(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년08월29일
(11) 등록번호 10-1301486
(24) 등록일자 2013년08월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) *C12N 5/071* (2010.01)
G01N 33/15 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0043311
(22) 출원일자 2012년04월25일
심사청구일자 2012년04월25일
(56) 선행기술조사문헌
정경혜. Development of thyroid specific mitochondrial dysfunction in a new animal model. 2011.08, 충남대학교 대학원 석사학위논문
KR101010487 B1
Parkinsonism & related disorders. 2011, vol. 17, no. 6, pp. 459-463.
전체 청구항 수 : 총 6 항

(73) 특허권자
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
송민호
대전 중구 문화1동 센트럴파크 306-1202
권기량
대전광역시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트 503동 1001호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김원준

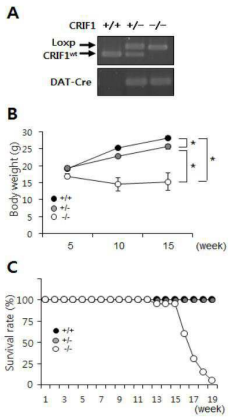
심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 **파킨슨병 동물 모델과 그 제조방법 및 이를 이용한 파킨슨병 치료제의 스크리닝 방법**

(57) 요 약

본 발명은 도파민성 뉴런세포에 특이적으로 CRIF1(CR6-interacting factor 1) 유전자가 결손(knock-out)된 마우스인 것을 특징으로 하는 파킨슨병 동물 모델과 CRIF1의 2번 엑손 양 옆에 loxp site를 삽입한 $CRIF1^{loxp/loxp}$ 마우스와, 도파민성 신경세포에서 특이적으로 Cre-recombinase를 발현하는 DAT-Cre 마우스를 교배하여 $CRIF1^{loxp/+}$, DAT-Cre m/+의 유전자형을 갖는 1세대의 CRIF1 이형접합 결손(heterozygous knockout) 마우스를 얻는 단계; 상기 이형접합 결손 마우스와 $CRIF1^{loxp/loxp}$ 마우스를 교배하여 2세대 마우스를 얻는 단계; 및 상기 2세대 마우스로부터 부터 $CRIF1^{loxp/loxp}$, DAT-Cre m/+의 유전자형을 가지는 CRIF1 동형접합 녹아웃(homozygous knockout) 마우스를 선별하는 단계;를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 파킨슨병 동물 모델의 제조 방법에 관한 것이며, 더 나아가 상기 동물 모델을 이용하여 파킨슨병 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

허준영

전라북도 전주시 완산구 중화산동2가 현대에코르아 파트 105동 603호

김성중

대전광역시 중구 대사동 248-22 동양아트빌 B01

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	A100588
부처명	보건복지부
연구사업명	보건의료연구개발사업
연구과제명	미트콘드리아 기능 개선에 의한 당뇨병 전환/진행 억제
주관기관	충남대학교병원
연구기간	2012.04.01 ~ 2013.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

도파민성 뉴런세포에 특이적으로 CRIF1(CR6-interacting factor 1) 유전자가 결손(knock-out)된 마우스인 것을 특징으로 하는 파킨슨병 동물 모델.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 마우스는 동형접합체(homozygote)인 것을 특징으로 하는 파킨슨병 동물 모델.

청구항 3

CRIF1의 2번 엑손 양 옆에 loxp site를 삽입한 $CRIF1^{loxp/loxp}$ 마우스와, 도파민성 신경세포에서 특이적으로 Cre-recombinase를 발현하는 DAT-Cre 마우스를 교배하여 $CRIF1^{loxp/+}$, DAT-Cre m/+의 유전자형을 갖는 1세대의 CRIF1 이형접합 결손(heterozygous knockout) 마우스를 얻는 단계;

상기 이형접합 결손 마우스와 $CRIF1^{loxp/loxp}$ 마우스를 교배하여 2세대 마우스를 얻는 단계; 및

상기 2세대 마우스로부터 부터 $CRIF1^{loxp/loxp}$, DAT-Cre m/+의 유전자형을 가지는 CRIF1 동형접합 녹아웃(homozygous knockout) 마우스를 선별하는 단계;

를 포함하여 이루어지는 것을 특징으로 하는 파킨슨병 동물 모델의 제조 방법.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항의 파킨슨병 모델 동물에 시료를 투여하는 단계;

시료 투여 후 상기 모델 동물의 체중 증가율과 생존율 중 하나 이상을 측정하는 단계; 및

상기 시료를 투여하지 않은 대조군과 비교하여 체중 증가율과 생존율 중 하나 이상을 향상시키는 시료를 선별하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병 예방 및 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항의 파킨슨병 모델 동물에 시료를 투여하는 단계;

시료 투여 후 상기 모델 동물의 운동성을 측정하는 단계; 및

상기 시료를 투여하지 않은 대조군과 비교하여 운동성을 향상시키는 시료를 선별하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 파킨슨병 예방 및 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 시료는 대조군의 운동성에는 유의적인 영향을 미치지 않는 것을 특징으로 하는 파킨슨병 예방 및 치료제의 스크리닝 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 파킨슨병 동물 모델과 그 제조방법에 관한 것이며, 더 나아가 상기 동물 모델을 이용하여 파킨슨병 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 파킨슨병은 알츠하이머 치매와 더불어 노년기에 나타나는 대표적인 퇴행성 신경질환이다. 파킨슨병은 임상적 증상으로서 진전(振戰)증, 2) 무운동증, 3) 근강강(筋强剛)의 3가지 큰 특징적 증상을 보이며, 우울증 및 판단력 저하 등의 정신적인 증상을 동반하기도 한다. 파킨슨병을 가진 환자의 뇌에서 도파민 함량이 저하된다는 것이 알려진 이래로, 파킨슨병은 뇌 안의 도파민 감소에 기인한 것으로 생각되고 있다. 따라서, 도파민을 전구체 형태로 투여하거나, 도파민의 대사를 억제하거나, 도파민의 작용 물질을 사용하는 치료가 현재 행해지고 있다. 그러나 병의 진행에 따라 도파민의 증상 완화 효과는 감소하게 되어 말기 환자의 경우 특별한 치료나 증상 완화 방법이 알려져 있지 않다. 파킨슨병 연구를 위한 실험모델은 초파리모델에서부터 마우스, 레트 모델에 이르기까지 다양하게 존재 하고 있으나 아직 치료제 효능을 평가 할 수 있는 정확한 동물 모델이 없다.

[0003] 파킨슨병의 발병기전은 유전적 요인과 환경적 요인이 모두 작용하고 있으며 파킨슨 병 치료제 개발에 있어 가장 중요한 점은 사람의 파킨슨병과 일치하는 정확한 마우스 모델을 만드는 것에 있다. 그러나 세계 각국에서 만들고 있는 파킨슨병 마우스 모델들은 하나의 원인적 측면에 초점을 맞추어 확립되었기 때문에 사람에게서 보여지는 질병의 진행경과와 다른 증상을 나타내고 있다.

[0004] 파킨슨병 환자의 약 5~10%가 가족력을 갖는 것으로 알려져 있는데, 이들 환자의 연구로부터 몇 개의 유전자 자리에서 돌연변이에 의해 파킨슨 병을 유발하는 유전자를 확인하였다. 돌연변이에 의해 파킨슨병을 일으키는 원인 유전자는 parkin, PINK1, DJ-1 등이 알려져 있다. 이에 상기 유전자 중 하나 이상이 결손된 마우스를 제작하였으나, 이들 마우스 모두는 파킨슨병과 연관된 운동 능력 이상을 나타내지 않았다. 또한, 이들 마우스는 다양한 신호 전달계와 세포 기능들이 상호 보완적으로 작용하는 사실을 반영하지 않는다는 문제가 있다. 파킨슨병 발병 기전을 연구하는데 있어 쉽게 유전자 상호 간의 상관관계를 쉽게 알 수 있는 초파리 모델이 많이 이용되고 있으나, 진화 단계에서 발생하는 사람과의 차이, 질병 발생 표현형의 차이 때문에 직접 치료 효과를 평가하기에는 한계가 있다.

[0005] 파킨슨병 환자는 사후 부검 시 85% 이상의 환자에서 뇌 흑색질(Substantia nigra)의 미토콘드리아 호흡복합체 I의 활성이 감소됨을 나타낸다. 파킨슨병의 환경적 원인 인자인 로테논(rotenone), 패러쿠왓(paraquat)이나 MPTP는 모두 세포내 소기관인 미토콘드리아를 표적으로 하여 신경세포의 사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다. 미토콘드리아는 세포내 활성산소(Reactive Oxygen Species, ROS) 제거 효소가 세포질에 비해 부족하고 핵 DNA와 달리 histone 단백질이 결여된 naked 상태이기 때문에 다른 세포소기관에 비하여 활성산소에 의해 쉽게 손상 받을 수 있다. 또한 세포 내에서 발생하는 90% 이상의 ROS는 미토콘드리아에서 생성되기 때문에 미토콘드리아가 손상 받게 되면 세포내 활성 산소종이 더욱 증가하게 되어 세포 사멸이 유도된다. 이에 로테논, 패러쿠왓, MPTP 등이나 활성산소종을 유발하는 6-OHDA (6-hydroxydopamine)를 기저핵 부위에 직접 주사하거나 혹은 전신으로 투여하는 방법에 의해 마우스 모델을 제조하는 방법이 있다. 그러나, 이러한 방법은 도파민성 신경세포 이외의 다른 부위나 조직에 독성을 일으키며 재현성이 나빠 반복실험을 수행하는 데 문제가 있다.

[0006] 따라서 인체 파킨슨병 모방형 모델로서, 1)원하는 시기와 연령에 맞추어 파킨슨병이 발생하는 예측 가능하고, 2) 여러 원인들의 복합적인 작용에 의한 파킨슨병 질병발생을 정확히 이해할 수 있으며, 3) 인체 파킨슨병의 진행 경과와 병리학적 기전이 일치하여 파킨슨 병의 치료제 개발 및 질병 치료에 응용할 수 있는 동물 모델이 절실히 요구되고 있다.

[0007] 한편, 미토콘드리아 단백질인 CRIF1(CR6-interacting factor 1)의 결손은 미토콘드리아 내막에 존재하는 호흡복

합체의 안정성을 감소시키며 이는 결국 미토콘드리아 호흡률 저하, 반응성 활성산소종의 증가, 미토콘드리아 내막의 구조적 변화를 발생하게 한다. CRIF1 결손에 의한 이러한 미토콘드리아의 구조적, 기능적 이상은 파킨슨병의 발병 원인으로 예상되어지는 미토콘드리아의 이상과 매우 유사하다. 따라서 도파민성 신경세포에서 CRIF1을 녹아웃시키게 된다면 환경적 요인을 배제한 유전적 요인에 의한 파킨슨병이 발병될 가능성이 매우 높으며 이러한 녹아웃 동물 모델은 미토콘드리아 이상에 의한 파킨슨병의 발병 기작 연구 및 파킨슨병 치료용 약물의 효능을 테스트를 하는데 최적의 실험동물 모델이 될 수 있을 것으로 기대하고, 연구를 계속한 결과 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 파킨슨병의 진행 및 병리학적 기전의 연구에 유용한 동물 모델을 제공하고자 하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 본 발명은 또한 상기 동물 모델의 제조방법을 제공하는 것을 다른 목적으로 한다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 동물 모델을 이용하여 파킨슨병 예방 및 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 도파민성 뉴런세포에 특이적으로 CRIF1(CR6-interacting factor 1) 유전자가 결손(knock-out)된 마우스인 것을 특징으로 하는 파킨슨병 동물 모델에 관한 것이다. 도파민성 뉴런세포 특이적 CRIF1 결손 마우스는 출생 시 성비 나 외형에 이상은 없었으나, 성장에 따라 파킨슨병 특유의 생리적인 변화와 운동능력 및 보폭 등에 이상을 나타내었다. 본 발명의 도파민성 뉴런세포 특이적 CRIF1 결손 마우스는 동형접합체(homozygote)인 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0012] 본 발명은 또한 CRIF1의 2번 엑손 양 옆에 loxp site를 삽입한 $CRIF1^{loxp/loxp}$ 마우스와, 도파민성 신경세포에서 특이적으로 Cre-recombinase를 발현하는 DAT-Cre 마우스를 교배하여 $CRIF1^{loxp/+}$, DAT-Cre m/+의 유전자형을 갖는 1세대의 CRIF1 이형접합 결손(heterozygous knockout) 마우스를 얻는 단계; 상기 이형접합 결손 마우스와 $CRIF1^{loxp/loxp}$ 마우스를 교배하여 2세대 마우스를 얻는 단계; 및 상기 2세대 마우스로부터 부터 $CRIF1^{loxp/loxp}$, DAT-Cre m/+의 유전자형을 가지는 CRIF1 동형접합 녹아웃(homozygous knockout) 마우스를 선별하는 단계;를 포함하여 이루어지는 파킨슨병 동물 모델의 제조 방법에 관한 것이다.

[0013] 본 발명의 파킨슨병 모델 동물은 모델 동물에 시료를 투여하는 단계; 시료 투여 후 상기 모델 동물의 체중 증가율과 생존율 중 하나 이상을 측정하는 단계; 및 상기 시료를 투여하지 않은 대조군과 비교하여 체중 증가율과 생존율 중 하나 이상을 향상시키는 시료를 선별하는 단계;를 포함하여 파킨슨병 예방 및 치료제를 스크리닝하는데 이용할 수 있다.

[0014] 또는 본 발명의 파킨슨병 모델 동물에 시료를 투여하는 단계; 시료 투여 후 상기 모델 동물의 운동성을 측정하는 단계; 및 상기 시료를 투여하지 않은 대조군과 비교하여 운동성을 향상시키는 시료를 선별하는 단계;를 포함하여 파킨슨병 예방 및 치료제를 스크리닝 할 수 있다. 이 때, 상기 운동성의 증가가 파킨슨병의 발병의 완화에 의한 것임을 확인할 수 있도록 대조군의 운동성에는 유의적인 영향을 미치지 않는 시료를 선정하는 것에 의해 파킨슨병 예방 및 치료제를 스크리닝할 수 있다.

[0015] 상기 시료의 투여 방법은 경구투여, 정맥주사, 피하투여, 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.

발명의 효과

[0016] 이상과 같이 본 발명의 도파민성 신경세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스는 성장에 따라 파킨슨병이 발병하여 파킨슨병 고유의 증상을 나타내므로 파킨슨병의 진행 경과와 병리학적 기전 연구의 동물 모델로 유용하게 이용될 수 있다.

[0017] 또한 본 발명의 도파민성 신경세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스는 파킨슨병 예방 및 치료제의 스크리닝에 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 도파민성 신경세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스의 유전자형을 나타내는 RT-PCR 결과 사진 및 성장과정 동안의 체중 증가율 및 생존율을 나타내는 그래프.

도 2는 도파민성 신경세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스의 미토콘드리아 이상을 보여주는 전자현미경 사진.

도 3은 도파민성 신경세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스에서 흑색질 부위의 DAB 염색 후의 현미경 사진.

도 4는 도파민성 신경세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스에서 흑색질 부위의 도파민 신경세포에서 도파민 및 도파민 대사물의 양을 보여주는 그래프.

도 5는 도파민성 신경세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스의 운동성을 보여주는 그래프.

도 6은 도파민성 신경세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스의 보폭 특성을 보여주는 그래프.

도 7은 도파민성 신경세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스에 L/C-DOPA를 투여한 후 운동성의 변화를 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 또한 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0020] **실시예 1 : 도파민성 뉴런세포 특이적 CRIF1 결손 마우스의 제조**

[0021] CRIF1의 결손을 도파민성 뉴런세포에게 특이적으로 발생시키기 위하여, CRIF1을 녹아웃 시키기 위하여 CRIF1의 2번 엑손 양 옆에 loxp site를 삽입한 $CRIF1^{loxp/loxp}$ 마우스(EMBO Journal, 27(4):642-53, 2008)와, 도파민성 신경세포에서 특이적으로 Cre-recombinase를 발현하는 DAT-Cre 마우스(J Neuroscience Methods 2005 143 27-32, PNAS, 104(4): 1325-30, 2006)를 이용하였다. $CRIF1^{loxp/loxp}$ 마우스와 DAT-Cre 마우스를 교배하여 1세대에 얻은 CRIF1 이형접합 녹아웃 (heterozygous knockout) 마우스 중 $CRIF1^{loxp/+}$, DAT-Cre m/+의 유전자형을 가지고 있는 male 마우스와 $CRIF1^{loxp/loxp}$ female 마우스를 교배하여 태어난 2세대의 마우스부터 $CRIF1^{loxp/loxp}$, DAT-Cre m/+의 유전자형을 가지는 CRIF1 동형접합 녹아웃(homozygous knockout) 마우스를 얻었다 (-/-). 또한 이들과 함께 태어난 다른 마우스 중 $CRIF1^{loxp/+}$, DAT-Cre m/+의 유전자형을 가지는 이형접합 녹아웃 마우스(+/-)와 $CRIF1^{loxp/loxp}$ 마우스(+/+)를 대조군 (littermate control) 마우스로 이용하였다. 도 1의 A는 상기 각 마우스에 대해 유전자형을 확인한 RT-PCR 결과 사진이다.

[0022] 상기 각 유전자형의 마우스 각 20마리씩을 장기간 기르며, 성장과정 동안의 체중 증가율과 생존율을 측정하여 도 1의 B와 C에 각각 도시하였다. 도파민성 신경세포 특이적 CRIF1 녹아웃 마우스(-/-)는 태어났을 때 특징적인 외형의 이상을 관찰 할 수 없었으며 출생 성비 또한 정상이었다. 하지만 약 5주령부터 체중이 더 이상 늘어나지 않거나 감소하기 시작하였으며 15주령 까지 비교해 보았을 때 대조군 마우스에 비해 개체가 매우 작은 것

을 알 수 있었다. 생존률에 있어서도 +/+와 +/- 마우스들은 19주 동안 특별한 이상 징후를 보이지 않았으나 -/- 마우스의 경우 행동성에 이상이 관찰되었고 최초 13주령 때부터 개체가 사망하기 시작하였다. 대부분의 -/- 마우스들은 16주에서 18주 사이에 사망하였고 최장 19주 까지 살아있었지만 19주 이후 모든 개체가 사망하였다.

[0023] **실시예 2 : 도파민성 뉴런세포 특이적 CRIF1 결손 마우스의 생리적 이상 확인**

[0024] **1) 뇌조직에서의 미토콘드리아 이상 확인**

[0025] 상기 실시예 1에서 제조한 도파민성 뉴런세포에서만 특이적으로 CRIF1이 결손 된 CRIF1 녹아웃 마우스의 미토콘드리아 이상을 확인하기 위하여 전자현미경을 이용하여 미토콘드리아 구조를 관찰하였다. 보다 상세하게는 10주령의 +/+, +/-, -/- 마우스를 마취 후 개복하여 10 unit/mL의 농도로 헤파린이 첨가된 saline 10mL를 심장으로 관류시켜 혈액을 제거한 뒤 10mL의 2%(w/w) glutaraldehyde(Sigma)를 관류시켜 조직을 고정하였다. 고정된 마우스의 뇌를 적출하여 2%(w/w) glutaraldegyde 용액에 침전시켜 4℃에서 2시간동안 전고정을 한 후 0.1%(w/w) $CaCl_2$가 첨가된 0.1M cacodylate 버퍼로 4℃에서 5회 세척하였다. 세척한 뇌 조직을 0.1%(w/w) $CaCl_2$와 1%(w/w) OsO_4가 포함된 0.1M cacodylate 버퍼(pH 7.2)로 4℃에서 1시간동안 후고정 하였다. 고정이 끝난 조직은 3차 증류수로 세척 후 10%-90%(v/v) 에탄올로 순차적으로 탈수한 후 4℃에서 propylene Oxide로 치환시켰다. 치환된 조직은 EMbed-812(EMS, USA)에 임베딩 한 후 60℃에서 36시간 동안 경화시켰다. 경화된 조직은 LEICA EM UC6 ultramicrotome (Leica, Austria)을 이용하여 절편을 만든 후 formvar-coated slot grid에 마운트 하였다. 마운트 된 절편은 4%(w/w) uranyl acetate와 lead citrate로 염색 후 Tecnai G2 Spirit Twin transmission electron microscope(FEI Company, USA)와 JEMARM1300S high voltage electron microscope(JEOL, Japan)을 이용하여 substantia nigra 부위를 관찰하고 그 결과를 도 2에 도시하였다. 관찰결과 도 2에서 확인할 수 있듯이 +/+, +/- 마우스의 미토콘드리아 구조는 정상적인 외막과 내막의 구조를 가지고 있었으나, -/- 마우스의 경우에는 정상적인 외막의 구조는 가지고 있지만 내막구조가 거의 존재하지 않고 있었으며 미토콘드리아 내막의 특징적 구조인 cristae 구조가 거의 관찰되지 않았다. 도 2의 결과로부터 도파민성 신경세포에서 CRIF1의 결손이 미토콘드리아의 이상을 발생시킴을 알 수 있었다.

[0026] **2) 흑색질에서 Tyrosine Hydroxylase의 감소 확인**

[0027] 흑질 선상체 경로(Nigrostriatal pathway)에서 도파민성 신경 세포의 사멸은 파킨슨 병 환자의 행동이상을 야기시키는 주된 원인이다. 도파민성 신경 세포 특이적 CRIF1 결손 마우스에서 흑질 선상체 경로에 세포사멸이 일어나는지 알아보기 위하여 도파민 합성과정에 중요한 효소인 Tyrosine hydroxylase의 발현 양상을 면역 조직 염색을 통해 비교 검경하였다.

[0028] 조직 절편을 얻기 위하여 먼저 마우스를 마취 한 후 Normal saline으로 관류 과정과 4% paraformaldehyde로 고정 과정을 진행하였다. 그 후 냉동분(cryosection) 과정을 통해 substantia nigra region을 얻었다. 각각 5주령, 10주령, 15주령 마우스에서 얻어진 상기 조직에 TH 항체를 붙이고 그 종에 따르는 2차 항체를 붙여 DAB(Diaminobenzidine) 염색으로 발색 하였다. 도 3은 상기 염색 결과를 보여주는 사진이다. 도 3으로부터 5주령 -/- 마우스의 흑색질 영역에서 TH positive 도파민성 신경 세포의 감소를 관찰할 수 있었으며, 이는 10주령, 15주령으로 마우스가 나이가 증가 함에 따라 더욱 많은 수의 도파민성 신경 세포의 감소가 관찰 되었다. 연령이 증가함에 따라 점차적으로 도파민성 신경 세포가 감소하는 것은 파킨슨병 환자에서 나타나는 증상 중 하나로써 상기 실시예 1에서 제작한 -/- 마우스가 파킨슨병의 진행 양상과 일치한다는 사실을 반영하는 결과이다.

[0029] **3) 흑색질에서의 도파민 감소 확인**

[0030] 파킨슨 병 환자에서 행동이상을 일으키는 표면적인 원인은 도파민의 감소에 있다. 실시예 3에서 확인한 바와 같이 -/- 마우스 역시 도파민성 신경세포가 감소하였으므로 도파민 분비의 감소가 예상된다.

[0031] 이를 확인 하기위하여, 실시예 1의 10주령 마우스에서 도파민성 신경 경로 중 하나인 선조체 영역(Striatum region)에서 10% PCA(perchloric acid)를 이용하여 세포내 물질을 추출 하였다. 추출액 중 HPLC에 의해 도파

민과 도파민의 대사물질인 DOPAC과 Homovalinic acid의 양을 HPLC로 정량하고 그 결과를 도 4에 도시하였다. 그 결과 -/- 마우스에서 도파민과 그 대사물질의 양은 대조군 마우스에 비해 크게 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0032] 또한 아직 정확한 원인은 모르지만 파킨슨병 환자에서 도파민의 생성 감소 에 비해 더욱 많은 대사물질이 생성된다는 특징이 보고된 바 있다. 즉 도파민의 대사에 관여하는 효소의 활성 증가로 인해 병이 진행 될수록 도파민의 대사가 더욱 빨라짐을 의미 한다. 본 발명에 의한 -/- 마우스에서도 동일한 현상이 나타나는 지 확인하기 위하여 각 대사물질의 양에 대한 도파민 양의 비를 계산하여 대조군과 함께 도 4에 함께 도시하였으며, 보고된 바와 같이 대조군에 비해 대사물질/도파민의 비가 DOPAC 및 HVA모두에 대해 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0033] 이와 같은 결과로부터 본 발명에 의한 -/- 마우스에서의 생리적인 신경 전달 물질 변화 양상이 파킨슨병 환자에서 나타나는 현상과 일치함을 알 수 있었다.

[0034] **실시예 3 : 도파민성 뉴런세포 특이적 CRIF1 결손 마우스의 운동 특성 확인**

[0035] **1) 행동성 검사**

[0036] 운동둔화는 인간 파킨슨병의 대표적 증상중 하나이다. 도파민성 뉴런세포 특이적 CRIF1 결손 마우스에서 이러한 운동 둔화가 나타나는지를 알아보기 위하여 행동성 검사를 실시하였다.

[0037] 행동성 검사는 오픈필드실험(open-field test)을 통하여 진행하였고, 모든 실험은 실험용 마우스의 주야간 행동 패턴 변화에 영향을 받지 않기 위하여 주간(오전 9시부터 오후 1시 사이)에만 실시하였다. 실험은 가로 세로 100cm, 높이 45 cm 되는 우리 안에 마우스를 놓고 polytrack video system을 이용하여 녹화 하였고 chromotrack software를 이용하여 데이터를 분석하였다(v4.02b by sandiego instrument, Inc. Sandiego, CA). 한 마리의 실험용 마우스가 우리 안에 들어가 있는 상태에서 우리 안에 존재하는 카메라를 이용하여 마우스의 움직임을 녹화하여 움직인 거리를 각각 비교 분석 하였다. 실험에 사용한 마우스는 실시예 1에서 제조한 +/+, +/-, -/-의 유전자형을 가지는 5주령, 10주령, 15주령 마우스로, 각 그룹별로 다섯 마리씩 운동성을 측정하고 그 결과를 도 5에 도시하였다. 도 5 및 하기 도면에서 *은 -/- 마우스를 +/+ 마우스와 비교했을 때 $P<0.05$ 임을, #은 -/- 마우스를 +/- 마우스와 비교했을 때 $P<0.05$ 임을 나타낸다.

[0038] 도 5의 결과로부터 +/+와 +/- 마우스는 주령에 상관없이 일정한 정도의 운동성을 나타내었고 또 그룹간 차이도 많이 나지 않는 것을 알 수 있었다. 그러나 -/- 마우스의 경우 5주령부터 대조군 마우스에 비하여 심각한 운동 둔화가 관찰되었으며 이러한 둔화 정도는 나이가 많아질수록 더욱더 감소하는 것으로 나타났다.

[0039] **2) 보폭 감소 확인**

[0040] 실시예 1에서 제조된 마우스들에 대해 각각의 세부적인 걷는 양상을 Cat walk 분석을 이용하여 측정하였다. 보다 구체적으로 바닥에서 내부로 형광이 나오고 있는 플라스틱 원통의 한쪽 끝부분 안에 마우스를 올려놓고, 다른 쪽 끝 부분에 먹이를 두어 마우스가 원통 내부를 걸어가게 하였다. 마우스가 형광이 비치는 통 내부를 걸어가면 발자국이 그대로 투영 되는 것을 카메라로 녹화하여 걷는 양상을 확인 하였고 그것을 걸리는 시간에 따라 각각 분석하고 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0041] 도 6에서 RF는 오른쪽 뒷발, LF는 왼쪽 뒷발, RH는 오른쪽 앞발, LH는 왼쪽 앞발에 대한 결과를 나타내며, Stand는 쥐가 땅에 발을 딛고 있는 시간, Swing은 걸음과 걸음 사이의 시간, Stride length는 걸음 사이의 거리, Swing speed는 한걸음 움직이는데 걸리는 속도, Regularity index는 걸음 패턴의 균일성 평가, Average speed는 평균 속도, Cadence는 초당 움직인 걸음 수를 나타낸다.

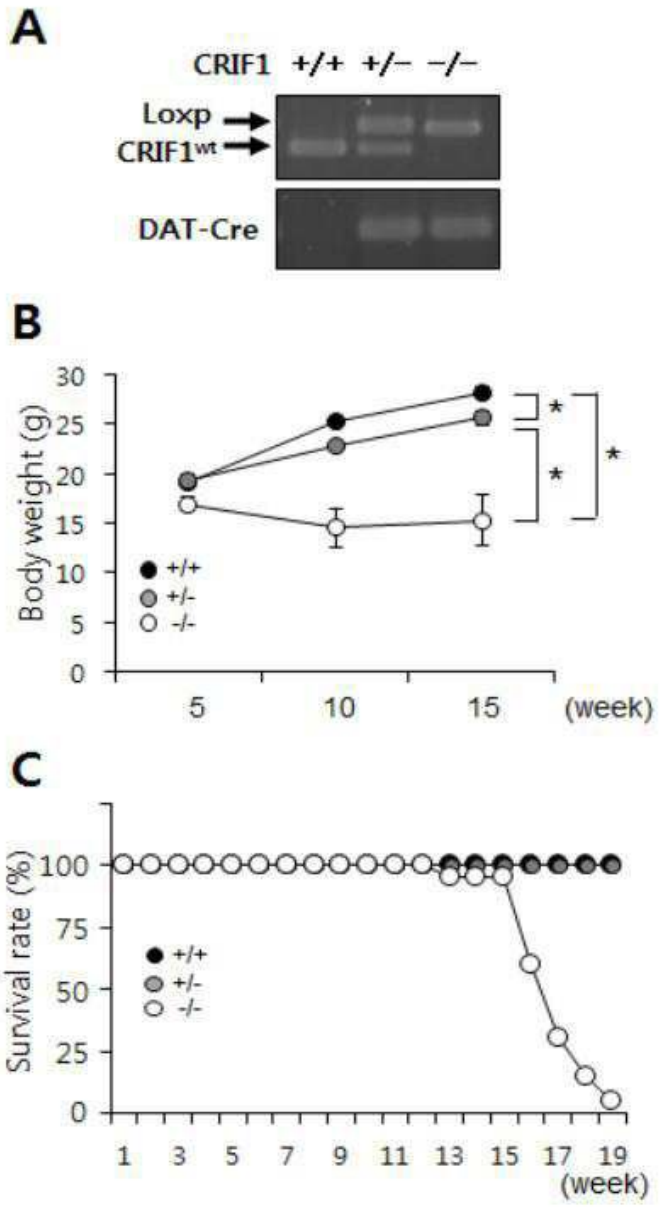
[0042] 도 6으로부터 서있는 시간(stand)은 DAT Crif1 마우스에서 변화가 없었지만 걸음과 걸음 사이의 시간(swing)은 유의성 있게 증가 하였다. 이에 반해 걸음 사이의 거리(stride length)는 감소하였다. 측정된 걸음과 걸음 사이의 시간과 거리 결과로부터 계산한 걸음걸이의 속도(swing speed) 역시 유의하게 DAT crif1 마우스에서 감소하였다. 이상의 결과에서 행동능력의 감소는 마우스의 걸음걸이 속도의 감소에 기인했음을 알 수 있었다.

[0043] **실시예 4 : L-DOPA 투여에 의한 파킨슨병 증세 완화 확인**

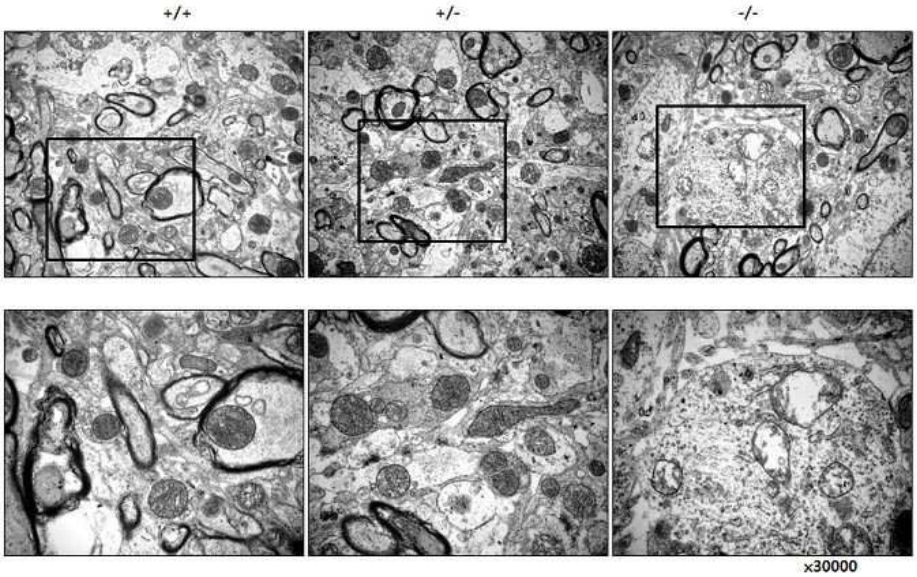
[0044] L-DOPA제제는 현재까지도 파킨슨 병 환자에서 사용하고 있는 대표적인 증상 완화를 위해 치료 약물로써, 환자에게 Levo DOPA/Carbi Dopa(L/C-DOPA)를 투여한 후 행동능력이 회복되는 지를 확인하는 것은 파킨슨 병을 확진할 수 있는 방법 중 하나이다. 이에, 도파민성 뉴런세포 특이적 CRIF1 결손 마우스를 파킨슨병 치료제의 스크리닝에 이용할 수 있는 지 확인하기 위해, 실시예 1에 제조한 10주령 마우스에 L/C-DOPA 와 대조군으로 Saline을 각각 경구투여 하고 한시간 후에 실시예 3과 동일한 방법에 의해 행동성 검사를 하였다. 약물의 투여는 개체의 몸무게에 따라 Levo DOPA (60.75㎍/g)/Carbi Dopa (11.25㎍/g)의 농도가 되도록 투여하였다. 도 6은 L/C-DOPA 또는 Saline을 주입한 그룹의 행동성 결과를 보여주는 그래프로, Saline을 주입한 그룹에서는 도5에서 보여준 10주령 마우스의 결과와 같은 양상을 보임을 알 수 있다. 하지만 L/C-DOPA를 주입한 그룹에서는 +/+, +/- 마우스는 Saline 주입 그룹과 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, -/- 마우스는 행동성이 크게 향상되는 것을 확인할 수 있었다. 이를 응용하면, -/- 마우스를 파킨슨병 치료제의 스크리닝에 이용할 수 있다.

도면

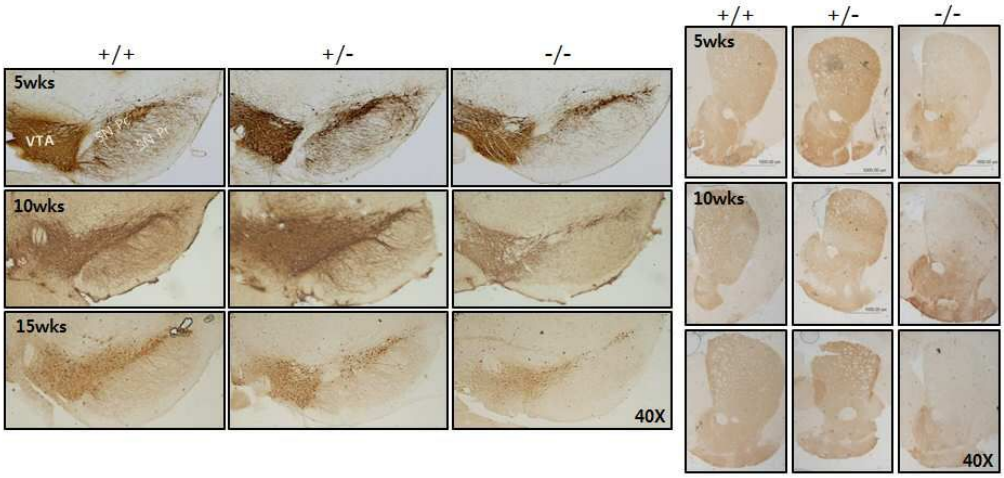
도면1



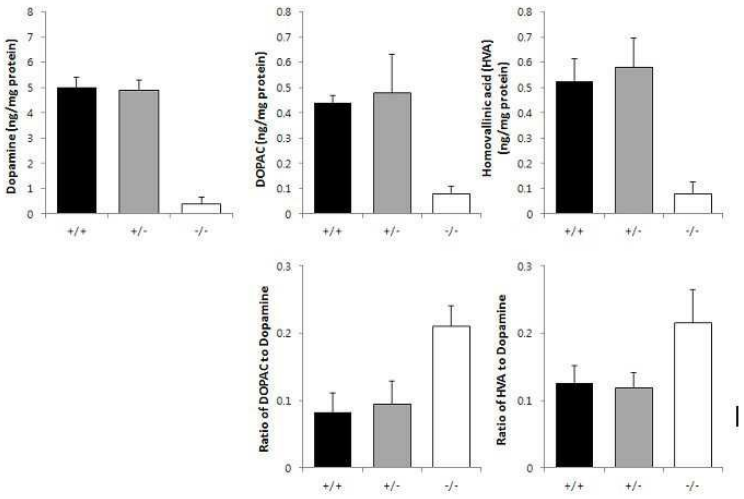
도면2


+/+
+/-
-/-
×30000

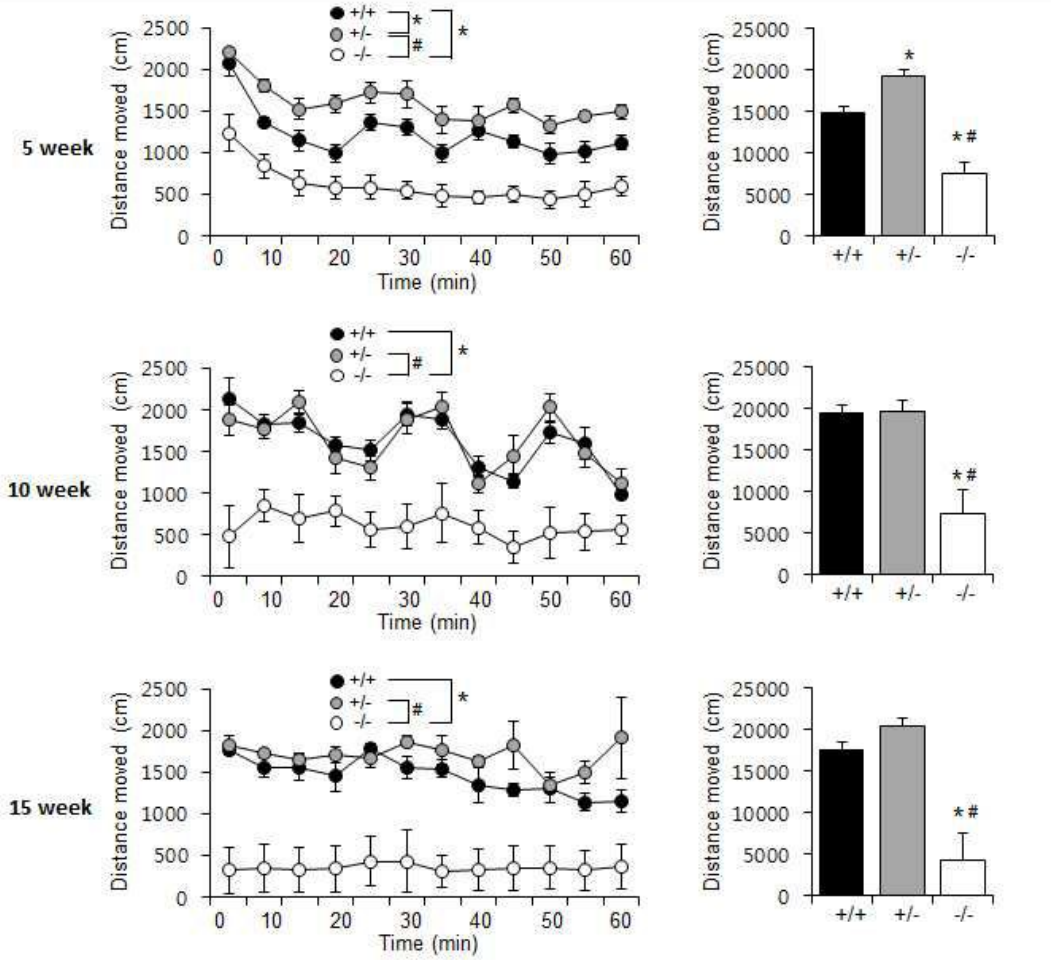
도면3


+/+
+/-
-/-
5wks
VTA
10wks
15wks
40X
+/+
+/-
-/-
5wks
10wks
40X

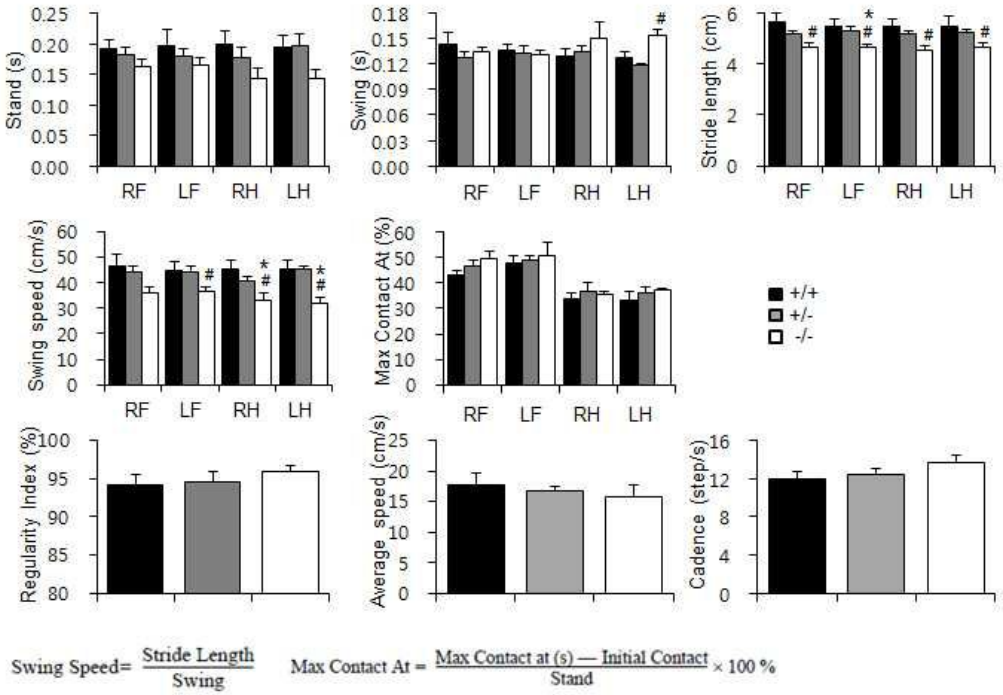
도면4


Dopamine (ng/mg protein)
DOPAC (ng/mg protein)
Homovallinic acid (HVA) (ng/mg protein)
Ratio of DOPAC to Dopamine
Ratio of HVA to Dopamine
+/+
+/-
-/-

도면5

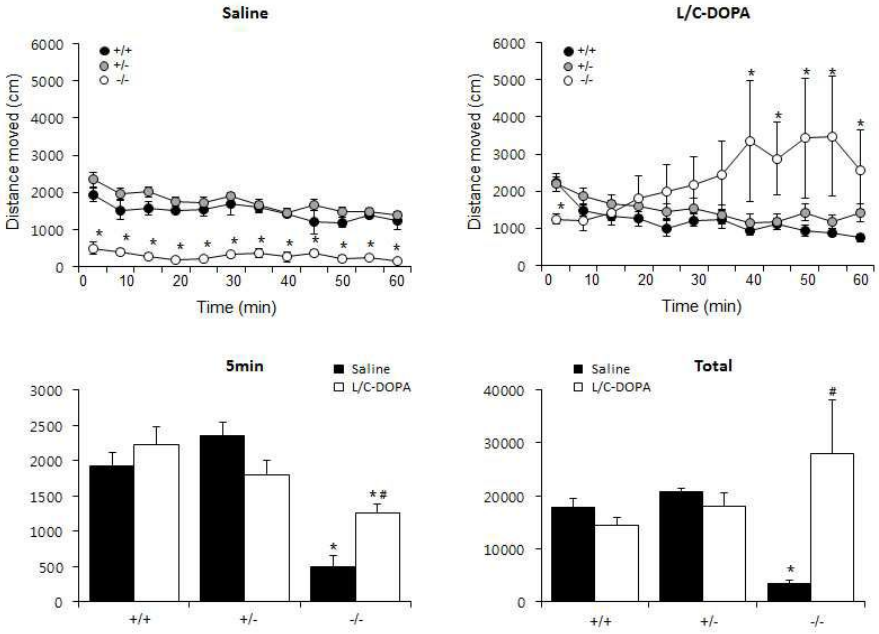


도면6



$$\text{Swing Speed} = \frac{\text{Stride Length}}{\text{Swing}} \qquad \text{Max Contact At} = \frac{\text{Max Contact at (s)} - \text{Initial Contact}}{\text{Stand}} \times 100\,\%$$

도면7


Saline
L/C-DOPA
Distance moved (cm)
Time (min)
+/+
+/-
-/-
5min
Total
Saline
L/C-DOPA
+/+
+/-
-/-