

표 지

(뒷면)

(측면)

(앞면)

<div style="border: 1px solid black; width: 100px; height: 40px; margin: 0 auto; text-align: center; padding: 5px;"> 주 의 (편집순서9) </div> <p style="text-align: center;">(16 포인트 고딕체)</p> <p style="text-align: center;">↑ 15cm ↓</p>	P N 1 9 1 2 0	<div style="border: 1px dashed black; width: 200px; margin: 0 auto; padding: 5px;"> 극지(연) 보고서발간번호 2016R1D1A1B03931923 </div> <p style="text-align: center;">↑ 5cm ↓</p> <p style="text-align: center;">북극환경특성연구(과제명) (20 포인트 중고딕체)</p> <p style="text-align: center;">A study on the Arctic Environment Characteristics (16 포인트 신명조체)</p> <p style="text-align: center;">↑ 5cm ↓</p> <p style="text-align: center;">2019. 11. 20</p> <p style="text-align: center; font-size: 2em; font-weight: bold;">KOPRI</p> <p style="text-align: center; font-size: 2em; font-weight: bold;">극지연구소</p> <p style="text-align: center; font-size: 1.5em; font-weight: bold;">한 국 해 양 과 학 기 술 원 부 설 극 지 연 구 소</p> <p style="text-align: center;">교육부 (한국연구재단)</p> <p style="text-align: center;">↑ 4cm ↓</p> <p style="text-align: center;">↑ 3cm ↓</p>
조현병 발병기 작 및 약물타 켓 연구를 위한 <i>in vitro</i> 3차원 세포배 양 및 <i>in vivo</i> 체브라 피쉬 모델 개발		한국해양연구원 부설극지연구소



5cm



조현병 발병기작 및 약물타겟 연구를 위한 *in vitro*
3차원 세포배양 및 *in vivo* 제브라피쉬 모델 개발

Development of *in vitro* 3D cell culture and *in vivo* zebrafish
model for studying pathogenesis and drug target of
schizophrenia



5cm



2019. 11. 20

한국해양과학기술원
부설극지연구소

교육부 (한국연구재단)



4cm

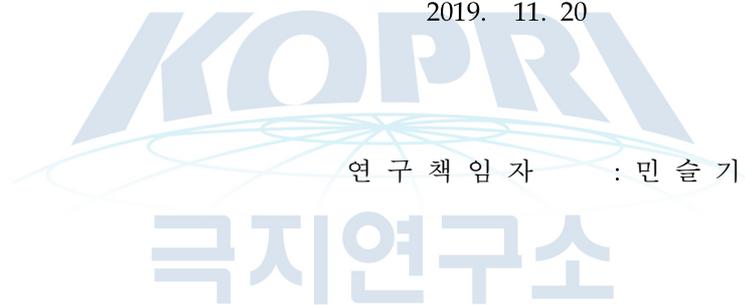


제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 “조현병 발병기작 및 약물타겟 연구를 위한 *in vitro* 3차원 세포배양 및 *in vivo* 제브라피쉬 모델 개발”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 11. 20



보고서 초록

과제관리번호	PN19120	해당단계 연구기간	3 년	단계 구분	1 단계 / 1 단계
연구사업명	중 사업 명	이공학개인지초연구지원사업			
	세부사업명	기본연구			
연구과제명	중 과 제 명	조현병 발병기작 및 약물타겟 연구를 위한 <i>in vitro</i> 3차원 세포배양 및 <i>in vivo</i> 제브라피쉬 모델 개발			
	세부(단위)과제명				
연구책임자	민 슬 기	해당단계 참여연구원수	총 : 1 명 내부 : 1 명 외부 : 2 명	해당단계 연구비	정부: 150,000 천원 기업: 천원 계: 150,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원 부설 극지연구소 극지생명과학연구부		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위 탁 연 구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요 약					보고서 면수
<p>◎ 조현병 치료제 개발 필요성</p> <ul style="list-style-type: none"> • 조현병 치료제는 완치가 어렵고 부작용이 많으므로 더욱 효과적인 약물 개발이 시급함 • 이를 극복하기 위해 뇌신경 아교세포의 3 차원 배양 및 <i>in vitro</i> model 제작을 통하여 세포 간 병리적 현상과 상호작용 확인 • 조현병 주 활성 유전자의 결여 zebrafish 모델을 개발하여 연관 유전자의 상호작용을 분석해 새로운 약물 조절 후보를 제시 <p>◎ <i>in vitro</i> 모델개발</p> <ul style="list-style-type: none"> • 3 차원 세포 배양 지지체 제작 및 뇌신경 아교세포를 성공적으로 배양 • <i>in vivo</i> 유사 조직 및 조현병 환경 구현을 통한 분자물질 작용기전을 확인 <p>◎ 유전자 변이 모델 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> • CRISPR/Cas9 기술로 유전자 변이 모델 개발을 하였으며, 병리적 환경하의 뇌신경아교세포에 약리효능 후보물질의 회복력을 검증하여 약물개발로 활용할 수 있는 모델임을 검증하고 후보약물을 제시하여 새로운 치료제 개발의 단초를 제시 • zebrafish 배아에 유전자 변이를 위한 물질을 미세주입 하였으며, 타겟 유전자 변이의 2세대 동형 접합체를 획득 					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	조현병, 신경아교세포, 3차원 세포배양 지지체, 3차원 세포배양 모델, 유전자가위, 제브라피쉬, 배아체 미세주입, 약물 타겟, 약물 스크리닝			
	영 어	Schizophrenia, Astrocytes, 3D cell culture scaffold, 3D cell culture model, CRISPR/Cas9, Zebrafish, Embryo microinjection, Drug target, Drug screening			

요 약 문

I. 제 목

조현병 발병기작 및 약물타겟 연구를 위한 *in vitro* 3차원 세포배양 및 *in vivo* 제브라피쉬 모델 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 조현병 환자들이 계속적으로 증가하지만 약물의 타겟이 제한적이므로 부작용 및 낮은 약물 순응도로 치료에 어려움을 보이고 있으며, 이러한 환자들을 위하여 새로운 메커니즘 타겟의 약물개발이 필요함. 따라서, 다양하고 반복적인 실험을 하기 위해서는 *in vivo* like-*in vitro* model을 개발할 필요가 있음
- 조현병 발병의 생물학적 원인으로 보고된 것들 중 hippocampus 신경세포의 glutamate receptor인 NMDAr의 활동 이상이 다수 이지만, 최근 astrocyte 및 oligodendrocyte에서의 이상을 주목하고 있음. 현재 상용화된 약물은 작용 범위가 제한적이므로 부작용 및 약물의 효과를 보지 못하는 사람들을 위하여 새로운 mechanism 조절약물의 개발이 필요하며 그에 필요한 다양한 반복 실험을 위해 *in vivo* 유사 *in vitro* model 개발이 필요함

III. 연구개발의 내용 및 범위

- 사회·경제적으로 큰 문제를 야기하고 있는 조현병은 현재까지의 치료제만으로는 완치가 어렵고 부작용에 대한 보고도 많으므로 더욱 효과적인 약물 개발이 시급하며 그에 더하여 실질적인 치료를 위해서는 약물의 치료 타겟 범위를 넓혀야 할 필요성이 있음
- 따라서, 조현병 약물의 부작용 최소화 및 효능 증가를 목표로 새로운 약물의 타겟을 탐색하고 후보를 제시하고자 함. 특히, 신경세포의 이상을 대상으로 한 기존 약물과 다르게 아교세포인 Astrocyte와 oligodendrocyte의 3차원 배양 및 *in vitro* model 제작을 통하여 병리적 현상과 상호작용을 확인함
- 본 연구에서 제안하는 바는 조현병의 약물 치료로 오직 D2 receptor를 타겟으로 하는 약물 (D2 receptor antagonist)만이 존재하는 한계점을 극복하기 위해 새로운 타겟 메커니즘을 다양한 세포 (Astrocytes, oligodendrocyte)를 대상으로 탐색하고 후보를 제시하고자 함

IV. 연구개발결과

당초 계획하였던 3차원 뇌신경아교세포 배양을 위한 3차원 세포 배양 지지체 제작 및 hippocampal astrocytes를 성공적으로 배양하여 *in vivo* 유사 조직 및 조현병 환경 구현을 통한 분자물질 발현 조절 메커니즘을 확인하였으며, CRISPR/Cas9 기법을 활용하여 유전자 변이 모델 개발을 수행함. 또한 병리적 환경하의 뇌신경아교세포에 약리효능 후보물질의 회복력을 검증하여 약물개발로 활용할 수 있는 모델임을 검증하였으며, 더 나아가 후보약물을 제시하여 새로운 치료제 개발의 단초를 제시하

기도 함. in vivo 조현병 모델 개발을 위해서는 zebrafish embryo에 특정 유전자 변이를 위한 물질을 injection 하였으며, 타겟 유전자 변이의 homogenous 개체를 획득하였음

V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구에서 개발한 조현병 유사 3차원 in vitro hippocampal astrocytes model과 조현병 발병 관련 유전자 결여 zebrafish 모델 개발은 아래의 근거에 의거하여 세포 조현병 발병원에 대한 메커니즘 확인 및 약물개발에 있어서 유용한 시스템이 될 수 있는 중요한 연구 결과라고 판단됨

[in vitro 조현병 세포배양 모델 형성을 위한 3차원 세포지지체 배양 모델 개발]

본 연구과제 수행을 통하여 hippocampal astrocyte를 3 차원 세포 지지체에서 최초로 배양하였으며, 화학물질 처리 방법과 타겟 유전자 결여 기술인 CRISPR/Cas9을 활용하여 조현병 유사 환경을 구현하였음. 특정 유전자를 발현 억제시킴으로서 연관 유전자와의 발현 연관성을 비교 분석하여 약물 작용 타겟을 제안함. 또한 뇌보호 효과의 C-phycoyanin의 약물개발 가능성을 확인한 결과, 3차원 지지체에서 serum deprivation으로 활성이 결여된 hippocampal astrocytes를 활성화 시킴으로써 조현병을 포함한 다양한 뇌질환에 특이적인 약물 개발에 활용될 수 있는 가능성을 최초로 확인하였음

[CRISPR/Cas9 기술을 활용한 zebrafish 조현병 유사 모델 개발]

조현병 발병요인과 연관된 유전자 변이 homogenous 모델은 추후 후보약물 스크리닝 및 작용기작 탐색에 활용할 수 있음



S U M M A R Y

I. Title

Development of *in vitro* 3D cell culture and *in vivo* zebrafish model for studying pathogenesis and drug target of schizophrenia

II. Purpose and Necessity of R&D

- Schizophrenia patient continues to increase but the drug targets are limited, which makes it difficult to treat side effects and low drug compliance. Therefore, *in vivo* like-*in vitro* model needs to be developed to perform various and repeated experiments.
- Although there are many reports about abnormalities of NMDAr, a glutamate receptor in hippocampus neurons, for the reason of the disease, Recently, abnormalities in astrocytes and oligodendrocytes have been noted. commercialized drugs have a limited range of action, so new mechanism modulators need to be developed for those who have side effects, and *in vivo* like *in vitro* models are needed for various screening tests.

III. Contents and Extent of R&D

- Schizophrenia, which causes many problems, is difficult to cure with current medicine, and there are many reports about side effects. Therefore it is urgent to develop more effective drugs. In addition, there is a need to broaden the therapeutic target range of drugs for practical treatment.
- Therefore, we aim to explore new drug targets and present candidates with the aim of minimizing side effects and increasing efficacy. In particular, unlike conventional drugs targeting neuronal abnormalities, pathological phenomena and interactions between astrocytes and oligodendrocytes were confirmed using three-dimensional culture.
- In this study, we propose a novel mechanism of the drug targeting a variety of cells to overcome the limitations of only the D2 receptor antagonist.

IV. R&D Results

◎ *in vitro* model development

- Three-dimensional cell culture scaffold was well-constructed and successful culturing of glial cells
- Molecular mechanism of action was confirmed by implementing *in vivo* like 3-D environment

◎ Gene mutation model development

- Genetic mutation model was developed using CRISPR / Cas9 technology. Verification of

pharmacological efficacy candidates for cerebral neuroglial cells under pathological environment was verified as a model that can be used for drug development.

- Microinjection of gene mutations into zebrafish embryos was implemented to obtain second generation homozygotes of target gene mutations

V. Application Plans of R&D Results

The development of the schizophrenic-like three-dimensional model and the zebrafish model with deletion of genes related to schizophrenia can be useful systems for identifying cell-level mechanisms and drug development.

- **Development of three-dimensional cell scaffold culture model for *in vitro* schizophrenic model**

Through this project, hippocampal astrocytes were cultured on a three-dimensional cell scaffold for the first time, and a schizophrenic-like environment was realized by using chemical treatment and CRISPR / Cas9. In addition, as a result of confirming the possibility of drug development of C-phycoyanin with the effect of neural protection, it was possible to activate hippocampal astrocytes lacking activity by serum deprivation in three-dimensional scaffold, which could be a drug candidate to develop drug specific to various brain diseases including schizophrenia.

- **Development of zebrafish schizophrenia-like model using CRISPR/Cas9 technology**

Genetic homogenous models associated with schizophrenia pathogens can be used for screening candidate drugs and screening mechanisms

C O N T E N T S

Chapter 1 Overview of the Project

Chapter 2 R&D Implementation Contents and Results

Chapter 3 Importance of R&D Results

Chapter 4 References

Chapter 5 References



목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 연구수행내용 및 연구결과

제 3 장 연구개발결과의 중요성

제 4장 참고문헌

제 5 장 연구성과



본 문

1. 연구개발과제의 개요

▶ 연구개발의 배경 및 목적

- 조현병 (정신분열증)은 망상과 환청 등 이상행동을 보이며 누군가가 자신을 해치려 하는 것으로 착각하거나 정서적으로 둔감해지므로, 강도 · 살인에 이르는 심각한 사회적 피해를 일으키기도 함
- 현재까지의 치료 방법은 하루에 한번 혹은 하루에 다수 약물 복용으로 매일 반복하거나 한 달에 한번 주사제를 맞는 것으로 효과를 볼 수 있음. 하지만 대표적으로 조현병 치료제로 사용되고 있는 antipsychotic medications (항신경병 약물, 파민이나 세로토닌에 영향을 주어서 증상 조절하는 것으로 여겨짐)는 완전한 치료가 안 될 뿐더러 부작용으로 인하여 예후가 좋지 않으므로 환자들이 약물 복용을 꺼리고 있으므로 개선된 약물을 개발할 필요가 있음
- 약물 개발은 임상시험이 되기 전 효능을 판별할 수 있도록 실험관내 시험(*in vitro*)과 동물을 이용한 전임상 시험(*in vivo*)이 선행되어야 하는데, 조현병과 같은 신경정신질환은 아직까지 최적의 *in vitro* model 과 *in vivo* 모델이 개발되어 있지 않아 약물 개발에 어려움이 많음
- 효과적 약물 개발 및 적용으로 인해 환자들의 독립적인 일상 및 사회생활 기능을 목표로 다 수의 과학자들이 새로운 약물의 타겟을 제시하거나 치료제 후보물질을 보고하고 있음

▶ 연구개발의 필요성

- 조현병 환자들이 계속적으로 증가하지만 약물의 타겟이 제한적이므로 부작용 및 낮은 약물 순응도로 치료에 어려움을 보이고 있으며, 이러한 환자들을 위하여 새로운 메커니즘 타겟의 약물개발이 필요함. 따라서, 다양하고 반복적인 실험을 하기 위해서는 *in vivo* like-*in vitro* model을 개발할 필요가 있음.
- 조현병 발병의 생물학적 원인으로 보고된 것들 중 hippocampus 신경세포의 glutamate receptor인 NMDAr의 활동 이상이 다수 이지만, 최근 astrocyte 및 oligodendrocyte에서의 이상을 주목하고 있음 (Lecardeur L. et al. 2009). 현재 상용화된 약물은 작용 범위가 제한적이므로 부작용 및 약물의 효과를 보지 못하는 사람들을 위하여 새로운 mechanism 조절약물의 개발이 필요하며 그에 필요한 다양한 반복 실험을 위해 *in vivo* 유사 *in vitro* model 개발이 필요함

▶ 연구 가설 및 범위

- 사회·경제적으로 큰 문제를 야기하고 있는 조현병은 현재까지의 치료제만으로는 완치가 어렵고 부작용에 대한 보고도 많으므로 더욱 효과적인 약물 개발이 시급하며 그에 더하여 실질적인 치료를 위해서는 약물의 치료 타겟 범위를 넓혀야 할 필요성이 있음

- 따라서, 조현병 약물의 부작용 최소화 및 효능 증가를 목표로 새로운 약물의 타겟을 탐색하고 후보를 제시하고자 함. 특히, 신경세포의 이상을 대상으로 한 기존 약물과 다르게 아교세포인 Astrocyte와 oligodendrocyte의 3차원 배양 및 *in vitro* model 제작을 통하여 병리적 현상과 상호작용을 확인함
- 본 연구에서 제안하는 바는 조현병의 약물 치료로 오직 D2 receptor를 타겟으로 하는 약물 (D2 receptor antagonist)만이 존재하는 한계점을 극복하기 위해 새로운 타겟 메커니즘을 다양한 세포 (Astrocytes, oligodendrocyte)를 대상으로 탐색하고 후보를 제시하고자 함

▶ 연구 최종 목표

본 연구는 다양한 연구보고들을 참고하여 조현병의 원인을 파악하고 이를 완전히 구현할 수 있는 *in vitro* 3차원 모델 및 *in vivo* 제브라피쉬 모델을 개발하고 이를 이용한 질병치료의 새로운 타겟 제안을 목적으로 함

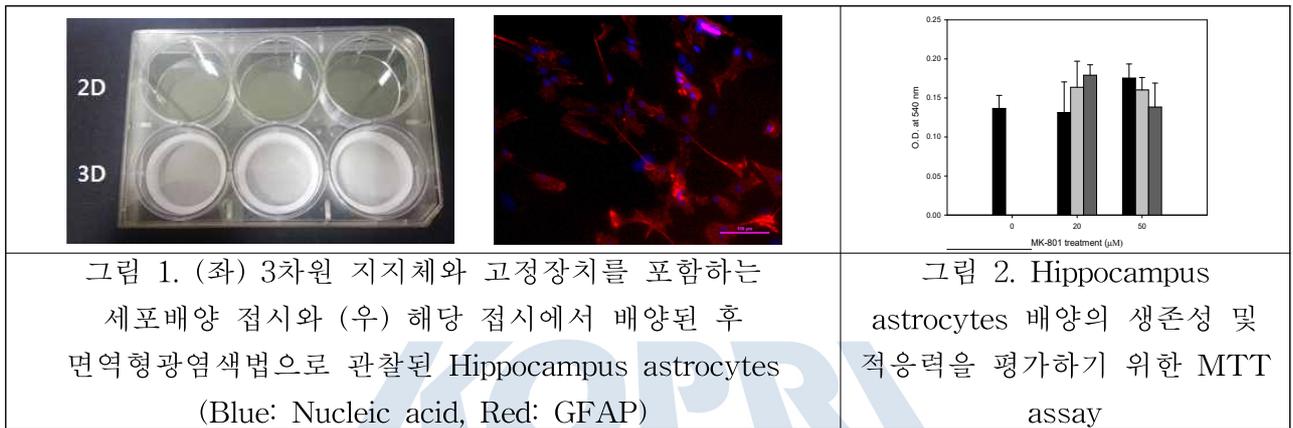
- *in vitro* model을 위하여 Hippocampus을 구성하며 조현병 발병원인과 연관되어 있는 것으로 밝혀져 있는 신경아교세포들(astrocyte, oligodendrocyte)이 배양된 3 차원 모델을 개발하고, 기존 모델 형성을 위한 화학물질 처리 및 유전자 기능결여를 위한 유전자교정기술 (CRISPR/Cas9)을 이용하여 실제 조직에서의 변화와 유사한 최적의 질병 모델을 구성함. 본 연구에서 제안하는 *in vitro* 모델에서 사용되는 3 차원 세포 지지체는 기존의 단순한 tissue culture dish를 이용한 세포 배양 환경이 아닌 조직의 미세구조와 유사한 나노섬유로 구성되어 있으며, 이러한 구조는 선행연구에 의해 *in vivo*에서의 뇌 구성 세포 본연의 특징을 유지하게 하는 것으로 밝혀졌으므로, 이것을 이용한 조직유사 *in vitro* 모델 및 특정 유전자기능 결여로 질병모델을 최초로 제작하고자 함
- CRISPR/Cas9 시스템을 이용하여 특정 유전자의 발현이 중단된 돌연변이 동물 (제브라피쉬) 모델을 최초로 제작하여 약물 스크리닝 및 작용기작 탐색에 활용하고자 함

2. 연구수행내용 및 연구결과

[1 차년도]

▶ Hippocampal astrocyte 배양 및 MK-801 (Dizocilpine)

전체 연구과정에 기반이 되는 신경아교세포 배양에 있어서, 대뇌피질의 astrocytes에 비하여 상대적으로 *in vitro* 배양이 불안정하다고 알려진 Hippocampal astrocytes를 3차원 나노섬유 지지체에 안정적으로 배양하였으며, 다양한 조건들을 적용하여 본 연구팀 고유의 프로토콜을 확립하였음



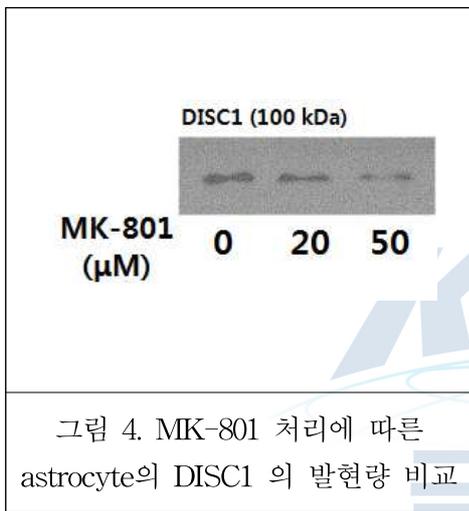
3차원 세포 지지체에 배양된 세포들은 초반 적응기간을 거친 후 세포 분열을 활발하게 하여 세포외기질 유사 조직 형성에 도움을 주는 것으로 판단할 수 있음. 이러한 3차원 지지체에서의 세포 배양 관찰 및 조절은 전체 연구의 기반이 되는 기술을 확립한 것으로 판단할 수 있음. *in vitro* 및 *in vivo* schizophrenia 모델을 형성할 때 사용되는 MK-801은 MTT assay로 Hippocampus astrocytes의 viable cell number를 측정된 결과 처리 농도 (20, 50 μM), 유무에 상관없이 viability에는 영향을 미치지 않았음

▶ 배양환경에 따른 세포 내 전 단백질 동정 및 GFAP, DISC1 발현량 비교

2 차원과 3 차원 표면에서 배양된 세포 전체 단백질 양을 비교하여 발현량에 현저한 차이가 있는 15-16 kDa과 22-23 kDa 크기의 두 단백질을 선정, 밴드를 분리하여 LC-MS 으로 동정하였음



동정된 단백질은 각각 hemoglobin, heat shock protein, ventral midline antigen, rho GDP-dissociation inhibitor 등 이었으며, 그 중 hemoglobin 은 iron ion을 이동시키는 단백질로 그 농도는 iron의 부족함을 판단할 수 있는 지표가 됨. Insel BJ et al. 2008)에 의하면 세포 내 hemoglobin 양이 적은 것이 schizophrenia의 원인이 될 수 있다고 하였으므로 이것은 작용기전 분석을 위한 중요한 표지 단백질이 될 것으로 판단됨. 또한, heat shock 27 kDa protein (HSPB 1)은 schizophrenia가 발생하였을 시 발현량이 증가되는 것으로 밝혀져 있음 (Vibeke et al. 2013). 따라서 추후 모델개발에 이어 약물개발 시 2차원 지지체에 비하여 3 차원 지지체에서 배양된 astrocytes는 이 두 단백질의 발현량 변화를 더욱 뚜렷히 관찰할 수 있으므로 다양한 환경 하에서의 관련 유전자 및 단백질의 특징적인 발현량 비교 분석을 통해 적합한 모델형성의 기반으로 사용될 수 있음을 검증한 결과라 할 수 있음



조현병이나 기타 정신질환 환자에게서 발견할 수 있는 병리학적 특징은 DISC1 단백질의 이상발현과 NMDA receptor의 hypofunction 상태이므로 (Melissa A. Snyder and Wen-Jun Gao, 2013) DISC1 단백질 발현량 검사 및 주변 환경과의 연관성 분석은 질병모델을 구현하거나 약물치료 방법을 개발할 때 매우 중요한 정보가 됨. 3 차원의 환경에서 배양된 hippocampal astrocytes에 NMDA receptor antagonist인 MK-801 (0, 20, 50 μM)을 72 시간동안 처리하였을 때 DISC1 발현량은 농도에 비례하여 감소한 것을 확인하였음

▶ Hippocampus astrocyte activities on 3D culture system 특징 확인

다양한 뇌질환에서 나타나는 동일한 병리적 증상은 astrocytes의 activation이며, 이러한 현상을 일컫는 astrogliosis는 많은 연구자들에 의해 수년간 뇌질환 치료의 타겟이 되어 다양한 연구가 진행되어 왔음. 조현병 역시 신경세포 자체뿐만 아니라 주변의 아교세포인 astrocyte 와 oligodendrocyte의 활성 변화에 의한 발병이 이슈가 되고 있으므로 (Rothermundt, Matthias et al, 2007) 해당 연구의 필요성이 있음. 그림에서 보이는 바와 같이 astrogliosis가 발생하였을 때 병리학적 마커 단백질들의 유전자 발현률이 배양환경에 따라 현저히 차이가 있었음. 이것은 세포를 배양하는 환경이 작용기전 및 그를 기반으로 한 약물개발에 사용될 때 지대한 영향을 미치므로 신중히 결정되어야 하는 요소임을 암시하는 결과임. 또한 3 차원 나노섬유에서는 *in vivo* 조직에서와 같이 astrogliosis 발생환경 (TGF-β 처리)하에서 세포의 이동이 활발히 발생하였으므로 조직과의 유사성을 추가적으로 검증한 결과라고 할 수 있음

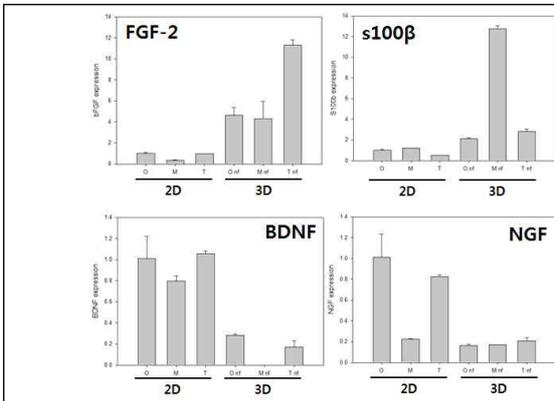


그림 5. Astrocyte의 배양 환경에 따른 유전자 발현량 비교

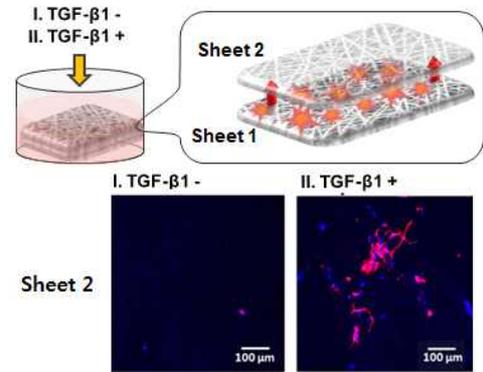


그림 6. Astroglial cell에서의 세포 이동을 확인하기 위한 모식도와 이동된 세포의 모습

[2 차년도]

▶ 유전자 교정 기술을 통한 *in vitro* 조현병 모델 제작

1 차년도 제작된 DISC1 유전자 deletion을 위한 sgRNA를 lipofectamine에 담지하여 3차원 세포지지체 모델에서 배양된 astrocyte와 oligodendrocyte에 다양한 농도로 처리(25 ng, 50 ng, 100 ng/ml, Cas9은 500 ng으로 고정)하고 배양하였으며, 세포 내로 온전히 진입하여 cas9과 함께 interest gene을 deletion하였는지 RT-qPCR을 활용하여 전사체 발현이 되지 않는 것을 통해 간접적으로 확인 검증하였음

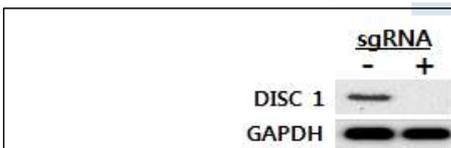


그림 7. sgRNA 투여 여부에 따른 DISC1 발현차이

그림과 같이 DISC1 유전자가 deletion되었음을 Western blot을 이용하여 확인하였음. western blotting 결과, 세포 내에서 DISC1 단백질이 제대로 생성되지 못하였음

▶ gene-modified cells을 이용한 조현병 발병기작 탐구

CRISPR/Cas9 기술로 DISC1 gene을 deletion 한 hippocampal astrocytes의 관련 유전자 발현률을 확인해 본 결과 NDEL1과 AKT1의 발현률을 각각 낮게 하거나 높게 함을 확인하였음. 각 유전자들은 Transcription factor로서 기존 2차원 *in vitro* 표면에서의 배양 세포와의 연구결과와 상이점을 확인할 수 있으며, 새로운 약물 target 선정이 가능할 것으로 판단됨

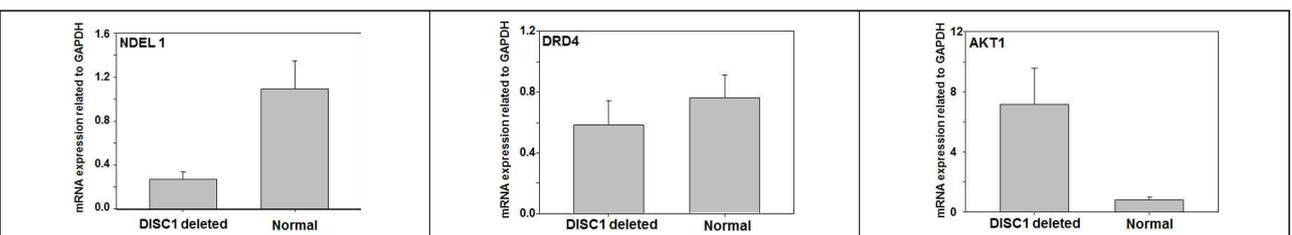


그림 8. 유전자 변이 세포의 관련유전자 (NDEL1, DRD4, AKT1) 발현률 차이 분석

▶ HRMA를 이용한 유전자 변이 확인 및 sequencing 으로 frameshift 돌연변이 탐색

Zebrafish와 같이 번식을 자주하며 수 백 마리의 개체를 얻는 경우 sequencing을 통한 유전자 변이 확인은 비용문제 뿐만 아니라 시간과 노동력의 한계를 야기함. HRMA 기술은 sequencing을 하지 않고 두 돌연변이의 유전적 상동성 및 상이성을 확인하는 방법이므로 본 연구에서 유용하게 사용되었음

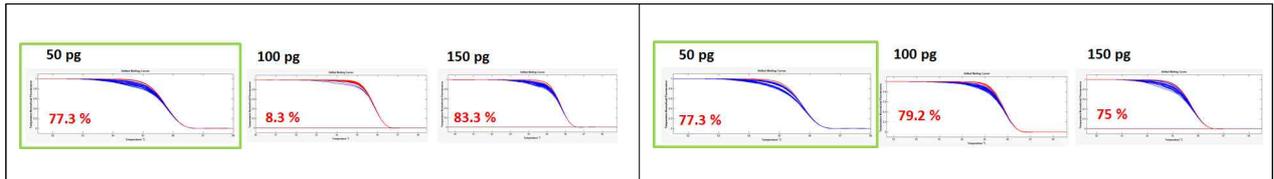


그림 9. DISC1을 타겟으로 하는 sgRNA (좌) #1, (우) #2 의 주입 농도별 KO 효율분석

유전자 결여 여부와 최적의 주입농도를 확인하기 위하여 다양한 농도를 주입 후 HRMA 분석을 해 보았을 때, 50 pg/egg 가 적합함을 확인하였으며, 해당 농도의 sgRNA 및 Cas9이 주입된 embryo들을 약 3 개월 간 사육한 후 야생형 (AB line)과 교배하여 F1를 획득한 후 유전자의 heteroduplex bond를 확인할 수 있는 T7E1 enzyme assay를 수행하여 injected fish를 선별하고 추후 AB line과의 교배를 통하여 germ line screening을 하였음. amplicon의 size는 356 bp이며 예상되는 cut site를 고려하였을 때 유전자 결여가 발생한 세포들은 214 bp와 142 bp를 갖게 되므로 injection 되어 개체 내 세포에 sgRNA 적용 비율에 따라 차이가 있지만 sgRNA가 작동한 개체는 356 bp, 214 bp, 142 bp의 세 개의 PCR product를 갖게 됨. 또한 DNA sequencing 결과 target sequence site에서 multiple peak이 관찰되었으므로 목적으로 한 DISC1의 exon 2 부위에 sgRNA가 결합하여 작동한 것을 최종적으로 검증하였음



그림 10. sgRNA+Cas9 injected fish (F0 embryo) 의 T7E1 assay 결과

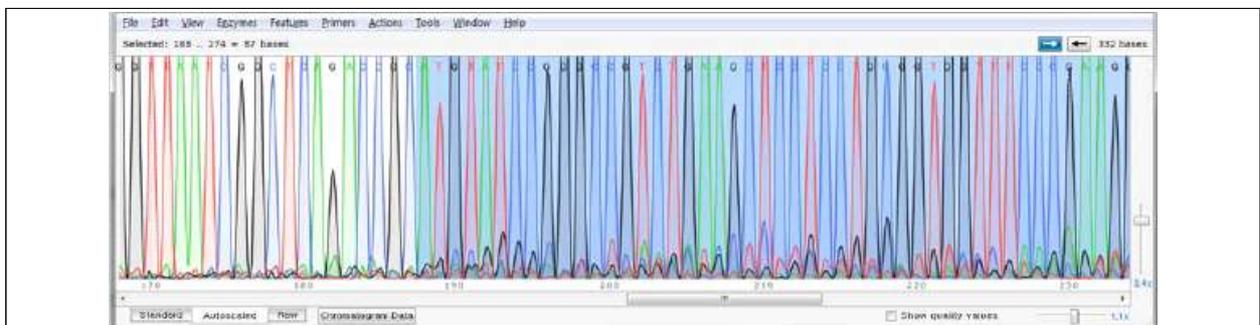


그림 11. sgRNA+Cas9 injected fish (F0 embryo) 의 DNA sequencing 결과

▶ 3 차원 배양 환경에서의 astrocyte 생리적 특성 및 lipofectamin의 담지물질 전달효율 분석

sgRNA 및 cas9의 세포 내 전달체인 Lipofectamine의 과 유사한 지질 약물 전달체 구조인 Liposome의 담지물질(약물) 세포 내 전달 능력을 확인하기 위하여 본 연구책임자가 이전 연구를 통해 기존 신경약리효능 물질로 밝힌 C-피코시아닌 (Min et al. 2015) 을 담지하여 허혈성 뇌손상 하의 astrocytes 및 질병유도 동물에 처리해 보았으며, 그 전달효능(치료효능)을 Liposome 특성과 연관지어 확인함. 약물전달체 용도로 사용되는 Liposome의 특성을 파악하여 추후 sgRNA와 Cas9의 전달에 적용하기 위하여 phosphatidyl choline을 이용하여 Liposome을 제작하였으며, 표면의 charge를 변화시키기 위하여 키토산 코팅을 이용하였음 (체내 리포솜의 흡수를 돕는 점액 조직은 주로 - charge이므로 키토산을 이용하여 + charge 적용). 약물 전달 효율을 명확히 확인하기 위하여 경색 부위의 부피를 확인할 수 있도록 허혈성 뇌졸중 모델을 활용하였으며 그 진행 일정은 아래 그림과 같음

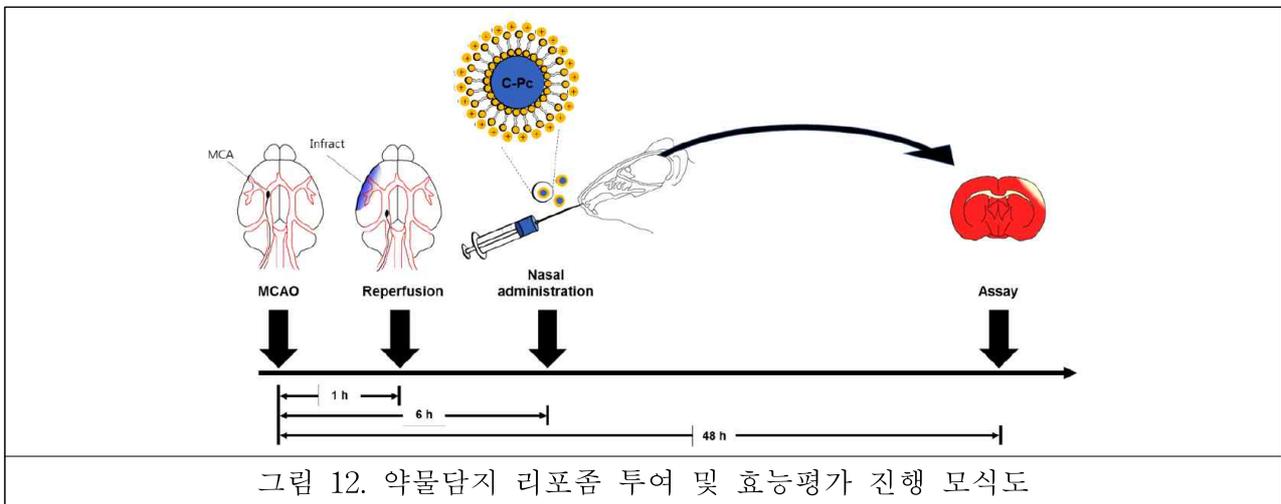
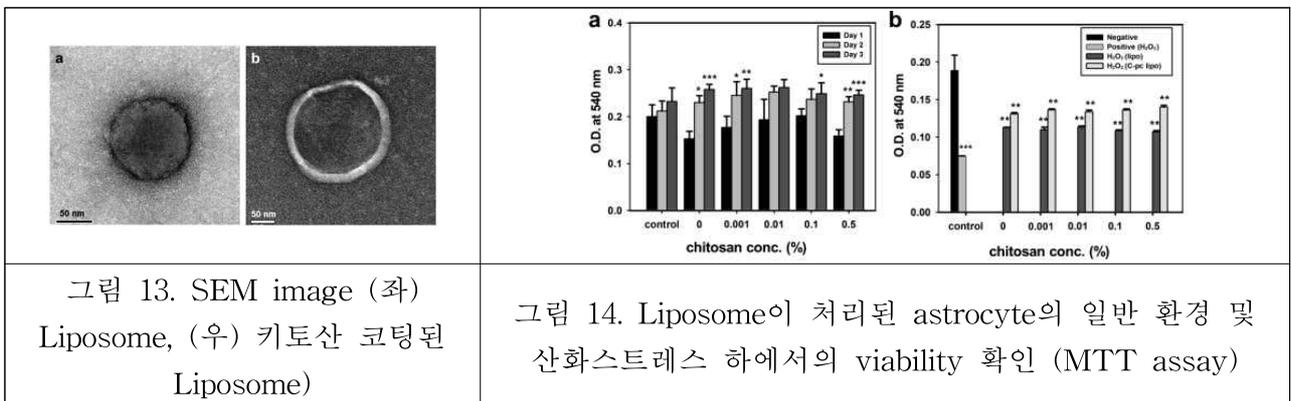


그림 12. 약물담지 리포솜 투여 및 효능평가 진행 모식도

키토산 코팅 유무에 따라 제작된 리포솜은 그림과 같은 모양이었으며, astrocytes에 적용하였을 때 독성을 나타내지 않았고 약물을 세포 내로 전달하여 산화스트레스를 극복하도록 도와주었음. 본 내용 및 결과를 기반으로 한 논문은 2018년 Current Pharmaceutical Design, 2018)에 게재되었음



생물체 내에서의 담지물질 전달능력을 직접적으로 확인해 보기 위하여 경색 부위를 직접 명확하

게 관찰할 수 있는 *in vivo* MCAO (허혈성 뇌손상) 모델을 제작하였고 리포솜의 약물전달능력을 평가함. 리포솜은 비강투여를 통하여 뇌의 MCA 조직 부위로 원활히 전달되었으며 키토산 코팅으로의 표면 charge 변화를 통해 그 전달능이 더욱 증가되었음. 이를 통하여 뇌졸중 환자에 약물 전달능을 극대화 하여 치료를 위한 time window가 약 2 배 (6 시간)으로 증가하였음. 본 연구결과는 뇌질환으로의 약물전달능이 증가된 약물전달체 및 그 코팅 방법에 대한 것이며, 뇌졸중 질환 뿐만 아니라 뇌조직으로의 약물전달이 필요한 정신질환에도 적용 가능할 것으로 판단됨. 또한 모델 개발 연구에서도 유전자 변이 유도물질 (sgRNA, Cas9)등의 세포 및 생물 개체 내 도입 효율을 더욱 높여줄 수 있을 것으로 기대됨

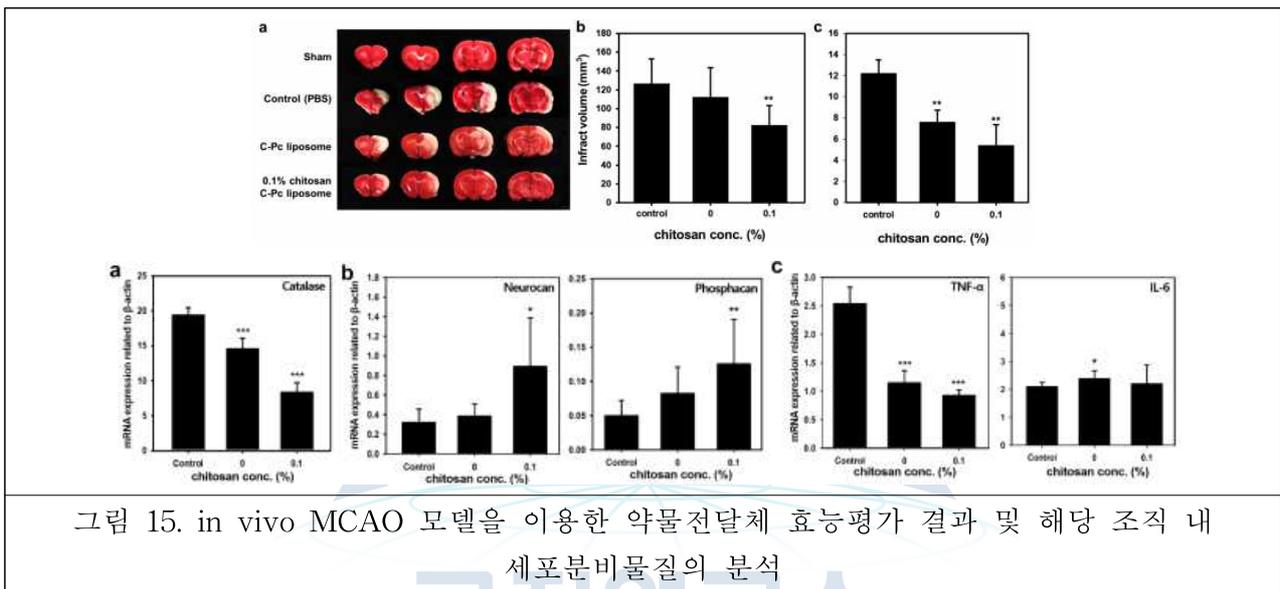
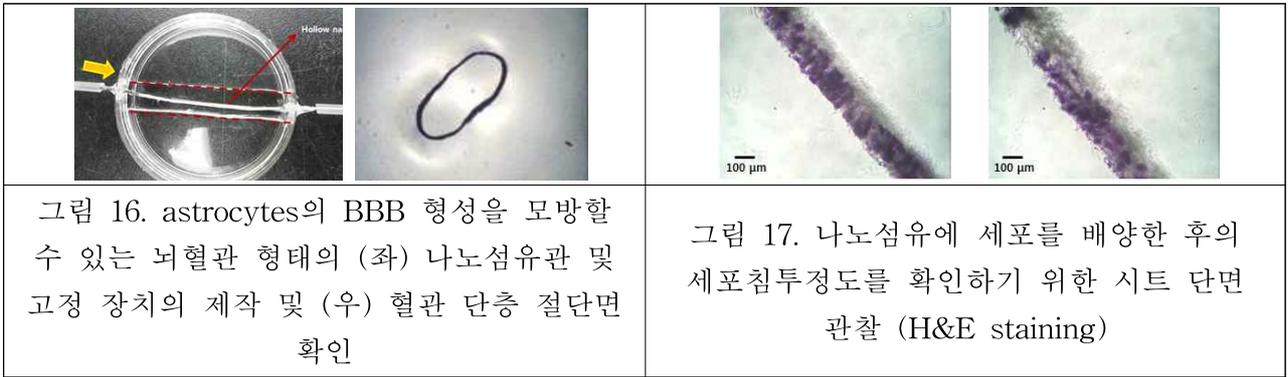


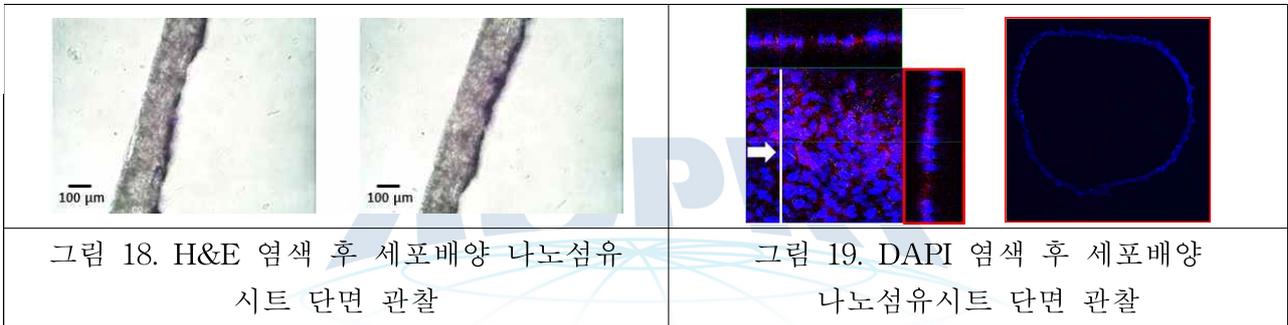
그림 15. *in vivo* MCAO 모델을 이용한 약물전달체 효능평가 결과 및 해당 조직 내 세포분비물질의 분석

▶ 3 차원 astrocyte 배양 및 체내 조직 유사모델 형성을 위한 단일층 세포배양 최적화 조건 확립

조현병에서 중요한 역할을 한다고 알려진 astrocytes 및 Oligodendrocytes에 대해 3 차원 환경에서 정확한 이해를 하기 위하여 두 세포 중 특히 astrocytes가 주된 역할을 하는 것으로 알려져 있는 뇌 혈관 및 장벽 (BBB) 시스템을 제작한 후 세포 기능평가를 실시함. 혈관모양의 나노섬유 세포 배양체를 고정하는 장치를 개발하였으며, 본 장치는 이 나노섬유 관 내·외부에 세포를 배양할 수 있게 하여 Neurovascular unit을 *in vitro*에서 구현할 수 있게 함. 하지만 혈관 모형을 구성하는 나노섬유시트에서 세포를 배양 한 후 측면을 절단하여 세포 위치 및 침투 정도를 관찰한 사진에서는 세포가 다층으로 분포되어 있는 것이 확인되었음



이와는 다르게 관 형태의 나노섬유 내부에 세포를 부착시키고 혈액과 동일하게 배지가 흐르게 하여 shear stress를 가하였을 때 관 내부에 배양된 세포들이 분열하며 섬유 내로 침투하지 않고 단일층을 형성하며 배양되었으므로 astrocyte의 뇌 조직 특히 BBB 형성에서의 특성 확인을 위해서는 반드시 배지의 흐름이 존재하는 환경에서 3 차원 세포지지체를 구성하여 세포의 단층 배양을 해야 함

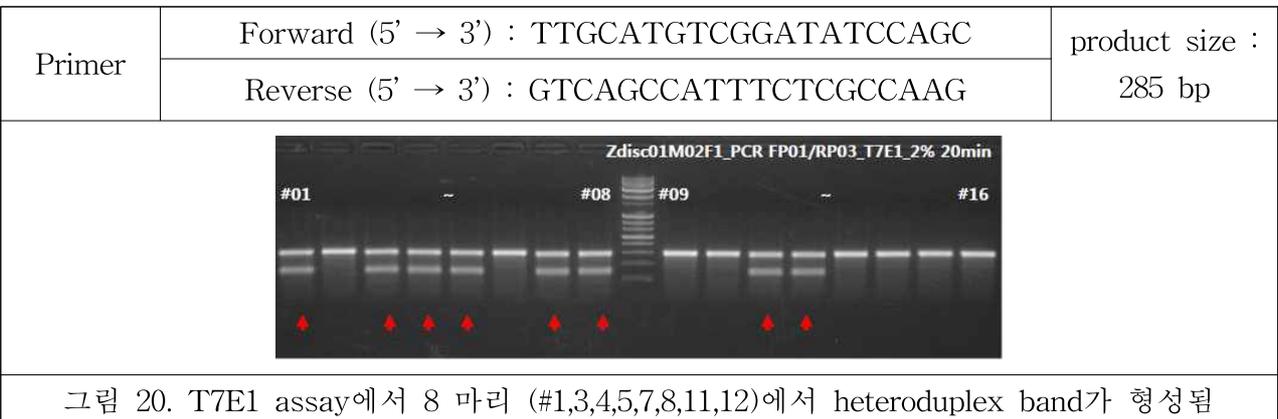


극지연구소

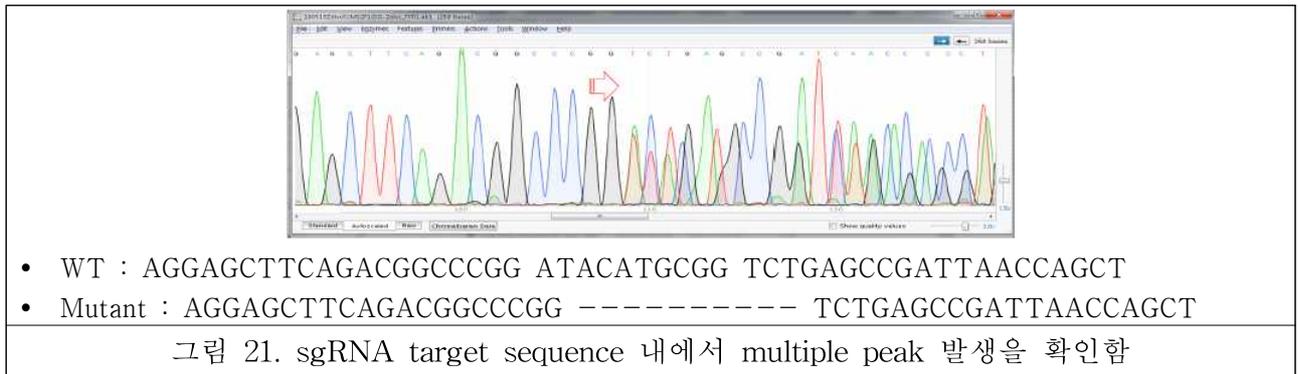
[3 차년도]

▶ 유전자 변이 zebrafish 제작

2 차년도에 획득한 F0 세대로부터 WT과 교배하여 획득한 F1 세대에서 이형 유전자 변이 개체를 획득하기 위하여 Fin clip을 하여 gDNA를 추출해 내었으며, 아래의 primer를 이용하여 PCR과 T7E1 assay를 수행하였음. 그 결과 16 마리의 개체 중 8 마리에서 heteroduplex가 형성됨을 확인하였음



이 중 #3의 DNA sequencing 결과 sgRNA target sequence 내에서 multi peak가 발생하였으며, -10 bp 로 frame shift에 의한 stop codon이 발생하였음을 확인함



WT와 교배하여 #3의 생식능력을 확인한 후 #1 (sequencing 결과 #3와 동일)과 교배하여 F2 세대를 획득하였으며 아래 그림과 같이 target 사이트를 포함하는 PCR을 수행하여 product의 크기에 따라 동형 변이개체를 획득하였음. F2 세대는 현재 수족관 배양 중이며 추후 WT과 교배한 후 생식능력을 확인할 예정이며, embryo의 발달 시기별 RNA sequencing을 통해 DISC1과 관련된 조현병 메커니즘 하의 유전자 발현정도를 WT과 비교하여 astrocyte 및 oligodendrocyte 모델과의 유사성을 판단할 예정임

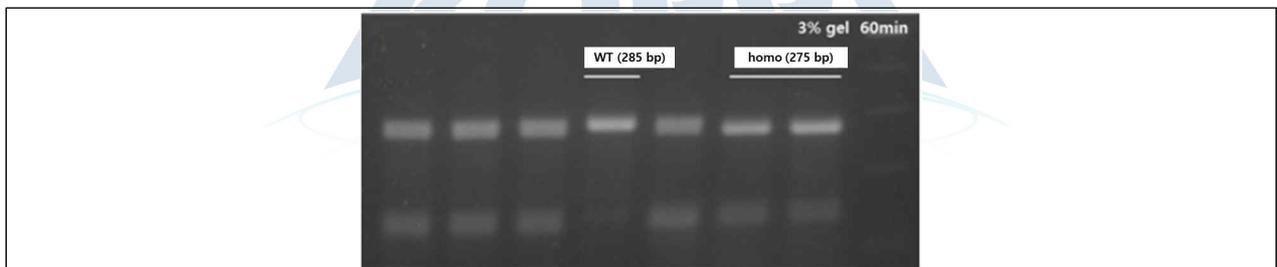


그림 22. F2 동형 유전자 변이 개체 선별을 위한 PCR 수행 결과

▶ hippocampal astrocytes의 특성 확인을 위한 trophic factor 결여환경에서의 연구

세포 배양 환경에서 배지 내 serum이 결여되었을 때 세포 내 metabolic activity의 감소, NADPH diaphorase 활성 감소, SOD 생성 감소 및 caspase dependent apoptosis가 강력히 유도될 수 있다고 알려져 있으며 (Payne et al. 1995), 조현병 (Khan Z. et al. 2005) 을 포함하여 다양한 뇌질환들이 이 메커니즘에 관여하고 있다고 알려져 있음. 따라서 해당 환경을 마련한 후 세포의 변화를 관찰하여 약물 개발의 새로운 target에 대한 중요한 단서를 발견할 수 있음. 우선적으로 뇌보호 효과를 가진 C-phycoyanin을 병리 환경 내에서 배양된 세포에 처리하였을 때 해당 현상들을 회복할 수 있도록 하는지 확인하였음. 그 결과 C-Phycocyanin은 우선적으로 고농도에서도 hippocampal astrocyte에 독성을 전혀 나타내지 않았으며, C-Phycocyanin을 처리한 후 배양한 세포의 모습을 관찰해 보면 처리하지 않은 세포에 비하여 더욱 별모양에 가까운 모습 (얇고 길게 뻗어나온 pseudopodia가 많음)을 보이고 있음. astrocytes는 morphology 차이에 따라

activity가 크게 변화하며, 별모양에 가까울수록 reactive state라고 알려져 있음

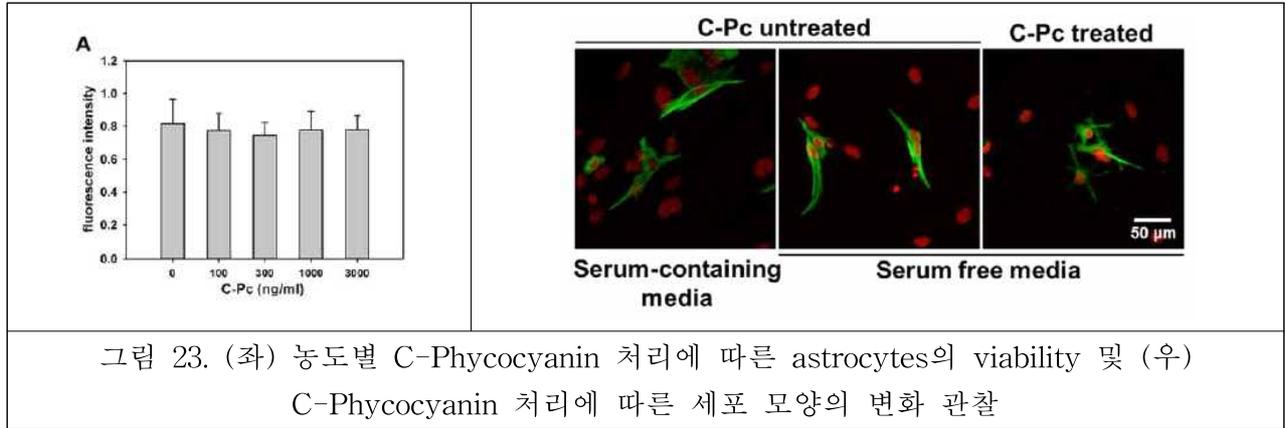


그림 23. (좌) 농도별 C-Phycocyanin 처리에 따른 astrocytes의 viability 및 (우) C-Phycocyanin 처리에 따른 세포 모양의 변화 관찰

이런 activity 차이가 발생한 작용기전을 확인하기 위하여 성장인자 결여 시 감소되는 효소와 반응생성물에 대해 분석해 본 결과, C-Phycocyanin은 NADPH diaphorase가 관여하는 NO 생성을 급증 시키고, serum free 환경에서 유도되는 산화스트레스 환경을 극복하고 자신을 보호하기 위하여 항산화 효소인 SOD의 생성량 역시 증가시켰음

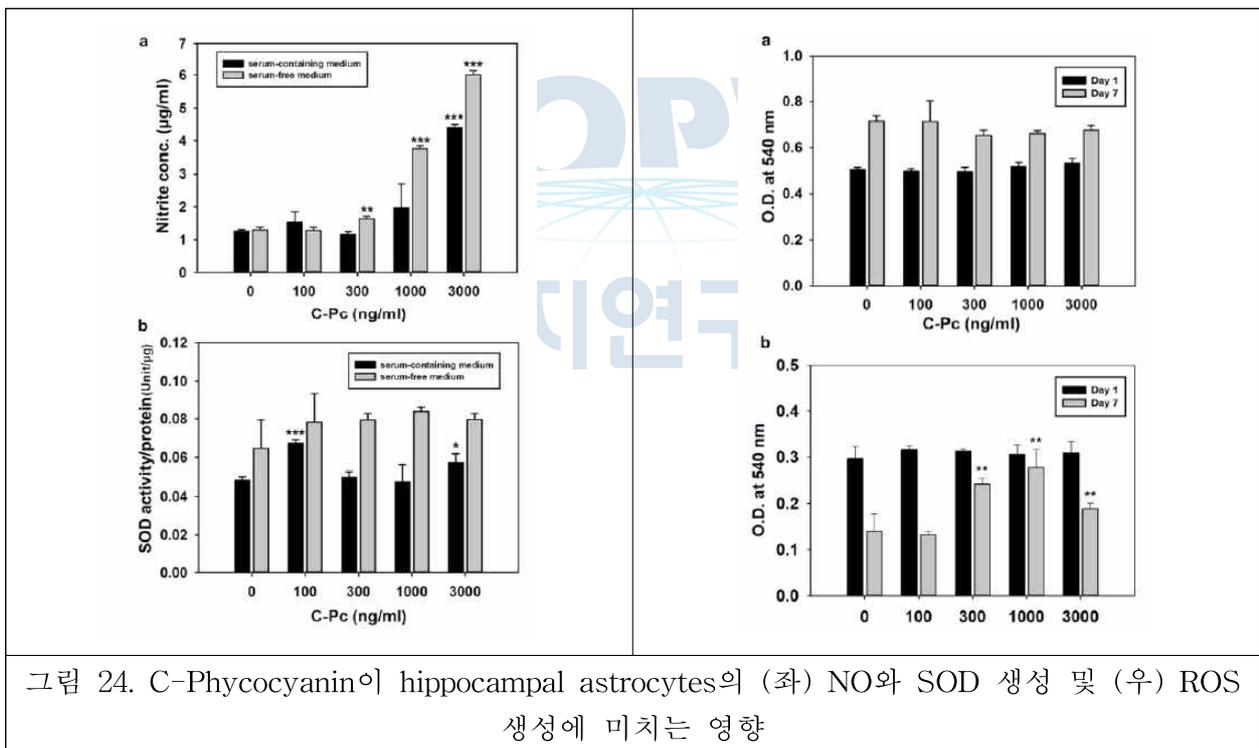


그림 24. C-Phycocyanin이 hippocampal astrocytes의 (좌) NO와 SOD 생성 및 (우) ROS 생성에 미치는 영향

따라서 C-phycoyanin이 hippocampal astrocytes의 병리환경 하에서의 보호효과가 있으며, 추후 조현병 치료 약물로의 개발 가능성이 있는 것으로 판단됨. 본 내용으로 논문을 게재하였음

3. 연구개발결과의 중요성

본 연구에서 개발한 조현병 유사 3차원 *in vitro* hippocampal astrocytes model과 조현병 발병 관련 유전자 결여 zebrafish 모델 개발은 아래의 근거에 의거하여 세포 조현병 발병원에 대한 메커니즘 확인 및 약물개발에 있어서 유용한 시스템이 될 수 있는 중요한 연구 결과라고 판단됨

▶ *in vitro* 조현병 세포배양 모델 형성을 위한 3차원 세포지지체 배양 모델

본 연구과제 수행을 통하여 hippocampal astrocyte를 3 차원 세포 지지체에서 최초로 배양하였으며, 화학물질 처리 방법과 타겟 유전자 결여 기술인 CRISPR/Cas9을 활용하여 조현병 유사 환경을 구현하였음. 특정 유전자를 발현 억제시킴으로서 연관 유전자와의 발현 연관성을 비교 분석하여 약물 작용 타겟을 제안함. 또한 astrocyte이 뇌 조직에서 갖는 중요한 구조·기능적 역할인 뇌혈관벽 형성에 대한 탐구를 하기 위해 3차원 뇌혈관구조를 제작하였으며 이는 이전 논문에서 보고된 구조물의 한계인 두께를 혈관에 거의 유사할 만큼 얇게 제작하였으며 그 세부구조 역시 세포외 기질과 매우 유사하여 현존 뇌혈관구조체 중 가장 체내와 유사하다고 할 수 있음. 따라서 해당 구조는 조현병을 포함한 다양한 뇌질환의 발병원 및 약물개발을 연구하기 위해 활용될 수 있음. 실제로 해당 연구에서 모델들을 활용하여 뇌보호 효과의 C-phycoyanin의 약물개발 가능성을 확인한 결과, 3차원 지지체에서 serum deprivation으로 활성이 결여된 hippocampal astrocytes를 활성화시킴으로써 조현병을 포함한 다양한 뇌질환에 특이적인 약물로 사용될 수 있는 가능성을 최초로 확인하였음.

▶ CRISPR/Cas9 기술을 활용한 zebrafish 조현병 유사 모델

현재 다 수의 연구자로부터 CRISPR/Cas9 기술을 활용하여 제작된 다양한 세포 및 생물체의 유전자 변이 모델이 보고되고 있음. 하지만 조현병 발병요인 중 유전자 변이에 대해 재현한 모델은 전무 하였으며 (현재 보고된 모델은 본 연구과제 수행 이후에 보고되었으며 상이한 유전자에 대한 탐색을 하였음) 해당 유전자 변이 모델은 약물 스크리닝 및 작용기작 탐색에 활용할 수 있음

4. 참고문헌

Lecardeur, Laurent, et al. "Effects of cognitive remediation therapies on psychotic symptoms and cognitive complaints in patients with schizophrenia and related disorders: a randomized study." *schizophrenia Research* 111.1-3 (2009): 153-158.

Insel, Beverly J., et al. "Maternal iron deficiency and the risk of schizophrenia in offspring." *Archives of general psychiatry* 65.10 (2008): 1136-1144.

Gao, Wen-Jun, and Melissa A. Snyder. "NMDA hypofunction as a convergence point for progression and symptoms of schizophrenia." *Frontiers in cellular neuroscience* 7 (2013): 31.

Rothermundt, Matthias, et al. "Glial cell activation in a subgroup of patients with schizophrenia indicated by increased S100B serum concentrations and elevated myo-inositol." *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 31.2 (2007): 361-364.

Min, Seul Ki, et al. "Assessment of C-phycocyanin effect on astrocytes-mediated neuroprotection against oxidative brain injury using 2D and 3D astrocyte tissue model." *Scientific reports* 5 (2015): 14418.

Payne, Claire M., Carol Bernstein, and Harris Bernstein. "Apoptosis overview emphasizing the role of oxidative stress, DNA damage and signal-transduction pathways." *Leukemia & lymphoma* 19.1-2 (1995): 43-93.

Khan, Zakir, Pratiksha Bhadouria, and P. S. Bisen. "Nutritional and therapeutic potential of Spirulina." *Current pharmaceutical biotechnology* 6.5 (2005): 373-379.

5. 연구성과

전문학술지 논문게재 성과정보											
과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci여부	impact Factor	국제공동연구논문	기여도
2016R1D1A1B03931923	201805	Chitosan-coated C-phycocyanin Liposome for Extending the Neuroprotective Time Window Against Ischemic Brain Stroke	Goo Yong Jung; Kyou Hee Shim; Hye Jin Kim; Seul Ki Min; Hwa Sung Shin	SCI	CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN	24(17)	국외	SCI등재	2.757	아니오	50
2016R1D1A1B03931923	accepted	Evaluating the effect of C-Phycocyanin on cultured rat primary hippocampal astrocytes undergoing trophic factor deprivation	Su Jin Yoon, Jung Il Choi, Seul Ki Min, Hwa Sung Shin	SCIE	Biotechnology and Biosciences Engineering	accepted	국외	SCIE	1.438	아니오	100

※ Accepted 논문 참고

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
View Submission Author Response View Decision Letter Correspondence Send E-mail	BBEN-D-19-00102	Evaluating the effect of C-Phycocyanin on cultured rat primary hippocampal astrocytes undergoing trophic factor deprivation	20 Mar 2019	07 Aug 2019	Accept

학술대회 논문발표 성과정보

과제번호	발표년월	학술대회명	저자	논문제목	학술대회구분	개최국
2016R1D1A1B03931923	201808	한국생명과학회 제 59회 국제학술대회	민슬기, 정구용, 심규희, 김혜진, 신화성	Extending the Neuroprotective Time Window In cerebral Ischemia-Reperfusion by treatment of Chitosan-coated C-phycocyanin Liposome	국내학술대회	대한민국
2016R1D1A1B03931923	201906	한국응용생명화학회	민슬기, 이후철, 신화성	C-phycocyaninContaining Multifunctional Chitosan-coated Poly(lactic-co-glycolic acid) Nanoparticles to Treat Atopic Dermatitis by Spatiotemporally Controlled Codeliveryof Ceramide	국내학술대회	대한민국

뒷 면

(국내 과제용)

주 의

1. 이 보고서는 극지연구소에서 수행한 기본연구사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 극지연구소에서 수행한 기본연구사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.

보고서 발간승인서

소속부서	극지생명과학연구부	신청인	민슬기
보고서 번호			
특기사항			

계정번호	연구과제명	연구기간	책임자	서명
PN19120	조현병 발병기작 및 약물타겟 연구를 위한 <i>in vitro</i> 3차원 세포배양 및 <i>in vivo</i> 제브라피쉬 모델 개발	2016. 11. 01 ~ 2019. 10. 31	민슬기	

아래와 같이 신청함

출판물명	조현병 발병기작 및 약물타겟 연구를 위한 <i>in vitro</i> 3차원 세포배양 및 <i>in vivo</i> 제브라피쉬 모델 개발		
발간신청 번호	극지인	보고서 부수	1
전체페이지수	23	보고서 제출일	2019. 11. 20
검색어(한)	조현병, 3차원 세포배양	검색어(영)	Schizophrenia, 3D cell culture

2019. 11. 20