



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0131256
(43) 공개일자 2017년11월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/17 (2014.01) A61K 35/14 (2015.01)
A61K 35/26 (2015.01) A61K 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 35/17 (2013.01)
A61K 35/14 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0061525
(22) 출원일자 2017년05월18일
심사청구일자 2017년05월18일
(30) 우선권주장
1020160062336 2016년05월20일 대한민국(KR)

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
서주영
서울특별시 양천구 목동동로 411 (목동, 부영그린타운3차아파트)
홍천표
경상북도 포항시 남구 지곡로 102, 3동 106호 (지곡동, 낙원아파트)
(74) 대리인
안소영

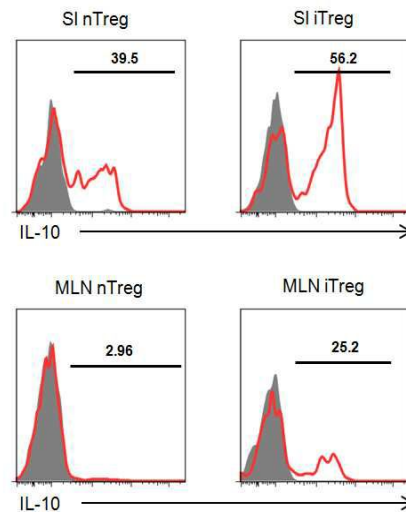
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 장 점막 타겟형 유도성 조절 T 세포를 유효성분으로 함유하는 제2형 당뇨병 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 장 점막 타겟형 유도성 조절 T 세포를 유효성분으로 함유하는 제2형 당뇨병 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 약학적 조성물을 이용하면 장 점막 고유 장벽기능을 회복시키고 IL-10과 같은 항염증성 사이토카인의 분비를 촉진하며, 혈중 글루코스를 감소시켜 제2형 당뇨병을 효과적으로 치료할 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A61K 35/26 (2013.01)

A61K 9/0019 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A2008077

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기초연구사업(학술진흥)-일반연구자지원사업-기본연구

연구과제명 고압산소요법의 면역조절기전 연구

기 여 율 1/1

주관기관 이화여자대학교 산학협력단

연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

장 점막 타겟형 유도성 조절 T 세포를 유효성분으로 함유하는 제2형 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용가능한 담체를 더 포함하는 약학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 조성물은 주사제인 약학적 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 장 점막 타겟형 유도성 조절 T 세포는 혈액, 비장 또는 림프절로부터 분리된 T 세포를 분화시킨 것인, 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 장 점막 타겟형 유도성 조절 T 세포는 $\text{TCR}\beta^+ \text{CD4}^+ \text{Foxp3}^+ \text{CCR9}^+ \alpha 4\beta 7^+$ 인 약학적 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 장 점막 타겟형 유도성 조절 T 세포를 유효성분으로 함유하는 제2형 당뇨병 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 당뇨병은 인슐린의 분비량이 부족하거나 정상적인 기능이 이루어지지 않는 등의 대사질환의 일종으로, 혈중 포도당의 농도가 높아지는 고혈당을 특징으로 하며, 고혈당으로 인하여 여러 증상 및 징후를 일으키고 소변에서 포도당을 배출하게 된다.

[0003] 당뇨병은 제1형과 제2형으로 구분되는데, 제1형 당뇨병은 인슐린을 생산하지 못하여 발생하고, 제2형 당뇨병은 인슐린 분비되거나 세포가 인슐린에 대한 저항성(insulin resistance)을 갖게 되어 발생한다. 제2형 당뇨병에서 인슐린 분비에는 이상이 없기 때문에 인슐린 비의존성 당뇨병(non-insulin dependent diabetes mellitus)이라고도 한다. 제2형 당뇨병은 고열량·고단백 식단 섭취 및 운동 부족으로 인한 비만과 복합적으로 나타나는 경우가 많으며, 그 외에 유전적 요인, 감염, 특정 약제, 췌장 수술 등에 의해서도 발생할 수 있다. 제2형 당뇨병의 정확한 원인 및 발병 기전에 대해서는 아직 완전히 규명되어 있지 않다.

[0004] 현재 전체 당뇨병 치료제 시장의 63%가 경구용 치료제이며, 나머지 약 37%는 인슐린 제제가 차지하고 있다. 그런데 인슐린 제제는 혈당 강하 효과는 뛰어난 반면 저혈당 쇼크, 체중 증가 등의 부작용이 있다. 따라서 효율적인 혈당관리가 어렵기 때문에 다양한 약물을 병용으로 사용하고 있는 실정이다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) Thompson JA, Perry D, Brusko TM, Autologous regulatory T cells for the treatment of type 1 diabetes, Curr Diab Rep. 2012

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 장 점막 타겟형 유도성 조절 T 세포(gut tropic inducible regulatory T cell)를 유효성분으로 함유하는 제2형 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위해서, 본 발명은 장 점막 타겟형 유도성 조절 T 세포(inducible regulatory T cell)를 유효성분으로 함유하는 제2형 당뇨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0008] 본 발명의 장 점막 타겟형 유도성 조절 T 세포는 Naive T 세포($CD4^{+}CD44^{lo}CD62L^{hi}CD25^{-}$)를 항-CD3e 항체 및 항 CD28 항체로 자극하고, hTGF β , IL-2, 및 레티노산을 포함하는 배지에서 분화시켜 제조한 것이다. 본 발명의 장 점막 타겟형 유도성 조절 T 세포는 유도성 조절 T 세포이므로 $TCR\beta^{+}CD4^{+}Foxp3^{+}$ 이며, 장 점막 친화성(gut tropic)으로서 $CCR9^{+}\alpha4\beta7^{+}$ 이다. 본 발명의 일 구현예로서, 상기 장 점막 타겟형 유도성 조절 T 세포는 혈액, 비장 또는 림프절로부터 분리된 T 세포를 분화시킨 것일 수 있다.

[0009] 본 발명자들은 소장(small intestine)의 면역기관으로서의 기능에 주목하였다. 소장은 음식물 흡수 작용 뿐 아니라 점막고유층(lamina propria)에 다양한 면역세포들이 존재하여 신체에서 가장 큰 면역 기관으로 작용한다. 본 발명자들은 장 점막 고유 장벽기능(barrier function) 붕괴가 제2형 당뇨병의 원인이 됨을 최초로 규명하였다. 구체적으로, 장 점막 고유 장벽기능 붕괴로 인해 장내 미생물들이 체내로 유입되어 내독소혈증(endotoxemia)을 유발하고, 내독소혈증에 의해 염증성사이토카인(TNF- α , IFN- γ)이 유도되고, 이러한 염증성(pro-inflammatory) 사이토카인은 인슐린신호를 교란시키면서 인슐린 저항성(insulin resistance)을 유도함을 규명하였다. 본 발명자들은 iTreg 투여시 장 점막 고유 장벽기능을 회복시키고 IL-10과 같은 항염증성 사이토카인의 분비를 촉진하여 제2형 당뇨병이 치료될 수 있음을 규명하고 본 발명을 완성하였다.

[0010] 본 발명의 일 구현예로서, 본 발명의 조성물은 주사제 조성물이 될 수 있다. 본 발명의 조성물이 주사제로 제제화되는 경우, 멸균된 용액 등이 포함될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 랫트, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로, 예를 들면, 복강내, 직장내, 정맥내, 근육내, 또는 자궁내 경막 으로 주사 등에 의해 투여될 수 있다.

[0011] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서, 유효성분의 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 경우에 따라 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 조성물은 체중 1×10^1 ~ 1×10^{50} 개/ kg, 예컨대 1×10^1 ~ 1×10^{30} 개/ kg, 보다 바람직하게는 1×10^5 ~ 1×10^{20} 개/ kg, 예를 들어 1×10^7 ~ 1×10^9 개/ kg의 범위 내에서 조절할 수 있다. 예를 들어, 1 kg 당 0.1 내지 100,000 mg/kg의 투여량으로 투여할 수 있다. 상기 투여는 하루에 한번 또는 수회 나누어 투여할 수도 있다.

[0012] 상기 약학적 조성물은 상기 장 점막 타겟형 유도성 조절 T 세포를 유효성분으로 함유하고, 약제학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있으며, 통상의 방법에 따라 멸균 주사용액 등 비경구 제형 형태로 제제화될 수 있다. 상기 약제학적으로 허용 가능한 담체는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한다.

[0013] 본 발명의 약학적 조성물은 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 포함한다.

[0014] 본 발명의 약학적 조성물은 예를 들어 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 직장, 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다. 바람직하게는 본 발명의 조성물은 비경구로 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로는 이에 제한되지 않는다.

[0015] 본 발명은 본 발명의 약학적 조성물을 치료학적으로 유효한 양으로 치료가 필요한 대상체에게 투여하여 제2형 당뇨병을 예방, 개선 또는 치료하는 방법을 제공한다. 상기 "치료가 필요한 대상체"는 인간을 위시한 포유동물을 의미하고, "투여"는 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미한다. "치료학적으로

로 유효한 양"은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상가에 의해 생각되는 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 활성 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분과 관련된 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다.

[0016] 본 발명은 제2형 당뇨병의 치료를 위한 약제학적 제제를 제조하는 데 상기 약학적 조성물을 사용하는 용도를 제공한다.

[0017] 본 명세서에서 “iTreg 세포”는 “유도성 조절 T 세포”를 의미하며, “nTreg 세포”는 “natural 조절 T 세포”를 의미한다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 약학적 조성물을 이용하면 장 점막 고유 장벽기능을 회복시키고 IL-10과 같은 항염증성 사이토카인의 분비를 촉진하며, 혈중 글루코스를 감소시켜 제2형 당뇨병을 효과적으로 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 HFD를 먹인 실험군 마우스가 NCD를 먹인 대조군 마우스보다 체중(좌측), VAT(중앙) 및 공복 혈당(우측)이 크게 증가함을 보여주는 도이다.

도 2는 비장에서 IL-1 β , IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-17A, 및 IL-6의 발현을 확인한 도이다.

도 3은 VAT에서 IL-1 β , IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-17A, 및 IL-6의 발현을 확인한 도이다.

도 4는 소장에서 IL-1 β , IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-17A, 및 IL-6의 발현을 확인한 도이다.

도 5는 소장의 각 부위(십이지장, 공장, 회장)에서 IL-10의 발현을 확인한 도이다.

도 6은 실험군의 소장에서 iTreg 세포가 대조군보다 약간 감소하는 것을 확인한 도이다.

도 7의 좌측 그래프는 실험군의 소장에서 nTreg 세포가 크게 증가하는 것을 확인한 도이다. 도 7의 중앙 그래프는 실험군과 대조군의 장간막 림프절, 비장, 파이어스 패치, 소장 및 결장 면역세포에서 iTreg 세포를 관찰한 결과이다. 도 7의 우측 그래프는 실험군과 대조군의 소장에서 HFD 급이가 지속됨에 따른 iTreg 세포의 수 변화를 관찰한 결과이다(도 7의 우측 그래프).

도 8은 소장 및 장간막 림프절(mesenteric lymph node, MLN)의 nTreg 세포와 iTreg 세포에서 IL-10의 발현 정도를 확인한 도이다.

도 9는 실험군에서 nTreg 세포 투여가 체중 증가에 효과가 없는 것을 확인한 도이다.

도 10은 실험군에서 nTreg 세포 투여가 피하지방 증가에 효과가 없는 것을 확인한 도이다.

도 11은 실험군에서 nTreg 세포 투여가 글루코스 내성 시험 결과에 효과가 없는 것을 확인한 도이다.

도 12는 실험군에서 nTreg 세포 투여가 인슐린 내성 시험 결과에 효과가 없는 것을 확인한 도이다.

도 13은 실험군에서 iTreg 세포 투여가 체중 증가에 효과가 없는 것을 확인한 도이다.

도 14는 실험군에서 iTreg 세포 투여가 글루코스 내성 시험 결과에 효과가 있음을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0021] 실시예 1. HFD에 의한 체중, 지방조직 및 공복혈당의 변화

[0022] 비만 유도를 위해, 6주령 수컷 마우스를 준비하여 실험군과 대조군으로 나누고(군 당 7마리), 실험군에는 HFD(High Fat Diet)(60 kcal% fat, Research Diets), 대조군에는 NCD(Normal Chow Diet)(12.41% calories fat, Cargill Agri Purina Inc)를 먹였다.

[0023] 실험군과 대조군의 체중을 매 주 측정하여 얻은 평균값을 도 1의 좌측 도에 그래프로 나타내었고, HFD 급이 10주차에 개복 후 VAT(visceral adipose tissue)를 촬영한 도 및 VAT 질량 평균값을 도 1의 중앙에 나타내었고,

HFD 급이 10주차에 글루코미터(glucometer)(Accu-Chek Performa kit, Roche)로 측정한 공복 혈당 평균값을 도 1의 우측 도에 그래프로 나타내었다.

[0024] 도 1에서 HFD를 먹인 실험군 마우스는 NCD를 먹인 대조군 마우스보다 체중, VAT 및 공복 혈당이 크게 증가하였음을 알 수 있다.

[0025] **실시예 2. HFD에 의한 대사관련 장기에서의 사이토카인의 변화**

[0026] 비장(spleen), VAT(Viceral Adipose Tissue, 복부지방) 및 소장(small intestine)은 대표적인 신체의 대사관련 장기이다. 비장은 신체에서 가장 큰 림프기관으로 감염을 막는 기능을 하며, VAT는 대사와 관련하여 직접적으로 영향을 받는 조직이고, 소장은 장점막의 다양한 면역세포를 통해 면역작용을 수행하는 신체의 가장 큰 면역기관이다. 따라서 상기 장기들에서 염증 관련 사이토카인인 IL-1 β , IL-10, TNF- α , IFN- γ , IL-17A, 및 IL-6의 발현 정도를 관찰하였다.

[0027] 실시예 1에서 준비한, 10주간 HFD를 먹인 실험군 마우스와 NCD를 먹인 대조군 마우스를 희생시키고, 비장(spleen), VAT 및 소장(small intestine)을 분리한 후, 각 장기에서 TRizole 시약(Life Technologies)으로 총 RNA를 추출하고 GoScript Reverse Trascription System (Promega)을 사용하여 cDNA를 합성하였다.

[0028] 그 다음 SYBR Premix Ex Taq (Takara) 및 Viia 7 real-time PCR instrument (Applied Biosystems)를 사용하여 정량적 실시간 PCR을 수행하여 각 사이토카인의 발현을 확인하였다.

[0029] 비장, VAT, 및 소장에서의 사이토카인 발현 결과를 각각 도 2, 3, 4에 나타내었다. 도 3에서 실험군의 VAT의 염증 관련 사이토카인 농도가 대조군에 비해 크게 증가하였다. 그러나 도 2에서 비장의 실험군과 대조군의 염증 관련 사이토카인 농도에 큰 변화가 없어, HFD 급이에 의해 유도된 VAT의 사이토카인 변화가 감염에 의한 것이 아니라는 것을 알 수 있다. 도 4에 나타난 소장에서의 결과 주목할 만한 것은 IL-10에 대한 것인데, 실험군에서 항염증성 사이토카인에 해당하는 IL-10의 농도가 크게 감소한 것으로 나타났다.

[0030] 또한 소장은 매우 큰 면역기관이므로 소장의 각 부위(십이지장(duodenum), 공장(jejenum), 회장(ileum))에서 총 RNA를 추출한 후 정량적 실시간 PCR로 IL-10의 발현을 확인한 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 HFD를 먹인 실험군 마우스의 소장 모든 부위에서 IL-10의 발현이 크게 감소한 것을 확인하였다.

[0031] 상기 결과로부터 HFD에 의해 유도된 비만 개체의 대사관련 장기에서 감염과 무관하게 염증 관련 사이토카인 발현이 증가하나, 소장에서 항염증 효과를 나타내는 IL-10의 발현이 크게 감소함을 알 수 있었다. 이로부터 비만에서 IL-10의 발현 감소에 의해 염증성 환경이 조성됨을 유추하였다.

[0032] **실시예 3. HFD에 의한 iTreg 감소**

[0033] **3-1. 면역세포의 분리**

[0034] 실시예 1과 같이, 10주간 HFD를 먹인 실험군 마우스와 NCD를 먹인 대조군 마우스를 준비하였다.

[0035] 소장에서 지방 및 파이어스 패치(Peyer's patches)를 제거한 후 소장을 세로로 절개하여 열고, PBS로 세척한 후 1-2 cm 길이로 절단하였다. 상피 세포를 제거하기 위해 소장 단편을 지속적으로 교반하면서 FACS 완충액(3% FCS, 20 mM HEPES, 100 U/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신, 1 mM 소듐 파이루베이트 및 10 mM EDTA를 함유하는 PBS) 내에 20분간 배양하였다. PBS 내에서 격하게 교반한 후에, 상기 소장 단편을 다지고 45분간 37 $^{\circ}$ C에서 효소 배지(콜라게나제 D(collagenase D) 400 U/ml, 10 μ g/ml DNase I, 3% FCS, 20 mM HEPES, 100 U/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신, 1 mM 소듐 파이루베이트, 및 1 mM NEAA를 함유하는 RPMI 400 배지)에서 소화시켰다. EDTA를 최종 농도 10 mM로 첨가하고 세포 현탁액을 추가로 5분간 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 100 μ M 셀 스트레이너(cell strainer)를 통해 여과한 후, 림프구를 풍부하게 하기 위해 40/75% Percoll (GE Healthcare Life Sciences)에서 회전시켰다.

[0036] 장간막 림프절(mesenteric lymph node, MLN)을 분리하고 이를 FACS 완충액 내에서 20분간 배양하고, 100 μ M 셀 스트레이너를 통해 여과한 후 이하의 분석에 사용하였다.

[0037] 또한 비장을 분리하고, 이를 FACS 완충액 내에서 20분간 배양하고, 100 μ M 셀 스트레이너를 통해 여과한 후, lysis buffer를 이용하여 적혈구를 제거하여 이하의 분석에 사용하였다. 파이어스 패치의 경우 FACS 완충액 내에서 20분간 배양하는 단계를 생략하고 그 외의 경우는 비장과 동일한 방법으로 준비하였다.

[0038] 결장의 경우, 소장와 동일한 방법으로 준비하되, 효소 배지에 콜라게나제 D 800 U/ml, DNase I 20 μ g/ml를 함

유하는 효소 배지를 사용하였다.

[0039] **3-2. 각 장기에서의 iTreg 세포 비율 관찰**

[0040] 상기 3-1에서 분리된 T 세포에서 iTreg 세포($\text{TCR}\beta^+ \text{CD4}^+ \text{Foxp3}^+ \text{Nrp-1}^-$)와 nTreg 세포($\text{TCR}\beta^+ \text{CD4}^+ \text{Foxp3}^+ \text{Nrp-1}^+$)의 비율을 유동 세포 계수법을 통해 관찰하였다. 이하 유동 세포 계수법에 사용된 모든 형광-컨주게이션 항체는 BD Biosciences, eBioscience, R&D Systems 또는 Biolegend로부터 구입되었다.

[0041] 3-1에서 분리된 실험군과 대조군의 소장 T 세포에서 항-CD16/CD32 (2.4G2, BD)로 Fc 수용체를 차단하고, 항-TCR β (H57-597) 항체, 항-CD4 (RM4-5) 항체, 및 항-Foxp3 (FJK-16s) 항체로 염색하였다. 전사인자 염색을 위해서는 Foxp3/전사인자 염색 완충액 세트(eBioscience)를 사용하였다. 그리고 유동 세포 계수법으로 관찰한 결과, 실험군에서 iTreg 세포의 마커인 Foxp3를 발현하는 세포의 수가 대조군보다 약간 감소한 것으로 나타났다(도 6).

[0042] 또한 3-1에서 분리된 실험군과 대조군의 소장 및 장간막 림프절 면역세포에서 항-CD16/CD32 (2.4G2, BD)로 Fc 수용체를 차단하고, 항-TCR β (H57-597) 항체, 항-CD4 (RM4-5) 항체, 항-Foxp3 (FJK-16s) 항체 및 항-neuropilin-1 (FAB5994A) 항체로 염색하고 유동 세포 계수법으로 관찰한 결과, 실험군의 소장에서 nTreg 세포의 마커인 neuropilin-1(Nrp-1)을 발현하는 세포의 수가 크게 증가하고 neuropilin-1을 발현하지 않는 세포의 비율이 감소한 것을 알 수 있었다(도 7의 좌측 그래프).

[0043] 3-1에서 분리된 실험군과 대조군의 장간막 림프절, 비장, 파이어스 패치, 소장 및 결장 면역세포에서 유동 세포 계수법으로 Foxp3를 발현하는 iTreg 세포의 비율을 관찰하였을 때, 장 관련 조직(파이어스 패치, 소장, 결장)에서 실험군의 iTreg 세포 비율이 대조군보다 감소했다. 소장의 경우 다양한 항원이 존재하여 iTreg 세포의 비율이 60~70% 정도로 높은 것이 정상이나, 실험군의 소장에서는 iTreg 세포의 수가 크게 감소한 것으로 나타났다(도 7의 중앙 그래프). 반면, 장 관련 조직이 아닌 장간막 림프절 및 비장에서는 실험군의 iTreg 세포 비율이 대조군과 비교하여 유의하게 감소하지 않았다(도 7의 중앙 그래프).

[0044] 3-1에서 분리된 실험군과 대조군의 소장 면역세포에서 Foxp3를 발현하는 iTreg 세포의 비율을 실험군의 HFD 급이 개시일로부터 2주, 4주, 10주 경과 시점에 유동 세포 계수법으로 관찰하였을 때, 실험군에서 iTreg 세포의 수가 HFD 급이가 지속됨에 따라 점점 감소하는 것으로 나타났다(도 7의 우측 그래프).

[0045] 상기 결과로부터 HFD에 의해 비만이 유도되면 소장에서 iTreg 세포 수가 현저하게 감소함을 알 수 있다.

[0046] **실시예 4. nTreg 세포와 iTreg 세포의 IL-10 발현**

[0047] IL-10 발현을 형광으로 확인할 수 있도록 형질전환된 IL-10 형광 (eGFP) 마우스를 준비하고, 마우스를 희생시키고 소장(장 점막 고유층) 및 장간막 림프절에 존재하는 T reg 세포를 분리하여 nTreg 세포와 iTreg 세포를 확인하였다.

[0048] 그 결과, iTreg 세포에서 IL-10이 많이 발현되는 것으로 나타났다(도 8). 이로부터 IL-10 사이토카인 발현에 있어서 iTreg 세포의 중요성을 알 수 있다.

[0049] **실시예 5. nTreg 세포의 양자 T 세포요법(Adoptive T cell Transfer)**

[0050] B6 마우스의 비장 및 림프절로부터 natural 조절 T 세포를 분리하여 정제하고, 3회 세척한 후 PBS 내에 재현탁시켰다.

[0051] 상기 재현탁된 nTreg 세포를, 10주간 HFD를 먹인 Rag1-null 마우스의 복강 내로 주사하였다. T 세포가 결여된 Rag1-null 마우스를 사용한 이유는 다른 T 세포의 영향을 받는 것을 막아 정확한 실험 결과를 도출하기 위함이다. 한편 대조군에는 PBS를 주사하였다. 그 다음 마우스에게 추가로 5주간 HFD를 주고 체중, 피하지방, 혈당, 초기 혈당 및 인슐린 농도를 모니터링하였다.

[0052] 그 결과, 도 9에서, nTreg 세포를 주사한 마우스는 대조군과 마찬가지로 체중이 증가하였고, 도 10에서 대조군보다 피하지방이 오히려 더 증가한 것을 알 수 있다. 도 11은 글루코스 내성 시험 결과인데, 마우스를 16시간 동안 금식시킨 후 글루코스 (2 g/Kg 체중)를 복강내로 투여하고 각 시점에 글루코미터로 혈당 농도를 측정했을 때 nTreg 세포를 주사한 마우스는 대조군보다 유사한 혈당 변화 양상을 나타내었다. 도 12는 인슐린 내성 시험 결과인데, 마우스를 4시간 동안 금식시킨 후 인간 인슐린(0.75 U/kg 체중)을 복강내로 투여하고 각 시점에 글루코미터로 혈당 농도를 측정했을 때 nTreg 세포를 주사한 마우스는 대조군과 유사한 혈당 변화 양상을 나타내었고(도 12의 좌측 그래프), 인슐린 ELISA (Mercodia)로 농도를 측정했을 때 nTreg 세포를 주사한 마우스는 대조

군보다 인슐린 농도가 더 높게 나타났다.

[0053] 상기 도 9 내지 12의 결과로부터, nTreg의 양자 T 세포요법은 HFD를 먹인 마우스에서 제2형 당뇨병 치료 효과가 없는 것을 알 수 있다.

[0054] **실시예 6. 장 점막 타겟형 iTreg 세포 제조**

[0055] B6 마우스의 비장 및 림프절로부터 Naive T 세포를 분리하고 부동화된 항-CD3e 항체(5 mg/ml, 145-2C11, BD Biosciences) 및 가용성 항-CD28 항체(2 mg/ml, 37.51, BD Biosciences)로 3-4일간 자극하였다. 그 다음 hTGFb (5 ng/ml), IL-2 (20 ng/ml) 및 all-*trans* Retinoic Acid (1 nM, Sigma Aldrich)로 보충된 배지에서 3-4일간 배양하여 Naive T 세포가 장 점막 타겟형 iTreg 세포로 분화되도록 유도하였다. 그 다음 Foxp3⁺인 세포를 제거하여 iTreg 세포로 분화된 세포들만을 정제하고, 3회 세척한 후 PBS 내에 재현탁시켰다.

[0056] **실시예 7. iTreg 세포의 양자 T 세포요법(Adoptive T cell Transfer)**

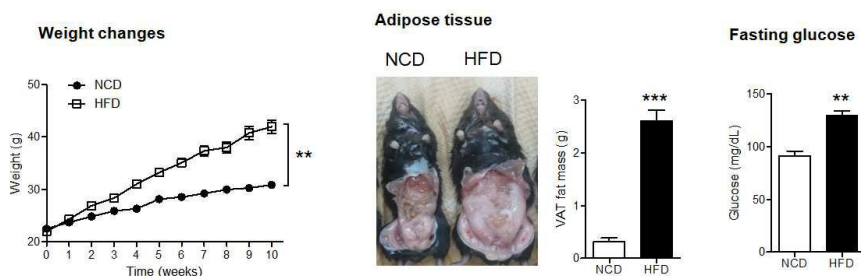
[0057] 상기 실시예 6에 따라 제조된 iTreg 세포를, 10주간 HFD를 먹인 C57BL/6 마우스의 복강 내로 주사하였다. 한편 대조군에는 PBS를 주사하였다. 그 다음 마우스에게 추가로 5주간 HFD를 주고 체중 및 혈당을 모니터링하였다.

[0058] 그 결과, 도 13에서, iTreg 세포를 주사한 마우스는 대조군과 마찬가지로 체중이 증가하였고, 체중의 증가량은 대조군과 비교하여 거의 차이가 없음을 알 수 있다. 도 14는 글루코스 내성 시험 결과인데, 마우스를 16시간 동안 금식시킨 후 글루코스 (2 g/Kg 체중)를 복강내로 투여하고 각 시점에 글루코미터로 혈당 농도를 측정했을 때 iTreg 세포를 주사한 마우스는 대조군에 비해 혈당이 급격히 감소하는 양상을 나타내었다. 구체적으로, 글루코스를 투여한 뒤 30분 경과시, 실험군의 혈중 글루코스 농도는 대조군에 비해 급격히 감소되었다.

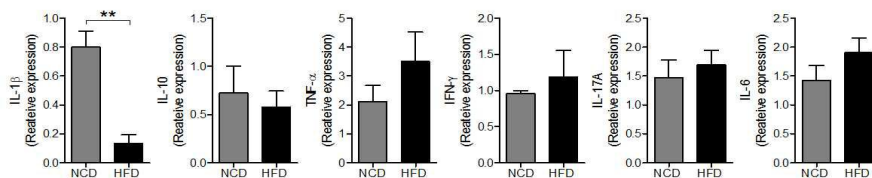
[0059] 상기 도 13 및 14의 결과로부터, iTreg는 제2형 당뇨병의 예방 및 치료 효과가 있음을 알 수 있다.

도면

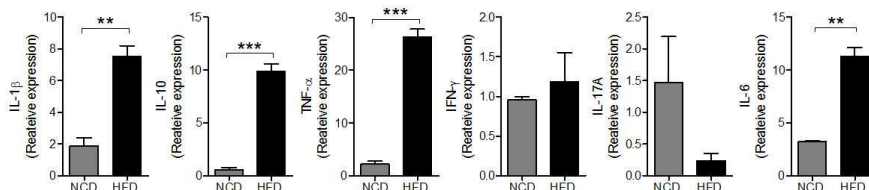
도면1



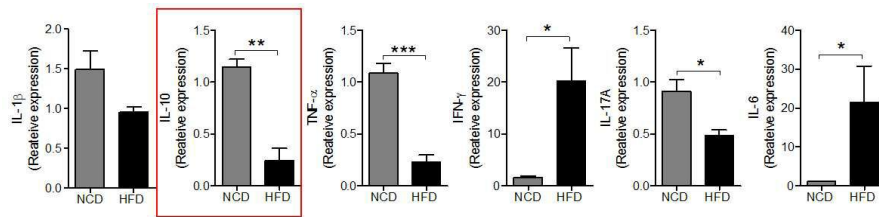
도면2



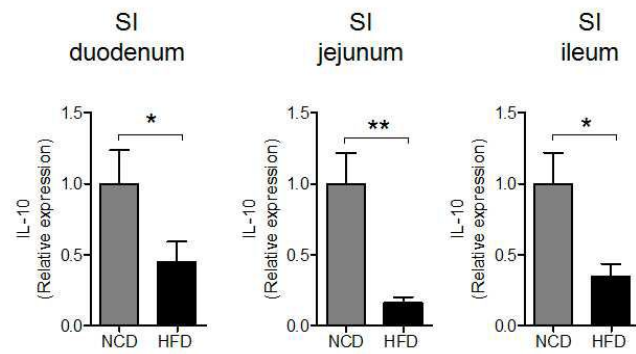
도면3



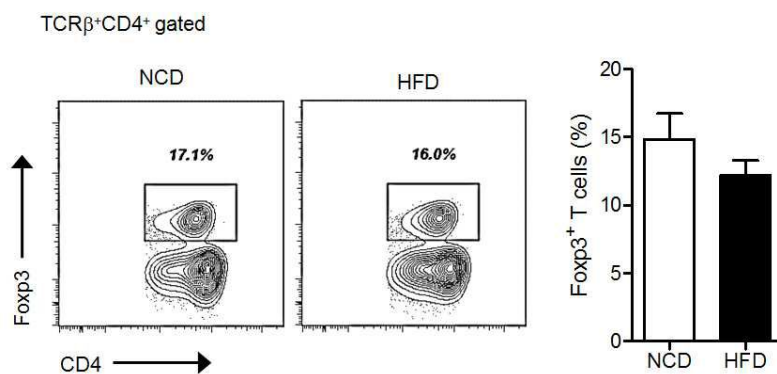
도면4



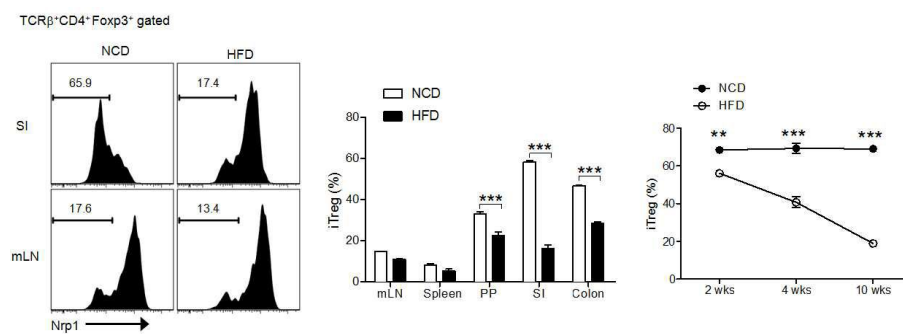
도면5



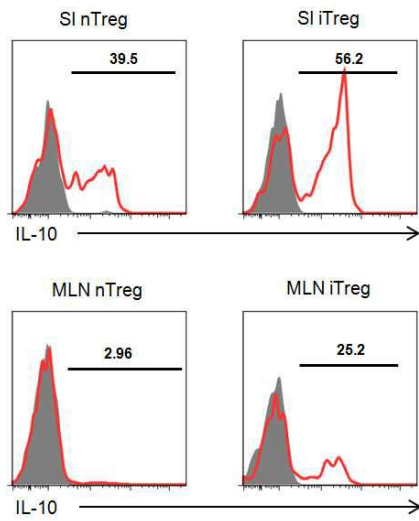
도면6



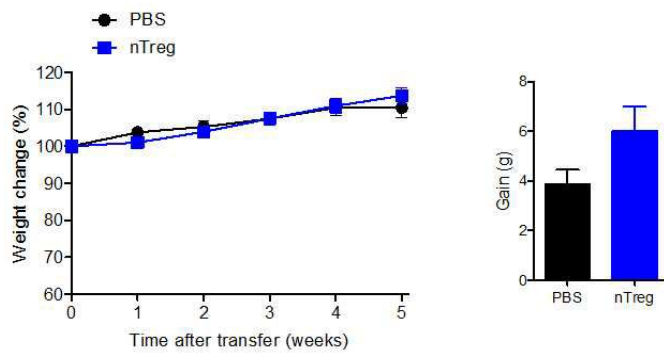
도면7



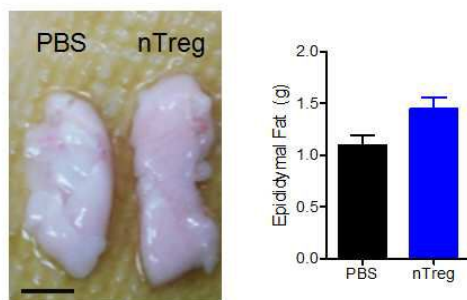
도면8



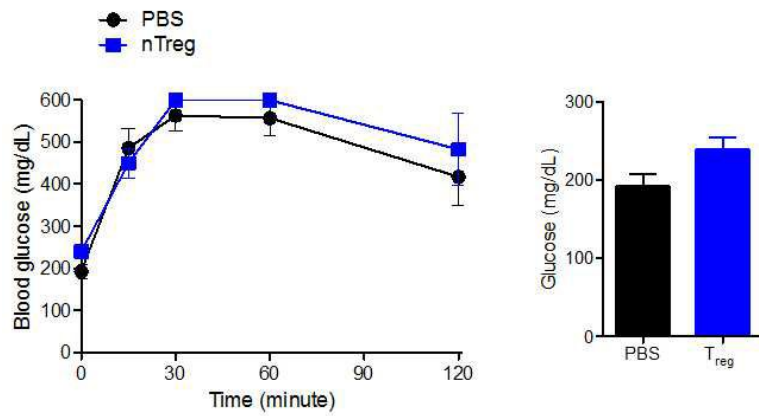
도면9



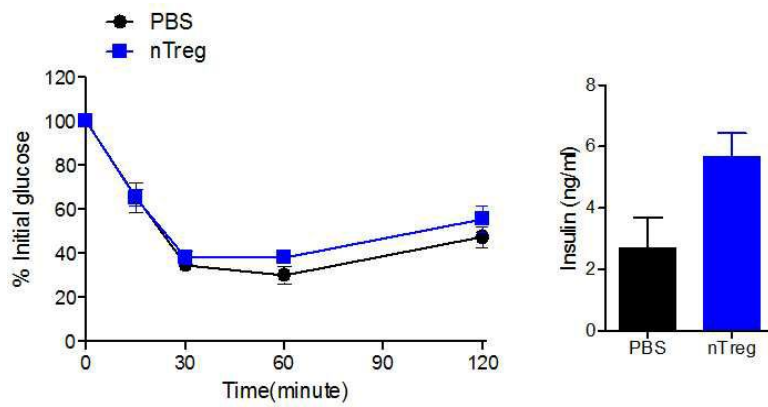
도면10



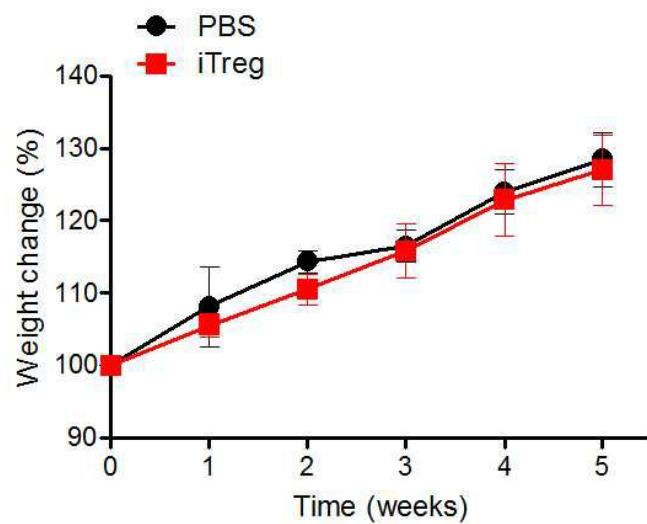
도면11



도면12



도면13



도면14

