(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0116200
(43) 공개일자 2012년10월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01K 67/027 (2006.01) *C12N 15/23* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0033802
(22) 출원일자 2011년04월12일
심사청구일자 2011년04월12일

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
홍석만
경기도 성남시 분당구 수내동 양지한양아파트 524동 705호
이성원
충청남도 천안시 서북구 성정8길 14, 활림2차 목련아파트 206호 (성정동)
(74) 대리인
특허법인태백

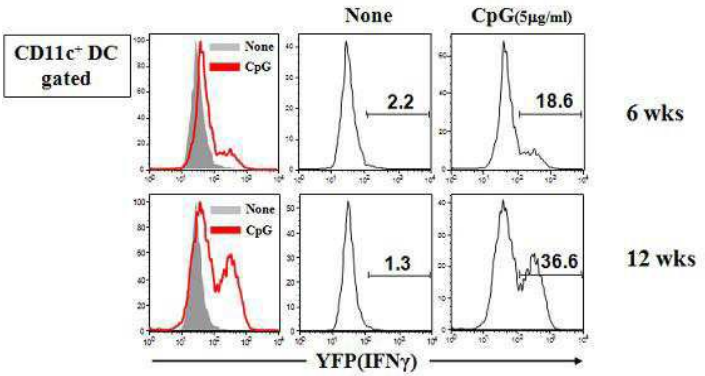
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **아토피 피부염 조절물질 선별용 동물모델 및 이를 이용한 약제 스크리닝 방법**

(57) 요 약

본 발명은 아토피 피부염 조절물질 선별용 동물모델 및 이를 이용한 약제 스크리닝 방법에 관한 것으로서, 상기 동물모델은 본 발명은 IFNγ 리포터 유전자를 포함하는 동물과 아토피 피부염 유발 동물의 교배를 통해 얻어진 이형접합 동물과, 아토피 피부염 유발 동물을 역 교배하여 얻어지며 IFNγ 분비세포를 형광 발현하는 것을 특징으로 하며, 이러한 동물 모델을 이용하면 아토피 피부염을 조절하는 약제를 효율적으로 스크리닝할 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A090645

부처명 보건복지부

연구사업명 보건의료연구개발사업

연구과제명 사이토카인 리포터 생쥐 모델을 통한 감마폴리글루탐산의 작용 메커니즘 규명 및 아토피 피부 질환에의 적용 연구

주관기관 세종대학교 산학협력단

연구기간 2009.05.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

인터페론-감마(IFNγ) 리포터 유전자를 포함하는 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 교배하는 단계; 및 상기 교배를 통하여 얻어진 이형접합 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 역 교배하는 단계를 포함하여 이루어지며, IFNγ 분비세포를 형광 발현하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 조절물질 선별용 동물모델.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 IFNγ 리포터 유전자를 포함하는 동물은 Yeti B6 마우스인 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 조절물질 선별용 동물모델.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 아토피 피부염 유발 동물은 NC/Nga 마우스인 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 조절물질 선별용 동물모델.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 이형접합 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 역 교배하는 단계는 6세대 이상 진행하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 조절물질 선별용 동물모델.

청구항 5

다음의 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 조절물질 스크리닝 방법:

(a)상기 제 1항에 따른 아토피 피부염 조절물질 스크리닝용 동물모델의 면역세포를 분리하는 단계;

(b)상기 면역세포에 아토피 피부염에 효과가 있을 것으로 예상되는 후보물질을 처리하는 단계; 및

(c)상기 후보물질이 처리된 면역세포의 IFNγ 리포터 유전자의 형광발현 여부를 확인하여 아토피 피부염 조절물질을 선별하는 단계.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 면역세포는 수지상세포인 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 조절물질 스크리닝 방법.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 아토피 피부염 조절물질 스크리닝 방법은 제 1항에 따른 아토피 피부염 조절물질 스크리닝용 동물모델을 이용하여 선별해 낸 후보물질의 아토피 피부염 조절효과를 검증하는 단계를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 조절물질 스크리닝 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 아토피 피부염 조절물질 선별용 동물모델 및 이를 이용한 약제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 아토피성 피부염(Atopic dermatitis)은 주로 유아기 혹은 소아기에 시작되는 만성적이고 재발성의 염증성 피부질환으로 소양증과 피부 건조증, 특징적인 습진을 동반하며, 일부 환자에게서는 천식, 고초열, 알러지성 비염 등의 다양한 알러지 질환이 유발되기도 한다.

[0003] 현재까지도 아토피성 피부염의 발생 기전에 대해서는 명확히 규명되지 않고 있으나, 대부분의 환자에서 체내의 체액성 면역반응을 강화하는 제 2형 T세포(Th2)에 의하여 분비되는 면역글로블린E(IgE)의 혈중수준이 증가할 뿐만 아니라, Th2에 의해 분비되는 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-5(IL-5)의 혈중 수준도 증가하는 것으로 보고되고 있어, 아토피성 피부염의 발명에 체액성 면역반응이 전반적으로 관여될 가능성이 높은 것으로 보고되고 있다. 이에 따라 체액성 면역반응을 조절하여 아토피 피부염을 치료하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0004] 또한 아토피 피부염이 발병한 경우 면역세포에서 분비되는 인터페론 감마(IFNγ)의 생산은 감소되는 것으로 보고되고 있는데, 이때 IFNγ는 항바이러스, 항균, 항암작용 이외에 IgE의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 아토피 피부질환을 앓는 환자에게 IFNγ를 투여하여 증상이 호전된 사례도 보고되고 있다. 이에 따라, 최근에는 아토피 피부염의 진단 및 이에 대한 치료효과를 나타내는 물질을 선별하는 데 있어, 면역세포내의 IFNγ의 증감이 중요한 지표가 되고 있다.

[0005] 한편, 지금까지는 인간 아토피 피부염과 유사한 임상적, 병리적, 조직학적 특징을 나타내는 Nc/Nga 마우스가 효율적인 아토피 피부염의 동물 모델로 사용되어져 왔다.

[0006] 그러나 아토피 피부염을 조절하는 물질을 선별하거나, 아토피 피부염에 대한 치료효과 검증 실험 시 면역세포내의 IFNγ의 증감을 확인하기 위해서는 현재로서는 항체염색법(Intra cellular cytokine antibody staining)을 이용할 수밖에 없다. 이 경우 Nc/Nga 마우스에서 면역세포를 분리하여 포르말린으로 고정시킨 후 사이토카인에 대하여 형광이 달려있는 면역항체를 염색하여 IFNγ의 수치를 확인하여야 하므로, 실험과정이 번거로울 뿐만 아니라 실험 중 여러 요인으로 인해 정확하지 않은 데이터가 도출될 가능성도 완전히 배제할 수 없다.

[0007] 특히 종래의 동물모델을 이용할 경우 in vitro에서 아토피 피부염 치료에 유용한 후보물질을 선별하였다 하더라도 살아있는 세포에서 IFNγ의 증감을 확인할 방법이 없으므로, in vivo 모델에서 아토피 피부염에 대한 면역조절의 효과를 검증하는 데에는 한계가 있었다.

[0008] 이에 아토피 피부염 치료물질의 선별 및 치료효과 검증을 위하여, 보다 효율적인 동물모델의 개발이 끊임없이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 상기한 종래기술의 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명자들은 아토피 피부염 조절물질을 선별하고 그 효과를 검증하는데 이용되는 동물모델을 개선하기 위한 방안으로서, 면역 세포내 IFNγ의 증감을 보다 용이하게 확인할 수 있는 동물모델에 초점을 두고 연구 개발하여 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 목적은 다른 인자들의 영향을 적게 받으며 면역 세포내 IFNγ 증감을 보다 용이하게 측정할 수 있고, in vivo에서도 IFNγ로 인한 면역조절 효과의 검증이 가능한 아토피 피부염 조절물질 선별용 동물모델을 제공하는 데 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 목적은 상기 아토피 피부염 조절물질 선별용 동물모델을 이용한 약제 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 IFNγ 리포터 유전자를 포함하는 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 교배하는 단계; 및 상기 교배를 통하여 얻어진 이형접합(heterozygous) 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 역교배하는 단계를 포함하여 이루어지며, IFNγ 분비세포를 형광 발현하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 조절물질 선별용 동물모델을 제공한다.

[0013] 본 발명에서, 상기 IFNγ리포터 유전자를 포함하는 동물은 형광단백질을 발현하는 리포터 유전자를 포함하여 별도의 과정을 거치지 않고 in vitro 또는 in vivo에서 IFNγ의 발현여부를 확인할 수 있는 어떠한 동물모델도 될 수 있으나, 본 발명자들은 C57BL/6 마우스에 IFNγ 황색형광단백질(yellow fluorescence protein, YFP) 리포터 유전자를 포함하는 Yeti B6 마우스를 발명의 바람직한 일 실시예로서 사용하였다. 이때, 상기 Yeti B6 마우스는 IFNγ 유전자의 정지코돈 뒤에 IRES(internal ribosomal entry site) 엘리먼트(element)가 연결된 YFP 유전자를 넉인(knock-in) 방법으로 집어넣어 제조하였다(*Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 8395). 한편, 상기 황색형광단백질(YFP) 이외에, 당업계에 널리 알려진 녹색형광단백질(green fluorescence protein, GFP), 청색형

광단백질(blue fluorescence protein,BFP), 및 적색형광단백질(red fluorescence protein) 등도 이용될 수 있음은 당연하다.

[0014] 또한, 본 발명에서 상기 아토피 피부염 유발 동물모델은 인간 아토피 피부염과 유사한 임상적, 병리적, 조직학적 특징을 나타내는 어떠한 동물모델이라도 무방하나, 본 발명자들은 현재 가장 보편적으로 사용되고 있는 NC/Nga 마우스를 본 발명의 바람직한 일 실시예로서 사용하였다.

[0015] 이때, 이형접합 동물모델에 IFNγ 리포터 유전자가 포함되어 있는지 여부는 리포터 유전자, 즉 형광단백질 유전자를 검출할 수 있는 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, PCR)을 통해 확인가능하다.

[0016] 한편, 본 발명에서 상기 이형접합 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 역교배(backcross)하는 단계는 6세대 이상 진행되는 것을 특징으로 한다. 이는 IFNγ 리포터 유전자를 포함하는 동물과 아토피 피부염 유발 동물모델을 교배하여 얻어진 이형접합 동물모델이 완전한(99% 이상) 아토피 피부염 형질로 전환하도록 위함이다.

[0017] 이외에 본 발명은 (a)본 발명에 따른 아토피 피부염 조절물질 선별용 동물모델의 면역세포를 분리하는 단계; (b)상기 면역세포에 아토피 피부염에 효과가 있을 것으로 예상되는 후보물질을 처리하는 단계; 및 (c)상기 후보물질이 처리된 면역세포의 IFNγ 리포터 유전자의 형광발현 여부를 확인하여 아토피 피부염 조절물질을 선별하는 단계를 포함하는 아토피 피부염 조절물질 스크리닝 방법을 제공한다.

[0018] 본 발명에서 상기 면역세포는 IFNγ를 분비하는 어떠한 면역세포도 이용될 수 있으나, 특히 IFNγ를 강하게 발현하는 것으로 알려진 수지상세포가 바람직하다.

[0019] 한편, 본 발명에서 IFNγ 리포터 유전자의 형광발현 여부를 확인하는 방법으로 유세포 분석(flow cytometry)이 이용할 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 이상의 단계를 통해 스크리닝 해 낸 후보물질을 본 발명에 따른 아토피 피부염 조절물질 선별용 동물모델에 적용하여 해당 후보물질의 아토피 피부염 조절효과를 검증하는 단계가 추가로 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0021] 본 발명은 IFNγ리포터 시스템을 포함하는 동물모델을 통하여 종래의 동물모델보다 다른 인자들의 영향을 적게 받으면서도 용이하게 면역 세포내의 IFNγ 증감을 측정할 수 있을 뿐만 아니라, in vivo에서도 IFNγ로 인한 면역조절 효과를 확인할 수 있으므로 아토피 피부염 조절물질을 선별하고, 그 치료효과를 검증하는 데 매우 유용하다.

[0022] 또한, 본 발명에 따른 동물모델은 세포가 살아있는 상태에서 IFNγ 발현 양상을 관측 가능할 뿐만 아니라, 분류기능이 있는 유세포 분석기(Flow cytometer)를 이용하여 살아있는 IFNγ 발현세포를 분리할 수 있으므로 아토피 질환 발달 시에 일어나는 면역세포의 유전자 발현 양상 등을 분석하는데도 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명에 따른 동물모델에서 분리한 수지상세포에 TLR9리간드(CpG)를 처리한 후 IFNγ 분비세포의 발현 여부를 측정하기 위한 형광유세포 분석결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 본 발명이 이러한 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0025] 실시예 1: IFNγ 분비세포를 형광 발현하는 아토피 피부염 조절물질 선별용 동물모델의 생산

[0026] 먼저, IFNγ 리포터 유전자와 아토피 피부염 유발 형질을 함께 갖는 이형접합 동물모델을 얻기 위해 Yeti B6 마우스와 NC/Nga 마우스(중앙실험동물 회사)를 교배하였다. 이때, 상기 Yeti B6 마우스는 미국 캘리포니아 주립대학 (University of California at San Francisco, UCSF)에 있는 Richard Locksley 교수의 허가에 의해 입수하였으며, IFNγ 유전자의 정지코돈 뒤에 IRES(internal ribosomal entry site) 엘리먼트(element)가 연결된 YFP 유전자를 넉인(knock-in) 방법으로 집어넣어 준비하였다(*Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 8395).

[0027] 교배로 얻어진 이형접합 마우스에 대하여 중합효소 연쇄 반응을 통해 황색형광단백질이 검출되는 지 여부를 확인한 후, NC/Nga 마우스와 역교배(backcross)하였다. 역교배는 6세대 이상 진행하며, 본 실시예에서는 8세대에

걸쳐 역교배를 진행하였다.

[0028] 실시예 2 : IFNγ를 분비하는 면역세포에 대한 형광발현 여부 확인실험

[0029] 비장에는 수지상세포, 대식세포, NK세포, T림프구, B림프구 등의 다양한 면역세포들이 존재하며, 이러한 면역세포에서는 IFNγ를 비롯한 다양한 사이토카인(cytokine)을 분비하고 있는데, 이중 수지상세포가 IFNγ를 강하게 발현하는 것으로 알려져 있으므로(*Journal of Immunology*, 2005, 174: 2612), 실시예 1에 따른 동물모델의 비장세포로부터 유래한 수지상 세포(dendritic cell)에 면역활성 물질을 처리한 후, 수지상세포 내에서 형광단백질을 발현하는 세포를 측정함으로써 실시예 1에 따른 동물모델이 IFNγ를 분비하는 면역세포에 대해 형광 발현하는지 여부를 확인할 수 있다.

[0030] 1) 실시예 1에 따른 동물모델로부터 수지상 세포의 분리.

[0031] 상기 실시예 1에 따라 생산된 8주령의 동물모델의 비장을 적출하여 2mML-글루타민, 항생제, 10%의 우태아 혈청(Fetal Bovine serum, FBS)이 첨가된 RPMI 배양액에 담근 후 바로 생리식염수(Phosphate Buffered Saline, PBS)로 2회 세척하고, 다시 RPMI 1640 배양액 내에서 비장을 분쇄하였다. 비장 분쇄액에 ACK RBC lysis buffer(0.15M NH_4Cl + 10mM $KHCO_3$ + 2mM EDTA)를 첨가하여 적혈구를 특이적으로 제거한 후 다시 MACS(Magnetic activated cell sorting)전용버퍼(1X PBS, 2mM EDTA, 0.5% BSA)로 1회 세척하였다. 190㎕의 MACS 버퍼와 수지상 세포의 면역학적 마커인 CD11c에 마그네틱 bead가 접합된 시약을 10㎕를 넣은 후 4℃에서 30분간 염색을 하였다. 5㎖ MACS 버퍼를 이용하여 3회 세척한 후 자석원리를 이용한 MACS 전용 kit를 이용하여 수지상세포만을 분리하였다.

[0032] 2) 수지상 세포의 활성화.

[0033] 순수하게 분리한 수지상세포를 U자형의 96 well plate에 $1x10^6$/well 빈도로 분주하고, 수지상세포의 톨라이크 수용체(TLR) 9에 대한 활성화물질인 CpG를 5㎍/㎖를 첨가하여 실험군을 준비하였다. 대조군에는 동일 조건에 RPMI 배양액을 첨가하였다. 실험군 및 대조군을 5% CO_2가 공급되는 인큐베이터 내에서 37℃에서 16시간 동안 배양하였다.

[0034] 3) 형광유세포 분석.

[0035] 배양을 끝낸 실험군 및 대조군을 0.5% 우태아혈청이 첨가된 생리식염수로 세척한 후 APC(allophycocyanin)형광이 접합된 수지상세포 표면마커(CD11c-APC)로 45분동안 표면염색을 실시하였다. 이후 0.5% 우태아 혈청이 첨가된 생리식염수액으로 3회 세척하고, 1% 포르말린 고정액에서 30분동안 고정하였다. 유세포 형광분석기(FACS, Becton Dickinson, U.S.A)를 이용하여, 실험군 및 대조군에서 황색형광단백질(YFP)를 발현하는 활성화된 면역세포의 비율을 측정하였다.

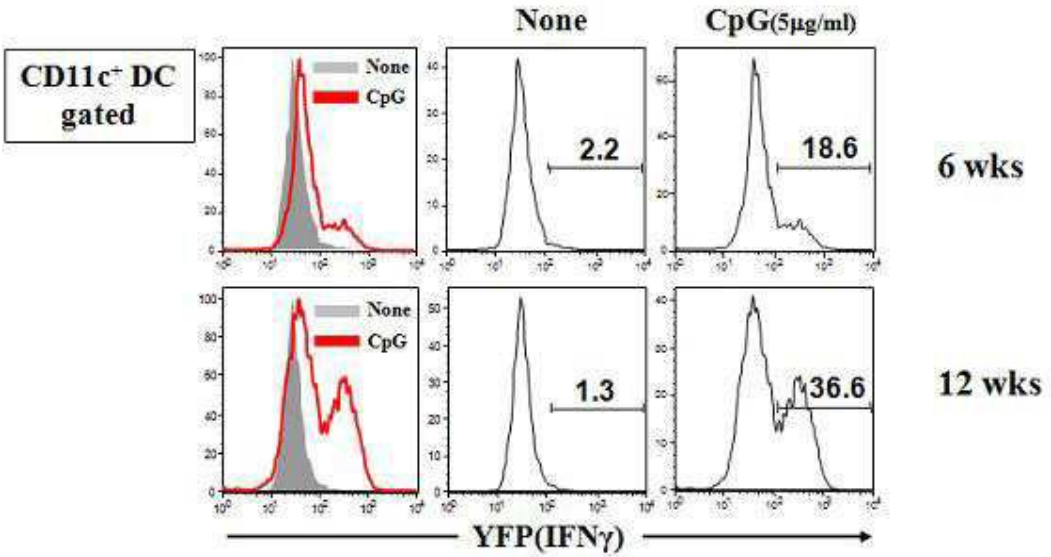
[0036] 실험 결과, 도 1에서 보는 바와 같이 CpG로 수지상세포를 활성화시킨 실험군에서는 황색형광단백질(YFP)을 발현하는 세포, 즉 IFNγ를 분비하는 세포가 증가된 것을 확인할 수 있었으나, 대조군에서는 황색형광단백질(YFP)을 발현하는 세포의 유의미한 증가를 확인할 수 없었다. 이는 실시예 1에 따른 동물모델에서 형광단백질의 발현여부 또는 활성화된 세포의 수를 측정하는 것만으로 타겟(target)으로 하는 면역세포에서의 IFNγ의 분비양상을 용이하게 모니터링 할 수 있음을 의미한다.

[0037] 따라서, 본 발명에 따른 아토피 피부염 조절물질 선별용 동물모델에서 분리된 면역세포(특히 수지상세포)에 다양한 후보물질을 첨가한 후, 형광단백질의 발현여부를 측정함으로써 in vitro상에서 IFNγ분비에 영향을 미치는 아토피 피부염 치료 후보물질을 신속하게 스크리닝해 낼 수 있다. 이렇게 스크리닝 해 낸 후보물질들을 본 발명에 따른 동물모델에 직접 적용(피부에 도포하거나 투여)한 후 육안적 병변관찰, 조직병리학적 분석, 및 혈중 IgE, IL4 및 IFNγ농도 변화를 측정함으로써 최종적으로 아토피 피부염 조절물질을 선별해 낼 수 있다.

[0038] 또한, 분류기능이 있는 유세포분석기(Flow cytometry)를 이용하여 살아있는 IFNγ 발현세포를 분리할 수 있으므로 아토피 질환 발달 시에 일어나는 면역세포의 유전자 발현 양상 등을 분석하는데도 유용하게 이용될 수 있음을 시사한다.

도면

도면1


None
CpG(5μg/ml)
CD11c+ DC gated
None
CpG
2.2
18.6
6 wks
None
CpG
1.3
36.6
12 wks
YFP(IFNγ)