(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0105334
(43) 공개일자 2019년09월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/7088 (2006.01) *A61P 25/28* (2006.01)
C12Q 1/68 (2018.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/7088 (2013.01)
A61P 25/28 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2018-0025754
(22) 출원일자 2018년03월05일
심사청구일자 2019년03월05일

(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(신천동, 파크리오)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

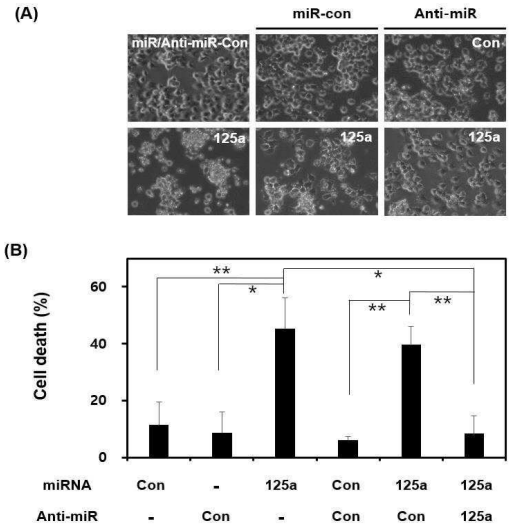
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **신경줄기세포 사멸 억제 효과를 가지는 miR-125a-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 신경줄기세포 사멸 억제 효과를 가지는 miR-125a-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(mircoarray-based genome-wide) miRNA 분석을 수행하여 miRNAs의 특성을 확인하였다. 그 결과, miR-125a-5p를 억제시킬 경우, 해마 유래 신경 줄기세포의 생존을 조절하여, 신경줄기세포 생착율을 향상시킬 수 있다는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 miR-125a-5p 억제제는 퇴행성 뇌신경질환의 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12Q 1/68 (2018.05)
C12Q 2600/136 (2013.01)
C12Q 2600/158 (2013.01)
C12Q 2600/178 (2013.01)

(72) 발명자
박수정
서울특별시 도봉구 도봉산길 13-6, 101호(도봉동)
김승후
서울특별시 송파구 오금로31길 28, 103동 1312호(방이동, 코오롱아파트)

전상용
서울특별시 송파구 올림픽로4길 42, 12동 205호(잠실동, 우성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2017-0283
부처명 미래부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업 (중견연구)
연구과제명 차세대 아데노부속바이러스 벡터에 기반한 망막혈관질환 유전자 치료
기 여 율 1/2
주관기관 울산대학교 산학협력단
연구기간 2017.03.01 ~ 2020.02.29
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016-9197
부처명 보건복지부
연구관리전문기관 보건산업진흥원
연구사업명 첨단의료기술개발사업 (줄기세포 재생의료 성과창출형 중개연구)
연구과제명 만성척수손상 재생치료를 위한 차세대 줄기세포 치료제 개발
기 여 율 1/2
주관기관 서울아산병원
연구기간 2016.11.08 ~ 2021.07.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

miR-125a-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 신경줄기세포 사멸 억제용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 miR-125a-5p 억제제는 안타고미르(antagomir), 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotide) 또는 억제성 RNA 분자(inhibitoy RNA molecule)인 것을 특징으로 하는 신경줄기세포 사멸 억제용 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 miR-125a-5p 억제제는 서열번호 1로 표시되는 anti-miR-125a-5p인 것을 특징으로 하는 신경줄기세포 사멸 억제용 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 miR-125a-5p는 서열번호 2로 표시되는 인간, 마우스 또는 랫트 유래 miR-125a-5p인 것을 특징으로 하는 신경줄기세포 사멸 억제용 조성물.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신경줄기세포는 뇌 유래 해마 신경(HCN) 줄기세포인 것을 특징으로 하는 신경줄기세포 사멸 억제용 조성물.

청구항 6

miR-125a-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 miR-125a-5p 억제제는 서열번호 1로 표시되는 anti-miR-125a-5p인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 8

제 6항 또는 제 7항 중 어느 한 항에 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-125a-5p의 발현 정도를 측정하는 단계; 및

대조구 시료와 비교하여 상기 miR-125a-5p의 발현 정도가 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌신경질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 10

miR-125a-5p를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경질환 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 11

miR-125a-5p를 유효성분으로 포함하는 신경줄기세포 사멸 검출용 바이오마커 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신경줄기세포 사멸 억제 효과를 가지는 miR-125a-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 신경질환 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, miR-125a-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 자가재생 능력 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 중합효소(polymerase) II에 의해 70-100 nts의 긴 1차 전사체를 만드는데, 이를 pri-miRNAs라고 한다. 이후 리보핵산분해효소 Ⅲ(ribonuclease Ⅲ)인 드로셔(Drosha) 및 다이서(Dicer)에 의해 성숙 miRNA 이중복합체(duplexes)가 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-125a-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 신경줄기세포 사멸 억제용 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 miR-125a-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 신경줄기세포에서 miR-125a-5p의 발현 정도를 측정하여 퇴행성 뇌신경질환 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 데에 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 miR-125a-5p를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 miR-125a-5p를 유효성분으로 포함하는 신경줄기세포 사멸 검출용 바이오마커 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 miR-125a-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 신경줄기세포 사멸 억제용 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 miR-125a-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 신경줄기세포에 시험물질을 접촉시키는 단계; 상기 시험물질을 접촉한 신경줄기세포에서 miR-125a-5p의 발현 정도를 측정하는 단계; 및 대조구 시료와 비교하여 상기 miR-125a-5p의 발현 정도가 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 퇴행성 뇌신경질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 miR-125a-5p를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 miR-125a-5p를 유효성분으로 포함하는 신경줄기세포 사멸 검출용 바이오마커 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 신경줄기세포 사멸 억제 효과를 가지는 miR-125a-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(mircoarray-based genome-wide) miRNA 분석을 수행하여 miRNAs의 특성을 확인하였다. 그 결과, miR-125a-5p를 억제시킬 경우, 해마 유래 신경 줄기세포의 생존을 조절하여, 신경줄기세포 생착율을 향상시킬 수 있다는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 miR-125a-5p 억제제는 퇴행성 뇌신경질환의 치료에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 miR-125a-5p의 이차 구조 및 염기서열을 나타낸 것이다.

도 2는 rHCN 세포의 세포사멸에 있어, miR-125a-5p 처리의 효과를 나타낸 것이다. (A) 형태학적 특성(24시간 또는 48시간 처리), (B) 정량적 세포사멸 분석(miRNA 농도: 10 nM, 50 nM, 100 nM). *: 0.05> p, ** : 0.005> p.

도 3은 miR-125a-5p에 의한 세포 사멸에 있어, anti-miR-125a-5p 처리의 효과를 나타낸 것이다. (A) 형태학적 특성(24시간 처리), (B) 정량적 세포사멸 분석(miRNA 농도: 50 nM, anti-miRNA 농도: 100 nM). *: 0.05> p, ** : 0.005> p.

도 4는 인슐린 결핍 조건에 의한 세포사멸에 있어, anti-miR-125a-5p 처리의 효과를 나타낸 것이다. (A) 형태학적 특성(24시간 처리), (B) 정량적 세포사멸 분석(anti-miRNA 농도: 100 nM). *: 0.05> p, ** : 0.005> p.

도 5는 자가포식 특이 세포 사멸에 있어, miR-125a-5p 처리의 효과를 나타낸 것이다. (A) 정량적 카스파제-3 활성 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-125a-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 신경줄기세포 사멸 억제용 조성물을 제공한다.

[0018] 바람직하게는, 상기 miR-125a-5p 억제제는 miRNA를 억제시킬 수 있는 어떠한 억제제도 사용 가능하나, 안타고미르(antagomir), 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotide) 또는 억제성 RNA 분자(inhibitory RNA molecule)일 수 있고, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 바람직하게는, 상기 miR-125a-5p 억제제는 서열번호 1 (5'-UCACAGGUUAAAGGGUCUCAGGGA-3')로 표시되는 anti-miR-125a-5p일 수 있다.

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

[0020] 바람직하게는, 상기 신경줄기세포는 뇌 유래 해마 신경(HCN) 줄기세포일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 상기 안타고미르(antagomir)나 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotide)는 miR-125a-5p의 염기서열에 상보적인 서열을 갖는 것을 특징으로 한다. 이러한 miRNA에 상보적인 서열을 갖는 억제제는 miR-125a-5p에 결합하여 이들 miRNA가 작용하지 못하도록 하는 역할을 한다.

[0022] 한편, 상기 miR-125a-5p는 서열번호 2 (5'-UCCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA-3')로 표시되는 인간(human) 유래 miR-125a-5p(miRBase Accession # MIMAT0000443), 마우스(Mouse) 유래 miR-125a-5p(miRBase Accession # MIMAT0000135), 또는 랫트(Rat) 유래 miR-125a-5p(miRBase Accession # MIMAT0000829)일 수 있다.

[0023] 상기와 같이, miR-125a-5p는 인간(human), 마우스(Mouse) 및 랫트(Rat)에서 공통적인 서열을 가지고 있으며, 상기 공통적인 서열은 miRNA의 표적화(targeting)에 중요한 부분이므로, 이로 인해 miR-125a-5p 억제제가 인간에서도 적용 가능하여 퇴행성 뇌신경질환 치료에 효과가 있다는 것을 예측할 수 있다.

[0024] 또한, 본 발명은 miR-125a-5p 억제제를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0025] 바람직하게는, 상기 miR-125a-5p 억제제는 miRNA를 억제시킬 수 있는 어떠한 억제제도 사용 가능하나, 안타고미르(antagomir), 안티센스 올리고뉴클레오티드(antisense oligonucleotide) 또는 억제성 RNA 분자(inhibitory RNA molecule)일 수 있고, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 바람직하게는, 상기 miR-125a-5p 억제제는 서열번호 1 (5'-UCACAGGUUAAAGGGUCUCAGGGA-3')로 표시되는 anti-miR-125a-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, 유제, 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-125a-5p의 발현 정도를 측정하는 단계; 및 대조구 시료와 비교하여 상기 miR-125a-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-125a-5p를 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌신경질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0032] 또한, 본 발명은 miR-125a-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 폴리-L-오르니틴(poly-L-ornithine) (플라스틱 플레이트 10 μg/ml 및 유리 슬라이드 50 μg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 및 마우스 라미닌(mouse laminin) (5 μg/ml; BD Pharmingen, San Diego, CA)으로 코팅하였다. 햄스 F-12 배지(Ham's F-12 medium) (Invitrogen), 1 mM L-글루타민(L-glutamine) (Invitrogen), 100 μg/ml 스트렙토마이신(streptomycin), 100 U/ml 페니실린(penicillin) (Invitrogen), 20 ng/ml b-FGF (PeproTech, Rocky Hill, NJ) 및 5 mg/L 인슐린(insulin) (Sigma-Aldrich)이 함유된 자체-제조한 N_2 보충물(supplement)이 첨가된 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium) (Invitrogen, Carlsbad, CA), 16 mg/L 푸트레신 디하이드로클로라이드(putrescin dihydrochloride) (Sigma-Aldrich), 100 mg/L 트랜스페린(transferrin) (Sigma-Aldrich), 30 nM 소듐 셀레나이트(sodium selenite) (Sigma-Aldrich) 및 20 nM 프로게스테론(progesterone) (Sigma-Aldrich)이 포함된 무혈청 배지에 HCN 세포를 배양하였다. 상기 배지는 소듐 바이카보네이트(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 mimic은 내재성 miR-125a-5p와 동일한 서열 및 동일한 기능을 하는 이중 나선 RNA 분자이다. 관련된 miR mimic(모방체)을 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. 회흐스트 33342(Hoechst 33342)/프로피디움 요오드화물(propidium iodide, PI) 염색 후, 세포 사멸 측정**

[0041] HCN 세포의 세포 생존/사멸은 형광 현미경 하에서 형태학적으로 관측하였고, 세포 사멸 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. 형광 현미경 하에서 임의로 5 필드를 촬영한 후, PI-양성 및 Hoechst 33342-양성 세포의 비율을 계산하여 세포 사멸율을 측정하였다.

[0042] 세포 사멸 (%) = [PI-양성 세포수 (빨강) / Hoechst33342-양성 세포수 (파랑)] × 100

[0043] **4. caspase-3 활성에 대한 면역블로팅 분석**

[0044] HCN 세포를 이용한 카스파제-3(caspase-3) 활성 수준의 정량 분석은 면역블로팅(immunoblotting)을 통해 수행하였다. 세포로부터 단백질을 추출하고, 상기 추출한 단백질(20 μg)을 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyamide gel elecreophoresis, 소듐 도데실페이트-폴리아미드 겔 전기영동)로 분획하였다. 폴리비닐리덴 디플루오라이드(polyvinylidene difluoride, PVDF) 멤브레인(Millipore)으로 옮긴 후, 카스파제-3, LC3, 또는 β-액틴에 특이적 항체로 블로팅하였다. 멤브레인은 HRP가 컨쥬게이션된 2차 항체로 인큐베이션 후, ECL(enhanced chemiluminescence, 증강 화학발광; Amersham)을 사용하여 현상하였다.

[0045] **<실시예 1> rHCN 세포에서 miR-125a-5p 처리에 의한 세포 사멸 유도 효과**

[0046] 도 1은 miR-125a-5p의 이차 구조 및 염기서열을 나타낸 것으로, 본 발명의 miR-125a-5p 및 anti-miR-125a-5p에 대한 염기서열 정보는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0047]

miRNA	species	sequence	accession number
miR-125a-5p	H	UCCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA	MIMAT0000443
	M	UCCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA	MIMAT0000135
	R	UCCCUGAGACCCUUUAACCUGUGA	MIMAT0000829
anti-miR-125a-5p	H	UCACAGGUUAAAGGGUCUCAGGGA	

[0048] H: 인간(Human), M: 마우스(Mouse), R: 랫트(Rat)

[0049] 인슐린 존재 하에 합성 miRNA mimic(모방체)으로 rHCN 세포를 형질감염시키고 관찰한 결과, 도 2를 참조하여 보면, 대조 miRNA mimic을 첨가한 대조군과 달리, miRNA mimic 존재 하에 rHCN 세포의 생존능이 크게 상실되었으며, 이는 세포 사멸을 나타내는 PI-양성 세포의 현저한 증가를 통해 확인하였다.

[0050] **<실시예 2> miR-125a-5p 유도 세포 사멸을 억제하고, 인슐린 결핍으로 유도된 세포 사멸을 보호하는 anti-miR-125a-5p**

[0051] rHCN 세포의 사멸에 있어서 miR-125a-5p의 특이성을 검증하기 위해, 본 발명자들은 miR-125a-5p 억제제로서 miR-125a-5p와 상보적 서열을 갖는 anti-miR-125a-5p를 사용하였으며, 이는 miR-125a-5p의 생리학적 활성을 녹다운(knockdown)시킨다. 도 3을 참조하여 보면, anti-miR-125a-5p의 처리는 miR-125A-5p에 의해 유도되는 세포 사멸을 현저하게 감소시켰다. 비특이적 혼합 서열을 가진 anti-miR-Con은 miR-125a-5p mimic에 의해 유도된 세포 사멸에 영향을 미치지 않았다.

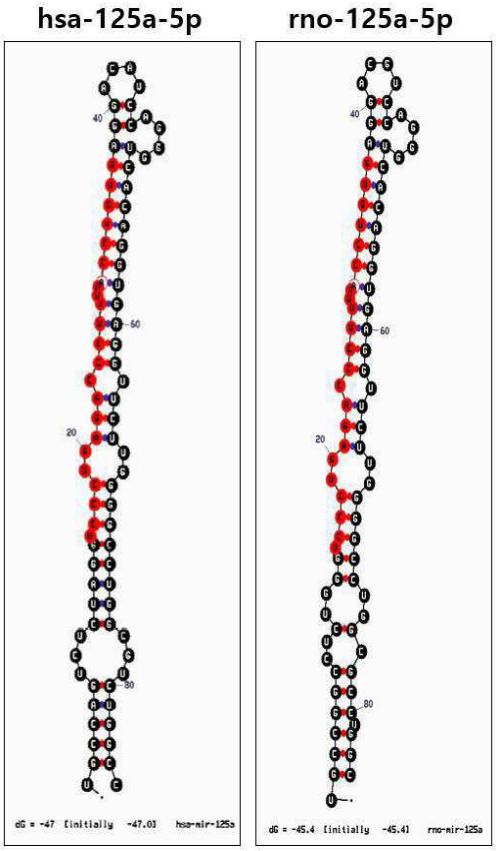
[0052] 또한, 도 4를 참조하여 보면, anti-miR-125a-5p의 처리는 인슐린 결핍 하에 나타나는 세포 사멸 유도 효과를 감소시키는 것을 확인하였다.

[0053] **<실시예 3> 자가포식(autophagy) 특이 세포 사멸을 유도하는 miR-125a-5p**

[0054] miR-125a-5p 처리에 의한 rHCN 세포의 사멸 유도 효과에 있어서, 신호 전달 경로를 분석하기 위해 카스파제-3 활성(A) 및 면역블로팅(B) 분석을 수행하였다. 그 결과, 도 5를 참조하여 보면, miR-125a-5p 처리가 카스파제-3 활성에 영향을 미치지 않는 반면, 대조군 독소루비신(Dox) 처리에 의해 카스파제-3 활성이 증가하는 것을 확인하였다. 또한, miR-125a-5p의 처리는 자가포식 작용의 대표적인 마커인 LC3-I에서 LC3-II로의 전환을 효과적으로 유도하는 것을 확인함으로써 miR-125a-5p에 의한 세포 사멸이 apoptosis에 의한 것이 아닌 자가포식 특이 세포 사멸임을 확인하였다.

도면

도면1



hsa-125a Pre-mature seq.

```
u      u u      uc  ug   c     ua          -----  a
 gccag c cuagg  cc  aga ccuu  accuguga     gg c
 ||||| | |||||  ||  ||| ||||  ||||||||     ||
 cgguc g gguCC  gg  ucu ggag  uggacacu     cc a
c      u c      ga  gu   u     --          ggga  u
```

hsa-125a Mature seq.

15-ucccugagacccuuuaaccuguga-38

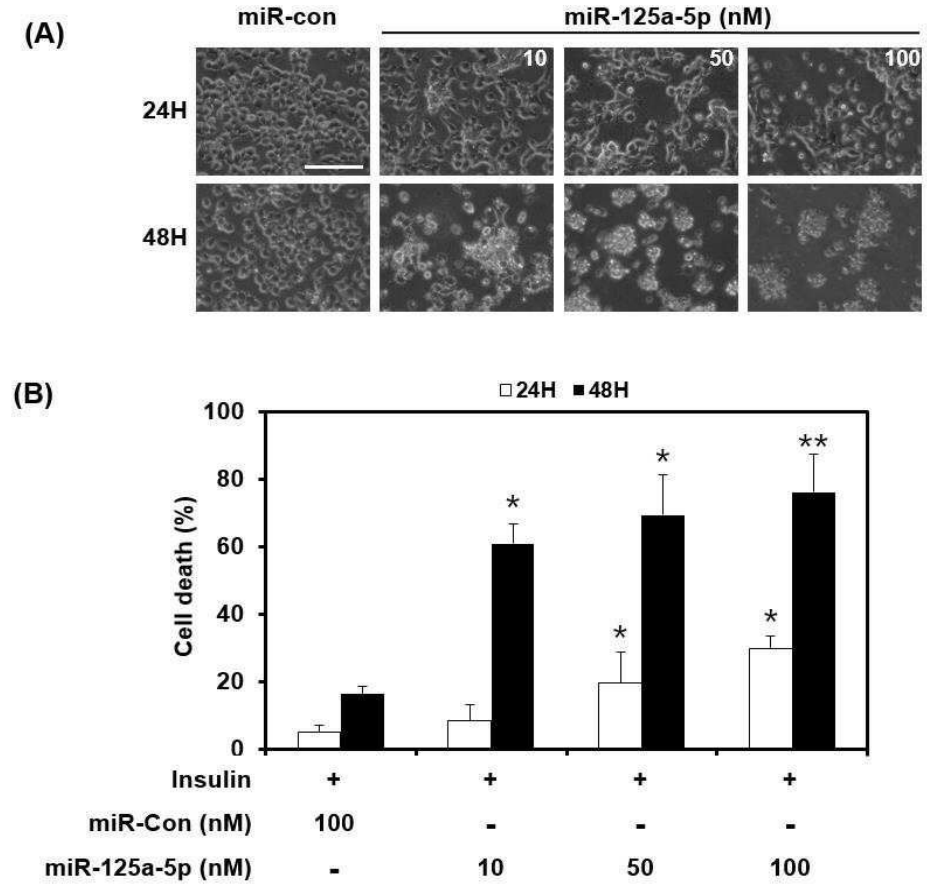
rno-125a Pre-mature seq.

```
u      c u ug  uc  ug   c     ua          -----  a
 gccgg c c  gg  cc  aga ccuu  accuguga     gg c
 ||||| | |  ||  ||  ||| ||||  ||||||||     ||
 cgguc g g  cc  gg  ucu ggag  uggacacu     cc g
-      c c gu  ga  gu   u     --          ggga  u
```

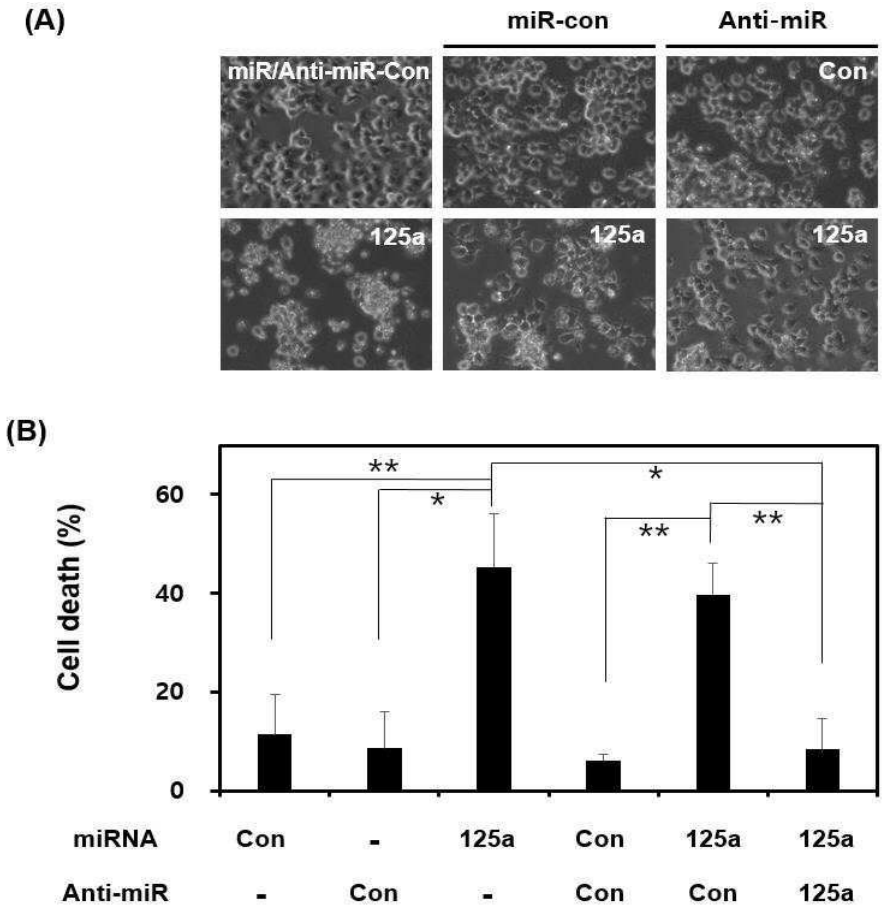
rno-125a Mature seq.

15-ucccugagacccuuuaaccuguga-38

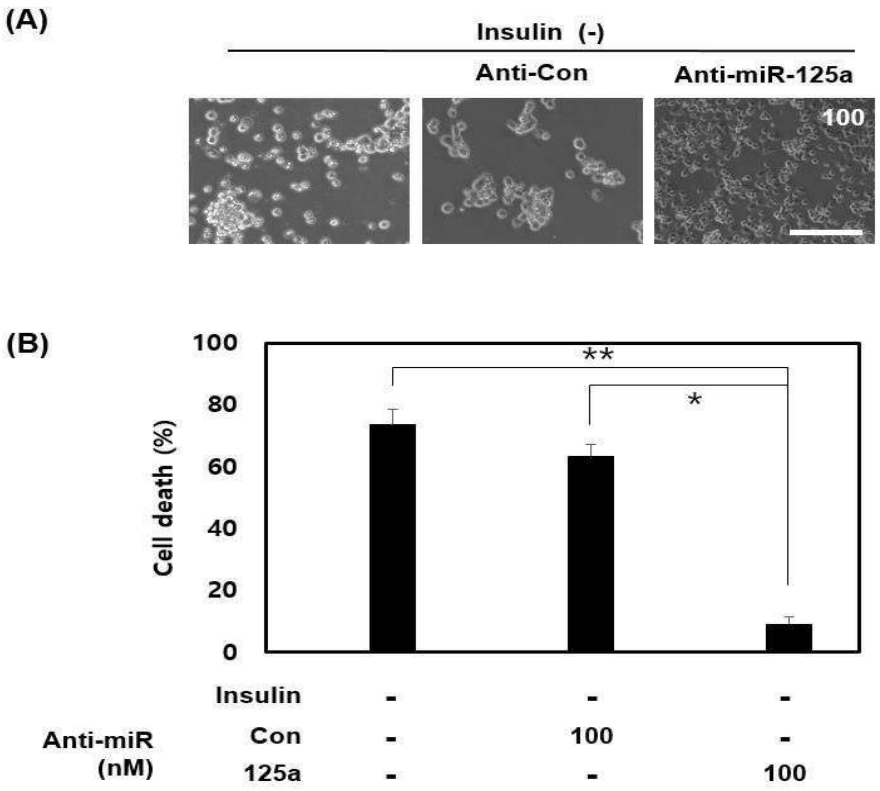
도면2


(A)
miR-con
miR-125a-5p (nM)
10
50
100
24H
48H
(B)
□24H ■48H
Cell death (%)
100
80
60
40
20
0
*
*
*
**
Insulin + + + +
miR-Con (nM) 100 - - -
miR-125a-5p (nM) - 10 50 100

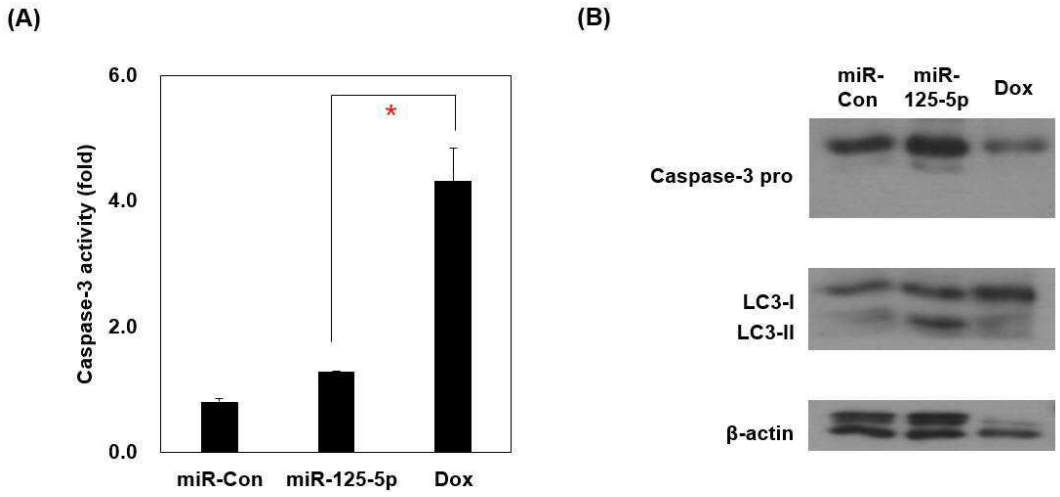
도면3


(A)
miR-con
Anti-miR
miR/Anti-miR-Con
Con
125a
125a
125a
(B)
Cell death (%)
60
40
20
0
**
*
*
**
**
miRNA
Con
-
125a
Con
125a
125a
Anti-miR
-
Con
-
Con
Con
125a

도면4



도면5



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-125a-5p inhibitor with inhibitory effect of cell death in hippocampal neural stem cells

<130> ADP-2017-0507

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> anti-miR-125a-5p

<400> 1

ucacagguua aagggucuca ggga 24

<210> 2

<211> 24

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-125a-5p

<400> 2

ucccugagac ccuuuaaccu guga 24