



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년04월22일
(11) 등록번호 10-1256837
(24) 등록일자 2013년04월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0019971
(22) 출원일자 2009년03월09일
심사청구일자 2009년03월09일
(65) 공개번호 10-2010-0101467
(43) 공개일자 2010년09월17일
(56) 선행기술조사문헌
Neurobiology of Aging, Vol. 30, No. 5,
pp759-768 (2007.10.01.)
Brain, Vol. 128, Pt. 8, pp1778-1789
(2005.04.27.)

(73) 특허권자
경북대학교 산학협력단
대구광역시 북구 대학로 80 (산격동, 경북대학교)
(72) 발명자
석경호
대구광역시 수성구 동원로 135, 205동 1705호 (만
촌동, 메트로팰레스)
조제열
대구광역시 수성구 달구벌대로522길 33, e-편한세
상아파트 103동 701호 (만촌동)
이호원
대구광역시 수성구 세진로 6-11, 월드메르디앙
201동 230 (범어동, 5호)
(74) 대리인
김순용

전체 청구항 수 : 총 3 항

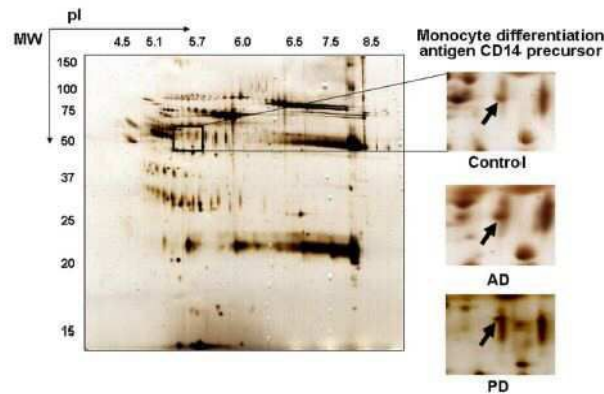
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 가용성 CD14의 파킨슨 병 진단 및 치료용 용도

(57) 요약

본 발명은 퇴행성신경질환에서 과발현되는 것으로 규명된 가용성 CD14의 발현량을 mRNA 또는 단백질 수준에서 측정하는 제제를 포함하는 파킨슨 병 치료용 억제학적 조성물 및 가용성 CD14의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 파킨슨 병에 대한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A060083

부처명 보건복지부

연구사업명 질병중심중개연구

연구과제명 미세아교세포의 분비단백질과 환자 뇌척수액의 단백질 분석을 통한 퇴행성신경질환의 새로운 진단 및 치료법 개발

주관기관 경북대학교

연구기간 2006년 5월 1일 ~ 2008년 3월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

가용성 CD14의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 파킨슨 병에 대한 정보를 제공하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 단백질 수준을 측정하는 제제가 상기 단백질에 특이적인 항체인 것을 특징으로 하는 정보를 제공하는 방법.

청구항 8

제 6항에 있어서, 상기 mRNA 수준을 측정하는 제제가 상기 유전자에 특이적인 프라이머 쌍 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 퇴행성신경질환에서 과발현되는 것으로 규명된 가용성 CD14의 발현량을 mRNA 또는 단백질 수준에서 측정하는 제제를 포함하는 파킨슨 병 치료용 약제학적 조성물 및 가용성 CD14의 mRNA 또는 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 파킨슨 병에 대한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 아교세포는 뇌 세포에서 가장 큰 그룹을 형성하고, 소교세포, 성상세포 및 퓌지교세포를 포함한다. 이들의 역할은 신경세포에 구조적, 대사적 및 영양적 지지를 제공하는 것으로 알려져 있다. 소교세포는 CNS에 존재하는 면역세포이다. 소교세포는 전체 아교세포의 약 10%를 차지한다. 소교세포는 CNS에서 면역 매개자의 주요 세포 소스(source)이다. 소교세포는 질산(NO), 산소종(ROS), 전염증 사이토카인, 케모카인 및 프로스타글란딘을 생산하여 신경면역에 관여하는 것으로 알려져 있다. 소교세포는 뇌의 선천 면역 효과기 세포로서, 침입 병원체를 제거하고, 뇌를 세포 손상 및 독성 단백질로부터 보호한다. 그러나, 만성적 신경면역은 퇴행성신경질

환의 발병기전과 관련이 있다. 최근, CNS의 건강 및 질환과 관련하여 소교세포가 면역 염증에서 중요한 세포로서 주목을 받고 있다. 정상세포도 염증반응에서 중요 인자들을 생산한다. 예를 들어, 정상세포는 PD의 흑색질에서 발생하는 염증 반응에 관여하고 도파민성 신경에서 다수의 신경영양적(neurotrophic) 인자를 분비한다. 그러나, 아교세포의 많은 정상적 영양적 기능은 세포가 진행성 퇴행성신경질환에서 만성적으로 활성화될 때 소실되거나 제거된다. 그러한 질환에서 활성화된 아교세포가 직접 또는 간접적인 염증 공격에 의해 다소 파괴적인 역할을 하는 것이 입증되어 있다.

[0003] 단핵구 분화 항원 CD14 전구체는 GPI(glycosylphosphatidylinositol) 앵코(anchored) 멤브레인 당단백질로서, 고친화적 LPS(lipopolysacchride) 수용체로서 작용한다. CD14는 많은 다른 세포 표면 수용체와 마찬가지로 멤브레인 결합형(GPI-anchored)과 가용성 형태 모두로 존재한다. 멤브레인 CD14(mCD14)는 단핵구의 표면에 발현되는 56kDa의 수용체이다. 가용성 CD14는 2개의 서로 다른 메커니즘에 의해 생산된다. 활성화된 단핵구에 의한 단백질의 절단이 한 메커니즘이다. 따라서, 가용성 CD14는 멤브레인 CD14(56kDa) 보다 더 적다(48-53kDa). 그러나, 분자량이 56kDa 보다 크고 펩타이드 서열도 상이한 또 다른 가용성 CD14가 확인되어 가용성 CD14의 생산에 또 다른 메커니즘이 존재함을 제시하였다. 가용성 수용체는 일반적으로 그들의 리간드 결합능을 보유하고 있으며, 자유 리간드에 대해 멤브레인 결합형과 경쟁한다. CD14가 CNS 면역 및 염증 반응에 관여하는지와 그의 구체적인 역할에 대해서는 알려진 바가 없다.

[0004] 알츠하이머병(Alzheimer's disease; AD) 및 파킨슨병(Parkinson's disease; PD)과 같은 퇴행성신경 질환은 일차적으로 임상소견에 의해 진단되고, 제한된 실험실에서의 분석과 기능적 신경영상화(neuroimaging) 분석에 의해 뒷받침된다. 현재까지 AD 또는 PD에 대해 신뢰할 수 있는 진단 검사는 없다. 퇴행성신경질환과 관련된 몇 개의 바이오마커가 동정되었고, AD의 경우에는 APP(amyloid precursor protein), 카텝신 B 전구체(cathepsin B precursor) 및 β-피브리노젠과 비타민 D-결합 단백질(Vitamin D-binding protein) 또는 세룰로플라스민(ceruloplasmin) 등이 있고, PD의 경우에는 크로모그라닌 B(chromogranin B)와 세룰로플라스민(ceruloplasmin) 또는 아포리포프로테인 H 등이 있다. 그러나, 이렇게 동정된 마커는 단독 또는 조합으로도 민감도 및 특이성이 통상의 임상적 용도를 만족하기에는 불충분하였다(Knopman et al., 2001, Neurology, 56(9), 1143-1153). 따라서, 임상적으로 유용한 신규 바이오마커의 발굴이 절실한 실정이다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0005] 본 발명자는 정상인과 퇴행성신경질환 환자에서 얻은 CSF(cerebrospinal fluid) 단백질을 프로테옴 분석한 결과, 가용성 CD14가 정상인에 비해 퇴행성신경질환 환자에서 유의적으로 과발현되어 퇴행성신경질환의 진단에 이용 가능하고, 또한, 가용성 CD14가 신경세포를 보호하여 퇴행성신경질환 치료에 유용함을 확인하고, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

[0006] 본 발명의 한 목적은 가용성 CD14의 발현량을 mRNA 또는 단백질 수준에서 측정하는 체제를 포함하는 퇴행성신경질환 진단용 조성물은 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 생물학적 시료의 가용성 CD14의 발현 수준을 측정하여 퇴행성신경질환을 진단하는 방법을 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 가용성 CD14를 함유하는 퇴행성신경질환 치료용 약제학적 조성물을 제공하는데 있다.

과제 해결수단

[0009] 본 발명에서는, 퇴행성신경질환 환자에서 얻은 생물학적 시료에서 정상인에 비해 특이적으로 과발현되는 단백질들을 스크리닝하여, 가용성 CD14를 퇴행성신경 질환 진단 마커로 확보하였다.

- [0010] 구체적으로, 본 발명에서는 정상인, 알츠하이머병(Alzheimer's Disease, AD) 또는 파킨슨병(Parkinson's Disease, PD) 환자에서 얻은 CSF(cerebrospinal fluid) 단백질을 SDS-PAGE로 분리하고 인-겔 트립신 소화한 후 LC-MS/MS 분석을 수행하였다. 분석 결과, 가용성 CD14가 정상인에 비해 AD 또는 PD 환자에서 유의적으로 과발현됨을 확인하였다(실시예 2-1).
- [0011] 또한, 정상인, AD 또는 PD 환자에서 얻은 CSF 단백질을 2차원 전기영동으로 분석하고, LC-MS/MS 분석을 통해 정상인과 AD 환자 간에 발현 수준이 상이한 단백질을 동정하였다. 가용성 CD14가 정상인에 비해 AD 환자에서 유의적으로 과발현됨을 확인하였다(실시예 2-1).
- [0012] 아울러, 정상인, AD 또는 PD 환자에서 얻은 CSF에서 가용성 CD14의 단백질 수준을 웨스턴 블랏으로 분석하였다. 예상된 바와 같이, 가용성 CD14가 정상인에 비해 AD 또는 PD 환자에서 유의적으로 과발현되었다(실시예 2-2).
- [0013] 따라서, 본 발명은 가용성 CD14를 퇴행성신경질환의 바이오마커로서 제공한다.
- [0014] 용어, "퇴행성신경질환"은 알츠하이머병, 파킨슨병, 루게릭병(Lou Gehrig's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 노인성 치매 등이 포함되나, 이에 제한되지 않는다.
- [0015] 용어, "퇴행성신경질환의 바이오마커" 또는 "퇴행성신경질환의 마커"란 정상 세포에 비하여 퇴행성신경질환을 가진 세포, 조직 등에서 증가 또는 감소를 보여 퇴행성신경질환을 진단할 수 있는, 유기 생체 분자 물질을 의미하며, 본 발명에서는 가용성 CD14의 발현을 mRNA 수준 또는 단백질 수준에서 확인함으로써, 퇴행성신경질환을 진단할 수 있다.
- [0016] 하나의 양태로서, 본 발명은 가용성 CD14의 mRNA 수준을 측정하는 제제를 포함하는 퇴행성신경질환 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0017] 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 제제는 바람직하게는 프라이머 쌍 또는 프로브이다.
- [0018] 구체적으로, 프라이머는 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3' hydroxyl group)를 가지는 핵산 서열로 상보적인 템플레이트와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고 템플레이트 가닥 복사를 위한 시작 지점으로 기능을 하는 짧은 핵산 서열을 의미한다.
- [0019] 본 발명의 프라이머는 필요한 경우, 분광학적, 광화학적, 생화학적, 면역화학적 또는 화학적 수단에 의해 직접적으로 또는 간접적으로 검출 가능한 표지를 포함할 수 있다. 표지는, 호스래디쉬 퍼옥시다제, 알칼린 포스파타아제 등과 같은 효소, 33P 등과 같은 방사성 동위원소, 바이오틴 등과 같은 화학그룹 및 형광성 분자를 예로 들 수 있다.
- [0020] 프로브는 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있으며 라벨링 되어 있어서 특정 mRNA의 존재 유무를 확인할 수 있는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미한다. 프로브는 올리고뉴클로타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single stranded DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double stranded DNA) 프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있다.
- [0021] 당업자는, 공지된 유전자의 핵산 서열로부터, 표적 유전자내 서열간의 혼성화 정도 등의 변수를 고려하여 상기 유전자의 특정 영역을 특이적으로 증폭하는 프라이머 쌍 또는 상기 유전자의 특정 영역을 특이적으로 인지하는 프로브를 디자인할 수 있다.
- [0022] 또 다른 양태로서, 본 발명은 가용성 CD14의 단백질 수준을 측정하는 제제를 포함하는 퇴행성신경질환 진단용 조성물에 관한 것이다.
- [0023] 유전자의 단백질 수준을 측정하는 제제는 바람직하게는 항체로, 가용성 CD14의 단백질에 대해 특이적으로 결합하는 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태 및 항체 분자의 기능적인 단편, 예를 들어, Fab,

F(ab'), F(ab')₂ 및 Fv를 포함한다.

- [0024] 본 발명의 퇴행성신경질환 진단용 조성물은 당분야에서 널리 사용되는 다른 구성 성분 또는 장치를 추가로 포함하여 퇴행성신경질환 진단용 키트로 응용, 제작될 수 있다.
- [0025] 구체적인 예로서, 상기 유전자에 대한 특이적인 프라이머 쌍 및, 추가적으로 테스트 튜브 또는 다른 적절한 컨테이너, 반응 완충액, 데옥시뉴클레오타이드(dNTPs), Taq-폴리머라아제 및 역전사효소와 같은 효소, DNase 억제제, RNase 억제제, DEPC-수(DEPC-water), 멸균수 등을 포함하여 RT-PCR용 키트로 제작될 수 있다. 또 다른 예로서, DNA 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 DNA 칩용 키트로 제작될 수 있다.
- [0026] 또 다른 예로서, 상기 유전자의 단백질에 대한 특이적인 항체 및, 추가적으로, 결합된 항체를 검출할 수 있는 시약, 예를 들면, 표지된 2차 항체, 발색단(chromophores), 효소 및 그의 기질을 포함하는 ELISA용의 키트로 제작될 수 있다. 또 다른 예로서, 단백질 칩을 수행하기 위해 필요한 필수 요소를 포함하는 단백질 칩용 키트로 제작될 수 있다.
- [0027] 상기 예시한 키트 외에도, 상기 유전자를 검출할 수 있는 래피드 진단 키트로 제작되는 여러 형태의 진단 키트를 포함한다.
- [0028] 또 다른 양태로서, 본 발명은 생물학적 시료의 가용성 CD14의 발현 수준을 측정하여 퇴행성신경질환을 진단하는 방법에 관한 것이다. 구체적으로는, 유전자의 발현 수준을 mRNA 수준 또는 단백질 수준에서 검출할 수 있다.
- [0029] 구체적인 양태로서, 본 발명은 가용성 CD14에 특이적인 프라이머 쌍 또는 프로브를 사용하여 퇴행성신경질환 의심 환자의 생물학적 시료로부터 상기 유전자의 mRNA 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 퇴행성신경질환 진단방법에 관한 것이다.
- [0030] 상기 방법으로 mRNA 수준을 측정하기 위한 구체적 분석 방법으로는 RT-PCR, 경쟁적 RT-PCR, 실시간 RT-PCR, RNase 보호 분석법, 노던블랏팅, DNA 칩 등이 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 또 다른 구체적인 양태로서, 본 발명은 가용성 CD14의 단백질에 특이적인 항체를 사용하여 퇴행성신경질환 의심환자의 생물학적 시료와 접촉시켜 항원-항체 복합체 형성하는 방법으로 단백질 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 퇴행성신경질환 진단방법에 관한 것이다.
- [0032] 상기 방법으로 단백질 수준을 측정하기 위한 구체적 분석 방법으로는, 웨스턴 블랏, ELISA, 방사선면역 분석, 방사면역 확산법, 오우크테로니 면역 확산법, 로케트 면역전기영동, 조직면역 염색, 면역침전 분석법, 보체 고정 분석법, FACS, 단백질 칩 등이 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다. ELISA는 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 표지된 또 다른 항체를 이용하는 직접적 샌드위치 ELISA, 고체 지지체에 부착된 항체와 항원의 복합체에서 항원을 인지하는 또 다른 항체와 반응시킨 후 이 항체를 인지하는 표지된 2차 항체를 이용하는 간접적 샌드위치 ELISA 등의 다양한 ELISA 방법을 포함한다.
- [0033] 진단에 사용되는 생물학적 시료는 특별히 제한되지 않으며, 조직, 세포, 전혈, 혈청, 혈장, 타액, 객담, 뇌척수액, 뇨와 같은 시료 등을 포함할 수 있다. 본 발명에서는 뇌척수액을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0034] 또한, 퇴행성신경질환에 걸리지 않은 시료를 대조군으로 사용하여 시료내의 퇴행성신경질환 의심 환자의 생물학적 시료에서의 유전자 발현량과 비교하는 단계를 포함할 수 있다. 이는 대조군과 생물학적 시료 간의 발현량의 차이는 절대적 또는 상대적 차이로 비교될 수 있다.
- [0035] 상기 예시한 검출 방법들을 통하여, 퇴행성신경질환 마커 유전자의 mRNA 또는 단백질 수준을 정량적으로 분석 가능하고, 이를 통하여 퇴행성신경질환 의심 환자의 퇴행성신경질환 여부를 진단할 수 있다.
- [0036] 한편, 본 발명에서는 LPS 또는 LPS/IFN- γ 로 자극받은 소교세포의 조건화 배지 및 세포 용해물과 성상세포에서 가용성 CD14의 발현을 검출하였다. 이로써, CSF의 가용성 CD14가 아교세포로부터 유래된 것임을 확인하였다(실시예 2-3).
- [0037] 또한, 본 발명에서는 가용성 CD14 단백질의 존재 또는 부재 조건에서 LPS 또는 LPS/IFN- γ 와 정치배양된 소교세포 및 성상세포에서 NO 생산 수준을 조사한 결과, 가용성 CD14 단백질이 상기 세포들의 NO 생산량을

현저하게 감소시킬 뿐만 아니라 상기 세포의 생존율도 증가시키는 것을 확인하였다(실시예 2-4).

[0038] 또한, 본 발명에서는 아교세포를 LPS 또는 LPS/IFN- γ 로 활성화한 후 가용성 CD14 단백질 존재 또는 부재 조건에서 신경세포와 공동배양하였다. 그 결과, 가용성 CD14는 공동배양에서 아교세포에 의한 신경세포의 사멸을 유의적으로 억제하였다. 이러한 결과는 가용성 CD14가 아교세포의 신경독성을 억제함으로써 신경세포를 보호할 수 있음을 의미한다(실시예 2-5).

[0039] 아울러, 가용성 CD14의 존재 또는 부재 조건에서 소교세포를 배양한 후 미생물(자이모산 A 입자)을 넣고 추가로 배양한 결과, 가용성 CD14는 소교세포에 의한 미생물의 포식작용을 촉진함을 확인하였다(실시예 2-6). 소교세포의 포식작용은 세포 데브리시 및 아밀로이드 플라크 제거에 유용하다. 따라서, 가용성 CD14는 특히 아밀로이드 플라크와 연관된 질병인 알츠하이머를 치료하는데 유용할 것이다.

[0040] 결론적으로, 가용성 CD14는 신경세포를 보호하므로 퇴행성신경질환을 치료하는데 이용될 수 있다.

[0041] 상기 퇴행성신경 질환에는 이에 제한되는 것은 아니지만, 알츠하이머병, 파킨슨병, 루게릭병(Lou Gehrig's disease), 헌팅턴병(Huntington's disease), 노인성 치매 등이 포함된다.

[0042] 본 발명의 가용성 CD14를 함유하는 약제학적 조성물은 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등 경구 투여용 제형, 멸균 주사용액, 좌제 및 경피 투여용 제제로 제형화하여 사용될 수 있다. 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 필요에 따라 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제형화한다.

[0043] 한 양태로서, 본 발명의 가용성 CD14는 경구 투여용 고상 제제로 제형화할 수 있다. 경구 투여를 위한 고상 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되는데, 이러한 고상 제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.

[0044] 다른 양태로서, 본 발명의 가용성 CD14를 함유한 약제학적 조성물을 경구 투여용 액상 제제로 제형화할 수도 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 이러한 액상 제제에는 통상적으로 사용되는 불활성 희석제 (예를 들면, 정제수, 에탄올, 리퀴드 파라핀) 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0045] 또 다른 양태로서, 본 발명의 가용성 CD14를 함유한 약제학적 조성물은 비경구, 바람직하게는 복강내 투여를 위한 제제로 제형화될 수도 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 멸균된 수용액으로는 한스 용액(Hank's solution), 링거 용액(Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 적절한 완충용액을 이용할 수 있으며, 비수성용제로, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 이용될 수 있다. 필요에 따라 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제를 이용할 수도 있다. 한편, 좌제의 경우에는 이의 통상적인 기제인 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0046] 상기와 같은 방법으로 제형화된 조성물은 유효량으로 비경구 또는 경구(경피, 피하, 정맥, 근육, 복강 등)를 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 상기에서 "유효량"이란 환자에게 투여하였을 때, 예방 또는 치료 효과를 나타내는 양을 말한다. 본 발명에 따른 조성물의 투여량은 투여 경로, 투여 대상, 연령, 성별, 체중, 개인차 및 질병 상태에 따라 적절히 선택될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있으나, 바람직하게는 1~10000 μ g/체중kg/day, 보다 바람직하게는 10~1000 μ g/체중kg/day의 유효량으로 투여될 수 있다.

효 과

[0047] 본 발명에 의하면, 퇴행성신경질환에서 특이적으로 과발현되는 가용성 CD14의 발현을 mRNA 또는 단백질

수준에서 측정함으로써 퇴행성신경질환을 간편하고 효과적으로 진단할 수 있다.

[0048] 또한, 가용성 CD14는 신경세포 보호작용을 가지는 것으로 규명된 바, 퇴행성신경질환을 치료하는데에도 유용하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0049] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0050] <실시예 1>

[0051] 1-1. 뇌척수액 시료

[0052] CSF 시료는 경북대학교 병원(KNUH)의 신경학과로부터 입수하였다. 총 17개의 CSF 시료를 입수하여 프로테오믹 분석에 이용하였다: 5명의 AD 환자는 71±12(mean±SD)세이었고, 6명의 PD 환자는 66.2±7.7세이었고, 6명의 정상인은 55.3±12.9세이었다. CSF 시료의 이용은 KNUH 윤리 위원회의 승인을 받았다. AD는 NINCDS-ADRDA(National Institute of Neurologic and Communicative Disorders and Stroke - AD and Related Disorder Association)를 기초로 표준 임상 기준에 따라 진단되었다(McKhann et al. 1984, Neurology, 34(7), 939-944). PD는 NINDS(National Institute of Neurological Disorders and Stroke) 진단 기준을 기초로 진단하였다(Gelb et al. 1999, Arch. Neurol. 56(1), 33-39). CSF 시료는 1ml씩 나누어 사용시까지 -70℃에서 보관하였다. 각 CSF 시료는 웨스턴 블랏 분석에 이용되었고, 풀(pooled) 시료는 그 외 모든 분석에 이용되었다. 풀 시료를 분석하는 것이 개별 시료보다 생산적이고 재현성이 있기 때문에 초기 프로테오믹 분석은 풀 시료로 수행하고 개별 시료를 이용하여 웨스턴 블랏으로 재확인하였다.

[0053] 1-2. 프로테움 분석을 위한 시료의 준비

[0054] CSF 시료를 -20℃에서 하룻밤동안 TCA(trichloroacetic acid)와 아세톤의 혼합물(아세톤에 녹인 10% TCA 및 10mM DTT)로 침전시켰다. 이렇게 얻은 단백질 침전물을 아세톤에 녹인 20mM DTT로 2회 세척하고 30μl의 용해 완충액(7M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 10μl의 protease inhibitor mix 및 40mM DTT)에서 용해하였다. 단백질의 농도는 Bio-Rad 단백질 측정 키트로 결정하였다. 동량의 3개의 CSF 시료(각각 20μg)를 초기 LC-MS/MS 및 2-DE 분석에 사용하였다. 각 CSF 시료에서 가용성 CD14의 수준은 웨스턴 블랏으로 분석하였다.

[0055] 1-3. 1차원 겔 전기영동(1-DE) 및 쿠사미 염색

[0056] 1-DE 및 쿠사미 염색은 공지된 바에 따라 수행하였다(Kim et al. 2007, J. Neurochem, 103(6), 2640-2650). 즉, CSF 단백질을 환원 SDS 시료 완충액(63mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glycerol, 0.005% bromophenol blue 및 1:20(v/v) β-mercaptoethanol)에 넣고 3분간 끓여주고 10% 폴리아크릴아미드 겔에서 전기영동에 의해 분리하였다. 전기영동 후 쿠사미 브릴리언트 G-250 염색 용액으로 염색하여 단백질을 시각화하였다. 그리고 겔 트립신 소화를 위해 전체 겔 레인을 동일한 크기의 10-15 슬라이스로 잘라내었다.

[0057] 1-4. 인 겔 트립신 소화

[0058] 절단된 겔 슬라이스를 0.1M 암모늄 비카르보네이트 및 0.1M 암모늄 비카르보네이트에 녹인 50%(v/v) 아세트니트릴로 세척하여 잔류 SDS와 쿠사미 블루 염료를 완전히 제거하였다. 탈염색된 겔 슬라이스는 아세트니트릴에서 탈수시켜 수축시키고 진공 원심분리기에서 건조시켰다. 수축된 겔 슬라이스내 단백질을 25mM 암모늄 비카르보네이트(pH 8.0)에 녹인 트립신으로 10:1(wt/wt)의 기질/효소의 비율로 처리하여 하룻밤 동안 소화시켰다. 물에 녹인 0.1% 포름산을 첨가하여 효소 반응을 중지시켰다. 겔 슬라이스로부터 펩타이드는 10분간 소니

케이션(sonication)으로 추출하였고, 펩타이드를 함유한 상등액을 새로운 시험관에 옮겨놓았다.

[0059] 1-5. LC-MS/MS(Liquid chromatography and tandem mass spectrometry) 분석

[0060] 역상 액체 크로마토그래피(reversed phase-liquid chromatography, RP-LC)가 장착된 LC-MS/MS 시스템이 프로테옴 분석에 이용되었다. 상기 시스템은 서베이어 MS 펌프(Surveyor MS pump, Thermo Electron, San Jose, CA), 스파크 자동 샘플러(Spark auto-sampler, EMMEN, The Netherlands) 및 나노스프레이 이온화(nanospray ionization; NSI) 소스가 장착된 핀니간 LTQ 리니어 이온 트랩 질량 스펙트로미터(Finnigan LTQ linear ion trap mass spectrometer, Thermo Electron, San Jose, CA)로 구성되어 있다. 0.1% 포름산 12 μ l에 녹인 트립신으로 소화된 펩타이드를 LC-MS/MS 분석을 위해 주입하였다. 우선 펩타이드 농축 및 탈염을 위해 소화된 시료를 펩타이드 캡트랩 카트리지(CapTrap cartridge)에 주입하고, 상기 펩타이드를 역상(reverse phase; RP) 컬럼 상에서 소수성에 따라 분리하기 위해, 5 μ m, 직경 300Å의 C18 실리카겔이 하우스 안에 충전되어 있는 RP 컬럼에 로딩하였다. 상기 RP 컬럼은 전자분사(electrospray)용 이온 트랜스퍼 튜브 바로 정면에 설치하였다. 이동상으로는 용액 A(H₂O)와 B(아세토니트릴, ACN)를 각각 사용하였으며, 상기 두 용액은 모두 0.1%(v/v) 포름산을 함유하였다. 유속은 200nL/min으로 유지하였다. 용매 그래디언트는 5% B 용액으로 시작하여 43분 내에 65% B 용액까지 리니어 그래디언트를 수행한 다음 7분간 80% B 용액으로 끌어올린 후 그 다음 10분간 100% A 용액을 사용하였다. 질량 스펙트로미터는 각각의 전체 MS 스캔 후 5개의 MS/MS 스캔이 이루어지는 데이터-의존 모드(m/z 300-1800)로 작동시켰다. 상기 모드에서는 5개의 가장 많은 펩타이드 분자 이온이 35%의 표준화된 충돌 에너지를 이용한 충돌-유도 분리(collision-induced dissociation; CID)를 위한 이전의 스캔으로부터 선별된다. 가열된 모세관의 온도 및 전자분사 전압은 각각 195°C 및 2.0kV였다.

[0061] 1-6. 생물정보 분석

[0062] 모든 MS/MS 데이터를 바이오위크스 소프트웨어(버전 3.2)가 포함된 SEQUEST 알고리즘(Thermo Electron, San Jose, CA)을 이용하여 IPI 인간 단백질 데이터베이스(버전 3.16)에서 검색하였다. 상기 데이터베이스 검색은 시스템인 잔기(57Da) 상의 카르복시아미도메틸레이션(carboxyamidomethylation) 및 메티오닌 잔기(16Da)상의 옥시데이션(oxidation)의 다양한 수식과 펩타이드 질량 오차 2Da 및 단편 질량 오차 1Da를 허용한다. 상기 데이터베이스 검색은 트립신 절단에 의해 생성되는 펩타이드에 한정된다. 상기 SEQUEST 결과를 전하 단계에 대한 Xcorr에 의해 필터링하였다. Xcorr값은 단독으로 이온화된 이온의 경우 1.9, 이중으로 이온화된 이온의 경우 2.2 및 3중으로 이온화된 이온의 경우 3.75와 일치되도록 사용하였다. 델타 Cn \geq 0.1 및 Rsp \leq 4 및 확률 점수(Probability score) \geq 1.0E-3으로 셋팅하였다. 단백질 동정은 해당 펩타이드 동정에 기초한다. 본 실시예에서는 둘 이상의 펩타이드에 의해 동정된 단백질을 양성 동정으로 간주하였다. 단백질 동정 후 각 데이터세트에 대하여 인하우스 분석 프로그램인 ProtAn을 이용하여 공지의 감산 프로테오믹 분석(Dieguez-Acuna et al. 2005, Mol. Cell. Proteomics, 4(10), 1459-1470; Oh et al. 2004, Nature, 429(6992), 629-635)을 약간 변형하여 수행하였다.

[0063] 1-7. 이차원 전기영동(2-DE) 및 단백질 동정

[0064] 2-DE 분석은 공지된 방법에 따라 수행하였다(Son et al. 2005, Biochem. Pharmacol. 70(4), 590-597). 즉 IEF(isoelectric focusing)를 공지 방법(West et al. 2001, Exp. Eye Res. 73(4), 479-491)을 약간 변형하여 20°C에서 IPGphor/IsoDalt 시스템 (Amershan Biosciences)을 이용하여 실시하였다. IPG 겔 스트립(Amershan Biosciences)을 60 μ g의 단백질을 함유한 팽윤 용액(7M urea, 2M thiourea, 2% CHAPS, 100mM DTT, 0.5% IPG 완충액 및 bromophenol blue)에서 12시간 동안 20°C에서 재수화하였다. IEF는 200V에서 1시간, 500V에서 1시간, 1000V에서 1시간, 1000V에서 1시간, 8000V에서 30분간, 45000Vh로 진행하였다. 그 후, IPG 스트립을 15분간 평형 완충액 1(50mM Tris-HCl (pH 8.8), 6M urea, 30% 글리세롤, 2% SDS, 10mg/ml DTT 및 브로모페놀 블루)에서, 그리고 15분간 평형 완충액 2(50mM Tris-HCl (pH 8.8), 6M urea, 30% 글리세롤, 2% SDS, 2% 이오도아세토아미드 및 브로모페놀 블루)에서 평형시켰다. 두 번째 전기영동을 위해 1.5mm의 수직 슬랩 겔(12% SDS PAGE)을 준비한 후 평형시킨 IPG 겔 스트립을 0.5% 아가로스 용액으로 충전된 겔에 위치시켰다. 겔 전기영동을 16°C에서 5mA/cm로 1시간 동안, 그리고 10mA/cm로 브로모페놀 블루가 겔의 바닥에 도달할 때까지 수행하였다. 겔을 50% 메탄올과 12% 아세트산에서 1.5시간 동안 고정하였다. 단백질을 공지된 바(Shevchenko et al.

1996, Anal. Chem. 68(5), 850-858)에 따라 은 염색으로 검출하였다. 단백질은 전술된 바와 같이 LC-MS/MS로 동정하였다.

[0065] 1-8. 2-DE 겔 이미지 분석

[0066] 스캔된 2-DE 겔 이미지는 Melanie 소프트웨어 패키지 v6.0(GeneBio, Geneva, Switzerland)을 이용하여 표준 프로토콜로 분석하였다. 9개의 이미지를 3개의 그룹(대조군, AD 군 및 PD 군)으로 나누어 스팟의 검출과 매칭을 위해 Melanie v6.0에 도입하였다. 자동으로 검출된 스팟은 기계적 결함을 제거하기 위해 수동으로 편집하였다. 일관되게, 각 그룹(대조군, AD 및 PD)별로 3개의 겔에 존재하는 스팟을 조합하여 합성 겔을 제작하였다. 그 다음, 3개의 겔 각각으로부터 유래된 스팟을 합성 겔의 스팟에 매칭하였다. 소프트웨어에 의해 검출된 매칭은 명백히 잘못되거나 잘못된 매칭을 교정하기 위해 수동으로 편집하였다. 각 겔에서 각각의 매칭된 2-DE 스팟의 통합된 광학 밀도(% 부피)는 스프레드시트 파일로 출력되었다. 스팟이 겔에서 검출되지 않았다면, 후속된 통계 분석(Finehout et al. 2007, Ann. Neurol. 61(2), 120-129)에서 제로 백분율 부피를 부여하였다.

[0067] 1-9. 웨스턴 블랏 분석

[0068] 개별 CSF 시료를 전술된 바와 같이 준비한 후 웨스턴 블랏하여 CD14를 검출하였다. 아교세포 조건화 배지 또는 세포 추출물을 공지된 바(Lafon-Cazal et al. 2003, 278(27), 24438-24448)를 약간 변형하여 준비한 후 가용성 CD14를 웨스턴 블랏으로 검출하였다. 구체적으로 설명하면, 먼저 100mm 배양 디쉬에서 배양한 아교세포를 무혈청 배양 배지로 5회 세척하여 모든 혈청 단백질을 제거하였다. 세포를 최소량(부피)의 무혈청 배지로 커버한 다음 LPS(100ng/ml)와 IFN- γ (50unit/mo)로 24시간 동안 37°C에서 처리하였다. 조건화 배지를 회수한 후 2,000 xg(5분), 15,600 xg(10분)에서 연속적으로 원심분리하여 비접착 세포와 데브리스(debris)를 제거하였다. 그 후 시료를 -20°C에서 하룻밤동안 TCA(trichloroacetic acid)와 아세톤의 혼합물(아세톤에 녹인 10% TCA 및 10mM DTT)로 침전시켰다. 조건화 배지를 제거한 후 PBS를 넣고 잔류 세포를 떼어낸 후 2000 xg(10분)에서 원심분리하였다. 그 다음 세포를 프로테아제 억제제의 혼합물(Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)을 함유한 얼음으로 차갑게 한 용해 완충액(50mM Tris-HCL, pH 8.0, 150mM NaCl, 0.02% sodium azide, 0.1% SDS, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate)에 재현탁하였다. 세포 용해 후 시료를 13,400 xg(10분)에서 원심분리하고 상층액을 분석에 이용하였다. 조건화 배지 및 세포 추출물에서 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 측정 키트를 이용하여 결정하였다. 각 샘플별로 동량의 단백질을 10% SDS-PAGE로 분리하고 Hybond ECL 니트로셀룰로스 멤브레인(Amersham Biosciences)으로 전이하였다. 멤브레인을 5% 스킵 밀크로 블로킹하고, 일차 항체[고오트 다클론 항-사람 CD14 항체(Santa Cruz Biotech; Santa Cruz, CA), 래트 단클론 항-마우스 CD14 항체(BD Bioscience; Franklin Lakes, NJ) 및 마우스 단클론 항- α -투블린 항체(Sigma; St. Louis, MO)]와 HRR가 접합된 이차 항체(항-고오트, -마우스, -래트 IgG; Amersham Biosciences)로 정치배양한 후 발광 이미지 분석기(LAS-1000; Fujifilm, Tokyo, Japan)을 이용하여 ECL 검출(Amersham Biosciences)을 수행하였다. 블랏을 스트리핑 완충액(stripping buffer; 2% SDS, 100mM beta-mercaptoethanol, 50mM Tris pH 6.8)에서 약하게 진탕하면서 50°C에서 30분 동안 정치배양하여 스트리핑한 후 투블린을 검출하였다. 블랏을 TBS로 수회 행귀주었다.

[0069] 1-10. 시약과 세포 배양

[0070] LPS는 Sigma Chemical Co로부터 입수하였다. 재조합 가용성 CD14는 Biometec(Greifswald, Germany)으로부터 수득하였다. 재조합 마우스 IFN- γ 를 R&D Systems(Minneapolis, MN)로부터 구입하였다. 달리 언급하지 않는 한 모든 다른 시약들은 Sigma로부터 구입하였다. BV-2 소교세포(Blasi et al. 1990. J. Neuroimmunol 27(2-3):229-237)는 10% FBS(fetal bovine serum), 페니실린-스트렙토마이신(100U/ml, Gibco, Gaithersburg, MD)이 보충된 DMEM에서 배양하고 유지하였다. 모든 아교세포는 LPS(100ng/ml), IFN- γ (50units/ml) 및 가용성 CD14 단백질 (10-20ng/ml)으로 단독 또는 조합으로 처리되었다. C6 래트 신경아교종 세포주를 5% FBS, 2mM 글루타민 및 페니실린-스트렙토마이신(100U/ml, Gibco)을 함유한 DMEM에서 배양하였다. U87MG 사람 신경아교종 세포주를 10% FBS, 페니실린-스트렙토마이신(100U/ml, Gibco)이 보충된 DMEM에서 배양하고 유지하였다. B35 래트 신경모세포종을 10% FBS, 페니실린-스트렙토마이신이 보충된 DMEM에서 배양하고 유지하였다.

[0071] 마우스 일차 소교세포 배양물을 공지된 바(Saura et al. 2003, Glia 44(3):183-189)를 약간 변형하여 온화한 트립신 처리에 의해 준비하였다. 구체적으로 설명하면, 먼저 신생 ICR 마우스의 전뇌를 기계적 분해에

의해 효평하고 분해한 후 나일론 메쉬로 걸러주었다. 세포를 폴리-L-리신이 코팅된 플라스크에 접종하였다. 10-14일 동안 생체의 배양한 후 혼합된 아교세포 배양물로부터 소교세포를 온화한 트립신 처리로 분리하였다. 혼합된 아교세포 배양물에, 트립신 용액(HBSS에 녹인 0.25% 트립신, 1mM EDTA)을 1mM CaCl₂를 함유하는 PBS로 1:4로 희석하여 처리해서 30-60분간 정치배양하였다. 이렇게 함으로써 상층부의 정상세포가 한 조각으로 탈착되고, 소교세포는 배양 플라스크의 바닥에 부착된 상태로 남아있다. 소교세포 배양물의 순도는 이소렉틴(isolectin) B4 염색으로 확인한 바, 95% 이상이었다. 상기 방법으로 정제된 소교세포는 통상의 진탕 방법으로 준비된 소교세포와 유사한 구조 및 기능적 특징을 나타내었다(Saura et al. 2003, *Glia* 44(3):183-189). 정상 세포는 혼합된 아교세포 배양물을 250rpm에서 하룻밤동안 진탕함으로써 분리하였고, 배양 배지는 공지된 바에 따라 제거하였다(McCarthy and de Vellis 1980, *The Journal of cell biology* 85(3):890-902; Suk et al. 2001, *Brain Research* 900(2):342-347). 정상세포 배양물의 순도는 GFAP(glial fibrillary acidic protein) 면역세포화학 염색으로 확인한 바, 95% 이상이었다.

[0072] 본 실시예에서 이용된 동물은 실험동물 관리 및 이용에 관한 NIH 지침서에 공개된 지침에 따라 획득되고 관리되었다. FBS는 Lonza Inc로부터 구입하였다. FBS에 대한 내독소 검사를 Kinetic-QCL 측정법이라고도 알려진 quantitative kinetic chromogenic assay를 이용하여 수행하였다. 검증된 KQCL 검사는 내독소가 검출되지 않았다는 것을 보여주었다($\leq 0.5\text{EU/ml}$ 로 기록됨).

[0073] 1-11. RT-PCR

[0074] 전체 RNA는 TRIZOL 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA)으로 제조업자의 프로토콜에 따라 준비하였다. RT-PCR 증폭은 CD14에 특이적인 프라이머 세트를 이용하여 55°C의 어닐링 온도에서 35회 수행되었다. β -액틴에 대한 PCR은 53°C의 어닐링 온도에서 25회 수행되었다. 프라이머의 뉴클레오타이드 서열은 마우스 CD14 및 β -액틴의 공개된 cDNA 서열을 기초로 작제되었다[CD14 포워드: 5'-CTG ATC TCA GCC CTC TGT CC-3'(서열번호: 1); CD14 리버스: 5'-GCA AAG CCA GAG TTC CTG AC-3'(서열번호: 2); β -액틴 포워드: 5'-ATC CTG AAA GAC CTC TAT GC-3'(서열번호: 3); β -액틴 리버스: 5'-AAC GCA GCT CAG TAA CAG TC-3'(서열번호: 4)]. PCR 반응은 DNA Engine Tetrad Peltier Thermal Cycler(MJ Research, Waltham, MA)를 이용하여 94°C에서 30초 동안 변성, 55°C에서 30초 동안 어닐링, 72°C에서 1분 동안 연장으로 진행하였다. PCR 산물의 분석을 위해, 각 PCR 산물 10 μ l를 1% 아가로스 겔에서 전기영동하고 UV 광하에서 검출하였다. β -액틴은 내부 대조군으로서 이용되었다.

[0075] 1-12. MTT 측정에 의한 세포독성 분석

[0076] 세포(5×10^4 세포 in 200 μ l/구)를 96구판에 접종하고 지정된 시간 동안 다양한 자극소로 처리하였다. 처리 후 배지를 제거한 다음 MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 0.5 mg/ml를 첨가하고, CO₂ 배양기에서 2시간 동안 37°C에서 정치배양하였다. 불용성 결정을 DMSO로 완전히 용해한 후 마이크로플레이트 리더(Anthos Labtec Instruments GmbH; Salzburg, Austria)를 이용하여 570nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[0077] 1-13. 질산의 정량분석

[0078] 세포를 96 구판에 넣고 자극소로 처리한 후 배양물 상층액에서 NO₂⁻를 측정하여 NO 생산 수준을 분석하였다. 96 구판에 50 μ l의 시료 방울을 넣고 50 μ l의 그리스 시약(Griess reagent; 1% sulfanilamide/0.1% naphthylethylene diamine dihydrochloride/2% phosphoric acid)을 첨가한 후 25°C에서 10분 동안 정치배양하였다. 마이크로플레이트 리더(Anthos Labtec Instruments GmbH)를 이용하여 540nm에서의 흡광도를 측정하였다. NaNO₂는 NO₂⁻ 농도를 계산하는데 기준으로서 이용되었다.

[0079] 1-14. 아교세포와 신경세포의 공동 배양

[0080] 공동 배양 실험을 위해, 아교세포를 96 구판에 1.5×10^4 세포/구의 농도로 3중으로 접종하였다. 아교

세포를 LPS 또는 LPS/IFN- γ 로 30분간 전처리하였다. 그 후 배양 배지를 버리고 20ng/ml의 재조합 가용성 CD14 단백질을 EGFP(enhanced green fluorescent protein)를 안정적으로 발현하는 B35 래트 신경모세포종(3.75 x 10⁴ 세포/구)과 함께 넣고 24시간 동안 공동 배양하였다. 공동 배양에서 아교세포 대 신경모세포종의 수적 비율은 1:2.5이었다. 그 후, EGFP 양성 세포를 형광 현미경(Olympus IX70, Tokyo, Japan) 하에서 계수하였다. 구당 3개의 임의적으로 선택된 필드의 이미지를 캡처하여 MetaMorph 이미징 시스템(Univertal Imaging Corp, West Chester, PA)으로 분석하였다. 모든 형광 세포를 형광 강도와 상관없이 계수에 포함시켰다.

[0081] 1-15. 포식작용 분석

[0082] BV-2 소교세포 공지된 바(Duffield et al. 2000, J. Immunol 164(4):2110-2119)에 따라 CMFDA(Molecular Probes Inc., Eugene, OR)로 라벨링하였다. 라벨링된 세포를 측정 18시간 전에 커버슬립당 7.5 x 10⁴ 세포의 농도로 접종하였다. 세포를 무혈청 DMEM에 넣고 20ng/ml의 가용성 CD14로 1시간 동안 전처리하거나, 하지 않았다. 그리고 세포를 Alexa Fluor 594가 접합된 자이모산 A(zymosan A, 사카로마이세스 세레비시애) Bioparticles(Molecular Probes) 30 μ g/ml로 3시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 정지배양하였다. 그 후 세포를 얼음으로 차갑게 한 PBS로 5회 세척하여 부착 입자를 제거하고 PBS에 녹인 4% 포름아미드로 실온에서 10분 동안 고정하였다. 커버슬립을 실온에서 10분 동안 건조시키고, 수용성 퍼머넌트 봉입제(DakoCytomation; Trappes, France)를 이용하여 표본제작하고, 형광 현미경(Axioplan2 imaging, Carl Zeiss, Jena, Germany) 또는 공초점 현미경(LSM 510, Carl Zeiss)하에서 시각화하였다. 세포는 3번의 개별 실험에서 3개의 임의 필드에서 계수되었다. 슬라이드 당 최소 400개의 세포가 공지된 바와 같이 계수되었다(Magnus et al. 2001, J Immunol 167(9):5004-5010; Shah et al. 2008, J Immunol 180(5):2777-2785).

[0083] <실시예 2>

[0084] 2-1. CSF의 프로테오믹 분석

[0085] 종래에는 CSF에서 바이오마커를 동정하기 위해 LC-MS/MS와 2-DE 분석을 개별적으로 이용하였다. 본 발명에서는 각 방법의 장점을 활용하기 위해 LC-MS/MS와 2-DE를 조합하였다. 정상인(n=3), AD 환자(n=3) 또는 PD 환자(n=3) 유래 풀(pool) CSF 단백질을 SDS-PAGE로 분리하고, LC-MS/MS 분석하였다. 상기 분석을 4회 반복하였고, 4회의 실험에서 단백질 분화 항원 CD14 전구체의 가용성 형태가 정상인과 환자간에 일관되게 상이한 수준을 보였다(표 1). 단백질은 적어도 2개의 펩타이드를 가지는 기준을 충족하는 것을 기초로 동정되었다.

표 1

[0086] 대조군, AD 환자 및 PD 환자의 CSF에서 동정된 가용성 CD14

	대조군에서 펩타이드 개수	AD에서 펩타이드 개수	PD에서 펩타이드 개수
1회 분석	0	9	14
2회 분석	0	8	9
3회 분석	0	확인되지 않음	2
4회 분석	0	5	9

[0087] 2-2. 2-DE에 의한 CSF의 분석

[0088] 풀(pool) CSF는 2-DE로 다시 분석되었다. 2-DE 분리 후 스캔된 2-DE 겔 이미지는 Melanie v6.0 소프트웨어를 이용하여 정량적으로 분석하였다. 각 시료의 2-DE 분리는 3회 반복하였고 합성 이미지를 만들어 스팟 강도를 정량 분석하였다. 겔은 검증된 스팟의 총 양에 따라 표준화되었다 : 멤버 겔(member gel)에 있는 각 스팟의 가공하지 않은 강도를 합성 겔에 포함된 겔에 있는 모든 스팟의 총 강도로 나누었다(Hansson et al.,

2004, *Proteome Sci.* 2(1), 7). 단백질 분해 항원 CD14 전구체의 가용성 형태는 단백질 스팟의 LC-MS/MS에 의해 동정되었으며(도 1), 이의 강도는 표 2에 나타난 바와 같이 정상인과 환자간에 2배 이상 차이가 났다.

표 2

[0089] 2-DE 분석에 의한 대조군에 대한 AD 및 PD 환자에서 가용성 CD14의 증가

이론적 pI	이론적 MW(kDa)	대조군에서 표준화된 스팟 강도 (mean±S.D.)	AD에서 표준화된 스팟 강도 (mean±S.D.)	PD에서 표준화된 스팟 강도 (mean±S.D.)	변화 배수 (AD/대조군)	변화 배수 (PD/대조군)
5.28	53.00	36.5±3.54	80.6±3.04	80.5±17.6	2.21	2.20

[0090] 2-3. CSF 및 아교세포 배양물에서 가용성 CD14의 웨스턴 블랏 검출

[0091] CSF 단백질의 총체적 분석으로부터 얻은 결과를 검증하기 위해, 정상인(n=4) 또는 환자(AD, n=4; PD, n=5) 유래 각각의 CSF를 SDS-PAGE로 분리하고 가용성 CD14로 프로브하였다. 웨스턴 블랏 분석에 의해 정상인에 비해 AD 및 PD 환자에서 높은 수준의 CD14가 확인되었다(도 2). 피어슨 곱적률 상관계수(pearson product-moment correlation coefficient)를 이용하여 연령과 CD14 수준의 상관관계를 평가하였다. 피어슨 γ 값은 대조군과 AD군 간에 또는 대조군과 PD 간에 각각 0.334 또는 0.284이었다. 따라서, 정상인과 환자간에 연령과 CD14 수준간에는 상관관계가 없거나 최소한이었다.

[0092] CSF의 가용성 CD14가 아교세포로부터 유래된 것인지 여부를 분석하기 위해 아교세포 조건화 배지 또는 세포 용해물을 조사하였다. 아교세포주 및 일차 아교세포 배양물을 모두 이용하여 배양된 세포를 모델로 사용하여 얻은 결과를 강화하였다. CD14 항체에 의한 ~53kDa 밴드의 검출은 BV-2 소교세포(도 3A) 또는 일차 소교세포 배양물(도 3B)의 조건화 배지 및 세포 용해물 모두에서 가용성 CD14의 한 형태가 존재함을 의미한다. 단백질 수준은 소교세포에서 LPS와 IFN- γ 의 자극에 의해 현저하지는 않으나, 약간 증가하였다. 소교세포 조건화 배지 및 세포 추출물에서 가용성 CD14 발현의 검출은 소교세포가 CNS에서 가용성 CD14의 세포 소스(source)일 수 있다는 것을 제안한다. 가용성 CD14는 정상세포 배양 배지에서 검출되는 것으로 알려져 있다(Cauwels et al. 1999, *J Immunol* 162(8):4762-4772; Deininger et al. 2003, *Acta neuropathologica* 106(3):271-277). 그러나, 가용성 CD14는 일차 정상세포 배양물, C6 래트 신경아교종세포주 또는 U87MG 사람 신경아교종세포주의 배양 배지에서 검출되지 않았다. 그럼에도, CD14 mRNA 발현은 일차 정상세포 뿐만 아니라 BV-2 소교세포주 모두에서 용이하게 검출되었다(도 3C). 이러한 결과에 의하면, 아교세포주에서 가용성 CD14의 존재는 아교세포가 사람 CSF에서 CD14 단백질의 소스임을 의미한다.

[0093] 2-4. 가용성 CD14에 의한 아교세포의 NO 생산 및 세포 사멸의 조절

[0094] LPS 또는 LPS/IFN- γ 로 자극받은 BV-2 마우스 소교세포, 일차 소교세포 배양물, C6 래트 신경아교종세포주 또는 일차 정상세포 배양물에서 NO 생산에 대한 가용성 CD14 단백질의 효과를 조사하였다. NO 생산은 아교세포의 염증 활성화를 나타내고, 아교세포 활성화의 척도로서 이용되어 왔다(Byrnes et al. 2009, *Glia*, 57(5):550-560; Chang et al. 2008, *Biochemical pharmacology* 76(4):507-519; Meng et al. 2008, *International immunopharmacology* 8(8):1074-1082; Walter et al. 2007, *Cell Physiol Biochem* 20(6):947-956). 10-20ng/ml의 재조합 가용성 CD14 단백질은 LPS 또는 LPS/IFN- γ 로 자극받은 소교세포 또는 정상세포에서 NO 생산의 수준을 현저하게 감소시켰다(도 4). 그러나, 가용성 CD14는 소교세포 또는 정상세포 모두에서 NO 생산의 최저(basal) 수준에는 유의적인 영향을 미치지 못하였다. 소교세포 및 정상세포의 연장된 자극은 아폽토시스를 유발하는 것으로 알려져 있다(Lee et al. 2001 *The Journal of biological chemistry* 276(35):32956-32965; Suk et al. 2002 *The Journal of neurochemistry* 80(2):230-238). BV-2 세포, C6 세포, 일차 소교세포 또는 정상세포의 배양물의 LPS 또는 LPS/IFN- γ 로의 자극은 세포 생존율을 유의적으로 감소시켰으나, 이는 가용성 CD14에 의해 부분적으로 반전되었다(도 4B). 이러한 결과는 가용성 CD14가 염증 자극 후 아교세포의 NO 생산 및 세포 사멸을 억제한다는 것을 의미한다.

[0095] 2-5. 가용성 CD14에 의한 아교세포 신경독성의 조절

[0096] 만성적으로 활성화된 아교세포는 다양한 신경독성 매개자를 생산하여 신경 퇴행을 유발한다. 아교세포의 신경독성에 대한 가용성 CD14의 효과를 조사하기 위해 아교세포와 신경모세포종을 공동배양하였다. 여기서, LPS 또는 IFN- γ 로 활성화된 아교세포는 신경모세포종에 세포독성을 나타내었다. 상기 세포 기반 모델에서, EGFP로 안정적으로 형질감염된 B35 신경모세포종 세포가 공동 배양시 신경모세포종 세포의 간단한 동정을 위해 도입되었다. BV-2 소교세포, C6 래트 아교세포종 세포 또는 일차 아교세포 배양물을 제조할 때 가용성 CD14 단백질로 전처리하거나, 하지 않고 LPS 또는 LPS/IFN- γ 로 활성화한 후 B35 신경모세포종 세포와 공동배양하였다(도 5F). B35 세포의 생존은 공동배양 후 형광 현미경 하에서 EGFP를 발현하는 세포를 계수함으로써 측정되었다. 가용성 CD14는 공동배양에서 B35 세포의 사멸을 유의적으로 억제하였다(도 5A, B, C, D). 이러한 결과는 가용성 CD14가 아교세포의 신경독성을 억제함으로써 신경을 보호할 것임을 의미한다. CD14 단백질 단독은 B35 세포 생존율에 영향을 미치지 않았다(도 5E).

[0097] 2-6. 가용성 CD14에 의한 소교세포의 포식작용 활성의 조절

[0098] CD14는 그람 음성 박테리아의 포식작용과 아포토시스 세포의 제거를 매개하는 것으로 알려져 있다 (Devitt et al. 1998 Nature 392(6675):505-509; Gregory 2000 Current opinion in immunology 12(1):27-34; Heidenreich et al. 1997 J Immunol 159(7):3178-3188). 포식작용은 미생물 감염에 대항하는 중요한 방어 시스템이다. 특히, 뇌 소교세포의 포식작용은 CNS에서 세포 데브리시 및 아밀로이드 플라크를 제거하는데 효과적인 메커니즘으로 작용한다. 효모 세포벽의 한 성분인 자이모산 A(Zymosan A) 입자가 포식작용 측정에서 미생물 인지 모델로서 이용되었다(Aderem and Underhill 1999 Annual review of immunology 17:593-623). 포식작용 측정은 자이모산 A 입자를 이용하여 수행하였고 소교세포의 포식작용 활성의 조절에서 가용성 CD14의 역할을 조사하였다. 가용성 CD14의 추가는 BV-2 소교세포에 의한 자이모산 A 입자의 포식을 촉진하였다(도 6). 가용성 CD14에 의한 포식작용의 증가는 약하였지만, 반복된 실험에서 일관되게 관찰되었다. 소교세포에 의한 자이모산 A 입자의 포식작용은 재구성된 3차원 이미지에 의해 재확인되었고, 여기서 자이모산 입자는 세포 내에 위치하였다. 상기 결과는 가용성 CD14가 소교세포의 포식작용을 상향조절한다는 것을 의미한다.

도면의 간단한 설명

[0099] 도 1은 정상인 또는 AD 환자에서 얻은 CSF를 이용하여 제작된 2-DE 이미지와 가용성 CD14에 대한 확대 이미지를 나타낸 것이다.

[0100] 도 2는 정상인, AD 또는 PD 환자에서 얻은 CSF에서 가용성 CD14의 단백질 수준을 웨스턴 블랏으로 분석하여 나타낸 것이다.

[0101] 도 3(A, B)은 LPS 또는 LPS/IFN- γ 로 처리된 BV-2 소교세포주와 일차 소교세포의 세포 용해물 또는 조건화 배지에서 가용성 CD14의 단백질 수준을 웨스턴 블랏으로 분석하여 나타낸 것이고, 도 3(C)는 LPS 또는 IFN- γ 로 처리된 BV-2 소교세포주와 정상세포주에서 가용성 CD14의 mRNA 수준을 RT-PCR로 분석하여 나타낸 것이다.

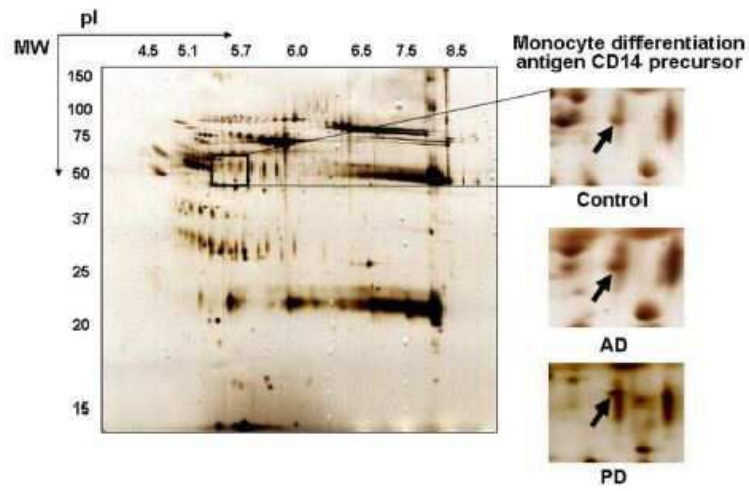
[0102] 도 4는 지정된 용량의 가용성 CD14 단백질의 존재 또는 부재시 LPS 또는 LPS/IFN- γ 로 자극받은 BV-2 마우스 소교세포, 일차 소교세포 배양물, C6 래트 신경아교종세포주 또는 일차 정상세포 배양물에서 NO 생산량(A)과 세포의 생존율(B)을 나타낸 것이다.

[0103] 도 5는 LPS 또는 LPS/IFN- γ 로 전처리된 또는 전처리되지 않은 BV-2 소교세포(A), C6 래트 아교세포종 세포(B) 또는 일차 아교세포 배양물(C) 또는 일차 정상세포(D)를 가용성 CD14 단백질 존재 또는 부재 조건에서 B35 신경모세포종 세포와 공동배양한 후 신경세포의 생존율을 나타낸 것이다. 도 5(E)는 가용성 CD14 단백질은 B35 세포 생존율에 영향을 미치지 못한다는 것을 나타내고, 도 5(F)는 공동배양 전략을 간략하게 나타낸 것이다.

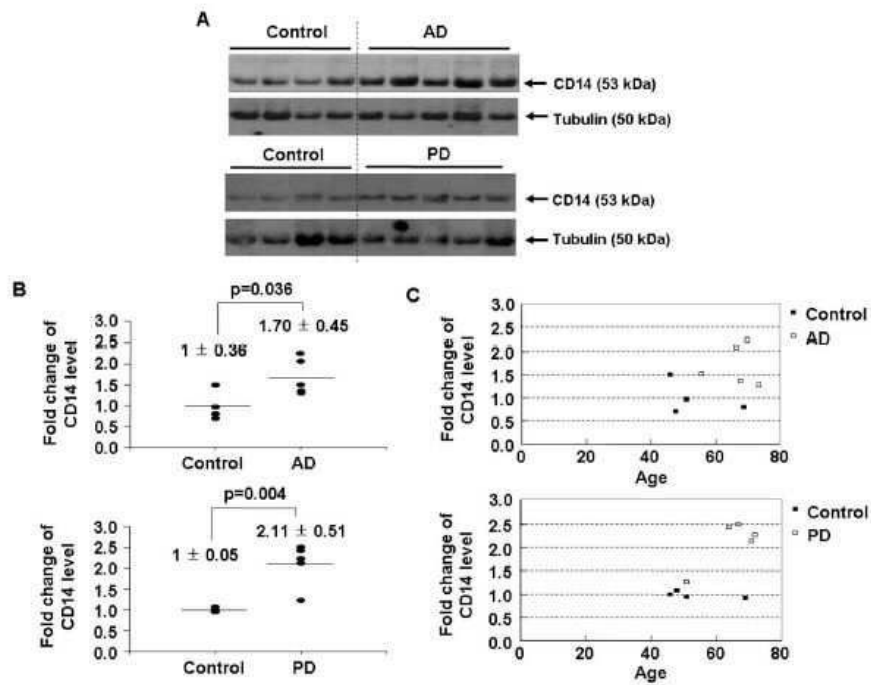
[0104] 도 6(A)는 가용성 CD14에 의해 BV-2 소교세포의 포식작용이 증가됨을 나타낸 것이고, 도 6(B)는 BV-2 소교세포에 의해 포식된 자이모산 A 입자를 나타낸 것이다.

도면

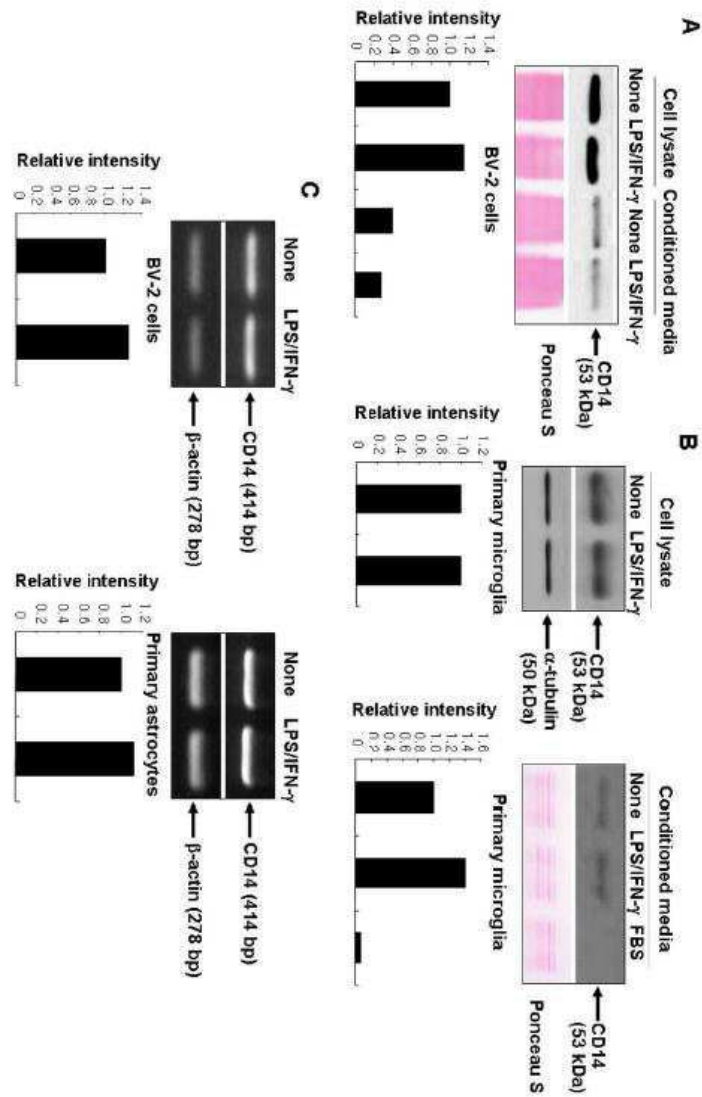
도면1



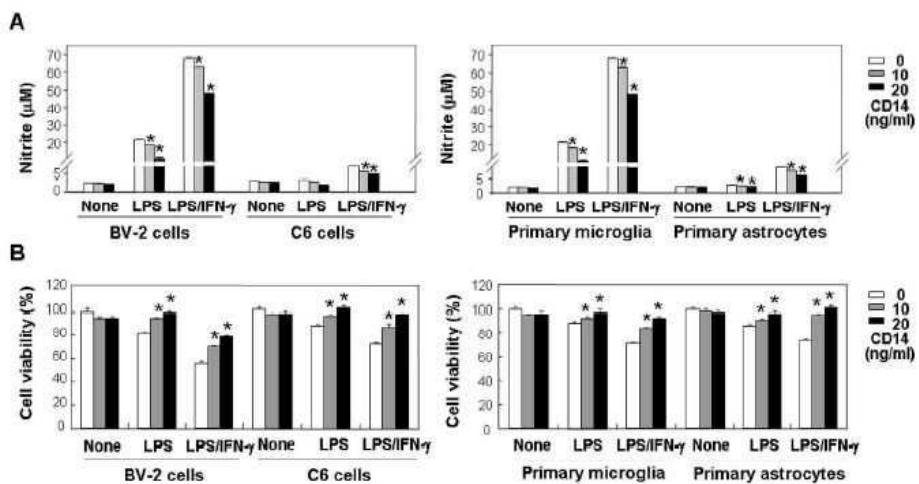
도면2



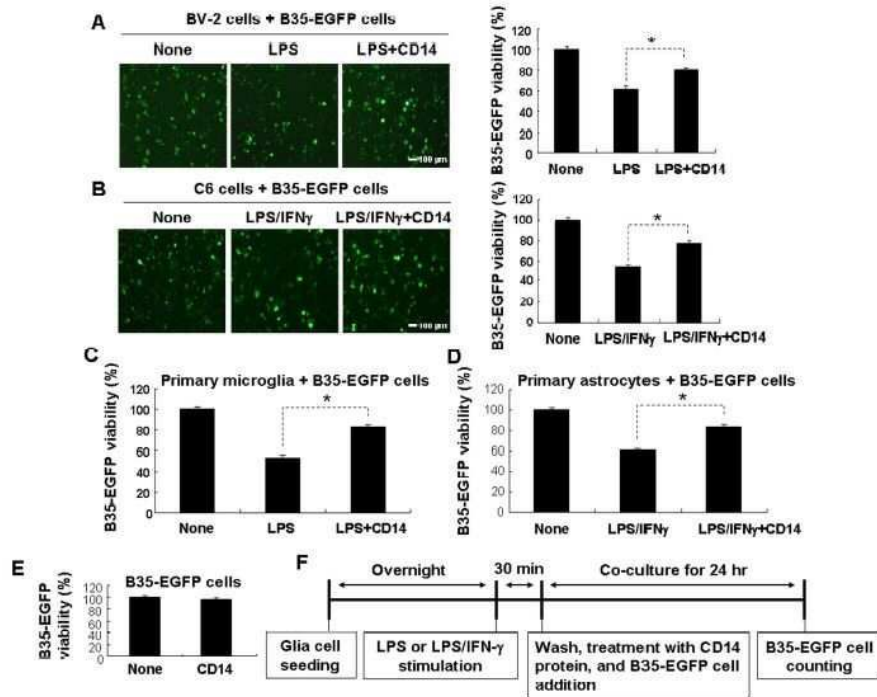
도면3



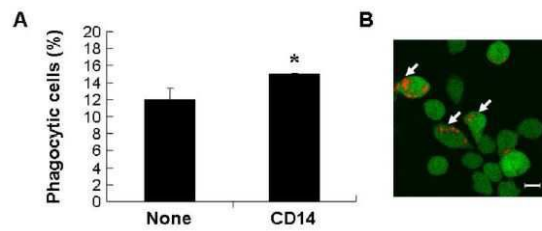
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> Kyungpook National University Industry-Academic Cooperation Foundation
 <120> Usage of Soluble CD14 for the Diagnosis and Treatment of Neurodegenerative Diseases

<160> 4

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1

<211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 1
 ctgatctcag ccctctgtcc 20

<210> 2
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 2
 gcaaagccag agttcctgac 20

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 3
 atcctgaaag acctctatgc 20

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> primer

<400> 4
aacgcagctc agtaacagtc

20