(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0014449
(43) 공개일자 2024년02월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/6883 (2018.01) *A01K 67/027* (2024.01)
A23L 33/18 (2016.01) *G01N 33/50* (2017.01)
G01N 33/68 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12Q 1/6883 (2022.01)
A01K 67/0276 (2024.01)
(21) 출원번호 10-2023-0095359
(22) 출원일자 2023년07월21일
심사청구일자 2023년07월21일
(30) 우선권주장
1020220091284 2022년07월22일 대한민국(KR)

(71) 출원인
재단법인대구경북과학기술원
대구 달성군 현풍읍 테크노중앙대로 333
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
허향숙
대구광역시 동구 이노밸리로29길 56 (각산동, 대구혁신도시서한 이다음)
김철희
대전광역시 유성구 어은로 57 (어은동, 한빛아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

전체 청구항 수 : 총 19 항

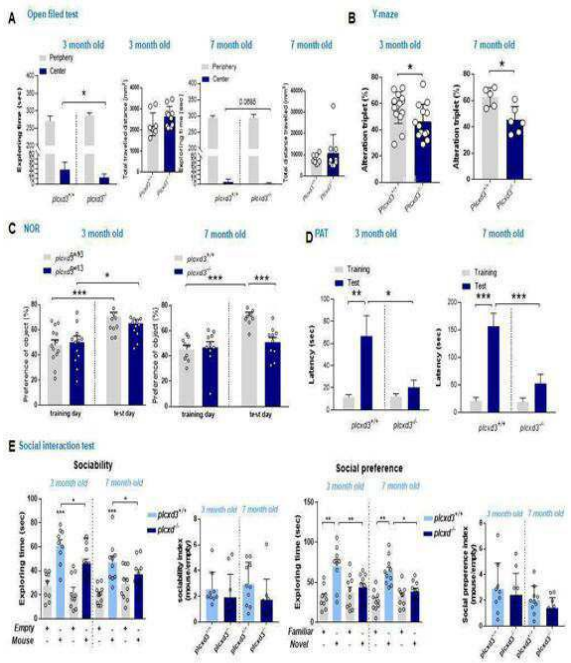
(54) 발명의 명칭 **기억, 인지 또는 학습장애의 치료 타겟으로서의 ＰＬＣＸＤ３용도**

(57) 요 약

본 발명은 기억, 인지 또는 학습장애의 치료 타겟으로서의 PLCXD3 용도에 관한 것으로, 구체적으로 본 발명은 (a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 PLCXD3의 발현수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 PLCXD3 발현수준을 정상 대조군의 발현수준과 비교하여 정상 대조군의 PLCXD3 발현수준 보다 낮은 경우, 기억, 인지 또

(뒷면에 계속)

대 표 도 - 도5



는 학습 장애인 것으로 판단하는 단계를 포함하는 기억, 인지 또는 학습장애 진단에 필요한 정보제공방법에 관한 것이고, 또한 본 발명은 Plcxd3 유전자가 결여(knock out)된 기억, 인지 또는 학습장애를 갖는 동물모델, 이의 제조방법 및 상기 Plcxd3 유전자가 결여된 동물모델을 이용한 기억, 인지 또는 학습장애 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이며, 나아가 PLCXD3, 이의 발현 촉진제 또는 이의 활성화제를 유효성분으로 포함하는 기억, 인지 또는 학습장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다. 또한 본원발명은 알츠하이머병 동물모델에서 PLCXD3 발현이 저해된 경우 working memory의 감소, 아밀로이드 플라크 및 뇌염증의 증가를 확인하였고, 이를 통해 PLCXD3가 알츠하이머병의 발병에 중요하게 작용하는 인자임을 규명함과 동시에 PLCXD3 발현 촉진제 또는 이의 활성화제가 알츠하이머병을 예방 또는 치료할 수 있음을 규명한 점에 특징이 있다.

(52) CPC특허분류
A23L 33/18 (2016.08)
G01N 33/5082 (2013.01)
G01N 33/6896 (2013.01)
A01K 2217/075 (2013.01)
A01K 2267/0356 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/322 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)
C12Q 2600/136 (2013.01)

(72) 발명자
이현주
대구광역시 달성군 화원읍 명곡로 11 (명곡미래빌 1단지)
김지은
대구광역시 동구 경안로 790-72 (동호동)
황혜은
대전광역시 유성구 유성대로877번길 33-19 (죽동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 230203
과제번호 23-BR-02-03
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국뇌연구원
연구사업명 기관고유사업
연구과제명 퇴행성뇌질환 관련 신규 분자타겟 발굴 및 치료 후보물질 도출
기 여 율 1/4
과제수행기관명 한국뇌연구원
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 230307
과제번호 23-BR-03-07
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국뇌연구원
연구사업명 기관고유사업
연구과제명 알츠하이머 특이적 Plc-xd family의 알츠하이머 신규분자타겟 기전 규명 및 치료제 개발
기 여 율 1/4
과제수행기관명 한국뇌연구원
연구기간 2023.03.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 230212
과제번호 23-BR-02-12
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국뇌연구원
연구사업명 기관고유사업
연구과제명 IP-R&D 연계 퇴행성뇌질환 치료제 개발
기 여 율 1/4
과제수행기관명 한국뇌연구원
연구기간 2023.03.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711169710
과제번호 2020R1A5A8017671
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업-선도연구센터-지역혁신성장분야
연구과제명 마이크로바이옴 - 뇌신경질환 융합연구센터
기 여 율 1/4
과제수행기관명 충남대학교
연구기간 2020.07.01 ~ 2027.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 PLCXD3의 발현수준을 측정하는 단계; 및

(b) 상기 (a) 단계의 PLCXD3 발현수준을 정상 대조군의 발현수준과 비교하여 정상 대조군의 PLCXD3 발현수준 보다 낮은 경우, 기억, 인지 또는 학습장애인 것으로 판단하는 단계;를 포함하는,

기억, 인지 또는 학습장애의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 발현수준은 Plcxd3 유전자의 mRNA 수준 또는 PLCXD3 단백질 발현수준인 것을 특징으로 하는, 기억, 인지 또는 학습장애의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 Plcxd3 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것이고, 상기 PLCXD3 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 기억, 인지 또는 학습장애의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 기억, 인지 또는 학습장애는 노화, 알츠하이머병, 정신분열증, 파킨슨병, 헌팅톤병, 피크병, 크로이츠펠트-야콥병, 우울증, 양극성장애, 두부 외상, 뇌졸중, CNS 저산소증, 뇌 허혈증, 뇌염, 건망증, 외상성 뇌손상, 저혈당증, 베르니케 코르사코프 신드롬, 약물중독, 뇌전증, 간질, 해마경화증, 두통, 뇌 노쇠증, 치매, 전측두엽 변성, 종양, 정상뇌압수두증, HIV, 뇌혈관성질환, 뇌신경질환, 심혈관계 질환, 기억상실, 방사능 노출, 대사성 질환, 갑상선 기능 저하증, 경도인지장애, 인지 결핍 또는 주의력 결핍에 의한 기억, 인지 또는 학습장애인 것을 특징으로 하는, 기억, 인지 또는 학습장애의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법.

청구항 5

Plcxd3 유전자가 결여(knock out)된 기억, 인지 또는 학습장애를 갖는 동물모델.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 Plcxd3 유전자의 결여는 CRISPR/Cas9 시스템으로 유도되는 것을 특징으로 하는, 기억, 인지 또는 학습장애를 갖는 동물모델.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 Plcxd3 유전자의 TCAACGAG 서열을 표적하여 Plcxd3 유전자의 결여를 유도하는 것을 특징으로 하는, 기억, 인지 또는 학습장애를 갖는 동물모델.

청구항 8

Plcxd3 유전자의 결여(knock out)를 유도하는 단계를 포함하는, 기억, 인지 또는 학습장애를 갖는 동물모델의 제조방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 Plcxd3 유전자의 결여는 Plcxd3 유전자의 TCAACGAG 서열을 표적하여 CRISPR/Cas9 시스템으로 유도하는 것을 특징으로 하는, 기억, 인지 또는 학습장애를 갖는 동물모델의 제조방법.

청구항 10

(a) 제5항의 동물모델에 후보 약물을 처리하는 단계; 및

(b) 상기 (a)에서 후보 약물이 처리된 동물모델을 무처리 대조군과 비교하여 기억, 인지 또는 학습장애의 개선 여부를 확인하는 단계를 포함하는,

기억, 인지 또는 학습장애의 치료제를 스크리닝하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

기억, 인지 또는 학습장애의 개선 여부를 확인하는 것은 신규 탱크 테스트(Novel tank test), 경고 물질 테스트(Alarm substance test) 오픈 필드 테스트(Open filed test (OFT)), Y-미로 검사(Y-maze), 새로운 물체 인식 테스트(NORT), 수동 회피 테스트(PAT) 또는 사회적 상호작용 시험(SAT)으로 분석하는 것을 특징으로 하는, 기억, 인지 또는 학습장애의 치료제를 스크리닝하는 방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 후보 약물이 처리된 동물모델에서 무처리 대조군에 비해,

피질 및 해마의 수상돌기가시(dendritic spine) 수의 증가;

PLC 서브패밀리인 β1 및 β2의 발현증가;

IP3의 생성 증가;

학습 또는 기억 관련 인자인 nrsn1, glun2b 및 creb의 발현증가; 또는

PLC 패밀리의 상위 표적인자인 gng2, gpr183 및 ephb2의 발현증가를 나타내는 경우, 상기 후보 약물을 기억, 인지 또는 학습장애의 개선, 예방 또는 치료할 수 있는 치료제로 판단하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, 기억, 인지 또는 학습장애의 치료제를 스크리닝하는 방법.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 기억, 인지 또는 학습장애는 노화, 알츠하이머병, 정신분열증, 파킨슨병, 헌팅톤병, 피크병, 크로이츠펠트-야콥병, 우울증, 양극성장애, 두부 외상, 뇌졸중, CNS 저산소증, 뇌 허혈증, 뇌염, 건망증, 외상성 뇌손상, 저혈당증, 베르니케 코르사코프 신드롬, 약물중독, 뇌전증, 간질, 해마경화증, 두통, 뇌 노쇠증, 치매, 전측두엽 변성, 종양, 정상뇌압수두증, HIV, 뇌혈관성질환, 뇌신경질환, 심혈관계 질환, 기억상실, 방사능 노출, 대사성 질환, 갑상선 기능 저하증, 경도인지장애, 인지 결핍 또는 주의력 결핍에 의한 기억, 인지 또는 학습장애인 것을 특징으로 하는, 기억, 인지 또는 학습장애의 치료제를 스크리닝하는 방법.

청구항 14

PLCXD3, 이의 발현 촉진제 또는 이의 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 기억, 인지 또는 학습장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 15

제14항에 있어서,

상기 Plcxd3 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것이고, 상기 PLCXD3 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 기억, 인지 또는 학습장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 16

제14항에 있어서,

상기 기억, 인지 또는 학습장애는 노화, 알츠하이머병, 정신분열증, 파킨슨병, 헌팅톤병, 피크병, 크로이츠펠트-야콥병, 우울증, 양극성장애, 두부 외상, 뇌졸중, CNS 저산소증, 뇌 허혈증, 뇌염, 건망증, 외상성 뇌손상, 저혈당증, 베르니케 코르사코프 신드롬, 약물중독, 뇌전증, 간질, 해마경화증, 두통, 뇌 노쇠증, 치매, 전측두엽 변성, 종양, 정상뇌압수두증, HIV, 뇌혈관성질환, 뇌신경질환, 심혈관계 질환, 기억상실, 방사능 노출, 대사성 질환, 갑상선 기능 저하증, 경도인지장애, 인지 결핍 또는 주의력 결핍에 의한 기억, 인지 또는 학습장애인 것을 특징으로 하는, 기억, 인지 또는 학습장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 17

PLCXD3, 이의 발현 촉진제 또는 이의 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 기억, 인지 또는 학습장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 18

PLCXD3, 이의 발현 촉진제 또는 이의 활성화제를 유효성분으로 포함하고, 미세아교세포(microglia) 또는 성상세포(astrocyte)의 활성 억제; 및 아밀로이드 플라크 억제활성을 갖는 것을 특징으로 하는,

신경염증, 타우 관련 질병 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 19

PLCXD3, 이의 발현 촉진제 또는 이의 활성화제를 유효성분으로 포함하고, 미세아교세포(microglia) 또는 성상세포(astrocyte)의 활성 억제; 및 아밀로이드 플라크 억제활성을 갖는 것을 특징으로 하는,

신경염증, 타우 관련 질병 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 기억, 인지 또는 학습장애의 치료 타겟으로서의 PLCXD3 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 전 세계가 빠른 속도로 고령화 사회로 진입하고 있으며, 이에 따라 인간은 질병없이 건강하게 장수할 수 있는 높은 삶의 질을 추구하고 있다. 과학의 발달로 인한 수명의 연장으로 노인 인구가 증가하면서, 뇌 기능 저하에 따른 퇴행성 뇌질환의 발병율이 급증하고 있다.

[0003] 뇌가 가지는 기능은 여러 가지가 있지만, 기억, 인지 및 학습 기능이 주요한 기능 중 하나이며, 인지 능력, 기억 능력 및 학습 능력이 없는 경우, 일상생활을 수행하기 힘들고 생존에도 문제가 된다.

[0004] 한편, 양극성 장애(Bipolar disorder)는 메커니즘이 알려지지 않은 가장 흔한 정신장애 중 하나이다. 양극성 장애는 평생 유병률이 2~5%에 달하며, 흔히 사춘기 후반이나 성인기 초기에 발병해 일생에 걸쳐 영향을 미치는 주요정신질환이다. 기분의 상승과 하강을 반복적으로 보이는 대표적 기분장애로 조증 삽화, 우울증 삽화, 혼재성 삽화 등의 반복적 재발과 만성화가 특징적이다.

[0005] 양극성 장애 환자의 가계연구에서 일반인구집단과 비교시 양극성 장애는 4배, 우울증은 2배의 유병률을 가진다고 알려져 있다. 양극성 장애의 쌍생아 연구에서는 일란성 쌍둥이에서 65-100% 진단이 일치하고 이란성 쌍둥이에서는 10-30%가 일치하였다. 여러 역학연구를 종합해 볼 때 양극성 장애는 60~80%의 유전율(heritability)을 가지는 유전율 높은 질환이라고 볼 수 있다.

[0006] 이러한 양극성 장애를 대상으로 많은 유전연구가 이뤄져 왔으나 다양한 염색체 부위에서 발생될 가능성이 있음이 보고되었고, 제시된 여러 후보 유전자 중에서상호 연관성이 불완전한 결과를 보였으며, 양극성 질환과 관련

된 감정 상태를 조절하는 유전자를 확인하기 위한 여러 연구에도 불구하고 아직까지 양극성 장애를 일으키는 원인 유전자 및 기본적인 메커니즘이 규명되지 못하고 있는 실정이다.

[0007] 한편, 포스포리파제 C (Phospholipase C, PLC)는 호르몬, 신경전달물질 및 신경세포성장인자와 같은 외부 자극에 반응하여 막 인지질인 포스파티딜이노시톨-4,5-비스포스페이트(Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, PIP2)를 이노시톨-1,4,5-트리포스페이트(inositol 1,4,5-trisphosphate, IP3) 및 디아실글리세롤(diacylglycerol, DAG)로 가수분해하는 효소이다. 또한 PLC 효소는 6가지 하위 유형(β, ɣ, δ, ε, ζ 및 η)이 존재하며 이들은 뇌, 심장, 비장, 흉선 및 조혈 세포를 포함하여 인간의 다른 조직에서 확인되었다. PLC 하위 유형의 대부분(PLC-β 및 PLC-ɣ 제외)은 외부 자극으로부터 세포막에 존재하는 상위 수용체(membrane-associated receptor)와 상호작용하여 IP3을 생산할 때 필수적인 역할을 하는 C2 도메인(Core-domain)을 가지고 있다. 또한 모든 PLC 하위 유형은 세포 대사를 조절하는 고유한 기능을 가진 효소의 위치가 조직마다 다른 패턴을 보이고 있다.

[0008] 최근 연구에 따르면, PI-PLC(phosphoinositide-specific phospholipase C)라고 불리는 PLC의 클래스가 밝혀졌다. PI-PLC는 IP3을 생산하는 기능을 가지는 X-도메인인 활성 도메인만(catalytic X-domain) 포함하는 PLC family의 하위그룹인 PLCXD 효소로 불린다. 또한 PLCXD의 3 가지 다른 이형체(PLCXD1, PLCXD2 및 PLCXD3)가 확인되었고, 각각의 효소는 조직 분포 및 세포 위치에 따라 고유한 기능을 가지고 있다고 생각되며, PLCXD 효소는 이노시톨 포스페이트의 증가에 영향을 미침으로써 활성 포스포디에스테라제로서 기능하는 것으로 밝혀졌다.

[0009] 이중에서 PLCXD3은 HeLa 세포의 세포질 및 핵주위 소포에 국한되어 존재하는 것으로 알려져 있을 뿐, 구체적으로 PLCXD3이 어떠한 기능을 하는지에 대한 연구는 거의 진행된 바가 없다.

[0010] 이에 본 발명자들은 뇌 기능에 있어서 PLCXD3의 역할을 규명하기 위해, CRISPER/Cas9 시스템 방법으로 Plcxd3 유전자가 결여된(Knock-out, KO) 동물모델을 제조하였고, Plcxd3 결여된 동물모델과 정상 동물모델과의 비교 분석을 통해 Plcxd3 유전자의 결핍 시, 운동능력, 공간기억능력, 인식능력, 학습 기억력 및 사회성 불균형을 초래하는 것을 확인할 수 있었다.

[0011] 또한 본 발명자들은 뇌 전체에서 Plcxd3 유전자가 결여된 동물모델에서 뇌부위별 Plc-xd3의 양극성장애 관련 행동에서의 역할을 규명하기 위해, 편도체와 해마-특이적 Plcxd3 유전자의 발현 저하 (knock-down, KD) 또는 과발현(over-expression, OE) 된 동물모델을 제조하였고, 제조된 각 동물모델을 분석한 결과, 편도체-특이적으로 Plcxd3 유전자의 발현 저하 (KD) 시, 정상 대조군과 비교하여 불안 반응이 감소하고, 단기 공간 기억 및 사회성 기억이 저하되었으며, 공포 형성이 정상적으로 이루어지지 않는 것을 확인하였으며, 편도체-특이적으로 Plcxd3 유전자 과발현(OE) 시, 정상 대조군과 비교하여 단기 공간 기억 및 사회성 기억이 저하되는 것을 확인하였다. 또한 해마 CA1-특이적으로 Plcxd3 유전자의 발현이 저하 (KD) 또는 과발현 (OE) 시, 정상 대조군과 비교하여 과잉행동(hyperactivity)이 증가하고, 단기 공간 기억 및 사회성 기억은 차이를 보이지 않음을 확인하였다.

[0012] 이와 더불어, 알츠하이머 동물 모델 (5xFAD)에 Plcxd3 유전자 결핍시 working memory 가 감소하고, 아밀로이드 플라크 및 뇌염증 병변이 유의미하게 증가함을 확인하였다.

[0013] 따라서, 본 발명자들은 기억력 장애, 인지기능 장애 또는 뇌발달 장애 및 퇴행성뇌질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 새로운 타겟으로 Plcxd3 유전자를 표적화할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0014] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허 10-2022-0024161

(특허문헌 0002) 2. 미국공개특허 US2020/0368239

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 그러므로 본 발명의 목적은, (a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 PLCXD3의 단발현수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 PLCXD3 발현수준을 정상 대조군의 발현수준과 비교하여 정상 대조군의 PLCXD3 발현수준

보다 낮은 경우, 기억, 인지 또는 학습장애인 것으로 판단하는 단계;를 포함하는, 기억, 인지 또는 학습장애 진단에 필요한 정보제공방법을 제공하는 것이다.

[0016] 또한 본 발명은 Plcxd3 유전자가 결여(knock out)된 기억, 인지 또는 학습장애를 갖는 동물모델 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0017] 또한 본 발명은 상기 Plcxd3 유전자가 결여(knock out)된 기억, 인지 또는 학습장애를 갖는 동물모델을 이용한 기억, 인지 또는 학습장애의 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공하는 것이다.

[0018] 또한 본 발명은 PLCXD3, 이의 발현 촉진제 또는 이의 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 기억, 인지 또는 학습장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0019] 또한 본 발명은 PLCXD3, 이의 발현 촉진제 또는 이의 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 기억, 인지 또는 학습장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0020] 또한 본 발명은 PLCXD3, 이의 발현 촉진제 또는 이의 활성화제를 유효성분으로 포함하고, 미세아교세포(microglia) 또는 성상세포(astrocyte)의 활성 억제; 및 아밀로이드 플라크 억제 활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 신경염증, 타우 관련 질병 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0021] 나아가 본 발명은 PLCXD3, 이의 발현 촉진제 또는 이의 활성화제를 유효성분으로 포함하고, 미세아교세포(microglia) 또는 성상세포(astrocyte)의 활성 억제; 및 아밀로이드 플라크 억제활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 신경염증, 타우 관련 질병 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0022] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 PLCXD3의 발현수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 PLCXD3 발현수준을 정상 대조군의 발현수준과 비교하여 정상 대조군의 PLCXD3 발현수준 보다 낮은 경우, 기억, 인지 또는 학습장애인 것으로 판단하는 단계;를 포함하는, 기억, 인지 또는 학습장애의 진단에 필요한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 발현수준은 Plcxd3 유전자의 mRNA 수준 또는 PLCXD3 단백질 발현수준일 수 있다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 Plcxd3 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것이고, 상기 PLCXD3 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0025] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 기억, 인지 또는 학습장애는 노화, 알츠하이머병, 정신분열증, 파킨슨병, 헌팅톤병, 피크병, 크로이츠펠트-야콥병, 우울증, 양극성장애, 두부 외상, 뇌졸중, CNS 저산소증, 뇌 허혈증, 뇌염, 건망증, 외상성 뇌손상, 저혈당증, 베르니케 코르사코프 신드롬, 약물중독, 뇌전증, 간질, 해마경화증, 두통, 뇌 노쇠증, 치매, 전측두엽 변성, 종양, 정상뇌압수두증, HIV, 뇌혈관성질환, 뇌신경질환, 심혈관계 질환, 기억상실, 방사능 노출, 대사성 질환, 갑상선 기능 저하증, 경도인지장애, 인지 결핍 또는 주의력 결핍에 의한 기억, 인지 또는 학습장애인 것일 수 있다.

[0026] 또한 본 발명은 Plcxd3 유전자가 결여(knock out)된 기억, 인지 또는 학습장애를 갖는 동물모델을 제공한다.

[0027] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 Plcxd3 유전자의 결여는 CRISPR/Cas9 시스템으로 유도되는 것일 수 있다.

[0028] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 Plcxd3 유전자의 TCAACGAG 서열을 표적하여 Plcxd3 유전자의 결여를 유도하는 것일 수 있다.

[0029] 또한 본 발명은 Plcxd3 유전자의 결여(knock out)를 유도하는 단계를 포함하는, 기억, 인지 또는 학습장애를 갖는 동물모델의 제조방법을 제공한다.

[0030] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 Plcxd3 유전자의 결여는 Plcxd3 유전자의 TCAACGAG 서열을 표적하여 CRISPR/Cas9 시스템으로 유도하는 것일 수 있다.

[0031] 또한 본 발명은, (a) 본 발명의 동물모델에 후보 약물을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 (a)에서 후보 약물이 처리된 동물모델을 무처리 대조군과 비교하여 기억, 인지 또는 학습장애의 개선 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 기억, 인지 또는 학습장애의 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0032] 본 발명의 일실시예에 있어서, 기억, 인지 또는 학습장애의 개선 여부를 확인하는 것은 신규 탱크 테스트(Novel

tank test), 경고 물질 테스트(Alarm substance test) 오픈 필드 테스트(Open filed test, OFT), Y-미로 검사(Y-maze), 새로운 물체 인식 테스트(Novel object recognition test, NORT), 수동 회피 테스트(Passive avoidance test, PAT) 또는 사회적 상호작용 시험(Social interaction test, SAT)으로 분석하는 것일 수 있다.

[0033] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 후보 약물이 처리된 동물모델에서 무처리 대조군에 비해, 피질 및 해마의 수상돌기가시(dendritic spine) 수의 증가; PLC 서브패밀리인 β1 및 β2의 발현증가; IP3의 생성 증가; 학습 또는 기억 관련 인자인 nrsn1, glun2b 및 creb의 발현증가; 또는 PLC 패밀리의 상위 표적인자인 gng2, gpr183 및 ephb2의 발현증가를 나타내는 경우, 상기 후보 약물을 기억, 인지 또는 학습장애의 개선, 예방 또는 치료할 수 있는 치료제로 판단하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0034] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 기억, 인지 또는 학습장애는 노화, 알츠하이머병, 정신분열증, 파킨슨병, 헌팅톤병, 피크병, 크로이츠펠트-야콥병, 우울증, 양극성장애, 두부 외상, 뇌졸중, CNS 저산소증, 뇌 허혈증, 뇌염, 건망증, 외상성 뇌손상, 저혈당증, 베르니케 코르사코프 신드롬, 약물중독, 뇌전증, 간질, 해마경화증, 두통, 뇌 노쇠증, 치매, 전측두엽 변성, 종양, 정상뇌압수두증, HIV, 뇌혈관성질환, 뇌신경질환, 심혈관계 질환, 기억상실, 방사능 노출, 대사성 질환, 갑상선 기능 저하증, 경도인지장애, 인지 결핍 또는 주의력 결핍에 의한 기억, 인지 또는 학습장애일 수 있다.

[0035] 또한 본 발명은 PLCXD3, 이의 발현 촉진제 또는 이의 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 기억, 인지 또는 학습장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0036] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 Plcxd3 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것이고, 상기 PLCXD3 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0037] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 기억, 인지 또는 학습장애는 노화, 알츠하이머병, 정신분열증, 파킨슨병, 헌팅톤병, 피크병, 크로이츠펠트-야콥병, 우울증, 양극성장애, 두부 외상, 뇌졸중, CNS 저산소증, 뇌 허혈증, 뇌염, 건망증, 외상성 뇌손상, 저혈당증, 베르니케 코르사코프 신드롬, 약물중독, 뇌전증, 간질, 해마경화증, 두통, 뇌 노쇠증, 치매, 전측두엽 변성, 종양, 정상뇌압수두증, HIV, 뇌혈관성질환, 뇌신경질환, 심혈관계 질환, 기억상실, 방사능 노출, 대사성 질환, 갑상선 기능 저하증, 경도인지장애, 인지 결핍 또는 주의력 결핍에 의한 기억, 인지 또는 학습장애일 수 있다.

[0038] 또한 본 발명은 PLCXD3, 이의 발현 촉진제 또는 이의 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 기억, 인지 또는 학습장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0039] 또한 본 발명은 PLCXD3, 이의 발현 촉진제 또는 이의 활성화제를 유효성분으로 포함하고, 미세아교세포(microglia) 또는 성상세포(astrocyte)의 활성 억제; 및 아밀로이드 플라크 억제활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 신경염증, 타우 관련 질병 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0040] 나아가 본 발명은 PLCXD3, 이의 발현 촉진제 또는 이의 활성화제를 유효성분으로 포함하고, 미세아교세포(microglia) 또는 성상세포(astrocyte)의 활성 억제; 및 아밀로이드 플라크 억제활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 신경염증, 타우 관련 질병 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0041] 본 발명에 따르면 PLCXD3 유전자 결핍 시, 운동, 공간, 인식, 학습, 기억 및 사회성 불균형을 초래하여 기억력 장애, 인지기능 장애 및 학습력 장애를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 발병 가능성을 확인함으로써, Plcxd3 유전자 및 PLCXD3 단백질을 이러한 뇌질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 새로운 타겟으로 사용할 수 있음을 규명하였고, 따라서 PLCXD3의 발현 또는 활성수준 측정을 통해 뇌질환의 발병여부를 진단할 수 있다. 또한 본 발명에서 제조된 Plcxd3 결여된 동물모델은 기억, 인지 또는 학습장애 및 이와 관련된 퇴행성뇌질환의 치료제의 스크리닝에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 본 발명의 일실시예에서 Plcxd3을 KO시킨 제브라피쉬를 일반 제브라피쉬와 비교한 것으로, (A)는 제브라피쉬 뇌에서 수정 후 48시간 후의 Plcxd3 유전자 발현패턴(상단) 및 형태학적 변화(하단)를 인시튜 혼성화(In situ-hybridization)로 분석한 결과를 나타낸 것이고, (B)는 Plcxd3 KO 제브라피쉬의 제조를 위해 엑손 2에서의 정상 Plcxd3 서열 및 + 뉴클레오타이드 29 bp가 삽입된 돌연변이체의 서열을 비교한 것이며, (C)는 5 hpf(수정 후 날짜)에서 정상 제브라피쉬와 비교한 Plcxd3 KO 제브라피쉬의 표현형을 관찰한 사진이며, (D) 및 (E)는 신규

한 탱크 시험 및 경고 물질 시험에서 이동한 거리를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 정상 마우스 뇌 부위에서 PLCXD3의 발현수준을 분석한 것으로, (A)는 3개월된 정상 마우스의 뇌에서 뇌 영역 특이적 PLCXD3 발현수준을 실시간 PCR로 분석한 결과이고, (B) 및 (C)는 3개월된 정상 마우스의 뇌에서 PLCXD3 단백질 발현수준을 면역조직화학법으로 확인한 결과를 나타낸 것이며, (D)는 3개월된 정상 마우스의 해마에서 PLCXD3 단백질의 발현수준을 관찰한 사진을 나타낸 것이다.

도 3은 PLCXD3이 정상 마우스의 흥분성 및 억제성 뉴런에서 주로 발현됨을 확인한 것을 나타낸 것으로, (A)는 정상 마우스에서 항- PLCXD3 및 항-GluA2 항체를 이용하여 면역형광염색을 수행한 결과를 나타낸 것이고, (B)~(G)는 (A)의 결과를 정량적으로 나타낸 것이고, (H)는 정상 마우스에서 항- PLCXD3 및 항-GAD67 항체를 함께 이용하여 면역형광염색을 수행한 결과를 나타낸 것이며, (I)~(N)은 (H)의 결과를 정량적으로 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명의 일실시예에서 Plcxd3 KO 마우스를 제조하는 과정을 나타낸 것으로, (A)는 Plcxd3 KO 마우스 생성을 위한 CRISPER/Cas9 시스템을 나타낸 것이고, (B)는 프레임 이동 돌연변이(8 bp, 위쪽, 파란색 삭제) 제조를 위한 Plcxd3의 타겟 서열 시퀀스를 나타낸 것이고, 정상 한배 새끼, Plcxd3이형 접합체 및 KO 마우스의 확인을 PCR을 통해 확인한 것으로 나타낸 것이며, (C)는 Plcxd3 KO 마우스의 교배 및 생성과정의 모식도를 나타낸 것이고, (D)는 Plcxd3의 프레임 이동 돌연변이(8 bp 삭제, 위쪽, 파란색) 타겟 서열 및 정상 한배 새끼와 Plcxd3 KO 마우스의 Plcxd3 유전자(노란색)를 검출하기 위한 프라이머 서열을 나타낸 것이며, (E)는 RT-PCR 또는 실시간 PCR을 사용하여 Plcxd3 KO 마우스를 확인하기 위한 과정의 모식도이고, (F)~(G)는 Plcxd3 KO 마우스 및 이의 한배 새끼들의 해마에서 Plcxd3의 발현여부를 RT-PCR 및 실시간 PCR로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 Plcxd3 KO 마우스에서의 행동, 공간, 인지, 학습, 기억 및 사회성 능력의 손상을 확인한 것으로, (A)오픈 필드 테스트, (B)는 Y-미로 테스트, (C)는 신규 물체 인지 테스트, (D)는 수동 회피 테스트, (E)는 사회적 관계성 테스트 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 Plcxd3 KO 마우스에서 피질 및 해마의 수상돌기가시 수의 감소를 확인한 것으로, (A)는 3개월된 Plcxd3 KO 마우스와 정상 한배 새끼의 피질 및 해마에서의 피질 정점 경사(AO) 및 기저 이동(BS) 영역에서 수상돌기가시 수를 골지염색으로 확인한 것이고, (B)~(C)는 (A)의 결과를 정량 그래프화 한 것이며, (D)는 7개월된 Plcxd3 KO 마우스와 정상 한배 새끼의 피질 및 해마에서의 피질 정점 경사(AO) 및 기저 이동(BS) 영역에서 수상돌기가시의 수를 골지염색으로 확인한 것이고, (E)~(F)는 (D)의 결과를 정량 그래프화 한 것이다.

도 7은 Plcxd3 KO에 의한 PLC 관련 분자들의 발현수준에 미치는 영향을 분석한 것으로, (A)는 3개월된 Plcxd3 KO 마우스와 정상 한배 새끼를 대상으로 해마에서의 IP3 농도를 ELISA를 사용하여 측정한 것이고, (B)는 PLC 이형체들의 발현수준을 실시간 PCR로 분석한 것이며, (C)~(D)는 학습 및 기억력 관련 인자인 nrsn1 및 glun2b의 발현수준을 실시간 PCR로 분석한 것이고, (E)는 7개월된 Plcxd3 KO 마우스 및 정상 한배 새끼에서 PLCXD3 관련 업스트림 수용체, gng2, gpr183 및 ephb2의 mRNA 수준을 실시간 PCR로 분석한 것이고, (F)는 3개월된 Plcxd3 KO 마우스 및 정상 한배 새끼의 해마에서 학습 및 기억력과 관련된 creb 및 nrsn1 유전자의 mRNA 수준을 실시간 PCR로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 정상동물(정상마우스)의 편도체-특이적 Plcxd3 유전자 발현 저하 (KD) 시, 불안/과잉 행동, 단기 공간 인지기능, 사회성, 공포 반응의 변화를 확인한 것으로, (A)는 십자미로 테스트, (B)는 Y-미로 테스트, (C)는 사회적 관계성 테스트, (D) 공포조건화 반응 테스트 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 정상동물의 편도체-특이적 Plcxd3 유전자 과발현 (OE) 시, 불안/과잉 행동, 단기 공간 인지기능, 사회성 변화를 확인 한 것으로, (A)는 십자미로 테스트, (B)는 Y-미로 테스트, (C)는 사회적 관계성 테스트 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 정상동물의 해마 CA1-특이적 Plcxd3 유전자 발현 저하 (KD) 시, 불안/과잉 행동, 단기 공간 인지기능, 사회성 변화를 확인 한 것으로, (A)는 십자미로 테스트, (B)는 Y-미로 테스트, (C)는 사회적 관계성 테스트 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 정상동물의 해마 CA1-특이적 Plcxd3 유전자 과발현 (OE) 시, 불안/과잉 행동, 단기 공간 인지기능, 사회성 변화를 확인 한 것으로, (A)는 십자미로 테스트, (B)는 Y-미로 테스트, (C)는 사회적 관계성 테스트 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 알츠하이머병 동물의 해마 CA1-특이적 Plcxd3 유전자 발현 저하 (KD) 시, (A) 해마 CA1-특이적 Plcxd3 또는 control AAV 바이러스가 잘 infection된 것을 확인하였고 (B) Passive avoidance 테스트 결과를 나타낸

것이다.

도 13은 알츠하이머병 동물의 해마 CA1-특이적 Plcxd3 유전자 발현 저하 (KD) 시, (A) PLCXD3 유전자 발현 (B) 아밀로이드 플라크 변화 (C) APP 발현 (D) BACE1 발현 (E) DYRK1A 발현 변화를 나타낸 것이다.

도 14는 알츠하이머병 동물의 해마 CA1-특이적 Plcxd3 유전자 발현 저하 (KD) 시, (A-B) 미세아교세포 활성 (C-D) 성상교세포 활성 변화를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 본 발명은 기억, 인지 또는 학습장애의 치료 타겟으로서의 PLCXD3(phospholipase C X-domain containing protein 3) 용도를 제공함에 특징이 있다.

[0044] 종래 PLCXD3과 관련하여 기억, 인지 또는 학습장애를 포함하는 뇌질환과의 관련성에 대한 연구가 전무가 실정이다.

[0045] 본 발명자들은 기억, 인지 또는 학습장애와 퇴행성뇌질환의 새로운 치료제를 발굴하기 위해 연구하던 중, Plcxd3 유전자가 결여된 동물모델을 제조하였고, Plcxd3 결여된 동물모델에서 정상 동물에 비해 과잉 행동 형태, 불안감 증진, 단기/장기 기억의 감소, 인지기능 감소, 학습장애 발생 및 사회적 행동이 손상되는 등, 기억장애, 인지장애 또는 학습장애가 유발되는 것을 확인할 수 있었다.

[0046] 이에 본 발명자들은 Plcxd3 유전자가 기억, 인지 또는 학습장애를 포함하는 뇌질환과 관련성이 있다는 것을 알 수 있었고, 하기 실시예의 실험을 통해 Plcxd3유전자가 결여된 제브라피쉬 및 마우스 모델에서 PLCXD3의 뇌기능에 미치는 역할을 규명하였다.

[0047] 본 발명의 일실시예에 따르면, Plcxd3 유전자가 결여된 제브라피쉬와 정상 제브라피쉬를 대상으로 새로운 탱크 테스트(Novel tank test) 및 경고 물질 테스트(Alarm substance test)를 수행한 결과, 정상 제브라피쉬에 비해 Plcxd3 결여된 제브라피쉬가 모든 테스트에서 "과잉 운동" 형태를 보이는 것으로 나타났고, 이러한 과잉 운동은 인간의 양극성 장애 증상에 해당된다고 볼 수 있다.

[0048] 본 발명의 또 다른 일실시예에서는 CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 Plcxd3 유전자가 결여된 마우스를 제조하였고, 다양한 뇌 기능 확인 실험을 수행하였다.

[0049] 그 결과, Plcxd3가 결여된 마우스의 경우, 오픈 필드 테스트에서 시험 공간의 중앙 구역에서 머무르는 시간이 정상마우스에 비해 짧은 것으로 관찰되어 불안감이 증가한 것을 확인할 수 있었고, Y-미로, NORT 및 PAT를 통해 Plcxd3 유전자가 결여된 마우스가 정상마우스에 비해 새로운 물체에 대한 인식 및 공간 인식 능력이 낮은 것으로 나타났고, 학습 능력도 낮은 것으로 나타났으며, 사회적 상호작용 행동도 손상된 모습을 관찰할 수 있었다.

[0050] 이러한 결과는 PLCXD3이 정서적 행동, 공간 작업, 인식 및 학습 기억과 사회적 행동 조절에 관여한다는 것을 의미한다.

[0051] 또한, 본 발명의 다른 일실시예에서는, Plcxd3 결여 마우스의 뇌 피질 및 해마에서의 수상돌기가시 수를 분석하였는데, Plcxd3 결여된 경우, 수상돌기가시가시의 수가 감소된 것으로 나타났다. 이러한 결과는 PLCXD3이 뇌의 기억 통합과 관련된 수상돌기가시의 수 형성에 작용한다는 것을 의미한다.

[0052] 뿐만 아니라, 본 발명자들은 학습, 인지 및 기억과 관련된 유전자들의 발현수준에도 PLCXD3이 영향을 미치는지를 분석하였는데, 그 결과, Plcxd3 결여 마우스에서 학습 및 기억력 관련 인자들인 세포질 소포 성분 nrsn1, NMDA 수용체 서브유닛 glun2b 및 creb의 mRNA 수준이 감소된 것으로 나타났고, PLC 패밀리의 상류 분자 표적인자들인 gng2, gpr183 및 ephb2의 발현 수준도 모두 유의하게 감소된 것을 확인할 수 있었다. 이와 더불어, 알츠하이머병 동물에 PLCXD3 발현을 저해했을 때 working memory 감소, 아밀로이드 플라크 및 뇌염증이 증가됨을 확인할 수 있었다.

[0053] 이를 통해 PLCXD3이 기억, 학습, 인지 및 사회적 행동 뿐만 아니라 알츠하이머병의 병변 등 뇌 기능에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었다.

[0054] 이상의 결과들을 토대로 본 발명자들은 뇌에서 PLCXD3의 발현이 감소 또는 억제될 경우, 기억, 인지 또는 학습장애를 포함하는 뇌질환이 유발될 수 있다는 것을 알 수 있었고, PLCXD3의 발현수준 또는 활성여부의 측정을 통해 기억, 인지 또는 학습장애를 포함하는 뇌질환의 발병 여부를 예측 또는 진단할 수 있음을 알 수 있었다.

[0055] 그러므로 본 발명은 Plcxd3 유전자가 결여(knock out)된 기억, 인지 또는 학습장애를 갖는 동물모델을 제공할

수 있다.

[0056] 상기 Plcxd3 유전자의 결여는 CRISPR/Cas9 시스템에 따른 방법으로 수행할 수 있고, 본 발명의 일실시예에서는 Plcxd3 유전자의 TCAACGAG 서열을 표적하여 CRISPR/Cas9 시스템에 의해 Plcxd3 유전자를 결여시켰다.

[0057] 또한 본 발명은 Plcxd3 유전자의 결여(knock out)를 유도하는 단계를 포함하는, 기억, 인지 또는 학습장애를 갖는 동물모델의 제조방법을 제공할 수 있으며, 구체적인 제조방법은 하기 실시예에 기재되어 있다.

[0058] 본 발명에서 Plcxd3 유전자가 결여(knock out)된 동물모델은 제브라피쉬 및 마우스를 이용하여 제조하였다.

[0059] 본 발명에서 상기 "결여(knock out)"는 타겟 유전자의 기능을 상실시키는 것을 의미하는 것으로, 유전공학적 방법을 이용하여 타겟 유전자를 파괴 또는 제거하여 유전자의 발현을 제거하는 것을 의미한다. 타겟 유전자의 결여를 유도하는 방법은 타겟 유전자의 일부 염기서열을 결손시키거나, 또는 다른 염기서열로 치환하거나 또는 다른 염기서열의 도입을 통해 타겟 유전자의 발현 및 기능을 상실시킬 수 있다.

[0060] 동물모델로 상기 마우스를 이용할 경우, 결여시키고자 하는 Plcxd3 유전자는 마우스 종에 존재하고 있는 Plcxd3 유전자일 수 있고, 본 발명의 일실시예에서는 서열번호 3의 염기서열로 이루어진 마우스의 Plcxd3 유전자 결여를 유도하였다. 또한 마우스 PLCXD3 단백질에 대한 아미노산 서열은 서열번호 4에 나타내었다.

[0061] 또한 본 발명은, (a) 개체로부터 분리된 생물학적 시료에서 PLCXD3의 발현수준을 측정하는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 PLCXD3 발현수준을 정상 대조군의 발현수준과 비교하여 정상 대조군의 PLCXD3 발현수준 보다 낮은 경우, 기억, 인지 또는 학습장애인 것으로 판단하는 단계를 포함하는, 기억, 인지 또는 학습장애의 진단에 필요한 정보제공방법을 제공할 수 있다.

[0062] 상기 PLCXD3의 발현수준은 Plcxd3 유전자의 mRNA 수준 또는 PLCXD3 단백질 발현수준일 수 있으며, 상기 PLCXD3 유전자는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것이고, 상기 PLCXD3 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0063] 상기 PLCXD3의 발현수준을 측정하는 방법은, Plcxd3 유전자 또는 PLCXD3 단백질에 특이적인 프라이머, 프로브 또는 항체를 이용하여, 역전사 중합효소 연쇄반응(Reverse Transcription-Polymerase chain Reaction, RT-PCR), 실시간 중합효소 연쇄반응(Real time PCR), 효소면역분석법(ELISA), 면역조직화학, 면역형광염색, 웨스턴 블럿(Western Blotting) 및 유세포분석법으로 이루어진 군 중에서 선택되는 방법을 통해 수행할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0064] 또한 본 발명은 본 발명에서 제조한 동물모델을 이용하여 기억, 인지 또는 학습장애의 치료제를 스크리닝하는 방법을 제공할 수 있는데, 상기 방법은 (a) Plcxd3 유전자가 결여(knock out)된 기억, 인지 또는 학습장애를 갖는 동물모델에 후보 약물을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 (a)에서 후보 약물이 처리된 동물모델을 무처리 대조군과 비교하여 기억, 인지 또는 학습장애의 개선 여부를 확인하는 단계를 포함한다.

[0065] 상기 기억, 인지 또는 학습장애의 개선 여부를 확인하는 방법은, 이에 제한되는 것은 아니며, 신규 탱크 테스트(Novel tank test), 경고 물질 테스트(Alarm substance test) 오픈 필드 테스트(Open filed test, OFT), Y-미로 검사(Y-maze), 새로운 물체 인식 테스트(NORT), 수동 회피 테스트(PAT) 또는 사회적 상호작용 시험(SAT)으로 수행할 수 있다.

[0066] 상기 방법에서, 후보 약물을 기억, 인지 또는 학습장애 치료제로 판단할 수 있는 기준은, 상기 기술된 다양한 실험 결과에서 기억, 인지 또는 학습력이 후보 약물을 처리하지 않은 대조군에 비해 개선 또는 증가된 경우, 상기 후보 약물을 치료제로 판단할 수 있다.

[0067] 또한, 상기 후보 약물이 처리된 동물모델에서 무처리 대조군에 비해, 피질 및 해마의 수상돌기가시(dendritic spine) 수의 증가; PLC 서브패밀리인 β1 및 β2의 발현증가; IP3의 생성 증가; 학습 또는 기억 관련 인자인 nrsn1, glun2b 및 creb의 발현증가; 또는 PLC 패밀리의 상위 표적인자인 gng2, gpr183 및 ephb2의 발현증가를 나타내는 경우, 상기 후보 약물을 기억, 인지 또는 학습장애의 개선, 예방 또는 치료할 수 있는 치료제로 판단할 수 있다.

[0068] 본 발명에서 기억, 인지 또는 학습장애는 PLCXD3의 결핍에 의해 유발되는 뇌질환을 모두 포함할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 노화, 알츠하이머병, 정신분열증, 파킨슨병, 헌팅톤병, 피크병, 크로이츠펠트-야콥병, 우울증, 양극성장애, 두부 외상, 뇌졸중, CNS 저산소증, 뇌 허혈증, 뇌염, 건망증, 외상성 뇌손상, 저혈당증, 베르니케 코르사코프 신드롬, 약물중독, 뇌전증, 간질, 해마경화증, 두통, 뇌 노쇠증, 치매, 전측두엽 변성, 종

양, 정상뇌압수두증, HIV, 뇌혈관성질환, 뇌신경질환, 심혈관계 질환, 기억상실, 방사능 노출, 대사성 질환, 갑상선 기능 저하증, 경도인지장애, 인지 결핍 또는 주의력 결핍에 의한 기억, 인지 또는 학습장애를 포함할 수 있다.

[0069] 또한 상기 뇌질환에는 퇴행성뇌질환도 포함될 수 있다. 퇴행성 뇌질환은 신경 구조 및 기능 손상을 특징으로 하는 중추신경계 또는 말초신경계 관련 진행성 퇴행 장애로서, 알츠하이머병 및 파킨슨병과 같이 아밀로이드 베타의 축적, 타우의 과인산화 및 α-시뉴클레인의 응집에 의해 유발되는 뇌 수축(위축) 및 신경저하를 포함하는 일반적인 신경퇴행성 질환이다.

[0070] 나아가 본 발명은 PLCXD3, 이의 발현 촉진제 또는 이의 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 기억, 인지 또는 학습장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

[0071] 본 발명의 일실시예에서는 Plcxd3 유전자가 결여되어 Plcxd3의 발현 및 활성이 억제된 동물모델에서 기억, 인지 또는 학습장애가 유발되는 것을 확인하였다.

[0072] 따라서 Plcxd3 유전자의 발현을 유도할 수 있는 발현 촉진제 또는 PLCXD3 단백질의 활성을 촉진할 수 있는 활성화제는 기억, 인지 또는 학습장애를 예방, 개선 또는 치료함으로써 단기 및 장기 기억력 개선, 인지능력 개선 또는 학습장애 개선 효과를 도출할 수 있다.

[0073] 본 발명에서, "기억력 개선" 및 "인지능력 개선"은 신체적인 피로, 수면 부족, 지나친 알코올 섭취, 치매 등에 의해 뇌가 위축되고 뇌 신경세포의 파괴가 이루어질 때 일어나는 기억력 감퇴, 기억력 장애 또는 인지능력 감소에 대해 뇌 세포를 손상시키는 유해물질을 조절하여 인지능력을 유지하거나, 뇌의 신경전달물질을 조절하여 저하된 인지능력을 개선하는 효과를 의미한다. 상기 기억력은 필요한 정보를 받아들여 뇌 속에 저장했다가 필요할 때 꺼내어 사용하는 능력이며, 인지능력은 사물을 분별하여 인지할 수 있는 능력을 말한다.

[0074] 본 발명에서 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 상기 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

[0075] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0076] 비경구투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테로 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0077] 상기 약학적 조성물은 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제, 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제 및 좌제로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 제형을 가질 수 있다.

[0078] 또한, 이들 약학적 조성물은 상기 기술된 바와 같이, 기억, 인지 또는 학습장애와 연관된 증상을 비롯한 다양한 뇌질환을 치료하기 위하여 본 발명의 약학적 조성물을 투여할 수 있다.

[0079] 상기 본 발명의 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 용어 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0080] 본 발명의 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하다. 본 발명의 약제학적 조성물의 일반적인 투여량은 성인 기준으로 0.001-100 ㎎/㎏ 범위 내이다.

[0081] 상기 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한, 상기조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

[0082] 본 발명의 조성물은 기억, 인지 또는 학습장애의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 수술, 호로몬 치료, 약물 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0083] 또한 본 발명은 PLCXD3, 이의 발현 촉진제 또는 이의 활성화제를 유효성분으로 포함하는, 기억, 인지 또는 학습장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공할 수 있다.

[0084] 본 발명의 건강기능식품은 식품학적으로 허용 가능한 담체를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0085] 상기 건강기능식품은 본 발명에서 예방, 개선 또는 목적으로 하는 질환의 개선에 도움을 주는 기능을 가질 수 있고, 상기 식품은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 유효성분을 첨가할 수 있는 식품의 종류에는 별다른 제한이 없으며, 예를 들어 각종 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다.

[0086] 상기 건강기능식품에는 본 발명의 유효성분 이외에도 예방, 개선 또는 치료효과에 방해가 되지 않는 다른 성분을 추가할 수 있으며, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 통상의 식품과 같이 여러 가지 생약 추출물, 식품학적으로 허용가능한 식품보조첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0087] 본 발명에서 사용된 용어 "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상 및 환 등의 형태로 제조 및 가공한 식품을 말한다. 여기서 기능성이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능성 식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어날 수 있다.

[0088] 본 발명의 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한은 없으며, 구체적인 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있고, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함할 수 있다.

[0089] 또한 본 발명은 PLCXD3, 이의 발현 촉진제 또는 이의 활성화제를 유효성분으로 포함하고, 미세아교세포(microglia) 또는 성상세포(astrocyte)의 활성 억제; 및 아밀로이드 플라크 억제활성을 갖는 것을 특징으로 하는, 신경염증, 타우 관련 질병 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있으며, 신경염증, 타우 관련 질병 또는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공할 수 있다.

[0090] 본 발명의 일실시 예에 따르면, 알츠하이머병을 유발시킨 마우스 모델에서 PLCXD3의 발현을 저해시킨 경우, 미세아교세포(microglia) 또는 성상세포(astrocyte)의 활성이 증가하고, 아밀로이드 플라크가 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 궁극적으로 PLCXD3, 이의 발현 촉진제 또는 이의 활성화제가 미세아교세포(microglia) 또는 성상세포(astrocyte)의 활성을 억제할 수 있고, 아밀로이드 플라크를 억제할 수 있어, 신경염증, 타우 관련 질병 또는 퇴행성 뇌질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있음을 의미한다.

[0091] 뇌에서 대식세포의 역할을 하는 미세아교세포(microglial cell)는 중추신경계(central nervous system, CNS) 내 면역반응을 조절하는 중요한 효과세포 (effector cell)이다. 이들의 활성화는 약물이나 독소에 의한 이물질을 제거하고 신경 성장 인자를 분비하여 CNS의 항상성을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 그러나 손상된 뉴런으로부터 발생하는 신호, 외부 자극에 의해 변형된 비정상적인 형태의 단백질의 축적, 병원체의 침투와 같은 유해한 스트레스에 노출되면 미세아교세포의 활성이 지나치게 증가되어 신경세포의 손상을 유발함으로써 알츠하이머 질환, 파킨슨질환, 다발성 경화증, 뇌경색 등과 같은 퇴행성 신경질환을 일으킬 수 있다. 또한 최근에는 미세아교세포 또는 성상세포에서의 과도한 염증반응이 퇴행성 뇌질환의 발병원인이 되고 있다는 연구결과가 밝혀지고 있다.

[0092] 성상세포(astrocyte) 역시 정상적인 뇌활동을 유지하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 특히 신경세포의 시냅스 형성, 시냅스 숫자 조절, 시냅스 기능, 신경줄기세포의 신경으로의 분화에 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그러나 이러한 성상세포가 과도하게 반응성을 가지게 되면, 즉 과도한 활성화 상태를 유지하게 되

면 신경세포의 사멸을 초래하고 이웃한 신경세포의 사멸도 유도하는 등, 퇴행성 뇌질환의 원인으로 작용하게 된다. 따라서 과도한 성상세포의 활성화 억제 역시 퇴행성 뇌질환의 새로운 치료 방법에 될 수 있다.

[0093] 또한 신경염증 반응은 선천성 면역세포(미세아교세포)의 활성화, 염증 매개체 예컨대 산화질소(nitric oxide; NO), 사이토카인 및 케모카인의 방출, 대식세포 침윤을 포함하며, 이는 신경 세포 사멸을 유도한다. 미세아교세포 및 성상세포의 염증활성화는 병리학적 마커 및 퇴행성 신경 질환의 진행에 있어 중요한 메커니즘으로 생각되어진다. 미세아교세포 활성의 엄격한 조절은 뇌 항상성을 유지하고 감염 및 염증 질환을 예방하는 데 필수적이다.

[0094] 또한, 베타 아밀로이드(Aβ: 아밀로이드 베타)는 베타 세크리타제와 감마 세크레타제에 의해 분해되어 Aβ를 생성하는 아밀로이드 전구체 단백질(APP)에서 유도되며, 주로 알츠하이머병과 같은 뇌질환의 환자 뇌에서 발견되는 아밀로이드 플라크의 주성분이고 비정상적으로 축적될 경우, 각종 뇌질환의 발병 원인이 된다.

[0095] 과도하게 축적된 베타 아밀로이드는 해마나 대뇌피질 및 주변 세포들에 염증 반응을 일으키며 따라서 신경세포가 손상되고 뇌의 정상적인 기능을 유지하는 신경회로망까지 훼손될 수 있다.

[0096] 또한, 타우 단백질은 분자량이 50000 내지 70000Da인 미세소관 결합 단백질의 일정으로 신경 섬유의 얽힘에 관여한다. 타우 단백질은 정상적인 신경세포의 axon에 존재하는 microtubule-associated protein 중의 하나이다. 이러한 타우 단백질이 과도하게 축적되면 미세소관이 붕괴되면서 정상 신경세포의 네트워크가 와해된다. 타우 단백질이 축적되는 원인으로는 타우 단백질에 인이 과도하게 부착되어 인산화로 인한 중량체를 형성하는데 있는 것으로 알려져 있고 이들 타우 단백질이 축적과 신경세포의 응집은 각종 퇴행성 뇌질환의 원인이 된다고 알려져 있다.

[0097] 그러므로 미세아교세포(microglia) 또는 성상세포(astrocyte)의 활성 억제; 및 아밀로이드 플라크 억제활성을 갖는 PLCXD3, 이의 발현 촉진제 또는 이의 활성화제는 신경염증, 타우 관련 질병 또는 퇴행성 뇌질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 물질로 사용될 수 있다.

[0098] 나아가 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물 및 건강기능식품의 내용은 앞서 기술된 바와 같다.

[0100] 이하 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0102] **<준비예 및 실험방법>**

[0103] Plcxd3 결여(Knock-Out) 제브라피쉬의 제조

[0104] 제브라피쉬의 Plcxd3에 대한 sgRNA의 제조를 위해 CRISPR SCAN 웹사이트(http://www.crisprscan.org/)를 사용하여 exon2 내의 20bp의 표적 뉴클레오티드 서열을 선택하였다. sgRNA용 DNA 주형은 제조사의 프로토콜에 따라 fill-in PCR 및 DNA 정제방법으로 준비하였다. MaxiScript T7 키트(Ambion)를 사용하여 sgRNA의 시험관 내 전사를 수행하였고 합성된 RNA를 암모늄 아세테이트로 침전시켰다. 제브라피쉬 게놈에서 Plcxd3 돌연변이의 제조를 위해 CRISPR/Cas9 시스템을 단일 세포 단계에서 제브라피쉬 배아에 미세 주입하였다(World Precision Instrument, USA). 미세주입 혼합물은 페놀 레드와 함께 100ng/μg sgRNA 및 300ng/μg Cas9 mRNA로 제조하였다.

[0106] Plcxd3 결여(Knock-Out) 마우스의 제조

[0107] Plcxd3 결여 마우스의 제조를 위해, MEGAshortscript™ 키트(Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 exon2 영역을 표적으로 하는 단일 가이드 RNA(sgRNA)를 디자인하였다. gRNA를 설계하기 위해 사용되는 서열 정보은 다음과 같다. crRNA1: 5'-TCTGGCTGCTCCGGGCCTAC-3', crRNA2: 5'-TTCAGTGCCAAAGTCAACGA-3' 및 crRNA3: 5'-GGGTCTGTCGTGTTTGCCCA-3'. Cas9 단백질과 sgRNA를 수정란에 미세주입하기 위해 수컷 C57BL6/J 마우스를 짝짓기 전에 1주일 동안 개별적으로 사육하였고, 암컷 C57BL6/J 마우스에 과배란을 위해 5 IU의 임신한 암말 혈청 성선 자극 호르몬과 5 IU의 인간 융모막 성선 자극 호르몬(HCG)을 투여하였다. C57BL6/J 수컷 및 암컷

마우스는 HCG 주사 후 교배시켰고 교미된 C57BL6/J 암컷 마우스로부터 수정된 배아를 얻었다. sgRNA(40ng/μl) 및 Cas9 단백질(40ng/μl)은 연속 유동 주입 모드를 사용한 미세주입으로 단일 세포 단계에서 수정란의 세포질로 주입시켰다. 살아남은 2세포 배아를 가임신 암컷 난관에 이식하였다. F0(founder mice)는 태어난 새끼 중에서 분석하였다. F0 마우스를 C57BL6/J 정상 마우스와 교배시키고 F1 마우스를 교배시켜 F2 동형접합 돌연변이체를 얻었다. 안정적인 근친교배 배경을 유지하기 위해 암컷 마우스를 약 10세대마다 부모 근친교배 계통으로 역교배시켰다. 유전형 분석에 사용되는 프라이머는 정방향: 5'-GTCCCATGATTCCTTCAGCT-3' 및 역방향: 5'-TTTCTCTGAGTCCACTTGCCA-3'를 사용하였다. 결여(KO) 돌연변이체는 PCR 산물에 대한 T7 엔도뉴클레아제 I 분석으로 스크리닝하였고, 여러 개의 삽입 또는 삭제 돌연변이가 확인되는데, +1 bp 삽입, -8 bp 삭제 및 2개의 -10 bp 삭제 돌연변이가 확인되었다. 최종적으로는 -8 bp 결실 돌연변이체(Plcxd3 KO) 마우스를 실험에 사용하였다.

[0109] 면역조직화학(Immunohistochemistry)(DAB staining)

[0110] 한국뇌연구원 동물관리위원회(IACUC-21-00059)의 모든 동물 실험방법에 대한 승인하에 실험을 수행하였다. 3개월령의 정상 마우스를 22±2° C, 50±5% 습도, 12시간 명암 주기의 무병원체 시설에서 먹이와 물을 임의로 제공하며 사육하였다. 마우스를 관류시키고 PBS 및 4% 파라포름알데히드로 고정시켰다. 면역조직화학 분석을 위한 뇌 절편을 얻기위해, 4° C에서 24시간 동안 4% 파라포름알데히드에 보관된 뇌 조직을 PBS의 30% 수크로스에 72시간 동안 침지시키고 동결조직절편기(Cryostat microtome)(Leica CM1850, Wetzlar , 독일)를 이용하여 30um의 두께로 절편화시켰다. 이후 절편을 PBS에서 30%의 H_2O_2로 배양한 다음, 토끼-항 PLCXD3 항체로 밤새도록 4° C에서 반응시켰고, 이후 슬라이스를 PBS 버퍼로 세척한 후, 상온에서 2시간 동안 바이오틸화된 이차 항체로 반응시켰다. PBS 완충액으로 다시 세척한 후 ABC 용액(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)을 첨가하고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 DAB 용액(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)을 사용하여 42초 동안 현상시켰다. 그런 뒤 Permount 솔루션(Vector Labs, Burlingame, CA)을 사용하여 유리 슬라이드에 마운팅한 후, 면역 염색된 조직에 대한 이미지를 얻었고(Pannoramic scan, 3dHistec, budapest, 헝가리), 이미지를 분석하였다(ImageJ, 미국 국립 보건원, Bethesda, MD, 미국).

[0112] 면역형광염색(Immunofluorescence straining)(IF staining)

[0113] Plcxd3 결여 마우스 및 한배새끼 정상 마우스를 22±2° C, 50±5% 습도 및 12시간 명암 주기의 무병원체 시설에서 먹이와 물을 임의로 제공하며 사육하였다. 행동 시험 후, 마우스를 관류시키고 PBS 및 4% 파라포름알데히드로 각각 고정시켰다. 면역형광염색을 위한 뇌 절편을 얻기 위해, 4° C에서 24시간 동안 4% 파라포름알데히드에 보관된 뇌 조직을 30% 수크로스를 함유한 PBS에 72시간 침지시킨 다음, 동결조직절편기(Cryostat microtome)(Leica CM1850, Wetzlar , 독일)를 이용하여 30um 두께로 절편화시켰다. 뇌 절편을 5% 정상 염소 혈청(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)으로 실온에서 2시간 동안 블록킹 후, 표적 항체로 4° C에서 밤새도록 반응시켰다. 사용한 항체들의 세부사항은 하기 표에 기재하였다. 이후 슬라이스를 PBST 완충액으로 세척하고 Alexa 555 또는 Alexa 488이 접합된 이차 항체로 실온에서 2시간 동안 반응시켰다. DAPI가 포함된 Vectashield 장착 용액(Vector Labs, Burlingame, CA)을 사용하여 유리 슬라이드에 마운팅시킨 후, 면역 염색된 조직의 형광 현미경 이미지를 얻었고(DMi8, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), 이를 분석하였다(ImageJ, 미국 국립 보건원, 베데스다, 메릴랜드, 미국).

[0115] 역전사 PCR

[0116] 정상 마우스 및 Plcxd3 결여 마우스의 해마에서 발현된 Plcxd3 mRNA 수준을 RT-PCR로 분석하였다. cDNA는 QIAzol Lysis Reagent(Qiagen, Cat No. 79306)를 사용하여 추출된 총 RNA를 이용한 역전사로 수득하였고, Prime Taq Premix(GeNetBio)로 30-사이클 RT-PCR을 수행하였다. 사용한 프라이머들의 서열은 하기 표에 나타내었다. 증폭산물(amplicon)은 EcoDye(1:5000, Biofact, Daejeon, Korea)가 첨가된 2% 아가로스 겔에서 전기영동으로 분리하였고, 소프트웨어 Fusion Capt Advance(Vilber Lourmat, Eberhardzell, Germany)를 사용하여 겔 이미지를 분석하였다.

[0118] 실시간 PCR(Real time PCR)

[0119] 정상 및 Plcxd3 결여 마우스의 해마에서 Plcxd3의 mRNA 수준을 실시간 PCR로 분석하였다. 즉, Superscript cDNA Premix Kit II(GeNetBio)로 합성된 cDNA는 Fast SYBR Green Master Mix(Thermo Fisher Scientific, CA, USA)와 QuantStudio™ 5 시스템(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 50-cycle 실시간 PCR로 분석하였다. GAPDH Ct 값을 정규화 값으로 사용하였다. Plcxd3 결여 마우스의 Plcxd3 mRNA 수준 변화는 정상 마우스를 기준으로 분석하였다. 또한, 상기 실험에 사용한 프라이머 서열은 하기 표에 기재하였다.

[0121] IP_3 어세이

[0122] 피질 및 해마에서의 IP3 발현수준에 PLCXD3이 미치는 영향을 정상 및 Plcxd3 마우스에서 분석하였다. 이를 위해 해마를 해부하고 PBS 완충액에서 균질화한 후, 얼음에서 1시간 동안 방치하였다. 그런 뒤, 10,000 rpm에서 4℃의 온도로 15분간 원심분리하여 상층액을 모았다. 총 단백질의 농도는 BCA 단백질 어세이를 이용하여 측정하였고, ELISA 키트(Cat no. CSB-E13410m, CUSABIO, Huston, TX, USA)를 사용하여 IP3 발현수준을 측정하였다.

[0124] 신규 탱크 테스트

[0125] 제브라피쉬는 낯선 환경에 노출되면 어항 바닥에 거주하며 불안한 행동을 보이는 것으로 알려져 있다. 이에 Plcxd3 결여된 돌연변이와 정상 사이의 행동 차이를 조사하기 위해, 각각의 제브라피쉬를 새로운 수조(24cm × 15cm × 15cm)에 넣고, 어항의 수위는 12cm까지 채우고 28℃의 온도를 유지시켰다. 제브라피쉬의 행동은 비디오 카메라(Sony, HDRCX190, Japan)를 사용하여 30분 동안 기록하였다. 비디오 기록의 이미지 추적은 EthoVision XT 7.0 운동 추적 소프트웨어(Noldus)를 사용하여 수행하였다.

[0127] 경고 물질 테스트(Alarm substance test)

[0128] 제브라피쉬가 포식자에게 피해를 입으면 피부에서 경고물질이 방출되어 다른 피쉬에서 위험 신호를 전달하는 것으로 알려져 있다. 제브라피쉬는 경고 물질에 노출되면 패닉 및 얼어붙는 것과 같은 행동을 보인다. 이에 이러한 행동변화가 Plcxd3 결여 돌연변이체에서 발생하는지를 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 경고물질은 제브라피쉬 피부 추출물로부터 제조되었다. 탱크는 앞서 기술한 신규 탱크 테스트에서 사용한 것(24 cm × 15 cm × 15 cm)와 동일한 조건으로 준비하였다. 탱크의 수위는 12 cm까지 채우고 28℃ 온도를 유지시켰다. 동작은 비디오 카메라(Sony, HDRCX190, Japan)를 사용하여 30분 동안 기록하였고, EthoVision XT 7.0 운동 추적 소프트웨어(Noldus)를 사용하여 탱크 높이를 3등분하여 이미지 추적을 수행하였다.

[0130] 오픈 필드 테스트(Open filed test (OFT))

[0131] 오픈 필드는 밝게 조명된 인클로저(40 × 40cm)로 구성하였고, 흰색 플라스틱 바닥과 투명한 Plexiglas 벽을 포함하도록 하였다(Kinder Scientific, Poway, CA, USA). 테스트 당일, 마우스는 5분 동안 인클로저를 탐색할 수 있도록 하였고, SMART 비디오 추적 소프트웨어(SMART 3.0, Panlab, Llobregat, Spain)의 비디오 소프트웨어를 사용하여 행동 성능을 추적하고 분석하였다. 오픈 필드에서의 탐색적 행동을 분석하기 위해 인클로저의 중앙 또는 주변에서 이동한 거리와 탐색 시간을 결과 척도로 분석하였다. 오픈 필드의 활동성을 평가한 후 장비는 70% 에탄올로 세척하여 잔류 냄새를 제거하였다.

[0133] Y-미로 검사(Y-maze)

[0134] Plcxd3 결여 마우스의 단기 기억 및 공간 기억 손상에서 Plcxd3의 기능을 조사하기 위해, Y-미로 테스트를 수행하였다. Y-미로는 120° 의 각도에서 만나는 3개의 팔(35cm x 7cm x 15cm)로 구성하였고, 각 테스트에서 단일 마우스가 5분 동안 미로를 자유롭게 탐색하도록 하였다. 비디오 카메라를 사용하여 5분 동안 자발적인 교대를 기록한 다음 수동으로 계산하였다. 교대 백분율은 다음 공식을 사용하여 계산되었습니다.

[0135] [교대 백분율(Alternation percentage)(%) = (교대 횟수(number of alternations)/교대 트라이어드 수(number of alternation triads) × 100].

[0137] 새로운 물체 인식 테스트(NORT)

[0138] 장기 기억 및 인지 기억에 대한 Plcxd3의 영향을 확인하게 위해, NOR 테스트를 수행하였다. NOR 테스트를 위한 장치는 측면 길이가 40cm이고 높이가 25cm인 개방형 상자를 이용하였고, NOR 테스트는 훈련과 테스트의 두 단계로 이루어져있다. 훈련 및 테스트 단계는 24시간 간격으로 수행하였다. 훈련 단계에서는 두 개의 동일한 물체가 상자안에 배치되었고 마우스가 5분 동안 상자를 탐색하도록 하였다. 테스트 단계에서는 친숙한 물체 하나와 새로운 물체 하나가 포함된 상자에 마우스를 5분 동안 돌려보냈다. 테스트 단계에서 상자에 있는 두 물체의 위치는 균형을 이루도록 하였고, 시도 후에는 상자와 물건을 70% 에탄올로 철저히 청소하여 냄새를 제거시켰다. 탐색 시간은 각 테스트의 비디오 녹화를 검토하여 수동으로 계산하였다. 마우스가 물체를 향해 코를 가리킬 때 행동은 탐색적인 것으로 간주하였다. 새로운 개체에 대한 개체 선호도(%)는 다음 공식을 사용하여 계산하였다.

[0139] [물체 선호도(%) = T 새로움/(T 익숙함 + T 새로움) × 100],

[0140] 여기서 T 새로움은 새로운 물체에 대한 탐색 시간이고, T 익숙함은 친숙한 물체를 탐색하는 시간이다.

[0142] 수동 회피 테스트(PAT)

[0143] 해마 의존적인 맥락적 공포 기억은 이전 훈련 동안 혐오 자극을 받은 환경에 다시 노출되는 것을 포함한다. 해마 의존적 수동 회피 테스트에서 마우스는 2개의 방이 있는 독립된 구획에 배치시켰고 덜 불안을 유발하는 어두운 구획에 들어갈 때 발 충격을 주였다. 다음날, 마우스를 조명이 있는 구획에 다시 놓고 어두운 구획에 들어가기 위한 대기 시간을 평가하였다. 이를 테스트하기 위해 어두운 구획(Hamilton-Kinder, Poway, CA, USA)을 포함하는 챔버에서 밝은 구획에 마우스를 배치시켰다. 10초 동안 순응 후 밝은 집 조명이 켜지고 어두운 구획으로 연결되는 문이 열리도록 하였다. 어두운 왼쪽을 선호하는 마우스는 일반적으로 게이트를 빠르게 통과하여 어두운 구획으로 들어가며 이후, 마우스는 짧은 발 충격(3초 동안 0.3mA)을 받도록 하였다. 각 마우스는 어두운 구획에 들어가지 않고 최대 180초의 테스트를 받았다. 24시간 후, 마우스를 다시 오른쪽 구획에 넣었다. 10초 후, 칸막이의 불이 켜지고 연결 문을 열었다. 어두운 구획에 다시 들어가는 시간은 최대 180초 동안으로 하여 측정하였다.

[0145] 사회적 상호작용 시험(SAT)

[0146] 장치는 직사각형의 조명이 있는 3개의 챔버가 있는 상자와 부착된 적외선 비디오 카메라로 구성되도록 하였다. 각 방의 크기는 40cm × 60cm × 22cm(높이)이고 칸막이 벽은 투명한 플렉시글라스로 제조하였으며 각 방을 탐색할 수 있도록 작은 정사각형 구멍(너비 5cm × 높이 3cm)을 내었다. 정상(C57BL/J)의 8주령 수컷 마우스를 '낯선 개체'로 사용하였다.

[0147] 테스트 하루 전에 '피험자 마우스'를 중간 챔버에 개별적으로 배치하고 5분 동안 전체 장치를 자유롭게 탐색할 수 있도록 하였다. 테스트 전에 대상 마우스를 중간 챔버에 배치하고 5분 동안 세 개의 챔버를 모두 자유롭게 탐색할 수 있도록 했하였다(습관화 시험). 사교성 시험(사교성 시험)에서는 피험자 마우스와 사전 접촉이 없는 낯선 정상 수컷 마우스('낯선 개체 1')를 측면 방 중 하나에 배치시켰다. 낯선 마우스는 막대 사이의 코 접촉을 허용하지만 싸움을 방지하는 작고 둥근 철사 케이지에 둘러싸여 있도록 하였다. 이 케이지는 높이가 11cm이고 바닥 직경이 9cm이고 수직 막대가 0.5cm 떨어져 있다. 피험자 마우스를 중간 방에 놓고 한 구획에는 낯선 개체 1을, 다른 구획에는 빈 케이지를 5분 동안 제시하였다. 각 케이지(낯선 개체 1 또는 비어 있음) 주변에서 보낸 시간을 측정하였다. 5분의 사교성 시험이 끝나면 각 피험자 마우스를 5분 동안 테스트하여 새로운 낯선 개체에 대한 사회적 선호도를 정량화하였다(사회적 선호도 시험). 친숙한 정상 수컷 마우스(낯선 개체 1)를 둘러싸고 있는 철조망을 사교성 시험 동안 비어 있던 방의 반대쪽으로 옮겼다. 두 번째로, 생소한 정상 수컷 마우스(낯선 개체 2)는 동일한 작은 철조망의 다른 쪽 방에 배치시켰다. 피험자 마우스는 이전 사교성 테스트에서 마우스(낯선 개체 1)와 새로운 마우스(낯선 개체 2)를 자유롭게 탐색할 수 있도록 하였다. 각 케이지(낯선 개체 1 또는 낯선 개체 2) 주변에서 보낸 시간을 측정하였다. 데이터 수집 및 분석은 수동으로 수행하였다.

[0149] 골지 염색

[0150] 행동 테스트 후, 4-5마리의 Plcxd3 결여 마우스 및 정상 마우스는 FD Rapid Golgi Stain kit(FD NeuroTechnologies)를 이용하여 골지 염색하였다. 각 마우스의 해부된 뇌를 실온에서 2주 동안 용액 A 및 B에서 배양한 다음, 4° C에서 24시간 동안 용액 C에 담궈두었다. 뇌는 vibratome(VT1000S; Leica)을 사용하여 150㎛의 두께로 절편화하였다. 피질층 V 및 CA1에 있는 피라미드 뉴런의 명시야 현미경(Axioplan 2; Zeiss) 이미지(63배 배율)를 기록하였고, ImageJ(NIH)를 사용하여 블라인드 방식으로 수상돌기가시 수를 계산하였다. 20 ㎛보다 긴 수상돌기 길이를 가진 수상돌기에서 수상돌기가시를 측정하였다.

[0152] 뇌 부위 특이적-Plcxd3 유전자 발현 저하(KD) 동물모델의 제조

[0153] 뇌부위 특이적 Plcxd3 유전자의 발현 저하(KD) 동물모델의 제조를 위해, CMV 프로모터와 eGFP로 표지된 shRNA 벡터 기반 Adeno-Associated Virus (AAV)를 사용하였다. 정상 마우스를 정위수술대에 고정하고, 브레그마(bregma)를 기준점 (AP 0 mm, ML 0 mm, DV 0 mm)으로 설정하고, 편도체-특이적 Plcxd3 발현 저하 동물모델 제조를 위해, 양쪽 편도체 (뇌 3차원 좌표: AP -1.1 mm, ML -/+ 3.45mm, DV -4.5 mm from bregma)에 대조군 바이러스 (AAV-CMV-control shRNA-eGFP) 또는 Plcxd3 발현 저하용 바이러스 (AAV-CMV-Plcxd3 shRNA-eGFP)를 미세 펌프를 통해 0.25 ㎕/min의 유속으로 0.5 ㎕씩 주입하였다. 또한, 해마 CA1 특이적 Plcxd3 발현 저하 동물모델 제조를 위해, 정상 마우스의 양쪽 CA1 (뇌 3차원 좌표: AP -2.0 mm, ML -/+ 1.5 mm, DV -1.55 mm from bregma)에 대조군 바이러스 (AAV-CMV-control shRNA-eGFP) 또는 Plc-xd3 발현 저하용 바이러스 (AAV-CMV-Plcxd3 shRNA-eGFP)를 미세 펌프를 통해 0.25 ㎕/min의 유속으로 1.0 ㎕씩 주입하였다. 주입 3주 후 행동 분석을 진행하여 뇌 부위별 Plc-xd3의 양극성 장애 관련 행동 조절 기능을 분석하였다.

[0155] 뇌 부위 특이적-Plcxd3 유전자 과발현(OE) 동물모델의 제조

[0156] 뇌부위 특이적 Plcxd3 유전자 과발현(OE) 동물모델의 제조를 위해, CMV 프로모터와 eGFP로 표지된 Adeno-Associated Virus (AAV)를 사용하였다. 정상 마우스를 정위수술대에 고정하고, 브레그마 (bregma)를 기준점 (AP 0 mm, ML 0 mm, DV 0 mm)으로 설정하고, 편도체-특이적 Plcxd3 발현 저하 동물모델 제조를 위해, 양쪽 편도체 (뇌 3차원 좌표: AP -1.1 mm, ML -/+ 3.45mm, DV -4.5 mm from bregma)에 대조군 바이러스 (AAV-CMV-control-eGFP) 또는 Plcxd3 과발현용 바이러스 (AAV-CMV-Plc-xd3-eGFP)를 미세 펌프를 통해 0.25 ㎕/min의 유속으로 0.5 ㎕씩 주입하였다. 또한, 해마 CA1 특이적 Plcxd3 발현 저하 동물모델 제조를 위해, 정상 마우스 양쪽 CA1 (뇌 3차원 좌표: AP -2.0 mm, ML -/+ 1.5 mm, DV -1.55 mm from bregma)에 대조군 바이러스 (AAV-CMV-control-eGFP) 또는 Plcxd3 과발현용 바이러스 (AAV-CMV-Plc-xd3-eGFP)를 미세 펌프를 통해 0.25 ㎕/min의 유속으로 1.0 ㎕씩 주입하였다. 주입 3주 후 행동 분석을 진행하여 뇌 부위별 Plc-xd3의 양극성 장애 관련 행동 조절 기능을 분석하였다.

[0158] 십자 미로 테스트 (Elevated plus maze, EPM)

[0159] 과잉행동 및 비정상 불안 반응은 양극성 장애의 특징 행동 중 하나로 십자 미로 테스트를 통해 분석할 수 있다. 지상에서 50cm 높이에 위치한 두 개의 폐쇄 팔 (25x5x16 cm)과 직각으로 서로 건너편이 열려있는 팔 (25x5x0.5 cm)로 구성된 플랫폼에 마우스를 두고 5분간 자유로이 움직이도록 하고, SMART 비디오 추적 소프트웨어(SMART 3.0, Panlab, Llobregat, Spain)의 비디오 소프트웨어를 사용하여 행동 성능을 추적하고 분석하였다. 폐쇄 팔 (closed arm)과 열려있는 팔 (open arm)에 머무른 시간 및 거리를 결과 척도로 분석하였다.

[0161] 공포 조건화 테스트 (Fear conditioning test, FCT)

[0162] 공포 형성 및 공포기억에 대한 편도체 특이적-Plcxd3의 기능을 확인하기 위해 FCR를 수행하였다. 테스트 챔버 (54cm x 30cm x 27cm)에 실험용 마우스를 두고 3분간 주변 환경에 적응 시킨 후, 90dB, 2.8 kHz의 소리 자극을 30초간 준 뒤, 0.2 mA의 전기자극 (발바닥 전기 충격)을 마지막 0.5초간 같이 부과하였다. 1분간의 시행간격을 주고 총 5번의 소리 및 전기자극을 부과하며 freezing behavior를 packwin software로 분석하였다 (공포 조건화; 공포형성 분석 가능). 24시간 후 (day 2), 소리에 대한 공포 기억만 선별적으로 분석하기 위하여, 동일한 테스트 챔버의 바닥 및 벽의 색깔을 변경한 후, 실험용 마우스를 두고 1분간 환경 적응 후, 50초 ~ 70초의 간격을 두고, 90dB, 2.8 kHz의 소리 자극을 30초간, 10번 부과하며 freezing behavior를 packwin software로 분석

하였다 (공포 인출). 8시간 및 72시간 후 (day 3-4), day 2와 동일한 조건하에서 freezing behavior를 packwin software로 분석하여 공포 소거를 관찰하므로 공포 기억에 대한 결과 척도로 분석하였다.

[0164] 알츠하이머병 마우스 동물모델 제작(5x FAD mice)

[0165] 5xFAD 마우스 (스톡번호. 008730, B6SJL-Tg APPSwFlLon,PSEN1*M146L*L286V6799Vas/Mmjax) F1세대를 Jacson 연구실로부터 입수하고, 형질전환 수컷 마우스 (5xFAD)를 Jacson 연구실로부터 구매한 암컷 C57BL/6J와 함께 두었다. 5xFAD는 K670N, M671L (Swedish), I716V (Florida), 및 V717I (London)를 지닌 돌연변이 사람 APP (695)와 2개의 FAD 변이 (M146L 및 L286V)를 갖는 사람 PS1에 수반하는 사람 가족성 알츠하이머병 (Familial Alzheimer's Disease, FAD) 변이를 과발현하는 것으로 알려져 있다. 상기 형질전환은 마우스 Thy1 프로모터에 의해 조절되어 뇌에서 과발현되도록 하였고, 5xFAD 형질전환에 대한 지노타이핑은 Jackson Lab의 지노타이핑 프로토콜에 의해 제공되는 PCR 방법으로 수행하였다.

[0167] 면역조직화학 및 면역형광분석

[0168] 알츠하이머 동물을 관류용액 (0.9% NaCl, Biosesang) 및 4% 파라포름알데히드 용액 (Chembio)을 사용하여 관류하고 고정하였으며, 뇌조직을 동결조직절편기 (Leica)로 절단하고 (30 ㎛ 두께), 면역형광 및 면역조직화학염색을 수행하였다. 면역형광염색을 위해, 0.2 % Triton X-100 (Sigma)을 함유하는 PBS로 세척한 다음, 상온에서 10% Normal Goat Serum Blocking Solution (Vector Laboratories)로 2시간 블록킹 과정을 거친 후 다음의 일차항체와 인큐베항체는 0.2 % Triton X-100을 함유하는 PBS로 희석하였고, 천천히 세이킹하면서 4℃에서 하룻밤 인큐베이션 하였다. 다음 날, 조직을 0.2 % Triton X-100을 함유하는 PBS로 세척하고, 2차항체와 함께 실온에서 2시간 동안 인큐베이션 하였다. 조직을 슬라이드글라스 위에 올리고 DAPI-함유 마운팅 용액 (Vector Laboratories)을 위에 가한 후 커버글라스로 덮어 4도 냉장 보관하였다. 염색된 조직을 형광현미경 (DMi8, Leica Microsystems)으로 촬영하였다.

[0170] 통계분석

[0171] 데이터 분석은 GraphPad Prism 7 소프트웨어(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)로 수행하였다. 두 그룹의 비교는 Welch's correction이 적용된 unpaired two-tailed T-test를 사용하였다. 다중 비교를 위해서는 일원 ANOVA와 Tukey의 검정을 사용하였다. 그리고 $p < 0.05$인 경우 이를 유의미한 것으로 간주하였다. 결과는 평균 ± SD로 표시하였다(*$p < 0.05$, **$p < 0.01$, ***$p < 0.001$).

[0173] 본 발명의 실시예에서 사용한 시약 및 올리고뉴클레오티드 정보는 하기 표 1에 나타낸 바와 같다.

표 1

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
1st Antibodies		
Plcxd3	Rabbit	Invitrogen
GluR1	Mouse	
GAD67	Mouse	

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
2nd Antibodies		
Biotinated	Rabbit	Enzo
Alexa 488	Mouse	Abcam
Alexa 594	Mouse	Abcam

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
DAB staining solution	Vector lab	
Golgi staining solution	GB biolscience Int	GB biolscience Int
IP3 ELISA KIT		

Oligonucleotides:

Reverse transcription PCR primer	SOURCE	IDENTIFIER
Plcxd3	Mouse	Sense: AGTGCCAAAG Antisense: GGTCTCGAAG
C57BL6/J	Mouse	Sense: GTCCCATGATTCCTTCAGCT Antisense: TGGCAAGTGGACTCAGAGAAA

Oligonucleotides:

Real time PCR primer	SOURCE	IDENTIFIER
plcxd3	Mouse	Sense: Antisense:
plcβ1	Mouse	Sense: AGATCAGCGAGGACAGCAAT Antisense: GCCCAGGCAGTGATATTTGT
plcβ2	Mouse	Sense: TGGTTGCCCTCAATTTCCAGAC Antisense: CTGCCCAGGTGTCAGGTATGT
pkca	Mouse	Sense: TGAATCCTCAGTGGAATGAGT Antisense: GGTTGCTTTCTGTCTTCTGAA
pkcβ	Mouse	Sense: AGGAAGCGAGGGCAATGAA Antisense: AGTTCATCTGTACCCTTCCG
pkcγ	Mouse	Sense: GCTGTATGAGATGTTGGCAG Antisense: GAGATTACATGACAGGCACG
nrsn1	Mouse	Sense: ATGGAGTTCGGTCCTACCTGCA Antisense: AGACAGTGCCTGAGATGAGTCC
glun2b	Mouse	Sense: TGCTCATCACCTCATTCTTCTC Antisense: TTGACTTCTCTGTGCCCTTC
creb	Mouse	Sense: CACAGACCACTGATGGACAGCA Antisense: AGGACGCCATAACAACTCCAGG

[0174]

[0176] **<실시예 1>**

[0177] **제브라피쉬에서 PLCXD3의 발현 특징 및 양극성 장애 관련 행동분석**

[0178] <1-1> CNS 특이적 Plcxd3 발현 패턴분석

[0179] 먼저 본 발명자들은 제브라피쉬에서 Plcxd3의 발현 특이성을 분석하였다. 제브라피쉬 유전자에서 Plcxd3의 CNS 특이적 발현 패턴을 조사하기 위해 whole-mount in situ hybridization을 수행하였고, 그 결과, Plcxd3이 제브라피쉬의 뇌와 척수의 신경세포 하위 집합에서 주로 발현된다는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 Plcxd3의 뉴런 특이적 발현이 24 hpf(hours post fertilization)에서 120 hpf 및 성체 제브라피쉬의 뇌까지 지속되고 있는 것을 확인할 수 있었다(도 1A).

[0181] <1-2> Plcxd3 KO 제브라피쉬의 양극성 장애 관련 행동 분석

[0182] 또한, 본 발명자들은 PLCXD3의 생리학적 역할을 확인하기 위해, CRISPR/Cas9 시스템을 사용하여 Plcxd3 결여(KO) 제브라피쉬를 제조하였고, PLCXD3 KO 돌연변이체를 선별한 후, 최종적으로 +29 bp가 삽입된 대립형질을 확립하였으며(도 1B), 본 실험에서는 +29 bp 삽입 돌연변이체(Plcxd3 KO 제브라피쉬)를 사용하였다. 또한 상기 돌연변이체와 정상의 형태학적 비교 분석 결과, 도 1C에 나타낸 바와 같이, 정상 제브라피쉬 배아와 비교하여 Plcxd3 KO 제브라피쉬는 최대 5dpf(수정 후 일)까지 형태학적 결함이 없는 것을 확인할 수 있었다.

[0184] 나아가 Plcxd3 KO 제브라피쉬가 '과잉 운동'과 같이 양극성 장애에서 나타나는 행동패턴을 보이는지 확인하기 위해, 새로운 탱크 테스트 및 경고 물질 테스트를 수행하였다.

[0185] 그 결과, Plcxd3 KO 성체 제브라피쉬가 정상 제브라피쉬에 비해 모든 테스트에서 '과잉 운동' 형태를 보이는 것을 확인할 수 있었다(도 1D 및 1E).

[0186] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 Plcxd3 KO 제브라피쉬가 인간 양극성 장애 환자와 유사 행동을 보이는 것을 알 수 있었고, PLCXD3이 양극성 장애와 관련성이 있다는 것을 알 수 있었다.

[0188] **<실시예 2>**

[0189] **정상 마우스 뇌의 해마에서 PLCXD3의 발현양상 분석**

[0190] 마우스 뇌에서 Plcxd3의 발현 패턴을 분석하였다. 이를 위해 정상 마우스의 Plcxd3 유전자에 대한 특이적 프라이머를 사용하여 실시간 PCR을 수행하였다.

[0192] 그 결과, Plcxd3의 mRNA 수준이 정상 마우스의 소뇌(CB), 시상하부(Hyhpothal), 해마 CA1 및 CA3에서 높게 발현되는 것을 확인할 수 있었다(도 2A). 또한, 우리는 면역조직화학을 통해 정상 마우스 뇌에서 CB, 시상하부, 해마 CA1 및 CA3 영역에서 고도로 발현되고 있는 PLCXD3 단백질을 확인할 수 있었고(도 2B, 2C). 특히, CA1의 피라미드 층 및 분자 층과 CA3의 피라미드 층에서 주로 발현되고 있는 것을 확인할 수 있었다(도 2C, 2D).

[0194] **<실시예 3>**

[0195] **정상 마우스에서 신경세포 종류별 PLCXD3의 발현양상 분석**

[0196] 어떤 세포 유형에서 PLCXD3이 특이적으로 발현되고 있는지를 확인하기 위해, 정상 마우스를 대상으로 항-PLCXD3 및 항-GluA2(흥분성 뉴런 마커) 또는 항-PLCXD3 및 항-GAD67 항체(억제성 뉴런 마커)를 이용하여 이중 형광 염색을 수행하였다.

[0197]

[0198] 그 결과, 도 3A 및 3H에 PLCXD3 항체와 흥분성 또는 억제성 신경 마커로 염색된 공동 국소화된 세포 비율을 나타내었으며, PLCXD3-발현 세포는 CA1(44.35%), DG(38%) 및 CA3(35%)에서 GluA1-양성 흥분성 뉴런과 공동 국소화되어 있는 것으로 나타났다(도 3B~3G). 또한, PLCXD3-발현 세포는 해마의 CA1(77.55%), DG(92.34%) 및 CA3(87.83%)에서 GAD67-양성 뉴런과 공동 국소화되어 있는 것으로 나타났다(도 3I~3N).

[0199] 이러한 결과를 통해 PLCXD3은 흥분성 및 억제성 뉴런 모두에서 발현되고 있는 것을 알 수 있었고, 특히 PLCXD3은 정상 마우스 뇌의 해마에 있는 억제성 뉴런에서 우세하게 발현되고 있다는 것을 알 수 있었다.

[0200]

[0201] **<실시예 4>**

[0202] **Plcxd3 결여(KO) 마우스의 제조 및 Plcxd3 결여 확인**

[0203] 뇌에서 PLCXD3의 생리학적 기능을 규명하기 위해, CRISPER/Cas9 시스템을 사용하여 Plcxd3 결여(KO) 마우스를 제조하였고, 제조된 마우스에서 여러 삽입 또는 결여 돌연변이를 확인하였다. 돌연변이로는 +1 bp가 삽입된 돌연변이체, -8 bp 가 결실된 돌연변이체 및 2개의 -10 bp가 결실된 돌연변이체를 확인하였다. 본 실험에서는 -8 bp가 결실된 돌연변이체(Plcxd3 KO)를 사용하였다(도 4B). -8 bp 결실은 PLCXD3 단백질의 조기 절단을 초래하는

프레임시프트 돌연변이의 원인으로 예측되었다.

[0204] 그런 다음, 정상 마우스의 Plcxd3+/+ 동형 접합체와 Plcxd3 KO 마우스의 Plcxd3-/- 동형 접합체(F1)를 교배하여 Plcxd3+/- 이형 접합체 마우스(F2)를 얻었고, F2 마우스의 이형 접합체를 서로 교배하고 번식시켜 멘델 유전학에 따라 F3 마우스인 Plcxd3+/+ 동형 접합체, Plcxd3+/- 이형 접합체 및 Plcxd3-/- 동형 접합체 마우스를 얻었다(도 4C). 본 실험에서 Plcxd3결여 마우스로는 Plcxd3+/- 이형 접합체의 한배 새끼인 F3의 Plcxd3-/- 마우스를 사용하였다.

[0205] 또한, Plcxd3 KO 마우스 뇌에서 Plcxd3 유전자가 결실되어 있는지를 확인하기 위해, Plcxd3 유전자 특이적 프라이머를 사용하여 유전형 분석을 수행했으며 그 결과, Plcxd3유전자가 Plcxd3 KO 마우스의 해마에서 검출되지 않는 것을 확인할 수 있었다(도 4D~4F). 실시간 PCR 결과에서도 해마에서의 Plcxd3 mRNA 수준이 F3의 정상 마우스(Plcxd3+/+)와 비교하여 P프 KO 마우스(Plcxd3-/-)에서 현저하게 감소되어 있는 것으로 나타났으며 거의 발현되지 않는 정도로 결여되어 있음을 확인할 수 있었다(도 4F).

[0207] **<실시예 5>**

[0208] **Plcxd3 결여에 의한 학습/기억력, 인지기능 및 사회적 행동의 손상 확인**

[0209] <5-1> 오픈 필드 테스트

[0210] 본 발명자들은 PLCXD3이 학습, 기억력, 인지기능 및 사회적 행동과 관련성이 있는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위해 3개월 또는 7개월된 Plcxd3 KO 마우스와 그 한배 새끼를 사용하여 동물행동 실험을 수행하였다.

[0212] 그 결과, 총 이동 거리의 변화가 없는 정상 마우스와 비교하여 3개월된 Plcxd3 KO 마우스는 중앙 구역의 탐색 시간이 크게 감소한 것으로 나타났고(도 5A), 이러한 결과와 유사하게, 7개월된 Plcxd3 KO 마우스도 중심 구역의 탐색 시간이 감소하는 경향을 나타내었지만 총 이동 거리에는 큰 변화가 없는 것으로 나타났다(도 5A).

[0213] 이러한 결과를 통해, 본 발명자들은 정상개체에 비해 Plcxd3 KO 마우스가 불안감을 많이 느끼고 있다는 것을 알 수 있었고, 이는 Plcxd3 유전자가 불안 관련 행동을 조절하는 역할을 한다는 것을 의미한다.

[0215] <5-2> Y-미로, NORT 및 PAT 테스트

[0216] 다음으로 PLCXD3이 공간, 인식 및 학습 기억에 미치는 영향을 조사하기 위해 Y-maze, NORT(Novel Object Recognition Test) 및 PAT(Passive 회피 테스트)를 각각 수행하였다.

[0218] 그 결과, 한배 새끼(F3)의 정상 마우스에 비해 3개월 및 7개월된 Plcxd3 KO 마우스에서 자발적인 변경의 정도가 유의하게 감소하는 것으로 나타났다(도 5B). 또한, 새로운 물체에 대한 호감도는 7개월된 Plcxd3 KO 마우스에서 유의하게 억제되어 있는 것으로 나타났고(도 5C). PAT 분석에서는 오른쪽 큐 유도실의 대기 시간이 3개월 및 7개월된 Plcxd3 KO 마우스에서 크게 감소한 것으로 나타났다(도 5D). 이러한 결과는 PLCXD3이 공간, 인식 및 학습 기억의 항상성을 유지하는데 중요한 작용을 한다는 것을 의미한다.

[0220] <5-3> 사회적 행동 테스트

[0221] PLCXD3이 사회적 행동에도 관여하는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 사회적 상호 작용 테스트는 3개월 및 7개월된 Plcxd3 KO 마우스와 그 한배 새끼(F3)를 사용하여 분석하였다.

[0223] 그 결과, 사교성 및 사회적 선호도가 정상 마우스에 비해 3개월 및 7개월 Plcxd3 KO 마우스에서 유의하게 감소되어 있는 것으로 나타났고, 이는 Plcxd3 KO 마우스의 경우, 사회적 상호작용 행동이 손상되었음을 의미한다(도 5E). 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 PLCXD3이 정서적 행동, 공간 작업, 인식 및 학습 기억과 사회적 행동

조절에 관여한다는 것을 알 수 있었다.

[0225] **<실시예 6>**

[0226] **Plcxd3 결여에 의한 피질 및 해마 수상돌기가시(dendritic spine)의 수감소 확인**

[0227] PLCXD3이 뇌의 기억 통합과 관련된 수상돌기가시 형성에 영향을 주는지 확인하기 위해, 골지(Golgi) 염색을 수행하였다. Golgi 염색은 3개월 또는 7개월된 Plcxd3 KO 마우스와 그 한배 새끼(F3)를 사용하여 수행하였다.

[0229] 그 결과, 3개월된 Plcxd3 KO 마우스에서 피질 정점 경사(AO) 및 기저 이동(BS) 영역에서 수지상 가시가 유의하게 감소되어 있는 것을 확인할 수 있었다(도 6A, 6B). 그러나, 해마에서의 수상돌기가시는 3개월된 PLCXD3 KO 마우스의 해마 피질 정점 경사(AO) 영역에서만 유의하게 감소되었고 기저 이동(BS) 영역에서는 유의한 감소를 보이지 않는 것으로 나타났다(도 6A, 6C). 또한, 7개월된 Plcxd3 KO 마우스의 피질 및 해마의 피질 정점 경사(AO) 및 기저 이동(BS) 영역에서는 수상돌기가시의 수가 유의하게 감소한 것으로 나타났다(도 6D, 6E).

[0230] 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 PLCXD3이 뇌의 기억 통합과 관련된 수상돌기가시의 수 형성에 중요하게 작용한다는 것을 알 수 있었고, Plcxd3 유전자 또는 단백질의 발현 결핍은 뇌에서 수상돌기가시의 형성을 감소시켜 뇌 기능 장애를 유발할 수 있음을 알 수 있었으며, 반면, Plcxd3 유전자 또는 단백질의 발현과 활성을 증가시키면 뇌 기능 장애를 개선, 예방 또는 치료할 수 있음을 알 수 있었다.

[0232] **<실시예 7>**

[0233] **Plcxd3 결여에 의한 기억, 학습 또는 인지기능과 관련된 분자들의 발현변화 분석**

[0234] PLC는 뇌에서 PIP2를 IP3 및 DAG로 가수분해하는 막 결합 효소의 한 종류이다. 이에 본 발명자들은 Plcxd3 유전자의 결여에 의해 PLC 활성이 조절되는지를 확인하기 위해, Plcxd3 KO 마우스의 해마 조직을 대상으로 IP3 분석을 수행하였다.

[0236] 그 결과, IP3의 농도는 한배 새끼의 정상에 비해 Plcxd3 KO 마우스의 해마에서 월등하게 감소되어 있는 것으로 나타났으며 이를 통해 Plcxd3 KO 마우스에서는 PLCXD3 활성이 현저하게 낮다는 것을 확인할 수 있었다(도 7A).

[0238] 또한, 본 발명자들은 Plcxd3 KO 마우스가 PLC 패밀리의 이형체(isoform)의 발현에 영향을 미치는지를 확인하기 위해 실시간 PCR을 수행하였다.

[0239] 그 결과, 3개월된 Plcxd3 KO 마우스에서 PLC의 서브패밀리인 β1 및 β2의 발현이 유의하게 감소되어 있는 것으로 나타나(도 7B), Plcxd3의 결여는 PLC의 서브패밀리들의 발현에 영향을 준다는 것을 알 수 있었다.

[0241] 또한, 학습 및 기억 관련 유전자의 발현수준에도 PLCXD3이 영향을 미치는지 확인하기 위해, 실시간 PCR을 수행한 결과, 3개월된 Plcxd3 KO 마우스에서 학습 및 기억력 관련 인자들인 세포질 소포 성분 nrsn1(neurensin 1) 및 NMDA 수용체 서브유닛 glun2b(NMDA receptor 2B)의 mRNA 수준이 상당히 감소되어 있는 것으로 나타났다(도 7C, 7D).

[0242] 뿐만 아니라, 7개월된 Plcxd3 KO 마우스에서는 PLC 패밀리의 상류 분자 표적인자들인 gng2(G protein subunit gamma 2), gpr183(Orphan G-protein coupled receptor 183) 및 ephb2(Eph receptor B2)의 발현 수준이 모두 유의하게 감소된 것으로 나타났으며(도 7E), 기억력 관련 유전자인 creb 및 nrsn1의 발현수준도 유의하게 감소된 것으로 나타났다(도 7F).

[0244] 이러한 결과들을 통해 본 발명자들은 PLCXD3이 기억, 학습, 인지 및 사회적 행동과 관련된 분자들의 발현 조절을 통해, 뇌 기능에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었고, 궁극적으로 PLCXD3의 발현 또는 활성을 증가시키

면 기억력, 학습력 및 인지기능 장애 질환들을 효과적으로 개선, 예방 또는 치료할 수 있음을 알 수 있었다.

[0246] **<실시예 8>**

[0247] **편도체-특이적 Plcxd3의 발현수준에 따른 과잉/불안 행동, 단기 공간 인지 능력, 사회성 및 공포 조건화 반응확인**

[0249] <8-1> 편도체-특이적 Plcxd3의 발현저하에 따른 반응확인

[0250] ① 십자 미로 테스트 (EPM)

[0251] 본 발명자들은 편도체-특이적 Plcxd3가 과잉/불안 행동과 관련성이 있는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위해 편도체에 대조군 바이러스 또는 Plcxd3 발현 저하용 바이러스(AAV-CMV-Plc-xd3 shRNA-eGFP)가 주입된 실험용 마우스를 사용하였다.

[0252] 그 결과, 편도체 특이적 plcxd3 발현이 저하된 실험용 마우스는 열려있는 팔에 머문 시간이 정상 대조군에 비해 유의미하게 증가하였고, 폐쇄 팔에 머문 시간은 유의미하게 감소하여, 정상 수치보다 불안 반응이 낮아져 있음을 확인하였다(도 8A). 양 팔에서 이동한 거리에는 두 그룹간 차이를 보이지 않아 편도체 특이적 Plcxd3는 불안 반응에는 관여하나 과잉행동에는 관여하지 않음을 유추할 수 있었다.

[0254] ② Y-미로 테스트 (Y maze)

[0255] 본 발명자들은 편도체-특이적 Plcxd3가 단기 공간 인지 행동과 관련성이 있는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위해 편도체에 대조군 바이러스 또는 Plcxd3 발현 저하용 바이러스(AAV-CMV-Plc-xd3 shRNA-eGFP)가 주입된 실험용 마우스를 사용하였다.

[0256] 그 결과, 편도체 특이적 plcxd3 발현이 저하된 실험용 마우스에서 정상 대조군에 비해 자발적 변경도(spontaneous alteration)가 유의미하게 감소한 것을 관찰하므로 인지 결핍이 발생하였음을 확인할 수 있었다(도 8B).

[0258] ③ 사회적 행동 테스트 (SAT)

[0259] 편도체-특이적 Plcxd3가 사회성 행동에 관여하는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위해 편도체에 대조군 바이러스 또는 Plcxd3 발현 저하용 바이러스(AAV-CMV-Plcxd3 shRNA-eGFP)가 주입된 실험용 마우스를 사용하였다.

[0260] 그 결과, 편도체-특이적 plcxd3 발현이 저하된 실험용 마우스에서 정상 대조군에 비해 사교성(sociability)은 차이가 없었고, 사회적 상호능력/사회성 기억 (social preference)은 감소한 것을 확인하였다(도 8C).

[0262] ④ 공포 조건화 테스트 (CFT)

[0263] 편도체-특이적 Plcxd3가 공포 형성/소거에 미치는 영향을 분석하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위해 편도체에 대조군 바이러스 또는 Plcxd3 발현 저하용 바이러스(AAV-CMV-Plc-xd3 shRNA-eGFP)가 주입된 실험용 마우스를 사용하였다.

[0264] 그 결과, 편도체 특이적 plcxd3 발현이 저하된 실험용 마우스에서 정상 대조군에 비해 낮은 공포 반응을 보였으며, 비정상적인 공포 형성으로 인해 공포 기억 및 소거 또한 정상 마우스와 다른 패턴을 보였다(도 8D).

[0266] <8-2> 편도체-특이적 Plcxd3의 과발현에 따른 반응확인

[0267] ① 십자 미로 테스트 (EPM)

[0268] 편도체-특이적 Plcxd3 저하 시, 저불안 반응을 확인한 본 발명자들은, 편도체-특이적 Plcxd3 과발현 시, 과잉/

불안 행동 변화가 있는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위해 편도체에 대조군 바이러스 또는 Plcxd3 과발현용 바이러스 (AAV-CMV-Plcxd3-eGFP)가 주입된 실험용 마우스를 사용하였다.

[0269] 그 결과, 편도체 특이적 plcxd3 유전자가 과발현된 실험용 마우스에서 열려있는 팔 및 폐쇄 팔에 머문 시간 및 이동 거리가 정상 대조군과 비교하여 차이가 없었다(도 9A).

[0271] ② Y-미로 테스트 (Y maze)

[0272] 본 발명자들은 편도체-특이적 Plcxd3 과발현이 단기 공간 인지 행동과 관련성이 있는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위해 편도체에 대조군 바이러스 또는 Plcxd3 과발현용 바이러스(AAV-CMV-Plc-xd3-eGFP)가 주입된 실험용 마우스를 사용하였다.

[0273] 그 결과, 편도체 특이적 plcxd3가 과발현된 실험용 마우스에서 정상 대조군에 비해 자발적 변경도(spontaneous alteration)가 유의미하게 감소한 것을 관찰하므로 인지 결핍을 확인할 수 있었다(도 9B).

[0275] ③ 사회적 행동 테스트 (SAT)

[0276] 편도체-특이적 Plcxd3 과발현이 사회성 행동에 관여하는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위해 편도체에 대조군 바이러스 또는 Plcxd3 과발현용 바이러스(AAV-CMV-Plcxd3-eGFP)가 주입된 실험용 마우스를 사용하였다.

[0277] 그 결과, 편도체 특이적 plcxd3가 과발현된 실험용 마우스에서 정상 대조군에 비해 사교성 (sociability)은 차이가 없었고, 사회적 상호능력/사회성 기억 (social preference)은 감소한 것을 확인하였다(도 9C).

[0279] 이상의 결과를 통해 본 발명자들은 편도체-특이적 Plcxd3은 불안 반응, 단기 공간 기억, 사회성 기억, 공포형성 과정을 조절하며 Plcxd3의 발현 항상성이 유지되지 않을 경우, 즉 발현이 저하되거나 또는 과발현되는 경우 이러한 기능 결핍이 초래됨을 알 수 있었다.

[0281] **<실시예 9>**

[0282] **해마 CA1 특이적 Plcxd3의 발현수준에 따른 과잉/불안 행동, 단기 공간 인지 능력, 사회적 상화작용 분석**

[0284] <9-1> 해마 CA1 특이적 Plcxd3의 발현저하에 따른 행동변화확인

[0285] ① 십자 미로 테스트 (EPM)

[0286] 본 발명자들은 해마 CA1-특이적 Plcxd3가 과잉/불안 행동을 어떻게 조절하는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위해 해마 CA1에 대조군 바이러스 또는 Plcxd3 발현 저하용 바이러스(AAV-CMV-Plc-xd3 shRNA-eGFP)가 주입된 실험용 마우스를 사용하였다.

[0287] 그 결과, 해마 특이적 plcxd3 발현이 저하된 실험용 마우스는 열려있는 팔 및 전체 팔에서 이동한 거리가 정상 대조군에 비해 유의미하게 증가하여 과잉 행동이 있음을 확인하였다(도 10A). 양 팔에서 머문 시간에는 두 그룹 간 차이를 보이지 않아 해마 CA1 특이적 Plcxd3는 과잉행동에는 관여하나 불안 반응에는 관여하지 않음을 알 수 있었다.

[0288]

[0289] ② Y-미로 테스트 (Y maze)

[0290] 본 발명자들은 해마 CA1-특이적 Plcxd3가 단기 인지 기능과 관련성이 있는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위해 해마 CA1에 대조군 바이러스 또는 Plcxd3 발현 저하용 바이러스(AAV-CMV-Plc-xd3 shRNA-eGFP)가 주입된 실험용 마우스를 사용하였다.

[0291] 그 결과, 해마 CA1 특이적 plcxd3 발현이 저하된 실험용 마우스에서 정상 대조군과 비교하여 자발적 변경도

(spontaneous alteration)는 변화 없음을 확인하였다 (도 10B).

[0293] ③ 사회적 행동 테스트 (SAT)

[0294] 해마 CA1-특이적 Plcxd3가 사회성 행동에 관여하는지 확인하기 위한 실험을 수행하기 위해 해마 CA1에 대조군 바이러스 또는 Plcxd3 발현 저하용 바이러스(AAV-CMV-Plc-xd3 shRNA-eGFP)가 주입된 실험용 마우스를 사용하였다.

[0295] 그 결과, 해마 CA1-특이적 plcxd3 발현이 저하된 실험용 마우스는 정상 대조군과 비교하여 사교성(sociability) 및 사회적 상호능력/사회성 기억(social preference)에 결핍이 없음을 확인하였다 (도 10C).

[0297] <9-2> 해마 CA1 특이적 Plcxd3의 과발현에 따른 행동변화확인

[0298] ① 십자 미로 테스트 (EPM)

[0299] 해마 CA1-특이적 Plcxd3 과발현 시, 과잉/불안 행동 변화가 있는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위해 해마 CA1에 대조군 바이러스 또는 Plcxd3 과발현용 바이러스(AAV-CMV-Plcxd3-eGFP)가 주입된 실험용 마우스를 사용하였다.

[0300] 그 결과, 해마 CA1-특이적 plcxd3 유전자가 과발현된 실험용 마우스는 열려있는 팔에서 이동한 거리가 정상 대조군에 비해 유의미하게 증가하였고, 양 팔에 머문 시간에는 차이가 없었다(도 11A).

[0302] ② Y-미로 테스트 (Y maze)

[0303] 본 발명자들은 해마 CA1-특이적 Plcxd3 과발현이 단기 공간 인지 행동과 관련성이 있는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위해 해마 CA1에 대조군 바이러스 또는 Plcxd3 과발현용 바이러스(AAV-CMV-Plc-xd3-eGFP)가 주입된 실험용 마우스를 사용하였다.

[0304] 그 결과, 해마 CA1-특이적 plcxd3가 과발현된 실험용 마우스에서 정상 대조군에 비해 자발적 변경도 (spontaneous alteration)에 유의미한 변화가 없었다 (도 11B).

[0306] ③ 사회적 행동 테스트 (SAT)

[0307] 해마 CA1-특이적-Plcxd3 과발현이 사회성 행동에 관여하는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 이를 위해 해마 CA1에 대조군 바이러스 또는 Plcxd3 과발현용 바이러스(AAV-CMV-Plcxd3-eGFP)가 주입된 실험용 마우스를 사용하였다.

[0308] 그 결과, 해마 CA1-특이적 plcxd3가 과발현된 실험용 마우스에서 정상 대조군에 비해 사교성 (sociability) 및 사회적 상호능력(social preference)에 변화가 없음을 확인하였다 (도 11C).

[0310] **<실시예 10>**

[0311] **알츠하이머병 동물에서 해마 CA1 특이적 Plcxd3 발현 저해에 따른 working memory 분석**

[0312] 3개월령 및 6개월령의 알츠하이머병 동물의 해마 CA1에 대조군 바이러스 또는 Plcxd3 발현 저하용 바이러스 (AAV-CMV-Plc-xd3 shRNA-eGFP)를 주입한후, passive avoidance 실험을 수행하였다.

[0313] 그 결과, 대조군 바이러스 또는 Plcxd3 발현 저하용 바이러스가 마우스에 잘 감염된 것을 확인하였고, 해마 CA1 특이적 plcxd3 발현이 저하된 실험용 마우스에서 정상 대조군과 비교하여 working memory가 유의미하게 감소함을 확인하였다 (도 12A, 12B).

[0315] **<실시예 11>**

[0316] **알츠하이머병 동물에서 해마 CA1 특이적 Plcxd3 발현 저해에 따른 아밀로이드 플라크 변화 분석**

[0317] 6개월령의 알츠하이머병 동물의 해마 CA1에 대조군 바이러스 또는 Plcxd3 발현 저하용 바이러스(AAV-CMV-Plc-xd3 shRNA-eGFP)를 각각 주입한 후, PLCXD3 발현변화를 실시간 PCR로 분석한 결과, Plcxd3 발현 저하용 바이러스를 투여한 알츠하이머병 동물에서 PLCXD3 발현이 유의미하게 감소함을 확인하였다 (도 13A).

[0318] 또한, PLCXD3 발현 저해에 따른 아밀로이드 병변의 변화를 확인하기 위하여, 6개월령의 알츠하이머병 동물의 해마 CA1에 대조군 바이러스 또는 Plcxd3 발현 저하용 바이러스(AAV-CMV-Plc-xd3 shRNA-eGFP)를 주입한 후, 항체-6E10를 이용하여 면역형광염색을 수행한 결과, Plcxd3 발현 저하용 바이러스를 투여한 알츠하이머병 동물에서 아밀로이드 플라크가 유의미하게 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다(도 13B).

[0319] 나아가 PLCXD3 발현 저해에 따른 알츠하이머병 동물에서의 아밀로이드 병변 관련 분자기전을 실시간 PCR을 이용하여 확인한 결과, Plcxd3 발현 저하용 바이러스를 투여한 알츠하이머병 동물에서 APP, BACE1 및 DYRK1A 발현이 유의미하게 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다(도 13C).

[0321] **<실시예 12>**

[0322] **알츠하이머병 동물에서 해마 CA1 특이적 Plcxd3 발현 저해에 따른 뇌염증 변화 분석**

[0323] PLCXD3 발현 저해에 따른 아밀로이드 병변의 변화를 확인하기 위하여, 6개월령의 알츠하이머병 동물에 해마 CA1에 대조군 바이러스 또는 Plcxd3 발현 저하용 바이러스(AAV-CMV-Plc-xd3 shRNA-eGFP)를 주입한 후, 항체-Iba-1 및 항체-GFAP를 이용하여 면역형광염색을 수행하였다.

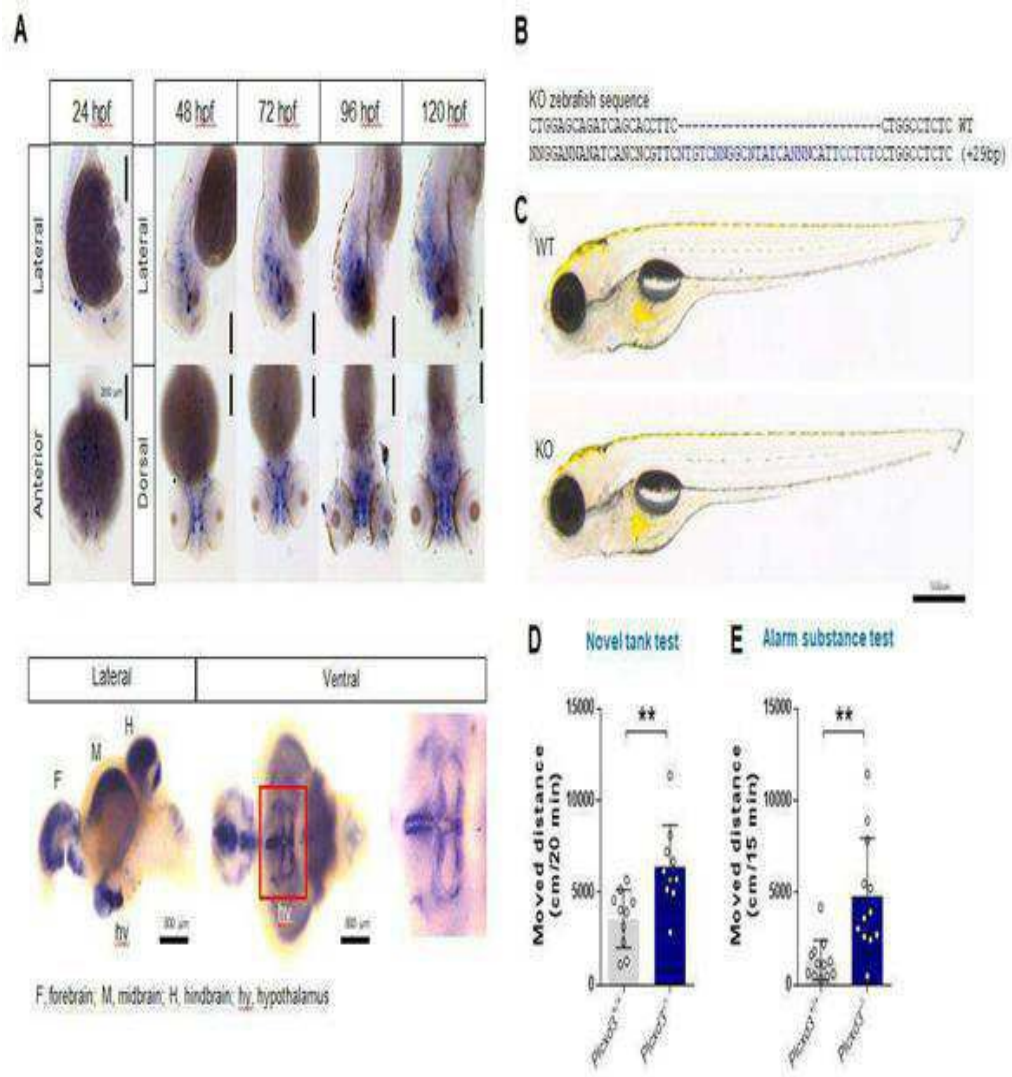
[0324] 그 결과, 해마 CA1 특이적 plcxd3 발현이 저하된 실험용 마우스에서 정상 대조군과 비교하여 뇌염증이 유의미하게 증가함을 확인하였다(도 14A, 14B).

[0326] 이러한 결과들을 통해 본 발명자들은 해마 CA1 및 편도체(BLA) 특이적 Plcxd3은 과잉행동을 조절하며 Plcxd3의 발현에 항상성이 유지되지 않을 경우, 즉 발현이 저하되거나 과발현되는 경우, 상기와 같은 기능 결핍이 초래됨을 알 수 있었다. 또한 상기와 같은 결과를 통해 본 발명자들은 PLCXD3이 기억, 학습, 인지 및 사회적 행동에 영향을 줄 뿐만 아니라 알츠하이머병과도 관련이 있음을 알 수 있었고, 특히 plcxd3 발현이 정상군에 비해 저하될 경우, 기억, 학습, 인지 및 사회적 행동장애가 초래될 수 있으며 알츠하이머병의 증상을 악화시킬 수 있는 등, 뇌질환을 유발시킬 수 있음을 알 수 있었다.

[0328] 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.

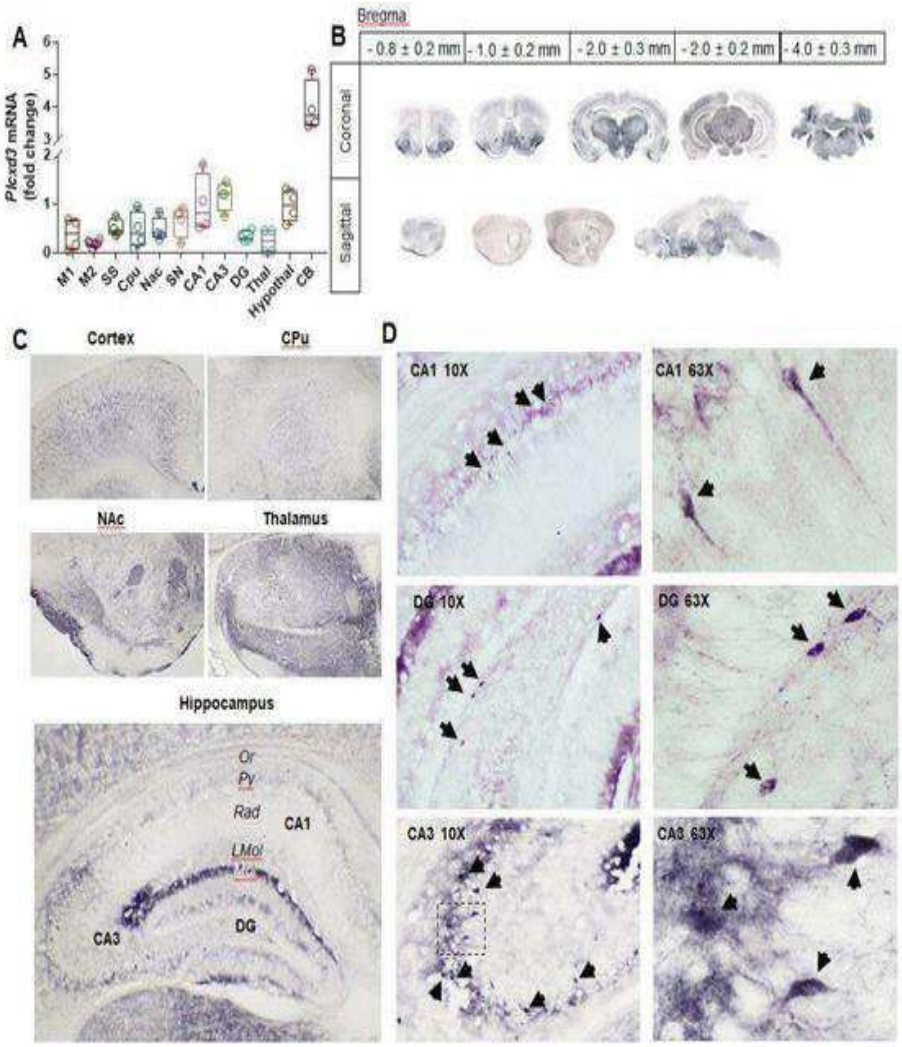
도면

도면1

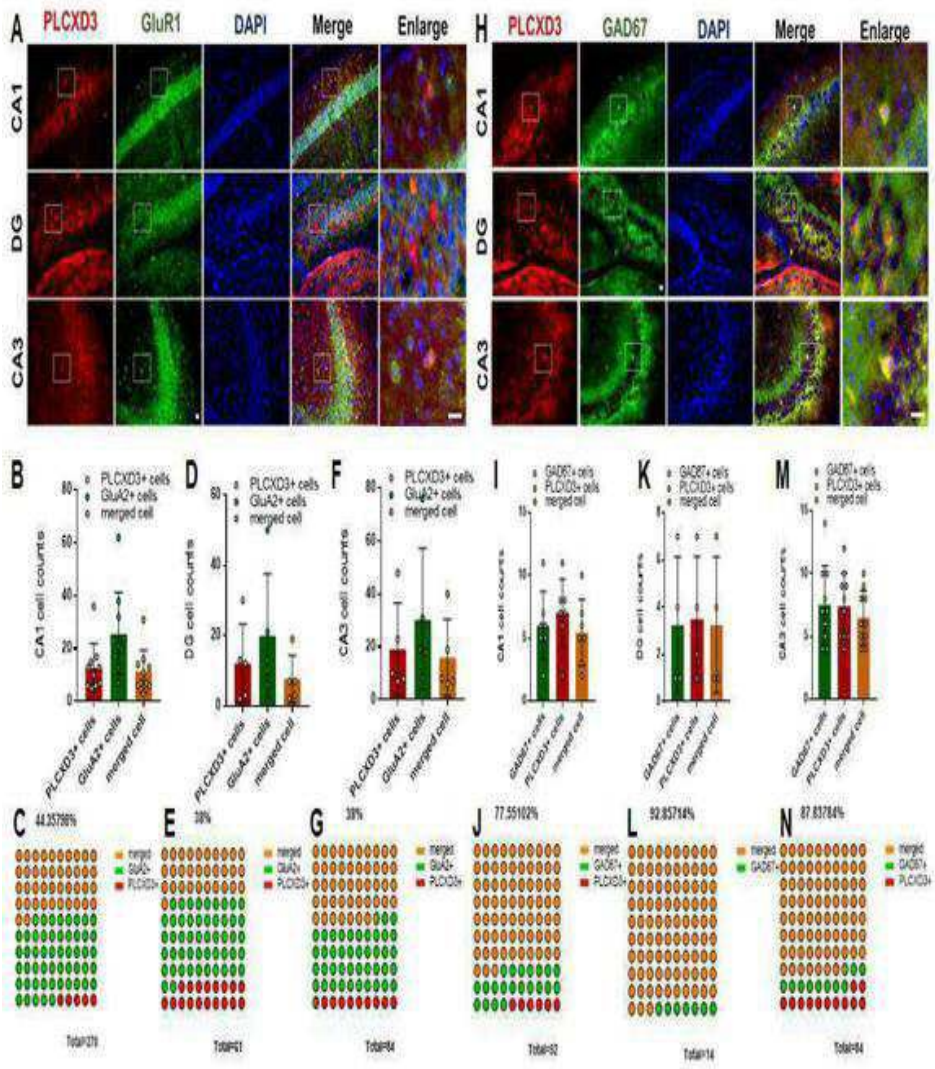


F, forebrain; M, midbrain; H, hindbrain; hy, hypothalamus

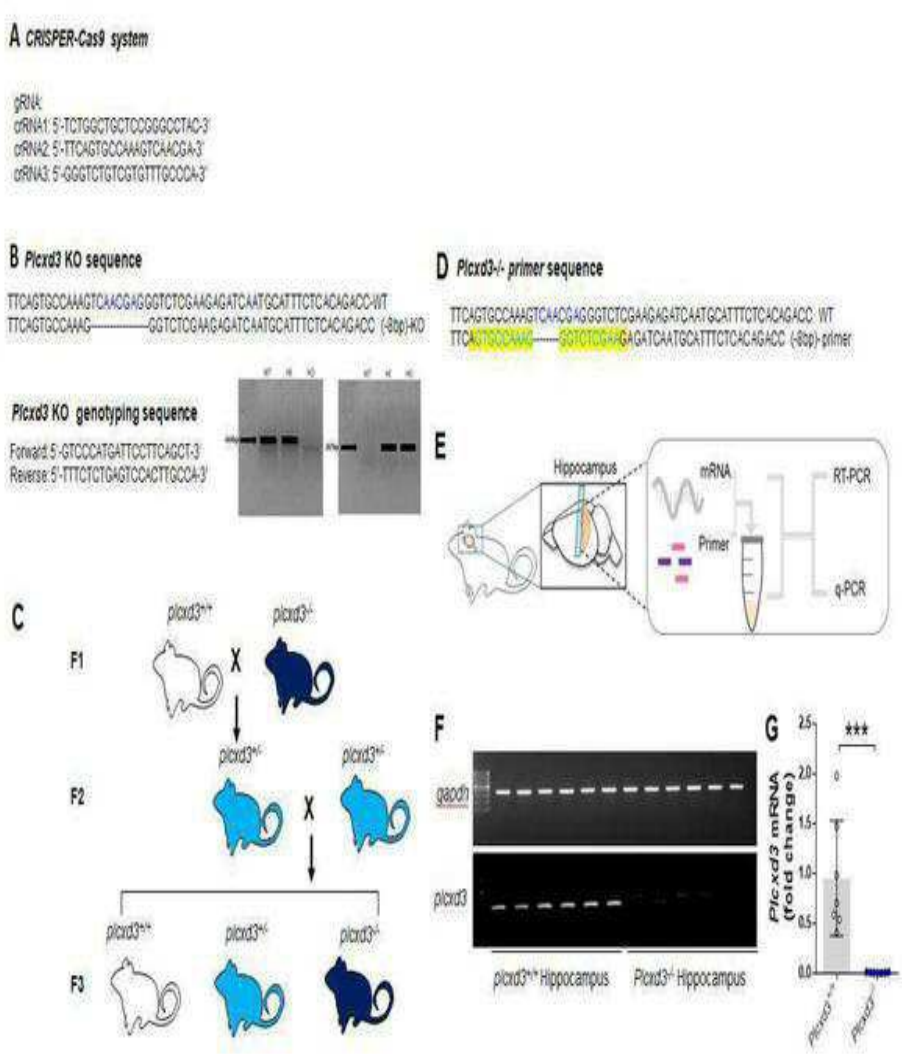
도면2


A
Plcxd3 mRNA (fold change)
M1
M2
SS
Cpu
Nac
SN
CA1
CA3
DG
Thal
Hypothal
CB
B
Bregma
- 0.8 ± 0.2 mm
- 1.0 ± 0.2 mm
- 2.0 ± 0.3 mm
- 2.0 ± 0.2 mm
- 4.0 ± 0.3 mm
Coronal
Sagittal
C
Cortex
CPu
NAc
Thalamus
Hippocampus
Or
Py
Rad
LMol
CA1
CA3
DG
D
CA1 10X
CA1 63X
DG 10X
DG 63X
CA3 10X
CA3 63X

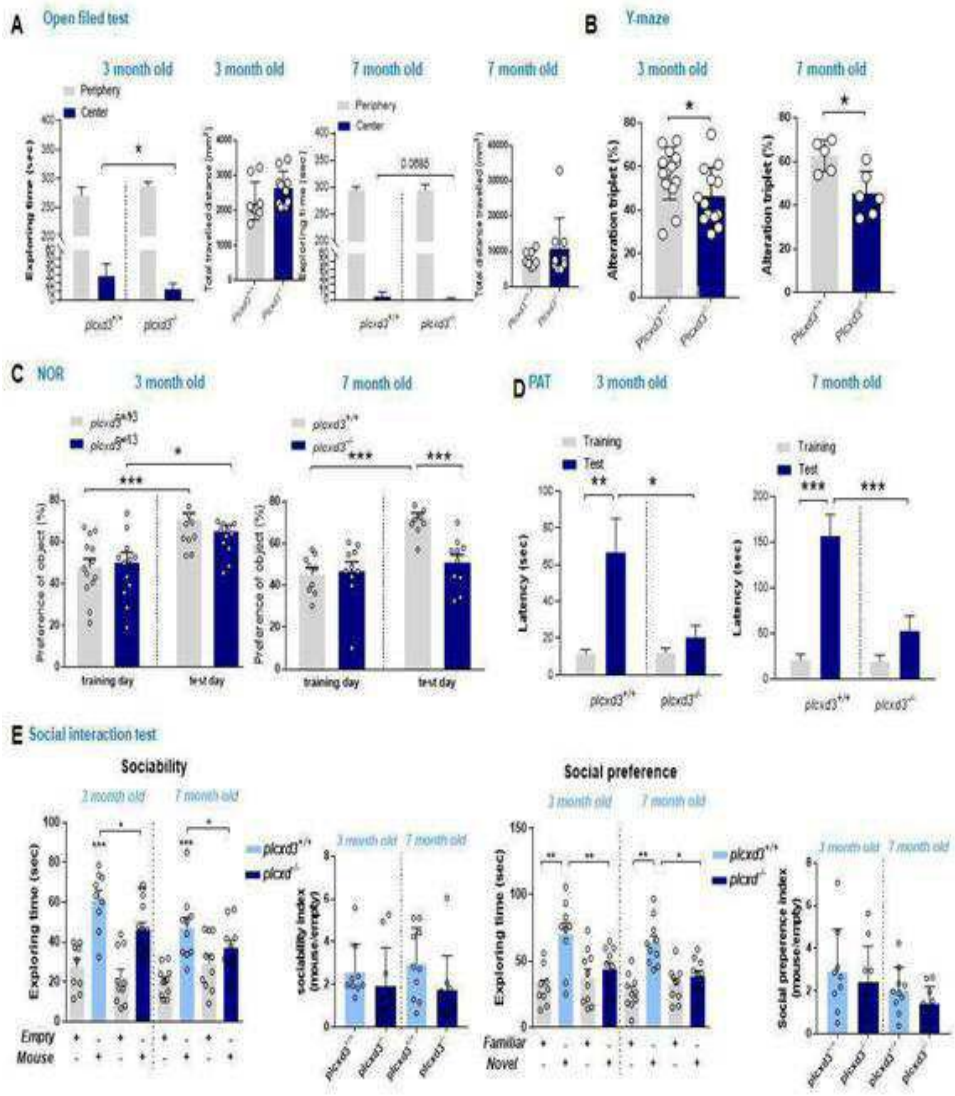
도면3


A
PLCXD3
GluR1
DAPI
Merge
Enlarge
CA1
DG
CA3
H
PLCXD3
GAD67
DAPI
Merge
Enlarge
B
D
F
I
K
M
C
E
G
J
L
N

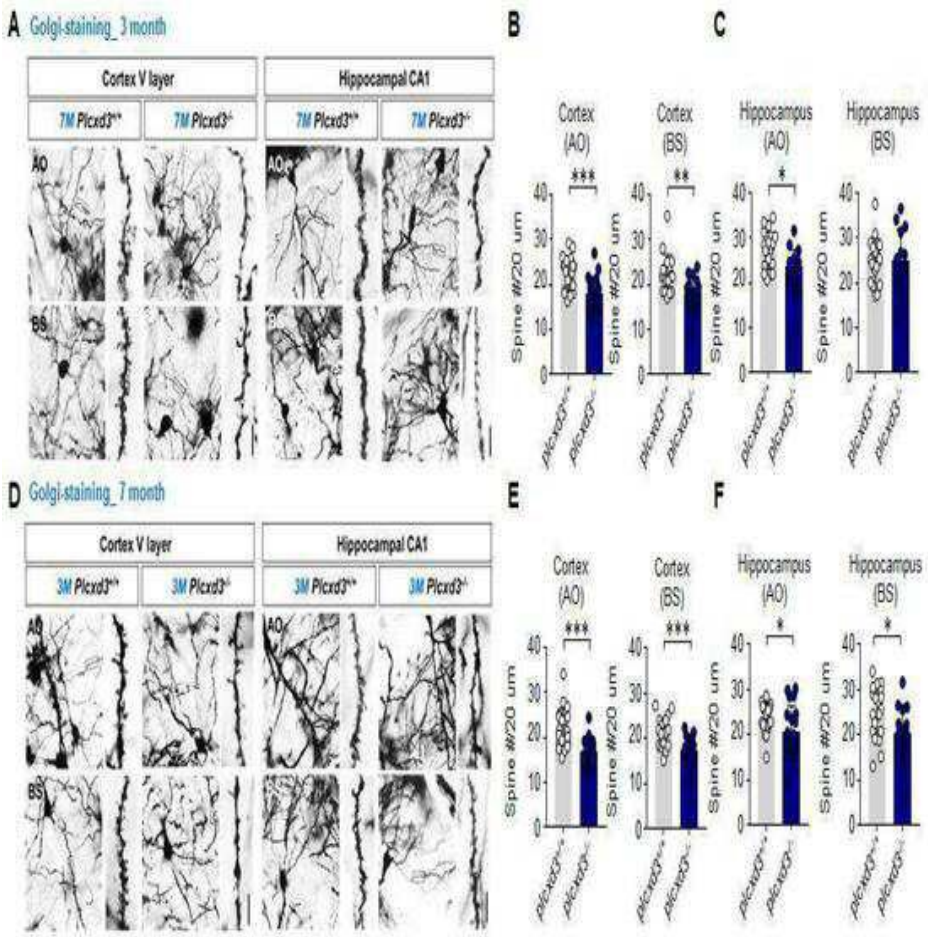
도면4


A CRISPER-Cas9 system
gRNA:
crRNA1: 5'-TCTGGCTGCTCCGGGCCTAC-3'
crRNA2: 5'-TTCAGTGCCAAAGTCAACGA-3'
crRNA3: 5'-GGGTCTGTCGTGTTTGCCCA-3'
B Plcxd3 KO sequence
TTCAGTGCCAAAGTCAACGAGGGTCTCGAAGAGATCAATGCATTTCTCACAGACC-WT
TTCAGTGCCAAAG----------GGTCTCGAAGAGATCAATGCATTTCTCACAGACC (-8bp)-KO
Plcxd3 KO genotyping sequence
Forward: 5'-GTCCCATGATTCCTTCAGCT-3'
Reverse: 5'-TTTCTCTGAGTCCACTTGCCA-3'
D Plcxd3-/- primer sequence
TTCAGTGCCAAAGTCAACGAGGGTCTCGAAGAGATCAATGCATTTCTCACAGACC: WT
TTCAGTGCCAAAG----GGTCTCGAAGAGATCAATGCATTTCTCACAGACC (-8bp)-primer
E
Hippocampus
mRNA
RT-PCR
Primer
q-PCR
C
F1
F2
F3
Plcxd3+/+
Plcxd3+/-
Plcxd3-/-
F
gapdh
Plcxd3
Plcxd3+/+ Hippocampus
Plcxd3-/- Hippocampus
G
***
Plcxd3 mRNA (fold change)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0

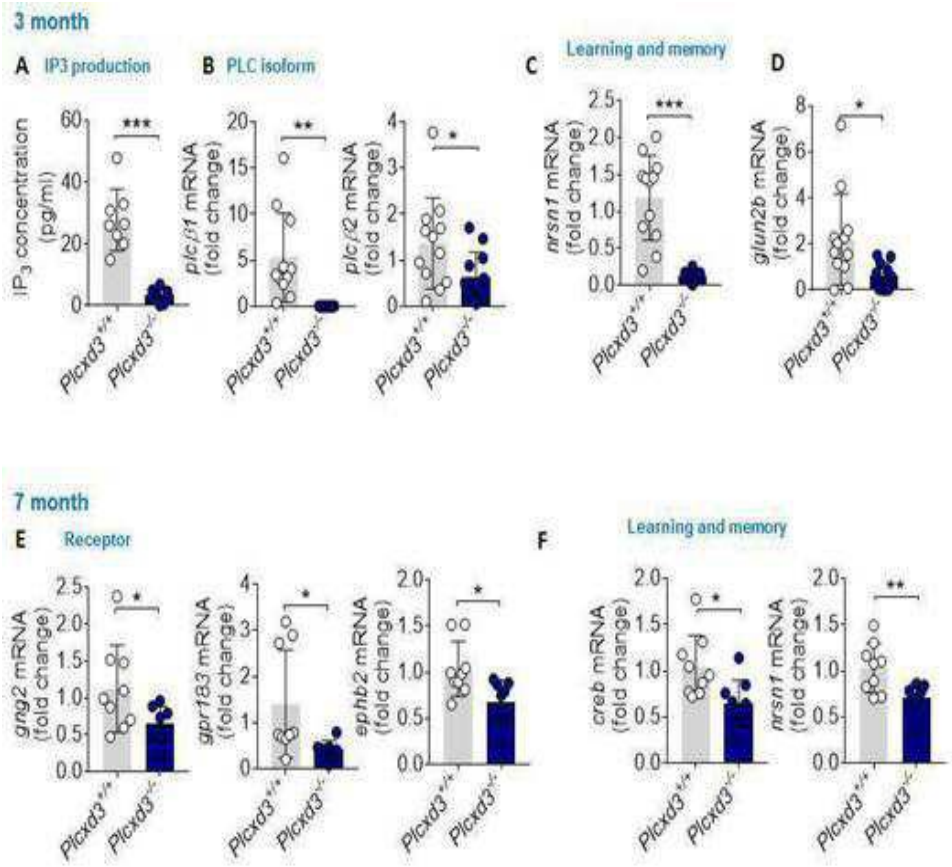
도면5


A Open filed test
3 month old
3 month old
7 month old
7 month old
Periphery
Center
Exploring time (sec)
Total travelled distance (mm)
Exploring time (sec)
Total distance travelled (mm)
plcxd3+/+
plcxd3-/-
B Y-maze
3 month old
7 month old
Alteration triplet (%)
C NOR
3 month old
7 month old
Preference of object (%)
training day
test day
D PAT
3 month old
7 month old
Training
Test
Latency (sec)
E Social interaction test
Sociability
2 month old
7 month old
Exploring time (sec)
Empty
Mouse
sociability index (mouse/empty)
Social preference
Familiar
Novel
Social preference index (mouse/empty)

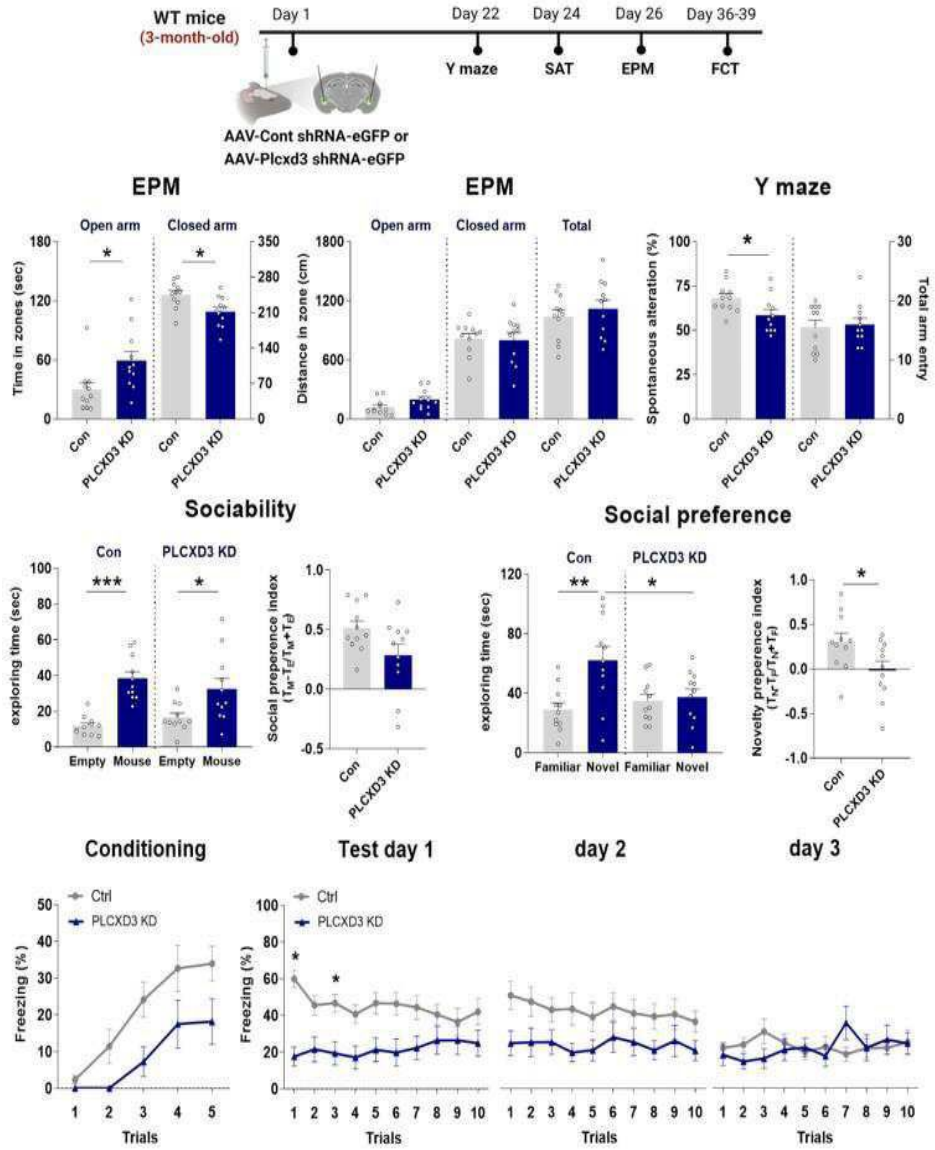
도면6


A Golgi-staining_3 month
Cortex V layer
Hippocampal CA1
7M Plcxd3+/+
7M Plcxd3-/-
AO
BS
B
C
Cortex (AO)
Cortex (BS)
Hippocampus (AO)
Hippocampus (BS)
Spine #/20 um
D Golgi-staining_7 month
3M Plcxd3+/+
3M Plcxd3-/-
E
F

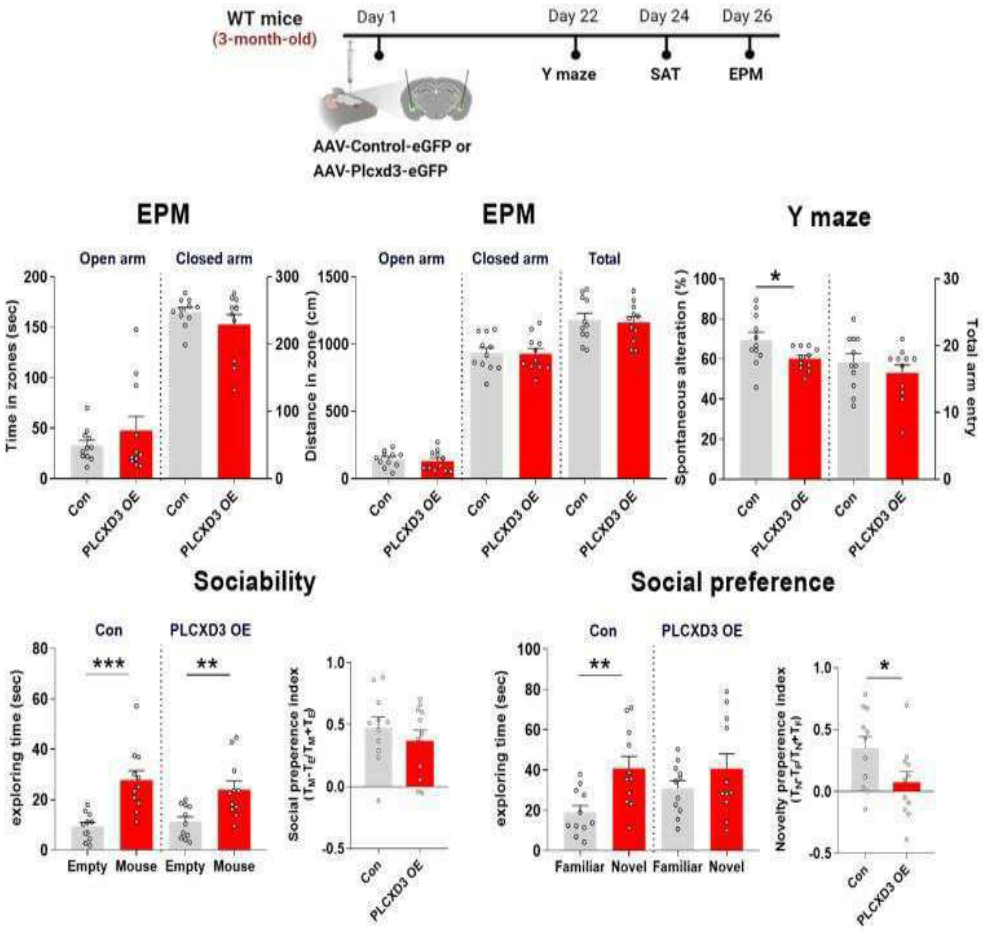
도면7


3 month
A IP3 production
B PLC isoform
C Learning and memory
D
IP3 concentration (pg/ml)
plcβ1 mRNA (fold change)
plcβ2 mRNA (fold change)
nrsn1 mRNA (fold change)
glun2b mRNA (fold change)
Plcxd3+/+
Plcxd3-/-
7 month
E Receptor
F Learning and memory
gng2 mRNA (fold change)
gpr183 mRNA (fold change)
ephb2 mRNA (fold change)
creb mRNA (fold change)
nrsn1 mRNA (fold change)

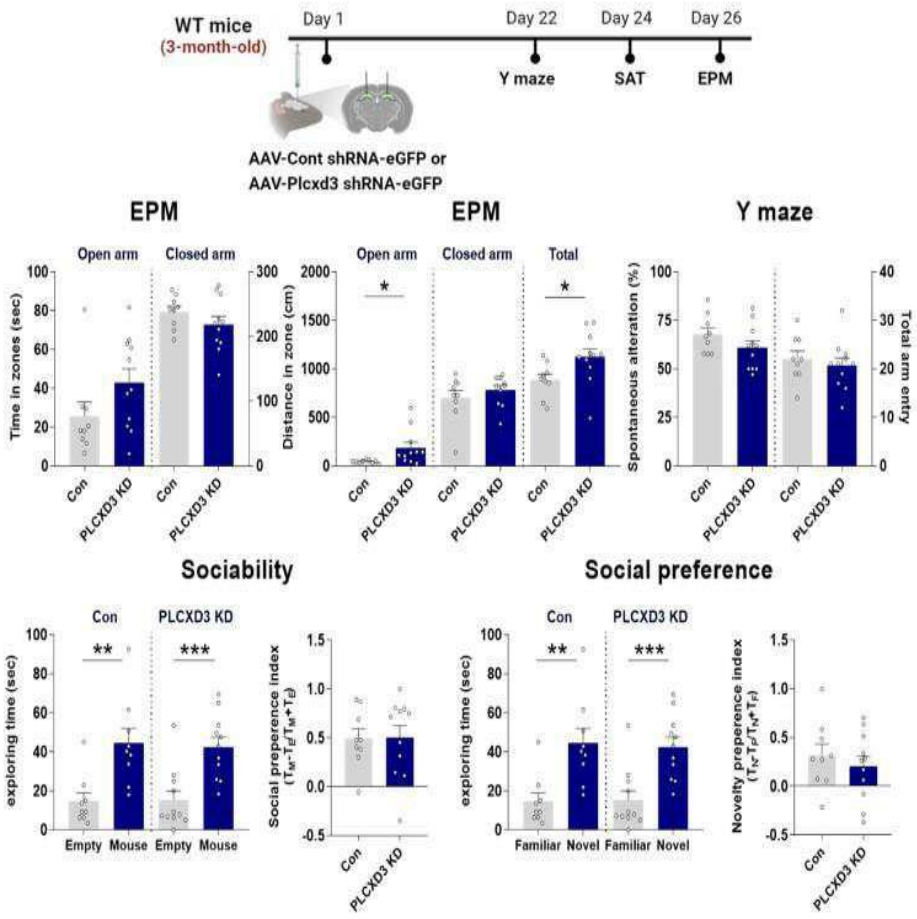
도면8


WT mice
(3-month-old)
Day 1
Day 22
Day 24
Day 26
Day 36-39
Y maze
SAT
EPM
FCT
AAV-Cont shRNA-eGFP or
AAV-Plcxd3 shRNA-eGFP
EPM
Open arm
Closed arm
Time in zones (sec)
EPM
Open arm
Closed arm
Total
Distance in zone (cm)
Y maze
Spontaneous alteration (%)
Total arm entry
Con
PLCXD3 KD
Sociability
Social preference
Con
PLCXD3 KD
exploring time (sec)
Empty
Mouse
Social preference index
Familiar
Novel
Novelty preference index
Conditioning
Test day 1
day 2
day 3
Ctrl
PLCXD3 KD
Freezing (%)
Trials

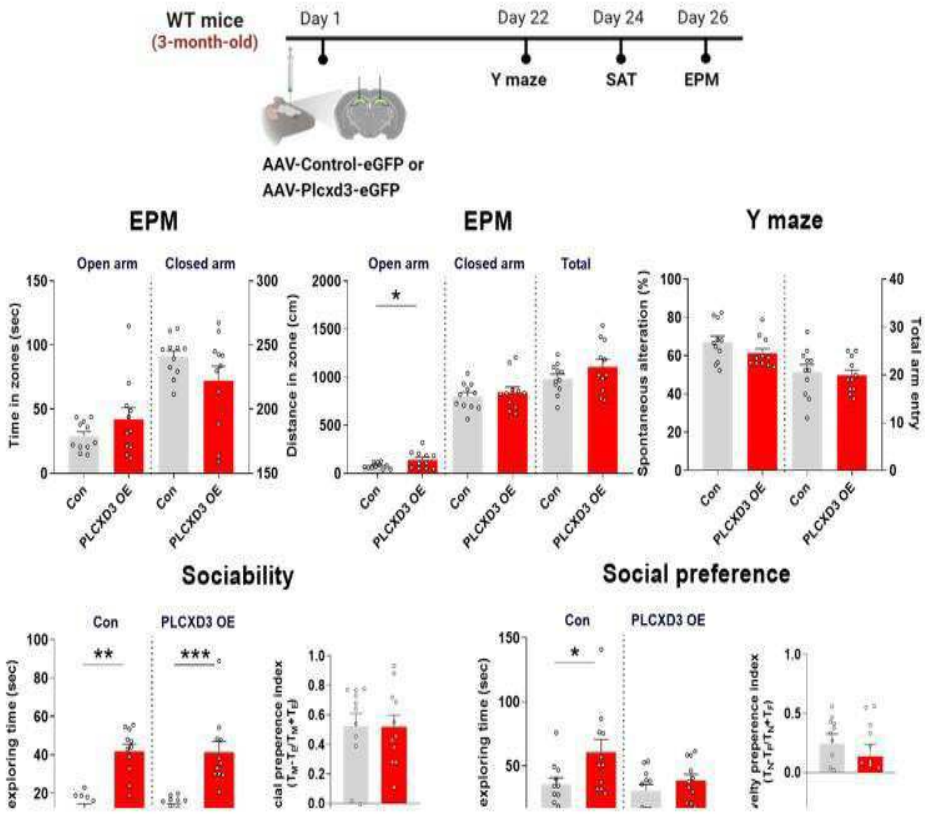
도면9


WT mice
(3-month-old)
Day 1
Day 22
Day 24
Day 26
Y maze
SAT
EPM
AAV-Control-eGFP or
AAV-Plcxd3-eGFP
EPM
Open arm
Closed arm
Time in zones (sec)
Distance in zone (cm)
EPM
Open arm
Closed arm
Total
Y maze
Spontaneous alteration (%)
Total arm entry
Con
PLCXD3 OE
Sociability
Social preference
exploring time (sec)
Empty
Mouse
Social preperence index
Familiar
Novel
Novelty preperence index

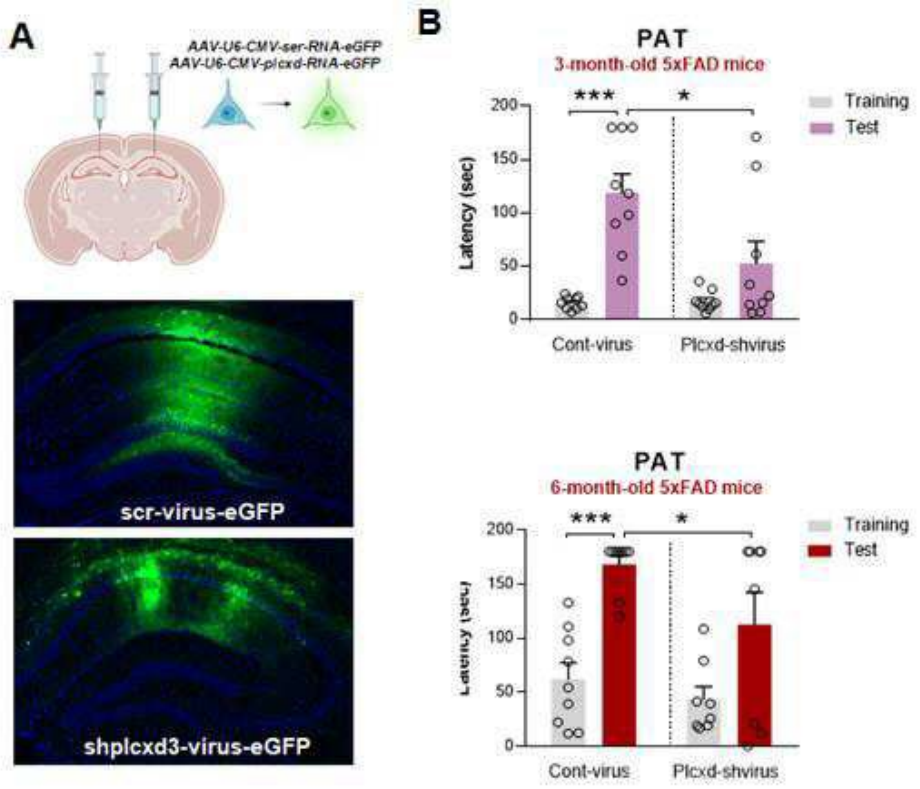
도면10


WT mice
(3-month-old)
Day 1
Day 22
Day 24
Day 26
Y maze
SAT
EPM
AAV-Cont shRNA-eGFP or
AAV-Plcxd3 shRNA-eGFP
EPM
EPM
Y maze
Open arm
Closed arm
Total
Time in zones (sec)
Distance in zone (cm)
Spontaneous alteration (%)
Total arm entry
Con
PLCXD3 KD
Sociability
Social preference
exploring time (sec)
Empty
Mouse
Familiar
Novel
Social preference index
Novelty preference index

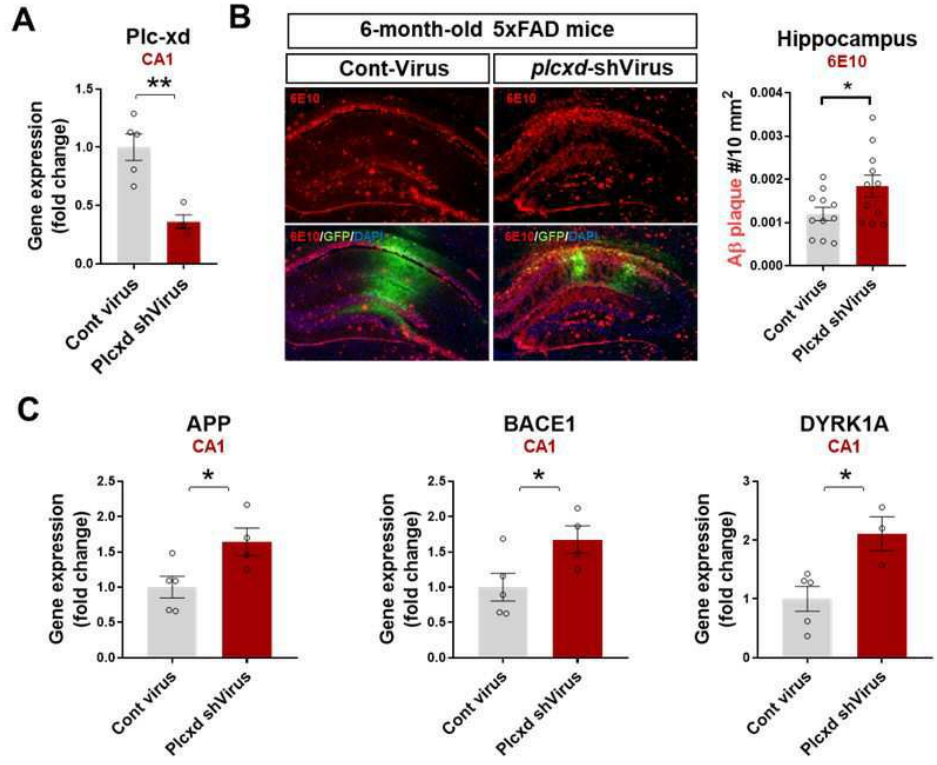
도면11


WT mice
(3-month-old)
Day 1
Day 22
Day 24
Day 26
Y maze
SAT
EPM
AAV-Control-eGFP or
AAV-Plcxd3-eGFP
EPM
Open arm
Closed arm
Time in zones (sec)
Distance in zone (cm)
EPM
Open arm
Closed arm
Total
Distance in zone (cm)
Y maze
Spontaneous alteration (%)
Total arm entry
Con
PLCXD3 OE
Sociability
Social preference
exploring time (sec)

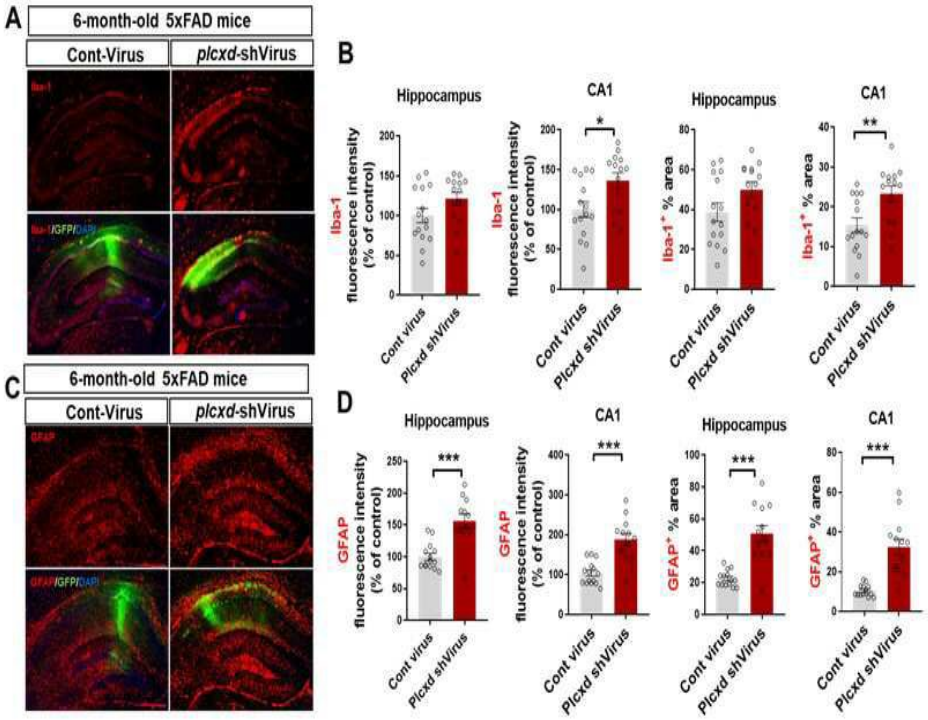
도면12


A
AAV-U6-CMV-scr-RNA-eGFP
AAV-U6-CMV-plcxd-RNA-eGFP
scr-virus-eGFP
shplcxd3-virus-eGFP
B
PAT
3-month-old 5xFAD mice
Training
Test
Latency (sec)
Cont-virus
Plcxd-shvirus
PAT
6-month-old 5xFAD mice
Training
Test
Cont-virus
Plcxd-shvirus

도면13


A
Plc-xd
CA1
Gene expression (fold change)
Cont virus
Plcxd shVirus
B
6-month-old 5xFAD mice
Cont-Virus
plcxd-shVirus
6E10
6E10/GFP/DAPI
Hippocampus
6E10
Aβ plaque #/10 mm2
Cont virus
Plcxd shVirus
C
APP
CA1
BACE1
CA1
DYRK1A
CA1
Gene expression (fold change)
Cont virus
Plcxd shVirus

도면14


A
6-month-old 5xFAD mice
Cont-Virus
plcxd-shVirus
B
Hippocampus
CA1
Hippocampus
CA1
Iba-1 fluorescence intensity (% of control)
Iba-1 fluorescence intensity (% of control)
Iba-1+ % area
Iba-1+ % area
Cont virus
Plcxd shVirus
C
6-month-old 5xFAD mice
Cont-Virus
plcxd-shVirus
D
Hippocampus
CA1
Hippocampus
CA1
GFAP fluorescence intensity (% of control)
GFAP fluorescence intensity (% of control)
GFAP+ % area
GFAP+ % area
Cont virus
Plcxd shVirus

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.