

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0049552
(43) 공개일자 2020년05월08일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) *G01N 33/50* (2017.01)
- (52) CPC특허분류
A01K 67/0275 (2013.01)
C07K 14/47 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-0130699
 (22) 출원일자 2019년10월21일
 심사청구일자 2019년10월21일
- (30) 우선권주장
 1020180132582 2018년10월31일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
 고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
- 한국과학기술연구원
 서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
- (72) 발명자
 박재용
 서울특별시 성북구 종암로24가길 80, 101동 504호 (종암동, 래미안라센트)
- 권오성
 서울특별시 노원구 한글비석로 396, 108동 1016호 (상계동, 벽산아파트)
- 황은미
 서울특별시 성북구 종암로24가길 80, 101동 504호 (종암동, 래미안라센트)
- (74) 대리인
 이명진

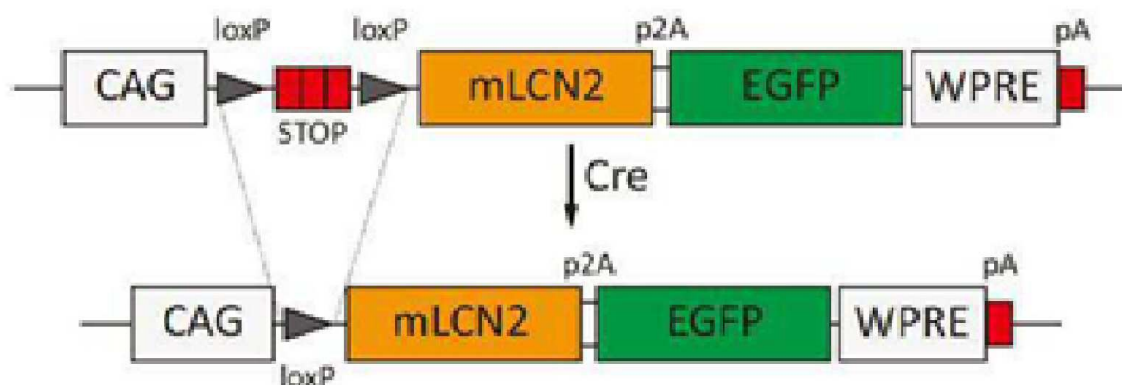
전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 리포칼린-2의 선택적 과발현을 통한 염증형성 형질전환 동물모델 및 그의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 리포칼린-2(Lipocalin-2; LCN2)의 선택적 과발현을 통한 염증유발 형질전환 동물모델에 관한 것으로서, 본 발명자들은 리포칼린-2(Lipocalin-2; LCN2) 유전자를 과발현 시키는 동물모델을 제작하기 위해 예의 연구한 결과, Cre-loxP 유전자 발현 시스템을 이용하여 조건부 LCN2의 과발현을 유도하는 형질전환 마우스를 (뒷면에 계속)

대표도 - 도1a



제작하고, 상기 형질전환 마우스가 뇌 국부 염증을 유도하는 것을 확인하였다. 본 발명으로 제작된 마우스를 이용하면 진정한 뇌 내 LCN2의 기능을 밝혀내는 데에 큰 도움이 될 것으로 기대되고, 뇌 내 세포 특이적으로 LCN2 유전자를 과발현시킴으로써 기존에는 불가능 하였던 LCN2의 세포수준의 기능과 뇌 염증에 대한 역할을 알아내는 연구를 가능할 것으로 판단되며, 국부적인 염증반응을 유도함으로써 뇌 내 지역별 염증반응에 대한 변화를 연구할 수 있을 것이라 기대된다. 또한, 높은 수준의 LCN2 연구와 새로운 염증 동물모델의 제시로 뇌 염증에 대한 발병기전 연구 및 치료법 개발에 크게 기여할 것으로 기대된다.

(52) CPC특허분류

C12N 15/8509 (2013.01)

G01N 33/5088 (2013.01)

A01K 2217/206 (2013.01)

A01K 2267/03 (2013.01)

C12N 2015/8527 (2013.01)

C12N 2800/30 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016M3C7A1904149

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발사업

연구과제명 막단백 기반 뇌염증 제어기술 개발

기 여 율 40/100

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017M3A9C4092979

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 전통천연물기반 유전자동의보감사업

연구과제명 질병 막단백질 핵심마커 기반 천연물 작용기전 및 효능 규명

기 여 율 30/100

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2017.11.01 ~ 2021.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017M3C7A1079694

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발사업

연구과제명 고빠핵-모노아민 중추 신경회로의 전기생리학적 연구

기 여 율 20/100

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2017.10.01 ~ 2023.03.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017M3C7A1043838

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 뇌과학원천기술개발사업

연구과제명 기저핵 장애 뇌질환 관련 신경회로의 구조적 연결망 규명 및 통합 DB 구축

기 여 율 10/100

주관기관 한국과학기술연구원

연구기간 2017.06.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

CAG(Cytomegalovirus early enhancer/chicken beta action) 프로모터; 제 1 loxP(locus of X-over P1) 부위; 정지 코돈(stop codon) 부위; 제 2 loxP 부위; 및 LCN2의 순서로 이루어진 DNA 서열을 포함하는 염증형성 동물 모델 제작용 리포칼린-2(Lipocalin-2; LCN2) 유전자 표적벡터(targeting vector).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 LCN2 뒤에, p2A(porcine teschovirus-1 2A), 향상된 녹색형광단백질(Enhanced green fluorescent protein; EGFP), 우드척 간염 바이러스 전사 후 조절요소 (Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; WPRE), 및 SV40 polyA signal(pA)의 순서로 이루어진 DNA 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는, 염증형성 동물모델 제작용 LCN2 유전자 표적벡터.

청구항 3

제1항의 LCN2 유전자 표적벡터가 형질 전환된 염증형성 동물모델 제작용 동물세포.

청구항 4

제3항의 동물세포를 대리모에 주입하여 제조한 염증형성 리포칼린-2(Lipocalin-2; LCN2) 키메라 동물모델.

청구항 5

제4항의 키메라 동물모델에 Cre 단백질을 발현시키는 바이러스를 감염시키거나 정상교세포 특이적 Cre 단백질 생산 동물모델과 교배시켜 제조한 염증형성 리포칼린-2(Lipocalin-2; LCN2) 동물모델.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 염증은 뇌 내 국부염증인 것을 특징으로 하는, 염증형성 LCN2 동물모델.

청구항 7

하기 단계를 포함하는 염증형성 리포칼린-2(Lipocalin-2; LCN2) 동물모델 제조방법:

- (a) 제1항 또는 제2항의 LCN2 유전자 표적벡터가 형질 전환된 동물세포를 제조하는 단계; 및
- (b) 상기 (a)단계의 동물세포를 대리모에 주입하여 키메라 동물모델을 제조하는 단계.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 제조방법은 (c) 상기 (b)단계의 키메라 동물모델에 Cre 단백질을 발현시키는 바이러스를 감염시켜 LCN2 동물모델을 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 제조방법은 (c) 상기 (b)단계의 키메라 동물모델을 성상교세포 특이적 Cre 단백질 생산 동물모델과 교배하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 동물은 마우스인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 염증은 뇌 내 국부염증인 것을 특징으로 하는, 제조방법.

청구항 12

하기의 단계를 포함하는, 염증 치료물질의 스크리닝 방법:

- (a) 염증형성 리포칼린-2(Lipocalin-2; LCN2) 동물모델의 피검체에 후보물질을 처리하는 단계;
- (b) 상기 피검체의 LCN2의 발현정도를 측정하는 단계; 및
- (c) 후보물질 비처리군에 비해, LCN2의 발현정도가 감소되는 후보물질을 염증 치료물질로 선정하는 단계.

청구항 13

하기의 단계를 포함하는, 염증 치료물질의 스크리닝 방법:

- (a) 염증형성 리포칼린-2(Lipocalin-2; LCN2) 동물모델의 피검체에 후보물질을 처리하는 단계;
- (b) 상기 피검체의 성상아교세포 및 미세아교세포의 형태의 변화를 관찰하는 단계; 및
- (c) 후보물질 비처리군에 비해, 성상아교세포 및 미세아교세포의 형태의 변화가 감소되는 후보물질을 염증 치료물질로 선정하는 단계.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 피검체는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 타액, 객담, 뇌척수액 및 뇨로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 15

제13항에 있어서,

상기 피검체는 조직 및 세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 리포칼린-2(Lipocalin-2; LCN2)의 선택적 과발현을 통한 염증형성 형질전환 동물모델에 관한 것으로서, 보다 구체적으로는 LCN2의 선택적 과발현을 유도하는 서열들을 포함하는 표적벡터(targeting vector), 상기 표적벡터를 이용하여 생성된 염증형성 동물모델 제작용 동물세포, 이를 이용하여 얻은 염증형성 LCN2 동물모델, 그 제조방법 및 이를 이용한 염증 치료물질의 스크리닝 방법 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 리포칼린-2(Lipocalin-2; LCN2)는 oncogene 24p3 또는 neutrophil gelatinase-associated lipocalin(NGAL)이라고도 알려져 있다. LCN2의 염증 상황에서의 역할은 아직 명확하게 규명되지 않고 있으며 특히 뇌 염증에 관한 연구는 미비한 실정이다.

[0004] 염증은 생체 또는 조직에 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상 부위를 수복 및 재생하려는 복구기전 또는 방어적 반응의 일종으로서, 자극이 가해지면 국소적으로 염증성 사이토카인 등의 염증성 성분이 증가되며 염증이 유발된다. 염증이 발생하면 발적(redness), 발열(fever), 종창(swelling), 동통(pain), 기능장애(dysfunction) 등의 증상이 나타나며, 형태학적으로 진행을 확인할 수 있는 증상으로는 퇴행성 병변, 순환장애 및 조직의 과도한 증식 등이 있다. 염증의 발생 원인으로는 물리학적 손상, 화학적 물질에 의한 손상 및, 세균 및 바이러스 등 미생물의 감염 등 다양한 원인이 있다.

[0005] 그 중에서도, 뇌 염증은 뇌염이라고도 불린다. 즉, 우리의 머리뼈(두개골) 속에는 뇌가 들어 있고, 이 뇌는 머리의 단단한 두개골로부터 보호받고 있고, 혈액 속에서의 영양분을 공급받으며, 뇌에서 발생하는 노폐물을 배출하는 역할을 하는 뇌막이라고 부르는 얇은 막에 의해 둘러싸여 있게 되는데, 여기서 뇌 자체에 염증이 생기는 경우를 뇌염이라고 부른다. 뇌염은 뇌 실질(intraventricular masses)이 세균이나 바이러스가 원인이 되는 염증 반응에 의하여 파괴되는 질환으로 대표적인 신경계 감염증이다. 뇌염이라고 하면 주로 뇌 조직을 침범한 증상을 보인다. 가장 대표적인 뇌염에는 일본뇌염이 있다. 그 외에도 세균에 의한 뇌염, 바이러스에 의한 경우가 많고 가장 흔한 것이 헤르페스성 뇌염이다. 대개가 유행성으로 감염력이 강하고, 특별한 치료법이 없기 때문에 정신장애와 지능저하 등의 후유증이 남는 병이다. 여러 가지 원인이 있을 수 있지만, 감기 등의 호흡기 질환이나 중이염 등의 귀 질환에 의해서 흔히 발생할 수 있고, 폐렴, 매독 등의 세균성 질환이나 결핵, 곰팡이 등의 질환이 피를 타고 머리로 들어갈 수도 있다. 또, 일반적으로 바이러스성이지만 세균이나 바이러스와는 관계없이 알레르기나 자가면역 이상으로 발병하는 경우도 있다. 뇌염은 일반적으로 10세 이하의 어린이들에게 발병하는 수가 많지만, 성인이 걸리게 되는 경우에 사망률은 어린이에 비해 높아진다. 감염으로부터 발병까지의 잠복 기간은 바이러스나 세균 종류에 따라 달라진다. 대부분은 감염 후 1주일에서 1개월 사이에 발병한다. 그러나 진행이 느린 바이러스성 뇌염도 있어서, 이 경우는 발병할 때까지 몇 달이나 걸리기도 한다.

[0006] 한편, LCN2의 연구를 위하여 해당 유전자가 결핍된 동물모델은 보고되고 있으나 그 유전자의 과발현되는 동물모델은 없어 제작의 필요성이 요구되었다. 또한, LCN2는 신경세포, 별아교세포, 미세아교세포 등 뇌 내 중요 세포에서의 기능이 서로 다를 것이라 예상되고 있으며 이에 대한 기술적인 툴(tool)의 개발이 절실한 실정이었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-0806914호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 CAG(Cytomegalovirus early enhancer/chicken beta action) 프로모터; 제 1 loxP(locus of X-over P1) 부위; 정지 코돈(stop codon) 부위; 제 2 loxP 부위; 및 LCN2의 순서로 이루어진 DNA 서열을 포함하는 염증형성 동물모델 제작용 리포칼린-2(Lipocalin-2; LCN2) 유전자 표적벡터(targeting vector)를 제공하는 것이다.
- [0010] 또한, 본 발명의 목적은 LCN2 유전자 표적벡터가 형질 전환된 염증형성 동물모델 제작용 동물세포를 제공하는 것이다.
- [0011] 또한, 본 발명의 목적은 동물세포를 대리모에 주입하여 제조한 염증형성 LCN2 키메라 동물모델을 제공하는 것이다.
- [0012] 또한, 본 발명의 목적은 키메라 동물모델에 Cre 단백질을 발현시키는 바이러스를 감염시키거나 성상교세포 특이적 Cre 단백질 생산 동물모델과 교배시켜 제조한 염증형성 LCN2 동물모델을 제공하는 것이다.
- [0013] 또한, 본 발명의 목적은 (a) 상기 LCN2 유전자 표적벡터가 형질 전환된 동물세포를 제조하는 단계; 및 (b) 상기 (a)단계의 동물세포를 대리모에 주입하여 키메라 동물모델을 제조하는 단계를 포함하는 염증형성 LCN2 동물모델 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 또한, 본 발명의 목적은 (a) 염증형성 LCN2 동물모델의 피검체에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 피검체의 LCN2의 발현정도를 측정하는 단계; 및 (c) 후보물질 비처리군에 비해, LCN2의 발현정도가 감소되는 후보물질을 염증 치료물질로 선정하는 단계를 포함하는 염증 치료물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0015] 또한, 본 발명의 목적은 (a) 염증형성 리포칼린-2(Lipocalin-2; LCN2) 동물모델의 피검체에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 피검체의 성상아교세포 및 미세아교세포의 형태의 변화를 관찰하는 단계; 및 (c) 후보물질 비처리군에 비해, 성상아교세포 및 미세아교세포의 형태의 변화가 감소되는 후보물질을 염증 치료물질로 선정하는 단계를 포함하는 염증 치료물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.
- [0016] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0018] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 CAG(Cytomegalovirus early enhancer/chicken beta action) 프로모터(서열번호 2); 제 1 loxP(locus of X-over P1) 부위(서열번호 3); 정지 코돈(stop codon) 부위; 제 2 loxP 부위; 및 LCN2(서열번호 1)의 순서로 이루어진 DNA 서열을 포함하는 염증형성 동물모델 제작용 리포칼린-2(Lipocalin-2; LCN2) 유전자 표적벡터(targeting vector)를 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일 구현 예로, LCN2 뒤에, p2A(porcine teschovirus-1 2A)(서열번호 4), 향상된 녹색형광단백질(Enhanced green fluorescent protein; EGFP)(서열번호 5), 우드척 간염 바이러스 전사 후 조절요소(Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element; WPRE)(서열번호 6), 및 SV40 polyA signal(pA)(서열번호 7)의 순서로 이루어진 DNA 서열을 포함할 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 LCN2 유전자 표적벡터가 형질 전환된 염증형성 동물모델 제작용 동물세포를 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 동물세포를 대리모에 주입하여 제조한 염증형성 LCN2 키메라 동물모델을 제공한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 키메라 동물모델에 Cre 단백질을 발현시키는 바이러스를 감염시키거나 성상교세포 특이적 Cre 단백질 생산 동물모델과 교배시켜 제조한 염증형성 LCN2 동물모델을 제공한다.
- [0023] 또한, 본 발명은 (a) 상기 LCN2 유전자 표적벡터가 형질 전환된 동물세포를 제조하는 단계; 및 (b) 상기 (a)단

계의 동물세포를 대리모에 주입하여 키메라 동물모델을 제조하는 단계를 포함하는 염증형성 LCN2 동물모델 제조 방법을 제공한다.

- [0024] 본 발명의 일 구현예로, 상기 제조방법은 (c) 상기 (b)단계의 키메라 동물모델에 Cre 단백질을 발현시키는 바이러스를 감염시키는 단계;를 포함하는 것일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 제조방법은 (c) 상기 (b)단계의 키메라 동물모델을 정상교세포 특이적 Cre 단백질 생산 동물모델과 교배하는 단계;를 포함하는 것일 수 있다.
- [0026] 또한, 본 발명은 (a) 염증형성 LCN2 동물모델의 피검체에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 피검체의 LCN2의 발현정도를 측정하는 단계; 및 (c) 후보물질 비처리군에 비해, LCN2의 발현정도가 감소되는 후보물질을 염증 치료물질로 선정하는 단계를 포함하는 염증 치료물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 일 구현 예로, LCN2의 발현정도를 측정하기 위한 피검체는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 타액, 객담, 뇌척수액, 및 뇨(urine)로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에서 분리될 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명은 (a) 염증형성 리포칼린-2(Lipocalin-2; LCN2) 동물모델의 피검체에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 피검체의 정상아교세포 및 미세아교세포의 형태의 변화를 관찰하는 단계; 및 (c) 후보물질 비처리군에 비해, 정상아교세포 및 미세아교세포의 형태의 변화가 감소되는 후보물질을 염증 치료물질로 선정하는 단계를 포함하는 염증 치료물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0029] 본 발명의 일 구현 예로, 정상아교세포 및 미세아교세포의 형태의 변화를 관찰하기 위한 피검체는 조직 및 세포로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상에서 분리될 수 있다.
- [0030] 본 발명의 일 구현 예로, 상기 동물은 마우스일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 다른 구현 예로, 상기 염증은 뇌 내 국부염증일 수 있다.

발명의 효과

- [0033] 본 발명자들은 리포칼린-2(Lipocalin-2; LCN2) 유전자를 과발현 시키는 동물모델을 제작하기 위해 예의 연구한 결과, Cre-loxP 유전자 발현 시스템을 이용하여 조건부 LCN2의 과발현을 유도하는 형질전환 마우스를 제작하고, 상기 형질전환 마우스가 뇌 국부 염증을 유도하는 것을 확인하였다. 본 발명으로 제작된 마우스를 이용하여 진정한 뇌 내 LCN2의 기능을 밝혀내는 데에 큰 도움이 될 것으로 기대되고, 뇌 내 세포 특이적으로 LCN2 유전자를 과발현 시킴으로써 기존에는 불가능 하였던 LCN2의 세포수준의 기능과 뇌 염증에 대한 역할을 알아내는 연구를 가능할 것으로 판단되며, 국부적인 염증반응을 유도함으로써 뇌 내 지역별 염증반응에 대한 변화를 연구할 수 있을 것이라 기대된다. 또한, 높은 수준의 LCN2 연구와 새로운 염증 동물모델의 제시로 뇌 염증에 대한 발병기전 연구 및 치료법 개발에 크게 기여할 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0035] 도 1a는 리포칼린-2(Lipocalin-2; LCN2) 유전자를 선택적으로 과발현 시키기 위한 DNA 구조(construct) 디자인을 나타낸 도이다.
- 도 1b는 선택적 과발현 LCN2 형질전환 마우스 제작을 위한 작업 흐름(work flow)을 나타낸 도이다.
- 도 2a는 LCN2 유전자를 선택적으로 과발현 시키기 위한 DNA 구조 벡터 맵(vector map)을 나타낸 도이다.
- 도 2b는 DNA 구조 벡터에서 웅성전핵(Male pronucleus)에 대한 미세주입(microinjection)용 DNA 준비를 위하여 제한효소로 절단한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 2c는 만들어진 파운더(founder) 마우스의 제작 확인을 위하여, 게놈 DNA 유전자형 PCR(genomic DNA genotype PCR) 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3a는 파운더 마우스로부터 생산된 형질전환 마우스를 확인(validation)하기 위하여, 정상세포 배양(primary astrocyte culture) 실험 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3b는 파운더 마우스로부터 생산된 형질전환 마우스를 확인(validation)하기 위하여, AAV-GFAP-mCh-Cre를 뇌

정위 주입(brain stereotaxic injection)한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 확인된 선택적 과발현 LCN2 형질전환 마우스를 이용하여, 국부적 뇌 염증 유도 실험한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 하이브리드 생쥐 제작 디자인을 나타낸 도이다.

도 6은 정상교세포 선택적 LCN2 과발현 생쥐(Astrocyte-specific LCN2 Overexpression, ALO)의 체중변화 및 혈액 serum안 LCN2 측정 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 ALO 생쥐의 뇌 내 LCN2 발현 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 ALO 생쥐의 뇌실 확장 관찰 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0036] 본 발명자들은 리포칼린-2(Lipocalin-2; LCN2) 유전자를 과발현 시키는 동물모델을 제작하기 위해 예의 연구한 결과, Cre-loxP 유전자 발현 시스템을 이용하여 조건부 LCN2의 과발현을 유도하는 형질전환 마우스를 제작하고, 상기 형질전환 마우스가 뇌 국부 염증을 유도하는 것을 확인하고, 이에 기초하여 본 발명을 완성하였다.
- [0038] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.
- [0040] 본 발명의 일 실시예에서는, 선택적 과발현 LCN2 형질전환 마우스를 제작하기 위하여, DNA 구조 벡터를 제작하고, 제한효소를 이용하여 자른 후 그 크기를 확인하였으며, 키메라 마우스를 제작하고, PCR기술을 이용해 상기 키메라 마우스가 제대로 제작되었는지 여부를 스크리닝으로 확인하였다(실시예 1 참조).
- [0041] 본 발명의 다른 실시예에서는 선택적 과발현 LCN2 형질전환 마우스가 Cre 단백질 의존적으로 LCN2가 과발현되는지 확인하기 위하여, 키메라 마우스의 주요 정상세포 배양 후 AAV-Cre-mCh 및 AAV-GFAP-mCh-Cre를 감염시켜 ELISA 및 면역조직화학 기술을 이용하여 뇌 정상아교세포 특이적으로 LCN2와 EGFP가 발현되는지 관찰하였다(실시예 2 참조).
- [0042] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 본 발명에서 제작한 형질전환 마우스가 Cre 단백질 발현에 의존적으로 뇌 내 국부 염증 반응을 유도할 수 있는지 확인하기 위해, 일측 해마 CA1 (unilateral hippocampal CA1) 부위에 뇌 정위 수술(brain stereotaxic surgery)로 AAV-GFAP-Cre-EGFP를 국부 감염한 뒤, 면역조직화학 기술을 이용하여 정상아교세포와 미세아교세포의 형태의 변화를 관찰하였다(실시예 3 참조).
- [0043] 따라서, 본 발명은 CAG(Cytomegalovirus early enhancer/chicken beta action) 프로모터; 제 1 loxP(locus of X-over P1) 부위; 정지 코돈(stop codon) 부위; 및 제 2 loxP 부위의 순서로 이루어진 DNA 서열을 포함하는 염증형성 동물모델 제작용 리포칼린-2(Lipocalin-2; LCN2) 유전자 표적벡터(targeting vector)를 제공한다.
- [0044] 본 발명의 구체적 실시예에 따르면, 상기 제 2 loxP 부위 뒤에, LCN2, p2A(porcine teschovirus-1), 향상된 녹색형광단백질(Enhanced green fluorescent protein; EGFP), 우드척 간염 바이러스 전사 후 조절요소(Woodchuck hepatitis virus post-transcriptional regulatory element; WPRE), 및 SV40 polyA signal(pA)의 순서로 이루어진 DNA 서열을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0045] 본 명세서에서 있어서, 상기 벡터는 도 2a에 개시된 개열지도를 가질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0046] 본 명세서에 있어서, 상기 “LCN2”는 바람직하게는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 유전자이고 가장 바람직하게는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어지나, 서열번호 1의 서열과 80 % 이상, 더욱 바람직하게는 90 % 이상, 더욱 바람직하게는 95 % 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0047] 본 명세서에 있어서, 상기 “CAG 프로모터”는 바람직하게는 서열번호 2의 염기서열을 포함하는 유전자이고 가장 바람직하게는 서열번호 2로 표시되는 염기서열로 이루어지나, 서열번호 2의 서열과 80 % 이상, 더욱 바람직하게는 90 % 이상, 더욱 바람직하게는 95 % 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0048] 본 명세서에 있어서, 상기 “loxP”는 바람직하게는 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 유전자이고 가장 바람직하게는 서열번호 3으로 표시되는 염기서열로 이루어지나, 서열번호 3의 서열과 80 % 이상, 더욱 바람직하게는

90 % 이상, 더욱 바람직하게는 95 % 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.

- [0049] 본 명세서에 있어서, 상기 “p2A”는 바람직하게는 서열번호 4의 염기서열을 포함하는 유전자이고 가장 바람직하게는 서열번호 4로 표시되는 염기서열로 이루어지나, 서열번호 4의 서열과 80 % 이상, 더욱 바람직하게는 90 % 이상, 더욱 바람직하게는 95 % 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0050] 본 명세서에 있어서, 상기 “EGFP”는 바람직하게는 서열번호 5의 염기서열을 포함하는 유전자이고 가장 바람직하게는 서열번호 5로 표시되는 염기서열로 이루어지나, 서열번호 5의 서열과 80 % 이상, 더욱 바람직하게는 90 % 이상, 더욱 바람직하게는 95 % 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0051] 본 명세서에 있어서, 상기 “WPRE”는 바람직하게는 서열번호 6의 염기서열을 포함하는 유전자이고 가장 바람직하게는 서열번호 6으로 표시되는 염기서열로 이루어지나, 서열번호 6의 서열과 80 % 이상, 더욱 바람직하게는 90 % 이상, 더욱 바람직하게는 95 % 이상의 서열 상동성을 가지는 염기서열을 포함할 수 있다.
- [0052] 본 명세서에 있어서, “벡터(expression vector)”란 벡터 내에 삽입된 이중의 핵산에 의해 코딩되는 펩타이드 또는 단백질을 발현할 수 있는 벡터를 지칭하는 것으로, 바람직하게는 LCN2를 발현할 수 있도록 제조된 벡터를 의미한다. 상기 “벡터”는 시험관 내, 생체 왜 또는 생체 내에서 숙주 세포로 염기의 도입 및/또는 전이를 위한 임의의 매개물을 말하며, 다른 DNA 단편이 결합하여 결합된 단편의 복제를 가져올 수 있는 복제단위(replicon)일 수 있으며, “복제 단위”란 생체 내에서 DNA 복제의 자가 유닛으로서 기능하는, 즉, 스스로의 조절에 의해 복제가 가능한, 임의의 유전적 단위(예를 들면, 플라스미드, 파지, 코스미드, 염색체, 바이러스 등)를 말한다. 본 발명의 재조합 발현 벡터는 바람직하게는 RNA 중합효소가 결합하는 전사 개시 인자인 프로모터(promoter), 전사를 조절하기 위한 임의의 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열과 전사 및 해독의 종결을 조절하는 서열, 터미네이터 등을 포함할 수 있다. 본 발명에서 사용되는 벡터는 예를 들어 Ai6 벡터일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0053] 본 발명에 사용되는 용어 “EGFP”란, *Aequorea victoria*에서 추출한 기본 (구성 형광) 녹색 형광 단백질을 의미하며, 알칼리성산 민감도가 약하고 빠르게 성숙하는 약한 이량체로 알려져 있다. LCN2가 과발현된 세포의 표식을 위하여 2A-EGFP linker를 LCN2 유전자 하류(down-stream)에 삽입하여 형광 표식을 구현하였다.
- [0054] 본 발명에 있어서, 상기 EGFP 대신 당업계에 공지된 다양한 리포터 단백질을 사용할 수 있으며, 예컨대, GFP(Green fluorescent prtein), UnaG, dsRed, eqFp611, Dronpa, TagRFPs, KFP, EosFP, Dendra, IrisFP, 또는 smURFP 등의 리포터 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0055] 본 발명에 사용되는 용어 “WPRE”란, 전사시 제 3의 구조가 발현되는 DNA 서열이다. 바이러스 벡터에 의해 전달되는 유전자의 발현을 증가시키기 위해 분자 생물학에서 일반적으로 사용된다. WPRE는 보통 감마, 알파 및 베타 요소가 포함된 삼차 조절요소이다.
- [0056] 본 발명에 있어서, 상기 WPRE 대신 당업계에 공지된 다양한 전사 후 조절요소를 사용할 수 있으며, 예컨대, HPRE, CREs, 또는 TREs 등의 전사 후 조절요소일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0057] 본 발명에 있어서, 상기 Cre 재조합효소와 loxP를 이용한 Cre-loxP 시스템은 loxP 부위를 목적하는 표적 유전체에 삽입하고, Cre 재조합효소를 발현시켜 표적 유전자에 돌연변이를 유발하는 방법이다. 표적하는 유전자가 플록스드(floxed)된 경우, 두 개의 loxP 사이트는 일정 간격을 두고 목적하는 유전자의 내부, 예를 들면 인트론 부위 또는 그 주위에 삽입되고, Cre 효소의 존재시 loxP 사이트간에 재조합이 일어나, 그 사이의 유전자가 결실(deletion) 또는 역위(inversion)된다. 본 발명에서 제 1 및 제 2 loxP 부위는 LCN2의 정지코돈을 플랭크(flank)할 수 있고, 그 결과 Cre의 존재시 LCN2가 과발현된다. Cre가 존재하지 않는 경우, 플록스(floxed)된 LCN2의 정지코돈은 영향을 받지 않는다.
- [0058] 또한, 본 발명은 LCN2 유전자 표적벡터가 형질 전환된 염증형성 동물모델 제작용 동물세포를 제공한다.
- [0059] 상기 동물세포는 형질전환(transformation), 형질감염(transfection), 아그로박테리움(*Agrobacterium*)-매개 형질전환 방법, 입자 총 충격법(particle gun bombardment), 초음파 처리법(sonication), 전기충격법(electroporation) 및 PEG(Polyethylen glycol)-매개 형질전환 방법 등의 방법으로 제조될 수 있으나, 본 발명의 벡터를 주입할 수 있는 방법이라면 제한이 없다.
- [0060] 상기 동물세포는 용성전핵일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0061] 또한, 본 발명은 동물세포를 대리모에 주입하여 제조한 염증형성 리포칼린-2(Lipocalin-2; LCN2) 키메라 동물모

텔을 제공한다.

- [0062] 본 발명에 있어서, 상기 동물세포를 대리모에 주입하는 것 대신, LCN2 유전자 표적백터를 동물세포로 형질도입한 후, 그 동물세포를 동물에 낭배(gastrula)에 주입하여 키메라 동물모델을 만들고, 그 모델을 Cre 단백질이 있는 동물모델과 교배시켜 염증형성 LCN2 동물모델을 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0063] 또한, 본 발명은 키메라 동물모델에 Cre 단백질을 발현시키는 바이러스를 감염시키거나 성상교세포 특이적 Cre 단백질 생산 동물모델과 교배시켜 제조한 염증형성 과발현 LCN2 동물모델을 제공한다.
- [0064] 상기 바이러스는 세포특이적으로 Cre 단백질을 발현시킬 수 있는 전달체 단백질로서, 예를 들어, AAV-Cre-mCh, AAV-GFAP-mCh-Cre, AAV-GFAP-Cre-EGFP, Ad-CMV-iCre 등이 사용될 수 있고, 바람직하게는 AAV-Cre-mCh, AAV-GFAP-mCh-Cre, 또는 AAV-GFAP-Cre-EGFP 이나 이에 제한되지 않는다.
- [0065] 상기 '세포특이적'이란, 특이적인 부위 또는 조직일 수 있고, 예를 들어, 뇌세포 특이적일 수 있으며, 바람직하게는 성상세포 또는 미세아교세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0066] 상기 '바이러스 감염' 부위는 조직, 세포, 전신, 또는 국부일 수 있고, 예를 들어, 뇌의 국부일 수 있고, 바람직하게는 일방 내측 고배핵(habenula)일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0067] 또한, 상기 바이러스 감염 외에도 Cre 단백질을 발현시키기 위한 전달체를 사용하는 것이라면 가능하며, 상기 Cre 단백질을 발현시키기 위한 바이러스에 한정되지 않는다.
- [0068] 본 발명의 구체적 실시예 따라, 상기 키메라 동물모델을 주요 성상세포 배양(primary astrocyte culture)한 후, AAV-GFAP-mCh-Cre를 감염시켜 특이적으로 상기 성상세포에만 Cre 단백질을 발현시킬 수 있고, 바람직하게는 일방 내측 하배눌라(unilateral medial habenula)에 AAV-GFAP-mCh-Cre를 국부감염시켜 상기 성상세포에만 Cre 단백질을 발현시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0069] 상기 'Cre 단백질 생산 동물모델'은 세포특이적으로 Cre 단백질을 발현시킬 수 있는 동물 모델일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 Cre 단백질 생산 동물모델은 예를 들어 Aldh111-Cre/ERT2, GFAP-Cre/ERT2, Cx3cr1-Cre/ERT2 및 Nestin-Cre/ERT2로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [0071] 또한, 본 발명의 다른 양태로서, (a) 상기 LCN2 유전자 표적백터가 형질 전환된 동물세포를 제조하는 단계; 및 (b) 상기 (a)단계의 동물세포를 대리모에 주입하여 키메라 동물모델을 제조하는 단계를 포함하는 염증형성 LCN2 동물모델 제조방법을 제공한다.
- [0072] 본 발명의 일 구현예로, 상기 제조방법은 (c) 상기 (b)단계의 키메라 동물모델에 Cre 단백질을 발현시키는 바이러스를 감염시키는 단계;를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0073] 본 발명의 다른 구현예로, 상기 제조방법은 (c) 상기 (b)단계의 키메라 동물모델을 성상교세포 특이적 Cre 단백질 생산 동물모델과 교배하는 단계;를 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0074] 또한, 본 발명의 다른 양태로서, (a) 염증형성 과발현 리포칼린-2(Lipocalin-2; LCN2) 동물모델의 피검체에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 피검체의 LCN2의 발현정도를 측정하는 단계; 및 (c) 후보물질 비처리군에 비해, LCN2의 발현정도가 감소되는 후보물질을 염증 치료물질로 선정하는 단계를 포함하는, 염증 치료물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0075] LCN2의 발현정도를 측정하기 위한 상기 피검체는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 타액, 객담, 뇌척수액, 또는 뇨 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0076] 또한, 본 발명의 또 다른 양태로서, (a) 염증형성 과발현 리포칼린-2(Lipocalin-2; LCN2) 동물모델의 피검체에 후보물질을 처리하는 단계; (b) 상기 피검체의 성상아교세포 및 미세아교세포의 형태의 변화를 관찰하는 단계; 및 (c) 후보물질 비처리군에 비해, 성상아교세포 및 미세아교세포의 형태의 변화가 감소되는 후보물질을 염증 치료물질로 선정하는 단계를 포함하는, 염증 치료물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0077] 성상아교세포 및 미세아교세포의 형태의 변화를 관찰하기 위한 상기 피검체는 조직, 세포, 전혈, 혈액, 타액, 객담, 뇌척수액, 또는 뇨 등일 수 있고, 바람직하게는 조직 또는 세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0078] 본 발명 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “후보물질”은 본 발명의 뇌 내 염증 치료 효과를 나타내는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 siRNA(small

interference RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA), 리보자임(ribozyme), DNzyme, PNA(peptide nucleic acids), 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 항체, 앵타머, 천연추출물 또는 화학물질을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0079] 또한, 상기 (a) 단계에서 후보물질의 처리는 비경구 또는 경구투여, 정위주사를 포함하나, 이로 제한하는 것은 아니며, 당업자라면 시험물질을 동물에게 테스트하기 위해 적절한 방법을 선택할 수 있을 것이다.
- [0080] 또한, 상기 (b) 단계는 중합효소연쇄반응(PCR), 마이크로어레이(microarray), 노던 블롯팅(northern blotting), 웨스턴 블롯팅(western blotting), 효소면역분석법(ELISA), 면역침전법(immunoprecipitation), 면역화학염색법(immunohistochemistry), 또는 면역형광염색법(immunofluorescence)을 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하나 이에 제한되지 않는다.
- [0081] 또한, 상기 후보물질은 LCN2의 발현정도를 측정하기 위하여 스크리닝에서 사용되는 미지의 물질을 의미하며, 바람직하게는 화합물, 미생물 배양액 또는 추출물, 천연물 추출물, 핵산, 및 펩타이드로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하나 이에 제한되지 않으며, 상기 핵산은 앵타머(aptamer), LNA(locked nucleic acid), PNA(peptide nucleic acid), 및 모폴리노(morpholino)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하나 이에 제한되지 않는다.
- [0082] 또한, 상기 피검체의 LCN2의 발현정도의 측정은 중합효소연쇄반응(PCR), 마이크로어레이(microarray), 노던 블롯팅(northern blotting), 웨스턴 블롯팅(western blotting), 효소면역분석법(ELISA), 면역침전법(immunoprecipitation), 면역화학염색법(immunohistochemistry), 또는 면역형광염색법(immunofluorescence)을 이용하여 측정하는 것을 특징으로 하나 이에 제한되지 않는다.
- [0083] 상기 동물모델은 인간을 제외한 포유동물을 이용하여 제조될 수 있으며, 상기 인간을 제외한 포유동물은 원숭이, 랫트, 생쥐, 토끼, 개, 영장류 등일 수 있으며, 바람직하게는 쥐과(Muridae) 동물일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.
- [0084] 상기 '염증형성'은 염증의 발병, 염증 활성화 또는 염증 과발현 등을 포괄하는 의미이며, 염증 유발되는 것이라면 어느 하나에 제한되지 않는다.
- [0085] 또한, 상기 염증은 뇌 내 국부염증, 알레르기, 자가면역질환, 전립선염, 사구체콩팥염, 대장염, 골반염, 및 류마티스 관절염으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 뇌 내 국부염증일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0086] 또한, 상기 염증이 발생하는 부위는 뇌, 전립선, 사구체콩팥염, 대장, 골반, 및 관절로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있고, 바람직하게는 뇌일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0087] 상기 뇌 염증은 예를 들어 수막염, 뇌막염, 뇌수막염, 뇌 농양, 뇌염 및 뇌 질환으로 인하여 수반되는 염증 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0089] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성 요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성 요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “약”, “실질적으로” 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본 발명의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 본원 명세서 전체에서 사용되는 정도의 용어 “~(하는) 단계” 또는 “~의 단계”는 “~를 위한 단계”를 의미하지 않는다.
- [0090] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 “이들의 조합(들)”의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.
- [0091] 본원 명세서 전체에서, “A 및/또는 B”의 기재는 “A 또는 B, 또는 A 및 B”를 의미한다.
- [0092] 어떤 실시예가 달리 구현 가능한 경우에 특정한 단계는 설명되는 순서와 다르게 수행될 수도 있다. 예를 들어, 연속하여 설명되는 두 단계는 실질적으로 동시에 수행될 수도 있고, 설명되는 순서와 반대의 순서로 수행될 수도 있다.

[0094] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0096] **[실시예]**

[0097] **실시예 1. 선택적 LCN2 과발현 형질전환 마우스 제작**

[0098] 선택적 LCN2 과발현 형질전환 마우스를 제작하기 위하여, 디자인된 LCN2 DNA 구조(construct)를 제작하였다. 도 2a에 나타난 바와 같이, Ai6 벡터(vector)에 선택적이고 안정적인 LCN2 유전자 과발현을 위하여, 강한 발현으로 널리 쓰이는 CAG(Cytomegalovirus early enhancer/chicken beta action) 프로모터를 사용하고, 그 하류에(down-stream)에 플록스(floxed)된 정지 코돈(STOP codon)을 삽입하였다. Cre-loxP 시스템을 이용하여 Cre 단백질의 존재 하에서 정지 코돈이 결실(deletion)되면, LCN2-2A-EGFP가 발현되고, 이후에 LCN2와 마커 단백질(maker protein)인 EGFP는 분리가 되어 단일 단백질로 기능하게 된다.

[0099] 도 2b에 나타난 바와 같이, 제작된 DNA 구조를 Avr II와 Sac I 제한효소를 이용하여 자른 후에, 겔 전기천공법(gel electroporation)을 이용하여 잘려진 크기를 확인하였다. 준비된 DNA 구조를 마우스의 융성전핵에 미세주입(microinjection) 하고 대리모에 이식하였다. 태어난 마우스가 3주령이 되었을 때 꼬리에서 게놈 DNA(genomic DNA)를 추출하여 도 2c에 나타난 바와 같이, 삽입(insertion)된 유전자를 확인할 수 있는 프라이머(primer) 조합을 통한 유전자형-PCR(genotype-PCR) 기술을 이용하여 올바르게 만들어진 키메라 마우스를 스크리닝(screening) 하였다. 확인된 마우스 계통(line)를 유지하며 생식-계열 전이(germ-line transfer)가 확인되는 계통(line)들만 선별한 뒤, 디자인된 선택적 LCN2 과발현이 나타나는지에 대한 검증을 실시하였다.

[0101] **실시예 2. 선택적 LCN2 과발현 형질전환 마우스 검증**

[0102] 키메라 마우스 계통이 디자인과 같이 발현을 보이는 지에 대한 검증을 위하여, 해당 계통에서 P1 새끼(pups)들을 이용하여 주요 성상세포 배양(primary astrocyte culture)를 수행하였다. 상기 배양(culture)한 성상세포를 AAV-Cre-mCh를 감염(infection)시켜 Cre 단백질을 통한 LCN2와 EGFP의 과발현을 유도시킨 후, 세포 배양 배지(cell culture media)에서의 LCN2의 양을 ELISA 기술을 이용하여 측정하였다. 도 3a에 나타난 바와 같이, 키메라 새끼에서 배양(culture)한 성상세포에서 월등히 높은 LCN2를 검출하였다.

[0103] 다음으로 성체 키메라 마우스에 AAV-GFAP-mCh-Cre(성상아교세포에서만 특이적으로 Cre 단백질을 발현 시킬 수 있는 virus vector)를 뇌 정위 수술(brain stereotaxic surgery)를 통하여 일방 내측 하베눌라(unilateral medial habenula)에 국부 주입을 하였다. 그 결과, 도 3b에 나타난 바와 같이, 수술 4주후에 마우스를 희생시킨 후, 면역조직화학(immunohistochemistry)기술을 통해 확인한 결과, 바이러스가 들어간 부위에서만 특이적으로 LCN2와 EGFP 발현을 관찰할 수 있었다.

[0104] 위의 두 실험을 통하여 본 발명에서 디자인한 LCN2 선택적 형질전환 마우스에서, 의도한대로 Cre에 의존적인 LCN2 과발현이 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0106] **실시예 3. 선택적 LCN2 과발현 형질전환 마우스의 국부 뇌 염증 유도 확인**

[0107] 제작이 완성된 선택적 LCN2 과발현 형질전환 마우스에서 LCN2 과발현이 국부적 뇌 염증을 유도할 수 있는지 확인하기 위하여, AAV-GFAP-Cre-EGFP를 뇌 정위 수술(brain stereotaxic surgery)를 통하여 일측 해마 CA1(unilateral hippocampal CA1) 부위에 국부적으로 주입하였다. 수술 4주후에 마우스를 희생한 뒤, 면역조직화학(immunohistochemistry) 기술을 통해 확인한 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 바이러스가 들어간 부위와 더불어 반대측(contralateral) 부위에서까지 특이적인 성상아교세포(GFAP 염색된)와 미세아교세포(Iba1 염색된)의 형태의 변화를 관찰할 수 있었다.

[0108] 이 실험결과는 이미 알려진 염증 상황에서의 뇌 내 성상아교세포와 미세아교세포의 형태변화와 유사한 결과로서, 본 발명에서 제작한 형질전환 마우스에서 Cre 단백질 발현 의존적인 뇌 내 국부 염증 반응을 유도할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[0110] **실시예 4. 성상교세포 선택적 LCN2 과발현 형질전환 마우스의 제작 및 확인**

[0111] 제작된 LCN2 선택적 과발현 형질전환 마우스와 성상교세포 특이적 Cre 생산 마우스 (Aldh111-Cre/ERT2)를 교배하여 Tamoxifen 처리로 인하여 전환되는 성상교세포 선택적 LCN2 과발현 형질전환 마우스(Astrocyte-specific LCN2 Overexpression, ALO)를 제작하였다. 구체적으로 교배된 하이브리드 생쥐에 corn-oil 에 녹인 20mg/ml 의 Tamoxifen 용액을 매일 5일동안 100ul 씩 복강주사하였다. 처리 4주 후에 sacrifice 하여 뇌를 적출 후 LCN2 발현과 뇌실의 형태 변화를 관찰하였다.

[0112] 도 6에 나타난 바와 같이, ALO 생쥐의 혈액에서 LCN2 과발현이 나타남을 확인하였다.

[0113] 또한, 도 7에 나타난 바와 같이 ALO 생쥐의 뇌 내에서 LCN2 및 EGFP가 과발현됨을 확인하였다.

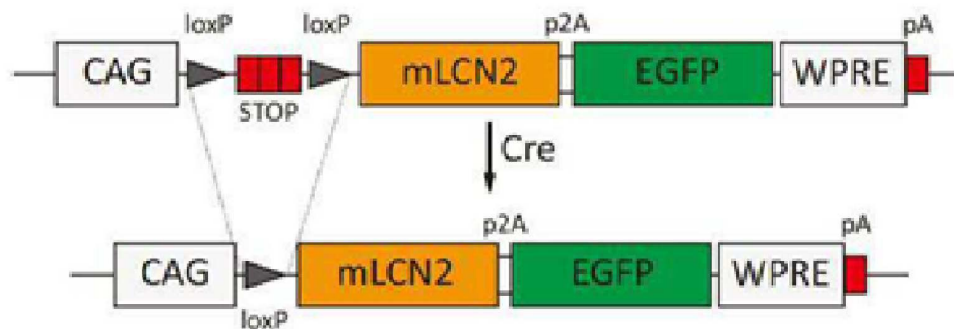
[0114] 또한, 도 8에 나타난 바와 같이, ALO 생쥐의 뇌실 확대증상, 뇌수종 증상 등이 나타남을 확인하였다.

[0115] 이 실험결과는 이미 알려진 염증 상황에서의 뇌 내 형태변화와 유사한 결과로서, 본 발명에서 제작한 형질전환 마우스를 성상교세포 특이적 Cre 단백질 발현 마우스와 교배한 경우에도, Cre 단백질 발현 의존적인 뇌 내 국부 염증 반응을 유도할 수 있다는 것을 확인할 수 있었다.

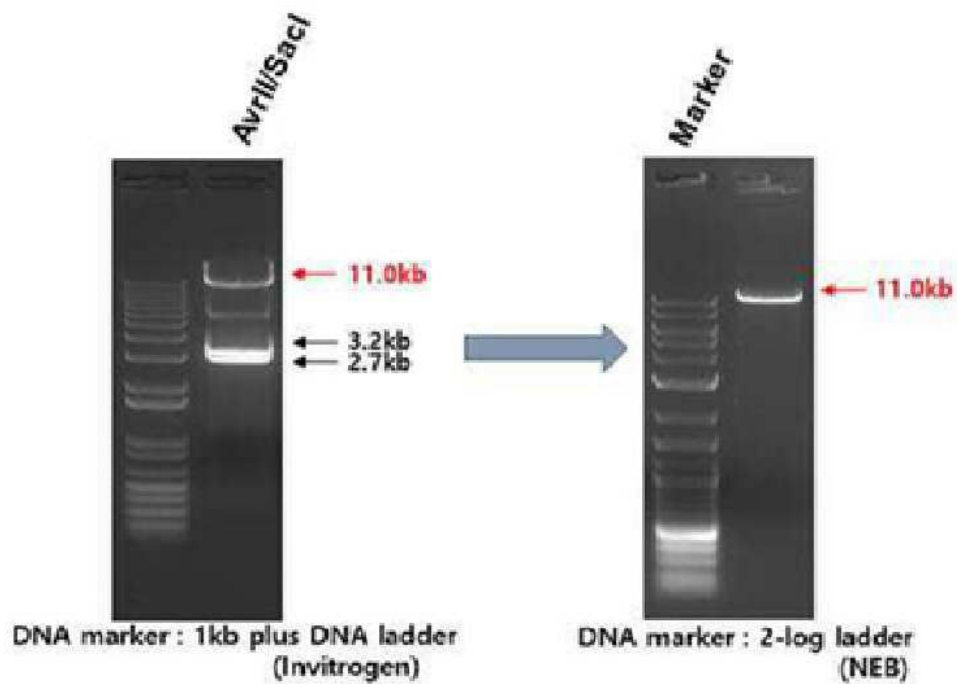
[0117] 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 아닌 것으로 이해해야 한다.

도면

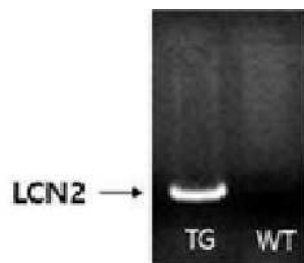
도면1a



도면2b



도면2c



* Primer information

- LCN2_F1 : 5'- gagctacaatgtgcaagtggc -3'
- LCN2_EGFP_R1 : 5'- GAACTTGTGGCCGTTTACGTC -3'

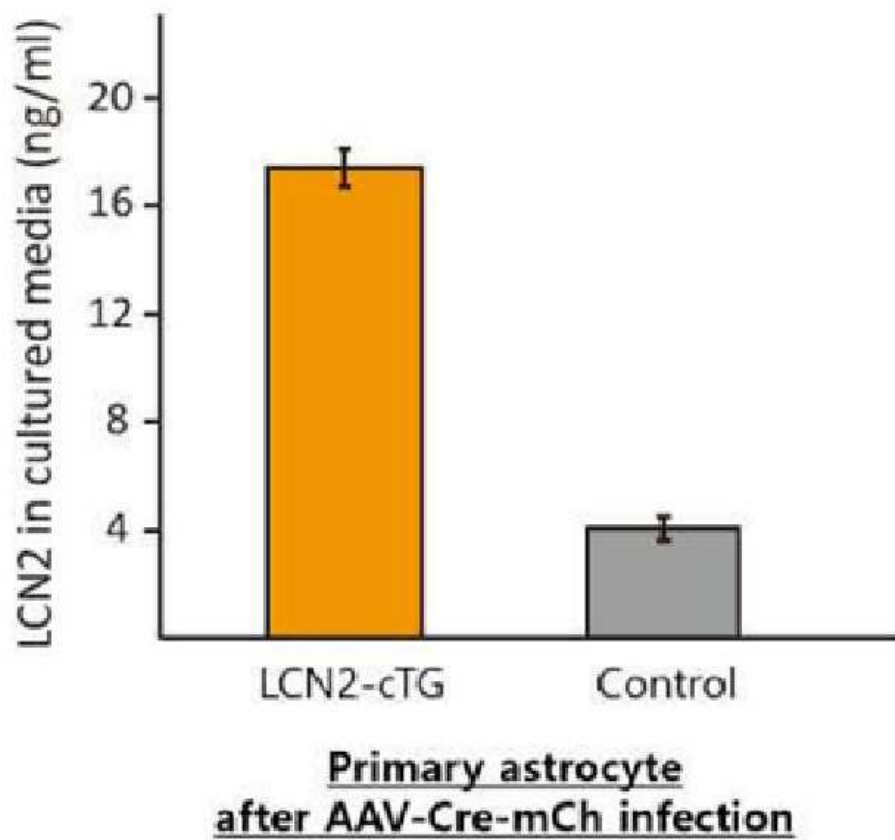
* PCR product size

- LCN2_F1 + LCN2_EGFP_R1 : ~364bp

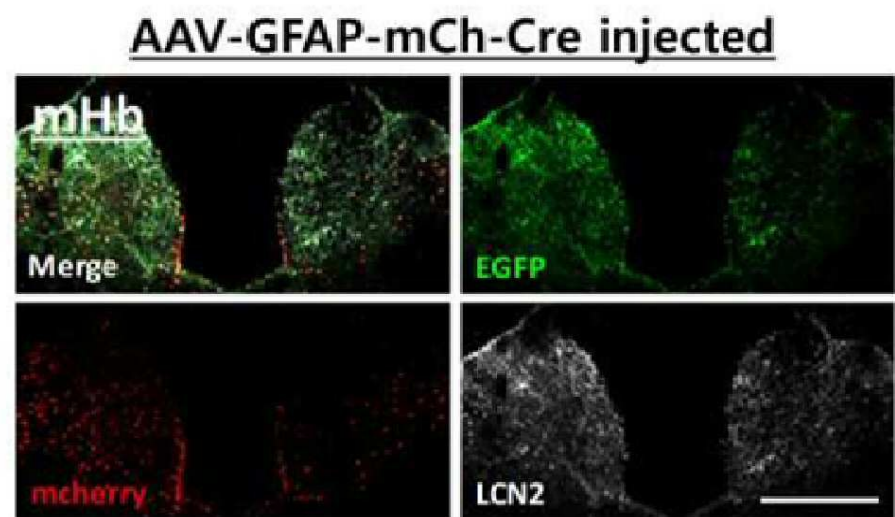
* PCR condition :

94°C 5min → 94°C 1min
 62°C 1min X 35cycles → 72°C 10min → 4°C ∞
 72°C 1min

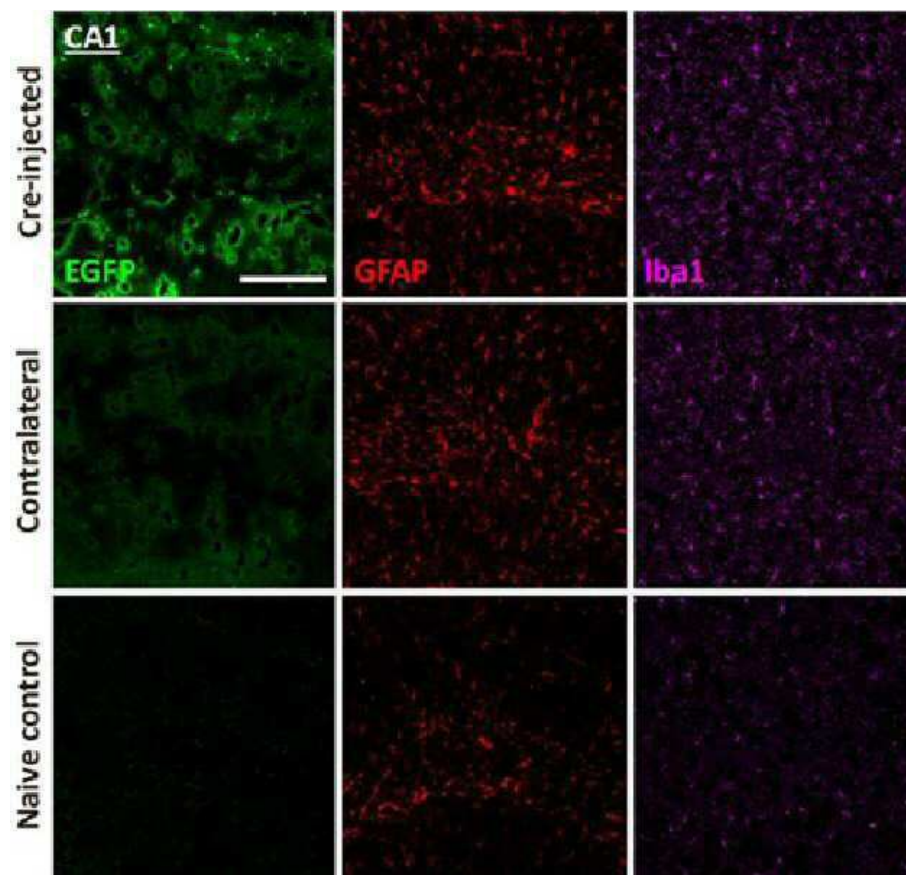
도면3a



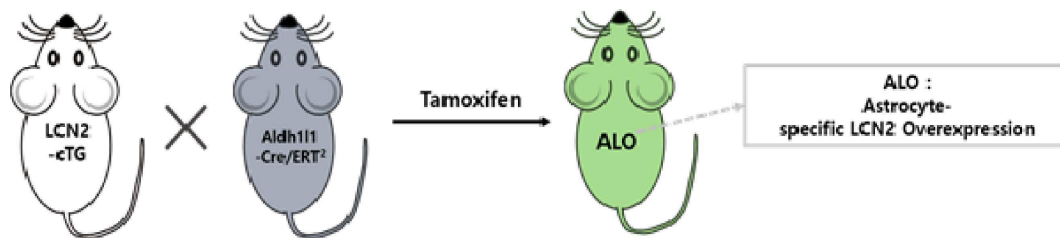
도면3b



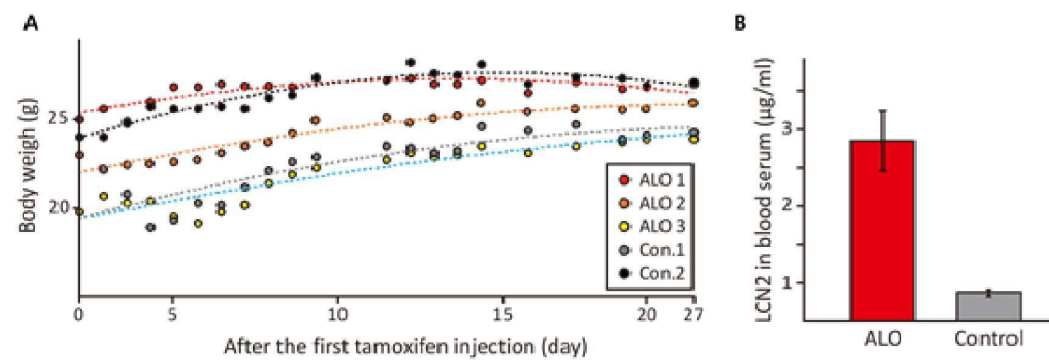
도면4



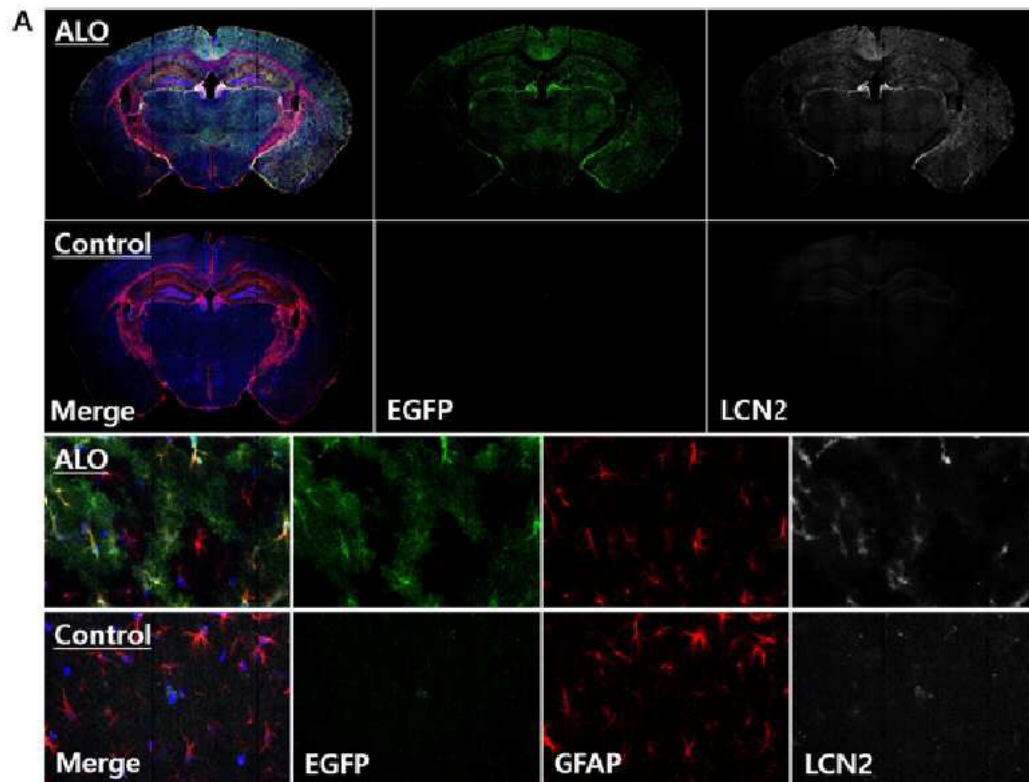
도면5



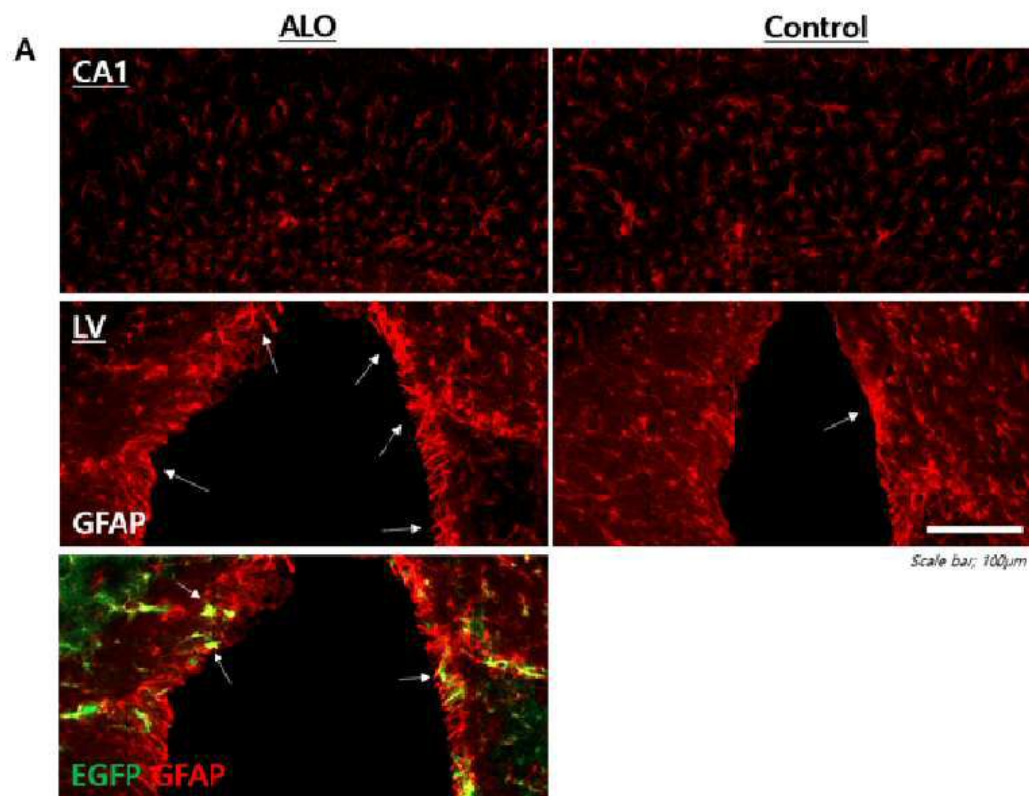
도면6



도면7



도면8



서열 목록

<110> Korea University Industry and Academy Cooperation Foundation
KOREA INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

<120> Inflammation-forming transgenic animal model through selective
over-expression of lipocalin-2 and a method for producing the
same

<130> MP19-248

<150> KR 10-2018-0132582

<151> 2018-10-31

<160> 7

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 600

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mLCN2

<400> 1

atggccctga gtgtcatgtg tctgggcctt gccctgcttg gggtcctgca gagccaggcc 60

caggactcaa ctcagaactt gatccctgcc ccatctctgc tcactgtccc cctgcagcca 120

gacttcgga gcgatcagtt ccggggcagg tggtagcttg tgggcctggc aggcaatgcg 180

gtccagaaaa aaacagaagg cagctttacg atgtacagca ccatctatga gctacaagag 240

aacaatagct acaatgtcac ctccatcctg gtcagggacc aggaccaggg ctgtcgctac 300

tggatcagaa catttgttcc aagctccagg gctggccagt tcactctggg aaatatgcac 360

aggtatcctc aggtacagag ctacaatgtg caagtggcca ccacggacta caaccagttc 420

gccatggtat ttttcgaaa gacttctgaa aacaagcaat acttcaaaat taccctgtat 480

ggaagaacca aggagctgtc ccctgaactg aaggaacgtt tcacccgctt tgccaagtct 540

ctgggcctca aggacgacaa catcatcttc tctgtcccca ccgaccaatg cattgacaac 600

600

<210> 2

<211> 583

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAG

<400> 2

cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc ccgcccatt 60
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 120
atgggtggag tatttacggt aaactgcca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 180

aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gccitggcatt atgcccagta 240
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 300
catggtcgag gtgagcccca cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc 360
cccaattttg tatttattta ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cggggggggg 420
ggggggggcg gcgccaggcg gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag 480
aggtgcggcg gcagccaatc agagcggcg gctccgaaag tttcctttta tggcgaggcg 540
gcggcggcgg cggccctata aaaagcgaag cgcgcggcgg gcg 583

<210> 3
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> LoxP

<400> 3
ataacttcgt ataattgatg ctatacgaag ttat 34

<210> 4
<211> 57
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> p2A

<400> 4
gctactaact tcagcctgct gaagcaggct ggagacgtgg aggagaacct tggacct 57

<210> 5
<211> 720
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFP

<400> 5
atggtgagca agggcgagga gctgttcacc ggggtggtgc ccatcctggt cgagctggac 60

ggcgacgtaa acggccacaa gttcagcgtg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120

ggcaagctga ccctgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccgtgcc ctggcccacc 180
ctcgtgacca ccctgaccta cggcgtgcag tgcttcagcc gctaccccga ccacatgaag 240
cagcacgact tcttcaagtc cgccatgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300
ttcaaggacg acggcaacta caagacccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360
gtgaaccgca tcgagctgag gggcatcgac ttcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420
aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tggccgacaa gcagaagaac 480

ggcatcaagg tgaacttcaa gatccgccac aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540
gaccactacc agcagaacac ccccatcggc gacggccccg tgctgctgcc cgacaaccac 600
tacctgagca cccagtcgcg cctgagcaaa gaccccaacg agaagcgcgga tcacatggtc 660
ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcgga tggacgagct gtacaagtga 720
720

<210> 6
<211> 600
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> WPRE

<400> 6

atggccctga gtgtcatgtg tctgggcctt gccctgcttg gggctctgca gagccaggcc 60

caggactcaa ctcagaactt gatccctgcc ccactctctg tcaactgtccc cctgcagcca 120
gacttccgga gcgacagtt ccggggcagg tggtagttg tgggcctggc aggcaatgcg 180
gtccagaaaa aaacagaagg cagctttacg atgtacagca ccacttatga gctacaagag 240
aacaatagct acaatgtcac ctccatctg gtcagggacc aggaccaggg ctgtcgctac 300
tggatcagaa catttgttcc aagctccagg gctggccagt tcaactctggg aaatatgcac 360
aggtatcctc aggtacagag ctacaatgtg caagtggcca ccacggacta caaccagttc 420
gccatggtat ttttccgaaa gacttctgaa aacaagcaat acttcaaat taccctgtat 480

ggaagaacca aggagctgtc ccctgaactg aaggaaagtt tcacccgctt tgccaagtct 540
ctgggcctca aggacgacaa catcatcttc tctgtcccca ccgaccaatg cattgacaac 600
600

<210> 7
<211> 135
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> pA

<400> 7

aacttgttta ttgcagctta taatgggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca 60

aaataaagcat ttttttcact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct 120

tatcatgtct ggatc 135