(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0175005
(43) 공개일자 2024년12월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/0276 (2024.01) *C12N 15/113* (2010.01)
C12N 15/85 (2006.01) *C12N 9/22* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0276 (2024.01)
C12N 15/113 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-0075217
(22) 출원일자 2024년06월10일
심사청구일자 2024년06월10일
(30) 우선권주장
1020230074194 2023년06월09일 대한민국(KR)

(71) 출원인
서울대학교산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
대한민국 (식품의약품안전처장)
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
장구
경기도 과천시 별양로 12, 321동 701호 (원문동, 래미안 슈르)
전범진
서울특별시 관악구 관악로13길 20, 1401호 (봉천동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

전체 청구항 수 : 총 11 항

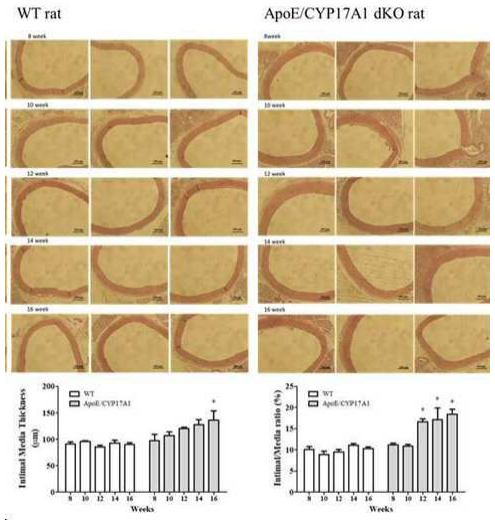
(54) 발명의 명칭 **ApoE 및 CYP17A1 유전자 이중 녹아웃 동맥경화 동물 모델 및 이의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 ApoE 및 CYP17A1 유전자 이중 녹아웃 동맥경화 동물 모델 및 이의 제조 방법에 관한 것으로, 본 발명에 따른 ApoE와 CYP17A1 유전자의 이중 녹아웃을 위한 특이적 sgRNA 및 CRISPR/Cas9법을 이용한 재조합 벡터는 형질전환된 동물에서 ApoE와 CYP17A1 유전자를 암호화하는 DNA 가닥을 전부 또는 일부를 변형시켜 동맥경화를 효과적으로 유도할 수 있다.

이에 따라, 본 발명은 사람과 유사한 특징을 가진 동맥경화 동물모델을 확보함으로써 동맥경화 치료제 신약 개발 및 예후증진을 위한 연구에 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
C12N 15/8509 (2013.01)
C12N 9/22 (2013.01)
A01K 2217/077 (2013.01)
A01K 2217/15 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/0375 (2013.01)
C12N 2310/20 (2017.05)

(72) 발명자
김희경
서울특별시 관악구 대학10길 10, B103호 (신림동)
강세찬
경기도 수원시 영통구 청명로 16, 405호 (영통동)
박대원
서울특별시 강북구 삼양로111길 32 (수유동)
이종권
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187, 식품의약품안전평가원
강명희
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187, 식품의약품안전평가원
박지수
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187, 식품의약품안전평가원

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1475013432
과제번호	DY0002259587-20182실험동501-3
부처명	식품의약안전처
과제관리(전문)기관명	식품의약품안전평가원
연구사업명	6) 실험동물자원 활용기술 및 관리 선진화 연구
연구과제명	동맥경화 치료제 평가를 위한 비임상 평가기반 마련 연구(3)
과제수행기관명	서울대학교 산학협력단
연구기간	2022.07.15 ~ 2023.07.14

명 세 서

청구범위

청구항 1

동맥경화 동물 모델로서,

상기 동물모델은 ApoE(apolipoprotein E) 및 CYP17A1(cytochrome P450 17A1) 유전자가 결손된 동형접합체(homozygote, $ApoE^{-/-}$, $CYP17A1^{-/-}$) 인 것인, 동물 모델.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 동물 모델은 Sprague Dawley(SD) 랫드인 것인, 동물 모델.

청구항 3

(a) ApoE 동형접합성 또는 이형접합체 랫드(ApoE+/- 또는 ApoE-/-)와 CYP17A1 이형접합체 랫드(CYP17A1+/-)를 교배하여 ApoE-CYP17A1 이형접합체 랫드를 제조하는 단계; 및

(b) 상기 ApoE-CYP17A1 이형접합체 랫드를 교배하여 ApoE/CYP7A1 이중 녹아웃 랫드를 제조하는 단계를 포함하는, 동맥경화 동물 모델의 제조 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 (b)단계 이후에 8~16주간 일반 식이를 수행하는 단계;를 추가로 포함하는 동맥경화 동물 모델의 제조 방법.

청구항 5

(a)서열번호 1 내지 3의 가이드 RNA (guide RNA) 중 어느 하나 및 Cas9 단백질; 및 서열번호 4 내지 6의 가이드 RNA (guide RNA) 중 어느 하나 및 Cas9 단백질; 을 도입하여 제조한 형질전환 세포주를, 수득된 탈핵된 난자에 이식하여 핵 이식란을 형성하는 단계;및

(b)상기 핵 이식란을 동물의 난관에 이식하는 단계;를 포함하는,

ApoE 및 CYP17A1 유전자 이중 녹아웃 동맥경화 동물모델의 제조 방법.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 형질전환은 서열번호 1 내지 3의 가이드 RNA 중 어느 하나; 및

서열번호 4 내지 6의 가이드 RNA 중 어느 하나를 포함하는 벡터를 이용하는 것인, 제조방법.

청구항 7

제 5항에 있어서,

상기 형질전환 동물모델은 ApoE 유전자 및 CYP17A1 유전자가 결실 또는 기능 저하된 것인, 제조방법.

청구항 8

제3항 내지 제7항 중 어느 하나의 제조방법으로 제조된, ApoE 및 CYP17A1 유전자 이중 녹아웃 동맥경화 동물모

델.

청구항 9

제 8항에 있어서,

상기 동물모델은 동맥경화 진행 단계인 초기변병(Early lesions), Vulnerable plaque, 및 Thrombosis 각각의 바이오마커 수치가 증가된 것인, 동물모델.

청구항 10

제 9항에 있어서,

초기변병(Early lesions)의 바이오마커는 sVCAM-1 및 MPO이고; Vulnerable plaque의 바이오마커는 MPO 및 MMP-1이고; Thrombosis의 바이오마커는 P-selectin인 것인, 동물모델.

청구항 11

제 8항에 있어서,

상기 동물모델은 혈관 두께가 증가하고; 동맥경화 발달을 나타내는 Intimal/Media ratio가 증가하는 것인, 동물모델.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 ApoE 및 CYP17A1 유전자 이중 녹아웃 동맥경화 동물 모델 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 죽상동맥경화(atherosclerosis)는 죽상경화증과 동맥경화증을 포함하는 것으로, 죽상경화증은 주로 혈관의 가장 안쪽을 덮고 있는 내막(endothelium)에 콜레스테롤이 침착하고 내피세포의 증식이 일어나 '죽종(atheroma)'이 형성되는 혈관질환을 말하며, 동맥경화증은 주로 혈관의 중간층에 퇴행성 변화가 일어나 섬유화가 진행되고 혈관의 탄성이 줄어드는 노화현상의 일종을 말한다. 동맥경화증은 주로 혈관의 중간층에 퇴행성 변화가 일어나서 섬유화가 진행되고 혈관의 탄성이 줄어드는 노화현상의 일종으로, 최근 4년간 환자가 15 % 증가하는 등, 꾸준히 증가추세이며, 그 원인으로 서구화된 식습관 등이 제시되고 있으나 정확한 원인은 알려진 바 없다.

[0003] 이러한 동맥경화는 수축기 고혈압을 초래하여 심장근육이 두꺼워지는 심장비대 현상을 초래하며, 협심증, 심근경색, 및/또는 뇌졸증과 같은 생명을 위협하는 심각한 질환을 유발하므로, 동맥경화 질환을 조기에 발견하고 치료하는 것이 무엇보다 시급하다.

[0004] 그러나 상기와 같이 이러한 동맥경화의 발생 및 진행에 대한 원인에 대해서는 아직까지 명확히 밝혀진 바가 없으므로, 동맥경화의 발생기전을 명확히 이해하고, 그와 관련된 질병의 진단, 예방 및 치료하기 위해서는 인위적으로 사람의 동맥경화와 유사한 특징을 갖는 동맥경화가 유도된 동물 모델을 확보하고, 이에 대하여 실험을 수행함으로써 풍부한 데이터를 확보하는 것에 대한 수요가 증가하는 추세에 있다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 ApoE 및 CYP17A1 유전자의 이중 녹아웃 동맥경화 동물 모델을 동맥경화 연구에 효율적으로 사용할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에, 본 발명의 발명자는 ApoE 및 CYP17A1(ApoE/CYP17A1) 유전자의 이중 녹아웃을 통해 동맥경화 동물모델을 제조할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0007] 따라서, 본 발명은 ApoE/CYP17A1 유전자 이중 녹아웃 동맥경화 동물모델의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 녹아웃을 실행하기 위한 sgRNA(single guide RNA)를 암호화하는 DNA 서열; 및 Cas9 유전자를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 동물모델을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 ApoE/CYP17A1 유전자 이중 녹아웃 동맥경화 동물모델의 제조방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 녹아웃을 실행하기 위한 sgRNA(single guide RNA)를 암호화하는 DNA 서열; 및 Cas9 유전자를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 동물모델을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명의 ApoE/CYP17A1 유전자 이중 녹아웃 동맥경화 동물모델의 제조 방법은 ApoE 및 CYP17A1 유전자를 암호화하는 DNA 전부 또는 일부를 변형시킴으로써 사람과 유사한 특징을 갖는 동맥 경화 유도 동물 모델을 효과적으로 제조할 수 있다.

[0014] 이에 따라, 본 발명의 상기 제조방법은 동맥경화 질환의 치료제 개발 및 예후 개선을 위한 연구에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 동맥경화 진행 단계별 바이오마커를 나타내는 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한 ApoE/CYP17A1 유전자 이중 녹아웃 동물모델에서 상기 도 1에 기재된 바이오마커 수치를 확인한 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따라 제조한 ApoE/CYP17A1 유전자 이중 녹아웃 동물모델의 혈관 조직 이미지 및 내막/중막 비율을 정량화한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 상세히 설명한다. 이하의 설명에 있어, 당업자에게 주지 저명한 기술에 대해서는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있다. 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다.

[0017] 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0019] 본 발명은 ApoE 유전자 및 CYP17A1(이하, "ApoE/CYP17A1") 유전자 이중 녹아웃 동맥경화 동물모델을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 녹아웃을 실행하기 위한 sgRNA(single guide RNA)를 암호화하는 DNA 서열; 및 Cas9 유전자에 관한 것이다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 동물 모델에 관한 것이다.

[0023] 본 발명의 용어 "ApoE"는 혈류에서 콜레스테롤과 다른 유형의 지방을 운반하는 데 도움이 되는 단백질을 만드는 데 관여하는 유전자로, ApoE 유전자에 이상이 생기는 경우 알츠하이머가 발병할 수 있음이 알려져 있다. 상기 ApoE는 ε2, ε3 등의 여러 대립 유전자의 형태를 가진다.

[0024] 본 발명의 용어 "CYP17A1"은 시토크롬 P450 패밀리 17 하위 패밀리 A 멤버 1로서, 시토크롬 P450 효소 계열의 구성원을 생성하는데 관여하는 유전자로, 테스토스테론 및 에스트로겐과 같은 성 호르몬을 포함하는 스테로이드

호르몬의 합성에 관여한다. 또한, 암 물질의 대사에 관여한다고 알려져 있는 바, 폐와 같이 환경 발암 물질에 주로 노출되는 간외 조직에서 CYP1A1의 발현 패턴을 조사하는 연구가 많이 진행되었으나, 동맥 경화 동물 모델 제조와 관련하여서는 알려진 바 없다.

[0025] 본 발명의 용어 "유전자 교정"은 인간 세포를 비롯한 동·식물 세포의 유전체 염기서열에 표적지향형 변이를 도입 또는 유도할 수 있는 기술로서, DNA 절단에 의한 하나 이상의 핵산 분자의 결실, 삽입, 치환 등에 의하여 특정 유전자의 기능을 제거 또는 저하시키거나, 단백질을 생성하지 않는 비코딩 DNA 서열로의 변이를 도입할 수 있는 기술을 말한다. 본 출원의 목적상 상기 유전자 교정은 특히 Cas9 단백질 및 gRNA를 이용하여 동물의 유전자에 변이를 도입하는 것일 수 있으며, 유전자 편집 (gene editing)이라는 용어와 혼용하여 사용될 수 있다.

[0026] 본 발명의 용어 "표적 유전자"는 본 발명을 통해 교정하고자 하는 동물체의 유전체 내에 있는 일부 DNA를 의미하며, 그 유전자의 종류에 제한되지 않고 코딩 영역 및 비-코딩 영역을 모두 포함할 수 있다. 당업자는 그 목적에 따라, 제조하고자 하는 유전체 교정 동물체에 대하여 원하는 변이에 따라 상기 표적 유전자를 선별할 수 있다.

[0027] 본 발명의 용어 "CRISPR-Cas9"는 3세대 게놈 편집 도구로, 타겟 DNA를 인식하여 결합하는 guide RNA (gRNA) 및 타겟 DNA를 절단하는 Cas9 nuclease를 이용하여 1세대 게놈 편집 도구인 ZFN (Zinc Finger Nuclease), 및 2세대 게놈 편집 도구인 TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease)보다 경제적이고 효율적으로 유전자를 조작할 수 있으며, 상기 "CRISPR-Cas9"는 "RNA 유전자 가위(RNA-guided engineered nucleases, RGENs)"로 불리기도 한다. 이때, gRNA와 PAM 서열의 조작을 통해 CRISPR-Cas9을 특정 유전자 조작에 사용할 수 있다.

[0028] 본 발명의 일 실시예에서는, 상기 CRISPR-Cas9에서 여러 gRNA 또는 Cas 효소가 한 번에 발현될 수 있으며, 이에 따라 유전자 편집, 전사 활성화 (CRISPRa), 및 전사 억제(CRISPRi)가 게놈의 여러 위치에서 동시에 수행될 수 있다.

[0029] 본 발명의 용어 "Cas9"은 CRISPR/Cas 시스템의 주요 단백질 구성요소로, 활성화된 엔도뉴클레아제로 작용할 수 있는 단백질이다. Cas9 단백질은 이중 가닥 DNA 절단 (double stranded DNA break)을 유도한다. Cas9단백질이 정확하게 표적DNA의 염기서열에 결합하여 DNA 가닥을 잘라내기 위해서는 PAM (Protospacer Adjacent Motif)이라 알려진 3개의 염기로 이루어진 짧은 염기서열이 표적 DNA의 염기서열 옆에 존재해야 하며, Cas9 단백질은 PAM 서열(NGG)로부터 3번째와 4번째 염기쌍 사이를 추정하여 절단한다.

[0030] 본 발명의 용어 "가이드 RNA(guide RNA, gRNA)"는 짧은 단일 가닥의 RNA로, 표적 유전자를 암호화하는 염기서열 중 표적 DNA에 특이적인 RNA를 의미하며, 표적 DNA 염기서열과 전부 또는 일부가 상보적으로 결합하여 해당 표적 DNA 염기서열로 엔도뉴클레아제 단백질을 이끄는 역할을 하는 리보핵산을 의미한다. 상기 가이드 RNA는 crRNA와 tracrRNA 두 개의 RNA로 분자로 구성된 gRNA 구조 뿐만 아니라, crRNA와 tracrRNA를 단일 RNA로 결합시킨 sgRNA(single guide RNA) 구조도 포함하며, 플라스미드 주형으로부터 전사된 것, 생체 외 (in vitro)에서 전사된(transcribed) 것 (예컨대, 올리고뉴클레오티드 이중가닥) 또는 합성한 가이드 RNA 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 본 발명에서의 sgRNA는 ApoE 및 CYP17A1 유전자의 변형을 위한 것으로, 당해 sgRNA의 서열 및 PAM 서열은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0032]

서열번호	구분	염기서열 (5'→3')	PAM	Strand
1	sgApoE #1	ATGCCTGGCCGAGGGAGAGC	TGG	sense
2	sgApoE #2	AGGTGACAGATCAGCTCCCA	GGG	sense
3	SgApoE #3	AGGGTTGGTCGCTTTGCCCT	GGG	antisense
4	sgCYP17A1 #1	AGCAACTTCAACCAAGAAGG	AGG	antisense
5	sgCYP17A1 #2	AAGTTGCTCCGCTCCACAGC	TGG	sense
6	sgCYP17A1 #3	TGACCCAAAAGAAATAGGCT	AGG	antisense

[0033] 상기 표 1에 기재된 sgRNA를 이용한 CRISPR로 ApoE 및 CYP17A1 유전자가 변형된 돌연변이 분석에 이용한 프라이머는 하기의 표 2와 같다.

표 2

[0034]

서열번호	구분	염기서열 (5'→3')
7	ApoE F	TGGGCAGATGCTCTATTGTG
8	ApoE R	TCACGGATAGCACTCACACC
9	CYP17A1 F	CTCTGTAACCCGATGGCAGT
10	CYP17A1 R	CTCACCATCTTGCTGGACAA

[0035] 상기 제조 방법에 있어서, 동맥경화 동물 모델의 제조를 위하여, ApoE 및 CYP17A1 유전자를 녹아웃 시키는 방법은 당업계에 공지된 다양한 방법으로 실시될 수 있으며, 바람직하게는 CRISPR 또는 유사 CRISPR 기술일 수 있고, 더 바람직하게는 CRISPR-Cas9일 수 있다.

[0036] 본 발명의 용어 "재조합"은 세포가 이종의 핵산을 복제하거나, 상기 핵산을 발현하거나 또는 펩티드, 이종의 펩티드 또는 이종의 핵산에 의해 코딩된 단백질을 발현하는 세포를 말한다. 재조합 세포는 상기 세포의 천연 형태에서는 발견되지 않는 유전자 또는 유전자 절편을, 센스 또는 안티센스 형태 중 하나로 발현할 수 있다. 또한 재조합 세포는 천연 상태의 세포에서 발견되는 유전자를 발현할 수 있으며, 그러나 상기 유전자는 변형된 것으로서 인위적인 수단에 의해 세포 내 재도입된 것이다.

[0037] 본 발명의 용어 "벡터"는 세포 내로 전달하는 DNA 단편(들), 핵산 분자를 지칭할 때 사용된다. 벡터는 DNA를 복제시키고, 숙주세포에서 독립적으로 재생산될 수 있다. 용어 "전달체"는 흔히 "벡터"와 호환하여 사용된다.

[0038] 본 발명의 용어 "발현 벡터"는 목적한 코딩 서열과, 특정 숙주 생물에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열을 발현하는데 필수적인 적정 핵산 서열을 포함하는 재조합 DNA 분자를 의미한다. 그 예시로, 진핵세포에서 이용 가능한 프로모터, 인핸서, 종결신호 및 폴리아데닐레이션 신호는 공지되어 있다.

[0040] 이하 본 발명을, 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명의 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것 일뿐, 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니며, 업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0042] **<실시예 1> 동물 모델 제조를 위한 배아 채취, 전기천공, 및 이식**

[0043] 모든 동물 관리 및 절차는 서울대학교 동물실험윤리위원회의 승인 (No. SNU-201222-4-2)을 받았으며, 서울대학교 지침에 따라 수행하였다. 본 연구에 사용된 SD rat은 오리엔트바이오(Korea)에서 구입하여 24±2℃, 50% 습도, 12:12시간의 명암주기를 유지하였다.

[0044] 배아 채취를 위한 과배란은 48시간 간격으로 150 IU/kg PMSG 및 150 IU/kg hCG(대성미생물연구소, Korea)를 복강 내 주사하여 유도한 후 수컷과 교배시켰다. 교미 다음 날 암컷의 난관에서 한 세포 단계 배아를 채취하여 0.5-2시간 동안 전기천공하기 전에 M16 배지(Sigma-Aldrich, St. Louis, Mom USA)에 보관했다. 한 세포기 배아를 M2 배지 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 및 Opti-MEM 배지(Thermo-Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 2회 세척한 다음, 25 ng/μL sgRNA 및 100 ng/μL Cas9 단백질(Invitrogen, Waltham, MA, USA) RNP가 포함된 Opti-MEM 배지(10 μL)로 채워진 BTX 마이크로슬라이드(Harvard Bioscience, Holliston, MA, USA) 위에 한 줄로 세워 전기천공을 진행했다. 전기천공은 30V, 7회, 3 밀리초, 97 밀리초 간격의 조건에서 유전체 편집기(GEB15; BEX, Tokyo, Japan)를 사용하여 수행하였다. 전기천공 후 배아를 M16배지에서 1시간동안 배양한 후 mR1ECM 배지(Cosmobio, Tokyo, Japan)로 옮겼다. 2-세포 단계 배아를 가임신 수혜 암컷의 난관에 이식하였다.

[0046] **<실시예 2> ApoE 및 CYP17A1 sgRNA 설계 및 세포 주입**

[0047] 온라인 툴(CRISPR RGEN tool, http://www.rgenome.net)을 이용하여 ApoE 및 CYP17A1 각각의 유전자 별로 3개의 sgRNA를 설계하고, 정밀 gRNA 합성 키트(Invitrogen)를 이용하여 합성하였다. 100 ng/μL의 sgRNA와 Cas9 RNP를 5분간 배양한 후 Neon Transfection system(Invitrogen)을 사용하여 쥐 섬유아세포 (Rat2 세포)에 전달시켰다. 각 sgRNA의 돌연변이 효율은 T7 엔도뉴클라아제 I(T7E1) 분석법으로 분석하여 가장 효율이 높은 sgRNA를 녹아웃 배아 생산에 사용했다. 구체적으로 정제한 두번째 PCR 산물을 5분 동안 95℃에서 변성하고 -2℃/초로 85℃까지, -0.1℃/초로 25℃까지에서 리어닐링(re-anneal)하였고, 그 후 리어닐링 한 산물은 37℃에서 30분 동안 T7E1(New England Biolabs; USA) 효소로 분해하였다. 두번째 PCR 산물 및 T7E1으로 분해된 산물은 TAE 버퍼에서 2% 아가로스 겔을 사용하여 전기영동시키고, 이후 이를 UV 트랜스일루미네이터를 사용하여 시각화하였다. 모든 sgRNA 후보는 아래 표 3에 기재하였고, 아래 표 3은 상기 표 1과 같다.

표 3

[0048]

서열번호	구분	염기서열 (5'→3')	PAM	Strand
1	sgApoE #1	ATGCCTGGCCGAGGGAGAGC	TGG	sense
2	sgApoE #2	AGGTGACAGATCAGCTCCCA	GGG	sense
3	sgApoE #3	AGGGTTGGTCGCTTTGCCCT	GGG	antisense
4	sgCYP17A1 #1	AGCAACTTCAACCAAGAAGG	AGG	antisense
5	sgCYP17A1 #2	AAGTTGCTCCGCTCCACAGC	TGG	sense
6	sgCYP17A1 #3	TGACCCAAAAGAAATAGGCT	AGG	antisense

[0049] **<실시예 3> ApoE 및 CYP17A1 유전자형 분석(Genotyping)**

[0050] DNeasy 혈액 및 조직 키트 (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여, 실시예 2의 Rat2 세포와 쥐 꼬리에서 Genomic DNA를 추출하였다. PCR은 아래 프라이머와 Maxime PCR PreMix(iNtRON Biotechnology, Seongnam-si, Korea)를 사용하여 수행하였다. 세포와 자손의 돌연변이를 분석하기 위해 T7E1 분석과 Sanger Sequencing을 수행하였고, 이때 분석에 사용된 프라이머는 아래 표 4에 기재하였고, 아래 표 4는 상기 표 2와 같다.

표 4

[0051]

서열번호	구분	염기서열 (5'→3')
7	ApoE F	TGGGCAGATGCTCTATTGTG
8	ApoE R	TCACGGATAGCACTCACACC
9	CYP17A1 F	CTCTGTAACCCGATGGCAGT
10	CYP17A1 R	CTCACCATCTTGCTGGACAA

[0052] **<실시예 4> ApoE 및 CYP17A1 유전자 녹아웃 동물모델의 제조**

[0053] 상기 실시예 1 내지 3의 과정에 따라 제작한 ApoE 및 CYP17A1 유전자 녹아웃 rat는 wild-type(WT) SD rat와 교배하여 라인을 유지하였으며, homozygous rat와 WT rat을 각각 실험군과 대조군으로 사용하였다. 모든 실험동물은 경희대학교 동물실험윤리위원회 (KHUASP-21-335) 승인을 받아 경희대학교 지침에 따라 수행하였다. 본 연구에 사용된 SD rat은 24±2℃, 50% 습도, 12:12시간의 명암주기를 유지하였다.

[0055] **<실시예 5> ApoE와 CYP17A1 유전자 이중 녹아웃 동물모델의 제조**

[0056] ApoE와 CYP17A1 유전자 이중 녹아웃 동물모델을 제조하기 위하여, 상기 실시예 4의 ApoE homozygous rat 개체와 CYP17A1 heterozygous rat 개체를 교배시켜서 ApoE/CYP17A1 double heterozygous rat개체를 생산하였으며, 이들 ApoE/CYP17A1 double heterozygous rat를 교배를 통해 ApoE와 CYP17A1 유전자 이중 녹아웃 동물모델을 제작하였다.

[0057] 이후, 태어난 새끼의 꼬리에서 Genomic DNA를 추출하였고, ApoE와 CYP17A1 유전자가 모두 녹아웃 개체들만 선정하여 실험에 사용하였다.

[0059] **<실험예 1> 표현학적 분석(phenotyping assay)을 통한 ApoE와 CYP17A1 유전자 이중 녹아웃 랫드의 동맥경화 확인**

[0060] **<1.1> 혈액학적 분석**

[0061] 동맥경화의 발달 과정은 도1에 나타낸 바와 같이 크게 초기변병(Early lesions), vulnerable plaque, thrombosis 세 단계로 구분한다. 상기 실시예 5에서 제조한 ApoE와 CYP17A1 이중 녹아웃 랫드를 주차별(8, 10, 12, 14, 16주차)로 혈액을 채혈하여 동맥경화 시기별 biomarker(sVCAM-1, MPO, MMP-1, P-selcectin)의 수치를 ELISA 키트(enzyme-linked immunosorbent assay kit; MyBioSource, USA)를 이용하여 측정하였다. sVCAM-1, MPO, MMP-1, P-selectin 수치는 제조자의 매뉴얼에 따라 확인하였다.

[0062] 그 결과, 도 2에 나타낸 바와 같이, WT rat에 비해 네 가지 항목 모두 증가한 것을 확인하였으며, early lesions 단계에 해당하는 sVCAM-1은 8주차때 큰 폭으로 증가하였다 시간이 지남에 따라 감소하는 경향을 보였으며, early lesions과 vulnerable plaque에 해당하는 MPO는 시간이 지남에 따라 증가하는 경향을 보였다. Vulnerable plaque에 해당하는 MMP-1의 경우, 10~12주차때 증가하였다가 14~16주차때 조금 감소하였다. 마지막

으로 thrombosis 단계에 해당하는 P-selectin의 수치가 시간이 지남에 따라 증가하는 것을 확인하였다.

[0064] **<1.2> 동맥경화 동물 모델 혈관의 조직학적 분석**

[0065] 상기 실시예 5에서 제조한 ApoE와 CYP17A1 이중 녹아웃 랫드를 주차별(8, 10, 12, 14, 16주차)로 희생하여 대동맥을 적출하여, 조직학적 시료 제작을 위해 10 부리% 포르말린 수용액으로 고정하였다. 이후 파라핀 블록을 제작을 위해 4 mm길이의 조직을 카세트에 한 개씩 분리하여 담고, 알코올 및 자일렌을 단계별로 처리하였으며, 파라핀으로 매립하였다. 파라핀 매립된 조직은 조직박절기로 4 μm 두께로 박절하였고, 유리 슬라이드(Superfrost Plus, Fisher Scientific)에 고정하여 헤마토실린 및 에오신 염색(hematoxylin and eosin stain, H&E stain)을 시행하였다.

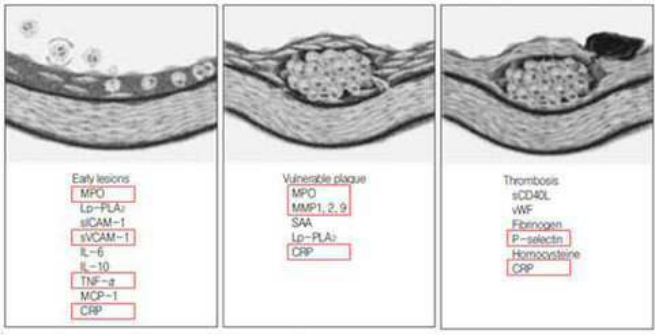
[0066] 이후, 상기의 염색된 조직 절편을 현미경으로 촬영하였으며, 촬영된 혈관 이미지를 imageJ 프로그램을 이용해서 혈관 두께(IMT; intimal media thickness)와 intimal/media ratio을 측정하여 동맥경화 발달단계를 분석하였다.

[0067] 그 결과 도 3과 같이, 동맥경화성 플라크가 형성되지 않았지만, 주차별로 혈관 두께가 대조군 WT rat에 비해 증가한 것을 확인하였으며, 동맥경화 발달을 나타내는 intimal/media ratio의 비율이 12주차부터 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다.

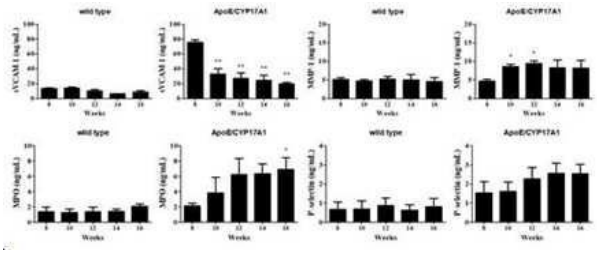
[0069] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허 청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

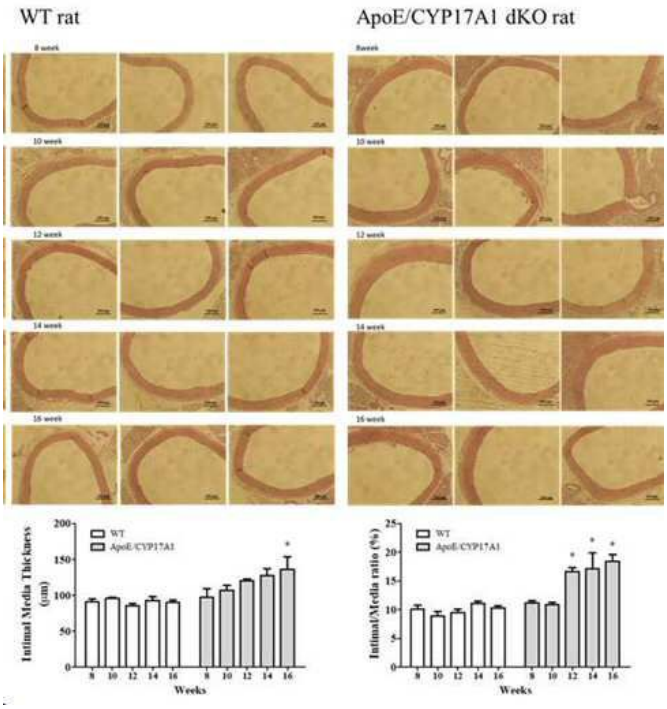
도면1



도면2



도면3


WT rat
ApoE/CYP17A1 dKO rat
10 week
12 week
14 week
16 week
WT
ApoE/CYP17A1
Intimal Media Thickness (μm)
Intimal/Media ratio (%)
Weeks
8 10 12 14 16 8 10 12 14 16

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.