

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2019-0124082
(43) 공개일자 2019년11월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/85 (2006.01) *A01K 67/027* (2006.01)*C12N 15/86* (2006.01) *G01N 33/50* (2017.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/8509 (2013.01)*A01K 67/0275* (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0048169

(22) 출원일자 2018년04월25일

심사청구일자 2018년04월25일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

조익현

서울특별시 서초구 신반포로 32, 19동 509호 (반포동, 반포아파트)

장민희

강원도 영월군 남면 들골안길 2-19

이승은

서울특별시 강남구 자곡로3길 45, LH 강남브리즈힐 408-608

(74) 대리인

위병갑

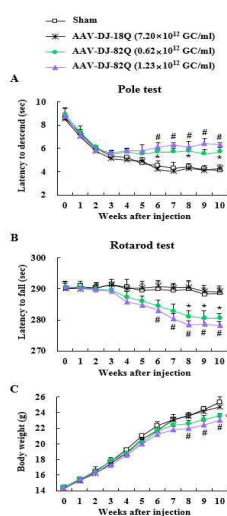
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 아데노-관련 바이러스 벡터를 이용한 헌팅턴병 동물모델 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 헌팅턴병 동물모델 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 인간과 유사한 질환 조건을 제공하고, 높은 재현성으로 간편하게 동물모델을 제조할 수 있어, 헌팅턴병 연구 및 치료제 개발 등 해당 질환의 연구 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/86 (2013.01)
G01N 33/5082 (2013.01)
A01K 2217/05 (2013.01)
A01K 2217/075 (2013.01)
A01K 2267/0318 (2013.01)
C12N 2750/14141 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1A2A2A05069493
 부처명 과학기술정보통신부
 연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공분야기초연구사업/중견연구자지원사업/핵심(후속)

연구과제명 헌팅턴질환 동물모델에서 미세아교세포 활성화의 병리 기능 및 치료기술 연구: aaV/DJ 백
 터와 shRNA 활용

기 여 율 50/100
 주관기관 경희대학교 산학협력단
 연구기간 2017.09.01 ~ 2020.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016M3C7A1905074
 부처명 미래창조과학부
 연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업/뇌과학원천기술개발사업

연구과제명 신경손상 연관 뇌기능조절 microglia 타겟 발굴 및 제어 융합기술 개발

기 여 율 50/100
 주관기관 서울대학교 산학협력단
 연구기간 2016.06.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

폴리-Q 및 헌팅틴 유전자를 포함한 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 아데노-관련 바이러스 벡터 (Adeno-associated viral vector; AAV 벡터)를 인간을 제외한 동물의 선조체 (striatum)에 주입하는 단계를 포함하는 헌팅턴병 동물모델의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리-Q 유전자는 36회 이상의 글루타민 반복 (repeats)을 갖는 아미노산을 암호화하는 것인, 헌팅턴병 동물모델의 제조 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 폴리-Q 유전자는 36회 이상의 CAG 코돈 반복 (repeats)을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것인, 헌팅턴병 동물모델의 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 폴리-Q 유전자는 82회의 글루타민 반복 (repeats)을 갖는 아미노산을 암호화하는 것인, 헌팅턴병 동물모델의 제조 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 폴리-Q 및 헌팅틴 유전자는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 것인, 헌팅턴병 동물모델의 제조 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 아데노-관련 바이러스 벡터는 혈청형 DJ (AAV-DJ)인 것인, 헌팅턴병 동물모델의 제조 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 AAV의 주입은 1×10^{11} GC/ml 내지 1×10^{13} GC/ml의 투여량으로 주입되는 것인, 헌팅턴병 동물모델의 제조 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 동물은 마우스, 래트, 햄스터, 토끼, 소, 말, 돼지, 양 또는 염소인, 헌팅턴병 동물모델의 제조 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따라 제조된 헌팅턴병 동물모델.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 동물모델은 선조체에서 신경퇴화, 세포사멸 증가, 신경아교세포 (glial) 활성화, 염증 매개체의 발현 증가 및 행동장애로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 특성을 나타내는, 헌팅턴병 동물 모델.

청구항 11

(a) 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따라 제조된 동물모델에 시험 물질을 처리하는 단계; 및
(b) 상기 시험 물질 처리 후 동물모델에서 헌팅턴병의 경감 또는 치료 정도를 평가하는 단계를 포함하는, 헌팅턴병 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 (b) 단계의 헌팅턴병의 경감 또는 치료 정도의 평가는 상기 동물모델에 시험 물질의 처리 전후 선조체에서 신경퇴화, 세포사멸, 신경아교세포 (glial) 활성화 및 염증 매개체의 발현으로부터 선택되는 어느 하나 이상의 특성 변화를 확인하는 것인, 헌팅턴병 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 (b) 단계의 헌팅턴병의 경감 또는 치료 정도의 평가는 대조군으로서 기존의 헌팅턴병 치료제를 처리한 경우 또는 시험 물질로 치료하지 않은 경우와 비교하는 단계를 추가로 포함하여 수행되는, 헌팅턴병 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 (b) 단계의 헌팅턴병의 경감 또는 치료 정도의 평가는 웨스턴 블롯 분석 또는 면역형광 염색법을 수행하여 평가되는 것인, 헌팅턴병 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 헌팅턴병 동물모델 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 헌팅턴병 (Huntington's disease, HD)은 불수의 (involuntary) 비정상 운동, 인지력 저하, 정서적 및 정신적 장애를 특징으로 하는 유전적 신경퇴행성 질환으로서, 한쪽 부모에게서 비정상적 상염색체 우성 유전자를 받을 경우 발병한다. 헌팅턴병은 전형적으로 35 ~ 45세에서 분명한 초기 첫 번째 임상 증상이 나타난 후 15 ~ 20년 이내에 사망으로 진행되며, 선조체 (striatum, 줄무늬체)를 포함한 뇌의 여러 영역에서 헌팅턴 (HTT) 유전자의 CAG 반복의 확장에 의해 유발되는 것으로 알려져 있다.

[0003] 특히 헌팅턴병은 운동에 관여하는 뇌의 특정 부위의 신경세포가 서서히 퇴화되어가는 진행성 질환이다. 퇴화되는 과정에서 나타나는 여러 부수적 증상으로 자가 운동조절 능력상실 (uncontrolled movement), 지적기능상실

(loss of intellectual facilities), 감정 장애 (emotional disturbance) 등이 나타나게 되며, 이는 뇌의 하저부에 위치한 대뇌 기저핵 (basal ganglia)에 이상으로 인해 유발된다.

[0004] 헌팅턴병의 증상은 대부분의 다른 유전질환과는 달리 중년까지는 나타나지 않으며, 질환의 발병 후 초기에는 근육의 경련이나 발작이 나타나고 시간이 지나면서 기억력과 근육의 조절 능력을 상실하게 되며 혼란과 성격적인 문제가 동반된다. 나아가 질환이 지속되면서 운동, 사고, 의사소통의 기능을 잃게 되어 결국 장기간 투병 후엔 과다 근육 긴장증과 심한 경직 상태에 이르러 흡입성 폐렴과 호흡곤란, 심부전, 감염으로 쉽게 사망한다.

[0005] 현재까지 헌팅턴병의 원인은 명확히 밝혀지지 않았으며 질환의 진행을 예방하거나 지연시키기 위한 확립된 치료법은 없는 실정이다. 헌팅턴병의 치료를 위한 신약 개발의 중요한 측면은 신경 퇴행성 과정의 근본적인 유전적 및 분자적 기전을 재현하고 헌팅턴병 환자의 전형적 증상을 나타내는 생체 내 모델의 개발이다. 즉, 헌팅턴병과 같은 신경 퇴행성 질환에 대한 새로운 치료 전략의 개발에 있어, 환자에서 나타나는 병인, 병리 및 분자 기전을 정확하게 재현하는 동물 모델이 적극적으로 필요하다.

[0006] 헌팅턴병의 최초 동물모델인 독소모델은 헌팅턴병 환자의 뇌에서 특징지어졌던 2가지 증상인 미토콘드리아 기능 장애 (mitochondrial dysfunction) 및 흥분독성 (excitotoxicity)의 역할을 규명하였다 (Beal MF et. al., Neurochemical and histologic characterization of striatal excitotoxic lesions produced by the mitochondrial toxin 3-nitropropionic acid. J Neurosci 1993; 13: 4181-4192). 그러나 이러한 모델이 헌팅턴병의 생리를 반복하는지 여부는 여전히 불분명하다 (Pouladi MA et. al., Choosing an animal model for the study of Huntington's disease. Nat Rev Neurosci 2013; 14: 708-721). 헌팅턴병의 형질전환 (Transgenic, Tg) 마우스 모델은 마우스 게놈에 청소년 (juvenile) 헌팅턴병 환자의 HTT 유전자 단편을 도입함으로써 생성되었다 (Menalled L et. al., Animal models of Huntington's disease for translation to the clinic: best practices. Mov Disord 2014; 29: 1375-1390). 그러나, 형질전환 모델은 다양한 표현형을 가지며, 선조체에서의 심각한 신경성 퇴행 (neuronal degeneration) 및 수명 감소와 같은 헌팅턴병 병리의 주요 특징을 재현하지 못하며, 동물 계통을 유지하기가 어려워 높은 비용이 소요되는 등의 문제점이 있다.

[0007] 이러한 기술적 배경 하에서, 본 발명자들은 헌팅턴병과 유사한 임상적 증상을 가지는 동물모델을 제조하기 위하여 예의 노력한 결과, 헌팅턴 유전자 돌연변이를 포함하는 아데노-관련 바이러스 (adeno-associated virus; AAV) 벡터 (vector)를 주입한 마우스에서 신경퇴화, 세포사멸 증가, 신경아교세포 (neuroglia) 활성화, 염증 매개체 발현 증가 또는 행동장애가 나타나 헌팅턴병 동물모델로 매우 유용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은 폴리(poly)-Q 및 헌팅틴(huntingtin) 유전자를 포함한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 아데노-관련 바이러스 벡터 (Adeno-associated viral vector; AAV 벡터)를 인간을 제외한 동물의 선조체 (striatum) 내로 주입하는 단계를 포함하는 헌팅턴병 동물모델의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 제조 방법에 따라 제조된 헌팅턴병 동물모델을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 동물모델을 이용한 헌팅턴병 치료제의 스크리닝 (screening) 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 이를 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시된 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0012] 상기의 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, 폴리(poly)-Q 및 헌팅틴 (huntingtin) 유전자를 포함한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 아데노-관련 바이러스 벡터 (Adeno-associated viral vector; AAV 벡터)를 인간을 제외한 동물의 선조체 (striatum, 줄무늬체) 내로 주입하는 단계를 포함하는 헌팅턴병 동물모델의 제조 방법이다.

[0013] 본 발명의 동물모델은 헌팅턴병과 유사한 임상적 증상을 가지면서 높은 재현성을 나타내므로, 발병기전 연구 및

치료제의 개발 등 헌팅턴병과 관련된 다양한 분야에서 매우 유용하게 사용될 수 있다.

- [0014] 본 발명에 있어, "동물모델"이란 인간의 질환과 아주 유사한 형태의 질환을 가진 동물모델을 말한다. 인간의 질환 연구에 있어 질환 동물모델이 의미를 갖는 것은 인간과 동물들 간의 생리적 또는 유전적인 유사성에 의한다. 질환 연구에 있어 생체의학 동물모델은 질환의 다양한 원인과 발병과정 및 진단에 대한 연구용 재료를 제공해주고, 질환 동물모델의 연구를 통해 질환과 관련된 발병기전을 이해할 수 있게 하고, 개발된 신약후보물질의 실제 효능 및 독성 검사를 통해 실용화 가능성의 여부를 판단하는 기초 자료를 얻을 수 있다.
- [0015] 본 발명에 있어 헌팅턴병은 단백질에 독성 기능을 부여하는 4번 염색체 상의 헌팅틴 (huntingtin) 유전자 (*HTT*)의 엑손 1번에 위치한 복수의 CAG 코돈 반복 (repeats)이 비정상적으로 확장하여 발생하는 질환으로, 이러한 확장은 *HTT* 단백질의 구조적 변화를 초래하고 뇌의 다양한 영역에서 돌연변이 *HTT*의 핵 내 함유물 (inclusion)의 형성을 유도하는 연장된 폴리글루타민 (polyglutamine) 서열을 암호화한다.
- [0016] 본 발명에서 벡터에 의해 동물 뇌의 선조체 내로 주입되는 목적 유전자는 폴리-Q 및 헌팅틴 유전자를 포함하는 뉴클레오티드 서열이다.
- [0017] 상기 폴리-Q 및 헌팅틴 유전자를 포함하는 뉴클레오티드 서열은 당업계에 공지된 유전자 재조합 방법에 의하여 제조될 수 있다. 예컨대, 게놈으로부터 핵산을 증폭시키기 위한 PCR 증폭, 화학적 합성법 또는 cDNA 서열을 제조하는 기술 등이 있으며, 당업계에서 공지된 핵산 증폭기술을 제한 없이 이용할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 폴리-Q 유전자는 36회 이상의 글루타민 반복 (repeats)을 갖는 아미노산을 암호화하는 것일 수 있으며, 36회 이상의 CAG 코돈 반복 (repeats)을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함할 수 있다. 상기 헌팅틴 유전자는 헌팅틴 단백질의 N-말단의 엑손-1의 일부 뉴클레오티드 서열일 수 있다.
- [0019] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 폴리-Q 및 헌팅틴 유전자는 82회의 글루타민 반복 (repeats)을 갖는 아미노산을 암호화하는 것 (N171-82Q 돌연변이 *HTT*) 일 수 있으며, 서열번호 1의 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 실시예에 따르면, 82회의 글루타민 반복 (repeats)을 갖는 헌팅틴 유전자를 포함한 AAV 벡터를 마우스의 선조체 내로 주입하는 경우 선조체에서의 신경퇴화, 세포사멸 증가, 신경아교세포 활성화, 염증 매개체 (cyclooxygenase-2 및 inducible nitric oxide synthase)의 발현 증가, *HTT* 응집 증가 및/또는 행동장애 등 헌팅턴병과 유사한 임상적 표현형을 가지면서 높은 재현성을 나타남을 확인하였다.
- [0021] 본 발명에 있어, "벡터"라 함은 구조유전자를 암호화하는 핵산이 삽입될 수 있고, 주입되는 기관, 조직, 세포 내에서 상기 핵산을 발현할 수 있는 벡터로서, 벡터 내 도입된 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 제작물을 말한다.
- [0022] 본 발명에 있어, 상기 바이러스 벡터는 아데노-관련 바이러스 벡터 (Adeno-associated viral vector; AAV 벡터)일 수 있으며, 이는 다른 종류의 바이러스 벡터, 예컨대 레트로바이러스 (Retrovirus) 벡터, 아데노바이러스 (Adenovirus) 벡터, 렌티바이러스 (Lentivirus) 벡터, 헤르페스 바이러스 (Herpes simplex virus, HSV) 벡터, 아비폭스바이러스 (Avipox- virus) 벡터 등과 비교하여 높은 효율로 인간의 헌팅턴병과 유사한 임상적 증상을 유도할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 아데노-관련 바이러스 벡터는 혈청형 DJ (AAV-DJ)일 수 있으며, AAV-DJ는 AAV-2, 8 및 9의 키메라 캡시드 (Chimeric capsid)를 갖는 합성 혈청형이다. 상기 AAV-DJ는 다른 혈청형 AAV 벡터와 비교하여 선조체로의 감염 효율이 우수하며, 높은 재현성으로 헌팅턴병 동물모델을 유도할 수 있다. 또한, AAV-DJ는 선조체에서 헌팅틴 유전자의 발현을 효과적으로 조절할 수 있고, 높은 신경세포 친화도, 삽입 돌연변이의 낮은 위험, 면역 반응의 감소 등 우수한 효과를 나타낼 수 있다.
- [0024] 본 발명의 폴리-Q 및 헌팅틴 유전자는 발현 조절 서열에 작동가능하게 연결되어 상기 벡터 내에 삽입될 수 있다. 본 발명에 있어, "작동 가능하게 연결된다(operably linked)"는 것은 핵산 발현 조절 서열 (예컨대, 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사 조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 해독을 조절할 수 있다. 상기 조절 서열은 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열 및 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열을 포함한다.
- [0025] 본 발명에서 사용되는 프로모터는 당업계에서 통상적으로 사용되는 벡터를 제조하기 위한 프로모터 서열을 제한 없이 사용할 수 있다. 사용될 수 있는 프로모터는 예컨대, CMV (cytomegalovirus) 프로모터, NSE (neuron-specific enolase) 프로모터, SP6 프로모터, T3 프로모터, 또는 T7 프로모터 등일 수 있고, 구체적으로 CMV 프

로모터일 수 있으나, 상기 예에 의해 본 발명에서 사용 가능한 프로모터 서열이 제한되는 것은 아니다.

- [0026] 상기 벡터는, 단백질 분리 정제 또는 확인용 태그 서열을 추가적으로 포함할 수 있다. 태그 서열의 예로는 GFP (green fluorescent protein), GST (glutathione S-transferase)-tag, HA (haemagglutinin), His-tag, Myc-tag, T7-tag, Flag-tag 등이 있으나, 상기 예들에 의해 본 발명의 태그 서열이 제한되는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 일 구현예에 있어, 본 발명의 제조방법은 상기 AAV 벡터를 동물의 선조체 내로 주입함으로써 뇌의 다른 영역, 예컨대 해마 (hippocampus) 또는 소뇌 (cerebellum)로 주입하는 경우와 비교하여 선조체에서의 신경퇴화, 세포사멸 증가, 신경아교세포 활성화, 신경세포 내 염증 매개체 발현 증가 또는 *HTT* 응집 증가, 행동장애 유발 등 헌팅턴병의 임상적 증상을 높은 재현성으로 나타낼 수 있다. 또한, 선조체내로 벡터를 주입함으로써 선조체에서만 특이적으로 상기 증상들이 나타나 인간의 병리와 유사한 질환 조건을 제공할 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명의 제조방법은 어린 마우스, 예컨대 3 내지 5주령 마우스의 선조체 내로 상기 *HTT* 돌연변이를 포함하는 AAV 벡터를 주입함으로써, 성체 마우스에서 상기 헌팅턴병의 임상적 증상 (신경 병리학적 특징 등)을 재현하도록 할 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 "주입"은 "주사" 또는 "감염"과 혼용되어 사용할 수 있다.
- [0030] 본 발명에서, "동물" 또는 "실험동물"이란 인간 이외의 임의의 포유류 동물을 의미한다. 상기 동물은 배아, 태아, 신생아 및 성인을 포함하는 모든 연령의 동물을 포함한다. 본 발명에서 사용하기 위한 동물들은, 예를 들어, 상업용 소스로 부터 이용할 수 있다. 이런 동물들은 실험용 동물 또는 다른 동물, 토끼, 설치류 (예를 들어, 생쥐, 쥐, 햄스터, 게르빌루스 및 기니피그), 소, 양, 돼지, 염소, 말, 개, 고양이, 새 (예를 들어, 닭, 칠면조, 오리, 거위), 영장류 (예를 들어, 침팬지, 원숭이, 붉은털원숭이)를 포함할 수 있다.
- [0031] 상기 인간을 제외한 동물은 마우스, 래트, 햄스터, 토끼, 소, 말, 돼지, 양 또는 염소일 수 있으며, 구체적으로 마우스 또는 래트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 선조체내로의 AAV 벡터의 주입은 인간 헌팅턴병 증상과 유사한 병리를 실험동물에 유발할 수 있는 투여량으로 주입될 수 있으며, 마우스 동물모델의 경우 1.0×10^{10} GC/ml 내지 1.0×10^{14} GC/ml, 구체적으로 1×10^{11} GC/ml 내지 1×10^{13} GC/ml의 투여량으로 주입될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 다른 양태는, 폴리-Q 및 헌팅턴 유전자를 포함한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 아데노-관련 바이러스 벡터 (Adeno-associated viral vector; AAV 벡터)를 인간을 제외한 동물의 선조체 (striatum)에 주입하는 단계를 포함하는 동물모델의 제조 방법에 따라 제조된 헌팅턴병 동물모델이다.
- [0034] 상기 폴리-Q 및 헌팅턴 유전자와 AAV 벡터는 상기에서 설명한 바와 같다.
- [0035] 본 발명의 동물모델은 선조체에서의 신경퇴화, 세포사멸 증가, 신경아교세포 활성화 또는 신경세포 내 염증 매개체 발현 증가, *HTT* 응집 증가, 행동장애 유발 등 헌팅턴병의 임상적 증상과 유사한 표현형을 가지면서 높은 재현성을 나타내므로, 발병기전 연구 및 치료제의 개발 등 헌팅턴병과 관련된 다양한 분야에서 매우 유용하게 사용될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 양태는, (a) 폴리-Q 및 헌팅턴 유전자를 포함한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 아데노-관련 바이러스 벡터 (Adeno-associated viral vector; AAV 벡터)를 인간을 제외한 동물의 선조체 (striatum)에 주입하는 단계를 포함하는 헌팅턴병 동물모델의 제조 방법에 따라 제조된 헌팅턴병 동물모델에 시험 물질을 처리하는 단계; 및 (b) 상기 시험 물질 처리 후 동물모델에서 헌팅턴병의 경감 또는 치료 정도를 평가하는 단계를 포함하는, 헌팅턴병 치료제의 스크리닝 방법이다.
- [0037] 본 발명에서 "치료" 또는 "경감"이란 시험 물질 또는 후보 물질의 투여로 헌팅턴병의 증세를 치료, 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 구체적으로, "치료"는 이롭거나 바람직한 임상적 결과를 수득하기 위한 접근을 의미한다. 본 발명의 목적을 위해서, 이롭거나 바람직한 임상적 결과는 비제한적으로, 증상의 완화, 질병 범위의 감소, 질병 상태의 안정화 (즉, 악화되지 않음), 질병 진행의 지연 또는 속도의 감소, 질병 상태의 개선 또는 일시적 완화 및 경감 (부분적이거나 전체적으로), 검출가능 여부를 포함한다. "치료"는 치료학적 치료 및 예방적 또는 예방조치 방법 모두를 가리킨다. 상기 치료들은 예방되는 장애뿐만 아니라 이미 발생한 장애에 있어서 요구되는 치료를 포함한다. 질병을 "완화 (palliating)"하는 것은 치료를 하지 않은 경우와 비교하여, 질병상태의 범위 및/또는 바람직하지 않은 임상적 징후가 감소되거나 및/또는 진행의 시간적 추이 (time course)가 늦춰지거나 길어지는 것을 의미한다.

- [0038] 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 헌팅틴병 치료용 후보 화합물 (또는 시험 물질)은 단일 화합물, 화합물들의 혼합물 (예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물), 또는 바이오의약품 (예컨대, 단백질, 항체, 펩타이드, DNA, RNA, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, RNAi, 앵타머, RNAzyme 및 DNAzyme) 일 수 있다. 상기 시험 물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있으며 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다.
- [0039] 헌팅틴병이 유발된 동물 모델에 시험 물질을 처리하는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 실시할 수 있다. 예를 들어, 헌팅틴병 동물 모델에 정맥 내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 국소 투여 또는 경피 투여 등의 방법이 포함될 수 있고, 사료 또는 음용수에 포함시켜 경구 투여 형태로 섭취시킬 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0040] 헌팅틴병 동물 모델에서 헌팅틴병의 경감 또는 치료 여부는 예를 들어, 선조체에서의 신경퇴화, 세포사멸, 신경아교세포 활성화, 염증 매개체 또는 동물의 운동장애 등의 변화를 측정함으로써 평가할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 스크리닝 방법에서 상기 시험 물질이 헌팅틴병의 경감 또는 치료에 효과가 있는지 평가하기 위해서 대조군을 이용한 스크리닝이 함께 수행될 수 있다. 대조군이란 시험 물질 처리 후 유의한 변화를 관찰하기 적합한 동물 모델 실험군을 의미하는 것으로, 폴리-Q 및 헌팅틴 유전자를 포함하는 AAV 벡터를 주입하지 않은 동물 모델, 시험물질로 처리되지 않은 동물모델, 기존의 알려진 헌팅틴병 치료제로 처리한 동물모델, 다른 유전자 혹은 유도방법을 통해 헌팅틴병이 유발된 동물모델 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 이러한 측면에서 본 발명의 방법은 대조군 동물모델을 제조하는 단계, 대조군 샘플에 후보 화합물을 처리하는 단계 및 후보 화합물이 헌팅틴병 치료 또는 경감의 효과가 있는지를 대조군과 비교 평가하여 선정하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예컨대, 상기 평가는 본 발명의 폴리-Q 및 헌팅틴 유전자를 포함하는 AAV 벡터를 동물의 선조체내로 주입한 동물모델에 대해 시험 물질을 처리한 경우의 신경퇴화, 세포사멸, 신경아교세포 활성화, 염증 매개체 발현 및/또는 운동장애 정도를 시험 물질을 처리하지 않은 경우와 비교하여 유의적 변화가 있는 것인지를 평가하는 것일 수 있고, 혹은 본 발명의 동물모델에 시험 물질을 처리하여 선조체에서 정상 대조군과 신경퇴화, 세포사멸, 신경아교세포 활성화, 염증 매개체 발현 및/또는 운동 수준이 유사해지는지 여부를 평가하는 것일 수 있다. 이를 통해 헌팅틴병 치료 또는 경감 효과를 보이는 경우 헌팅틴병 질환의 치료제 후보 물질로 선별할 수 있다.
- [0043] 본 발명에 있어, 헌팅틴병의 경감 또는 치료 정도의 평가는 당업계에 공지된 분석방법을 제한 없이 이용할 수 있으며, 구체적으로 웨스턴 블롯 분석 또는 면역형광염색법을 수행하여 평가할 수 있다.

발명의 효과

- [0044] 본 발명의 헌팅틴병 동물모델의 제조방법은 선조체에서 신경퇴화, 세포사멸 증가, 신경아교세포 활성화, 염증 매개체의 발현 증가 또는 행동장애 등 인간의 헌팅틴병과 유사한 질환 조건을 제공하고, 높은 재현성으로 간편하게 동물모델을 제조할 수 있어, 헌팅틴병 연구 및 치료제 개발 등 해당 질환의 연구 개발에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0045] 도 1은 본 발명에 따른 마우스 동물모델에서 매주 폴 행동시험 (pole test), 로타로드 행동시험 (rotarode test) 및 체중 변화를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 마우스 동물모델에서 항-*HTT* (헌팅틴 단백질의 마커), EM48 (돌연변이 헌팅틴 응집체의 마커), NeuN (신경세포의 마커), DARPP32 (줄무늬체 신경세포의 마커) 및 cleaved caspase-3 (아포토시스의 마커)의 발현의 변화를 웨스턴 블롯 및 면역형광염색으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명에 따른 마우스 동물모델에서 항-Iba-1 (미세아교세포의 마커), EM48, NeuN, Iba-1 및 GFAP (별아교세포의 마커) 항체를 사용하여 선조체 절편을 이중 면역형광염색법으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명에 따른 마우스 동물모델에서 TNF- α , IL-6, iNOS, COX-2, p-I κ B α , p-NF- κ B 및 p-STAT3의 발현의 변화를 웨스턴 블롯으로 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명에 따른 마우스 동물모델에서 EM48 (돌연변이 헌팅틴 응집체)이 신경세포 (NeuN), 미세아교세포 (Iba-1), 별아교세포 (GFAP) 및 희소돌기아교세포 (Olig2)에서 발현되는지를 면역형광염색으로 분석한 결과를

나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0046] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0047] **실시예**
- [0048] **실험재료 및 방법**
- [0049] AAV 벡터
- [0050] 본 실시예에서 사용한 바이러스 벡터는 위형 (pseudo-typed)이며, 대상 전이유전자는 AAV-DJ 캡시드에 패키징 (packing)된 AAV-2의 역전된 말단 반복에 의해 측면에 위치하였다. AAV-DJ는 8개의 AAV 혈청형으로부터 하이브리드 캡시드 (hybrid capsid)를 생성하는 DNA 패밀리 셔플링 (DNA family shuffling) 기술을 사용하여 조작하였다. 플로리다 대학의 David R. Borchelt 박사 (SantaFe HealthCare Alzheimer's Disease Research Center)로부터 얻은 82개의 CAG 유전자 반복 (HTT-N171-82Q)을 가진 인간 *HTT*의 처음 3개의 엑손 (171 아미노산)을 AAV-MCS 발현 벡터 (Cell Biolabs, Inc. cat # VPK-410)의 EcoRI-XhoI 제한효소 멀티 클로닝 사이트에 삽입하고 시퀀싱에 의해 검증하였으며, 거대세포바이러스 (cytomegalovirus, CMV) 전초기 (immediate early) 인핸서 (enhancer) 및 프로모터 (promotor) 하에서 발현하여 HTT-N171-82Q를 포함하는 벡터 (AAV-DJ-HTT-N171-82Q)를 제조하였다.
- [0051] 18Q CAG 반복의 *HTT* cDNA (서열번호 2)를 포함하는 벡터를 대조군 벡터 (AAV-DJ-HTT-N171-18Q)로 사용하였으며, 상기 HTT-N171-82Q를 포함하는 벡터와 동일한 방법으로 제조하였다.
- [0052] 그 후, AAV-DJ-HTT-N171-82Q 및 AAV-DJ-HTT-N171-18Q 벡터를 KIST Virus Facility (<http://virus.kist.re.kr>)에서 아이오디사놀 (iodixanol) 구배 (gradient)로 정제하였으며, 각 벡터의 생산 역가는 AAV-DJ-HTT-N171-82Q의 경우 1.3 E13 genome copies/ml (GC/ml)이었고, AAV-DJ-HTT-N171-18Q의 경우 1.6 E13 GC/ml이었다.
- [0053] 실험동물
- [0054] 실험 1 주일 전부터 수컷 C57BL/6 마우스 (Narabiotec Co., Ltd., Seoul, Republic of Korea)를 12 시간 명암 주기로 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 의 일정 온도로 유지하고, 음식과 물을 자유롭게 먹여 적응시켰다. 모든 실험 절차는 경희대학교 동물 실험 관리위원회에 의해 검토되고 승인되었으며, 이 과정에서 신경 질환의 전임상 모델에 대한 NIH Workshop의 최근 권장 사항에 따라, 실험실 동물의 적절한 무작위 추출 및 데이터 처리를 블라인드 방법으로 수행하였다.
- [0055] 실험군
- [0056] AAV-DJ-82Q 벡터의 감염 효과를 확인하기 위해, 4 주령의 어린 마우스를 5 일간의 예비 행동 검사로 선별하였다. 상기 선별된 마우스를 sham ($n = 5$), AAV-DJ-18Q (7.9×10^{12} GC/ml, $n = 7$), AAV-DJ-82Q (0.62×10^{12} GC/ml, $n = 7$) 및 AAV-DJ-82Q (1.23×10^{12} GC/ml, $n = 7$) 군으로 나누었다.
- [0057] 뇌 정위 수술 (Stereotactic brain surgery)
- [0058] 마우스 (4 주령; 체중 14 ~ 15 g)를 마취 (2 ~ 3% isoflurane, 60% O₂, 40% N₂O)시켜 정위 기구 (myNeuroLab, St. Louis, MO, USA)에 놓고 이어바 (ear bars)와 헤드홀더로 고정시켰다. AAV-DJ-18Q (7.9×10^{12} GC/ml) 및 AAV-DJ-82Q (0.62×10^{12} GC/ml 및 1.23×10^{12} GC/ml) 2 ml를 30-게이지의 날카로운 팁 (sharp-tip)이 장착된 해밀턴 시린지 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA)를 사용하여 0.5 μl /분의 속도로 양측 선조체의 중앙 관상면 (coronal level) (stereotaxic coordinates in mm with reference to the bregma were anteroposterior, +0.8; mediolateral, ± 2.0 ; dorsoventral, - 2.5; Paxinos and Watson, 1998)에 주입하였다. 역류를 최소화하기 위해 5분 후 바늘을 3분 동안 제거하고, 수술 봉합 후 마우스가 깨어날 때까지 따뜻한 패드 위에 두었다.
- [0059] 행동평가

- [0060] AAV-DJ-82Q 벡터의 주입이 신경 손상 (운동 조절 능력 감소 및 불균형)을 유도하는지를 조사하기 위해, AAV-DJ-82Q 벡터 주입 1일 전부터 10주 동안 매주 체중을 측정하고 폴 및 로타로드 행동시험을 실시하였다.
- [0061] 폴 검사의 경우, 각 마우스를 머리가 위를 향하도록 굴곡 표면 (직경 1 cm, 높이 50 cm)이 있는 폴의 꼭대기에 두었으며, 마우스가 폴 꼭대기에서 완전히 바닥까지 내려간 시간을 측정하였다. 폴 검사 1 시간 후 각 마우스를 회전 로드 (직경 = 4 cm)에 놓고 16 rpm/초로 5분간 시험하였고, 이 시간 내에 로타로드 기구에서 떨어지는 시간을 마그네틱 트립 플레이트에 의해 기록하였다. 모든 행동시험은 일정한 온도 ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) 및 습도 ($55 \pm 5\%$) 조건 하에서 실험 조건을 알지 못하는 실험자가 수행하였다.
- [0062] 첫 번째 검사 전 5일 동안 마우스를 폴 및 로타로드 기구에 적응시켰다. 폴 꼭대기에서 아래쪽으로 돌고 2분 이내에 바닥으로 내려가 훈련 중 (5분 동안) 떨어지지 않고 로드 위에 머물렀던 마우스를 선택하여 무작위로 실험 그룹을 나누었다.
- [0063] 조직 준비 및 면역형광검사
- [0064] AAV-DJ-82Q 벡터 주입 10주 후 (출생 후 14주)에 선조체의 조직병리학적 변화를 조사하기 위하여, 마우스 (그룹당 7 마리)를 디에틸에테르로 마취시키고 0.1 M 인산 완충액 (phosphate buffer, PB, pH 7.4)의 식염수 및 차가운 4% 파라포름알데히드 (paraformaldehyde)로 심장 내로 관류하였다. 뇌를 제거하고 24시간 동안 고정시킨 후 4°C 에서 인산완충액 (phosphate buffered saline; PBS) 중 10, 20 및 30% 수크로오스에 연속적으로 동결 보존하였다. 동결절편용 마이크로톰 (모델, CM3050S)을 사용하여 선조체의 연속 관상절편 (coronal sections, 두께 $30 \mu\text{m}$)을 수득한 후에, PBS에 담겨서 (free-floating section) 보관하였다.
- [0065] 상기 수득한 선조체의 중앙부분의 관상면의 절편을 사용하여 면역형광염색을 시행하였다. 구체적으로, 각 그룹 (뇌 당 $n = 2$)의 뇌 절편을 마우스 항-HTT 단백질 (1:400; catalog MAB5374, clone EM48; Millipore, Darmstadt, Germany), 토끼 항-NeuN (1:5,000; Abcam, Cambridge, MA, USA), 토끼 항-cleaved caspase-3 (1:500; Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA), 토끼 항-Iba 1 (ionized calcium-binding adapter molecule 1) (1:2,000; WAKO, Chuo-Ku, Japan) 및 토끼 항-GFAP (glial fibrillary acidic protein) (1:5,000; DACO, Carpinteria, CA, USA)과 함께 실온에서 교반하면서 밤사이 동안 배양하였다. 상기 각 항체로 처리된 절편을 이차 항체의 혼합액으로 처리하고, DAPI가 포함된 vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)로 봉입(mounting)하고, 공초점 이미징 시스템 (LSM 5 PASCAL; Carl Zeiss, Germany)으로 확인하였다.
- [0066] 웨스턴 블롯 분석
- [0067] AAV-DJ-82Q 벡터 주입 10주 후 (출생 후 14주), 마우스 (그룹당 7마리)를 마취시키고 선조체 (striatum)를 용해 PBS로 즉시 제거하였다. 각 선조체로부터 단백질 ($30 \mu\text{g}$)을 폴리비닐리덴 플루오라이드 (polyvinylidene fluoride membrane; PVDF) 막으로 옮기고 블로킹 (blocking)하였다. 상기 PVDF 막을 마우스 항-HTT (1:500; catalog LS-C24591-100, a.a. 181-810, clone 2Q75; LifeSpanBioSciences, Seattle, WA, USA), 마우스 항-HTT 단백질 (1:200; catalog MAB5374, clone EM48; Millipore, Darmstadt, Germany), 토끼 항-NeuN (1:2,000; Abcam), 마우스 항-DARPP 32 (dopamine- and cAMP-regulated neuronal phosphoprotein) (1:2,000; BD Biosciences, San Jose, CA, USA), 토끼 항-cleaved caspase-3 (1:1,000; Cell Signaling Technology), 토끼 항-Iba 1 (1:1,000; WAKO), 마우스 항-GFAP (1:2,000; Millipore), 토끼 항-Olig2 (oligodendrocyte transcription factor 2) (1:500; Millipore), 토끼 항-Olig2 (1:500; Abcam), 토끼 항-TNF- α (tumor necrosis factor- α) (1:500; Cell Signaling Technology), 토끼 항-IL-6 (interleukin 6) (1:500; Cell Signaling Technology), 마우스 항-iNOS (inducible nitric oxide synthases) (1:500; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), 마우스 항-COX-2 (cyclooxygenase-2) (1:500, BD Biosciences), 토끼 항-p-I κ B α (phospho-IkappaB- α) (1:500; Cell Signaling Technology), 토끼 항-p-NF- κ B (phospho-nuclear factor kappa B) (1:500; Cell Signaling Technology) 및 토끼 항-p-STAT3 (phospho-signal transducer and activator of transcription 3) (1:500; Cell Signaling Technology)로 처리하고, 겨자무과산화효소 (horseradish peroxidase)가 결합된 2차 항체와 함께 배양하였다. PVDF 막의 화학적 발광 (chemiluminescence)의 정도는 ECL kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 측정되었다.
- [0068] 각 단백질의 발현 정도를 표준화 (normalization)하기 위하여, PVDF 막을 제거하고 마우스 항-GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) (1:5,000; Cell Signaling Technology)로 다시 반응시켰다. 웨스

턴 블롯을 3회 수행한 후 포토샵 CS2 프로그램 (Adobe, San Jose, CA, USA)을 사용하여 각 밴드의 밀도를 수치로 변환하고, 유의미한 단백질 밴드 바로 옆 영역의 배경 값을 제외시켰으며, 데이터를 각 샘플에 대해 총 GAPDH에 대한 단백질 비율로 표현하였다.

[0069] 통계분석

[0070] 통계 분석은 Windows 용 SPSS 21.0 패키지 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)를 이용하여 수행하였으며, Tukey post hoc test를 이용한 one-way ANOVA를 사용하여 다중비교를 수행하였다. 모든 데이터는 평균 $\pm$ S.E.M.로 나타내었고 달리 명시하지 않는 한 통계적 차이는 5% 수준에서 인정된다.

[0071] 실험결과

[0072] AAV-DJ-82Q 벡터 주입은 신경 손상을 유도한다.

[0073] 먼저, AAV-DJ-82Q 벡터 주입이 신경학적 증상을 유발하는지 여부를 확인하고 바이러스 벡터의 효과적인 투여량을 선택하기 위해, 폴 및 로타로드 행동시험을 사용하여 AAV-DJ-82Q 벡터 주입 후 매주 마우스의 운동조절 기능 및 균형조절 기능을 측정하였으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0074] 도 1에서 확인되는 바와 같이, 폴 검사에서, AAV-DJ-82Q 벡터 주입 후 4주 (출생 후 8주)부터 폴 바닥까지의 평균 하강 시간 (0.62×10^{12} GC/ml 군: 5.7 ± 0.3 초; 1.23×10^{12} GC/ml 군: 6.3 ± 0.2 초)은 주사 후 8주째에 sham 군 (주입 후 8 주에 4.3 ± 0.5 초) 및 AAV-DJ-18Q 군 (주입 후 8 주에 4.0 ± 0.3 초)에 비해 증가했다 (도 1A).

[0075] 로타로드 검사에서, AAV-DJ-82Q 벡터 주입 4주 후 (0.62×10^{12} GC/ml 군: 282.9 ± 2.3 초; 1.23×10^{12} GC/ml 군: 280.3 ± 1.7 초, 주입 후 8주)부터 sham 군 (289.5 ± 1.9 초, 주입 후 8주) 및 AAV-DJ-18Q군 (290.5 ± 1.3 초, 주입 후 8주)에 비해 평균 반응시간 (latency)이 감소했다 (도 1B).

[0076] 또한, 폴 및 로타로드 검사 모두에서 높은 용량의 AAV-DJ-82Q 벡터 주입은 보다 심각한 운동 장애를 일으킴을 확인할 수 있다.

[0077] 또한, 체중 변화는 부분적으로 유의하게 감소하였고 행동 증상 모두에 부분적으로 상응하였다 (도 1C).

[0078] AAV-DJ-82Q 벡터 주입은 돌연변이 HTT 발현을 증가시키고 선조체에서 신경퇴화를 유도한다.

[0079] AAV-DJ-82Q 벡터의 1.23×10^{12} GC/ml 주사가 0.62×10^{12} GC/ml 대비 더 효과적으로 신경 손상을 유발했기 때문에, 동일 투여량에서 신경 손상이 AAV-DJ-82Q 벡터 주입 정도와 관련이 있는지를 조사하였다.

[0080] AAV-DJ-82Q 벡터 주입 8주 후에 HTT의 마커 (catalog LS-C24591-100, a.a. 181-810, clone 2Q75)에 대한 웨스턴 블롯 분석에 의하여, AAV-DJ-82Q 벡터의 감염 수준을 측정하였다. 돌연변이 HTT의 발현 수준 (250 KDa보다 큰 사이즈)은 sham 군 및 AAV-DJ-18Q 군과 비교하여 AAV-DJ-82Q 벡터 군의 선조체에서 현저히 증가한 반면, AAV-DJ-18Q 군의 선조체에서는 검출되지 않았다 (도 2A 및 2D). 그러나 정상 HTT의 발현 수준 (75 KDa보다 작은 사이즈)은 AAV-DJ-82Q 벡터 군과 비교하여 sham 군 및 AAV-DJ-18Q 군의 선조체에서 현저히 증가한 반면, AAV-DJ-82Q의 선조체에서는 검출되지 않았다 (도 2A 및 2D).

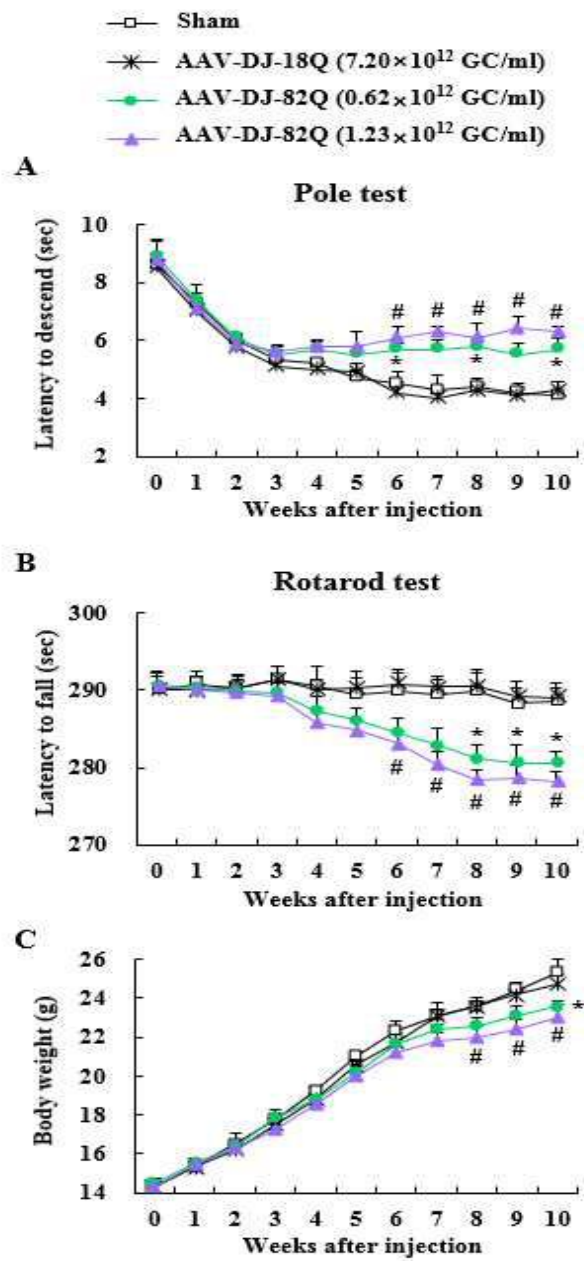
[0081] 또한, 돌연변이 HTT 응집체 마커인 EM48 단백질 (catalog MAB5374, clone EM48)에 대한 웨스턴 블롯 및 면역조직화학 분석에 의하여, AAV-DJ-82Q 벡터의 감염 수준을 측정하였다. EM48의 단백질의 발현 수준은 sham 군과 비교하여 AAV-DJ-82Q 벡터 군의 선조체에서 현저히 증가한 반면, AAV-DJ-18Q 군에서는 선조체에서의 EM48 발현이 검출되지 않았다 (도 2B 및 2D). 상기 결과와 일치하여, 많은 EM48-면역반응 (immunoreactive) 세포가 AAV-DJ-82Q 벡터 군의 선조체에서 검출된 반면, sham 군 및 AAV-DJ-18Q 군의 선조체에서는 검출되지 않았다 (도 2E 내지 2G).

[0082] 상기 결과를 토대로, AAV-DJ-82Q 벡터의 주입이 선조체에서 신경 퇴행을 유도했는지를 확인하였다. NeuN (신경세포의 마커), DARPP-32 (선조체 신경세포의 마커) 및 cleaved caspase-3 (아포토시스의 마커)의 단백질 발현 (도 2C 및 2D)은 NeuN 및 cleaved caspase-3 면역 반응성 세포의 발현 양상 (도 2H 내지 2M)과 일치하는 AAV-DJ-18Q 벡터 군 및 sham 군과 비교하여 AAV-DJ-82Q 벡터 군의 선조체에서 유의하게 향상되었다. 이러한 결과는 AAV-DJ-82Q 벡터의 주입이 선조체에서 돌연변이 HTT를 과다 발현시켜 세포 사멸과 관련된 신경 퇴행을 유발할 수 있음을 시사한다.

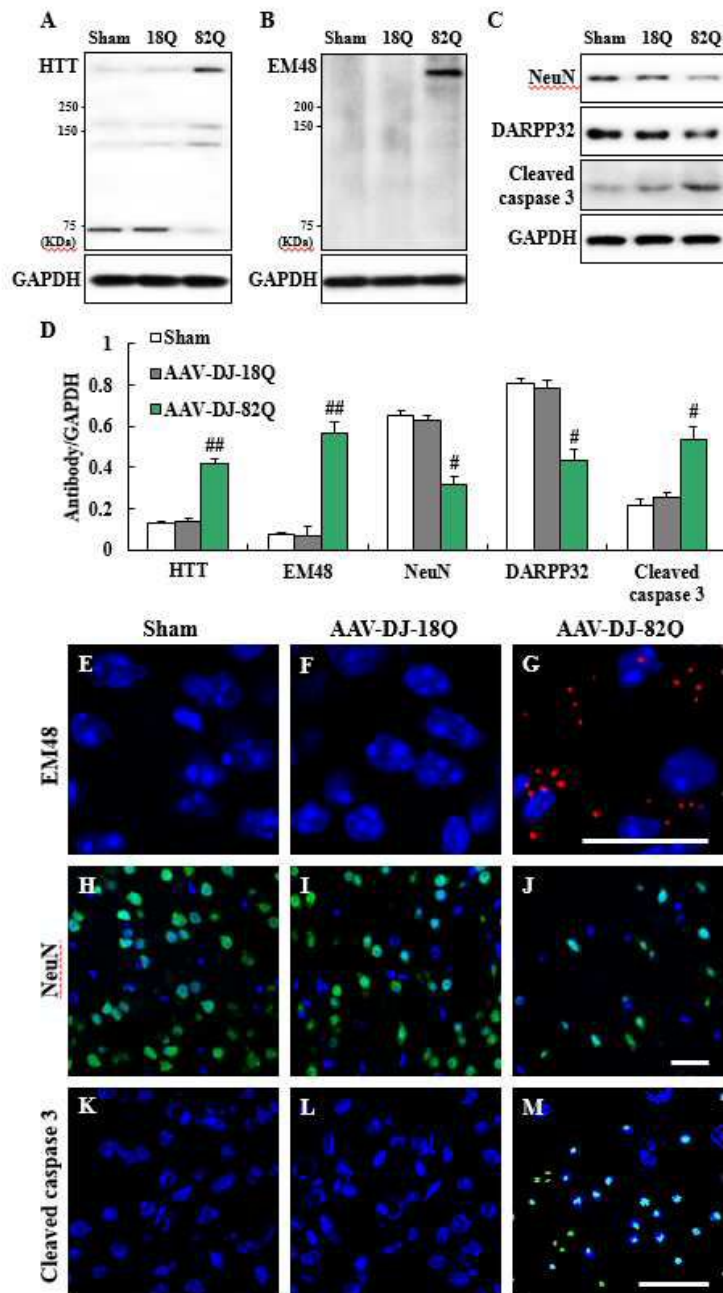
- [0083] AAV-DJ-82Q 벡터 감염은 선조체에서 미세아교세포(microglia, 소교세포) 및 별아교세포(astrocyte, 성상세포)의 활성화를 유도한다.
- [0084] 선조체에서 AAV-DJ-82Q 벡터 감염이 신경아교세포 (neuroglia)의 특징에 영향을 주는지를 조사했다 (도 3).
- [0085] 웨스턴 블롯 분석에 의한 Iba-1 (미세아교세포 마커) 및 GFAP (별아교세포 마커)의 단백질 발현은 sham 군 및 AAV-DJ-18Q 벡터 군과 비교하여 AAV-DJ-82Q 벡터 군의 선조체 병변에서 유의하게 향상되었다 (도 3A 및 3B). 이러한 결과와 일치하여 Iba-1 면역 반응성 미세아교세포의 강도는 AAV-DJ-82Q 벡터 군에서 선조체 병변 내 또는 주위에서 증가하였고, 작은 세포체 및 얇은 돌기를 갖는 휴지기 세포의 전형적인 형태를 일반적으로 나타내는 sham 군 및 AAV-DJ-18Q 벡터 군과 비교하여 면역 반응성 세포는 세포체가 넓고 짧으며 두꺼운 돌기로 활성화된 형태를 보였다 (도 3C 내지 3E). 또한 GFAP-면역 반응성 별아교세포의 강도는 sham 군 및 AAV-DJ-18Q 벡터 군과 비교하여 AAV-DJ-82Q 벡터 군의 선조체 병변 내 또는 주위에서 증가하였다 (도 3F 내지 3H). 그러나, AAV-DJ-82Q 벡터 주입은 Olig2 (회돌기아교세포 마커)의 단백질 발현에 유의한 영향을 미치지 않았다 (도 3A 및 3B). 이러한 결과는 AAV-DJ-82Q 벡터 주입이 미세아교세포와 별아교세포의 활성화를 유도함으로써 선조체 세포 사멸 및 신경기능 이상을 일으킬 수 있음을 시사한다.
- [0086] AAV-DJ-82Q 벡터 감염은 선조체에서 염증매개인자 및 염증신호기전을 유도한다.
- [0087] 활성화된 미세아교세포 및 별아교세포가 염증 반응에 관여하므로, 웨스턴 블롯 분석을 통해 AAV-DJ-82Q 벡터 주입 8주 후 선조체에서 대표적인 염증 매개 인자의 발현 수준을 측정하였다 (도 4A 내지 4C).
- [0088] Sham 군 및 AAV-DJ-18Q 벡터 군의 선조체에서 TNF- α , IL-6, iNOS 및 COX-2 단백질의 발현은 거의 또는 전혀 나타나지 않았지만, AAV-DJ-82Q 벡터 군의 선조체에서는 그 발현이 유의하게 증가되었다 (도 4A 및 4B).
- [0089] 또한, 염증반응을 일으키는 대표적인 신호기전의 활성화의 수준을 측정하였다 (4A 및 4C). Sham 군 및 AAV-DJ-18Q 벡터 군의 선조체에서 p-I κ B α , p-NF- κ B 및 p-STAT3 단백질의 발현은 거의 또는 전혀 나타나지 않거나 낮았지만, AAV-DJ-82Q 벡터 군의 선조체에서는 그 발현이 유의하게 증가되었다 (도 4A 및 4C). 이러한 결과는 AAV-DJ-82Q 벡터 주입이 염증 반응의 활성화와 이의 주요 기전인 NF- κ B 및 STAT3 기전을 활성화시킴으로써 선조체 세포 사멸 및 신경기능 이상을 일으킬 수 있음을 시사한다.
- [0090] AAV-DJ-82Q 벡터는 뉴런, 미세아교세포 및 별아교세포를 감염시키지만, 회소돌기아교세포를 감염시키지 않는다.
- [0091] HTT 응집체가 특정 세포 유형에서 발현되는지 여부를 조사하였으며, 구체적으로 NeuN, Iba-1, GFAP 및 Olig2 항체 (각각, 뉴런, 미세아교세포, 별아교세포 및 회소돌기아교 세포의 마커)를 사용하여 면역형광 염색을 수행하였다.
- [0092] EM48-양성 응집체는 뉴런, 미세아교세포 및 별아교세포의 핵과 세포질에서 주로 발현되었다 (도 5A 내지 5C). 응집체는 NeuN ($23.1 \pm 1.5\%$, 193.0 ± 8.7 NeuN-양성 세포의 45.4 ± 5.2 공동 염색 세포), Iba-1 ($19.5 \pm 1.3\%$, 71.0 ± 3.6 Iba-1-양성 세포의 14.0 ± 1.5 공동 염색 세포) 및 GFAP ($11.8 \pm 1.1\%$, 67.3 ± 3.9 GFAP-양성 세포의 8.1 ± 1.2 공동 염색 세포) 항체로 공동 염색 (co-stained)되었다 (도 5A 내지 5C). 그러나, 응집체는 Olig2 항체로 공동 염색되지 않았다 (도 5D).
- [0093] 이러한 결과는 AAV-DJ-82Q 벡터가 선조체에서 특정 세포 유형을 감염시키고 헌팅턴병 유사 병리를 유도할 수 있음을 나타낸다.
- [0094] 상기와 같은 결과들은 본 발명의 동물모델이 인간의 헌팅턴병과 유사한 임상 및 병리적 증상을 나타내고, 높은 재현성으로 간편하게 동물모델을 제조할 수 있음을 시사하는 것이다.
- [0095] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

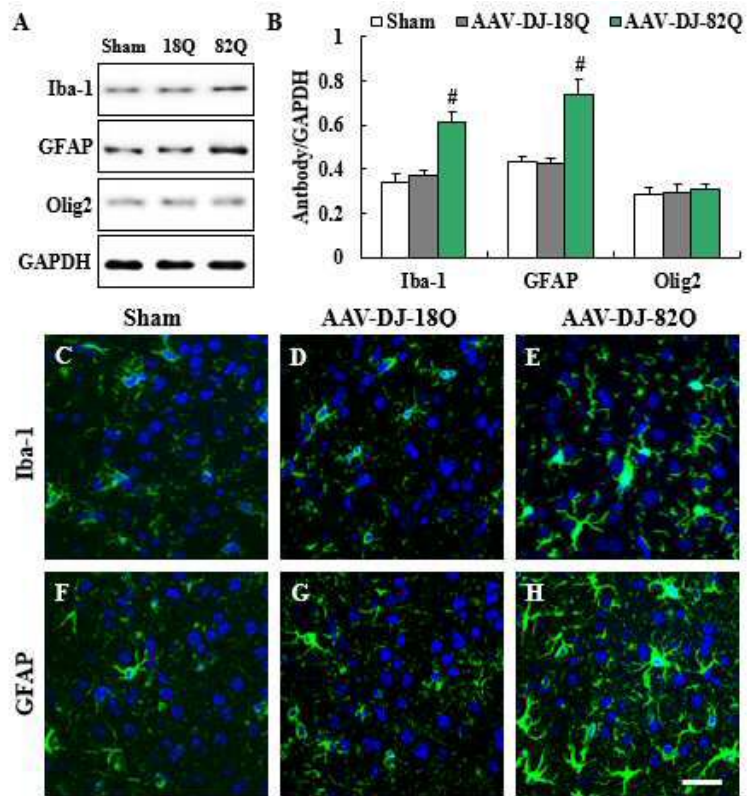
도면1



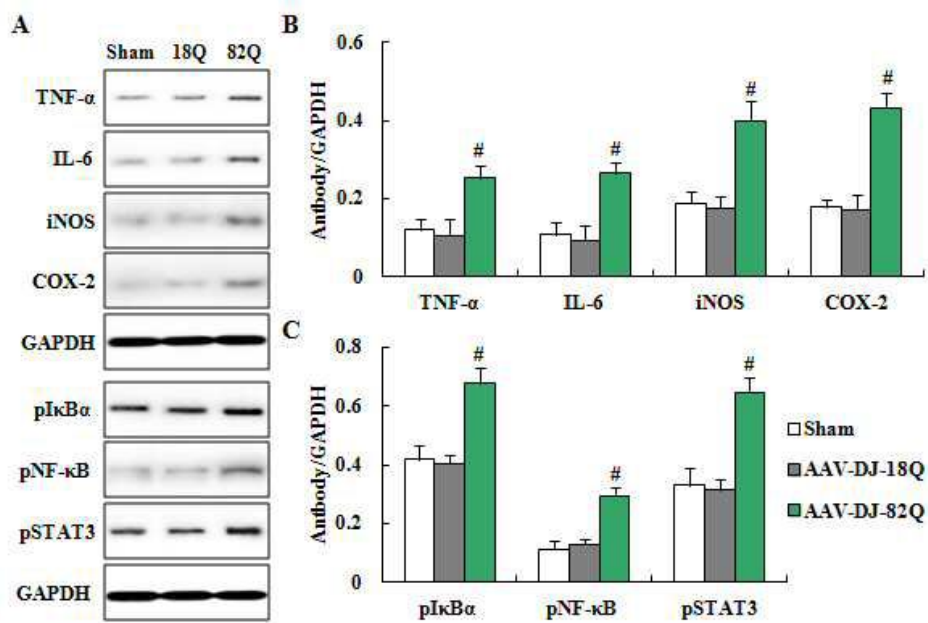
도면2



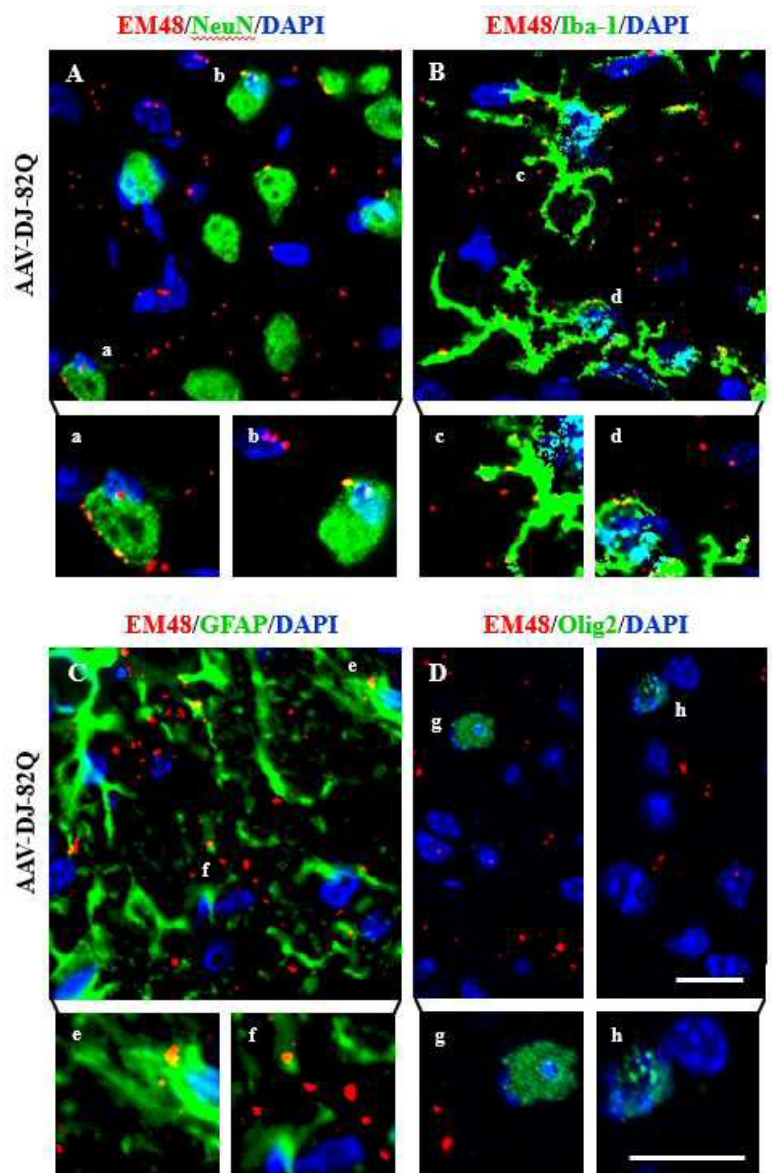
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> UNIVERSITY-INDUSTRY COOPERATION GROUP OF KYUNG HEE UNIVERSITY
- <120> An animal model having Huntington's disease using
adeno-associated viral vector and method for producing the same
- <130> P17-191-KHU
- <160> 2
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 684
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> N171-82Q

<400> 1

atggcgaccc tggaaaagct gatgaaggcc ttcgagtcctt tcaagtcctt ccagcagcag	60
cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag	120
cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag	180
cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag	240
cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagcagca gcaacagccg	300
ccaccgccgc cgccgccgcc gccgcctcct cagcttcctc agccgccgcc gcaggcacag	360
ccgctgctgc ctacgccga gccgcccccg ccgccgcccc cgccgccacc cggcccggt	420
gtggctgagg agccgctgca ccgaccaaag aaagaacttt cagctacca gaaagaccgt	480
gtgaatcatt gtctgacaat atgtgaaaac atagtggcac agtctgtcag aaattctcca	540
gaatttcaga aactttctggg catcgctatg gaactttttc tgctgtgcag tgatgacgca	600
gagtcagatg tcaggatggt ggctgacgaa tgcctcaaca aagttatcaa agctttgatg	660
gattctaatac ttccaagggtt acag	684

<210> 2

<211> 492

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> N171-18Q

<400> 2

atggcgaccc tggaaaagct gatgaaggcc ttcgagtcctt tcaagtcctt ccagcagcag	60
cagcagcagc agcagcagca gcagcagcag cagcagcagc agcagccgcc accgccgccg	120
ccgccgccgc cgctctctca gcttctctag ccgccgccgc aggcacagcc gctgtgcct	180
cagccgcagc cgccccgcc gccgcccccg ccgccaccgg gcccggtgt ggctgaggag	240
ccgctgcacc gaccaaagaa agaactttca gctaccaaga aagaccgtgt gaatcattgt	300
ctgacaatat gtgaaaacat agtggcacag tctgtcagaa attctccaga atttcagaaa	360
cttctgggca tcgctatgga actttttctg ctgtgcagtg atgacgcaga gtcagatgtc	420
aggatggtgg ctgacgaatg cctcaacaaa gttatcaaag ctttgatgga ttctaattctt	480
ccaaggttac ag	492