



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0124418
(43) 공개일자 2015년11월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/704 (2006.01) A61K 36/48 (2006.01)
C12N 5/0793 (2010.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/704 (2013.01)
A61K 36/48 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-0124921(분할)
(22) 출원일자 2015년09월03일
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2014-0059758
원출원일자 2014년05월19일
심사청구일자 2014년05월19일
- (30) 우선권주장
1020140049765 2014년04월25일 대한민국(KR)
- (71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
- (72) 발명자
김윤희
서울 강남구 압구정로29길 23, 210동 503호 (압구정동, 현대13차아파트)
김동현
서울 강남구 압구정로29길 71, 20동 902호 (압구정동, 현대아파트)
한마음
서울 중랑구 봉화산로 193, 1102동 608호 (신내동, 신내대명아파트)
- (74) 대리인
손민

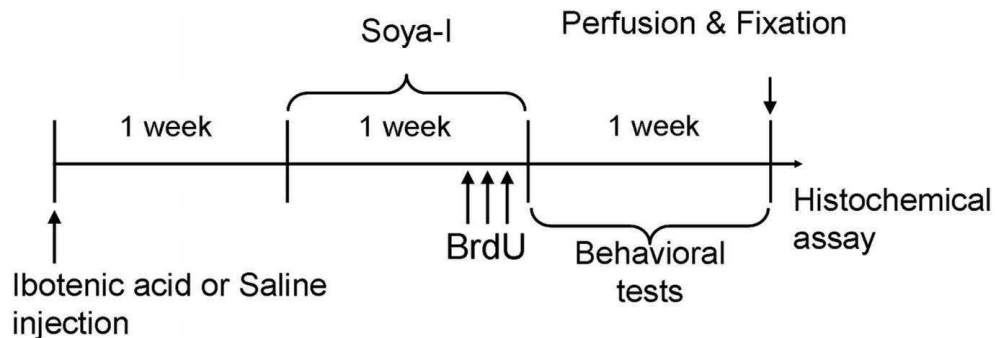
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 소야사포닌-I을 포함하는 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화 촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 소야사포닌-I을 포함하는 신경줄기세포 또는 신경전구세포 분화 또는 증식 촉진용 조성물에 관한 것으로, 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화 또는 증식을 촉진하기 위한 세포배양용 조성물로서 유용하게 사용될 수 있으며, 이식부위에 적합한 신경세포로의 분화 및 재생을 도모하여 퇴행성 뇌질환 및 신경손상으로 인한 각종 신경 질환의 예방 및 치료에 사용될 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

C12N 5/0619 (2013.01)
C12N 2500/76 (2013.01)
C12N 2501/11 (2013.01)
C12N 2501/113 (2013.01)
C12N 2501/115 (2013.01)
C12N 2501/999 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2012M3A9C6049937
부처명	미래창조부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발사업
연구과제명	혈관세포 분비인자에 의한 신경줄기세포 재생기술
기 여 율	2/3
주관기관	고려대학교 의과대학
연구기간	2012.10.01 ~ 2017.09.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2011-0019354
부처명	미래창조부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	바이오의료기술개발사업
연구과제명	줄기세포 Niche에서 Heregulin 신호 전달에 의한 미세환경 변화연구 및 응용기술 개발
기 여 율	1/3
주관기관	가톨릭 의과대학
연구기간	2011.06.01 ~ 2016.05.30

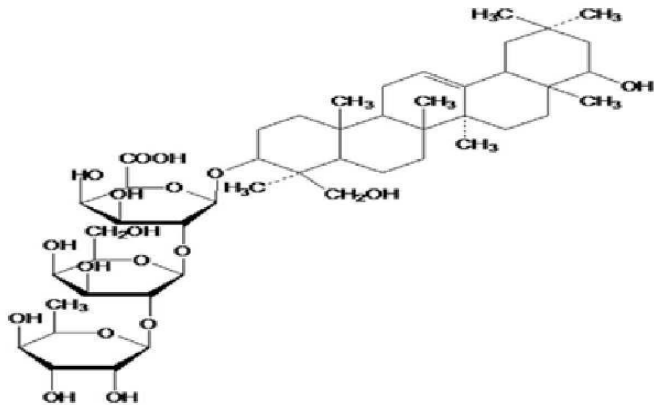
명세서

청구범위

청구항 1

하기의 화합식 1로 표시되는 소야사포닌-I(soyasaponin-I)을 포함하는 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화 촉진용 조성물.

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서,

상기 신경줄기세포 또는 신경전구세포는 체내에서 분리된 또는 내재성 신경줄기세포 또는 신경전구세포인, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 소야사포닌-I은 대두류에서 추출되는, 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 대두류는 콩, 발아콩, 또는 콩나물 중 어느 하나인, 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 증식 또는 분화 유도제를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 유도제는 FGF, EGF, 레티노산(retinoic acid)을 포함하는, 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 포함하는 세포 배양용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 소야사포닌-I을 포함하는 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화 또는 증식 촉진용 조성물, 이를 포함하는 세포 배양용 조성물, 및 신경관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 신경줄기세포(neural stem cell; NSC)는 배아의 발달시 모든 뇌 영역을 형성하는 신경 및 신경교세포의 근원으로, 신경줄기세포는 분열하여 자기 자신과 동일한 세포 또는 분화할 세포를 만드는데, 이때 세포분열이 잘못되거나 필요 없는 세포는 자연사(apoptosis)하게 되며 생존한 세포는 앞으로 어떤 세포로 분화할 것인지 운명을 결정하게 된다.

[0003] 정상동물에서는 성체 시기에도 해마 등 뇌의 일부 부위에는 신경전구세포가 증식하여 사멸한 세포를 대체한다(Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system(1999), Cell 96, 25-34). 퇴행성 뇌질환 또는 뇌손상을 받은 부위에서는 신경세포의 상실이 크게 일어나므로 신경줄기세포의 증식(neurogenesis)이 촉진되어야 한다. 인간의 경우 중추신경계는 물론 말초신경계도 재생이 어려워 퇴행성 뇌질환뿐만 아니라 산업재해, 교통사고 및 전쟁으로 인한 불구자 등이 누적되면서 사회적으로 문제가 되고 있으므로 신경계의 재생에 관한 연구에 많은 관심이 집중되고 있다.

[0004] 특히, 신경발생이 끝난 성체에서, 말초신경이 손상된 경우에는 그 손상된 부위 중 신경말단 쪽의 축색부분(distal stump)은 월러퇴행(Wallerian degeneration)이라고 알려진 과정을 통해 점차 퇴화하며, 중추신경계의 경우 세포와 기질 단백질과 같은 여러 가지 저해물질 때문에 축색 재생은 거의 일어나지 않는다. 따라서, 중추신경 및 말초신경의 손상 시 신경계를 재생하기 위한 기술이 여전히 요구되고 있다.

[0005] 한편, 최근 유럽에서는 퇴행성 뇌질환 환자 특히 파킨슨씨병 환자의 경우 태아에서 얻은 신경줄기세포를 이식하는 것이 임상적으로 적용되고 있는데 이식 후에 환자는 매우 빨리 회복되어 행동이 좋아지지만 3달 내지 1년 후면 대부분의 이식된 세포가 사멸하여 다시 이식해야 하며, 이식을 요하는 환자의 수는 많은 반면 신경줄기세포의 확보는 매우 어렵다는 문제가 있다(Olanow C. W., Kordower J. H., Freeman T. B. (1996) Fetal nigral transplantation as a therapy for Parkinson's disease. Trends Neurosci. 19, 102109).

[0006] 이러한 줄기세포들은 그 배양에 있어서, 특정한 세포적 미세환경(microenvironment) 또는 적소(niche)를 필요로 한다는 것이 줄기세포 생물학의 정설이다. 신경줄기세포를 선택적으로 배양하는 배양 기술도 뉴로스페어(neurosphere) 형성법, 저밀도 배양법, 고밀도 배양법 등이 보고되었으나, 현재까지 배분화 상태의 대규모 배양에서 세포들을 확장하는 것은 어려운 것으로 알려져 있다.

[0007] 따라서, 여러 연구자들이 줄기세포의 대량배양을 시도하고 있지만, 특히 인간 성체 신경줄기세포는 기내배양 자체가 매우 어려우며, 또 그 증식능력 또한 제한되어있어 연구의 답보가 거듭되고 있는 실정이다.

[0008] 한편, 대두는 많은 음식들에서 재료로 널리 이용되고, 항암작용, 항산화작용, 항염증작용, 혈중지방감소작용, 에스트로겐과 같은 작용을 한다. 최근에 대두도 학습과 기억증진을 일으킨다는 보고가 있다. 대두는 이소플라본과 사포닌을 포함하여 많은 식물화학물질을 갖고 있다. 또한 이소플라본은 기억을 증진시키고 항염증작용, 식물 에스트로겐 효과가 있다고 보고되었다.

[0009] 반면에 소야사포닌은 항대장염, 항종양작용, 간기능강화 작용이 있고 에스트로겐과 같은 효과가 있다. 소야사포닌-I의 대사산물인 소야사포게놀 B(Soyasapogenol B)은 인간의 유방암 세포들의 증식을 억제한다는 보고가 있다.

나 소야사포닌-I이 학습과 기억증진 및 신경줄기세포에 어떤 영향을 미치는지에 대해서는 아직 연구되어 있지 않다.

[0010]

이러한 배경 하에, 본 발명자들은 신경계 재생 및 이식용 신경줄기세포의 대량생산을 위하여 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화와 증식을 촉진하는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력한 결과, 소야사포닌-I이 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화 또는 증식을 촉진할 뿐만 아니라, 손상된 신경계를 회복할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011]

본 발명의 주된 목적은 소야사포닌-I(soyasaponin-I)을 포함하는 신경줄기세포 또는 신경전구세포 분화 또는 증식 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0012]

본 발명의 또 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는 세포 배양용 조성물을 제공하는 것이다.

[0013]

본 발명의 또 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는, 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화 또는 증식 촉진에 의한, 신경 관련 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0014]

본 발명의 또 하나의 목적은 상기 조성물을 포함하는, 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화 또는 증식 촉진에 의한, 신경 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015]

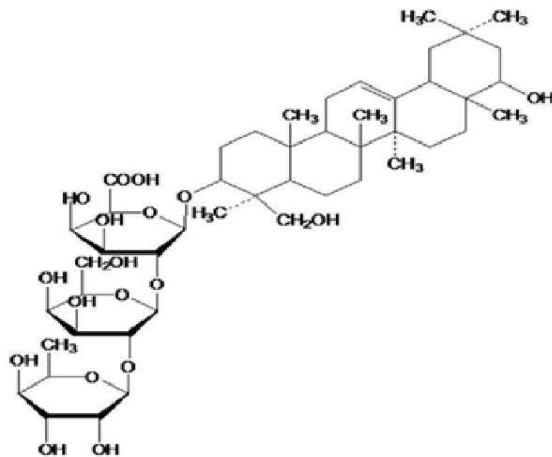
상기의 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 소야사포닌-I(soyasaponin-I)을 포함하는 신경줄기세포 또는 신경전구세포 분화 또는 증식 촉진용 조성물을 제공한다.

[0016]

본 발명에서 용어, "소야사포닌-I"은 하기의 화학식 1로 표시되는 화합물을 말한다.

[0017]

[화학식 1]



[0018]

하나의 구체예로서, 본 발명의 소야사포닌-I은 일반적인 화학합성방법에 의해 합성될 수 있다.

[0019]

[0020]

또 다른 구체예로서, 본 발명의 소야사포닌-I은 대두류에서 추출한 추출물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021]

또 다른 구체예로서, 상기 대두류는 콩, 발아콩, 또는 콩나물 중 어느 하나에서 추출할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 대두류는 상업적으로 판매되는 것을 구입하거나 또는 자연계에서 재배 또는 채취한 것을 사용할 수 있다.

[0022]

본 발명의 용어, "추출물"이란, 목적하는 물질을 다양한 용매에 침지한 다음, 상온 또는 가온 상태에서 일정시간 동안 추출하여 수득한 액상성분, 상기 액상성분으로부터 용매를 제거하여 수득한 고형분 등의 결과물을 의미한다.

- [0023] 이때, 사용되는 용매는 본 발명의 신경줄기세포 또는 신경전구세포 분화 또는 증식 촉진 효과를 갖는 추출물을 수득할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 물, 극성용매 또는 비극성 용매가 될 수 있고, 보다 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올(메탄올, 에탄올, 프로판올 또는 부탄올 등), 이들의 혼합용매 등이 될 수 있으며, 가장 바람직하게는 메탄올 또는 그의 혼합용매를 사용할 수 있다.
- [0024] 또한, 상기 추출물을 수득하기 위한 방법 역시 신경줄기세포 또는 신경전구세포 분화 또는 증식 촉진 효과를 갖는 추출물을 수득할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로 상기 추출은 대두류의 분쇄물을 건조 중량의 약 5 내지 30배, 바람직하게는 약 10 내지 20배에 달하는 부피의 물, 메탄올, 에탄올 등과 같은 탄소수 1(C1) 내지 4(C4)의 저급 알코올과 같은 극성 용매 또는 이들의 약 1:0.1 내지 1:10의 혼합비를 갖는 혼합용매로 용출하여 이루어질 수 있으며, 추출 온도는 20 내지 100℃, 바람직하게는 60 내지 100℃에서, 추출기간은 약 1 시간 내지 4일 동안 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출, 여과 추출 또는 초음파 추출 등의 추출방법을 사용하여 추출한 추출물일 수 있다.
- [0025] 그러나 상기 추출물은 본 발명의 신경줄기세포 또는 신경전구세포 분화 또는 증식 촉진 효과를 나타낼 수 있는 추출물인 한, 이에 제한되지는 않고, 추출액, 추출액의 회석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 이들 조정제물, 정제물, 또는 분획물을 모두 포함할 수 있다.
- [0026] 본 명세서에서 사용된 용어, "분획물"은 상기와 같이 제조된 소야사포닌-I을 포함하는 추출물로부터 특정 성분 또는 특정 그룹을 분리하는 분획방법에 의하여 얻어진 결과물을 의미한다.
- [0027] 본 발명의 조성물에 포함된 상기 소야사포닌-I을 포함하는 추출물 또는 그의 분획물의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 최종 조성물 총중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9 중량%, 보다 바람직하게는 0.01 내지 50 중량%의 함량으로 포함될 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 용어, "신경줄기세포" 또는 "신경전구세포"는 서로 혼용되어 사용될 수 있으며, 경우에 따라서는 신경줄기세포로부터 유래된 세포를 신경전구세포라고 지칭할 수도 있다. 또한 상기 신경전구세포는 "Neural precursor cell" 및 "Neural progenitor cell"을 포함하는 개념으로 사용된다.
- [0029] 하나의 구체예로서, 본 발명에서 이용 가능한 신경줄기세포 또는 신경전구세포는 포유동물의 초기 배아에서 분리한 배아줄기세포 (embryonic stem cell), 배아의 원시 생식세포에서 분리한 배아생식세포(embryonic germ cell) 및 성체에서 분리한 다능성 성체줄기세포(multipotent adult progenitor cell)에서 유래한 것일 수 있으며, 상기 다능성 성체줄기세포는 제대혈, 골수, 지방, 뇌조직 등의 성체 조직 또는 혈액으로부터 유래된 모든 다능성 성체줄기세포일 수 있다. 또한, 위의 배아줄기세포, 배아생식세포, 및 성체줄기세포에 유전자 이입 또는 세포핵을 치환 또는 융합하여 제조된 줄기세포를 포함한다.
- [0030] 본 발명에서 용어, "분화"는 초기 단계의 세포가 각 조직으로서의 특성을 갖게 되는 과정으로, 본 발명에 따른 조성물에 의하여 신경줄기세포 또는 신경전구세포는 그 장소에 적합한 신경전달물질을 분비하는 신경세포로 분화한다.
- [0031] 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명에 따른 소야사포닌-I을 포함하는 조성물은 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화를 촉진함을 기억손상 모델 및 배아 유래 신경전구세포를 통하여 확인하였다.
- [0032] 신경줄기세포의 "증식"은 분화와 상이한 과정으로, 신경줄기세포의 이식을 위하여 다양한 연구자들이 줄기세포의 대량배양을 시도하고 있지만, 특히 인간 성체 신경줄기세포는 기내배양 자체가 매우 어려우며, 그 증식능력 또한 제한되어 있어 연구의 답보가 거듭되고 있는 실정이다. 나아가, 신경줄기세포 증식 및 이식 후에도 많은 줄기세포가 세포 사멸하고, 이식 1년 후에는 이식된 줄기세포가 거의 사멸하여 없어지고 그 효과도 사라지는 문제가 있었다. 따라서, 줄기세포를 이용한 세포치료제의 개발을 위하여, 줄기세포성(stemness)을 유지하고 노화를 최대한 억제하면서, 효과적으로 증식시킬 수 있는 방법을 개발하는 것이 요구되고 있다.
- [0033] 이에, 본 발명자들은 오랜 연구 결과, 본 발명에 따른 소야사포닌-I을 포함하는 조성물이 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 증식을 촉진함을 기억손상 모델 및 배아 유래 신경전구세포에서 확인하였다(실험예 2, 3).
- [0034] 따라서, 본 발명에 따른 소야사포닌-I을 포함하는 조성물은 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 증식을 촉진하는 현저한 효과가 있으므로, 줄기세포의 대량 배양 및 이를 통한 신경계 재생에 효과적으로 사용될 수 있다.
- [0035] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 하나의 양태로서, 본 발명에 따른 조성물은 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화 또는 증식을 촉진하기 위한 세포 배양용 조성물로 사용할 수 있다. 상기 세포 배양용 조성물은 신경세포 부족, 손상과 관련된 각종 질환을 치료하기 위한 대량의 신경줄기세포의 수득을 위하여 이용될 수 있으며, 또한

세포치료에 있어서 세포이식을 위해 체내에서 분리된 신경줄기세포 또는 신경전구세포에 이식 직전에 처리될 수 있다.

[0036] 상기 세포 배양용 조성물은 소아사포닌-I 화합물, 또는 소아사포닌-I을 포함하는 식물 추출물 또는 분획물을 단독으로 포함할 수도 있고, 또는 다른 증식 또는 분화 유도제를 추가적으로 포함할 수 있다. 추가적으로 포함할 수 있는 증식 또는 분화 유도제는 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 증식 또는 분화 유도제로 알려진 어떠한 것도 가능하며, 이에 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어 FGF, EGF, 레티노산(retinoic acid) 등을 포함할 수 있다.

[0037] 신경줄기세포 또는 신경전구세포를 배양하는 배양액에 상기 조성물을 주입할 경우, 세포 생존, 증식 관련 인자 및 전사인자와 같은 생성 또는 분비 단백질에 변화가 생기며 이로 인해 세포의 활성이 변화하게 되고, 특히 세포의 생존 및 증식이 활성화 된다. 따라서, 본 발명에 따른 세포 배양용 조성물에 의하여 증식이 향상되어 대량 생산된 줄기세포를 세포치료제로서 체내의 질환 부위에 이식함으로써 신경세포의 재생을 촉진시킬 수 있으며, 신경 관련 질환들을 효과적으로 치료할 수 있다.

[0038] 상기의 목적을 달성하기 위한 또 하나의 양태로서, 본 발명에 따른 소아사포닌-I을 포함하는 조성물은 신경 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물로 사용될 수도 있다. 상기 약학 조성물은 직접 체내에서 내재성 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 증식을 촉진할 수 있다.

[0039] 상기 신경 관련 질환은 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병, 피크병, 헌팅톤병, 간질, 중풍, 뇌졸중, 허혈성 뇌질환, 퇴행성 뇌질환, 기억력 감퇴, 외상성 중추 신경계 질환, 척수 손상 질환, 말초신경손상, 근위축성 측색 경화증, 말초신경질환, 행동 장애, 발달장애, 정신 지체, 다운증후군 또는 정신분열증을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 또한, 상기 신경 관련 질환은 신경세포의 세포 수 부족, 세포 손상 또는 세포 사멸 등을 원인으로 하는 질환일 수 있다.

[0041] 본 발명에서 사용되는 용어, "예방"이란, 본 발명에 따른 미생물 감염 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 개체에 투여하여 미생물 감염 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0042] 본 발명에서 사용되는 용어, "치료"란, 본 발명의 상기 조성물을 미생물 감염 질환 발병 의심 개체에 투여하여 미생물 감염 질환의 증세가 호전되도록 하거나 이롭게 되도록 하는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0043] 본 발명에서 사용되는 용어, "개선"은 치료되는 상태와 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 적어도 감소시키는 모든 행위를 의미할 수 있다.

[0044] 본 발명의 약학 조성물은 단일제제로도 사용할 수 있고, 공인된 신경 관련 질환 효과를 가진다고 알려진 약물을 추가로 포함하여 복합제제로 제조하여 사용할 수 있으며, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다.

[0045] 본 발명에서 사용되는 용어, "약학적으로 허용 가능한 담체"란 생물체를 자극하지 않으면서, 주입되는 화합물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체 또는 희석제를 의미할 수 있다. 본 발명에 사용 가능한 상기 담체의 종류는 특별히 제한되지 아니하며 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되고 약학적으로 허용되는 담체라면 어느 것이든 사용할 수 있다. 상기 담체의 비제한적인 예로는, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사 용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 등을 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[0046] 또한, 필요한 경우 항산화제, 완충액 및/또는 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가하여 사용할 수 있으며, 희석제, 분산제, 계면 활성제, 결합제, 윤활제 등을 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제 등으로 제제화하여 사용할 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양의 소아사포닌-I을 포함할 수 있다. 본 발명에서 용어, "약제학적으로 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, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여할 수 있다. 그리고 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용을 유발하지 않으면서 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을

투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

- [0048] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0049] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여 방식은 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용하는 방식에 따를 수 있다. 상기 투여 방식의 비제한적인 예로, 조성물을 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다. 본 발명에 따른 약학 조성물은 목적하는 투여 방식에 따라 다양한 제형으로 제작될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 약학조성물의 투여량은 예를 들어, 본 발명의 약학 조성물을 사람을 포함하는 포유동물에 하루 동안 1 내지 20 mg/kg, 보다 바람직하게는 1 내지 10 mg/kg으로 투여할 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다.
- [0051] 본 발명자들은 소야사포닌-I을 포함하는 조성물이 기억손상 모델에서 소야사포닌-I의 신경재생 촉진 효과를 나타내어 학습력 및 기억력을 향상시키며, 신경 관련 질환을 예방, 치료할 수 있음을 확인하였다(실험예 1).
- [0052] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 상기 신경 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경 관련 질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [0053] 본 발명에서 사용되는 용어, "개체"란, 신경 관련 질환이 발병되었거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 상기 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지, 염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0054] 본 발명의 상기 예방 또는 치료 방법은 구체적으로, 신경 관련 질환이 발병하였거나 발병할 위험이 있는 개체에 상기 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0055] 본 발명에서 사용된 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학적 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 경구 또는 비경구의 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있다.
- [0056] 본 발명에서 용어, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 상기 조성물의 적합한 총 1일 사용량은 올바른 의학적 판단범위 내에서 처치의 의해 결정될 수 있으며, 일반적으로 0.001 내지 1000 mg/kg의 양, 바람직하게는 0.05 내지 200 mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1 내지 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 본 발명의 목적상, 특정 환자에 대한 구체적인 치료적 유효량은 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 경우에 따라 다른 제제가 사용되는지의 여부를 비롯한 구체적 조성물, 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 구체적 조성물과 함께 사용되거나 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자와 의학 분야에 잘 알려진 유사 인자에 따라 다르게 적용하는 것이 바람직하다.
- [0057] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 신경 관련 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0058] 상기 소야사포닌-I을 포함하는 대두류는 오랫동안 식량자원으로서 사용되어 안전성이 입증되었으므로, 소야사포닌-I을 포함하는 조성물은 상식할 수 있으면서도 신경 관련 질환의 예방 또는 개선을 도모할 수 있는 식품의 형태로 제조되어 섭취할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 식품 조성물은 식품학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것일 수 있다.
- [0060] 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 소야사포닌-I을 포함하는 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 종류에는 별다른 제한이 없으며, 예를 들어 각종 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다. 상기 식품 조성물에는 신경 관련 질환의 예방 또는 개선 효과에 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.
- [0061] 본 발명에서 사용된 용어 "식품보조첨가제"란 식품에 보조적으로 첨가될 수 있는 구성요소를 의미하며, 각 제형의 건강기능식품을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 식품보조첨가제의 예로는 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 향미제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부

제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 본 발명의 식품보조 첨가제의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[0062] 상기 천연 탄수화물의 예는 포도당, 과당 등의 단당류; 말토스, 수크로스 등의 이당류; 및 텍스트린, 시클로덱스트린 등의 다당류와, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제 (타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0063] 본 발명의 식품 조성물에는 건강기능식품이 포함될 수 있다. 본 발명에서 사용된 용어 "건강기능식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 정제, 캡셀, 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 제조 시에는 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 뛰어나 사용할 수 있다.

[0064] 본 발명의 조성물을 건강기능식품에 포함하여 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 건강기능식품 또는 건강기능식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품의 제조 시에 본 발명의 소야사포닌-I을 포함하는 조성물은 원료 조성물 중 1 ~ 10 중량%, 바람직하게는 5 ~ 10 중량%의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하로도 사용될 수 있다.

[0065] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 농식품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

발명의 효과

[0066] 본 발명에 따른 소야사포닌-I을 포함하는 조성물은 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화 또는 증식을 촉진하는 효과가 있어, 실험용 또는 체내 이식용 신경줄기세포의 대량 배양을 위한 세포 배양용 조성물로 유용하게 사용할 수 있으며, 이식부위에 적합한 신경세포로의 분화, 손상된 신경세포의 재생을 도모하는 효과가 있다.

[0067] 따라서, 본 발명에 따른 소야사포닌-I을 포함하는 조성물은 각종 신경 질환의 예방, 개선, 치료에 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0068] 도 1은 기억손상 모델에서 소야사포닌-I의 효과를 나타낸 것으로, 도 1a는 실험 과정, 도 1b 및 도 1c는 Y자형 미로 실험결과(자발적 변경, 총 진입 수), 도 1d는 수동회피 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 기억손상 모델에서 소야사포닌-I 투여에 따른 신경전구세포의 증식 촉진 효과를 나타낸 것으로, 도 2a는 신경세포 증식 마커인 BrdU를 발현하는 세포를 PI로 염색한 결과를 나타낸 것이고(Sham: 음성대조군, Control: 기억손상 모델(양성대조군), Soya-I: 소야사포닌-I을 투여한 기억손상 모델), 도 2b는 해마 슬라이스 당 BrdU를 발현하는 세포 수를 그래프로 나타낸 것이다.

도 3은 기억손상 모델에서 소야사포닌-I 투여에 따른 신경세포 타입의 변화 및 미세아교세포(microglia)의 활성화 효과를 나타낸 것으로, 도 3a는 신경세포의 특정 마커인 GAD67(가바성 뉴런), VGluT1(글루탐산성 뉴런), ChAT (콜린성 뉴런), OX42(반응성 소교세포)로 면역염색한 결과를 나타낸 것이고, 도 3b는 해마 슬라이스 당 GAD67 발현 세포수, 도 3c는 해마 슬라이스 당 VGluT1 발현 세포수, 도 3d는 해마 슬라이스 당 ChAT 발현 세포수를 나타낸 것이며, 도 3e는 음성대조군(Sham) 대비 OX42의 발현 강도를 나타낸 것이다.

도 4는 기억손상 모델에서 소야사포닌-I 투여 2주 후 동물실험 결과를 나타낸 것으로, 도 4a는 실험 과정, 도 4b, 도 4c는 Y자형 미로 실험결과(자발적 변경, 총 진입 수), 도 4d는 수동회피 실험 결과, 도 4e, 도 4f, 및 도 4g는 모리스 수중 미로 실험 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 기억손상 모델에서 소야사포닌-I 투여 4주 후 새로 증식한 신경전구세포의 소야사포닌-I 투여에 따른 분

화 촉진 효과를 나타낸 것으로, 도 5a는 성숙한 뉴런마커(NeuN)와 세포 아형들의 마커(VGluT1, GAD67)의 발현 결과를 나타낸 것이고, 도 5b는 해마 슬라이스 당 BrdU 발현 세포수, 도 5c는 해마 슬라이스 당 융합세포(merged cell) 수, 도 5d는 ChAT 양성 세포, 도 5e는 해마 슬라이스 당 ChAT 발현 세포수를 나타낸 것이다.

도 6a 및 도 6b는 소야사포닌-I에 의한 신경전구세포의 증식 촉진 효과를 나타낸 것이고, 도 6c 내지 도 6h는 소야사포닌-I에 의한 신경전구세포의 분화 촉진 및 신경돌기 성장 촉진 효과를 나타낸 것이다.

도 7a 내지 도 7c는 소야사포닌-I에 의한 신경세포 분화 효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0070] 실시예 1. 재료의 준비

[0071] 돌베코 수정 이글 배지(Dulbecco's modified eagle media)-F12 배지, Ca²⁺/Mg²⁺-프리 HBSS(Hank's balanced salt solution), bFGF(basic fibroblast growth factor), 트립신-에틸렌디아민테트라아세트산, 이차 항체들 그리고 L-글루타민은 인비트로젠(칼스바트, CA, USA)에서 구매했다. 일차항체들은 Abcam(케임브리지, UK), Chemicon (빌러리카, MA, USA) 그리고 Serotec (키들링턴, UK)에서 구매했다. 이차항체들은 잭슨(웨스트 그로브, PA, USA)에서 구매했다. 이보텐산(IBO), poly-L-ornithine, 프로게스테론, D-(+)-포도당, 푸트레신, 아포트랜스페린, 인슐린, 파이프록토킨, 4-(2-하이드록시에틸)-I-피페라진에탄설포닉산(piperazineethanesulfonic acid), 페놀 레드, 방사성 면역 침전 분석법 완충제, 인산완충식염수(PBS), 포스파타아제 억제자 혼합제, 단백질 분해 효소 억제자 혼합제, 다이메틸설포시아물, 파라포름알데히드(PFA) 그리고 트윈 80은 시그마(세인트 루이스, MO, USA)에서 구매했다.

[0072] 소야사포닌-I(순도 95% 이상)은 Chang et al.(2009)에서 기재한 것과 같이 대두로부터 추출하여 얻었다. 모든 다른 재료는 표준 상업적 출처로부터 얻었다.

[0073] 실시예 2. 기억손상 래트 모델 제작 및 소야사포닌-I의 주입

[0074] (1) 동물의 준비

[0075] 수컷 실험용쥐(200-250g)은 오리엔트 동물 사육센터(찰스리버레보라토리즈의 분점, 경기도, 한국)에서 얻었다. 쥐는 적어도 일주일의 적응기간 동안 한 케이지당 4마리 또는 5마리를 보관하였으며 물과 음식(ad libitum)이 공급되고 일정한 온도(20-23±1℃), 습도(60±10%) 및 주/야(12h/12h) 주기 방식(빛 07:00-19:00시) 조건을 유지되도록 했다. 수술 과정 후 쥐는 사회적 스트레스를 피하기 위해 한 케이지 당 2마리 또는 3마리로 나눠서 보관하였다. 모든 실험들은 NIH와 경희대학교 동물 관리와 사용 가이드라인을 따랐고 경희대학교 약학 대학 동물 관리와 사용 위원회에서 승인을 받았다.

[0076] (2) 기억손상 래트 모델 제작

[0077] 이보텐산은 버섯류에 존재하는 신경독성 물질로서, 쥐나 랫의 뇌에 직접 주입하였을 때 강력한 신경세포의 손상을 야기한다고 알려져 있다. 특히 노인성반점과 신경세포 사멸이 초기 알츠하이머병 환자의 내후각 피질과 해마에서 일어나기 때문에(Ueki A et al. J Neurol Sci, 1994), 이보텐산(IBO)을 내후각 피질에 주사해 기억 손상 모델 쥐를 만들었다. 수술 프로토콜은 Heo H et al. (J Ethnopharmacol, 2009)을 일부 수정하였다. 모델 동물에서 이보텐산 주사는 내비피질뿐만 아니라 해마의 CA 부분, DG부분의 세포사멸을 유도하고 해마와 관련된 학습과 기억능력을 손상시킨다.

[0078] 6주령 쥐를 에퀴테신(equithesin; 350mM 나트륨 펜토바르비탈, 250mM 클로랄 수화물, 85 mM MgSO₄, 40% 프로필렌글리콜 in 10% 에탄올, 2 ml/kg)으로 마취시켰다. 치상회와 해마 그리고 내후각 피질에서 세포사멸을 유도하기 위해 이보텐산을 동물 한 마리당 1.5 μ l, 1 mg/ml로 내후각 피질에 주입하였다. 주입방법은 쥐를 이간 선 3.4mm 아래 앞니 바와 함께 동물 실험용 정위장치(Stoelting Co., Wood Dale, IL, U.S.A.)에 올려두고, 바늘은 정중시상면 오른쪽으로 10° 기울여지게 둔 후, 이보텐산을 내후각 피질과 중간 내후각 피질 안의 3 곳에 1분당 0.35 μ l 속도로 주사하였다(첫 번째, AP: 8.4mm, ML: 4.8 mm, DV: 4.6 to 4.8 mm; 두 번째, AP: 8.4mm, ML: 4.8 mm, DV: 2.6 to 2.8 mm; 세 번째, AP: 8.8 mm, ML: 3.65 mm, DV: 4.8 mm).

[0079] 정상군(Sham 그룹)으로 이보텐산 대신 생리식염수를 같은 자리에 주입하였다.

(3) 소야사포닌-I의 주입

상기 기억손상 래트 중 IBO 그룹에는 담체(2 % Tween 80)을, Soya-I 그룹에는 소야사포닌-I을 각각 5, 10, 20 mg/kg 주입하였다. 담체 또는 소야사포닌-I은 하루에 1 ml을 한번씩 1주 동안 구강 주입 바늘(구강 존트 바늘, 9cm)을 사용해 삽관하여 구강 주입하였고 구토 반응은 관찰되지 않았다.

실험예 1. 소야사포닌-I의 학습능력과 기억능력 증진 효과 확인

실시에 2에 따른 기억손상 래트 모델에서 소야사포닌-I이 해마에서 신경세포의 재생을 증가시켜 손상된 학습능력과 기억능력을 향상시키는지 확인하기 위하여 도 1a에 도시된 과정으로 Y자형 미로 실험, 수동 회피 실험, 모리스 수중 미로 실험, 면역 조직 화학 분석 실험을 진행하였다.

(1) Y자형 미로 실험

Y자형 미로 실험을 행동실험 중 가장 먼저 수행하였다. 수행방법은 Heo H et al.(J Ethnopharmacol, 2009)에 기재된 내용을 참조하였다.

미로는 검은색의 아크릴로 구성되어있고 수평면에 놓여있다. 쥐는 그룹별로 나뉘었고(그룹 3 n=12, 그룹 2 n=12, 그룹 1 n=5-6) 30분 동안 Y자형 미로 실험을 하는 방에서 적응시켰다. 쥐를 Y자형 미로 팔 끝에 놓고 8분 동안 미로에서 자유롭게 움직이도록 하였다. 미로 팔에 들어가는 시간은 쥐의 뒷발이 완전히 팔 안에 들어갔을 때 기록하였다. 3개의 팔에 번갈아가며 연속적으로 들어가는 것은 연속적으로 들어가는 것으로 정의하였고 교체 퍼센트는 실제 교체/가능한 교체(팔의 전체 수-2)*100 의 비율로 측정되었다.

실험결과는 도 1b 및 도 1c에 도시하였다.

(2) 수동 회피 실험

수동 회피 실험은 Y자형 미로 실험과 같이 각 그룹당 같은 수의 쥐로 Heo H et al.(J Ethnopharmacol, 2009)에 기술한 것과 같이 수행하였다. 이 실험은 서틀 방과 함께 반자동의 시스템으로 이루어져 있다. 이 쥐들은 빛이 켜질 때 아크릴 문을 통해 어두운 방으로 들어가서 빛을 피하도록 훈련받았다. 이 훈련은 3~4일 동안 쥐가 20초 내에 어두운 방으로 들어갈 때까지 하루에 세 번 반복 하였다(적응). 이번 연구에서 모든 쥐는 마지막 훈련하는 날 20초 내에 어두운 방으로 들어가는 훈련을 성공적으로 했다. 훈련 마지막 날 적응 훈련을 수행한 후 쥐는 밝은 방에 놓였고 어두운 방으로 들어갔을 때 문을 손으로 닫고 전기 충격(1mA)을 석쇠를 통해 3초 동안 발에 주었다. 정확히 적응 훈련 24시간 후에 쥐는 다시 밝은 방에 놓이고 어두운 방에 들어가는 대기 시간(latency time)을 720초 동안 측정하였다(감금 실험).

실험결과는 도 1d에 도시하였다.

(3) 모리스 수중 미로 실험

모리스 수중 미로 실험은 둥글고 녹슬지 않고 내부 표면이 하얀 폴(지름 160 cm; 높이 60 cm)에서 수행하였다 (13주 노화 쥐, 정상군 n=13, 이보텐산 그룹 n=13, 소야-I n=6). 폴은 50cm 깊이로 물(23.0 ± 1.0 °C 유지)을 채웠다. 눈에 보이지 않는 플랫폼(15 cm, 둥글고 흰색)은 물표면 1.0cm 아래에 숨겨졌고 북동사분면의 중앙에 놓였다. 각각의 쥐는 숨겨진 플랫폼을 찾도록 4일 동안 하루에 한 번씩 훈련을 하였다. 훈련은 쥐를 무작위로 4개의 사분면 중 하나의 폴 벽을 마주보도록 물속에 두면서 시작했다. 모든 4개의 사분면은 매일 한 번씩 사용되었다.

각각의 훈련 동안 쥐를 최대 60초 동안 플랫폼을 찾도록 하였고 플랫폼을 찾고 1분 동안 휴식시켰다. 4개의 사분면 테스트의 평균 시간은 훈련하는 날 그룹당 탈출 대기 시간으로 정의하였다. 훈련 마지막 날에 플랫폼이 제거된 폴에서 쥐를 검증 실험하였다. 쥐를 60초 동안 플랫폼이 제거된 검증 구역을 찾도록 수영시켰다. 수영 시간과 훈련 길이는 기록되고 비디오카메라를 통해서 감시되었다. 추적은 하얀 배경의 검은 지점에 지시된 흰쥐의 궤적을 따라 수행하였다. 캡처된 비디오 사진은 비디오 추적 시스템(Ethovision 수중 미로 프로그램, Noldus 정보 기술, 워게닝겐, 네덜란드)으로 분석하였다. 분석된 정보는 타겟 사분면에서 수영한 시간과 제거된 플랫폼을 찾기 위해 가상의 플랫폼을 건너는 횟수를 포함한다.

(4) 면역 조직 화학 분석 BrdU

상기 3개의 행동 실험 후 면역조직화학 분석을 위해 쥐를 희생하였다.

각 정상군(Sham), IBO 그룹, 소야-I 그룹의 실험동물에 대한 뇌 절편 면역염색 방법은 Heo H et al.(J

Ethnopharmacol, 2009)에 기술한 것을 수정하여 사용하였다. 쥐를 4% PFA in PBS로 경심 관류하였다. 4시간 동안 4% PFA in PBS로 담가 고정된 후에 뇌 조직은 30 % 수크로오스 in PBS에서 비냉동화했고 최적의 절단 온도 (OCT) 혼합물로 얼리고 -80℃에서 보관하였다.

[0097] 뇌 조직 조각은 35 μ m두께의 관상면을 통해 차가운 곳에서 잘랐다. 뇌 조직 절편은 저장 용액(30 % 글리세롤, 30 % 에틸렌글리콜 in PBS)에 담가 4℃에서 보관하였다. 보관된 뇌 조각은 0.5 % 트리톤 X-100에서 20분 동안 투과하고, 37℃에서 30분 동안 2 N HCl에서 배양했다. 그 후, 15% 표준 혈청과 3% 소 혈청 알부민(BSA, bio-WORLD, 더블린, OH, USA) 그리고 0.1% 트리톤 X-100에서 2시간 동안 자유롭게 떠있는 상태로 블로킹하였다.

[0098] 상기 조각을 16시간 동안 4℃에서 1차 항체인 항-브로모오시유리딘(Bromodeoxy uridine; BrdU, 시그마) 항체와 함께 배양하였다.

[0099] 2차 항체는 Alexa Fluor 488 (1:1,000, 인비트로젠), Cy2 (1:500, 잭슨) 그리고 Cy3(1:500, 잭슨)이 결합한 항체를 사용하였다. 핵은 1 μ g/ml PI(propidium iodide, 시그마)로 5분 동안 대비염색 하였다. 면역염색된 조각은 공초점 현미경(LSM510, 칼자이스, 오버코헨, 독일)로 스캔하였다.

[0100] 상기 (1)에서 나온 그룹당 5마리 이상의 동물이 면역 조직 화학 분석을 위해 사용되었다. 결과는 도 2a 및 도 2b에 도시하였다.

[0101] **(5) 면역 조직 화학 분석 VGluT1, ChAT, GAD67, OX42**

[0102] 상기 (4)의 면역염색에서 1차 항체를 항-BrdU 항체 대신, VGluT1(1:500비율로 희석, 케미콘), ChAT(1:500, 케미콘), GFAP(1:1,000, 케미콘), 티로신 히드록실라제(tyrosine hydroxylase; TH, 1:500, 케미콘), 및 OX42(CD11b/c, 1:250, Serotec)에 대한 항체로 바꾸어 수행하였다. 37℃에서 30분 동안 2 N HCl에서 배양하는 과정을 제외하고는 동일하게 진행하였다.

[0103] 결과는 도 3a 내지 도 3e에 도시하였다.

[0104] **실험예 2. 소야사포닌-I의 주입 2주후 행동실험 및 면역조직화학분석**

[0105] 실험예 1은 소야사포닌-I 주입 후 바로 행동실험을 진행한 반면, 실험예 2는 새롭게 생겨난(new-born) 신경전구세포의 증식 촉진 효과를 확인하기 위하여, 소야사포닌-I 주입 2주 후에 2주 동안 도 4a에 도시된 과정과 같이 Y자형 미로실험, 수동 회피 실험, 모리스 수중 미로 실험을 포함한 행동실험을 진행하였다.

[0106] 만약 일주일 안에 새롭게 생겨난(new-born) 신경전구세포가 생존, 증식하여 신경네트워크로 들어가서 신경세포의 아형들이 증가하게 되면 기억형성은 유지될 수 있으므로, 소야사포닌-I 주입 후 신경전구세포가 새롭게 생겨나는 기간을 고려하여, 기간을 두어 실험을 진행한 것이다.

[0107] **(1) 행동 실험**

[0108] 실험예 2와 동일하게 Y자형 미로 실험, 수동 회피 실험, 모리스 수중 미로 실험을 진행하였다. 실험 결과는 도 4b 내지 도 4g에 도시하였다.

[0109] **(2) 면역 조직 화학 분석**

[0110] 소야사포닌-I 경구투여 4주 후에 새롭게 탄생한 신경전구세포들의 생존과 분화가 일어나는지 확인하기 위하여, BrdU를 발현하는 세포들이 성숙한 뉴런마커와 세포 아형들의 마커(NeuN, VGluT1, GAD67)를 동시에 발현하는지 관찰하였다.

[0111] 상기 3개의 행동 실험 후 면역조직화학 분석을 위해 쥐를 희생하였다. 한 그룹 당 5마리 이상의 동물이 면역 조직 화학 분석을 위해 사용되었다.

[0112] 실험예 2의 (4)와 동일하게 진행하고, BrdU/아류형 세포 표지자(GAD64, VGluT1, NeuN)의 이중 염색을 위해 20분 동안 0.5 % 트리톤 X-100에서 투과한 후 37℃에서 30분 동안 2 N HCl에서 배양하였다.

[0113] 실험결과는 도 5a 내지 도 5e에 도시하였다.

[0114] **실험예 3. 소야사포닌-I의 배아 신경전구세포 분화 및 증식에 대한 효과 확인**

[0115] 소야사포닌-I이 신경전구세포의 증식과 분화를 직접적으로 유도하는 효과가 있는지 확인하기 위하여 배아에서 분리된 신경전구세포를 분리, 배양하여 면역 블로팅 실험 및 면역세포화학 분석을 진행하였다.

- [0116] **(1) 배아 신경전구세포의 분리 및 배양**
- [0117] 임신한 실험용 쥐는 스프라그 돌리(Sprague-Dawley)로 오리엔트 동물 사육 센터(찰스리버레보라토리즈의 분점, 경기도, 한국)에서 구입하고 CO2 흡입에 대한 노출로 죽였다. 해마 유래 신경전구세포(NPC)는 E16 쥐 배아의 뇌로부터 분리되었다. 분리 시 Shin MH et al(Exp Mol Med, 2002)의 방법을 약간 수정하여 사용하였다.
- [0118] 해마는 배아의 전뇌로부터 무균 상태로 잘게 절단하고 기계적으로 Ca²⁺/Mg²⁺-free HBSS(Hank's balanced salt solution)에서 분리하였고, 15 μ g/ml의 폴리-L-오르니틴(poly-L-ornithine)과 1 μ g/ml의 피브로넥틴으로 미리 코팅된 60mm 디쉬에 7x10⁵ 세포/cm²로 심었다. 신경전구세포들은 3일 동안 10 ng/ml bFGF in 5 % CO₂가 첨가된 N2 배지에서 배양한 후 무혈청의 0.05 % 트립신-EDTA(ethylenediaminetetra acetic acid)을 처리하여 세포를 떼어내고 12mm 유리 커버글라스(벨코, 바인랜드, NJ, USA)에 신경전구세포를 심어서 10 ng/ml bFGF in 5 % CO₂가 첨가된 N2 배지에서 하루 더 배양하였다(일차배양).
- [0119] **(2) 면역세포화학 분석 - Ki67**
- [0120] (1)의 일차배양 이후, 소야사포닌-I의 배아 신경전구세포의 증식에 대한 효과를 확인하기 위하여 Ki67 항체를 사용하여 면역세포화학 분석을 진행하였다.
- [0121] 먼저, 신경전구세포들을 bFGF가 없는 N2 배지에서 11일 동안 12mm 유리 커버글라스(Bellco Co., 바인랜드, NJ, USA) 위에서 2x10⁴ 세포/웰로 배양하였다.
- [0122] 상기 배양된 신경전구세포(NPCs)의 면역염색은 수정해서 예전에 기술한 것처럼 수행하였다(Donaldson JG (2001) Immunofluorescence staining. Curr Protoc Cell Biol Chapter 4: Unit 4 3).
- [0123] 다음 날 각각 담체(디메틸 술폰) 또는 0.5, 1, 2 μ M 농도의 소야-I을 배지에 첨가하고 세포들을 4에서 15분 동안 4% PFA in PBS로 고정시켰다. 세포들에 5분 동안 0.5 % 트리톤 X-100을 투과시켰고 상기 세포를 5% 표준 혈청(표준 당나귀, 염소, 그리고 말 혈청의 혼합물)으로 1시간동안 실온에서 블로킹 하였다.
- [0124] 일차 항체인 anti-Ki67(1:500, Abcam) 항체와 함께 1시간동안 실온에서 배양하였다. Cy3, Cy5 (1:700, 잭슨) 또는 Alexa 488 (1:1,000, 인비트로젠)이 결합된 이차 항체들이 사용되었다. 핵은 1 μ g/ml PI로 5분 동안 대비 염색하였다. 면역 염색된 세포들은 공초점 레이저 현미경(LSM10, 칼자이스)으로 스캔하였다.
- [0125] 실험결과는 도 6a 및 도 6b에 도시하였다.
- [0126] **(3) 면역세포화학 분석 NeuN, GFAP, TUJ1, MAP2**
- [0127] (1)의 일차배양 이후, 신경전구세포의 분화 및 분화된 신경세포의 증식을 확인하기 위하여, 신경전구세포들을 bFGF가 없는 N2 배지에서 12mm 유리 커버글라스(Bellco Co., 바인랜드, NJ, USA) 위에서 2x10⁴ 세포/웰로 4일 동안 배양하였다. 다만, GFAP와 NeuN 그리고 TUJ1와 MAP2 이중 면역염색하는 경우에는 2일 동안만 배양하였다.
- [0128] 상기 배양된 신경전구세포의 면역염색은 수정해서 예전에 기술한 것처럼 수행하였다(Donaldson JG (2001) Immunofluorescence staining. Curr Protoc Cell Biol Chapter 4: Unit 4 3).
- [0129] 다음 날 각각 담체(디메틸 술폰) 또는 0.5, 1, 2 μ M 농도의 소야사포닌-I을 배지에 첨가하고 세포들을 4℃에서 15분 동안 4% PFA in PBS로 고정시켰다. 세포들에 5분 동안 0.5 % 트리톤 X-100을 투과시켰고 상기 세포를 5% 표준 혈청(표준 당나귀, 염소, 그리고 말 혈청의 혼합물)으로 1시간동안 실온에서 블로킹 하였다.
- [0130] 상기 세포들을 일차 항체인 anti- GFAP(1:1,000, 케미콘), anti-NeuN(1:500, 케미콘), anti-MAP2(1:2,500, 시그마), 및 anti-TUJ1(1:2,000, 시그마) 항체들과 함께 1시간동안 실온에서 배양하였다. 이차 항체 및 이후의 염색, 스캔방법은 (2)와 동일하게 사용하였다.
- [0131] 실험결과는 도 6c 내지 도 6h에 도시하였다.
- [0132] **(4) 면역 블로팅 실험 - VGluT1, ChAT, GAD65/67**
- [0133] (1)의 일차배양 이후, VGluT1, ChAT, 그리고 GAD65/67의 면역블로팅 법을 위해 상기 배양된 해마의 신경전구세포들을 단백질 분해효소 억제자 혼합물을 포함하고 있는 차가운 RIPA 완충 용액 80 μ l에서 용해하였다. 10분 동안 13,000 x g에서 원심 분리 후 상층액은 에펜도르프 튜브로 나누었고 -80℃에서 보관하였다.
- [0134] 단백질 정량 분석법은 브래드퍼드 단백질 분석 키트(바이오 래드, 헤라클래스, 캘리포니아, USA)를 사용해서 수

행하였다. 면역블로팅 분석법을 위해 샘플 로딩 완충 용액(바이오세상 회사, 서울, 한국)과 20 μ g의 단백질 혼합물을 10분 동안 100℃에서 끓였다. 변성된 단백질은 10 % 폴리아크릴아미드 겔 전기영동으로 2.3시 간동안 100 V에서 분리하였고 2-3시간 동안 100 V에서 0.2 μ m 니트로셀룰로오스 막으로 옮겼다.

이후, 상기 막은 다음 과정마다 0.1% 트윈-20 PBS로 15분 동안 3번 씻었다: 5% 탈지분유에서 1시간 블로킹하는 과정, 4℃에서 VGluT1 (1:400, 케미콘), GAD65/67(1:500, 케미콘), ChAT(1:400, 케미콘) 그리고 β -액틴 (1:1,000, 산타크루즈, 델라웨어, 캘리포니아, USA)에 대한 일차항체들로 하룻밤 동안 배양하는 과정, 및 실온에서 이차 항체들로 1시간 배양하는 과정.

실험결과는 도 7a 내지 도 7c에 도시하였다.

(5) 정량화와 통계

한편, 상기의 실험예에서 세포 수 계산은 Park HJ et al.(Phytother Res, 2008)에 보고된 것과 같이 수행하였다.

또한 세포체보다 두 배 더 긴 신경 돌기를 가진 MAP2-양성 세포의 신경 돌기 하나 당 평균 길이는 커버 글라스에서 배양된 것에서 무작위하게 골라진 10~12 공초점 현미경 영역에서 계산했다. 첫 번째 지점이 세포체 너비의 2배보다 클 때 세포체로부터 바로 더 커진 첫 번째 지점을 계산했다. 일차와 이차 지점으로부터 나온 모든 두 번째 그리고 세 번째 지점들을 각각 계산했다. 또한 지점들의 수는 또한 뉴런 세포들이 길러지고 MAP2 항체들로 면역염색된 각각의 커버글라스에서 무작위로 골라진 10~12 공초점 현미경 영역에서 계산하였다. 신경돌기의 길이와 지점들의 수 분석은 LSM 이미지 분석기 버전 2.80(칼자이스)로 수행하였다.

면역 조직 화학 분석법에서 각각의 항체로 면역 염색된 세포의 수는 5 또는 6 해마의 관상단면에서 계산했다. 각각의 염색 분석을 위해 뇌 조직의 해마 영역의 5번째 절편(AP: 브레그마 -4.5 에서 -4.3mm)이 면역염색을 위해 사용되었다. 면역 염색된 세포의 수는 하나의 뇌 조각의 해마 영역에서 평균 세포 수로 나타났다.

소야사포닌-I 주입 1주 그리고 4주 후의 뇌 조각 샘플에서 VGluT1 그리고 GAD-양성 세포들은 현미경 영역(x400-VGluT1, x800-GAD67)당 세포의 수 그리고 뇌 조각의 각각의 해마영역(10-12 공초점 현미경 영역)당 ChAT-양성 세포들로 나타났다. 한 그룹 당 5에서 11마리의 동물이 사용되었다. 웨스턴 블로팅한 막은 LAS-4000 미니(후지 필름 생명과학, 스탬퍼드, CT, USA)의 멀티-게이지, 바이오-이미지화 프로그램을 사용해 분석했다. VGluT1/ β -액틴, GAD65/67/ β -액틴 그리고 ChAT/ β -액틴 발현 비율의 밀도계 분석은 담체 그룹에 표준화되었다.

모든 행동 데이터, 세포 계산 데이터 그리고 밀도계 데이터는 평균표준오차로 표현했고 통계적 유의성은 뉴먼-쿨스 다중 비교 검증 또는 쌍이 아닌 t 검증(그래프 패드 프리즘, 버전 5.01) 후 일원 분산 분석(ANOVA) 사용해서 분석했다. 검증력 분석은 G*검증력 버전 3.1.7을 사용하여 수행하였다(Faul F et al., Behav Res Methods, 2009). 통계적 유의성은 p<0.05로 설정하였다.

실험결과 1. 기억손상 모델에서 새로 탄생한 신경전구세포에 대한 소야사포닌-I의 분화 및 증식 촉진 효과(실험예 2)

일주일 안에 새롭게 생겨난(new-born) 신경전구세포의 증식이 촉진되어 신경네트워크로 들어가게 되고 신경세포의 아형들이 증가하게 되면 기억형성이 유지되는 결과가 나타날 수 있으므로, 소야사포닌-I이 신경전구세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보기 위하여 실험한 행동실험 결과를 도 4b 내지 도 4g에, 면역 조직 화학 분석 결과를 도 5a 내지 도 5e에 도시하였다.

(1) Y자형 미로 실험 결과

도 4b 내지 도 4c와 같이, Y자형 미로 실험에서 기억손상 모델 전체 그룹에서 입장(entry) 수는 모든 그룹 간에 큰 차이가 없었던 반면, 소야사포닌-I을 투여하지 않은 그룹(IBO)과 비교했을 때, 투여할 경우, 전체 자발적 변경(spontaneous alteration)이 78.57%로 눈에 띄게 증가했다(뉴먼-쿨스 다중 비교검증법 이용, ### p < 0.001, IBO 그룹을 정상군과 비교, 뉴먼-쿨스 다중 비교검증법 이용, ** p < 0.01, 소야사포닌-I 10mg/kg 그룹을 IBO 그룹과 비교; F2,27 = 25.57, 일원배치 분산분석 이용, p < 0.0001).

(2) 수동 회피 실험 결과

도 4d와 같이, 수동회피실험에서 기억손상 모델에 소야사포닌-I을 투여하지 않은 그룹(IBO)과 비교했을 때, 투여할 경우, 지연시간(latency time)이 현저하게 회복되었고 정상군의 89.65%까지 증가하였다(뉴먼-쿨스 다중 비교검증법 이용 ### p<0.001, IBO 그룹을 정상군과 비교함, 뉴먼-쿨스 다중 비교검증법 이용 *** p<0.001 소야사

포닌-I 10mg/kg 그룹을 IBO 그룹과 비교함.; $F_{2,27}=40.57$, 일원배치 분산분석 이용 $p<0.0001$).

[0149] (3) 모리스 수중 미로실험 결과

[0150] 도 4e 내지 도 4g와 같이, 모리스 수중 미로실험에서 기억손상 모델에 소야사포닌-I을 투여하지 않은 그룹(BO)과 비교했을 때, 정상 그룹과 소야사포닌-I을 투여한 기억손상 그룹에서 숨겨진 플랫폼을 찾기 위한 탈출 지연시간(escape latency time)은 트레이닝 기간인 4일 동안 서서히 감소했다(도 4e). 특히 3일과 4일에서 소야사포닌-I을 투여한 그룹의 탈출 지연시간은 이보텐산을 투여한 그룹보다 감소했다(3일, $F_{2,29}=14.29$, $p<0.0001$; 4일, $F_{2,29}=9.985$, $p=0.0004$).

[0151] 또한, 도 4f 및 도 4g와 같이 프로브 실험에서 타겟 프로브를 가로지르는 크로싱의 수와 타겟 사분면 안에서의 수영시간은 소야사포닌-I을 투여하지 않은 그룹(BO)에서 감소한 경향을 보였으나, 소야사포닌-I을 투여한 그룹의 경우 거의 정상모델의 수치까지 회복했다(수영시간, $F_{2,29}=21.07$, $p<0.0001$; target crossing, $F_{2,29}=25.63$, $p<0.0001$).

[0152] 이러한 결과는 행동실험에서의 기억향상은 소야사포닌-I 투여 덕분임을 알 수 있고 소야사포닌-I 투여 후 4주 동안 지속되었다는 것을 알 수 있다.

[0153] (4) 면역 조직 화학 분석 결과

[0154] 새롭게 탄생되는 신경전구세포의 분화에 소야사포닌-I이 어떠한 영향을 미치는지 살펴보기 위하여 소야사포닌-I 경구 투여 4주 후에 BrdU를 발현하는 세포들이 성숙한 뉴런마커와 세포 아형들의(NeuN, VGluT1, GAD67) 마커들을 동시에 발현하는지 살펴보았으며, 그 결과를 도 5a 내지 도 5e에 도시하였다.

[0155] 소야사포닌-I 경구 투여 4주후에 해마 조직 슬라이스에서 BrdU 발현 세포 수(도 5b)는 소야사포닌-I 경구투여 1주 후 BrdU 발현 세포 수(도 2b)보다 절반 이하로 감소하였다. 대조적으로 BrdU 발현 세포 수와 새롭게 생성된 등쪽과립세포(DGC)의 수는 소야사포닌-I을 투여하지 않은 그룹(BO)보다 소야사포닌-I을 투여한 그룹에서 대략 3.5배 증가했다(정상군 $n=5$, 이보텐산 투여그룹 $n=5$, 소야사포닌-I 10 mg/g $n=5$; $F_{2,12}=9.975$, $p=0.0028$ 일원배치 분산분석 이용). 이러한 결과는 새롭게 생성된 세포들의 생존이 적어도 4주 동안은 유지된다는 것을 알 수 있다.

[0156] 한편, 도 5a 및 도 5c와 같이, NeuN(성숙한 뉴런 마커)와 BrdU를 모두 발현하는 세포 수는 이보텐산을 투여한 그룹보다 소야사포닌-I을 투여한 그룹에서 3배 많다(정상군 $n=4$, IBO 그룹 $n=5$, 소야사포닌-I 10 mg/g $n=5$; $F_{2,11}=11.18$, 일원배치 분산분석 이용, $p=0.0022$)

[0157] 또한, 도 5a와 같이, BrdU를 발현하는 세포 중에 각각 VGluT1과 GAD67를 동시에 발현하는 세포 수는 IBO 그룹보다 소야사포닌-I을 투여한 그룹에서 각각 3.5배, 2.8배로 많다(정상군 $n=3$, 이보텐산 투여 그룹 $n=3$, 소야사포닌-I 10 mg/g $n=3$; GAD67+BrdU, $F_{2,6}=30.33$, 일원배치 분산분석 이용, $p=0.0007$; VGluT1+BrdU, $F_{2,6}=10.94$, 일원배치 분산분석 이용, $p=0.01$).

[0158] 그러나, BrdU와 동시에 발현하는 VGluT1-, NeuN-, GAD67-발현세포들의 비율은 별다른 차이가 없다(도 5b, c).

[0159] 성상세포 마커(GFAP), 도파민성 뉴런(TH), 콜린성 뉴런(ChAT)을 발현하는 해마세포 중에 동시에 BrdU를 발현하는 세포들은 어느 그룹에서도 찾기 어려웠다. 이는 아마도 새롭게 태어난 세포들이 대개 과립세포 층으로 이동해서 글루타메이트성 뉴런과 가바성 뉴런을 구성하기 때문으로 보인다.

[0160] 또한, 콜린성 뉴런을 찾고, 내생의 전체 ChAT 발현하는 세포를 면역염색 한 결과, 콜린성 뉴런은 소야사포닌-I 경구투여 1주일 후에 증가한 것으로 나타났다. 또한 도 5d, e와 같이 소야사포닌-I 경구투여 4주 후에도 비슷한 수준을 유지했다(정상군 $n=5$, 이보텐산 투여 그룹 $n=5$, 소야사포닌-I 10 mg/g $n=5$; $F_{2,12}=15.78$, $p=0.0004$ 일원배치 분산분석 이용, $p=0.0004$). 이러한 결과는 소야사포닌-I은 기억손상 모델에서 이보텐산 투여로 인한 퇴화로부터 콜린성 뉴런을 보호(neuroprotection)한다는 것을 알 수 있다.

[0161] 한편, 신경전구세포들은 우선적으로 성상세포보다는 뉴런으로 분화한다. 신경세포의 타입은 도파민성 뉴런과 콜린성 뉴런보다는 글루타메이트성 뉴런과 가바성 뉴런이다.

[0162] 이와 같이, 소야사포닌-I은 신경세포의 생존과 새롭게 생성되는 신경전구세포의 증식, 및 이식 부위에 적합한 신경세포로의 분화를 촉진하는 효과가 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0163] 실험결과 2. 소야사포닌-I의 배아 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화 및 증식 촉진 효과(실험예 3)

- [0164] (1) 배아 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 증식 촉진 효과
- [0165] 실험예 3.(2)에 따른 Ki67에 의한 면역세포화학 분석 결과를 도 6a 및 도 6b에 도시하였다. Ki67은 세포증식마커이다. 소야사포닌-I을 2 μ M를 처리한 실험군(Soya-I으로 표시)의 경우, 정상군(Vehicle로 표시)과 비교 시 증식하는 세포 수가 2.5배 증가하였으며, 소야사포닌-I 농도 의존적으로 신경전구세포의 증식이 급격히 증가하였다(정상군 n=3, 소야사포닌-I 0.5 μ M n=3, 1 μ M n=3, 2 μ M n=3; F3,8=9.426, 일원배치 분산분석 이용 p=0.0053).
- [0166] 이를 통하여, 소야사포닌-I은 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 증식 촉진 효과가 뛰어난 것을 확인하였다. 신경줄기세포의 증식은 분화와 상이한 과정으로, 신경줄기세포의 이식을 위하여 다양한 연구자들이 줄기세포의 대량 배양을 시도하고 있지만, 특히 인간 성체 신경줄기세포는 기내배양 자체가 매우 어려우며, 그 증식능력 또한 제한되어 있어 연구의 답보가 거듭되고 있는 실정이다. 이에, 본 발명자들은 본 발명에 따른 소야사포닌-I을 포함하는 조성물이 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 증식을 촉진하는 현저한 효과가 있음을 최초로 확인하였다.
- [0167] (2) 배아 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화 촉진 효과
- [0168] 실험예 3. (3)에 따라 신경전구세포들에 소야사포닌-I을 처리한 후 6일 동안 분화를 위해 배양하고, 신경세포 분화마커(NeuN, TUJ1)와 신경돌기 성장을 알 수 있는 MAP2를 이용하여 면역염색한 결과를 도 6c 내지 도 6h에 나타내었다.
- [0169] 도 6c 및 도 6d는 신경세포 분화마커인 NeuN를 이용하여 면역염색한 결과를 나타낸 것이다(정상군 n=12, 소야사포닌-I 0.5 μ M n=12, 소야사포닌-I 1 μ M n=14; F2,35=14.21, p<0.0001 by One-way ANOVA). 소야사포닌-I은 성숙한 뉴런으로의 분화를 촉진하며, 농도 의존적으로 분화되어 NeuN을 발현하는 세포 수가 증가하였다.
- [0170] 도 6e 및 도 6f는 신경세포 분화마커인 TUJ1를 이용하여 면역염색한 결과를 나타낸 것이다(정상군 n=8, 소야사포닌-I 0.5 μ M n=8; p<0.0001 by unpaired t test). 소야사포닌-I을 처리한 결과, TUJ1을 발현하는 세포는 정상군에 비하여 약 4배 이상 증가하였다. 신경전구세포에 소야사포닌-I을 처리하면 후기단계의 신경전구세포로 분화한다.
- [0171] 도 6g 및 도 6h는 신경돌기 성장마커인 MAP2를 이용하여 면역염색한 결과를 나타낸 것이다(MAP2 발현 세포; 정상군 n=5, 소야사포닌-I 0.5 μ M n=5; 쌍이 아닌 t 검증, p= 0.0073). 해마신경전구세포에 소야사포닌-I 1 μ M을 4일 동안 처리하면 신경돌기 길이가 정상군보다 2.2배 증가하였다. 소야사포닌-I은 신경돌기의 성장을 촉진하는 효과가 있음을 확인하였다.
- [0172] 한편, 해마 신경전구세포 배양에서 GFAP(glial fibrillary acidic protein; 글리아필라멘트산성단백질)를 발현하는 정상세포는 찾기 어려웠다. GFAP는 중간섬유(intermediate filament)를 구성하는 물질로 글리아필라멘트를 구성한다.
- [0173] 또한, 도 6g에 도시된 것과 같이, 신경돌기의 평균 길이 및 모든 첫 번째와 두 번째의 돌기들의 수는 소야사포닌-I을 처리한 그룹에서 눈에 띄게 증가하였다(정상군 1 μ M n=17, 소야사포닌-I 1 μ M n=17; 쌍이 아닌 t 검증, p<0.0001).
- [0174] 이를 통하여, 소야사포닌-I은 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 증식의 촉진뿐만 아니라 분화를 촉진함에도 효과가 있음을 확인하였다.
- [0175] 또한, 실험예 3. (4)에 따른 신경전구세포의 면역블로팅 결과를 도 7a 내지 도 7c에 도시하였다. VGluT1(vesicular glutamate transporter1)은 글루탐산성 뉴런의 마커이고, GAD67은 가바성 뉴런의 마커이며, ChAT(choline acetyltransferase)는 콜린성 뉴런의 마커이다.
- [0176] 도 7a와 같이 ChAT 단백질 발현량은 실험군에서 정상군보다 각각 1.9배 증가했다.(정상군 n=4, 소야사포닌-I 0.5 μ M n=4, 소야사포닌-I 1 μ M n=4; 소야사포닌-I 2 μ M n=4; F3,12=4.584, 일원배치 분산분석, p=0.0232). 그러나 VGluT1나 GAD65/67 단백질 발현량은 소야사포닌-I을 6일 동안 처리한 그룹에서 다소 적게 증가하였다(도 3b 및 도 3c).
- [0177] 이와 같이 소야사포닌-I이 배아에서 일차배양한 해마 신경전구세포들의 증식과 분화를 증가시킴을 확인하였다.
- [0178] **실험결과 3. 기억손상 모델에서 소야사포닌-I의 신경재생 촉진 효과 (실험예 1)**
- [0179] (1) Y자형 미로 실험 결과

- [0180] 도 1b 및 도 1c는 실험예 1.(1)에 따른 Y자형 미로 실험 결과로, 공간 기억력을 확인하기 위한 Y자형 미로 실험의 결과를 나타낸 것이다. 래트는 Y자형 트랙에서 갈 길을 선택하게 된다. 미로 팔에 들어가기 위한 자발적 변경(Spontaneous alteration)은 그룹 3(Sham)에 비하여 그룹 1 및 그룹 2에서 더 낮게 나타났다($p < 0.001$ by the Newman-Keuls Multiple Comparison Test). 그러나, 소야사포닌-I을 주입한 그룹 1(Soya-I) 래트의 기억력의 감소는 그룹 2(BO)에 비하여 다소 향상됨을 확인하였다($p < 0.01$ by Newman-Keuls Multiple Comparison Test; $F_{4,34} = 10.64$, $p < 0.0001$ by One-way ANOVA).
- [0181] 이를 통하여, 소야사포닌-I은 기억손상 모델에서 새로 탄생한 신경전구세포의 증식을 촉진하여 학습력 및 기억력 손상을 회복하고 학습력 및 기억력을 증진하는 효과가 있음을 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 소야사포닌-I을 포함하는 조성물은 다양한 경위의 학습과 기억손상을 겪는 알츠하이머병, 파킨슨병, 간질, 우울증, 뇌 허혈증 등의 다양한 신경질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학 조성물로 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0182] (2) 수동 회피 실험 결과
- [0183] 도 1d는 실험예 1.(2)에 따른 수동 회피 실험 결과로, 래트에 쇼크를 주고 24시간 후에 래트가 어두운 상자에 들어가기까지 걸리는 시간(지연시간; latency time)을 측정하여 나타낸 것이다. 정상 마우스인 그룹 3(Sham)과 비교할 때, 기억손상 모델인 그룹 2가 어두운 방으로 들어가기까지 걸리는 시간은 눈에 띄게 감소하였다. 이에 반하여, 소야사포닌-I을 주입한 기억손상 그룹인 그룹 1의 지연시간은 향상됨을 확인하였다.
- [0184] 이를 통하여, 소야사포닌-I은 기억손상 모델에서 새로 탄생한 신경전구세포의 증식을 촉진하여 학습력 및 기억력 손상을 회복하고 기억력을 증진하는 효과가 있음을 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 소야사포닌-I을 포함하는 조성물은 다양한 경위의 학습과 기억손상을 겪는 알츠하이머병, 파킨슨병, 간질, 우울증, 뇌 허혈증 등의 다양한 신경질환을 예방 또는 치료하기 위한 약학 조성물로 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0185] (3) 소야사포닌-I의 분화된 신경세포의 증식 촉진 효과 확인
- [0186] 실험예 1.(4)에 따른 BrdU에 의한 면역 조직 화학 분석 결과를 도 2a 및 도 2b에 도시하였다. 소야사포닌-I이 학습과 기억을 형성하는 해마세포의 증식과 분화를 촉진하는지 살펴보기 위하여 래트의 뇌 조직을 세포증식의 마커(BrdU)로 면역염색한 결과, 도 2b에 나타난 것과 같이, 내생 신경전구세포의 BrdU 발현 세포수는 소야사포닌-I을 주입하지 않은 기억손상 모델(BO)과 비교했을 때, 소야사포닌-I을 경구주입한 기억손상 모델(Soya-I)의 해마에서 증가하였다.
- [0187] 특히, 도 2b에 나타난 것과 같이, 해마의 치마이랑(DG, Dentate gyrus)에서 세포증식의 마커인 BrdU를 발현하는 세포수는 경구주입한 소야사포닌-I의 모든 용량(5, 10, 20 mg/kg 그룹)에서 현저하게 증가했다. 10 mg/kg의 소야사포닌-I을 주입했을 때 BrdU 발현 세포수가 가장 증가하였다(정상군 $n=4$, 이보텐산 주입 그룹 $n=3$, 소야사포닌-I 5mg/kg 주입 그룹 $n=3$, 소야사포닌-I 10 mg/kg 주입 그룹 $n=3$, 소야사포닌-I 20 mg/kg 주입 그룹 $n=3$; $F_{4,11} = 18.18$, $p < 0.0001$ 일원배치 분산분석이용).
- [0188] 따라서, 소야사포닌-I은 기억손상된 래트에서 해마 신경세포의 증식을 현저하게 촉진하는 효과가 있으며, 소야사포닌-I은 학습능력과 기억능력과 관련된 신경 관련 질환을 예방, 치료, 개선할 수 있음을 확인하였다.
- [0189] 또한, 도 3a 내지 도 3e는 해마와 내비피질에서 학습과 기억에 관여하는 신경세포의 증식 및 분화 촉진효과를 관찰하기 위하여 수행한 실험예 1.(5)에 따른 면역 조직 화학 분석 결과로, 해마와 내비피질에서 학습과 기억에 관여하는 신경세포 아형의 분화 마커를 이용하여 신경세포를 면역 조직 화학 염색한 결과를 나타낸 것이다. 각 마커는 GAD67(가바성 뉴런), VGluT1(글루탐산성 뉴런), ChAT (콜린성 뉴런), OX42(반응성 소교세포)이다.
- [0190] 정상 모델(Sham)과 비교했을 때, 소야사포닌-I을 주입하지 않은 기억손상 모델(BO)의 해마에서 GAD67 발현 세포수, VGluT1 발현 세포수, 및 ChAT 발현 세포수는 아래 표와 같이 현저히 감소했다.

표 1

(단위: %)

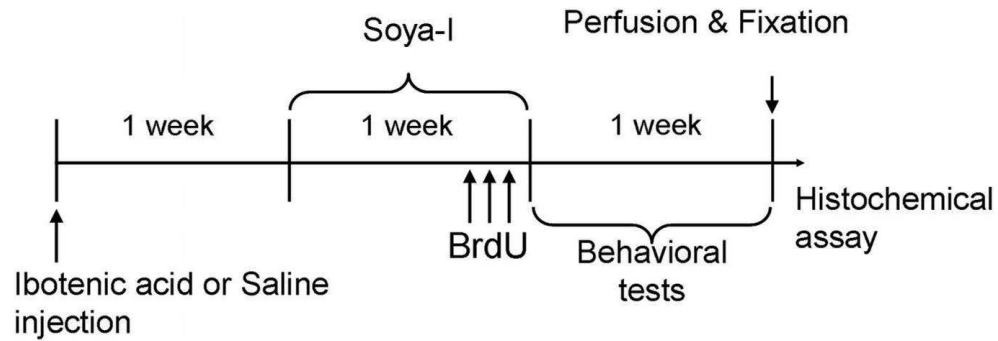
[0191]

	IBO	Sham
GAD67	43.02 ± 3.72	100 ± 11.43
VGluT1	72.44 ± 3.86	100 ± 6.50
ChAT	52.07 ± 7.38	100 ± 1.64

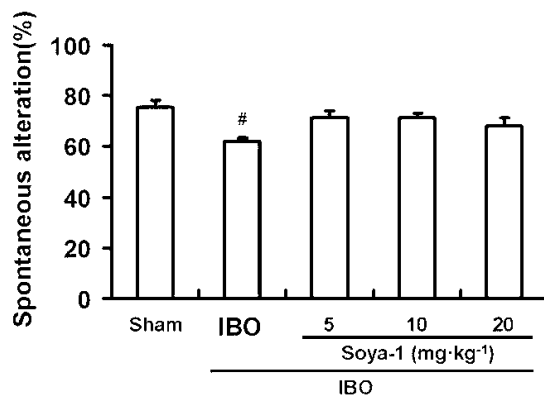
- [0192] 이러한 결과는 많은 뉴런들이 해마로 뻗은 내비피질에 이보텐산 주입할 경우 해마의 기억형성에 관여하는 글루탐산성 뉴런, 가바성 뉴런, 콜린성 뉴런 같은 주요한 신경 세포 타입의 수를 감소시킨다는 것을 보여주는 것이다.
- [0193] 한편, 기억손상 모델에서 소야사포닌-I을 주입할 경우, 주입하지 않은 경우(IB0)에 비하여 각 마커의 발현이 현저히 높게 나타났다.
- [0194] 먼저, 가바성 뉴런의 마커인 GAD67의 발현정도를 비교한 조건은 다음과 같다: 3.81 ± 0.63 세포수, 정상군 n=5, 이보텐산그룹 n=5, 소야사포닌-I그룹 5mg/kg n=5, 소야사포닌-I 10 mg/kg n=5, 소야사포닌-I 20 mg/kg n=5; F4,20 = 5.191, 일원배치 분산분석 이용 시 p = 0.0049. 소야사포닌-I을 주입한 그룹 1은 세 가지 용량(5, 10, 20 mg/kg) 모두에서, 해마의 GAD67 발현 세포 수가 약 1.66 내지 1.76배 증가하였다(해마 슬라이드당 6.83 ± 1.47 세포수에서 7.86 ± 1.62 세포수).
- [0195] 글루탐산성 뉴런의 마커인 VGluT1의 발현정도를 비교한 조건은 다음과 같다: 정상군 n=5, 이보텐산그룹 n=5, 소야사포닌-I 5mg/kg n=5, 소야사포닌-I 10mg/kg n=5, 소야사포닌-I 20mg/kg n=5; F4,20 = 8.127, 일원배치 분산분석이용시 p = 0.0005. 그룹 1은 10 mg/kg에서 현미경 사진당 57.33 ± 2.43 세포 수를 나타내었으며, 용량 의존적 방식으로 VGluT1 발현 세포수가 정상군 레벨까지 증가하였다.
- [0196] 콜린성 뉴런의 마커인 ChAT의 발현정도를 비교한 조건은 다음과 같다: 7.30 ± 1.32 세포 수; 정상군 n=5, 이보텐산 그룹 n=5, 소야사포닌-I 5 mg/kg n=5, 소야사포닌-I 10mg/kg n=5, 소야사포닌-I 20mg/kg n=5; F4,20=3.314, 일원배치 분산분석 이용시 p = 0.0308. 그룹 2와 비교했을 때 그룹 1의 해마에서 ChAT 발현 세포 수는 1.39배에서 2.23배(17.64 ± 4.23 세포 수에서 20.93 ± 4.50 세포 수) 증가하였다.
- [0197] 이를 통하여, 소야사포닌-I이 신경전구세포의 증식과 가바성, 글루타메이트성, 콜린성 뉴런 같은 분화된 신경세포의 증식을 효과적으로 촉진하여 신경재생을 일으킴을 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 소야사포닌-I을 포함하는 조성물은 신경줄기세포 또는 신경전구세포 증식 촉진용 조성물로 사용할 수 있다.
- [0198] 한편, OX42의 경우 반응성 소교세포의 마커로서, 도 3a와 같이, 소야사포닌-I을 처리하지 않은 그룹(IB0)의 DG와 CA1에서 OX42를 발현하는 세포들의 밝기를 정상군의 밝기로 표준화했을 때, 이보텐산 그룹의 표준화된 밝기는 정상군과 비교했을 때 상당히 증가했다. 이에 반하여 소야사포닌-I을 처리한 그룹에서 표준화된 밝기가 DG와 CA1 구역 모두에서 용량 의존적으로 감소했다.
- [0199] 도 3e는 정상 모델(Sham) 대비 기억 손상 모델의 OX42의 발현 강도를 나타낸 것이다. 분석은 다음의 조건에서 이루어졌다: 정상군 n=5, 이보텐산 그룹 n=5, 소야사포닌-I 5mg/kg n=5, 소야사포닌-I 10mg/kg n=6, 소야사포닌-I 20mg/kg n=5; CA1, F4,21= 12.83, 일원배치 분산분석 이용 p < 0.0001; DG, F4,21 = 3.559, 일원배치 분산분석 이용 p = 0.0229. 정상모델에 이보텐신으로 기억 손상을 유도할 경우 OX42 발현이 높아졌으나, 소야사포닌-I을 처리할 경우(Soya-I) 다시 OX42의 발현이 정상모델에 비할 정도로 낮아졌음을 확인하였다.
- [0200] 종합하면 이 결과들은 소야사포닌-I의 다양한 기능이 신경퇴화를 막고 이보텐산에 의해 유도된 기억손상 모델에서의 신경염증을 억제함으로써 신경재생과 신경보호를 일으킴을 보여주는 것이다. 따라서 본 발명에 따른 소야사포닌-I은 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 증식 촉진 효과뿐만 아니라 이를 통한 신경재생과 신경보호가 있음을 확인하였다.
- [0201] 이와 같이, 본 발명에 따른 소야사포닌-I을 포함하는 조성물은 신경줄기세포 또는 신경전구세포의 분화 또는 증식을 촉진하는 효과가 있으며, 손상된 신경세포를 회복하는 효과가 있다. 따라서 본 발명에 따른 소야사포닌-I을 포함하는 조성물은 실험용 또는 체내 이식용 줄기세포의 대량 배양, 및 이를 통한 신경계 재생을 통하여 신경 관련 질환 예방 또는 치료에 효과적으로 사용할 수 있다.
- [0202] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

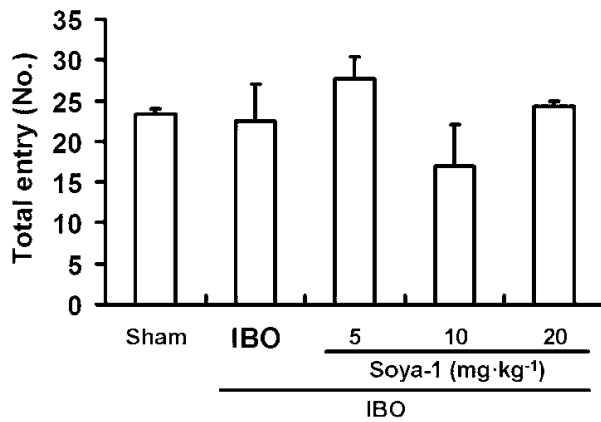
도면1a



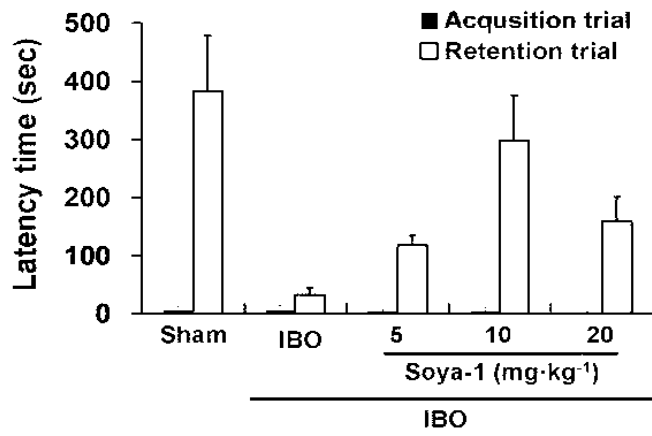
도면1b



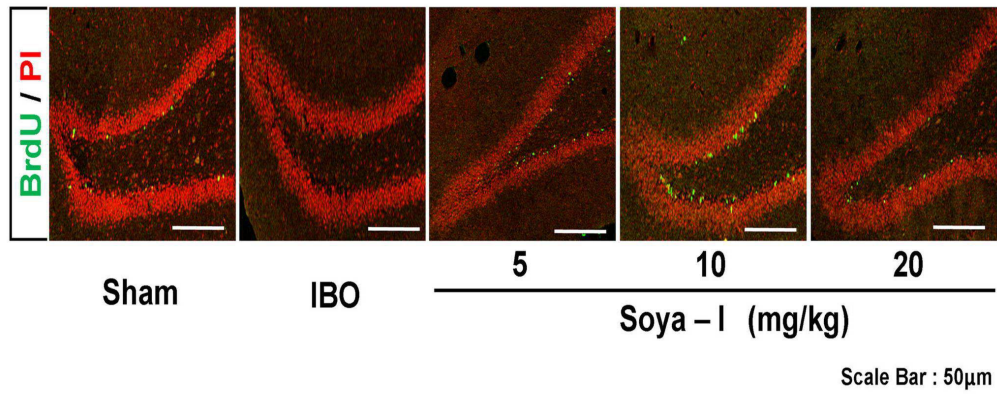
도면1c



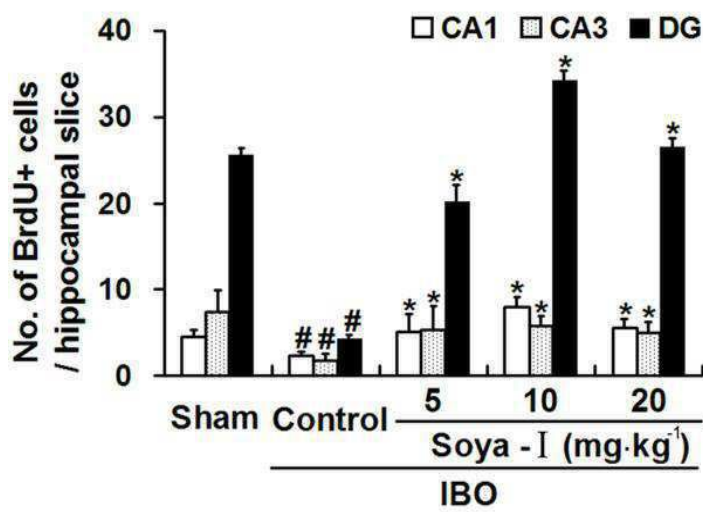
도면1d



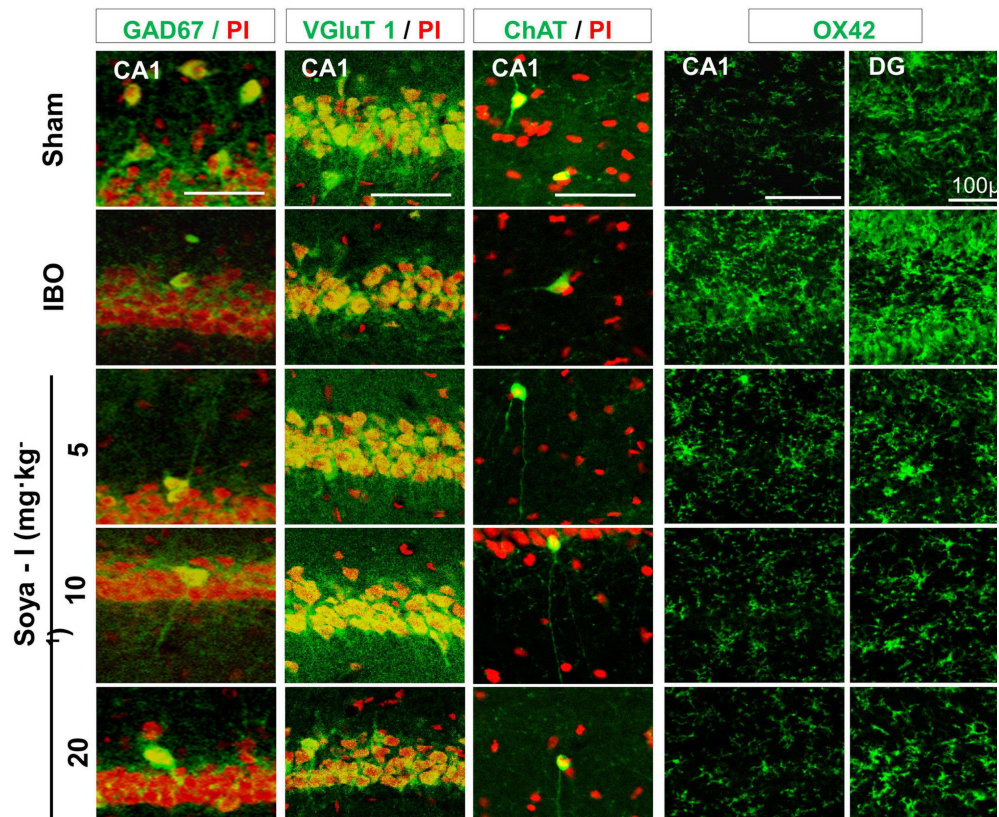
도면2a



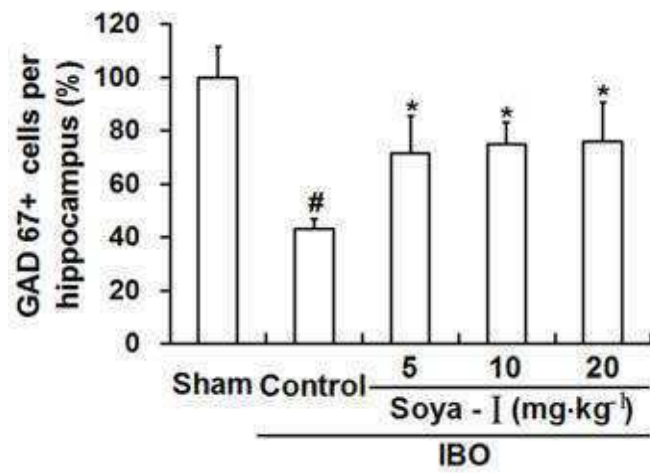
도면2b



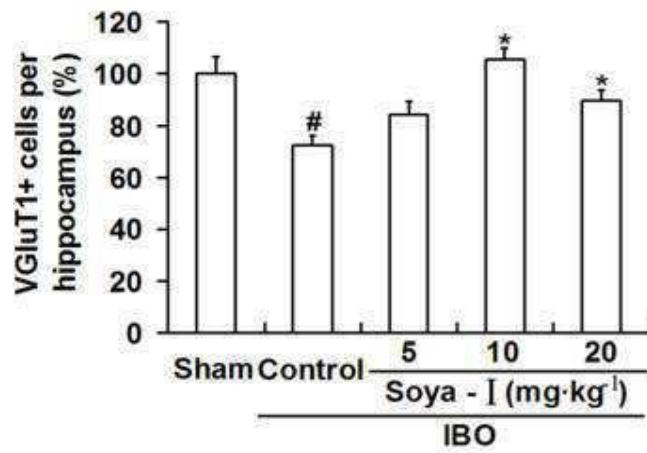
도면3a



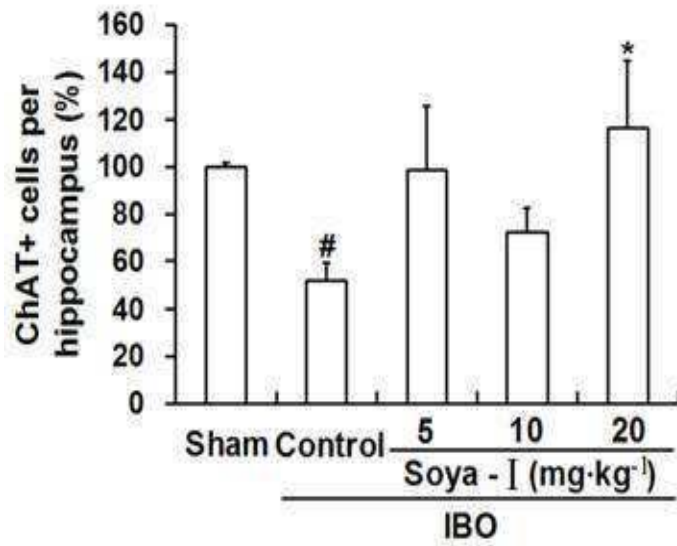
도면3b



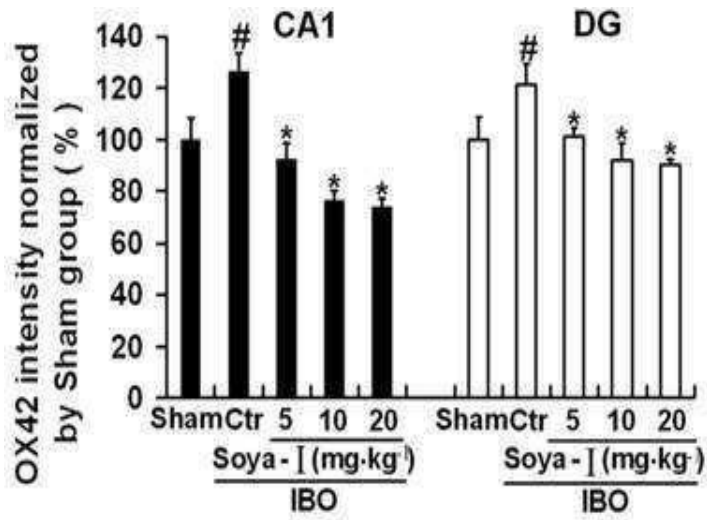
도면3c



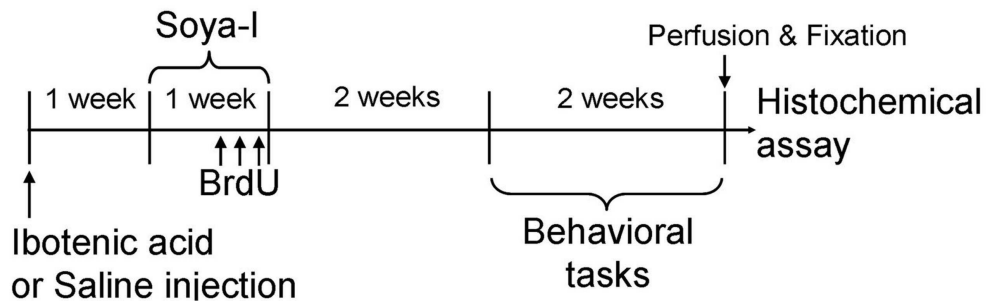
도면3d



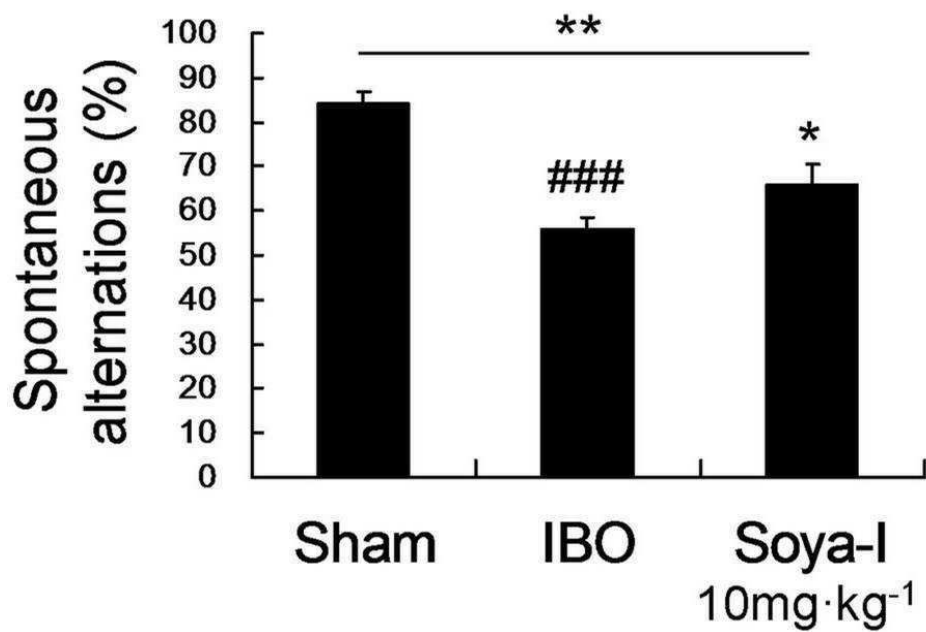
도면3e



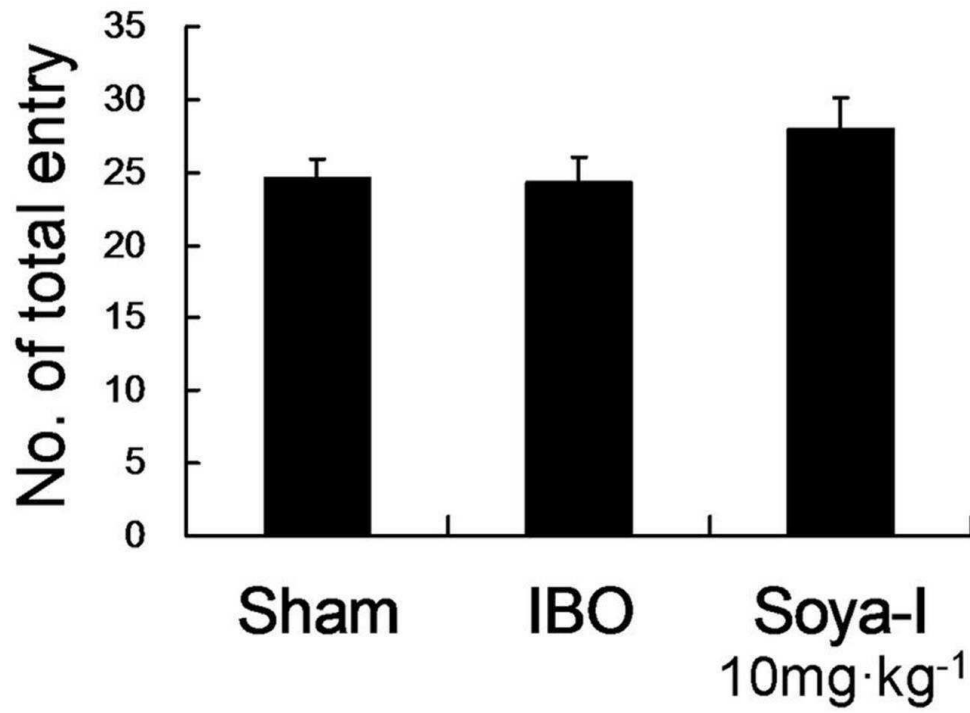
도면4a



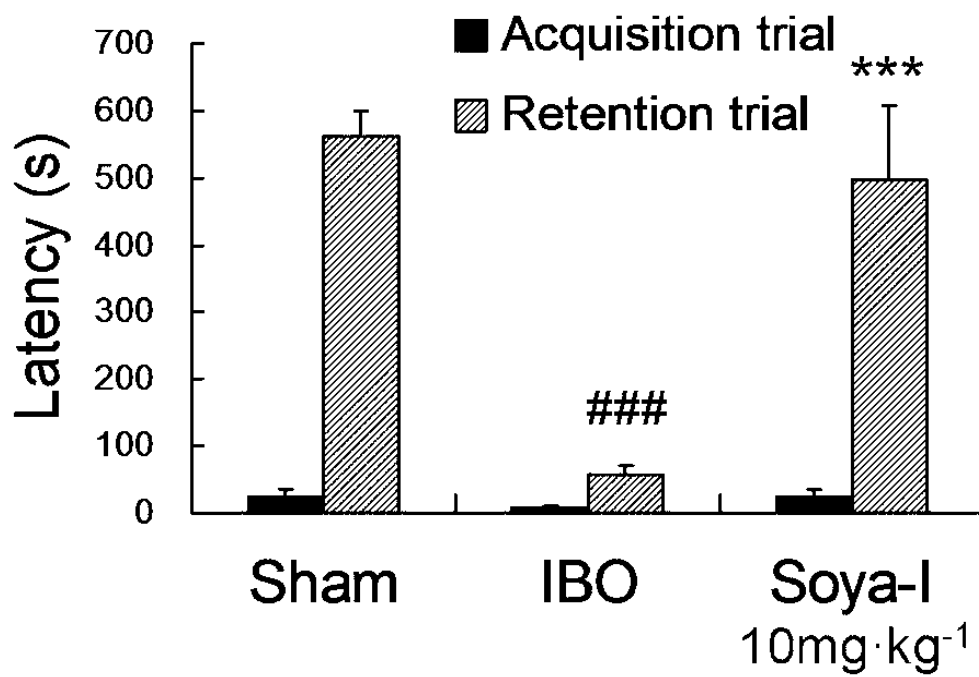
도면4b



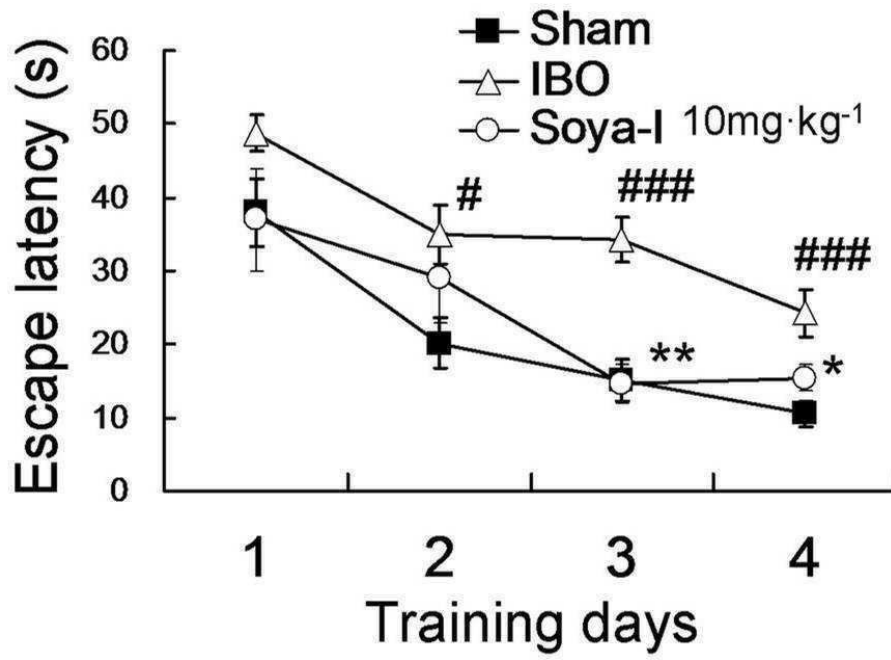
도면4c



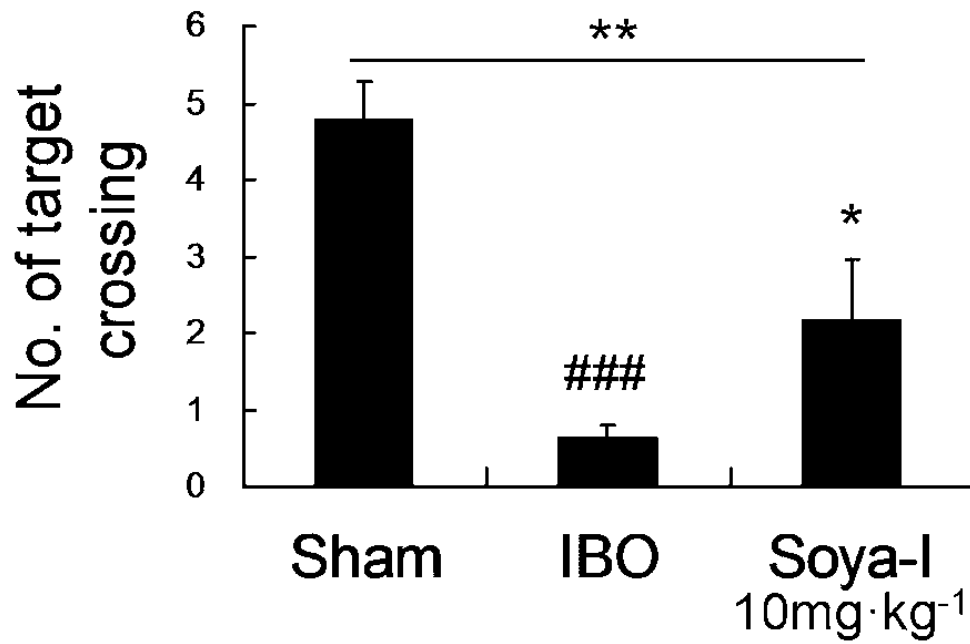
도면4d



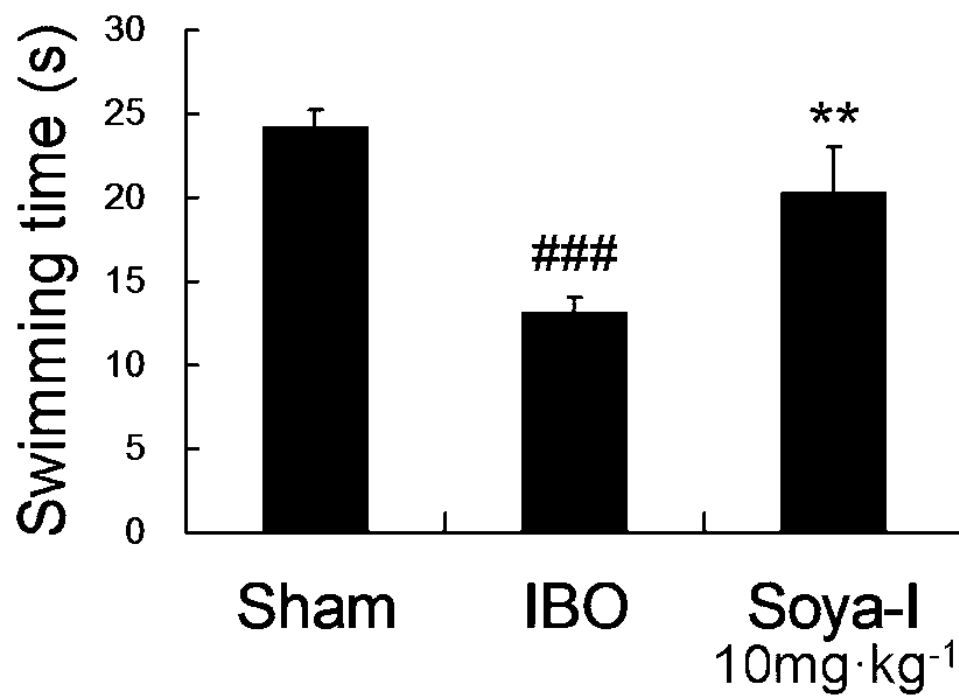
도면4e



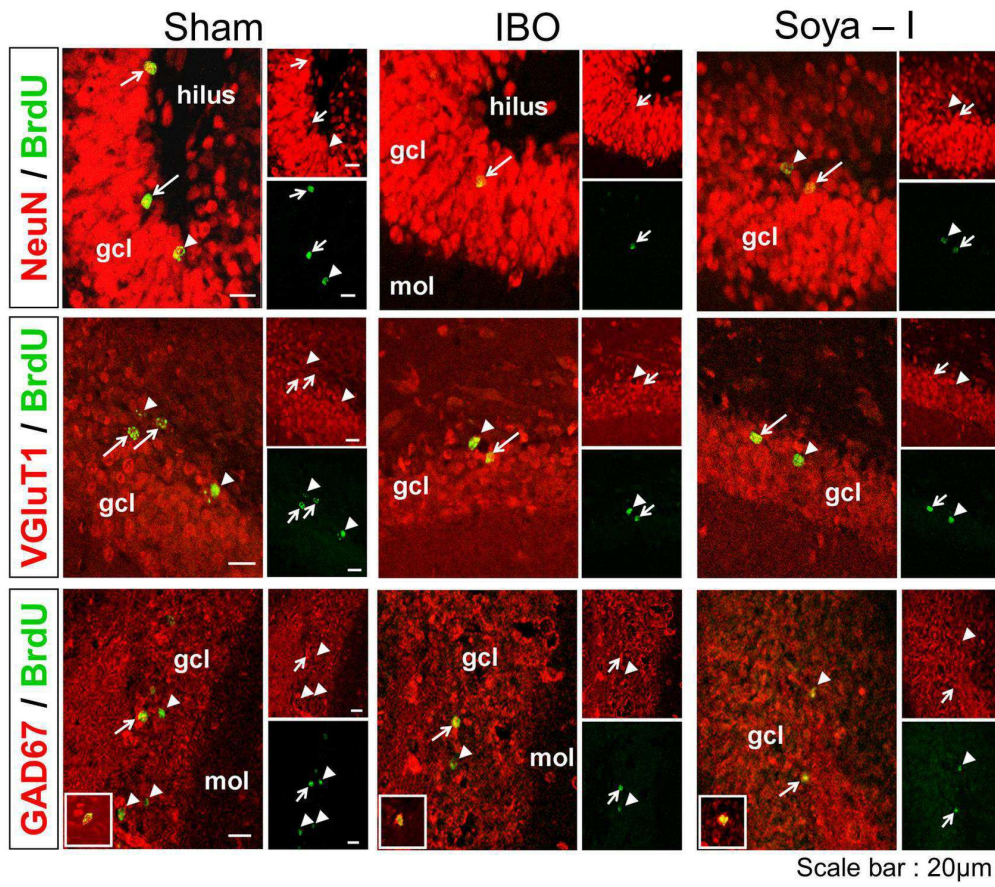
도면4f



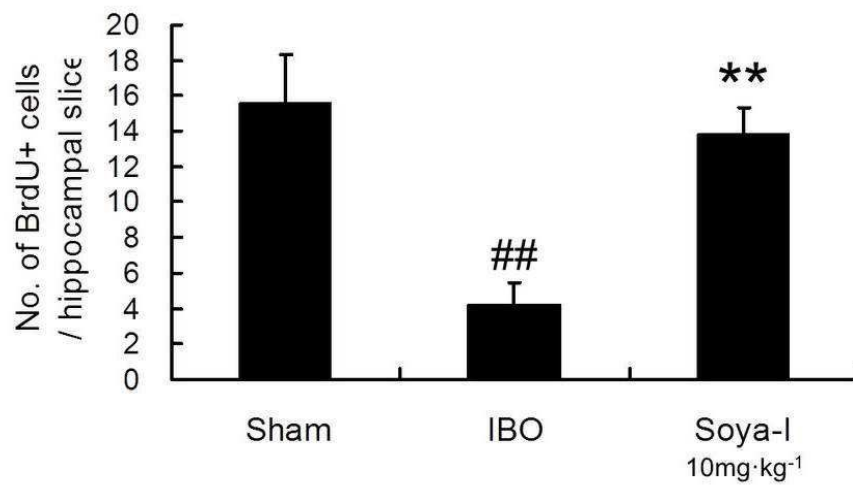
도면4g



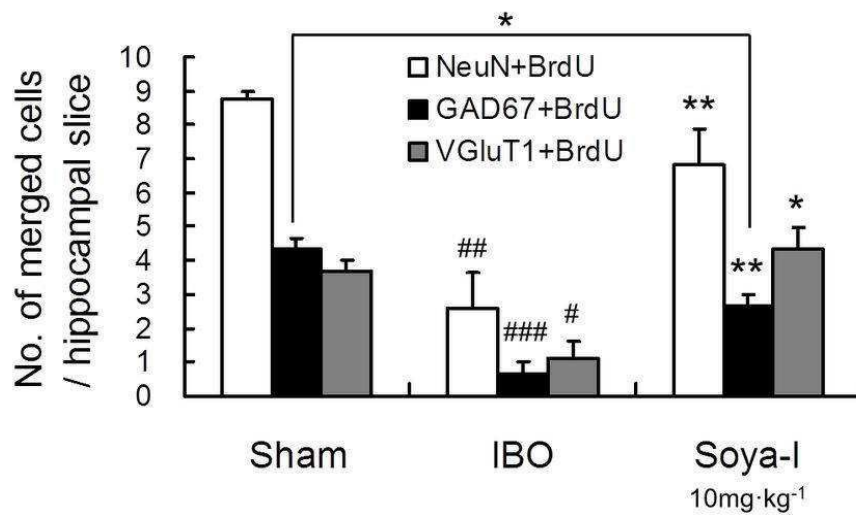
도면5a



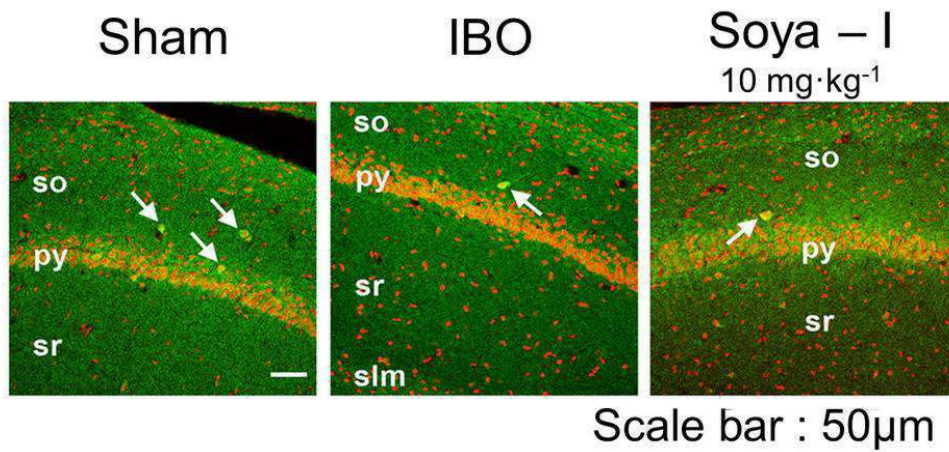
도면5b



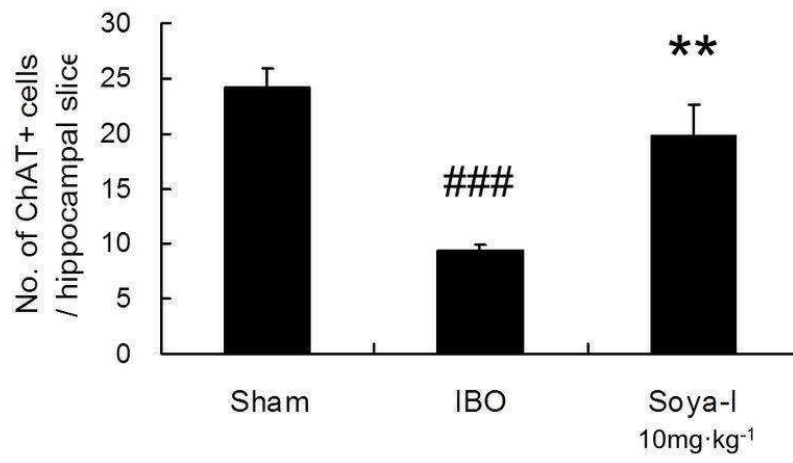
도면5c



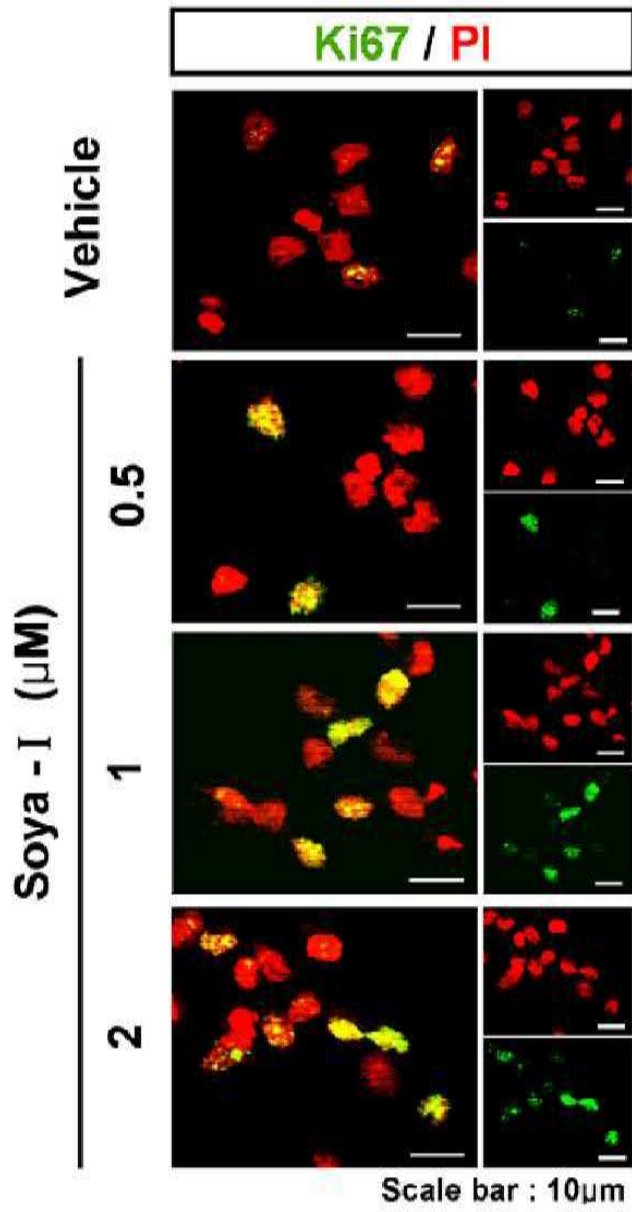
도면5d



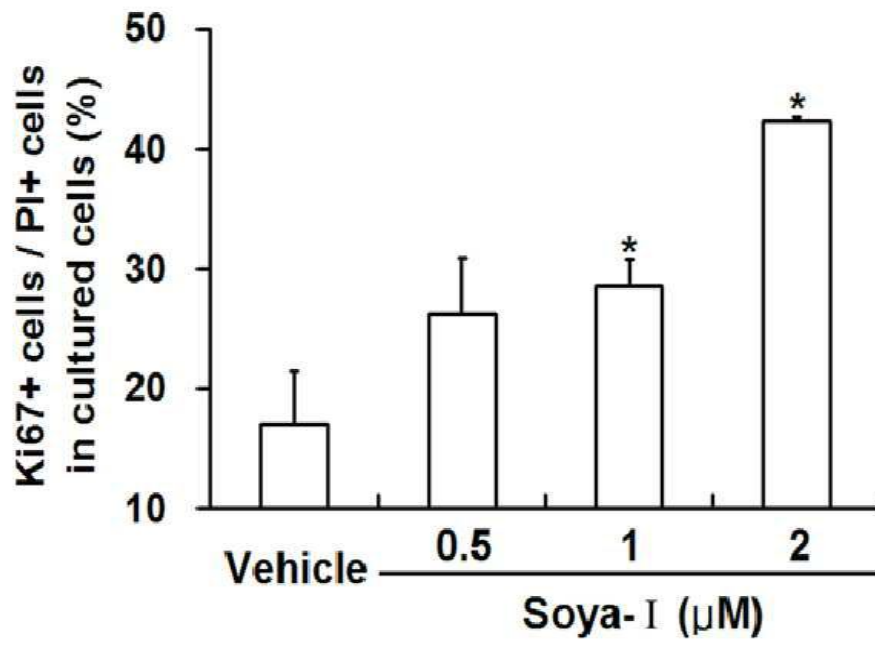
도면5e



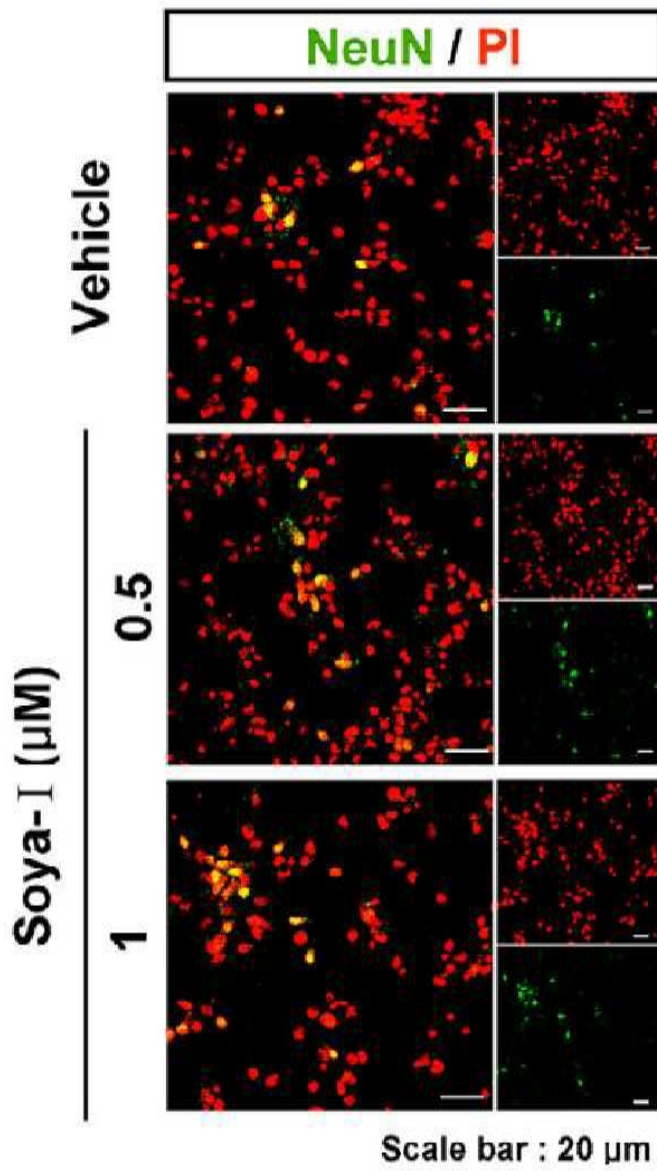
도면6a



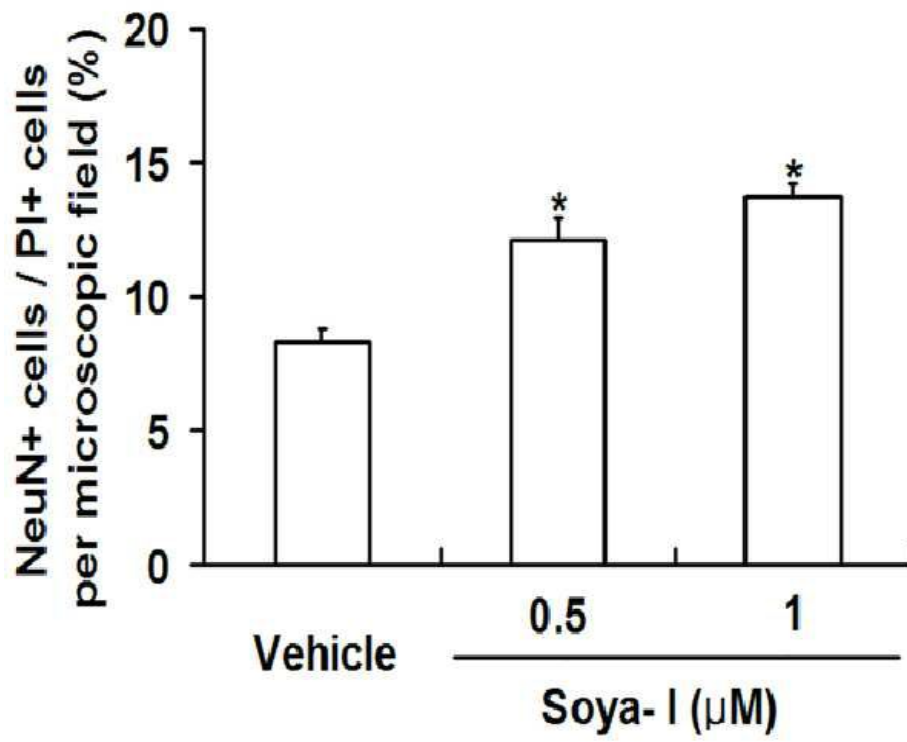
도면6b



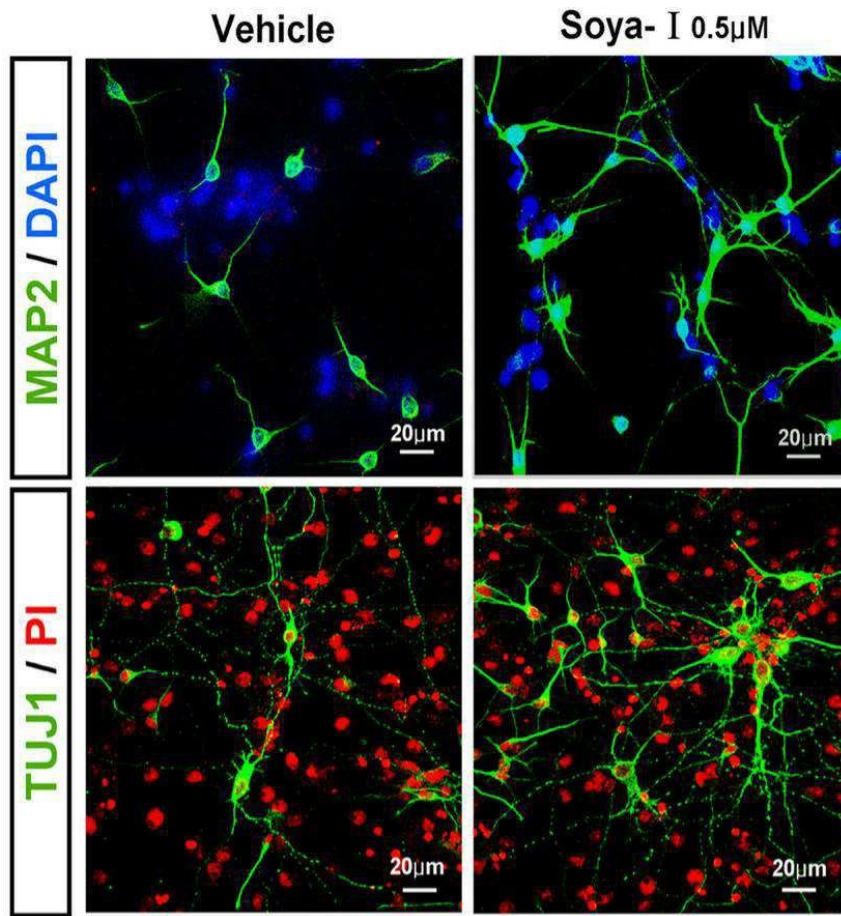
도면6c



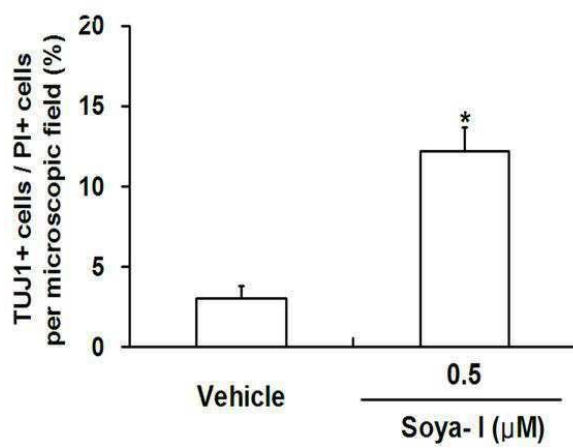
도면6d



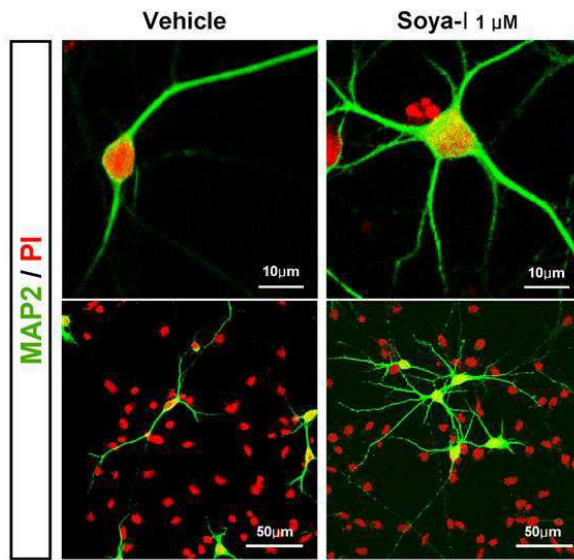
도면6e



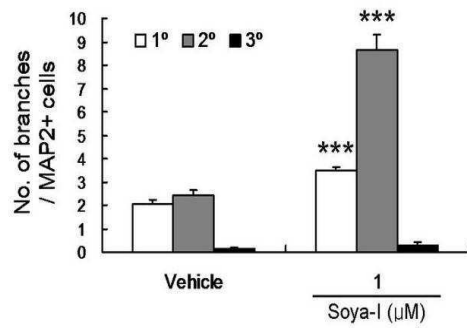
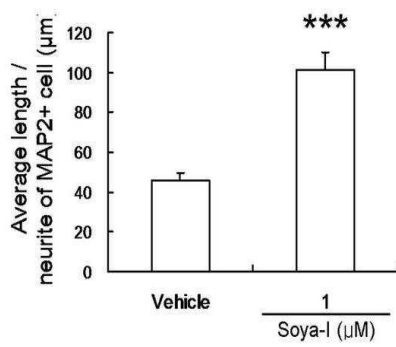
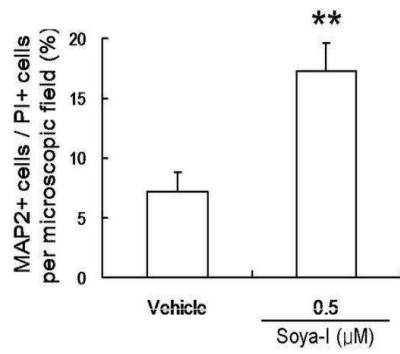
도면6f



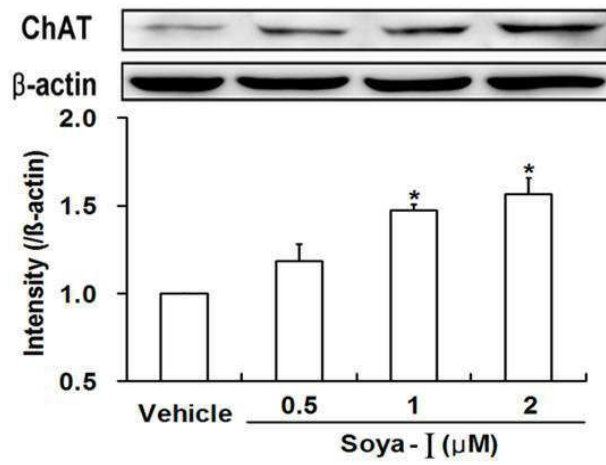
도면6g



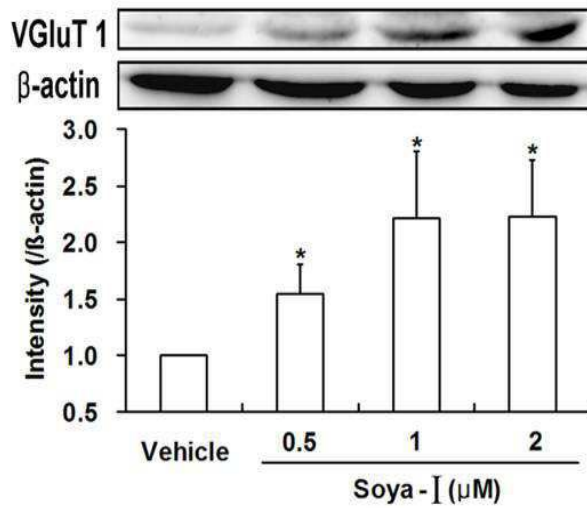
도면6h



도면7a



도면7b



도면7c

