(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0037884
(43) 공개일자 2013년04월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0784 (2010.01) *C12N 1/38* (2006.01)
C07K 14/35 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0102394
(22) 출원일자 2011년10월07일
심사청구일자 2011년10월07일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
신성재
대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의학전문대학원 미생물학교실 (문화동)
변의홍
대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의학전문대학원 미생물학교실 (문화동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

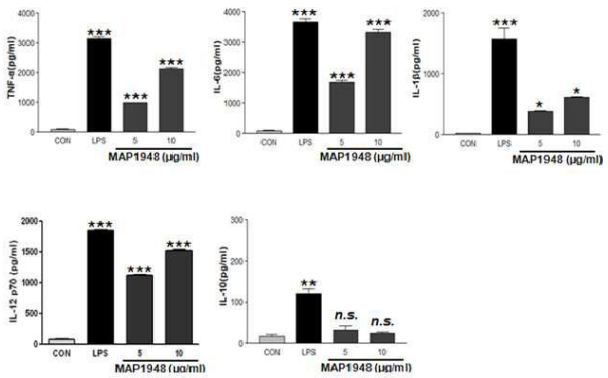
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **마이코박테리움 파라튜버큘로시스의 ＭＡＰ１９４８ 단백질을 이용한 수지상 세포의 성숙방법**

(57) 요 약

본 발명은 수지상 세포를 성숙시키는 방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는 마이코박테리움 파라튜버큘로시스 유래의 MAP1948 단백질을 이용하여 미성숙 수지상 세포를 성숙 수지상 세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3a



(72) 발명자

김우식

대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의학전문대학원 미생물학교실 (문화동)

김종석

대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의학전문대학원 미생물학교실 (문화동)

김화중

대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의학전문대학원 미생물학교실 (문화동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-0017906
부처명	교육과학기술부
연구사업명	기초연구사업-중견연구자지원사업-핵심연구지원사업
연구과제명	항산균의 병원성인자에 의한 면역세포의 분화조절 기전 연구
주관기관	충남대학교 산학협력단
연구기간	2011.05.01 ~ 2012.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

MAP1948 단백질을 유효성분으로 포함하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 MAP1948 단백질은 마이코박테리움 파라튜버큘로시스(*Mycobacterium paratuberculosis*) 유래의 단백질인 것을 특징으로 하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 MAP1948 단백질이 1 ㎍/ml 내지 10 ㎍/ml 농도로 포함된 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

미성숙 수지상 세포에 MAP1948를 처리하는 것을 특징으로 하는 미성숙 수지상 세포의 성숙화 유도 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 처리 후 세포를 12시간 이상 36시간 이하로 배양하는 것을 특징으로 하는 성숙화 유도 방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 미성숙 수지상 세포의 성숙화는 IL-6, IL-1ß 및 T 세포 내 인터페론 감마(IFN-γ) 생성의 증가인 것을 특징으로 하는 성숙화 유도 방법.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 MAP1948 단백질은 1 ㎍/ml 내지 10 ㎍/ml 농도로 처리되는 것을 특징으로 하는 성숙화 유도 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항의 조성물을 포함하는 면역 증강용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 면역은 Th1형 면역반응임을 특징으로 하는 면역 증강용 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 수지상 세포 성숙화 유도 조성물 및 수지상 세포를 성숙시키는 방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는 마이코박테리움 파라튜버큘로시스 유래의 MAP1948 단백질을 유효 성분으로 포함하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물 및 이를 이용하여 미성숙 수지상 세포를 성숙 수지상 세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다. 또한 본 발명은 상기 수지상 세포 성숙화 유도 조성물을 포함하는 면역 증강용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 수지상 세포 또는 수상돌기 세포 (dendritic cell, DC)는 포유동물의 면역계의 일부를 이루는 면역 세포이다. 이 세포들은 항원 물질을 처리하여 그것을 표면에 나타나게 함으로써 면역계의 다른 세포가 인식하게 하는 항원 발현 세포의 역할을 한다. 수지상 세포는 주로 피부, 코, 폐, 위 및 장의 내벽과 같이 외부 환경과 접하는 조직에 소량 존재하며 특히 피부에 있는 세포를 랑게르한스 세포라 한다. 수지상 세포는 혈액 중에서 미성숙한 상태로 발견될 수 있으며, 활성화되면 림프기관으로 이동하여 T 세포 및 B 세포와 상호작용하여 면역반응이 시작되게 한다. 특정 발달 단계에서 그것들은 수상돌기 (dendrites)라고 하는 돌기를 뻗는다.

[0003] 수지상 세포는 조혈 골수 전구세포 (hemopoietic bone marrow progenitor cells)로부터 유래한다. 이 전구세포는 처음에는 미성숙 수지상 세포로 변화하며, 높은 엔도시토시스 활성 및 T-세포 활성 능력을 특징으로 한다. 미성숙 수지상 세포는 주변에 있는 바이러스 및 박테리아와 같은 병원체를 끊임없이 탐식한다. 이것은 TLR (toll-like receptor)와 같은 패턴 인식 수용체 (pattern recognition receptor, PRR)를 통해서 가능하다. TLR은 병원체의 서브셋 상에서 발견되는 특정 화학적 특징을 인식하며, 미성숙 수지상 세포는 살아있는 자가세포로부터 니블링 (nibbling)이라는 과정을 통해 세포막을 탐식한다. 이들이 현존하는 항원과 접하게 되면, 성숙 수지상 세포로 활성화되어 림프절로 이동한다. 미성숙 수지상 세포는 병원체를 탐식하고 자신의 단백질을 작은 조각들로 분해해서, 성숙하였을 때 이 조각들이 MHC (Major Histocompatibility Complex) 분자를 이용하여 그 세포 표면에 나타나게 된다. 동시에, 그것은 CD (Cluster of Differentiation)80, CD86, 및 CD40과 같이 T-세포 활성화에서의 공동-수용체로 작용하는 세포 표면 수용체를 증가시킨다. 그것들은 비항원성 특정 공동자극 신호와 함께 병원체에서 유래한 항원을 나타냄으로써 헬퍼 T-세포, 킬러 T-세포 뿐만 아니라, B 세포를 활성화시킨다.

[0004] 모든 헬퍼 T-세포는 하나의 특정 항원에 대해 특이적이다. 오직 전문적인 항원 발현 세포(대식세포, B림프구 및 수지상 세포)만이 맞는 항원이 존재할 때 나머지 헬퍼 T-세포를 활성화시킨다. 그러나 대식세포와 B림프구는 메모리 T-세포만 활성화시킬 수 있는 반면에 수지상 세포는 메모리 및 처녀 (naive) T-세포를 모두 활성화시킬 수 있어서 가장 강력한 항원 발현 세포이다.

[0005] 성숙 수지상 세포는 신체를 순환하는 백혈구인 단핵구로부터 유래할 수 있는데, 단핵구는 적절한 신호에 따라 수지상 세포로도 대식세포로도 바뀔 수 있다. 단핵구는 골수의 줄기세포에서 유래한다. 단핵구-유래 수지상 세포는 실험실에서 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)로부터 생성될 수 있다. PBMC를 조직 배양 플라스크에 심어서 단핵구가 부착되게 할 수 있는데 이 단핵구를 IL-4 및 GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor)로 처리함으로써 미성숙 수지상 세포로 분화시킬 수 있다. 이후에 TNFα로 처리하면 미성숙 수지상 세포가 성숙 수지상 세포로 분화된다.

[0006] 완전히 성숙한 수지상 세포는 미숙한 DC와는 정성적 및 정량적으로 상이하다. 완전히 성숙한 DC는 고 수준의 MHC (Major Histocompatibility Complex)I형 및 II형 항원, 및 고수준의 T 세포 공동자극성 분자, 즉 CD80 및 CD86을 발현시킨다. 이들 변화는 수지상 세포의 T 세포 활성화 능력을 증가시키는데, 이는 이들이 세포 표면상의 항원 밀도를 증가시킬 뿐만 아니라, 예를 들어 CD28과 같은 T 세포 상의 공동자극성 분자의 대응물을 통한 T 세포 활성화의 양을 증가시키기 때문이다. 추가로, 성숙한 DC는 다량의 사이토카인을 생성하며, 이 사이토카인은 T 세포 반응을 자극하고 유도한다. 이들 사이토카인 중 2 가지는 인터루킨 10 (IL-10) 및 인터루킨 12 (IL-12)이다. 이들 사이토카인은 유도된 T 세포 반응의 방향에 대해 정반대의 효과를 갖는다. IL-10이 생성되면 Th-2형 반응이 유도되는 반면, IL-12가 생성되면 Th-1 형 반응이 유도된다. 후자의 반응이 세포 면역 반응이 요구되는 경우, 예를 들면 암 면역요법에서 특히 바람직하다. Th-1형 반응에 의해 세포 면역계의 작동인자 공격수단인 세포독성 T 림프구(CTL)가 유도 및 분극화된다. 이러한 작동인자 공격수단은 종양 성장을 억제하는 데 가장 효과적이다. IL-12는 또한 천연 킬러 (NK) 세포의 성장을 유도하고, 항-혈관신생 활성을 갖고, 이는 모두 효과적인 항-종양 공격수단이다. 따라서, IL-12를 생성하는 수지상 세포의 사용은 면역자극에 사용하는데 이론상 최

적으로 적합하다.

[0007] 수지상 세포는 흔치 않고 분리하기 어렵기 때문에 서로 다른 유형과 서브셋의 수지상 세포의 정확한 생성과 발달 및 그 상호관계에 대해서는 오직 대략적으로만 알려졌다. 수지상 세포는 신체의 다른 세포들과 끊임없는 소통을 한다. 이러한 소통은 세포 표면 단백질의 상호작용에 근거한 직접적인 세포 대 세포 접촉의 형태를 취할 수 있다.

[0008] 수지상 세포에 의해 생산되는 사이토카인은 세포의 유형에 따라 다르다. 림프구성 수지상 세포는 다량의 타입-1 IFN을 생산할 수 있는데 그것은 더 많은 활성화된 대식 세포를 모아서 탐식 작용을 가능하게 한다. 림프구성 수지상 세포는 중추와 말초 면역조절에 관여하고, 골수성 수지상 세포는 외래성 항원이나 감염에 대한 면역유도에 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 수지상 세포가 정상 기능을 못할 경우 당뇨병, 류머티스성 관절염, 알레르기성 과민반응과 같은 자가 면역 질환이 나타나거나 감염성 질환이나 암 발생에 대해 정상적인 면역반응이 일어나지 않게 된다.

[0009] 암환자에서는 수지상 세포의 기능이 저하되어 있어 정상적 항암 면역능을 유도하는 것이 어렵다. 지금까지 수지상 세포의 분화를 조절(활성화)하는 물질들(LPS, TNF-α, IL-1β)은 많이 알려져 있으나 생체독성의 부작용으로 생체에의 직접적인 응용에 문제가 많다.

[0010] 마이코박테리움 (Mycobacterium) 속(屬)에는 결핵, 우형결핵 (牛形結核), 나병 (癩病)과 같이 사람과 동물에 심각한 질병을 일으키는 균종 (species)뿐 아니라, 기회감염균으로 일컬어지는 균종, 그리고 자연환경에서 볼 수 있는 사물 (死物)기생의 균종 (saprophytic species) 등 현재까지 약 72 종(species)이 알려져 있으며, 그 중 인체 질환과 관련된 것이 25종에 이르는 것으로 알려져 있다.

[0011] *M.paratuberculosis*은 결핵균과 마찬가지로 세포 내 기생세균이나 결핵균과는 다르게 주로 동물에서 질환을 유발시킨다. 특히, 염증성 장질환의 하나인 크론씨병의 병인 기전에 마이코박테리움 아비움 아종명 파라투버큘로시스 (*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis,* 이하 M. 파라투버큘로시스)가 관여할 것이라는 가설이 최근 각광을 받고 있다. M. 파라투버큘로시스는 소, 양, 염소, 사슴 등의 동물에서 만성육아종성 염증으로 특징화된 요네병 (Johne's disease)을 유발시키며 사람의 크론씨병 (Crohn's disease)과도 매우 밀접하게 연관되었다는 보고가 2000년 이후 선진국을 중심으로 보고되고 있다. 현재까지 보고된 연구 내용을 보면 사람의 크론씨병과 연관하여 Leprosy, tuberuculosis, 파라투버큘로시스와 크론씨병을 비교하여 mycobacteri가 크론씨병의 원인체로서 갖는 의의와, 사람의 크론씨병과 미생물과의 연관성을 규명, 크론씨병의 추정적인 원인체로서 M. 파라투버큘로시스가 갖는 공중보건의 위험성 규명, in situ hybridization법을 이용하여 크론씨병에 걸린 사람으로부터 M. 파라투버큘로시스의 분리 동정, M. 파라투버큘로시스의 항원인 p35와 p36 단백질을 이용하여 사람의 크론씨병에 대한 혈청학적 연구 등이 수행되어 왔다. 그러나 이러한 연구에도 불구하고, M. 파라투버큘로시스를 크론씨병의 원인체로 확신하지 못하는 이유는 이 병원체가 극도로 느리게 자라는 특성과 균체 배양의 어려움 등 많은 제약이 있기 때문이다. 따라서, 현재까지 M. 파라투버큘로시스의 백신으로서의 가능성에 대한 연구는 전무한 실정이다.

[0012] 또한 *M. paratuberculosis*와 숙주의 면역반응에 대한 연구는 epithelial cell과 macrophage cell line을 이용한 실험이 다양하게 이루어지고 있다. 최근 마우스 모델이 *M.paratuberculosis*의 감염모델로 각광을 받고 있으며 그 이유는 사람의 임상상과 병리조직학적으로 유사한 건락성 괴사 (caseous necrosis) 의 소견을 나타내기 때문으로 알려져 있다. 최근에는 숙주의 특이적 면역인자 결핍에 따른 연구도 보고된 바 있다. 한 보고에 의하면 IFN-γ와 TNF-a가 knock-out되면 *M. paratuberculosis* 감염을 조절할 수 없으며 TLR-2 수용체와 물리적인, 생리적 상호작용을 통하여 여러 가지 싸이토카인의 분비를 조절한다고 알려져 있다.

[0013] 하지만 이러한 현상은 다른 감염질환에서도 공통적으로 나타나는 현상이므로 *M.paratuberculosis* 감염의 특이적 면역반응에 대한 연구가 필요한 실정이며, 특히, *in vitro*에서 빠르게 자라는 특징과 반대로 사람의 폐질환에서는 가장 만성적인 질병을 유발시키는 기전과 결핵과 유사하게 수년에서 수십 년 동안 지속되는 기전, 재활성화의 가능성 여부, 이와 관련된 면역학적 현상을 규명하는 연구가 매우 중요할 것으로 평가된다.

[0014] 상기와 같이 수지상 세포는 신체 자체의 면역 기능을 높이는데 중요한 역할을 하고 있어, 수지상 세포의 분화를 촉진하여 성숙시킴으로써 강력한 면역 반응을 일으키는 무독성의 면역조절제의 개발과 그 물질의 작용기전을 명확히 이해하는 것은 수지상 세포를 이용한 세포 면역 치료에 중요한 과제가 되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명은 미성숙된 수지상 세포를 간편하고 효과적으로 성숙시킬 수 있는, MAP1948 단백질을 유효성분으로 포함하는 미성숙 수지상 세포 성숙화 유도 조성물 및 미성숙 수지상 세포에 MAP1948을 처리하여 성숙 수지상 세포로 성숙화 시키는 것을 특징으로 하는 미성숙 수지상 세포의 성숙화 유도방법을 제공한다. 또한 본 발명은 상기 수지상 세포 성숙화 유도 조성물을 포함하는 면역 증강용 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 MAP1948 단백질을 유효성분으로 포함하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물을 제공한다.

[0017] 또한 본 발명은, 미성숙 수지상 세포에 MAP1948을 처리하는 것을 특징으로 하는 미성숙 수지상 세포의 성숙화 유도 방법을 제공한다.

[0018] 또한 본 발명은, 상기 수지상 세포 성숙화 유도 조성물을 포함하는 면역 증강용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따르면, 미성숙 수지상 세포의 분화를 촉진함으로써 수지상 세포를 효과적으로 성숙시킬 수 있으며 이를 통해 신체의 면역 반응을 효과적으로 증강시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도1은 클로닝을 통해 분리한 MAP1948을 도시한다. (a: His-tagged 재조합MAP1948(1)과 벡터 대조군 (CON)(2)에 대한 SDS-PAGE 비교, b: NTA로 정제한 후 SDS-PAGE, c: 웨스턴 블롯 분석).

도 2는 MAP1948을 처리한 수지상 세포의 생존율 측정 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3a는 수지상 세포에 MAP1948을 처리한 후 ELISA 키트에 적용하여 수지상 세포의 사이토카인(IL-12 p70, IL-10, TNF-α, IL-6, IL-1β) 분비 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

도3b는 세포내의 IL-12p70과 IL-10의 분비량을 측정하기 위하여 유세포 분석기로 분석한 결과를 도시한다.

도 4는 MAP1948을 처리한 수지상 세포에서 특이적인 단백질표면인자인 CD80, CD86과 MHC class I, II의 발현을 분석한 그래프이다.

도 5는 MAP1948을 처리한 수지상 세포의 덱스트란-FITC 탐식능 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6a는 MAP1948에 의해 유도되는 수지상 세포의 TNF-α 및 IL-6 방출에 대한열변성의 영향을 도시한다.

도6b는 MAP1948에 의해 유도되는 수지상 세포의 TNF-α 및 IL-6 방출에 대한 프로테인아제 K 소화의 영향 분석 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 MAP1948를 처리한 수지상 세포에서 신호전달계의 변화를 ERK, JNK, p38, IκB-α, NF-κB p65의 인산화 및 분해 여부로 확인한 그래프를 도시한다.

도8a는 MAPK 및 NF-kB 억제 물질들을 처리한 후 항-CD80-PE(BD bioscience), 항-CD86-PE(BD bioscience) 세포 표면인자 항체를 이용하여 염색한 후 유세포분석기FACs Canto (BD Biosciences)로 분석한 결과를 도시한다.

도8b는 MAPK 및 NF-kB 억제 물질들을 처리한 후 수지상 세포의 성숙 여부에 따라 분비되는 사이토카인을 EILSA 키트를 적용하여 측정한 결과를 도시한다.

도 9은 MAP1948를 처리한 수지상 세포의 T세포 자극에 의한 활성 효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명은 MAP1948을 유효성분으로 포함하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물에 관한 것이다.

[0022] 본 발명은 MAP1948을 유효성분으로 포함하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물에 관한 것이다.

[0023] 마이코박테리움 파라튜버큘로시스(*M. paratuberculosis* K-10)의 전체 유전체 염기서열이 2004년도 1월달에 해독되어 보고되었으며 [NCBI GenBank ID: AE016958.1] 이중 MAP1948의 단백질 ID는 41396401이다.

[0024] MAP1948 (CobT protein)은 349 아미노산 서열로 이루어졌으며 약 35kDa의 크기를 갖고 있다. MAP1948은 *M. paratuberculosis*에 감염된 동물 (Johne's disease)에서 혈청학적 특이성이 높다고 보고되었으며 다른 마이코박테리아 균종에서도 유전적 상동성이 높은 단백질이다. 현재 추정되는 기능은 Nicotinate-nucleotide-dimethylbenzimidazole phosphoribosyltransferase (DMB-PRT)로 작용할 것으로 예상되고 있다. 하지만 MAP1948과 수지상세포의 상호작용과 단백질 자체의 면역조절 작용에 대해서 알려진 바는 전무하다.

[0025] 본 발명은 마이코박테리움 파라튜버큘로시스의 MAP1948에 대한 유전자를 클로닝하여 대장균 발현시스템을 이용하여 분리, 정제하여 수지상 세포 성숙화 유도 조성물을 제공할 수 있다.

[0026] 미숙한 수지상 세포는 성숙하여 성숙한 수지상 세포를 형성한다. 성숙한 수지상 세포는 항원을 포획하고 동시자극하는 세포 표면 분자 및 각종 사이토카인의 상향-조절된 발현을 나타내는 능력을 상실한다. 특히, 성숙한 수지상 세포는 MHC Ⅰ형 및 Ⅱ형 항원을 미숙한 수지상 세포보다 더 높은 수준으로 발현시키고, CD (Cluster of Differentiation) 80+, CD83+, CD86+ 및 CD14-을 조절한다. 더 많은 MHC 발현으로 수지상 세포 표면상에서 항원 밀도의 증가를 유도하는 반면, 동시-자극의 분자 CD80 및 CD86의 상향 조절로, T 세포 상에 CD28과 같은 동시-자극의 분자 상응물을 통해서 T 세포 활성 시그날을 강화한다.

[0027] 본 발명은 MAP1948을 포함하는 조성물을 통해 성숙한 수지상 세포로의 분화를 촉진할 수 있다. 유효한 재조합 방법으로 제조된 MAP1948는 이에 제한되는 것은 아니나 1 ㎍/ml 내지 20 ㎍/ml, 바람직하게는 1 ㎍/ml 내지 10 ㎍/ml, 보다 바람직하게는 5㎍/ml 또는 10 ㎍/ml 농도로 조성물에 포함될 수 있다.

[0028] 또한 본 발명은 미성숙 수지상 세포에 MAP1948을 처리하는 것을 특징으로 하는 미성숙 수지상 세포의 성숙화 유도방법을 제공할 수 있다.

[0029] 본 발명의 MAP1948 단백질은 1 ㎍/ml 내지 20 ㎍/ml 농도로 처리할 수 있으며, 보다 바람직하게는 5 ㎍/ml 또는 10 ㎍/ml 농도로 처리할 수 있다.

[0030] 본 발명은 미성숙 수지상 세포에 MAP1948을 처리하여 성숙화를 유도하기 위하여 MAP1948이 처리된 세포를 배양할 수 있다. 적절한 성숙 수지상 세포로의 분화 유도를 위하여 상기 세포를 바람직한 일 예로써 12시간 이상 36시간 이하로 배양하여 성숙시킬 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명에서의 MAP1948 단백질 처리를 통해 성숙이 촉진된 성숙된 수지상 세포는 성숙된 수지상 세포가 가지는 일반적인 특징을 발현할 수 있다. 본 발명에 따르면, MAP1948을 유효성분으로 처리함으로써 미성숙 수지상 세포가 분화되어 성숙한 수지상 세포로 변화하며, 보다 바람직하게는 IL-6, IL-1ß 및 T 세포 내 인터페론 알파(IFN-α)의 생성이 증가된 성숙 수지상 세포로 변화할 수 있다. 본 발명의 조성물을 통해 형성되는 성숙 수지상 세포는 바람직하게는 IL-10의 분비에는 영향을 주지 않는 세포로 분화될 수 있으며 이에 따라 Th1 형의 세포로 편향될 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명은 MAP1948을 유효성분으로 포함하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물을 포함하는 면역 증강용 조성물을 제공할 수 있다. 본 발명에 따르면 미성숙의 수지상 세포가 성숙되며, 수지상 세포의 성숙으로 표면 단백질 표시인자의 발현이 증가 될 수 있다. 보다 구체적으로 본 발명의 면역 증강용 조성물에 따르면, 유효성분인 MAP1948의 처리를 통해서 수지상 세포를 성숙시키고 결과적으로 T 세포의 활성을 유도하여 면역 반응을 증가시킬 수 있다.

[0033] 수지상 세포의 성숙은 당해 기술분야에 공지된 방법으로 모니터할 수 있으며 세포 표면 마커를 유세포 분석기(flow cytometry) 및 면역조직화학법 등과 같은 당해 기술분야에 친숙한 검정으로 검출할 수 있다. 또한 상기 세포를 사이토카인 생성 (예, ELISA, FACS 및 다른 면역 검정)을 통해 모니터할 수 있다.

[0034] 이하, 본 발명을 실시 예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 더욱 쉽게 이해할

수 있도록 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0035] **실시예 1. 수지상 세포의 분리 및 유도**

[0036] **1. 1 수지상 세포의 분리 및 유도**

[0037] C57BL/6 마우스로부터 골수 채취용 주사를 이용해 대퇴부 골수를 채취하였다. 채취한 골수를 세척한 후 적혈구를 염화암모늄을 이용하여 제거하였다. 분리한 세포를 6-웰 플레이트에서 RPMI 1640 (10 % FBS(Fetal bovine serum, 송아지 혈청), 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린/스트렙토마이신, 50 μM 머캅토에탄올, 0.1 mM 비필수 아미노산, 1 mM 피루브산 나트륨, 20 ng/ml GM-CSF, 20 ng/ml IL-4)을 첨가하여 8일 동안 배양하였다. GM-CSF 및 IL-4은 수지상 세포로의 분화를 유도하기 위하여 사용하였다.

[0038] **1.2 재조합 MAP1948의 클로닝**

[0039] 마이코박테리움 파라튜버큘로시스의 게놈 DNA로부터 MAP1948를 분리하여 클로닝하였다. 정방향 프라이머의 (5'-CATATGGAATTCGCGACCGTCTCGC-3', 서열번호1)및 역방향 프라이머 (5'-CTCGAGCGGGTGAGCGGACGGGTCG-3', 서열번호2)를 이용해 MAP1948 부위를 증폭시켰다.

[0040] PCR 산물을 NdeI 과 XhoI으로 절단하고, 발현벡터인 pET-22b(+)벡터 (Novagen, Madison, WI)에 삽입하였다. MAP1948 유전자가 삽입된 pET-22b(+) 벡터로 형질 전환시킨 E. coli BL21을 37 ℃에서 600 nm에서의 흡광도(OD)가 0.4 내지 0.5가 되도록 배양한 후에 1 mM의 이소프로필-D-티오갈락토피라노사이드 (IPTG)를 첨가하고 6시간 동안 배양하였다. 발현된 단백질은 니켈-니트릴로트라이아세트산 (Ni-NTA, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 아가로즈를 이용하여 제조사의 방법에 준하여 정제하였다. 최종적으로 정제한 재조합 단백질은 SDS-PAGE로 분석하였으며, 35.2 kDa 위치에서 확인하였다(도 1).

[0041] **실시예 2. MAP1948의 세포 독성 확인**

[0042] MAP1948로 자극한 수지상 세포의 세포 생존율을 측정하기 위해서, 수지상 세포를 10μg/ml 농도의 MAP1948 또는 대조군으로 100 ng/ml 농도의 LPS (lipopolysaccharide)를 24 시간 동안 처리하였다. 이 후 요오드화 프로피듐(propidium iodide, PI) 및 아넥신-V로 이중 염색하고 유세포분석기 (flow cytometry)를 통해 분석하였다. 도 2에 나타낸 바와 같이 10 μg/ml 농도의 MAP1948은 수지상 세포에서 독성을 나타내지 않았다.

[0043] **실시예 3. MAP1948이 수지상 세포의 사이토카인 분비에 미치는 영향 분석**

[0044] 수지상 세포의 성숙 여부에 따라 분비되는 사이토카인의 종류가 달라진다. 이를 확인하기 위해 수지상 세포에 5 μg/ml 또는 10 μg/ml 농도의MAP1948또는 대조군으로 100 ng/ml의 LPS 를 처리한 후 24 시간 동안 배양하였다.

[0045] 상층액을 TNF-α, IL-6, IL-1β, IL-10 및 IL-12 p70 에 대한 ELISA 키트에 적용하여 사이토카인 분비량을 측정하였다(도3a). IL-12 p70와 IL-10은 수지상 세포에서 분비되는 주요 사이토카인으로 각각 T 세포가 Th1과 Th2로 분화되는데 중요한 역할을 한다. IL-12는 대표적인 Th1형 사이토카인이며, IL-10은 활성화 된 단핵구, NK 세포 및 Th1 세포에 의해 생산되는 사이토카인 (IL-12 p70포함)의 활성을 방해하는 것으로 알려져 있다. 이러한 내용들을 바탕으로 세포내의IL-12 p70와 IL-10의 분비량을 측정하기 위해 항-IL-12 p70-APC (BD bioscience)과 항-IL-10-APC를 염색하여 유세포 분석기 FACScallibur (Beckson Dikinson, USA)로 분석하였다 (도면3a). 도면3a에 나타낸 바와 같이 IL-12 p70가 증가했고 전염증 사이토카인인 TNF-a, IL-6, IL-1β 또한 증가하였으므로, MAP1948이 수지상 세포를 성숙하게 하여 사이토카인의 양에 변화를 준다는 것을 알 수 있다. 반면 IL-10의 분비에는 유의성 있는 증가를 보이지 않아, MAP1948이 수지상 세포를 Th1형 세포로 편향할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

[0046] **실시예 4. MAP1948에 의한 수지상 세포의 성숙 정도 분석.**

[0047] 먼저 모든 세포의 성숙도를 균일하게 하기 위하여 GM-CSF 와 IL-4가 함유된 OptiMEM 배지에서 유지한 후, 수지상 세포에 5 ㎍/ml 및 10 ㎍/ml 농도의 MAP1948 및 100 ng/ml 농도의 LPS를 각각 24시간 처리한 후 수지상 세포를 회수하였다. 비특이적인 결합을 억제하기 위하여 1 ㎍/ml의 Fcγ I/III(BD bioscience)을 4℃에서 20분간 처리한 후, 수지상 세포 분석을 위해CD11c-FITC(BD bioscience)로 4℃에서 20분간 염색하였다. 이 후 항-CD80-PE(BD bioscience), 항-CD86-PE(BD bioscience), 항-MHC I 및 II-PE(BD bioscience)와 같은 세포 표면인자 항체를 이용하여 염색한 후 유세포분석기FACs Canto (BD Biosciences)로 분석하였다(도면 4). 도4에 나타낸 바와 같이MAP1948은 수지상 세포의 단백질표면인자인 CD80, CD86와MHC class I, II의 발현을 용량 의존적으로 증가시켰다. 이를 통해MAP1948에 의해 수지상세포의 성숙이 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

[0048] **실시예 5. MAP1948에 의한 수지상 세포의 항원 취득 능력 분석**

[0049] 미성숙 수지상 세포는 항원취득을 잘하지만, 성숙한 수지상 세포는 항원취득 능력이 감소한다고 알려져 있다. 따라서MAP1948 단백질이 수지상 세포의 대식 활동 (endocytic activity)에 미치는 영향을 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 미성숙 수지상 세포를 5 및 10 ㎍/ml의MAP1948 또는 100 ng/ml LPS를 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 이 수지상 세포에 1 ㎍/ml의 플루오레신 결합 덱스트란(fluoresceinconjugated dextran, 분자량 40,000; Molecular Probes, Eugene, OR)을 1시간 동안 첨가하였다. 37℃와 4℃ 에서 각각 30분 동안 배양한 후 콜드 스테이닝 완충액을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 세포를 세척 하였다. 이 후 PE(Phycoerythrin)-결합 CD11c(BD bioscience)로 염색한 후에 유세포분석기FACs Canto (BD Biosciences)를 이용하여 덱스트란-FITC(Fluorescein isothiocyanate) 탐식능을 측정하였다(도5). 도5에 나타낸 바와 같이, MAP1948을 처리한 수지상 세포가 그렇지 않은 것보다 덱스트란(항원) 포식 능력이 감소하였다. 이러한 점에서MAP1948이 기능적인 면에서 수지상 세포를 성숙시킴을 알 수 있다. 덱스트란의 수지상 세포에 대한 비특이적 결합을 측정하기 위해서 4 ℃에서도 측정하여 결과값을 보정하였다. 이를 통해 MAP1948처리에 의해 수지상 세포의 성숙도가 증가하였음을 기능적으로 확인할 수 있었다.

[0050] **실시예 6 LPS 및 MAP1948에 의해 유도되는 수지상 세포의 TNF-α 및 IL-6 방출에 대한 열변성 및 프로테인아제 K 소화의 영향분석**

[0051] LPS 및 MAP1948에 의해 유도되는 수지상 세포의 TNF-α 및 IL-6 방출에 대한 LPS 및 MAP1948의 열변성의 영향을 분석하기 위해, C57BL/6 마우스의 미성숙 수지상 세포를 100 ng/ml LPS 또는 10 ㎍/ml MAP1948, 또는 끓인 LPS 또는 MAP1948로 처리하거나, 처리하지 않았다. 24시간 후에 상기 수지상 세포의 상층액내 TNF-α, IL-6의 양을 ELISA를 이용하여 분석하였다. 도면 6a에 나타낸 바와 같이 MAP1948은 단백질이므로 끓이면 분해되기 때문에 끓인 MAP1948의 경우 TNF-α, IL-6의 분비가 억제되었다. 반면, LPS의 경우에는 끓이더라도 TNF-α, IL-6의 분비에 차이가 없었다.

[0052] 또한, 100 ng/ml LPS 또는 10 ㎍/ml MAP1948에 프로테인아제 K로 처리한 후 미성숙 수지상 세포의 배양물에 첨가하였다. 프로테인아제 K의 농도를 LPS와 MAP1948농도의 1/20로 처리한 후 50℃에서 1시간 활성화시키고 100℃에서 비활성시켰다. 상기 수지상 세포의 상층액내 TNF-α, IL-6 양을 ELISA를 이용하여 분석하였다. 도면 6B에 나타낸 바와 같이 MAP1948은 단백질이므로 단백질 분해효소인 프로테인아제 K로 처리하면 분해되기 때문에 프로테인아제 K를 처리한 MAP1948의 경우 TNF-α, IL-6의 분비가 억제되었다. 반면 LPS의 경우에는 프로테인아제 K를 처리하여도 TNF-α, IL-6의 분비에 차이가 없었다 (도면 6b).

[0053] **실시예 7. MAP1948가 수지상 세포의 신호전달계에 미치는 영향 분석**

[0054] 수지상세포는 성숙과정 중에 ERK, JNK, p38 등의 MAPK(mitogenactivated protein kinases) 및 NF-κB(nuclear factor-kappa B) 신호전달계가 활성화된다고 알려져 있다.

[0055] 미성숙 수지상 세포에 MAP1948를 0분 5 분, 15 분, 30 분, 60 분간 처리한 후, 세포를 파괴하여 단백질을 모두 분리하고, MAPK (mitogen-activated protein kinases) 및 NF-κB (nuclear factor-kappa B) 신호전달계와 관련된 인자인 ERK, JNK, p38, IκB-α, NF-κB p65 의 인산화 및 분해 여부를 확인하였다. 단백질양은 특정항체를 이용하는 웨스턴 블랏 방법으로 측정하였다(도7).

[0056] 도7에서 나타낸 바와 같이 인산화되어 있는 p-p38, p-ERK, p-JNK의 양이MAP1948처리에 의해 증가하였음을 확인

하였다. 또한 p-IκB-α가 증가하고 IκB-α는 분해되는 것을 확인하였다. 최종 신호전달 인자인 NF-κB p65도 MAP1948처리에 의해 핵 안으로 전사된 것을 확인하였다. 이를 통해 MAP1948는 수지상세포의 MAPKs 및 NF-κB 신호 전달 체계에 관여한다는 것을 확인할 수 있었다.

[0057] **실시예 8. 주화성 MAP1948에 의한 수지상 세포의 활성에 있어 MAPK 및 NF-κB 의 영향 분석**

[0058] MAP1948에 의해 활성화된 수지상 세포가 MAPK 및 NF-κB의 신호 전달 체계에 의해 유도되었는지를 알아보기 위해 U0126 (ERK1/2), SB203580 (p38), SP600125 (JNK), Bay 11-0782 (NF-κB)과 같은 MAPK 및 NF-κB 억제 물질을 이용하여 분석하였다. 수지상 세포에 MAPK 및 NF-κB 억제 물질 1시간 동안 처리한 후 10 μg/ml 농도의 MAP1948 또는 대조군으로 100ng/ml의 LPS 를 처리한 후 24 시간 동안 배양하였다. 수지상 세포의 표면인자 발현 분석을 위해 CD11c-FITC(BD bioscience)로 4℃에서 30분간 염색하였다. 이 후 항-CD80-PE(BD bioscience), 항-CD86-PE(BD bioscience)와 같은 세포 표면인자 항체를 이용하여 염색한 후 유세포 분석기FACs Canto (BD Biosciences)로 분석하였다. 또한 수지상 세포의 성숙 여부에 따라 분비되는 사이토카인을 분석하기 위해 상층액을 통하여 TNF-α, IL-6, IL-1β 에 대한 ELISA 키트(BD PharMingen, USA)를 적용하여 사이토카인 분비량을 측정하였다 (도면 8b).

[0059] 도면 8a에 나타낸 바와 같이 MAPK 및 NF-κB 억제 물질들은 MAP1948에 의한 수지상 세포의 보조자극인자인 CD80과 CD86 발현을 감소시켰다. 또한 도면 8b에 나타낸 바와 같이 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-6, IL-1β들을 감소시켰다. 이를 통해 MAP1948의한 수지상 세포의 활성은 MAPK 및 NF-κB 신호 전달 체계에 의존한다는 것을 확인할 수 있었다.

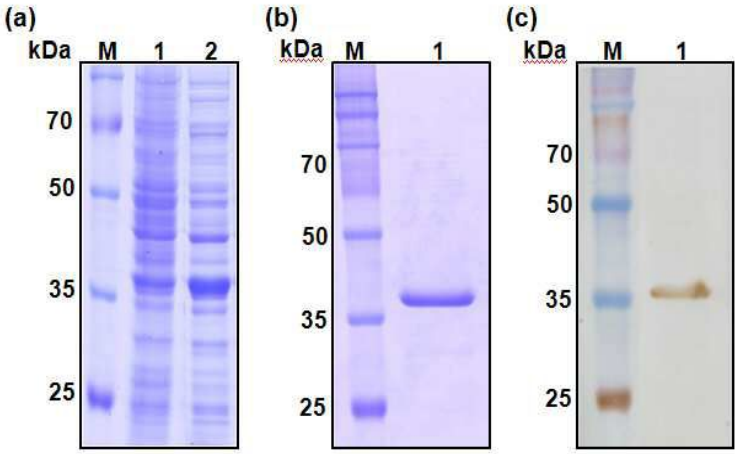
[0060] **실시예 9. MAP1948 로 성숙 유도된 수지상 세포의 T세포 활성 분석**

[0061] 성숙 수지상 세포의 생체 내에서의 가장 중요한 특징은 T 림프구의 활성을 유도하는 것이다. MAP1948 로 유도된 수지상 세포가 항원 특이적 세포독성 T 림프구 (Cytotoxic T Lymphocyte, CTL) 반응을 강화하고 종양을 처리하는데 효과적 이라는 것을 밝히기 위하여 실험을 수행하였다. 활성화 된 T 림프구는 증식 속도가 증가하며 인터페론 감마의 분비가 증가되어 주변의 다른 T 림프구의 활성을 돕고 면역 작용을 활발하게 일으켜 항원을 제거한다. BALB/c 마우스 비장으로부터 분리된 $CD4^+$ 및 $CD8^+$ 세포를 C57BL/6로부터 유래된 MAP1948 처리 수지상 세포와 함께 배양한 후 T 세포의 증식 정도를 측정하였다. 도 9에 나타낸 바와 같이 MAP1948으로 처리한 경우 대조군 (Con)에 비해 T 세포의 증식 정도가 높은 것을 확인할 수 있다. 이를 통해 MAP1948는 수지상세포의 T 세포의 증식에 의한 면역 활성 능력을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다. 특히 앞서 실시예 3에서 확인한 바와 같이 MAP1948 단백질 처리에 의하면 IL12 등의 Th1형 사이토카인의 분비가 편향되어 증가되므로, MAP1948로 처리하여 성숙된 수지상 세포는 T 세포를 Th1형 세포로 분화되도록 유도할 수 있으며 이를 통해 면역 활성을 증가시킬 수 있음을 알 수 있었다.

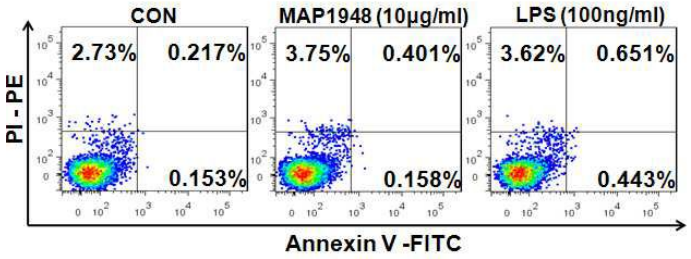
[0062] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시 예들을 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

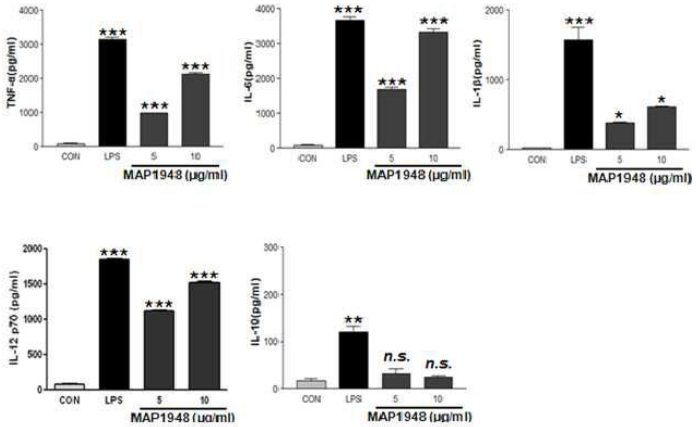
도면1



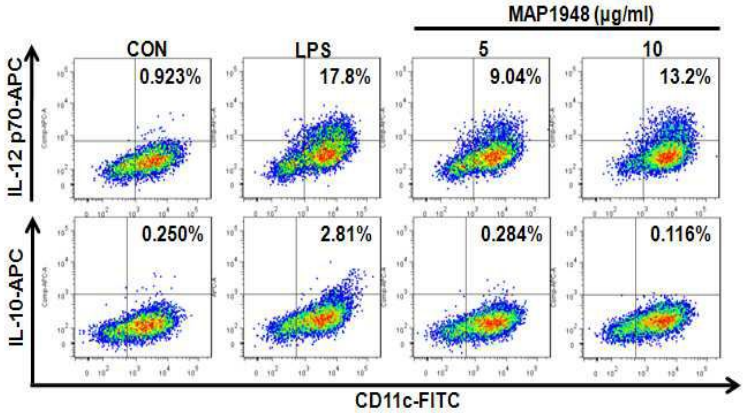
도면2



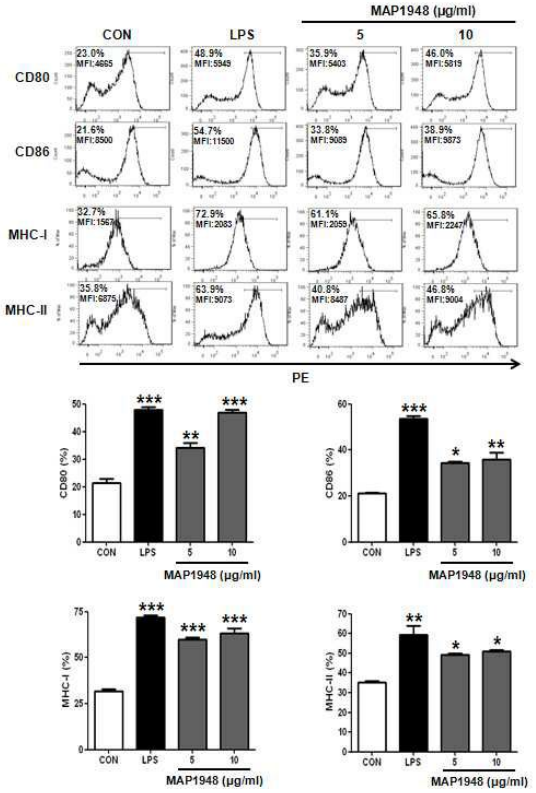
도면3a



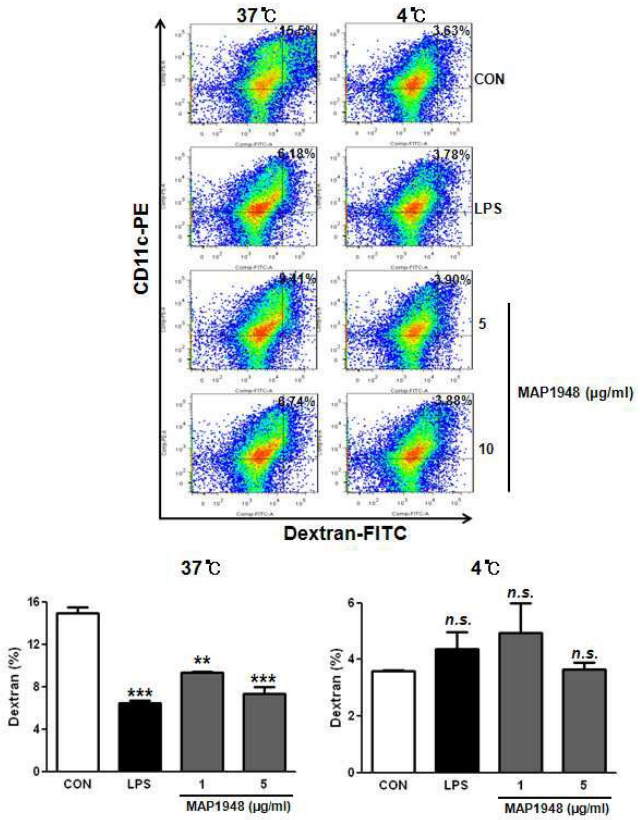
도면3b


MAP1948 (μg/ml)
CON
LPS
5
10
0.923%
17.8%
9.04%
13.2%
0.250%
2.81%
0.284%
0.116%
IL-12 p70-APC
IL-10-APC
CD11c-FITC

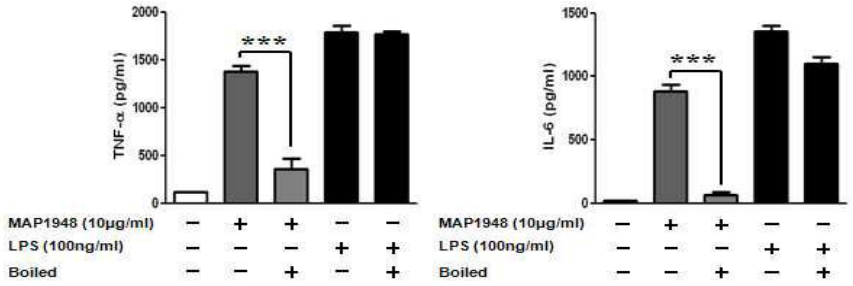
도면4


MAP1948 (μg/ml)
CON
LPS
5
10
CD80
CD86
MHC-I
MHC-II
PE
CD80 (%)
CD86 (%)
MHC-I (%)
MHC-II (%)
MAP1948 (μg/ml)

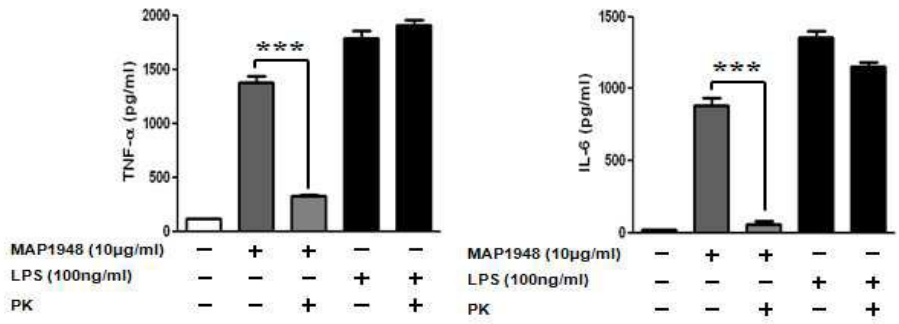
도면5



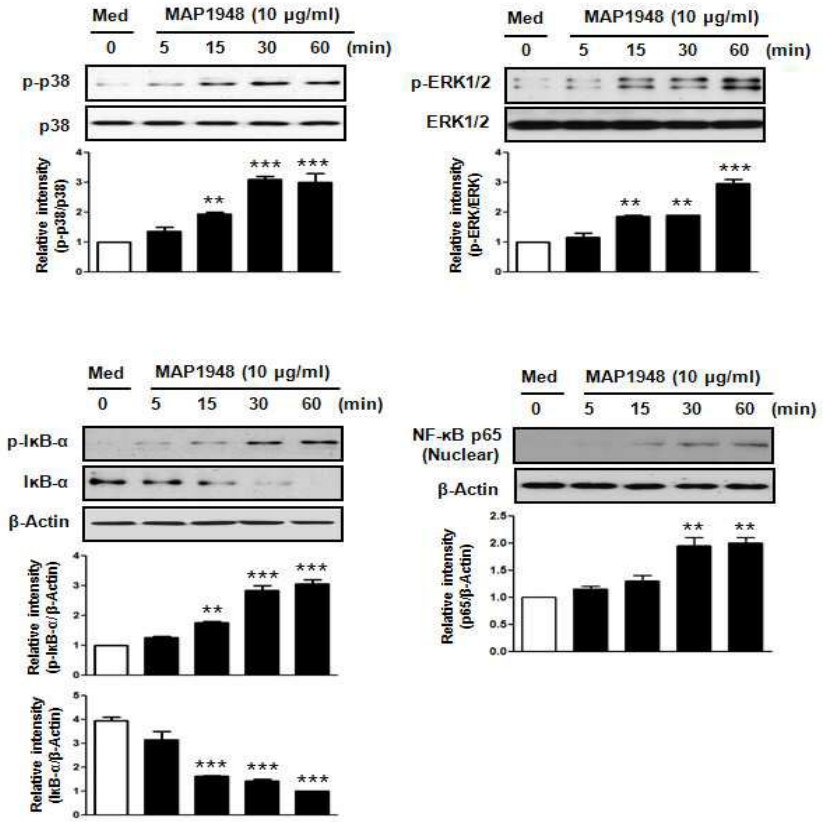
도면6a



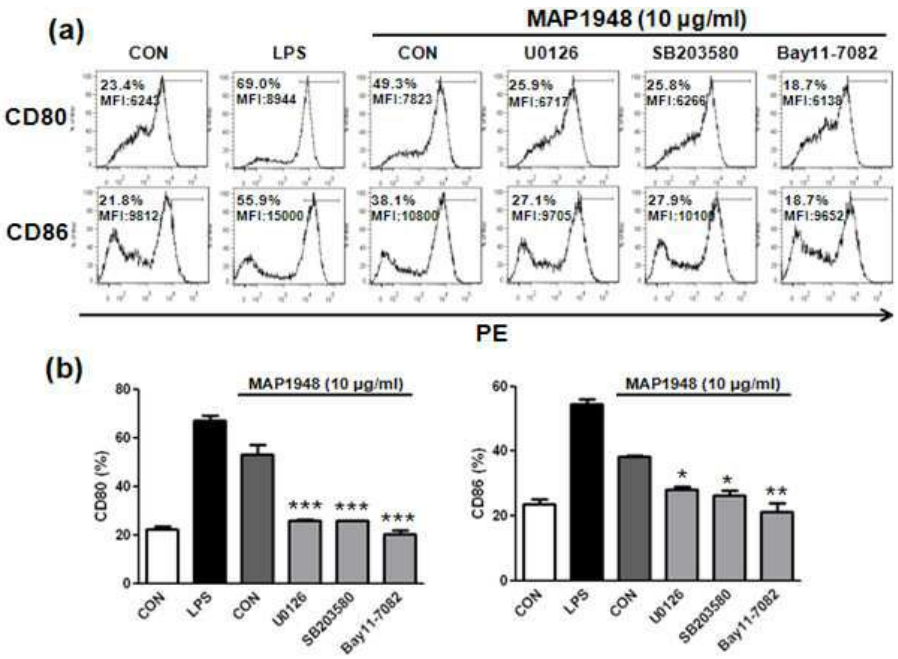
도면6b



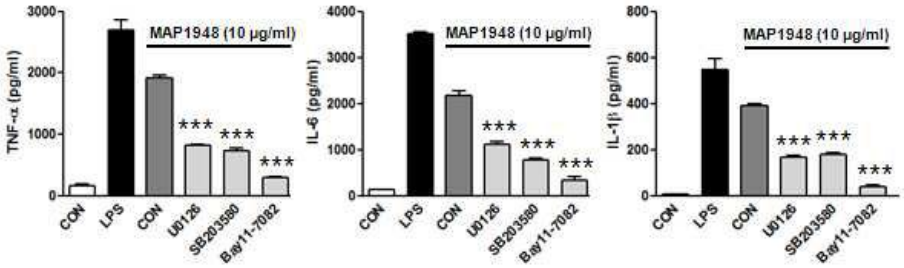
도면7


Med
MAP1948 (10 μg/ml)
0 5 15 30 60 (min)
p-p38
p38
Relative intensity (p-p38/p38)
p-ERK1/2
ERK1/2
Relative intensity (p-ERK/ERK)
p-IκB-α
IκB-α
β-Actin
Relative intensity (p-IκB-α/β-Actin)
Relative intensity (IκB-α/β-Actin)
NF-κB p65 (Nuclear)
Relative intensity (p65/β-Actin)

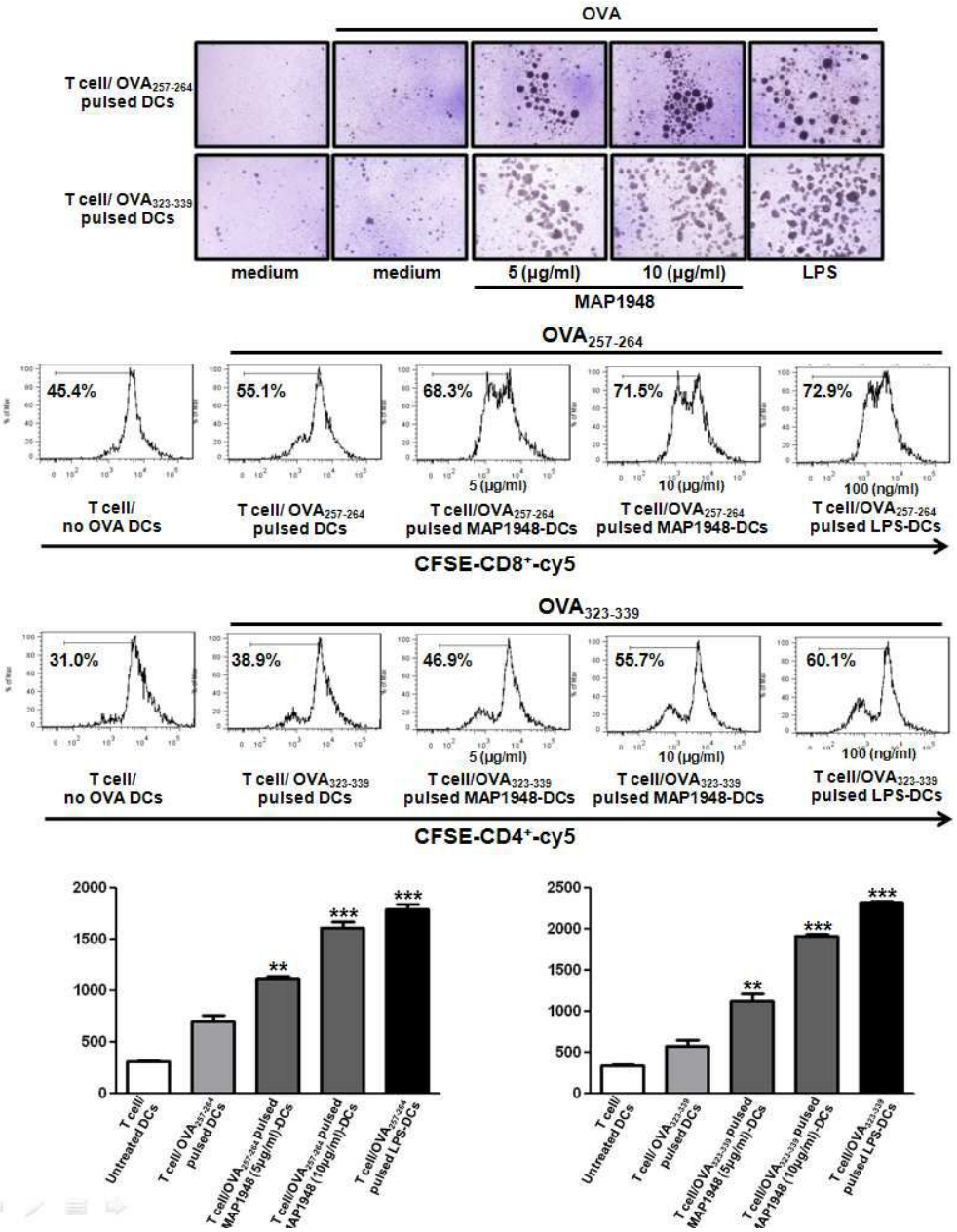
도면8a


(a)
MAP1948 (10 μg/ml)
CON
LPS
CON
U0126
SB203580
Bay11-7082
CD80
CD86
23.4% MFI:5243
69.0% MFI:8944
49.3% MFI:7823
25.9% MFI:6717
25.8% MFI:6266
18.7% MFI:6138
21.8% MFI:9812
55.9% MFI:15000
38.1% MFI:10800
27.1% MFI:9705
27.9% MFI:10108
18.7% MFI:9652
PE
(b)
MAP1948 (10 μg/ml)
CD80 (%)
CD86 (%)
CON
LPS
CON
U0126
SB203580
Bay11-7082

도면8b



도면9



서 열 목 록

<110> The Industry & Academic Cooperation in Chungnam National University (IAC)

<120> Maturation method for Dendritic cell using Mycobacterium paratuberculosis MAP1948

<160> 2

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Forward primer

<400> 1

catatggaat tcgcgaccgt ctcgc 25

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Reverse primer

<400> 2

ctcgagcggg tgagcggacg ggtcg 25