



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년09월07일
(11) 등록번호 10-2576165
(24) 등록일자 2023년09월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) A61K 49/00 (2006.01)
C12N 5/09 (2010.01)
(52) CPC특허분류
A01K 67/027 (2013.01)
A61K 49/0008 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0018188
(22) 출원일자 2021년02월09일
심사청구일자 2021년02월09일
(65) 공개번호 10-2022-0114774
(43) 공개일자 2022년08월17일
(56) 선행기술조사문헌
강석구, 이공학개원기초연구지원사업 최종(결과)
보고서(2017.11.18.)*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
연세대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)
(72) 발명자
강석구
경기도 수원시 영통구 광고호수공원로 277, 101
동202호(중흥에스클래스)
이동규
경기도 성남시 분당구 중앙공원로 53, 125동1304
호(시범단지삼성.한신아파트)
최란주
서울특별시 서대문구 증가로 150, DMC 센트럴 아
이파크 104동 1203호
(74) 대리인
파도특허법인유한회사, 이재영

전체 청구항 수 : 총 15 항

심사관 : 박영관

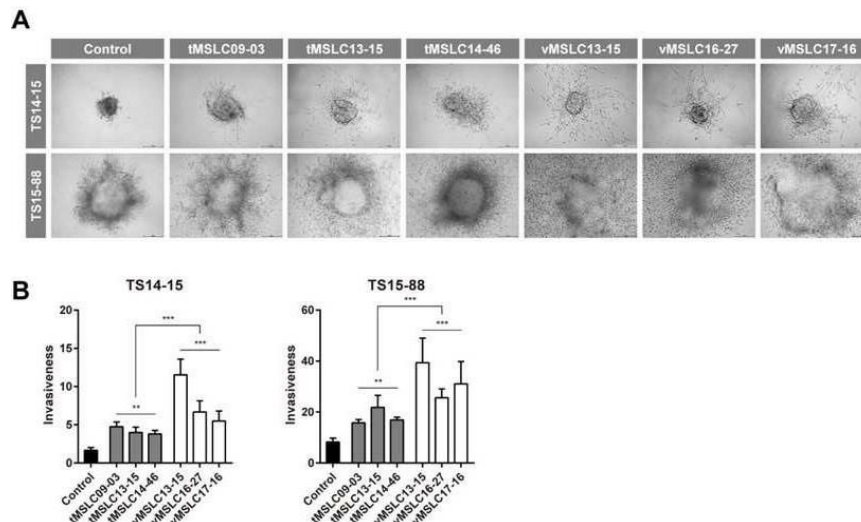
(54) 발명의 명칭 침윤성 뇌암 동물 모델 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 침윤성 뇌암 동물 모델 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명의 침윤성 뇌암 동물 모델은 교모세포종과 같이 뇌암 중에서도 침윤성이 강한 특징을 구현하므로, 뇌암 세포의 침윤을 억제하는 후보 물질을 스크리닝하거나, 뇌암 세포의 침윤으로 인해 발생하는 뇌암 전이를 억제하는 후보 물질을 스크리닝 하는 등 침윤성 뇌암의 치료제 개발을 위해 활발히 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 5/0693 (2013.01)
A01K 2207/12 (2013.01)
A01K 2267/0331 (2013.01)
A01K 2267/0393 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

강석구, 이공학개인지초연구지원사업 최종(결과)보고서(2020.05.23.)*
 KR1020130143532 A
 KR1020190121499 A
 Annals of Surgical Oncology, 2012, 19권, 페이지 S608-S619
 Neuro-Oncology, 2020, 22권, 10호, 페이지 1452-1462

 Neuro-Oncology, 2015, 17권, 1호, 페이지 81-94
 Oncotarget. vol.9 no.37 pp.24766-24777 2018.
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711112182
과제번호	NRF-2019R1A2C3004155
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	교모세포종 발암 기원세포의 특이적 신호전달체계 규명 및 치료 표적 발굴
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711121356
과제번호	2020M2D9A2092372
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원자력연구개발사업
연구과제명	난치성 뇌암의 방사선치료 병합 약물 발굴을 위한 다중 모니터링 시스템 개발
기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.07.31 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711119610
과제번호	NRF-2020M3E5E2037960
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	원천기술개발사업
연구과제명	신경교종 발암기원세포를 표적으로 하는 혁신 신약 타겟 검증 및 유효성 평가 시스템 구축

기 여 율

기 여 율	1/3
과제수행기관명	연세대학교
연구기간	2020.07.01 ~ 2020.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 뇌암 세포와 뇌실 간엽 줄기 유사 세포(ventricle mesenchymal stem like cell)을 혼합하는 단계; 및,
(b) 인간을 제외한 개체에게 상기 (a)의 혼합 세포를 이식하는 단계;를 포함하는, 침윤성 뇌암 동물 모델의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,
상기 뇌암은 교모세포종(Glioblastoma)인 것인, 침윤성 뇌암 동물 모델의 제조방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,
상기 뇌암은 암 종양구인 것인, 침윤성 뇌암 동물 모델의 제조방법.

청구항 4

뇌암 세포, 및 뇌실 간엽 줄기 유사 세포(ventricle mesenchymal stem like cell)가 이식된 침윤성 뇌암 동물 모델로서,
상기 동물은 인간을 제외한 개체인 것인, 침윤성 뇌암 동물 모델.

청구항 5

제 4항에 있어서,
상기 뇌암은 교모세포종(Glioblastoma)인 것인, 침윤성 뇌암 동물 모델.

청구항 6

제 4항에 있어서,
상기 뇌암은 암 종양구인 것인, 침윤성 뇌암 동물 모델.

청구항 7

(a) 뇌실 간엽 줄기 유사 세포(ventricle mesenchymal stem like cell)를 배양한 배양액을 수득하는 단계; 및,
(b) 뇌암 세포를 상기 (a)의 배양액에서 배양하는 단계;를 포함하는, 침윤성 뇌암 세포의 제조방법.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 뇌암은 교모세포종(Glioblastoma)인 것인, 침윤성 뇌암 세포의 제조방법.

청구항 9

제 7항에 있어서,

상기 뇌암은 암 종양구인 것인, 침윤성 뇌암 세포의 제조방법.

청구항 10

뇌실 간엽 줄기 유사 세포(ventricle mesenchymal stem like cell)를 배양한 배양액에서 배양된 뇌암 세포인, 침윤성 뇌암 세포.

청구항 11

제 10항에 있어서,

상기 뇌암은 교모세포종(Glioblastoma)인 것인, 침윤성 뇌암 세포.

청구항 12

제 10항에 있어서,

상기 뇌암은 암 종양구인 것인, 침윤성 뇌암 세포.

청구항 13

뇌실 간엽 줄기 유사 세포(ventricle mesenchymal stem like cell), 또는 이의 배양 산물을 유효성분으로 포함하는, 뇌암 세포의 침윤 촉진용 조성물.

청구항 14

- (a) 제 4항의 동물 모델, 또는 제 10항의 세포에 뇌암 세포의 침윤을 억제하는 후보 물질을 처리하는 단계; 및,
- (b) 상기 후보물질에 의하여 뇌암 세포의 침윤이 억제된 경우에 상기 후보물질을 뇌암 세포의 침윤 억제 물질로 결정하는 단계를 포함하는, 뇌암 세포의 침윤 억제용 후보물질의 스크리닝 방법.

청구항 15

- (a) 제 4항의 동물 모델, 또는 제 10항의 세포에 뇌암 세포의 침윤을 억제하는 후보 물질을 처리하는 단계; 및,
- (b) 상기 후보물질에 의하여 뇌암 세포의 침윤이 억제된 경우에 상기 후보물질을 뇌암 세포의 침윤으로 인해 발생하는 뇌암 전이를 억제하는 물질로 결정하는 단계를 포함하는, 뇌암 전이 억제용 후보물질의 스크리닝 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 침윤성 뇌암 동물 모델 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 다양한 암 중에서도 특히 뇌암은 연령에 관계없이 발생되며, 소아에 발생 빈도가 다른 암에 비하여 높은 특징이 있다. 뇌암은 뇌 조직과 뇌를 싸고 있는 뇌막에서 발생하는 원발성 뇌암과 두개골이나 신체의 다른 부위에서 발생한 암으로부터 전이된 이차성 뇌암으로 구분되는데, 뇌암 중에서도 가장 흔한 형태인 교모세포종, 특히 이 중에서도 신경교종 (glioma)은 원발성 뇌암(Primary brain tumor)의 60%를 차지하는 종양으로서 발생 빈도가 높다. 또한 교모세포종은 다른 뇌암에 비해서 가장 악성이고, 침윤성이 강하며, 공격적 변이(Aggressive variant)를 나타내어 예후가 매우 좋지 않다. 교모세포종을 빠른 시일 내에 치료하지 않으면 몇 주 이내에 치명적인 결과를 초래할 수 있다. 그러나 뇌암은 뇌혈관 장벽(Brain Blood Barrier)에 의해 치료용 약물이 목적하는 뇌 부위로 전달되기 어렵다는 뇌 고유의 특징으로 인하여 현재까지도 방사선 치료 외엔 특별한 치료법이 없는 실정이다. 따라서 교모세포종의 전이를 억제하거나 예후 진단을 위해 이용할 침윤성 뇌암 동물 모델의 필요성이 대두되고 있다.

[0004] 본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하기 위해 고안된 것으로, 침윤성 뇌암 동물 모델 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 동물 모델은 교모세포종과 같이 뇌암 중에서도 침윤성이 강한 특징을 구현하므로, 침윤성 뇌암의 치료제 개발을 위해 활발히 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

[선행문헌]

선행문헌 1: 대한민국 공개특허 제 KR 10-2015-0142928 A 호

선행문헌 2: 대한민국 공개특허 제 KR 10-2017-0105854 A 호

선행문헌 3: 대한민국 공개특허 제 KR 10-2017-0011984 A 호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 일 목적은 침윤성 뇌암의 동물 모델을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 침윤성 뇌암의 동물 모델 제조를 위한 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 침윤성 뇌암 세포를 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 침윤성 뇌암 세포의 제조를 위한 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 뇌암 세포의 침윤 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 뇌암 세포의 침윤을 억제하는 후보 물질을 스크리닝 하는 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 뇌암 세포의 침윤으로 인해 발생하는 뇌암 전이를 억제하는 후보 물질을 스크리닝 하는 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 본 발명의 일 구현예에서는 침윤성 뇌암의 동물 모델, 및 이의 제조 방법을 제공한다.

[0016] 본 발명의 상기 방법은 뇌암 세포와 뇌실 간엽 줄기 유사 세포(ventricle mesenchymal stem like cell; vMSC)을 혼합하는 단계; 및, 인간을 제외한 개체에게 상기의 혼합 세포를 이식하는 단계;를 포함한다.

[0017] 본 발명의 상기 "뇌암"이란, 두개강 내에서 발생한 모든 종양을 의미하는 것으로서, 예를 들면, 신경교종일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명의 상기 "신경교종"은 원발성 뇌 종양(primary brain tumor)의 60%를 차지하는 종양으로서, 발생 빈도가 높고 치료가 어려워, 현재까지도 방사선 치료 외엔 특별한 치료법이 없는 악성 종양으로서, 예를 들면, 성상세포종, 교모세포종 또는 핍지교종 등 일 수 있고, 바람직하게는 교모세포종일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아

니다.

- [0019] 본 발명의 상기 뇌암은 암 종양구인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명의 상기 "암 종양구"란, 암 조직을 구성하는 세포 중 줄기세포(Stem cell)와 유사한 특성을 가지는 일부의 세포가 3차원 배양 조건에서 형성될 수 있는 세포 응집체를 의미한다.
- [0021] 본 발명의 상기 "침윤성"이란, 원발 장기에서 발생한 종양 세포가 암이 진행됨에 따라 전이(metastasis)에 필요한 새로운 유전 형질을 획득한 뒤, 혈관과 림프선으로 침윤(Invasion)되는 현상으로서, 이와 같은 침윤성 높은 경우에는 혈관과 림프선으로 침윤된 종양 세포가 림프를 따라 순환함으로써 원발 장기로부터 다른 장기에 존재하는 조직에 정착한 뒤 증식됨으로써 궁극적으로 다른 장기에 암이 쉽게 전이될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 상기 "MSLC(mesenchymal stem like cell)"란, 간엽 줄기 유사 세포이다. 간엽 줄기 세포(mesenchymal stem cell; MSC)는 원래 골수에서 분리된 다분화능을 가진 비조혈(non-hematopoietic) 전구체이지만, 간엽 줄기 유사 세포(MSLC)는 뇌종양을 비롯한 다양한 조직에서 검출되며 다분화능을 가진 기질세포로서, 간엽 줄기 세포와 유사한 특성을 가지는 세포를 의미한다. 획득한 위치에 따라 tMSLC(종양 유래 간엽 줄기 유사 세포; tumor MSLC)는 종양 조직 자체에서 획득된 세포이며, vMSLC(뇌실 간엽 줄기 유사 세포; ventricle MSLC)는 종양의 발생 부위와 떨어진 곳이지만 교모세포종의 기원이 되는 곳에 위치하는 뇌실하영역(subventricular zone; SVZ) 영역에서 분리된 간엽 줄기 유사 세포이다.
- [0023] 본 발명의 상기 동물 모델은 뇌암 세포, 및 vMSLC(뇌실 간엽 줄기 유사 세포)가 이식된 개체를 의미한다.
- [0024] 본 발명의 다른 구현 예에서는 침윤성 뇌암 세포, 및 이의 제조 방법을 제공한다.
- [0025] 본 발명의 상기 방법은 vMSLC(뇌실 간엽 줄기 유사 세포)를 배양한 배양액을 수득하는 단계; 및, 뇌암 세포를 상기의 배양액에서 배양하는 단계;를 포함한다.
- [0026] 본 발명의 상기 침윤성 뇌암 세포, 및 이의 제조 방법에서, "뇌암", "신경교종", "암 종양구", "침윤성", 및 "vMSLC(뇌실 간엽 줄기 유사 세포)"는 상기 침윤성 뇌암의 동물 모델, 및 이의 제조 방법에서 기재한 바와 중복되어, 이하 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0027] 본 발명의 다른 구현 예에서는 vMSLC(뇌실 간엽 줄기 유사 세포), 또는 이의 배양 산물을 유효성분으로 포함하는 뇌암 세포의 침윤 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 발명의 상기 "배양 산물"은 세포, 세포의 파쇄물, 또는 세포의 배양물을 포함하는 의미이며, 상기의 배양물은 세포 배양에 사용된 배양액, 및 상기 배양액 내 부산물을 포함한다.
- [0029] 본 발명의 상기 뇌암 세포의 침윤 촉진용 조성물에서, "뇌암", "신경교종", "암 종양구", 침윤과 상응하는 의미의 "침윤성", 및 "vMSLC(뇌실 간엽 줄기 유사 세포)"는 상기 침윤성 뇌암의 동물 모델, 및 이의 제조 방법에서 기재한 바와 중복되어, 이하 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0030] 상기 침윤성 뇌암의 동물 모델, 침윤성 뇌암 세포, 또는 뇌암 세포의 침윤 촉진용 조성물에서 침윤과 상응하는 의미의 침윤성은 침윤과 관련된 단백질을 암호화하는 유전자, 또는 단백질의 발현 수준을 측정하거나, 또는 침윤 면적으로 확인할 수 있다.
- [0031] 상기 유전자의 발현 수준 측정은 시료에 포함된 측정 대상이 되는 유전자의 발현 수준을 확인하는 것으로, 상기 측정 대상이 되는 유전자로부터 전사된 유전자, 예를 들면 유전자로부터 전사된 mRNA의 수준을 측정하는 방법으로 구현될 수 있다. 구체적으로, 상기 방법은 RT-PCR, 정량 실시간 PCR(quantified real time PCR), 경쟁적 RT-PCR(Competitive RT-PCR), 실시간 RT-PCR(real time quantitative RT-PCR), RNase 보호 분석법(RPA; RNase protection assay), 노던 블롯 분석(Northern blot assay), DNA 칩 분석법 등의 방법에 사용되는 측정 대상이 되는 mRNA에 특이적으로 결합할 수 있는 프라이머 쌍 또는 프로브를 이용하여 구현될 수 있다.
- [0032] 상기 "프라이머"는 짧은 자유 3'말단 수산화기(free 3'hydroxyl group)를 가지는 염기 서열로 상보적인 주형 가닥(template)와 염기쌍(base pair)을 형성할 수 있고, 주형 가닥 복사를 위한 시작 지점으로서 기능을 하는 짧은 염기 서열을 의미한다. 상기 프라이머는 적절한 완충 용액 및 온도에서 중합반응(즉, DNA 폴리머레이즈 또는 역전사효소)을 위한 시약 및 상이한 4가지 뉴클레오사이드 트리포스페이트의 존재 하에서 DNA 합성이 개시될 수 있다.
- [0033] 상기 "프로브"는 상기 유전자, 또는 상기 유전자로부터 전사되는 mRNA와 특이적으로 결합을 이룰 수 있는 염

기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미하고, 이와 같은 프로브는 특정 mRNA의 존재 유무, 발현되는 수준(발현량)을 확인할 수 있도록 라벨링되어 있을 수 있다. 상기 프로브는 올리고뉴클레오타이드(oligonucleotide) 프로브, 단쇄 DNA(single strand DNA) 프로브, 이중쇄 DNA(double strand DNA)프로브, RNA 프로브 등의 형태로 제작될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0034] 상기 프라이머 또는 프로브는 공지된 염기 서열, 예를 들면 침윤 마커인 Zeb1의 공지된 염기 서열을 참조하여 당해 기술 분야에서 통상이 지식을 가진 자가 공지된 방법에 의해 쉽게 제작될 수 있다.

[0035] 상기 단백질의 발현 수준 측정은 시료에 포함된 측정 대상이 되는 유전자로 암호화되는 단백질의 발현 수준을 확인하는 것으로, 상기 측정 대상이 되는 단백질에 특이적으로 결합할 수 있는 항체 또는 앵타머를 이용하는 방법으로 구현될 수 있다. 구체적으로, 상기 방법은 웨스턴 블롯 분석(Western blot assay), ELISA(Enzyme linked immunosorbent assay), 방사선면역분석(RIA: Radioimmunoassay), 방사 면역 확산법(Radioimmunodiffusion), 오우크테로니(Ouchterlony) 면역 확산법, 로케트 면역전기영동(Rocket immunoelectrophoresis), 면역조직화학염색법(Immunohistochemical staining), 면역침전 분석법(Immunoprecipitation Assay), 보체 고정 분석법(Complement Fixation Assay), 면역형광법(Immunofluorescence), 면역크로마토그래피법(Immunochromatography), FACS(Fluorescenceactivated cell sorter analysis) 및 단백질 칩 분석법(protein chip technology assay) 등의 방법에 사용되는 항체 또는 앵타머를 이용하여 구현될 수 있다.

[0036] 상기 “항체”는 단백질 또는 펩티드 분자의 항원성 부위에 특이적으로 결합할 수 있는 단백질 분자를 의미한다. 상기 항체의 형태는 특별히 제한되지 않으며 폴리 클로날 항체, 모노 클로날 항체 또는 항원 결합성을 갖는 것이라면, 항체의 일부인 경우라도 포함될 수 있고, 모든 종류의 면역 글로불린 항체가 포함될 수 있다. 또한, 인간화 항체 등의 특수 항체가 포함될 수 있고, 상기 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태뿐만 아니라 항체 분자의 기능적인 단편을 포함한다. 항체 분자의 기능적인 단편이란 적어도 항원 결합 기능을 보유하고 있는 단편을 의미하며 Fab, F(ab'), F(ab')₂, Fv 등이 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 상기 “앵타머”는 단일 가닥 올리고 뉴클레오타이드를 의미하는 것으로, 소정의 표적 분자에 대한 결합 활성을 갖는 핵산 분자를 말한다. 상기 앵타머는 그 염기 서열에 따라 다양한 3차원 구조를 가질 수 있으며, 항원-항체 반응과 같이 특정 물질에 대하여 높은 친화력을 가질 수 있다. 앵타머는 소정의 표적 분자에 결합함으로써 소정의 표적 분자의 활성을 저해할 수 있다. 상기 앵타머는 RNA, DNA, 변형된(Modified) 핵산 또는 이들의 혼합물일 수 있으며, 그 형태가 직쇄상 또는 환상(環狀)일 수 있다.

[0038] 상기 항체는, 공지된 염기 서열을 통상적인 방법에 따라 발현 벡터에 클로닝하여 상기 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 얻은 뒤에 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있고, 상기 앵타머는 공지된 염기 서열을 참조하여 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 공지된 방법에 따라 쉽게 제작할 수 있다.

[0039] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 뇌암 세포의 침윤을 억제하는 후보 물질을 스크리닝 하는 방법을 제공한다.

[0040] 본 발명의 상기 스크리닝 방법은 상기 본 발명의 침윤성 뇌암의 동물 모델, 또는 상기 본 발명의 침윤성 뇌암 세포에 뇌암 세포의 침윤을 억제하는 후보 물질을 처리하는 단계; 및, 상기 후보물질에 의하여 뇌암 세포의 침윤이 억제된 경우에 상기 후보물질을 뇌암 세포의 침윤 억제 물질로 결정하는 단계를 포함한다.

[0041] 본 발명의 상기 뇌암 세포의 침윤을 억제하는 후보 물질을 스크리닝 하는 방법에서, “뇌암”, “신경교종”, “암 종양구”, “침윤성”, 및 “vMSLC(뇌실 간엽 줄기 유사 세포)”는 상기 침윤성 뇌암의 동물 모델, 및 이의 제조 방법에서 기재한 바와 중복되어, 이하 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

[0042] 본 발명의 또 다른 구현 예에서는 뇌암 세포의 침윤으로 인해 발생하는 뇌암 전이를 억제하는 후보 물질을 스크리닝 하는 방법을 제공한다.

[0043] 본 발명의 상기 스크리닝 방법은 상기 본 발명의 침윤성 뇌암의 동물 모델, 또는 상기 본 발명의 침윤성 뇌암 세포에 뇌암 세포의 침윤을 억제하는 후보 물질을 처리하는 단계; 및, 상기 후보물질에 의하여 뇌암 세포의 침윤이 억제된 경우에 상기 후보물질을 뇌암 세포의 침윤으로 인해 발생하는 뇌암 전이를 억제하는 물질로 결정하는 단계를 포함한다.

[0044] 본 발명의 상기 뇌암 세포의 침윤으로 인해 발생하는 뇌암 전이를 억제하는 후보 물질을 스크리닝 하는 방법에서, “뇌암”, “신경교종”, “암 종양구”, “침윤성”, 및 “vMSLC(뇌실 간엽 줄기 유사 세포)”는 상기 침윤성 뇌암의

동물 모델, 및 이의 제조 방법에서 기재한 바와 중복되어, 이하 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.

발명의 효과

[0046] 본 발명의 침윤성 뇌암 동물 모델은 교모세포종과 같이 뇌암 중에서도 침윤성이 강한 특징을 구현하므로, 뇌암 세포의 침윤을 억제하는 후보 물질을 스크리닝하거나, 뇌암 세포의 침윤으로 인해 발생하는 뇌암 전이를 억제하는 후보 물질을 스크리닝 하는 등 침윤성 뇌암의 치료제 개발을 위해 활발히 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 뇌에서 TS(tumor sphere), VS(ventricle sphere), tMSLC(tumor mesenchymal stem like cell), 및 vMSLC(ventricle mesenchymal stem like cell) 위치를 표시한 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, 뇌로부터 추출한 세포가 tMSLC, 또는 vMSLC가 맞는지 형태, 분화, MSLC(mesenchymal stem like cell) 표면 마커를 통해 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, tMSLC와 vMSLC에 의한 TS의 침윤성 차이를 침윤 면적, 침윤 관련 단백질의 발현량으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, tMSLC와 vMSLC의 유전자 발현 차이를 tMSLC와 vMSLC의 유전자 발현 프로파일로 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, 배양 배지에 따른 VS의 침윤성 차이를 침윤 면적과 침윤 관련 단백질의 발현량으로 확인한 결과를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, TS, TS+tMSLC, 또는 TS+vMSLC를 이식한 마우스 동물 모델에서 암세포의 침윤성 차이를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0051] 실시예

[0053] 실시예 1. 세포 추출 및 배양

[0054] 외과적 수술, 화학 요법, 또는 방사선 치료와 같은 처치 없이 새롭게 진단받은 뇌암 환자 조직을 본 연구에서 사용하였다. 각각의 환자에서 암 조직을 제거하기 위한 수술을 진행하기 전, 7일 내에 Achieva 3.0T 시스템(Philips Medical Systems)을 이용하여 MR 이미지를 촬영하였다. 뇌들보(Corpus callosum)의 전부(Anterior) 및 후부(Posterior) 가장자리에 평행하도록 하여 축상(Axial) 이미지를 촬영하였다. 상기 이미지에서 TS(tumor sphere), VS(ventricle sphere), tMSLC(tumor mesenchymal stem like cell), 및 vMSLC(ventricle mesenchymal stem like cell) 위치를 표시하여 도 1에 나타내었다.

[0055] 이후 교모세포종(GBM) 환자 유래 조직에서 세포를 분리하여 DMEM/F-12(Corning), 1x B27(Invitrogen), 20 ng/mL bFGF, 및 20 ng/mL EGF(Novoprotein)가 포함되어 있는 TS 배지(tumor sphere complete media)으로 배양하였다. 이로부터 tMSLC(tumor mesenchymal stem like cell)와 vMSLC(ventricle mesenchymal stem like cell)의 배양을 위해 MEM α , 10 % FBS(Lonza), 2 mM L-glutamine(Mediatech), 100x antibiotic-antimycotic solution(Gibco)이 포함되어 있는 MSC 배지(MSC complete media)에서 조직에서 분리한 세포를 배양하였다. 배양 접시에 tMSLC 또는 vMSLC를 70% 이상 MSC 배지를 첨가하여 과중하고, 세포가 부착된 후 MSC 배지를 제거하고 TS 배지를 첨가하여 24시간 추가 배양 후, 이물질을 제거한 배지 상층액을 수득하여 이를 각각 tMSLC 조건 배지(tMSLC conditioned media), vMSLC 조건 배지(vMSLC conditioned media)로 사용하였다.

[0057] 실시예 2. 세포 확인

[0058] 상시 실시예 1에서 추출한 세포가 tMSLC, 또는 vMSLC가 맞는지 형태, 분화, MSLC(mesenchymal stem like cell) 표면 마커를 통해 확인하여, 이를 도 2에 나타내었다.

- [0059] 먼저 세포를 광학현미경으로 관찰한 결과, tMSLC와 vMSLC 모두 MSLC의 전형적인 세포 형태임을 확인하였다.
- [0060] 분화 특성은 지방 분화(Adipogenic differentiation), 골 분화(Osteogenic differentiation), 및 연골 분화(chondrogenic differentiation)로 구분하여 확인하였다. 지방 분화 확인을 위해서는 6웰 배양접시에 4×10^4 세포/웰 밀도로 tMSLC 또는 vMSLC를 MSC 배지로 배양하였다. 세포가 부착된 후 adipogenic differentiation BulletKit(Lonza Walkersville, Walkersville, MD, USA) 배지를 첨가하고, 3~4일 마다 한번씩 3주간 배지를 교체하였다. 3주 후 배지를 제거하고, PBS로 세포를 세척한 후 10 % 포르말린(Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ, USA)에 30분간 고정하고, PBS 세척 후 60 % 이소프로판올(Sigma-Aldrich)을 5분간 처리하고, Oil Red O 용액(Sigma-Aldrich)으로 10분간 염색하였다. 이를 PBS 세척 후 헤마톡실린(Sigma-Aldrich)에 1분간 염색 후 세척하고 관찰하였다. 골 분화 확인을 위해서는 6웰 배양접시에 3×10^4 세포/웰 밀도로 tMSLC 또는 vMSLC를 MSC 배지로 배양하였다. 세포가 부착된 후 osteogenic differentiation BulletKit(Lonza Walkersville) 배지를 첨가하고, 3~4일 마다 한번씩 3주간 배지를 교체하였다. 3주 후 배지를 제거하고, PBS로 세포를 세척한 후 냉장 온도의 70 % 에탄올(Sigma-Aldrich)로 1시간 고정하고, PBS 세척 후 40 mM Alizarin Red(pH 4.2; Sigma-Aldrich)에 10분간 상온에서 염색하였다. 이를 증류수로 5번 세척 후 관찰하였다. 연골 분화 확인을 위해서는 15ml 튜브(SPL, Pocheon, Gyeonggi, Republic of Korea)에 2.5×10^5 개의 tMSLC 또는 vMSLC를 $150 \times g$ 로 5분간 원심분리하여 세포를 모으고, 이를 20 $\mu g/ml$ 의 TGF- β 3 (Ontogeny Research Products, Cambridge, MA, USA)가 첨가된 chondrogenic differentiation BulletKit(Lonza Walkersville)에서 배양하였다. 3~4일 마다 한번씩 3주간 배지를 교체하고, 3주 후 1시간 동안 10 % 포르말린에 세포 펠렛(cell pellet)을 고정하여 toluidineblue(Sigma-Aldrich)염색하였다. 상기 3가지 염색 모두 대조군은 MSC 배지로 동일하게 진행하였다. 상기 지방 분화, 골 분화, 및 연골 분화 확인 결과, tMSLC와 vMSLC 모두 지방세포, 골세포, 및 연골 세포로 잘 분화되었음을 확인하였다.
- [0061] 또한 세포를 마우스에 이식한 후 뇌 조직의 헤마톡실린 염색 및 형태 관찰을 통해서 tMSLC와 vMSLC 모두 in vivo에서 종양을 형성하지 않음을 확인하였다.
- [0062] MSLC 표지 마커 확인을 위해 종양구(tumor sphere)에 트립신-EDTA를 처리하여 세포펠렛을 모은 후 FACS buffer(10% FBS + 90% PBS)를 사용하여 EP 튜브에 1×10^6 세포/ 100ul의 농도로 제조하였다. 이후 2~5ul의 CD16(DB pharmingen)을 4℃에서 15~20분간 모든 EP 튜브에 처리하고, 원심 분리를 통해 세포 펠렛을 남긴 후 FACS buffer로 한번 세척한 후 100ul의 FACS buffer를 사용하여 펠렛을 풀어주었다. 이를 1차 항체로 5~10ul/ 100ul로 4℃에서 30분간 처리하고, 원심분리 및 세포를 세척한 후 2차 항체를 1~20ul/ 100ul로 4℃에서 30분간 처리하였다. 다시 원심분리하여 세포를 모으고, 두 번 세척한 후 100ul의 1% 파라포름알데히드를 사용하여 10분간 고정하고, 100ul의 시표를 FACS tube에 넣고 400ul 이상의 PBS를 첨가한 뒤 FACS를 사용하여 마커의 발현을 측정하였다. 실험 결과, MSLC의 대표적인 표면 마커들이 발현됨을 확인하였다.
- [0064] **실시예 3. tMSLC와 vMSLC의 침윤성 차이 확인**
- [0065] 96웰 배양접시에 마트리젤, 콜라겐 타입 I(Corning Incorporated), 및 TS 배지를 채우고 각 웰에 한 개의 종양구(tumor sphere)를 파종하였다. 매트릭스(Matrix)가 적당히 굳으면 TS 배지, tMSLC 조건 배지, 또는 vMSLC 조건 배지를 첨가하여 72시간 동안 배양하며 관찰하였다. 72시간 후 종양구의 침윤 면적(invasion area)을 측정하여 day 0과 비교하였다. 이를 도 3에 나타내었다.
- [0066] 실험 결과, 매트릭스에서 tMSLC 조건 배지, 또는 vMSLC 조건 배지에 의해 종양구의 침윤이 증가하는 것을 확인하였다. 침윤 면적은 대조군 < tMSLC < vMSLC 순으로 증가하였다.
- [0068] **실시예 4. tMSLC와 vMSLC의 유전자 발현 차이 확인**
- [0069] 교모세포종 종양구와 해당 환자의 조직에서 키아젠 RNeasy 플러스 미니 키트(Qiagen RNeasy Plus Mini kit, Qiagen, 미국)를 이용하여 제조사가 제공하는 방법에 따라 전체 RNA를 추출하였다. 상기 추출된 전체 RNA를 일루미나 휴먼HT-12 v4 발현 비드칩(Illumina HumanHT-12 v4 Expression BeadChip, Illumina, 미국)에 로딩하였다. 데이터 변형의 안정화 및 표준화를 위해 R/ Bioconductor lumi 패키지를 사용하는 분위 일반화(quantile normalization) 방법을 사용하였다. GENE-E 소프트웨어를 사용하여 피어슨의 상관관계를 거리 메트릭로서 평균 연결 계층적 클러스터링(average linkage hierarchical clustering)을 수행하고, 각각의 유전자의 발현 수준을 히트 맵으로 나타내었다. 유전자는 GO 유전자 세트를 사용하는 ORA(over-representation analysis)에 의해 기능적으로 주선 처리(functionally annotate)한 다음 ClueGO plug-in과 함께 사이토스케이프(Cytoscape)를 사용

하여 누적맵(enrichment map)으로 시각화하였다. 누적된 GO 값(Enriched GO terms)은 카파 점수(kappa scores, > 0.4)에 따라 분류되었다. 통계적 유의성은 양면 초기하 검정(two-sided hypergeometric test)을 사용하여 결정되었으며 $P\text{-value} < 0.01$ 인 부분만 표시하였다. 상기 결과를 도 4에 나타내었다.

[0070] 실험 결과, 전체 유전자 발현 프로파일(whole gene expression profiles)에서 tMSLC와 vMSLC가 유사하나, 643 개의 발현율이 상이한 유전자(differentially expressed genes; DEGs)의 존재를 확인하였다. 구체적으로, vMSLC의 경우 침윤과 관련된 세포 유주(cell migration), 케모카인 생성(chemokine production), 및 케모택신(chemotaxis)과 관련된 유전자의 발현이 높게 나타났다.

[0072] **실시예 5. 배양 배지에 따른 VS(ventricle sphere)의 침윤능 차이 확인**

[0073] 상시 실시예 3의 매트릭스를 이용하여 VS를 TS 배지, tMSLC 조건 배지, 또는 vMSLC 조건 배지에서 배양하고, 세포 용해(Cell lysates)한 후, 10% 트리스-글라이신 겔(Tris-glycine gels)에서 SDS-PAGE를 진행하였다. 전기영동된 단백질은 니트로셀룰로스 막(nitrocellulose membranes)에 전이하고, β -catenin(BD Biosciences), N-cadherin(R&D Systems), Zeb1(Sigma-Aldrich), CD44(Cell Signaling Technology), 또는 GAPDH(Santa Cruz Biotechnology)의 1차 항체를 처리하였다. 이후 2차 항체를 처리하고, horseradish peroxidase-conjugated IgG(Santa Cruz Biotechnology) with Western Lightning Plus-enhanced chemiluminescence reagent(PerkinElmer, Waltham)를 처리하였다. 실험 결과 이미지는 ImageQuant LAS 4000 mini(GE Healthcare Life Sciences)로 촬영하였고, 밴드(band)는 imageJ software를 사용하여 정량화하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0074] 실험 결과, 콜라겐-마트리젤 매트릭스 상에서 VS가 tMSLC 조건 배지, 또는 vMSLC 조건 배지에 의해 침윤능이 증가하는 것을 확인하였다. 세포의 침윤능은 대조군인 TS 배지 $<$ tMSLC 조건 배지 $<$ vMSLC 조건 배지 순으로 증가하였다. 또한 침윤 관련 단백질의 발현과 침윤 면적도 대조군인 TS 배지 $<$ tMSLC 조건 배지 $<$ vMSLC 조건 배지 순으로 증가함을 확인하였다.

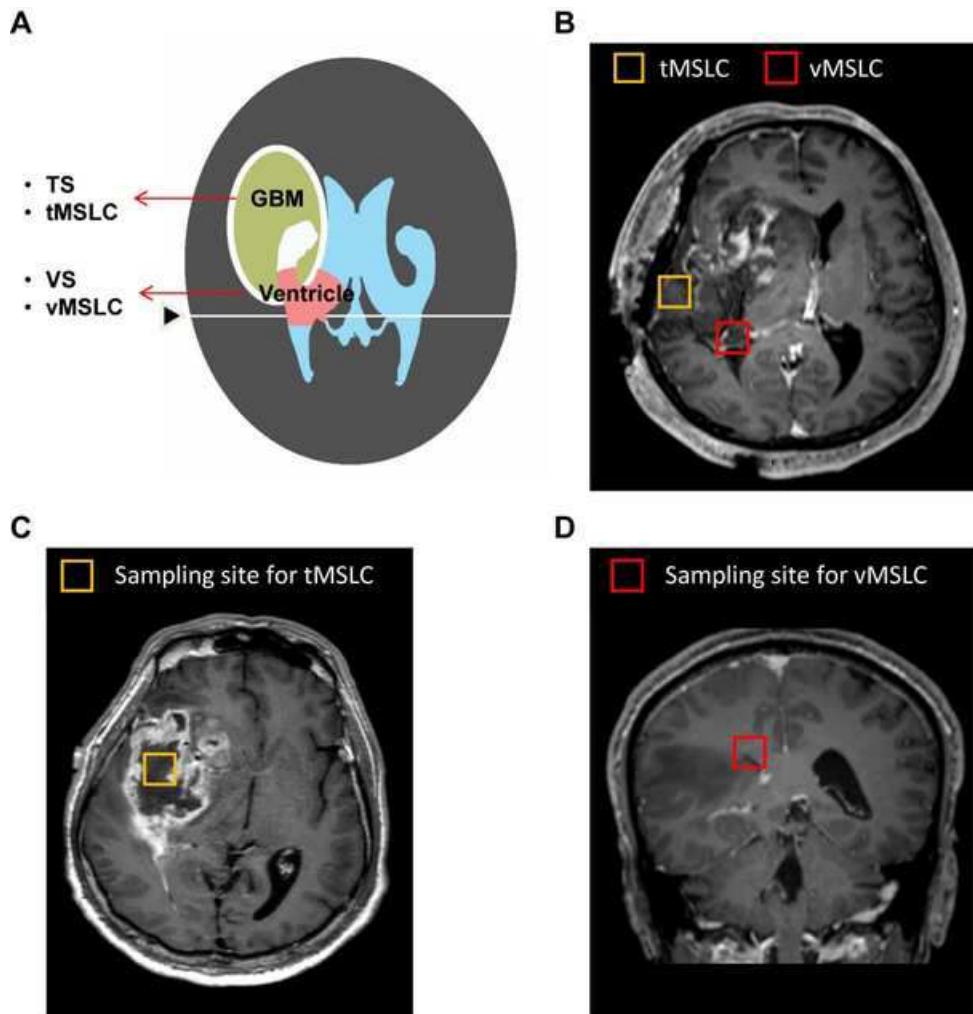
[0076] **실시예 6. 마우스 정위 이종이식 모델의 제조**

[0077] 수컷의 흉선 누드 마우스(6 주령, Central Lab. Animal Inc.)는 실험 전 1주간 빛, 온도, 습도가 조절되고 멸균된 상태에서 순화 기간을 가진 후 실험에 이용하였다. 마우스 정위 이종이식 모델의 제조를 위해 교모세포종 종양구(GBM TSs, 마우스 당 5×10^5)와 동일한 수의 tMSLC 또는 vMSLC를 마우스의 우측 전두엽(right frontal lobe)에 가이드 나사 시스템(guide-screw system)을 사용하여 4.5mm 깊이에 이식하였다. 시험 기간 중 동물의 체중이 최대치에서 15% 이상 감소하는 경우에는 안락사를 진행하였다. 마우스로부터 뇌 조직을 수득하여 면역염색을 진행하기 위해 조직을 파라핀 블록으로 제조하고, 마이크로톰을 사용하여 5- μ m 두께로 잘라 슬라이드를 제작하였다. 자동화 기기(Discovery XT)를 사용하여 항원 검색과 항체 부착을 진행하고, Peroxidase / DAB 염색하여 침윤 마커인 Zeb1을 관찰하였다. 상기 결과를 도 6에 나타내었다. In vivo에서 마우스의 생존율과 종양 형성을 확인한 결과 TS+vMSLC 실험군에서 현저한 뇌암 생성이 나타났으며, 대조군(TS) $<$ tMSLC $<$ vMSLC 순으로 침윤 마커인 Zeb1의 발현이 증가하는 것으로 나타났다.

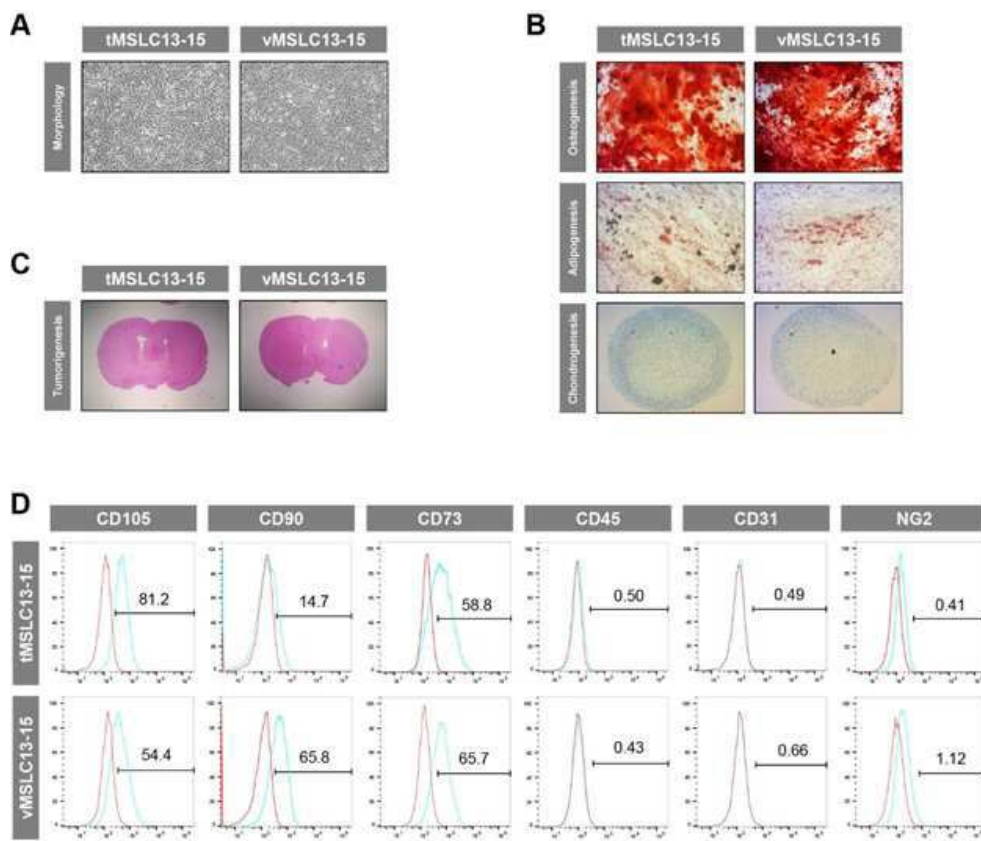
[0079] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

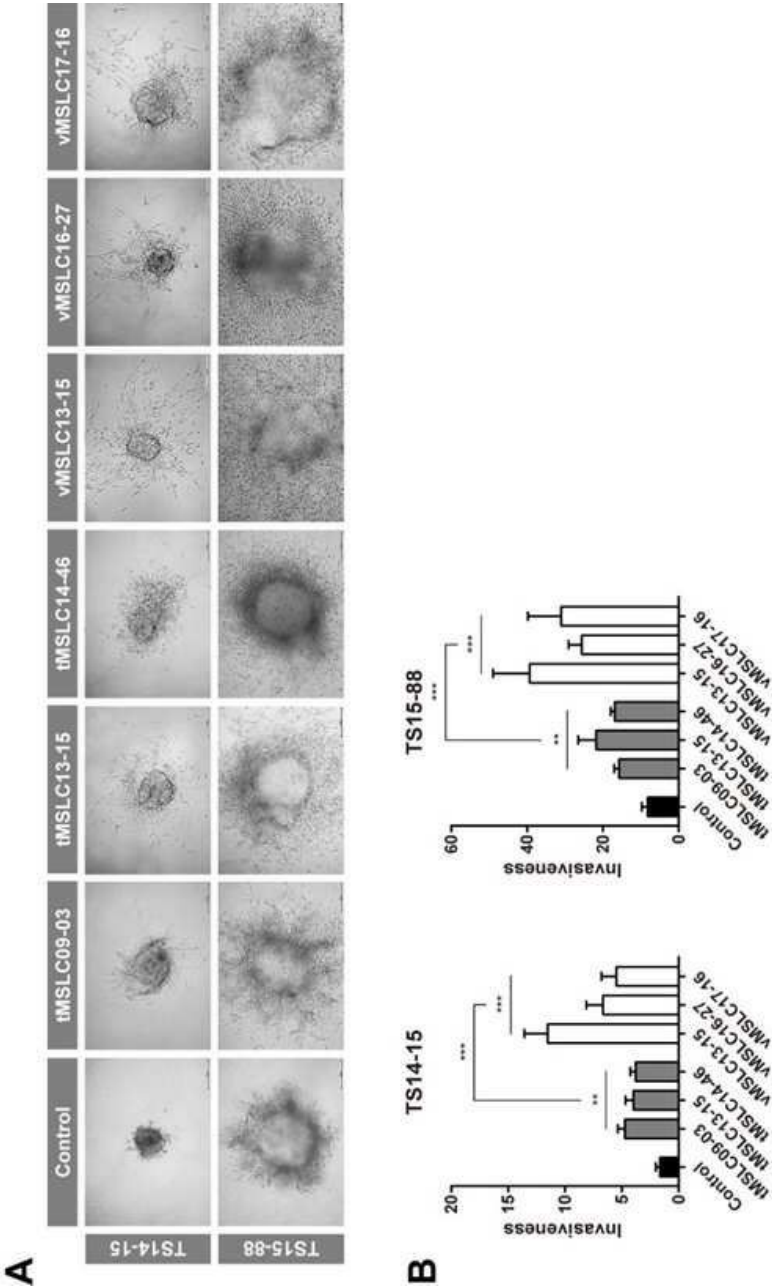
도면1



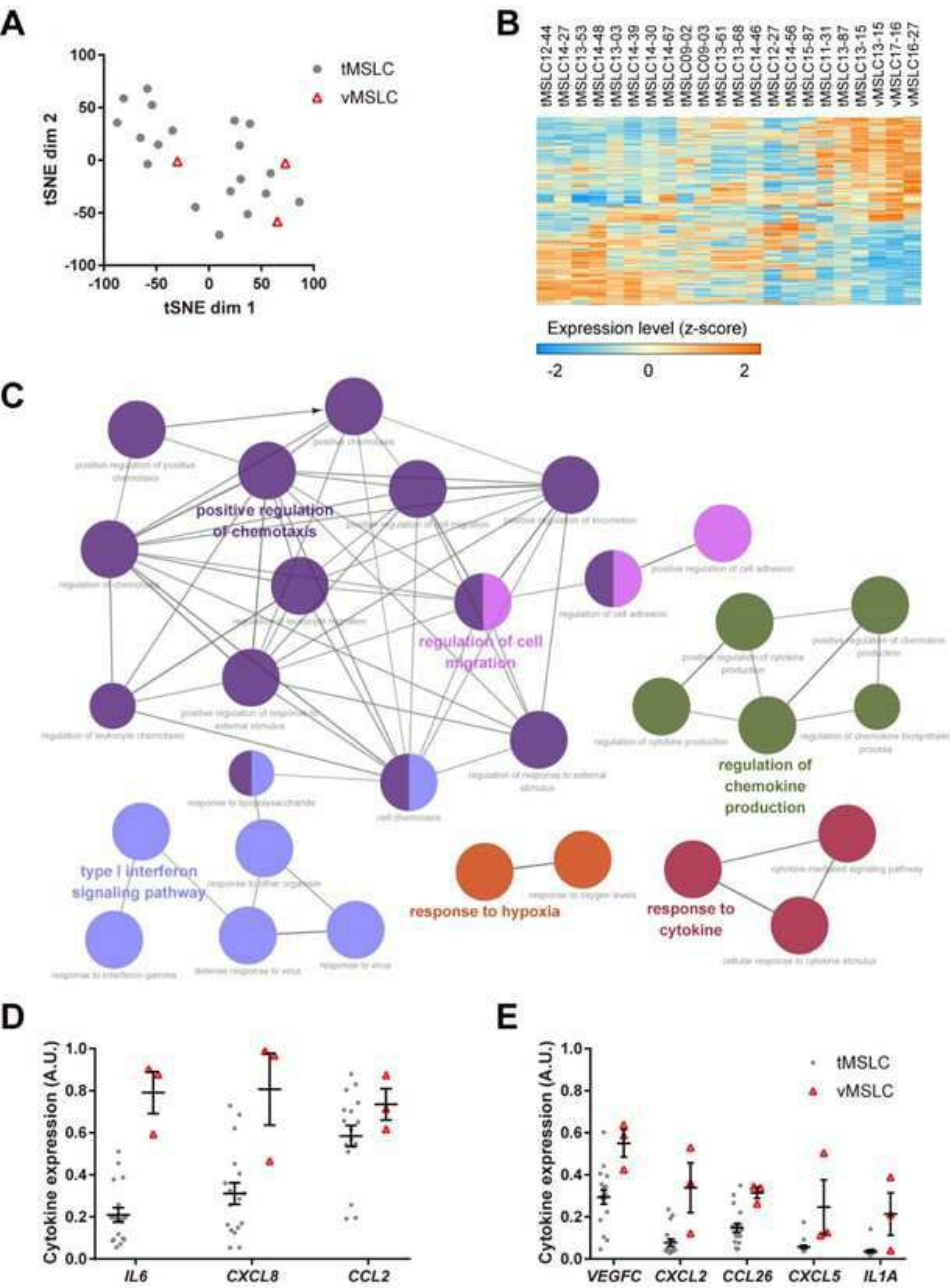
도면2



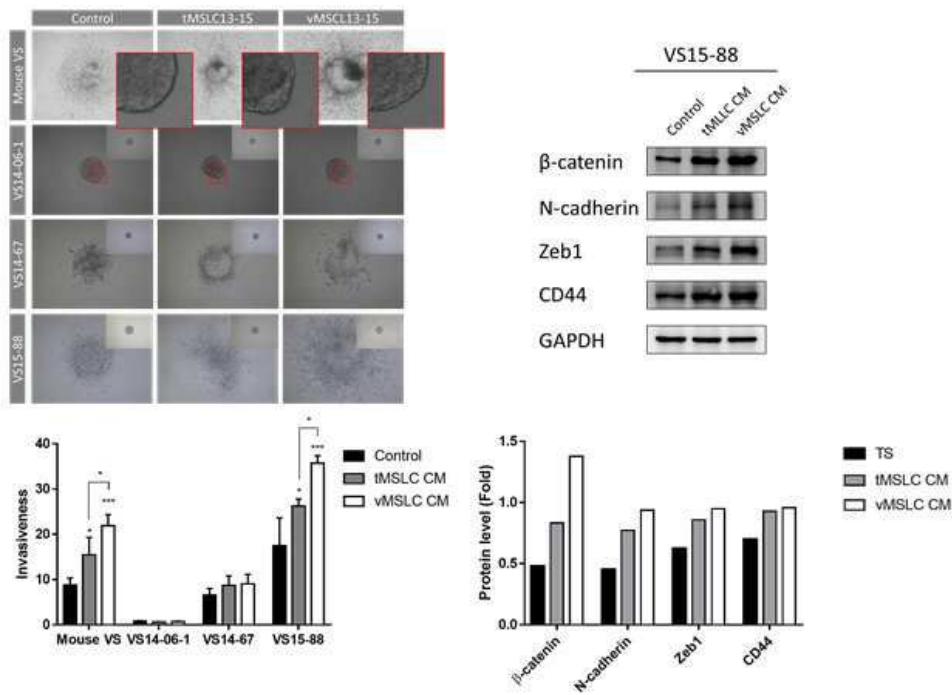
도면3



도면4



도면5



도면6

