

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2009-0069514 (43) 공개일자 2009년07월01일
(51) Int. Cl. <i>A61K 31/375</i> (2006.01) <i>A61K 31/555</i> (2006.01) <i>A61P 21/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2007-0137204 (22) 출원일자 2007년12월26일 심사청구일자 2007년12월26일	(71) 출원인 경상대학교산학협력단 경상남도 진주시 가좌동 900 (72) 발명자 김명옥 경남 진주시 호탄동 대동아파트 102동 303호 정봉철 서울 성북구 하월곡동 39-1 (뒷면에 계속) (74) 대리인 김동완	

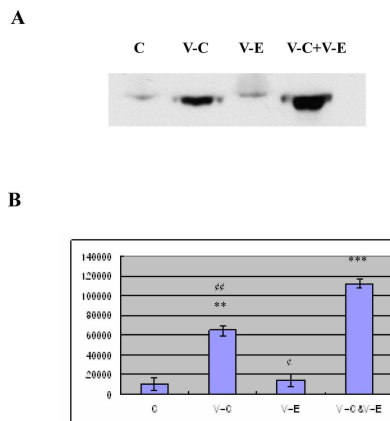
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 벤트랄 중뇌 내 티로신 하이드록실라제 및 Nurr1 발현증강제로서 비타민 C 및 비타민 E

(57) 요약

본 발명은 벤트랄 중뇌에서 도파민 신경세포의 생성을 위한 티로신 하이드록실라제 및 Nurr1 발현 증강제로서 비타민 C 및 비타민 E를 제공한다. 또한 상기 증강제로서 함량은 래트 태아 벤트랄 중뇌 세포 10^6 세포수에 대해 0.4~0.6 mM 비타민 C 및 0.8~1.2 μ M 비타민 E임을 특징으로 하고, 상기 래트 태아 벤트랄 중뇌 세포는 임신 13.5일째에 채취된 세포임을 특징으로 한다.

대표도



(72) 발명자

이혜령

경남 진주시 가좌동 경상대학교

박문석

경남 진주시 가좌동 경상대학교

정병화

서울 성북구 하월곡동 39-1

나집 올라

대한민국 경남 진주시 가좌동 900

특허청구의 범위

청구항 1

벤트랄 중뇌에서 도파민 신경세포의 생성을 위한 티로신 하이드록실라제 및 Nurr1 비타민 C 및 비타민 E 발현 증강제

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 증강제로서 함량은 래트 태아 벤트랄 중뇌 세포 10^6 세포수에 대해 0.4~0.6 mM 비타민 C 및 0.8~1.2 μ M 비타민 E임을 특징으로 하는 발현 증강제

청구항 3

제 1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 래트 태아 벤트랄 중뇌 세포는 임신 13.5일째에 채취된 세포임을 특징으로 하는 발현 증강제

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

<1> 본 발명은 벤트랄 중뇌 내 티로신 하이드록실라제 및 Nurr1 발현 증강제로서 비타민 C 및 비타민 E에 관한 것이다. 더욱 상세하게는 래트 태아 벤트랄 중뇌 내에서 도파민 신경세포의 생성을 위한 티로신 하이드록실라제 및 Nurr1 발현 증강제로서 비타민 C 및 비타민 E에 관한 것이다.

배경 기술

<2> 비타민 C(아스코르브산) 수용성 산화방지제로서 잘 알려져 있다. 더욱이 카테콜라민 합성을 포함한 여러 가지 생화학적 반응에서 보조인자로서 작용한다. 또한 비타민 E(α -토코페롤)는 강력한 산화방지제이고 뇌에서 효과적인 자유 라디칼 제거제로서 항산화 작용을 지닌다. 또한 세포막의 다중불포화 지질에서 산화적 손상을 방지한다. 중뇌 도파민(DA) 신경세포는 성장되는 벤트랄 중뇌(VM)의 뇌실영역에서 전구세포로부터 발생하기 때문에 배양 및 도파민 신경생물학의 이식 연구에서 사용하기 위한 공여자 세포 공급원의 후보물질로서 관심 받고 있다.

<3> 그러나 VM 세포를 효과적으로 획득하기 위해서는 시간적 제한이 존재한다; 이는 래트에서 임신 13.5~14.5일째에 채취할 수 있다. 티로신 하이드록실라제는 카테콜라민의 합성에서 속도제한효소이고 도파민 세포의 마커로서 사용된다. 전사인자의 세포핵 수용체 수퍼패밀리의 구성요소인 Nurr1 유전자는 중추신경계에서 상향 발현되고 중뇌 도파민 세포 발달 및 생존에 중요하다.

<4> 또한 배측부 중뇌 지역에서 Nurr1 발현의 징후는 도파민 신경세포의 발생(임신 11.5일째) 하루 전인 임신 10.5일째 초기 단계에서 나타난다. Backman 등은 대부분의(91%~96%) 성숙한 도파민 신경세포 A₈-A₁₀에서 Nurr1 mRNA이 발현됨을 밝혀냈다. 벤트랄 도파민 신경세포 분화 및 성체 세포에서 지속적인 발현에 의한 Nurr1의 효과는 이 유전자가 성체 세포의 벤트랄 중뇌의 도파민 신경세포의 유지뿐만 아니라 분화에 필수적인 역할을 한다는 것을 의미한다.

<5> 티로신 하이드록실라제 단백질 수치 및 티로신 하이드록실라제 유전자 발현은 비타민 C 처리에 의해 상향 조절됨을 측정하였고 RT-PCR 분석으로 티로신 하이드록실라제 mRNA 발현이 비타민 C를 처리한 세포에서 증가된다는 것을 확인하였다. 또한 Nurr1 역시 비타민 C 및/또는 비타민 E를 투여시 상향 발현됨을 확인하였다.

<6> 이에 본 발명자들은 래트 태아 임신 13.5일째 벤트랄 중뇌에서 티로신 하이드록실라제 및 Nurr1 발현시 비타민 C 및 비타민 E가 발현 증강제로서 효과적임을 측정함으로써 본 발명을 완성하게 된 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <7> 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 래트 태아 벤트랄 중뇌에서 티로신 하이드록실라제 및 Nurr1 발현에 효과적인 증가제로서 비타민 C 및 비타민 E를 개발코자 한 것이다.

과제 해결수단

- <8> 본 발명의 목적은 벤트랄 중뇌에서 도파민 신경세포의 생성을 위한 티로신 하이드록실라제 및 Nurr1 발현 증강제로서 비타민 C 및 비타민 E를 제공하는 것이다.
- <9> 상기 증강제로서 함량은 래트 태아 벤트랄 중뇌 세포 10^6 세포수에 대해 0.4~0.6 mM 비타민 C 및 0.8~1.2 μ M 비타민 E임을 특징으로 한다.
- <10> 또한 상기 래트 태아 벤트랄 중뇌 세포는 임신 13.5일째에 채취된 세포임을 특징으로 한다.

효과

- <11> 본 발명의 효과는 래트 태아 벤트랄 중뇌에서 티로신 하이드록실라제 및 Nurr1 발현에 효과적인 증가제로서 비타민 C 및 비타민 E를 제공하는 것이다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <12> 본 발명자들은 임신 13.5일째 래트의 벤트랄 중뇌 세포에서 티로신 하이드록실라제 및 Nurr1 발현시 비타민 C 및 비타민 E의 동시투여의 효과를 실험했다. 실험과 내에서 일차 배양을 티로신 하이드록실라제 및 Nurr1 그룹으로 분류하였다.
- <13> 각 그룹은 하기 4개의 그룹으로 다시 나누었다: 대조군, 비타민 C 투여 그룹, 비타민 E 투여 그룹, 비타민 C 및 비타민 E 투여 그룹. 배양물은 3일 동안 비타민을 투여하였다. 배양된 세포를 웨스턴 블롯 분석 및 면역세포화학을 사용하여 티로신 하이드록실라제 및 Nurr1 함량을 측정하였다.
- <14> 본 발명은 비타민 C 및 비타민 E 투여 그룹에서 티로신 하이드록실라제 및 Nurr1 발현이 가장 증가되는 것을 측정하였다. 티로신 하이드록실라제 발현은 대조군보다 비타민 C 투여 그룹에서 더 증가되었으나: 비타민 E 투여 그룹에서의 발현은 유의적인 변화는 없었다.
- <15> 그러나 비타민 C 그룹 및 비타민 E 그룹 모두 대조군과 비교하였을 때 Nurr1 단백질의 발현 수치는 명백히 증가하였다. 본 실험 결과는 비타민 C 투여 그룹이 티로신 하이드록실라제 단백질 발현을 조절할 수 있음을 확인하였다. 그러나 Nurr1 수치는 비타민 C 또는 비타민 E 단독으로 투여한 경우에도 모두 증가하였다. 더욱이 비타민 E는 임신 13.5일째 벤트랄 중뇌 세포에서 티로신 하이드록실라제 및 Nurr1 발현을 증가시키기 위해 비타민 C와 함께 병용 투여하는 것이 바람직하다.
- <16> 이하 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- <17> 웨스턴 블롯 분석은 비타민 C 및 비타민 E 처리가 티로신 하이드록실라제 및 Nurr1 단백질 발현에 효과적인지 여부를 확인하기 위해 실시되었다. 티로신 하이드록실라제에 대한 표본 밴드는 도 1에 나타내었다. 비타민 C 및 비타민 E 투여 그룹에서, 티로신 하이드록실라제 단백질은 60 kDa에서 최대 신호를 나타내었다. 두 번째로 높은 티로신 하이드록실라제의 발현은 비타민 C 투여 그룹에서 나타났다. 비타민 E 투여 그룹에서 티로신 하이드록실라제 단백질의 수치는 대조군의 수치와 현격한 차이는 없었다. 그러나 비타민 C 투여 그룹 대비 비타민 C 및 비타민 E 투여 그룹 및 비타민 E 투여 그룹 대비 비타민 C 투여 그룹도 통계적으로 유의적이지 않았다.
- <18> Nurr1 웨스턴 블롯 분석에서 비타민 C 투여 그룹, 비타민 E 투여 그룹 및 비타민 C 및 비타민 E 투여 그룹 모두 대조군과 비교시 Nurr1 단백질 수치가 명백히 증가되었다(도 2). 더욱이 비타민 C 및 비타민 E 투여 그룹은 Nurr1 단백질의 최대 발현을 나타내었다. 그러나 비타민 C 투여 그룹은 비타민 E 투여 그룹과는 통계적인 차이는 없었다.
- <19> 티로신 하이드록실라제 및 Nurr1에 대한 면역-양성 세포는 갈색으로 염색되었다. Nurr1(도 4)에 대해 염색된 세포 밀도는 티로신 하이드록실라제(도 3)보다 적었다. 티로신 하이드록실라제 및 Nurr1 모두에 염색된 밀도는 각각 상이하였다.

- <20> 종래의 연구의 결과와 유사하게 티로신 하이드록실라제 단백질의 발현은 비타민 C 투여 그룹에서 증가되었다. 자료에서 티로신 하이드록실라제 유전자의 비타민 E 조절과 관련된 연구는 나타나 있지 않지만, 본 발명자들의 자료에 따르면 비타민 E와 비타민 C 사이의 공동작용은 티로신 하이드록실라제 발현을 증가시키는 나타낸다. 더욱이 Nurr1 단백질 수치는 비타민 C 및 비타민 E의 처리에 따른 증가뿐만 아니라 비타민 C 및 비타민 E의 공동 투여에 따른 Nurr1 단백질의 최대 발현도 나타낸다. 종래의 연구는 마우스는 Nurr1이 결실될 경우 티로신 하이드록실라제 발현을 개시할 수 없음을 입증하였다. 티로신 하이드록실라제 발현은 Nurr1에 의해서 직접적으로 조절된다. 따라서 티로신 하이드록실라제 발현은 비타민 C 및 비타민 E 투여에 따른 Nurr1 상향-조절에 의해 증가될 수 있다. 그러나 비타민 C와 비타민 E의 공동 효과의 확실한 메커니즘은 불확실하다. 더욱이 연구는 명확한 메커니즘을 필요로 한다. 임상 수기, 특별히 신경 수술에서는 비타민 E 및 비타민 C 모두 항산화제로 작용하고 따라서 신경보호 효과를 지닌다. 따라서 비타민 C는 파킨슨병(PD) 환자의 흑색질 세포에서 산화 스트레스를 최소화하기 위해 비타민 E와 협력하여 사용된다. 그러나 티로신 하이드록실라제 발현시 비타민 C 및 비타민 E의 공동 효과는 아직 널리 임상학적으로는 연구되지 않았다. 파킨슨병의 기본적인 치료는 레보도파(levodopa)를 사용하여 도파민 교체와 관련되나 이것의 부작용은 중요한 문제점을 내포하고 있다. 그러므로 비타민 C 및 비타민 E의 사용은 초기 파킨슨병 치료에 대한 두 가지 이점을 제공한다. 본 발명자들은 비타민 C가 임신 13.5일째 VM 세포에서 티로신 하이드록실라제 및 Nurr1 단백질의 발현을 상향 조절할 수 있다고 결론지었다. 더욱이 비타민 E는 티로신 하이드록실라제 및 Nurr1 발현을 증가시키기 위해서 비타민 C와 공동으로 작용한다.
- <21> 이하 실시예를 통해 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예들로 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- <22> 동물 및 조직의 준비
- <23> 임신기간은 질점액전(vaginal plug)을 위한 조사에 의해 날짜를 정했고 플러그의 날짜는 임신 13.5일째 임신한 래트로부터 관찰된 임신 0.5일째 VM 조직으로 한정하였고, 그 후 30분간 37℃에서 0.1% 트립신/0.04% DNase/HBSS (Hanks Balanced Salt Solution)에서 침지시켰다. 상기 조직은 HBSS에서 0.04% DNase로 세척하였고, 그 후 해리된 세포 현탁액을 형성하기 위해 파스퇴르 피펫으로 분쇄시켰다. 상기 세포는 6.5×10^5 cell/dish의 밀도에서 폴리-L-리신(PBS에서 50 µg/ml)-코팅된 60 mm 디쉬 상에서 평판 배양되었고 5% CO₂, 95% 공기와 37℃에서 26mM NaHCO₃, 20mM HEPES, 20% 우혈청 및 1% 항생물질의 항진균제를 포함한 DMEM에서 배양되었다. 배양은 48시간 동안 동일한 배지에서 실시되었다. 이후 세포들을 3일간 각각 대조군, 0.5mM 비타민 C, 1µM 비타민 E(시그마) 및 0.5mM 비타민 C + 1µM 비타민 E 배지로 덮었다. 그 후 상기 세포들을 티로신 하이드록실라제 및 Nurr1 웨스턴 블롯 분석으로 시험하였다.
- <24> (실시예 1) 임신 13.5일 제의 VM으로부터 초기 세포 배양과 웨스턴 블롯팅
- <25> 배양된 VM 세포는 고무 폴리스판으로 분리시키고 3,000 rpm으로 미세원심분리기에서 회전시킴으로써 PBS로 2회 세척한다. 이후 1% Nonidet P-40(NP-40), 0.1% 디옥시콜산나트륨, 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl (pH7.5), 1mM 페닐메틸 술폰닐 플로라이드(PMSF) 및 0.2U/ml 아프로티닌을 포함한 100 µl 세포용해 완충액으로 균질화한다. 용해물을 4℃에서 10분 동안 20,000 g로 원심분리함으로써 분리하고 액화질소에서 동결시키고 사용할 때까지 -80℃에서 저장한다. 상청액에서 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 에세이를 사용하여 측정한다(Bio-Rad Laboratories, Richmond, VA). 전체 단백질(30 µg)과 동일한 양을 제공하기 위해서 소량의 부피를 보정한 후 다른 배양 접시의 상청액을 SDS-샘플 완충용액에 즉시 첨가하고 가열하고 그 후 환원 조건에서 12.5% SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 시킨다. 전기영동 단백질을 이동 완충액 시스템 및 반건조 전기영동 트랜스퍼(39mM 글리신, 48mM 트리스, 20% MeOH 및 0.037% SDS 일렉트로트랜스퍼) 세포(15V, 90분)를 사용하여 PVDF 세포막으로 이동시킨다. 세포막은 비특이적인 결합을 감소시키기 위해 0.1% 트윈 20, 5% 탈지분유를 포함한 트리스 완충 식염수(TBS)에서 블록되었다. 이들은 4℃에서 24시간 동안 1차 항체(토끼 항-래트 티로신 하이드록실라제, 1:500 희석, Pel-Freez Biologicals; 토끼 항-래트 Nurr1, 1:500 희석, Santa Cruz Biotechnology)에서 배양되었고 뒤이어 실온에서 2시간 동안 두 번째 항체(홍당무 과산화효소-컨쥬게이트된 염소 항-토끼 IgG, Bio-Rad 1:1000)를 배양하였다. 항원 단백질을 제작자의 지침에 따라 ECL-검출 시약(Amersham pharmacia biotech, 웨스턴 블롯팅 검출 시약)을 사용하여 화학발광시켜 검출하였다. 웨스턴 블롯을 컴퓨터-기반 시그마 겔(SPSS Inc. 시카고, 미국) 시스템을 이용하여 농도계로 분석하였다. 밀도 수치는 3번 실험 수치의 평균±표준편차로 표현하였다. 통계적인 분석은 Student's t-테스트를 사용하여 실시되었다.

<26> (실시예 2) 면역세포화학

<27> 면역세포화학은 시험관 내에서 폴리-D-리신으로 코팅된 둥근 챔버 글라스 커버슬립 상에서 성장하는 임신 13.5 일 제 프라이머리 신경세포 배양 VM을 수행하였다. 배양을 4% NBP로 5분 동안 고정하였고 5분 동안 PBS에서 0.3% 트리톤 X-100에 투과시킨 후 PBS로 2회 세척하였다. 상기 세포는 37℃에서 1시간 동안 PBS에서 10% BSA로 예비 배양되었다. 슬라이드는 15분간 0.02M 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척되었다. 정상 염소 혈청을 비특이적 결합의 환원을 위해 실온에서 90분간 처리한 후(1:20) 밤새 4℃에서 1차 항체(PBS에 희석된)에 노출시켰다. 사용된 1차 항체는 토끼 항-래트 티로신 하이드록실라제(1:500, Pel-Freez Biologicals) 및 토끼 항 래트 Nurr1(1:500, Santa Cruz Biotechnology)이었다. 0.5 % 과요오드산으로 처리한 후 실온에서 90분간 2차 항체(1:200, 비오틴화된 염소 항-토끼 IgG)를 배양시켰다. 슬라이드를 PBS로 세척한 후 표본을 실온에서 90분간 아비딘-비오틴화 퍼옥시다아제 복합체로 표지하였다. 이후 5분간 PBS에서 3, 3'-디아미노벤지딘-H₂O₂로 염색시키고 세척하였다. 슬라이드를 명시야에서 현미경으로 관찰한 후 사진 촬영했다.

도면의 간단한 설명

<28> 도 1은 대조군 및 태아의 벤트랄 중뇌 세포에 비타민 C- 및 비타민 E-처리시 티로신 하이드록실라제의 표본 웨스턴 블롯 분석을 나타낸 것이다. A: 벤트랄 중뇌 세포에서 티로신 하이드록실라제 발현의 면역블롯. 면역블롯은 토끼 항-티로신 하이드록실라제 항체로 표지된다. 티로신 하이드록실라제 단백질은 60 kDa에서 밴드에 따라 블롯에서 확인된다. C: 대조군; V-C, 0.5mM 아스코르브산; V-E, 1μM α-토코페롤; V-C & V-E, 0.5mM 아스코르브산 + 1μM α-토코페롤. B: A에서 밴드의 농도계측 평가.

<29> 도 2는 대조군 및 태아의 벤트랄 중뇌 세포에 비타민 C- 및 비타민 E-처리시 Nurr1의 표본 웨스턴 블롯 분석을 나타낸 것이다. A : 벤트랄 중뇌 세포에서 Nurr1 발현의 면역블롯. 면역블롯은 토끼 항-Nurr1 다클론 항체로 표지된다. Nurr1 단백질은 91 kDa에서 밴드에 따라 블롯에서 확인된다. C, 대조군; V-C, 0.5mM 아스코르브산; V-E, 1μM α-토코페롤; V-C & V-E, 0.5mM 아스코르브산 + 1μM α-토코페롤. B: A에서 밴드의 농도계측 평가.

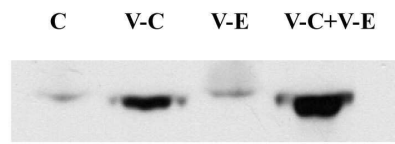
<30> 도 3은 임신 13.5일 제 VM으로부터 배양된 1차 세포 상에서 티로신 하이드록실라제에 대한 면역조직화학적 염색을 나타낸 것이다. 모든 양성 염색은 갈색을 나타낸다. 태아의 벤트랄 중뇌 세포에 비타민 C 및 비타민 E로 처리시 티로신 하이드록실라제에 대한 양성 세포 밀도는 정상(B)보다 높게 나타난다. A, 음성 대조군; B, 정상; C, 비타민 C를 처리함; D, 비타민 C 및 비타민 E를 처리함, 축척 막대 = 50 μm

<31> 도 4는 임신 13.5일제 VM으로부터 배양된 1차 세포 상에서 Nurr1에 대한 면역조직화학적 염색을 나타낸 것이다. 모든 양성 염색은 갈색을 나타낸다. 태아의 벤트랄 중뇌 세포에 비타민 C 및 비타민 E를 처리시, Nurr1에 대한 양성 세포 밀도는 정상(B)보다 높게 나타난다. A, 정상; B, 비타민 C 및 비타민 E를 처리함, 축척 막대 = 30 μm

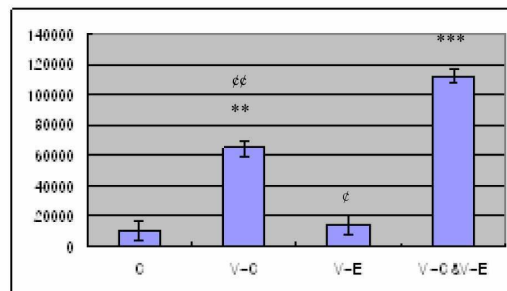
도면

도면1

A

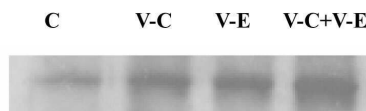


B

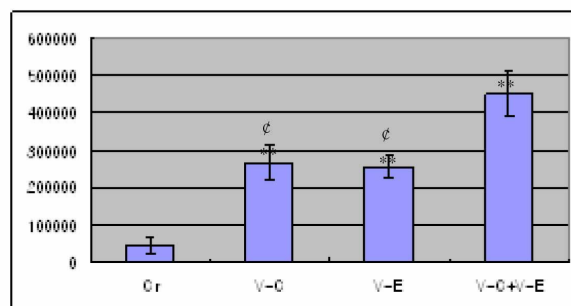


도면2

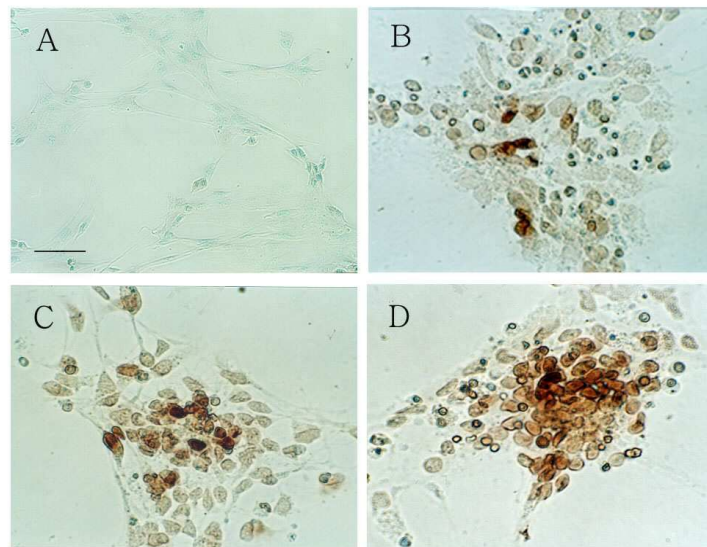
A



B



도면3



도면4

