



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0001021
(43) 공개일자 2017년01월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01K 67/027 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01K 67/0275 (2013.01)

A01K 2217/075 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0090349

(22) 출원일자 2015년06월25일

심사청구일자 2015년06월25일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

정효균

대전시 중구 수침로 122(태평동, 푸른빛 아파트)

101-602

송민호

대전시 중구 계백로 1716번길 87(문화동 센트럴파크) 306-1202

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

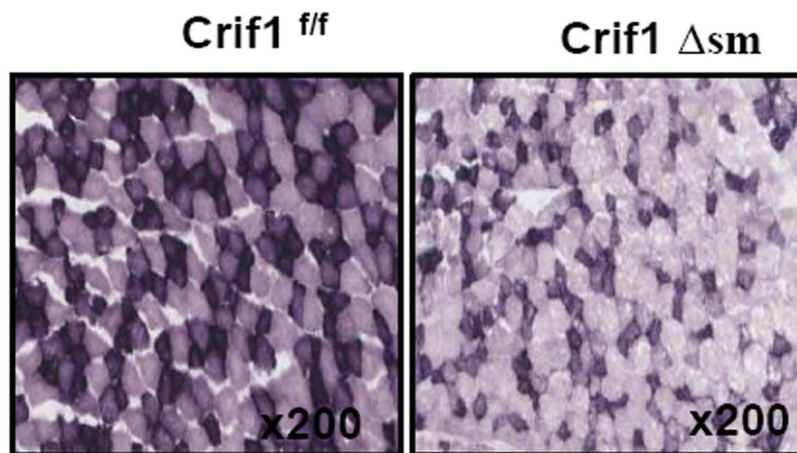
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 근감소증 (Sarcopenia) 동물 모델과 그 제조 방법 및 이를 이용한 근감소증 치료제의 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명의 근감소증 동물 모델은 출생시에는 성비 및 외형에 이상이 없으면서 성장에 따라 근세포의 양, 운동량 및 운동력이 감소하여 근감소증 고유의 증상을 나타내므로 근감소증 진행 경과, 병리학적 기전 연구의 동물 모델 및 근감소증 예방 및 치료제의 스크리닝에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A01K 2267/0306 (2013.01)

(72) 발명자

김군순

대전시 서구 관저로 83(관저동, 신선마을 아파트)
2011-1404

권기량

대전시 유성구 엑스포로 448(전민동,
엑스포아파트) 503동 1001호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A2058889

부처명 교육부(한국연구재단)

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업(기본연구)

연구과제명 당뇨병 전환/진행에서 미토콘드리아 기능조절분석

기 여 율 30/100

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014M3A9D8034464

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 원천기술개발사업-바이오의료기술개발사업(노화제어원천기술)

연구과제명 세포소기관 기능회복을 통한 대사항상성 복원 기술 개발

기 여 율 40/100

주관기관 한국과학기술원

연구기간 2015.06.26 ~ 2016.06.25이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014R1A6A1029617

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중점연구소지원사업

연구과제명 혈관염증제어 및 유효성평가기술개발

기 여 율 30/100

주관기관 충남대학교

연구기간 2014.09.01 ~ 2017.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

근육세포 특이적으로 CRIF1(CR6-interacting factor 1) 유전자가 결손(Knock-out)된 근감소증(sarcopenia) 동물 모델.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 동물 모델은 동형접합체(homozygote)인 것을 특징으로 하는 근감소증 동물 모델.

청구항 3

CRIF1의 2번 엑손 양 옆에 Loxp site를 삽입한 CRIF1 loxp/loxp 마우스와 골격근육 타입2 세포에서 특이적으로 Cre-recombinase를 발현하는 MLC-cre 마우스를 교배하여, CRIF1 loxp/+ 및 MLC-cre m/+의 유전자형을 갖는 1세대의 CRIF1 이형접합 녹아웃(heterozygous knock out) 마우스를 얻는 단계 ;

상기 이형접합 결손 마우스와 CRIF loxp/loxp 마우스를 교배하여 2세대 마우스를 얻는 단계; 및

상기 2세대 마우스로부터 CRIF1 loxp/loxp 및 MLC-cre M/+의 유전자형을 가지는 CRIF1 동형접합 녹아웃(homozygous knock out) 마우스를 선별하는 단계를 포함하는 근감소증 동물 모델의 제조 방법.

청구항 4

제 1항 또는 제 2항의 근감소증 동물 모델에 시료를 투여하는 단계;

시료 투여 후 상기 동물 모델의 근육 감소율 또는 증가율과 생존율 중 하나 이상을 측정하는 단계; 및

상기 시료를 투여하지 않은 대조군과 비교하여 근육 감소율 또는 증가율과 생존율 중 하나 이상을 향상시키는 시료를 선별하는 단계를 포함하는 근감소증 예방 및 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 5

제 1항 또는 제 2항의 근감소증 동물 모델에 시료를 투여하는 단계;

시료 투여 후 상기 동물 모델의 운동성을 측정하는 단계; 및

상기 시료를 투여하지 않은 대조군과 비교하여 운동성을 향상시키는 시료를 선별하는 단계를 포함하는 근감소증 예방 및 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서 상기 시료는 대조군의 운동성에는 유의적인 영향을 미치지 않는 것을 특징으로 하는 근감소증 예방 및 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 근감소증 동물 모델과 그 제조방법 및 이를 이용한 근감소증 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 근감소증(sarcopenia)은 나이가 들면서 근육량과 근력 감소가 함께 나타나는 대표적인 퇴행성 근육 및 신경질환이다. 근감소증의 임상 증상은 여성보다는 남성에게서 더욱 호발하고, 50세 이상부터 나타나기 시작하여 80세 이상에서는 2명 중 1명이 근감소증이 있으며, 근육량, 운동력 및 근력이 현저히 감소되어 결국 독립생활을 못하게 하는 증상을 보인다. 노인에게서 관찰되는 근감소증 외에도 다양한 질환들에 이차적으로 나타나는 근감소증이 이환된 질환의 호전을 어렵게 만드는 중요한 인자로 알려져 있다.

[0003] 즉, 근감소증은 골격근량과 골격근 기능의 감소를 모두 만족시킬 때 표현되는 질병군으로써, 노화에 의한 일차성 근감소증(Primary sarcopenia)과 다양한 원인들에 의한 이차성 근감소증(Secondary sarcopenia)이 있다. 이차성 원인들로는 영양결핍, 활동 저하, 장기 부전, 약물, 염증 혹은 악성 질환 및 내분비대사질환과 관련된 것들이 있다.

[0004] 현대 한국 사회는 남자 및 여자 모두 평균 수명의 증가로 노인인구가 급격히 증가하고 있고, 핵가족화 및 출산을 저하로 인하여 노인의 독립생활 비중이 매우 높아지고 있는 현실이다. 따라서 미래에는 폭발적인 노인인구의 증가 및 노화에 따르는 근감소증과 이로 인한 독립생활 저하로 인하여 심각한 의료 및 사회 비용이 유도될 것으로 예상된다. 하지만, 현재까지 근감소증의 복잡한 병인으로 인하여 공통의 치료 타겟이 없고, 마땅한 약물도 없는 실정인바 적극적인 영양 보충과 운동요법만이 유일한 치료법이다. 그러므로, 공통 병인 기반에 의거한 치료 타겟의 발굴을 위해서 근감소증 동물 모델의 개발과 이를 활용한 약물 스크리닝이 절실하다.

[0005] 따라서 인체 근감소증 모방형 동물 모델로서, 1) 원하는 시기와 연령에 맞추어 근감소증 발생이 예측 가능하고, 2) 여러 원인들의 복합적인 작용에 의한 근감소증의 발생을 정확히 이해할 수 있으며, 3) 인체 근감소증의 진행 경과와 병리학적 기전이 일치하여 근감소증의 치료제 개발 및 질병 치료에 응용할 수 있는 동물 모델이 절실히 요구되고 있다.

[0006]

[0007] CRIF1(CR6-interacting factor 1)은 미토콘드리아(mitochondria) 단백질의 하나이며, Gadd45(growth arrest and DNA damage inducible)와 결합한다. CRIF1의 결손은 미토콘드리아 내막에 존재하는 호흡복합체의 안정성을 감소시키며, 이는 결국 미토콘드리아 호흡률 저하, 반응성 활성산소종의 증가 및 미토콘드리아 내막의 구조적 변화를 발생하게 한다.

[0008] Cre-loxp는 조건부로 유전자를 파괴할 수 있는 시스템으로, 박테리오파지(bacteriophage) P1에서 유래한 Cre 재조합효소(Cre recombinase)가 loxp 부위를 인식하면 loxp 서열로 둘러싸인(fank) 목표 유전자 조각이 제거되고 유전자 파괴 현상이 나타난다. 이때 Cre 재조합효소는 Cre 이식유전자의 앞쪽에 위치한 조직 및 세포 특이적 프로모터에 의하여 활성화의 장소가 결정되고 그 결과 목표 유전자가 정해진 조직이나 세포에서 비활성화된다. Loxp 서열은 처음과 끝의 13개 염기가 역반복서열의 관계에 있으며, 중앙 부분의 서열은 loxp 배열의 종류에 따라 다양하다.

[0009] 본 발명자들은 임상적인 미충족 수요를 해결하기 위해서 근육 특이적으로 미토콘드리아 호흡사슬을 억제하여 근감소증 동물모델을 개발하고자 연구하였고, 골격 근육세포 특이적으로 CRIF1 유전자를 녹아웃(Knock-out)시킨 동물 모델이 대조군과 비교하여 성장하는 동안 근세포의 양, 운동량 및 운동력이 감소하는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명의 목적은 근감소증 동물 모델과 그 제조방법 및 이를 이용한 근감소증 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 근육세포 특이적으로 CRIF1(CR6 interacting factor 1) 유전자가 녹아웃된 근감소증(sarcopenia) 동물 모델을 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명은 CRIF1의 2번 엑손 양 옆에 Loxp site를 삽입한 CRIF1 loxp/loxp 마우스와 골격근육 타입2 세포에서 특이적으로 Cre-recombinase를 발현하는 MLC(Myosin light chain)-cre 마우스를 교배하여, CRIF1 loxp/+ 및 MLC-cre m/+의 유전자형을 갖는 1세대의 CRIF1 이형접합 녹아웃(heterozygous knock out) 마우스를 얻는 단계 ;
- [0013] 상기 이형접합 녹아웃 마우스와 CRIF1 loxp/loxp 마우스를 교배하여 2세대 마우스를 얻는 단계; 및
- [0014] 상기 2세대 마우스로부터 CRIF1 loxp/loxp 및 MLC-cre M/+의 유전자형을 가지는 CRIF1 동형접합 녹아웃(homozygous knock out) 마우스를 선별하는 단계를 포함하는 근감소증 동물 모델의 제조 방법을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 본 발명의 인간 근감소증 동물 모델에 시료를 투여하는 단계;
- [0016] 시료 투여 후 상기 동물 모델의 근육 감소율 또는 증가율과 생존율 중 하나 이상을 측정하는 단계; 및
- [0017] 상기 시료를 투여하지 않은 대조군과 비교하여 근육 감소율 또는 증가율과 생존율 중 하나 이상을 향상시키는 시료를 선별하는 단계를 포함하는 근감소증 예방 및 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 본 발명의 인간 근감소증 동물 모델에 시료를 투여하는 단계;
- [0019] 시료 투여 후 상기 동물 모델의 운동성을 측정하는 단계; 및
- [0020] 상기 시료를 투여하지 않은 대조군과 비교하여 운동성을 향상시키는 시료를 선별하는 단계를 포함하는 근감소증 예방 및 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0021] 본 발명의 근감소증 동물 모델은 출생시에는 성비 및 외형에 이상이 없으면서 성장에 따라 근세포의 양, 운동량 및 운동력이 감소하여 근감소증 고유의 증상을 나타내므로 근감소증 진행 경과, 병리학적 기전 연구의 동물 모델 및 근감소증 예방 및 치료제의 스크리닝에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1a는 동물 모델 제조에 사용한 벡터의 구조 및 근육세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스의 유전자형을 확인한 도이다:

CRIF^{f/f}: CRIF1의 2번 엑손 양 옆에 Loxp site를 삽입한 CRIF1 loxp/loxp 마우스;

CRIF1^{f/+ MLC1f}: CRIF loxp/+, MLC m/+ 이형접합 녹아웃(heterozygous knock out) 마우스; 및

CRIF1 Δsm: CRIF loxp/loxp, MLC m/+ 동형접합 녹아웃(homozygous knock out) 마우스.

도 1b는 근육세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스의 성장에 따른 체중 증가량을 확인한 도이다:

CRIF^{f/f}: CRIF1의 2번 엑손 양 옆에 Loxp site를 삽입한 CRIF1 loxp/loxp 마우스;

CRIF1^{f/+ MLC1f}: CRIF loxp/+, MLC m/+ 이형접합 녹아웃(heterozygous knock out) 마우스; 및

CRIF1 Δ sm: CRIF loxp/loxp, MLC m/+ 동형접합 녹아웃(homozygous knock out) 마우스.

도 1c는 근육세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스의 나이에 따른 생존율을 확인한 도이다:

CRIF^{f/f}: CRIF1의 2번 엑손 양 옆에 Loxp site를 삽입한 CRIF1 loxp/loxp 마우스;

CRIF1^{f/+ MLC1f}: CRIF loxp/+, MLC m/+ 이형접합 녹아웃(heterozygous knock out) 마우스; 및

CRIF1 Δ sm: CRIF loxp/loxp, MLC m/+ 동형접합 녹아웃(homozygous knock out) 마우스.

도 1d는 대조군 마우스 및 근육세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스의 13주령시의 표현형을 나타낸 도이다:

CRIF^{f/f}: CRIF1의 2번 엑손 양 옆에 Loxp site를 삽입한 CRIF1 loxp/loxp 마우스; 및

CRIF1 Δ sm: CRIF loxp/loxp, MLC m/+ 동형접합 녹아웃(homozygous knock out) 마우스.

도 2a는 13주령의 근육세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스에서 근육량을 확인한 결과를 나타낸 도이다:

CRIF^{f/f}: CRIF1의 2번 엑손 양 옆에 Loxp site를 삽입한 CRIF1 loxp/loxp 마우스;

CRIF1 Δ sm: CRIF loxp/loxp, MLC m/+ 동형접합 녹아웃(homozygous knock out) 마우스;

Gas: 비복근(Gastrocnemius); 및

TA/EDL: 전경골근(Tibialis anterior)/긴발가락편근(Extensor digitorum longus).

도 2b는 8주령의 근육세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스에서 장기 및 근육의 무게를 나타낸 도이다:

CRIF^{f/f}: CRIF1의 2번 엑손 양 옆에 Loxp site를 삽입한 CRIF1 loxp/loxp 마우스;

CRIF1 Δ sm: CRIF loxp/loxp, MLC m/+ 동형접합 녹아웃(homozygous knock out) 마우스;

iWAT: 피하지방조직(Inguinal white adipose tissue);

eWAT: 부고환 백색 지방 조직(epididymal white adipose tissue);

EDL: 긴발가락편근(Extensor digitorum longus); 및

Gas: 비복근(Gastrocnemius).

도 2b는 8주령의 근육세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스에서 근세포의 감소 표현형 및 근육다발 면적을 나타낸 도이다:

CRIF^{f/f}: CRIF1의 2번 엑손 양 옆에 Loxp site를 삽입한 CRIF1 loxp/loxp 마우스; 및

CRIF1 Δ sm: CRIF loxp/loxp, MLC m/+ 동형접합 녹아웃(homozygous knock out) 마우스.

도 3은 8주령의 근육세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스의 근육에서 숙신산 탈수소효소(succinate dehydrogenase)의 염색 결과를 나타낸 도이다:

CRIF^{f/f}: CRIF1의 2번 엑손 양 옆에 Loxp site를 삽입한 CRIF1 loxp/loxp 마우스; 및

CRIF1 Δ sm: CRIF loxp/loxp, MLC m/+ 동형접합 녹아웃(homozygous knock out) 마우스.

도 4는 13주령의 근육세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스의 악력 테스트(grip strength), 평균지연시간(mean latency) 및 운동력을 측정한 결과를 나타낸 도이다:

CRIF^{f/f}: CRIF1의 2번 엑손 양 옆에 Loxp site를 삽입한 CRIF1 loxp/loxp 마우스; 및

CRIF1 Δ sm: CRIF loxp/loxp, MLC m/+ 동형접합 녹아웃(homozygous knock out) 마우스.

도 5a는 근육세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스의 긴발가락편근에서 미토콘드리아를 전자현미경으로 확인한 결과를 나타낸 도이다:

CRIF^{f/f}: CRIF1의 2번 엑손 양 옆에 Loxp site를 삽입한 CRIF1 loxp/loxp 마우스; 및

CRIF1 Δsm: CRIF loxp/loxp, MLC m/+ 동형접합 녹아웃(homozygous knock out) 마우스.

도 5b는 근육세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스에서 미토콘드리아 호흡사슬 복합체에 관여하는 대표 단백질의 발현량을 확인한 도이다:

CRIF^{f/f}: CRIF1의 2번 엑손 양 옆에 Loxp site를 삽입한 CRIF1 loxp/loxp 마우스;

CRIF1 Δsm: CRIF loxp/loxp, MLC m/+ 동형접합 녹아웃(homozygous knock out) 마우스;

NDUFA9: NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 9;

SDHA: succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein variant;

UQCRC2: ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 2;

COX I: cyclooxygenase I; 및

Tom40: translocase of the outer membrane 40.

도 4c는 근육세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스에서 미토콘드리아 호흡사슬 복합체의 어셈블리 이상을 확인한 도이다:

CRIF^{f/f}: CRIF1의 2번 엑손 양 옆에 Loxp site를 삽입한 CRIF1 loxp/loxp 마우스;

CRIF1 Δsm: CRIF loxp/loxp, MLC m/+ 동형접합 녹아웃(homozygous knock out) 마우스; 및

I, II, III, IV 및 V: 미토콘드리아 호흡사슬 복합체.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 근육세포 특이적으로 CRIF1(CR6-interacting factor 1) 유전자가 녹아웃(Knock-out)된 근감소증(sarcopenia) 동물 모델을 제공한다.

상기 근감소증은 노화에 따른 근육량 및 근력 감소를 의미하나, 이에 한정하지 아니한다.

상기 근감소증 동물 모델은 동형접합체(homozygote)인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 아니한다.

또한, 본 발명은 상기 근감소증 동물 모델의 제조방법을 제공한다.

상기 제조방법은 하기의 단계를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 아니한다:

1) CRIF1 유전자의 2번 엑손 양 옆에 Loxp site를 삽입한 CRIF1 loxp/loxp 마우스 및 골격 근육 타입2 세포에서 특이적으로 Cre-recombinase를 발현하는 MLC-cre 마우스를 교배하여, CRIF1 loxp/+ 및 MLC-cre m/+의 유전자형을 갖는 1세대의 CRIF1 이형접합 녹아웃(heterozygous knock out) 마우스를 얻는 단계;

2) 상기 이형접합 녹아웃 마우스 및 CRIF loxp/loxp 마우스를 교배하여 2세대 마우스를 얻는 단계; 및

3) 상기 2세대 마우스에서 CRIF1 loxp/loxp 및 MLC-cre M/+의 유전자형을 가지는 CRIF1 동형접합 녹아웃(homozygous knock out) 마우스를 선별하는 단계.

상기 CRIF1 유전자는 서열번호 1의 핵산 서열로 기재되는 것이 바람직하나 이에 한정하지 아니한다.

상기 단계 3)의 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스는 CRIF1 유전자의 결손이 상동 염색체 1쌍에서 모두 일어난 것으로서, CRIF1 -/-의 유전형질을 가지며, 출생시 성비 및 외형에는 이상이 없지만, 성장함에 따라 근감소증 증상을 나타내는 특징이 있다.

- [0034] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 CRIF1 loxp/loxp 마우스 및 MLC-cre 마우스를 교배하여, CRIF1 loxp/+ 및 MLC-cre m/+의 유전자형을 갖는 1세대의 CRIF1 이형접합 녹아웃(heterozygous knock out) 마우스를 얻었으며, 이형접합 녹아웃 마우스와 CRIF1 loxp/loxp 마우스를 교배하여 2세대 마우스를 얻고, 상기 2세대 마우스에서 CRIF1 loxp/loxp 및 MLC-cre M/+의 유전자형을 가지는 CRIF1 동형접합 녹아웃(homozygous knock out) 마우스를 근감소증 동물 모델로 선별하였다. 선별한 상기 근감소증 동물 모델은 출생시에는 성비 및 외형에 이상이 없으면서 성장에 따라 대조군과 비교하여 체중 증가량이 감소하고(도 1b 참조), 근세포의 양, 운동량 및 운동력이 감소하여(도 2 및 도 4 참조) 근감소증 고유의 증상을 나타내므로, 근감소증 진행 경과 및 병리학적인 연구의 동물 모델로 유용하게 이용될 수 있다.
- [0035] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 근감소증 동물 모델을 이용한 근감소증 예방 및 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0036] 1) 근감소증 동물 모델에 시료를 투여하는 단계;
- [0037] 2) 시료 투여 후 상기 동물 모델의 근육 감소율 또는 증가율과 생존율 중 하나 이상을 측정하는 단계; 및
- [0038] 3) 시료를 투여하지 않은 대조군과 비교하여 근육 감소율 또는 증가율과 생존율 중 하나 이상을 향상시키는 시료를 선별하는 단계.
- [0039] 상기 단계 1)의 근감소증 동물 모델은 근육세포 특이적으로 CRIF1 유전자가 결손된 CRIF1 동형접합 녹아웃(homozygous knock out) 마우스를 의미한다.
- [0040] 상기 단계 1)에서 시료의 투여 방법은 경구투여, 정맥주사, 피하투여 및 복강내 투여 등 종래 시료의 투여 방법 중 적절한 방법을 선택할 수 있으며, 시료의 투여량은 투여 방법이나 사전 실험 결과 등에 따라 적절히 선택할 수 있다.
- [0041] 또한, 본 발명은 하기의 단계를 포함하는 근감소증 동물 모델을 이용한 근감소증 예방 및 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0042] 1) 근감소증 동물 모델에 시료를 투여하는 단계;
- [0043] 2) 시료 투여 후 상기 동물 모델의 운동성을 측정하는 단계; 및
- [0044] 3) 시료를 투여하지 않은 대조군과 비교하여 운동성을 향상시키는 시료를 선별하는 단계.
- [0045] 상기 단계 1)의 근감소증 동물 모델은 근육세포 특이적으로 CRIF1 유전자가 결손된 CRIF1 동형접합 녹아웃(homozygous knock out) 마우스를 의미한다.
- [0046] 상기 단계 1)의 시료는 대조군의 운동성에는 유의적인 영향을 미치지 않는 것을 특징으로 하나, 이에 한정하지 아니한다.
- [0047] 본 발명의 근감소증 동물 모델은 성장함에 따라 근세포의 양, 운동량 및 운동력이 감소하여 근감소증 고유의 증상을 나타내는 것을 확인하였으므로, 근감소증 예방 및 치료제의 스크리닝에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0048] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의하여 상세히 설명한다.
- [0049] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해서 한정되는 것은 아니다.
- [0050] <실시예 1> 근육세포 특이적 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스의 제조
- [0051] 근육세포 특이적으로 CRIF1 유전자가 결손된 마우스를 제조하기 위하여, 하기와 같이 실험하였으며, 모든 마우스는 충남대학교병원 전임상실험센터(LMO 등록번호: LML-14-39)에서 마우스 표준사육지침에 의거하여 사육하였

다.

[0052] 구체적으로, CRIF1의 2번 엑손 양 옆에 loxp site를 삽입한 CRIF1 loxp/loxp 마우스(C57BL/6 계통) 및 골격 근육세포 2형 타입에서 특이적으로 Cre-recombinase를 발현하는 MLC(myosin light chain)-Cre 마우스(C57BL/6 계통)를 이용하였다. 먼저 CRIF1 loxp/loxp 마우스 및 MLC-Cre 마우스를 교배하여 얻은 1세대 CRIF1 이형접합 녹아웃(heterozygous knockout) 마우스 중에서 CRIF1 loxp/+, MLC-Cre m/+의 유전자형을 가지는 마우스를 선별하고, 상기 마우스와 CRIF1 loxp/loxp 마우스를 교배하여 2세대 마우스를 얻었다. 2세대 마우스 중에서 CRIF1 loxp/loxp MLC-Cre m/+의 유전자형을 가지는 CRIF1 동형접합 녹아웃(homozygous knockout) 마우스를 선별하여 실험에 이용하였다.

[0053] 선별한 마우스의 유전자형을 역전사-PCR(reverse transcription PCR)로 확인한 결과, 도 1a에 나타난 바와 같이 CRIF1 유전자가 녹아웃된 것을 확인할 수 있었다(도 1a). 또한, 선별된 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스는 태어났을 때에는 정상적인 외형 및 출생비를 가지고 있었으나, 대조군과 비교하여 약 10주령부터 체중 증가율이 감소하는 경향을 보였으며(도 1b), 생존율 또한 약 14주령부터 급격히 감소하는 경향을 보였다(도 1c). CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스의 13주령 때의 표현형을 도 1d에 나타내었다(도 1d).

[0054] <실험예 1> 근육세포 특이적 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스에서 생리적 이상 증상의 확인

[0055] 상기 <실시예 1>에서 선별한 근육세포 특이적 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스의 생리적 이상 증상을 하기와 같이 확인하였다.

[0056] <1-1> 근육세포 특이적 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스에서 근육량 및 근세포 확인

[0057] 13주령의 수컷 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스(CRIF1 Δ^{sm}) 및 대조군 마우스(CRIF1^{+/+})(N=10마리)에서 각각의 비복근(Gastrocnemius, Gas) 근육 및 전경골근(Tibialis anterior, TA)/긴발가락뿔근(Extensor digitorum longus, EDL)을 절제하여 근육을 확인하였다. 그 결과, 도 2a에 나타난 바와 같이 13주령의 수컷 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스는 대조군 마우스와 비교하여 근육량이 감소한 것을 확인하였다(도 2a).

[0058] 또한, 8주령의 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스 및 대조군 마우스에서 장기 및 근육을 적출하여 무게를 측정하였다. 그 결과, 도 2b에 나타난 바와 같이 8주령의 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스에서 부고환 백색지방 조직(epididymal white adipose tissue, eWAT), 긴발가락뿔근(EDL) 및 비복근(Gas)의 무게가 유의성 있게 감소된 것을 확인하였다(도 2a).

[0059] 또한, 당업계에 통상적으로 알려진 방법에 따라 긴발가락뿔근을 헤마토히알린&에오신(hematoxylin&eosin)으로 염색하여 관찰하였다. 그 결과, 도 2c에 나타난 바와 같이 대조군 마우스와 비교하여 13주령의 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스에서 근육의 근육다발 면적이 유의성 있게 감소한 것을 확인하였다(도 2c).

[0060] <1-2> 근육세포 특이적 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스의 근육에서 미토콘드리아 활성 확인

[0061] 근육세포 특이적 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스의 근육에서 미토콘드리아 활성을 확인하기 위하여 하기와 같이 확인하였다.

[0062] 구체적으로, 미토콘드리아 활성 단백질인 숙신산 탈수소효소(succinate dehydrogenase, SDH)를 염색하기 위하여 근육조직을 동결 절편한 슬라이드를 SDH반응 용액(0.2M succinic acid, 0.2M phosphate buffer, pH 7.4, 0.2% Nitor-BT solution, Sigma)에서 37℃, 30분간 반응시켰다. 그 후, 10% 포르말린 용액으로 고정하고, 15% 에탄올 용액으로 세척하여, 글리세린 젤라틴(glycerin gelatin) 용액으로 봉입한 후 광학 현미경으로 비교분석하였다.

[0063] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스에서 숙신산 탈수소효소의 활성이 감소된 것을 알 수 있었으며, 이를 통하여 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스의 근육에서 미토콘드리아 활성이 감소한 것을 확인하였다(도 3).

[0064] <1-3> 근육세포 특이적 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스의 운동 능력 확인

[0065] 13주령의 수컷 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스의 운동 능력을 하기와 같이 확인하였다.

[0066] 구체적으로, 13주령의 수컷 대조군 마우스 및 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스(N=10)에서 악력 테스트(grip strength), 평균지연시간(mean latency) 및 운동량을 측정하였다. 악력 테스트는 악력 측정기(grip strength meter, harvard apparatus Ins, 미국)를 사용하여 마우스의 4지 악력을 측정하였으며, 평균지연시간(Mean latency) 평가는 전처리없는 상태(Pre)와 3일 동안, 매일 5분씩, 3회의 전처리교육을 실시(post)한 이후 측정하였다. 운동력(Drop test)은 2개월 내지 4개월령(Mo)의 마우스를 로타-로드(rota-rod, Panlab Rota-Rods, harvard apparatus Ins., 미국) 위에서 매일 5분씩, 3회의 전처리교육을 3일간 실시한 후, 25RPM 속도로 5분간 로드(rod)를 작동시키고 마우스가 로드에서 떨어지는 횟수를 측정하여 평가하였다.

[0067] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 모든 측정 결과에서 대조군 마우스와 비교하여 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스의 운동 능력이 유의하게 감소하였으며, 특히 주령이 증가할수록 운동 능력이 현저하게 감소되는 것을 확인하였다(도 4).

[0068] <실험예 2> 근육세포 특이적 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스에서 미토콘드리아 표현형 및 미토콘드리아 호흡사슬 복합체의 확인

[0069] CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스의 근육세포에서 미토콘드리아 표현형 및 호흡사슬 복합체의 이상유무를 확인하기 위하여, 하기와 같이 실험하였다.

[0070] 구체적으로, 3주령의 수컷 대조군 마우스 및 CRIF1 동형 접합 녹아웃 마우스(N=10)에서 긴발가락뿔근(EDL) 근육을 분리하여 마우스전자현미경(JEOL, Tokyo, 일본)으로 미토콘드리아를 관찰하였다. 그 결과, 도 4a에 나타난 바와 같이 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스에서 미토콘드리아 크리스타 구조가 파괴되어 있는 비정상적인 미토콘드리아를 확인하였다(도 4a).

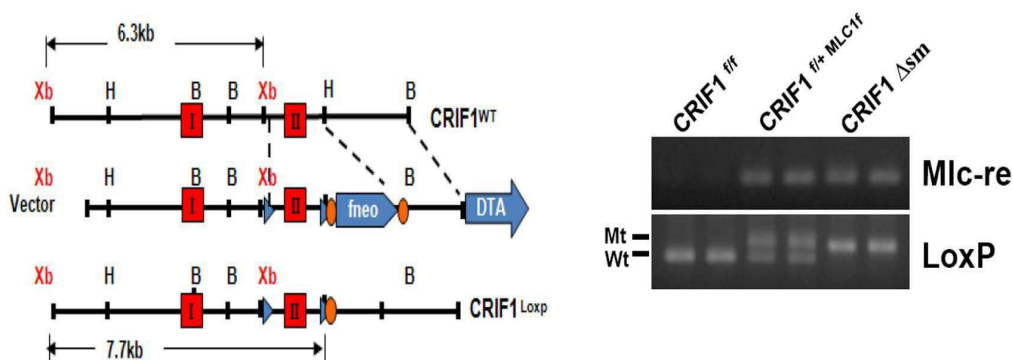
[0071] 또한, 미토콘드리아 호흡사슬 복합체에 관여하는 단백질의 발현량을 확인하기 위하여 각각의 호흡사슬 복합체에 관여하는 대표단백질을 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다.

[0072] 그 결과, 도 4b에 나타난 바와 같이 대조군 마우스와 비교하여 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스에서는 호흡사슬 복합체 I, III 및 IV에 관여하는 NDUFA9(NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex subunit 9), UQCRC2(ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 2) 및 Cox I(cyclooxygenase I)의 발현량이 현저히 감소된 것을 확인하였다(도 4b).

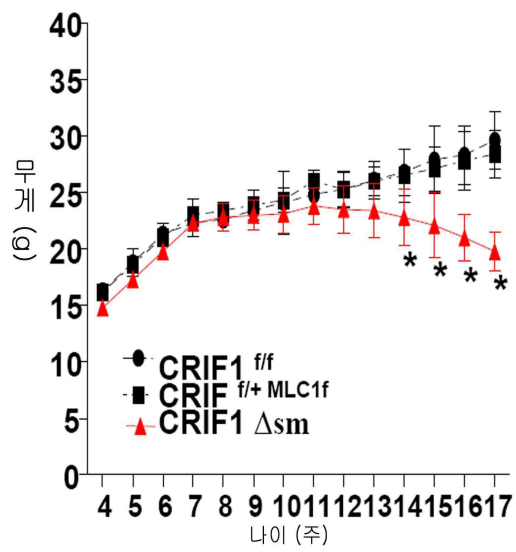
[0073] 또한, 미토콘드리아 호흡사슬 복합체의 어셈블리 상태를 확인하기 위하여 긴발가락뿔근(EDL) 근육에서 포도당 밀도구배 원심분리법을 이용하여 미토콘드리아를 분리 및 정제하여, BN-PAGE((Blue native-polyacrylamide gel electrophoresis, Life Technologies, USA)를 실시하였다. 그 결과, 도 4c에 나타난 바와 같이 대조군 마우스와 비교하여 CRIF1 동형접합 녹아웃 마우스에서는 복합체 I 및 III의 어셈블리 형성이 저해된 것을 알 수 있었고, 이로 인하여 미토콘드리아 이상이 생긴 것을 확인하였다(도 4c).

도면

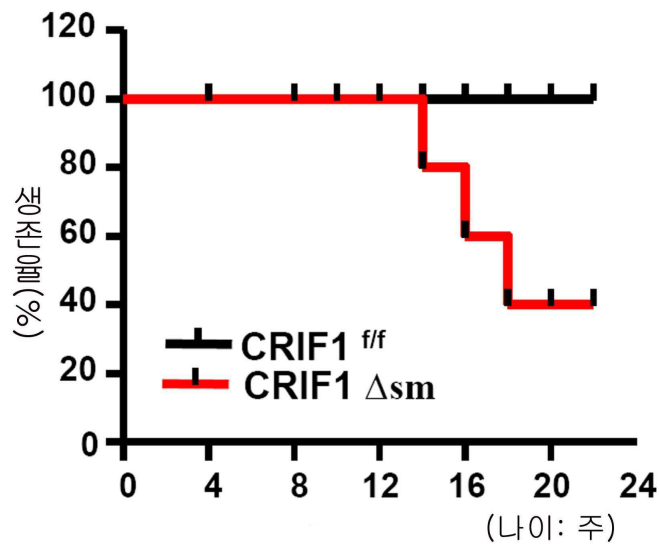
도면1a



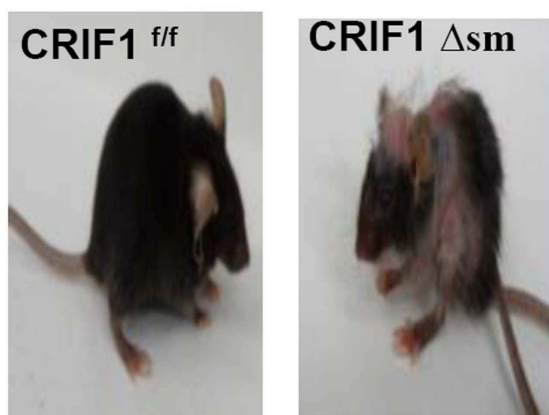
도면1b



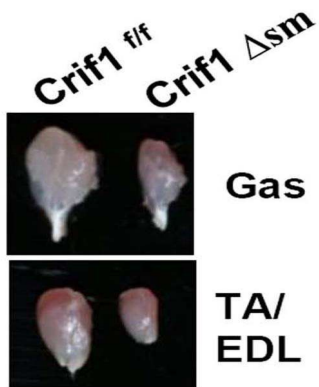
도면1c



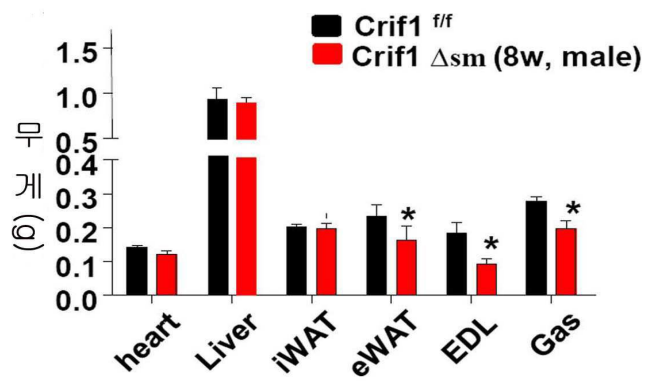
도면1d



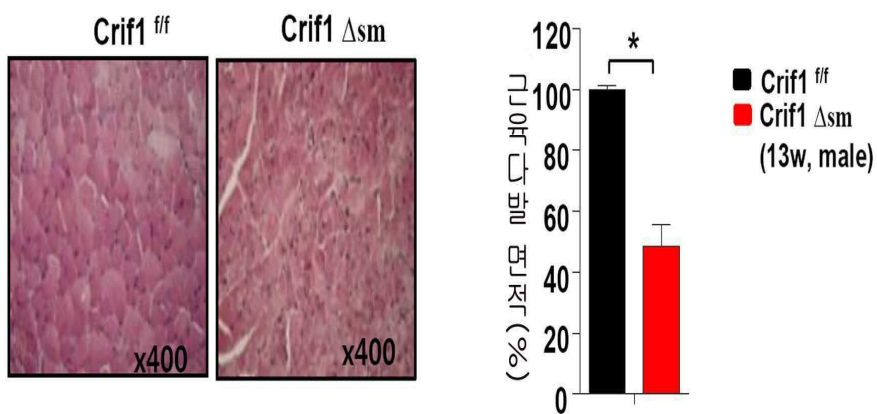
도면2a



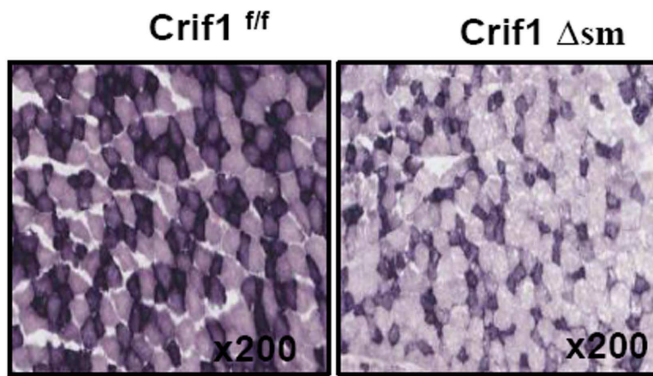
도면2b



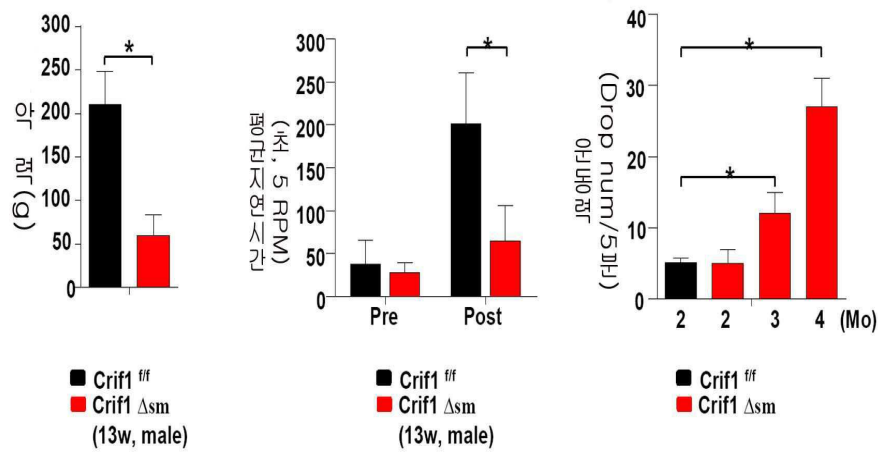
도면2c



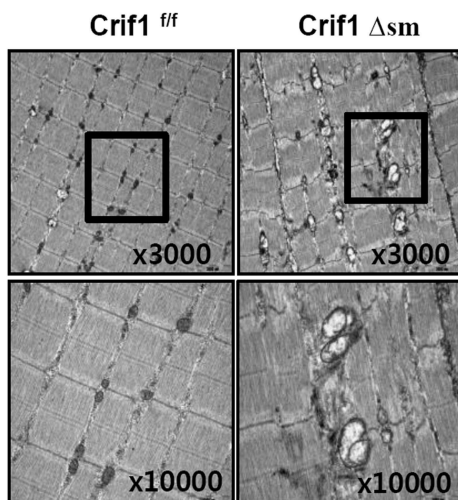
도면3



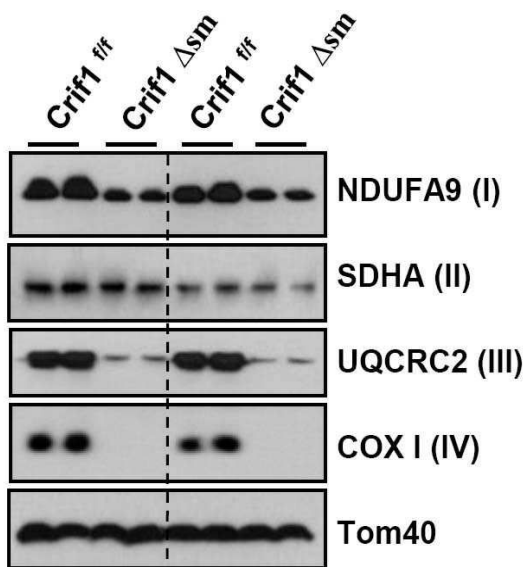
도면4



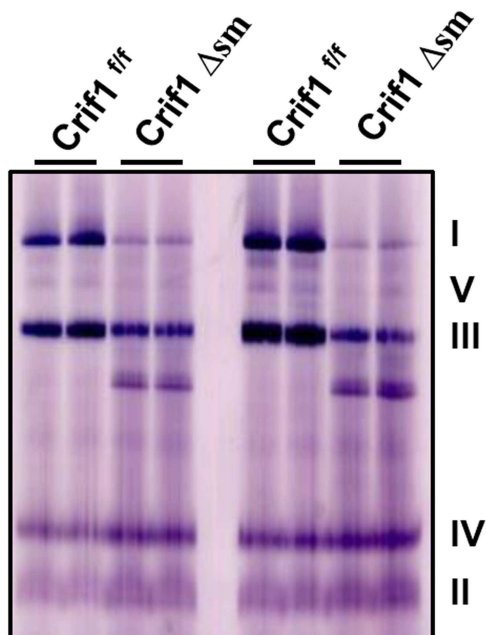
도면5a



도면5b



도면5c



서열 목록

- <110> Foundation of Research&Business of Chungnam National University
- <120> Sarconia model mice, preparation method thereof and screening method of sarconia using them
- <130> 2015P-05-025
- <160> 1

<170> KoPatent In

<210> 1

<211> 1734

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

acagccaaga tggcggcgct cgcaatgcgg agtggctatc tcctgcggct ctctgtggct	60
ctgggtccca ggtcccgagc ctaccgtgcg cccccgcccc cgcgccgccc tcccgggccc	120
cactcgccag acccggagaa cctgctgacc ccgcgatggc agctaacgcc ccgctatgtg	180
gccaagcagt tcggacgaca tggcgccatc tccgggggtgc ccccgccctc cctgtggccc	240
acccagagc agctgcgcga gttggaggcc gaggagcaag aatggtaccc gagcttagcg	300
accatgcaag agtcgctgcg cttgcagcag caggccttgg aggcaaggcg ccaagccagg	360
gagcagcgta tcgcagagtg catggccaag atgccacaaa tgattgaaaa ctggcgaaaag	420
cagaagcgag aacgctggga gaaaattcag gctgacaagg agcggagggc ccggttacag	480
gctgaggccc aggaacgcct gggctaccac gtggacccaa ggagtgctcg cttccaggaa	540
ctattacagg acctagacaa gcagcaacga aagcgccctaa aggaagaaaag acaacgacag	600
aagaaggagg cacgaattgc tgctatggcc tctgctgaag cccaggactc agcagtgtct	660
ggtgaacca gtcctgaaa gtcctcttcc caataaagcc agctgctgac aacctatatt	720
ctacacattc tcctcaagt tgtgacttcc tgggtcgccc ggctcattcc ccaacacctg	780
ggcgggagaa tcctccacc tggctgtgtt cacacctgga cactaggcca tgccatgaac	840
tggggctttg gggagagaga aaggggaatg gatgggcaaa taatgaagga gcagatggca	900
ggagaggagg aggtttctgt ttaccaacat taatctccag taattagcca attaccaggg	960
ggagtacagc caaacagact gcatgataga aggagcagca gtccttctag ggttgagctg	1020
aggcaggggc ccaagtttcc agagggagga gatgctgggg cccgtctgta aggttcctag	1080
gtctctcccc gtttctcagc atgcccactt cacctgtgcc cccggctagc tcagactcac	1140
aaacagctgt gagaagctcc agtaggcatg aaccattatt agggctcatt tttaaaactt	1200
tattcacgtc aaaaccttta tcagagatgt ggttctgtcc tggggaaggg gtggccttgg	1260
ccttcagaac tgatgataac cccctttcca ggctggaggc caaggccaga ctggggagaa	1320
ggcctttggc ttctaacata gacttactcc agatggaaag atctgggcca ctccaataga	1380
ggatcaaagc ttagggctcc agcttccct catcatggtg gaggaaggag ggttgtcctt	1440
ggggatgctt cagggatggg gaagcaggca ggcgcccc ccatctggctg caggagctg	1500

ggacagaggc caagaggggc ccatctgtcg cctcatggtc ttgccaacaa cttttgagta	1560
ggctgggctg ttaagaggac ggggacagct gtctggccca ggtcttctcg gactgatatg	1620
ggaatggggg ccacttcagg aggggtgggaa gctgggctgg gttttttttt gttgttgttt	1680
ttttaatggt ttttgatatt cttcctctta aacatgaata tatatatgtt atat	1734