



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0132213
(43) 공개일자 2024년09월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2024.01) C12N 15/10 (2017.01)
C12N 15/113 (2010.01) C12N 15/85 (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0276 (2024.01)
C12N 15/102 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0026571
(22) 출원일자 2024년02월23일
심사청구일자 2024년02월23일
(30) 우선권주장
1020230025355 2023년02월24일 대한민국(KR)

(71) 출원인
재단법인 아산사회복지재단
서울특별시 송파구 올림픽로43길 88 (풍납동)
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93(무거동)
(72) 발명자
성영훈
서울특별시 강북구 도봉로 157, 두원프라자 808호
이진수
서울특별시 관악구 신림로3길 40, 건영아파트 4동 703호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태평양

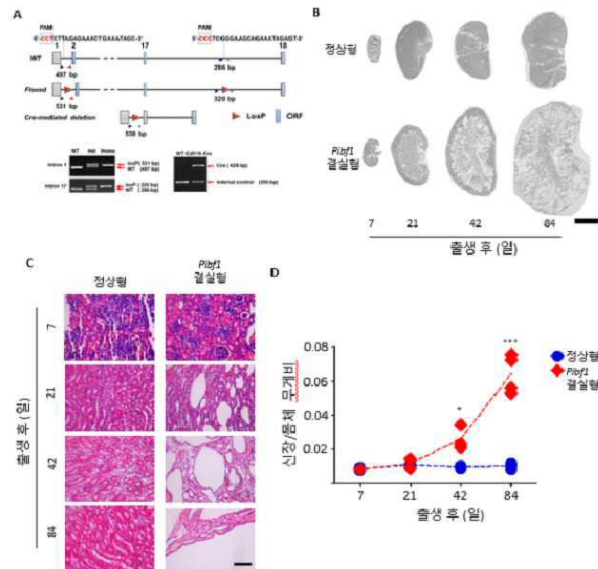
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 신장-특이적 PIBF1 유전자 결손에 기반한 다낭성 신장 질환의 형질전환 동물 모델 및 이의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 신장-특이적 PIBF1 유전자 결손에 기반한 다낭성 신장 질환의 형질전환 동물 모델, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 다낭성 신장 질환 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 15/113 (2013.01)
C12N 15/8509 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
G01N 33/5008 (2013.01)
A01K 2217/075 (2013.01)
A01K 2217/206 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)
C12N 2999/007 (2013.01)

(72) 발명자

백인정

서울특별시 은평구 은평터널로 65, 대림한숲타운아파트 108동 103호

신성

서울특별시 강남구 삼성로51길 25, 대치SK-VIEW아파트 103동 1103호

김경남

울산광역시 울주군 범서읍 평천길 94, 천상청구그린타운 101동 2007호

신병호

서울특별시 관악구 남부순환로 1910, 505호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711103715
과제번호	2020M3A9C4018567
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오·의료기술개발(R&D)
연구과제명	자가포식 기반 천연물 신약후보 스크리닝을 통한 간암 표적항암제 내성 극복 연구
과제수행기관명	울산대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711166579
과제번호	2019R1A2C2002726
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	개인기초연구(과기정통부)
연구과제명	세포 분열 및 분화 과정에서 중심체 연구
과제수행기관명	서울대학교
연구기간	2022.03.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

프로게스테론 면역조절 결합인자 1(Progesterone Immunomodulatory Binding Factor, PIBF1) 유전자가 신장에서 특이적으로 결손된, 다낭성 신장 질환 동물 모델.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 동물 모델은 야생형 동물에 비하여 섬모가 결핍된 것인, 다낭성 신장 질환 동물 모델.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 동물 모델은 신장낭 세포 내의 Yes-관련 단백질(Yes-Associated Protein; YAP)이 활성화된 것인, 다낭성 신장 질환 동물 모델.

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 동물은 생쥐(*Mus musculus*)를 포함하는 설치류인 것인, 다낭성 신장 질환 동물 모델.

청구항 5

동물 모델에서 신장 특이적인 프로게스테론 면역조절 결합인자 1(Progesterone Immunomodulatory Binding Factor, PIBF1) 유전자의 결손을 유도하는 단계;를 포함하는 다낭성 신장 질환 동물 모델의 제조 방법.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 PIBF1 유전자의 결손은 Cre-loxP 시스템에 의해 유도되는 것인, 다낭성 신장 질환 동물 모델의 제조 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 신장 특이적인 프로게스테론 면역조절 결합인자 1(Progesterone Immunomodulatory Binding Factor, PIBF1) 유전자의 결손의 유도는, PIBF1 유전자의 염기서열 내에 두 개의 loxP의 염기서열이 삽입되어 있는 조건적 PIBF1 녹아웃 대립유전자를 갖는 동물 모델과, 신장에서 Cre 재조합효소를 특이적으로 발현하는 유전자형을 갖는 동물 모델을 서로 교배하는 단계;를 포함하는 것인, 다낭성 신장 질환 동물 모델의 제조 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서,

상기 loxP의 염기서열의 삽입은 CRISPR-Cas9 유전자 가위; 및 상기 유전자 가위를 상기 PIBF1로 인도하는 sgRNA;에 의하여 유도되는 것인, 다낭성 신장 질환 동물 모델의 제조 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

상기 sgRNA는 서열번호 1 내지 서열번호 4의 염기서열로 구성된 군에서 선택된 적어도 하나 이상의 염기서열 또는 이와 상보적인 염기서열을 포함하는 것인, 다낭성 신장 질환 동물 모델의 제조 방법.

청구항 10

청구항 7에 있어서,

상기 교배로 얻어진 자손 동물 모델들 중, PIBF1 유전자의 염기서열 내에 두 개의 loxP의 염기서열이 삽입되어 있는 유전자형과 신장에서 Cre 재조합효소를 특이적으로 발현하는 유전자형을 모두 갖는 개체를 선별하는 단계;를 더 포함하는 것인, 다낭성 신장 질환 동물 모델의 제조 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서,

상기 PIBF1 유전자의 염기서열 내에 두 개의 loxP의 염기서열이 삽입되어 있는 유전자형은 상기 loxP 염기서열이 삽입된 조건적 PIBF1 유전자에 대하여 동형접합체(homozygote)인 것인, 다낭성 신장 질환 동물 모델의 제조 방법.

청구항 12

청구항 10에 있어서,

상기 선별된 개체의 신장 세포에서 PIBF1 유전자가 결손되었는지 여부를 확인하는 단계;를 더 포함하는 것인, 다낭성 신장 질환 동물 모델의 제조 방법.

청구항 13

청구항 1의 다낭성 신장 질환 동물 모델에 피검사체를 처리하는 단계;

상기 단계 피검사체가 처리된 동물 모델을 무처리 대조군과 비교하여 다낭성 신장 질환 증상의 개선 여부를 확인하는 단계;를 포함하는, 다낭성 신장 질환의 치료제 스크리닝 방법.

발명의 설명**기술 분야**

본 발명은 신장-특이적 PIBF1(Progesterone Immunomodulatory Binding Factor 1) 유전자 결손에 기반한 다낭성 신장 질환의 형질전환 동물 모델, 이의 제조 방법 및 이를 이용한 다낭성 신장 질환 치료제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0003] 다낭성 신장 질환(Polycystic Kidney disease, PKD)은 신장에 여러 개의 물질(낭종)이 생기면서 점차 신장 기능이 감소하는 질환에 관한 것으로, 포성 변화가 진행함에 따라 정상 조직은 감소해 결국 신부전으로 이행한다. 각각의 낭종은 달걀 또는 야구공 크기 정도까지 자랄 수 있으며, 우리나라의 경우 30대에서 50대 사이에 처음 진단되며, 복부에서 커진 신장의 표면이 울퉁불퉁한 혹처럼 만져지거나 두통·복부팽대·요통·고혈압·혈뇨·요로결석 등이 생긴다. 또한 낭종 파열과 요석·출혈·신장감염·신장암·신부전 등의 합병증을 유발한다. 간과 이자·난소·비장 등에 낭종을 만들지만, 일반적으로 큰 불편을 초래하지는 않는다. 이밖에도 심장판막 이상과 대장 게실·횡격막 탕장·뇌혈관종이 수반되는데, 뇌혈관종 파열로 인해 어려움을 겪게 되는 수도 있다.
- [0004] 이러한 다낭성 신장 질환의 기전 연구 및 치료제의 개발을 위해서는 다낭성 신장 질환의 증상 및 메커니즘이 효율적으로 재연되면서 인간을 대상으로 개발된 치료제에 반응할 수 있는 동물 모델이 반드시 필요함에도 아직까지 효율적인 다낭성 신장 질환 동물 모델은 개발되지 못하고 있는 실정이다.
- [0005] 프로게스테론 면역조절 결합인자 1(Progesterone Immunomodulatory Binding Factor, PIBF1) 유전자로 암호화된 단백질은 면역계의 여러 측면을 조절하여 사이토카인 합성, 자연살해(NK) 세포 활성화 및 아라키돈산 대사를 포함한 정상 임신을 촉진함이 보고되었다. PIBF1은 CEP90으로도 명명된 유전자이다. 즉, PIBF1/CEP90 단백질은 중심립에 존재하고, 섬모의 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0006] 한편, 본 발명의 발명자들은 이러한 PIBF1 유전자와 다낭성 신장 질환 간의 관련성을 규명하고, 신장 특이적 PIBF1 유전자 결손을 유도하여 다낭성 신장 질환 동물 모델을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 다낭성 신장 질환 동물 모델을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 상기 다낭성 신장 질환 동물 모델을 제조하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 다낭성 신장 질환의 치료제 스크리닝 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 측면은 프로게스테론 면역조절 결합인자 1(Progesterone Immunomodulatory Binding Factor, PIBF1) 유전자가 신장에서 특이적으로 결손된 다낭성 신장 질환 동물 모델을 제공한다.
- [0012] 또한, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 또 다른 측면은 동물 모델에서 신장 특이적인 프로게스테론 면역조절 결합인자 1(Progesterone Immunomodulatory Binding Factor, PIBF1) 유전자의 결손을 유도하는 단계;를 포함하는 다낭성 신장 질환 동물 모델의 제조 방법을 제공한다.
- [0013] 또한, 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 또 다른 측면은 상기 다낭성 신장 질환 동물 모델에 피검사체를 처리하는 단계; 상기 단계 피검사체가 처리된 동물 모델을 무처리 대조군과 비교하여 다낭성 신장 질환 증상의 개선 여부를 확인하는 단계;를 포함하는, 다낭성 신장 질환의 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명에 따르면 PIBF1 유전자를 신장에서 특이적으로 결손시킴으로써 동물 내에서 다낭성 신장 질환을 유발할 수 있어, 다낭성 신장 질환의 다양한 증상, 기전을 효과적으로 재연하는 우수한 동물 모델로 유용하게 활용될 수 있다.
- [0015] 다만, 본 발명의 효과는 상기에서 언급한 효과로 제한되지 아니하며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 하기의 기재로부터 당업자에게 명확히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 본 발명의 신장 특이적인 PIBF1 유전자 결손의 과정을 나타낸 모식도와 본 발명의 동물 모델에서 PIBF1 유전자가 결손됨에 따라 신장낭이 형성되는 점을 확인한 결과를 나타낸다.
- 도 2는 본 발명의 동물 모델에서 PIBF1 유전자가 결손됨에 따라 나타나는 신장낭 세포에서의 섬모의 특성을 분석한 결과를 나타낸다.
- 도 3은 본 발명의 동물 모델에서 섬모가 결핍됨에 따라 나타나는 신장낭 세포의 형태 변화를 분석한 결과를 나타낸다.
- 도 4는 본 발명의 동물 모델에서 섬모가 결핍됨에 따라 나타나는 mTOR 단백질의 활성화 변화를 분석한 결과를 나타낸다.
- 도 5는 본 발명의 동물 모델에서 섬모가 결핍됨에 따라 나타나는 YAP 단백질의 활성화 변화를 분석한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0020] 1. 본 발명의 다낭성 신장 질환 동물 모델

- [0021] 본 발명의 일 측면은 프로게스테론 면역조절 결합인자 1(Progesterone Immunomodulatory Binding Factor, PIBF1) 유전자가 신장에서 특이적으로 결손된 다낭성 신장 질환 동물 모델을 제공한다.
- [0022] 상기 동물 모델이란 사람의 질병과 아주 유사한 형태의 질병을 가진 동물을 의미한다. 사람의 질병 연구에 있어 질환 모델 동물이 의미를 갖는 것은 사람과 동물들 간의 생리적 또는 유전적인 유사성에 의한다. 질병 연구에 있어 생체의학 질환모델동물은 질병의 다양한 원인과 발병과정 및 진단에 대한 연구용 재료를 제공해주고, 질환 모델 동물의 연구를 통해 질병에 관련된 유전자들을 알아내며, 유전자들 간의 상호작용을 이해할 수 있게 하고, 개발된 신약후보물질의 실제 효능 및 독성 검사를 통해 실용화 가능성의 여부를 판단하는 기초 자료를 얻을 수 있다. 상기 동물은 인간을 제외한 포유 동물인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 포유 동물은 설치류일 수 있고, 바람직하게는 생쥐(*Mus musculus*)일 수 있다.
- [0023] 상기 다낭성 신장 질환은 두 신장에서 체액이 찬 주머니(낭종)가 다수 형성되는 유전 질환으로, 신장은 더 커지지만 기능하는 조직은 더 적어지는 현상을 나타낸다. 상기 신장 특이적 PIBF1 유전자의 결손으로 인하여 전형적인 다낭성 신장 질환의 증상이 나타나므로 이를 신장질환 동물모델로 사용할 수 있다.
- [0024] 상기 PIBF1은 면역계의 여러 측면을 조절하여 사이토카인 합성, 자연살해(NK) 세포 활성화 및 아라키돈산 대사를 포함한 정상 임신을 촉진하는 것으로 보고되었다. 상기 PIBF1은 CEP90으로도 명명된 유전자이다. 상기 PIBF1/CEP90 단백질은 중심립에 존재하고, 섬모의 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0025] 상기 다낭성 신장 질환 동물 모델은 특히 신장에서 특이적으로 PIBF1 유전자가 결손된 것일 수 있다.
- [0026] 상기 신장 특이적 PIBF1 유전자의 결손으로 인하여 다낭성 신장 질환의 증상이 나타나는 것일 수 있다.
- [0027] 또한, 상기 다낭성 신장 질환 동물 모델은 신장낭 세포에서 섬모 형성이 정상 동물에 비하여 저해된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 신장 특이적 PIBF1 유전자 결손 동물 모델의 경우, 신장세포에서 섬모가 형성되지 않을 수 있다. 상기 섬모는 진핵세포의 움직임을 위한 기관으로, 전형적으로 2개의 미세소관(microtubules)이 한 쌍을 이루어 총 9쌍이 원 모양으로 배열하고 중앙에 2개의 미세소관이 위치한 "9 + 2" 구조를 가지며, 미세소관에 부착되어 있는 동력단백질 (motor protein)인 디네인(dynein)에 의해 운동성을 갖출 수 있다. 신장세포에 존재하는 섬모의 경우 운동성은 없고, 세포 주위의 환경을 감지하는 역할을 담당한다. 섬모가 형성되지 않으면 신장낭이 형성됨이 보고되어 있다. 따라서, 본 발명의 PIBF1 결손 동물 모델은 섬모결핍으로 인한 신장낭 형성의 동물 모델로 사용될 수 있다.
- [0028] 섬모는 신장뿐 아니라 다양한 기관에 존재하므로, 만일 동물 전체에 섬모를 제거하면 동물이 배아 상태에서 사망하게 된다. 상기 섬모의 결핍 및 이상으로 인한 신장낭 형성을 연구하려면 신장에만 섬모가 없는 동물 모델을 제작해야 한다. 따라서, 본 발명의 신장 특이적 PIBF1 유전자 결손 동물 모델의 경우 신장세포에서만 섬모가 형

성되지 않기 때문에 섬모에 의한 신장낭 연구 모델이 될 수 있다.

- [0029] 상기 다낭성 신장 질환 동물 모델은 상기 섬모의 결핍에 의하여 신장낭 세포의 형태에 변화가 나타날 수 있으며, 구체적으로 상기 다낭성 신장 질환 동물 모델에서는 신장낭 세포들이 정상 동물의 신장낭의 세포에 비하여 더 납작한 형태를 갖고, 더 큰 너비를 갖을 수 있다.
- [0030] 상기 다낭성 신장 질환 동물 모델은 상기 섬모의 결핍에 의하여 상기 다낭성 신장 질환 발병 이후에 또는 신장낭이 형성된 이후에 YAP(Yes-Associated Protein) 단백질이 활성화된 것일 수 있다. 상기 YAP은 대표적인 기계 생물학(mechanobiology) 단백질로서 세포의 삼차원 환경의 변화에 반응하여 활성화되면 섬모의 형성을 저해하며 분열을 유도하는 것이 알려져 있다.
- [0031] 상기 다낭성 신장 질환 동물 모델은 상기 섬모의 결핍에 의하여 상기 다낭성 신장 질환 발병 초기에 라파마이신의 포유류 타겟 단백질(mammalian target of rapamycin, mTOR)이 활성화될 수 있다. 상기 mTOR의 신호 전달 체계는 신장낭을 구성하는 세포의 모양 변화를 유발하는 기작으로 알려져 있다.
- [0032] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 신장 특이적 PIBF1 결손 생쥐 모델의 신장낭 세포에서, 섬모와 신장낭 세포의 형태 변화를 관찰하였고, YAP 및 mTOR의 활성을 측정하였다. 그 결과, 상기 생쥐 모델에서 섬모 결핍이 관찰되었고, 신장낭 세포의 너비가 넓어지며, 신장낭 세포에서 YAP 단백질이 활성화되었고, 초기 신장낭 세포에서는 mTOR이 활성화되는 것으로 확인되었다.
- [0034] **2. 본 발명의 다낭성 신장 질환 동물 모델의 제조 방법**
- [0035] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 다낭성 신장 질환 동물 모델의 제조 방법을 제공한다.
- [0036] 상기 제조 방법은 동물 모델에서 신장 특이적인 프로게스테론 면역조절 결합인자 1(Progesterone Immunomodulatory Binding Factor, PIBF1) 유전자의 결손을 유도하는 단계;를 포함한다.
- [0037] 상기 PIBF1 유전자의 결손을 위하여서는 통상의 기술자가 인간을 포함하여 동물, 식물 또는 미생물의 유전자를 제거 또는 결손시키기 위하여 채택할 수 있는 기술이라면, 제한없이 이용하여 상기 PIBF1 유전자의 결손을 유도할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 PIBF1 유전자의 결손은 Cre-loxP(Cyclization recombinase - locus of X-over P1)시스템에 의하여 조건적으로 유도되는 것일 수 있다.
- [0039] 상기 Cre-loxP 시스템을 사용하면 특정 세포, 조직 또는 전체 생물체, 심지어 특정 시점에서도 어떤 유전자를 녹아웃(knockout)하거나 발현할 수 있어 특정 유전자에 대한 시공간 특이적 조작을 달성할 수 있으며, 이는 유전자 기능에 대한 연구 및 인간 질병 동물 모델의 확립에 큰 영향을 미친다.
- [0040] 상기 Cre 재조합 효소(Cyclization recombinase)는 loxP 부위에 특이적으로 작용하는 재조합 효소로, 두 개의 loxP 사이의 부위 특이적 재조합을 촉매할 수 있다. 상기 Cre 재조합 효소는 P1 박테리오파지(bacteriophage)에서 유래한 것으로, loxP 부위를 특이적으로 인식할 수 있다.
- [0041] 상기 loxP는 상기 Cre 재조합 효소가 인식하는 회문 DNA 부위는 길이가 34bp이며 그 특징적인 구조는 ATAACCTCGTATA-NNNTANNN-TATACGAAGTTAT를 포함한다. 야생형 loxP 외에 흔한 Lox2272, Lox511, Lox5171 등 돌연변이 Lox 부위도 Cre 재조합 효소에 의해 인식될 수 있지만, 일반적으로 동일한 시퀀스를 가진 두 개의 Lox 부위 사이에서만 재조합 될 수 있다.
- [0042] 따라서 본 발명의 동물 모델 제조 방법은 PIBF1 유전자의 염기서열 내에 두 개의 loxP의 염기서열이 삽입되어 있는 조건적 PIBF1 녹아웃 대립유전자형을 갖는 동물 모델과, 신장에서 Cre 재조합효소를 특이적으로 발현하는 유전자형을 갖는 동물 모델을 서로 교배하는 단계;를 통하여 상기 신장 특이적 PIBF1 유전자의 결손을 유도하는 것일 수 있다.
- [0043] 상기 loxP의 염기서열의 삽입은 CRISPR-Cas9 유전자 가위; 및 상기 유전자 가위를 상기 PIBF1로 인도하는 sgRNA;에 의하여 유도되는 것일 수 있다.
- [0044] 상기 CRISPR 시스템은 특정 유전자의 결손 또는 과발현을 유도하여 생명체의 유전정보를 자유롭게 교정할 수 유전자 교정 기술로서, 인간을 포함하여 동물, 식물 또는 미생물의 유전정보를 변화시킬 수 있고, 유전체 교정 기술에서 핵심 역할을 하고 있다. 상기 CRISPR 시스템으로는 통상의 기술자가 유전자의 편집 또는 교정을 유도하

기 위하여 적용할 수 있는 것이면 제한없이 사용될 수 있으며, 예를 들어, CRISPR-Cas9, CRISPR-Cpf1 유전자 등이 있을 수 있고, 구체적으로, CRISPR-Cas9 일 수 있다.

- [0045] 상기 sgRNA는 PIBF1 유전자를 인식하여, 상기 CRISPR 유전자 가위를 상기 PIBF1 유전자로 인도하는 역할을 수행하는 것으로, 상기 PIBF1 유전자를 결합하고, 상기 PIBF1 유전자로 CRISPR 유전자 가위를 유도하는 것이면 제한없이 사용될 수 있으며, 구체적으로, 서열번호 1 내지 서열번호 4 중 어느 하나의 염기서열 또는 이와 상보적인 염기서열을 포함하는 것일 수 있다.
- [0046] 상기 loxP 염기서열의 삽입은 상기 CRISPR-Cas9 mRNA 또는 이의 제조합 단백질, sgRNA 및 loxP를 중심으로 PIBF1 유전자와 동일한 염기서열을 양 옆으로 포함하는(homology arm) 단일가닥 donor DNA (single stranded oligodeoxynucleotide, ssODN)를 도입하여 상기 PIBF1 유전자에 상기 CRISPR-Cas9이 이중가닥 절단(double-strand DNA break, DSB)을 생성하면, 상동인도복구(homology-directed recombination, HDR) 기전에 의해 상기 loxP 염기서열을 상기 PIBF1 유전자에 삽입하는 것일 수 있다.
- [0047] 본 발명의 일 구현예에서는 상기 sgRNA와 상기 ssODN를 수정란에 미세주입하여 상기 두 개의 loxP 염기서열을 PIBF1 유전자의 인트론 1 및 인트론 17 위치에 각각 하나씩 삽입하였다.
- [0048] 또한, 상기 loxP가 동물 모델에 도입된, 형질전환체를 제공할 수 있다.
- [0049] 상기 형질전환체는 상기 loxP가 숙주세포에 도입된 형질전환체를 의미한다. 상기 형질전환체는 외래 유전물질이 도입된 숙주세포를 의미하며, 본 발명에서 상기 형질전환체는 상기 loxP 염기서열이 상기 PIBF1 유전자의 양 말단 위치에 각각 하나씩 도입된 숙주세포를 의미할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 일 구현예에서는, 본 발명의 형질전환체로서, 상기 loxP 염기서열이 상기 PIBF1 유전자의 인트론 1 및 인트론 17 위치에 각각 하나씩 도입된 생쥐의 수정란을 제조하였다. 이 때, 상기 PIBF1 유전자의 인트론 1 및 인트론 17 위치에 loxP 염기서열이 삽입된 조건적 PIBF1 녹아웃 대립유전자는 야생형 PIBF1 유전자와 기능상으로 차이가 없다.
- [0051] 본 발명의 형질전환체는 상기 CRISPR-Cas9 mRNA 또는 이의 제조합 단백질, sgRNA 및 loxP를 포함하는 단일가닥 donor DNA (single stranded oligodeoxynucleotide, ssODN)가 미세주입을 통해 생쥐의 수정란 단계에서 도입되어 형질전환됨으로써, 상기 loxP 염기서열이 생쥐 PIBF1 유전자의 인트론 1 및 인트론 17에 각각 하나씩 HDR에 의해 삽입되었다.
- [0052] 본 발명에서 상기 "도입"은 숙주세포에 외래 유전물질을 도입시켜 숙주세포를 형질전환(transformation)시키는 과정을 의미하며, 상기 숙주세포는 예를 들어, 면역 세포, 상피 세포, 근육 세포, 신장 세포, 종양 세포 등일 수 있고, 구체적으로, 동물의 수정란일 수 있다.
- [0053] 상기 형질전환은 유전자가위에 의한 DSB를 복구하는 과정에서 일어나는 HDR을 통해 세포의 게놈(genome) 내로의 이중 핵산의 삽입을 지칭한다.
- [0054] 또한, 상기 loxP 염기서열의 도입은 국소주입법, 미세주입법, 마이크로주입법, 전기천공법, 초음파 천공법(sonoporation), 세포 압착 기법(cell squeezing), 광학 형질주입(optical transfection), 리포펙션, 나노섬유 기법(nanofiber), 나노파티클 등을 이용한 방식으로 수행될 수 있다. 그러나 상기 전달 방법은 이러한 전달 방법으로 제한되는 것은 아니며, 상기 염기서열을 적절한 전달 형태로 대상 세포 내에 도입할 수 있는 것이라면 특별히 제한되지 않는다.
- [0055] 상기 교배로 인하여 생성되는 자손 동물 모델에서, 상기 신장 특이적인 Cre 제조합 효소가 상기 조건적 PIBF1 녹아웃 대립유전자의 양 말단의 인트론에 삽입된 두 개의 loxP 염기서열을 인식하고, 상기 두 개의 loxP 염기서열의 중간에 존재하는 PIBF1 유전자 서열을 제거하게 된다. 따라서, 상기 PIBF1 유전자의 양 말단의 인트론 위치에 두 개의 loxP 염기서열이 삽입된 조건적 PIBF1 녹아웃 대립유전자에 대해 동형접합체(homozygote)이면서, 상기 신장특이적인 Cre 제조합 효소를 발현하는, 상기 자손 동물 모델의 신장에서 특이적으로 PIBF1 유전자의 결손을 유도할 수 있다.
- [0056] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 서열번호 1 내지 서열번호 4의 sgRNA와 서열번호 5 및 서열번호 6 올리고머를 포함하는 단일가닥 donor DNA와 CRISPR-Cas9 유전자 가위를 이용하여 생쥐의 PIBF1 유전자의 인트론 1과 인트론 17에 각각 loxP 염기서열을 삽입하였고, 상기 loxP가 삽입된 유전자형을 갖는 형질전환된 생쥐를, 신장에서 특이적으로 Cre 제조합효소를 발현하는 Cdh16-Cre transgenic (형질전환) 생쥐와 교배하여, 본 발명의 다낭성 신장 질환 동물 모델을 제조하였다. 상기 다낭성 신장 질환 동물 모델은 상기 인트론 1과 인트론 17에 각각 loxP

가 삽입된 (floxed) 조건적 PIBF1 녹아웃 대립유전자가, 상기 Cre 효소의 발현으로 인하여 결손되는 것으로, 조건적 PIBF1 녹아웃 대립유전자에 대해 동형접합체(homozygote) 일 때 신장낭이 다수 형성된 것으로 관찰되었다.

[0057] 또한, 상기 제조 방법은 상기 교배로 얻어진 자손 동물 모델들 중, 야생형 PIBF1 유전자가 존재하지 않고 조건적 PIBF1 녹아웃 대립유전자만 갖고 있는 유전자형(동형접합체, homozygote)과 신장에서 Cre 재조합효소를 특이적으로 발현하는 유전자형을 모두 갖는 개체를 선별하는 단계;를 더 포함하는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 PIBF1 유전자의 염기서열 내에 두 개의 loxP의 염기서열이 삽입되어 있는 유전자형은 상기 loxP의 염기서열이 삽입된 조건적 PIBF1 녹아웃 대립유전자에 대하여 동형접합체(heterozygote)일 수 있다. 나아가, 상기 선별된 개체의 신장 세포에서 PIBF1 유전자가 결손되었는지 여부를 확인하는 단계;를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0059] 3. 본 발명의 다낭성 신장 질환 동물 모델의 활용

[0060] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 다낭성 신장 질환 동물 모델을 이용한 다낭성 신장 질환의 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0061] 상기 '1. 본 발명의 다낭성 신장 질환 동물 모델'에서 진술한 바와 동일한 내용은 중복하여 서술하지 않는다.

[0062] 상기 스크리닝 방법은 상기 다낭성 신장 질환 동물 모델에 피검사체를 처리하는 단계; 상기 단계 피검사체가 처리된 동물 모델을 무처리 대조군과 비교하여 다낭성 신장 질환 증상의 개선 여부를 확인하는 단계;를 포함한다.

[0063] 상기 피검사체는 상기 다낭성 신장 질환의 예방 또는 치료에 효과가 있을 것으로 예측되는 것이라면 제한이 없고, 예를 들어, 저분자 화합물, 저분자 펩타이드, 단백질, 항체 등이 있을 수 있다.

[0064] 본 발명의 동물 모델과의 비교 대상으로서, 피검 화합물을 처리하지 않은 무처리 대조군을 사용할 수 있으며, 신장 특이적 PIBF1 결손이 유도되지 않은 정상 대조군 생쥐를 함께 대조군으로서 사용할 수 있다.

[0065] 상기 다낭성 신장 질환 증상의 개선은, 신장낭의 수 감소, 크기 감소 등이 있을 수 있으나, 다낭성 신장 질환으로 인해 유발된 증상이 예방 또는 치료되는 것이라면, 이에 한정되지 않는다.

[0066] 상기 예방은 상기 피검사체의 처리 또는 투여에 의해 다낭성 신장 질환을 억제시키거나 발병을 지연시키는 모든 것을 의미하고, 상기 치료는 피검사체의 처리 또는 투여에 다낭성 신장 질환에 대한 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 것을 의미한다.

[0068] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

[0069] 단, 하기 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되지 아니한다.

[0071] [실시예 1]

[0072] 본 발명의 신장 특이적 PIBF1 결실 생쥐 모델의 제작

[0073] 생쥐 신장에서의 PIBF1의 역할을 알아보기 위해 배아 치사성을 우회할 수 있는 Cre-LoxP 시스템 기반 PIBF1-floxed 생쥐를 제작하였다(그림 1A). 구체적으로, PIBF1의 인트론 1에 특이적으로 결합하는 sgRNA를 제작하기 위해서 서열번호 1 또는 서열번호 2의 염기서열을 갖는 올리고머를 섞어서 어닐링(annealing)하여 pUC57-sgRNA 벡터(출처: Addgene plasmid # 51132)에 클로닝하였다. PIBF1의 인트론 17에 특이적인 서열번호 3 또는 서열번호 4의 염기서열을 갖는 올리고머를 이용하여 동일하게 클로닝하였다. 이들을 주형(template)으로 사용하여 인용문헌 1(Sung *et al.*, Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA-guided endonucleases. Genome Res. 2014 Jan;24(1):125-31)에서 기 확립된 실험방법에 따라 sgRNA를 제작하였다. 또한, 상기 sgRNA들과 함께 사용된 loxP 유전자를 포함하는 서열번호 5 및 서열번호 6의 염기서열의 단일 가닥 도너 DNA (single-stranded deoxynucleotide donor DNA)는 Integrated DNA Technologies를 통해 주문제작하여 이용하였다. 상기 2개의 sgRNA, 2개의 ssODN 및 CRISPR-Cas9 mRNA를 C57BL/6J(B6J) 스트레인(strain)의 생쥐의 수정란에 미세주입하여 loxP 염기서열이 상기 PIBF1의 인트론 1 및 인트론 17 영역 사이에 삽입된 형질전환된 생쥐 모델(이하, Pibf1-floxed 생쥐 모델)을 제작하였다. 구체적으로, 상기 Cas9의 mRNA는 인용문헌 1(Sung *et al.*, Highly efficient gene knockout in mice and zebrafish with RNA-guided endonucleases. Genome Res.

2014 Jan;24(1):125-31)에 설명된 방법과 동일하게 제작하였고, C57BL/6J(B6J) 스트레인(strain)의 암컷 생쥐로부터 채취한 수정란의 미세한 조작 및 생쥐 모델 제작에 필요한 후속 공정은 인용문헌 2(Sung *et al*, Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting. *Nat Biotechnol*. 2013 Jan;31(1):23-4)에 설명된 방법으로 수행하였다. 이후, 상기 PIBF1-floxed 생쥐에 대하여 신장 특이적인 PIBF1 유전자 결실을 유도하기 위해, 신장 특이적으로 Cre 재조합효소를 발현하는 Cdh16-Cre transgenic 생쥐(출처: Jax (Strain #:012237))와 교배함으로써 본 발명의 다낭성 신장 질환 생쥐 모델을 제작하였다(도 1). 상기 교배에 의하여 생긴 자손 생쥐에 대하여 PCR을 통해 유전자형 분석을 수행하였다. 상기 PCR에는 표 1에 나타난 프라이머 쌍을 사용하였다.

표 1

Gene	Target sgRNA	Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	Size (bp)
<i>Pibf1</i>	Intron 1 loxP	CTTGGTAACACGCAAGGAT	TCAAACCAAGGAGAGGTTGATT	WT, 497; floxed, 531
	Intron 17 loxP	AGTGTAGTGTCTTCAAGATTCATTC	CCTCCAGCTCCCTGTAGT	WT, 286; floxed, 320
<i>Cdh16-Cre Tg</i>	Cre transgene	GCAGATCTGGCTCTCCAAAG	AGGCAAATTTTGGGTGACGG	420
	Internal control	CAAATGTTGCTTGTCTGGTG	CAAATGTTGCTTGTCTGGTG	200

그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, PIBF1-floxed 대립유전자가 동형 접합이며 Cdh16-Cre를 발현하는 생쥐(결실형)와 PIBF1-floxed 대립유전자가 동형 접합이지만 Cdh16-Cre를 발현하지 않는 생쥐(정상형)의 신장을 비교한 결과, 분석에 사용된 연령인 생후 21일부터 결실형 생쥐에서 신장낭이 관찰되었다. 반면 Cdh16-Cre 생쥐와 교배되었지만 조건적 PIBF1 녹아웃 대립유전자가 이형 접합으로 존재하여 정상형의 PIBF1 대립유전자 하나가 남아있는 경우, 신장낭이 관찰되지는 않는 것으로 확인되었다. 보다 자세한 분석을 위해, 헤마톡실린-에오신(Hematoxylin and Eosin, H&E) 염색법을 통해 염색된 절편을 현미경으로 관찰한 결과, 생쥐 생후 21일부터 결실형 생쥐에서 신장낭이 관찰되기 시작하였다. 또한 신장낭 형성의 지표로 사용되는 신장 대비 무게 무게 비율을 분석하여 본 결과, 생쥐 생후 42일부터는 결실형 생쥐의 신장 무게비가 통계적으로 유의미하게 증가하여, PIBF1 결실이 신장낭 형성을 초래하는 점을 확인하였다.

나아가, PIBF1의 결실에 의해 신장낭이 유도되는 원인 기전을 세포 수준에서 심층적으로 분석하기 위해 신장낭 형성이 두드러지는 생후 42일의 결실형 생쥐의 신장 조직에서 PIBF1의 발현 양상을 면역염색 방법을 통하여 관찰하였다. 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, PIBF1 단백질은 정상형의 생쥐의 신장의 중심체 부근에 위치하고, 결실형 생쥐의 신장에는 PIBF1이 관찰되지 않음을 확인하였다. 상기 결과로부터, PIBF1이 결실됨과 동시에 신장낭 형성이 유발되는 점을 알 수 있었다.

[실시예 2]

본 발명의 신장 특이적 PIBF1 결실 생쥐의 신장낭에서의 섬모 관련 특성

[2-1] 신장낭 세포의 섬모 결핍 확인

PIBF1은 중심립의 끝 부분에 위치하는 단백질로서 PIBF1의 결실이 원부속지(distal appendage)의 형성을 저해하여 중심립 성숙을 방해하고, 결국 섬모 형성을 억제한다는 사실이 알려져 있다. 이에, 실시예 1에서 제작된 본 발명의 다낭성 신장 질환 생쥐 모델의 신장낭 세포에서 나타나는 섬모의 특성을 분석하였다. 구체적으로 상기 원부속지를 이루고 있는 단백질인 CEP83(Centrosomal Protein 83) 및 CEP164(Centrosomal Protein 164)가 신장낭을 이루고 있는 세포에 위치하는지 여부를 확인하였다.

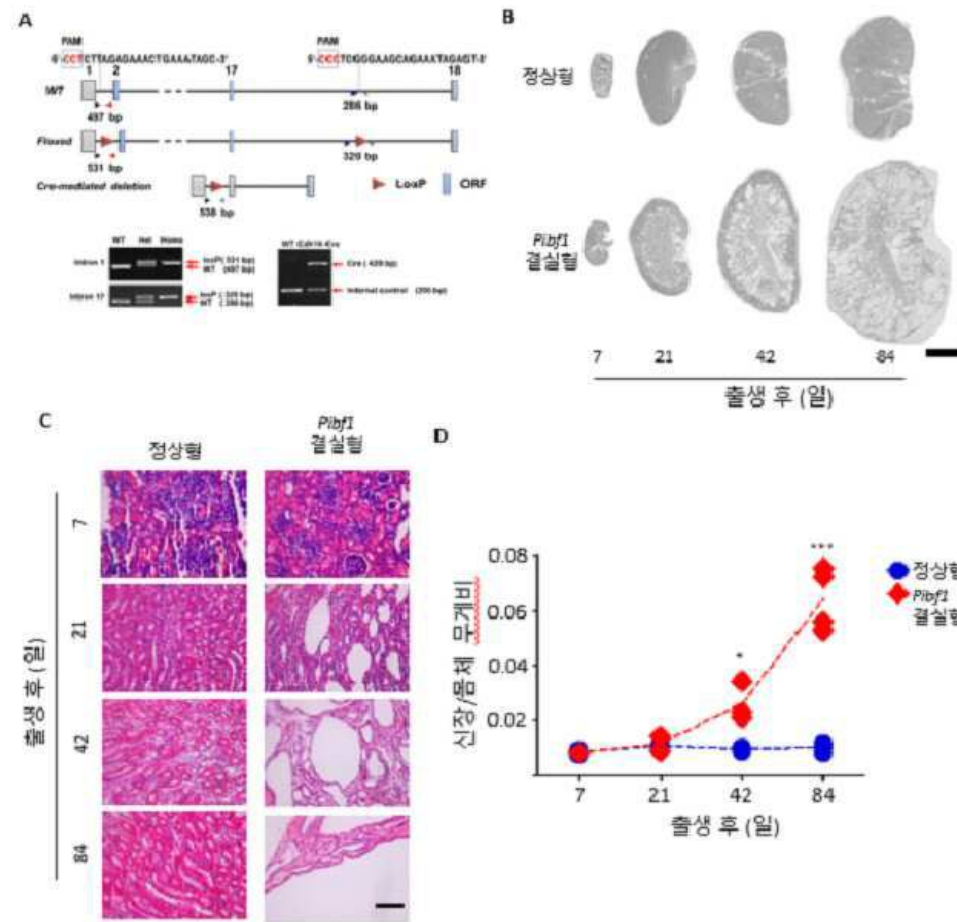
그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 정상형 생쥐에 존재하는 정상 신장관에는 CEP83이 기저체(basal body)에 위치하는 반면, 결실형 생쥐의 신장낭을 이루고 있는 세포에서는 기저체/중심립에 존재하지 않았고, CEP164도 마찬가지로 결실형 생쥐의 신장낭 세포에서 특이적으로 결핍되어 있는 것으로 확인되었다. 이러한 일련의 결과는 PIBF1 결실에 의한 신장낭 발병이 원부속지 형성 저해와 그에 따른 섬모 결핍에서 기인한 것임을 시사한다.

[2-2] 신장낭 세포의 섬모 결핍에 의한 신장낭 세포의 형태 변화

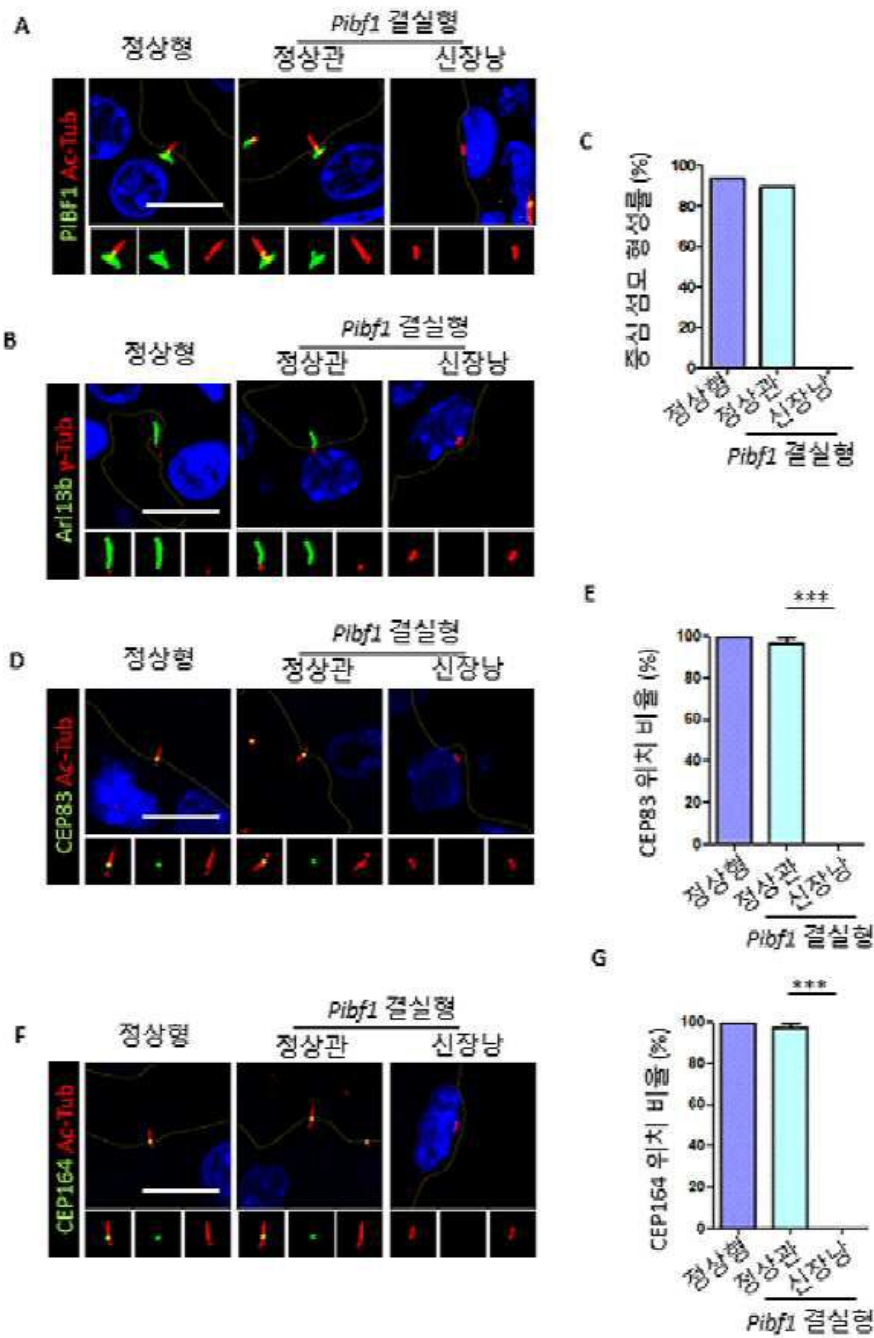
- [0084] 상기 섬모의 형성 저해가 신장낭의 세포 모양 변화에 미치는 영향을 조사하였다. 구체적으로, 중심 섬모를 표지하는 Arl13b(ADP Ribosylation Factor Like GTPase 13B) 항체와 세포의 접합부를 표지하는 베타-카테닌(β -catenin) 항체를 이용해 정상형 생쥐와 결실형 생쥐의 신장낭 세포를 관찰하였고, 3D 이미지를 통하여 세포의 단면 넓이를 측정하였다.
- [0085] 그 결과, 도 3에 도시된 바와 같이, 후기 신장낭의 세포들은 정상과 초기 신장낭의 세포들에 비해 납작한 형태이고, 초기 신장낭 내의 섬모가 결핍된 세포는 섬모를 형성한 신장낭 세포들에 비해 더 큰 너비를 갖는 것으로 확인되었다. 이러한 관찰 결과는 PIBF1 결실 생쥐의 신장낭 세포에서 섬모가 결핍되면, 신장낭 세포의 형태가 변함을 시사한다.
- [0086] **[2-3] 신장낭 세포의 섬모 결핍에 의한 mTOR 활성화**
- [0087] 상기 실시예 2-2와 같은 신장낭 세포의 형태 변화와 라파미신의 포유류 타겟 단백질(mammalian target of rapamycin, mTOR)의 활성화 간의 관계를 확인하기 위하여, mTOR 활성화의 주된 지표인 p-S6RP(phospho-S6 ribosomal protein)를 표지하는 항체를 활용하여 신장낭 세포의 모양 변화를 조사하였다. 상기 정상형과 결실형 생쥐의 신장 세포의 너비를 측정하였다.
- [0088] 그 결과, 도 4에 도시된 바와 같이, 초기 신장낭 내에서는 활성화된 p-S6RP를 나타내는 세포의 크기가 활성화되지 않은 세포보다 통계적으로 유의미하게 더 커진 것을 확인할 수 있었다. 또한, 섬모와 p-S6RP를 동시에 조사하기 위하여, 신장낭의 발병 정도가 각기 다른 생후 21일, 42일, 84일의 생쥐의 신장을 조사하였고, 전 시기에 걸쳐 초기 신장낭에서는 섬모를 형성한 세포에 비해 섬모 형성이 저해된 세포에서 p-S6RP가 더 많이 활성화되어 있음을 확인하였다. 상기 결과는 섬모의 형성 저해가 초기의 일시적 mTOR 활성을 유발하여 세포의 크기에 영향을 미치는 것을 시사한다.
- [0089] **[2-4] 신장낭 세포의 섬모 결실에 의한 YAP 활성화**
- [0090] YAP(Yes-Associated Protein)은 대표적인 기계생물학(mechanobiology) 단백질로서 세포의 삼차원 환경의 변화에 반응하여 활성화되면 섬모의 형성을 저해하며 분열을 유도하는 것이 알려져 있다. 이에, 신장낭 세포의 섬모 결실과 YAP1 단백질의 활성화의 관계를 확인하기 위하여, YAP 활성화에 대한 간접적 지표로서 세포 분열능을 조사하였다. 구체적으로, 분열하는 세포를 표지하는 Ki-67 항체를 이용한 염색을 통해 분열능을 분석하였다. 이후 직접적으로 YAP의 활성을 확인하기 위해 YAP를 표지하는 항체를 이용하여, 활성을 띠는 형태인 핵에 위치한 YAP의 비율을 측정하였고, YAP의 타겟 유전자들인 c-Myc, Ctgf(Connective tissue growth factor), Cyr61, Amotl2(Angiomotin Like 2)의 발현양을 측정하였다.
- [0091] 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이, 신장낭이 발병된 결실형 생쥐의 세포의 분열능이 크게 증가하였고, 정상형에 비해 결실형 생쥐의 신장낭 세포에서 더 많은 비율의 YAP 단백질이 활성화되는 것으로 확인되었다. 또한, 상기 c-Myc, Ctgf, Cyr61, Amotl2의 YAP 타겟 유전자들의 발현이 크게 증가하는 것으로 확인되었다. 따라서, 섬모 결실 신장낭에서 YAP이 활성화되어 있음을 알 수 있었다.
- [0093] 상기에서는 본 발명의 대표적인 실시예를 예시적으로 설명하였으나, 본 발명의 범위는 상기와 같은 특정 실시예에만 한정되지 아니하며, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 출원의 청구범위에 기재된 범주 내에서 적절하게 변경이 가능할 것이다.

도면

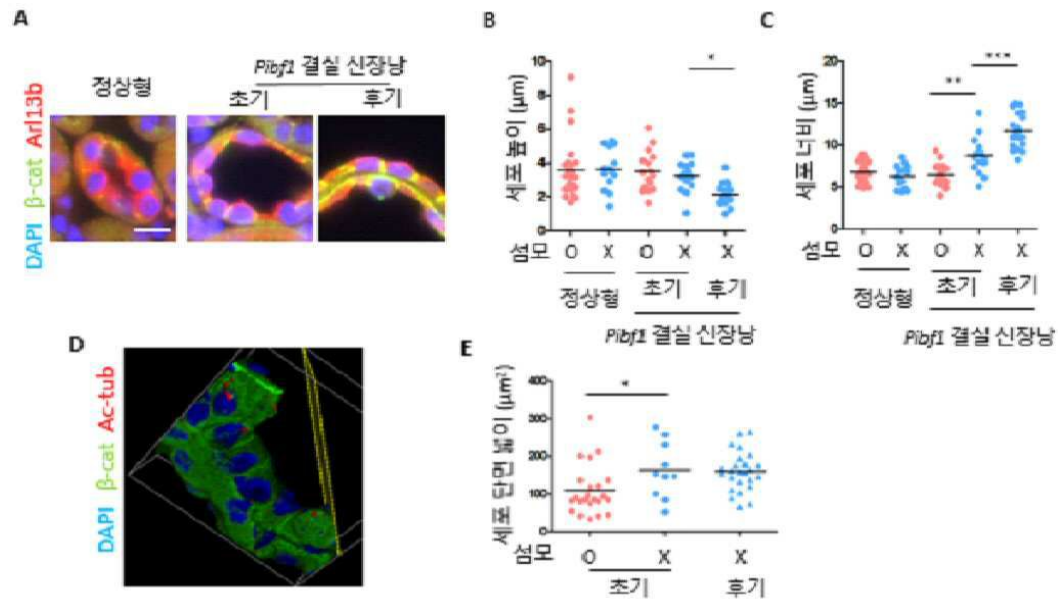
도면1



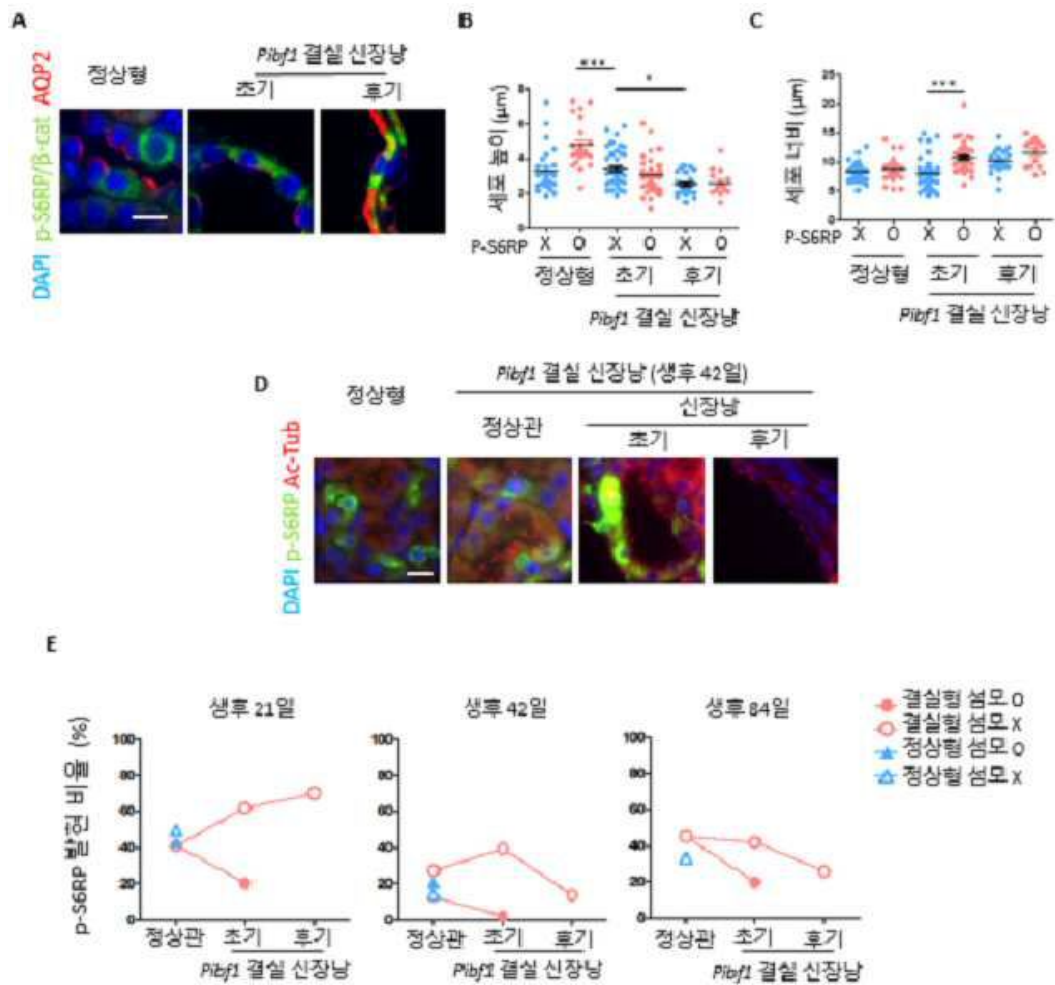
도면2



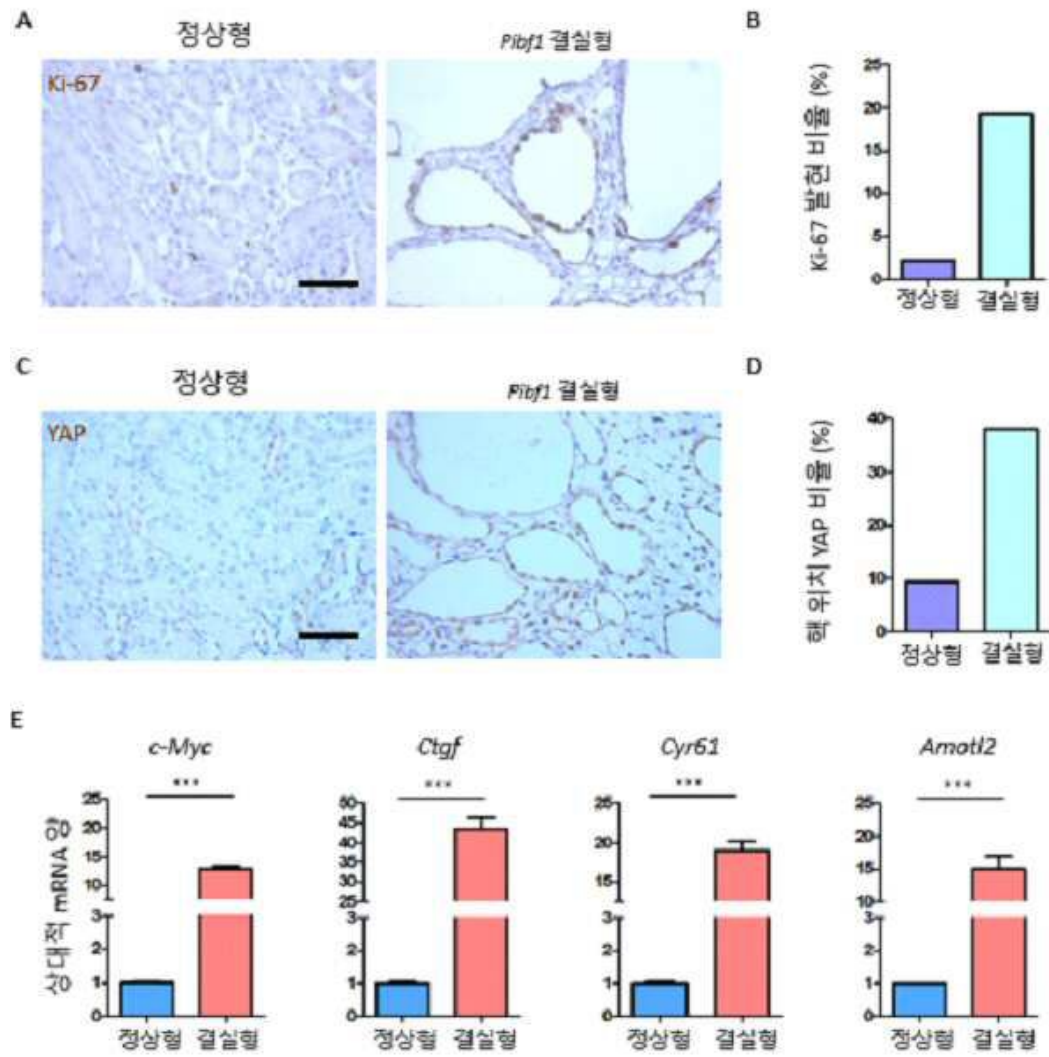
도면3



도면4



도면5



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.