

질환모델동물의 의학적 응용

Transgenic Animal as a Disease Model and Bioreactor

가톨릭의대 의과학연구원

류 재 응

I. Tumorigenesis of transgenic mice induced by mouse Vasopressin-SV40 hybrid oncogene

1. 서 론

Vasopressin (VP)은 hypothalamic magnocellular의 cell body내에서 합성되는 9개의 amino-acid로 구성된 neuropeptide 호르몬이다. VP는 삼투압을 조절하는 메카니즘에서 중요한 물질로서 작용한다. 본 연구는 VP의 조절부위를 확인하고 또한 *in vivo*에서 뇌하수체 종양을 유도하기 위하여 mVP의 조절하에 SV40T antigen이 과발현되는 형질전환생쥐를 생산, VP를 분비하는 세포주의 개발과 생체내 (*in vivo*)의 뇌종양화에 관여하는 질환모델동물을 확립하기 위하여 수행하였다.

2. 재료 및 방법

pVPSVIGR 두 발현 벡터는 2.1 kb의 구조유전자, 3.5 kb IGR (pVPSVIGR3.5)이 포함되어 있으며, 구조유전자인 exon III Not I 위치에 SV40 T antigen 유전자가 in-frame으로 삽입되었다. 발현 벡터의 확인을 위하여 sequencing 및 PC12 신경세포주에 주입하여 SV40T antigen에 대한 antibody로 Western 및 면역학적 염색으로 확인하였다. SV40T antigen의 발현이 확인된 벡터를 제한 효소 BamH I/Sca I으로 절단한 후 0.7% agarose gel에서 분리하여 BDF1 생쥐의 수정란에 미세주입하였으며, ICR 대리모에 이식하였다. 태어난 산자는 PCR 및 Southern으로 형질전환 생쥐를 선별하였으며, Northern 및 H-E 염색으로 병리학적인 관찰을 실시하였다.

3. 결 과

미세주입으로 pVPSVGR2.1의 경우 2lines, pVPSVGR3.5의 경우 6lines의 founder 형질전환생쥐가 생산되었으며, 생산된 형질전환생쥐 (pVPSVGR2.1)에서 mRNA는 뇌, 비장, 폐 그리고 림프절에서 발현됨을 Northern blot으로 확인하였다. 폐의 경우는 VP발현의 ectopic site로 많이 알려져 왔다. 형질전환동물의 경우 병리학적인 첫증상은 등을 구부리는 모양을 나타냈으며, 특이하게도 자성의 경우 머리가 돌아가는 현상을 나타냈다. 해부학적 조직관찰의 경우 비장과 림프절에서 과분화 현상을 보였으며, 다른 양적인 변화는 어떤 장기에서도 나타나지 않았다. 뇌의 종양화는 약 4~5주령부터 개시되며, 종양의 발생 원인으로는 SV40T 안티젠의 과발현에 의한 것임을 조직면역학적 방법으로 확인하였으며, 형질전환생쥐의 평균수명은 14~16주 정도였다. 뇌에서의 종양과 함께 세포 림프

중으로의 종양을 형질전환생쥐에서 확인하였다. pVPSVGR3.5의 경우 평균수명은 4~6주 정도였으며, 2~3주 이후부터 음식섭취에 문제가 생겨 4주의 평균 몸무게 (7.5 ± 0.5 g, 비형질전환 생쥐 16 ± 0.5 g)에서 큰 차이를 나타냈으나, 종양의 발달은 확인되지 않았다. 이상의 결과로 볼 때 VP의 조절구역은 2.1~3.5 kb사이에 존재하는 것 같으며, 5'의 3.5 kb와 3'의 3.5 kb 모두가 VP조절에 관여하는 것 같다. 이러한 형질전환동물은 VP의 조절기전 연구와 종양 발생의 기전 및 세포 림프종 연구의 기초모델동물로서 유용하게 사용할 수 있을 것으로 추측된다.

II. 방광에서 hGM-CSF를 생산하는 형질전환 마우스의 생산

1. 서론

본 연구는 형질전환동물을 이용한 유즙에서 생리활성물질 생산이 암컷동물만 제한되어 있고, 동물의 품종 또한 젖소 혹은 양 등의 유즙을 생산하는 동물로 제한을 받으며, 이들 암컷의 동물은 성숙숙기가 되어 임신 후, 수유시기에만 유즙을 생산하고, 유즙에는 lipid 뿐만 아니라 total protein이 많이 함유되어 있어 순수한 생리활성물질의 생산이 불가능하다. 반면, 오줌에서 생리활성물질이 생성된다면, 동물의 암수 구별과 품종의 선택이 불필요하고, 오줌에는 lipid나 total protein의 함량이 적어 순수한 생리활성물질의 생산이 가능할 뿐만 아니라 형질전환동물이 태어나는 즉시 이들 동물의 경제성 평가가 가능하므로, 경제적 경비 및 연구에 필요한 인력을 상당히 줄일 수 있는 부수적인 효과 또한 얻을 수 있는 잇점이 있다. 따라서 본 연구는 방광에서 특이적으로 발현하는 mouse UPII promoter를 이용, urine에서 cytokine의 일종인, 사람조혈성장인자 (Human Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor)를 생산하는 형질전환생쥐에서 방광조직 특이적 발현 여부를 검토한 후, 대동물의 urine에서 Animal Bioreactor System을 활용하기 위한 기초실험으로 수행하였다.

2. 재료 및 방법

hGM-CSF의 생산을 위한 발현 벡터는 생쥐의 방광특이적 조절유전자인 3.6 kb의 UPII promoter에 목적유전자인 2 kb hGM-CSF genomic DNA가 결합되었으며, 0.5 kb bGH poly A signal이 첨가되었다. 정확한 벡터의 검증을 위해 제한 효소 절단으로 확인하였다. 제작된 발현 벡터는 Cla I으로 절단하여 0.7% agarose gel에서 분리하여 BDF1 생쥐의 수정란의 전핵에 미세주입하였으며, 형질전환생쥐는 PCR 및 Southern blot으로 선별하였다. Founder와 F1으로부터 채취한 urine과 serum으로 ELISA를 수행하여 그 양을 확인하였으며, immunohistochemistry를 통해 조직 특이적 발현을 확인하였다.

3. 결과

미세주입하여 생산된 산자중 hGM-CSF를 발현하는 형질전환생쥐 9line을 PCR과 Southern blot를 이용하여 확인하였다. Northern blot 결과, bladder에서의 발현을 확인하였고, 아울러 다른 조직에서는 나타나지 않았지만 일부 kidney, lung, lymph node에서는 아주 미미한 발현을 나타내었다. 각 line founder와 F1을 이용하여 urine과 serum에서 hGM-CSF의 양을 ELISA로 확인한 결과 serum에서는 대조군 (0 ng/ml)과 별다른 유의한 차이를 발견하지 못했으나 urine의 경우에는 평균 (185 ng/

ml)이 생산·분비되었다. 또한 Immunohistochemistry 염색을 한 결과, 조직특이적 발현은 urine 및 ureter의 epithelium에서만 강하게 발현되었으며 다른 조직에서는 발현되지 않았다.

III. Generation of Human Growth Hormone Transgenic Rats and Analysis

본 연구는 사람 hGH (human growth hormone)에 관한 연구로서 promoter로 mWAP (mirine whey acidic protein)을 사용하였으며, 대표적 조절 기능으로 유즙내에 외인성 단백질을 분비하는 것이 특징 중의 하나이다. 본 실험에서는 WAP유전자에 사람 성장 호르몬 유전자를 구축하여 형질전환 rat를 생산하여, 내분비학적으로 어떤 현상이 야기되는지를 검토하였다.

1. Changes in Endogenous Growth Hormone Secretion and Onset of puberty in hGH Transgenic Rats

mWAP/hGH fusion gene을 사용하여 두계통의 형질전환 rat를 생산하였다. 혈중 hGH의 농도가 높게 분비되는 high line (serum hGH 농도, male 157 ng/ml; female 468 ng/ml)과 낮게 분비되어지는 low line (serum hGH 농도, male 11.3 ng/ml; female 21.7 ng/ml)으로 구분하였다. Low line의 암수 모두 hGH과 rGH의 분비 형태가 pluse상의 거의 없는 기저치 현상을 보였으며, 정상적인 산자보다 rGH 농도는 낮게 나타났다. High line의 경우 성장률이 높았지만, low line의 경우는 정상적인 개체와 비슷한 체성장을 보였다. 그럼에도 불구하고 양 계통 모두 성성숙 시기가 정상적인 것에 비해 7-8일 정도 빠르게 나타났다. Low line의 경우 성성숙시 정상적인 개체에 비해 체중이 현저히 낮은데, 이러한 사실로 미루어 exogenous hGH의 발현이 체성장의 가속화에 상관없이 성성숙 개시를 조기 유도하는 것으로 나타났다.

2. Different Female RE productive Phenotypes Determined by Human Growth Hormone (hGH) Levels in hGH-Transgenic Rats

hGH을 분비하는 성숙된 형질전환 암컷의 경우 만성적인 hGH분비가 생식 기관내 미치는 영향을 검토하기 위하여, 두 계통의 형질전환을 rat을 사용하였다. 혈중 hGH 농도가 높은 high line과 혈중농도가 낮은 low line 계통이다. High line암컷은 위임신된 경우와 비슷한 양상으로 혈중 P4 (progesterone)농도가 증가하여 장주기 (12~14일)형의 발정주기를 보였으며, 수태 또한 가능하였다. 혈중 고 hGH분비는 PRL (prolactin)과 유사한 작용을 하는 것으로 인위적인 경관 자극없이도 황체퇴행이 유도되는 것으로 나타났다. 반면, low line의 경우 PRL surge현상은 전혀 관찰할 수 없었으며, dopamin 항원인 metoclopramide투여에도 불구하고 PRL surge는 전혀 유기되지 않았다. 그리고 low line의 경우에는 황체가 정상적인 개체에 비하여 비대하여 있었고, 그 수도 많이 존재하고 있었다. 이러한 원인은 황체퇴행을 유도하는 PRL기능의 손실에 의한 것으로서, 뇌하수체에서 lactotrophs의 수가 현저히 감소했기 때문인 것으로 사료된다. 또한 rat의 경우, 혈중 hGH농도는 황체기능 조절에 아주 중요한 역할을 하는 것으로 사료된다.