



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 21/00 (2006.01)

(11) 공개번호

10-2007-0084750

(43) 공개일자

2007년08월27일

(21) 출원번호 10-2006-0016919

(22) 출원일자 2006년02월21일

심사청구일자 2006년02월21일

(71) 출원인 경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 수원캠퍼스내

(72) 발명자 김윤희
서울특별시 강남구 대치동 청실아파트 5동 901호
유민주
경기 안양시 동안구 관양동 공작부영아파트 301동 804호
허환
서울 동대문구 이문2동 264-291번지 305호
한아미
경기 구리시 인창동 현대아파트 103동 402호
임정수
경기 고양시 덕양구 행신3동 햇빛마을 2104동 1102호
권혁만
서울 강남구 대치동 청실아파트 6-606

(74) 대리인 특허법인 신성

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 유효성분으로 P a x 6 단백질을 포함하는 신경 질환 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 유효성분으로 페어드 박스(Paired box)6(이하 Pax6) 단백질을 포함하는 신경질환 치료용 조성물에 관한 것으로 더욱 상세하게는 Pax6(Canonical form) 전사인자를 신경 간세포와 중간엽 세포에 형질도입, 특정 종류의 신경세포 수립과 치매 동물모델 내 형질도입된 신경 간세포와 중간엽 세포의 뇌이식으로 퇴행성 신경질환 및 뇌척수 손상 등의 치료에 관한 것이다.

대표도

도 10a

특허청구의 범위

청구항 1.

유효성분으로 페어드 박스(Paired box;Pax)6 단백질을 포함하는 신경질환 치료용 조성물.

청구항 2.

제1항에 있어서, 상기 Pax 6 단백질은 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 신경질환 치료용 조성물.

청구항 3.

제1항 또는 제 2항에 있어서, 상기 Pax 6 단백질은 서열번호 2에 기재된 DNA 염기서열에 의하여 코딩되는 것을 특징으로 하는 신경질환 치료용 조성물.

청구항 4.

제1항에 있어서, 상기 Pax 6 단백질은 신경 줄기세포를 콜린성 신경으로 분화를 유도하는 것을 특징으로 하는 신경질환 치료용 조성물.

청구항 5.

제1항에 있어서, 상기 Pax 6 단백질은 중간엽 줄기세포를 콜린성 신경으로 유도하는 것을 특징으로 하는 신경질환 치료용 조성물.

청구항 6.

제1항에 있어서, 상기 신경질환은 퇴행성 또는 신경세포 손상 질환과 운동신경 손상을 동반하는 뇌 또는 척수 손상 질환인 것을 특징으로 하는 신경 질환 치료용 조성물.

청구항 7.

제6항에 있어서, 상기 신경질환은 알츠하이머, 노인성 치매, 간질, 루게릭, 뇌졸중, 헌팅톤, 파킨슨 병, 정신분열증, 발생장애, 자폐증 또는 뇌척수 손상인 것을 특징으로 하는 신경 질환 치료용 조성물.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 Paired box Transcription Factor(이하 Pax6)을 신경간세포와 중간엽세포에 형질도입, 특이적 신경세포 수립과 치매동물모델내 형질도입된 신경간세포와 중간엽세포의 뇌내 주입으로 퇴행성 신경질환 및 뇌척수 손상의 치료에 관한 것이다.

본 발명의 Pax 6 인자는 신경줄기세포에서의 신경세포 분화유도, 콜린성신경분화유도, GAD와 GABA를 생산하는 신경세포의 분화 억제, 중추신경재생효과, 줄기세포 치료 및 유전자치료에서 특정 신경세포의 수립과 분화증진 효과, 치매 및 파킨슨병들 퇴행성 뇌질환 모델에서 신경세포의 수립과 재생효과가 우수하였다. 따라서 본 발명은 다양한 종류의 퇴행성 신경질환, 신경손상 질환의 줄기세포 및 유전자 치료로서 매우 유용하게 사용될 수 있다.

포유동물의 뇌는 신경줄기세포의 분열과 분화 및 생존과 사멸(Apoptosis) 그리고 시냅스 형성 등 일련의 과정을 거쳐 체계적인 신경회로망(Neural network)을 발생(development)함으로서 기억저장, 계산 등 뇌의 복잡한 기능을 수행할 수 있게 된다.

신경 발생과정에서 신경줄기세포는 최종적으로 이동하여 생착한 뇌부위에 적합한 신경세포 종류로 분화한다. 특정신경세포의 분화는 다양한 세포외부 자극과 세포내부의 고유의 전사인자의 발현증가, 그로 인한 다른 전사인자의 발현억제 또는 증가등 끊임없이 전사인자들의 새로운 조합과 협동, 방해로 전사인자의 발현양상이 결정되는 복잡한 과정이다. 특정신경세포는 세포분화시 특정 전사인자의 발현 양상이 고유하며 성체의 뇌에서 시냅스 연결과 신경회로망을 통하여 흥분성 신호 또는 억제성 신호를 보냄으로서 신호를 조합, 그 결과로서 새로운 학습과 기억이 이루어진다. 그러나 최근 사회가 고령화됨에 따라 선진국에서 퇴행성 뇌질환 의 의료비용을 천문학적 수치를 기록하고 있으며 사회문제화되고 있고 한국에서도 평균수명이 급속도로 증가하고 있다. 선진국의 통계에 따르면 85세 이상의 노인에서 50%가 노인성 치매에 걸리므로 이에 대한 대비가 시급하다고 하겠다. 특정신경세포사멸로 인한 퇴행성 뇌질환 외에도 중추조직 손상과에 대한 치료로서 약품과 수술 및 줄기세포 주입을 통한 뇌내의 자체 신경망복구를 기대한 세포치료가 이용되고 있다. 또한 중추조직 손상과 특정신경세포사멸로 인한 퇴행성 뇌질환에 신경줄기세포를 세포치료제로 이용하기 위해서는 특정신경세포로 분화하는 기술이 개발되어야 한다.

Pax6는 2개의 DNA-binding 도메인인 paired 도메인(PD)과 Paired-like homeo도메인(HD)을 가지고 있으며 여러 splice variant가 존재한다.(Anderson *et al.*, 2002; Duncan *et al.*, 2000; Epstein *et al.*, 1994; Kozmik *et al.*, 1997; Mishra *et al.*, 2002) 주로 발현되는 것은 canonical Pax6(14개의 아미노산이 없는 형태; 이하 Pax6)와 PD내에 14개의 아미노산이 삽입되어 있는 Pax6 variant 이 존재한다. Pax6는 처음 밝혀진 것은 시신경의 분화에 관련하는 전사인자로 밝혀졌으며 (Ton *et al.*, 1992)이후 spinal cord의 형성과정에서 전반적인 발현을 통하여 downstream의 전사인자를 발현케하여 운동신경의 분화를 유도하는 upstream 전사인자로서 로 연구되었다.

알츠하이머 병과 혈관성 치매를 포함하는 치매에서의 세포사멸 synaptic circuit: 노인성 치매(알츠하이머병)에서 신경세포는 서서히 죽어가면서 기억력 퇴화를 일으키는데 신경세포의 사멸로 처음 해부학적 병리 현상을 보이는 부위가 대뇌 측두엽의 entorhinal cortex 이다. Entorhinal cortex의 신경세포들은 해마의 dentate gyrus로 sensory input을 보내고 dentate gyrus에서는 CA3로 mossy fiber projection을 보낸다. 다시 CA3에서는 CA1으로 Schaefer collateral projection을, CA1에서는 subiculum 으로 ammonia-subicular projection하여 해마의 주요 intrinsic synaptic circuit을 이룬다. 치매 초기에 entorhinal cortex에 손상이 오므로 이 경로를 따라 신경세포가 죽게 되며 기억을 상실하게 된다. 신경독소 ibotenic acid에 의한 entorhinal cortex에서의 뇌손상은 해마의 주요 cortical input을 상실하게 하며 치매에서와 매우 유사한 경로로 신경세포사멸과 기억력 상실을 일으킨다고 보고 되어있다(Ueki *et al.*, 1996; Miwa *et al.*, 2001).

최근 중간엽 줄기세포가 뇌에서 신경교세포로 분화하는 잠재력을 지닌 것이 알려지면서 (Kofen *et al.*, 1999; Azizi *et al.*, 1998) 중간엽 줄기세포를 이용한 중추신경계의 질병을 치료하는 기술이 가능한 것으로 제시되었다. 즉 중간엽 줄기세포가 뇌조직으로 분화할 수 있는 능력을 바탕으로, 분화과정을 재 프로그래밍하여 신경세포로 분화시키는 기술의 개발 가능성이 높아졌다. 현재 신경세포로의 분화를 유도하는 신경영양인자 및 호르몬이 소수 알려져 있으나(Baine *et al.*, 1995) 다른 종류의 세포로 분화하는 것이 제어되지 않는 것이 문제점으로 지적되고 있다. 따라서 균질한 신경세포를 얻기 위하여 세포의 분화과정을 재프로그래밍하여 신경세포로의 분화를 유도하는 획기적인 기술이 필요하다. 비신경세포를 신경세포로 분화시킬 수 있는 전사인자를 이용하면 신경세포로의 분화과정을 재프로그래밍 할 수 있을 것으로 예상된다. 그 예로 NeuroD, neurogenin 유전자는 bHLH구조를 지닌 전사인자로서 신경세포의 분화에 필요한 다른 유전자들의 발현을 직접적으로 조절하며 (Lee *et al.*, 1995; Ma *et al.*, 1996) neurogenin은 NeuroD보다 발생초기에 작용하여 신경세포의 형질을 갖도록 유도하면서 세포의 증식능력은 감소시키지 않을 것으로 NeuroD는 발생후기에 작용하여 미분화세포를 신경세포로 분화시키는 동시에 세포의 증식을 억제한다고 밝혀졌다.(Sharma *et al.*, 1998)

성체에도 신경줄기세포가 있으며 그 줄기세포가 성체의 뇌에서 발생 분화하는 과정은 재생과정이라고 할 수 있다. 신경줄기세포가 분화하는 과정 동안 특정전사인자발현을 밝혀 냄으로서 특정신경세포의 재생을 수립함은 성체의 퇴행성뇌질환 치료에 이바지할 수 있어 유용하다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 뇌신경 질환 치료제를 제공하는 것이다.

발명의 구성

상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 유효성분으로 페어드 박스(Paired box:Pax)6 단백질을 포함하는 신경질환 치료용 조성물을 제공한다.

본 발명에서 상기 Pax 6 단백질은 본 발명의 효과를 가지는 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열을 가지는 단백질 또는 그것의 절편 및 그들의 변이체를 포함한다.

본 발명의 상기 Pax 6 단백질은 신경 줄기세포를 콜린성 신경으로 분화를 유도하는 것을 특징으로 하며, 또한 중간엽 줄기세포를 콜린성 신경으로 유도하기도 한다.

본 발명의 단백질로 치료가능한 신경질환은 기억 손상을 동반하는 퇴행성 또는 신경세포 손상 질환과 운동신경 손상을 동반하는 뇌 및 척수 손상 등이다. 상기 뇌 신경질환은 알츠하이머, 노인성 치매, 간질, 루게릭, 뇌졸중, 헌팅톤 또는 파킨슨 병, 정신분열증, 발생장애, 자폐증, 뇌척수 손상 등을 포함한다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

1. 신경줄기세포내 Pax6에 의한 분화 유도 확인

본 발명에서는 특정신경분화유도와 Neurogenesis유도에 대한 Pax6의 효과를 조사하기 위하여 흰쥐의 해마에서 유래하는 HiB5신경줄기세포주를 사용하였다. 이때 신경줄기세포의 세포사멸을 감소시키고 세포생존을 증가시키는 성장인자인 PDGF를 HiB5 세포에 분화시작 조건에서 처리하여 배양시켰다. 그 결과 Pax6가 형질도입된 HiB5 세포는 성장인자를 첨가하고 2일이 지났을 때, 형질도입되지 않은 HiB5세포와 형질도입되지 않고 성장인자가 첨가된 HiB5세포보다 콜린성 신경세포 표지자인 콜린아세틸 전달효소(cholinacetyl transferase, 이하, "ChAT"라 함)의 발현이 증가하였다.(도 2, 4, 5 참조) Pax6가 형질도입된 HiB5 세포는 Glutamate의 생산의 차이는 크게 보이지 않았으나 GABA의 발현은 감소하였다. Pax6가 형질도입된 HiB5세포는 분화시켰을 때 Neuron에서는 발현되지 않는 Astrocyte의 표지자인 GFAP가 발현되지 않았다.(도2 참조) 또한 Pax6의 DNA binding에 있어서 중요한 부분인 Paired box 도메인과 Homeod도메인의 mutation 하여 만든 Pax6 돌연변이체의 HiB5내 형질도입시 ChAT의 발현이 감소하는 것을 확인하였으며 (도 3 참조) GAD의 발현이 유지되는 것을 알 수 있었다.(도 5 참조)

흰쥐의 배아 16일자의 HiB5 보다 이른 시기인 흰쥐의 배아 14일 cortex primary cell 내 Pax6의 형질도입 실험에서는 형질도입된 세포 내 ChAT의 발현이 증가하는 것을 관찰하였다. (도 6 참조) 또한 Pax6 돌연변이체의 배아 14일 primary cell 내 형질도입시 ChAT의 발현이 감소하는 것을 확인하였으며 흰쥐의 배아 16일자 해마 유래의 HiB5와 달리 Pax6 돌연변이체의 배아 14일 대뇌 유래 primary cell 내 형질도입시 완전한 Neurogenesis억제가 일어나는 것을 볼 수 있고 신경세포 분화표지자인 Neurofilament 200가 Pax6 돌연변이체가 형질도입된 세포에서는 발견되지 않는 것을 알 수 있었다. (도 7참조)

2. 중간엽간세포내 Pax6에 의한 콜린성 신경으로의 분화 유도 확인

Pax6에 의한 신경줄기세포가 콜린성신경으로 주로 분화한다는 사실을 확인한 후 신경 간세포가 아닌 중배엽에서 유래한 줄기세포에서도 동일한 양상을 보이는지 알기 위해 중간엽 간세포(Mesenchymal stem cell)에 재조합 Pax6-아데노 바이러스 벡터(Pax6-Ad)를 도입하여 면역염색하고 발현의 증감을 보기 위하여 면역분석법 (Immunoblot)을 이용하였다. 인간으로부터 분리한 중간엽 간세포는 신경 간세포에서 신경세포로의 분화시 나타나는 초기 표지자인 beta-tubulin isotype III을 발현하고 있었으나 다른 성숙한 신경 표지자로는 검출되지 않았다. Pax6-Ad가 도입된 중간엽세포는 분화조건(0.5% FBS 배지)으로 이동한 후 2일 동안 배양하였을 때 ChAT의 발현이 관찰되었다.(도 8 참조) 이는 Pax6가 신경이 유래되는 조상세포뿐만 아니라 정상적으로는 신경세포가 되지 않는 중간엽세포를 신경으로 유도하는 기능을 발휘한다는 것이다. 이러한 교차분화(trans-differentiation)기술은 환자 본인의 성체 줄기세포를 세포치료제로서의 이용 면에서 유용하다고 볼 수 있다.

3. 뇌 이식 후 분화에 미치는 효과

사람 중간엽 줄기세포를 아무런 전처리를 하지 않은 대조군과 Pax6-Ad를 감염시킨 실험군으로 나누고 뇌질환 모델 흰쥐 해마의 hippocampal alveus 위치에 뇌이식하여 12주후 세포가 이동, 분화한 것을 면역 조직 화학법으로 형광염색하여 공초점 레이저 주사 현미경으로 관찰 하였다.(도 9a, 9b 참조) 콜린성 신경세포 표지자인 ChAT를 발현하는 세포를 관찰해 보면 해마의 CA1부위에 편입되어 길게 축색을 내고 있는 것을 볼 수 있다. Pax6-Ad(Pax6 아데노 바이러스 벡터)를 감염시켜 뇌이식한 경우에는 Pax6를 발현하는 세포가 뚜렷하게 ChAT를 발현하고 있음을 알 수 있다. 이는 Pax6가 콜린성 신경세포로의 분화에 직, 간접적으로 기능을 하고 있다고 추측해 볼 수 있다. Pax6-Ad 감염하여 뇌이식한 실험군에서의 GABA성 신경세포 표지자는 ChAT에 비해 발현이 잘 되지 않고 그 수 또한 많지 않음을 알 수 있다.(도 9c) Pax6가 과발현된 사람 중간엽 줄기세포는 콜린성 및 글루타메이트성 신경세포로 주로 분화함을 도9c에서 살펴볼 수 있으며 이는 대조군의 ChAT 발현률 44.12%에 비해 85.26%로 약 2배의 증가를 보여주고 있다. 또한 글루타메이트성 신경세포 표지자인 Glutamate의 발현률도 58.90%에서 Pax6-Ad를 감염시켜 뇌이식한 경우에는 84.38%로 증가했음을 알 수 있다.(도 9c 참조) 반면에 GABA의 발현은 44.83에서 52.73%로 크게 차이가 없었다. 글루타메이트 수용체의 두 표지자인 NR2A, GluR2의 경우에 있어서도 발현이 증가했는데, NR2A는 48.05%에서 66.13%로 증가하였고 GluR2는 21.95%에서 46.67%로 증가한 것으로 보아 신경세포들 사이 신호전달에 있어 유효한 세포로의 분화가 이루어지고 있음을 평가할 수 있다.(도 9c 참조)

4. Pax6-Ad의 해마 의존적 기억력 회복에의 기여

이보테닉산(Ibotenic acid)을 측뇌 주입하여 해마의 신경세포의 사멸을 유도하여 제작한 기억력 손상 모델 흰쥐는 해마 의존적 기억력 검사인 Y maze 시험 및 passive avoidance 시험에 대하여 뚜렷하게 기억력이 소실된 것을 보여주고 있다. 이 기억력 손상모델 흰쥐에 사람 중간엽 줄기세포를 해마부위에 뇌이식하면 두 가지의 해마 의존적 기억력 검사에서 기억력이 회복하는 것을 보이는데 Pax6-Ad를 감염시켜 뇌이식한 경우에 자극반응에 의한 기억력 검사인 passive avoidance 시험에 대하여 크게 기억력이 회복되는 것을 알 수 있다. 수치상으로 자극에 대한 기억이 기억력 손상모델 대조군의 경우 31.67초인 반면 전처리 없이 사람 중간엽 줄기세포를 뇌이식한 경우엔 357초로 크게 증가했으며 Pax6-Ad를 사람 중간엽 줄기세포에 감염시켜 뇌이식한 경우에는 648.4초로 더욱 크게 자극을 기억하는 것으로 분석해 볼 수 있다.(도 10a 참조) 이는 뇌이식 후 사람 중간엽 줄기세포의 기능성 신경세포로의 분화를 유도하여 사멸이 유도된 신경세포를 대체하여 신경세포간 연결을 이루어 기억력 회복에 기여한 것으로 추측해 볼 수 있다. 또한 공간 지각적 기억력 검사인 Y maze 시험을 통해서는 Pax6-Ad를 감염시켜 뇌 이식한 실험군의 경우 전처리 없이 뇌이식한 사람 중간엽 줄기세포와 비교하여 유의한 증가는 없었으나 새로운 공간에서의 8분동안의 측정에서 뇌질환 모델의 기억력 59.05%에 비하여 72.26% (hMSCs), 75.65%(Pax6-Ad)로 크게 향상된 것을 보여주고 있다.(도 10b 참조)

이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다.

실시예

1) 본 발명에서 Pax6는 canonical form Pax6(NCBI #NM000280)를 UP Primer 5'-AGCCAGCATGCAGAACAG-3'(서열번호 3),DOWN Primer 5'-TTTTACTGTAATCTTGCCA-3'(서열번호 4)으로 U87 cell line에서 얻어낸 cDNA내에서 PCR(polymerase chain reaction)하여 얻어낸 insert(1278bp)를 pGEM T-easy vector(promega catalog #A1360)에 삽입하여 pGEM T-easy vector내의 multi-clonig site내의 Sac I,SacII로 restriction enzyme cut하여 얻어진 product를 pIRES2-EGFP(BD bioscience clontech catalog #6029-1)내에 재삽입하였다. Paired box 도메인과 Homeodomain의 active 도메인을 불활성화시킨 canonical form Pax6 돌연변이체와 canonical Pax6는 각각 pCS3+ MT vector내에 subcloning된 것을 실험에 이용하였다.

2) 신경세포주배양

흰쥐 배아의 해마에서 기원하는 HiB5 세포는 온도 민감성(temperature sensitive) SV40 T-항원(antigen)을 레트로바이러스로 감염시켜(retrovirus infection)만들었으므로 32℃에서 배양할 때는 세포분열을 하나 위의 정상체온인 39℃로 옮기면 분열을 멈춘다. 배지는 DMEM에 10% FBS(Fetal bovine serum), 페니실린/스트렙토마이신, 글루타민, sodium bicarbonate을 첨가하고 39℃에서 분화 시에는 무혈청(serum-free media) 배지인 N2(DMEM/F12,인슐린,프랜스페린,퓨트레신, selenium, BSA 포함 ;botten Stein & Sato., 1979)에 피루베이트(pyruvate)를 첨가하여 사용하였다.

3) 일차 세포(Primary cell) 배양

임신한 지 14일 이 지난 흰쥐를 죽인후 배아를 분리하여 뇌부분에서 cortex부위를 분리하여 세포 분리과정을 거친 Primary cell을 poly-L-ornithine, Fibronectin으로 코팅한 dish에 세포를 심어 배양하였다. 배지는 N2(DMEM/F12,D+ glucose ,L-Glutamine ,인슐린,프랜스페린,퓨트레신,selenium, BSA 포함)을 사용하며 분열을 촉진하는 FGF를 처리하여 배양하였다.

4) 중간엽세포 배양 및 면역세포화학법

사람 중간엽세포(Human mesenchymal stem cell)는 alpha -minimum essential medium에 10%, FBS , 페니실린/스트렙토마이신, sodium bicarbonate을 첨가하여 배양하고 분화시에는 0.5% FBS media에서 배양하였다.

면역세포화학적 방법은 신경세포특이적 표적 단백질(neurofilament, GABA, ChAT, GAD등)의 발현을 조사하기 위해 배양된 세포를 4% paraformaldehyde로 15분간 고정한 후 0.5% triton X-100으로 5분간 세포막 투과 조건 상태(permeablizing)로 만들고 15% normal serum(5% goat, 5% donkey, 5%horse)으로 1시간 동안 blocking하였다. 서로 다른 origin인 두 종류의 primary antibody로 4℃에서 16시간 동안 배양한 후 각 primary antibody를 검출하기 위하여 FITC 또는 rhodamine이 결합된 이차항체를 암실에서 배양하였다. 세포로 염색할 경우 세포의 핵을 DAPI로 염색하여 공초점 현미경을 이용해 관찰하였다.

5) Immunoblot 분석법

Pax6가 형질 도입된 세포가 분화표지자를 발현하는지 알아보기 위하여 형질도입한 HiB5을 분화상태로 옮긴 후 그 세포를 시간별로 채취하였다. 세포가 자라고 있는 dish를 PBS로 씻은 후 NP-40가 포함되어 있는 lysis buffer(Tris buffered saline에 NP-40,pyrophosphate ortho-vanadate, fluoride, aprotinin, pepstatin, Leupeptin 첨가)를 넣어 세포를 추출하였다. 10분간 얼음에서 반응한 후 10분간 원심분리기로 핵을 제거하였다. 각각 ChAT ,GAD, neurofilament, tag-myc에 대한 항체를 이용하여 세포추출물을 면역침전한 후 면역침전물을 SDS-polyacrylamide gel로 분획한 후 nitrocellulose에 단백질을 이전하였다. 이후 표지자의 발현을 확인하기 위해 immunoblot(Western blot)분석법을 시행하였다.

6) 사람 중간엽 줄기세포의 뇌이식 전 처리

뇌 이식 전 처리로서 hMSCs에 형광을 띄는 1,1-diocadecyl-3,3,3,3-tetra- methylindocarbo cyanine perchlorate (DiI-C18-(3))을 빛 차단 조건에서 2시간 동안 실온에서 표지를 하였다. 이후 10% FBS in α -MEM 배지로 37℃에서 배양한 다음 2시간 동안 serum starvation 조건인 0.5% FBS in α -MEM에서 분화 조건이 되도록 처리한 후 부착되어 있는 세포를 탈착하여 살아있는 세포 수가 Saline containing 0.7% Penicillin/Streptomycin, 20mM hepes(pH=7.2)와 0.5% glucose내에 6×10^4 cells/ μ l 되도록 한 다음 2 μ l씩 뇌 이식하였다.

7) 실험동물 및 뇌이식

실험에 사용한 흰쥐는 7-8주령 된(250-300g) Sprague-Dawley (CrjBgi:CD(SD) IGS, Orient, Korea)로서 실험동물 사육실(20-23℃, 주/야(12h/12h)cycle 방식)에서 1-2주 적응 시킨 뒤 뇌이식 하였다. 사람 중간엽 세포 이식에 따른 면역반응을 억제하기 위하여 Cyclosporin(100 μ l/200g)을 이식 이틀 전부터 복강주사 처리하였다. Stereotaxic surgery시 먼저 흰쥐를 50mg/ml equithensin을 복강 주사하여 전신마취하고 기억력 손상 모델을 제작하기 위하여 측뇌의 entorhinal cortex부위에 신경 독소인 ibotenic acid(1mg/ml)을 총 1.5 μ l 주입하고 hMSCs의 이식은 해마 내 hippocampal alveus에 6×10^4 cells/ μ l의 세포를 2.0 μ l 자동 microinjector를 이용 stereotaxic 주입하였다. 이후 회복 단계를 거쳐 6주 후에 행동 검사 시험에 사용하고 12주에 관류하여 뇌를 적출하였다.

8) 행동학적 검사

기억력 회복능을 조사하기 위하여 두 종류의 행동 검사를 시행하였다. 첫 번째로 수행된 Y maze task를 이용한 실험은 뇌 이식 후 6주에 시행하였다. 물체를 식별 가능한 어두운 공간에 Y maze task를 설치하고 그 주변으로 시각적 표지들을 설치하였다. 이후 검사 대상 흰쥐를 그 공간에 옮겨 약 1시간 이상 공간에 대한 적응을 시킨 다음 실험에 들어간다. 각 분지 통로에 임의적으로 순서를 표지하고 8분, 10분, 12분의 시간에 흰쥐의 탐색에 의한 각 분지 통로에 들어간 순서와 횟수를 기록하여 이들이 바로 전 단계에서 선택하여 들어갔던 분지 통로가 아닌 다른 분지 통로로의 진입 시 점수를 주어 3차례

연속 다른 분지 통로로의 선택이 한 score가 되어 전체 선택에 대한 비율로서 %를 나타낸다. 흰쥐들은 주변에 설치된 시각적 표지를 기억하여 새로운 분지 통로로의 탐색을 하게 되는데 이 수치가 높을수록 alteration 확률이 높으므로 탐색에 의한 공간지각력 검사를 의미하였다.

두 번째로 시행한 검사는 Passive avoidance 검사로서 6주령이 되기 4-5일 전 미리 훈련을 하였다. 훈련 방법은 빛에 대한 회피 반응력으로서 명암 구분이 되는 두 chamber의 이동 통로를 막고 흰쥐가 들어있는 chamber에 전등을 켜 후 통로를 열어서 맞은 편 어두운 chamber로의 이동 시간을 기록하였다. 이 훈련을 하루에 4-6회 실시하며 훈련 실시 후 24시간이 지난 후에 다시 훈련을 실시하여 4-5일 동안 평균 이동시간이 20초 내 외 일 경우 실험을 시행하였다. 실험은 빛에 의한 회피가 이루어지고 다른 chamber로 이동하면 전기적 충격(1.5-2.8mA)을 5초간 준다. 전기충격 24시간 후 같은 조건으로 chamber에 넣고 전등을 켜 다음 이들이 반대편 chamber로 이동하는 시간을 기록하였다. 이 수치가 높을수록 자극에 대한 기억력 회복의 정도를 비교 할 수 있다.

9) 흰쥐 뇌의 고정 및 적출

Perfusion method 전 이산화탄소를 약 5분간 주입하여 죽인 흰쥐를 개복하여 우심실에 pH 7.25의 4% PFA (Parafolmaldehyde, Sigma, USA) in PBS를 약 400ml 주입하였다. 주입은 peristaltic pump(manhatan company, Korea)를 연결한 직경 1mm 주사바늘을 이용하여 시행하였고 주사바늘은 우심실의 밑 부분에 찔러 넣어 동맥을 통과할 수 있게 된다. 그리고 우심방을 터트려 피가 더 이상 심장으로 들어가지 못하게 하며 동시에 관류를 통해 흘러나오는 피를 제거해 준다.

각 조직이 고정되면 brain을 적출하여 4% PFA 용액에 4℃조건에서 4시간 둔 다음, fixing solution(30% Sucrose in 1X PBS)에 넣어 10시간 저장하여 조직의 고정과 탈수가 일어나도록 하였다. 그 후 -40℃에 동결, OCT compound(Sakura co. Japan)로 동결 절삭할 수 있도록 고정시킨 후 Cryostat(Zeiss, Germany)를 이용하여 35μm의 두께로 coronal section 하였다. 이때 24well에 storing buffer solution을 담고 그 안에 hippocampus의 시작부분부터 끝부분까지를 담아 4℃에서 보관하였다. 그리고 형광 염료인 DiI의 특성상 생체가 죽은 순간부터 세포막으로부터 확산하기 때문에 perfusion method를 시행한 순간부터 48시간 이내에 이후의 모든 실험이 이루어졌다.

10) 면역조직화학법

냉동 절편 하여 보관된 조직을 아크릴 24well로 옮겨 PBS로 2번 씻어 준 다음 0.5% Triton X-100 in PBS 용액으로 20분간 4℃ chamber에서 얼음위에 두고 DiI가 확산하지 않도록 shaker로 돌린다. 이후 15% normal serum in 3% Bovine Serum Albumin(BSA) with 0.1% Triton X-100 in PBS 용액에서 비특이적 면역반응에 대한 blocking 단계를 2시간 동안 shaker위에서 시행하고 이후 1차 항체(primary antibody)를 4시간동안 부착시킨다(3시간 4℃, 1시간 실온). 이때 항체는 1% BSA in PBS에 희석하여 사용하였다. 이때 사용된 항체는 ChAT(Chemicon, 1:1000), GABA(Sigma, 1:500), glutamate(Sigma, 1:1200), NR2A(Chemicon, 1:250), GluR2(Chemicon, 1:250)이다. 이후 1차 항체에 상보적인 2차 항체를 실온에서 45분간 부착하였다. 이때 사용된 2차 항체는 형광 표지된 Cy2(Jackson, 1:500), FITC(Chemicon, 1:500)으로 DiI의 Rhodamin과 다른 파장 대역을 설정하였다. 이후 모든 과정이 끝나면 mounting하여 Confocal Laser Scanning Microscope(LSM510, Carl Zeiss, Germany)으로 관찰 및 촬영하였다.

11) 세포 수 확인 및 데이터 분석

이중(double) 촬영한 슬라이드에서 DiI로 표지된 이식한 hMSCs의 수를 카운트하고 각 분화 표지자인 ChAT, GABA, glutamate, NR2A, GluR2 각각의 FITC 세포의 수를 카운트하여 각 실험동물의 해마 내 분화 표지자의 수를 DiI수로 백분율하였다. 이 때 모양과 위치가 정확히 일치되고 세포의 모양을 하고 있는 FITC의 수를 카운팅하였다. 데이터분석은 일원배치분산분석(Anova)을 통하여 대조군과 실험군을 비교하였다.

발명의 효과

상기의 구성에서 알 수 있는 바와 같이 본 발명의 Pax6 인자는 신경줄기세포에서의 신경세포 분화유도, 콜린성 신경분화유도, GAD,GABA를 생산하는 신경세포의 분화 억제, 중추신경재생효과, 줄기세포 치료 및 유전자치료에서 특정 신경세포의 수립과 분화증진 효과, 치매 및 파킨슨병들 퇴행성 뇌질환 모델에서 신경세포의 수립과 재생효과가 우수하였다.

따라서 본 발명은 다양한 종류의 퇴행성 신경질환, 신경손상 질환의 줄기세포 및 유전자 치료로서 매우 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 신경줄기세포(neural precursor cell)가 세포 증식할 때는 Pax6를 발현하지 않고 신경세포로의 분화를 시작하면서 발현하는 것을 보여준다. 신경줄기세포 HiB5는 32℃에서 배양할 때는 세포분열하고 39℃에서 배양했을 때는 분화하는 신경줄기세포의 세포주(cell line)으로, 분열할 때는 Pax6를 발현하지 않으나 분화 배양조건으로 이전 시 신경세포 분화 표지자인 Neurofilament의 발현이 시작되고 Pax6 발현 또한 증가하는 것을 면역 염색하여 관찰하였다. N2 1d: 신경세포 분화를 위한 배지인 N2 media에서 1일 동안 세포를 배양. Merged: pax6 항체와 여러 종류의 neurofilament를 인식하는 pan NF항체를 1차 항체로 사용하여 면역형광염색한 사진과 DAPI (2-(4-Amidinophenyl)-6 -indolecarbamidine Dihydrochloride: 붉은 형광 염색약)로 염색한 핵을 겹친 사진.

도 2a와 2b는 Pax6 유전자 전달에 의해 신경줄기세포인 HiB5가 특정신경세포로 분화 유도되는 것을 콜린성 신경 특이적 표지자인 choline acetyltransferase(ChAT), 글루타민성 신경세포(Glutamatergic neuron)의 표지자인 Glutamate, 가바성 신경세포(GABAergic neuron)의 표지자인 GABA로 염색하고(X200 배율) 신경교세포(astrocyte)의 표지자인 GFAP로 면역형광염색을 하여 보여주는 사진이다(X400). 도 2a에서 HiB5는 pCS3+ MT/Pax6을 electroporation방법으로 형질도입한 후 세포증식 허용온도인 32℃에서 하루 동안 안정화를 시킨 후 세포사멸과 세포분화가 시작되는 비허용온도인 39℃에서 N2배지로 교환하고(N2 3d) 신경성장인자인 Platelet-derived growth factor(PDGF: 30ng/ml)를 처리함으로써(PDGF 2d) 세포분화를 시작하고 특정 신경세포로의 분화를 유도하였다. 도 2b에서 GABA 염색 세포는 PDGF와 Brain derived growth factor(BDNF: 100ng/ml)를 처리하여 유도하였으며, Pax6를 유전자 도입하지 않은 세포(w/o tf)에서 GABA 염색이 잘 되었다. Pax6가 형질도입된 HiB5세포(w tf)는 ChAT의 발현이 증가하였고 GABA의 발현이 억제되었다. 또한 Pax6 형질도입 세포는 GFAP를 발현하지 않고, Pax6를 도입하지 않은 경우에는 GFAP로 염색되는 세포가 검출되었다. merged: pax6 항체 염색을 각각 ChAT, GABA, GFAP 항체로 면역 염색한 사진과, DAPI 염색을 겹친 사진.

도 3은 Pax6가 DNA에 결합하는데 중요한 부분인 Paired box 도메인과 Homeo도메인에 염기서열 변이를 하여 만든 pCS3+ MT/Pax6 돌연변이체를 신경줄기세포주인 HiB5에 유전자 전달하였을 때 이를 발현하는 세포는 ChAT의 발현이 감소하는 것을 염색하여 보여주고 있다. 신경세포로 분화 유도하는 N2 배지상태에서 3일간 배양한 세포(N2 3d) 중에서 Pax6 돌연변이체가 도입된 세포에서는(붉은 세포) ChAT가(녹색) 발현하지 않는다. 신경세포의 분화를 강하게 유도하는 PDGF의 처리시 전체적인 ChAT를 발현하는 세포가 증가하였다. 그러나 PDGF가 처리되었던 세포군에서도 Pax6 돌연변이체가 도입된 세포에서는 ChAT가 발현하지 않는다. Merged: Pax6항체와 ChAT항체로 면역염색하여 찍은 사진과 DAPI 염색을 겹친 사진.

도 4는 신경줄기세포인 HiB5에 Pax6 또는 Pax6 돌연변이체의 유전자 도입 후 ChAT를 발현하는 세포수를 센 것이다. 대조군은 형질도입을 하지 않은 전체 HiB5 세포(DAPI로 염색된 세포) 중에서 ChAT를 발현하는 세포의 수가 차지하는 비율을 나타낸 것이고 Pax6 tf과 Pax6 돌연변이체 tf은 각각을 형질도입한 세포 숫자 중에서 ChAT를 발현하는 세포수 비율을 나타낸 것이다. Pax6 형질도입시 대조군보다 ChAT를 발현하는 세포가 매우 증가함을 보여준다(4배 이상). 반대로 Pax6 돌연변이체를 형질도입하면 대조군과 Pax6 형질도입세포군과 비교하여 ChAT를 발현하는 세포의 비율이 현저히 감소하였다(10배 이상). 대조군은 N2 배지에서 3일 동안 배양한 것보다 PDGF 처리군에서 ChAT를 발현하는 세포의 수가 증가하였고, 이 경향은 형질도입군에서도 유사하다.(* P<0.01)

도 5는 신경줄기세포인 HiB5에 Pax6와 Pax6 돌연변이체의 형질도입후 ChAT의 발현증가와 GAD의 발현감소를 Immunoblot (western blot)으로 보여주고 있다. HiB5 세포를 N2 배지에서 2일 17시간 배양하거나, Pax6나 Pax6 돌연변이체 유전자 도입 1일 후에 PDGF로 분화 유도하여 전체 같은 시간동안 배양하여 얻은 세포 추출물(cell lysates)을 Immunoblot을 하여 ChAT 항체로 검출하였다. PDGF 처리군은 대조군에 비해 밴드의 굵기가 증가하며 Pax6를 형질도입하여 얻은 세포 추출물에서 ChAT에 의해 검출되어 나타나는 밴드의 굵기는 다른 실험군과 비교시 가장 크게 증가하였고, Pax6 돌연변이체 도입시 다시 감소하였다. Pax6 형질 도입은 사용한 cloning 벡터내 Myc tag 가 있어 이를 Myc 항체로 Immunoblot하여 검출했으나, Pax6 돌연변이체는 Myc tag가 잘 검출되지 않는다. 또한 GABA 합성 효소인 Glutamic Acid decarboxylase(GAD)의 발현은 Pax6 도입 시 감소하였고, Pax6 돌연변이체 도입 시 오히려 증가하였으므로, 이는 도 4와 일치하는 결과이다. 단백질이 동량 사용된 것은 β -tubulin 항체로 증명하였다.

도 6은 흰쥐의 배아기 14일(Embryonic day 14)된 배아 대뇌의 신경줄기세포를 일차 배양하고 pIRES2-EGFP/Pax6을 electroporation 방법으로 형질도입하여 신경세포의 분화를 유도하였다. N2 배지에서 배양하였을 때 Pax6가 형질도입된

것을 GFP항체로 검침하여 형질도입된 세포내 ChAT의 발현을 ChAT항체로 면역염색하여 보았을때 EGFP 형광이 검출되는 Pax6 형질도입된 세포내에서 ChAT의 발현이 증가하였다. PDGF를 3일 동안 처리하면 ChAT를 발현하는 세포가 증가하였으며 그중에서도 Pax6 형질도입된 세포내에서 ChAT의 발현양이 증가하였다 (x400배율).

도 7은 흰쥐 E16 배아의 대뇌세포를 일차배양한 후에 pCS3+ MT/Pax6 돌연변이체를 형질도입하여 도 6에서와 같이 신경세포의 분화를 유도하였다. N2 배지에서 3일간 배양하고 Pax6 돌연변이체가 형질도입된 것을 Myc-tag항체(붉은색 형광)로 검출하고 그 형질도입된 세포의 ChAT의 발현을 ChAT항체로 (녹색) 면역염색하여 보았을때 Pax6 형질도입된 세포내에서 ChAT의 발현이 감소하였다. PDGF를 3일동안 처리시 ChAT를 발현하는 세포가 증가하였으나 그중에서도 Pax6 돌연변이체가 형질도입된 세포내에서 ChAT의 발현이 감소한 것을 면역염색하여 보여주고 있다(Merged: 붉은색 세포). 또한 글루타민성 신경세포(Glutamatergic neuron)를 검침하는 항 Glutamate항체와 신경세포 표지자인 항 Neurofilament 200 항체로 면역염색시 Pax6 돌연변이체가 형질도입된 세포내에서는 도입되지 않는 세포와 비교하여 Glutamate, Neurofilament 200가 감소한 것을 면역염색으로 보여주고 있다. (Merged: 붉은 세포, x400배율)

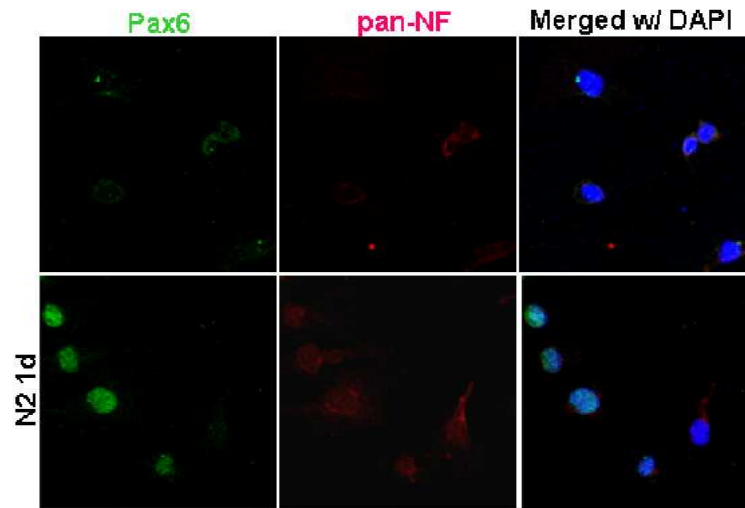
도 8은 사람 중간엽세포를 분화시키기 위하여 0.5% FBS 배지에서 배양하고 재조합 Pax6 아데노바이러스(Pax6-Ad)를 사람 중간엽세포에 감염시켰을 때 Pax6-Ad가 감염된 세포에서 ChAT의 발현이 증가한 것을 면역염색으로 보여준다. Pax6-Ad에 의해 감염되지 않은 사람 중간엽세포의 세포 추출물과 Pax6-Ad에 의해 감염된 세포 추출물, GFP-Ad 아데노 바이러스 벡터만을 감염시킨 세포 추출물을 ChAT항체로 Immunoblot하였을 때 Pax6-Ad가 감염된 cell lysate,에서 ChAT항체에 의해 검침된 밴드가 나타난 것을 보여주고 있다.

도 9a는 사람 중간엽 줄기세포를 흰쥐의 해마 부위에 뇌이식하고 12주 후에 신경특이적 표지자들 (콜린성 신경세포표지자(ChAT), GABA성 신경세포표지자(GABA), 글루타메이트성 신경세포표지자(Glutamate), NMDA 수용체표지자(NMDA receptor 2A:NR2A), 글루타메이트 수용체2(Glutamate receptor2:GluR2))로 면역 조직 화학법을 시행하여 공초점 레이저 주사 현미경으로 촬영한 사진이다(X400배율, 지시막대: 20 μ m). 사진에서 표시된 가로축의 DiI는 뇌이식한 사람 중간엽 줄기세포의 붉은색 염색을 나타내고, FITC는 위에서 설명된 각 신경세포 특이적표지자(세로축 배열)를 나타낸 것이며, Merged는 두 가지의 사진을 병합하여 표시한 것이다. 뇌이식 후 12주가 지나면 사람 중간엽 줄기세포가 흰쥐 뇌 해마부위에서 각종 신경세포로 분화하여 분포되어 있는 것을 확인할 수 있다. 도 9b는 사람 중간엽 줄기세포에 Pax6-Ad를 감염시켜 이식한 후 12주 후에 9a와 마찬가지로 면역 조직 화학법을 시행하여 보여주는 사진이다(X400배율, 지시막대: 20 μ m). 사진에서 표시된 가로축의 DiI는 뇌이식한 사람 중간엽줄기세포의 붉은색 염색을 나타내고, Pax6-GFP는 Pax6가 과발현되는 세포를 구별하기 위해 GFP-IRES-Pax6-Ad로 감염하고 GFP를 형광염색한 세포를 나타낸 것이며, Cy5는 위에서 설명된 각 신경 세포특이적 표지자(세로축 배열)를 나타낸 것이다. Merged는 세 가지의 사진을 병합하여 표시한 것으로서 Pax6-Ad의 효과를 나타내는 세포를 공초점 레이저 주사 현미경으로 촬영한 사진이다. Pax6-Ad로 감염된 세포는 ChAT를 많이 발현하고 glutamate, NMDA 수용체(NR2A), AMPA 수용체(GluR2)도 다량 포함하나 GABA는 매우 적게 생산하는 것을 보여준다. 도 9c는 사람 중간엽 줄기세포에 Pax6-Ad 감염하여 흰쥐 해마 부위에 뇌이식한 실험군과 GFP-Ad를 감염한 대조군의 각종 신경 특이적 표지자 발현을 조사하였다. 세포 이식된 뇌절편 염색 후에 해마 부위에서 세포수를 측정하여 전체 이식된 세포 중 염색된 세포의 백분율을 나타낸 분화양상 그래프이다(* p<0.05, 대조군: hMSCs). Pax6-Ad 감염된 중간엽 줄기세포들은 대조군에 비해 ChAT를 많이 발현하고 glutamate, NMDA 수용체(NR2A), AMPA 수용체(GluR2) 생산도 증가하였으나, GABA 생산의 증가는 유의하지 않았으므로 도 9b의 결과를 뒷받침한다.

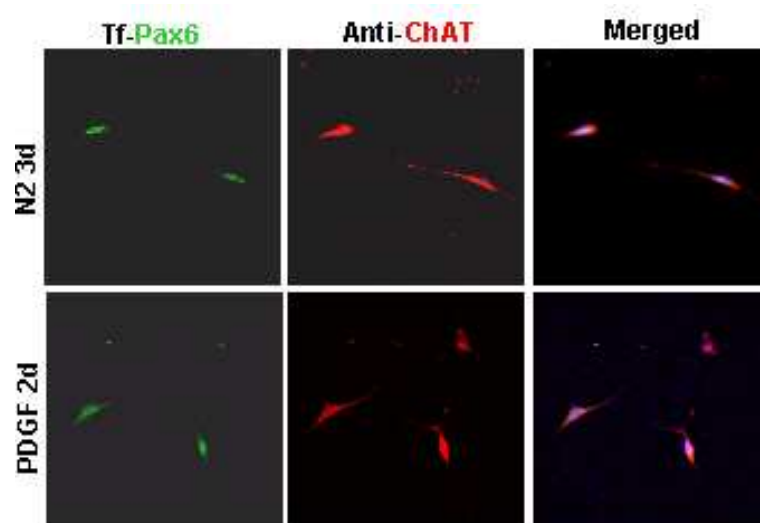
도 10a는 뇌질환 동물 모델을 만들기 위해 신경독소인 이보테닉 산(Ibotenic acid)을 측뇌에 주입하여 치매를 유도한 대조군과, Pax6-Ad를 감염시켜 Pax6의 과발현을 유도한 사람 중간엽 줄기세포, 또는 감염되지 않은 사람 중간엽 줄기세포를 흰쥐 뇌 해마 부위에 이식한 실험군의 공간 지각적 기억력을 검사한 Y maze 시험 결과의 그래프이다(* p<0.05, 대조군: Ibo). 행동 측정 결과 대조군에 비해 중간엽세포를 뇌이식한 경우(hMSCs, Pax6-Ad) 모두 유의하게 공간 지각력이 향상되었으며, 8분 측정 후에는 Pax6-Ad 감염된 세포를 이식한 경우 더욱 향상되었다. 또 도 10b는 대조군과 실험군의 자극 반응에 대한 기억력 검사인 Passive avoidance 시험 결과의 그래프를 나타내고 있다(* p<0.05, ** p<0.01). 행동 측정 검사 결과 대조군에 비해 중간엽세포를 뇌이식한 경우(hMSCs) 유의하게 공간 지각력이 향상되었으며(약 10 배), Pax6-Ad 감염된 세포를 이식한 경우 더욱 현저하게 향상되었다(약 20배).

도면

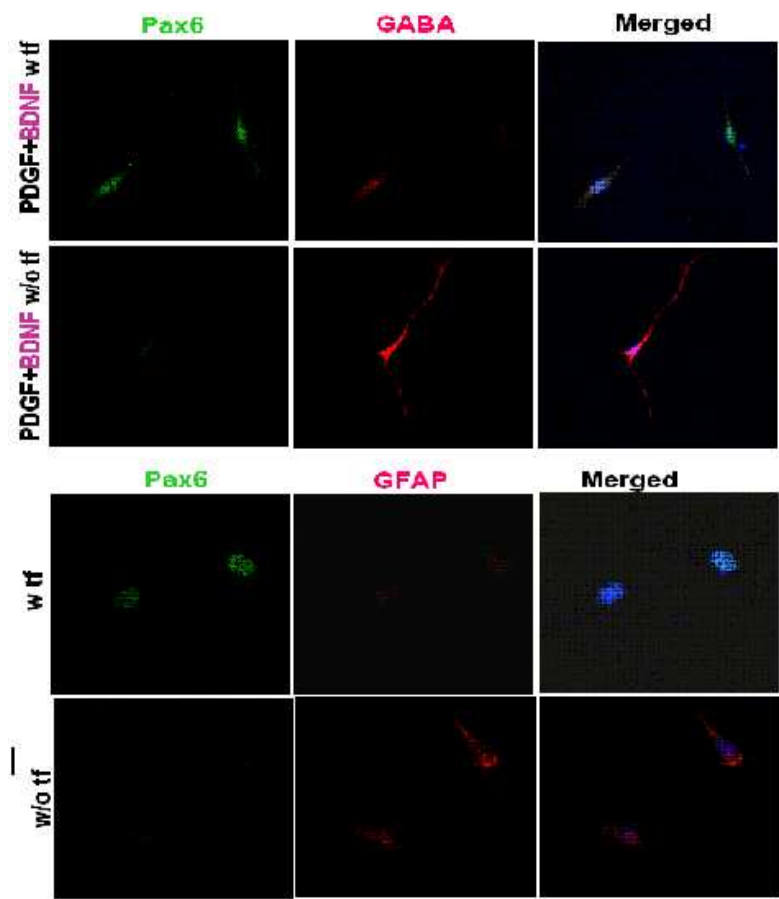
도면1



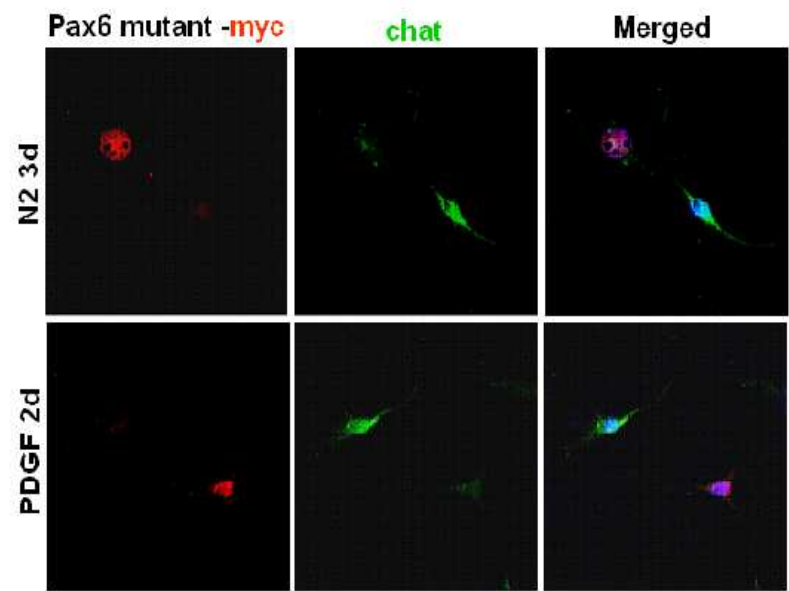
도면2a



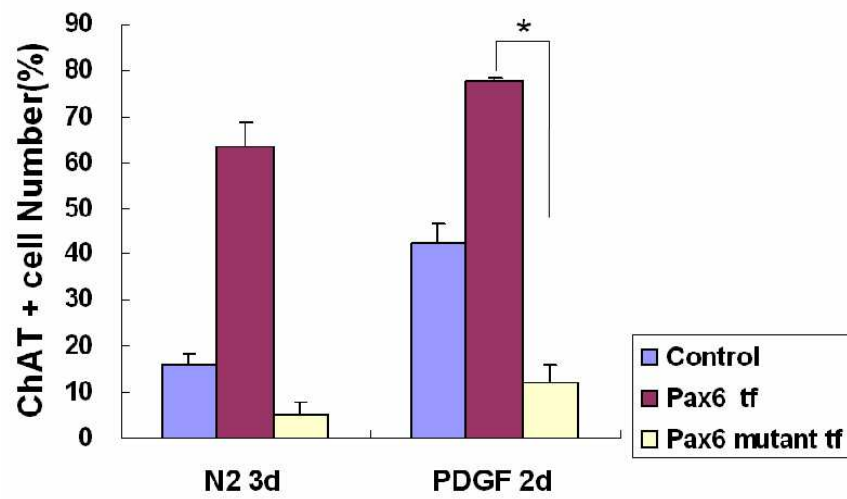
도면2b



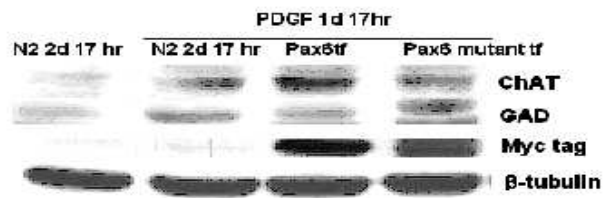
도면3



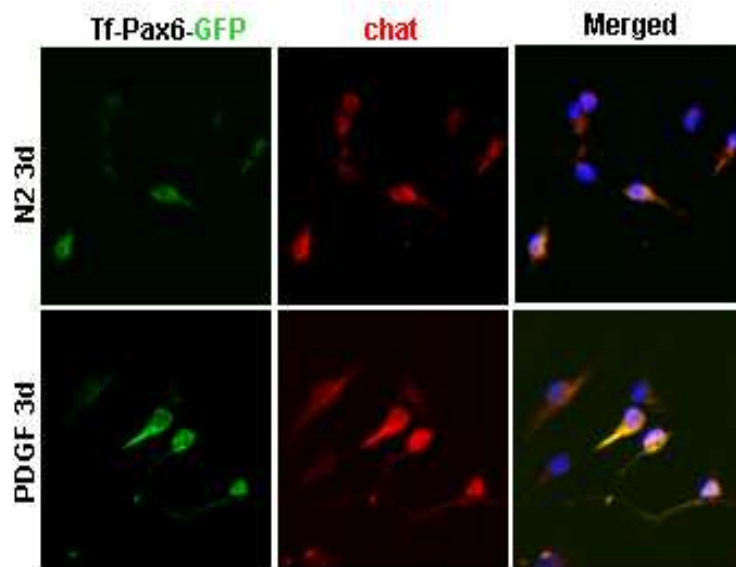
도면4



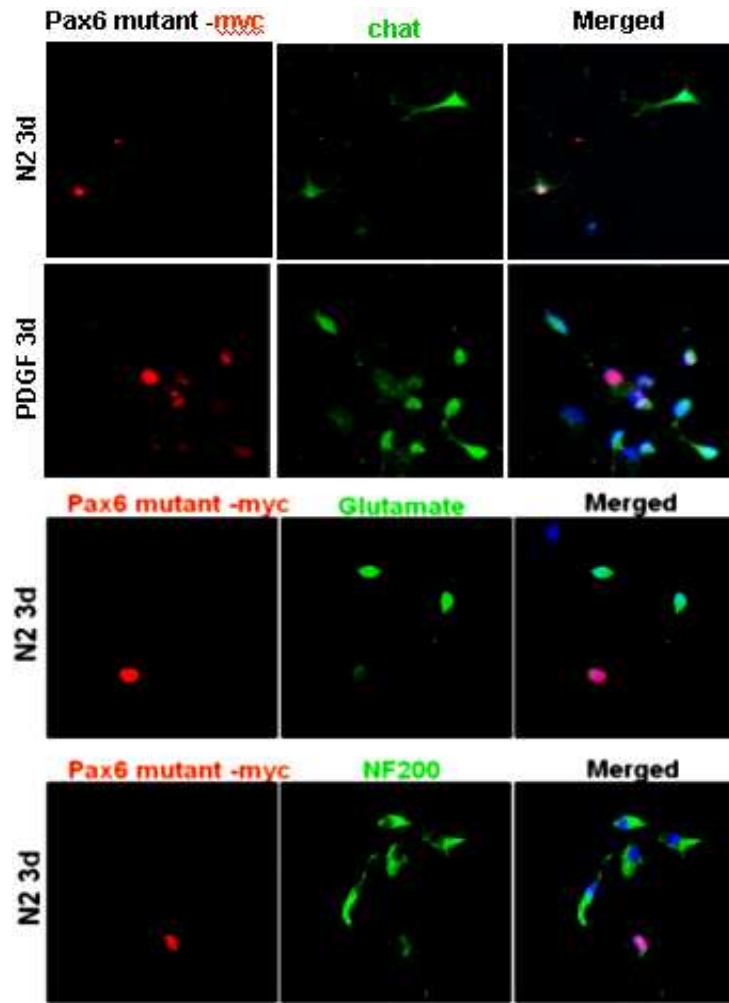
도면5



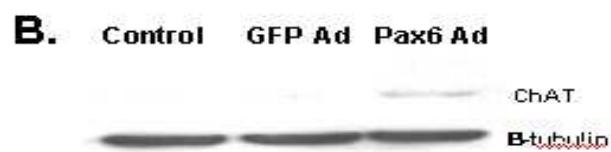
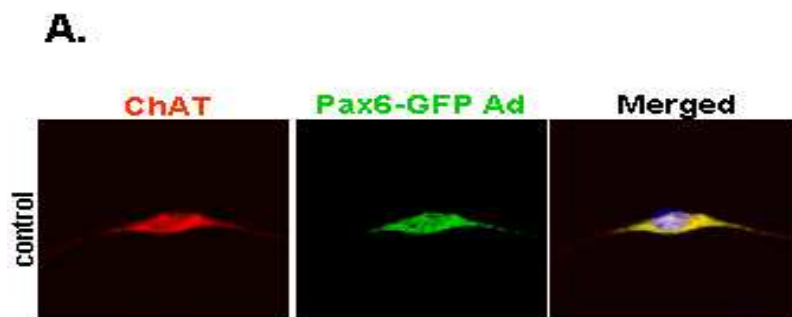
도면6



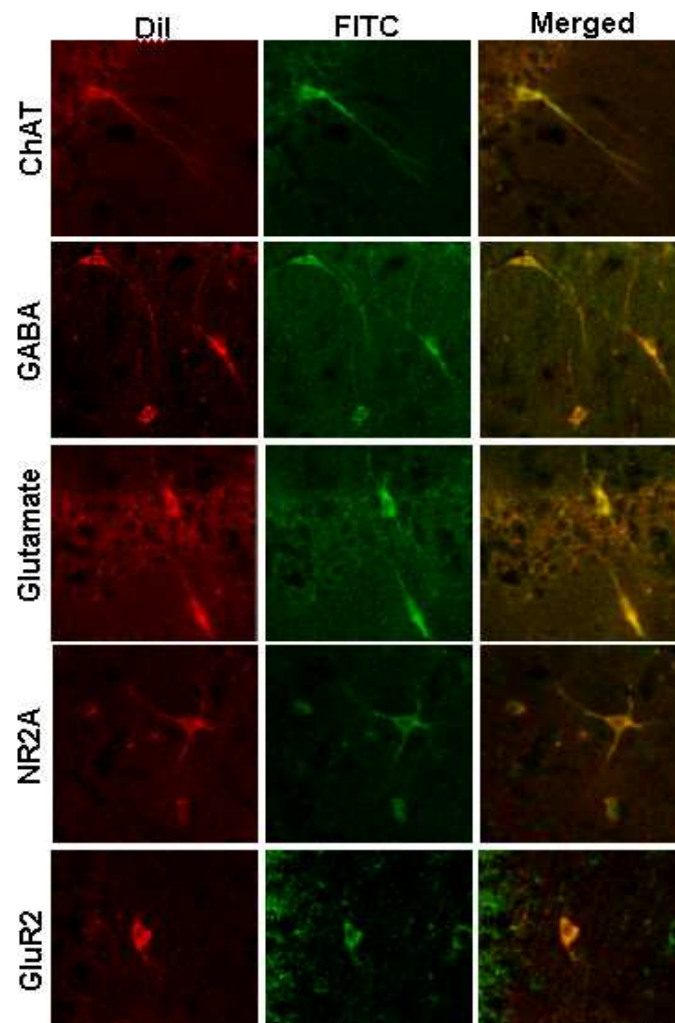
도면7



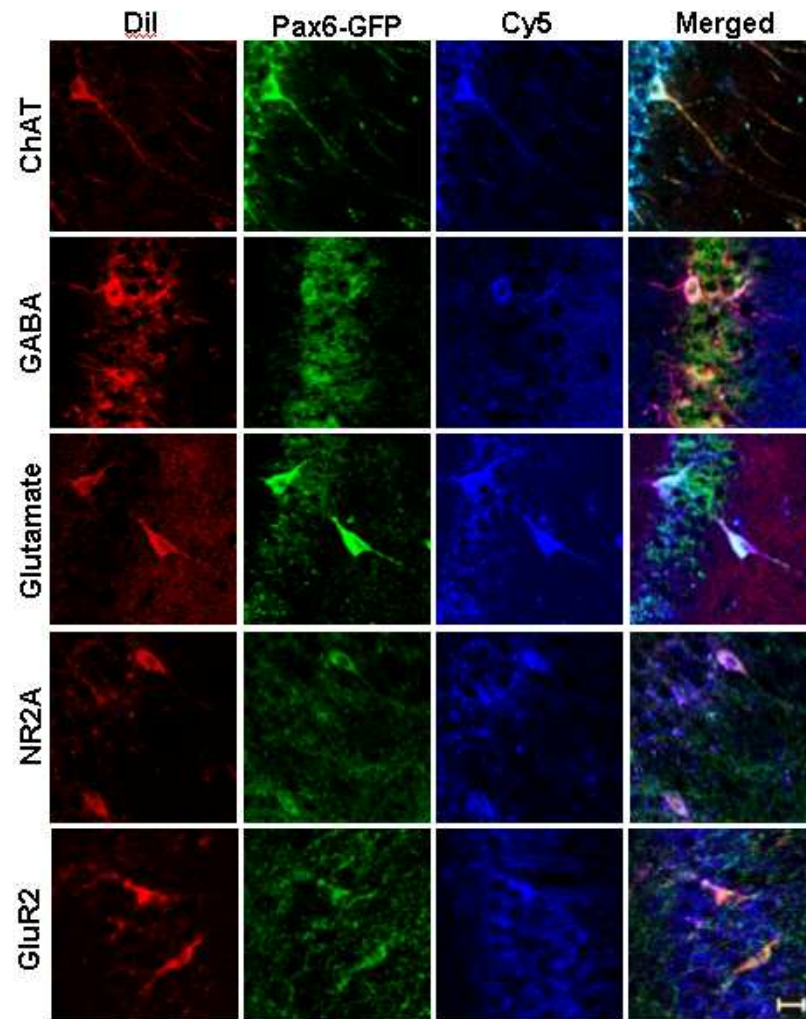
도면8



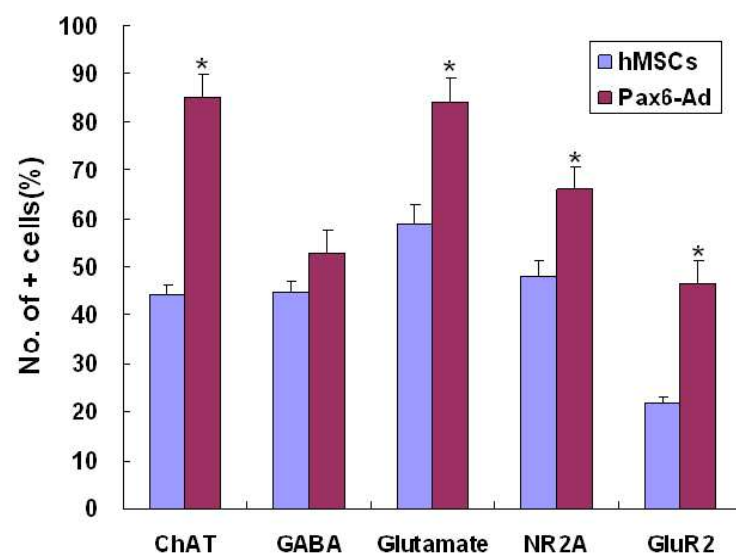
도면9a



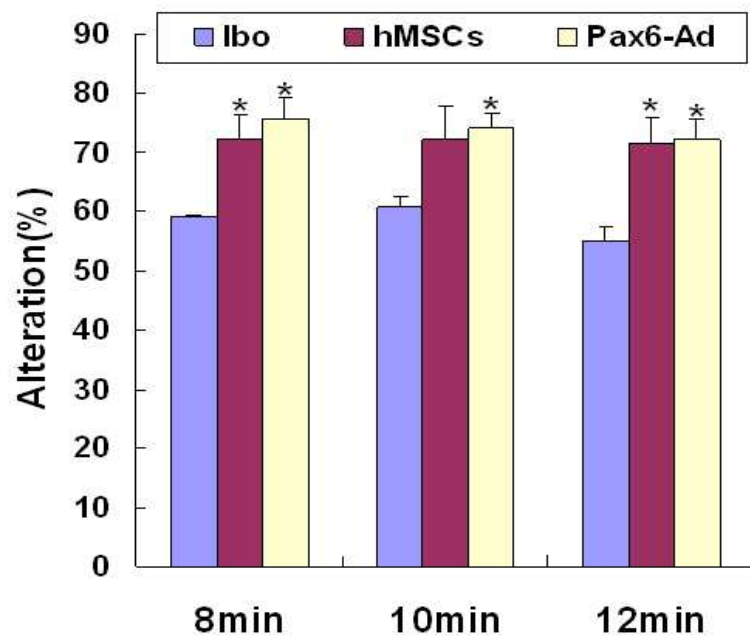
도면9b



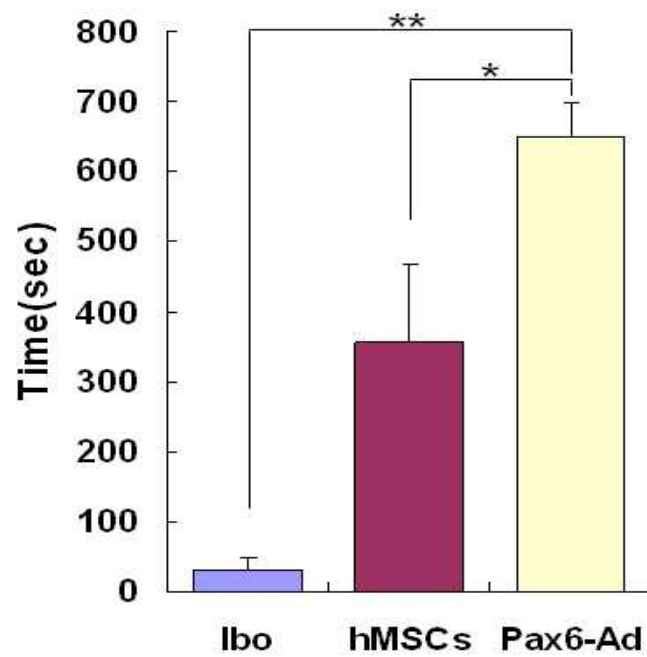
도면9c



도면10a



도면10b



서열목록

<110> Kyung Hee Univ. Office of Research University-Industry Cooperation

<120> Composition for treating neurologic diseases comprising Pax6

<160> 4

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 422

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gln Asn Ser His Ser Gly Val Asn Gln Leu Gly Gly Val Phe Val
1 5 10 15

Asn Gly Arg Pro Leu Pro Asp Ser Thr Arg Gln Lys Ile Val Glu Leu
20 25 30

Ala His Ser Gly Ala Arg Pro Cys Asp Ile Ser Arg Ile Leu Gln Val
35 40 45

Ser Asn Gly Cys Val Ser Lys Ile Leu Gly Arg Tyr Tyr Glu Thr Gly
50 55 60

Ser Ile Arg Pro Arg Ala Ile Gly Gly Ser Lys Pro Arg Val Ala Thr
65 70 75 80

Pro Glu Val Val Ser Lys Ile Ala Gln Tyr Lys Arg Glu Cys Pro Ser
85 90 95

Ile Phe Ala Trp Glu Ile Arg Asp Arg Leu Leu Ser Glu Gly Val Cys
100 105 110

Thr Asn Asp Asn Ile Pro Ser Val Ser Ser Ile Asn Arg Val Leu Arg
115 120 125

Asn Leu Ala Ser Glu Lys Gln Gln Met Gly Ala Asp Gly Met Tyr Asp
130 135 140

Lys Leu Arg Met Leu Asn Gly Gln Thr Gly Ser Trp Gly Thr Arg Pro
145 150 155 160

Gly Trp Tyr Pro Gly Thr Ser Val Pro Gly Gln Pro Thr Gln Asp Gly
165 170 175

Cys Gln Gln Gln Glu Gly Gly Gly Glu Asn Thr Asn Ser Ile Ser Ser
180 185 190

Asn Gly Glu Asp Ser Asp Glu Ala Gln Met Arg Leu Gln Leu Lys Arg
195 200 205

Lys Leu Gln Arg Asn Arg Thr Ser Phe Thr Gln Glu Gln Ile Glu Ala
210 215 220

Leu Glu Lys Glu Phe Glu Arg Thr His Tyr Pro Asp Val Phe Ala Arg
225 230 235 240

Glu Arg Leu Ala Ala Lys Ile Asp Leu Pro Glu Ala Arg Ile Gln Val
245 250 255

Trp Phe Ser Asn Arg Arg Ala Lys Trp Arg Arg Glu Glu Lys Leu Arg
260 265 270

Asn Gln Arg Arg Gln Ala Ser Asn Thr Pro Ser His Ile Pro Ile Ser
275 280 285

Ser Ser Phe Ser Thr Ser Val Tyr Gln Pro Ile Pro Gln Pro Thr Thr
290 295 300

Pro Val Ser Ser Phe Thr Ser Gly Ser Met Leu Gly Arg Thr Asp Thr
305 310 315 320

Ala Leu Thr Asn Thr Tyr Ser Ala Leu Pro Pro Met Pro Ser Phe Thr
325 330 335

Met Ala Asn Asn Leu Pro Met Gln Pro Pro Val Pro Ser Gln Thr Ser
340 345 350

Ser Tyr Ser Cys Met Leu Pro Thr Ser Pro Ser Val Asn Gly Arg Ser
355 360 365

Tyr Asp Thr Tyr Thr Pro Pro His Met Gln Thr His Met Asn Ser Gln
370 375 380

Pro Met Gly Thr Ser Gly Thr Thr Ser Thr Gly Leu Ile Ser Pro Gly
385 390 395 400

Val Ser Val Pro Val Gln Val Pro Gly Ser Glu Pro Asp Met Ser Gln
405 410 415

Tyr Trp Pro Arg Leu Gln
420

<210> 2

<211> 2816

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gtgattagtg ggtttgaaaa gggaaccgtg gctcggcctc atttcccgtc ctggttcagg 60

cgcaggagga agtgtttttc tggaggatga tgacagaggt caggcttcgc taatgggcca 120

gtgaggagcg gtggaggcga ggccggggcg cggcacacac acattaacac acttgagcca 180

tcaccaatca gcataggaat ctgagaattg ctctcacaca ccaaccagc aacatccgtg 240

gagaaaactc tcaccagcaa ctcttttaaa acaccgtcat ttcaaaccat tgtggtcttc	300
aagcaacaac agcagcacia aaaaccccaa ccaaacaaaa ctcttgacag aagctgtgac	360
aaccagaaaag gatgcctcat aaagggggaa gactttaact aggggcgcg c agatgtgtga	420
ggccttttat tgtgagagt gacagacatc cgagatttca gagccccata ttcgagcccc	480
gtggaatccc gcgcccccca gccagagcca gcatgcagaa cagtcacagc ggagtgaatc	540
agctcggtgg tgtctttgtc aacggggcgg cactgccgga ctccacccgg cagaagattg	600
tagagctagc tcacagcggg gcccgccgt ggcacatttc ccgaattctg caggtgtcca	660
acggatgtgt gagtaaaatt ctgggcaggt attacgagac tggctccatc agaccagg	720
caatcggtgg tagtaaaccc agagtagcga ctccagaagt tgtaagcaaa atagcccagt	780
ataagcggga gtgcccgtcc atctttgctt gggaaatccg agacagatta ctgtccgagg	840
gggtctgtac caacgataac ataccaagcg tgtcatcaat aaacagagtt cttcgcaacc	900
tggctagcga aaagcaacag atgggcgag acggcatgta tgataaacta aggatgttga	960
acgggcagac cggaagctgg ggcacccgcc ctggttggt tccggggact tcggtgccag	1020
ggcaacctac gcaagatggc tgccagcaac aggaaggagg gggagagaat accaactcca	1080
tcagttccaa cggagaagat tcagatgagg ctcaaatgcg acttcagctg aagcggaagc	1140
tgcaaagaaa tagaacatcc tttacccaag agcaaattga ggccctggag aaagagtttg	1200
agagaaccca ttatccagat gtgtttgccc gagaaagact agcagccaaa atagatctac	1260
ctgaagcaag aatacaggta tggttttcta atcgaagggc caaatggaga agagaagaaa	1320
aactgaggaa tcagagaaga caggccagca acacacctag tcatatctct atcagcagta	1380
gtttcagcac cagtgtctac caaccaattc cacaaccac cacaccggtt tcctccttca	1440
catctggctc catgttgggc cgaacagaca cagccctcac aaacacctac agcgctctgc	1500
cgcctatgcc cagcttcacc atggcaaata acctgcctat gcaaccccca gtccccagcc	1560
agacctctc atactcctgc atgctgcca ccagcccttc ggtgaatggg cggagttatg	1620
atacttacac cccccacat atgcagacac acatgaacag tcagccaatg ggcacctcg	1680
gcaccacttc aacaggactc atttcccctg gtgtgtcagt tccagttcaa gttcccggaa	1740
gtgaacctga tatgtctcaa tactggccaa gattacagta aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1800

aaggaaagga aatatttgtgt taattcagtc agtgactatg gggacacaac agttgagctt 1860
tcaggaaaga aagaaaaatg gctgtagag ccgcttcagt tctacaattg tgtcctgtat 1920
tgtaccactg gggaaggaat ggacttgaaa caaggacctt tgtatacaga aggcacgata 1980
tcagttggaa caaatcttca ttttggtatc caaactttta ttcatttttg tgtattat 2040
gtaaatgggc atttgtatgt tataatgaaa aaaagaacaa tgtagactgg atggatgttt 2100
gatctgtgtt ggtcatgaag ttgttttttt tttttttaa aagaaaacca tgatcaacaa 2160
gctttgccac gaatttaaga gttttatcaa gatatatcga atacttctac ccatctgttc 2220
atagtttatg gactgatgtt ccaagtttgt atcattcctt tgcatataat taaacctgga 2280
acaacatgca ctagatttat gtcagaaata tctgttggtt ttccaaagg tgttaacaga 2340
tgaagtttat gtgcaaaaaa gggtaagata taaattcaag gaagaaaaaa agttgatagc 2400
taaaaggtag agtgtgtctt cgatataatc caatttggtt tatgtcaaaa tgtaagtatt 2460
tgtcttcctt agaaatcctc agaatgattt ctataataaa gttaatttca tttatatttg 2520
acaagaatat agatgtttta tacacatttt catgcaatca tacgtttctt ttttgccag 2580
caaaagttaa ttgttcttag atatagttgt attactgttc acgggtccat cattttgtgc 2640
atctagagtt cattcctaata caattaaaag tgcttgcaag agtttttaaac ttaagtgttt 2700
tgaagttgtt cacaactaca tatcaaaatt aaccattgtt gattgtaaaa aaccatgcca 2760
aagcctttgt atttccttta ttatacagtt ttctttttta ccttaaaaaa aaaaaa 2816

<210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Up primer for Pax6

<400> 3
agccagcatg cagaacag 18

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Down primer for Pax6

<400> 4

ttttactgta atcttggcca

20