광유전자 기법을 이용한 시각장애인의 망막기능 복원 기술

Optogenetic Restoration of Retinal Function for The Blind

*#서준교 [1], 문혁준 [1], 강동훈 [1], 김수영 [1], 황은미 [2], 이창준 [2], 신현준 [1]

*#J-K.F. Suh(jkfsuh@gmail.com)[1], H. J. Moon[1], D. H. Kang[1], S.Y. Kim[1], E.M. Hwang[2], C.J. Lee[2], H. J. Shin[1],

한국과학기술연구원, [1]바이오닉스연구단, [2]기능커넥토믹스연구단

Key words : optogenetics, retinal prosthesis, vision restoration

1. 서론

세계적인 인구고령화 추세에 따라 노인성 시각장애 역시 기하급수적으로 증가하고 있다. 특히 망막색소상피변성증(RP: Retinis Pigmentosa)이나 퇴행성 황반 변성증(AMD: Age-related macular degeneration)과 같은 질병에 의한 망막 손상은 시력상실로 이어지며, 현재의 기술로는 병의 치료가 불가능한 실정이다.

망막 손상으로 시력을 상실한 이들을 위해 전기적으로 퇴행 망막의 잔여부분을 자극하여 시신호를 발생시키는 망막보철이 제시되고 연구되어 왔으나 비특이적 자극, 침습성, 해상도의 제한 등 다양한 부분에서 한계를 드러냈다.

이에 우리는 최근 각광받고 있는 광유전자 기법(Optogenetics)[(1)]을 이용하여 시각 장애인의 망막기능을 복원하는 기술을 제안한다. 광반응성을 상실한 퇴행 망막에 잔존하는 시각신경 세포(RGC 또는 BC)에 선택적으로 광유전자를 전달하면, 그 세포들은 특정 파장의 빛에 반응하여 신경신호를 생성하게 된다. 그 다음 광자극 장치를 이용, 원하는 세포만을 자극하여 신경 신호를 생성할 수 있다.

본 방법을 사용할 경우, 비침습적이고 높은 해상도의 빛 자극이 가능할 뿐만 아니라 세포 특이적 자극을 통해 망막 회로를 선택적으로 자극하여 보다 완벽에 가깝게 정상 망막의 시신호를 모사할 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구에서는 제안하는 망막기능 복원 기술의 가능성을 확인하기 위하여 BALB/c mouse 망막에 바이러스 벡터를 이용하여 광유전자를 전달하고, 실험군과 대조군(wild type BALB/c) 망막의 광반응성을 비교하여 광유전자 기법에 의한 신경 신호 생성 능력을 확인하였다.

2. 광유전자의 선택적 도입

실험에 사용한 쥐는 실험군과 대조군 모두 BALB/c 타입 5 주령 암컷을 사용하였고, 광유전자는 473 nm 의 빛에 반응하여 신경 신호를 유발하는 ChR2, virus vector 는 adeno associated virus(AAV) KI serotype 을 사용하였으며, 비특이적인 CMV promoter 를 사용하였다.

Virus vector 를 망막 조직에 전달하기 위하여 동물을 Zoletil 과 Rompun 혼합액(3:1)으로 마취한 후 33 gauge 의 Hamilton syringe 를 이용하여 intravitreous injection 을 수행하였다. Injection 의 성공여부를 확인하기 위하여 fast green dye 를 virus 와 1:10 비율로 섞어 indicator 로 사용하였다.

3. 광반응 망막 신경 신호의 측정

Virus vector 를 전달한지 3 일 후 실험군의 망막 조직에서 광반응을 측정하기 위하여 망막 조직을 쥐에서 분리하였다. 쥐는 경추탈골법을 이용하여 처리한 후 안구를 적출하였으며, 조직의 유지를 위하여 산소 95%, 이산화탄소 5%의 gas 를 aeration 하는 Ames'

medium 내에서 망막 조직의 분리와 보관을 수행하였다.

분리한 망막 조직은 256 channel MEA (Multichannel systems) 에 mesh 와 anchor 를 사용하여 밀착 고정시켜 측정하였으며, 용액 순환 장치를 이용하여 aeration 하는 Ames' medium 을 지속적으로 공급하였다.

BALB/c mouse 는 망막 손상 모델이 아니므로 광수용체로부터 ON bipolar cell 로 전달되는 광반응 신호를 차단하기 위하여, L-(+)-2-amino-4-phosphono-butyric acid (APB)를 Ames' medium 에 5uM 의 농도로 혼합하여 사용하였다. APB 를 처리함으로써 간이적으로 퇴행 망막 질환 모델을 모사할 수 있다.(2)

광유전자를 자극하기 위해 473nm 파장의 blue Laser 를 사용하여 0.6 mW/mm^2 세기의 광자극을 가하였으며, MC stimulus (Multichannel systems)를 사용하여 광자극을 제어하고 자극 시점을 MEA 와 동기화하였다. 광자극은 2 초간 자극 3 초간 비자극의 패턴을 한 주기로 하여 반복하였다.

4. 망막 신경 신호 분석

MC Rack(Multichannel systems)을 통하여 분석된 신경 신호 정보는 신호의 표준편차의 3.5 를 기준으로 threshold 를 넘는 파형을 spike 로 detection 하여 spike time stamp 를 얻었다. 광자극에 대한 spike 패턴을 분석하기 위하여 MC Rack 에서 자체 제공하는 rack 을 이용하여 Raster plot 을 그리고, 자체 제작한 MATLAB 프로그램을 이용하여 광자극에 대한 Peristimulus time histogram(PSTH)을 얻었다.

5. 결론

대조군(wild type, control)의 경우 망막의 전체 회로가 완벽하게 살아있으므로 빛을 가하면 다수의 신경신호가 발생하는 것을 확인할 수 있다. 하지만 대조군에 APB 를 처리하게 되면 Photoreceptor 에서 ON Bipolar cell 로 가는 회로가 끊어져 빛을 비추었을 때 나타나는 신경신호(ON set response)가 사라지게 된다. (Fig.1 left, mid)

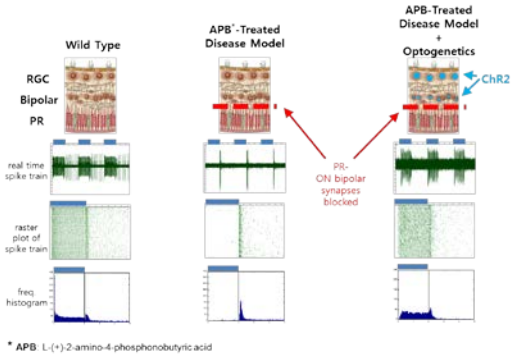

Fig. 1 Response of 3-types retinal patches on blue laser stimulation, (left) BALB/c, control mouse, (mid) APB-Treated BALB/c mouse (right) APB-Treated ChR2 transfected BALB/c mouse. (1st row) retinal cross section, (2nd row) real time spike train, (3rd row) raster plot, (4th row) peristimulus time histogram

그러나 virus vector 를 이용하여 광수용체(ChR2)를 전달한 실험군에서는, 일부 전극에서 APB 를 처리한 뒤에도 빛에 반응하는 신경신호를 다수 확인 할 수 있었다. (Fig.1 right)

APB 처리 후에 나타나는 ON set response 는 photoreceptor 에서 유래된 것이 아니므로 bipolar cell 이나 ganglion cell 에서 광유전자에 의해 자체 유도된 신경신호로 강하게 추정되며, 이를 통해 광유전자 기법의 신경신호 생성 능력과 이를 이용한 망막기능 복원기술의 가능성을 확인할 수 있었다.

후기

본 연구는 기초기술연구회 협동연구사업 (NAP-09-04)과 미래유망 융합기술 파이오니어 사업 기획연구(2013M3C1A3000426)의 지원으로 이루어졌다.

참고문헌

1. K. Deisseroth, Nature Methods, **8**, 26-29 , 2011.
2. P.S. Lagali, Nature neuroscience, **11**, 667-675, 2008.