



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

미세아교세포 포식능 관련 대사체
변화가 아밀로이드 베타 축적에
미치는 영향과 병변 관찰을 위한
이광자능 탐침 개선 연구

Investigation of microglia
phagocytosis-related metabolite changes
in the pathogenesis of Alzheimer's
disease, and the development of a
two-photon microscopic amyloid beta
plaque probe

2023년 8월

서울대학교 대학원

의과학과 의과학 전공

최 하 영

미세아교세포 포식능 관련 대사체
변화가 아밀로이드 베타 축적에
미치는 영향과 병변 관찰을 위한
이광자능 탐침 개선 연구

지도교수 목 인 희

이 논문을 의학박사 학위논문으로 제출함
2023년 4월

서울대학교 대학원
의과학과 의과학 전공
최 하 영

최하영의 박사 학위논문을 인준함
2023년 7월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

초록

본 연구에서는 아밀로이드에 의해 변화 되는 미세아교세포의 기능에 집중하여 알츠하이머병(AD) 병인 기전에 관련 된 조절 인자를 탐색하고 그 조절 방법을 찾고자 하였다. 기존 보고 된 $A\beta$ 에 의해 변화하는 미세아교세포에 대한 많은 차등발현유전자 (Differential expression genes, DEGs)를 기반으로, 직접적인 면역 조절 및 활성화 역할을 보유하고 있는 후보 탐색을 통해 면역 및 지질 대사의 조절에 중요한 역할을 한다고 알려진 25HC를 생성하는 효소인 *Ch25h*를 연구 대상으로 선정하였다.

$A\beta$ 에 의해 실제 미세아교세포의 *Ch25h* 발현 및 25HC의 생성 증대를 여러 모델과 생화학적 실험을 통해 검증하였다. 실시간 생체 내 이광자현미경 촬영 및 FACS 기반의 미세비드 포식 실험을 통해서, $A\beta$ 에 의한 과도한 25HC에 의해 미세아교세포의 주요 기능인 주변 탐색 능력과 포식능이 저해되는 것을 확인하였다. 미세아교세포의 반응성 및 포식능 저하는 25HC에 의한 미세아교세포의 콜레스테롤에스터 (Cholesteryl ester, CE) 증가에 의해 매개 되는 것으로 나타났다. CE의 증가는 미세아교세포의 세포막 유동성을 저해시키는 것으로 판명되었다. 일련의 25HC에 의한 미세아교세포의 기능저하는 콜레스테롤에스터화 억제제인 Avasimibe에 의해 회복 가능한 것으로 나타났다. 더 나아가 5XFAD에 25HC를 4주간 장기적으로 투약하는 실험 결과를 통해 25HC 처리군의 인지기능 및 AD 병변이 악화되어 있는 것을 확인하였다. 이를 통해 $A\beta$ 에 의한 과도한 *Ch25h* 발현이 궁극적으로 미세아교세포의 기능을 저하시켜, AD 병인기전 가속화에 영향을 미친다는 것을 확인하고 이를 조절하는 약물 처리를 치료 가능성으로 제시하였다.

AD의 명확한 병인기전에 아밀로이드 병변 축적 및 변화를 배제할 수 없는바, 기존 개발 된 $A\beta$ 를 표지하는 이광자현미경 탐침의 배경 신호를 분자 내 회전 스위치 적용을 통해 개선하고자 하였다. 해당 전략으로 새롭게 개발한 IRI-1은, 구조적으로 유사하지만 분자 내 회전 고리가 없는

기존의 탐침보다 현저한 배경 신호의 감소를 나타냈다. 또한 IRI-1은 좋은 BBB 투과성을 나타내며, A β 병변에 대한 높은 선택적 발광 및 민감도를 보였다. 이를 통해 분자 내 회전 시스템의 도입이 신규 이광자현미경 여기능 형광체 개발에 좋은 전략이 될 수 있음을 함께 제시하였다.

주요어 : 알츠하이머병, 신경염증, 미세아교세포, 포식능, 아밀로이드 베타, 이광자 현미경

학 번 : 2017-24177

약어 목록

AD: Alzheimer's disease

APP: Amyloid precursor protein

A β : Amyloid beta

Ava: Avasimibe, [[2,4,6-tris(1-methylethyl)phenyl]acetyl]-, 2,6-bis(1-methylethyl)phenyl ester] sulfamic acid

ARIA: Amyloid-related imaging abnormalities

BBB: Blood brain barrier

CAA: Cerebral amyloid angiopathy

cDNA: Complementary DNA

CE: Cholesteryl ester

CH25H: Cholesterol 25-hydroxylase

CNS: Central nervous system

CSF: Cerebrospinal fluid

CX3CR1: CX3C chemokine receptor 1

DAM: Disease associated microglia

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DEG: Differentially expressed genes

DiI: 1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine Perchlorate

DMEM: Dulbecco modified Eagle media

DMF: Dimethylformamide

DMSO: Dimethyl sulfoxide

ELISA: Enzyme-linked immunospecific assay

FACS: Fluorescence activated cell sorting
FAME: Fatty acid methyl esters
FRAP: Fluorescence recovery after photobleaching
GC-MS: Gas Chromatography-Mass Spectrometer
GFAP: Glial fibrillary acidic protein
GFP: Green fluorescent protein
HBSS: Hank's balanced salt solution
HFIP: 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-isopropanol
HPC: hematopoietic progenitor cell
IBA1: Ionized calcium-binding adaptor molecule 1
IHC: immunohistochemistry
iMG: human iPSC derived microglia
iPSC: Induced pluripotent stem cells
IRI-1: Intramolecular rotation enabled iminocoumarin-1
LPS: Lipopolysaccharide
MCI: Mild cognitive impairment
MSTFA: N-methyl-N-trimethylsilyl trifluoroacetamide
MACS: Magnetic-activated cell sorting
MeO-X04: Methoxy-X04
NFT: Neurofibrillary tangle
NIR: Near infrared
NOR: Noble object recognition
PBS: Phosphate buffered saline
PCR: Polymerase chain reaction

PFA: Paraformaldehyde

PMG: Primary microglia

PS1: presenilin 1

PVDF: polyvinylidene fluoride

RNA-ISH: RNA in situ hybridization

ROI: Region of interest

SD : Standard deviation

SEM: Standard error of mean

Veh: Vehicle

WB: Western Blot

WT: Wild type

24HC: 24-Hydroxy cholesterol

25HC: 25-Hydroxy cholesterol

27HC: 27-Hydroxy cholesterol

5XFAD: Transgenic mice with five familial AD mutations

목 차

초록	i
약어 목록	iii
목차	vi
표 및 그림 목록	vii
서론	1
실험 재료 및 방법	19
결과	41
고찰	88
결론	98
참고문헌	101
초록 (영문)	120

표 및 그림 목록

그림 1. AD 환자의 뇌 조직에서 관찰 되는 대표적인 병리학적 특성에 관한 모식도.....	14
그림 2. 알츠하이머병의 진행에 영향을 미치는 미세아교세포의 역동적 활성 변화.....	15
그림 3. 신경퇴행성 질병에서 나타나는 미세아교세포의 표현형 변화.....	16
그림 4. <i>Ch25h</i> 의 조절과 25HC의 지질 대사, 염증반응에 대한 다양한 역할.....	17
그림 5. 이광자현미경 광원 조사 원리와 마우스 뇌 이미징을 위한 수술 기법 모식도	18
그림 6. A β 에 의한 미세아교세포 <i>Ch25h</i> 발현 및 25HC 생성 증가.....	50
그림 7. A β 에 의한 미세아교세포 특이적 <i>Ch25h</i> 발현 증가.....	52
그림 8. <i>Ch25h</i> 의 산물 25HC에 노출 된 미세아교세포의 움직임, 포식능 및 염증성 사이토카인 분비 변화.....	54
그림 9. A β 및 25HC에 의한 미세아교세포의 콜레스테롤 에스터화 효소 발현 증가.....	56
그림 10. A β 및 25HC에 의한 미세아교세포 콜레스테릴에스터 증가.....	57
그림 11. A β 및 25HC에 의한 미세아교세포의 세포막 유동성 감소.....	58
그림 12. 콜레스테롤 에스터화 억제제 처리를 통한 25HC에 의해 저해된 미세아교세포의 세포막유동성 회복.....	59
그림 13. 콜레스테롤 에스터화 억제제 처리를 통한 25HC에 의해 저해된 미세아교세포의 움직임 및 포식능 회복.....	60
그림 14. 25HC 및 콜레스테롤에스터화 억제제 처리에 의한 AD 모델 쥐의 미세아교세포 포식능 및 인지기능 변화.....	62

그림 15. 25HC 및 콜레스테롤에스터화 억제제 처리에 의한 AD 모델 쥐 전전두엽대뇌피질 영역의 아밀로이드 병변 변화.....	64
그림 16. 25HC 및 콜레스테롤에스터화 억제제 처리에 의한 AD 모델 쥐 해마 영역의 아밀로이드 병변 변화.....	66
그림 17. 25HC 및 콜레스테롤 에스터화 억제제 처리에 의한 5XFAD 모델 쥐의 성상교세포 및 신경세포 변화	68
그림 18. 콜레스테롤 에스터화 억제제 처리에 의한 5XFAD 모델 미세아교세포의 움직임 변화.....	69
그림 19. Part 1 연구 요약.....	71
그림 20. 신규 아밀로이드 베타 탐침 IRI-1 합성 전략 및 개선 착안점	77
표 1. BBB 통과능 선택규칙 기반 IRI-1 특성	78
그림 21. IRI-1 광학적 특성	79
그림 22. A β 섬유응집체 Cryo-EM 구조 기반 IRI-1의 <i>in silico</i> 결합 분석.....	81
표 2. 인공혈뇌장벽 투과성 측정 실험 결과.....	83
그림 23. 이광자 현미경을 통한 마우스 뇌 내 아밀로이드 플라크 시각화	84
그림 24. 5XFAD_TG 마우스 뇌 조직에서 이광자현미경으로 촬영한 IRI-1 표지 아밀로이드 플라크.....	85
그림 25. Part 2 연구 요약.....	87
그림 26. 전체 연구 요약.....	100

(그림 1-5, 19, 26 : Created with BioRender.com)

서론

1. 알츠하이머병의 특징

알츠하이머병 (Alzheimer's disease, AD)은 점진적으로 치매를 일으키고 결국 죽음에 이르게 하는 가장 흔한 퇴행성 뇌질환으로, 치매 인구의 60-70%에서 나타난다 (1). 질병이 진행됨에 따라 AD 환자는 점진적인 기억력 감퇴와, 인지 기능 손상을 보인다 (2), (3). 인간의 기대 수명이 연장됨에 따라, 노인 인구의 많은 비율을 차지하는 치매의 치료의 필요성이 증대되고 있다. 환자의 뇌 조직에서 발견 되는 대표적인 병리학적 특징으로는 아밀로이드 베타 플라크 (노인반, 신경반)와, 신경 세포 내부에서 나타나는 과도하게 응집 된 타우 단백질의 신경섬유 덩어리 (neurofibrillary tangle, NFT)가 있다 (4), (5). 비정상적 단백질 응집체 병변과 더불어, 이들의 독성으로 인한 시냅스 및 신경세포의 소실과 신경염증 반응도 함께 나타난다 (그림 1) (6), (7).

$A\beta$ 는 아밀로이드 전구 단백질 (amyloid precursor protein, APP)가 β -secretase 및 γ -secretase 효소들에 의해 순차적으로 절단되며 발생되며 38-43개의 아미노산을 갖는 신경세포독성을 보유한 짧은 펩타이드이다 (8). 단량체끼리는 서로 결합하여 올리고머화 될 수 있고, 이들은 점차 더 큰 다량체로 응집되어 결국에는 용해되지 않는 아밀로이드 베타 플라크를 형성하게 된다 (9). 이러한 $A\beta$ 병변은 AD에서 나타나는 여러 임상-병리학적 증상들 중 가장 앞서서 나타난다. 이런 병리학적, 유전학적 관점에서 아밀로이드 베타 플라크의 축적은 오랫동안 AD 병인기전의 중심으로 여겨져 왔다 (10), (11). 또 다른 대표적인 병변인 NFT의 경우, 정상시에는 세포내 미세소관을 안정화 시키는 역할을 하는 타우 단백질에 과도한 인산화가 일어나며 신경 세포 내부에 응집이 생긴 병변이다 (12). $A\beta$ 병변과 비교하면 NFT 병변은 발생 되는 시점은 늦지만, 신경 사멸 및 인지기능 저하에는 오히려 더욱 밀접한 연관이 있다는 것이 타우-PET 이미징이 가능해지면서 많이 보고가 되었다 (7), (13), (14)

). 그러나 단백질 병변만으로는 AD 병인기전이 전부 설명 되지 않는 부분들이 있어서 보다 복잡적이고 종합적인 발병 기전에 대한 이해가 필요하다 (15).

A β 병변을 제거하는 전략의 치료제 개발에 대한 많은 시도들이 있어 왔다. 2021년 아두카누맙 (Aducanumab)이라는 A β 를 타겟하는 단항체 기반 치료제가 FDA에 의해 첫 번째 AD 치료제로 부분 승인 되면서 차후의 치료제 개발의 기준이 되었고, 유사한 전략의 많은 치료제가 임상 시험의 결과와 승인을 기다리고 있다 (16), (17). 그러나 A β 병변이 제거 되었음에도 MCI 및 AD 환자들의 실질적인 인지 기능 개선 효과는 기대보다 크지 않다는 우려의 보고들이 있기도 하다 (18), (19). 아두카누맙 (Aducanumab)이 부분 승인 이후 보고 된 추가적인 결과들에 따르면 해당 약물 투여는 아밀로이드 관련 영상 이상 (amyloid-related imaging abnormalities, ARIA), 뇌 위축, 뇌출혈 및 염증 반응 등의 부작용을 일으키기도 하는 것으로 나타나고 있다 (20), (21). 이러한 요소들을 종합적으로 고려할 때 A β 병변은 AD의 명백한 특징이자 주요한 원인 물질 중 하나이지만, 타우, 신경 염증, 산화스트레스, 대사 이상 등 여러 가지 서로 매우 밀접하게 연관 된 여러 요인들에 대한 분자적 기전에 대한 종합적인 연구와 이해가 추가적으로 필요하다고 말할 수 있겠다 (22), (23).

2. 알츠하이머병에서 나타나는 미세아교세포의 변화

그 중에서도 신경염증 기전에 관한 것은 A β 병변과도 직접적인 연관이 높은 현상으로, AD 병인기전이 뇌의 면역학적 특성과 큰 연관이 있음을 시사하며 병인 기전 및 치료제 개발 탐구 영역에 큰 각광을 받고 있는 가설이다 (24), (25), (26). 전체유전체 상관분석연구 (Genome-wide analysis, GWAS)를 통해 산발성 AD (sporadic AD)의 위험성 돌연변이를 보유한 유전자로 신경 염증 및 선천 면역세포와 관련 된 유전자들이 동정되었다. 그 예로 보체계 단백질인 CR1, 선천면역세포의 분화 발생에

필수적인 전사조절인자 SIP1, 골수유래 세포들의 막 표면에 발현하는 TREM2 등이 있다. 이를 기점으로 신경염증, 미세아교세포의 기능과 AD 병인 기전에 대한 연구에 많은 관심이 집중 되고 있다 (27). 신경염증 반응은 감염원 및 독소에 노출 되거나 외상이 있는 등 다양한 병리학적 손상에 의해 일어나는 신경교세포들의 활성화를 의미한다 (26). A β 펩타이드는 교세포들을 자극시키는 독성이 있으며, 신경염증 병변은 AD 발병 초기부터 환자의 뇌 내에서 관찰 된다 (7).

뇌 내 선천면역세포인 미세아교세포는 수많은 걸가지 돌기를 사용하여 주변 환경을 끊임없이 탐색하다가, 면역원 자극 및 손상 자극에는 반응하여 그 가지를 손상부위를 향해 물러드는 특징을 보인다 (28). 이 과정에서 많은 수의 긴 가지로 주변을 탐색하는 모양 (ramified form)에서부터 보다 짧아진 가지에 비대한 세포체의 모양 (amoeboid form)으로 형태적 변화를 나타내기도 한다 (29), (30). 또한 더 많이 분열하여 숫자적으로 증대되며, 많은 염증성 사이토카인의 생성과 분비를 일으키는 쪽으로 분화 된다 (31), (32). 자극원에 대한 방어를 위해 활성화 되는 것이지만, 만성 질환인 AD의 경우에는 원인물질 또는 병원체의 궁극적인 제거 및 방어 기능을 수행하지 못한다. 오히려 활성화에 의해 분비되는 염증성 사이토카인 자체가 신경세포 독성을 나타내는 등 신경세포가 추가적으로 사멸하는 악순환에 빠지게 되는 문제에 직면 한다 (33), (34), (35). 때문에 이러한 신경염증을 적절히 조절하는 것은 AD 병인을 극복하는 주요한 방법이 될 수 있을 것으로 기대된다 (그림2) (36).

AD 병인 기전에 관련 된 신경염증의 조절 인자를 탐색하기 위해 기본적인 분자 및 세포 기전과 매개체를 정의하고자, 미세아교세포에 대한 전사체 분석 기반의 많은 연구가 이루어져 왔다 (37), (38), (39), (40). 다양한 분석들에서 공통적으로 나타나는 주요 골자는 노화 및 퇴행성 뇌 질환에 직면 한 미세아교세포에서는 *P2ry12*, *Tmem119* 등의 항상성 기능 유지를 나타내는 전사체 발현 네트워크는 무너져 있고, *ApoE*, *Trem2*, *MHC II* 등 활성화에 관련이 있는 전사체 발현이 증가하면서

전체적인 불균형이 발생한다는 것이다. 질병 연관 미세아교세포 (Disease associated microglia, DAM)로 통칭되는 이러한 불균형적인 특성의 세포 집단에 대해 많은 연구들에서 제시 되고 있다 (37), (41), (42), (43). 그러나 각 변화의 특징들이 AD 발병에 방어적인 역할을 하는지, 악화를 가속화하는지에 대해 명확한 기능과 기전까지 파악 하고 있는 것 들은 아직까지는 많지 않다. 이에 본 연구에서는 기존 보고 된 DAM에서 보고 된 차등발현유전자 (Differentially expressed genes, DEG) 정보를 기반으로 미세아교세포의 기능 조절에 중요하고 실질적으로 AD 병인에 영향을 미칠 수 있는 표적이 없을지 탐색해보고자 하였다 (그림 3).

3. 알츠하이머병에서 나타나는 콜레스테롤 대사 변화

1990년대 초반 지질단백질 ApoE4가 산발형 AD의 가장 높은 위험 인자로 동정된 것을 기점으로 지질 및 콜레스테롤 대사와 AD의 관련성에 대한 연구가 각광을 받아왔다 (44). APOE 단백질의 112번 158번 아미노산 잔기의 종류에 따라 cysteine/cysteine을 보유하는 ϵ 2형, cysteine/arginine을 보유하는 ϵ 3형, arginine/arginine을 보유하는 ϵ 4형의 3가지 isoform이 존재한다 (45). 인종 및 성별에 따라 조금씩 차이가 있으나, 통상적으로 ϵ 4형을 보유하지 않은 군과 비교하여 ϵ 4형을 이형접합자로 보유하면 AD 위험 평가 지표를 나타내는 교차비 (odds ratio)가 약 2-3배, 동형접합자로 보유하면 8-12배가량 높아지며 그 발병 시기 또한 앞당겨지는 것으로 알려져 있다 (46), (47). ϵ 4형은 동맥경화, 고지혈증 및 심혈관계 질환 환자에서도 많이 발견되어 해당 유전자의 다형성이 지질 대사 질환들과도 밀접한 관련이 있다는 것 또한 잘 알려져 있으며, 후향적 역학 조사 연구를 통해 비만, 심혈관 질환 및 고콜레스테롤혈증 노년기의 치매 위험을 증가시킬 수 있다는 밀접한 통계적 상관성이 제시 되기도 하였다 (48), (49), (50), (51). ApoE 뿐 아니라 CLU 및 ABCA7 등 지질 대사 및 수송과 관련 된 추가적인 위험유전자가 추가로 동정되면서 AD 발병에 콜레스테롤 대사가 밀접한 영향이 있을 것이라는 것은

통상적으로 받아들여지고 있으나, 아직 명확한 기전에 대한 것은 추가적인 연구들이 필요한 실정이다 (52).

뇌의 무게는 전신의 2% 가량이지만, 체내의 25% 가량의 콜레스테롤이 뇌에 보유되어 있을 정도로 지질의 비율이 높은 장기이다. 특히 뇌 내의 신경세포의 경우 평균적으로 그 크기도 크고 수초와 같은 막대한 지질이 필요한 구조를 보유하고 있으면서 더 이상 분열하지 않고 긴 시간을 생존해야 하는 바, 세밀하게 조절 되는 콜레스테롤의 조절 및 항상성 유지 는 뇌의 정상적 기능을 위해 필수적이라고 말할 수 있겠다 (53). 콜레스테롤은 BBB를 그냥 통과할 수 없으므로 뇌 내의 콜레스테롤은 다른 기관과 구별되어 뇌 내에서 자체적으로 생성 및 소비되는 비율이 높은 것으로 알려져 있다. 특히 대부분의 콜레스테롤은 뇌 내 성상교세포에서 생성되고, 지질단백질에 포장되어 ABCA 및 ABCG와 같은 ABC 수송체를 통해 신경세포에 전달 된 후 사용된다 (54). 이는 *in vitro* 배양 수준에서 성상교세포가 신경세포에 비해 콜레스테롤 합성 효율이 2배 이상 높으며, *in vivo*에서 신경세포 특이적으로 콜레스테롤 생성을 저해하더라도 별다른 시냅스 소실이나 신경세포소실이 없다는 현상을 기반으로 밝혀진 바 있다 (55), (56).

신경세포의 보다 세밀한 콜레스테롤 대사 조율을 위해서, 과량의 콜레스테롤은 신경세포 특이적인 콜레스테롤 수산화효소인 CYP46A1 효소를 보유하고 있다. CYP46A1에 의해 콜레스테롤은 24-hydroxycholesterol (24HC)로 전환되어 신경세포 밖으로 배출되며, 24HC는 확산을 통해 BBB를 통과해 체내로 퍼져나갈 수 있다. 뇌에서 생성되는 옥시스테롤 종류 중 가장 많은 비율을 24HC가 차지하고 있으며, 24HC가 BBB를 통해 체내로 넘어가는 것이 가장 주요한 뇌 내 콜레스테롤 배출 경로인 것으로 밝혀져 있다 (57). 기본적인 콜레스테롤 항상성 조절은 신생합성 (de novo synthesis), 흡수, 저장, 배출 4가지의 경로를 통해 이루어진다. 24HC를 비롯한 옥시스테롤 및 대부분의 콜레스테롤 유도체는 대개 세포의 콜레스테롤의 흡수 및 신생성은 저해하고 저장 및 배출을 증진시키는

방향으로 세포내 전사 조절 인자들을 작용시킬 수 있다 (58). 24HC는 자체적으로 확산 되어 배출 되는 콜레스테롤 유도체일 뿐 아니라, 콜레스테롤의 배출을 활성화시키는 조절자인 liver X receptor (LXR)에 직접 결합하여 세포의 지질 유출 수송체들의 발현을 증가시키는 역할 또한 잘 알려져 있다 (58). 뇌 내에서 24HC 다음으로 많은 비율을 차지하는 것으로 알려진 27-hydroxycholesterol (27HC)의 경우 다양한 세포 유형에서 CYP27A1이라는 효소에 의해 생성될 수 있으며 마찬가지로 BBB를 통과할 수 있고 LXR의 작용제인 것으로 알려져 있다 (58). 그러나 27HC의 경우 뇌에서 생성된 것이 뇌 내에 존재하는 것이 아니라 대부분이 간으로부터 합성된 후 BBB를 통과해 중추 신경계로 넘어온 것으로, 24HC와는 반대로 체내로부터 뇌 내에 콜레스테롤이 흡수 되게 하는 주요한 경로를 매개하는 유도체라고 말할 수 있겠다 (59). 이렇듯 뇌 내 콜레스테롤 수준은 뇌 내 다양한 세포의 긴밀한 대사 조절 및 체내와 교류를 다양하게 활용하여 정상 기능 유지를 위한 전략으로 활용하고 있다. 그러나 AD 환자 뇌에서는 이러한 콜레스테롤 대사들이 정상적으로 통제되지 않는 증거들이 관찰되고 있다.

우선 AD의 가장 큰 병리적 특징인 아밀로이드 베타 플라크에는 다량의 콜레스테롤이 APOE와 같은 지질단백질들과 함께 뭉쳐져 축적된다 (60). 일부는 플라크가 형성 되는 동안 주변의 신경세포가 사멸 되며 나오는 지질이 풍부한 세포 찌꺼기들이 혼재되어 축적되어 나타날 수 있을 것이다. 보다 근본적으로는 세포 외부로 잘려져 분비 된 독성 A β 가 세포막의 지질뿔목 구조에 달라붙기 매우 쉬우며, 그 달라붙은 조각이 떨어져 나오면서 플라크 형성 초기의 씨앗으로 작용하는 이유도 작용할 것이다 (61). 더 나아가 과량의 콜레스테롤은 세포막에 위치하는 APP 단백질이 절단 효소들과 만나게 되는 확률을 증진 시키면서 amyloidogenic 경로에 진입하는 것을 촉진할 수 있고, 낮은 콜레스테롤은 그 반대의 역할을 한다는 것을 다수의 연구 결과들이 직접적으로 증명하고 있다 (62), (63), (64), (65).

그렇다고 해서 AD 환자의 뇌 내에서 콜레스테롤의 양적 증가가 관찰되었는가하면 꼭 그런 것은 아니다. 기본적으로 뇌 내의 실질적인 콜레스테롤 합성 여력은 뇌 발생 및 발달 단계에 가장 높고, 성인이 된 후에는 나이가 들수록 그 여력이 점차 감소한다 (66), (53). 노화에 따라 점진적으로 진행되는 AD 환자의 경우에도 마찬가지로 뇌 내 전반적인 콜레스테롤 신규 합성은 줄어들고, 회백질 영역 등에서 실질적인 콜레스테롤 양적 감소가 관찰된다는 보고가 있기도 하다 (67), (68). 반면 AD 환자의 회백질 영역에서 콜레스테롤이 증가했다는 연구 결과가 있기도 하며 (63), (69), AD 환자의 해마 영역에서는 절대적인 콜레스테롤양이 어느 정도 유지된다는 보고가 있기도 하는 등 AD 환자 뇌 내의 콜레스테롤 양적 변화에 대해서는 아직까지는 논란의 여지가 있는 다양한 결과들이 존재한다 (70). 이것은 뇌 조직 위치, 샘플링 방식, 환자마다 다른 AD 병리 단계 등으로 인한 결과일 수 있을 것이다. 대신 뇌 내의 가장 많은 비율을 차지하는 24HC의 경우에는 AD 환자 뇌 내에서 유의하게 감소하여 있고, CSF에서는 증가되어 있다는 것이 공통적으로 보고되어 있다 (71), (72), (73). 이는 AD 환자의 뇌에서는 뇌 내에 축적된 A β 를 뇌 밖으로 유출 시킬 수 있는 기능을 할 수 있는 콜레스테롤 기능이 정상군보다 감소되고 정체되어 플라크 형성 및 축적에 더욱 취약해진다고 해석할 수 있겠다. 특히나 AD 후기 단계로 갈수록 죽어가는 세포에서 나오는 지질이 풍부한 찌꺼기가 더 증가될 것이라는 점에서 (74), 미세아교세포가 이를 처리하는 과정에서 해당 세포의 막대한 지질, 콜레스테롤의 변화가 수반될 수 있겠다. 또한 BBB 자체가 손상되면서 통제되지 않은 체내로부터의 콜레스테롤 유출입의 영향이 혼재되면서 뇌 내 세포와 병리 현상에 영향을 줄 수 있는 가능성도 AD에서 변화되는 콜레스테롤 대사의 요인으로 볼 수 있겠다.

4. 콜레스테롤 대사 변화가 미세아교세포 면역 반응에 미칠 수 있는 영향

미세아교세포는 정상교세포에 비하면 일반적인 상황에서는 콜레스테롤 신생합성 수준 자체는 높지 않아 정상교세포로부터 전달받는 것에 상당 부분 의존하는 알려져있다 (75). 미세아교세포 표면에 존재하는 TREM2, TLR, 그리고 LDLR 등의 수용체 단백질들이 APOE 지질단백질과 결합하여 세포 안으로 수송하는 기능을 한다 (76). 말초 면역계의 대식세포에서 지질 및 콜레스테롤 대사 변화를 포함한 대사 경로의 유연한 변화 및 적용이 면역세포의 정상적 면역 기능 중요한 기반이 되고 있다는 것이 밝혀지고 있다 (77), (78). 이러한 면역대사학적 관점에서도 뇌 내 지질대사 변화가 미세아교세포의 많은 기능적 변화 또한 초래할 수 있을 것이라고 말할 수 있겠다 (79). 미세아교세포에서 연구된 DAM 표현형에서 살펴보면 *ApoE* 발현이 증가 되어 있으며, 그 변화에 TREM2-APOE 경로가 핵심적이라는 보고 등으로부터 지질 대사 변화가 미세아교세포 기능 및 표현형에 핵심적인 영향을 미칠 수 있다는 것을 확인할 수 있다 (37), (80). TREM2가 ApoE와 상호작용할 수 있으며 (81), 해당 유전자의 위험 유전자형 보유군의 미세아교세포는 A β 에 대한 반응성이 현저히 떨어지고 아밀로이드 베타 플라크 형성에 기여 할 수 있다는 점 등에 대한 연구를 통해 AD 뇌 내 미세아교세포의 기능 변화와 지질 대사 변화의 상관성이 제시 되고 있다 (82). 또한 APOE 동형 단백질 유형별로 미세아교세포의 신경 염증 물질 분비 정도가 차이가 있고, ϵ 4형 유형일수록 염증성 사이토카인 분비가 증가한다는 것도 관찰 된 바 있는 등 AD 미세아교세포의 지질대사 변화와 그 기능 변화에 대한 것이 제시되고 있다 (83).

노화 및 신경 퇴행 질환의 진행에 따라 콜레스테롤이 풍부한 세포 찌꺼기들이 축적됨에 따라 미세아교세포가 포식 및 처리해야하는 부담이 점차 늘어난다는 점도 AD 뇌 내 미세아교세포의 지질 대사 변화에 있어서 주요하게 고려해야하는 사항이다. 노화에 따라 미세아교세포가 다량의 콜레스테롤을 대사할 수 있는 여력이 감소하고, 축적 된 콜레스테롤은 크리스탈 구조로 세포 내에 침착 되는 것이 보고 된 바 있다. 이러

한 현상은 미세아교세포의 염증성 반응을 증진시키고, 수초형성의 재생을 막아 신경세포의 손상을 야기하게 된다고 알려져 있으며, 콜레스테롤 유출을 증진시키면 완화 될 수 있는 것으로 확인 되었다 (84). 또한 노화 및 신경 퇴행에 따라 뇌 내에서는 지방방울 축적 미세아교세포 (lipid droplet accumulated microglia, LDAM)가 다수 관찰되며, 이렇게 지방방울 (lipid droplet, LD)이 축적 된 미세아교세포들에서도 염증성 반응이 증진 되는 등의 기능적 결함이 나타나는 것으로 잘 알려져 있다 (85), (86), (87).

이렇듯 면역 반응과 지질 대사가 AD 병인기전과 밀접한 관련이 있는 것으로 보고되어 있는 바, 미세아교세포의 면역 및 지질 대사를 동시에 조절 할 수 있을 것으로 보이는 후보를 탐색하였다 (88), (89). 본 연구에서는 많은 후보 중에서도 콜레스테롤 수산화효소의 한 종류인 Ch25h를 선정하였다. DAM에서 채택한 CH25H 유전자는 사람의 10q23 염색체에 존재하는 유전자로 AD 관련성 유전자로도 보고 된 적이 있는 표적이다 (90). 2005년 수행한 연구에서는 약 천여명 규모의 AD 환자와 정상군에 대한 관련 유전자 메타분석 결과를 통해 CH25H 프로모터 위치의 rs13500 ‘T’ 좌위가 AD 발병과 아밀로이드 플라크 축적에 관련이 있다고 보고되었다 (91). 그러나 후속으로 진행 된 대규모의 GWAS 연구 결과에서는 해당 유전좌위의 유전적 다형성이 제시되지 않았기 때문에 관련성이 있을 가능성이 제시 된 정도의 후보 중 하나로 이해할 수 있겠다 (88), (89). *Ch25h*는 콜레스테롤 25번 탄소에 수산화기를 도입하여 25-hydroxy cholesterol (25HC)를 생성한다 (92). 앞서 설명한 뇌 내 스테롤 유도체의 대부분의 비율을 차지한다고 알려져 있는 24HC 및 27HC에 비하면 25HC는 뇌 내에 존재 비율이 높은 편은 아닌 것으로 알려져 있다 (93), (94), (95). 25HC 또한 알려진 위의 옥시스테롤과 마찬가지로 LXR의 작용제로 지질 유출 수송체의 증가를 초래할 수 있고, 콜레스테롤 및 지질 신생합성에 관여하는 SREBP를 조절하는 INSIG에 결합능을 보유하여 SREBP의 작용이 지연되도록 하는 지질 대사 조절 기

능을 보유하고 있다 (58). 또는 25HC는 콜레스테릴에스터화효소 발현을 증진시켜 콜레스테롤이 저장 될 수 있는 형태인 콜레스테릴에스터로 전환 되도록 하는 조절할 수 있다고 알려져 있다 (96). 특이하게도 *Ch25h*는 면역 활성화 시에 증대되는 표적으로, toll-like receptor (TLR) 등 패턴 인식 수용체를 통한 면역원 자극이나 및 제 1형 타입 인터페론 시그널링에 의해 증폭된다 (97), (98). 면역원 자극에 의해서 전반적으로 모든 옥시스테롤이 증대되는 것은 아니고 *Ch25h*에 의해 생성되는 25HC만 유의하게 증가하는 것으로 보고된 바 있다 (99). 이렇듯 25HC는 많은 콜레스테롤 유도체 중에서도 가장 직접적인 면역 조절 및 활성화 역할을 보유하고 있으며, 콜레스테롤 및 지질 대사의 조절에도 중요한 역할을 한다고 기존 보고 된 생리활성물질이다 (100).

이러한 특성을 바탕으로 바이러스 및 세균 감염증에 반응하는 대식세포에서는 25HC에 의해 매개 되는 면역-대사 조절의 기능이 연구되어 왔다 (그림 4), (101), (102), (103), (104), (105). 대표적으로 *Ch25h* 유전자를 제거한 *in vitro* 및 *in vivo* 모델들에서 바이러스 및 박테리아 감염 시 생존율이 감소하고, 이러한 현상이 25HC를 대사체를 보충해주었을 때에는 다시 회복된다는 것을 통해 감염면역에서 25HC가 면역 반응 및 생존에 중요한 역할을 한다는 것이 알려져 있다 (103), (106). 그 기전으로는 25HC가 기계적으로 바이러스의 세포막 진입을 억제하거나, 또는 세포막에 존재하는 콜레스테롤 대사체의 조성을 비유동적으로 변화시켜 추가적인 전파를 막는다는 것이 알려져있다 (107), (108), (104), (105). 25HC에 의한 면역 및 사이토카인의 조절에 대한 양상은 상황에 따라 다양하고 양면적으로 나타나는 것으로 보고 된 바 있다. 일례로 interleukin-1 (IL-1) 군에 속하는 IL-1 α , IL-1 β 및 IL-18 등은 25HC에 의해 생성이 저해되고 (109), (110), TNF α , IL-6, IL-8, monocyte chemoattractant protein-1 (MCP1), 그리고 C-C motif chemokine ligand 2 (Ccl2) 등의 염증성 사이토카인의 생성 및 분비는 증가될 수 있는 것으로 알려졌다 (111), (112), (113). 25HC는 염증소체 (inflammasome) 조절

에도 관련이 있는 것으로 보고되었는데, 고콜레스테롤 상황에 노출된 대식세포에서 생성되는 콜레스테롤 크리스탈이 미토콘드리아 손상을 일으켜 AIM2 염증소체가 발생하는 것을 25HC가 억제할 수 있다는 항염 조절 기전 또한 유전자 제거 기반 연구를 통해 알려져 있다 (114).

그러나 아직 AD 및 미세아교세포의 기능적인 맥락에서는 *Ch25h* 및 그 대사산물인 25HC에 대한 연구가 많이 이루어지지 않았기 때문에 본 연구에서는 뇌 조직에 A β 가 과발현 되도록 유도된 형질 전환 모델인 5XFAD 마우스 모델을 활용하여 아밀로이드 병인기전과 미세아교세포의 기능 및 지질대사 사이의 상관관계를 조사하고자 하였다 (115).

5. 이광자현미경의 특징 및 이광자여기능 탐침 개발

앞에서도 언급한 것처럼, 실제로 경도 인지 장애나 치매로 진단 받기 십 수 년을 앞서 환자의 뇌 조직에서는 비정상 단백질들이 응집 및 축적이 선행된다 (116), (117). 아직까지 명확히 밝혀지지 않은 알츠하이머병의 분자적 병인기전을 보다 심도 있게 이해하고, 효과적인 치료 기전을 연구하기 위해서는 이러한 병리학적 특징들과 뇌 안에 있는 세포 및 물질들의 직접적인 상호작용을 관찰하는 것은 큰 도움이 될 것이다. 특히 생체 내의 신호를 비침습적으로 실시간으로 촬영 및 관찰할 수 있다면 고정된 시료의 한계를 넘는 강력한 대안이 될 것이다 (118). 이광자현미경은 투과성이 높은 적외선에 가까운 긴 파장대의 광원을, 펨토초 단위의 빠른 펄스로 주는 원리의 현미경이다. 여기 파장이 방출 파장보다 더 짧고, 에너지 준위가 높은 기존의 형광 현미경과 다르게, 방출되는 빛보다 더 긴 파장의 두 광자를 동시에 여기시켜 사용한다 (119). 이러한 이광자 조사 방식은 근적외선광에 가까운 광원을 사용할 수 있어서 세포내 산란이 감소하고, 광 독성이 감소하는 장점이 있다 (120). 그리고 보다 높은 조직 침투력을 보유하여, 보다 두꺼운 조직 내부에 대한 영상화가 가능해진다 (그림 5) (120), (121). 이광자현미경을 통해 살아 있는 쥐의 생체 내부를 고배율로 실시간 관찰할 수 있기 때문에 뇌 내 신경

세포의 활성화에 대한 칼슘 이미징 등 신경생리학 분야의 활용되거나, 면역 세포 및 암 연구 분야, 눈 망막 연구 등 다양한 분야에서 적극적으로 이용되고 있다 (122), (123), (124), (125), (126).

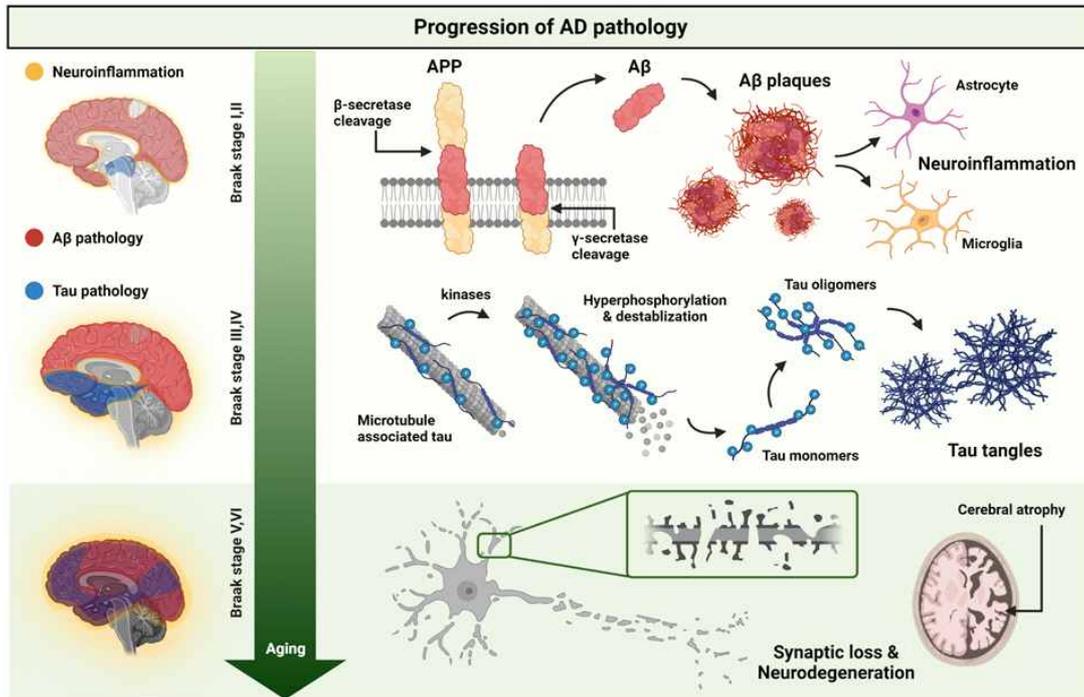
이광자현미경을 의미 있게 활용하기 위해서는 이광자여기능을 보유한 좋은 염료 및 형광탐침 개발 및 개선 또한 중요하다. AD의 명확한 병인 기전의 이해에 아밀로이드 병변 축적 및 변화를 배제할 수 없는바, 이를 표지하여 주변 신경세포 및 교세포들과의 상호작용을 마이크로 단위로 실시간 관찰 하는 것은 전임상 연구에서 중요한 의미를 지닐 수 있을 것이다 (127). A β 를 표지하는 이광자여기능 탐침이 기존에 아예 존재하지 않는 것은 아니지만, 시그널 대비 노이즈에 대한 문제나, 밝기 문제가 고질적으로 존재하고, 용해도나 BBB 투과성, 그리고 세포 독성 측면 등에서도 아직 개선의 여지가 있다 (128), (129). 기존 개발된 탐침들보다 좀 더 정확하고 정밀하게 감지할 수 있는 전략으로 분자 내 회전 스위치를 적용시킨 탐침 개발을 고안하였다. 분자 내 회전 스위치가 있게 되면, 두 고리 분자 내 회전이 가능하게 되면서 평소에는 두 고리 구조가 꼬인 상태를 선호하게 되어, 꼬인 분자 내 전하 상태 기반의-탈여기 현상 (TICT-based de-excitation pathway)이 일어나 발광하지 않다가 플라크에 결합하였을 때에는 한 평면에 있도록 회전되어 형광 스위치가 켜지게 되어 배경 신호를 감소시키는 효과를 얻고자 하였다 (130).

연구 목적

본 연구에서는 미세아교세포의 기능 변화에 따른 AD 병인기전 변화 및 개선된 A β 탐침 개발에 관한 다음 두 가지 연구 주제를 통하여 아밀로이드 병변의 변화와 AD 병인기전에 대한 추가적인 단서를 찾고자 하였다.

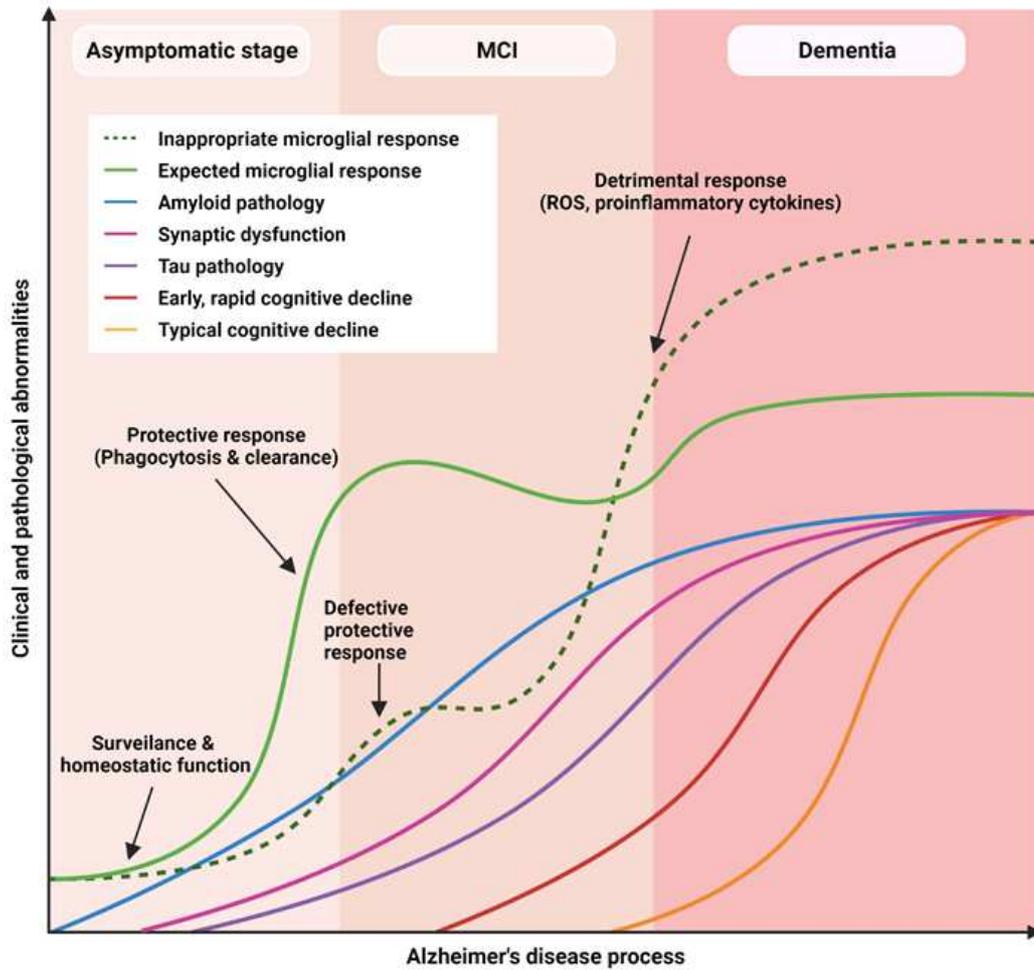
- I. 질병연관 미세아교세포에서 나타나는 특징 및 기능변화가 아밀로이드 병변에 미치는 영향 연구
- II. 개선된 배경 신호를 보이는 이광자현미경 아밀로이드 베타 플라크 탐침 개발

이러한 아밀로이드에 의한 미세아교세포의 기능 변화와 병변과의 상호 작용 연구를 통하여서 주변 환경적 요인과 신경염증성 요인이 아밀로이드 병리에 미치는 영향에 대한 기전을 제시하고자 한다. 또한 아밀로이드 병변에 대한 아밀로이드 베타 플라크의 탐침 개선을 통해 보다 명확한 뇌 내 병리 현상의 촬영 및 관찰 가능성을 제공하는데 기여하고자 하였다.



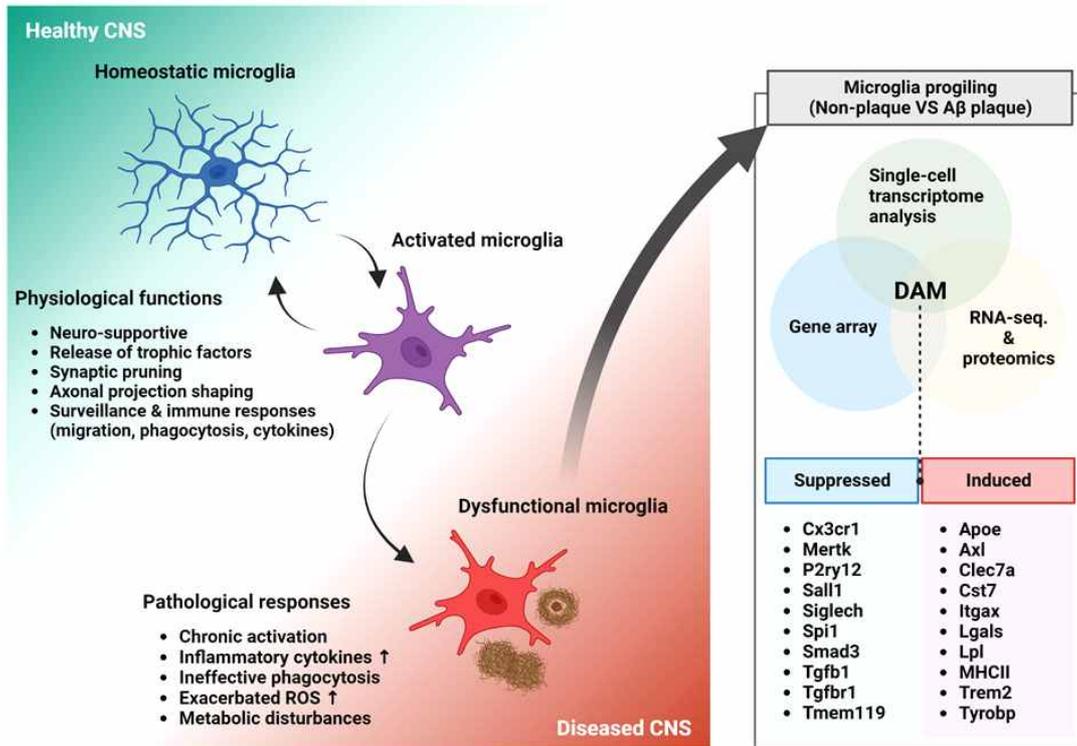
(Modified from Estella Newcombe et al., J. Neuroinflammation., 2018)

그림 1. AD 환자의 뇌 조직에서 관찰 되는 대표적인 병리학적 특성에 관한 모식도



(Modified from Fangda Len & Paul Edison., Nat. Rev. Neurology., 2021)

그림 2. 알츠하이머병의 진행에 영향을 미치는 미세아교세포의 역동적 활성 변화



(Modified from Oleg Butovsky & Howard L. Weiner., Nat. Rev. Neurosci., 2018)

그림 3. 신경퇴행성 질병에서 나타나는 미세아교세포의 표현형 변화

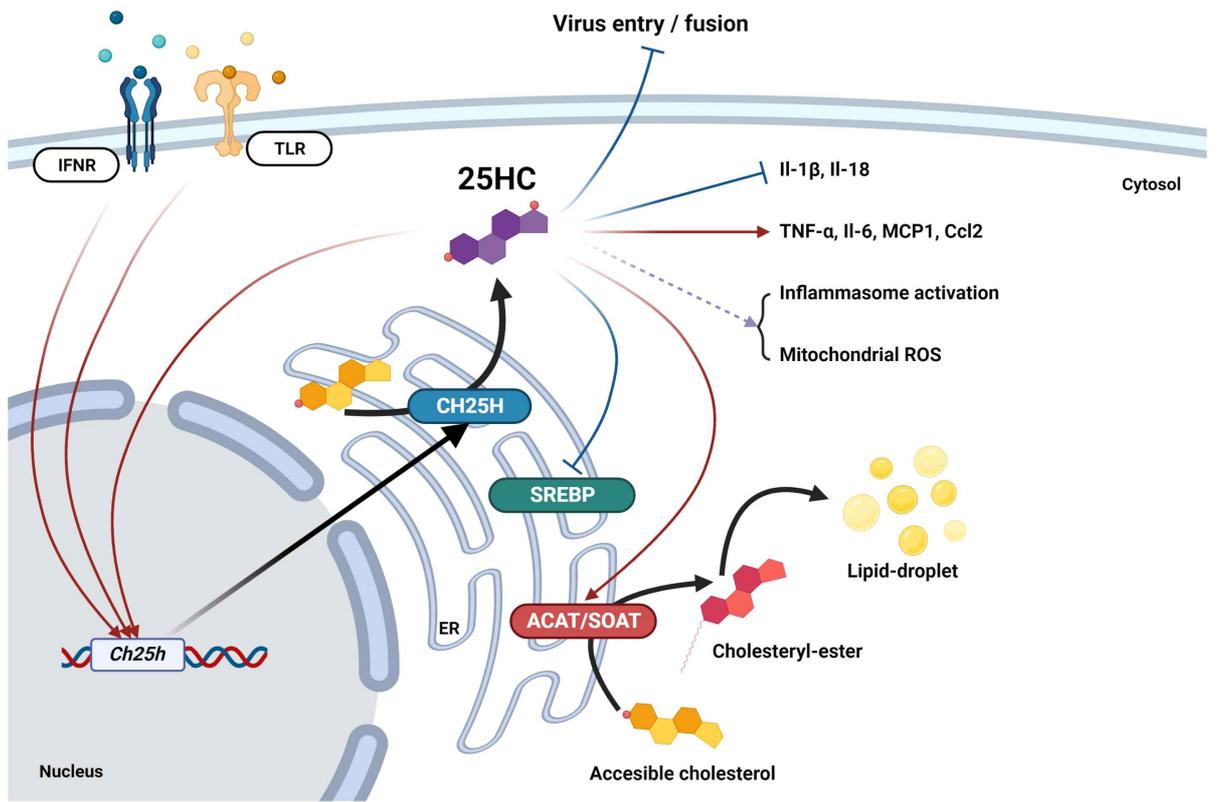


그림 4. *Ch25h*의 조절과 25HC의 지질 대사, 염증반응에 대한 다양한 역할

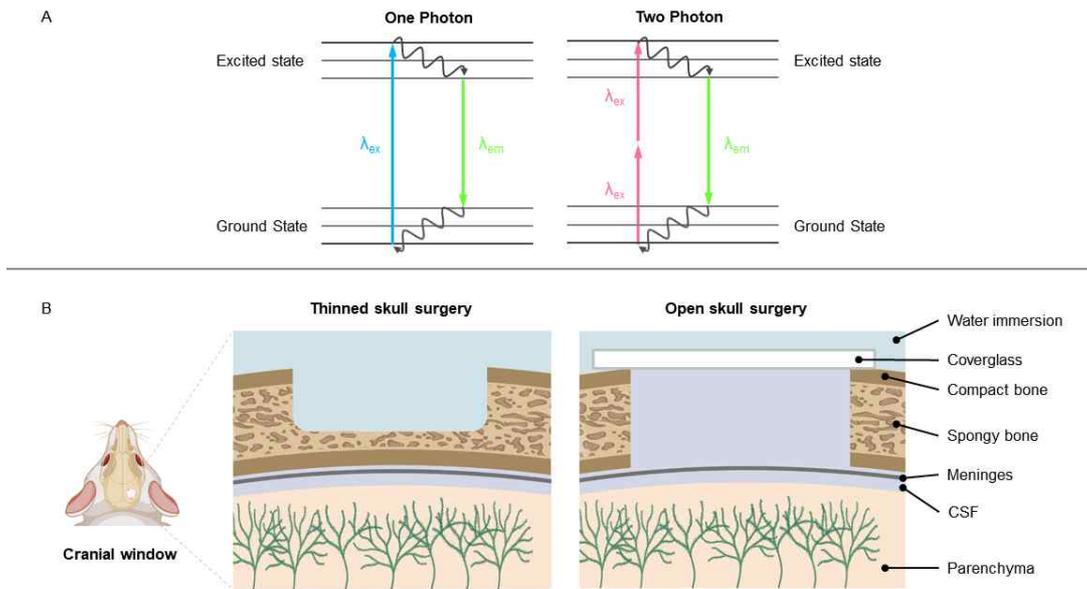


그림 5. 이광자현미경 광원 조사 원리와 마우스 뇌 이미징을 위한 수술 기법 모식도

실험 재료 및 방법

Part 1. 질병연관 미세아교세포의 기능변화가 알츠하이머병의 병인기전에 미치는 영향 연구

1. 실험에 이용 한 동물 모델

알츠하이머병 동물 모델 5XFAD (Tg6799; Jax stock #006554; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, 미국)은 가족형 알츠하이머병에서 보고된 돌연변이 5개를 보유한 형질전환 마우스이다. 해당 5가지의 돌연변이는 인간 APP에 대한 3가지 (스웨덴변이, K670N, M671L; 플로리다변이, I716V; 런던변이, V717I)와 인간 PS1에 대한 2가지(M146L 변이, L286V 변이)이며, 이들은 *Thy1* 프로모터에 의해 조절되어 신경세포에서 과발현하도록 설계되었다. 5XFAD 모델에서는 최소 2개월령부터 대뇌 피질 5번째 세포층에서 아밀로이드 베타 병변이 관찰되는 등 빠르고 극심한 아밀로이드 병변이 관찰되는 것이 특징이다. 신경염증 반응 및 인지 기능 저하 등의 AD 유사 형질 또한 재현된다. 귀 조직 편치로 얻은 조직을 이용하여 유전자형을 판독하였다.

미세아교세포 특이적으로 GFP를 표지할 수 있는 모델 마우스인 CX3CR1^{GFP/GFP}(Jax stock #005582; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, 미국)를 5XFAD와 교배하여 CX3CR1^{GFP/+}_WT 및 CX3CR1^{GFP/+}_TG 마우스를 얻어 실험에 사용하였다. 모든 동물 관리 및 실험 절차는 서울대학교 실험동물 자원관리원 (IACUC)의 규정에 따라 수행되었다.

2. 동물 실험 시약처리

25HC (H1015; Sigma, St.Louis, 미국) 대사체가 *in vivo* 미세아교세포에 미치는 영향을 확인하기 위해서 10 mg/kg으로 복강 주입하였다. Avasimibe (Cholenterol O-AcylTransferase inhibitor; PZ0190; Sigma, St.Louis, 미국)의 경우에는 15 mg/kg 농도로 경구투여 하였다. 각각의 원시시약이 녹여진 용매(25HC는 에탄올, Avasimibe은 DMSO)에 상응 하

는 물질 및 양을 대조군에 투약하였다. 약물 효과를 확인하는 실험은 5XFAD_WT에서 수컷 쥐로 수행하였다. 병변 확인 및 5XFAD_TG 관련한 실험은 암컷 쥐들로 수행하였다. 장기간 약물 투여 실험에는 시작 전후로 체중을 측정하여 부작용의 유무를 검증하였다

3. 동물 행동 실험

4주 동안의 Veh, 25HC, Avasimibe 투약을 마친 4.5개월 령의 마우스들의 인지 기능 및 기본 움직임 평가를 수행하였다. 서울대학교 중앙연구지원실의 동물행동분석센터 시설을 이용하였다. 모든 실험 수행 전 최소 1시간 동안 실험을 수행할 방으로 사육케이지를 옮겨 실험 환경에 적응하도록 하였다.

가 Open Field

마우스들이 행동 평가를 수행할 실험 환경 및 상자에 적응할 수 있도록 실제 세션이 시작되기 하루 전에 개방형 상자 (58 × 42 × 35 cm) 안에 30분씩 마우스를 자유롭게 두고 모든 행동을 카메라로 녹화하였다. 실험이 수행되는 동안에 실험자는 실험 공간 바깥에서 카메라를 통해 영상으로 지켜보며 대기한다. 개체를 교체하기 전, 후로는 70% 에탄올로 상자를 충분히 소독하고, 마른 종이 타월로 남아있는 알코올을 모두 닦아주었다. 움직임은 추후 Ethovision XT 14 (Noldus, Wageningen, 네덜란드) 소프트웨어로 분석하였다. Outlier 검정 (Grubbs' test, $\alpha = 0.05$) 을 통해 벗어나는 개체는 추후 분석에서 제외하였다.

나. NOR (Novel objective recognition)

Open Field 테스트를 통해 상자 환경에 적응한 마우스는 기존 알려진 실험 방법을 실험실 형편에 최적화하여 1일차 NOR 학습 세션을 진행하였다 (131).. 상자 안에 동일하게 생긴 물체 두 개를 준비해두고 마우스를 넣어 10분씩 자유롭게 탐색하도록 하였다. 개체 교체 전, 후로 상자 및 물체를 모두 깨끗하게 소독하고 닦아준다. 2일차 NOR 세션에서는 상자 안에 1일 차 세션에서 제공한 기존 물체 1개와, 새로운 형태의 물체 1개

를 각각 준비하여 넣어둔다. 이후 마우스를 상자에 넣고 5분간 마우스의 행동을 촬영한다. 코나 발로 직접적으로 각각의 물체에 접촉하는 탐색적 행동을 보이는 누적된 시간 정보를 정량한다. 마우스가 새로운 물체를 변별하는 인지 능력은 (새로운 물체 탐사 시간 - 기존 물체 탐사 시간) / (물체 탐사 총 시간)의 수식에 대입하여 계산하였다. 총 탐사 시간이 1 초 미만인 개체들은 추후 분석에서 제외하였다.

다. Y형 미로

Y형 미로에서 마우스 인지 기능 평가는 매우 잘 정립된 기존 문헌의 실험 방법을 따라 진행하였다 (132). 길이 40 cm, 높이 30 cm, 너비 15 cm의 팔이 Y형으로 연결된 미로를 사용한다. Y형 미로에 중앙에 마우스를 놓고, 30초 간 자유롭게 탐색하도록 한 후 이후 7분 동안 오고 나간 팔의 방향을 기록하였다. 팔에 출입하는 기준은 뒷발이 넘어갔는지 여부로 결정하였다. 미로는 마우스 교체 전, 후로 70% 에탄올로 소독하고 닦아주었으며 실험자는 바깥에서 대기하였다. 미로의 서로 다른 3가지의 팔 방향에 얼마나 겹치지 않게 출입하였는지에 대해 3번의 연속적인 입장의 방향이 중복되지 않은 횟수를 전체 출입 횟수에서 2를 빼 값으로 나누어 계산하였다. 총 출입 횟수가 15회 미만이거나, 실험 도중 미로 바깥으로 점프하여 뛰쳐나온 개체들은 추후 분석에서 제외하였다.

4. 마우스 두개골 수술

마우스 두개골 수술(Thinned skull surgery)은 기존 알려진 방법을 실험실 실정에 맞게 수정하여 수행하였다 (133). Tiletamine - Zolazepam (Virbac, Carros, 프랑스) and Xylazine (Bayer Korea, 서울, 대한민국) 혼합제 근육주사 (1.2 mg/kg)를 통해 마취시킨 쥐는 주문 제작된 보정용 온열기 (37°C; LCI, 남양주시, 대한민국) 위에 단단하게 고정시킨다. 쥐가 완전히 마취된 것을 확인한 후에, 수술 부위에 포비돈 (Firson, 천안, 대한민국)을 충분히 도포하여 소독한다. 두피를 수술용 가위로 잘라 제거하고 epinephrine (제일제약, 대구, 대한민국)을 한 방울 떨어뜨려 국소

통증 및 출혈을 방지한다. 수술용 칼날로 골막을 긁어내고 물기가 남아 있지 않도록 말려준다. 해부현미경으로 수술 위치를 보면서, bregma 기준 -2.5 mm, sagittal 두개골봉합선(suture) 기준 우측 2.5 mm에 위치한 뼈 영역(체성감각신경 피질 영역)에 치과용 미세 드릴과 수술용 칼날을 이용해 아주 조심스럽게 두개골을 갈아낸다. 중간 중간 차가운 식염수로 열 및 출혈을 최소화하면서 골수 스폰지층까지 최대한 얇게 갈아내서 20 μ m 정도의 뼈 두께로 만든다. 물-액침용 렌즈로 촬영시에 물이 마르지 않을 수 있도록, 수술 부위보다 바깥쪽으로 넓게 치과용 시멘트 (이스라엘, BJM LAB)를 우물처럼 둘러서 충분히 말려서 준비한다. 수술 한 뒤는 당일 촬영, 당일 안락사 하였다.

5. 이광자 현미경 이미징

CX3CR1^{GFP/+}_WT 및 CX3CR1^{GFP/+}_TG 마우스를 이용하여 미세아교세포의 *in vivo* 실시간 움직임을 관찰하고자 하였다. LSM 7 MP (Carl Zeiss, Oberkochen, 독일) 현미경과 Chameleon-Ultra II (Coherent, Santa Clara, 미국) 레이저 시스템 및 20X 물-액침용 대물렌즈 (W Plan-Apochromat 20x/1.0 DIC M27 70 mm; Carl Zeiss, Oberkochen, 독일) 시스템을 사용하였다. 사용한 NDD 필터는 적색 채널 (555-610 nm), 녹색 채널 (490-555 nm) 청색 채널 (485-490 nm)로 구성되어 있으며, 관찰한 GFP 신호는 녹색채널을 통과한 신호이다. 피질 표면을 기준으로 50 μ m 깊이를 시작으로 1 μ m 간격의 50 장의 Z-stack 이미지를 1 분 간격으로 60분 동안 확보하였다. 기본적인 촬영은 광독성을 방지하기 위해서 30 mW의 출력으로 제한하여 수행하였고, 레이저 조사를 통한 국소 조직 손상을 위해서는 직경 15 μ m ROI에 최대 출력 레이저를 조사하였다. 손상 부위에 대한 미세아교세포의 움직임과 반응성은 기존 보고된 분석 방법을 기반으로 수행하였다 (134). 간략하게는 손상된 ROI의 중심을 원의 중심으로 갖는 140 μ m 직경의 바깥 원과, 70 μ m 직경의 안쪽 원을 그린 다음 시간 별로 각 원 안에 있는 형광 세기를 측정한다. (안

쪽 원 형광 세기(시간) - 안 쪽 원 형광 세기 (시작) / 바깥 쪽 원 형광 세기 (시작))의 공식에 측정된 형광 세기 정보를 대입하여 반응성 정도를 환산한다. 이미지의 추가적인 3차원 재구성 및 형광세기 분석 등의 추가 작업은 Volocity 소프트웨어(Perkin-Elmer, Waltham, 미국)를 이용하여 수행하였다.

6. 성체 마우스 미세아교세포 분리 (MACS: Magnetic-activated cell sorting)

마우스 뇌의 미세아교세포를 얻기 위해서는, 마우스 마취 후 PBS 심부 관류 이후 적출한 뇌 조직을 1.6 mg/100 ml DNaseI (Sigma, St.Louis, 미국)이 섞인 DPBS 용액에 담아 Dounce 균질화기(Wheaton Industries, Millville, 미국)로 파쇄한다. 70 μ m 구멍의 거름망에 조직파쇄액을 잘 걸러준 다음, Myelin 및 세포잔해물을 조직 잔해 제거 용액(Debris Removal Solution, #130-109-398; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, 독일)을 이용하여 제조사가 제공하는 실험 방법대로 농도구배 원심분리를 수행하여 제거한다. 미세아교세포는 CD11b MicroBeads (Cat#130-093-634; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, 독일) 자석부착 항체 기반 전략으로 분리하고, 차가운 PBS로 세척하여 -80°C에서 보관하였다가 사용한다.

7. 세포 배양

세포는 37°C, 5% CO₂ 배양 조건에서 배양한다.

가. 마우스 교세포 초대배양

마우스 교세포 초대배양은 생후 1-2일차의 비근교계(outbred) 마우스 (Hsd: ICR (CD-1); KOATECH, 평택시, 대한민국) 뇌를 이용하였다. 대뇌 및 해마를 분리하여 차가운 HBSS (WelGENE, 경산시, 대한민국) 배양액 위에서 뇌막을 벗겨낸 후, 10% FBS 및 1% Penicilin/Streptomycin

항생제를 포함한 DMEM (Hyclone, Marlborough, 미국) 배양액에 뇌 조직을 옮겨 담고 미세관을 반복적으로 통과시켜 단일 세포 수준으로 흩어지도록 한다. 세포 현탁액은 40 μm 필터사이즈의 여과망에 걸러서 쪼개지지 않고 남은 찌꺼기는 제거한다. 걸러진 세포현탁액은 총 20 ml의 DMEM 배양액에 담아, Poly-D-lysine (PDL; #P7280; Sigma, St.Louis, 미국) 코팅 해 둔 T75 플라스크에 옮겨 담는다. 하루 뒤에 세포가 가라앉으면 전체 배양액을 교체해주고 10-14일간 그대로 배양한다. 플라스크 바닥면에서는 정상교세포가 단단히 부착되어 자라고, 그 층 위에 비부착성의 미세아교세포가 자라게 된다. 미세아교세포는 플라스크를 툭툭 쳐서 물리적으로 떼는 방법으로 키우던 배양액과 함께 분리하여, PDL 코팅 한 새로운 배양접시에 옮겨주면 바닥에 부착되어 자라나게 되어 이것을 약물 처리 및 실험에 사용하였다. 정상교세포의 경우, 미세아교세포를 떼어주고 남은 플라스크의 바닥을 PBS로 3회 충분히 세척한 후, 0.25% 트립신 용액으로 세포를 떼어내고 2회 계대 배양 한 것을 사용하였다.

나. 마우스 신경세포 초대배양

마우스 신경세포 초대배양은 배아 16일 차의 비근교계(outbred) 마우스(Hsd: ICR (CD-1); KOATECH, 평택시, 대한민국) 뇌를 이용하였다. 대뇌를 분리하여 차가운 HBSS (WelGENE, 경산시, 대한민국) 배양액 위에서 뇌막을 벗겨낸 후 papain (Worthington, Columbus, 미국) 처리와 미세관을 통해 세포를 단일 수준으로 분리시킨다. 준비된 세포 현탁액은 PDL로 미리 코팅 해 둔 배양접시에서 배양하였다. B27 (2%; #17504-044; Gibco, Waltham, 미국), Sodium pyruvate (1:100 (v/v), #11360-070; Gibco, Waltham, 미국), Glutamax (1:100 (v/v); #35050-061; Gibco, Waltham, 미국)가 첨가된 Neurobasal media-A (#10888-022; Gibco, Waltham, 미국) 배양액을 사용하였고, 3일에 한 번씩 기존 배양액을 절반 덜어내고 새로운 미디어를 추가해주었다. 16일 경과 되어 충분히 성숙된 신경세포를 추후 약물 처리 등 실험에 사용하였다.

다. 유도만능줄기세포(iPSC) 유래 미세아교세포(iMG) 배양

iPSC 유래 미세아교세포(iMG)는 기존 알려진 방법을 기반으로 약간의 변형을 가해 배양하였다 (135). 먼저 iPSC로부터 HPC를 분화시키기 위해 HPC 배양액(#05310; Stemcell technologies, Vancouver, 캐나다)에서 12일간 키운다. 둥근 모양의 비부착성 HPC는 IL-34 (100 ng/ml; #200-34; PeproTech, Cranbury, 미국), TGF- β (50 ng/ml; #100-21; PeproTech, Cranbury, 미국) 및 M-CSF (25 ng/ml; #300-25; PeproTech, Cranbury, 미국)들을 포함한 새로운 배양액에 옮겨준 다음 25 일간 분화시킨다. 25 일 이후부터는 CD200 (100 ng/ml; #BP004; Bon Opus Bio, Millburn, 미국) 및 CX3CL1 (100 ng/ml; #300-31; PeproTech, Cranbury, 미국) 인자를 추가로 첨가한 배양액으로 5-7일간 키운 다음 약물 처리 등 실험에 이용하였다.

8. 세포 시약 처리

A β ₁₋₄₂는 (Cat#4061966; Bachem, Budendorf, 스위스) 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-isopropanol (HFIP)에 1 mg/ml 농도로 녹여서 밀봉하여 72시간 동안 충분히 단량체화 시켜 녹인 후에, 분주하여 SpeedVac (SPD2010; Thermofisher, Waltham, 미국)으로 HFIP를 건조시켜서 얇은 막으로 튜브에 남아 있는 A β ₁₋₄₂ 펩타이드를 획득한다. 분주 된 A β ₁₋₄₂ 펩타이드는 -80°C에 보관하였다. 이것은 무수 DMSO (#276855, Sigma, St.Louis, 미국)에 1 mM이 되도록 녹인 원료시약을 만든 후, 적정 농도로 배양액에 희석하여 세포에 처리하였다. LPS (#L6529, Sigma, St.Louis, 미국) 원시 시약은 멸균 증류수에 1 mg/ml에 녹여 두고 실험에는 10 ng/ml 농도로 처리하였다. 25HC (#H1015, Sigma, St.Louis, 미국)는 DMSO에 1 mg/ml로 녹인 원시시약을 분주하여 최종 농도 5 μ g/ml 가 되도록 배양액에 희석하여 사용하였다. Avasimibe (Cholenterol O-AcylTransferase inhibitor; #PZ0190; Sigma, St.Louis, 미국)은 500 μ M 농도로 DMSO에 녹인 용액을 원시시약으로 두고, 최종 1 μ M 농도로 사용하였다. 각 약물

을 처리할 때에는, 약물의 원시시약에 사용된 용매와 동일한 것을, 약물 처리 부피에 상응하는 양만큼 배양액에 섞어준 것으로 대조군에 처리하였다. 실험에 사용한 정확한 농도 조건은 각 그림 밑에 기재하였다.

9. 세포 광퇴색후형광측정 (FRAP: Fluorescence Recovery After Photobleaching)

(본 실험의 설계 및 분석은 서울대학교 장성호 교수님 연구실의 이상은 박사님의 도움을 받아 수행하였다.)

PDL 코팅 한 18 mm 커버글라스에 배양한 초대배양미세아교세포 (PMG)는 약물 처리가 끝난 후 Tyrode 수용액 (136 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1.3 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 10 mM glucose, pH 7.4, ~290 mOsm)으로 2-3회 행구어 준비하였다. 세포막 전체에 존재하는 지질을 염색할 수 있는 것으로 알려진 1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3'-Tetramethylindocarbocyanine perchlorate 형광 염색용액(DiI; #V22885; Invitrogen, Waltham, 미국)을 Tyrode 수용액에 1:200 (v/v)로 희석하여 강하게 교반시켜 섞어준 다음, 13000 rpm로 5 분간 원심분리하여 그 상층액만 조심스럽게 따서 사용하였다. 행귀준 세포 배양 커버글라스는 라이브 이미징 전용 챔버(LCI, 남양주시, 대한민국)에 포셉으로 옮겨 담고, 준비한 DiI 염색약을 담아 그 즉시 콘포컬 형광 현미경(37°C, 5% CO₂; A1Rsi s/Ti-E, Nikon)으로 라이브이미징을 수행하였다. (Plan Apo VC 60x Oil DIC N2 NA / 1.4; 561nm diode laser) 라이브이미징은 광퇴색 이전에 4초 간격으로 4장의 이미지를 얻은 다음, 광퇴색을 위해 설정한 ROI에 최대 출력 레이저를 10초 조사 하였고, 광 퇴색 후 회복 관찰을 위해 2초 간격으로 3분간 91장의 이미지를 획득하였다. 원시 이미지 자료는 ImageJ (NIH, Bethesda, 미국) 소프트웨어를 이용하여 대표이미지를 얻고, 표백보정(bleaching correction) 등 필요한 처리를 한 후 시간 흐름에 따른 ROI 형광 세기 데이터를 확보하였다. 확보한 원시 데이터는 GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, 미국) 프로그램

을 이용하여 비선형 표준화 작업을 거쳐 그룹별 분석 자료로 활용하였다.

10. 유세포 분석 (Flow cytometry)을 이용한 미세아교세포 포식능 분석

형광 비드 Fluoresbrite® YG Carboxylate Microspheres(1.68×10^9 particles/ml; $3.00 \mu\text{m}$; #17147-5; Polysciences, Warrington, 미국)는 50% FBS 함유 DMEM 1 ml과 함께 37°C , 30분간 1000rpm으로 교반하며 옅소닌화 하여 준비한다. 옅소닌화 된 형광비드 혼합제는 미리 데워둔 DMEM에 1:10으로 희석하여 최종적으로 1.0×10^6 particles/ml의 5% FBS 함유 DMEM 형광 비드 용액으로 세포와 반응시킨다. PMG는 약물 처리 후 PBS로 헹구고, 준비된 최종 형광 비드 반응 용액에 담아 37°C , 5% CO_2 유지공급 배양기에서 1시간 동안 배양한다. 성체미세아교세포의 경우에는 PBS 관류 하여 적출 한 뇌 조직을 Dounce 균질화기(Wheaton Industries, Millville, 미국)로 파쇄하고, 조직 잔해 제거 용액(Debris Removal Solution, #130-109-398; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, 독일)을 이용하여 잔해물을 제거한 후 형광 비드 용액에 담아 세포배양기에서 1시간 배양하였다. 형광 비드와 반응이 끝난 세포는 0.1 M PB 용액에 옮겨 바깥에 붙어 있는 비드 잔해를 떨어뜨려준다. 350 g, 5분, 4°C 원심분리하여 상층액을 버리는 식으로 FACS 버퍼(2% FBS 및 0.05% sodium azide 포함 HBSS)로 세포들을 옮겨준다. 총 100 μl 에서 항체 염색이 될 수 있도록 FACS 전용 형광 항체(Rat monoclonal anti-CD11b, APC, Cat#17-0112-81, 1:1000, eBioscience, San Diego, 미국; PE/Cy7 anti-mouse CD45.2 Antibody, #109829, 1:500, Biolegend, San Diego, 미국)들을 각 역가에 맞춰 넣고 4°C 에서 빛을 차단하고 30분 반응 시킨다. 반응이 끝나면 350 g, 5분, 4°C 원심분리하여 상층액을 버리는 식으로 FACS 버퍼로 2회 씻어낸다. 마지막에 죽은 세포에 염색되는 염료 (SYTOX™ AADvanced™ Dead Cell Stain Kit; #S10349,

Invitrogen, Waltham, 미국)를 넣어준다. LSRFortessa X-20 (미국, Becton Dickinson, Franklin Lakes, 미국) 장비로 읽어 들인 정보는 FlowJo (Flowjo, Ashland, 미국) 소프트웨어를 이용하여 분석하였다.

11. 뇌 조직 면역조직화학 (IHC: Immunohistochemistry)

가. 뇌 조직 준비

마우스는 졸레틸 근육 주사 마취 후 차가운 PBS로 심장관류 하여 방혈하였다. 적출 한 뇌의 반구는 4% PFA 용액에 담가 4°C에서 하룻밤 두고 고정시킨다. 고정 된 뇌 조직은 30%의 수크로스 PBS 용액에 옮겨 담고, 72시간 정도 두면서 뇌 조직이 바닥으로 가라앉으면 꺼내서 -80°C에 얼려 보관하였다. 얼린 뇌 조직은 극저온포매제로 포매하여 Leica CMI1850 Cryostat (Leica Biosystems, Wetzlar, 독일)를 사용하여 관상면 방향으로 30 μ m 두께로 절편화 하였다. 뇌 절편은 4°C의 조직보존용액에 보관한다.

나. 면역조직화학 염색

조직보존용액에 보관 해 둔 뇌 절편을 건져내어, 4% PFA 용액으로 후고정 처리를 시켜준다. PBS 세척 후 70% 포르산-PBS 용액에 담가 항원노출반응 시킨 다음, 비특이적 반응 최소화 및 세포막 투과성 확보를 위한 차단 및 투과 반응 용액 (사용하고자 하는 2차 항체 공여 동물의 혈청 10%, Triton X-100/PBS 0.3%)에 반응 시킨다. 모든 과정에서는 PBS에 3회 이상 세척 과정이 포함된다. 1차 항체(Mouse monoclonal anti- β -Amyloid, biotin labeled, clone: 4G8, 1:2000, Biolegend, San Diego, 미국; Anti Iba1, 1:1000, FUGIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Richmond, 미국)를 항체 희석 용액(사용하고자 하는 2차 항체 공여 동물의 혈청 5%, Triton X-100/PBS 0.3%)에 알맞은 역가로 희석하여 뇌 조직과 함께 하룻밤 반응시킨다. 1차 항체 반응이 끝나면, 1차 항체 공여 동물에 상응 하는 2차 형광 항체(Alexa FluorTM, 1: 500;

Invitrogen, Waltham, 미국)로 항체희석용액에 준비하여 상온에서 1시간 반응시킨다. CongoRed(Sigma, St.Louis, 미국) 염색 필요시에는 2차 항체 염색을 할 때에 CongoRed 1 mM 수용액을 1:100 (v/v) 희석하여 사용하였다. 마지막으로 핵을 염색하는 DAPI (0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma, St.Louis, 미국)를 처리하였다. 조직은 LSM700 (Car Zeiss, Oberkochen, 독일) 콘포컬 형광현미경으로 촬영하고 Image J (NIH, Bethesda, 미국) 소프트웨어를 활용하여 정량 및 분석하였다.

12. 면역조직화학과 RNA 현장혼성화 (RNA-ISH: RNA *in situ* Hybridization)

RNAscope RNA-단백질 공동 검출(Advanced Cell Diagnostics, ACD, Newark, 미국)을 활용한 RNA-ISH 실험을 제조사에서 제공하는 실험 방법을 따라 수행하였다. 뇌 절편은 10 μm 두께로 동결절단하고, 슬라이드에 올려 건조 시켜 -80°C 에 보관한 것을 사용한다. 실험에 사용할 슬라이드는 4% PFA에 고정 및 건조, 수분 제거 과정을 거친 후 항원노출 용액에 담가 95°C 로 10분간 끓여 항원을 노출시키고, 1차 항체 (Anti Iba1, Cat#019-19741, 1:50, FUGIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Richmond, 미국; GFAP monoclonal antibody 2.2B10, Cat# 13-0300, 1:50, Invitrogen, Waltham, 미국)와 함께 4°C 에서 하룻밤 반응시킨다. 반응 후 1차 항체는 0.1% Tween20의 PBS(PBST) 용액으로 충분히 씻어낸 후, 4% PFA로 추가 고정한다. 이후에는 protease 처리로 RNA 결합 단백질들을 제거한 후, 마우스 *Ch25h* RNA 탐침을 반응시키고, 이후 순차적으로 시그널 증폭 탐침 및 형광 탐침을 반응시킨다. (40°C , HybEZ™ II, ACD, Newark, 미국) 마지막으로 차단제 처리 후 형광 표지 된 2차 항체 및 DAPI 염색하여 커버글라스를 덮어 준다. 형광 이미지 촬영은 LSM700(Car Zeiss, Oberkochen, 독일) 콘포컬 형광현미 장비를 이용하였으며, 정량 및 분석은 Image J(NIH, Bethesda, 미국) 소프트웨어를 활용하였다.

13. 실시간 역전사 연쇄중합효소반응 (qRT-PCR)

다양한 세포 및 뇌 조직 내 mRNA 발현 수준 확인을 위해서 RNasy Mini Kit(Qiagen, Hilden, 독일)를 이용해 검체를 용해시키고 컬럼을 걸어서 총 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 Maxime™ RT PreMix(iNtRON Biotechnology, 성남시, 대한민국)를 이용하여 cDNA로 합성하였다. 정량적 실시간 역전사 PCR 반응은 KAPA SYBR® FAST qPCR 범용 키트(KAPA Biosystems, Wilmington, 미국)를 사용하였으며, 연구에 사용 한 각 표적 mRNA에 대응하는 프라이머 정보는 다음과 같다.

mouse *Rps18* F: 5'-GGATGTGAAGGATGGGAAGT-3'

mouse *Rps18* R: 5'-CCCTCTATGGGCTCGAATTT-3'

mouse *Ch25h* F: 5'-TGCTACAACGGTTCGGAGC-3'

mouse *Ch25h* R: 5'-AGAAGCCCACGTAAGTGATGAT-3'

mouse *Acat1* F: 5'-CAGGAAGTAAGATGCCTGGAAC-3'

mouse *Acat1* R: 5'-TTCACCCCCTTGGATGACATT-3'

mouse *Acat2* F: 5'-AGACTTGGTGCAATGGACTCGAC-3'

mouse *Acat2* R: 5'-CATAGGGCCCGATCCAACAG-3'

mouse *Soat* F: 5'-GAAACCGGCTGTCAAATCTGG-3'

mouse *Soat* R: 5'-TGTGACCATTTCTGTATGTGTCC-3'

14. 웨스턴 블롯 (WB: Western blot)

RIPA(iNtRON Biotechnology, 성남시, 대한민국) 용액에 단백질 분해 효소 억제제, 포스파타제 억제제 및 페닐-메틸설포닐 플루오르화물 혼합제를 첨가한 RIPA 파쇄용액을 세포 및 조직 검체에 첨가하고 세포를 해리한다. 추가적인 물리적인 파쇄를 위해 음파분쇄를 수행하고, 해리된 혼합물은 13000 rpm, 4°C, 15분 동안 원심분리 하여 깨지지 않고 침전

된 잔해는 버리고 상층액만 따로 모아 사용하였다. 얻은 검체는 BCA 정량을 통해 농도를 측정하고, 10-15 μg 의 단백질을 실험에 사용하였다. 동일한 단백질 양의 샘플을 4-12% Bis-Tris polyacrylamide precast gel (NuPAGE; Invitrogen, Waltham, 미국)에 로딩한 다음 전기영동을 통해 단백질을 크기 별로 분리한다. 젤에 있는 단백질은 PVDF 막으로 옮겨 이후 항체 반응을 수행한다. 항체와 반응시키기 전에 5% 탈지우유 용액에 담가 상온에서 1시간 반응시켜 불특정한 결합을 방지한다. 1차 항체 (CH25H Polyclonal Antibody, #PA5-72349, Invitrogen, Waltham, 미국; Mouse monoclonal anti- β -actin, Cat#A1978, Sigma, St.Louis, 미국; Goat polyclonal anti-mouse Il-1 β , #AF-401-NA, R&D systems, Minneapolis, 미국; Human/Mouse TNF- α antibody, AF_410_NA, R&D systems, Minneapolis, 미국)는 방부제 sodium-azide가 포함 된 용액에 1:1000 (v/v)으로 희석하여 사용하였고, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 16시간 이상 반응시킨다. PVDF 막은 이후 1차 항체의 공여 동물에 대한 HRP 결합 2차 항체와 상온에서 1시간 반응시킨다. 해당 PVDF 막은 ECL 용액 (West Save Gold, AbFrontier, 서울, 대한민국)으로 시그널을 증폭하여 AmershamTM Imager600 (GE, Chicago, 미국) 기기를 이용해 현상하였다. 얻어진 밴드 이미지는 MultiGauge software(FUJIFilm, Tokyo, 일본)로 분석 및 정량하였다.

15. 동물 뇌 조직 A β 효소면역측정법 (ELISA: Enzyme-linked immunospecific assay)

적출 한 후 LN2 급속 냉각하여 -80 $^{\circ}\text{C}$ 에 보관해 둔 전전두엽 피질 및 해마 뇌 조직의 무게를 측정한다. 무게의 4배가 되는 용량의 PBS 과쇄 용액(단백질 분해효소 억제제, 포스파타제 억제제 및 페닐-메틸설포닐 플루오르화물 혼합제를 첨가한 PBS)으로 뇌 조직을 균질화하였다. 단백질 분해효소 억제제, 포스파타제 억제제 및 페닐-메틸설포닐 플루오르화물 혼합제를 첨가한 RIPA(iNtRON Biotechnology, 성남시, 대한민국) 과

쇄 용액 200 μl 에 PBS에 파쇄 된 뇌 조직 100 μl 를 섞고 13000 rpm, 4°C, 5분 원심분리 한다. 해당 검체는 이어서 음파분쇄 및 균질화 작업을 거친다. 모든 작업은 열에 의한 단백질 손상을 최소화 하기 위해서 얼음 위에서 수행한다. 얻은 뇌 조직 파쇄 용액은 농도를 측정하여, RIPA 파쇄 용액 조절을 통해 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 되도록 맞춘다. 해당 검체 100 μl 를 초원심분리기에서 100,000 g, 4°C, 1시간 분리한다. 이때 얻어지는 상층액이 RIPA 용해 단백질이며, 남아있는 pellet은 70% 포름산 수용액 400 μl 씩에 파쇄하여 초원심분리기에서 100,000 g, 4°C, 1시간 분리한다. 두 번째 초원심분리 끝에 얻어지는 포름산 용해물은 RIPA 불용성 단백질 분획이며, 이것은 1M, pH11의 Tris 완충액과 1:20 (v/v)으로 섞어서 중화시켜 이후 실험에 사용하였다. 효소면역측정은 Abeta(1-42) ELISA kit (#27711, IBL, Minneapolis, 미국) 제품을 사용 하였으며 업체에서 제공 되는 실험 방법에 따라 수행하였다.

16. 세포 내 대사체 추출 및 25HC 정량 (GC-MS)

(본 실험은 서울대 이도엽 교수님 연구실에서 진행하였다.)

가. 세포 내 대사체 추출

-80°C에 얼려서 보관한 미세아교세포 침전 펠릿을 4°C에서 녹이고, methanol, isopropanol, 물이 3:3:2 (v/v)로 혼합된 용액을 넣어 잘 섞는다. Mixer Mill MM400 (Retsch GmbH & Co., Haan, 독일)와 금속 비드를 이용하여 90 초 동안 균질화하고, 15분 동안 음파분쇄 시킨다. 균질화시킨 샘플은 13200 rpm, 4°C, 5분 조건으로 원심분리 한다. 분리된 상층액 1300 μl 를 새로운 1.5 ml 튜브에 옮긴 후 원심진공농축기 (SCANVAC, Labogene, Lillerød, 덴마크)에서 건조시켜 유도체화 반응 전까지 -80°C에 보관한다.

나. 유도체화 및 GC-MS 실험

Methoxyamine hydrochloride을 40 mg/ml 농도로 pyridine에 녹인 용액 5 μl 를 건조 된 대사체 추출물에 넣어서 200 rpm, 30°C, 90분 동안

methoxyamination 시킨다. 머무름 시간 지표를 위해 FAMEs 혼합물 (C8, C9, C10, C12, C14, C16, C18, C20, C22, C24, C26, C28, 및 C30 포함) 2 μl 를 첨가하고 난 후, MSTFA plus 1% TMCS (Thermo, Waltham, 미국)를 45 μl 첨가하여 200 rpm, 37°C, 60분 동안 trimethylsilylation 반응을 시킨다. GC-MS 실험은 Agilent 7890B (Agilent Technologies, Santa Clara, 미국) 기기에 RTX-5Sil MS 컬럼(Restek, Bellefonte, 미국)을 사용하여 수행하였다. 유도체 화 된 샘플 0.5 μl 를 splitless 모드로 주입하고, 20 spectra/초 비율로 85-500 m/z 범위에 해당하는 질량스펙트럼을 Leco Pegasus HT time-of-flight 질량 분석기를 통해 확보하였다. 전체 시스템은 ChromaTOF 소프트웨어 4.50 버전(LECO, St. Joseph, 미국)으로 조절하였으며, 확보 된 원시자료는 MS-DIAL을 이용하여 후속 분석하였다. 모든 샘플은 무작위 순서로 실험에 사용하였다.

17. 세포 내 콜레스테릴에스터 측정

가. 세포 내 지질 추출

세포 내 지질 추출은 Chloroform이 없는 추출 키트 (#K216, BioVision)를 사용하여 제조사의 매뉴얼대로 수행하였다. 미세아교세포는 1.5 ml tube에 옮겨 담아 1000 g, 5분 원심분리 하여 상층액에 떠있는 찌꺼기를 제거한 후 PBS에 다시 풀어준다. 샘플 50 μl 마다 지질 추출 버퍼를 1 ml씩 넣고, 재빨리 1-2분간 소용돌이 교반기(Vortexer)에서 강하게 혼합한다. 상온에서 오비탈셰이커 위에 두고 15-20분간 혼합물을 교반 시키며 지질이 충분히 녹아 나오게 한 후 10000 g, 5 분 동안 원심 분리하여 상층액만 새로운 1.5 ml tube에 옮겨 담는다. 얻은 혼합액은 SpeedVac 감압농축기 (SPD2010, Thermofisher, Waltham, 미국)로 용매를 건조시켜서 얇은 막으로 남아 있는 지질 추출물을 획득한다.

나. 콜레스테롤 및 콜레스테릴에스터 측정

콜레스테롤 및 콜레스테릴에스터 (Cholesteryl-ester, CE) 측정은 콜레스테롤 특이적 탐침의 발색 및 발광 반응에 기반한 상용화 된 키트

(Ab65359; Abcam, Cambridge, 영국)를 사용하여 제조 설명서를 기반으로 수행하였다. 건조된 지질추출물은 제공되는 반응 버퍼를 넣고 음과 분쇄하여 잘 녹여서 사용하였다. 콜레스테롤 기준 물질을 0, 1, 2, 3, 4, 5 $\mu\text{g}/\text{well}$ 농도가 되도록 준비하고, 준비한 샘플과 기준 물질을 96 well 마이크로플레이트에 50 μl 씩 넣어준다. 동일한 샘플에 대해 2개의 well을 준비하여 하나는 콜레스테롤 특이적 탐침, 콜레스테롤산화효소를 넣어 CE를 측정하고, 나머지 하나에는 콜레스테롤 특이적 탐침, 콜레스테롤산화효소, 그리고 콜레스테롤가수분해효소를 넣어 총 콜레스테롤을 측정할 수 있도록 한다. 기준 물질은 총 콜레스테롤 측정이 가능한 혼합액을 넣는다. 반응 혼합제를 넣고 37°C 어두운 곳에서 60분간 반응시키고, 마이크로플레이트 리더기(Tecan, Männedorf, 스위스)를 이용하여 OD 570 nm 측정값을 얻는다. 기준 물질의 농도와 발색 정도를 이용한 표준곡선으로 샘플의 농도를 계산하였다.

18. 통계 처리

데이터 분석에는 GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, 미국) 프로그램을 사용하였다. 두 개 그룹 간의 유의성 차이는 t-Test 검정, 세 개 이상의 그룹 간의 유의성 차이는 one-way ANOVA 검정을 이용하여 계산하였다. 이광자현미경으로 촬영한 미세아교세포 반응성 그래프는 해당 원시 결과값들에 대한 선형 회귀식을 산출하여 둘 간의 차이를 비교하였다. FRAP 분석 결과의 경우 원시 밝기 결과에 대해 non-linear fitting 처리하여 그룹별 평균 회귀 곡선 데이터를 획득하였다. 값들은 Mean \pm SEM 또는 Mean \pm SD로 실험에 적합하게 표기하고 각 결과 아래에 기재하였다. FRAP 실험을 제외한 *in vitro* 실험의 N은 각각의 단독 수행된 실험 세트를 의미한다. FRAP 실험의 경우 그룹당 같은 날 수행한 최소 5개 이상의 이미지에 대한 평균을 N=1로 설정하였다. *Ex vivo* 및 *In vivo* 실험의 N은 각각 사용된 동물의 마리 수를 나타낸다.

Part 2. 개선된 이광자현미경 아밀로이드 베타 플라크 탐침 개발 연구

1. IRI-1 합성

(본 실험은 고려대 화학과 김종승 교수님 연구실에서 진행하였다.)

실험에 사용한 모든 화합물 및 용매는 TCI (Tokyo, 일본), ThermoFischer (Waltham, 미국), Merck (Darmstadt, 독일), 삼전화학 (서울, 대한민국)에서 구매하여 추가적인 정제 없이 사용하였다.

가. 1단계 - 1차 화합물 합성

4-bromosalicylaldehyde (500 mg, 2.5 mmol) 와 4-(dimethylamino) phenylboronic acid (534 mg, 3.2 mmol)을 60 ml의 1,2-dimethoxyethane/ Na_2CO_2 2M의 35:25 (v/v) 용액에 녹인다. Argon 버블링 30분 후, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$ (287 mg, 0.25 mmol, 0.1 equiv.)를 첨가하고 반응 혼합액을 90°C 에서 저으면서 하룻밤 동안 반응시킨다. 반응 혼합액은 상온에서 식히고, 분별 깔때기에 옮겨 100 ml의 염수를 첨가한다. 혼합물은 EtOAc (3×100 ml)로 추출하고, 유기층은 무수 Na_2SO_4 로 건조시키며, 감압 여과 및 농축 시킨다. 이 원물질을 silica column 크로마토그래피 (EtOAc/*n*-Hexane, 1:7)을 통해 정제하여 노란색 고체의 1차 화합물을 얻는다.

나. 2단계 - IRI-1 합성

1차 화합물(398 mg, 1.7 mmol)과 malononitrile(120 mg, 1.8 mmol)이 혼합된 Ethanol (40 ml)에 piperidine을 한 방울 첨가한다. 반응 혼합물은 상온에서 2시간 동안 저어가며 반응시킨다. 용매를 감압 증류 시키고 남은 물질을 ethanol을 통해 재결정화 시켜 오렌지 색깔 고체인 IRI-1을 얻는다.

2. 분광학 측정

(본 실험은 고려대 화학과 김종승 교수님 연구실에서 진행하였다.)

UV/Vis 스펙트럼은 Jasco V-750 분광광도계 (Jasco, Oklahoma City,

미국), 형광 스펙트럼은 Shimadzu RF-5301PC 분광광도계 (Shimadzu, Kyoto, 일본)를 사용하였다.

가. A β ₁₋₄₂ 및 간섭 물질 있을 때의 IRI-1 방출 파장 측정

IRI-1 원액을 DMF에 녹여 준비하고, 간섭물질은 PBS에 준비한 후 최종 DMF 농도가 2% 되도록 맞춘다. 모든 방출 파장 스펙트럼은 37°C에서 2 분간 잘 저어준 다음 측정하였다. 사용한 슬릿의 폭은 3/5이며, 사용한 간섭물질 목록은 다음과 같다. A β ₁₋₄₂ fibrils (20 μ M) metal ions (20 μ M; Al³⁺, Fe³⁺, Fe²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Ni²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺), amino acids (20 μ M; Lys, Arg, Asp, Glu, His, Trp, Tyr, Phe), 및 thiols (20 μ M; DTT, Hcy, GSH, Cys)

나. 용매 점성 변화에 따른 IRI-1 방출 파장 측정

IRI-1 (10 μ M)의 방출스펙트럼은 methanol, ethylene glycol, ethylene glycol & glycerol (1:1, v/v) 혼합용액, 및 glycerol에서 37°C에서 측정하였다. IRI-1 원액은 DMF에 녹여 준비하였고, 모든 용액에도 최종적으로 2% DMF가 포함되게 하였다.

3. 인공혈뇌장벽 투과성 측정 (PAMPA: Parallel-Artificial Membrane Permeability Assay)

(본 실험은 고려대 화학과 김종승 교수님 연구실에서 진행하였다.)

BBB-PAMPA (pION, Massachusetts, 미국)은 제조사의 설명서를 따라 진행하였다. 간략하게는, IRI-1 및 ThT는 각각 12.5 μ M 되도록 공여 버퍼(pH 7.4)에 희석하고 200 μ l씩 96 well PAMPA 샌드위치 플레이트에 분주한다. 양성대조군인 progesterone 및 theophylline은 50 μ M로 담는다. 투과성 막의 공여 방향에 BBB-지질 용액을 코팅하고, 200 μ l의 수여 버퍼를 PAMPA 플레이트의 위쪽 챔버에 넣는다. 25°C에서 4시간 반응 시킨 이후에, 모든 샘플은 새로운 U.V 플레이트에 옮겨 담고 250 nm 에서 498 nm의 파장대를 다중 모드 마이크로플레이트 리더기(Tecan

Infinite M200 Pro, Tecan, Männedorf, 스위스)로 읽어 들인 이후에 pION PAMPA Explorer 소프트웨어 (Ver. 3.8; pION, Massachusetts, 미국)를 통해 투과성 정도 (Pe , 10^{-6} cm/s) 분석하였다.

4. $A\beta_{1-42}$ 응집체 준비

(본 실험은 고려대 화학과 김종승 교수님 연구실에서 진행하였다.)

$A\beta_{1-42}$ 단백질은 기존 보고된 문헌의 방법대로 준비하였다. 간략하게 정리하면, 감압동결건조된 $A\beta_{1-42}$ 펩타이드는 100% HFIP에 2 mg/ml 농도로 녹여서 상온에서 2 시간 두었다가, 가벼운 argon 흐름으로 용액을 제거한다. 펩타이드는 감압동결건조 장치로 40 시간 동안 건조시킨다. 1 mg의 $A\beta$ 는 NaOH (0.5 ml, 2 μ M)에 녹인 다음 0°C, 10 분 간 음과분쇄시킨다. HFIP/NaOH 처리된 $A\beta$ 는 PBS에 200 μ M (0.6 ml, 20 mM, pH = 7.4)로 희석하고, 교반기(Biofree)에서 30 분 동안 뒤섞어 준다. 해당 원액은 PBS에 20 μ M (9.9 ml, 20 mM, pH = 7.4)로 실험 전 희석하여 사용하였다.

5. Cryo-EM 구조 기반 IRI-1의 $A\beta$ 결합능 *in silico* 분석

(본 실험은 고려대 화학과 김종승 교수님 연구실에서 진행하였다.)

이론상 바닥 상태인 B3LYP-최적화 구조의 IRI-1이 *in silico* 결합 분석의 리간드 구조로 사용되었다. Cryo-EM 구조 (PDB ID: 5OQV)는 AutoDock Vina를 이용하여 Glu²² 또는 Val¹⁸과 마주보고 있는 Phe²⁰의 형태나, 전체의 섬유전구체가 탐색 부위 ($38 \times 50 \times 32$ Å)를 에워싸게 되는 경우는 제외하고, 1000의 완전성을 기준으로 준비하였다. 동정된 결합 위치는 다시 터널이나 ($14 \times 14 \times 26$ Å), Phe²⁰ 근접한 결합 위치 ($14 \times 20 \times 26$ Å) 등 좀 더 좁혀진 탐색 부위에 대해 다시 계산하도록 하였다. 결합 계산을 위한 인풋 데이터는 AutoDockTools 4.2 (CCSB, La Jolla, 미국)를 이용하여 준비하였고, 최종 모식도는 Python Molecule Viewer 1.5.6 소프트웨어 패키지 (Phython, Wilmington, 미국)

를 이용하여 그렸다.

6. 실험에 이용 된 동물 모델

본 연구에서 사용한 5XFAD (Tg6799; Jax stock #006554; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, 미국) 알츠하이머병 모델 쥐는, 유전성 알츠하이머병에서 보고 된 돌연변이들 중 APP에 대한 스웨덴변이 (K670N, M671L), 플로리다변이(I716V) 및 런던변이(V717I)와 더불어 PS1에 대한 M146L 및 L286V 변이를 보유한 아밀로이드 과발현 형질전환 마우스이다. 도입 된 변이 유전자들은 신경세포 특이적인 *Thy1* promoter에 의해 조절되며, 빠른 아밀로이드 병변을 나타낸다. 모든 동물 관리 및 실험 절차는 서울대학교 및 경희대 실험동물 자원관리원 (IACUC)의 규정에 따라 수행되었다. 실험에는 마우스 성별에 관계없이 아밀로이드 베타 플라크 병변이 충분히 축적 된 10-12 개월 령 개체를 사용하였다.

7. *Ex vivo* 동물 실험 및 시약처리

11 개월령 5XFAD_TG 마우스에서 적출 한 뇌 조직은 드라이아이스로 급속 냉동시킨 후 수술용 칼(No.10; Feather safety razor Co.,LTD, Gifu, 일본)로 수평절편으로 잘라낸다. 뇌 절편은 IBC-2 또는 IRI-1 (각 20 μ M)이 희석 된 DMEM 용액에 담가서 30분~2시간, 37°C로 유지하며 염색한다. 염색이 끝나면 PBS로 3회 씻어내고, 4% PFA용액으로 고정하여 이광자현미경 이미징 수행 전까지 보관하였다.

8. *In vivo* 동물 실험 시약처리

IRI-1는 DMSO에 16 mg/ml로 원액을 만든 후, PBS 및 propylene glycol (Sigma Aldrich) 1:1 혼합용액에 5 mg/kg 용량 되도록 희석 시켜 복강 주입하였다. 실시간으로 BBB를 통과하는 것을 관찰하려고 할 때에는 마취, 보정 및 두개골 수술이 모두 끝나고 이미징 하기 최대한 직전에 투

여하였으며, 그 외에는 수술 하루 전 미리 투여하였다. MeO-X04는 DMSO에 50 mg/ml로 원액을 만든 후, 마찬가지로 PBS 및 propylene glycol 1:1 혼합용액에 5 mg/kg 용량 되도록 희석 시켜 수술 및 이미징 하루 전에 복강 주입하였다.

9. *In vivo* 동물 수술 및 이광자 현미경 이미징

가. 두개골 수술

마우스 두개골 수술은 기존 알려진 방법을 최적화 하여 수행하였다 (133). 마우스를 Tiletamine - Zolazepam (Virbac, Carros, 프랑스) and Xylazine (Bayer Korea, 서울, 대한민국) 혼합제를 근육주사 (1.2 mg/kg) 하여 마취시키고 주문 제작 된 보정용 온열기 (37°C; 대한민국, LCI)에 올려 머리를 단단히 고정시킨다. 꼬리 및 발바닥 핀칭을 통해 쥐가 완전히 마취 된 것을 확인한 후에, 두피 부분에 포비돈 (Firson, 천안, 대한민국)을 충분히 도포하여 수술 부위를 소독한다. 수술용 가위로 두피를 잘라 제거하고 epinephrine (제일제약, 대구, 대한민국)을 한 방울 떨어뜨려 국소 통증 및 출혈을 방지하면서, 수술용 칼날로 골막을 벗겨내고 말려준다. 해부현미경으로 수술 부위를 보면서, bregma 기준 -2.5 mm, sagittal 두개봉합선(suture) 기준 우측 2.5 mm 에 위치한 뼈 영역(체성감각신경 피질 영역)에 치과용 미세 드릴로 3 mm 직경의 원 모양으로 창을 내준다. 드릴 사용 시 중간 중간 차가운 식염수로 열 및 출혈을 최소화해준다. 5 mm 직경의 커버슬립을 두개골 뼈 제거 부위에 Loctite 454 (Henkel-Loctite, Düsseldorf, 독일) 순간접착제로 단단히 고정한다. 물-액침용 렌즈로 촬영시에 물이 마르지 않을 수 있도록, 수술 부위보다 바깥쪽으로 넓게 치과용 시멘트 (BJM LAB, Yehuda, 이스라엘)를 둘러서 테두리를 만들어 말려서 준비한다. 당일 이미징 종료 후에 수술 한 쥐는 규정에 따라 마취 후 경추 탈골 시켜 안락사하였다.

나. 이광자 현미경 이미징

(*Ex vivo* 조직 이미징 수행 시에는 경희대 김도경 교수님 연구실의 시스템(Leica, Nussloch, Germany)을 이용하였다.)

In vivo 이광자 현미경 이미징은 LSM 7 MP (Carl Zeiss, Oberkochen, 독일) 현미경과 Chameleon-Ultra II (Coherent, Santa Clara, 미국) 레이저 시스템을 이용하였다. 과도한 광표백을 방지하고자 레이저 출력은 파장대 별로 30 mW으로 맞추어 사용하였다. 20X 물-액 침용 대물렌즈 (W Plan-Apochromat 20x/1.0 DIC M27 70 mm; Carl Zeiss, Oberkochen, 독일)를 사용하였으며, 형광시그널은 적색 채널 (555-610 nm) 또는 청색 채널 (485-490 nm)의 NDD 필터를 통해 얻어진 것이다. Z-stack 으로 확보한 이미지의 추가적인 3차원 재구성 등의 추가 작업은 Volocity 소프트웨어 (Perkin-Elmer, Waltham, 미국)를 이용하여 수행하였다.

결과

Part 1. 질병연관 미세아교세포의 기능변화가 알츠하이머병의 병인기전에 미치는 영향 연구

1. A β 에 의한 미세아교세포 *Ch25h* 발현 및 25HC 생성 증가

DAM 특성으로 보고된 DEG (37) 중에서 미세아교세포의 면역 반응 및 지질 대사 변화와 긴밀한 연관이 있을 것으로 보이는 콜레스테롤 산화효소의 한 종류인 *Ch25h* 발현 수준을 확인하였다. 먼저 5XFAD_WT과 5XFAD_TG 뇌 조직에서 *Ch25h*의 mRNA 수준을 비교한 결과, WT 대비 TG 군의 발현이 유의하게 증가해 있는 것으로 나타났다 (그림 6a). TG 군에서 나타난 *Ch25h* mRNA 발현 증가는 마우스의 뇌에서 미세아교세포만을 MACS로 분리하여 검증하였을 때에도 동일하게 확인되었다 (그림 6b). *In vitro* 수준에서 초대배양미세아교세포 (PMG, primary microglia)에 A β 를 직접 처리해 준 결과, 대조군에 대비하여 *Ch25h* 발현이 매우 증가하였다 (그림 6c). iPSC derived microglia (iMG)에서도 A β 처리 군에서 대조군 대비 CH25H 단백질 수준의 발현이 유의하게 증가해있음을 확인하였다 (그림 6d, e). 더 나아가 CH25H 효소가 생성하는 대사체인 25HC의 농도가 변화하는지 확인하고자 하였다. 이를 위해 PMG에서 지질체를 추출하여 25HC 함유량을 측정하였고, 그 결과 A β 처리군에서 대조군에 비하여 유의하게 증가해 있는 것을 확인하였다 (그림 6f).

*Ch25h*가 미세아교세포 특이적으로 발현하는 유전자는 아니기 때문에, 이들의 발현 변화가 뇌 내의 다른 세포들에서도 나타나는지 현상인지 확인하고자 하였다. 이를 위해 마우스 신경세포 및 성상교세포의 초대배양하였다. 각 세포 유형마다 대조시약, A β 및 강한 면역원으로 알려진 LPS를 처리한 후 *Ch25h* mRNA 발현 수준을 대조군과 비교하였다. 그 결과 신경세포에서는 약물 처리에 따른 *Ch25h* mRNA 발현의 차이가 나타나지 않았다. 성상교세포에서는 강한 LPS 자극에 의해서는 3배가량의

유의한 발현 증폭이 관찰되었으나 A β 처리에 의해서는 차이가 나타나지 않았다 (그림 7a-c). 미세아교세포에서는 A β 처리에 의해 15배가량의 큰 폭의 유의한 발현 증폭이 나타났고, 더 강한 면역원으로 작용하는 LPS에 의해서는 30배가량의 유의한 증폭이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 추가적으로, 5XFAD의 뇌 조직에 발현된 *Ch25h*의 양과 위치적 정보를 시각화하고자 하였다. 마우스 조직 염색 가용한 CH25H 단백질에 대한 항체가 부재하여 RNA-*in situ* 방법을 이용하였다. *Ch25h* 형광 신호들은 미세아교세포 특이적 단백질인 IBA1 항체와 동일한 위치에서 관찰되고, 성상교세포 특이적 단백질인 GFAP과는 겹치는 신호가 거의 관찰되지 않았다 (그림 7d, e). 이 결과들을 통해 A β 에 의해 여러 뇌내 세포 유형 중에서 미세아교세포 특이적으로 *Ch25h* 발현 및 25HC 생성이 증가함을 알 수 있었다.

2. 25HC에 노출된 미세아교세포의 움직임, 포식능 및 염증성 사이토카인 분비 변화

A β 에 의해 증가된 *Ch25h*가 미세아교세포의 기능에는 어떠한 영향을 끼칠 수 있을지 알아보하고자, 그 산물인 25HC를 처리한 후 미세아교세포의 대표적인 탐색기능, 포식능 및 사이토카인 분비 등에 변화가 있는지 확인하였다. 먼저 미세아교세포의 뇌 내 탐색기능은 미세아교세포 특이적으로 초록 형광을 표지하는 마우스 모델 CX3CR1^{GFP/+}_WT에 대조시약 또는 25HC를 투여한 후, 살아있는 쥐 뇌 내의 미세아교세포를 이광자현미경으로 실시간 촬영하여 측정하였다. 25HC를 비롯한 옥시스테롤 대부분은 막 투과성 및 BBB 투과성이 좋을 것으로 알려져 있는 바 (93), (59), (136), 직접적인 뇌 주입으로 인한 뇌 손상 및 미세아교세포의 활성화를 방지하고자 복강 주사를 통해 약물을 주입하는 방식을 채택하였다. 강한 레이저로 국소 뇌 손상을 자극한 다음 미세아교세포의 반응을 관찰한 결과, 25HC를 투여한 군의 *in vivo* 미세아교세포는 대조군에 비하여 손상 부위로 몰려드는 반응 정도가 유의하게 낮은 것이 확인되었

다 (그림 8a, b). CX3CR1^{GFP/+}_5XFAD에서 이러한 움직임 반응이 저하되어 있다고 기존 알려져 있는 바 (134), A β 에 의한 미세아교세포의 *Ch25h* 증가 및 25HC 생성 증가가, A β 에 의한 미세아교세포의 반응성 저하 이전에 직접적인 관련이 있을 것으로 나타났다.

또 다른 대표적 특징인 미세아교세포의 포식능에 대한 비교를 위해 옅소닌화 된 형광 비드를 처리한 후 세포 내에 함유 된 정도를 FACS 기법으로 비교하였다. 먼저 *ex vivo* 수준에서 5XFAD_WT 마우스에 대조시약 또는 25HC를 투여 한 후 적출한 미세아교세포에 대한 실험을 수행하였다. 그 결과 대조군에 비하여 25HC 처리 군에서 형광 비드를 포식한 세포의 비율이 현저히 감소해 있는 것으로 나타났다 (그림 8c). *In vitro* PMG에 25HC를 직접 처리한 모델에서도 대조군 처리 조건에 비해서 포식능이 감소하는 것으로 나타났다 (그림 8d). 이러한 미세아교세포의 포식능 저하 현상은 5XFAD_WT 마우스와 비교하여 5XFAD_TG 마우스에서도 나타나는 현상이며, 나이 들고 AD 병리가 악화 됨에 따라 심화되는 현상인 것을 확인할 수 있었다 (그림 8e). 이를 고려할 때에 A β 에 반응한 미세아교세포가 생성하는 25HC가 세포의 포식능을 직접적으로 둔화시킬 수 있는 것으로 보인다.

마지막으로는 25HC에 의한 대표적인 염증 반응을 *in vitro* PMG의 세포 내, 외의 환경에서 확인하였다. 그 결과 기존 알려진 문헌들과 유사하게 25HC 처리에 의해 세포 배양액 내의 TNF- α 단백질 및 세포 내의 IL-1 β 등 대표적인 염증성 사이토카인의 생성 및 분비가 유의하게 증가하는 것을 알 수 있었다 (그림 8f, g) (111). 종합하면 A β 에 반응한 미세아교세포의 *Ch25h* 증가 및 25HC 생성 증가는 미세아교세포의 반응성 및 포식능을 저해 시키고 염증성 반응은 증진시켜 AD 뇌 내 병인단백질 축적 및 손상에 영향을 미칠 수 있음을 확인하였다.

3. A β 및 25HC에 의한 미세아교세포의 콜레스테롤에스터 증가와 막 유동성 변화

그렇다면 25HC가 어떤 기전을 통하여 미세아교세포의 움직임 및 포식능을 저해시키는 것인지 알아보려고 하였다. 25HC는 옥시스테롤 중에서도 뇌 내에 미량 존재하는 대사체이기 때문에 (95), 전체적인 뇌 내의 콜레스테롤의 수송이나 양 조절에 대한 것 보다는 좀 더 세포에 국소적이고 직접적으로 미칠 수 있는 영향 요인을 찾는 것에 초점을 두었다. 말초면역계의 대식세포에서 밝힌 보고들에 따르면 25HC는 여러 감염원에 노출 되었을 때 증가 되어 여러 면역 반응을 매개할 수 있는 면역-조절 콜레스테롤 유도체로 알려져 있다 (92). 이렇게 증가한 25HC는 직접적인 염증성 사이토카인의 분비를 조절할 뿐 아니라, 세포막에 있는 콜레스테롤의 질적 변화를 일으켜서 감염원의 추가적인 진입 및 전파를 억제할 수 있다는 보고가 있다 (103). 25HC가 콜레스테롤에스테르화효소 증가를 야기하여 콜레스테릴에스테르(Cholesteryl-ester, CE)의 생성을 증폭시킬 수 있고 (96), 이렇게 생성된 CE는 세포막에 유동성 있는 콜레스테롤 비율을 감소시킬 수 있다는 것이 알려진 기전이다 (104), (105). 이에 착안하여, 25HC에 의한 세포막 구성 요소의 변화가 미세아교세포의 움직임이나 A β 에 대한 반응성 및 포식능 저하에 영향을 미치게 되는 것은 아닐지 검증하고자 하였다. 이를 위해 우선 A β 및 25HC에 의한 미세아교세포의 콜레스테롤에스테르화효소 발현 변화에 대해 조사하였다. 5XFAD_WT 및 TG 마우스에서 얻은 성체미세아교세포에서는 콜레스테롤에스테르화효소 종류인 *Acat1*, *Acat2* 및 *Soat1* mRNA 수준 모두 TG에서 유의하게 증가해 있는 것으로 나타났다 (그림 9a-c). *In vitro* PMG에서는 *Acat2* 및 *Soat1*는 25HC 처리에 의해 유의하게 증가하였고, *Acat1*의 경우는 큰 차이가 확인되지 않았다. 다만 PMG에 A β 를 직접 처리한 경우에는 *Acat1*의 경우 유의하게 감소하고, *Acat2*는 유의하게 증가하며, *Soat1*의 경우 큰 차이가 없는 것으로 나타나 그 조절 양상이 좀 더 복잡한 것으로 확인되었다 (그림 9d-f).

효소의 mRNA 발현 수준은 대사 산물에 의해 유동적으로 변화할 수 있다는 점을 고려하여 실질적인 CE의 변화를 검증하고자 하였다. 특히 A

β 처리에 의해 콜레스테롤에스터화효소의 발현 양상이 일관적이지 않았던 *in vitro* PMG를 활용하였다. 정량 결과 $A\beta$ 및 25HC를 처리해 준 PMG에서 대조군 대비 CE가 유의하게 증가해있음을 확인하였다 (그림 10a). CE의 증가는 전체 콜레스테롤의 증가와 동반하여 나타났다 (그림 10b,c). 이 결과를 통하여 $A\beta$ 및 25HC에 의해 세포막의 콜레스테롤 구성에 질적 변화가 일어나며 특히 유동성을 감소시키는 방향의 CE가 증대 되는 것을 확인하였다.

증가 된 CE가 세포막에는 직접적으로 영향을 미치고 있는지 알아보기 위해서, FRAP 실험을 통해 세포의 막 유동성을 측정하였다. 약물 처리가 끝난 PMG의 세포막을 DiI 염료로 형광 표지 하여 사용하였다. 세포에 균일하게 염색 된 부분에 국소 ROI를 지정하여 그 부분만 강한 레이저를 조사하여 광표백을 일으킨 후 해당 ROI에 형광 세기의 회복을 정량 하였다. 대조군 대비 $A\beta$ 및 25HC 처리군에서 세포막의 형광 신호가 회복되는 유동 분획이 유의하게 감소하는 것이 관찰되었다 (그림 11a-c). 그러나 포화지점에 도달하는데 걸리는 시간에 대한 지표인 τ 정량 결과에서는 그룹간에 큰 차이가 없는 것으로 나타났다 (그림 11d). 해당 결과들을 종합하면 $A\beta$ 및 25HC에 의해 미세아교세포 내의 CE 생성이 증가 되고, 이러한 세포 구성 지질의 질적 변화는 세포막 유동성 감소로 이어지는 것으로 보인다.

4. 콜레스테롤에스터화 억제제에 의한 미세아교세포의 움직임 및 포식능의 회복

관찰 한 일련의 움직임 반응성 저하 및 포식능 저하와 CE 생성 증가로 인한 세포막 유동성 변화 사이에 실제 연관이 있는지 확인하기 위해서, CE 생성을 저해하는 전략으로 추가 검증하였다. CE 생성 저해를 위해서는 Avasimibe으로 불리는 콜레스테롤에스터화억제제 약물을 처리하였다. 먼저 Avasimibe이 처리의 효과 확인을 위해 발색 기반의 콜레스테롤 정량 실험을 수행하여 25HC에 의해 증가 된 CE의 비율이

Avasimibe 처리에 의해 다시 감소되는 것을 확인하였다 (그림 12a). 이렇게 Avasimibe 처리에 의해 CE가 줄어든 그룹에서는 저해된 세포막 유동성 또한 다시 회복되는 것을 FRAP 실험을 통해 검증하였다 (그림 12b-e).

Avasimibe은 BBB를 잘 통과할 것으로 예상되는 구조를 가진 화합물이기 때문에 (137), 기존 제시된 효과적인 투약 방법대로 경구 투여를 통해 마우스에 전달하였다 (그림 13a) (138). 25HC 단독 투여 군과, 25HC와 Avasimibe을 함께 투여한 군의 *in vivo* 미세아교세포 움직임을 비교 관찰한 결과, 25HC 투여로 감소한 미세아교세포의 움직임이 Avasimibe을 함께 투약해주었을 때에 다시 회복되는 것으로 나타났다 (그림 13b-c). 동일 동물 모델을 이용한 *ex vivo* 미세아교세포의 형광 비드 포식능 또한 Avasimibe을 함께 투약해주었을 때에 다시 회복되는 것으로 나타났다 (그림 13d). 세포막 유동성 변화를 확인했던 *in vitro* PMG 모델에서도 포식능 변화를 확인한 결과, 25HC에 의해 저하된 것으로 나타났던 포식능이 Avasimibe 처리에 의해 회복되는 것을 확인하였다 (그림 13e). 이를 통해 CE에 의한 세포막의 질적 변화가 실질적인 미세아교세포의 움직임 및 포식능과 연관되어 있으며, A β 로 인한 미세아교세포의 25HC와 CE 과도한 생성에 의해 기능적 결함이 매개되고 있음을 말할 수 있겠다.

5. 25HC에 의해 AD 모델 마우스 병변 악화 가속화되며 콜레스테롤에스터화 억제제는 이를 방지함

25HC에 의해 움직임 및 포식 기능에 기능적 결함이 생긴 미세아교세포가 궁극적으로 AD의 병인 기전을 악화시키게 되는 것은 아닐까 확인해보고자 하였다. 이를 위해 아밀로이드 베타 플라크 병변이 나타나는 비교적 초기 단계인 3.5 개월령의 5XFAD_TG 마우스에 대조시약, 25HC, 및 25HC와 Avasimibe를 4주간, 이틀에 한 번씩 투약하고 미세아교세포 기능 및 병리학적 변화를 관찰하였다 (그림 14a; 15a; 16a). 약

물 투여가 끝난 후 인지 행동 능력에 대한 평가를 우선 수행하였다. NOR의 물체 분별 지표 (Discrimination index) 및 Y-MAZE 실험의 교차 출입 빈도 (alternation) 수치를 통해 평가한 마우스의 인지, 기억 능력은 대조군에 비하여 25HC 처리 군에서 악화되어 있는 것으로 나타났다. 25HC에 Avasimibe를 함께 투약해 준 군에서는 25HC 단독 처리 군에 비하여 인지 기능이 유의하게 회복되는 양상을 보였다 (그림 14c-d). 4 주간의 장기 투약은 기본적인 운동, 보행 능력에 결함을 일으키지 않음을 Y-미로 실험의 총 출입 횟수 및 Open field 실험의 총 움직임 거리를 통해 확인 할 수 있었다. 오히려 대조군 대비 25HC 처리 군에서는 그 움직임이 증가해 있는 경향을 확인할 수 있었다 (그림 14e-g). 증가된 움직임은 치매 모델 쥐에서 나타나는 일종의 불안 및 이상행동 요소로 해석 할 수 있는 바, 행동 실험 결과들을 종합하면 25HC 처리 군에서 인지 행동적 AD 표현형 발현이 가속화 되며 Avasimibe에 의해 회복된다는 것을 알 수 있었다. 4 주간의 장기 투약이 마우스에 특별한 대사 이상 및 부작용에 의한 피해를 일으키지 않았다는 것을 그룹 간 체중 변화에 큰 차이가 없다는 것을 통해 확인 하였다 (그림 14h). 행동 실험이 종료 된 다음, 각 군별 성체미세아교세포의 포식능을 비교한 결과 WT 마우스에 짧은 기간 약효를 확인했던 양상과 동일하게 25HC 처리군에서 유의한 포식능 감소 및 Avasimibe에 의한 회복이 관찰되었다 (그림 14b).

약물 투여 후 5XFAD 마우스 뇌 조직의 아밀로이드 병변의 변화를 확인하기 위해 전전두엽대뇌피질 및 해마에 존재하는 RIPA 용해성 및 비용해성 $A\beta_{1-42}$ 를 ELISA로 측정하였다. 그 결과 25HC 처리군에서 RIPA 비용해성 $A\beta_{1-42}$ 가 대조군에 비해 확연하게 늘어나있었고, Avasimibe를 함께 처리해 준 군에서는 대조군 수준으로 회복 되는 경향을 확인 할 수 있었다 (그림 15b,c; 그림 16b,c). 더 나아가 면역조직화학법을 통해 뇌 조직 피질 및 해마 영역의 $A\beta$ 및 미세아교세포의 분포를 시각화하여 관찰하였다 (그림 15d; 그림 16d). 그 결과 4G8 항체로 표지 된 모든 $A\beta$

와 CongoRed로 염색 된 응집 된 플라크 영역 모두 25HC 처리 군에서 대조군 대비 유의하게 증가해 있는 것으로 나타났다 (그림 15e,f; 그림 16e,f). Avasimibe 처리 군에서 IBA1으로 염색 된 미세아교세포가 차지하는 영역은 25HC 처리 군에 비해서 감소하는 것으로 확인 되었다 (그림 15g, 그림 16g). 이 현상은 아밀로이드 병변이 감소됨과 동반하여 미세아교증 (microgliosis)이 감소되어 관찰 되는 결과로 보인다.

25HC 및 Avasimibe 처리가 뇌내 다른 세포들에게도 영향을 끼칠 수 있을지 전두엽 대뇌피질 및 해마 영역에 대한 면역화학기법을 통하여 추가적으로 검증하였다. 정상교세포 특이적 GFAP 염색을 통해 확인한 바, 25HC에 의한 astrogliosis의 변화는 관찰 되지 않았고, Avasimibe 처리 군에서 아밀로이드 병변 감소와 동반한 신경아교증의 감소 경향이 관찰 되었다 (그림 17. a,b,d,e). 신경세포 특이적인 NeuN 염색을 통해 장기간의 약물 처리가 신경세포의 사멸 및 밀도에는 큰 영향을 주지 않음을 검증하였다 (그림 17. a,c,d,f). 사용 된 5XFAD 모델 쥐의 경우 인지 행동 기능 저하 표현형은 4-5개월 령부터 나타나고, 신경세포의 소실은 6개월 령부터 나타나는 것으로 알려져 있다 (139). 해당 결과를 통해 4주간의 25HC 투여가 인지 행동 저하를 앞당기지만, 신경세포의 사멸이 발생 되는 단계까지 병리 단계를 악화시키는 것은 아님을 확인하였다. 25HC 및 Avasimibe의 5XFAD 적용 시험 결과를 통해, 25HC는 직접적으로 아밀로이드 병변 악화 및 AD 유사 인지행동 저하를 유발 할 수 있으며 이러한 가속화는 Avasimibe을 통해 회복 될 수 있다는 것을 알 수 있다. 아밀로이드 축적이 이미 많이 진행 되어 미세아교세포의 기능 저하가 관찰 되는 5XFAD의 TG에 Avasimibe을 적용하였을 때에도 미세아교세포의 기능 개선에 직접적인 효과가 있는지 *in vivo* 이광자 현미경 imaging을 통해 확인하였다. 그 결과 기존 관찰 되던 대로 WT 대비하여 TG 군에서 낮은 반응성이 나타났으며, Avasimibe을 처리 한 TG 군의 미세아교세포의 반응성이 대조시약 처리 군에 비하여 소폭이나마 유의하게 개선 되는 것을 확인 할 수 있었다 (그림 18).

요약하면, AD 모델에서 나타나는 DAM 특징 중 하나인 *Ch25h* 증가는 그 대사 산물 25HC의 생성 증가를 야기하고 25HC는 CE의 증가를 유발하는 것으로 나타났다. 이러한 세포 내 국지적 CE의 증가는 직접적인 세포막 유동성, 미세아교세포의 반응성 및 포식능의 감소를 일으키게 된다. 과도한 25HC로 인한 미세아교세포의 기능저하는 5XFAD 모델의 병리현상을 가속화 시킬 수 있는 것으로 나타났다. CE 생성을 억제하는 Avasimibe 약물 처리를 통해 미세아교세포의 기능저하가 회복 될 수 있으며, 이는 5XFAD에서 병리현상 가속화를 억제하는데 효과적으로 작용하였다. 이를 통해 미세아교세포의 기능 저해가 AD 병인 기전을 가속화 시킬 수 있고, 관련 된 기전의 조절을 통해 회복 시키는 효과가 있음을 제시하는 바이다 (그림 19).

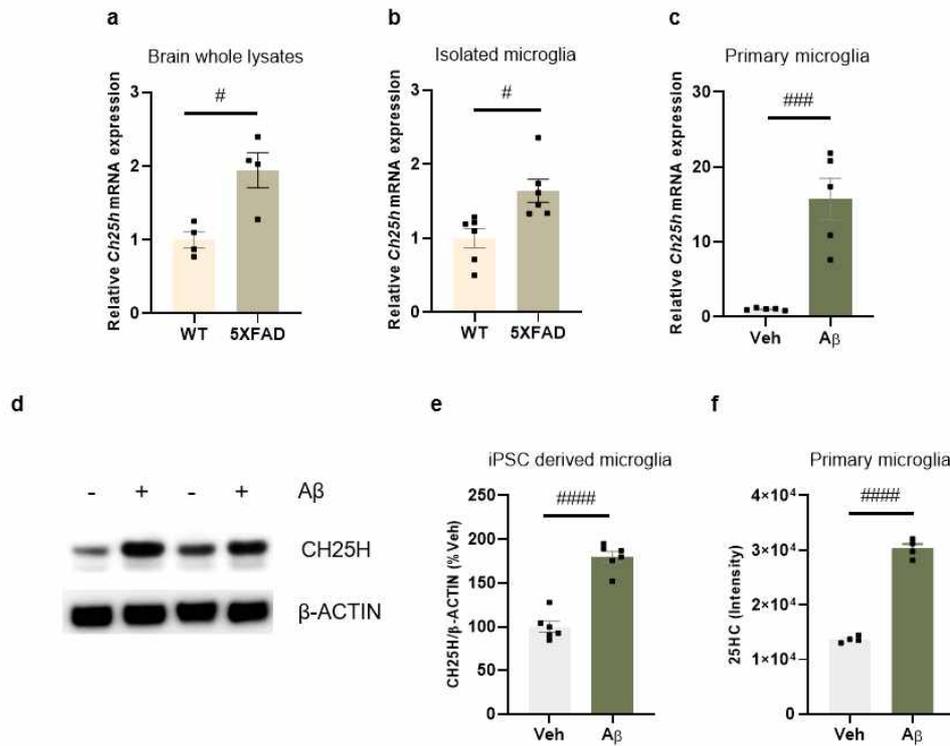


그림 6. Aβ에 의한 미세아교세포 *Ch25h* 발현 및 25HC 생성 증가

(A) 뇌 조직 파쇄액에서 *Ch25h* 효소 mRNA 발현 수준을 RT-PCR로 측정 (5XFAD, female, 3개월; N=3-4; Mean ± SEM; unpaired *t*-test; #*p*<0.05, ##*p*<0.01)

(B) 마우스 뇌 조직에서 분리한 미세아교세포에서 *Ch25h* 효소 mRNA 발현 수준을 RT-PCR로 측정 (5XFAD, female, 7개월; N=6; Mean ± SEM; unpaired *t*-test; #*p*<0.05).

(C) 초대배양미세아교세포에 대조시약 또는 Aβ(4 μM) 24 시간 처리 후 *Ch25h* 효소 mRNA 발현 수준을 RT-PCR로 측정 (N=5; Mean ± SEM; unpaired *t*-test; ###*p*<0.005).

(D,E) iMG에 대조시약 또는 Aβ(2 μM) 24 시간 처리 후 CH25H

효소 단백질 발현 수준을 WB로 측정 (N=6; Mean \pm SEM; unpaired *t*-test; #####*p*<0.001).

(F) 초대배양미세아교세포에 대조시약 또는 A β (4 μ M) 24 시간 처리 후 세포파쇄액에 존재하는 25HC 농도를 GC-MS 측정 및 비교 (N=4; Mean \pm SEM; unpaired *t*-test; #####*p*<0.001).

PMG 대사체 추출 및 GC-MS 분석은 서울대 이도엽 교수님 연구실 송현호 선생님이 수행하였다.

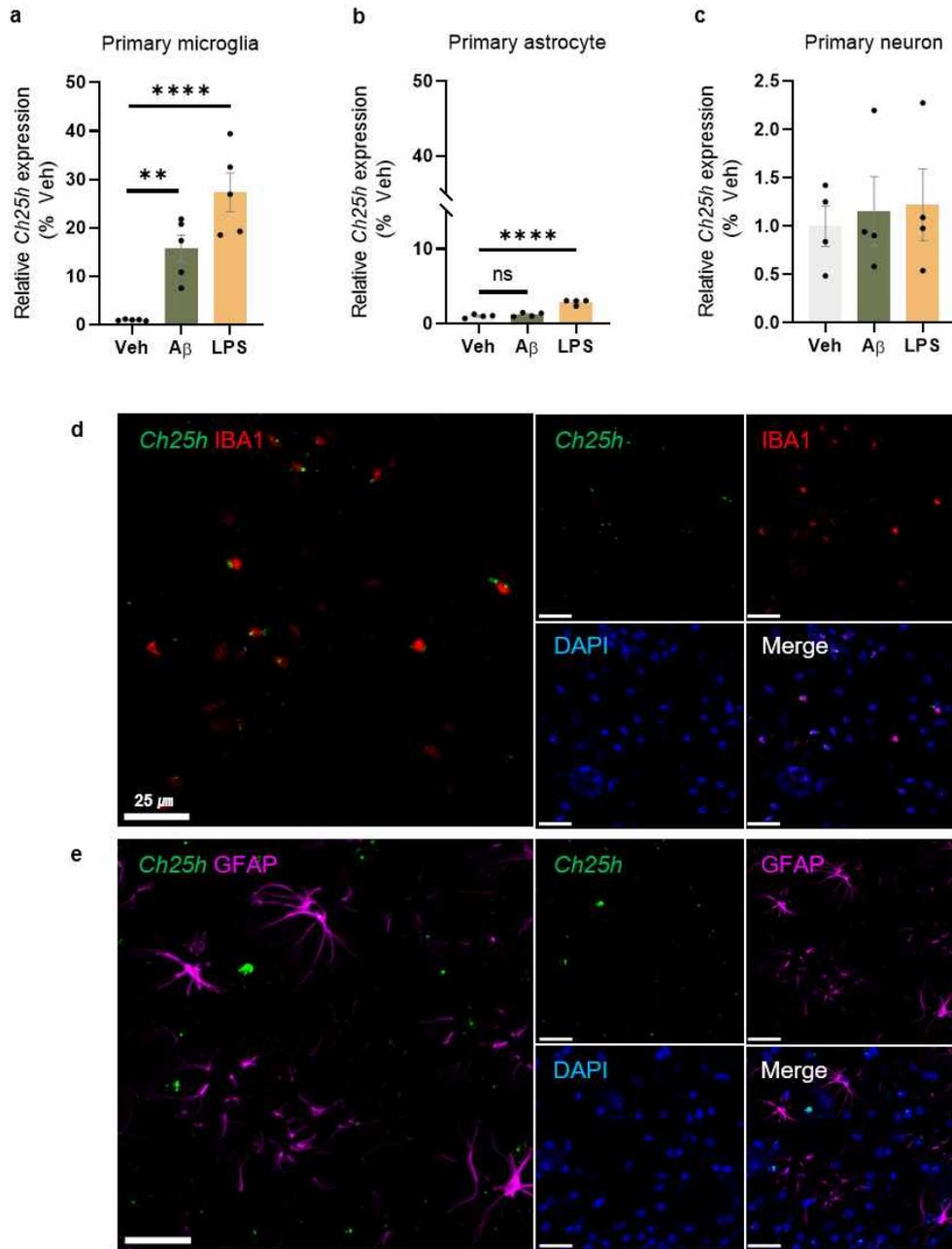


그림 7. A β 에 의한 미세아교세포 특이적 *Ch25h* 발현 증가

(A-C) 마우스 초대배양미세아교세포, 초대배양성상교세포, 초대배양신경 세포에 각각 대조시약 또는 $A\beta(4 \mu M)$, 또는 LPS (10 ng/ml)을 24 시간 처리 한 후 *Ch25h* 효소 mRNA 발현 수준을 RT-PCR로 측정 (N=4-5; Mean \pm SEM; One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons; **p<0.01, ****p<0.001, ns., not significant).

(D) 7개월령 5XFAD_TG의 뇌 조직에 RNA-ISH 기법으로 *Ch25h* RNA 를 표지 하고, 동시에 IBA1 (미세아교세포 특이적 단백질)에 대한 항체 로 면역 염색한 대표이미지. 축척 바는 25 μm .

(E) 7개월령 5XFAD_TG의 뇌 조직에 RNA-ISH 기법으로 *Ch25h* RNA 를 표지 하고, 동시에 GFAP (성상교세포 특이적 단백질)에 대한 항체로 면역 염색한 대표이미지. 축척 바는 25 μm .

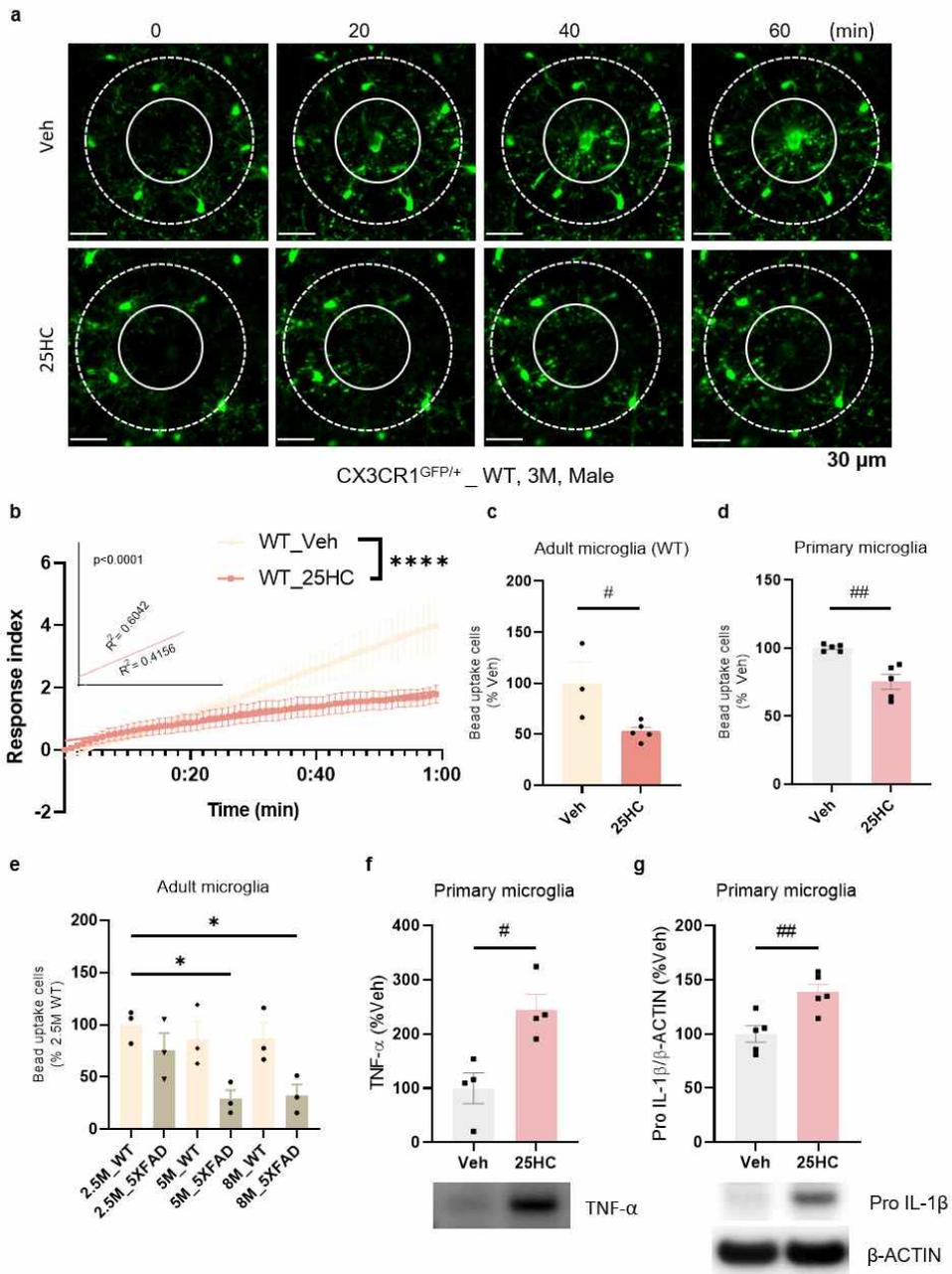


그림 8 . 25HC에 노출 된 미세아교세포의 움직임, 포식능 및 염증성 사이토카인 분비 변화

(A, B) CX3CR1^{GFP/+}_WT 마우스에 대조시약 또는 25HC (10 mg/kg)를 복강 주사 한 후, 이광자 현미경을 이용하여 조직 손상에 대한 미세아교세포의 움직임 실시간 이미징 및 반응 수준 정량 (N=5; Slope comparison analysis; ****p < 0.001; 축척 바는 30 μ m, 바깥 원 지름 140 μ m, 안 쪽 원 지름 70 μ m).

(C) 5XFAD_WT 마우스에 대조시약 또는 25HC (10 mg/kg)를 복강 주사 한 후, 적출 한 뇌 세포를 형광 bead와 함께 배양하여 *ex vivo* 미세아교세포 포식능을 FACS로 비교 (N=3; Mean \pm SEM; unpaired *t*-test; #p<0.05).

(D) 초대배양미세아교세포에 대조시약 또는 25HC (5 μ g/ml) 24 시간 처리 후 형광 bead와 함께 배양하여 그 포식능을 FACS로 비교 (N=5; Mean \pm SEM; unpaired *t*-test; ###p<0.005).

(E) 연령별 5XFAD_WT 및 TG 마우스 뇌에서 적출 한 뇌 세포를 형광 bead와 함께 배양하여 *ex vivo* 미세아교세포 포식능을 FACS로 비교 (N=3; Mean \pm SEM; One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons; *p<0.05).

(F) 초대배양미세아교세포에 대조시약 또는 25HC (5 μ g/ml) 24 시간 처리 후 배양액에 있는 TNF- α 단백질을 TCA 침전시켜 WB으로 정량 (N=4; Mean \pm SEM; unpaired *t*-test; #p<0.05).

(G) 초대배양미세아교세포에 대조시약 또는 25HC (5 μ g/ml) 24 시간 처리 후 세포 내 IL-1 β 단백질을 WB으로 정량 (N=5; Mean \pm SEM; unpaired *t*-test; ##p<0.01).

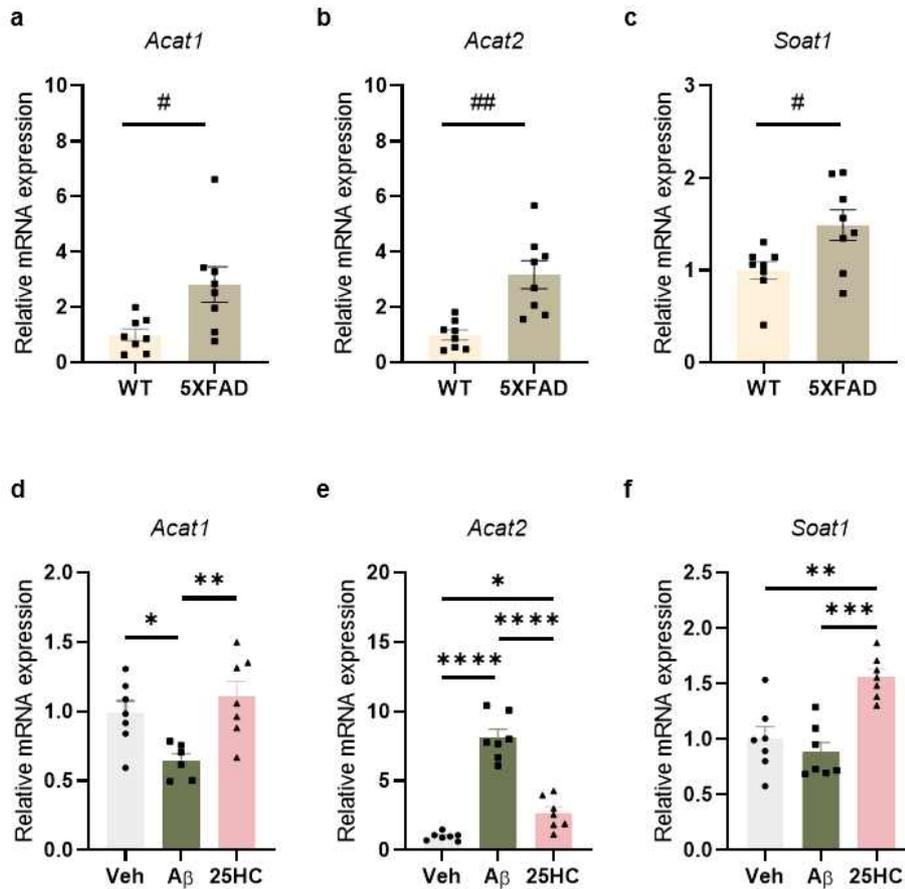


그림 9. A β 및 25HC에 의한 미세아교세포의 콜레스테롤 에스터화 효소 발현 증가

(A-C) 7개월령 5XFAD 모델 쥐 뇌에서 분리한 미세아교세포의 *Acat1*, *Acat2*, *Soat1* mRNA 발현 수준을 RT-PCR로 측정 (N=8; Mean \pm SEM; unpaired *t*-test; #*p*<0.05, ##*p*<0.01)

(D-F) 초대배양미세아교세포에 대조시약, A β (4 μ M) 또는 25HC (5 μ g/ml)를 24 시간 처리 후 *Acat1*, *Acat2*, *Soat1* mRNA 발현 수준을 RT-PCR로 측정 (N=6-7; Mean \pm SEM; One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons; **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.005, *****p*<0.001)

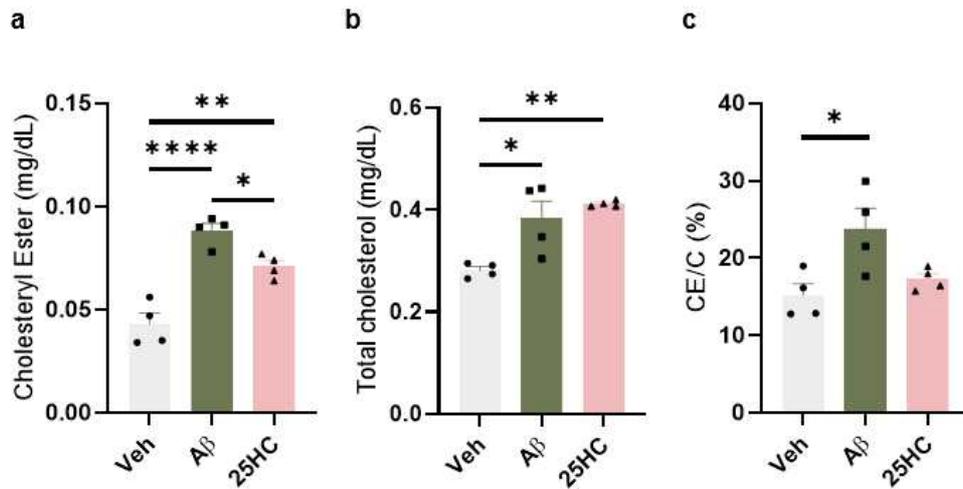


그림 10. Aβ 및 25HC에 의한 미세아교세포 콜레스테릴에스터 증가

(A-C) 초대배양미세아교세포에 대조시약 또는 Aβ (4 μM) 또는 25HC (5 μg/ml)를 24 시간 처리 한 후 세포과쇄액에 존재하는 지질을 추출하여 콜레스테롤 및 콜레스테릴에스터를 정량 (N=4; Mean ± SEM; One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test; *p<0.05, **p<0.01, ****p<0.001).

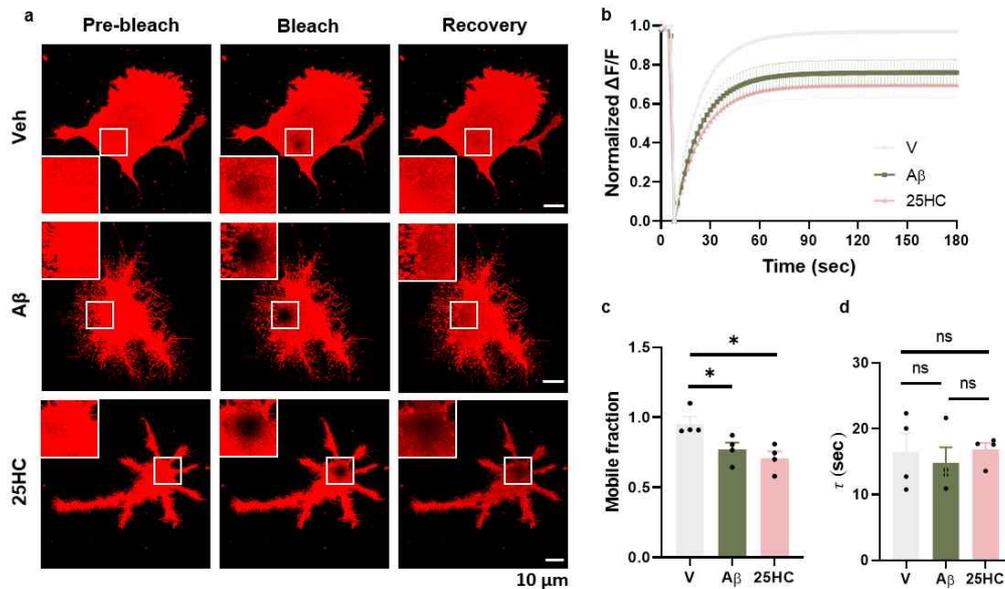


그림 11. Aβ 및 25HC에 의한 미세아교세포의 세포막 유동성 감소

(A) 초대배양미세아교세포에 대조시약 또는 Aβ (4 μM) 또는 25HC (5 μg/ml)를 24 시간 처리 한 광퇴색후형광측정 (FRAP) 실험 대표 이미지 (축척 바는 10 μm, Recovery 대표 이미지는 bleach 이후 10초경과 시점).
 (B) FRAP 실험 결과에 대한 형광시그널 변화 표준화 정량 그래프 (N=4, 1개의 N은 5개 이상의 세포 이미지에 대한 평균값을 나타냄).
 (C-D) 표준형광시그널 정량 그래프에 대한 이동 분획 (mobile fraction) 및 타우 값에 대한 정량 그래프 (N=4, Mean ± SEM; One-way ANOVA, Holm-Sidak multiple comparisons test; *p<0.05).

FRAP 실험의 분석 및 대표이미지 정리는 서울대학교 장성호 교수님 연구실의 이상은 박사님의 도움을 받아 수행하였다.

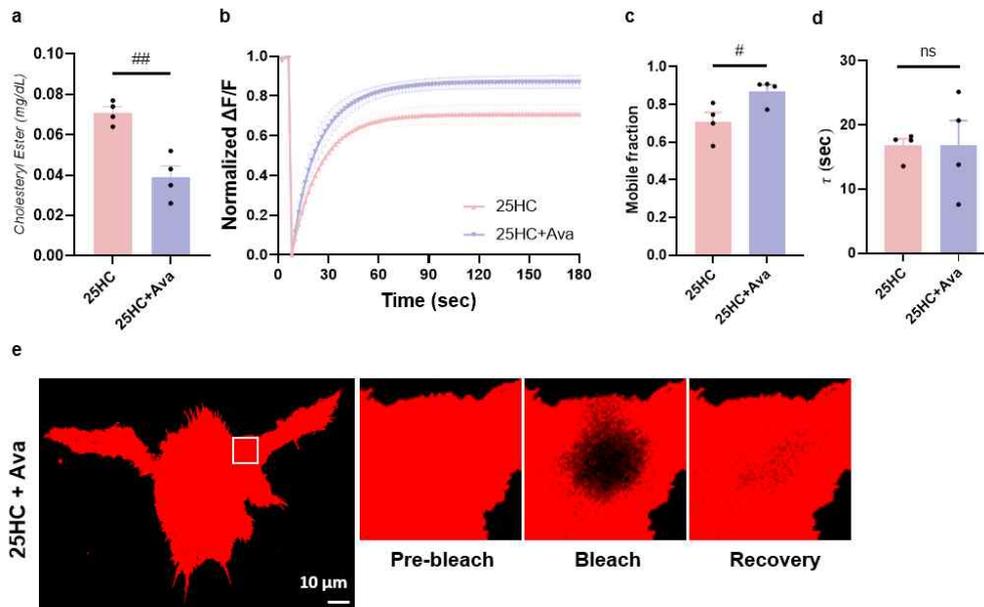


그림 12. 콜레스테롤에스터화 억제제 처리를 통한 25HC에 의해 저해된 미세아교세포의 세포막유동성 회복

(A) 미세아교세포에 25HC (5 $\mu\text{g/ml}$) 단독 또는 25HC와 Avasimibe (1 μM)을 24 시간 처리 한 후 세포과쇄액에 존재하는 지질을 추출하여 콜레스테롤 및 콜레스테릴에스터를 정량 (N=4; Mean \pm SEM; unpaired-*t* test # $p < 0.05$).

(B-D) 표준형광시그널 정량 그래프 및 이동 분획 (mobile fraction)과 타우 값에 대한 정량 그래프 (N=4, Mean \pm SEM; One-way ANOVA, Holm-Sidak multiple comparison test; * $p < 0.05$, ns., non significant).

(E) FRAP 실험 결과에 대한 대표이미지(축척 바는 10 μm , Recovery 대표이미지는 bleach 이후 10초경과 시점). 25HC에 대한 정량 결과는 (그림 11)에 있는 결과와 동일하다.

FRAP 실험의 분석 및 대표이미지 정리는 서울대학교 장성호 교수님 연구실의 이상은 박사님의 도움을 받아 수행하였다.

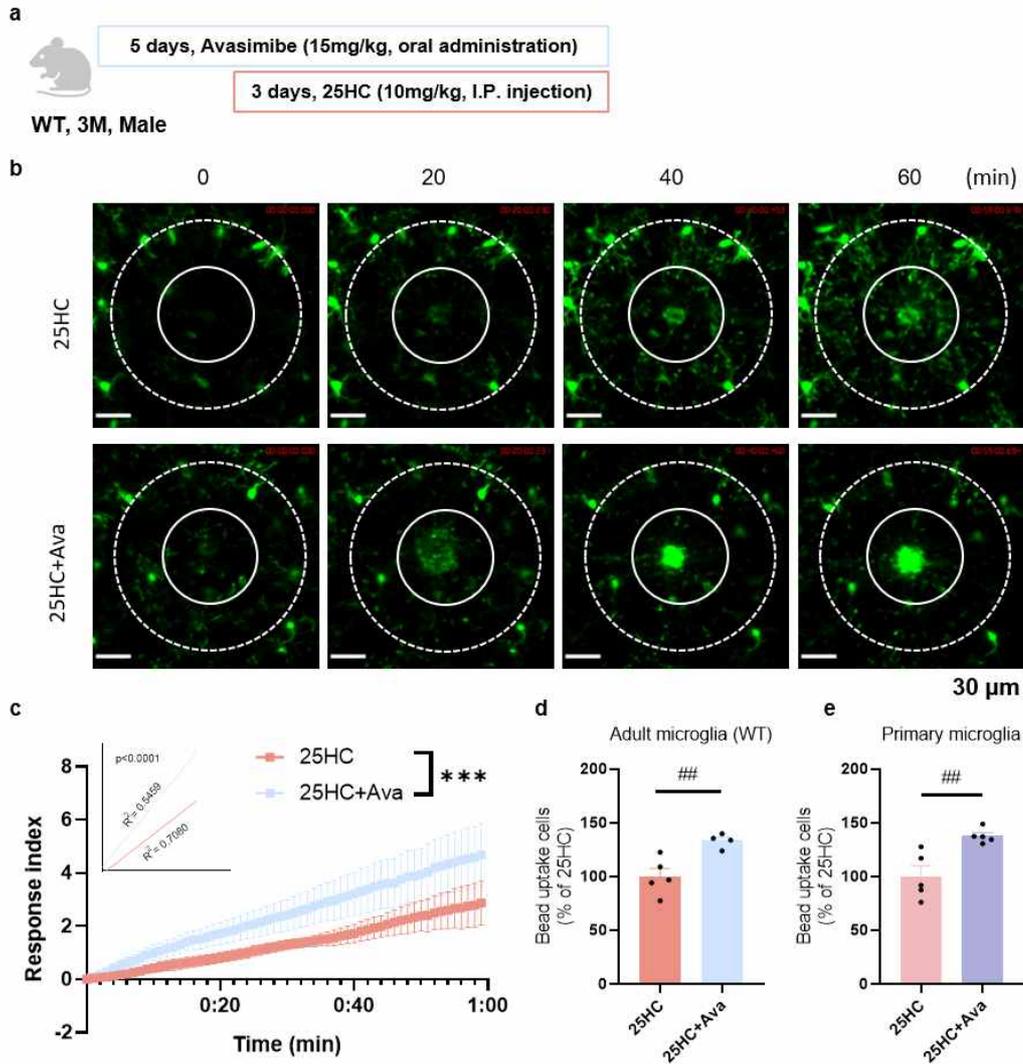


그림 13. 콜레스테롤에스터화 억제제 처리를 통한 25HC에 의해 저해된 미세아교세포의 움직임 및 포식능 회복

(A) 약물투여 모식도.

(B-C) CX3CR1^{GFP/+}_WT 마우스에 Avasimibe (15 mg/kg) 5일 경구 투여, 25HC (10 mg/kg)를 3일 복강 주사 한 후, 이광자 현미경을 이용한 실시간 이미징을 통해 조직 손상에 대한 미세아교세포의 움직임 확인 및 그 정량 (N=3-4; Slope comparison analysis; *** $p < 0.001$)

(D) WT 마우스에 대조시약 또는 Avasimibe (15 mg/kg) 5일 경구 투여, 25HC (10 mg/kg)를 3일 복강 주사 한 후 적출 한 뇌 세포를 형광 bead 와 함께 배양하여 *ex vivo* 미세아교세포 포식능을 FACS로 비교 (N=4; Mean \pm SEM; unpaired-*t* test ##p<0.01).

(E) PMG에 25HC (5 μ g/ml) 단독 처리, 또는 25HC와 Avasimibe (1 μ M) 24 시간 처리 후 형광 bead와 함께 배양하여 그 포식능을 FACS로 비교 (N=5; Mean \pm SEM; unpaired-*t* test ##p<0.01).

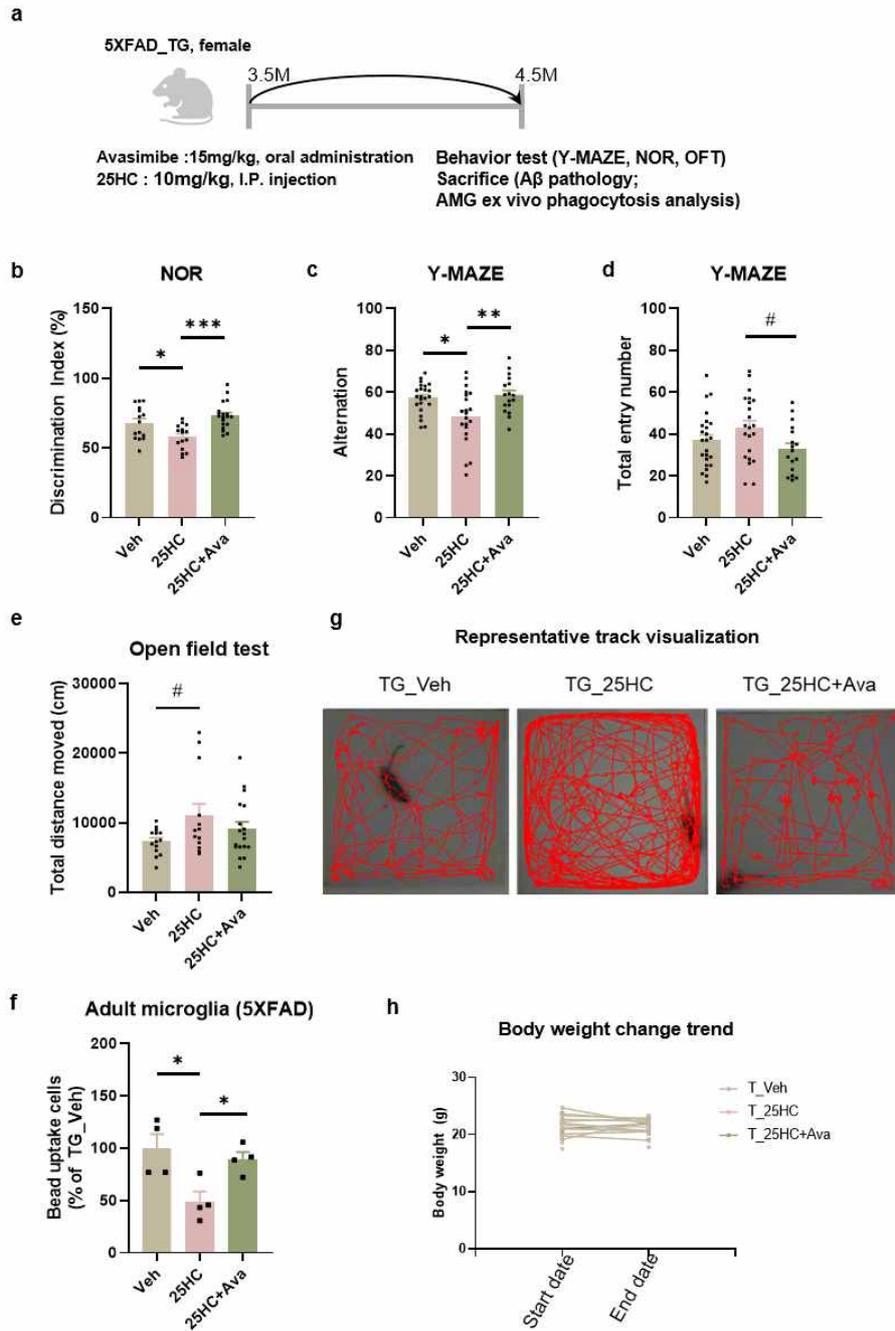


그림 14. 25HC 및 콜레스테롤에스터화 억제제 처리에 의한 AD 모델 쥐의 미세아교세포 포식능 및 인지기능 변화

- (A) 5XFAD_TG 약물투여 및 실험 계획 모식도.
- (B) 약물 투여 후 NOR 마우스 인지기능 평가 실험 결과 (N=15-19; Mean \pm SEM; One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test; * p <0.05, *** p <0.005).
- (C) Y-MAZE 마우스 인지기능 행동 평가 실험 결과 (N=19-22; Mean \pm SEM; One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test; * p <0.05, ** p <0.001).
- (D) Y-MAZE 행동실험 과정에서 기본적인 움직임 수준을 평가하는 마우스가 갈림길에 진입한 총 횟수 평가 (N=19-22; Mean \pm SEM; unpaired t -test; # p <0.05).
- (E-F) Open field 행동 실험으로 마우스가 움직인 거리 및 그 경로에 대한 시각화 대표이미지 (N=13-18; Mean \pm SEM; unpaired t -test; # p <0.05).
- (G) 약물 투여 후 *ex vivo* 미세아교세포를 형광 bead와 함께 배양하여 포식능을 FACS로 비교 (N=4; Mean \pm SEM; One-way ANOVA, Holm-Sidak multiple comparisons test; * p <0.05).
- (H) 약물 투여 전후의 마우스 체중 변화.

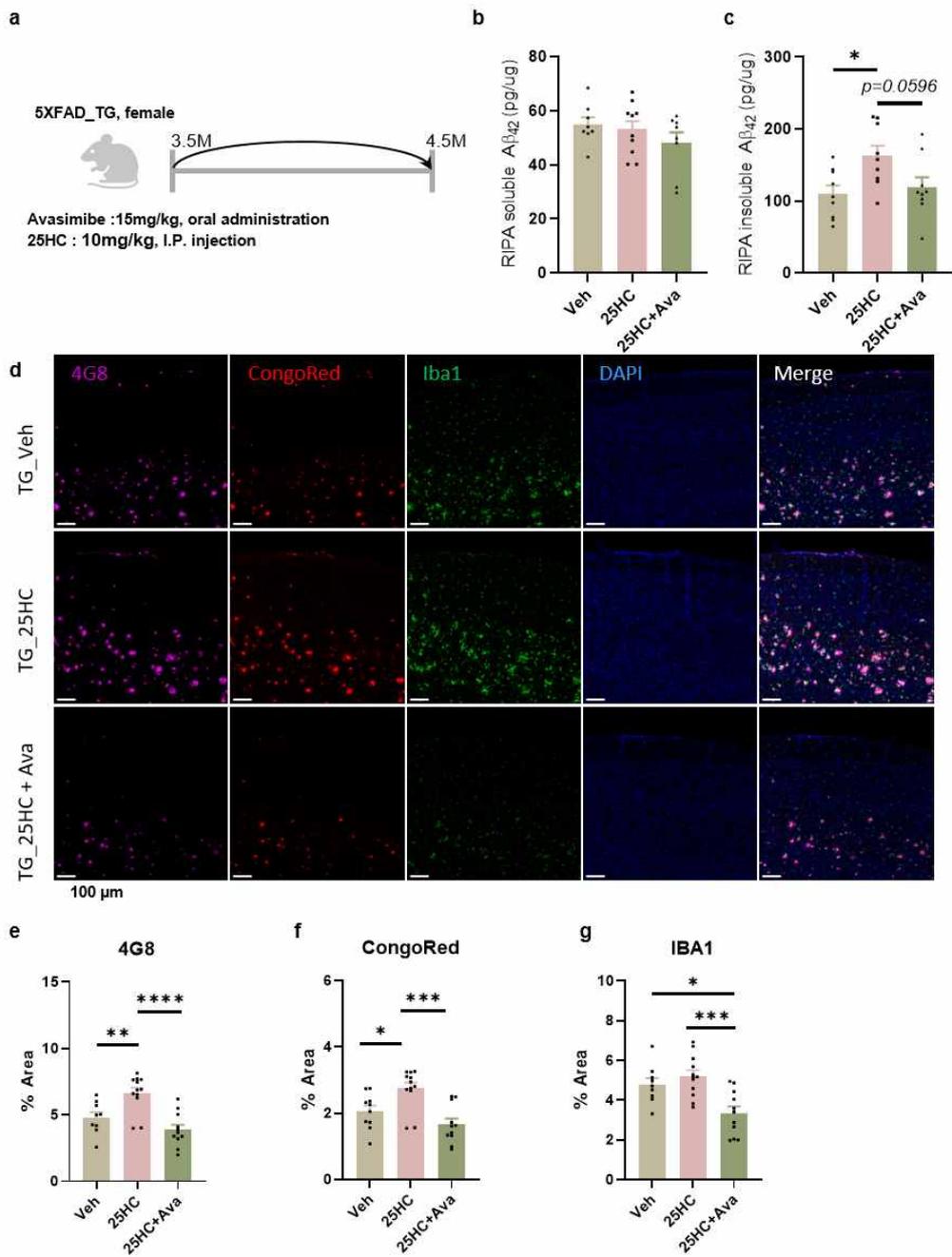


그림 15. 25HC 및 콜레스테롤에스터화 억제제 처리에 의한 AD 모델 쥐 전전두엽대뇌피질 영역의 아밀로이드 병변 변화

(A) 5XFAD_TG 약물투여 실험 모식도.

(B-C) 약물 투여 이후 5XFAD 마우스 전전두엽 대뇌피질에 존재하는 RIPA 용해성 및 비용해성 A β ₁₋₄₂ ELISA 정량 결과 (N=8-10; Mean \pm SEM; One-way ANOVA, Holm-Sidak's multiple comparisons test ; *p<0.05).

(D-G) 5XFAD 마우스 대뇌피질 영역에 나타나는 병변을 4G8 (아밀로이드 베타 특이적 단항체), CongoRed (과응집 아밀로이드 플라크 표지 염료), IBA1 (미세아교세포 특이적 단백질) 면역 염색 기법으로 관찰 및 정량화 (N=9-12; Mean \pm SEM; One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test; *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.005, ****p<0.001).

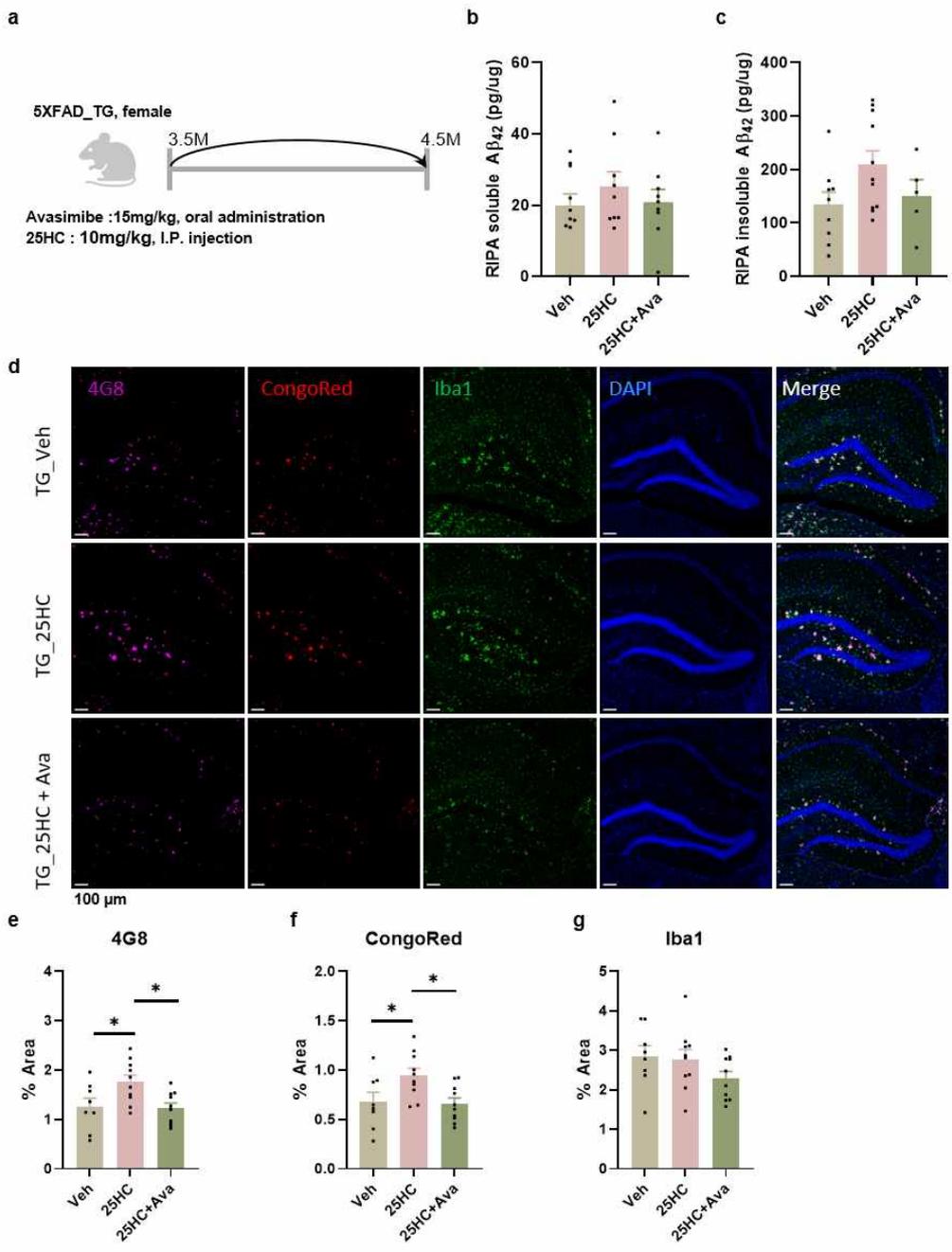


그림 16. 25HC 및 콜레스테롤에스터화 억제제 처리에 의한 AD 모델 쥐 해마 영역의 아밀로이드 병변 변화

(A) 5XFAD_TG 약물투여 실험 모식도.

(B-C) 약물 투여 이후 5XFAD 마우스 해마에 존재하는 RIPA 용해성 및 비용해성 A β ₁₋₄₂ ELISA 정량 결과 (N=9-10; Mean \pm SEM; One-way ANOVA, Hols-Sidak's multiple comparisons test).

(D-G) 5XFAD 마우스 해마 영역에 나타나는 병변을 4G8 (아밀로이드 베타 특이적 단항체), CongoRed (과응집 아밀로이드 플라크 표지 염료), IBA1 (미세아교세포 특이적 단백질) 면역 염색 기법으로 관찰 및 정량화 (Mean \pm SEM; N=8-10; One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test; *p<0.05, ns., non significant).

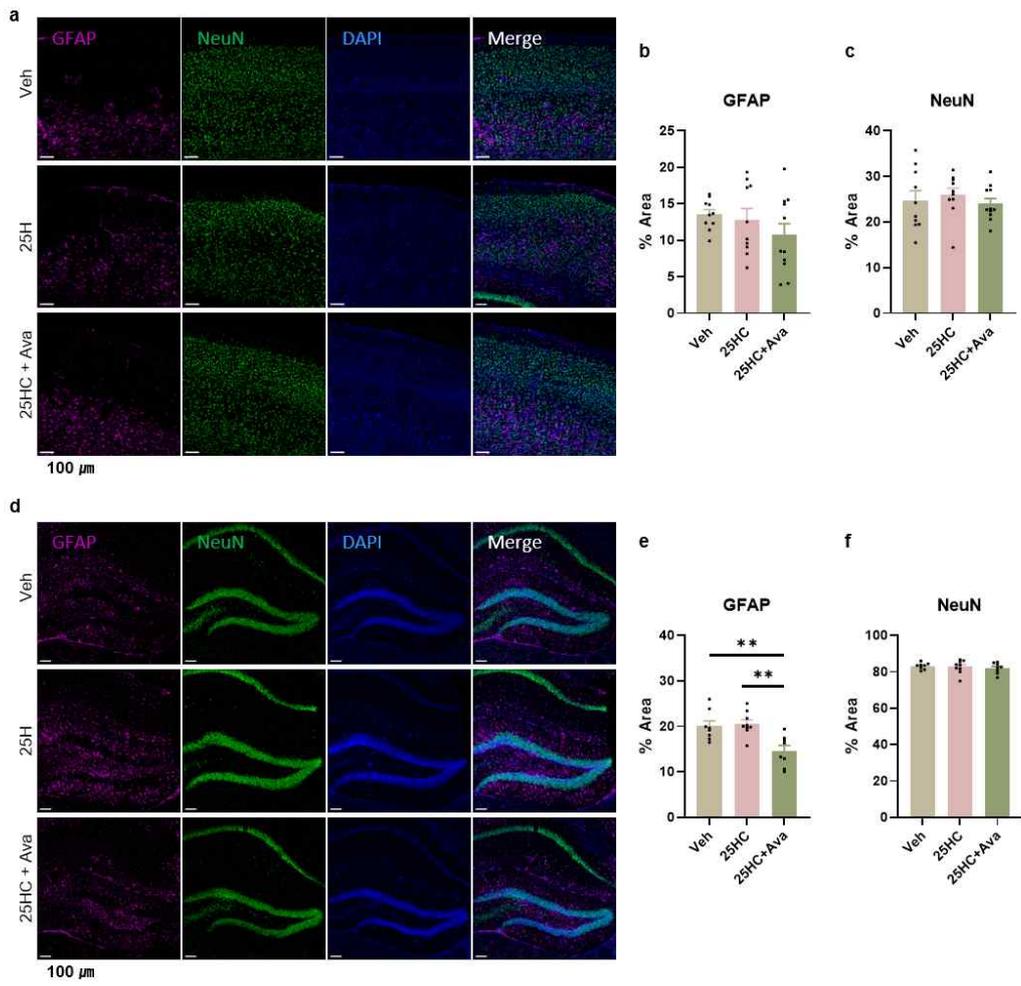


그림 17. 25HC 및 콜레스테롤에스터화 억제제 처리에 의한 5XFAD 모델 쥐의 성상교세포 및 신경세포 변화

(A-C) 5XFAD 마우스 전전두엽 영역에 분포하는 GFAP (Astrocyte 특이적 단항체) 및 NeuN (신경세포 특이적 단항체) 면역 염색 기법으로 관찰 및 정량 (N=8-10; Mean \pm SEM; One-way ANOVA).

(A-C) 5XFAD 마우스 해마 영역에 분포하는 GFAP (Astrocyte 특이적 단항체) 및 NeuN (신경세포 특이적 단항체) 면역 염색 기법으로 관찰 (N=8-10; Mean \pm SEM; One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test; **p<0.01).

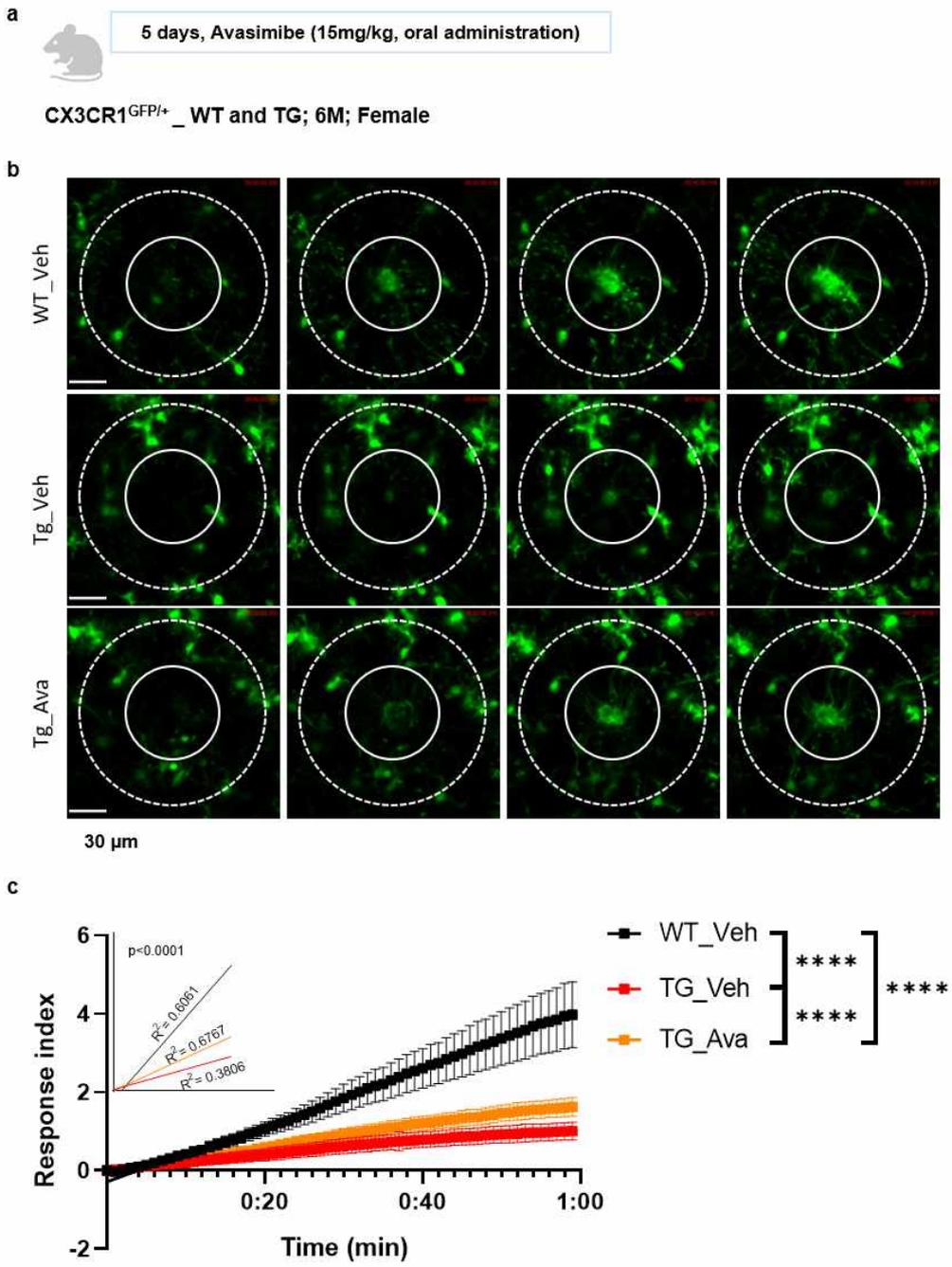


그림 18. 콜레스테롤에스터화 억제제 처리에 의한 5XFAD 모델 미세아교세포의 움직임 변화

(A) 약물투여 계획 모식도.

(B-C) CX3CR1^{GFP/+}_5XFAD 마우스에 Veh 또는 Avasimibe (15 mg/kg) 5일 경구 투여 한 후, 이광자 현미경을 이용한 실시간 이미징을 통해 조직 손상에 대한 미세아교세포의 움직임 확인 및 그 정량 (N=6; Slope comparison analysis; ****p < 0.001; 축척 바는 30 μ m, 바깥 원 지름 140 μ m, 안 쪽 원 지름 70 μ m)

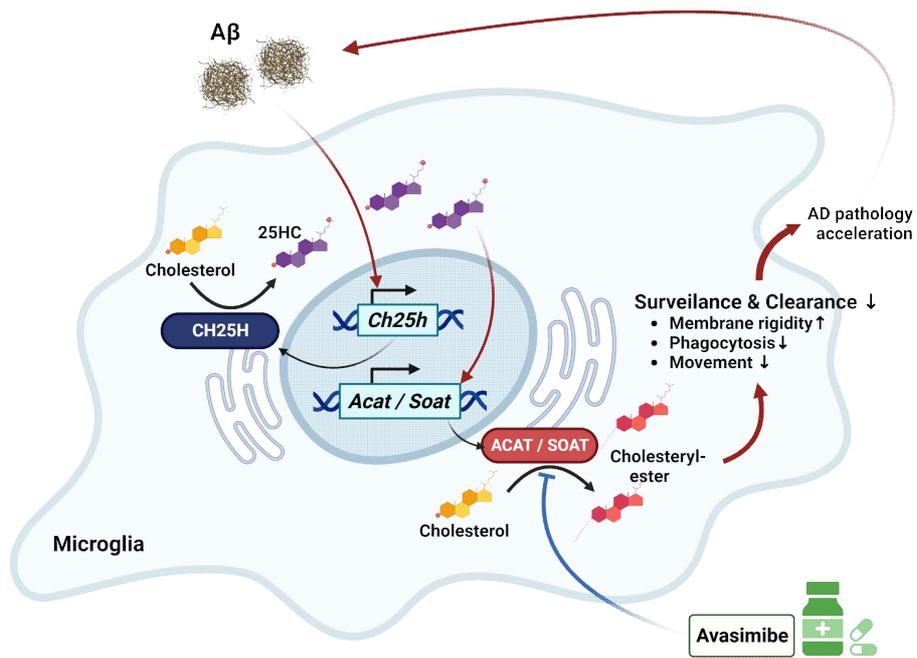


그림 19. Part1 연구 요약

Part 2. 개선된 이광자현미경 아밀로이드 베타 플라크 탐침 개발 연구

1. 신규 아밀로이드 베타 탐침 IRI-1 합성 전략 및 개선 착안점

이광자현미경 촬영을 위한 신규 아밀로이드 베타 탐침 개발은 기존에 개발된 탐침들이 보유한 단점을 보완하고 장점들만을 취할 수 있도록 고안되었다. BBB 투과율이 높아 *in vivo* 적용이 용이한 IBC-2 형광체의 높은 BBB 투과 장점을, 분자 내 회전 구조를 보유하여 좋은 선택적 발광 효율을 나타내는 ThT의 높은 선택적 발광효율의 장점을 각각 접목하고자 하였다 (그림 20a). 더 나아가 최대한 NIR 파장대의 형광을 방출하여 조직 침투력과 광독성을 최소화하도록 하는 탐침을 개발하고자 하였다.

ThT 형광체가 아밀로이드 베타 플라크에 결합 하였을 때에만 강한 선택적 발광 효율을 가질 수 있는 것은, 분자 내 회전 구조로 인하여 평소에는 꼬인 분자 내 전하 상태 기반의-탈여기 현상 (TICT-based de-excitation pathway)이 일어나기 때문이다. 이러한 분자 내 회전 현상을 이용한 분자 고리 구조 기반의 스위치를 접목 시킨다면 기존 탐침의 성능을 개선할 수 있을 것으로 기대하였다. 이에 아밀로이드베타 특이적이면서 NIR 파장대의 형광을 방출한다고 알려진 iminocoumarin 탐침구조를 뼈대로 하여, 적절한 고리 구조를 추가로 합성하는 전략으로 신규 탐침을 개발하였다. 신규 개발 한 탐침은 분자내회전능을 보유한 iminocoumarin-1이라는 뜻의 약자인 IRI-1(Intramolecular rotation enabled iminocoumarin-1)이라고 명명하였다. IRI-1은 4-bromosalicylaldehyde와 4-(dimethylamino)phenylboronic acid를 Suzuki coupling 반응시킨 화합물에 malononitrile과 고리화 반응을 통해 합성하였다 (그림 20b). 기존 고리 구조를 가지고 있는 ThT 같은 경우 BBB 통과능이 전혀 없었기 때문에 IRI-1 탐침에 대해 이론적인 BBB 투과성을 우선적으로 예측하여보았다 기존 정립 되어 있는 Hitchcock의 BBB 투과능 선택 규칙

과 IRI-1의 구조를 기반으로 이론적으로 계산된 물리화학적 특징을 비교하였을 때, 미달 되는 조건이 없이 잘 투과할 것으로 예측되었다 (표 1), (140).

2. IRI-1 광화학적 특성

IRI-1 탐침의 광화학적 특성을 여러 조건에서 조사하였다. IRI-1은 A β 섬유응집체 존재 시 419 nm에서 최대 흡광도를 나타내며 (그림 21a), 566 nm 파장대에서 최대 형광 세기를 나타냈다 (λ_{ex} : 405 nm). PBS에 희석된 IRI-1 탐침 검체는 A β 섬유응집체가 존재하지 않을 때에는 사실상 형광 방출이 없는 것으로 나타났다. A β 섬유응집체 유무에 따른 형광 증폭 세기의 차이는 A β 섬유응집체가 존재 할 시에 167 배 더 밝은 것으로 나타났다 (그림 21b). 형광 발색에 영향을 줄 만한 여러 분석물인 금속 이온, 아미노산 및 티올(머캡토) 각각에 IRI-1을 섞어 형광 증폭을 측정하였을 때에도 방출 되는 형광의 세기가 매우 낮거나 없는 (그림 21c) 좋은 선택적 발광 능력을 보여주었다. IRI-1의 A β 섬유응집체에 대한 결합친화성은 $K_d = 374 \pm 115$ nM 나타났다 (그림 21d). A β 섬유응집체에서 선택적으로 형광이 증폭되는 것은 IRI-1이 아밀로이드 단백질에 결합 될 때는 회전이 막히면서 TICT 기반 탈여기 현상이 일어나는 구조로부터 벗어나 발광할 수 있게 되는 회전각을 보유하게 되기 때문이다. 분자 고리 구조 도입을 통한 TICT 기반 탈여기 현상을 유도한 전략이 효과가 있는지 추가적으로 확인하기 위하여 다양한 점성의 용매에 녹인 IRI-1 탐침의 형광 방출 정도를 측정하였다. 그 결과 메탄올, 에틸렌 글리콜, 글리세롤 순서로 용매의 점도가 점점 증가함에 따라 명확한 형광의 증대가 관찰되었으며 (그림 21e) 이를 통해 TICT-기반 탈여기 현상을 적용한 전략이 잘 적용되고 있는 것을 확인할 수 있었다.

3. IRI-1와 A β 섬유응집체 결합에 대한 *in silico* 분석

A β_{1-42} 섬유응집체에 대하여 기존 알려진 원자 근접 분석 수준의 초

저온 전자 현미경 구조를 기반으로, IRI-1이 분자적 수준에서 어떻게 결합 하는지 *in silico* 분석을 수행하였다 (그림 22), (141). A β_{1-42} 섬유 응집체의 Phe²⁰은 존재할 수 있는 모양에 2가지 가능성이 존재하기 때문에, 두 가지 구조 모두에 대해 각각 분석하였다. 비슷한 결합력을 보이게 나타나는 두 가지의 주요 결합 부위가 도출 되었다. 첫 번째 결합 부위는 섬유 축을 따라 나 있는 Phe¹⁹, Asn²⁷, Gly²⁹, 및 Ile³¹ 잔기로 이루어진 터널 내부이며, 두 번째 결합 부위는 섬유 축 바깥을 따라 바깥 표면에 위치하는 Phe²⁰ 잔기 근처의 홈이다. (그림 22b)에 묘사된 모식도에 나타난 내부 터널의 결합 위치는 이전에 보고 된 것과 결합 친화도와 일치하는 것으로 나타났다. 결합 분석을 통해서 는 결합 친화도가 비슷하게 나타났기 때문에 두 결합 부위 중에 어떤 부위가 더 우세한지까지는 비교하기 어려웠으나, 터널 내부에서 일어나는 상호작용이 역학적으로 비교적 안정할 것으로 추정된다.

4. 5XFAD 동물 모델 아밀로이드 베타 플라크 이미징에 IRI-1 적용

IRI-1을 아밀로이드 플라크 병변을 다량 보유한 10-12 개월 령의 5XFAD 마우스에 실제 적용하였다. 동물 모델에 직접 적용하기 전에, *in vitro* 상에서 BBB를 모사한 인공막에 대한 투과성 실험인 PAMPA 실험을 선행하였다 (표 2). 그 결과 BBB를 잘 통과한다고 알려진 양성 대조물질인 프로게스테론이나 Theophylline처럼 IRI-1도 좋은 투과성을 보이는 투과 속도 기준을 상회하는 결과를 나타냈다. 이광자현미경 촬영을 수행하기 직전에 IRI-1 탐침을 5XFAD 마우스에 5 mg/kg 용량으로 복강 내 주입 한 후 어느 정도 시간이 경과 하였을 때 탐침의 시그널이 구분 되는지 실시간 이미징을 수행하였다. 이론상의 예측 및 *in vitro* PAMPA 실험을 통해 예측했던대로, IRI-1은 BBB를 잘 통과하여, 탐침 투여 10분 이내에 이미 아밀로이드 플라크 병변 위치에 형광시그널이 잘 잡히며 40분 정도 경과하면 어느 정도 밝기 정도가 포화 되는 것을 관찰

할 수 있었다 (그림 23).

기존 개발 된 IRI-1과 뼈대 발색단을 공유하는 IBC2 형광탐침에 비해 그 성능이 얼마나 개선되었는지 5XFAD 마우스 뇌 조직 절편 염색 한 후 이광자현미경 촬영을 통해 비교하였다. 동일한 농도로 녹인 두 탐침에 준비한 뇌 조직을 담가 염색시킨 후, 염색 된 아밀로이드 베타 플라크에 대한 형광세기와, 무작위로 선정한 배경 부위의 ROI에 대한 형광세기를 추출하였다. 발색단의 뼈대가 거의 유사하기 때문에 탐침이 내는 최대 형광의 세기에는 큰 차이가 있지는 않았다. 그러나 플라크를 표지 하는 형광세기를 배경표지 형광 세기로 나누어, 실제 보고자 하는 아밀로이드베타 플라크에 대한 선택적인 형광 증폭이 얼마나 명확한지 나타 내는지 비교한 결과, IRI-1이 IBC2에 비하여 3.75 배가량 구별 능력이 개선 된 것으로 나타났다(그림 24a-d). 이를 통해 TICT 기반 탈여기 전략의 도입이 실제 동물 조직의 병변을 촬영의 선명도 개선에 효과가 있다는 것 또한 확인 할 수 있었다.

IRI-1이 탐지한 것이 실제 아밀로이드 베타 플라크 병변인지를 보다 확실하게 하고자, 기존 알려진 MeO-X04 탐침과 동시에 염색을 수행하여 두 탐침의 시그널이 실제 플라크 병변에 함께 위치하는지 확인하였다. IRI-1과 MeO-X04는 각기 다른 조건에서, 서로 다른 파장대의 형광을 방출하기 때문에, 각 탐침의 형광 시그널이 간섭하지 않는 조건으로 각각 촬영할 수 있었다 (그림 24l,m). 확보한 이미지를 서로 겹쳐 확인하면 모든 형광 신호가 서로 동일한 부분을 표지하고 있는 것으로 나타나, IRI-1이 아밀로이드 베타 플라크를 잘 표지 하는 것을 검증할 수 있었다 (그림 24e-j). 또한 혈관벽에 붙어 있는 비교적 작은 크기의 아밀로이드 병변인 CAA 또한 선명하게 촬영되는 것도 확인 할 수 있었다 (그림 24h-j). Z-stack 촬영한 것을 3차원 재구성한 대표이미지에서처럼 172 μm 깊이에서도 IRI-1의 신호가 잘 표지 되어 근적외선 형광이 갖는 깊은 조직 침투력의 장점이 잘 살아있음을 확인하였다 (그림 24k). 분자 내 회전 현상을 이용한 분자 고리 구조 기반의 스위치를 접목 전략을 통해

서, 동물모델에 적용 가능한 새로운 아밀로이드 플라크 특이적인 이광자 현미경용 탐침을 효과적으로 개발하였다 (그림 25).

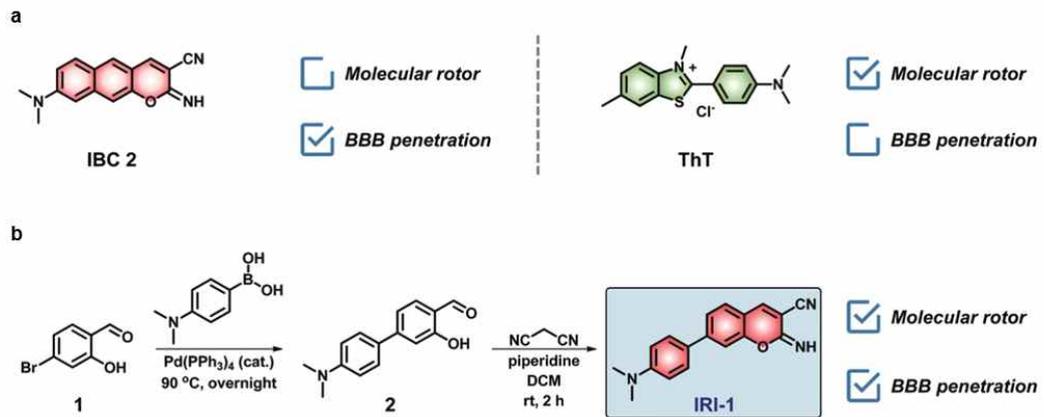


그림 20 . 신규 아밀로이드 베타 탐침 IRI-1 합성 전략 및 개선 착안점

(A) 기존 아밀로이드 베타 플라크 표지 탐침 및 그 장단점

(B) IRI-1 합성 전략 및 개선 착안점

본 화합물 합성은 고려대학교 김종승 교수님 연구실의 신진우 선생님에 의해 실험 된 결과이다.

Selection rule		IRI-1
Topological polar surface area (TPSA)*	< 90 Å ²	64 Å ²
H-bond donors	≤ 3	1
Calculated logP	2 - 5	3.30 ± 0.49
Calculated logD	2 - 5	3.30 ± 0.49
Molecular weight	< 500 Da	289.33 Da

표 1. BBB 통과능 선택 규칙 기반 IRI-1 화합물의 특성

* Calculatated using the Molinspiration applet.

본 결과는 고려대학교 김종승 교수님 연구실의 신진우 선생님에 의해 분석 된 결과이다.

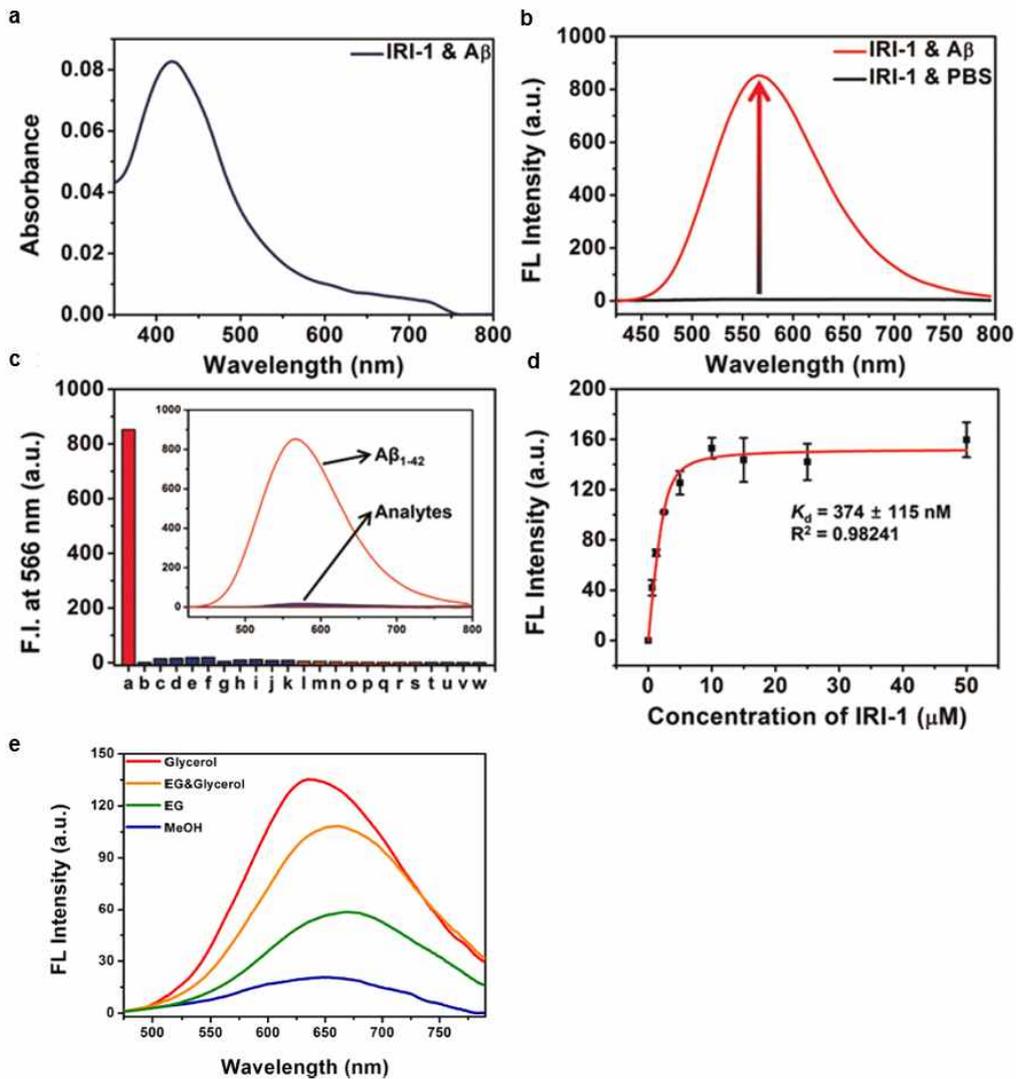


그림 21 . IRI-1 광학적 특성

- (A) Aβ 섬유응집체 (20 μM)와 함께 있을 때 IRI-1의 흡수분광도.
- (B) PBS 또는 Aβ 섬유응집체 (20 μM)가 있을 때 파장에 따른 IRI-1의 형광 세기 스펙트럼(λ_{ex} : 405 nm).
- (C) Aβ 섬유응집체 및 다양한 간섭물질 존재 시 IRI-1의 형광 반응 그래프 (λ_{em} : 566 nm; PBS 용매; a: Aβ₁₋₄₂ fibrils (20 μM), b - k: metal ions (20 μM), b=Al³⁺, c=Fe³⁺, d=Fe²⁺, e=Ca²⁺, f=Cu²⁺, g=Zn²⁺, h=Ni²⁺,

i=Mg²⁺, j=Na⁺, k=K⁺), l - s: amino acids (20 μM, l=Lys, m=Arg, n=Asp, o=Glu, p=His, q=Trp, r=Tyr, s=Phe), and t - w: thiols (20 μM, t=DTT, u=Hcy, v=GSH, w=Cys).

(D) Aβ 섬유응집체 (10 μM)와 IRI-1 (0-50 μM) 포화 반응 곡선 (PBS 용매; N=3; mean ± SD).

(E) 용매 점성 증가에 따른 IRI-1의 형광 세기 스펙트럼 (IRI-1: 10 μM; λ_{ex}: 405 nm; 용매별 점성 in 20°C, Glycerol 1412 cP, EG 18.376 cP, MeOH 0.594 cP; EG: ethylene glycol, MeOH: methanol).

본 결과는 고려대학교 김종승 교수님 연구실의 신진우 선생님께서 의해 분석된 결과이다.

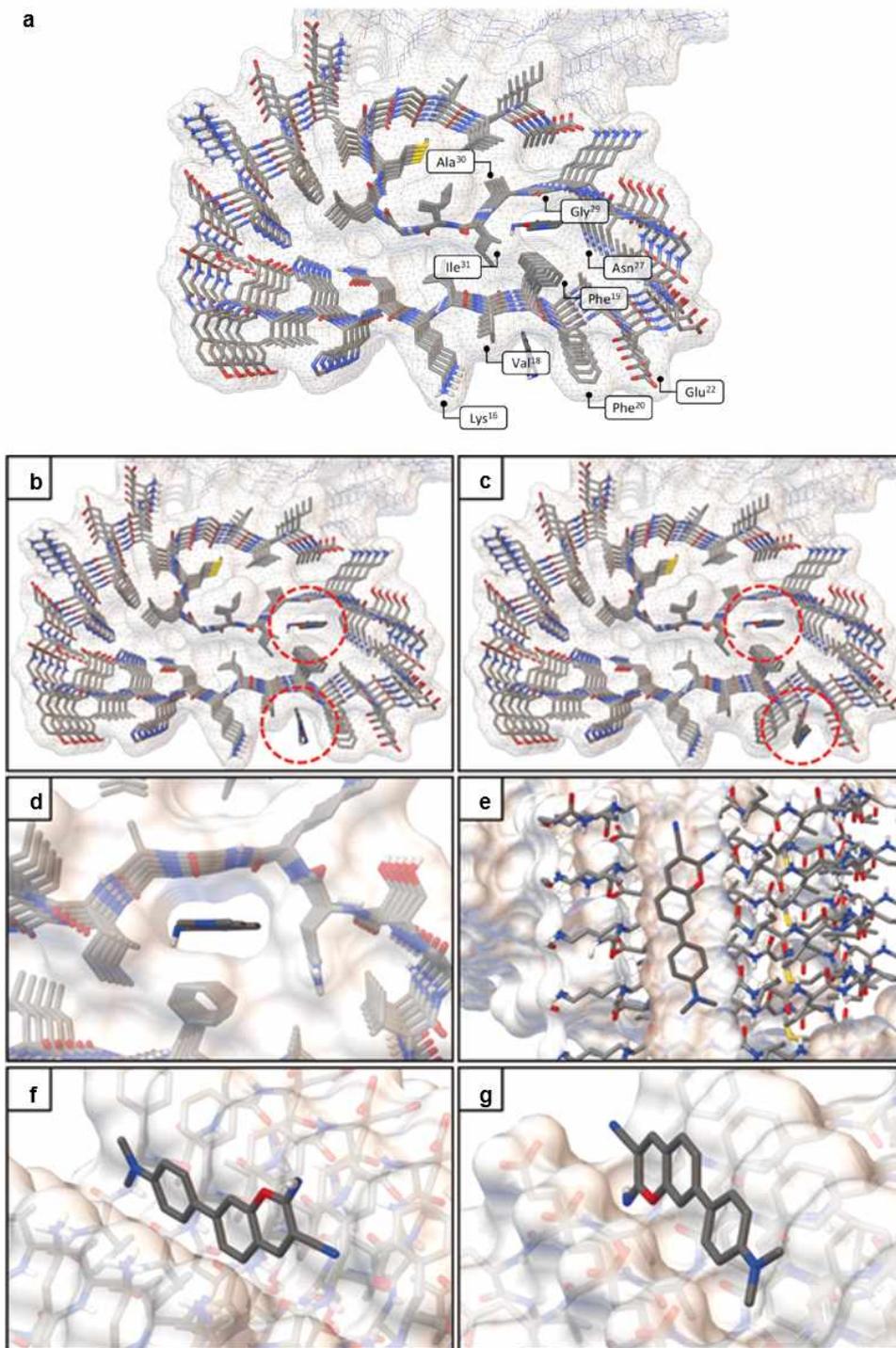


그림 22 . A β 섬유응집체의 Cryo-EM 구조 기반 IRI-1의 *in silico* 결합 분석

- (A) 위에서 바라본 A β ₁₋₄₂ 섬유응집체의 Cryo-EM 구조 및 주요 아미노산 잔기 위치
- (B) Val¹⁸, Phe²⁰ 표면 및 내부 터널의 단백질-리간드 상호작용 위치
- (C) Phe²⁰, Glu²² 표면 및 내부 터널의 단백질-리간드 상호작용 위치
- (D) 위에서 바라본 A β ₁₋₄₂ 의 Phe¹⁹, Asn²⁷, Gly²⁹, Ile³¹ 표면에 감싸여진 IRI-1 모식도
- (E) A β ₁₋₄₂ 섬유응집체의 내부 터널에 위치한 IRI-1 확대 모식도
- (F) Lys¹⁶, Val¹⁸, Phe²⁰ 홈에 위치한 IRI-1 확대 모식도
- (G) Phe²⁰, Glu²² 홈에 위치한 IRI-1 확대 모식도

본 결과는 고려대학교 김종승 교수님 연구실의 Peter Verwilst 박사님에 의해 분석된 결과이다.

Compound	Pe (10 ⁻⁶ cm/s) Mean and SD, n=3	Permeability classification**
Progesterone*	39.45 ± 5.593	High
Theophylline*	0.250 ± 0.023	Low
IRI-1	0.562 ± 0.053	High
Thioflavin T	0	Not permeable

표 2. 인공혈뇌장벽 투과성 측정 실험 결과

* 실험 양성 대조군.

** PAMPA 실험 제조사 제공하는 높은 투과율 기준: $Pe > 0.4 \times 10^{-6}$ cm/s.

본 결과는 고려대학교 김종승 교수님 연구실의 신진우 선생님에 의해 분석된 결과이다.

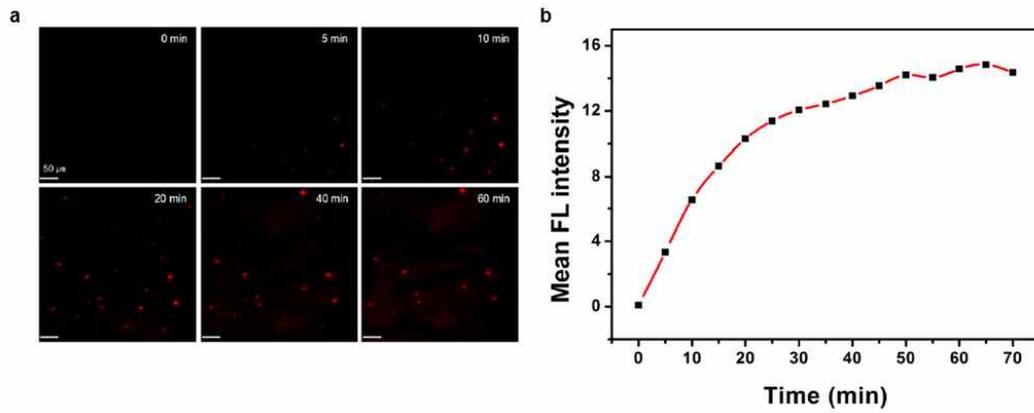


그림 23 . 이광자 현미경을 통한 마우스 뇌 내 아밀로이드 플라크 시각화

(A-B) IRI-1 (5 mg/kg) 복강 주입 후, 시간 경과에 따른 뇌 내 형광 세기 변화 대표 이미지 및 형광 세기 그래프 (λ_{ex} : 920 nm; λ_{em} : 555-610 nm) 축척 바 50 μm .

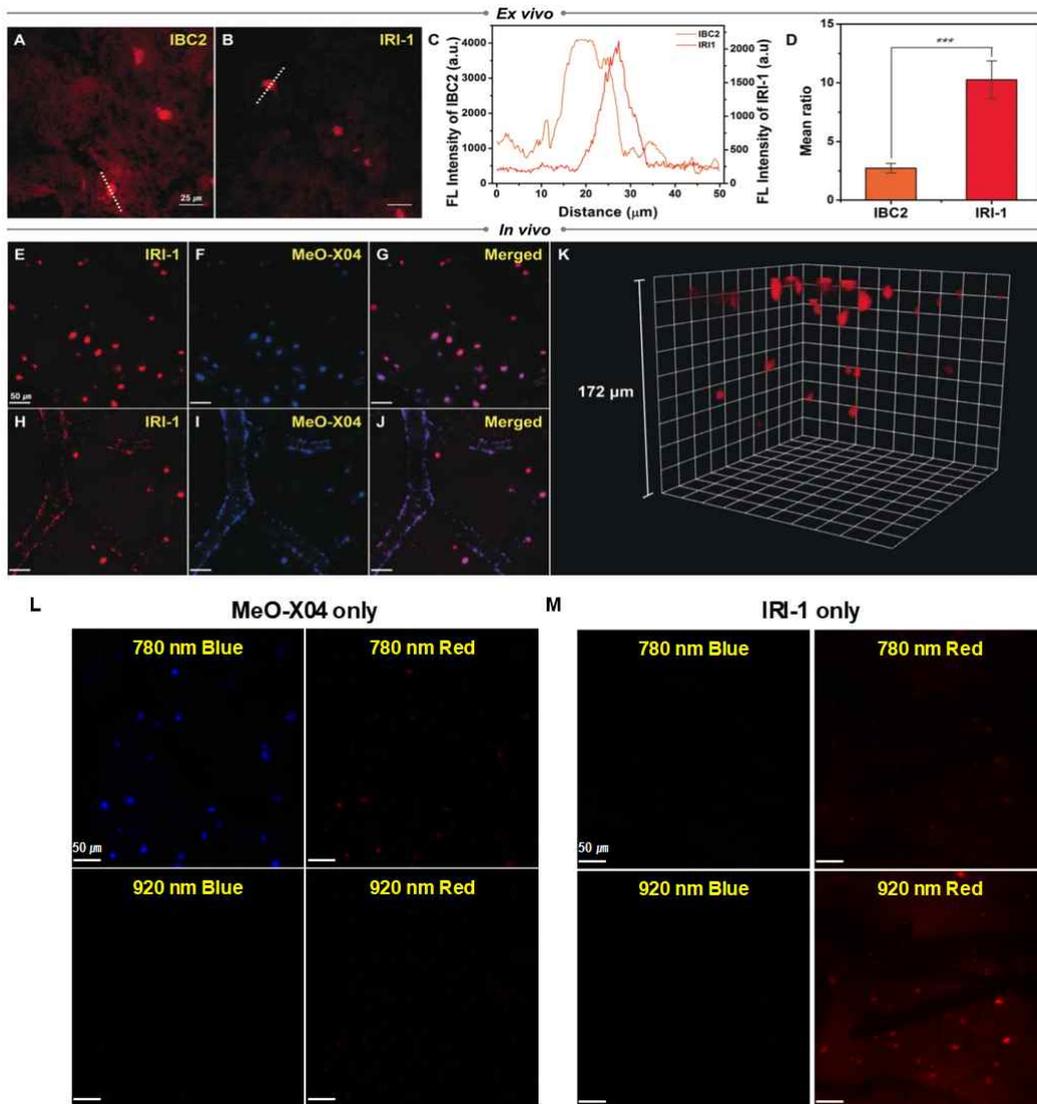


그림 24 . 5XFAD_TG 마우스 뇌 조직에서 이광자현미경으로 촬영한 IRI-1 표지 아밀로이드 플라크

(A-C) *Ex vivo* 뇌 절편에 IBC2 또는 IRI-1 (각 20 μM) 용액에서 1시간 염색 한 후 이광자현미경 촬영 한 대표 이미지 및 그 형광 세기 (11개월령, λ_{ex} : 850 nm, λ_{em} : 580-779 nm; 축척 바 50 μm).

(D) 배경 간섭 시그널 대비 실제 아밀로이드 베타 플라크 시그널 비율 (플라크 및 배경 ROI n=15; Mean \pm SD; unpaired *t*-test; ***p<0.005).

(E-J) IRI-1 및 MeO-X04 (각 5 mg/kg, I.P. injection) 동시 염색 한 후 *in vivo* 이광자 현미경 촬영 (5XFAD_TG; 10-12 개월령; E,H: λ_{ex} : 920 nm, λ_{em} : 555-610 nm; F,I: λ_{ex} : 850 nm, λ_{em} : 485-490 nm; 축척 바는 50 μm)

(K) IRI-1 표지 아밀로이드 베타 플라크 *in vivo* 이광자 현미경 촬영 3 차원 재구성 이미지 (5XFAD_TG; 10-12 개월령; λ_{ex} : 920 nm, λ_{em} : 555-610 nm)

(L-M) MeO-X04 (5 mg/kg) 또는 IRI-1 (5 mg/kg) 각각 복강 주입 후, 조사 레이저 광원 파장대 및 채널별 확보 되는 신호 정보.

Ex vivo 실험은 경희대 김도경교수님 연구실 김나희 선생님과 공동으로 수행하였다.

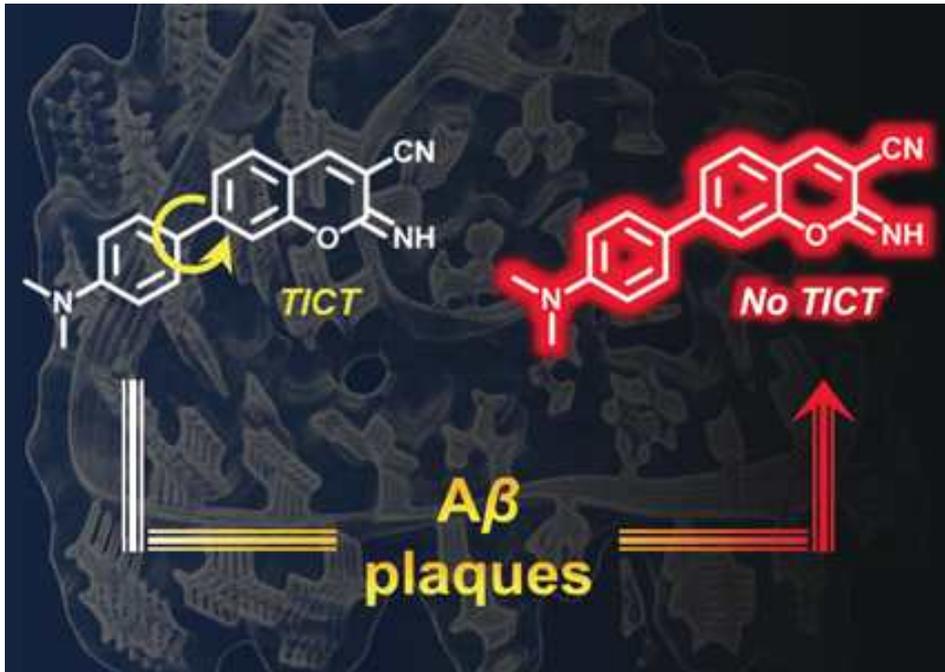


그림 25. Part 2 연구 요약

고찰

Part 1. 질병연관 미세아교세포의 기능변화가 알츠하이머병의 병인기전에 미치는 영향 연구

본 연구에서는 DAM 유전자 중 하나로 알려진 *Ch25h*가 $A\beta$ 에 의해 미세아교세포에서 증가하며, 함께 증가하는 대사산물인 25HC가 직접적으로 미세아교세포의 움직임 및 포식능을 저해시키는 것을 확인하였다. $A\beta$ 및 면역원 자극에 의한 미세아교세포의 *Ch25h* 발현 증가는 AD 환자 뇌 조직, 또 다른 아밀로이드 과발현 모델인 APPPS1 모델 쥐, 그리고 타우 병변을 지니는 PS19 모델 쥐에서도 관찰 되었다는 보고가 있으며, AD 환자 뇌 조직 샘플에서도 25HC가 증가 되어 있다는 것이 기존 보고 된 바 있어 본 연구에서 확인 된 결과들의 신뢰성을 더해준다 (111), (142). 해당 논문에서는 25HC가 염증성 사이토카인의 생성 및 분비를 증가 시킬 수 있으며, 이러한 현상은 APOE3 보다 APOE4 동형단백질을 보유하였을 때 더 두드러진다는 결과를 제시하며 *Ch25h*와 산발성 AD의 가장 위험성 높은 유전인자 *ApoE*의 상관성을 일부 주장하였다 (111), (143). 이를 단서로, $A\beta$ 병인 기전과 밀접하게 연관이 있는 뇌 내 전반적인 콜레스테롤대사 및 APOE 단백질의 동형단백질들과 25HC 사이에 연관성을 규명하는 것이 향후의 숙제 중 하나가 되겠다.

콜레스테롤 대사가 아밀로이드 베타 플라크 생성에 미치는 영향, 그리고 미세아교세포의 활성화에 연루 된 콜레스테롤 대사 변화에 따른 포식기능의 저하에 대한 복합적 작용 AD 병인기전에 상승적으로 악영향을 미칠 것으로 보인다. 산발형 AD 모델에서 알려진 여러 콜레스테롤에 관련 된 위험 요소는 본 연구에 사용한 유전성 AD를 모방하는 아밀로이드 과발현 5XFAD 형질전환 모델에서는 반영이 되지 않았다. 또한 유전적 수준에서 신경세포 APP의 amyloidogenic 경로가 증가해 있는 뇌 내에서 정확히 어떤 콜레스테롤 대사 변화가 일어나게 되는지에 대한 관점으로 증명된 자료는 많지 않다. 따라서 언급한 요소들 중 무엇이 AD 병

인 기전에 더욱 선행되고 주요한 영향을 미칠 것이냐에 대한 것을 본 연구를 통해 명확히 구분하는 것은 한계가 있겠다. 그러나 포식 기능을 수행하는 미세아교세포의 관점에서는 초기 올리고머 형태의 작은 플라크 씨앗을 포식할 때부터 이미 외부적인 추가 콜레스테롤의 유입이 꾸준히 증가하여 그 처리 부담이 점점 증가할 것이라는 것이 명백하다. 이러한 축적은 본 연구에서 관찰한 미세아교세포의 25HC 및 CE 생성 증가 현상으로도 연결되면서 포식 기능의 감소와 염증 증가 악순환의 고리를 강화시킬 것으로 보인다. 25HC 또한 옥시스테롤의 한 종류로서 LXR을 작동시키는 등 뇌 바깥으로의 콜레스테롤 유출을 조장하여 아밀로이드 청소를 증진시킬 가능성에 대해서도 고려해 볼 필요가 있겠다. 그러나 25HC가 뇌 내에서는 워낙 미량으로 존재하는 옥시스테롤이며 (95), AD 뇌에서는 훨씬 더 큰 비중을 차지하는 24HC의 생성이 유의하게 감소해 있는 것으로 알려져 있음을 고려하면 그 효과는 크지 않을 것으로 유추할 수 있겠다 (142). 25HC 증진을 통해 BBB 상피세포의 LXR 증진을 통해 밖으로 청소되는 총합이 24HC 감소로 인한 변화를 뛰어넘는 효과를 나타낼 것은 기대하기는 어려울 것이기 때문이다. 오히려 국지적으로 주변에 있는 신경세포나 교세포에서 필요로 하는 지질 및 콜레스테롤 생합성을 저해시키고, 세포외기질로 지질단백질 분비를 촉진시켜 새로운 플라크 형성 씨앗이 증가하게 하는 등 오히려 악영향을 미치게 할 가능성도 함께 고려해 볼 수 있겠다.

그렇다면 왜 뇌 내에 풍부한 다른 옥시스테롤 말고 유독 *Ch25h*만이 미세아교세포에서 주요하게 조절되는지, 아주 미량으로 존재하는 대사체 임에도 면역 반응을 크게 조절할 수 있도록 설계 되었는지에 대한 궁금증이 수반된다. 가장 큰 원인으로서는 미세아교세포가 내배엽의 난황낭(yolk sac)으로 부터 기원한 선천면역세포인만큼, 외배엽 기원인 뇌 내의 다른 세포들과는 발달 단계부터 근본적으로 내재된 특성이 다르기 때문 이겠다 (144). 그러나 이러한 설계적 차이가 어떤 결과를 초래하는지, 그 조절 방식이 생물학적으로 어떤 합리성이 있는지에 대한 해석까지 해당

연구를 통해 유추하기에는 한계가 있겠다. 다만 본 연구에서 관찰한 결과를 바탕으로, 그동안 정상교세포에 중심으로만 고려되었던 뇌 내 콜레스테롤 대사 및 상호작용에 대한 관점을, 적어도 면역 반응이 수반 될 시에는 미세아교세포 또한 콜레스테롤 대사 및 상호작용 조절에 능동적인 역할을 보유할 수 있음에 대한 관점을 본 연구를 통해 제시하는 바이다.

더 나아가 미세아교세포에서 생성된 25HC가 미세아교세포 뿐 아니라 뇌 내 주변 세포들에 미치는 영향 및 상호 관계를 이해하는 것도 중요할 것으로 보인다 (145). 특히 지질 대사의 큰 축을 담당하는 정상교세포와의 관련성에 대한 연구가 필요할 것으로 보인다. 미세아교세포에서 생성, 분비된 25HC가 정상교세포의 지방 대사를 변화시킬 수 있다고 제시한 2023년 최신 보고 한 가지에 따르면, 미세아교세포로부터 분비된 25HC가 정상교세포가 지방 방울을 과도하게 축적 시키고, 콜레스테롤 재흡수에 결함이 생기는 동시에, APOE 분비를 증진시키는 방향으로 변화시킨다고 한다 (146). 지방 방울이 쌓여 있는 세포들이 대부분 증진된 염증성 표현형을 나타내며, 정상적인 지질 대사 수행의 여력이 남아있지 않고, APOE 분비 증대 자체도 뇌염증 반응 증진과 관련이 깊다는 보고가 있다 (147), (148). 이러한 측면을 고려하면, 본 연구에서 확인한 미세아교세포의 25HC 증가는 미세아교세포뿐만 아니라 주변 정상교세포의 기능 저하에도 영향을 주어 알츠하이머병 병인기전 가속화에 상승적인 영향을 미칠 것으로 생각 된다.

Avasimibe이 기존 AD 모델에서 독성 A β 생성 경로를 억제하여 A β 병변을 완화시킬 수 있다는 것이 다수 보고 되었다는 점 또한 결과 해석에 중요하게 고려해야 하는 부분이다 (137), (149), (150), (151). 따라서 본 연구에서 확인한 4주간의 Avasimibe 투약 실험 결과는 미세아교세포 포식능 회복에 의한 작용과 기존 제시된 A β 생성 억제 기전이 복합적으로 나타난 결과일 수 있을 것으로 보인다. 미세아교세포에 효과적인 유전자 전달이 어렵다는 실험적 한계와 미세아교세포 특이적으로 특

정 유전자 삽입 또는 제거 된 AD 동물 모델을 생산하는 한계로 인하여 미세아교세포 특이적인 *Ch25h* 및 콜레스테롤에스터화 효소 관련 유전적 조절을 통한 규명에는 어려움이 있다. 해당 부분은 Avasimibe의 효과가 25HC에 의해 발생하는 미세아교세포의 여러 기능적 저하를 회복시키는 것이 *in vitro*에서 유의하게 재현되는 것을 통해 확인할 수 있었다. 또한 Avasimibe이 *in vivo* 미세아교세포에도 직접적으로 효과를 미친다는 것을 실시간 이광자 현미경 이미징을 통해 직접적으로 입증 하였다. 따라서 그동안 밝혀진 Avasimibe의 A β 병변 완화 효과에는 오히려 본 연구에서 밝힌 미세아교세포의 기능 회복을 통한 작용이 상당부분 함께 기여했을 것으로 보인다. 이에 Avasimibe이 미세아교세포를 통해 AD 병인 기전 완화에 미칠 수 있는 추가적인 긍정적인 효과를 제시함과 더불어, 그동안 간과 되었던 여러 약물들이 미세아교세포 및 면역세포에도 직접적으로 끼치는 효과들에 대해 검증하는 작업들이 의미가 있을 수 있음을 제시하는 바이다.

막 유동성의 변화가 실질적인 세포의 움직임 및 포식 작용을 조절하는 세부적인 기전까지는 본 연구에서 다루지 못하였다. 25HC에 의해 세포막에 존재하는 지질 뗏목 (lipid raft)의 형성 비율이 변화 되고, 엔도솜 신호 전달에 영향을 미친다는 기존 보고 및 세포막의 접근 가능한 콜레스테롤 구성의 변화가 오토파지 및 리소좀 분해능에도 영향을 끼칠 수 있다는 보고 등을 통해 막 유동성의 저하로 인해 세포 내의 여러 신호 전달에 지연이 발생하고 미세아교세포의 전반적인 주변 상황 감지, A β 포식 및 분해능이 감소 될 것으로 유추할 수 있다 (152), (153). 이러한 연관성과 관련 기전을 더욱 면밀하게 규명하는 것이 향후 미세아교세포의 기능 조절 및 치료제 개발 연구에도 중요한 단서가 될 수 있을 것으로 기대 된다.

25HC를 비롯한 옥시스테롤은 콜레스테롤과는 다르게 BBB 투과성이 좋다는 것이 기존 잘 알려져 있다 (59). 따라서 미세아교세포의 활성화 를 야기하는 뇌 침습적인 시술을 지양하고자 복강 주사로 전체 순환을

통해 주입하였다. 복강 주사를 통한 실험적 디자인으로 인해서 모델 쥐 뇌 내에는 A β 에 의한 신호 전달을 통해 *Ch25h*가 활성화 되어 소포체 막에서 콜레스테롤이 25HC로 합성되고 있는 미세아교세포와, 외부로부터 25HC를 먼저 전달 받게 되는 미세아교세포가 구분 되어 존재하는 시기가 생기게 될 것이다. BBB를 확산으로 통과할 수 있을 정도라고 알려진 대사체인만큼, 어떤 경로를 통하던지 장기적인 측면에서는 25HC에 노출 된 미세아교세포는 콜레스테릴에스터화 효소 활성 증대와 CE 생성 증가로 인한 포식 기능 결함이 발생할 것으로 보인다. 그러나 대사체가 보유한 막 투과성의 자유도 측면에서 고려해볼 때 각 미세아교세포가 처하게 되는 콜레스테롤 대사적 요구에는 차이가 있을 것으로 보인다. 콜레스테롤과 콜레스테릴에스터는 그 이동이 현저히 제한되는 바, 처음에 과도한 콜레스테롤이 있는게 아님에도 면역 반응 신호를 통해 콜레스테롤로부터 25HC를 생성 한 미세아교세포 입장에서는, 세포 내에 존재하는 자유로운 콜레스테롤 양이 필요 이상으로 감소되는 상황에 직면하게 될 가능성이 생길 수 있겠다. 특정 요구 수준 이하로 콜레스테롤의 양이 감지되면 콜레스테롤을 CE로 전환하여 저장하려는 신호 보다는 세포 내로 지질을 더 흡수하기 위한 ApoE 등 지질단백질의 생성 및 분비를 늘리거나, 자체적으로 신생합성하는 SREBP 경로 스위치가 켜지는 것이 선행 될 수 있을 것으로 보인다 (58). 말초 면역의 대식세포에서는 이러한 지질 신생합성 경로가 작동할 때 포식 기능이 수행된다는 보고도 있기 때문에(78), 이를 고려한다면 이러한 과정에서 반응 초기에 일시적으로는 포식 작용이 증진되는 시점도 존재할 수 있을 것으로 여겨진다. 하지만 결국에는 대식세포는 포식 작용을 하면 할수록 외부로부터 많은 지질 및 콜레스테롤 찌꺼기를 부담하게 되기 때문에 결국에는 콜레스테롤의 과부하가 쌓이고, CE 생성이 증진되게 될 것이라고 볼 수 있겠다. 25HC를 먼저 공급 받은 세포 입장에서는, 전체 세포 내에 콜레스테롤 풀 자체가 증대 된 상황에 먼저 노출 되는 것이기 때문에 신생합성 경로는 켜지지 않을 것이고, CE 전환을 통한 저장 및 과도한 콜레스테롤의

처리에 대한 수요가 바로 증진될 가능성이 높을 것으로 보인다. 면역 증진 경로 또한 차이가 있을 수 있겠다. A β 를 먼저 만난 미세아교세포는 Ch25h 증진을 일으키게 되는 STAT 및 NF κ B를 비롯한 수많은 면역 활성화 신호가 크게 활성화 될 것이나, 25HC에 먼저 노출 되는 미세아교세포는 물론 그 양상이 염증성 반응에 가깝긴 하지만 그 정도에 차이가 있을 수 있겠다. 25HC에 먼저 노출되는 미세아교세포는 그 기능적 저하가 좀 더 빨리 나타나서 좀 더 만성적인 표현형으로 먼저 접어들게 되는 것이라고 정리할 수도 있겠다. 이러한 일련의 반응은 한편으로는 적절한 면역 반응의 종료가 이루어지기 위한 자연스러운 현상일 수 있겠으나, 독성 단백질의 축적이 지속되는 만성 질환인 AD라는 관점, 그리고 전체 혈류 및 림프 순환을 통해 세포의 생성과 소멸이 조율되는 말초 대식세포의 상황과는 다르게 뇌 내에서 각 세포의 영역을 지키고 순찰해야하는 미세아교세포의 관점에서는 이러한 조절로 인해 결국에는 기능적 역설에 빠지게 되는 것으로 말할 수 있겠다. 따라서 만성적으로 기능적 저하가 일어나는 면역세포의 대사를 특이적으로 세밀하게 조절할 수 있는 방향을 찾는 것이 새로운 치료 타겟의 후보가 될 수 있을 것으로 기대된다. 바깥으로부터 전달되는 25HC가 특이적으로 작용할 수 있는 막 단백질이나 수송체 등이 있지는 않은지, 구조 및 방향적으로 세포막을 완전하게 통과하지 않고 끼워 들어가거나 옆으로 누워 붙어있는 25HC가 남아 있는 경우는 없을지 등에 대한 것도 (107), 해당 대사체가 미세아교세포의 기능에 영향을 줄 수 있는 요인으로 고려되는 바이다. 현재까지는 지질 대사체에 대해서는 방사선 동위원소를 통한 표지 외에는 형광 표지나 이미징에 대한 실험적 기법이 상당 부분 제한적이지만, 실질적인 25HC의 세포내 위치 정보 및 수송 단계 등에 따라 미세아교세포의 기능이 어떻게 조절되는지 직접적으로 증명될 수 있다면 해당 궁금증들을 해결할 수 있을 것으로 기대 된다.

복강 주사를 통해 주입한 만큼 말초 혈류에서 25HC를 만나 그 기능이 변화하게 되는 말초 대식세포 및 면역 세포가 해당 모델에 영향을 끼쳤

을 가능성 또한 배제할 수 없을 것이다. 정확하게 어떤 종류의 세포에서 어떠한 변화가 일어났는지에 대한 것까지는 본 연구에서 다루지 못했으나 기존 문헌을 통해 미루어 볼 때 적어도 상피세포의 자유 콜레스테롤 비중이 낮아지는 효과와 B 세포 및 항체 생성에도 어느 정도 영향이 있었을 것으로 유추할 수 있겠다. 문헌에 따르면 감염증에 의해 대식세포에서 25HC 생성이 증가했을 때 분비된 25HC는 상피세포에 전달되어 상피세포의 자유 콜레스테롤을 CE로 변환하여 격리시킨다는 기전이 알려져 있다 (104), (105). B 세포의 경우 25HC로 인해 증식과 IgA로의 클래스 전환이 억제되거나 2차 림프 기관으로 이동하게 되는 시그널로 작용할 수 있다는 작용 등이 알려져 있어 항체 생성 수준에 영향을 미쳤을 것으로 예상 된다 (154), (155). 다만 이러한 변화가 뇌 내 AD 병인 기전에 영향을 미칠 수 있었는지에 대해서는 추후 말초 면역계와 뇌 내의 상호작용에 대한 연구와 이해가 확장 되었을 때 비로소 논의할 수 있을 것으로 보인다. 같은 맥락에서, 25HC가 BBB를 잘 통과할 수 있다는 것은 다른 병원성 미생물이나 바이러스에 감염 이력을 통해 증대된 체내 25HC가 뇌 내 미세아교세포에도 영향을 끼칠 가능성이 있을 수 있음을 시사한다. 실제로 Corona virus, Zika virus 등 수많은 바이러스 감염에 의해 말초 면역계의 대식세포에서 *Ch25h* 발현 증가 및 25HC 생성이 증대됨이 규명된 바 있다 (101), (103), (156). 전체 순환을 통해 뇌 내에 전달되는 25HC의 정량적 규명과 더불어 여러 감염 이력에 따른 인지 기능 저하에 25HC의 역할에 대한 후속 연구 또한 의미가 있을 것으로 보인다. 더 나아가 활성화 T 세포 등 여러 가지 말초 면역계의 개입이 AD 병인 기전에 영향을 미칠 수 있음이 점차 제시되고 있다 (157), (158). 이러한 관점에서 25HC와 같은 생리활성대사체가 다양한 말초면역 세포 및 미세아교세포에 어떤 작용을 일으킬 수 있을지에 대한 궁금증도 향후 AD 병인 기전의 이해와 새로운 치료 표적 탐구에 의미 있는 연구가 될 수 있을 것으로 기대 된다 (159), (160).¹⁾

1) Part 1 연구 결과는 현재 논문 투고를 준비 중에 있다.

Part 2. 개선된 이광자현미경 아밀로이드 베타 플라크 탐침 개발 연구

본 연구를 통해 개발한 IRI-1의 경우 *ex vivo* 및 *in vivo* 이광자현미경 이미징에 사용한 920 nm 파장대의 여기광선을 사용하였다. 그러나 IRI-1의 이광자여기능을 고려할 때, 1000 nm 이상의 더 긴 근적외선 파장대의 광원을 조사해 줄 경우 IRI-1은 더욱 개선된 배경 신호 감소 효과를 보일 것으로 짐작된다. 본 연구에서는 사용한 레이저시스템 조사 광원 파장대의 제한이 있어서 보다 긴 근적외선 파장대를 활용한 *in vivo* 영상화를 검증해 보지 못 하였다는 아쉬움이 있다. 그러나 보다 고사양의 다광자 레이저 시스템이 점차 보급되고 있는바, 가용하다면 더 높은 파장대의 광원을 활용하여 실험에 적용할 것을 제안하는 바이다.

신규 개발한 IRI-1 탐침은 아밀로이드 병리 동물 모델 활용 연구에 향후 적극 도입 될 수 있을 것으로 기대 된다. 일례로 성장교세포 또는 미세아교세포 특이적으로 초록 및 파란색 계열 형광이 표지된 아밀로이드 병리를 보유한 쥐 모델에 IRI-1를 주입하여 활용이 가능하다. 이 경우, 교세포들이 어떻게 아밀로이드 플라크와 접촉하고 변화되는지 또는 아밀로이드 플라크 형성에 어떻게 관여하는지 등의 실시간, 장기간 영상화 정보를 확보할 수 있다. 우선 IRI-1의 활용은 기존 BBB 투과성 제한으로 인해 *ex vivo*에 제한적으로 사용 가능했던 ThT 등의 아밀로이드 플라크 전용 탐침을 대체하여 *in vivo* 이광자 현미경 이미징에 적용 가능하다는 장점이 있다. 또한 기존에 *in vivo* 이광자 현미경 촬영에 많이 활용되고 있는 탐침 MeO-X04가 푸른 형광 발색을 보이는 것에 비교하여 IRI-1은 붉은 형광쪽 발색을 나타내기 때문에, 배경 신호 감소뿐만 아니라 발광 세기 및 촬영 깊이에서도 비교 우위를 점할 수 있다는 장점이 있다. *In vivo* 이광자 현미경 촬영의 적용에서 더 나아가, IRI-1 탐침을 주입한 모델 쥐의 사후 조직을 활용하는 실험에도 적극 활용 가능할

것으로 보인다. 우선 IRI-1 탐침의 PFA 고정 이후 발색능 및 필요한 형광 발색 조합에 대한 검증 등 실험 방법적 최적화 선행 이후에, 촬영을 마친 쥐의 사후 뇌 조직을 분리 한 후 IHC 및 ISH 기법을 함께 적용하여 형광 현미경 이미징을 통해 IRI-1 표지 근처 또는 보유 세포의 표현형을 추가 검증하는데 활용 방안을 고려해볼 수 있겠다. 또는 뇌 세포를 분리하여 후고정을 하지 않고 FACS 기법을 적용을 기반으로 IRI-1 표지 세포를 분리하는 활용 방안도 있다. 이러한 세포 분리를 기반으로 여러 전사체 및 대사체의 동정 및 분석 등의 후속 연구에도 적극 활용 할 수 있을 것으로 기대된다.

분자 내 회전 고리의 유무에 따른 형광물질의 발광 효율 변화 및 그에 대한 주변 매질의 기계적 특징에 의존하는 특성을 기반으로 한 형광탐침 개발 시도는 생물-형광 이미징 분야에서 지속적으로 시도 되어 온 바 있다. 특히 점성차이나 극성차이가 존재하는 표적이나 세포막 및 세포 내 소기관 특이적인 탐침 개발이나, BODIPY와 같이 지질 구조를 탐지하는 염료 개발 및 분야 등에 도입 된 물질들이 존재한다 (161), (162), (163). 이론상으로는 단일 광자 또는 다광자 여기 기반 형광체 모두에서 분자 내 회전 시스템을 도입함으로써 꼬인 분자 내 전하 상태 기반의-탈여기 현상이 잘 일어나게 되면 형광체 자체의 발광으로 인해 발생하는 필연적인 배경 신호를 획기적으로 감소시킬 수 있으며 형광체의 발광 커짐과 꺼짐을 조절 할 수 있다. 본 연구에서는 이를 기반으로 새로운 이광자 여기능 탐침 개발에서도 이를 기반한 탐침 개선이 성공적으로 가능하다는 것을 선보인바, 추후 이러한 전략이 앞으로 아밀로이드 플라크 뿐 아니라 보다 다양한 이광자 여기능을 보유한 생체 분자 영상 분야의 물질 개발에 응용이 될 수 있을 것으로 기대 된다.

이광자 현미경 촬영 자체는 임상적으로는 적용하기에 한계가 있는 기법이기에 때문에 개발한 IRI-1이 임상적 진단이나 예측의 범용성은 부재하다는 한계가 존재한다. 그러나 앞서 언급한 것처럼, 보다 개선 된 아밀로이드 플라크 병변 실시간 촬영 및 활용이 가능해진만큼 뇌 내 여러 세포

들과 함께 실시간 촬영에 응용하는 등의 전임상 모델 연구에서는 적극적으로 활용하며 기전 연구를 수행 할 수 있을 것으로 보인다. 향후 아직까지 실질적으로 활용 가능한 대안이 없는 타우 병변에 대한 것이나, 세포 내의 미토콘드리아를 표지 할 수 있는 이광자현미경의 염료 및 탐침 개발이 이루어진다면 복합적인 AD 병인 및 치료 기전에 대한 연구에도 큰 도움이 될 것으로 기대 된다.²⁾

2) Part 2 연구 결과는 *Angew Chem Int Ed Engl.* 2019;58(17):5648-52. DOI: 10.1002/anie.201900549에 발표되었다.

결론

본 연구에서는 질병연관 미세아교세포에서 나타나는 특징 및 기능변화가 아밀로이드 병변에 미치는 영향 연구와 개선된 A β 탐침 개발에 관한 다음 두 가지 목표를 설정하였다. 이를 통해 아밀로이드에 의해 변화하는 미세아교세포의 기능과, 주변 환경적 요인과 신경염증성 요인이 아밀로이드 병변에 미치는 영향에 대한 기전 및 조절 가능성을 제시하고 아밀로이드 병변에 대한 보다 명확한 뇌 내 병리 현상의 촬영 및 관찰 가능성을 제공하는데 기여하고자 하였다 (그림 26).

질병연관 미세아교세포의 기능변화가 알츠하이머병의 병인기전에 미치는 영향 연구에서는 A β 에 의해 실제 미세아교세포 *Ch25h* 발현 및 25HC 생성이 증가됨을 *in vitro* 및 *ex vivo* 수준에서 mRNA, 단백질, 대사체 관련 다양한 생화학적 실험을 통해 검증하였다. A β 에 의해 과도하게 생성되는 25HC에 노출된 미세아교세포는 주요 기능인 주변 환경에 대한 반응성이 감소되는 것을 실시간 생체내 이광자 현미경 촬영을 통해 확인하였다. 25HC는 미세아교세포의 포식능 또한 저해 시키는 것으로 판명되었다. 이러한 움직임 및 포식능의 저하는 미세아교세포가 AD 뇌 내의 독성 단백질을 청소 및 분해 하는 것에 악영향을 미칠 것으로 예상된다.

미세아교세포의 반응성 및 포식능 저하는 25HC에 의한 미세아교세포의 콜레스테롤에스터 증가 기전에 의해 매개 되는 것으로 나타났다. A β 및 25HC에 의해 미세아교세포의 콜레스테롤에스터화 효소의 발현의 증가 더불어 그 대사 산물인 CE의 증대가 관찰 되었다. 증가된 CE는 세포막의 비유동성 분획을 증가시키면서 세포막 유동성을 감소시키는 효과를 나타냄을 FRAP 실험을 통해 규명하였다. 관찰된 일련의 기능저하는 콜레스테롤에스터화 억제제인 avasimibe 처리에 의해 회복 가능한 것으로 확인 되었다. 해당 기전이 실제 AD 병인 기전에 영향을 주는지 파악하고자 어린 5XFAD_TG 마우스에 25HC를 장기투약 하는 실험을

수행하였다. 그 결과 25HC 의해 해당 쥐의 A β 병변의 악화가 가속화됨을 확인하였다. 동일한 구성에서 25HC와 콜레스테롤에스터화 억제제 avasimibe를 함께 처리해 준 군에서는 25HC에 의한 증상 악화가 방지되는 것으로 나타났다.

아밀로이드 병변에 대한 보다 명확한 뇌 내 병리 현상의 촬영 및 관찰을 위해, 분자 내 회전 시스템을 도입하여 A β 를 탐지하는 신규 이광자형광 탐침을 개발하였다. 신규 개발된 IRI-1은 구조적으로 유사하지만 분자 내 회전 고리가 없는 기존의 탐침보다 현저한 배경 신호의 감소를 보이는 것을 *in vitro*, *ex vivo* 및 *in vivo* 수준의 촬영으로 검증하였다. 특히 여러 복잡한 생물학적인 조직 기반에서도 해당 전략이 통하였다는 것은 앞으로 이러한 전략을 다른 표적을 탐지하는 이광자형미경용 염료 개발에도 도입하여 연구에 활용 가능한 다양한 탐침을 개발하는데 도움이 될 것으로 기대 된다. 개발한 IRI-1은 좋은 BBB 투과성을 나타내며, A β 병변에 대한 높은 선택적 발광 및 민감도를 보였다.

본 연구를 통해 AD의 A β 병인기전이 미세아교세포의 대사적 특성 및 기능과 밀접한 연관이 있음을 제시하였다. 그 중에서도 콜레스테롤 대사체 중 하나인 25HC가 직접적으로 미세아교세포의 기능을 저하시킬 수 있으며, 이를 조절 하는 것을 통해 병리적 증상을 완화 시킬 수 있는 것을 제시하였다. 또한 관련 된 A β 병인기전을 보다 명확하게 촬영하고 연구에 활용할 수 있는 신규 물질을 개발하여 향후 연구에 기여하였다.

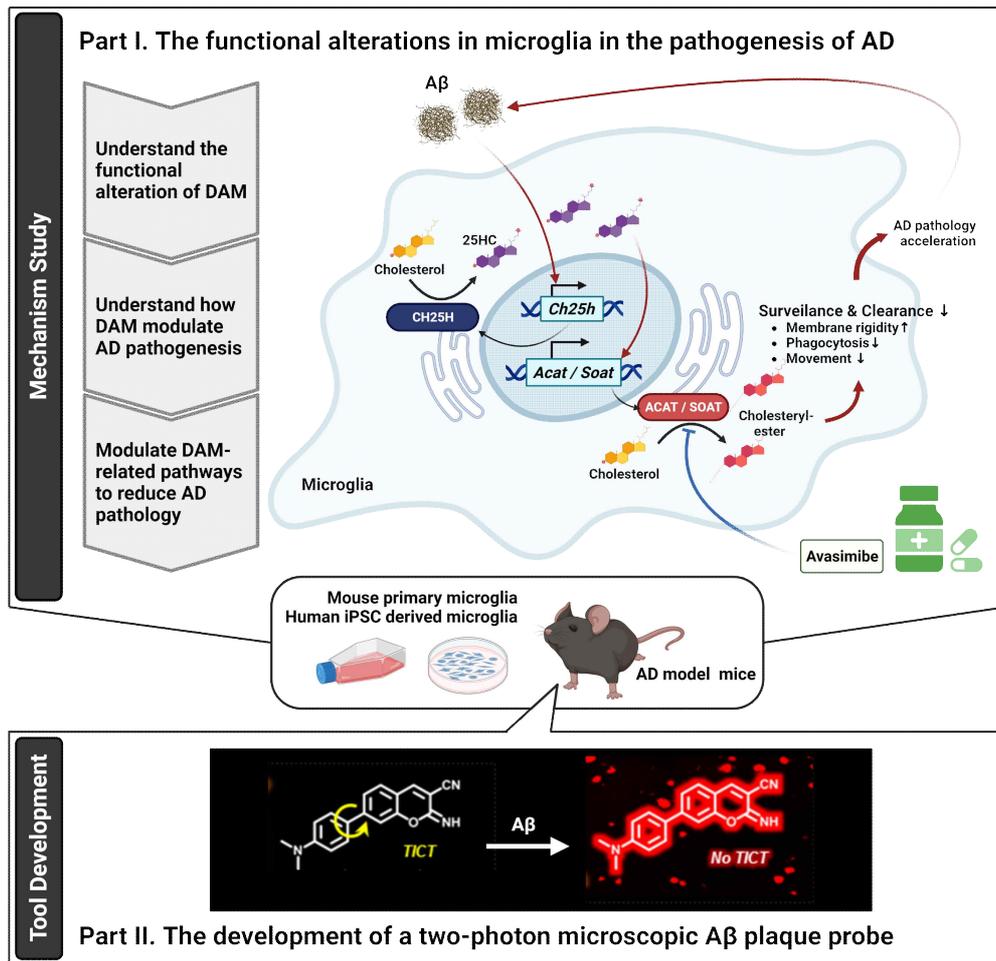


그림 26. 전체 연구 요약

참 고 문 헌

1. 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. 2023;n/a(n/a).
2. McKhann GM, Knopman DS, Chertkow H, Hyman BT, Jack CR, Jr., Kawas CH, et al. The diagnosis of dementia due to Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*. 2011;7(3):263-9.
3. Anand R, Gill KD, Mahdi AA. Therapeutics of Alzheimer's disease: Past, present and future. *Neuropharmacology*. 2014;76 Pt A:27-50.
4. Braak H, Braak E. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*. 1991;82(4):239-59.
5. Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL. Alzheimer's disease. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15056.
6. Roberson ED, Mucke L. 100 Years and Counting: Prospects for Defeating Alzheimer's Disease. *Science*. 2006;314(5800):781-4.
7. Long JM, Holtzman DM. Alzheimer Disease: An Update on Pathobiology and Treatment Strategies. *Cell*. 2019;179(2):312-39.
8. Thinakaran G, Koo EH. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*. 2008;283(44):29615-9.
9. Finkbeiner S, Glockshuber R. Amyloid-beta aggregation. *Neurodegener Dis*. 2007;4(1):13-27.
10. Hardy J, Allsop D. Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci*. 1991;12(10):383-8.
11. Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*. 1992;256(5054):184-5.
12. Wang Y, Mandelkow E. Tau in physiology and pathology. *Nat*

Rev Neurosci. 2016;17(1):5–21.

13. Jack CR, Jr., Knopman DS, Jagust WJ, Shaw LM, Aisen PS, Weiner MW, et al. Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade. *Lancet Neurol.* 2010;9(1):119–28.
14. Bischof GN, Endepols H, van Eimeren T, Drzezga A. Tau-imaging in neurodegeneration. *Methods.* 2017;130:114–23.
15. Herrup K. The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci.* 2015;18(6):794–9.
16. Kuller LH, Lopez OL. ENGAGE and EMERGE: Truth and consequences? *Alzheimer's & Dementia.* 2021;17(4):692–5.
17. van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, Bateman RJ, Chen C, Gee M, et al. Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine.* 2022;388(1):9–21.
18. Lannfelt L, Relkin NR, Siemers ER. Amyloid- β -directed immunotherapy for Alzheimer's disease. *J Intern Med.* 2014;275(3):284–95.
19. Knopman DS, Jones DT, Greicius MD. Failure to demonstrate efficacy of aducanumab: An analysis of the EMERGE and ENGAGE trials as reported by Biogen, December 2019. *Alzheimers Dement.* 2021;17(4):696–701.
20. Salloway S, Chalkias S, Barkhof F, Burkett P, Barakos J, Purcell D, et al. Amyloid-Related Imaging Abnormalities in 2 Phase 3 Studies Evaluating Aducanumab in Patients With Early Alzheimer Disease. *JAMA Neurol.* 2022;79(1):13–21.
21. Alves F, Kallinowski P, Ayton S. Accelerated Brain Volume Loss Caused by Anti- β -Amyloid Drugs: A Systematic Review and Meta-analysis. *Neurology.* 2023.
22. Small SA, Duff K. Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease: a dual pathway hypothesis. *Neuron.* 2008;60(4):534–42.

23. Cerasuolo M, Papa M, Colangelo AM, Rizzo MR. Alzheimer's Disease from the Amyloidogenic Theory to the Puzzling Crossroads between Vascular, Metabolic and Energetic Maladaptive Plasticity. *Biomedicines*. 2023;11(3).
24. Querfurth HW, LaFerla FM. Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine*. 2010;362(4):329-44.
25. Heneka MT, Carson MJ, El Khoury J, Landreth GE, Brosseron F, Feinstein DL, et al. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *Lancet Neurol*. 2015;14(4):388-405.
26. Leng F, Edison P. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nature Reviews Neurology*. 2021;17(3):157-72.
27. Efthymiou AG, Goate AM. Late onset Alzheimer's disease genetics implicates microglial pathways in disease risk. *Molecular Neurodegeneration*. 2017;12(1):43.
28. Bernier L-P, York EM, Kamyabi A, Choi HB, Weilinger NL, MacVicar BA. Microglial metabolic flexibility supports immune surveillance of the brain parenchyma. *Nature Communications*. 2020;11(1):1559.
29. Stence N, Waite M, Dailey ME. Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia*. 2001;33(3):256-66.
30. Plescher M, Seifert G, Hansen JN, Bedner P, Steinhäuser C, Halle A. Plaque-dependent morphological and electrophysiological heterogeneity of microglia in an Alzheimer's disease mouse model. *Glia*. 2018;66(7):1464-80.
31. Mishra A, Kim HJ, Shin AH, Thayer SA. Synapse loss induced by interleukin-1 β requires pre- and post-synaptic mechanisms. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2012;7(3):571-8.
32. Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated

apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell*. 2003;114(2):181–90.

33. Hong S, Beja-Glasser VF, Nfonoyim BM, Frouin A, Li S, Ramakrishnan S, et al. Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science*. 2016;352(6286):712–6.

34. Onuska KM. The Dual Role of Microglia in the Progression of Alzheimer's Disease. *J Neurosci*. 2020;40(8):1608–10.

35. Chen Y, Colonna M. Two-faced behavior of microglia in Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*. 2022;25(1):3–4.

36. Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, Ma D. Neuroinflammation: the role and consequences. *Neurosci Res*. 2014;79:1–12.

37. Keren-Shaul H, Spinrad A, Weiner A, Matcovitch-Natan O, Dvir-Szternfeld R, Ulland TK, et al. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell*. 2017;169(7):1276–90.e17.

38. Olah M, Menon V, Habib N, Taga MF, Ma Y, Yung CJ, et al. Single cell RNA sequencing of human microglia uncovers a subset associated with Alzheimer's disease. *Nature Communications*. 2020;11(1):6129.

39. Provenzano F, Pérez MJ, Deleidi M. Redefining Microglial Identity in Health and Disease at Single-Cell Resolution. *Trends in Molecular Medicine*. 2021;27(1):47–59.

40. Lopes KdP, Snijders GJL, Humphrey J, Allan A, Sneeboer MAM, Navarro E, et al. Genetic analysis of the human microglial transcriptome across brain regions, aging and disease pathologies. *Nature Genetics*. 2022;54(1):4–17.

41. Deczkowska A, Keren-Shaul H, Weiner A, Colonna M, Schwartz M, Amit I. Disease-Associated Microglia: A Universal

- Immune Sensor of Neurodegeneration. *Cell*. 2018;173(5):1073–81.
42. Ofengeim D, Mazzitelli S, Ito Y, DeWitt JP, Mifflin L, Zou C, et al. RIPK1 mediates a disease-associated microglial response in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2017;114(41):E8788–E97.
 43. Ulland TK, Colonna M. TREM2 – a key player in microglial biology and Alzheimer disease. *Nature Reviews Neurology*. 2018;14(11):667–75.
 44. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science*. 1993;261(5123):921–3.
 45. Mahley RW. Apolipoprotein E: Cholesterol Transport Protein with Expanding Role in Cell Biology. *Science*. 1988;240(4852):622–30.
 46. Yamazaki Y, Painter MM, Bu G, Kanekiyo T. Apolipoprotein E as a Therapeutic Target in Alzheimer's Disease: A Review of Basic Research and Clinical Evidence. *CNS Drugs*. 2016;30(9):773–89.
 47. Sando SB, Melquist S, Cannon A, Hutton ML, Sletvold O, Saltvedt I, et al. APOE epsilon 4 lowers age at onset and is a high risk factor for Alzheimer's disease; a case control study from central Norway. *BMC Neurol*. 2008;8:9.
 48. Anstey KJ, Ashby-Mitchell K, Peters R. Updating the Evidence on the Association between Serum Cholesterol and Risk of Late-Life Dementia: Review and Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis*. 2017;56(1):215–28.
 49. Stampfer MJ. Cardiovascular disease and Alzheimer's disease: common links. *J Intern Med*. 2006;260(3):211–23.
 50. Whitmer RA, Gunderson EP, Barrett-Connor E, Quesenberry CP, Jr., Yaffe K. Obesity in middle age and future risk of dementia: a 27 year longitudinal population based study. *Bmj*.

2005;330(7504):1360.

51. Flores-Cordero JA, Pérez-Pérez A, Jiménez-Cortegana C, Alba G, Flores-Barragán A, Sánchez-Margalet V. Obesity as a Risk Factor for Dementia and Alzheimer's Disease: The Role of Leptin. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9).
52. Chew H, Solomon VA, Fonteh AN. Involvement of Lipids in Alzheimer's Disease Pathology and Potential Therapies. *Frontiers in Physiology.* 2020;11.
53. Dietschy JM, Turley SD. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *J Lipid Res.* 2004;45(8):1375-97.
54. Björkhem I, Meaney S. Brain Cholesterol: Long Secret Life Behind a Barrier. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 2004;24(5):806-15.
55. Nieweg K, Schaller H, Pfrieger FW. Marked differences in cholesterol synthesis between neurons and glial cells from postnatal rats. *Journal of Neurochemistry.* 2009;109(1):125-34.
56. Fünfschilling U, Saher G, Xiao L, Möbius W, Nave K-A. Survival of adult neurons lacking cholesterol synthesis in vivo. *BMC Neuroscience.* 2007;8(1):1.
57. Xie C, Lund EG, Turley SD, Russell DW, Dietschy JM. Quantitation of two pathways for cholesterol excretion from the brain in normal mice and mice with neurodegeneration. *Journal of Lipid Research.* 2003;44(9):1780-9.
58. Spann NJ, Glass CK. Sterols and oxysterols in immune cell function. *Nature Immunology.* 2013;14(9):893-900.
59. Gamba P, Testa G, Gargiulo S, Staurenghi E, Poli G, Leonarduzzi G. Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience.*

2015;7.

60. Panchal M, Loeper J, Cossec J-C, Perruchini C, Lazar A, Pompon D, et al. Enrichment of cholesterol in microdissected Alzheimer's disease senile plaques as assessed by mass spectrometry. *Journal of Lipid Research*. 2010;51(3):598-605.
61. Qiu L, Lewis A, Como J, Vaughn MW, Huang J, Somerharju P, et al. Cholesterol modulates the interaction of beta-amyloid peptide with lipid bilayers. *Biophys J*. 2009;96(10):4299-307.
62. Schneider A, Schulz-Schaeffer W, Hartmann T, Schulz JB, Simons M. Cholesterol depletion reduces aggregation of amyloid-beta peptide in hippocampal neurons. *Neurobiol Dis*. 2006;23(3):573-7.
63. Xiong H, Callaghan D, Jones A, Walker DG, Lue LF, Beach TG, et al. Cholesterol retention in Alzheimer's brain is responsible for high beta- and gamma-secretase activities and A β production. *Neurobiol Dis*. 2008;29(3):422-37.
64. Grimm MO, Grimm HS, Tomic I, Beyreuther K, Hartmann T, Bergmann C. Independent inhibition of Alzheimer disease beta- and gamma-secretase cleavage by lowered cholesterol levels. *J Biol Chem*. 2008;283(17):11302-11.
65. Marquer C, Laine J, Dauphinot L, Hanbouch L, Lemercier-Neuillet C, Pierrot N, et al. Increasing membrane cholesterol of neurons in culture recapitulates Alzheimer's disease early phenotypes. *Mol Neurodegener*. 2014;9:60.
66. Pfrieger FW, Ungerer N. Cholesterol metabolism in neurons and astrocytes. *Prog Lipid Res*. 2011;50(4):357-71.
67. Thelen KM, Falkai P, Bayer TA, Lütjohann D. Cholesterol synthesis rate in human hippocampus declines with aging. *Neurosci Lett*. 2006;403(1-2):15-9.
68. Egawa J, Pearn ML, Lemkuil BP, Patel PM, Head BP. Membrane lipid rafts and neurobiology: age-related changes in

membrane lipids and loss of neuronal function. *J Physiol.* 2016;594(16):4565–79.

69. Lazar AN, Bich C, Panchal M, Desbenoit N, Petit VW, Touboul D, et al. Time-of-flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS) imaging reveals cholesterol overload in the cerebral cortex of Alzheimer disease patients. *Acta Neuropathol.* 2013;125(1):133–44.

70. Söderberg M, Edlund C, Kristensson K, Dallner G. Lipid compositions of different regions of the human brain during aging. *J Neurochem.* 1990;54(2):415–23.

71. Papassotiropoulos A, Lütjohann D, Bagli M, Locatelli S, Jessen F, Buschfort R, et al. 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia. *Journal of Psychiatric Research.* 2002;36(1):27–32.

72. Heverin M, Bogdanovic N, Lütjohann D, Bayer T, Pikuleva I, Bretillon L, et al. Changes in the levels of cerebral and extracerebral sterols in the brain of patients with Alzheimer's disease. *J Lipid Res.* 2004;45(1):186–93.

73. Pikuleva IA. Cytochrome P450s and cholesterol homeostasis. *Pharmacol Ther.* 2006;112(3):761–73.

74. Callaghan MF, Freund P, Draganski B, Anderson E, Cappelletti M, Chowdhury R, et al. Widespread age-related differences in the human brain microstructure revealed by quantitative magnetic resonance imaging. *Neurobiol Aging.* 2014;35(8):1862–72.

75. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, Bennett ML, Scholze AR, O'Keefe S, et al. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci.* 2014;34(36):11929–47.

76. Loving BA, Bruce KD. Lipid and Lipoprotein Metabolism in Microglia. *Frontiers in Physiology.* 2020;11.

77. Makowski L, Chaib M, Rathmell JC. Immunometabolism: From basic mechanisms to translation. *Immunol Rev.* 2020;295(1):5-14.
78. Yan J, Horng T. Lipid Metabolism in Regulation of Macrophage Functions. *Trends in Cell Biology.* 2020;30(12):979-89.
79. Lee S, Devanney NA, Golden LR, Smith CT, Schwartz JL, Walsh AE, et al. APOE modulates microglial immunometabolism in response to age, amyloid pathology, and inflammatory challenge. *Cell Reports.* 2023;42(3):112196.
80. Krasemann S, Madore C, Cialic R, Baufeld C, Calcagno N, El Fatimy R, et al. The TREM2-APOE Pathway Drives the Transcriptional Phenotype of Dysfunctional Microglia in Neurodegenerative Diseases. *Immunity.* 2017;47(3):566-81.e9.
81. Mai Z, Wei W, Yu H, Chen Y, Wang Y, Ding Y. Molecular recognition of the interaction between ApoE and the TREM2 protein. *Transl Neurosci.* 2022;13(1):93-103.
82. Nguyen AT, Wang K, Hu G, Wang X, Miao Z, Azevedo JA, et al. APOE and TREM2 regulate amyloid-responsive microglia in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* 2020;140(4):477-93.
83. Kloske CM, Wilcock DM. The Important Interface Between Apolipoprotein E and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Front Immunol.* 2020;11:754.
84. Cantuti-Castelvetri L, Fitzner D, Bosch-Queralt M, Weil MT, Su M, Sen P, et al. Defective cholesterol clearance limits remyelination in the aged central nervous system. *Science.* 2018;359(6376):684-8.
85. Shimabukuro MK, Langhi LGP, Cordeiro I, Brito JM, Batista CMdC, Mattson MP, et al. Lipid-laden cells differentially distributed in the aging brain are functionally active and correspond to distinct phenotypes. *Scientific Reports.* 2016;6(1):23795.
86. Marschallinger J, Iram T, Zardeneta M, Lee SE, Lehallier B,

Haney MS, et al. Lipid-droplet-accumulating microglia represent a dysfunctional and proinflammatory state in the aging brain. *Nat Neurosci.* 2020;23(2):194-208.

87. Farmer BC, Walsh AE, Kluemper JC, Johnson LA. Lipid Droplets in Neurodegenerative Disorders. *Frontiers in Neuroscience.* 2020;14.

88. Kunkle BW, Grenier-Boley B, Sims R, Bis JC, Damotte V, Naj AC, et al. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing. *Nature Genetics.* 2019;51(3):414-30.

89. Jansen IE, Savage JE, Watanabe K, Bryois J, Williams DM, Steinberg S, et al. Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. *Nature Genetics.* 2019;51(3):404-13.

90. Riemenschneider M, Mahmoodzadeh S, Eisele T, Klopp N, Schwarz S, Wagenpfeil S, et al. Association analysis of genes involved in cholesterol metabolism located within the linkage region on chromosome 10 and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2004;25(10):1305-8.

91. Papassotiropoulos A, Lambert JC, Wavrant-De Vrièze F, Wollmer MA, von der Kammer H, Streffer JR, et al. Cholesterol 25-hydroxylase on chromosome 10q is a susceptibility gene for sporadic Alzheimer's disease. *Neurodegener Dis.* 2005;2(5):233-41.

92. Simon A. Cholesterol Metabolism and Immunity. *New England Journal of Medicine.* 2014;371(20):1933-5.

93. Saint-Pol J, Gosselet F. Oxysterols and the NeuroVascular Unit (NVU): A far true love with bright and dark sides. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology.* 2019;191:105368.

94. Gamba P, Staurengi E, Testa G, Giannelli S, Sottero B, Leonarduzzi G. A Crosstalk Between Brain Cholesterol Oxidation and

Glucose Metabolism in Alzheimer's Disease. *Frontiers in Neuroscience*. 2019;13.

95. Yutuc E, Angelini R, Baumert M, Mast N, Pikuleva I, Newton J, et al. Localization of sterols and oxysterols in mouse brain reveals distinct spatial cholesterol metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(11):5749–60.

96. Du X, Pham YH, Brown AJ. Effects of 25-hydroxycholesterol on cholesterol esterification and sterol regulatory element-binding protein processing are dissociable: implications for cholesterol movement to the regulatory pool in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem*. 2004;279(45):47010–6.

97. Diczfalusy U, Olofsson KE, Carlsson AM, Gong M, Golenbock DT, Rooyackers O, et al. Marked upregulation of cholesterol 25-hydroxylase expression by lipopolysaccharide. *J Lipid Res*. 2009;50(11):2258–64.

98. Park K, Scott AL. Cholesterol 25-hydroxylase production by dendritic cells and macrophages is regulated by type I interferons. *J Leukoc Biol*. 2010;88(6):1081–7.

99. Blanc M, Hsieh WY, Robertson KA, Kropp KA, Forster T, Shui G, et al. The transcription factor STAT-1 couples macrophage synthesis of 25-hydroxycholesterol to the interferon antiviral response. *Immunity*. 2013;38(1):106–18.

100. Zhao J, Chen J, Li M, Chen M, Sun C. Multifaceted Functions of CH25H and 25HC to Modulate the Lipid Metabolism, Immune Responses, and Broadly Antiviral Activities. *Viruses* [Internet]. 2020; 12(7).

101. Asano T, Wakabayashi T, Kondo Y, Okada K, Yamamuro D, Koga Y, et al. Serum 25-hydroxycholesterol levels are increased in patients with coronavirus disease 2019. *Journal of Clinical Lipidology*. 2023;17(1):78–86.

102. Gold ES, Diercks AH, Podolsky I, Podyminogin RL, Askovich PS, Treuting PM, et al. 25-Hydroxycholesterol acts as an amplifier of inflammatory signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2014;111(29):10666-71.
103. Liu S-Y, Aliyari R, Chikere K, Li G, Marsden Matthew D, Smith Jennifer K, et al. Interferon-Inducible Cholesterol-25-Hydroxylase Broadly Inhibits Viral Entry by Production of 25-Hydroxycholesterol. *Immunity*. 2013;38(1):92-105.
104. Abrams ME, Johnson KA, Perelman SS, Zhang L-s, Endapally S, Mar KB, et al. Oxysterols provide innate immunity to bacterial infection by mobilizing cell surface accessible cholesterol. *Nature Microbiology*. 2020;5(7):929-42.
105. Zhou QD, Chi X, Lee MS, Hsieh WY, Mkrtchyan JJ, Feng A-C, et al. Interferon-mediated reprogramming of membrane cholesterol to evade bacterial toxins. *Nature Immunology*. 2020;21(7):746-55.
106. Russo L, Muir L, Geletka L, Delproposto J, Baker N, Flesher C, et al. Cholesterol 25-hydroxylase (CH25H) as a promoter of adipose tissue inflammation in obesity and diabetes. *Molecular Metabolism*. 2020;39:100983.
107. Bielska AA, Olsen BN, Gale SE, Mydock-McGrane L, Krishnan K, Baker NA, et al. Side-chain oxysterols modulate cholesterol accessibility through membrane remodeling. *Biochemistry*. 2014;53(18):3042-51.
108. Zang R, Case JB, Yutuc E, Ma X, Shen S, Gomez Castro MF, et al. Cholesterol 25-hydroxylase suppresses SARS-CoV-2 replication by blocking membrane fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2020;117(50):32105-13.
109. Guarda G, Braun M, Staehli F, Tardivel A, Mattmann C, Förster I, et al. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and

- inflammasome activation. *Immunity*. 2011;34(2):213-23.
110. Cyster JG, Dang EV, Reboldi A, Yi T. 25-Hydroxycholesterols in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. 2014;14(11):731-43.
111. Wong MY, Lewis M, Doherty JJ, Shi Y, Cashikar AG, Amelianchik A, et al. 25-Hydroxycholesterol amplifies microglial IL-1 β production in an apoE isoform-dependent manner. *Journal of Neuroinflammation*. 2020;17(1):192.
112. Pokharel SM, Shil NK, Gc JB, Colburn ZT, Tsai SY, Segovia JA, et al. Integrin activation by the lipid molecule 25-hydroxycholesterol induces a proinflammatory response. *Nat Commun*. 2019;10(1):1482.
113. Palozza P, Simone R, Catalano A, Monego G, Barini A, Mele MC, et al. Lycopene prevention of oxysterol-induced proinflammatory cytokine cascade in human macrophages: inhibition of NF- κ B nuclear binding and increase in PPAR γ expression. *J Nutr Biochem*. 2011;22(3):259-68.
114. Dang EV, McDonald JG, Russell DW, Cyster JG. Oxysterol Restraint of Cholesterol Synthesis Prevents AIM2 Inflammasome Activation. *Cell*. 2017;171(5):1057-71.e11.
115. Oakley H, Cole SL, Logan S, Maus E, Shao P, Craft J, et al. Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations: potential factors in amyloid plaque formation. *J Neurosci*. 2006;26(40):10129-40.
116. Villemagne VL, Burnham S, Bourgeat P, Brown B, Ellis KA, Salvado O, et al. Amyloid β deposition, neurodegeneration, and cognitive decline in sporadic Alzheimer's disease: a prospective cohort study. *Lancet Neurol*. 2013;12(4):357-67.
117. Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's

- disease at 25 years. *EMBO Mol Med.* 2016;8(6):595–608.
118. Zelmer A, Ward TH. Noninvasive fluorescence imaging of small animals. *J Microsc.* 2013;252(1):8–15.
119. Frackowiak D. The Jablonski diagram. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 1988;2(3):399.
120. Helmchen F, Denk W. Deep tissue two-photon microscopy. *Nature Methods.* 2005;2(12):932–40.
121. Marker DF, Tremblay ME, Lu SM, Majewska AK, Gelbard HA. A thin-skull window technique for chronic two-photon in vivo imaging of murine microglia in models of neuroinflammation. *J Vis Exp.* 2010(43).
122. Brawek B, Schwendele B, Riester K, Kohsaka S, Lerdkrai C, Liang Y, et al. Impairment of in vivo calcium signaling in amyloid plaque-associated microglia. *Acta Neuropathol.* 2014;127(4):495–505.
123. Stosiek C, Garaschuk O, Holthoff K, Konnerth A. In vivo two-photon calcium imaging of neuronal networks. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(12):7319–24.
124. Li W, Hsiao HM, Higashikubo R, Saunders BT, Bharat A, Goldstein DR, et al. Heart-resident CCR2(+) macrophages promote neutrophil extravasation through TLR9/MyD88/CXCL5 signaling. *JCI Insight.* 2016;1(12).
125. Ramos-Gomes F, Bode J, Sukhanova A, Bozrova SV, Saccomano M, Mitkovski M, et al. Single- and two-photon imaging of human micrometastases and disseminated tumour cells with conjugates of nanobodies and quantum dots. *Scientific Reports.* 2018;8(1):4595.
126. Qin Z, He S, Yang C, Yung JS-Y, Chen C, Leung CK-S, et al. Adaptive optics two-photon microscopy enables near-diffraction-limited and functional retinal imaging in vivo. *Light: Science & Applications.* 2020;9(1):79.

127. Baik SH, Kang S, Son SM, Mook-Jung I. Microglia contributes to plaque growth by cell death due to uptake of amyloid β in the brain of Alzheimer's disease mouse model. *Glia*. 2016;64(12):2274-90.
128. Kim D, Baik SH, Kang S, Cho SW, Bae J, Cha MY, et al. Close Correlation of Monoamine Oxidase Activity with Progress of Alzheimer's Disease in Mice, Observed by in Vivo Two-Photon Imaging. *ACS Cent Sci*. 2016;2(12):967-75.
129. Xue C, Lin TY, Chang D, Guo Z. Thioflavin T as an amyloid dye: fibril quantification, optimal concentration and effect on aggregation. *R Soc Open Sci*. 2017;4(1):160696.
130. Sasaki S, Drummen GPC, Konishi G-i. Recent advances in twisted intramolecular charge transfer (TICT) fluorescence and related phenomena in materials chemistry. *Journal of Materials Chemistry C*. 2016;4(14):2731-43.
131. Leger M, Quiedeville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P, et al. Object recognition test in mice. *Nature Protocols*. 2013;8(12):2531-7.
132. Nitta A, Murai R, Suzuki N, Ito H, Nomoto H, Katoh G, et al. Diabetic neuropathies in brain are induced by deficiency of BDNF. *Neurotoxicol Teratol*. 2002;24(5):695-701.
133. Mostany R, Portera-Cailliau C. A craniotomy surgery procedure for chronic brain imaging. *J Vis Exp*. 2008(12).
134. Baik SH, Kang S, Lee W, Choi H, Chung S, Kim J-I, et al. A Breakdown in Metabolic Reprogramming Causes Microglia Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Cell Metabolism*. 2019;30(3):493-507.e6.
135. McQuade A, Coburn M, Tu CH, Hasselmann J, Davtyan H, Blurton-Jones M. Development and validation of a simplified method to generate human microglia from pluripotent stem cells. *Mol*

Neurodegener. 2018;13(1):67.

136. Meaney S, Bodin K, Diczfalusy U, Björkhem I. On the rate of translocation in vitro and kinetics in vivo of the major oxysterols in human circulation. *Journal of Lipid Research*. 2002;43(12):2130–5.

137. Huttunen HJ, Havas D, Peach C, Barren C, Duller S, Xia W, et al. The acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase inhibitor CI-1011 reverses diffuse brain amyloid pathology in aged amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2010;69(8):777–88.

138. Llaverías G, Laguna JC, Alegret M. Pharmacology of the ACAT inhibitor avasimibe (CI-1011). *Cardiovasc Drug Rev*. 2003;21(1):33–50.

139. Holly O, Sarah LC, Sreemathi L, Erika M, Pei S, Jeffery C, et al. Intraneuronal β -Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *The Journal of Neuroscience*. 2006;26(40):10129.

140. Hitchcock SA, Pennington LD. Structure–brain exposure relationships. *J Med Chem*. 2006;49(26):7559–83.

141. Yang Y, Arseni D, Zhang W, Huang M, Lövestam S, Schweighauser M, et al. Cryo-EM structures of amyloid- β 42 filaments from human brains. *Science*. 2022;375(6577):167–72.

142. Testa G, Staurenghi E, Zerbinati C, Gargiulo S, Iuliano L, Giaccone G, et al. Changes in brain oxysterols at different stages of Alzheimer's disease: Their involvement in neuroinflammation. *Redox Biol*. 2016;10:24–33.

143. Liu CC, Liu CC, Kanekiyo T, Xu H, Bu G. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: risk, mechanisms and therapy. *Nat Rev Neurol*. 2013;9(2):106–18.

144. Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S,

et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010;330(6005):841–5.

145. Barber CN, Raben DM. Lipid Metabolism Crosstalk in the Brain: Glia and Neurons. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. 2019;13.

146. Cashikar AG, Toral-Rios D, Timm D, Romero J, Strickland M, Long JM, et al. Regulation of astrocyte lipid metabolism and ApoE secretion by the microglial oxysterol, 25-hydroxycholesterol. *Journal of Lipid Research*. 2023;64(4):100350.

147. Sienski G, Narayan P, Bonner JM, Kory N, Boland S, Arczewska AA, et al. APOE4 disrupts intracellular lipid homeostasis in human iPSC-derived glia. *Science Translational Medicine*. 2021;13(583):eaaz4564.

148. Huynh T-PV, Davis AA, Ulrich JD, Holtzman DM. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: the influence of apolipoprotein E on amyloid- β and other amyloidogenic proteins: Thematic Review Series: ApoE and Lipid Homeostasis in Alzheimer's Disease. *Journal of Lipid Research*. 2017;58(5):824–36.

149. Hutter-Paier B, Huttunen HJ, Puglielli L, Eckman CB, Kim DY, Hofmeister A, et al. The ACAT inhibitor CP-113,818 markedly reduces amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuron*. 2004;44(2):227–38.

150. Huttunen HJ, Peach C, Bhattacharyya R, Barren C, Pettingell W, Hutter-Paier B, et al. Inhibition of acyl-coenzyme A: cholesterol acyl transferase modulates amyloid precursor protein trafficking in the early secretory pathway. *Faseb j*. 2009;23(11):3819–28.

151. Shibuya Y, Niu Z, Bryleva EY, Harris BT, Murphy SR, Kheirollah A, et al. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase 1 blockage enhances autophagy in the neurons of triple transgenic Alzheimer's disease mouse and reduces human P301L-tau content at the presymptomatic stage. *Neurobiol Aging*. 2015;36(7):2248–59.

152. Lee JH, Han J-h, Woo JH, Jou I. 25-Hydroxycholesterol suppress IFN- γ -induced inflammation in microglia by disrupting lipid raft formation and caveolin-mediated signaling endosomes. *Free Radical Biology and Medicine*. 2022;179:252-65.
153. Lee M-S, Bensinger SJ. Reprogramming cholesterol metabolism in macrophages and its role in host defense against cholesterol-dependent cytotoxins. *Cellular & Molecular Immunology*. 2022;19(3):327-36.
154. Bauman DR, Bitmansour AD, McDonald JG, Thompson BM, Liang G, Russell DW. 25-Hydroxycholesterol secreted by macrophages in response to Toll-like receptor activation suppresses immunoglobulin A production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(39):16764-9.
155. Hannedouche S, Zhang J, Yi T, Shen W, Nguyen D, Pereira JP, et al. Oxysterols direct immune cell migration via EBI2. *Nature*. 2011;475(7357):524-7.
156. Li C, Deng YQ, Wang S, Ma F, Aliyari R, Huang XY, et al. 25-Hydroxycholesterol Protects Host against Zika Virus Infection and Its Associated Microcephaly in a Mouse Model. *Immunity*. 2017;46(3):446-56.
157. Chen X, Firulyova M, Manis M, Herz J, Smirnov I, Aladyeva E, et al. Microglia-mediated T cell infiltration drives neurodegeneration in tauopathy. *Nature*. 2023;615(7953):668-77.
158. Bettcher BM, Tansey MG, Dorothée G, Heneka MT. Peripheral and central immune system crosstalk in Alzheimer disease – a research prospectus. *Nature Reviews Neurology*. 2021;17(11):689-701.
159. Vijaya Kumar DK, Moir RD. The Emerging Role of Innate Immunity in Alzheimer's Disease. *Neuropsychopharmacology*. 2017;42(1):362-.

160. Chen X, Holtzman DM. Emerging roles of innate and adaptive immunity in Alzheimer's disease. *Immunity*. 2022;55(12):2236-54.
161. Feng L, Xie Y, Au-Yeung SK, Hailu HB, Liu Z, Chen Q, et al. A fluorescent molecular rotor probe for tracking plasma membranes and exosomes in living cells. *Chemical Communications*. 2020;56(60):8480-3.
162. Lee S-C, Heo J, Woo HC, Lee J-A, Seo YH, Lee C-L, et al. Fluorescent Molecular Rotors for Viscosity Sensors. *Chemistry - A European Journal*. 2018;24(52):13706-18.
163. Zhao Y, He S, Yang J, Sun H, Shen X, Han X, et al. Study on TICT emission of TPE-BODIPY derivatives mediated by methyl group on BODIPY. *Optical Materials*. 2018;81:102-8.

Abstract

Investigation of microglia phagocytosis-related metabolite changes in the pathogenesis of Alzheimer's disease, and the development of a two-photon microscopic amyloid beta plaque probe

Hayoung Choi

Biomedical Sciences

The Graduate School

Seoul National University

This study focused on the microglial function related to the pathogenesis of AD based on the previously reported disease-associated microglial DEG and their molecular phenotypes. *Ch25h*, an enzyme that produces 25HC, was selected among many candidates since it has been previously reported to have direct immunomodulatory functions and plays a crucial role in controlling cholesterol and lipid metabolism. Various models and biochemical

experiments verified the increase in *Ch25h* expression and 25HC production in microglial cells by A β . Intravital two-photon imaging and FACS-based microbead phagocytosis experiments confirmed that excessive 25HC caused by A β inhibits the microglial ability to explore the surroundings and phagocytosis. The reduction in responsiveness and phagocytic capacity of microglia was shown to be mediated by a 25HC-induced cholesteryl ester (CE) increase in microglia. An increase in CE was found to inhibit the cell membrane fluidity of microglia. The cholesterol esterification inhibitor Avasimibe was shown to restore the defect in microglial function caused by 25HC. Furthermore, the long-term administration of 25HC to 5XFAD for four weeks confirmed that the cognitive function and AD lesions of the 25HC-treated group have deteriorated. Together, these data demonstrate that excessive *Ch25h* expression by A β ultimately reduces the function of microglial cells and accelerates the pathogenesis of AD.

Accumulation and change of amyloid plaque lesions are essential for the pathogenesis of AD. This study demonstrated that the molecular-rotor concept significantly reduces background fluorescence in a two-photon A β plaque-sensing probe. The newly developed IRI-1 with this strategy showed a significant reduction in background signal compared to the existing probe, which is structurally similar but without an intramolecular rotor. In addition, this probe exhibits effective BBB penetration and strong A β plaque selectivity and sensitivity.

Keywords : Alzheimer's disease, Neuro-inflammation, Microglia, phagocytosis, Amyloid beta plaque, Two-photon microscope

Student Number : 2017-24177