



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0062139
(43) 공개일자 2019년06월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/0276 (2013.01)
C07K 14/47 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0085536
(22) 출원일자 2018년07월23일
심사청구일자 2018년07월23일
(30) 우선권주장
1020170160783 2017년11월28일 대한민국(KR)

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박종선
서울특별시 성동구 왕십리로 80, 11동 10층 1109호(성수동1가, 동아아파트)
조명행
서울특별시 서초구 송동길 37(우면동)
박성진
대전광역시 서구 도안동로 177, 109동 1001호(도안동, 도안신도시 수목토 APT)
(74) 대리인
김순웅

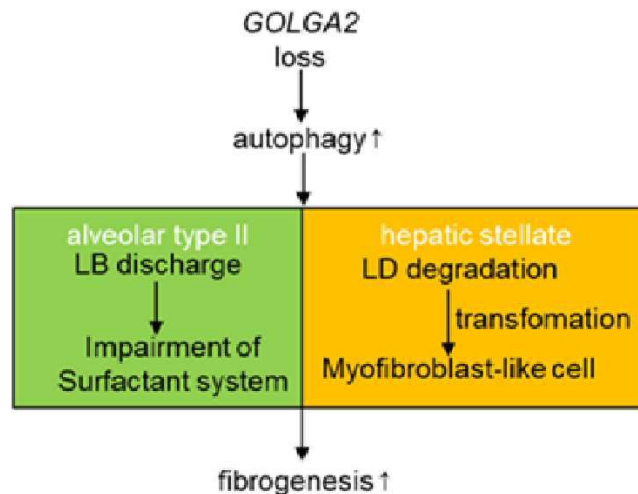
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 GOLGA2 유전자 녹아웃 간 섬유화 마우스 모델

(57) 요약

본 발명은 *GOLGA2* 유전자가 녹아웃된 간 섬유화 마우스 모델, 상기 간 섬유화 마우스 모델 제조용 조성물, 간 섬유화 마우스 모델 제조방법 및 간 섬유화 억제 또는 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 *GOLGA2* 유전자 녹아웃 간 섬유화 마우스 모델을 이용하면, 간 조직의 심각한 병변 없이 유전적 변이로 인해 간의 전체적인 부위에 섬유화가 유발된 모델을 사용할 수 있다는 장점이 있다. 또한 상기 모델은 골지체의 이상형태, 자가포식 및 간 섬유화의 연관성 연구를 위한 모델로서 다양하게 활용할 수 있으며, 케미컬 기반 간 섬유화가 아닌 유전적 기반 간 섬유화의 치료제 스크리닝을 위한 동물 모델로 사용할 수 있다.

대표도 - 도16



(52) CPC특허분류

A01K 2217/075 (2013.01)

A01K 2227/105 (2013.01)

A01K 2267/03 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2012M3A9B6055302

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 바이오·의료기술개발사업

연구과제명 폐암에서 멀티모달 오믹스 기법을 이용한 미토콘드리아 혹은 골지체 특이적 자가포식에 대한 핵심단백질 발굴 및 기반 연구

기 여 율 40/100

주관기관 충남대학교

연구기간 2015.12.01 ~ 2017.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2015R1A2A2A01003597

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 핵심개인연구사업

연구과제명 두경부암에서 Warburg effect의 새로운 조절자로서 CTMP와 LETM1의 분자적 제어 기술 발굴

기 여 율 30/100

주관기관 충남대학교

연구기간 2015.05.01 ~ 2018.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1A6A3A11031556

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 학문후속세대양성사업

연구과제명 유사분열종결을 위한 글로벌 단백질분해가 탈수모화-유비퀴틴화에 의한 (소포체-골지체 유래) 자가소화작용 기전 오믹스 연구

기 여 율 30/100

주관기관 충남대학교

연구기간 2017.06.01 ~ 2020.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

GOLGA2 유전자가 녹아웃된, 간 섬유화 마우스 모델.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 마우스 모델은 골지체에서 *GOLGA2* 단백질이 녹아웃된 것을 특징으로 하는, 간 섬유화 마우스 모델.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 마우스 모델은 간에서 자가포식 작용이 증가된 것을 특징으로 하는, 간 섬유화 마우스 모델.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 간은 간성상세포인 것을 특징으로 하는, 간 섬유화 마우스 모델.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 마우스 모델은 *GOLGA2* 유전자 엑손 1 내지 26번이 결실된 배아줄기 세포로 제조된 것을 특징으로 하는, 간 섬유화 마우스 모델.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 마우스 모델은 간에서 SMAD4 단백질이 증가된 것을 특징으로 하는, 간 섬유화 마우스 모델.

청구항 7

GOLGA2 유전자 엑손 1 내지 26번이 결실된 배아줄기 세포를 포함하는, 간 섬유화 마우스 모델 제조용 조성물.

청구항 8

GOLGA2 유전자를 녹아웃시키는 단계;를 포함하는, 간 섬유화 마우스 모델 제조방법.

청구항 9

(S1) 제1항의 간 섬유화 마우스 모델에 후보 물질을 처리하는 단계; 및

(S2) 상기 후보 물질이 처리된 간 섬유화 마우스 모델에서 간 섬유화 억제 또는 치료 물질을 판정하는 단계;를 포함하는, 간 섬유화 억제 또는 치료제의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 *GOLGA2* 유전자가 녹아웃된 간 섬유화 마우스 모델, 상기 간 섬유화 마우스 모델 제조용 조성물, 간 섬유화 마우스 모델 제조방법 및 간 섬유화 억제 또는 치료제의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 자가포식(autophagy or self-eating) 현상은 필요하지 않거나 손상된 세포내 단백질, 리피드, 소기관들이 라이소좀에 의해 제거되는 과정으로서 생리학적으로 자가포식 과정은 단순히 제거의 의미라기보다는 다이내믹하게 세포를 개선하거나 항상성을 유지하기 위한 에너지들을 공급하고 새로운 소기관 등 기반을 구축하는 재활용 시스템으로 중요한 역할을 담당하고 있다. 이러한 자가포식 작용과 관련하여 골지체는 자가소화포(autophagosome) 조립 초기에 생성되는 이중 격리막(phagophore)을 제공한다고 알려져 있다.

[0004] 한편 간 섬유화는 간염 등 만성 간질환에 수반되는 생체 적응 반응의 일부로서 손상된 간 조직이 정상적인 간세포로 복구되는 것이 아니라 콜라겐과 같은 섬유조직으로 변형되는 상태를 칭한다. 간 섬유화는 조직 손상의 복구 과정에서 발생하는 생체 적응 반응이지만 물질 대사 및 담즙 분비 등의 고유 기능을 전혀 수행할 수 없는 섬유조직으로 간조직을 대체시키므로 필연적으로 간 기능의 저하가 나타난다. 간 섬유화 현상이 지속적으로 반복될 때에는 간 경화로 발전되어 사망에까지 이르게 한다는 점에서 적절한 치료제의 개발은 신약 개발의 중요한 과제가 된다. 그러나 현재까지는 간 섬유화의 기전 자체가 명확하게 밝혀져 있지 않고 효능이 우수한 치료제가 아직 개발되지 않은 실정이다.

[0005] 기존에 이러한 간 섬유화를 일으킨 모델은 존재하나 이는 케미컬 기반의 섬유화 모델로서 케미컬이 닿는 조직 부위에 심각한 병변을 야기한다는 문제점이 있었다. 또한 골지체, 자가포식 및 간 섬유화와의 관계와 이러한 현상에 어떠한 유전자가 관여하는지 밝혀진 바가 없으며 이에 대한 구체적인 연구가 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 연구를 수행하던 중, 최초로 골지체의 형성면 쪽인 cis-골지체에 존재하는 *GOLGA2* 유전자 녹아웃 마우스가 골지체의 붕괴를 일으키며 자가포식을 유도하고 간 섬유화가 유발되는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서 본 발명의 목적은, *GOLGA2* 유전자 녹아웃된, 간 섬유화 마우스 모델, 상기 간 섬유화 마우스 모델 제조용 조성물, 상기 간 섬유화 마우스 모델 제조방법 및 간 섬유화 억제 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 *GOLGA2* 유전자가 녹아웃된, 간 섬유화 마우스 모델을 제공한다.

[0011] 또한 본 발명은 *GOLGA2* 유전자 엑손 1 내지 26번이 결실된 배아줄기 세포를 포함하는, 간 섬유화 마우스 모델 제조용 조성물을 제공한다.

[0012] 또한 본 발명은 *GOLGA2* 유전자를 녹아웃시키는 단계;를 포함하는, 간 섬유화 마우스 모델 제조방법을 제공한다.

[0013] 또한 본 발명은 (S1) 상기 간 섬유화 마우스 모델에 후보 물질을 처리하는 단계; 및 (S2) 상기 후보 물질이 처

리된 간 섬유화 마우스 모델에서 간 섬유화 억제 또는 치료 물질을 판정하는 단계;를 포함하는, 간 섬유화 억제 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 *GOLGA2* 유전자 녹아웃 간 섬유화 마우스 모델을 이용하면, 간 조직의 심각한 병변 없이 유전적 변이로 인해 간의 전체적인 부위에 섬유화가 유발된 모델을 사용할 수 있다는 장점이 있다. 또한 상기 모델은 골지체의 이상형태, 자가포식 및 간 섬유화의 연관성 연구를 위한 모델로서 다양하게 활용할 수 있으며, 케미컬 기반 간 섬유화가 아닌 유전적 기반 간 섬유화의 치료제 스크리닝을 위한 동물 모델로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 *GOLGA2* 유전자의 위치와 *GOLGA2* 녹아웃 마우스 제작에 사용된 배아줄기 세포의 모식도를 나타낸 도이다.
 도 2는 간 세포주에서 *GOLGA2* 녹아웃에 의해 *GOLGA2* 단백질이 골지에서 없어짐을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 3은 *GOLGA2* 녹아웃 간 세포주에서 증가된 자가포식 작용이 유리지방산(free fatty acid, FFA)에 의해 형성된 지방 방울을 분해함을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 4는 *GOLGA2* 녹아웃 간 세포주에서 자가포식 마커 단백질 SQSTM1, LC3I 및 LC3II의 발현이 증가됨을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 5는 정상, 이형접합체 및 *GOLGA2* 녹아웃 마우스의 유전형질분석 결과를 나타낸 도이다.
 도 6은 *GOLGA2* 녹아웃 마우스의 조직 내 *GOLGA2* mRNA의 발현 분석을 통해 *GOLGA2* 녹아웃 마우스를 선별한 결과를 나타낸 도이다.
 도 7은 정상, 이형접합체 및 *GOLGA2* 녹아웃 마우스의 크기를 비교한 사진을 나타낸 도이다.
 도 8은 정상, 이형접합체 및 *GOLGA2* 녹아웃 마우스의 크기 비교 그래프를 나타낸 도이다.
 도 9는 정상, 이형접합체 및 *GOLGA2* 녹아웃 마우스의 몸무게 비교 그래프를 나타낸 도이다.
 도 10은 수컷 *GOLGA2* 녹아웃 마우스의 장기 크기 감소를 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 11은 *GOLGA2* 녹아웃 마우스 간조직에서 자가포식 마커 단백질인 LC3B가 간의 특정 세포에서 매우 활성화된 것을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 12는 *GOLGA2* 녹아웃 마우스 간의 전자현미경 이미지 분석 결과를 통해 간에서 자가포식에 의해 지방 방울이 분해되었다는 것을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 13은 *GOLGA2* 녹아웃 마우스 간의 조직학적 분석을 통해 간 전체에 섬유화 병변이 발견됨을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 14는 *GOLGA2* 녹아웃 마우스 간의 면역조직염색 분석을 통해 Smooth muscle actin (SMA)의 발현이 증가된 것을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 15는 *GOLGA2* 녹아웃 마우스 간의 면역블랏 분석을 통해 TGF- β 신호 전달 기전의 하위 기전 단백질인 SMAD4가 현저하게 증가한 것을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
 도 16은 *GOLGA2* 유전자 녹아웃으로 의한 간조직 섬유화 마우스 모델 제조기전을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명은 *GOLGA2* 유전자가 녹아웃된, 간 섬유화 마우스 모델을 제공한다.

[0019] 본 발명의 *GOLGA2* 유전자는 NCBI Gene ID 99412 의 유전자이며 크로모솜 2에 속하는 유전자로서 다양한 종에 존재한다. 구체적으로 상기 *GOLGA2* 유전자는 NCBI Reference Sequence NM_133852 의 염기서열로 이루어지는 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 또한 상기 *GOLGA2* 유전자는 골지체의 형성면 쪽인 cis-골지체에 존재하는 유전자이

다.

- [0020] 상기 마우스 모델은 골지체에서 *GOLGA2* 단백질이 녹아내린 것일 수 있다. 이로 인해 골지체가 붕괴되며 자가포식이 유도된다. 또한 상기 마우스 모델은 간에서 자가포식 작용이 증가된 것일 수 있다. 상기 마우스 모델은 간에서 자가포식 마커 단백질인 LC3B의 발현이 증가된 것일 수 있다.
- [0021] 또한 상기 간은 간성상세포일 수 있으며 간성상세포에서 자가포식 작용의 증가로 인해 지방 방울이 분해될 수 있다. 또한 이로 인해 상기 간성상세포는 섬유화세포로 형질전환되어 간조직의 섬유화를 일으킨다.
- [0022] 상기 마우스 모델은 *GOLGA2* 유전자 엑손 1 내지 26번이 결실된 배아줄기 세포로 제조된 것일 수 있으며 이에 제한되지는 않는다. 또한 상기 배아줄기 세포는 마우스의 배반포에 주입될 수 있다.
- [0023] 상기 마우스 모델은 간에서 SMAD4 단백질이 증가된 것일 수 있다. 상기 SMAD4 단백질은 TGF- β 신호 전달 기전의 하위 기전 단백질로서 TGF- β 신호 전달 기전의 증가는 섬유화에서 일어나는 중요한 기전이므로 SMAD4 단백질의 증가를 확인함으로써 간 섬유화가 유발됨을 확인할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 *GOLGA2* 유전자 녹아내린 마우스 모델을 통해 *GOLGA2* 녹아내림으로 골지체에서 *GOLGA2* 단백질이 녹아내리며 간에서 자가포식 작용이 증가하고 간 섬유화가 유발됨을 확인할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 *GOLGA2* 유전자 녹아내린 간 섬유화 마우스 모델을 이용하면, 간 조직의 심각한 병변 없이 유전적 변이로 인해 간의 전체적인 부위에 섬유화가 유발된 모델을 사용할 수 있다는 장점이 있다. 또한 상기 모델은 골지체의 이상형태, 자가포식 및 간 섬유화의 연관성 연구를 위한 모델로서 다양하게 활용될 수 있으며, 케미컬 기반 간 섬유화가 아닌 유전적 기반 간 섬유화의 치료제 스크리닝을 위한 동물 모델로 사용할 수 있다.
- [0026] 또한 본 발명은 *GOLGA2* 유전자 엑손 1 내지 26번이 결실된 배아줄기 세포를 포함하는, 간 섬유화 마우스 모델 제조용 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 바람직하게는 배지 조성물일 수 있으며 상기 “배지(culture media)”는 인 비트로에서 세포 성장 및 생존을 지지할 수 있게 하는 배지를 의미하고, 세포의 배양에 적절한 당 분야에서 사용되는 통상의 배지를 모두 포함한다. 상기 배지는 세포가 최소 증식 및/또는 생존하는데 필요한 필수 및 비필수 아미노산, 비타민, 에너지원, 지질 및 미량원소 등을 포함할 수 있다.
- [0028] 또한 본 발명은 *GOLGA2* 유전자를 녹아내리는 단계;를 포함하는, 간 섬유화 마우스 모델 제조방법을 제공한다. 상기 녹아내리는 당 분야에 알려진 통상의 방법으로 실시될 수 있고 바람직하게는 *GOLGA2* CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 실시될 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 상기 *GOLGA2* 유전자를 녹아내리는 단계를 거쳐 간 섬유화 마우스 모델을 제조하면 간 조직의 심각한 병변 없이 유전적 변이로 인해 간의 전체적인 부위에 섬유화가 유발된 간 섬유화 모델을 얻을 수 있다. 또한 케미컬 기반 간 섬유화가 아닌 유전적 기반 간 섬유화 모델을 얻을 수 있다.
- [0030] 또한 본 발명은 (S1) 상기 간 섬유화 마우스 모델에 후보 물질을 처리하는 단계; 및 (S2) 상기 후보 물질이 처리된 간 섬유화 마우스 모델에서 간 섬유화 억제 또는 치료 물질을 판정하는 단계;를 포함하는, 간 섬유화 억제 또는 치료제의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0031] 상기 (S1) 단계는 본 발명의 *GOLGA2* 유전자가 녹아내린 간 섬유화 마우스 모델에 후보 물질을 처리하는 단계이다. 상기 “후보 물질”은 간 섬유화를 치료, 예방 또는 개선할 수 있는 것으로 기대되는 물질로서 화합물, 올리고뉴클레오타이드, 펩티드, 유전자, 단백질, 식품, 제형, 화합물, 조성물, 의약, 영양보조제, 건강관리제품 또는 음료 등의 물질을 제한 없이 포함한다. 또한 상기 “처리”는 후보 물질을 본 발명의 간 섬유화 마우스 모델에 투여하는 방법일 수 있으며 이에 제한되지는 않는다. 상기 “투여하는 방법”으로는 경구투여, 정맥주사, 피하투여, 복강내 투여 등 종래의 투여 방법 중 적절한 방법을 선택할 수 있으며, 후보 물질의 투여량은 투여 방법, 실험 동물의 체중 및 상태나 사전 실험 결과 등에 따라 적절히 선택할 수 있으며 이에 제한되지는 않는다.
- [0032] 상기 (S2) 단계는 (S1) 단계에서 처리된 후보 물질 중 간 섬유화를 개선시킴이 확인된 물질을 선별함으로써 간 섬유화 억제 또는 치료 물질로 판정하는 단계이다. 상기 “선별”은, 후보 물질의 처리 전 본 발명의 간 섬유화 마우스 모델의 간 섬유화 정도를 측정한 결과와 후보 물질의 처리 후 측정 결과를 비교한 결과, 후보 물질의 처

리 전 간 섬유화 정도보다 그 정도를 감소시킨 후보 물질을 선택함으로써 이루어질 수 있다.

[0033] 본 발명의 *GOLGA2* 유전자가 녹아웃된 간 섬유화 마우스 모델을 이용한 상기 간 섬유화 억제 또는 치료제의 스크리닝 방법을 이용하면, 유전적 변이로 인해 간의 전체적인 부위에 섬유화가 유발된 모델을 사용하여 치료제를 스크리닝할 수 있다는 장점이 있다. 또한 케미컬 기반 간 섬유화가 아닌 유전적 기반 간 섬유화의 치료제를 스크리닝할 수 있다.

[0035] 이하, 본 발명을 실시예에 의거하여 보다 구체적으로 설명한다. 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0036] 실시예 상의 각 실험의 통계는 $\pm$ S.D 사용하였고, $p < 0.05$ (* 또는 #), $p < 0.01$ (** 또는 ##)로 기록하였다.

[0038] 실험예 1. 간 세포주 배양 및 *GOLGA2* 녹아웃 세포주 제작

[0039] 인간 정상 간세포주인 Chang 세포주를 Dulbecco's modified Eagle medium/high-glucose 배지 (WELGENE Inc.), 우태아 혈청 10%, 항생제 10%, Heps 20%를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

[0040] 또한 *GOLGA2* 녹아웃된 Chang 세포주는 *GOLGA2* CRISPR/Cas9 시스템으로 제작하였다.

[0042] 실험예 2. *GOLGA2* 유전자 녹아웃 마우스 제작

[0043] Wellcome Trust Sanger Institute로부터 *GOLGA2* 1-26 엑손이 결실된 배아줄기 세포를 구입하여 C57B/L6J 계통 마우스의 배반포에 주입하여 이형접합체 자손들을 얻어냈고 그 이형접합 마우스의 근친교배를 통한 자손들의 유전형질분석을 통해 *GOLGA2* 녹아웃 마우스를 선별하였다.

[0044] 상기 유전형질분석에 사용한 PCR primer는 다음과 같다. *GOLGA2* KO-F(5'-CTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGCTAGC-3')와 Reg-*GOLGA2*-R(5'-ACTGAGCCGGTGAAAACCTAGAAGC-3')는 *GOLGA2*(-/-) 녹아웃을 확인하는데 사용하였으며, Mus *GOLGA2* Exon 27 wt-F(5'-AAGACTGGCGCCAAAGCC-3')와 Reg-*GOLGA2*-R는 *GOLGA2*(+/+)을 확인하는데 사용하였다.

[0045] 도 1에 *GOLGA2* 유전자의 위치와 *GOLGA2* 녹아웃 마우스 제작에 사용된 배아줄기 세포의 모식도를 나타내었으며, 도 1에 나타난 바와 같이 *GOLGA2* 유전자는 크로모솜 2에 속하며 사용된 배아줄기세포의 *GOLGA2* 엑손 1-26번이 결실되어 있음을 확인하였다.

[0047] 실험예 3. 면역 형광법(Immunofluorescence) 분석

[0048] Chang 세포주를 배양용 8웰 챔버 슬라이드에서 배양 후 3% 파라포름알데하이드(Paraformaldehyde)로 4 °C에서 10분 동안 고정시켰다. 그 후 0.25% Triton® X-100에 5분 처리한 다음 30분간 3% 소혈청알부민을 이용하여 블락킹 처리시켰으며, 일차 항체를 4 °C에서 하루동안 처리한 후 형광으로 표지된 이차 항체를 처리하였다. 그 후 간조직은 파라핀 블록을 4um로 섹션하여 슬라이드에 옮긴 후 자일렌으로 파라핀을 제거, 수화시킨 후 항원항체 반응을 살리기 위해 retrieval 버퍼로 10분간 끓이고 식혔으며 위의 세포와 같이 블락킹 후 동일한 방법으로 분석하였다.

[0050] 실험예 4. 면역블랏(Western Blot) 분석

[0051] 면역블랏 분석을 위해 우선 배양한 Chang 세포주를 6well plate에 각각 3×10^5 3well을 칸 후, 24시간 배양 후에 미디어를 제거하였다. 그 후 1X PBS로 워싱한 후에 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 3 mM EDTA, 3 mM EGTA, 0.5% NP40, 10 mM 베타-글리세로포스페이트(beta-glycerophosphate), 50 mM 플루오린화나트륨(sodium fluoride), 0.2 mM 바나듐산나트륨(sodium vanadate), 10 mM PNPP, 5 mM PMSF 및 10 µg/ml 류페틴(leupeptin

n)으로 만들어진 용해 버퍼(lysis buffer)로 세포를 용해시켰다. 용해시킨 단백질을 Bradford protein assay (Bio-Rad, Hercules, CA)로 단백질 농도를 잰 다음 40ug를 정량하여 Laemmli sample buffer를 농도에 맞게 섞어 끓인 후 SDS-PAGE에 로딩 후 이동시켰으며 밀크 블라킹(milk blocking) 및 TBS-T 워싱하고 1차 항체를 넣고 밤새도록 반응시켰다. 이후 다음날 TBS-T 워싱한 후 Rabbit 2차 항체를 1시간 배양한 뒤, 20분간 3차례 TBS-T 워싱하고 필름으로 현상하였다. 마우스 간조직은 초저온으로 얼려서 잘게 부순 후 위와 같은 방법으로 수득하여 분석하였다.

[0053] 실험예 5. 조직학(Histology) 및 면역조직화학적(Immunohistochemistry) 특성 분석

[0054] *GOLGA2* 유전자 녹아웃 마우스의 간 조직은 10% 포르말린에 고정 후 파라핀 임베딩되었고 조직 블록은 4um로 섹션 후 실란(silane) 코팅된 슬라이드에 옮겼다. 조직학 분석을 위해 파라핀이 제거된 조직 슬라이드를 헤마톡실린 및 에오신(hematoxylin&eosin, H&E)으로 염색하거나 콜라겐 침착을 관찰하기 위해 Sirius Red시약으로 염색하였다. 또한 면역조직화학적(Immunohistochemistry) 분석을 위해 파라핀 제거된 조직 섹션은 retrieval 버퍼로 끓인 후 내생적 페록시다아제(oxidase)를 제거하기 위해 5% 과산화수소로 15분 처리 후 tween 20 포함된 TBS 버퍼로 워싱하고 1시간동안 블라킹 하였다. 연이어 1차와 2차 항체 처리 후 다시 워싱하고 DAB 기질 용액으로 발색한 후 재빨리 멸균된 물에 워싱하였다. 카운터 염색을 위해 헤마톡실린(hematoxylin)으로 염색하였다. 그 후 알코올화 및 마운팅을 거쳐 조직 현미경으로 관찰하였다.

[0056] 실험예 6. 전자현미경(Transmission electron microscope, TEM) 분석

[0057] TEM 분석을 위해 간 조직을 1% 사산화오스뮴(osmium tetroxide) 포함된 2.5% 글루타르알데히드(glutaraldehyde) 버퍼로 4 °C에 밤새도록 고정된 후 알콜화처리 하였으며 프로필렌옥사이드(propylene oxide) epon resin을 조직에 침투시켜 70 °C에서 밤새도록 굳힌 다음 40nm로 초박절편하여 구리 그리드에 올렸으며 JEM1010 TEM(JEOL)을 사용하여 관찰하였다.

[0059] 실시예 1. 간 세포주에서 *GOLGA2* 녹아웃이 자가포식 작용을 유발함을 확인

[0060] 실험예 1에서 제작한 *GOLGA2* 녹아웃 간 세포주에서 *GOLGA2* 녹아웃이 미치는 영향을 확인하기 위해 면역 형광법(Immunofluorescence) 분석을 실시하였으며 이에 대한 결과를 도 2에 나타내었다.

[0061] 도 2에 나타난 바와 같이, 간 세포주에서 *GOLGA2* 유전자를 녹아웃시켰을 때 *GOLGA2* 단백질이 골지에서 없어짐을 확인함으로써, *GOLGA2* 녹아웃 세포주에서 골지체의 *GOLGA2* 단백질 녹아웃을 확인하였다. 파란색은 핵(nucleus)을 나타낸다.

[0062] 또한 *GOLGA2* 녹아웃 간 세포주에서 자가포식 작용이 유발되는 것을 확인하기 위해, 정상 간세포주(Chang)와 *GOLGA2* 녹아웃 간세포주를 250uM의 유리지방산(free fatty acid, FFA)으로 24시간 처리 후 중성지방(neutral lipid) 염색으로 지방 방울을 확인하였으며, 이에 대한 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3에서 파란색은 핵(nucleus)을 나타낸다.

[0063] 도 3에 나타난 바와 같이, *GOLGA2* 녹아웃 간 세포주에서 자가포식 작용의 증가로 인해 FFA에 의해 형성된 지방 방울이 분해됨을 확인하였다. 따라서 *GOLGA2* 녹아웃 간세포주에서 자가포식의 증가로 인해 지방 방울의 크기가 줄어든 것을 확인하였다.

[0064] 또한 *GOLGA2* 녹아웃 간 세포주에서 자가포식 마커 단백질인 SQSTM1, LC3I 및 LC3II의 발현을 확인하기 위해 면역블랏(Western Blot) 분석을 실시하였으며 이에 대한 결과를 도 4에 나타내었다.

[0065] 도 4에 나타난 바와 같이, *GOLGA2* 녹아웃 간 세포주에서 자가포식 마커 단백질로 알려진 SQSTM1, LC3I 및 LC3II이 증가함을 확인하였다.

[0066] 따라서 상기 결과들을 통해 *GOLGA2* 유전자를 녹아웃시켰을 때 골지체에서 *GOLGA2* 단백질이 녹아웃되며 자가포식 이 증가함을 확인하였다.

[0068] **실시예 2. *GOLGA2* 유전자 녹아웃 마우스 특성 분석**

[0069] 실험예 2에서 제작한 *GOLGA2* 유전자 녹아웃 마우스의 특성을 알아보기 위해 다음과 같이 분석하였다.

[0071] 실시예 2-1. 유전형질 분석

[0072] 실험예 2를 통해 제작한 *GOLGA2* 유전자 녹아웃 마우스 선별을 위하여 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하였으며 PCR을 통해 정상, 이형접합 및 *GOLGA2* 녹아웃 마우스의 유전형질을 분석하여 도 5에 나타내었다.

[0073] 도 5에 나타난 바와 같이, PCR을 통한 *GOLGA2* 녹아웃 마우스 확인 결과 *GOLGA2* KO 밴드만 관찰된 마우스들을 *GOLGA2* 녹아웃 마우스로 선별하였다.

[0075] 실시예 2-2. mRNA 발현 분석

[0076] 선별된 *GOLGA2* 녹아웃 마우스의 조직 내에서 *GOLGA2* 유전자가 모두 녹아웃된 것을 확인하기 위해서 mRNA의 발현 분석을 하였으며 이에 대한 결과를 도 6에 나타내었다.

[0077] 도 6에 나타난 바와 같이, 모든 장기에서 완전하게 *GOLGA2*가 녹아웃된 것을 확인하였다.

[0079] 실시예 2-3. 마우스 크기 비교 분석

[0080] 정상, 이형접합체 및 *GOLGA2* 녹아웃 마우스의 크기를 비교하여 사진과 그래프를 각각 도 7 및 도 8에 나타내었다.

[0081] 도 7에 나타난 바와 같이, 정상 마우스에 비해 *GOLGA2* 녹아웃 마우스의 크기가 작으며 특히 수컷에서 더 크기가 작은 것을 확인하였다.

[0082] 또한 도 8의 그래프에 나타난 바와 같이, 암수 상관없이 *GOLGA2* 녹아웃 마우스만이 정상에 비해 유의미하게 크기가 감소함을 확인하였다(n=3).

[0084] 실시예 2-4. 마우스 몸무게 비교 분석

[0085] 정상, 이형접합체 및 *GOLGA2* 녹아웃 마우스의 몸무게를 측정하여 비교 그래프를 도 9에 나타내었다.

[0086] 도 9에 나타난 바와 같이, 암컷은 각 군의 몸무게 변화가 없었으며 수컷에서 이형접합체와 *GOLGA2* 녹아웃 마우스의 몸무게는 정상 마우스에 비해 유의미하게 몸무게가 감소함을 확인하였다(n=3).

[0088] 실시예 2-5. 녹아웃 마우스의 장기 크기 분석

[0089] *GOLGA2* 녹아웃 마우스의 장기 크기를 비교하여 도 10에 나타내었다.

[0090] 도 10에서와 같이, 수컷 정상 마우스와 비교하여 수컷 *GOLGA2* 녹아웃 마우스의 장기 크기가 감소한 것을 확인하였다.

[0092] **실시예 3. *GOLGA2* 녹아웃 마우스의 간에서 *GOLGA2* 녹아웃이 자가포식 작용을 유발시킴을 확인**

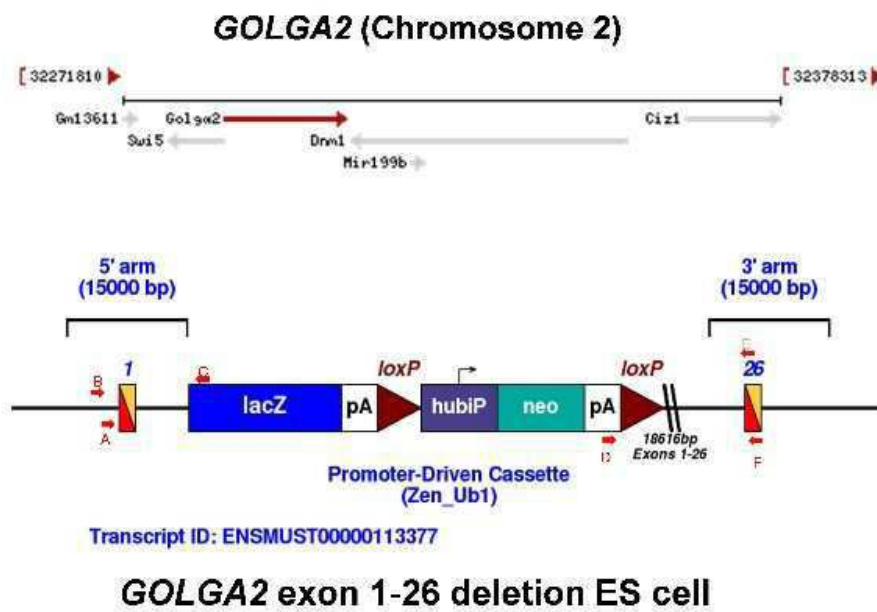
[0093] 상기 실험예 2에서 제작한 *GOLGA2* 유전자 녹아웃 마우스를 통해 실제 간에서 *GOLGA2* 녹아웃이 자가포식 작용을 유발시키는지 확인하기 위해 면역형광염색 분석을 실시하였으며 이에 대한 결과를 도 11에 나타내었다.

[0094] 도 11에 나타난 바와 같이, *GOLGA2* 녹아웃 마우스 간조직에서 자가포식 마커 단백질인 LC3B 염색은 간의 특정 세포에서 매우 활성화된 것을 확인하였다. 또한 그 수는 전체 간의 10% 이하로 분석하였으며 이는 간장 대식 세포(hepatic macrophage)이거나 간성상세포일 가능성이 높을 것으로 확인하였다.

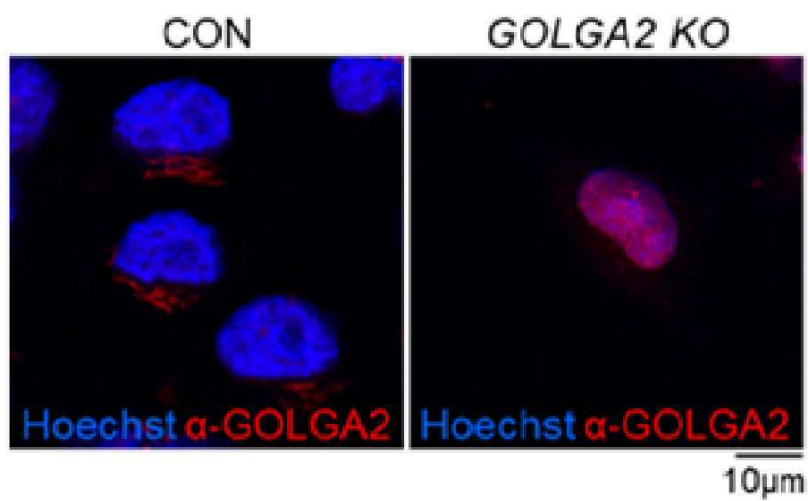
- [0095] 또한 *GOLGA2* 녹아웃 마우스 간의 전자현미경 이미지 분석 결과를 도 12에 나타내었다. 도 12에서 Nu는 핵, M은 미토콘드리아, G는 골지체, LD는 지방 방울을 나타낸다.
- [0096] 도 12에 나타낸 바와 같이, 정상 간세포는 정상적인 형태의 지방 방울과 골지체가 관찰되지만 *GOLGA2* 녹아웃 마우스의 간세포에서는 지방 방울과 골지체가 관찰되지 않으며 미토콘드리아는 이중막으로 둘러싸여 있는 것을 확인하였다. 이는 미토콘드리아 자가포식(mitophagy)에서 발견되는 표현형이며, 이를 통해 *GOLGA2* 녹아웃 마우스 간에서 자가포식에 의해 지방 방울이 분해되었다는 것을 확인하였다.
- [0097] 따라서 상기 결과들을 통해 *GOLGA2* 녹아웃 마우스의 간에서 *GOLGA2* 녹아웃이 간에서 자가포식 작용을 활성화시킴을 확인하였다.
- [0099] **실시예 4. *GOLGA2* 녹아웃 마우스를 통해 간섬유화(liver fibrosis)에서 *GOLGA2* 녹아웃이 미치는 영향 확인**
- [0100] 상기 실험예 2에서 제작한 *GOLGA2* 유전자 녹아웃 마우스를 통해 실제 간에서 *GOLGA2* 녹아웃이 간섬유화에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해 조직학적 분석을 실시하였으며 이에 대한 결과를 도 13에 나타내었다.
- [0101] 도 13에 나타낸 바와 같이, H&E 염색시 *GOLGA2* 녹아웃 마우스의 간관 (hepatic duct) 주변의 간세포의 밀도가 높아진 것을 확인하였다. 또한 Sirius red 염색에서 간 전체에 섬유화 병변이 발견됨을 확인하였다(도 13 내 검은 화살표).
- [0102] 이러한 결과는 기존의 화합물인 사염화탄소에 의해 간관 주변의 간섬유화를 확인한 것과 다르게, 유전적 요인에 의해 간 전체에 섬유화가 일어남을 확인한 결과이다.
- [0103] 또한 *GOLGA2* 유전자 녹아웃 마우스 간의 면역조직염색 분석 결과를 도 14에 나타내었다.
- [0104] 도 14에 나타낸 바와 같이, *GOLGA2* 녹아웃 마우스의 간관 주변에 섬유화의 지표 단백질인 Smooth muscle actin (SMA)의 발현이 증가된 것을 확인하였다.
- [0105] 또한 *GOLGA2* 유전자 녹아웃 마우스 간의 면역블랏 분석 결과를 도 15에 나타내었다.
- [0106] 도 15에 나타낸 바와 같이, *GOLGA2* 녹아웃 마우스 간에서 TGF- β 신호 전달 기전의 하위 기전 단백질인 SMAD4가 현저하게 증가한 것을 확인하였다. 이 TGF- β 신호 전달 기전의 증가는 섬유화에 일어나는 중요한 기전이므로, 이를 통해서도 *GOLGA2* 녹아웃이 간 섬유화를 일으킴을 확인하였다.
- [0108] **실시예 5. *GOLGA2* 유전자 녹아웃된 간조직 섬유화 마우스 모델 확립**
- [0109] 상기와 같은 실시예를 통하여, 골지체 단백질인 *GOLGA2* 유전자의 결실은 자가포식을 유발하고 특히 많은 지질을 포함하고 있는 간의 간성상세포에서 자가포식 작용에 의해 세포내 지질이 분해됨을 확인하였다. 또한 이로 인해 간성상세포는 섬유화세포로 형질전환되어 간조직의 섬유화를 일으킴을 확인하였다. 이를 통해 최종적으로 *GOLGA2* 유전자 녹아웃된 간조직 섬유화 마우스 모델을 확립하였으며, 이를 도 16에 나타내었다.

도면

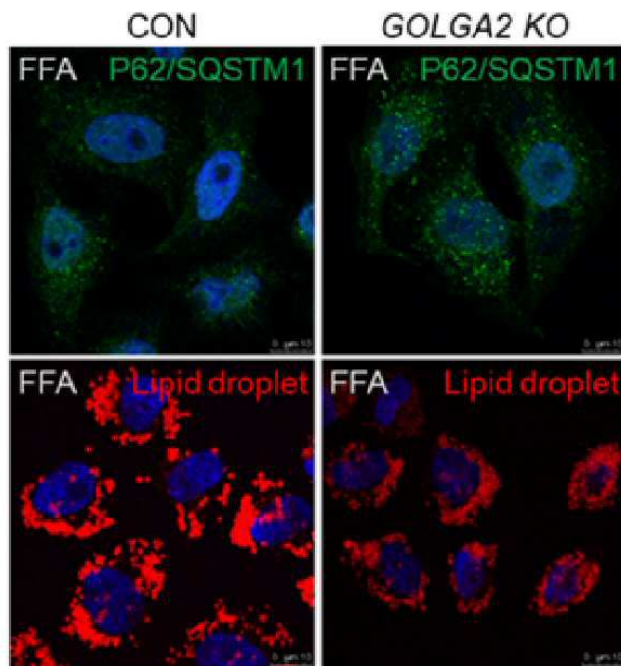
도면1



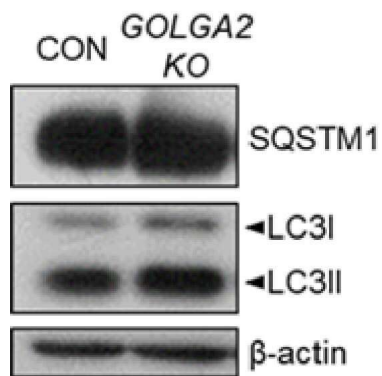
도면2



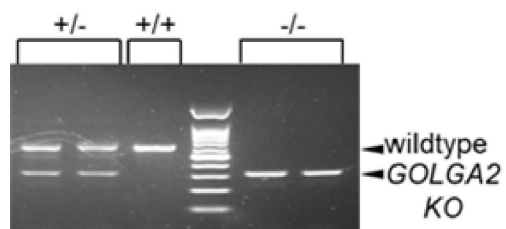
도면3



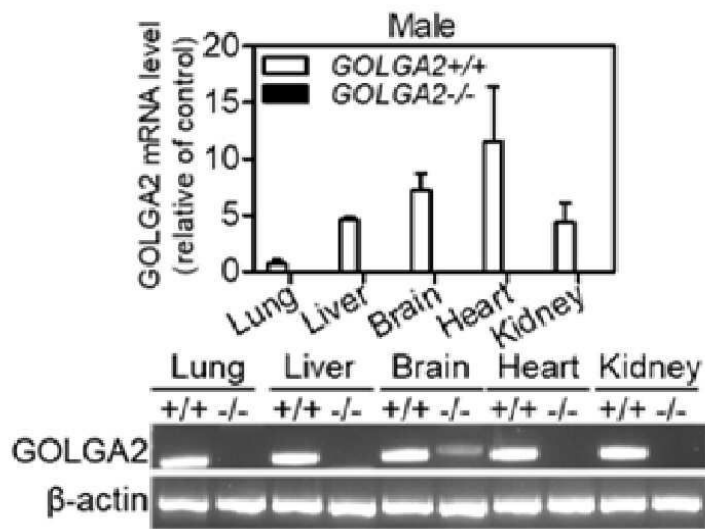
도면4



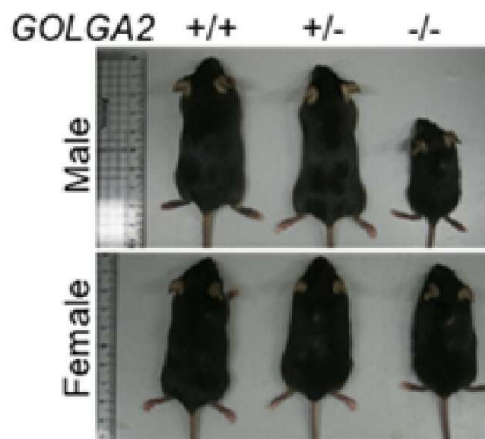
도면5



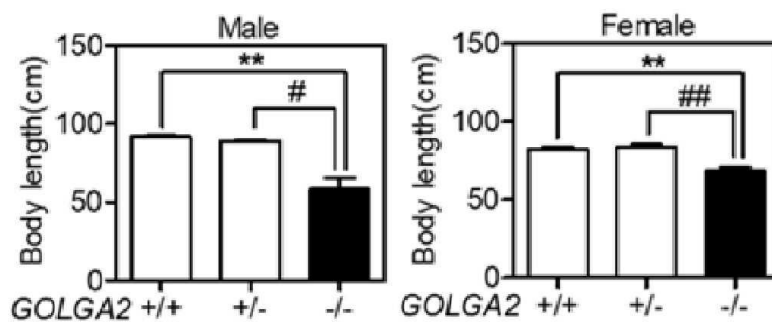
도면6



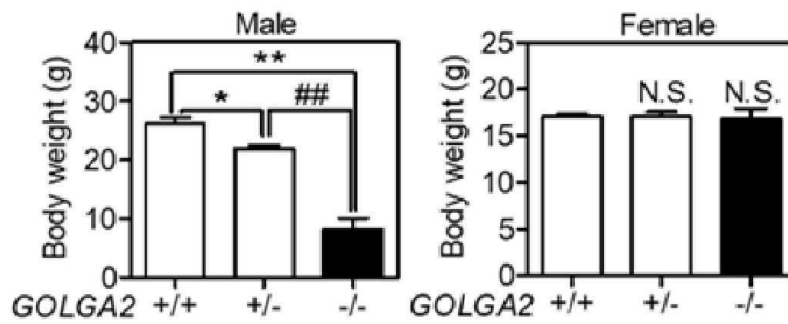
도면7



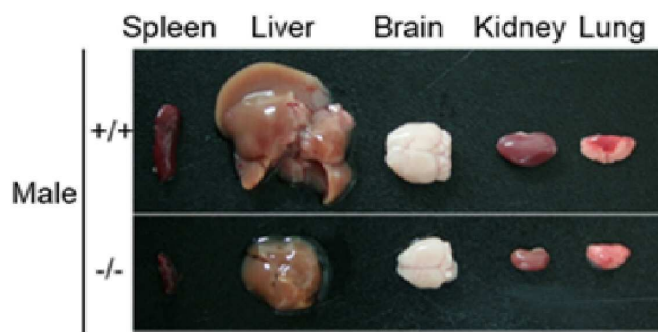
도면8



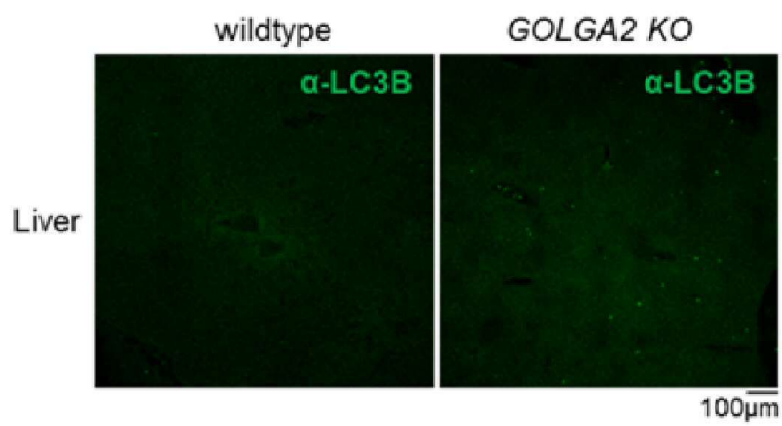
도면9



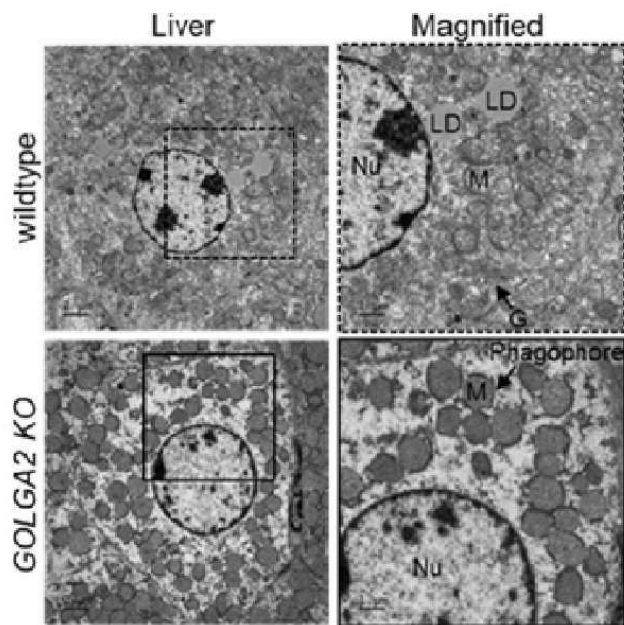
도면10



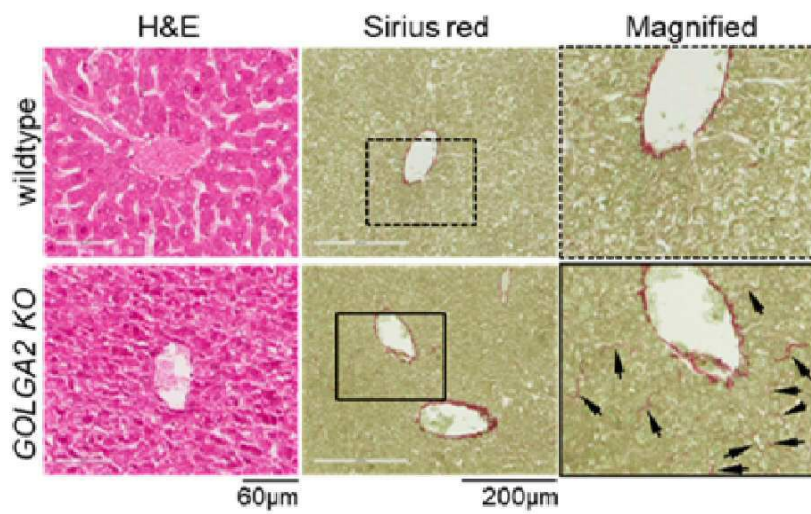
도면11



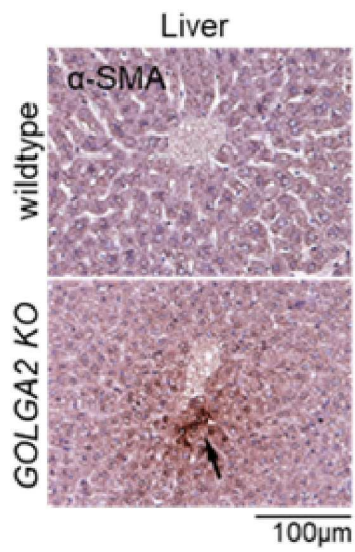
도면12



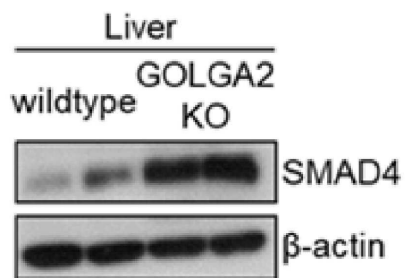
도면13



도면14



도면15



도면16

