



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0020090
(43) 공개일자 2011년03월02일

(51) Int. Cl.

A61K 48/00 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)

A61K 35/12 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0077802

(22) 출원일자 2009년08월21일

심사청구일자 2009년08월21일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내

(72) 발명자

김윤희

서울특별시 강남구 대치1동 청실아파트 6-606

유민주

경기도 안양시 동안구 부림동 공작부영아파트 304-905

허현

경상남도 사천시 벌리동 55 -11

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 11 항

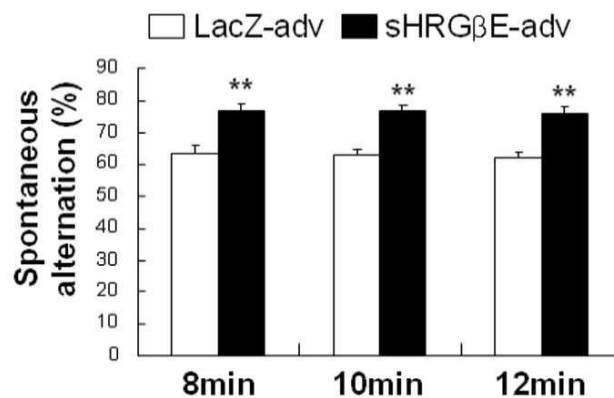
(54) 히레글린 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드의 용도

(57) 요약

본 발명은 히레글린 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드의 기억력 향상 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.

본 발명에 따른 히레글린 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드는 신경전구세포의 증식 및 신경전달물질을 생산하는 신경세포로의 분화를 유도함으로써 기억력을 향상시킬 수 있으며 기억 손상 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

대표도 - 도10a



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009K001245 / A0400180900400

부처명 과기부 / 보건복지부

연구관리전문기관

연구사업명 신경발생 제어 및 재생응용기술 / 기능성 세포 치료제 개발

연구과제명 콜린성 세포분화과정에서 전사인자 및 에피제네틱 인자의 기능 연구 및 퇴행성 뇌질환
모델에서 기억향진 약물 개발 / 혈액줄기세포응용 뇌졸중 치료제 개발

기여율

주관기관 아주대학교 / 가톨릭대학교

연구기간 2009년 04월 01일 ~ 2013년 03월 31일 / 2006년 04월 01일 ~ 2010년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

히레굴린 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드(EGF-like domain peptide)를 암호화하는 핵산을 포함하는 기억력 향상용 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

히레굴린 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 포함하는 기억력 향상용 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

히레굴린 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 재조합 아데노바이러스를 포함하는 기억력 향상용 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

히레굴린 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 암호화하는 핵산을 도입한 중간엽 줄기세포를 포함하는 기억력 향상용 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 핵산의 도입은 미세주입법, 전기 도입법, 직접주입법, 입자분사법, 리포솜법 또는 발현벡터를 이용하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 기억력 향상용 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 발현벡터는 재조합 아데노바이러스인 기억력 향상용 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 재조합 아데노바이러스는 분비 지시 펩타이드(signal peptide)를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 기억력 향상용 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 재조합 아데노바이러스는 DNA 서열을 발현시킬 수 있는 바이러스 프로모터를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 기억력 향상용 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

바이러스 프로모터는 CMV 프로모터인 기억력 향상용 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 재조합 아데노바이러스는 표적 세포 내에서의 복제를 위해 필요로 하는 게놈의 일부가 결핍된 것을 특징으로 하며, 상기 결핍된 일부는 E1, E3, E4, 및 L1-L5 유전자로부터 선택되는 것인 기억력 향상용 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 기억 손상 질환은 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병, 정신분열증 간질, 뇌졸중, 정신분열증 또는 외상성 뇌손상인 기억력 향상용 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 히레글린 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드의 기억력 향상 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 포유동물의 뇌는 신경전구세포(neural precursor cell)의 증식에 의해 세포수를 확보하고 이들의 분화 및 생존과 사멸, 시냅스 형성 등 일련의 과정을 거쳐 체계적인 신경회로망(neural network)을 발생함으로써 복잡한 기능을 수행할 수 있게 된다. 최근에는 성체에도 신경전구세포가 있다는 것이 확인되고 있으며 줄기세포가 성체의 뇌에서 증식 및 분화하는 과정(neurogenesis)은 바로 재생과정(regeneration)이라 할 수 있다 (Identification of a neural stem cell in the adult mammalian central nervous system(1999), *Cell* 96, 25-34). 신경전구세포는 주로 측뇌실(lateral ventricle)과 맞닿는 줄무늬체(striatum)의 부뇌실 구역(subventricular zone)에서 발견되고 또한 해마(hippocampus)의 치상회에 있는 부뇌실 구역에서 줄기세포들이 분열하여 과립세포로 되며 이 세포들이 분화하여 기능을 가질 수 있다(Functional neurogenesis in the adult hippocampus(2002) *Nature* 415, 1031-1034). 성체시기에도 해마 등 뇌의 일부 부위에는 신경전구세포가 증식하여 사멸한 세포를 대체하는데 퇴행성 뇌질환 또는 뇌손상을 받은 부위에서는 신경세포의 상실이 크게 일어나므로 신경전구세포의 증식(neurogenesis)이 촉진되어야 한다. 성체 뇌에서는 신경성장에 필요한 많은 물질을 생산하여 축삭돌기(axon)과 수상돌기(dendrite)가 성장하게 되고 새로운 학습과 기억을 할 때마다 시냅스 연결과 신경회로망을 끊임없이 재구성(synaptic remodeling)하므로 분화가 계속된다. 성인 뇌에서 신경전구세포의 증식 및 분화는 주로 해마에서 일어나며 해마는 공간지각력 및 기억력을 형성하는 부위로 치매 환자에서는 초기에 측뇌의 entorhinal cortex와 해마에서 콜린성 신경세포 (cholinergic neuron) 및 글루타메이트성 신경세포 (glutamatergic neuron), 이들의 활동성을 조절하는 가바성 신경세포 (GABAergic neuron)들이 사멸함으로써 공간기억력이 감퇴한다. 그 외에도 해마에서 경련이나 허혈에 의한 신경세포 사멸은 간질과 뇌졸중에서의 기억력 감퇴를 일으킨다.

[0003] 신경세포는 세포분화하고 시냅스를 형성하는 과정에서 신경성장인자와 같은 표적유래 생존인자(target-derived survival factor)를 받지 못하면 세포사멸하며, 스트레스와 세포독성물질(cytotoxic agent)에 의한 세포사멸은 퇴행성 뇌질환의 주요 원인이 된다. 뇌신경세포의 사멸이 주요한 원인이 되는 퇴행성 뇌질환은 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병 등의 다양한 질환을 포함한다. 대부분의 퇴행성 뇌질환은 기억 장애 (기억력 감퇴)를 수반하며,

최근 복잡한 사회활동 등에 의한 스트레스 및 공해와 같은 생활 환경 악화로 일반인에서도 기억력 감퇴 현상이 나타나고 있다.

[0004] 신경재생물질로 가장 가능성이 큰 후보물질은 신경성장인자(neurotrophic factor)이다. 따라서 신경성장인자를 이용하여 신경전구세포의 증식을 촉진하여 세포수를 확보하고 이들의 분화를 증진시킴으로써 신경재생을 촉진할 수 있으며, 이를 바탕으로 신경세포의 생존 및 사멸, 이동, 시냅스 형성 등을 조절에 의해 기억 장애를 회복하고 기억력을 향상시킬 수 있을 것이다.

[0005] 신경계에 존재하는 신경성장인자들은 일반적으로 세포막 수용체를 활성화하여 신호전달을 조절함으로써 신경세포의 반응을 유도한다. 신경성장인자 중 뉴레귤린(neuregulin)은 구조적으로 연관된 유전자군(gene family)를 이루고 있으며 선택적 스플라이싱(alternative splicing)에 의해 30여 개의 다른 형태로 발현된다(Glial growth factors are alternatively spliced erbB2 ligands expressed in the nervous system (1993) *Nature* 362, 312-318; Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies (2003) *Exp. Cell Res.* 284, 14-30). 뉴레귤린은 크게 타입I, 타입II 및 타입III의 세 가지 종류로 나누며, 이 중 타입I 뉴레귤린은 NDF (Neu differentiation factor), HRG (Heregulin), ARIA (Acetylcholin receptor inducing activity) 등으로 불린다(이하 타입I 뉴레귤린은 히레귤린으로 통칭한다). 타입II 뉴레귤린은 GGF (glial growth factor)로 불리고 신경계 발달 후기에 주로 발현하며, 타입III 뉴레귤린은 SMDF (sensory and motor neuron derived facto), CRD (Cytein rich domain) 뉴레귤린으로 불린다.

[0006] 히레귤린(HRG)은 수용체 티로신 키나제인(receptor tyrosine kinase: RTK) ErbB3 및 ErbB4와 반응하여 신호전달을 조절하며 중요한 세포질 내 신호단백질들의 인산화를 조절함으로써 신경세포의 반응을 유도한다. 또 다른 수용체인 ErbB2는 히레귤린이 ErbB3및 ErbB4와 결합한 후에 반응한다(Expression of neuregulins and their putative receptors, ErbB2 and ErbB3, is induced during wallerian regeneration (1997) *J. Neurosci.* 17, 1642-1659). 모든 뉴레귤린에는 EGF (epidermal growth factor)-성 도메인(like domain)이 있으며 이 부분만으로 ErbB 단백질과 결합하여 세포반응을 나타낼 수 있다. 히레귤린은 EGF-성 도메인 옆에 있는 α 또는 β 형태의 도메인에 의해 히레귤린 α 또는 β 로 나뉘며 α 는 비신경세포, β 는 신경세포에서 발견된다. 히레귤린은 중추신경계와 말초신경계에서 슈반세포와 신경교세포의 사멸과 증식, 신경세포의 생존과 이동과 분화, 축삭 성장 등을 유도한다(Role of neuregulins in glial cell development (2000)*Glia* 29, 104-111; GDNF family ligands activate multiple events during axonal growth in mature sensory neurons (2004) *Mol. Cell. Neurosci.* 25, 453-459).

[0007] 신경성장인자를 신경질환 치료에 이용하는 방법으로는 줄기세포에 직접 처리하여 이식하는 방법이 있으나 이는 신경전구세포의 분리 및 유지가 어렵다는 문제가 있으며 다른 방법으로 유전자 전달 벡터로서 바이러스를 이용하는 세포치료 방법이 있다. 줄기세포의 이식을 통한 세포치료(stem cell therapy)를 근간으로 하는 재생의학은 질환의 궁극적인 치료방법이 될 것이다.

[0008] 유전자치료법은 인간을 대상으로 1990년 처음 임상시험이 시작된 이래 2002년까지 약 600여건의 임상시험이 3500명의 환자를 대상으로 진행 중이다. 그러나 지금까지 승인된 유전자치료법 중 75%가 암이나 낭포성 섬유증 등의 단일유전 질환의 치료를 목표로 하고 있고 신경질환이나 신경재생을 위한 유전자치료제의 개발은 활발하지 않다 (미국 NIH 재조합 DNA 자문보고서(2002); Gene therapy clinical trials (2002) *J Gene Med.* www.wiley.co.uk/genmed).

[0009] 신경 계통의 질환은 뇌기능 연구에 대한 신경과학의 전반적인 연구가 아직 부진한 상태이므로 각종 만성 신경계 질환의 치료 약제개발 또한 난관에 처해 있다. 특히 신경전구세포의 사용은 이제까지와는 전혀 다른 관점에서 질환을 원인적으로 치료하는 의료계의 혁명적인 새로운 치료법으로서 이식부위에 적합한 신경세포 종류로의 분화의 증진을 도모할 수 있다. 또한 신경전구세포의 증식과 분화를 촉진하는 유전자치료제의 직접 주입은 이러한 치료를 현실화하고 대중화할 수 있을 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 본 발명은 히레귤린 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드의 기억력 향상 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료 용도를 제공함을 목적으로 한다.

과제 해결수단

- [0011] 상기 과제의 해결을 위해, 본 발명은 히레글린 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하는 기억력 향상용 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0012] 또한 본 발명은 히레글린 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 포함하는 기억력 향상용 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0013] 또한 본 발명은 히레글린 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 암호화하는 DNA 서열; 및 분비 지시 펩타이드(signal peptide)를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 재조합 아데노바이러스를 포함하는 기억력 향상용 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한 본 발명은 히레글린 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드를 암호화하는 DNA 서열; 및 분비 지시 펩타이드(signal peptide)를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 재조합 아데노바이러스를 도입한 중간엽 줄기세포를 포함하는 기억력 향상용 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

효 과

- [0015] 본 발명에 따른 히레글린 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드는 신경전구세포의 증식 및 기억 형성에 필요한 신경세포로의 분화를 유도함으로써 기억력을 향상시킬 수 있으며 기억 손상 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명은 히레글린 베타1의 EGF-성 도메인 펩타이드(이하, HRGβE라고 한다)를 암호화하는 핵산을 포함하는 기억력 향상용 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명자들은 이전 연구를 통하여 HRGβE가 말초신경계 신경세포의 이동, 분화, 신경돌기 성장촉진 및 재생효과가 있어서 이를 말초신경계 신경 손상 질환의 치료에 효과가 있음을 밝힌 바 있다(대한민국 등록특허 제10-0765496호). 그러나 HRGβE를 대상으로 연구를 계속하던 끝에 놀랍게도HRGβE가 중추신경계의 신경전구세포의 증식, 생존, 분화 등을 유도하는 효과가 있음을 밝혔으며, 더욱 놀랍게는 HRGβE가 기억력을 향상시키는 효과가 있음을 입증함으로써 본 발명을 완성하게 되었다. 앞서 기술한 바와 같이 포유동물의 뇌는 신경세포의 수를 확보하고 이들이 기관 내의 적절한 위치로 이동, 분화, 생존 및 사멸, 시냅스 형성 등 일련의 과정을 거쳐 체계적인 신경회로망을 발생함으로써 복잡한 기능을 수행하게 된다. 따라서 단순히 신경전구세포의 증식 또는 재생을 촉진한다고 하여 곧 기억력 향상 또는 기억 손상을 회복시키는 기능을 수행할 수 있는 것은 아니다. 따라서 HRGβE가 기억력 향상 및 기억 손상 질환의 치료 효과를 갖는다는 연구 결과는 이전의 연구 결과로부터 전혀 예측할 수 없었던 놀라운 효과의 발견이 아닐 수 없다.
- [0018] 본 발명자들은 하기 실시예를 통하여 HRGβE를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 재조합 아데노바이러스(이하, HRGβE-Ad라 한다)를 도입한 중간엽 줄기세포를 흰쥐의 뇌에 이식하여, 신경전구세포의 증식, 분화 촉진 및 기억력 향상 효과가 있는 것을 확인하였다. 즉, 사람의 골수 중간엽 줄기세포에 HRGβE-Ad를 감염시킨 결과 HRGβE-Ad가 HRGβE를 합성하여 세포 외로 분비하는 것과, HRGβE-Ad 감염시킨 중간엽 줄기세포를 신경전구세포와 공동배양한 결과 상기 HRGβE가 신경전구세포의 증식을 유도하는 것을 관찰하였다. 또한 상기 HRGβE-Ad로 감염시킨 중간엽 줄기세포를 뇌질환 모델인 흰쥐의 뇌에 이식한 결과, 내재성 신경전구세포의 증식, 증식세포의 생존 및 뉴런으로의 분화를 유도하였으며 특히 해마에서 기억 형성에 필요한 신경세포 종류인 글루타메이트성, 가바성, 콜린성 세포로 분화하였다. 뿐만 아니라, 뇌 손상 모델 흰쥐의 기억력 검사 결과 기억력이 향상되는 결과를 얻음으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0019] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 HRGβE를 암호화하는 핵산은 이에 제한되는 것은 아니지만 서열번호 1의 염기서열을 갖는 핵산일 수 있다. 이외에도 서열번호 1의 염기서열과 90% 이상의 상동성을 가지며, 신경전구세포의 증식을 유도하는 활성을 갖는 변이체 펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함하며, 예를 들어, GGF(glial growth factor), NDF(Neu differentiation factor), ARIA(Acetylcholin receptor inducing activity), 또는 SMDF(sensory and motor neuron derived factor)와 같은 다른 타입의 랫트 또는 인간 히레글린 알파/베타의 EGF-성 도메인 펩타이드를 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다.

- [0020] 본 발명은 또한 HRG β E를 포함하는 기억력 향상용 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 HRG β E는 이에 제한되는 것은 아니지만 서열번호 4의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드일 수 있다. 이외에도 서열번호 4의 아미노산 서열과 90% 이상의 상동성을 가지며, 신경전구세포의 증식을 유도하는 활성을 갖는 변이체 펩타이드를 포함하며, 예를 들어, GGF(glial growth factor), NDF(Neu differentiation factor), ARIA(Acetylcholin receptor inducing activity), 및 SMDF(sensory and motor neuron derived factor)와 같은 다른 타입의 랫트 또는 인간 히레글린 알파/베타의 EGF-성 도메인 펩타이드를 포함한다.
- [0022]
- [0023] 본 발명은 또한 HRG β E를 암호화하는 DNA 서열을 포함하는 재조합 아데노바이러스(HRG β E-Ad)를 포함하는 기억력 향상용 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 재조합 아데노바이러스는 분비 지시 펩타이드(signal peptide)를 암호화하는 DNA 서열을 추가로 포함할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 분비 지시 펩타이드는 서열번호 5의 아미노산 서열을 갖는 펩타이드일 수 있으며, 상기 분비 지시 펩타이드를 암호화하는 DNA서열은 서열번호 2의 서열을 갖는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 실질적으로 동일한 활성을 갖는 이들의 변이체 또는 단편이 포함되는 것으로 해석할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 다른 구체예에서, 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 상기 HRG β E를 암호화하는 DNA 서열과 상기 분비 지시 펩타이드를 암호화하는 DNA 서열이 융합된 염기서열을 가질 수 있다. 보다 구체적으로, 이에 제한되는 것은 아니지만, 상기 HRG β E를 암호화하는 DNA 서열과 상기 분비 지시 펩타이드를 암호화하는 DNA 서열이 융합된 염기서열은 서열번호 3의 염기서열일 수 있으며, HRG β E와 분비 지시 펩타이드가 융합된 펩타이드는 서열번호 6의 아미노산 서열을 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 실질적으로 동일한 활성을 갖는 이들의 변이체 또는 단편이 포함되는 것으로 해석할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 DNA 서열을 발현시킬 수 있는 바이러스 프로모터를 추가로 포함할 수 있으며, 이 때 상기 바이러스 프로모터는 CMV 프로모터일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 본 발명의 재조합 아데노바이러스는 표적 세포 내에서의 복제를 위해 필요로 하는 게놈의 일부가 결핍된 것일 수 있으며, 상기 결핍된 일부는 E1, E3, E4, 및 L1-L5 유전자로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 E1 유전자가 결핍된 것일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 실시예에 사용된 재조합 아데노바이러스는 E1B 부위가 삭제된 복제결손 바이러스 매개체(replication defective viral vector)로써 최근 신경계 질환에 치료 유전자를 주입함으로써 질환부위에 대한 치료 효과를 거두기 위해 연구되고 있다(Viral vectors for modulating expression in neurons (1996) *Curr. Opin. Neurobiol.* 6, 576-583; Adenovirus vectors for gene delivery (1999) *Curr. Opin. Biotech.* 10, 440-447). 아데노바이러스의 장점은 분열하는 세포에만 도입되는 레트로바이러스와 달리 신경이나 근육 세포와 같이 최종적으로 분화한 다양한 종류의 세포에도 도입이 가능하다는 것이다(Gene delivery into the brain using virus vector(1993)*Nature genetics* 3, 187-189; Gene therapy for cerebral vascular disease(1997), *Stroke* 27, 534-539). 또한 다른 바이러스 매개체에 비해 세포독성이 낮아 안전하고 높은 농도로 정제될 수 있으며 8kb의 비교적 큰 수용능력을 지녔을 뿐만 아니라 생산하기도 쉽다. 또한 본 발명에 사용되는 재조합 아데노바이러스는 레트로바이러스와 달리 중간염 줄기세포에 100% 도입되며 염색체에 끼어들어가지 않으므로 3개월 후에 없어지며, 삽입 돌연변이(insertional mutagenesis)가 발생할 위험이 낮은 것도 큰 장점이다.
- [0030] 기존의 논문에서는 아데노바이러스가 폐의 상피세포, 피부, 및 근육에서 E. coli β -갈락토시다아제 유전자의 발현 유도시 높은 정도로 발현이 된다는 것을 확인한 바 있다(Adenovirus-mediated in vivo gene transfer and expression in normal rat liver (1992), *Nature genetics* 1, 372-378 ; Diversity of airway epithelial cell target for in vivo recombinant adenovirus-mediated gene transfer (1993) *J. Clin. Invest.* 91, 225-234 ; Intraperitoneal in vivo gene transfer in the skin using replication-deficient recombinant adenovirus vector(1994) *J. Invest. Dermatol.* 102, 415-421 ;Immunology of gene therapy with adenoviral vectors in mouse skeletal muscle(1996) *Hum.Mol.* 5 1703-1712). 또한 본 발명자들은 재조합 LacZ 아데노바이러스가 HiB5 신경전구세포에 잘 도입되며 쥐의 신경계에 잘 도입되고 6주 이상 발현되는 양상을 보고하였다(Effective gene transfer into regenerating sciatic nerves by adenoviral vectors: potentials for gene

therapy of peripheral nerve injury (2000) *Mol. cells*. 10, 540-545). 따라서 본 발명에서 사용한 재조합 아데노바이러스 HRGβE-Adv는 하기에서 설명하는 바와 같이 중간엽 줄기세포에 도입하여 이식하거나, 기억 장애를 수반하는 퇴행성 뇌질환의 재생에 직접 사용할 수 있다.

[0031] 본 발명은 또한 HRGβE를 암호화하는 핵산을 도입한 중간엽 줄기세포를 포함하는 기억력 향상용 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0032] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 핵산의 도입은 미세주입법, 전기 도입법, 직접주입법, 입자분사법, 리포솜법 또는 발현벡터를 이용하여 이루어질 수 있다. 미세주입법(microinjection)은 이에 제한되는 것은 아니지만 예를 들어 스테레오택식 미세주입법을 사용할 수 있으며, DNA의 크기(50-200kb)에 상관없이 게놈에 삽입이 잘되고 후손에 전달이 잘되는 장점이 있다. 전기도입법(electroporation)에 의한 핵산의 도입 방법은 특히 ES cell등에 보편적으로 사용하는 방법으로서, 그 원리는 세포현탁액에 짧은 시간 동안 고전압을 걸어서 그 충격으로 세포막 투과성이 변화되어 외래 DNA가 들어가는 방법이다. 입자 분사법(particle bombardment)은 금, 텅스텐등의 미세입자(직경 0.5-10 μm 정도) 표면에 원하는 DNA를 발라 세포나 조직속으로 고속 분사함으로써 DNA를 금속입자와 함께 세포 내로 주입하는 방법이다. 리포솜법은 리포솜을 이용하여 DNA를 세포막에 융합시키는 방법이다. 또한 다양한 발현벡터 내에 목적하는 핵산을 삽입하여 이를 숙주세포 내로 도입하는 방법이 있다. 발현벡터는 이에 제한되는 것은 아니지만 플라스미드 또는 바이러스일 수 있으며, 바람직하게는 재조합 아데노바이러스일 수 있다.

[0033] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 재조합 아데노바이러스(HRGβE-Ad)는 앞서 설명한 바와 같다.

[0034] 중간엽 줄기세포(mesenchymal stem cell)는 일반적으로 골수에서 조혈작용을 돕는 지지세포(stroma)로 알려져 있으며, 뼈, 연골, 지방, 근육세포를 포함한 여러 가지 중배엽성 세포로 분화하는 능력을 지닌 세포로서, 기타 미분화 세포에 비해 유지비용과 노력이 비교적 저렴하다. 사람의 골수 중간엽 줄기세포가 뇌에서 신경교세포로 분화하는 잠재력을 지닌 것이 알려지면서 (Kofen et al. 1999; Azizi et al. 1998), 중간엽 줄기세포를 세포치료제로 이용한 중추신경계 질환의 치료가 가능한 것으로 제시되었다. 따라서, HRGβE를 중간엽 줄기세포를 이용해 전달하는 방법은 HRGβE 뿐만 아니라 중간엽 줄기세포가 분비하는 성장인자에 의한 신경 재생 효과 및 중간엽 줄기세포 자체가 신경세포로 분화함으로써 신경세포를 대체하는 효과도 가질 수 있어 유리하다.

[0035] 본 실시예에 따르면 HRGβE를 도입한 중간엽 줄기세포가 뇌이식 후에 신경세포로 더 많이 분화하였으며, 이식 부위에 필요한 신경세포 종류인 GABA성 신경세포 (GABAergic neuron), 글루타메이트성 신경세포 (glutamatergic neuron), 콜린성 신경세포(cholinergic neuron) 등으로 분화하였음을 알 수 있다. 특히, 신경 분화 초기에 분비되는 신경전달물질인 GABA를 만드는 효소인 glutamic acid dehydrogenase(GAD)를 발현하는 신경세포가 더 많이 분화하였다. 이처럼 중간엽 줄기세포가 해마에서의 기억 형성에 중요한 글루타메이트성, 가바성, 콜린성 신경세포 등으로 분화함으로써 신경세포의 사멸로 인한 기억력 감퇴를 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있다.

[0036] 본 발명의 한 구체예에서, 중간엽 줄기세포는 이에 제한되는 것은 아니지만 골수 중간엽 줄기세포 또는 제대혈 중간엽 줄기세포일 수 있으며, 바람직하게는 골수 중간엽 줄기세포일 수 있고, 더욱 바람직하게는 상기 조성물을 투여하고자 하는 대상체 자신의 골수에서 추출한 중간엽 줄기세포일 수 있다. 상기 대상체는 인간, 오랑우탄, 침팬지, 마우스, 랫트, 개, 소, 닭, 돼지, 염소, 양 등을 포함하나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다. 대상체 자신의 골수에서 추출한 중간엽 줄기세포의 경우 세포분열을 통해 증식 가능하므로 암유전자의 도움 없이도 세포의 다량확보가 용이하다.

[0037] 본 발명의 기억력 향상 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 조성물은 의약 조성물로 이용할 수 있다. 따라서 본 발명은 향상 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 HRGβE를 암호화하는 핵산, HRGβE 펩타이드, HRGβE-Ad 또는 HRGβE-Ad 로 감염시킨 중간엽 줄기세포의 용도; HRGβE를 암호화하는 핵산, HRGβE 펩타이드, HRGβE-Ad 또는 HRGβE-Ad 로 감염시킨 중간엽 줄기세포를 포함하는 기억력 향상 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료용 의약 조성물; 및 치료상 유효량의 HRGβE를 암호화하는 핵산, HRGβE 펩타이드, HRGβE-Ad 또는 HRGβE-Ad 로 감염시킨 중간엽 줄기세포를 대상체에 투여하는 것을 포함하는 기억 손상 질환의 치료방법을 제공한다.

[0038] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 기억 손상 질환은 이에 제한되는 것은 아니지만 치매, 파킨슨병, 알츠하이머병,

간질, 뇌졸중, 정신분열증 또는 외상성 뇌손상(traumatic brain injury) 등의 질환일 수 있다. 다만 본 명세서에서 예시한 기억 손상 질환 외에도, 신경세포의 기능 손상에 의해 기억 장애를 나타내는 질환에 대해서는 당업계에 잘 알려져 있다. 본 발명에서 HRGβE펩타이드가 신경전구세포의 증식 및 뉴런으로의 분화를 촉진하며 결과적으로 기억력을 향상 또는 회복시킨다는 사실을 밝힌 이상 당업자는 기억 손상과 관련된 질환의 예방 또는 치료를 위해 상기 HRGβE를 암호화하는 핵산, HRGβE 펩타이드, HRGβE-Ad 또는 HRGβE-Ad 로 감염시킨 중간엽 줄기세포를 이용할 수 있을 것이다.

- [0039] 본 발명의 의약 조성물의 유효성분의 유효량은 기억력 향상 또는 기억 손상 질환의 예방 또는 치료 효과를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 예컨대, 성인의 경우 1일 1회 내지 수회 투여시, HRGβE펩타이드의 경우 0.1ng/kg~10g/kg, HRGβE를 암호화하는 핵산, HRGβE-Ad 또는 HRGβE-Ad 로 감염시킨 중간엽 줄기세포의 경우 0.01ng/kg~10g/kg의 용량으로 투여할 수 있다.
- [0040] 본 발명에 있어서, '대상체'는 인간, 오랑우탄, 침팬지, 마우스, 랫트, 개, 소, 닭, 돼지, 염소, 양 등을 포함하나, 이들 예에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명의 의약 조성물은 유효 성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등의 가용화제를 사용할 수 있다.
- [0042] 본 발명의 의약 조성물은 투여를 위해서 유효 성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 의약 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0043] 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 의약 조성물의 약제 제제 형태는 과립제, 산제, 피복정, 정제, 캡슐제, 좌제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 및 활성 화합물의 서방출형 제제 등이 될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 의약 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

실시예

- [0046] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0047] <실험예>
- [0048] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.
- [0049] HRGβE-Ad의 제조
- [0050] 본 발명의 실시예에서 사용된 HRGβE-Ad는 대한민국 등록특허 제10-0765496호의 실시예에 기재된 방법에 따라 제조하였다. HRGβE 를 암호화하는 DNA 서열은 서열번호 1의 서열을 사용하였고, 분비 지시 펩타이드를 암호화하는 DNA 서열은 서열번호 2의 서열을 사용하였다.

[0051] 실험동물

[0052] 실험에 사용한 흰쥐는 6 내지 7주령 된(190-240g) Sprague-Dawley (CrjBgi:CD(SD) IGS, Orient, Korea) 로서, 실험동물 사육실 (20-23℃, 주/야(12h/12h) 사이클 방식)에서 1 내지 2주 적응 시킨 뒤 뇌이식 실험에 사용하였다.

[0053] 중간엽 줄기세포의 뇌이식 전 처리

[0054] hMSC를 형광을 띄는 1,1-디옥타데실-3,3,3-테트라-메틸린도카보 시아닌 퍼클로레이트 (DiI-C18-(3))로 실온의 암실 조건에서 2시간 동안 표지하였다. 형광표지한 hMSC를 37℃, 10% FBS α-MEM 배지에서 배양한 후 2시간 동안 혈청 결핍 조건인 0.5% FBS α-MEM에서 분화되도록 처리하였다. 이후 식염수 포함 0.7% 페니실린/스트렙토마이신, 20mM 헤페스(pH=7.2) 및 0.5% 글루코스 내에서 살아있는 세포 수가 $6 \times 10^4 \text{ cells}/\mu\text{l}$ 가 되도록 부착되어 있는 세포를 탈착한 다음 $2\mu\text{l}$ 씩 뇌이식 하였다.

[0055] 뇌이식

[0056] 입체정위 수술(stereotaxic surgery)을 위해 먼저 흰쥐에 50mg/ml 이퀴텐신 (equithensin)을 복강 주사하여 진신마취 시켰다. 기억력 손상 모델을 제작하기 위하여 측뇌의 후각뇌피질(entorhinal cortex) 부위에 신경 독소인 이보테닉산 (1mg/ml)을 총 $1.5\mu\text{l}$ 주입하였고, 해마 내 해마백색판에 $6 \times 10^4 \text{ cells}/\mu\text{l}$ 의 세포를 $2.0\mu\text{l}$ 자동 미소분사기를 이용하여 정위 방법으로 hMSC를 주입하였다. 이후 회복 단계를 거쳐 기억력 검사를 수행하였고, 10주 후에 관류하여 뇌를 적출하였다. 증식 세포는 중간엽 줄기세포의 이식 후 11일로부터 3일간 BrdU (5-브로모-2-데옥시유리딘, Sigma)를 50mg/kg으로 복강주사하여 표지하였다. 마지막 복강주사 24시간 후에 관류를 통하여 뇌조직을 획득하였다.

[0057] 흰쥐 뇌의 고정 및 적출

[0058] 관류 방법(perfusion method) 수행 전, 이산화탄소를 약 5분간 주입하여 죽인 흰쥐를 개복하여 우심실에 pH 7.25의 4% PFA(파라포름알데히드, Sigma, USA) PBS를 약 400ml 주입하였다. 연동펌프 (manhatan company, 한국)를 연결한 직경 1mm의 주사바늘을 사용하여 주입하였으며, 주사바늘은 우심실의 밑 부분에 찔러 넣어 동맥을 통과할 수 있도록 하였다. 그리고 우심방을 터트려 피가 더 이상 심장으로 들어가지 못하게 함과 동시에 관류를 통해 흘러나오는 피를 제거하였다.

[0059] 각 조직이 고정되면 뇌를 적출하여 4℃, 4% PFA 용액에 4시간 둔 다음, 고정 용액 (30% 수크로스 1X PBS)에 넣어 10시간 동안 저장하여 조직의 고정과 탈수가 일어나도록 하였다. 그 후 -40℃에서 동결, OCT 컴파운드 (Sakura co. 일본)로 동결 절삭할 수 있도록 고정시킨 후 Cryostat(Microm)를 이용하여 $35\mu\text{m}$ 의 두께로 관상 섹션하였다. 이때 24well에 저장 완충용액을 담고 그 안에 해마의 시작부분부터 끝부분까지를 담아 4℃에서 보관하였다. 그리고 형광 염료인 DiI는 생체가 죽은 순간부터 세포막으로부터 확산하기 때문에, 관류방법을 시행한 순간부터 48시간 이내에 이후의 모든 실험이 이루어졌다.

[0060] BrdU 염색법

[0061] 냉동 절편하여 보관된 조직을 아크릴 24well로 옮겨 PBS로 3번 씻어 준 다음 0.5% Triton X-100 in PBS 용액으로 25분간 교반기에서 반응시켰다. 이후 37℃의 2N HCl 용액에 조직을 옮긴 다음 37℃에서 30분간 반응시켰다. 이후 PBS로 조직을 3회 세척한 다음 10% normal serum in 3% Bovine Serum Albumin(BSA) with 0.1% Triton X-100 in PBS 용액에서 비특이적 면역반응에 대한 블로킹 단계를 1시간 동안 진탕기 위에서 시행하고 이후 1차 항체를 4℃ 에서 16시간 동안 부착시켰다. 이때 항체는 1% BSA PBS로 희석하여 사용하였다. 이때 사용된 항체는 BrdU(BD bioscience, 1:500), Nestin(1:1000), Tuj1(Sigma, 1:1500), GFAP(Cemicon, 1:700), ChAT(Cemicon, 1:500), GAD67(Cemicon, 1:2000), VGluT1(Cemicon, 1:500), 및 TH(Cemicon, 1:700)였다. 이후 1차 항체에 상보적인 2차 항체를 실온에서 45분간 부착시켰다. 이때 사용된 2차 항체는 형광 표지된 Cy3(Jackson, 1:500),

FITC(Chemicon, 1:500), 및 Alexa488(Molecular probe, 1:700)이다.

[0062] BrdU 세포 수는 대조염색된 신호의 핵 부위에 신호가 잡히는 세포를 카운트하여 측정하였으며, BrdU는 핵 모양으로 둥근 형태를 띄고 있고 조직의 가장자리나 찢어진 부분에서 나타나는 비특이적 신호는 세지 않았다. 데이터 분석은 일원배치분산분석(Anova)을 사용하였다.

[0063] <실시예 1> HRGβE-Ad 감염된 중간엽 줄기세포로부터 HRGβE 분비능 측정

[0064] 사람의 골수 중간엽 줄기세포에 sHRGβE 아데노바이러스를 도입시킨 후에 sHRGβE의 분비량을 분석하기 위하여 도입 2일 후에 배양배지를 채취하고 표준 ELISA방법을 이용하여 분석하였다. 구체적으로, 35mm 배양 용기에 사람의 골수 중간엽 줄기세포를 3×10^5 으로 심고 하루 뒤 2% FBS가 함유된 배지에서 2시간 동안 LacZ-Ad 또는 HRGβE-Ad를 도입시킨 후 10% FBS 배지로 교환하고 12시간이 지난 후에 최종적으로 알파-MEM 1mL로 다시 교환하였다. 24시간이 지난 후 그 배지를 얻어 단백질을 분해효소 저해제를 넣고 사용하기 전까지 -70℃에서 보관하였다. 배지 내 sHRGβE의 양을 측정하기 위하여 ELISA 키트(R&D Systems, Germany)를 사용하였다.

[0065] 도1에 나타나듯, HRGβE 아데노바이러스가 도입된 인간의 중간엽세포는 10^{7-8} 바이러스입자당 83.5ng의 HRGβE를 생산하였으며 LacZ-Ad가 도입된 대조군 실험군에서는 HRGβ 단백질 30-40ng이 자연적으로 생산되었다. 즉 HRG ELISA 시 HRGβE (6.5kDa)가 3×10^5 세포당 100moi로 도입된 후에 대조군과 비교하였을 때 약 36.6 ng/mL이 생산되었다. 그러나 전체 HRGβ 단백질(45kDa)의 분자량에 비해 HRGβE 펩타이드(6.5kDa)는 매우 작은 분자량임으로 전체 단백질을 경우 1.17nM로 생산된 것에 비해 펩타이드로 생산시 약 5배인 5.6 nM로 생산되었음을 알 수 있다.

[0066] 결과적으로 HRGβE-Ad에 의해 효과적으로 세포 밖으로 HRGβE가 분비된다는 것을 알 수 있다.

[0067] <실시예 2> sHRGβE의 신경전구세포 증식 촉진 효과 (in vitro)

[0068] 분비된 sHRGβE가 신경전구세포의 증식에 영향을 미치는지를 확인하기 위하여 중간엽 줄기세포와 배아14일자에서 얻은 신경전구세포를 공동배양 하였다. 사람 골수 중간엽 줄기세포를 커버글라스에 심고 다음 날 2% FBS가 함유된 배지에서 2시간 동안 LacZ-Ad 또는 sHRGβE-Ad를 도입시킨 후 10% FBS 배지로 교환하였다. 12시간이 지난 후에 중간엽 줄기세포에 흰쥐의 배아14일자의 전피질로부터 분리한 피질 신경줄기세포(cortical neural stem cells)를 심은 후 FGF가 함유된 N2 배지에서 12시간 동안 배양하였고, 이후 N2 배지로 교환한지 12시간 후에 BrdU를 10μM로 처리하였다. BrdU가 처리된지 1일 후 세포를 4% 파라포름알데히드로 고정한 후 BrdU항체와 HuNu(human nuclear protein)항체로 면역 염색하였다.

[0069] 신경전구세포는 배양시 표면에 폴리오르니틴, 폴리라이신 같은 기질과 피브로넥틴, 라미닌 같은 세포외 기질 단백질을 필요로 한다. 그러나 본 발명에서는 HRGβE를 분비하는 중간엽 줄기세포 위에 신경전구세포를 공동배양했을 때 기질과 세포외 기질 단백질 없이도 신경전구세포가 중간엽 줄기세포를 지지대로 안착하여 자라는 것을 관찰하였으며, HRGβE에 의해 신경전구세포가 증식하는 효과를 관찰하였다. 도 2의 (a) 및 (b)에 따르면, 대조군으로 사용된 LacZ-Ad가 도입된 중간엽 줄기세포위에서 자란 신경전구세포는 전체 신경전구세포의 22.4%의 BrdU로 표지되어 증식한 세포의 비율이 22.4%임을 확인하였으며, HRGβE-Ad가 도입된 중간엽 줄기세포 위에서 자란 신경전구세포는 전체 신경전구세포의 39.9%가 증식한 세포임을 확인하였다. 대조군인 LacZ중간엽 줄기세포를 기준으로 보면, HRGβE 중간엽 줄기세포와 공동배양된 신경전구세포의 증식이 약78% 증가되었다는 것이며, 이는 신경전구세포의 증식에HRGβE가 영향을 미쳤다는 것을 의미한다. 또한 HRGβE 중화 항체를 중간엽 줄기세포에서 생산되는 펩타이드(5.6nM)의 약6배의 농도(33.3nM, 5μg/mL)로 처리함에 의해 중간엽 줄기세포에서 분비된 HRGβE 펩타이드의 증식 효과가 억제되는 것을 확인하였다.

[0070] <실시예 3> HRGβE에 의한 내재성 신경전구세포 증식 및 신경전구세포의 분화

[0071] HRGβE에 의한 내재성 신경전구세포 증식

[0072] 사람 중간엽 줄기세포에 LacZ-Ad를 도입시킨 대조군과 HRGβE-Ad를 도입시킨 실험군으로 나누고 이들을 각각 기억손상 모델 흰쥐 해마의 해마백색판 위치에 뇌이식하였다. 뇌이식 11일 후부터 3일간 BrdU를 복강주사하여 내

재성 신경전구세포에 표지하였다. 이식 후 2주차가 되는 시점에서 쥐의 뇌를 관류 후 적출하여 면역 조직 화학 방법으로 BrdU가 표지된 증식세포를 검출하였다(도 3).

[0073] 도 4는 중간엽 줄기세포의 이식 부위에 대한 모식도 및 형광 표지하여 이식한 중간엽 줄기세포의 안착된 부위를 비교하여 나타낸다. 이식된 중간엽 줄기세포의 안착부위와 형태로 볼 때 정확한 부위에 이식되어 있음을 알 수 있다.

[0074] (도 5a, 5b 참조). 도 5(a)에 나타나듯 BrdU 표지된 증식세포는 주로 해마의 치아이랑 영역의 SGZ(subgranular zone) 및 CA1 영역의 해마백색판 부위에 존재한다. 도 5(b)에 의하면 HRGβE-Ad 감염된 중간엽 줄기세포를 이식한 신경전구세포의 증식세포의 수가 해마의 치아이랑 및 CA1 영역에서 2배 이상 증가한 것으로 나타났다.

[0075] HRGβE에 의한 신경전구세포의 분화

[0076] 증식이 증가된 내재성 신경전구세포의 초기 신경세포 분화를 관찰하기 위하여 신경세포 특이적 마커인Nestin 및 Tuj-1, 아교세포 중 성상세포 특이적 마커인 GFAP를 사용하여 이중 형광염색을 수행하였다(도 6a, 6b 참조).

[0077] 도6(a)에 나타난 바와 같이 HRGβE-Ad 그룹의 BrdU 표지된 세포에서 Nestin의 발현은 증가되고 GFAT의 발현은 감소되었다. 도 6(b)는 상기 분화세포들의 발현양을 정량화하여 나타내는데, HRGβE-Ad 그룹에서 신경세포 표지자인 Nestin을 발현하는 세포의 수치는 증가된 반면, 성상세포를 표지하는 GFAP를 발현하는 세포의 수치는 대조군에 비해 오히려 감소되었다. 따라서 HRGβE에 의해 신경전구세포의 초기 신경세포로의 분화가 촉진되는 반면 아교세포로의 분화는 억제함을 알 수 있다.

[0078] <실시예 4> HRGβE에 의한 내재성 신경전구세포의 생존 및 신경전구세포의 분화

[0079] BrdU를 복강 주사한 뒤 4주 후에 대조군과 실험군 동물의 뇌를 관류 후 적출하여 BrdU 표지된 세포들의 장기간 생존 여부를 평가하는 실험을 진행하였다.

[0080] 도 7(a)에 나타난 BrdU 표지 세포들은 세포들은 2주째에 분열하여 4주간 생존한 세포들로, HRGβE-Ad 그룹에서 대조군에 비해 많은 수의 세포가 생존하여 해마 CA1 영역의 so(stratum oriens), py(stratum pyramidale; pyramidal layer), sr(stratum radiatum) 부위 등으로 이동하여 존재하고 있으며, 치아이랑(DG) 영역의 gcl(granule cell layer)에서도 대조군에 비하여 증식한 세포가 다수 생존하고 있음을 알 수 있다.

[0081] 도 7(b)는 4주간 분화한 내재성 신경전구세포를 각 신경세포 타입별 마커로 형광 조직염색을 시행한 결과 각 타입별 신경세포로 분화함을 보여준다. 글루타메이트를 사용하는 글루타메이트성 뉴런의 마커로 VGluT1(vesicular glutamate transporter 1), GABA성 뉴런의 마커로 GAD67(glutamic acid decarboxylase 67), 아세틸콜린을 신경 전달물질로 사용하는 콜린성 뉴런의 마커로 ChAT(choline acetyl transferase) 및 도파민성 뉴런의 마커로 TH(tyrosine hydroxylase)를 사용하여 형광 조직염색을 시행한 결과, HRGβE-Ad감염시킨 중간엽 줄기세포를 이식한 그룹에서 상기 각 뉴런 타입별 마커로 염색되는 세포의 수치가 증가하였다.

[0082] 결과적으로 HRGβE에 의해 증식한 내재성 신경전구세포가 해마에서의 기억 형성을 조절하는 신경세포인 글루타메이트성 뉴런, GABA성 뉴런, 콜린성 뉴런 및 도파민성 뉴런 세포로의 분화를 유도함을 알 수 있다.

[0083]

[0084] <실시예 5> 이식된 중간엽 줄기세포의 분화

[0085] 뇌이식 10주 후 HRGβE-Ad감염시킨 중간엽 줄기세포의 분화양상을 탐색하기 위하여 뉴런의 마커인 NeuN, 아교세포 중 성상세포의 마커인 GFAP, 및 희소돌기교세포의 마커인 O4로 이중 형광 조직염색을 시행하였다. 뇌이식한 중간엽 줄기세포는 DiI로 형광 표지하여 이중 형광 조직염색에 사용하였다. 구체적으로, 냉동 절편 하여 보관된 조직을 아크릴 24well로 옮겨 PBS로 2번 씻어 준 다음 0.5% Triton X-100 in PBS 용액으로 20분간 4℃ 챔버에서 얼음 위에 두고 DiI가 확산하지 않도록 진탕기로 돌린다. 이후 15% normal serum in 3% Bovine Serum Albumin(BSA) with 0.1% Triton X-100 in PBS 용액에서 비특이적 면역반응에 대한 블로킹 단계를 2시간 동안 진탕기 위에서 시행하고 이후 1차 항체를 4시간 동안 부착시킨다(3시간 4℃, 1시간 실온). 이때 항체는 1% BSA in PBS로 희석하여 사용하였다. 이때 사용된 항체는 ChAT(Chemicon, 1:500), GAD65/67(Chemicon, 1:500),

GAD67(Chemicon, 1:2000), VGluT1(Chemicon, 1:500), NeuN(Chemicon, 1:700), GFAP(Chemicon, 1:700), O4(Chemicon, 1:700)이다. 이후 1차 항체에 상보적인 2차 항체를 실온에서 45분간 부착하였다. 이때 사용된 2차 항체는 형광 표지된 Cy2(Jackson, 1:500), FITC(Chemicon, 1:500)으로 DiI의 로다민과 다른 파장 대역을 설정하였다. 이후 모든 과정이 끝나면 마운팅하여 공초점 레이저 주사 현미경(LSM510, Carl Zeiss, Germany)으로 관찰 및 촬영하였다.

[0086] 이중(double) 촬영한 슬라이드에서 DiI로 표지된 이식한 hMSC의 수를 카운트하고 각 분화 마커인 ChAT, GAD65/67, VGluT1, NeuN, GFAP, O4 각각의 FITC 세포의 수를 카운트하여 각 실험동물의 해마 내 분화 마커의 수를 DiI수로 백분율하였다. 이 때 모양과 위치가 정확히 일치되고 세포의 모양을 하고 있는 FITC의 수를 카운트하였다.

[0087] 도 8은 기억손상동물 모델의 해마에 HRGβE-Ad 또는 LacZ-Ad를 도입한 사람 중간엽 줄기세포를 이식한지 10주 후에, 중간엽 줄기세포의 분화 실험 및 기억력 검사를 수행하는 과정을 설명하는 모식도이다.

[0088] 도 9(a)는 이식된 중간엽 줄기세포를 각 신경세포 타입별 분화 마커로 형광 조직염색을 수행한 결과 각 타입별 신경세포로 분화함을 보여주는 사진이다. 이들 세포는 HRGβE-Adv 그룹과 대조군 모두에서 ChAT, GAD65/67, TH, NeuN, GFAP, O4 등 중추신경계를 구성하는 세포들의 마커를 발현함으로써 이들이 신경계 구성 세포로 분화하고 있음을 알 수 있다.

[0089] 도 9(b)는 상기 각 신경세포 타입별 분화 정도를 정량적으로 분석하여 나타낸 그래프이다. HRGβE-Ad 그룹의 세포에서 ChAT 표지된 세포의 분화 수치가 1.5배 가량 증가하였으며 GAD65/67표지된 세포의 분화 수치도 1.8배 가량 증가하였고 NeuN의 경우에도 1.3배 가량 증가하였다. 그러나 GFAP로 표지된 세포의 분화 수치는 오히려 1.8배 가량 감소하였고 O4의 경우에도 1.5배 가량 감소하였다. 이에 비해 도파민성 뉴런의 마커인 TH의 발현은 실험군과 대조군 사이에 큰 차이가 없었다.

[0090] 결과적으로 HRGβE-Ad감염된 중간엽 줄기 세포는 뇌에 이식될 경우에 해마에서 기억형성에 필요한 신경세포인 콜린성 뉴런 및 GABA성 뉴런으로 분화되는 것으로 관찰되었으며, 신경세포로 분화된 세포 수 (NeuN 발현 세포 수)는 증가하지만 정상세포 및 희소돌기교세포로의 분화는 오히려 감소됨을 알 수 있다.

[0091] <실시예 6> HRGβE에 의한 기억력 향상 실험

[0092] HRGβE에 의한 기억력 회복능을 조사하기 위하여 두 종류의 행동 검사를 시행하였다.

[0093] Y 자형 미로 (Y maze) 실험

[0094] Y 자형 미로 실험은 뇌이식 6주 후에 시행하였다. 물체의 식별이 가능한 어두운 공간에 Y자형 미로 공간을 설치하고 그 주변으로 시각적 표지들을 설치하였다. 이후 검사 대상 흰쥐를 그 공간에 옮겨 약 1시간 이상 공간에 대한 적응을 시킨 다음 실험을 실시하였다. 각 분지 통로에 임의적으로 순서를 표지하고 8분, 10분, 12분 후에 흰쥐의 탐색에 의한 각 분지 통로에 들어간 순서와 횟수를 기록하였다. 이들이 바로 전 단계에서 선택하여 들어갔던 분지 통로가 아닌 다른 분지 통로로의 진입 시 점수를 주는데 3차례 연속 다른 분지 통로를 선택하면 점수를 주어 전체 선택에 대한 비율로서 %로 나타내었다. 흰쥐들은 주변에 설치된 시각적 표지를 기억하여 새로운 분지 통로로의 탐색을 하게 되는데 이 수치가 높을수록 변화(alteration) 확률이 높은 것인바, 탐색에 의한 공간지각력을 검사할 수 있다.

[0095] 도 10(a)에 나타나듯이, HRGβE-Ad처리한 중간엽 줄기세포를 뇌이식한 실험군의 경우 전처리 없이 뇌이식한 중간엽 줄기세포와 비교하여 8분, 10분, 및 12분 간의 기억 행동 측정에서 1.2배 정도의 기억행동 향상 결과를 보였다.

[0096] 수동적 회피반응 (passive avoidance) 실험

[0097] 수동적 회피반응 실험을 위해 뇌이식 후 10주차가 되기 4-5일 전에 미리 훈련을 하였다. 훈련은 빛에 대한 회피반응력으로서, 명암 구분이 되는 두 챔버의 이동 통로를 막고 흰쥐가 들어있는 챔버에 전등을 켜 후 통로를 열어 맞은 편 어두운 챔버로의 이동 시간을 기록하였다. 이 훈련을 하루에 4-6회 실시하며 훈련 실시 후 24시간

이 지난 후에 다시 훈련을 실시하여 4-5일 동안 평균 이동시간이 20초 내외일 때에 실험을 시행하였다. 실험은 빛에 의한 회피가 이루어지고 다른 챔버로 이동하면 전기적 충격(1mA)을 3초간 준다. 전기충격 24시간 후 같은 조건으로 챔버에 넣고 전등을 켜 다음 이들이 반대편 챔버로 이동하는 시간을 기록하였다. 이 수치가 높을수록 자극에 대한 기억력 회복의 정도를 비교 할 수 있다.

[0098] 도 10(b)에 의하면HRGβE-Ad감염시킨 중간엽 줄기세포를 뇌이식한 경우에 수동적 회피실험에 대하여 크게 기억력이 회복되는 것을 알 수 있었다. 수치상으로 자극에 대한 기억이 LacZ-Ad 대조군에 비해 sHRGβE-Ad에서 약 4배 이상 증가되었다.

[0099] 따라서, 기억력 손상모델 환경에 HRGβE-Ad감염시킨 사람 중간엽 줄기세포를 해마부위에 뇌이식하면, 이로부터 분비된 HRGβE에 의해 사람 중간엽 줄기세포의 증식 및 기능성 신경세포로의 분화가 유도됨으로써, 세포사멸한 신경세포를 대체하여 신경세포간 연결을 이루고 결과적으로 기억력 회복에 기여할 수 있음을 알 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0100] 도 1은 사람의 골수 중간엽 줄기세포에 HRGβE-Ad를 도입한 후 HRGβE가 세포외로 분비되는 양을 ELISA로 분석하여 정량화한 그래프이다.

[0101] 도 2는 HRGβ가 신경전구세포의 증식에 미치는 영향을 보여준다. (a)는 BrdU 면역 염색을 이용하여 LacZ, sHRGβE, 및 HRGβE 중화항체를 처리한 후의 세포 증식을 보여주는 현미경 사진이고, (b)는 이를 정량화하여 나타낸 그래프이다.

[0102] 도 3은 아데노바이러스 감염시킨 중간엽 줄기세포를 기억손상 동물모델에 이식한 후 내재성 신경전구세포의 증식 및 재생 효과를 실험하는 과정을 보여주는 모식도이다.

[0103] 도 4는 중간엽 줄기세포 이식 부위에 대한 모식도 및 형광 표지하여 이식한 사람 중간엽 줄기세포가 안착된 부위와 형태를 보여주는 도면이다.

[0104] 도 5는 아데노바이러스 감염시킨 중간엽 줄기세포를 기억손상 동물모델에 이식한 후 내재성 신경전구세포의 증식을 조사한 결과를 보여준다. (a)는 BrdU 면역 염색에 의한 세포 증식을 보여주는 현미경 사진이고, (b)는 이를 정량화하여 나타낸 그래프이다.

[0105] 도 6은 아데노바이러스 감염시킨 중간엽 줄기세포의 이식 후 증식한 내재성 신경 전구세포의 초기 신경세포 분화를 관찰한 결과를 보여준다. (a)는 초기 신경세포 분화를 보여주는 현미경 사진, (b)는 각 마커를 발현하는 세포의 수를 측정하여 나타낸 표이다.

[0106] 도 7 은 아데노바이러스 감염시킨 중간엽 줄기세포의 이식 후 증식한 내재성 신경전구세포의 4주 후 신경전구세포의 생존 및 분화를 관찰한 결과를 보여준다. (a)는 증식된 신경전구세포들이 각 해마영역으로 이동하여 생존함을 보여주며, (b)는 각 신경세포 타입별 마커로 형광 조직염색을 수행한 결과 증식된 신경전구세포가 기억형성에 필요한 신경전달물질인 글루타메이트 또는 가바를 분비하는 글루타메이트성 또는 가바성 신경세포 종류로 분화하였음을 보여준다.

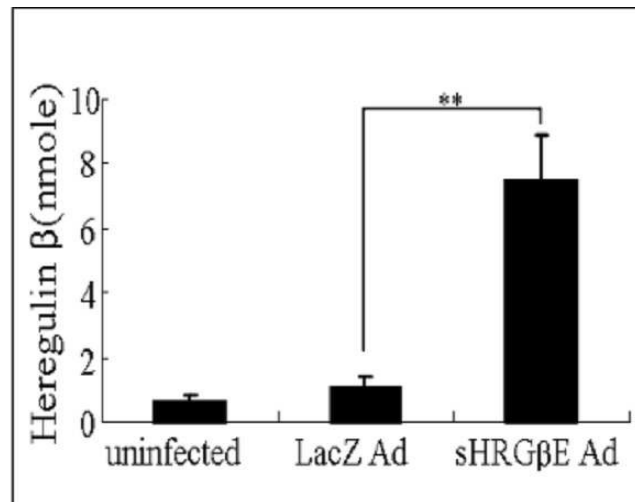
[0107] 도 8 은 아데노바이러스 감염시킨 사람 중간엽 줄기세포를 기억손상 동물모델에 이식한지 10주 후에 중간엽 줄기세포의 분화 및 기억력 검사를 수행하는 과정을 보여주는 모식도이다.

[0108] 도 9 는 아데노바이러스 감염시킨 사람 중간엽줄기세포를 기억손상 동물모델에 이식한지 10주 후, 중간엽 줄기세포의 분화를 관찰한 결과를 보여준다. (a)는 각 신경세포 타입별 마커로 염색한 결과를 보여주는 현미경 사진, (b)는 이식된 중간엽줄기세포가 기억형성에 필요한 신경전달물질인 아세틸콜린, 가바 (GABA)를 분비하는 콜린성 및 가바성 신경세포 종류로 분화하였음을 보여준다.

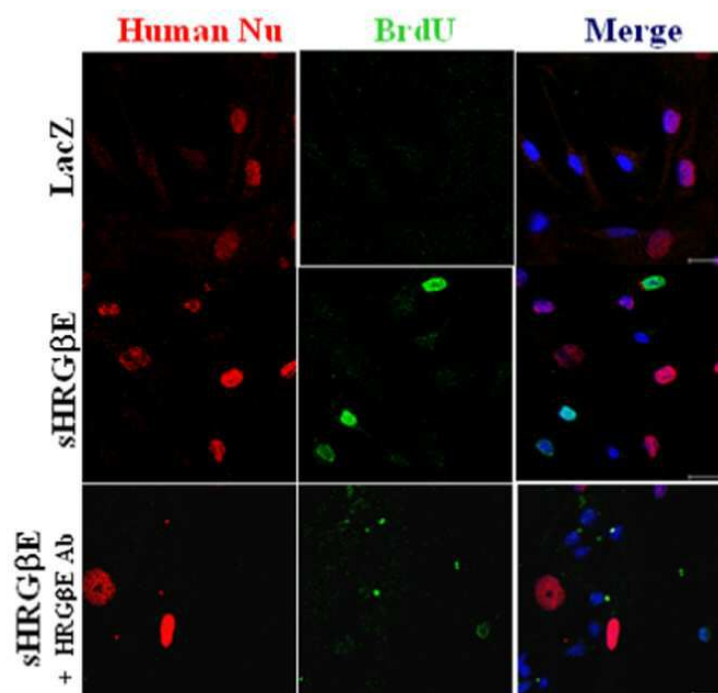
[0109] 도 10 은 아데노바이러스 감염시킨 사람 중간엽줄기세포의 이식 후의 기억력 회복능을 검사한 결과를 보여준다. (a)는 단기 공간기억력을 검사하는 Y자형 미로 검사 결과를 나타낸 그래프이며, (b)는 장기기억을 검사하는 수동적 회피반응 결과를 나타낸 그래프이다.

도면

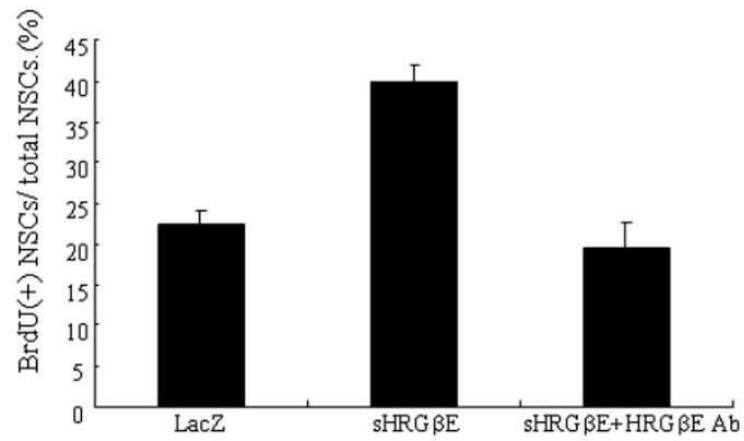
도면1



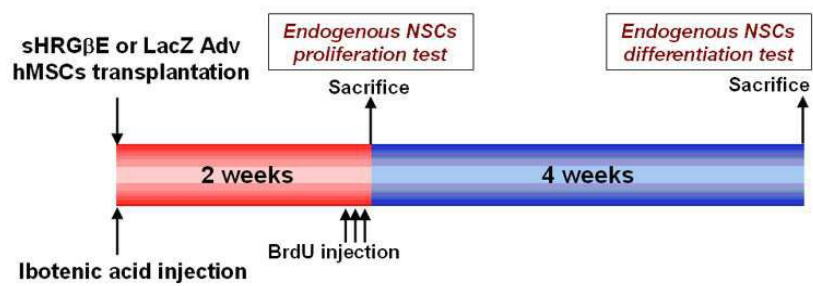
도면2a



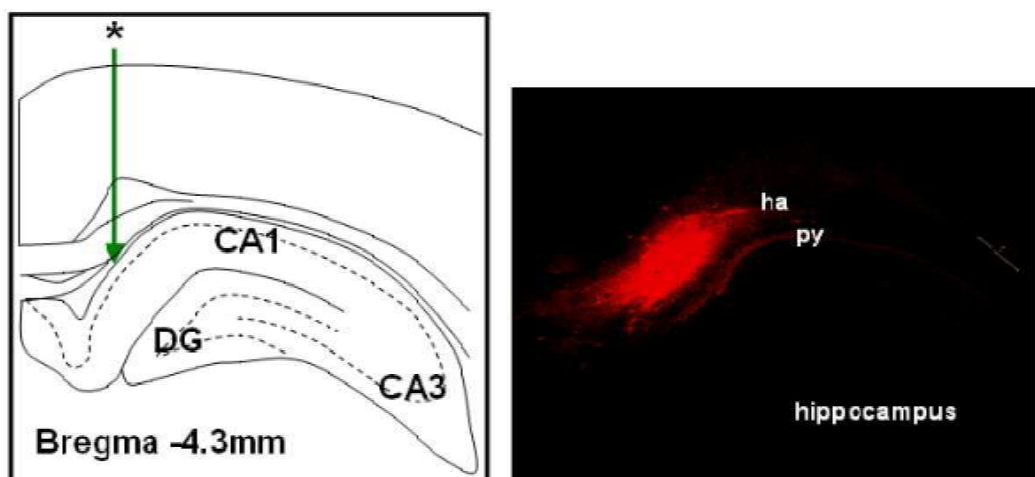
도면2b



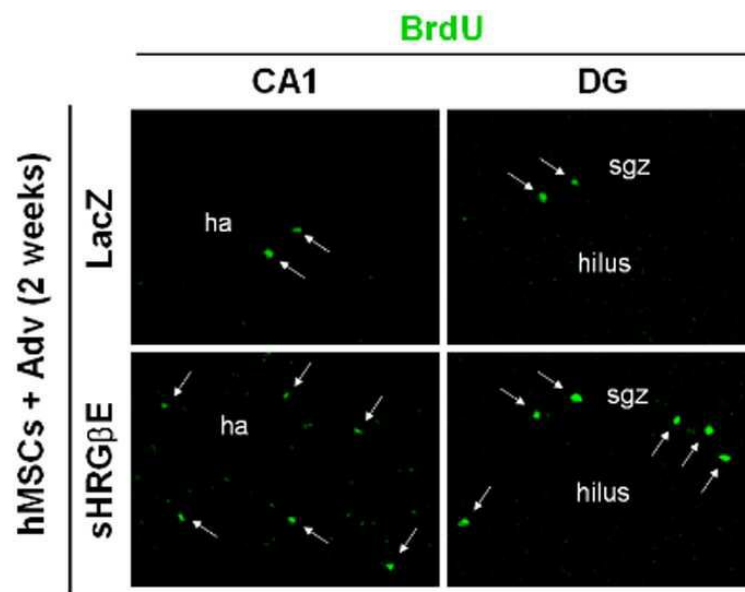
도면3



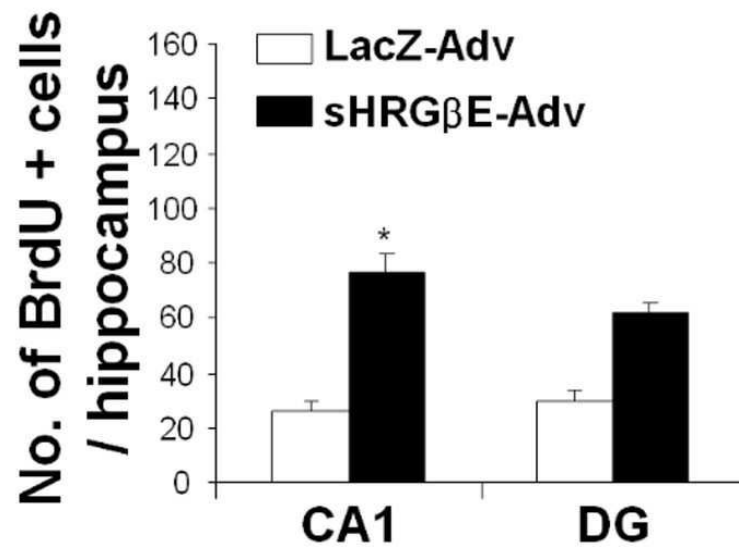
도면4



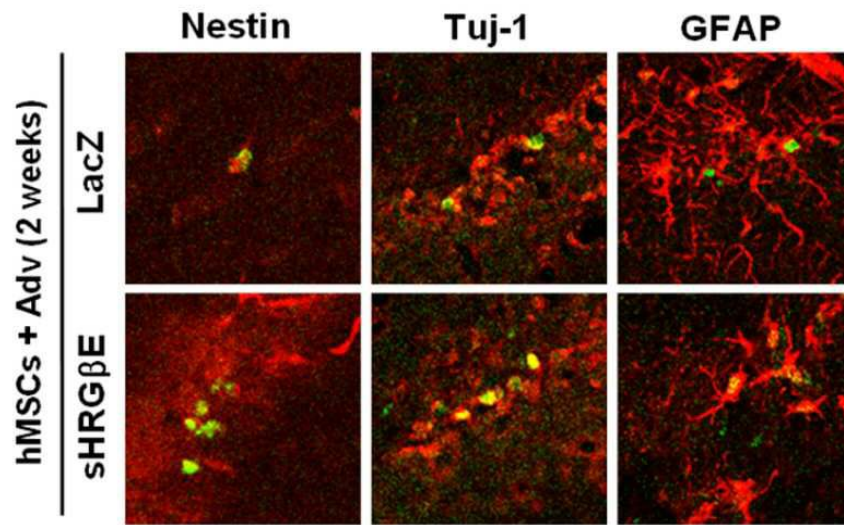
도면5a



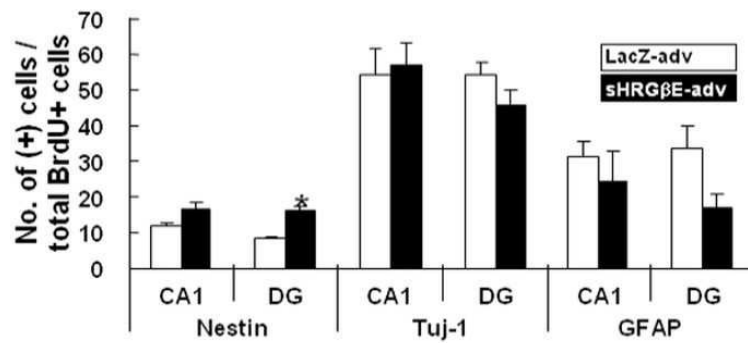
도면5b



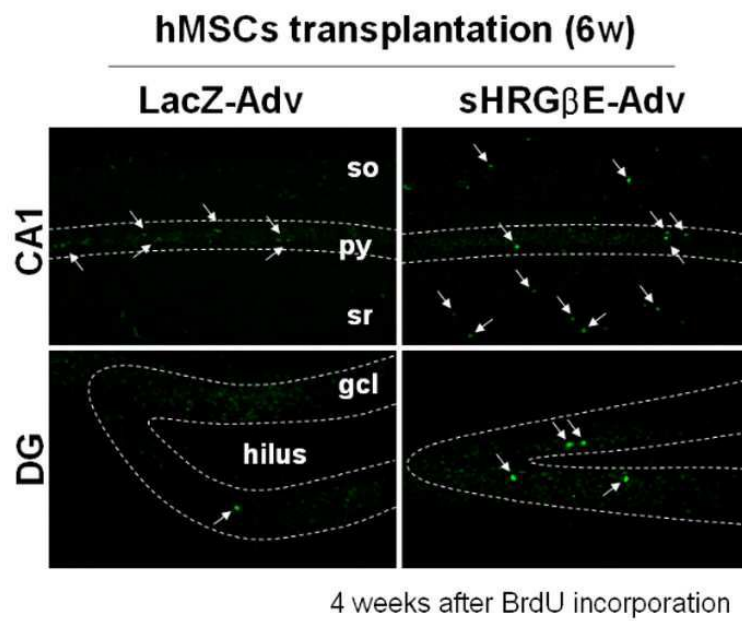
도면6a



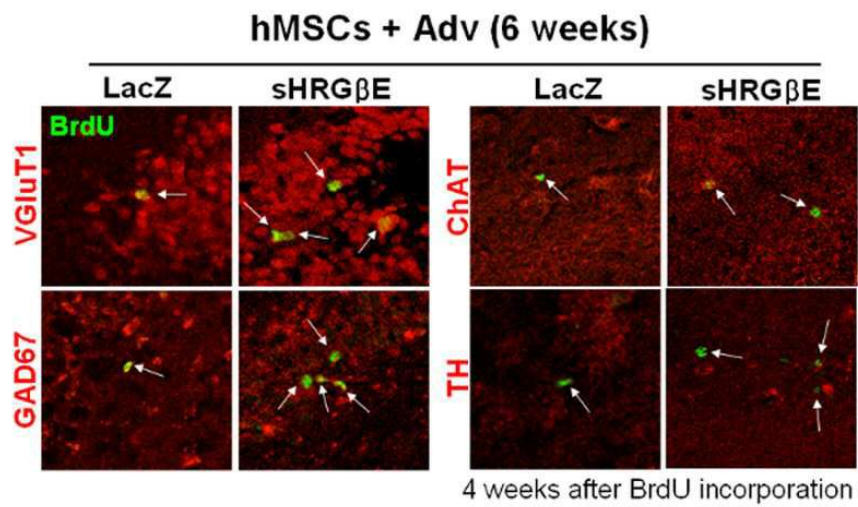
도면6b



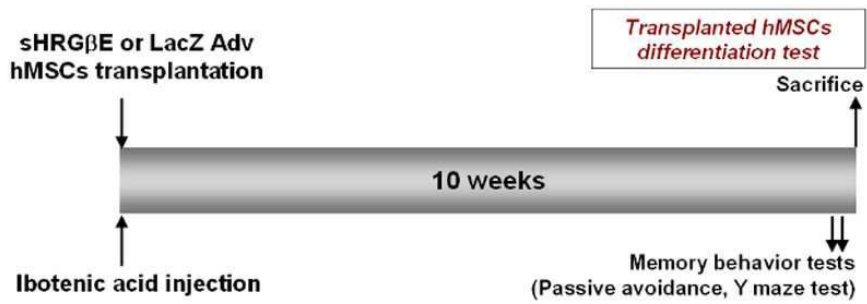
도면7a



도면7b

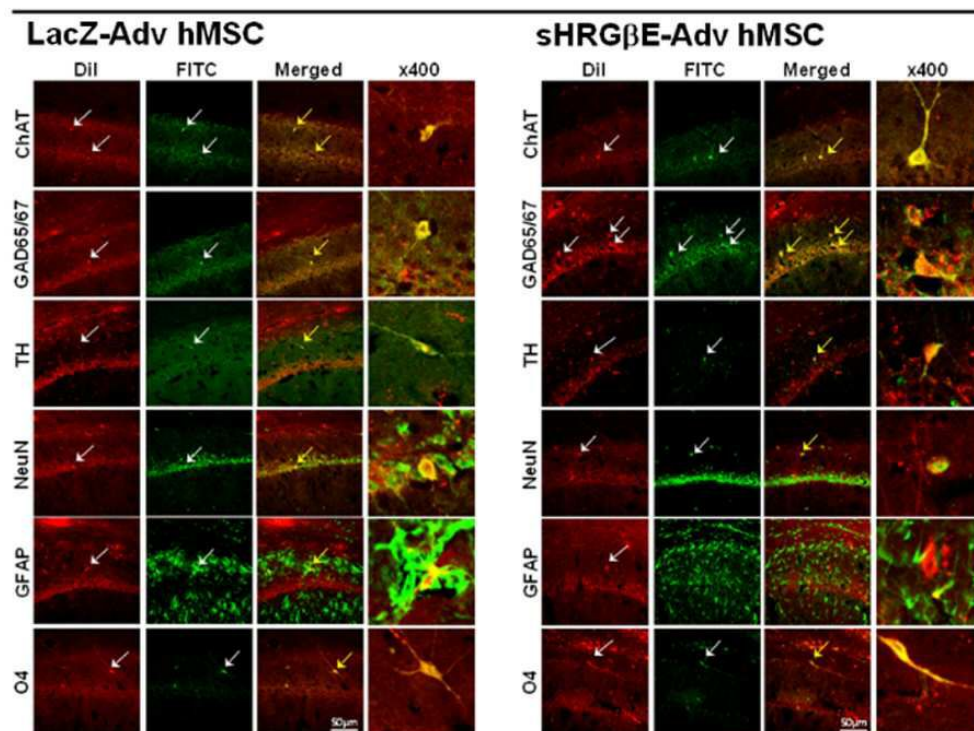


도면8

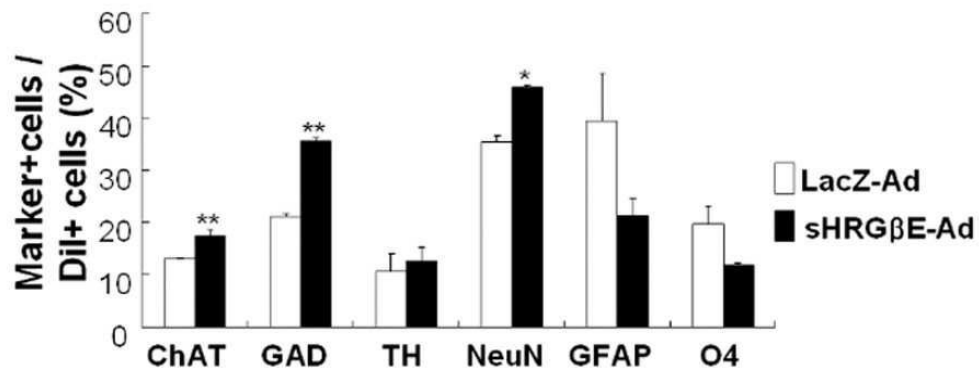


도면9a

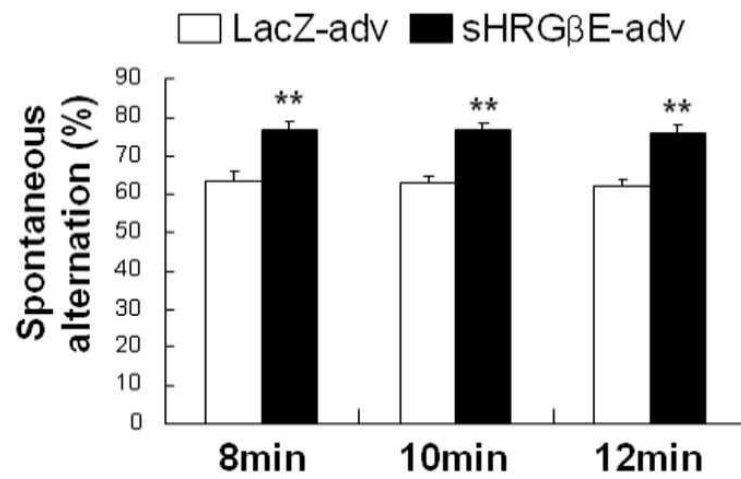
hMSCs + Adv (10 weeks)



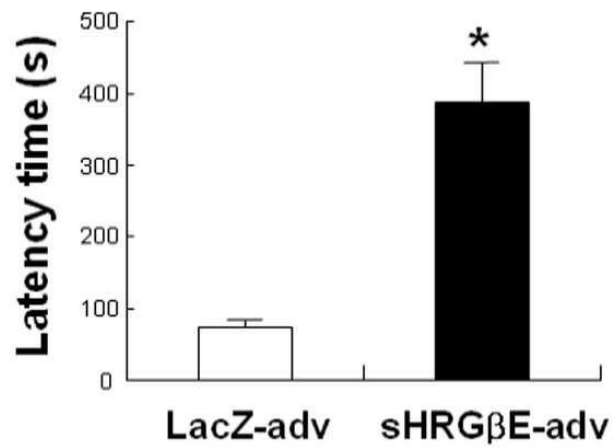
도면9b



도면10a



도면10b



서열 목록

<110> Industry Academic Cooperation Foundation of KyungHee University
 <120> Use of EGF-like Domain Peptide of Heregulin Beta 1

<160> 6

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 189
 <212> DNA
 <213> EGF-like domain peptide of Heregulin beta1

<400> 1
 atgtccacga ctgggaccag ccatctcata aagtgtgcgg agaaggagaa aactttctgt 60
 gtgaatgggg gcgagtgctt cacggtgaag gacctgtcaa acccgtcaag atacttgtgc 120
 aagtgcccaa atgagtttac tggatgatgt tgccaaaact acgtaatggc cagcttctac 180
 aagcattaa 189

<210> 2
 <211> 24
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> signal peptide

<400> 2

atgtcgggac caggaactgc agca 24

<210> 3

<211> 219

<212> DNA

<213> fusion of EGF-like domain peptide of Heregulin betal and signal peptide

<400> 3

atgtcgggac caggaactgc agcaggtacc atgtccacga ctgggaccag ccatttcata 60

aagtgtgcgg agaaggagaa aactttctgt gtgaatgggg gcgagtgcctt cacggtgaag 120

gacctgtcaa acccgtcaag atacttgtgc aagtgcctaa atgagtttac tggatgatcgt 180

tgccaaaact acgtaatggc cagcttctac aagcattaa 219

<210> 4

<211> 62

<212> PRT

<213> EGF-like domain peptide of Heregulin betal

<400> 4

Met Ser Thr Thr Gly Thr Ser His Leu Ile Lys Cys Ala Glu Lys Glu

1 5 10 15

Lys Thr Phe Cys Val Asn Gly Gly Glu Cys Phe Thr Val Lys Asp Leu

20 25 30

Ser Asn Pro Ser Arg Tyr Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly

35 40 45

Asp Arg Cys Gln Asn Tyr Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His

50 55 60

<210> 5
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> signal peptide

<400> 5
 Met Ser Gly Pro Gly Thr Ala Ala
 1 5

<210> 6
 <211> 72
 <212> PRT
 <213> Fusion of EGF-like domain peptide of Heregulin betal and signal peptide

<400> 6
 Met Ser Gly Pro Gly Thr Ala Ala Cys Thr Met Ser Thr Thr Gly Thr
 1 5 10 15

Ser His Leu Ile Lys Cys Ala Glu Lys Glu Lys Thr Phe Cys Val Asn
 20 25 30

Gly Gly Glu Cys Phe Thr Val Lys Asp Leu Ser Asn Pro Ser Arg Tyr
 35 40 45

Leu Cys Lys Cys Pro Asn Glu Phe Thr Gly Asp Arg Cys Gln Asn Tyr
 50 55 60

Val Met Ala Ser Phe Tyr Lys His
 65 70