(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0124404
(43) 공개일자 2017년11월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A01K 67/027* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*A01K 67/027* (2013.01)
*A01K 2207/10* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0054258
(22) 출원일자 2016년05월02일
심사청구일자 2016년05월02일

(71) 출원인
**충남대학교산학협력단**
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
**송창화**
대전광역시 동구 한밭대로1237번길 52, 2동 501호(용전동, 신동아아파트)
**임윤지**
대전광역시 서구 용문로 41-22 (괴정동)
(74) 대리인
**특허법인충정**

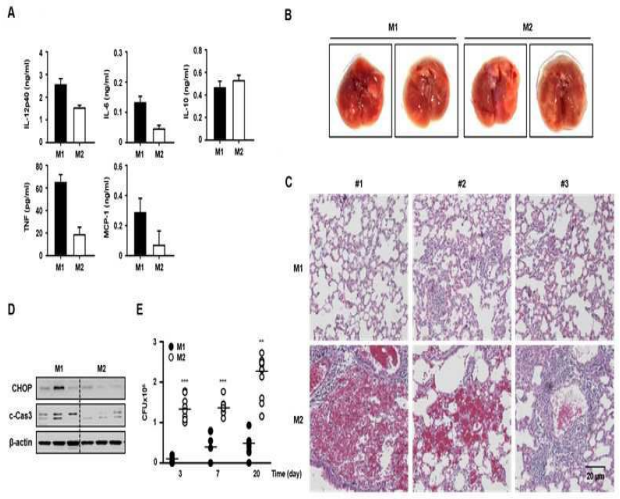
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **대식세포의 극성이 조절된 마우스 모델 및 그 제작방법.**

## (57) 요 약

본 발명은 대식세포의 활성화 또는 극성화된 마우스 모델을 사용하여, 질병 또는 감염 유발시 체내에서 극성화된 대식세포의 기능 및 특성을 알아보기 위한 마우스 모델 제작 방법으로써 제시하고자 한다. 좀 더 상세히는, 마우스 모델의 폐포 내 대식세포의 극성을 유도하기 위하여 M1 대식세포 마우스 모델은 Lipopolysaccharide(0.5~5㎍/kg)와 IFN감마( 0.5~5㎍/kg)로 자극시켜줌으로써, 질병 또는 감염 유발 시 작용하는 대식세포의 기능 및 특성에 대한 연구에 적용 가능한 마우스 모델 제작 방법으로써 제시한다.

*대 표 도* - 도2



(52) CPC특허분류
*A01K 2227/105* (2013.01)
*A01K 2267/03* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 HI15C0395
부처명 교육부
연구관리전문기관 보건산업진흥원
연구사업명 보건의료기술연구개발사업
연구과제명 결핵환자 면역세포 특성 분석에 근거한 방어기전 규명 및 제어기술 개발
기 여 율 1/1
주관기관 충남대학교
연구기간 2015.07.01 ~ 2018.06.30

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

다음 단계를 포함하는 마우스 모델의 제작방법:

(a) 사이토카인을 마우스의 비강내로 주입하는 방법에 의하여 마우스의 대식세포(macrophage)를 극성화(polarization) 시키는 단계;

(b) 상기 극성화시키는 단계로부터 12시간 내지 72시간후에 대식세포의 극성을 확인하는 단계;

(c) 결핵균을 마우스의 비강내로 감염시키는 단계; 및

(d) 상기 감염시키는 단계 후 사이토카인을 비강내로 주입하는 방법에 의하여 극성화를 유지시켜주는 단계.

### 청구항 2

제1항에 있어서

상기 대식세포(macrophage)의 극성화는 in vivo 상태에서 일어나는 것을 특징으로 하는 마우스 모델 제작방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 사이토카인은 결핵균에 감염된 대식세포의 세포자멸사(apoptosis)를 유도함으로써 결핵균의 증식을 억제하는 마우스 모델 제작방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 사이토카인은 지질다당류(Lipopolysaccharide) 및 인터페론 감마를 포함하는 마우스 모델 제작방법.

### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 지질다당류(Lipopolysaccharide)의 양은 0.5~5㎍/kg 및 인터페론감마의 양은 0.5~5㎍/kg인 것을 특징으로 하는 마우스 모델 제작방법.

### 청구항 6

제1항에 있어서,

결핵균을 감염시키는 단계 후 3,8,14일마다 사이토카인을 주입함으로써 대식세포의 극성을 유지시키는 것을 특징으로 하는 마우스 모델 제작방법.

### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 결핵은 안결핵, 피부 결핵, 부신 결핵, 신장결핵, 부고환 결핵, 림프선 결핵, 후두 결핵, 중이 결핵, 장결핵, 다약제내성 결핵, 폐결핵, 담결핵, 골결핵, 인후결핵, 임파선 결핵, 폐허증, 유방 결핵 또는 척추 결핵인 마우스 모델 제작방법.

### 청구항 8

제 1항 내지 제7항 중의 어느 한 항의 방법에 의하여 제작된 마우스 모델.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 대식세포(macrophage)의 극성(polarization)을 조절한 마우스 모델 및 그 제작방법에 관한 것이다.

[0002] 또한, 본 발명은 대식세포의 극성에 관련된 in vivo.실험시 적용가능한 마우스 모델 및 그 제작방법에 관한 것이다.

[0003] 또한, 본 발명은 결핵균에 대한 대식세포의 기능 및 특성을 알아보기 위한 마우스 모델 및 그 제작방법에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0005] 결핵은 결핵균 및 다른 마이코박테리움(Mycobacterium)종의 감염에 의해 유발되는 만성 감염성 질병이다. 결핵은 매년 약 8백만명의 신규 감염자가 발생되며 3백만명의 목숨을 앗아가는 개발도상국의 주요 질병이며, 또한 선진국에서도 문제점으로 부각되고 있다. 상당한 기간 동안 감염은 무증상일 수 있으나, 결핵은 가장 공통적인 증상으로서 폐의 급성 염증을 나타내며, 그 결과 발열 및 마른 기침(nonproductive cough)을 유발시킨다. 치료하지 않으면, 일반적으로 심각한 합병증 및 사망을 초래한다.

[0006] 결핵은 장기간에 걸친 항생제 요법을 이용하여 치료될 수 있으나, 이러한 치료법이 결핵의 확산을 막기에는 역부족이다. 감염된 개체들은 증상을 나타내지는 아니하나, 일정기간 보균상태(contagious)일 수 있다. 게다가 치료 섭생을 엄격하게 따르더라도 환자의 행동을 통제하는 것은 어렵다. 일부 환자들은 치료과정을 끝마치지 못하는데, 이는 효험없는 치료와 약제 내성의 발달을 초래할 수 있다. 치료의 전 과정을 끝마친다 하더라도, 결핵균 감염은 감염된 개체로부터 근절되지 아니하며 여전히 재활성화될 수 있는 잠복성 감염으로 잔존하게 된다.

[0007] 결핵의 확산을 통제하기 위해서는, 상기 질병에 대한 효과적인 예방접종(vaccination) 및 정확한 초기 진단이 가장 중요하다. 현재까지는 생균(live bacteria)을 이용한 예방접종이 보호 면역을 유도하기 위한 가장 효율적인 방법이다. 상기 목적을 위해 이용되는 가장 일반적인 마이코박테리움은 바실러스 칼메트-게링(BacillusCalemette-Guerin, BCG)인데, M. bovis의 비병원성 종이다. 그러나 BCG의 안정성 및 효능은 논쟁의 대상이 되고 있으며, 미국과 같은 일부 국가에서는 상기 제제를 사용한 일반 대중의 예방접종을 실시하지 않고 있다. 결핵의 진단은 일반적으로 피부 검정법을 이용하여 수행되는데, 상기 검정법은 투베르쿨린 PPD(proteinpurifed derivative)에 대한 피내 노출을 포함한다. 항원-특이 T 세포 반응은 주입후 48-72시간 까지 주입 부위에서의 측정가능한 정도 경화(induration)를 초래하는데, 이는 마이코박테리움 항원에 대한 노출을 의미한다. 그러나 상기 검정법은 민감도 및 특이성에서 문제가 있으며, BCG로 예방접종된 개체들은 감염된 개체들과 구별할 수 없다.

[0008] 대식세포(macrophage)가 마이코박테리움 면역의 주요 작동자로서 역할하는 것으로 밝혀져 왔으며, 또한 T 세포는 이러한 면역의 유력한 유발자이다. 마이코박테리움 감염에 대한 보호에서의 T 세포의 본질적인 역할은 인체면역결핍바이러스(HIV) 감염과 관련된 $CD4^+$T 세포의 고갈로 인한 AIDS 환자에서의 마이코박테리움 감염의 빈번한 발생에 의해 설명된다. 마이코박테리움-감작성 CD4+ T 세포는 γ-인터페론(IFN-γ)의 잠재적인 생산자인 것으로 밝혀져왔으며, 이는 차례로 생쥐에서 큰포식세포에 의한 항-마이코박테리아 영향을 촉발시키는 것으로 입증된 바 있다. 인간에 있어서 IFN-γ의 역할은 덜 명확하지만, 연구는 단독으로 또는 IFN-γ 또는 종양괴사인자-알파와 혼합된, 1,25-디히드록시-비타민 D3가 인간 큰포식세포를 활성화시켜 결핵균 감염을 억제한다는 것을 밝혀내었다. 더욱이, IFN-γ는 인간 큰포식세포를 자극하여 1,25-디히드록시-비타민 D3를 만들어 내는 것으로 알려져 있다. 유사하게, 인터루킨-12(IL-12)는 결핵균 감염에 대한 저항력을 자극하는데 역할을 하는 것으로 밝혀진 바 있다. 결핵균 감염의 면역학에 대한 고찰을 위해, 다음 문헌을 참조하라(Chan & Kaufmann, Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control(Bloom ed., 1994), Tuberculosis(2nd ed., Rom and Garay, eds.,2003), 및 Harrison 's Principles of Internal Medicine, Chapter 150, pp. 953-966(16th ed., Braunwald,et al, eds., 2005)). 활동성 및 잠복성 감염 둘 모두에서의, 마이코박테리움 튜버큘로시스 감염의

재활성화를 예방하기 위한 효과적인 치료 전략에 대한 요구가 여전히 존재한다.

[0009] 현재 많이 이용되고 있는 결핵균 치료제의 경우 40% 이상의 환자에서 치료효과가 나타나지 않고 있다. 또한 효과가 나타나는 환자들의 경우에도 수주에서 수개월간의 시간이 소요된다. 이에 따라서 새로운 결핵균 치료제 개발에 대한 필요성이 대두되고 있다. 효과적인 결핵균 치료제 개발을 위해 동물모델은 필수적이다. 그러나 현재까지 폐질환의 임상적 특성을 포괄적으로 반영하는 모델은 없었다.

[0010] 동물모델에서 고려되어야 할 기본적인 요소는 행동의 조작적 증명과 재현성 및 폐질환 치료에 대한 반응성이다. 이러한 점을 고려할 때, 결핵균 원인 유전자의 이식 및 화학물질 주입방법의 동물 모델 개발은 증상 발현의 균일성과 재현 가능한 결과 확보에 큰 장점이 있다. 또한, 이를 통해 신약의 효능 평가 및 개발기간의 단축을 유도할 수 있다. 특히 결핵균 원인 유전자 이식을 통해 개발된 마우스를 이용하여 신약 스크리닝 시스템을 구축할 경우 다양한 물질의 효능을 개체 수준에서 단기간에 광범위하게 테스트가 가능할 것으로 기대된다.

[0011] 본 발명자들은 상기와 같은 기술적 문제를 해결하기 위하여 신규한 결핵균 동물 모델을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 특정 유전자의 과발현이 유도된 동물모델에서 결핵균 증상이 균일하게 발생하여, 결핵균 치료제에 대한 반응성이 탁월한 것을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

## *발명의 내용*

### *해결하려는 과제*

[0013] 본 발명은 *in vivo.* 실험 시 대식세포(macrophage)의 활성화(activation) 또는 극성화(polarization)된 마우스 모델을 사용하여, 질병 또는 감염 유발 시 체내에서 극성화된 대식세포의 기능 및 특성을 알아보기 위한 마우스 모델 및 그 제작 방법을 제시하고자 함을 목적으로 한다.

### *과제의 해결 수단*

[0015] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일측면에 따른 마우스 모델 제작방법은 사이토카인을 마우스의 비강내로 주입하는 방법에 의하여 마우스의 대식세포(macrophage)를 극성화(polarization) 시키는 단계; 및 상기 극성화시키는 단계로부터 12시간 내지 72시간 후에 대식세포의 극성을 확인하는 단계; 및 결핵균을 마우스의 비강내로 감염시키는 단계; 및 상기 감염시키는 단계 후 사이토카인을 비강내로 주입하는 방법에 의하여 극성화를 유지시켜주는 단계를 포함한다

[0016] 여기서 상기 병원균은 결핵균 또는 염증성 폐질환과 관련된 병원균 또는 감염성 폐질환과 관련된 병원균을 포함한다.

[0017] 상기 대식세포의 극성화는 in vivo 상태에서 일어나는 것을 특징으로 한다.

[0018] 상기 사이토카인은 결핵균에 감염된 대식세포의 세포자멸사(apoptosis)를 유도함으로써 병원균의 증식을 억제하는 것을 특징으로 하며 사이토카인은 지질다당류(Lipopolysaccharide) 및 인터페론 감마로 구성되는 것을 포함한다.

[0019] 또한 구체적으로 대식세포의 극성을 활성화시키기 위하여 사용하는 조성물은 지질다당류(Lipopolysaccharide)의 양은 0.5-5㎍/kg 및 인터페론감마의 양은 0.5-5㎍/kg인 것을 특징으로 한다.

[0020] 상기 마우스 모델 제작방법은 결핵균을 감염시키는 단계 후 3,8,14일마다 사이토카인을 주입함으로써 대식세포의 극성을 유지시켜주는 것을 특징으로 한다.

[0021] 상기 결핵은 안결핵, 피부 결핵, 부신 결핵, 신장결핵, 부고환 결핵, 림프선 결핵, 후두 결핵, 중이 결핵, 장결핵, 다제내성 결핵, 폐결핵, 담결핵, 골결핵, 인후결핵, 임파선 결핵, 폐허증, 유방 결핵 및 척추 결핵으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나일 수 있다.

[0022] 다른 관점에서, 본 발명은 상기 방법에 의하여 제작된 마우스 모델을 포함한다.

## 발명의 효과

[0024] 이상과 같이 본 발명에 따라 신규하게 성립한 마우스 모델은 결핵균 치료제 개발을 위하여 유용하게 사용될 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0026] 도 1A는 자극 후 1,3,6,10일째 M1/M2 마우스 모델의 폐 조직에서 M1/M2 대식세포 극성 마커인 STAT 발현을 보여주는 Western blotting에 의한 단백질 발현 전기영동사진.

도 1B는 결핵균 감염 연구 진행 시의 M1/M2 마우스 모델 제작방법을 간단히 나타낸 모식도.

도 1C는 결핵균을 감염시킨 M1/M2 마우스 모델의 폐 조직에서 M1/M2 대식세포 극성이 유지되는지 확인하기 위해 Weatern blotting 방법을 이용하여 M1/M2 마커인 STAT발현을 확인한 사진..

도 2A는 결핵균 감염 20일 후의 M1/M2 마우스 모델의 혈청에서 Enzime-linked immunosorbent assay(ELISA) 분석방법을 이용하여 사이토카인 분비량을 보여주는 그래프.

도 2B는 결핵균 감염 20일 후의 M1/M2 마우스 모델의 폐 조직의 형태를 나타낸 사진.

도 2C는 결핵균 감염 20일후 M1/M2 마우스 모델의 폐조직을 Hematoxylin& Erosin(H&E) 염색을 통한 병리학적 결과를 보여주는 사진.

도 2d는 결핵균 감염 20일후 마우스 모델의 폐 조직에서 세포자멸(apoptosis)시 유도되는 CHOP와 Caspase-3 단백질 발현을 보여주는 Western blotting에 의한 단백질 발현 전기영동사진.

도 2e는  결핵균 감염 3, 7, 20 일후 M1/M2 마우스 모델의 폐 조직 내에서 생존한 결핵균의 수를 측정한 사진.

이하 첨부된 도면을 참조하여 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 첨부된 도면은 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 또한 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명은 마우스 모델 및 그 제작방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 질병 또는 감염 유발시 체내에서 극성화된 대식세포의 기능 및 특성을 알아보기 위한 마우스 모델을 제조하는 방법에 관한 것이다.

[0028] 이하, 본 발명에 따른 마우스 모델 및 그 제작방법을 실시예와 도면을 참조하여 각 단계별로 구체적으로 설명하도록 한다.

[0030] 본 발명의 일실시에 따른 마우스 모델 제작방법은 사이토카인을 마우스의 비강내로 주입하는 방법에 의하여 마우스의 대식세포(macrophage)를 극성화(polarization) 시키는 단계; 및 상기 극성화시키는 단계로부터 12시간 내지 72시간 후에 대식세포의 극성을 확인하는 단계 ; 및 결핵균을 마우스의 비강내로 감염시키는 단계; 및 상기 감염시키는 단계 후 사이토카인을 비강내로 주입하는 방법에 의하여 극성화를 유지시켜주는 단계를 포함할 수 있다.

[0032] 먼저 본 발명에 일 실시예에 따르면 마우스 모델의 폐포 내 대식세포의 극성을 유도하기 위하여 M1 대식세포 마우스 모델은 Lipopolysaccharide(0.5-5㎍/kg와 IFNγ(0.5-5㎍/kg)를, M2 대식세포 마우스 모델은 IL-4(0.5-5㎍/kg)와 IL-13(0.5-5㎍/kg)을 비강 내로 자극시켜 주었다

[0033] 상기 대식세포의 극성화는 in vivo 상태에서 일어나는 것을 특징으로 하며, 상기 사이토카인은 결핵균에 감염된 대식세포의 세포자멸사(apoptosis)를 유도함으로써 병원균의 증식을 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0035] 그 다음 상기 단계 후 12시간 ~ 72시간내에 대식세포의 극성을 확인하는 단계를 포함한다. 도면에서 1A는 자극 후 1, 3, 6, 10일 째 M1/M2 마우스 모델의 폐 조직에서 M1 대식세포 극성을 나타내는 마커인 phospho-STAT1(p-STAT1)과, M2 대식세포 극성을 나타내는 마커인 phospho-STAT3(p-STAT3), phospho-STAT6(p-STAT6)의 단백질 발현 정도를 웨스턴 블로팅(Western blotting) 방법으로 확인한 결과이다. 자극 후 12시간부터 72시간이내에 대식세포의 M1/M2 극성이 유도되는 것을 확인할 수 있었고, 자극 후 6일 이후부터는 M1/M2 마커의 경향이 사라지는 것을 확인할 수 있었다. (도에서 STAT1, STAT3, STAT6는 내부콘트롤, 이하 동일)

[0037] 그 다음 마우스에 결핵균을 마우스의 비강내로 감염시키는 단계를 포함한다.

[0038] 상기 결핵은 안결핵, 피부 결핵, 부신 결핵, 신장결핵, 부고환 결핵, 림프선 결핵, 후두 결핵, 중이 결핵, 장결핵, 다제내성 결핵, 폐결핵, 담결핵, 골결핵, 인후결핵, 임파선 결핵, 폐허증, 유방 결핵 및 척추 결핵으로 이루어진 군으로부터 선택된 적어도 하나일 수 있다.

[0040] 마지막으로 상기 결핵균을 감염시키는 단계 후 3,8,14일마다 사이토카인을 주입함으로써 대식세포의 극성을 유지시켜주는 단계를 포함한다. 좀 더 구체적으로 M1/M2 대식세포 극성을 유지시키기 위해 감염 후 3, 8, 14일마다 M1 대식세포 마우스 모델은 IFNɣ(0.5-5μg/kg)를, M2 대식세포 마우스 모델은 IL-4(0.5-5μg/kg)를 비강내로 자극시켜 주었다.

[0042] 또한 다른 관점에서, 본 발명은 상기 방법에 의하여 제작된 마우스 모델을 포함한다.

[0043] 그 밖에 본원 발명의 배경개념으로 인터페론 감마는 항원을 만나기 전의 대식세포보다 강력한 항원제시 능력을 갖게 하고 보체매개 탐식능도 키우며 전염증성 사이토카인을 생성하게 만든다는 사실과 이것을 소위 전형적인 활성화된 대식세포(M1)이라 부른다는 사실이다.

[0044] 또한 보조 T림프구는 분비하는 사이토카인에 따라 크게 두가지 다른 형태로 분류하는데 Th1과 Th2 세포로 분류할 수 있다. 이중 IL-4와 같은 Th2 세포에 의해 주로 분비되는 사이토카인은 대식세포를 인터페론 감마에 의해 유도되는 활성화와 대조적인 상태, 예를 들면 주조직적합성항원 class Ⅱ의 발현을 증가시킨다. 이런 상태의 대식세포를 일컬어 대체 활성화 대식세포(M2)라고 한다.

[0046] 이하 본 발명에 따른 대식세포의 극성(Macrophage polarization)을 이용한 세포 내 결핵균의 생존 및 증식 억제 방법의 바람직한 실시예를 첨부한 도면을 참조로 하여 상세히 설명한다. 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 수 있으며, 단지 본 실시예는 본 발명의 개시가 완전하도록 하며 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위하여 제공되는 것이다.

## *실 시 예 1*

[0047] 대식세포의 극성에 관련된 in vivo 실험시 적용가능한 마우스 모델 제작방법

[0048] 1. 대식세포를 M1/M2를 극성화시키는 마우스 모델 제작단계

[0049] 마우스 모델의 폐포 내 대식세포의 극성을 유도하기 위하여 M1 대식세포 마우스 모델은 Lipopolysaccharide(0.5-5μg/kg와 IFNɣ(0.5-5μg/kg)를, M2 대식세포 마우스 모델은 IL-4(0.5-5μg/kg)와 IL-13(0.5-5μg/kg)을 비강 내로 자극시켜 주었다

[0051] 2. 상기 단계 1일 후 대식세포의 극성을 확인하는 단계

[0052] 도면에서 1A는 자극 후 1, 3, 6, 10일 째 M1/M2 마우스 모델의 폐 조직에서 M1 대식세포 극성을 나타내는 마커인 phospho-STAT1(p-STAT1)과, M2 대식세포 극성을 나타내는 마커인 phospho-STAT3(p-STAT3), phospho-STAT6(p-STAT6)의 단백질 발현 정도를 웨스턴 블로팅(Western blotting) 방법으로 확인한 결과이다. 자극 후 1일부터 대식세포의 M1/M2 극성이 유도되는 것을 확인할 수 있었고, 자극 후 6일 이후부터는 M1/M2 마커의 경향

이 사라지는 것을 확인할 수 있었다. (도에서 STAT1, STAT3, STAT6는 내부콘트롤, 이하 동일)

[0054] 3. 마우스에 결핵균을 감염시키는 단계

[0055] 도 1B는 결핵균 감염 연구 진행 시의 M1/M2 마우스 모델 제작방법을 간단히 나타낸 모식도이다. 도 1A에서 얻은 결과를 토대로 하여 대식세포 극성 마우스 모델을 제작하고, 자극 후 1일에 결핵균($5X10^6$)을 비강 내로 감염시켰다.

[0057] 4. 상기 감연시키는 단계 후 3,8,14일후 인터페론 감마등을 비강내로 주입하는 방법에 의하여 극성을 유지시키는 단계 및 유지되었는지 확인하는 단계.

[0058] 감염 후 마우스 모델의 폐 내에서 M1/M2 대식세포 극성을 유지시키기 위해 감염 후 3, 8, 14일 마다 M1 대식세포 마우스 모델은 IFNγ(0.5-5μg/kg)를, M2 대식세포 마우스 모델은 IL-4(0.5-5μg/kg)를 비강 내로 자극시켜 주었다.

[0059] 도 1C는 결핵균을 감염시킨 M1/M2 마우스 모델의 폐 조직에서 M1/M2 대식세포 극성이 유지되는지 확인하기 위해 Western blotting 방법을 이용하여 M1/M2 마커인 STAT 발현을 확인한 결과이다. M1/M2 극성 마우스 모델에 결핵균 감염 3일후, 마우스 모델의 폐 조직에서 M1 대식세포 극성을 나타내는 마커인 phospho-STAT1과, M2 대식세포 극성을 나타내는 마커인 phospho-STAT3, phospho-STAT6의 단백질 발현 정도를 Western blotting 방법으로 확인한 결과이다. 감염 후에도 마우스 모델의 폐 내 대식세포에서 M1/M2 극성이 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

[0060] 상기 실시예에서는 마우스의 폐포 내 극성화된 대식세포 즉, 마우스 폐의 대식세포 극성을 조절하여 M1 대식세포 또는 M2 대식세포 마우스 모델을 제작하고 이를 확인하였다. 본 발명에 의한 대식세포 극성 조절 마우스 모델은 다양한 병원균 감염 및 여러 질병에 관련한 대식세포 극성 조절 연구에도 적용할 수 있을 것이다.

## *실 시 예 2*

[0062] 제조된 마우스 모델을 통하여 대식세포의 극성화가 결핵균 억제에 효능이 있는지 확인하는 방법.

[0063] 도 2A는 결핵균 감염 20일 후의 M1/M2 마우스 모델의 혈청에서 Enzime-linked immunosorbent assay(ELISA) 분석방법을 이용하여 사이토카인 분비량을 보여주는 그래프이다. 결핵균 감염 20일 후 M1/M2 마우스 모델의 혈액에서 혈청을 분리한 후, Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 분석방법을 이용하여 염증성 사이토카인 IL-12p40, IL-6, tumor necrosis factor (TNF), monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) 과, 항염증성 사이토카인 IL-10의 분비량을 확인하였다. 결핵균 감염 후 마우스 모델의 폐 내 대식세포의 M1/M2 극성에 따라 사이토카인의 발현 경향이 다르게 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

[0064] 도 2B는 결핵균 감염 20일 후 M1/M2 마우스 모델의 폐 조직의 형태를 나타낸 사진이다. M1 마우스 모델보다 M2 마우스 모델의 폐 조직에서 염증성 병변의 수가 현저히 증가되어 있는 것을 관찰하였다.

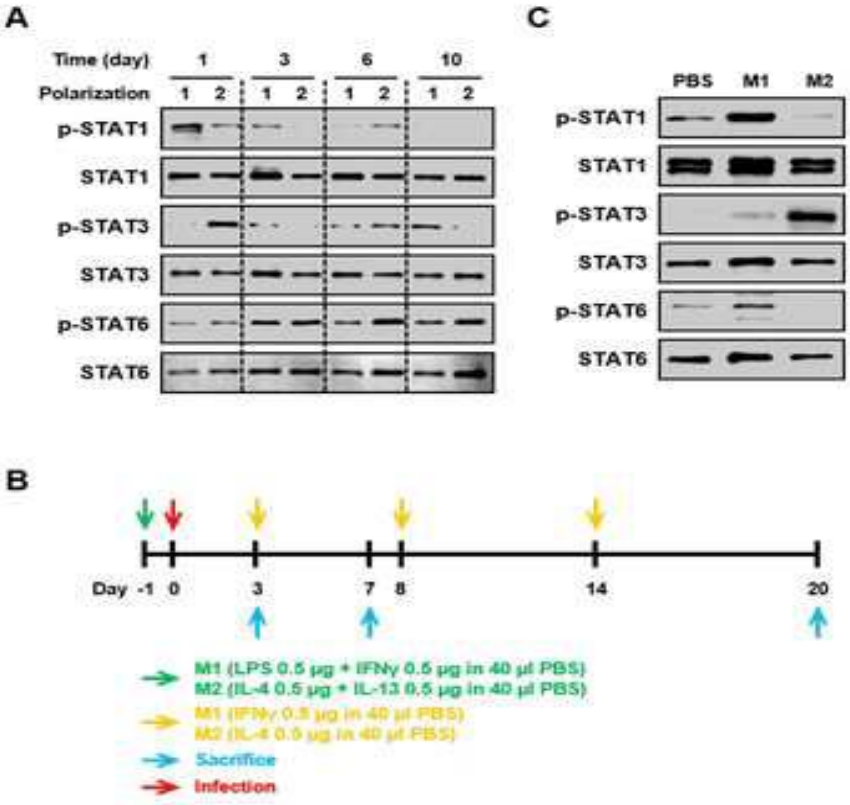
[0065] 도 2C는 결핵균 감염 20일 후 M1/M2 마우스 모델의 폐 조직을 H&E 염색시키고 현미경으로 관찰한 병리학적 결과를 보여주는 사진이다. M1 마우스 모델보다 M2 마우스 모델의 폐 조직에서 염증에 의한 면역세포의 밀집이 유도되고 육아종이 형성된 것을 확인할 수 있었다.

[0066] 도 2D는 결핵균 감염 20일 후 M1/M2 마우스 모델의 폐 조직에서 세포자사멸(Apoptosis) 시 유도되는 CHOP과 Caspase-3 단백질 발현 정도를 Western blotting 방법으로 확인한 결과이다. M2 마우스 모델보다 M1 마우스 모델의 폐조직에서 CHOP과 Caspase-3의 활성이 현저히 높은 것을 관찰할 수 있었다.

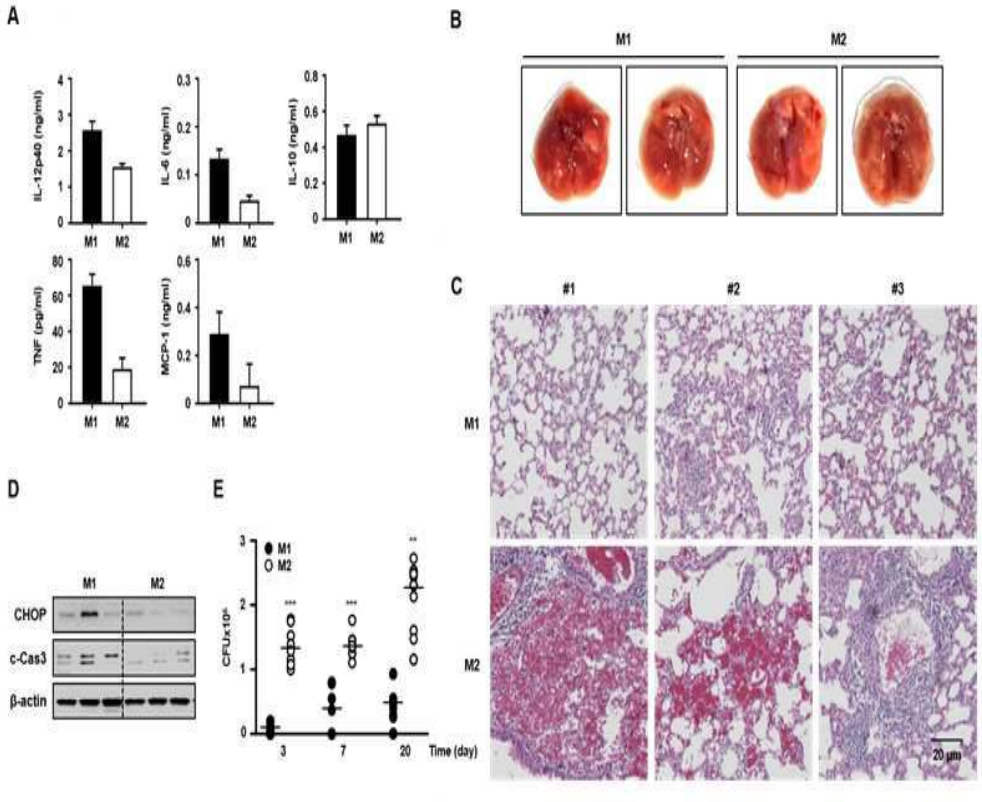
[0067] 도 2E는 결핵균 감염 3, 7, 20일 후 M1/M2 마우스 모델의 폐 조직 내에서 생존한 결핵균의 수를 측정하였다. M1 마우스 모델보다 M2 마우스 모델의 폐 내에서 결핵균의 생존이 유리한 것을 확인할 수 있었다.

도면

도면1


A
Time (day)
1
3
6
10
Polarization
1 2 1 2 1 2 1 2
p-STAT1
STAT1
p-STAT3
STAT3
p-STAT6
STAT6
C
PBS
M1
M2
p-STAT1
STAT1
p-STAT3
STAT3
p-STAT6
STAT6
B
Day -1 0 3 7 8 14 20
M1 (LPS 0.5 μg + IFNγ 0.5 μg in 40 μl PBS)
M2 (IL-4 0.5 μg + IL-13 0.5 μg in 40 μl PBS)
Sacrifice
Infection

도면2


A
IL-12p40 (ng/ml)
IL-6 (ng/ml)
IL-10 (ng/ml)
TNF (pg/ml)
MCP-1 (ng/ml)
M1
M2
B
M1
M2
C
#1
#2
#3
M1
M2
20 μm
D
M1
M2
CHOP
c-Cas3
β-actin
E
M1
M2
CFU×10⁶
Time (day)
3
7
20