(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0086934
(43) 공개일자 2020년07월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/027 (2013.01)
A01K 2217/15 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0003325
(22) 출원일자 2019년01월10일
심사청구일자 2019년01월10일

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
민경태
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
최치열
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
특허법인태백

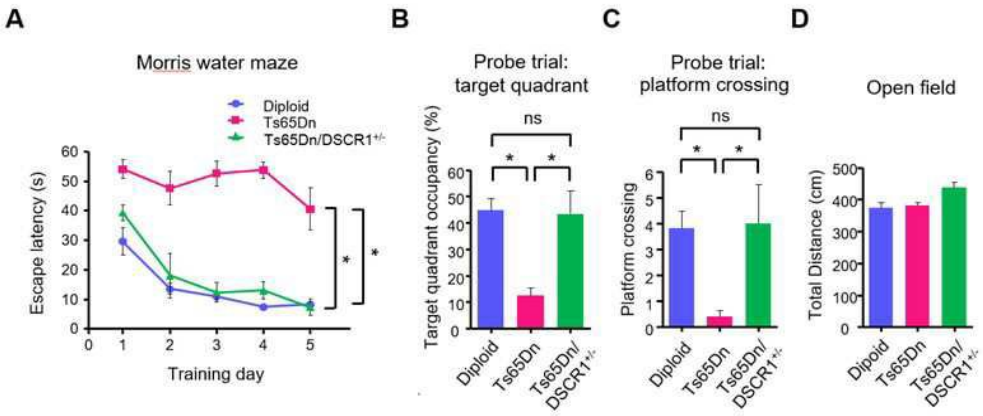
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **지적장애를 가진 다운증후군 질환에서 DSCR1의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 지적장애를 가진 다운증후군 질환에서 다운증후군 위험 영역 1(Down syndrome critical region 1; DSCR1)의 용도에 관한 것으로서, 특히, Ts65Dn 마우스에서의 DSCR1 유전자 양의 정상화가 손상되어 있던 해마 치상회에서의 신경 전구세포 증식을 회복시켰으며, 해마의 학습 및 기억까지 영향을 미쳤다는 것을 보여준다. 따라서 DSCR1 유전자를 목표로 하는 약리학적 접근 전략은 다운증후군과 관련된 지적 장애의 치료에 기여 할 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/0318 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2016R1A3B1905982
부처명 과학기술정보통신부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 창의적연구(리더연구자)
연구과제명 핵내 단백질 항상성 연구단
기 여 율 1/1
주관기관 울산과학기술원
연구기간 2018.04.01 ~ 2019.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

다운증후군 질환 모델 마우스 및 다운증후군 위험 영역 1(Down syndrome critical region 1; DSCR1) 유전자 결핍 마우스를 교배시키는 단계; 및

DSCR1 유전자가 이배체로 존재하는 마우스를 선별하는 단계를 포함하는 다운증후군 증상이 개선 또는 치료된 마우스 모델 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 다운증후군 질환 모델 마우스는 DSCR1 유전자가 삼배체로 존재하는 마우스인 것을 특징으로 하는 다운증후군 증상이 개선 또는 치료된 마우스 모델 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 다운증후군 증상은 지적장애인 것을 특징으로 하는 다운증후군 증상이 개선 또는 치료된 마우스 모델 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 지적장애는 학습장애 또는 기억장애인 것을 특징으로 하는 다운증후군 증상이 개선 또는 치료된 마우스 모델 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 다운증후군 증상이 개선 또는 치료된 마우스 모델은 성체 신경발생이 정상 수준으로 회복된 것을 특징으로 하는 다운증후군 증상이 개선 또는 치료된 마우스 모델 제조방법.

청구항 6

인간을 제외한 다운증후군 질환 동물에서 삼배체로 존재하는 DSCR1 유전자를 이배체로 정상화시켜, 다운증후군 증상을 개선 또는 치료하는 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 동물은 마우스인 것을 특징으로 하는 다운증후군 증상을 개선 또는 치료하는 방법.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 다운증후군 증상은 지적장애인 것을 특징으로 하는 다운증후군 증상을 개선 또는 치료하는 방법.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 지적장애는 학습장애 또는 기억장애인 것을 특징으로 하는 다운증후군 증상을 개선 또는 치료하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 지적장애를 가진 다운증후군 질환에서 다운증후군 위험 영역 1(Down syndrome critical region 1; DSCR1)의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 다운증후군(Down syndrome; DS)은 약 800명당 1명의 확률로 가장 흔하게 발생하는 선천적 장애로서, 21번 염색체의 부분 또는 전체의 불균형한 유전자량으로 인해 야기되는 복합 장애이다. 다운증후군은 21번 염색체 상에 여분의 염색체가 존재하여 유발되는데, 다운증후군 환자에서 지적장애를 유발하는 특정 유전자는 여전히 불명확하다. 다운증후군 위험 영역 1(Down syndrome critical region 1; DSCR1, 또는 RCAN1로도 불림)은 인간의 21번 염색체에 위치하며, 뇌에서 높게 발현되고, 해마 신경세포에 특히 풍부하다. DSCR1은 칼시프레신(calcipressins)이라고 불리는 칼시뉴린(calcineurin; CaN) 억제제의 진화적으로 보존된 패밀리에 속하며, 여기에는 초파리의 네뷸라(nebula)와, 마우스 및 인간의 DSCR1이 포함된다. DSCR1이 학습 및 기억에 필수적이라는 것이 알려졌는데, 이는 DSCR1이 다운증후군 환자의 지적장애에 주요한 역할을 할 수도 있다는 것을 뒷받침한다.

[0003] 성체 신경 발생(adult neurogenesis)은 성체 신경전구체로부터 새로운 신경세포들이 만들어지는 과정으로, 성인 뇌 해마의 치상회(dentate gyrus) 부분과 측 뇌실(lateral ventricle)의 뇌실 하대(subventricular zone)에서 국한적으로 일어나게 된다. 새롭게 만들어진 신경세포들은 해마의 학습 그리고 기억 능력의 형성에 중요한 역할을 하며, 최근에는 이런 성체 신경 발생의 정도가 알츠하이머 병, 파킨슨 병 등의 신경퇴행성 질환에서 줄어든 것이 확인되고 있다. 하지만 어떤 생리학적, 병리학적인 기전에 의해 성체 신경 발생이 조절되고 있는지에 대해 알려진 것은 미미한 편이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2011-0117518호 (2011.10.27. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 지적장애를 가진 다운증후군 질환에서 다운증후군 위험 영역 1(Down syndrome critical region 1; DSCR1)의 용도를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 다운증후군 질환 모델 마우스 및 다운증후군 위험 영역 1(Down syndrome critical region 1; DSCR1) 유전자 결핍 마우스를 교배시키는 단계; 및 DSCR1 유전자가 이배체로 존재하는 마우스를 선별하는 단계를 포함하는 다운증후군 증상이 개선 또는 치료된 마우스 모델 제조방법을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 인간을 제외한 다운증후군 질환 동물에서 삼배체로 존재하는 DSCR1 유전자를 이배체로 정상화시켜, 다운증후군 증상을 개선 또는 치료하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명은 지적장애를 가진 다운증후군 질환에서 다운증후군 위험 영역 1(Down syndrome critical region 1; DSCR1)의 용도에 관한 것으로서, 특히, Ts65Dn 마우스에서의 DSCR1 유전자 양의 정상화가 손상되어 있던 해마 치상회에서의 신경 전구세포 증식을 회복시켰으며, 해마의 학습 및 기억까지 영향을 미쳤다는 것을 보여준다. 따라서 DSCR1 유전자를 목표로 하는 약리학적 접근 전략은 다운증후군과 관련된 지적 장애의 치료에 기여 할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 Ts65Dn/DSCR1$^{+/-}$ 마우스 제작 개요도를 나타낸다.

도 2는 Ts65Dn 및 DSCR1 KO에 대한 검출 마커를 이용하여 확인한 Ts65Dn/DSCR1$^{+/-}$ 마우스의 유전형 분석결과를 나타낸다.

도 3은 증가된 DSCR1 유전자양이 Ts65Dn 마우스에서 손상된 해마의 성체 신경발생에 기여한다는 결과를 나타낸다. Ts65Dn/DSCR1$^{+/-}$ 마우스의 과립하영역(subgranular zone:SGZ)에서 BrdU 및 Ki67 이중 염색으로 확인된 전구 뉴런의 증식 정도를 Ts65Dn 마우스와 비교하였다. 스케일 바: 100 μm (큰 이미지), 10 μm (확대 이미지). 각 해마 절편은 40 μm 두께이고, 총 6개의 해마 절편을 분석에 사용하였다. 수치는 평균 ± SEM으로 나타냈고, 통계적 유의성은 Bonferroni post hoc test에 따른 one-way ANOVA 분석을 수행하였다. N = 6 (대조군), 5 (Ts65Dn), 3 (Ts65Dn/DSCR1$^{+/-}$) 마우스, *P< 0.05.

도 4는 Ts65Dn/DSCR1$^{+/-}$ 마우스에서의 TET1 및 miRNA-124 수준 분석한 결과를 나타낸다. (A) Ts65Dn 마우스에서의 DSCR1 mRNA 발현은 야생형과 비교하여 약 2.5배 증가하였다. 하지만, Ts65Dn/DSCR1$^{+/-}$ 마우스에서는 정상 DSCR1 mRNA 전사체 수준을 나타냈다. 수치는 평균 ± SEM으로 나타냈고, 통계적 유의성은 Bonferroni post hoc test에 따른 one-way ANOVA 분석을 수행하였다. 각 조건에 대해 N = 3, *P< 0.05. (B, C) 예상대로, Ts65Dn 마우스에서 TET1 및 miR-124는 감소되었으나, Ts65Dn/DSCR1$^{+/-}$ 마우스에서는 TET1 mRNA 및 miR-124 발현이 회복되었다. 수치는 평균 ± SEM으로 나타냈고, 통계적 유의성은 Bonferroni post hoc test에 따른 one-way ANOVA 분석을 수행하였다. β-액틴은 표준화를 위해 사용되었다. N = 3 (Diploid), 3 (Ts65Dn), 4 (Ts65Dn/DSCR1$^{+/-}$) 마우스, *P< 0.05, **P< 0.01 (C), *P< 0.001.

도 5는 DSCR1 유전자양의 정상화가 Ts65Dn 마우스들의 손상 되어 있던 학습 및 기억의 회복에 대한 결과를 나타낸다. (A) Morris water maze 훈련기간 동안의 탈출 지연시간. (B, C) MWM 실험에서 probe trial 1분 동안 목표물 사분 면에서 보낸 시간의 비율 MWM 실험에서 probe trial 30초 동안 플랫폼을 지나간 빈도. (D) Diploid, Ts65Dn, Ts65Dn/DSCR1$^{+/-}$ 에서 Open-field 분석(n=3-6 pairs of mice). 평균 ± SEM으로 정량하여 나타냈고, one-way ANOVA로 분석하였다. *P < 0.05, ns: 유의성 없음(not significant). N = 6 (control), 5 (Ts65Dn), 3 (Ts65Dn/DSCR1$^{+/-}$) 마우스.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명은 다운증후군 질환 모델 마우스 및 다운증후군 위험 영역 1(Down syndrome critical region 1; DSCR1) 유전자 결핍 마우스를 교배시키는 단계; 및 DSCR1 유전자가 이배체로 존재하는 마우스를 선별하는 단계를 포함하는 다운증후군 증상이 개선 또는 치료된 마우스 모델 제조방법을 제공한다.

[0011] 상세하게는, 상기 다운증후군 질환 모델 마우스는 DSCR1 유전자가 삼배체로 존재하는 마우스일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0012] 상세하게는, 상기 다운증후군 증상은 지적장애일 수 있고, 보다 상세하게는 상기 지적장애는 학습장애 또는 기억장애일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0013] 상세하게는, 상기 다운증후군 증상이 개선 또는 치료된 마우스 모델은 성체 신경발생이 정상 수준으로 회복된 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0014] 또한, 본 발명은 인간을 제외한 다운증후군 질환 동물에서 삼배체로 존재하는 DSCR1 유전자를 이배체로 정상화시켜, 다운증후군 증상을 개선 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0015] 바람직하게는, 상기 동물은 마우스일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 상세하게는, 상기 다운증후군 증상은 지적장애일 수 있고, 보다 상세하게는 상기 지적장애는 학습장애 또는 기억장애일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명에 있어서, DSCR1 단백질은 Gene ID 1827일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0019] **<실험예>**

[0020] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0021] **1. 마우스**

[0022] DSCR1 KO 마우스는 K. Baek (Sungkyunkwan University, Seoul, South Korea) 으로부터 받았으며, 유전형분석(genotyping)을 수행하였다. 간단히 설명하자면, genomic DNA 추출한 후 유전형분석(genotyping) 프라이머(primer)로 PCR을 수행하여 2% DNA agarose gel에 로딩한다. Ts65Dn 마우스의 경우 367bp 크기를 보이며, 대조군 마우스의 경우 208bp에서 DNA 밴드(band)가 보이게 된다. Ts65Dn 마우스는 The Jackson Laboratory에서 구입하였으며, 유전형분석(genotyping)을 수행하였다. 간단히 설명하자면, genomic DNA 추출한 후 유전형분석(genotyping) 프라이머(primer)로 PCR을 수행하여 2% DNA agarose gel에 로딩한다. Ts65Dn 마우스의 경우 396bp 크기를 보이며, 이배체(diploid; 대조군) 마우스의 경우 290bp에서 DNA 밴드(band)가 보이게 된다(도 1 및 도 2).

[0023] **2. BrdU 투여**

[0024] Ts65Dn을 비롯한 이배체(diploid), Ts65Dn/DSCR1$^{+/-}$ mice에 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU, 150mg/kg body weight, Sigma-Aldrich)을 하루 2 회, 12 시간 간격으로 5 일간 복강 내 주사하였다. IHC 실험을 위해 마지막 주사 1 일후에 마우스를 희생시켰으며, 인산염 완충 식염수 (PBS 0.1M, pH 7.4) 및 4 % 파라포름알데히드(PFA)로 관류(perfusion)을 수행하였다. 그런 다음 분리한 두뇌를 4 ℃에서 4 % PFA로 밤새 고정시키고, 냉동 보존을 위해 30 % sucrose로 2 일간 사후 고정시켰다. 뇌는 신속하게 동결 배지(freezing medium)로 고정(-80℃) 시킨 다음 저온 유지 장치(Leica)를 사용하여 40 μm 두께로 절단하였다.

[0025] **3. 면역조직화학 분석**

[0026] 뇌 절편을 PBS로 각각 5 분간 3번 씻어주고, sodium citrate buffer (10mM, pH 6)과 함께 80 ℃에서 30 분간 반응시켰다. 절편을 실온(RT)으로 냉각시키고 blocking buffer (0.1M PBS, 0.3 % Triton X-100, 5 % normal horse serum)로 1 시간 동안 배양하였다. BrdU 면역염색을 위해서 절편을 1M HCl 중에서 30 분 동안 실온에서 반응시켰고, PBS로 3 회 각각 5 분간 헹구었다. 절편을 1 차 항체와 함께 4 ℃에서 밤새 반응시켰고, 수 차례 세척한 후, Alexa Fluor conjugated 2 차 항체를 실온에서 2 시간 동안 적용하였다. 이미지는 Zeiss LSM 780 공초점 현미경을 사용하여 촬영하였으며, BrdU (1 : 300, Abcam), Ki67 (1 : 500, Abcam) 항체들을 사용하였다.

[0027] **4. Morris water maze test**

[0028] Hidden platform 및 probe trial test는 기존의 보고에 따라 수행하였다. 간단히 설명하자면, hidden platform test의 경우 시작 방향을 서로 다르게 하여 4 번의 test을 측정하였다. 각 test는 1 분간 지속되었으며, test 사이에 2 분의 간격이 있었다. 5 일 동안 마우스를 훈련했으며, probe test를 위해 5 일 동안 훈련을 마친 마우스를 30 초 동안 테스트하였다. 동물의 관찰은 SMART 시스템 (HARVARD 장치)에 의해 기록되고 분석되었다.

[0029] **5. Open field test**

[0030] 각 마우스는 아크릴 상자(40 × 40 × 40 cm)의 중앙에 위치시켰고, 비디오 추적 시스템을 사용하여 20 분 동안 그 행동을 기록하였다. 총 이동 거리는 SMART 시스템(HARVARD 장치)으로 분석하였다.

[0031] **6. RNA 분리 및 qPCR**

[0032] Trizol을 사용하여 해마에서 총 RNA를 추출하고 High-Capacity RNA-to-cDNA Kit(Life Technologies)를 사용하여 만든 cDNA를 이용하여, 실시간 정량 PCR(real-time quantitative PCR)을 수행하였다. Power Up SYBR Green Master Mix(Life Technologies)는 제조사의 지침에 따라 사용되었으며, LightCycler 480 II (Roche) 을 사용하였다. 자료 분석은 comparative Ct method으로 수행되었다.

[0033] **<실시예 1> 다운증후군에서의 성체 신경발생 과정과 DSCR1의 역할**

[0034] 성체 신경발생(Adult neurogenesis)은 성체 신경줄기세포(adult neuronal stem cell)와 간세포(progenitor cell)들의 증식(proliferation), 분화(differentiation), 성숙(maturation) 그리고 새로운 신경세포들이 기존 신경세포들과 연결망을 형성하는 통합(integration)의 과정을 포함한다.

[0035] 본 발명자들은 브로모데옥시우리딘(bromodeoxyuridine; BrdU) 주입을 통하여 치상회 간세포의 증식을 살펴본 결과, Ts65Dn 다운증후군 마우스 모델에서는 증식이 줄어든 것을 확인하였으나, DSCR1의 유전자량을 정상적으로 만든 Ts65Dn/DSCR1$^{+/-}$ 마우스에서는 정상적인 마우스에서의 간세포 증식 정도로 회복된 것을 확인하였다(도 3).

[0036] **<실시예 2> Ts65Dn/DSCR1$^{+/-}$ 마우스에서의 TET1 및 miRNA-124 수준 분석**

[0037] 상기 결과에서, DSCR1 유전자양의 증가는 Ts65Dn에서의 해마 성체 신경발생 손상에 기여하는 것으로 나타났다. 본 발명자들은 DSCR1이 해마 성체 신경발생을 조절하는 TET1 및 miRNA-124 경로의 상류에 존재한다는 것을 밝혀냈으므로, 다음으로 Ts65Dn/DSCR1$^{+/-}$ 마우스에서 TET1 및 miRNA-124 수준이 회복되는지 확인하였다. 예상대로, Ts65Dn 마우스에서는 TET1 및 miRNA-124가 낮은 수준으로 확인되었으나, Ts65Dn/DSCR1$^{+/-}$ 마우스에서는 정상 수준의 TET1 및 miRNA-124로 나타났다(도 4).

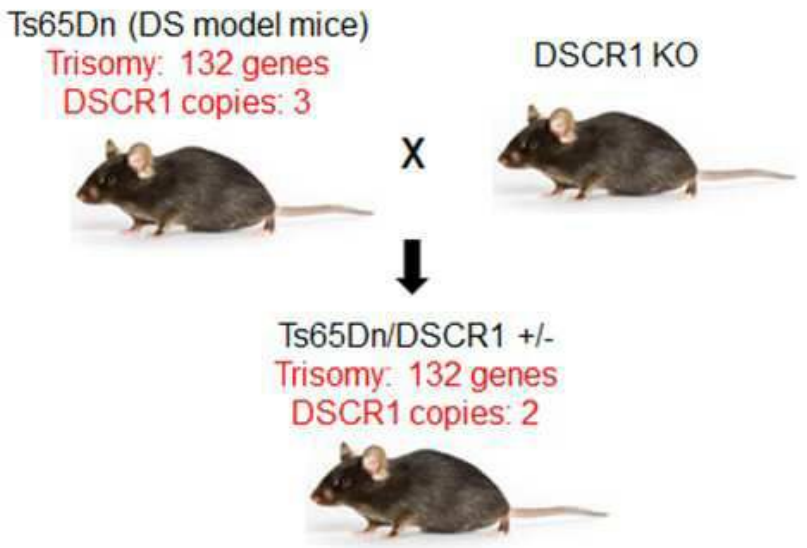
[0038] **<실시예 3> 다운증후군에서의 학습 및 기억에 대한 DSCR1의 역할**

[0039] 본 발명자들은 이러한 DSCR1 유전자양의 정상화가 Ts65Dn 마우스에서 보이는 학습 및 기억 문제를 완화할 수 있을 것인지를 검사하기 위하여 Morris water maze 실험을 진행하였다(도 5).

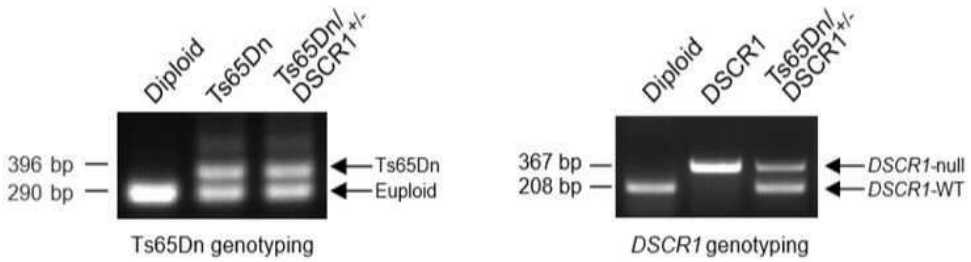
[0040] 흥미롭게도 Ts65Dn/DSCR1+/- 마우스들은 정상적인 학습 및 기억 능력을 보였으며, 이는 실제로 DSCR1이 공간 학습과 기억에 중요한 역할을 한다는 것을 나타낸다.

도면

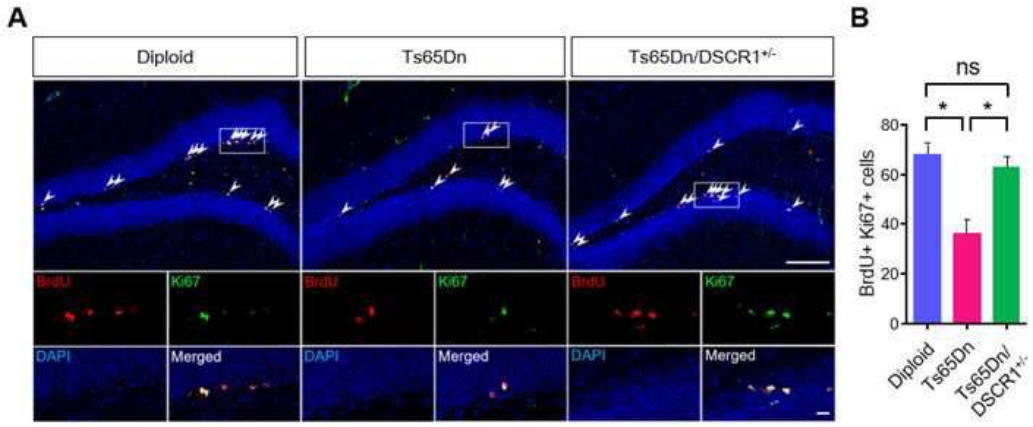
도면1



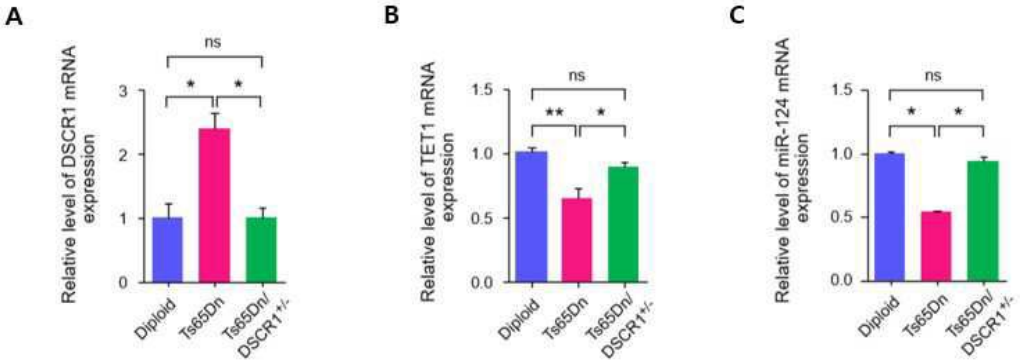
도면2



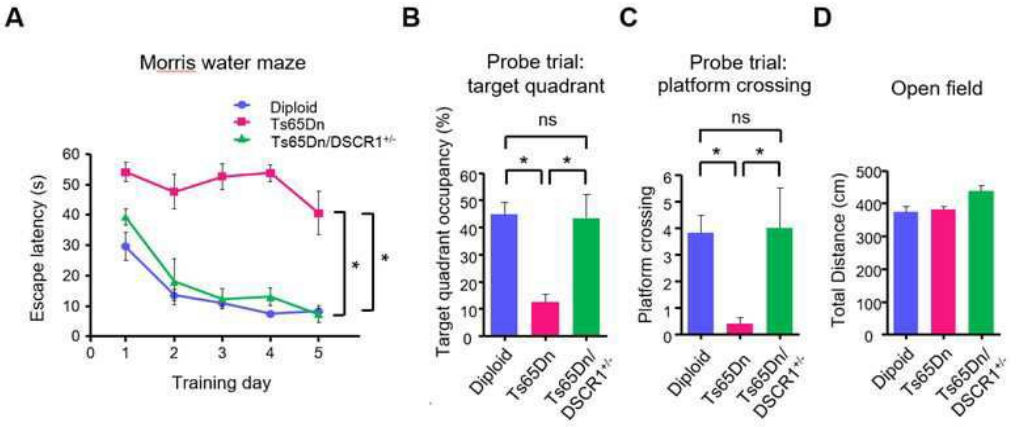
도면3


A
Diploid
Ts65Dn
Ts65Dn/DSCR1+/-
BrdU
Ki67
DAPI
Merged
B
ns
BrdU+ Ki67+ cells
Diploid
Ts65Dn
Ts65Dn/DSCR1+/-

도면4


A
Relative level of DSCR1 mRNA expression
B
Relative level of TET1 mRNA expression
C
Relative level of miR-124 mRNA expression
ns
Diploid
Ts65Dn
Ts65Dn/DSCR1+/-

도면5


A
Morris water maze
Diploid
Ts65Dn
Ts65Dn/DSCR1+/-
Escape latency (s)
Training day
B
Probe trial: target quadrant
Target quadrant occupancy (%)
C
Probe trial: platform crossing
Platform crossing
D
Open field
Total Distance (cm)
ns