

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2010-0052094 (43) 공개일자 2010년05월19일
(51) Int. Cl. <i>A61K 38/16</i> (2006.01) <i>A61P 25/00</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2008-0110972 (22) 출원일자 2008년11월10일 심사청구일자 2008년11월10일	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내 (72) 발명자 최의주 서울특별시 강남구 도곡동 463-1 우성5차 501-605 이재근 서울특별시 송파구 신천동 크로바아파트 1-507 (뒷면에 계속) (74) 대리인 구현서	

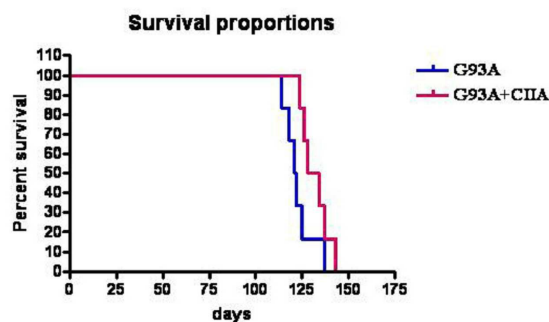
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) C I I A를 포함하는 운동성 신경세포사멸 또는 뇌신경계질환을 치료 또는 예방용 조성물

(57) 요약

본 발명은 운동성 신경세포 질환 및 특히 근위축성 측색 경화증의 신규한 치료방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 SOD1 유전자 변이에 따른 ASK1 활성 및 운동성 신경세포의 사멸을 효과적으로 억제하는 CIIA 유전자 또는 CIIA 단백질 및 그 사용 용도에 관한 것이다. 본 발명의 신규한 질환 치료요법을 통하여 신경세포사멸을 효과적으로 방지함으로써 신경세포사멸과 관련된 질환, 예를 들어, 루게릭병, 알츠하이머성 치매, 파킨슨병, 헌팅톤병, 뇌졸중, 외상성 뇌 손상, 외상성 척추 손상 등의 뇌질환을 효과적으로 치료 또는 예방할 수 있다.

대표도 - 도3b



(72) 발명자

곽병주

경기도 수원시 영통구 망포동 693 망포마을 현대2
차아아파크 201-201

신진희

서울특별시 송파구 신천동 크로바아파트 1-507

황상길

서울특별시 중랑구 묵1동 신내대림아파트 512-1003

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A080613

부처명 보건복지부

연구사업명 보건의료기술연구개발사업

연구과제명 CIIA 단백질에 의한 ALS 질환 제어 기전 연구

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2008. 5. 1 ~ 2010. 3 .31

특허청구의 범위

청구항 1

CIIA 단백질을 유효성분으로 하는 신경세포사멸 또는 뇌신경질환 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 뇌신경질환은 루게릭병, 알츠하이머성 치매, 파킨슨병, 헌팅톤병, 뇌졸중, 외상성 뇌 손상 및 외상성 척수 손상으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 신경세포사멸 또는 뇌 신경질환 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 CIIA 단백질은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 신경세포사멸 또는 뇌신경질환 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 CIIA 단백질의 유효량은 일 당 0.01 ~100 mg/kg 체중인것을 특징으로 하는 신경세포사멸 또는 뇌신경질환 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 5

CIIA 유전자를 유효성분으로 하는 것을 특징으로 신경세포사멸 또는 뇌신경질환 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 뇌신경질환은 루게릭병, 알츠하이머성 치매, 파킨슨병, 헌팅톤병, 뇌졸중, 외상성 뇌 손상 및 외상성 척수 손상으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 신경세포사멸 또는 뇌 신경질환 치료 또는 예방용 조성물.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 CIIA 유전자는 서열번호 2에 기재된 염기 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 신경세포사멸 또는 뇌신경질환 치료 또는 예방용 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 운동성 신경세포 질환 및 특히 근위축성 측색 경화증의 신규한 치료방법과 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 세포고사 (apoptosis)를 억제하는 CIIA 유전자의 과발현에 의한 세포사멸 억제 효과 및 생존증진 효과를 향상시키는 ALS 치료 또는 예방에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] ALS는 운동 피질(motor cortex), 척수(spinal cord), 뇌간(brain stem) 그리고 근육에 이르기까지 운동 뉴런을 중심으로 선택적으로 손상이 오는 진행성질환으로서 아직까지 그 발병 원인은 잘 알려지지 않고 있다 (Cleveland and Rothstein, Nat Rev Neurosci 2:806-819. 2001). ALS는 질환명이 의미하는 바와 같이 임상적으로 근위축, 근력약화, 섬유축성연축 등을 특징으로 하는 퇴행성 신경계 질환으로 그 증상은 점차 진행되며 대부분의 경우 어느 시점에서는 호흡근의 마비가 일어나며, 대개의 경우 증상이 나타난 지 5년 이내에 사망에 이르게 된다.
- [0003] 세포고사(apoptosis) 또는 프로그램화 세포 사멸(programmed cell death, PCD)는 발생 과정상에 일정한 세포수를 조절하거나 외부의 자극에 의해서 손상된 세포를 자발적으로 자기-제거(self-elimination)하기 위한 필수적 이면서 동시에 정교하게 조절되는 세포내 과정으로, 이 과정이 부적절하게 진행되면 퇴행성신경계질환에서 신경 세포사멸을 유도한다는 증거들이 제시되고 있다. 세포고사는 세포질과 핵의 수축, 핵 염색질의 응축, 핵막의 파괴, 핵산의 규칙적 분해 및 자살 유전자와 단백질의 활성화에 의해 서서히 진행되는 세포사멸의 유형이다(Kerr et al., N Engl J Med 287:1322-1325.1972).
- [0004] 특히 TUNEL 특이적(TUNEL-positive) 세포, 올리고뉴클레오솜(oligonucleosome) 형태의 DNA 절편화(DNA fragmentation), Bax와 같은 세포고사촉진 단백질의 발현 증가 및 지금까지 최소한 14개의 서로 다른 부류에 속하는 대표적인 자살 단백질인 시스테인-아스파테이트 프로테아제들(cysteine-aspartate proteases, caspases)의 활성화가 뇌졸중(Moroni et al., Cell Death Differ 8:921-932.2001), 파킨슨병(Novikova et al., Neuroscience 140:67-76.2006; Vila et al., Proc Natl Acad Sci U S A 98:2837-2842. 2001), 알츠하이머성 치매(Kang et al., Neurobiol Dis 18:450-458. 2005; Su et al., Exp Neurol 163:9-19. 2000; Smale et al., Exp Neurol 133:225-230. 1995) 및 루게릭병(Shin et al., Mol Pharmacol 71:965-975. 2007; Li et al., Science 288:335-339. 2000; Martin, J Neuropathol Exp Neurol 58:459-471. 1999) 등과 같은 뇌질환의 손상 받는 뇌부위에서 관찰된다고 보고되고 있다.
- [0005] ALS의 발병원인은 다른 여러 퇴행성 신경계 병변에서와 마찬가지로 명확하게 밝혀지지 않은 상태이며, 여러 가지 추측되는 원인들만 알려져 있다. 미토콘드리아의 구조 또는 기능의 손실, 산화적 독성, Glutamate의 과다 생성, 신경세포의 고사(apoptosis), 성장인자의 결핍, 응축된 단백질의 발견 등 많은 병변들이 ALS의 발생 기전과 관련이 있다는 것이 입증되었다 (Turner and Talbot, Prog Neurobiol 85:94-134. 2008). 특히 운동성 신경세포 (motor neuron)의 세포고사 (apoptosis) 과정은 ALS에서 중요한 병리 기전 중의 하나이다. ALS 발병 초기 및 진행 과정 동안 세포고사가 지속적인 운동성 신경세포사멸의 주된 원인이라고 생각되어지며, 실제 ALS 환자 및 동물모델의 척수에 있는 운동성 신경세포에서 세포고사를 유도하는 단백질인 Bax와 세포고사를 억제하는 단백질인 Bcl-2의 RNA 및 단백질 비율의 증가가 관찰되어 진다 (Mu et al., Ann Neurol 40:379-386. 1996; Vukosavic et al., J Neurosci 20:9119-9125. 1999). 또한 항고사 약물인 caspase 저해제 혹은 신경영양인자 중 하나인 IGF-1 을 ALS 동물모델에 투여한 결과 질병의 진행 정도 및 생존율을 증가시키는 경향을 보였다(Li et al., Science 288:335-339. 2000; Kaspar et al., Science 301:839-842. 2003).
- [0006] 기존 연구에 따르면, 다양한 스트레스에 의한 apoptosis 과정에 ASK1 관련되어 있음이 보고된 바 있다. 선행연구에서 본 발명자들은 ASK1의 활성을 인위적으로 올릴 수 있는 환경 (UV light, H₂O₂, TRAF2의 공발현)에서 CIIA의 역할을 규명하였다 (Cho et al., J Cell Biol 163:71-81. 2003).
- [0007] 한편, CIIA에 의해서 특이적으로 그 활성이 저해되는 ASK1은 MAPKKK의 일종으로 SEK1-JNK 및 MKK3/6-p38 경로를 선택적으로 활성화시켜서(Ichijo et al., Science 275:90-94. 1997), TNF α- 및 Fas-유도성 세포내 신호 캐스케이드(signal cascade)의 매개자로서 사이토카인 유도성 아포토시스에서 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다 (Bijangi-Vishehsaraei et al., Blood 106:4124-4130. 2005; Chang et al., Science 281:1860-1863. 1998). 특히 ASK1이 퇴행성신경계질환에서 신경세포사멸을 유도한다는 증거들이 제시되고 있다. SOD1 유전자의 돌연변이에 의해서 야기되는 가족형 ALS(familial ALS)의 운동성 신경세포사멸을 일으키는 과정상에 ASK1 및 이것에 의해서 조절되는 신호전달체계가 관련되어 있다는 사실들이 in vitro 및 in vivo 모델에서 제시되었다 (Raoul et al., Neuron 35:1067-1083. 2002; Veglinase et al., Mol Cell Neurosci 31:218-231. 2006; Nishitoh et al., Genes Dev 16:1345-1355. 2008). 이러한 결과들은 SOD1 유전자의 돌연변이에 의한 운동성 신경세포사멸 과정상에 ASK1 중요한 조절자로서 작용한다는 것을 제시하고 있으며, ASK1의 활성을 선택적으로 조절할 수 있는 CIIA 는 ALS 질환에 대한 유전자요법에 사용될 수 있을 것이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0008] 본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서, 본 발명의 목적은 ASK1과 CAD 를 동시에 저해함으로써 초기 및 후기의 세포고사 (apoptosis) 과정을 효과적으로 조절하는 항고사 (anti-apoptotic) 단백질인 CIIA의 ALS 질환모델에서의 역할 규명을 바탕으로 아직 효과적인 치료제가 개발되어 있지 않은 ALS 및 다른 뇌질환 분야의 유전자 치료(gene therapy)에 적용 가능성을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- [0009] 상기 기술적 과제를 달성하기 위하여 본 발명은
- [0010] CIIA 단백질을 유효성분으로 하는 신경세포사멸 또는 뇌신경질환 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다.
- [0011] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 뇌신경질환은 루게릭병, 알츠하이머성 치매, 파킨슨병, 헌팅톤병, 뇌졸중, 외상성 뇌 손상 및 외상성 척수 손상으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0012] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 CIIA 단백질은 통상 알려진 모든 CIIA 단백질 및 그 단백질의 기능을 가지는 그 기능적인 단편을 포함하고, 바람직하게는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 것이 바람직하나, 이들 아미노산서열을 가진 단백질이 표시하는 CIIA 단백질의 특성이 손상되지 않는 범위 내에서, 1 이상의 아미노산의 결실, 치환 및 부가의 적어도 1종의 변이가 도입된 변이 단백질도 본 발명에 관한 CIIA 단백질에 포함된다.
- [0013] 본 발명의 CIIA 단백질은 본 발명자의 기 공개된 대한민국 특허 공개번호 2001-0113088호에 기재된 방법으로 얻었다.
- [0014] 또한 본 발명은 CIIA 유전자를 유효성분으로 하는 것을 특징으로 신경세포사멸 또는 뇌신경질환 치료 또는 예방용 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 일 구체예에 있어서, 상기 뇌신경질환은 루게릭병, 알츠하이머성 치매, 파킨슨병, 헌팅톤병, 뇌졸중, 외상성 뇌 손상 및 외상성 척수 손상으로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0016] 본 발명의 일 구체예에 있어서 상기 CIIA 유전자는 서열번호 2에 기재된 염기 서열을 가지는 것이 바람직하나 유전자 코드의 디제러시 등을 고려하여 서열번호 2에 기재된 서열과 적어도 85% 이상, 바람직하게는 적어도 90% 이상, 더욱 바람직하게는 95% 이상 상동성을 가지는 서열이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.
- [0017] 이하, 본 발명의 신경세포사멸을 치료 또는 예방하기 위한 CIIA를 이용한 방법에 대해 보다 구체적으로 설명한다.
- [0018] 본 발명은 SOD1 유전자의 돌연변이에 의해서 발생하는 가족형 ALS 의 지속적인 운동성 신경세포사멸 주된 원인이 세포고사라는 사실과 CIIA 단백질이 세포고사를 통한 신경세포사멸을 효과적으로 억제함과 동시에 생존연장 효과도 있다는 놀라운 사실에 기초한다.
- [0019] 즉, 본 발명에서와 같이 CIIA 유전자의 발현을 증가시킬 경우 세포고사와 관련된 질환, 예를 들어, 루게릭병, 알츠하이머성 치매, 파킨슨병, 헌팅톤병, 뇌졸중, 외상성 뇌 손상, 외상성 척추 손상 등의 뇌질환을 효과적으로 치료 또는 예방할 수 있다. 다만, 본 발명에 따른 유전자요법은 신경세포의 사멸과 관련된 어떠한 질환에도 적용가능하며, 앞서 언급한 루게릭병, 알츠하이머성 치매, 파킨슨병, 헌팅톤병, 뇌졸중, 외상성 뇌 손상, 외상성 척추 손상 등에 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.
- [0020] 한편 본 발명의 운동성 신경세포사멸 또는 뇌신경계질환 예방 또는 치료용 조성물은 약학적으로 허용되는 부형제, 담체, 희석제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0021] 본 발명에서 사용가능한 담체로는 단백질, 폴리펩티드, 리포솜, 다당, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체성아미노산, 아미노산 공중합체 및 불활성 바이러스 입자와 같이 천천히 대사되는 거대분자를 들 수 있다. 또한 예를

들면, 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 포스페이트 및 설페이트와 같이 무기산의 염; 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트 및 벤조에이트와 같은 유기산의 염과 같은 약제학적으로 허용가능한 염; 물, 염수, 글리세롤 및 에탄올과 같은 액체, 및 수화제, 유화제 또는 pH 완충 물질과 같은 보조적 물질을 사용할 수 있다.

[0022] 약제학적으로 허용가능한 담체에 관해서는 문헌 [Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, 1991]에 기재되어 있다.

[0023] 상기 저해제 및 치료제는 임상 투여시에 치료해야 할 질환 및 개체의 상태에 따라 경구제, 주사제(예를 들어, 근육주사, 복강주사, 정맥주사, 주입(infusion)경구 또는 비경구로 투여가 가능하며, 특히 비경구 주사 투여가 바람직하다. 투여경로에 따라 통상적으로 사용되고 비독성인, 약제학적으로 허용되는 운반체, 첨가제, 비히클을 포함하는 적당한 투여 유닛 제형으로 제제화될 수 있다. 일정 시간 동안 약물을 지속적으로 방출할 수 있는 데포(depot) 제형 또한 본 발명의 범위에 포함된다.

[0024] 마우스 CIIA 단백질 및 그 변이형 단백질의 유효효량은 매일 0.01 ~ 100 mg/kg 체중이고, 바람직하게는 0.1 ~ 10 mg/kg 체중으로 1일 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 유효성분의 실제 투여량은 예방 또는 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별, 약제조합, 반응 민감성 및 치료에 대한 내성/반응 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 하며, 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0025] 본 발명의 CIIA는 유전자 치료법에 의하여 투여될 수도 있다. 이를 위해서는, 본 발명의 CIIA는 DNA 서열로부터 발견되어 그 자리에서 (*in situ*) 조합될 수 있도록 당분야의 통상적인 유전자 치료법에 따라 환자에게 도입되어야 한다.

[0026] 본 발명의 실시예에서는, CIIA 단백질에 의한 ALS 질환제어 조절 기전, 신경세포보호 및 수명 연장 효과의 특성을 규명함으로써 상기 단백질의 바람직한 용도를 확인하였다.

[0027] 앞서 언급한 바와 같이, 본 발명에서는 CIIA 유전자를 고발현하는 세포주 및 동물에서 ASK1의 활성이 저해됨을 확인함으로써, 본 발명의 유전자 치료제가 루게릭병, 알츠하이머성 치매, 파킨슨병, 헌팅톤병, 뇌졸중, 외상성 뇌 손상, 외상성 척추 손상 등의 상기 질환에 유용함을 확인하였다.

[0028] 구체적으로 본 발명자들은 ALS 동물모델(이하 G93A 쥐라고 칭함)에서 선행 연구를 토대로 CIIA 단백질에 의한 운동성 신경세포사멸의 억제 가능성을 검증하고자 CIIA 단백질의 발현 정도를 확인한 결과 G93A 쥐에서 그 발현이 현저히 감소하였다(도 1 참조). 이러한 사실을 토대로 ALS 질환의 치료를 목적으로 인위적으로 CIIA 유전자 발현을 증가시킨 쥐(이하 CIIA 쥐라고 칭함)를 제작하여 G93A 쥐와 교차교배를 실시하여 이 과정에서 태어나는 쥐들 가운데 두 가지 표현형을 동시에 가지고 태어나는 쥐(G93A/CIIA 쥐라고 칭함)들을 G93A 쥐들과 비교를 통해서 상기 목적을 달성하고자 하였다(도 2 참조). 아울러 교차교배로 태어난 쥐들은 상기 질병들의 기전연구과정 등에 유용하게 이용할 수 있다.

[0029] G93A 쥐들을 대조군으로 하여 G93A/CIIA 쥐들의 수명연장효과를 분석해 본 결과, G93A/CIIA 주들에서 약 일주일 정도 수명이 연장됨을 보였다(도 3 참조).

[0030] CIIA에 의한 ALS 동물모델에서의 행동기능 회복 효과를 확인하기 위해 교차교배 과정을 거쳐서 태어난 동물의 행동능력을 G93A 쥐들을 대조군으로 해서 측정하였다. 회전하는 원통 위에서 떨어지는 시간 측정으로 행동능력을 시험하는 Rotarod test를 수행한 결과 G93A/CIIA 쥐들이 대조군에 비해 좋은 점수를 얻었다(도 4 참조). 또 다른 행동실험법으로 천장에 얼마나 오래 매달려 있는지를 통해 다리의 근력을 측정하는 PaGE (Paw Grip Endurance)를 수행한 결과 역시 Rotarod test와 마찬가지로 G93A/CIIA 쥐들이 대조군에 비해 좋은 결과를 보였다(도 4 참조).

[0031] 생쥐를 3그룹으로 나누어 운동성 신경세포사멸 제어 효과를 분석한 결과, G93A 쥐에서의 운동신경세포는 69%까지 감소하였으나, G93A/CIIA 는 보통 쥐보다 32%의 감소율로, 운동신경세포사멸을 효과적으로 억제하였다(도 5 참조).

[0032] 또한, *in vitro* 및 *in vivo* 실험 결과, SOD1 돌연변이에 의해서 운동성 신경세포가 사멸되며, 이 과정에서 ASK1 및 p38이 활성화되며, 신경세포사멸을 매개한다는 사실을 확인하였으며, ASK1 및 p38의 활성이 CIIA에 의해서 효과적으로 저해되었다(도 6 참조). *in vitro* 실험을 실시하고자 NSC34 라는 운동성 신경세포주에 G93A로 변형시킨 인간 SOD1 유전자를 주입하여 지속적으로 과발현시켜서 ALS 동물모델과 유사한 세포배양모델을 구축한다. 이는 ALS 질환의 세포배양모델을 제작하고 분석하는 시스템이 구축되어, 신경세포사멸의 심층적인 이해

가 가능해지고, 더 나아가 ALS 질환의 예방 및 치료를 위한 일차적인 테스트가 가능해진다.

효 과

- [0033] CIIA 단백질을 포함하는 세포고사 활성 저해제 및 뇌신경질환 치료제는 SOD1 유전자 변이에 따른 ASK1 활성 및 운동성 신경세포의 사멸을 효과적으로 억제하므로, CIIA 단백질은 세포고사에 의한 신경세포사멸 관련 과정이 관여하는 루게릭병, 알츠하이머성 치매, 파킨슨병, 헌팅톤병, 뇌졸중, 외상성 뇌 손상 및 외상성 척수 손상 등의 질병을 치료 또는 예방하는데 유용하게 사용될 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0034] 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위하여 하기 실시예 등을 들어 설명한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며 본 발명의 범위가 아래에서 상술하는 실시예들에 한정되는 것으로 해석해서는 안 된다. 본 발명의 실시예들은 본 발명의 구체적 이해를 돕기 위해 예시적으로 제공되는 것이다.

- [0035] <실시예 1-1> 연령별 ALS 동물 모델(G93A mice)에서의 CIIA의 발현 양상

- [0036] 세포고사 (apoptosis)과정은 퇴행성 뇌질환에서 신경세포사멸경로의 한 가지 경로로 인식되고 있어, 적절한 동물모델에서의 명확한 규명이 필요하다. 대표적인 퇴행성 뇌질환 가운데 ALS 동물모델에서 질병의 시기에 따른 CIIA 단백질의 발현 정도를 ALS 동물 모델 (G93A 쥐)과 같은 연령의 보통 쥐를 비교 평가하였다. 8주령, 12주령 16주령 일 때 웨스턴 블랏을 통하여 CIIA 단백질의 발현정도를 관찰한 결과 모든 주령에서 보통 쥐에 비해서 G93A 쥐에서 발현이 감소되어있음을 확인하였다 (도 1a). 이러한 결과를 정량적으로 분석한 그래프에서도 역시 유의적으로 CIIA의 발현 수준이 ALS 동물모델에서 감소됨을 보였다 (도 1b). 또한 항-CIIA 항체를 이용하여 면역표지법을 확인하였을 때 발현 위치가 요수의 운동신경세포에 위치한다는 것을 확인하였다(도 1c).

- [0037] 그 결과, G93A 쥐 모델에서 운동신경세포가 죽기 이전부터 CIIA 단백질의 발현이 감소되어 있으며, 또한 산화적 독성은 운동신경세포에만 특이적으로 발현됨을 알 수 있었다. 이는 운동신경세포가 죽어 가는데 하나의 역할을 하고 있는 사실을 추론할 수 있다.

- [0038] <실시예 1-2> CIIA 유전자가 과발현된 쥐 제작

- [0039] 본 발명자들은 도1의 결과로부터 ALS 질환에서의 CIIA 단백질의 역할을 규명하고자 CIIA 유전자가 주입되어 CIIA 과발현 쥐를 제작하고자 다음의 실험들을 수행하였다. 우선 Flag 표시자가 달린 CIIA 유전자를 chicken b-actin promoter를 포함하는 발현벡터에 삽입하여 pCAGGS/CIIA-Flag 벡터를 제조하였다. 이 벡터를 293T cell에서 발현시켜 CIIA-Flag 단백질이 제대로 발현되는 지를 Flag 항체를 이용한 웨스턴 블랏으로 확인하였다. pCAGGS/CIIA-Flag 벡터를 이용하여 CIIA 유전자를 과발현시킨 쥐를 제조한 후 CIIA-Flag 유전자를 갖는 쥐들을 구별하기 위하여 쥐들로부터 genomic DNA를 추출한 후 CIIA-Flag에 특이적인 PCR을 수행한 결과 보통 쥐와 CIIA 유전자가 과발현된 쥐가 Flag 표시자에 특이적으로 선별됨을 관찰하였다 (도 2a). 보통 쥐 및 CIIA 과발현 쥐의 척수 요수부위를 적출하여 웨스턴 블랏을 통하여 표시 항체인 Flag과 CIIA 단백질의 발현 형태를 관찰하였다. PCR 결과와 마찬가지로 CIIA-Flag 벡터가 주입된 쥐에서 Flag 항체 특이적으로 반응을 보였으며, 보통 쥐 보다 CIIA 유전자가 주입된 쥐에서 CIIA의 발현이 더욱 증가함을 확인하였다 (도 2b). 또한 항-Flag 항체를 이용하여 면역표지법을 확인하였을 때 발현 위치가 요수의 운동신경세포에 주로 위치한다는 것을 확인하였다(도 2c).

- [0040] <실시예 1-3> ALS 동물 모델(G93A mice)에서 CIIA 유전자 발현에 의한 생존율 증가

- [0041] 본 발명자들은 CIIA에 의한 ALS 동물모델에서의 수명 연장 및 행동기능 회복 효과를 확인하기 위해 교차 교배 (cross breeding) 과정을 거쳐서 두 가지 표현형을 모두 가지고 태어난 동물들 (G93A / CIIA)의 행동능력을 G93A 쥐를 대조군으로 해서 측정하였다. 먼저 ALS의 표현형은 G93A로 돌연변이가 일어난 쥐가 아니라 인간의 SOD1 유전자를 주입해야만 관찰이 가능하기 때문에 다음의 4그룹에서 항 hSOD1 항체를 이용해서 hSOD1의 발현 형태를 조사하였다. 8주령된 보통 쥐 (야생형), G93A 쥐 (ALS 표현형), CIIA 쥐 (CIIA 유전자를 과발현시킨 쥐) 및 G93A / CIIA 쥐 (두 가지 표현형을 동시에 발현하는 쥐)의 척수 요수부위의 조직을 hSOD1 및 액틴 (actin)을 이용하여 웨스턴 블랏을 수행한 결과 G93A 쥐 및 G93A / CIIA 쥐에 특이적으로 발현됨을 관찰하였다 (도 3a) 도

3b는 생쥐를 11마리씩 2그룹으로 나누어 각 생쥐들이 죽을 때까지를 도식화 한 것이다.

[0042] <실시예 1-4> ALS 동물 모델(G93A mice)에서 CIIA 유전자 발현에 의한 운동수행능력 향상과 운동성 신경세포 사멸 억제효과

[0043] 도 4a-4b는 생쥐를 11마리씩 3그룹으로 나누어 각 생쥐들이 죽을 때까지의 행동실험을 일주일에 두 번씩 실행한 결과이다(mean±SEM, n=11). 도 4a-4b에서 *는 대조군(G93A 쥐)에 비하여 p<0.05의 유의차를 보임을 나타내는 것이다.

[0044] 도 5a와 5b는 생쥐를 3마리씩 3그룹으로 나누어 실험한 결과이다. 보통 쥐와 G93A 쥐를 비교하였을 때 운동성 신경세포의 수가 유의적으로 (p<0.05) 감소함을 확인하였다. 이와 더불어 G93A / CIIA 쥐에서는 운동성 신경세포의 감소가 대조군 (G93A 쥐)과 비교했을 때 유의적 수준으로 억제되는 양상을 보였다.

[0045] G93A/CIIA 쥐는 대조군 (G93A 쥐) 보다 11주령부터 18주령까지 여러 가지 행동수행 능력이 향상 되었다(도 4a-4b). PaGE 테스트를 통한 결손과 Rotarod 테스트를 통한 결손을 통한 발병시점(Onset)과 사망률(mortality)을 각 그룹 당 11마리에 대하여 측정하였다. 전반적 운동력, 행동의 조화에 있어서도 G93A/CIIA 쥐는 전반적으로 행동능력이 향상되었음을 확인하였다. 또한 PaGE를 통한 발병시점을 관찰시 G93A 그룹은 91.1일 G93A/CIIA 그룹은 111.2일로 발병시점이 늦춰진다는 사실을 확인하였다. CIIA 유전자를 G93A 쥐에 동시에 발현시켰을 경우 (G93A/CIIA) 발병시점과 생존율의 연장효과를 종합하여 하기 표 1에 나타내었으며, 각 그룹 당 11마리로 실험하였다.

표 1

[0046]

	G93A	G93A/CIIA
Rotarod테스트를 통한 발병시점	94.27±4.12	110.7±3.04 ^a
PaGE 테스트를 통한 발병시점	91.18±6.64	111.20±4.79 ^a
생존율	126.27±2.10	133.40±1.96 ^a
a: 대조군 (G93A 쥐)과 비교한 것 (p<0.05)		

[0047] 상기 표 1에 나타나는 바와 같이, CIIA와 G93A가 동시에 발현되는 쥐는 PaGE 테스트를 통한 발병시점이 111.2일로 상당히 연장되었음을 확인할 수 있었다. Rotarod 테스트를 통한 발병시점은 G93A 그룹은 약 94.2일에 비해서 두 가지 표현형을 모두 나타내는 G93A/CIIA 그룹은 110.7일로 역시 발병시점을 늦추는 경향을 보였다. 생존능력은 대조군 (G93A)의 경우 126.6일이지만, 두 가지 표현형을 모두 보이는 그룹 (G93A/CIIA)은 133.4일로 생존능력 또한 G93A/CIIA 쥐에서 훨씬 더 연장시킨다는 것을 확인하였다(표 1, 도 3b). 마지막으로, 요수에 위치한 운동신경세포의 보호효과를 크레실 바이올렛 염색법을 이용하여 동물이 16주가 되었을 때 비교 실험을 하였다. G93A 쥐에서의 운동신경세포는 69%까지 감소하였으나, 교차교배(cross breeding) 통해서 두 가지 형질을 모두 가지고 있는 G93A/CIIA 는 보통 쥐보다 32%의 감소율로, 운동신경세포의 사멸정도를 억제하는 효과 역시 확인하였다. 이와 같은 결과를 볼 때 본 발명자들에 의해서 새롭게 제시된 항고사 단백질인 CIIA는 ALS 진행과정에서 지속적으로 나타나는 운동증상 악화를 예방하는 효과가 있음이 입증되었다.

[0048] <실시예 2-1> ALS 세포 배양 모델에서의 CIIA 단백질의 신경세포 보호효과

[0049] 본 발명의 목표를 원활히 수행하기 위하여 일차적으로 적절한 세포배양모델과 동물모델이 필수 불가결하다. 이번 연구에서 사용할 G93A-SOD1 ALS 동물모델과 동일한 조건의 세포배양모델의 제작하기 위해서 NSC34 라는 운동성 신경세포주에 G93A로 변형시킨 human SOD1 유전자를 주입하여 지속적으로 과발현시켜서 동물모델과 유사한 세포배양모델을 제작하였다. 이렇게 제작된 세포 모델에 CIIA 단백질의 세포보호 효과를 확인하기 위해서 CIIA siRNA 및 이것의 대조군인 GFP siRNA를 각각 제시된 조합으로 ALS 세포모델에 주입하여 48시간 뒤 TUNEL 방법을 이용하여 세포사멸을 정량화하였다 (도 6a). G93A 그룹은 야생형에 비해서 약 35% 정도 세포사멸이 증가하였으며, 이는 CIIA siRNA를 주입한 G93A 그룹에서는 60% 까지 세포사멸이 더욱 증가됨이 관찰되었다.

[0050] 그 결과 CIIA 단백질은 ALS 발병에 따른 운동성 신경세포 사멸에 중요한 역할을 한다는 사실을 추론할 수 있다.

[0051] <실시예 2-2> CIIA에 의한 ALS 세포 배양 모델 및 동물모델에서의 ASK1 활성 억제효과

- [0052] 일반적으로, JNK/SAPK와 p38 신호기작에서 MAPK 카이네이즈 카이네이즈(MAPKKK)로 작용하는 ASK1은 다양한 스트레스에 세포가 노출됨에 의해 활성화된다고 알려져 있다. ASK1 활성화 관련 세포고사를 통한 신경세포의 사멸은 알츠하이머 치매나 파킨슨 병, 헌팅톤 병 및 ALS 같은 퇴행성신경질환에서 이미 관찰된 바 있다 (Akterin et al., Cell Death Differ 13:1454-1465. 2006; Karunakaran et al., FASEB J 21:2226-2236. 2007; Nishitoh et al., Genes Dev 22:1451-1464. 2002; Nishitoh et al., Genes Dev 16:1345-1355. 2008)
- [0053] 이는 G93A 변이에서 ASK1-관련 고사를 통한 운동신경세포의 소실을 가능하게 하는 증거가 된다.
- [0054] 따라서 본 발명자들은 ASK1 및 다음 단계의 인산화 효소인 P38 활성을 ALS 세포 및 동물 모델에서 관찰하였으며, 더 나아가 CIIA에 의한 조절 여부도 조사하였다. In vitro kinase assay 방법으로 ASK1 과 p38 의 활성화 정도를 NSC34 세포주에서 확인한 결과 야생형에 비해서 SOD1의 돌연변이인 G93A에서 그 활성이 증가함을 보였고 CIIA siRNA를 주입한 경우 두 가지 인산화 효소의 활성이 더욱 증가함을 확인하였다 (도 5b). CIIA siRNA에 의한 세포내 CIIA 발현의 감소는 항 CIIA 항체를 이용한 웨스턴 블롯을 통해서 확인하였다. 도면에 제시된 항체들을 이용해서 각각 단백질들의 발현 양상을 분석한 결과 ASK1 및 p38 의 발현상의 차이는 보이지 않았다. 이와 같은 ASK1 및 p38 의 활성화는 ALS 동물모델에서도 관찰되었다. 8주령된 보통 쥐, G93A 쥐, CIIA 쥐, 그리고 G93A/CIIA 쥐의 척수 요수부위를 적출하여 ASK1 및 p38 인산화 효소의 기질들을 첨가하여 이들의 효소 활성도를 측정해 본 결과 ALS 동물 모델인 G93A 쥐에서 활성화 되어있던 ASK1 및 p38 이 G93A/CIIA 쥐에서 그 활성이 현저히 감소되어있음을 보였다 (도 5c). 도면에 제시된 항체들을 이용해서 각각 단백질들의 발현 양상을 분석한 결과 ASK1의 경우 G93A 쥐와 G93A/CIIA 쥐에서 보통 쥐 및 CIIA 쥐보다 그 발현이 증가 되어있었으나, p38 의 발현상의 차이는 보이지 않았다.
- [0055] 그 결과 SOD1 돌연변이에 의해서 ASK1 및 p38이 활성화 되며 이는 CIIA에 의해서 특이적으로 조절됨을 ALS 세포 및 동물 모델에서 확인하였다. 따라서 ASK1은 운동성 신경세포 사멸에 주요한 위험 요소라고 예상할 수 있으며, 이는 CIIA에 의해서 그 활성이 특이적으로 조절되므로 CIIA는 신규한 ALS 및 다양한 퇴행성신경계질환의 제어 요소로 널리 사용될 가능성을 지니고 있다.

도면의 간단한 설명

- [0056] 도 1a-1c는 ALS 동물모델에서 CIIA 단백질의 발현양상을 분석한 도면으로, 도 1a는 표시된 주령에서 보통 쥐(야생형)와 G93A 쥐(ALS 표현형)의 요수 부위에서 CIIA 및 액틴(actin) 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행한 사진이고, 도 1b는 보통 쥐 및 G93A 쥐에서의 CIIA 단백질의 발현 정도를 액틴(actin)을 기준으로 정량적으로 분석한 그래프이며(mean±SEM, N=3-5). 도 1b에서 *는 인디펜던스 t 테스트(independence t test)를 이용하여 대조군(보통 쥐)에 비하여 p<0.05의 유의차를 보임을 나타내는 것이고, 도 1c는 8주령된 보통 쥐 (야생형)와 G93A 쥐(ALS 표현형)의 척수에서 운동신경세포를 CIIA 항체로 염색한 사진이다.
- [0057] 도 2a-2c는 CIIA 유전자를 과발현시킨 생쥐의 제작 방법을 설명한 도면으로, 도 2a는 보통 쥐 및 CIIA 유전자가 과발현된 쥐 (CIIA)의 꼬리에서 genomic DNA를 추출하여 CIIA 유전자 발현 벡터 제작시 표지자로 사용된 Flag를 탐침자 (primer)로 사용하여 PCR을 수행한 사진이고, 도 2b는 보통 쥐 및 CIIA 유전자가 과발현된 쥐 (CIIA)의 요수 부위를 수득하여 표지항체인 플래그 (Flag), 씨아 (CIIA) 및 액틴 (actin)을 이용하여 웨스턴 블롯을 수행한 사진이며, 도 2c는 보통 쥐 및 CIIA 유전자가 과발현된 쥐 (CIIA)의 척수에서 요수 부위 (lumbar segment)를 표지항체인 플래그(Flag)로 면역 염색법을 통해 관찰한 사진이다.
- [0058] 도 3a-3b는 G93A 쥐 및 G93A / CIIA 쥐 사이의 수명 연장 효과를 분석한 도면으로, 도 3a는 8주령된 보통 쥐 (야생형), G93A 쥐 (ALS 표현형), CIIA 쥐 (CIIA 유전자를 과발현시킨 쥐) 및 G93A / CIIA 쥐 (두 가지 표현형을 동시에 발현하는 쥐)의 척수 요수부위의 조직을 hSOD1 및 액틴 (actin)을 이용하여 웨스턴 블롯을 수행한 사진이고, 도 3b는 그룹별로 생쥐들의 생존율을 확률로 계산한 그래프이다.
- [0059] 도 4a-b는 ALS 동물모델에서 CIIA 유전자에 의한 운동능력의 개선효과를 나타내는 도면으로, 도 4a는 각 그룹별 사지의 근력을 테스트하기 위한 PaGE 실험결과를 각 주령별로 나타내는 도면으로, 도면에서 ●: 보통 쥐 (야생형), ○: G93A 쥐 (ALS 표현형), ▼: G93A / CIIA 쥐 (ALS 및 CIIA en 표현형을 모두 발현하는 쥐)를 각각 나타내며, 도 4b는 전반적인 보행 및 조화로운 근육 운동을 수행하는 정도를 테스트하기 위한 로타로드(rotarod) 실험 결과를 각 주령별로 나타내는 도면이다.
- [0060] 도 5a-5b는 ALS 동물 모델에서 CIIA 유전자에 의한 운동신경세포퇴화의 지연에 대한 효과를 나타내는 도면으로

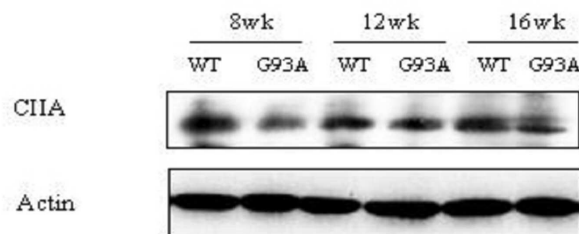
도 5a는 크레실 바이올렛 염색법을 이용하여 보통 쥐, G93A 쥐, G93A / CIIA 쥐의 운동신경세포를 보여주는 그림이고, 도 5b는 각 그룹별로 크레실 바이올렛 염색이 된 살아있는 운동신경세포의 수를 나타내는 그래프이다.

[0061]

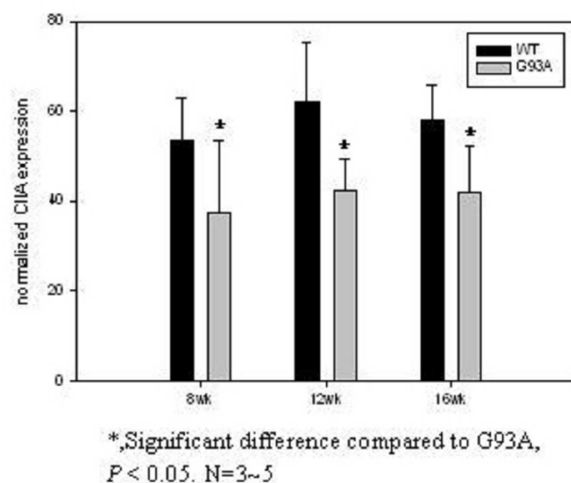
도 6a-6c는 ALS 세포 배양 및 동물 모델에서 CIIA 를 통한 돌연변이된 SOD1 유전자에 의한 ASK1 활성화의 억제 효과를 나타내는 도면으로 6a는 NSC34 세포에서 SOD1 유전자의 돌연변이 (G93A)에 의한 운동성 신경세포의 고사에 대한 CIIA 의 효과를 나타내는 그래프이고, 6b는 NSC34 세포에서 주어진 각 그룹별 ASK1 및 P38 의 정량적 인산화 정도 및 ASK1, 인산화된 p38 (p-p38), p38, CIIA, 및 Tubulin 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행한 사진이다. 도면에서 Line 1 : 야생형 (SOD1 정상) + siGFP (control siRNA), Line 2 : G93A (SOD1 돌연변이) + siGFP (control siRNA), Line 3 : 야생형 (SOD1 정상) + siCIIA (CIIA 단백질의 발현을 줄이는 siRNA), Line 4 : G93A (SOD1 돌연변이) + siCIIA (CIIA 단백질의 발현을 줄이는 siRNA)를 각각 나타내며, 6c는 8주령된 각 그룹별 쥐의 척수 요수부위에서 ASK1 및 P38 의 정량적 인산화 정도 및 ASK1, 인산화된 p38 (p-p38), p38, 및 actin 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행한 사진으로, 도면에서 Line 1 : 보통쥐, Line 2 : G93A (ALS 표현형), Line 3 : CIIA (CIIA 유전자를 과발현시킨 쥐), Line 4 : G93A / CIIA (두 가지 표현형을 동시에 발현하는 쥐)를 각각 나타낸다.

도면

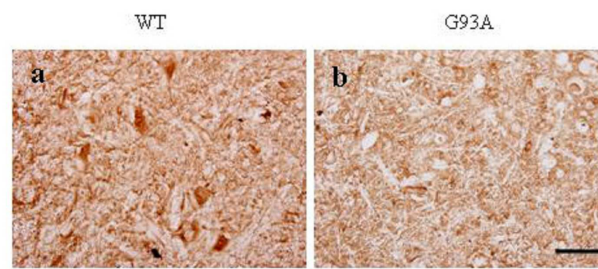
도면1a



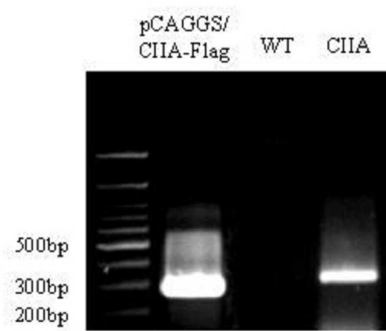
도면1b



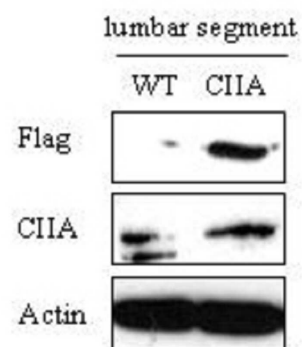
도면1c



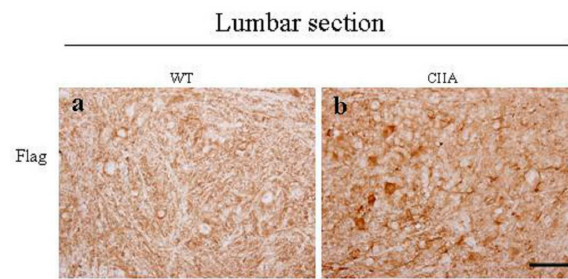
도면2a



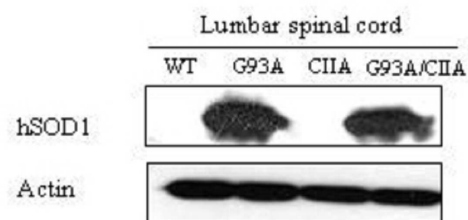
도면2b



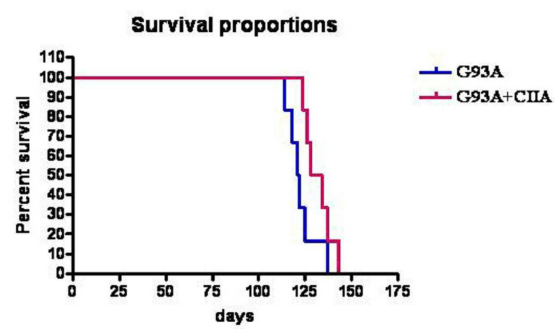
도면2c



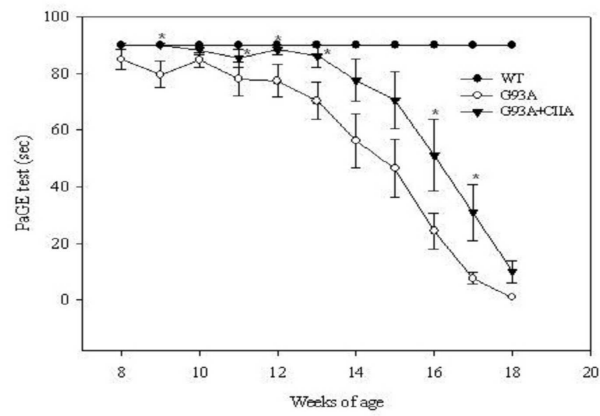
도면3a



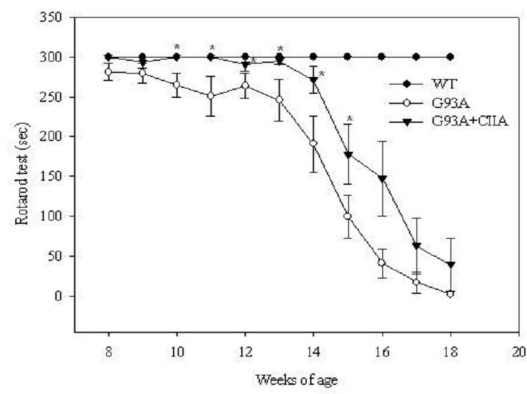
도면3b



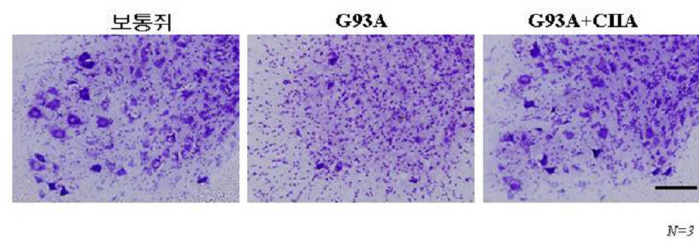
도면4a



도면4b

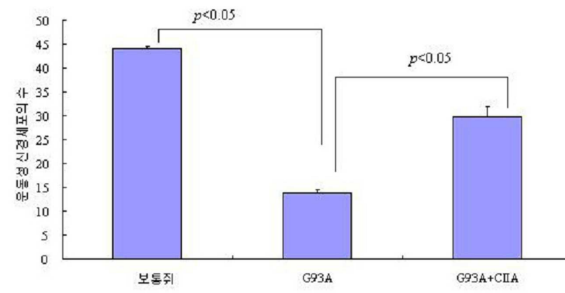


도면5a

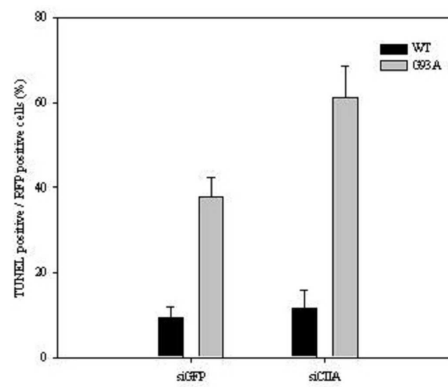


N=3

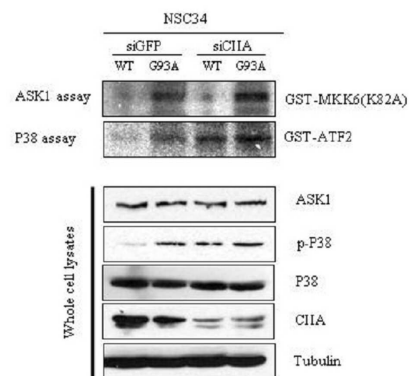
도면5b



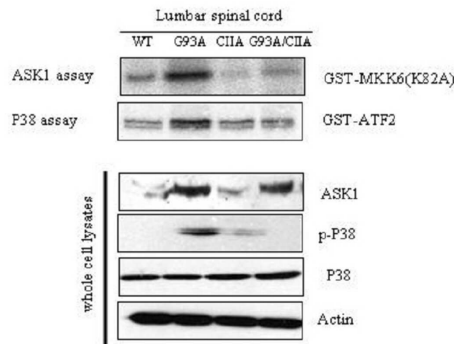
도면6a



도면6b



도면6c



서열목록

<110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
 <120> Composition for treating or preventing motor neuron death or neurodegenerative diseases comprising CIIA

<160> 2

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Mouse CIIA

<400> 1
 Met Phe His Gly Ile Pro Ala Thr Pro Gly Val Gly Ala Pro Gly Asn
 1 5 10 15

Lys Pro Glu Leu Tyr Glu Glu Val Lys Leu Tyr Lys Asn Ala Arg Glu
 20 25 30

Arg Glu Lys Tyr Asp Asn Met Ala Glu Leu Phe Ala Val Val Lys Thr
 35 40 45

Met Gln Ala Leu Glu Lys Ala Tyr Ile Lys Asp Cys Val Thr Pro Asn
 50 55 60

Glu Tyr Thr Ala Ala Cys Ser Arg Leu Leu Val Gln Tyr Lys Ala Ala
 65 70 75 80

Phe Arg Gln Val Gln Gly Ser Glu Ile Ser Ser Ile Asp Glu Phe Cys
85 90 95

Arg Lys Phe Arg Leu Asp Cys Pro Leu Ala Met Glu Arg Ile Lys Glu
100 105 110

Asp Arg Pro Ile Thr Ile Lys Asp Asp Lys Gly Asn Leu Asn Arg Cys
115 120 125

Ile Ala Asp Val Val Ser Leu Phe Ile Thr Val Met Asp Lys Leu Arg
130 135 140

Leu Glu Ile Arg Ala Met Asp Glu Ile Gln Pro Asp Leu Arg Glu Leu
145 150 155 160

Met Glu Thr Met His Arg Met Ser His Leu Pro Pro Asp Phe Glu Gly
165 170 175

Arg Gln Thr Val Ser Gln Trp Leu Gln Thr Leu Ser Gly Met Ser Ala
180 185 190

Ser Asp Glu Leu Asp Asp Ser Gln Val Arg Gln Met Leu Phe Asp Leu
195 200 205

Glu Ser Ala Tyr Asn Ala Phe Asn Arg Phe Leu His Ala
210 215 220

<210> 2
<211> 914
<212> DNA
<213> Mouse CIIA

<400> 2
ctgccgatcg gggttcccg caggcgcagg cggaataaagc gagcacccag cttctgtcgc 60

catctccggg actccaaacg cccaggtct cttgtgtgt atagctgcct gggcctgcag 120

gatgttccac gggatcccg ctactcctgg tgttgagcc cctgggaaca agccggagct 180

gtatgaggaa gtaaagctct acaagaatgc tcgggagcgg gagaagtatg acaacatggc	240
agagctcttt gccgtggiga agacgatgca ggccctggag aaggcgtaca tcaaggactg	300
tgtcaccccc aatgagtaca ctgcagcctg ctccaggctc ctggtccagt acaaagctgc	360
cttccgacag gtccaaggct cagagatcag ctccattgat gaattttgcc gaaagttcag	420
actggactgc ccacttgcta tggagaggat caaagaggac cggcccatca ctatcaaaga	480
cgacaagggc aatctcaacc gctgcattgc agatgttggt tcgctcttca ttacagtcac	540
ggacaagctg cgcttgaga tccgtgccat ggacgagatt cagccagacc tgcgggagct	600
gatggagaca atgcacagaa tgagccacct gcctccagac ttcgagggcc gccagacagt	660
cagccagtgg ctgcagacct tgagtggat gtcggcctct gacgagctgg atgactctca	720
agttcgccag atgctcttcg atctggagtc cgtttacaac gcctttaacc gcttcttaca	780
cgcctaagcc tcaccgagac aggaatgaga gtggtagaga tgtgacgact cagcccccca	840
gtgtgtctac atccgtccta gatgcctata ttgtcaggat atcaccaca ataaatattt	900
gtctaacctt caaa	914