(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0038281
(43) 공개일자 2025년03월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/192 (2006.01) *A23K 20/111* (2016.01)
A23L 33/10 (2022.01) *A61P 25/28* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/192 (2023.05)
A23K 20/111 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2023-0120802
(22) 출원일자 2023년09월12일
심사청구일자 2023년09월12일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김명옥
경상남도 진주시 가호로44번길 7, 102동 303호 (호탄동, 대동디지털황토아파트)
최경환
서울특별시 구로구 경인로 382, 106동 1701호 (개봉동, 한마을아파트)
박준성
경상남도 진주시 진주대로404번길 10-1, 203호 (가좌동)
(74) 대리인
최규환

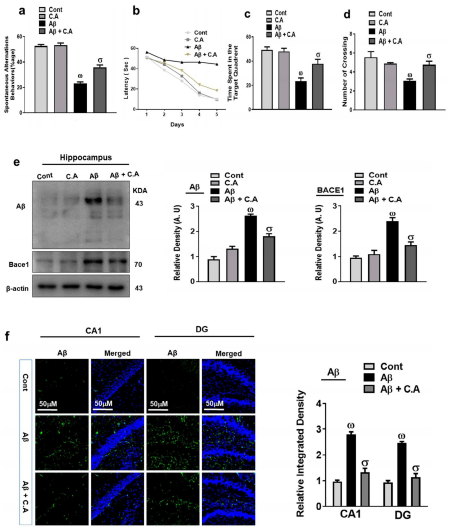
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **카페산을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 카페산을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 카페산은 동물 모델을 이용한 기억 기능에 대한 행동 분석; 및 Aβ 및 BACE-1 발현량의 변화를 통해 뇌신경 보호 효과가 있으며, 산화 스트레스를 감소시키고, 마우스 해마 조직에서 신경염증인자인 GFAP 및 Iba-1의 발현량을 감소시킬 뿐만 아니라, p-NFκb, TNF-α, IL-1β 및 TLR4의 발현량을 감소시키는 효과가 있고, p-PI3K, p-AKT 및 BDNF의 발현량을 증가시키며, 시냅스 단백질(SNAP-25, SYN 및 SNAP-23 및 PSD-95)의 발현량을 증가시키는 효과가 있으므로, 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 또는 치료를 위한 의약품, 건강기능 식품 또는 사료 첨가제로 유용하게 사용할 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A23L 33/10 (2022.01)
A61P 25/28 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2250/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711119484
과제번호 2020M3E5D9080660
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 뇌질환극복연구사업(R&D)
연구과제명 면역제어 타겟 신규 물질발굴 및 효능 검증 ; 신개념 파킨슨병 예방치료제 개발에 응용
기 여 율 1/1
과제수행기관명 경상국립대학교(뇌신경극복 면역제어연구단)
연구기간 2020.07.01 ~ 2024.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

카페산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 및 기억장애 중에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 퇴행성 뇌질환은 신경염증(Neuroinflammation) 또는 세포사멸(Apoptotic cell death)에 의한 것임을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 유효성분 이외에, 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 현탁액, 에멀젼, 시럽 및 에어로졸 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 6

카페산 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조되는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 조성물은 퇴행성 뇌질환에 의해 증가된 Aβ(Amyloid beta), BACE1(beta-site amyloid precursor protein (APP) cleaving enzyme-1), GFAP(glial fibrillary acidic protein), Iba-1(ionized calcium-binding adaptor molecule-1), p-NFκb(p-nuclear factor kappa B), TNF-α(tumor necrosis factor-alpha), IL-1β(interleukin 1 beta) 및 TLR4(toll-like receptor 4) 중에서 선택된 하나 이상의 단백질 발현량을 감소시키는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 조성물은 퇴행성 뇌질환에 의해 감소된 Nrf2(nclear factor erythroid-2-related factor 2), HO-1(Heme oxygenase-1), p-PI3K(p-phosphatidylinositol 3-kinases), p-AKT(p-protein kinase B), BDNF(brain-derived neurotrophic factor), SNAP-25(synaptosome associated protein of 25kDa), SYN(synaptophysin), SNAP-23(synaptosome associated protein of 23 kDa) 및 PSD-95(postsynaptic density protein-95) 중에서 선택되는 하나 이상의 단백질 발현량을 증가시키는 것을 특징으로 하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 10

카페산 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 사료 첨가제.

청구항 11

카페산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물.

청구항 12

카페산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물을 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계;를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 카페산을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 알츠하이머병(AD)은 기억력과 인지기능을 손상시키는 치매의 가장 흔한 원인이다. AD는 두 가지 주요 병리학적 특징, 즉 뇌에서 아밀로이드 베타(Aβ) 펩타이드의 축적과 신경섬유매듭(NFT)의 형성을 특징으로 한다. Aβ 생산을 담당하는 주요 효소는 β-분비효소(β-secretase)로, β-부위 아밀로이드 전구체 단백질 절단 효소-1(BACE-1)로도 알려져 있으며, 이는 AD 관련 병리학적 변화 및 신경변성을 유발하는 독성 Aβ 펩타이드를 생성한다. 신경원섬유매듭은 신경 미세소관의 안정화에 중요한 역할을 하고 세포 내 수송 경로를 제공하는 미세소관 관련 단백질인 타우의 과인산화로 형성된다. 과인산화된 상태에서 타우는 미세소관에 결합하는 능력을 잃고 세포 골격 조직을 유지할 수 없어 잘못 접힌 단백질과 NFT를 초래한다. 뇌에 이 두 가지 병리학적 단백질이 축적되면 산화 스트레스, 신경염증, 뇌의 신경 영양 인자의 하향 조절 및 시냅스 기능 장애가 발생한다. 뇌에 Aβ가 축적되면 활성산소종(ROS) 형성과 지질 과산화가 유발되어 세포 내 방어 메커니즘이 파괴된다. 내인성 세포 항산화 메커니즘은 핵 인자 적혈구계 2 관련 인자 2(Nrf2) 및 관련 유전자와 같은 특정 요인에 의해서만 조절된다. Nrf2는 단계 2(phase II) 해독 효소를 활성화하여 활성산소 및 산화환원 신호를 조절하는 주요 신호 전달 경로이다. Nrf2는 세포 항산화 및 해독 방어 메커니즘의 조절자 역할을 하며, 그 활성화는 여러 기관과 조직에서 세포 손상을 줄일 수 있다.

[0003] AD와 관련된 증가된 산화 스트레스는 미토겐 활성화 단백질 키나제의 구성원인 NF-κB와 같은 특정 염증 인자의 전사를 유도할 수 있고, 아밀로이드 베타의 축적과 그에 따른 신경변성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 산화 스트레스 외에도 신경염증은 활성화된 성상교세포 및 소교세포와 같은 다양한 요인에 의해 발생할 수 있다. 특히 산화 스트레스는 성상교세포와 소교세포의 활성화에 관여하는 것으로 보고되고 있고, 소교세포와 성상교세포의 활성화는 신경염증의 핵심 중요성 중 하나이며 AD 및 파킨슨병(PD)과 같은 다양한 신경 퇴행성 질환의 발병에 관여한다. AD의 초기 단계에 영향을 받는 해마는 장기 기억과 단기 기억을 저장하는 역할을 한다. 해마 가소성과 기억 기능에서 성장인자와 PI3K/AKT 신호 전달 경로의 역할이 광범위하게 강조된 바 있다. PI3K/AKT 신호 전달 경로는 정상적인 세포 활동에 중요한 세포 생존, 증식 및 분화를 촉진한다. BDNF 단백질은 뇌 생리 및 기능의 항상성에 있어서 핵심 인자로 알려져 있는데, 신경세포 생존, 시냅스 기능 및 해마 신경 발생 유도를 지원하고 인지 능력을 향상시키는 역할을 한다.

[0004] 현재 AD를 치료할 수 있는 알려진 치료법은 없으며 특정 약물만이 AD와 관련된 징후와 증상을 감소시킬 수 있다. 한편, 플라보노이드, 비타민, 페놀산, 폴리페놀과 같은 여러 천연 화합물은 이러한 질병 관리에 특별한 관심을 받아왔다. 천연 화합물은 항산화 및 항염증 활성을 갖고 있으며 시냅스 무결성, 기억 및 인지 기능도 증가시킨다. 항산화, 항암, 항박테리아, 항염증 특성을 지닌 페놀 화합물은 주로 과일과 채소에서 발견되는 화합물군이다.

[0005] 한편, 카페산 관련 선행기술로는 한국공개특허 제2016-0144020호에 카페산을 포함하는 가려움증 관련 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물이 개시되어 있고, 한국등록특허 제1409111호에 카페산 또는 이의 염을 포함하는 여드름 치료 또는 예방용 조성물이 개시되어 있으나, 아직까지는 카페산을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대하여 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명은 카페산을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하고, 상기 카페산이 동물 모델을 이용한 기억 기능에 대한 행동분석; 및 Aβ 및 BACE-1 발현량의 변화를 통해 뇌신경 보호 효과가 있으며, 산화 스트레스를 감소시키고, 마우스 해마 조직에서 신경염증인자인 GFAP 및 Iba-1의 발현량을 감소시킬 뿐만 아니라, p-NFκb, TNF-α, IL-1β 및 TLR4의 발현량을 감소시키는 효과가 있고, p-PI3K, p-AKT 및 BDNF의 발현량을 증가시키며, 시냅스 단백질(SNAP-25, SYN 및 SNAP-23 및 PSD-95)의 발현량을 증가시키는 효과가 있다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 카페산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 카페산 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 카페산 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 사료 첨가제를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 카페산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 수의학적 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 카페산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물을 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계;를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 카페산을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 상기 카페산은 동물 모델을 이용한 기억 기능에 대한 행동 분석; 및 Aβ 및 BACE-1 발현량의 변화를 통해 뇌신경 보호 효과가 있으며, 산화 스트레스를 감소시키고, 마우스 해마 조직에서 신경염증인자인 GFAP 및 Iba-1의 발현량을 감소시킬 뿐만 아니라, p-NFκb, TNF-α, IL-1β 및 TLR4의 발현량을 감소시키는 효과가 있고, p-PI3K, p-AKT 및 BDNF의 발현량을 증가시키며, 시냅스 단백질(SNAP-25, SYN 및 SNAP-23 및 PSD-95)의 발현량을 증가시키는 효과가 있는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 카페산의 화학 구조를 나타낸 것이다.

도 2는 동물 모델을 이용한 기억 기능에 대한 행동 분석 결과 및 기억 기능에 관여하는 Aβ 및 BACE-1 발현량의 변화를 통해 카페산의 신경 보호 효과를 확인한 결과이다. (a) Y-미로에서 실험 마우스의 자발적인 변화 행동의 백분율; (b) 5일째까지 숨겨진 플랫폼에 도달하기 위한 평균 탈출 대기 시간; 프로브 테스트 결과, (c) 훈련 시 플랫폼이 있었던 사분면에서 마우스가 보낸 시간, (d) 중앙을 가로지르는 횟수를 나타낸 결과이고, (e) 마우스의 해마에서 Aβ 및 BACE-1의 웨스턴 블랏 분석결과이며, (f) 마우스의 해마(Cornu Ammonis(CA1) 및 Dentate Gyrus(DG))에서 DAPI 염색(Aβ의 파란색 염색) 결과를 공초점 현미경으로 확인 이미지(배율 10X, 스케일 바=50 μm) 및 이를 정량화한 그래프이다. Cont는 식염수를 투여한 대조군이고, CA는 대조군에 카페산을 투여한 군이고, Aβ는 Aβ를 투여하여 AD를 유발시킨 군이며, Aβ+CA는 AD 유발 및 카페산 투여한 군이다. ω는 대조군의 측정값과 Aβ군의 측정값은 통계적으로 유의미한 차이가 있다는 것으로, $p<0.05$이고, σ는 Aβ의 측정값과 Aβ+CA군의 측정값은 통계적으로 유의미한 차이가 있다는 것으로, $p<0.05$이다.

도 3은 산화 스트레스에 대한 카페산의 효과를 확인한 결과이다. (a, b) 마우스의 해마에서 ROS와 LPO 값의 변화를 확인한 결과이고, (c) 마우스 해마에서 면역블랏으로 확인한 Nrf2 및 HO-1의 단백질 발현량을 나타낸 결과이며, (d) 마우스의 해마[Cornu Ammonis (CA1) 및 Dentate Gyrus (DG)]에서 Nrf2의 발현량을 확인한 면역형광 이미지(배율 10X, 스케일 바 = 50μm) 및 이를 정량화한 그래프이다. ω는 대조군의 측정값과 Aβ군의 측정값

은 통계적으로 유의미한 차이가 있다는 것으로, $p<0.05$이고, σ는 Aβ의 측정값과 Aβ+CA군의 측정값은 통계적으로 유의미한 차이가 있다는 것으로, $p<0.05$이다.

도 4는 본 발명의 카페산이 신경아교세포(glial cell)의 활성화를 감소시키는 효과를 확인한 결과이다. (a) 마우스 해마 조직에서 GFAP 및 Iba-1의 웨스턴 블랏 결과이고, (b) 마우스의 해마 조직에서 확인한 GFAP의 공초점 현미경 이미지 및 이를 정량화한 그래프이다. ω는 대조군의 측정값과 Aβ군의 측정값은 통계적으로 유의미한 차이가 있다는 것으로, $p<0.05$이고, σ는 Aβ의 측정값과 Aβ+CA군의 측정값은 통계적으로 유의미한 차이가 있다는 것으로, $p<0.05$이다.

도 5는 카페산이 염증인자에 미치는 효과를 확인한 결과이다. (a) 마우스의 뇌에서 p-NFκb, TNF-α 및 IL-1β의 웨스턴 블랏 분석 결과이고, (b) 마우스 해마에서 면역블랏으로 확인한 TLR4 단백질 발현량을 나타낸 결과이다. ω는 대조군의 측정값과 Aβ군의 측정값은 통계적으로 유의미한 차이가 있다는 것으로, $p<0.05$이고, σ는 Aβ의 측정값과 Aβ+CA군의 측정값은 통계적으로 유의미한 차이가 있다는 것으로, $p<0.05$이다.

도 6은 Aβ를 투여하여 유도된 AD 마우스의 해마에서, p-PI3K, p-AKT 및 BDNF의 발현량에 미치는 카페산의 효과를 확인한 웨스턴 블랏 결과이다. ω는 대조군의 측정값과 Aβ군의 측정값은 통계적으로 유의미한 차이가 있다는 것으로, $p<0.05$이고, σ는 Aβ의 측정값과 Aβ+CA군의 측정값은 통계적으로 유의미한 차이가 있다는 것으로, $p<0.05$이다.

도 7은 카페산의 투여에 따른 시냅스 단백질의 발현량 변화를 확인한 결과로, (a) SNAP-25, SYN 및 SNAP-23 단백질의 웨스턴 블랏 결과 및 (b) PSD-95의 면역형광 분석 결과이다. ω는 대조군의 측정값과 Aβ군의 측정값은 통계적으로 유의미한 차이가 있다는 것으로, $p<0.05$이고, σ는 Aβ의 측정값과 Aβ+CA군의 측정값은 통계적으로 유의미한 차이가 있다는 것으로, $p<0.05$이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 카페산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0015] 상기 카페산은 도 1에 개시한 구조식으로 이루어진 화합물이며, 상기 퇴행성 뇌질환은 치매, 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 및 기억장애 중에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않는다.

[0016] 상기 퇴행성 뇌질환은 신경염증(Neuroinflammation) 또는 세포사멸(Apoptotic cell death)에 의한 것이 특징이다.

[0017] 상기 약학 조성물은 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0018] 상기 약학 조성물의 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 텍스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 중에서 선택된 1종 이상의 담체를 더 함유할 수 있으며, 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 항산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 계면활성제, 결합제, 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제 및 보존제 중에서 선택된 1종 이상의 보조제를 더 함유할 수 있다.

[0019] 상기 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 경구 또는 비경구의 제형으로 투여될 수 있으며, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 또한, 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 카페산 또는 이의 식품학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물에 관한 것이다.

[0021] 상기 건강기능성식품 조성물은 퇴행성 뇌질환에 의해 증가된 Aβ(Amyloid beta), BACE1(beta-site amyloid precursor protein (APP) cleaving enzyme-1), GFAP(glial fibrillary acidic protein), Iba-1(ionized calcium-binding adaptor molecule-1), p-NFκb(p-nuclear factor kappa B), TNF-α(tumor necrosis factor-alpha), IL-1β(interleukin 1 beta) 및 TLR4(toll-like receptor 4) 중에서 선택된 하나 이상의 단백질 발현량을 감소시키는 것이 특징이다.

[0022] 상기 건강기능성식품 조성물은 퇴행성 뇌질환에 의해 감소된 Nrf2(nclear factor erythroid-2-related factor 2), HO-1(Heme oxygenase-1), p-PI3K(p-phosphatidylinositol 3-kinases), p-AKT(p-protein kinase B), BDNF(brain-derived neurotrophic factor), SNAP-25(synaptosome associated protein of 25kDa), SYN(synaptophysin), SNAP-23(synaptosome associated protein of 23 kDa) 및 PSD-95(postsynaptic density protein-95) 중에서 선택되는 하나 이상의 단백질 발현량을 증가시키는 것을 특징이다.

[0023] 상기 건강기능성식품 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조될 수 있지만, 이에 한정하는 것은 아니다.

[0024] 본 발명의 건강기능성식품 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 건강기능성식품 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 양은 그의 사용 목적(예방 또는 개선)에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 건강기능성식품 조성물은 총 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강을 목적으로 하는 장기간의 섭취인 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있다.

[0025] 상기 건강기능성식품의 종류에 특별한 제한은 없다. 상기 건강기능성식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0026] 또한, 본 발명의 건강기능성식품 조성물은 식품, 특히 기능성 식품으로 제조될 수 있다. 본 발명의 기능성 식품은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분 이외에 천연 탄수화물 또는 향미제를 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등), 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로스 등), 올리고당, 폴리사카라이드(예컨대, 덱스트린, 시클로덱스트린 등) 또는 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등)인 것이 바람직하다. 상기 향미제는 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등)와 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.

[0027] 상기 건강기능성식품 조성물 이외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 더 함유할 수 있다. 이러한 상기 첨가되는 성분의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강기능성식품 조성물 100 중량부에 대하여, 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0028] 또한, 본 발명은 카페산 또는 이의 식품학적으로 허용 가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 사료 첨가제에 관한 것이다.

[0029] 본 발명의 사료 첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당한다. 본 발명에서 용어 '사료'는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미할 수 있다. 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명은 카페산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방

또는 치료용 수의학적 조성물에 관한 것이다.

[0031] 본 발명의 수의학적 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 수의학적 조성물에 포함될 수 있는 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 세탄올, 스테아릴알콜, 유동파라핀, 솔비탄모노스테아레이트, 폴리소르베이트 60, 메칠파라벤, 프로필파라벤 및 광물유를 들 수 있다. 본 발명에 따른 수의학적 조성물은 충진제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향신료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있는데, 본 발명에 따른 수의학적 조성물은 동물에 투여된 후 활성성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있고, 제형은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 용액, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캅셀, 좌제, 멸균 주사용액, 멸균 외용제 등의 형태일 수 있다. 본 발명에 따른 수의학적 조성물의 유효한 양은 동물의 개체에 따라 적절하게 선택할 수 있다. 질환 내지 상태의 중증도, 개체의 연령, 체중, 건강상태 또는 성별에 따른 본 발명의 유효성분에 대한 민감도, 투여 경로, 투여 기간, 상기 조성물과 배합 또는 동시 사용되는 다른 조성물을 포함한 요소 및 기타 생리 내지 수의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명은 카페산 또는 이의 약학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 포함하는 조성물을 인간을 제외한 동물에게 투여하는 단계;를 포함하는 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

[0033] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0034] [재료 및 방법]

[0035] 1. 화합물

[0036] 카페산(CAS 331-39-5), 아밀로이드 베타-펩타이드(Aβ) 및 모든 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology(Dallas, TX, USA)에서 구입하였다. 본 발명의 실시예에서 사용된 1차 항체에 대한 정보를 표 1에 개시하였다.

[0037] 표 1. 1차 항체 목록

Protein Targets	Host	Application/Dilution	Catalog Number	Manufacturer
Nrf2	Mouse	WB/IF 1:1000/1:100	SC 365949	Santa Cruz Biotechnology
HO-1	Mouse	WB 1:1000	SC 136961	Santa Cruz Biotechnology
Aβ	Mouse	WB/IF 1:1000	SC 28365	Santa Cruz Biotechnology
BACE1	Mouse	WB 1:1000	SC 33711	Santa Cruz Biotechnology
Iba-1	Mouse	WB 1:1000	SC 398406	Santa Cruz Biotechnology
p-NfKB-p65	Mouse	WB 1:1000	SC 136548	Santa Cruz Biotechnology
TNF-α	Mouse	WB 1:1000	SC 52746	Santa Cruz Biotechnology
TLR4	Mouse	IF 1:1000	SC 293072	Santa Cruz Biotechnology
IL-1β	Mouse	WB 1:1000	SC 32294	Santa Cruz Biotechnology
PSD-95	Mouse	IF 1:1000	SC 71933	Santa Cruz Biotechnology
SNAP-23	Mouse	WB 1:1000	SC 374215	Santa Cruz Biotechnology
Synaptophysin	Mouse	WB 1:100	SC 17750	Santa Cruz Biotechnology
p-PAKT	Mouse	WB 1:100	SC 514032	Santa Cruz Biotechnology
BDNF	Mouse	WB 1:100	SC 65514	Santa Cruz Biotechnology

[0038]

[0039] 2. 뇌내 주사 아밀로이드-베타(Aβ) 및 마우스 그룹화

[0040] 인간 $A\beta_{1-42}$펩타이드의 저장 용액(1mg/㎖)을 멸균 식염수에 용해시킨 후, 37℃에서 4일 동안 인큐베이션하여 펩타이드를 응집시켰다. 마우스를 케타민/자일렌으로 마취시키고 정위 프레임에 두었다. 두개골의 브레그마 포인트가 노출되었다. $A\beta_{1-42}$(5㎕/5분/마우스)를 해밀턴 주사기(Trajan Scientific and Medical, Victoria Australia)를 사용하여 뇌실내(i.c.v)로 주입하였다. 좌표는 DV(dorsoventral) 2.4mm, 전후면(AP) 0.2mm, 내외측(ML) 1mm에서 조정되었다. 발열 패드를 이용하여 체온을 유지하였다.

[0041] 무작위로, 마우스를 4개 그룹(n=8마리/그룹)으로 나누었다(그룹 1: 대조군(식염수를 투여한 정상 마우스), 그룹 2: 2주 동안 카페산(50 mg/kg/일)을 투여한 정상 마우스), 그룹 3: AD 유발 마우스($A\beta_{1-42}$를 i.c.v를 투여한 알츠하이머가 유발된 마우스), 그룹 4: 2주 동안 50mg/kg/day의 용량으로 카페산을 경구투여한 AD 마우스. 본 발명에 사용된 4개 그룹의 마우스는 다음과 같이 식별된다: 그룹 1은 Cont; 그룹 2는 CA; 그룹 3은 Aβ; 및 그룹 4는 Aβ+CA. 동물과 관련된 모든 실험은 대한민국 경상대학교 응용생명과학부 동물기관관리위원회(IACUC)(승인 ID: 125)에서 승인한 지침 및 원칙에 따라 수행되었다.

[0042] 3. 행동 연구

[0043] 약물 처리가 완료된 후 마우스를 2일간 조정한 후 Y-미로 테스트 및 모리스 수중 미로(MWM) 행동 연구를 실시하

였다.

[0044] (1) Y-미로 테스트

[0045] Y-미로 장치는 투명한 플라스틱으로 만들어졌으며, 서로 120° 각도로 배향된 3개의 팔을 가지고 있다. 팔의 크기는 높이 20㎝, 너비 10㎝, 길이 50㎝이다. 마우스를 미로 중앙에 놓고 8분 동안 세 개의 팔을 탐색하도록 허용하였다. 미로 속에서 마우스의 움직임을 관찰하였다. 자발적인 교대는 설치류가 대체 팔로 들어가는 것으로 정의되었으며, 총 팔 진입 횟수도 고려되었다.

[0046] 변경 행동 비율(%)은 다음 식을 사용하여 계산되었다: 연속적으로 3개의 팔에 진입한 횟수/총 팔에 진입한 횟수-2 ×100. 자발적 교대 행동의 비율이 높을수록 공간 작업 기억이 향상되었음을 나타내는 것으로 간주되었다.

[0047] (2) 모리스 수중 미로 테스트

[0048] MWM 테스트는 직경 100㎝, 높이 40㎝의 원형 탱크에서 수행되었다. 탱크는 실온(23±0.5℃)에서 15.5㎝ 깊이까지 불투명한 물로 채워졌다. 숨겨진 플랫폼은 수면 아래 1㎝의 한 사분면에 배치되었다. 플랫폼은 훈련 세션 동안 동일한 위치를 유지했으며 프로브 테스트에서는 제거되었다. MWM은 이전에 설명한 대로 수행되었다. 모든 마우스는 5일 동안 훈련되었으며 숨겨진 플랫폼에 도달하기 위한 각 시험의 대기 시간을 고려하였다.

[0049] 훈련이 완료된 후 숨겨진 플랫폼을 제거하여 프로브 테스트를 실시하였다. 마우스를 물탱크 내에서 1분 동안 자유롭게 헤엄칠 수 있도록 하였다. 교차 횟수와 목표 사분면에서 소요된 시간을 분석하였다. 데이터는 비디오 추적 소프트웨어(SMART V3.0 Panlab Harvard Apparatus Bioscience Company, Holliston, MA, USA)를 사용하여 기록되었다.

[0050] 4. 웨스턴 블랏 및 생화학적 분석을 위한 단백질 추출

[0051] 행동 연구가 완료된 후, 마우스를 무작위로 두 그룹으로 나누었는데, 하나는 웨스턴 블랏 및 생화학적 분석을 위한 그룹이고, 다른 하나는 면역형광 연구를 위한 그룹이었다. 웨스턴 블랏 및 생화학적 분석을 위해, 마우스를 케타민/자일렌으로 마취시키고, 뇌를 제거하고, 해마를 조심스럽게 해부하였다. 해마 조직을 PRO-PREP™ 추출 용액(iNtRON Biotechnology, Inc., 성남, 대한민국)에서 균질화하였다. 상청액을 수집하고 4℃에서 25~30분 동안 분당 13,000rpm으로 원심분리한 후 실험을 위해 -80℃에 보관하였다.

[0052] 5. 형태학적 분석을 위한 뇌 수집

[0053] 마우스를 마취시키고 0.9%(w/v) 생리식염수와 4%(w/v) 파라포름알데히드 용액을 관류시켰다. 뇌를 조심스럽게 제거하고 차가운 4%(w/v) 중성 완충용액 파라포름알데히드(4℃에서 72시간)에 고정하였다. 고정 후 뇌를 20%(w/v) 수크로스에서 72시간 동안 탈수시켰다. 뇌를 일본 도쿄의 Finetek Japan C., Ltd.에서 구입한 최적 절단 온도(O.C.T.) 화합물에 넣은 후 냉동시켰다. 마이크로톰(Leica cryostat CM 3050S, Nussloch, Germany)을 사용하여 젤라틴 코팅 슬라이드에서 14㎛ 섹션을 얻었다.

[0054] 6. 웨스턴 블랏

[0055] 웨스턴 블랏은 종래의 방법에 따라 수행하였다. 단백질의 농도는 Bio-Rad 단백질 분석 키트(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 측정되었다. 동일한 양의 단백질을 사전 염색된 단백질 마커(GangNam-STAIN, iNtRON Biotechnology, Dallas, TX, USA)를 사용하여 SDS-PAGE(12-15%) 겔에 로딩하고 PVDF(polyvinylidene-difluoride) 막으로 옮겼다. 5% 탈지유로 차단한 후 막을 1차 항체와 함께 4℃에서 배양하였다. 인큐베이션 후, 상기 막을 HRP(horseradish peroxidase) 결합 2차 항체와 반응시키고, ECL(enhanced chemiluminescent) 검출 시약(ATTO Corporation, Tokyo, Japan)을 사용하여 형광을 시각화하였다. X-ray 필름에서 밴드의 발현이 검출되었다. 밀도 분석을 위해 ImageJ 소프트웨어(v.1.50, NIH, Bethesda, MD, USA)를 사용하였다.

[0056] 7. 면역형광 분석

[0057] 면역형광법은 종래의 방법에 따라 수행하였다. 슬라이드를 1% 인산염 완충 식염수(PBS)로 세척하고 Proteinase-k와 5분 동안 반응시켰다. 다음으로, 1% PBS에 2%의 정상 혈청 및 0.3% Triton X-100을 함유한 차단 용액을 인큐베이션하였다. 1차 항체를 슬라이드에 밤새 4℃에서 적용한 후 세척하였다. 그 후, 슬라이드를 TRITC(tetramethylrhodamine isothiocyanate) 또는 FITC(fluorescein isothiocyanate) 표지된 2차 항체(Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)와 반응시켰다. 2차 항체 처리 후 슬라이드를 DAPI(4,6-diamidino-2-phenylindole)와 반응시켜 핵 염색을 하였다. 형광 장착 매체를 사용하여 슬라이드를 커버슬립으로 덮었다. 공

초점 현미경(FluoView FV 1000, Olympus, Tokyo, Japan)을 사용하여 이미지를 촬영하였다.

[0058] 8. 반응성 산소종(ROS) 분석

[0059] 해마 뇌 균질물을 희석하여 조직 5mg/㎖의 최종 농도를 얻었다. 1㎖ Lock 완충액(pH ±7.4)과 0.2㎖의 균질액을 포함하는 용액을 5㎜ 7-디클로로디하이드로플루오레세인 디아세테이트(DCFH-DA) 10㎖와 혼합하였다. 혼합물을 실온에서 인큐베이션하여 형광성 DCF를 형성하였다. 484nm(여기) 및 530nm(방출)의 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 DCHFH-DA에서 DCF의 전환을 모니터링하였다. 평행 블랭크를 사용하여 균질액(배경 형광)이 없는 경우 흡광도를 제어하였다. ROS는 형성된 DCF(pmol)/단백질의 양(mg)으로 표시하였다.

[0060] 9. 지질 과산화(LPO) 분석

[0061] LPO(Lipid peroxidation) 실험은 분석 키트의 지침(카탈로그 번호 K739-100 Biovision Incorporated, Milpitas, CA, USA)에 따라 수행되었다. LPO는 실험 동물의 해마에서 검사되었다. LPO의 바이오마커인 말론디알데히드(MDA)는 LPO의 존재를 확인하기 위하여, 티오바르비투르산 반응성 물질(TBARS)을 활용하여 측정되었다. 표준물질 TEP(1,1,3,3-테트라에톡시프로판)을 사용하여 분광광도계(535 및 520nm에서의 흡광도)를 사용하여 TBARS 함량을 측정하였고. 데이터를 상대적 MDA nmol/mg 단백질로 평가하였다.

[0062] [평가 및 통계분석]

[0063] 웨스턴블랏 및 면역형광 분석에서, 농도 측정을 위해 이미지 J 소프트웨어를 사용했다. 그래프 작성 및 통계 분석을 위해 GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)을 사용하였다.

[0064] 행동 결과는 그룹당 8마리의 마우스로부터 얻어졌다. 웨스턴 블랏 및 공초점 현미경을 이용한 면역형광 분석의 경우 데이터는 각각 그룹당 4마리의 마우스에서 얻었으며 세 가지 실험을 대표하였다. 결과는 평균±표준 편차로 표시되며 일원분산 분석에 이어 Tukey의 다중 비교 테스트로 분석된다. $p<0.05$의 값은 유의미한 것으로 간주되었다.

[0065] **실시예 1. 카페산(caffeic acid) 투여에 따른 AD 마우스의 행동변화 분석, Aβ 및 BACE-1 단백질 발현량 감소 효과 확인**

[0066] 알츠하이머병(AD)과 관련된 기억 장애에 대한 카페산의 효과를 확인하기 위하여, Y-maze 및 Morris water maze(MWM) 테스트를 실시하였다. Y-미로에서는 마우스를 팔 중앙에 위치시키고 미로를 탐색하도록 허용하였다.

[0067] (1) Y-미로 테스트

[0068] Y-미로 테스트 결과, 대조군(Cont)은 새로운 팔(미로의 이전에 방문하지 않은 팔)에 더 자주 들어가 더 많은 시간을 보냈으나, Aβ를 주입한 AD 마우스군(Aβ)은 새로운 팔에 대한 선호도를 보이지 않았고, 무작위로 팔에 들어가서 각 팔에서 동일한 시간을 소비하였다. AD 마우스군(Aβ) 대비하여 카페산 투여군(Aβ+CA)의 자발적인 교대 행동 비율이 증진된 것을 확인하였다(도 2a).

[0069] 또한, 물에서 탈출하기 위한 숨겨진 플랫폼을 찾도록 하는 MWM 테스트를 실시하였다. 이를 수행하기 위해 마우스는 뇌에 "공간 방향 지도"를 하였다. 훈련 기간 동안 마우스는 숨겨진 플랫폼을 찾을 수 있었으며, 이는 AD 마우스군(Aβ)이 대조군에 비해 숨겨진 플랫폼에 도달하는데 더 많은 시간이 걸렸고, 카페산으로 처리하면 시간이 단축되는 것을 확인하였다(도 2b). 프로브 테스트에서, 플랫폼 위치에 도달하는 대기시간과 숨겨진 플랫폼 위의 교차 횟수가 대조군 대비 Aβ 주입 마우스에서 감소하였다. 카페산이 투여된 AD 마우스군은 표적 사분면에서의 시간과 플랫폼 교차시간을 증진시켰다(도 2c 및 2d).

[0070] 상기 마우스의 뇌에서 Aβ와 BACE-1(beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme-1)의 발현량 변화를 분석하여, 아밀로이드 생성 인자에 대한 카페산의 효과를 확인하였다. 웨스턴 블랏 결과, 야생형 식염수로 처리된 대조군에 대비하여 AD 마우스군(Aβ)의 뇌 조직에서, Aβ 및 BACE-1의 발현량이 증가하였고, 이에 대비하여, 카페산 투여군에서는 Aβ 주입 마우스에 비해 Aβ 및 BACE-1의 발현량이 유의미하게 감소하였다(도 2e).

[0071] 면역형광 분석 결과에서도, 대조군 대비 AD군의 뇌 조직(CA1 및 DG)에서, Aβ의 발현량이 증가된 것을 확인하였고, 카페산이 투여된 군에서는 AD 군에 대비하여 Aβ의 발현량이 감소하였다(도 2f).

[0072] **실시예 2. Aβ에 의해 유발된 마우스 해마에서 카페산의 투여에 따른 산화 스트레스의 감소 효과 확인**

[0073] Aβ에 의해 유발된 산화 스트레스에서 카페산의 항산화 활성에 대한 평가를 실시하였다. 우선적으로, 마우스의 뇌에서 활성산소종(ROS)의 수준을 평가했는데, Aβ 주입 후 세포 내 ROS가 증가하였고, 카페산 투여에 의해 증

가된 ROS가 감소되는 것을 확인하였다(도 3a). 또한, 지질 과산화(LPO) 분석 결과, Aβ 주입에 의해 마우스의 뇌에서 LPO가 증가하였고, 카페산 투여에 의해 증가된 LPO가 감소하였다(도 3b).

[0074] 내인성 산화 스트레스 조절자인 Nrf2는 ROS 수준이 증가하면 억제되는데, 본 실시예 2에서, Nrf2 및 이의 하류 표적인 HO-1의 발현량 변화를 웨스턴 블랏으로 확인하였다. 그 결과는 Aβ의 주입에 의해 Nrf2 및 HO-1의 발현량이 감소하였고, 이에 대비하여 카페산을 투여하는 경우는 Nrf2 및 HO-1의 발현량이 증가하였다(도 3c).

[0075] 또한, 면역 형광 분석을 통해 식염수 처리 대조군 마우스와 비교하여 Aβ 주입 마우스 해마에서 Nrf2의 발현량이 감소하였고, 이에 대비하여 카페산 투여에 의해 Nrf2의 발현량이 증가하였다(도 3d).

[0076] **실시예 3. Aβ에 의해 유도된 AD 마우스 해마 조직에서 카페산의 투여에 따른 GFAP 및 Iba-1의 발현량에 미치는 효과 확인**

[0077] 뇌의 신경아교세포는 신경세포의 항상성을 유지하는데 중요한 활동을 수행한다. 뇌에 Aβ와 산화 스트레스가 축적되면 신경아교세포가 과도하게 활성화되어 신경염증과 신경퇴행이 발생한다. Aβ에 의해 유도된 활성화된 신경아교세포에 대한 카페산의 효과를 분석하기 위해, 활성화된 성상교세포의 마커인 GFAP(glial fibrillary acidic protein)과 활성화된 소교세포의 마커인 Iba-1(ionized calcium-binding adaptor molecule-1)의 발현량 변화를 확인하였다.

[0078] 웨스턴 블랏 결과는 Aβ에 의해 유도된 AD 마우스의 뇌에서 GFAP와 Iba-1의 발현량이 증가하였으며, 카페산이 투여된 마우스의 해마에서는 GFAP와 Iba-1의 발현량이 감소하였다(도 4a).

[0079] 또한, 공초점 현미경을 이용하는 면역형광 분석 결과, AD 마우스의 해마에서는 GFAP의 발현량이 증가하였으나, 카페산 투여한 군에서는 GFAP의 발현량이 감소하였다(도 4b).

[0080] **실시예 4. AD 마우스의 해마에서 카페산 투여에 따른 염증성 사이토카인의 발현량 변화 확인**

[0081] 카페산의 항염증 효과를 확인하기 위하여, p-NFkB, TNF-α, IL-1β의 염증성 사이토카인의 발현량을 웨스턴 블랏으로 확인하였다.

[0082] 그 결과 도 5a에 개시한 바와 같이, Aβ를 주입하여 유도한 AD 마우스의 뇌에서 p-NFkB, TNF-α 및 IL-1β의 발현량이 증가하였고, AD 마우스 대비 카페산 투여군에서는 p-NFkB, TNF-α 및 IL-1β의 발현량이 감소하였다.

[0083] 한편, TLR4의 발현량 변화를 면역형광 분석을 통해 확인하였으며, 그 결과 AD 마우스의 뇌(CA1 및 DG)에서 TLR4의 발현량이 증가하였고, AD 마우스 대비 카페산 투여군에서는 TLR4β의 발현량이 감소하였다(도 5b).

[0084] **실시예 5. 카페산 투여에 따른 AD 마우스의 해마에서 PI3k/AKT 및 BDNF의 발현량 변화 확인**

[0085] PI3K(phosphatidylinositol 3-kinase)/AKT(portin kinase b) 신호 전달 경로는 세포 생존 및 증식에 중요한 역할을 한다. PI3K/AKT 신호 경로를 활성화하는 물질은 신경퇴행성질환으로부터 뉴런을 보호하는 것으로 보고되었다. BDNF(Brain-derived neurotrophic factor)는 CNS(중추신경계)의 신경영양인자이며, 그 활성화는 Aβ 유발 신경독성으로부터 뉴런을 보호한다. 카페산의 성장 조절 효과를 고려하여 실험 마우스의 뇌에서 PI3k/AKT 신호 전달 경로와 BDNF의 발현량 변화를 웨스턴 블랏으로 분석하였다.

[0086] 그 결과 도 6에 개시한 바와 같이 식염수 처리된 마우스(대조군)에 대비하여 AD 마우스의 해마에서 유의하게 pPI3K, p-AKT 및 BDNF의 발현량이 감소하였고, AD 마우스군 대비 카페산 투여군에서는 pPI3K, p-AKT 및 BDNF의 발현량이 증가하였다(도 6).

[0087] **실시예 6. 카페산 투여에 따른 AD 마우스의 해마에서 시냅스 가소성의 개선 효과**

[0088] Aβ는 시냅스 기능을 방해하여 인지 저하 및 기억 장애를 유발하는 것으로 알려져 있다. 시냅스 기능 장애에 대한 카페산의 효과를 확인하기 위하여, presynaptic 인자인 SNAP-25(synaptosomal-associated protein 25) 및 SYN(synaptophysin)의 발현량 및 postsynaptic 인자인 SNAP-23 및 PSD-95(postsynaptic density protein-95) 단백질의 발현량을 확인하였다.

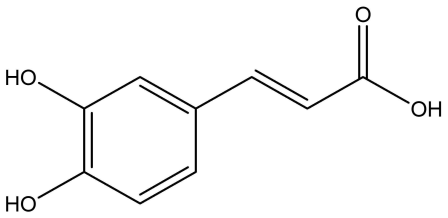
[0089] 웨스턴 블랏으로, SNAP-25, SYN 및 SNAP-23의 발현량을 분석하였고, 면역형광분석으로, PSD-95의 단백질 발현량을 분석하였다.

[0090] 그 결과 도 7a에 개시한 바, 대조군 대비 AD 유도군에서의 SNAP-25, SYN 및 SNAP-23의 발현량이 통계적으로 유의미하게 감소하였고, AD 유도군 대비 카페산 투여군의 SNAP-25, SYN 및 SNAP-23의 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였으며, 도 7b에 개시한 바, 해마 조직(CA1 및 DG 영역)에서 대조군 대비 AD 유도군의 PSD-95 발현

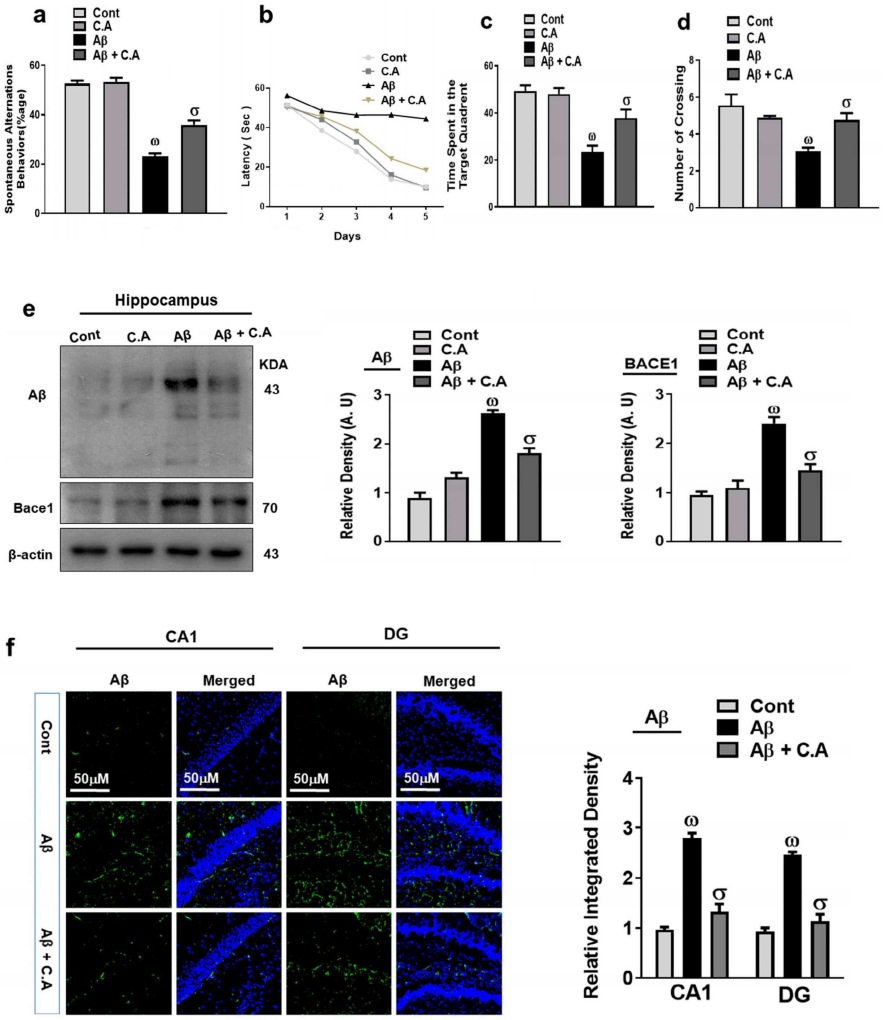
량이 통계적으로 유의미하게 감소하였고, AD 유도군 대비 카페산 투여군의 PSD-95 발현량이 통계적으로 유의미하게 증가하였다.

도면

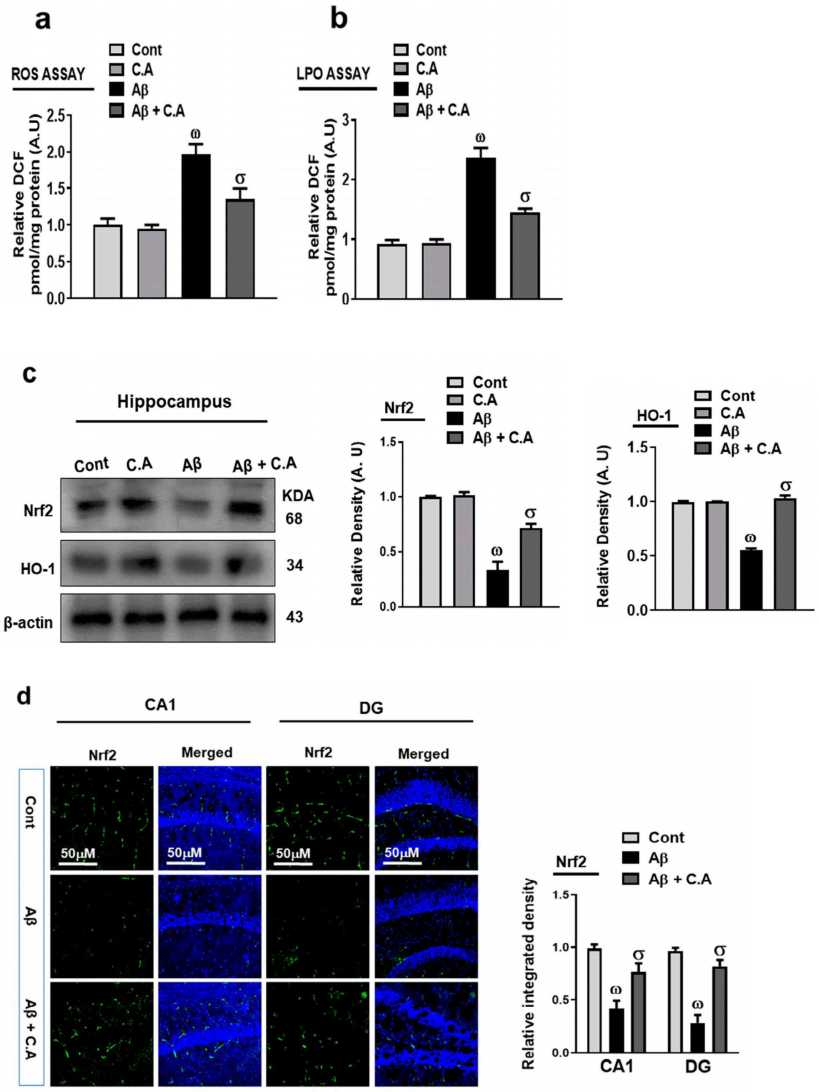
도면1



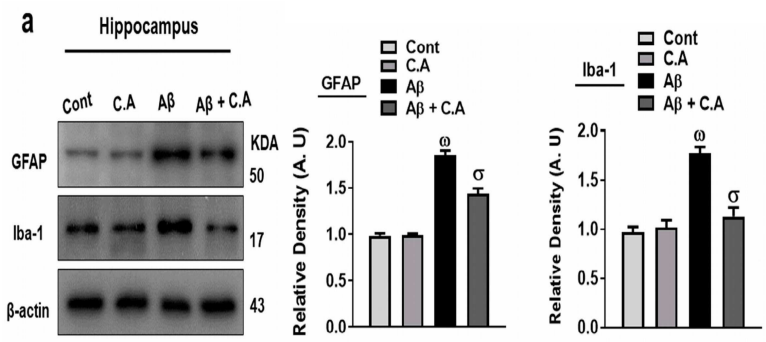
도면2

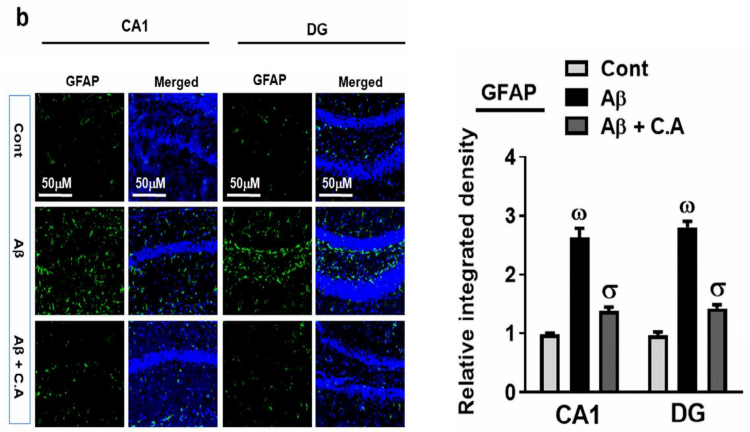


도면3

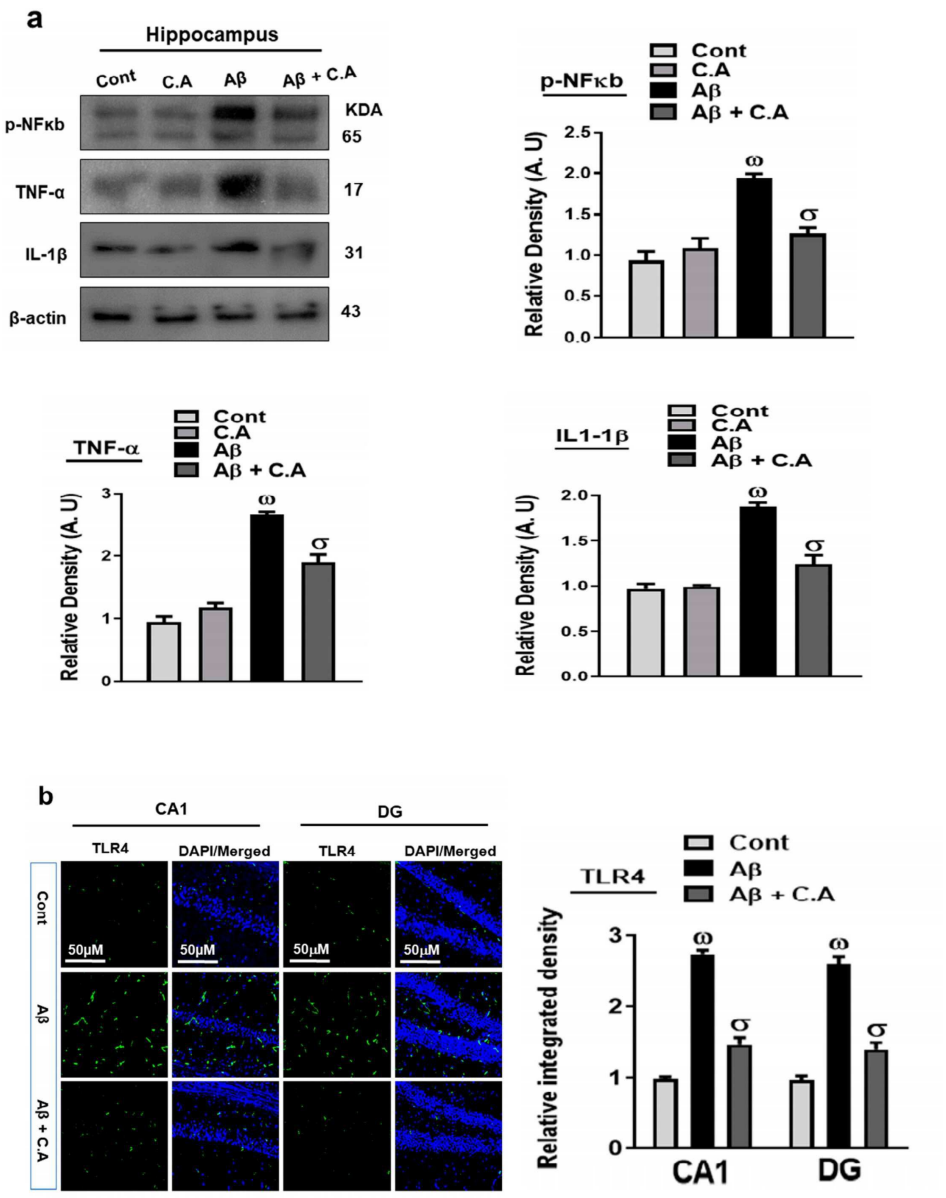

a
ROS ASSAY
Cont
C.A
Aβ
Aβ + C.A
Relative DCF pmol/mg protein (A.U)
b
LPO ASSAY
c
Hippocampus
Cont C.A Aβ Aβ + C.A
Nrf2
HO-1
β-actin
KDA
68
34
43
Relative Density (A. U)
d
CA1
DG
Nrf2
Merged
50μM
Relative integrated density

도면4

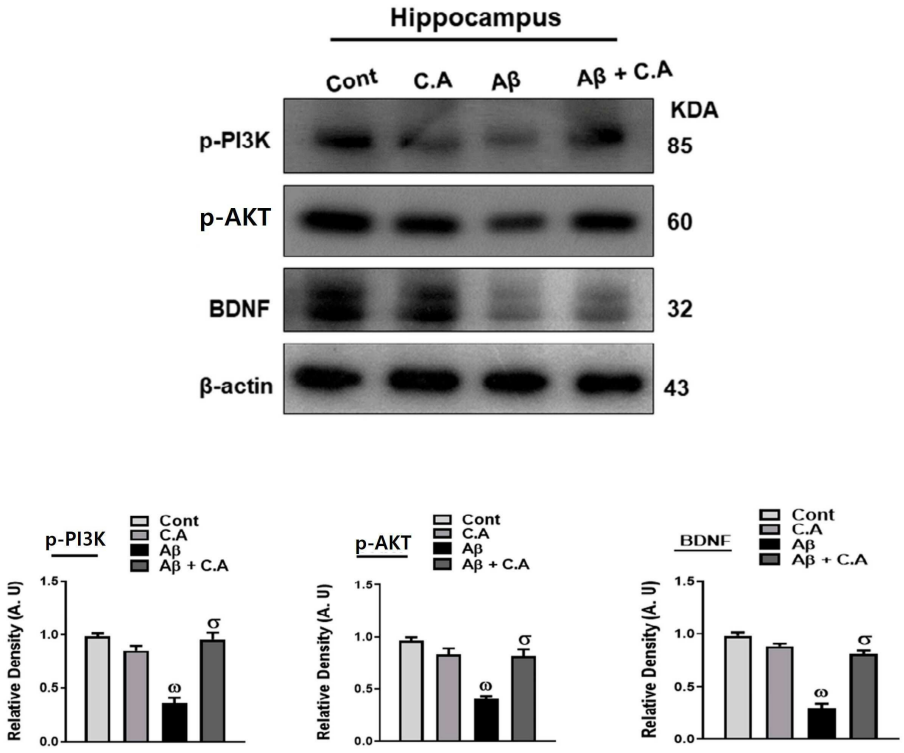

a
Hippocampus
Cont
C.A
Aβ
Aβ + C.A
KDA
GFAP
50
Iba-1
17
β-actin
43
GFAP
Cont
C.A
Aβ
Aβ + C.A
Relative Density (A. U)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ω
σ
Iba-1
Cont
C.A
Aβ
Aβ + C.A
Relative Density (A. U)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ω
σ


b
CA1
DG
GFAP
Merged
GFAP
Merged
Cont
Aβ
Aβ + C.A
50μM
50μM
50μM
50μM
GFAP
Cont
Aβ
Aβ + C.A
Relative integrated density
4
3
2
1
0
ω
σ
ω
σ
CA1
DG

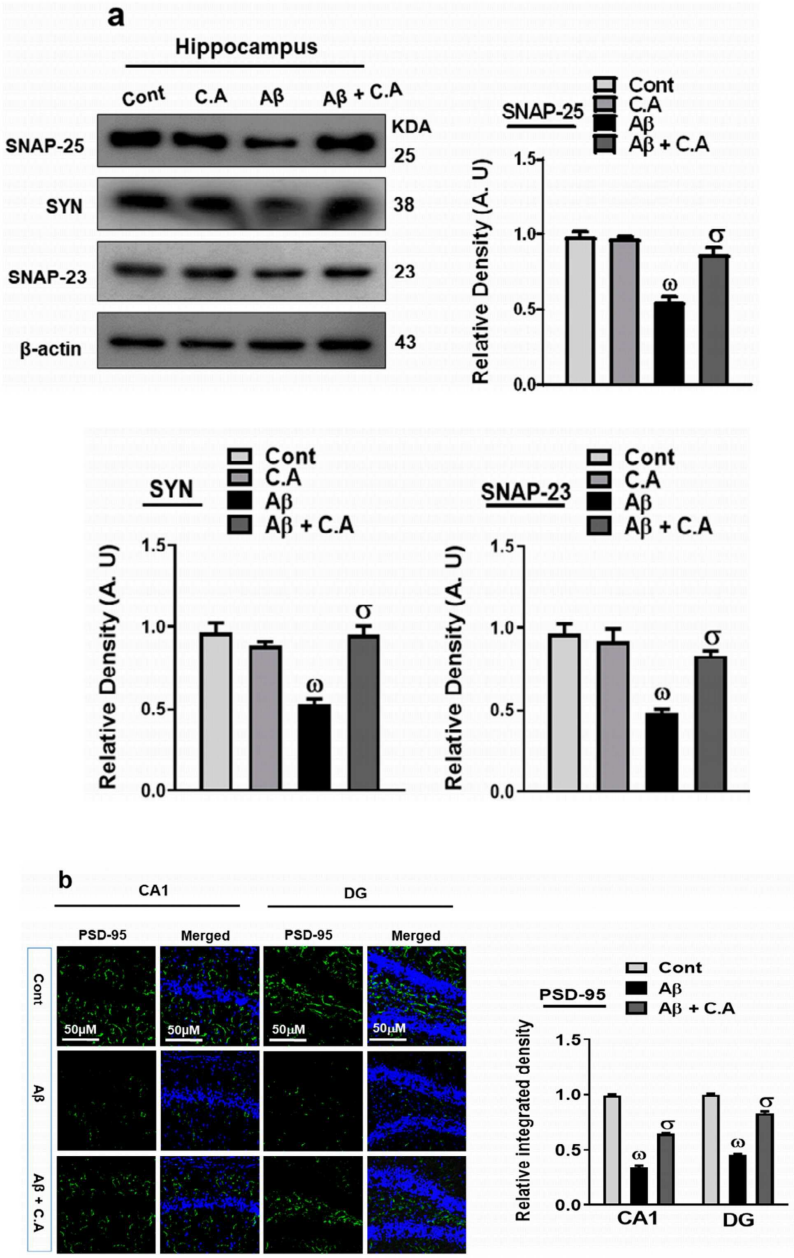
도면5


a
Hippocampus
Cont
C.A
Aβ
Aβ + C.A
KDA
p-NFκb
65
TNF-α
17
IL-1β
31
β-actin
43
p-NFκb
Relative Density (A. U)
TNF-α
IL1-1β
b
CA1
DG
TLR4
DAPI/Merged
50μM
Relative integrated density

도면6


Hippocampus
Cont
C.A
Aβ
Aβ + C.A
KDA
p-PI3K
85
p-AKT
60
BDNF
32
β-actin
43
p-PI3K
p-AKT
BDNF
Cont
C.A
Aβ
Aβ + C.A
Relative Density (A. U)
1.5
1.0
0.5
0.0
ω
σ

도면7


a
Hippocampus
Cont
C.A
Aβ
Aβ + C.A
KDA
SNAP-25
25
SYN
38
SNAP-23
23
β-actin
43
SNAP-25
Relative Density (A. U)
SYN
SNAP-23
b
CA1
DG
PSD-95
Merged
50μM
PSD-95
Relative integrated density
CA1
DG