

TSPE20010-035-12

극지 유래 라말린 및 라말린 유도체들의  
항염증 기전 연구

Molecular mechanism of Ramalin and Ramalin  
derivatives-mediated anti-inflammatory effects



성균관대학교

# 제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “극지 바이오 대사체 상용화 구축 사업” 과제의 위탁연구 “극지 유래 라말린 및 라말린 유도체들의 항염증 기전 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.



2021. 7. 20

(본과제) 총괄연구책임자 : 임 정 한  
위탁연구기관명 : 성균관대 산학협력단  
위탁연구책임자 : 조 동 규  
위탁참여연구원 : 이 정 미  
“ : 김 학 균  
“ : 설 재 훈

## 보고서 초록

위탁연구과제명	극지 유래 라말린 및 라말린 유도체들의 항염증 기전 연구				
위탁연구책임자	조동규	해당단계 참여연구원수	4	해당단계 연구비	40,000,000원
연구기관명 및 소속부서명	성균관대학교 산학협력단		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)				보고 서면 수	46
<p>극지 생물 유래 라말린 및 라말린 유도체들의 항염증 효과를 확인하고, 항염증 효과에 대한 작용기전 규명을 최종목표로 함.</p> <p>1. In vitro 신경퇴행성 질환 염증모델 확립</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 미세교세포에 Lipopolysaccharide(LPS)를 처리하여 염증반응 관련인자들의 발현을 증가 확인.</li> <li>- LPS 처리 후, Nigericin을 처리하여 NLRP3 인플라마솜의 형성을 증가시킴.</li> <li>- 신경세포에 Hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 처리하여 BACE1의 발현 증가 확인</li> <li>- 신경퇴행성 질환에서 대표되는 특징인 산화적 스트레스 증가와 미세교세포 활성화 염증 모델 구축.</li> </ul> <p>2. 라말린 및 라말린 유도체의 항염증 효과 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 미세교세포에 라말린 및 라말린 유도체를 처리한 후, LPS와 Nigericin을 처리하여 염증 반응 활성화시킴.</li> <li>- 염증반응 관련인자인 COX2, NFκB, NLRP3, IL-1β, Caspase-1의 발현량 변화를 단백질 수준에서 확인함.</li> <li>- 신경세포에 라말린 및 라말린 유도체를 처리한 후, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 산화적 스트레스를 증가시킴.</li> <li>- 산화적 스트레스에 의해 증가하는 BACE1의 발현량 변화를 단백질 수준에서 확인함.</li> <li>- 라말린 유도체들 중 항산화 및 항염증 효과를 보이는 후보군 선정.</li> </ul>					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	라말린, 라말린 유도체, 항염증 효과, NLRP3, 항염증 기전			
	영 어	Ramalin, Ramalin derivatives, anti-inflammatory effects, NLRP3, mechanism of anti-inflammatory effects			

# 요 약 문

## I. 제 목

극지 유래 라말린 및 라말린 유도체들의 항염증 기전 연구

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

극지 생물 유래 라말린 및 라말린 유도체들의 항염증 효과를 확인하고, 항염증 효과에 대한 작용기전 규명을 최종목표로 함.

## III. 연구개발의 내용 및 범위

1. In vitro 신경퇴행성 질환 염증모델 확립
  - 미세교세포 활성화 염증 모델 구축
  - 신경세포에서 산화적 스트레스 유도 모델 구축
  - 염증반응 인자들의 발현 변화 확인
2. 라말린 및 라말린 유도체의 항염증 효과 확인
  - 미세교세포 활성화 염증 모델에 라말린 및 라말린 유도체 처리
  - 산화적 스트레스 유도 모델에 라말린 및 라말린 유도체 처리
  - 염증반응 인자들의 발현 변화 확인

## IV. 연구개발결과

1. In vitro 신경퇴행성 질환 염증모델 확립
  - 미세교세포에 Lipopolysaccharide(LPS)를 처리하여 염증반응 관련인자들의 발현을 증가 확인.
  - LPS 처리 후, Nigericin을 처리하여 NLRP3 인플라마솜의 형성을 증가시킴.
  - 신경세포에 Hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)를 처리하여 BACE1의 발현 증가 확인



- 신경퇴행성 질환에서 대표되는 특징인 산화적 스트레스 증가와 미세교세포 활성화 염증모델 구축.

## 2. 라말린 및 라말린 유도체의 항염증 효과 확인

- 미세교세포에 라말린 및 라말린 유도체를 처리한 후, LPS와 Nigericin을 처리하여 염증반응 활성화시킴.

- 염증반응 관련인자인 COX2, NFκB, NLRP3, IL-1β, Caspase-1의 발현량 변화를 단백질 수준에서 확인함.

- 신경세포에 라말린 및 라말린 유도체를 처리한 후, H2O2를 처리하여 산화적 스트레스를 증가시킴.

- 산화적 스트레스에 의해 증가하는 BACE1의 발현량 변화를 단백질 수준에서 확인함.

- 라말린 유도체들 중 항산화 및 항염증 효과를 보이는 후보군 선정.

## V. 연구개발결과의 활용계획

라말린 유도체들 중 항산화 및 항염증 효과를 보이는 후보군들을 선정하여, 라말린 유도체의 타겟을 스크리닝하고, 그 타겟과 염증 반응 인자의 상관관계를 밝힐 것임. 또한, 라말린 및 라말린 유도체에 의한 염증반응 조절 메커니즘을 규명하여 신경퇴행성 질환의 새로운 타겟 제시 및 치료제로의 개발 가능성을 제시할 것임.

# S U M M A R Y

(영 문 요 약 문)

## I. Title

Molecular mechanism of Ramalin and Ramalin derivatives-mediated anti-inflammatory effects

## II. Purpose and Necessity of R&D

The purpose of this study is to confirm the anti-inflammatory effects of polar organism-derived Ramalin and Ramalin derivatives, and to identify the mechanism of action for the anti-inflammatory effect.

## III. Contents and Extent of R&D

### 1. Establishment of inflammatory neurodegenerative disease in vitro model

- Establishment of inflammatory response model mediated by activated microglia
- Establishment of oxidative stress model in neurons
- Confirmation of the differences in expression of inflammatory factors

### 2. Confirmation of anti-inflammatory effects of Ramalin and Ramalin derivatives

- Treatment of Ramalin and Ramalin derivatives in inflammation model
- Treatment of Ramalin and Ramalin derivatives in oxidative stress induction model
- Confirmation of the differences in expression of inflammatory factors

mediated by Ramalin and Ramalin derivatives

#### IV. R&D Results

##### 1. Establishment of inflammatory neurodegenerative disease in vitro model

- Treatment of Lipopolysaccharide (LPS) in microglia to confirm the increase in the expression of inflammatory factors.
- After LPS treatment, Nigericin was treated to increase the formation of NLRP3 inflammasome.
- Confirmation of increased expression of BACE1 by treating nerve cells with hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)
- Establishment of oxidative stress induction model and microglia-activated inflammatory model, which are characteristics of neurodegenerative diseases.

##### 2. Confirmation of anti-inflammatory effects of Ramalin and Ramalin derivatives

- After treating the microglia with Ramalin and Ramalin derivatives, LPS and Nigericin were treated to activate the inflammatory response.
- Changes in the expression levels of COX2, NF $\kappa$ B, NLRP3, IL-1 $\beta$ , and Caspase-1, which are factors related to the inflammatory response, were confirmed at the mRNA and protein levels.
- Neurons were treated with Ramalin and Ramalin derivatives and then treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to increase oxidative stress.
- The change in the expression level of BACE1 increased by oxidative stress was confirmed at the protein level.
- Selection of candidate groups showing anti-inflammatory effects among Ramalin derivatives.

#### V. Application Plans of R&D Results

Among the Ramalin derivatives, candidates showing anti-inflammatory effects will be selected, the targets of the Ramalin derivative will be

screened, and the correlation between the target and the inflammatory factors will be revealed. In addition, by elucidating the mechanism of inflammatory response regulation by Ramalin and Ramalin derivatives, new targets for neurodegenerative diseases and the potential for development as therapeutic agents will be suggested.



# 목 차

1. 서론 .....	9
2. 국내외 기술개발 현황 .....	12
3. 연구개발수행 내용 및 결과 .....	21
4. 연구개발목표 달성도 및 대외기여도 .....	39
5. 연구개발결과의 활용계획 .....	42
6. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	44
7. 참고문헌 .....	45

# 제 1 장 서론

## 제 1 절. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발의 목적

본연구팀은 이전 과제에서 퇴행성 뇌질환 원인물질로 알려진 A $\beta$ 와 tau 생성을 억제하는 항치매 생리활성 물질인 Ramalin을 양극해 해양생물의 추출물에서 찾아냈음. 특히 퇴행성 뇌질환 환자의 뇌에서 발현이 증가해 있으며 A $\beta$ 생성에 중요한 BACE1의 발현과 tau의 인산화 조절을 통해 응집을 억제하는 것을 밝혀냄. 최근 A $\beta$ 에 의한 미세교세포의 NLRP3 inflammasome의 활성화가 알츠하이머 치료의 타겟으로 주목받고 있음. 따라서, 본연구팀은 Ramalin 및 Ramalin 유도체가 NLRP3 inflammasome 활성화 조절에 관여하는지를 밝히고 그 작용기전을 규명할 것임. 또한 Ramalin의 항치매 효과에 관여하는 작용점을 찾아서 새로운 퇴행성 뇌질환 치료 타겟으로 제시할 것임.

### 2. 연구개발의 필요성

#### 가. 알츠하이머 치매 환자 증가

인구의 고령화가 급속하게 진행됨에 따라 알츠하이머 치매 환자수와 비용이 증가하고 있다. ‘Alzheimer’s Disease International’에 따르면 2015년 전 세계 사회 및 경제 비용은 8,180억 달러, 즉 세계 GDP의 1.09 %로 추정되며, 한국의 경우 2019년에 매년 160억 달러가 소비된 것으로 추정된다. 또한, 직접 비용이외에 치매로 인한 간접비용은 치매 환자의 주변사람들에게 매우 높은 부담을 주게 된다. 이러한 간접비용은 정서적 부담과 함께 알츠하이머 치매 환자를 돌보는 사람들에게 불안, 우울증 등 큰 영향을 미치며 삶의 질을 떨어뜨릴 수 있다 [1].

우리나라는 2018년 기준, 65세 이상 인구가 약 670만 명이며, 그 중 750,000명 (10.16%)이 알츠하이머병으로 추정되고 있다 [2]. 현재 수준의 간병을 지속하려면 정부는 지원 금액을 계속해서 늘려야한다. 또한, 알츠하이머 치매 진단과 치료 사이의 시간 간격이 줄어들어 따라 앞으로 비용이 크게 증가 할 수 있다. 따라서 알츠하이머 치매의 조기 진단 및 치료에 대한 연구 및 개발에 지금 투자함으로써

미래의 사회 비용을 절감 할 수 있다. 이것은 알츠하이머 치매의 발병을 예방하거나 늦출 수 있는 약물 개발 및 의료 기술뿐만 아니라 예방 조치에 대한 정보를 제공하고 정확하고 시기적절한 진단의 속도를 높일 수 있는 데이터 생산도 포함된다.

#### 나. 알츠하이머 치매 발병 가설

알츠하이머 질환(AD)은 치매의 가장 일반적인 형태로서, 환자 뇌조직의 퇴행으로 인해 인지능력 및 기억력 손상이 점진적으로 진행되어 발병 후 10년 정도 진행되면 완전한 뇌기능의 상실로 사망에 이르게 된다(그림 1). 현재 상용되는 치매 치료제는 단순히 증상을 경감시킬 뿐 근본적인 치료제가 아니며, 치매는 매우 복잡적이고 원인이 다양한 난치성 질환으로서 기존의 연구방법과는 다른 독창적 개념의 접근 방법이 절실히 요구된다.

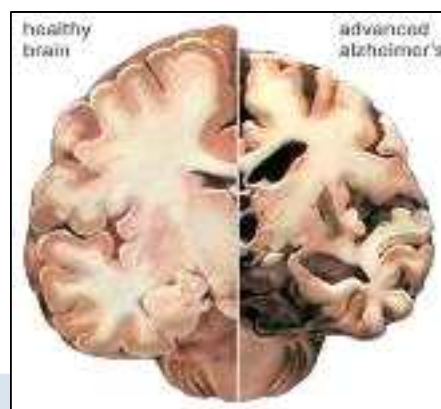


그림 1. 노인성 치매(Alzheimer's disease; AD)에 의한 대량의 뇌신경조직 퇴화

알츠하이머 치매 발병의 가설로는 여러 가지가 있으며, 그 중 첫 번째는 산화적 스트레스이다. 치매모델과 치매환자의 뇌 조직에서 증가하는 산화스트레스(oxidative stress) 및 베타-아밀로이드 ( $A\beta$ )플라크는 신경세포의 사멸을 유도한다.  $A\beta$ 플라크는 노화 과정 중에 증가하며, 알츠하이머 질환(AD) 환자들에서 더욱 급격하게 증가됨. AD 환자의 2% 이내의 경우는 특정 유전자의 돌연변이에 의해서 유발되고, 나머지 대부분의 경우는 아직 그 원인이 불확실하지만 산화스트레스가 가장 중요한 원인으로 추정되고 있다.

두 번째는 Tau 단백질의 엉킴이다. 치매 초기에는  $A\beta$ 플라크가 증가하지만, 막상 치매 증상을 촉발시키는 것은 tau 단백질 엉킴의 확산이라는 연구결과가 2016년 Science Translational Medicine에 발표되었다. 또한, 알츠하이머 치매 발병 기전에서  $A\beta$ 와 Tau theory에 이어 NLRP3 inflammasome에 의한 염증반응이 치료 타겟으로 주목받고 있다.  $A\beta$ 에 의해 미세교세포의 NLRP3 inflammasome이 활성화되고, 이는  $IL-1\beta$ 와 caspase-1의 활성화와 면역반응을 일으킨다. 따라서 NLRP3 inflammasome을 억제하는 것이 알츠하이머 치매의 새로운 치료 타겟임이 보고되었다.

#### 다. 알츠하이머 치매 치료약물의 부재

알츠하이머 질환은 치매의 가장 일반적인 형태로서, 환자 뇌조직의 퇴행으로 인해 인지능력 및 기억력 손상이 점진적으로 진행되며, 발병 10년 후 완전한 뇌기능의 상실로 사망에 이르게 된다. 현재 상용되는 치매 치료제로서 아세틸콜린 에스터레이즈(Acetylcholine esterase) 억제제인 도네페질(Donepezil), 갈란타민(Galantamine), 리바스티그민(Rivastigmine)이 있으며, 증세가 극심할 경우 NMDA 수용체 길항제인 메만틴(Memantine)을 병용하고 있다. 그러나 지금까지 미국식품의약국(FDA, Food and Drug Administration) 허가를 받은 약물들은 단순히 증상을 경감시키는 것이기 때문에 알츠하이머 치매에 대한 근본적인 치료제가 필요하다.

알츠하이머 치매 약물에 대한 기존의 FDA 승인은 인지기능의 개선 여부로 결정됐다. 이 접근법은 인지 기능 개선과 함께 기능적 이점을 보여줌으로써 임상적으로 의미 있는 효과가 있음을 보여주었다. 그러나 지난 2018년 2월 FDA는 알츠하이머 치매의 각 단계마다 다른 임상 종점을 제시하는 새로운 지침을 발표했다 [3]. 알츠하이머 치매에 대한 연구가 진행됨에 따라, 연구자들은 인지 기능 장애가 없을 수 있는 질병의 초기 단계에서 알츠하이머 치매의 근본적인 병리 생리학적 변화를 반영하는 바이오 마커를 사용하려고 시도했다. 알츠하이머 치매의 초기 단계에서의 개입이 질병의 진행을 지연시킬 것이기 때문에 이러한 노력은 매우 중요하다. 알츠하이머 치매에 대한 새로운 가이드라인을 통해 FDA는 알츠하이머 치매에서 바이오 마커의 역할을 이해하기 위한 연구를 장려하고, 알츠하이머 치매의 초기 단계에서 효과적인 치료법을 개발하는 것의 중요성을 강조하고 있다.



## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 알츠하이머 치매 치료제 개발 현황

#### 1. 알츠하이머 치매 치료제 종류 (FDA 승인 약물)

성분명	상품명	회사	작용기전	치료제 형태
<b>Aducanumab</b>	Aduhelm BIIB037	Biogen, Neurimmune	Amyloid-relat ed	Immunotherapy (passive)
Donepezil	Aricept, Erantz	Eisai Co., Ltd., Pfizer	Cholinergic System	Small molecule
Galantamine	Razadyne, Reminyl, Nivalin	Janssen, Ortho-McNeil Pharmaceutical, Sanochemia Pharmazeutika, Shire, Takeda Pharmaceutical Company	Cholinergic System	Small molecule
Memantine	Ebixa, Namenda, Axura, Akatinol, Memary	Forest Laboratories, Inc., H. Lundbeck, Merz Pharma	NMDA receptor antagonist	Small molecule
Rivastigmine	Exelon, Rivastach, Prometax	Novartis Pharmaceuticals Corporation	Cholinergic System	Small molecule

표 1. 알츠하이머 치매에 대한 FDA 승인 약물 [4]

현재 알츠하이머 치매 치료 가이드라인으로, 초기/중기에는 아세틸콜린 에스테라아제(Acetylcholine esterase, AChE) 억제제인 도네페질(Donepezil), 갈란타민(Galantamine), 리바스티그민(Rivastigmine)이 사용되고 있으며, 중기/말기에는 NMDA 수용체 길항제인 메만틴(Memantine) 병용을 권고하고 있다. 이는 알츠하이머 치매에서 대뇌기저부의 콜린성 신경세포의 손상이 일어나 신경전달물질인 아세틸콜린의 농도가 낮아져있는 것을 타겟으로 한 약물이다. 아세틸콜린 에스테라아제 억제제는 아세틸콜린의 분해를 막아 시냅스에서의 아세틸콜린의

농도를 높여 치매의 악화를 늦추고 있다.

2021년 6월, 아두카누맵(Aducanumab)이 알츠하이머 치매 치료에 대한 FDA 승인을 받았다. 아두카누맵은 아밀로이드에 대한 항체로서, 아밀로이드 플라크를 직접적으로 타겟하여 제거하는 약물이다. 아두카누맵은 스위스 Neurimmune 회사에서 개발하였으며, 2013년, AD/PD 2013 국제 학술대회에서 알츠하이머 치매 모델 마우스에 아두카누맵을 13주간 투여하였을 때 아밀로이드 베타 플라크의 사이즈가 줄어들었다고 보고되었다 [11]. 2019년 진행한 임상 3상 분석 결과, 아두카누맵이 아밀로이드 베타를 효과적으로 줄였다. 그러나 아직까지 인지기능 손상을 늦추는 데는 효과가 불분명하며, 승인 후 임상시험 결과에 따라 약물의 승인 지속여부가 결정될 것으로 보인다.

## 2. 알츠하이머 치매 신약 개발 현황

### 가. 임상 4상 진행 중인 약물

성분명	상품명/동의어	회사	작용기전	치료제 형태
AVP-923	Nuedexta, Zenvia	Avanir Pharmaceuticals	Other Neurotransmitters	Combination, Small Molecule
Carvedilol	Coreg, Artist , Aucardic, Dilatrend, Kredex	Procter & Gamble	-	Small Molecule
Docosahexaenoic acid (DHA)	Omega 3 fatty acid	Martek Biosciences Corporation, NeuroBioPharm, Inc.	-	Supplement, Dietary
Ketasyn	Axona, Caprylic Acid, AC-1202	Accera, Inc.	-	Supplement, Dietary
Methylphenidate	Ritalin, Concerta	-	Other Neurotransmitters	Small molecule
Prazosin	Minipress,	-	Other	Small molecule

	Hypovase, Vasoflex		Neurotransmitters	
Resveratrol	trans-3,4',5-tri hydroxystilbene	-	-	Small Molecule, Supplement, Dietary
Simvastatin	Zocor®, Lipex®, Lipovas®, Denan®	Merck	Cholesterol	Small molecule

표 2. 알츠하이머 치매에 대한 임상 4상 진행 약물 [4]

알츠하이머 치매에서 뇌혈관 기능장애, 특히 고혈압 및 뇌졸중이 깊이 연관되어 있다는 것은 여러 차례 보고된바 있다 [5, 6]. 카르베딜롤(Carvedilol)은 현재 고혈압과 협심증에 사용되는 약물로서, 비선택적으로  $\alpha/\beta$  교감신경 수용체를 차단하여 혈관의 수축을 억제한다. 혈관을 확장시켜 혈압을 낮출 뿐만 아니라 심근 수축력과 심장 박동수를 감소시켜 심부전 치료에도 효과적이다. 지난 2011년, 미국 Pasinetti 연구팀은 카르베딜롤이 아밀로이드베타 플라크의 생성을 줄이고 알츠하이머 치매 모델 마우스에서 인지기능 개선 효과를 보였다고 보고하였다 [7].

프라조신(Prazosin)은 선택적  $\alpha_1$  교감신경 수용체 차단제이며, 이 약물이 타겟으로 하는 수용체는 뇌혈관 평활근에 많이 발현하고 있다. 프라조신은 현재 고혈압, 전립선비대증, 외상후 스트레스 장애 치료제로 허가받은 약물이다. 2013년에 영국 Sastre 연구팀에서 프라조신이 알츠하이머 치매 모델 마우스의 인지기능을 개선시키고, 아밀로이드베타 플라크의 생성을 감소시킨다고 발표하였으며 [8], 독일의 Wallukat 연구팀은 아밀로이드베타 펩타이드가  $\alpha_1$  교감신경 수용체를 활성화시킨다고 보고하였다 [9].

심바스타틴(Simvastatin)은 콜레스테롤 합성 효소인 HMG-CoA reductase 억제제로서 고지혈증 치료제로 사용되고 있다. 심바스타틴은 혈액-뇌 장벽(Blood-Brain-Barrier, BBB)을 통과할 수 있으며, 고지혈증 치료를 위해 장기간 심바스타틴을 투여한 그룹에서 알츠하이머 치매의 발병률이 낮음이 보고되었다. 또한, 임상결과에 따르면 심바스타틴을 투여한 그룹에서 뇌척수액의 아밀로이드베타 40과 아밀로이드베타 42의 양에 변화는 없었으나, 인지기능이 개선되었다고 밝혔다 [10].

나. 임상 3상 진행 중인 약물

성분명	상품명/ 동의어	회사	작용기전	치료제 형태
ALZ-801	NRM-849 9, homotaurine, 3-APS	Alzheon Inc	Amyloid-Related	Small Molecule
ALZT-OP1	Cromolyn sodium, Intal, Ibuprofen	AZTherapies, Inc.	Amyloid-Related, Inflammation	Combination, Small Molecule
AVP-786	-	Avanir Pharmaceuticals, Concert Pharmaceuticals, Inc., Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.	Other Neurotransmitters	Combination, Small Molecule
Alpha-Tocopherol	Vitamin E	-	-	Supplement, Dietary
Aripiprazole	Abilify, BMS-337 039	Bristol-Myers Squibb, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.	Other Neurotransmitters	Small Molecule
Brexpiprazole	Rexulti, OPC 34712	H. Lundbeck, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.	Other Neurotransmitters	Small Molecule
Citalopram	escitalopram, Celexa, Lexapro , Ciprallex	-	Other Neurotransmitters	Small Molecule
Continuous	CPAP	-	-	Procedural

Positive Airway Pressure				Intervention
Donanemab	N3pG-A $\beta$ Monoclonal Antibody, LY3002813	Eli Lilly & Co.	Amyloid-Related	Immunotherapy (passive)
GV-971	sodium oligomannate, sodium oligomannurate	Shanghai Green Valley Pharmaceuticals	Amyloid-Related, Inflammation	Small Molecule
Gantenerumab	RO4909832, RG1450	Chugai Pharmaceutical Co., Ltd., Hoffmann-La Roche	Amyloid-Related	Immunotherapy (passive)
Guanfacine	Intuniv, SPD503, Afken, Estulic, Tenex	-	Other Neurotransmitters	Small Molecule
LMTM	TRx0237, LMT-X, Methylene Blue, Tau aggregation inhibitor (TAI)	TauRx Therapeutics Ltd	Tau	Small Molecule
Lecanemab	BAN2401, mAb158	Biogen, Eisai Co., Ltd.	Amyloid-Related	Immunotherapy (passive)
Levetiracetam	Keppra	UCB S.A.	Amyloid-Related, Other	Small Molecule

Lumateperone	ITI-007	Bristol-Myers Squibb, Intra-Cellular Therapies, Inc.	Other Neurotransmitters	Small Molecule
Masitinib	Masivet, Kinavet, AB1010, Masitinib mesylate	AB Science	-	Small Molecule
Pimavanserin	Nuplazid, ACP-103, Pimavanserin tartrate	Acadia Pharmaceuticals	Neurotransmitters	Small Molecule
Semaglutide	Ozempic, Rybelsus	Novo Nordisk A/S	-	-
Solanezumab	LY2062430	Eli Lilly & Co.	Amyloid-Related	Immunotherapy (passive)
UB-311	-	United Neuroscience	Amyloid-Related	Immunotherapy (active)

표 3. 알츠하이머 치매에 대한 임상 3상 진행 약물 [4]

성분명	상품명/동의어	회사	작용기전	치료제 형태
AXS-05	Dextromethorphan/bupropion	Axsome Therapeutics, Inc.	Neurotransmitters	Combination, Small Molecule
Atuzaginstat	COR388	Cortexyme, Inc.	-	Small Molecule
Blarcamesine	Anavex 2-73	Anavex Life Science Corp.	-	Small Molecule
Azeliragon	PF-04494700, TTP488	Pfizer, TransTech Pharma, Inc., vTv Therapeutics LLC	Amyloid-Related, Inflammation	Small Molecule

Epigallocatechin Gallate(EGCG)	Sunphenon EGCg	Taiyo International	Amyloid-Related, Inflammation, Other	Supplement, Dietary
Gamunex	Intravenous Immunoglobulin, Human Albumin Combined With Flebogamma	Grifols Biologicals Inc.	Amyloid-Related, Inflammation	Combination, Immunotherapy (passive)
Metformin	Glucophage, Glucophage XR	-	-	Small Molecule
Tricaprilin	AC-1204, Caprylic triglyceride	Accera, Inc.	-	Supplement, Dietary, Other
Troriluzole	BHV-4157, trigriluzole, FC-4157	Biohaven Pharmaceuticals	Neurotransmitters	-
Vascepa	Icosapent ethyl(IPE), Ethyl eicosapentaenoic acid (E-EPA), AMR101, Miraxion	-	-	Small Molecule

표 4. 알츠하이머 치매에 대한 임상 2/3상 진행 약물 [4]

기준에 제2형 당뇨병에 대한 적응증으로 FDA 승인을 받은 약물인 Metformin이 알츠하이머 치매에 적용 중이다. Metformin이 염증반응 및 산화적 스트레스를 낮추고, 신경세포 생성을 촉진한다고 보고되었다. 2020년 8월부터 임상 2/3상이 진행되었으며, 2024년까지 진행될 예정이다.

## 제 2절 알츠하이머 치매 발병 기전 연구

### 1. 알츠하이머 치매 발생 가설

알츠하이머 치매는 매우 복잡적이고 원인이 다양한 난치성 질환으로서 아직까지 알츠하이머 치매의 발병 기전은 명확히 밝혀지지 않았다. 대표적인 알츠하이머 치매의 발병기전으로 아밀로이드베타 가설과 타우 단백질 가설이 있다.

알츠하이머 치매 환자의 뇌 조직에서 산화스트레스(oxidative stress) 및 아밀로이드 베타(A $\beta$ ) 플라크가 매우 증가해있으며 이는 신경세포의 사멸을 유도한다. 아밀로이드베타 플라크는 노화 과정 중에 증가하며, 알츠하이머 치매 환자들에서 더욱 급격하게 증가된다. 알츠하이머 치매 환자의 2 %의 경우는 특정 유전자(APP, MAPT, PSEN, APOE 등)의 돌연변이에 의해서 유발되며, 나머지 대부분의 경우는 산화스트레스가 가장 중요한 원인으로 추정되고 있다. 알츠하이머 치매 초기에는 아밀로이드베타 플라크가 증가하지만, 실제로 치매 증상을 더욱 촉발시키는 것은 타우 단백질 엉킴의 확산이라는 연구결과가 2016년 Science Translational Medicine에 발표되었다 [13].

한편, 알츠하이머 치매 발병 기전에서 아밀로이드베타 가설과 타우 단백질 가설에 이어 NLRP3 inflammasome에 의한 염증반응이 치료 타겟으로 주목받고 있다. 알츠하이머 치매에서 아밀로이드베타에 의해 미세교세포의 NLRP3 inflammasome이 활성화되고, 이는 IL-1 $\beta$ 와 caspase-1를 활성화시키며 면역반응을 더욱 촉진한다 [14]. 또한, 바이러스 가설도 매우 유력한 가설 중 하나이다. 특히 헤르페스 바이러스(Herpes viruses)가 알츠하이머 치매와 매우 높은 연관성을 보이고 있다. 알츠하이머 치매 환자 뇌조직에서 헤르페스 바이러스 특이적 유전체가 발견되었으며, 알츠하이머 치매 모델 마우스에서 헤르페스 바이러스가 아밀로이드베타 플라크의 형성을 더욱 촉진시키는 것으로 보고되었다 [15, 16].

### 2. 알츠하이머 치매 치료제 개발 전망

알츠하이머병 환자 뇌에 침착되는 A $\beta$ 를 치료 표적으로 많은 연구가 진행되고 있지만 효과적인 치료법이 개발되지 않았다. 알츠하이머병은 광범위한 연구들을 통해 매우 다양한 메커니즘과 치료 표적들이 밝혀졌고 이를 통해 여러 가지 치료제가 개발 되었지만 모두 임상시험을 통과하지 못했다. 이는 지금까지



밝혀진 알츠하이머 발병 기전을 바탕으로 개발된 치료제들이 충분한 신경보호 효과를 보이지 못하여 공통적으로 염증 반응과 다량의 신경세포사멸이 나타났고, 이러한 결과로 뇌기능에 심각한 문제를 초래하였기 때문이다. 그러므로 아직 밝혀지지 않은 새로운 알츠하이머 발병 기작 및 타겟 연구가 동반되어야 한다. AD 질환 치료제의 개발을 위해서는 선진국에서 이미 접근 중인 방법과 알려진 물질의 범주를 벗어난 새로운 접근 방법 및 새로운 물질의 풀을 이용한 접근이 반드시 필요하다. 따라서 새로운 생리활성물질군이 무궁무진한 양극해 유래 생물자원을 이용한 향치매 물질 규명 및 특성 연구가 반드시 필요하다. 실질적으로 해양생물의 제품화 비율은 1/6,000로서 육상생물(1/13,000)에 비해 신물질 개발 성공가능성이 매우 높다. 따라서 본 과제에서 개발될 수 있는 양극해 해양생물 유래 화합물을 기반으로 하는 치매치료 물질 개발 연구는 학문적으로나 기술적으로 전망이 매우 밝다.



## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구내용 및 결과

#### 1. 추진전략 및 방법

연구내용 요약	<ul style="list-style-type: none"> <li>미세교세포의 면역반응을 활성화한 in vitro 신경퇴행성 질환 염증모델 확립</li> <li>활성화된 미세교세포에서 Ramalin 및 Ramalin 유도체의 항염증 효과 확인</li> </ul>
------------	--

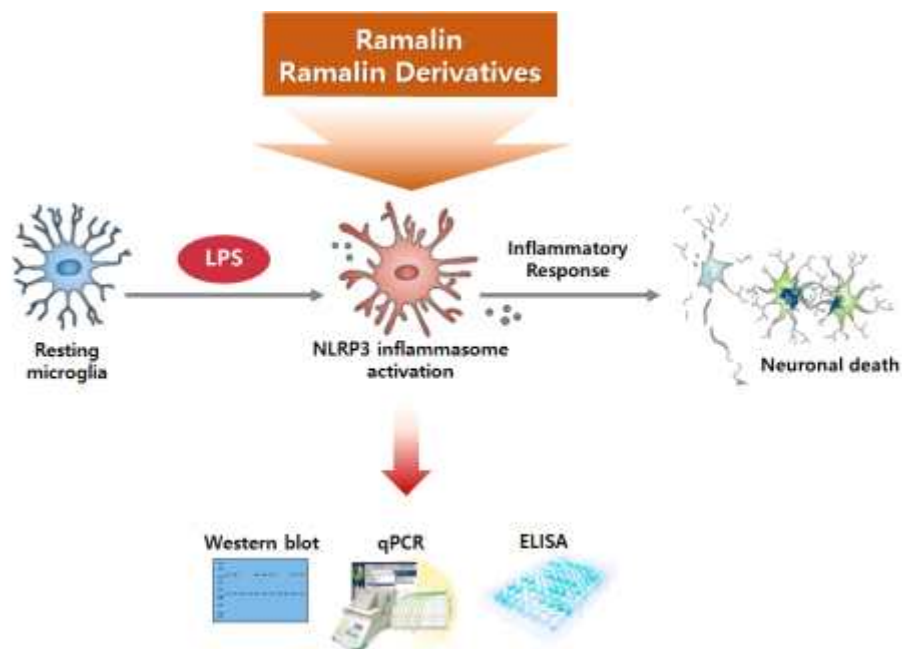


그림 2. 미세교세포에서 Ramalin 및 Ramalin 유도체의 항염증 효과 확인

#### 가. In vitro 신경퇴행성 질환 염증모델 확립

미세교세포에 Lipopolysaccharide(LPS)를 처리하여 염증반응 관련인자들의 발현을 증가시키고, 이후 Nigericin을 처리하여 NLRP3 인플라마솜의 형성을 증가시킴. 이를 통해 신경퇴행성 질환에서 대표되는 특징인 미세교세포 활성화 염증 모델을 구축함.

#### 나. Ramalin 및 Ramalin 유도체의 항염증 효과 확인

염증반응을 활성화 시킨 미세교세포에 Ramalin 및 Ramalin 유도체를 처리한 후, 염증반응 관련인자인 COX2, NFκB, NLRP3, IL-1β, Caspase-1의 발현량 변화를 mRNA 및 단백질 수준에서 확인함.

## 2. *In vitro* 신경퇴행성 질환 염증모델 확립

### 가. *In vitro* 신경퇴행성 질환 염증모델 확립

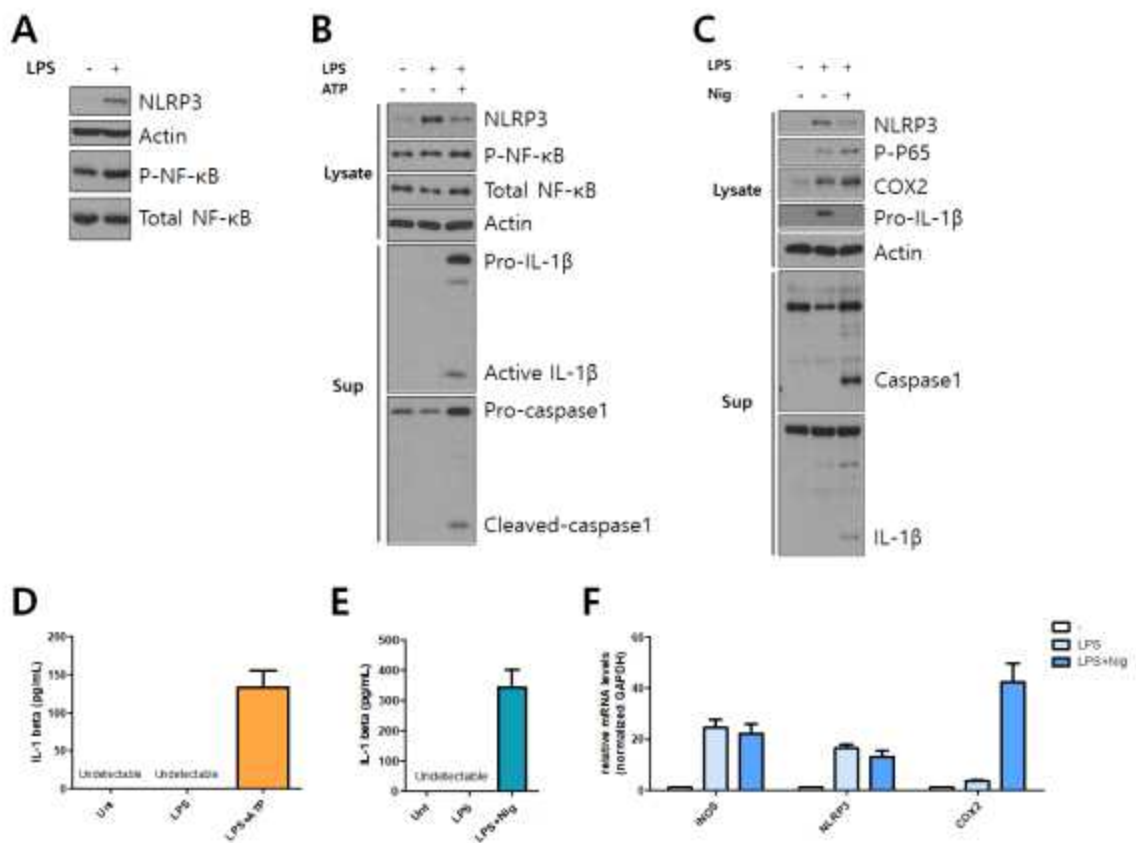


그림 3 미세교세포의 면역반응 활성화(BV-2, Primary cultured microglia)

신경퇴행성 질환에서 미세교세포의 염증반응이 활성화 되어 있으며, 이에 대한 *in vitro* 모델을 확립하기 위해 마우스 미세교세포 cell line, 마우스 primary cultured 미세교세포를 이용하였다. 마우스 미세교세포인 BV-2에 Lipopolysaccharide(LPS)를 0.1μg/mL로 7시간 처리하였을 때, NLRP3의 발현이 증가하고 NF-κB의 인산화가 증가한 것을 확인할 수 있었다(그림3A). 한편, 마우스의 뇌조직으로부터 얻은 primary cultured microglia에 LPS 1μg/mL를 3시간 처리한 후, Adenosine Triphosphate(ATP)를 5mM로 1시간 처리하였다(그림

3B, 3D). LPS를 처리했을 때, NLRP3의 발현량이 증가했으며, LPS와 ATP를 처리한 샘플에서 NLRP3 inflammasome이 활성화 되어 Interleukin-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )와 Caspase1의 활성화된 형태가 증가한 것을 확인할 수 있었다. 또한, Primary cultured microglia에 ATP 대신 Nigericin(Nig)을 20 $\mu$ M로 1시간 처리하였을 때, NLRP3 inflammasome signaling이 활성화 된 것을 확인하였으며, microglia conditioned media에 IL-1 $\beta$ 가 존재하는 것을 확인하였다(그림3C, 3E). 염증반응에 관여하는 유전자들의 mRNA 발현량을 확인하였을 때, LPS를 처리한 샘플과 LPS와 Nigericin을 처리한 샘플에서 iNOS, NLRP3, COX2의 mRNA 발현량이 유의적으로 증가한 것을 확인하였다(그림3F).

#### 나. *In vitro* 신경퇴행성 질환 산화적 스트레스 모델 확립

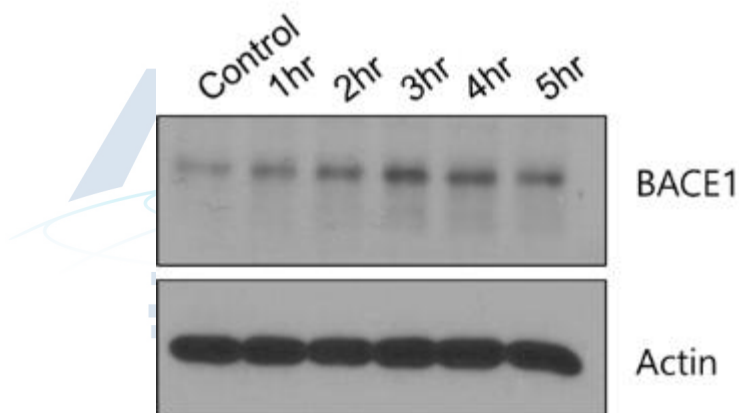


그림 4 신경세포의 산화적 스트레스 활성화 (SH-SY5Y)

신경퇴행성 질환에서 신경세포의 산화적 스트레스가 증가되어 있으며, 이에 대한 *in vitro* 모델을 확립하기 위해 인간 신경세포 SH-SY5Y cell line을 이용하였다. SH-SY5Y에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 200 $\mu$ M 처리하였을 때, BACE1의 발현량을 확인하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 1, 2, 3, 4, 5시간 후 BACE1의 단백질량이 증가한 것을 확인할 수 있었다 (그림4).

### 3. Ramalin 및 Ramalin 유도체의 항염증 효과 확인

#### 가. 인간 미세교세포 HMC3 cell line에서 항염증 효과 확인

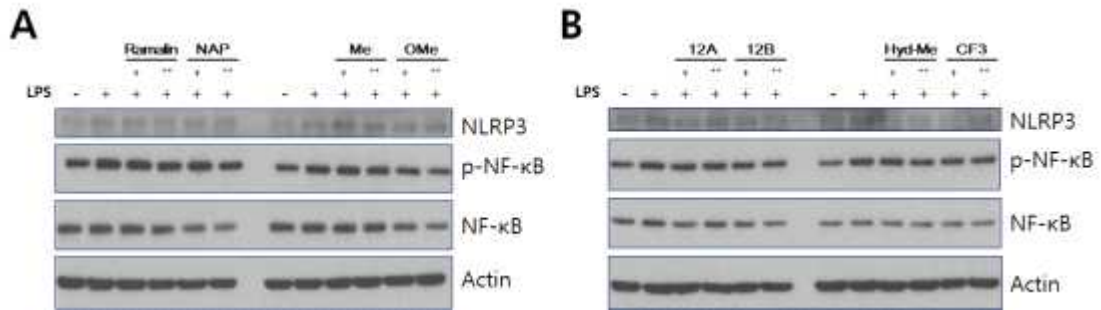


그림 5 Human 미세교세포에서 라말린 및 라말린 유도체의 항염증 효과 확인(RA-NAP, RA-Me, RA-OMe, RA-12A, RA-12B, RA-Hyd-Me, RA-CF3)

Ramalin 및 Ramalin 유도체에 의한 염증 관련 유전자들의 조절을 *in vitro*에서 확인하기 위해 Human HMC3 미세교세포를 사용했다. Ramalin과 Ramalin 유도체(NAP, Me, OMe, 12A, 12B, Hyd-Me, CF3)를 HMC3에 2.5, 5 $\mu$ g/mL의 농도로 24시간 처리한 후, LPS 0.2 $\mu$ g/mL를 4시간 처리하였다. LPS에 의해 증가된 NLRP3 및 phospho-NF- $\kappa$ B의 발현량이 OMe(2.5, 5 $\mu$ g/mL), 12A(2.5 $\mu$ g/mL), 12B(2.5, 5 $\mu$ g/mL), Hyd-Me(5 $\mu$ g/mL)를 처리한 샘플에서 감소한 것을 확인하였다(그림5A, 5B).

나. 마우스 미세교세포 BV-2 cell line에서 항염증 효과 확인

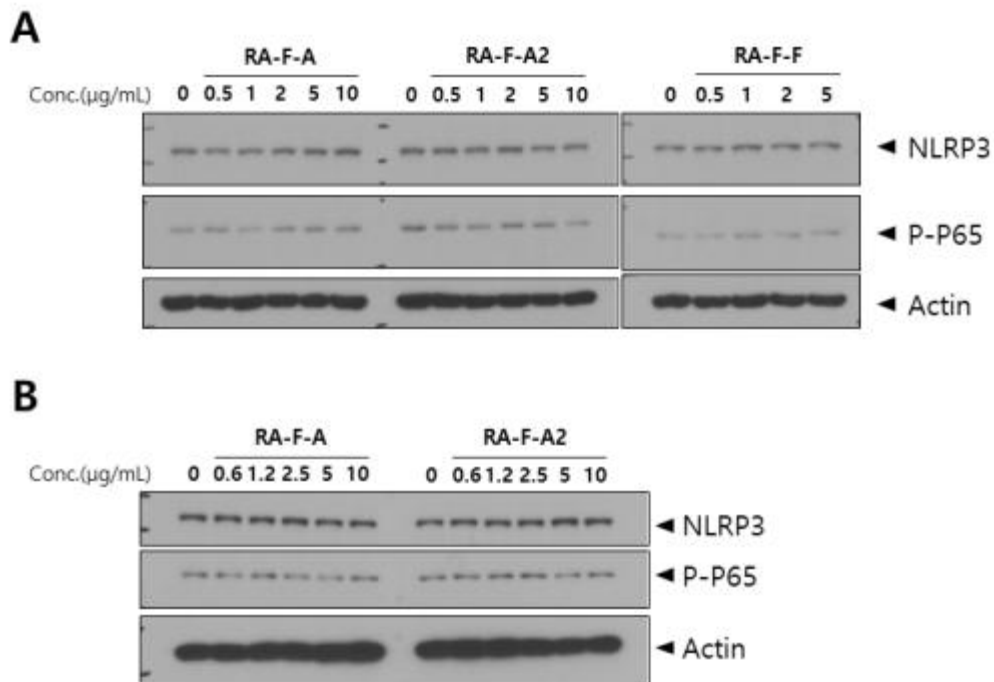


그림 6 Mouse 미세교세포에서 라말린 및 라말린 유도체의 항염증 효과 확인 (RA-F-A, RA-F-A2, RA-F-F)

다음으로, Ramalin 및 Ramalin 유도체에 의한 염증 관련 유전자들의 조절을 in vitro에서 확인하기 위해 Mouse BV-2 미세교세포를 사용했다. Ramalin과 Ramalin 유도체(RA-F-A, RA-F-A2, RA-F-F)를 BV-2에 0.5, 1, 2, 5, 10 $\mu$ g/mL(그림 6A) 또는 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10 $\mu$ g/mL(그림 6B)의 농도로 24시간 처리한 후, LPS 0.2 $\mu$ g/mL를 6시간(그림 6A) 또는 4시간(그림 6B) 처리하였다. LPS에 의해 증가된 NLRP3 및 phospho-NF- $\kappa$ B의 발현량이 RA-F-A2(5, 10 $\mu$ g/mL)를 처리한 샘플에서 감소한 것을 확인하였다(그림6A, 6B).

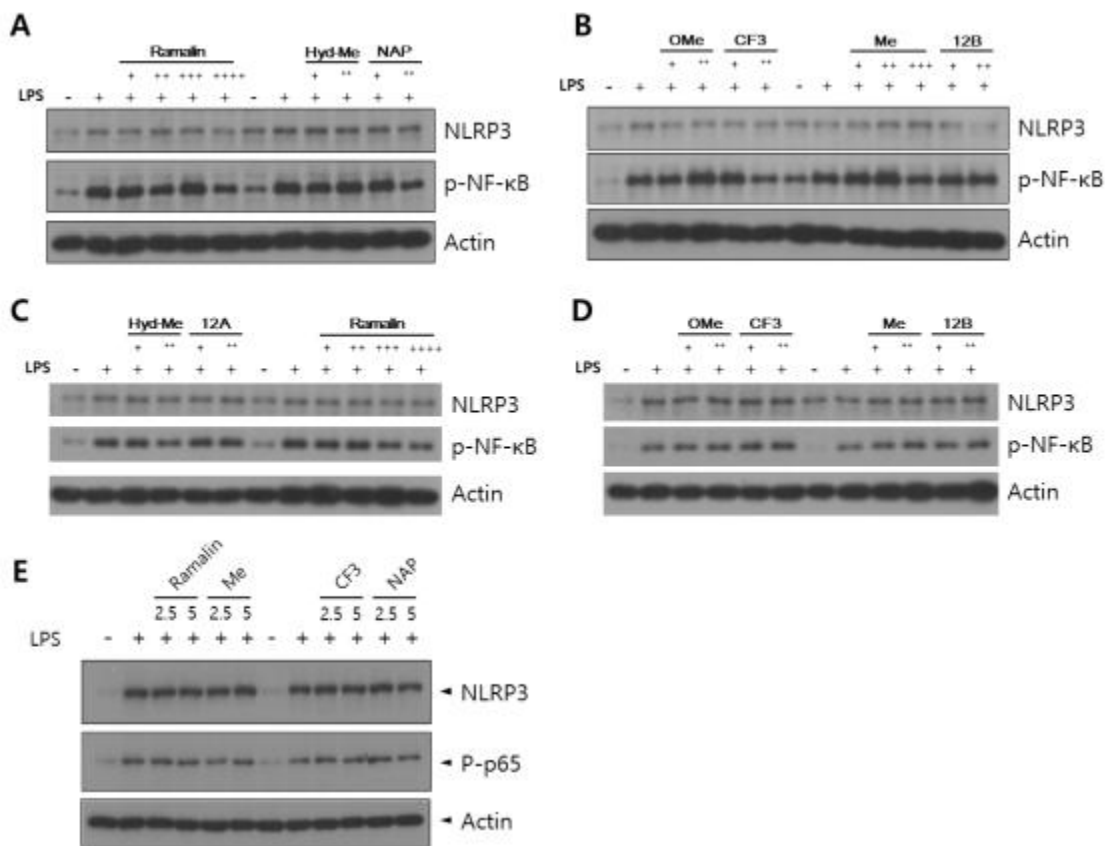


그림 7 Mouse 미세교세포에서 라말린 및 라말린 유도체의 항염증 효과 확인(RA-NAP, RA-Me, RA-OMe, RA-12A, RA-12B, RA-Hyd-Me, RA-CF3)

또한, 2차에 합성된 Ramalin 유도체에 의한 염증 관련 유전자들의 조절을 확인하기 위해 마우스 BV-2 미세교세포를 사용했다. Ramalin(1.25, 2.5, 5, 10 $\mu$ g/mL)과 Ramalin 유도체(NAP, Me, OMe, 12B, Hyd-Me, CF3)를 BV-2에 2.5, 5 $\mu$ g/mL의 농도로 24시간 처리한 후, LPS 1 $\mu$ g/mL를 1시간 처리하였다. LPS에 의해 증가된 NLRP3 및 phospho-NF- $\kappa$ B의 발현량이 Ramalin(2.5, 5, 10 $\mu$ g/mL), NAP(5 $\mu$ g/mL), OMe(2.5 $\mu$ g/mL), CF3(5 $\mu$ g/mL), Me(2.5, 5 $\mu$ g/mL), Hyd-Me(5 $\mu$

g/mL)를 처리한 샘플에서 감소한 것을 확인하였다(그림7A-7E).

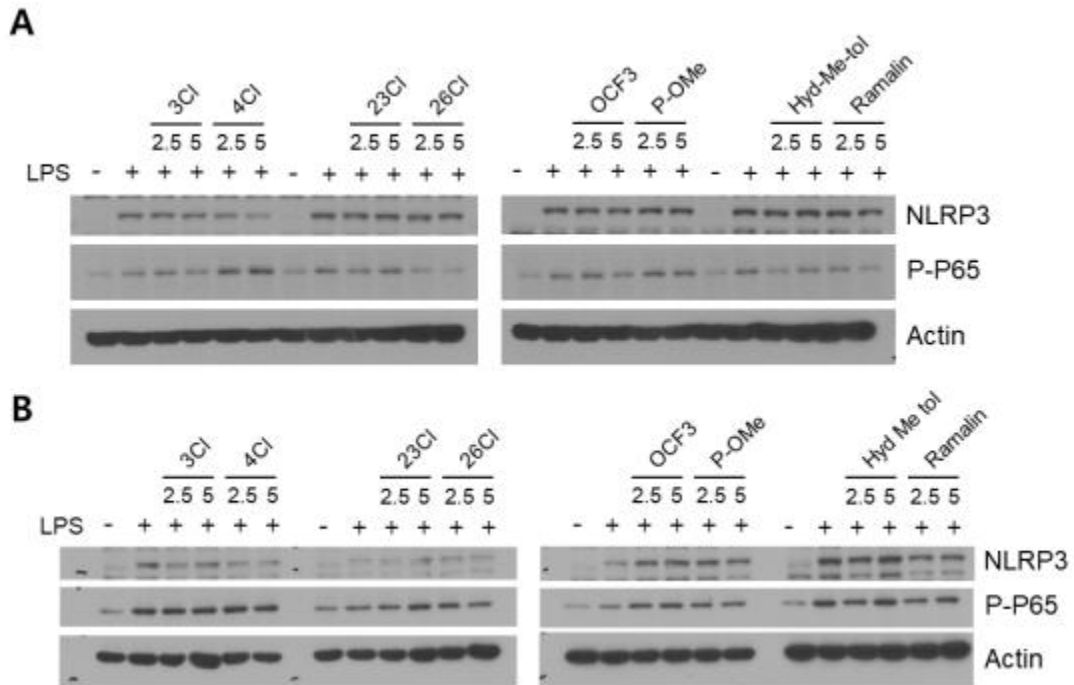


그림 8 Mouse 미세교세포에서 라말린 및 라말린 유도체의 항염증 효과 확인(RA-3Cl, RA-4Cl, RA-23Cl, RA-26Cl, RA-OCF3, RA-P-OMe, RA-Hyd-Me-tol)

마지막으로, 3차에 합성된 Ramalin 유도체에 의한 염증 관련 유전자들의 조절을 확인하기 위해 마우스 BV-2 미세교세포에 약물을 처리하였다. Ramalin(2.5, 5 $\mu$ g/mL)과 Ramalin 유도체(RA-3Cl, RA-4Cl, RA-23Cl, RA-26Cl, RA-OCF3, RA-P-OMe, RA-Hyd-Me-tol)를 BV-2에 2.5, 5 $\mu$ g/mL의 농도로 24 시간 처리한 후, LPS 0.2 $\mu$ g/mL를 6시간 처리하였다. LPS에 의해 증가된 NLRP3 및 phospho-NF- $\kappa$ B의 발현량이 Ramalin(2.5, 5 $\mu$ g/mL), 4Cl(2.5, 5 $\mu$ g/mL), 26Cl(2.5, 5 $\mu$ g/mL), Hyd-Me-tol(2.5, 5 $\mu$ g/mL)를 처리한 샘플에서 감소한 것을 확인하였다(그림8A-8B).

다. 마우스 primary cultured 미세교세포에서 항염증 효과 확인

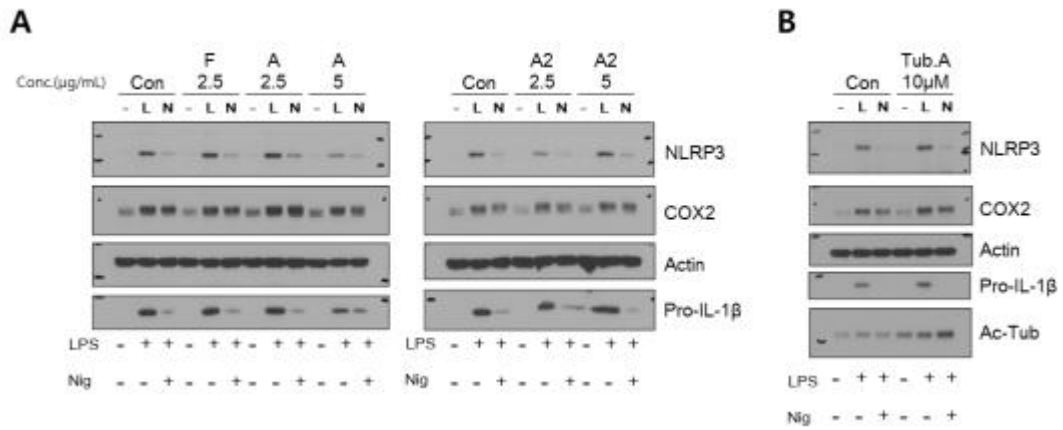


그림 9 Mouse primary microglia에서 라말린 및 라말린 유도체의 항염증 효과 확인 (RA-F-A, RA-F-A2, RA-F-F)

C57BL6/J 생후 1일 마우스로부터 분리한 Primary glia를 2주간 세포배양 한 후, CD11b 항체를 이용하여 microglia를 분리하여 배양하였다. Ramalin 유도체 (RA-F-A, RA-F-A2, RA-F-F)를 primary microglia에 2.5, 5μg/mL의 농도로 24시간 처리한 후, LPS 0.2μg/mL를 3시간 처리하였다. 그 후, Nigericin 20μM을 1시간 처리한 후 샘플을 harvest하였다. LPS 및 Nigericin에 의해 증가된 NLRP3 및 COX2, Pro-IL-1β의 발현량이 RA-F-A(5μg/mL), RA-F-A2(2.5μg/mL)를 처리한 샘플에서 감소한 것을 확인하였다(그림9A). 또한, Ramalin의 예상 타겟인 HDAC6의 특이적 inhibitor인 Tubastatin A를 Primary cultured microglia에 처리하였다(그림 9B). 그러나 Ramalin 및 Ramalin 유도체와 달리 Tubastatin A는 항염증효과를 나타내지 않았다.



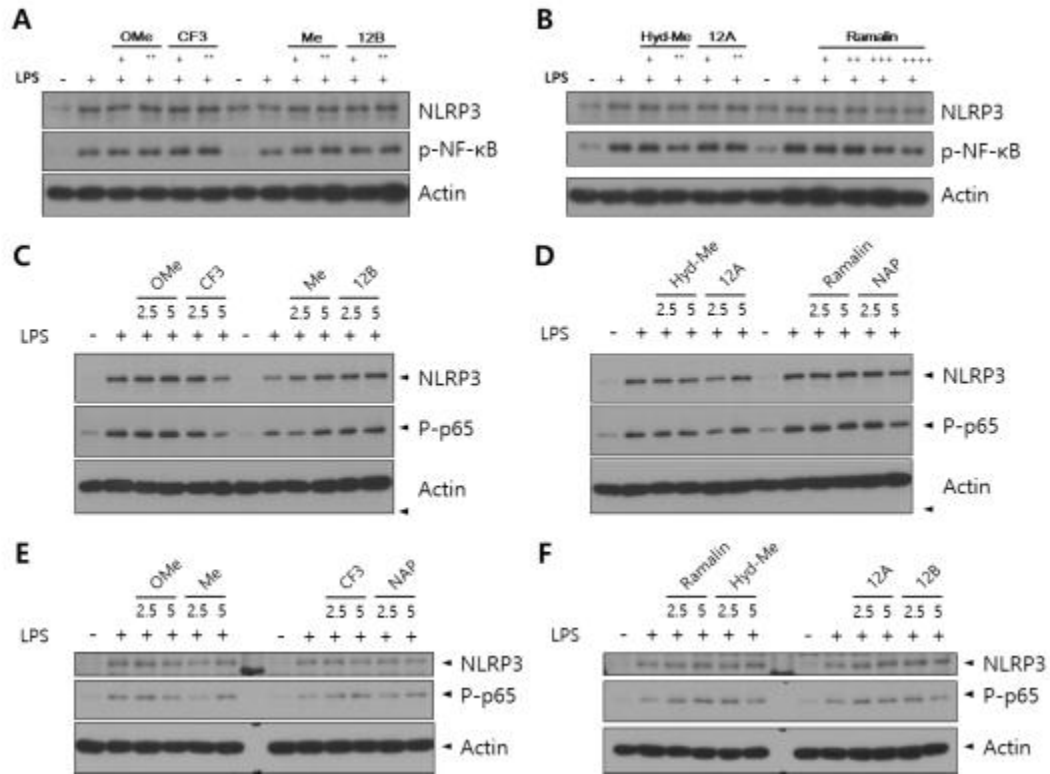


그림 10 Mouse primary microglia에서 라말린 및 라말린 유도체의 항염증 효과 확인 (RA-NAP, RA-Me, RA-OMe, RA-12A, RA-12B, RA-Hyd-Me, RA-CF3)

다음으로, 2차에 합성된 Ramalin 유도체들(RA-NAP, RA-Me, RA-OMe, RA-12A, RA-12B, RA-Hyd-Me, RA-CF3)의 항염증효과를 확인하기 위해 Primary cultured microglia를 이용하였다. C57BL6/J 생후 1일 마우스로부터 분리한 Primary glia를 2주간 세포배양 한 후, CD11b 항체를 이용하여 microglia를 분리하여 배양하였다. Ramalin(1.25, 2.5, 5, 10 $\mu$ g/mL)과 Ramalin 유도체(Me, OMe, 12A, 12B, Hyd-Me, CF3)를 primary microglia에 2.5, 5 $\mu$ g/mL의 농도로 24시간 처리한 후, LPS 1 $\mu$ g/mL를 1시간(그림10A-10D) 또는 3시간(그림 10E-10F) 처리하였다. LPS에 의해 증가된 NLRP3 및 phospho-NF- $\kappa$ B의 발현량이 Ramalin(5, 10 $\mu$ g/mL), Hyd-Me(5 $\mu$ g/mL)를 처리한 샘플에서 감소한 것을 확인하였다(그림10A, 10B).

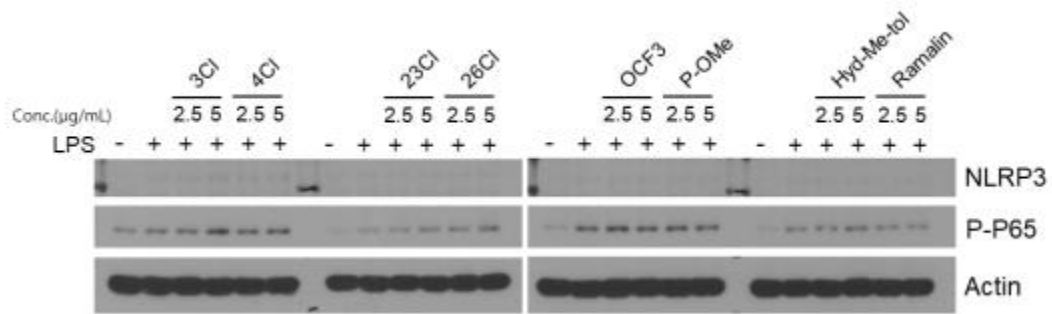


그림 11 Mouse primary microglia에서 라말린 및 라말린 유도체의 항염증 효과 확인 (RA-3Cl, RA-4Cl, RA-23Cl, RA-26Cl, RA-OCF3, RA-P-OMe, RA-Hyd-Me-tol)

마지막으로, 3차에 합성된 Ramalin 유도체들(RA-3Cl, RA-4Cl, RA-23Cl, RA-26Cl, RA-OCF3, RA-P-OMe, RA-Hyd-Me-tol)의 항염증 효과를 Ramalin과 비교하였다. Ramalin과 Ramalin 유도체(RA-3Cl, RA-4Cl, RA-23Cl, RA-26Cl, RA-OCF3, RA-P-OMe, RA-Hyd-Me-tol)를 primary microglia에 2.5, 5 $\mu$ g/mL의 농도로 24시간 처리한 후, LPS 1 $\mu$ g/mL를 1.5시간(그림11) 처리하였다. LPS에 의해 증가된 NLRP3 및 phospho-NF- $\kappa$ B의 발현량이 Ramalin(2.5, 5 $\mu$ g/mL)을 처리한 샘플에서 감소하였으나, 다른 Ramalin 유도체를 처리한 샘플에서는 변화가 없었다.

결론적으로, 미세교세포 BV-2, HMC3, Primary cultured microglia에서 Ramalin 및 Ramalin 유도체의 항염증효과를 확인했을 때, 효과를 나타내는 Ramalin 유도체의 종류 및 농도에 차이를 보였다. 반복적인 항염증 효과를 보였던 Ramalin 유도체로는 RA-OMe, RA-Hyd-Me, RA-F-A2가 있었으며, 세포마다 약물에 대한 반응성이 다를 수 있기 때문에 추후 치료농도를 확립하기 위해 반복실험이 필요할 것으로 보인다.

#### 4. Ramalin 및 Ramalin 유도체의 항산화 효과 확인

가. 인간 신경세포 SH-SY5Y cell line에서 항산화 효과 확인

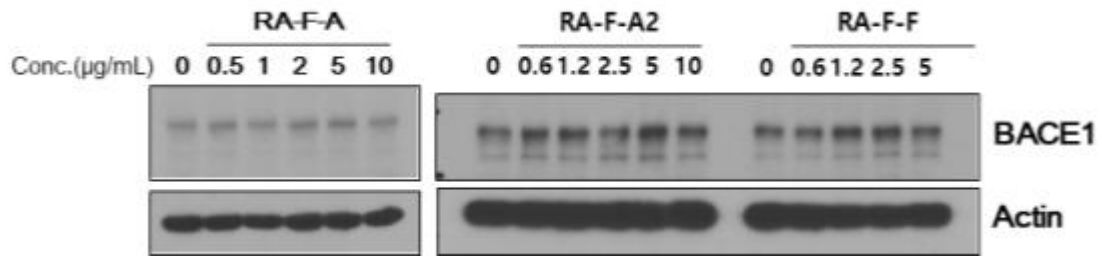


그림 12 Human 신경세포에서 라말린 및 라말린 유도체의 항치매 효과 확인(RA-F-A, RA-F-A2, RA-F-F)

본 연구팀은 SH-SY5Y 신경세포 또는 Primary culture 신경세포에 Ramalin을 처리하였을 때 BACE1 단백질 발현량이 감소하는 것을 확인하였다. Ramalin 유도체도 이와 같은 BACE1 단백질 감소 효과를 보이는 지 확인하기 위해 신경세포 SH-SY5Y에 Ramalin 유도체(RA-F-A, RA-F-A2, RA-F-F)를 0.5, 1, 2, 5, 10µg/mL(RA-F-A) 또는 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10µg/mL(RA-F-A2, RA-F-F)로 24시간 처리하였다. Ramalin과 달리 Ramalin 유도체(RA-F-A, RA-F-A2, RA-F-F)에서는 BACE1 단백질 발현량이 감소하지 않았다 (그림 12).



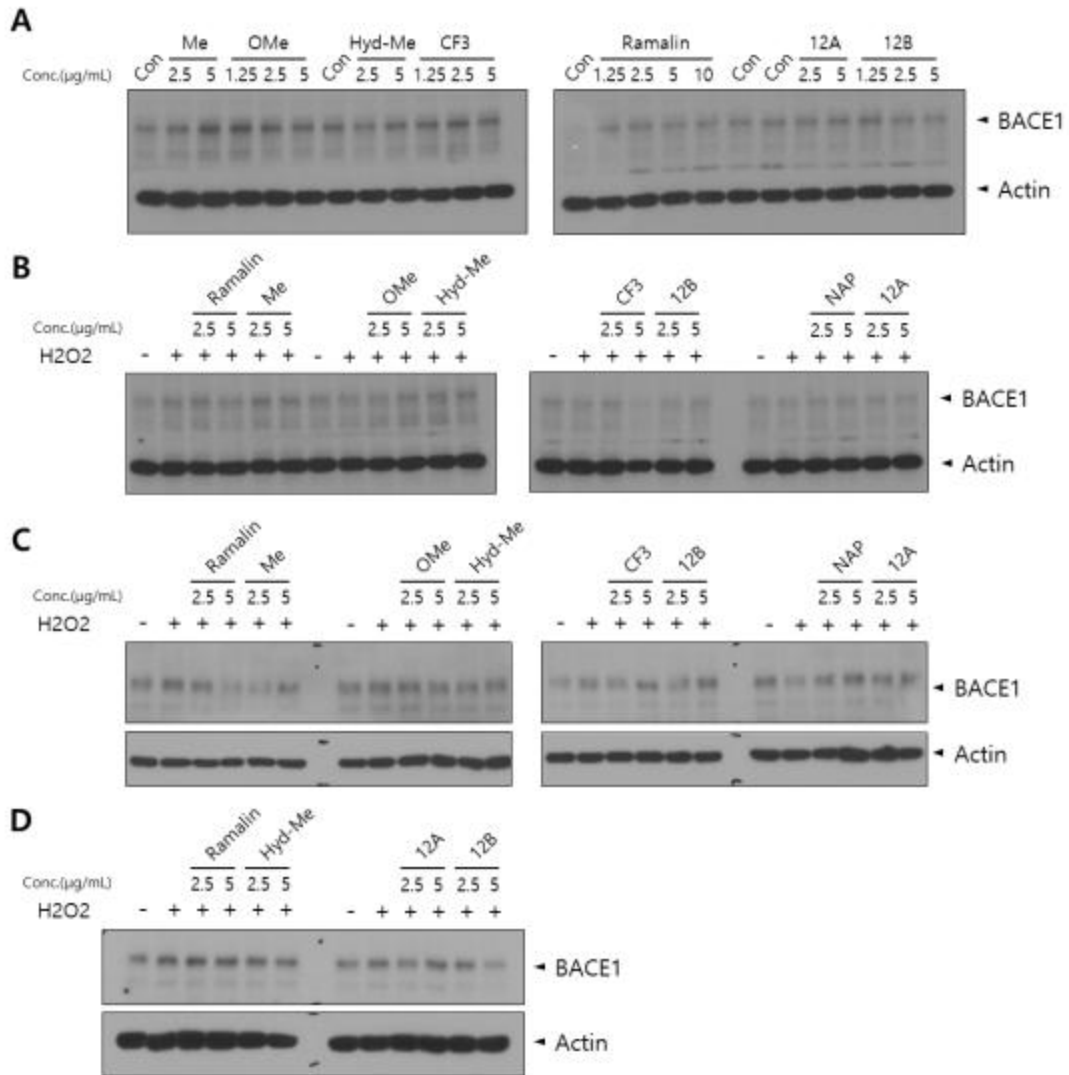


그림 13 Human 신경세포에서 라말린 및 라말린 유도체의 항치매 효과 확인(RA-NAP, RA-Me, RA-OMe, RA-12A, RA-12B, RA-Hyd-Me, RA-CF3)

다음으로, 2차에 합성된 Ramalin 유도체들(RA-NAP, RA-Me, RA-OMe, RA-12A, RA-12B, RA-Hyd-Me, RA-CF3)의 항치매효과를 확인하기 위해 SH-SY5Y 세포에서 BACE1의 단백질 발현량을 확인하였다. Ramalin 및 Ramalin 유도체들을 SH-SY5Y 세포에 1.25, 2.5, 5, 10 $\mu$ g/mL로 24시간 처리하였다(그림 13A). Hyd-Me(2.5 $\mu$ g/mL), 12B(5 $\mu$ g/mL)를 처리한 샘플에서 BACE1 단백질 발현량이 감소하였다. 그러나 Ramalin의 효과가 뚜렷하게 나타나지 않아 H2O2로 hypoxia 조건을 주어 BACE1의 발현량을 증가시켰다(그림 13B-13D). Ramalin 및 Ramalin 유도체를 24시간 전처리한 후, H2O2 200 $\mu$ M 2시간(그림 13B), H2O2 500 $\mu$ M 1시간(그림 13C), H2O2 200 $\mu$ M 3시간(그림 13D)

처리한 후 샘플을 harvest하였다. Ramalin(5 $\mu$ g/mL), CF3(5 $\mu$ g/mL), Me(2.5 $\mu$ g/mL), 12B(5 $\mu$ g/mL)를 처리했을 때 BACE1의 단백질 발현량이 감소하는 것을 확인하였다.

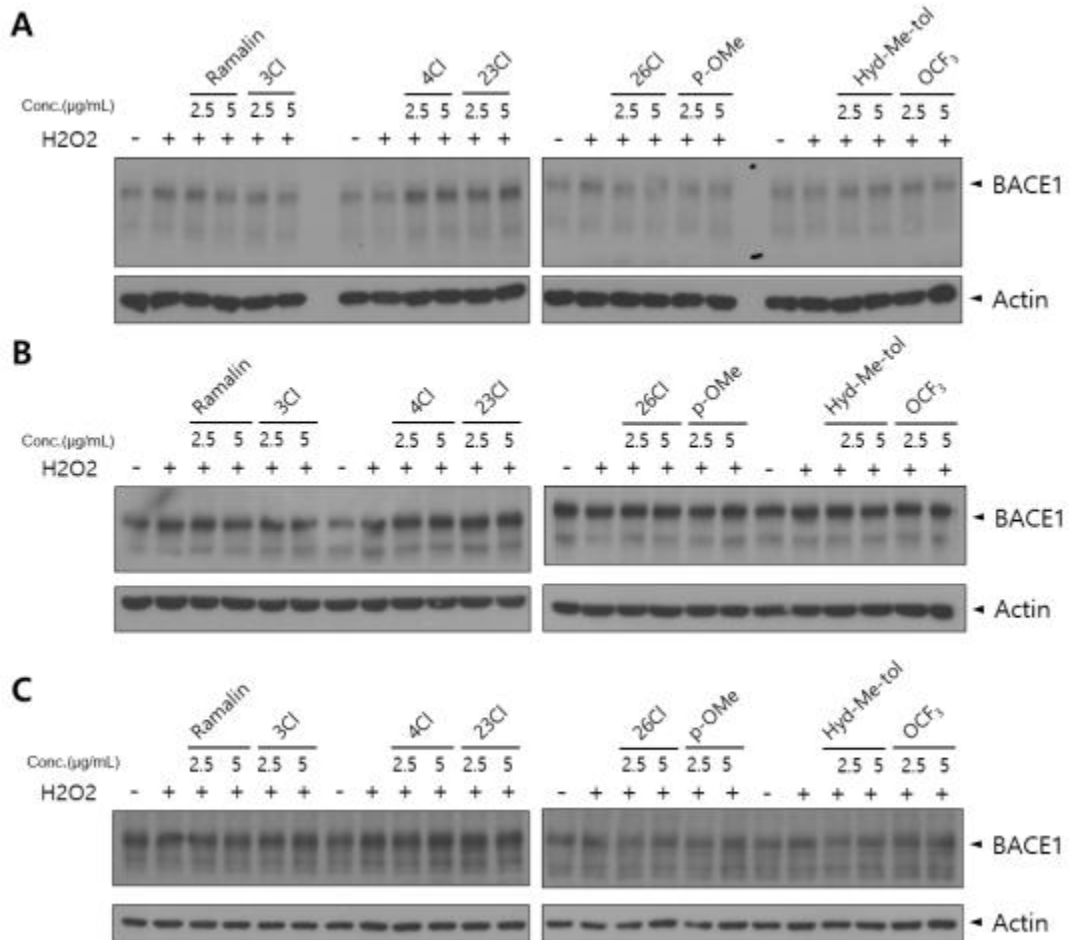


그림 14 Human 신경세포에서 라말린 및 라말린 유도체의 항치매 효과 확인(RA-3Cl, RA-4Cl, RA-23Cl, RA-26Cl, RA-OCF<sub>3</sub>, RA-P-OMe, RA-Hyd-Me-tol)

마지막으로, 3차에 합성된 Ramalin 유도체들(RA-3Cl, RA-4Cl, RA-23Cl, RA-26Cl, RA-OCF<sub>3</sub>, RA-P-OMe, RA-Hyd-Me-tol)의 항치매 효과를 Ramalin과 비교하였다. Ramalin 및 Ramalin 유도체 2.5, 5 $\mu$ g/mL을 24시간 처리한 후, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 $\mu$ M을 3시간 처리하였다(그림14A-14C). Ramalin(5 $\mu$ g/mL), 3Cl(2.5, 5 $\mu$ g/mL)를 처리했을 때 BACE1 단백질 발현량이 감소하였다.

나. 마우스 신경세포 N2A cell line에서 항산화 효과 확인

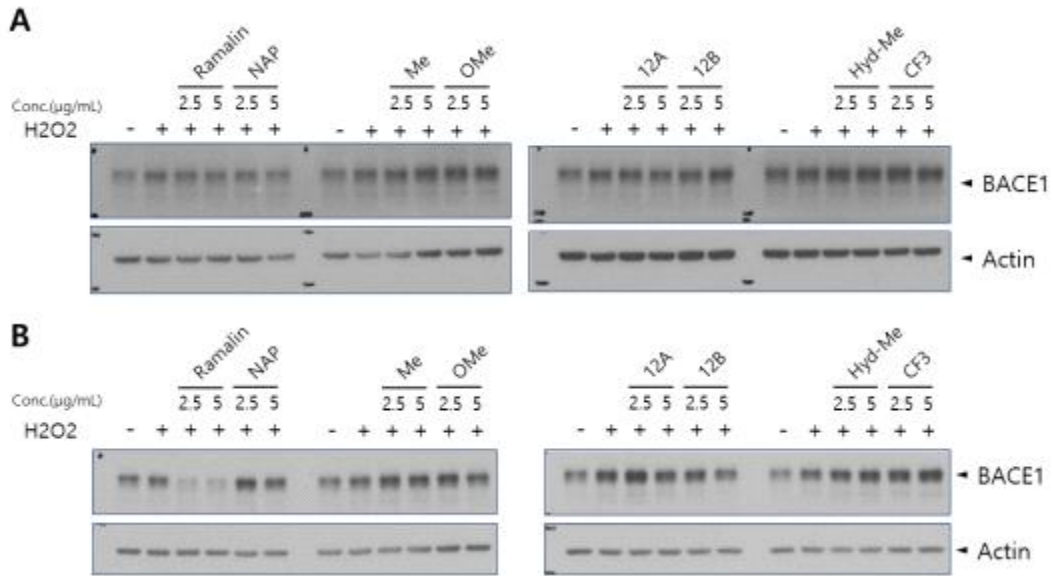


그림 15 Mouse 신경세포에서 라말린 및 라말린 유도체의 항치매 효과 확인(RA-NAP, RA-Me, RA-OMe, RA-12A, RA-12B, RA-Hyd-Me, RA-CF3)

Ramalin 및 Ramalin 유도체(RA-NAP, RA-Me, RA-OMe, RA-12A, RA-12B, RA-Hyd-Me, RA-CF3)의 항치매 효과를 Mouse 신경세포에서 확인하였다. Ramalin 및 Ramalin 유도체를 2.5, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  24시간 처리한 후, H2O2 100 $\mu\text{M}$ 을 3시간 처리하였다(그림 15A-15B). Ramalin(2.5, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 12B(5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )를 처리했을 때 H2O2에 의한 BACE1 유도가 감소하는 것을 확인하였다.

결론적으로, 신경세포 SH-SY5Y, N2a에서 Ramalin 및 Ramalin 유도체의 항치매효과를 확인했을 때, 효과를 나타내는 Ramalin 유도체의 종류 및 농도에 차이를 보였다. 그러나 Ramalin과 RA-12B는 두 종류의 신경세포에서 모두 BACE1 감소효과를 나타냈으며, 추 후 반복실험을 통하여 RA-12B의 치료농도를 확립할 필요가 있다.

## 제 2 절 이론적·실험적 접근 방법

성과목표	세부목표	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)	구체적인 내용
<p>Ramalin 및 Ramalin 유도체의 항염증 효과 확인</p>	<p>Ramalin 및 Ramalin 유도체에 의한 염증인자 발현 변화 확인</p>	<p>염증반응 관련인자(COX2, NFκB, NLRP3, IL-1β, Caspase1)의 단백질 발현 변화 확인</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ICR 또는 C57BL6 mouse 생후 1일령의 뇌 조직으로부터 교세포 배양. 16일 후, CD11b 항체를 이용하여 미세교세포 분리.(EasySep Mouse CD11b Positive Selection Kit II, Stem Cell 18970) [17]</li> <li>- 미세교세포에 Ramalin 및 Ramalin 유도체 2.5, 5μg/mL을 24시간 처리한 뒤, LPS 0.2μg/mL 6시간, Nigericin 20μM 1시간 처리함.</li> <li>- BV-2 cell line 또는 HMC3 cell line에 Ramalin 및 Ramalin 유도체 2.5, 5μg/mL을 24시간 처리한 뒤, LPS를 처리하여 염증반응 유도.</li> <li>- Cell lyates 또는 microglia cultured media로부터 단백질을 추출하여, 염증관련 인자 및 NLRP3 inflammasome 인자들의 단백질 발현량 확인.</li> </ul>

		<p>염증반응 관련인자(COX2, NFκB, NLRP3, IL-1β, Caspase1)의 mRNA 발현 변화 확인</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ICR 또는 C57BL6 mouse 생후 1일령의 뇌 조직으로부터 교세포 배양. 16일 후, CD11b 항체를 이용하여 미세교세포 분리.</li> <li>- 미세교세포에 Ramalin 및 Ramalin 유도체 2.5, 5μg/mL을 24시간 처리한 뒤, LPS 0.2μg/mL 6시간, Nigericin 20μM 1시간 처리함.</li> <li>- BV-2 cell line 또는 HMC3 cell line에 Ramalin 및 Ramalin 유도체 2.5, 5μg/mL을 24시간 처리한 뒤, LPS를 처리하여 염증반응 유도.</li> <li>- Cell lysates에서 RNA 추출. cDNA를 합성하여 realtime PCR기법으로 염증관련 인자 및 NLRP3 inflammasome 인자들의 mRNA 발현량 확인.</li> </ul>
		<p>IL-1β secretion 변화를 ELISA를 통해 확인</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ICR 또는 C57BL6 mouse 생후 1일령의 뇌 조직으로부터 교세포 배양. 16일 후, CD11b 항체를 이용하여 미세교세포 분리.</li> <li>- 미세교세포에 Ramalin</li> </ul>



			<p>및 Ramalin 유도체 2.5, 5<math>\mu</math>g/mL을 24시간 처리한 뒤, LPS 0.2<math>\mu</math>g/mL 6시간, Nigericin 20<math>\mu</math>M 1시간 처리함.</p> <p>- microglia cultured media를 harvest한 후, IL-1<math>\beta</math> antibody로 코팅한 plate에 같은 양을 로딩함. IL-1<math>\beta</math> ELISA kit (Invitrogen, 88-7013-88)에서 제공한 protocol를 이용하여 미세교세포를 배양한 배지에 있는 IL-1<math>\beta</math> 양 확인.</p>
		Ramalin 및 Ramalin 유도체 처리에 따른 BACE1 발현량 확인	<p>- SH-SY5Y 신경세포 또는 N2a 신경세포에 Ramalin 및 Ramalin 유도체 2.5, 5<math>\mu</math>g/mL을 처리함.</p> <p>- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200<math>\mu</math>M을 3시간 처리한 후 세포로부터 단백질을 추출함. BACE1 단백질 발현량 확인.</p>
		세포 배양 조건	<p>- SH-SY5Y, N2A, BV-2 세포를 성장 배지 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 10% FBS, 1% Penicillin/streptomycin), 37<math>^{\circ}</math>C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양한다.</p>

			<p>- Mouse primary cultured glia, microglia 세포를 성장 배지 (DMEM/F12, 10% FBS, 1% Penicillin/streptomycin, 1% L-glutamine, 1% Sodium pyruvate, 1% non-essential amino acids), 37°C, 5% CO2 조건에서 배양한다.</p>
	Western blotting		<p>- 단백질 정량은 BCA protein assay를 이용하였다. 같은 양의 단백질을 8% SDS-PAGE로 분리하여 PVDF membrane에 transfer하였다. membrane은 5% skim-milk로 1시간동안 상온에서 blocking하였다. 5% BSA에 dilution한 1차 항체 (anti-BACE1, anti-NLRP3, anti-p-p65, anti-COX2, anti-β-actin, anti-IL-1β)를 4°C에서 overnight으로 인큐베이션했다. 다음 날, TBS-T로 10분, 3번 washing한 후, horseradish peroxidase가 conjugation된 2차 항체를 상온에서 1시간 인큐베이션했다. 단백질 밴드는 ECL solution에 반응시킨</p>

			<p>뒤 X-ray film을 이용하여 detection 했다.</p> <p>- 총 RNA는 배양 세포에서 추출되었으며 RNAiso plus(Takara)를 이용하였다. DNase I (Promega)을 사용하여 genomic DNA 오염을 제거했으며, 각 샘플에 대해 RNA 1<math>\mu</math>g을 cDNA 합성에 사용했다. (PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit, Takara).</p> <p>- CFX Connect Real-Time PCR (Biorad)을 사용하였으며, PCR 증폭은 SYBR Premix Ex TaqTMII(Takara)를 사용하여 수행되었다. PCR 조건은 다음과 같았다: 95<math>^{\circ}</math>C에서 30초; 5초 동안 95<math>^{\circ}</math>C 그리고 60<math>^{\circ}</math>C에서 30초 (40 사이클 반복).</p>
		Quantitative real-time PCR	



## 제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

### 제 1 절 연구개발목표 달성도

#### 1. 연도별 연구목표 및 평가착안점

년도	성과목표	세부목표	가중치	평가의 착안점 및 척도
1차년도 (2020.1~ 2021.5)	Ramalin 및 Ramalin 유도체의 항염증 효과 확인	- Ramalin 및 Ramalin 유도체의 치료 농도 설정	50%	1. 공동 연구 수행 능력 2. 기초 분석 및 해석 능력 3. 연구결과의 적용가능 성
		- Ramalin 및 Ramalin 유도체에 의한 염증인자 발현 변화 확인	50%	

#### 2. 연구개발목표 및 달성도

성과목표	세부목표	달성 중요내용	달성도 (%)
1. Ramalin 및 Ramalin 유도체의 항염증 효과 확인	1-1 Ramalin 및 Ramalin 유도체의 치료 농도 설정	- 세포에 미치는 독성을 알아보기 위한 세포독성 평가 - 적절한 치료 농도 범위 설정	100
	1-2 Ramalin 및 Ramalin 유도체에 의한 염증인자 발현 변화 확인	- 염증반응 관련인자(COX2, NFκB, NLRP3, IL-1β, Caspase1)의 발현 변화 확인	100

## 제 2 절 대외기여도

### 1. 기술적 측면

- 퇴행성뇌질환 중 하나인 알츠하이머에 대한 치료제는 현재 도네패질과 같은 콜린성 신경계 조절물질이 허가된 상태이다. 질환에 대한 원인은 지난 수십 년간 A $\beta$  theory가 주목을 받아왔으나 계속된 BACE-1 저해제,  $\gamma$ -secretase 저해제 및 항체의 개발 실패로 인하여 점차 약화되었음.
- Tau theory가 부각되어 왔으나, Tau의 인산화를 조절하는 kinase들의 수가 많고 tau 만을 인산화시키는 kinase의 부재 등으로 인하여 연구 및 치료제 개발이 어려운 상태임.
- 최근에 NLRP3 inflammasome에 의한 알츠하이머 질환의 악화는 A $\beta$ 와 Tau theory를 잇는 알츠하이머 치매의 중요한 치료 타겟으로 판단된다. 그러나 현재까지 개발되어진 약물의 경우 A $\beta$ 와 Tau theory에 관여하는 효소의 활성 및 aggregates를 타겟하는 항체 개발에 초점이 맞추어 왔음.
- 극지연구소의 지원을 받아 수행한 선행연구를 통하여 BACE1의 발현을 조절할 수 있는 물질인 라말린을 찾아냈고, in-vitro, in-vivo 약효평가를 수행할 수 있었음. 또한, 라말린은 Tau 인산화 감소 및 미토콘드리아의 수송 개선에서도 효과를 보였음.
- 라말린의 기능은 한가지의 target에 국한하지 않고 전반적인 작용을 통하여 항치매 효과를 나타낸다고 여겨지며, 라말린을 기반으로 합성한 유도체들의 알츠하이머 치매 유효성을 검증하여, 항치매 후보약물을 발굴이 가능할 것으로 예상함.
- 유효 화합물을 검색하고 합성하는 연구, 세포 및 동물기반 생리 활성 연구 및 표적 단백질 및 약물 결합체의 구조에 관한 연구는 상호 보완적으로 질병 치료의 유효물질 개발에 시너지 효과를 발휘하며, 본 과제는 국내 구조기반 신약연구의 좋은 선례가 될 것이라 기대함.

### 2. 경제적-산업적 측면

- 알츠하이머 질환은 수명의 증대로 인하여 꾸준히 발병률이 높아지고 있는 질환으로 사회적 비용은 예측치를 벗어날 정도로 증가하고 있음.
- 현재 환자 수는 4,000만 명으로 추정되고 있고 5,000억 달러의 시장규모를 가지고 있으며, 약물시장은 향후 5년 이내에 1조 달러 이상의 시장으로 성장할 것

으로 예측됨. 알츠하이머 질환에 대한 치료제는 앞서 언급했듯이 현재 콜린성 신경계 조절물질만이 유일하게 승인되어 판매되고 있지만, 근본적인 치료 효과는 보이지 못하고 있음.

- 앞선 연구결과에서 항치매 효과를 확인했던 라말린의 작용기전을 밝히고, 라말린 유도체의 항치매 효과를 검증함으로써 새로운 신약 개발의 가능성을 보일 것으로 기대됨.

- 질병을 치료하는 대부분 약물은 생체 내 특정 표적 단백질들과 결합하여 활성을 저해하거나 조절함으로써 약효를 나타내므로 해당 단백질의 구조 또는 리간드 결합체 구조를 규명할 경우 표적 단백질의 조절 기전을 밝히고 관련 병리 현상을 이해하여 기초 의학학 발전에 이바지할 수 있으며, 이로부터 얻어진 후보 물질이 의학적 가치를 지니고 제약 산업으로 응용될 수 있다면 경제적 파급 효과를 가질 것으로 예상함.

### 3. 사회적 측면

- 알츠하이머병 비용은 해마다 증가하고 있으며, Alzheimer 's Disease International에 따르면 2015년 전 세계 사회 및 경제적 비용은 8,180억 달러로 전 세계 GDP의 1.09 %로 추산되며, 우리나라에서는 2019년 연간 160억 달러가 지출될 것으로 추정.

- 치매 직접 비용은 가족과 공공 시스템이 분담하지만, 간접 비용은 전적으로 가족이 부담하게 되며, 이는 치매로 인한 개인의 경제적 부담이 매우 높다는 것을 의미하며, 간접 비용은 질병의 정서적 부담과 함께 알츠하이머병을 돌보는 사람들에게 큰 영향을 미치고, 더 나아가 불안, 우울증 등으로 인해 삶의 질이 저하 될 수 있음.

- 우리나라에서는 2018년 기준 65세 이상이 740만 명, 알츠하이머병으로 추정되는 사람은 75만 명 (10.16 %)임. 이러한 현상은 국가의 의료 시스템, 예산, 가족에게 점점 더 많은 압력을 가하고 있으며, 현재 수준의 치료를 계속하려면 정부의 지원이 시급함.

- 전 세계적으로 AD 비용이 엄청나고 진단과 치료 사이의 간격이 감소함에 따라 향후 몇 년 동안 비용이 매우 증가할 것으로 예상하며, 조기진단 및 치료에 대한 비용 효율적인 접근 방식의 연구 및 개발에 지금 투자함으로써 미래의 사회적 비용을 관리할 수 있을 것으로 기대함.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 절 추가연구의 필요성

문제점 또는 원인	개선방향 또는 대책
-Ramalin 및 Ramalin 유도체의 타겟을 찾아야 함	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 효모 유전체 라이브러리를 이용한 작용점 스크리닝</li> <li>- Ramalin 처리에 따른 mRNA 발현 변화 확인 (RNA-Sequencing)</li> </ul>
-Ramalin 및 Ramalin 유도체의 염증반응 조절 기전 규명	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Ramalin 타겟의 과발현 또는 발현 억제에 따른 염증반응 관련인자들 (COX2, NFκB, NLRP3, IL-1β, Caspase1)의 발현 변화 확인</li> <li>- Ramalin의 타겟과 Ramalin 처리에 의해 발현이 변화된 유전자들 간의 상관관계 분석</li> </ul>

극지연구소



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 제 1 절 해외과학기술정보

#### 1. 알츠하이머 치매 Tau 단백질의 새로운 수용체 발견 [18]

- 2020년, Martin Kampmann과 Kenneth S. Kosik 연구팀에서 LRP1이 Tau의 uptake와 전파를 조절하는 중요한 조절자로서 제시했다. LRP1은 신경세포에서 타우 단백질 엔도사이토시스의 주요 조절자이며, 뇌에서 타우의 확산에 중요한 역할을 한다. 신경세포의 LRP1을 표적으로 하는 것은 생체 내에서 타우 확산의 상당한 감소를 가져왔고, 타우 관련 신경퇴행성 질환에 대한 새로운 치료 접근을 보여주었다. 또한, 알츠하이머병에서 LRP1은 아밀로이드 베타의 분해와 생산, 그리고 ApoE의 내재화를 조절하며, ApoE4는 LRP1 발현에 의존하는 방식으로 아밀로이드 베타 병리를 악화시킨다.

#### 2. 알츠하이머 치매의 염증반응에서 PLC $\gamma$ 2의 역할 [19]

- 2020년, Joseph W. Lewcock 연구팀에서 알츠하이머 치매에서 일어나는 TREM2 매개 염증반응이 PLC $\gamma$ 2 의존적이라는 것을 밝혔다. PLC $\gamma$ 2 활성화는 TREM2 및 TLR의 하위 pathway에서 생존, 식작용, 신경세포의 debris 처리 및 지질 대사와 같은 여러 미세교세포 기능을 조절한다. TREM2 및 TLR 신호 전달은 모두 PLC $\gamma$ 2 활성화에 따라 하위단계 기능을 조절한다. PLC $\gamma$ 2는 질병이 진행되는 동안 유익한 결과와 해로운 결과 사이에서 미세교세포 기능을 조절하는 역할을 할 수 있다.

#### 3. HDAC6의 NLRP3 inflammasome 활성화 [20]

- 2020년, Hao Wu 연구팀에서 HDAC6가 NLRP3 inflammasome과 Pyrin inflammasome의 활성을 촉진시키는 것을 밝혔다. aggresome 형성 및 분해를 위해 NLRP3와 pyrin inflammasome 형성과 HDAC6에 의한 병리학적 응집체의 MTOC로의 수송이 모두 일어난다. NLRP3 및 pyrin inflammasome 활성화는 유비퀴틴화와 HDAC6에 의한 수송에 의해 조절된다. MTOC에 위치하는 것은 inflammasome의 balance를 위해 활성화시키기도, 억제하기도 하는 이중적인 역할을 한다.

## 제 7 장 참고문헌

1. Assessing the socioeconomic impact of Alzheimer's in Western Europe and Canada. The Economist Intelligence Unit. 2017.
2. 남효정 외 3인. 대한민국 치매현황 2018. 보건복지부 중앙치매센터. 2018
3. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Early Alzheimer's Disease: Developing Drugs for Treatment Guidance for Industry. 2018.
4. THERAPEUTICS. Alzforum. 2021.07.17.  
<https://www.alzforum.org/therapeutics>
5. Dunn KM et al. Neurovascular signaling in the brain and the pathological consequences of hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2014. 306(1):H1-14.
6. Rosenberg PB et al. Effects of cardiovascular medications on rate of functional decline in Alzheimer disease. *Am J Geriatr Psychiatry*. 2008. 16(11):883-92.
7. Wang J et al. Carvedilol as a potential novel agent for the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2011. 32(12):2321.e1-12.
8. Katsouri L et al. Prazosin, an  $\alpha(1)$ -adrenoceptor antagonist, prevents memory deterioration in the APP23 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2013. 34(4):1105-15.
9. Haase N et al. Amyloid- $\beta$  peptides activate  $\alpha(1)$ -adrenergic cardiovascular receptors. *Hypertension*. 2013. 62(5):966-72.
10. Carlsson CM et al. Effects of simvastatin on cerebrospinal fluid biomarkers and cognition in middle-aged adults at risk for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*. 2008. 13(2):187-97.
11. THERAPEUTICS - Aducanumab. Alzforum. 2021.07.17.  
<https://www.alzforum.org/therapeutics/aducanumab>
12. Jeff S et al. The antibody aducanumab reduces A $\beta$  plaques in Alzheimer's disease. *Nature*. 2016. 537:50-56.
13. Brier MR et al. Tau and A $\beta$  imaging, CSF measures, and cognition in Alzheimer's disease. 2016. *Science Translational Medicine*. 8(338).
14. Heneka MT et al. NLRP3 is activated in Alzheimer's disease and

- contributes to pathology in APP/PS1 mice. 2013. *Nature*. 493(7434):674-678.
15. Readhead B et al. Multiscale Analysis of Independent Alzheimer's Cohorts Finds Disruption of Molecular, Genetic and Clinical Networks by Human Herpesvirus. *Neuron*. 2018. 99(1):64-82.
16. Eimer WA Vijaya Kumar DK Navalpur Shanmugam NK et al. Alzheimer's disease-associated  $\beta$ -amyloid is rapidly seeded by Herpesviridae to protect against brain infection. *Neuron*. 2018; 99: 56-63.
17. Souvarish Sarkar et al. Rapid and Refined CD11b Magnetic Isolation of Primary Microglia with Enhanced Purity and Versatility. *J Vis Exp*. 2017. 122:55364.
18. Jennifer N. Rauch et al. LRP1 is a master regulator of tau uptake and spread. *Nature*. 2020. 580.
19. Benjamin J. Andreone et al. Alzheimer's-associated PLC $\gamma$ 2 is a signaling node required for both TREM2 function and the inflammatory response in human microglia. *Nature Neuroscience*. 2020. 23:927-938.
20. Venkat Giri Magupalli, Roberto Negro, Yuzi Tian et al. HDAC6 mediates an aggresome-like mechanism for NLRP3 and pyrin inflammasome activation. *Science*. 2020. 369:1448.

극지연구소