

기관고유연구사업 최종보고서

(과제번호 : NCC-0810060)

제브라피쉬를 이용한 발암 유전자 기능 연구와 암 모델동물
개발을 위한 연구 기반 구축

Establishment of research infrastructure for the
functional study of oncogenes and the development of
cancer models using zebrafish

과제책임자 : 배영기

국립암센터

(뒷면)

(측면)

<div data-bbox="284 1039 1155 1603" style="border: 1px solid black; padding: 20px;"><ol style="list-style-type: none">1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구사업 최종보고서입니다.2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.<p style="text-align: center;">(14 pont, 고딕체)</p></div> <div data-bbox="676 1783 756 1861" style="text-align: center;">↑ 6cm ↓</div>	<div data-bbox="1238 539 1294 663" style="text-align: center;">↑ 5cm ↓</div> <div data-bbox="1257 725 1342 1350" style="text-align: center;">제브라 피쉬를 이용한 발암 유전자 기능 연구와 암 모델동 물 개발을 위한 연구 기반 구축</div> <div data-bbox="1238 1406 1267 1603" style="text-align: center;">국 립 암 센 터</div> <div data-bbox="1238 1666 1294 1789" style="text-align: center;">↑ 3cm ↓</div>
--	--

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “제브라피쉬를 이용한 발암 유전자 기능 연구와 암 모델동물 개발을 위한 연구 기반 구축” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2009. 12. 31.

국립암센터

과제책임자 : 배영기

연구원 : 나원호

” : 최진욱

” : 서은석

목 차

< 요약 문 >	3
(한글)	
(영문)	
1. 연구의 최종목표	
2. 연구의 내용 및 결과	5
3. 연구결과 고찰 및 결론	17
4. 연구성과 및 목표달성도	18
5. 연구결과의 활용계획	20
6. 참고문헌	28
7. 첨부서류	29

※ 여러개의 세부과제로 과제가 구성된 경우 위 목차와 동일하게 세부과제별로 작성함

(I. 총괄과제, II. 제1세부과제, III. 제2세부과제.....)

< 요약 문 >

연구분야(코드)	실용화 연구(B-4)	과제번호	NCC-0810060
과제명	제브라피쉬를 이용한 발암 유전자 기능 연구와 암 모델동물 개발을 위한 연구 기반 구축		
연구기간/연구비 (천원)	합계	2008년 1월 1일 ~ 2009년 12월 31일	240,000
	1차년도	2008년 1월 1일 ~ 2008년 12월 31일	120,000
	2차년도	2009년 1월 1일 ~ 2009년 12월 31일	120,000
과제책임자	성명	배영기	주민등록번호
	전화번호	031-920-2263	전자우편
		zebra@ncc.re.kr	
색인단어	국문	제브라피쉬, 발암 유전자, 암 모델동물	
	영문	Zebrafish (<i>Danio rerio</i>), Oncogenes, Animal Cancer Model	

◆ 연구목표

<최종목표> 제브라피쉬를 모델동물로 암 관련 유전자 기능 연구와 발암 신호전달계 연구 및 표적 치료제 탐색 및 유용성 평가를 위한 암모델동물의 개발을 위한 연구기반 구축을 최종 목표로 함.

<당해년도 목표> 암모델동물 개발을 위한 유전자 변형 제브라피쉬 제작 기반 구축과 제브라피쉬를 이용한 tumor xenograft 모델의 개발과 응용

1. 암모델동물 개발을 위한 발암 억제 유전자 기능 이상 제브라피쉬 돌연변이체의 개발 및 확보
2. 표적 발암 유전자 발현형 형질전환 제브라피쉬의 제조
3. 제브라피쉬를 이용한 tumor xenograft 모델 개발과 응용

◆ 연구내용 및 방법

1. 암 모델동물 개발을 위한 발암억제유전자 기능이상 돌연변이체의 개발 및 확보

- 발암억제유전자의 돌연변이체의 확보: 총 2종, TP53, patched2
- 발암억제유전자의 돌연변이체의 기능 해석: TP53 돌연변이체의 gamma-irradiation에 의한 세포사 저항성 검사 및 TP53 antisense morpholino oligonucleotides 처리 제브라피쉬와의 기능 동등성 확인
- 발암억제유전자의 돌연변이체와 형질전환체와의 교배를 통한 모델동물 개발기반 구축 : TP53 (10XUAS::K-ras G12V), patched2 (10XUAS::N-myc T50A)

2. 표적 발암 유전자 발현형 형질전환 제브라피쉬의 제조

- 제브라피쉬 신경줄기세포 특이적으로 GAL4를 발현하는 형질전환 제브라피쉬의 제조
 - 신경교종 모델: GFAP::GAL4를 발현하는 F2세대의 제브라피쉬
 - 수모세포종 모델: NeuroD2::GAL4를 발현하는 F2세대의 제브라피쉬
- 각종 발암 유전자(oncogene)을 유도발현하는 형질전환 제브라피쉬의 제조
 - 신경교종 관련 발암 유전자: 10XUAS::EGFRvIII, 10XUAS::Kras 등 총 9종 개발
 - 수모세포종 관련 발암 유전자: 10XUAS::N-Myc, 10XUAS::SmoA1 등 총 4종 개발
- GAL4 및 UAS 형질전환 제브라피쉬의 교배에 의한 제브라피쉬 암모델의 개발
 - GAL4 및 UAS 형질전환 제브라피쉬의 교배에 의한 trans-induction 확인

- GAL4-UAS system의 제브라피쉬 생체 교배를 통한 신경줄기세포 특이적 발암 유전자 이상 발현형 형질전환 제브라피쉬 암모델의 개발

3. 제브라피쉬를 이용한 tumor xenograft 모델 개발과 응용

- 제브라피쉬를 이용한 암세포 이동 및 전이 모델 개발
 - 인간 폐암 세포주(H1299::mRFP) 모델: 암세포 이식후 성장없이 다른 장기로 이동
 - 인간 위암 세포주(AGS::mRFP/GFP) 모델: 암세포 이식후 성장없이 혈관 내에 축적
- 제브라피쉬를 이용한 암세포 성장 모델 개발
 - 인간 뇌암 세포주(U87MG::mRFP) 모델: 암세포 이식후 4일 이내에 tumor cell mass 형성
 - 마우스 melanoma(B16-F10::mRFP) 모델: 암세포 이식후 4일 이내에 tumor cell mass 형성 및 제브라피쉬의 혈관을 암세포로 유도하는 신혈관형성 활성 관찰
- 제브라피쉬 tumor xenograft 모델을 이용한 응용
 - 인간 위암 세포주(AGS::mRFP) 모델을 이용하여 암세포 혈관 이동에 관여하는 유전자 기능 검사: Gal3, MMP1, Par1
 - 인간 뇌암 세포주(U87MG::mRFP) 모델을 이용하여 각종 항암제의 in vivo validation: paclitaxol, cisplatin, gleevec, temozolomide, AMPK inhibitors

◆ 연구성과

-정량적 성과

구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)
SCI 논문 편수	3 / 4	75 %
IF 합	9.548 / 18	53 %
기타 성과		

1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값

-정성적 성과

- 제브라피쉬를 이용한 암실험 기반을 국립암센터 내에 구축
- 유전자 변형 암모델동물 개발을 위한 각종 암 관련 유전자 돌연변이 개체, 형질전환 개체 등의 암실험자원의 확보
- 각종 암관련 신호전달체계와의 상호작용 등과 같은 분자종양학적 기전을 규명과 표적치료제의 탐색 및 그 독성조사를 일시에 할 수 있는 개체 수준의 암모델 확보
- 종양 이종이식 모델로서의 제브라피쉬 모델의 확립, 암발생 및 암전의 모델로서의 가능성을 확인

◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)	성 명	배영기, 나원호, 최진옥, 서은석
	주민등록번호	

※ 요약문의 총분량은 2page 이내로 제한함

Project Summary

Title of Project	Establishment of research infrastructure for the functional study of oncogenes and the development of cancer models using zebrafish
Key Words	<i>Zebrafish (Danio rerio)</i> , Oncogenes, Animal Cancer Model
Project Leader	Young-Ki Bae
Associated Company	
<p>◆ Aims Although a number of mouse models has represented genetic and pathological aspects of human tumor successfully, it is increasing the need for a new type of animal model that can be used not only as a model for understanding tumorigenesis but also as a tool for drug discovery. The zebrafish (<i>Danio rerio</i>) has proven to be a useful vertebrate model system for cancer research and high through-put drug discovery, because they have several advantages, including transparency of embryos, fecundity, and feasibility for forward and reverse genetic analyses. In order to develop the zebrafish cancer model that would be used as the research for cancer pathway and high through-put drug discovery, we established the research infrastructure in National Cancer Center.</p> <p>◆ Results</p> <p>1. Establishment of research infrastructure for developing the zebrafish cancer models</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Construction of zebrafish facility in NCC: 240 fish cages for 3.5 L ○ Microinjection system set up: 2 sets <p>2. Research Materials for developing the zebrafish cancer models</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ Isolation of neural specific promoter/enhancer for Gal4VP16 expressing transgenic zebrafish: GFAP genes (for Glioma), NeuroD2 genes (for medulloblastoma) ○ Construction of Tol2 mediated transgenes harboring human oncogenes for genetic modified zebrafish cancer model: EGFRvIII, Kras Akt, etc. (for glioma), N-myc, SmoA1, PI3KCA, etc. (for medulloblastoma) ○ Adoption of Gal4VP16-UAS binary transgenic system in which neural progenitor specific promoters driven Gal4VP16 protein can induce and amplify the expression of UAS controlled oncogenes. <p>3. Generation of genetic modified zebrafish cancer models</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 2 transgenic lines of Gal4VP16 expressing F1 zebrafish: GFAP genes (for Glioma), NeuroD2 genes (for medulloblastoma) ○ 9 transgenic lines of UAS-oncogenes expressing F1 zebrafish ○ 2 lines of mutants for tumor suppressor genes: TP53, Patched2 	

4. Development of zebrafish tumor xenograft models

- Establishment of cancer cell lines that express fluorescent protein for visualization of injected cells, and performed transplantation into flk::gfp transgenic zebrafish
 - Human lung cancer cell model (H1299::RFP): cancer cell migration into other tissues at 4 days post transplantation (dpt)
 - Human stomach cancer cell model (AGS::RFP/GFP): cancer cell migration into tail veins at 4 dpt
 - Human glioma cell model (U87MG::RFP): tumor cell mass formation at 4 dpt
 - Murine melanoma cell model (B16-F10::RFP): tumor cell mass formation and neovascularization at 4 dpt
- 9 transgenic lines of UAS-oncogenes expressing F1 zebrafish

5. Application of zebrafish tumor xenograft models

- Functional analysis of genes that are concerned in cancer migration and metastasis via vessel using AGS::RFP/GFP model: Gal3, MMP1, Par1
- In vivo validation of anti-cancer drugs using U87MG::mRFP model: paclitaxol, cisplatin, gleevec, temozolomide, AMPK inhibitors, etc.

◆ Conclusion and achievement

- Establishment of research infrastructure for developing the zebrafish cancer models
- Isolation of tumor suppressor gene mutants and construction of transgenes harboring human oncogenes for production of genetic modified zebrafish cancer models
- Development of GAL4-UAS mediated transgenic zebrafish cancer models
- Development and application of tumor xenograft models using zebrafish

1. 연구의 최종목표

(1) 최종목표

- 제브라피쉬를 모델동물로 암 관련 유전자 기능 연구와 발암 신호 전달계 연구 및 표적 치료제 탐색을 위한 제브라피쉬 암 모델동물의 개발을 위하여
 - 제브라피쉬 사육 시설 구축과 유전자 미세주입 실험 기반 구축과
 - 제브라피쉬를 이용한 암 관련 유전자 기능 분석을 위한 연구 기반을 구축하고,
 - 암 모델동물 개발을 위한 유전자 변형 제브라피쉬의 제작에 필요한 고효율 형질전환 시스템 개발, 조직 특이적 프로모터의 동정, 표적 발암 유전자의 확보, 발암 억제 유전자 기능 이상 돌연변이체의 확보 등의 연구 기반을 구축하여
 - 발암 유전자 과잉발현 형질전환 제브라피쉬의 제작할 수 있는 연구기반을 구축하고자 함.

(2) 연구사업의 목표 및 범위

구분	목표	내용 및 범위
1차년도 (2008)	제브라피쉬를 이용한 발암 유전자 기능 연구과 암 모델 개발을 위한 연구 기반 구축	◆ 제브라피쉬 사육 시설 가동 및 유전자 미세 주입 실험 기반 구축
		◆ 발암 유전자의 조직 특이적 과잉발현을 위한 promoter 및 enhancer 영역의 분리 동정과 구조 분석 및 제브라피쉬 생체내에서 발현 분석
		◆ 형질전환 제브라피쉬 제작을 위한 기반 구축: GAL4-UAS system 및 Tol2 transposon system의 개발 및 확보
		◆ 발암 유전자 기능연구를 위한 연구 기반 구축: Transglutaminase2와 간암/위암 후보 유전자 기능 분석을 위한 연구 기반 확보
2차년도 (2009)	암모델동물 개발을 위한 유전자 변형 제브라피쉬 제작 기반 구축과 제브라피쉬를 이용한 tumor xenograft 모델의 개발과 응용	◆ 암 모델동물 개발을 위한 발암 억제 유전자 기능 이상 제브라피쉬 돌연변이체의 개발 및 확보
		◆ 표적 발암 유전자 발현형 형질전환 제브라피쉬의 제조
		◆ 제브라피쉬를 이용한 tumor xenograft 모델 개발과 응용

2. 연구의 내용 및 결과

2-1. 제브라피쉬를 모델동물로 한 암연구 시설 및 실험 기반 구축

- 제브라피쉬 사육 시설 가동: 성체 제브라피쉬 약 5,000 마리의 개체를 수용할 수 있는 자동화된 수조 시설 (3.5 L 수조 약 240 여개에 상당)을 국립 암센터 연구동 4층에 구축 (그림 1)
- 실험동물의 확보: 현재 약 3200 마리의 각종 제브라피쉬 성체 및 배아 사육하고 있음 (2009년 10월 1일 현재)
 - 야생형: 2 종 (AB, TL)
 - 돌연변이체 (Mutants): 9 종
 - Tumor suppressor genes: 2 종 (*TP53*, *Patched*)
 - Cell polarity genes: 3 종 (*Crumbles*, *Nok*, *Moe*)
 - Non identifications: 4 종 (Cell proliferation, etc)

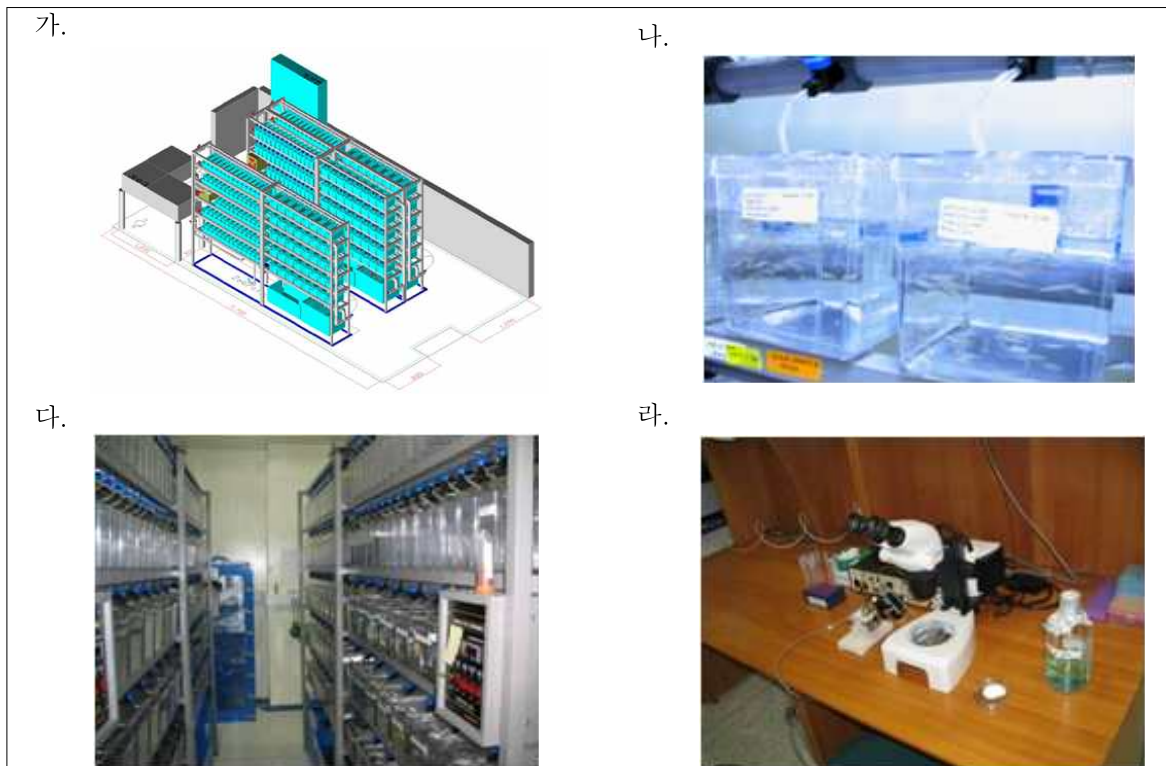


그림 1. 제브라피쉬 사육 시설 및 유전자 미세주입 기기

가. 제브라피쉬 사육 시설 조감도. 국립암센터 연구동 4층 위치, 나. 각종 돌연변이체, 다. 자동화된 수조시설, 라. 미세주입 실험기기.

- 형질전환체 (Transgenic Zebrafish): 약 40여종
 - [Flk-gfp (혈관), Atoh1a-gfp (소뇌 신경줄기세포), GFAP-gfp (신경줄기세포 및 Glia)]
 - GAL4-UAS transgenic: 24종
 - Cre-lox transgenic: 12종.

- 유전자 미세주입기, 실체현미경 및 형광현미경의 구비 및 운용 실시

2-2. 형질전환 제브라피쉬 제작을 위한 기반 구축

- GAL4-UAS system의 적용: 고효율 형질전환 제브라피쉬의 확립하기 위한 전략은 그림 2에서 보는 바와 같이 표적 발암유전자의 고효율 발현을 위해서 조직 특이적인 promoter에 강력한 전사활성인자인 GAL4를 유도하는 형질전환체와 GAL4 단백질에 의해 유도되는 UAS:oncogene 형질전환체의 교배를 통한 형질전환 제브라피쉬 모델의 완성 하고자 함.

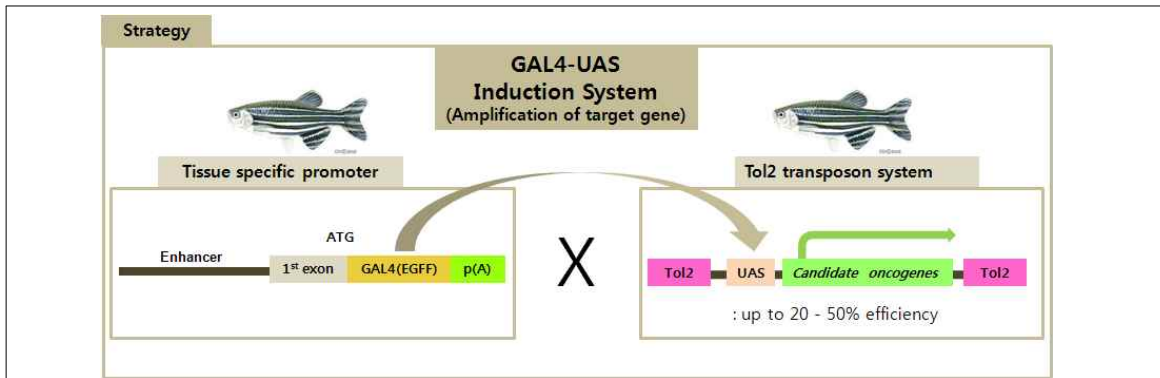
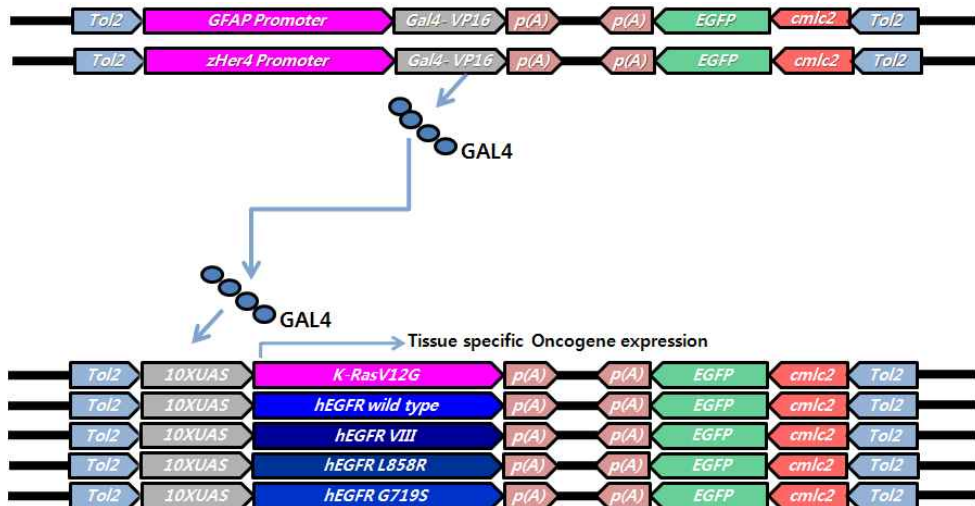


그림 2. 형질전환 제브라피쉬에서 표적 발암 유전자의 유도 발현 전략

- 또한 형질전환 효율을 높이기 위해서 Tol2-transposon system을 이용: 위의 각 형질전환 유전자에 Tol2 transposal element를 유전자 재조합 기법을 이용하여 형질전환체계를 확립하여 총 15개의 형질전환 유전자(transgenes)을 제작 하였음(그림 3.)
 - 신경교종모델을 위하여 제작한 형질전환 유전자 (7 종류): GFAP::GAL4VP16, zHer4::GAL4VP16, 10xUAS::KrasV12G, 10xUAS::hEGFRwt, 10xUAS::hEGFRvIII, 10xUAS::hEGFR-L858R, 10xUAS::G719S.
 - 수모세포종모델을 위하여 제작한 형질전환 유전자 (8 종류): Atoh1a::GAL4VP16, zNeuroD1::GAL4VP16, zNeuroD2::GAL4VP16, 10xUAS::Nmyc, 10xUAS::NmycT50A, 10xUAS::Akt, 10xUAS::zSmoA1, 10xUAS::zSmoA1-W514L.

가.



나.

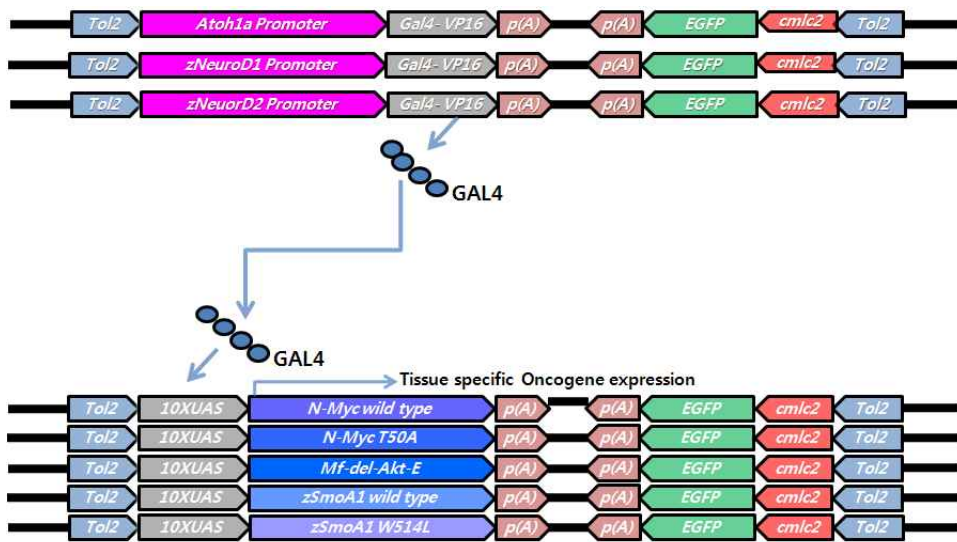
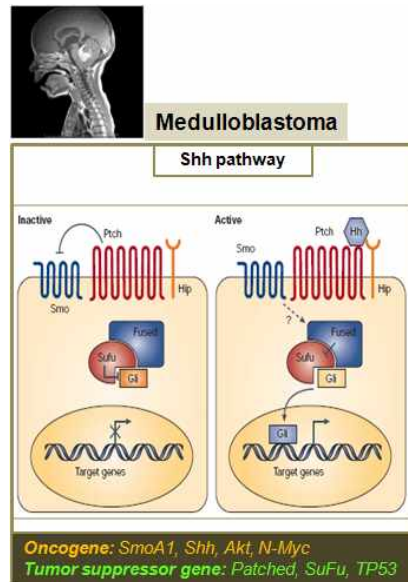
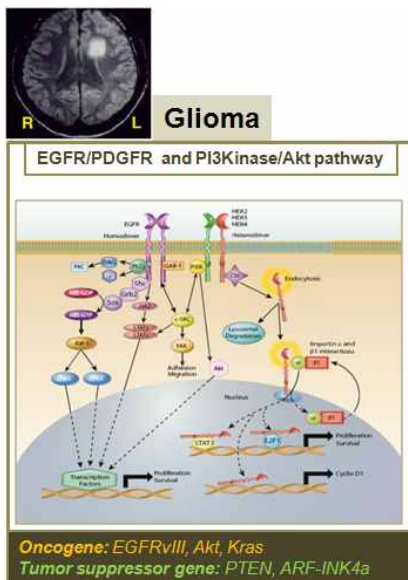


그림 3. Tol2-transposon system을 이용한 형질전환 유전자
 가. 신경교종 모델을 위하여 제작한 형질전환 유전자 (7 종류), 나. 수모세포종 모델을 위하여 제작
 한 형질전환 유전자 (8 종류)

- 제브라피쉬 뇌종양모델을 개발하기 위한 전략은 그림 4에서 보는 바와 같으며, 각각의 신경교종(glioma) 및 수모세포종(medulloblastoma)의 발암 과정에 중요한 신호전달계의 발암유전자(oncogenes)를 발암억제유전자(tumor suppressor genes)의 기능이 억제된 돌연변이체 유전적 배경(genetic background) 위에 과발현 시킴으로서 제작하고자 하였음.

가.



나



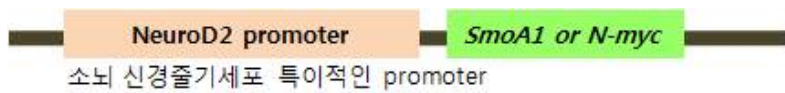
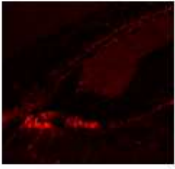
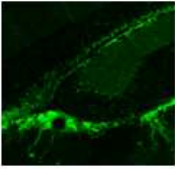


그림 4. 뇌종양 발생에 중요한 발암 신호전달계 모식도 및 형질전환 유전자 제작 전략
 가. 뇌종양에서 중요한 신호전달경로 및 발암 유전자 및 발암 억제 유전자, 나. 신경교종 및 수모세포
 종 암모델 형질전환 동물 제작을 위한 전략.

- 표적 발암유전자를 조직 특이적으로 과발현 시키기 위해 genomic DNA, BAC plasmid에서 신경줄기세포 특이적인 유전자의 promoter 및 enhancer 영역의 분리 동정하였음. (그림 5)
 -신경교종모델을 위한 유전자: GFAP (-3.2kb 5'-upstream of ATG + 3kb 1st intron), Her4 (-4.7kb 5'-upstream of ATG)
 -수모세포종모델을 위한 유전자: Atoh1a(약 160kb의 BAC plasmid), NeuroD1 (-5.1kb 5'-upstream of ATG), NeuroD2 (-4.9kb 5'-upstream of ATG)
- 분리 동정된 유전자의 promoter 및 enhancer 영역으로부터 GFP의 발현을 유도하는
 가.

Glioma			
유전자 확보 (Gene cloning)	GFAP(100%)	Her4(100%)	-BLBP (5.1 kb of 5'-upstream + 3kb 3'-downstream)
Promoter 확보 (Construction)	-3.2 kb of 5'-upstream + 3kb 1 st intron	-4.7 kb of 5'-upstream	-Nestin (2.2 kb of 5'-upstream + 1kb 2 nd intron)
Promoter 동정 (in-vivo analysis)	Specific (100%) 	Specific (100%) 	Non-specific

나.

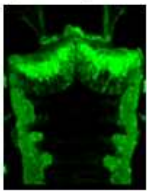
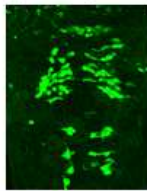
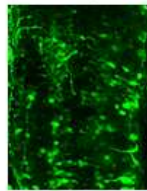
Medulloblastoma			
유전자 확보 (Gene cloning)	Atoh1a(100%)	NeuroD1(100%)	NeuroD2(100%)
Promoter 확보 (Construction)	BAC recombination	-5.1 kb of 5'-upstream	-4.9 kb of 5'-upstream
Promoter 동정 (in-vivo analysis)	Specific (100%) 	Specific (100%) 	Specific (100%) 

그림 5. 표적 발암유전자의 조직특이적 발현을 위한 promoter 및 enhancer 영역의 분리 동정 및 제브라피쉬 생체내에서의 발현 양상
 가. 신경교종 (glioma) 모델 제조를 위한 유전자의 promoter의 영역 및 제브라피쉬에서의 발현양상,
 나. 수모세포종 (medulloblastoma) 모델 제조를 위한 유전자의 promoter의 영역 및 제브라피쉬에서의 발현양상

Reporter 유전자(Promoter::GFP reporter)를 제작한 후, 제브라피쉬의 배아에 미세주입하여 조직 특이적인 GFP의 발현을 제브라피쉬 생체 내에서 현광현미경을 사용하여 육안으로 분석함.

(그림 4)

2-3. GAL4-UAS 형질전환 제브라피쉬 제작

- 각각의 transgenic constructs를 제브라피쉬의 배아에 미세 주입하여 성체 founder 제브라피쉬를 제조한 후 교배한 후, 실제 germ-line transmission 된 자손을 스크리닝하여 안정한 형질전환 제브라피쉬를 제조 현재 F1 세대의 암실험동물 라이브러리를 구축함 (그림6, 표 1)

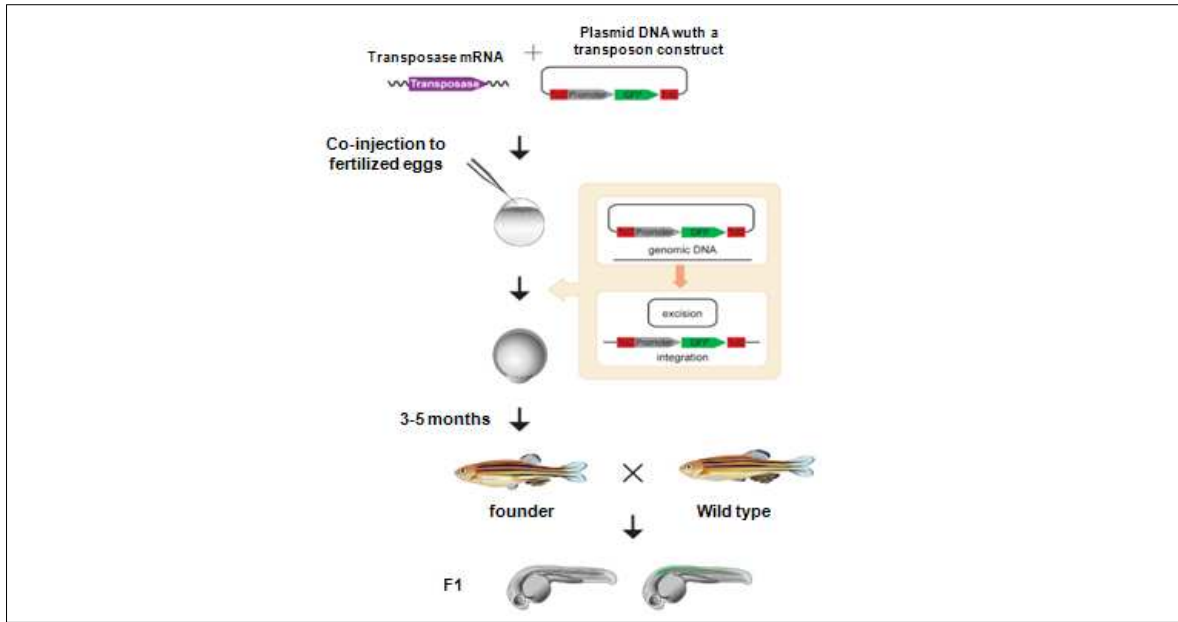


그림 6. Tol2 mediated transgenesis in zebrafish

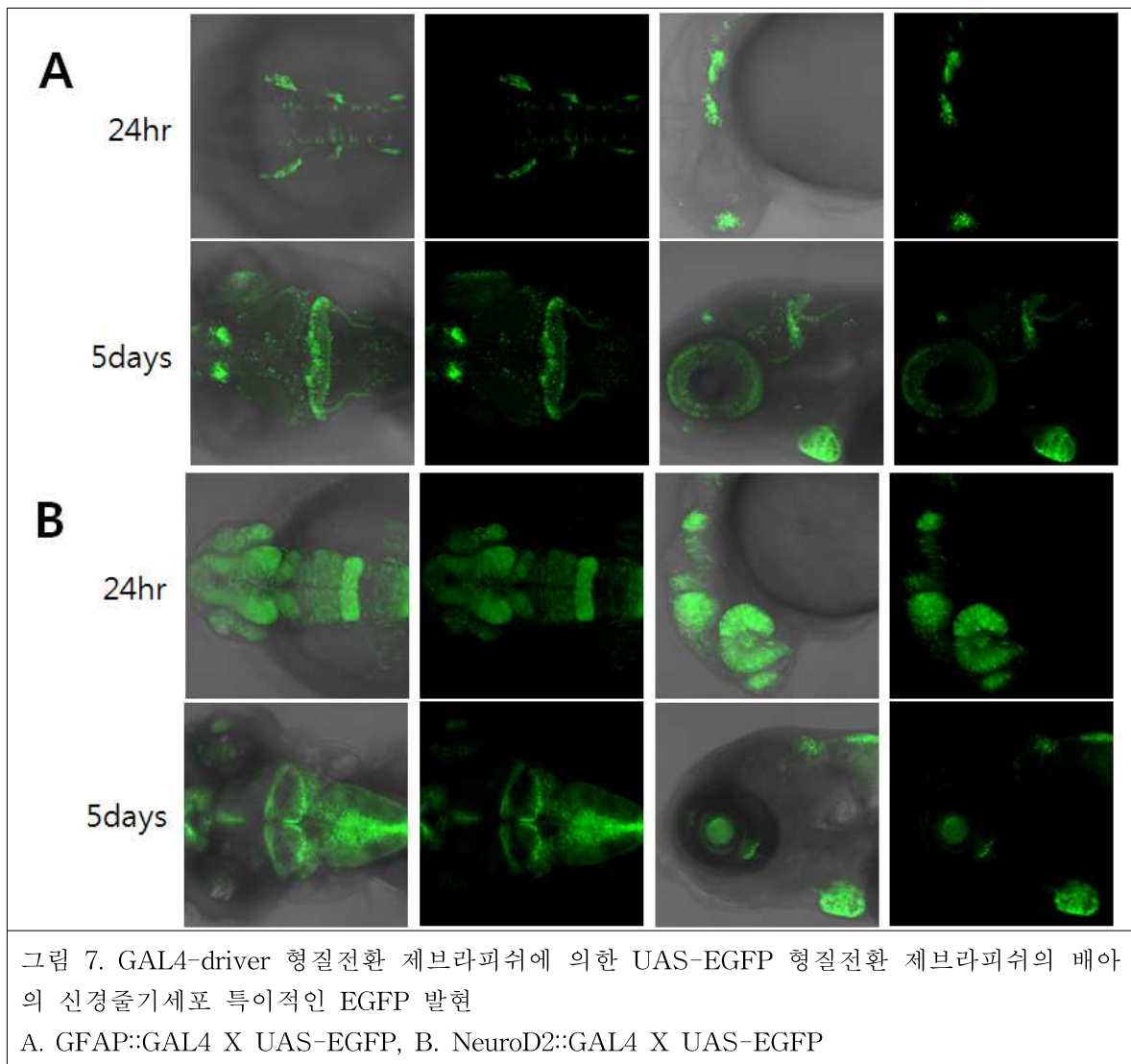
- 신경교종 관련 발암 유전자: 10XUAS::EGFRvIII, 10XUAS::Kras 등 총 9종 개발
- 수모세포종 관련 발암 유전자: 10XUAS::N-Myc, 10XUAS::SmoA1 등 총 4종 개발

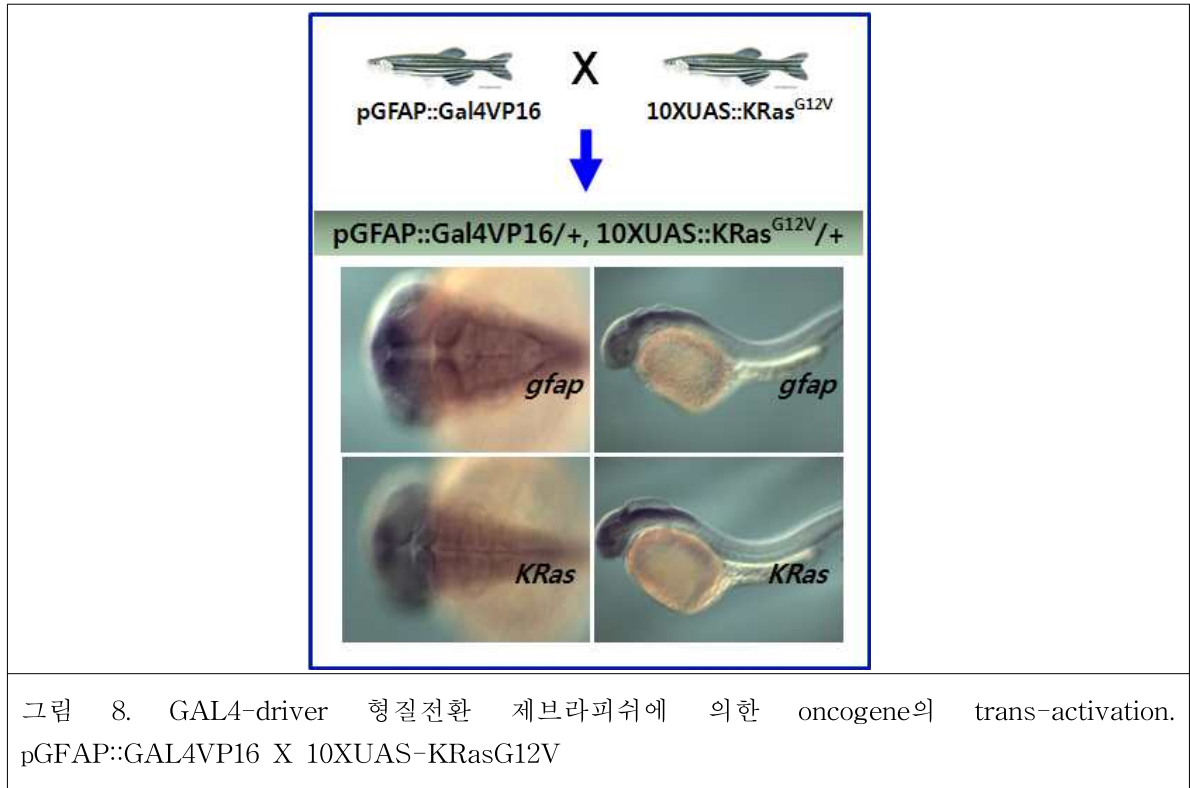
	Gal4-UAS construct	Generation
1	zGFAP-Gal4VP16	F1 Homozygous
2	zNeuroD1-Gal4VP16	F1 Homozygous
3	zHes5-Gal4VP16	Founder fish
4	10XUAS-HRas	F1 Homozygous
5	10XUAS-NRas	F1 Homozygous
6	10XUAS-KRasG12V	F1 Homozygous
7	10XUAS-NMyc	F1 Homozygous
8	10XUAS-NMycT50A	F1 Homozygous
9	10XUAS-Akt	F1 Homozygous
10	10XUAS-PI3KCA	Founder fish
11	10XUAS-zSmoA1	F1 Homozygous
12	10XUAS-zSmoA1W514L	F1
13	10XUAS-hEGFR	F1
14	10XUAS-hEGFR vIII	F1
15	10XUAS-hEGFR L858R	F1
16	10XUAS-hEGFR G719S	F1

표 1. Gal4-UAS Transgenic zebrafish in NCC

2-4. GAL4-UAS 시스템을 이용한 표적 발암유전자 발현형 형질전환 제브라피쉬의 제작

- 제작된 각각의 GAL4-driver 형질전환 제브라피쉬와 UAS-oncogenes 형질전환 제브라피쉬의 교배를 실시하여 표적 발암유전자 발현형 형질전환 제브라피쉬의 제작을 하였음.
- 먼저 GAL4-driver 형질전환 제브라피쉬의 신경 줄기세포 특이적 발현을 확인하기 위하여 UAS-EGFP 형질전환 제브라피쉬와 교배하여 EGFP의 발현을 확인함. 그 결과 신경교종 모델용 GFAP::GAL4를 발현하는 F2세대의 제브라피쉬와 수모세포종 모델용 NeuroD2::GAL4를 발현하는 F2세대의 제브라피쉬는 각각의 유전자의 발현을 조직 특이적으로 유도하는 promoter/enhancer 영역을 가지고 있고 UAS-형질전환 제브라피쉬의 교배에 의해 EGFP의 발현을 신경줄기세포 특이적으로 유도하는 것을 확인함 (그림 7).
- 또한 GAL4 및 UAS-oncogenes 형질전환 제브라피쉬의 교배에 의한 trans-induction 확인하기 위하여 교배에 의한 생산된 배아의 oncogene 특이적인 RNA probe를 제작하여 in-situ hybridization법을 이용하여 oncogene이 조직 특이적으로 유도되는 현상을 확인함(그림 8).





2-5. 암 모델동물 개발을 위한 발암억제유전자 기능이상 돌연변이체의 확보

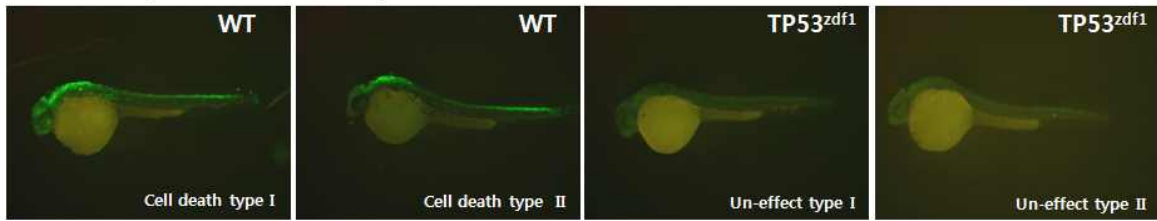
- 효율적인 암 모델동물의 개발을 위해서는 단순히 발암 유전자의 과발현만으로는 발암 유도가 충분하지 않을 가능성이 있어 발암 유전자 과잉발현형 형질전환 제브라피쉬의 발암 유도 효율을 극대화하기 위하여 발암억제유전자 (tumor suppressor genes)인 TP53, patched2의 돌연변이체를 확보함. (표 2)

표 2. 발암 억제 유전자 (tumor suppressor genes)의 돌연변이체	
발암 억제 유전자 돌연변이체	참고문헌
Tp53	(Berghmans et. al. PNAS, 102: 407-412, 2005)
Patched2 (Shh signal pathway)	(Koudijs et. al. PLoS Genetics, Aug;1(2):e19. Epub, 2005)

- 발암억제유전자의 돌연변이체의 기능 해석: TP53 돌연변이체의 gamma-irradiation에 의한 세포사 저항성 검사 및 TP53 antisense morpholino oligonucleotides 처리 제브라피쉬와의 기능 동등성 확인함 (그림 9).
- 또한 발암억제유전자의 돌연변이체와 형질전환체와의 교배를 통한 모델동물 개발기반 구축함.
: TP53 (10XUAS::K-ras G12V), patched2 (10XUAS::N-myc T50A)

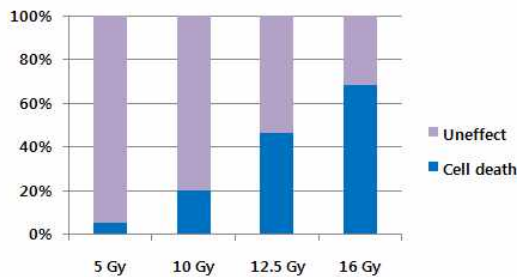
가.

TP53^{zdf1} γ-irradiation (16 Gy)



나.

TP53 ^{zdf1} γ-irradiation			
	Cell death	Uneffect	Total
5 Gy	2	36	38
10 Gy	7	28	35
12.5 Gy	20	23	43
16 Gy	28	13	41



다.

p53 MO microinjection and γ-irradiation			
	0.5ng	1.0ng	2.0ng
cell death	29	17	2
uneffect	7	14	31
Total	36	31	33

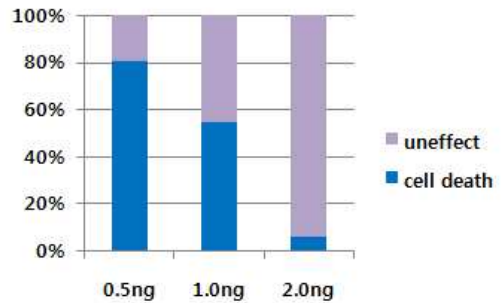


그림 9. GAL4-driver 형질전환 제브라피쉬에 의한 oncogene의 trans-activation. pGFAP::GAL4VP16 X 10XUAS-KRasG12V

2-6. 제브라피쉬를 이용한 tumor xenograft 모델 개발

- 제브라피쉬 생체 내에서 주입된 암세포의 성장, 증식, 이동을 실시간으로 관찰하기 위하여 인간 및 포유류 암세포주에 mRFP/pcDNA3.1 유전자를 transfection하여 G418 selection 과정을 거쳐 형광단백질을 발현하는 stable cell lines를 확립함.
 - 인간 폐암 세포주: H1299::mRFP의 확립 (암실험자원연구과 홍경만박사와의 공동연구)
 - 마우스 melanoma: B16-F10::mRFP의 제작
 - 인간 위암 세포주: AGS::GFP-LacZ의 제작 (위암연구과 전경희박사와의 공동연구)
 - 인간 뇌암 세포주: U87MG::mRFP의 제작 (특수암연구과 박종배박사와의 공동연구)
- 형광단백질을 발현하는 각각의 암세포주를 제브라피쉬의 수정후 24시간 후의 배아의 난황 부위에 세포수 약 100에서 200 여개를 미세주입 후 1 주일에서 10일 동안 형광현미경을 사용하여 암세포의 증식, 이동 등을 관찰 하였음 (그림 10)

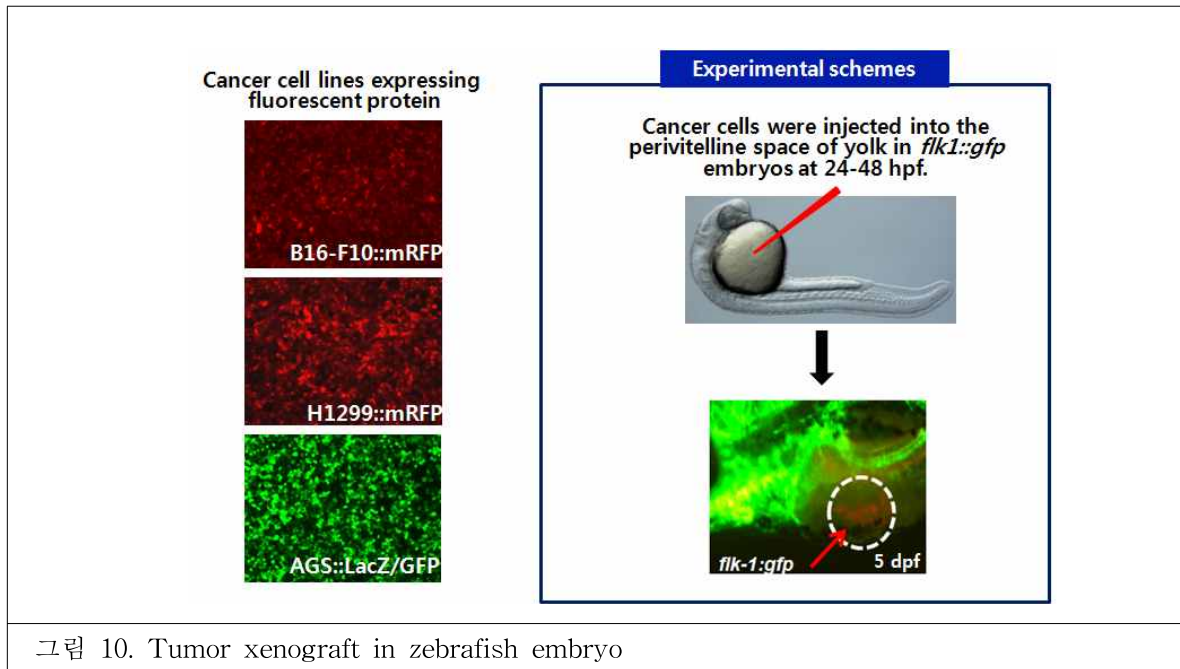


그림 10. Tumor xenograft in zebrafish embryo

- H1299 (human lung cancer cell line)::RFP/ *Flk::gfp* Models: 복강에 이종이식한 인간 폐암세포가 tail vein 및 혈관, 눈 등으로 이동함. 제브라피쉬를 이용한 cancer cell migration, invasion model를 확립(그림 11).

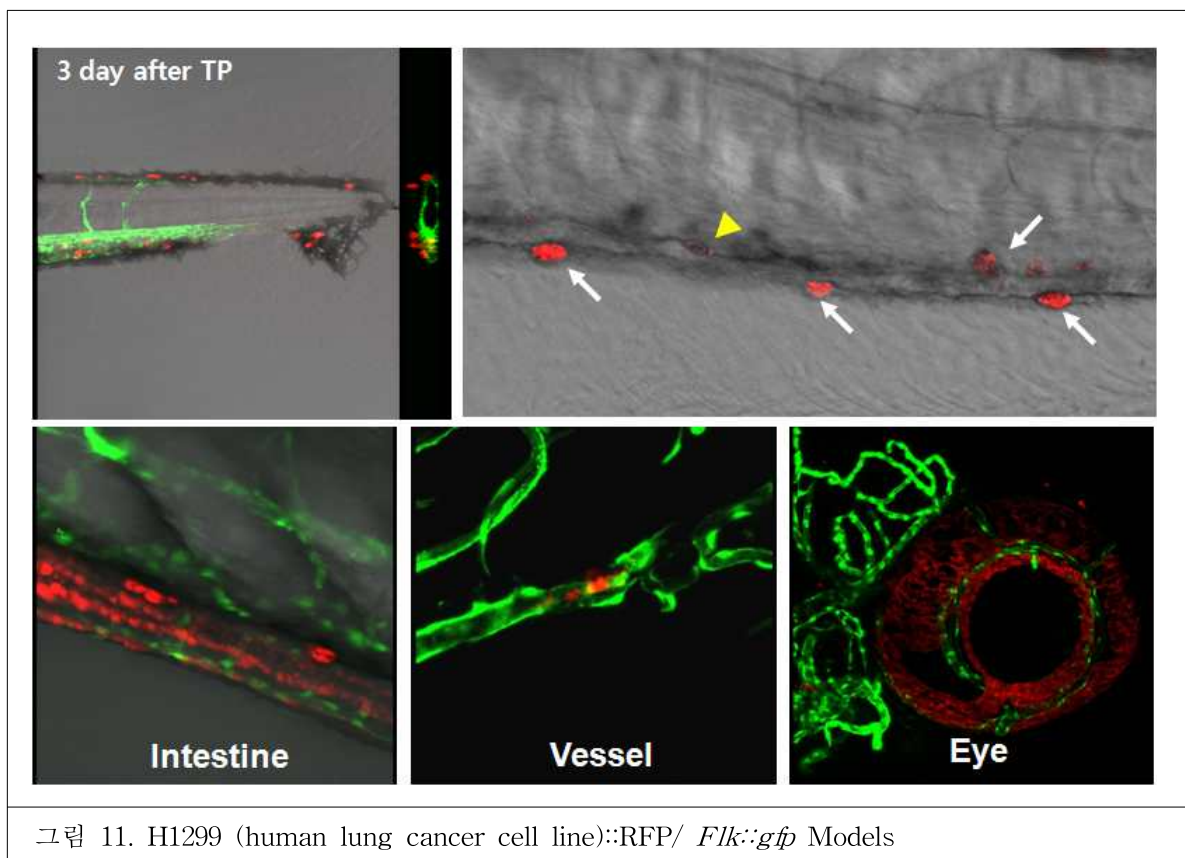
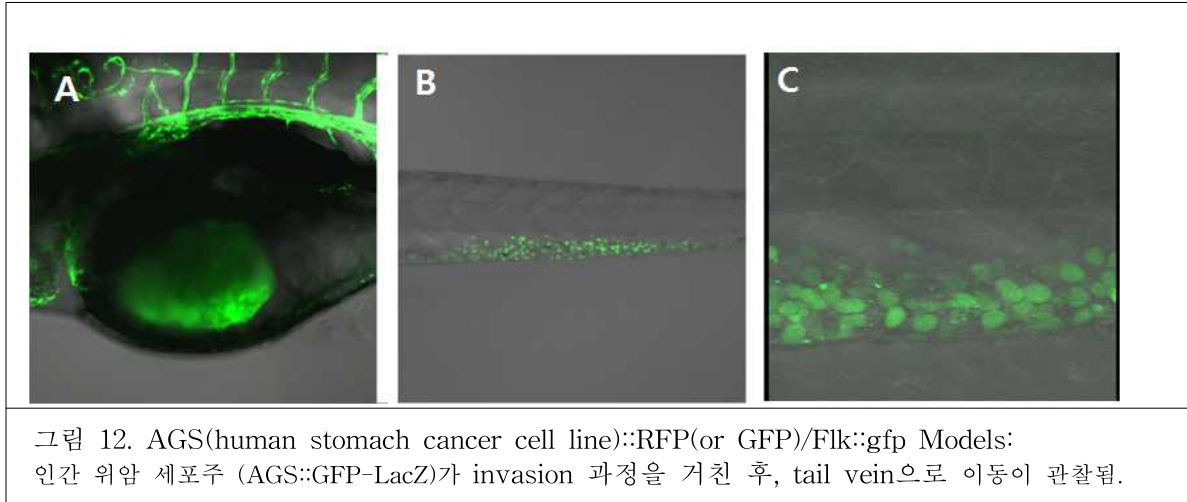
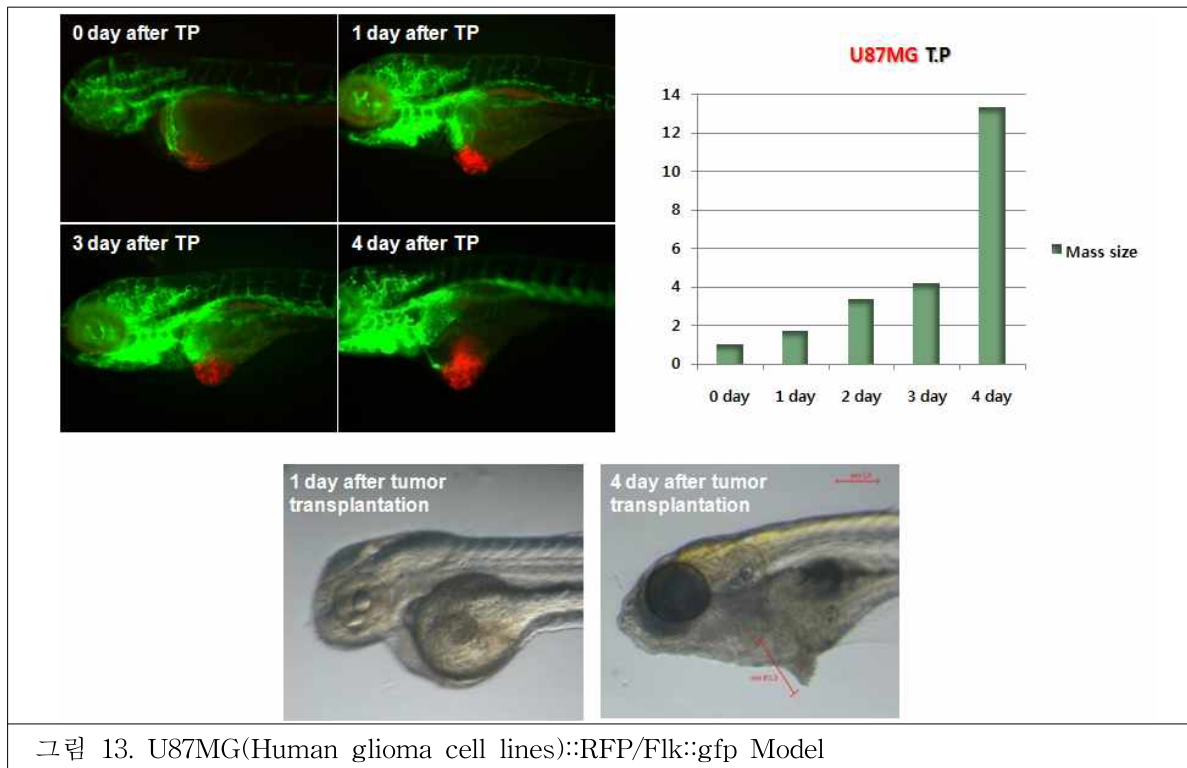


그림 11. H1299 (human lung cancer cell line)::RFP/ *Flk::gfp* Models

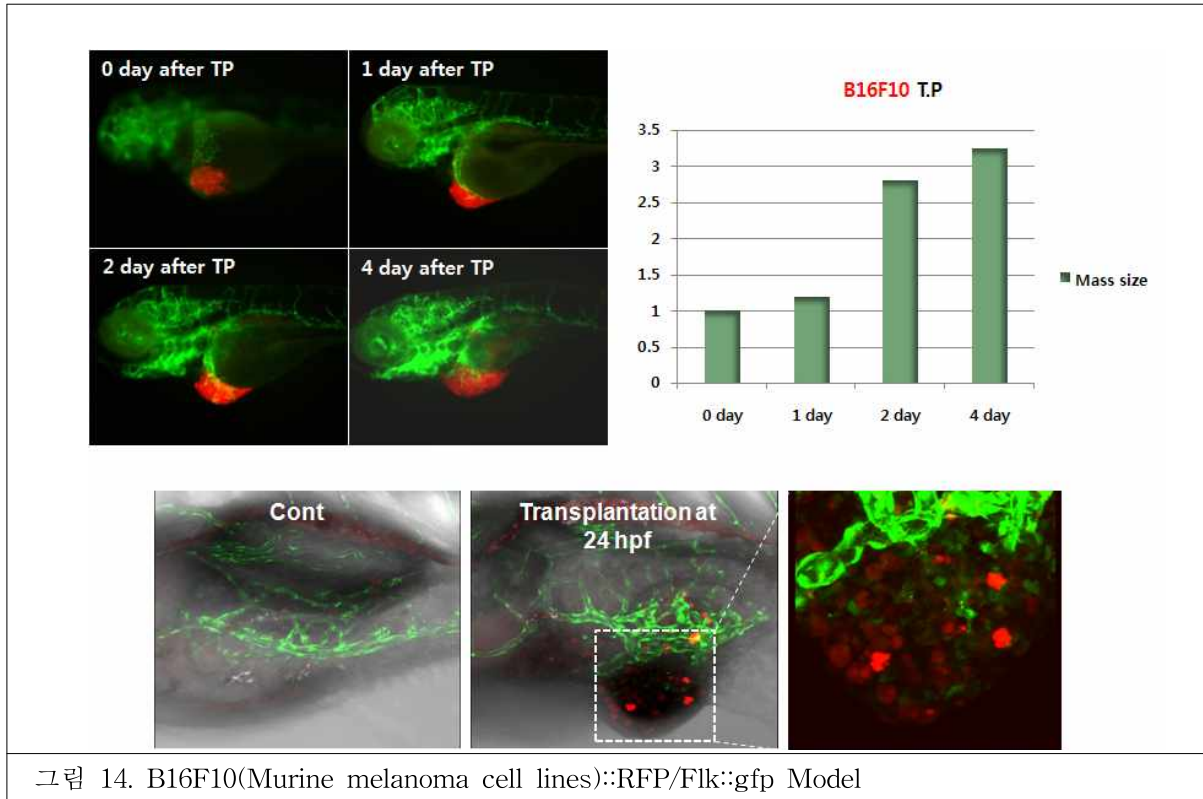
- **AGS(human stomach cancer cell line)::RFP(or GFP)/Flk::gfp Models:** 복강에 이종이식한 인간위암세포가 invasion 과정을 거친 후, tail vein으로 이동하는 모델을 확립. 국립암센터 전경희 박사팀과의 공동연구로 세계 최초로 위암세포의 동물모델을 개발함 (그림 12).



- **U87MG(Human glioma cell lines)::RFP/Flk::gfp Models:** 복강에 이종이식한 인간뇌암세포가 제브라피쉬의 복강내에서 증식하여 tumor mass를 형성하는 모델을 확립(그림 13).



- **B16F10(Murine melanoma cell lines)::RFP/Flk::gfp Model:** 복강에 이종이식한 마우스 melanoma가 제브라피쉬의 복강내에서 증식하여 tumor mass를 형성하고 또한 제브라피쉬의 혈관을 유도(neovascularization)하는 모델을 확립 (그림 14).



2-7. 제브라피쉬를 이용한 tumor xenograft 모델 응용

- 개발된 인간 위암 세포주(AGS::mRFP) 모델을 이용하여 암세포 혈관 이동에 관여하는 유전자 기능 검사를 시도하였음. 암세포의 전이 및 이동에 관여하는 유전자인 galectin3, MMP1, Par1 등의 기능을 siRNA로 억제한 위암 세포주는 제브라피쉬 배아에 이식후 꼬리 혈관으로의 이동이 거의 검출되지 않아 위의 유전자들이 위암세포의 전이 및 이동에 관여하는 유전자임을 모델 동물을 이용하여 in vivo validation 하였음 (그림 15).
- 시판중인 paclitaxol, cisplatin, gleevec, temozolomide, AMPK inhibitors와 같은 항암제를 in vitro cell culture 실험을 통하여 세포사에 이르는 농도를 결정하고, 인간 뇌암 세포주 (U87MG::mRFP)를 Flk::gfp 형질전환 제브라피쉬에 이식한 동물모델을 사용하여 항암제에 대한 감수성을 시험하였음. 그 결과 gleevec 및 AMPK inhibitors 등이 제브라피쉬 배아에 대하여 특별한 독성없이 이식한 암세포에 대해 성장억제 효과를 보인다는 것을 in vivo 실험을 통하여 증명하였음.

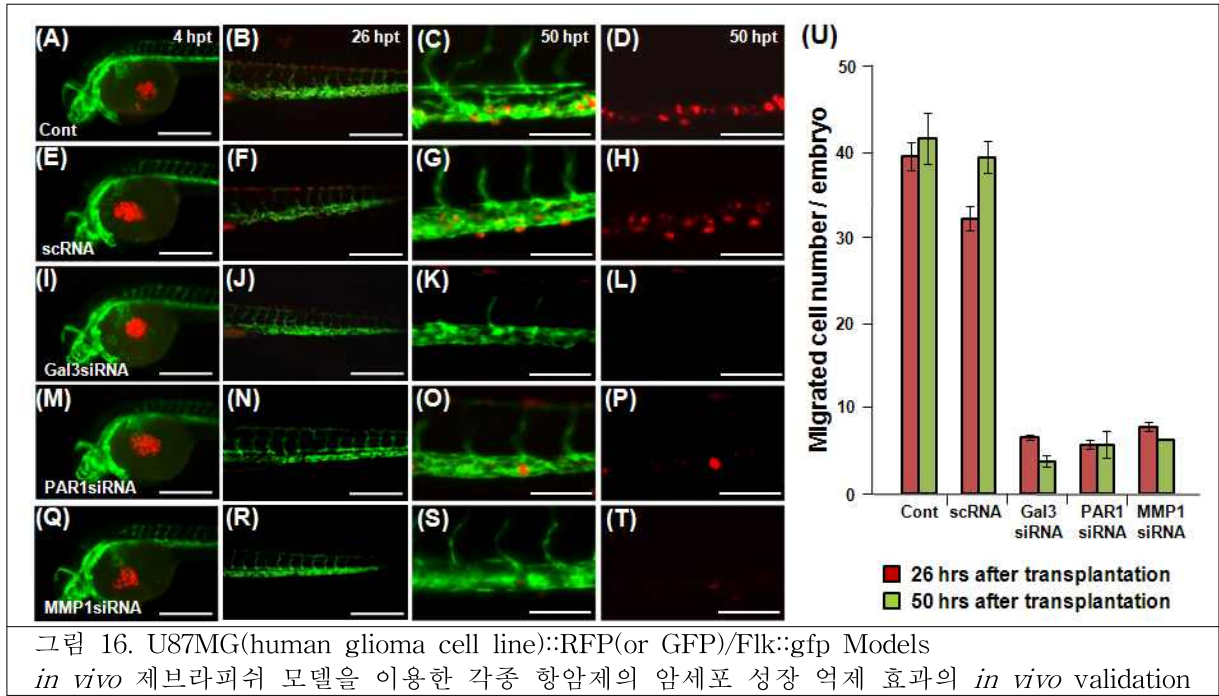


그림 16. U87MG(human glioma cell line)::RFP(or GFP)/Flk::gfp Models *in vivo* 제브라피쉬 모델을 이용한 각종 항암제의 암세포 성장 억제 효과의 *in vivo* validation

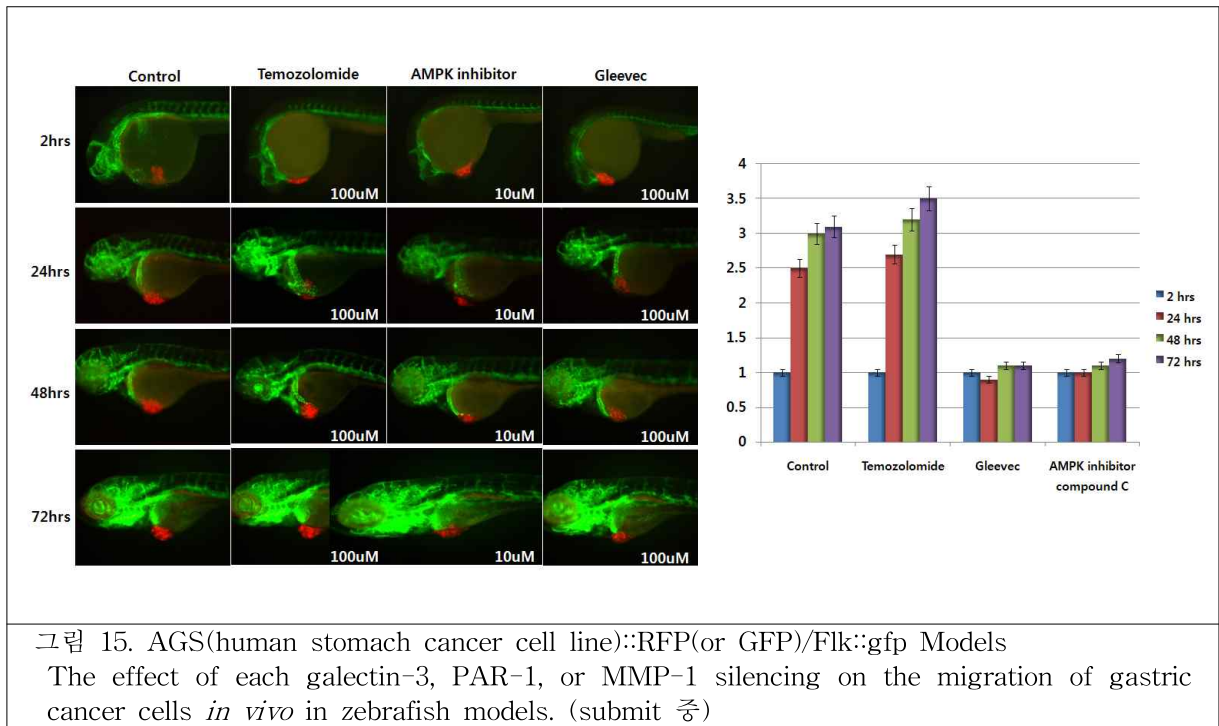
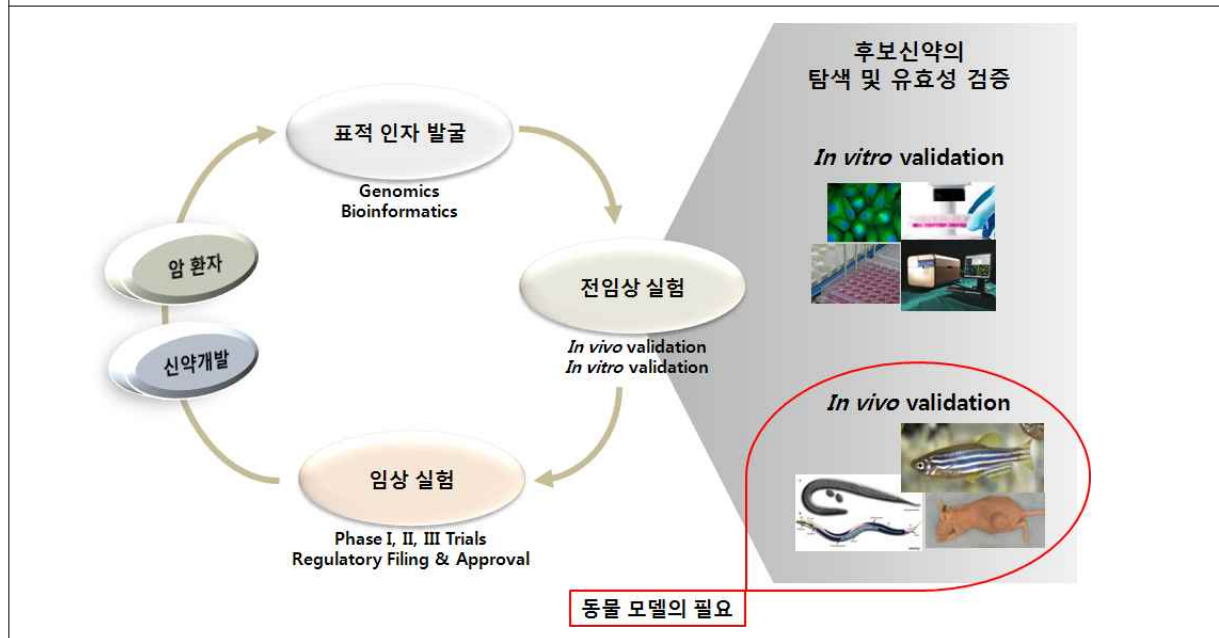


그림 15. AGS(human stomach cancer cell line)::RFP(or GFP)/Flk::gfp Models The effect of each galectin-3, PAR-1, or MMP-1 silencing on the migration of gastric cancer cells *in vivo* in zebrafish models. (submit 중)

3. 연구결과 고찰 및 결론

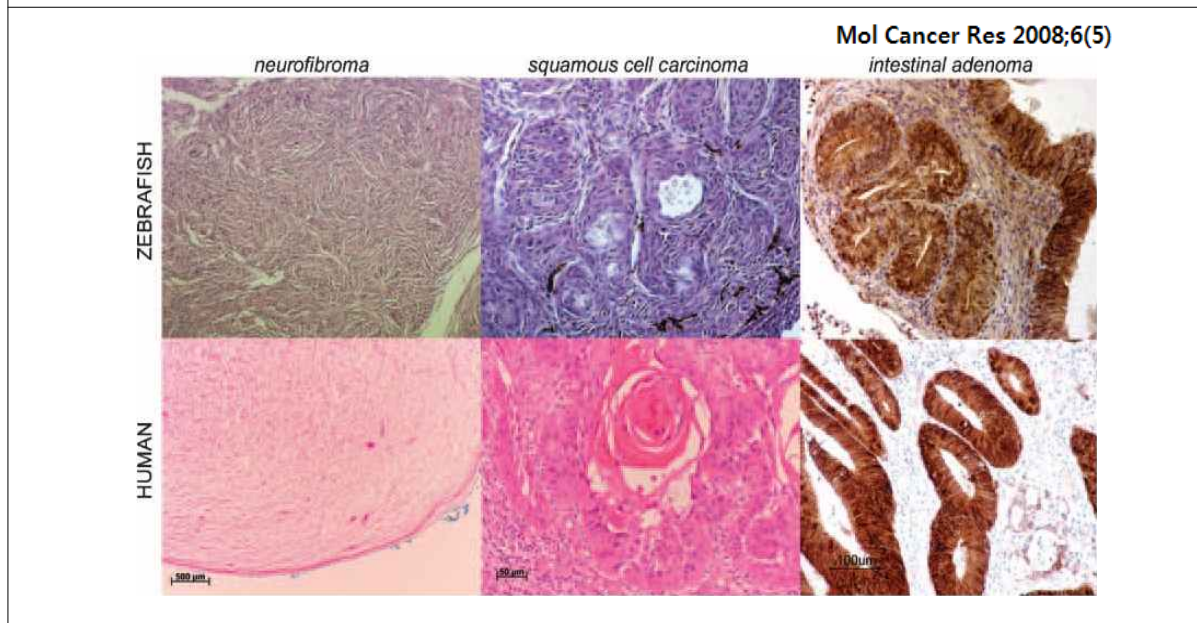
3-1. 암연구를 위한 새로운 동물모델의 필요성

그림 16. 암연구에서 동물모델의 필요성



- 기존의 암 연구는 주로 시험관 (*in vitro*)에서 암 세포 배양 등을 통하거나 환자로부터 얻은 암 조직을 이용하여 수행되어 왔으나, 보다 높은 수준의 유전학적 연구 및 특히 개체 수준에서의 연구를 위해서는 유전자 조작등이 가능하고 어느정도 윤리적 문제에서 자유로운 동물모델이 필요함.
- 그림 16에서 제시한 바와 같이 전체 암 치료 사이클에서 동물 모델이 차지하는 부분은 발암 표적인자 발굴과 항암 후보신약의 탐색과 그 유효성 검토를 위한 전임상 실험이고, 그 중 특히 효과적인 분자종양학적 기전연구 및 후보신약의 효능 검증 등에 있어 동물모델의 중요성이 증가하고 있음.
- 특정한 암의 발병기전이나 암세포 표지 인자를 표적으로 하는 분자 표적 치료제를 천연물 또는 인공합성 후보 물질로부터 선별 도출하는데 있어, 현재까지는 세포 수준에서 스크리닝을 실행하고 있으나, 실제 발굴된 선도물질을 동물모델로 적용하였을 때 정상적인 세포에 대하여도 유전적, 세포적 독성 문제가 불거지는 경우가 많음.
- 그러나 개체 수준의 발암 모델 동물은 정상세포에는 별다른 영향 없이 암세포에만 표적 치료가 가능한 후보 물질을 일거에 스크리닝할 수 있어 이러한 문제점을 일거에 해결할 수 있고, 특히 한정된 시간 내에 수많은 후보 물질로부터 대량 스크리닝을 위해서는 발암 모델 동물의 개체 수가 대량으로 확보되어야 하고, 그 유지 및 스크리닝 비용이 경제적이어야 함. 이러한 모든 조건을 충족시키는 동물 모델은 현재 유전자의 기능 해석 뿐만 아니라 각종 질환 모델 동물로서 각광받고 있는 제브라피쉬 (zebrafish, *Danio rerio*)가 유일함.

그림 17. 제브라피쉬에서 유발된 암 조직은 인간 암조직과 조직학적으로 매우 유사



3-2. 질환모델동물로서의 제브라피쉬의 유용성 및 암모델동물로의 응용

- 제브라피쉬 (Zebrafish, *Danio rerio*)는 최근 세계적으로 척추동물의 발생 연구 및 사람의 질환 연구에 탁월한 장점을 가지고 있는 중요한 모델 동물로 특히 조직특이적으로 형광을 발현하는 transgenic fish를 이용하면 특정 세포의 이동이나 증식 사멸 분화 과정을 생체 내에서 살아있는 상태에서 관찰할 수 있음. 또한 제브라피쉬는 25개의 염색체를 가지고 있으므로, 인체의 유전자와 크기와 수가 비슷하며 유전자 및 단백질간의 상동성이 매우 높고, 또한 신경계 뿐 아니라 각종 기관형성 과정이 사람과 매우 유사하기에 제브라피쉬의 연구를 통하여 얻어진 결과들은 바로 인간의 건강과 질병 연구에 중요한 자료로 활용될 수 있음.
- 특히 제브라피쉬는 인체의 질병모델 뿐 아니라 밑의 그림에서 보는바와 같이 암이 유발되는 경로 및 암의 조직학적 구조가 사람과 유사하며(그림 17), 각종 암 유발 관련 유전자들의 발암 기전이 사람과 거의 동일한 것으로 확인되어 최근 많은 연구자들에 의하여 암동물모델로서 암 연구에 활용되고 있음(그림 19). 또한 제브라피쉬는 각종 carcinogen에 대한 반응성이 일반적인 암세포주와 비슷하며, 특히 발생후 약 5-7일째까지는 96 well plate에서 배양이 가능하므로 질환모델로 확립한 제브라피쉬를 사용하여 대단위 신약 탐색이 가능함(그림 18).

그림 18. 제브라피쉬의 carcinogen에 대한 반응성 및 96 well plate상의 배양 예

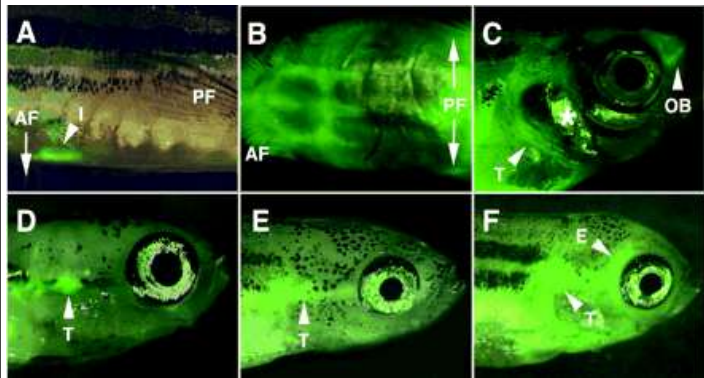


그림 19. 제브라피쉬를 이용한 발암 모델 동물

Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish

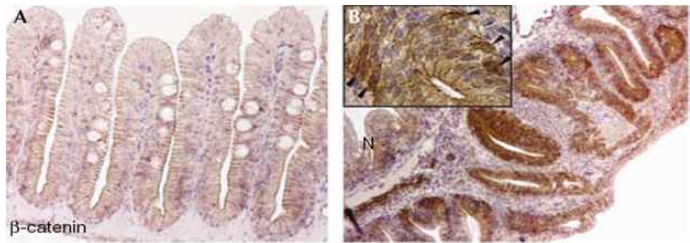
(Langenau et. al. *Science* 299: 887-890, 2003)

제브라피쉬에서 thymus 특이적 promoter에 의한 발암유전자 발현을 통한 T cell leukemia 발생, 형광단백질의 동시 발현에 의해 살아 있는 개체 내에서 암 형성 및 전이를 쉽게 관찰



Adenomatous polyposis coli-deficient zebrafish as colorectal cancer model

(Haramis et. al. *EMBO Rep* 7: 444-449, 2006)



Fish model for melanoma

(Patton et. al. *Curr Biol* 15: 249-254, 2005)

p53 유전자에 돌연변이가 일어난 제브라피쉬에 human BRAF 유전자를 이상 발현시킨 형질전환 모델

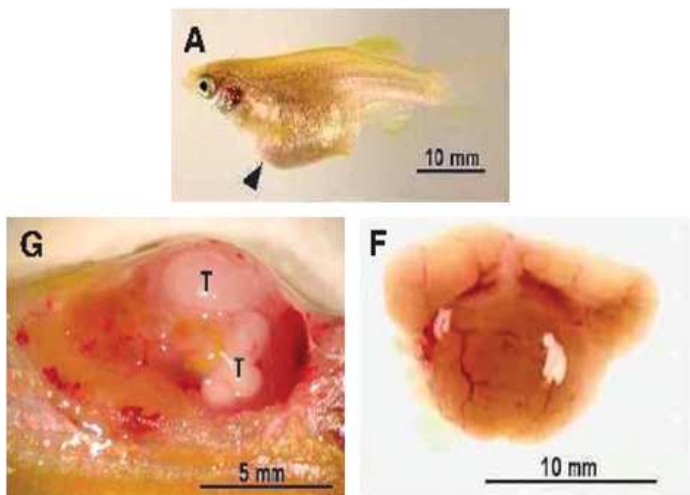


Transplantable tumor lines in clonal zebrafish

(Mizgireuv et. al. *Cancer res* 66: 3120-3125, 2006)

F: Hepatoma

G: Pancreas acinar cell carcinoma



3-3. 유전자 조작 제브라피쉬 암모델동물 개발

- 최근 많은 연구자들에 의해서 뇌종양 조직 및 확립된 암세포주로부터 종양 유발 관련 유전자들의 돌연변이에 의한 종양유전자의 활성화, 세포 신호전달체계의 이상 등에 의한 분자 종양학적 기전이 각각의 종양 종류에 따라 특이적인 것이 밝혀지고 있음.(표 3)
- 현재까지 뇌암 및 뇌전이암 동물 모델에 관한 연구는 전 세계적으로 매우 활발하게 진행되고 있고, 그 대부분은 생쥐모델임 (표 4). 뇌암 동물모델 개발 방법은 유전적으로 발암유전자를 신경줄기세포에 과잉발현 시키거나, 발암억제유전자가 유전자적중방법을 사용하여 기능을 억제하는 것으로 거의 대부분의 모델의 경우 특정 뇌암 발생 과정에 관한 것으로 암전이 현상을 특정한 모델은 거의 찾아보기 힘들.
- 제브라피쉬는 개체 수준의 표적 치료제 개발을 위한 발암 모델 동물로 각광받고 있고, 특히 제브라피쉬를 모델동물로 뇌암 발생모델은 개발성공사례가 세계적으로도 거의 전무한 실정으로 국제적으로 통용될 수 있는 원천 기술의 확보를 위해서도 국내 개발의 필요성이 시급하여 본 연구과제를 통해 그 연구 기반 구축 사업을 시도하였음.

표 3. 뇌종양 유발 관련 대표적인 표지 인자		
	발암 유전자 (Oncogene)	발암 억제 유전자 (Tumor suppressor gene)
신경교종 (Glioblastoma)	EGF receptor: EGFRvIII (Wong et. al. <i>PNAS</i> 89: 2965-2969, 1992)	PTEN (Li DM, Sun H. <i>PNAS</i> 95: 15406-15411, 1998)
	Kras (Holland et. al. <i>Nature Genetics</i> 25: 55-57, 2000)	p16INK4a/CDKN2A (Arap et. al. <i>Oncogene</i> 14: 603-609, 1997)
	Akt (Holland et. al. <i>Nature Genetics</i> 25: 55-57, 2000)	p53 (van Meyel et. al. <i>JNCI</i> 86: 1011-1017, 1994)
수모세포종 (Medulloblastoma)	SmoA1 (Shh signaling) (Hallahan et. al. <i>Cancer Res</i> 64: 7794-7800, 2004)	Patched (Vorechovsky et. al. <i>Oncogene</i> 15: 361-366, 1997)
	N-Myc (Browd et. al. <i>Cancer Res</i> 66: 2666-2672, 2006)	SuFu (Shh signaling) (Taylor et. al. <i>Nature Genetics</i> 31: 306-310, 2002)
	Kras (Thomas et. al. <i>Nature Genetics</i> 39: 347-351, 2007)	Axin1 (Wnt signaling) (Dahmen et. al. <i>Cancer Res</i> 61: 7039-7043, 2001)

- 유전자조작 동물모델은 기본적으로 발암억제 유전자 기능이상 돌연변이체에 발암유전자 형질 전환 유전자를 신경줄기세포 (neural stem cell) 특이적으로 발현하는 형질전환체의 제브라피쉬를 교배하는 전략을 토대로 구상함 (그림 20, 21)

표 4. 대표적인 뇌종양 관련 동물모델 (*Genes Dev.* 2007 21: 2683-2710)

	Tumor classification	Genetic pathway/method	Promoter	Study
Transgenic and knockout GEMs	Low-grade astrocytoma	<i>Ras/tg</i> <i>Src/tg</i>	GFAP GFAP	Ding et al. 2001 Weissenberger et al. 1997
	Anaplastic astrocytoma	<i>Nf1 + p53/ko</i> <i>floxNf1 + p53/ko</i> <i>Ras/tg</i> <i>Nf1 + p53/ko</i> <i>Src/tg</i>	— GFAP-Cre GFAP — GFAP	Reilly et al. 2000 Zhu et al. 2005 Ding et al. 2001 Reilly et al. 2000 Weissenberger et al. 1997
	Glioblastoma	<i>Rb/SV40 lg T PTEN/ko</i> <i>floxNf1 + p53/ko</i> <i>Nf1 + p53/ko</i> <i>floxNf1 + p53/ko</i> <i>FIG-ROS + Ink4aArf ko</i> <i>Arf/ko</i>	GFAP GFAP-Cre — GFAP-Cre Ad-Cre —	Xiao et al. 2002 Zhu et al. 2005 Reilly et al. 2000 Zhu et al. 2005 Charest et al. 2006 Kamijo et al. 1999
	Low-grade oligodendrogloma	<i>v-erbB/tg</i> <i>Ras + EGFRvIII/tg</i> <i>v-erbB/tg + Ink4a/Arf ko</i>	S100β GFAP S100β	Weiss et al. 2003 Ding et al. 2003 Weiss et al. 2003
	High-grade oligodendrogloma			
RCAS virus	Glioblastoma	<i>Ras + Akt</i> <i>Ink4aArf ko + Ras RCAS</i> <i>PDGFB</i>	Nestin GFAP/Nestin Nestin	Holland et al. 2000 Uhrbom et al. 2002 Dai et al. 2001
	Low-grade oligodendrogloma	<i>Ink4a, Arf, Ink4aArf ko + PDGFB RCAS</i>	GFAP/Nestin	Tchougounova et al. 2007
	Anaplastic oligodendrogloma	<i>Ink4aArf ko + PDGFB RCAS</i>	Nestin	Dai et al. 2001
	Mixed oligoastrocytoma Glioblastoma	<i>Ink4a, Arf, Ink4aArf ko + PDGFB RCAS</i> <i>Tet-off KRAS + Akt</i>	GFAP Nestin	Tchougounova et al. 2007 Dai et al. 2001 Holmen and Williams 2005
Retroviral	Glioblastoma	PDGFB	Mixed	Uhrbom et al. 1998
Astrocyte and NSC transgenesis	High-grade gliomas	<i>Inka/Arf ko/EGFRvIII retrovirus</i>	GFAP and Nestin	Bachoo et al. 2002
NHA transformation	Anaplastic astrocytoma	<i>hTERT, H-ras, HPV E6 and E7</i>	—	Sonoda et al. 2001
	Anaplastic astrocytoma-glioblastoma	<i>hTERT, H-ras, SV40 T/t-Ag</i>	—	Rich et al. 2001

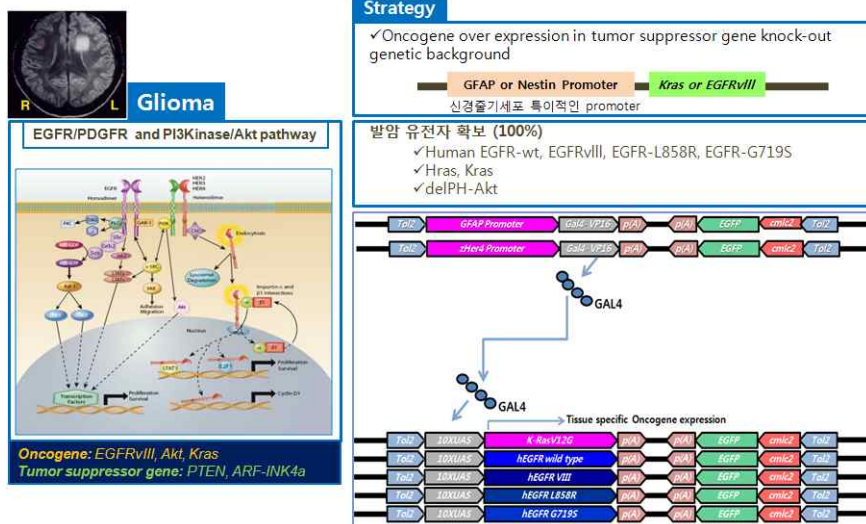


그림 20. Strategy for development of zebrafish glioma model

○ 고효율 형질전환 제브라피쉬의 확립 전략은 각각의 transgenic constructs를 제브라피쉬의 배아에 미세 주입하여 성체 founder 제브라피쉬를 제조한 후 교배한 후, 실제 germ-line transmission이 된 자손을 스크리닝하여 안정한 형질전환 제브라피쉬를 제조 확립하고, 표적 발암 유전자의 고효율 발현을 위해서 강력한 전사 활성 인자인 GAL4의 transcriptional activator domain에 형광단백질을 융합한 GAL4-UAS system을 적용하였음 (Scheer et. al. Mech Dev 80: 153-158, 1999). 또한 형질전환 효율을 높이기 위해서 Tol2-transposon system을 이용하였음 (Kawakami et. al. Dev Cell 7: 133-144, 2004).

○ 신경줄기세포 (neural stem cell) 특이적으로 발현하는 형질전환체의 제브라피쉬를 제작하기 위해서 선행연구에서 GFAP 및 Hes5의 전자의 발현조절영역 (Promoter/enhancer)을 포함한 형질전환체를 개발하였고, 각종 oncogene의 유도 발현형 형질전환 제브라피쉬를 제작하여, 조직 특이적으로 GAL4를 발현 가능한 Driver 형질전환 제브라피쉬만 바꾸면, 어떠한 형태의 암모델 제브라피쉬도 제작 가능한 다중교배 암모델동물 라이브러리를 구축함.

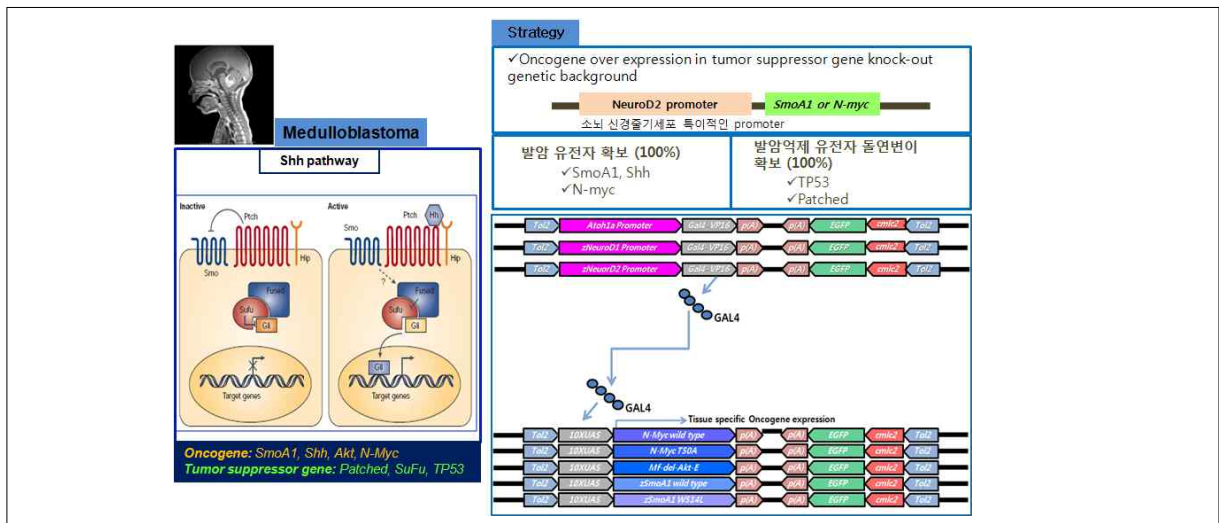


그림 21. Strategy for development of zebrafish medulloblastoma model

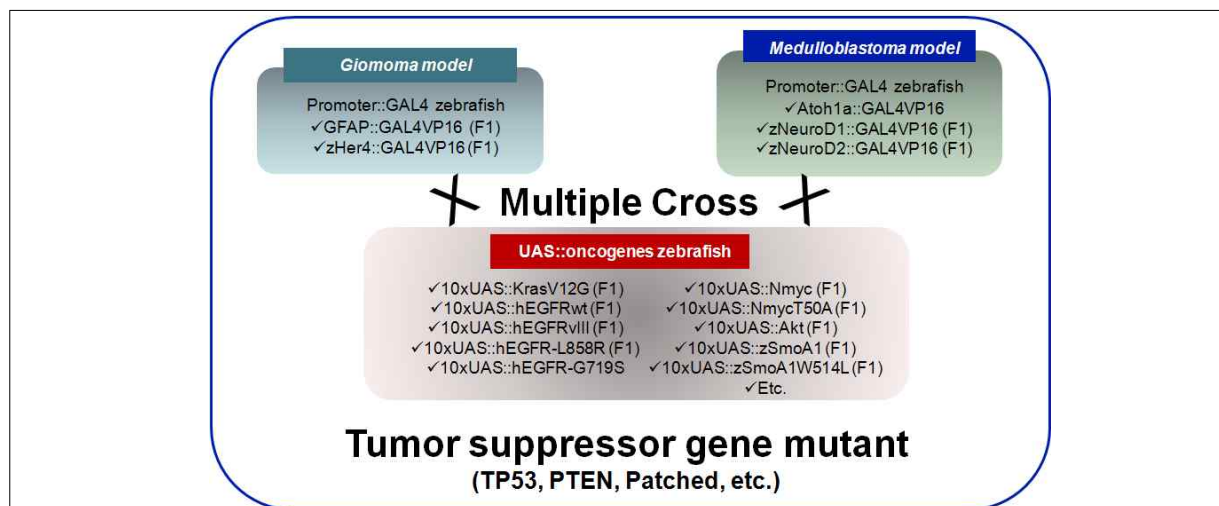


그림 22. Multiple cross of trans-oncogenic zebrafish in tumor suppressor gene mutation backgrounds

3-4. 암세포의 성장 및 이동의 분자기전 및 그 억제법을 연구하기 위한 제브라피쉬 이종이식 암모델 (zebrafish xenograft cancer model)의 개발

- 최근 많은 연구자들에 의해서 제브라피쉬를 이용하여 암세포 이종이식을 시도, 전임상모델로서의 가능성을 연구하고 있음 (표 5)

표 5. 제브라피쉬 이종이식 암모델 현황

이종이식 암모델	참고문헌
Tumorigenic FGF2-overexpressing MAE (murine aortic endothelial) model	Cancer Research 67: 2927-2931 (2007)
Human metastatic melanoma (WM-266-4) model	Angiogenesis 9: 139-151 (2006)
Transplantable Tumor Lines Generated in Clonal Zebrafish	Cancer Research 66: 3120-3125 (2006)
1. Human endometrial adenocarcinoma Tet-FGF2 cells 2. Murine melanoma B16-BL16 cells	Nature Protocols 2: 2918 - 2923 (2007)
Human glioma (U251-RFP) model	Cancer Res 68: 3396-3404 (2008)
Human adonocarcinoma (MDA-MB-435) model	PNAS 104(44) 17406-17411 (2007)

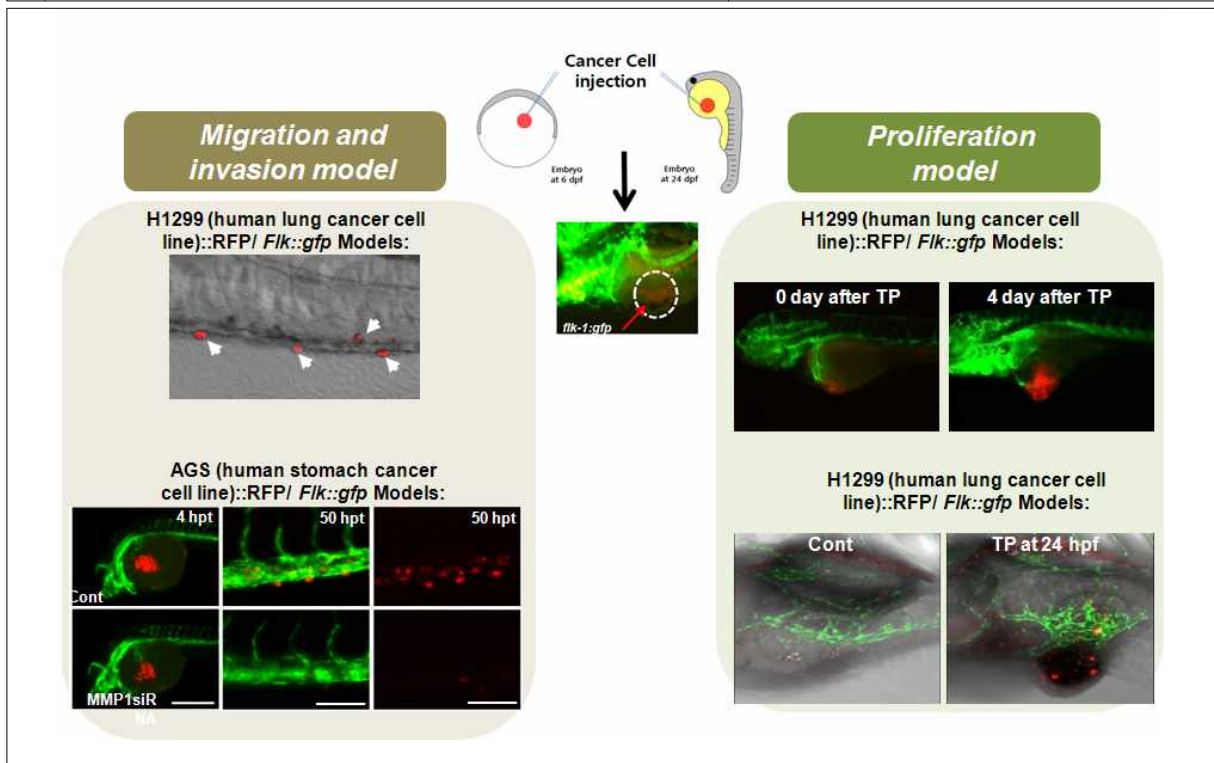


그림 18. Transplantation of fluorescent labeled cancer cell into the yolk of zebrafish embryo

- 본 연구과제에서도 국내 최초로 암세포의 제브라피쉬 이식 실험한 후 in vivo 실시간 관찰을 위하여 4종의 형광단백질 발현 stable cell lines를 제작하여 제브라피쉬 생체 내에서 주입된 암세포의 성장 및 이동을 관찰하여 그림 23에 제시한 바와 같은 제브라피쉬 이종이식모델을 확립함.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 ¹⁾)	저널명(I.F.)	Year; Vol(No):Page	구분 ²⁾	지원과제번호
Notch-regulation of perineurial glia development from radial glia in the spinal cord of zebrafish embryos	배영기 (공동)	Neuroscience Letters (2.085)	2008; 448: 240-244	국외 SCI	0810060-1
Her4 is necessary for establishing peripheral projections of the trigeminal ganglia in zebrafish	배영기 (제1)	Biochemical and Biophysical Research Communication (2.749)	2009; 448: 240-244	국외 SCI	
Anatomy of zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting its development	배영기 (제1)	Developmental Biology (4.714)	2009; 448: 240-244	국외 SCI	0810060-2
Proneural gene-linked neurogenesis in zebrafish cerebellum	배영기 (제1)	Developmental Biology (4.714)	신청중	국외 SCI	0810060-2

1) 저자구분 : 교신, 제1, 공동

2) 구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등

3) 지원과제번호(Acknowledgement)

- 과제번호를 연차 표시(-1, -2, -3 등)를 생략하고 7자리로 기재하고, 과제와 관련성은 있으나 불가피하게 Acknowledgement가 누락된 경우에는 '없음'으로 기재

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 ¹⁾	지원과제번호
Genetic and histological analysis of cerebellum development in zebrafish	배영기	한국유전체학회 2008년 정기학술대회	국내	0810060-1
Cerebellum development in zebrafish	배영기	제 20회 한국분자세포생물학회 정기학술대회	국내	0810060-1
Development of brain tumor models in zebrafish	나원호, 배영기	제 20회 한국분자세포생물학회 정기학술대회	국내	0810060-1
Genetic and histological analysis of cerebellar neurogenesis	배영기	8th International Conference on Zebrafish Development and Genetics	국외	

Polarization and dendritic morphogenesis of cerebellar purkinje cells	배영기	8th International Conference on Zebrafish Development and Genetics	국외	
Development of genetic engineered cancer models in zebrafish	나원호, 배영기	제 21회 한국분자세포생물학회 정기학술대회	국내	0810060-2
Development of genetic engineered cancer models in zebrafish	나원호, 배영기	제66차 한국생화학분자생물학회 정기학술대회	국내	0810060-2
Development of tumor model using zebrafish: genetic engineered brain tumor models and xenograft models for preclinical trials	배영기	2009 Asia-Oceania Zebrafish Meeting in Jeju	국내	0810060-2
Development of tumor model using zebrafish: genetic engineered brain tumor models and xenograft models for preclinical trials.	배영기	한국유전체학회 2009년 정기학술대회	국내	0810060-2
Anatomy of zebrafish cerebellum and screen for mutations affecting its development	배영기	모델동물 연합회 2009 심포지엄	국내	0810060-2

1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분 ¹⁾	특허명	출원인	출원국	출원번호

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
제브라피쉬를 이용한 발암 유전자 기능 연구과 암 모델 개발을 위한 연구 기반 구축	1차년도	제브라피쉬 사육 시설 가동 및 유전자 미세 주입 실험 기반 구축	○ 제브라피쉬 사육 시설 구축 및 가동: 3.5 L 수조 250개 규모의 항온 항습 시설 구축, ○ DNA/RNA 등과 morpholino oligonucleotides의 생체 미세 주입 실험을 위해 형광현미경, microinjector 등의 연구 기반 구축	100	80
		발암 유전자의 조직 특이적 과잉발현을 위한 promoter 및 enhancer 영역의 분리 동정과 구조 분석 및 제브라피쉬 생체내에서 발현 분석	○ Genomic DNA, BAC plasmid에서 총 5종의 신경줄기 세포 특이적 유전자의 enhancer 영역을 분리 동정 ○ 제작된 promoter::GFP reporter 유전자를 제브라피쉬의 배아에 미세주입하여 조직특이적인 GFP의 발현을 제브라피쉬 생체 내에서 형광현미경을 사용하여 육안으로 분석		
		형질전환 제브라피쉬 제작을 위한 기반 구축: GAL4-UAS system 및 Tol2 transposon system의 개발 및 확보	○ 조직특이적으로 GAL4를 유도하는 형질전환 유전자 5종과 UAS에 의해 유도되는 형질전환 발암유전자 10종을 제작 ○ 제작된 형질전환 유전자에 유전자 재조합 기법으로 Tol2 transposon element를 이용하여 개선		
	제브라피쉬를 이용한 tumor xenograft 모델 제작을 위한 연구 기반을 구축	○ 제브라피쉬 생체내에서 이식한 암세포의 위치 및 형상을 파악하기 위해서 형광단백질을 안정적으로 발현하는 인간 및 포유류 암세포주 3종류를 확립 ○ 제브라피쉬에서의 tumor xenograft 실시 및 암세포의 생장, 이동 등을 형광현미경을 사용하여 육안으로 분석			
		암모델동물 개발을 위한 발암 억제 유전자 기능 이상 제브라피쉬 돌연변이체의 개발 및 확보	○ 발암억제유전자의 돌연변이체의 총 2종 확보: TP53, patched2 ○ 발암억제유전자의 돌연변이체의 기능 해석: TP53 돌연변이체의 gamma-irradiation에 의한 세포사 저항성 검사 및 TP53 antisense morpholino oligonucleotides 처리 제브라피쉬와의 기능 동등성 확인		

	2차년도		○ 발암억제유전자의 돌연변이체와 형질전환체와의 교배를 통한 모델동물 개발기반 구축 : TP53 (10XUAS::K-ras G12V), patched2 (10XUAS::N-myc T50A)	100	100
		표적 발암 유전자 발현형 형질전환 제브라피쉬의 제조	○ 제브라피쉬 신경줄기세포 특이적으로 GAL4를 발현하는 형질전환 F2세대의 제브라피쉬 제조: GFAP::GAL4, NeuroD2::GAL4 ○ 각종 발암 유전자를 유도발현하는 형질전환 제브라피쉬의 제조: 총 13종 개발 ○ GAL4-UAS system의 제브라피쉬 생체 교배를 통한 신경줄기세포 특이적 발암 유전자 이상 발현형 형질전환 제브라피쉬 암모델의 개발		
		제브라피쉬를 이용한 tumor xenograft 모델 개발과 응용	○ 제브라피쉬를 이용한 암세포 이동 및 전이 모델 개발 :H1299::mRFP ,AGS::mRFP ○ 제브라피쉬를 이용한 암세포 성장 모델 개발 : (U87MG::mRFP),(B16-F10::mRFP) ○ 제브라피쉬 tumor xenograft 모델을 이용한 응용 - AGS::mRFP 모델을 이용한 암세포 혈관 이동에 관여하는 유전자 기능 검사 - U87MG::mRFP 모델을 이용한 각종 항암제의 in vivo validation		

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

세부연구목표	평가의 착안점 및 척도	자 체 평 가
제브라피쉬 사육 시설 가동 및 유전자 미세 주입 실험 기반 구축	제브라피쉬 사육 및 실험 동물 확보, 미세 인젝션 가능 여부. (A, B, C)	자동화된 제브라피쉬 사육이 현재 가동되고 있고, 야생형 2종, 돌연변이체 9종, 형질전환체 3종 등 약 1200 마리의 실험동물 확보 및 현재 각종 인젝션 실험이 순조롭게 진행 중이므로 기대치 이상의 목표를 달성하였음.
발암 유전자의 조직 특이적 과잉발현을 위한 promoter 및 enhancer 영역의 분리 동정과	1. 조직 특이적인 유전자의 promoter 확보 정도. [A(≥3), B(=2), C(<2)]	1. 신경교종 모델용 2종, 수모세포 종 모델용 3종의 신경줄기세포 특이적 유전자의 promoter를 확

<p>구조 분석 및 제브라피쉬 생체내에서 발현 분석</p>	<p>2. 제브라피쉬 생체내에서 발현 능력 비교 분석 여부. [분석 수 A(≥ 3), B(=2), C(<2)]</p>	<p>보하여 목표치를 상회하는 성과를 얻음. 2. 제작된 promoter::GFP reporter 유전자 5종을 제브라피쉬의 배아에 미세주입하여 제브라피쉬 생체 내에서 현광현미경을 사용하여 육안으로 분석하여 목표 달성을 하였음.</p>
<p>형질전환 제브라피쉬 제작을 위한 기반 구축: GAL4-UAS system 및 Tol2 transposon system의 개발 및 확보</p>	<p>형질전환 유전자 제작 개수. [A(≥ 5), B(=4), C(<4)]</p>	<p>총 15종의 Tol2 transposable element가 들어가 있는 GAL4 형질전환 유전자 5종, UAS 형질전환 유전자 10종을 제작하여 목표치를 상회하여 확보.</p>
<p>제브라피쉬를 이용한 tumor xenograft 모델 제작을 위한 연구 기반을 구축</p>	<p>1. 형광단백질을 발현하는 암세포주 확보 수. [A(≥ 3), B(=2), C(<2)] 2. tumor xenograft 실시 및 분석. [분석 수 A(≥ 3), B(=2), C(<2)]</p>	<p>1. 형광단백질을 안정적으로 발현하는 인간 및 포유류 암세포주 3종류를 확립 2. 인간 및 포유류 암세포주 3종류를 제브라피쉬 배아에 tumor xenograft 실시하여 암세포의 성장, 이동 등을 현광현미경을 사용하여 육안으로 분석</p>
<p>암모델동물 개발을 위한 발암 억제 유전자 기능 이상 제브라피쉬 돌연변이체의 개발 및 확보</p>	<p>발암 억제 유전자 기능 이상 제브라피쉬 돌연변이체의 개발 및 확보 정도. [돌연변이체의 확보 수 (A(≥ 3), B(=2), C(<2))]</p>	<p>1. tp53과 patched2 발암억제 유전자 기능이상 제브라피쉬를 확보함 2. 각기의 제브라피쉬 돌연변이체에 형질전환 제브라피쉬를 교배하여 암모델 제작</p>
<p>표적 발암 유전자 발현형 형질전환 제브라피쉬의 제조</p>	<p>형질전환 제브라피쉬 제조의 진행 정도. [F1 모자이크 개체군의 제작 수 (A(≥ 3), B(=2), C(<2))]</p>	<p>총 11종의 GAL4-driver 형질전환 제브라피쉬 2종, UAS 형질전환 제브라피쉬 9종을 homozygous F2 세대까지 제작하여 목표치를 상회하여 확보.</p>
<p>제브라피쉬를 이용한 tumor xenograft 모델 개발과 응용</p>	<p>1. 형광단백질을 발현하는 암세포주 확보 수. [A(≥ 3), B(=2), C(<2)] 2. tumor xenograft 실시 및 분석. [분석 수 A(≥ 3), B(=2), C(<2)]</p>	<p>1. 총 4종의 형광단백질을 발현하는 암세포주를 제작 확보함 2. 각기의 암세포에 대하여 제브라피쉬 tumor xenograft 실시하여 4종의 이종이식 암모델 개발하였고 암세포 이동 관련 유전자 기능 해석 및 항암제 테스트를 각각 한모델에 대하여 분석</p>

5. 연구결과의 활용계획

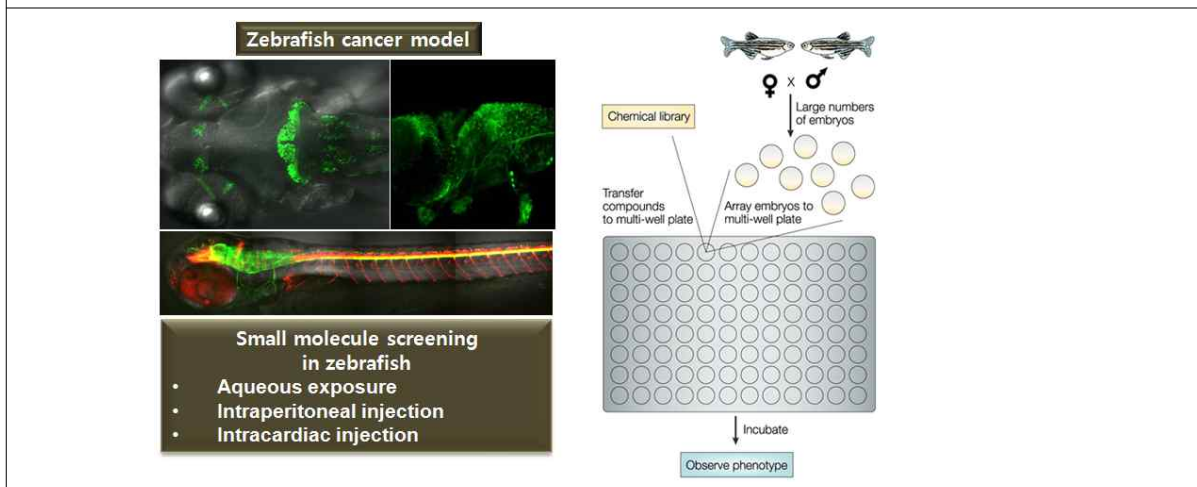
(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구분	건수	비고
학술지 논문 게재	총 4건	PNAS(9.643), Cancer Research(7.656), Developmental Biology(4.714), Journal of Biological Chemistry(5.808)
산업재산권 등록		특허 등록 예상 국가, 예상 특허명 등
기타		

(2) 연구성과의 활용계획

- 본 연구개발을 통하여 만들어질 제브라피쉬 발암 모델에서 규명되리라 기대되는 [표적 유전자 및 각종 신호전달계의 조절에 의한 발암 특성 규명] 등과 같은 분자종양학적 조절기전 연구결과는 표적 유전자와 상호작용을 하는 새로운 표적 인자 발굴에 유용한 정보를 제공하리라 사료됨. 또한, 본 연구개발을 통하여 얻게 될 각종 연구방법 및 기술 등을 향후 표적 인자만 바꾸어 활용하면 다양한 종류의 암연구에도 응용이 가능하리라 기대됨.
- 특히 비교적 적은 비용으로 단시간 내에 표적 치료제를 탐색할 수 있는 개체 수준의 발암 동물 모델은 현재 세계적으로도 거의 전무한 실정으로 국제적으로 통용될 수 있는 원천 기술의 확보가 가능하리라 기대되어, 향후 표적 발암 유전자를 대상으로 한 항암 치료제 개발에 있어 항암제 탐색 및 그 독성조사를 일시에 할 수 있는 개발 사업을 위한 획기적인 재료로 활용될 것임
- 본 연구개발을 통하여 얻게 될 각종 연구방법 및 기술 등을 향후 표적 인자만 바꾸어 활용하면 다양한 다른 종류의 암연구에도 응용이 가능하리라 기대되고, 또한 본 연구개발을 통하여 확립된 발암 동물 모델에서 발암 유전자에 대한 세포 증식 사멸 및 분화 조절에 관한 분자 종양학적 기전과 전이 과정의 intravasation, migration, extravasation 등의 기전이 규명되면 얻어진 연구결과들을 바로 고등동물인 생쥐 동물 모델 및 사람의 종양세포 등에서 그 결과들을 검증함으로써 전임상연구에 있어서도 중요한 자료로서 활용될 것임.

그림 23. 표적 치료제 탐색을 위한 제브라피쉬 암모델과 대단위 스크리닝.



6. 참고문헌

1. Arap W, Knudsen ES, Wang JY, Cavenee WK and Huang HJ. Point mutations can inactivate in vitro and in vivo activities of p16(INK4a)/CDKN2A in human glioma. *Oncogene*. 14(5):603–609. (1997)
2. Berghmans S, Murphey RD, Wienholds E, Neuberg D, Kutok JL, Fletcher CD, Morris JP, Liu TX, Schulte–Merker S, Kanki JP, Plasterk R, Zon LI and Look AT. tp53 mutant zebrafish develop malignant peripheral nerve sheath tumors. *PNAS*. 102:407–412. (2005)
3. Browd SR, Kenney AM, Gottfried ON, Yoon JW, Walterhouse D, Pedone CA and Fulst DW. N–myc can substitute for insulin–like growth factor signaling in a mouse model of sonic hedgehog–induced medulloblastoma. *Cancer Research*. 66(5):2666–2672. (2006)
4. Dahmen RP, Koch A, Denkhau D, Tonn JC, S N, Berthold F, Behrens J, Birchmeier W, Wiestler OD and Pietsch T. Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas. *Cancer Research*. 61(19):7039–7043. (2001)
5. Feitsma H and Cuppen E. Zebrafish as a cancer model. *Mol Cancer Res*. 6(5):685–694. (2008)
6. Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA and Cavenee WK. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment. *Genes and Development*. 21(21):2683–2710. (2007)
7. Geoffrey A. Geiger, Weili Fu, and Gary D. Kao, Temozolomide–Mediated Radiosensitization of Human Glioma Cells in a Zebrafish Embryonic System, *Cancer Research*. 68:3396–3404. (2008)
8. Hallahan AR, Pritchard JJ, Hansen S, Benson M, Stoeck J, Hatton BA, Russell TL, Ellenbogen RG, Bernstein ID, Beachy PA and Olson JM. The SmoA1 mouse model reveals that notch signaling is critical for the growth and survival of sonic hedgehog–induced medulloblastomas. *Cancer Research*. 64(21):7794–7800. (2004)
9. Haramis AP, Hurlstone A, van der Velden Y, Begthel H, van den Born M, Offerhaus GJ and Clevers HC. Adenomatous polyposis coli–deficient zebrafish are susceptible to digestive tract neoplasia. *EMBO Report*. 7(4):444–449. (2006)
10. Holland EC, Celestino J, Dai C, Schaefer L, Sawaya RE and Fuller GN. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nature Genetics*. 25(1):55–57. (2000)
11. Igor V. Mizgireuv and Sergei Y. Revskoy. Transplantable Tumor Lines Generated in Clonal Zebrafish. *Cancer Research*. 66:3120–3125. (2006)

12. Kawakami K, Takeda H, Kawakami N, Kobayashi M, Matsuda N and Mishina M. A transposon-mediated gene trap approach identifies developmentally regulated genes in zebrafish. *Developmental Cell*. 7(1):133–144.. (2004)
13. Konstantin Stoletov, Valerie Montel, Robin D. Lester, Steven L. Gonias, and Richard Klemke. High-resolution imaging of the dynamic tumor cell interface in transparent zebrafish. *PNAS*. 104(44):17406(2007)
14. Koudijs MJ, den Broeder MJ, Keijser A, Wienholds E, Houwing S, van Rooijen EM, Geisler R and van Eeden FJ. The zebrafish mutants dre, uki, and lep encode negative regulators of the hedgehog signaling pathway. *PLoS Genet*. 1(2):e19. (2005)
15. Langenau DM, Traver D, Ferrando AA, Kutok JL, Aster JC, Kanki JP, Lin S, Prochownik E, Trede NS, Zon LI and Look AT. Myc-induced T cell leukemia in transgenic zebrafish. *Science*. 299(5608):887–890. (2007)
16. Li DM and Sun H. PTEN/MMAC1/TEP1 suppresses the tumorigenicity and induces G1 cell cycle arrest in human glioblastoma cells. *PNAS*. 95(26):15406–15411. (1998)
17. Maryann Haldi, Christopher Ton, Wen Lin Seng and Patricia McGrath. Human melanoma cells transplanted into zebrafish proliferate, migrate, produce melanin, form masses and stimulate angiogenesis in zebrafish. *Angiogenesis* 9:139(2006)
18. Mizgirev IV and Revskoy SY. Transplantable tumor lines generated in clonal zebrafish. *Cancer Research*. 66(6):3120–3125. (2006)
19. Nicoli S, Ribatti D, Cotelli F and Presta M. Mammalian tumor xenografts induce neovascularization in zebrafish embryos. *Cancer Research*. 67(7):2927–2931. (2007)
20. Patton EE, Widlund HR, Kutok JL, Kopani KR, Amatruda JF, Murphey RD, Berghmans S, Mayhall EA, Traver D, Fletcher CD, Aster JC, Granter SR, Look AT, Lee C, Fisher DE and Zon LI. BRAF mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. *Current Biology*. 15(3):249–254. (2005)
21. Scheer N and Campos-Ortega JA. Use of the Gal4-UAS technique for targeted gene expression in the zebrafish. *Mechanisms of Development*. 80(2):153–158(1999)
22. Stefania Nicoli, Domenico Ribatti, Franco Cotelli and Marco Presta. Mammalian Tumor Xenografts Induce Neovascularization in Zebrafish Embryos. *Cancer Research* 67:2927–2931. (2007)
23. Stefania Nicoli and Marco Presta. The zebrafish/tumor xenograft angiogenesis assay. *Nature Protocols* 2:2918–2923. (2007)
24. Taylor MD, Liu L, Raffel C, Hui CC, Mainprize TG, Zhang X, Agatep R, Chiappa S, Gao L, Lowrance A, Hao A, Goldstein AM, Stavrou T, Scherer SW, Dura WT, Wainwright B, Squire

- JA, Rutka JT and Hogg D. Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nature Genetics*. 31(3):306–310. (2002)
25. Thomas RK, Baker AC, DeBiasi RM, Winckler W, Laframboise T, Lin WM, Wang M, Feng W, Zander T, MacConaill L, Lee JC, Nicoletti R, Hatton C, Goyette M, Girard L, Majmudar K, Ziaugra L, Wong KK, Gabriel S, Beroukhim R, Peyton M, Barretina J, Dutt A, Emery C, Greulich H, Shah K, Sasaki H, Gazdar A, Minna J, Armstrong SA, Mellinghoff IK, Hodi FS, Dranoff G, Mischel PS, Cloughesy TF, Nelson SF, Liao LM, Mertz K, Rubin MA, Moch H, Loda M, Catalona W, Fletcher J, Signoretti S, Kaye F, Anderson KC, Demetri GD, Dummer R, Wagner S, Herlyn M, Sellers WR, Meyerson M and Garraway LA. High-throughput oncogene mutation profiling in human cancer. *Nature Genetics*. 39(3):347–351. (2007)
26. van Meyel DJ, Ramsay DA, Casson AG, Keeney M, Chambers AF and Cairncross JG. p53 mutation, expression, and DNA ploidy in evolving gliomas: evidence for two pathways of progression. *J Natl Cancer Inst*. 86(13):1011–1017. (1994)
27. Vorechovsky I, Tingby O, Hartman M, Stromberg B, Nister M, Collins VP, Toftgard R. Somatic mutations in the human homologue of *Drosophila* patched in primitive neuroectodermal tumours. *Oncogene*. 15(3):361–366. (1997)
28. Wong AJ, Ruppert JM, Bigner SH, Grzeschik CH, Humphrey PA, Bigner DS and Vogelstein B. Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas. *PNAS*. 89(7):2965–2969. (1992)

7. 첨부서류

- 본 연구의 성과로 논문, 저서, 산업재산권, 정책정책 기여 등이 있을 경우 관련 증빙자료를 첨부토록 함