



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0036929
(43) 공개일자 2017년04월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/68 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/6896 (2013.01)
A01K 67/027 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0135502
(22) 출원일자 2015년09월24일
심사청구일자 2016년09월23일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
윤승용
서울 송파구 올림픽로43길 서울아산병원 울산의대
뇌과학교실
박지선
전라북도 남원시 용성로 207 102동 310호 (도통동, 부영1차아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

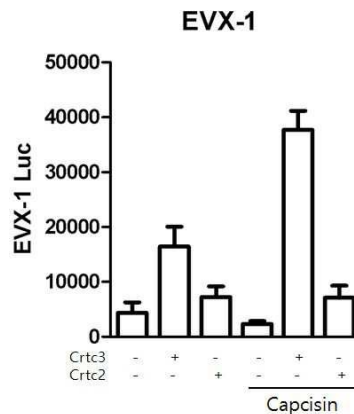
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 CRTC3 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 함유하는 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학조성물

(57) 요약

본 발명은 CRTC3 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 함유하는 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학조성물 및 이의 스크리닝 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 뇌신경질환인 알츠하이머 치매 환자의 뇌조직에서 CRTC3 발현 감소가 확인되었으며, CRTC3 결핍된 동물모델의 뇌조직에서 뇌신경질환에서 나타나는 반응성 별아교세포증이 확인됨에 따라, CRTC3을 뇌신경질환 진단용 마커조성물로 사용할 수 있으며, CRTC3 발현 촉진 또는 활성화제를 유효성분으로 함유하는 조성물을 뇌신경질환 치료용 약학조성물로 제공할 수 있으며, CRTC3 발현 촉진 또는 활성화 정도를 확인하여 뇌신경질환 치료용 약학조성물을 스크리닝하는 방법을 제공할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)

C12Q 1/6883 (2013.01)

A01K 2227/105 (2013.01)

A01K 2267/0312 (2013.01)

(72) 발명자

송영섭

경기도 용인시 수지구 성북2로 220 301동 1003호
(성북동, 벚들치마을성북힐스테이트3차)

김동호

서울특별시 서초구 바우피로 91 112동 101호 (양재동, 우성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2008-0062286

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 선도연구센터(ACE)육성사업 기초의약학분야(MRC)

연구과제명 세포기능장애연구센터

기 여 율 40/100

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2008.09.01 ~ 2017.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C1630

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 보건의료연구개발사업 중개연구자 양성/신경계통의 질환

연구과제명 타우 타깃 알츠하이머병 신약 후보물질 발굴

기 여 율 30/100

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.01 ~ 2016.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI13C1502

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발 : 질병중심 중개기반연구

연구과제명 대사질환 치료제 개발을 위한 Trib3의 당뇨병, 비만 발병 기전 연구

기 여 율 30/100

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2013.12.01 ~ 2016.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

CRTC3(cAMP-regulated transcriptional co-activators 3)을 포함하는 뇌신경질환 진단용 바이오마커 조성물.

청구항 2

CRTC3(cAMP-regulated transcriptional co-activators 3)을 검출하는 재제를 포함하는 뇌신경질환 진단용 키트.

청구항 3

CRTC3(cAMP-regulated transcriptional co-activators 3) 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 함유하는 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 CRTC3 발현 촉진제 또는 활성화제는 뇌조직에서 CRTC3발현 또는 활성을 증가시켜 별아교세포의 활성을 감소시키고 CREB 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 CRTC3 발현 촉진제 또는 활성화제는 화합물, 펩타이드, 앵타머 및 항체로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 뇌신경질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병, 니만픽병 및 뇌졸중으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학조성물.

청구항 7

CRTC3 결핍 동물모델 또는 세포에 시험물질을 처리하는 단계;

상기 시험물질이 처리된 CRTC3 결핍 동물모델 또는 세포에서 CRTC3 발현 또는 활성화 정도를 측정하는 단계; 및 대조군 시료와 비교하여 상기 CRTC3 발현 또는 활성화 정도가 증가된 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 뇌신경질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 CRTC3 발현 또는 활성화 정도는 CREB(cAMP response element binding protein) 목적 유전자인 EVX-1 발현 증가를 확인하는 것을 특징으로 하는 뇌신경질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 CRTC3 발현 또는 활성화 정도는 역전사 중합효소 연쇄반응((Reverse Transcription-Polymerase chain Reaction, RT-PCR), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, 웨스턴 블랏(Western Blotting) 및 유세포분석법(FACS)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것을 특징으로 하는 뇌신경질환 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 CRTC3 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 함유하는 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학조성물 및 이의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] cAMP 반응요소결합단백질(cAMP response element binding protein; 이하 “CREB”)은 특정 DNA 염기서열에 결합하여 여러 유전자들의 전사를 조절하는 인자로 활성화된 CREB는 CRE 영역에 결합하여 CBP(CREB 결합 단백질)를 불러들이고 이를 통하여 특정 유전자의 활성을 조절하여 세포증식, 분화 및 생존에 매우 중요한 세포 내 인자이다.

[0003] 이러한 CREB는 뇌에서 기억, 발생, 세포의 생존유지, 체내 시계 등 여러 가지 기능과 관련되어 있는데, CREB에 의해 조절되는 유전자는 4000여 개로 알려져있다. 하지만 뇌의 각 부위에서 어떻게 특정 유전자군만 읽어들여 부위 특이적 기능을 발현할 수 있는지에 대해서는 아직 해명되지 않았다.

[0004] 현재 STAT, TCF3, P53, SREBF와 같은 많은 CREB 결합 단백질이 보고되어 있으며, 상기 결합 단백질은 CREB와 상호작용을 통하여 다양한 유전자의 전사를 활성화시킴에 따라, 세포 증식 및 분화를 조절하여 생체 기능을 제어하고 있다. 그 중 cAMP 조절 전사 공동 활성화제(cAMP-regulated transcriptional co-activators)인 TORC1(CRTC1) 및 TORC2(CRTC2)는 CREB의 발현을 조절하는 CREB 결합 단백질로, 최근 보고에서는 CRTC2가 CREB와 상호작용을 통하여 간의 포도당 생성을 증가시키는데 필요한 유전자를 활성화시키는 역할을 하는 것으로 알려졌다(The coactivator CRTC2 links hepatic ER stress and fasting gluconeogenesis, 2009). 그러나 CRTC3와 CREB가 상호작용할 경우 뇌에서 어떠한 기능을 발현하는가에 대해서는 아직 보고된 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국등록특허 10-0679306호(2006.10.09 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 CRTC3을 유효성분으로 함유하는 뇌신경질환 진단용 마커조성물, CRTC3 발현 촉진 또는 활성화제를 유효성분으로 함유하는 뇌신경질환 치료용 약학조성물 및 뇌신경질환 치료용 약학조성물의 스크리닝 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 CRTC3(cAMP-regulated transcriptional co-activators 3)을 포함하는 뇌신경질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.

[0008] 본 발명은 CRTC3(cAMP-regulated transcriptional co-activators 3)을 검출하는 제제를 포함하는 뇌신경질환 진단용 키트를 제공한다.

[0009] 본 발명은 CRTC3(cAMP-regulated transcriptional co-activators 3) 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 함유하는 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공한다.

[0010] 본 발명은 CRTC3 결핍 동물모델에 시험물질을 처리하는 단계; 상기 시험물질이 처리된 CRTC3 결핍 동물모델에 CRTC3 발현 또는 활성화 정도를 측정하는 단계; 및 대조구 시료와 비교하여 상기 CRTC3 발현 또는 활성화 정도가 증가된 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 뇌신경질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따르면, 뇌신경질환인 알츠하이머 치매 환자의 뇌조직에서 CRTC3 발현 감소가 확인되었으며, CRTC3 결핍된 동물모델의 뇌조직에서 뇌신경질환에서 나타나는 반응성 별아교세포증이 확인됨에 따라, CRTC3을 뇌신경질환 진단용 마커조성물로 사용할 수 있으며, CRTC3 발현 촉진 또는 활성화제를 유효성분으로 함유하는 조성물을 뇌신경질환 치료용 약학조성물로 사용할 수 있으며, CRTC3 발현 촉진 또는 활성화 정도를 확인하여 뇌신경질환

치료용 약학조성물을 스크리닝하는 방법을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 알츠하이머 치매 환자 및 정상군의 뇌조직에서 CRTC3 발현 수준을 확인한 웨스턴 블롯 결과이다.
- 도 2는 CRTC3 결핍 생쥐 동물모델의 뇌조직에서 반응성 별아교세포의 활성화 수준을 확인한 GFAP 염색결과이다.
- 도 3은 CRTC2 및 CRTC3을 단독처리하거나, 캡사이신 존재하에서 CRTC2 및 CRTC3을 처리하고 CREB 목적 유전자인 EVX-1의 발현 수준을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명은 CRTC3(cAMP-regulated transcriptional co-activators 3)을 포함하는 뇌신경질환 진단용 바이오마커 조성물을 제공한다.
- [0014] 본 발명은 CRTC3(cAMP-regulated transcriptional co-activators 3)을 검출하는 제제를 포함하는 뇌신경질환 진단용 키트를 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 따르면, 알츠하이머 치매(AD) 환자 및 정상 노인군의 뇌시료와 APP/PS1 마우스로부터 얻은 전체 뇌 조직을 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하여 CRTC3의 발현 수준을 확인한 결과, 도 1과 같이 정상군과 비교하여 알츠하이머 치매 환자군에서 CRTC3의 발현 수준이 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다.
- [0016] 또한, CRTC3이 결핍된 생쥐 동물모델의 뇌 조직에서 CRTC3 결핍에 따른 뇌 신경 변화를 확인한 결과, 도 2와 같이 뇌신경질환의 특징적 병리소견인 별아교세포가 과도한 활성화가 나타나는 반응성 별아교세포증(reactive astrocytosis)을 확인할 수 있었다.
- [0017] 상기 결과들로부터 CRTC3이 별아교세포의 활성을 조절하는 역할을 할 수 있으며, CRTC3의 발현 감소가 알츠하이머와 같은 뇌신경질환의 병인으로 작용하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0018] 따라서, 본 발명은 CRTC3 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 함유하는 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학조성물을 제공할 수 있다.
- [0019] 상기 CRTC3 발현 촉진제 또는 활성화제는 뇌조직에서 CRTC3 발현 또는 활성을 증가시켜 별아교세포의 활성을 감소시키고 CREB 발현을 증가시킬 수 있다.
- [0020] 상기 CRTC3 발현 촉진제 또는 활성화제는 뇌조직에서 CRTC3 발현 또는 활성을 증가시키는 화합물, 펩타이드, 염타미 및 향체로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나일 수 있다.
- [0021] 상기 뇌신경질환은 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 루게릭병, 니만픽병 및 뇌졸중으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, CRTC3이 CREB 발현을 조절할 수 있는지 확인하기 위해, CRTC3 및 CRTC2를 처리하고 CREB의 타겟 유전자인 EVX-1의 발현 정도를 확인하였다. 그 결과, 도 3과 같이 CRTC2가 처리된 실험군보다 CRTC3이 처리된 실험군에서 높은 EVX-1 발현 수준을 확인할 수 있었다.
- [0023] 상기 결과로부터 CRTC3의 활성이 증가할수록 CREB 발현 수준이 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0024] 상기 CRTC3 발현 촉진제 또는 활성화제는 약학조성물 총 100 중량부에 대하여 0.01 내지 10 중량부로 함유될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 CRTC3 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 함유하는 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학조성물은 통상적인 방법에 따라 주사제, 과립제, 산제, 정제, 환제, 캡슐제, 좌제, 겔, 현탁제, 유제, 점적제 또는 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 제형을 사용할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 다른 구체예에서, CRTC3 발현 촉진제 또는 활성화제를 유효성분으로 함유하는 뇌신경질환 예방 또는 치료용 약학조성물은 약학조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 붕해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0027] 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로

즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0028] 본 발명의 일실시예에 따르면 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다.

[0029] 본 발명에 따른 약학조성물의 바람직한 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면 이에 제한되는 것은 아니지만 1일 투여량이 0.01 내지 200 mg/kg, 구체적으로는 0.1 내지 200 mg/kg, 보다 구체적으로는 0.1 내지 100 mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 '대상체'는 인간을 포함하는 포유동물일 수 있으나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명은 CRTC3 결핍 동물모델 또는 세포에 시험물질을 처리하는 단계; 상기 시험물질이 처리된 CRTC3 결핍 동물모델 또는 세포에 CRTC3 발현 또는 활성화 정도를 측정하는 단계; 및 대조군 시료와 비교하여 상기 CRTC3 발현 또는 활성화 정도가 증가된 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 뇌신경질환 치료제 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.

[0032] 상기 CRTC3 발현 또는 활성화 정도는 CREB 목적 유전자인 EVX-1 발현 증가를 확인할 수 있다.

[0033] 상기 CRTC3 발현 또는 활성화 정도는 역전사 중합효소 연쇄반응((Reverse Transcription-Polymerase chain Reaction, RT-PCR), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, 웨스턴 블랏(Western Blotting) 및 유세포분석법(FACS)으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정될 수 있다.

[0034] 본 발명의 다른 일실시예에 따르면, 알츠하이머 치료 효과를 나타내는 것으로 보고된 캡사이신이 CRTC3이 활성을 향상시킬 수 있는지 확인한 결과, 도 3과 같이 캡사이신과 CRTC3을 293T 세포에 처리하고 CREB 목적 유전자인 EVX-1 발현을 확인한 결과, 도 3과 같이 캡사이신과 CRTC3이 함께 처리된 실험군에서는 EVX-1 발현량이 CRTC3 단독 처리된 실험군보다 매우 높은 수준으로 확인되었다.

[0035] 상기 결과로부터 캡사이신은 CRTC3을 활성화시키는 물질임이 확인되었으며, CRTC3을 활성화시켜 알츠하이머 치료 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

[0037] 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.

[0039] <실시예 1> 알츠하이머 치매 환자에서 CRTC3의 발현 수준 확인

[0040] 알츠하이머 치매(AD) 환자 및 정상 노인군의 뇌시료에서 CRTC3의 발현 수준을 확인하였다.

[0041] 표 1과 같이 8명의 AD 환자로부터 얻은 안쪽 측두부의 뇌회(medial temporal gyri)와 나이 및 성별이 맞는 7개의 대조군을 네덜란드 브레인 뱅크(Netherlands Brain Bank)로부터 얻었다.

[0042] AD의 병리학적 병기(Pathological staging)는 Braak staging system(Braak & Braak 1991)을 기반으로 하였다.

[0043] 또한, 같은 연령(12 달)의 대조군 마우스와 APP/PS1 마우스로부터 얻은 전체 뇌 조직을 이용하여 웨스턴 블롯을

수행하여 CRTC3의 발현 수준을 확인하였다.

- [0044] 단백질 추출 용액(protein extraction solution, Pro-Prep, Intron)을 이용하여 마우스 또는 인간 뇌 조직 용해물을 준비하였다.
- [0045] SDS-PAGE를 이용하여 단백질을 분리하고 폴리비닐리덴디플루오리드 멤브레인(PVDF membrane, Bio-Rad)으로 옮긴 후, 5% 탈지유(skim milk)가 포함된 TTBS(tween 20-Tris-Buffered Saline) 완충액으로 차단하였다.
- [0046] 차단된 멤브레인은 CRTC3 (1:1000, Cell Signaling) 및 β -액틴(β -actin, 1:1000, Sigma)의 항체와 함께 4℃에서 16시간 배양하였다.
- [0047] 그 후 멤브레인을 TTBS 완충액으로 세척하고, 23℃에서 1시간 동안 이차 항체와 함께 배양하고 강화된 화학발광 시약(enhanced chemiluminescence reagents, Thermo)으로 블롯을 가시화하였다.
- [0048] 그 결과, 도 1과 같이 정상군과 비교하여 알츠하이머 치매 환자군에서 CRTC3의 발현 수준이 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다.
- [0049] 상기 결과로부터 CRTC3이 뇌신경을 보호할 수 있는 물질로 제안될 수 있다.

표 1

진단	성별	연령	Braak	아밀로이드	PMD	pH	무게
알츠하이머(AD)	남	85	5	C	07:10	6.13	1020
알츠하이머(AD)	남	65	6	C	08:50	6.88	1057
알츠하이머(AD)	남	65	5	C	05:50	6.36	1355
알츠하이머(AD)	남	65	5	C	07:20	6.47	1173
알츠하이머(AD)	남	87	5	C	06:10	6.14	1047
알츠하이머(AD)	남	67	5	C	04:10	6.40	1252
알츠하이머(AD)	남	70	6	C	04:50	6.95	1040
알츠하이머(AD)	남	82	5	C	05:15	6.34	1182
대조군	남	73	0	O	24:45	-	1267
대조군	남	71	1	O	07:40	6.20	1150
대조군	남	87	1	A	10:20	5.32	1256
대조군	남	80	0	O	07:15	6.80	1331
대조군	남	84	1	A	05:35	6.98	1337
대조군	남	82	1	O	05:10	6.75	1087
대조군	남	78	1	O	<17:40	6.52	1125

[0051] *PMD(postmortem delay): 후 검시 지연

[0053] <실시예 2> CRTC3 결핍에 따른 뇌 조직 변화 확인

[0054] CRTC3이 결핍된 생쥐 동물모델의 뇌 조직을 GFAP로 염색하고 뇌신경질환의 특징적 병리소견인 반응성 별아교세포증(reactive astrogliosis)을 확인하였다.

[0055] 1. CRTC3이 결핍된 생쥐 동물모델 제작

[0056] CREB와의 결합에 중요한 역할을 하는 CBD를 코딩하는 Crtc3의 N 말단 도메인(Exon1)에 neomycin cassette를 넣고 Crtc3 exon1의 양쪽 유전체(genomic) DNA를 arm으로 하는 구조를 ES 세포에 전기천공법(electroporation)으로 도입시켜, neomycin selection을 거친 후, 살아남은 세포를 유전체 DNA PCR과 서던 블롯(southern blot)으로 확인하고, 타겟팅된 세포를 찾은 후 임신한 생쥐에 주입하여 키메라(Chimera) 생쥐를 구축하였다.

[0057] 교배를 통하여 타겟팅 벡터가 생식세포에 들어간 생쥐를 찾아 이형접합성 생쥐를 구축하였다.

[0058] 그 후, 이형접합성 생쥐끼리 교배하여 동형접합체 CRTC3 KO 생쥐를 구축하였다(Nature. 2010 Dec 16;468(7326):933-9. doi: 10.1038/nature09564. CRTC3 links catecholamine signalling to energy balance).

[0059] 2. 면역조직화학 염색을 통한 별아교세포 활성 정도 확인

[0060] CRTC3 knockout과 wild-type 쥐의 뇌를 적출하여 4% 파라포름알데하이드(in 0.1M PB pH7.4)로 36시간 고정하였다.

흐르는 물로 충분히 고정액을 씻어 낸 후 70, 80, 90 및 100% 에탄올로 탈수시키고 100% 자일렌에 2회 담궈 투명화시켰다.

[0061] 그 후 60℃로 녹인 파라핀에 담궈 포매시켰다.

[0062] 상기 파라핀에 포매된 조직을 4μm 두께로 박절하고 코팅 슬라이드에 부착시켰다. 조직을 100% 자일렌으로 탈 파라핀 시키고 다시 100, 90, 80 및 70% 에탄올 순으로 함수시켰다. 함수 후 증류수로 세척하고 2% 정상 말 혈청, 2% 소혈청알부민(BSA) 및 0.1% Triton X-100이 포함된 PBS 완충액을 조직에 30분간 처리하여 비특이 반응을 제거하고 항체가 세포막을 잘 통과할 수 있도록 하였다.

[0063] 그 후 2% 정상 말혈청 및 2% 소혈청알부민(BSA)을 포함한 PBS 완충액에 GFAP(1:300, Sigma) 및 CRT3(1:300, Abcam) 일차 항체를 적당한 농도로 희석하여 세포에 처리하고 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다.

[0064] 그 다음 PBS로 5분씩 3회 수세하고, Cy3(빨강) 또는 FITC(녹색)가 붙은 이차 항체 용액을 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후, PBS로 5분씩 3회 수세하고 커버글라스를 부착하여 확인하였다.

[0065] 그 결과, 도 2와 같이 정상 생쥐의 뇌 조직과 비교하여 CRT3이 결핍된 생쥐 동물모델의 뇌 조직에서 별아교세포가 과도한 활성화를 나타내었다.

[0066] 상기 결과로부터 CRT3이 별아교세포의 활성을 조절하는 역할을 할 수 있으며, CRT3의 발현 감소가 알츠하이머와 같은 뇌신경질환의 병인으로 작용할 수 있음을 확인하였다.

[0068] <실시예 3> CRT3에 의한 CREB 발현 증가 확인

[0069] CRT3의 CREB 발현 조절 효과를 확인하기 위해, CRT3 및 CRT2에 따른 CREB의 타겟 유전자인 EVX-1의 발현 정도를 확인하였다.

[0070] 또한, 알츠하이머 치료 효과가 확인된 캡사이신(Capsaicin)을 함께 처리하여 CRT3의 활성 증가효과를 확인하였다.

[0071] CREB 타겟 유전자인 EVX-1의 프로모터에 fly luciferase를 연결시켜 EVX-1 프로모터 활성에 따라 루시페라아제(luciferase)의 발현이 조절되는 construct를 293T 세포(ATCC)에 발현시켰다.

[0072] CRT3과의 연관성을 확인하기 위해, CRT3을 함께 발현시킨 것과 발현시키지 않은 세포에 포스콜린(forskolin)을 처리하여 루시페라아제 발현을 비교하였으며, CRT2, CRT3을 각각 25ng 씩 형질주입하고, 캡사이신(1μM)을 포스콜린 처리 1시간 전에 전처리하여 CRT2, CRT3 및 캡사이신을 처리하지 않은 것과 효과를 비교하였다.

[0073] 형질주입(transfection)과 세포 수의 표준화를 위하여 β-액틴에 의하여 발현이 조절되는 β-갈락토시다아제(galactosidase) construct를 동시에 발현시켜 표준화하였다.

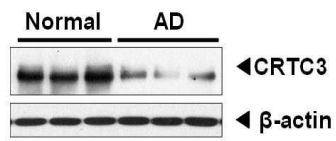
[0074] 그 결과, 도 3과 같이 CRT2가 처리된 실험군보다 CRT3이 처리된 실험군에서 높은 EVX-1 발현 수준을 확인할 수 있었으며, 캡사이신과 CRT3이 함께 처리된 실험군에서는 EVX-1 발현량이 CRT3 단독 처리된 실험군보다 매우 높은 수준으로 확인되었다.

[0075] 상기 결과로부터 CRT3의 활성이 증가할수록 CREB 발현 수준이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 캡사이신은 CRT3을 활성화시켜 알츠하이머를 치료에 효과가 있음을 확인하였다.

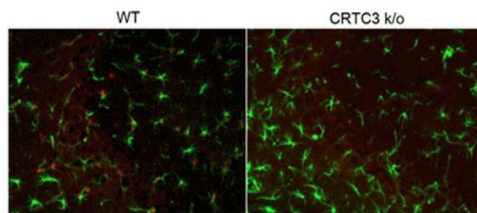
[0077] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

도면1



도면2



도면3

