

보안과제(), 일반과제(0)

보고서 번호: PE-68000-RZ-Z016
(KAERI/CM-1231/2009)

양성자기반공학기술개발
(양성자가속기 이용자 프로그램 개발 및 운영)

양성자빔을 이용한 질환모델동물 개발
(Development of disease animal models using proton beam)

KAERI

한국생명공학연구원

한국원자력연구원
양성자기반공학기술개발사업단

제 출 문

한국원자력연구원 양성자기반공학기술개발사업단장 귀하

이 보고서를 "양성자빔을 이용한 질환모델동물 개발" 과제(세부과제: "양성자기반공학 기술개발(양성자가속기 이용자 프로그램 개발 및 운영)")의 보고서로 제출합니다.

2010 . 03.

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 남기환

연구원 : 김은경

" : 김해림

" : 서영원

보고서 요약서

과제고유번호	B-3-1	해당단계 연구기간	3단계 1년	단계구분	(3 단계)/ (3 단계)
연구사업명	양성자기반공학기술개발사업				
연구과제명	세부과제명	이용자프로그램 개발 및 운영			
	위탁과제명	양성자빔을 이용한 질환모델동물 개발			
연구책임자	남기환	해당단계 참여 연구원수	총 : 4 명 내부 : 1 명 외부 : 3 명	해당단계 연구비	정부 : 25,000천원 기업 : 천원 계 : 천원
		총연구기간 참여 연구원수	총 : 4 명 내부 : 1 명 외부 : 3 명	해당단계 연구비	정부 : 25,000천원 기업 : 천원 계 : 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국생명공학연구원 의생명마우스센터		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약				보고서면수	34쪽
<p>○ 1차년도 연구 목표인 유전자변이 유발을 위한 효율적인 양성자빔 조사 조건 확립을 위하여 총 7회의 양성자빔 조사를 실시하였고, 마우스 수정란에서의 유전자변이 유발조건을 아래와 같이 확립하였음</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) 1Gy 이하의 양성자빔 조사는 마우스 수정란 초기발생을 억제하나 태어나는 산자에서의 유전자변이 유발율은 비교적 낮음. 2) 1.5Gy-2.5Gy의 양성자빔 조사는 착상과 임신과정을 거쳐서 태어나는 동물의 일부에서 유전자변이를 유발함 . 3) 1-10Gy의 양성자빔 조사는 2세포기까지의 마우스 수정란 발달에 용량의존적으로 억제하며, 3Gy이상의 양성자빔이 조사된 마우스 수정란에서 임신 전기간동안 발생 과정이 가능하지 못함. 4) 10Gy를 초과하는 양성자빔 조사는 2세포기 이후의 발생과을 크게 억제함. 5) 따라서 효율적인 유전자변이마우스 개발을 위한 양성자빔 조사범위는 1.5-2.5Gy가 적합함. 					
색인어 (각 5개 이상)	한글	양성자빔, 마우스, 수정란, 질환모델동물, 유전자변이			
	영어	Proton beam, Mouse, Embryo, Animal disease model, genetic mutation			

요 약 문

I. 제목

- 양성자빔을 이용한 질환모델동물 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 당해연도 목표: 양성자빔조사조건 설정
- 양성자빔을 이용한 유전자변이 마우스를 개발하여 질병의 새로운 표적발굴에 활용될 수 있는 질환모델마우스를 개발

III. 연구개발의 내용 및 범위

효율적인 마우스 유전자변이를 유발하기 위한 양성자빔 조건 탐색

IV. 연구개발결과

- 1차년도 목표인 유전자변이 유발을 위한 효율적인 양성자빔 조사 조건 확립 : 총 7회의 양성자빔 조사를 통하여 마우스 수정란에서의 유전자변이 유발조건을 아래와 같이 확립하였음
 - 가. 1세포기의 마우스 수정란에 양성자빔을 조사하여 태어난 마우스에 유전자돌연변이를 유발하기 위한 빔조사량은 1.5Gy-2.5Gy의 매우 좁은 영역에서 수행하는 것이 가장 효율적이며, 특히 2Gy에서 높은 효율의 마우스 분만과 높은 유전자돌연변이 유발율을 나타냄.
 - 나. 3-5Gy를 초과한 양성자빔 조사는 마우스 수정란의 초기발생에는 영향이 적으나 착상과 임신 유지 등의 과정에 영향을 미쳐서 대리모에 이식된 마우스의 임신과 분만이 이루어지지 않음.
 - 다. 10-15Gy를 넘는 양성자빔 조사는 2세포기 이후의 발생과정에 큰 영향을 미치는 것으로 사료됨.
 - 라. 1Gy 이하의 양성자빔 조사는 마우스 수정란에 돌연변이를 유발하는 비율이 매우 낮을 것으로 사료됨.

V. 연구개발결과의 활용계획

- 양성자빔 조사에 의한 유전자변이 신규생명연구자원 개발을 통한 활용

SUMMARY

I. Title

- Development of disease animal models using proton beam

II. Purpose

- Determination of proton beam dose for induction of mutant mouse

III. Contents and scopes

- Screening the proton beam dose for induction of mutant mouse

IV. Results

- To identify proper proton beam dose for mutant mouse development, total 7 times of proton beam were performed. And get the following results.
 1. There are too low incidence of mutation in pup mouse which were derived embryos radiated by 1Gy proton beam.
 2. Some mutation could be identified in pup mice which were derived embryos radiated by 1.5-2.5Gy proton beam.
 3. Mouse embryos irradiated with 1-10Gy of proton beam were inhibited in their in vitro development to 2 cell stage. There was no pups born from embryos which were irradiated with proton beam over 3 Gy.
 4. Early mouse development were greatly inhibited by proton beam irradiation of over 10Gy when cultured in vitro.
 5. In conclusion, it is efficient to irradiate mouse embryo with 1.5-2.5Gy of proton beam for development of mutant mice.

V. Future application

- Application of proton beam irradiation for lots of mutant mouse library for development of disease mouse model that can be used for new biomedicine.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	-----	7
Chapter 2. Current status of international and domestic researches	-----	11
Chapter 3. Research contents and results	-----	15
Chapter 4. Achievement and contribution to the related areas.	-----	32
Chapter 5. Future application plans	-----	33
Chapter 6. Information gathered from abroad	-----	34
Chapter 7. References	-----	35

목 차

제1장 연구개발과제의 개요	-----	7
제2장 국내외 기술개발 현황	-----	11
제3장 연구개발수행 내용 및 결과	-----	15
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	-----	32
제5장 연구개발결과의 활용계획	-----	33
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	-----	34
제7장 참고문헌	-----	35

제1장 연구개발과제의 개요

제 1절 연구개발의 목적

1. 연구개발의 목적

- 가. 생명과학은 바이오신약의 개발을 통한 인간질병의 예방 및 치료가 가능하게 하는 것이 궁극적인 목표임.
- 나. 바이오신약의 개발은 질병치료 및 예방을 위한 표적발굴로부터 시작하여, 해당 표적에 대한 후보약물의 개발 및 인간에 대한 적용과정을 통하여 완성됨.
- 다. 글로벌 신약을 개발하기 위해서는 질병치료에 대한 새로운 표적을 발굴하여야만 함.
 - 라. 질병치료에 대한 새로운 표적 발굴에 있어서 질환모델동물이 필수적으로 이용되고 있음.
- 마. 그러므로 기초/원천기술을 확보하고 글로벌 바이오신약을 개발을 위해서는 새로운 질환 모델동물의 개발이 필요함.
- 바. 따라서 본 과제에서는 양성자빔을 이용한 유전자변이 마우스를 개발하여 질병의 새로운 표적발굴에 활용될 수 있는 질환모델마우스를 개발하고자 함.

제 2절 연구개발 필요성

1. 기술적 측면

- 가. 2002년에 인간게놈프로젝트가 완료되면서 많은 바이오신약이 쏟아져 나올 것으로 예상되었음. 그러나 실제적으로는 인간게놈프로젝트 이후에도 바이오신약의 개발은 정체된 상태로 큰 변화가 없었음. 그 이유는 바이오신약은 질병에 관련된 각 유전자들의 기능과 이 기능들이 어떻게 각각의 질병의 발생과 진행 또는 치유에 영향을 미치는지를 이해하고, 그 각각의 경로에 있어서 질병의 예방과 치료라는 원하는 효과를 얻기 위하여 조절가능한 방법을 찾는 과정에 개발되는 것임.
- 나. 따라서 인간게놈프로젝트 이후에 전세계는 인간유전자 기능연구를 위한 최적의 실험동물로서 마우스를 선택하고 마우스 전체 유전자 28,000여개에 대하여 녹아웃 시키는 프로젝트를 시작하였음. 이 프로젝트는 미국에서는 KOMP (knockout mouse project), 유럽에서는 EuCOMM (European conditional mouse mutagenesis), 캐나다에서는 NorCOMM (North america condition mouse mutagenesis)라는 프로젝트가 수행되고 있으며, 일본과 중국에서도 일부 진행되고 있음 (Collins F.S., Rossant J. and Wurst W. (2007) A mouse for all reasons. Cell 128: 9-13; Collins F.S., Finnell R.H., Rossant J. and Wurst W. (2007) A new partner for the international knockout mouse consortium. Cell 129: 235.; Capecchi M.R. (2005) Gene targeting in mice: Functional analysis of the mammalian

genome for the twenty-first century. Nature 6: 507-512).

- 다. 이와는 별개로 유전자 기능을 이해하기 위하여 일본과 미국 및 유럽을 중심으로 마우스에서 질환모델을 만들기 위한 프로젝트로서 ENU mutagenesis 프로젝트를 수행하여 왔음 (Gondo, Y. (2008) Trends in large-scale mouse mutagenesis: from genetics to functional genomics. Genetics 9: 803-807).
- 라. 방법론 및 접근론적으로 볼때 유전자기능과 질병기작 및 예방치료법을 연구하기 위한 두 가지로 나누어 볼 수 있음. 첫째는 마우스의 유전자 하나하나에 대하여 변형된 마우스를 만들어 정상적인 마우스와의 비교검토를 통하여 해당 유전자의 기능을 탐구하여 그 작용기전과 질병과의 연관성을 찾아 질병의 치료 및 예방을 위한 조절이 가능한 표적이 되는지 여부를 연구하는 방법임(이 방식을 reverse genetics라 함). 두 번째는 유전적 이상에 의하여 질병이 발생하거나 질병상태가 되거나 아니면 반대로 특정 질병이 발생하지 않는 상태가 되는 동물을 발굴하여 해당 질병의 원인과 기전을 연구함으로써 질병조절이 가능한 표적을 찾아서 신약개발에 응용하는 방식이 될 수 있음(이 방식을 forward genetics라 함).
- 마. 마우스에 있어서 전자의 방법은 1984년 처음으로 마우스 배아줄기세포를 이용한 유전자 녹아웃기술이 개발된 이래 현재까지 지속적으로 이루어지고 있는 방식으로서 한 개 한 개의 유전자를 대상으로 그 기능을 탐구하는 방식으로 이용되어지고 있음. 이 방식의 단점은 해당 유전자변형동물을 개발하는 데 2-3년의 긴 기간이 필요하다는 것과, 단일 유전자의 기능변이에 의하여 형태 또는 생리적인 표현형(질병)이 나타나는 경우에만 질환이 나타난다는 것임.
- 바. 그러나 인간의 질병에 있어서 한가지 유전자만의 이상만으로 발생하는 질병은 많지 않으며, 대부분은 여러 가지 유전자의 이상에 의하여 질병이 발생하는 것으로 알려져 있음. 따라서 생체내에서 특정표현형을 나타내는 인간의 질병상태를 그대로 표현할 수 있는 질환모델로서는 극히 제한적으로만 사용될 수 있다는 것임.
- 사. 이러한 reverse-genetics방식의 단점을 보완하기 위하여 활용되고 있는 방식이 forward genetics방식의 질환모델임. 이 방식의 동물모델은 1) 자연돌연변이에 의하여 발생하는 질환모델과, 2)인위적 돌연변이 유발에 의하여 발생하는 질환모델로 크게 구분할 수 있음. 이 중에서 자연적 돌연변이 모델은 발생자체가 낮을 뿐만 아니라, 그 중에서 유용한 질환모델이 될 가능성이 매우 희박함. 따라서 많은 선진국의 연구팀에서는 돌연변이 유발능이 뛰어난 것으로 알려진 화학물질인 ENU (N-ethyl-N-nitrosourea)를 이용하여 정자에서 돌연변이를 유발시키는 방식을 도입하여 대량의 돌연변이 마우스를 개발하고 있음(Russell WL, Kelly EM, Hunsicker PR, Bangham JW, Maddux SC, Phipps EL. 1979. Specificlocus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(11):5818 - 19).

아. ENU를 이용한 돌연변이는 주로 ENU에 있는 ethyl 기를 DNA를 구성하는 4개의 염기에 있는 질소나 산소에 이전시키는 alkyl화 반응을 유발하고, 전이된 ethyl기가 세포증식을 위한 DNA복제기에 유전성의 변이를 유발하는 것으로 알려져 있음. 따라서 ENU를 이용한 유전자변이는 단일염기변이(point mutation)가 대부분이며, 극히 일부에서는 소규모 삭제 (small deletion)에 의한 변이가 나타나는 것으로 알려져 있음(Justice MJ, Noveroske JK, Weber JS, Zheng B, Bradley A. 1999. Mouse ENU mutagenesis. *Hum. Mol. Genet.* 8(10):1955-63, O'Neill JP. 2000. DNA damage, DNA repair, cell proliferation, and DNA replication: how do gene mutations result? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(21):11137 - 39). 특히 ENU에 의한 단일염기변이는 A-T염기쌍에 주로 발생하는 편중현상이 있어서 ENU를 이용한 변이유발로서 얻을 수 있는 유전자변이의 한계가 있음이 알려져 있음 (Noveroske JK, Weber JS, Justice MJ. 2000. The mutagenic action of N-ethyl-N-nitrosourea in the mouse. *Mamm. Genome* 11(7):478 - .83).

2. 경제·산업적 측면

가. 생명과학의 연구는 궁극적으로 인간의 질병예방과 치료를 통한 무병장수를 이루는데 일조하는 것이며, 구체적으로는 바이오신약의 개발을 통한 인간질병의 예방 및 치료가 가능하게 하는 것임.

나. 바이오신약의 개발은 기초연구를 통한 표적발굴과 표적에 대한 후보약물의 개발 및 인간에 대한 적용과정을 통하여 완성됨. 국내에서도 신약개발을 위한 노력이 집중되고 있으나 개량신약을 제외하고는 글로벌신약으로서 주목받을 만한 신약을 개발하지 못하고 있는 실정임.

다. 글로벌 신약을 개발하기 위해서는 질병치료에 대한 새로운 표적을 발굴하여야만 함. 그렇지 않으면 기존의 약물을 변형시키거나 기존특허를 침해하는 약물을 개발하게 됨으로서 글로벌신약을 개발할 수 없음.

라. 따라서 질병치료를 위한 새로운 표적발굴은 진정한 의미의 글로벌신약을 개발하기 위해서는 필수적 과정이 되고 있음.

3. 사회·문화적 측면

가. 인간유전자해석프로젝트 이후 질환관련 유전자에 대한 기능해석에 기반을 둔 원천특허의 확보와 관련 유전자 신약을 개발하기 위한 생명의과학 연구경쟁 국내외에서 이미 시작되었고, 그에 따라 포유류인 마우스를 이용한 유전자기능연구용자원 및 질병모델의 개발이 폭발적으로 증가하고 있으며, 이러한 연구를 지원하기 위한 정부지원의 실험동물공공인프라 기관을 미국, 일본, 유럽 뿐 아니라, 중국, 대만 싱가포르 등에서도 대대적으로 확대하고 있음.

- 나. 그러나 국내에서는 표적발굴 부문에 대한 투자가 거의 이루어지고 있지 않음. 그 이유는 국내 제약기업 또는 바이오벤처기업의 규모가 영세하기 때문에 성공 가능성을 보장할 수 없는 신규표적발굴에 투자를 할 수 없는 상황이기 때문임.
- 다. 질병치료에 대한 새로운 표적 발굴에 있어서 동물세포 또는 모델동물이 이용되고 있음. 신약표적발굴에 이용되는 모델동물에는 효모, 선충, 초파리, 개구리, 지브라피쉬, 마우스 등이 이용되고 있음. 이들의 특징은 생체내에서 유전자조작이 가능하다는 것임.
- 라. 그 중에서 인간과 가장 유사한 것은 마우스임. 포유류중에서 유전자 조작이 가능한 것은 현재까지 마우스가 유일함.
- 마. 포유류인 마우스는 기타 동물에 비하여 실험동물로서 다음과 같은 많은 장점을 가지지고 있음. 첫째, 크기가 작아서 유지비용이 저렴함. 둘째, 6주만에 성숙되어 임신이 가능함. 셋째, 임신기간이 3주로서 매우 짧음. 넷째, 한번에 태어나는 동물숫자가 많아서 증식 및 유전연구에 매우 유리함. 다섯째, 포류로서 인간과 유전적으로 매우 유사하며, 유사한 질병이 발생함. 여섯째, 포유류이면서 유전자 조작이 가능한 유일한 동물임. 일곱째, 마우스의 유전자 서열이 모두 밝혀져 있음.
- 바. 이와 같은 장점이 있기 때문에 전세계으로 마우스를 이용한 인간유전자 기능연구 및 질병에 대한 연구는 2000년대 들어서면서 더욱 집중되고 있음.

The logo for KAERI (Korea Atomic Energy Research Institute) is centered at the bottom of the page. It features the word "KAERI" in a bold, sans-serif font. Above the text is a stylized graphic consisting of a large, light-colored arc that curves from the left towards the right, with several smaller circles and lines extending from it, suggesting a molecular or atomic structure.

KAERI

제2장 국내외 기술개발 현황

제1절 선진국의 신약개발을 위한 마우스 모델 개발

1. 마우스자원의 국외 개발 동향

2001년 인간게놈프로젝트의 종료 이후, 유전자기능에 대한 특허확보를 통한 바이오신약의 원천기술 확보를 위하여 동물모델활용이 필수적임을 인지하고, 인간과 동일한 포유류이면서도 유전자변형이 가능한 유일한 동물인 마우스에서 유전자변형마우스 개발과 분석을 통한 인간유전자 기능연구를 적극 추진하고 있음. 이들 프로젝트들의 최종목적은 질병관련 유전자의 in vivo 역할을 규명하기 동물모델을 개발하고 이들 모델의 in vivo 분석을 통한 질병의 기전연구 및 치료법 및 치료제의 개발로 연결하여 세계 바이오시장의 석권임.

유전자변이 마우스는 바이오신약 개발을 위한 타겟 발굴과 검증 있어서 필수적인 자원으로 활용되고 있으며, 이와 관련된 국제 기구 및 세계적 프로젝트가 최근 집중적인 지원 아래 진행되고 있음.

2. 국제적 변이마우스 개발 프로젝트 진행 현황

유전자변이 마우스를 이용한 유전자기능연구 및 신약개발을 목적으로 선진국은 다음과 같은 유전자변형마우스 개발 프로젝트를 진행하고 있음.

가. 미국: KOMP (Knockout Mouse Project): NIH가 주도아래 19개 기관이 연합하여 진행하며, 5년간 약 5,500만 달러 지원

나. 캐나다: NorCOMM (North American Conditional Mouse Mutagenesis Project): 2002년 CMMR (canadian mouse mutant repository)와 CMHD (center for modeling human disease) 중심으로 변이유전자 수집과 마우스의 전유전자 변이 프로그램 진행

다. 유럽: EuCOMM (European Conditional Mouse Mutagenesis Project): 2002년 EMMA (european mouse mutant archive) 발족 후, 연계하여 진행

라. 일본: 1990년대 후반부터 대규모 ENU변이마우스프로젝트를 진행중

3. 주요 국제마우스자원기구 현황

선진국은 마우스자원을 활용한 바이오연구를 지원하기 위하여 국가지원의 마우스 자원센터를 운영하고 있으며, 국제적인 협력을 증진하기 위하여 주요 마우스자원기관들을 포함하는 다음과 같은 기구들이 구성되어 있음.

가. 국제마우스자원연맹(FIMRe: Federation of International Mouse Resources): 선진국의 마우스자원 센터를 중심으로 다음과 같은 회원기관들로 구성되어 있음.

(1) The Jackson Laboratory

(2) 3 개의 Mouse Mutant Resource Regional Center (MMRRC)

(3) Mouse Models of Human Cancer Consortium (MMHCC)

(4) Canadian Mouse Consortium (CMC)

(5) Canadian Mouse Mutant Repository (CMMR)

(6) European Mouse Mutant Archive (EMMA) (이탈리아, 프랑스, 영국 2곳, 스웨덴, 포르투갈,

(7) RIKEN BioResource Center

(8) Center for Animal Resources and Development (CARD)

(9) Australian Phenomics Facility (APF)

나. 아시아유전자변형마우스자원연합(AMMRA: Asia Mouse Mutagenesis and Resources Association): 2006년 한국, 일본, 중국, 대만, 싱가포르, 태국의 주요 실험동물자원센터 회원으로 구성된 한국, 일본, 중국, 대만, 싱가포르, 태국의 주요 실험동물자원센터 회원으로 구성되어 있음.

4. 국제적 변이마우스 표현형분석 프로젝트 진행 현황

유전자변이 마우스자원을 이용한 바이오연구를 촉진하고 기본 정보를 구축하기 위하여 선진국은 다음과 같이 마우스표현형분석센터를 구축하여 운영하고 있음.

가. 독일마우스표현형분석센터 (German Mouse Clinic): 유럽에서 개발한 표준표현형분석프로토콜 (EMPreSS)에 따른 마우스 표현형분석 시작

나. 일본마우스표현형분석센터 (Japan Mouse Clinic): 2008년 일본 RIKEN BRC에 구축하여 운영시작하였으며, 유럽에서 개발한 표준표현형분석프로토콜(EMPreSS)을 준용함

다. 캐나다 토론토마우스표현형분석센터 (TCP: Toronto Center for Phenogenomics): 유럽에서 개발한 표준표현형분석프로토콜(EMPreSS)을 준용하여 표현형분석정보의 표준화를 채택함

라. 국제마우스표현형분석콘소시움 (IMPC: International Mouse Phenotyping Consortium): 2007년 유럽과 캐나다 중심으로 구성하였으며, 미국과 일본이 추가로 참여하고 있음.

제2절 국내의 신약개발을 위한 마우스 모델 개발

1. 마우스자원 활용 동향

가. 최근 생명과학연구의 핵심분야가 의생명과학으로 무게중심이 이동되면서 인간의 보건과 건강의 연구와 신약개발에 활용되는 필수자원으로서 마우스자원에 대한 중요성 부각되고 있음.

나. 마우스자원에 대한 국가 인프라 구축은 한국생명공학연구원의 생물자원센터에서 1986년부터 수행하기 시작하였으며, 국가수준의 마우스자원분야 공공인프라로서는 국내에서 유일한 사업이며 한국생명공학연구원의 기관고유사업으로 연간 예산 6.1억을 지원하고 있음.

다. 2006년부터는 마우스인프라부분이 오창캠퍼스로 이전되어 진행되고 있으며, 2010년에 마우스자원분야 조직을 생명마우스센터로 독립시켜 마우스자원에 대한 전문센터로 발돋움하는 계기가 되고 있음.

라. 또한 연구용 마우스자원에 대한 국가적 집중지원프로젝트는 진행중인 것이 없으나, 2010년에 GEM (Genetically engineered mouse)에 대한 개발과 분석을 위한 프로젝트로서 GEM사업이 계획되어 있음. 그러나 규모가 작아서 실질적인 GEM사업의 효과를 얻기에는 매우 미진할 것으로 예상됨.

2. 방사선에 의한 돌연변이 유발모델의 개발 필요성

가. 기타 자외선이나 방사선(X-ray 등) 등에 의하여 돌연변이가 유발되는 것으로 알려져 있으나 그 효율이 낮아서 유전자돌연변이 모델의 개발에 활용되어지는 못하고 있음.

나. 이온화 방사선에 의한 세포사망은 DNA손상으로 인한 세포의 증식억제를 통한 세포사 또는, 세포내 세포사 신호전달 유발에 의한 apoptosis를 유발하게되어 발생함. DNA손상은 주로 DNA 이중나선에 대한 한쇄 또는 양쇄 절단과 같은 손상에 의하여 발생하며, 방사선에 의해 절단된 DNA이중나선의 95%는 자가치유기전에 의하여 회복되지만 일부는 치유가되지 못하고 세포사망으로 이어지게 됨(Bedford, J. S. (1991) Sublethal damage, potentially lethal damage, and chromosomal aberrations in mammalian cells exposed to ionizing radiations. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 21, 1457 - 1469, Pastwa, E., Neumann, R. D., Mezhevaya, K. and Winters, T. A. (2003) Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks is dependent upon radiation quality and the structural complexity of double-strand breaks. *Radiat. Res.* 159, 251-261).

다. 광자(photons(감마레이, 엑스레이)) 또는 전자(electrons)에 비하여 양성자빔은 매우 국소적이면서도 균일한 양의 조사가 가능한 특성을 나타내며, 특히 세포사에 대한 높은 효율을 나타내는 것으로 알려져 있음. 따라서 이러한 성질을 이용하여 종양치료에 양성자빔을 이용하고자 하는 노력이 최근 급격히 증가되고 있음.

라. 한편, 이러한 성질은 양성자빔이 다른 방사선에 비하여 돌연변이 유발능이 매우 높다는 것을 의미하는 것이기도 함.

마. 양성자 빔에 의한 BRE(biological effectiveness)를 결정하는 요소가 있으나, 유전자변이 유발과 관련하여서는 LET (linear-energy transfer)가 중요한 것으로 알려져 있음.

바. 즉, high-LET를 가지는 방사선은 low-LET를 가지는 방사선보다 유전자변이를 일으키는 데 있어서 훨씬 효과적임. 따라서 양성자 빔의 경우, 이온화 유발에 대한 화학적효과면에서는 감마선과 유사하더라도 생물학적 효과와 돌연변이 유발효과에서 양성자빔이 더욱 우수한 것으로 알려져 있음. 또한 양성자 빔의 경우에 조절이 용이하여 사용하기 편리하며, 짧은 조사시간으로 목적하는 조사량을 확보할 수 있어서 마우스 수정란에 미치는 외부인자를 감소시킬 수 있는 장점도 있음.

사. 보고된 바에 의하면 10KeV/m 양성자빔에 조사된 human fibroblast에서 HPRT 유전자에서, 137Cesium gamma rays에 비하여 BRE가 1.3을 나타내었으며(Hei, T.K., Chen, D.J.,

Brenner, D.J., Hall, E.J., 1988. Mutation induction by charged particles of defined linear energy transfer. *Carcinogenesis* 9, 1233-1236), 설치류세포의 실험에서는 30.5KeV/m 양성자에 노출된 설치류의 세포에서 X-ray에 비하여 BRE가 최대 6.0까지 나타내었으며, 7.7KeV/m에서는 2.5정도로 나타났다고 보고되어 있음(Belli, M., Cera, F., Cherubini, R., Vecchia, M.D., Haque, A.M.I., Ianzini, F., Moschini, G., Sapor, O., Simone, G., Tabocchini, M.A., Tiverson, P., 1998. RBE-LET relationships for cell inactivation and mutation induced by low energy protons in V79 cells: further results at the LNL facility. *Int. J. Radiat. Biol.* 74, 501-509).

- 아. 따라서 양성자를 이용한 마우스 유전자변이유발은 point mutation 을 일으키는 것이 아닌 deletion방식의 유전자 변이를 매우 효율적으로 유발하는 방식이 될 것이며, 이는 ENU를 사용한 방식의 단점을 보완할 수 있을 것으로 기대됨.
- 자. 즉, 질환관련 표현형이 뚜렷이 나타나는 질환모델을 개발하는 것이 가능하고, ENU의 편향된 유전자변이로 인한 한계를 극복하는 신규질환 모델의 개발이 가능할 것으로 기대됨.
- 차. 이러한 향상된 질환모델을 활용한다면 글로벌 바이오신약을 개발하기 위한 질병의 새로운 표적발굴이 가능하고, 발굴된 표적을 대상으로 바이오신약을 개발하게 되는 원천기술 확보의 밑거름이 될 것으로 기대됨.

The logo for KAERI (Korea Atomic Energy Research Institute) is centered at the bottom of the page. It features the word "KAERI" in a bold, sans-serif font. Above the text is a stylized graphic consisting of two curved lines that sweep upwards and outwards, resembling a pair of wings or a dynamic motion. Two small circles are positioned at the ends of these curves, one on the left and one on the right, suggesting a path or trajectory.

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 연구개발 수행 방법

1. 마우스 확보:

필요한 수의 C57BL6 마우스를 동물판매회사로부터 구입 또는 자체 생산하여 확보하였음.

2. 과배란 처리 유도

가. 청정화를 위한 동물이 선정된 후, 수정란을 채취하기 위하여 PMSG와 hCG를 이용하여 4-6주령의 암컷 마우스를 과배란시킴.

나. 과배란 유도 과정

- (1) 4-8주령의 암컷 마우스와 성숙된 수컷 마우스 적당수를 선발하여 2일간 새로운 케이지와 환경에 적응시킴.
- (2) 오후 2시-5시 사이에 암컷 마우스의 복강에 PMSG 5IU를 주사함.
- (3) 48시간 후에 hCG 5IU를 복강에 주사함.
- (4) hCG 처치후에 수컷의 마우스와 1:1-2의 비율로 교배함.
- (5) 다음날 아침 암컷마우스의 질전(plug)형성 유무를 확인하여 질전이 존재하는 마우스를 분리함.

3. 수정란 채취 및 동결

가. 과배란 처리된 암컷 마우스를 수컷마우스와 교배시킨 후, plug가 확인된 동물에 대하여 임신 2일째에 마우스를 마취제를 이용하여 마취시킨 후, 난관에서 수정란을 채취함.

나. 초자화 동결 (Vitrification)법을 아래와 같은 수순으로 조작하여 수정란을 동결함.

- (1) 배양접시에 PB1 용액에 만든 1M DMSO 용액 (1M DMSO solution) 을 4개 drop (~0.1ml / drop) 을 준비함. 한 개 drop은 수정란을 회수하는 과정에서 사용된 배지를 세척하는데 사용되며, 나머지 3개 drop은 세척된 수정란을 담는데 사용함.
- (2) 4방울 중의 한 방울에 수정란을 모두 옮겨서 회수에 사용된 배지를 제거하기 위한 세정을 함. 세정이 끝나면 실제로 동결튜브에 넣고자 하는 개수에 따라서 수정란을 분할하여 다른 3개의 방울에 분주함. 예를 들면, 120개의 수정란을 채취하여 세 개의 동결 튜브에 각각 40개씩 초자화 동결시키고자 하는 경우, 120개 모두를 한 개의 방울에 넣고 세척 한 뒤에 3개의 방울에 40개씩 분주하여 옮김.
- (3) 20ul용의 피펫맨을 이용하여 5ul 의 1M DMSO 용액과 함께 수정란을 회수하여 동결용 튜브(cryotube) 속으로 넣고, 동결튜브를 0C의 block cooler 에 옮긴 후, 5분간 기다림 (block cooler는 사용 전에 -20 C의 냉장고에 넣어 두었다가 실온으로 꺼내어 10 정도

두었다가 사용함. 이 경우 한 시간 정도 사용할 수 있음, 얼음을 사용해도 되지만 물기가 묻으면 액체질소에 들어갈 때 온도의 변화가 일정하지 않을 수 있음).

주의 1) 0 C의 block cooler 에서 5분 이상 20분 이내로 동결튜브를 두어도 됨.

주의 2) 5ul의 배지만으로 수정란 전부를 회수하고자 할 때에는 배지방울의 중앙부에 수정란이 모아지도록 만든 후에, 회수하면 쉽게 할 수 있음.

(4) 5분이 지난 후, 미리 0 C로 냉각시켜 둔 동결 보호액 DAP213 45ul를 0 C block cooler 에 첨가한 후, 5분간 배양하여 평형이 이루어지도록 함.

주의: DAP 213을 첨가한 후에 뚜껑을 너무 단단하게 막지 않음. 그렇지 않으면 수정란을 응해할 때에 빨리 처리해야 할 때 그렇게 하기 어려울 수 있음.

(5) 동결튜브를 신속하게 cane 에 옮겨서 고정시키고 액체질소에 바로 집어 넣음.

4. 불임수컷동물의 준비

가. 대리모를 준비하기 위하여, 가임신된 암컷 마우스를 준비함. 그러나 가임신 마우스를 얻기 위해서는 불임의 수컷 마우스가 필요함. 따라서 교미능력이 뛰어난 수컷마우스를 선별하여 마취제로 마취한 후, 정관결찰 수술을 시행하여 회복시킴. 회복된 수컷 마우스는 성숙된 암컷 마우스와의 교미를 통하여 plug를 잘 형성시키면서도 불임인 수컷인지를 확인한 후, 불임수컷 마우스로 사용함.

나. 정관 결찰술은 아래와 같은 방법으로 시술함.

* 5주령의 수컷 마우스를 마취함.

* 전통적 방법에 따라 중앙부에 2개의 절개선을 만들. 절개부위는 뒷다리 윗쪽과 만나는 부분에서 시작하여 머리쪽으로 약 1cm정도 절개함. 절개부에서 정소와 정소상체 및 정관을 복강 밖으로 노출시킴.

(1) 정관(vas deferens)을 포셉으로 잡고 주변 결합조직을 다른 포셉으로 떼어냄.

(2) 한쪽 포셉으로 정관을 잡고, 양쪽을 불에 달군 포셉으로 살짝 집어서 지킴

(3) 포셉으로 잡고 있는 정관 부위와 불로 지진 부위 사이를 가위로 절단하고, 떼어낸 정관은 확인을 위하여 한쪽에 정리하여 놓음.

(4) 정소, 정소상체 및 정관을 복강내로 되돌리고, 피부의 절개부를 자동클립으로 집음.

(5) 다른 한쪽의 정관에 대해서도 같은 방법으로 수술을 시행함.

주의: 정관을 결찰한 여러 마리의 수컷마우스를 같은 케이지에 넣어두면, 싸움이 일어나서 수술부위에 상처가 생겨서 다음날 사망하는 경우가 있으므로 주의함

5. 대리모 동물의 준비

가. 대리모 준비 과정은 다음과 같이 준비함.

- (1) 대리모로 이용될 동물은 한국생명공학연구원의 SPF동물중에서 선발하여 사용함.
- (2) 대리모용 동물은 2세포기 수정란을 이식받을 동물로서 수정란 이식이 이루어지기 1주일 전에 선발하여 새로운 환경에 적응시켜 둠.
- (3) 수정란 이식이 이루어지기 1일전에 선발된 암컷동물을, 정관결찰술을 받고 불임이 확인된 수컷동물과 교배하여 둠.
- (4) 수정란 이식이 이루어지는 당일 오전에 질전(plug)가 존재하는지를 확인하고 확인된 동물을 별도로 분리하여 수정란 이식수술실로 이동시킴.

6. 동결수정란의 해동

가. 초자화된 동결수정란을 아래와 같은 조작으로 해동하여 다음과 같이 회수함.

- (1) 액체질소에서 유지되고 있는 동결튜브를 꺼내어 뚜껑을 연다. 튜브 내에 액체질소가 남아있는 경우에는 실온에서 30초간 정치시켜서 모두 날려버림.(뚜껑을 열고 액체질소를 곧바로 쏟아버리고 뚜껑을 열어둔 채로 30초간 실온에 방치함).
- (2) 30초 후에, 미리 37 C로 맞추어 놓은 0.9ml의 PB1 (0.25 M sucrose 포함) 용액을 동결 튜브에 넣고 10회 정도 공기가 생기지 않도록 피펫팅하여 빨리 따뜻해지도록 함 (이때 피펫 끝이 튜브벽에 닿으면 열어서 용액이 나가지 않을 수 있으므로 조심함). 그러나 피펫팅 할 때에 공기방울이 생기지 않도록 조심하여야 함. 그리고 나서, 동결튜브내의 내용물을 배양접시에 옮김.
- (3) 혹시 남아있을지 모르는 수정란을 회수하기 위하여 다시 한번 0.4-0.5ml의 PB1 (0.25 M sucrose 포함) 용액을 동결튜브에 넣었다가 배양접시로 회수함. 이렇게 함으로써 동결 보호제를 희석하는 효과와 함께 모든 수정란을 회수하게 됨.
- (4) 주의를 기울여서, 용액으로부터 수정란을 흡입하여, 배양접시에 준비한 100ul의 mWM 한 방울 속으로 옮기고 10분간 기다림.
- (5) 10분 뒤에, 수정란을 신선한 mWM 으로 두번 세척해 줌.
* blastocyst의 경우에는 수정란을 60분 후에 세척해 줌.

7. 양성자빔 조사 수정란의 이식

가. 아래와 같은 방식으로 난관에 수정란을 이식함. 양성자빔조사된 1세포기의 수정란을 overnight 배양하여 2-세포기로 발생하는 것을 확인하고 2세포기의 수정란을 이식함. 그러나 그 이후까지 발생한 수정란 (4세포기- 포배기)을 이식하는 것도 가능함.

- (1) 준비물
 - (가) 1일령의 가임신 된 암컷 마우스 (질전이 확인된 당일) .
 - (나) Micro-spring scissors (5 mm blade)) (미세가위)

- (다) Pair of watchmaker's #5 forceps (5번 핀셋 한 쌍)
- (라) (자동클립기와 자동클립날) Wound clip 과 clip applicator
- (마) 배양접시
- (바) 수정란 이식용 미세피펫 (외경 약 200-250 um)

(2) 마우스 조작

- (가) 암컷 대리모 마우스를 마취함.
- (나) 전통적 방법에 따라서, 복강을 절개하고, 난소를 감싸고 있는 지방을 핀셋으로 잡고, 난관과 자궁 부분을 외부로 끄집어냄 .

(3) 이식할 수정란을 미세피펫에 준비

- (가) 200 ul의 mWM 용액 한 방울(이식용 방울)을 배양접시의 중앙에 만듬 (mineral oil 로 덮지 않는다). 20개까지의 수정란을 한 개의 방울에 넣음.
- (나) 미리 2-3mm의 간격으로 공기층과 배양액층을 번갈아 가며 담아 놓은 이식용 미세 피펫(glass capillary , 외경 200-250um) 에 최소한의 배양액과 함께 10개의 수정란 (보통 한쪽에 10개씩 이식함)을 흡입함.

주의 : 미세피펫을 처음 용액 방울에 넣을 때, mineral oil 이 용액방울의 바깥쪽 표면에 남아있게 되므로, 수정란을 미세피펫에 흡입하고자 할 때에는 mineral oil 이 포함되지 않도록 조심하면서 mineral oil 이 있는 반대쪽 표면을 이용하여야 함. mineral oil 이 난관에 들어가면 배아가 발육하는데 악영향을 준다고 알려져 있음.

(4) 수정란 이식

- (가) 난관조작용 미세핀셋(watchmakers #5 forceps)과 미세가위(micro-spring scissors) 를 이용하여, 나팔관(infundibulum)과 팽대부(ampulla) 사이의 난관의 벽을 절개 함.
- (나) 이식을 위한 수정란이 담겨진 미세피펫을 절개된 곳으로 삽입하여, 팽대부 쪽으로 미세피펫을 밀어 넣음.
- (다) 미세피펫이 삽입되는 난관부분을 핀셋으로 잡아줌.
- (라) 팽대부쪽으로 수정란과 함께 2-3개의 공기방울이 들어가도록 불어넣음.

주의: 수정란 주입이 성공적으로 끝나면, 팽대부 벽을 통하여 공기방울을 확인할 수 있음.

- (마) 미세피펫을 부드럽게 난관으로부터 빼냄.
- (바) 난소, 난관 및 자궁각을 복강으로 되돌린 후, 피부를 자동클립기를 이용하여 봉합함.
- (사) 마우스가 마취에서 깨어날 때까지 37C로 따뜻하게 보온해 줌.

8. 동물실(SPF barrier system) 유지조건

가. 온도 21±1℃

나. 습도 45 ± 10

다. 환기 15-20회/시간

라. 멸균: 깔집, 케이지, 음수

마. 기타: 조명 및 소음 조절



제2절 연구개발 수행 내용 및 결과

1. 연구수행 내용

가. 양성자빔 조사

(1) 실험 방법

- (가) 수정란 채취-5주령 C57BL/6 암컷 마우스에 PMSG, HCG 호르몬을 이용하여 과배란 유도 후, 수컷 마우스와 1:1 교배를 유도하여 1세포기 수정란 채취
- (나) 액체질소를 이용하여 마우스 수정란을 초자화 동결하여 이동
- (다) 양성자빔의 수정란 조사
- (라) over night 배양-5% CO₂, 온도 37°C의 습윤 배양기에서 배양하여 2세포기 수정란으로 발달한 수정란을 선별
- (마) 2세포기 수정란의 초자화 동결 후 이동하여 보존하다가 대리모가 준비되면 해동하여 이식함.
- (바) 대리모 준비: SPF의 ICR마우스 7주령된 암컷 마우스와 정관결찰을 통하여 불임을 유도한 수컷 마우스를 1:1 교배하여 질전이 확인된 마우스를 대리모로 선별함.
- (사) 초자화 동결된 2세포기 마우스 수정란을 해동하여 가임신 0.5일령의 대리모에 수정란 이식하고, 동물실에서 유지관리함.
- (아) 동물실 관리조건: 온도 21±1°C, 상대습도 50±5%를 유지하며 hepafilter를 이용한 정정공기를 양압으로 유지하는 SPF 동물실에서 멸균된 마우스용 사료와 물을 자유로이 섭취시키는 환경에서 관리 함.
- (자) 마우스 수정란 이식 3주 후, 대리모에서 태어난 마우스 산자 관찰

2. 연구수행 결과

가. 1차 양성자 빔 조사 결과 요약

(1) 양성자빔을 조사한 수정란을 이식결과는 아래 표1과 같음.

표1. 1차 양성자 빔 조사 결과

조사 군	양성자빔 조사량	빔조사 1세포기 수정란 수	2세포기 발달		수정란 이식 대리모 수	결과		
			수정란 수	수정란 수		분만모체	산자수	이상유무
1	2 Gy	47	17 (36%)		1	○	6	○
2	5 Gy	44	21 (47%)		1	×	0	×
3	10 Gy	50	14 (28%)		1	×	0	×
4	20 Gy	47	5	12	1	×	0	×
5	40 Gy	44	6					
6	80 Gy	34	1					

(2) 양성자빔 조사후 태어난 마우스의 관찰 결과: 2Gy를 조사한 후 태어난 6마리의 체중 변화는 아래와 같으며, 산자 중 1마리(암컷 6번개체)가 체중과 크기에서 작았으며, 8주령에 사망함(그림1).

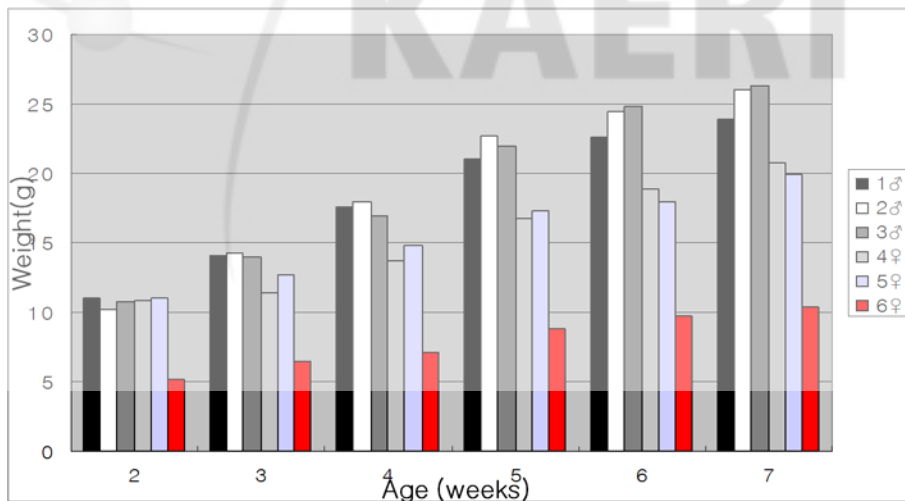


그림1. 양성자빔조사한 마우스 수정란으로부터 태어난 마우스의 체중변화.

(3) 실험결과 해석:

- (가) 2-80 Gy의 양성자빔을 조사한 수정란을 체외배양하면 2세포기까지 발생하는 것이 가능함 - 2세포기까지 발달하는 수정란의 이식 효율의 문제를 확인할 필요성 있음.
- (나) 2-10 Gy의 양성자빔 조사에 의하여 2세포기까지의 발생에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료됨- 2세포기까지 발달하는 수정란의 이식 효율의 문제를 확인할 필요성 있음.
- (다) 20Gy이상의 양성자 빔 조사에 의하여 2세포기까지의 발생하는 수정란의 비율이 크게 낮아짐- 2세포기까지 발달하는 수정란의 이식 효율의 문제를 확인할 필요성 있음.
- (라) 5Gy를 초과하는 양성자 빔 조사는 수정란의 정상적인 임신과정에 영향을 주는 것으로 사료됨- 2세포기까지 발달하는 수정란의 착상 및 임신 과정의 문제점을 점검할 필요성 있음.
- (마) 2Gy 의 양성자 빔으로 조사된 마우스 수정란에 유전자변이 유발됨.

나. 2차 양성자 빔 조사 결과 요약

- (1) 양성자빔을 조사한 수정란을 이식결과는 아래 표2와 같음.

표2. 2차 양성자 빔 조사 결과

연번	양성자빔 조사량	빔조사 1세포기 수정란 수	2세포기 발달 수정란 수	수정란 이식 대리모 수	결과		
					분만모체	산자수	이상유무
1	2.5 Gy	27	10 (37%)	1	○	4	×
2	5 Gy	58	13 (22%)	1	×	0	×
3	7.5 Gy	58	20 (34%)	1	×	0	×
4	10 Gy	19	9 (47%)	1	×	0	×

- (2) 양성자빔 조사후 태어난 마우스의 관찰 결과: 6주령까지의 관찰결과 이상을 관찰 할 수 없었음.

(3) 실험결과 해석:

- (가) 2.5Gy의 양성자빔을 조사한 수정란을 체외배양하면 2세포기까지 발생하는 것이 가능함

- (나) 2.5-10 Gy의 양성자빔 조사에 의하여 2세포기까지의 발생에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 사료됨- 2세포기까지 발달하는 수정란의 이식 효율의 문제를 확인할 필요성 있음.
- (다) 5Gy를 초과하는 양성자 빔 조사는 수정란의 정상적인 임신과정에 영향을 주는 것으로 사료됨
- (라) 2.5Gy 의 양성자 빔으로 조사된 마우스 수정란에 유전자변이 유발을 확인하지 못함 - 유전바 변이 유발 효율에 대한 결론을 얻기위해서는 대리모에 이식하는 수정란의 숫자를 증가시켜 산자수의 수를 증가시킬 필요성 있음.
- (마) 위의 결과를 종합해 볼때, 초기 수정란 발생과정에는 영향이 적은 것으로 사료되나 착상과 임신유지과정에 영향을 많이 주는 것으로 사료되나, 결론을 내기까지 더 많은 표본수가 필요함.

다. 3차 양성자빔 조사

(1) 2차 양성자 빔 조사 결과 요약

가) 양성자빔을 조사한 수정란을 이식결과는 아래 표3과 같음.

표3. 3차 양성자 빔 조사 결과

연번	양성자빔 조사량	빔조사 1세포기 수정란 수	2세포기 발달 수정란 수	수정란 이식 대리모 수	결과		
					분만모체	산자수	이상유무
1	4 Gy	170	54 (32%)	2	×	0	×
2	6 Gy	170	39 (23%)	3	×	0	×
3	8 Gy	170	39 (23%)	2	×	0	×
4	10 Gy	170	23 (23%)	2	×	0	×
5	12 Gy	170	23 (14%)	1	×	0	×

(2) 양성자빔 조사후 태어난 마우스의 관찰 결과: 태어난 마우스 없음.

(3) 실험결과:

(가) 4-12Gy의 양성자빔을 조사한 수정란을 체외배양하면 2세포기까지 발생하는 것에

큰 영향이 없는 것으로 사료됨 - 2세포기까지 발달하는 수정란의 이식 효율의 문제를 확인할 필요성 있음.

(나) 4Gy를 초과하는 양성자 빔 조사는 수정란의 정상적인 임신과정에 영향을 주는 것으로 사료됨 - 표본수를 증가시켜서 확인할 필요성이 있음.

(다) 위의 결과를 종합해 볼때, 초기 수정란 발생과정에는 영향이 적은 것으로 사료되나 착상과 임신유지과정에 영향을 많이 주는 것으로 사료되나, 결론을 내기까지 더 많은 표본수가 필요함.

라. 4차 양성자 빔 조사 결과 요약

(1) 양성자빔을 조사한 수정란을 이식결과는 아래 표4와 같음.

표4. 4차 양성자 빔 조사 결과

연번	양성자빔 조사량	빔조사 1세포기 수정란 수	2세포기 발달 수정란 수	수정란 이식 대리모 수	결과		
					분만모체	산자수	이상유무
1	5 Gy	97	30 (31%)	1	×	0	×
2	10 Gy	98	23 (23%)	1	×	0	×
3	15 Gy	100	17	1	×	0	×
4	20 Gy	100	11				
5	30 Gy	50	7				

- 15 Gy, 20 Gy, 30 Gy 조사한 수정란은 합쳐서 대리모에 이식.

(2) 양성자빔 조사후 태어난 마우스의 관찰 결과: 태어난 마우스 없음.

(3) 실험결과:

(가) 5-30Gy의 양성자빔을 조사한 수정란을 체외배양하면 2세포기까지 발생하는 것에 큰 영향이 없는 것으로 사료됨.

(나) 5Gy를 초과하는 양성자 빔 조사는 수정란의 정상적인 착상과 임신과정에 영향을 주는 것으로 사료됨 - 표본수를 증가시켜서 확인할 필요성이 있음.

(다) 15Gy를 넘는 양성자빔 조사는 마우스 수정란의 초기 발생에 영향을 미치는 것으로 사료됨.

(라) 위의 결과를 종합해 볼 때, 초기 수정란 발생과정에는 영향이 적은 것으로 사료되나 착상과 임신유지과정에 영향을 많이 주는 것으로 사료되나, 결론을 내기까지 더

많은 표본수가 필요함.

마. 5차 양성자빔 조사

(1) 실험 방법

예비 실험과 동일하나 아래와 같이 양성자 빔 조사 후, 양성자빔센터에서의 배양과정 없이, 조사 당일 (동결과정 없이) 오창의 실험실로 보온 이동하여 하룻동안 배양하고, 2세포기의 수정란을 동결과정 없이 즉시 대리모에 이식함.

- (가) 수정란 채취-5주령 C57BL/6 암컷 마우스에 PMSG, HCG 호르몬을 이용하여 과배란 유도 후 수컷 마우스와 1:1 교배를 유도하여 1세포기 수정란 채취
- (나) 수정란 이동-액체질소를 이용한 수정란 동결 후 이동
- (다) 양성자빔의 수정란 조사
- (라) 수정란 이동-양성자빔을 조사한 수정란을 보온 상태에서 이동하여 하룻밤 배양
- (마) 대리모 준비-대리모에 수정란 이식 하기 하루 전 ICR 7주령 암컷 마우스와 불임 수컷 마우스를 1:1 교배하여 질전이 확인된 마우스 사용
- (바) 수정란 이식 (대리모가 준비되지 못한 경우 동결 보존후, 대리모 준비시에 해동하여 이식 실시)
- (사) 동물실 관리조건: 온도 $21\pm 1^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 5\%$ 를 유지하며 hepafilter를 이용한 정정공기를 양압으로 유지하는 SPF 동물실에서 멸균된 마우스용 사료와 물을 자유로이 섭취시키는 환경에서 관리 함.
- (아) 마우스 수정란 이식 3주 후, 대리모에서 태어난 마우스 산자 관찰

(2) 5차 양성자 빔 조사 결과 요약

(가) 양성자빔을 조사한 수정란을 이식결과는 아래 표5와 같음.

표5. 5차 양성자 빔 조사 결과

연번	양성자빔 조사량	빔조사 1세포기 수정란 수	2세포기 발달 수정란 수	4-16세포기 발달 수정란 수	수정란 이식 대리모 수	결과		
						분만 모체	산자 수	이상 유무
1	2 Gy	200	74 (37%)	15/34	2	1	2	0
2	5 Gy	200	65 (33%)	8/25	3	×	0	×
3	10 Gy	140	45 (32%)	2/15	2	×	0	×
4	15 Gy	100	.	.	2	×	0	×

- 15Gy는 양성자빔 조사한 후 바로 대리모에 이식

(나) 양성자빔 조사후 태어난 마우스의 관찰 결과: 2Gy를 조사한 조사군에서 2마리의 마우스 산자가 태어났으나 모체의 카니발리즘에 의해 모두 소실됨.

(다) 실험결과:

- ① 2-10Gy의 양성자빔을 조사한 수정란을 체외배양하면 2세포기까지 발생하는 것에 큰 영향이 없는 것을 확인함.
- ② 5Gy를 초과하는 양성자 빔 조사는 2세포기 이후의 수정란 발달과 그 이후의 정상적인 착상과 임신과정에 영향을 주는 것을 확인함.
- ③ 위의 결과를 종합해 볼 때, 5Gy이상의 양성자빔 조사는 2세포기까지의 수정란 발생 과정에는 영향이 적은 것으로 사료되나 그 이후의 발생과정, 특히 착상과 임신유지 과정에 영향을 많이 주는 것으로 사료됨.

사. 6차 양성자 빔 조사 결과 요약

(1) 양성자빔을 조사한 수정란을 이식결과는 아래 표6과 같음.

표6. 6차 양성자 빔 조사 결과

연번	양성자빔 조사량	빔조사 1세포기 수정란 수	2세포기 발달 수정란 수	4-16세포기 발달 수정란 수	수정란 이식 대리모 수	결과		
						분만 모체	산자 수	이상 유무
1	1 Gy	158	56 (35%)	8/16	2	2	6	×
2	1.5 Gy	134	45 (33%)	9/23	2	2	3 (2)*	1
3	2 Gy	209	78 (37%)	13/32	2	2	2 (2)*	2
4	3 Gy	141	50 (35%)	4/15	2	×	0	×

*, 1.5 Gy와 2 Gy에서 각각 2마리의 산자가, 모체의 카니발리즘에 의해 분만직후 산자가 소실되어 관찰하지 못함.

(2) 양성자빔 조사후 태어난 마우스의 관찰 결과:

(가) 1Gy를 조사한 조사군: 2마리의 모체에서 6마리의 마우스 산자가 태어났으나 2010년 3월 22일 현재까지의 관찰결과 이상 소견이 관찰되지 않음.

(나) 1.5Gy를 조사한 조사군: 2마리의 모체에서 5마리가 태어났으나 1마리의 모체가 카니발리즘으로 2마리를 소실시켰으며, 나머지 모체에서 태어난 3마리의 산자중에서 2010년 3월 22일 현재까지의 관찰결과, 1마리가 현저히 체중이 작은 이상소견이 관찰되고 있음.

(다) 2Gy를 조사한 조사군: 2마리의 모체에서 4마리가 태어났으나 1마리의 모체가 카니발리즘으로 2마리를 소실시켰으며, 나머지 모체에서 태어난 2마리의 산자중에서 2010년 3월 22일 현재까지의 관찰결과, 2마리 모두 체중이 작은 이상소견이 관찰되고 있음.

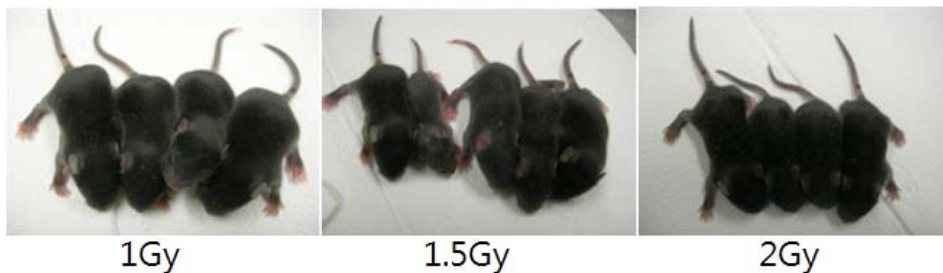


그림2. 수정란에 양성자빔을 조사한 후 태어난 마우스 산자

(3) 실험결과:

- (가) 1Gy의 양성자빔을 조사한 수정란은- 임신율에서 정상적인 수정란의 이식에 비하여 임신율이 낮으나, 태어난 마우스에서 유전자변이를 유발하는 효율은 낮은 것으로 사료됨.
- (나) 1.5Gy의 양성자 빔 조사는 임신율에서 정상적인 수정란의 이식에 비하여 임신율이 낮으나, 태어난 마우스에서 유전자변이를 유발하는 것으로 사료됨.
- (다) 2Gy의 양성자 빔 조사는 임신율에서 정상적인 수정란의 이식에 비하여 임신율이 낮으나, 태어난 마우스에서 유전자변이를 유발하는 것으로 사료되며, 1.5Gy의 양성자 빔 조사보다는 높은 효율로 유전자돌연변이를 유발하는 것으로 사료됨.
- (라) 3Gy의 양성자 빔 조사는 초기의 수정란 발달에는 영향이 적으나, 착상과 임신유지에 큰 영향을 미치는 것으로 사료됨 (표7, 그림 3과 4)
- (마) 위의 결과를 종합해 볼 때, 1세포기의 마우스 수정란에 1.5-2Gy의 양성자빔 조사를 통하여 높은 효율로 유전자돌연변이를 유발할 수 있는 것을 확인 하였음.



KAERI

표7. 양성자빔의 조사량에 따른 마우스 수정란의 초기발생

연번	양성자빔 조사량	2세포기 발달 수정란 수 (%)	4-8세포기 발달 수정란 수 (%)
1	control	60~80%	80~100%
2	1 Gy	35%	50%
3	1.5 Gy	33%	39%
4	2 Gy	37%	45%
5	2.5 Gy	37%	-
6	3 Gy	35%	27%
7	4 Gy	32%	-
8	5 Gy	29%	32%
9	6 Gy	23%	-
10	7.5 Gy	34%	-
11	8 Gy	23%	-
12	10 Gy	31%	13%
13	12 Gy	14%	-
14	15 Gy	17%	-
15	20 Gy	11%	-
16	30 Gy	14%	-

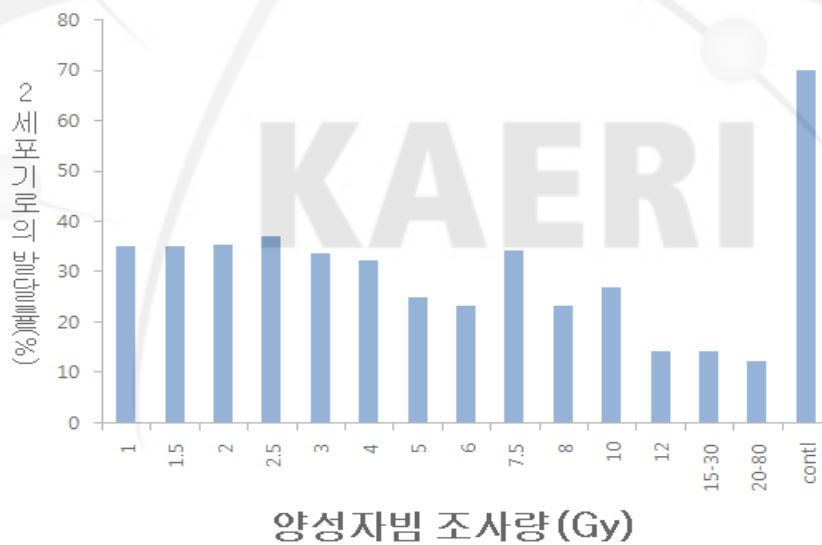


그림 3. 양성자빔의 조사량에 따른 마우스 수정란의 초기발생율. 1세포기에 양성자빔을 조사한 마우스 수정란이 2세포기까지 발달하는 비율을 백분율로 나타내었음.

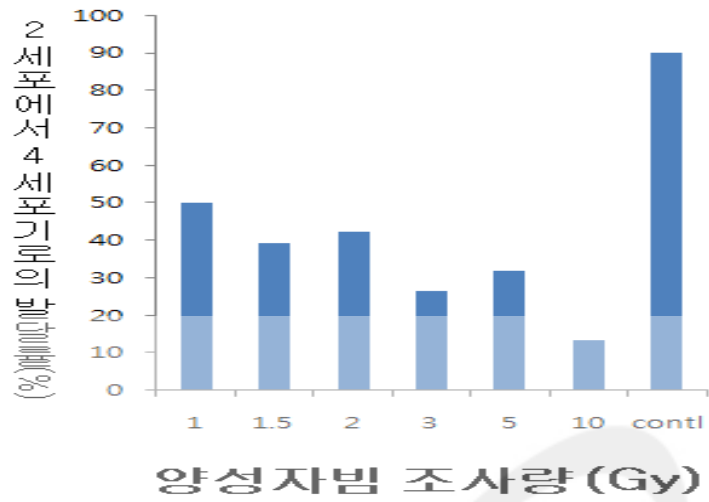


그림 4. 양성자빔의 조사량에 따른 마우스 수정란의 초기발생율. 1세포기에 양성자빔을 조사한 후, 2세포기까지 발달한 수정란이 4세포기까지 발달하는 비율을 백분율로 나타내었음.

KAERI

제3절 연구개발 결론

1. 1차년도 양성자빔 조사실험의 종합 결론:

- 가. 1Gy 이하의 양성자빔 조사는 마우스 수정란 초기발생을 억제하나 태어나는 산자에서의 유전자변이 유발율은 비교적 낮음.
- 나. 1.5Gy-2.5Gy의 양성자빔 조사는 착상과 임신과정을 거쳐서 태어나는 동물의 일부에서 유전자변이를 유발함.
- 다. 1-10Gy의 양성자빔 조사는 2세포기까지의 마우스 수정란 발달에 용량의존적으로 억제하며, 3Gy이상의 양성자빔이 조사된 마우스 수정란에서 임신 전기간동안 발생과정이 가능하지 못함.
- 라. 10Gy를 초과하는 양성자빔 조사는 2세포기 이후의 발생과을 크게 억제함.
- 마. 따라서 효율적인 유전자변이마우스 개발을 위한 양성자빔 조사범위는 1.5-2.5Gy가 적합함.



KAERI

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 1절 목표달성도

목 표	연구 내용	달 성 도(%)
양성자빔조사조건 설정	효율적인 마우스 유전자변이를 유발하기 위한 양성자빔 조건 탐색	100

제 2절 관련분야에의 기여도

1. 양성자빔에 의한 마우스 수정란 돌연변이 유발효율에 대한 신규정보 확보하여 유전자변이 마우스 개발에 활용될 수 있는 실질적인 자료 확보함.
2. ENU mutagenesis법에 의한 유전자변이마우스 개발의 단점을 보완하는 대량 유전자변이 유발기술 개발기술을 확보함
3. 새로운 형태의 질환모델동물개발을 통한 생명과학연구용 신규자원 확보가 가능하게 되었음.



KAERI

제5장 연구개발결과의 활용계획

제 1절 추가연구의 필요성

1. 본 연구에서는 양성자빔을 이용한 마우스 유전자변이유발이 가능함을 밝혔으며,
2. 유전자변이 마우스 개발을 위한 최적의 양성자빔 조사조건을 확립하였으므로,
3. 본 연구에서 밝힌 연구결과를 신약개발을 위한 신규 질환모델 마우스의 개발에 활용할 수 있는 유전자변이 마우스자원을 확보하는데 적용할 필요성이 있음.

제 2절 연구결과의 활용

1. 새로운 형태의 질환모델동물개발을 통한 생명과학연구용 신규자원 확보하는데 활용하며,
2. 양성자빔으로 개발된 유전자변이 마우스자원을 바이오신약개발을 위한 신규질환모델의 연구자원으로 학연산에 공동활용이 가능할 것이며,
3. 국내 글로벌 바이오신약 개발 가능성 향상키는데 기여할 것임.



KAERI

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 양성자빔을 이용한 유전자변이 마우스의 개발에 대하여 보고된 예가 전세계적으로 없음.



제7장 참고문헌

(보고서 작성시 인용된 모든 참고 문헌을 열거)

1. Russell WL, Kelly EM, Hunsicker PR, Bangham JW, Maddux SC, Phipps EL. 1979. Specificlocus test shows ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76(11):5818 - 19
2. Justice MJ, Noveroske JK, Weber JS, Zheng B, Bradley A. 1999. Mouse ENU mutagenesis. Hum. Mol. Genet. 8(10):1955-63
3. O'Neill JP. 2000. DNA damage, DNA repair, cell proliferation, and DNA replication: how do gene mutations result? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(21):11137 - 39
4. Noveroske JK, Weber JS, Justice MJ. 2000. The mutagenic action of N-ethyl-N-nitrosourea in the mouse. Mamm. Genome 11(7):478 - .83
5. Bedford, J. S. (1991) Sublethal damage, potentially lethal damage, and chromosomal aberrations in mammalian cells exposed to ionizing radiations. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 21, 1457 - 1469
6. Pastwa, E., Neumann, R. D., Mezhevaya, K. and Winters, T. A. (2003) Repair of radiation-induced DNA double-strand breaks is dependent upon radiation quality and the structural complexity of double-strand breaks. Radiat. Res. 159, 251-261
7. Hei, T.K., Chen, D.J., Brenner, D.J., Hall, E.J., 1988. Mutation induction by charged particles of defined linear energy transfer. Carcinogenesis 9, 1233-1236
8. Belli, M., Cera, F., Cherubini, R., Vecchia, M.D., Haque, A.M.I., Ianzini, F., Moschini, G., Saporà, O., Simone, G., Tabocchini, M.A., Tiverson, P., 1998. RBE-LET relationships for cell inactivation and mutation induced by low energy protons in V79 cells: further results at the LNL facility. Int. J. Radiat. Biol. 74, 501-509
9. Capecchi M.R. (2005) Gene targeting in mice: Functional analysis of the mammalian genome for the twenty-first century. Nature 6: 507-512.
10. Collins F.S., Rossant J. and Wurst W. (2007) A mouse for all reasons. Cell 128: 9-13.
11. Collins F.S., Finnell R.H., Rossant J. and Wurst W. (2007) A new partner for the international knockout mouse consortium. Cell 129: 235.
12. Gondo, Y. (2008) Trends in large-scale mouse mutagenesis: from genetics to functional genomics. Genetics 9: 803-807.