

11-1543000
-002895-01

기술사업화지원사업 제3차 연도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-002895-01

사
람
의

난
치
성

질
환
모
델

복
제

개

주
문
생
산

사
업
화

최
종
보
고
서

사람의 난치성 질환모델 복제 개 주문생산 사업화 최종보고서

2019.10.15.

주관연구기관 / (주)메디클론
협동연구기관 / 충남대학교

2019

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “사람의 난치성 질환모델 복제 개 주문생산 사업화”(개발기간 : 2016. 08. 25 ~ 2019. 08. 24) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 10. 15.

주관연구기관명 : (주)메디클론
협동연구기관명 : 충남대학교

(대표자) 길 태 영
(대표자) 이 영 석



주관연구책임자 : 길 태 영
협동연구책임자 : 김 민 규

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	816007-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2016.08.25. ~2019.08.24	단 계 구 분	연구개발
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	기술사업화지원사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	사람의 난치성 질환모델 복제 개 주문생산 사업화			
연구책임자	길 태 영	해당단계 참여연구원 수	총: 26명 내부: 26명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 750,000천원 민간: 250,000천원 계: 1,000,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 26명 내부: 26명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 750,000천원 민간: 250,000천원 계: 1,000,000천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)메디클론			참여기업명	충남대학교
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반 「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의 4에 해당하지 않음				

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호											

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

- | | |
|--|--------------|
| <ol style="list-style-type: none"> 1. 선행연구를 통해 생산된 PD 모델 개에서 과발현되는 DJ-1의 분자적 기능을 규명 2. 선행연구에서 생산된 DJ-1 형질전환 복제개의 후대생산을 통한 생식선전이 확인 및 형질전환 복제개와 동일한 행동 확인 3. 형질전환 복제개와 후대에서 생산된 형질전환 DJ-1 개의 동일한 뇌 영상 확인 4. AD 병인 유전자인 돌연변이 아밀로이드 전구체 단백질 유전자 스크리닝 및 렌티바이러스 벡터 시스템 구축 5. CRISPR/Cas9을 이용한 DJ-1 Knock-Out 세포주 확립 6. 새로운 체세포복제 융합바늘 개발로 개 생산 시스템 개선 | 보고서 면수
68 |
|--|--------------|

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>적절한 질병 동물 모델을 개발하는 것이 발병 기전의 연구 및 치료제의 개발에 가장 먼저 선행되어야 할 중요한 과제이나 국내외적으로 이러한 환자와 유사한 적절한 질병 동물 모델의 개발은 미진한 상태에 있다. 설치류 및 비설치류에서의 알츠하이머/파킨슨 모델은 질병의 발현 및 후성학적 검증에 여러 가지 문제점을 갖고 있어 본 연구과제는 알츠하이머/파킨슨 질환모델의 생산을 위하여 개를 선택하였다. 그 이유로 개는 기존 설치류 모델에 비해 생존 기간이 길며, 인간과 유사한 생체 메카니즘을 지니며, 사람과 매우 친숙하여 행동학적 관찰이 용이하고 생활환경을 공유하고 있다는 장점이 있기 때문이다. 특히 개는 뇌기능 장애를 평가할 수 있는 인지/운동기능 분석이 가능하여 사람의 난치성 퇴행성 뇌질환 모델에 바로 적용할 수 있는 장점이 있다. 따라서 본 과제를 통한 이루어야 할 연구의 목표는 다음과 같다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 기존 질병모델과 차별성을 지닌 동물모델 개발 2. 모델동물의 행동학적/병리학적 유효성 평가 및 발병기전 연구 3. 퇴행성신경 질환모델 동물 확립을 통한 기술선점 및 활용 4. 생산된 질병모델 동물의 전임상 실험 및 치료제 개발에 활용 5. 모델동물의 대량생산 체제 구축 6. 주문형 질병모델동물 제작 기반 구축 				
<p>연구개발성과</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 선행연구를 통해 생산된 파킨슨 모델 개에서 과발현되는 DJ-1의 분자적 기능을 규명 2. 선행연구에서 생산된 DJ-1 형질전환 복제개의 후대생산을 통한 생식선전이 확인 및 형질전환 복제개와 동일한 행동 확인 3. 형질전환 복제개와 후대에서 생산된 형질전환 DJ-1 개의 동일한 뇌영상 확인 4. 알츠하이머 병인 유전자인 돌연변이 아밀로이드 전구체 단백질 유전자 스크리닝 및 렌티바이러스 벡터 시스템 구축 5. CRISPR/Cas9을 이용한 DJ-1 Knock-Out 세포주확립 6. 새로운 체세포복제 융합마늘 개발로 개 생산 시스템 개선 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ol style="list-style-type: none"> 1. 난치성질환모델 개의 생산으로 신약개발에 따른 전임상 실험 및 치료제 개발에 이용 2. 난치성 신경질환의 진단 및 치료장비 개발에 활용 3. 난치성질환 병인 기전연구에 활용 4. 세계적 제약그룹과의 연계를 통한 맞춤형 질환모델 개의 생산 및 사업화 5. 원천기술 확보 및 독점체제 구축 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>주문형 질환모델</p>	<p>신약개발</p>	<p>퇴행성 뇌질환</p>	<p>전임상실험</p>	<p>질환모델동물의 사업화</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Customized disease models</p>	<p>New medicine development</p>	<p>degenerative neurological disease</p>	<p>Pre-clinical research</p>	<p>Industrialization of disease animal models</p>

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	6
2. 연구수행 내용 및 결과	12
3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	62
4. 연구결과의 활용 계획 등	64
붙임. 참고 문헌	67

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목적

가. 근본적 치료방법 연구 필요

- ① 고도로 발달된 현대사회는 **헌팅턴병 (Huntington's disease)이나 파킨슨병 (Parkinson's disease, PD), 알츠하이머병 (Alzheimer's disease, AD) 같은 신경 퇴행성 질환 (neuronal degenerative disease)들이 만연하다.** 이는 환자 뿐 만 아니라 가족 및 사회에 대하여 많은 문제를 낳고 있으며, **치료수단을 개발하는 것이 시급한 국가적 과제로 부각되고 있다.**
- ② 특히 국내 **알츠하이머병**에 의해 기인되는 노인성 치매의 경우 2005년 6만5천명, 2008년 13만 7천명으로 **연평균 25%의 증가율**을 보이고 있으며, 특히 80대 이상 연령층의 실진료 환자 수는 **연평균 34%씩 증가**하고 있는 실정이다. 치매로 인한 건강보험 진료비도 해마다 증가하여, 2005년 872억 원에서 2008년에는 3천817억 원으로 집계되어, 치매 진료환자 1인당 연간 건강보험 진료비가 최근 7년 동안 2.4배나 증가하였다.
- ③ 이렇듯 치매 등 노인성 질환으로 인한 건강보험 급여비가 30%에 육박하는 등 노인의료비와 함께 커다란 경제 사회적 문제로 야기되고 있다. 특히 대표적 퇴행성 뇌신경질환인 알츠하이머와 파킨슨병은 원인미상의 뇌신경세포의 선택적인 사멸로 발생하는 질환으로 아직까지 질병의 발생이나 진행을 억제하거나 근치적인 **치료 방법이 없는 상태고 이에 대한 연구가 필요하다.**
- ④ **파킨슨병**은 알츠하이머병에 이어 두 번째로 흔한 신경퇴행성질환이다. 국내 유병율은 의료이용 기록으로 60세 이상자에서 **인구 10만명당 1,473명이 발병**하고 있다. 2006년 자료에 의하면 **환자수는 만성신부전증 다음으로 가장 많은 수를 차지**한다. 의료비는 환자 1인당 1,036천원으로 지난 5년간 70% 증가하는 추세를 보이고 있다.
- ⑤ 하지만 현재 50대 미만의 환자에서 유전적소인에 의해 발병한다는 보고만 있고, 정확한 병인론을 밝히지 못하고 있다. 따라서 현재 밝혀진 질병관련 **유전자의 조절을 통한 병인론의 연구가 절실**하다.
- ⑥ **유전적 운동부조화증(ataxia)**는 우리나라에서 최근 3년간 2배의 환자가 증가하고 있으며, 의료비도 3배이상 증가하고 있는 실정이다. 최근 미국에서도 ataxia질환은 환자가 크게 급증하며 사회적 관심이 크게 일고 있어 이 질병을 극복하려는 노력으로 **National ataxia foundation을 설립하여 질병의 원인구명과 치료지원을 할 만큼 치료가 쉽지 않은 유전성 질환**이다.
- ⑦ 이러한 노력에도 불구하고 **전임상자료가 부족하여 질병의 원인과 치료제가 개발이 상당히 지연**되고 있어 이를 충족시킬 질환모델 동물의 개발이 시급하다.

나. 신경계질환모델 연구에 대한 문제점

- ① 현재 **다양한 생쥐모델을 통한 질환 모델을 구축하여 인간의 질환을 연구**하고 있으나, 뇌질환의 경우 단순히 유전적 defect를 가져 신경발생 문제와 같은 실험만 가능하다. 그러나 인식, 특히 노화에 따른 퇴행성 신경질환 연구는 거의 불가능하다는 한계성을 인식하여 최근 원숭이를 이용한 연구가 시작되었으나, 아직 초기단계이며 그 성공여부

가 불투명하다. 현재 사용되고 있는 퇴행성신경질환 모델의 작성은 주로 설치류에서 뇌혈관을 수술 적으로 결찰하거나 특정 receptor를 knockout한 후 제작하고 있으나, **행동학적 관찰이 어렵고 수명이 짧은 마우스에서 질병의 발현을 기대하기에는 어려운 점이 많은 것이 사실이다.**

- ② **마우스에서의 파킨슨 모델동물 연구의 한계점** ; 생쥐에서의 파킨슨 질환 모델 연구만으로는 현재 한계점에 도달하였다. 퇴행성 질환인 파킨슨병은 가계도를 이용한 **유전학적 연구로 밝혀진 early-onset 유전자들 Parkin, Pink1, DJ-1등에 의해 유발됨**이 알려져 있다. 현재까지는 이어한 유전자들의 기능이나 질병 관련 메커니즘의 연구에 생쥐 파킨슨 질환 모델이 이용되어 왔다. 그러나 **생쥐의 파킨슨 질환 모델에서는 사람들에게서 나타나는 발병 증상들이 뚜렷이 나타나지 않았으며 knockout을 시키지 않은 생쥐와 행동 비교실험을 하였을 때도 뚜렷한 차이점을 찾을 수 없었다.** 이러한 문제점들은 생쥐에서 파킨슨 질환 연구는 인간의 파킨슨 발병 메커니즘의 규명이나 치료법 개발에 한계를 나타냈다.
- ③ 지난 20년간 유전성 AD 원인 유전자 (Amyloid precursor protein (APP), b-secretase, 등)들의 변화에 의해서 생기는 현상을 in vivo level에서 해석하고, AD관련 인자의 발굴 및 관련 단백질의 in vivo에서의 기능 연구는 AD연구의 큰 흐름으로 되어 있다. 하지만 아직까지 **최적의 설치류 동물 질환모델이 확립되지 않아 AD관련 신약개발에서 in vivo 평가방법의 확립 및 신속 정확한 약효 관찰이 불가능하고 식품, 진단시약 개발 등 산업적 효율성이 낮게 평가되고 있다.**
- ④ **ATM 결손 마우스를 제작하여 기능을 분석하고자하는 연구가 있기는 하나 질환 모델동물로서의 한계성이 나타났다.** 인간 환자들에게 나타나는 진행성 신경 퇴행증적인 행동들이 ATM결손 마우스에서는 나타나지 않은 것이다. 이런 퇴행적인 행동들에는 팔약근의 실조 (dyssynergia), 의도적인 행동을 하려고 할 때 생기는 경련현상인 기도진전 (intention tremor), 심부반사작용의 감소 (diminution of deep reflexes), 눈 움직임의 행동불능증 (apraxia)을 포함하는 소뇌의 근력저하 (hypotonia)와 동안신경의 이상을 반영하는 특징적인 얼굴과 태도의 변화 등이 있다. 의도적 행동을 하려고 할 때 경련이 일어나는 이런 퇴행성 행동들은 마우스 모델로 분석하기에는 한계성이 있기에 유전자적중 모델건의 확립이 요구된다.
- ⑤ **Ataxia 모델 마우스가 미국 등에서 개발되었지만 사람과 다른 양상의 형태학적인 특성을 나타내어 증상이 너무 강하여 조기 폐사하거나 증상이 나타나지 않아 마우스모델의 한계를 나타내었다.**

다. 기존 질병모델과 차별성 지닌 동물모델 개발

- ① 본 연구에서는 인간 질병 연구에 보다 가까운 모델이 될 수 있는 개를 대상으로 하고자 하는데, 윤리적 문제나 기술적 한계를 극복할 수 있는 이점을 제공해 준다. 미국 NIH자료에서 **개는 영장류 외에 인간과 공유하는 질병이 가장 많은 동물로서 인간 질병 모델에 이용할 수 있는 유전자가 367개로, 93개인 돼지나 186개인 고양이와 비교할 때 훌륭한 인간 질병 모델이 될 수 있다고 볼 수 있다.**
- ② 개는 인간질병과 유사성이 매우 높은 동물일 뿐만 아니라 지능이 높아 실험동물로 다

루기 수월하며 의약품 개발 질병모델동물로 관심이 집중되고 있는 동물이다. 질환모델 동물의 개발 분야는 무척 다양하여 인간 질환의 전 분야를 커버 할 수도 있겠으나 우선 취로서 도저히 접근하지 못하는 신경질환 영역부터 본 과제를 통해 개발해 본다면 그 시장 규모를 추정해 볼 수 있는 좋은 예가 될 수 있을 것이다.

- ③ **유전자 편집기술 및 형질전환 기술을 이용하여 사람의 퇴행성 뇌질환 모델동물을 고등동물인 개에서 복제 기술을 적용하여 생산하고자 한다.** 특히, 뇌질환 관련 모델은 생쥐에서 사람의 질환과 유사성을 보이지 않는 점에 착안하여, 퇴행성뇌질환 관련 유전자 적중, 형질전환 개를 체세포 복제 기술을 통하여 생산하고 **인간과 유사한 퇴행성 뇌질환 및 관련 행동을 분석하여 인체뇌질환 모델로서의 활용 가능성을 모색하며, 신약개발에 필요한 발병기전 및 치료기작 연구에 대한 자료로 활용하고자 한다.**
- ④ 개발된 기술은 세계적 우수 제약사, CRO 및 관련 연구자 등에게 제공할 수 있는 사업화를 완성하고자 하며, 이는 현재 정체되어 있는 뇌신경질환의 신약개발에 새로운 패러다임으로 작용하여 블루오션을 창출할 것으로 예상된다.

따라서 본 과제의 목표는 **유전자 편집기술 및 형질전환 기술을 이용하여 알츠하이머병 (Alzheimer's disease, AD)과 파킨슨병(Parkinson's disease, PD), 당뇨병, 유전적 운동부조화증 (Ataxia) 등의 질환모델 복제개를 생산하는데 있으며, 주문형 질환모델 동물 사업화**를 이루는 것이다.

1-2. 연구개발의 필요성

가. 신경질환의 연구의 필요성

(1) 신경질환의 근본적 치료방법 연구 필요

- ① 치매의 가장 큰 발병 원인은 노화인 만큼 국민 누구도 치매로부터 자유로울 수 없는 문제이며, 치매는 환자 개인 차원의 문제에서 벗어나 간병에 따르는 가족의 고통과 희생 등으로 인한 사회경제적 문제로 더욱 부각되고 있다. 우리나라 65세 이상 노인 인구의 사회구성비는 2000년 7.2%로 이미 고령화사회에 진입하였으며, 2011년 11.1%로 매년 꾸준한 증가 추세를 보이고 있다. 앞으로 2019년에는 14.0%에 이르러 고령사회로 진입에 이어 **2026년 20.8%로 본격적인 초고령사회가 될 것으로 전망된다** (보건복지부, 2013). 급속한 고령화와 더불어 노인 인구의 **치매 유병률은 계속 상승하여 환자수도 2012년 약 54만 명 (9.2%)에서 2030년에는 약 127만 명 (10.0%), 2050년에는 약 271만 명 (15.1%)으로 매 20년마다 약 2배씩 증가할 것으로 추산된다** (보건복지부, 2013년). 고령화에 따른 노인성 만성질환의 증가는 의료비 지출압박으로 연계되어, 건강보험 총 진료비는 2010년 약 43조원 (**65세 이상노인 약 14조원**)에서 2020년 54조원, 2040년 108조원, 2050년에는 약 129조원으로 증가할 것으로 예상된다 (한국개발연구원, 2005). 이러한 급격한 고령화와 노인 의료비 증가에 대비하여, 노인건강에 대한 국가차원의 체계적, 통합적 관리가 절실히 요구된다.
- ② 이렇듯 치매 등 노인성 질환으로 인한 건강보험 급여비가 30%에 육박하는 등 노인의료비와 함께 커다란 경제 사회적 문제로 야기되고 있다. 특히 대표적 퇴행성 뇌신경질환인 알츠하이머와 파킨슨병은 원인미상의 뇌신경세포의 선택적인 사멸로 발생하는

질환으로 아직까지 질병의 발생이나 진행을 억제하거나 근치적인 **치료 방법이 없는 상태고 이에 대한 연구가 필요하다.**

- ③ 유전적 질병의 대부분은 유전자의 결함으로 인해 만들어지는 단백질 또는 효소 등의 생성에 기인하여 발생하므로 결함 유전자에 의한 세포신호전달과정 중의 각 단계에 작용하는 물질을 투여하여 대사 물질 생성 또는 억제를 제어함으로써 치료효과를 얻을 수 있다. 따라서 본 연구를 통해 유전자의 결함에 의한 세포신호 전달과정을 연구한다면 신약개발의 효율을 매우 효과적으로 향상시킬 것으로 추정된다.
- ④ 하지만 현재 **전임상자료가 부족하여 질병의 원인과 치료제가 개발이 상당히 지연되고** 있어 이를 충족시킬 질환모델 동물의 개발이 시급하다.

(2) 혁신적 질병모델 동물의 필요성

- ① 퇴행성질환의 약물치료나 기전연구를 위한 질병모델로는 대부분 설치류를 이용해 왔으나, 동물 질환모델의 병리양상과 증상이 사람에서 관찰되는 것과 많은 차이를 보이고 있어 동물 질환모델에서 나온 결과를 토대로 임상시험을 시행할 경우 많은 문제점을 안고 있다.
- ② 알츠하이머병 관련인자의 *in vivo* 기능 연구를 수행함에 있어서 **환자를 대신할 수 있는 알츠하이머병의 최적 실험(모델)동물개발은 필수적으로** 기억과 학습뿐만 아니라 인지 및 자기표현이 가능한 개를 이용한 질환모델은 알츠하이머병 연구를 통해 단순히 질병의 원인 및 예방과 치료제의 개발에 큰이바지를 할 수 있을 뿐만 아니라 **한국의 알츠하이머병연구 수준을 세계적 수준으로 끌어올릴 것이라 기대** 할 수 있다.
- ③ 적절한 **질병 동물 모델을 개발하는 것이 발병 기전의 연구 및 치료제의 개발에 가장 먼저 선행**되어야 할 중요한 과제이나 국내외적으로 이러한 환자와 유사한 적절한 질병 동물 모델의 개발은 미진한 상태에 있다.
- ④ Pfizer 등 **글로벌제약사들이 경쟁적으로 신경계질환 치료제를 개발하고 있으나 마땅한 전임상실험동물의 부족으로 임상진입에 많은 어려움**을 겪고 있기에 개에서 퇴행성 신경계질환 모델동물이 생산된다면 이들의 치료제개발에 유용하게 활용될 수 있을 것이다.

적절한 신경질환모델동물을 개발하는 것이 발병 기전의 연구 및 치료제의 개발에 가장 먼저 선행되어야 할 과제



나. 국가적 연구지원 필요성

(1) 파급잠재력 높은 대동물 모델 필요

- ① 위의 국내외 연구결과에서 보듯이 설치류 및 비설치류에서의 AD/PD모델은 질병의 발현 및 후성학적 검증에 여러 가지 문제점을 갖고 있어 본 연구과제는 알츠하이머/파킨슨 질환모델의 생산을 위하여 개를 선택하였다. 그 이유로 개는 기존 설치류 모델에 비해 생존 기간이 길며, 인간과 유사한 생체 메카니즘을 지니며, 사람과 매우 친숙하여 행동학적 관찰이 용이하고 생활환경을 공유하고 있다는 장점이 있기 때문이다.
- ② 특히 개는 뇌기능 장애를 평가할 수 있는 인지/운동기능 분석이 가능하여 사람의 난치성 퇴행성 뇌질환 모델에 바로 적용할 수 있는 장점이 있다.

(2) 세계수준의 원천 기술력 확보 분야

- ① **개 형질전환복제는 우리나라에서만 유일하게 성공한 바 있으며**, 본 연구팀이 성공적으로 완성되면 지금까지 불치병으로 알려진 **알츠하이머병과 파킨슨병 등의 뇌신경질환 정복**을 위한 획기적인 전환기를 맞을 것이다.
- ② 퇴행성 신경질환모델 개를 세계에서 처음으로 우리가 개발한다면 질병기전의 규명, 치료물질의 탐색, 진단법의 개발 및 진단장비까지 우리나라가 주도적으로 개발할 수 있으므로 국가적으로도 이 분야 기술을 지닌 핵심연구팀을 구성하여 집중적 지원을 해야 하는 당위성이 있다.

1-3. 연구개발 범위

연구 범위	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)
PD모델의 해외 홍보를 통해 수익 창출을 위한 적극적인 마케팅 수행	- 국내 사업화 촉진을 위한 홍보 - 해외 진출을 위한 다국적 기업과의 접촉
수익창출을 위한 해외지사 설립	- 두바이 CARTC와 공동투자 벤처 설립 합의 - 두바이에 연구시설 건립 및 장비 도입 완료
질병모델개의 주문생산 및 공급을 위한 사업화 계획	- 중동지역 유전적 질환모델 개발 협의(CARTC) - 중국 기업 및 대동물 임상지원센터와 공동연구 추진 - 미국 Viagen Pets와 질환모델 동물 공동 생산 추진
PD 모델 개에서 과발현되는 DJ-1의 분자적 기능 규명	- DJ-1 과발현 세포주 및 결손 변이 세포주를 이용한 DJ-1 기능 분석 - 기존 연구에서 알려진 DJ-1의 세포 내 보호 작용에 대한 비교 연구
DJ-1 형질전환 복제개의 생식선 전이 및 행동학적 검증	- DJ-1 형질전환 복제개와 암컷비글견을 교배하여 후대 생산 - 생산된 형질전환 개의 모니터링을 통한 행동학적 분석
후대 생산된 DJ-1 복제개의 영상학적 분석 및 병리학적 검증	- 후대 생산된 개 중 형질전환 복제개와 유사한 행동을 보이는 개의 뇌 영상 촬영
AD 단일유전자 과발현 구축을 위한 vector 시스템 구축	- 돌연변이형 APP 유전자 스크리닝 및 벡터 시스템 구축
CRISPR/CAS 9을 이용한 PD 관련	- DJ-1 단백질을 생산하는 PARK-7 유전자의 결손 유도

세포주 작성	- 기존에 보고된 PARK-7 결손과 비교 연구
개 생산 시스템 개선	- 실험실에서 개발한 난자-세포 융합방법을 이용하여 체세포 복제 실시 후 대리모에 이식
human mutant APP 발현하는 세포주 구축	- 사람 돌연변이형 APP 유전자 스크리닝 및 벡터 시스템 구축 - 벡터를 이용하여 human mutant APP 발현하는 세포주 제작
미분화 줄기세포를 이용한 병인유전자 과발현 벡터와 넉아웃 벡터의 기능 검증	- 개 중간엽 줄기세포에 PD/AD 병인유전자 과발현 벡터와 넉아웃 벡터 도입 - 줄기세포의 신경 분화 유도 후 단백질 형성 및 억제여부 확인
CRISPR/Cas9을 이용한 PD 관련 유전자 결손변이체 복제개 생산 및 분자적 검증	- DJ-1 유전자 결손변이체 세포주 생산 - DJ-1 유전자 결손된 복제개 생산 및 분자적 검증
정상개와 약물을 투여한 신경 질환 모델개에서의 행동학적 모니터링 개발	- 증상을 보이는 신경질환 모델개에 약물 투여 후 행동학적 및 영상의학적 모니터링 실시
human mutant APP 발현하는 형질 전환 복제개 생산	- human mutant APP 발현 세포주를 이용한 복제개 생산
parkin 유전자 스크리닝과 넉다운 벡터 구축	- parkin 유전자 스크리닝 후 넉다운 벡터 구축
기년도에 구축된 신경질환 모델건의 가능성 평가	- 생산된 AD 형질전환개와 PD 넉아웃 개의 신경질환 모델건으로서의 가능성 평가
Parkin 넉다운 복제개 생산	- 2차년도에 구축된 Parkin 넉다운 세포주 이용하여 복제개 생산
복합형질전환 AD모델 복제개 생산	- human mutant APP와 PS-1의 복합 과발현벡터를 이용하여 세포주 구축 - APP & PS-1가 발현하는 AD 복제개 생산
복합 넉아웃 PD모델 복제개 생산	- CRISPR/Cas9을 이용하여 DJ-1과 PINK1 넉아웃된 결손변이체 세포주 구축 - DJ-1 & PINK1 이중 넉아웃 복제개 생산
질병모델 복제개의 대량번식 체계 구축	- 기년도에 생산된 생식선전이된 개체간의 번식을 통해 PD/AD homozygosity 생산
AD/PD 유전자의 조절기능 규명	- AD/PD 유전자의 삽입부위에 따른 유전자의 조절기능 규명 - 삽입 또는 결손 유전자의 분자적/생리적 기능 규명
PD/AD 모델건의 확립	- PD/AD 모델건의 뇌병변의 영상학적 평가, 행동학적 및 유전학적/후성학적 평가 실시

2. 연구수행 내용 및 결과

2-1. 연구 내용 및 결과

<제1세부 : 질환 모델 개의 산업화> (주관연구기관 : 메디클론)

가. 국내 사업화 부문

- 동물병원 및 일반인을 대상으로 한 일반 복제개의 사업화를 위한 준비 완료
- 포스터 및 리플렛 제작 완료 및 배포 (대형 동물병원)

What is Dog Cloning?



Cloning a new companion is health and safe

MEDI CLONE (주)메디클론
www.mediclone.co.kr Tel 042.821.5773
mediclone@naver.com Fax 042.823.9754

인류의 꿈을 실현하는
세계 최고의 생명공학기술 실현으로
인간의 복지향상에 기여하겠습니다.



대전광역시 대덕구 대화로 147 (우)30660
147, Daehwa-ro, Daedeok-gu, Daejeon, Korea
Tel. 042) 821-5773 Fax. 042)823-9754
E-mail : mediclone@naver.com

유전적으로 동일한반려견을 다시가족으로

반려견체세포복제




MEDI CLONE (주)메디클론

Clon your DOG



반려동물로서의 개는 인류의 가장 오랜 친구이며 성서고락을 함께해 온 가족이다. 이러한 반려견을 질병이나 노화로 잃었을 때의 슬픔을 잊게 할 반려동물의 복제를 커다란 상실감을 극복할 수 있다. 반려견의 복제는 유전적으로 동일한 가족을 다시 갖게 될 수 있으며, 건강하고 행복하게 복제견과 오랜 시간을 함께 할 수 있다.

건강했을 때에도, 질병을 앓았을 때에도 세포보관을 통해 여러분의 특별한 반려견을 보존할 수 있으며, 오랜 시간이 지나도 사랑했던 반려견을 다시 여러분의 품으로 돌아오게 할 수 있다. 복제로 태어난 반려견은 매우 정상적이며, 외모가 동일하여와 행복했던 순간들을 다시 회상할 수 있다. 이렇게 태어난 반려견은 정상적인 삶을 영위할 수 있으며, 다른 반려견과 마찬가지로 행복하고 건강하게 살 수 있다.

(주)메디클론의 복제과정은 여러분의 반려견 유전자기 전혀 변형되지 않는 안전한 방법으로 수행됩니다. 현재 복제할 수 없다면 **(주)메디클론**의 장기간 세포보관서비스를 통하여 추후에 복제견을 태어나게 할 수 있다. 또한 이러한 세포보관서비스는 나중에 반려견에게 심각한 질환이 발생했을 때 세포치료에 안전하게 적용할 수 있다.

체세포 보관서비스 (Genetic Preservation)

- 반려견 체세포 장기간 보관서비스
- 매우 간단하고 짧은 시간의 시술 가능
- 동물병원 수의사와 상의하여 (주)메디클론으로 보관서비스 의뢰
- 다양한 세포는 -196℃에서 영구보존 가능
- 보호자가 원하는 기간에 언제든지 복제 가능
- 어린 개체부터 노령 개체까지, 사후 24시간 이내 조직을 채취 할 경우 보존 가능 (**생동 전 조직생물량 필요**)



반려견 복제 (Cloning a new Companion)

- 반려견의 조직을 제공하면 세포배양 후 보관
- নিজ의 체세포를 융합하여 복제수정란 형성
- 대리모에 이식하여 정상임신과 분만
- 분만 후 2개월 안의 입양
- 세포 채취 후 1년 이내 복제견 입양 가능
- 유전적으로 동일하여 외모가 같음

*사망한 반려견은 절대 냉동하지 않 것



- 20년간 축적된 체세포 복제 기술력
- 삼성 이견회 회장 반려견 3두 복제 (2010, 2017)
- 마약 및 경찰 탐지견 10여두 복제 (2015, 2016)
- 천연기념물 삼살개 복제 복원 5두 (2016, 2017)
- 일본 반려견 30여두 복제 분양 등 (2010 ~ 2017)
- 체세포 복제견 특허 등록 및 출원 (제10-1433049호, 10-2016-00117142출원)

- 메디클론 국내용 포스터 제작

What is Dog cloning??

Cloning a new companion
is health and safe

 (주)메디클론
www.mediclone.co.kr
mediclone@naver.com

042.821.5773

- 질환모델 복제 개의 경우 국내 CRO구축을 위한 사업전략 구상
- 국내 VC들을 대상으로 투자유치를 위한 IR 발표 실시



- 국내 홍보를 통한 사업화 촉진 기대

시사 > 전체기사

[단독] 삼성家 희소식 '복제견'... 이건희 회장이 아꼈던 반려견, 다시 태어났다

충남대 김민규 교수팀·메디클론 복제견 출산사실 첫 공개

입력 : 2017-01-24 17:39 / 수정 : 2017-01-25 00:04



이건희 삼성전자 회장의 반려견이었던 포메라니안 '벤지' 복제견이 24일 충남대 농업생명과학대학 환경조절실험동물사에서 태어나 연구팀원의 손에 올려져 있다. 김민규 교수 연구팀 제공

이건희 삼성전자 회장의 반려견이었던 포메라니안 '벤지'가 네 번째 태어났다. 김민규 충남대 동물자원생명과학과 교수 연구팀과 바이오 테크(생명공학기술) 업체 메디클론은 24일 오전 11시 이 회장의 반려견을 복제하는데 성공했다. 복제 횟수로는 2010년 쌍둥이 복제 이후 두 번째, 복제견으로는 세 번째다. 세 번째 복제견은 몸무게 273g으로 건강하게 태어났다.

이 회장의 반려견 복제 사실은 이번에 처음 공개됐다. 김 교수 연구팀은 2010년에도 벤지를 복제, 쌍둥이를 탄생시켰다.

평범한 직장인이 5년 동안

7,200만원
수익 낸비결은? **확인**

많이 본 기사

- 변희재가 '권양숙 구속' 티셔츠 입고 당한 일(영상)
- '물난리 외유' 김학철 도의원 "국민이 '레밍' 같다" 막
- [단독] 뺨 후려치고... 발로 머리 차고... 대학 야구감
- 홍준표가 수해복구 현장서 장화 신는 법... 같은날 문
- [포착] "이거 실화냐?" 뇌섹녀 이연화의 완벽한 몸
- 탈북BJ 이소율, "임지현 고문 가능성유, 살기위한 발

(국민일보 1면 기사, 2017. 01. 25자)

이건희 삼성전자 회장의 반려견이었던 포메라니안 ‘벤지’가 네 번째로 태어났다.

25일 국민일보에 따르면 김민규 충남대 동물자원생명과학과 교수 연구팀과 생명 과학 업체 메디클론이 이 회장의 반려견을 복제하는데 성공했다. 2010년에도 포메라니안의 쌍둥이 복제에 성공했다. 이번이 세 번째 복제견이다. 이 회장의 반려견 복제 사실은 이번에 처음 공개됐다.

이 회장의 반려견 벤지는 포메라니안 순종 수컷이다. 2009년 16세의 노령으로 죽었다. 국민일보는 삼성 측이 벤지의 근육조직을 김 교수에게 전달했다고 보도했다. 연구팀은 벤지의 체세포를 배양해 보관해왔다. 2010년 첫 복제 때 태어난 쌍둥이는 ‘벤지 2호’ ‘3호’로 불렸다. 연구팀은 이번 복제에도 8년 전 받았던 체세포를 사용했다.



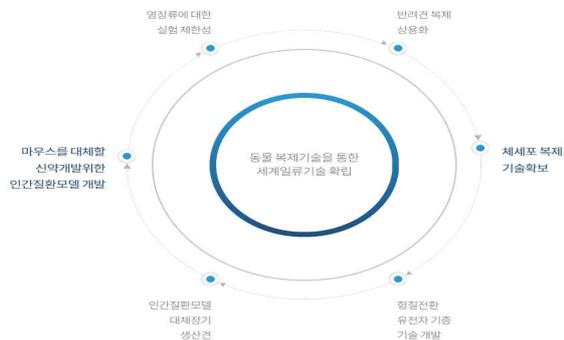
(중앙일보, 2017. 01. 25자)

- 국내외 홍보를 위한 홈페이지 개편 (<http://mkbio.plani.co.kr/html/korean/main.php>)



중점연구분야

1 개의 복제기술에 관한 세계일류기술을 활용할 영역 확대



질환 모델 동물

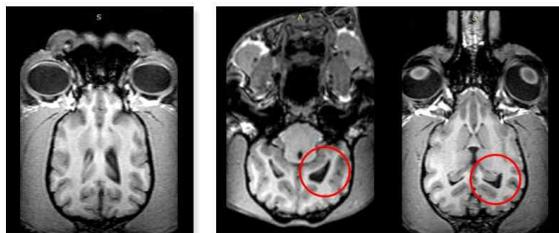
Alzheimer's disease

알츠하이머 병 연구를 위한 질환 모델 동물

치매를 일으키는 가장 흔한 퇴행성 뇌 질환으로 기억력과 인지기능이 약화되는 병입니다.



가을만성 하는 등의 증상이 발생하게 됩니다. 파킨슨병을 가진 동물은 개와 고양이 밖에 없습니다.



Neurodegenerative Disease

신경퇴행성질환 연구를 위한 질환모델동물

신경퇴행성질환의 연구를 위해 질환 모델 동물을 생산합니다. 글로벌 제약회사들이 경쟁적으로 신경계질환 치료제를 개발하고 있으나 중대형 전임상 실험동물의 부족으로 임상진입에 많은 어려움이 있습니다. 개의 경우 생존기간, 인간과의 생체기반 유사성 및 공유 유전질환의 수, 인지/운동능력의 분석과 평가 가능성 등으로 퇴행성질환의 연구모델로 기존의 마우스의 용이 한계를 극복할 수 있을 것입니다.

치매 환자 수는 세계적으로 약 5천만명, 파킨슨 환자 수는 3천만명으로 의료비용은 300조원으로 추정됩니다. (향후 10년간 3배 성장 예상, 한국과학기술정보연구원 2005년) 한국의 경우 2008년 기준 지난 5년간 등록 된 환자 수가 파킨슨병 120% 치매 300% 증가 (2010년 건강보험공단 진료 자료)

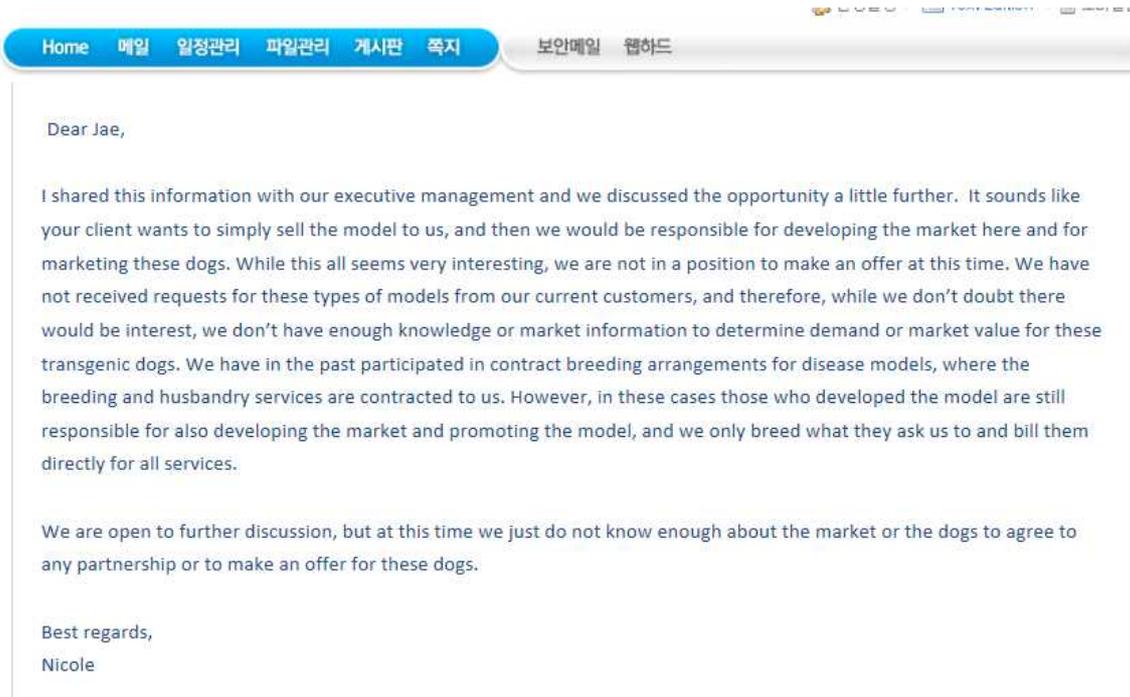
Customized Model

맞춤형 질환 모델 동물

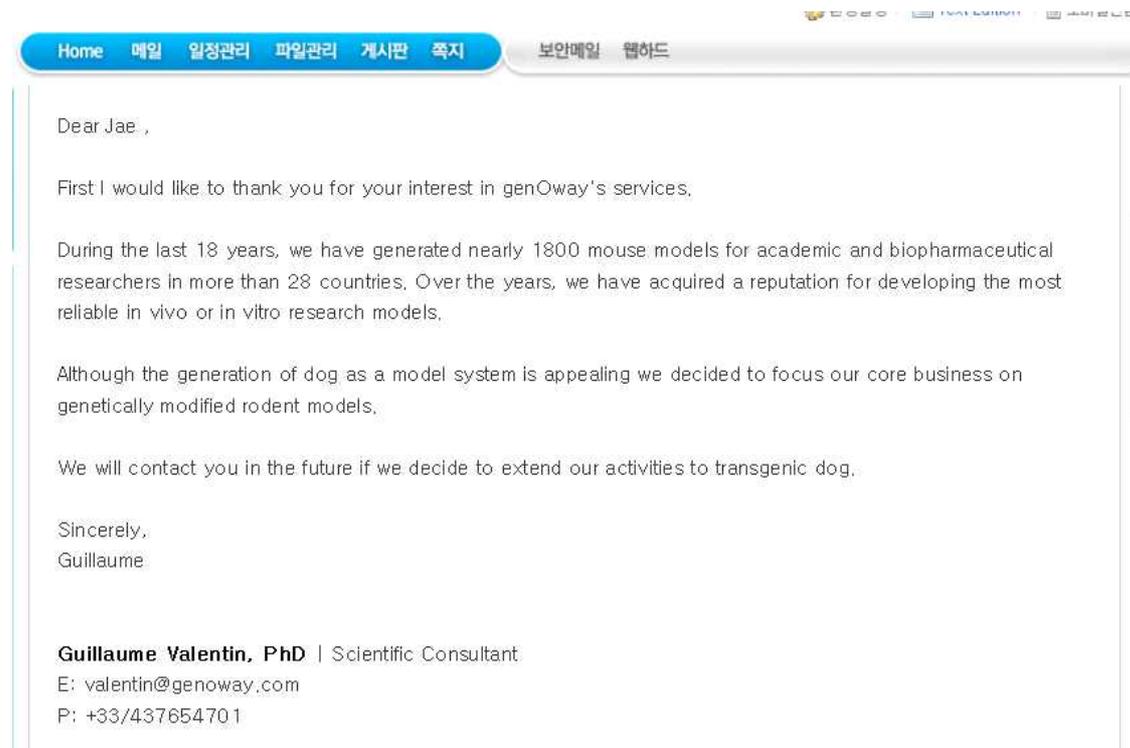
당뇨병, 고혈압, 암 등 각종 질환을 지닌 동물을 생산하여 질환에 유요한 약을 투여해 치료 경과를 확인하여 약의 효능을 확인하는데 이용할 수 있습니다.

나. 해외 진출 모색

- 미국 (주)마살 실험동물 전문회사와의 접촉을 통하여 실험동물로서의 우수성 입증
- 하지만 아직 시장보다 앞선 기술로 평가 받고 있어 시장개척을 위한 다각적 노력이 요구됨



- 또 다른 미국의 GeneOway's service 그룹과의 접촉을 통하여 개의 형질전환 개의 질병 모델에 지대한 관심을 표명하고 있어 현재 지속적으로 접촉 중임



- UAE의 CARTC와 공동 투자벤처 설립을 위한 양해각서 체결 및 추진
- 연구원 2명 파견하여 공동연구 및 사업화 추진중(2017. 6 ~)

CARTC
Dubai, UAE

Chungnam National
University,
South Korea

Letter of Agreement for Scientific Collaboration

This is a letter of agreement between the Center for Advanced Reproductive Technology (CARTC), Zaabeel Office, Dubai, UAE and Lab. of Animal Reproduction & Physiology, Chungnam National University, South Korea.

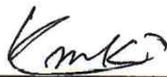
The aim of this agreement is to develop a plan of scientific collaboration for advancement in reproductive biotechnology and disease modeling, in two phases (short term and long term) under scientific supervision by Dr. Kim (Lab. of Animal Reproduction & Physiology, Chungnam National University) as the “adjunct professor” and a defined professor from CARTC as the “home professor”.

During the short term plan, a dog embryology expert doctor from Chungnam National University will be hosted by CARTC for a duration of 6 months to produce a clone dog as the starting point of the long term plan according to the terms and conditions declared in the second page of this letter of collaboration. The long term plan will be to develop a unique center for biotechnological advances in human disease modeling using transgenes technology.

In both short term and long term plans of collaboration, CARTC provides the infrastructure and funding supports of the projects carried out in CARTC. The adjunct and home professors develop the above mentioned advancement through scientific and technical plan of collaboration, establishment of technologies/protocols and exchanging/training of the expert researchers. All the scientific results, patents and commercial values of the long term plan will be shared as per co-correspondence by equal sharing effects.

2017. 4. 2

Professor MIN-KYU KIM



Lab. of Animal Reproduction &
Physiology, Chungnam National
University, South Korea

Hammad Buti Mohammed



5/4/2017

Center for Advanced Reproductive
Technology (CARTC), Margham,
Dubai, UAE

Terms and conditions of the short term plan of collaboration

1. The duration of the short term plan is 6 months (starting from 1-May-2017 to 31-October-2017) that could be considered for extending as per need.
2. CARTC will provide the support for travel, accommodation, food and salary of the dog embryology expert doctor from Chungnam National University for the duration of the short term plan as per official routines.
3. All the biological samples that are used or developed during the short term plan of collaboration are belong to the CARTC and should not be transferred or used elsewhere without direct permission from the CARTC.
4. All the document(s), agreement(s), and result(s) developed during the short term plan of collaboration will be considered to be confidential and any release of information in any form (media, newspaper, and journal) should be with direct permission from CARTC.

Professor MIN-KYU KIM

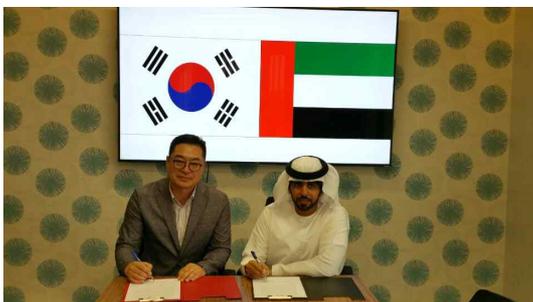


Lab. of Animal Reproduction &
Physiology, Chungnam National
University, South Korea

Hammad Buti Mohammed


5/4/2017

Center for Advanced Reproductive
Technology (CARTC), Margham,
Dubai, UAE



- 2017년 8월 두바이에 기반시설 및 장비 공사 시작



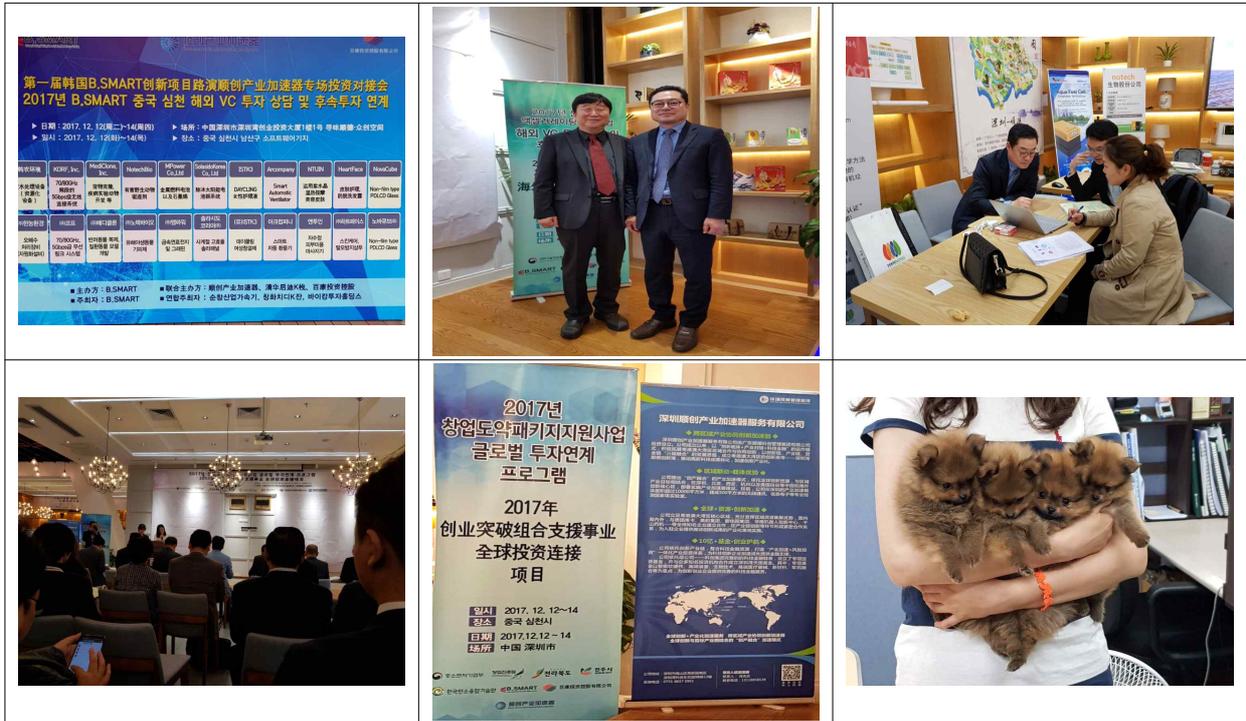
- 베트남 VK group CEO 방문하여 사업화 진출 모색



- 중국 Cathies' Votican International Trade Co. LTD사와 공동연구 추진 협의



- 중국 심천 방문하여 글로벌 투자연계 프로그램을 통한 회사 IR자료 발표 및 투자협상



다. 3차년도 연구결과

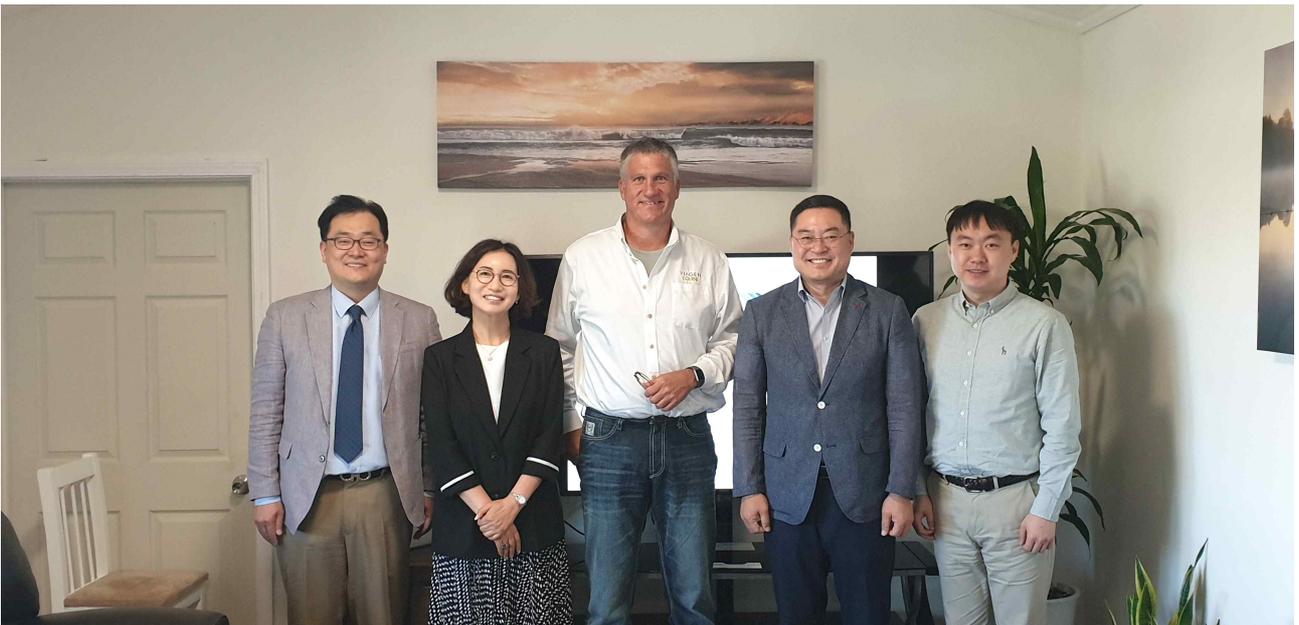
- 남경 Help 社와 파킨슨질환모델 개를 이용한 파킨슨 치료제 개발 공동연구 추진



- 태주 의약성 대동물전임상센터와 퇴행성질환모델 동물 및 심혈관계 질환모델 개발 공동 연구 추진



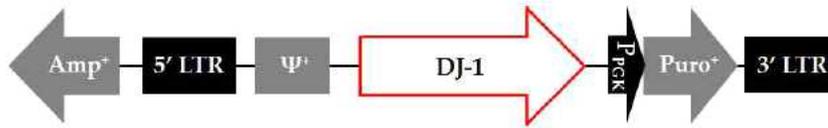
- 미국 Viagen Pets 社와 질환모델 동물 공동 개발 및 미국 시장 진출 협력



<제1협동 : 사람 난치성 질환모델 개의 생산> (협동연구기관 : 충남대학교)

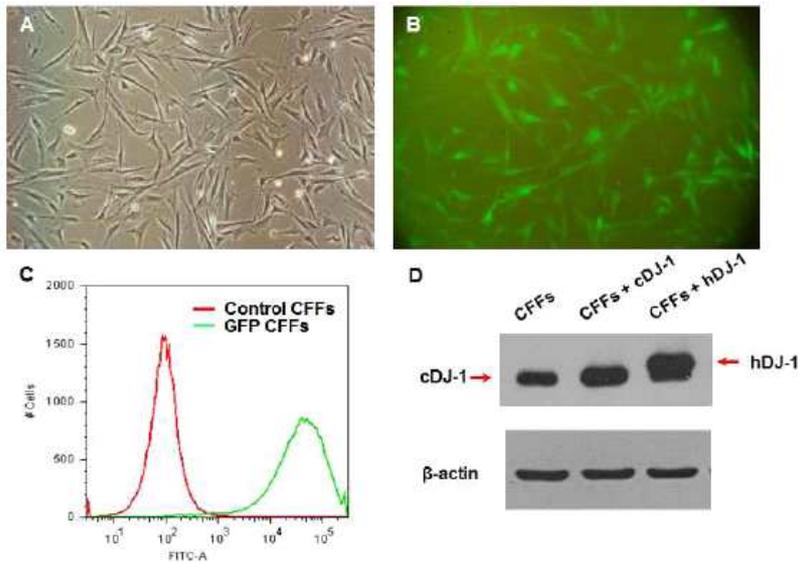
가. PD 모델 개에서 과발현 되는 DJ-1의 분자적 기능 규명

- 개와 사람 DJ-1 이 클로닝 된 레트로 바이러스 벡터 구축



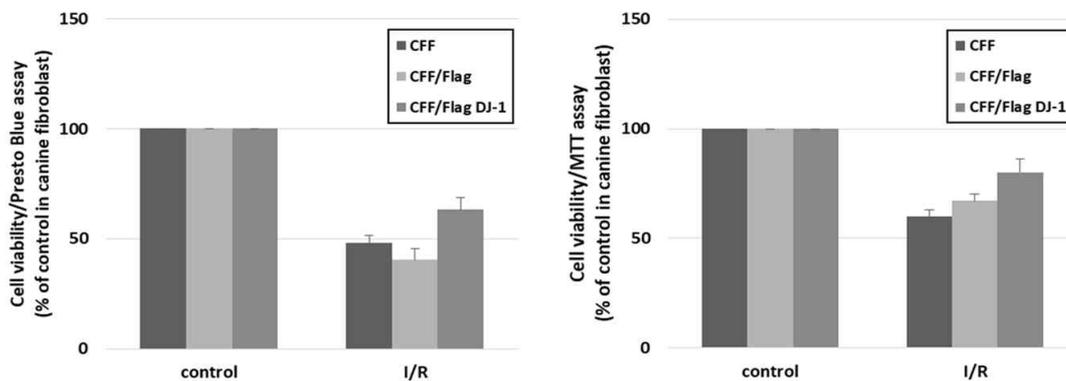
[개와 사람 DJ-1 이 클로닝된 벡터 구축 모식도]

- DJ-1 유전자를 가진 레트로바이러스를 구축. pMSCV(murine stem cell virus)-puro 벡터를 이용하여 개와 사람의 DJ-1 유전자를 PCR로 증폭시킨 후 제한효소인 XhoI과 EcoRI로 잘라 클로닝하여 세포주 생산
- DJ-1 단일 유전자 적중 시스템을 이용한 형질전환 세포주 구축



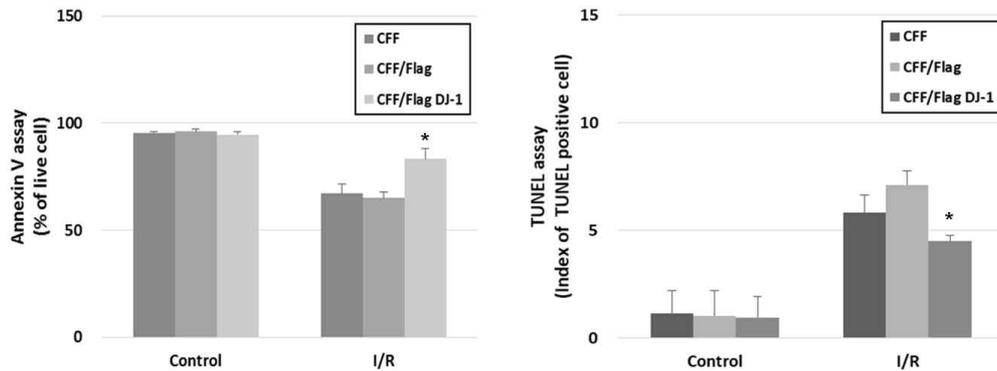
[개의 배아섬유아 세포에 대한 레트로 바이러스의 감염 효율성과 DJ-1 단백질의 발현정도 확인]

- DJ-1 유전자의 세포내 분자/ 생리학적 기능 규명
- 세포사멸조건에서 DJ-1의 세포 보호 기능을 세포 활성 인자 Presto blue 와 세포 성장 인자 MTT를 통해 확인



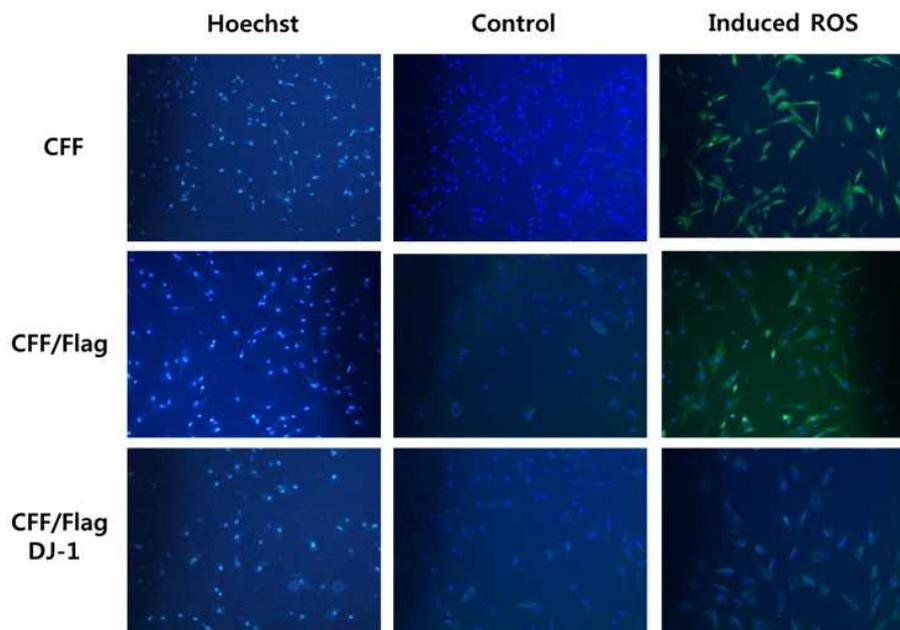
[세포사멸조건에서 DJ-1의 세포 활성 및 성장 확인]

- DJ-1 과발현 세포주의 세포 사멸 조절 기능 확인
- 세포사멸조건에서 DJ-1 유전자의 활성세포 증가 및 세포사멸 감소를 Annexin V와 TUNEL assay를 통해 확인



[세포사멸조건에서 세포사멸 관련 인자 활성 확인]

- 주요 질병의 원인으로 지목되는 활성산소종 ROS (Reactive oxygen species)의 세포 내 생산 결과에서 DJ-1 이 ROS의 생산을 줄여 세포 보호 기능에 영향을 미치는 것을 확인



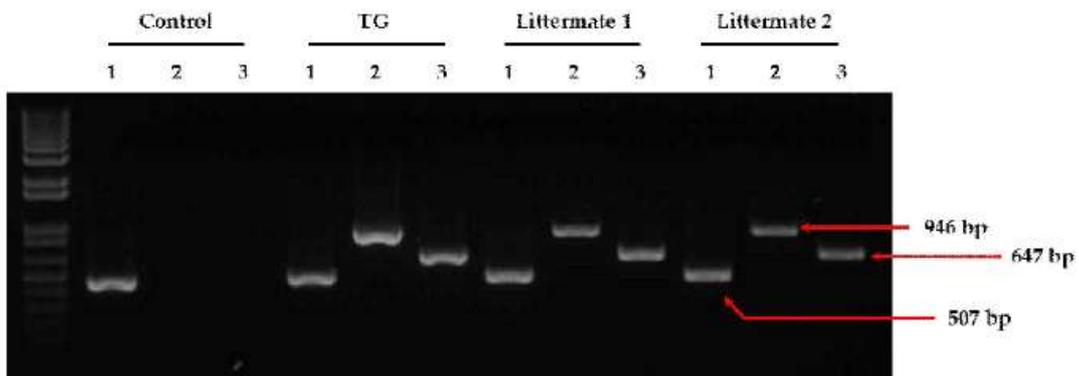
[세포 내 활성산소종 생산 확인]

나. DJ-1 형질전환 복제개의 생식선 전이 및 행동학적 검증

- 생산된 형질전환 복제개와 암컷비글견을 교배하여 후대 생산
- DJ-1 형질전환 복제개가 성성숙이 완료된 후 정액을 채취하여 암컷 비글견에 수술적으로 인공수정을 실시하였다. 후대 생산된 복제개의 2세들의 DJ-1 유전자의 발현을 확인하였으며 그 결과 후대 생산된 모든 F1에서 DJ-1 유전자의 생식선 전이를 확인

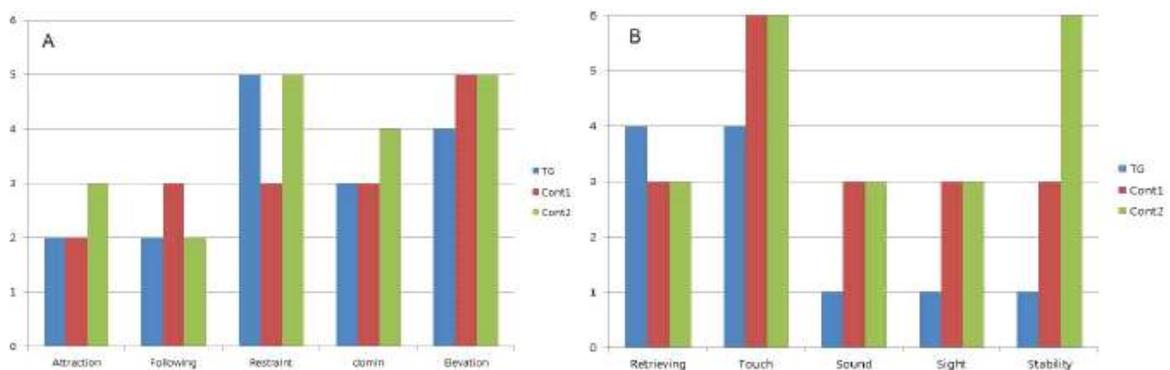


[DJ-1 형질전환 복제개의 2세들]



[DJ-1 형질전환 복제 개의 F1에서의 hDJ-1 유전자 발현]

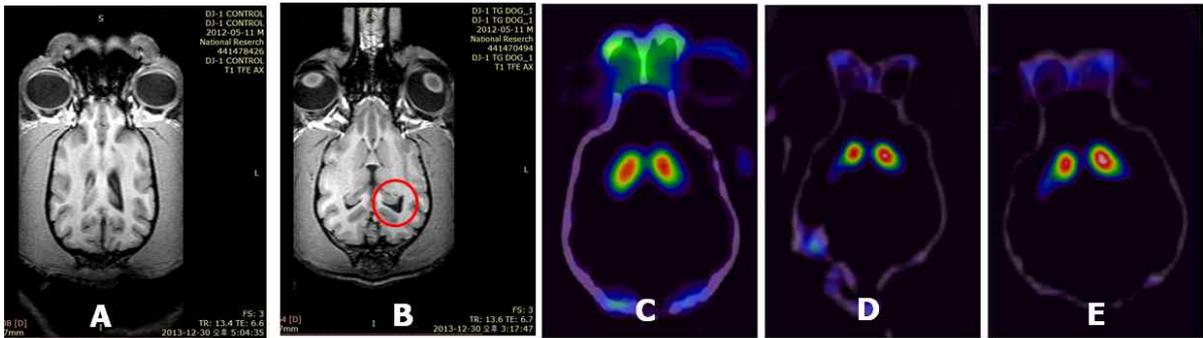
- 후대 생산된 형질전환개의 행동학적 분석



[Wendy Volhard' Puppy Aptitude Test를 통한 행동학적 분석 결과]

다. 후대 생산된 DJ-1 복제개의 영상학적 분석 및 병리학적 검증

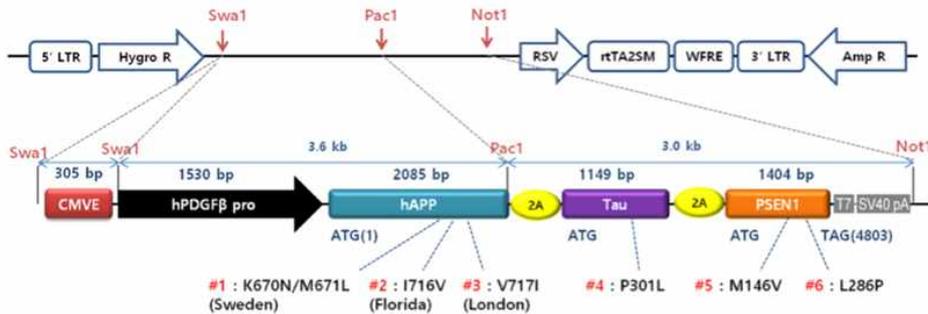
- MRI, PET-CT을 이용하여 뇌영상 촬영



[hDJ-1 형질전환 복제개의 MRI scan]

라. AD 단일유전자 과발현 구축을 위한 vector 시스템 구축

- 돌연변이형 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein, APP) 유전자 스크리닝 및 벡터 시스템 구축
- AD를 유발한다고 알려진 대표적인 3가지 유전자와 뇌에서 특이적으로 발현이 가능한 프로모터를 사용하여 vector를 구축했다. 각각의 유전자는 PCR을 이용하여 증폭하고 이를 연결하여 사용하도록 제작하고, 하나의 프로모터로 3개의 유전자를 동시에 발현이 가능하도록 2A 시스템을 이용



[AD 과발현 벡터 시스템 모식도]

- 유전자 도입 후 레트로 바이러스 시스템을 이용하여 모든 세포에 유전자 도입이 가능하도록 설계

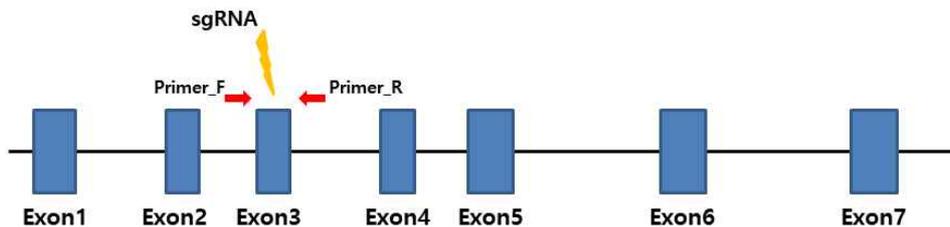
마. CRISPR/Cas9을 이용한 PD 관련 세포주 작성

- Human 파킨슨병 관련 유전자 PARK7을 표적으로 CRISPR/Cas9을 이용하여 파킨슨병 모델 세포주 확립
- PARK-7 적중 CRISPR/Cas9 제작

Name	Sequence
sgRNA_1	CCT GTA GAT GTC ATG AGA CGA GC
sgRNA_3	CCG AGA CGT CAT CAT TTG TCC TG

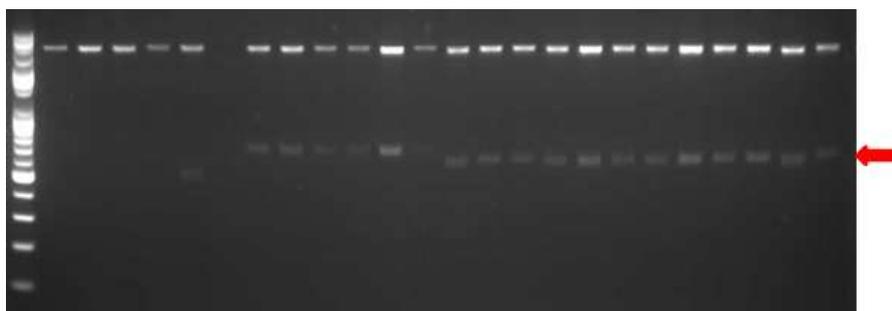
[PARK-7을 표적한 sgRNA 시퀀스]

- 유전자 편집 기술을 가진 CRISPR/Cas9을 Human 파킨슨병과 관련된 유전자인 PARK-7을 타겟하여 설계하고, 적용할 수 있도록 CRISPR/Cas9 단백질과 PARK-7의 Exon-2와 Exon-3을 타겟한 sgRNA를 합성
- 세포주 개발을 위해 제작한 CRISPR/Cas9 단백질과 sgRNA를 Canine fetal fibroblast에 적용하여, DMEM에 10%의 FBS와 1% penicillin/streptomycin을 배지와 1200V, 30mSec 전기자극 조건에서 세포주 확립
- PARK-7 적중 세포주 분석



[PARK-7의 유전자 모식도]

- sgRNA를 타겟으로 CRISPR/Cas9이 작용하여 PARK-7 유전자의 결손을 유도세포주에서 유전자 분석을 진행한 결과, PARK-7 유전자의 결손을 확인



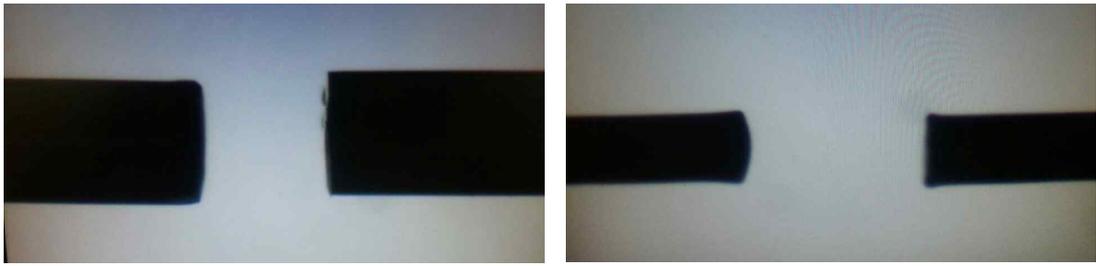
[CRISPR/Cas9이 적용된 유전자의 PCR 결과]

Translate	Consensus	TCCTGGCCAAAGGAGCAGAGGAGATGGAGAC-A-GTCATTCTGTAGATGTCATGAGACGAGCTGGAGT
PARK7.seq (1>743)	→	TCCTGGCCAAAGGAGCAGAGGAGATGGAGAC-A-GTCATTCTGTAGATGTCATGAGACGAGCTGGAGT
▶_5-M13F (-40).ab1 (14>939)	←	TCCTGGCCAAAGGAGCAGAGGAGATGGAGAC-A-GTCATTCTGTAGATGTCATGAGACGAGCTGGAGT
▶_1-M13F (-40).ab1 (10>897)	←	TCCTGGCCAAAGGAGCAGAGGAGATGGAGAC-A-GTCATTCTGTAGATGTC--AGACGACCTGGAGT
▶_6-M13F (-40).ab1 (7>891)	←	TCCTGGCCAAAGGAGCAGAGGAGATGGAGAC-A-GTCATTCTGTAGATGTCATGAGACGAGCTGGAGT
▶_3-M13F (-40).ab1 (12>809)	→	TCCTGGCCAAAGGAGCAGAGGAGATGGAGAC-A-GTCATTCTGTAGATGTC-TGAGACGAGCTGGAGT
▶_4-M13F (-40).ab1 (1>793)	←	TCCTGGCCAAAGGAGCAGAGGAGATGGAGAC-A-GTCATTCTGTAGATGTCATGAGACGAGCTGGAGT
▶_2-M13F (-40).ab1 (8>438)	←	TGTTGTCAAAGGAGCAGAG--AATGGAGACTATGTC-T-CCTAAAGATGTCATGAGTT-AGCA--GAGT

[CRISPR/Cas9이 적용된 유전자의 시퀀스 분석 결과]

바. 개 생산 시스템 개선

- 본 실험실에서 개발한 백금 남자-세포 융합바늘과 융합배지를 이용하여 융합율, 배발달율, 복제견 생산을 확인



백금 융합 바늘

티타늄 융합 바늘

[융합 바늘 비교 (×100)]

- 기존에 사용하던 티타늄 융합바늘은 약 64%인 반면, 백금 융합바늘 사용시 남자-세포 융합율이 78.5%로 향상

[체세포 복제란의 배발달율 비교]

바늘종류	No. of oocyte	No. of fused oocyte (%)	2cell (%)	4cell (%)	8cell (%)	10cell (%)
티타늄	61	41 (64.1)	26 (41.5)	19 (29.5)	9 (14.8)	2 (3.1)
백금	56	44 (78.5)	31 (62)	24 (48)	12 (24)	8 (16)

- 총 62개의 체세포 복제란을 8마리의 대리모에 이식한 결과, 6마리가 임신이 되었으며, 7마리의 복제견이 생산

사. human mutant APP 발현 세포주 구축

- family Alzheimer's disease mutant APP (swedish type) 제작. 사람 cDNA library에서 알츠하이병의 원인이 되는 유전자 서열(붉은글씨)을 확인함

wide-type APP cDNA sequence

```

ATGCTGCCCGGTTTGGCACTGCTCCTGCTGGCCGGCTGGAGCGGCTCGGGCGCTGGAGGTACCCACTGATGGTAATGCTGG
80 CCTGCTGGCTGAACCCAGATTGCCATGTTCTGTGGCAGACTGAACATGCACATGAATGTCCAGAAATGGGAAGTGGGATT
CAGATCCATCAGGGACCAAAACCTGCATTGATACCAAGGAAGGCATCCTGCAGTATTGCCAAGAAGTCTACCCCTGAACTG
CAGATCACCAATGTGGTAGAAGCCAACCAACCAAGTGACCATCCAGAAGTGGTCCAAGCGGGCCGCAAGCAAGTGCAGAC
CCATCCCACTTTGTGATTCCCTACCGCTGCTTAGTTGGTGGATTGTAAAGTATGATGCCCTTCTCGTTCCCTGACAAAGTGCA
AATTCTTACACCAGGAGAGGATGGATGTTTGCAGAACTCATCTTCACTGGCACACCGTCGCCAAAGAGACATGCAGTGGAG
AAGAGTACCAACTTGCATGACTACGGCATGTTGCTGCGCTGCGGAATTGACAAGTTCGCGAGGGGTAGAGTTTGTGTGTG
CCCCTGCGCTGAAGAAATGACAATGTGGATTCTGCTGATGCGGAGGAGGATGACTCGGATGTCTGGTGGGGCGGAGCAG
ACACAGACTATGCAGATGGGAGTGAAGACAAAGTAGTAGAAGTAGCAGAGGAGGAAGAAGTGGCTGAGGTGGAAGAAGAA
GAAGCCGATGATGACGAGGACGATGAGGATGGTGTAGAGTAGAGGAAGAGGCTGAGGAACCTACGAAAGAGCCACAGA
800 GAGAACCCAGCATTGCCACCACCACCACCACCACCAGAGTCTGTGGAAGAGGTG6TTCGAGTTCCTACAACAGCAG
CCCACTGCGCTGAAGAAATGACAATGTGGATTCTGCTGATGCGGAGGAGGATGACTCGGATGTCTGGTGGGGCGGAGCAG
GAGAGGCTTGAAGCCAGACCCGAGAGAGAATGTCCAGGTCATGAGAGAATGGGAAGAGGCGAGACGTCAGCAAGAAAGAA
CTTGCTTAAAGCTGATAAGAAAGGCAGTTATCCAGCATTTCCAGGAGAAAGTGGAAATCTTTGGAACAGGAAGCAGCCAAAG
AGAGACAGCAGCTGGTGSAGACACATGGCCAGAGTGGAAAGCCATGCTCAATGACCGCCGCGCTGGCCCTGGAGAAC
TACATCACCGCTGTGCAGGCTGTTCCTCCTCGGCTCGTACGTTTCAATATGCTAAAGAAAGTATGTCCGCGCAGAACAA
GAAGGACAGACAGCACACCCTAAAGCATTTGAGCATGTGCGCATGGTGGATCCCAAGAAAGCCGCTCAGATCCGGTCCC
AGGTATGACACACCTCCGTGTGATTTATGAGCGCATGAATCAGTCTCTCTCCCTGCTCTACAACGTCGCTGCAGTGGCC
GAGGAGATTCAAGATGAAGTTGATGAGCTGCTTCAGAAAGAGCAAACTATTGAGATGACGTCCTTGGCCAAATGATTAG
TGAACCAAGGATCAGTTACGAAACGATGCTCTCATGCCATCTTTGACCAGAAACGAAAACCAACCGTGGAGCTCCTTCCCG
1600 TGAATGGAGAGTTGAGCCTGGACGATCTCCAGCCGTGGCATTCTTTGGGGCTGACTCTGTGCCAGCCAAACACAGAAAC
GAAATTGAGCCCTGTGATGCCCGCCCTGCTGCGGACCGAGGACTGACCACTCGACCAAGGTTCTGGGTGACAAATATCAA
GACGGAGGAGATCTCTGAAGTGAAGATGATGACAGAAATCCGACATGACTCAGGATATGAAGTTCATCATCAAAAATTGG
TGTCTTTGACAGAAGATGTGGGTTCAAACAAGGTGCAATCATTTGGACTCATGGTGGGGCGGTGTTGTATAGCGACAGTG
ATCGTCATCACCTTGGTGTGCTGAAGAAGAAACAGTACACATCCATTTCATCATGGTGTGGTGGAGGTTGACGCCGCTGT
CACCCAGAGGAGCGCCACCTGTCCAAGATGCAGCAGAACGGCTACGAAAATCCAACCTACAAGTCTTTGAGCAGATGC
2080 AGAACGATATCGAATTCCTGCAGGACTACAAGACGATGA
    
```

[사람의 cDNA library에서의 APP wild-type 시퀀스(붉은글씨)]

- Site specific point mutagenesis 방법을 이용하여 wild-type APP 유전자를 알츠하이머병을 유도하는 것으로 알려진 swedish-type APP 유전자로 제작함. sequencing 방법을 이용하여 site-specific point mutation 부분 (파란색 글씨) 확인

swedish APP cDNA sequence

```

1600 GAAGITGAGCCTGTTGATGCCCGCCCTGCTGCCGACCGAGGACTGACCACTCGACCAAGTTCCTGGGTTGACAAATATCAA
GACGEGAGGAGATCTCTGAAGTGAATCTGATGACAGAATTCGACATGACTCAGGATATGAAGTTCATCATCAAAAATTGG
TGTCTTTGACAGAAGATGTGGGTTCAAACAAGGTGCAATCATTTGGACTCATGGTGGGGCGGTGTTGTATAGCGACAGTG
ATCGTCATCACCTTGGTGTGCTGAAGAAGAAACAGTACACATCCATTTCATCATGGTGTGGTGGAGGTTGACGCCGCTGT
CACCCAGAGGAGCGCCACCTGTCCAAGATGCAGCAGAACGGCTACGAAAATCCAACCTACAAGTCTTTGAGCAGATGC
2080 AGAACGATATCGAATTCCTGCAGGACTACAAGACGATGA
    
```

[swedish-type APP 시퀀스]

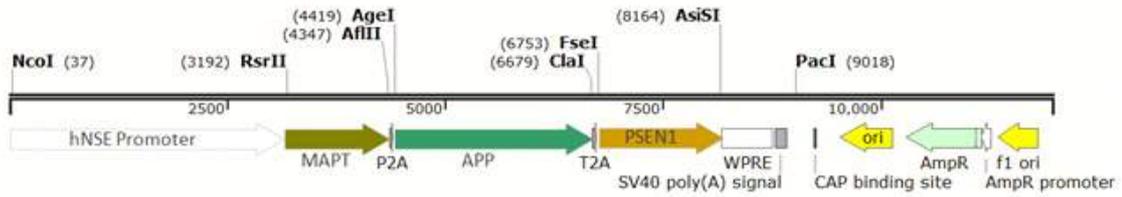
- Lentiviral vector에 swedish-type APP 유전자와 blasticidin 저항 유전자를 클로닝하여, 개의 태아섬유아세포주에 infection하여 swedish-type APP 유전자가 과발현되는 세포주 구축함. blasticidin를 이용하여 swedish-type APP 유전자가 삽입된 세포를 선별함



[swedish-type APP 유전자가 삽입된 lentiviral vector 모식도]

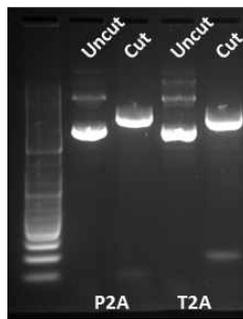
- 또한 AD를 유발한다고 알려진 대표적인 3가지 유전자 APP, Tau, PSEN1이 동시에 발현하기 위한 벡터 구축함. 각각의 유전자는 PCR을 이용하여 증폭하고 이를 연결하여 사

용하도록 제작하고, 하나의 프로모터로 3개의 유전자를 동시에 발현이 가능하도록 2A 시스템을 이용

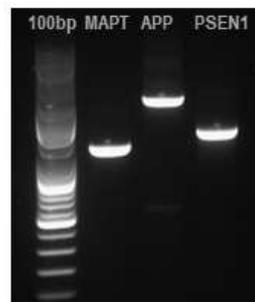


[2A 벡터 구축도]

- 각각의 유전자를 2A 사이에 삽입하여 하나의 프로모터로 3가지의 유전자를 동시 발현하도록 계획함. 각각의 2A는 sub cloning하여 시퀀싱 분석으로 확인함. 이를 이용하여 벡터를 구축하고, 각 2A 사이에 알츠하이머 질환을 유도할 수 있는 유전자를 삽입할 예정임



[2A의 sub cloning]

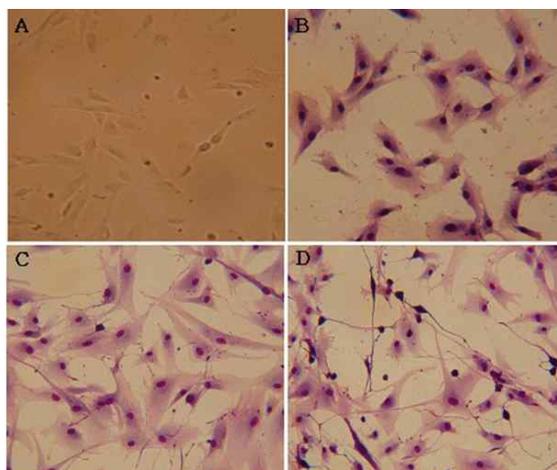


[PCR을 이용한 유전자 합성]

- 알츠하이머 질환을 유도할 수 있는 3가지 유전자를 각각 PCR로 합성한 후 시퀀싱을 통해 확인함

아. 미분화 줄기세포를 이용한 병인유전자 과발현 벡터와 녀아웃 벡터의 기능 검증

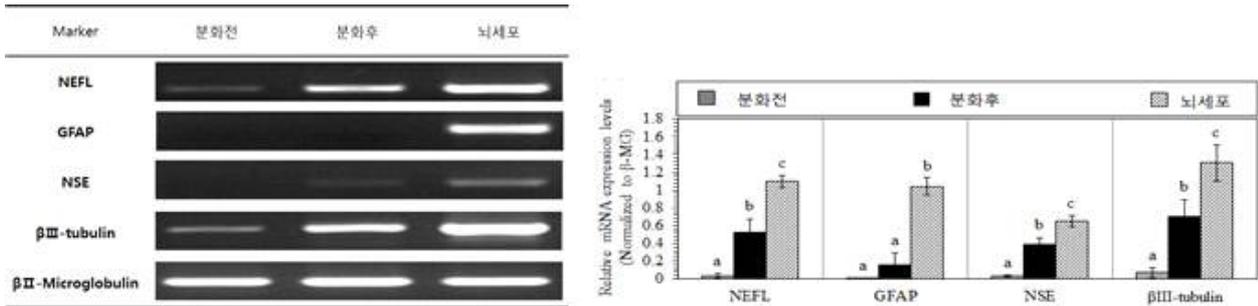
- 개 양수 유래 중간엽 줄기세포를 신경세포 분화 배지에서 배양하여 형태적 변화를 현미경을 통해 관찰함. 유도 후 시간의 경과에 따라 세포핵이 커지고 spindle 형태로 변화 후 신경세포의 돌기 부분과 비슷한 형태를 확인함



[신경세포 분화 유도 후 형태적 변화]

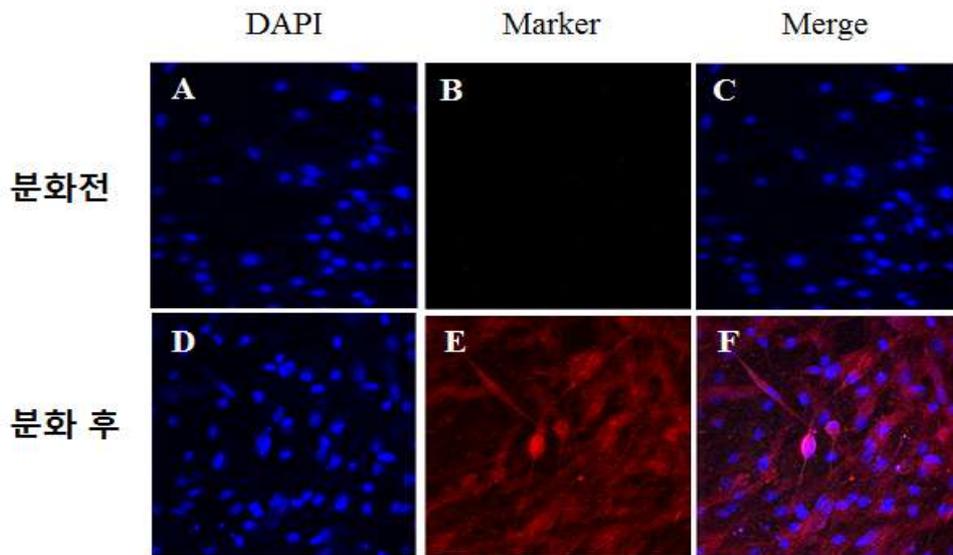
(A, B:분화 전, C: 분화 배지에서 2일 배양, D:분화 배지에서 5일 배양)

- RT-PCR을 이용하여 신경세포 특정 primer인 NEFL, GFAP, NSE, beta3-tubulin과 β 2-Microglobulin의 발현 여부를 관찰함. 분화 후 신경세포의 미성숙 마커에서도 변화를 보였지만 특히 성숙된 신경세포 마커에서 매우 큰 증가를 관찰함. 이것은 분화 된 신경 세포가 성숙된 신경 세포와 더욱 비슷하다는 것을 나타냄



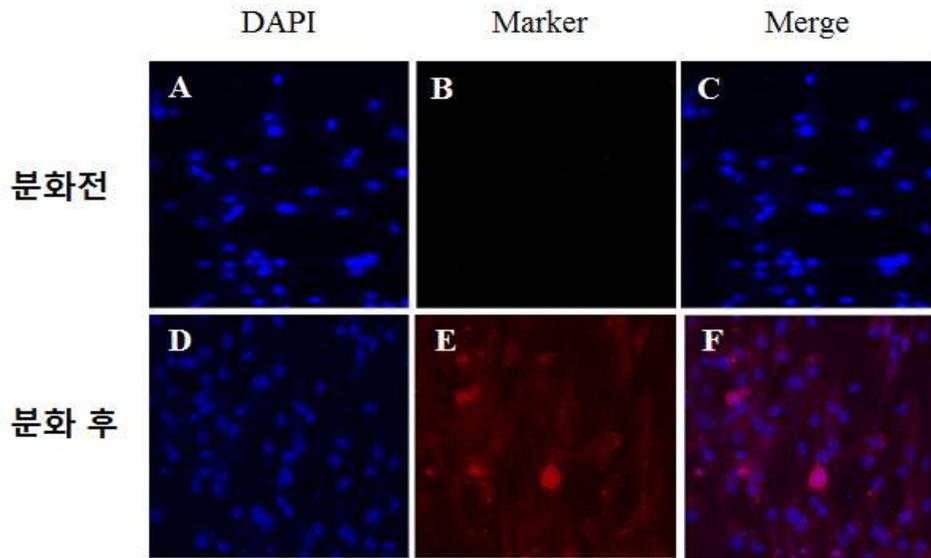
[RT-PCR을 통한 신경 세포 특정 marker 발현 여부 확인 (분화 5일 후)]

- 신경세포 분화 확인을 위해 분화된 세포를 신경세포와 관련 있는 nestin과 β 3-tubulin을 이용하여 면역 형광염색을 수행한 결과, 두 marker 모두 세포질에서 발현 양상을 보임. Tyrosine hydroxylase(TH)은 도파민신경을 포함한 모든 카테콜 신경세포에서 도파민가 카테콜을 합성하는 효소로서 조직 특이성이 매우 높기 때문에 신경계 발생과정에서 발현조절을 조사하는 marker로서, TH antibody를 이용하여 면역형광 염색한 결과, 분화된 신경 세포가 도파민 관련으로 분화됨을 확인



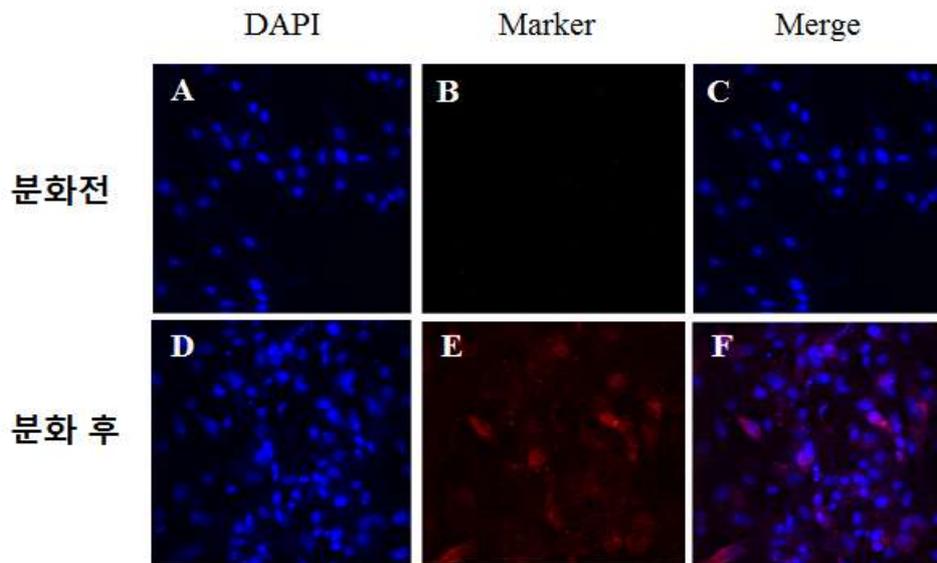
[면역형광을 통한 nestin 분석]

A-C: 분화 전 양수세포의 면역형광염색, D-F: 분화 후 nestin antibody의 발현
C, F: antibody의 발현과 DAPI 염색 병합



[면역형광을 통한 $\beta 3$ -tubulin antibody 분석]

A-C: 분화 전 양수세포의 면역형광염색, D-F: 분화 후 $\beta 3$ -tubulin antibody의 발현, C, F: antibody의 발현과 DAPI 염색 병합



[면역형광을 통한 TH antibody 분석]

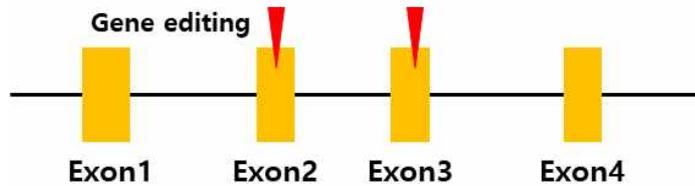
A-C: 분화 전 양수세포의 면역형광염색, D-F: 분화 후 TH antibody의 발현, C, F: antibody의 발현과 DAPI 염색 병합

자. CRISPR/Cas9을 이용한 PD 관련 유전자 결손변이체 복제개 생산 및 분자적 검증

- DJ-1을 target으로 한 gene knock-out cell을 제작하기 위해 DJ-1 유전자의 구조를 확인. 정확히 CRISPR/Cas9이 작용할 위치를 지정한 후 sgRNA를 디자인하여 DJ-1 유전자를 타겟할 vector를 구축함

[DJ-1을 표적할 sgRNA 시퀀스]

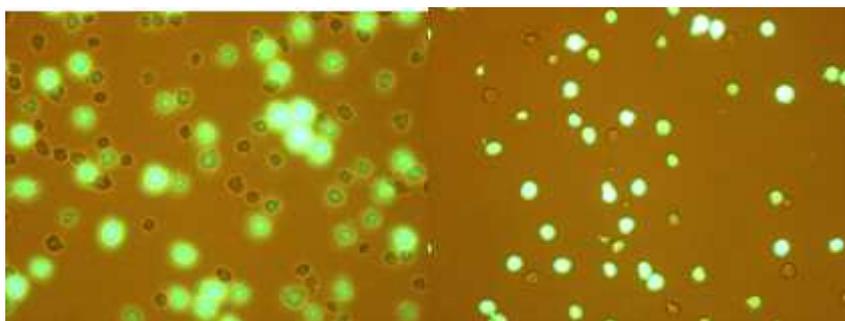
Name	Sequence
sgRNA_1	CCT GTA GAT GTC ATG AGA CGA GC
sgRNA_3	CCG AGA CGT CAT CAT TTG TCC TG



```
TAAACAAAACAAAATAAAAAACATGGTCAGAGAAAATCCAAACGGTACTGACACGTGTTAGCAACCCTGCTGTGTTTTTCAT
CTCAAAAATAACAGCAGTTGAAATCTGTGTAAACCACTGTTAACCTTAAAATGCTTTTTTTCACGTACTGTTTTGTCTCTC
AGGATCTTTCCCTAGGAGGCACCTTGGTCACCTTGCTTAAAAATGTTCCCTGAACTTGAGATTTTTTTTAAACTTGAGGTTTT
TGAATATCTTAGGGTTGCCATGCAAGTGTGTTTGAATAATCTTGTGTTTTTTTTTTTTTTCTCTCCCAATTAAGTCTTTTTAAAAA
TCAACATAAAAATGGCTTCGAAAAGAGCTCTGGTCATCCTGGCCAAAGGAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATT [sg1] CCT
GTAGATGTCATGAGACGAGCTGGAATAAGTCCCTCCCAACATTTTCAGCCCTCCCTTCTCAAACATTTTTGGGTTTTGAA
GGCATTTTTTAATAATATTCAGTGTACTTTATAAAATATTTCAAACACAAAATGCAGAGACTATATAACAATAAATGCCTGT
CTATTGTCCGCATTTAATACTTGTAAACATTTTGCCAAATTTCTGTAAATATTCCTCTTCTTGAGGAACAGATGCTTTAAA
AAGAAATAAAGCATTGCACAGCCCTCTTTGTAATTTCCCTGGATACTATTCCCTTCAACGGCAGGGATAACTCTGTCTCT
CATTAAATGTGTA
```

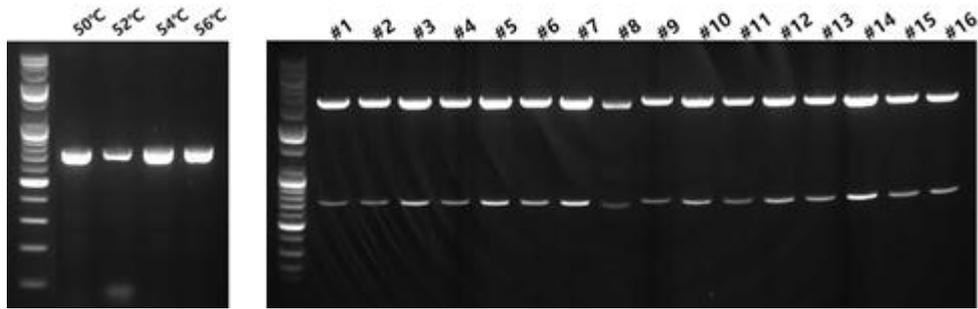
[DJ-1의 sgRNA 작용 위치(위)와 exon2의 sgRNA 타겟 위치(아래)]

- DJ-1 유전자 편집을 위해 개의 태아 섬유아세포에 protein 형태의 CRISPR/Cas9 10 μ g과 sgRNA 2.5 μ g을 사용하여 transfection을 진행함. Transfection 조건은 GFP를 이용한 조건으로 진행함



[transfection 조건을 위한 GFP가 발현하는 개 세포주]

- 제작한 세포에서 genomic DNA를 추출하여 sgRNA에 의해 타겟된 DJ-1 유전자를 PCR하여, 유전자 편집의 유무를 확인함. TA-cloning을 하여 PCR로 증폭된 DNA 패턴은 시퀀싱 방법을 이용하여 분석함



[DJ-1 유전자의 exon2 PCR(좌)과 TA-cloning(우)]

▶ Translate ▶ Consensus	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATTCTGTAGATGTCATGAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA(
<i>PARK7.seq(1>731)</i> →	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATTCTGTAGATGTCATGAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA(
▶ 1-M13F(-40).abl(7>725) ←	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATTCTGTAGA--TCATGAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA(
▶ 2-M13F(-40).abl(11>726) ←	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATTCTGTAG--GTCATGAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA(
▶ 4-M13F(-40).abl(3>726) ←	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATTCTGTAGATGTCATGAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA(
▶ 6-M13F(-40).abl(11>726) ←	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATTCTGTAG---CATGAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA(
▶ 7-M13F(-40).abl(11>728) ←	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATTCTGTAGA--TCATGAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA(
▶ 9-M13F(-40).abl(11>725) ←	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATTCTGTGTT---GTCATGAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA(
▶ 10-M13F(-40).abl(6>726) ←	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATTCTGTGA-ATGTCATGAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA(
▶ 11-M13F(-40).abl(5>724) ←	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATTCTGTGA-----GAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA(
▶ 13-M13F(-40).abl(9>723) ←	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATTCTGTGA-----CATGAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA(

[시퀀싱 분석을 통해 확인한 DJ-1 유전자 편집 패턴]

차. 정상개와 약물을 투여한 신경 질환 모델개에서의 행동학적 모니터링 개발

- 파킨슨병과 유사한 증상을 보이는 질환 모델개에 레보도파 투여함. 1일째 6.8mg/kg(1회) 씩 하루에 2회, 2~14일째 2.8mg/kg(1회)씩 하루에 2회, 12시간 간격으로 투여하고, 사람의 파킨슨병 평가척도인 UPDRS 행동학적 분석을 변형하여 평가함
- 평가항목은 정신상태, 행동 및 정서를 평가하는 우울감, 일상생활 활동을 평가하는 타액 분비, 연하운동, 보행, 경련, 운동기능검사를 평가하는 편한 자세에서의 떨림, 강직, 자세 안정도, 걷는 양상을 평가함
- F1 3-5 개체는 투약 후 16일경 강직이 덜해지고 증상이 완화됨. F2 1-2 개체와 F1 3-7 개체는 투약 후 7일경 증상이 완화됨



[파킨슨 증상발현으로 자세 불안정(좌)와 7일 투약 후 증상 완화(우)]

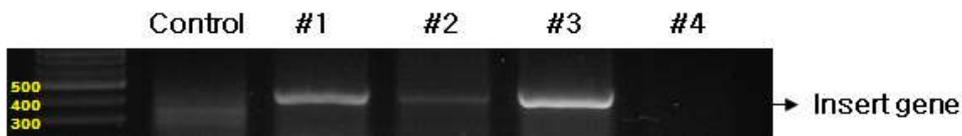
카. human mutant APP 발현하는 형질전환 복제개 생산

- swedish-type APP 유전자가 과발현되는 세포주를 이용하여 28개의 핵이식란 작성하고, 이를 3마리의 대리모에 이식함. 1마리가 임신하여 4마리의 복제견을 생산함



[생산된 복제견 4마리의 모습]

- 그 중 3마리는 swedish-type APP 유전자가 과발현되는 형질전환 복제견이고, 1마리는 일반 복제견임을 genotyping을 통해 확인함



[태어난 swedish-type APP 유전자 형질전환 개의 genotyping 결과]

- AD 신경질환 모델견에서 현재까지 증상 발현이 나타나지 않음. 본래 알츠하이머병 발현이 노인에서 대부분이기 때문에 본 실험에서 APP 유전자 한 개만으로는 증상 발현을 앞당기지 못함

타. parkin 유전자 스크리닝과 녹다운 벡터 구축

- 현재까지 early-onset 파킨슨병을 유발하는 유전자로는 적어도 여섯 개 정도의 유전자가 이 질병과 관련되며 그 중에서 상염색체 우성 돌연변이와 관련된 유전자는 alpha-synuclein, uchL1, LRRK2이고 상염색체 열성 변이와 관련된 유전자는 Parkin, PINK1, DJ-1로 알려져 있음. Parkin은 파킨슨병 환자의 50%정도에서 돌연변이가 발견될 정도로 중요한 유전자이고, DJ-1은 초기에 발병하는 파킨슨병의 1%에서 돌연변이가 발견되고 산화적 스트레스 (oxidative stress)를 상쇄시키는 중요한 기능을 함. 또한 PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) 유전자는 잠정적인 세린/쓰레오닌 kinase로 파킨슨환자의 8-15%정도에서 변이가 발견됨. PINK1유전자가 DJ-1과 상호작용하며 미토콘드리아의 기능장애와 관련 된다는 보고가 있음. 파킨슨병의 발병 원인과 메카니즘 네트워크를 밝히기 위해서, 관련 유전자들을 탐색함

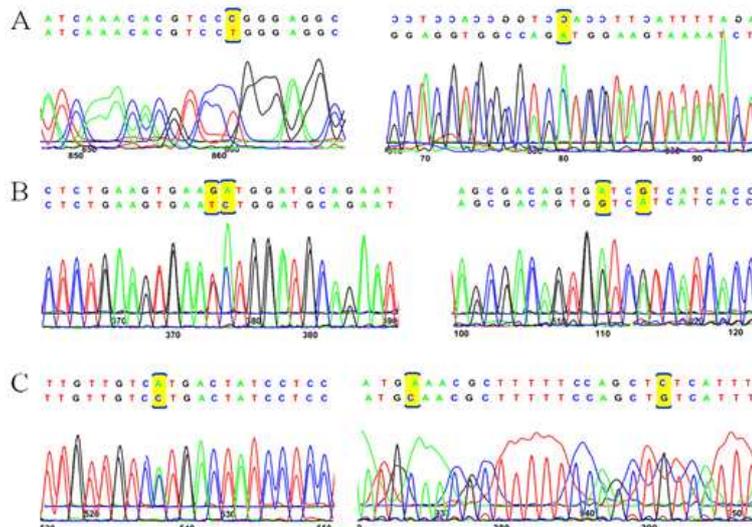
과. 복합형질전환 AD모델 복제개 생산

- 알츠하이머병 관련 유전자인 APP, MAPT, PSEN1은 각각 기존의 유전자와는 다른 알츠하이머병을 유발하는 mutation type인 isoform의 형태를 가진 유전자를 사용함. 벡터 제작에 사용된 promoter는 뇌에서 특이적으로 발현을 가능하게 하는 human NSE promoter를 사용함
- 각각의 vector는 2A system으로 연결되어 하나의 promoter로 3개의 gene을 발현 가능하게 제작함. 2A system은 바이러스에 존재하는 특이적인 유전자 sequence로 하나의 promoter로 여러 유전자를 발현시키고 coding된 유전자는 자연스럽게 분리되어 각각의 단백질으로 역할을 하게 한다고 알려짐. APP와 MAPT, MAPT와 PSEN1 사이에 각각 2A로 연결하여 하나의 promoter로 3가지의 gene이 발현되도록 조절함. 또한 2A는 각각 P2A와 T2A를 사용하여 서로 다른 효과를 내도록 조절함 (porcine teschovirus-1 2A (P2A)와 Thoseaasigna virus 2A (T2A)로써 각각의 바이러스에서 유래한 2A의 이름을 따서 P2A와 T2A라 함)
- 벡터가 삽입된 형질전환 세포를 구분하기 위한 마커로 Neomycin과 형광을 발현하는 유전자인 GFP를 vector에 도입하고, 이 때 GFP 유전자는 CAGGS promoter를 사용하였음



[완성된 vector의 모식도]

- 각각의 유전자와 promoter는 PCR(Polymerase Chain Reaction)방법을 이용하여 증폭한 후 sequencing analysis를 통해 이상 유무를 확인함. 각각의 3가지 유전자에 대한 site-directed mutagenesis (SDM)의 효율을 확인한 결과, 아래의 표와 같은 결과를 확인함

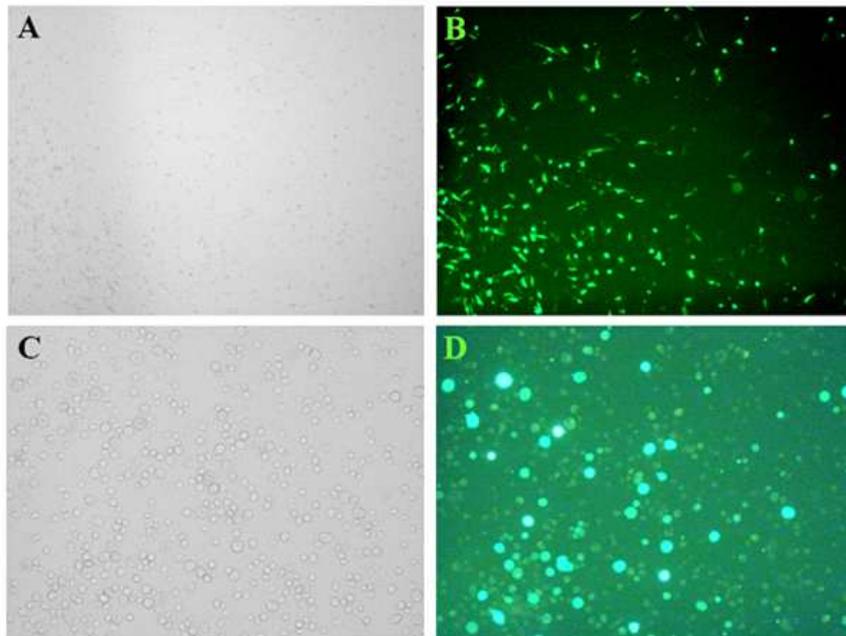


[각각 MAPT (A), APP (B) 그리고 PSEN1 (C)의 wild type과 mutant type의 sequencing analysis]

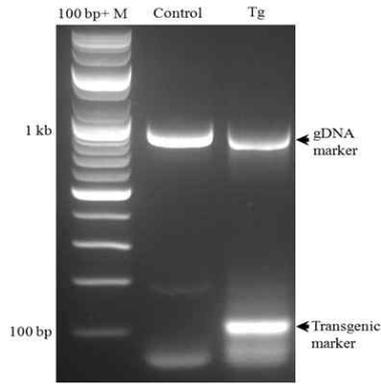
[SDM efficiency. SDM transformants as a proportion of total sequenced transformants]

Gene	SDM for 1st locus	SDM for 2nd locus
MAPT	2/4 (50 %)	1/5 (20 %)
APP	2/4 (50 %)	6/6 (100 %)
PSEN1	1/4 (25 %)	4/6 (67 %)

- 개의 태아섬유아세포를 이용하여 알츠하이머 관련 유전자가 삽입된 세포주를 구축함.
- Transfection은 Invitrogen에서 제공하는 Neon을 사용하여 진행하였으며, 3×10^5 의 세포와 2.5 μ g의 벡터를 사용함. 아래 그림에서 A와 B는 각각 bright field(오른쪽)와 GFP field(왼쪽)로 보여주고 있으며, GFP를 발현하는 세포는 transfection이 되어있음을 확인함
- NSE promoter의 activity는 DNA 수준을 제외한 성숙한 신경에 대해 보고된 것이 대부분이기 때문에, 우선 개의 태아섬유아세포에서는 tricistronic mRNA 또는 그것의 단백질의 탐지가 거의 불가능함. 따라서 duplex PCR에 의한 세포 내 형질전환된 construct의 유무를 확인함. 개의 유전자를 타겟하는 gDNA(cSYN) primer에 대해서는 일반세포와 형질전환된 세포에서 모두 PCR 밴드를 확인하였으나, specific P2A 시퀀스에 대해서는 형질전환된 세포에서만 밴드를 확인함



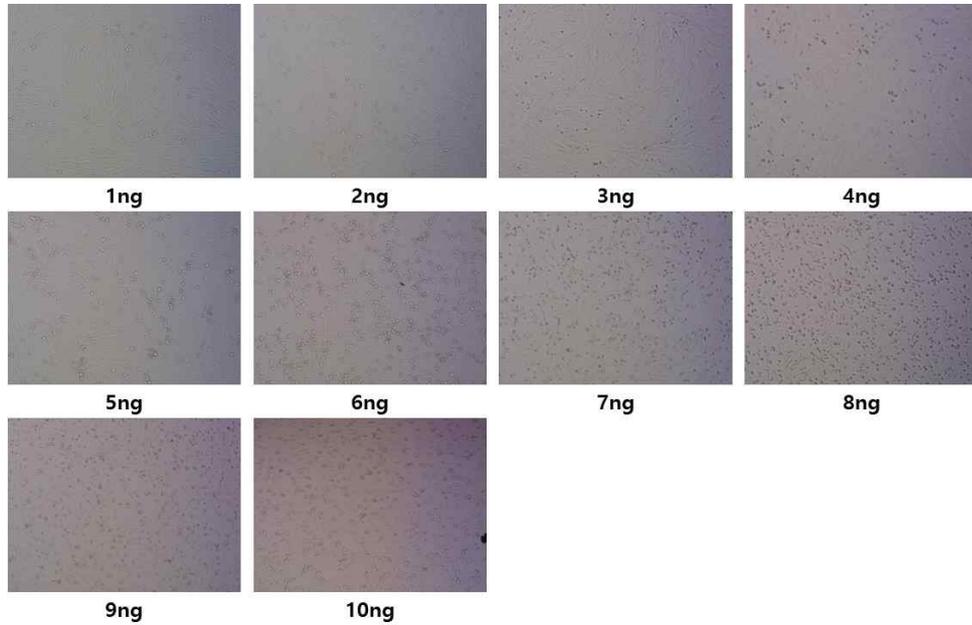
[Transfection 확인된 세포주. bright field(A,C)와 GFP 발현(A,D)]



[Duplex PCR based confirmation]

하. 복합 넉아웃 PD모델 복제개 생산

- DJ-1 넉아웃 세포주를 구축하기 위해 CRISPR/Cas9을 도입한 후 selection을 위한 항생제 killing test를 진행함. Puromycin 항생제를 각 well마다 1ng/μl에서 10ng/μl 높여가며 사용함

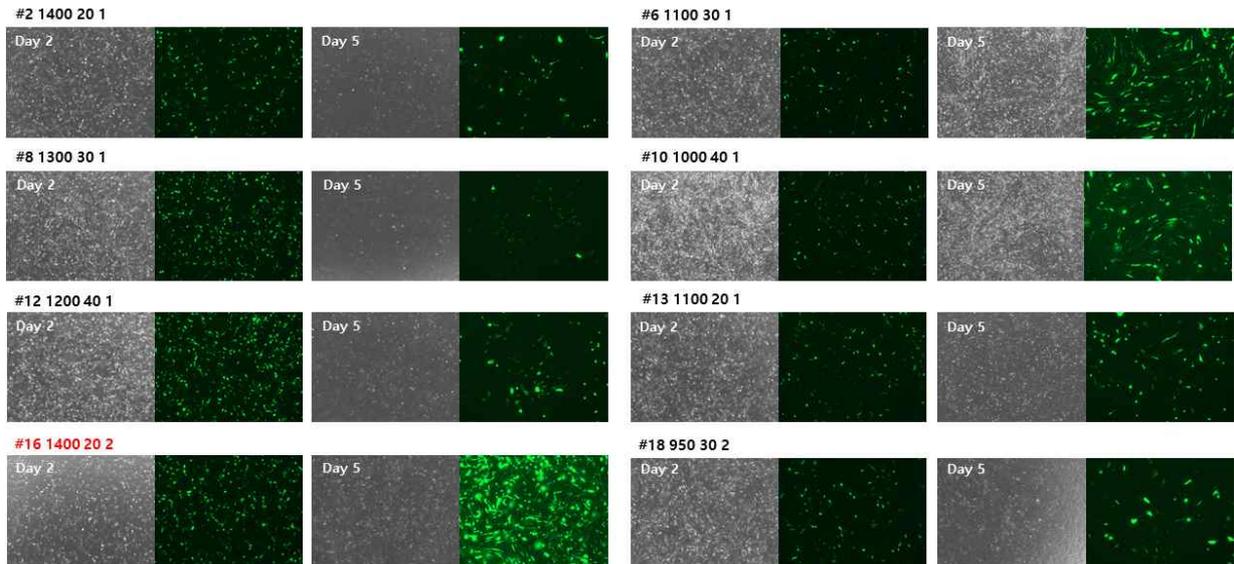


[Puromycin killing test 결과]

- 개 태아섬유아세포에 최적의 transfection 조건을 찾기 위해 test를 진행함. 24개의 조건으로 2×10^5 의 cell과 500ng/μl의 control DNA를 이용하여 진행함

[Transfection 조건]

NO	V	mSec	P												
1	0	1	1	2	1,400	20	1	3	1,500	20	1	4	1,600	20	1
5	1,700	20	1	6	1,100	30	1	7	1,200	30	1	8	1,300	30	1
9	1,400	30	1	10	1,000	40	1	11	1,100	40	1	12	1,200	40	1
13	1,100	20	2	14	1,200	20	2	15	1,300	20	2	16	1,400	20	2
17	850	20	2	18	950	30	2	19	1,050	30	2	20	1,150	30	2
21	1,300	10	3	22	1,400	10	3	23	1,500	10	3	24	1,600	10	3



[Transfection test 결과]

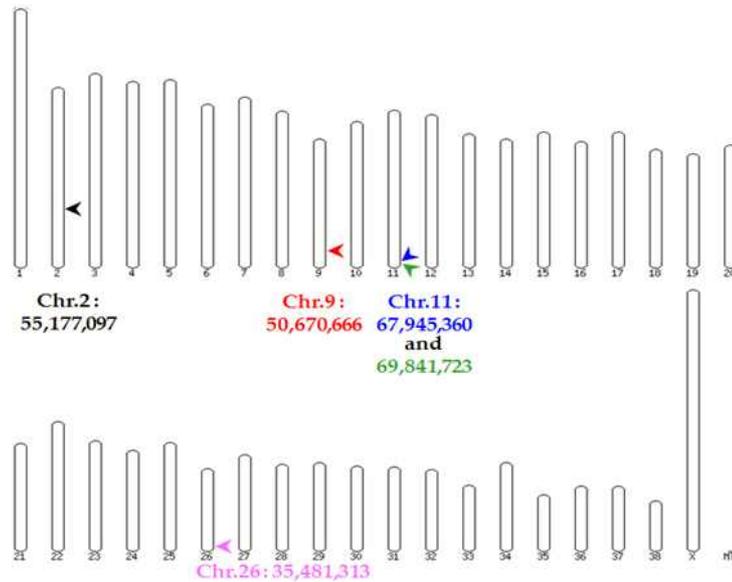
- CRISPR/Cas9 도입을 위한 transfection을 진행함. CRISPR/Cas9은 piggy-bac system을 이용한 방법으로 도입함. PB-Cas9-Puro vector와 Transpose vector 두 가지를 함께 transfection함. Transfection의 조건은 test 결과 1,400V, 20mSec, 2p와 1,600V, 10msec, 3p의 조건으로 진행함
- Transfection 이후 puromycin 4ng/μl를 처리하여 CRISPR/Cas9이 도입되지 않은 cell과 도입된 cell을 selection함. 세포를 충분히 culture하여 키운 후 sgRNA를 추가로 transfection하여 Knock-out을 진행함
- Knock-Out cell에서 gDNA를 분리하여 sequencing 분석을 진행함

▶ Translate ▶ Consensus	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATT CCTGTAGATGTCATGAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA
<i>PARK7.seq (1>731)</i> →	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATT CCTGTAGATGTCATGAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA
▶ 1-M13F(-40).abl (7>725) ←	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATT CCTGTAGA--TCATGAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA
▶ 2-M13F(-40).abl (1>726) ←	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATT CCTGTAG--GTCATGAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA
▶ 4-M13F(-40).abl (3>726) ←	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATT CCTGTAGATGTCATGAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA
▶ 6-M13F(-40).abl (11>726) ←	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATT CCTGTAG---CATGAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA
▶ 7-M13F(-40).abl (11>728) ←	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATT CCTGTAGA--TCATGAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA
▶ 9-M13F(-40).abl (11>725) ←	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATT CCTGT---GTCATGAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA
▶ 10-M13F(-40).abl (6>726) ←	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATT CCTGTA-ATGTCATGAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA
▶ 11-M13F(-40).abl (5>724) ←	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATT CCTGTA-----GAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA
▶ 13-M13F(-40).abl (9>723) ←	GAGCAGAGGAGATGGAGACAGTCATT CCTGTA-----CATGAGACGAGCTGGAGTAAGTCCTCCCAA

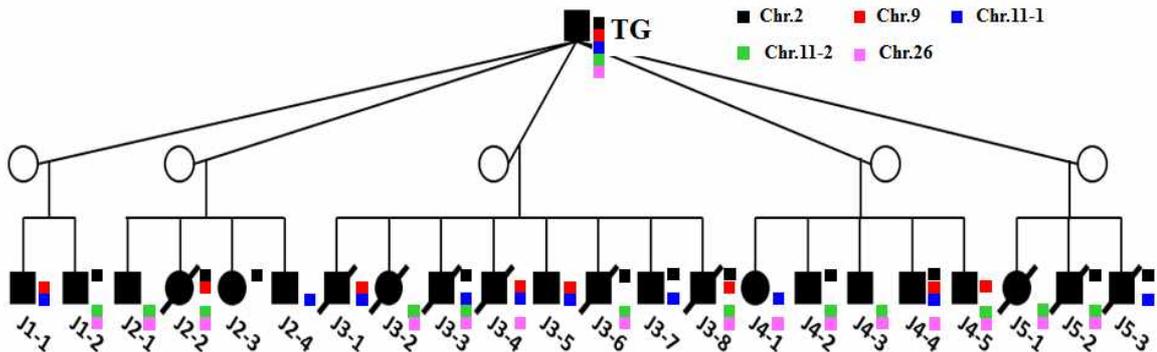
[Sequencing 분석 결과]

거. 질병모델 복제개의 대량번식 체계구축

- 질병모델 복제개 수컷의 정액을 이용하여 일반 암컷 비글견에 인공수정하여 다음 세대의 질병모델견을 생산함. 이들의 genomic DNA를 추출하여 PCR을 수행한 결과 자손들 모두 DJ-1 유전자를 가지고 있는 것을 확인함.
- 질병모델 복제개에서 DJ-1 유전자가 개의 염색체 상에 삽입된 곳을 확인하기 위해 inverse PCR을 수행한 결과, 염색체 2, 9, 11 (2곳), 26번에 삽입을 확인함. 또한 자손들에서도 삽입 위치를 확인함



[질병모델 복제개의 inverse PCR 결과]



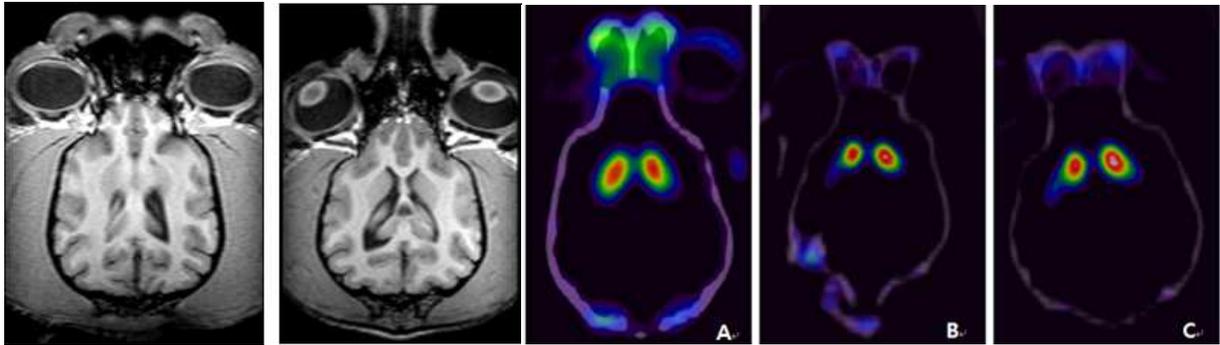
[질병모델 복제개 자손들의 inverse PCR 결과]

너. PD/AD 모델건의 확립

- 각각의 복제건의 뇌병변에 대해 MRI와 pet-CT 뇌영상을 통해 PD/AD 질병의 진단 및 평가를 실시하고, 24시간 모니터링을 통해 PD/AD 질병의 증상 및 진행 양상을 확인함. 또한 후성학적인 평가를 위해 DNA methylation의 비교 분석과 Histone modification Chip-Seq 분석을 실시함
- 생산된 복제건의 뇌영상학적 평가, 행동학적 및 유전학적/후성학적 평가를 통해 PD/AD 질병모델건 임을 확립함



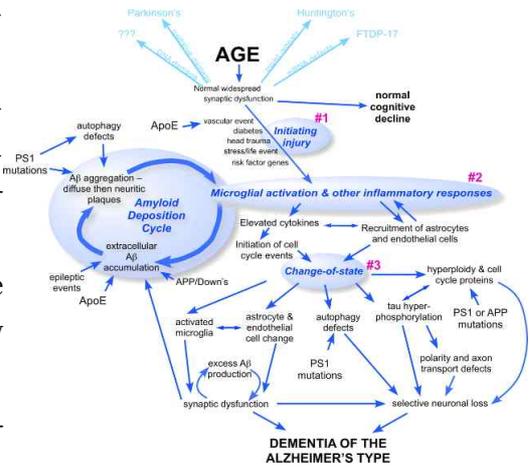
[PD/AD 모델건의 행동학적 분석]



[질병모델건 뇌의 영상학적 분석]

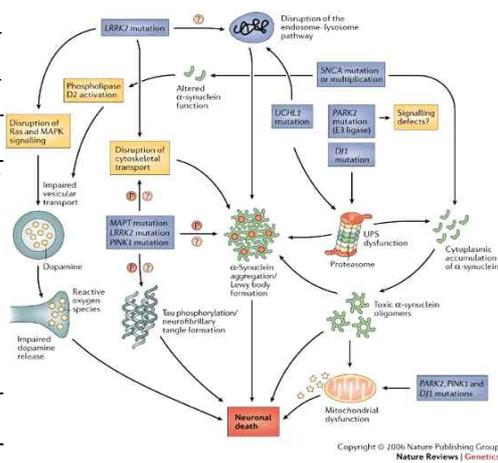
2-2. 연구개발 추진전략 및 방법

- ① 알츠하이머병은 가장 흔한 퇴행성신경질환(neurodegenerative disease)의 하나로 현재까지 AD를 완치시킬 수 있는 명확한 치료약이나 치료법은 없다.
- ② AD의 주요한 병리학적 특징은 해마와 대뇌 피질의 신경세포 외부에는 아밀로이드 베타 단백질(amyloid β protein, A β)로 구성된 노인성 반점(senile plaque, SP)이, 신경세포 내부에는 과인산화된 타우 단백질(hyperphosphorylated tau protein)로 구성된 신경섬유 덩어리(neurofibrillary tangle, NFT)의 두 가지 불용성 단백질이 축적된다는 것이다.
- ③ 이러한 현상의 원인은 (i) 노인성 반점(senile plaque)과 신경섬유 덩어리(neurofibrillary tangle)를 생성하게 하는 A β 와 tau 단백질의 과발현 혹은 돌연변이, (ii) 면역반응 혹은 산화성 스트레스를 포함한 수없이 많은 기능 구조적 변화, (iii) 그리고 이들 모두의 복합적 반응에 의한 것으로 알려지고 있는데, 가장 주된 원인은 아밀로이드 베타 단백질(amyloid β protein)과 tau 단백질의 이상이다.



[AD발병 mechanism]

- ④ 파킨슨병은 뇌의 흑질(substantia nigra)에 분포하는 도파민 신경세포가 선택적으로 파괴되어 발생하는 것으로 알츠하이머병에 이어 가장 흔한 질환이며, 안구떨림, 경직, 운동완만(운동느림) 및 자세 불안정성이 특징적으로 나타난다.
- ⑤ 노인 인구 증가에 따라 환자수가 증가하고 있으며, 50세 이전에 발병하는 조기발현 파킨슨병 환자도 증가하고 있으나, 현재까지 조기 진단 및 예방, 완치가 가능한 명확한 치료약이나 치료법은 없다.
- ⑥ PD에서 나타나는 선택적 세포 파괴의 발병기전 및 원인도 밝혀져 있지 않으며, 현재 유전적 인자와 환경적 인자가 서로 상호작용을 일으킨다는 '다인성 가설'이 가장 보편적으로 받아들여지고 있다.
- ⑦ 대부분의 파킨슨병 환자들은 가족력 없이 발병하지만 약 10% 정도에서는 가족성 파킨슨병이 나타나고 있다. 현재까지 유전자 돌연변이에 의한 가족성 파킨슨병이 밝혀지고 있는데, 가장 먼저 확인된 유전성 파킨슨 질환은 alpha-synuclein gene defect의 autosomal dominant inheritance에 의하여 발생하는 것이다.



[PD 질환의 병인론]

- ⑧ 이 alpha-synuclein은 PD환자의 중뇌 흑질의 도파민 뉴런의 세포질 내에 침착되는 Lewy body의 주된 구성 성분이다. 이외에도 young onset juvenile PD를 일으키는 familial genetic PD로 잘 알려진 대표적인 gene들은 Park2(Parkin), Park6(PTEN-induced kinase 1; PINK), 및 park7(DJ-1)이다.

- ⑨ 이들 유전자 결함에 의한 familial PD의 경우 증상 발현은 10대에서 20대부터 발현되며 모두 autosomal recessive inheritance에 의하여 발생하는 early onset juvenile PD질환들이나 아직까지 이러한 세 유전자에 의한 PD 발생의 정확한 기전 및 상호 작용에 대해 알려진 바가 없다.

따라서 본 연구에서는 **신경계질환의 원인이 되는 유전자의 과발현 및 KO/KD를 통해 형질전환 세포주를 작성하여, PD/AD 모델 복제개를 생산하고 이들 유전자의 기능을 규명하는 것을 최종 목표로 설정**하고 다음과 같은 구체적 전략을 수립하여 연구를 수행하고자 한다.

구체적 전략 1. 체세포 핵이식 세포주의 확립

Progesterone 농도로 정확한 배란일을 측정한 후 배란 3일 후에 자연교미한 비글견의 태아를 임신 28일령에 제왕절개 방법으로 회수한다. 회수된 태아는 39°C, 5% CO₂ 및 95% 공기의 가습 조건으로 10% (v/v) FBS (Invitrogen, Carlsbad, CA), 1 mM 글루타민 (Invitrogen, Carlsbad, CA), 25 mM NaHCO₃ 및 1% (v/v) minimal essential medium (MEM) nonessential amino acid solution (Invitrogen, Carlsbad, CA)이 보충된 DMEM에서 6 내지 10일 간 배양한다. 부착되지 않은 세포 또는 외식편 덩어리를 제거한 후, 부착된 세포들이 컨플루언시 (confluency) 될 때까지 계속 배양한다. 이들 세포들을 3 내지 5일 간격으로 0.1% 트립신/0.02% EDTA을 사용하여 3분 간 트립신 처리하고 추가 계대를 위해 적정농도로 배분하여 2개의 새로운 배양접시에 계대 배양하고, 나머지 세포는 동결 배지를 사용하여 -196°C의 액체 질소 내에서 동결 저장한다. 배양된 세포주들은 이용한 체세포 핵이식을 시도하여 복제 가능성을 탐색한 후, 복제에 성공한 세포주를 형질전환 세포주로 사용한다.

구체적 전략 2. 파킨슨병 모델 동물을 이용한 DJ-1의 분자적 기능 규명

파킨슨병은 퇴행성 신경계 질환으로는 두 번째로 빈번한 질병이다. 유전학적 연구 결과, DJ-1, Parkin, PINK1, alpha synuclein, LRRK2 등의 유전자가 이 질병과 관련되어 있다는 사실이 밝혀졌다. 이 중 DJ-1은 열성유전자로 알려져 있으며, chaperone, protease, glyoxalase 등의 기능이 보고되어 있다. 이처럼 다양한 기능을 가진 DJ-1에 대해서 아직까지도 분명한 발병 메커니즘이 확립되어 있지 않다. 따라서 선충, 마우스, DJ-1이 과발현되는 형질전환 개를 이용하여 기존에 알려진 기능을 토대로 DJ-1의 기능을 규명하고자 한다. 접근 방법으로는 형질전환 개와 정상 개체에서 얻은 체세포에 glyoxal를 처리한 후 세포 생존능력을 cell viability assay로 비교한다. 또한 glyoxal에 의해 일어나는 단백질 변형 (Advanced glycation endproducts)과 대사물질의 변화를 웨스턴 블랏과 HPLC를 이용하여 관찰할 것이다. 세포 사멸 과정을 p38, PARP 등의 세포사 관련인자들의 변화로 추적할 것이다.

구체적 전략 3. 파킨슨병 발병 메커니즘 및 행동 실험에 의한 관련성 확인

생쥐를 이용한 동물모델에서는 파킨슨병 유도물질을 처리하여 뇌의 흑질부위와 선조체에 위치한 도파민 신경 세포의 사멸을 관찰하고 있다. 하지만 도파민 신경세포의 사멸은 관찰되었으나 운동성의 이상에 대해서는 뚜렷한 이상이 없는 경우도 있다. 본 연구진은 파킨슨

병 동물모델인 DJ-1 과발현 형질전환 개와 정상 개체에 대해 glyoxal을 처리한 후 도파민 신경세포의 사멸을 면역조직화학법으로 비교할 것이다. 그리하여, 파킨슨병을 앓는 환자에서 관찰되는 운동성 이상을 파킨슨병의 개 모델에서도 관찰하여 질병의 진행과정과 치료방법을 찾아낼 수 있게 될 것이다. 생쥐에서 수행되고 있는 open field test등의 운동성 측정실험을 수행할 것이며, sugar preference test등을 시도할 것이다. DJ-1의 기능이 glyoxalase이기 때문에, glyoxal의 처리에 따라 질병이 유도될 경우 이상적인 파킨슨병 동물 모델이 될 가능성이 있다.

구체적 전략 4. 유전자의 절단 실험

유전자 결손 동물모델을 만들기 위해 많이 쓰이는 방법은 homologous recombination (HR)으로 원하는 타겟 유전자를 제거하는 것이다. 그렇지만 이 방법은 별도의 타겟 벡터가 제작되어야하고 이 벡터가 도입된 세포주를 다시 선별해야한다는 번거로움이 있으며, 약 6-12개월 정도가 소요되기 때문에 용이하지 않다. 따라서 본 연구진은 최근에 개발된 CRISPR/Cas9 기술을 이용하여 파킨슨병 관련 유전자 (DJ-1, Parkin, PINK1)의 결손을 시도하게 될 것이다. CRISPR/Cas9 시스템은 병원성 세균에서 유래한 단백질인 Cas9을 이용하는 방법이며 세균의 면역 기능에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이는 세균에 외부의 DNA나 RNA가 침입하였을 때 작용한다. 현재 CRISPR/Cas9 기술을 이용하여 결손 생쥐와 게잡이원숭이를 만드는 일이 가능해졌다. 따라서 본 연구진은 CRISPR/Cas9 기술을 이용하기 위하여, 리포터벡터를 만들 예정이다. 리포터벡터의 중간에 타겟 시퀀스를 클로닝하고 Cas9으로 자르면 SSA (single strand annealing)에 의해 형광마커인 GFP와 항생제 마커인 puromycin이 발현된다. 파킨슨병 관련 유전자 (DJ-1, Parkin, PINK1)의 절단 위치를 예측하고, CRISPR/Cas9 기술에 필요한 RNA 단편을 제작하여 293T 세포에 형질전환하여 동시에 여러 RNA 후보 배열을 테스트할 것이다. 이어서 DNA를 뽑은 후 T7 endonuclease1 assay를 통하여 이 기술의 효율성을 측정할 것이다. 이 중 가장 높은 효율을 보인 기술로 파킨슨병 모델건을 만들고자 한다.

구체적 전략 5. 파킨슨병 유전자 결손 개의 생산 및 병리학적 이상 규명

CRISPR/Cas9 기술을 이용하여 만들어진 파킨슨병 유전자 결손 개는 여러 가지 방법을 이용하여 확인할 수 있다. 우선 Vector insertion 유무를 판단하기 위하여 특정 primer를 이용하여 PCR을 수행하여 Transgenic 유무를 확인한다. 또한 지놈 상 원하는 부분에 정확하게 targeting 되었는지를 판단하기 위하여 sequence analysis를 통하여 유전자 결손 유무를 검증한다. 목적하는 유전자 결손변이체가 만들어지면 병리학적 방법을 적용하여, 뇌의 흑질부위와 선조체에서 도파민 신경세포의 사멸여부를 조사하고, 기존에 보고되지 않은 병리학적 변화를 찾게 될 것이다. 행동 실험으로는 동작의 둔화, 근육경직, 떨림 등에 의한 보행 장애를 검사하고, 운동장애 여부를 판단하며, 총체적으로 파킨슨병에 대한 체계적인 접근 방법을 모색하고자 한다. 뿐만 아니라, 대사적 스트레스를 야기시킴으로써 그에 따른 각 유전자의 역할과 상호관계를 파악하여 궁극적인 메커니즘의 규명을 시도하고자 한다. 또한 glyoxal의 체내농도는 glycemia의 조건에 따라 영향을 받을 수 있다. 이러한 영향으로 seizure의 발생 유무를 예측할 수 있고, glyoxal 장기적 노출에 의한 도파민 신경세포의 소실이라는 가정 하에, 신경생리학적 방법이나 EEG등을 이용한 분석이 이루어 질 것이며, fMRI나 PET등을 이

용한 관찰도 가능할 것이다.

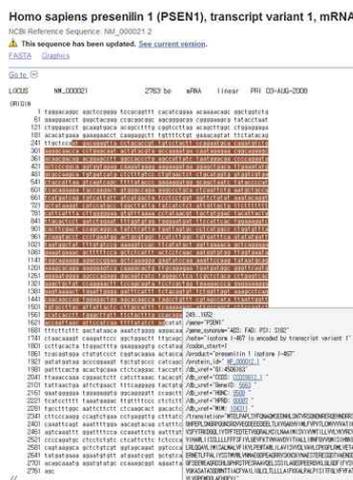
구체적 전략 6. 알츠하이머 질환 유도 핵심 유전자 발현 렌티바이러스 벡터 시스템 구축

노인의 정신기능 장애를 특징적으로 나타내는 알츠하이머 질환은 치매(dementia)의 가장 흔한 형태이며, 최근 인류의 평균수명이 증가함에 따라서 알츠하이머병과 같은 노화 관련 질환이 증가 하고 있다. 알츠하이머병의 가장 큰 원인으로 알려진 아밀로이드 올리고머(amyloid oligomer)는 아밀로이드 섬유(amyloid fibril) 및 플라크(plaque)라 불리는 알츠하이머 병 환자들의 뇌에서 발견되는 단백질 퇴적물 형성의 근간이다. 그러므로 알츠하이머병의 효과적인 유도를 위하여 아밀로이드 올리고머가 대량 생산되는 amyloid precursor protein(APP)와 presenilin 1(PS1) mutant type이 동시에 발현하는 렌티바이러스 벡터를 제작 할 계획이다.

기존에 사용되는 유전자 전달 시스템인 adenoviral vector와 retroviral vector는 염증반응이 발생하며, 신경과 같은 분화가 완료되는 세포에서 발현이 되지 않는 한계가 있다. 그래서 염증반응이 없으며, 분열하지 않는 세포에서도 안정적인 발현을 보여주는 유전자 전달 시스템인 렌티바이러스를 사용할 예정이다.

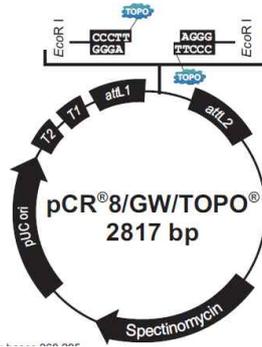
1) APP와 PS1의 Human cDNA 확보

- APP human cDNA는 본 연구진이 이미 구축한 cDNA library로부터, PS1은 ORIGENE 에서 판매하는 pCMV6-XL5-PSEN1(NM_000021) Human cDNA clone으로부터 구입하여 구축할 계획이다.



[Human Presenilin 1 유전자의 CDS 영역]

- 구입한 PS1 유전자의 clone을 TOP10 competent cell에 transformation 하여 확보하고 plasmid는 mini prep을 통하여 확보할 계획이다.
- PS1유전자는 Taq polymerase를 이용하여 PCR을 통해서 증폭시킨 후 pCR8/GW/TOPO (그림 15) 벡터에 transformation하여 37°C 에 agar 배지에 배양할 계획이다. 항생제는 spectinomycin을 사용할 계획이다. 배양한 pCR8/GW/TOPO-PS1 벡터의 colony가 형성 되면 broth 배지에 배양한 후 mini prep을 통하여 plasmid를 확보할 예정이다.



[pCR8/GW/TOPO 벡터의 모식도]

2) Point mutation을 이용하여 APP와 PS1 유전자의 mutation 확보

- APP와 PS1 mutation type의 cDNA를 확보하기 위하여 pCR8/GW/TOPO 벡터에 삽입된 APP와 PS1 유전자를 site-direct mutagenesis kit를 이용하여 point mutation을 유도할 계획이다. APP는 K595N/M596L, PS1은 A264E mutation을 제작할 계획이다. 본 연구진은 이미 APP(K595N/M596L) mutation은 보유하고 있으며, PS1(A264E) mutation을 제작할 예정이다.

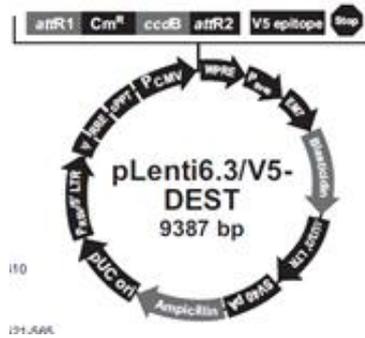
3) APP/PS1 mutation 유전자가 동시에 발현하는 렌티바이러스 벡터 시스템 구축

- APP/PS1 각각의 mutation이 동시에 발현하는 벡터 시스템을 구축하기 위하여 pGEM T 벡터에 APPswe 유전자를 삽입한 후 제한효소 절단을 이용하여 PS1 유전자를 삽입할 계획이다.
- APP 유전자 뒤에 종결코돈을 인식하지 않고 다음 유전자를 발현시키는 시스템으로 알려진 IRES나 2A 시스템을 이용하여 PS1의 mutation도 동시에 발현시키는 시스템을 구축할 계획이다.



[완성된 APP/PS1 벡터 모식도]

- 2A 또는 IRES 염기서열을 이용하여 한 개의 promoter에서 2개의 유전자의 발현을 유도할 계획이다.
- 완성된 APP/PS1의 double mutation이 동시에 발현하는 APP-2A-PS1 또는 APP-IRES-PS1 유전자를 pCR8/GW/TOPO 벡터에 삽입할 계획이다.
- APP/PS1 double mutation 유전자가 발현하는 렌티바이러스 벡터를 제작하기 위하여 LR clonase를 이용한 gateway 시스템을 이용할 계획이다. 먼저, entry vector (pCR8/GW/TOPO)에 삽입되어 있는 돌연변이 DJ-1 유전자를 LR clonase를 이용하여 pLenti6.3/V5/DEST (invitrogen), destination vector에 삽입할 계획이다. pLenti6.3/V5/DEST 벡터는 CMV promoter를 통해서 유전자의 발현이 유도되고, blasticidin이 EM7 프로모터를 통해서 발현되어 항생제를 통한 세포군의 선별이 가능하다.



[pLenti6.3/V5-DEST 벡터의 모식도]

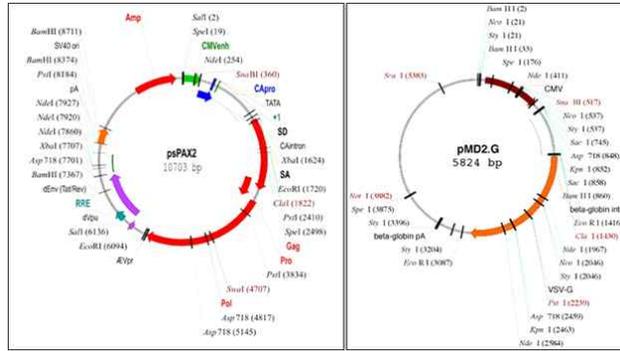
4) APP/PS1 mutation 유전자가 동시에 발현하는 렌티바이러스 벡터 시스템 구축

- APP/PS1 double mutation 유전자가 발현하는 벡터는 모두 LR clonase에 의해서 pCR8/GW/TOPO 벡터에서 pLenti6.3/V5-DEST 벡터로 recombination이 발생하여 삽입된다. pLenti6.3/V5-DEST 벡터는 Stbl3 competent cell에 transformation하여 배양하며, 항생제는 ampicillin을 사용할 계획이다.
- 배양된 pLenti/V5-DEST-APP/PS1 벡터는 broth 배지에 배양 후 plasmid를 추출하여 검증할 계획이다. 첫 번째 검증방법은 제한효소를 이용하여 절단된 밴드의 크기를 확인하고 sequencing을 통하여 정확한 염기서열을 검증할 계획이다. 검증된 벡터는 E.coli. stock을 확보하여 추후 실험시 용이하도록 할 계획이다.
- 검증이 완료된 렌티바이러스 벡터를 세포주에 transfection하여 발현을 검증하기 위해서 확보된 벡터 stock을 통해서 broth배지에 대량 배양 후 midi나 max prep을 통하여 양질의 plasmid를 대량으로 확보 할 예정이다. 인간세포주에 APP/PS1 유전자의 발현을 검증하기 위하여 HEK293 세포에 lipofectamine2000을 이용하여 transfection을 실시하여 36시간 후 단백질 및 RNA를 추출할 계획이다. 단백질은 동량의 단백질을 이용하여 western blotting을 이용하여 각각 APP, PS1, V5항체를 이용하여 검증할 계획이다. RNA는 cDNA를 제작하여 APP, PS1 각각의 primer를 이용하여 PCR을 통하여 검증할 계획이다.

구체적 전략 7. APP/PS1 double mutation이 동시에 발현하는 렌티바이러스 생산

1) APP/PS1 렌티바이러스 생산

- APP/PS1 double mutation이 동시에 발현하는 형질전환 개 체세포주를 구축하기 위해서 안정적으로 APP/PS1 렌티바이러스를 제작이 필수적이다. 그래서 본 연구진은 3세대 렌티바이러스 제작시스템을 이용하여 최적화를 계획하고 있으며, packaging, envelop 벡터를 이용하여 체계적으로 렌티바이러스 유전자를 생산할 것이다.
- APP/PS1, packaging, envelope 3가지 벡터를 HEK293 세포에 transfection한 후 상층액에 생성되는 렌티바이러스를 받아서 농축할 예정이다. 농축액은 PEG(polyethylene glycol)를 사용하거나 초고속원심분리를 이용할 계획이며, 최대 100배까지 농축할 계획이다.



[packaging (psPAX2), envelope (pMD2.G)의 구성
(렌티바이러스 제작을 위한 필수적임)]

- 농축한 렌티바이러스의 농도를 조사하기 위하여 기존의 p24를 이용한 면역효소활성측정법(ELISA) 방법이 아닌 신속하고 편리한 진단 kit를 활용할 계획이다. 본 진단 kit를 사용하면 최대 20분 안에 titration이 가능하며, 비용적인 측면에서도 매우 유리한 장점이 있다.

2) APP/PS1 렌티바이러스의 발현 검증

- APP/PS1 double mutation이 동시에 발현하는 렌티바이러스를 검증하기 위해서 HEK293 세포에 infection 할 예정이다. APP/PS1 렌티바이러스는 바이러스 infection 효율을 높여 주는 것으로 알려진 polybrene (8 μg/mL)과 함께 처리할 계획이다.

- APP/PS1 double mutation이 동시에 발현하는 렌티바이러스의 발현을 검증하기 위하여 infection 36시간 후 단백질 및 RNA를 추출할 계획이다. 단백질은 동량의 단백질을 이용하여 western blotting을 이용하여 각각 APP, PS1, V5항체를 이용하여 검증할 계획이다. RNA는 cDNA를 제작하여 APP, PS1 각각의 primer를 이용하여 PCR을 통하여 검증할 계획이다.

구체적 전략 8. APP/PS1 double mutation이 동시에 발현하는 개 체세포주 구축

APP/PS1 double mutation이 동시에 발현하는 형질전환 개 체세포주를 구축하기 위해서 APP/PS1 렌티바이러스를 제 1세부로부터 공여 받은 개의 섬유아세포에 infection 할 예정이다. 개의 섬유아세포는 DMEM에 10%FBS를 포함한 배지에 배양할 계획이다. APP/PS1 렌티바이러스는 바이러스 infection 효율을 높여 주는 것으로 알려진 polybrene과 함께 처리할 계획이다.

개 체세포로부터 효과적으로 형질전환 복제개를 생산하기 위해서는 형질전환된 체세포의 선별이 필수적이다. 그러므로 본 연구진은 pLenti6.3/V5-DEST에 삽입되어 있는 blasticidin 항생제 저항 유전자를 이용하여 APP/PS1 렌티바이러스 도입 형질전환 개의 체세포를 선별할 계획이다. 4 μg/mL의 blasticidin을 infection 36시간 후 처리하여 매일 배지를 교환하여 선별할 계획이다. 3일간 선별하여 살아남은 개 체세포주를 모아서 제1세부에 안정적으로 전달 할 계획이다.

개 체세포주에 APP/PS1 렌티바이러스의 발현을 검증하기 위하여 선별한 APP/PS1 도입 후 선별한 개 체세포주를 배양하여 단백질 및 RNA를 추출할 계획이다. 단백질은 동량의 단백질을 이용하여 western blotting을 이용하여 각각 APP, PS1, V5항체를 이용하여 검증할 계획이다. RNA는 cDNA를 제작하여 APP, PS1 각각의 primer를 이용하여 PCR을 통하여 검증할

계획이다.

구체적 전략 9. PD/AD 모델 형질전환 복제개의 생산

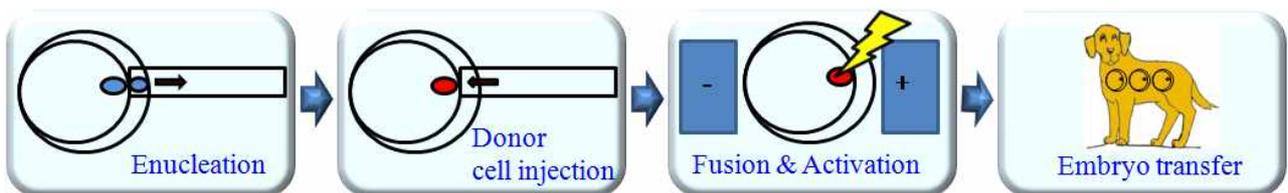
체세포 핵이식을 하기에 앞서, AD/PD 병인유전자가 조절된 세포들을 해동하고, 첫 번째 100% 컨플루언시가 될 때까지 배양하거나, 두 번째 50% 컨플루언시가 될 때 10-30uM의 엑티오사이드를 첨가하여 24-48시간 동안 배양 하는 두 가지의 방법 중 한 가지를 선택하여 배양한 후의 약 3분 동안 트립신 처리하여 단일 층으로부터 분리시켜 하나의 세포로 회복시켜 핵공여세포로 이용한다.

수핵 난자의 준비를 위해 발정초기의 암캐의 요측피정맥에서 혈액을 채취하여 혈청을 분리한 후 혈중프로게스테론 농도를 측정한다. 측정된 프로게스테론 농도를 기초로 배란시기를 판단한 후 배란 3일 후에 Isoflurane으로 전신 마취후 개복하여 난관내의 성숙 난자를 회수한다. 생식열구를 통하여 난관의 처음 끝단에 bulb needle를 삽관한다. 자궁-난관접속부 바로 위의 난관 기저부를 드러내고, 10%(v/v) FBS, 2 mM NaHCO₃, 5 mg/ml BSA가 보충된 HEPES-완충 배양액(TCM)-199으로 플러싱하여 체내에서 성숙된 난자를 회수한후, HEPES-buffered TCM-199 내에서 30분 이내에 실험실로 옮긴다.

체내성숙난자는 HEPES-buffered TCM-199 배지 내에서 0.1% (v/v) 히알루로니다제를 이용하여 미세 유리파이펫을 이용하여 성숙된 난자로부터 난구세포를 제거한다. 그 후, 각각의 난자들을 홀딩 마이크로피펫으로 고정하고, 10%(v/v) FBS 및 5 ug/mL 비즈벤지미드(Hoechst 33342)와 5 ug/mL 사이토칼라신 B가 보충된 HEPES-buffered TCM-199 배지 내에서 미세조작기로 탈핵한다. 비즈벤지미드로 염색된 제1극체 및 중기-II 염색체를 흡입 피펫을 사용하여 제거한다. 탈핵된 난자는 10% (v/v) FBS가 보충된 TCM-199에 두고 계속하여 체세포핵이식에 사용한다.

미세주입, 융합, 활성화 및 수정란 배양을 위해 탈핵 난자의 위란강으로 준비된 체세포를 주입한 후, 0.26 M 만니톨, 0.1 mM MgSO₄, 0.5 mM HEPES 및 0.05%(w/v) BSA를 포함하는 융합 배지에 재구축된수정란을 침전시키고, 70-75V, 15 usec 지속시간으로 2 펄스를 가하며 융합을 유도한다. 융합된 수정란은 10 uM 칼슘 아이노포어를 포함하는 난관액함성배지(mSOF)로 복제수정란의 활성화를 유도한 후, 1.9 mM 6-디메틸아미노푸린으로 4시간 동안 배양한다. 복제수정란의 활성화 후, 수정란 이식 전까지 5 내지 6 개의 수정란 그룹을 미네랄 오일 로 도포된 25 uL의 mSOF 미소적내에서 각각 배양한다.

핵이식란의 이식 및 임신 진단을 위해 재구성 후 4시간 이내에, 체세포 복제란을 대리모의 난관으로 수술적방법을 이용해 이식한다. 체세포 복제란을 이식받는 대리모는 자연발정으로 동기화시킨다. 복제수정란은 3.5F Tom cat catheter를 사용하여 대리모의 난관 팽대부에 이식한다.



[체세포 이식 기술을 이용한 형질전환 복제개의 생산방법]

이식 후 22일에 7.0 MHz 막대형 프로브가 부착된 SONOACE 9900초음파 스캐너를 사용하여 임신을 관찰한다. 임신 최초 확인 후 매 2주 간격으로 초음파로 모니터링한다. 생산한 질환모델 복제 동물의 유전적 동일성을 확인하기 위해 핵 공여 섬유아세포, 복제된 개 및 대리모의 혈통분석을 수행한다. 본 실험은 형질전환 동물의 생산이라는 측면에서 다수의 난자 제공견과 대리모가 필요하여, 수많은 반복 실험의 필요가 요구되나 현재까지의 기술 축적으로 최대한 적은 수의 공시 견을 사용할 예정이다.

구체적 전략 10. 알츠하이머병 관련 유전자 체세포 복제견 유전자 도입 규명 및 평가

생산된 알츠하이머병 질환모델 복제견의 복제의 유무를 판단하는 것은 매우 중요하다. 그래서 알츠하이머병에 관련된 유전자가 발현될 때 형광을 동시에 발현하는 유전자를 이용하여 질환모델 복제견을 유도하였기 때문에, 복제견의 조직이나 혈액으로부터 추출한 세포 또는 개체를 이용하여 형광 발현의 유무에 의해 복제여부를 판단 가능할 것으로 고려되어진다. 또한 생체 내에서 유전자의 기능이 상실되었는지에 대한 분자유전학적 분석도 가능할 것으로 사료된다. 또한 lentiviral vector는 염색체에 삽입되어 발현을 유도하는 것으로 알려져 있는데, lentiviral vector의 삽입 위치를 파악하는 매우 중요하다. 삽입위치에 따라서 알츠하이머병 형질의 차이가 발생할 수 있을 뿐만 아니라, lentiviral vector의 삽입위치를 데이터화 시킨다면 추후 lentiviral vector를 이용한 형질전환 모델견을 제작할 경우 참고 자료로 활용 가능할 것이다.

구체적 전략 11. 알츠하이머병 질환 발현 평가

생산된 복제 개의 알츠하이머병 질환 유전자 도입 규명 및 평가에서 알츠하이머병 유전자의 발현과 행동학적 이상을 나타내는 약 6-12개월령의 개를 대상으로 인간에서 알츠하이머병의 분자병리학적, 생화학적 특징을 비교하고, 질환모델로서의 가능성을 분석하여 검증한다. 기존에 알츠하이머 질병의 병인으로 알려진 아밀로이드 올리고머 생성 및 아밀로이드 플라크의 형성을 분자병리학적으로 분석할 예정이며, 신경세포의 사멸 및 미세교아세포의 활성화를 확인하여 알츠하이머병 모델견으로써 가능성을 확인할 예정이다. 또한, 알츠하이머병 모델견의 행동학적 검증을 위하여 알츠하이머병 환자의 특징 중 하나인 인지기능의 이상을 인지기능이 뛰어난 개를 대상으로 확인할 예정이다. 그리고 최근 알려진 알츠하이머병 초기표지 인자인 CDK5의 활성 및 미토콘드리아의 분절을 알츠하이머병 모델견을 이용하여 생화학적 방법으로 분석할 예정이다. 이 과정에서 인간에서는 불가능하였던, 뇌의 조직별 연령별 알츠하이머병 기전 연구와 유용 유전자를 분석하여 실제 효율적인 알츠하이머병 질환 연구의 타깃을 발굴하고자 한다.

구체적 전략 12. 복제견을 이용한 알츠하이머병 치료 연구가능성 확인

기존에 알려진 많은 알츠하이머병 치료 약물뿐만 아니라 최근에 발표되고 있는 많은 알츠하이머병 치료약물의 문제점은 세포 시험 및 마우스 시험에서는 뛰어난 효과를 보였지만 실제로 사람을 대상으로 하는 임상시험에서는 기대한 효과가 나타나지 않은 경우가 많았다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 인지기능이 뛰어난 개를 이용하여 알츠하이머병 모델견을 제작할 예정이며, 생산된 알츠하이머병 질환 모델견의 검증을 완료하면, 알츠하이머병 치료

약물의 효과를 입증할 예정이다. 기존에 알려진 알츠하이머병 치료 약물 중 하나인 스타틴 (Statin) 및 다수의 치료 약물을 선정한 후 알츠하이머병 모델건의 뇌에서 아밀로이드 플라크 생성의 변화, oxidative stress 등 다수의 알츠하이머병 표지 인자를 이용하여 약물 효과를 검증할 예정이다. 뿐만 아니라 최근 알츠하이머병 초기표지로 알려진 CDK5의 활성화 및 신경세포 및 신경교아세포의 미토콘드리아 분절화도 확인하여 알츠하이머병의 치료타겟을 분자적인 방법으로 발굴할 예정이다.

구체적 전략 13. 복제생산된 질환모델개의 생식선전이 확인 및 대량생산 시스템 구축

생산된 PD/AD 모델개를 정상 비글견과 교배하여 F1 산자들을 통해 생식선전이를 확인하고 검증한다. 생식선전이된 개체간의 번식을 통하여 PD/AD homozygosity 생산하고, 이를 이용하여 대량번식 체계를 구축하고자 한다.

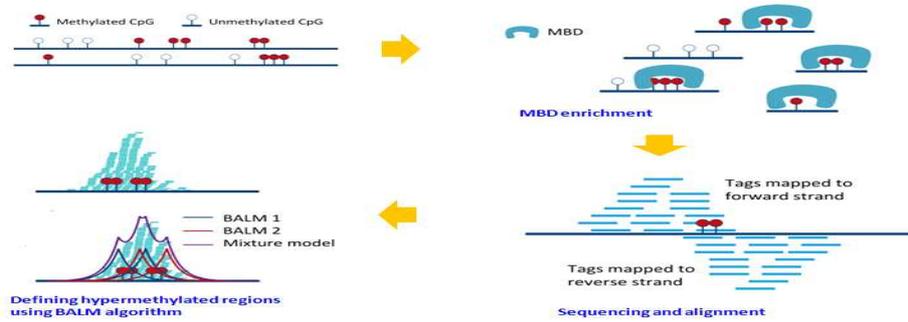
구체적 전략 14. 질환모델 복제개의 유전학적, 후성학적, 영상학적 평가

가장 먼저 RNA-seq을 실험을 수행하기 위해 RNA시료를 확보해야함. 하지만 초기에 만들어진 난치성 질환모델 복제개의 경우 발생단계별, 조직별 시료의 확보가 불가능함으로 혈액 시료를 통해 정상 개와의 비교 분석을 수행함. 전사체 분석에서 가장 중요한 부분인 high quality의 RNA 시료 확보를 위해 RIN (RNA Integrity Number) 값을 기준으로 비교 분석하여 가능한 9이상의 양질의 시료를 사용한다. 그리고 RNA-seq 실험에 필요한 DNA 라이브러리를 제작하여 Illumina sequencing (HiSeq 2000)을 수행하여 데이터를 얻는다.

기본적인 실험의 과정은 genome sequencing과정과 동일하지만, genome 분석 과정과 전사체 분석 과정은 근본적으로 다르다. 전사체의 분석과정은 기 완성된 연구기반인 genome reference에 RNA-Seq의 short read를 얼라이언트 시킴으로써 (splice junction결정을 통해) 유전자 단위로 어셈블리를 수행하여 (overlap graph작성법을 토대로 수행) Unigene을 완성한 뒤, DEG 분석 (Differentially expressed Gene), GO 분석 (Gene Ontology), AS분석 (Alternative Splicing), KEGG pathway분석 등 다양한 분석을 통해 난치성 질환모델 복제 개와의 전사체 수준의 차이점을 비교분석한다.

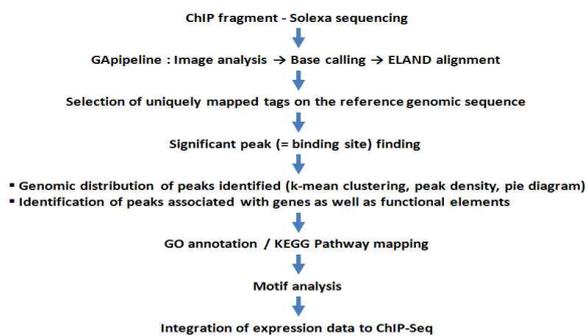
행동학적 모니터링 시스템의 개발을 위해 정상개 및 정상 복제개에서 motor rating scale 및 behavioral rating scale을 개발하고 표준화하여, 이 방법을 바탕으로 단일 또는 복합적인 유전자 조절에 따른 질환모델 개의 행동학적인 변화를 모니터링하고 사람에서의 알츠하이머/파킨슨병의 증상 및 진행 양상과 비교 연구한다.

후성학적인 평가를 위해서는 기본적으로 DNA methylation의 비교 분석 (MBD-Seq) 과 Histone modification Chip-Seq에 대한 2가지의 분석이 필요하다. MBD-Seq (5-methylcytosine sequencing)은 Methylated DNA binding domain sequencing으로 methy-CpG-rich regions을 탐색한다. 분석 절차는 IP를 이용하여 methylated DNA binding domain을 캡처하여 200-bp short inserts에 대한 양방향 서열을 결정하고, 얼라이언트를 수행해 높은 수준 및 낮은 수준의 메틸레이션 영역을 선별함으로써 정상 개와의 메틸화 변형적 영역 (DMRs)을 비교 분석한다.

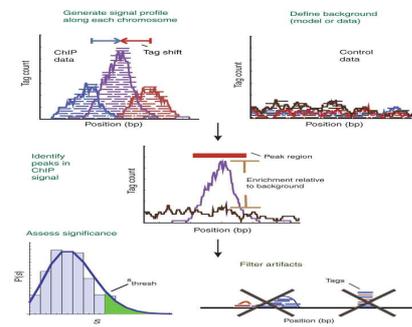


[MBD-Seq 분석 절차의 예]

또한 후성학적인 평가에서는 히스톤변형에 의해 전사 조절되는 영역에 대한 평가도 가능 한데 이것이 Histone modification Chip-Seq 방법이다. 히스톤 변형 ChIP-Seq수행시 active marks (H3K4me3 및 H3K9ac) 및 repressive marks (H3K27me3 및 H3K9me2)에 대해 실험을 진행하여 ChIP fragments을 이용하여 시퀀싱을 수행하여 정상개와 비교 분석을 수행한다.



[ChIP-Seq 데이터 기본 분석방법]



[Peak detection방법]

다양한 질환에서 영상학적 평가방법은 달라지며, 파킨슨씨병, 치매 진단 및 평가 방법은 다음과 같다. 먼저 파킨슨씨병은 1. T1, T2, STIR상에서 중뇌 흑색질의 형태학적 분석, 2. DW1상에서 평균 확산성 및 신경섬유다발의 이방성 변화 분석, DTI상에서 백색질의 비정상적인 신경섬유다발분석, T2상에서 뇌조직 내 철의 침착확인이다. 두 번째 치매의 경우 1. T1, T2상에서 대뇌 피질부의 위축 및 뇌실의 확장 관찰, FLAIR상에서 피질하 백색질부 병변 관찰, 3. DTI상에서 백질 조직의 이방성 확산수치의 증가이다. PET-CT의 경우 질환모델 개의 대사체 분석 및 영상의학적 질환평가는 다음과 같다.

[파킨슨병의 진단 및 평가 방법]

핵종(Tracer)	목표지점(Target)	평가(Assessment)
18F-DOPA	aromatic amino acid decarboxylase	Monoaminergic systems (Presynaptic dopaminergic system)
18F-FECNT	dopamine transporter	Presynaptic dopaminergic system
11C-DTBZ	vesicular monoamine transporter 2	Presynaptic dopaminergic system
11C-SCH23390	D1 receptors	Postsynaptic dopaminergic system
11C-raclopride	D2/D3 receptors	Postsynaptic dopaminergic system Dopamine release
11C-DASB	serotonin transporter	Presynaptic serotonergic system

[알츠하이머병의 진단 및 평가 방법]

핵종(Tracer)	목표지점(Target)	평가(Assessment)
18F-FDG	Relative regional cerebral metabolic rate of glucose consumption	Brain metabolism
11C-flumazenil	central benzodiazepine receptor	GABA _A /cBZRcomplex
11C-PK11195	translocator protein	Microglial activation
11C-PIB	Fibrillar β -amyloid	β -amyloid plaque load

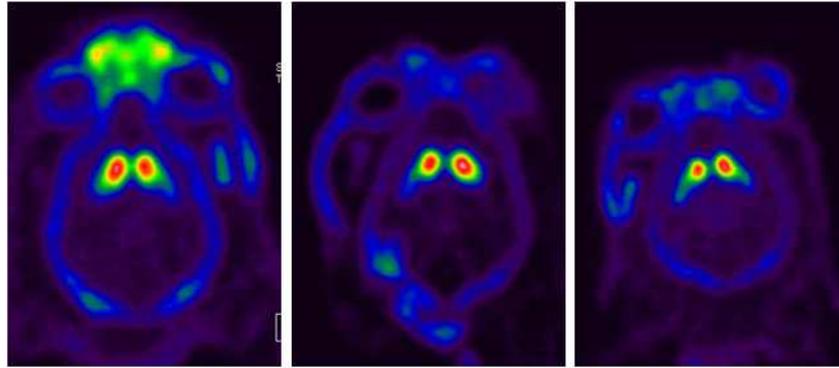
3T MRI(또는 7T MRD)를 이용한 뇌 MRI 영상의 연구를 위해 3T 또는 7T MRI(research prototype) (Magnetom: Siemens, Erlagen Germany)를 이용하여two-dimensional gradient echo(GRE) 기법으로 beagle의 뇌영상을 촬영한다. MR영상촬영의 parameter는 다음과 같다. (repetition time(TR), 750 msec.; echo time(TE), 17.8 msec.; flip angle, 30o; total number of slices per acquisition time(TA), 15 slices in 12.50 min.; bandwidth(BW), 30; number of Averages, 1; and, in-plane resolution was 0.25 mm with a slice thickness of 2 mm. To cover the entire brain, 7.0T optimized 8-channel SENSE coils(200 mm long and 300 mm in diameter)



[3T MRI를 이용한 뇌 MRI 영상 구조를 촬영]

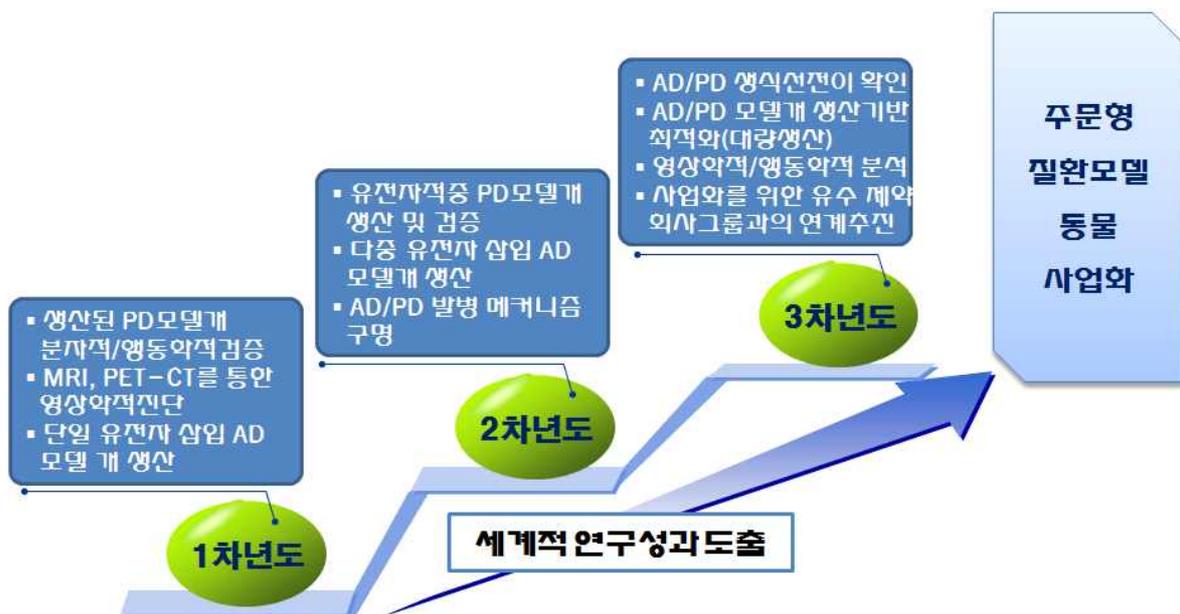
18F FDG PET scan (HRRT)를 이용한 뇌 PET 영상의 연구를 위해 High resolution research tomography(HRRT)-PET(Siemens Medical Systems and CTI, Inc)를 이용하여 뇌 18F-FDG PET 영상을 촬영한다. 전신 마취 전에[F-18 FDG (500 uCi/100g of body weight)

를 정맥주사한다. 30분 뒤에 뇌 18F-FDG PET 영상 촬영은 기관지 삽관을 통한 isoflurane 흡입마취를 이용하여 시행한다. parameter는 다음과 같다. repetition time(TR), 750 msec.; echo time(TE), 17.8 msec.; flip angle, 30°; total number of slices per acquisition time(TA), 15 slices in 12.50 min.; bandwidth (BW), 30; number of Averages, 1; and, in-plane resolution was 0.25 mm with a slice thickness of 2 mm. To cover the entire brain, 7.0T optimized 8-channel SENSE coils(200 mm long and 300 mm in diameter



[형질전환 비글견의 18F-FDG를 이용한 PET-CT촬영]

해부학적 구조물의 이해 및 병리조직학적 검사를 위해 정상 beagle, 복제개 beagle 및 유전자 형질 변형을 이용한 PD 복제개 모델의 뇌의 형태학적 특징 및 변화를 관찰한다. 마이크로톰을 이용하여 coronal 10 um로 뇌 절편을 잘라 H&E staining, Congo Red staining for amyloids, Tau, TH(tyrosine hydroxylase) immuno-staining을 시행하고. 이미지 프로그램을 사용하여 분석한다. 생산된 개체의 각 조직으로부터 RT-PCR 및 western blot 등을 실시하여 뇌다운 성공 여부를 확인하고, PD가 발병된 것으로 추정되는 형질전환 동물의 중뇌 흑질의 신경조직/세포를 대상으로 lewy body를 면역학적 염색 방법으로 확인하고자 한다.



2-3. 연구개발 추진체계

본 과제의 연구기술개발은 충남대학교의 김민규 교수팀에서 수행하고, 사업화의 진행은 (주)메디클론에서 수행할 예정임

가. 추진전략 및 방법

(1) 기술정보의 수집

- 국내외 특허분석을 통한 원천기술 및 생산기술 기초자료 활용
- 연구팀의 선행기술결과의 적용 분석 및 전임상시험 적용 가능성 검토 및 활용
- 국내외 생산 사례분석을 통한 원천기술 및 기술개발 자료 활용
- 국내외 전문가의 자문 활용
- 질환모델 동물의 자료수집 및 활용

(2) 전문가 확보

- 기술사업화 컨설팅 투자 유치 전문가 : (주) 밸류플레이트 및 인텔렉추얼 디스커버리(주)에서 사업화 컨설팅 및 투자유치 추진
- 형질전환 세포주의 작성과 관련된 전문가 확보 : KAIST 박찬규 교수팀, 경북대 이동석 교수팀, KRIBB 이정웅박사팀 등 공동연구 수행
- 질환모델 유전자 분석 및 평가 전문가 확보 : KRIBB 국가영장류센터 이상래 박사팀
- 외부전문가 : 서울대학교 병원 백선하교수팀, 충남대학교 병원 송기학 교수팀, 축과원 및 축산법인 관계자를 중심으로 구성
- 특허출원은 전문 특허법인에 의뢰하여 수행

(3) 타기관 협조 및 문제점 해결 접근방법

- 정책기관(농림식품축산부 등)과 연계한 개발품의 시책건의, 식약처 등 관련기관에 개발 관련 정보제공 및 활용
- 바이오박람회 등에 참여하여 개발된 질환모델 개의 홍보
- 동물실험 윤리를 위하여 충남대 동물실험윤리위원회의 및 동물자유연대(대표 조희경) 참여

(4) 단계별 사업화 추진 전략

- [타당성 조사단계 : R&D기획 1년차]
 - 퇴행성 신경질환 형질전환 동물 생산 및 검증
 - 국내외 시장조사 및 사업화 컨설팅
 - 기술분석 및 기술개발 방향 분석
- [기술검증단계 : 연구개발 1-2년차]
 - 국제 저널에 논문 발표 및 국제학회 발표
 - 산업재산권 확보로 사업추진동력 확보
- [제품화 단계 : 연구개발 3년차]
 - 완성형 질환 모델 개발

- 세계적 제약사와 접촉을 통한 홍보 및 자료제공
- 해외 및 국내 제약사와 MOU체결
- [사업화 단계 : 기술개발 완료 후 1년차]
- 국내외 시장 반영한 모델동물 생산 및 양산체제 구축
- 주요 질환 모델 개발 상품화
- [상용화 단계 : 산업화 2년차 후]
- 제약사 전임상 시험용 주문형 질환모델 동물 생산 및 보급
- 대량생산 체제 구축

2-4. 연구개발 추진일정

번호	연구내용	추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)
		1차년도				2차년도				3차년도					
		1분기	2분기	3분기	4분기	1분기	2분기	3분기	4분기	1분기	2분기	3분기	4분기		
C-1	파킨슨병 질환모델개 검증 완성	■	■											140,000	(충남대)
C-2	유전자 결손변이체 세 포주 작성			■	■										
C-3	알츠하이머관련 유전자 다중 형질전환 세포주 확립			■	■										
C-4	알츠하이머병 질환모델 개 생산 및검증					■	■	■	■					180,000	김민규 (충남대)
C-5	생산된 질환모델 개의 행동학적 검증					■	■	■	■						
C-6	CRISPR/CAS9이용한 유 전자 편집기술 개발					■	■	■	■						
C-7	PD 관련 유전자 DJ-1과 PINK1이 이중으로 녹아 웃된 결손변이체 세포 주 작성									■	■			250,000	김민규 (충남대)
C-8	다중유전자 결손 파킨 슨병 모델 개 생산									■	■	■	■		
C-9	질환모델 개의 영상학 적, 병리분자적 규명										■	■	■		
M-1	질환모델개의 홍보 및 마케팅 전략수립	■	■	■	■									140,000	김현주 (메디칼론)
M-2	수출을 통한 수익창출					■	■	■	■					120,000	김현주 (메디칼론)
M-3	질병모델개의 주문생산 및 공급으로 사업화 확 장									■	■	■	■	170,000	김태영 (메디칼론)

2-5. 연구개발성과

가. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일
1	Effect of Acteoside as a Cell Protector to Produce a Cloned Dog	Plos one	이지혜	11(7)	미국	Public Library of Science	SCI	2016.07.18
2	Protective Effect of Trehalose on Canine Spermatozoa in Cryopreservation	J. Fac. Agr., Kyushu Univ	박강선	63(1)	일본	kyushu university	SCI	201804

나. 국내 및 국제학술회의 발표

No	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	The 16th International Symposium of Developmental Biotechnology	김은영	2016.10.28	대구대학교	대한민국
2	The 16th International Symposium of Developmental Biotechnology	이지혜	2016.10.28	대구대학교	대한민국
3	Journal of Embryo Transfer	이보명	2017.05.26	충남대학교	대한민국
4	The Society for the Study of Reproduction	이지혜	2017.07.14	Washington, D.C	미국
5	4 th world congress of reproductive biology	김은영	2017.09.27	Okinawa Convention Center	일본
6	4 th world congress of reproductive biology	이지혜	2017.09.27	Okinawa Convention Center	일본
7	4 th world congress of reproductive biology	박강선	2017.09.27	Okinawa Convention Center	일본
8	2018년 한국동물번식학회, 한국 수정란이식학회 공동학술대회	윤치선	2018.06.21	한경대학교	한국
9	Japan China Korea graduate student Forum 2018	김범식	2018.09.29	일본 쓰쿠바대학	일본
10	The 18th International Symposium on Developmental Biotechnology	김경엽	2018.11.01	서울대학교	대한민국
11	The 18th International Symposium on Developmental Biotechnology	김동연	2018.11.01	서울대학교	대한민국
12	2019“Green Agriculture Innovation and Sustainable Development“China-Korea Joint Academic Symposium	김규현	2019.05.22	중국 심양대학교	중국

다. 특허출원 및 등록

No	특허명	출원 및 등록번호	출원등록일	구분	국명
1	복제 개의 생산방법 및 그에 따 른 복제 개	10-1943158-0000	2019.01.22	등록	대한민국
2	백금선을 이용한 체세포 핵이식 란 생산용 전기 융합 바늘	10-2019-0045820	2019.04.19	출원	대한민국
3	흑삼 분말을 포함하는 개과 동 물의 정자 운동성 증가용 조성 물	10-2019-0093334	2019.07.31	출원	대한민국

3. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

구분	내용
최종목표	유전자 편집기술 및 형질전환 기술을 이용하여 알츠하이머병(Alzheimer's disease, AD)과 파킨슨병(Parkinson's disease, PD), 당뇨병, 유전적 운동부조화증(Ataxia) 등의 질환모델 복제개를 생산하는데 있으며, 주문형 질환모델 동물 사업화를 이루는 것이다.
세부목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ DJ-1 과발현 복제개의 검증 ○ 다양한 형질전환 벡터 및 세포주 구축 ○ PD/AD 모델 복제개 생산/검증 ○ 형질전환 복제개에서의 유전자의 분자적/생리적 기능 규명 ○ 생산된 질병모델 개의 산업화 주문형 질환모델동물 생산기지화

3-2. 목표 달성여부

구분	연구개발의 목표	평가착안점	달성도 (%)
1차 년도	PD 모델 개에서 과발현되는 DJ-1의 분자적 기능 규명	<ul style="list-style-type: none"> - DJ-1 단일 유전자 적중 시스템을 이용한 형질전환 세포주 구축 - DJ-1 유전자의 세포내 분자/ 생리학적 기능 규명 	100
	DJ-1 형질전환 복제개의 생식선 전이 및 행동학적 검증	<ul style="list-style-type: none"> - 생산된 형질전환 복제개와 암컷비글견을 교배하여 후대 생산 - 후대 생산된 형질전환개의 행동학적 분석 	100
	후대 생산된 DJ-1 복제개의 영상학적 분석 및 병리학적 검증	<ul style="list-style-type: none"> - MRI, PET-CT을 이용하여 뇌영상 촬영 	100
	AD 단일유전자 과발현 구축을 위한 vector 시스템 구축	<ul style="list-style-type: none"> - 돌연변이형 아밀로이드 전구체 단백질(amyloid precursor protein, APP) 유전자 스크리닝 및 벡터 시스템 구축 	100
	CRISPR/Cas9을 이용한 PD 관련 세포주 작성	<ul style="list-style-type: none"> - Human 파킨슨병 관련 유전자 PARK7을 표적으로 CRISPR/Cas9을 이용하여 파킨슨병 모델 세포주 확립 	100
	개 생산 시스템 개선	<ul style="list-style-type: none"> - 본 실험실에서 개발한 세포-난자 융합 바늘을 이용하여 체세포 복제 실시 	100
	PD모델의 해외 홍보를 통해 수익창출을 위한 적극적인 마케팅 수행	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 사업화 준비 및CRO 구축을 위한 사업 전략 구상 - 해외 진출 모색 	100
2차 년도	수익창출을 위한 해외지사 설립	<ul style="list-style-type: none"> - 질환모델개의 수출을 통한 수익창출 	100
	human mutant APP 발현하는 세포주 구축	<ul style="list-style-type: none"> - human mutant APP 발현 벡터 구축 - 벡터 이용하여 human mutant APP 발현 세포주 제작 	100

	미분화 줄기세포를 이용한 병인유전자 과발현 벡터와 녀아웃 벡터의 기능 검증	- PD/AD 병인유전자 과발현 벡터와 녀아웃 벡터를 이용한 미분화 줄기세포에 벡터 도입 - 신경 분화 유도 후 단백질 형성 및 억제여부 확인	100
	CRISPR/Cas9을 이용한 PD 관련 유전자 결손변이체 복제개 생산 및 분자적 검증	- CRISPR/Cas9를 이용한 DJ-1 유전자 결손변이체 세포주 생산 - DJ-1 유전자 결손된 복제개 생산 및 분자적 검증	100
	정상개와 약물을 투여한 신경 질환 모델 개에서의 행동학적 모니터링 개발	- 신경질환 모델개에 약물 투여 후 행동학적 및 영상의학적 모니터링 실시	100
	human mutant APP 발현하는 형질전환 복제개 생산	- human mutant APP 발현 세포주를 이용한 복제개 생산	100
	parkin 유전자 스크리닝과 녀다운 벡터 구축	- parkin 유전자 스크리닝 - parkin 유전자 녀다운 벡터 구축	10
	기년도에 구축된 신경질환 모델건의 가능성 평가	- AD 형질전환 개의 운동능 및 행동학적, 영상학적, 조직병리학적 검사 실시 - PD 녀아웃 개의 운동능 및 행동학적, 영상학적, 조직병리학적 검사 실시	100
3차 년도	질병모델개의 주문생산 및 공급을 위한 사업화 계획	- 중동지역 유전적 질환모델 개발 협의(CARTC) - 중국 기업 및 대동물 임상지원센터와 공동연구 추진 - 미국 Viagen Pets와 질환모델 동물 공동 생산 추진	100
	Parkin 녀다운 복제개 생산	- Parkin 녀다운 세포주 이용하여 복제개 생산	100
	복합형질전환 AD모델 복제개 생산	- human mutant APP와 PS-1의 복합 과발현하는 AD 복제개 생산	100
	복합 녀아웃 PD모델 복제개 생산	- DJ-1과 PINK1 이중 녀아웃된 복제개 생산	100
	질병모델 복제개의 대량번식 체계 구축	- 생산된 질병모델 복제개의 생식선전이 확인 - PD/AD 질병모델 복제건의 개체간의 번식을 통해 homozygosity 개체 생산	100
	AD/PD 유전자의 조절기능 규명	- AD/PD 유전자의 삽입 또는 결손에 따른 유전자의 분자적/생리적 조절기능 규명	100
	PD/AD 모델건의 확립	- PD/AD 모델건의 뇌병변의 영상학적 평가, 행동학적 및 유전학적/후성학적 평가 실시	100

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

- 해당사항 없음

4. 연구결과의 활용 계획 등

가. 연구결과의 활용방안

현재까지 퇴행성 질환모델은 전핵내미세주입법을 이용하여 생산된 설치류가 대부분이었으며, 이는 원하는 균질한 형질의 동물을 얻는데 한계를 보여주었다. 그러나 본 연구센터를 통해, 체세포핵이식기법을 이용할 경우 세포단계에서 조절된 유전자와 동질의 동물을 생산할 수 있어 다양한 활용 가치를 지닐 것이다.

(1) AD/PD 전임상 실험 및 치료제 개발에 활용

- ① 신약 치료제 개발의 전임상 단계에 적용하여 약물에 대한 부작용이나 독성 반응 예측, 용량과의 상관성, 회복성 여부 등을 평가하여 사람의 반응에 대한 안전성 평가를 실시할 수 있다.
- ② 개과 동물은 수명이 설치류에 비해 길기 때문에 만기 독성 시험 등의 평가에도 활용될 수 있다.

(2) AD/PD 진단 및 치료 장비 개발에 활용

- ① 난치병 진단 및 치료 장비는 우리나라와 같이 IT 기술이 발달한 나라에서는 블루오션 분야이다.
- ② 의료기기 선진국이 마우스 모델로 AD/PD 진단 및 치료 장비를 개발할 때 우리는 사람과 디멘손이 유사한 신경질환 모델 개를 이용하여 동일한 장비를 개발한다면 개발 속도나 활용도 측면에서의 충분히 우위 선점이 가능할 것이며, 이에 활용가능하다.

(3) AD/PD 병인의 기전연구에 활용

- ① 질환 모델개의 생산은 개의 다산성의 특징으로 인한 질환 모델 동물의 대량 생산가능성을 확인시켜 줄 수 있다.
- ② 암수가 생산되어진다면 그들의 교배를 통해 질병유전자가 안정적으로 발현되는 가계도를 형성, 동일한 유전형질을 지닌 질환모델 복제개 생산할 수 있을 것이다.
- ③ 이를 통해 산발적으로 나타나는 다양한 AD/PD의 유형들을 반복적으로 생산하여, 병인의 정확한 기전연구에 크게 활용될 것이다.

나. 기대성과 및 파급효과

(1) 기술적 측면

(가) 쥐 모델의 한계 극복 기대

- ① 소동물 모델(쥐)을 대동물 모델(개)로 전환함으로써 인한 국내외 생명과학 지식 및 관련 기술의 비약적 발전을 유도하는 촉매제로 작용할 수 있으며, 질환 모델 동물 연구의 분야에 새로운 전환점을 가져다줄 것으로 기대 된다.
- ② 질환모델 개를 생산하여 병인론적 기전이 완전히 밝혀지지 않은 AD/PD 연구에 있어, 한 단계 진보해나갈 수 있는 밑거름이 될 것이다.

(나) 대동물 모델 활용 치료제 개발기대

- ① 신경보호 물질 효능을 평가하는 진단 기술 개발 및 치료제 개발 연구에 있어 서 큰 진

보가 기대된다.

- ② 기존의 기술 개발과 관련하여 인간의 질병 연구는 질환모델동물로 형질전환마우스를 이용하여 진행하고 있는 실정이므로 인간과 근접한 대동물 모델을 통한 관련 연구가 기대된다.

(다) 기술의 진보 통한 삶의 질 향상 기대

이러한 기술 개발을 통해서, AD/PD의 조기 진단이 가능할 것이다. AD/PD의 조기진단이 가능해 진다면, 인간의 수명 연장과 조기 치료가 가능하여 인간의 삶을 향상 시킬 수 있다.

(2) 경제 · 산업적 측면

고가 특수동물의 복제수요가 급증하고 있는 상황에서, 본 연구의 성공적인 수행은 경제적 부가가치 창출도 가능할 것으로 기대된다. 인간과 직접적으로 관련된 질환모델동물의 복제생산을 위한 기반구축은 인간질병의 진단, 치료 및 의약품 개발 및 진단장비, 치료용 의료장비 시장에서 수요가 클 것으로 예상되므로 경제적인 가치뿐만 아니라, 미래의 국가 경쟁력 확보에도 크게 이바지 할 수 있다. 또한 세계에서 가장 먼저 기술선점을 통해 다양한 종류의 질환모델 복제개를 생산하여, 경제 · 산업적으로 국가적 이익이 창출 된다.

(가) 조기진단 키트 대량생산 및 산업화

본 연구를 통하여 발굴한 임상에 적용 가능한 파킨슨병 조기진단 바이오마커들의 전임상시험을 통해 유효성과 안전성을 확인한 다음 기업적 차원에서 파킨슨병 조기진단 키트를 대량생산하여 이를 산업화할 수 있을 것으로 기대된다.

(나) 알츠하이머병과 파킨슨병 신경보호 치료제 대량생산 및 산업화

- ① 질환유전자를 지닌 질환 모델 복제개가 생산된다면 대부분 치료제 개발 연구에 쓰일 것이며 그로 인해, AD/PD 질병진행을 막을 수 있는 신경보호치료제를 전임상시험을 통해 그 유효성과 안전성을 확인한 다음 기업적 차원에서 이를 대량생산하여 산업화할 수 있을 것으로 기대된다.

- ② 인구 노령화로 인해 그 규모가 기하급수적으로 증가하고 있는 알츠하이머 치료제 시장에 큰 파급효과를 가져올 것으로 판단된다.

(다) 파킨슨병 조기진단 및 신경보호 치료제 평가의 새로운 방법을 제시하여 국제 시장 진출

- ① 현재까지 미국에서 승인받은 알츠하이머 치료제는 미약하거나 중간단계 정도의 알츠하이머병에 대한 치료제로 전체 알츠하이머병의 20%에 달하는 심각한 중증의 환자는 현재 승인된 약물 치료법으로 처치 받지 못하는 것이 현실이다.
- ② 제한적인 상황이지만 알츠하이머 치료제 시장은 그 규모가 2009년에도 \$2,000백만에 달하며 앞으로의 알츠하이머 내 틈새(niche) 시장 및 최초 시장 진입의 이점 등 그 가능성을 생각한다면 무궁무진하다 할 수 있다.
- ③ 따라서 본 연구를 통하여 개발된 복제개를 이용한 AD/PD 모델 복제개를 통하여 발굴한 임상에 적용 가능한 AD/PD 조기진단 키트 및 질병진행을 막을 수 있는 신경 보호 치료제를 기업적 차원에서 산업화한다면 AD/PD 진단 및 치료제의 세계시장에 진출하여 막대한 외화 획득이 가능할 것으로 기대 된다.

(3) 사회적 측면

(가) 건강수명연장

- ① 인간은 단순 수명연장보다는 건강수명의 연장을 바라고 있다.
- ② 특히 퇴행성 뇌질환의 경우 개인뿐만 아니라 가정과 사회에 미치는 영향은 매우 크다. 우리나라와 같이 가족을 중시 여기는 문화에서 필연적으로 발생하는 환자는 가정에 큰 부담이고 형제자매간의 유대감 파괴 및 사회적 손실로 이어짐은 당연한 현실이다.
- ③ 본 연구를 통해 이러한 문제가 다소라도 해결된다면 사회적으로 삶의 질 향상을 위한 큰 영향이 기대되며, 선도연구센터의 육성 목적과도 부합될 것이다.

(나) 과학기술선도국민으로서 자긍심

- ① 본 연구를 통하여 임상에 적용 가능한 파킨슨병 조기진단 및 신경보호 치료제를 개발하면 파킨슨 환자당 국가가 지출하는 막대한 단순의료비용, 간접의료비용 및 부대 경제손실을 줄일 수 있고 파킨슨병의 조기 진단을 위한 국가적 차원이 지원 및 관리가 이뤄지게 되면 국가 사회적, 인적, 경제적 손실을 최소화 시킬 수 있다고 기대된다.
- ② 이 연구에서 얻어지는 퇴행성신경계질환 AD/PD의 질환모델 형질전환 복제개는 지적재산권 확보를 통해 산업재산권을 선점하여 대한민국 바이오산업의 독보적인 발달로 인해 국가의 위상 및 국민의 사회적 자긍심을 높일 것으로 기대된다.



붙임. 참고문헌

- Diaz NF, Diaz-Martinez NE, Velascoand I, Camacho-Arroyo I. Progesterone Increases Dopamine Neurone Number in Differentiating Mouse Embryonic Stem Cells. *J Neuroendocrinol.* 2009. 21(8):730-736
- Flames N, Hobert O. Gene regulatory logic of dopamine neuron differentiation. *nature.* 2009. 458:885-889
- German DC, Yazdani U, Speciale SG, Pasbakhsh P, Games D, Liang CL. Cholinergic neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Comp Neurol.* 2003 Aug 4;462(4):371-81.
- Hedlund E, Perlmann T. Neuronal cell replacement in Parkinson' 's disease. *J Intern Med.* 2009. 266(4):358-371
- Hermann A, Gastl R, Liebau S, Popa MO, Fiedler J, Boehm BO, Maisel M, Lerche H, Schwarz J, Brenner R, Storch A. Efficient generation of neural stem cell-like cells from adult human bone marrow stromal cells. *J Cell Sci.* 2004. 117:4411-4422
- Kalinowska A, Losy J. PECAM-1, a key player in neuroinflammation. *Eur J Neurol.* 2006 Dec;13(12):1284-90.
- Loring JF, Paszty C, Rose A, McIntosh TK, Murai H, Pierce JE, Schramm SR, Wymore K, Lee VM, Trojanowski JQ, Peterson KR. Rational design of an animal model for Alzheimer's disease: introduction of multiple human genomic transgenes to reproduce AD pathology in a rodent. *Neurobiol Aging.* 1996 Mar-Apr;17(2):173-82.
- Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM. Transgenesis by lentiviral vectors: Lack of genesilencing in mammalian embryonic stem cellsand preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002 Feb 19;99(4):2140-5.
- Sarasa L, Gallego C, Monleón I, Olvera A, Canudas J, Montañés M, Pesini P, Sarasa M. Cloning, sequencing and expression in the dog of the main amyloid precursor protein isoforms and some of the enzymes related with their processing. *Neuroscience.* 2010 Dec 29;171(4):1091-101. doi: 10.1016/j.neuroscience.2010.09.042. Epub 2010 Sep 27.
- Sarasa M, Pesini P. Natural non-trasgenic animal models for research in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res.* 2009 Apr;6(2):171-8.
- Schulz TC, Noggle SA, Palmarini GM, Weiler DA, Lyons IG, Pensa KA, Meedeniya AC, Davidson BP, Lambert NA, Condie BG. Differentiation of Human Embryonic Stem Cells to Dopaminergic Neurons in Serum-Free Suspension Culture. *Stem Cells.* 2004. 22(7):1218-1238
- Shinohara H, Wang F. Real-Time Detection of Dopamine Released from a Nerve Model Cell by an Enzyme-Catalyzed Luminescence Method and Its Application to Drug Assessment. *Anal Sci.* 2007. 23(1):81-84
- Van Dam D, De Deyn PP. Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nat Rev Drug Discov.* 2006 Nov;5(11):956-70.
- Winner B, Desplats P, Hagl C, Klucken J, Aigner R, Ploetz S, Laemke J, Karl A, Aigner L,

- Masliah E, Buerger E, Winkler J. Dopamine receptor activation promotes adult neurogenesis in an acute Parkinson model. *Experimental Neurology*. 2009. 219:543-552
- Yamada K, Nabeshima T. Animal models of Alzheimer's disease and evaluation of anti-dementia drugs. *Pharmacol Ther*. 2000 Nov;88(2):93-113.
 - Yan Y, Yang D, Zarnowska ED, Du Z, Werbel B, Valliere C, Pearce RA, Thomson JA, Zhang SC. Directed Differentiation of Dopaminergic Neuronal Subtypes from Human Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*. 2005. 23(6):781-790

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 기술사업화지원사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.