(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0051183
(43) 공개일자 2025년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2024.01) *G01N 33/50* (2017.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/027 (2025.01)
G01N 33/5067 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0133937
(22) 출원일자 2023년10월10일
심사청구일자 2023년10월10일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
유지희
인천광역시 연수구 해돋이로 107, 6동 4401호
(74) 대리인
위병갑

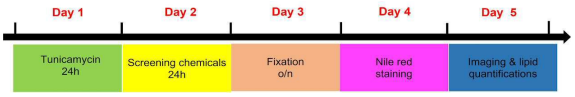
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **제브라피쉬를 이용한 지방간 치료제 약물 스크리닝 방법**

(57) 요 약

본 발명은 비알코올성 지방간 질환 모델의 제작방법 및 이를 통한 지방간 치료제 약물 스크리닝 방법에 관한 것으로, 본 발명의 최적화된 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델의 제작방법으로 제작된 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델은 종래의 동물 모델과 달리 비알코올성 지방간이 신속하게 유도되었으며, 제작이 간단하고 일정한 재현이 가능하며, 지방간 개선 효과를 가진 화합물을 신속하게 선별할 수 있는 효과가 있으므로, 지방간 치료제 신약 후보 물질 발굴 및 약물 독성 반응 평가에 유용하게 활용할 수 있다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
A01K 2207/20 (2013.01)
A01K 2227/40 (2013.01)
A01K 2267/035 (2013.01)
A01K 2267/0393 (2013.01)
G01N 2500/00 (2013.01)
G01N 2800/52 (2021.08)

명 세 서

청구범위

청구항 1

a) 제브라피쉬(zebrafish, *Danio rerio*) 배아(embryo)를 사육하는 단계; 및

b) 수정 후 6일차(day post fertilization, dpf)에 튜니카마이신(tunicamycin)을 처리하는 단계를 포함하는, 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 모델의 제작방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 제브라피쉬 배아는 간 세포-특이적 발현을 유도하는 fabp10 프로모터를 포함하는 벡터로 형질전환된 제브라피쉬의 배아인, 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델의 제작방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 제브라피쉬 배아는 간 특이적으로 형광단백질을 발현하는, 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델의 제작방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 제브라피쉬 배아는 2 또는 3마리/ml의 밀도 조건으로 사육되는, 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델의 제작방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 제브라피쉬 배아는 공복(fasting) 상태로 유지되는, 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델의 제작방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 튜니카마이신을 1 내지 2 μM의 농도로 처리하는, 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델의 제작방법.

청구항 7

제 1항에 있어서, 튜니카마이신을 20 내지 28시간 동안 처리하는, 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델의 제작방법.

청구항 8

제 1항에 있어서, 비알코올성 지방간 질환은 비알코올성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 비알코올성 지방간(non-alcoholic fatty liver; NAFL) 및 NAFLD-연관 간 섬유증(liver fibrosis)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델의 제작방법.

청구항 9

제 1항의 방법으로 제작된 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델.

청구항 10

1) 제 9항의 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델에 피검물질을 처리하는 단계;

2) 피검물질 처리 24시간 후 모델의 간에서 지방량을 측정하는 단계; 및

3) 상기 단계 2)에서 측정한 지방량이 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는, 비알코올성 지방간 질환의 예방 또는 치료 물질의 스크리닝 방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델은 수정 후 6일차(6dpf)의 제브라피쉬 치어에 튜니카마이신을 처리하고 24시간이 지난 수정 후 7일차(7dpf)의 제브라피쉬 치어인, 비알코올성 지방간 질환의 예방 또는 치료 물질의 스크리닝 방법.

청구항 12

제 10항에 있어서, 피검물질을 24시간 동안 처리하는, 비알코올성 지방간 질환의 예방 또는 치료 물질의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 비알코올성 지방간 질환 모델의 제작방법 및 이를 통한 지방간 치료제 약물 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 약물 스크리닝 과정은 많은 비용과 시간이 소요되기 때문에 신약 개발 단계 전반에 있어 효율성은 극대화하면서도 선도물질과 후보물질의 탈락률을 최소화하는 기술이 요구되고 있다. 신약 개발 과정은 크게 기초연구에 의한 작용점 도출 및 선정, 화합물 스크리닝에 의한 유효물질 및 선도물질 선정, 후보물질의 확정, 전임상/임상 1상의 임상화 연구 과정, 임상 2, 3상의 상품화 과정으로 나뉜다. 그러나 비약적인 신약 개발 기술의 발전에도 불구하고 최종 신약으로 개발되는 화합물의 비율은 극히 낮다. 전임상 약물 개발에서 약물의 독성 및 효능 검증을 위해 전통적으로 사용되어 온 스크리닝 방법은 일반적으로 시험관에서 수행하는 in vitro assay 방법과 세포를 대상으로 하는 cell-based assay 방법으로 구분될 수 있다. 간은 생체 내에서 본래 재생 능력을 가지는 대표적인 기관이지만, 간 대사를 평가하기 위한 최적 표준(gold standard)으로 간주되는 일차 인간 간세포(primary human hepatocytes, PHHs)는 in vitro에서 증식 능력 및 장기 기능성이 상실된다는 한계가 있다. 또한 약물의 작용 및 최종 효과는 생체 내 세포와 조직들간의 상호 작용에 의해 나타나므로 in vitro or cell-based assay를 통해 발굴된 많은 후보 물질들은 그 다음의 동물 실험 단계에서 예상치 않은 문제와 부작용 및 약제 독성과 같은 사항들로 대다수 탈락된다. 따라서 신약 개발 초기 과정에서 가능성이 낮은 선도물질과 후보물질을 가려낸 후 탈락시키는 것이 약물 스크리닝 과정의 핵심 기술이라 할 수 있다. 최근에는 이러한 한계를 극복하기 위해 오가노이드(organoids)를 이용한 신약 스크리닝 기술 개발도 많은 진전이 이뤄졌으나 고비용 발생 및 생체 내 환경과 비슷한 주변 조직과의 상호작용을 재현하는 면에 있어서 여전히 한계가 있다.

[0003] 따라서 동물 질환 모델을 이용한 생체 내 약물 스크리닝 플랫폼이 필요하나 약물 스크리닝의 동물 모델로서 포유류는 고비용 및 물류적 문제, 하우징(housing) 요건 때문에 적합하지 않다. 따라서 높은 번식력과 단순한 하우징의 요건을 갖는 상대적으로 작은 크기의 동물 모델이 신약 스크리닝 모델로서 인기를 얻고 있다. 그 중 제브라피쉬(zebrafish)는 신약 개발을 위한 동물 실험 대체제로 급부상하고 있으며 이미 미국과 유럽에서는 약물 스크리닝 및 연구 목적으로 널리 사용되고 있다. 제브라피쉬는 담수 열대어류로 유지 비용은 마우스의 1% 미만이며 적은 약물로도 실험 결과를 신속하게 도출할 수 있어 비용 절감 및 연구 기간을 단축할 수 있다는 장점이 있다.

[0004] 한편, 간(liver)은 신체에서 오른쪽, 위쪽 복강 내에 위치하고 있는 커다란 장기로서 성인 에서는 그 무게가 약 1.5Kg이다. 정상적인 간은 육안 적으로 붉은 색조를 띄 고 있으며 표면은 매끈하다. 이러한 간의 모양과 크기는 간에 질병이 발생 하게 되면 변하게 된다. 대표적인 예로, 술을 많이 마셔서 간에 기름기가 쌓이게 되면 간의 크기가 커지며 기름기에 의해 노란 색조를 띄게 된다. 반대로, 간경변증이 심해지면 간의 크기가 줄어들고 표면은 울퉁불퉁하게 변한다. 간은 여러 가지의 기능을 갖고 있는 매우 중요한 장기로 그 기능을 정리하면 다음과 같다. 첫째, 간은 우리 몸에 있는 여러 가지 영양소들을 적절하게 처리하는 기능, 즉 대사기능을 한다. 장으로부터 흡수된 음식물들은 우리 몸의 여러 조직에서 사용할 수 있도록 간에서 적절히 변화되게 되며, 여러 조직에서 영양소를 이용하고 남은 노폐물들은 다시 간으로 운반되어 처리되는 것이다. 둘째, 간에서는 우리 몸에 필요한 몇 가지 영양소들을 보관하는 기능을 한다. 셋째로는 장에서 영양소 흡수를 위해 꼭 필요한 물질인 담즙산을

만들고 이를 담도를 통해 장으로 배출하는 기능을 한다. 이러한 담즙산이 만들어지지 않으면 여러 영양소의 흡수가 되지 않아서 영양 결핍이 생기게 된다. 넷째, 우리 몸이 적절한 기능을 하는데 절대적으로 필요한 물질들(알부민, 혈액응고단백질, 콜레스테롤 등)을 만드는 기능을 한다. 마지막으로, 술(알코올), 약물, 및 우리 몸에서 생긴 여러 가지 독소를 해독하는 작용이다 (Eugene Brainward, et al. Harrison' s principles of internal medicine. 15th edition. 2001). 비알코올성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 알코올에 의한 간 손상이 아니라, 지방산이 중성지방의 형태로 간의 실질세포 내에 5% 이상 축적된 경우로 정의한다. 병리학적으로는 단순 지방간(simple steatosis)과 염증을 동반한 지방간염(steatohepatitis)으로 분류된다. 비알코올성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH)은 상기 비알코올성 지방간 질환(NAFLD)의 악화 과정에서 발생되는 질환으로, 간세포 내에 지방이 축적되면서 간세포 변성/괴사가 발생하고, 이로 인한 염증 및 간섬유화(liver fibrosis)에 의해 간경화(cirrhosis) 및 간암(liver cancer)으로 발전하게 되기 때문에, 전세계적으로 심각한 질환으로 인식되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델의 제작방법을 제공하는 것이다.

[0006] 또한, 본 발명의 목적은 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델을 제공하는 것이다.

[0007] 아울러, 본 발명의 목적은 비알코올성 지방간 질환의 예방 또는 치료 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델의 제작방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제작된 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델을 제공한다.

[0010] 아울러, 본 발명은 비알코올성 지방간 질환의 예방 또는 치료 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명의 최적화된 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델의 제작방법으로 제작된 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델은 종래의 동물 모델과 달리 비알코올성 지방간이 신속하게 유도되었으며, 제작이 간단하고 일정한 재현이 가능하며, 지방간 개선 효과를 가진 화합물을 신속하게 선별할 수 있는 효과가 있으므로, 지방간 치료제 신약 후보 물질 발굴 및 약물 독성 반응 평가에 유용하게 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 NAFLD 제브라피쉬 치어 동물모델 (fabp10a:CFP 형질전환 Tg)의 간을 공초점 현미경으로 촬영한 후 간 내 지방 방울(lipid droplet)을 정량한 과정을 나타낸 도이다:

a: 제브라피쉬의 간을 공초점 현미경으로 촬영 (x400 배율)한 이미지;

b: 총 6장의 confocal Z-stack 이미지를 압축한 maximum intensity projection image;

c: Image J 프로그램으로 흑백 전환한 maximum intensity projection image; 및

d: image J 프로그램으로 간의 단위 면적당 관찰되는 지방 방울의 수 및 면적 정량.

도 2는 6 dpf의 fabp10a:CFP 형질전환 Tg 제브라피쉬 치어에 튜니카마이신(tunicamycin)을 24시간 처리한 7 dpf의 제브라피쉬 치어에 유도된 비알코올성 지방간을 확인한 도이다.

도 3은 7 dpf의 본 발명의 NAFLD 제브라피쉬 치어 동물모델을 공초점 현미경 이미지, 및 간의 단위 면적 당 지방 방울(lipid droplets)의 면적(%) 및 수를 나타낸 도이다.

도 4는 NAFLD 제브라피쉬 치어 동물모델 제조시 튜니카마이신의 처리 시점에 따른 NAFLD 유도 효과를 비교한 도이다.

도 5는 NAFLD 제브라피쉬 치어 동물모델을 이용한 NAFLD 치료 약물 스크리닝 스케줄을 나타낸 모식도이다.

도 6은 종래의 NAFLD 치료 효과를 가지는 약물 GFT505 처리에 의한 NAFLD 제브라피쉬 치어 동물모델에서의 지방

간 치료 효과를 확인한 도이다.

도 7은 CPT1 억제제 (Etomoxir) 또는 활성화제 (C75)의 처리에 의한 NAFLD 제브라피쉬 치어 동물모델에서의 간 내 지방량 변화를 확인한 도이다.

도 8은 종래 연구에서 지방간 개선 효과를 나타낸 약물들의 처리에 의한 NAFLD 제브라피쉬 치어 동물모델에서의 간 내 지방량 변화를 확인한 도이다.

도 9는 본 발명의 NAFLD 제브라피쉬 치어 동물모델에 지방간 유도 (튜니카마이신 처리) 시점 (Day 1)부터 후보 약물 처리 및 지방간 개선 효능 평가 완료 시점까지의 NAFLD 치료 약물 스크리닝 시스템을 나타낸 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0014] 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. 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.

[0015] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

[0016] 본 명세서에서 사용되는 정도의 용어 "~(하는) 단계" 또는 "~의 단계"는 "~를 위한 단계"를 의미하지 않는다.

[0018] 일 측면에서, 본 발명은 제브라피쉬(zebrafish, *Danio rerio*) 배아(embryo)를 사육하는 단계; 및 수정 후 6일차(day post fertilization, dpf)에 튜니카마이신(tunicamycin)을 처리하는 단계를 포함하는, 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 모델의 제작방법에 관한 것이다.

[0019] 일 구현예에서, 상기 제브라피쉬 배아는 간 세포-특이적 프로모터를 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 제브라피쉬의 배아일 수 있으며, 간 세포-특이적 프로모터는 fabp10 프로모터일 수 있다.

[0020] 일 구현예에서, 상기 간 세포-특이적 프로모터에 형광단백질을 코딩하는 핵산 분자가 작동가능하게 연결되어, 제브라피쉬 배아에서 간 특이적으로 형광단백질이 발현될 수 있고, 형광단백질은 녹색형광단백질(green fluorescent protein, GFP), 향상 녹색형광단백질(Enhanced Green Fluorescent Protein, EGFP), 황색형광단백질(yellow fluorescent protein, YFP), 적색형광단백질(red fluorescent protein, RFP), 주황형광단백질(orange fluorescent protein, OFP), 청록색형광단백질(cyan fluorescent protein, CFP), 청색형광단백질(blue fluorescent protein, BFP), 원적색형광단백질(far-red fluorescent protein) 또는 테트라시스테인 모티프(tetracystein motif)일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 간-특이 형광 단백질(CFP)을 발현하도록 형질전환된 제브라피쉬 Tg (fabp10a:CFP)를 이용하였다.

[0021] 일 구현예에서, 제브라피쉬 배아는 수정 후 6일차(day post fertilization, dpf)까지 배양액 (egg water) 1mL 당 2 또는 3마리의 저밀도로 사육될 수 있다.

[0022] 일 구현예에서, 제브라피쉬 배아는 공복(fasting) 상태로 사육될 수 있으며, 실험 종료 시점까지 공복 상태로 유지될 수 있다.

[0023] 일 구현예에서, 튜니카마이신을 1 내지 2 μM의 농도로 처리할 수 있으며, 20 내지 28시간 동안 처리할 수 있다.

[0024] 일 구현예에서, 비알코올성 지방간 질환은 비알코올성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis, NASH), 비알코

올성 지방간(non-alcoholic fatty liver; NAFL) 및 NAFLD-연관 간 섬유증(liver fibrosis)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있다.

[0025] 본 명세서에서 사용되는 용어 “간 특이적”, “간-특이" 또는 "간세포-특이적"은 간 이외의 기관에서는 발현되지 않거나 낮은 정도로 발현되는 반면, 간에서는 매우 높은 정도로 발현되는 특징을 의미하며, 본 발명의 간 특이적 발현은 간 세포-특이적 발현을 유도하는 fabp10a 프로모터를 활용한 형광 단백질에 의한 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명에서 사용된 용어, "재조합 벡터"는 적합한 숙주에서 핵산 분자의 발현을 이행할 수 있는 적합한 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 핵산 분자를 함유하는 DNA 작제물을 지칭한다. 이러한 조절 서열은 전사를 수행하기 위한 프로모터, 이러한 전사를 조절하기 위한 임의적인 오퍼레이터 서열, 적합한 mRNA 리보솜 결합 부위를 코딩하는 서열, 및 전사 및 번역의 종결을 조절하는 서열을 포함한다. 벡터는 플라스미드, 파지 입자, 바이러스, 또는 단순히 잠재성 게놈 인서트일 수 있다. 적합한 숙주로 변환되면, 벡터는 숙주 게놈과 독립적으로 복제 및 기능할 수 있거나, 또는 일부 경우는, 게놈 자체로 통합될 수 있다. 본 명세서에서, "플라스미드", "발현 플라스미드," "바이러스" 및 "벡터"는 종종 동일한 의미로 사용된다.

[0027] 본 명세서에서 사용된 용어, "작동가능하게 연결된"은 하나의 핵산 단편이 다른 핵산 단편과 결합되어 그의 기능 또는 발현이 다른 핵산 단편에 의해 영향을 받는 것을 의미한다.

[0028] 본 발명에서 사용된 프로모터는 다양한 성질 및 기원일 수 있고 다양한 성질을 가진다. 이는 사용된 프로모터의 선택이 특히 해당 유전자에 좌우되기 때문이다. 이에 따라, 프로모터는 예를 들면 강하거나 약하고, 편재되거나 조직/세포에 특이적이거나, 생리적 또는 병리생리적 상태에 특이적인 프로모터에서 유도될 수 있다(활성은 세포 분화 상태 또는 세포 사이클의 특정 단계에 좌우됨). 프로모터는 진핵생물, 원핵생물, 바이러스, 동물, 식물, 인공, 인간 등의 기원일 수 있다.

[0029] 본 명세서에서 사용된 용어, "형질전환"은 플라스미드 형태의 DNA를 제브라피쉬 또는 이의 발생배에서 분열하는 세포에 물리화학적으로 직접 도입하거나 바이러스를 숙주세포에 감염시켜 외래 유전자를 발현시키는 것을 말하며, 본 발명에서 사용된 용어, "형질전환 (Tg) 제브라피쉬"는 목적 뉴클레오타이드 서열의 통합에 의하여 유전체(genome)가 변형된 제브라피쉬를 말한다.

[0030] 본 명세서에서 사용된 용어, "모델" 또는 "동물 모델(animal model)"은 사람의 질병과 유사한 특정 질환을 가지고 있어, 병인을 규명하고 병태를 확인할 수 있는 연구 대상이 될 수 있는 모델이 되는 동물을 의미한다. 동물 모델로서 본 발명에서 채택한 제브라피쉬는 인간에서와 같은 효과를 예측할 수 있으며, 쉽게 만들 수 있고, 재현성이 높다는 장점이 있다.

[0031] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명의 제브라피쉬 치어 모델은 간에서 지방량이 증가하여 NAFLD가 유도되며, 상기 간 특이적으로 형광단백질이 발현된다. 따라서, 제브라피쉬 치어 모델의 간에서 지방간 유도를 시각적으로 관찰함으로써, NAFLD 치료 물질 개발에 관한 연구에 유용하게 사용할 수 있다.

[0032] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 방법으로 제작된 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델에 관한 것이다.

[0033] 일 구현예에서, 상기 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델은 수정 후 6일차(6dpf)의 난황이 없어진 제브라피쉬 치어에 튜니카마이신을 처리하고 24시간이 지난 수정 후 7일차(7dpf)의 제브라피쉬 치어일 수 있다.

[0034] 일 구현예에서, 상기 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델은 간 특이적으로 형광단백질이 발현될 수 있다.

[0035] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델에 피검물질을 처리하는 단계; 피검물질 처리 24시간 후 모델의 간에서 지방량을 측정하는 단계; 및 상기 단계에서 측정한 지방량이 피검물질을 처리하지 않은 대조군에 비해 감소한 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는, 비알코올성 지방간 질환의 예방 또는 치료 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

[0036] 일 구현예에서, 상기 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델은 수정 후 6일차(6dpf)의 난황이 없는 상태의 제브라피쉬 치어에 튜니카마이신을 처리하고 24시간이 지난 수정 후 7일차(7dpf)의 제브라피쉬 치어일 수 있다.

[0037] 일 구현예에서, 제브라피쉬 배아는 스크리닝 종료 시점까지 공복 상태로 유지될 수 있다.

[0038] 일 구현예에서, 상기 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델은 간 특이적으로 형광단백질이 발현될 수 있다.

[0039] 일 구현예에서, 상기 피검물질을 24시간 동안 처리할 수 있다.

[0040] 일 구현예에서, 간 내 지방량은 간내 지방 방울(lipid droplet)을 공초점 현미경으로 촬영하여 측정할 수 있으며, 간의 단위 면적 당 지방 방울의 수 및 면적을 정량하여 평가할 수 있다.

[0041] 본 발명에서 분석하고자 하는 피검물질은 다양한 물질을 포함한다. 예를 들어, 상기 피검물질은 비알코올성 지방간 질환에 치료에 효과가 있는지 여부를 확인하기 위해 처리하는 물질로서, 화학물질, 단백질, 펩타이드, 항체, 핵산 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명의 스크리닝 방법에 의해 분석되는 피검물질은 단일 화합물 또는 화합물들의 혼합물(예컨대, 천연 추출물 또는 세포 또는 조직 배양물)일 수 있다. 후보물질은 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다. 이러한 화합물의 라이브러리를 얻는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 합성 화합물 라이브러리는 Maybridge Chemical Co.(영국), Comgenex(미국), Brandon Associates(미국), Microsource(미국) 및 Sigma-Aldrich(미국)에서 상업적으로 구입 가능하며, 천연 화합물의 라이브러리는 Pan Laboratories(미국) 및 MycoSearch(미국)에서 상업적으로 구입 가능하다. 시료는 당업계에 공지된 다양한 조합 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있으며, 예를 들어, 생물학적 라이브러리, 공간 어드레서블 패러럴 고상 또는 액상 라이브러리(spatially addressable parallel solid phase or solution phase libraries), 디컨볼루션이 요구되는 합성 라이브러리 방법, "1-비드 1-화합물" 라이브러리 방법, 그리고 친화성 크로마토그래피 선별을 이용하는 합성 라이브러리 방법에 의해 얻을 수 있다. 분자 라이브러리의 합성 방법은, DeWitt et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90, 6909, 1993; Erb et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 91, 11422, 1994; Zuckermann et al., J. Med. Chem. 37, 2678, 1994; Cho et al., Science261, 1303, 1993; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2059, 1994; Carell et al., Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 33, 2061; Gallop et al., J. Med. Chem. 37, 1233, 1994 등에 개시되어 있다.

[0043] 일 구현예에서, 선별하는 단계는 모델의 간에서 지방량을 측정한 결과를 정량적 또는 정성적으로 분석하여 피검물질을 처리한 제브라피쉬 치어 모델과 피검물질을 처리하지 않은 대조군의 간 내 지방량 비교를 통해 대조군에 비해 비알코올성 지방간 증상이 감소한 피검물질을 선별하는 것일 수 있다.

[0044] 또한, 비알코올성 지방간 질환의 증상 감소 정도는, 상기 모델의 간에서 지방 축적 정도를 확인할 수 있는 한, 당업계에 공지된 임의의 방법들을 이용하여 확인할 수 있다.

[0045] 일 측면에서, 본 발명은 본 발명의 제브라피쉬 치어 비알코올성 지방간 질환 모델에 비알코올성 지방간 질환 치료제를 처리하는 단계; 및 상기 모델의 비알코올성 지방간의 진행 여부를 측정하는 단계를 포함하는 비알코올성 지방간 질환에 대한 치료 효과 예측 방법에 관한 것이다.

[0046] 일 구현예에서, 비알코올성 지방간 질환 치료제는 비알코올성 지방간 질환 치료에 효과가 있다고 알려져 있거나 새로 개발된 치료제로서, 바람직하게는 화합물, 펩티드, 펩티드모방체, 기질유사체, 앱타머, 항체 등을 포함할 수 있다.

[0047] 일 구현예에서, 제브라피쉬 배아는 실험 종료 시점까지 공복 상태로 유지될 수 있다.

[0049] 하기의 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명의 내용을 구체화하기 위한 것일 뿐 이에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0051] **실시예 1. 비알코올성 지방간(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 모델 제작**

[0052] 증류수 1L에 Instant Ocean 해수염(Sea Salts) 40g을 녹여 스탁 염을 제조하고, 이를 증류수 1L에 1.5 ml 녹여 최종 60 μg/ml 농도의 Egg Water를 제작하였다. 이 후, 표준 사육 지침에 따라서 키운 fabp10a:CFP 형질전환 Tg 제브라피쉬를 표준 교배 조건에 따라 교배시키고 얻은 제브라피쉬 수정란을 페트리디쉬(petri dish)에 <40마리/egg water 20 ml/10cm dish (2 또는 3 마리/ml의 밀도)로 나눈 후, 인큐베이터(incubator)에서 사육하였다. 수정 후 3일차(3 day post fertilization, dpf)되는 시점에 형광현미경으로 CFP 형광을 발현하는 배아(embryo)들을 선별하여, 실험 종료 시점까지 공복(fasting)을 유지한 상태로 인큐베이터에서 사육하였다. 수정 후 6일

차(6 dpf)에 제브라피쉬를 12 웰 플레이트 (10 내지 12마리/3mL egg water/웰)로 옮겨 난황(yolk)이 거의 소실된 상태인지 현미경으로 확인하고, 제브라피쉬에 튜니카마이신(tunicamycin) 약물을 1 μM 농도로 처리하였다. 이 때, 난황이 다른 개체에 비해 아직 많이 남아있거나 다른 발생학적 기형 혹은 부종(edema)이 동반되어 상태가 양호하지 않은 제브라피쉬는 실험 대상에서 제외시켰으며, 튜니카마이신의 처리 대조군에는 DMSO(dimethyl sulfoxide) 1 μM를 처리하였다. 약물을 처리한 제브라피쉬 치어(larvae)는 인큐베이터에서 24시간 동안 사육하였다.

[0054] **실시예 2. NAFLD 유도 확인**

[0055] 상기 실시예 1에서 제작한 제브라피쉬 치어(larvae) NAFLD 모델에서 NAFLD가 잘 유도되었는지 확인하기 위해, 상기 실시예 1에서 6 dpf 제브라피쉬에 튜니카마이신 1 μM을 처리하고 24시간 뒤의 7 dpf 제브라피쉬 치어에 4% PFA(paraformaldehyde)를 처리하여 4℃에서 하룻밤 동안 고정(fixation)하고, 고정된 제브라피쉬 치어를 PBST(PBS-Tween)로 15분 간격으로 4회 세척하였다. 세척 후, 지방(lipid) 염색을 위해 nile red (stock concentration: 1.25mg/ml acetone)를 0.5 μL/PBST 농도로 1ml 처리하고 1시간 동안 상온에서 암반응시킨 뒤, PBST로 15분 간격으로 4회 세척하여 슬라이드 글라스에 마운팅(mounting)하였다. 간내 지방 방울(intrahepatic lipid droplets)을 촬영하기 위해, 공초점 현미경으로 슬라이드 글라스의 제브라피쉬 치어의 간(liver)을 4 μm 간격 x400 배율로 촬영하고, 촬영한 6장의 Z-stack image를 압축하여 한 장의 maximum intensity projection 이미지를 얻은 뒤 (도 1a 및 b), 이를 image J 프로그램으로 흑백 이미지로 전환하여 간의 단위 면적당 관찰되는 지방 방울의 수와 면적을 정량하였다 (도 1c 및 d).

[0056] 그 결과, 본 발명의 제브라피쉬 치어 NAFLD 모델에서 대조군에 비해 현저하게 간내 지방 방울(lipid droplet)이 증가된 것으로 나타났으며 (도 2), 간의 단위 면적 당 지방 방울의 수 및 면적을 정량한 결과에서도 대조군에 비해 현저하게 간 내 지방 방울의 수 및 면적이 증가한 것으로 나타나 (도 3), 본 발명의 제브라피쉬 치어 NAFLD 모델에서 비알코올성 지방간이 잘 유도된 것을 확인하였다.

[0058] **실시예 3. 튜니카마이신 처리 시점에 따른 NAFLD 유도 차이 확인**

[0059] 제브라피쉬의 치어에서 유의한 정도의 NAFLD를 가장 빠르게 유도할 수 있는 조건을 도출하기 위해, 튜니카마이신을 처리하는 시점을 4dpf, 5dpf 또는 6dpf로 다르게 하고 NAFLD의 유도를 비교하였다.

[0060] 그 결과, 난황이 남아있는 상태인 4 dpf 또는 5 dpf에 튜니카마이신을 처리한 경우 NAFLD가 잘 유도되지 않은 반면, 난황이 완전히 소실되는 시점인 6 dpf에 튜니카마이신을 처리한 경우 NAFLD가 현저하게 유도된 것으로 나타나 (도 4), 6 dpf에 튜니카마이신을 처리하는 것이 NAFLD 유도에 가장 효과적임을 확인하였다.

[0062] **실시예 4. NAFLD 모델 스크리닝 시스템 수립**

[0063] 상기 실시예 1에서 제작한 본 발명의 제브라피쉬 치어 NAFLD 모델을 이용하여 NAFLD 치료 약물을 스크리닝하는 경우 약물의 처리 시점 및 스크리닝 방법을 수립하였다. 구체적으로, 튜니카마이신을 6dpf에 처리하고 24시간 동안 사육하여 제작한 7 dpf 시점의 본 발명의 제브라피쉬 치어 NAFLD 모델이 위치한 웰에서 튜니카마이신이 처리된 egg water를 최대한 제거하고 테스트하고자 하는 스크리닝 약물을 특정 농도로 처리한 egg water를 기존과 동일 볼륨 (3ml/well)으로 교체하여 약물을 처리하였다 (도 5). 이 후, 큐베이터 내에서 다시 24시간 동안 공복(fasting) 상태를 유지하면서 사육하고 (8 dpf), 스크리닝 약물의 NAFLD 치료 효과는 상기 실시예 2에서와 같이 간내 지방 방울(intrahepatic lipid droplets)을 공초점 현미경으로 촬영하고 정량하여 분석함으로써, 스크리닝 약물에 의한 간 내 지방량의 변화가 대조군에 비해 유의한 차이인지를 통계적으로 분석하여 후보 약물의 지방간 개선 효과 유무를 평가하였다.

[0065] **실시예 5. NAFLD 모델 스크리닝 시스템 검증**

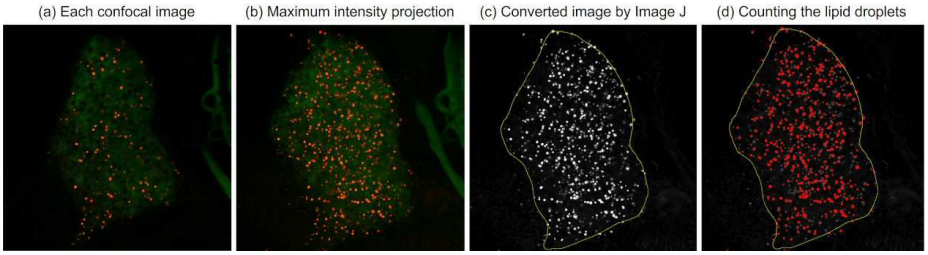
[0066] 상기 실시예 4의 본 발명의 제브라피쉬 치어 NAFLD 모델을 이용한 NAFLD 치료 약물 스크리닝 시스템의 유효성을 테스트하기 위해, 종래의 연구들에서 이미 NAFLD 치료 효과가 검증된 약물들을 스크리닝 약물로 사용하여 모델에서 실제 NAFLD 치료 효과가 있는 것으로 나타나는지 확인하였다. 구체적으로, 본 발명의 제브라피쉬 치어

NAFLD 모델 (6df에 튜니카마이신을 24h 처리한 7dpf의 제브라피쉬 치어)에 PPAR α/δdual 작용제(agonist)인 GFT505 (elafibranor), CPT1(Carnitine palmitoyltransferase 1) 억제제(inhibitor)인 etomoxir, CPT1 활성화제(activator)인 c57, PPAR-α 작용제인 GW7647, 브로모도메인 억제제(bromodomain inhibitor)인 Gne049 및 JQ1, EGFR 억제제인 erlotinib, AG1478 및 gefitinib, vitamin D 호르몬인 calcipotriol 및 Alfacalcidol, 에스트로겐(estrogen)인 17βestradiol(ES) 및 G1, HDAC 억제제인 MS275, 및 FXR 작용제인 DY268 및 tropifexor를 각각 24시간 동안 처리한 뒤 실시예 2의 방법으로 간 내 지방 방울의 수 및 면적을 DMSO 처리 대조군 및 튜니카마이신 처리 대조군과 비교 분석하였다.

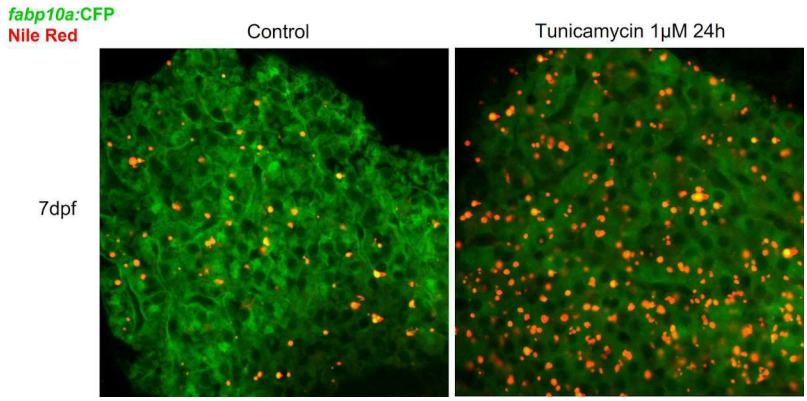
[0067] 그 결과, 인슐린 저항성 및 지질 대사를 개선시키는 효과와 더불어 간 내 지방량을 유의하게 감소시키는 약제로서 비알코올성 지방간염 환자들을 대상으로 현재 3상 임상 연구까지 진행된 약물인 GFT505는 제브라피쉬 치어 NAFLD 모델에 처리시 20 μM 농도에서 간의 단위 면적 당 지방 방울의 수 및 면적이 튜니카마이신을 처리한 대조군에 비해 현저하게 감소하는 것으로 나타났다 (도 6). 또한, 지방산(fatty acid)을 미토콘드리아 내로 운송하여 지방산의 베타 산화 과정을 촉진하는 역할을 하는 rate-limiting enzyme인 CPT1의 비가역적 억제제인 etomoxir를 30 μM 처리한 결과, 간 내 지방량이 현저하게 증가한 반면, CPT1 작용을 촉진하는 것으로 알려진 C75를 20 μM 처리한 결과, 튜니카마이신 처리에 의해 증가한 간 내 지방량이 현저하게 감소되는 것으로 나타났다 (도 7). 또한, PPAR-α 작용제, 브로모도메인 억제제, EGFR 억제제, vitamin D 호르몬, 에스트로겐, HDAC 억제제 및 FXR 작용제 약물들 중 종래 연구에서 지방간 개선 효과를 나타낸 것으로 알려진, GW7647, Gne049, erlotinib, gefitinib, calcipotriol, 17βestradiol, MS275 및 tropifexor를 처리한 경우에도 튜니카마이신을 처리한 대조군 대비 현저하게 지방간이 개선되는 것으로 나타났다 (도 8). 이를 통해, 본 발명의 제브라피쉬 치어 NAFLD 모델의 NAFLD의 치료제 스크리닝 유효성을 확인하였다.

도면

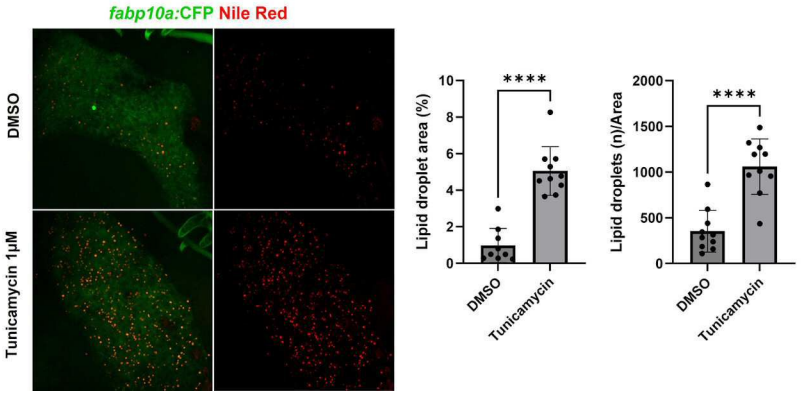
도면1



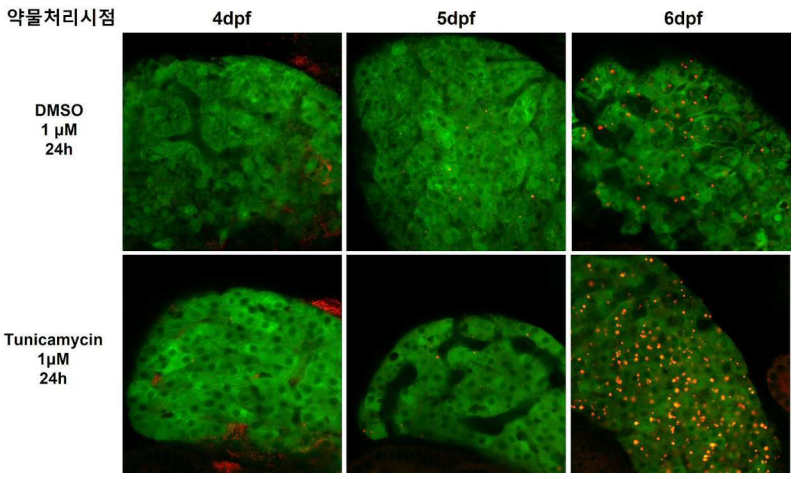
도면2


fabp10a:CFP
Nile Red
Control
Tunicamycin 1μM 24h
7dpf

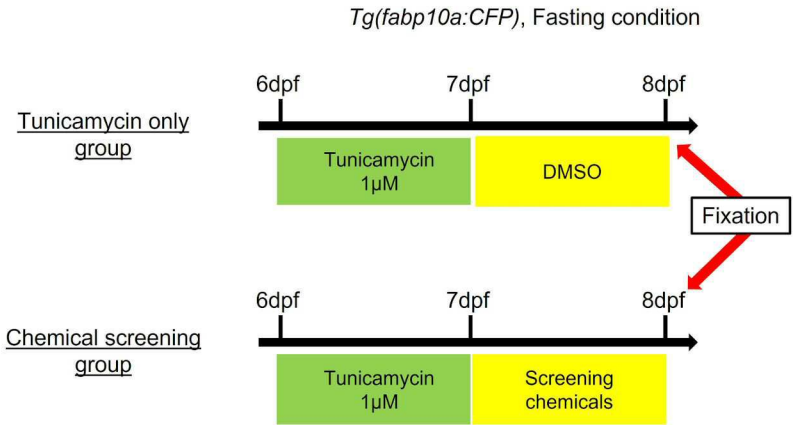
도면3


fabp10a:CFP Nile Red
DMSO
Tunicamycin 1μM
Lipid droplet area (%)
****
DMSO
Tunicamycin
Lipid droplets (n)/Area
****
DMSO
Tunicamycin

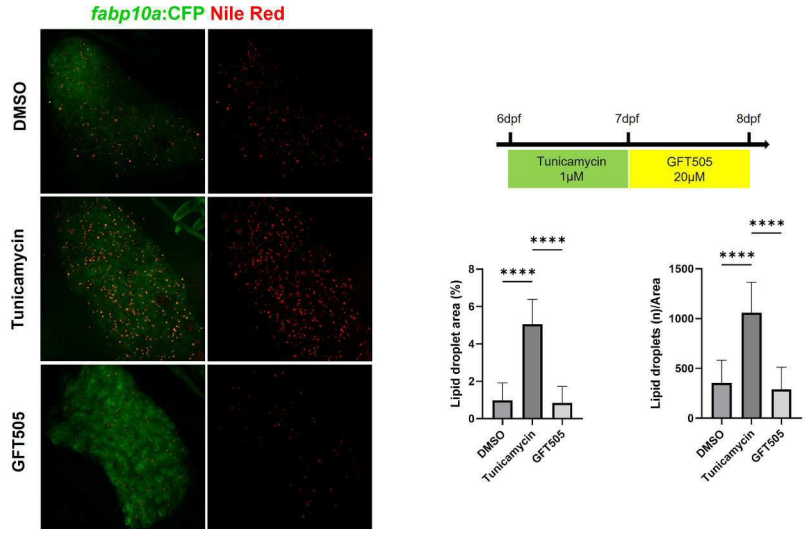
도면4


약물처리시점
4dpf
5dpf
6dpf
DMSO
1 μM
24h
Tunicamycin
1μM
24h

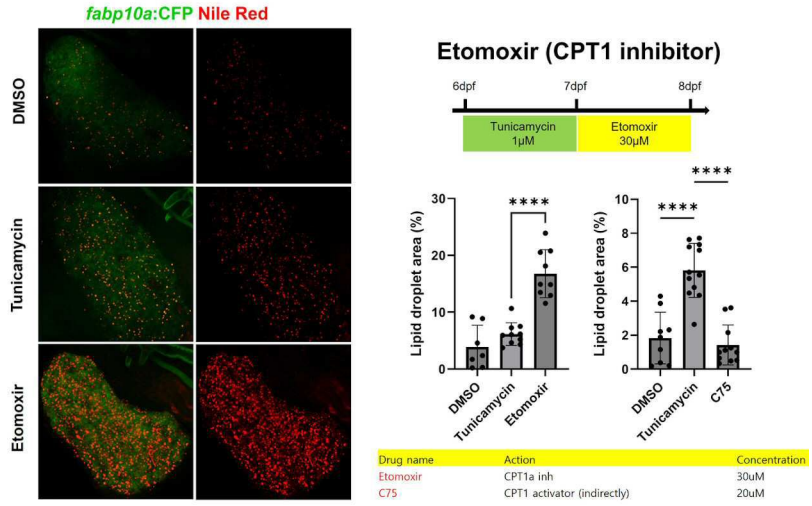
도면5


Tg(fabp10a:CFP), Fasting condition
Tunicamycin only group
6dpf
7dpf
8dpf
Tunicamycin 1μM
DMSO
Fixation
Chemical screening group
6dpf
7dpf
8dpf
Tunicamycin 1μM
Screening chemicals

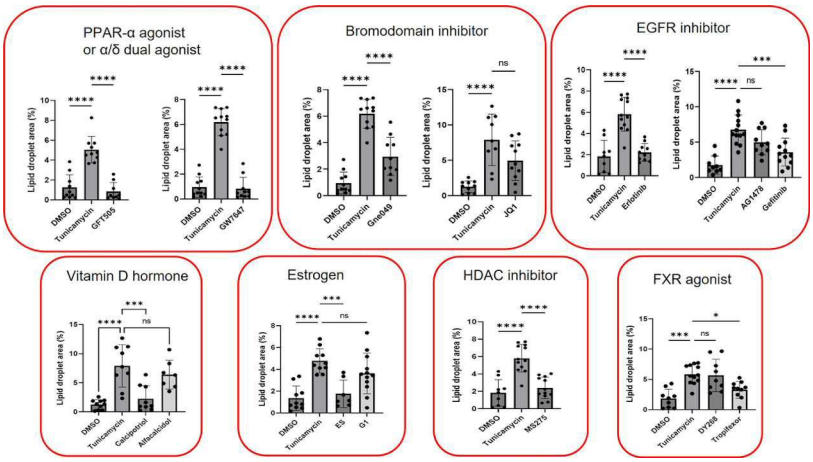
도면6


fabp10a:CFP Nile Red
DMSO
Tunicamycin
GFT505
6dpf
7dpf
8dpf
Tunicamycin 1μM
GFT505 20μM
Lipid droplet area (%)
Lipid droplets (n)/Area
****
DMSO
Tunicamycin
GFT505

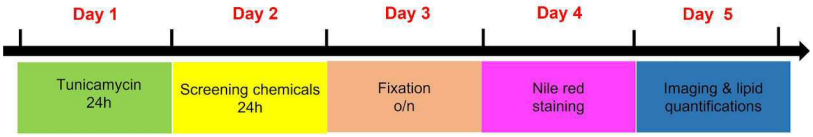
도면7


fabp10a:CFP Nile Red
DMSO
Tunicamycin
Etomoxir
Etomoxir (CPT1 inhibitor)
6dpf
7dpf
8dpf
Tunicamycin 1μM
Etomoxir 30μM
Lipid droplet area (%)
****
DMSO
Tunicamycin
Etomoxir
C75
Drug name
Action
Concentration
Etomoxir
CPT1a inh
30uM
C75
CPT1 activator (indirectly)
20uM

도면8


PPAR-α agonist
or α/δ dual agonist
Bromodomain inhibitor
EGFR inhibitor
Vitamin D hormone
Estrogen
HDAC inhibitor
FXR agonist
Lipid droplet area (%)
DMSO
Tunicamycin
GFT505
GW7647
Gne049
JQ1
Erlotinib
AG1478
Gefitinib
Calcipotriol
Alfacalcidol
ES
GI
MS275
DY268
Tropiflexor

도면9


Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
Day 5
Tunicamycin 24h
Screening chemicals 24h
Fixation o/n
Nile red staining
Imaging & lipid quantifications