



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0046189
(43) 공개일자 2018년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) G01N 33/50 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/027 (2013.01)
G01N 33/5088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0141139
(22) 출원일자 2016년10월27일
심사청구일자 2016년10월27일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
강동호
서울특별시 마포구 광성로6길 16 (신수동)
홍빛나
경기도 성남시 분당구 판교원로82번길 30, 1304동 901호 (운중동, 산운마을13단지아파트)
남윤희
경기도 수원시 권선구 금호로 55, 1동 101호 (금곡동, 장미빌라)
(74) 대리인
안소영

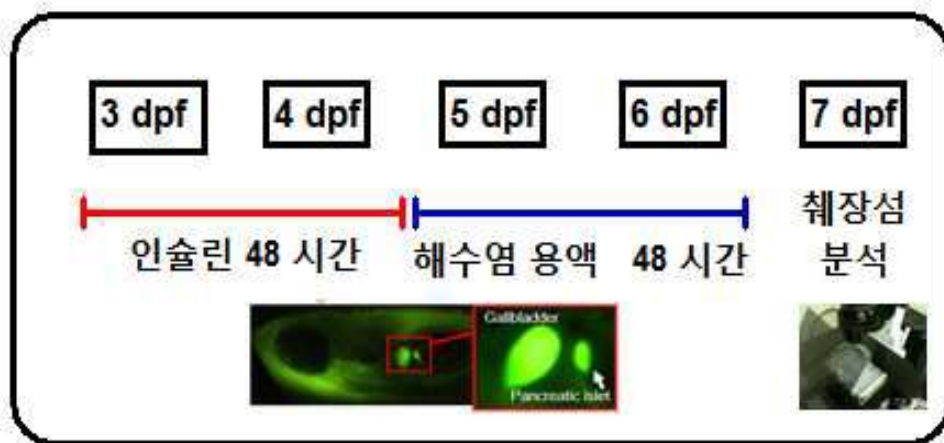
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 당뇨병 동물모델 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 과다 인슐린으로 유발된 인슐린 저항성에 의한 당뇨병 동물모델 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 당뇨병 제브라피쉬 동물모델은 인슐린 노출에 의해 간단히 인슐린 저항성을 유발시킬 수 있으며, 미세주입과 같은 고도의 기술이 필요하지 않으므로 비용 및 시간을 감소시킬 수 있어 당뇨병 제브라피쉬 동물 모델, 특히 제2형 당뇨병 제브라피쉬 동물 모델로서 효율적이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A01K 2207/10 (2013.01)
A01K 2227/40 (2013.01)
A01K 2267/0362 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2015R1D1A1A09060469
부처명	교육부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	이공학 기초연구사업
연구과제명	전통한약을 이용한 청각기능 손상 치료 효능 연구
기 여 율	1/1
주관기관	경희대학교
연구기간	2015.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

- (a) 제브라피쉬 치어를 인슐린에 노출시키는 단계; 및
- (b) 상기 (a) 단계에서 인슐린에 노출된 제브라피쉬 치어를 해수염 용액에서 배양하는 단계;를 포함하는 당뇨병 환 제브라피쉬 동물모델의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 제브라피쉬 치어는 수정 2 내지 4일 후(day post fertilization)의 치어인 당뇨병 환 제브라피쉬 동물모델의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계의 인슐린에 노출은 인슐린이 5 내지 15 μ M의 농도로 24 내지 72 시간 동안 배지에 첨가되어 수행되는 것인 당뇨병 환 제브라피쉬 동물모델의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (b) 단계의 해수염 용액에서 (a) 단계에서 인슐린에 노출된 제브라피쉬 치어의 배양은 24 내지 72 시간 동안 수행되는 것인 당뇨병 환 제브라피쉬 동물모델의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 당뇨병 환 제브라피쉬 동물모델은 인슐린 저항성에 의한 제2형 당뇨병 또는 당뇨병성 신경병증 제브라피쉬 동물모델인 당뇨병 환 제브라피쉬 동물모델의 제조방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 당뇨병 환 제브라피쉬 동물모델.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 당뇨병 환은 제2형 당뇨병 또는 당뇨병성 신경병증인 당뇨병 환 제브라피쉬 동물모델.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 당뇨병 환 제브라피쉬 동물모델은, (a) 췌장섬 크기의 감소; (b) 베타세포 크기의 감소; (c) 글루코스 흡수의 감소; 및 (d) 신경소구(neuromast)의 감소 및 (e) 헤어셀(hair cell) 개수의 감소로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 특성을 갖는 것인 당뇨병 환 제브라피쉬 동물모델.

청구항 9

- (a) 제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 제브라피쉬 동물모델을 시험물질에 노출시키는 단계; 및
- (b) 시험물질에 노출시키지 않은 대조군과 대비하여 췌장섬의 크기 증가, 베타세포의 크기 증가, 글루코스 흡수의 증가 및 신경소구의 증가로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 시험물질의 선별을 위한 인자를 측정하는 단계;
- (c) 대조군과 대비하여 상기 측정된 인자의 증가를 보이는 물질을 선별하는 단계를 포함하는 항당뇨 물질의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 과다 인슐린으로 유발된 당뇨병환 제브라피쉬 동물모델 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 당뇨병(糖尿病, diabetes mellitus)은 대표적인 만성 대사성 질환으로 인슐린의 비정상적 작용으로 인한 혈당치의 증가로 소변으로 당을 배출하는 질환이다. 당뇨병은 발생기전에 따라 제1형 당뇨병(인슐린 의존형 당뇨병)과 제2형 당뇨병(인슐린 비의존형 당뇨병)으로 분류하고 있으며, 그 중 제2형 당뇨병이 전체 당뇨병 환자의 약 95% 이상을 차지한다(Diabet Med.14 Suppl 5:S1-85; 1997). 제1형 당뇨병은 췌장 베타세포를 파괴하는 자가 면역과정이 주원인으로 인슐린의 분비 부족 또는 완전한 결핍이 특징이다. 제2형 당뇨병은 인슐린 저항성, 베타세포 기능저하, 유전적 소인 등의 상호작용으로 발생한다. 제2형 당뇨병의 경우 인슐린 저항성을 극복하기 위하여 인슐린 분비가 증가하다가 어느 한도를 넘으면 더 이상 증가하지 못하여 혈당이 높아지고 당뇨병으로 발전하게 된다.

[0003] 현재 당뇨병 연구를 위한 동물 모델로는 mice나 rat 등의 동물에 알록산이나 스트렙토조토신(streptozotocin)을 주사하여 베타세포를 선택적으로 파괴하여 실험동물을 만드는 방법이 있다. 또한 비만증 및 당뇨병 연구에 흔히 사용하는 동물모델은 인간의 제2형 당뇨병과 유사한 동물 모델들이 다양한 유전적, 실험적, 그리고 영양학적인 원인을 가지고서 여러 가지 종(species)이 존재한다. 우선 고려사항 중에 하나는 췌장 베타세포의 기능의 유지 정도에 따라서 비교적 잘 유지되는 모델과 질병이 진행됨에 따라 인간의 제2형 당뇨병 환자와 비슷하게 베타세포 기능이 점차 감소되는 모델이 있다. 유지되는 모델의 대표적인 예는 심한 고인슐린혈증과 비교적 경도의 고혈당을 보이며 베타세포의 인슐린 분비능을 유지하는 Zucker fatty rats (ZFR), ob/ob (obese), KK mouse, corpulent (cp) rat group 등이 있다.

[0004] 최근 당뇨병 동물모델로 제브라피쉬 모델이 많은 연구에 활용되고 있다. 제브라피쉬 (*Danio rerio*)는 인도산 잉어과의 소형 열대어 척추동물로서, 인간과 유전자의 크기 및 수가 비슷하고 신경계 및 기관형성 과정이 유사하여 설치류 동물모델의 대체 실험모델로 활용되고 있다. 특히 제브라피쉬 치어의 경우 투명하여 형광염색을 하여 장기 및 특정세포들의 분화과정을 생체 내에서 관찰할 수 있다는 점이 큰 장점으로 활용되고 있다.

[0005] 제브라피쉬 1형 당뇨병모델의 경우, 제브라피쉬를 알록산에 노출시켜 췌장섬의 크기와 형광강도를 측정하여 정상 군에 비해 현저히 감소됨을 보여주었다. 또한 알록산으로 당뇨 유발 후에, 글리메피라이드(Glimepiride) 등의 항-당뇨 물질을 투여하여, 췌장섬의 크기가 회복 되는 것을 보여주었다 (J Agric Food Chem. 17;63(23):5612-21; 2015). 제브라피쉬 2형 당뇨병모델의 경우, 제브라피쉬 배아 (embryo)에 직접 인슐린을 주입하여 인슐린 저항성을 유발한 모델이 보고되었다 (J Endocrinol. 222(2):229-41; 2014). 이 모델의 경우 PTPN6 (Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 6)의 레벨의 정량을 통해 PTPN6 발현이 증가함을 확인하여 인슐린 저항성 모델로 활용되고 있다.

[0006] 그러나 제브라피쉬 배아에 각각 인슐린을 주입하는 방법은 고도의 기술과 실험적 시간, 노동, 그에 따른 경제적 비용의 부담으로 제브라피쉬를 이용한 실험에 많은 제약을 주고 있다. 특히 제브라피쉬 실험은 약물효능 검색 등 대량의 물질 검색 시 사용되는 모델로서, 위와 같은 당뇨유발 방법은 실험의 효율성이 매우 낮아 활용되기 어렵다.

[0007] 이러한 배경 하에서, 빠르고 간편하며 형태학적으로 당뇨임을 입증할 수 있는 당뇨병환 동물모델의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Nam YH et al. J Agric Food Chem. 17;63(23):5612-21; 2015

(비특허문헌 0002) Ruben Marin-Juez et al. J Endocrinol. 222(2):229-41; 2014

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 제브라피쉬에 인슐린을 노출시켜 인슐린 저항성을 유발한 당뇨병 제브라피쉬 동물모델 및 이의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 제브라피쉬 동물모델을 이용한 해당노 물질의 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 제브라피쉬를 인슐린에 노출시켜 인슐린 저항성을 유발한 당뇨병 제브라피쉬 동물모델의 제조방법을 제공한다.
- [0012] 구체적으로, 본 발명은 (a) 제브라피쉬 치어를 인슐린에 노출시키는 단계; 및
- [0013] (b) 상기 (a) 단계에서 인슐린에 노출된 제브라피쉬 치어를 해수염 용액에서 배양하는 단계를 포함하는 당뇨병 제브라피쉬 동물모델의 제조방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명자들은 빠르고 간편하며 형태학적으로 당뇨임을 입증할 수 있는 당뇨병 동물모델을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 인슐린 저항성을 유발시키기 위하여 제브라피쉬에 직접 인슐린을 주입하지 않고, 인슐린에 노출 시킴으로써 인슐린 저항성에 의한 당뇨병이 유발되는 것을 확인하였다.
- [0015] 본 발명에 따른 당뇨병 제브라피쉬 동물모델 제조방법은, 제브라피쉬에 인슐린을 직접 주사하여 저항성을 유발하는 방법에 비해 시간, 인력 및 비용에 있어 경제적이고 효율적이며, 특히 본 발명에 따른 당뇨병 제브라피쉬 동물모델의 제조방법은 인슐린 저항성을 유발하여 제조되는 동물모델을 제공하기 때문에 인슐린 저항성에 의한 제2형 당뇨병 또는 당뇨병성 신경병증 동물모델을 제공하는데 적합하다.
- [0016] 본 발명에서의 용어 "노출"이란, 제브라피쉬가 물질과 맞닿는 것을 의미한다. 본 발명에 제브라피쉬를 인슐린에 노출시키는 방법은 제브라피쉬와 인슐린을 맞닿게 할 수 있는 어떠한 경우도 포함되며, 예컨대 제브라피쉬가 배양 또는 유지되는 배지에 상기 인슐린을 첨가하여 제브라피쉬와 인슐린이 존재하는 환경에 놓이게 하는 것을 포함한다.
- [0017] 본 발명의 제브라피쉬는 제브라피쉬 치어(zebrafish larvae)이며, 구체적으로 수정 2일 내지 4일 후, 바람직하게 3일 후(3 day post fertilization)의 치어일 수 있다. 이러한 제브라피쉬 치어는 온몸이 투명한 특성으로 인해 생체 내 장기 및 세포들의 분화과정을 관찰할 수 있으며, 작은 체적 사이즈로 인해 관리 및 하우징(housing)이 용이하다.
- [0018] 본 발명의 동물모델 제조방법은 제브라피쉬 치어를 인슐린에 노출시켜 인슐린 저항성에 의한 당뇨병을 유발하며, 상기 인슐린은 5 내지 15 μ M의 농도로 배지에 첨가되어 24 내지 72 시간 동안 노출시킬 수 있고, 바람직하게는 6 내지 12 μ M의 농도로 24 내지 60시간, 보다 바람직하게는 8 내지 11 μ M의 농도로 36 내지 50시간, 가장 바람직하게는 10 μ M의 농도에서 48시간 배지에서 노출시킬 수 있다. 상기 농도 및 시간의 범위를 초과하는 경우, 제브라피쉬의 체장섬이 완전히 소실되는 문제가 있으며, 상기 범위에 미치지 못하는 경우 체장섬의 손상이 발생하지 않아 적합한 인슐린 저항성 당뇨병 모델로 성립될 수 없는 문제가 발생하게 된다.
- [0019] 위 인슐린 노출 후의 제브라피쉬 치어는 해수염 용액에 24 내지 72시간 바람직하게는 24 내지 48 시간, 보다 바람직하게는 48시간 동안 배양됨으로써 인슐린 저항성이 유발된 제브라피쉬 동물모델을 제공하게 된다. 해수염 용액에서의 제브라피쉬 유지는 과도한 인슐린 노출 후 체장섬 형성 및 인슐린 저항성을 유발하기 위해 필요하다.
- [0020] 본 발명은 또한 상기 제조방법에 의해 제조된 당뇨병 제브라피쉬 동물모델을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 제브라피쉬 동물모델은 제조과정이 단순하며 적은 용량의 인슐린으로도 단기간 내 당뇨병 모델을 유발하여 연구기간, 경제적 비용 및 인력을 획기적으로 줄이면서도, 안정적인 당뇨병 질환 동물모델을 제공하는 장점이 있다.
- [0022] 본 발명의 당뇨병 제브라피쉬 모델은 (a) 체장섬 크기의 감소, (b) 베타세포 크기의 감소, (c) 글루코스 흡수의 감소, (d) 신경소구(neuromast)의 감소 및 (e) 헤어셀(hair cell) 개수의 감소로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 특성을 확인함으로써 당뇨병, 바람직하게 제2형 당뇨병 또는 당뇨병성 신경병증이 유발되었음을

확인할 수 있다.

- [0023] 본 발명에 따른 당뇨 질환 제브라피쉬 동물 모델은 과다 인슐린에 노출시킴으로써 제브라피쉬의 신경소구(neuromast) 및 헤어셀의 개수가 감소되는 것이 확인되었다. 따라서, 본 발명에 따른 당뇨질환 제브라피쉬 동물 모델은 당뇨병성 신경병증(Diabetic Neuropathy) 모델로서 사용될 수 있다. 당뇨병성 신경병증은 당뇨에 따른 합병증으로서 여러 종류의 신경병증이 동시에 나타나는 경우가 많으며, 심한 통증 및 운동성 상실 등을 그 대표적인 증상으로 가진다.
- [0024] 또한 인슐린 저항성에 따른 제2형 당뇨병 제브라피쉬 동물모델로도 사용 가능하다.
- [0025] 즉 본 발명의 당뇨질환 제브라피쉬 모델은 인슐린 저항성에 의한 제2형 당뇨병 또는 당뇨병성 신경병증 동물모델로 바람직하다.
- [0026] 본 발명은 또한 본 발명의 제브라피쉬 모델을 이용한 항당뇨물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 항당뇨 물질의 스크리닝 방법은 당뇨 치료제의 안전성과 유효성 분석 및 당뇨 치료제 개발에 적용될 수 있으며, 대규모의 스크리닝 프로그램에 적합하다.
- [0028] 구체적으로, 본 발명은 (a) 본 발명의 당뇨질환 제브라피쉬 동물모델의 제조방법에 의해 제조된 제브라피쉬 동물모델을 시험물질에 노출시키는 단계; 및
- [0029] (b) 시험물질에 노출시키지 않은 대조군과 대비하여 췌장섬의 크기 증가, 베타세포의 크기 증가, 글루코스 흡수의 증가 및 신경소구의 증가로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 시험물질의 선별을 위한 인자를 측정하는 단계;
- [0030] (c) 대조군과 대비하여 상기 측정된 인자의 증가를 보이는 물질을 선별하는 단계를 포함하는 항당뇨 물질의 스크리닝 방법을 제공한다.
- [0031] 본 발명의 스크리닝 방법에 사용되는 용어 "시험물질"은 당뇨병으로 진행되는 활성을 억제하는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다.
- [0032] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 단계 (a)의 시험물질로는 펩티드, 단백질, 비펩티드성 화합물, 합성 화합물, 발효 생산물, 세포 추출액, 식물 추출액, 동물 조직 추출액 또는 혈장 등이 있고, 상기 화합물은 신규 화합물 또는 공지된 화합물일 수 있으며 바람직하게는 합성 또는 천연 화합물의 라이브러리로부터 얻을 수 있다.
- [0033] 본 발명의 상기 (a) 단계에서 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 제브라피쉬를 시험물질에 노출시키는 방법은 제브라피쉬와 시험물질을 맞게 할 수 있는 어떠한 경우도 포함되며, 예컨대 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 제브라피쉬 모델이 존재하는 배지에 상기 시험물질을 첨가 또는 투여하여 제브라피쉬와 시험물질이 맞닿을 수 있는 상태에 놓이게 하는 것을 포함한다.
- [0034] 본 발명의 상기 (b) 시험물질에 노출시키지 않은 대조군과 대비하여 시험물질의 선별을 위한 인자를 측정하는 단계는 췌장섬의 크기 증가, 베타세포의 크기 증가, 글루코스 흡수의 증가 및 신경소구의 증가로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 측정을 포함한다.
- [0035] 본 발명의 일실시양태에 따르면, 상기 시험물질의 선별을 위한 인자를 측정하는 단계는 췌장섬의 크기 변화를 측정하는 것일 수 있다.
- [0036] 단계 (a)의 제브라피쉬 동물의 췌장섬이 염색되고, 염색된 췌장섬의 크기를 측정함으로써 췌장섬의 크기 증가 여부가 측정된다. 상기 염색은 췌장섬의 크기 변화를 확인하기 위한 당업계에서 통상적으로 사용되는 염색시약이 이용될 수 있다. 예를 들어, 2-NBDG(2-테옥시-2-[(7-니트로-2,1,3-벤조사디아졸-4-일)아미노]-D-글루코오스)로 수행될 수 있다. 2-NBDG은 형광물질-태깅된 글루코오스 유사체(analogues)로 박테리아에서 글루코오스 섭취를 연구하기 위하여 개발된 것으로, 당분해 경로에서 헥소키나아제에 의해 인산화된 후 비-형광성 산물로 빠르게 분해되는 특성을 나타낸다. 상기 2-NBDG는 약 465/540 nm에서 전형적인 여기/발광 스펙트럼을 나타내기 때문에, 형광물질(fluorescein)용 광학 필터를 이용하여 현미경 하에서 시각화할 수 있다.
- [0037] 췌장섬 크기의 측정은 염색에 따른 췌장섬의 형광신호(fluorescence signal) 측정 또는 형광이미지 측정을 통해 수행될 수 있으며, 바람직하게는 형광 이미지 특징을 통해 수행될 수 있다.
- [0038] 또한 베타세포의 크기 증가는 예를 들어 염색된 베타세포의 크기를 형광 현미경으로 확인함으로써 측정될 수 있으며, β -세포에서 특이적으로 GFP(green fluorescent protein)을 발현하는 형질전환 제브라피쉬(transgenic

zebrafish lines)인 *ins:GFP* 제브라피쉬 또는 *Ins:nfsB-mCherry* F1 제브라피쉬를 이용하여 시각화할 수도 있다.

[0039] 또한 글루코스 흡수의 증가 또는 신경소구의 증가에 대한 측정은 제브라피쉬 동물모델에서 일반적으로 사용되는 통상의 글루코스 흡수의 측정, 신경소구 수 측정 방법에 의해 측정될 수 있다.

[0040] 본 발명의 (c) 대조군과 대비하여 상기 측정된 인자의 증가를 보이는 물질을 선별하는 단계에 있어서 당뇨병의 치료제 여부는 시험물질에 노출시키지 않은 대조군과 대비하여 이루어질 수 있다. 예를 들어, 시험물질을 노출시키지 않은 대조군과 비교하여 췌장섬 크기를 증가시키는 경우 시험물질은 당뇨병 치료제로 판단된다. 상기와 같은 방법으로 스크리닝된 당뇨병 치료제는 당뇨병, 특히 제2형 당뇨병 환자에서의 당뇨병 예방 및 치료에 매우 유용하게 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0041] 본 발명에 따른 당뇨병 제브라피쉬 동물모델은 인슐린 노출에 의해 간단히 인슐린 저항성을 유발시킬 수 있으며, 미세주입과 같은 고도의 기술이 필요하지 않으므로 비용 및 시간을 감소시킬 수 있어 당뇨병 제브라피쉬 동물 모델, 특히 제2형 당뇨병 제브라피쉬 동물 모델로서 효율적이다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 본 발명에 따른 과다 인슐린으로 유발된 인슐린 저항성에 의한 당뇨병 제브라피쉬 모델의 제조방법에 관한 개요도이다.

도 2는 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 제브라피쉬 모델을 염색하여 췌장섬의 크기를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 3은 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 제브라피쉬 모델의 글루코스 흡수도를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 제브라피쉬 모델의 β -세포 베타세포 크기 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 5는 본 발명의 제브라피쉬 모델의 신경소구를 염색하여 확인한 결과를 나타내는 도이다.

도 6은 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 제브라피쉬 모델의 신경소구를 확인한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 당뇨병 제브라피쉬 모델에 일레트로일레 및 아카보스를 투여한 경우 췌장섬의 크기 변화를 확인한 결과를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시 예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시 예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0044] <실시예 1> 제브라피쉬의 준비

[0045] 제브라피쉬 성어를 제브라피쉬 시스템 S 타입 (1500(W) x 400(D) x 2050(H) mm) (지노믹디자인, 대전, 한국)에서 유지하였다. 알과 성어를 분리하기 위한 망을 설치한 수조에 암컷과 수컷을 1:1 비율로 넣고 12시간 후에 제브라피쉬 배아(embryo)를 수집하였다. 채취 후 0.03% 해수염 용액을 사용하여 3회 세척하고 28.5 °C에서 광주기 (14 light : 10 dark)가 설정된 인큐베이터에서 사육하였다.

[0046] <실시예 2> 과다 인슐린으로 유발된 인슐린 저항성에 의한 제2형 당뇨 제브라피쉬의 제조

[0047] 인슐린 저항성에 의한 당뇨병 제브라피쉬 동물모델의 제조방법의 모식도는 도 1에 나타내었다.

[0048] 구체적으로, 수정 3일 후(3 day post fertilization)의 제브라피쉬 치어(zebrafish larvae)를 6 웰에 위치시킨 후 1, 5, 10 μ M 인슐린에 24, 48, 72시간 노출시켰다. 그 다음, 0.03% 해수염 용액(sea salt solution)으로 교체하고 인슐린과 해수염 용액에 노출시간이 최종 96시간이 되도록 하였다. 제브라피쉬의 췌장섬을 40 μ M 2-NBDG (2-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)Amino)-2-Deoxyglucose)로 30분 동안 염색하고, 형광현미경

(올림푸스 1×70, 올림푸스, 일본)을 사용하여 췌장섬을 직접 관찰하였다. 형광현미경을 통해 획득한 췌장섬 이미지는 Focus Lite 소프트웨어를 사용하여 제브라피쉬의 췌장섬 크기를 분석하였다. 또한 Image J 소프트웨어를 사용하여 췌장섬의 형광 강도를 측정된 후에 췌장섬의 크기와 형광 강도를 곱하여 글루코스 흡수도를 수치화하였다.

[0049] 위 결과를 도 2 및 도 3에 나타내었다.

[0050] 도 2에 나타난 바와 같이, 10 μ M 인슐린에 48시간 동안 노출된 제브라피쉬의 치어는 췌장섬 크기가 정상군 비해 유의적으로 감소한 것으로 확인되었다.

[0051] 또한, 도 3에 나타난 바와 같이, 글루코스 흡수도 또한 정상군에 비해 유의적으로 감소한 것으로 확인되었다.

[0052] 위 결과들을 통해 바람직하게 10 μ M 인슐린에 48시간 노출된 제브라피쉬가 과다 인슐린으로 인한 인슐린 저항성 모델로서 가장 적합한 것을 확인하였다.

[0053] <실시예 3> 과다 인슐린으로 유발된 인슐린 저항성에 의한 제2형 당뇨 제브라피쉬의 베타세포 평가

[0054] 수정 3일 후의 β -세포에서 특이적으로 GFP(green fluorescent protein)를 발현하는 형질전환 제브라피쉬(transgenic zebrafish lines)인 *ins:GFP zebrafish*를 6 웰에 위치시킨 후, 10 μ M 인슐린에 48시간 노출시켰다. 그 다음, 0.03% 해수염 용액(sea salt solution)으로 교체하고 다시 48시간 노출시켰다. 직접적인 베타세포의 관찰을 위해 형광현미경(올림푸스 1×70, 올림푸스, 일본)을 사용하였다. 형광현미경을 통해 획득한 베타세포의 이미지는 Focus Lite 소프트웨어를 사용하여 제브라피쉬의 베타세포의 크기를 분석하였다.

[0055] 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0056] 도 4에 나타난 바와 같이, 과다 인슐린 처리군의 베타세포 크기가 정상군(인슐린으로 처리하지 않은 군)에 비해 유의적으로 감소한 것으로 확인되어, 과다 인슐린으로 베타세포 또한 손상된 것을 확인하였고 이는 본 발명에 따라 제조된 인슐린 저항성에 의한 당뇨병 제브라피쉬 동물 모델의 질환 유발을 확인시켜준다.

[0057] <실시예 4> 과다 인슐린으로 유발된 인슐린 저항성에 의한 당뇨병성 신경병증 제브라피쉬의 제조

[0058] 수정 3일 후의 제브라피쉬 치어를 6 웰에 위치시키고 10 μ M 인슐린에 48시간 노출시킨 후, 0.03% 해수염 용액으로 교체하고 인슐린과 해수염 용액에 노출시간이 최종 96시간이 되도록 하였다. 신경소구(neuromasts)를 0.1% YO-PRO-1으로 30분 동안 염색하고, 형광현미경(올림푸스 1×70, 올림푸스, 일본)을 사용하여 제브라피쉬의 신경소구를 관찰하였다. 형광현미경을 통해 획득한 신경소구와 헤어셀(hair cell)의 개수를 카운팅하여 데이터를 분석하였다.

[0059] 인슐린에 노출된 제브라피쉬를 2.5% 글루타르알데히드(glutaraldehyde) 용액에 12시간 고정시킨 후 세척한 다음 여러 농도의 에탄올 솔루션으로 탈수과정을 진행하였다. 전처리 과정을 마친 제브라피쉬의 신경소구는 주사형 전자 현미경으로 관찰하여, 그룹 간 손상정도를 비교하였다.

[0060] 그 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다.

[0061] 도 5에 나타난 바와 같이, 10 μ M 인슐린에 48시간 동안 노출된 제브라피쉬의 치어는 측선(lateral line)의 수가 정상군 비해 유의적으로 감소한 것으로 확인하였다..

[0062] 또한 도 6에 나타난 바와 같이, otic hair cell과 term part hair cell이 유의적으로 손상된 것을 확인하였다. 주사형 전자 현미경으로 관찰한 신경소구에서도 유사한 결과를 얻었다.

[0063] <실시예 5> 과다 인슐린으로 유발된 인슐린 저항성에 의한 제2형 당뇨 제브라피쉬에서 항당뇨물질의 효과 확인

[0064] 수정 3일 후의 제브라피쉬 치어를 6 웰에 위치시키고 10 μ M 인슐린에서 48시간 동안 노출시켰다. 이후 일레프로 일레와 아카보스 5 μ M를 48시간 동안 노출시켰다. 직접적인 췌장섬의 관찰을 위해 형광현미경(올림푸스 1×70, 올림푸스, 일본)을 사용하였으며, 형광현미경 관찰 전 40 μ M 2-NBDG로 췌장섬을 30분 동안 염색하였다. 형광현미경을 통해 획득한 이미지는 Focus Lite 소프트웨어를 사용하여 제브라피쉬의 췌장섬 크기를 분석하였다.

[0065] 그 결과를 도 7에 나타내었다.

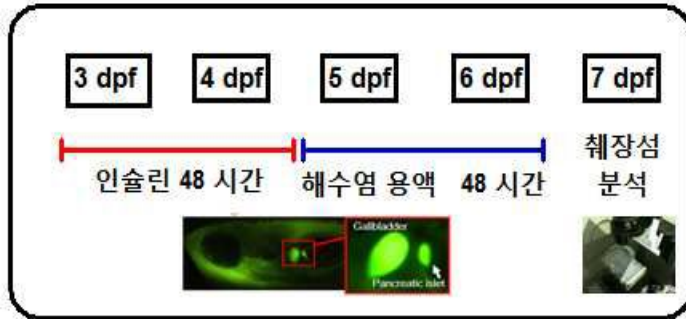
[0066] 도 7에 나타난 바와 같이, 일레프로일레와 아카보스 처리군의 췌장섬 크기가 과다 인슐린 처리군에 비해 유의적으로 증가한 것으로 확인되어, 과다 인슐린으로 유발된 인슐린 저항성에 의한 제2형 당뇨 제브라피쉬에 항-당뇨물질을 투여했을 때 치료 효과가 있음을 확인하였다.

[0067]

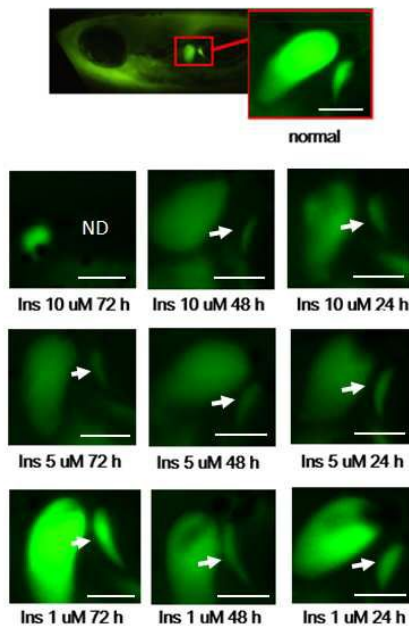
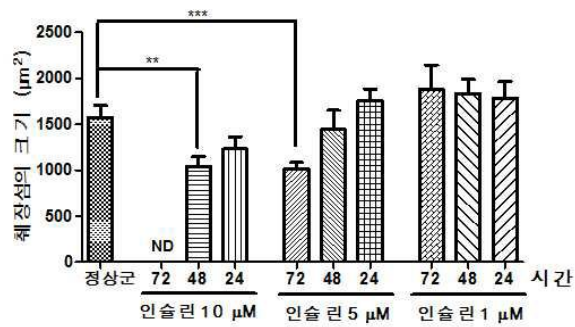
즉, 이를 통해 본 발명에 따른 동물모델이 당뇨병 치료제 개발과 연구에 최적의 동물모델이 될 수 있음을 확인하였다.

도면

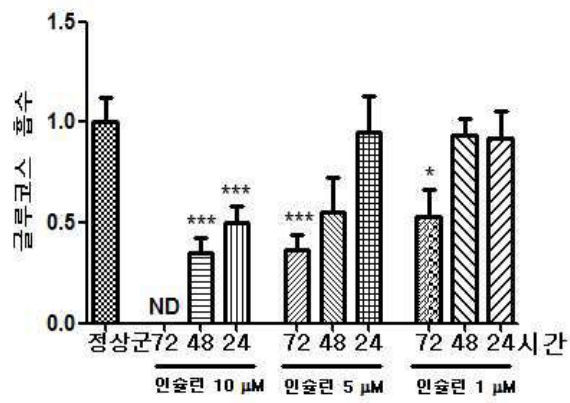
도면1



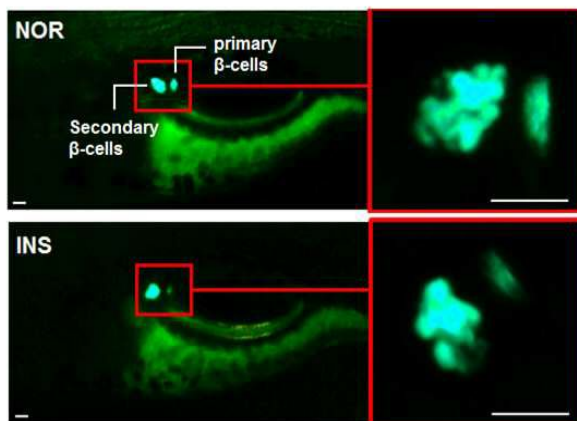
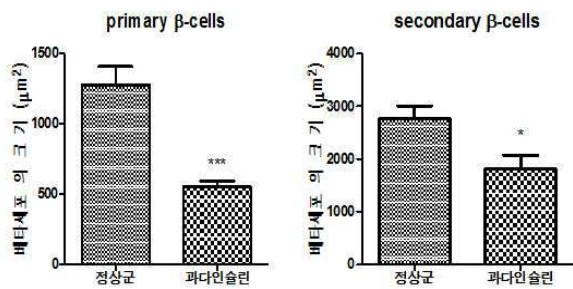
도면2



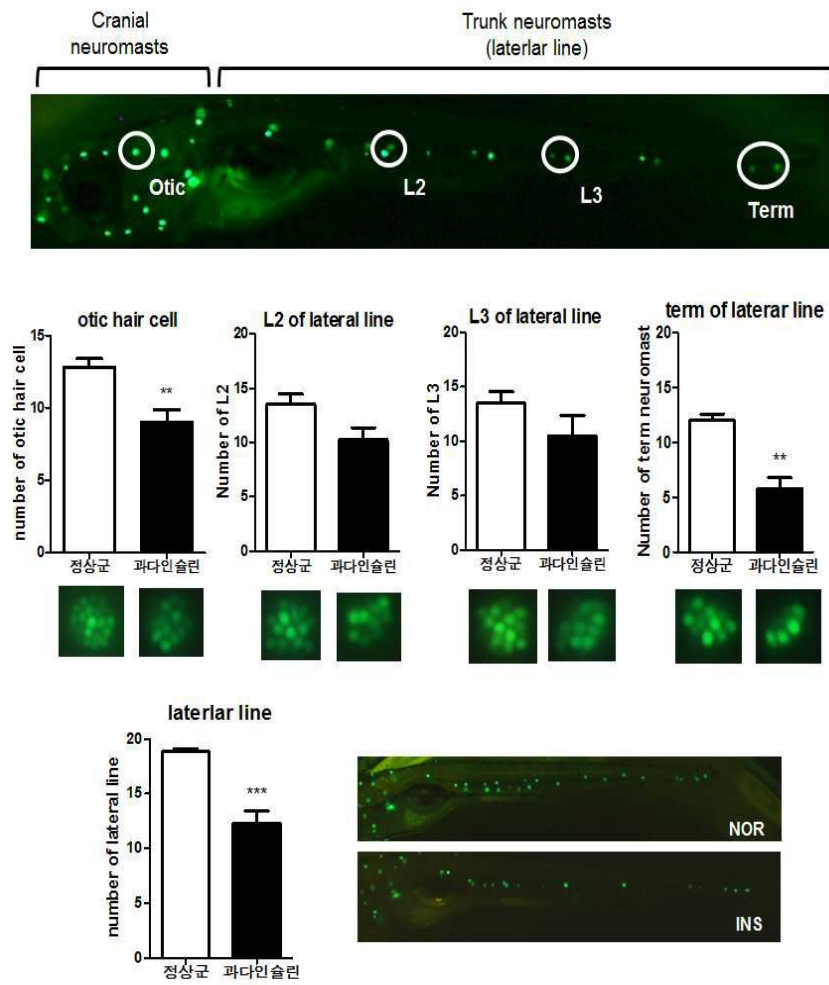
도면3



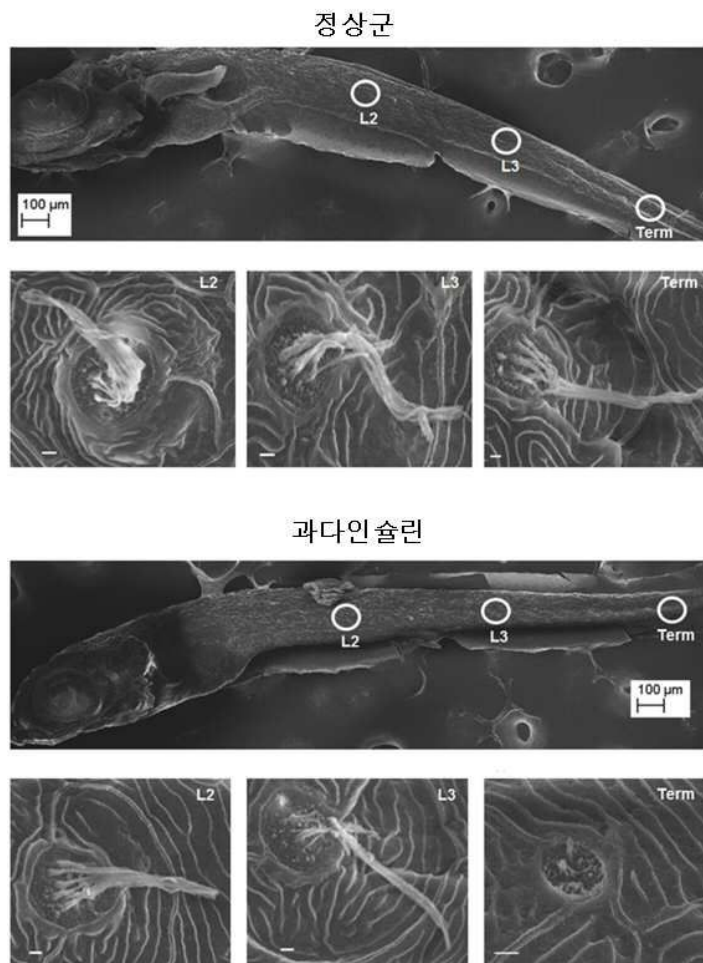
도면4



도면5



도면6



도면7

