



- (51) 국제특허분류:
A61K 38/16 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2014/011208
- (22) 국제출원일: 2014년 11월 20일 (20.11.2014)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2013-0141193 2013년 11월 20일 (20.11.2013) KR
10-2014-0158645 2014년 11월 14일 (14.11.2014) KR
- (71) 출원인: 한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 305-701 대전시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 김진우 (KIM, Jin Woo); 305-701 대전시 유성구 대학로 291 한국과학기술원, Daejeon (KR). 김남석 (KIM, Nam-Suk); 305-701 대전시 유성구 대학로 291 한국과학기술원, Daejeon (KR).
- (74) 대리인: 이원희 (LEE, Won Hee); 135-910 서울시 강남구 테헤란로 147 성지하이츠 2차 8층, Seoul (KR).

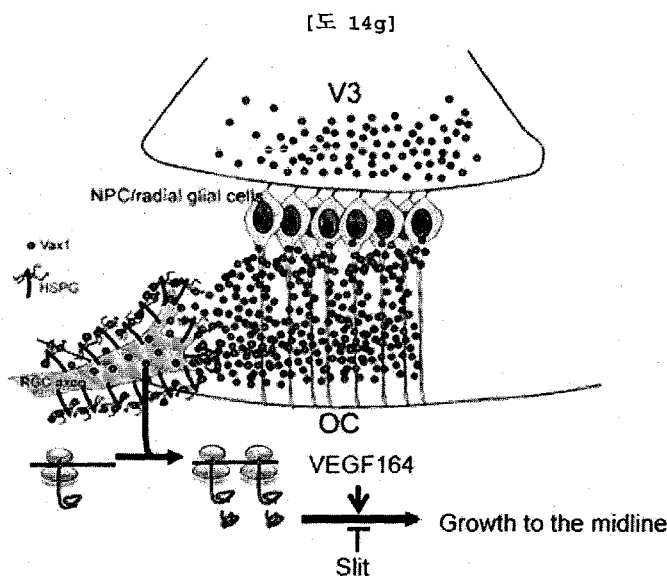
- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

(54) Title: NERVE-CELL-REGENERATING OR NERVE-CELL GROWTH-PROMOTING PHARMACEUTICAL COMPOSITION CONTAINING VAX PROTEIN AS ACTIVE INGREDIENT

(54) 발명의 명칭: Vax 단백질을 유효성분으로 함유하는 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a nerve-cell-regenerating pharmaceutical composition containing Vax protein as an active ingredient, and, more specifically, the Vax protein can advantageously be used as a nerve-cell-regenerating pharmaceutical composition as it has been confirmed that Vax1 is secreted from a ventral hypothalamus (vHT) section isolated from the mouse and that, after the secreted Vax1 has been bound to extracellular sugar groups of heparan sulphate proteoglycans (HSPGs) present in retinal ganglion cell (RGC) axons of a co-cultured retinal section such that the product penetrates as axoplasm (axonoplasm), the synthesis of local protein is activated and the growth of retinal ganglion cells (RGCs) is promoted.

(57) 요약서: 본 발명은 Vax 단백질을 유효성분으로 함유하는 신경세포 재생용 약학적 조성물에 관한 것으로, 구체적으로 마우스에서 분리한 복측 시상하부(ventral hypothalamus, vHT) 절편체에서 Vax1이 분리되고, 상기 분리된 Vax1이 공동배양한 망막 절편체의 망막 신경절 세포(retinal ganglion cell, RGC) 축삭(axon)에 존재하는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(heparan sulfate proteoglycans, HSPGs)의

세포의 당 그룹에 결합하여 축삭형질(axonoplasm)로 침투한 후, 국소 단백질(local protein) 합성을 활성화하여 망막신경절 세포 축삭의 성장을 촉진함을 확인함으로써, 상기 Vax 단백질을 신경세포 재생용 약학적 조성물로 유용하게 사용할 수 있다.

【명세서】

【발명의 명칭】

Vax 단백질을 유효성분으로 함유하는 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물

5

【기술분야】

본 발명은 Vax 단백질을 유효성분으로 함유하는 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물, 및 Vax 단백질을 이용한 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 후보 물질 스크리닝 방법에 관한 것이다.

10

【배경기술】

포유류 양안 시력 시스템(binocular visual system)은 뇌의 배외측 슬상핵(dorsal lateral geniculate nucleus, dLGN) 및 뇌의 상구(superior colliculus, SC)에 있는 신경세포(neuron)에 망막신경절세포(retinal ganglion cell, RGC) 축삭(axon)이 지형학적 시냅스 접촉(topographic synaptic connection)을 이루며 형성된다. 망막신경절세포 축삭이 시냅스 표적에 접촉하기 위하여, 시신경 원판(optic disc, OD), 안병(optic stalk, OS), 시신경교차(optic chiasm, OC) 및 시각로(optic tract, OT)를 포함한 시각경로 구조(optic pathway structure)에서 발현되는 신경축삭 성장 유도 신호(guidance cues)를 인식함으로써, 망막으로부터 나와서 선택적 방향을 향해 성장한다(Lemke and Reber, 2005; Petros et al., 2008). 망막신경절세포 축삭 유도 신호로는 안병에 존재하는 세마포린(semaphorin) 및 시신경교차에 존재하는 에프린B2(efrinB2)와 같은 세포 표면 리간드, 또는 시신경 원판에 있는 네트린-1(netrin-1) 및 시신경교차의 주변 부위에 있는 Slit1과 같은 분비성 인자(secreted factor)가 있다(Erskine and Herrera, 2007). 그러나, 마우스 망막의 복측 및 측두 부위로부터 유래한 망막신경절세포 축삭의 약 3%로만이 동측(ipsilateral) 뇌 반구로 진행하고, 대부분의 마우스 망막신경절세포 축삭은 시신경교차가 있는 복측 시상하부 (ventral

hypothalamus) 중선(midline)을 가로질러 반대 측 (contralateral) 뇌 반구로 진행한다.

복측 시상하부 세포는 시신경교차에서 망막신경절세포 축삭의 방향성을 결정하는 분자들을 발현한다. 예를 들어, 복측 시상하부 방사아교세포(radial glial cell)는 복측-측두 망막신경절세포 축삭에서 발현된 EphB1 수용체(receptor)에 결합하는 에프린B2를 발현하여 동측 시각로로 향하는 축삭을 후퇴하게 한다(Nakagawa et al., 2000; Williams et al., 2003). 반면, 복측 시상하부에서 발현되는 혈관 내피 성장 인자 164(vascular endothelial growth factor 164, VEGF164) 및 신경세포접착분자(neuronal cell adhesion molecule, NrCAM)는 각각 뉴로필린 1(Neurophilin 1) 및 플렉신 A1(Plexin A1)에 결합하여 복측 시상하부 중선을 가로질러 망막신경절세포 축삭 성장을 유도한다(Erskine et al., 2011; Kuwajima et al., 2012; Williams et al., 2006). 망막신경절세포 축삭은 시신경교차에 있는 이들 분자들의 방향성 유도 신호를 받기 위하여 Slit 및 세마포린과 같은 후퇴(repulsive) 유도 신호가 높은 수준으로 발현되는 복측-외측 간뇌 부위(ventral-lateral diencephalic area)를 지나야 한다(Erskine and Herrera, 2007). 그러나, 이들 후퇴 유도신호를 극복하고 망막신경절세포 축삭이 중선으로 성장하게 유도하는 복측 간뇌 부위 분자들의 정체는 아직 잘 알려져 있지 않다.

Vax1(ventral anterior homeobox 1)은 내측 및 외측 무릎융기(medial and lateral geniculate eminence, MGE and LGE), 복측 격막(septum), 각내핵 부위(anterior entopeduncular area, AEP), 시신경앞부위(preoptic area, POA), 복측 시상하부 및 안병을 포함한 다양한 복측-내측 전뇌(forebrain)-유래 구조에서 발현되는 호메오도메인(homeodomain) 전사인자이다(Bertuzzi et al., 1999; Hallonet et al., 1998). 인간 및 쥐에서 Vax1의 유전적 비활성은 안검홍채맥락막선천적결손증(coloboma of the eye) 뿐만 아니라, 전교련(anterior commissure), 뇌량(corpus callosum) 및 시신경교차를 포함한 뇌의 다중 중선 구조의 무발생(agenesis)를 야기한다(Bertuzzi et al., 1999;

Hallonet et al., 1999; Slavotinek et al., 2012). Vax1-결핍 마우스에서 망막신경절세포 축삭은 안병을 통과하여 성장할 수는 있지만 복측 시상하부와 접촉하지 못하고, 결국, 시신경교차가 형성되지 못한다. 또한, Vax1은 망막신경절세포 축삭의 성장 및 섬유축연축(fasciculation)에 있어서 중요한 역할을 하지만 망막신경절세포에서 발현되지 않는다(Bertuzzi et al., 1999).

이에 본 발명자들은 Vax의 망막신경절세포 축삭의 성장을 유도와 관련된 기능과 이를 매개하는 분자를 찾기 위해 노력한 결과, 마우스에서 분리한 복측 시상하부(ventral hypothalamus, vHT) 절편체에서 Vax1이 분비되고, 상기 분비된 Vax1이 공동배양한 망막 절편체의 망막신경절세포(retinal ganglion cell, RGC) 축삭(axon)에 존재하는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(heparan sulfate proteoglycans, HSPGs)의 세포외 당 그룹에 결합하여 축삭형질(axonplasm)로 침투한 후, 국소 단백질(local protein) 합성을 활성화하여 망막신경절세포 축삭의 성장을 촉진함을 확인함으로써, 상기 Vax1 단백질을 망막신경절세포를 포함한 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물로 유용하게 사용할 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명의 상세한 설명】

【기술적 과제】

본 발명의 목적은 Vax 단백질을 유효성분으로 함유하는 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

【기술적 해결방법】

본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 Vax 단백질을 유효성분으로 함유하는 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 Vax 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 세포를 유효성분으로 함유하는 신경세포 재생 또는 신경세포 성장

촉진용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은

1) 피검체로부터 수득한 세포에 피검물질을 처리하고 신경축삭 성장을 측정하는 단계;

5 2) 상기 단계 1)의 세포에서 Vax1 및 헤파란 설페이트 프로테오글리칸의 결합수준을 측정하는 단계;

3) 상기 단계 2)의 Vax1 및 헤파란 설페이트 프로테오글리칸 결합수준을 무처리 대조군과 비교하여 증가시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 후보물질 스크리닝 방법을
10 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 Vax 단백질을 신경세포가 손상된 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경세포 재생 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 Vax 단백질을 신경세포가 손상된 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경세포 성장 촉진 방법을
15 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 Vax 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 세포를 신경세포가 손상된 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경세포 재생 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 Vax 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 세포를 신경세포가 손상된 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경세포 성장 촉진 방법을 제공한다.
20

또한, 본 발명은 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물로 사용하기 위한 Vax 단백질의 용도를 제공한다.

또한, 본 발명은 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물로 사용하기 위한 Vax 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 세포의 용도를 제공한다.
25

【유리한 효과】

본 발명은 Vax 단백질을 유효성분으로 함유하는 신경세포 재생용 약학적
 조성물에 관한 것으로, 배자기 마우스에서 분리한 복측 시상하부(ventral
 hypothalamus, vHT) 절편체에서 Vax1이 분비되고, 상기 분비된 Vax1이
 공동배양한 망막 절편체의 망막신경절세포(retinal ganglion cell, RGC)
 5 축삭(axon)에 존재하는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(heparan sulfate
 proteoglycans, HSPGs)의 세포외 당 그룹에 결합하여 축삭형질(axonplasm)로
 침투한 후, 국소 단백질(local protein) 합성을 활성화하여 망막신경절세포
 축삭의 성장을 촉진시키므로, 상기 분비된 Vax 단백질은 신경세포 재생 또는
 신경세포 성장 촉진용 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

10

【도면의 간단한 설명】

도 1a는 배자기 E13.5(E 13.5)일 된 Vax1 정상 마우스(Vax1+/+) 및 Vax1
 결핍 마우스(Vax1-/-)의 신경간세포(neural progenitor cells, NPC), 발생 중인
 분열 후(post-mitotic neuronal) 신경세포에서 Vax1 단백질의 발현을 나타낸
 15 도이다.

도 1b는 E13.5 Vax1+/+ 및 Vax1-/- 마우스의 시신경교차(optic chiasm,
 OC) 형성 세포에서 Vax1 단백질의 발현을 나타낸 도이다.

도 2a는 망막신경절세포(retinal ganglion cell, RGC) 축삭(axon)의
 방향성을 측정하는 방법을 모식화한 도이다.

20 도 2b는 E13.5 Vax1+/+ 또는 Vax1-/- 마우스에서 분리한 복측
 시상하부(ventral hypothalamic, vHT)와 공동배양한 신경망막(retina, NR)
 절편체에서 성장하는 망막망신경절세포 축삭을 나타낸 도이다.

도 2c는 E13.5 Vax1+/+ 또는 Vax1-/- 마우스에서 분리한 복측 시상하부와
 공동배양한 신경망막 절편체에서 복측 시상하부로 향하는 망막망신경절세포
 25 축삭 끝(tip)의 방향성을 나타낸 도이다:

WT: Vax1+/+; 및

KO: Vax1-/-.

도 2d는 E13.5 Vax1+/+ 또는 Vax1-/- 마우스에서 분리한 복측 시상하부와

공동배양한 신경망막 절편체에서 복측 시상하부로 향하는 망막신경절세포 축삭(shaft)의 방향성을 나타낸 도이다:

WT: Vax1+/+; 및

KO: Vax1-/-.

- 5 도 2e는 E13.5 Vax1+/+ 또는 Vax1-/- 마우스에서 분리한 복측 시상하부 및 이를 지나는 망막신경절세포 축삭의 결합을 확인한 도이다:

Vegfa: vesicular endothelial growth factor, VEGF164;

ISH: In situ hybridization;

NrCAM: neuronal cell adhesion molecule; 및

- 10 IF: immunofluorescence staining(스케일 바(scale bar): 100 μ m).

도 3a는 Vax1, 전사 비활성 Vax1 돌연변이(Vax1(R152S)) 및 Vax2를 과발현시킨 COS7 세포와 공동배양한 신경망막 절편체에서 성장하는 망막신경절세포 축삭을 나타낸 도이다.

- 15 도 3b는 Vax1, 전사 비활성 Vax1 돌연변이(Vax1(R152S)) 및 Vax2를 과발현시킨 COS7 세포와 공동배양한 신경망막 절편체에서 COS7 세포로 향하는 망막신경절세포 축삭의 방향성을 나타낸 도이다.

도 3c는 Vax1, 전사 비활성 Vax1 돌연변이(Vax1(R152S)) 및 Vax2를 과발현시킨 COS7 세포의 성장배지에 존재하는 Vax 단백질을 검출하여 나타낸 도이다.

- 20 도 4a는 Vax1, GFP-Vax1 및 GFP-Vax2를 과발현시킨 HEK293T 세포(좌)의 성장배지를 처리한 COS7 세포(우)에서 Vax 단백질의 위치를 나타낸 도이다:

▶: GFP 면역염색된 손상되지 않은 COS7 세포; 및

→: GFP 면역염색된 죽은 세포 잔해(debris).

- 25 도 4b는 Myc-Vax1 과발현된 HEK293T 세포의 성장배지를 주입한 E13 마우스 뇌의 제3뇌실(the third ventricle)에 존재하는 Vax1 단백질을 나타낸 도이다:

▶: Myc-Vax1이 존재하는 세포.

도 4c는 E14.5 정상(WT) 및 Vax1 결핍(Vax1-/-) 복측 시상하부 절편체의

세포 용해물(cell lysate, CL) 및 성장배지(growth media, GM)에서 Vax1 단백질의 존재를 나타낸 도이다.

도 4d는 복측 시상하부 절편체의 세포 용해물(CL), 및 E14.5 마우스의 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF)의 상층액(S3) 및 죽은 세포잔해(P2)에서 Vax1 단백질의 존재를 나타낸 도이다.

도 4e는 망막신경절세포 축삭 성장 유도에 있어서 Vax1 과발현 COS7 세포에서 분비된 Vax1의 기능을 확인하기 위하여, 비면역(pre-immune) 래빗(rabbit) 면역글로블린(rbIgG), 래빗 항-Vax1 다클론(polyclonal) 항체(-Vax1)를 처리하여 COS7 세포와 공동배양한 신경망막 절편체(NR)에서 COS7를 향해 성장하는 망막신경절세포 축삭을 나타낸 도이다:

→: Myc-태그된 마우스 Vax1이 존재하는 곳(스케일 바: 500 (왼쪽), 스케일 바: 100 (오른쪽)).

도 5a는 비면역(pre-immune) 래빗(rabbit) 면역글로블린(rbIgG), 래빗 항-Vax1 다클론(polyclonal) 항체(α -Vax1) 및 래빗 항-Vax2 다클론 항체(α -Vax2)를 처리하여 복측 시상하부 절편체(vHT)와 공동배양한 신경망막 절편체(NR)에서 복측 시상하부 절편체를 향해 성장하는 망막신경절세포 축삭을 나타낸 도이다:

→: 확대 부위로, 확대부위 내 Vax1(녹색)이 NF160 (적색)으로 표지된 망막신경절세포 축삭에 분포할 경우 두 색깔이 겹쳐진 황색으로 나타난다(스케일 바(scale bar): 500 μ m).

도 5b는 비면역 래빗 면역글로블린(rbIgG), 래빗 항-Vax1 다클론항체(α -Vax1) 및 래빗 항-Vax2 다클론 항체(α -Vax2)를 처리하여 복측 시상하부 절편체(vHT)와 공동배양한 신경망막 절편체(NR)에서 복측 시상하부 절편체로 향하는 망막신경절세포 축삭의 방향성을 나타낸 도이다.

도 5c는 비면역 래빗 면역글로블린(rbIgG), 래빗 항-Vax1 다클론항체(α -Vax1) 및 래빗 항-Vax2 다클론 항체(α -Vax2)를 처리하여 복측 시상하부 절편체(vHT)와 공동배양한 신경망막 절편체(NR)에서 복측 시상하부 절편체로 향하는 망막신경절세포 축삭의 수 및 두께를 나타낸 도이다.

도 5d는 망막 절편체에 6X-His에 플루오레세인이소티오시안산염(fluorescein isothiocyanate, FITC)이 표지된 펩타이드(peptide)(100 ng/ml) 또는 His이 태그된 Vax1에 FITC이 표지된 재조합 단백질(500 ng/ml)을 첨가하여 배양한 후, 이를 확인한 도이다:

5 ▶: 확대 부위.

도 5e는 망막 절편체에 6X-His 펩타이드(100 ng/ml) 또는 Vax1-His-FITC 단백질(500 ng/ml)을 첨가하여 배양한 후, 면역염색하여 나타낸 도이다:

→: Vax1과 His 단백질 위치.

도 5f는 망막 절편체의 사분면에서 6X-His 펩타이드(25 ng/ml, 하얀색
10 막대) 또는 Vax1-His 단백질(100 ng/ml, 검은색 막대)를 처리하고 24 시간 후
변화한 축삭 길이를 측정하여 나타낸 도이다:

DN: Dorsal Nasal;

DT: Dorsal Temporal;

VN: Ventral Nasal; 및

15 VT: Ventral Temporal.

도 5g의 (A)는 망막 절편체에 His-태그된 Vax2(100 ng/ml)을 첨가하거나,
하지않은 상태로 24 시간 동안 배양한 후면역 염색하여 나타낸 도이고, (B)는
망막신경절세포 축삭 길이를 측정하여 그래프로 나타낸 도이다:

→: Vax2-His의 위치(스케일 바: 500 μ m(위쪽), 스케일 바: 100
20 μ m(아래쪽)).

도 6a는 비면역 래빗 면역글로블린(rbIgG), 래빗 항-Vax1 다클론
항체(α -Vax1)를 주입한 E13.5 마우스의 제3뇌실(V3)에서 망막신경절세포
축삭의 성장을 나타낸 도이다:

A: 전측(anterior);

25 P: 후측(posterior);

M: 내측(medial);

L: 외측(lateral); 및

*: 시신경교차(optic chiasm).

도 6b는 Vax1 재조합 단백질, 또는 Vax1 재조합 단백질 및 래빗 항-Vax1 다클론 항체(α -Vax1)를 처리한 신경망막 절편체에서 성장하는 망막신경절세포 축삭을 나타낸 도이다:

- : 확대 부위로, 확대부위 내 Vax1(녹색)이 NF160 (적색)으로 표지된
5 망막신경절세포 축삭에 분포할 경우 두 색깔이 겹쳐진 황색으로 나타난다(스케일 바: 500 μ m).

도 6c는 Vax1 재조합 단백질, 또는 Vax1 재조합 단백질 및 래빗 항-Vax1 다클론 항체(α -Vax1)를 처리한 신경망막 절편체에서 시간에 따른 망막신경절세포 축삭의 길이를 나타낸 도이다.

- 10 도 6d는 Vax1 재조합 단백질, 또는 Vax1 재조합 단백질 및 래빗 항-Vax1 다클론 항체(α -Vax1)를 처리한 신경망막 절편체에서 망막신경절세포 축삭의 수, 두께 및 길이를 나타낸 도이다.

도 7a는 Vax1+/+ 및 Vax1lacZ/lacZ E14.5 마우스의 망막에서 Vax1 mRNA의 발현을 나타낸 도이다.

- 15 도 7b는 Vax1+/lacZ 및 Vax1lacZ/lacZ E14.5 마우스의 시각경로 구조(optic pathway structure)에서 Vax1 단백질 및 베타 갈락토시다아제(β -galactosidase, β -gal)의 발현을 나타낸 도이다:

GCL: 신경절세포층(ganglion cell layer); 및

NBL: 신경아세포층(neuroblast layer).

- 20 도 7c는 Vax1+/+ 및 Vax1lacZ/lacZ E14.5 마우스의 망막에서 존재하는 Vax1 단백질을 나타낸 도이다:

▶: 망막신경절세포 축삭 표지자인 NF160(neurofilament)가 면역염색된 부위; 및

→: NF160 및 Vax1이 면역염색된 부위.

- 25 도 7d는 Vax1+/+ 및 Vax1lacZ/lacZ E18.5 마우스의 망막 및 시신경에 존재하는 Vax1 단백질을 나타낸 도이다:

RGC: 망막신경절세포;

OS APC: 안병 별아교전구세포(optic disc astrocyte precursor cell);

RGC에 있는 ►: 세포내 유입 소포(endocytic vesicle)에 존재하는 Vax1 단백질; 및

RGC에 있는 →: RGC 세포막 막(plasma membrane)의 세포외(extracellular) 표면에 결합된 Vax1 단백질;

5 OS APC에 있는 ►: 수송 소포(trafficking vesicle)에 존재하는 Vax1 단백질; 및

OS APC에 있는 →: 핵에 있는 크로마틴(chromatin)과 연관된 Vax1 단백질.

도 7e의 (A)는 Vax1^{+/+}(WT) 및 Vax1^{-/-} E14.5 마우스로부터 준비된 뇌
10 섹션에서 [33P]-CTP-표지된 안티센스(antisense) Vax1 프로브(probe)를 이용해 Mui et al., 2005에 기재된 방법으로 계내 RNA 혼성화(in situ RNA hybridization)를 수행하여 Vax1 mRNA 발현을 [33P]-CTP-표지된 안티센스(antisense) Vax1 프로브(probe)의 방사선 강도를 시각화하여 나타낸 도이고, (B)는 E14.5 Vax1^{+/+}lacZ 및 Vax1^{lacZ/lacZ} 마우스에서 뇌 섹션을
15 획득하여 면역염색으로 시각화하여 나타낸 도이다:

HCC: Hypothalamic cell cord;

ON: Optic nerve; 및

OC: Optic chiasm.

도 8은 Ptc-gal4>Vax1-EGFP,Ds-Red 초파리,
20 Ptc-gal4>Vax1-EGFP,Ds-Red,Sdc23 초파리, Ptc-gal4>Vax1-EGFP,Ds-Red,Sdc 초파리, 및 Ptc-gal4>Vax1-EGFP,Ds-Red,Dlp 초파리의 날개 성충판(imaginal disc)에서 녹색형광단백질이 표지된 Vax1 단백질 및 동일 세포에서 발현된 적색형광단백질(dsRed)의 분포를 나타낸 도이다.

도 9a는 출생 0일(post-natal day 0, P0) 마우스의 시신경에서 Vax1 및
25 신데칸2(Sdc2)의 결합을 공동면역침강법(co-immunoprecipitation)으로 조사한 결과를 나타낸 도이다.

도 9b는 Vax1, 및 GFP-Sdc1 또는 GFP-Sdc2 과발현된 HEK293T 세포에서 Vax1, 및 신데칸1(Sdc1) 또는 신데칸2(Sdc2)의 결합을 공동면역침강법으로

조사한 결과를 나타낸 도이다.

도 9c는 Vax2, 및 GFP-Sdc1 또는 GFP-Sdc2 과발현된 HEK293T 세포에서 Vax1, 및 Sdc1 또는 Sdc2의 결합을 공동면역침강법으로 조사한 결과를 나타낸 도이다.

5 도 9d는 Vax1, 및 GFP-Sdc2-N 또는 GFP-Sdc2-C 과발현된 HEK293T 세포에서 Vax1, 및 Sdc2-N 또는 Sdc2-C의 결합을 공동면역침강법으로 조사한 결과를 나타낸 도이다.

도 9e는 헤파린(heparin)을 처리한 E14.5 마우스 시신경에서 Vax1과 결합하는 단백질을 공동면역침강법으로 조사한 결과를 나타낸 도이다.

10 도 9f는 헤파란 설페이트(HS) 또는 CS가 코팅된 사파로즈 4B(sepharose 4B) 레진(resin)과 Vax1 단백질의 결합을 나타낸 도이다.

도 10a는 Vax1 단백질, Vax1 단백질 및 헤파리나제 I(heparinase I), 및 Vax1 단백질 및 콘드로이티나제ABC(chondroitinase ABC, ChnaseABC) 처리한 신경망막 절편체에서 성장하는 망막신경절세포 축삭을 나타낸 도이다:

15 →: 확대 부위로, 확대부위 내 Vax1(녹색)이 NF160 (적색)으로 표지된 망막신경절세포 축삭에 분포할 경우 두 색깔이 겹쳐진 황색으로 나타난다(스케일 바: 500 μ m).

도 10b는 Vax1 단백질 및 Otx2 당 결합 모티프와 상동성을 가지는 Vax1 아미노산 서열 101 내지 112를 암호화하는 바이오틴(biotin) 표지된 Vax1
20 KR-펩타이드(KR-bio), Vax1 단백질 및 두 개의 중요한 당 결합 잔기 101번 리신 및 102번 알기닌(Lys101-Arg102(KR))을 알라닌(Ala-Ala(AA))으로 치환한 AA-bio 펩타이드, 또는 Lys101-Arg102(KR)을 Ala-Ala(AA)로 치환한 Vax1(KR/AA) 돌연변이 단백질을 처리한 신경망막 절편체에서 성장하는 망막신경절세포 축삭을 나타낸 도이다:

25 →: 확대 부위로, 확대부위 내 Vax1(녹색)이 NF160 (적색)으로 표지된 망막신경절세포 축삭에 분포할 경우 두 색깔이 겹쳐진 황색으로 나타난다(스케일 바: 500 μ m).

도 10c는 Vax1 단백질, Vax1 단백질 및 헤파리나제 I, 및 Vax1 단백질 및

콘드로이티나제ABC, Vax1 단백질 및 Vax1 KR-펩타이드(KR-bio), Vax1 단백질 및 AA-bio 펩타이드, 및 Vax1(KR/AA) 돌연변이 단백질을 처리한 신경망막 절편체에서 망막신경절세포 축삭의 성장을 나타낸 도이다.

5 도 11a는 헤파린을 처리한 Vax1 및 Vax1(KR/AA) 과발현 HEK293T 세포의 성장배지에 존재하는 Vax1 단백질을 웨스턴 블롯팅(western blotting)으로 조사한 결과를 나타낸 도이다.

도 11b는 GFP-Sdc2, 및 Vax1 또는 Vax1(KR/AA) 과발현 HEK293T 세포에서 Sdc2와 결합하는 Vax1 단백질을 공동면역침강법으로 조사한 결과를 나타낸 도이다.

10 도 11c는 Myc-Vax1 또는 Myc-Vax1(KR/AA) 과발현 HEK293T 세포의 성장배지를 첨가한 COS7 세포에 존재하는 Vax1 단백질을 나타낸 도이다.

도 12a는 GFP-Sdc2, 및 안테나페디아(antennapedia, Antp)의 세포-침투 영역의 중요한 잔기와 상동성을 가지는 147번 트립토판(Trp) 및 148번 페닐알라닌(Phe)(WR) 아미노산 잔기를 Ser-Arg(SR)로 치환한 Myc-Vax1(WF/SR)
15 돌연변이 또는 Myc-Vax1을 과발현한 HEK293T 세포에서 Sdc2와 결합하는 Vax1 단백질을 공동면역침강법으로 조사한 결과를 나타낸 도이다.

도 12b는 Myc-Vax1 또는 Myc-Vax1(WF/SR) 과발현 HEK293T 세포의 성장배지를 첨가한 COS7 세포에 존재하는 Vax1 단백질을 웨스턴 블롯팅으로 조사한 결과를 나타낸 도이다.

20 도 12c는 Myc-Vax1 또는 Myc-Vax1(WF/SR) 과발현 COS7 세포와 공동배양한 신경망막(NR) 절편체에서 COS7 세포를 향해 성장하는 망막신경절세포 축삭을 나타낸 도이다.

도 12d는 Myc-Vax1 또는 Myc-Vax1(WF/SR) 과발현 COS7 세포와 공동배양한 신경망막(NR) 절편체에서 COS7 세포로 향하는 망막신경절세포 축삭의 방향성을
25 나타낸 도이다.

도 13a는 GST 및 GST-Vax1 과발현된 HEK293T 세포에서 세포질(cytoplasm) 분획에서 Vax1 단백질 복합체를 구성하는 단백질을 나타낸 도이다.

도 13b는 Vax1 또는 Vax1(WF/SR) 단백질이 포함된 배지에서 배양한

신경망막 절편체에서 새로 합성되는 단백질을 녹색형광을 이용해 표지하여 나타낸 도이다.

도 13c는 Vax1 또는 Vax1(WF/SR) 단백질이 포함된 배지에서 배양한 신경망막 절편체에서 분리한 축삭에서 새로 합성되는 단백질을 녹색형광을 이용해 표지하여 나타낸 도이다.

도 13d는 Vax1 또는 Vax1(WF/SR) 단백질이 포함된 배지에서 배양한 신경망막 절편체에서 분리한 축삭의 성장을 나타낸 도이다.

도 14a의 (A)는 His-펩타이드, Vax1-His, Vax1(WF/SR)-His, Robo1-Fc 분절 등을 주입한 Vax1lacZ/lacZ 배자기 마우스의 제3뇌실에서 망막신경절세포 축삭의 성장을 면역염색으로 나타낸 도이고, (B)는 형광 강도를 측정하여 그래프로 나타낸 도이다.

도 14b의 (A)는 Vax1 및 Slit2를 농도별로 공동 처리한 신경망막 절편체에서 성장하는 망막신경절세포 축삭을 나타낸 도이고, Vax1 및 Slit2를 농도별로 공동 처리한 신경망막 절편체에서 성장하는 망막신경절세포 축삭의 길이를 그래프로 나타낸 도이다.

도 14c의 (A)는 E13.5 마우스 신경망막 절편체와 Vax1-낙아웃 복측 시상하부 절편체를 함께 Robo 1-Fc이 존재하거나, 없는 상태로 24 시간 동안 배양한 후, 이를 시각화하고, 면역 염색하여 나타낸 도이고, (B)는 망막신경절세포 축삭의 방향성을 계수하여 그래프로 나타낸 도이다:

20 +: 정방향;
 0: 중립; 및
 -: 역방향.

도 14d는 Vax1 및 Slit2를 농도별로 공동 처리한 신경망막 절편체에서 성장하는 망막신경절세포 축삭을 면역염색하여 나타내고, 이의 형광 강도를 그래프로 나타낸 도이다(스케일바: 20 μ m).

도 14e는 Vax1, 또는 Vax1 및 Slit2 단백질을 처리한 신경망막 절편체에서 망막신경절세포 축삭 내로 침투하는 Vax1 단백질을 나타낸 도이다.

도 14f는 Vax1, Vax1(R152S) 및 Vax1(WF/SR)으로 처리한 대뇌

절편(cortical explants)의 축삭 내로 침투한 Vax1 단백질을 면역형광염색으로 조사한 결과를 나타낸 도이다.

도 14g는 분비된 Vax1 단백질에 의한 망막신경절세포 축삭 성장 조절 모델의 모식도를 나타낸 도이다.

5

【발명의 실시를 위한 최선의 형태】

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 Vax(ventral anterior homeobox) 단백질을 유효성분으로
10 함유하는 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물을 제공한다.

상기 Vax 단백질은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 Vax1
단백질 또는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 Vax2 단백질로
이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하나 이에 한정되지
15 않는다.

상기 신경세포는 Vax1이 결핍된 시신경(optic nerve), 대뇌교차신경
(cortical commissural nerve), 해마교차신경(hippocampal commissural nerve),
뇌하수체교차신경(hypothalamic commissural nerve), 삼차신경(trigeminal
nerve)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에
20 한정되지 않는다.

상기 Vax1은 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(heparan sulfate
proteoglycan, HSPG)과 결합하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 망막신경절세포 축삭의
25 성장에 있어서 Vax1 단백질의 기능을 확인하기 위하여, Vax1lacZ/+ 및
Vax1lacZ/lacZ 낙인(knock-in) 및 Vax1-/- 낙아웃(knock-out) 마우스를 제작하고,
상기 획득한 마우스에서 신경망막(neural retina, NR) 및 복측
시상하부(ventral hypothalamic, vHT) 절편체(explant)를 분리하여 배양하였다.

또한, Vax1이 과발현된 Ptc-Gal4>UAS-Vax1-EGFP, UAS-DsRed;+, Ptc-Gal4>UAS-Vax1-EGFP, UAS-DsRed;Sdc23, Ptc-Gal4>UAS-Vax1-EGFP, UAS-DsRed;Sdc, Ptc-Gal4>UAS-Vax1-EGFP, UAS-DsRed;Dlp 초파리를 제작하였다.

5 또한, 본 발명자들은 Vax1이 시신경교차 구조(optic pathway structure)에 미치는 영향을 확인하기 위하여, Vax1+/+(WT) 및 Vax1-/- 마우스의 시신경교차 구성 세포를 대상으로 면역염색법(immunostaining)을 수행한 결과, Vax1이 Sox2(SRY box 2)-양성 신경간세포 및 네스틴(nestin, RC2)-양성 방사아교세포(radial glia)에서 발견되었다. 또한, 시신경교차 구성 세포인
10 신경간세포 및 방사아교세포가 Vax1-/- 마우스에서 정상적으로 발달하는 것을 확인하였다. 따라서 상기 Vax1은 신경간세포 및 방사아교세포에 존재하는 시신경교차에서 발현되고, Vax1-/- 마우스에서 시신경교차의 비정상적인 발달은 시신경교차 형성 관련 복측 시상하부 세포의 잘못된 형성에 의한 것은 아님을 확인하였다(도 1a 및 도 1b 참조).

15 또한, 본 발명자들은 Vax1이 시신경교차 발달에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 배자기 13.5일 된(E13.5) Vax1+/+(WT) 및 Vax1-/(KO) 마우스의 신경망막 절편체 및 복측 시상하부 절편체를 공동배양하여 망막신경절세포 축삭 성장 관찰 및 방향성을 측정한 결과, Vax1+/+(WT) 신경망막 절편체에서 Vax1-/(KO) 복측 시상하부 절편체로 향하는 망막신경절세포 축삭의 수가
20 감소하는 것을 확인함으로써, 복측 시상하부 절편체에서 유래한 Vax1이 망막에서 망막신경절세포 축삭 성장을 직·간접적으로 유도함을 확인하였다. 따라서, Vax1이 비세포-자율적인(non-cell autonomous) 방법으로 분비된 축삭 유도 분자를 통해 망막신경절세포 축삭 성장을 조절함을 확인하였다(도 2a 내지 도 2e 참조).

25 또한, 본 발명자들은 Vax1의 전사활성이 망막신경절세포 축삭 성장에 영향을 미치는지 확인하기 위하여, Vax1, 전사 비활성 Vax1 돌연변이(Vax1(R152S)) 및 Vax1과 동일한 호메오도메인(homeodomain)을 공유하는 Vax2를 과발현시킨 COS7 세포를 이용하여 면역염색법, 망막신경절세포

축삭 성장의 방향성 측정 및 배지 내 단백질에 대한 웨스턴 블롯팅(western blotting)을 수행한 결과, 신경망막 절편체에서 Vax1 및 Vax1(R152S) 과발현된 COS7 세포를 향해 성장하는 망막신경절세포 축삭의 수가 대조군에 비해 현저하게 증가하고, 흥미롭게도 Vax1 및 Vax1(R152S) 단백질은 해당 단백질을 발현하지 않는 망막신경절세포 축삭에서도 관찰되는 것을 확인하였다. 또한, 상기 Vax1 및 Vax1(R152S) 과발현된 COS7 세포의 세포 용해물(cell lysate, CL) 및 성장배지(growth media, GM)에서 Vax1 및 Vax1(R152S) 단백질이 모두 발견되는 것을 확인함으로써, 상기 Vax1이 전사활성과 상관없이 세포 밖으로 분비되어 망막신경절세포 축삭 성장을 유도함을 확인하였다(도 3a 내지 도 3c).

또한, 본 발명자들은 망막신경절세포 축삭 성장 유도에 있어서 Vax1 분비를 확인하기 위하여, Vax1 또는 Vax2 과발현 HEK293T 세포 성장배지를 첨가한 COS7 세포 및 Vax1 과발현 HEK293T 세포 성장배지를 E13.5 마우스 뇌실에 주입 한 뇌 절편(section)을 이용하여 면역염색법 및 웨스턴 블롯팅을 수행한 결과, Vax1 과발현 HEK293T 세포 성장배지에 있는 Vax1 단백질이 체외배양 COS7 세포 및 체내배양 복측 간뇌(ventral diencephalic, vDC)에서 발견됨을 확인하였다. 또한, 복측 시상하부 절편체의 세포 용해물 및 성장배지, 및 뇌 척수액(cerebrospinal fluid, CSF)에서도 Vax1 단백질이 발견되는 것을 확인함으로써, 상기 Vax1 단백질이 체외배양뿐만 아니라 체내 세포로부터 분비되는 단백질이며, 따라서, Vax1 단백질이 전사활성과 관계없이 복측 시상하부에서 분비되는 단백질임을 확인하였다(도 4a 내지 도 4e 참조).

또한, 본 발명자들은 분비된 Vax1 단백질이 복측 시상하부 절편체를 향한 망막신경절세포 축삭 성장을 유도하는 분비 단백질인지 확인하기 위하여, 래빗(rabbit) 항-Vax1 다클론(polyclonal) 항체 및 항 Vax2 다클론 항체로 세포의 Vax 단백질을 격리시킨 상태에서 공동배양한 신경망막 절편체 및 복측 시상하부 절편체로의 망막신경절세포 축삭 성장 방향성 및 길이 측정을 수행한 결과, 항-Vax1 항체를 처리한 신경망막 절편체에서 복측 시상하부 절편체를 향해 성장하는 망막신경절세포 축삭의 수 및 두께가 감소하는 것을

확인함으로써, 상기 세포의 Vax1이 축삭의 섬유축연축(fasciculation)에 중요한 역할을 함을 확인하였고, Vax1-His-FITC 단백질을 이용하여 확인한 결과, 망막신경절세포 축삭의 성장에 강한 자극 효과를 발휘하고, 망막신경절세포 축삭의 성장에 강한 자극 효과를 발휘하는 것을 확인하였으며, Vax2의 경우에도 Vax1과 거의 동일하게 망막신경절세포 축삭의 성장을 유도하는 것을 확인하였다(도 5a 내지 도 5g 참조).

또한, 본 발명자들은 체내(in vivo)에서 망막신경절세포 축삭 성장에 있어서 세포의 Vax1의 역할을 확인하기 위하여, 항-Vax1 다클론 항체를 제3뇌실에 이식한 E13.5 마우스 뇌 절편을 이용하여 DiI 축삭염색제 검출 및 면역염색법을 수행한 결과, 항-Vax1 다클론 항체를 이식한 마우스에서 시신경교차로 향하는 망막신경절세포 축삭이 감소하고, 복측 간뇌의 외측 벽에서 축삭이 멈춰있으며, 망막신경절세포 축삭 내 Vax1 단백질의 분포가 감소함을 확인하였다.

또한, 본 발명자들은 Vax1 재조합 단백질 또는 항-Vax1 다클론 항체를 신경망막 절편체 배양액에 처리 한 후 면역염색법, 망막신경절세포 축삭 성장, 축삭 두께 측정 등을 수행한 결과, Vax1 재조합 단백질을 처리한 신경망막 절편체에서 망막신경절세포 축삭의 수, 두께 및 길이가 증가하고, 반대로 신경망막 Vax1 재조합 단백질 및 항-Vax1 다클론 항체를 처리한 신경망막 절편체에서 망막신경절세포 축삭의 수, 두께 및 길이가 감소하는 것을 확인함으로써, 상기 재조합 Vax1 단백질이 망막신경절세포 축삭 성장 자극 효과를 직접 나타냄을 확인하였다(도 6a 내지 도 6d 참조).

또한, 본 발명자들은 Vax1 mRNA 및 단백질이 망막에서도 발현되는지 확인하기 위하여, Vax1^{+/+}, Vax1^{lacZ/lacZ} 및 Vax1^{+/lacZ} 마우스의 망막 및 뇌 섹션을 이용하여 계내 RNA 혼성화(in situ RNA hybridization)법을 수행한 결과, Vax1^{+/+} 마우스 안구 및 시신경에서 망막을 제외한 시신경 원판(OD), 안병(OS) 및 시신경교차앞구역(POA)에서 Vax1 mRNA가 발견됨을 확인하였다. 또한, 각각의 상동염색체에서 Vax1과 베타-갈락토시다제 (beta-galactosidase; lacZ)를 발현하는 Vax1^{+/lacZ} 마우스 안구 절편을 항-Vax1 다중 항체와

베타-갈락토시다제 항체를 이용한 면역염색법을 통해 조사한 결과, Vax1이 베타-갈락토시다제 (beta-galactosidase)를 동시 발현하는 Vax1+/lacZ 마우스의 안병(OS) 별아교전구세포(astrocyte precursor cell, APC)에서 발현되는 것을 확인하였다. 이와 별도로 Vax1 단백질은 베타-갈락토시다제를 발현하지 않는 망막 신경절세포에서도 검출됨을 확인하였다. 면역전자현미경 분석을 이용한 Vax1 단백질의 세포 내 미세 분포 조사에서 Vax1 단백질이 Vax1+/+ 마우스의 망막신경절세포 플라즈마 막(plasma membrane)의 세포의 표면에 결합하고 망막신경절세포 세포내 유입 소포(endocytic vesicles) 내에 존재하는 것을 확인함으로써, 상기 Vax1은 망막을 제외한 안병 별아교세포에서 발현되어 분비되고, 상기 분비된 Vax1 단백질이 망막신경절세포 내로 이동함을 확인하였다(도 7a 내지 도 7e 참조).

또한, 본 발명자들은 Vax1의 세포간 이동의 조절 기작 및 Vax1의 세포간 이동 조절에 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)인 신데칸(syndecan, Sdc)이 관여하는지 확인하기 위하여, Vax1이 과발현된 Ptc-Gal4>UAS-Vax1-EGFP,UAS-DsRed;+, Ptc-Gal4>UAS-Vax1-EGFP,UAS-DsRed;Sdc23, Ptc-Gal4>UAS-Vax1-EGFP,UAS-DsRed;Sdc, Ptc-Gal4>UAS-Vax1-EGFP,UAS-DsRed;Dlp 초파리를 이용하여 면역염색법을 수행한 결과, 신데칸 돌연변이 발현 초파리에서 Vax1-EGFP 단백질과 동시발현된 적색형광단백질의 발현이 없는 날개 성충판(imaginal disc) 앞쪽에서 Vax1만 발현되는 세포의 수가 증가하는 반면, 신데칸 및 HSPG 글리피칸(glypican, Glp)의 초파리 상동 단백질인 Dlp를 Vax1-EGFP, 적색형광단백질 등과 함께 동시 발현시킨 초파리의 날개 성충판 앞쪽 Vax1만 발현하는 세포의 수가 감소하는 것을 확인함으로써, 상기 신데칸 및 Dlp가 Vax1 단백질과 결합하여 이웃세포로 분산되는 것을 방해하고, 따라서, 상기 Vax1의 세포간 이동은 헤파란 설페이트 프로테오글리칸에 의해 매개됨을 확인하였다(도 8 참조).

또한, 본 발명자들은 Vax1의 이동에 있어서 신데칸의 역할을 확인하기 위하여, 출생 0일(post-natal day 0, P0) 마우스의 시신경 및 Vax1, 신데칸

1(Sdc1), 신데칸 2(Sdc2), N-말단 세포외 도메인이 결핍된 신데칸 2(Sdc2-C), C-말단 세포외 도메인이 결핍된 신데칸 2(Sdc2-N) 과발현된 HEK293T 세포를 이용하여 면역침강법 및 웨스턴 블롯팅을 수행한 결과, 망막 시신경 및 HEK293T 세포에서 Sdc2에 의해 Vax1이 침강되고, Sdc2-N에 의해 Vax1이 침강되는 것으로 확인함으로써, 상기 Vax1은 신데칸2, 특히, 신데칸2의 세포외 도메인과 상호작용함을 확인하였다(도 9a 내지 도 9d 참조).

또한, 본 발명자들은 신데칸2의 헤파란 설페이트(HS) 측면 사슬에 Vax1이 결합하는지 확인하기 위하여, 고농도의 헤파린을 첨가한 E14.5 마우스의 시신경을 이용하여 면역침강법을 수행한 결과, 헤파린을 처리한 시신경에서 항-Vax1 항체에 의해 Pax2를 제외한 Sdc2, Sdc3, Glp1이 침강되지 않으며, 헤파린 코팅된 사파로즈 4B(sepharose) 레진(resine)을 이용하여 HS-사파로즈 4B 레진에 의해 Vax1 단백질이 침강되는 것을 확인함으로써, 상기 Vax1은 헤파린과 경쟁하며, 헤파란 설페이트 프로테오글리칸 단백질의 헤파란 설페이트 측면 사슬과 결합함을 확인하였다(도 9e 및 도 9f 참조).

또한, 본 발명자들은 Vax1의 망막신경절세포 축삭 성장 자극 효과가 Vax1의 헤파린 당사슬에의 결합에 의해 매개하는지 확인하기 위하여, Vax1을 및 헤파리나제 I(heparinase I) 또는 콘드로이티나제 ABC(chondroitinase ABC, ChnaseABC)의 존재 하에 처리한 결과 Vax1의 망막신경절세포 축삭 성장효과 및 축삭 내 Vax1 축적이 헤파리나제 I 처리에 의해 저해됨을 확인하였다 (도 10a 참조).

또한, 본 발명자들은 Vax1의 헤파란 설페이트 프로테오글리칸에 결합이 Otx2 당 결합 모티프와 상동성을 가지는 Vax1 아미노산 서열 101 내지 112에 의해 매개되는지를 확인하고자, 이 부위를 암호화하는 바이오틴(biotin) 표지된 Vax1 KR-펩타이드(KR-bio) 또는 두 개의 중요한 당 결합 잔기 101번 리신 및 102번 알기닌(Lys101-Arg102(KR))을 알라닌(Ala-Ala(AA))으로 치환한 AA-bio 펩타이드, 또는 Lys101-Arg102(KR)을 Ala-Ala(AA)로 치환한 Vax1(KR/AA)-His 돌연변이 단백질을 처리한 신경망막 절편체를 이용하여 면역염색법 및 망막신경절세포 축삭 성장을 측정한 결과, KR-bio 펩타이드를 함께 처리한

신경망막 절편체에서 망막신경절세포 축삭의 성장이 감소하고, Vax1(KR/AA) 돌연변이 단백질을 처리한 신경망막 절편체에서 망막신경절세포 축삭의 성장이 감소하는 것을 확인함으로써, 상기 Vax1이 당 결합 모티프를 이용해 헤파란 설페이트와 결합하여 망막신경절세포 축삭의 성장을 자극함을 확인하였다(도 5, 10c 참조).

또한, 본 발명자들은 Vax1(KR/AA) 돌연변이 단백질의 분비와 신데칸2와의 결합력을 측정하기 위하여, Vax1 또는 Vax1(KR/AA) 과발현 HEK293T 세포의 성장배지에 헤파린을 첨가 후 성장배지에 추출된 Vax1 및 Vax1(KR/AA) 단백질의 양을 헤파린 무첨가 성장배지와 비교하였고, Sdc2와 Vax1 또는 Vax1(KR/AA) 과발현 HEK293T 세포를 이용해 면역침강법 및 웨스턴 블롯팅을 수행한 결과, Vax1 및 Vax1(KR/AA) 단백질과 Sdc2와의 상호작용함을 확인하였다(도 11b 참조). 또한, Vax1 또는 Vax1(KR/AA)를 과발현한 293T 세포 성장배지를 첨가한 COS7 세포를 이용해 면역염색법을 수행한 결과, Vax1(KR/AA) 과발현 HEK293T 세포 성장배지를 첨가한 COS7 세포에서 Vax1(KR/AA)가 세포 내로 이동하지 못하는 것을 확인함으로써, 상기 Vax1의 당 결합 모티프(motif)가 헤파란 설페이트 프로테오글리칸의 헤파란 설페이트에 결합하여 망막신경절세포 축삭 내로 이동하고 축삭의 성장을 유도함을 확인하였다(도 11c 참조).

또한, 본 발명자들은 Vax1이 세포내 침투 후 세포질 반응을 조절하여 망막신경절세포 축삭 성장을 자극하는지 또는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸의 하위 신호를 활성화하여 망막신경절세포 축삭 성장을 자극하는지 확인하기 위하여, Sdc2, 및 Vax1 또는 세포 표면 헤파란 설페이트 프로테오글리칸에 결합할 수 있지만 타겟 세포에 침투할 수 없는 Vax1(WF/SR) 돌연변이를 과발현시킨 HEK293T 세포를 이용하여 면역침강법 및 웨스턴 블롯팅을 수행하고, Vax1 또는 Vax1(WF/SR) 과발현 HEK293T 세포 성장배지를 첨가한 COS7 세포를 이용하여 면역염색법을 수행하고, Vax1 또는 Vax1(WF/SR) 과발현 COS7 세포를 공동배양한 신경망막 절편체를 이용하여 면역염색법 및 망막신경절세포 축삭의 방향성 측정을 수행한 결과, Vax1(WF/SR)이 신데칸2와 결합하지만, COS7 세포 내에서 발견되지 않는 것을 통해 Vax1(WF/SR)

돌연변이가 헤파란 설페이트 프로테오글리칸에 결합할 수 있지만 세포 내로 침투할 수 없음을 확인하였다. 또한, 신경망막 절편체에서 Vax1(WF/SR) 과발현 COS7 세포로 향해 성장하는 망막신경절세포 축삭의 수가 감소하는 것을 확인함으로써, 상기 Vax1이 망막신경절세포 내로 침투하여 축삭의 성장을 유도함을 확인하였다(도 12a 내지 도 12d 참조).

또한, 본 발명자들은 세포질 내에서 Vax1의 기능을 확인하기 위하여, 293T 세포에 과발현된 GST-Vax1 단백질과 상호작용하는 단백질 복합체를 정제 및 은염색(silver staining) 후 MALDI-TOF로 단백질을 확인한 결과, Vax1과 리보솜 구성단백질(ribosomal component)인 리보솜 단백질(ribosomal proteins, RPs) L11, L23A, L26, S14 및 S16, 번역 조절자(translation regulator)인 eIF(eukaryotic translation initiation factor) 3B 및 3C, 및 HSPA1A(chaperon heat shock 70-KD protein 1A)인 것을 확인함으로써, 상기 Vax1은 세포질 En2가 망막신경절세포 축삭 성장을 조절하는 것과 유사한 기전인 국소 단백질 합성에 관여함을 확인하였다(도 13a 참조).

또한, 본 발명자들은 Vax1이 국소 단백질 합성에 관여하는지 확인하기 위하여, Vax1 또는 Vax1(WF/SR) 돌연변이 단백질이 포함된 배지에서 배양한 E13.5 마우스의 신경망막 절편체를 이용하여 면역염색법 및 망막신경절세포 축삭 성장의 측정을 수행한 결과, Vax1 과발현된 신경망막 절편체에서 망막신경절세포 축삭의 단백질 합성을 및 성장이 증가하는 반면, Vax1(WF/SR) 과발현된 신경망막 절편체의 망막신경절세포 축삭의 단백질 합성을 및 성장이 감소하는 것을 확인함으로써, 상기 Vax1이 세포 내로 이동하여 국소 단백질 합성을 촉진하고, 망막신경절세포 축삭의 성장을 자극함을 확인하였다(도 13a 및 도 13d 참조).

또한, 본 발명자들은 Vax1^{-/-} 마우스에서 손상된 망막신경절세포 축삭이 세포외 Vax1 단백질에 의해 성장이 회복되는지 확인하기 위하여, Vax1 재조합 단백질, Vax1(WF/SR) 재조합 단백질을 포함한 콜라겐 겔을 Vax1lacZ/lacZ 마우스의 뇌 제3뇌실에 이식하고 면역염색법을 수행한 결과, Vax1 단백질을 이식한 경우와 달리 Vax1(WF/SR) 단백질을 이식한 마우스의 망막신경절세포

축삭의 시상하부의 접근 및 성장이 잘 이뤄지지 않는 것을 확인하였고, Robo 1-Fc 분질이 혼합된 콜라겐 겔을 이용하여 확인한 결과, 복측 시상하부에서 망막신경절세포 축삭의 성장은 Vax1-His와 Robo 1-Fc가 혼합된 콜라겐 겔을 이식하였을 때, 더욱 강화된 효과를 나타내는 것을 확인함으로써, 상기 Vax1

5 단백질은 축삭 유도 분자의 발현에 비의존적으로 축삭형질(axoplasm)에 침투하여 망막신경절세포 축삭의 성장을 자극함을 확인하였다(도 14a 참조).

또한, 본 발명자들은 Vax1과 Slit2 사이의 관계를 확인하기 위하여, 농도별 Vax1 및 Slit2 단백질을 처리한 신경망막 절편체를 이용하여 면역염색법 및 망막신경절세포 축삭 길이 측정을 수행한 결과, Vax1 단독 처리군보다

10 Slit2를 함께 처리한 군에서 망막신경절세포 축삭의 성장이 억제되고, 축삭의 길이가 감소하며, Vax1은 망막신경절세포 축삭 내로 침투가 Slit2에 의해 크게 영향을 받지 않는 것을 확인하였고, Vax1과 Robo 1-Fc를 함께 처리하여 배양하였을 때, 망막신경절세포의 축삭의 성장이 확연히 증가하는 것을 확인하였으며, Vax1과 Slit2를 함께 처리한 군에서 서로 경쟁하는 것을 한번

15 더 확인함으로써, 상기 Vax1과 Slit2가 헤파란 설페이트 프로테오글리칸에 경쟁적으로 결합하지 않으면서 Slit2와 상호간 길항작용(reciprocal antagonism)함을 확인하였다(도 14b 내지 도 14e 참조). 또한, 대뇌 절편체에 Vax1, Vax1(R152S) 및 Vax1(WF/SR)을 처리하고 면역염색법을 수행한 결과, Vax1 단백질은 망막신경절세포 축삭 뿐만 아니라 대뇌신경 축삭의 성장을 유도하는

20 것을 확인함으로써, Vax1 유전자 결핍 생쥐 및 인간에서 나타나는 다양한 신경 축삭의 뇌 중선 통과 역시 망막신경절세포 축삭과 유사하게 Vax1 단백질에 의해 조절될 가능성을 확인하였다(도 14f 참조).

아울러, 본 발명자들은 상기 결과들을 통해 포유류 뇌의 복측 시상하부의 방사아교세포 및 신경간세포에서 발현되어 세포 밖으로 분비되고,

25 상기 분비된 Vax1이 신데칸을 포함한 헤파란 설페이트 프로테오글리칸에 결합하여 망막신경절세포 축삭 내로 침투한 후, 축삭형질에서 국소 단백질 합성을 촉진하여 망막신경절세포 축삭의 성장을 자극함을 확인함으로써, 상기 Vax1 단백질에 의한 망막신경절세포 축삭 성장 조절 모델을 완성하였다(도 14g

참조).

따라서, 본 발명의 복측 시상하부 및 대뇌 중격(septum)에서 분리된 Vax1은 망막신경절세포 및 대뇌교차신경 축삭에 존재하는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸의 세포외 당 그룹에 결합하여 축삭형질(axonplasm)로 침투한 후, 국소 단백질 합성을 활성화하여 망막신경절세포 축삭의 성장을 촉진시키므로, 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물의 유효성분으로 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 Vax 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 세포를 유효성분으로 함유하는 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물을 제공한다.

상기 Vax 단백질은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 Vax1 단백질 또는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 Vax2 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하나 이에 한정되지 않는다.

상기 벡터는 선형 DNA, 플라스미드 DNA 또는 재조합 바이러스성 벡터인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 재조합 바이러스는 레트로 바이러스(retrovirus), 아데노 바이러스(adenovirus), 아데노 부속 바이러스(adeno-associated virus, AAV), 헤르페스 심플렉스 바이러스(herpes simplex virus), 렌티바이러스(lentivirus)로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

상기 세포는 조혈 줄기세포(hematopoietic stem cells), 수지상 세포(dendritic cells), 자가이식 종양세포.autologous tumor cells) 및 정착 종양세포(established tumor cells)로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 복측 시상하부 및 대뇌 중격에서 분리된 Vax 단백질은 망막신경절세포 및 대뇌교차신경 축삭에 존재하는 헤파란 설페이트

프로테오글리칸의 세포외 당 그룹에 결합하여 축삭형질로 침투한 후, 국소 단백질 합성을 활성화하여 망막신경절세포 축삭의 성장을 촉진시키므로, 상기 Vax 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 세포는 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물의 유효성분으로
5 유용하게 사용될 수 있다.

상기 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

상기 본 발명의 조성물은 비경구 투여할 수 있으며, 비경구 투여시 피부
10 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식 또한 고형체 이식을 선택하는 것이 바람직하며, 이에 한정되는 것은 아니다.

상기 본 발명의 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 조성물에 포함될
15 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수
20 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은
25 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

본 발명의 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의

정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 상기 조성물은 1일 0.0001 내지 1 g/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 200 mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

또한, 본 발명은

1) 피검체로부터 수득한 세포에 피검물질을 처리하고 신경축삭 성장을 측정하는 단계;

2) 상기 단계 1)의 세포에서 Vax1 및 헤파란 설페이트 프로테오글리칸의 결합수준을 측정하는 단계;

3) 상기 단계 2)의 Vax1 및 헤파란 설페이트 프로테오글리칸 결합수준을 무처리 대조군과 비교하여 증가시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 후보물질 스크리닝 방법을 제공한다.

상기 결합수준은 면역형광법, 질량분석법, 단백질칩, 웨스턴 블롯팅 및 ELISA로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

본 발명의 복측 시상하부 및 대뇌 중격에서 분비된 Vax1은 망막신경절세포 및 대뇌교차신경 축삭에 존재하는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸의 세포외 당 그룹에 결합하여 축삭형질로 침투한 후, 국소 단백질 합성을 활성화하여 망막신경절세포 축삭의 성장을 촉진시키므로, 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 후보물질 스크리닝으로 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 Vax 단백질을 신경세포가 손상된 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경세포 재생 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 Vax 단백질을 신경세포가 손상된 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경세포 성장 촉진 방법을 제공한다.

- 5 또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 Vax 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 세포를 신경세포가 손상된 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경세포 재생 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 약학적으로 유효한 양의 Vax 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 세포를 신경세포가 손상된 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경세포 성장 촉진 방법을 제공한다.

- 10 본 발명의 복측 시상하부 및 대뇌 중격에서 분비된 Vax 단백질은 망막신경절세포 및 대뇌교차신경 축삭에 존재하는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸의 세포외 당 그룹에 결합하여 축삭형질로 침투한 후, 국소 단백질 합성을 활성화하여 망막신경절세포 축삭의 성장을 촉진시키므로, 상기 Vax 단백질, 또는 Vax 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터
15 또는 세포를 신경세포가 손상된 개체에 투여하여 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진 방법으로 유용하게 사용될 수 있다.

또한, 본 발명은 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물로 사용하기 위한 Vax 단백질의 용도를 제공한다.

- 20 또한, 본 발명은 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물로 사용하기 위한 Vax 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 세포의 용도를 제공한다.

- 본 발명의 복측 시상하부 및 대뇌 중격에서 분비된 Vax 단백질은 망막신경절세포 및 대뇌교차신경 축삭에 존재하는 헤파란 설페이트
25 프로테오글리칸의 세포외 당 그룹에 결합하여 축삭형질로 침투한 후, 국소 단백질 합성을 활성화하여 망막신경절세포 축삭의 성장을 촉진시키므로, 상기 Vax 단백질, 또는 Vax 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 세포는 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물의

용도로 유용하게 사용될 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기
5 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> Vax1 과발현(overexpression), 낙아웃(knock-out) 및
낙인(Knock-in) 동물모델 제작

10 <1-1> Vax1 낙아웃(knock-out) 마우스로부터 신경망막(neural retina, NR)
및 복측 시상하부(ventral hypothalamic, vHT) 절편체 분리 및 배양

Vax1lacZ/+ 및 Vax1-/-낙아웃(knock-out) 및 Vax1lacZ/lacZ
낙인(knock-in) 마우스는 Bertuzzi et al., 1999; Hallonet et al., 1999에 기재된
방법에 따라 제작하였다. 상기 획득한 마우스의 신경망막(neural retina, NR)
15 및 복측 시상하부(ventral hypothalamic, vHT) 절편체(explant)는 Sato et al.,
1994에 기재된 방법으로 획득하였다. 상기 획득한 신경망막 또는 복측
시상하부 절편체를 콜라겐(collagen) 혼합액(Invitrogen)에 첨가하고, 신경망막
또는 복측 시상하부 절편체가 포함된 콜라겐 혼합액을 10 μ g/ml의
폴리-L-리신(poly-L-lysine) 및 10 μ g/ml의 라미닌(laminin)으로 코팅된
20 플레이트에 첨가한 후, 37°C에서 1 시간 동안 배양하여 젤화(gelling)하였다.
그 다음, B27 보충제(Invitrogen)을 포함한 신경기저 배지(Neurobasal
medium)로 배양하였다.

<1-2> Vax1 과발현 초파리 제작

25 Bloomington stock center로부터 Ptc-Gal4, UAS-DsRed, UAS-Sdc, UAS-Dlp,
및 sdc23 초파리를 획득하였다. 또한, 마우스 Vax1(서열번호 1)을 pUAS-EGFP
벡터로 클로닝하여 pUAS-Vax1-EGFP 벡터를 획득하고, 상기 벡터를 초파리에
주입하여 UAS-Vax1-EGFP 초파리를 획득하였다.

Ptc-Gal4>UAS-Vax1-EGFP,UAS-DsRed;+의 3령기 애벌레(Third instar larvae)는 Ptc-Gal4>UAS-DsRed;TM6B 초파리 및 UAS-Vax1-EGFP 초파리를 교차 교배하여 획득하였다. Ptc-Gal4>UAS-Vax1-EGFP,UAS-DsRed;Sdc23의 3령기 애벌레는 Ptc-Gal4>UAS-DsRed;Sdc23 초파리 및 UAS-Vax1-EGFP 초파리를 교차 교배하여
 5 획득하였다. Ptc-Gal4>UAS-Vax1-EGFP,UAS-DsRed;Sdc의 3령기 애벌레는 Ptc-Gal4>UAS-DsRed;Sdc 초파리 및 UAS-Vax1-EGFP 초파리를 교차 교배하여 획득하였다. Ptc-Gal4>UAS-Vax1-EGFP,UAS-DsRed;Dlp의 3령기 애벌레는 Ptc-Gal4>UAS-DsRed;Dlp 초파리 및 UAS-Vax1-EGFP 초파리를 교차 교배하여
 10 획득하였다.

<실시예 2> Vax1의 비세포-자율적(non-cell-autonomous) 망막신경절세포(retinal ganglion cell, RGC) 축삭 성장 조절

<2-1> Vax1 결핍 마우스(Vax1^{-/-})에서 정상적인 시신경교차(optic chiasm, OC) 형성 세포의 발달 확인

Vax1은 안병(optic stalk, OS) 및 시신경 교차(optic chiasm, OC)와 같은 시각경로 구조(optic pathway structure)에 위치한 세포에서 발현되고, 망막신경절세포 축삭의 섬유속연축(fasciculation) 및 시신경교차의 형성에 있어서 중요한 역할을 한다고 보고되고 있다(Bertuzzi et al., 1999; Hallonet et al., 1999). 따라서, Vax1이 시각경로 구조에 미치는 영향을 확인하기
 15 위하여, Vax1 결핍 마우스(Vax1^{-/-})의 시신경교차 형성 세포를 이용하여 면역염색법(immunostaining)을 수행하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 Vax1^{+/+} 및 Vax1^{-/-} 배자기 14.5(E14.5)된 마우스로부터 적출한 뇌를 절단하여 뇌
 20 섹션(section)(수직(coronal): 12 μ m)을 획득하였다. 상기 뇌 섹션을 1×PBS로 세척하고 4℃에서 2 내지 16 시간 동안 4%(v/v) 파라포름알데하이드(paraformaldehyde, PFA)/PBS로 고정하고, 4℃에서 16 시간 동안 20%(w/v) 수크로스(sucrose)/PBS 용액으로 배양한 후 OCT 배지로 침투하여 동결시켰다. 상기 동결된 뇌 섹션은 1 시간 동안 0.2% TritonX-100, 5% 정상

당나귀 혈청(normal donkey serum) 및 2% 소혈청알부민(bovine serum albumen, BSA)이 포함된 차단 용액(blocking solution)으로 배양한 후, 4℃에서 16 시간 동안, 래빗(rabbit) 항-Vax1 항체(Mui et al., 2005)(초록), 신경간세포(neural progenitor cells, NPC) 마커인 Sox2를 시각화하기 위한 고트(goat) 항-Sox2 항체(Santa Cruz Biotechnology)(빨강) 및 발생 중인 분열 후 신경세포(post-mitotic neuronal) 마커인 튜블린-베타III(tubulin-betaIII)을 시각화하기 위한 마우스(mouse) 항-Tuj1 항체(Covance)(파랑)로 반응시킨 후, PBS로 세 번 세척하였다. 그 다음, 상온에서 2시간 동안 1:1000으로 희석한 Alexa488, Cy3 또는 Cy5-접합 이차 항체(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Glove, PA, USA)와 함께 반응시키고, PBS로 세척한 후 Zeiss LSM710 공초점 현미경을 이용해 시각화하였다(도 1a). 또한, 상기와 같이 뇌 세션을 고정, 침투 및 블릿킹(blocking)하고, 항-Vax1 항체(초록), 항-네스틴(nestin, RC2) 항체(빨강)(Millipore)를 이용하여 면역염색하고 시각화하였다(도 1b).

그 결과, 도 1a 및 도 1b에 나타난 바와 같이, Vax1이 망막신경절세포 축삭 유도 신호를 제공하는 Sox2(SRY box 2)-양성 신경간세포 및 RC2가 탐색된 네스틴-양성 방사아교세포(radial glia)에서는 발견되지만 Tuj1-양성 신경세포에서는 발견되지 않고(도 1a 및 도 1b, 1행), 시신경교차 형성 세포들이 Vax1-/- 마우스에서도 정상적으로 발달함을 확인함으로써(도 1a 및 도 1b, 2행), 상기 Vax1은 Sox2-양성 신경간세포 및 네스틴-양성 방사아교세포에 존재하는 시신경교차에서 발현되고, Vax 1 결핍 마우스에서 시신경교차의 비정상적인 발달은 시신경교차 형성 복측 시상하부 세포의 잘못된 형성에 의한 것이 아님을 확인하였다(도 1a 및 도 1b).

<2-2> Vax1에 의한 비세포-자율적(non-cell-autonomous) 망막신경절세포

축삭 성장 조절 확인

Vax1이 시신경교차 발달에 미치는 영향을 확인하기 위하여, Vax1-/- 마우스에서 분리한 복측 시상하부 및 신경망막 절편체를 공동배양하여 망막신경절세포 축삭 성장의 방향성 관찰 및 측정을 수행하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 Vax1 정상 마우스(Vax+/+, WT) 및 Vax1 결핍 마우스(Vax-/-, KO)의 E13.5 마우스로부터 분리한 복측 시상하부(vHT) 및 신경망막(NR) 절편체를 Vax1+/+ vHT/Vax1+/+ NR, Vax1+/+ vHT/Vax1-/- NR 및 Vax1-/- vHT/Vax1+/+ NR의 조합으로 48 시간 동안
 5 공동배양한 후, 4℃에서 2 내지 16 시간 동안 4% PFA/PBS로 고정하고 상기 실시예 <2-1>과 같이 망막신경절세포 축삭 마커인 NF160을 시각화하기 위한 마우스 항-NF160 항체(DSHB)(빨강) 및 절편체의 핵을 시각화하기 위한 DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)(파랑)을 이용하여 면역염색하고 시각화하였다(도 2b), 그 후, 망막신경절세포 축삭 성장의 방향성을 측정하였다.
 10 도 2a의 모식도와 같이 모든 의미있는 망막 축삭 성장 부위인 신경망막 절편체의 바깥쪽의 20 μ m와 40 μ m 사이 부위를 노란 링(ring)으로 표시하였고, 망막 축삭/다발의 끝에 평행한 선과 신경망막 절편체(NR) 및 복측 시상하부 절편체(vHT)의 중양을 연결하는 선이 이루는 시계방향 각도를 측정하여, 각도값이 0° 와 60° 사이 및 301° 와 360° 사이이면 양성(+; 빨강) 방향,
 15 61° 와 120° 사이 및 241° 와 300° 사이이면 중립(0; 초록) 방향, 121° 와 240° 사이이면 음성(-; 파랑) 방향으로 정의하여, 망막신경절세포 축삭 끝(tip)의 방향성(도 2c) 및 노란 링 부위에서 망막신경절세포 축삭 축(shaft)의 방향성(도 2d)을 그래프화하였다(도 2c 및 도 2d).

그 결과, 도 2b 내지 도 2d에 나타낸 바와 같이, Vax1+/+ 및 Vax1-/-
 20 마우스의 망막에서 Vax+/+ 마우스의 복측 시상하부 절편체를 향한 망막신경절세포 축삭의 수는 증가하는 반면, Vax1-/- 복측 시상하부 절편체를 향한 망막신경절세포 축삭의 수는 감소하는 것을 확인함으로써, 복측 시상하부 절편체에서 유래한 Vax1이 망막에서 망막신경절세포 축삭 성장을 유도함을 확인하였다(도 2b 내지 도 2d).

25

<2-3> Vax1에 의한 비세포-자율적 망막신경절세포 축삭 성장 조절의 현장혼성화(In situ hybridization, ISH) 및 면역형광염색법(immunofluorescence staining, IF)을 통한 확인

Vax1이 시신경교차 발달에 미치는 영향을 확인하기 위하여, Vax1^{-/-} 마우스에서 분리한 복측 시상하부의 망막신경절세포 축삭 유도능의 결함을 확인하기 위하여, 망막신경절세포 축삭 성장 인자인 혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF164) 및
5 신경세포접착분자(neuronal cell adhesion molecule, NrCAM)의 존재 여부를 검증하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 Vax1 정상 마우스(Vax^{+/+}, WT) 및 Vax1 결핍 마우스(Vax^{-/-}, KO)의 E14.5 마우스로부터 분리한 배아 두부를 4℃에서 2 내지 16 시간 동안 4% PFA/PBS로 고정하고, 이를
10 다시 냉동절편으로 준비한 후, 이 절편에 존재하는 Vegfa mRNA의 발현은 현상혼성화를 통해 확인하였고, NrCAM 단백질의 발현은 면역형광염색법을 통해 확인하였다(스케일 바(scale bar): 100 μ m).

그 결과, 도 2e에 나타낸 바와 같이, Vax1^{-/-} 마우스에서 시신경교차 형성 세포와 시신경교차부의 신호인 NrCAM 및 Vegfa가 발현되고 있으며, 그
15 발현 부위가 다소 넓어진 것을 확인하였다(도 2e).

따라서, <실시예 2>의 결과들을 통해 상기 Vax1이 비세포-자율적인(non-cell autonomous) 방법으로 망막신경절세포 축삭 성장을 조절함을 확인하였다.

20 <실시예 3> 전사활성 비의존적으로 세포의 Vax1 분비 확인

<3-1> Vax1 전사활성 비의존적 망막신경절세포 축삭 성장 자극 확인

전사적으로 비활성화된 Vax1(R152S) 돌연변이는 안검홍채맥락막선천적결손증(coloboma), 구개열(cleft palate) 및 뇌량결손(agenesis of corpus callosum, ACC)을 보이는 환자에서 보고되고
25 있으며, 이는 Vax1 결손 마우스의 돌연변이와 유사한 표현형이다(Slavotinek et al., 2012). 따라서, Vax1의 전사활성이 망막신경절세포 축삭 성장에 영향을 미치는지 확인하기 위하여, Vax1, 전사 비활성 Vax1 돌연변이(Vax1(R152S)) 및 Vax1과 동일한 호메오도메인(homeodomain)을 공유하는 Vax2를 과발현시킨 COS7

세포를 이용하여 면역염색법, 망막신경절세포 축삭 성장의 방향성 측정 및 웨스턴 블롯팅(western blotting)을 수행하였다.

구체적으로, Myc-태그된(tagged) 마우스 Vax1, 152번 알기닌(R)을 세린(S)로 치환한 Myc-태그된 마우스 전사 비활성 Vax1 돌연변이(Vax1(R152S)) 및 Myc-태그된 마우스 Vax2를 암호화하는 컨스트럭트(construct)를 제작한 후, 5 상기 컨스트럭트를 COS7 세포(ATCC)에 인산칼슘 방법으로 형질전환(transfection)시키고, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 신경망막 절편체와 48 시간 동안 공동 배양한 후, 상기 실시예 <2-1>과 같이 항-Myc 항체(Santa Cruz Biotechnology)(초록), 항-NF160 항체(빨강) 및 10 DAPI(파랑)를 이용하여 면역염색하고 시각화하였다. 상기 두 절편체의 중앙을 빨간 점선으로 연결하여 표시하였다(스케일 바(scale bar): 500 μ m(1열), 스케일 바: 100 μ m(2열 및 3열))(도 3a).

또한, 상기 실시예 <2-2>와 같이 신경망막 절편체 및 COS7 세포의 중앙을 연결하는 빨간 점선을 기준으로 각도를 측정하여 망막신경절세포 축삭의 15 방향성을 그래프화하였다. 그래프의 값은 평균내었고, 에러바는 SD로 구하였다(대조군(n=21), Vax1(n=17), Vax1(R152S)(n=8), Vax2(n=7)). p-값은 ANOVA로 구하였다($0.01 < p < 0.005$)(도 3b).

아울러, 상기 Vax1, Vax1(R152S) 또는 Vax2 과발현시킨 COS7 세포의 성장배지에서 Vax 단백질의 유무를 확인하기 위하여, 웨스턴 블롯팅을 20 수행하였다. 상기 제작한 Myc-Vax1, Myc-Vax1(R152S) 또는 Myc-Vax2 형질전환 COS7 세포의 성장배지 및 세포를 수득하였다. 수득한 세포는 10 mM Tris-HCA(pH7.4), 200 mM NaCl 및 1% NP-40이 포함된 용해 버퍼(lysis buffer)로 용해하였다. 또한, 수득한 성장배지는 500×g에서 10 분 동안 2 번 원심분리한 후, 2,000×g에서 15 분 동안 2 번 추가 원심분리하여 상층액(supernatant, S3) 25 부분(fraction)을 획득하였다. 상기 획득한 상층액 부분에 동량의 3 M 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid, TCA) 용액을 혼합하여 거대분자를 침전시키고, 상기 TCA 침전물을 100% 아세톤(acetone)으로 2 번 세척한 후, 건조하여 펠렛(pellet)을 획득하였다. 상기 수득한 세포 용해물 및 펠렛은

2×SDS 시료 완충용액을 첨가하여 반응을 종결시킨 후, SDS-PAGE 겔(gel)을 이용하여 분리하고 PVDF 막(Polyvinylidene fluoride membrane)(Milipore, USA)으로 전달시켰다. 일차 항체로 항-Myc 항체를 처리하여 반응시킨 후, 상기 막에 붙은 일차 항체에 HRP-접합 이차 항체를 붙이고, 이를 ECL(Pierce chemical co, USA)을 이용하여 확인하였다(도 3c).

그 결과, 도 3a 및 도 3b에 나타난 바와 같이, 신경망막 절편체에서 공동 배양한 Vax1 과발현 COS7 세포를 향한 신경미세섬유 160 kDa(neurofilament 160 kDa, NF 160)-양성 망막신경절세포 축삭의 수가 대조군에 비해 현저히 증가하는 반면, 공동 배양한 야생형 COS7 세포 및 Vax2 과발현 COS7 세포를 향해 성장하는 망막신경절세포 축삭의 수는 동일한 것을 확인하였다. 한편, 전사적으로 비활성화된 Vax1(R152S) 돌연변이를 발현시킨 COS7 세포를 공동배양한 경우, 야생형(WT) Vax1 과발현 COS7 세포를 공동배양한 경우와 유사하게, 성장하는 망막신경절세포 축삭의 수가 증가하고, 또한, Vax1 및 Vax1(R152S) 단백질 모두 공동배양한 망막 절편체로부터 나온 NF160-양성 망막신경절세포 축삭에서도 발견됨을 확인함으로써, 망막신경절세포 축삭 성장 자극 활성화는 Vax1에 특이적이고, 상기 Vax1은 전사 비의존적으로 망막신경절세포 축삭 성장을 유도함을 확인하였다(도 3a 및 3b).

또한, 도 3c에 나타난 바와 같이, Vax1 및 Vax1(R152S) 단백질은 형질전환된 COS7 세포의 성장배지(growth medium, GM)에서도 발견되는 반면, Vax2 단백질은 발견되지 않음을 확인함으로써, 상기 Vax1이 전사활성과 상관없이 세포 밖으로 분비되어 망막신경절세포 축삭 성장을 유도함을 확인하였다(도 3c).

〈3-2〉 체내배양(in vivo) 및 체외배양(in vitro) 세포에서 Vax1의 분비

확인

망막신경절세포 축삭 성장 유도에 있어서 Vax1 분비를 확인하기 위하여, 체외배양(in vitro) 및 체내배양(in vivo) 세포를 이용하여 면역염색법 및 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

구체적으로, EGFP, EGFP 태그된-Vax1, EGFP 태그된-Vax2를 암호화하는 컨스트럭트를 제작한 후, 상기 실시예 <3-1>과 같이 HEK293T 세포(ATCC)로 형질전환하고, 48 시간 후 성장배지를 수득하여 원심분리하고 세포를 제거하여 분비된 단백질 및 세포외막 수포(extracellular membrane vesicles)가 포함된 상층액(S3)을 수득하였다. 상기 수득한 상층액을 비형질전환 COS7 세포에 첨가하여 12 시간 동안 배양한 후, 상기 실시예 <2-1>과 같이 HEK293T 세포 및 COS7 세포를 마우스 항-GFP 항체(Santa Cruz Biotechnology)(초록) 및 DAPI(파랑)을 이용해 면역염색하고 시각화하였다(스케일바: 20 μ m)(도 4a).

또한, 상기 실시예 <3-1>과 같이 HEK293T 세포에 Myc 또는 Myc-Vax1 컨스트럭트를 형질전환하고, 48 시간 후 성장배지의 상층액(S3)을 수득하였다. 상기 수득한 성장배지의 상층액(S3)을 센트리콘 필터(Centricon filters)(cut-off limit 20 kDa; Millipore)를 이용하여 제조사의 절차에 따라 농축한 후, 50 μ g 단백질을 포함한 상기 농축한 상층액 2 μ l를 자궁 내(in utero) E13.5 마우스 뇌의 외측 뇌실(lateral ventricle)에 주입하였다. 12 시간 후, 상기 실시예 <2-1>과 같이 뇌를 적출하고 뇌 섹션(수평(horizontal): 20 μ m)을 획득한 후 마우스 항-Myc 항체 및 DAPI를 이용하여 면역염색하고 시각화하였다(도 4b).

또한, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 E13.5 마우스로부터 분리한 복측 시상하부 절편체를 24 시간 동안 배양한 후, 상기 실시예 <3-1>과 같이 성장배지(GM)의 펠렛 및 세포 용해물을 수득하고, 상기 수득한 세포 용해물 및 펠렛은 항-Vax1 항체 및 항-튜블린-베타III 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 4c). 또한, E14.5 마우스로부터 준비된 외측 뇌실(lateral ventricle)로부터 뇌척수액(cerebrospinal fluid, CSF)을 수득하고, 상기 실시예 <3-1>의 성장배지로부터 상층액을 수득하는 방법과 같이 상층액(S3)을 죽은 세포잔해(dead cell debris, P2)로부터 분리하였다. 상기 수득한 상층액(S3), 죽은 세포잔해(P2) 및 복측 시상하부 절편체 세포 용해물(CL)을 상기 실시예 <3-1>과 같이 항-Vax1 및 항-튜블린-베타III 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 4d).

그 결과, 도 4a 및 4b에 나타낸 바와 같이, EGFP, EGFP-Vax1, EGFP-Vax2 형질전환된 HEK293T 세포의 생존능이 서로 유사하고, Vax1 형질전환된 HEK293T 세포의 성장배지에 있는 Vax1 단백질이 체외배양(in vitro) COS7 세포(도 4a, 2행)뿐만 아니라 체내배양(in vivo) 복측 간뇌(ventral diencephalic, vDC)(도 4b, 2행)에서도 발견되는 것을 확인함으로써, 상기 Vax1 단백질이 형질전환된 HEK293T 세포로부터 분비되고 공동 배양된 망막신경절세포 축삭으로 이동함을 확인하였다(도 4a 및 4b).

또한, 도 4c 및 4d에 나타낸 바와 같이, 복측 시상하부 절편체에서 발현된 세포내 Vax1의 발현량이 COS7 세포에서 과발현된 Vax1(도 3c)의 발현량과 유사하고, 복측 시상하부 절편체의 성장배지(도 4c, GM) 및 뇌척수액(CSF)에서 발견되는 것을 확인함으로써(도 3D, CSF; S3), 상기 Vax1이 체외배양뿐만 아니라 체내배양 세포로부터 분비되는 단백질을 확인하였다.

<3-3> 체외배양(in vitro) 세포에서 Vax1의 분비 확인

망막신경절세포 축삭 성장 유도에 있어서 Vax1 분비를 확인하기 위하여, 체외배양(in vitro) 세포를 이용하여 면역염색법을 수행하였다.

Myc-태그된(tagged) 마우스 Vax1을 COS7 세포에 인산칼슘 방법으로 형질전환(transfection)시키고, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 신경망막 절편체와 24 시간 동안 공동 배양하였다. 그 후, rb-IgG($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) 또는 항-Vax1 항체(-Vax1, $1 \mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가한 배지에서 다시 24시간 동안 공동 배양 후, 상기 실시예 <2-1>과 같이 항-Myc 항체(초록), 항-NF160 항체(빨강) 및 DAPI(파랑)를 이용하여 면역염색하고 시각화하였다. 왼쪽의 박스 표시된 부분은 오른쪽에 나타냈으며, 화살표는 망막신경절세포 축삭에 Myc-태그된 마우스 Vax1이 존재하는 곳을 나타낸다(스케일 바: $500 \mu\text{m}$ (왼쪽), 스케일 바: $100 \mu\text{m}$ (오른쪽)).

그 결과, 도 4e에 나타낸 바와 같이, 축삭 Vax1 면역염색 신호는 항-Vax1 항체(α -Vax1)의 존재하에서 현저하게 감소하였다(도 4e).

따라서, 상기 <실시예 3>의 결과를 통해 Vax1은 전사활성에 상관없이

복측 시상하부에서 분비되는 단백질을 확인하였다.

<실시에 4> 분비된 Vax1 단백질에 의한 망막신경절세포 축삭 성장 자극 확인

5 <4-1> 복측 시상하부 절편체에서 분비된 Vax1에 의한 망막신경절세포 축삭 성장 유도 확인

분비된 Vax1 단백질이 복측 시상하부 절편체를 향한 망막신경절세포 축삭 성장을 유도할 수 있는지 확인하기 위하여, 래빗 항-Vax1 다클론 항체 및 항-Vax2 다클론 항체를 이용하여 세포외 Vax 단백질을 격리시키고 면역염색법,
10 RGC 축삭 성장의 방향성 및 RGC 축삭 길이 측정을 수행하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득하여 공동배양한 복측 시상하부 절편체 및 신경망막 절편체에 비면역(pre-immune) 래빗 IgG(rbIgG) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 항-Vax1 다클론 항체(α -Vax1) 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 또는 항-Vax2 다클론 항체(α -Vax2) $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 처리하고 48 시간 동안 배양한 후, 상기 실시예 <2-2>와
15 같이 래빗 항-Vax1 항체(초록) 및 항-NF160 항체(빨강)를 이용하여 면역염색하고 시각화하였다. 상기 두 절편체의 중앙을 빨간 점선으로 연결하여 표시하였고, 화살표 부분을 확대하였다(스케일 바: 500 μm)(도 5a).

또한, 상기 실시예 <2-2>와 같이 상기 빨간 점선을 기준으로 각도를 측정하여 망막신경절세포 축삭의 방향성을 그래프화하였다. 그래프의 값은
20 평균내었고, 에러바는 SD로 구하였다(rbIgG(n=17), α -Vax1(n=19), α -Vax2(n=11)). p-값은 ANOVA로 구하였다($0.001 < p < 0.005$)(도 5b).

또한, NF160 면역형광 이미지의 픽셀(pixel)을 계산하여 망막으로부터 나오는 축삭/다발의 상대적인 수 및 두께를 그래프화하였다. NF160 면역형광 이미지를 이진법 이미지(binary image)로 바꾼 후에 이미지-J 소프트웨어의
25 히스토그램(Histogram) 기능을 이용하여 픽셀 수를 측정하였다. 축삭/다발의 상대적인 수는 축삭/다발을 포함한 절편체 전체 픽셀 수에서 신경망막 절편체 안쪽의 픽셀 수를 감하여 나타내었다. 두께의 경우는 각각 하나의 축삭/다발에서 30-40 μm 사이의 픽셀 수를 측정하여 나타내었다. 그래프의

값은 평균내었고, rblgG 처리군을 100%로 설정하였으며, 에러바는 SD로 구하였다(도 5c).

또한, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 망막 절편체를 24 시간 동안 배양한 후, 6X-His에 플루오레세인이소티오시안산염(fluorescein isothiocyanate, FITC)이 표지된 펩타이드(peptide)(100 ng/ml) 또는 His이 태그된 Vax1에 FITC이 표지된 재조합 단백질(500 ng/ml)을 첨가하여 24 시간 동안 배양하였다. 이 배양 기간 동안 각 15분 마다 배양 망막 절편체에서 성장하는 신경축삭과 이 신경 축삭에 존재하는 FITC 형광 신호를 검출하여 시각화하였다. 빨간색 화살은 확대 이미지를 나타냄(도 5d). 이 망막 절편체를 PBS로 세척한 후, 상기 실시예 <2-1>에 기재된 방법으로 래빗 α -Vax1(초록) 및 항-His 항체(빨강)로 면역염색하여 시각화하였다. 오른쪽 박스는 왼쪽의 확대된 이미지 부분을 나타내고, 화살표는 망막신경절세포 축삭에 Vax1과 His 단백질이 위치함을 나타낸다(도 5e)(스케일 바: 100 μ m).

또한, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 망막 절편체의 사분면에서 6X-His 펩타이드(25 ng/ml, 하얀색 막대) 또는 Vax1-His 단백질(100 ng/ml, 검은색 막대)를 처리하고 24 시간 후 변화한 축삭 길이를 측정하여 그래프로 나타내었다. 그래프의 값은 평균내었고, 에러바는 SD로 구하였다. 막대에 쓰인 수는 분석한 축삭의 수이고, 분석 절편체의 수는 상단에 표시하였다. p-값은 t-test로 구하였다(**, $p < 0.001$). 결과는 독립적인 두 번의 실험으로 얻었다(도 5f).

또한, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 망막 절편체에 His-태그된 Vax2(100 ng/ml)을 첨가하거나, 하지않은 상태로 24 시간 동안 배양한 후, 상기 실시예 <2-1>에 기재된 방법으로 래빗 항-Vax2 항체(초록), 마우스 항-NF160 항체(빨강) 및 DAPI(파랑)로 면역염색하여 시각화하였다. 위쪽 박스는 아래쪽의 확대된 이미지 부분을 나타내고, 화살표는 망막신경절세포 축삭에 His-태그된 Vax2가 위치함을 나타내었고(스케일 바: 500 μ m(위쪽), 스케일 바: 100 μ m(아래쪽)(도 5g-A), 이의 축삭 길이를 측정하여 그래프로 나타내었다. 그래프의 값은 평균내었고, 에러바는 SD로 구하였다.

막대에 쓰인 수는 분석한 축삭의 수이고, 분석한 절편체의 수는 6X-His(n=5), Vax2(n=4)이다. p-값은 t-test로 구하였다(**, $p < 0.001$)(도 5g-B).

그 결과, 도 5a 및 도 5b에 나타낸 바와 같이, 래빗 IgG 및 항-Vax2 다클론 항체를 처리한 경우와 달리 항-Vax1 다클론 항체를 처리한 경우, 5 망막신경절세포 축삭에서 Vax1이 발견되지 않고(도 5a), 복측 시상하부 절편체로 향하는 망막신경절세포 축삭이 감소하는 것을 확인함으로써(도 5b), 항-Vax1 다클론 항체의 영향으로 Vax1의 망막신경절세포 축삭으로의 이동 및 축삭의 성장이 억제됨을 확인하였다.

또한, 도 5c에 나타낸 바와 같이, 래빗 IgG 및 항-Vax2 다클론 항체를 10 처리한 경우, 망막신경절세포 축삭/다발의 수 및 두께가 유사한 반면, 항-Vax1 다클론 항체를 처리한 경우 축삭/다발의 수 및 두께가 감소하는 것을 확인함으로써, 세포의 Vax1은 축삭의 섬유축연축에 중요한 역할을 함을 확인하였다(도 5c).

또한, 도 5d 내지 도 5f에 나타낸 바와 같이, His이 태그된 Vax1에 15 FITC이 표지된 재조합 단백질을 첨가하였을 때, 망막신경절세포 축삭의 성장에 강한 자극 효과를 발휘하는 것을 확인하였고(도 5d 내지 도 5e), 이는 망막 절편체의 사분면에서도 동일하게 나타나는 것을 확인하였다(도 5f).

또한, 도 5g에 나타낸 바와 같이, Vax2의 경우에도 Vax1과 거의 동일하게 망막신경절세포 축삭의 성장을 유도하는 것을 확인하였다(도 5g).

20

<4-2> 체내배양(in vivo)에서 세포의 Vax1에 의한 망막신경절세포 축삭 성장 자극 확인

체내배양(in vivo)에서 망막신경절세포 축삭 성장에 있어서 세포의 Vax1의 역할을 확인하기 위하여, 콜라겐 겔(collagen gel)을 이식한 마우스를 25 이용하여 면역염색법, 망막신경절세포 축삭의 수, 두께 및 길이 측정을 수행하였다.

구체적으로, 도 6a(위) 모식도와 같이 망막신경절세포 축삭을 표지하기 위하여, E13.5 마우스의 왼쪽 안구에 친지성 형광염료(lipophilic fluorescent

dye) Dil(25 μ M)을 주입한 후, 뇌의 등측(dorsal) 절반 및 입의 아래부분을 절단하고 배측 부분이 아래로 오도록 하여 배양 슬라이드 챔버(culture slide chambers)에 옮겨 안구, 전뇌(forebrain) 및 중뇌(midbrain) 구조를 포함한 마우스 뇌 슬랩(slab)을 획득하였다. 그 다음, 비면역 래빗 IgG(rbIgG) 1 μ g/ml 또는 래빗 항-Vax1 다클론 항체(α -Vax1) 1 μ g/ml을 포함한 콜라겐 용액을 상기 슬랩의 제3뇌실에 이식하고 배양 배지로 채워 습도가 유지되는 37°C, 7% CO₂ 배양기에서 12 시간 동안 배양하였다. 그 후, 상기 실시예 <2-1>과 같이 뇌 슬랩을 절단하여 뇌 섹션(수평 절단: 12 μ m)을 획득하고, 4% PFA/PBS로 고정한 후 OCT 배지로 동결시켰다. 상기 동결된 뇌 섹션은 복측 시상하부에서 Dil-표지된 축삭 성장을 확인하기 위하여 Dil의 표면형광(epifluorescence)를 Olympus FV1000 공초점 현미경으로 시각화하여 하였다(도 6 아래, 1행). 또한, 상기 동결된 시신경교차가 포함된 뇌 섹션은 상기 실시예 <2-1>과 같이 항-Vax1 항체(초록) 및 항-NF160 항체(빨강)을 이용하여 면역염색하고 시각화하였다(스케일 바: 200 μ m)(도 6 아래 2행).

또한, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 망막 절편체를 24 시간 동안 배양한 후, 1 μ g/ml의 래빗 항-Vax1 다클론 항체를 처리 또는 무처리한 상태에서 Vax1-His 재조합 단백질 0.1 μ g/ml를 처리하고 24 시간 동안 추가 배양하였다. 그 후, 24 시간 후 상기 실시예 <2-1>과 같이 항-Vax1 항체(초록), 항-NF160 항체(빨강) 및 DAPI(파랑)을 이용하여 면역염색 및 시각화하고, 화살표 부위를 확대하여 나타내었다(스케일 바: 500 μ m)(도 6b). 또한, 면역염색하기 24 시간 전, 실시간으로 망막신경절세포 축삭의 길이 변화를 비디오 촬영하고 그래프화하였다(도 6c). 또한, 면역 염색 후, 24 시간 동안 망막신경절세포 축삭/다발의 수, 두께 및 길이 변화를 상기 실시예 <4-1>와 같이 그래프화하였다(도 6d). 그래프의 값은 평균내었고, 에러바는 SD로 구하였다(무처리(n=11), Vax1(n=10), Vax1+ α -Vax1(n=12)).

그 결과, 도 6a에 나타낸 바와 같이, 비면역 IgG를 처리한 경우와 비교하여 항-Vax1 다클론 항체를 이식한 마우스의 경우, 시신경교차로 향하는 망막신경절세포 축삭이 감소하고(도 6a, 1행, 어두운 부분의 Dil-표지된

망막신경절세포 축삭), 항-Vax1 이식 배자기 마우스에서, 상당수의 망막신경절세포 축삭이 감소된 Vax1 면역반응(immunoreactivity)를 보이고 Vax1 결핍 마우스에서 나타나는 것과 유사하게 복측 간뇌의 외측 벽에서 멈춰있는 것을 확인하였다(도 6a, 2행).

- 5 또한, 도 6b 내지 6d에 나타난 바와 같이, 성장배지에 재조합 Vax1 단백질을 첨가한 경우 망막신경절세포 축삭의 수, 두께 및 길이가 증가하는 반면, 재조합 Vax1 단백질 및 항-Vax1 다클론 항체를 함께 첨가한 경우, 망막신경절세포 축삭의 수 및 두께가 대조군과 유사하고, 길이의 증가가 억제되는 것을 확인함으로써, 재조합 Vax1 단백질과 공동배양된 항-Vax1 항체는
- 10 축삭 위치 및 축삭 성장 자극효과에 있어서 서로 길항작용을 하며, 상기 재조합 Vax1 단백질이 강한 망막신경절세포 축삭 성장 자극 효과를 나타냄을 확인하였다(도 6b 내지 6d). 따라서, 상기 <실시에 4>의 결과를 통해 세포 밖으로 분비된 세포외 Vax1이 직접 망막신경절세포 축삭의 성장을 자극함을 확인하였다.

15

<실시에 5> 체내배양(in vivo) Vax1 단백질의 세포간 이동 확인

- Vax1 mRNA는 E14.5 마우스의 시신경 원판(OD), 안병(OS), 시각교차앞구역(preoptic area, POA) 및 복측 시상하부(vHT)를 포함한 망막신경절세포 축삭 관련 구조에서 발현된다고 보고되고 있다(Bertuzzi et al.,
- 20 1999; Hallonet et al., 1999). 따라서, Vax1 mRNA 및 단백질이 망막에서도 발현되는지 확인하기 위하여, 계내 RNA 혼성화(in situ RNA hybridization), 면역염색법 및 qRT-PCR을 수행하였다.

- 구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 Vax1+/+(WT) 및 Vax1lacZ/lacZ E14.5 마우스로부터 준비된 망막을 [33P]-CTP-표지된
- 25 안티센스(antisense) Vax1 프루브(probe)을 이용해 Mui et al., 2005에 기재된 방법으로 계내 RNA 혼성화를 수행하여 Vax1 mRNA 발현을 시각화하였다(스케일바: 200 μ m)(도 7a).

또한, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 E14.5 Vax1lacZ/+ 및

Vax1lacZ/lacZ 마우스에서 상기 실시예 <2-1>과 같이 뇌 섹션을 획득하고, 래빗 항-Vax1 항체(초록), 마우스 항-베타-갈락토시다아제(β -galactosidase) 항체(DSHB)(빨강) 및 DAPI(파랑)을 이용하여 면역염색하고 시각화하였다. i 및 iii는 신경망막(NR)을 시각화하였고, ii 및 iv는 안병(OS)을 시각화하였다(스케일바: 200 μ m(1열 및 2열), 스케일바: 20 μ m(3열 및 4열))(도 7b).

또한, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 Vax1+/+ 및 Vax1lacZ/lacZ E14.5 마우스로부터 상기 실시예 <2-1>과 같이 뇌 섹션을 획득하고, 래빗 항-Vax1 항체(초록), 마우스 항-NF160 항체(빨강) 및 DAPI(파랑)을 이용하여 면역염색하고 시각화하였다. i 및 iii는 신경망막(NR)을 시각화하였고, ii 및 iv는 안병(OS)을 시각화하였다(스케일바: 200 μ m(1열), 스케일바: 20 μ m(2열 및 3열))(도 7c).

또한, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 Vax1+/+(WT) 또는 Vax1lacZ/lacZ E18.5 마우스로부터 상기 실시예 <2-1>과 같이 뇌 섹션을 획득하고, 망막(위) 및 시신경(optic nerve, ON)(아래)을 래빗 항-Vax1 항체 및 금(250 nm)-표지된 항 래빗 IgG를 이용하여 면역염색한 후, 전자현미경(electron microscopy, EM)으로 시각화하였다(스케일바: 0.5 μ m(1열), 스케일바: 0.2 μ m(2열 및 3열))(도 7d).

또한, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 Vax1+/+(WT) 및 Vax1-/- E14.5 마우스로부터 준비된 뇌 섹션에서 [33P]-CTP-표지된 안티센스(antisense) Vax1 프루브(probe)을 이용해 Mui et al., 2005에 기재된 방법으로 계내 RNA 혼성화를 수행하여 Vax1 mRNA 발현을 시각화하였고, 항-Vax1 항체로 면역염색을 하여 시각화하였으며(스케일바: 50 μ m)(도 7e-A)고, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 E14.5 Vax1+/lacZ 및 Vax1lacZ/lacZ 마우스에서 상기 실시예 <2-1>과 같이 뇌 섹션을 획득하고, 래빗 항-Vax1 항체(초록) 및 마우스 항-베타-갈락토시다아제(β -galactosidase) 항체(DSHB)(빨강)를 이용하여 면역염색하고 시각화하였다. 왼쪽 박스는 오른쪽에 확대된 이미지 위치를 나타낸다(스케일바: 50 μ m)(도 7e-B).

그 결과, 도 7a에 나타난 바와 같이, E14.5 Vax1+/+ 마우스의 시신경 원판(OD), 안병(OS), 시신경교차앞구역(POA) 및 복측 시상하부에서는 Vax1 mRNA가 발현되지만 망막에서는 발견되지 않음을 확인함으로써, 상기 Vax1은 망막을 제외한 시신경 원판, 안병 및 시신경교차앞구역을 포함한 망막신경절세포 축삭 관련 구조에서 발현됨을 확인하였다(도 7a).

또한, 도 7b에 나타난 바와 같이, Vax1lacZ/+ 마우스의 망막 세포에서 Vax1 단백질이 발현되고, 안병(OS) 별아교전구세포(astrocyte precursor cells, APCs)에서는 Vax1과 베타-갈락토시다아제가 동시에 발현되지만 Vax1 단백질은 주로 핵(nuclei)에 존재하며(도 7b, 1행), Vax1lacZ/lacZ 이형접합 10 녀인(knock-in) 마우스의 망막신경절세포 및 안병 별아교전구세포(OS APCs)에서는 Vax1이 완벽하게 발현되지 않는 것을 확인함으로써(도 7b, 아랫줄), 상기 Vax1이 Vax1lacZ/+ 마우스의 망막신경절세포에 특이적임을 확인하였다(도 7b).

또한, 도 7c에 나타난 바와 같이, Vax1+/+ 마우스의 안병 15 별아교전구세포의 핵에서 Vax1 및 NF160 단백질이 동시에 발현되는 반면(도 7c, 1행), Vax1lacZ/lacZ 마우스의 안병 및 신경망막에서는 NF160 단백질은 발현되지만 Vax1 단백질은 발현되지 않음을 확인함으로써(도 7c, 2행), 상기 Vax1이 Vax+/+ 마우스 시신경의 망막신경절세포 축삭에 존재하지만, 탈섬유화된 Vax1lacZ/lacZ 마우스 망막신경절세포 축삭에서는 나타나지 않음을 20 확인하였다(도 7c).

또한, 도 7d에 나타난 바와 같이, Vax1 단백질이 망막신경절세포 플라즈마막(plasma membrane)의 세포외 표면에 결합하고, 망막신경절세포 세포내 유입 소포(endocytic vesicles) 내에 존재하는 반면(도 7d, 1행), 안병 별아교전구세포(OP APC)에서는 수송 소포(trafficking vesicles) 및 핵 내 25 크로마틴(chromatin)과 함께 존재하는(도 7d, 2행) 것을 확인하였다(도 7d).

또한, 도 7e에 나타난 바와 같이, Vax1의 mRNA가 시상하부의 시상하부 세포 코드, 시신경, 시신경교차에서 발현하고, Vax1lacZ/lacZ 마우스에서는 뇌에서 발현되지 않음을 확인하였다(도 7e).

따라서, 상기 결과들을 통해 Vax1은 망막을 제외한 망막신경절세포 축삭 관련 구조에서 발현되고, 안병 또는 복측 시상하부에서 분비된 Vax1 단백질이 망막신경절세포 축삭막에 안착하여 망막신경절세포 내로 이동함을 확인하였다.

5 <실시예 6> 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)에 의한 Vax1 세포간 이동 조절 확인

세포간 이동은 En2(engrailed-2) 및 Otx2(orthodenticle homeodomain 2)와 같은 호메오도메인 전사인자(homeodomain transcription factors)에서 보고되고 있으나(Brunet et al., 2007; Brunet et al., 2005; Sugiyama et al., 2008), 호메오도메인 전사인자의 수송에 관한 조절 기작은 잘 알려져 있지 않다. 또한, 초파리에서 Vax1의 세포간 이동을 변형할 수 있는 유전자 암호화 단백질로서 막횡단(transmembrane) 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(HSPG) 단백질인 신데칸(syndecan, Sdc)을 발견하였다(Spring et al., 1994). 따라서, 호메오도메인 전사인자인 Vax1의 세포간 이동의 조절 기작 및 Vax1의 세포간 이동 조절에 신데칸이 관여하는지 확인하기 위하여, Ptc-Gal4-유도 Vax1-EGFP 및 Ds-Red를 발현시킨 초파리, Ptc-Gal4-유도 Vax1-EGFP, Ds-Red 및 Sdc 또는 Sdc 돌연변이(sdc23)를 발현시킨 초파리, 및 Ptc-Gal4-유도 Vax1-EGFP, Ds-Red 및 헤파란 설페이트 프로테오글리칸 글리피칸(glypican, Glp)의 초파리 상동 단백질인 Dlp(dally like protein)를 발현시킨 초파리를 이용하여 면역염색법을 20 수행하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-2>에 기재된 방법으로 획득한 Ptc-gal4>Vax1-EGFP, Ds-Red 초파리, Ptc-gal4>Vax1-EGFP, Ds-Red, Sdc23 초파리, Ptc-gal4>Vax1-EGFP, Ds-Red, Sdc 초파리, 및 Ptc-gal4>Vax1-EGFP, Ds-Red, Dlp 초파리의 날개 성충판(imaginal disc)을 4% PFA/PBS로 30 분 동안 고정하고, 25 세포의 Vax1을 시각화하기 위하여 1:10으로 희석한 항-Vax1 항체로 4℃에서 10 분 동안 반응시킨 후 PBS로 세 번 세척하였다. 그 다음, 상온에서 1 시간 동안 1:1000으로 희석한 Cy5-접합 이차 항체와 함께 반응시킨 후, 세포의 Vax1, EGFP 및 Vax1-EGFP 단백질의 Ptc-Gal4-유도 초록 형광 신호 및 Ds-Red 단백질의 빨강

형광 신호를 공초점 현미경(Olympus FV1000)으로 시각화하였다.

그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, Sdc 돌연변이 발현 초파리의 날개 성충판 앞쪽에서 Vax1-EGFP만 발현된 세포의 수가 증가하는 반면, sdc(도 8, 3행) 및 Dlp(도 8, 4행) 발현 초파리의 날개 성충판 앞쪽에서는 Vax1-EGFP 발현된 세포의 수가 감소하는 것을 확인함으로써, 초파리 날개 성충판 세포막에서 과발현된 신데칸(Sdc)이 공동 발현된 Vax1 단백질과 결합하여 이웃세포로 분산되는 것을 방해함을 확인하였다. 따라서, 이들 결과를 통해 Vax1 단백질은 포유류 시스템과 유사하게 초파리 날개 성충판에 있는 이웃세포로 이동하고, 상기 Vax1의 세포간 이동은 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(HSPGs)에 의해 매개됨을 확인하였다(도 8).

<실시에 7> Vax1과 헤파란 설페이트 의존적 헤파란 설페이트 프로테오글리칸의 결합 확인

<7-1> Vax1과 헤파란 설페이트 프로테오글리칸의 결합 확인

Vax1의 이동에 있어서 신데칸의 역할을 확인하기 위하여, 면역침강법(immunoprecipitation) 및 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

구체적으로, 출생 0일(post-natal day 0, P0) 마우스로부터 준비된 시신경을 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 200 mM NaCl, 1% Triton X-100, 및 1% NP-40이 포함된 용해 버퍼로 용해하였다. 세포 용해물은 12,000×g로 10 분 동안 4℃에서 원심분리하여 상층액을 수득하였다. 상기 수득한 상층액은 항-Vax1 및 항-Sdc2 항체(Santa Cruz Biotechnology)를 처리하여 4℃에서 16 시간 동안 반응시키고 단백질 A-아가로즈 비드(Protein A-agarose bead)를 첨가하여 4℃에서 16 시간 동안 추가적으로 반응시켜 면역침강하였다. 그 다음, 용해 버퍼로 5 번 세척하고 2×SDS 시료 완충용액을 첨가하여 반응을 종결시킨 후, 상기 실시예 <3-1>과 같이 일차 항체로 항-Sdc2 및 항-Vax1 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 9a). 음성대조군으로 래빗 IgG(rbIgG)로 침강시키고 상기와 같이 웨스턴 블롯을 수행하였다.

또한, Vax1, Vax2, GFP-태그된 Sdc1 및 Sdc2를 암호화하는 컨스트럭트를

제작한 후, 상기 실시예 <3-1>과 같이 HEK293T 세포로 Vax1, 및 GFP-Sdc1 또는 GFP-Sdc2를 형질전환하고(도 9b), Vax2, 및 GFP-Sdc1 또는 GFP-Sdc2를 형질전환하였다(도 9c). 2일 후, 상기와 같이 세포를 용해하여 상층액을 획득하고, 항-GFP 항체로 면역침강한 후, 상기 실시예 <3-1>과 같이 일차 항체로 항-Vax1 항체(도 9b) 또는 항-Vax2 항체(도 9c)를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 9b 및 도 9c).

그 결과, 도 9a 내지 9c에 나타난 바와 같이, E14.5 마우스 시신경에서 Vax1 항체에 의해 Sdc2가 침강되고, Sdc2 항체에 의해 Vax1이 침강되며(도 9a), HEK293T 세포에서 GFP 항체에 의해 Vax1이 침강되는 반면(도 9b), Vax2는 침강되지 않는 것을(도 9c) 확인함으로써, 상기 Vax1이 HEK293T 세포에서 과발현된 신데칸1(Sdc1) 및 신데칸2(Sdc2)뿐만 아니라 E14.5 마우스 시신경에 있는 신데칸2와 상호작용함을 확인하였다(도 9a 내지 도 9c).

<7-2> Vax1의 신데칸2 결합 부위 확인

Vax1과 상호작용하는 신데칸2(Sdc2)의 부위를 확인하기 위하여, N-말단 세포의 도메인이 결핍된 Sdc2-C 및 C-말단 세포질 도메인이 결핍된 Sdc2-N을 이용하여 면역침강법 및 웨스턴 블롯팅을 수행하였다.

구체적으로, GFP-태그된 Sdc2-N 또는 Sdc2-C를 암호화하는 컨스트럭트를 제작한 후, 상기 실시예 <3-1>과 같이 HEK293T 세포로 Vax1, 및 상기 GFP-Sdc2-N 또는 Sdc2-C 컨스트럭트를 형질전환하였다. 그 다음 상기 실시예 <7-1>과 같이 세포를 용해하여 세포 용해물의 상층액을 수득한 후, 항-GFP 항체로 면역침강한 후, 상기 실시예 <3-1>과 같이 일차 항체로 항-Vax1 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 9d).

그 결과, 도 9d에 나타난 바와 같이, GFP-Sdc2-N를 과발현시킨 경우, GFP 항체에 의해 Vax1이 침강되지만, GFP-Sdc2-C를 과발현시킨 경우, GFP 항체에 의해 Vax1이 침전되지 않는 것을 확인함으로써, 상기 Vax1이 신데칸의 세포외 도메인과 결합함을 확인하였다(도 9d).

<7-3> 헤파란 설페이트 측면에 결합하는 Vax1 확인

신데칸의 세포외 도메인은 주로 헤파란 설페이트 당에 의해 변형되고(Bishop et al., 2007), 따라서, Vax1이 신데칸의 단백질 백본(backbone)뿐만 아니라 당 그룹과도 상호작용할 수 있다. 따라서, 신데칸2의 헤파란 설페이트(HS) 측면 사슬에 Vax1이 결합하는지 확인하기 위하여, 면역침강법을 수행하였다.

구체적으로, E14.5 마우스 시신경에 헤파린(heparin)(Acros Organics) 1 mg/ml를 처리 또는 무처리하고, 상기 실시예 <7-1>과 같이 항-Vax1 항체로 침강시키고 각 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 수행하였다. 음성대조군으로 래빗 IgG(rbIgG)로 침강시키고 상기와 같이 웨스턴 블롯을 수행하였다. 일차항체로 항-sdc2, 항-Sdc3(santa cruz Biotechnology), 항-Glp1(Santa Cruz Biotechnology), 항-Pax2(Invitrogen), 항-Vax1 항체를 사용하였다(도 9e).

또한, 1 μ g의 Vax1-His 단백질을 최종 농도 0.2 mg/ml로 HS 또는 CS(Chondroitin sulfate)가 코팅된 사파로즈 4B(sepharose 4B) 레진(resin)과 함께 4°C에서 1 시간 동안 배양하였다. 레진에 결합한 Vax1 단백질은 SDS 시료 완충용액을 처리한 후 상기 실시예 <3-1>과 같이 10% SDS-PAGE로 전기영동한 후, 일차항체로 항-Vax1 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅하였다. Vax1 밴드의 상대적 강도는 이미지-J 소프트웨어(image-J software)를 이용하여 분석하였다(도 9f).

그 결과, 도 9e에 나타난 바와 같이, 헤파린의 첨가하지 않은 경우, Vax1 항체에 의해 Sdc2, Sdc3 및 Glp1이 침강되는 반면, 헤파린을 첨가한 경우, 상기 Sdc2, Sdc3, Glp1이 침강되지 않는 것을 확인함으로써, 자유 헤파린과 Vax1이 헤파란 설페이트 프로테오글리칸의 헤파란 설페이트와 경쟁하고, 또한, Vax1이 안병 별아교전구세포에서 Vax1과 복합체를 형성하는 Pax2를 제외한 망막신경절세포 축삭에서 발현되는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸과 상호작용함을 확인하였다(도 9e).

또한, 도 9f에 나타난 바와 같이, 재조합 Vax1 단백질이 헤파란 설페이트 코팅된 레진에 결합하는 것을 확인함으로써, 상기 Vax1이 망막신경절세포에서

발현되는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸 단백질의 헤파란 설페이트 측면 사슬과 결합함을 확인하였다(도 9f). 따라서 <실시예 7>의 결과들을 통해 Vax1이 헤파란 설페이트 프로테오글리칸의 세포외 도메인, 특히, 헤파란 설페이트 프로테오글리칸의 헤파란 설페이트 측면 사슬에 특이적으로 결합함을

5 확인하였다.

<실시예 8> Vax1 및 헤파란 설페이트 프로테오글리칸의 상호작용에 의한 신경망막절세포 축삭 성장 자극 확인

<8-1> 헤파란 설페이트 프로테오글리칸에 결합한 Vax1에 의한

10 망막신경절세포 축삭 성장 자극 확인

헤파란 설페이트 프로테오글리칸에 결합한 Vax1이 망막신경절세포 축삭 성장 자극 활성화에 미치는 영향을 확인하고, Vax1의 망막신경절세포 축삭 성장 자극 효과가 하기 [표 1]과 같이 Otx2에 있는 모티프와 상동성을 가지는 Vax1의 당-결합 모티프(sugar binding motif)에 의해 매개하는지 확인하기

15 위하여, Vax1 및 헤파리나제 I(heparinase I), 콘드로이티나제 ABC(chondroitinase ABC, ChnaseABC), 바이오틴(biotin) 표지된 Vax1 KR-펩타이드 또는 AA-bio 펩타이드, 및 Vax1(KR/AA) His 돌연변이 단백질을 처리한 신경망막 절편체를 이용하여 면역염색법을 수행하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 신경망막

20 절편체에 헤파린 및 헤파란 설페이트 당 사슬을 절단하는 헤파리나제 I(heparinase I)(Sigma) 2.5U/ml 또는 콘드로이틴(chondroitine) 당 사슬을 제거하는 콘드로이티나제 ABC(chondroitinase ABC, ChnaseABC)(Sigma) 2.5 U/ml를 3 시간 동안 처리한 후, Vax1-His 재조합 단백질 0.1 μ g/ml를 첨가하고 24 시간 동안 반응시켰다. 그 다음, 망막신경절세포 축삭에서 Vax1의 존재를

25 확인하기 위하여, 상기 실시예 <2-1>과 같이 항-Vax1 항체(초록) 및 항-NF160 항체(빨강)를 이용하여 면역염색하고 시각화하였다. 화살표는 확대한 부위이다(스케일바: 500 μ m)(도 10a).

또한, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 24 시간 전배양한

신경망막 절편체의 축삭 길이를 상기 실시예 <4-1>과 같이 측정한 후, 신경망막 절편체에 재조합 Vax1-His 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 하기 [표 1]과 같이 Otx2 당 결합 모티프와 상동성을 가지는 Vax1 아미노산 서열 101 내지 112를 암호화하는 바이오틴(biotin) 표지된 Vax1 KR-펩타이드(KR-bio; 100 ng/ml), Vax1-His(0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 및 두 개의 중요한 당 결합 잔기 101번 리신 및 102번 알라닌(Lys101-Arg102(KR))을 알라닌(Ala-Ala(AA))으로 치환한 AA-bio 펩타이드(100 ng/ml), 또는 Lys101-Arg102(KR)을 Ala-Ala(AA)로 치환한 Vax1(KR/AA)-His 돌연변이 단백질을(0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$)(AnyGen)을 처리하고 24 시간 동안 반응시켰다. 그 다음, 축삭의 길이를 상기 실시예 <4-1>과 같이 재측정하고, 4% PFA/PBS로 고정한 후, 상기 실시예 <2-1>과 같이 항-Vax1 항체(초록) 및 항-NF160 항체(빨강)로 면역염색하고 시각화하였다(도 10b). 화살표로 확대한 부위를 표시하였다(스케일바: 500 μm).

【표 1】

당 결합 모티프(sugar binding motif)	서열
Otx2	44-RKQRRERTTFTR-55(서열번호 3)
Vax1	101-KRTRTSFTAEQL-112(서열번호 4)

15

또한, 상기 헤파리나제 I, 콘드로이티나제 ABC, KR-bio 펩타이드, AA-bio 펩타이드 및 Vax1(KR/AA) 돌연변이 단백질을 처리한 신경망막 절편체를 24 시간 배양하는 동안 망막신경절세포 축삭 길이의 변화를 상기 실시예 <4-1>과 같이 측정하여 그래프화하였다. 값은 평균을 구하였고, 에러바는 SD로 분석하였다(Vax1(n=7), Vax1+Heparinase1(n=6), Vax1+ChnaseABC(n=6), Vax1+RK-bio(n=6), Vax1+AA-bio(n=6), Vax1(KR/AA)(n=5)). P-값은 student t-test로 구하였다(*, $p < 0.01$; **, $p < 0.001$)(도 10c).

그 결과, 도 10a 및 10c 나타낸 바와 같이, 콘드로이티나제 ABC를 처리한 신경망막 절편체보다 헤파리나제 I을 처리한 신경망막 절편체에서 망막신경절세포 축삭 성장이 억제되고, 축삭의 면역염색 신호가 감소하는 것을 확인함으로써, 헤파리나제 I에 의한 헤파란 설페이트 프로테오글리칸의 헤파란

25

설페이트 당 사슬이 절단되어 Vax1이 헤파란 설페이트에 결합하지 못하고, 따라서, 망막신경절세포 축삭의 성장 자극이 억제됨을 확인하였다(도 10a 및 10c).

- 또한, 도 10b 및 10c에 나타난 바와 같이, KR-bio 펩타이드 또는 Vax1(KR/AA) 돌연변이 단백질을 처리한 경우, 망막신경절세포 축삭의 성장이 억제되는 반면, AA-bio 펩타이드를 처리한 경우, Vax1만 처리한 경우와 유사하게 축삭이 성장하는 것을 확인하였다(도 10b 및 10c).

<8-2> Vax1 당 결합 모티프 및 헤파란 설페이트 프로테오글리칸과의

10 결합에 의한 망막신경절세포 축삭 성장 자극 확인

Vax1(KR/AA) 돌연변이 단백질이 망막신경절세포 축삭 성장에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 면역침강법, 웨스턴 블롯팅 및 면역염색법을 수행하였다.

- 구체적으로, V5-태그된 Vax1 또는 Vax1(KR/AA)를 암호화하는 15 컨스트럭트를 제작한 후, 상기 실시예 <3-1>과 같이 HEK293T 세포로 형질전환하고, 3 시간 동안 헤파린 10 mg/ml를 처리하여 배양한 후, 상기 실시예 <3-1>과 같이 세포를 수득하여 용해하고, 성장배지는 원심분리하여 상층액(S3) 부분을 수득하였다. 상기 수득한 상층액은 동량의 3 M 트리클로로아세트산(TCA; 최종 농도 20%) 용액을 혼합하여 거대분자를 20 침전시키고, 차가운 아세톤(acetone)으로 3 번 세척한 후, 건조하여 펠렛을 획득하였다. 상기 수득한 세포 용해물 및 펠렛은 상기 실시예 <2-1>과 같이 일차 항체로 항-V5 항체(GenWay Biotech)를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하고(도 11a, 위), Vax1 밴드의 상대적 강도를 이미지-J 소프트웨어를 이용해 그래프화하였다(도 11a, 아래).

- 25 또한, 상기 실시예 <3-1>과 같이 HEK293T 세포에 GFP-Sdc2, 및 Myc-Vax1 또는 Myc-Vax1(KR/AA) 컨스트럭트를 형질전환하였다. 그 다음 상기 실시예 <7-1>과 같이 세포를 용해하여 세포 용해물의 상층액을 수득한 후, 항-Vax1 항체로 면역침강한 후, 상기 실시예 <3-1>과 같이 일차 항체로 항-GFP 항체를

이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 11b).

또한, 상기 실시예 <3-1>과 같이 HEK293T 세포에 Myc-Vax1 또는 Myc-Vax1(KR/AA) 컨스트럭트를 형질전환하고, 세포 성장배지의 상층액(S3)을 COS7 세포에 첨가하여 3 시간 동안 배양하였다. 그 다음, 상기 COS7 세포를
5 항-Myc 항체(초록, 세포 표면), 항-Vax1 항체(빨강) 및 DAPI(파랑)를 이용하여 면역염색하고 시각화하였다(스케일바: 20 μ m)(도 11c).

그 결과, 도 11a 내지 11c에 나타난 바와 같이, 헤파린을 처리한 HEK293T 세포에서 침강되는 Vax1과 Vax1(KR/AA)의 양은 유사하지만, 헤파린 무처리 HEK293T 세포에 침강되는 Vax1(KR/AA)가 Vax1보다 많은 것을 확인하였다(도
10 11a). 또한, Vax1(KR/AA)와 Sdc2가 결합하지 못하고(도 11b); Vax1(KR/AA)가 세포 내로 이동하지 못하며(도 11c), 신경망막 절편체에서 성장하는 망막신경절세포 축삭의 수가 적음을 확인함으로써(10c), 상기 Vax1(KR/AA) 돌연변이 단백질이 Vax1보다 헤파란 설페이트 프로테오글리칸에 덜 효과적으로 결합하여 망막신경절세포 축삭 성장 유도를 저해함을 확인하였다(도 11a 내지
15 11c 및 10c). 따라서, <실시예 8>의 결과를 통해 헤파란 설페이트 프로테오글리칸에 Vax1의 결합이 망막신경절세포 축삭 성장 유도에 필수적임을 확인하였다.

**<실시예 9> 세포내 Vax1 침투 및 국소 단백질 합성 유도에 의한
20 망막신경절세포 축삭의 성장 확인**

<9-1> 세포내 Vax1 침투에 의한 망막신경절세포 축삭의 성장 확인

상기 <실시예 7> 및 <실시예 8>을 통해 세포의 Vax1이 헤파란 설페이트 프로테오글리칸에 결합할 뿐만 아니라, 망막신경절세포 축삭의 세포질 내로 이동함을 확인하였다. 따라서, Vax1이 세포내 침투 후 세포질 반응을
25 조절하여 망막신경절세포 축삭 성장을 자극하는지 또는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸의 하위 신호를 활성화하여 망막신경절세포 축삭 성장을 자극하는지 확인하기 위하여, 세포 표면 헤파란 설페이트 프로테오글리칸에 결합할 수 있지만 타겟 세포에 침투할 수 없는 Vax1(WF/SR) 돌연변이를

제작하고, 이를 이용하여 면역침강법 및 면역염색법을 수행하였다.

구체적으로, GFP-Sdc2, 및 안테나페디아(antennapedia, Antp)의 세포-침투 영역의 중요한 잔기와 상동성을 가지는 147번 트립토판(Trp) 및 148번 페닐알라닌(Phe)(WR) 아미노산 잔기를 Ser-Arg(SR)로 치환한 Vax1(WF/SR) 돌연변이 또는 Vax1를 상기 실시예 <3-1>과 같이 HEK293T 세포로 형질전환한 후, 세포 용해물을 수득하였다. 상기 실시예 <7-1>과 같이 세포 용해물의 상층액을 항-GFP로 면역침강한 후, 상기 실시예 <3-1>과 같이 일차 항체로 항-Vax1 항체를 이용하여 웨스턴 블롯팅을 수행하였다(도 12a).

또한, 상기 실시예 <3-1>과 같이 상기 Vax1 및 vax1(WF/SR)을 과발현시킨 HEK293T 세포 성장배지의 상층액(S3)을 COS7 세포에 첨가하고 3 시간 동안 배양하였다. 그 다음, 상기 실시예 <3-1>과 같이 상기 COS7 세포를 항-Myc 항체(초록), 항-Vax1 항체(빨강) 및 DAPI(파랑)를 이용하여 면역염색하고 시각화하였다(스케일바: 20 μ m)(도 12b).

또한, Myc-Vax1(WT) 또는 Vax1(WF/SR) 돌연변이를 상기 실시예 <3-1>과 같이 COS7 세포로 형질전환하였다. 그 다음, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 신경망막 절편체와 상기 형질전환 COS7 세포를 48 시간 동안 공동배양한 후, 상기 실시예 <2-1>과 같이 항-Vax1 항체(초록) 및 항-NF160 항체(빨강)로 면역염색하여 시각화하고(스케일바: 500 μ m(위), 200 μ m(아래))(12c), 방향성을 측정하였다(도 12d).

그 결과, 도 12a 및 도 12b에 나타난 바와 같이, Vax1 및 Vax1(WF/SR) 모두 항-GFP 항체에 의해 침강되지만(도 12a), Vax1(WF/SR)의 경우 세포 내에서 발견되지 않는 것(도 12b)을 확인함으로써, 상기 Vax1(WF/SR) 돌연변이는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸에 결합할 수는 있지만 타겟 세포로 침투할 수 없음을 확인하였다(도 12 a 및 도 12b).

또한, 도 12c 및 도 12d에 나타난 바와 같이, Vax1(WR/SR) 과발현 COS7 세포를 공동배양한 신경망막 절편체에서 COS7 세포로 향한 망막신경절세포 축삭의 성장 유도가 저해되는 것을 확인함으로써, 상기 Vax1에 의해 유도된 망막신경절세포 축삭 성장을 위하여 외부에서 유래한 Vax1의 세포내 침투가

요구됨을 확인하였다.

<9-2> 세포질 내 Vax1 단백질 복합체 확인

세포질 내에서 Vax1의 기능을 확인하기 위하여, GST-Vax1 단백질
5 복합체를 정제 및 은염색(silver staining) 후 MALDI-TOF로 단백질을
확인하였다.

구체적으로, GST 및 GST-Vax1를 암호화하는 컨스트럭트를 제작한 후,
상기 실시예 <3-1>과 같이 HEK293T 세포로 형질전환하였다. 그 다음, 상기 GST
및 GST-Vax1 과발현된 HEK293T 세포를 용해하여 세포 용해물을 수득하였다.
10 상기 수득한 용해물을 4℃에서 12,000×g로 10 분 동안 원심분리하여 세포질
상층액(S3)을 획득한 후, 4℃에서 1 시간 동안 글루타티온
세파로즈(glutathione Sepharose) 4B 레진(resine)과 함께 배양하였다. 그
다음, 용해 버퍼로 5 번 세척하고, 2×SDS 시료 완충용액으로 용출하였다. 상기
용출된 단백질을 전기영동하고 silver staining kit(Thermo)를 이용해 제조사의
15 절차에 따라 염색하였다. 또한, 세포를 0.1% SDS 및 1% Triton X-100가 포함된
PBS 용액으로 용해하고, 상기와 같이 용해된 세포로부터 상층액을 수득하여
레진과 함께 배양하였다. 그 다음, 고염 버퍼(high salt buffer)(10 mM
Tris-HCl (pH 7.4), 1 M NaCl, 1% Triton X-100 및 1% NP-40) 및 PBS로 2 번
세척하고, 10 mM 글루타티온이 포함된 PBS 용액으로 GST-접합된 단백질을
20 용출하였다. 상기 샘플을 10% SDS-PAGE로 전기영동하고, Pierce Silver Stain
Kit for Mass Spectrometry®(Pierce)로 제조사의 절차에 따라 염색하였다.
염색된 밴드는 한국기초과학지원연구원에 의뢰하여 MALDI-TOF mass
spectrometry로 분석하였다.

그 결과, 도 13a에 나타낸 바와 같이, Vax1 친화성 정제에 의해 분리된
25 주된 단백질이 리보솜 구성단백질(ribosomal component)인 리보솜
단백질(ribosomal proteins, RPs) L11, L23A, L26, S14 및 S16, 번역
조절자(translation regulator)인 eIF(eukaryotic translation initiation
factor) 3B 및 3C, 및 HSPA1A(chaperon heat shock 70-KD protein 1A)인 것을

확인함으로써, 상기 Vax1은 세포질 En2가 망막신경절세포 축삭 성장을 조절하는 것과 유사한 기전인 국소 단백질 합성에 관여함을 확인하였다(Brunet et al., 2005; Yoon et al., 2012)(도 13a).

5 <9-3> 망막신경절세포 축삭으로 침투한 Vax1에 의한 국소 단백질 합성 촉진 확인

Vax1이 국소 단백질 합성에 관여하는지 확인하기 위하여, Vax1(WF/SR) 돌연변이를 이용하여 면역염색법을 수행하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 E13.5 마우스
 10 신경망막 절편체를 24 시간 배양한 후, Vax1 또는 Vax1(WF/SR)이 포함된 배지에 옮겨 24 시간 동안 추가 배양하였다. 그 다음, 절편체 배양배지를 메티오닌(methionine) 자유 배지로 교체하고 30 분 후, 생물직교 비필수아미노산(bioorthogonal noncanonical amino acid) AHA(L-azidohomoalanine, Invitrogen) 50 μ M를 첨가하였다. 6 시간 후, 상기
 15 신경망막 절편체를 1% FBS를 포함한 D-PBS로 2 번 세척하고, 1% FBS를 포함한 D-PBS에 있는 30 μ M DIBO-Alexa Fluor (Invitrogen)을 첨가하여 암실에서, 상온으로 1시간 동안 배양하였다. 그 다음, 1% FBS를 포함한 D-PBS로 4 번 세척하고, 4% PFA/D-PBS로 15 분 동안 상온에서 배양한 후, AHA-Alexa488 포함한 단백질의 형광을 시각화하여 망막신경절세포 축삭(도 13b, 2행) 및 절편체
 20 세포체(cell body)(도 13b, 3행)에서 단백질 합성율을 확인하였다(스케일바: 500 μ m(1행), 스케일바: 100 μ m(3행))(도 13b).

또한, Vax1에 의해 유도되는 망막신경절세포 축삭 성장에 있어서 핵에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 현미경 상에 망막신경 절편체를 놓고 해부용 칼을 이용하여 세포체를 중심으로 돌려가며 축삭을 자른 후, 최종적으로
 25 세포체만을 제거하여 세포체로부터 축삭을 분리하고 상기와 같이 AHA 50 μ M를 첨가하여 6 시간 동안 배양한 후, AHA-Alexa488 포함한 단백질의 형광을 시각화하여 단백질 합성율을 확인하고(스케일바: 500 μ m)(도 13c), 상기 실시예 <4-1>과 같이 6 시간 동안 성장한 망막신경절세포 축삭의 길이를

그래프화하였다(**, $p < 0.001$)(도 13d).

그 결과, 도 13b에 나타난 바와 같이, WT 재조합 Vax1이 발현된 경우, 망막신경절세포 축삭에서 Alexa Fluor 488-표지된 단백질의 형광 밀도가 현저하게 증가하는 반면(도 13b, 2열), 침투 결함 Vax1(WF/SR) 돌연변이는 5 망막신경절세포 축삭에서 새롭게 합성된 단백질의 밀도 증가를 억제함을 확인함으로써(도 13b, 3열), 상기 외인성(exogenous) Vax1이 축삭에 침투하여 단백질 합성을 자극함을 확인하였다(도 13b).

또한, 도 13c 및 13d에 나타난 바와 같이, 세포체로부터 분리된 망막 축삭 역시 재조합 Vax1이 발현된 경우 합성된 단백질의 밀도가 증가하는 10 반면(13c, 2열), Vax1(WF/SR) 돌연변이가 발현된 경우 합성된 단백질의 밀도가 대조군과 유사한 것을 확인하였다(도 13c, 3열). 또한, 세포체로부터 분리된 망막 축삭은 Vax1의 자극으로 축삭 성장이 증가하지만, Vax1(WF/SR) 돌연변이 발현된 망막 축삭은 성장이 억제됨을 확인하였다(도 13d). 따라서, 상기 <실시예 9>의 결과를 통해 Vax1이 세포 내로 이동하여 국소 단백질 합성을 15 촉진하고, 망막신경절세포 축삭의 성장을 자극함을 확인하였다.

<실시예 10> 외인성(exogenous) Vax1 단백질에 의한 중선(midline)으로 향하는 망막신경절세포 축삭 조절 확인

<10-1> 세포외 Vax1 단백질에 의한 손상된 망막신경절세포 축삭의 성장 20 회복 확인

Vax1-/- 마우스에서 손상된 망막신경절세포 축삭이 세포외 Vax1 단백질에 의해 성장이 회복되는 확인하기 위하여, Vax1 재조합 단백질 및 Vax1(WF/SR) 재조합 단백질을 이용해 면역염색을 수행하였다.

구체적으로, 상기 실시예 <4-2>와 같이 Vax1lacZ/lacZ 배자기 마우스 뇌 슬랩의 제3뇌실에 $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 6×His 펩타이드, Vax1-His 또는 Vax1(WF/SR)-His 25 단백질이 혼합된 콜라겐 겔을 24 시간 동안 이식한 후, Dil의 표면형광을 시각화하고 항-Vax1 항체(초록) 및 항-NF160 항체(빨강)를 이용하여 면역염색하고 시각화하였고(도 14a-A), 상기 실시예 <4-2>와 같이

Vax1lacZ/lacZ 배자기 마우스 뇌 슬랩의 제3뇌실에 1 / Robo 1-Fc 분질(12.35 pmol, R&D Systems)와 4.78 / 6X-His 펩타이드(5.69 nmol) 또는 200 / Vax1-His(5.69 nmol) 단백질이 혼합된 콜라겐 겔을 12 시간 동안 이식한 후, 위쪽 형광 이미지는 광검출기로 시각화하였고, 아래쪽 이미지는 같은 부분을

5 항-Vax1 항체(초록) 및 항-NF160 항체(빨강)를 이용하여 면역염색하여 시각화하였으며, 또한, 면역 염색 이미지의 형광 강도를 측정하여 이미지-J 소프트웨어를 이용해 그래프화하였다. 값은 rb-IgG를 처리한 샘플을 상대적으로 발현 강도를 나타내었고, 그래프 위의 숫자는 분석한 뇌 슬랩의 수이며, 에러바는 SD로 구하였고, p-값은 ANOVA로 구하였다(**p<0.001)(도

10 14a-B).

그 결과, 도 14a에 나타난 바와 같이, Vax1 결핍 마우스 배자기 및 Vax1(WF/SR) 돌연변이 단백질을 이식한 경우, 망막신경절세포 축삭의 복측 시상하부의 접근 및 축삭 성장이 잘 이루어지지 않는 반면, Vax1 단백질을 포함한 콜라겐 겔을 이식한 Vax1 결핍 마우스 배자기의 복측 시상하부에서

15 많은 수의 망막신경절세포 축삭이 발견되고, 축삭이 재성장하는 것을 확인하였다(+Vax1-His). 한편, Vax1 및 Vax1(WF/SR) 단백질의 이식은 복측 외측 간뇌(ventral lateral diencephalon)에서 Slit1의 발현 및 내측 간뇌(medial diencephalon)에서 EphB3의 결여에 영향을 미치지 않는 것을 확인함으로써, 상기 Vax1 단백질은 축삭형질(axoplasm)로 침투하여 축삭 유도

20 분자의 발현에 비의존적으로 망막신경절세포 축삭의 성장을 자극함을 확인하였다. 또한, 복측 시상하부에서 망막신경절세포 축삭의 성장은 Vax1-His와 Robo 1-Fc가 혼합된 콜라겐 겔을 이식하였을 때, 더욱 강화된 효과를 나타내는 것을 확인하였다(도 14a).

25 <10-2> 세포의 Vax1 단백질 및 Slit2 간의 길항작용에 의한 망막신경절세포 축삭의 성장 조절 확인

시신경교차에서 망막신경절세포 축삭 투사(projection)는 종종 적층(floor plate, FP)으로 향하는 척수 교차 축삭(spinal commissural axonal)

투사와 비교된다. 척수 교차 축삭이 내측 척수(medial spinal cord)에서
 발현되는 Slit1에 의해 중선으로 미성숙하게 들어가는 것이 억제되고 복측
 방향으로 성장하며, 같은 방법으로 시신경교차앞구역(POA)에 있는 Slit1 및
 복측-외측 간뇌는 망막신경절세포 축삭이 시신경교차에 도달하기 전에 뇌로
 5 들어가는 것을 막는다. 한편, 척수 교차 축삭은 적층에서 분비되는
 네트린(netrin) 및 Shh와 같은 유도 신호를 감지한다. 네트린 및 Shh 유인
 신호(attractive signal)는 heparan sulfate 프로테오글리칸에 의해
 국소적으로 축적될 수 있는 Slit2의 반발 신호(repulsive signal)와 경쟁할 수
 있다고 보고되고 있다(Matsumoto et al., 2007; Wright et al., 2012). 그러나,
 10 네트린 및 Shh 모두 망막신경절세포 축삭을 복측 시상하부로 유도하기 위해
 필요한 것은 아니다(Deiner and Sretavan, 1999; Sanchez-Camacho and Bovolenta,
 2008; data not shown). 따라서, 본 발명자들은 Vax1과 Slit2 사이의 관계를
 확인하기 위하여, Vax1 및 slit2 단백질을 처리하여 면역염색법 및
 망막신경절세포 축삭 길이 측정을 수행하였다.

15 구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 E13.5 마우스
 신경망막 절편체를 24 시간 동안 배양한 후, Vax1 0 ng/ml(왼쪽), 10
 ng/ml(가운데) 및 100 ng/ml(오른쪽) 농도 하에 Slit2-His(R&D Systems) 10
 ng/ml를 24 시간 동안 처리하였다(도 14b-A, 윗줄). 또한, 상기와 반대로
 Slit2-His 0 ng/ml(왼쪽), 10 ng/ml(가운데) 및 100 ng/ml(오른쪽) 농도 하에
 20 Vax1-His 10 ng/ml를 24 시간 동안 처리하였다(도 14b-A, 아랫줄). 그 후, 이를
 시각화하고(도 14b-A), 24 시간 동안 변화한 망막신경절세포 축삭의 길이를
 상기 실시예 <4-1>과 같이 그래프화하였다. 에러바는 SD로 구하였고, 그래프
 위의 숫자는 분석한 축삭의 수를 나타낸다(무처리군(n=22), Vax1(10
 ng/ml)(n=10), Vax1(100 ng/ml)(n=9), Slit2(10 ng/ml)(n=5), Slit2(100
 25 ng/ml)(n=5), Vax1(10 ng/ml)+Slit2(10 ng/ml)(n=7), Vax1(10 ng/ml)+Slit2(100
 ng/ml)(n=6), Vax1(10 ng/ml)+Slit2(10 ng/ml)(n=13), and Vax1(100
 ng/ml)+Slit2(10 ng/ml)(n=7))(도 14b-B).

또한, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 E13.5 마우스

신경망막 절편체와 Vax1-낙아웃 복측 시상하부 절편체를 함께 100 ng/ml Robo 1-Fc이 존재하거나(도 14c-A), 없는 상태로(도 14c-B) 24 시간 동안 배양하였다. 그 후, 이를 시각화하거나(왼쪽), 면역염색하여 시각화하였다(오른쪽)(스케일바: 500 μ m)(도 14c-A). 또한, 망막신경절세포

5 축삭의 방향성을 축삭 마커인 NF160 면역염색 이미지 픽셀을 이용하여 계수하여 그래프화하였다. +는 정방향, 0는 중립, -는 역방향을 나타내며, 에러바는 SD로 구하였고, 그래프 y축의 숫자는 분석한 절편체의 수를 나타내며, p-값은 ANOVA로 구하였다($p < 0.01$)(도 14c-B).

또한, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 E13.5 마우스

10 신경망막 절편체를 24 시간 동안 배양한 후, Vax1 0 ng/ml(왼쪽), 10 ng/ml(가운데) 및 100 ng/ml(오른쪽) 농도 하에 Slit2-His(R&D Systems) 10 ng/ml를 24 시간 동안 처리하였다(도 14d, 아랫줄). 또한, 상기와 반대로 Slit2-His 0 ng/ml(왼쪽), 10 ng/ml(가운데) 및 100 ng/ml(오른쪽) 농도 하에 Vax1-His 10 ng/ml를 24 시간 동안 처리하였다(도 14d, 아랫줄). 그 후, 이를

15 시각화하고(도 14b-A), 형광 강도를 이미지-J 소프트웨어를 이용해 그래프화하였다. 에러바는 SD로 구하였고, 그래프 위의 숫자는 분석한 영역의 수를 나타낸다(스케일바: 20 μ m)(도 14d).

또한, 상기 실시예 <1-1>에 기재된 방법으로 획득한 신경망막 절편체에 Vax1-His(10 ng/ml), 및 Vax1-His(10 ng/ml) 및 Slit2-His(10 ng/ml)를 처리하고

20 상기와 같이 시각화하고, 항-Vax1 항체(초록) 및 항-His 항체(빨강)을 이용하여 상기 실시예 <2-1>과 같이 면역염색하여 시각화하였다(스케일바: 500 μ m(dark field), 스케일바: 10 μ m(점선 박스))(도 14e).

또한, 상기 실시예 <1-1>과 같이 대뇌 절편체(cortical explants)를 획득하고, 상기 획득한 대뇌 절편체에 Vax1, Vax1(R152S) 및 Vax1(WF/SR)을

25 처리한 후, 상기 실시예 <3-1>과 같이 항-Vax1 항체(초록), 항-NF160 항체(빨강) 및 DAPI(파랑)을 이용하여 면역염색하고 시각화하였다(도 14f).

그 결과, 도 14b에 나타낸 바와 같이, Vax1을 단독처리한 군보다 Slit2를 함께 처리한 군에서 망막신경절세포 축삭의 성장이 억제되고(Vax1(10 ng/ml) 및

Slit2 무처리 이미지와 Vax1(10 ng/ml) 및 Slit2(10 ng/ml) 이미지 비교), Slit2를 단독처리한 군보다 Vax1을 함께 처리한 군에서 망막신경절세포 축삭의 성장이 촉진(Slit2(10 ng/ml) 및 Vax1 무처리 이미지와 Slit2(10 ng/ml) 및 Vax1(10 ng/ml) 이미지 비교)되는 것을 확인하였다(도 14b-A). 또한, Vax1을
5 단독 처리한 군에 비해 Slit2를 함께 처리한 군에서 대체적으로 축삭의 길이가 감소하는 것을 확인함으로써(도 14b-B), Vax1과 Slit2가 서로 경쟁하며, Vax1이 Slit2-유도 망막신경절세포 축삭 후퇴 반응(retraction response)과 길항작용함을 확인하였다(도 14b).

또한, 도 14c 내지 도 14d에 나타낸 바와 같이, Vax1과 Robo 1-Fc를 함께
10 처리하여 배양하였을 때, 망막신경절세포의 축삭의 성장이 확연히 증가하는 것을 확인하였고(도 14c), Vax1과 Slit2를 함께 처리한 군에서 서로 경쟁하는 것을 한번 더 확인하였다(도 14d).

또한, 도 14e에 나타낸 바와 같이, Vax1은 망막신경절세포 축삭 내로 침투해 있지만, slit2는 축삭 표면에 붙잡혀 있는 것을 확인함으로써, Vax1과
15 slit2의 상호간 길항작용(reciprocal antagonism)은 헤파란 설페이트 프로테오글리칸에 의해 매개되지 않음을 확인하였다(도 14e).

또한, 도 14f에 나타낸 바와 같이, Vax1 및 Vax1(R152S)를 처리한 경우, 대뇌 절편체에서 축삭의 성장이 유도되는 것을 확인함으로써, Vax1 단백질은 망막신경절세포 축삭 뿐만 아니라 대뇌신경 축삭의 성장도 유도하며, 따라서,
20 다양한 신경 축삭의 뇌중선 통과 역시 망막신경절세포 축삭과 유사하게 Vax1 단백질에 의해 조절될 가능성을 확인하였다(도 14f).

<10-3> 분비된 Vax1 단백질에 의한 망막신경절세포 축삭 성장 조절 모델

상기 <실시예 2> 내지 <실시예 9>의 결과를 통해 포유류 뇌의 복측
25 시상하부에서 분비된 축삭 성장 인자로서 Vax1의 기능을 확인하였다.

도 14f에 나타낸 바와 같이, Vax1이 복측 시상하부의 방사아교세포(radial glia) 및 신경간세포(NPC)에서 발현되어 세포 밖으로 분비되고, 농도 구배를 형성하여 중선(midline)에서 고농도로 존재하고

측면으로 확산된다. 복측 시상하부로 접근하는 망막신경절세포 축삭의 신데칸(syndecan)을 포함한 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(HSPGs)에 Vax1이 결합하면, 망막신경절세포 성장 부위에서 Vax1의 농도가 국소적으로 증가하게 된다. 그 후, Vax1이 망막신경절세포 축삭 내로 침투하여 단백질 합성을 자극하고, 따라서, 중선을 향해 축삭 성장을 촉진한다. 추가적으로, 유도 VEGF164-뉴로필린(neurophilin) 및 억제 에프린B2-EphB1(ephri nB2-EphB1)과 같은, 복측 시상하부 중선에 풍부한 망막신경절세포 축삭 유인 신호들은 시신경교차 형성을 위해 중선에서 망막신경절세포 축삭의 방향성을 결정한다. 상기를 통해 Vax1 단백질에 의한 망막신경절세포 축삭 성장 조절 모델을 완성하였다.

【청구의 범위】**【청구항 1】**

Vax(ventral anterior homeobox) 단백질을 유효성분으로 함유하는
5 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 상기 Vax 단백질은 서열번호 1로 기재되는 아미노산
서열을 갖는 Vax1 단백질 또는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는
10 Vax2 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는
신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물.

【청구항 3】

제 1항에 있어서, 상기 신경세포는 상기 신경세포는 Vax1 단백질이
15 결핍된 시신경(optic nerve), 대뇌교차신경 (cortical commissural nerve),
해마교차신경(hippocampal commissural nerve), 뇌하수체교차신경(hypothalamic
commissural nerve), 삼차신경(trigeminal nerve)으로 이루어진 군으로부터
선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 신경세포 재생 또는 신경세포 성장
촉진용 약학적 조성물.

20

【청구항 4】

제 2항에 있어서, 상기 Vax1 단백질은 헤파란 설페이트
프로테오글리칸(heparan sulfate proteoglycan, HSPG)과 결합하는 것을
특징으로 하는 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물.

25

【청구항 5】

제 2항에 있어서, 상기 Vax1 단백질은 신데칸2(Syndecan-2, Sdc2)의
세포외 도메인과 결합하는 것을 특징으로 하는 신경세포 재생 또는 신경세포

성장 촉진용 약학적 조성물.

【청구항 6】

5 Vax 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 세포를 유효성분으로 함유하는 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물.

【청구항 7】

10 제 6항에 있어서, 상기 Vax 단백질은 서열번호 1로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 Vax1 단백질 또는 서열번호 2로 기재되는 아미노산 서열을 갖는 Vax2 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물.

【청구항 8】

15 제 6항에 있어서, 상기 벡터는 선형 DNA, 플라스미드 DNA 또는 재조합 바이러스성 벡터인 것을 특징으로 하는 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물.

【청구항 9】

20 제 6항에 있어서, 상기 재조합 바이러스는 레트로 바이러스, 아데노 바이러스, 아데노 부속 바이러스, 헤르페스 심플렉스 바이러스, 렌티바이러스로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물.

25 【청구항 10】

제 6항에 있어서, 상기 세포는 조혈 줄기세포, 수지상 세포, 자가이식 종양세포 및 정착 종양세포로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물.

【청구항 11】

1) 피검체로부터 수득한 세포에 피검물질을 처리하고 신경축삭 성장을 측정하는 단계;

5 2) 상기 단계 1)의 세포에서 Vax1 및 헤파란 설페이트 프로테오글리칸의 결합수준을 측정하는 단계;

3) 상기 단계 2)의 Vax1 및 헤파란 설페이트 프로테오글리칸 결합수준을 무처리 대조군과 비교하여 증가시키는 피검물질을 선별하는 단계를 포함하는 신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 후보물질 스크리닝 방법.

10

【청구항 12】

제 10항에 있어서, 상기 결합수준은 면역형광법, 질량분석법, 단백질칩, 웨스턴 블롯팅, dot 블롯팅(dot-blotting) 및 ELISA로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 신경세포 재생 또는 신경세포 성장
15 촉진용 후보물질 스크리닝 방법.

【청구항 13】

약학적으로 유효한 양의 Vax 단백질을 신경세포가 손상된 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경세포 재생 방법.

20

【청구항 14】

약학적으로 유효한 양의 Vax 단백질을 신경세포가 손상된 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경세포 성장 촉진 방법.

25 【청구항 15】

약학적으로 유효한 양의 Vax 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 세포를 신경세포가 손상된 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경세포 재생 방법.

【청구항 16】

약학적으로 유효한 양의 Vax 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 세포를 신경세포가 손상된 개체에 투여하는 단계를 포함하는 신경세포 성장 촉진 방법.

【청구항 17】

신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물로 사용하기 위한 Vax 단백질의 용도.

10

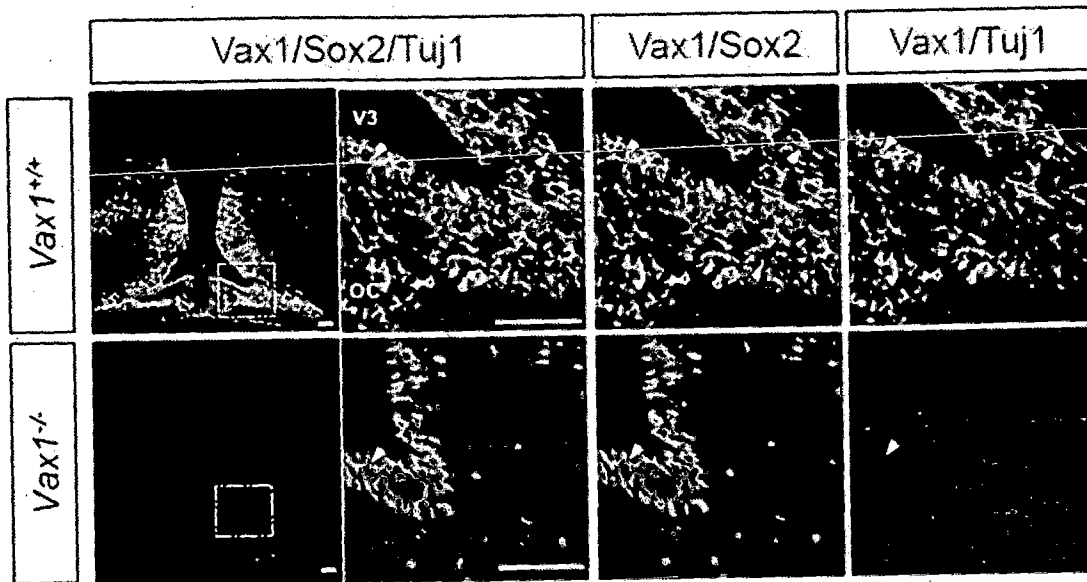
【청구항 18】

신경세포 재생 또는 신경세포 성장 촉진용 약학적 조성물로 사용하기 위한 Vax 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터 또는 세포의 용도.

15

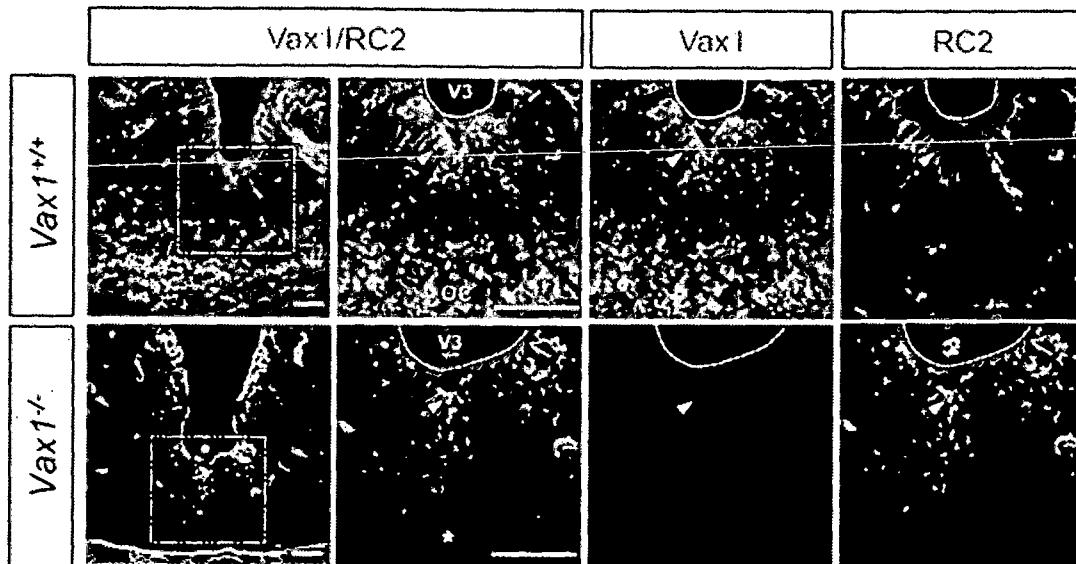
1/59

[도 1a]



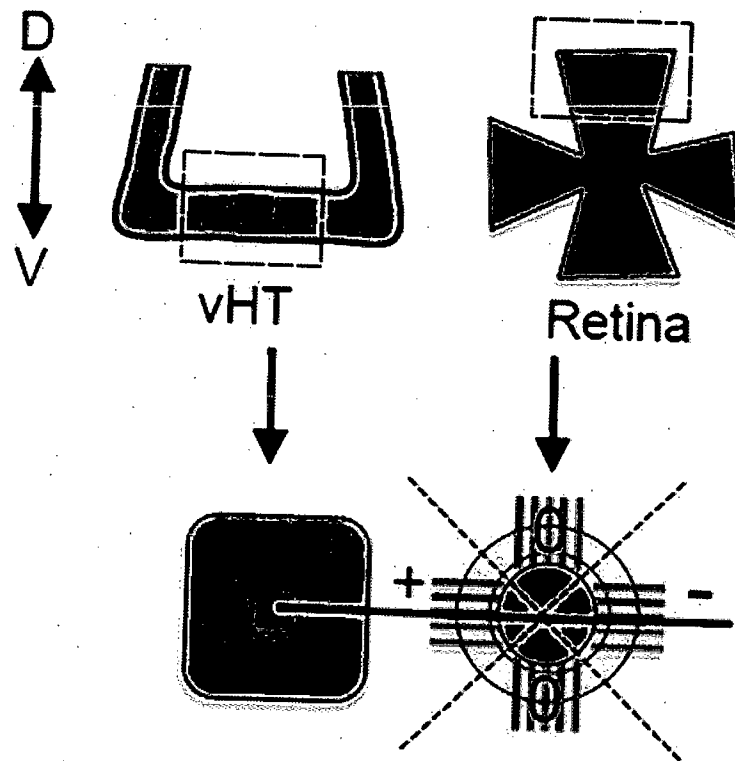
2/59

[도 1b]



3/59

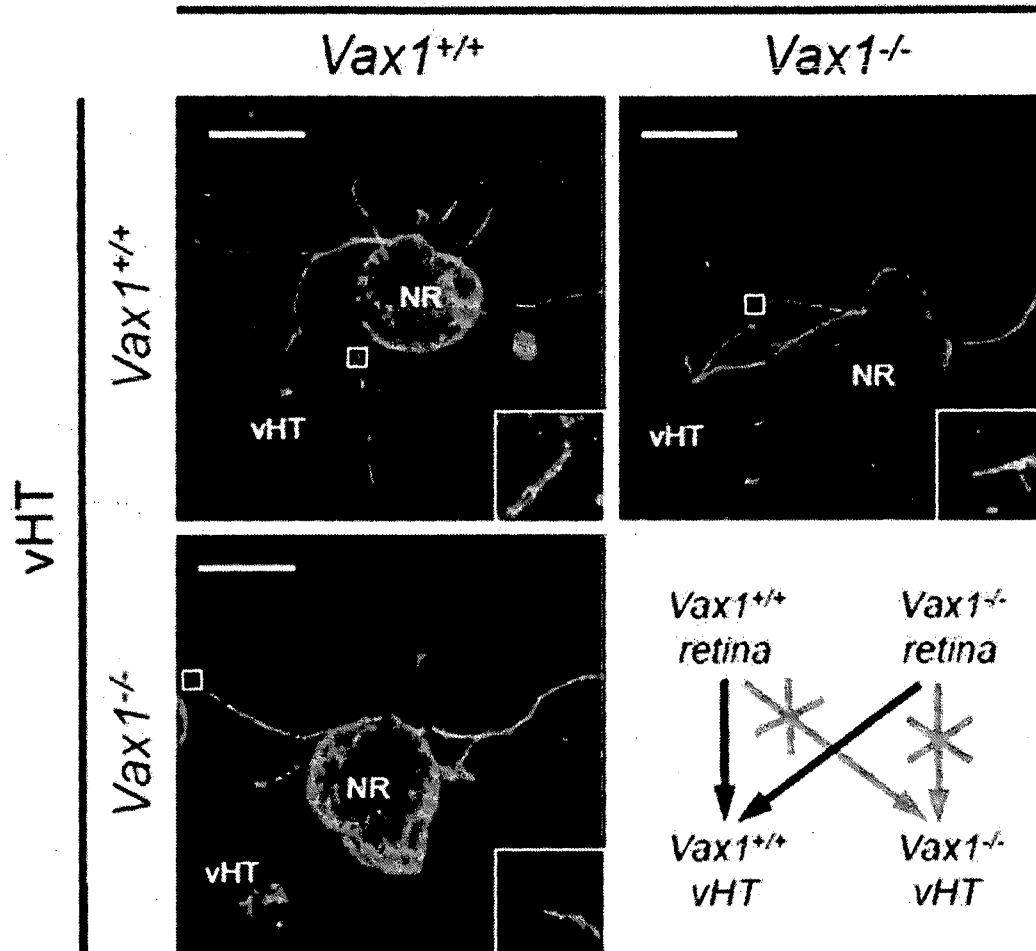
[도 2a]



4/59

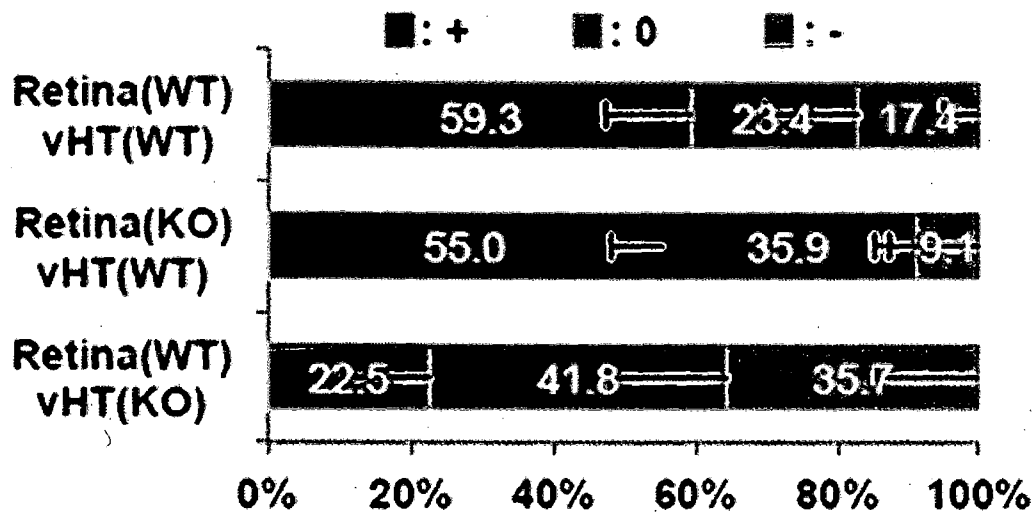
[도 2b]

Retina



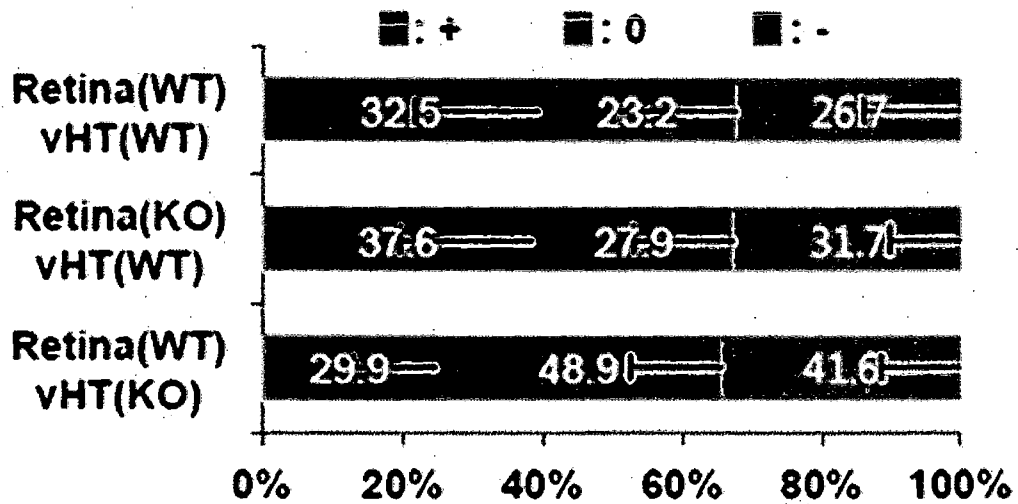
5/59

[도 2c]

**Directions of RGC axon growth tip
(toward vHT explants)**

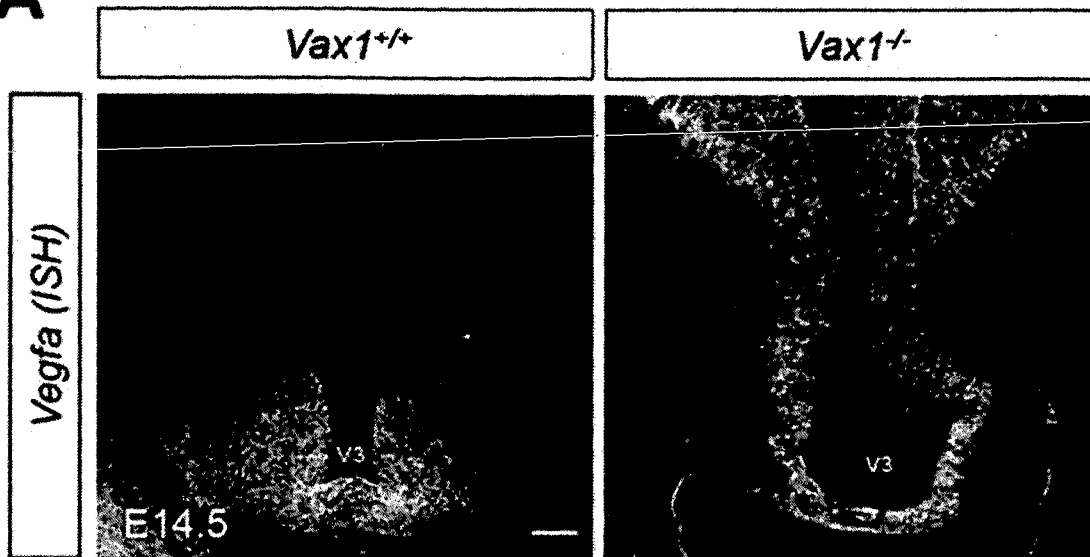
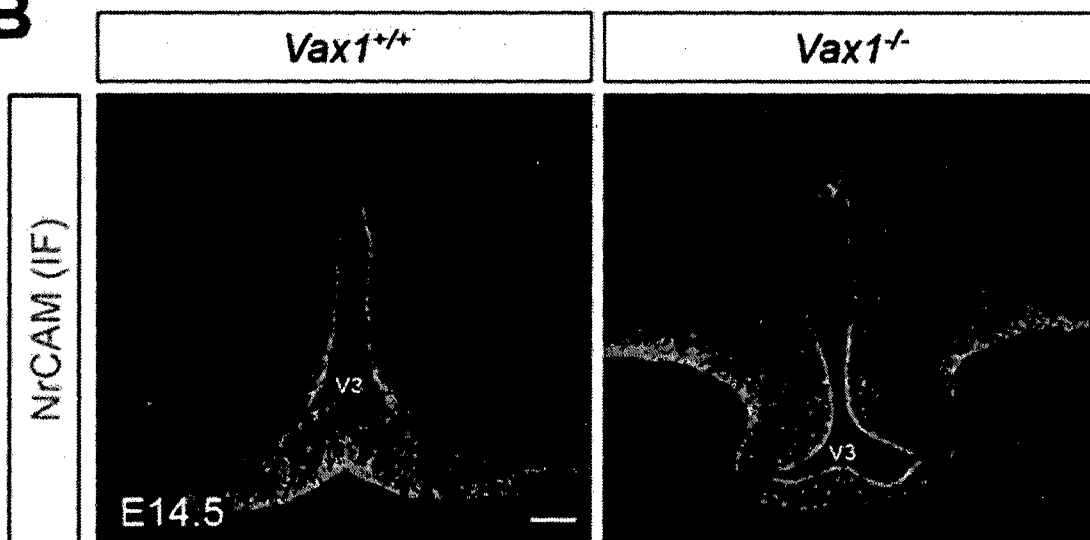
6/59

[도 2d]

**Directions of RGC axon shaft
(toward vHT explants)**

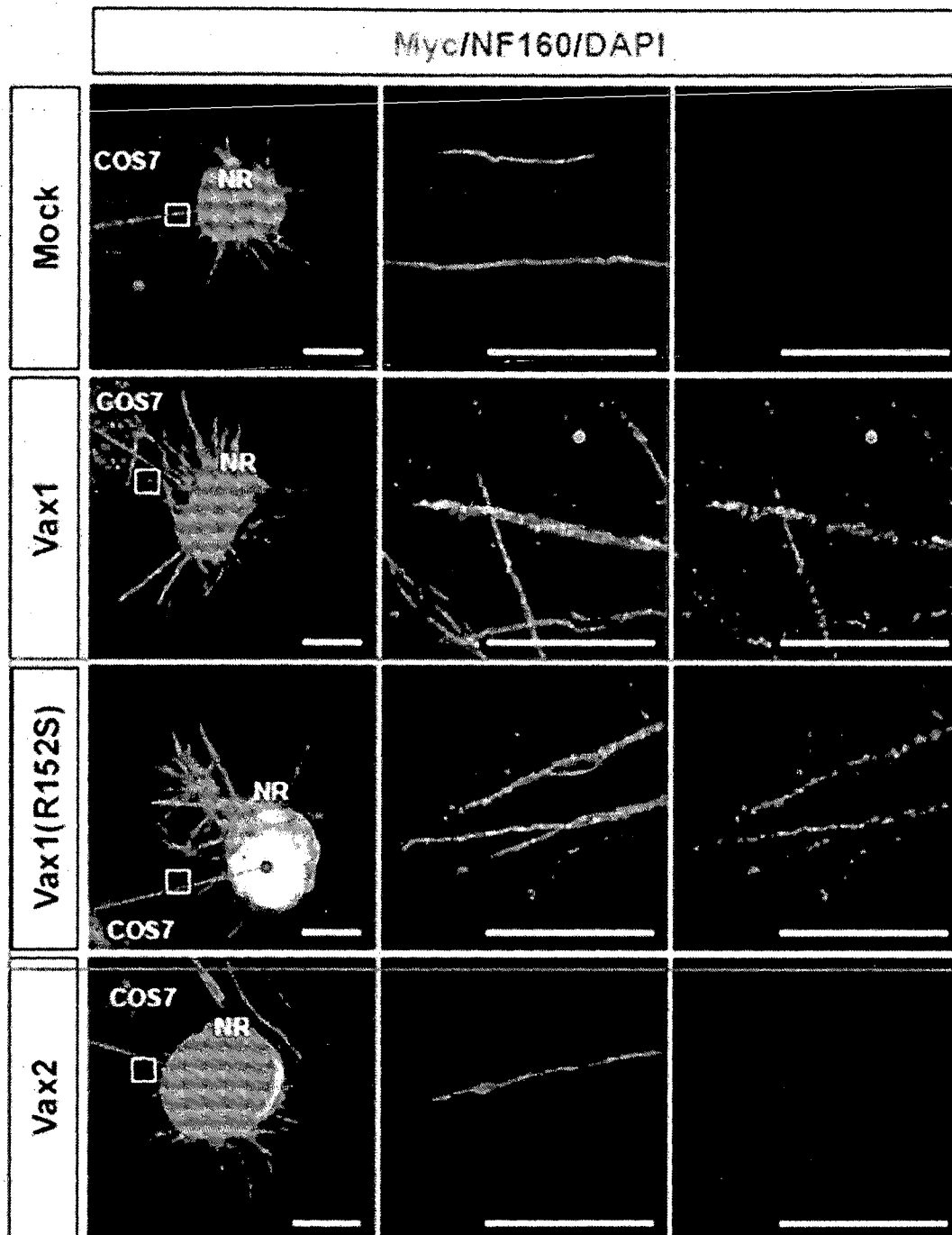
7/59

[도 2e]

A**B**

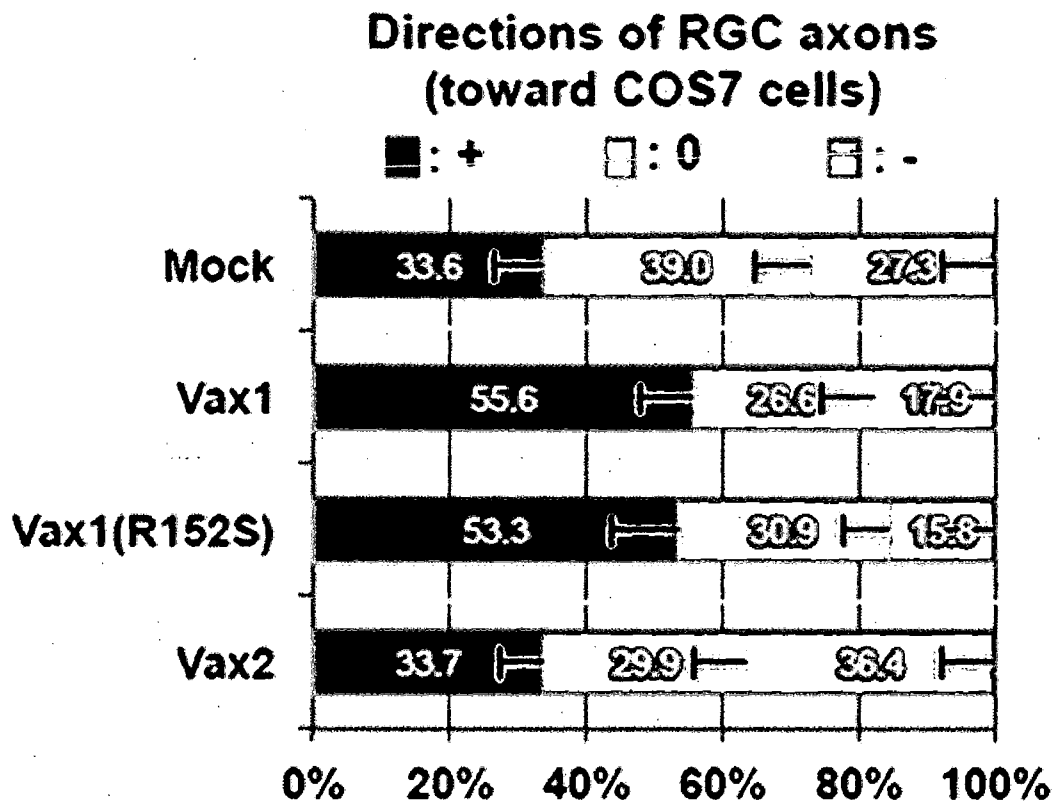
8/59

[도 3a]



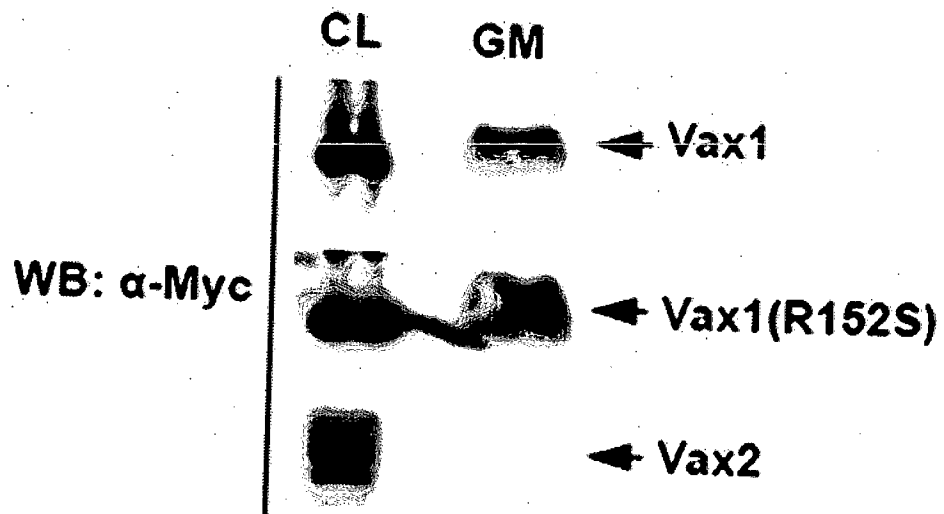
9/59

[도 3b]



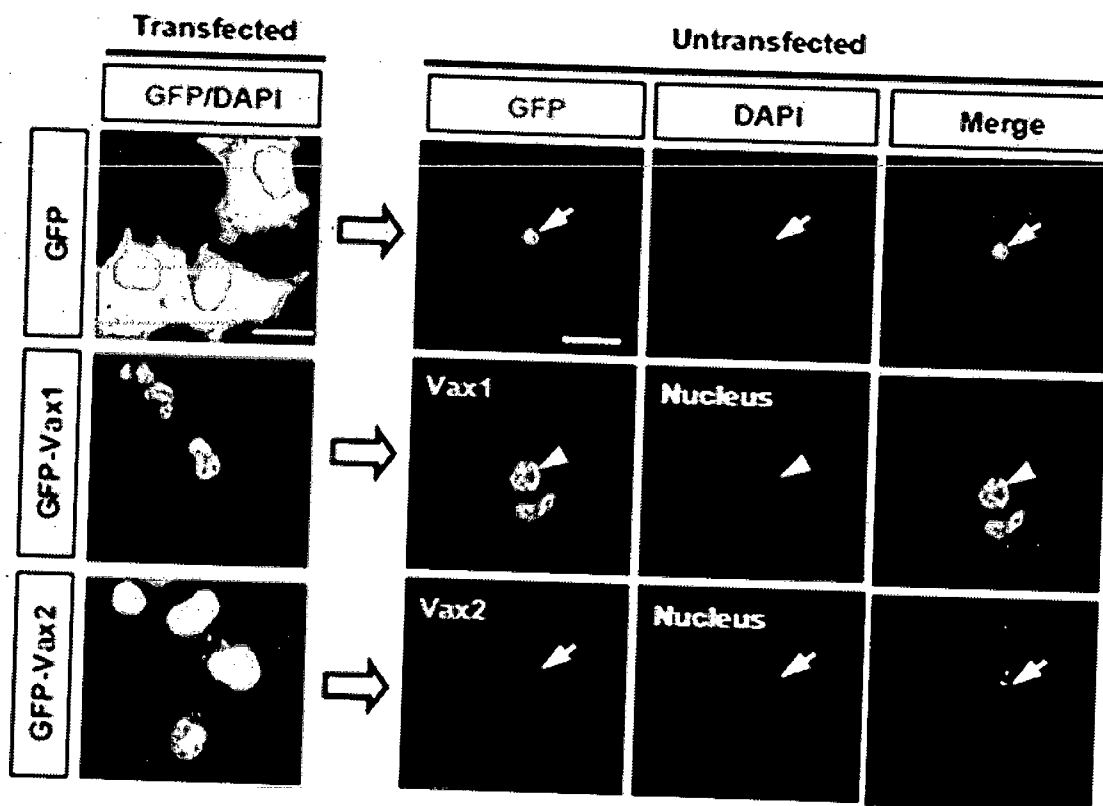
10/59

[도 3c]



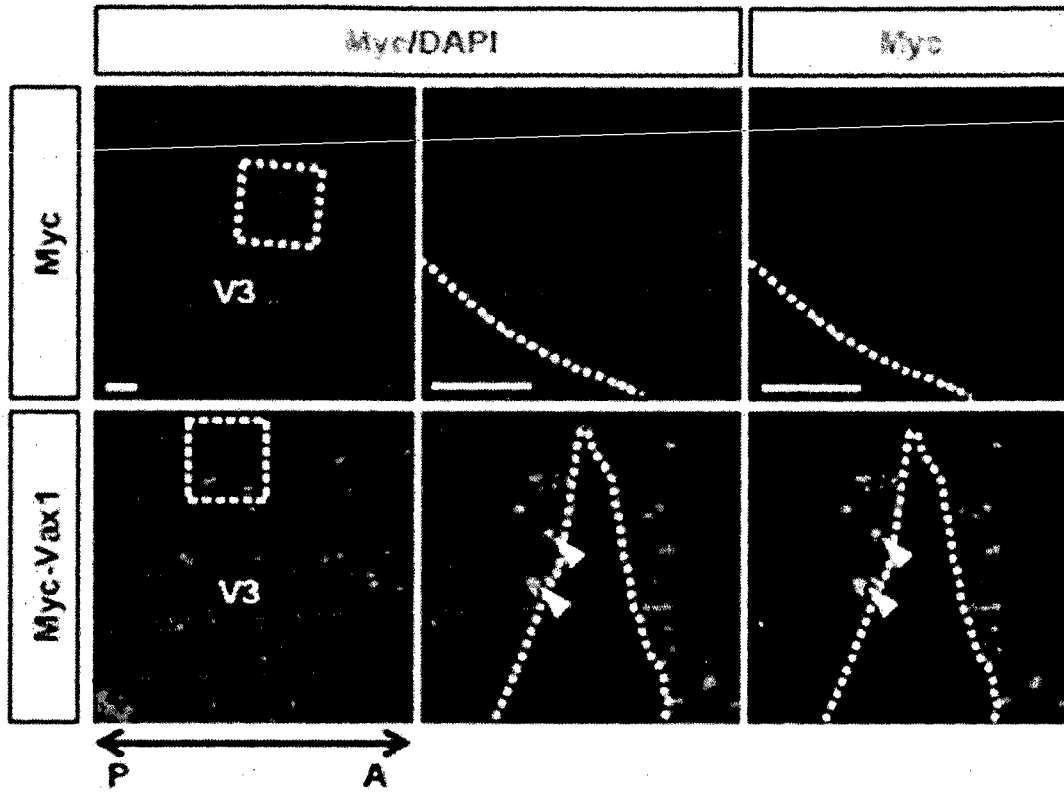
11/59

[도 4a]



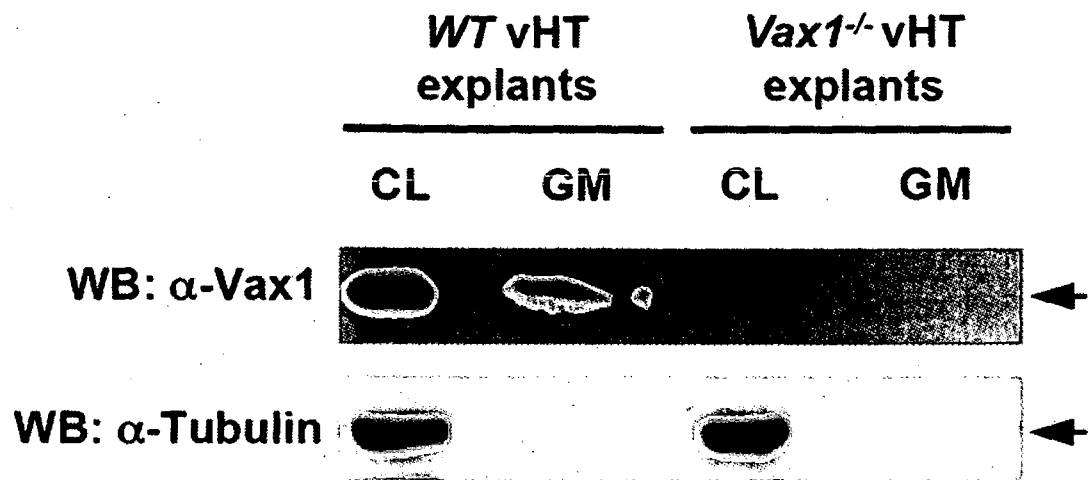
12/59

[도 4b]



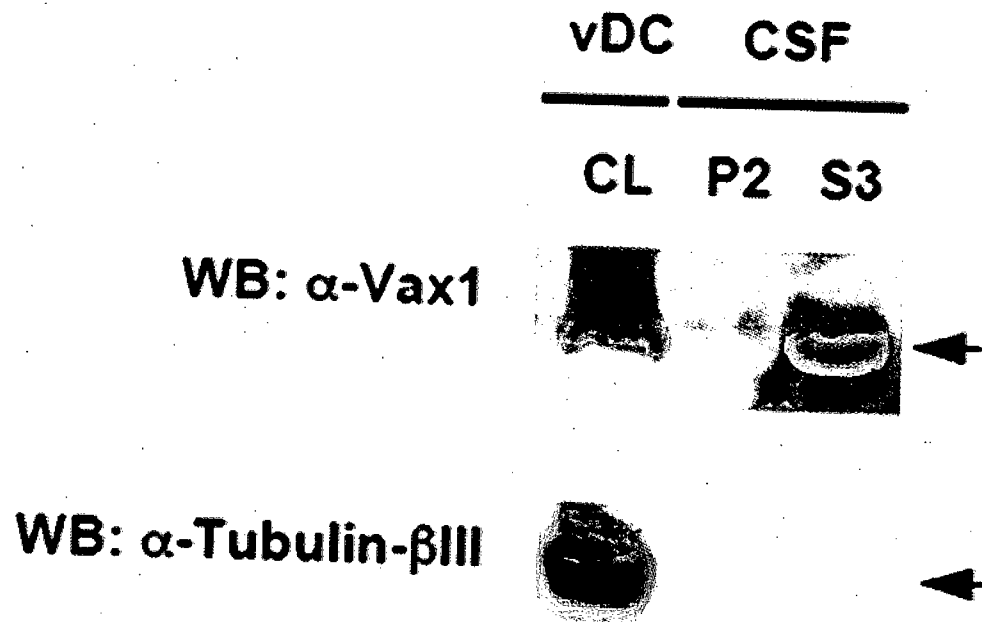
13/59

[도 4c]



14/59

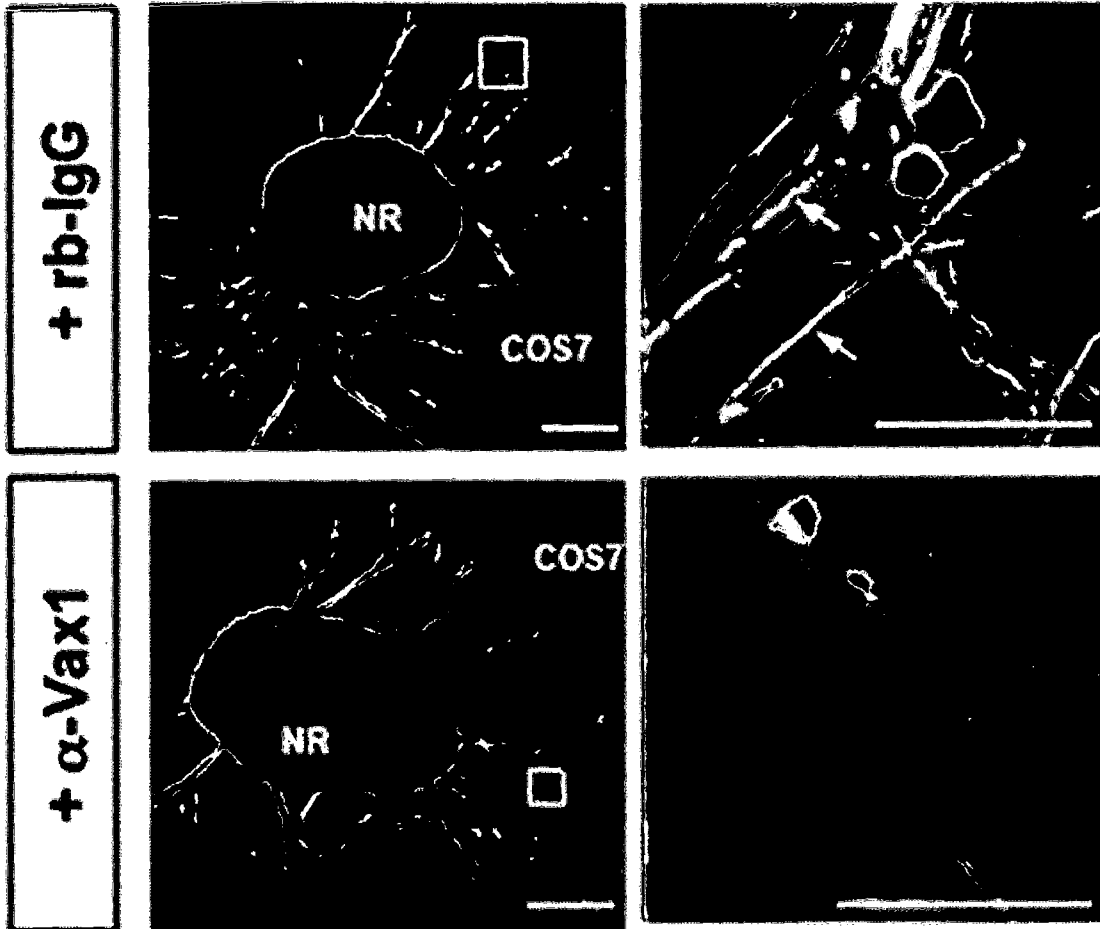
[도 4d]



15/59

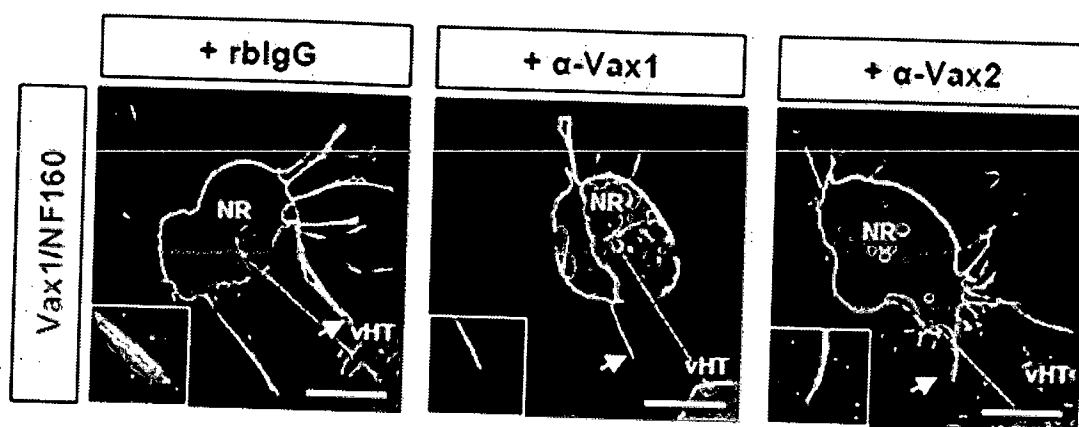
[도 4e]

Myc/NF160/DAPI



16/59

[도 5a]

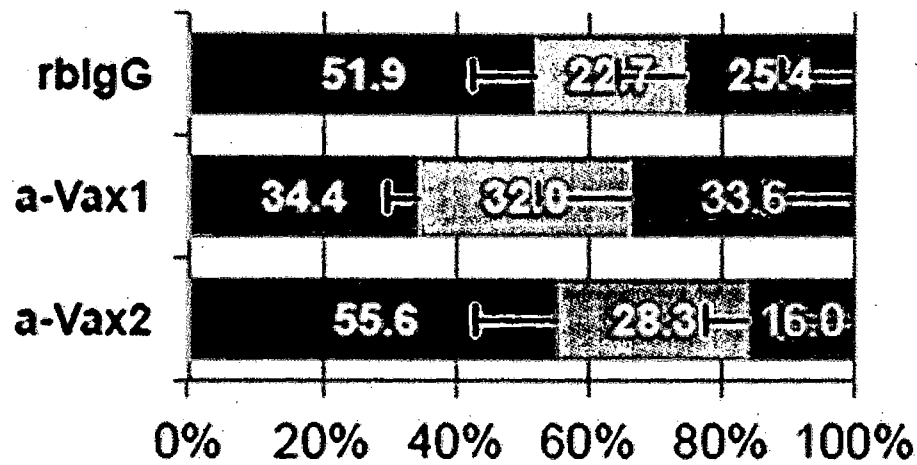


17/59

[도 5b]

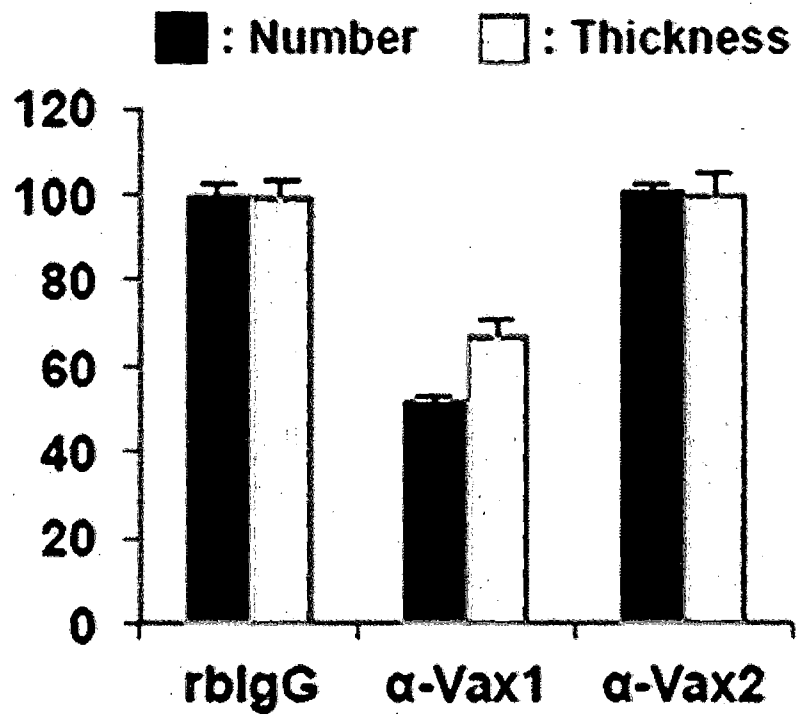
**Directions of RGC axons
(toward vHT explants)**

■ : + □ : 0 ■ : -



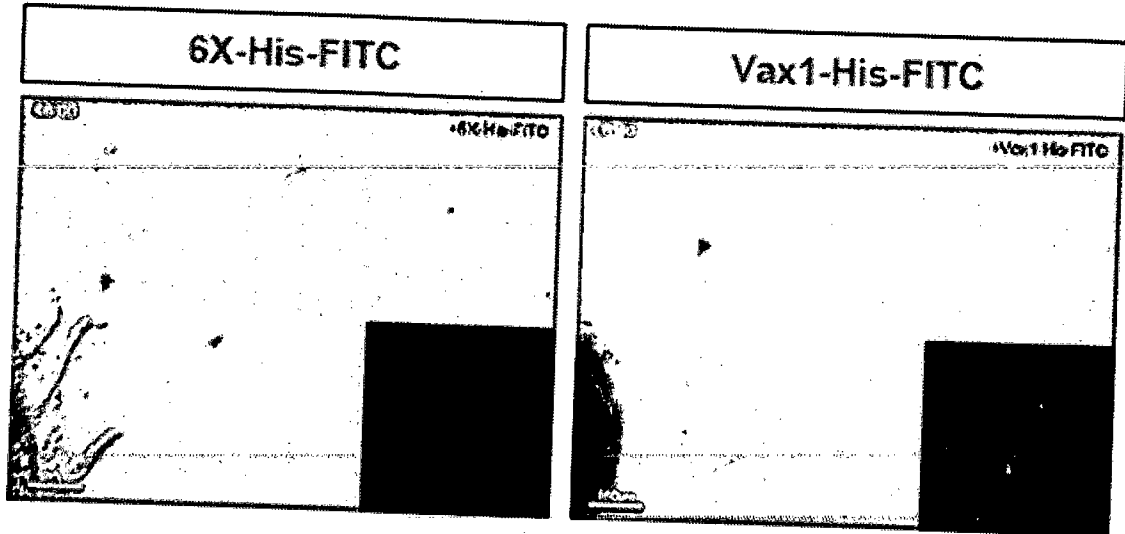
18/59

[도 5c]



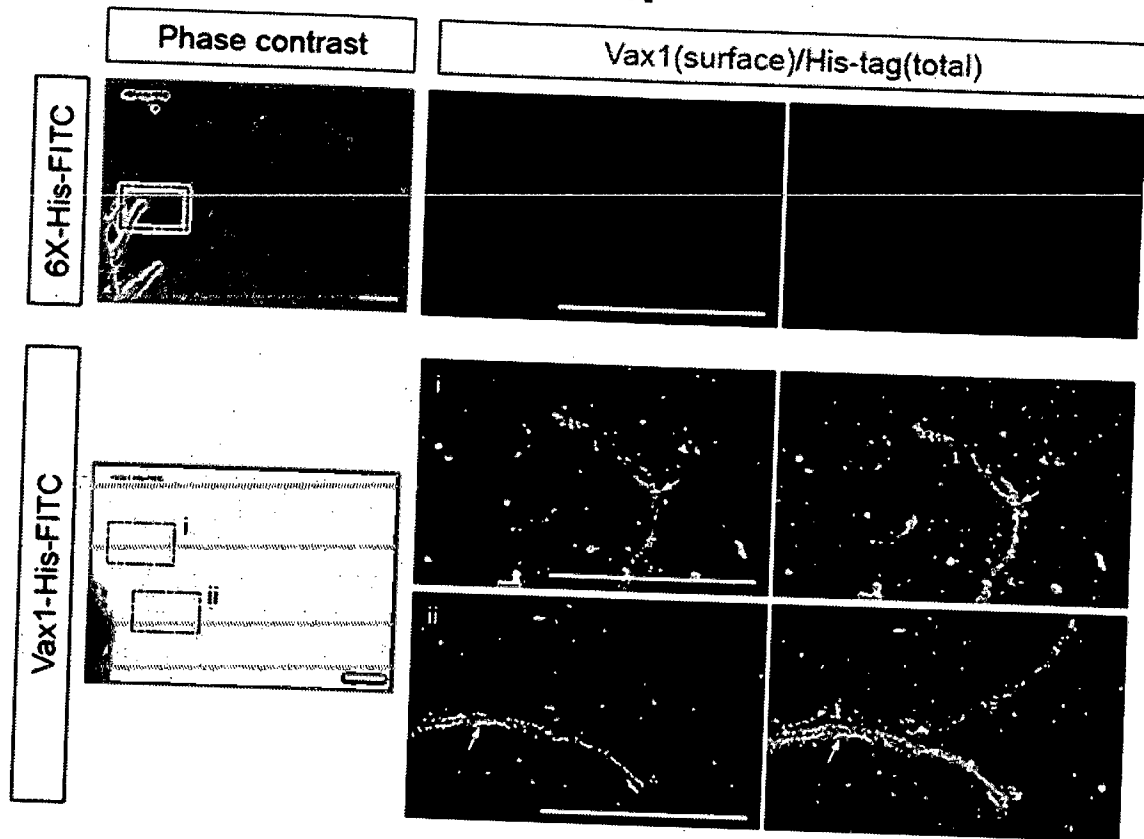
19/59

[도 5d]



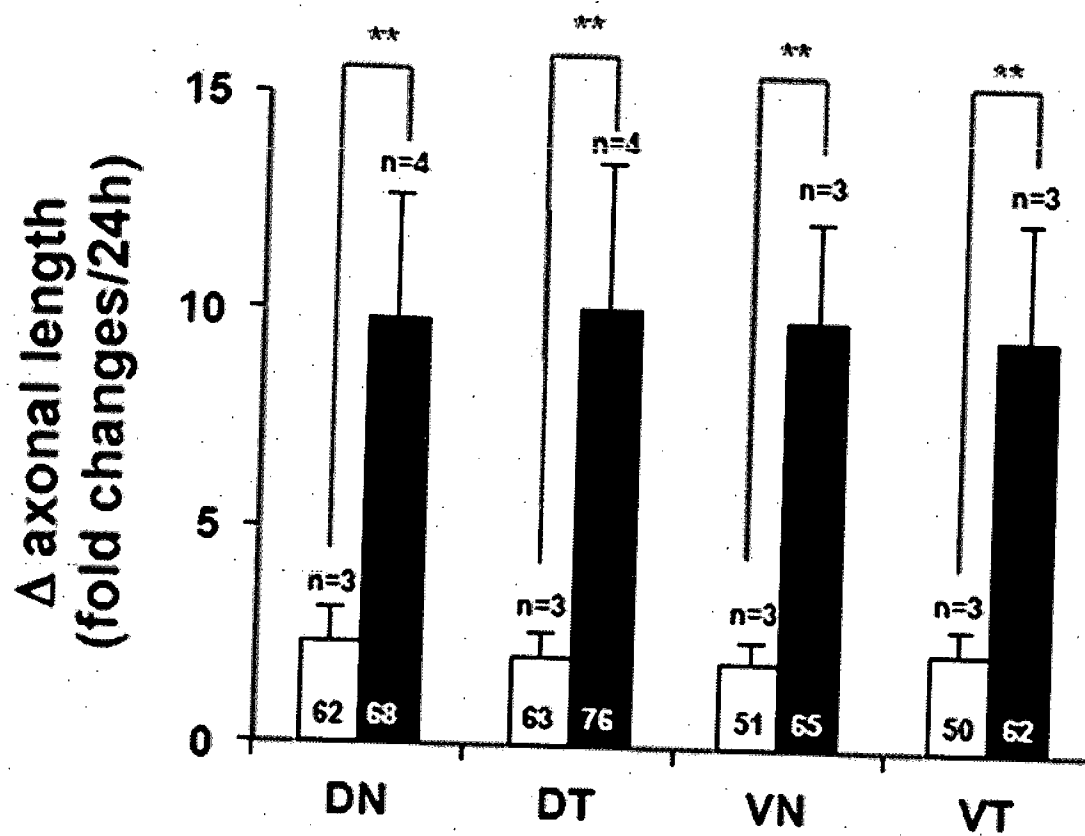
20/59

[도 5e]



21/59

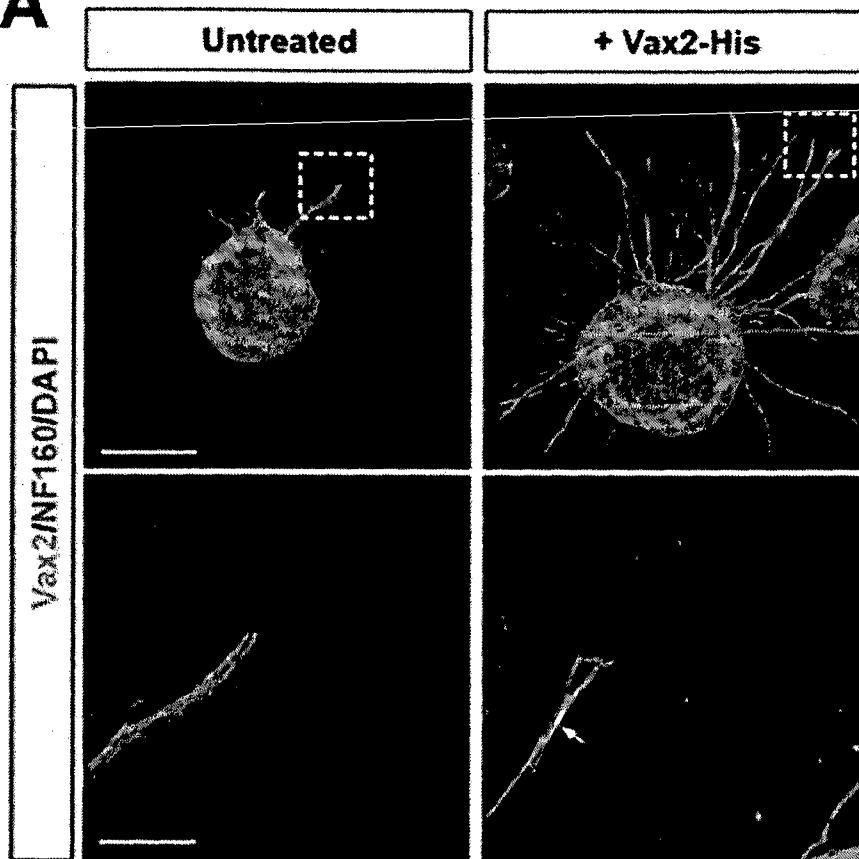
[도 5f]



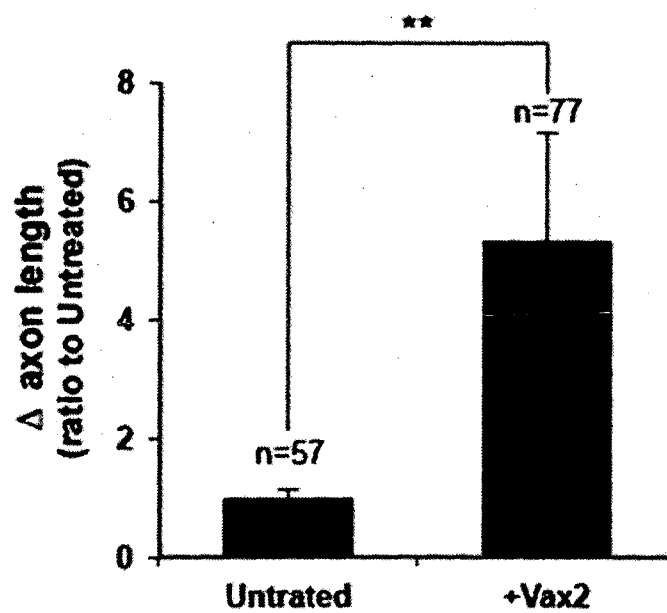
22/59

[도 5g]

A



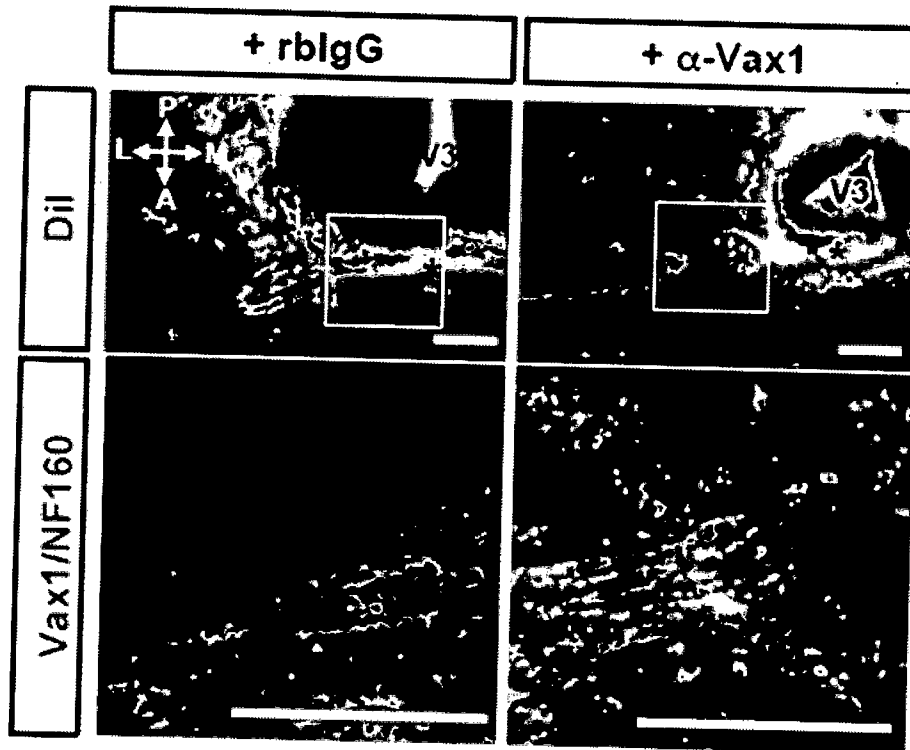
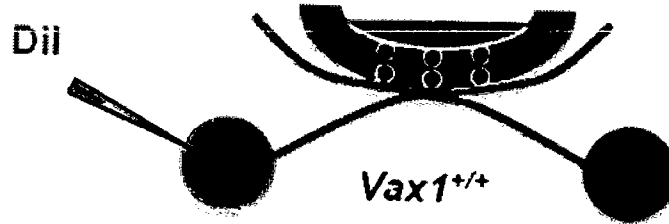
B



23/59

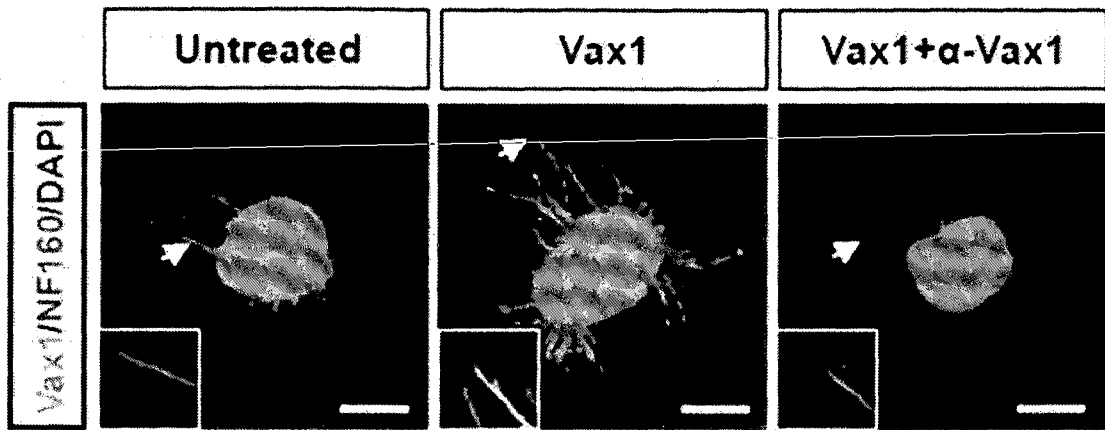
[도 6a]

rbIgG
or
 α -Vax1



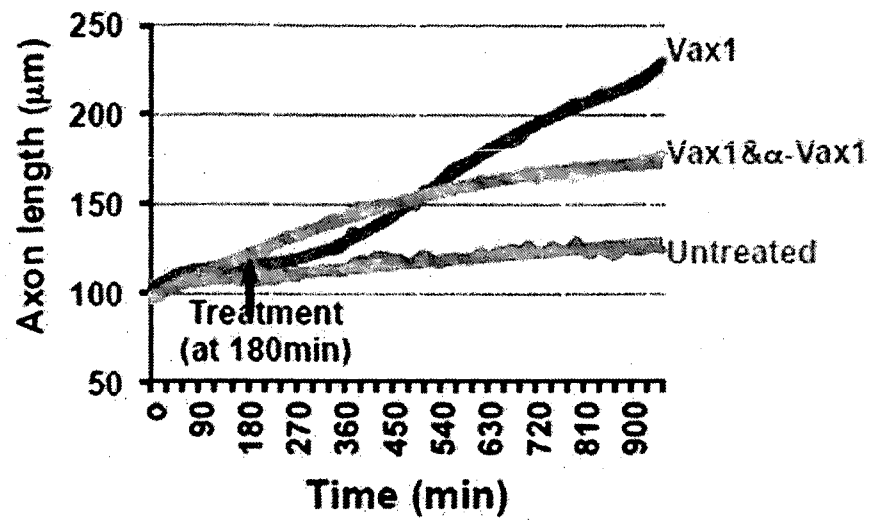
24/59

[도 6b]



25/59

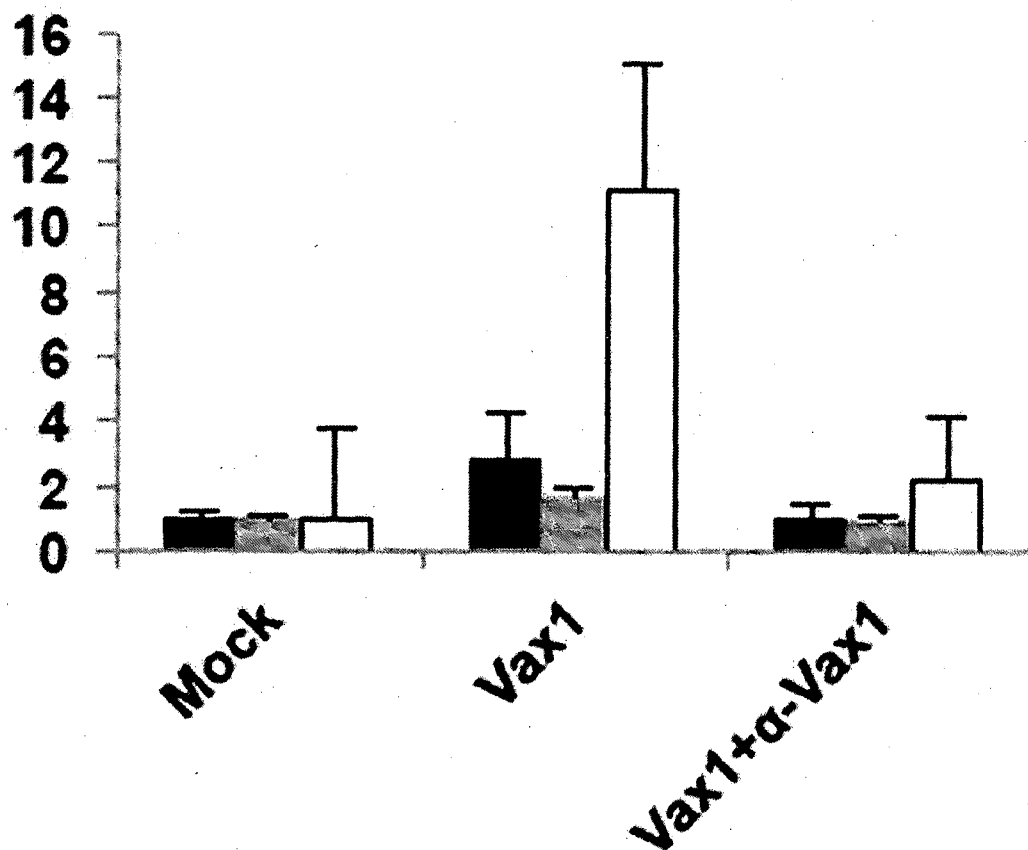
[도 6c]



26/59

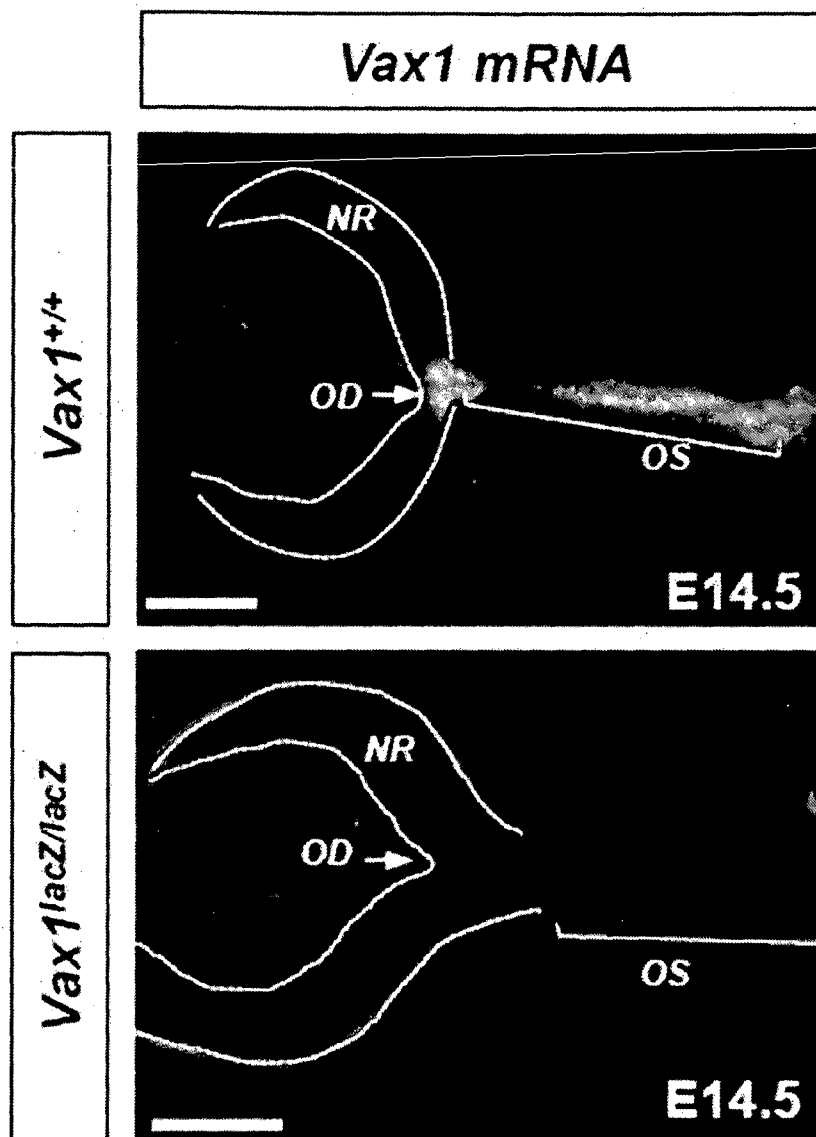
[도 6d]

■ : Number ▨ : Thickness □ : Length



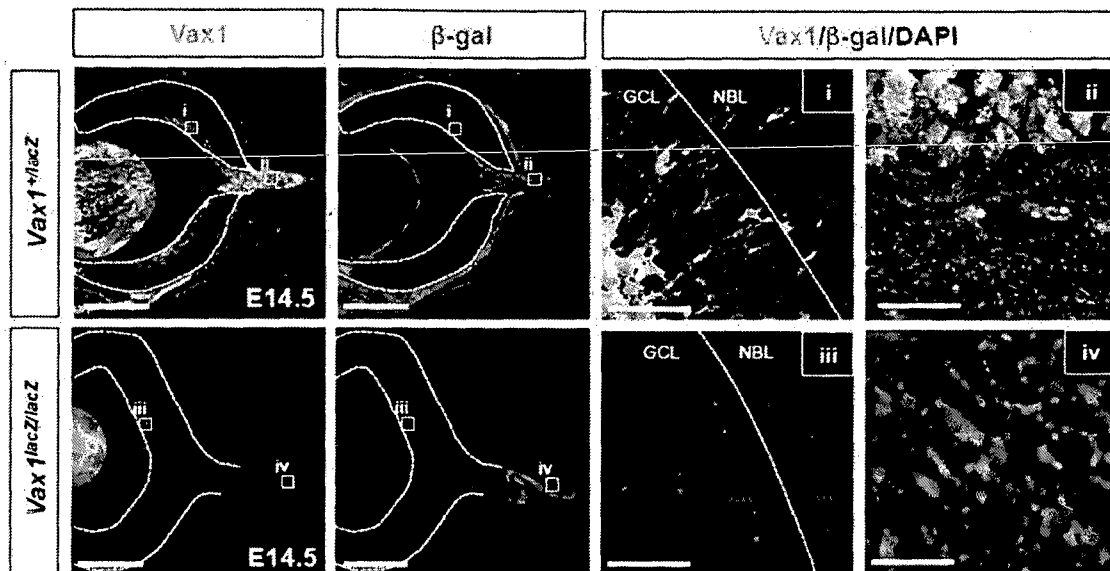
27/59

[도 7a]



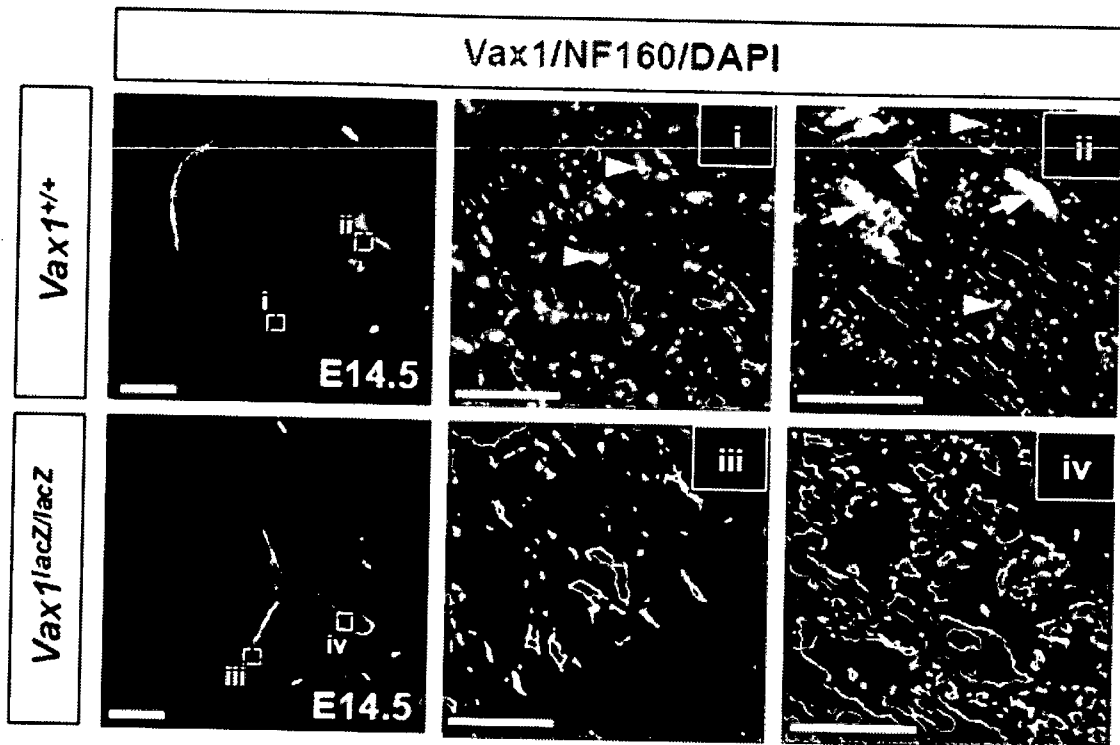
28/59

[도 7b]



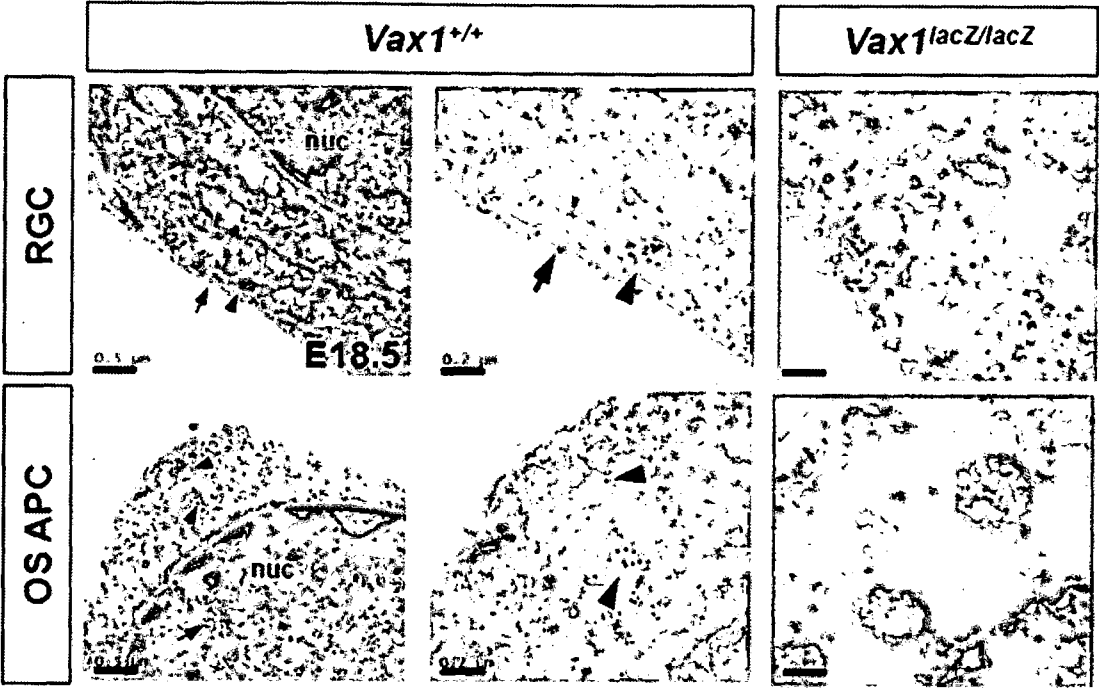
29/59

[도 7c]



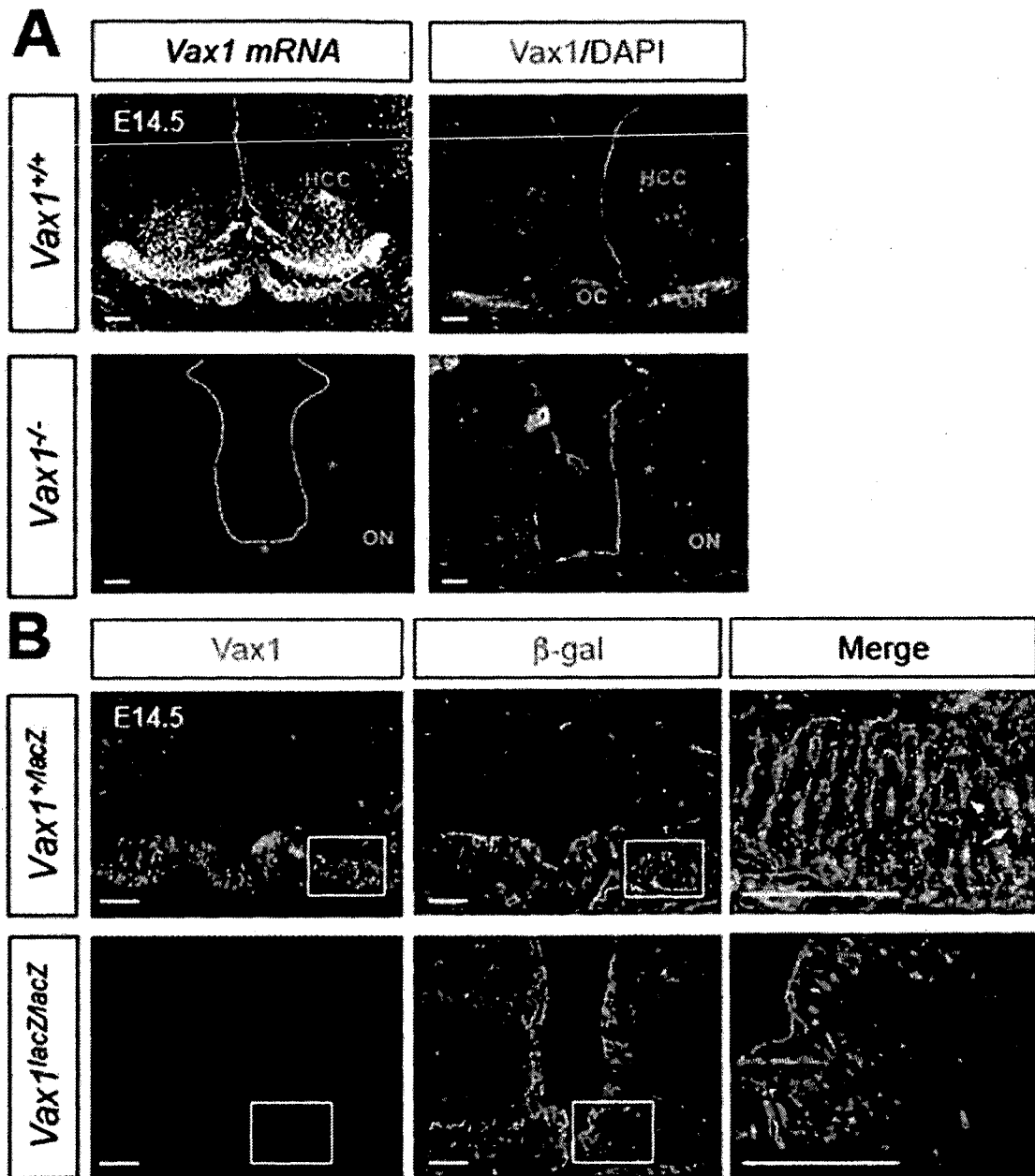
30/59

[도 7d]



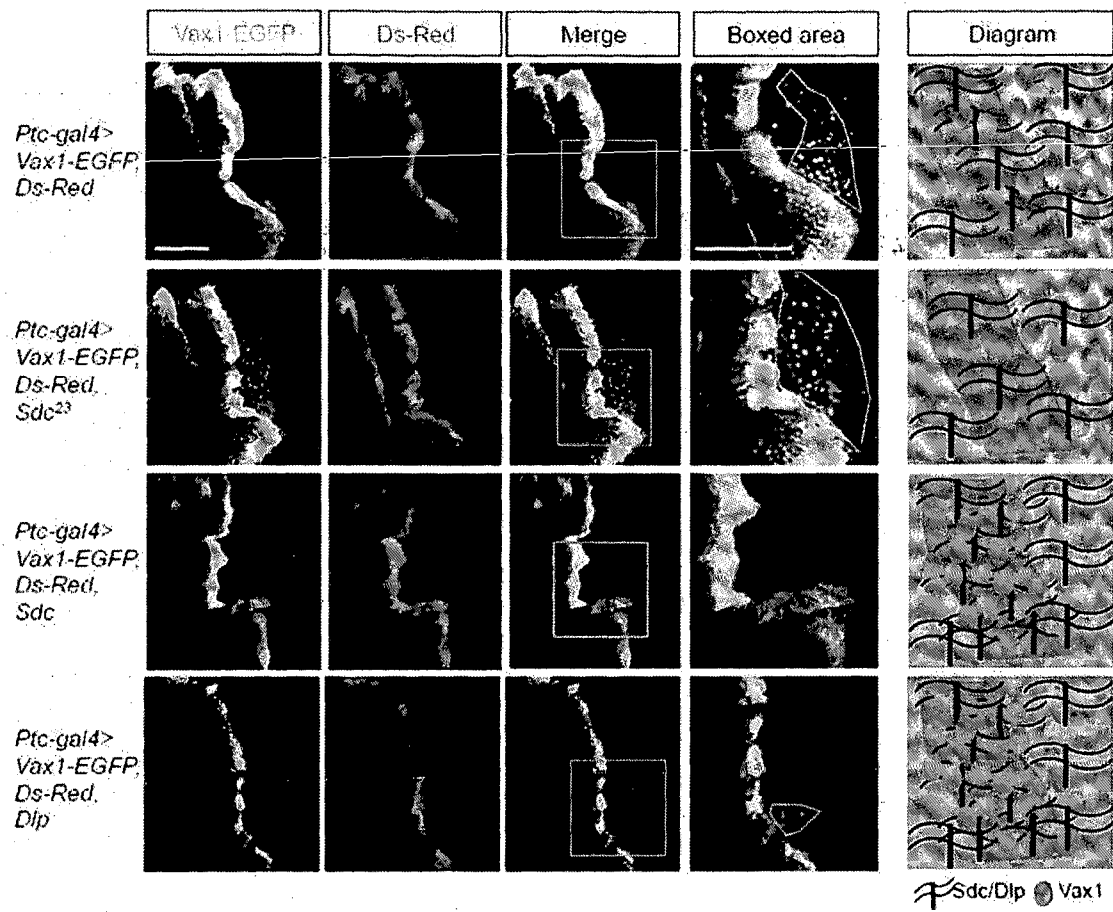
31/59

[도 7e]



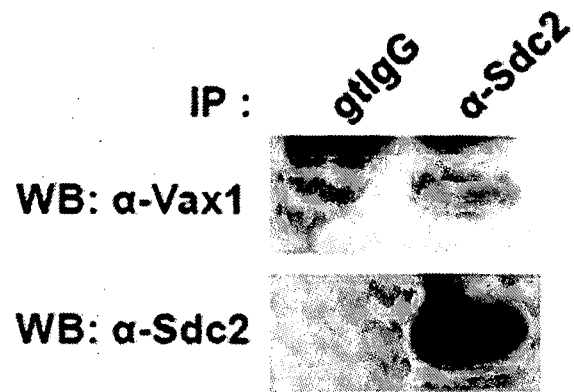
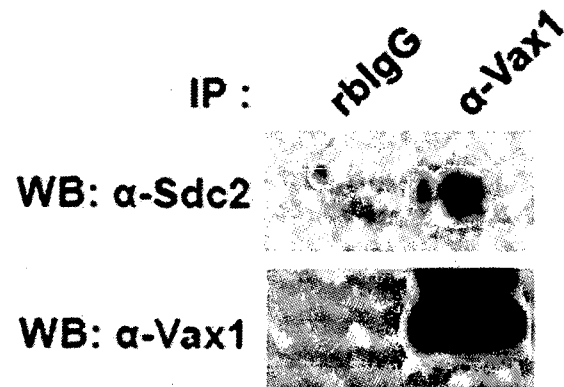
32/59

[도 8]



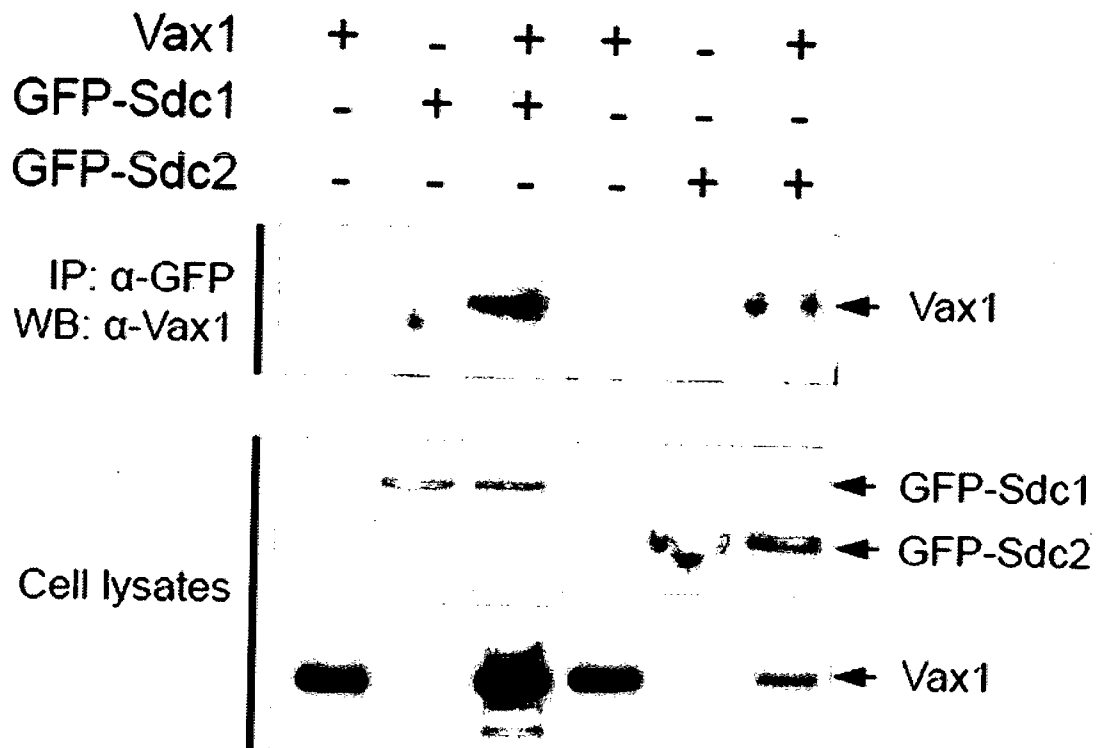
33/59

[도 9a]



34/59

[도 9b]



35/59

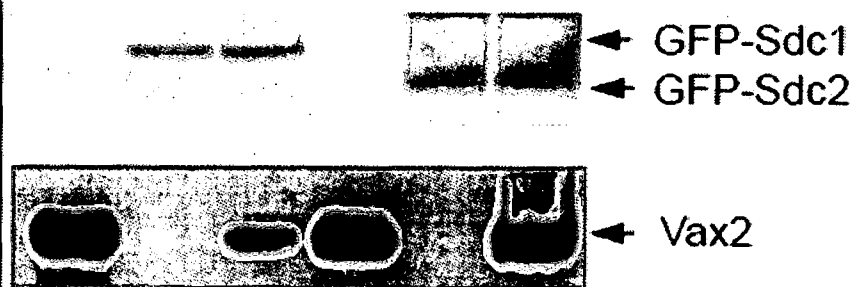
[도 9c]

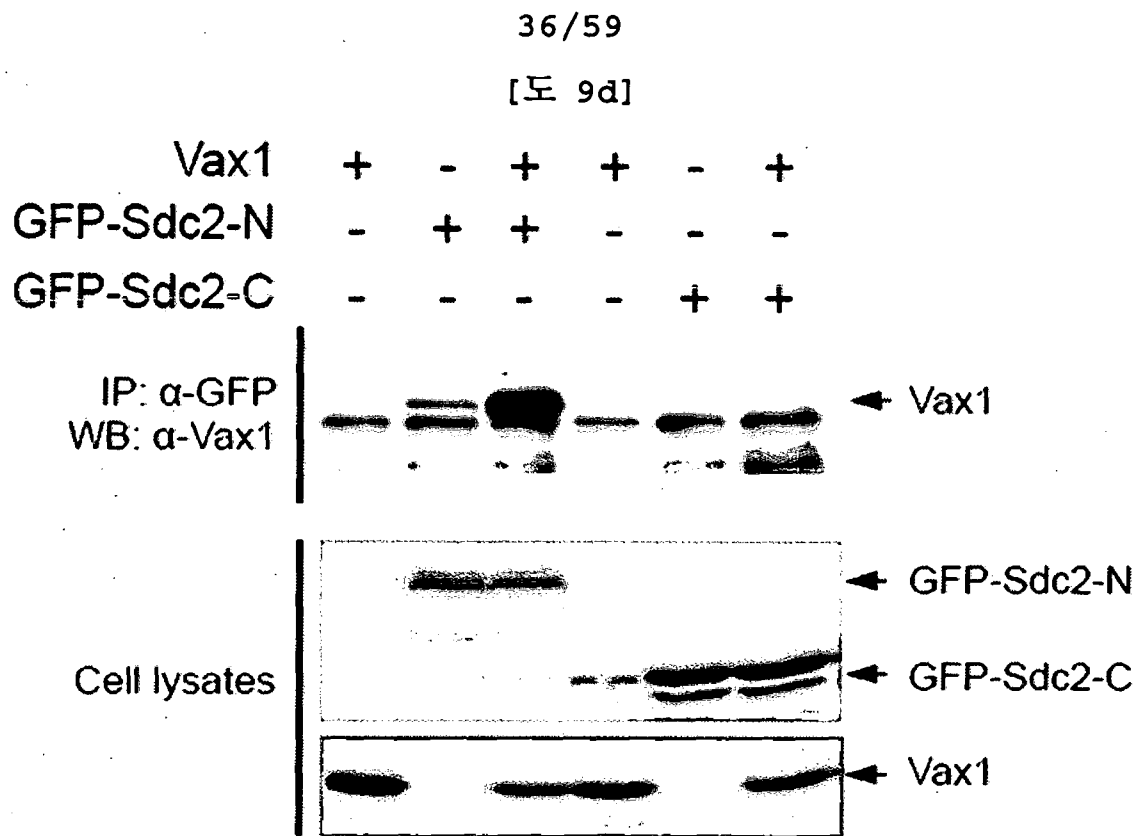
Vax2	+	-	+	+	-	+
GFP-Sdc1	-	+	+	-	-	-
GFP-Sdc2	-	-	-	-	+	+

IP: α -GFP
WB: α -Vax2

← Vax2

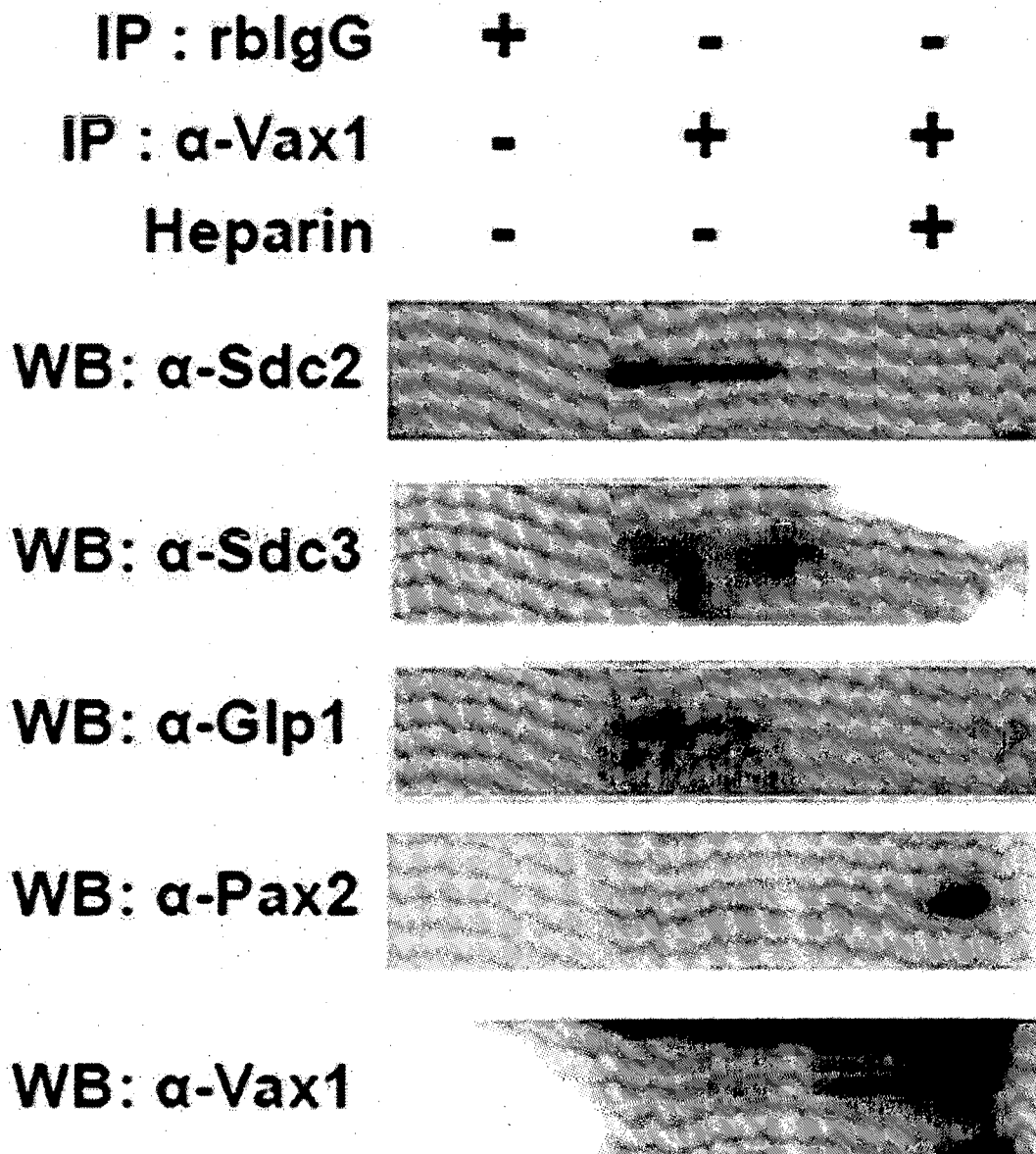
Cell lysates





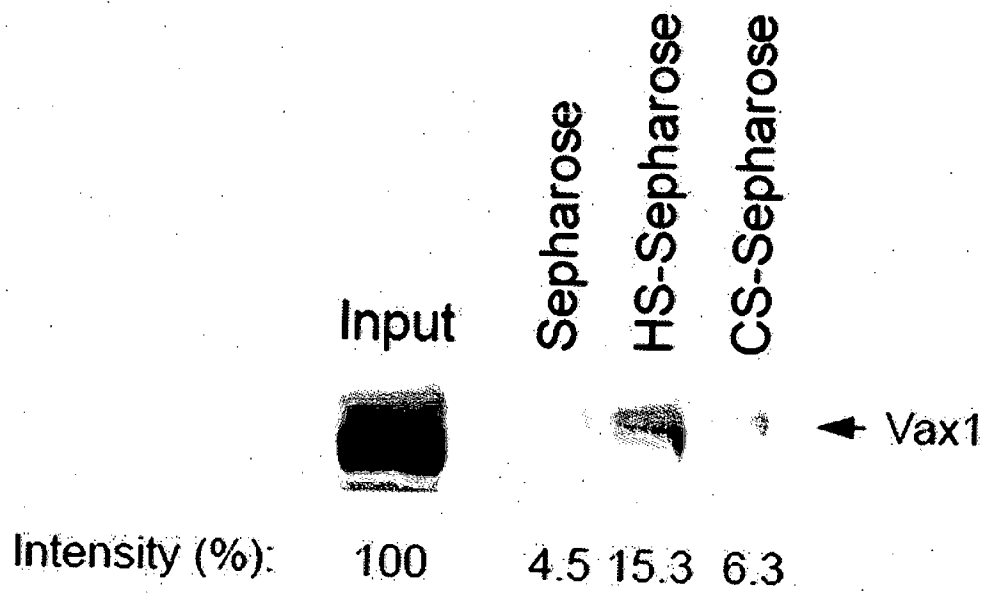
37/59

[도 9e]



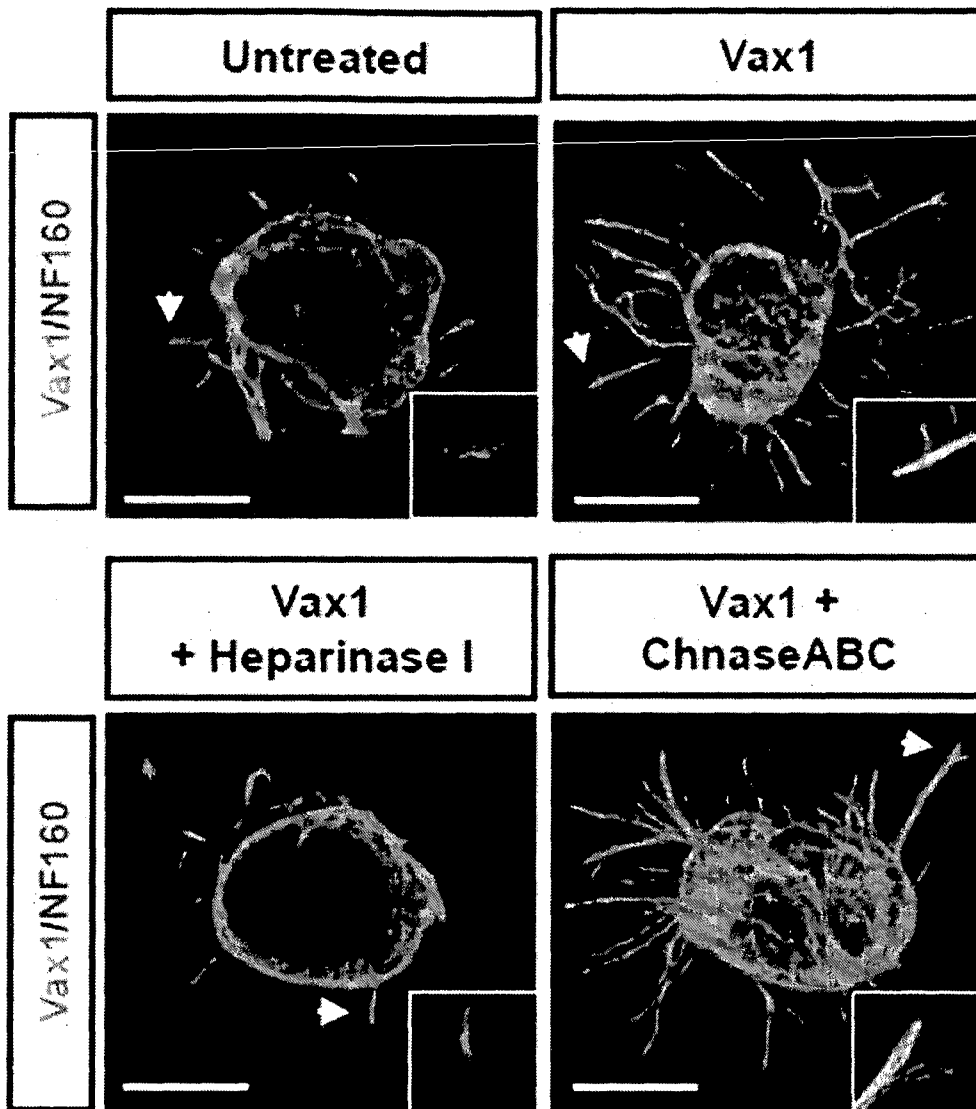
38/59

[도 9f]



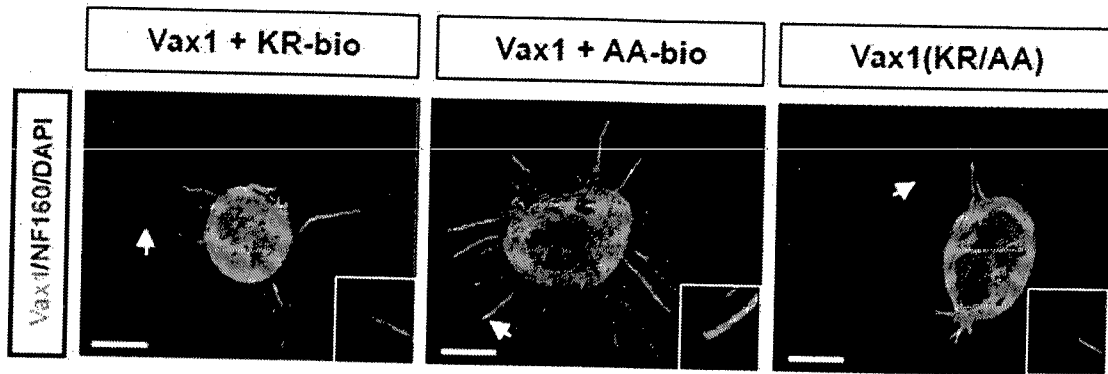
39/59

[도 10a]



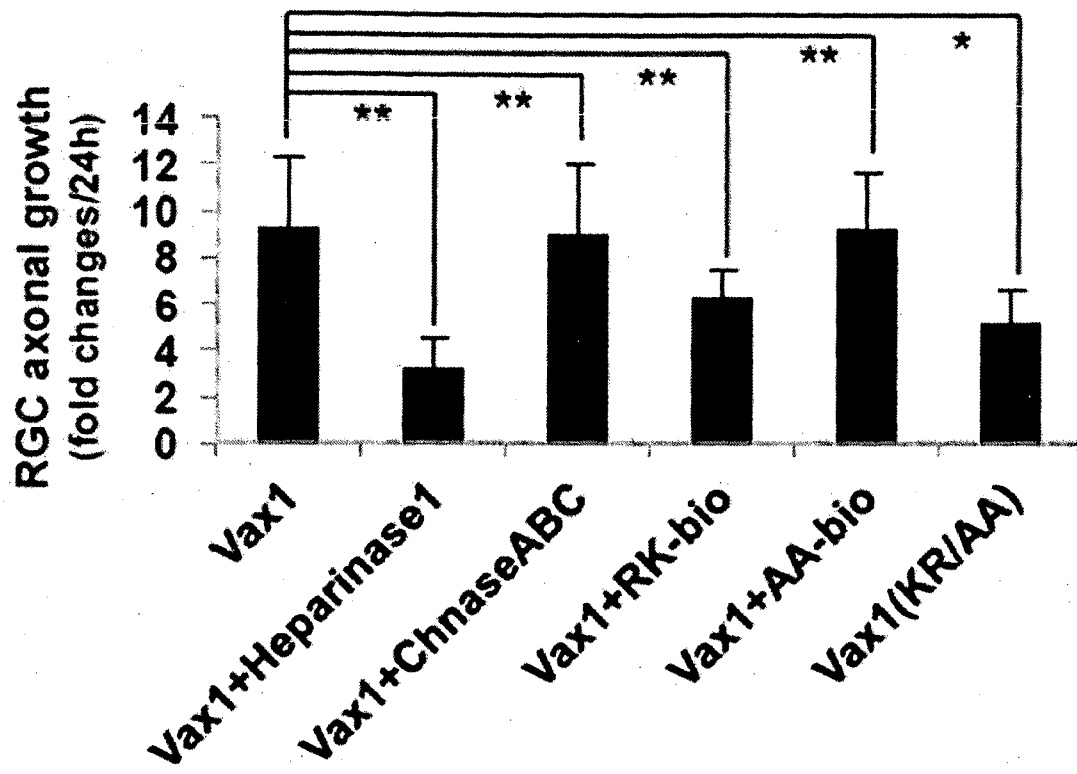
40/59

[도 10b]



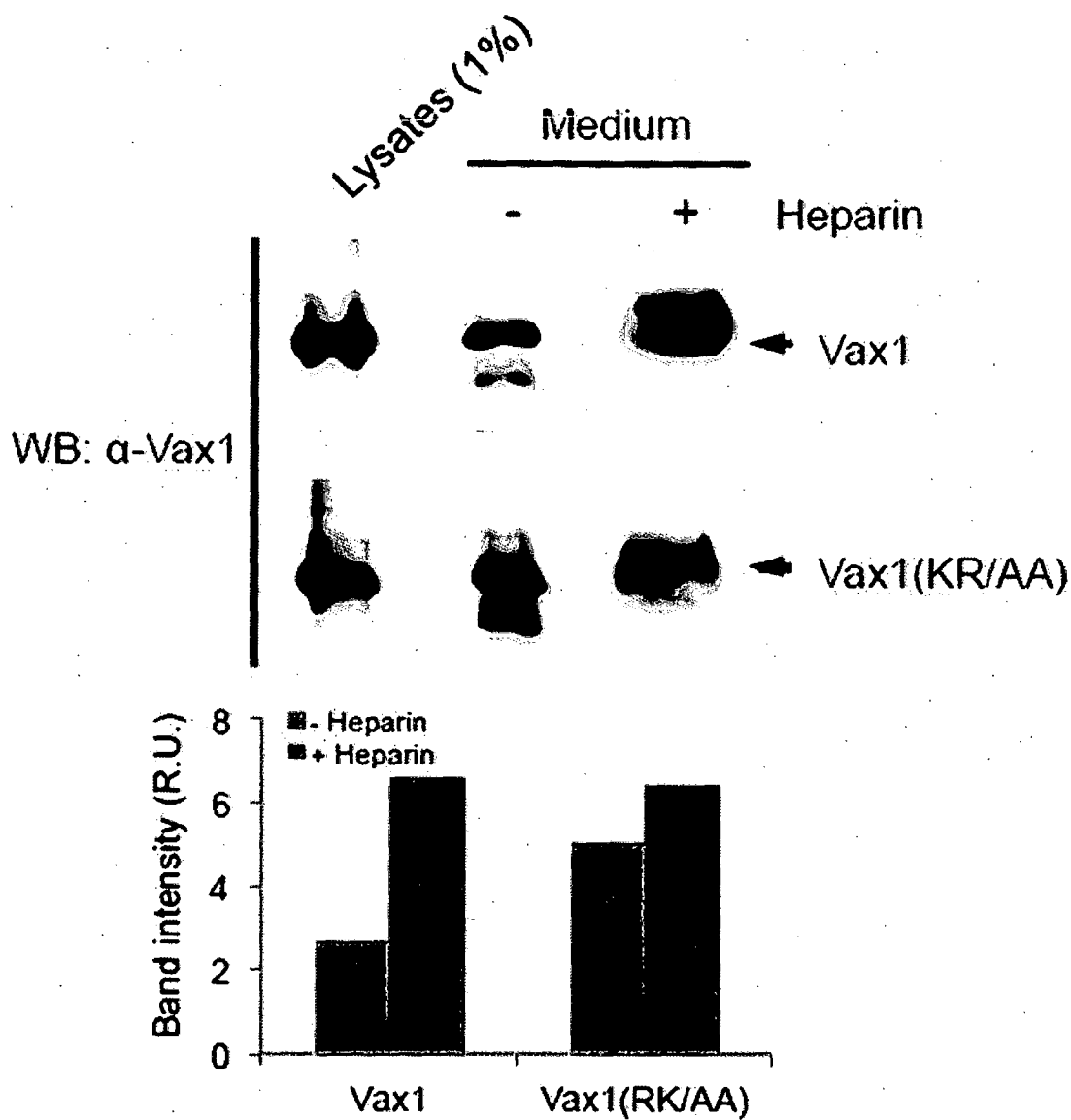
41/59

[도 10c]



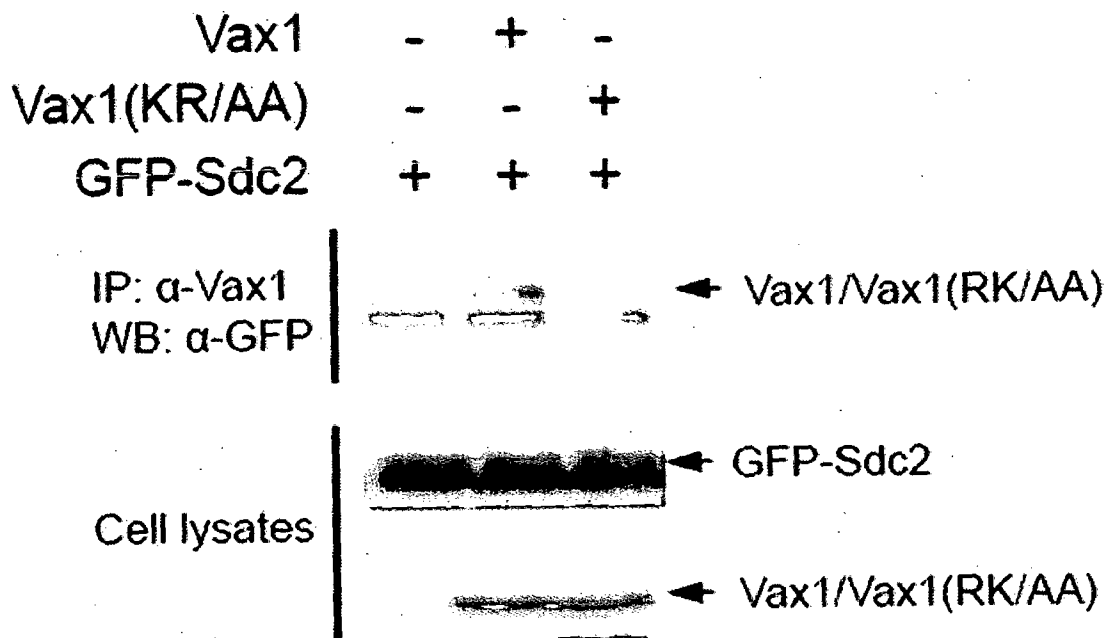
42/59

[도 11a]



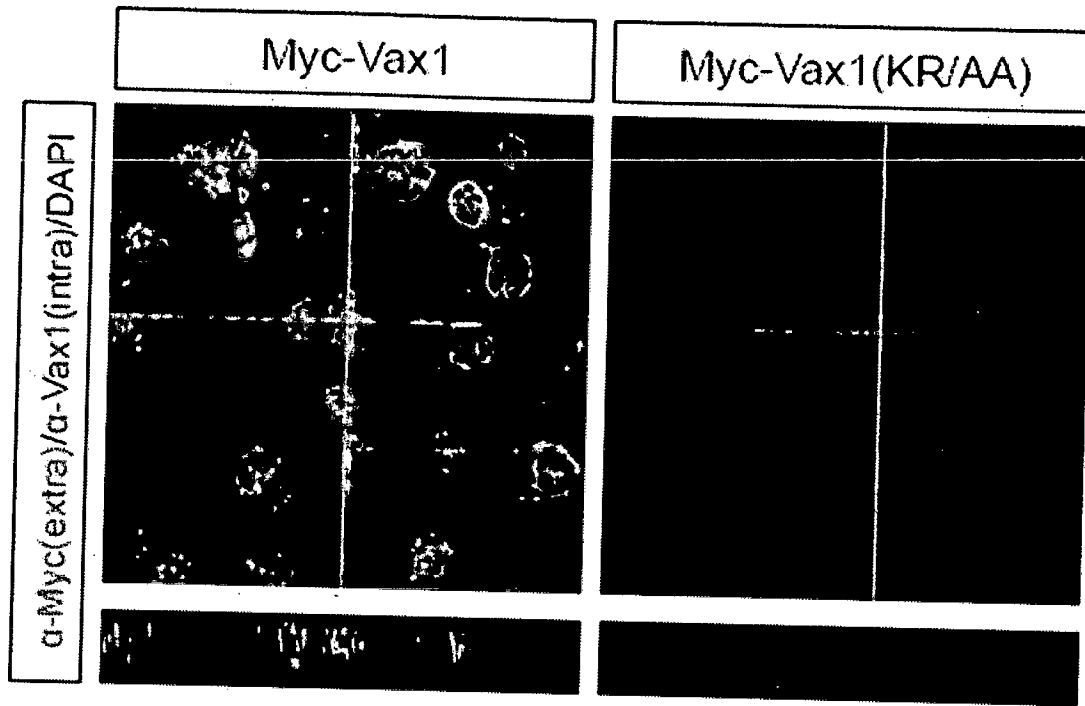
43/59

[도 11b]



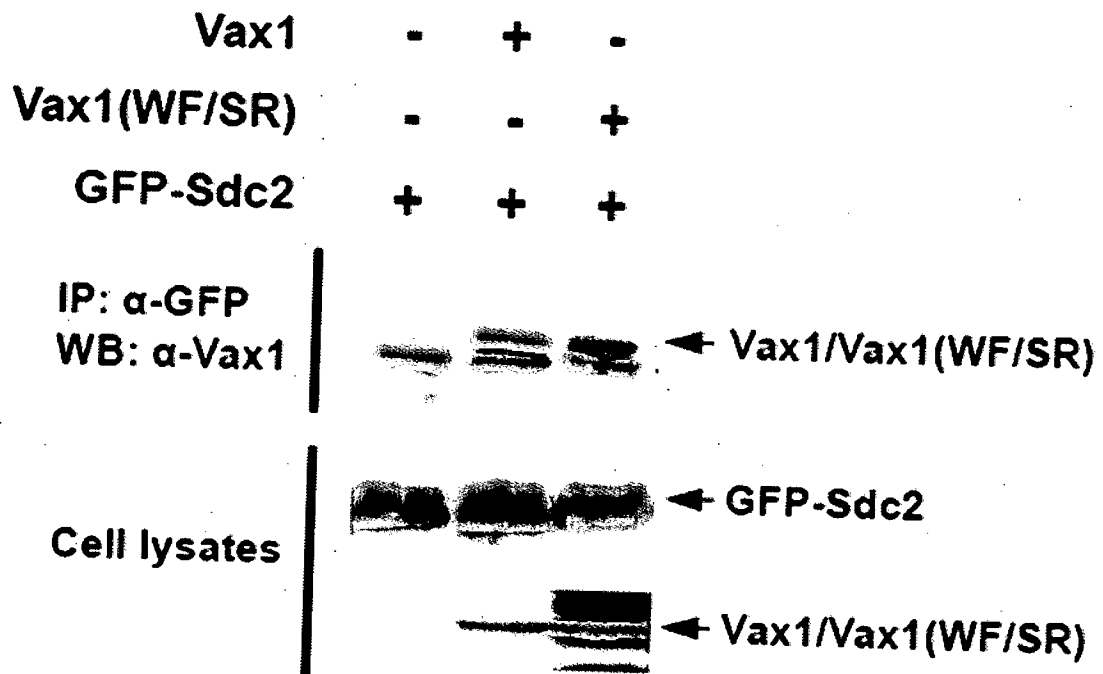
44/59

[도 11c]



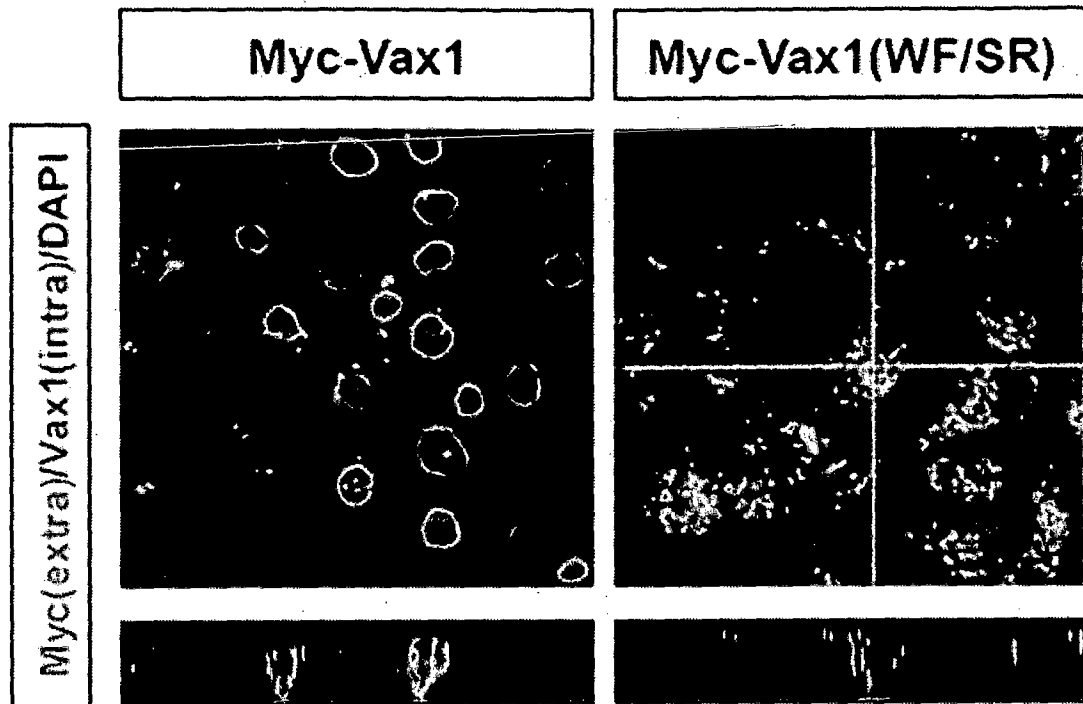
45/59

[도 12a]



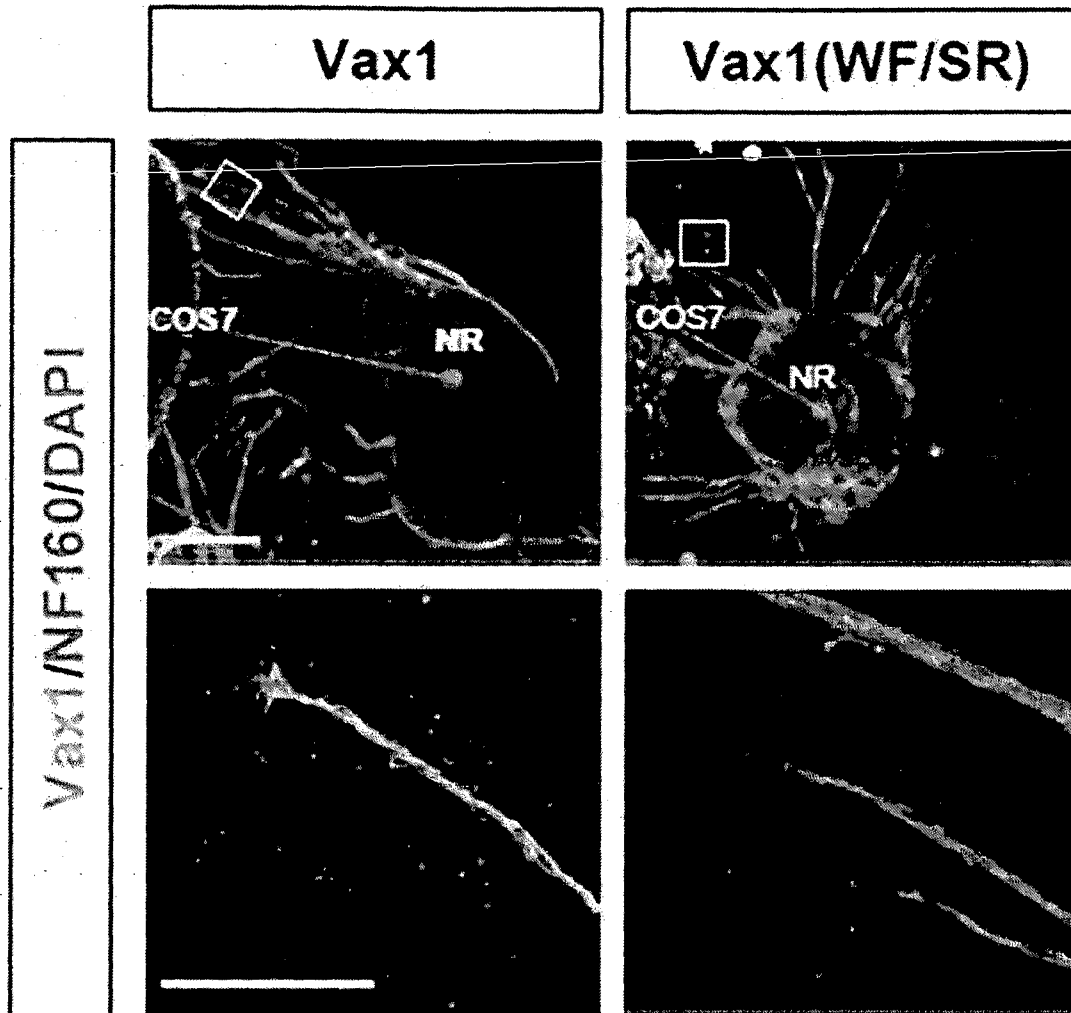
46/59

[도 12b]



47/59

[도 12c]

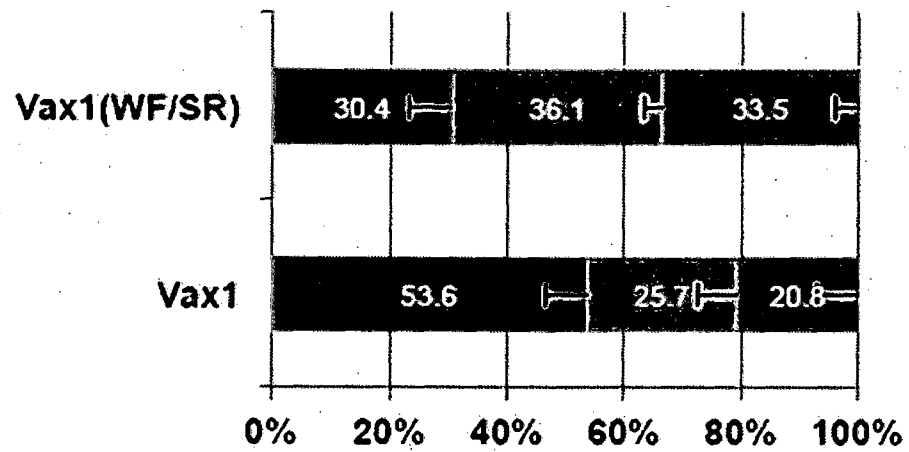


48/59

[도 12d]

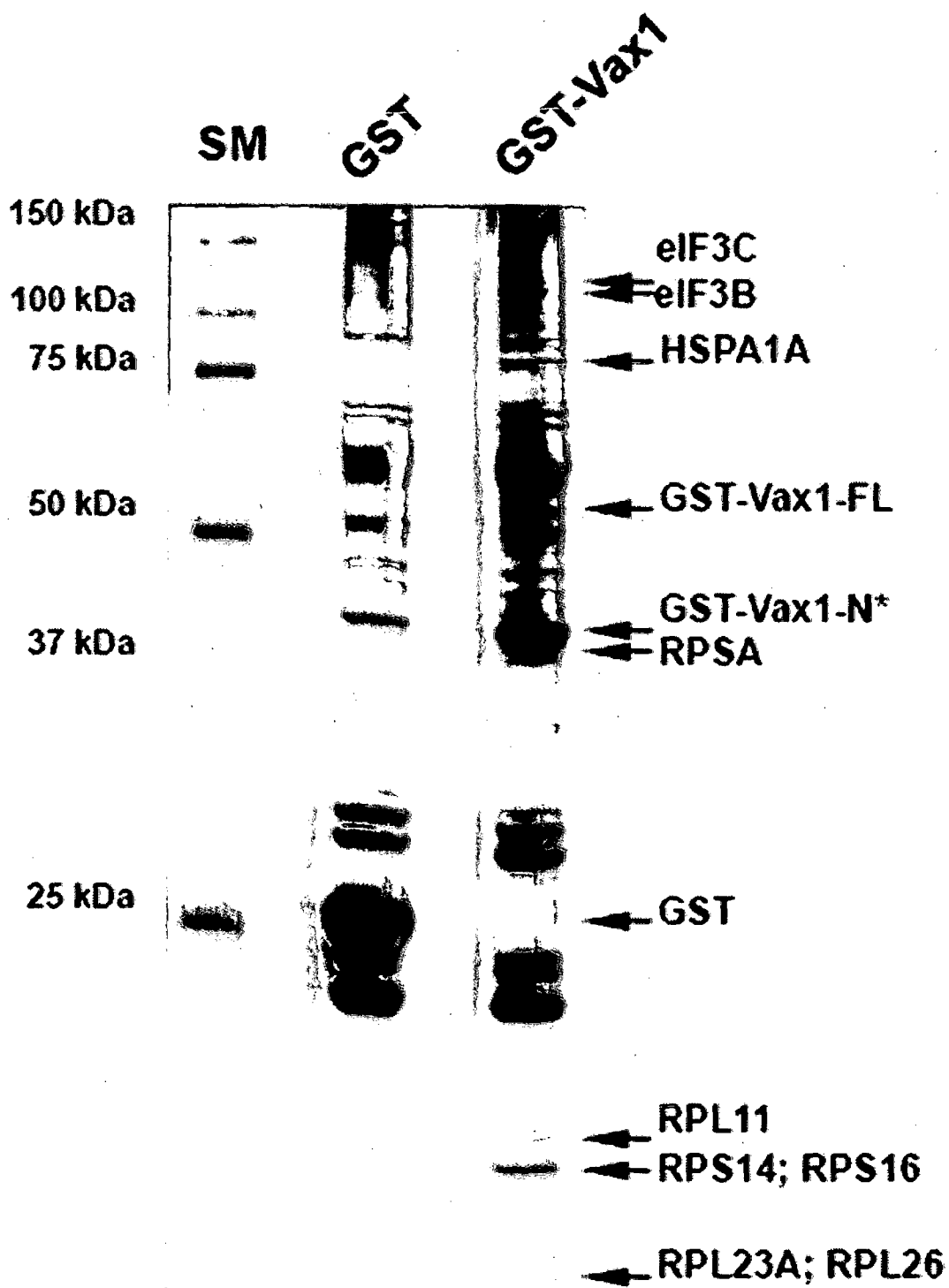
Directions of RGC axons
(toward COS7 cells)

■: + ■: 0 ■: -



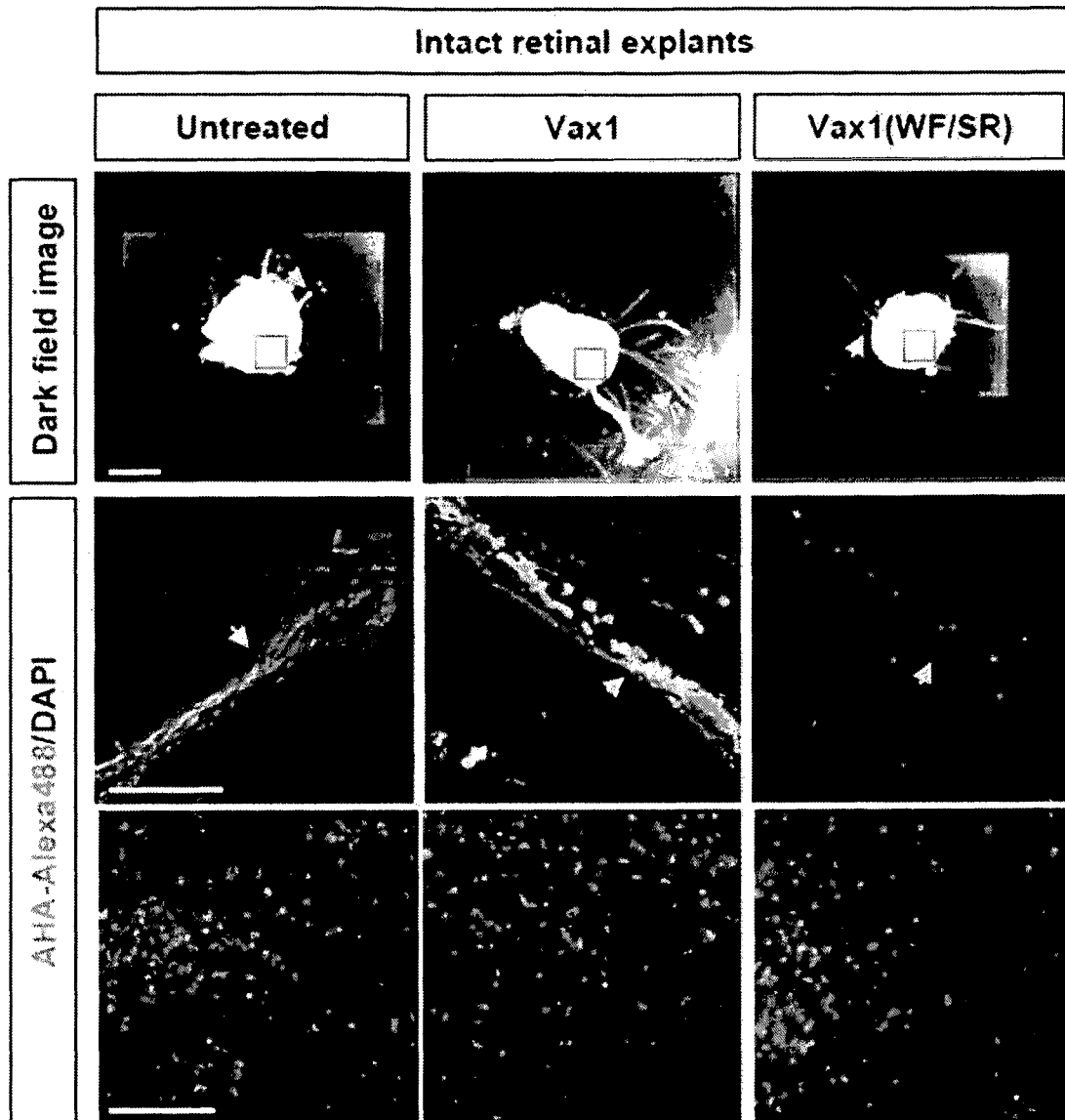
49/59

[도 13a]



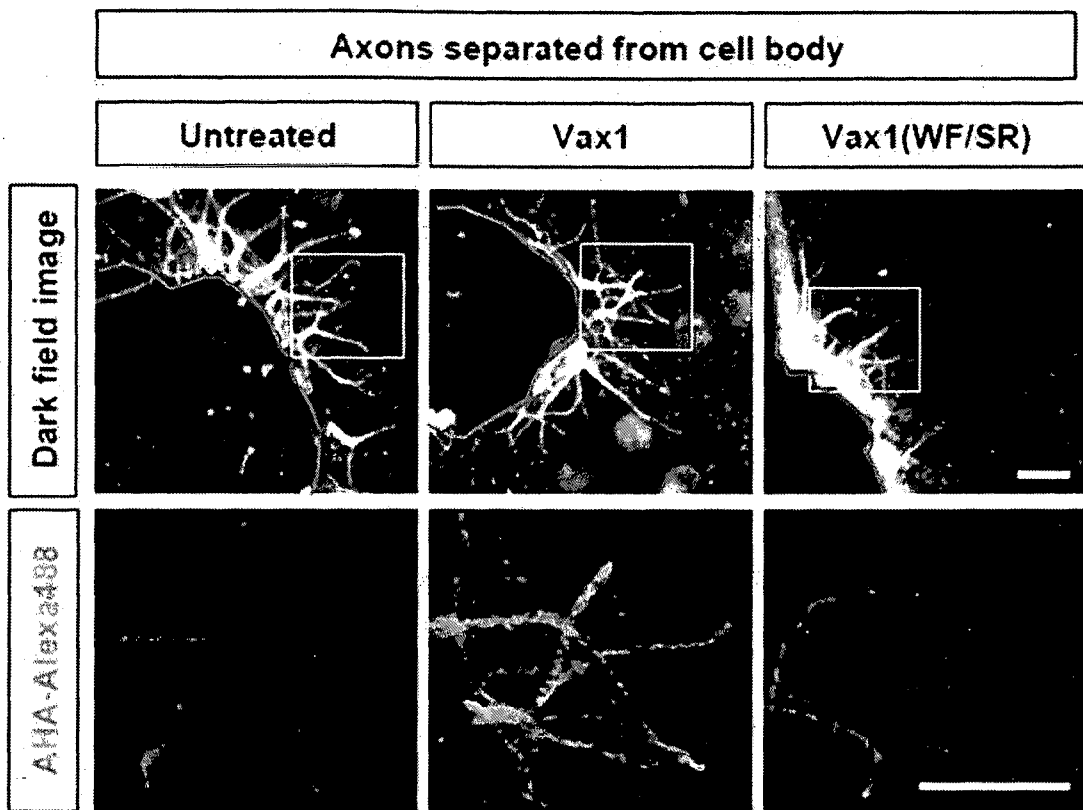
50/59

[도 13b]



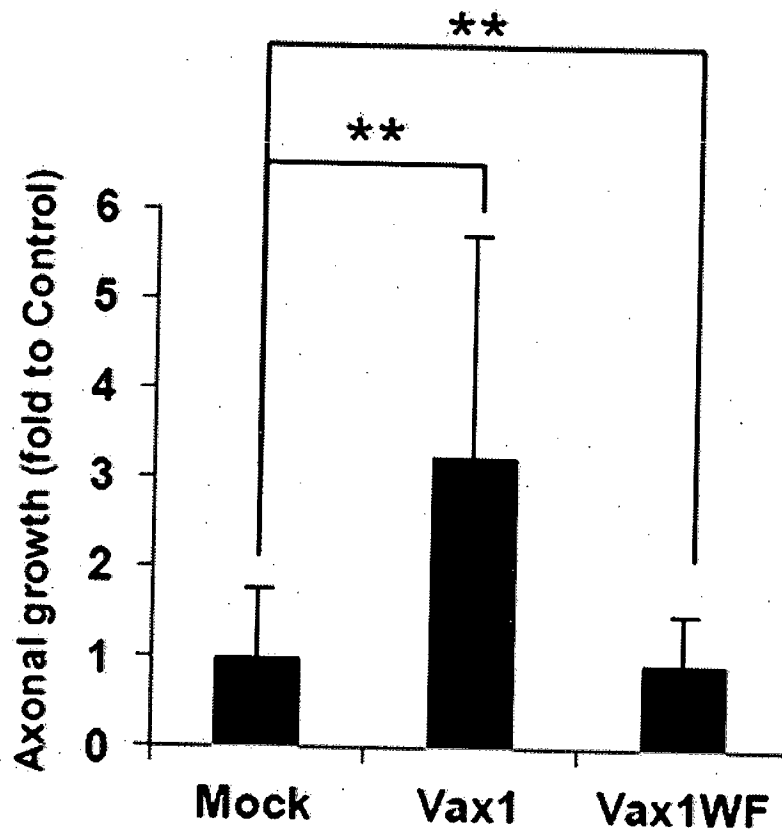
51/59

[도 13c]



52/59

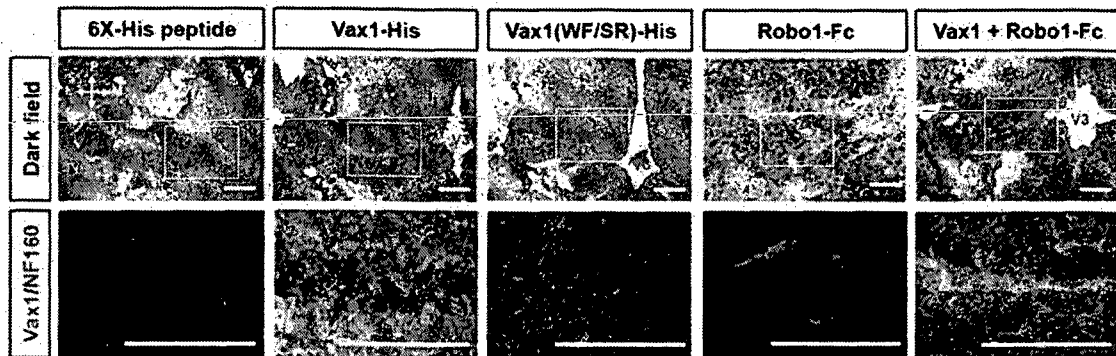
[도 13d]



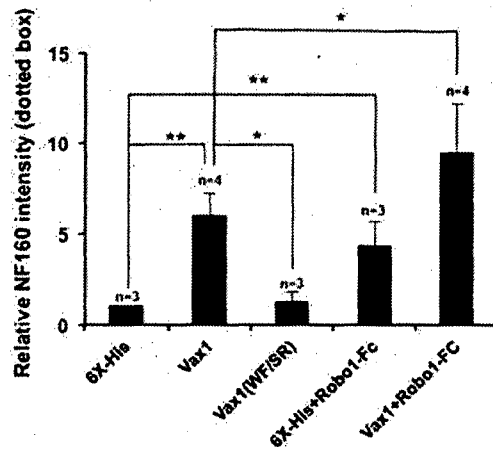
53/59

[도 14a]

A

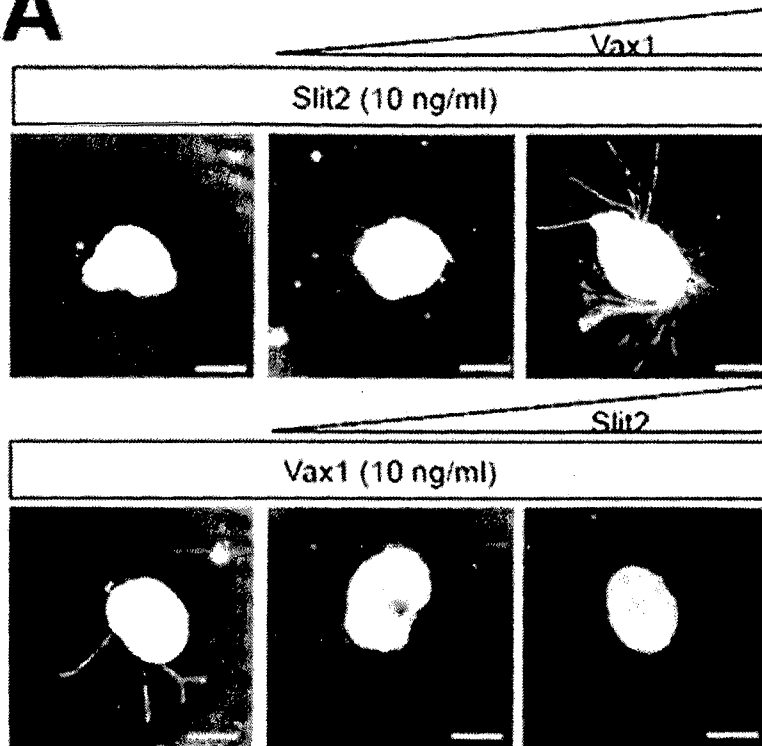
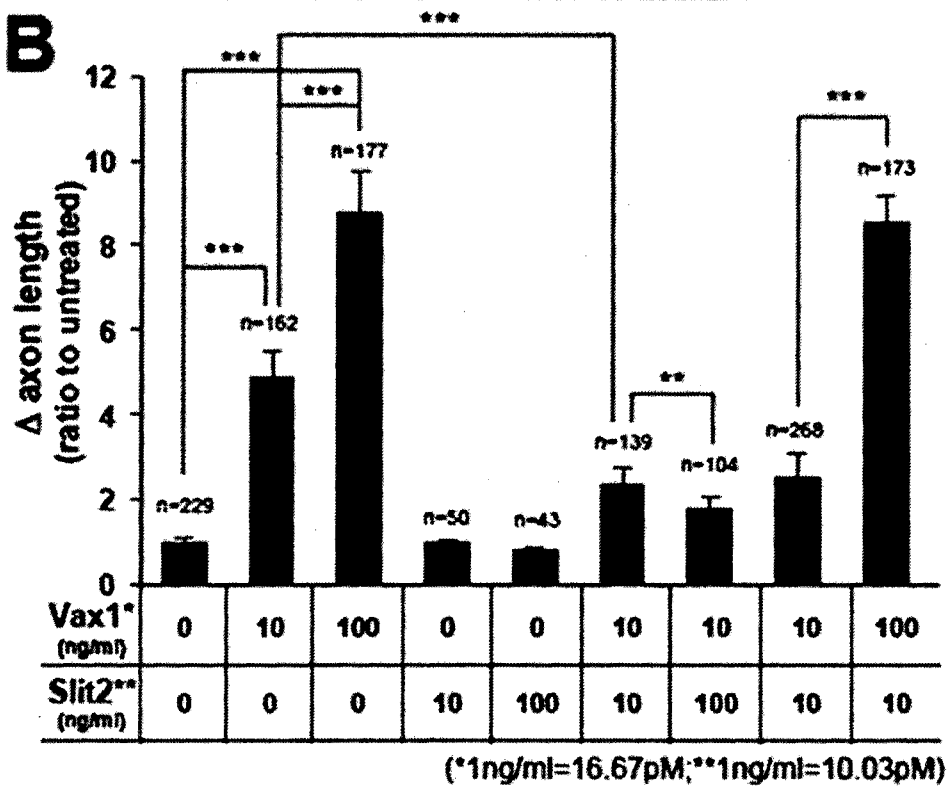


B



54/59

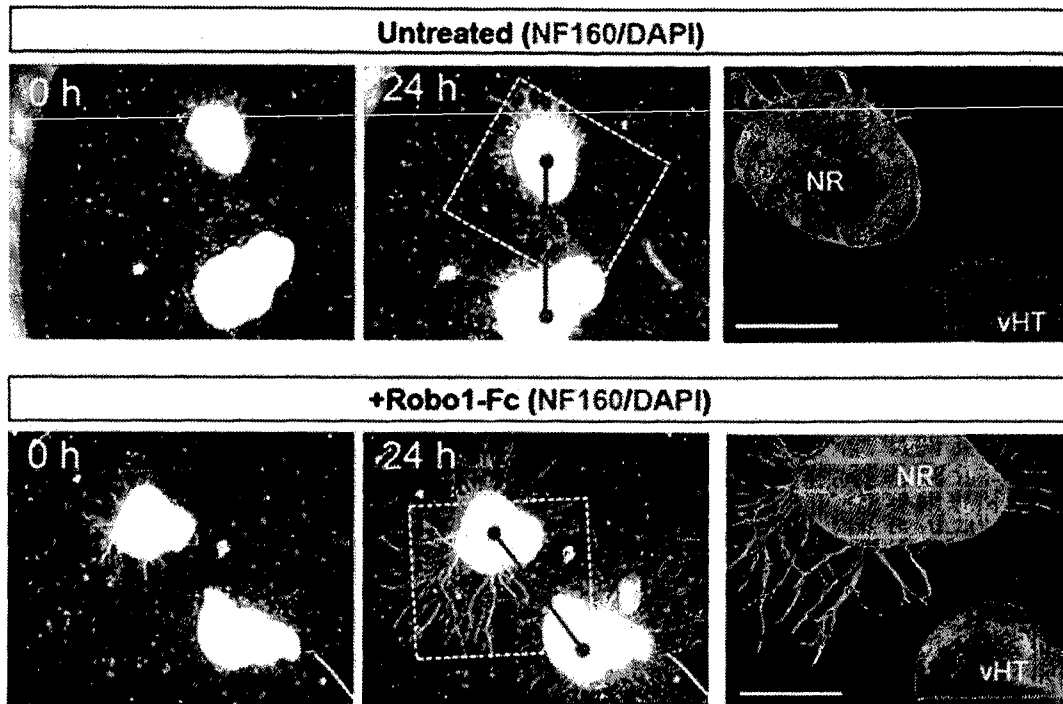
[도 14b]

A**B**

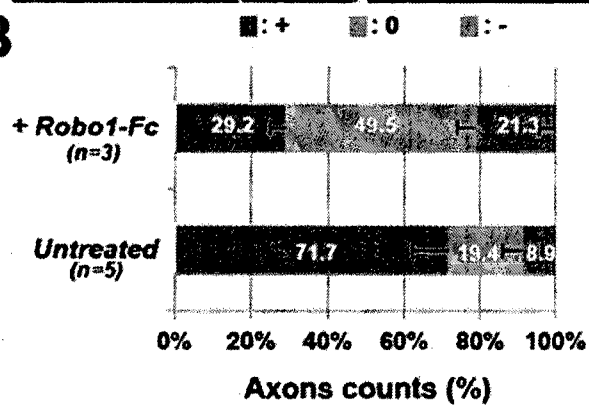
55/59

[도 14c]

A

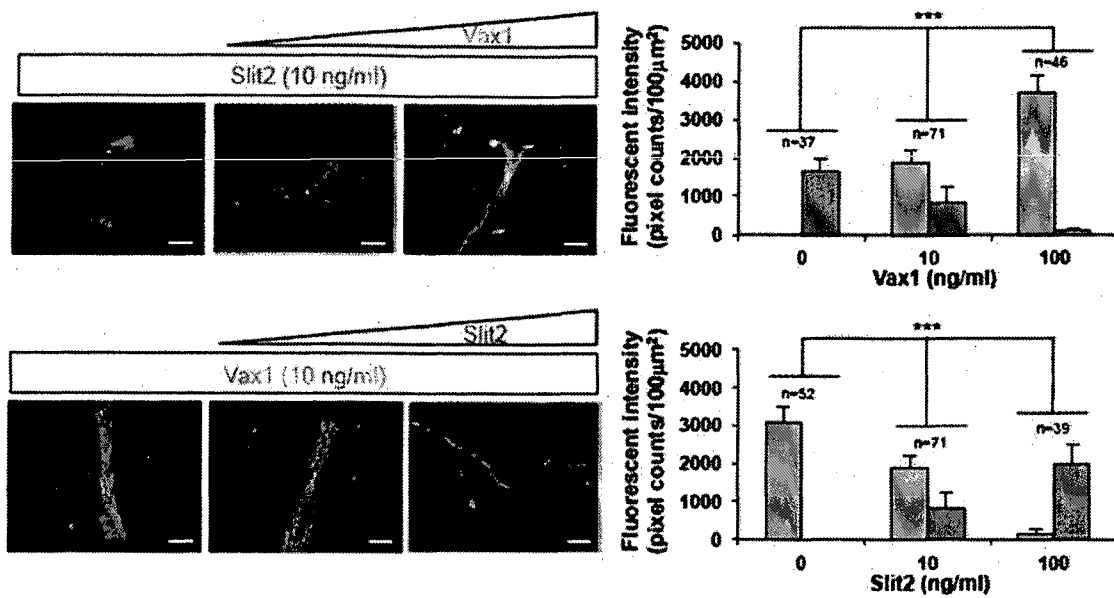


B



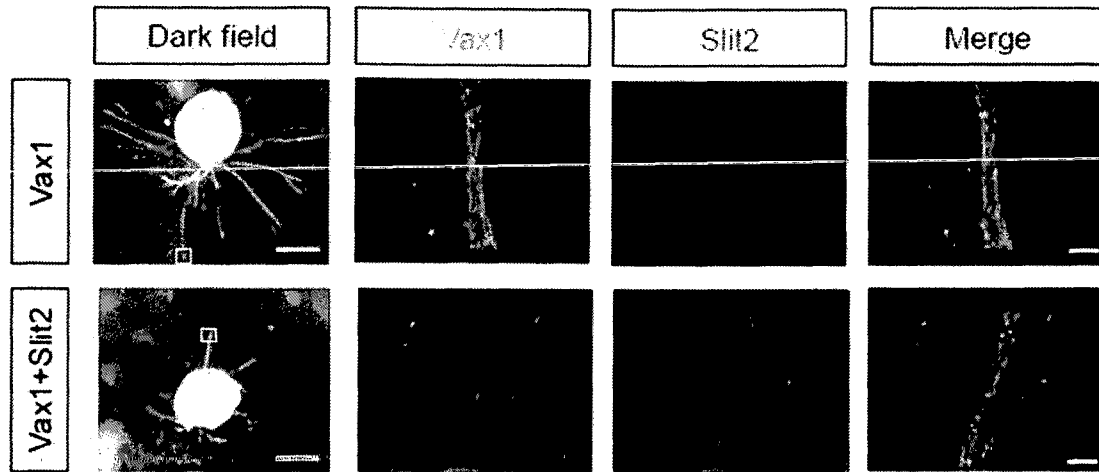
56/59

[도 14d]



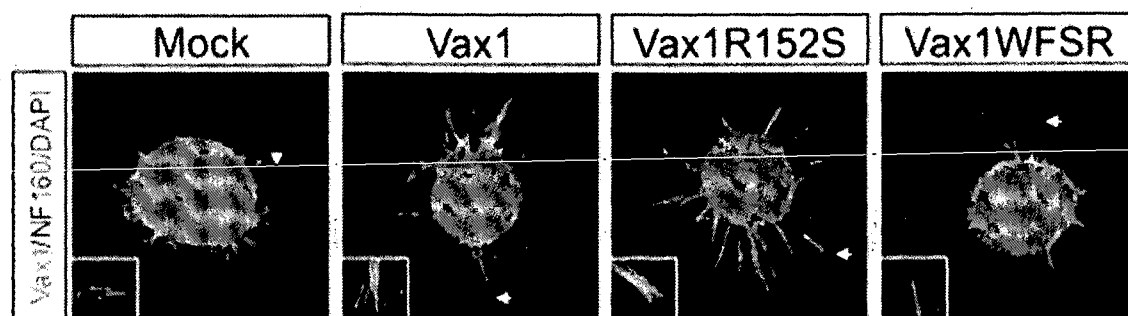
57/59

[도 14e]



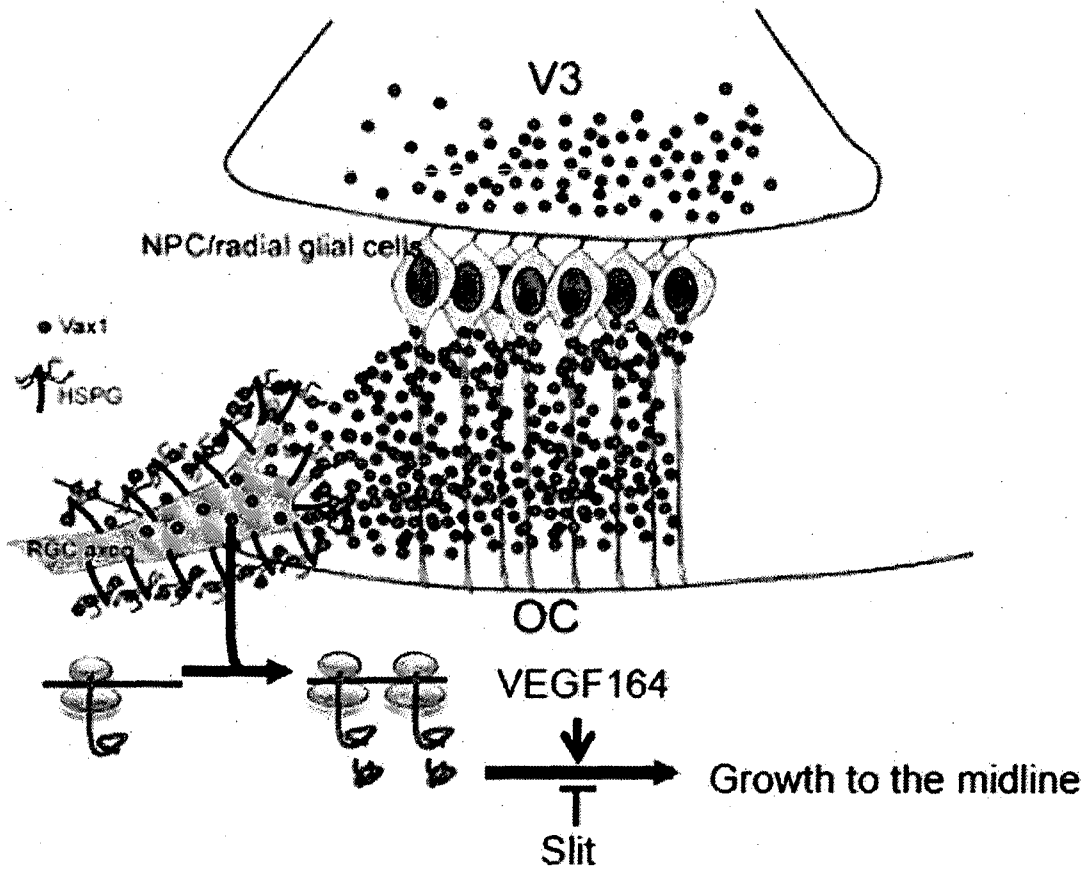
58/59

[도 14f]



59/59

[도 14g]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/011208

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 38/16(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 25/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 38/16; A61K 48/00; A61P 25/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: Vax, optin nerve, retinal ganglion cells, axon guidance

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BERTUZZI, S. et al., The homeodomain protein Vax1 is required for axon guidance and major tract formation in the developing forebrain, GENES & DEVELOPMENT, 1999, vol. 13, pages 3092-3105 See abstract, pages 3094-3096, figure 3.	1,3,6,8-10,17-18
Y		2,4-5,7
A		11-12
X	HALLONET, M. et al., Vax1, a novel homeobox-containing gene, directs development of the basal forebrain and visual system, GENES & DEVELOPMENT, 1999, vol. 13, pages 3106-3114 See abstract, pages 3109-3110, figure 4.	1,3,6,8-10,17-18
Y		2,4-5,7
A		11-12
X	BARBIERI, A.M. et al., Vax2 inactivation in mouse determines alteration of the eye dorsal-ventral axis, misrouting of the optic fibres and eye coloboma, DEVELOPMENT, 2002, vol. 129, pages 805-813 See abstract, pages 809-812, figure 4.	1,3,6,8-10,17-18
Y		2,4-5,7
A		11-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

03 MARCH 2015 (03.03.2015)

Date of mailing of the international search report

03 MARCH 2015 (03.03.2015)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/011208

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Ventral anterior homeobox 1[Mus musculus], NCBI Reference Sequence: NP_033527.1 (26 October 2013) See sequence.	2,4-5,7
A		1,3,6,8-12,17-18
Y	Ventral anterior homeobox 2[Mus musculus], NCBI Reference Sequence: NP_036042.1 (13 January 2013) See sequence.	2,4-5,7
A		13,6,8-12,17-18
A	FUERST, P.G. et al., Defects in eye development in transgenic mice overexpressing the heparan sulfate proteoglycan agrin, DEVELOPMENTAL BIOLOGY, 2007, vol. 303, pages 165-180 See the entire document.	1-12,17-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2014/011208

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **13-16**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The invention as set forth in claims 13-16 comprises a method for treatment of the human by therapy, and thus relates to subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2014/011208

Patent document
cited in search report

Publication
date

Patent family
member

Publication
date

NONE

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A61K 38/16(2006.01)i, A61K 48/00(2006.01)i, A61P 25/00(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A61K 38/16; A61K 48/00; A61P 25/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))

eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: Vax, optin nerve, retinal ganglion cells, axon guidance

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	BERTUZZI, S. 외 4인, The homeodomain protein Vax1 is required for axon guidance and major tract formation in the developing forebrain, GENES & DEVELOPMENT, 1999년, 제13권, 3092-3105면 요약, 3094-3096면, 그림3 참조.	1,3,6,8-10,17-18
Y A		2,4-5,7 11-12
X	HALLONET, M. 외 3인, Vax1, a novel homeobox-containing gene, directs development of the basal forebrain and visual system, GENES & DEVELOPMENT, 1999년, 제13권, 3106-3114면 요약, 3109-3110면, 그림 4 참조.	1,3,6,8-10,17-18
Y A		2,4-5,7 11-12
X	BARBIERI, A.M. 외 10인, Vax2 inactivation in mouse determines alteration of the eye dorsal-ventral axis, misrouting of the optic fibres and eye coloboma, DEVELOPMENT, 2002년, 제129권, 805-813면 요약, 809-812면, 그림 4 참조.	1,3,6,8-10,17-18
Y A		2,4-5,7 11-12

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2015년 03월 03일 (03.03.2015)

국제조사보고서 발송일

2015년 03월 03일 (03.03.2015)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소



대한민국 특허청

(302-701) 대전광역시 서구 청사로 189,

4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 ++82 42 472 7140

심사관

이수정

전화번호 +82-42-481-8158



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	Ventral anterior homeobox 1[Mus musculus], NCBI Reference Sequence: NP_033527.1 (2013.10.26.) 서열 참조.	2,4-5,7
A		1,3,6,8-12,17-18
Y	Ventral anterior homeobox 2[Mus musculus], NCBI Reference Sequence: NP_036042.1 (2013.01.13.) 서열 참조.	2,4-5,7
A		1,3,6,8-12,17-18
A	FUERST, P.G. 외 2인, Defects in eye development in transgenic mice overexpressing the heparan sulfate proteoglycan agrin, DEVELOPMENTAL BIOLOGY, 2007년, 제303권, 165-180면 전문 참조.	1-12,17-18

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 13-16
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 13-16 발명은 치료에 의한 사람의 처치 방법을 포함하고 있으므로, PCT 조약 제17조(2)(a)(i) 및 조약 규칙 39.1(IV)의 규정에 의하여 국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

제3기재란 발명의 단일성이 결여된 경우의 의견(첫 번째 용지의 3의 계속)

본 국제조사기관은 본 국제출원에 다음과 같이 다수의 발명이 있다고 봅니다.

1. ☐ 출원인이 모든 추가수수료를 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 모든 조사 가능한 청구항을 대상으로 합니다.
2. ☐ 추가수수료 납부를 요구하지 않고도 모든 조사 가능한 청구항을 조사할 수 있었으므로, 본 기관은 추가수수료 납부를 요구하지 아니하였습니다.
3. ☐ 출원인이 추가수수료의 일부만을 기간 내에 납부하였으므로, 본 국제조사보고서는 수수료가 납부된 청구항만을 대상으로 합니다. 구체적인 청구항은 아래와 같습니다.
4. ☐ 출원인이 기간 내에 추가수수료를 납부하지 아니하였습니다. 따라서 본 국제조사보고서는 청구범위에 처음 기재된 발명에 한정되어 있으며, 해당 청구항은 아래와 같습니다.

이의신청에
관한 기재

- ☐ 출원인의 이의신청 및 이의신청료 납부(해당하는 경우)와 함께 추가수수료가 납부되었습니다.
- ☐ 출원인의 이의신청과 함께 추가수수료가 납부되었으나 이의신청료가 보정요구서에 명시된 기간 내에 납부되지 아니하였습니다.
- ☐ 이의신청 없이 추가수수료가 납부되었습니다.

국제조사보고서에서
인용된 특허문헌

공개일

대응특허문헌

공개일

없음