



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년08월04일

(11) 등록번호 10-2563048

(24) 등록일자 2023년07월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01K 67/027 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01K 67/027 (2013.01)

A01K 2207/25 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0018410

(22) 출원일자 2021년02월09일

심사청구일자 2021년02월09일

(65) 공개번호 10-2022-0015300

(43) 공개일자 2022년02월08일

(30) 우선권주장

1020200094819 2020년07월29일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌

Preprints, pp. 1-17(2020.07.22.,

doi:10.20944/preprints202007.0505.v1)*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 18 항

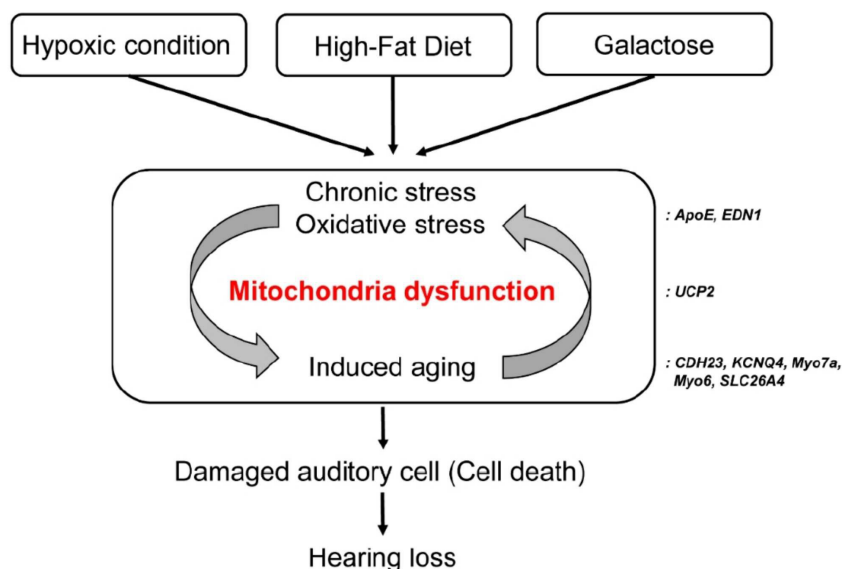
심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 노인성 난청 동물모델 및 이의 제작방법

(57) 요약

본 발명은 노인성 난청(Age-related hearing loss, ARHL)의 동물모델 및 이의 제작방법에 관한 것으로, 구체적으로 간헐적 저산소 환경에서 동물에게 고지방식을 제공하고 갈락토스를 투여하여 청각기관을 단기간에 노화 및 손상시키는 노인성 난청 동물모델 제작방법 및 상기 제작방법으로 제작된 동물모델에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A01K 2207/35 (2013.01)

A01K 2267/03 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020120021941 A

KR1020180100849 A

KR1020200032448 A

US20160015011 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1465035588

과제번호 HH21C0009000022

부처명 보건복지부

과제관리(전문)기관명 한국보건산업진흥원

연구사업명 범부처 재생의료기술개발사업

연구과제명 급성 난청 재생치료를 위한 줄기세포 유래 세포외소포 치료제 “SPISOME” 의 비임
상 연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 연세대학교원주산학협력단

연구기간 2022.02.01 ~ 2022.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 인간을 제외한 동물 중 정상청력을 가진 실험동물을 선별하는 단계;
 - (2) 저산소 환경 조건 형성을 챔버에 상기 단계 (1)에서 선별된 실험동물을 투입하는 단계;
 - (3) 상기 단계 (2)의 챔버에 간헐적 저산소 환경 조건을 형성하는 단계; 및
 - (4) 상기 단계 (3)의 동물에 고지방식을 제공 또는 갈락토스를 투여하는 단계;
- 를 포함하는 노인성 난청 동물모델 제작방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 단계 (1)의 실험동물은 랫트, 마우스, 랫트 저빌(gerbil), 모르모트, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 소, 양, 돼지 및 염소로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 비인간 동물인, 노인성 난청 동물모델 제작방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 단계 (3)의 간헐적 저산소 환경 조건은 8 내지 16시간은 산소농도가 0 내지 10 %인 저산소 환경 및 8 내지 16시간은 산소농도 15 내지 25 %의 정상산소 환경이 교대로 형성된 것인, 노인성 난청 동물모델 제작방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 단계 (3)의 간헐적 저산소 환경 조건은 12시간은 산소농도가 0 내지 5 %인 저산소 환경 및 12시간은 산소농도 15 내지 25 %의 정상산소 환경이 교대로 형성된 것인, 노인성 난청 동물모델 제작방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 단계 (4)는 고지방식 제공 및 갈락토스 투여를 병행하여 수행하는 것인, 노인성 난청 동물모델 제작방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 단계 (4)의 고지방식은 비타민이 함유되고 지방 함량이 25 내지 60%인 사료인, 노인성 난청 동물모델 제작방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 단계 (4)의 갈락토스는 동물의 단위체중(kg)당 100 내지 800 mg인, 노인성 난청 동물모델 제작방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 단계 (4)의 갈락토스는 동물의 단위체중(kg)당 250 내지 600 mg인, 노인성 난청 동물모델 제작방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 제작방법은 4주 내지 16주의 기간을 통해 제조되는, 노인성 난청 동물모델 제작방법.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 제작방법은 8주 내지 12주의 기간을 통해 제조되는, 노인성 난청 동물모델 제작방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 노인성 난청은 감각성 노인성 난청(sensory presbycusis), 신경성 노인성 난청(neural presbycusis), 대사성 노인성 난청(metabolic presbycusis), 와우전도성 노인성 난청(cochlear conductive presbycusis), 혼합성 노인성 난청(mixed presbycusis) 및 중간성 노인성 난청(intermediate presbycusis)으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 난청인, 노인성 난청 동물모델 제작방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 노인성 난청 동물모델은 지방 축적, 산화 스트레스 증가, 미토콘드리아 기능 장애 유도, 노화 촉진, 청각 기관 노화 및 손상 관련 유전자 발현, 및 청각 유모세포 사멸 효과로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 효과로 인해 난청이 발현되는, 노인성 난청 동물모델 제작방법.

청구항 13

제12항에 있어서,

상기 발현되는 유전자는 심혈관 합병증 관련 유전자인 Edn1, 청각 기관의 이온 채널 관련 유전자인 Slc24A4, 미토콘드리아 기능 장애 관련 유전자인 Ucp2, 비증후군성 난청 관련 유전자인 Kcnq4, Myo7a 및 Myo6, 연령 관련 난청 관련 유전자인 Cdh23, 연령 관련 장애 및 혈관 질환 관련 유전자인 ApoE로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자인, 노인성 난청 동물모델 제작방법.

청구항 14

제1항에 있어서,

상기 노인성 난청은 청력 역치가 30 dB 이상인, 노인성 난청 동물모델 제작방법.

청구항 15

제1항에 있어서,

상기 노인성 난청은 만성으로 유지되는 것인, 노인성 난청 동물모델 제작방법.

청구항 16

제1항에 있어서,

상기 노인성 난청은 3개월 이상 유지되는 것인, 노인성 난청 동물모델 제작방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 제작방법으로 제작된, 노인성 난청 동물모델.

청구항 18

(a) 제17항에 따른 노인성 난청 동물모델에 노인성 난청 치료제 후보 물질을 투여하는 단계;

(b) 상기 단계 (a)의 후보물질이 투여된 동물모델의 청력 역치를 측정하는 단계; 및

(c) 상기 단계 (b)의 동물모델의 청력 역치와 후보물질 미투여 동물모델의 청력 역치를 비교하여 감소하는 경우의 후보물질을 노인성 난청 치료제로 선별하는 단계;

를 포함하는, 노인성 난청 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 노인성 난청(Age-related hearing loss, ARHL, Presbycusis) 동물모델 및 이의 제작방법에 관한 것으로, 구체적으로 간헐적 저산소 환경에서 실험동물에게 고지방식(High fat diet, HFD)을 제공하고 갈락토스(Galactose)를 투여하여 제작되는 난청 동물모델 및 이의 제작방법에 관한 것이다.

[0002]

배경 기술

[0003] 평균수명의 증가와 그에 따른 고령화 사회로 진입하는 과정에서 발생하는 노인성 질환에 대한 관심은 꾸준히 증가하고 있는 추세이고, 이로 인한 의료비 비중이 급격히 늘어가고 있다.

[0005] 노인성 질환 중 하나인 노인성 난청(Age-related hearing loss, ARHL, Presbycusis)은 연령의 증가에 따라 신체의 퇴행성 변화에 의한 청력감소로, 35세 이상의 고령에서 발생하는 가장 흔한 감각장애이고 만성 질환이다. 청력의 감소는 40대 초반부터 시작될 수 있으나, 1000 Hz 부근의 회화 영역에서 청력 감소가 생겨 실제로 잘 안 들린다고 느껴지는 되는 연령은 주로 50 내지 60세이고, 60세가 넘어가면 질병, 외상, 퇴행성 변화 등의 요인에 의하여 저주파 영역도 떨어져 소리의 감지능력이 떨어지게 된다. 고음 영역에서 감각신경성 난청의 형태로 나타나며, 남성이 더 심하게 영향을 받는 것으로 알려져있다. 노인성 난청의 정확한 기전은 알려져 있지 않지만, 산화 스트레스로 인한 미토콘드리아의 기능 장애로 인한 노화 및 유모세포의 사멸, 달팽이관속의 유모세포와 청신경의 퇴행성변성 등의 노화에 의한 손상 및 식습관, 수면습관, 노출된 소음, 흡연, 아미노글리코사이드 계열의 항생제 및 고리 이뇨제 등의 이독성 약물 및 가족력 등의 환경적 인자에 의해 복합적으로 발생할 수 있다.

- [0006] 노인성 난청의 경우, 인간의 노화 과정에서 필연적인 부분으로 인식되어 삶의 질에서 전반적인 기여도가 과소평가 되어왔지만, 설문조사를 통해 확인한 결과 난청 노인들의 삶은 질은 전반적으로 낮은 점수로 평가되었다. 그 원인으로는 청력 손실 발견을 위한 노력이 부족하고, 청력손실을 인지하면서도 긍정적으로 받아들이지 못하며, 청력손실 개선을 위한 보청기 사용을 불편한 것으로 인식하는 것으로 확인되었다.
- [0008] 이미 진행된 노인성 난청을 치료하는 방법으로 아직 밝혀진 약물이나 치료법이 존재하지 않으며, 현재까지 밝혀진 치료방법으로는 노인성 난청 환자를 조기에 발견하여 보청기를 이용한 청각 재활을 통해 일상생활에 적응하도록 하는 방법 및 보청기가 효과가 없는 양측 고도 난청 환자의 경우 인공와우와 같은 수술적 치료가 진행되어 왔다.
- [0010] 대부분의 노인성 난청 연구에서는 예방 및 치료를 목적으로 하고 있으며, C57B6/J 마우스에 항산화제를 투여하거나 유전자 치료, 줄기세포 국소 주입 등의 방법으로 노인성 난청 치료 연구를 위해 유전자 조작 및 약물 주입으로 노화가 유도된 노인성 난청 동물모델을 이용하지만, 노화를 촉진하기 위한 간헐적인 환경 변화로 자극된 노인성 난청 동물모델은 존재하지 않아 새로운 노인성 난청 동물모델의 개발이 요구되고 있다.
- [0012] 이에 본 발명의 발명자들은 환경에 의해 발현되는 노인성 난청 동물모델을 제작하기 위해 노력한 결과, 간헐적 저산소 환경에서 실험동물에게 고지방식(High fat diet, HFD)을 제공하고 갈락토스(Galactose)를 투여한 결과, 지속적으로 산화 스트레스가 유도되어 단기간에 세포의 노화가 촉진되어 노인성 난청이 발생한다는 점을 새로이 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0014] (비특허문헌 0001) 황수연, 허승덕; 노인성 난청이 삶의 질에 미치는 영향. 한국언어치료학회 학술발표대회 논문집, 2016.12, 498-501
- (비특허문헌 0002) Someya S, Xu J, Kondo K, Ding D, Salvi RJ, Yamasoba T, Rabinovitch PS, Weindrich R, Leeuwenburgh C, Tanokura M, Prolla TA; Age-related hearing loss in C57BL/6J mice is mediated by Bak-dependent mitochondrial apoptosis. Proceedings of the National Academy of Sciences. 106(46):19432-19437.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0015] 본 발명은 유전자 조작 또는 약물 주입이 아닌 실험동물의 체내 산화 스트레스를 증가시키고 노화 관련 인자를 자극하여, 단기간에 노인성 난청이 유발될 수 있는 노인성 난청 동물모델 및 이의 제작방법을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

- [0017] 본 발명은 (1) 인간을 제외한 동물 중 정상청력을 가진 실험동물을 선별하는 단계; (2) 저산소 환경 조건 형성용 챔버에 상기 단계 (1)에서 선별된 실험동물을 투입하는 단계; (3) 상기 단계 (2)의 챔버에 간헐적 저산소 환경 조건을 형성하는 단계; 및 (4) 상기 단계 (3)의 동물에 고지방식을 제공 또는 갈락토스를 투여하는 단계;를 포함하는 노인성 난청 동물모델 제작방법을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 방법에 따라 제작된 노인성 난청 동물모델을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 (a) 상기 노인성 난청 동물모델에 노인성 난청 치료제 후보 물질을 투여하는 단계; (b) 상기 단계 (a)의 동물모델의 청력 역치를 측정하는 단계; 및 (c) 상기 단계 (b)의 동물모델의 청력 역치와 후보물질 미투여 동물모델의 청력 역치를 비교하여 감소하는 경우의 후보물질을 노인성 난청 치료제로 선별하는 단계;를 포함하는 노인성 난청 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

도면의 간단한 설명

[0023]

- (a) 8 kHz에서 G1 및 G2의 청력 역치 변화 비교;
- (b) 16 kHz에서 G1 및 G2의 청력 역치 변화 비교;
- (c) 24 kHz에서 G1 및 G2의 청력 역치 변화 비교;
- (d) 8 kHz에서 G1 및 G3의 청력 역치 변화 비교;
- (e) 16 kHz에서 G1 및 G3의 청력 역치 변화 비교; 및
- (f) 24 kHz에서 G1 및 G3의 청력 역치 변화 비교.

도 8은 12주 동안의 저산소 환경, 고지방식 섭취 및/또는 D-갈락토스 투여 조건에서 다양한 주파수에서 마우스의 청력 역치의 변화를 확인한 도이다.

- (a) 8 kHz에서 G1 및 G5의 청력 역치 변화 비교;
- (b) 16 kHz에서 G1 및 G5의 청력 역치 변화 비교;
- (c) 24 kHz에서 G1 및 G5의 청력 역치 변화 비교;
- (d) 8 kHz에서 G1 및 G4의 청력 역치 변화 비교;
- (e) 16 kHz에서 G1 및 G4의 청력 역치 변화 비교;
- (f) 24 kHz에서 G1 및 G4의 청력 역치 변화 비교;
- (g) 8 kHz에서 G1 및 G6의 청력 역치 변화 비교;
- (h) 16 kHz에서 G1 및 G6의 청력 역치 변화 비교;
- (i) 24 kHz에서 G1 및 G6의 청력 역치 변화 비교;
- (j) 8 kHz에서 G1 및 G7의 청력 역치 변화 비교;
- (k) 16 kHz에서 G1 및 G7의 청력 역치 변화 비교;
- (l) 24 kHz에서 G1 및 G7의 청력 역치 변화 비교;
- (m) 8 kHz에서 G1 및 G8의 청력 역치 변화 비교;
- (n) 16 kHz에서 G1 및 G8의 청력 역치 변화 비교; 및
- (o) 24 kHz에서 G1 및 G8의 청력 역치 변화 비교.

도 9는 저산소 환경, 고지방식 섭취 및/또는 D-갈락토스 투여 조건에서 마우스의 단독, 이중 및 삼중조건에서의 청력 역치를 비교한 도(a 내지 c); 및 청각 유모세포(hair cells)의 생존율(d 내지 l)을 확인한 도이다.

- (a) GI의 단독, 이중 및 삼중조건에서의 청력 역치 비교;
- (b) HFD의 단독, 이중 및 삼중조건에서의 청력 역치 비교;
- (c) 저산소 환경의 단독, 이중 및 삼중조건에서의 청력 역치 비교;
- (d) 대조군(4주령 마우스);
- (e) G1(12주령 마우스; 정상산소+NF);
- (f) GI 단독조건;
- (g) HFD 단독조건;
- (h) 저산소 환경 단독조건;
- (i) HFD 및 GI 이중조건;
- (j) 저산소 환경 및 HFD 이중조건;
- (k) 저산소 환경, HFD 및 GI 삼중조건; 및

(1) 외유모세포(out hair cells, OHC) 및 내유모세포(inner hair cells, IHC) 생존 비율.

도 10은 저산소 환경, 고지방식 섭취 및/또는 D-갈락토스 투여 조건에서 마우스의 청각 유모세포의 손상정도를 확인한 도이다.

노란색 화살표: OHC line; 하얀색 화살표: IHC line;

빨간색 화살표 및 점선: 사멸 또는 손상된 유모세포;

(a) 대조군(4주령 마우스)의 OHC(현미경 배율 $\times 1.5$ k);

(b) 저산소 환경(현미경 배율 $\times 1.5$ k);

(c) 저산소 환경+HDF+GI(현미경 배율 $\times 1.5$ k);

(d) 대조군(4주령 마우스)의 OHC(현미경 배율 $\times 3.0$ k);

(e) 저산소 환경(현미경 배율 $\times 3.0$ k); 및

(f) 저산소 환경+HDF+GI(현미경 배율 $\times 3.0$ k).

도 11은 저산소 환경, 고지방식 섭취 및/또는 D-갈락토스 투여 조건에서 마우스의 청각 기관의 노화 또는 손상과 관련된 유전자 발현 효과를 확인한 도이다.

(a) Edn1 유전자 발현 정도;

(b) Slc24A4 유전자 발현 정도;

(c) Ucp2 유전자 발현 정도;

(d) Kcnq4 유전자 발현 정도;

(e) Myo7a 유전자 발현 정도;

(f) Myo6 유전자 발현 정도;

(g) Cdh23 유전자 발현 정도; 및

(h) ApoE 유전자 발현 정도.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시형태를 들어 상세히 설명한다. 본 발명의 실시형태는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 더욱 완전하게 설명하기 위해서 제공되는 것이다. 따라서 본 발명의 실시형태는 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 이하 설명하는 실시형태로 한정되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명의 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0026] 본 발명에서 사용되는 용어, "투여"는 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여, 국소 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 조성물은 활성물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 탑재된 형태로 투여될 수 있다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어, "난청(hearing loss)"은 일반적으로 개체가 듣는 소리에 대한 민감도 및 능력의 감소를 의미한다. 또한, "노인성 난청(presbycusis)"은 청각기관이 노화되면서 생기는 난청으로 청력 역치의 상승 및 중추 신경계의 음향 자극의 처리 저하로 어음분별력이 떨어지는 증상이다.

[0028] 본 발명에서 사용되는 용어, "청력 역치(hearing threshold)"는 각 주파수에서 들을 수 있는 가장 작은 소리를 의미한다.

[0030] 본 발명은

- [0031] (1) 인간을 제외한 동물 중 정상청력을 가진 실험동물을 선별하는 단계;
- [0032] (2) 저산소 환경 조건 형성을 챔버에 상기 단계 (1)에서 선별된 실험동물을 투입하는 단계;
- [0033] (3) 상기 단계 (2)의 챔버에 간헐적 저산소 환경 조건을 형성하는 단계; 및
- [0034] (4) 상기 단계 (3)의 동물에 고지방식을 제공 또는 갈락토스를 투여하는 단계;를 포함하는 노인성 난청 동물모델 제작방법을 제공한다.
- [0035] 또한, 본 발명은 상기 제작방법으로 제작된 노인성 난청 동물모델을 제공한다.
- [0037] 이하, 본 발명의 노인성 난청 동물모델 제작방법에 대해 단계별로 상세히 설명한다.
- [0038] 상기 단계 (1)은 정상청력을 가진 실험동물을 선별하는 단계로, 상기 정상청력을 가진 실험동물은 청력 역치가 30 dB 이하인 실험동물일 수 있고, 구체적으로는 청력 역치가 25 dB 이하일 수 있으며, 바람직하게는 20 dB 이하일 수 있다. 상기 실험동물은 노인성 난청 연구의 약효 평가에 적합한 것이면 특별히 한정되지 않고, 랫트, 마우스, 랫트 저빌(gerbil), 모르모트, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 소, 양, 돼지 및 염소로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 비인간 동물일 수 있으며, 바람직하게는 랫트, 마우스, 랫트 저빌일 수 있다. 상기 제작방법으로 동물모델을 제작하기 전 실험동물의 사육 조건은 특별히 한정되지 않고 통상적인 방법을 이용할 수 있지만 균질의 실험동물을 얻기 위해서는 가능한 한 개체를 동일한 조건하에서 사육하는 것이 바람직하다.
- [0040] 상기 단계 (2)는 저산소 환경 조건이 형성될 수 있는 챔버에 상기 실험동물을 투입하는 단계로, 상기 챔버는 산소 농도를 조절할 수 있는 아르키로 만들어진 저산소실로 내부 체적이 3 내지 7 L 인 저산소실일 수 있고, 바람직하게는 3 내지 6 L일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기 챔버는 중앙에 벽으로 나누어져있어 조건이 상이한 마우스를 구분할 수 있고, 각 5 마리 이하의 마우스를 투입할 수 있다.
- [0042] 상기 단계 (3)은 간헐적 저산소 환경 조건을 형성하여 실험동물에 노출시키는 단계로, 혈액으로의 산소 공급을 일시적으로 차단시켜 세포의 노화를 촉진하기 위한 것이다. 상기 저산소 환경은 상기 챔버에 질소를 주입하여 산소 농도를 조절하여 산소 농도를 약 15% 내지 20%(정상산소 환경)에서 10% 이하(저산소 환경)로 감소시켜 만들 수 있고, 바람직하게는 5% 이하로 감소시켜 만들 수 있다. 또한, 상기 간헐적 저산소 환경은 8 내지 16시간은 정상산소 환경에서 저산소 환경으로 산소 농도를 교대하여 만들 수 있고, 구체적으로는 10 내지 14시간은 정상산소 환경에서 저산소 환경으로 산소 농도를 교대하여 만들 수 있으며, 바람직하게는 12시간 간격으로 정상산소 환경에서 저산소 환경으로 산소 농도를 교대하여 만들 수 있다.
- [0044] 상기 단계 (4)는 간헐적 저산소 환경 조건에 노출된 실험동물에게 고지방식(High fat diet)을 제공하거나 갈락토스를 투여하는 단계로, 상기 제공되는 고지방식은 혈관에 고지혈증을 유발하고 대사 이상으로 인한 세포의 노화를 촉진하기 위한 것이고, 청각 기관의 혈관에 고지혈증을 유발하여 혈류 감소로 인해 영양 공급의 불균형으로 인한 청력 상실의 원인일 수 있다. 상기 고지방식은 비타민을 포함하고 지방 함량이 20 내지 60 %인 사료일 수 있고, 구체적으로는 20 내지 50 %인 사료일 수 있으며, 바람직하게는 25 내지 45%인 사료일 수 있다.
- [0045] 상기 투여되는 갈락토스는 산화 스트레스 및 미토콘드리아 기능 장애를 발생시키고 세포의 노화를 촉진하기 위한 것으로, 상기 실험동물의 단위체중 kg 당 100 내지 700 mg을 투여할 수 있고, 구체적으로는 200 내지 600 mg을 투여할 수 있으며, 바람직하게는 500 mg을 투여할 수 있고, 한 주에 1 내지 2회 투여할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 갈락토스를 투여하는 방법은 일반적으로 알려진 방법을 이용하여 투여할 수 있고, 바람직하게는 주사기를 이용하여 피하에 투여할 수 있다.
- [0046] 또한, 상기 단계 (4)에서 고지방식 제공 및 갈락토스 투여는 병행하여 수행할 수 있다.
- [0048] 본 발명에서, 상기 제작방법에서 제작기간은 4 내지 16주 일 수 있고, 구체적으로는 6 내지 14주 일 수 있으며, 바람직하게는 8 내지 12주일 수 있다. 상기 제작기간이 3주 이하일 경우 노인성 난청이 발생되지 않을 수 있고, 17주 이상일 경우 난청이 심화되어 청력상실이 발생할 있다.
- [0050] 본 발명에서, 상기 노인성 난청은 노화, 음주, 유전적 소인, 지속적인 소음노출, 혈관성 또는 대사성 요인, 및 이독성 약물에 노출 등에 의해 발생할 수 있고, 소음 환경에서 노화로 인한 중추 신경계의 청각처리능력 저하로 인해 어음분별력 및 소리의 위치 감각이 떨어질 수 있다.
- [0051] 상기 노인성 난청은 와우 기저회전의 외유모세포 및 지지세포의 손상으로 인한 감각성 노인성 난청(sensory presbycusis), 와우 청신경원 손상으로 인한 신경성 노인성 난청(neural presbycusis), 와우의 중간 및 첨단 회전의 혈관조 위축으로 인한 대사성 노인성 난청(metabolic presbycusis; 혈관조 노인성 난청, strial

presbycusis), 와우의 기계적 운동성 저하로 인한 와우전도성 노인성 난청(cochlear conductive presbycusis), 중추신경계의 병변으로 인한 중간성 노인성 난청(intermediate presbycusis) 및 상기 원인 중 하나 이상의 원인으로 인한 혼합성 노인성 난청(mixed presbycusis)으로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 난청일 수 있다.

[0053] 본 발명에서, 상기 제작방법은 지방 축적, 산화 스트레스 증가, 미토콘드리아 기능 장애 유도, 노화 촉진, 청각 기관 노화 및 손상 관련 유전자 발현, 및 청각 유모세포 사멸 효과로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 효과로 인해 난청이 발현되는 노인성 난청 동물모델 제작방법일 수 있다. 상기 효과는 저산소 환경의 단독조건에서 발현될 수 있으나 저산소 환경에서 고지방식 섭취 또는 D-갈락토스 투여의 이중조건에서 상승효과가 있고, 저산소 환경, 고지방식 섭취 및 D-갈락토스 투여의 삼중조건에서 현저히 우수한 상승효과가 있다.

[0054] 상기 발현되는 청각 기관의 노화 또는 손상과 관련된 유전자는 심혈관 합병증 관련 Edn1, 청각기관의 음이온 수송 장애 관련 Slc24A4, 미토콘드리아 기능 장애 관련 Ucp2, 비증후군성 감각신경성 난청 관련 Kcnq4, Myo7a 및 Myo6, 연령 관련 난청 관련 Cdh23, 및 연령 관련 장애 및 혈관 질환 관련 ApoE로 구성된 군에서 선택되는 하나 이상의 유전자일 수 있다.

[0056] 본 발명에서, 상기 노인성 난청은 청력 역치가 50 dB이상일 경우 난청으로 판단할 수 있다. 상기 청력 역치는 주파수별로 순음을 들려주었을 때 각 주파수 내에서 들을 수 있는 가장 작은 소리로, 청력 역치에 따라 경도 난청(청력 역치 26~40 dB), 중등도 난청(청력 역치 41~55 dB), 중고도 난청(청력 역치 56~70 dB), 고도 난청(청력 역치 71~90 dB) 및 심도 난청(청력 역치 91 dB 이상)으로 구분될 수 있다.

[0057] 상기 청력 역치는 청성뇌간반응검사(ABR-TEST, Auditori brainstem respons test)를 실시하여 판단할 수 있다. 상기 청성뇌간반응검사는 소리 자극을 들려지고 이에 대한 청각계로부터 전기반응을 두피에 위치한 전극을 통하여 기록하는 검사로, 크고 뚜렷하게 기록되어 반응 분석에 이용되는 V파의 반응역치를 통해 청력 역치를 파악할 수 있다.

[0059] 본 발명에서, 상기 제작방법에 의해 유도된 노인성 난청은 종래의 난청 동물모델에서와는 상이하게 만성으로 유지될 수 있고, 구체적으로는 3개월 이상 유지될 수 있으며, 보다 구체적으로는 1개월 이상 유지될 수 있다. 종래의 난청 동물모델의 노인성 난청은 시간이 흐르면 자연 치유 되어 약효 평가를 할 수 있는 시기가 짧아 치료제의 효과를 판정하기 어려울 수 있고 동일한 방법에 의해서도 재현성이 떨어질 수 있는 반면, 본 발명의 노인성 난청 동물모델은 유모세포가 사멸되어 재생되지 않아 실험동물의 노인성 난청이 자연적으로 치유되지 않고 만성으로 유지될 수 있다.

[0061] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 상기 제작방법을 3개월 동안 적용한 마우스의 변화를 확인한 결과, 산화 스트레스 및 노화로 인해 모발의 색이 변화(도 3 참조); 체중, 지방량 및 주름(도 4 참조), 산화 스트레스(도 5 참조) 및 청력 역치(도 6 내지 도 8 참조) 증가; 청각 유모세포를 손상 및 사멸(도 9 내지 10 참조); 청각 기관의 노화 또는 손상과 관련된 Edn1, Slc24A4, Ucp2, Kcnq4, Myo7a, Myo6, Cdh23, 및 ApoE 유전자의 발현(도 11 참조)이 증가;하는 효과가 있음을 확인하여 상기 마우스에서 노인성 난청이 유도되었음을 확인하였다. 또한 상기 단독조건보다 이중조건 및 삼중조건에서 현저히 우수한 상승효과가 있음을 확인하였다.

[0063] 또한, 본 발명은

[0064] (a) 상기 제작된 노인성 난청 동물모델에 노인성 난청 치료제 후보 물질을 투여하는 단계;

[0065] (b) 상기 단계 (a)의 후보물질이 투여된 동물모델의 청력 역치를 측정하는 단계; 및

[0066] (c) 상기 단계 (b)의 동물모델의 청력 역치와 후보물질 미투여 동물모델의 청력 역치를 비교하여 감소하는 경우의 후보물질을 노인성 난청 치료제로 선별하는 단계;

[0067] 를 포함하는 노인성 난청 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0068] 본 발명에서, 노인성 난청 치료제 스크리닝 방법에서 청력 역치, 투여방법 및 노인성 난청의 종류는 상기 노인성 난청 동물모델 제작방법에 대한 설명과 동일한 바, 구체적인 설명은 상기 내용을 원용한다.

[0070] 이하, 본 발명의 실시예에 의해 상세히 설명한다.

[0071] 단, 하기의 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0073] <실험예 1> 노인성 난청 동물모델 실험 방법

[0074] <1-1> 실험군

[0075] 총 72마리의 C57BL/6 마우스(수컷, 12주령)를 간헐적 산화 스트레스 발현과 관련된 세가지 환경 조건에 노출되었는지 여부에 따라 8 그룹으로 분류하였다. 분류 기준 및 분류 그룹은 하기 표 1에 나타난 바와 같다.

표 1

	정상산소 환경			저산소 환경	
	Food	GI(D-갈락토스 투입)		Food	GI
G1	NF	×	G5	NF	×
G2	NF	○	G6	NF	○
G3	HDF	×	G7	HDF	×
G4	HDF	○	G8	HDF	○

[0077] NF=보통식(Normal diet), HDF=고지방식(High fat diet),

[0078] GI=D-갈락토스 투여(D-Galactose injection)

[0080] <1-2> 동물실험 절차

[0081] 연세대학교 원주 의과대학 동물실험실에서 동물관리 및 사용위원회의 승인을 받은 후(승인번호: YWC-181001-2), C57BL/6 마우스(수컷, 12주령)를 사용하여 동물실험을 진행하였다. 상기 마우스는 정상산소 및 간헐적 저산소 환경을 포함한 다양한 산소 조건하에서, 12시간의 명암을 주기로 실온에서 관찰하였다.

[0082] 각 그룹은 세가지 환경 조건에 대한 노출에 따라 상기 표 1과 같이 8개의 그룹으로 분류되었다. 산소 농도 관련하여, 정상산소 환경 그룹 및 저산소 환경 그룹으로 분류하였다. 구체적으로 그룹 G1 내지 G4의 마우스는 산소 농도가 20%인 정상산소 환경에서 사육하였고, 그룹 G5 내지 G8의 마우스는 산소 농도가 5%인 저산소 환경 및 정상산소 환경이 각각 12시간/일인 환경에서 사육하였다.

[0083] 지방 섭취와 관련하여, 보통식 그룹(Normal diet, NF; NIH-41, 고압멸균, Zeigler Bros Inc., PA, USA) 및 고지방식 그룹(High fat diet, HDF; High Fat Diet 32, 고압멸균, CLEA Japan Inc., Tokyo, Japan)으로 분류하였다. 상기 NF 및 HDF는 한국 공장에서 준비 및 혼합하였다. 구체적으로 그룹 G3, G4, G7 및 G8의 마우스는 비타민이 포함된 지방함량 32%의 HDF를 섭취하였고, 그룹 G1, G2, G5 및 G6 그룹은 NF를 섭취하였다. 상기 HDF 및 NF의 조성은 각각 하기 표 2(HFD 32의 Ingredient), 표 3(HFD 32의 AIN93-VX vitamin mix), 표 4(HFD 32의 AIN93G mineral mix), 표 5(NIH-41의 Ingredient), 표 6(NIH-41의 Amino Acid), 표 7(NIH-41의 Mineral Concentration), 표 8(NIH-41의 Vitamin Concentration) 및 표 9(HFD 32 및 NIH-41의 성분분석 비교)에 나타난 바와 같다.

표 2

Ingredient Composition	% per weight
Milk casein	24.5
Egg white	5
L-cystine	0.43
Powdered beef tallow (including 80% of beef tallow)	15.88
Safflower oil (high oleic acid)	20
Crystalline Cellulose	5.5
Maltodextrin	8.25
Lactose	6.928
Sucrose	6.75
AIN93 vitamin mix	1.4
AIN93G mineral mix	5
Choline bitartrate	0.36
Teriary butylhydroquinone	0.002
Total	100

표 3

[0085]

Ingredient Composition	g per weight
Niacin	3.0
Calcium Pantothenate	1.6
Pyridoxine HCl	0.7
Thiamin (81%)	0.6
Riboflavin	0.6
Folic Acid	0.2
Biotin	0.02
Vitamin B12(0.1% in mannitol)	2.5
Vitamin E, DL-alpha tocopheryl acetate (500IU/g)	15.0
Vitamin A Palmitate (500,000IU/g)	0.8
Vitamin D3, Cholecalciferol (500,000 IU/g)	0.2
Vitamin K1, Phylloquinone	0.075
Sucrose, fine ground	974.705
Total	1000

표 4

[0086]

Ingredient Composition	g per weight
Calcium Carbonate	357.0
Potassium Phosphate	196.0
Potassium Citrate	70.78
Sodium Chloride	74.0
Potassium Sulfate	46.6
Magnesium Oxide	24.3
Ferric Citrate	6.06
Zinc Carbonate	1.65
Magnanous Carbonate	0.63
Cupric Carbonate	0.31
Potassium Iodate	0.01
Sodium Selenate	0.0103
Ammonium Paramolybdate	0.008
Sodium Meta-Silicate	1.45
Chromium Potassium Sulfate	0.275
Lithium Chloride	0.0174
Boric acid	0.0815
Sodium Fluoride	0.0635
Nickel Carbonate Hydroxide	0.0318
Ammonium Meta-vanadate	0.0066
Sucrose	220.7159
Total	1000

표 5

[0087]

Ingredient (Unit)	% per weight
Ground whole wheat	34.9
Ground No. 2 Yellow Corn	21.0
Ground whole oats	10.0
Wheat Middlings	10.0
Fish Meal (60% protein)	9.0

Soybean Meal (45% protein)	5.0
Soy Oil	2.0
Alfalfa Meal (17% protein)	2.0
Corn gluten meal (60% protein)	2.0
Dicalcium phosphate	1.5
Brewers dried east	1.0
Premixes	0.6
Limestone	0.5
Salt	0.5

표 6

[0088]

Amino Acid Concentration	% of total diet
Arginine	0.9
Lysine	0.85
Methionine	0.35
Cystine	0.25
Tryptophan	0.2
Glycine	0.95
Histidine	0.38
Leucin	1.4
Isoleucine	0.95
Phenylalanine	0.85
Tyrosine	0.6
Threonine	0.65
Valine	0.9
Glycine	0.95

표 7

[0089]

Mineral Concentration (Unit)	per weight
Calcium (%)	1
Phosphorous (%)	0.94
Potassium (%)	0.55
Sodium (%)	0.25
Magnesium (%)	0.15
Iron (ppm)	300
Zinc (ppm)	40
Manganese (ppm)	140
Copper (ppm)	12
Cobalt (ppm)	0.7
Iodine (ppm)	1.8

표 8

[0090]

Vitamin Concentration (Unit)	per weight
Vitamin A (IU/g)	17
Vitamin D3 (IU/g)	4
Alpha-Tocopherol (IU/g)	45
Thiamine (ppm)	15
Riboflavin (ppm)	9
Niacin (ppm)	70
Pantothenic Acid (ppm)	30
Choline (ppm)	1900
Folic Acid (ppm)	2

Biotin (ppm)	2
Vitamin B12 (Mcg/kg)	75
Vitamin K (ppm)	2

표 9

Guaranteed Analysis	NIH-41	HFD32
Moisture with vitamins	36.9	6.2
Crude Protein	18.0	25.5
Crude Fat	5.0	32.0
Crude Fiber	5.0	2.9
Ash (%)	35.1	4.0
Nitrogen-free extract (%)	-	29.4
Total	100	100

[0091]

[0093]

갈락토스 투여와 관련하여, D-갈락토스 주사(D-Galactose injection, GI) 여부로 분류되었다. 구체적으로, 그룹 G2, G4, G6, 및 G8의 마우스는 0.9% 식염수로 용해된 D-갈락토스(G0750, Sigma-Aldrich, USA)를 500 mg/Kg의 농도로 피하주사하였고, G1, G3, G5 및 G7의 마우스는 0.9% 식염수(비히클)을 피하주사하였다.

[0095]

상기 마우스는 매주 체중을 측정하여 변화를 확인하였고, 2주마다 청각 뇌간 반응(ABR)을 측정하여 청력 임계값을 평가하였으며, 매일 체내 산화 스트레스를 확인하여 위해 혈청 샘플을 채취하였다.

[0097]

<1-3> 저산소 환경 설계

[0098]

마우스에게 산화 스트레스를 가하기 위해 저산소 챔버를 설계하였다.

[0099]

구체적으로, 상기 아크릴 시트로 만들어진 저산소 챔버는 상부에 신선한 공기와 질소를 자동으로 주입하고 공기를 분산시키는 팬 및 NF 그룹 및 HFD 그룹으로 먹이 유형을 그룹을 구분하기 위한 벽으로 구성되었고, 상기 저산소 챔버(340 × 240 × 60 mm, 내부 체적 4.9 L)는 LCI 시스템 (Live Cell Instrument Co., Seoul, Korea)을 사용하여 질소 자동 주입을 통해 산소 농도를 제어하도록 설계하였다(도 2 참조).

[0100]

총 24시간 반응을 한 주기로 하여, 12시간동안 2분 간격으로 질소를 자동주입하여 산소 농도를 5%로 낮추고, 12시간 후 신선한 공기를 주입하여 충분한 산소를 공급하였으며, 산소의 농도는 매일 1초마다 기록하였다(도 2의 b, c 참조). 사용된 모든 가스는 튜브를 통해 건물 밖으로 배출되었고, 산소 표시기로 챔버의 산소량을 확인하였다. 마우스의 사료, 물 및 배변을 제거하기 위해 일주일에 한 번 청소하였다.

[0102]

<1-4> 청성뇌간반응검사(Auditory Brainstem Response test, ABR-test)

[0103]

상기 실험예 <1-1>의 마우스(실험군 G1 내지 G8)를 100 mg/kg의 케타민(ketamine; 유한 킴벌리, 서울) 및 10 mg/kg의 자일라진 하이드로클로라이드(xylazine hydrochloride, 동물마취제; Bayer, 안산)로 복강내 주사 마취하고 일시적인 소리(auditory clicks 또는 tone pips)에 대한 응답으로 청각 신경 및 중추 청각 경로의 활동에서 파생되는 청각 유발 전위를 측정하는 청각뇌간반응을 검사하였다. ABR의 파동 V(wave V 기준값은 녹음된 트레이스(recorded traces)에서 파동 V와 노이즈 플로어(noise floor)가 구별되지 않을 때 까지 80dB SPL에서 5dB 단계로 사운드 강도를 점진적으로 감소하면서 결정하였다. 내장된 패러데이 상자가 있는 소음 감쇠 챔버에서 TDT RZ6 / BioSigRZ 시스템(Tucker Davis Technologies, Alachua, FL, USA)을 이용하여 데이터 관리 및 마우스의 청성뇌간반응검사를 진행하였다.

[0104]

데이터를 수집하기 위해 각 마우스의 피하조직에 전극을 배치하였다. 자극과 같은 쪽에 있는 기준 전극은 귓바퀴에 축 방향으로 배치하였고, 접지 전극은 반대 쪽으로 배치하였으며, 활성 전극은 꼭지점에 배치하였다. 상기 마우스의 체온을 유지시키기 위해 등은 패드를 이용하였고, 상기 ABR 검사는 실험군의 안정성을 위해 2주마다 수행하였다.

[0106]

<1-5> 슈퍼옥시드 디스뮤타아제(Superoxide dismutase, SOD) 활성 시험

[0107]

상기 실험예 <1-1>의 마우스(실험군 G1 내지 G8)의 안와 뒤 신경총에서 채취한 혈액을 이용하여 체내에 쌓인 과잉의 활성산소를 제거하는 항산화 효소인 SOD의 양을 측정하였다.

- [0108] 구체적으로, 상기 혈액을 항응고제 튜브에서 25 ℃(실온)에서 30분동안 반응시킨 후, 2,000 x g에서 15분 동안 4 ℃에서 원심 분리하여 정제된 혈청을 제조하였다. 상기 정제된 혈청을 -80 ℃에서 한달동안 보관하고, 분석하기 전에 샘플버퍼를 이용하여 1 : 5로 희석한 후 SOD 검정 키트(No. 706002, Cayman Che., MI, USA)를 이용하여 체내 SOD의 양을 확인하였다. 상기 SOD 검정 키트는 크산틴산화효소(xanthine oxidase)와 하이포크산틴(hypoxanthine)에 의해 생성된 과산화물 라디칼을 검출하기 위해 테트라졸륨 염(tetrazolium salt)을 사용하는 키트이다.
- [0109] 각 샘플에 대한 SOD 활성은 표준 곡선의 선형 회귀 분석을 통해 얻은 방정식(the equation obtained from the linear regression of the standard curve)을 사용하여 계산되었고, 단위는 SOD의 라디칼이 50% 치환되었을 때 필요한 효소의 양으로 정의하였다.
- [0111] **<1-6> 조직학적 분석**
- [0112] 상기 실험에 <1-1>의 마우스(실험군 G1 내지 G8)의 마우스를 희생시키고 달팽이관을 해부하고 염색하였다.
- [0113] 구체적으로, 희생한 마우스의 달팽이관 뼈 꼭대기 부분에 개구부를 만들고 실온(room temperature)에서 고정액인 4 %의 파라포름알데히드(paraformaldehyde)가 함유된 pH 7.4의 인산염 완충 식염수를 관류시켰다. 고정액으로 관류한 달팽이관을 Calci-Clear Rapid에 24시간 동안 침지하여 탈회하고, OCT(Optimal Cutting Temperature) 화합물을 삽입한 후 LEICA RM2145(Leica Biosystems, Wetzlar, German)를 이용하여 2 내지 5 μ m의 두께의 절편으로 절단하였다. 절단한 달팽이관을 표준 헤마톡실린에서 3분간 배양하고 에오신(H&E)로 60초 동안 염색하였다.
- [0115] **<1-7> 면역염색법**
- [0116] 상기 실험에 <1-6>에서 제조한 달팽이관 절편을 고정하고 현미경을 이용하여 청각 유모세포의 이미지를 분석하였다.
- [0117] 구체적으로, 상기 달팽이관 절편을 5 μ m 두께의 젤라틴이 코팅된 슬라이드에 4 %의 파라포름알데히드로 15분 동안 고정시킨 후 실온에서 건조하였다. 비특이적 라벨링을 방지하기 위해 상기 절편을 5 % 노말 고트 세럼(normal goat serum)과 함께 실온에서 1시간동안 배양하고, 1차 항체인 MY07A(1:200, ab3481, Abcam, UK)와 함께 4 ℃에서 1시간동안 배양하였다. 배양한 절편을 PBS로 5분동안 총 3회 세척하고 2차 항체인 고우트 항-레빗 IgG H&L(Alexa Fluor® 488; 1:1000, ab150077, Abcam, UK)와 함께 실온에서 1시간동안 배양한 후, 다시 PBS로 5분동안 총 3회 세척하고 DAPI(40,6-diamidino-2-phenylindole)가 포함된 마운팅 용액으로 고정하였다.
- [0118] 상기 모든 달팽이관 절편을 공초점현미경(confocal microscopy; Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena, Germany) 및 ZEN lite ver. 2.3(ZEN lite, Jena, Germany) 소프트웨어를 사용하여 청각 유모세포의 이미지를 분석하였다.
- [0120] **<1-8> SEM(scanning electron microscopy) 분석**
- [0121] 상기 실험에 <1-6>에서 제조한 달팽이관 절편을 고정하고 SEM 분석법으로 청각 유모세포의 이미지를 분석하였다.
- [0122] 구체적으로, 상기 달팽이관 절편을 2.5 %의 글루타르알데하이드로 4 ℃에서 2시간 동안 1차 고정시킨 후, 0.1 M의 카코딜레이트(cacodylate) 버퍼로 2번 세척하고 1 % 사산화오스뮴(osmium tetroxide, OsO₄)으로 2차 고정하였다. 고정된 절편을 50, 70, 80, 90 및 100 % 에탄올로 탈수한 후 실온에서 3-메틸 부틸 아세테이트(Isoamyl acetate, Hanawa, Japan)와 15분동안 반응시켰다. 반응 후의 절편을 헥사메틸디실라잔(hexamethyldisilazane; cat. 440191, Sigma-Aldrich, USA)을 사용하여 실온에서 15분동안 건조하고 금으로 코팅한 후, 데이블탑 현미경(TM-1000, Hitachi Ltd., Tokyo, Japan)으로 청각 유모세포의 형태를 확인하였다.
- [0124] **<1-9> 실시간 PCR(Real-time polymerase chain reaction) 분석**
- [0125] 상기 실험에 <1-1>의 마우스(실험군 G1 내지 G8)의 마우스를 희생시키고, 상기 마우스의 간, 신장 및 달팽이관에서의 노화 또는 손상과 관련된 유전자 발현을 분석하기 위해 실시간 PCR을 수행하였다.
- [0126] 구체적으로, Total RNA는 TRIzol(Thermo Fisher Scientific, San Diego, CA, USA) 시약을 이용하여 분리하였다.
- [0127] mRNA 샘플을 준비하기 위해 2 μ l의 mRNA 및 1 μ l of 10X 효소 믹스, 2 μ l의 5X 효소 반응 버퍼, 및 5 μ l의 뉴클

레아제가 제거된 물을 포함하는 총 8 μ l의 역전사효소 용액을 혼합하였다. 상기 준비한 샘플을 SYBR Select master 믹스(Applied Biosystems, Calrsbad, CA, USA)를 이용하여 제조업체의 프로토콜에 따라 역전사하였다. 사용한 프라이머 서열은 하기 표 10에 나타내었다.

표 10

Target gene	Predicable Dysfunctional effect	F/R	5'→3'
Edn1	Cardiovascular complications	F	ACA CCG TCC TCT TCG TTT TG
		R	GAG CTC CTT GGA AAG TCA CG
Slc24A4	Anion transport dysfunction in auditory organ	F	TCA TTG CCT TTG GGA TAA GC
		R	GGC AAC CAT CAC AAT CAC AG
Ucp2	Mitochondria dysfunction	F	CTC AAA GCA GCC TCC AGA AC
		R	ACA TCT GTG GCC TTG AAA CC
Kcnq4	Non-syndromic sensorineural hearing loss	F	TGT TGG GAT CCG TGG TCT AT
		R	GAG TTG GCA TCC TTC TCA GC
Myo7a	Non-syndromic hearing loss and deafness	F	GAC AAC TCT AGC CGC TTT GG
		R	GAC ACG TGA CTT CTC CAG CA
Myo6	Non-syndromic hearing loss and deafness	F	AGA CCA CTT CCG GCT CAC TA
		R	TGG GTT GTC TCG TAG CAC AC
Cdh23	Age-related hearing loss	F	ATG GAG AGC CCT CTG GAA AT
		R	ACC CAC AAA GGC TGT ACT GG
ApoE	Age-related disorders, Vascular disease	F	GGT TCG AGC CAA TAG TGG AA
		R	ATG GAT GTT GTT GCA GGA CA
18s	Ribosomal RNA	F	CAT TCG AAC GTC TGC CCT AT
		R	GTT TCT CAG GCT CCC TCT CC

상기 실시한 PCR 과정은 1 μ l의 cDNA, 5 μ l의 프리믹스, 1 μ l의 10 pmol 정방향/역방향 프라이머 및 3 μ l의 뉴클레아제가 없는 물을 포함하는 총 10 μ l의 샘플을 90 °C에서 3분, 95 °C에서 10초동안 40사이클, 60 °C에서 60초동안 선행증폭(preamplification)하고 용융 곡선 분석하였다. 상기 모든 과정은 반복해서 수행되었으며, mRNA 발현 수준의 정규화(normalization)는 18s rRNA를 사용하여 계산되었다.

<1-10> 통계분석

통계분석은 SPSS 통계 패키지 버전 21.0(SPSS Inc., La Jolla, CA, USA)을 사용하여 수행하였다.

연속 변수의 결과는 정규 분포 변수의 평균 표준 편차로 표현하였고, 평균 청력 역치는 양방향 ANOVA로 비교되었다.

또한, 통계적으로 유의한 mRNA의 민감도와 특이성은 GraphPad PRISM 버전 5.0(GraphPad Inc., La Jolla, CA, USA)을 사용한 Mann-Whitney U-test로 분석하였다. 0.05 미만의 p-value는 통계적으로 유의미한 것으로 간주하였다.

<실험예 2> 실험결과

<2-1> 노화에 대한 그룹의 표현형 분석 결과

상기 실험예 <1-1>의 마우스(실험군 G1 내지 G8)의 마우스의 모발, 체중 및 피부조직 변화를 확인하였다.

그 결과, 저산소 환경 그룹(G5 내지 G8)에서는 마우스의 모발에서 윤기가 사라지고 색이 회색으로 변화함을 확인하였다(도 3 참조). 또한, 다른 산소 조건에서 3개월 후의 저산소 환경의 체중 변화는 4 g으로 체중을 증가시키는 효과는 미비함을 확인하였고(도 4의 b 참조), 진피의 두께가 약 100 μ m을 증가함을 확인하였다(도 4의 c 참조).

또한, 다른 섭식 조건에서 3개월 후의 보통식 그룹의 체중 변화는 3 g 미만으로 변화가 미비한 반면 HFD 그룹의 체중은 약 20 g 증가함을 확인하여 HFD가 체중, 및 지방층이 가장 크게 증가시키는 효과가 있음을 확인하였다(도 4의 a 및 b 참조).

또한, 다른 갈락토스 주입 조건에서 3개월 후의 정상산소 환경에서 갈락토스를 투여한 그룹의 체중 변화는 8~10

g인 반면 저산소 환경에서 갈락토스를 투여한 그룹의 체중 변화는 3~6g 으로, 갈락토스 투여는 체중 변화에 체중 변화와 관련이 없음을 확인하였다(도 4의 a 및 b 참조).

[0142] 하기 표 11에 3개월 후 변화한 진피 및 지방층 두께를 나타내었다.

표 11

	WT(G1)	+GI(G2)	+HFD(G3)	+HFD, GI(G4)	+Hypoxic(G5)	+Hypoxic, HFD, GI(G8)
Dermis Thickness	287.05 ±99.26	348.5 ±85.9	346.76 ±81.53	392.35 ±67.59	351.4 ±93.46	388.42 ±66.9
Fat layer Thickness	87.59 ±19.76	127.4 ±29.04	600.29 ±18.18	594.44 ±18.55	89.71 ±36.00	133.67 ±36.87

[0144] 결론적으로, HFD는 지방층의 두께를 증가시키는데 가장 큰 영향을 미치고, 저산소 환경 조건이 진피의 두께를 증가시키는데 큰 영향을 미치며, GI는 피부 표면에 깊은 주름을 증가시키는데 영향을 미침을 확인하였다(도 4 및 표 11 참조).

[0146] <2-2> 혈청 내 산화 스트레스 분석 결과

[0147] 상기 실험에 <1-5>의 SOD 활성 실험 결과를 분석하여 혈청 내 산화 스트레스 양을 분석하였다.

[0148] 그 결과, 3달 후의 대조군 SOD 값(G1, 0.5311 ± 0.019)에 비해 저산소 환경 그룹의 SOD 값(G5, 0.6215 ± 0.048)이 높아 저산소 환경 그룹에서 산화 스트레스가 증가함을 확인하였다. 또한, 대조군의 SOD 값(G5, 0.6215 ± 0.048)보다 저산소 환경 및 HFD 섭취의 그룹의 SOD 값(D7, 0.6453 ± 0.055) 또는 저산소 환경, HFD 및 GI 그룹의 SOD 값(D8, 0.5955 ± 0.022)이 높아 저산소 환경의 단독조건보다 저산소 환경이 포함된 이중조건 및 삼중조건에서 산화 스트레스가 증가함을 확인하였다. 반면, 3달 후의 대조군의 SOD 값(G1, 0.5311 ± 0.019)에 비해 HFD 그룹의 SOD 값(G3, 0.4901 ± 0.011), GI 그룹의 SOD 값(D2, 0.5148 ± 0.028) 및 HFD 및 GI 그룹의 SOD 값(D4, 0.5572 ± 0.050)의 차이는 약 0.05 내지 0.1534로 유의한 차이가 없어 큰 영향을 미치지 않음을 확인하였다(0.04 이하의 차이는 오류값일 수 있다). 한편, 저산소 환경에서는 2개월 후부터 정상산소 환경 대비 SOD가 증가하는 경향이 있고, 정상산소 환경 그룹(G1 내지 G3)에서는 3개월 후 SOD가 감소하여 산화 스트레스가 감소하는 경향이 있음을 확인하였다(도 5 참조).

[0149] 하기 표 12에 확인한 혈청 내 SOD의 양을 나타내었다.

표 12

Group	0 M	1 M	2 M	3 M
G1	0.6325 ± 0.000	0.5873 ± 0.005	0.5667 ± 0.000	0.5311 ± 0.019
G2	0.5955 ± 0.017	0.5463 ± 0.005	0.5216 ± 0.005	0.5148 ± 0.028
G3	0.5586 ± 0.011	0.5463 ± 0.005	0.5298 ± 0.005	0.4901 ± 0.011
G4	0.5873 ± 0.005	0.5298 ± 0.005	0.5011 ± 0.011	0.5572 ± 0.050
G5	0.5873 ± 0.029	0.5463 ± 0.005	0.5463 ± 0.005	0.6215 ± 0.048
G6	0.5914 ± 0.000	0.5627 ± 0.005	0.5463 ± 0.005	0.5695 ± 0.059
G7	0.5996 ± 0.000	0.5463 ± 0.005	0.5914 ± 0.000	0.6435 ± 0.055
G8	0.5750 ± 0.011	0.5463 ± 0.005	0.5380 ± 0.005	0.5955 ± 0.022

[0151] G1=정상산소 환경 + NF, G2=정상산소 환경 + NF + GI

[0152] G3=정상산소 환경 + HDF, G4=정상산소 환경 + HDF + GI

[0153] G5=저산소 환경 + NF, G6=저산소 환경 + NF + GI

[0154] G7=저산소 환경 + HDF, G8=저산소 환경 + HDF+GI

[0156] <2-3> 청력 역치값 비교실험 결과

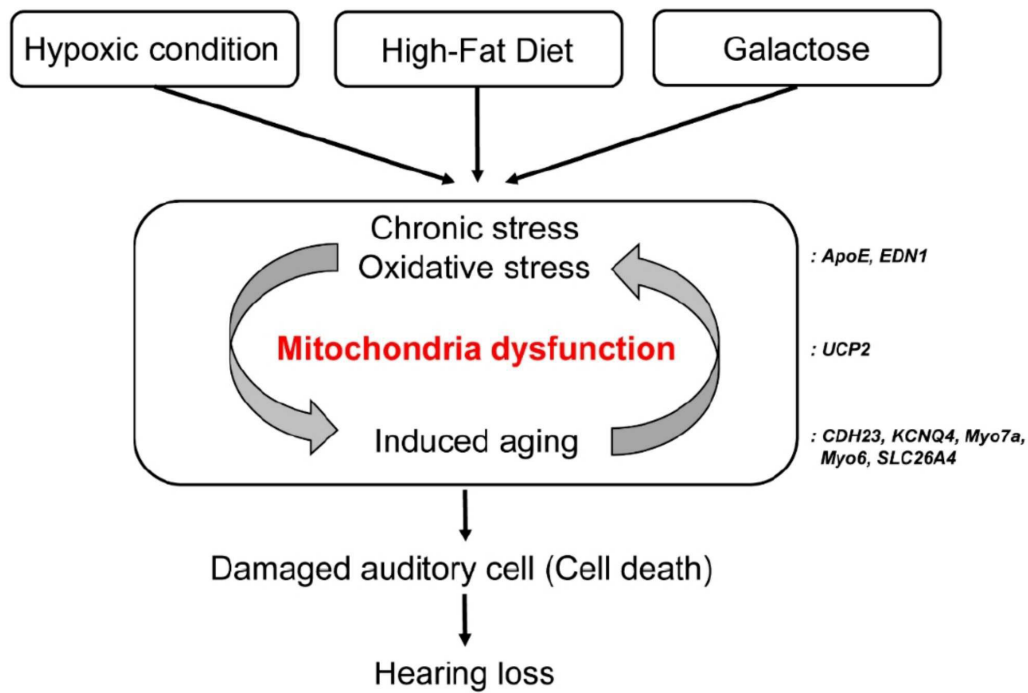
- [0157] 상기 실험에 <1-4>의 톤 버스트(Tone-burst) ABR 에서 4 내지 32 kHz 주파수에서의 청력 역치 값을 분석하였다.
- [0158] 그 결과, 대조군의 청력 역치 변화는 3개월 동안 미미한 반면, G8(저산소+HFD+GI)의 청력 역치가 8 kHz에서 35 dB에서 67 dB로, 16 kHz에서 31 dB에서 70 dB로 크게 증가함을 확인하였다(도 6의 b 참조). 또한, G5(저산소)의 청력 역치는 8 kHz에서 25 dB에서 58 dB로, 16 kHz에서 35 dB에서 56 dB로 증가함을 확인하였다(도 5의 a 및 e 참조). 또한, G6(저산소+GI) 및 G7(저산소+HFD)의 청력 역치가 8 kHz에서 34 ± 3.76 dB에서 67 ± 10.13 dB로, 16 kHz에서 38 ± 4.08 dB에서 60 ± 7.33 dB로 증가함을 확인하였다(도 6의 g 및 h 참조).
- [0159] 반면, G2(GI), G3(HFD) 및 G4(HFD+GI)의 청력 역치는 유의한 변화가 없음을 확인하였다(도 6의 c, d 및 f 참조).
- [0161] 구체적으로, 각 그룹 마우스의 청력 역치를 변화가 가장 큰 세가지 주파수 8, 16, 24kHz를 선택하여 분석한 결과, G2(GI), G3(HFD) 및 G5(저산소 환경)의 단독조건에서 G2 및 G3의 청력 역치는 대조군과 비교하여 큰 변화가 없는 반면(도 7 참조), G5의 경우 2개월 후부터 청력 역치 증가의 유의미한 변화가 나타남을 확인하였다(도 8의 a 참조). 또한, G4(GI+HFD)에서는 변화가 없는 반면, G6(저산소+GI) 및 G7(저산소+HFD)의 경우 1개월 후부터 청력 역치가 30 dB에서 60dB로 크게 증가함을 확인하였다(도 8의 g, j 및 K 참조). 아울러, G8(저산소+GI+HFD)의 청력 역치는 짧은 기간에 현저히 증가함을 확인하였다(도 8의 m 및 n 참조).
- [0162] 보다 구체적으로, 단독, 이중 및 삼중조건에서 결정 요인을 평가하기 위해 8 kHz를 선택하여 변화한 청력 역치를 분석한 결과, GI(G2), HFD(G3) 및 GI+HFD(G4)에서 청력 역치에 큰 변화가 없었고(도 9의 a 및 b 참조), HFD+저산소(G7)의 이중조건에서는 2개월 이내 청력 역치가 증가함을 확인하였다(도 9의 b 및 c 참조). 아울러, 저산소 환경 조건이 포함된 경우(G5 내지 G8) 2개월 후에는 청력 역치가 증가함을 확인하여 저산소 환경 조건 및 HFD 섭취 조건이 청력 역치 상승에 큰 영향을 미침을 확인하였다(도 9의 a 내지 c 참조).
- [0164] 결론적으로, 청력 역치 변화에서 가장 효과적인 방법은 저산소 환경 조건이고, HFD 섭취 및/또는 갈락토스 투여는 저산소 환경과 상승효과(synergy effect)가 나타남을 확인하였다.
- [0166] <2-4> 유모세포 조직학적 관찰 결과
- [0167] 상기 실험에 <1-7>과 같은 방법에 의해 유모세포의 생존율을 평가하였다. 생존율은 청각유모세포에 존재하는 주요 단백질인 Myo7a를 분석하여 평가하였다.
- [0168] 그 결과, 4주령 마우스에서는 3개의 외유모세포(OHC, outer hair cells) 및 1개의 내유모세포(IHC, inner hair cells)가 관찰되었고(도 9의 d), G1(대조군) 마우스에서도 유모세포의 손상이 관찰되지 않았다(도 9의 e).
- [0169] 또한, GI 그룹에서는 세포에 거의 손상이 없는 반면(도 9의 f), HFD 그룹에서는 중등도 손상(도 6의 g), 저산소 환경 그룹에서는 심각한 손상(도 9의 h)이 발생함을 확인하였다. 특히 OHC의 경우 이중조건 및 삼중조건에서 손상이 심각함을 확인하였다(도 9의 i 내지 k).
- [0170] 또한, HFD 또는 GI의 단일조건에서 유모세포의 생존율은 80% 이상이었고, HFD 및 GI의 이중조건에서는 생존율이 50% 이상이었으나, 저산소 환경 조건이 포함되면 생존율이 20% 미만으로 감소함을 확인하여, 저산소 환경으로 인한 산화 스트레스가 유모 세포에 손상을 입히고 청력손실을 초래함을 확인하였다.
- [0172] 아울러, 산화 스트레스로 인한 손상을 추가로 분석하기 위해 상기 실험에 <1-8>에서 분석한 SEM 이미지를 분석하여 유모세포의 부동섬모(stereocilia) 손상을 확인하였다.
- [0173] 그 결과, 4주령 마우스에서는 손상되지 않은 OHC 및 IHC의 라인이 관찰할 수 있는 반면(도 10의 a 및 d), 저산소 환경 조건의 마우스에서는 산화 스트레스로 인해 OHC가 손상됨을 확인하였다(도 10의 b 및 e). 또한, 저산소 환경, HFD 및 GI 그룹에서는 유모세포의 부동섬모의 대부분이 사라진 것으로 관찰되었고, 대부분의 OHC가 손상됨을 확인하였으며, 청각 유모 세포가 상기 저산소 환경, HFD 또는 GI의 조건으로 인한 산화 스트레스에 의해 손상됨을 확인하였다(도 10의 c 및 f 참조).
- [0175] <2-5> 달팽이관의 연령 관련 요인 표현형 분석 결과
- [0176] 상기 실험에 <1-9>에서 분석한 실시한 PCR 결과를 분석하여 달팽이관의 연령 관련 요인 표현형의 변화를 분석하였다.
- [0177] 그 결과, 청각 기관의 노화 또는 손상과 관련된 유전자인 Edn1, Slc24A4, Ucp2, Kcnq4, Myo7a, Myo6, Cdh23, 및 ApoE의 발현이 저산소 환경, HFD 및 GI의 삼중조건에서 유의하게 증가함을 확인하였다(도 11 참조).

[0178] 구체적으로 Slc26a4 및 Kcnq4와 같은 청각 기관의 이온 채널 관련 유전자가 과발현되었고(도 11b, d), 미토콘드리아 기능 장애에서 발현되는 Ucp2가 다른 유전자에 비해 현저히 상승함을 확인하였다(도 11의 c). 또한, 청각 기관의 손상으로 인해 Myo7a와 Myo6의 발현이 크게 증가하였고(도 11 e, f), 청각 기관의 노화 과정에서 가장 많이 발현되는 유전자인 Cdh23의 발현도 상승함을 확인되었다(도 7a). 반면, ApoE는 상기 삼중조건 외에 저산소 환경 또는 HFD의 단독조건에서도 삼중조건에서와 발현량이 유사함을 확인하였다(도 11의 h).

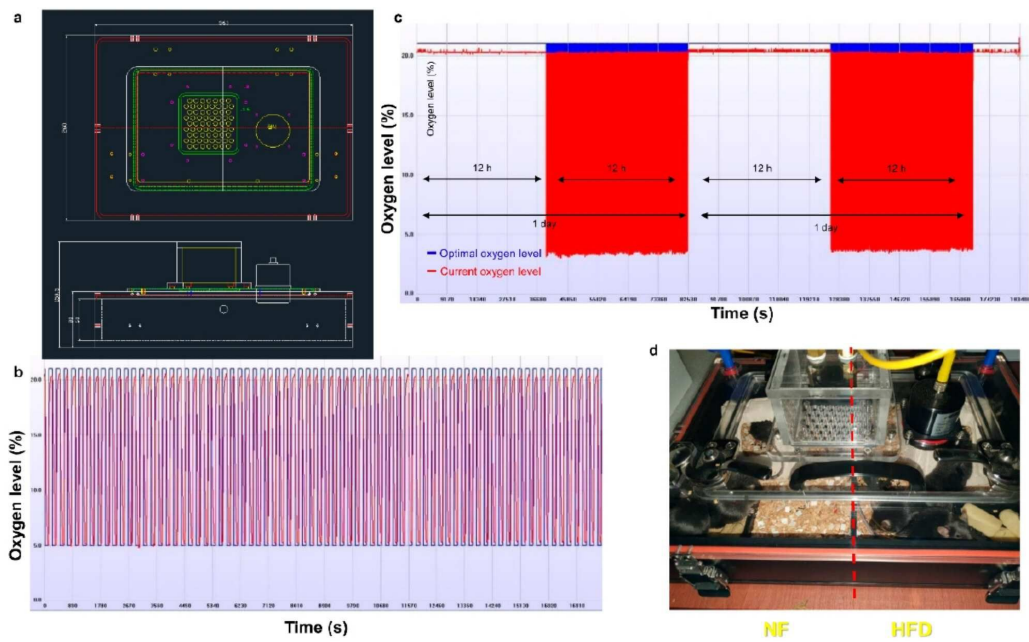
[0179] 결론적으로, 저산소, HFD 및 GI의 단독조건에서보다 이중조건 및 삼중조건에서 노화 인자의 발현이 현저히 상승함을 확인하였다.

도면

도면1



도면2



도면3

(a) Normoxic vs. hypoxic (Gal (-) vs Gal(+))

	Normoxic	Hypoxic			
Feed	NF	NF		HFD	
G.I.	(-)	(-)	(+)	(-)	(+)
Group	G1	G5	G6	G7	G8

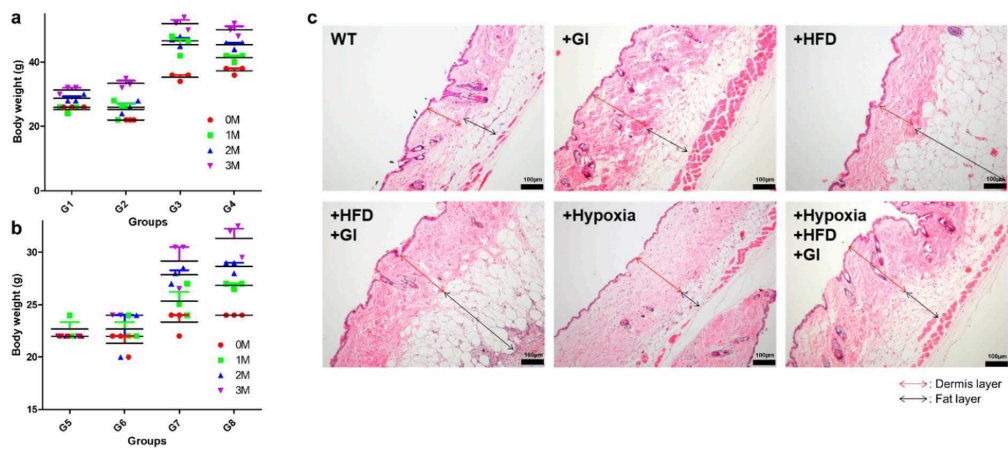
Photographs of mice from groups G1, G5, G6, G7, and G8.

(b) NF vs. HFD

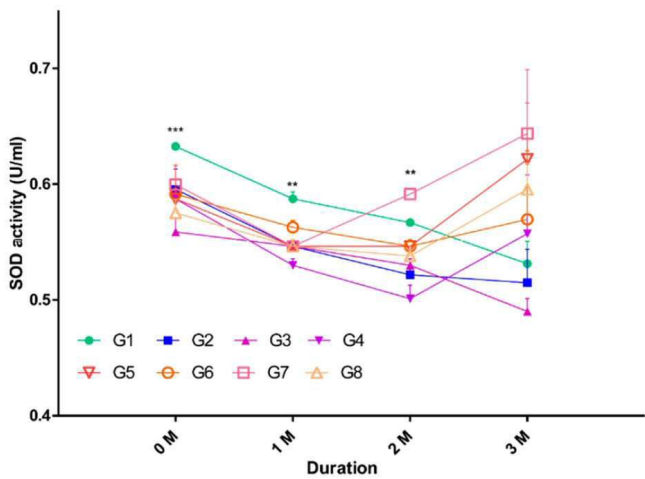
Normoxic		Hypoxic	
NF	HFD	NF	HFD
G1	G3	G5	G7

Photographs of mice from groups G1, G3, G5, and G7.

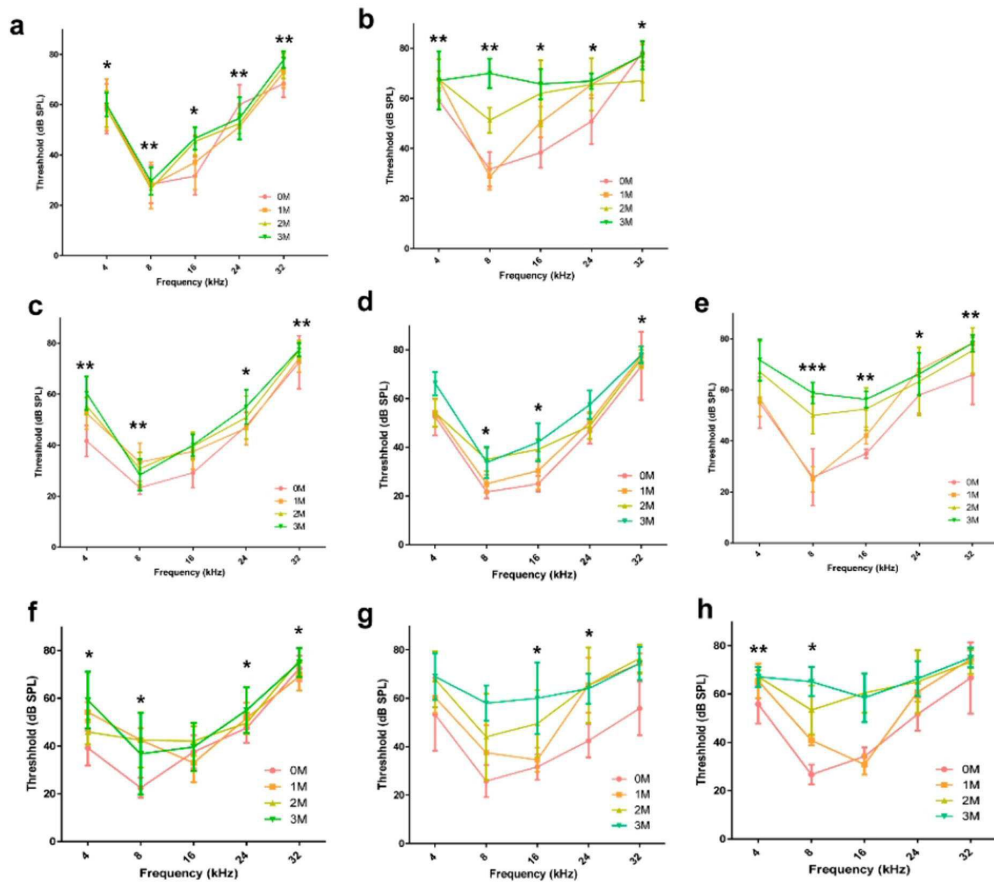
도면4



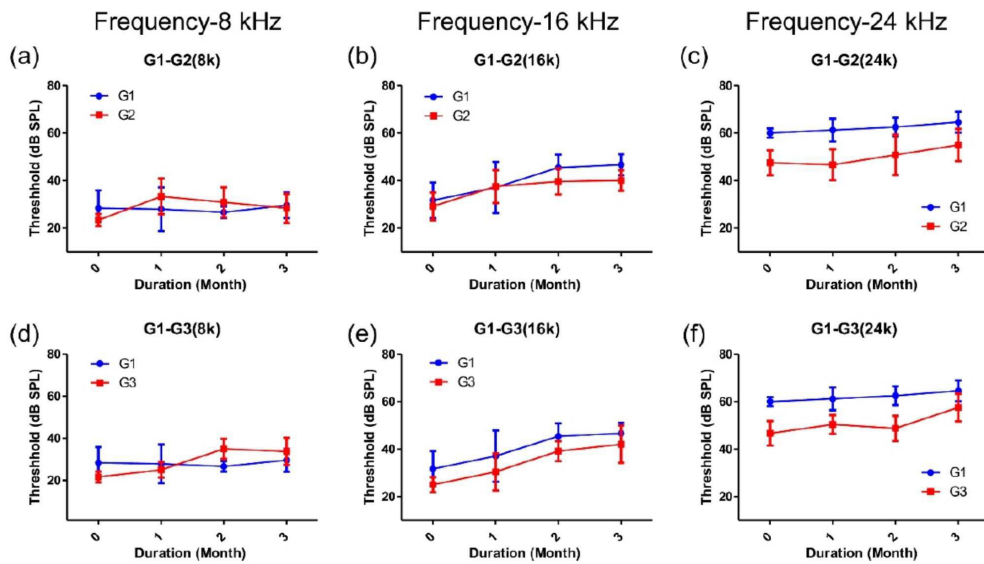
도면5



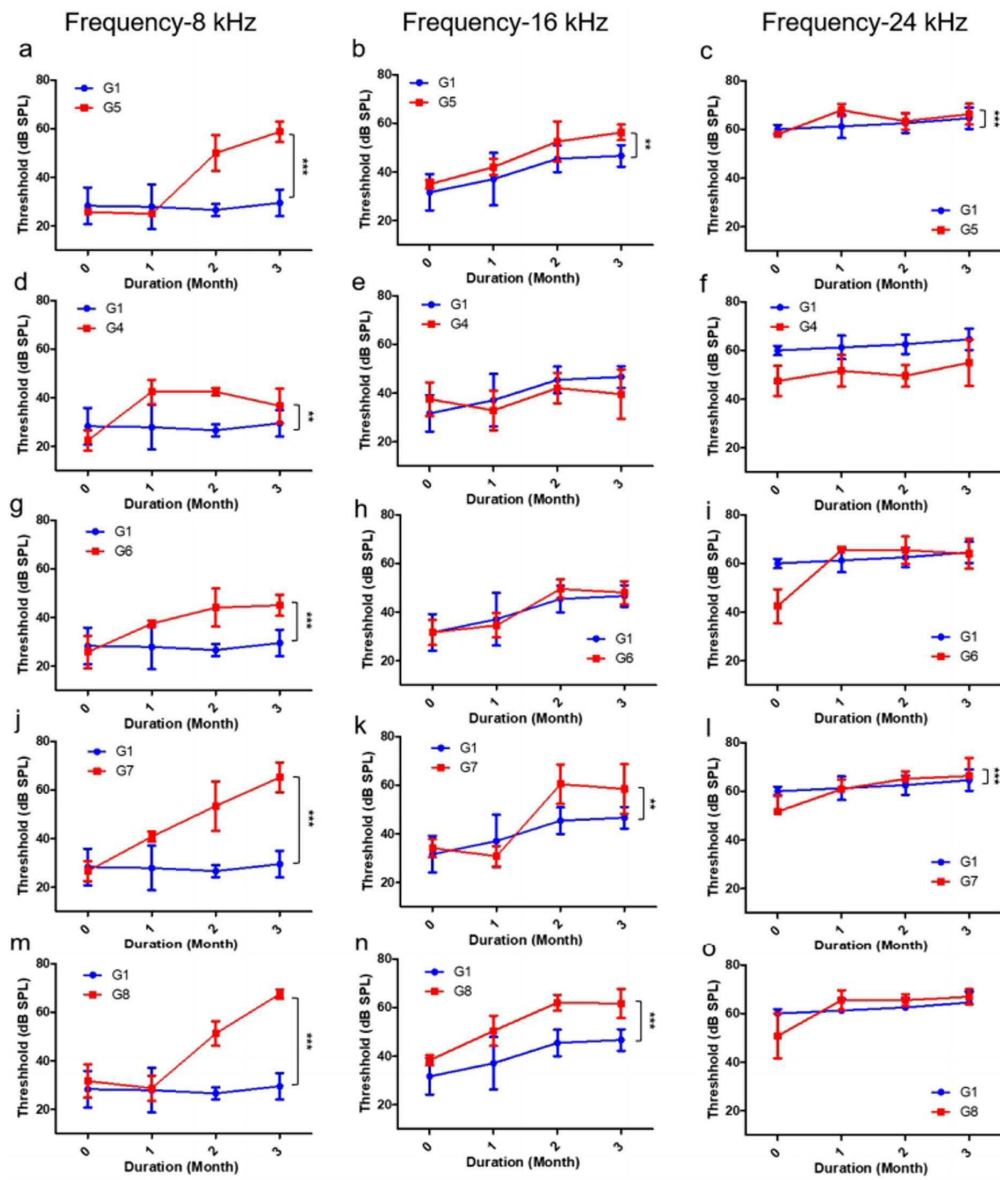
도면6



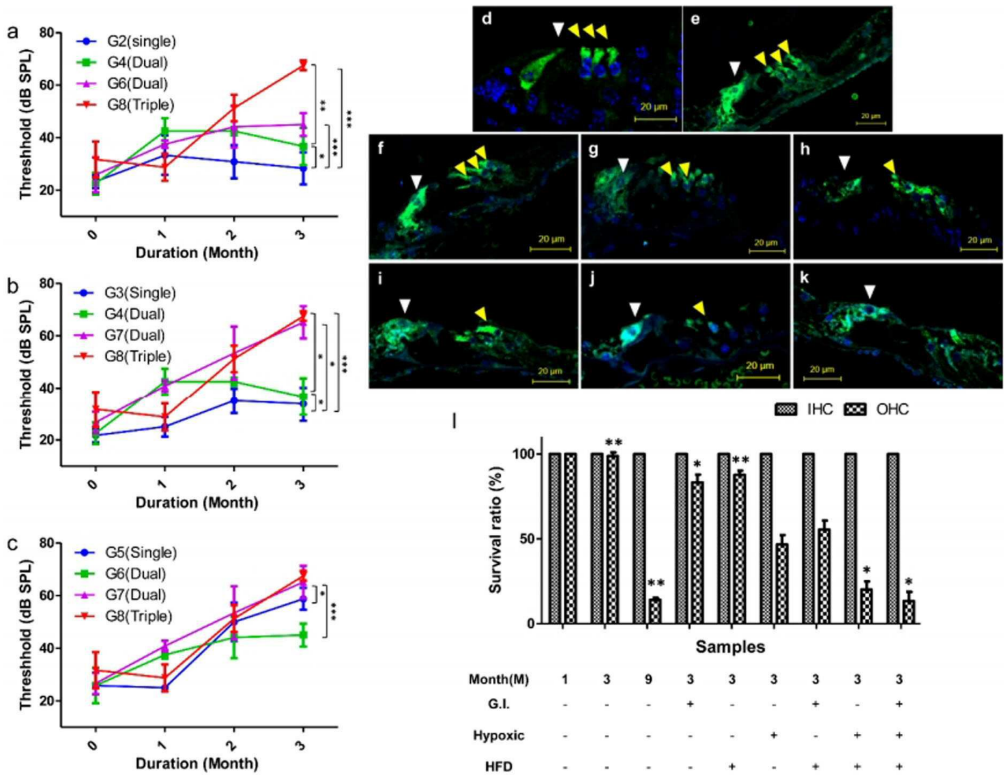
도면7



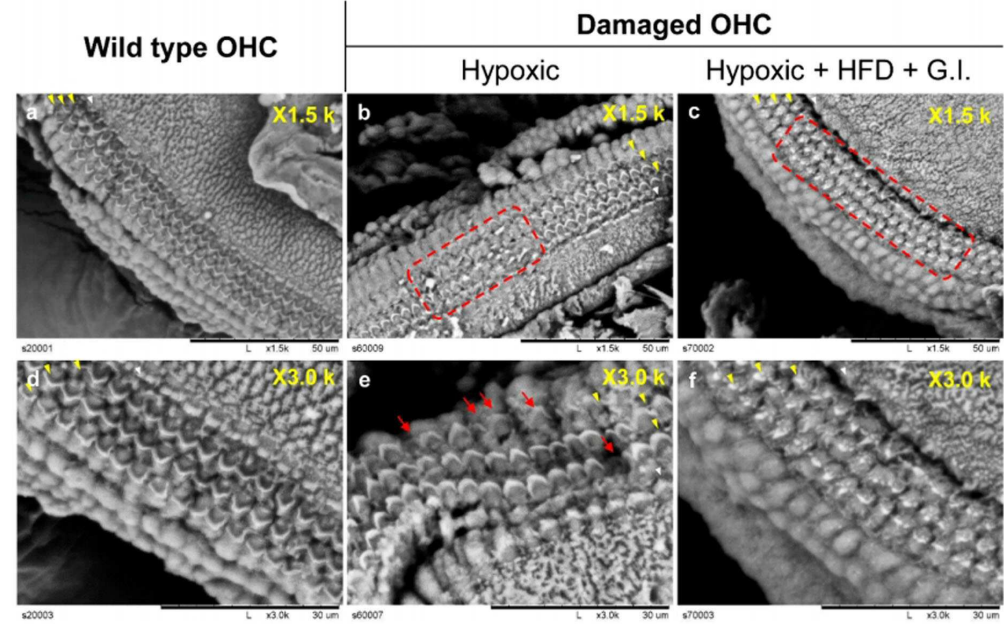
도면8



도면9



도면10



도면11

