

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2016-0087955 (43) 공개일자 2016년07월25일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A01K 67/027 (2006.01)	(71) 출원인 충남대학교산학협력단	
(52) CPC특허분류 A01K 67/0276 (2013.01)	대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)	
(21) 출원번호 10-2015-0006826	(72) 발명자	
(22) 출원일자 2015년01월14일	송민호	
심사청구일자 2015년01월14일	대전광역시 중구 계백로1716번길 87 306동 1202호 (문화동, 센트럴파크3단지아파트)	
	김용경	
	대전광역시 서구 관저북로 52 대자연마을아파트 109동 1006호	
	(74) 대리인	
	김원준	

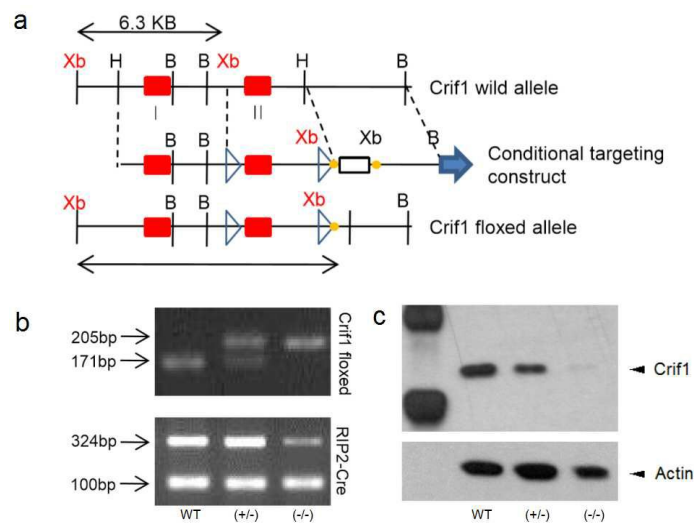
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 당뇨병 동물 모델 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 미토콘드리아의 OxPhos(Oxidative Phosphorylation) 이상에 의한 당뇨병 동물 모델 및 그 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 베타세포에 특이적으로 Crif1 유전자가 결손(knock-out)된 마우스인 것을 특징으로 하는 당뇨병 동물 모델 및 그 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012R1A2A1A03002833

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 미토콘드리아 OXPHOS 단백질의 번역조절기전을 기반으로 하는 당뇨병 제어

기 여 율 5/10

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2014.05.01 ~ 2015.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012M3A9B2027958

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업

연구과제명 작업부하 분자조절 규명을 통한 베타세포 기능부전 제어

기 여 율 5/10

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

베타세포에 특이적으로 Crif1(CR6-interacting factor 1) 유전자가 결손(knock-out)된 마우스인 것을 특징으로 하는 당뇨병 동물 모델.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 마우스는 동형접합체(homozygote)인 것을 특징으로 하는 당뇨병 동물 모델.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

미토콘드리아 이상에 의한 당뇨병인 것을 특징으로 하는 당뇨병 동물 모델.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

제2형 당뇨병인 것을 특징으로 하는 당뇨병 동물 모델.

청구항 5

Crif1의 2번 엑손 양 옆에 loxp site를 삽입한 Crif1^{flox/flox} 마우스와, 베타세포에 특이적으로 Cre-recombinase를 발현하는 Ins2-Cre 마우스를 교배하여 Crif1^{flox/+}, Ins2-Cre m/+의 유전자형을 갖는 1세대의 Crif1 이형접합 결손(heterozygous knockout) 마우스를 얻는 단계;

상기 이형접합 결손 마우스와 Crif1^{flox/flox} 마우스를 교배하여 2세대 마우스를 얻는 단계; 및

상기 2세대 마우스로부터 부터 Crif1^{flox/flox}, Ins2-Cre m/+의 유전자형을 가지는 Crif1 동형접합 녹아웃(homozygous knockout) 마우스를 선별하는 단계;

를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 당뇨병 동물 모델의 제조 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 Crif1 동형접합 녹아웃 마우스의 선별은,

RT-PCR에 의해 유전자형을 확인하거나,

체도에서 Crif1의 발현을 확인하는 것에 이루어지는 것을 특징으로 하는 당뇨병 동물 모델의 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미토콘드리아의 OxPhos(Oxidative Phosphorylation) 이상에 의한 당뇨병 동물 모델 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 노령화 사회로의 진입, 생활양식, 식생활, 사회문화의 변화로 인하여 고혈압, 심장병, 동맥경화증 및 당뇨병 등의 만성퇴행성 질환의 발생률이 높아지고 있다. 특히 당뇨병 환자의 수는 지난 약 20년간에 걸쳐 최고 12배 이상 급격히 증가하고 있다.

[0003] 전신의 혈당 항상성은 췌도(pancreatic islets)에 존재하는 베타세포(β -cell)의 기능에 의존한다. 제1형 당뇨병은 전체 당뇨병의 약 10% 정도를 차지하며, 인슐린을 분비하는 췌장의 베타세포가 파괴되어 인슐린 결핍이 유발되어 고혈당, 당뇨, 조갈(polydipsia) 및 체중감소의 증상이 나타난다. 전체 당뇨병 중 약 90%를 차지하는 제2형 당뇨병에서는 인슐린 민감 세포가 정상농도의 인슐린에 반응하지 않는 인슐린 저항성을 극복하기 위해 췌장의 베타세포가 인슐린 분비를 증가시키는데, 시간이 경과함에 따라 베타세포의 과부하에 의해 기능이 악화되면서 인슐린 분비가 감소하고 그로 인해 고혈당이 나타나게 된다. 이와 같이 각각의 베타세포의 기능 감소 또는 전체 베타세포의 양의 감소로 정의되는 베타세포의 기능 장애가 당뇨병의 전형적인 특징이다. 그러나 인슐린 저항성의 진행과 당뇨병에서 베타세포의 기능 장애의 원인은 아직도 명확히 규명되지 않았다.

[0004] 당뇨병에서 베타세포의 이상의 근본적인 원인으로 미토콘드리아나 소포체와 같은 세포 소기관의 기능 장애가 오래 동안 연구되어왔다. 베타세포의 미토콘드리아는 글루코스 산화에 반응하여 인슐린 분비에 대한 대사 신호를 생성할 뿐 아니라 세포사멸(apoptosis)이나, 괴사(necrosis), 자가포식(autophagy)과 같은 세포 과정에도 관여한다. 이러한 세포 과정에 대한 미토콘드리아의 기능 이상은 당뇨병의 진행에서 베타세포의 손실을 초래한다고 여겨진다.

[0005] 당뇨병의 발병에서 미토콘드리아 OxPhos(Oxidative Phosphorylation) 이상의 역할을 밝히기 위하여, 베타세포에서 미토콘드리아의 OxPhos 변형을 포함하는 동물 모델이 개발되었다. 베타세포에서의 obligatory mtDNA 전사 인자인 Tfam(mitochondrial transcription factor A)의 결손은 인슐린 분비의 감소 및 베타세포의 손실과 관련된 자발성 고혈당증을 초래한다. 특히 베타세포 유래의 mitochondrial translation factor TFB1M(transcription factor B1 mitochondrial)은 베타세포의 기능 장애와 베타세포 양의 손실을 야기한다. 이러한 점들은 손상된 OxPhos가 당뇨병의 유발에 기여한다는 가설을 지지한다.

[0006] 한편, 동물의 형질전환 기술의 발전은 생명공학의 전반적인 분야에 영향을 미치고 있으며 인간의 각종 질환에 대한 새로운 치료제의 개발 및 효능 검증과 질병의 발병원인 해석 등을 위한 질환모델 동물의 생산에도 응용이 되고 있다. 당뇨병 역시 현재 인류가 직면한 대표적인 질병의 하나로 질병연구를 위해 여러 종류의 동물모델이 사용되고 있다. 등록특허 제1393711호에서는 동물이 한쪽 신장을 절제한 후 췌장세포의 독성물질인 스트렙토조토신을 투여하여 제1형 당뇨를 유발하는 동시에, 고지방 사료를 급이하여 인슐린 저항성과 관련된 제2형 당뇨를 유발하여 제1형 및 제2형 당뇨병이 동시에 유발된 동물모델에 대해 개시하고 있다. 등록특허 제1174493호에서는 PEA15 유전자의 과발현시켜 제2형 당뇨를 유발시킨 전임상 당뇨질환 모델 형질전환 돼지에 대해 개시하고 있다.

[0007] Crif1(CR6-interacting factor 1)은 미토콘드리아의 라이보솜의 큰 소단위체의 단백질 컴포넌트와 특이적으로 상호작용하는 미토콘드리아 단백질로, mtDNA 암호화된 OxPhos 폴리펩티드의 합성과 OxPhos 소단위체의 미토콘드리아 막으로의 후속적인 삽입에 중요한 역할을 한다. Crif1의 결손은 미토콘드리아 내막에서 OxPhos 복합체 형성의 손실에 의해 야기되는 미토콘드리아성 호흡의 현저한 손상을 야기하며, 반응성 활성산소종의 증가, 미토콘드리아 내막의 구조적 변화를 발생하게 한다.

[0008] 따라서 췌장의 베타세포에서 Crif1을 녹아웃시키게 된다면 미토콘드리아의 OxPhos 기능 장애와 관련된 베타세포의 이상에 의해 당뇨병이 발병될 가능성이 매우 높으며 이러한 동물 모델은 미토콘드리아의 OxPhos 이상에 의한 당뇨병의 발병 기작 연구 및 당뇨병 치료용 약물의 효능을 테스트를 하는데 최적의 실험동물 모델이 될 수 있을 것으로 기대된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 등록특허 제1393711호
(특허문헌 0002) 등록특허 제1174493호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 미토콘드리아의 OxPhos 이상에 의한 당뇨병의 발병 기작 연구 및 당뇨병 치료용 약물의 효능 테스트에 유용한 동물 모델을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 본 발명은 또한 상기 동물 모델의 제조 방법을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 동물 모델을 이용하여 당뇨병 예방 및 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 베타세포에 특이적으로 Crif1 유전자가 결손(knock-out)된 마우스인 것을 특징으로 하는 당뇨병 동물 모델에 관한 것이다. 본 발명의 베타세포 특이적인 Crif1 결손 마우스는 동종접합체(homozygote)인 것이 바람직하다.
- [0014] 본 발명의 당뇨병 동물 모델은 베타세포에서 Crif1의 결손에 따른 미토콘드리아의 기능손상으로 OxPhos 기능이 손상되고, 이로 인해 베타세포의 기능손상과 함께 베타세포 양이 감소하는 것에 의해 당뇨병의 진행을 나타낸다. 따라서, 본 발명의 동물 모델은 미토콘드리아의 기능 장애에 의해 야기되는 베타세포의 손상에 대한 동물 모델로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [0015] 본 발명의 당뇨병 동물 모델은 4주령 때 대조군과 베타세포의 양에는 차이가 없었으나, 글루코스 자극에 의한 인슐린 분비가 감소됨을 나타내었다. 이후 주령이 증가함에 따라 베타세포 양이 크게 감소하여 11주령에서는 당부하 정도가 더욱 심화되었다. 즉, 본 발명의 동물 모델에서는 베타세포의 기능 장애에 이은 베타세포의 감소로 제2형 당뇨에 해당하는 양상을 나타낸다.
- [0016] 본 발명은 또한 상기 동물 모델의 제조 방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 본 발명은 Crif1의 2번 엑손 양 옆에 loxp site를 삽입한 Crif1^{flox/flox} 마우스와, 베타세포에 특이적으로 Cre-recombinase를 발현하는 Ins2-Cre 마우스를 교배하여 Crif1^{flox/+}, Ins2-Cre m/+의 유전자형을 갖는 1세대의 Crif1 이형접합 결손(heterozygous knockout) 마우스를 얻는 단계; 상기 이형접합 결손 마우스와 Crif1^{flox/flox} 마우스를 교배하여 2세대 마우스를 얻는 단계; 및 상기 2세대 마우스로부터 부터 Crif1^{flox/flox}, Ins2-Cre m/+의 유전자형을 가지는 Crif1 동형접합 녹아웃(homozygous knockout) 마우스를 선별하는 단계;를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 당뇨병 동물 모델의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0017] 상기 Crif1 동형접합 녹아웃 마우스의 선별은 RT-PCR에 의해 Crif1이 결손된 유전자형을 확인하거나, 채도에서 Crif1의 발현을 확인하는 것에 의해 이루어질 수 있다.

발명의 효과

- [0018] 이상과 같이 본 발명의 베타세포 특이적 Crif1 녹아웃 마우스는 미토콘드리아의 기능 장애에 의해 야기되는 베타세포의 손상으로 인하여 당뇨병 고유의 증상을 나타내므로 당뇨병의 진행 경과와 병리학적 기전 연구의 동물 모델로 유용하게 이용될 수 있다.
- [0019] 또한 본 발명의 당뇨병 동물 모델은 당뇨병의 예방 및 치료제의 스크리닝에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 본 동물 모델의 개략도 및 동물 모델의 유전자형을 확인한 RT-PCR 결과 사진.
- 도 2는 성장과정 동안 각 유전자형 군별 마우스의 식이량과 체중의 변화를 보여주는 그래프.
- 도 3은 유전자형 군별 베타세포의 TEM 이미지와 미토콘드리아 수 및 관련 단백질의 발현을 보여주는 그래프 및 웨스턴 블랏 이미지.
- 도 4는 각 유전자형 군별 당부하 검사와 인슐린 저항성 측정 결과를 보여주는 그래프.
- 도 5는 췌도의 산소소비율 및 췌도에서의 KC1 자극에 의한 인슐린 분비의 효과를 보여주는 그래프.
- 도 6은 각 유전자형 군별 췌장 조직의 모폴로지의 비교 결과를 보여주는 면역형광염색 이미지 및 그래프.
- 도 7은 각 유전자형 군별 베타세포 증식률의 차이를 보여주는 면역형광이미지 및 그래프.
- 도 8은 (-/-) 마우스의 췌도에서 세포사멸이 증가함을 보여주는 이미지.
- 도 9는 췌도의 모폴로지 및 당부하에 대한 GLP-1 길항제 처리의 영향을 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하 첨부된 도면 및 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 도면 및 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0022] 실시예

[0023] 실시예 1 : 베타세포 특이적 Crif1 결손 마우스의 제조

- [0024] 베타세포에 특이적으로 Crif1을 녹아웃(knockout)시킨 마우스(Crif1^{beta-/-})를 제작하기 위하여, 인슐린 프로모터인 Ins2에 의해 베타세포에 특이적으로 Cre-recombinase을 발현하는 Ins2-Cre 형질전환 마우스(C57BL/6-Tg(Ins2-cre)25Mgn/J)를 Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)에서 구매하여 Crif1의 녹아웃을 위해 Crif1의 2번 엑손 양 옆에 loxp site를 삽입한 Crif1^{flox/flox} 마우스(EMBO Journal, 27(4):642-53, 2008)와 교배하였다. Crif1^{flox/flox} 마우스와 Ins2-Cre 형질전환 마우스를 교배하여 1세대에 얻은 Crif1 이형접합 녹아웃(heterozygous knockout) 마우스 중 Crif1^{flox/+}, Ins2-Cre m/+의 유전자형을 가지고 있는 male 마우스와 Crif1^{flox/+}, Ins2-Cre m/+ female 마우스를 교배하여 태어난 2세대의 마우스부터 Crif1^{flox/flox}, Ins2-Cre m/+의 유전자형을 가지는 Crif1 동형접합 녹아웃(homozygous knockout) 마우스(-/-)를 얻었다. 또한 이들과 함께 태어난 다른 마우스 중 Crif1^{flox/+}, Ins2-Cre m/+의 유전자형을 가지는 이형접합 녹아웃 마우스(+/-)와 Crif1^{+/+}, Ins2-Cre m/+마우스(+/, WT)를 대조군(littermate control) 마우스로 이용하였다. 도 1의 a는 본 동물 모델에서 Cre에 의해 Crif1 대립유전자로부터 2번 엑손을 절단시킨 것을 나타내는 개략도이며, b는 상기 각 마우스에 대해 유전자형을 확인한 RT-PCR 결과 사진이다. LoxP 사이트의 유전자형 확인을 위해서는 다음 서열번호 1 및 서열번호 2의 프라이머를 사용하여 RT-PCR 하였으며, Ins2-Cre에 대한 유전자형은 Jackson Laboratory PCT primer information(Genesis 26: 139-142, 2000)에 의거하여 분석하였다. 도 1의 b에서 (-/-) 마우스의 췌도에서 Crif1 유전자의 발현이 나타나지 않아, 베타세포에서 Cre를 매개로한 Crif1 유전자의 녹아웃이 효과적으로 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

- [0025] 서열번호 1 : 5'-GGG CTG GTG AAA TGT GTT G-3'
- [0026] 서열번호 2 : 5'-TCA GCT AGG GTG GGA CAG A-3'.
- [0027] 또한, 100~150의 분리된 채도를 배양하고 PBS로 세척한 후 protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics)를 보충한 SDS 완충액으로 용출하여 웨스턴 블랏에 의해 Crif1의 발현을 확인한 결과, WT 및 (+/-) 마우스에서는 Crif1의 발현이 확인된 것에 반하여 (-/-) 마우스에서는 Crif1가 검출되지 않아 베타세포에서의 Crif1의 녹아웃을 다시 한번 확인할 수 있었다(도 1의 c 참조).
- [0028] 상기 각 유전자형의 마우스 각 7마리씩을 사육환경이 조절되는 특정미생물 부재 시설에서 12시간 명암 주기로 사육하며 성장과정 동안의 체중 증가율과 식이량을 측정하여 도 2의 a~c에 도시하였다. 성장과정 동안 각 유전자형 군별 마우스의 식이량과 체중 간 유의적인 차이는 없었다.
- [0029] **실시예 2 : 베타세포 특이적 Crif1 결손 마우스의 생리적 이상 확인**
- [0030] **1) 베타세포의 구조적 이상 확인**
- [0031] 각 유전자형 군별 11주령의 마우스의 췌장의 조직을 1%(v/v) glutaraldehyde를 사용하여 4℃에서 4시간 고정하고 0.1M cacodylate 완충액으로 4℃에서 5회 세척하였다. 1%(w/v)의 OsO₄와 0.1%(w/v) CaCl₂를 함유하는 0.1M cacodylate 완충액(pH 7.2)을 사용하여 4℃에서 1시간 후-고정하였다. 고정된 시료는 에탄올과 프로필렌 옥사이드로 순차적으로 처리하여 탈수시키고, Embed-812(EMS, Hattfield, PA, USA)에 임베딩하고, 60℃에서 36시간 중합하였다.
- [0032] EM UC6 ultramicrotome (LEICA)을 사용하여 상기 임베딩된 췌장 조직의 절편을 생성하고, 4%(w/v) uranyl acetate와 citrate로 염색한 후 Tecnai G2 Spirit Twin transmission electron microscope (FEI Company, OR, USA)과 JEM ARM 1300S high-voltage electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan)으로 관측하고 그 결과를 도 3의 a에 도시하였다(scale bar = 2 μ m). 도 3의 A에서 화살표가 가리키는 부분이 미토콘드리아로 도 3의 b는 각 유전자형 군별 베타세포에서의 미토콘드리아의 수를 나타낸다. 도 3의 b에서 (-/-) 마우스의 베타세포에서는 WT나 (+/-) 마우스에 비해 미토콘드리아의 수가 약 3배정도 유의적으로 증가한 것을 볼 수 있다. 도 3은 베타세포에서의 Hsp60과 Vdac1의 발현량을 웨스턴 블랏에 의해 측정한 결과로, 베타세포 내 미토콘드리아 수의 증가와 함께 Vdac1의 발현량의 증가는 (-/-) 마우스의 베타세포에서 미토콘드리아의 생체내 합성이 상향조절되었음을 나타낸다. 또한, 미토콘드리아 스트레스의 지표인 Hsp-60의 증가로부터 (-/-) 마우스에서 베타세포의 미토콘드리아 생체 내 합성의 증가가 Crif1 결손에 기인한 미토콘드리아 기능 장애에 대한 적응 반응에 의해 야기되었음을 시사한다.
- [0033] **2) 당부하 검사 및 인슐린 저항성 측정**
- [0034] 당부하 검사를 위하여 각 유전자형 군별 4주령 및 11주령의 마우스 5마리씩을 16시간 절식시키고 2g/kg의 글루코스를 복강내 주사 또는 위관영양(gavage feeding)하였다. 혈당측정기(Accu-CHEK Active, Roche Diagnostics)와 마우스 insulin ELISA kit(Alpco Diagnostics)를 사용하여 시간의 경과에 따른 혈당치 및 플라즈마 인슐린 양을 측정하고 그 결과를 도 4의 a~d에 도시하였다.
- [0035] 또한, 인슐린 저항성 측정을 위해 각 유전자형 군별 11주령의 마우스 5마리씩을 4시간 절식시키고 0.75units/kg의 인슐린(HumalogTM, EliLilly, Indianapolis, IN, USA)을 복강내 주사하였다. 주사 전 후 시간의 경과에 따른 혈당치를 측정하고 글루코스 처리율을 도 4의 e에 도시하였다. 도 4의 a, c e에서 ○는 (-/-) 마우스, ■는 (+/-), □는 WT 마우스를 나타내고, e와 d에서는 각 시간별 막대에서 순서대로 WT, (+/-), (-/-) 마우스를 나타낸다.
- [0036] 도 4에서 4주령 및 11주령의 (-/-) 마우스에서 복강내 당부하 검사 동안 글루코스의 자극에 반응한 인슐린 분비의 감소로 인한 당부하가 유발되었음을 확인할 수 있었다. 4주령의 마우스와 비교하였을 때에 11주령의 마우스에서는 인슐린 분비의 결함 정도는 유사하였으나 당부하 정도가 더욱 심해진 것을 확인할 수 있었다.
- [0037] 상기와 같이 당부하가 심각하게 유발된 것에 반해, 도 4의 f에서 11주령인 (-/-) 마우스의 인슐린 저항성은 WT 및 (+/-) 마우스와 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서 (-/-) 마우스에 유발된 당뇨는 인슐린 분비의 부

족에 기인한 것임을 알 수 있다.

[0038] 3) 췌도에서의 산소소비율(OCR, Oxygen Consumption Ratio)의 측정

[0039] 미토콘드리아의 기능 이상과 인슐린 분비 결함의 관계를 확인하기 위하여 정제된 췌도에서 OCR을 측정하였다.

[0040] 통상의 chow diet를 급이한 4주령 및 11주령의 마우스로부터 nature protocols 4: 1649-1652(2009)에 기재된 방법에 따라 collagenase P(Roche Diagnostics) 소화 및 Ficoll 구배 원심분리법(Biochrom, L6155, Berlin, Germany)dp 의해 췌도를 분리하였다. 분리된 췌도에서 OCR을 a Seahorse XF-24 analyzer (Seahorse Bioscience, North Billerica, MA, USA)를 사용하여 측정하였다.

[0041] 즉, 췌도를 assay media(Seahorse Bioscience)로 세척하고 50개씩 군으로 나눈 후 XF-24 islet culture microplate로 이식하였다. 췌도는 췌도 호흡조건을 최적화하기 위하여 10 mM pyruvate와 2 mM glutamine가 보충된 assay media를 사용하여 37℃, CO₂가 없는 조건에서 1시간 선회양하였다. 세포의 산소소비를 자극하기 위하여 글루코스를 20mM의 농도가 되도록 첨가하였으며, ATP 합성을 저해하기 위하여 5mM 농도로 oligomycin을 주입하였다. 미토콘드리아의 호흡 언커플러(uncoupler)인 CCCP 1μM의 농도가 되도록 주입하였다. 분석을 종결하기 위하여 전자 수송을 차단하는 미토콘드리아 복합체 1 저해제인 rotenone를 5μM의 농도로 첨가하였다. OCR은 기저 OCR에서 초기 속도에 대해 노말라이즈하였으며, Seahorse software를 사용하여 분석하고 그 결과를 도 5의 a에 도시하였다. 도 5의 a에서 G1은 WT을, G2는 (-/-) 마우스를 나타낸다.

[0042] 도 5의 a에서 기저(Basal) OCR은 WT와 (-/-) 마우스의 췌도에서 유사하였으나, 글루코스 자극에 의해 WT 마우스에서 OCR이 약 2.1배 증가한 것에 반해, (-/-) 마우스에서는 1.3배만이 증가하였다. (-/-) 마우스의 췌도에서 oligomycin에 대한 반응은 정상적이었으나, CCCP에 대한 반응은 지연되었으며 최대 용량(capacity)이 WT 마우스에서는 2.4배인 것에 반해 (-/-) 마우스에서는 1.8배로 감소하였다. 글루코스 자극에 대한 인슐린 분비에서 미토콘드리아의 OxPhos의 정상적인 기능이 요구되므로, (-/-) 마우스의 췌도에서 글루코스 자극에 대한 OCR의 감소는 베타세포에서의 OxPhos의 손상이 글루코스에 대한 반응에서 인슐린의 부적절한 분비의 원인이 됨을 시사한다.

[0043] 인슐린 분비 자체에 대한 Crif1 녹아웃의 효과를 확인하기 위하여, 각각의 유전자형 군별 췌도에서 분배되는 인슐린 양을 계산하였다. 구체적으로 글루코스 자극에 의한 인슐린 분비(GSIS) 분석 전에, 분리된 췌도를 11 mM glucose, 2 mM L-glutamine, 10 % FBS, 100 U/ml penicillin 및 100 μg/ml streptomycin이 보충된 M199배지에서 배양하였다. 10개의 췌도를 수집하여 2mg/ml BAS와 2.8mM glucose가 보충된 Krebs-Ringer bicarbonate buffer(KRB)에서 60분간 배양하고, 2mg/ml BAS와 2.8mM(low), 22mM(high) 또는 40mM KCl이 보충된 KRB 배지에서 60분간 추가로 배양하였다. 배양 후 인슐린의 추출을 위하여 췌도를 acid/ethanol에 재현탁하고 Nature 414: 792-798(2001)의 방법에 따라 acid/ethanol법으로 췌장의 인슐린을 추출하였다. 전체 췌장 및 췌도를 acid/ethanol(1.5% HCl in 70% EtOH)에 넣고 균질화한 후 밤새 교반하였다. 균질화된 시료를 4℃ 2000rpm에서 15분간 원심분리하고, 상등액은 1M Tris-HCl buffer(pH 7.4)로 중화하였다. 상등액에서 인슐린 농도를 insulin ELISA kit(Alpco Diagnostics, Windham, NH, USA)를 사용하여 측정하고 그 결과를 도 5의 b와 c에 도시하였다.

[0044] 도 5의 b와 c에서 WT 또는 (+/-) 마우스에 비해 (-/-) 마우스의 췌도에서 KCl의 자극에 의한 인슐린의 분비가 감소한 것을 확인할 수 있다. KCl은 미토콘드리아에서 APT 생성을 증가시키지 않고 인슐린 분비를 직접적으로 자극하므로, 상기 데이터는 (-/-) 마우스의 베타세포가 단순한 OxPhos의 기능장애 보다는 보다 근원적인 결함이 있음을 나타낸다.

[0045] 4) 주령에 따른 췌도의 형태분석 및 면역형광염색 분석

[0046] 주령에 따른 (-/-) 마우스에서의 당부하의 심화와 KCl 자극에 의한 인슐린 분비의 감소는 베타세포에서 미토콘드리아의 기능장애가 베타세포의 기능성(functional integrity)를 점차적으로 악화시킴을 시사한다. 따라서 연령에 따라 (-/-) 마우스의 췌도의 형태분석 및 면역형광염색을 실시하였다.

[0047] (1) 췌도의 표면적 및 면역형광염색 분석

- [0048] 각 유전자형 군별 4주령 및 11주령의 마우스에서 췌장을 잘라내어 무게를 측정하여 10% NBF (HistoperfectTM fixation, BCBiochemical, WA, USA)에서 4시간 처리한 후, 파라핀에 임베딩하였다. 60 μ m 간격, 4 μ m 두께로 절편을 생성하고, hematoxylin & eosin 염색을 한 후 광학 현미경(Olympus)으로 관측하였다. 췌도의 표면적은 Image Inside software를 사용하여 분석하였다.
- [0049] 4 μ m 두께의 절편에서 파라핀을 제거하고, 탈수한 후 citrate buffer에서 10분간 가열한 후 Anti-insulin(1:200, Cell Signaling Technology, MA, USA) 또는 anti-glucagon (1:200, Sigma, St.Charles, MO, USA) 항체와 반응하였다. 이후 2차 항체로 Alexa dye-conjugated secondary antibodies for multiple labeling (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 처리하여 표지한 후 봉입과정을 거쳐 Olympus Fluoview FV1000 현미경을 이용하여 관찰하였다.
- [0050] 도 6의 a는 췌장조직의 면역형광염색 이미지로 파란색은 DAPI 염색된 부분을 나타내며, 빨간색은 인슐린, 초록색은 글루카곤이 염색된 부분을 나타낸다. 도 6의 b는 췌장에서 인슐린을 acid/ethanol법에 의해 추출한 후 ELISA kit를 사용하여 분석하고, 그 양을 췌장 무게로 나눈 값이며, 도 6의 c는 췌장 무게에 대한 췌도 표면적을 도시한 그래프이다.
- [0051] 도 6의 a에서 인슐린과 글루카곤의 면역형광염색은 각 유전자형별 군에서 4주령의 마우스에서는 면역반응성에 차이가 없음을 나타낸다. 그러나 11주령의 마우스에서는 (-/-) 마우스에서 인슐린 양성 베타세포가 크게 감소한 것을 보여준다. 췌장의 인슐린 함량은 4주령의 (-/-) 마우스에서는 WT 마우스에 비해 20% 정도 감소하였으나, 11주령에서는 68% 정도 감소하였다(n=3). 4주령에는 모든 유전자형별 마우스에서 췌도의 표면적이 서로 유사하였으나, 11주령에는 (-/-) 마우스는 WT 또는 (+/-) 마우스에 비해 췌도의 면적이 45% 정도 감소하였다. 이는 (-/-) 마우스에서 베타세포의 양의 손실이 일어났음을 의미한다.
- [0052] (2) 세포증식 마커의 면역형광염색에 의한 베타세포 증식을 비교
- [0053] 베타세포 양의 점차적인 손실의 메커니즘을 규명하기 위하여 췌장 절편을 인슐린(green)과 함께 세포증식 마커인 Ki67에 대해 면역형광염색(red)하고(도 7의 a), 베타세포의 증식율을 정량화하여 그래프로 나타내었다(도 7의 b). 베타세포의 증식율은 각 췌장 절편에서 최소 4,000개의 인슐린 양성 세포를 대상으로 Ki67과 인슐린 모두에 양성인 세포의 비율로 계산하였다. Ki67 양성 세포의 비율은 4주령과 11주령 모두의 (-/-) 세포에서 유의적으로 감소하였다.
- [0054] (3) 베타세포에서의 세포사멸 분석
- [0055] (-/-) 마우스에서 베타세포 손실 수준을 시험하기 위하여 췌도에서의 세포사멸 수준을 분석하였다.
- [0056] 먼저, 췌도에서의 TUNEL 염색이나 cleaved caspase 9의 면역염색은 각 유전자형별 마우스에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다(데이터 미도시).
- [0057] 도 8의 a는 11주령 (-/-) 마우스의 베타세포 절편의 TEM 이미지로 오른쪽은 x10,000, 왼쪽은 x25,000의 배율이다. 왼쪽의 붉은색 사각형으로 표시된 부분에 이중 막으로 둘러싸이고 작은 미토콘드리아를 포함하는 전형적인 양상의 오토파고솜(autophagosome)이 관측되어 미토파지(mitophagy)의 존재를 시사하였다. 이와 함께 부풀은 미토콘드리아 주변의 소포체가 팽창한 것도 관측할 수 있었다(데이터 미도시). 도 8의 b는 11주령 마우스의 췌도에서 웨스턴 블롯으로 LC3-II의 발현량을 분석한 결과(n=5)이며, c는 LC3B로 염색한 췌장 조직의 면역조직화학 이미지이다. 도 8의 b에서 LC3-II의 면역반응성이 증가한 것을 알 수 있으며, c로부터 (-/-) 마우스의 췌도에서 LC3B의 발현이 강하게 유도되었음을 알 수 있다.
- [0058] 이러한 결과들은 세포사멸이 (-/-) 마우스에서의 췌도의 특징들과 연관되어 있음을 나타낸다.
- [0059] 5) 글루카곤 유사 펩티드-1(GLP-1) 길항제에 의한 영향 평가
- [0060] GLP-1 길항제인 Exenatide는 인슐린 분비를 개선하고, 베타세포의 증식을 자극하며, 베타세포의 사멸을 방지하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다. Exenatide는 (-/-) 마우스에서의 베타세포의 점진적인 악화에 대해 효능이 있는지 확인하기 위하여, 두 군에서 베타세포의 양이 유사하였던 4주령의 WT 마우스와 (-/-) 마우스에 Exenatide (10nmol/kg) 또는 생리식염수를 매일 4주간 피하주사하였다. 이후 상기 실시예에서와 동일한 방법으로 췌도의 형태검사(n=3), 베타세포 증식률 측정(n=3) 및 당부하 검사(n=5)를 실시하고 그 결과를 도 9에 도시하였다. 도 9의 c에서 □는 Exenatide 처리한 WT 마우스를 나타내며, △는 saline 처리한 (-/-) 마우스, ●은

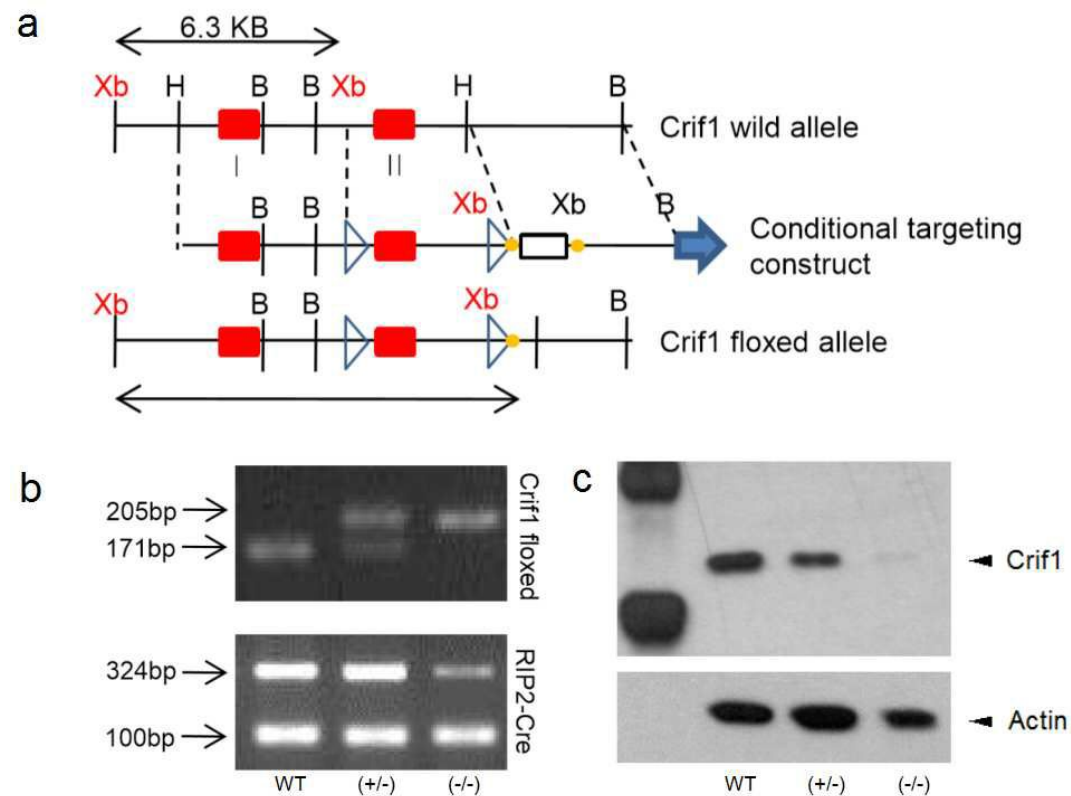
Exenatide 처리한 (-/-) 마우스를 나타낸다. 도 9의 d에서는 각 시간에서 왼쪽은 saline을 처리한 (-/-) 마우스를, 오른쪽은 Exenatide 처리한 (-/-) 마우스를 표시한다.

[0061]

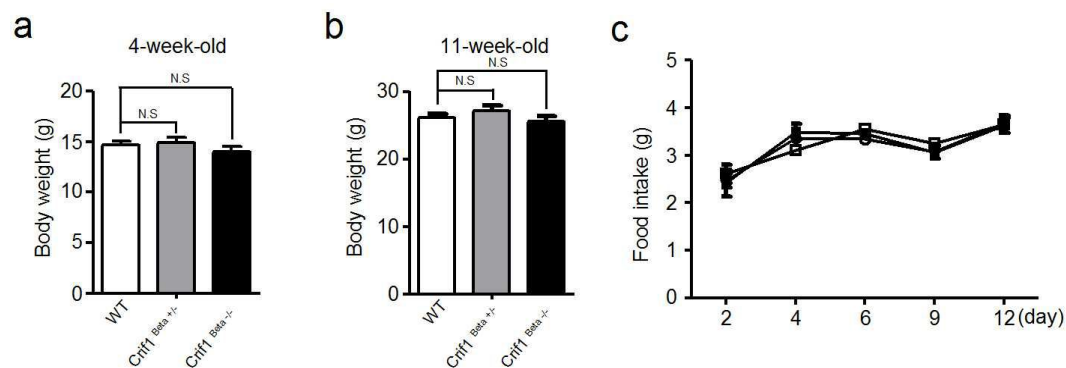
도 9로부터 정상적인 베타세포 모폴로지를 갖는 WT 마우스에서는 Exenatide의 처리에 의해 베타세포의 표면적 (양)과 증식률이 모두 증가하였으나, (-/-) 마우스에서는 베타세포의 양과 증식률 모두에 유의적인 변화가 없었다. 당부하 검사에서도 혈당치나 인슐린 분비에 대해 (-/-) 마우스에서 Exenatide 처리에 의한 유의적인 변화는 관찰되지 않았다. 이로부터 GLP-1 길항제나 DPP-4 저해제는 악화된 미토콘드리아의 기능장애를 갖는 환자에서 보호 효과를 나타내지 않을 것임을 시사한다.

도면

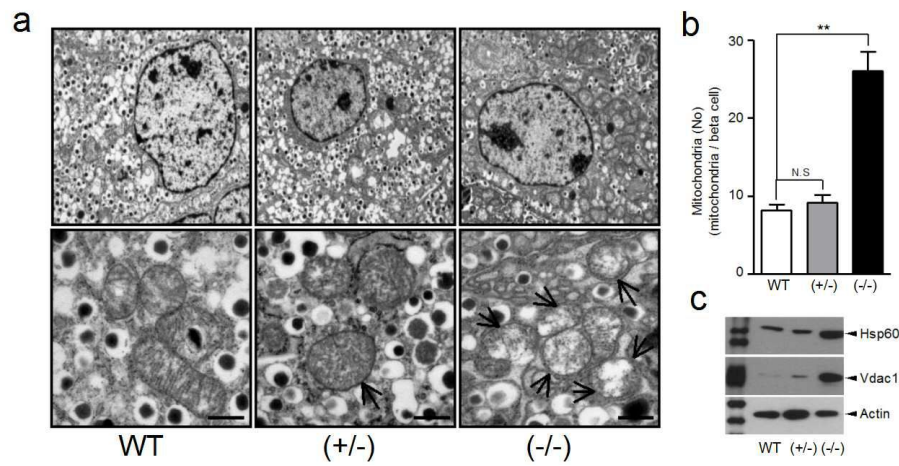
도면1



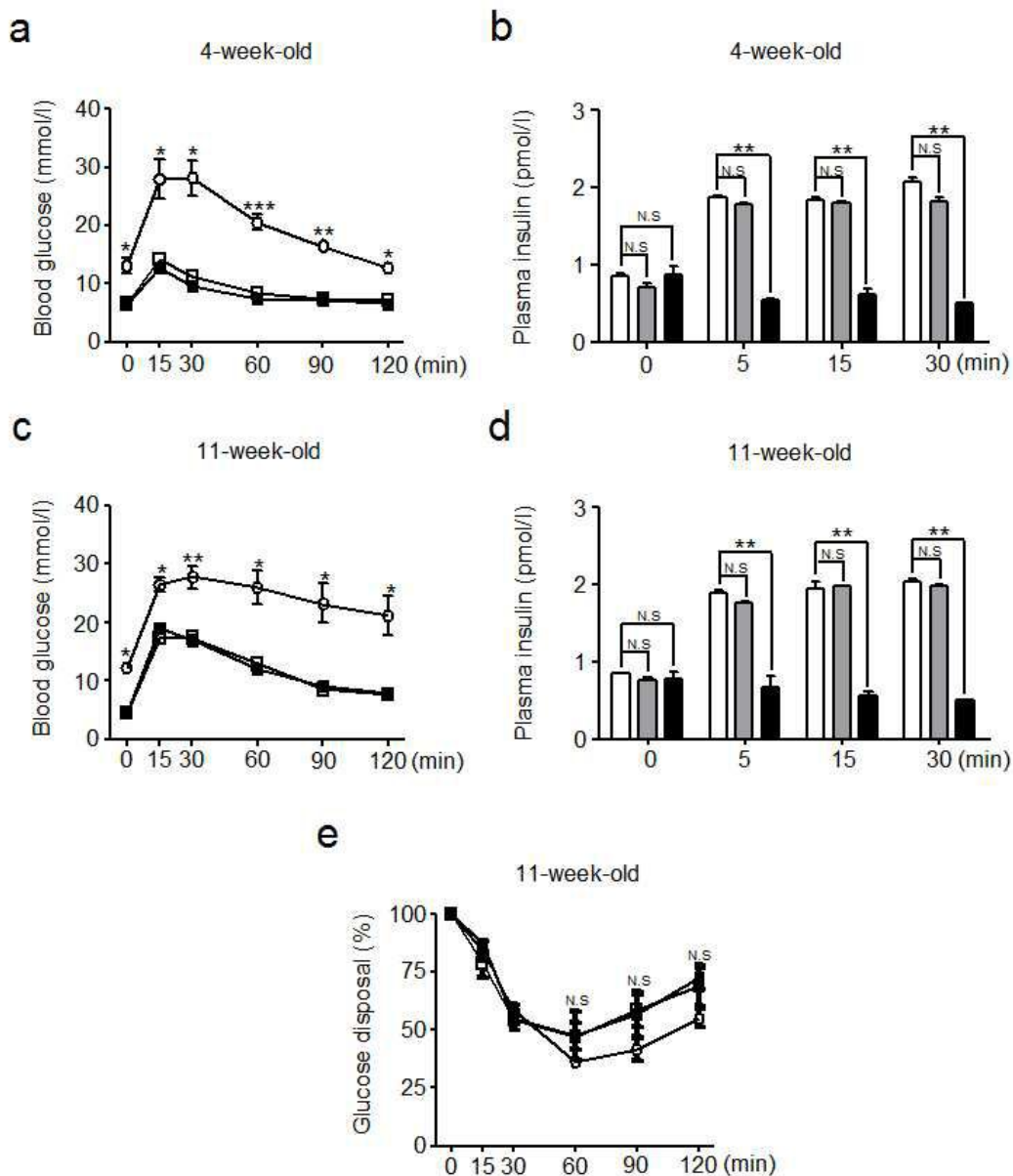
도면2



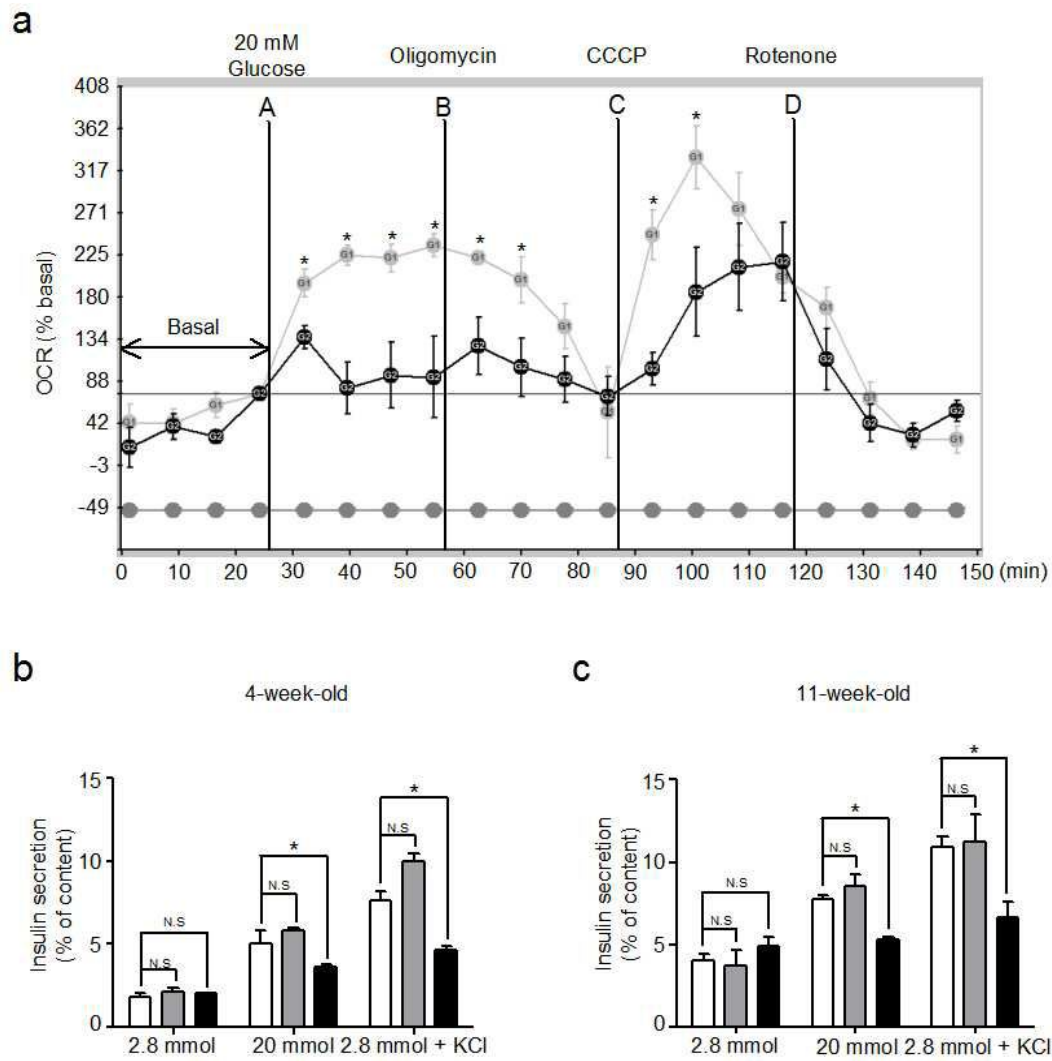
도면3



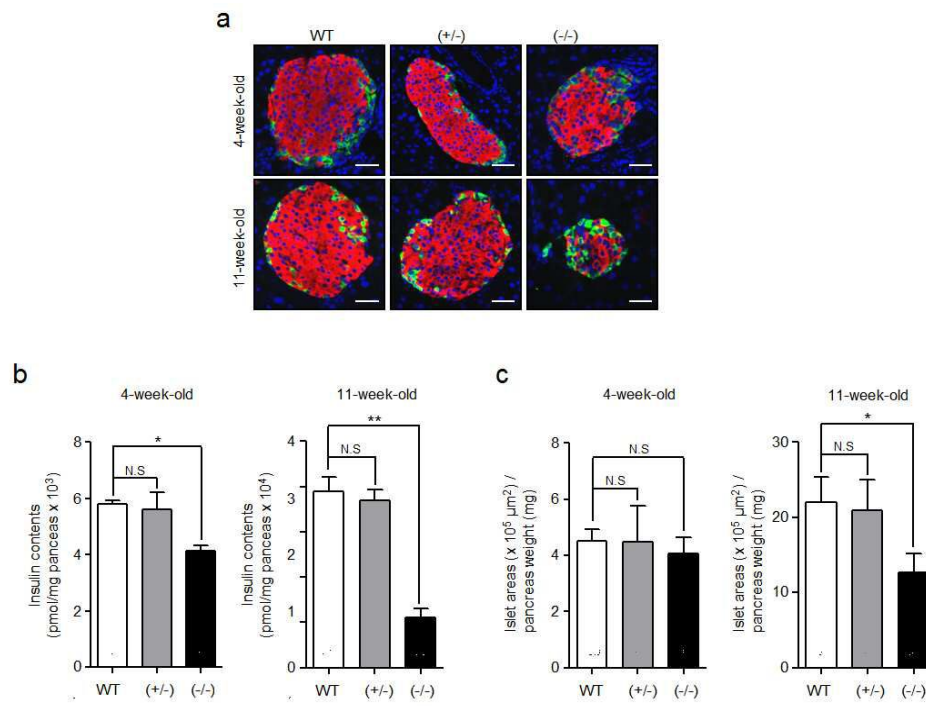
도면4



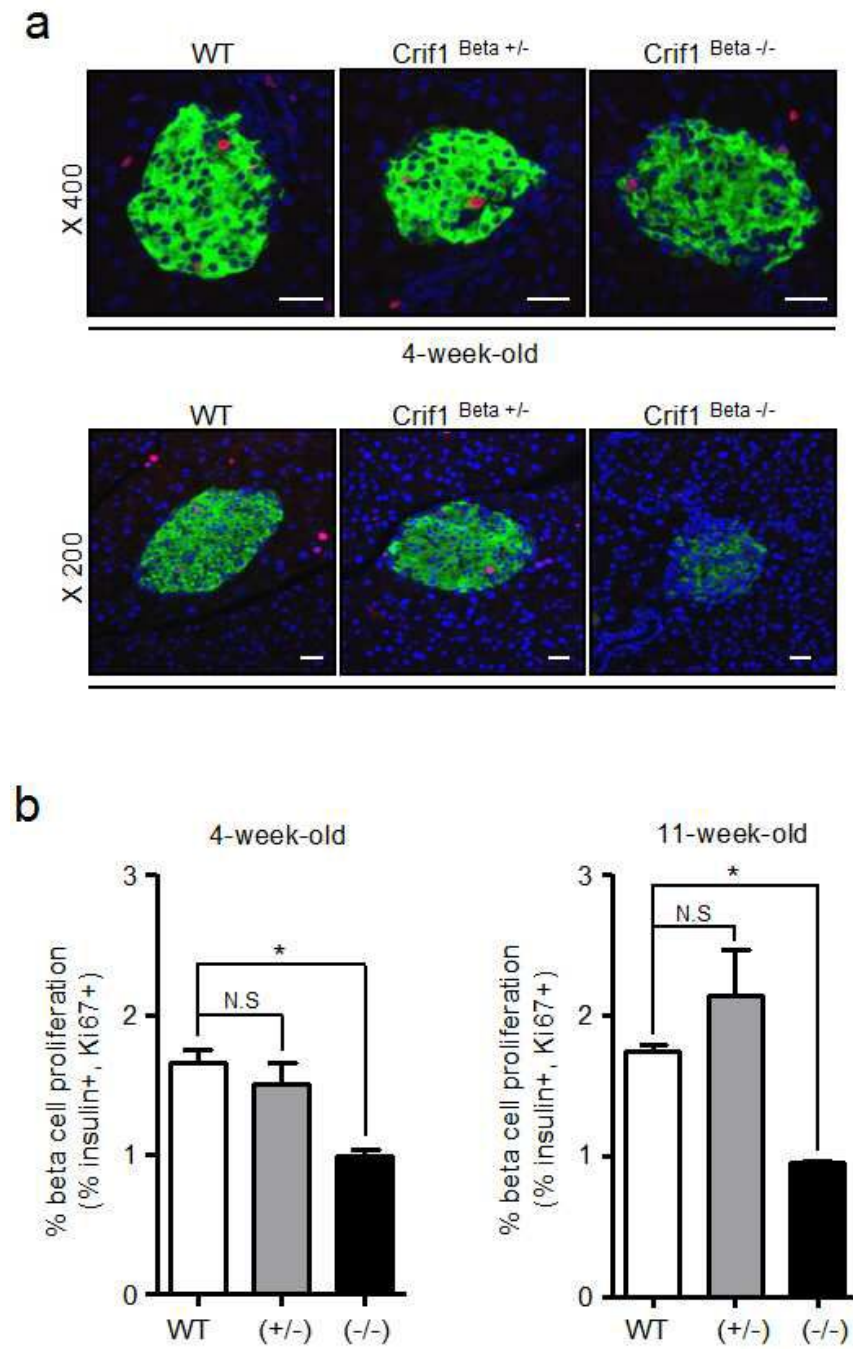
도면5



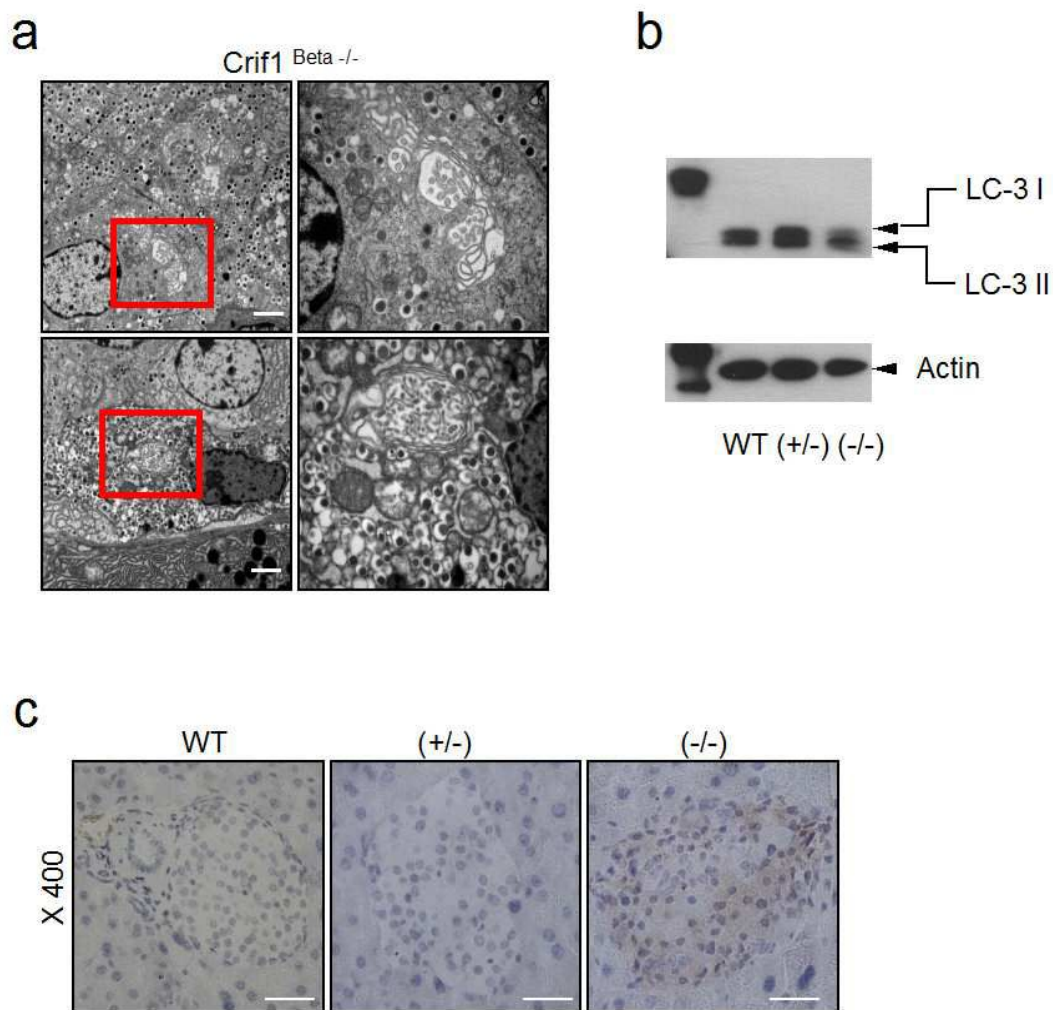
도면6



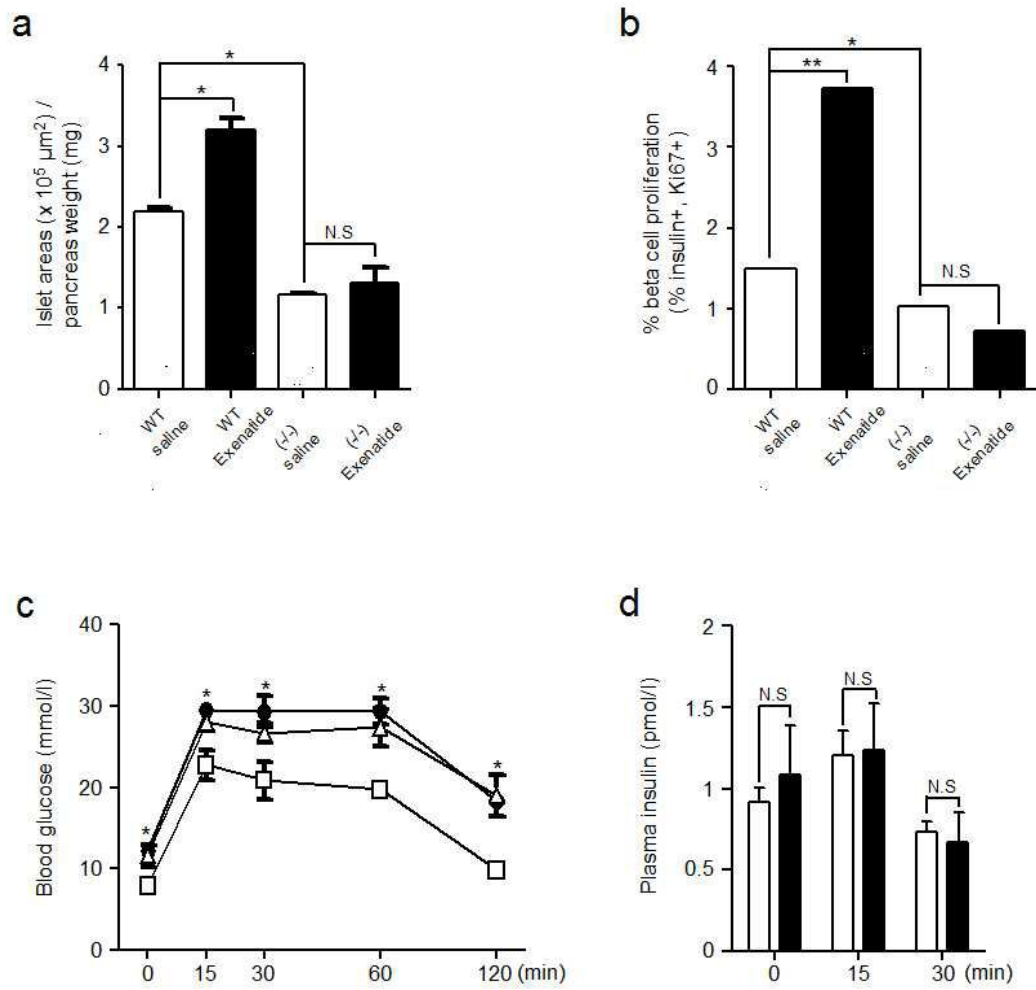
도면7



도면8



도면9



서열 목록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Diabetes Model Mice and Preparation Method thereof

<130> P0115-015

<160> 2

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

gggctgggtga aatgtgttg

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

tcagctaggg tgggacaga

19