



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0055640
(43) 공개일자 2020년05월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61K 41/00 (2020.01)
A61N 5/06 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/0058 (2013.01)
A61K 41/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0069141
(22) 출원일자 2019년06월12일
심사청구일자 2019년06월12일
(30) 우선권주장
1020180138838 2018년11월13일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
곽지현
서울특별시 강남구 봉은사로109길 14-8, 702호 (삼성동, 에스케이뷰아파트)
이재동
경기도 구리시 동구릉로53번길 42, 103동 603호 (동원베네스트아파트)
(74) 대리인
윤귀상

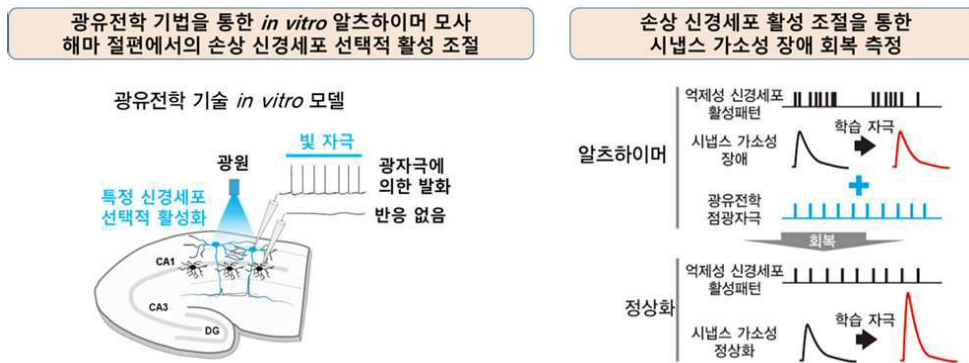
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 광유전학 기법을 이용한 알츠하이머성 치매에서의 시냅스 가소성 회복 방법

(57) 요약

본 발명은 광유전학 기법을 통해 특정 억제성 신경세포를 새로운 치료 표적으로 삼아 활성을 조절하는 방법 및 새로운 치료 표적을 스크리닝 하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61N 5/0622 (2013.01)

A61P 25/28 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465021806

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발

연구과제명 알츠하이머병에 의한 GABA 성 시냅스 장애 연구를 통한 새로운 치료 표적 개발 연구

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI17C0212

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 질환극복기술개발사업

연구과제명 GABA성 시냅스의 광유전학적 조절을 통한 알츠하이머병 행동기억 및 뇌파 장애 치료

기 여 율 1/2

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2017.04.10 ~ 2019.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 광수용체 유전자를 포함하고, 해마 인터뉴론(hippocampal interneuron)을 표적하도록 설계된 벡터 바이러스를 제조하는 단계;
- (b) 인간을 제외한 포유동물의 뇌의 해마영역에 상기 벡터 바이러스를 주입하는 단계;
- (c) 1주 내지 3주 간 상기 해마 인터뉴론에서 상기 광수용체 유전자를 발현시키는 단계;
- (d) 450 nm ~ 500 nm 영역의 빛을 상기 뇌의 해마영역에 조사하는 광자극 단계; 및
- (f) STDP(spike-timing-dependent plasticity) 방식으로 상기 뇌의 해마영역에 전기자극을 주는 단계를 포함하는 신경세포의 시냅스 가소성 회복 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 (d)단계의 광자극은 470 nm 영역의 빛을 조사하는 것인, 신경세포의 시냅스 가소성 회복 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 해마 인터뉴론은 소마토스타틴 포지티브 인터뉴론(SST-positive interneuron)인 것인, 신경세포의 시냅스 가소성 회복 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 포유동물은 알츠하이머성 치매 질환(Alzheimer's disease)을 가지는 것인 신경세포의 시냅스 가소성 회복 방법.

청구항 5

광수용체 유전자를 포함하고, 해마 인터뉴론을 표적하도록 설계된 벡터 바이러스.

청구항 6

광수용체 유전자를 포함하고, 해마 인터뉴론을 표적하도록 설계된 벡터 바이러스를 포함한 알츠하이머성 치매를 치료하거나 개선하는 약학적 조성물.

청구항 7

- (a) 알츠하이머 질환을 모사한 해마 절편을 제조하는 단계;
- (b) 광수용체 유전자를 포함하도록 설계된 벡터 바이러스를 제조하는 단계;
- (c) 스크리닝 대상이 되는 특정 신경세포만 표적이 될 수 있도록 형질전환된 cre 마우스를 준비하는 단계;
- (d) 상기 단계(c)의 cre 마우스에 상기 단계(b)의 벡터 바이러스를 주입하고 1 내지 3주간 상기 광수용체 유전자를 발현시키는 단계;
- (e) 상기 광수용체 유전자가 발현된 상기 cre 마우스의 해마영역의 절편을 준비하는 단계;
- (f) 450 nm ~ 500 nm 영역의 빛을 상기 단계(e)의 해마 절편 및 상기 단계 (a)의 해마 절편에 조사하는 광자극 단계; 및
- (g) 상기 (f)단계에서 광자극 받은 해마 절편들의 시냅스 가소성을 패치클램프 방식으로 측정하고 비교하여 장기시냅스 강화가 일어나는지 확인하는 단계를 포함하는 시냅스 가소성 회복에 효과가 있는 신경세포 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신경세포, 특히 알츠하이머성 치매가 발병한 뇌의 해마 영역에서 손상된 시냅스 가소성을 광유전학 기법을 통해 특정 신경세포의 활성을 조절함으로써 회복시키는 방법 및 특정 신경세포를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 광유전학(optogenetics)이란 광학(optics)과 유전학(genetics)을 결합해 만든 용어로 빛과 유전공학을 이용해 동물의 뇌 신경세포를 조절하는 기술이다. 이 기술은 ‘채널로돕신’이라는 녹조류의 청색광단백질을 쥐의 신경 세포에 발현한 후 빛만으로 신경세포를 활성화하고 이를 이용해 마우스의 행동을 컨트롤했던 스탠퍼드대 칼 다 이서로스 교수의 연구에서 시작됐다. 이 연구는 녹색식물, 그중에서도 녹조류에 착안해 시작됐다. 녹조류에는 빛의 유무에 따라 채널이 열리고 닫히는 채널로돕신(Channelrhodopsin, ChR2)이라는 단백질이 존재한다. 연구팀은 빛과 관련된 채널로돕신의 특성을 다른 세포에 똑같은 방식으로 적용하고자 했다. 이를 위해 채널로돕신을 바이러스 벡터를 이용해 유전자 형태로 쥐의 뉴런에 주입하는 방법이 사용되었다. 바이러스 벡터는 기존에 존재 하지 않던 유전자를 숙주 세포에 삽입하고자 할 때 사용되는 DNA 분자이다. 연구팀은 조작한 세포의 유전자가 발현되면 채널로돕신 단백질이 형성되고, 채널로돕신이 생긴 뉴런에 청색광을 비추면 녹조류에서와 같은 방식으로 채널이 열리며 소음이온이 세포 속으로 유입되는 것을 확인했다.

[0003] 시냅스는 신경세포 간의 정보 전달이 일어나는 아주 미세한 장소이며, 뇌의 복잡한 신경회로망을 형성하는 기본적인 구조이다. 학습과 기억 형성 과정에서 뇌 내에서는 신경회로망이 형성되고 변화하는데, 이 과정에서 시냅스는 사멸되기도 하고 새로 형성되기도 하며, 시냅스를 통한 신경세포 간의 신호전달 효율이 높아지기도 하고 낮아지기도 한다. 시냅스의 이러한 특징을 시냅스 가소성이라고 하며, 시냅스의 가소성은 인간의 학습과 기억 뿐만 아니라 전반적인 뇌기능의 근본적인 메커니즘의 주요 기반으로 알려져 왔다.

[0004] 알츠하이머병은 대표적인 치매 질환으로써 아밀로이드 베타 펩티드(amyloid beta peptide, A β)가 해마 및 내비 피질의 시냅스에 침착됨에 따른 신경세포의 사멸 및 신경회로 붕괴를 야기함으로써 기억 기능을 포함한 인지 기능 전반에서 장애를 일으키는 신경 퇴행성 질환이다.

[0005] 알츠하이머 질병을 포함하여 현재 치매 치료에 대한 확실한 치료제가 부재한 상황이며, 많은 전 세계 국가들의 연구 노력에도 불구하고 치매를 완치할 수 있는 치료약으로 개발된 약물이 없는 상황이다.

[0006] 현재까지 미 FDA 승인을 받은 치매 치료 약물들은 아세틸콜린분해 효소 길항제(tacrine, ravastigmine, galantamine 및 donepezil)와 NMDA 수용체 길항제(memantine)등이 있으나 병의 완치가 아닌 단순 진행속도를 늦추는 수준에 머물러 있어, 치매 치료제에 대한 수요는 충족되지 못하고 있는 실정이다.

[0007] 우리나라 또한 인구의 고령화로 인하여 치매환자가 점차 증가하면서 2012년 기준 국내 치매 환자 수는 약 54만 명으로 20년 마다 2배씩 증가하여 2050년에는 271만 명에 달할 것으로 추산되며, 이로 인한 사회적, 경제적 비용은 2050년 기준 43.2조원으로 예상되는 등 치매로 인한 막대한 사회적 비용 부담이 소요될 것으로 예상된다. 이에 따라 국내 치매치료제 시장도 2009년 720억 원에서 2012년 4,000억 원으로 급격히 성장 중이고, 향후 연평균 20%씩 성장해 2020년에는 약 2조 원 이상으로 확대될 것으로 예상된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 알츠하이머병의 대표적인 증상 중 하나는 기억 및 학습 기능의 감퇴이며, 이는 기억 및 학습기능의 중추인 해마 영역에 A β 가 비정상적으로 침착되어 기억의 생물학적 기전으로 알려진 시냅스 가소성(synaptic plasticity) 현상을 저하시키는 것과 관련이 있다고 알려져 있다.

[0009] 기존의 알츠하이머병에서의 시냅스 가소성 회복을 위한 연구의 대다수는 뇌 신경세포 종류 중 하나인 흥분성 신경세포(excitatory neuron)에 초점이 맞춰져 있었으나, 최근 연구에서는 또 다른 신경세포 종류인 억제성 신경세포(inhibitory neuron) 역시 시냅스 가소성 유도에 중요한 기여를 하는 것으로 알려졌다.

[0010] 그러나 억제성 신경세포는 그 종류가 매우 다양하고 종류에 따른 기능적 특징도 다르기 때문에 특정 억제성 신

경세포들의 기능적 연구가 아직 부족한 실정이다. 또한, 기존의 전기 자극이나 약물에 의한 치료 개발 연구는 뇌의 불특정 다수의 신경세포를 자극하기 때문에 의도하지 않은 부작용(환각, 우울증 등)을 일으킬 수 있는 위험이 높다.

과제의 해결 수단

- [0011] 이러한 문제를 해결하기 위하여 본 발명자들은 광유전학 기법을 이용하여 알츠하이머성 치매에서의 시냅스 가소성을 회복에 효과가 있는 억제성 신경세포를 선별하여 시냅스 가소성을 효과적으로 회복시키는 방법을 고안하였다.
- [0012] 본 발명은 뇌 신경세포의 전기적 신호를 측정할 수 있는 전기생리학 분야의 패치클램프 기술을 기반으로 하며, 학습과 기억의 기전이라고 알려진 뇌 신경세포 간의 시냅스 가소성을 유도하기 위해 유도 프로토콜을 이용하여 학습과 기억의 세포수준에서의 기전인 시냅스 가소성을 회복시키는 것을 특징으로 한다.
- [0013] 상기한 본 발명의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은
- [0014] (a) 광수용체 유전자를 포함하고, 해마 인터뉴론(hippocampal interneuron)을 표적하도록 설계된 벡터 바이러스를 제조하는 단계;
- [0015] (b) 인간을 제외한 포유동물의 뇌의 해마영역에 상기 벡터 바이러스를 주입하는 단계;
- [0016] (c) 1주 내지 3주 간 상기 해마 인터뉴론에서 상기 광수용체 유전자를 발현시키는 단계;
- [0017] (d) 450 nm ~ 500 nm 영역의 빛을 상기 뇌의 해마영역에 조사하는 광자극 단계; 및
- [0018] (f) STDP(spike-timing-dependent plasticity) 방식으로 상기 뇌의 해마영역에 전기자극을 주는 단계를 포함하는 신경세포의 시냅스 가소성 회복 방법을 제공한다.
- [0019] 상기 (a) 단계인, 광수용체 유전자를 포함하고, 해마 인터뉴론을 표적하도록 설계된 벡터 바이러스를 제조하는 단계는 대상 개체의 특정 신경세포, 해마 인터뉴론에 광수용체 유전자를 전달하여, 광자극을 통해, 상기 유전자가 발현되도록 하기 위함이다.
- [0020] 상기 해마 인터뉴론은 소마토스타틴 포지티브 인터뉴론을 포함한다. 소마토스타틴 포지티브 인터뉴론은 소마토스타틴(somatostatin)이 존재하는 인터뉴론을 말한다. 인터뉴론은 다양한 다른 용어(internuncial neuron, relay neuron, association neuron, connector neuron, intermediate neuron 또는 local circuit neuron)로도 지칭되고, 상당히 넓은 범위의 신경세포를 포함한다.
- [0021] 광수용체 유전자는 채널로돕신(channelrhodopsin), 레드-시프티드 채널로돕신(Red-shifted channelrhodopsin), 크림슨(ChrimsonR) 유전자일 수 있고, 더 바람직하게는 채널로돕신 유전자일 수 있다. 채널로돕신은 광유전학에서 빛을 인지하는 센서로 작용하며 자극을 원하는 세포만을 자극시킬 수 있도록 해준다. 본 발명의 채널로돕신은 EF1a-DIO-hChR2(E123T/T159C)-p2A-mCherry-WPRE 로 구성될 수 있고, 상기 레드-시프티드 채널로돕신은 AAV-EF1a-DIO-C1V1(E122T/E162T)-TS-mCherry로 구성될 수 있고, 상기 크림슨은 AAV-hSyn-FLEX-ChrimsonR-tdTomato로 구성될 수 있다. 본 발명에서 사용된 채널로돕신은 구입(<https://www.med.unc.edu/genethrapy/vectorcore/in-stock-aav-vectors/>)하여 사용하였다.
- [0022] 상기 (b) 단계인, 포유동물의 뇌의 해마영역에 상기 벡터 바이러스를 주입하는 단계는 포유동물의 뇌의 해마영역에 상기 광수용체 유전자를 포함하는 벡터 바이러스를 미세유리주사기 등을 이용하여 주입하는 것을 말한다. 주입된 벡터 바이러스는 표적 세포인 소마토스타틴 포지티브 인터뉴론만을 선택하여 광수용체 유전자를 세포 내로 전달하게 된다. 이러한 유전자 전달의 효율성을 높이기 위하여 cre 마우스를 만들 수도 있다. 본 발명자들은 SST CRE 형질전환 마우스를 이용하였다.
- [0023] 상기 Cre란, Cre recombinase라는 효소로, 특정 서열의 DNA를 인식하여 잘라내고 이어붙이는 기능을 한다. 예를 들어, SST-Cre라는 마우스는 Cre 유전자를 가진 마우스인데, SST를 발현시키는 promotor가 Cre 유전자 앞에 있어, SST가 발현되는 세포에서만 Cre 효소가 발현되도록 한다.
- [0024] 상기 (c) 단계인, 1주 내지 3주 간 상기 해마 인터뉴론에서 상기 광수용체 유전자를 발현시키는 단계는 광수용체 유전자가 해마 인터뉴론에 주입되어 발현되도록 1 내지 3주, 또는 2주의 발현시간을 갖는 것을 의미한다.
- [0025] 상기 (d) 단계인, 450 nm ~ 500 nm 영역의 빛을 상기 뇌의 해마영역에 조사하는 광자극 단계는 소마토스타틴 포지티브 인터뉴론에 전달된 광수용체가 광자극 받을 수 있는 영역대인 청색 파장 영역, 450 nm ~ 500 nm 영역,

또는 460 ~ 480 nm 영역, 또는 470 nm 영역의 빛을 조사할 수 있다. 이러한 광자극으로 해마 인터뉴론에 주입된 채널로돕신 단백질이 반응하여 해당 신경세포의 활성이 상승하는 결과로 이어진다. 본 발명자들은 일련의 전기생리학 실험을 통해 해당 신경세포를 광자극할 경우, 장기시냅스 강화 효과가 발생하고, 시냅스 가소성이 회복되는 결과를 얻게 되었다.

- [0026] 상기 (f) 단계인 STDP(spike-timing-dependent plasticity) 방식으로 상기 뇌의 해마영역에 전기자극을 주는 단계에서, STDP 방식은 시냅스 전 전기자극(presynaptic input)과 시냅스 후 다발성 발화를 일정한 시간차로 반복하는 것일 수 있다. 인접한 두 세포의 발화(spike) 타이밍에 따라 시냅스 가소성이 tLTD(spike-timing dependent long-term depression) 혹은 tLTP(spike-timing dependent long-term potentiation) 형태로 유도된다.
- [0027] 본 발명자들은 다발성 발화를 이용하면 단일 발화(single spike)보다 탈분극(depolarization) 시간이 더 지속되며 그만큼 LTP 유도에 필요한 Ca^{2+} influx 양이 증가하는 등에 따라 LTP 유도가 용이하다는 실험결과를 얻었다.
- [0028] 이러한 시냅스 가소성 회복 방법은 인간을 포함한 포유동물에 적용할 수 있고, 특히 퇴행성 신경질환을 가진 환자 및 동물에게 적용할 수 있다. 상기 퇴행성 신경질환은 알츠하이머성 치매 질환(Alzheimer's disease)을 포함할 수 있다.
- [0029] 또한, 본 발명은 광수용체 유전자를 포함하고, 해마 인터뉴론을 표적하도록 설계된 벡터 바이러스를 제공한다.
- [0030] 또한, 본 발명은 광수용체 유전자를 포함하고, 해마 인터뉴론을 표적하도록 설계된 벡터 바이러스를 포함한 알츠하이머성 치매를 치료하거나 개선하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 다른 일측면으로는,
- [0032] (a) 알츠하이머 질환을 모사한 해마 절편을 제조하는 단계;
- [0033] (b) 광수용체 유전자를 포함하도록 설계된 벡터 바이러스를 제조하는 단계;
- [0034] (c) 스크리닝 대상이 되는 특정 신경세포만 표적이 될 수 있도록 형질전환된 cre 마우스를 준비하는 단계;
- [0035] (d) 상기 단계(c)의 cre 마우스에 상기 단계(b)의 벡터 바이러스를 주입하고 1 내지 3주간 상기 광수용체 유전자를 발현시키는 단계;
- [0036] (e) 상기 광수용체 유전자가 발현된 상기 cre 마우스의 해마영역의 절편을 준비하는 단계;
- [0037] (f) 450 nm ~ 500 nm 영역의 빛을 상기 단계(e)의 해마 절편 및 상기 단계 (a)의 해마 절편에 조사하는 광자극 단계; 및
- [0038] (g) 상기 (f)단계에서 광자극 받은 해마 절편들의 시냅스 가소성을 패치클램프 방식으로 측정하고 비교하여 장기시냅스 강화가 일어나는지 확인하는 단계를 포함하는 시냅스 가소성 회복에 효과가 있는 신경세포 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0039] 상기 단계(a)에서, 알츠하이머 질환을 모사한 해마 절편은 A β 펩티드 중 가장 독성이 강하며 용해성 물질인 A β 중합체(oligomer)를 인위적으로 합성하여 뇌 절편 상층부에 직접 분사하는 방식 등으로 A β 가 뇌 조직에 침착하도록 유도하여 알츠하이머 질환을 모사하는 절편을 제작할 수 있다.
- [0040] 상기 단계(b)에서, 광수용체 유전자는 채널로돕신 유전자일 수 있고, EF1a-DIO-hChR2(E123T/T159C)-p2A-mCherry-WPRE 를 포함할 수 있다.
- [0041] 상기 단계(c)에서, 스크리닝 대상이 되는 특정 신경세포는 흥분성 신경세포 또는 억제성 신경세포일 수 있다.
- [0042] 상기 단계(d)에서, 광수용체 유전자를 발현시키는 시간은 1 내지 3주, 2주 또는 10일이 될 수 있다.
- [0043] 상기 단계 (f)에서, 광자극은 청색 파장 영역, 450 nm ~ 500 nm 영역, 또는 460 ~ 480 nm 영역, 또는 470 nm 영역의 빛을 조사할 수 있다.
- [0044] 상기 단계 (g)에서, 패치클램프(Patch Clamp)란, 세포의 전기생리적 반응을 측정하는 도구이다. 일반적으로 이온채널 연구와 전기생리학 실험은 하나의 세포에서 이온의 세포막 통과에 따른 전류, 전압을 측정한다. 이때 사용하는 기기가 패치클램프이다. 상기 패치클램프 방식의 전기생리적 반응 측정시 시냅스 가소성 회복 방법에 사용한 STDP의 방식으로 전기자극을 할 수 있다.

[0045] 또한, 본 발명은 상기의 스크리닝한 신경세포를 표적하고, 광수용체 유전자를 포함하도록 설계된 벡터 바이러스를 제공한다.

[0046] 또한, 본 발명은 상기의 스크리닝한 신경세포를 표적하고, 광수용체 유전자를 포함하도록 설계된 벡터 바이러스를 포함한 알츠하이머성 치매를 치료하거나 개선하는 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0047] 본 발명은 종래의 약리학적 기법을 이용한 알츠하이머성 치매 치료 연구가 아닌 광유전학 기법을 통해 특정 억제성 신경세포를 새로운 치료 표적으로 삼아 활성을 조절하는 방법으로, 불특정 광범위하게 작용하는 종래의 기술과는 달리 광유전학 기법은 특정 신경세포만을 표적으로 하여 신속하고 즉각적으로 활성을 조절할 수 있기 때문에 자극에 의한 부작용에 염려가 적고, 치료 표적을 명확하게 하여 치료 효율을 높일 수 있다.

[0048] 본 발명은 그 중 해마 인터뉴론을 표적으로 하여 효과를 얻었다. 본 발명은 광자극을 이용한 해마 인터뉴론의 활성을 높이면 알츠하이머 질병에서 손상되었던 시냅스 가소성을 일반 수준까지 회복시키는 효과를 얻을 수 있다. 이러한 결과는 시냅스 가소성의 주된 기능인 기억능력 향상 또는 회복의 효과까지 활용할 수 있다는데 기술적 의미가 있다.

도면의 간단한 설명

[0049] 도 1은 본 발명의 주요 기술적 특징인 광유전학 기법을 통한 알츠하이머 모사 해마 절편에서의 손상 신경세포의 가소성 회복 방법을 도시한다.

도 2는 아밀로이드 베타 펩티드 중합체 합성과정을 도시한다.

도 3은 광유전학 기법에 의한 CRE 형질전환된 마우스에 광수용체 유전자를 포함하는 벡터 바이러스를 주입하는 과정을 도시한다.

도 4는 해마 절편에서의 발화 타이밍 기반 장기 시냅스 강화(tLTP) 유도 프로토콜 방식 및 측정 방식을 도시한다.

도 5는 정상 해마, 알츠하이머 모사 해마, PV-cre 마우스의 알츠하이머 모사 해마, 및 SST-cre 마우스의 알츠하이머 모사 해마 각각의 해마 절편에서의 발화 타이밍 기반 장기 시냅스 강화(tLTP) 유도 프로토콜 결과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0051] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0053] <실험방법>

[0054] 1. 알츠하이머 모사 뇌 절편 제작

[0055] 본 연구진은 알츠하이머병 연구에서 주로 사용되는 A β 펩티드 중 가장 독성이 강하며 용해성 물질인 A β 중합체(oligomer)를 인위적으로 합성하여 이를 이용한 알츠하이머병 모사 해마 절편 모델을 제작하였다. A β 단량체(monomer)형태에 유기용매인 Hexafluoro-2-propanol (HFIP)를 처리하여 1 mM 농도로 부유시켜 모노머화(monomerization) 시킨 후, 진공농축기를 이용하여 A β 부유액에서 HFIP를 제거하여 필름화 시켰다.

[0056] 필름화 된 A β 에 DMSO(Dimethyl sulfoxide)를 처리하여 A β 의 응집을 늦추면서 부유화 하여 5 mM의 A β 부유액을 만들었다. 실험에 사용할 A β 부유액은 인공 뇌척수액(artificial cerebrospinal fluid)을 처리하여 200 nM로 희석시킨 후 약 12시간 냉장(4 $^{\circ}$ C) 배양을 함으로써 용해성 A β 형태인 올리고머로 합성한 뒤, 뇌 절편 상층부에 직접 분사 후 약 20분 간 배양함으로써 A β 가 뇌 조직에 침착된 알츠하이머병을 모사하는 뇌 절편을 제작하였다. 도2에 이를 도시하였다.

[0058] 2. 바이러스 주입

- [0059] 본 발명은 광수용체 발현을 위해 채널로돕신(channelrhodopsin) 종류 중 하나를 사용하였으며, 광수용체 유전자는 EF1a-DIO-hChR2(E123T/T159C)-p2A-mCherry-WPRE로 구성되고 광 자극을 통해 신경세포를 활성화시키는 역할을 한다. 본 발명에서 형질전환을 위해 사용한 바이러스는 UNC Vector Core에서 구입하였다(<https://www.med.unc.edu/genetherapy/vectorcore/in-stock-aav-vectors/deisseroth/>).
- [0060] 해당 광수용체 유전자가 삽입된 벡터 바이러스를 미세유리주사기(Hamilton syringe)를 이용해 소마토스타틴 포지티브 인터뉴론(SST-positive interneuron)만 표적이 될 수 있게끔 형질전환 된 SST-cre 마우스의 뇌 해마 영역에 주입하였다.
- [0061] 이 때 바이러스 주입은 10분에 걸쳐서 모두 주입되는 속도로 설정하고, 주입이 완료된 후 바이러스의 조직 내 확산을 위해 5분 간 미세유리주사기를 고정시켜 놓았다. 바이러스를 주입한 후 바이러스 발현을 위해 약 2주의 회복 기간 후 전기생리학 실험을 진행하였다. 도3에 이를 도시하였다.
- [0063] 3. 전기 생리학 실험
- [0064] 세포의 전기생리적 반응을 측정하기 위해 해마 CA1영역의 흥분성 신경세포에 패치 클램프 기술을 통해 전기신호를 측정하였다.
- [0065] 해마 절편에서 흥분성 신경세포의 시냅스 가소성을 유도하기 위해 자극전극(stimulating electrode)을 통해 시냅스 전(presynaptic) 전기 자극을 발생시켜 흥분성 시냅스 후 전압(excitatory postsynaptic potential, EPSP)을 측정하였고, 약 10 ms의 시간 간격을 두고 시냅스 후(postsynaptic) 신경세포에서 다발성 발화(bursting firing)를 유도함으로써 시냅스 후 신경세포에서 발화 타이밍 기반 시냅스 연결이 강화되는 장기시냅스 강화(spike-timing dependent long-term synaptic potentiation, tLTP)를 유도하였다.
- [0066] 본 연구에서는 두 개의 자극전극을 이용하여 test, control pathway로 구분하여 전극을 측정하였고, 10분 간 자극전극을 통해 EPSP baseline을 측정한 후 그 중 tLTP 유도 패러다임은 test pathway에서만 실시하였다.
- [0067] 알츠하이머병을 모사한 해마절편에서 동일한 시냅스 가소성 유도 프로토콜을 통해 시냅스 가소성 유도 여부를 측정한 결과, 프로토콜 적용 전 후의 시냅스 연결이 강화되는 결과가 측정되지 않아 Aβ 중합체에 의해 시냅스 가소성이 유도되지 않는 것을 확인하였다.
- [0068] 도 1에 본 발명의 기술적 특징을 도시하였다. 도1의 왼쪽 이미지는 해마 절편 내 광수용체가 발현된 신경세포만을 광자극을 통해 선택적으로 활성 조절할 수 있는 광유전학 기법에 대한 개요를 나타낸다. 본 해마 절편에 아밀로이드 베타 펩티드를 처리하여 알츠하이머 질병을 모사함으로써 시냅스 가소성 회복 연구를 진행하였다. 오른쪽 이미지는 뇌신경망에서의 아밀로이드 베타 펩티드에 의한 억제성 신경세포 활성패턴 불안정으로 인한 시냅스 가소성 유도에 실패했으나, 광유전학 점광자극을 통해 억제성 신경세포의 활성패턴 조절함으로써 해마의 시냅스 가소성 유도 회복된 것을 도시한다.
- [0069] Aβ 중합체에 의해 손상된 시냅스 가소성을 회복시키기 위해 해마 인터뉴론 중 하나인, 소마토스타틴 포지티브 인터뉴론에 채널로돕신이 발현된 해마 절편을 이용해 동일한 시냅스 가소성 유도 프로토콜을 진행하였고, 동시에 소마토스타틴 포지티브 인터뉴론을 활성화시키기 위해 채널로돕신을 자극시킬 수 있는 파란 파장대역(470 nm)의 빛을 조사하였다. 그 결과, 시냅스 가소성 유도 프로토콜 중 광 자극에 의해 소마토스타틴 포지티브 인터뉴론이 활성화될 때, 손상되었던 시냅스 가소성이 다시 정상수준으로 회복되는 결과를 얻었다.
- [0070] 도 4에서 이러한 결과를 도시한다. 구체적으로 도4의 A는 tLTP 유도를 위한 실험 개요도, 두 자극전극(test pathway stim, control pathway stim)을 통해 전기신호를 유발하여 측정전극으로 CA1 흥분성세포(pc)에 패치클램프하여 전기신호를 측정하는 방식을 도시한다. 도4의 B는 test pathway에서 tLTP 유도를 위해 사용하는 프로토콜을 도시한다.
- [0072] <실시결과>
- [0073] 1. Wild type 마우스에서의 시냅스 가소성 유도 결과
- [0074] CRE 마우스의 wild type인 C57BL/6 마우스 해마 절편에서 tLTP를 유도하기 위해 해마 CA1 흥분성 신경세포에 패치 클램프를 통해 전기신호를 측정하였고, 앞선 시냅스 가소성 유도 프로토콜을 적용하여 신경세포에서 tLTP를

유도하였다.

[0076] 2. 알츠하이머병 모사 해마 절편에서의 시냅스 가소성 유도 결과

[0077] 같은 시냅스 가소성 유도 프로토콜을 200 nM A β 중합체를 침착시킨 알츠하이머병 모사 해마 절편에서 적용시켰으나, tLTP를 유도에 실패하였다.

[0079] 3. 광수용체가 발현된 SST-cre 마우스의 해마 절편에서 시냅스 가소성 유도 결과

[0080] 시냅스 가소성 유도 회복을 위해 광수용체가 발현된 SST-cre 마우스의 해마 절편에 200 nM A β 중합체를 처리하여 동일한 알츠하이머병 모사 해마 절편을 만든 후, 앞선 시냅스 가소성 유도 프로토콜을 적용함과 동시에 소마토스타틴 포지티브 인터뉴론을 활성화시키기 위한 광자극(470 nm)을 조사하였을 때, 손상되었던 tLTP 유도가 다시 정상수준으로 회복되는 것을 관찰하였다.

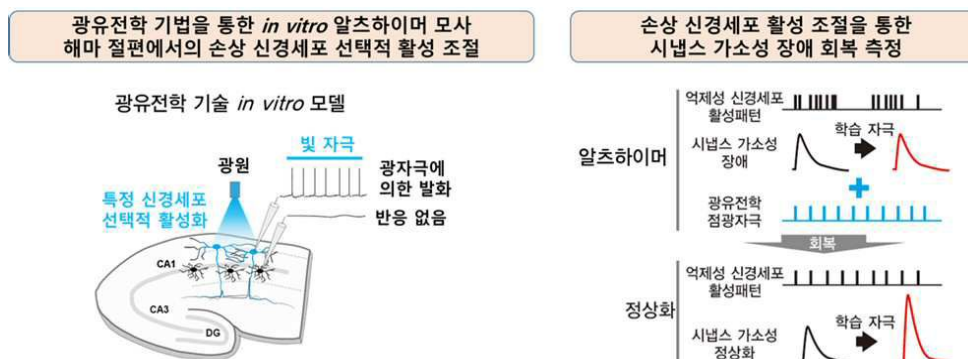
[0082] 5. 각 결과의 비교

[0083] 상기 실험결과를 도5에 도시하였다. 도5의 A는 해마 절편에서의 tLTP 유도 실험 개요도를 나타낸 것으로서, 두 자극전극(test pathway stim, control pathway stim)을 통해 전기신호를 유발하여 CA1 흥분성세포(pc)에 패치 클램프를 통해 전기신호를 측정된 결과이다. 도5의 B는 정상해마에서 10분 baseline 측정 후 test pathway에서 tLTP 유도 프로토콜(화살표)을 통해 유도된 tLTP (filled circle)와 tLTP 유도 프로토콜을 적용하지 않은 control pathway (empty circle)를 나타낸다. 도5의 C는 알츠하이머 모사 해마에서 동일한 tLTP 유도 프로토콜 시 tLTP 유도 실패 결과를 나타낸다. 도5의 D는 SST에서 광수용체(ChR2)를 발현 후, 알츠하이머 모사 해마 절편에서 광자극과 동시에 tLTP 유도하는 실험 개요도를 나타낸다. 도5의 E는 알츠하이머 모사 해마 절편에서 tLTP 유도 프로토콜(화살표)과 동시에 광자극(ChR2-SST activation)을 통해 SST 인터뉴론을 활성화했을 때, test pathway (filled circle)에서 tLTP 유도 회복 결과를 나타낸다. 도5의 G는 baseline을 기준으로 변화한 마지막 5분간의 EPSP slope 값, filled bar (test pathway), empty bar (control pathway)를 나타낸다.

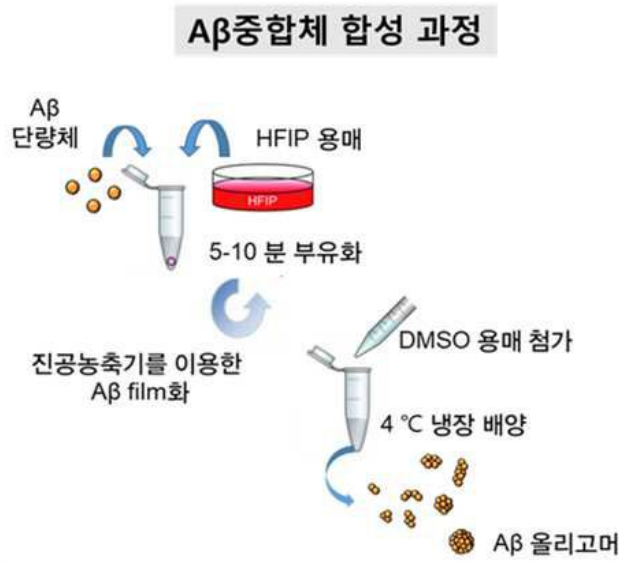
[0084] 상기와 같이, 해마 인터뉴론인 소마토스타틴 포지티브 인터뉴론의 활성을 유도하는 광자극과 장기 시냅스 가소성 유도 프로토콜을 동시에 주입할 시 tLTP가 회복되는 결과를 얻었다. 이러한 연구결과를 통해 알츠하이머병에서 억제성 신경세포 표적의 활성을 조절할 시 A β 에 의한 장기 시냅스 가소성 장애가 회복되는 것을 밝혔으며, 이는 억제성 신경세포가 알츠하이머병 치료에 새로운 치료 타겟으로서의 가능성을 제시하고 있다.

도면

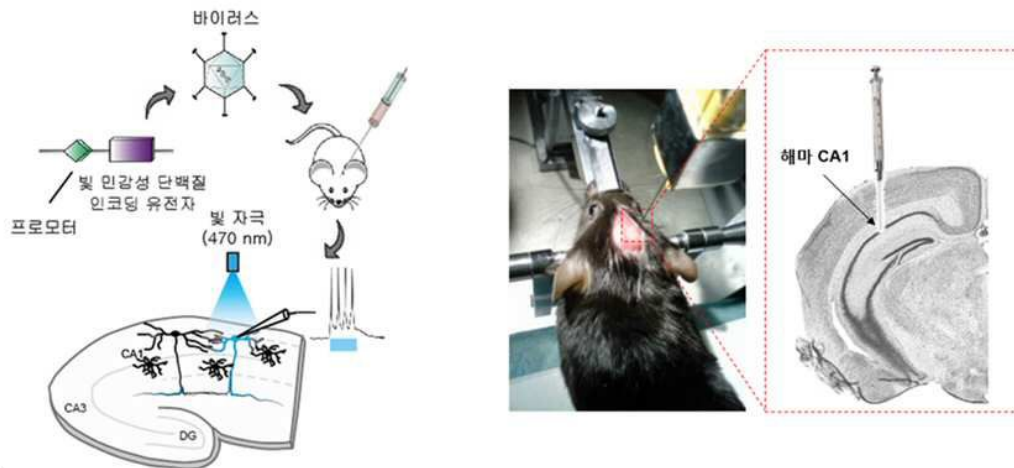
도면1



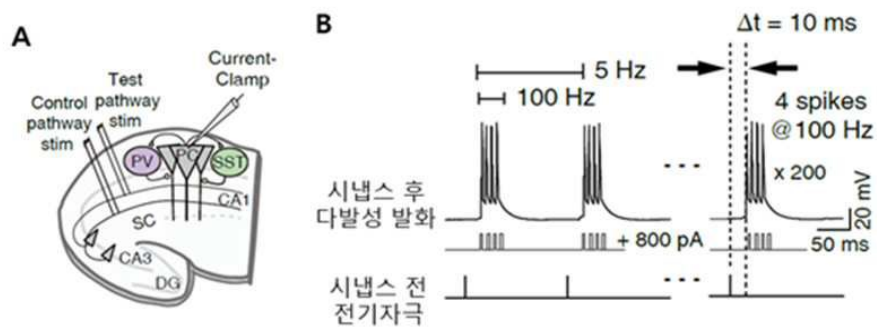
도면2



도면3



도면4



도면5

