



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0084426
(43) 공개일자 2013년07월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/12 (2006.01) C12N 15/70 (2006.01)
C12N 15/89 (2006.01) A01K 67/027 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2012-0005207
(22) 출원일자 2012년01월17일
심사청구일자 2012년01월17일
기술이전 희망 : , 실시권하여, 기술지도
- (71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
- (72) 발명자
허성오
강원도 춘천시 후평동 에리트아파트 106-107
김승혁
서울특별시 중랑구 상봉중앙로6길 13-25 제일빌라 402호
양해걸
강원도 춘천시 옥천동 한림대학교 의과대학 약리 학교실

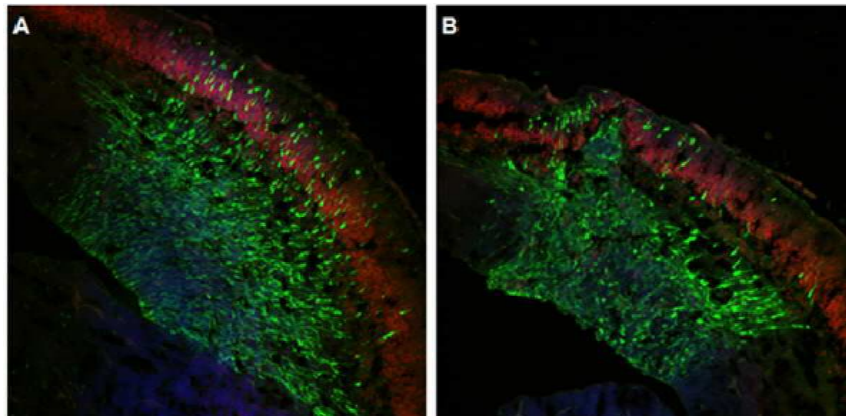
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 특정 유전자 조합을 이용하여 뇌 발생 시기에 발병하는 뇌회결손(lissencephaly)을 연구할 수 있는 동물 모델 제작 기술

(57) 요약

본 발명은 특정 유전자 조합을 이용하여 뇌 발생 시기에 발병하는 뇌회결손(lissencephaly)을 연구할 수 있는 동물 모델을 유전자 미세주입기법을 이용한 제작 방법 기술 창출에 관한 것이다.

대표도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 3044-20110034

부처명 교육과학기술부

연구사업명 21C프론티어사업(뇌기능활용및뇌질환치료기술개발연구사업)

연구과제명 신경세포 리모델링의 신호전달체계 규명을 통한 뇌기능향진기술 개발

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2011.04.01 ~ 2012.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

대장균을 숙주로 하여 과생산시킨 pCAGIG-b-pix isoform 재조합 유전자.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 pCAGIG-b-pix isoform 재조합 유전자의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 재조합 유전자의 생체내에 주입양과 주입방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항에 있어서, pCAGIG-b-pix isoform 재조합 유전자를 마우스 태아 뇌실에 주입 후 뇌 신경발달단계의 뇌회결손 질환동물모델을 제작하는 기술에 관한 연구를 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 특정 유전자 조합을 이용하여 뇌 발생 시기에 발병하는 뇌회결손(lissencephaly)을 연구할 수 있는 동물 모델을 유전자 미세주입기법을 이용한 제작 방법 기술 창출에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 뇌의 신경단위세포는 임신 후 3, 4 개월 시기에 만들어지기 시작한다. 신경단위세포가 만들어지는 원래 위치는 뇌 안쪽이지만 제 기능을 발휘하기 위해서는 뇌 피질(cortex)의 적절한 위치로 이동해야만 한다. 세포 입장에서 보면 자신의 크기보다 수백 배나 먼 길을 여행해야만 하는 셈이다. 만약 이 같은 세포 이동 과정이 원활하지 못하면 정상적인 뇌 발달이 불가능해진다. 그 결과로 생기는 뇌 장애가 바로 뇌회결손(lissencephaly)이다. 뇌는 발달 과정을 통해 굴곡과 적절한 주름을 형성해 주름진 구조가 생긴다. 그러나 비정상적인 발달이 진행되면 주름이 없는 매끈한 뇌가 생기는데, 이를 뇌회결손이라고 한다.

[0003] 정상적인 뇌의 표면은 층과 이랑의 복잡한 연속체로 형성되어있다. 이러한 층을 뇌회(gyri 또는 convolutions)라 부르며, 이랑은 뇌구(sulci)라고 부른다. 뇌회결손을 가진 아이들은 이러한 정상적인 뇌회가 없거나 오직 일부분만 형성되어있어 뇌의 표면이 편편하게 형성된다. 무뇌회(agyria, no gyri) 또는 뇌회비대(pachygyria, broad gyri)라는 용어는 뇌표면의 외형을 묘사하기 위한 것이다. 무뇌회는 뇌회층이 완전히 결실된 것이고, 뇌회비대는 비정상적으로 넓은 뇌회층을 보이는 것으로 보통 무뇌회증 보다는 증상이 덜 심하다. 이러한 질환은 배아시기에 신경아세포의 이동 장애로 발생한다.

[0004] 뇌회결손은 1868년에 Owen에 의해 “편편한 뇌(smooth brain)” 이란 용어로 처음 소개되었다. 이것은 뇌의 전체적인 외형을 묘사한 것으로 현미경적으로는 뇌가 비정상적으로 두껍고 통합이 안 된 모습을 나타낸다. 대뇌피질의 층 구조는 정상적인 6개의 층이 아닌 4개의 층으로 전반적으로 비정상적이다. 또한, 이 증상이 생기면 정신지체(mental retardation)를 비롯해서 간질(epilepsy)과 뇌성마비(cerebral palsy) 등 이상이 생긴다.

[0005] 뇌회결손은 두개의 주요 아류형으로 나눌 수 있다. 전형적 뇌회결손으로 알려진 1형은 대뇌 피질의 편편한 표면과 비정상적인 네층으로 구성된 피질로써 확연히 구별된다. 또한 뇌량(corpus callosum) 또는 소뇌의 기형을 포함한 뇌의 발달장애와 관련이 있으며, 밀러-테커증후군에서의 안면기형처럼 다른 발달이상과도 연관이 있다. 2형 또는 조약돌 뇌회결손은 뇌표면이 비정상적으로 울퉁불퉁한 것이 특징이다. 2형 뇌회결손의 피질은 뉴런(신경세포)의 과이동에 의해 울퉁불퉁한 조약돌 형태를 띠고 있다. 이것은 Walker-Warburg증후군, 근육-눈-뇌병과 후쿠야마형 선천성 근이영양증을 포함하는 대뇌피질 발육부전과 연관된 선천성 근이영양증 환자에서 관찰된다.

[0006] 1형 뇌회결손이 일반적인 형태로 한 보고에 따르면 전체의 43%가 이해 해당되며, 2형 뇌회결손은 14%를 차지한다. 나머지는 뇌회비대와 같은 여러 가지 질환들로 구성된다.

- [0007] 뇌회결손을 가진 아기는 출생시 정상처럼 보일 수 있다. 그러나 시간이 경과하면서 심한 발달장애, 정신운동장애, 연하장애, 발육장애가 생긴다. 이상소두증으로 알려진 비정상적으로 작은 머리 크기를 보일 수 있다. 또한 손, 손가락 또는 발가락의 기형, 근육 경련과 발작이 생길 수 있다. 발작은 보통 출생 후 몇 달 이내 처음 시작되며, 치료가 어렵다.
- [0008] 환아들은 또한 뇌성마비가 생길 수 있고 근육의 힘이 떨어질 수 있다. 심한 경우에는 영아기 또는 초기 유아기에 사망한다. 2중 대뇌피질증후군과 같은 경한 형태를 가진 환아들은 유아기 말까지 증상이 없을 수도 있다. 그들은 이상소두증 없이 경한 발달지체와 발작만을 나타내기도 한다.
- [0009] 뇌회결손은 신경세포들이 그들의 최종 목적으로 이동하여 대뇌피질의 여섯 층을 형성하는 초기 뇌 발달 과정 중 뉴런의 이동 장애에 의해 발생한다. 이러한 과정은 임신 9~13주 사이에 일어난다. 뉴런은 뇌가 처음 형성될 때 뇌실 구역이라 불리는 뇌의 한 부분에서 형성된다. 그곳에서부터 그들은 방사형 신경교세포로 알려진 다른 세포들을 따라 바깥쪽으로 무리를 지어 이동하여 피질 표면에 도착한다. 뉴런이 이동하는 데는 시작, 지속 그리고 이동을 멈출 때 지령이 필요한데, 이러한 과정들은 복잡한 분자 구조에 의해 조절된다.
- [0010] 지금까지 몇 가지 유전자들이 뇌회결손을 일으키는 원인으로 알려져 있으며, 뉴런의 이동에서 몇몇 유전자들의 역할이 최근에 밝혀졌다.
- [0011] 전형적 뇌회결손(1형)은 염색체 17p13.3에 위치하는 LIS1 유전자의 결실 또는 돌연변이에 의해 발생한다. 이 유전자는 Miller-Dieker증후군(MDS)과 독립적 뇌회결손(ILS) 환자에서 발견되었다. MDS는 LIS1 유전자가 위치하고 있는 염색체 17p13.3의 결실 때문에 발생하며 환자들은 특징적인 안면 기형과 무뇌회증을 가지고, 때로는 제대 탈장 또는 심장기형과 같은 다른 연관된 선천적 기형을 가지고 있다. 반면에 ILS는 LIS1 유전자내의 돌연변이 또는 미세 결실과 관련이 있다. MDS 환자들이 일반적으로 ILS 환자들보다 증상이 심하고 완전한 무뇌회증을 보인다. ILS 환자들은 대뇌 피질의 기형 범위는 무뇌회증과 뇌회비대 사이이다.
- [0012] 현재까지 1형 뇌회결손의 원인으로 6개의 유전자가 밝혀졌는데, 이들 중 LIS1, DCX, 그리고 RELN은 뉴런이 이동하는 여러 단계에 중요하게 연루되어 있다. X 염색체에 위치하는 DCX 유전자 돌연변이는 2중 대뇌피질증후군으로 알려진 피질하 밴드의 전위(SBH)를 일으킨다. 이 질환은 대뇌피질이 이중층으로 되어 있어 비정상적인 뇌의 외형을 보이며 한 층은 정상이고 한 층은 비정상적으로 백질에 위치한다.
- [0013] 이 질환은 보통 여성에서 나타나는데, DCX 유전자의 변이된 쌍을 가진 염색체가 비활성화 되지 않고, 정상 쌍을 가진 염색체가 비활성화 될 때 발생한다. DCX 유전자 돌연변이를 가진 남성은 일반적으로 전형적 뇌회결손을 가지게 되나 돌연변이의 종류나 모자이크형을 가지는 경우 남성에서도 경한 임상양상을 나타낼 수 있다.
- [0014] 전형적 뇌회결손이 신경세포의 이동이 느리거나 지연됨으로써 발생하는데 반해 2형 뇌회결손은 과도한 이동이 원인으로 생각된다. 신경세포가 피질 표면위에 축적되어 조약돌 모양을 이루며, 원인 유전자로는 Fukitin, POMT1, POMGnT1, FKRP가 알려져 있다. 이외에 뇌회결손의 비유전적 원인으로 거대세포바이러스 감염이 포함된다.
- [0015] 진단은 보통 신경학적 영상진단에 의해 이루어진다. 컴퓨터 단층촬영(CT) 또는 자기공명영상(MRI)주사는 특징적 층이 결여된 편편한 뇌의 모습을 보여준다. MRI는 이중 대뇌피질 증후군에서 비정상 신경세포 밴드를 묘사해 주기도 한다. 또한 어떤 형태의 뇌회결손에선 MRI로 뇌의 다른 부분들의 기형을 보여줄 수도 있다. LIS1 또는 DCX 유전자의 이상을 밝히기 위해 유전학적 검사를 수행할 수 있으나 유전학적 검사가 진단에 필수적인 건 아니다.
- [0016] 임상적으로 Miller-Dieker증후군은 특징적인 안면 기형으로 독립적 뇌회결손증과 구분되며, 좀더 심한 뇌회결손을 보인다. 1형 뇌회결손 중 Miller-Dieker증후군은 뇌이랑이 두드러지고 전체가 결여되기 때문에 산전 영상 검사로 가장 쉽게 발견할 수 있는 형태다. 다른 형태들은 뇌회결손 정도가 경하거나 일차 뇌이랑이 형성된 후에 뇌이랑 발달 장애가 발생하기 때문에 산전검사로 알기 어렵다. 도빈스(Dobyns)에 의해 제안된 Walker-Warburg증후군의 진단 기준에는 2형 뇌회결손, 소뇌 기형(cerebellar malformation), 망막의 기형, 그리고 선천성 근이영양증이 포함된다. 뇌간(brainstem) 기형이 또한 있을 수 있다.
- [0017] 2형 뇌회결손과 관련된 증후군인 Walker-Warburg증후군, 근육-눈-뇌 병, 후쿠야마형 선천성 근이영양증은 상염색체열성유전을 한다. 따라서 환자에서 근조직 검사 및 관련 근육 면역 조직 화학 염색을 통해 상기 질환이 확진 되고, 관련 유전자 돌연변이가 확인된 경우에 한해서, 다음 번 태아에 대해 DNA 분석을 통한 조기 산전 진단을 할 수 있다. 그러나 상기 2형 뇌회결손과 관련된 증후군의 경우 관련 유전자들의 크기가 크고 여러 가지 관

런 유전자를 동시에 검사해야 하며, 유전자 검사에서 유전자 원인을 알 수 없는 경우도 있어 유전자 검사로 확진하는 것은 아니다.

[0018] 뇌회결손의 치료는 소아신경전문의와 재활의학 전문의에 의해 진행된다. 유전학 전문의 및 소아신경전문의는 가족계획에 대한 상담 및 조언을 제공할 수 있다. 그러나 아직까지는 뇌회결손의 특별한 치료법이 없다. 환자의 치료는 임상증상과 뇌기형의 위치 및 심한 정도에 따라 달라진다. 경련의 치료를 위해 항경련제가 처방될 수 있고, 근긴장도가 증가된 경우 근육 이완제가 처방된다. 뇌수종이 있다면 단락술이 필요할 수 있다. 수유가 어려우면 위절개술을 고려한다. 재활의학전문의는 물리치료를 통해 약해지거나 굳은 관절 및 근육의 치유를 도울 수 있다.

[0019] 뇌회결손을 가진 환아들의 예후는 기형의 정도에 따라 다양하다. 많은 환아들이 3-5개월이 넘어서도 의미 있는 발육을 보이지 않으나 어떤 경우에는 거의 정상수준의 발달과 지능을 보이는 아이도 있다. 많은 수의 환자들이 2세 이전에 발육장애 또는 폐렴과 같은 감염으로 인해 사망한다. 그러나 현대 약물과 치료로 10대까지 생존하는 환아들도 있으며, 대뇌피질 증후군과 같은 약한 형태의 뇌회결손 환자들은 오직 정도의 정신지체와 발작만을 가질 수도 있다.

[0020] 이러한 뇌회결손에 관한 연구는 지속적으로 진행되고 있으나, 확실한 메커니즘이 밝혀지지 않아 특별한 치료법이 없는 실정이다. 그래서 세계적 난치병 목록에도 뇌회결손이 등록되어 있다. 현재 연구가 진행되고 있는 분야는 특정유전자 결손동물모델을 이용한 연구가 가장 활발하며, 신경세포의 이동능력을 다양한 유전자들을 이용한 연구가 진행 중이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0021] 본 발명자들은 본 발명은 특정 유전자 조합을 이용하여 뇌 발생 시기에 발병하는 뇌회결손(lissencephaly)을 연구할 수 있는 동물 모델을 특정유전자 미세주입기법을 이용하여 본 발명을 완성하였다.

[0022] 따라서, 본 발명의 일례는 특정유전자 미세주입기법을 이용하여 뇌 발생 시기에 발병하는 뇌회결손을 연구할 수 있는 동물 모델을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0023] 본 발명은 대장균을 숙주로 사용하여 특정 b-pix isoform 유전자를 과생산함으로써 정제된 대량의 b-pix isoform 재조합 유전자를 용이하게 얻을 수 있는 방법을 제공한다.

[0024] 본 발명은 대장균을 숙주로 사용하는 재조합 b-pix isoform 유전자의 생산방법에 관한 것이며, 순수한 b-pix isoform 유전자의 생산을 증가시킬 수 있다는 점에 착안하여 이루어진 것이다.

[0025] 본 발명은 b-pix isoform 유전자를 마우스의 뇌실 내에 주입시켜, 뇌신경발달 중 일어나는 뇌회결손 질환 동물 모델을 제작하는 것을 주 목적으로 한다.

발명의 효과

[0026] 본 발명은 유전자재조합 방법을 이용하여 pCAGIG- b-pix isoform 유전자를 대량으로 생산할 수 있다.

[0027] 본 발명에서 pCAGIG- b-pix isoform 을 마우스 뇌실 내 유전자주입 기법을 이용하여 유발되는 특정 질환들을 연구하는 데 용이하게 이용할 수 있다.

[0028] b-pix isoform은 배아기 뇌신경발생단계에서 신경세포의 이동에 중요한 역할을 일으키는 것으로 알려져 있고 본 발명에 의한 결과로 뇌회결손의 증상을 보이므로, 본 발명은 뇌신경발달단계 질환중 하나인 뇌회결손의 발병원인을 규명하고, 현재 치료법이 없는 뇌회결손의 치료법 개발 등에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0029] 도 1은 마우스 벡터 pCAGIG-b-pix isoform제작물을 나타내는 도이다. pCAGIG 벡터에 b-pix isoform유전자를 EcoR I과 Xho I 효소를 이용하여 자른 후 라이게이션 하여 pCAGIG-b-pix isoform벡터를 제작하였다.

도 2a는 생체내 유전자주입기기를 이용한 태아 뇌실 내 유전자 주입 기법의 모식도이다.

도 2b 는 마우스 벡터 pCAGIG-b-pix isoform유전자를 태아 뇌실 내 유전자 주입 기법을 이용하여 뇌의 일정구역에 발현시킨 사진이다.

도 2c 는 마우스 벡터 pCAGIG-b-pix isoform유전자를 태아 뇌실 내에 주입하고 이를 후 조직을 section하여 대뇌피질 안쪽에GFP단백질의 발현여부를 확인한 현미경 사진이다.

도 3a 는 b-pix isoform유전자가 포함되지 않은 공벡터 pCAGIG를 태아 뇌실 내에 주입하고 이를 후 조직을 section하여 면역염색형광기법을 실시하였다. 파란색은 핵을 염색한 것이고, 녹색은 GFP단백질을 염색한 것이고, 빨간색은 신경세포를 염색한 것이다. 염색 후 형광현미경으로 촬영하였다.

도 3b 는 b-pix isoform유전자가 포함된 벡터 pCAGIG-b-pix isoform유전자를 태아 뇌실 내에 주입하고 이를 후 조직을 section하여 면역염색형광기법을 실시하였다. 파란색은 핵을 염색한 것이고, 녹색은 GFP단백질을 염색한 것이고, 빨간색은 신경세포를 염색한 것이다. 염색 후 형광현미경으로 촬영하였다. 대조군인 3a와 비교해 봤을 때 pCAGIG-b-pix isoform유전자가 들어간 부위에서 Type2 뇌회결손의 형태를 보인다.

도 4a 는 b-pix isoform유전자가 포함되지 않은 공벡터 pCAGIG를 태아 뇌실 내에 주입하고 이를 후 조직을 section하여 면역염색형광기법을 실시하였다. 파란색은 핵을 염색한 것이고, 녹색은 GFP단백질을 염색한 것이고, 빨간색은 대뇌피질의 5,6층을 염색한 것이다. 염색 후 형광현미경으로 촬영하였다.

도 4b 는 b-pix isoform유전자가 포함된 벡터 pCAGIG-b-pix isoform유전자를 태아 뇌실 내에 주입하고 이를 후 조직을 section하여 면역염색형광기법을 실시하였다. 파란색은 핵을 염색한 것이고, 녹색은 GFP단백질을 염색한 것이고, 빨간색은 대뇌피질의 5,6층을 염색한 것이다. 염색 후 형광현미경으로 촬영하였다. 대조군인 4a와 비교해 봤을 때 pCAGIG-b-pix isoform유전자가 들어간 부위에서 Type2 뇌회결손의 형태를 보인다.

도 5는 뇌 발달기간 중 신경세포의 이동에 의해 일어날 수 있는 질병들을 정리한 모식도이다. C Lambert de Rouvroit 와 A M Goffinet가 2001년에 Mech Dev 에 투고한 논문에서 발췌하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하도록 한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 대표적으로 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

실시예 1: 대장균을 이용한 재조합 b-pix isoform 유전자의 발현 및 분리

대장균의 형질전환은 변형된 Mandel과 Higa (1970)의 방법에 따라 수행되었다. 대장균으로부터 플라스미드 DNA의 분리는 alkaline lysis 방법을 이용하였고, 염기서열 분석을 위한 플라스미드 순수 분리는 plamid extraction kit

(iNtRON Co.)을 이용하였다. 제한효소 절단, ligation 및 agarose gel 전기영동은

Sambrook의 방법에 따라 수행하였다.

접합반응 튜브에 1884 염기쌍의 b-pix isoform유전자 6129 염기쌍의 pCAGIG 핵산 절편을 1:3 비율로 넣은 다음, 2ul의 10배 접합반응용액 및 10단위체의 T4 DNA 리가아제와 함께 총 부피가 20ul가 되도록 증류수를 가하였다. 이를 25℃에서 30분간 반응시킨 후, 65℃ 10분간 효소를 불활성화 시켰다. 반응이 끝난 뒤 이노우에 방법(inoue et. Al., Gene 96:23-28, 1990)을 사용하여 제작된 DH5a ultra-competent 세포에 형질전환시켜 b-pix isoform 유전자를 포함한 pCAGIG-b-pix isoform벡터를 얻었다.

실시예 2: 생체내 유전자주입기법을 이용한 태아 뇌신경발달단계 중 뇌실 내 특정 유전자 주입

상기 실시예에서 얻은 pCAGIG-b-pix isoform벡터를 배아기(E13.5) 마우스의 뇌실에 생체내유전자주입기기를 이용하여 주입시키고, 유전자를 주입시킨 부위에 전압을 가하여 pCAGIG-b-pix isoform유전자가 배아기 뇌의 신경세포에 transfection되도록 한다. 주입시킨 유전자의 양은 약 0.1ug/ml 내지 약 100ug/ml, 더욱 바람직하게는 약 1ug/ml 내지 10ug/ml로 존재한다.

실시예 3: 유전자 주입된 뇌의 동결 색전

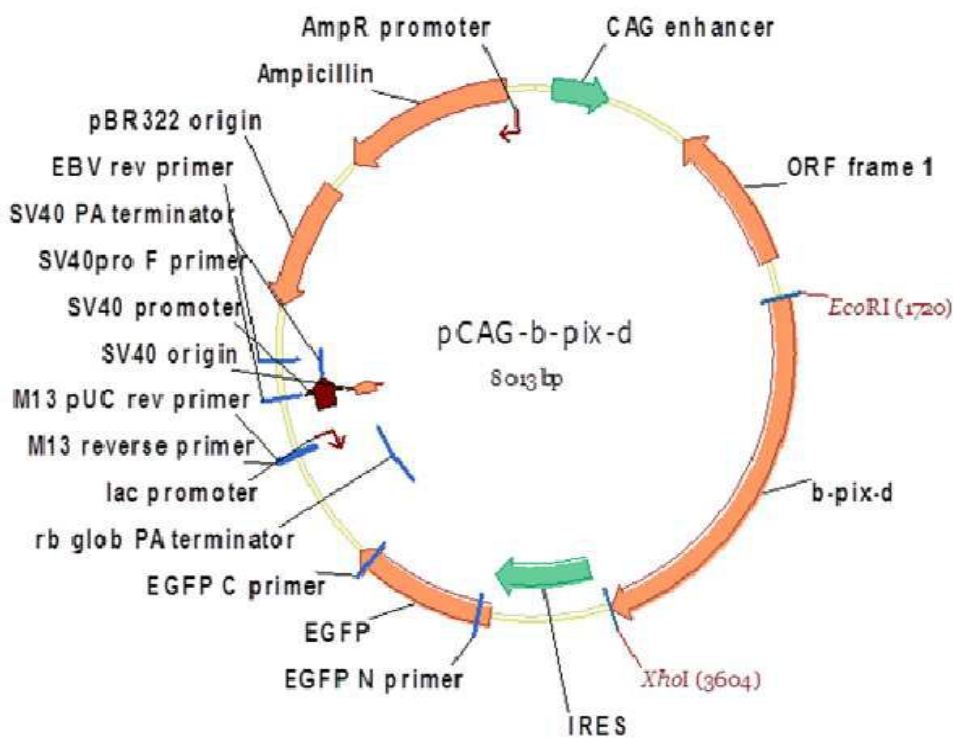
[0039] 유전자를 주입한 태아의 뇌를 PBS에서 꺼낸 후 4% PFA(para formaldehyde)에 담근 후 섭씨 4도에서 2시간 동안 고정한다. 그 다음 30% sucrose에 담근 후 섭씨 4도에서 조직이 가라앉을 때까지 기다린다. 조직이 가라앉으면 꺼내어 30% sucrose를 제거하고 OCT compound(Tissue tek)에 넣고 섭씨 -20도에서 같이 얼린다. OCT compound와 함께 언 조직을 동결섹션기기(LEICA CM3050)에서 10 um 두께로 섹션하여 슬라이드글라스에 붙인다.

[0040] 실시예 4: 유전자 주입된 뇌 조직의 면역염색형광기법

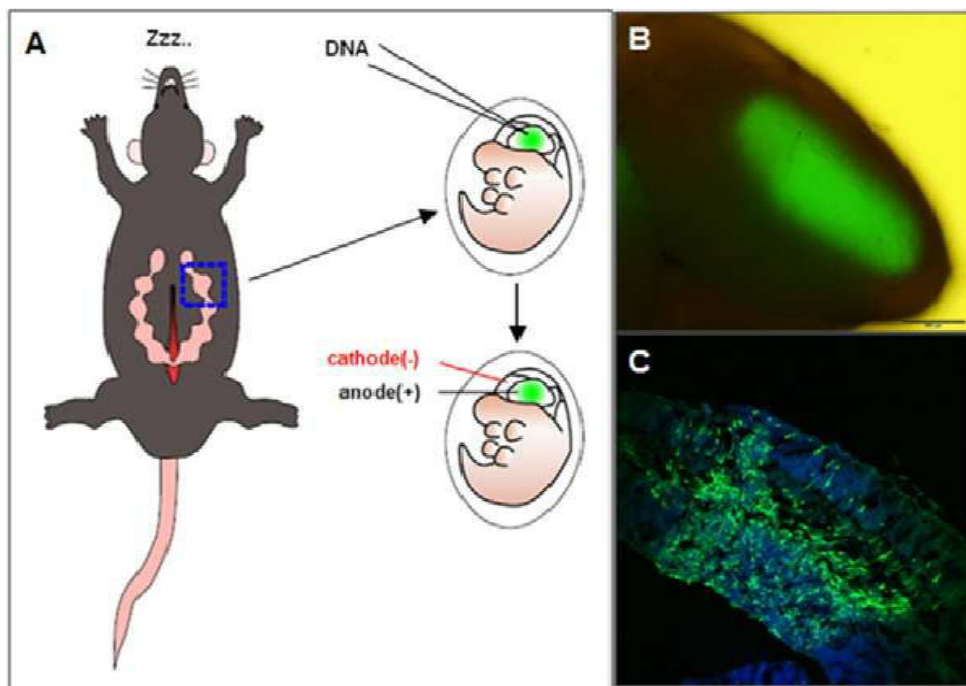
[0041] 섹션된 조직이 붙어있는 슬라이드글라스를 1시간 이내로 건조시킨 후 끓는 Citric buffer에 넣고 5분 더 끓인다. 조직을 식힌 후 10% normal goat serum을 조직 위에 도포하는 blocking 과정을 1시간 동안 실시한다. PBST로 세척 후 1단계 항체를 적당한 농도로 조직위에 도포하고 섭씨 4도에서 다음날까지 둔다. 그 후 조직을 PBST로 5분씩 4번 세척하고, 형광물질이 붙어있는 2단계 항체를 조직위에 도포하여 1단계 항체에 2단계 항체가 붙도록 한다. 2시간 후, PBST로 세척하고 PVA(polyvinyl alcohol)을 이용하여 커버글라스로 조직을 덮는다. 어두운 곳에서 완벽히 건조한 후 형광현미경을 이용하여 결과를 확인한다.

도면

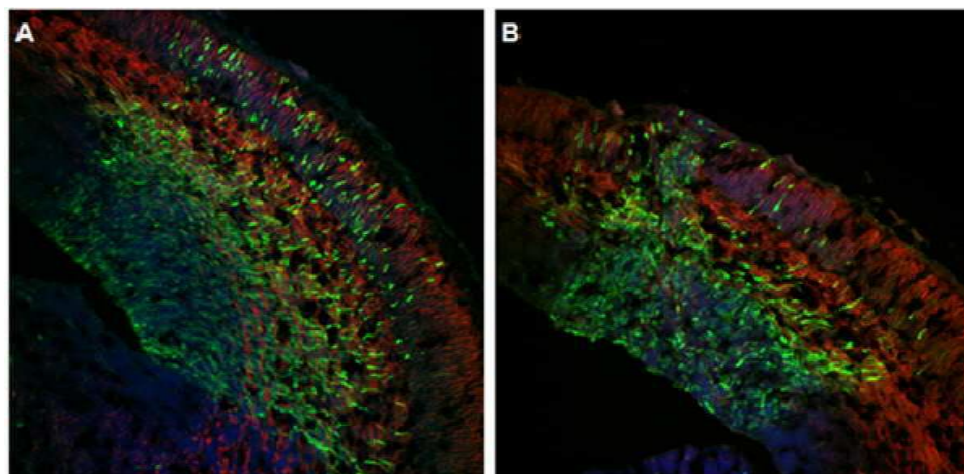
도면1



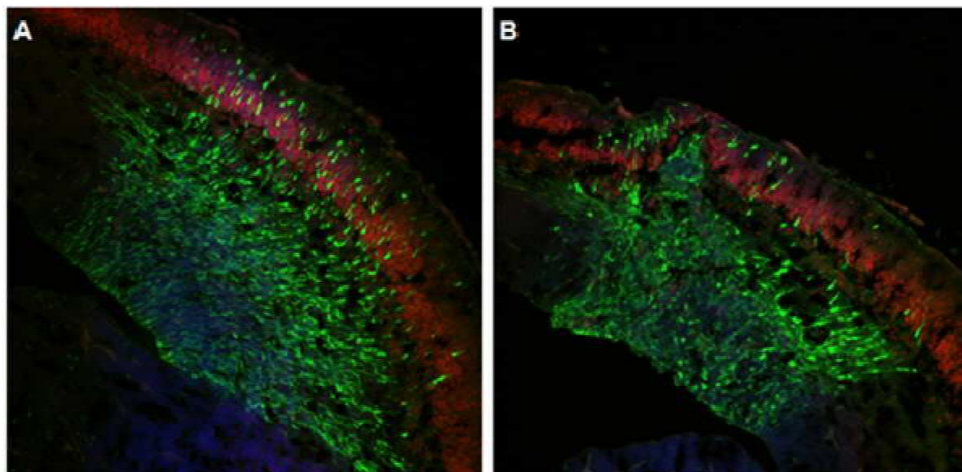
도면2



도면3



도면4



도면5

