(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0015667
(43) 공개일자 2017년02월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/50 (2017.01) *G01N 33/66* (2006.01)
G01N 33/74 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/5044 (2013.01)
G01N 33/66 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0107864
(22) 출원일자 2015년07월30일
심사청구일자 2015년07월30일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
박은미
서울특별시 양천구 목동동로 350 531동 404호 (목동,목동5단지아파트)
(74) 대리인
이원희

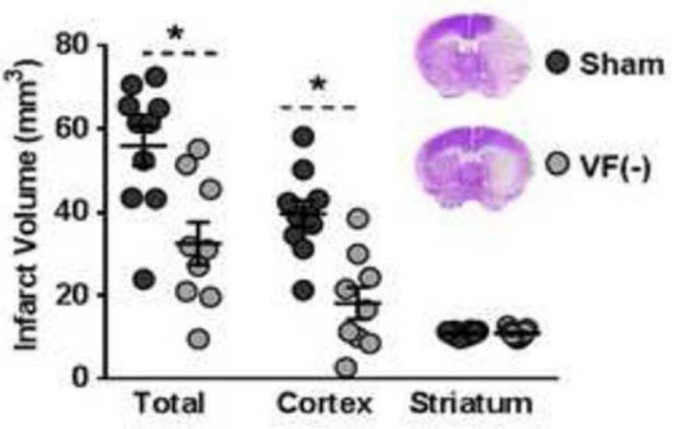
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **내장지방조직 염증 여부 검사를 통한 허혈성 뇌질환 치료제 스크리닝 방법**

(57) 요 약

본 발명은 허혈성 뇌질환 치료제 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 내장지방 조직 염증이 노령의 뇌 노화 과정 및 허혈성 뇌손상에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 내장지방 제거를 한 노령의 마우스에서 뇌의 노화성 염증 반응을 감소시키고, 허혈성 뇌손상 후 뇌경색 용적, BBB 투과성, 및 뇌에서의 전염증성 사이토카인의 수치가 감소함을 확인함으로써, 상기 결과는 허혈성 뇌질환 치료제의 스크리닝 방법으로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

대 표 도 - 도5a



(52) CPC특허분류
G01N 33/6854 (2013.01)
G01N 33/6863 (2013.01)
G01N 33/6869 (2013.01)
G01N 33/6893 (2013.01)
G01N 33/743 (2013.01)
G01N 2800/2871 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012R1A5A2A32671867
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업-선도연구센터육성사업-기초의과학분야(MRC)
연구과제명 조직손상방어연구센터-효율적인 내인성 보호 모듈 발굴
기 여 율 50/100
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2012.09.01 ~ 2019.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2014R1A2A1A11051461
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-중견연구자지원사업-도약연구지원사업(전략)(상향식)
연구과제명 허혈성 뇌중풍 후 소교세포/대식세포 표현형이 뇌 수복에 미치는 영향
기 여 율 50/100
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2014.11.01 ~ 2017.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

1) 시료에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 시료에서 염증성 지표를 측정하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)의 염증성 지표가 무처리 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 허혈성 뇌질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 시료는 혈장 또는 조직인 것을 특징으로 하는 허혈성 뇌질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 조직은 내장지방 조직인 것을 특징으로 하는 허혈성 뇌질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 단계 1)의 피검물질은 추출물, 천연 화합물, 합성물, 단백질, 펩티드(peptide) 및 조성물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 허혈성 뇌질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 단계 2)의 염증성 지표는 테스토스테론(testosterone), 전염증성 사이토카인(proinflammation cytokine), 글루코스(glucose), 마크로파지(macrophage), IgG 혈관외누출(IgG extravasation), 치밀이음부(tight junction) 단백질, 및 지방세포 크기로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 허혈성 뇌질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 전염증성 사이토카인은 인터루킨-1β(interleukin-1β) 또는 종양괴사인자-α(tumour necrosis factor-α; TNF-α)인 것을 특징으로 하는 허혈성 뇌질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 치밀이음부 단백질은 claudin-5 또는 occludin인 것을 특징으로 하는 허혈성 뇌질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 단계 2)의 측정은 면역형광염색법(immunofluorescence staining), RT-PCR(reverse

transcription-PCR), 실시간 PCR(real-time PCR), 웨스턴 블롯(western blot), EIA(enzyme immunoassay), ELISA 및 단백질칩으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것을 특징으로 하는 허혈성 뇌질환 치료제 스크리닝 방법.

청구항 9

제 1항에 있어서, 상기 허혈성 뇌질환은 뇌중풍 또는 뇌경색인 것을 특징으로 하는 허혈성 뇌질환 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 허혈성 뇌질환 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 허혈성 중풍(ischemic stroke)은 나이와 관련된 질병으로, 중풍의 2/3가 65세 이상에서 발생하는 것으로 잘 알려져 있어, 나이는 허혈성 중풍에 있어 수정할 수 없는 위험 요인이다(Allen 및 Bayraktutan, 2008). 허혈성 중풍이 성인에서 사망률과 이병률의 가장 중요한 요인 임에도, 오직 한정된 치료적 창(therapeutic window)을 가진 혈전 용해(thrombolysis) 만이 급성 허혈성 중풍에 대한 효과적인 치료법이다(Asdaghi 등., 2012). 전-임상 연구에서 몇 개의 잠재적인 약물이 개발되고 있으나, 허혈성 중풍에 대한 효과가 임상적으로 증명된 것은 없다. 전-임상 중풍 연구에서 어리고 건강한 설치류의 사용과 연관된 하나의 문제점이 있어, STAIR(Stroke Therapy Academic Industry Roundtable)는 어린 동물에서의 치료적 효과를 확인하기 위해 노령의 동물을 사용하는 것을 추천한다(Fisher 등., 2009). 허혈성 중풍 연구에서 노령의 동물을 사용하기 위해, 허혈성 손상에 영향을 줄 수 있는 나이와 연관된 생리적 변화들이 고려되어야 한다.

[0005] 정상적인 노화는 낮은 등급의 전신성 염증(low-grade systemic inflammation)을 이끄는 염증성 매개체(mediator) 증가와 연관되어 있고(Salvioli 등., 2006), 노화와 함께 전신성 염증은 심혈관성(cardiovascular), 대사성(metabolic), 및 신경병성(neurodegenerative)의 질병과 같은, 나이와 연관된 질병을 개시하거나 악화시킨다(Huffman 및 Barzilai, 2009). 몇몇의 신체 기관(organ) 및 다수의 요인들이 노화와 함께 전신성 염증 상태와 연관이 되어있기 때문에, 그 기전은 복잡하게 나타난다(Cevenini 등., 2010). 상기 신체 기관 중에서, 케모카인(chemokines) 및 사이토카인(cytokines)을 분비하는 내분비 기관인 내장지방 조직(visceral adipose tissue)은 나이와 연관된 전신선 염증의 확립에 연관이 되어있다(Cevenini 등., 2010). 노화 과정 동안 피하 지방은 내장 지방으로 재분포되어, 내장 지방 조직의 축적이 일어난다(Beaufrere 및 Morio, 2000). 지방조직의 축적과 함께, 마크로파지(macrophage) 침투(infiltration) 및 전염증성 사이토카인의 생산 등 지방 조직내 염증 반응이 증가한다. 내장지방 조직으로부터 분비되는 이러한 염증성 매개체들은 낮은 등급의 전신성 염증에 기여한다(Cevenini 등., 2010).

[0006] 내장지방 축적은 뇌 건강에 부정적인 영향을 미친다는 것이 보고되었다. 노령 인간을 조사한 인간 연구에서, 허리-대-엉덩이 비율(waist-to-hip) 또는 이미지 연구에 의해 측정된 내장지방 축적은 뇌 부피, 피질 두께, 및 언어적 기억 및 주의와 같은 인지 행동에서의 감소와 연관이 있다(Debette 등., 2010; Isaac 등., 2011). 이러한 연구들은 내장지방 축적이 뇌에서의 구조적 및 기능적인 변화를 유도함을 의미한다. 더 나아가, 중풍 이력을 갖거나 또는 갖지 않는 개체에서의 뇌 이미지 연구는 내장지방 축적이 뇌혈관성(cerebrovascular) 질병에 대한 위험 요인일 수 있다는 것을 제시하는데, 내장지방 축적 및 총 지방 조직 중 내장지방 조직의 비율 증가는 뇌의 백색질 장애(white matter lesions) 또는 허혈성 장애(ischemic lesions)와 강하게 연관되어 있기 때문이다(karcher 등., 2013; Nagura 등., 2004; Yamashiro 등., 2014). 내장지방 축적은 뇌중풍의 위험 요인일 뿐만 아니라, 급성 허혈성 손상 후 뇌 손상에 영향을 줄 수 있는데, 특히 노화 과정의 뇌에 대한 영향이 크다. 전염성 매개체들의 증가 및 혈액-뇌 장벽(blood-brain barrier; BBB) 투과성 증가와 같은, 노화 과정의 뇌내 변화 때문에(Norden 및 Godbout, 2013; Popescu 등., 2009), 노령의 환자는 허혈성 중풍 이후에 내장 지방으로부

터 분비되는 염증성 매개체들에 더 취약할 수 있다. 게다가, 한 연구는 급성 허혈성 중풍 후, 교감 신경계(sympathetic nervous system)를 통한 β-아드레너직 수용체(β-adrenergic receptor)의 활성에 의해 내장지방 조직의 전염증성 사이토카인이 증가함을 보고하였다(Wang 등., 2011).

[0008] 한편, 내장지방염증과 노화성 뇌염증 및 뇌질환과의 연관성에 대한 선행기술로서, Tushar Singh, Anne B. Newman는, 장년층에서 나이와 연관된 질병의 진행 과정에서 염증의 역할에 대한 연구결과를 개시하였고(Ageing Res Rev. 2011; 10(3): 319-329.), Miina K. Ohman 등은 내장지방 염증이 ApoE(apolipoprotein E)가 결핍된 마우스에서 동맥경화(atherosclerosis)를 가속화하며, thiazolidinediones와 같은 약물이 내장 염증성 지방에 의해 유도되는 혈관성 질병을 특이적으로 중지시키는 데에 유용하게 사용될 수 있음에 관하여 개시하였으며(Circulation. 2008;117:798-805), Emanuele Cereda 등은 치매에 대한 위험 요인으로서 BMI(body mass index)보다, 증가된 내장 지방 조직이 더 유용함에 대해 개시하였으나(Age and Ageing 2007; 36: 488-491), 내장지방 염증 감소를 통한 노화성 뇌염증 및 뇌질환 예방 및 치료제 스크리닝 방법에 대해서는 현재까지 알려진 바가 없다.

[0010] 이에, 본 발명자들은 노화성 뇌염증 및 뇌질환 치료제를 위한 스크리닝 방법을 연구하던 중, 노령 마우스에서 내장지방 제거 후 전신 혈액, 내장지방 조직, 및 뇌에서 염증성 마커의 수치가 감소하고, 허혈성 뇌손상을 감소시키는 것을 관찰하여, 내장지방 증가를 억제하고 내장지방 내 염증을 감소시키는 것은 뇌의 노화 작용을 억제하고 허혈성 뇌손상과 같은 뇌질환 예방 및 치료제의 스크리닝 방법에 사용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 허혈성 뇌질환 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 허혈성 뇌질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다:

[0015] 1) 시료에 피검물질을 처리하는 단계;

[0016] 2) 상기 단계 1)의 시료에서 염증성 지표를 측정하는 단계; 및

[0017] 3) 상기 단계 2)의 염증성 지표가 무처리 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계.

발명의 효과

[0019] 본 발명에서 내장지방 조직 염증이 노령의 뇌 노화 과정 및 허혈성 뇌손상에 미치는 효과를 확인하기 위하여, 내장지방 제거를 한 노령의 마우스에서 뇌의 노화성 염증 반응을 감소시키고, 허혈성 뇌손상 후 뇌경색 용적, BBB 투과성, 및 뇌에서의 전염증성 사이토카인의 수치가 감소함을 확인함으로써, 본 발명은 허혈성 뇌질환 치료제 스크리닝 방법으로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1a는 2.5개월령의 어린 마우스(2.5mo, n=10), 18개월령(18mo, n=8) 및 20개월령(20mo, n=7) 마우스에서의 혈장 테스토스테론(serum testosterone) 수치를 나타낸 도이다.

도 1b는 어린(2.5개월령) 및 노령(20개월령)의 마우스에서 총 신체 모양 및 내장(부고환의) 지방량을 대표하는

도로, 점선은 내장지방의 영역을 나타낸 도이다.

도 1c 및 1d는 어린 마우스(n=15), sham(n=10) 및 내장지방 제거(VF(-)) 수술 이후의 노령의 마우스(n=10)에서 IL-1β(c) 및 TNF-α(d)의 혈장 수치를 나타낸 도이다.

도 1e는 어린 마우스, sham 및 VF(-) 수술 이후의 노령의 마우스(각 n=10)에서의 공복 상태의 혈중 글루코스 수치를 나타낸 도이다; $^{*}p < 0.05$ 대. 어린 마우스; $^{\#}p < 0.05$ 대. sham.

도 2a는 어린 마우스, sham 및 VF(-) 수술 이후의 노령의 마우스(각 그룹에서 n=5)의 내장지방에서 IL-1β, IL-6, 및 TNF-α의 역-전사 PCR 블롯(reverse-transcribed PCR blots), 및 정량적인 mRNA 수치를 나타낸 도이다.

도 2b는 어린 마우스, sham 및 VF(-) 수술 이후의 노령의 마우스(각 그룹에서 n=5)의 내장지방에서 IL-1β 및 TNF-α의 웨스턴 블롯 결과 및 이의 양(액틴(actin)으로 보정)을 나타낸 도이다.

도 2c는 어린 마우스, sham 및 VF(-) 수술 이후의 노령의 마우스(각 그룹에서 n=3)의 내장지방 조직에서 CD68(녹색, 기준자=100 ㎛)에 대한 면역형광 염색(immunofluorescence staining), 100개의 지방세포(100%) 당 CD68-양성 마크로파지(macrophage)(화살표로 표시된) 및 CLS(crown like structure; 별모양으로 표시된)의 개수를 나타낸 도이다.

도 2d는 어린 마우스, sham 및 VF(-) 수술 이후의 노령의 마우스(각 그룹에서 n=3)의 내장지방에서 지방세포의 헤마톡실린(hematoxylin) 및 이오신(eosin) 염색(기준자=200 ㎛)의 결과, 및 지방세포의 평균 세포 지름을 나타낸 도이다; $^{*}p < 0.05$ 대. 어린 마우스, $^{\#}p < 0.05$ 대. sham.

도 3a는 어린 마우스, sham 및 VF(-) 수술 이후의 노령의 마우스(각 그룹에서 n=5)의 뇌에서 IL-1β, IL-6, 및 TNF-α의 역-전사 PCR 블롯(reverse-transcribed PCR blots), 및 정량적인 mRNA 수치를 나타낸 도이다.

도 3b는 어린 마우스, sham 및 VF(-) 수술 이후의 노령의 마우스(각 그룹에서 n=5)의 뇌에서 IL-1β 및 TNF-α의 웨스턴 블롯의 결과, 및 이의 양(액틴(actin)으로 보정)을 나타낸 도이다.

도 3c는 어린 마우스, sham 및 VF(-) 수술 이후의 노령의 마우스(각 그룹에서 n=5)의 피질(cortex)에서 Iba1 및 CD68에 대한 면역형광 염색(녹색, 기준자=100 ㎛) 및 활성화된 Iba1-양성 및 CD68-양성 세포(화살표로 표시) 개수의 양을 나타낸 도이다. 이미지 분석을 위해서 각 염색에서 피질의 영역(뇌 섹션의 도표에서 박스로 표시)을 사용하였다; $^{*}p < 0.05$ 대. 어린 마우스, $^{\#}p < 0.05$ 대. sham.

도 4a는 어린 마우스, sham 및 VF(-) 수술 이후의 노령의 마우스(각 그룹에서 n=5)의 뇌에서 IgG 단백질의 웨스턴 블롯의 결과, 및 양(H, 중사슬+L, 경사슬)을 나타낸 도이다.

도 4b는 어린 마우스, sham 및 VF(-) 수술 이후의 노령의 마우스(각 그룹에서 n=5)의 뇌에서 claudin-5 및 occludin 단백질의 웨스턴 블롯의 결과, 및 양(액틴으로 보정)을 나타낸 도이다; $^{*}p < 0.05$ 대. 어린 마우스, $^{\#}p < 0.05$ 대. sham.

도 5a는 MCAO 3일 이후, sham(n=10) 및 VF(-) 수술 후의 노령 마우스(n=9)의 총 반구(hemisphere), 피질, 및 선조체(striatum)에서의 경색(infarct) 부피를 나타낸 도이다.

도 5b는 sham 및 VF(-) 수술 이후 노령의 마우스에서 허혈(ischemia) 및 재관류(reperfusion) 동안의 CBF 변화를 나타낸 도이다.

도 5c는 sham 및 VF(-) 수술을 받은 노령 마우스(각 그룹에서 n=5)에서 MCAO 6시간 후에, 허혈성 피질에서 IgG 단백질의 웨스턴 블롯의 결과 및 양(H, 중사슬+L, 경사슬)을 나타낸 도이다.

도 5d 및 5e는 sham 및 VF(-) 수술을 받은 노령 마우스(각 그룹에서 n=5)에서 MCAO 6시간 후에 허혈성 피질에서, cludin-5 및 occludin의 웨스턴 블롯의 결과(5d) 및 IL-1β 및 TNF-α의 웨스턴 블롯(5e)의 결과를 나타낸 도이다; $^{*}p < 0.05$ 대. 어린 마우스, $^{\#}p < 0.05$ 대. sham.

도 6a는 MCAO 미수행(대조군) 및 MCAO 3일 후의 sham 수술 이후 노령 마우스(각 n=5)의 내장지방 조직에서 IL-1β, IL-6, 및 TNF-α의 정량적인 mRNA 수치를 나타낸 도이다; $^{*}p < 0.05$ 대. 대조군.

도 6b는 MCAO 미수행(대조군) 및 MCAO 3일 후의 VF(-) 수술 이후 노령 마우스(각 n=5)의 내장지방에서 IL-1β,

IL-6, 및 TNF-α의 정량적인 mRNA 수치를 나타낸 도이다; *p < 0.05 대. 대조군.

도 6c는 sham 및 MCAO 3일 후의 VF(-) 수술 이후 노령 마우스(각 n=5)의 내장지방에서 IL-1β 및 TNF-α의 웨스턴 블롯의 결과를 나타낸 도이다; *p < 0.05 대. sham.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0024] 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 허혈성 뇌질환 치료제 스크리닝 방법을 제공한다:

[0025] 1) 시료에 피검물질을 처리하는 단계;

[0026] 2) 상기 단계 1)의 시료에서 염증성 지표를 측정하는 단계; 및

[0027] 3) 상기 단계 2)의 염증성 지표가 무처리 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계.

[0028] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 시료는 혈장 또는 조직이고, 상기 조직은 내장지방 조직인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0029] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 피검물질은 추출물, 천연 화합물, 합성물, 단백질, 펩티드(peptide) 및 조성물로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0030] 상기 방법에 있어서, 단계 2)의 염증성 지표는 테스토스테론(testosterone), 전염증성 사이토카인(proinflammation cytokine), 글루코스(glucose), 마크로파지(macrophage), IgG 혈관외누출(IgG extravasation), 치밀이음부(tight junction) 단백질, 및 지방세포 크기로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0031] 또한, 상기 전염증성 사이토카인은 인터루킨-1β(interleukin-1β) 또는 종양괴사인자-α(tumour necrosis factor-α; TNF-α)인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0032] 또한, 상기 치밀이음부 단백질은 claudin-5 또는 occludin인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0033] 상기 단계 2)의 측정은 면역형광염색법(immunofluorescence staining), RT-PCR(reverse transcription-PCR), 실시간 PCR(real-time PCR), 웨스턴 블롯(western blot), EIA(enzyme immunoassay), ELISA 및 단백질칩으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나로 측정하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0034] 상기 허혈성 뇌질환은 혈전증, 색전증, 일과성 허혈발작, 뇌중풍, 뇌경색, 뇌출혈, 지주막하 출혈, 백질 이상증 및 소경색으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하고, 뇌중풍 또는 뇌경색인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

[0036] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 내장지방이 전신의 염증에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 어린 마우스, sham 및 내장지방 제거 수술 이후의 노령의 마우스에서, 전신적인 염증을 ELISA 분석 키트를 사용하여 혈장 인터루킨-1β(interleukin-1β) 및 종양괴사인자-α(tumour necrosis factor-α; TNF-α)의 수치를 확인한 결과, IL-1β 및 TNF-α의 혈장 수치는 어린 마우스에 비해서 sham 그룹에서 현저하게 증가하였고, 반면 내장지방 제거에 의해 상기 증가가 억제됨을 확인하였다(도 1c 및 1d 참조).

[0037] 또한, 내장지방의 축적 및 노화는 글루코스(glucose) 대사 질환과 연관이 있어, 이를 확인하기 위하여, 상기 마우스 동물 모델에서 글루코스 수치를 측정하였고 그 결과, sham 그룹은 어린 마우스와 비교하여 기근상태에서 혈액 글루코스 수치가 증가하였으나, 내장지방 제거에 의해 영향을 받지 않음을 확인하였다(도 1c 참조).

[0038] 또한, 내장지방이 내장지방 조직 염증에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 어린 마우스, sham 및 내장지방 제거 수술 이후의 노령의 마우스에서 내장지방을 제거한 뒤, 내장지방 조직에서의 전염증성 사이토카인 수치를 측정하였고, 그 결과, 어린 마우스와 비교하여, IL-1β, IL-6 및 TNF-α의 mRNA 수치 및 IL-1β 및 TNF-α의 단백질 수치는 sham 노령 마우스의 내장 지방에서 현저하게 증가되어 있었고, 내장지방 제거 그룹의 남아있는 지방에서, mRNA 및 단백질의 수치는 sham과 비교하여 현저하게 감소되어 있음을 확인하였다(도 2a 및 2b 참조). 또한, 지방 조직 마크로파지는 전염증성 사이토카인의 중요한 요인이기 때문에, 이의 발현을 확인하기 위해서

CD68 면역형광 염색을 수행하였고, 그 결과, 내장지방 조직에서 CD68-양성 마크로파지 및 CLS 형성의 백분율이 어린 마우스에 비해서 노령의 sham 마우스에서 현저하게 증가되어 있었고, 상기 증가는 내장지방 제거에 의해 현저하게 감소됨을 확인하였다(도 2c 참조). 또한, 지방세포의 크기는 전염증성 사이토카인 생성과 일치하는 것이 잘 알려져 있어, 내장지방 조직에서 지방세포의 크기를 측정하였고, 그 결과, 어린 마우스에 비해 노령의 sham 마우스에서 지방세포의 크기가 현저하게 증가되어 있었으나, 내장지방 제거 그룹에서 남아있는 내장지방 조직에 대한 지방세포의 전체적인 크기는 변화가 없음을 확인하였다(도 2d 참조).

[0039] 아울러, 노화성 뇌에서 내장지방의 효과를 정의하기 위하여, 내장지방 제거 후의 뇌에서의 전염증성 사이토카인 수치를 측정하였고, 그 결과, 뇌의 피질에서 IL-1β, IL-6 및 TNF-α의 mRNA 수치 및 IL-1β, 및 TNF-α의 단백질의 수치는 어린 마우스와 비교하여 sham 노령 마우스에서 현저하게 증가 되어 있었고, 상기 증가는 sham과 비교하여 내장지방 제거에 의해 현저하게 회복됨을 확인하였다(도 3a 및 3b 참조). 또한, 뇌의 피질에서 Iba1 및 CD68 면역활성에 의해 활성화된 마이크로글리아(microglia)/마크로파지를 측정한 결과, 어린 마우스에서는 적은 개수의 활성화된 마이크로글리아/마크로파지를 확인하였지만, 노령의 sham 마우스에서는 이의 숫자가 현저하게 증가하였고, 내장지방 제거에 의해서 현저히 감소함을 확인하였다(도 3c 참조).

[0040] 또한, 내장지방 제거가 BBB 투과성(blood brain barrier permeability)에 미치는 영향을 확인하기 위하여, IgG 혈관외누출(IgG extravasation) 및 주요 치밀이음부(tight junction) 단백질인 claudin-5 및 occludin의 단백질 수치를 각 그룹간의 뇌에서 비교한 결과, IgG 혈관외누출은 어린 마우스에 비해서 노령의 sham 마우스에서 현저하게 증가하였고, 이는 내장지방 제거에 의해 감소하였으며, claudin-5 및 occludin 단백질 수치는 노령의 sham 마우스에서 감소하였고, 이 또한 내장지방 제거에 의해 회복됨을 확인하였다(도 4a 및 4b 참조).

[0041] 또한, 노령 마우스에서 허혈성 뇌 손상에 대한 내장지방 염증의 영향을 확인하기 위하여, 마우스 동물 모델에 허혈성 뇌 손상(ischemic brain damage)을 유발한 뒤 뇌경색(brain infarct)의 용적을 측정하였고, 그 결과, MCAO(middle cerebral artery occlusion) 3일 후에, 총 뇌경색 용적은 sham과 비교하여 내장지방 제거에 의해 현저하게 감소함을 확인하였다(도 5a 참조). 또한, 뇌경색 용적의 감소가 초기의 재관류(reperfusion) 기간 동안 BBB의 붕괴 및 염증성 반응과 연관이 있는지 확인하기 위하여, MCAO 6시간 후에 IgG 혈관외누출 및 치밀이음부 단백질 및 전염증성 사이토카인의 단백질 수치를 확인한 결과, 허혈성 손상에 의한 IgG 혈관외누출의 증가는 내장지방 제거의 마우스의 뇌에서 현저하게 감소되었고, claudin-5 및 occludin 단백질 수치 또한 감소하였으며, 허혈성 손상에 의한 IL-β 및 TNF-α의 단백질 수치의 증가는 내장지방 제거 그룹에서 현저하게 감소함을 확인하였다(도 5c 내지 도 5e 참조).

[0042] 아울러, 내장지방 조직 염증이 허혈성 뇌 손상에 의해 영향을 받는지를 확인하기 위하여, 뇌 손상 3일 후의 MCAO를 하지 않은 대조군 마우스 및 MCAO를 수행한 마우스의 전염증성 사이토카인 수치를 비교한 결과, sham 마우스에서 IL-1β, IL-6, 및 TNF-α의 mRNA 수치는 MCAO 이후에 내장지방에서 현저하게 증가하였으나, 내장지방 제거 그룹은 이들 수치가 증가하지 않았고, MCAO 3일 이후에 sham 및 내장지방 제거 그룹 간의 IL-1β 및 TNF-α의 단백질 수치를 비교하였을 때, 상기 단백질의 수치가 내장지방 제거 그룹에서 현저하게 감소됨을 확인하였다(도 6a 내지 도 6c 참조).

[0043] 따라서 본 발명은 허혈성 뇌질환 치료제 스크리닝 방법으로 유용하게 사용될 수 있다.

[0045] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해서 상세히 설명한다.

[0046] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해서 한정되는 것은 아니다.

[0048] **<실시예 1> 마우스 동물 모델의 준비**

[0049] 수컷 C57BL/6 마우스(6주령)는 Orient Bio Inc.(성남, 대한민국)로부터 구입하였고, 이화여자대학교의 정교한 무균 동물 시설에서 22±2℃의 12시간 빛/어둠 사이클에서 사육하였다. 하룻밤 동안의 기근상태(fasting)가 필요한 경우를 제외하고, 일반적인 설치류 식이 및 수돗물을 임의로(ad libitum) 제공하였다. 실험은 어린 성인(2.5개월령) 및 건강한 상태의 노령(18 및 20개월령) 마우스를 사용하여 수행하였다. 혈장 테스토스테론(testosterone)을 측정하기 위하여, 2.5개월령의 10마리, 18개월령의 8마리 및 20개월령의 7마리를 사용하였다. 19개월령에서, 106마리의 마우스는 임의로 sham 및 내장지방제거 그룹(visceral fat removal group)으로 나누

었다(각각 53마리). 내장지방제거를 위한 하기의 수술적 과정은 이전의 공지된 방법에 따라 수행하였다(Shi 등., 2013).

[0050] 구체적으로, 마우스는 이소플루란(isoflurane)으로 마취하였고 단일 복부 정준선 절개(single abdominal midline incision)를 만들었다. 1 내지 1.5 g의 범위의 무게인 양쪽의(bilateral) 부고환(epididymal) 지방 조직은 꺼내어, 절개하였고 제거하였다. sham의 수술도 같은 방법으로 수행하였으나, 지방은 제거하지 않았다. 수술 이후, 상기 복부의 복막(abdominal peritoneum)은 비크릴 봉합사(vicryl sutures)를 사용하여 봉합하였고, 피부는 멸균 상처용 클립으로 마무리하였다. 상기 과정은 마우스가 수술로부터 회복하고 체중을 다시 얻게 하기 위하여 허혈성 손상 4 주 전에 수행하였다. 각 그룹의 15마리의 마우스는 sham 수술 또는 내장지방 제거 전 및 4주 후에 글루코미터(glucometer, CareSens II , i-sence Inc.,원주, 대한민국)를 사용하여 전날 저녁부터(16±1 시간) 공복 상태에서 꼬리 정맥으로부터 혈중 글루코스 수치를 측정하였다. 추가적으로, 마우스의 체중을 sham 수술 또는 내장지방 제거의 전 및 4 주 후에 측정하였고, 또한 수술 직후의 체중에서 체중이 15%보다 더 많이 감소한 마우스는 제외하였다.

[0051] 각 그룹에서, 22 내지 23마리의 마우스는 허혈성 뇌 손상(ischemic brain insult)에 앞서 기초 상태(basal state)에서의 혈장 사이토카인 정도(serum cytokine level)(n=10), 웨스턴 블롯팅(western blotting) 및 실시간 PCR(real-time PCR)(n=5), IgG 혈관외누출(extravasation)(n=4 및 5), 및 면역형광 염색(immunofluorescence staining)(n=3) 시험의 분석에 사용하였다. 또한, 2.5개월령의 28마리의 마우스(혈장 사이토카인에 대해 15마리, 웨스턴 블롯팅/실시간 PCR 및 IgG 혈관외누출에 대해 각각 5마리, 및 형광면역 염색에 대해 3마리)는 기초 상태에서 비교를 위해 사용하였다. 허혈성 중풍(ischemic stroke)은 경색(infarct) 부피를 측정하여 분석하였다. 총 149마리 중 137마리의 마우스의 시험이 데이터 분석에 포함되었다.

[0053] **<실험예 1> 노령 마우스에서 내장지방 제거에 의한 전신적인 염증의 감소 확인**

[0054] **<1-1> 혈장 테스토스테론 수치 확인**

[0055] 혈장 테스토스테론 수치는 어린 마우스보다 노령 마우스에서 더 낮았고, 순환(circulation)에서 낮은 총 테스토스테론 수치는 내장의 비만과 연관되어있다(Reed 등., 2007; Tchernof 및 Despres, 2013). 본 명세서에서 사용된 마우스의 노화 과정을 결정하기 위하여, 혈장 테스토스테론 수치는 2.5-, 18-, 및 20-개월의 마우스에서 측정하였다. 낮은 테스토스테론 수치와 함께, 20개월령의 노령 수컷 마우스는 인구통계학적의(demographic) 60세 노인과 거의 동등하며, 그러므로 본 발명자는 상기 나이의 마우스를 본 발명에 사용하였다.

[0056] 상기 <실시예 1>에서 제조된 내장지방제거 그룹에서 테스토스테론의 수치를 확인하기 위하여, Cayman Chemical 키트를(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, 미국)사용하여 EIA(enzyme immunoassay, 효소면역분석) 방법으로 측정하였고, 또한, 전신적인 염증감소를 확인하기 위하여, ELISA 키트를 사용하여 제조사(R&D systems, Minneapolis, MN, 미국)의 프로토콜대로 측정하였다.

[0057] 그 결과, 도 1a에 나타난 바와 같이, 2.5개월령의 어린 마우스(2.83±0.58 ng/ml, p=0.02)와 비교하여 20개월령의 노령 마우스에서 유의성 있는 감소(1.17±0.31 ng/ml)를 확인함으로써, 테스토스테론 수치가 나이와 관련되고(도 1a), 도 1b에 나타난 바와 같이, 체중의 증가 및 내장 부분(부고환 지방)에 있는 지방의 축적이 어린 마우스와 비교하여 노령 마우스에서 증가함을 확인하였다(도 1b).

[0058] 또한, sham 수술 또는 내장지방 제거 그룹에 있어서, 수술 전 그룹 간의 체중은 차이가 없었고(sham 군에 대해 39.83±1.11 g, 내장지방 제거 군에 대해 40.63±0.83 g, n=15, p=0.57), 내장지방 제거에 의해 3.90±0.4%(지방의 1.60±0.16 g)의 체중이 감소하였다. 4주 후에, 그룹 간의 통계적인 차이는 없었으나, 두 그룹에 대한 체중의 감소를 관찰하였다; 그러나 상기 감소는 내장지방을 제거한 마우스에서 현저하였다(sham 그룹에 대해 38.37±1.13 g 및 내장지방 제거 그룹에 대해 36.50±0.81 g, p=0.19).

[0060] **<1-2> 전염증성 사이토카인의 발현 변화 확인**

[0061] 상기 <실시예 1>에서 제조된 내장지방 제거 그룹에서 전신적인 염증 감소를 확인하기 위하여, 혈장 인터루킨-1β(interleukin-1β) 및 종양괴사인자-α(tumour necrosis factor-α; TNF-α)의 수치는 ELISA 분석 키트(R&D Systems, Minneapolis, MN, 미국)를 사용하여 제조사의 프로토콜을 따라 측정하였고, 효소 반응의 강도는 분광계(spectrometer)를 사용하여 450 nm에서 측정하였다. 마우스 당 3개의 웰(well)로부터 평균값을 계산하였다.

또한, 본 명세서의 모든 데이터는 평균의 평균±표준오차로써 표현하였다. 두 그룹간의 비교는 unpaired Student's t-test를 사용하여 분석하였고, 두 그룹 이상간의 비교는 사후(post-hoc) 피셔의 방어적 최소 유의차 검정(Fisher's protected least significant difference test)을 따르는 one-way analysis of variance(ANOVA)를 사용하여 분석하였다. 신경학적 점수 및 와이어 서스펜션 시험 점수는 Mann-Whitney U-test(Prism6, GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)를 사용하여 분석하였다. 통계적 유의성은 $P < 0.05$에서 정하였다.

[0062] 그 결과, 도 1c 및 1d에 나타난 바와 같이, 전신 염증의 마커인, 전염증성(proinflammatory) 사이토카인 IL-1β 및 TNF-α의 혈장 수치는 어린 마우스에 비해서 sham 그룹에서 현저하게 증가하였고(두 개 모두 $p < 0.01$), 반면 내장지방 제거에 의해 상기 증가가 억제됨을 확인할 수 있었다(두 개 모두 $p < 0.01$ 대. sham, 도 1c 및 1d).

[0064] **<1-3> 혈액 글루코스 수치 확인**

[0065] 또한, 내장지방 축적 및 노화가 글루코스 대사의 발병(pathogenesis)에 연관되어있으므로(Huffman 및 Barzilai, 2009), 전날 저녁부터(16±1 시간) 사료를 중단하고 다음 날 아침 공복 상태의 혈액 글루코스 수치를 글루코미터(glucometer, CareSens II, i-sence Inc., 원주, 대한민국)를 사용하여 꼬리 정맥으로부터 측정하였다.

[0066] 그 결과, 도 1e에 나타난 바와 같이, sham 그룹에서, 어린 마우스와 비교하여 기근상태에서 혈액 글루코스는 증가하였으나(112.42±3.22 mg/이 대. 92.60±2.16 mg/dl, p=0.03), 이는 내장지방 제거에 의해 영향을 받지 않았다(116.01±3.65 mg/dl, p=0.47 대. sham; 도 1e). 상기 결과는 내장지방 조직이 마우스의 노화와 연관된 전신성 염증의 중요한 요인임을 나타낸다.

[0068] **<실험예 2> 노령 마우스에서 내장지방 제거에 의한 내장지방 조직 염증의 감소 확인**

[0069] **<2-1> 전염증성 사이토카인의 발현 변화 확인**

[0070] 전신의 염증의 요인인 노령 마우스의 축적된 내장지방 조직에서의 전염증성 사이토카인 수치를 확인하기 위하여, 실시간 PCR 및 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

[0071] 구체적으로, 뇌 피질로부터 RNA 분리는 RNeasy® Mini 키트(QIAGEN, Germantown, MD, 미국)를 사용하였고, 내장지방 조직으로부터의 RNA 분리는 RNeasy Lipid Tissue Mini 키트(QIAGEN)를 사용하였다. 상기 분리된 RNA는 Power cDNA Synthesis kit(iNtRON Biotechnology, 성남, 대한민국)을 사용하여, 각 샘플로부터 총 RNA의 1 ㎍으로 cDNA 합성을 수행하였다. 희석한 cDNA(1:10)의 2-㎕ 부분표본은 SYBR® Green PCR Master Mix(Applied Biosystems, Forster City, CA, 미국)을 이용하여 증폭하였고, PCR 반응은 ABI Prism 7000 서열 측정기(Applied Biosystems)를 사용하여, 95℃에서 5분 동안 초기 변성, 95℃에서 30초, 56℃에서 30초, 및 72℃에서 45초의 40 사이클로 수행되었다. 상기에 사용된 프라이머는 Bioneer Corporation(대전, 대한민국)에서 구입하였고, 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0072]

유전자 이름	서열(5'-3')
actin	forward: AGGCTGTGCTGTCCCTGTAT (서열번호 1)
	reverse: AAGGAAGGCTGGAAAAGAGC (서열번호 2)
IL-1β	forward: AATGATCTGTTCTTTGAGGCTGAC (서열번호 3)
	reverse: CGAGATGCTGCTGTGAGATTTGAAG (서열번호 4)
IL-6	forward: CGGAGAGGAGACTTCACAGAGGA (서열번호 5)
	reverse: GGAGAGCATTGGAAATTGGGG (서열번호 6)
TNF-α	forward: GAACTGGCAGAAGAGGCACTC (서열번호 7)
	reverse: AGGGTCTGGGCCATAGAACTG (서열번호 8)

[0073] IL-1β, IL-6 및 TNF-α의 사이클링 임계(cycling threshold; Ct) 값은 액틴의 Ct 값에 보정하였고, 상대적인 발현 수치은 $2^{-\triangle\triangle Ct}$ 방법(Livak 및 Schmittgen, 2001)에 의해 계산하였다. 어린 및 노령 마우스 사이의 비교를

위한 어린 마우스, 및 MCAO(Middle cerebral artery occlusion) 전후의 비교를 위한 MCAO를 하지 않은 노령 마우스는 대조군으로서 사용하였다. 모든 실험은 세 차례 수행하였다.

[0075] 또한, 웨스턴 블롯팅을 위해서는 마우스 동물 모델의 각 반구(hemisphere)로부터 분리한 피질(cortical) 조직 및 내장지방 조직을 사용하였다. 상기 피질 조직은 sodium dodecyl sulfate 완충용액(50 mM Tris-HCl, 1% IGEPAL CA-630, 0.25% deoxycholic acid, 150 mM NaCl, 1 mM ethylene-diaminetetra acetic acid, 1 mM NaF, 0.1% sodium dodecyl sulfate, pH 7.4)에 내장지방 조직은 프로테아제 억제 칵테일(Complete Mini, Roche, Mannheim, 독일)을 함유하는 HNTG 완충용액(50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 10% 글리세롤, 1% triton X-100; pH 7.5)에 각각 용리하였고, 그 후 4℃에서 10분간 배양한 뒤, 4℃에서 15분 동안 15,700×g에서 원심분리하였다. 그리고 나서, 뇌 조직에서 분리된 단백질 80 ㎍의 및 지방 조직에서 분리된 단백질 50 ㎍을 로딩하여, 전기영동하였으며, trans-Blot® TurboTM Transfer membrane(Bio-Rad, Hercules, CA, 미국)에 이를 이동시켰다. 상기 멤브레인은 1시간 동안 0.1% Tween-20 및 10% 건조 우유를 포함하는 TBS(Tris-buffered saline)에 전처리하였고, IL-1β(1:250; R&D Systems), TNF-α(1:250; Santa Cruz Biotechnology), cludin-5(1:1000; Invitrogen Corporation), occludin(1:1000; Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, 미국), 또는 액틴(1:1000)의 1차 항체를 사용하여 하룻밤 동안 반응시켰다. 그리고나서 이를 세척한 후, 홀스래디쉬 퍼록시다제-결합된 이차 항체(horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody)를 사용하여 1시간 동안 반응시켰고, 단백질 밴드는 Western Blotting Luminol Reagent(Santa Cruz Biotechnology)를 사용하여 시각화하였다. 정량을 위해, 각 밴드의 강도는 Image J 1.37v 프로그램을 사용하여 액틴의 강도로 보정하였다.

[0076] 그 결과, 도 2a 및 2b에 나타난 바와 같이, 어린 마우스와 비교하여, IL-1β, IL-6 및 TNF-α의 mRNA 수치(각각 5.04-, 6.79, 및 5.39-배의 변화, 모두 $p < 0.01$) 및 IL-1β 및 TNF-α의 단백질 수치(각각 3.34- 및 2.35-배의 변화, 모두 $p < 0.01$)는 sham 노령 마우스의 내장 지방에서 현저하게 증가되어 있었다(도 2a 및 2b). 내장 지방 제거 그룹의 남아있는 지방에서, mRNA 및 단백질의 수치는 sham과 비교하여 현저하게 감소되어 있었다(모두 $p < 0.05$; 도 2a 및 2b).

[0078] **<2-2> 마크로파지의 발현 수준 확인**

[0079] 지방 조직 마크로파지는 전염증성 사이토카인의 중요한 요인이기때문에(Olefsky 및 Glass, 2010), 이의 발현을 확인하기 위해서 CD68 면역형광 염색을 수행하였다.

[0080] 구체적으로, 상기 <실시예 1>에서 제조된 마우스의 내장지방 조직을 고정된 상태로 30% 수크로스 용액에 하룻밤 동안 반응시켰다. 그리고 나서 상기 조직을 0.1% Triton X-100, 5% 정상 혈장, 및 1% 소 혈장 알부민(bovine serum albumin)을 포함하는 TBS에서 1 시간동안 배양하였고, 그 후 CD68(1:1000; BD Bioscience, San Jose, CA, 미국) 또는 이온화된 칼슘-결합 어댑터 분자 1(ionized calcium-binding adapter molecule 1; Iba1, 1:1000; wako Pure Chemical Industries)의 일차 항체에서 하룻밤 동안 반응시키고, 상기 배양된 조직에 플루오르세인 이소티오시아네이트(fluorescein isothiocyanate, 1:1000; Vector laboratories, Inc., Burlingame, CA, 미국)에 결합 되어있는 이차 항체를 처리하여 1시간 동안 반응시켰다. 이 때, 모든 과정사이에서 조직은 TBS로 세척하였다. 상기 조직은 핵 스테인 6'-이아미디노-2-페닐린돌(nuclear stain 6'-diamidino-2-phenylindole; DAPI, Vector Laboratories, Inc.)를 포함하는 Vectashield mounting 배지에 올려 공초점 현미경(confocal microscope, LSM5 PASCAl; Carl Zeiss)을 사용하여 형광 이미지를 획득하였다. 획득한 이미지에서 CD68-양성 마크로파지(macrophage) 및 CLS(crown like structure)는 Axiovision LE 프로그램(Carl Zeiss)을 사용하여 다섯 개의 순차적인 조직 섹션으로부터 임의로 선택된 내장지방 조직 영역(1024×1024 픽셀)에서 정량화하였다. 지방세포 염증을 나타내는(Murano 등., 2008) CLS는 지방세포 둘레에 둘러쌓여있는 CD68-양성 세포로서 정의하였다. 최소 125개의 지방세포가 각 동물에 대해(n=3) 조사되었고, 마크로파지 및 CLS의 갯수는 이전에 기술된 바와 같이(Harman-Boehm 등., 2007; Michaud 등., 2012), 100개의 지방세포에 대해 보정하였다(마크로파지 및 CLS의 백분율). 짙게 염색되고 원-모양의 Iba1-양성 세포 및 CD68-양성 세포는 Axiovision LE 프로그램(Carl Zeiss)를 사용하여 정량하였다. 각 동물로부터의 두 개의 순차적인 뇌 섹션이 사용되었고, 정량은 각 뇌 섹션에 대해 오른쪽 반구에서 측면 피질(lateral cortex)의 세 개의 서로 다른 영역(500 μm^2)에서 수행하였다. 여섯 개의 500-μm^2 영역에 대한 평균 세포 갯수는 각 동물에 대해서 계산하였다(Park 등., 2012).

[0081] 그 결과, 도 2c에 나타난 바와 같이, 내장지방 조직에서 CD68-양성 마크로파지(62.06±8.57%) 및 CLS 형성(8.4±2.20%)의 백분율이 어린 마우스에 비해서(각각 5.64±0.83% 및 0.33±0.33%, 모두 $p < 0.01$) 노령의 sham 마우스에서 현저하게 증가되어 있었다(도 2c). 상기 증가는 내장지방 제거에 의해 현저하게 감소되었다(각각 32.188±5.73% 및 1.54±0.44%, 모두 $p < 0.05$ 대. sham).

[0083] **<2-3> 지방세포의 크기 측정**

[0084] 지방세포의 크기는 전염증성 사이토카인 생성과 일치하는 것이 잘 알려져 있어(Skurk 등., 2007), 내장지방 조직에서 지방세포의 크기를 측정하여 내장지방 조직의 염증 감소를 확인하였다.

[0085] 구체적으로, 상기 <실시예 1>에서 제조된 마우스를 sodium pentobarbital(120 mg/kg, 복강내(intraperitoneal))로 마취한 뒤, 차가운 4% 포름알데히드(formaldehyde)를 포함하는 0.1 M 인산 나트륨 완충액(sodium phosphate buffer)(pH 7.2)에 이어서 살린(salin)으로 경심관류(transcardially)로 관류시켰다. 저온유지장치를 사용하여 순차적으로 지방 섹션(30 ㎛ 두께, 300-㎛ 간격)을 절단하였고 젤라틴-코팅된 슬라이드(gelatin-coated slide) 위에 둔 뒤, 상기 절단된 섹션을 헤마톡실린(hematoxylin, Sigma, St. Louis, MO, 미국) 및 이오신(eosin, Sigma)으로 염색하였다. 그리고 나서, 염색된 섹션은 상승적인 알코올 용액에서 탈수화하였고, 자일렌(xylene)으로 투명화하였으며, Permount®(Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, 미국)에 고정시켰다. 상기 섹션의 이미지는 Nikon Microphoto 현미경(Nikon Corporation, Tokyo, 일본)으로 20배 확대에서 획득하였고, 각 동물의 다섯 개의 순차적인 섹션(1024×1024 픽셀)에서 지방세포의 크기는 Axioxision LE 프로그램(Carl Zeiss)를 사용하여 세포의 중앙 포인트를 포함하는 멤브레인 간의 거리를 측정하는 것으로 결정하였다(Tan 등., 2013). 각 동물에 대해 최소 100개의 지방세포를 조사하였다.

[0086] 그 결과, 도 2d에 나타난 바와 같이, 지방세포의 크기는 어린 마우스에 비해 노령의 sham 마우스에서 현저하게 증가되어 있었으나(100.09±6.41 대. 47.89±1.61 ㎛, $p < 0.01$), 내장지방 제거 그룹에서 남아있는 내장지방 조직에 대한 지방세포의 전체적인 크기는 변화가 없었다(97.36±2.54 ㎛, $p=0.65$ 대. sham, 도 2d).

[0087] 상기 결과는 내장지방 조직에서 노화와 함께 염증성 반응이 증가하고 침투된 마크로파지가 내장지방 조직에서의 염증성 반응에 관련되어 있다는 것을 나타낸다.

[0089] **<실험예 3> 뇌에서 내장지방 제거에 의한 노화 관련 변화의 억제 확인**

[0090] **<3-1> 내장지방 제거 후 뇌에서의 전염증성 사이토카인 수치 확인**

[0091] 노화성 뇌에서의 내장지방의 효과를 정의하기 위하여, <실험예 2>에 기술된 방법과 같은 방법으로 내장지방 제거 후의 뇌에서의 전염증성 사이토카인 수치를 측정하였다.

[0092] 그 결과, 도 3a 및 3b에 나타난 바와 같이, 뇌의 피질에서 IL-1β, IL-6 및 TNF-α의 mRNA 수치(각각 3.11-, 3.12, 및 5.49-배의 변화, 모두 $p < 0.01$) 및 IL-1β, 및 TNF-α의 단백질의 수치(각각 1.98- 및 3.49-배의 변화, 모두 $p < 0.01$)는 어린 마우스와 비교하여 sham 노령 마우스에서 현저하게 증가되어 있었고(도 3a 및 3b), 상기 증가는 sham과 비교하여 내장지방 제거에 의해 현저하게 회복되었다(모든 $p < 0.05$).

[0093] 또한, 도 3c에 나타난 바와 같이, 뇌의 피질에서 Iba1 및 CD68 면역활성에 의해 활성화된 마이크로글리아(microglia)/마크로파지를 측정하였을 때, 어린 마우스에서는 적은 개수의 활성화된 마이크로글리아/마크로파지를 확인하였지만, 노령의 sham 마우스에서는 이의 숫자가 현저하게 증가하였다(Iba1에 대해 3.87-배의 변화, CD68에 대해 7.26-배의 변화, 모두 $p < 0.01$). 그러나, 상기 활성화된 마이크로글리아/마크로파지의 개수는 내장지방 제거에 의해서 현저히 감소하였다(모두 0.53-배의 변화, Iba1에 대해 $p < 0.01$ 및 CD68에 대해 $p=0.014$ 대. sham; 도 3c).

[0095] **<3-2> 내장지방 제거 후 뇌에서의 IgG 혈관외누출 및 치밀이음부 단백질 발현 변화 확인**

[0096] BBB 투과성은 일반적으로 노화와 함께 증가하고(Popescu 등., 2009), 치밀이음부(tight junction)의 분열은 뇌에서의 혈액-유래 분자들의 파라셀룰라(paracellular) 유동(flux)에 의한 염증성 반응에 연관되어 있음이 잘 알려져 있다(Coisne 및 Engelhardt, 2011). 따라서, 본 발명자들은 IgG 혈관외누출 및 주요 치밀이음부 단백질인

claudin-5 및 occludin의 단백질 수치를 각 그룹간의 뇌에서 비교하였다.

[0097] 구체적으로, BBB 투과성의 측정은 이전에 기술된 방법을 참고하여(Shin 등., 2013), MCAO 6시간 이후에 대조군 마우스의 오른쪽 피질(cortex) 및 동측(ipsilateral) 피질에서 IgG 혈관외누출을 조사하였다. 50 ㎍의 단백질이 로딩된 Immobilon-P 멤브레인(membrane)(Millipore Corporation, Billerica, MA, 미국)은 바이오틴화(biotinylated) 항-마우스 IgG(1:250; Vector Laboratories, Burlingame, CA, 미국)의 일차 항체로 하룻밤 동안 반응시킨 후, 1시간 동안 avidin peroxidase 키트(Vextastain Elite; Vector Laboratories)에 반응시켰다. 상기 단백질의 정량을 위해 Image J 1.37v 프로그램(National Institues of Health, Bethesda, MD, 미국)을 사용하였고, 각 단백질의 총 사슬 강도(중사슬(heavy chain)+ 경사슬(light chain))를 이에 상응하는 블롯에서 액틴(actin, 1:1000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, 미국) 밴드의 강도로 보정(normalized)하여 확인하였다.

[0098] 또한, claudin-5 및 occludin의 단백질 수치 측정을 위한 웨스턴 블롯팅은 상기 실험예 <2-1>의 방법으로 수행하였으며, claudin-5(1:1000; Invitrogen Corporation) 및 occludin(1:1000; Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, 미국)의 일차 항체를 사용하였다.

[0099] 그 결과, 도 4a 및 4b에 나타난 바와 같이, IgG 혈관외누출은 어린 마우스에 비해서 노령의 sham 마우스에서 현저하게 증가하였고(2.71-배의 변화, $p < 0.01$), 이는 내장지방 제거에 의해 감소하였다(0.78-배의 변화, $p < 0.01$ 대. sham; 도 4a). 또한, claudin-5 및 occludin 단백질 수치는 노령의 sham 마우스에서 감소하였고(각각 0.81- 및 0.76-배의 변화, 모두 $p < 0.01$ 대. 어린 그룹), 이 또한 내장지방 제거에 의해 회복되었다(모두 $p < 0.05$ 대. sham; 도 4b).

[0100] 상기 결과는 축적된 내장지방 조직이 뇌에서의 노화와 연관된 염증성 변화 및 BBB 투과성에 연관되어 있음을 나타낸다.

[0102] **<실험예 4> 허혈성 뇌손상 동물 모델에서 내장지방 제거에 의한 허혈성-유도 염증의 감소 확인**

[0103] **<4-1> 내장지방 제거에 의한 뇌경색 부피의 감소 확인**

[0104] 노령 마우스에서 허혈성 뇌 손상에 대한 내장지방 염증의 영향을 확인하기 위하여, 하기와 같이 실험을 수행하였다.

[0105] 구체적으로, 상기 <실시예 1>에서 제조한 15마리의 마우스를 sham 또는 내장지방 제거 그룹으로 분리하였다. 내장지방 제거 그룹에서 두 마리의 마우스가 수술 4주 후에 체중이 감소 되어 제외하였고, 최종적으로 MCAO(Middle cerebral artery occlusion)는 sham 그룹의 15마리의 마우스 및 내장지방 제거 그룹의 13마리의 마우스를 사용하여 허혈성 뇌손상을 유발시켰다. 일시적인 MCAO 및 뇌의 혈액 흐름(cerebral blood flow; CBF) 모니터링은 공지된 방법으로 수행하여(Shin 등., 2013), MCAO 30분 후, MCAO 동안 CBF에서 85% 이상의 감소를 나타내고 재관류(reperfusion) 10분 후 80% 이상까지 회복된 마우스만을 포함하였다. 직장의(rectal) 온도는 수술 과정부터 마우스가 의식을 회복할 때까지 37.0±0.5℃를 유지하였다. 대조군의 동물은 sham 및 내장지방 제거 수술 이후에 MCAO를 수행하지 않았다. 그리고 나서, 뇌경색 부피 측정은 MCAO 3일 후, 마우스의 뇌를 제거한 뒤, 동결하고, 저온유지장치(cryostat)에서 절개하였다(30 ㎛ 두께). 순차적으로 수집된 뇌 섹션(600-㎛ 간격)은 크레실 바이올렛(cresyl violet)으로 염색하였다. 경색(infarct) 부피는 이미지 분석기(Axiovision LE 4.1, Carl Zeiss, Jena , 독일)를 사용하여 측정하였다. 값은 이전에 기술한 대로(Shin 등., 2013) 허혈성 팽윤 후(post-ischemic swelling)에 대한 보정을 한 후에 기록하였다.

[0106] 그 결과, 도 5a 및 5b에 나타난 바와 같이, MCAO 3일 후에, 10마리의 sham 마우스 및 9마리의 내장지방 제거 마우스가 생존하였고, 상기 총 경색 부피는 sham과 비교하여 내장지방 제거에 의해 현저하게 감소하였으며(32.44 ±5.13 mm^3 대. 55.91±4.80 mm^3, 0.58-배의 변화, $p < 0.01$), 또한 상기 감소는 피질에서 분명하였으나(18.12 ±3.82 mm^3 대. 39.57±3.19 mm^3, 0.46-배의 변화, $p < 0.01$), 선조체(striatum)에서는 차이가 없었다($p=0.95$; 도 5a). 또한, sham 및 내장지방 제거 그룹간의 CBF의 차이는 없었다(도 5b).

[0108] **<4-2> 행동 실험**

[0109] 상기 마우스 동물 모델에 대한 행동 실험을 위해 와이어 서스펜션 시험(wire suspension test) 및 그립 강도 시

험(grip strength test)을 수행하였다.

[0110] 구체적으로, 상기 행동 실험은 MCAO에 유도 전 및 3일 후에 측정하였고, 신경학적 점수 및 와이어 서스펜션 시험에 대해 5-포인트 등급의 점수 시스템을 사용하였으며(Shin 등., 2015), 앞다리(forelimb) 강도는 Grip 강도 시험기 bio-GS3(BIOSEB, Virtolles cede, 프랑스)를 사용하여 측정하였다. 마우스의 양쪽 앞다리가 꼬리를 잡아 당기는 것에 의해 느슨해져 있을 때, 최대의 힘(g)을 기록하였다. 각 시험에서 각각의 마우스는 5번 시도하여 시험하였고, 평균값을 계산하였으며, MCAO 이전에 측정한 기초량으로부터 백분율을 분석하였다.

[0111] 그 결과, MCAO 전에, 신경학적 점수(모두 0) 및 와이어 서스펜션 시험(2.23±0.17 대. 2.18±0.18, p=0.91)에서 그룹간의 수행의 차이는 없었다. 각 마우스에서 MCAO에 앞서 측정된 기초량으로부터의 백분율 변화는 그립 강도에 대해 분석되었다. MCAO 3일 후에, 내장지방 제거된 마우스는 그립 강도 시험에서 약간 더 나은 수행도를 나타내었으나, 모든 시험에서 그룹간의 통계적인 유의성은 없었다(신경학적 시험에 대해 2.10±0.41 대. 2.11±0.46, $p > 0.99$; 와이어 서스펜션 시험에 대해 1.70±0.31 대. 2.15±0.37; 그립 강도 시험에 대해 88.29±2.87% 대. 94.04±2.60%, p=0.16).

[0113] **<4-3> IgG 혈관외누출, 치밀이음부 단백질 및 전염증성 사이토카인 단백질 수치의 확인**

[0114] 다음으로, 경색 부피의 감소가 초기의 재관류(reperfusion) 기간 동안 BBB의 붕괴 및 염증성 반응과 연관이 있는지 확인하기 위하여, MCAO 6시간 후에 IgG 혈관외누출 및 치밀이음부 단백질 및 전염증성 사이토카인의 단백질 수치를 상기 실험예 <2-1> 및 <3-2>에 기재된 방법으로 확인하였다.

[0115] 그 결과, 도 5c 내지 5e에 나타난 바와 같이, 허혈성 손상에 의한 IgG 혈관외누출의 증가는 내장지방 제거의 마우스의 뇌에서 현저하게 감소되었고(0.72-배의 변화, $p < 0.01$ 대. sham; 도 5c), claudin-5 및 occludin 단백질 수치 또한 감소하였다(각각 1.23- 및 1.25-배의 변화, 모두 $p < 0.01$ 대. sham; 도 5d). 또한, 허혈성 손상에 의한 IL-β 및 TNF-α의 단백질 수치의 증가는 내장지방 제거 그룹에서 현저하게 감소하였다(각각 0.85- 및 0.79-배의 변화, 모두 $p < 0.01$ 대. sham; 도 5e).

[0116] 상기 결과는 내장 지방 축적으로 인한 염증이 BBB 붕괴 및 뇌 염증 반응에 기여하여 허혈성 뇌 손상을 증가시킴을 의미한다.

[0118] **<실험예 5> 노령 마우스에서 허혈성 뇌중풍에 의한 내장지방 조직에서의 전염증성 사이토카인 수치의 변화 확인**

[0119] 지방 전염증성 사이토카인 수치는 허혈성 뇌 손상에 따라 증가함이 밝혀졌다(Wang 등., 2011). 내장지방 조직 염증이 허혈성 뇌 손상에 의해 영향을 받는지를 결정하기 위하여, 뇌 손상 3일 후의 MCAO를 하지 않은 대조군 마우스 및 MCAO를 수행한 마우스의 전염증성 사이토카인 수치를 비교하였다.

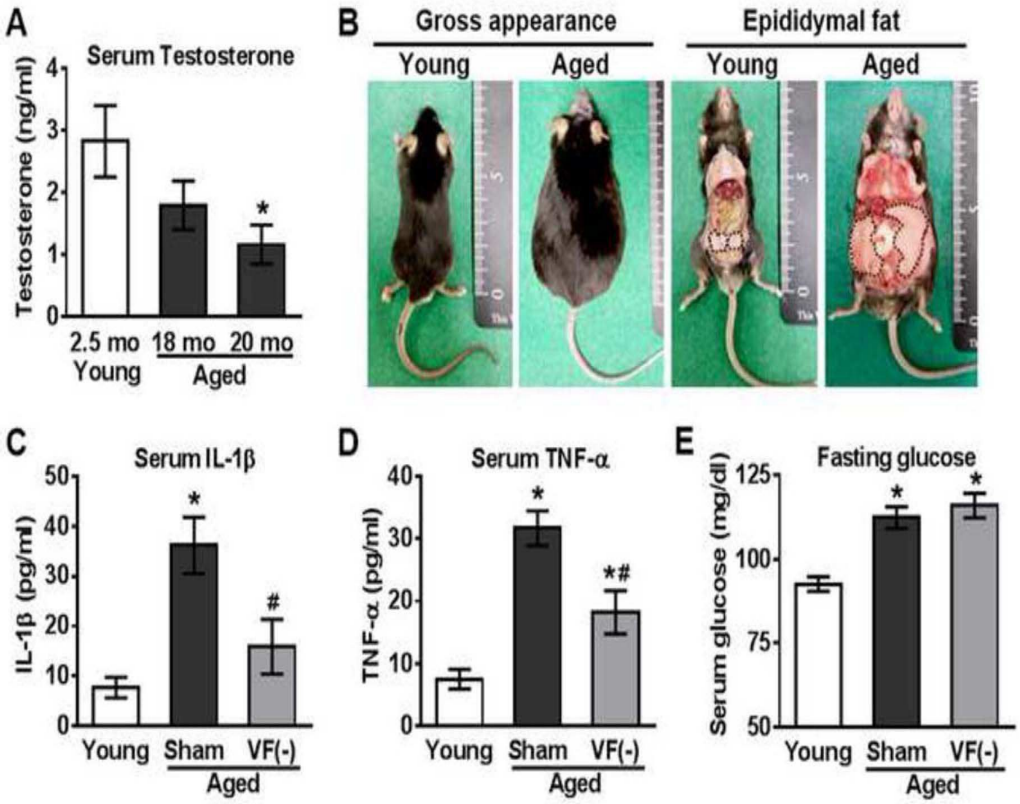
[0120] 먼저, 마우스 동물 모델에서 허혈성 뇌중풍을 유도하기 위하여, 하기의 방법을 사용하였다. C58Bl/6 2.5개월령의 수컷 마우스를 1.2%의 이소플루랜(isoflurane) 흡입 마취 하에 오른쪽 두정부(parietal area)의 피부를 절개하고 정수리점(bregma)에서 뒤로 2 ㎜, 오른쪽으로 5 ㎜ 부위 두정골(parietal bone)에 컴퓨터와 연결된 레이저 도플러 뇌혈류 측정기(laser-Doppler flowmeter)의 광섬유 측정소자(fiber optic probe)를 부착시켜 뇌혈류를 측정하였다. 마우스의 앞쪽 경부(anterior neck)의 피부를 절개한 후, 오른쪽 외경동맥(external carotid artery)한 부위에 실리콘으로 끝부분이 코팅된 6-0 나일론 봉합사를 삽입하여 컴퓨터상 정상 뇌혈류의 85% 이상 감소되는 지점인 중뇌동맥(middle cerebral artery)의 시작 부위(origin)까지 진행시킨 후 30분간 유지하고 이후 나일론 봉합사를 천천히 꺼내면서 재관류 시켰다. 재관류가 80% 이상임을 확인하고, 피부를 봉합한 후 마우스를 마취에서 회복시켰다. 그리고 나서, 상기 마우스를 이용하여 상기 실시예 <2-1>에 기재된 방법으로 전염증성 사이토카인의 양을 측정하였다.

[0121] 그 결과, 도 6a 및 6b에 나타난 바와 같이, sham 마우스에서 IL-1β, IL-6, 및 TNF-α의 mRNA 수치는 MCAO 이후에 내장지방에서 현저하게 증가하였으나(각각 3.36-, 2.23-, 및 4.72-배의 변화, 모두 $p < 0.01$ 대. 대조군), 내장지방 제거 그룹은 이들 수치가 증가하지 않았다(도 6a 및 6b). 또한, 도 6c에 나타난 바와 같이, MCAO 3일 이후에 sham 및 내장지방 제거 그룹 간의 IL-1β 및 TNF-α의 단백질 수치를 비교하였을 때, 상기 단백질의 수치가 내장지방 제거 그룹에서 현저하게 감소됨을 확인하였다(각각 0.77- 및 0.76-배의 변화, 모두 $p < 0.01$; 도 6c).

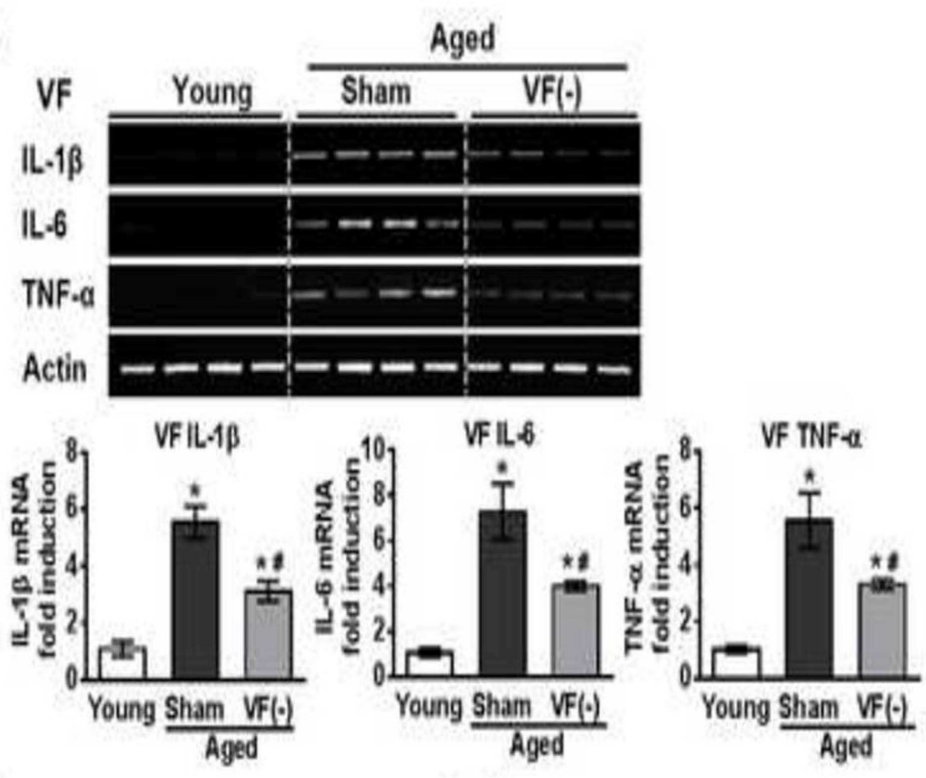
[0122] 상기 결과는 내장 지방 조직의 염증 반응이 허혈성 뇌손상으로 증가하고, 또한 뇌허혈 손상 후 증가된 내장지방 염증 반응이 허혈성 뇌 손상에 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다.

도면

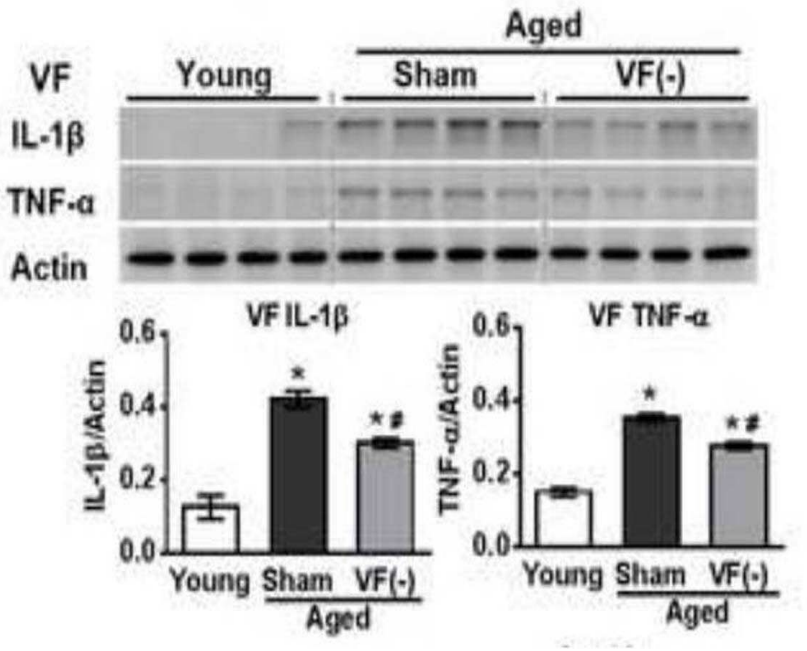
도면1



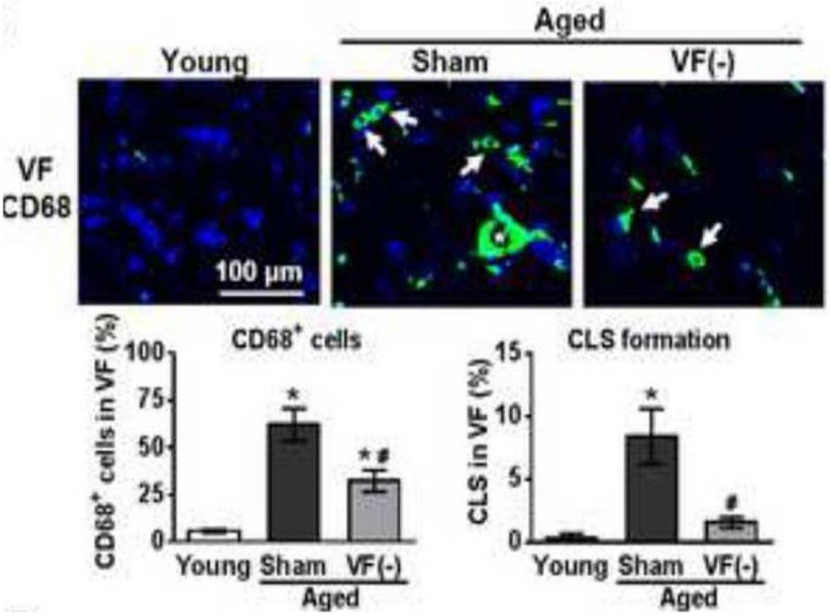
도면2a


Aged
VF
Young
Sham
VF(-)
IL-1β
IL-6
TNF-α
Actin
VF IL-1β
IL-1β mRNA fold induction
VF IL-6
IL-6 mRNA fold induction
VF TNF-α
TNF-α mRNA fold induction
Young Sham VF(-)
Aged

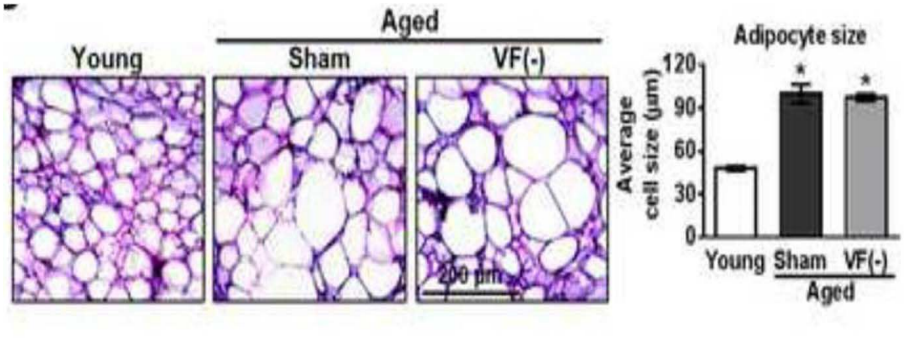
도면2b


Aged
VF
Young
Sham
VF(-)
IL-1β
TNF-α
Actin
VF IL-1β
IL-1β/Actin
VF TNF-α
TNF-α/Actin
Young Sham VF(-)
Aged

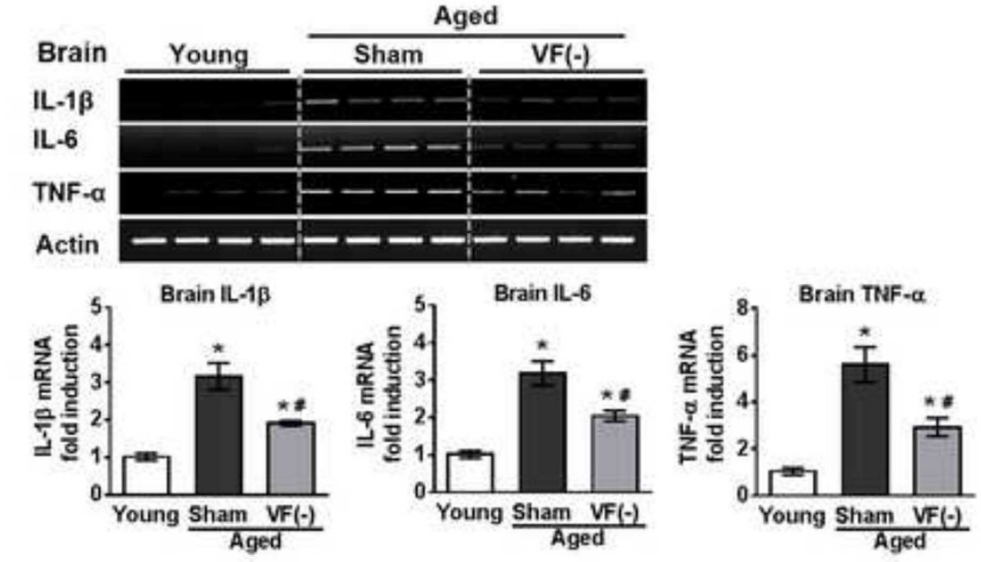
도면2c



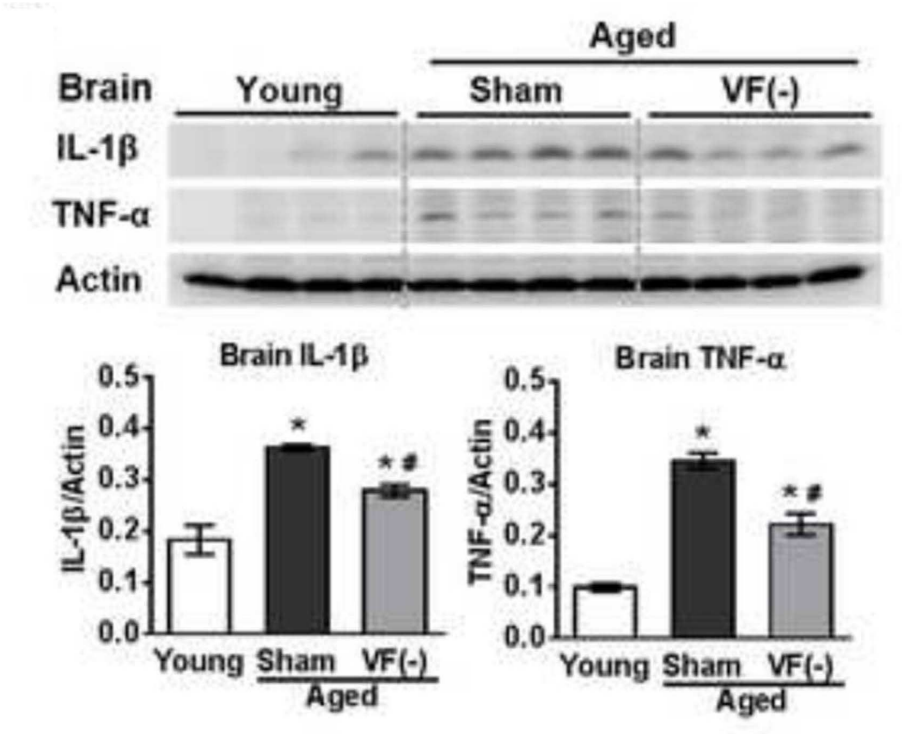
도면2d



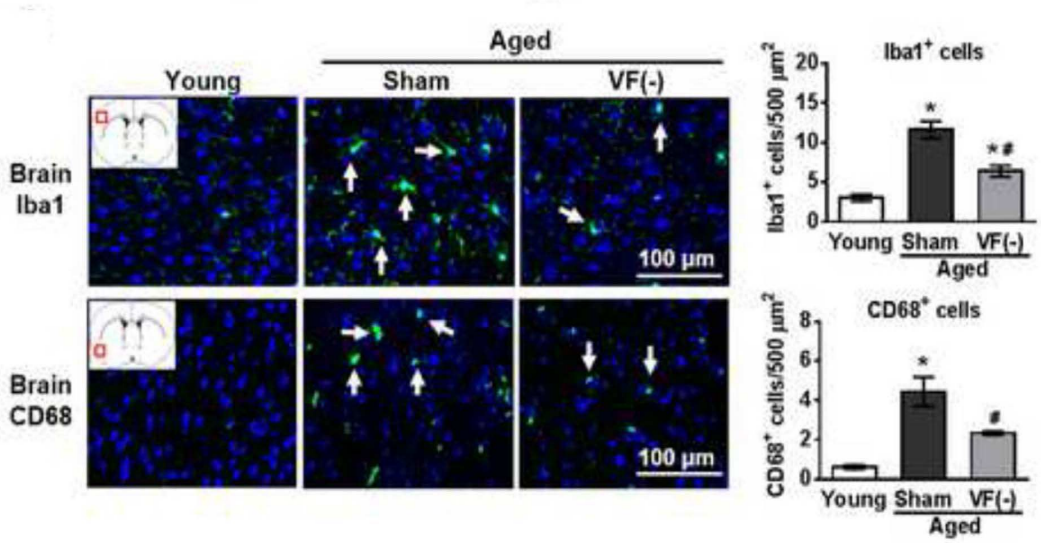
도면3a



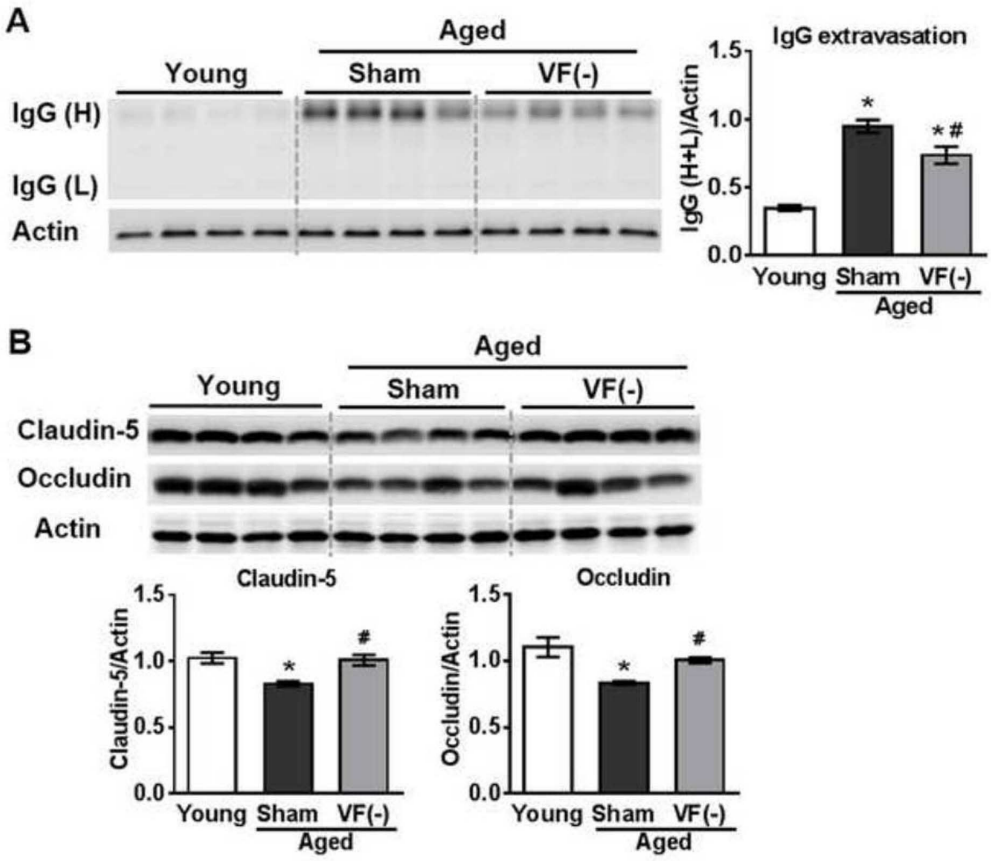
도면3b


Aged
Brain
Young
Sham
VF(-)
IL-1β
TNF-α
Actin
Brain IL-1β
IL-1β/Actin
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
Young
Sham
VF(-)
Aged
Brain TNF-α
TNF-α/Actin

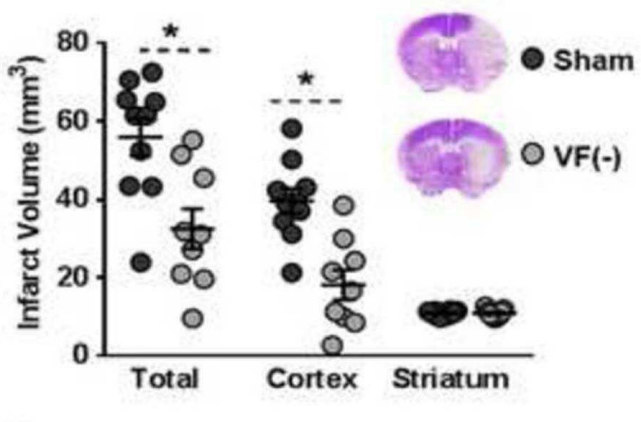
도면3c


Aged
Young
Sham
VF(-)
Brain
Iba1
Brain
CD68
100 μm
Iba1+ cells
Iba1+ cells/500 μm2
CD68+ cells
CD68+ cells/500 μm2
Young
Sham
VF(-)
Aged

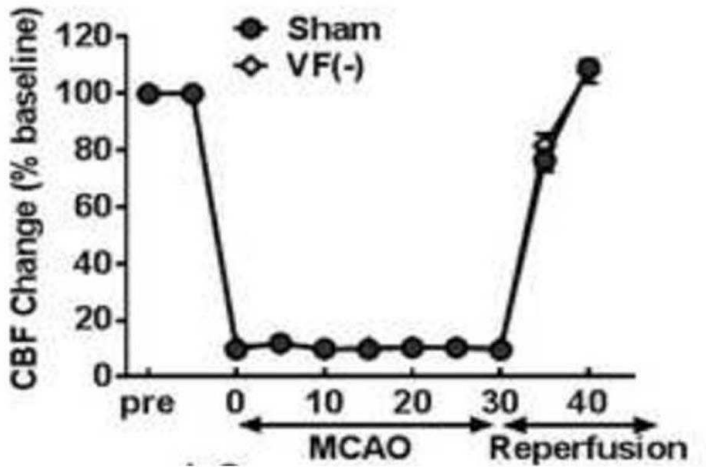
도면4


A
Aged
Young
Sham
VF(-)
IgG (H)
IgG (L)
Actin
IgG extravasation
IgG (H+L)/Actin
1.5
1.0
0.5
0.0
*
*#
Young
Sham
VF(-)
Aged
B
Aged
Young
Sham
VF(-)
Claudin-5
Occludin
Actin
Claudin-5
Claudin-5/Actin
Occludin
Occludin/Actin
1.5
1.0
0.5
0.0
*
#
Young
Sham
VF(-)
Aged

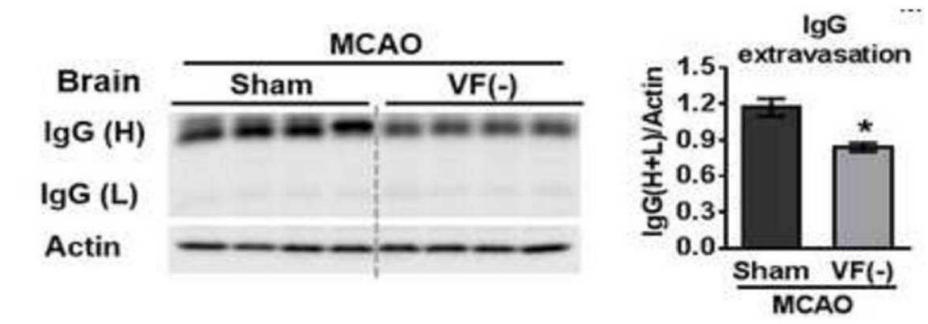
도면5a


Infarct Volume (mm3)
80
60
40
20
0
*
*
Total
Cortex
Striatum
Sham
VF(-)

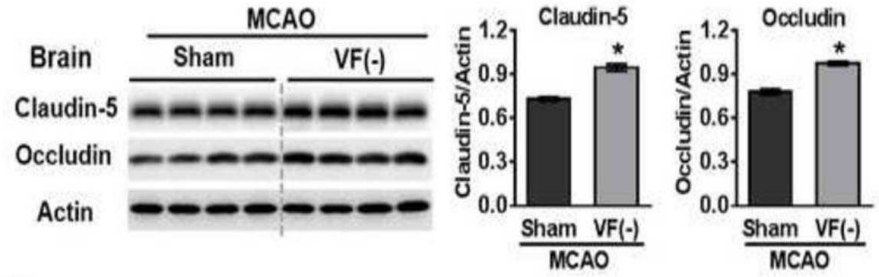
도면5b



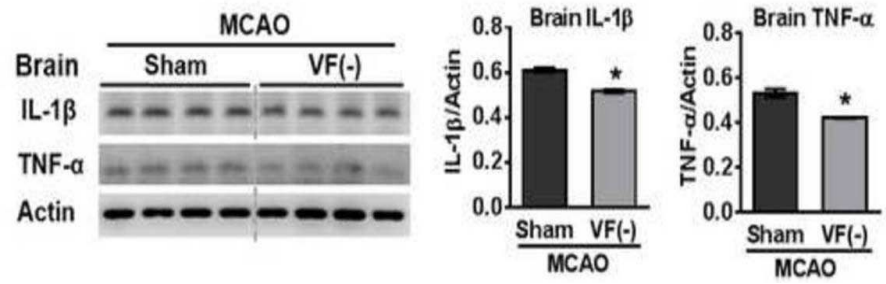
도면5c



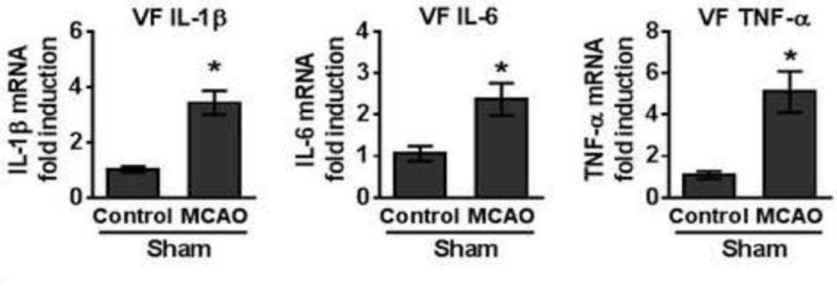
도면5d



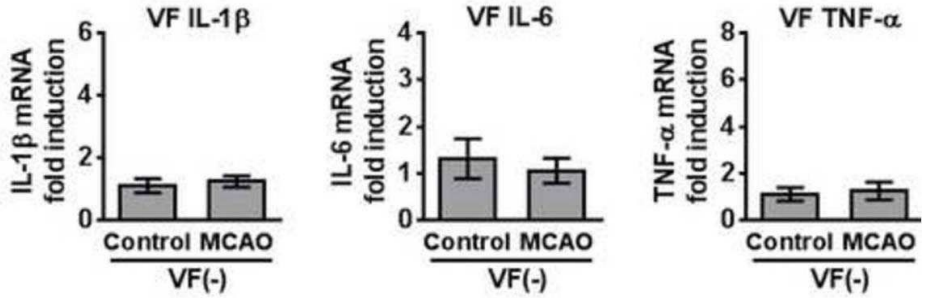
도면5e



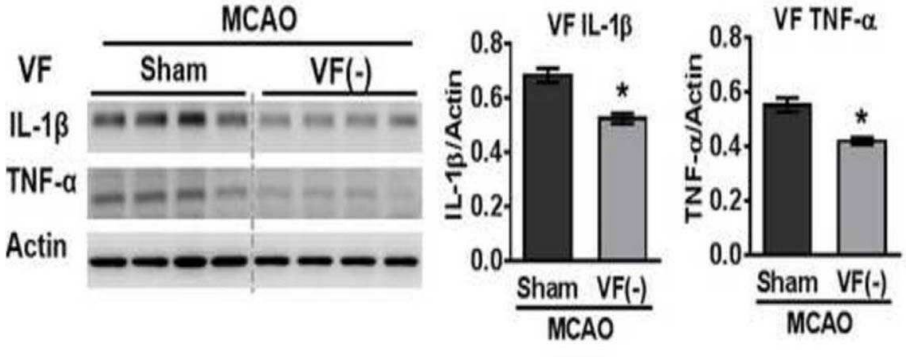
도면6a



도면6b



도면6c



서 열 목 록

<110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation

<120> Screening method for ischemic brain disease treatment using visceral adipose tissue inflammation inspection

<130> 15P-05-045

<160> 8

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer F1

<400> 1

aggctgtgct gtccctgtat 20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer R1

<400> 2

aaggaaggct ggaaaagagc 20

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer F2

<400> 3

aatgatctgt tctttgaggc tgac 24

<210> 4

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer R2

<400> 4

cgagatgctg ctgtgagatt tgaag 25

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer F3

<400> 5

cggagaggag acttcacaga gga 23

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer R3

<400> 6

ggagagcatt ggaaattggg g 21

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer F4

<400> 7

gaactggcag aagaggcact c 21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer R4

<400> 8

agggtctggg ccatagaact g 21