



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0024658
(43) 공개일자 2019년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0276 (2013.01)
G01N 33/5088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0084365
(22) 출원일자 2018년07월19일
심사청구일자 2018년07월19일
(30) 우선권주장
1020170110930 2017년08월31일 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)
황은미
서울특별시 성북구 종암로24가길 80, 101동 504호 (종암동, 래미안라센트)
(74) 대리인
이명진

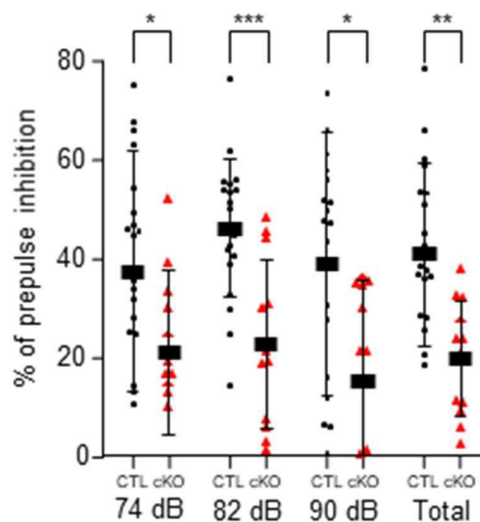
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 조현병 동물모델 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 내측고삐핵의 콜린성 신경세포에서 특이적으로 ANO1(Anoctamin 1) 유전자가 결손된 생쥐인 것을 특징으로 하는 조현병 동물모델 및 이의 제조방법 등에 관한 것이다. 본 발명에 따른 조현병 동물모델은 조현병 발병 기전에 주요하게 작용하는 뇌조직인 내측고삐핵을 표적으로 한 것으로서, 내측고삐핵의 콜린성 신경세포에서 ANO1 유전자가 특이적으로 결손되는 경우 조현병의 양성증상, 음성증상, 및 인지증상이 나타남을 확인하여 조현병이 유발됨을 확인하였는바, 본 발명의 동물모델이 조현병의 발병기전 연구, 치료제 개발 및 스크리닝의 동물모델로 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A01K 2217/075 (2013.01)
A01K 2217/206 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/0318 (2013.01)

이상준

서울특별시 광진구 천호대로127길 33, 102호 (중곡동, 선화빌라11차)

(72) 발명자

임혜인

경기도 성남시 분당구 동판교로52번길 21-13, 301호 (백현동)

조장훈

서울특별시 강남구 선릉로130길 20, 104동 703호 (삼성동, 래미안삼성2차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014M3A9C4066463
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 전통천연물-유전자동의보감사업
연구과제명 막 단백질 네트워크기반 천연물 복합성분의 세포내 기능검증 시스템 개발
기 여 율 40/100
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2016.09.01 ~ 2018.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2014R1A2A1A01007039
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 도약연구지원사업(도전)
연구과제명 Ion channel interactomics 기법을 이용한 별아교세포-신경세포 상호작용 연구
기 여 율 30/100
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2016M3C7A1904149
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 뇌과학원천기술개발사업
연구과제명 막단백 기반 뇌염증 제어기술 개발
기 여 율 30/100
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2016.03.01 ~ 2017.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

내측고삐핵(medial habenula)의 콜린성 신경세포(cholinergic neuron)에서 ANO1(Anoctamin 1) 유전자가 결손(knock-out)된 생쥐인 것을 특징으로 하는, 조현병 동물모델.

청구항 2

ChAT(choline acetyltransferase)-Cre 생쥐와 ANO1(Anoctamin 1) 플록스트(floxed) 생쥐를 교배시켜 2세대 생쥐를 얻는 단계; 및

상기 2세대 생쥐로부터 내측고삐핵(medial habenula)의 콜린성 신경세포(cholinergic neuron)에서 ANO1(Anoctamin 1) 유전자가 발현되지 않는 생쥐를 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 조현병 동물모델의 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 ChAT-Cre 생쥐는 ChAT의 프로모터의 조절 하에 Cre 재조합효소(recombinase)가 발현된 생쥐인 것을 특징으로 하는, 조현병 동물모델의 제조방법.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 ANO1(Anoctamin 1) 플록스트(floxed) 생쥐는 ANO1의 exon8 양 옆에 loxP 염기서열이 삽입된 생쥐인 것을 특징으로 하는, 조현병 동물모델의 제조방법.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 내측고삐핵의 콜린성 신경세포에서 ANO1 유전자가 발현되지 않는 생쥐의 선별은 면역조직화학법(immunohistochemistry)을 통하여 이루어지는 것을 특징으로 하는, 조현병 동물모델의 제조방법.

청구항 6

제1항의 조현병 동물모델에 시험물질을 처리하는 단계;

상기 시험물질 처리 후 조현병 증상을 측정하는 단계; 및

비처리군과 비교하여 상기 조현병 증상이 유의하게 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 조현병 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 시험물질은 조현병 치료제 후보물질인 것을 특징으로 하는, 조현병 치료제의 스크리닝 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 조현병 증상의 측정은 3-chamber test(3CT), 네스렛 파쇄 실험(nestlet shredding test), 수동회피 실험(passive avoidance test), 코카인 민감성 실험(cocaine sensitization test), 또는 선행자극 억제 실험(prepulse inhibition test)을 통해 이루어지는 것을 특징으로 하는, 조현병 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 내측고삐핵(medial habenula)의 콜린성 신경세포(cholinergic neuron)에서 특이적으로 ANO1(Anoctamin 1, TMEM16A) 유전자가 결손(knock-out)된 생쥐인 것을 특징으로 하는 조현병 동물모델 및 이의 제조방법 등에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 조현병(schizophrenia, 정신분열증)은 자기 자신이나 외부 세계에 대한 부적절한 이해, 사고의 혼란, 현실감이 결여된 행동 장애 등을 특징으로 하는 심각한 정신질환으로서, 전세계 인구 중 1%가 대상환자이다. 조현병 증상은 증상의 원인과 진단 기준에 따라 3가지 소분류로 나눌 수 있는데, 가장 일반적으로 양성증상(환각, 망상 등), 음성증상(무욕증, 사회성 결여 등), 인지증상(인지력 장애, 정서장애 등)으로 나눌 수 있다. 1개월 이상 동안 대부분의 특정 증상이 지속되거나, 일부 증상이 6개월 이상 지속되는 경우 조현병으로 간주한다.

[0003] 조현병은 정신심리적인 치료요법과는 별도로 약물치료를 하게 되는데, 기존의 전형적인 항정신성 의약품은 환각, 망상 및 착란 등의 양성 증상을 치료하는데 중점을 두고 있다. 이러한 치료에는 도파민 D2 수용체 길항 약물이 유용한 것으로 알려져 있으며, 구체적으로 할로페리돌(haloperidol), 클로르프로마진(chlorpromazine) 및 플루페나진(fluphenazine) 등이 사용되고 있다. 그러나 조현병의 분자생물학적 발병기전에 대한 연구는 상대적으로 미비한 실정이다.

[0004] 조현병 발병에 주요하게 작용한다고 알려진 뇌조직 또한 전전두엽 피질(prefrontal cortex)과 줄무늬체(striatum)정도로 제한되어 있으며, 인간 유전체 연구가 지속되면서 조현병 발병에 연관된 유전적 요인이 보고되고 있으나, 조현병 발병 빈도의 통계적 연관성을 제시할 뿐, 보고된 대립유전자의 기능이 실제 조현병 발병에 미치는 영향에 대해서는 많이 밝혀지지 않았다. 또한, 환경적 요인이 조현병 발병에 미치는 영향에 관한 연구도 진행되고 있으나, 실제 환자군을 포함한 집단연구(population study)는 비용, 연구대상의 한계 등 현실적 제약으로 인해 정확한 결과를 도출하기 어려운 실정이다. 이에, 임상연구를 보완하기 위해 다양한 조현병 동물모델을 개발하려는 노력이 지속되었으나, 아직 조현병의 분자/유전학적 기전의 연구와 조현병 약물 치료제 검증에 활용하기 위한 적절한 동물모델이 부족한 실정이다.

[0005] 형질전환 동물(transgenic animals)이란 인위적으로 외부의 유전자를 삽입하거나 또는 유전자를 제거하여 의도하는 유전형질을 발현시킨 동물을 말하며, 생명체에서의 특정 유전자의 역할을 파악하는 기초연구에 유용하게 쓰일 수 있다. 즉, 연구하고자 하는 유전자를 삽입 또는 결손시키고, 그 영향이 어떻게 나타나는지를 관찰하여 상기 유전자가 매개하는 생리적 기능을 유추할 수 있다. 뿐만 아니라, 형질전환 동물은 사람 질병의 한 모델로서 사용할 수 있고, 질병의 원인이나 질병의 진행과정 등을 파악하거나 잠재적 치료약품의 효과나 부작용을 알아보는데 매우 유용하게 사용되고 있다. 현재 치매, 암, 심장병, 유전병 등의 질병에 걸린 형질전환 생쥐, 제브라피쉬 등이 개발되고 있으며(국내등록특허 KR 10-1750893), 이 중 조현병 동물모델로는 DISC1(Disrupted in schizophrenia 1), 뉴레귤린1(Neuregulin1: NRG1), DTNBP1(dystrobrevin-binding protein 1), 및 릴린(reelin) 돌연변이 유전자 도입 생쥐모델 등이 알려져 있다.

[0006] 한편, ANO1(anoctamin 1, TMEM16A) 유전자는 염색체 밴드 11q13에 위치하고 두경부암, 유방암, 전립선암과 같은 다양한 암세포들에서 과발현되어 있다. ANO1(Anoctamin 1) 단백질은 2007년에 칼슘에 의해 활성화되는 염소 이

온통로로서 그 역할이 규명되면서 전기생리학적 기법 등을 이용한 기능 연구가 활발하게 진행되어 왔다. ANO1 발현이 증가한 암세포 등의 경우에서, ANO1 유전자 자체의 발현을 억제하였을 경우 암세포의 성장이 억제되는 결과가 최근 밝혀지면서, 새로운 항암 치료의 타겟으로 주목받고 있다. 하지만, 조현병과 ANO1 유전자의 상관관계에 대하여는 전혀 밝혀진 바가 없다.

[0007] 이에, 본 발명자들은 신규한 조현병 동물모델을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 내측고삐핵(medial habenula)의 콜린성 신경세포(cholinergic neuron)에서 특이적으로 ANO1 유전자가 결손된 생쥐가 조현병 증상들을 보임을 확인하였고, 이를 이용하여 조현병 동물모델로 사용할 수 있는 형질전환 동물을 효과적으로 제조할 수 있다는 것을 발명하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1750893호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명자들은 조현병 발병에 관여하는 뇌조직에 대하여 연구하던 중, 내측고삐핵의 콜린성 신경세포에서 특이적으로 ANO1 유전자가 결손된 생쥐가 조현병 증상들을 보인다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 조현병 동물모델과 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0011] 또한, 본 발명의 다른 목적은 조현병 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 내측고삐핵(medial habenula)의 콜린성 신경세포(cholinergic neuron)에서 ANO1(Anoctamin 1) 유전자가 결손(knock-out)된 생쥐인 것을 특징으로 하는, 조현병 동물모델을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 생쥐는 동형접합체(homozygote) 또는 이형접합체(heterozygote)일 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 ChAT(choline acetyltransferase)-Cre 생쥐와 ANO1(Anoctamin 1) 플록스드(floxed) 생쥐를 교배시켜 2세대 생쥐를 얻는 단계; 및 상기 2세대 생쥐로부터 내측고삐핵(medial habenula)의 콜린성 신경세포(cholinergic neuron)에서 ANO1(Anoctamin 1) 유전자가 발현되지 않는 생쥐를 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 조현병 동물모델의 제조방법을 제공한다.

[0016] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 ChAT-Cre 생쥐는 ChAT의 프로모터의 조절 하에 Cre 재조합효소(recombinase)가 발현된 생쥐일 수 있다.

[0017] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 ANO1(Anoctamin 1) 플록스드(floxed) 생쥐는 ANO1의 exon8 양 옆에 loxP 염기서열이 삽입된 생쥐일 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 내측고삐핵(medial habenula)의 콜린성 신경세포에서 ANO1 유전자가 발현되지 않는 생쥐의 선별은 중합효소연쇄반응(PCR)방법과 면역조직화학법(immunohistochemistry)을 통하여 이루어지는 것일 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기 조현병 동물모델에 시험물질을 처리하는 단계; 상기 시험물질 처리 후 조현병 증상을 측정하는 단계; 및 비처리군과 비교하여 상기 조현병 증상이 유의하게 감소한 시험물질을 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 조현병 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 시험물질은 조현병 치료제 후보물질인 것일 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 조현병 증상의 측정은 3-chamber test(3CT), 네스렛 파쇄 실험(nestlet shredding test), 수동회피 실험(passive avoidance test), 코카인 민감성 실험(cocaine sensitization test), 또는 선행자극 억제 실험(prepulse inhibition test)을 통해 이루어지는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명에 따른 조현병 동물모델은 기존에 알려진 DISC1, NRG1, DTNBP1, 및 Reelin 돌연변이 유전자 도입 조현병 동물모델과 달리 조현병 발병기전에 주요하게 작용하는 뇌조직인 내측고삐핵을 표적으로 한 새로운 유전적 모델로서, 내측고삐핵의 콜린성 신경세포에서 ANO1(Anoctamin 1) 유전자가 특이적으로 결손된 생쥐에서 조현병 환자가 갖는 양성증상, 음성증상, 및 인지증상이 나타남을 확인하였는바, 복잡적이고 다양한 증상을 수반하는 대다수의 조현병 환자 집단을 대체할 수 있는 이상적인 동물모델이 될 것으로 기대된다. 또한, 본 발명의 동물 모델은 조현병의 유전적/환경적 요인과 행동 이상의 연관성을 밝히고, 조현병 치료 약물을 스크리닝하고, 이를 검증하는 것에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1a는 본 발명의 내측고삐핵의 콜린성 신경세포에서 ANO1 유전자가 결손된 생쥐의 제조방법을 나타낸 모식도이다.

도 1b는 본 발명에 따라 제조된 생쥐(cKO)가 내측고삐핵의 콜린성 신경세포에서 특이적으로 ANO1 유전자가 결손된 생쥐인지 면역조직화학법(immunohistochemistry)을 통해 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 2a 내지 도 2c는 본 발명에 따라 제조된 생쥐(cKO)와 정상 생쥐(CTL)의 3-chamber test(3CT) 결과를 나타낸 도면으로, 도 2a는 본 발명에 따라 제조된 생쥐(cKO)와 정상 생쥐(CTL)의 각 챔버에서 보내는 시간 및 선호도를 나타낸 도면이고, 도 2b는 본 발명에 따라 제조된 생쥐(cKO)와 정상 생쥐(CTL)의 무생물인 물체(0)와 살아있는 생쥐(S1)에 대한 관심 정도를 나타낸 도면이며, 도 2c는 본 발명에 따라 제조된 생쥐(cKO)와 정상 생쥐(CTL)의 도 2b에서의 살아있는 생쥐(S1)와 새로운 생쥐(S2)에 대한 관심 정도를 나타낸 도면이다.

도 3은 본 발명에 따라 제조된 생쥐(cKO)와 정상 생쥐(CTL)의 네스렛 파쇄 실험 (nestlet shredding test) 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 본 발명에 따라 제조된 생쥐(cKO)와 정상 생쥐(CTL)의 수동회피 실험 (passive avoidance test) 결과를 나타낸 도면이다.

도 5는 본 발명에 따라 제조된 생쥐(cKO)와 정상 생쥐(CTL)의 선행자극 억제 실험(PPI test) 결과를 나타낸 도면이다.

도 6은 본 발명에 따라 제조된 생쥐(cKO)와 정상 생쥐(CTL)의 선행자극 억제 실험(PPI test)에서 할로페리돌(haloperidol) 효과를 나타낸 도면이다.

도 7은 본 발명에 따라 제조된 생쥐(cKO)와 정상 생쥐(CTL)의 코카인 민감성 실험(cocaine sensitization test) 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명자들은 Cre/Lox genetic system을 이용하여 내측고삐핵(medial habenula)의 콜린성 신경세포(cholinergic neuron)에서 특이적으로 ANO1(Anoctamin 1) 유전자가 결손(knock-out)된 생쥐를 제조하였고(도 1a 및 실시예 1 참조), 상기 제조한 생쥐가 조현병의 음성증상, 양성증상, 및 인지증상을 모두 보임을 확인하여, 본 발명의 동물모델이 조현병의 분자/유전학적 기전의 연구와 조현병 치료를 위한 약물 검증을 위한 효과적인 동물모델로써 이용될 수 있음을 확인하였다. 이에, 본 발명은 내측고삐핵의 콜린성 신경세포에서 특이적으로 ANO1유전자가 결손된 조현병 동물모델과 이의 제조방법, 및 이를 이용한 조현병 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

[0025] 본 발명에서 "내측고삐핵(medial habenula)"은 다양한 뇌영역들에서 신경신호를 전달받는 뇌조직으로서, 기저핵 및 대뇌변연계로부터 신경신호를 전달받아 도파민 및 세로토닌 신경세포를 함유하는 전뇌 및 중뇌 구조로 신경신호를 내보내며, 통증 진행, 생식 활동, 영양, 수면-각성(sleep-wake) 주기, 스트레스 반응, 및 학습 등과 연관이 있다.

- [0026] 본 발명에서 "콜린성 신경세포(cholinergic neuron)"는 신경전달물질로서 아세틸콜린을 분비하는 신경세포를 의미한다. 상기 콜린성 신경세포는 동물의 뇌신경계 질환의 유발에 직접적으로 관여하는 것으로 알려져 있는데, 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성 측색경화증 등의 다양한 퇴행성 뇌질환의 발병 시에 콜린성 신경세포의 손상이 수반된다고 알려져 있다.
- [0027] 본 발명에서 "ANO1(anoctamin 1)"는 Transmembrane member 16A (TMEM16A)를 암호화 하는 유전자로도 알려져 있으며, 염소 이온통로의 유전자이다. 상기 염소 이온통로는 염소 음이온을 평활근과 상피세포 밖으로 내보내어 세포로부터의 수분 분비에 관여하며, 인체는 이 과정을 통해 침, 눈물 및 땀의 분비, 콩팥 및 위장에서의 수분 흡수 등의 생체활동을 한다.
- [0028] 본 발명에서 "내측고삐핵의 콜린성 신경세포에서 특이적으로 ANO1 유전자가 결손된"이란 다른 조직에서는 ANO1 유전자가 발현되나, 내측고삐핵에 있는 콜린성 신경세포에서만 ANO1 유전자가 조건부 결손(conditional knock-out, cKO)된 것을 의미한다.
- [0029] 본 발명에서 사용되는 용어 "결손(knock-out)"은 유전자의 부분적, 실질적, 완전한 결손, 또는 비활성화를 의미한다.
- [0030] 또한, 본 발명은 Cre/Lox genetic system를 이용하여 ChAT(choline acetyltransferase)-Cre 생쥐와 ANO1(Anoctamin 1) 플록스드(floxed) 생쥐를 교배시켜 2세대 생쥐를 얻는 단계; 및 상기 2세대 생쥐로부터 내측고삐핵(medial habenula)의 콜린성 신경세포에서 ANO1 유전자가 발현되지 않는 생쥐를 선별하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는, 조현병 동물모델의 제조방법을 제공한다.
- [0031] 본 발명에서 "Cre/Lox genetic system"은 P1 박테리오파지에서 유래된 2가지 유전자(Cre 및 Lox)의 발현을 조절하는 강력한 시스템으로, 특히 생쥐의 형질전환분야에서 잘 정립된 연구 도구이다. Cre 재조합효소(recombinase)는 동일한 또는 별도의 DNA 조각상에 위치할 수 있는 두 개의 loxP 사이트 사이에서 부위 특이적 재조합을 촉매 한다. 단일 loxP 사이트의 두 13bp 반복서열은 Cre 단백질과 인식 및 결합하여 이량체를 형성하고, 두 개의 loxP 사이트는 평행 배향으로 정렬되어 4 개의 Cre 단백질과 사량체를 형성한다. 각 loxP 사이트의 코어 스페이스(core spacer) 내에서 이중가닥 DNA의 절단이 일어나고, 두 가닥이 연결되어 상호 교차하여 DNA가 삭제(deletion)됨으로써, 원하는 DNA를 가지는 형질전환 동물을 얻을 수 있다.
- [0032] 한편, 본 발명의 조현병 동물모델은 인간을 제외하고 케이지 안에서 사육할 수 있는 동물이라면 제한되지 아니하며, 설치류, 토끼, 및 원숭이 등을 포함하나, 바람직하게는 실험용 쥐(mouse 및 rat)일 수 있다.
- [0033] 설치류에 속하는 쥐는 동물실험에 가장 많이 이용되는 것으로서, 특히 실험용 쥐는 마우스(mus musculus: mouse) 및 래트(rattus norvegicus: rat) 등이 있으며, 기르기 쉽고, 번식이 빠르며, 가격이 저렴하다는 점에서 실험동물로서 유리하고, 조현병 환자의 다양한 증상과 대응되는 행동 양상에 대한 연구가 숙성되어, 조현병 동물모델로써 보다 적합하다. 본 발명에서 실험용 쥐는 마우스와 래트를 포함하는 의미로 사용되며, 본 명세서에서 실험용 쥐는 생쥐라고 호칭한다.
- [0034] 본 발명에서, 상기 조현병 증상의 측정은 3-chamber test(3CT), 선행자극 억제 실험(prepulse inhibition test), 집짓기 행동 테스트(Nesting behavior test), 면도 행동(barbering behavior) 테스트, 또는 사회적 우위 테스트(Social dominance test) 등에 의해 수행될 수 있고, 바람직하게는 3-chamber test(3CT), 네스렛 파쇄 실험(nestlet shredding test), 수동회피 실험(passive avoidance test), 코카인 민감성 실험(cocaine sensitization test), 또는 선행자극 억제 실험(prepulse inhibition test)에 의해 수행될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 본 발명의 일실시예에서, 내측고삐핵의 콜린성 신경세포 특이적으로 ANO1 염소 이온통로 유전자 발현이 결손된 유전자변형 생쥐를 만들기 위하여 콜린성 신경세포의 특이적 발현 유전자인 choline acetyltransferase (ChAT)의 프로모터의 조절 하에 Cre 재조합효소(recombinase)가 발현되는 ChAT-Cre 생쥐와 ANO1의 exon8 양 옆에 loxP 염기서열이 삽입된 ANO1 플록스드(floxed) 생쥐를 교배하여 콜린성 신경세포에서 Cre 재조합효소에 의해 ANO1 유전자의 exon8이 제거됨으로써, 내측고삐핵의 콜린성 신경세포에서 선택적으로 ANO1 이온통로의 발현이 제거된 생쥐를 제조하였다(도 1a 및 실시예 1 참조). 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 제조한 생쥐(cKO)가 내측고삐핵의 콜린성 신경세포에서 특이적으로 ANO1 유전자가 결손된 생쥐인지 확인하기 위하여 ANO1 이온통로 단백질에 대한 항체 및 ChAT 단백질에 대한 항체와 세포핵 표지를 위한 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindol)를 이용하여 면역조직화학법(immunohistochemistry)을 수행하여 내측고삐핵의 콜린성 신경세포에서 특이적으로 ANO1 유전자가 결손된 생쥐(cKO) 내측고삐핵의 콜린성 신경세포에서 ANO1 이온통로 단백질의 발현이 완벽히 제거됨을

확인하였다(도 1b 및 실시예 1 참조).

- [0036] 한편, 본 발명의 동물모델을 이용하여 연구하기 위한 “조현병(schizophrenia)”은 다양한 증상이 복합적으로 나타나는 정신질환으로, 다른 정신질환과 구별되는 특징적인 증상뿐만 아니라, 우울증 등과 같은 다양한 정신질환에서도 진단될 수 있는 증상도 동반하기 때문에 조현병 진단 시 종합적인 판단이 중요하다.
- [0037] 앞서 언급된 바와 같이, 조현병 증상은 증상의 원인과 진단 기준에 따라 양성증상(positive symptom), 음성증상(negative symptom), 및 인지증상(cognitive symptom)으로 분류할 수 있다. 각각의 증상은 조현병 동물모델에서 나타나는 대표적인 행동 양식에 대응해 구분될 수 있다.
- [0038] 한편, 조현병의 음성증상은 정서적이고 능동적인 기능이 약화되거나 없어지는 현상을 말하는데, 동물모델에서는 사회적 상호작용 검사(social interaction test)를 통해 확인할 수 있다.
- [0039] 조현병 환자에서 나타나는 사회적 동기의 결여(사회적 격리 및 사회적 위축을 포함하는 의미)는 조현병 음성증상의 형태 중 하나로서 조현병 동물모델에서는 개체간의 친밀도를 측정하는 행동실험 기법이 적용된다. 사회적 동물인 생쥐는 기본적으로 동종의 다른 생쥐를 만났을 때 호기심과 친밀도를 표현하는데, 조현병 동물모델에서는 이러한 사회적 표현이 결여되는 것을 특정한 실험 환경에서 확인할 수 있다. 예를 들어 격리된 동종의 생쥐가 있는 장소에 대한 장소 선호(place preference)가 감소되는 경우가 그러하다. 또한, 설치류에서 보금자리를 만드는 행동(nesting behavior) 역시 협력과 사회성을 반영하는 본성으로 알려져 있기 때문에 사회성의 중요한 지표로 활용될 수 있다. 정상 생쥐의 경우 보금자리 물질(nesting material)을 활용하여 둥지 모양의 형태를 만들어 내는 반면, 조현병 모델 생쥐의 경우 이러한 행동 특성이 상대적으로 결여되어 있다.
- [0040] 이에, 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명자들은 본 발명의 동물모델이 조현병의 음성증상을 나타내는지 확인하기 위하여 3CT 행동실험(3-chamber test)과 네스렛 파쇄 실험(nestlet shredding test)을 수행하였다. 그 결과, 본 발명의 내측고배핵의 콜린성 신경세포 특이적 ANO1 유전자 결손 생쥐(cKO)는 정상 생쥐(CTL)와 비교하여 동종 생쥐에 대한 관심도가 매우 낮음을 확인할 수 있었으며, 보금자리를 만드는 행동 양상이 감소됨을 확인할 수 있었다(실시예 2 및 실시예 3 참조). 상기로부터 본 발명의 동물모델이 조현병 음성증상의 연구를 위한 적절한 동물모델로 제공될 수 있음을 알 수 있다.
- [0041] 또한, 조현병의 인지증상은 주의력 결핍, 감각운동 동기 이상 등이 있다. 특정 자극에 대한 학습 내용을 다른 결과로 대체하기 어려운 현상을 잠재적 억제라 하는데, 조현병 환자들은 이러한 잠재적 억제 능력이 비정상적인 것으로 밝혀져 있다. 동물모델에서는 공포 조건화(fear conditioning) 패러다임을 통해 잠재적 억제를 측정한다.
- [0042] 이에, 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명자들은 본 발명의 동물모델이 조현병의 인지증상을 나타내는지 확인하기 위하여 수동회피 실험(passive avoidance test)을 수행하였다. 그 결과, 본 발명의 내측고배핵의 콜린성 신경세포 특이적 ANO1 유전자 결손 생쥐(cKO)는 정상 생쥐(CTL)와 비교하여 부정적 자극에 대한 학습 및 기억의 약화로 상기 자극에 다시 진입하는 시간이 짧았다(실시예 4 참조). 상기로부터 본 발명의 동물모델이 조현병 인지증상의 연구를 위한 적절한 동물모델로 제공될 수 있음을 알 수 있다.
- [0043] 또한, 조현병의 양성증상은 망상, 환각, 위협적인 언변, 환청 등과 같이 동물 모델에서 구현하고 확인하기 어려운 증상이지만 일부 행동 양상은 조현병 동물 모델에서 선행자극 억제 (prepulse inhibition: PPI) 실험과 향정신성 약물(예를들어 코카인)에 대한 민감성 측정 실험을 통해 간접적으로 확인할 수 있다.
- [0044] 보통 정상인의 경우 강한 감각 자극에 최초로 반응하는 정도보다 반복된 동일한 자극에 둔감한 반응을 나타내는 데, 조현병 환자들은 반복적인 감각 자극에도 과민하게 반응하는 것으로 알려져 있다. 조현병 환자에서 나타나는 이러한 선행자극 억제(prepulse inhibition: PPI)의 감소 현상은 조현병 동물모델에서도 거의 동일한 방식으로 측정하여 확인할 수 있다. 또한, 도파민 시스템을 자극하는 코카인(cocaine)은 정상인에게 정신병을 유발하거나 조현병 환자의 증상을 더 악화시키는 것으로 알려져 있다. 생쥐 동물모델 역시 코카인에 반응하여 조현병 환자와 유사한 과다활동(hyperactivity)을 보이는데, 이는 양성증상과 연관된 하나의 행동으로 간주된다.
- [0045] 이에, 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명자들은 본 발명의 동물모델이 조현병의 양성증상을 나타내는지 확인하기 위하여 선행자극 억제 실험(prepulse inhibition test)을 수행하였다. 그 결과, 반복적 자극에 대한 반응이 그대로 유지되어 선행자극에 대한 억제 현상이 감소됨을 확인할 수 있었다. 또한, 본 발명의 동물모델에 조현병 증상 완화제로 임상에서 사용되는 할로페리돌(Haloperidol)을 투여한 결과 선행자극 억제 현상이 정상 생쥐 수준으로 회복됨을 확인하였다(실시예 5 참조). 또한, 본 발명자들은 본 발명의 동물모델이 나타내는 조현병 양성증상을 보다 다방면에서 확인하기 위하여 코카인에 대한 민감성 측정 실험(cocaine sensitization test)을

수행하였다. 그 결과, 본 발명의 내측고삐핵의 콜린성 신경세포 특이적 ANO1 유전자 결손 생쥐(cKO)는 정상 생쥐(CTL)와 비교하여 월등하게 큰 폭의 움직임을 나타내었는바, 본 발명의 동물모델은 항정신성 약물에 대하여 민감하게 반응하여 조현병 양성증상의 연구를 위한 적절한 동물모델로 제공될 수 있음을 확인하였다(실시예 6 참조). 상기로부터 본 발명의 동물모델이 조현병 양성증상의 연구를 위한 적절한 동물모델로 제공될 수 있음을 알 수 있다.

[0046] 즉, 본 발명에 따른 내측고삐핵의 콜린성 신경세포 특이적 ANO1 유전자 결손 생쥐는 조현병에서 나타나는 양성 증상, 음성증상, 및 인지증상을 모두 나타내어 복합적이고 다양한 증상을 수반하는 대다수의 조현병 환자 집단을 대변할 수 있는 이상적인 동물모델로써, 조현병의 연구를 위한 유용한 동물모델로 이용될 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명의 동물모델을 활용하여 유전적/환경적 요인과 행동 이상의 연관성을 밝히고, 조현병 치료 약물을 스크리닝하고, 이를 검증하는 것에 유용하게 이용될 수 있다.

[0049] 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.

[0051] **실시예 1. Cre/Lox genetic system을 이용한 내측고삐핵(medial habenula)의 콜린성 신경세포(cholinergic neuron)에서 특이적으로 ANO1(Anoctamin 1) 유전자가 결손(knock-out)된 생쥐의 제조**

[0052] 내측고삐핵의 콜린성 신경세포 특이적으로 ANO1 염소 이온통로 유전자 발현이 결손된 유전자변형 생쥐를 만들기 위하여 콜린성 신경세포의 특이적 발현 유전자인 choline acetyltransferase (ChAT)의 프로모터의 조절 하에 Cre 재조합효소(recombinase)가 발현되는 ChAT-Cre 생쥐와 ANO1의 exon8 양 옆에 loxP 염기서열이 삽입된 ANO1 플록스드(floxed) 생쥐(Cho et al., 2012 Nature Neuroscience 15, 1015; KIST 오우택 교수님 제조)를 교배하였다. 상기 교배에 의해 만들어진 생쥐는 콜린성 신경세포에서 Cre 재조합효소에 의해 ANO1 유전자의 exon8이 제거됨으로써, 내측고삐핵의 콜린성 신경세포에서 선택적으로 ANO1 이온통로의 발현이 제거된 생쥐를 제조하였다(도 1a 참조).

[0053] 상기 제조한 생쥐(cKO)가 내측고삐핵의 콜린성 신경세포에서 특이적으로 ANO1 유전자가 결손된 생쥐인지 확인하기 위하여, ANO1 이온통로 단백질에 대한 항체(Abcam 제조) 및 ChAT 단백질에 대한 항체(Merck Milipore 제조)와 세포핵 표지를 위한 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindol)(Sigma-Aldrich, USA 제조)를 이용하여 면역조직화학법(immunohistochemistry)을 수행하였다. 대조군으로는 정상 생쥐(CTL)가 사용되었다. 세포핵표지 DAPI 신호는 파란색(도 1b의 왼쪽패널 참조), ANO1 이온통로 단백질이 발현되는 경우 녹색(도 1b의 중앙패널 참조), ANO1 이온통로 단백질과 ChAT 단백질이 함께 발현되는 경우 노란색, ChAT 단백질만 발현되는 경우 빨간색(도 1b의 오른쪽패널 참조)으로 표시하였다.

[0054] 그 결과, 도 1b에 나타난 바와 같이, 정상 생쥐(CTL)와 내측고삐핵(medial habenula)의 콜린성 신경세포(cholinergic neuron)에서 특이적으로 ANO1 유전자가 결손된 생쥐(cKO) 모두에서 ChAT 단백질이 발현되는 것을 확인하였으나, 내측고삐핵의 콜린성 신경세포 특이적으로 ANO1 유전자가 결손된 생쥐(cKO)에서는 내측고삐핵의 콜린성 신경세포에서 ANO1 이온통로 단백질의 발현이 완벽히 제거됨을 확인하였다.

[0056] **실시예 2. 3CT(3-chamber test) 행동실험**

[0057] 상기 실시예 1의 방법으로 제조한 내측고삐핵의 콜린성 신경세포 특이적 ANO1 유전자 결손 생쥐가 조현병 음성 증상을 나타내는지 확인하기 위하여 생쥐의 사회성을 확인하는 행동 실험 중 가장 널리 사용되는 3CT(3-chamber test) 행동실험을 수행하였다. 구체적으로, 투명한 벽을 통해 분리된 연속된 3개의 방 중 가운데 방에 측정 생쥐(8 내지 14주령, male)를 EthoVision XT 11.5(Noldus, Netherlands 제조)에 위치시키고, 양쪽 방 중 한쪽 방에 다른 생쥐(S1)를, 반대편 방에는 무생물인 물체(O)(도 2b 참조) 또는 도 2b에서의 살아있는 생쥐(S1)과 새로운 생쥐(S2)(도 2c 참조)를 놓아두었으며, 오래 머문 자리일수록 붉은색으로 표시하였다. 테스트는 10분간 수행하였고, 대조군으로는 한배 새끼(littermate)인 정상 생쥐(CTL)가 사용되었다.

[0058] 그 결과, 도 2a의 왼쪽 두 개의 패널 및 도 2b에 나타난 바와 같이, 정상생쥐(CTL)는 무생물인 물체(O)보다 살아있는 생쥐(S1)에 유의하게 관심을 보이는 반면, 내측고삐핵(medial habenula)의 콜린성 신경세포(cholinergic

neuron)에서 특이적으로 ANO1 유전자가 결손된 생쥐(cKO)는 물체(O)와 살아있는 생쥐(S1)에 대한 관심의 정도가 비슷함을 확인하였다.

[0059] 또한, 도 2a이 오른쪽 두 개의 패널 및 도 2c에 나타난 바와 같이, 정상 생쥐(CTL)는 도 2b에서의 살아있는 생쥐(S1)보다 새로운 생쥐(S2)에 관심을 보이는 반면, 내측고삐핵(medial habenula)의 콜린성 신경세포(cholinergic neuron)에서 특이적으로 ANO1 유전자가 결손된 생쥐(cKO)는 물체(O)와 살아있는 생쥐(S1)에 대한 관심의 정도가 비슷함을 확인하였다.

[0060] 상기로 부터 내측고삐핵의 콜린성 신경세포 특이적으로 ANO1 유전자가 결손된 생쥐(cKO)가 동종의 생쥐에 대한 호기심과 친밀도가 감소하고 사회적 감성이 결여 증상을 나타냄을 알 수 있다.

[0062] 실시예 3. 네스렛 파쇄 실험 (nestlet shredding test)

[0063] 상기 실시예 3에서 사회성 결여 확인실험에 이어서, 상기 실시예 1의 방법으로 제조한 내측고삐핵의 콜린성 신경세포 특이적 ANO1 유전자 결손 생쥐가 보다 다방면에서 조현병의 음성증상이 나타나는지 확인하기 위하여 네스렛 파쇄 실험을 수행하였다. 구체적으로, 미리 무게를 측정된 네스렛 (5×5 cm)과 측정 생쥐 한 마리를 투명한 플라스틱 생쥐 케이지 (19×29×13 cm)에 넣었다. 한시간 후 파쇄되지 않은 네스렛의 무게를 측정하여, ANO1 유전자 결손 생쥐(cKO)가 파쇄한 네스렛의 무게와 정상 생쥐가 파쇄한 네스렛의 무게를 비교하였다.

[0064] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 내측고삐핵의 콜린성 신경세포 특이적으로 ANO1 유전자가 결손된 생쥐(cKO)는 정상생쥐(CTL)보다 네스렛 파쇄 양이 적었으며, 정상생쥐가 ANO1 유전자 결손 생쥐(cKO)보다 약 두배 이상의 네스렛을 파쇄하여 보금자리를 만들고자 하는 양상을 나타냄을 확인할 수 있었다. 상기로부터, ANO1 유전자 결손 생쥐(cKO)가 협력과 사회성을 반영하는 본성이 정상생쥐보다 감소된 양상을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0066] 실시예 4. 수동회피 실험 (passive avoidance test)

[0067] 상기 실시예 1의 방법으로 제조한 내측고삐핵의 콜린성 신경세포 특이적 ANO1 유전자 결손 생쥐가 조현병 인지 증상을 나타내는지 확인하기 위하여 생쥐의 학습력과 기억능력을 확인하는 행동 실험 중 가장 널리 사용되는 수동회피실험을 수행하였다. 구체적으로 측정 생쥐를 조용하고 어두운 실험공간에서 적어도 20분 동안 안정시킨 후, 각각의 생쥐를 방 두 개 중 실험공간의 밝은 부분에 놓는다. 1분후 어두운 다른 쪽 방으로 향한 문을 열어 생쥐가 들어갈 수 있도록 하였다. 생쥐의 온몸이 어두운 방으로 들어가면 문이 닫히고 방바닥으로 전기적인 고통(0.45 mV, 2초간)을 가하였다. 다음날 다시 동일한 실험을 반복하나, 어두운 방에 들어갔을 때 전기적 고통을 주지 않았다. 이때, 생쥐가 어두운 공간으로 들어가는데 걸리는 시간을 측정하여 그 전날의 시간과 비교하여, 생쥐의 학습 및 기억에 의한 회피행동을 관찰하였다.

[0068] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 내측고삐핵의 콜린성 신경세포 특이적으로 ANO1 유전자가 결손된 생쥐(cKO)는 정상생쥐(CTL)보다 다시 어두운 공간으로 들어가는데 걸리는 시간이 짧았으며, 정상생쥐보다 ANO1 유전자 결손 생쥐(cKO)가 약 두배 빠르게 어두운 공간으로 진입하였다. 상기로부터, ANO1 유전자 결손 생쥐(cKO)가 부정적 자극에 대한 기억과 학습이 정상생쥐보다 부족한 양상을 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0070] 실시예 5. 선행자극 억제 실험(prepulse inhibition test: PPI test)

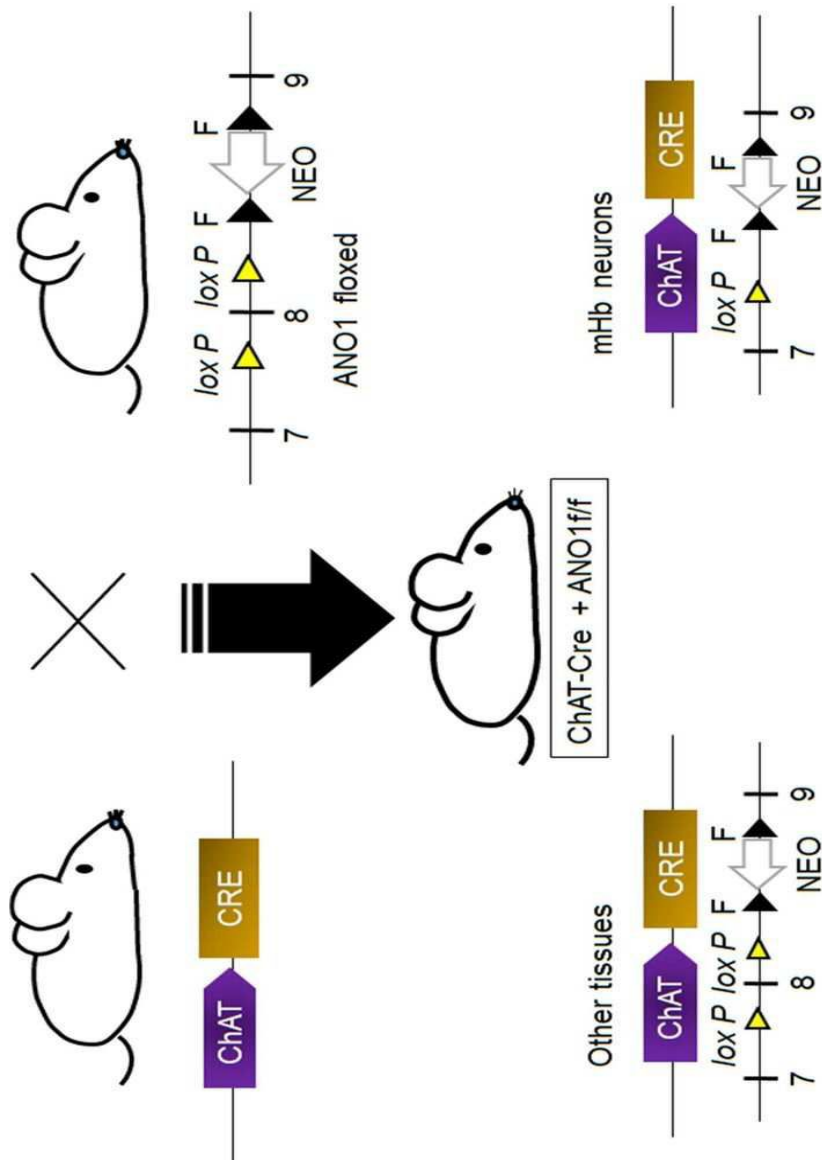
[0071] 상기 실시예 1의 방법으로 제조한 내측고삐핵의 콜린성 신경세포 특이적 ANO1 유전자 결손 생쥐가 조현병의 양성증상이 나타나는지 확인하기 위하여 청각 자극에 대하여 놀라는 정도를 측정하는 선행자극 억제 실험을 수행하였다. 구체적으로, 8 내지 14주령의 각각 8 마리 수컷 생쥐에 대해 하나의 청각놀람 챔버(acoustic startle chamber, Coulbourn instrument)를 사용하여 한번에 8 마리씩 수행하였다. 놀람 반사는 65 dB의 백색소음 분출(SS) 형태의 펄스 자극으로 가해졌다. SS-유도 놀람반응 억제는 100 msec의 SS가 선행되는 다양한 강도(74, 82, 및 90 dB 백색소음)의 120 mB, 40 msec 전펄스(prepulse) 자극을 사용하여 수행하였다.

[0072] 테스트는 연속적인 7개의 블록으로 구성되었는데 각각의 블록은 8가지 다른 시험형(trial type, 무자극, SS 단독, 세 가지 PP 단독, 세 가지 PP와 SS)의 "세미-랜덤" 혼합으로 10 내지 15초의 간격에 의해 분리되었다. %PPI(% Prepulse inhibition)는 $[1 - (PP - SS \text{ 커플링에 대한 반응} / SS \text{ 단독에 대한 반응})] \times 100$ 으로 계산하였다.

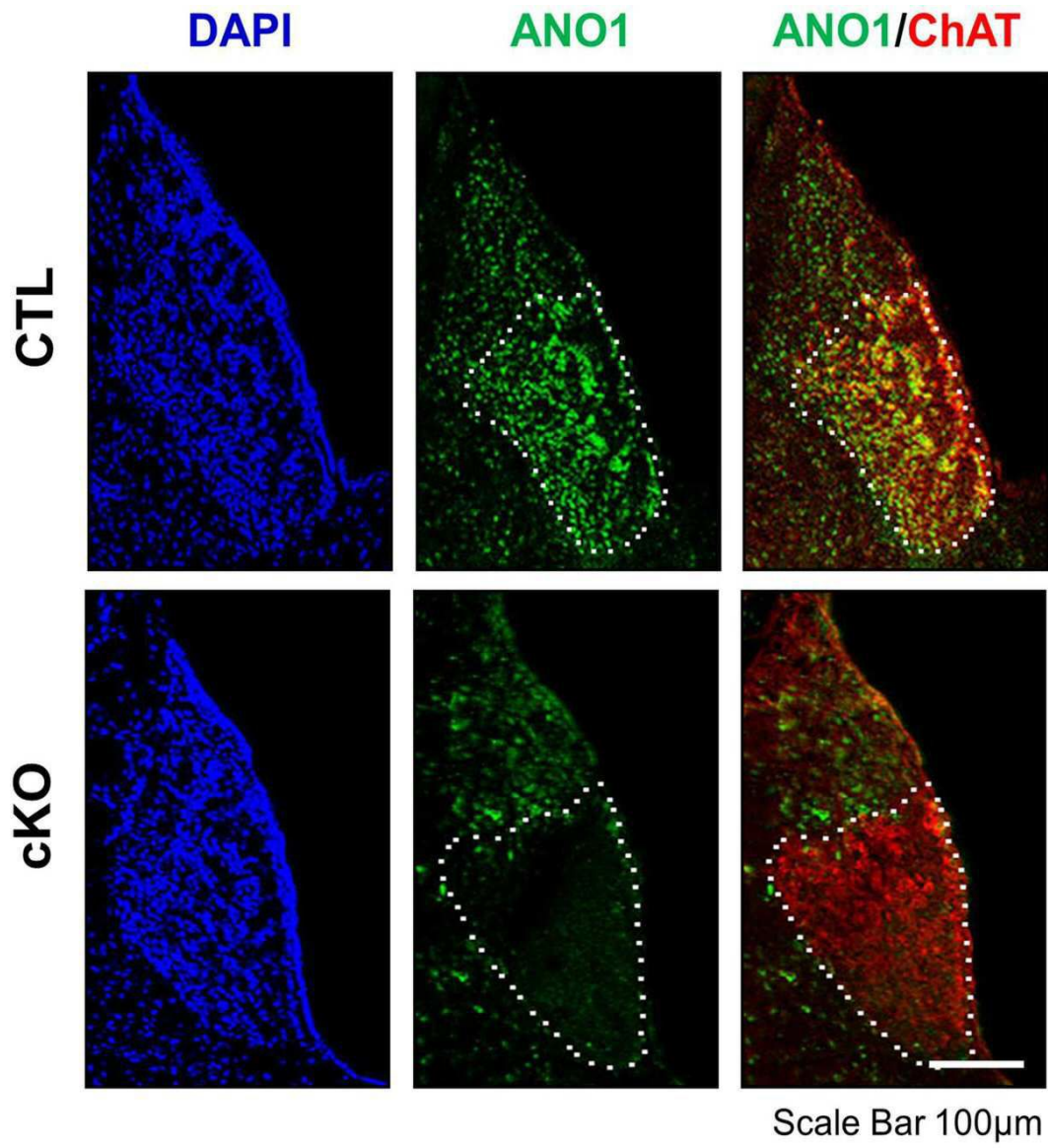
- [0073] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 내측고삐핵(medial habenula)의 콜린성 신경세포(cholinergic neuron)에서 특이적으로 ANO1 유전자가 결손된 생쥐(cKO)에서 선행하는 약한 자극 이후에 더 큰 자극에 덜 민감하게 반응하는 현상(PPI)이 현격하게 억제되었음을 확인하였다. 이는 내측고삐핵(medial habenula)의 콜린성 신경세포(cholinergic neuron)에서 특이적으로 ANO1 유전자가 결손된 생쥐(cKO)가 조현병 증상을 나타냄을 보여주는 결과이다.
- [0074] 더불어, 조현병 환자들의 증상 완화제로 임상적으로 사용되는 할로페리돌(0.1 mg/kg 체중, Tocris, USA)을 테스트 30분 전에 i.p. 투여함으로써, 내측고삐핵(medial habenula)의 콜린성 신경세포(cholinergic neuron)에서 특이적으로 ANO1 유전자가 결손된 생쥐(cKO)의 PPI 실험에서 조현병 증상을 호전시키는 결과(도 6 참조)를 확인하였다. 비히클로는 0.3 M HCl (pH5.5 - 6.0)을 사용하였다. 할리페리돌 저장용액은 0.3 M HCl (pH 5.5 - 6.0)에 준비하여 한 달 이하로 20℃에 보관하였다.
- [0075] 이는 ANO1 cKO 생쥐가 훌륭한 조현병 생쥐모델로써 활용될 수 있음을 보여주는 결과이다.
- [0077] **실시예 6. 코카인 민감성 실험(cocaine sensitization test)**
- [0078] 상기 실시예 1의 방법으로 제조한 내측고삐핵의 콜린성 신경세포 특이적 ANO1 유전자 결손 생쥐가 조현병 양성 증상을 나타내는지 확인하기 위하여 향정신성 약물인 코카인(cocaine)에 대한 민감성 실험을 수행하였다. 구체적으로, 측정 생쥐 (8 내지 14주령, male)에 코카인 (15mg/kg)을 복강주사하고, 열린공간 (40×40 cm)에서 코카인 투여 전/후로 각각 30분 동안 총 움직인 거리를 측정하여 활동양상을 관찰하였다. 대조군으로는 식염수를 복강주사한 한배 새끼(littermate)인 정상생쥐(CTL)를 이용하였다.
- [0079] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 내측고삐핵의 콜린성 신경세포 특이적으로 ANO1 유전자가 결손된 생쥐(cKO)는 정상생쥐(CTL)보다 코카인 투여 후 월등하게 움직임이 증가되었는데, 이로써 상기 ANO1 유전자 결손 생쥐(cKO)가 향정신성 약물에 민감하여 정상생쥐보다 과잉활동 양상을 나타냄을 확인할 수 있었다.
- [0081] 상기 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 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

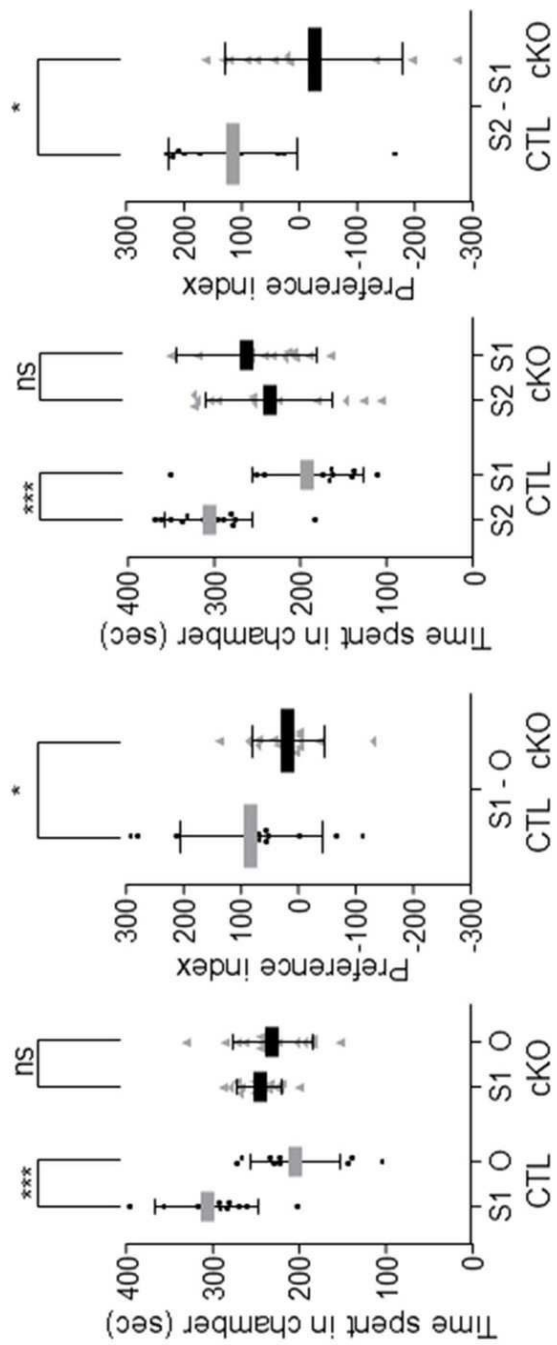
도면1a



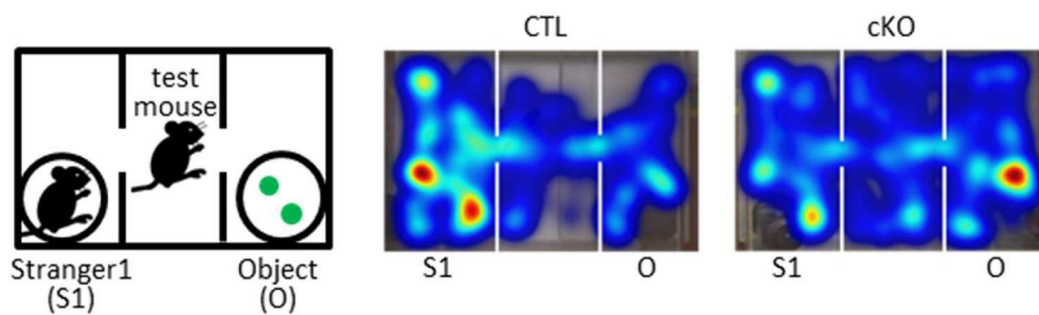
도면1b



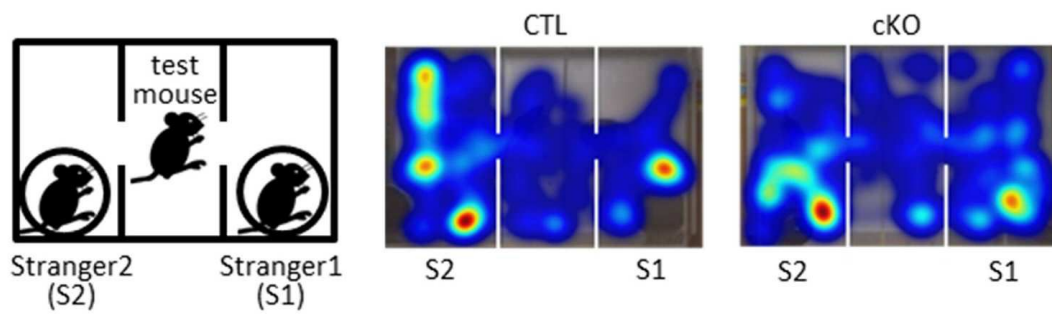
도면2a



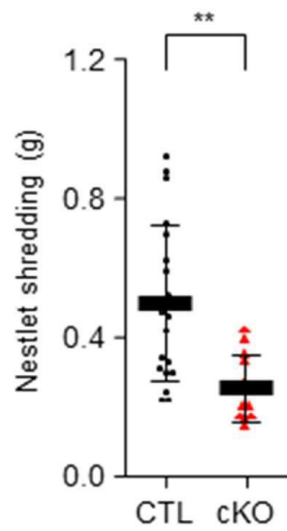
도면2b



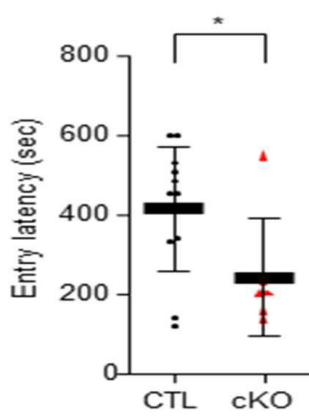
도면2c



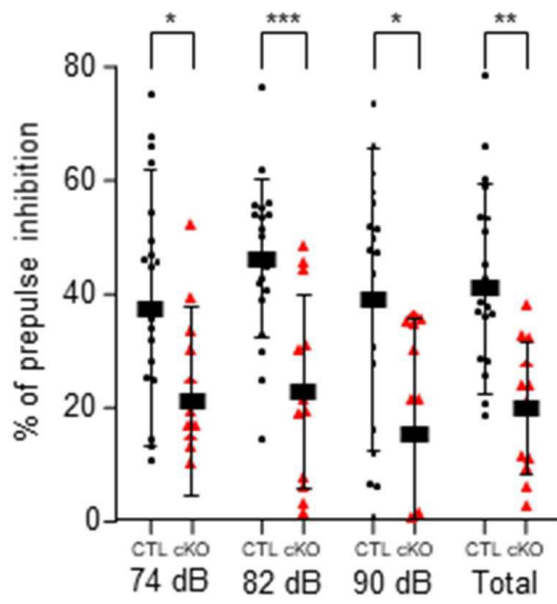
도면3



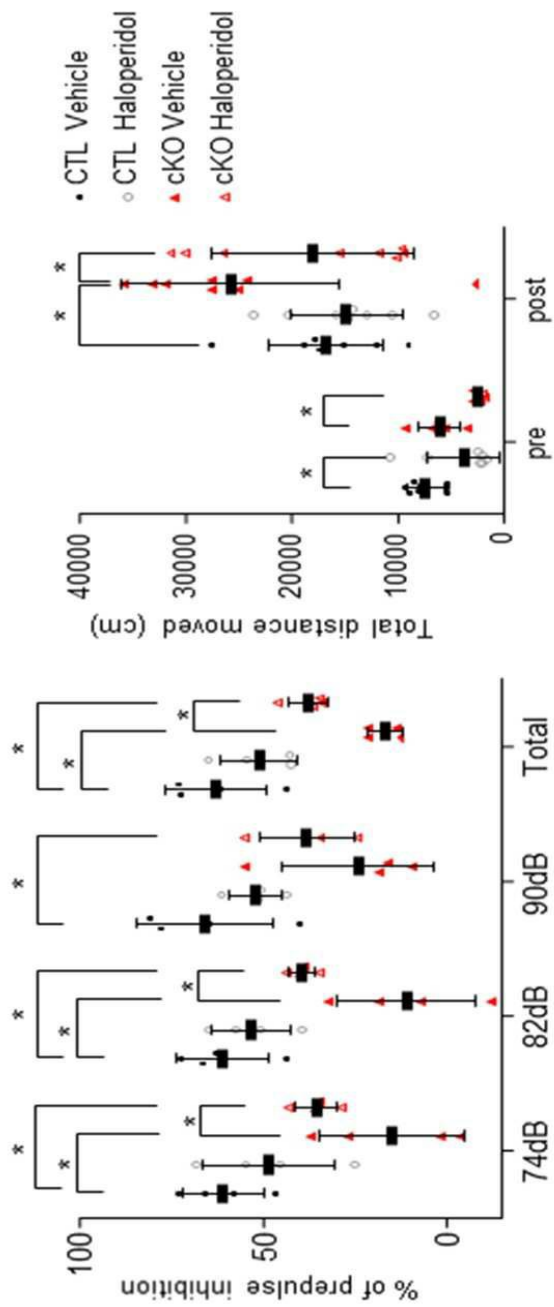
도면4



도면5



도면6



도면7

