



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0124025
(43) 공개일자 2022년09월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/198 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/198 (2013.01)
A61P 25/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2021-0027692

(22) 출원일자 2021년03월02일

심사청구일자 2021년03월02일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)

(72) 발명자

양선아

경상북도 칠곡군 왜관읍 아곡5길 79, 동호빌리지
A동

박세호

대구광역시 달서구 장산남로 33, 103동 1003호(용
산동, 용산롯데캐슬그랜드)

이재열

대구광역시 남구 자유5길 72(대명동)

(74) 대리인

특허법인태백

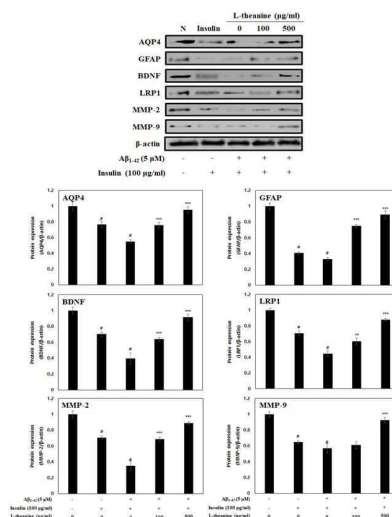
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 L-테아닌을 유효성분으로 함유하는 AQP4 발현 또는 활성 조절용 조성물

(57) 요약

본 발명은 L-테아닌(L-theanine)을 유효성분으로 함유하며, 뇌세포의 AQP4(Aquaporin 4) 발현 또는 활성 조절용 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 인슐린 및 β -아밀로이드가 처리된 세포에서 AQP4, GFAP, BDNF, LRP1, MMP-2 및 MMP-9의 단백질 발현이 감소가 확인되었으나, L-테아닌의 처리 농도가 증가함에 따라 정상세포(astrocytic) 특성을 나타내는 AQP4의 발현을 증가시켰으며, 노화(aging) 회복과 관련된 GFAP 및 BDNF의 발현이 증가시키고, β -아밀로이드 축적을 억제시키는 LRP1, MMP-2 및 MMP-9의 발현을 증가시키는 것으로 확인됨에 따라, 상기 L-테아닌을 유효성분으로 함유하는 조성물은 AQP4 발현 조절용 조성물로 제공될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61P 25/28 (2018.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345319955
과제번호	2018R1D1A1A02048746
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(교육부)(R&D)
연구과제명	퇴행성 뇌질환 예방 식용소재물질 평가를 위한 aquaporin 4 기반 in vitro 시스템
구축 및 적용 연구	
기 여 율	1/1
과제수행기관명	계명대학교 산학협력단
연구기간	2020.06.01 ~ 2021.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

L-테아닌 (L-theanine)을 유효성분으로 함유하며, 시험관 내(in vitro)에서 뇌세포의 AQP4 (Aquaporin 4) 발현 또는 활성 조절용 시약조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 L-테아닌은 계대배양에 의해 노화되고, 인슐린 및 β -아밀로이드로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상에 의해 손상된 뇌세포의 AQP4 발현 또는 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 시약조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 뇌세포는 정상세포 및 신경교종세포로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 시약조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 L-테아닌은 손상된 뇌세포에서 GFAP, BDNF, LRP1, MMP-2 및 MMP-9로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 발현 또는 활성을 추가로 더 증가시키는 것을 특징으로 하는 시약조성물.

청구항 5

개체로부터 분리된 뇌세포를 계대배양하여 노화를 유도하는 단계;

상기 노화가 유도된 뇌세포에 인슐린 및 β -아밀로이드로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 처리하여 뇌세포 손상을 유도하는 단계;

상기 손상된 뇌세포에 L-테아닌을 처리하는 단계를 포함하는 AQP4 발현 조절방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 L-테아닌은 손상된 뇌세포의 AQP4 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는 AQP4 발현 조절방법.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 L-테아닌은 손상된 뇌세포에서 GFAP, BDNF, LRP1, MMP-2 및 MMP-9로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 발현을 추가로 더 증가시키는 것을 특징으로 하는 AQP4 발현 조절방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 L-테아닌 (L-theanine)을 유효성분으로 함유하며, 뇌세포의 AQP4 (Aquaporin 4) 발현 또는 활성 조절용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 정상세포(astrocyte)는 뾰여 있는 많은 돌기 때문에 별처럼 보이는 신경 아교 세포로 뇌와 척수에 존재하여, 혈뇌장벽(혈액-뇌 장벽)의 안쪽 세포들을 생화학적으로 도와주는 역할을 하며 혈관벽에 돌기가 붙어 있어 신경세포에 영양분을 공급하는 역할을 한다. 그 밖에도 신경세포의 이온농도 조절, 신경세포의 지지, 노폐물의 제거, 식세포 작용 등의 다양한 역할을 수행한다. 또한 신경조직이 손상되면 신경교종이라는 돌기로 증식하여 그 부분을 채우기도 하며 손상된 조직을 복구하거나 파괴하는 역할을 한다. 또한, 정상세포는 베타 아밀로이드 축적을

제어하여 알츠하이머병(Alzheimer's disease)나 파킨슨병(Parkinson's disease)를 제어하는 역할을 수행하며, 정상세포에서 베타 아밀로이드의 축적 제어가 되지 않는다면 퇴행성 뇌질환이 발생할 수 있다.

[0003] 퇴행성 뇌질환으로 알츠하이머병, 파킨슨병 등이 대표적이며 특히 알츠하이머병의 병변으로 뇌에서의 베타 아밀로이드의 축적과 타우 단백질(Tau protein)의 인산화가 알려져 있다. 정상적인 뇌는 베타 아밀로이드의 축적을 방지하기 위해 베타 아밀로이드 분해효소(β -amyloid degradation enzyme)의 활성화를 통해 조절한다.

[0004] 아쿠아포린-4(aquaporin-4, AQP4)는 물 수송 막단백질로 알려져 있으며, 최근 연구에 의하면 정상 세포의 막단백질로써 베타 아밀로이드의 제거 또는 글루타메이트의 흡수에 기여하여 신경세포를 보호하는 것으로 확인되었다. 정상세포가 손상된 신경세포를 복구시키고 새로운 신경세포를 생성한다는 것이 밝혀져 in vivo 연구에서 치매, 뇌졸중 후유증 등의 뇌 손상에 대한 AQP4의 역할 연구가 활발히 이루어지고 있으나, 이는 정상세포 기반 AQP4의 역할로 알려져 있으며 in vitro 연구에서 신경교종세포(glioma cell)에서의 AQP4의 역할 및 발현 여부는 불분명하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2001-0041158호 (2001.05.15. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 시험관 내(in vitro)에서 뇌세포의 AQP4 (Aquaporin 4) 발현 또는 활성을 조절하기 위해 L-테아닌(L-theanine)을 유효성분으로 함유하는 AQP4 발현 조절용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 L-테아닌(L-theanine)을 유효성분으로 함유하며, 시험관 내(in vitro)에서 뇌세포의 AQP4 (Aquaporin 4) 발현 또는 활성 조절용 시약조성물을 제공한다.

[0008] 본 발명은 개체로부터 분리된 뇌세포를 계대배양하여 노화를 유도하는 단계;

[0009] 상기 노화가 유도된 뇌세포에 인슐린 및 β -아밀로이드로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 처리하여 뇌세포 손상을 유도하는 단계;

[0010] 상기 손상된 뇌세포에 L-테아닌을 처리하는 단계를 포함하는 AQP4 발현 조절방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따르면, 인슐린 및 β -아밀로이드가 처리된 세포에서 AQP4, GFAP, BDNF, LRP1, MMP-2 및 MMP-9의 단백질 발현이 감소가 확인되었으나, L-테아닌의 처리 농도가 증가함에 따라 정상세포(astrocytic) 특성을 나타내는 AQP4의 발현을 증가시켰으며, 노화(aging) 회복과 관련된 GFAP 및 BDNF의 발현이 증가시키고, β -아밀로이드 축적을 억제시키는 LRP1, MMP-2 및 MMP-9의 발현을 증가시키는 것으로 확인됨에 따라, 상기 L-테아닌을 유효성분으로 함유하는 조성물은 AQP4 발현 조절용 조성물로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 계대배양으로 노화가 유도된 C6 세포(cell passage 75)에서 L-테아닌(L-theanine) 처리에 따른 세포 생존율을 확인한 MTT 분석 결과이다.

도 2는 계대배양으로 노화가 유도되고 인슐린 및 β -아밀로이드에 의해 세포손상이 유도된 C6 세포에서 L-테아닌(L-theanine) 처리에 따른 세포 생존율을 확인한 MTT 분석 결과이다.

도 3은 계대배양으로 노화가 유도되고 인슐린 및 β -아밀로이드에 의해 세포손상이 유도된 C6 세포에서 L-테아닌(L-theanine) 처리에 따른 AQP4, GFAP, BDNF, LRP1, MMP-2 및 MMP-9의 발현 수준을 확인한 웨스턴 블롯 분석 결과이다.

도 4는 계대배양으로 노화가 유도되고 인슐린 및 β -아밀로이드에 의해 세포손상이 유도된 C6 세포에서 L-테아닌 (L-theanine) 처리에 따른 글루타메이트 흡수율을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0015] 본 발명은 L-테아닌 (L-theanine)을 유효성분으로 함유하며, 시험관 내(in vitro)에서 뇌세포의 AQP4 (Aquaporin 4) 발현 또는 활성 증가용 시약조성물을 제공할 수 있다.
- [0016] 상기 L-테아닌은 계대배양에 의해 노화되고, 인슐린 및 β -아밀로이드로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상에 의해 손상된 뇌세포의 AQP4 발현 또는 활성을 증가시키는 것일 수 있다.
- [0017] 상기 뇌세포는 정상세포 및 신경교종세포로 이루어진 군에서 선택되는 것일 수 있다.
- [0018] 상기 L-테아닌은 손상된 뇌세포에서 GFAP, BDNF, LRP1, MMP-2 및 MMP-9로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 발현 또는 활성을 추가로 더 증가시키는 것일 수 있다.
- [0019] 또한, 본 발명은 개체로부터 분리된 뇌세포를 계대배양하여 노화를 유도하는 단계; 상기 노화가 유도된 뇌세포에 인슐린 및 β -아밀로이드로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 처리하여 뇌세포 손상을 유도하는 단계; 및
- [0020] 상기 손상된 뇌세포에 L-테아닌을 처리하는 단계를 포함하는 AQP4 발현 조절방법을 제공할 수 있다.
- [0021] 상기 L-테아닌은 손상된 뇌세포의 AQP4 발현을 증가시키는 것일 수 있다.
- [0022] 상기 L-테아닌은 손상된 뇌세포에서 GFAP, BDNF, LRP1, MMP-2 및 MMP-9로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 발현을 추가로 더 증가시키는 것일 수 있다.
- [0024] 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.
- [0026] <참고예>
- [0027] 하기의 참고예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 참고예를 제공하기 위한 것이다.
- [0029] 1. 응집된 β -아밀로이드 준비
- [0030] β -아밀로이드 (β -amyloid; Abcam, ab120301)를 250 μ M로 제조하여 37℃의 조건에서 3일간 방치하여 응집 (aggregation)을 유도하여 사용하였다.
- [0032] 2. 세포 배양
- [0033] C6 세포 (ATCC, CCL-107)를 DMEM (with FBS, antibiotics)에 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하여 사용하였으며, 모든 실험에서 cell passage는 #75로 고정하였다.
- [0035] <실시예 1> 노화가 유도되고 인슐린 및 β -아밀로이드에 의해 손상된 C6 세포에서 L-테아닌 처리에 따른 세포 생존도 확인
- [0036] 먼저, 계대배양에 의해 노화가 유도된 C6 세포 (cell passage 75, 5×10^4 cells/well)를 96-웰 세포 배양 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후 L-테아닌을 10, 50, 100, 250 및 500 μ g/ml 농도로 처리하여 48시간 배양하

였다. 상기 배양된 C6 세포에 MTT 용액 (final concentration: 500 μ g/ml)를 각 well에 처리하여 4시간 반응시키고 상등액을 제거한 후 DMSO로 생성된 포르마잔을 용해시키고 ELISA reader 기기를 이용하여 550 nm 파장에 서의 흡광도를 측정하여 세포 생존도를 확인하였다.

[0037] 그 결과, 도 1과 같이 L-테아닌은 C6 세포의 세포사멸을 유도하지 않는 것이 확인되었다.

[0038] 다음으로 계대배양에 의해 노화가 유도된 C6 세포 (5×10^4 cells/well)를 96-웰 세포 배양 플레이트에 분주하고 24시간 배양한 후 인슐린 (100 μ g/ml)과 β -아밀로이드 (5 μ M)를 각각 또는 병용 처리하여 48시간 배양하였으며, L-테아닌을 10, 50, 100, 250 및 500 μ g/ml 농도로 β -아밀로이드와 함께 처리하였다. 이후 앞선 실험과 동일한 방법으로 MTT 분석을 수행하여 세포 생존도를 확인하였다.

[0039] 그 결과, 도 2와 같이 인슐린 단독 처리군과 비교하여 인슐린과 β -아밀로이드 병용 처리군의 세포사멸에 증가되었으며, 인슐린 단독 처리군 및 인슐린과 β -아밀로이드 병용 처리군 모두 L-테아닌의 농도의존적으로 세포 생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (100 μ g/ml의 L-theanine 처리군 간 비교; 74.29%, 67.11%).

[0041] <실시예 2> 노화가 유도되고 인슐린 및 β -아밀로이드에 의해 손상된 C6 세포에서 L-테아닌 처리에 따른 단백질 발현 수준 확인

[0042] 계대배양에 의해 노화가 유도된 C6 세포 (1×10^5 cells/well)를 6-웰 플레이트에 분주하여 24시간 배양한 후 인슐린 (100 μ g/ml)과 β -아밀로이드 (5 μ M)를 단독 또는 병용 처리하였으며, L-테아닌을 10, 50, 100, 250 및 500 μ g/ml 농도로 함께 처리하여 48시간 동안 배양하였다. 배양 후 AQP4, GFAP, BDNF, LRP1, MMP-2 및 MMP-9의 발현을 확인하기 위해 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0043] ThermoFisher Scientific 사의 Mem-PER™ Plus Membrane Protein Extraction Kit를 사용하여 AQP4 및 LRP1의 발현(100 μ g)을 확인하였으며, RIPA lysis buffer로 전체 단백질을 추출하여 GFAP, BDNF, MMP-2 및 MMP-9의 발현(50 μ g)을 확인하였다. 단백질의 정량은 BCA assay로 확인하였으며 degradation된 단백질을 10% polyacrylamide gel에 loading 하였다(120 V, 1시간). PVDF membrane에 transfer (100V, 1시간)하고 3% skim milk solution에 blocking한 후, AQP4 (cell signaling, #59678, 1:500 dilution), GFAP (cell signaling, #80788, 1:500 dilution), BDNF (Abcam, ab108319, 1:500 dilution), LRP1 (cell signaling, #64099, 1:500 dilution), MMP-2 (Abcam, ab86607, 1: 500 dilution), MMP-9 (Abcam, ab38898, 1:500 dilution), β -actin (cell signaling, #3700, 1:1000 dilution)에 하루 동안 반응시켰다. TBS-T solution으로 3회 washing하고 secondary antibody (rabbit, cell signaling, #7074, 1:5,000 dilution) 또는 secondary antibody (mouse, cell singaling, #7076, 1:5,000 dilution)에 1시간, 상온에서 반응시키고 TBS-T solution으로 3회 세척하였다. ThermoFisher scientific 사의 SuperSignal Chemiluminescent Substrates를 선반응시키고 Chemidoc (UVP Vision Works® LS Image Acquisition & Analysis Software, Upland, CA)으로 단백질의 발현을 정성 및 정량하여 확인하였다.

[0044] 그 결과, 도 3과 같이 인슐린 단독 처리군과 인슐린 및 β -아밀로이드 병용 처리군에서 AQP4, GFAP, BDNF, LRP1, MMP-2 및 MMP-9의 단백질 발현이 감소가 확인되었으며, 특히 병용 처리군에서 발현 감소가 매우 뚜렷하게 확인되었으나, L-테아닌의 처리 농도가 증가함에 따라 정상세포(astrocytic) 특성 및 노화(aging) 회복과 관련된 AQP4, GFAP 및 BDNF의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, β -아밀로이드 축적을 억제시키는 LRP1, MMP-2 및 MMP-9의 발현 증가를 확인할 수 있었다.

[0046] <실시예 3> 노화가 유도되고 인슐린 및 β -아밀로이드에 의해 손상된 C6 세포에서 L-테아닌 처리에 따른 글루타메이트 흡수율 (glutamate uptake) 확인

[0047] 계대배양에 의해 노화가 유도된 C6 세포 (1×10^5 cells/well)를 6-웰 플레이트에 분주하여 24시간 배양한 후 인슐린 (100 μ g/ml)과 β -아밀로이드 (5 μ M)를 단독 또는 병용 처리하였으며, L-테아닌을 10, 50, 100, 250 및 500 μ g/ml 농도로 함께 처리하여 48시간 동안 배양하였다.

[0048] 배양된 세포를 용해시킨 후, 13,000 rpm, 10분간 원심분리하여 불순물을 제거하고 제조사의 설명서를 참고하여 Glutamate-Glo™ Assay를 수행하였으며, GloMax luminescence (GM3510)의 기기로 인광광도를 측정하여 글루타

메이트 흡수율을 확인하였다.

[0049]

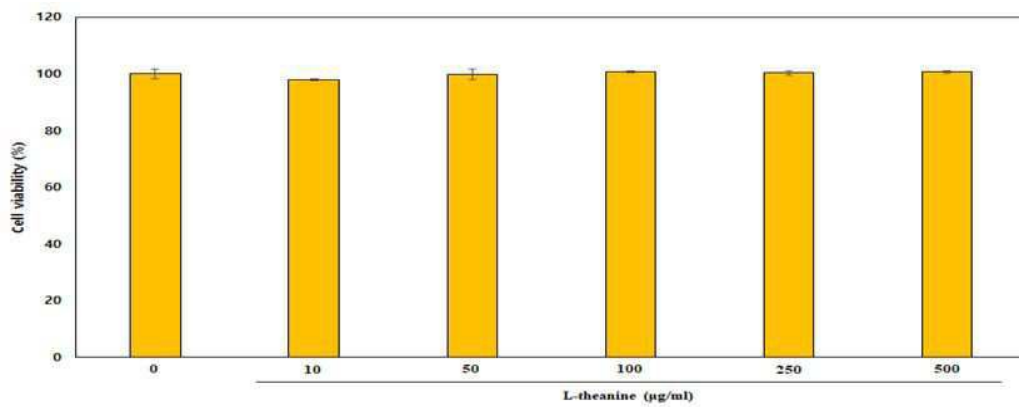
그 결과, 도 4와 같이 인슐린 또는 β -아밀로이드 단독 처리군에서 글루타메이트 흡수 감소가 확인되었으며, 인슐린 및 β -아밀로이드 병용 처리군에서는 글루타메이트 흡수 감소 비율이 더욱 증가되는 것이 확인됨에 따라 세포손상이 더욱 심화되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 L-테아닌 처리 농도 증가에 따라 인슐린 및 β -아밀로이드 병용 처리군의 글루타메이트 흡수율이 증가되는 것을 확인할 수 있었다 (100 μ g/ml의 L-theanine 처리군 간 비교; 62.74%, 56.15%).

[0051]

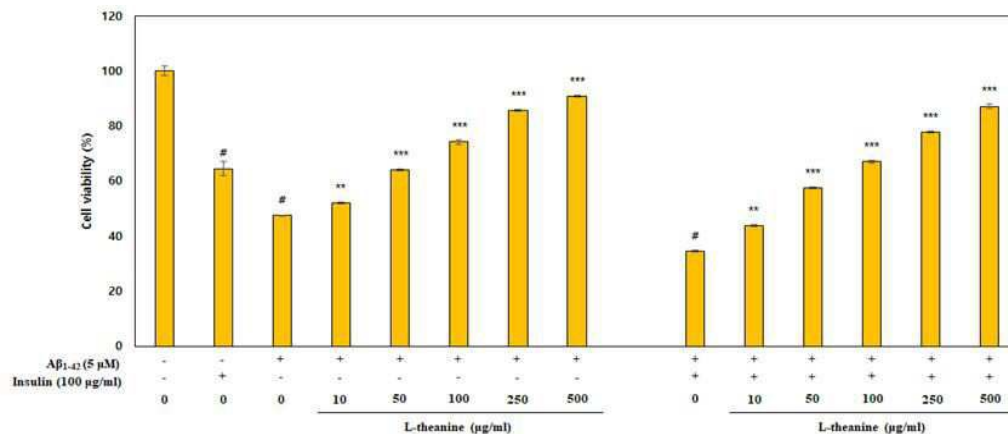
이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

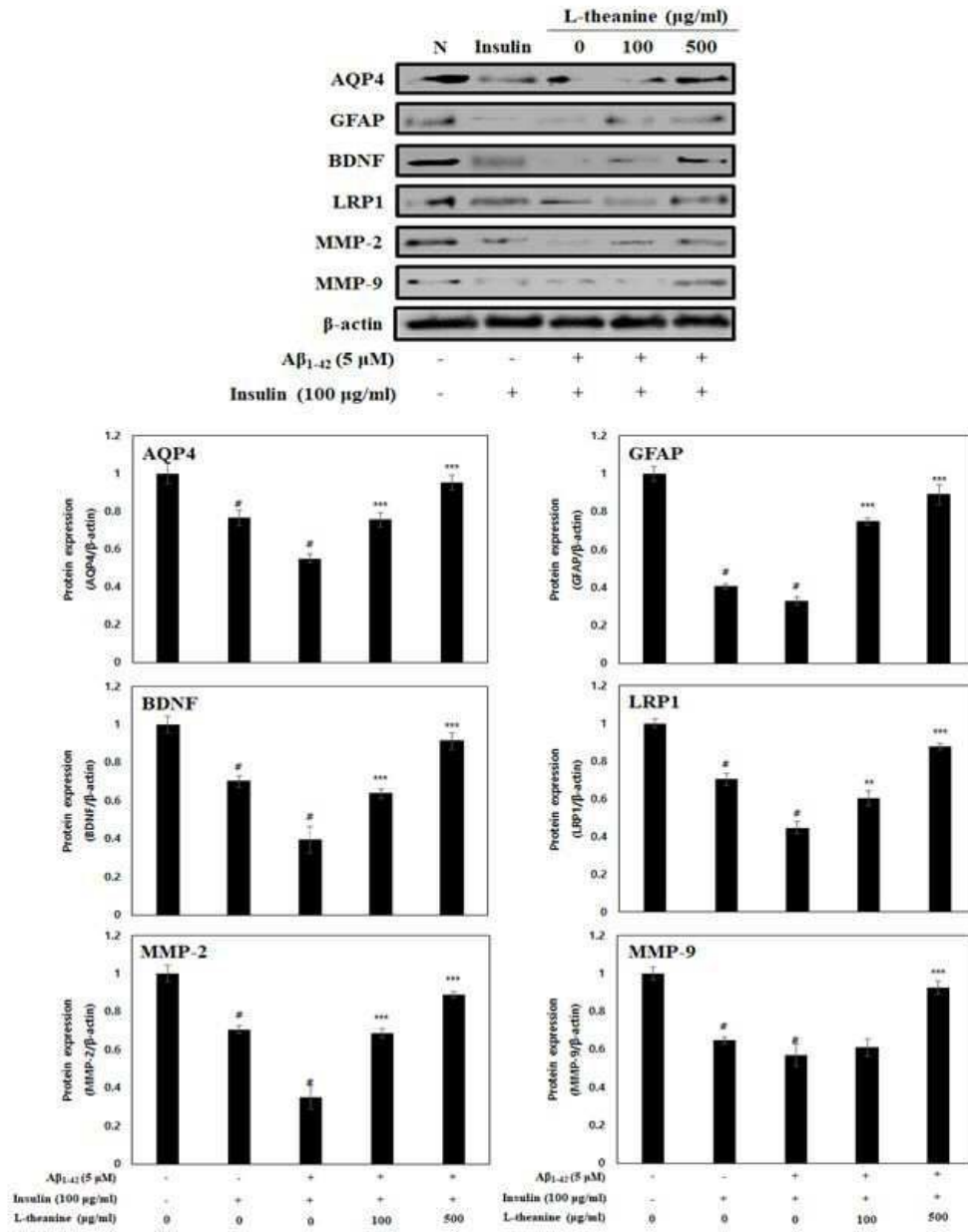
도면1



도면2



도면3



도면4

