



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0085265
(43) 공개일자 2013년07월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/89 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0006301
(22) 출원일자 2012년01월19일
심사청구일자 2012년01월19일
기술이전 희망 : , 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
허성오
강원도 춘천시 후평동 에리트아파트 106-107
오성민
강원도 춘천시 후평1동 봉의아파트 1-401
(뒷면에 계속)

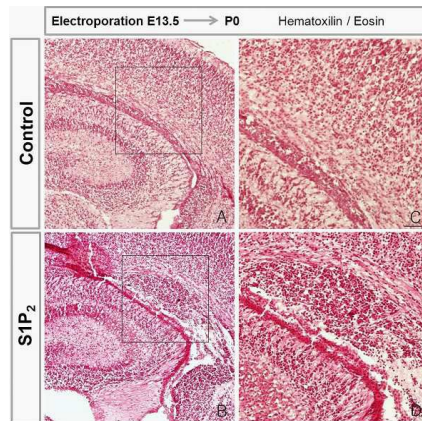
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 스핑고지질 수용체 과발현을 통한 뇌실 내종양 동물모델 개발

(57) 요약

본 발명은 유전자 이상으로 인해 사람의 두개골 안에서 성장하여 뇌압을 상승시키고 다양한 장애를 유발하는 뇌 종양 모델 제작 방법으로, 세포에 영향을 주는 생체활성물질중의 하나인 스핑고지질(Sphingolipid)의 수용체 Sphingosine-1-phosphate receptor를 미세유전자 주입기술을 통하여 일시적, 위치특이적으로 뇌실내에 유도하여 만들어진 뇌실내 종양 발생 동물 모델 개발을 포함하는 것을 특징으로 한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김남호

강원도 춘천시 후평1동 봉의아파트 6-204

양해걸

강원도 춘천시 옥천동 한림대학교 의과대학 약리학
교실

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 3044-20110034

부처명 교육과학기술부

연구사업명 21C프론티어사업(뇌기능활용및뇌질환치료기술개발연구사업)

연구과제명 신경세포 리모델링의 신호전달체계 규명을 통한 뇌기능향진기술 개발

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2011.04.01 ~ 2012.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

스핑고지질 수용체 과발현을 이용한 사람 뇌실내 종양 질환모델동물 개발.

청구항 2

제 1항에 있어서, 미세 유전자 주입기술을 사용할 시에 사용되는 스핑고지질 수용체 유전자 발현벡터.

청구항 3

제 1항에 있어서, 수용체 과발현시에 사용되는 미세 유전자 주입기술

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 유전자 이상으로 인해 사람의 두개골 안에서 성장하여 뇌압을 상승시키고 다양한 장애를 유발하는 뇌 종양 모델 제작 방법을 내용으로 한다.

배경 기술

[0002] 세포는 성장(Growth), 분화(Differentiation), 프로그램된 죽음(Apoptosis)의 과정을 밟거나 성장이 정지된 상태를 유지하고 있으며, 이러한 과정은 엄격하게 조절을 받고 있다. 그러나 종양세포의 경우 세포의 유전자 중 일부에 이상이 발생하여 이들 유전자의 산물인 단백질의 특성이 바뀌게 되고, 그 결과로 세포 성장 조절에 이상이 발생한다. 여러가지 이유로 인해 세포의 유전자에 변화가 일어나면 비정상적으로 세포가 변하여 불완전하게 성숙하고, 과다하게 증식하게 되는데 이를 종양(Tumor)이라 정의할 수 있다.

[0003] 뇌는 매우 중요한 기관이기 때문에 외부로부터 완벽하게 보호되고 있는데, 뇌막(경막, 지주막, 연막)으로 둘러싸여 있고 이 막 속에는 뇌척수액이 담겨져 있어 완충작용을 하며 이는 다시 두개골로 완전히 둘러싸여 있다. 또한 뇌는 혈관을 타고 유해물질이 침입하는 것을 방지하기 위하여 다른 조직에는 없는 혈관-뇌장벽이라는 것이 존재합니다. 따라서 뇌에는 약물이 잘 투과되지 않는다.

[0004] 뇌종양이란 두개골 내에 생기는 모든 종양을 말하며 뇌 및 뇌 주변 구조물에서 발생하는 모든 종양을 포함하여 말한다. 다른 종양과 뇌종양을 구별하는 가장 큰 특징은 종양이 두개골 안에서 성장한다는 것이다. 두개골 안에서는 팽창할 수 있는 여유 공간이 없다. 그래서 종양이 커지면서 뇌압이 상승하면 두통이나 구토 등의 뇌압상승 증상이 나타날 수 있고, 종양에 의해 특정 부위가 눌리면서 압박될 경우에는 해당 부위의 뇌가 담당하는 특정 기능에 장애가 발생하기도 한다. 뇌종양은 다시 두 부류로 나뉘는데, 주변의 신경조직을 침윤하는 신경교종과 뇌조직을 침윤하지 않고 압박하는 비(非)교종성으로 나뉜다. 주변 신경조직을 침윤하는 경우는 수술로 완치되는 경우가 매우 드물어 항암화학요법이나 방사선치료가 추가로 필요로 한다. 뇌실내 종양은 전체 뇌종양의 약 3~10% 정도의 빈도를 차지하며, 다양한 종류의 종양이 발생할 수 있다. 이들은 뇌실내에서 서서히 자라서 상당히 커진 후에 발견되며, 대부분 특이한 신경학적 증상보다 뇌척수액 경로의 차단에 의한 두통, 구토 또는 의식장애 등의 폐쇄성 수두증 증상을 보인다. 그 외에 인접한 뇌 조직 압박에 의한 간질발작, 운동 및 감각장애, 시야 장애, 배뇨 및 보행장애등이 나타나기도 한다. 뇌실내 종양은 다른 뇌종양에 비하여 수술적 접근이 쉽지 않아서 수술의 실패 확률과 예후가 좋지 않은 경우가 다른 종양에 비하여 높다. 뇌실내 종양은 가능한 한 종양의 전적출을 해야하며, 동반되는 수두증의 처리를 신중하게 하고, 수술중 술기에 세심한 주의를 기울여서 합병증 발생을 줄여야 하는 어려움이 있다.

[0005] 종양의 생성은 신생 혈관의 성장에 많은 영향을 받는데 혈관을 이루고 있는 내피세포층의 분화, 이동, 발달, 성장에 스핑고지질이 많은 영향을 준다는 연구결과가 밝혀져 있다. 혈관의 빠른 성장은 세포에 그만큼 많은 영양분을 공급하여 주고 이는 종양세포의 빠른 성장속도에 있어서 꼭 필요한 요소이다. 스핑고지질은 스핑고지질의 수용체에 신호를 전달하여 혈관생성에 직,간접적으로 영향을 주는 결정적인 요소이다. 이런 스핑고지질의 하나인 SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE 는 이러한 스핑고지질을 대표하는 인자중의 하나로 이미 많은 연구가 되어 있으며 SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE 의 수용체들은 혈관생성 조절연구 등을 통하여 많은 연구가 이루어지고 있다. 최근

의 연구에 따르면 SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE 수용체 하나의 유전자를 없앤 마우스에서 유도된 종양의 크기가 정상 마우스에서 유도된 종양의 크기보다 많이 증가했다는 결과를 볼 수 있다. 이는 SPHINGOSINE-1-PHOSPHATE 수용체가 종양 조절에 크게 관여한다는 사실을 부여함으로써 종양 연구의 큰 실마리가 되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 세포에 영향을 주는 생체활성물질중의 하나인 스펡고지질(Sphingolipid)의 수용체 Sphingosine-1-phosphate receptor를 미세유전자 주입기술을 통하여 일시적, 위치특이적으로 뇌실내에 유도하여 만들어진 뇌종양발생 동물모델을 통하여 뇌실내 종양 질환 치료를 연구하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적에 따라, 본 발명에서는 사람 뇌실내 종양 및 관련 질환을 연구할 수 있는 질환모델동물을 제공한다.

[0008] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0009] 본 발명자들은 사람 뇌실내 종양을 연구할 수 있는 질환모델 동물을 제작하기 위하여 스펡고지질 수용체 발현백터를 제작하였으며, 대뇌 미세 유전자 주입술을 이용하여 발생중인 마우스 대뇌에 스펡고지질 수용체를 과발현 시켰으며, 마우스 대뇌에 뇌실내 종양을 유발시켜 본 발명을 완성하였다.

[0010] 이에, 본 발명에서는 사람 뇌실내 종양을 연구할 수 있는 질환모델 동물을 제작하기 위한 스펡고지질 수용체와 발현할 수 있는 유전자 재조합 발현백터를 제작하였다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 대뇌 미세 유전자 주입기술을 이용하여 사람 뇌실내 종양 질환모델동물을 제작하는 것을 그 특징으로 하며, 이를 활용하여 사람 뇌실내 종양을 포함하는 질병의 연구에 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 대뇌 미세 유전자 주입기술을 이용하여 제작한 질환모델동물의 뇌실내 종양을 조사하기 위하여 hematoxylin and eosin 염색을 실시하였다. 스펡고지질 수용체를 과 발현 시키고 (A) 5일이 경과한 후 스펡고지질 수용체를 과발현 시키지 않은 대조군(B)과 비교하였다. 실험결과 스펡고지질 수용체에 의하여 뇌실에 뇌실내 종양이 형성됨을 확인하였고, 또한 다른조직이 압박을 받으며, 뇌실이 좁아짐을 확인하였다. (C)는 (A)의 2배 확대된 그림이다. (D)는 (B)의 2배 확대된 그림이다.

도 2는 상기 재조합 유전자 발현 백터로서 CMV enhancer/chick beta-globin promoter에 의하여 스펡고지질 수용체를 발현시킬 수 있고, 트랜스펙션(transfection)된 세포에서 스펡고지질 수용체가 과발현 되는 백터이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하도록 한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 대표적으로 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0014] 제작예 1: 유전자 재조합 기술을 이용한 스펡고지질 수용체 발현백터 제작

[0015] 스펡고지질 수용체 유전자를 마우스 염색체에서 복제하여서 대뇌미세 유전자 주입기술에 쓰일 백터에 삽입하였다.

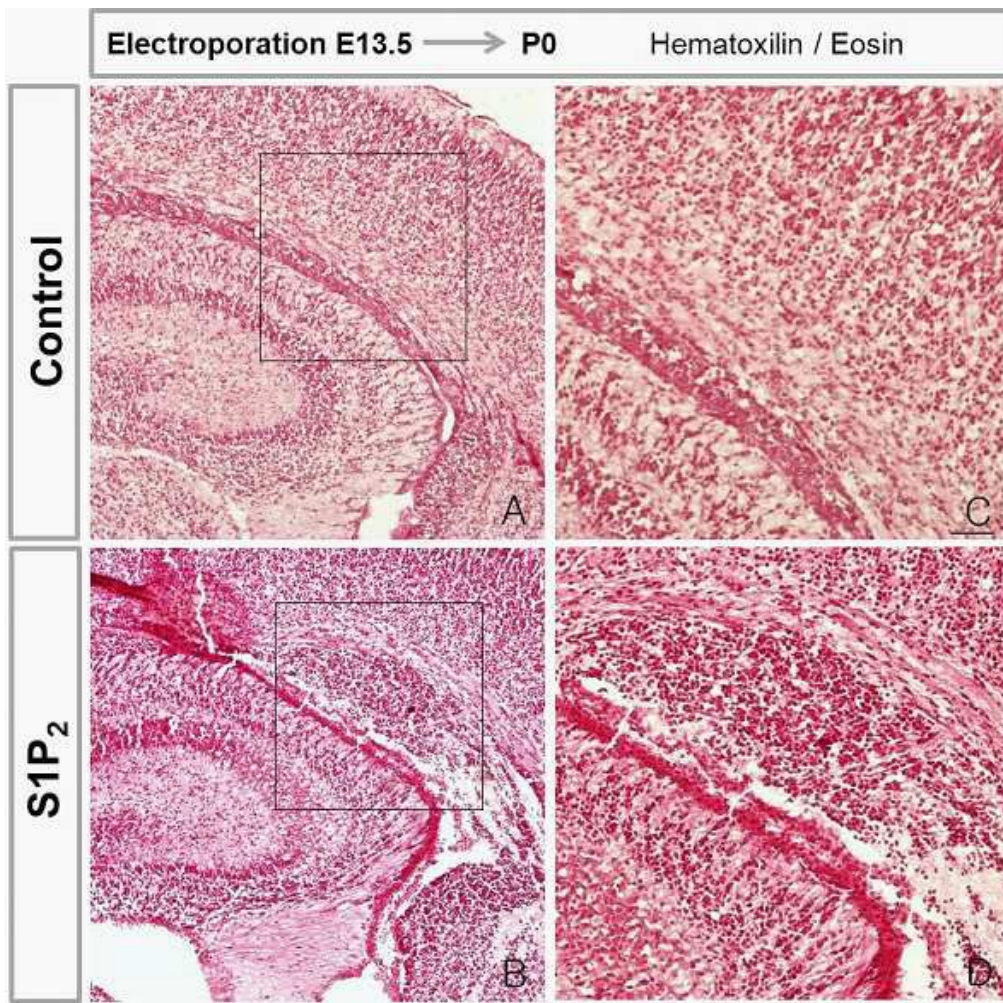
[0016] 유전자 재조합 기술은 먼저 마우스의 염색체에서 스펡고지질 유전자를 특정 프라이머를 통하여 잡아내고 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용하여 복제해낸다. 여기서 만들어진 리보핵산은 효소를 이용하여 상보적 DNA로 만들어낸다. 이 때 프라이머 양 끝은 발현 백터에 들어가기 위해 발현백터의 양끝의 제한효소와 같은 제한효소를 삽입하게 되지만 이에 한정되는 것은 아니다. 복제된 유전자 부위와 발현백터는 접합효소를 통하여 다시 이어지게 된다. 상기 방법과 같이 유전자가 삽입된 백터는 미세 유전자 주입기술시 눈으로 관찰하기 위해 1X

Fast green dye 에 녹이지만 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0017] 제작예 2: 대뇌 미세 유전자 주입기술을 이용한 사람 뇌실내 종양 질환모델동물 제작
- [0018] 상기 제작된 스펅고지질 수용체 과발현 벡터를 이용하여 대뇌에 스펅고지질 수용체를 과발현 시키기 위하여 대뇌 미세 유전자 주입기술을 이용하였다.
- [0019] 대뇌 미세 유전자 주입기술은 시간적인 조절 하에 임신된 마우스를 마취시킨 후, 재조합 유전자 발현 벡터를 생쥐 태아의 뇌실에 주입한다. 이때 재조합 유전자 발현벡터는 2ug/ul 또는 4ug/ul를 주입하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 그리고 대뇌에 전기자극을 가함으로써 재조합 유전자 발현 벡터를 신경 전구세포에 주입 되도록 하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 실험을 실시한 마우스 태아를 다시 생쥐모체에 원위치 시켜서 정상적인 발생이 진행되도록 한다.
- [0020] 그 결과는 도1과 같다. 도1에서 보듯이 상기 유전자 재조합 발현 벡터 및 대뇌미세 유전자 주입술을 통하여 생쥐 대뇌의 뇌실 부위에 뇌실내 종양을 유발시킬 수 있었으며, 뇌실내에 종양이 생기면서 뇌실이 좁아져 다른 조직을 압박하는 사람 뇌실내 종양과 유사한 모습을 보이는 질환동물 모델을 제작할 수 있었다.

도면

도면1



도면2

