

연차 보고서 (1차)

사업명	KAIST Grand Challenge 30 Project		
과제명	모자이크 억제 기술 개발을 통한 파킨슨병 치료 연구		
	Development of mosaic inhibition technique for Parkinson's disease therapy		
연구책임자	김 대 수	소 속	생명과학과
총수행기간 (1단계)	2018. 01. 01. ~ 2023. 12. 31. (5년)		
당해연도 협약기간	2018. 01. 01. ~ 2018. 12. 31. (1년)		
당해연도 사업비(원)	30,000,000		

자체연구협약서(KAIST Grand Challenge 30 Project)제5조에 의거하여
연차보고서 2부를 제출합니다.

2019년 01월 15일

연구책임자: 김 대 수 (인)

한국과학기술원 총장 귀하

I. 해당 연도 추진 현황

I-1 기술개발 추진 내용

- 파킨슨병은 전 세계에서 두 번째로 흔한 퇴행성 뇌 질환이지만 아직 안정적이고 영구적인 치료법이 없어 새로운 치료법 개발이 필요한 실정이다. 도파민 신경의 괴사로 인한 시상핵(thalamus)의 억제가 파킨슨병의 운동 이상을 유발하는 것으로 생각되어왔지만, 본 연구팀은 최신 광유전학 기술을 이용하여 시상핵 신경의 억제가 아닌 억제성 입력에 의해 집단적으로 반발하는 ‘반발성 흥분’을 통해 운동 이상이 나타남을 증명하였다.
- 본 연구팀은 선행 연구를 통해 증명한 ‘억제 후 반발성 흥분 이론’을 치료에 적용하고자 한다. 본 연구의 주요 가설은 반발성 흥분을 보이는 시상핵 신경의 수를 적절하게 조절한다면 파킨슨병을 회복시킬 수 있다는 것이다. 이를 위해 반발성 흥분을 보이는 시상핵 신경의 수를 최신 신경학적 기술 개발 및 적용을 통해 조절하고자 한다. 세부 연구 내용은 다음과 같다. 첫째, 시상핵 신경세포들의 집단 반발성 신경활동 조절을 위한 모자이크 억제기법을 개발한다. 둘째, ‘모자이크 억제 기법’을 통한 파킨슨 증상회복을 파킨슨 모델 생쥐 및 영장류에 적용하여 검증한다.

1) 시상핵 신경집단의 반발성 흥분활동을 세밀하게 조절하는 원천기술 개발

1-1) 모자이크 억제기법 개발

- 첫 번째로 뇌 전반에 미치는 광범위한 영향은 최소화하면서 시상핵 신경세포의 과도한 활동을 억제하는 방법이 필요하다. 이를 위하여 본 연구에서는 신경세포를 죽이지는 않으면서 신경전달 물질의 분비만을 막아 신경 신호의 전달을 억제하는 tetanus toxin을 사용했다.
- 생쥐 뇌의 시상핵 신경세포의 활동을 억제하기 위해 바이러스 전달 시스템을 이용하여 tetanus toxin을 발현시킨 결과, 알려진 연구 결과와 같이 운동회로의 과도한 억제로 인해 운동 이상이 유도됨을 관찰하였다 (그림 1).

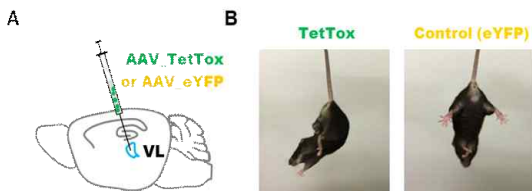


그림 1. Tetanus toxin을 이용하여 운동 시상핵의 출력 신호를 과도하게 억제했을 때 관찰되는 운동 이상

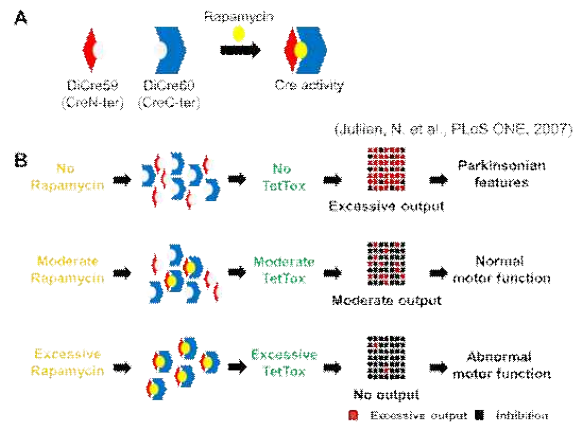


그림 2. 신경 집단의 활동을 세부적으로 제어할 수 있는 모자이크 억제기법의 개략도

- 이에 두 번째로 적절한 수의 신경세포만 억제하기 위해 tetanus toxin의 발현 정도를 세밀하게 조절할 방법이 필요하다. 이를 위해 본 연구팀은 라파마이신에 의존적으로 Cre 재조합효소가 활성화되는 Dimerizable Cre (DiCre) 시스템을 이용했다 (Jullien et al., 2003; Jullien et al., 2007). 라파마이신 투여 농도와 투여 기간을 조절함으로써 Cre 재조합효소의 활성을 조절할 수 있으며, 결과적으로 Cre 의존성 tetanus toxin 발현 시스템과 결합하면 신경세포 억제 정도를

체계적으로 조절할 수 있다 (그림 2).

1-2) 모자이크 억제기법의 생체 외 구현

- 1차년도 연구를 통해 *in vitro* 수준에서 모자이크 억제기법의 성공적인 구현을 확인하였다. 라파마이신에 의한 표적 유전자의 발현 조절을 정량적으로 분석한 결과, 라파마이신의 투여농도와 투여 기간이 증가함에 따라 실제 표적 유전자의 발현량 또한 증가함을 확인할 수 있었다 (그림 3).

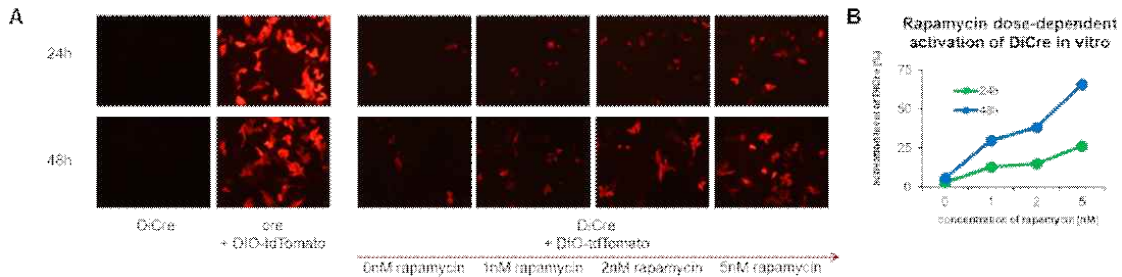


그림 3. 생체 외 모자이크 억제기법 구현: 라파마이신 투여 농도와 투여 기간에 따른 표적 유전자 발현량 조절

1-3) 생체 내 도입을 위한 바이러스 시스템 확립

- tetanus toxin과 DiCre를 동물 모델에 적용하고 모자이크 억제기법의 치료 효과를 검증하기 위해서는 바이러스 전달 시스템이 필요하다. 이를 위해 질병을 유발하지 않으면서 신경세포에 특이적으로 작용하는 adeno-associated virus (AAV)를 제작하였다. 제작한 바이러스를 생쥐의 시상핵에 주입하여 효과적인 발현을 확인하였다 (그림 4).

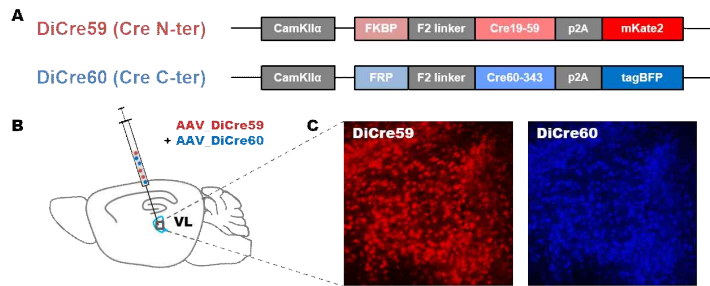


그림 4. 생체 내 모자이크 억제기법을 위한 바이러스 시스템 확립

2) 시상핵 신경 활동 조절을 통한 운동 이상 완화 검증

1-1) 광유전학적 생쥐 파킨슨병 모델에 도입 및 효과 검증

- 생쥐 모델에 광유전학 방법을 적용하여 시상핵으로 들어가는 억제성 입력을 증가시키면, 반발성 흥분 현상을 통해 파킨슨병의 운동 증상이 나타난다. 모자이크 억제기법에서 가정한 것처럼 파킨슨병 모델 생쥐에서 나타나는 과도한 시상핵 활동을 적절히 억제하였을 때 실제로 운동 증상이 완화되는지를 확인하는 실험을 수행하였다. 그 결과 시상핵에 tetanus toxin을 발현하는 생쥐 그룹에서 빛 자극에 의해 나타나는 파킨슨병 운동 증상이 감소하여 있음을 확인하였다 (그림 5).

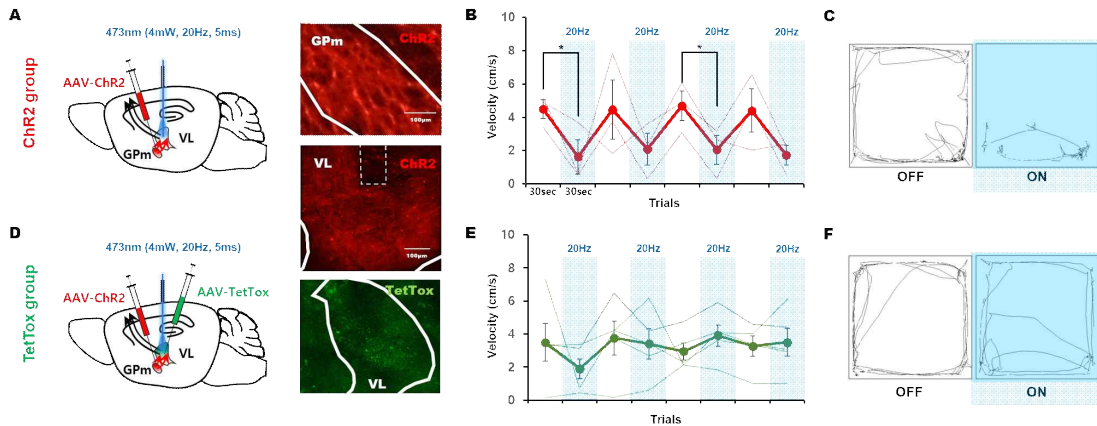


그림 5. 파킨슨병 모델 생쥐에서 과도한 시상핵 활동을 적절히 억제하였을 때 나타나는 운동 증상 완화 효과

I-2 해당 연도 추진 실적

가. 당초 연구 목표

1차 년도 연구의 주요 목표는 반발성 흥분 활동을 보이는 시상핵 신경 집단을 적절하게 억제할 수 있는 기초 기술을 개발하는 것이다. 세부 목표는 아래 두 가지 항목에 따라 구분할 수 있다.

1) 시상핵 신경집단의 반발성 흥분활동을 세밀하게 조절하는 원천기술 개발

- 반발성 흥분을 보이는 신경세포의 수를 체계적으로 줄일 수 있는 ‘모자이크 억제기법’을 개발한다.
- 모자이크 억제기법을 동물 모델에 적용할 수 있도록 바이러스 전달 시스템을 확보하고 생체 내에 도입한다.

2) 시상핵 신경 활동 조절을 통한 운동 이상 완화 검증

- 파킨슨병 모델 생쥐에서 시상핵의 과도한 흥분성 출력신호를 억제하였을 때 운동 이상 완화 효과를 확인한다.

나. 연구수행 달성 정도

목 표	달성도(%)	내 용
시상핵 신경집단의 반발성 흥분활동을 세밀하게 조절하는 원천기술 개발	80%	모자이크 억제기법 개발
	100%	모자이크 억제기법의 생체 외 구현
	100%	생체 내 도입을 위한 바이러스 시스템 확립
	30%	모자이크 억제기법의 생체 내 구현
시상핵 신경 활동 조절을 통한 운동 이상 완화 검증	50%	생쥐 파킨슨 모델에 도입하여 증상 완화 검증

II. 기술개발결과

국의 논문 발표 8건

논문 제목	게재 학술지명	게재년월	IF
Optogenetic control of body movements via	Nano Energy	2018.01	13.120

flexible vertical light-emitting diodes on brain surface.			
Rebound excitability mediates motor abnormalities in Parkinson's disease.	BMB reports	2018.01	3.085
Medial preoptic circuit induces hunting-like behavior to target objects and prey.	Nature Neuroscience	2018.01	19.912
Monolithic Flexible Vertical GaN Light-Emitting Diodes for a Transparent Wireless Brain Optical Stimulator.	Advanced Materials	2018.05	21.950
Nodding behavior couples to vigilance fluctuation in a high-calorie diet model of drowsiness.	Molecular brain	2018.06	3.449
Overcoming Depression by Inhibition of Neural Burst Firing.	Neuron	2018.06	14.319
Trichogenic Photostimulation Using Monolithic Flexible Vertical AlGaInP Light-Emitting Diodes.	ACS Nano	2018.08	13.709
Flexible wireless powered drug delivery system for targeted administration on cerebral cortex.	Nano Energy	2018.09	13.120

국외 특허 출원 2건

출원국가	출원일자	출원번호	발명자	발명의 명칭	과제 기여도
미국	2018.04.25	15/962,894	김 대 수 , 김 정 진 , 김 영 수 , 정민주	시상핵 신경의 반발성 흥분을 제어하여 파킨슨 증상을 치료하는 방법	20%
PCT	2018.11.01	PCT/KR2018/013 159	김 대 수 , 김정은	신규 디스토니아 치료용 약학적 조성물	20%

III. 결론 및 차년도 계획

가. 결론

- 본 연구팀은 1차 년도 생체 외 실험을 통해 ‘모자이크 억제기법’이 실제로 표적 유전자 발현을 세밀하게 조절할 수 있음을 보였다. 또한, 모자이크 억제기법에서 사용하는 치료 콘셉트의 일부를 파킨슨병 모델 생쥐에 도입하여 운동 증상의 완화 효과를 확인하였다. 1차 년도의 연구 결과를 바탕으로 모자이크 억제기법을 완성한 후, 파킨슨병 동물 모델에 도입하여 반발성 흥분을 보이는 신경세포의 수를 체계적으로 줄였을 때의 치료 효능을 입증한다면 환자치료를 위한 획기적인 단서가 될 것으로 기대한다.

나. 차년도 계획

- 1) 시상핵 신경 집단의 활동을 세밀하게 조절하는 원천기술 확립
- 1차 년도의 연구 결과를 바탕으로 모자이크 억제기법을 완성하고 생쥐 뇌 내에 도입한다. 생쥐의 시상핵에서 원하는 정도의 신경세포 집단에만 선택적으로 신경 활동을 억제할 수 있는 최적

의 프로토콜 (바이러스 주입량, 바이러스 역가, 발현 기간 등)을 확립하고자 한다. 신경세포를 이용한 실험을 통해 tetanus toxin과 DiCre를 결합한 모자이크 억제기법이 신경 활동을 효과적으로 억제할 수 있는지 검증한다. 또한, 생쥐 시상핵에서 정밀한 조직학적 분석을 통해 모자이크 억제기법의 생체 내 조절 가능성을 확인한다.

- 라파마이신 의존적으로 활성도를 보이는 DiCre 뿐만 아니라 빛에 의해 활성화되는 여러 재조합 효소를 이용하여 다양한 플랫폼 기술을 고안한다. 이를 통해 여러 뇌 영역의 신경 활동을 효과적으로 조절할 수 있는 기술을 개발하고 다양한 뇌 질환에 응용할 가능성을 제시한다.
- 현재까지 도파민 신경세포들의 사멸로 인해 야기되는 신경회로 변화와 운동 증상 사이의 관계에 대한 명확한 기전이 밝혀져 있지 않다. 뇌 내로 렌즈를 삽입하여 수백 개의 신경세포 활성 변화를 관찰할 수 있는 최신 이미징 기술을 통해 다양한 행동에 따라 변화하는 시상핵 신경 집단의 활성을 관찰하고자 한다 (그림 6). 이를 통해 시상핵의 운동 정보 코딩 메커니즘을 정립하고 복잡한 운동회로 (기저핵-시상핵-대뇌피질)와 운동기능 사이의 관계에 대한 새로운 기전을 밝힌다.

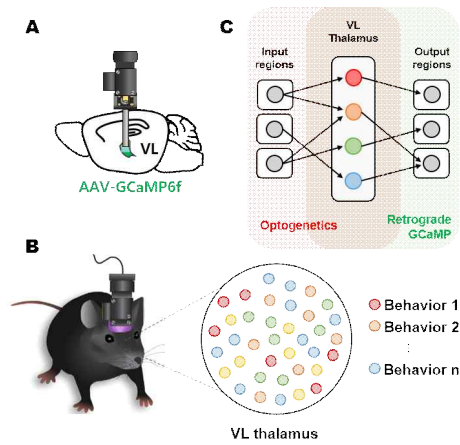


그림 6. 운동 시상핵의 운동 정보 코딩 메커니즘 정립

2) 동물 모델을 이용한 모자이크 억제기법의 파킨슨병 치료 효과 검증

- 본 연구팀에서 보유한 생쥐 파킨슨병 모델 (광유전학적 유도, 유전학적 유도)에 모자이크 억제기법을 적용하여 파킨슨병 치료 효과를 검증한다. 파킨슨병에서 주요하게 나타나는 운동 증상을 느린 운동, 강직증, 진전증 등으로 나누어 모자이크 억제에 따른 완화 효과를 정량적으로 분석한다.
- 정밀한 조직 이미징 방법을 이용하여 서로 다른 모자이크 억제 정도에 따른 운동 증상 완화 정도의 차이 또한 정량적으로 분석하여 동정한다 (그림 7).

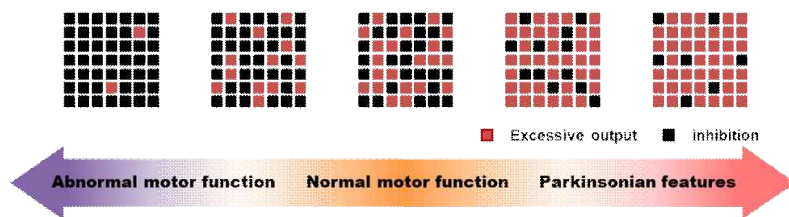


그림 7. 모자이크 억제 정도에 따라 예상되는 운동 증상 차이를 나타낸 개략도

IV. 기타 * 변경 사항 없음