



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0024071
(43) 공개일자 2014년02월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) C07K 14/77 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0088893
(22) 출원일자 2012년08월14일
심사청구일자 2012년08월14일

(71) 출원인
울산대학교 산학협력단
울산광역시 남구 대학로 93
(72) 발명자
홍수중
서울 강남구 압구정로29길 71, 33동 801호 (압구정동, 현대아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

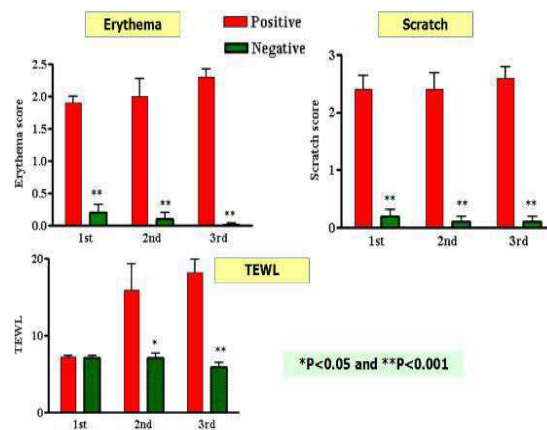
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 알레르겐 피부 감작을 통한 아토피피부염 모델 SKH-1 Hr 마우스 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 알레르겐 피부 감작을 통한 아토피피부염 모델 SKH-1 Hr 마우스 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 알레르겐 피부감작을 통한 아토피피부염 동물 모델 제조방법 및 상기 제조방법에 따라 제조된 아토피피부염 동물 모델을 제공한다. 상세하게는 상기 알레르겐은 오브알부민(ovalbumin; OVA)인 것을 특징으로 하고, 상기 실험동물은 SKH-1 Hr 마우스인 것을 특징으로 한다. 또한, 상기 아토피피부염 동물 모델을 이용한 아토피피부염 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0022233

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업

연구과제명 피부장벽손상에 의한 알레르기행진 동물모델의 개발과 새로운 면역치료의 개발

기 여 율 1/1

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2010.09.01 ~ 2013.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

실험동물에 알레르겐으로 처리하여 피부감작을 일으키는 단계를 포함하는 아토피피부염 동물 모델 제조방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 알레르겐은 오브알부민(ovalbumin; OVA)인 것을 특징으로 하는 아토피피부염 동물 모델 제조방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 실험동물은 SKH-1 Hr 마우스인 것을 특징으로 하는 아토피피부염 동물 모델 제조방법.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 아토피피부염 동물 모델.

청구항 5

제 1 항의 방법에 따라 아토피피부염 동물 모델을 제조하는 단계;

상기 아토피피부염 동물 모델에 아토피피부염 치료제 후보 물질을 투여하는 단계; 및 상기 아토피피부염 치료제 후보 물질의 치료 효과를 측정하는 단계를 포함하는 아토피피부염 치료제 스크리닝 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 아토피피부염 치료제 후보 물질의 치료 효과를 측정하는 단계는 발적(erythema), 소양감(scratch) 및 피부표면 수분손실량(transepidermal water loss; TEWL)을 측정하여 아토피 피부염 치료 효과를 확인하는 것을 특징으로 하는 아토피피부염 치료제 스크리닝 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 알레르겐 피부 감작을 통한 아토피피부염 모델 SKH-1 Hr 마우스 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 우리 몸의 면역반응은 생체 방어 반응의 한 형태로 극히 유익한 작용을 담당하고 있으나 항원의 종류, 감작 양식, 개체면역 능력의 상태 등에 의해 항원 항체 반응을 일으켜 역으로 조직과 세포를 상해하는 경우가 있는데, 이를 과민반응 또는 알레르기 반응이라고 한다. 알레르기의 종류는 매우 다양하며 아토피피부염과 천식, 알레르기성 비염 등도 모두 알레르기 질환에 속한다고 볼 수 있다.

[0003] 아토피피부염(atopic dermatitis; AD)은 가려움증과 습진성 피부 병변을 나타내는 만성적이고 재발성의 염증성 피부 질환이다(J Invest Dermatol (1994) 102: 128-137; Eur J Dermatol (2007) 17: 267-283). 아토피피부염은 피부의 가려움, 발진, 부종, 출혈 및 짓무름 등의 특징을 갖고, 면역글로불린 E(immunoglobulin E, IgE) 수준을 증가시키고, 피부 내의 산성백혈구(eosinophils), 중성백혈구(neutrophils), 비만세포(mast cells) 및 림프구(lymphocytes)의 침윤을 증가시킨다(Int Immunopharmacol (2009) 9: 403-411; Exp Dermatol (2008) 17: 958-964; Biosci Biotechnol Biochem (2008) 72: 974-981).

[0004] 아토피피부염의 발병기작은 완전히 알려지지 않았다. 아토피피부염을 가진 환자에 있어서 증가된 혈청 IgE 수준은 T 헬퍼 2(T helper 2; Th2) 사이토카인이 발병에 관여할 수도 있다는 사실을 제안한다(Curr Dir Autoimmun (2008) 10: 76-118). 최근의 연구결과는 흉선 간질 림포포이에틴(thymic stromal lymphopoietin; TSLP)이 알레르기 면역 반응을 시작하고 유지하는 역할을 한다고 밝혀냈고, 아토피피부염을 가진 어린이 및 마우스에서 TSLP 발현이 증가하였다(Annu Rev Immunol (2006) 25: 193-219; Pediatr Allergy Immunol (2010) 21: e457-e460; Nat Immunol (2002) 3: 673-680; J Exp Med (2005) 202: 541-549). 게다가, TSLP 수용체는 우선적으로 체세포

분열(mitosis)을 하고 IL-4를 발현하는 T 세포에서 발현되는데, 이는 TSLP가 알레르기 염증 위치에서 Th2 반응을 증폭시킨다고 할 수 있다(J Allergy Clin Immunol (2011) 127: 689-695).

[0005] 아토피피부염에 있어서 아웃사이드-인사이드 이론(outside-inside theory)은 장벽기능(barrier function)을 방해하는 유전적 감수성(genetic susceptibility)에 대해 설명하고 있는데, 이는 피부 내로 알레르겐의 침입을 허용하는 기작이다(J Dermatol Sci (2006) 43: 159-69). 비록 필라그린(filaggrin) 유전자에 삭제 돌연변이(null mutation)를 일으킨 flaky tail 마우스와 같은 아토피피부염 마우스 모델이 존재하지만(Nat Genet (2009) 41: 512-513), 마우스의 콜로니를 유지하기 위해 드는 높은 비용으로 인해 이러한 마우스에서는 아토피피부염에 대한 모델을 확립하기는 쉽지 않다. 따라서 몇몇 연구들에서는 물리적 및 화학적 자극을 통해 피부 장벽기능을 손상시키고 및 염증을 유발하는 방법을 시도하고 있다(Int Immunopharmacol (2008) 8: 1761-1766; Allergy (2011) 66: 351-359; J Clin Invest (1998) 101: 1614-1622; J Invest Dermatol (2011) 131: 1845-1852). 그러나 이러한 모델들은 인간에게서 일어나는 자연발생적 아토피피부염을 설명할 수 없다. 따라서 인간에서의 아토피피부염 발생 메커니즘을 유사하게 대변할 수 있는 적절한 모델의 개발이 시급하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 알레르겐 피부감작을 통한 아토피피부염 동물 모델 제조방법을 제공하는데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 제조방법에 따라 제조된 아토피피부염 동물 모델을 제공하는데 있다.

[0008] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 알레르기 행진 동물 모델을 이용한 아토피피부염 치료제 스크리닝 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 기존에 없었던 SKH-1 Hr 마우스에서 알레르겐의 피부 감작을 통해 아토피피부염을 유발하는데 성공하고 본 발명을 완성하였다.

[0010] 본 발명은 실험동물에 알레르겐으로 처리하여 피부감작을 일으키는 단계를 포함하는 아토피피부염 동물 모델 제조방법을 제공한다. 상세하게는 상기 알레르겐은 오브알부민(ovalbumin; OVA)인 것을 특징으로 하고, 상기 실험동물은 SKH-1 Hr 마우스인 것을 특징으로 한다.

[0011] 본 발명에 사용된 "SKH-1 Hr 마우스"는 털이 없는 종으로서, 누드마우스보다 피부가 얇고, 사람의 피부와 가장 가깝다는 특징을 가지고 있다. 따라서 피부를 통한 항원의 감작이 훨씬 수월하며, 피부를 통한 항원 노출에 의한 아토피피부염 유발이라는 인간에서의 아토피피부염 발생 과정을 매우 흡사하게 대변할 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기의 방법에 따라 제조된 아토피피부염 동물 모델을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기의 방법에 따라 아토피피부염 동물 모델을 제조하는 단계; 상기 아토피피부염 동물 모델에 아토피피부염 치료제 후보 물질을 투여하는 단계; 및 상기 아토피피부염 치료제 후보 물질의 치료 효과를 측정하는 단계를 포함하는 아토피피부염 치료제 스크리닝 방법을 제공한다.

[0014] 상세하게는 상기 아토피피부염 치료제 후보 물질의 치료 효과를 측정하는 단계는 발적(erythema), 소양감(scratch) 및 피부표면 수분손실량(transepidermal water loss; TEWL)을 측정하여 아토피 피부염 치료 효과를 확인하는 것을 특징으로 한다.

[0015] 상기 아토피피부염 치료제 후보 물질이란 상기 아토피피부염에 대한 치료효과가 있는 것으로 예상되어, 치료 효과를 측정하기 위한 실험대상으로 사용될 수 있는 모든 물질을 의미하며, 실험동물에 적용할 수 있고 치료 효과를 측정할 수 있으면 천연물질 또는 그로부터 얻어진 것이든, 인공적으로 합성된 것이든 제한되지 않고, 그 중

류도 제한되지 않는다. 상기 실험동물에 적용이란 경구로 섭취시키거나 주사 등의 방법을 이용하거나 외용하는 등의 모든 방법을 의미하며, 상기 방법은 제형이나 제재의 종류에 의해서 제한되지 아니한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명은 알레르겐 피부 감작을 통한 아토피피부염 SKH-1 Hr 마우스 및 이의 제조방법에 관한 것으로서, 기존에 알려지지 않았던 SKH-1 Hr 마우스의 피부를 통한 알레르겐의 감작을 통해 아토피피부염을 유도하였다. 상기 SKH-1 Hr 마우스 모델은 털이 없어 다른 마우스에 비해 용이한 장점을 가지고 있고, 사람의 아토피피부염을 가장 유사하게 표현하는 용이한 모델로서 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 아토피피부염 모델 구축 방법을 나타낸다.
 도 2는 아토피피부염의 발생 확인을 위한 발적(erythema), 소양감(scratch), 피부표면 수분손실량(TEWL)의 측정 결과를 나타낸다.
 도 3은 음성대조군과 비교한 피부 병변의 모습을 나타낸다.
 도 4는 전신 면역 유발 정도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0019] <실시예 1> SKH-1 Hr 마우스에서 알레르겐 피부 감작을 통한 아토피피부염 모델 구축

[0020] 1. 동물
 [0021] 털이 없는 암컷 마우스(SKH-1/Hr, 4주령)은 일본 SLC, Inc.(Shizuoka, Japan)에서 구입하였고, 습도(40%) 및 온도($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) 조건 하에서 사육하였다. 마우스는 아산 의료센터 및 울산대학교 의대에서 정한 동물실험 윤리 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC)의 가이드라인에 따라서 다루었다.

[0022] 2. 알레르겐 피부 감작

[0023] 피부 감작을 통해 알레르기 행진 모델을 구축하기 위해서, 각각의 마우스는 1주일 동안 총 3번에 걸쳐 오브알부민(ovalbumin; OVA) 패치에 노출시켰고, 각각의 피부 감작 사이에는 2주간의 간격을 두었다(도 1). OVA (100 μl , grade V, Sigma Inc., St. Louis, MO, USA)는 등 부분의 피부에 부착된 거즈(1 cm $\times$ 1 cm)를 사용하여 TegadermTM (3MTM, St. Paul, MN, USA)와 함께 처리하였다. OVA 패치는 일주일에 한 번 교체하였다. 마우스는 세 번째 감작 후에 안락사시켰다. 음성대조군(n=5)은 멸균 생리식염수(100 μl)를 상기와 같은 방법으로 처리하였다.

[0024] <실시예 2> 아토피 피부염 발생 지표 검증

[0025] 아토피 피부염의 발생 여부를 확인하기 위하여, 아토피 피부염 발생의 지표인 발적(erythema), 소양감(scratch) 및 피부표면 수분손실도(TEWL)를 측정하였다.

[0026] 발적(erythema) 및 소양감(scratch)의 등 부위 병변은 각각의 감작 후 20분에 측정하였다. 각각의 파라미터를 위한 수치는 0 (증상 없음), 1 (약함), 2 (중간) 및 3 (심각함)으로 등급을 나누어서 측정하였다. 발적(erythema) 및 소양감(scratch)은 각각의 감작 후에 동일한 시험자에 의해 측정되었다.

[0027] OVA-유도된 아토피 피부염에서 표피 투과 장벽(epidermal permeability barrier)의 기능이 달라지는지 확인하기

위해서, 본 발명자들은 피부표면 수분손실량(transepidermal water loss; TEWL)를 Vapometer[®] SWL-3 (Delfin Technologies Ltd., Kuopio, Finland)를 이용하여 측정하였다. 본 발명자들은 실험을 시작할 때 기준 TEWL를 측정하고, 각각의 감각 후에 3번 이상 측정하였다.

[0028] 그 결과, 생리식염수를 대신 적용한 음성대조군에 비해, 알레르겐(OVA)를 적용한 그룹에서 발적(erythema), 소양감 (scratch), 피부표면 수분손실량(TEWL)이 모두 증가한 모습을 확인할 수 있었다(도 2 및 도 3). 따라서, 피부를 통한 알레르겐(OVA) 적용을 통해 아토피 피부염이 발생된 것이 확인되었다.

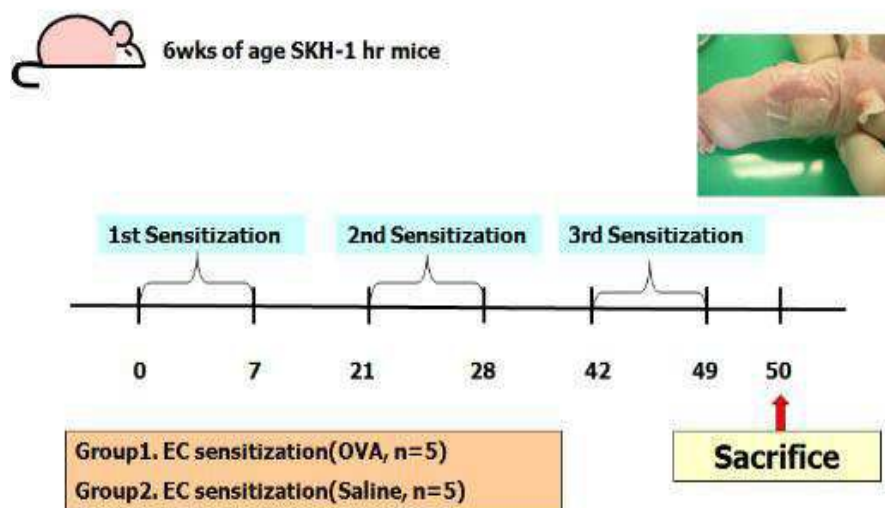
[0029] <실시예 3> 전신면역 유발 여부 확인

[0030] 혈청은 실험 마지막 날에 기도 측정을 한 후, 마우스의 채혈을 통해 얻었다. 총 IgE의 검출을 위해서, 우선 96-well plate를 밤새도록 항-마우스 IgE(0.5 µg in 100 µl carbonate-bicarbonate buffer, PharMingen, San Diego, USA)로 코팅하였다. OVA-Ig의 검출을 위해서, 플레이트는 밤새도록 OVA(100 µg in 1 µl carbonate-bicarbonate buffer, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)로 코팅하였다. 남은 결합 사이트를 차단하였고, 플레이트는 웰 당 100ul의 희석 혈청(1/10 dilution in carbonate-bicarbonate buffer)과 함께 배양하였다. 씻어 낸 다음, 기질을 연속적으로 첨가하여 배양하고, 퍼옥시다제(oxidase)-표지된 랫트 항-마우스 OVA-IgE(20 ng/100 µl, Acris Antibodies, Herford, Germany) 및 100ul TMB 용액(Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)을 웰마다 첨가하였다. 그 후 450nm에서 광학 밀도를 측정하였다.

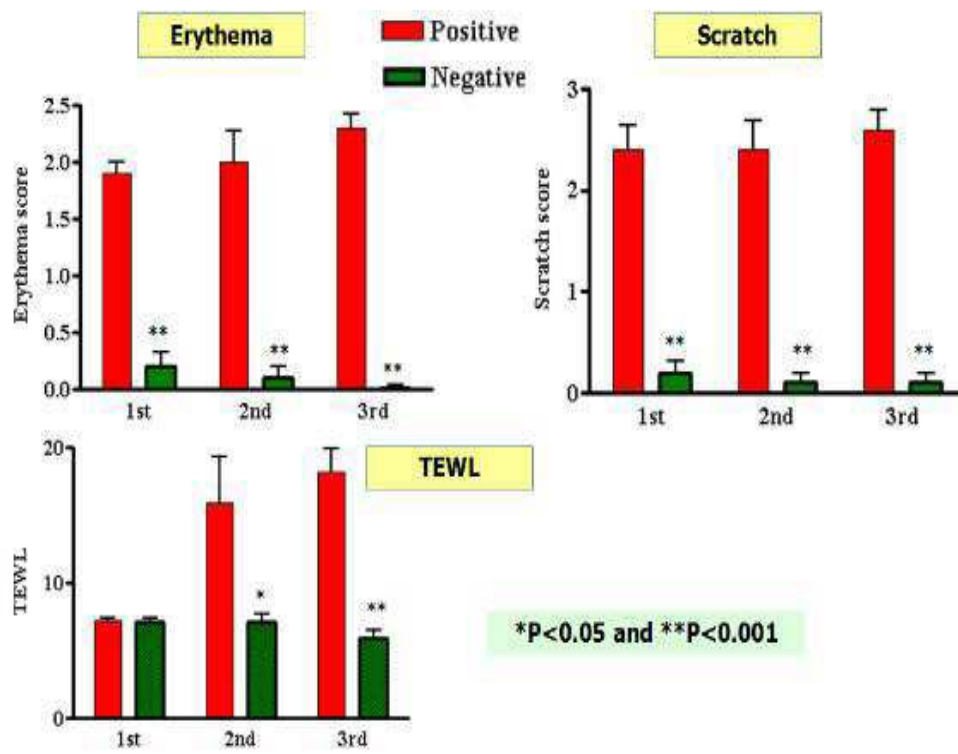
[0031] 그 결과, 음성대조군에 비해 총 IgE 및 OVA-Ig가 증가하는 것으로 나타나 피부를 통한 알레르겐(OVA) 적용 그룹에서 전신면역이 유발되었음을 확인하였다(도 4).

도면

도면1



도면2



도면3



도면4

