

유전자 가위를 이용한 종양 모델 개발



최시호

동남권원자력의학원 연구기획팀 팀장

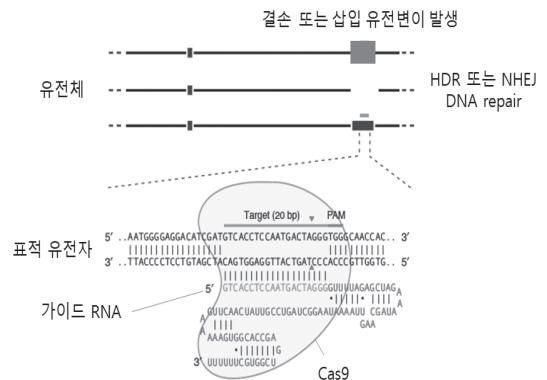
- University of Southern California 후성유전학 박사
- University of Southern California 박사후연구원
- University of Minnesota 박사후연구원
- 동남권원자력의학원 선임연구원

연구개발 배경

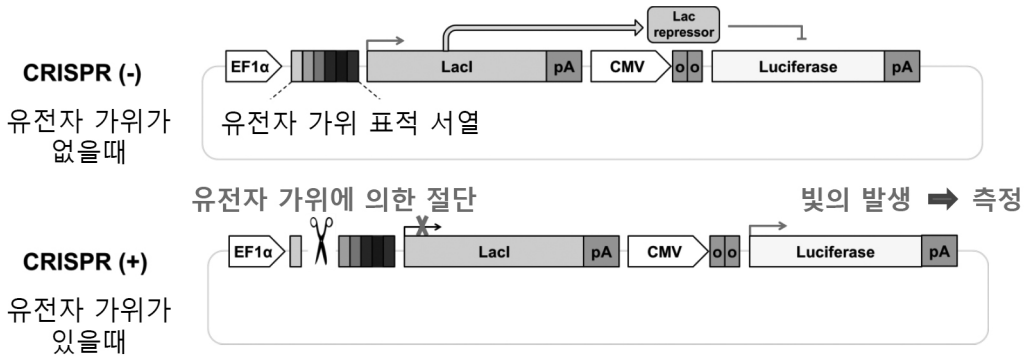
유전자 가위 기술을 이용하여 세포 내에 있는 유전물질인 약 33억 쌍의 DNA 서열 중에서 원하는 DNA 서열을 인식하고 편집할 수 있다. 유전자 가위는 1세대인 ZFNs(Zinger Finger Nucleases), 2세대인 TALENs(Transcription Activator-Like Effector Nucleases), 3세대 CRISPR/Cas 시스템으로 발전하였다. 3세대 유전자 가위인 CRISPR(Clustered Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas 시스템은 박테리아가 바이러스로부터 자신을 보호하기 위한 면역시스템이다. 박테리아에 바이러스가 들어오게 되면 외부 DNA 조각(protospacer)을 박테리아 유전체 속 반복 서열 사이에 가지고 있다가, 다시 바이러스가 공격하면 Cas 단백질과 결합하여 외부 바이러스 DNA를 인지하고 절단하게 된다. 이러한 박테리아의 면역기작을 이용

하여 유전자 편집에 활용한 것이 CRISPR-Cas9 유전자 가위이다.

CRISPR-Cas9 유전자 가위는 가이드 RNA와 DNA를 자르는 절단효소(Cas9 단백질)로 구성되어 있다. 특정 유전자 서열을 인식하는 길잡이 역할을 하는 가이드 RNA가 DNA 염기서열 중 목표한 위치에 달라붙으면 Cas9 단백질이 DNA를 잘라낸다. CRISPR/Cas9 유전자 가위에 의해 표적 서열의 DNA 이중나선 절단(DNA



[그림 1] CRISPR-Cas9 유전자 가위의 작동 원리⁽¹⁾



[그림 2] Lac-I 리포터의 작동 원리. 유전자 가위가 표적 서열을 절단했을 때 발생하는 빛을 측정하여 유전자 가위의 효율을 측정

double strand break)이 발생하면 DNA 손상이 비상동 말단 접합(NHEJ, non-homologous end joining)에 의해 복구되는 과정에서 빈번히 삽입(insertion) 또는 결손(deletion) 돌연변이가 발생하는 것을 이용하여 특정 유전변이를 생성할 수 있고, 주형 DNA(template DNA)를 넣어주면 상동재조합수선(HDR, homology-directed repair) 기전을 이용하여 치환 유전변이를 유발할 수도 있다(그림 1).

연구개발 내용

유전자 가위(CRISPR/Cas9)를 이용하여 표적 유전자를 편집하기 위해서는 유전자 가위의 표적 서열을 인식하는 길잡이 역할을 하는 가이드 RNA(gRNA)의 효율이 중요하다. 표적 서열에 맞는 가이드 RNA를 디자인하는 웹(web) 기반의 툴(tool)이 많이 개발되고 있고, 가이드 RNA의 효율을 실험적으로 평가하는 방법으로 T7E1 분석, Surveyor nuclease 분석, 차세대 염기서열 분석 및 리포터 시스템 등 여러 가지가 있다.

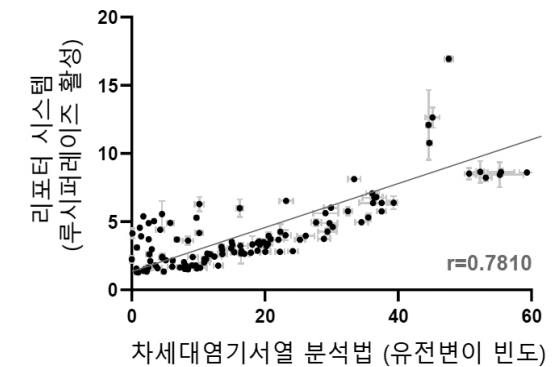
본 연구에서는 가이드 RNA의 절단 효율성을

평가하기 위해서 LacI 리포터(LacI-reporter)라는 이름의 유전자 절단 기반 리포터 시스템을 개발하였다. LacI 유전자에서 만들어지는 Lac 억제자(lac repressor) 단백질은 Lac 조절자(lac operator) 서열에 결합하여 루시페레이즈(발광 단백질) 리포터 발현을 억제하는 역할을 하는데, 유전자 가위가 표적 서열을 절단하면, Lac 억제자 단백질 발현은 감소하고 루시페레이즈 발현이 증가한다. 루시페레이즈 활성화 또는 EGFP 발현을 측정하여 가이드 RNA 효율을 정량화할 수 있다(그림 2).

LacI 리포터 시스템은 기존의 방법들과 비교하여 시간과 비용은 절감할 수 있고, 정확성 면에서도 현재 가장 우수한 방법으로 평가받는 '차세대 염기서열 분석법'과 비슷한 수준으로 가이드 RNA의 효율을 측정할 수 있다. 가이드 RNA의 효율을 LacI 리포터 시스템과 차세대 염기서열 분석법으로 각각 분석하여 두 방법 간의 상관관계를 분석하였다(그림 3).

상관계수는 0.7810로서 두 방법 간의 상관관계는 높았으며, 이러한 결과는 리포터 시스템이 차세대 염기서열 분석법과 유사한 수준의 정확

성을 보여준다는 것을 나타낸다. 차세대 염기서열 분석법은 하나의 표적 서열에 대하여 각각 증폭 및 염기서열을 분석해야 하지만, 이번에 개발한 리포터 시스템은 120개 이상의 표적 서열을 하나의 리포터에서 분석할 수 있어 시간과 비용, 효율 면에서 우수하다. 이번 연구에서 개발된 LacI 리포터 시스템은 우수한 가이드 RNA를 효율적으로 선별할 수 있는 기술로서 유전자 가위의 효율을 향상할 것으로 기대된다. 이번 연구는 동남권원자력의학원이 과학기술 정보통신부의 정부출연금 사업으로 수행하였으며, 논문은 영국 옥스퍼드대학교에서 출판하는 Nucleic Acids Research 저널 6월호 온라인판에 게재되었다⁽²⁾. 이 저널은 DNA에 관련된 광범위한 내용을 다루는 영향력 있는 저널 중 하나이다(영향력 지수 16.9).



[그림 3] Lac-I 리포터 시스템과 차세대 염기서열 분석법 간의 상관관계

해당 기술 활용 계획 및 방안

유전물질인 DNA는 염기서열 하나만 잘못되

어도 치명적인 유전질환을 유발할 수 있는데, 유전자 가위를 사용하여 원인 유전변이를 교정하면 질병을 치료할 수 있다. 예를 들어, 혈우병은 원인 유전자의 유전변이에 의해 발생하는데, 유전자 가위를 이용하여 혈우병의 원인 유전변이를 고칠 수 있다. 또한, 유전자 가위로 유전변이를 유발하여, 치료제 개발연구에 활용할 수 있는 ‘연구용 질병 모델’도 개발할 수 있다. 특히 종양은 여러 유전자의 유전변이 조합에 의해 발생하는 경우가 많은데, 유전자 가위를 이용하여 이러한 연구용 종양 모델을 만들면 유전변이에 따라 적합한 치료제를 찾아낼 수도 있다. 또한, 유전자 가위를 이용하여 세포와 생쥐 모델에 유전변이를 유발함으로써 종양 모델을 개발할 수 있다(그림4).

간암 모델의 경우 유전자 가위(가이드 RNA와 Cas9)를 발현하는 플라스미드를 쥐의 꼬리 정맥을 통해 유체역학주입(hydrodynamic injection) 방법으로 주입하면 유전자 가위가 생쥐의 간에서만 발현한다⁽³⁾. 이러한 방법으로, 간에서 표적 유전자의 유전변이를 유발하여 간암 생쥐 모델을 개발할 수 있다. 폐암의 경우 Cre-recombinase 단백질에 의존적으로 Cas9을 발현하는 생쥐에서 가이드 RNA와 Cre recombinase를 발현하는 adeno-associated virus9(AAV9)을 카테터(catheter)를 이용하여 폐로 전달하게 되면 표적 유전자에 유전변이를 유발하고, 폐암 생쥐 모델을 개발할 수 있다⁽⁴⁾. 또한, 뇌암의 경우에도 폐암 모델과 유사한 방

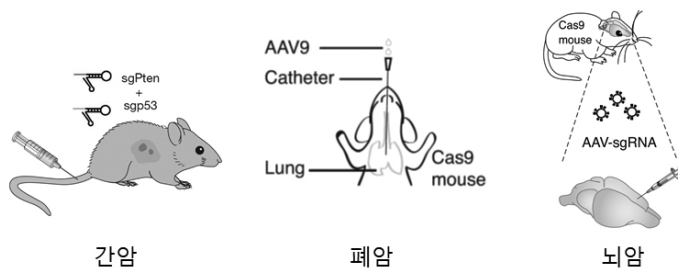


법으로 adeno-associated virus(AAV)를 이용하여 가이드 RNA를 발현시킴으로써 유전변이를 유발할 수 있고, 뇌암 생쥐 모델을 개발할 수 있다⁽⁴⁾. 췌장과 같은 다른 장기에서도 전기천공법(electroporation)을 이용하여 가이드 RNA를 전달하고 종양 모델을 개발할 수 있다⁽⁵⁾.

간암, 폐암, 뇌암 등의 장기에서 종양을 유발하는 유전변이 조합은 각각 다르며, 각 장기에 맞는 암 유발 유전변이 조합을 구성하여 원하는 장기에서 종양 모델을 개발할 수 있다. 기존의 암세포 이식이나 형질전환 동물과 비교하여 유전자 가위를 이용한 생쥐 종양 모델이 지닌 가장 큰 장점은 인간에서 종양 발생 과정을 더 유사하게 재현한다는 점이다. 암세포를 이식하여 종양 모델을 생산할 경우에는 종양 세포 이식에 따른 면역 거부 반응 때문에 면역 결핍 생쥐를 사용하게 된다. 면역결핍 생쥐 모델에서는 방사선 치료나 방사선 의약품에 대한 효능이 면역

이 있는 일반 생쥐에서 다를 수 있다. 또한 종양 발생은 유전적으로 영향을 받기도 하지만, 살아가면서 암 유발 원인에 의해 일부 세포가 유전변이를 획득하고, 결국 종양으로 발전하게 된다. 유전자 가위를 이용한 종양 생쥐 모델은 면역 반응이 있는 성체 생쥐의 일부 세포에서만 유전변이를 유발하기 때문에 인간에서 발생하는 종양 발생 과정과 유사하며 종양 생성, 종양 진행, 종양 치료에 관한 연구를 수행하기에 적절한 모델이다.

유전자 가위 기술은 유전병의 치료뿐 아니라 품종 개량, 질병의 원인 연구, 환자 맞춤형 약물 검색 등 여러 가지에 활용할 수 있는 유망한 연구 분야이다. 앞으로 유전자 가위를 이용한 질병 모델 개발은 약물 및 방사선 치료, 방사선 의약품 개발과 유효성 테스트에 도구로 활용될 것으로 기대된다. **KIF**



[그림 4] CRISPR/Cas9 유전자 가위를 이용한 종양 모델 개발^(3,4)

참고문헌

1. Ran, F. A. et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nature Protocols 8, 2281-2308 (2013).
2. Jung, SB., Lee, CY., Lee, KH., Heo, K. & Choi, SH. A cleavage-based surrogate reporter for the evaluation of CRISPR-Cas9 cleavage efficiency. Nucleic Acids Research gkab467 (2021) doi:10.1093/nar/gkab467.
3. Xue, W. et al. CRISPR-mediated direct mutation of cancer genes in the mouse liver. Nature 514, 380-384 (2014).
4. Platt, R. J. et al. CRISPR-Cas9 knockin mice for genome editing and cancer modeling. Cell 159, 440-455 (2014).
5. Maresch, R. et al. Multiplexed pancreatic genome engineering and cancer induction by transfection-based CRISPR/Cas9 delivery in mice. Nat Commun 7, 10770 (2016).