이 첨가된 튜브에 넣고, 3000rpm 및 4℃ 조건에서 15분 동안 원심분리한 후, 혈장을 분리하였다. 그 후, Mouse L308 array membraine kit(RayBiotech)를 이용하여 혈장 내 사이토카인을 분석하였다.

[0059] 상기 복부지방 및 혈장 분석 결과는 이바이오젠에서 제공하는 ExDEGA 프로그램를 이용하여 프로파일링을 수행하였다.

[0060] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 서양식 식이 급여군(WD)에서 상기 염증반응 지표 단백질들의 발현이 유의하게 증가한 것을 확인하였다. 또한, 표 2에 나타난 바와 같이, RNA 시퀀싱 및 사이토카인 array 프로파일링을 통해 알츠하이머병 유발 내장지방염증 유래인자(CCL8; C-C Motif Chemokine Ligand 8)를 도출하였다.

표 2

[0061]

유전자	Quent-Seq		AB array	
	Fold change	*p* value	Fold change	*p* value
CCL8	2.229	0.042	1.467	0.013
CCL8 NCBI gene ID : 20307				

[0063] **[실시예 3] 알츠하이머병 병변 관련 단백질 및 내장지방염증 유래인자 단백질 발현 분석**

[0064] 마우스의 복부지방 및 혈장을 수집한 후, 마우스를 경추탈골법으로 희생시키고, 뇌 조직을 적출하여 대뇌 피질과 해마 부위를 수집하였다. 복부지방조직 시료를 cooled lysis buffer[Tris-Cl 20mM, 염화나트륨(NaCl) 145mM, 글리세롤(Glycerol) 10%, EDTA 5mM, Triton-X 1% 및 Nonidet 0.5%]에서 균질화한 후, 14,000×g 및 4℃ 조건에서 20분 동안 원심분리하였다. 상층액을 취하고, loading buffer에 희석하여 단백질을 15% SDS-폴리아크릴아마이드(polyacrylamide) 겔(gel)로 100V에서 1.5시간 동안 전기영동하였다. 그 후, PVDF 막(polyvinylidene difluoride membrane)으로 블로팅(blotting)하고, 알츠하이머병 병변 관련 단백질 및 상기 알츠하이머병 유발 내장지방염증 유래인자(CCL8) 단백질의 발현을 분석하였다.

[0065] 마우스의 복부지방 및 혈장을 수집한 후, 마우스를 경추탈골법으로 희생시키고, 뇌 조직을 적출하여 10% 포르말린에 고정하였다. 고정된 뇌 조직은 탈수(dehydration) 및 투명화(clearing) 후, 파라핀에 포매(embedding)하여 표본을 제작하였다. 파라핀 포매 표본은 마이크로톰(Microtome)을 이용하여 4㎛ 두께로 조직절편박절(sectioning) 한 후, 세팅된 프로토콜에 준하여 헤마톡실린/에오신(haematoxylin/eosin; H&E) 염색법으로 핵 및 세포질을 염색하였다.

[0066] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 서양식 식이 급여군에서 해마 CA1 및 CA3 부위가 손상된 것을 확인하였고, 알츠하이머 병변 단백질인 Aβ oligomer, APP 및 p-Tau의 발현이 유의하게 증가하는 것을 확인하였다. 또한, 도 5에 나타난 바와 같이, 서양식 식이 급여군(WD)에서 CCL8 단백질 발현이 특히 유의하게 증가하는 것을 확인하였다.

[0068] **[실시예 4] 세포모델을 이용한 CCL8 단백질의 신경독성 평가**

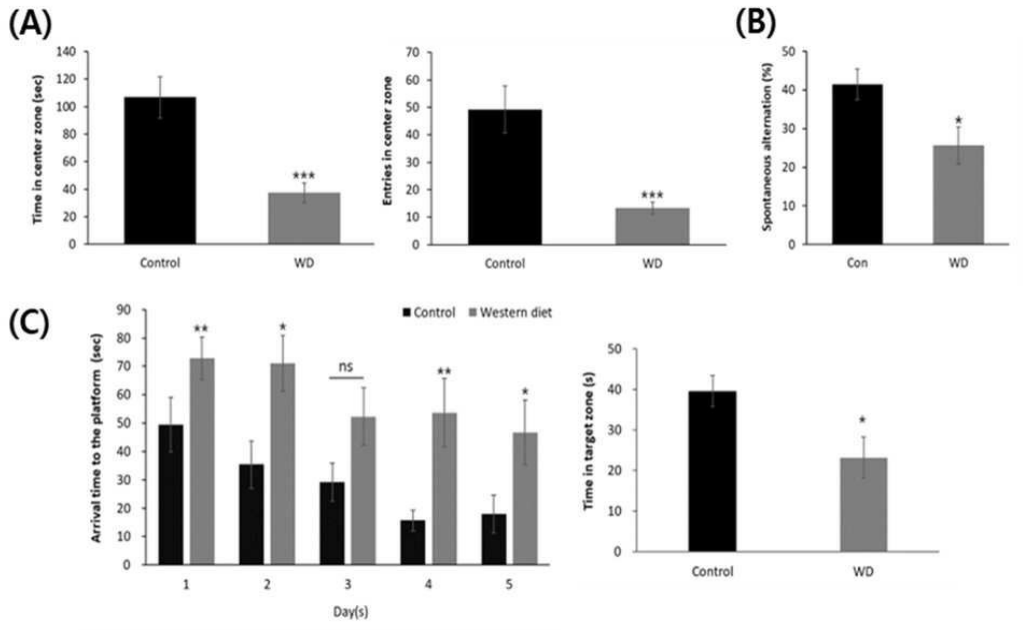
[0069] 마우스 해마 유래 신경세포인 HT22 세포에 CCL8 단백질을 처리한 마우스 미세아교세포인 BV2 세포의 배양액을 처리하여 cell counting kit(CCK-8)을 활용하여 신경세포 사멸을 평가하였다. 12-웰 플레이트에 미세아교세포를 2×10^4개/well로 분주하고, 24시간 동안 배양한 후, 100ng/mL 농도의 CCL8 단백질과 신경독성을 일으키는 양성대조군으로 1㎍/mL LPS를 처리하였다. 24시간 후 배양액을 수집하여 12-웰 플레이트에 1×10^4개/well로 분주하고, 48시간 동안 배양한 신경세포에 처리하여 24시간 배양하였다. CCK-8 시약 400㎕/well을 첨가하여 1시간 반응 후 분광광도계를 이용하여 450nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0070] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 대조군에 비해 100ng/mL 농도의 CCL8 단백질 처리군에서 세포사멸이 유의하게 나타남을 확인하였다.

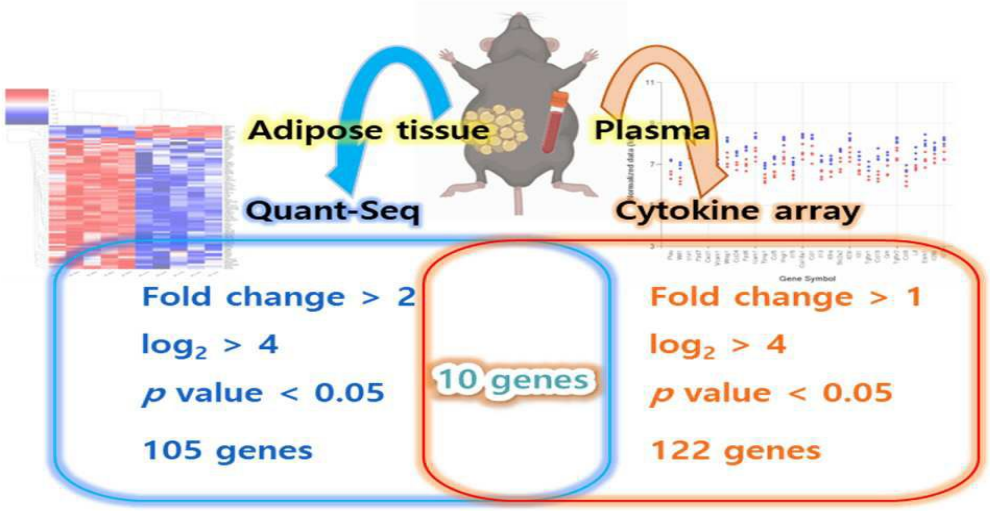
[0072] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

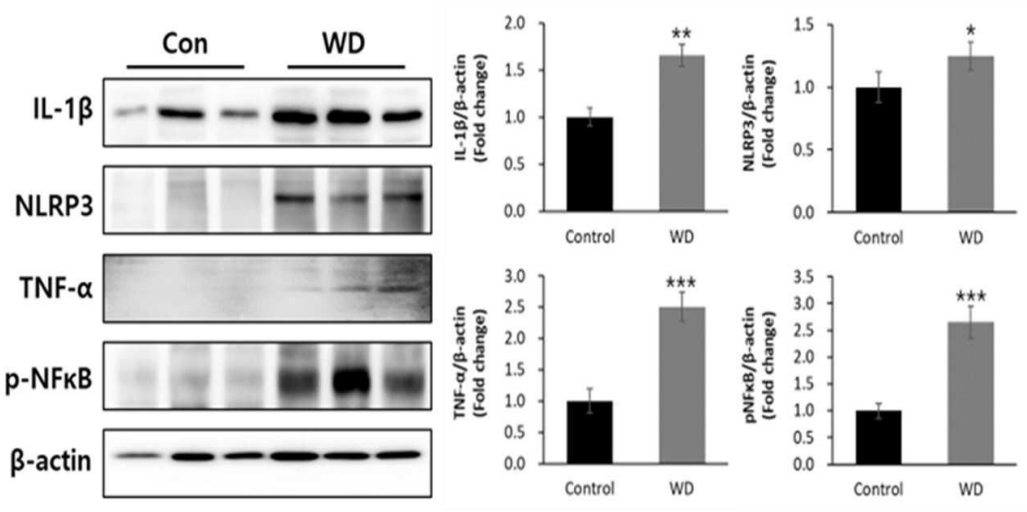
도면1



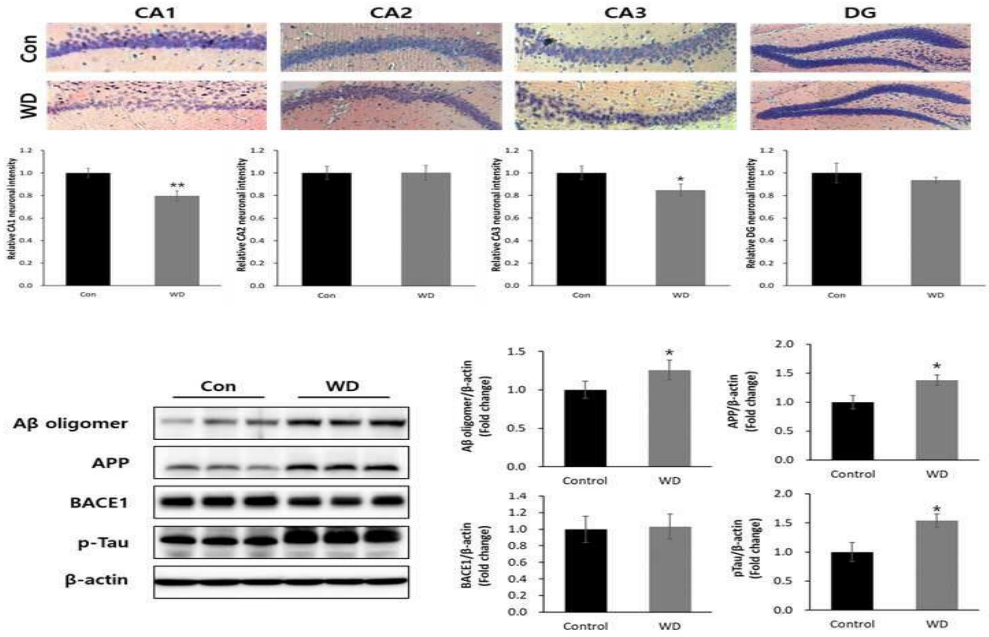
도면2



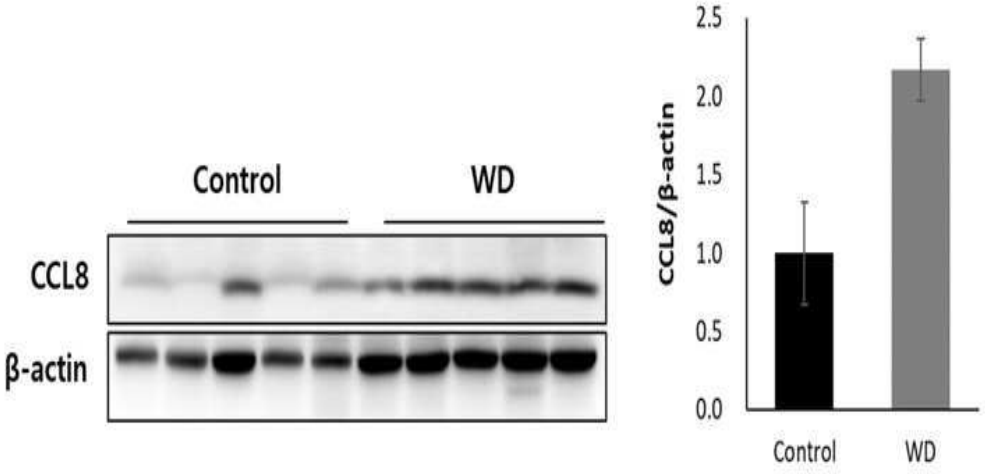
도면3


Con
WD
IL-1β
NLRP3
TNF-α
p-NFκB
β-actin
IL-1β/β-actin (Fold change)
NLRP3/β-actin (Fold change)
TNF-α/β-actin (Fold change)
pNFκB/β-actin (Fold change)
Control
WD

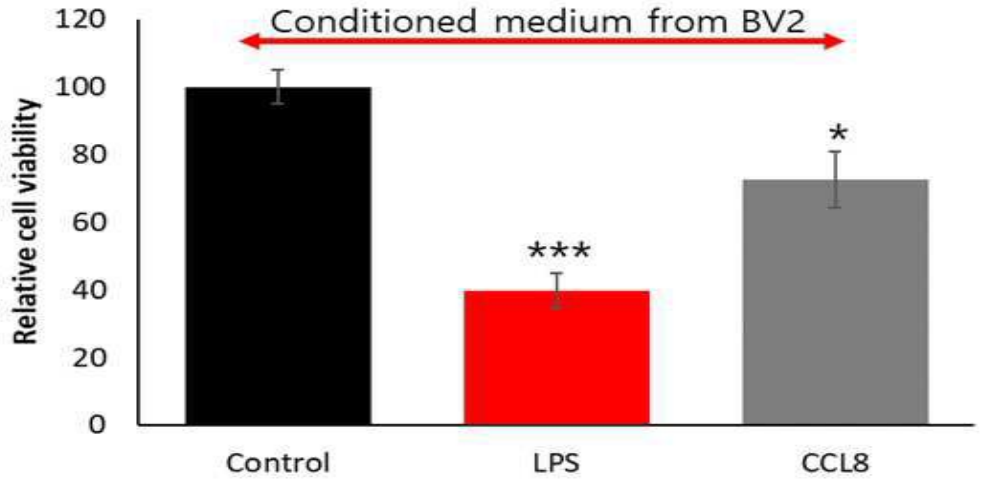
도면4


CA1
CA2
CA3
DG
Con
WD
Aβ oligomer
APP
BACE1
p-Tau
β-actin
Aβ oligomer/β-actin (Fold change)
APP/β-actin (Fold change)
BACE1/β-actin (Fold change)
pTau/β-actin (Fold change)
Control
WD

도면5


Control
WD
CCL8
β-actin
CCL8/β-actin
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Control
WD

도면6


Conditioned medium from BV2
Relative cell viability
120
100
80
60
40
20
0
***
*
Control
LPS
CCL8