



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0148100
(43) 공개일자 2016년12월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61K 35/744 (2014.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0084101
(22) 출원일자 2015년06월15일
심사청구일자 2015년06월15일

(71) 출원인
충북대학교 산학협력단
충청북도 청주시 서원구 충대로 1 (개신동)
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
(72) 발명자
한남수
충청북도 청주시 흥덕구 풍년로 56 804동 1503호
(가경동,가경뜨란채8차아파트)
강희
서울특별시 서초구 잠원동 나루터로 4길 39
한신10차아파트 319-110
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양부현

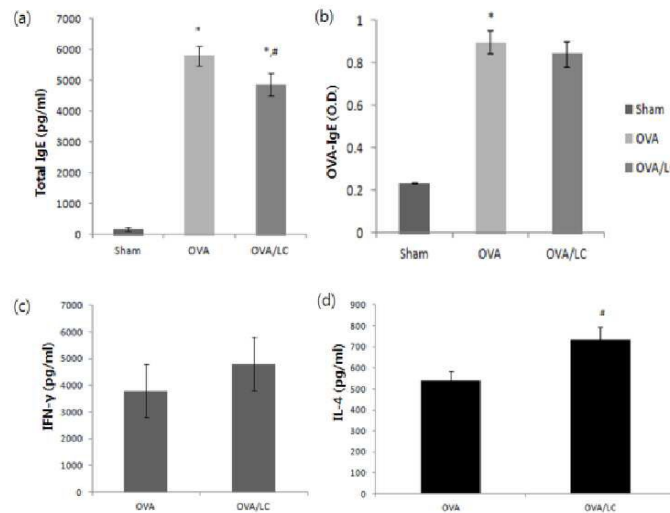
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 면역조절 활성을 갖는 류코노스톡 시트리움 EFEL2061 균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 김치에서 분리한 신규한 균주인 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) EFEL2061(LC61) 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 류코노스톡 시트리움 EFEL2061 균주는 Th2-매개 면역반응을 조절하는 활성을 가지고 있다. 따라서 본 발명의 류코노스톡 시트리움 EFEL2061 균주 또는 이의 배양액은 Th2-매개 면역질환의 예방 또는 치료용 조성물로 이용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 35/744 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23Y 2260/21 (2013.01)

노술지

충청북도 청주시 상당구 낭성면 관정길 31-12

(72) 발명자

문진석

충청북도 청주시 청원구 율량동 율량9단지 2006호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2013M3A6A80735531
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	글로벌프론티어사업
연구과제명	Phytochemical 생물전환용 지능형 유산균 세포공장 개발
기 여 율	1/2
주관기관	충북대학교
연구기간	2014.09.01 ~ 2016.08.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	iPET914002041SB
부처명	농림축산식품부
연구관리전문기관	농림수산물기술기획평가원
연구사업명	농림축산식품 미생물유전체사업
연구과제명	김치유산균의 유전학적 기능성 및 안전성 연구
기 여 율	1/2
주관기관	충북대학교
연구기간	2014.07.01 ~ 2018.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) EFEL2061 균주(기탁번호 KACC92070P).

청구항 2

류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) EFEL2061 균주(기탁번호 KACC92070P) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 Th2-매개 면역 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 조성물은 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 2 항에 있어서, 상기 조성물은 약제학적 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 2 항에 있어서, 상기 Th2-매개 면역 질환은 알레르기 질환인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 김치로부터 분리된 알레르기 질환 개선기능을 갖는 류코노스톡 시트리움 EFEL2061 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 프로바이오틱스(probiotics)는 기생하는 숙주의 생리현상에 유익한 효과를 줄 수 있는 살아있는 미생물이다. 인간의 장내 미생물 생태계(microbial ecosystem)가 파괴되면 건강에 영향을 미칠 수 있기 때문에, 프로바이오틱스는 많은 관심을 받아왔다. 최근 수년간, 장내 미생물군(microbiota)이 숙주의 면역계를 발달시키고 유지하는데 중요한 역할을 한다는 증거가 많이 제시되고 있다(1). 특히, 아동기에 미생물에 대한 낮은 노출 및 항생제 과다 사용은 알레르기성 질환 환자의 증가와 밀접한 연관이 있다(2, 3). 이러한 연구를 기초로 알레르기성 질환의 치료에 프로바이오틱스를 이용하고자 하는 연구가 진행되고 있으며(4). 이를 위해서는 숙주의 면역계를 조절할 수 있는 유익한 프로바이오틱스의 동정 및 개발이 필요하다.

[0003] 미접촉 보조 T 세포(naive T helper (Th) cell)가 활성화되기 위해서는 항원제시세포(antigen presenting cell, APC)의 MHC II 단백질에 의해 제시된 항원 펩타이드(peptide antigen)와 접촉하는 것이 필요하며, 이를 수행하는 전문 항원제시세포로는 B 세포와 선천면역세포(innate immune cell)인 대식세포(macrophages) 및 수지상세포(dendritic cell)가 있다(5). 또한, 보조 T 세포가 최적의 상태로 활성화되기 위해서는 보조 T 세포의 CD28이 항원제시세포의 공동자극분자(costimulatory molecule)인 CD80, CD86과 상호작용하는 것이 필요하다. 이 신호전달은 활성화된 보조 T 세포에서의 CD40 리간드(ligand) 발현을 유도하고, 이는 항원제시세포의 CD40와 결합하게 된다. CD40 리간드와 CD40의 상호작용은 항원제시세포에서 공동자극분자의 발현을 증가시키고 다른 생물학적 기능을 향상시켜, B 세포에 의한 면역글로불린(immunoglobulin, Ig) 합성 및 대식세포와 수지상세포에

의한 사이토카인(cytokine)합성 등을 촉진한다(6). 활성화된 보조 T 세포는 B 세포가 IgM외에도 동종형(isotype)인 IgG, IgA, IgE를 생산하는 데 매우 중요한 역할을 한다.

[0004] 활성화된 보조 T 세포는 영향을 받는 사이토카인의 종류에 따라 Th1이나 Th2 보조 T 세포, 또는 다른 세포로 분화할 수 있다. 대식세포와 수지상세포가 미생물의 존재를 인지하여 인터류킨-12(interleukin-12, IL-12), 종양괴사인자-알파(tumor necrosis factor TNF- α , TNF- α) 또는 인터페론-감마(interferon- γ , IFN- γ)와 같은 염증성 사이토카인(inflammatory cytokines)을 분비하면, 활성화된 보조 T 세포는 인터류킨-4에 비해 훨씬 많은 양의 인터페론-감마를 분비하는 Th1 보조 T 세포로 분화한다(7). 반대로, 활성화된 보조 T 세포 주변에 이러한 염증성 사이토카인이 없는 경우에는 인터류킨-4의 비율이 높은 사이토카인을 분비하는 Th2 보조 T 세포로 분화하며, B 세포가 IgE를 생산하도록 신호를 보낸다. 현재까지는, 인터류킨-12에 의한 신호전달이 없을 때 활성화된 보조 T 세포가 Th2 세포로 분화하는 것이 기본 경로로 생각되고 있다(8). 알레르기성 질환 중 Th2 보조 T 세포가 과활성화되고 면역글로불린 E의 합성이 증가하는 특징을 가지는 경우가 늘어나고 있는데, 이는 적절한 미생물 자극(microbial stimulation)의 부재로 인터류킨-12와 인터페론-감마를 생산하여 Th1 세포 유도를 촉진하는 선천면역세포의 활성이 감소한 결과로 추정된다.

[0005] 김치는 채소를 소금에 발효시킨 것으로서 다량의 젖산균(lactic acid bacteria)을 함유하고 있으며, 이 중 일부는 면역조절 효과(immunomodulatory effect)를 나타내는 것으로 알려져 있다(9, 10). 류코노스톡(*Leuconostoc*) 속(genus)은 김치의 초기 발효과정 동안 우위를 차지하는 젖산균의 하나이다. 따라서 류코노스톡(*Leuconostoc*)속 균주 가운데 면역조절활성을 갖는 균주를 발굴할 수 있다면, 면역계를 조절할 수 있는 유익한 프로바이오틱스로서 활용이 가능할 것이다.

[0006] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 김치로부터 류코노스톡 시트리움 유산균을 분리하고 이중에서 Th2-매개 면역조절 활성을 가지고 있는 균주를 발굴하고자 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 김치에서 분리한 신규한 균주인 류코노스톡 시트리움 EFEL2061(LC 61) 균주가 *in vitro*와 *in vivo*에서 Th2-매개 면역조절 효과를 나타낸다는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 본 발명의 목적은 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) EFEL2061 균주(기탁번호 KACC92070P)를 제공하는 데 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) EFEL2061 균주(기탁번호 KACC92070P) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 Th2-매개 면역 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) EFEL2061 균주(기탁번호 KACC92070P)를 제공한다.

[0011] 류코노스톡(*Leuconostoc*)은 김치의 초기 발효과정 동안 우위를 차지하는 젖산균의 하나이다. 류코노스톡은 동그란 구형의 모양을 하고 있으며, 류코노스톡 균의 종류로는 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*), 류코노스톡 락티스(*Leuconostoc lactis*), 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*) 등이 있다.

[0012] 본 발명자들은 김치로부터 Th2-매개 면역조절 활성을 가지는 균주를 선별하여, 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) EFEL2061로 명명하고, 이 균주의 Th2-매개 면역조절 활성을 확인하였다.

[0013] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) EFEL2061 균주(기탁번호 KACC92070P) 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 Th2-매개 면역 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공

한다.

- [0014] 본 발명에서 “이의 배양액”이란, 균주를 액체배지에서 배양한 경우, 균주를 포함하고 있는 배양액을 의미한다,
- [0015] 본 발명의 조성물은 다양한 Th2-매개 면역 질환, 질병 또는 상태의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다. 본 명세서에서, 용어 “Th2-매개 면역 질환”은 알러젠-특이 Th2 세포의 생성 및 활성화에 의한 IgE 및 매스트 세포가 관여하는 질환을 의미한다. 본 명세서에서 용어 “Th2 세포”는 유전자 발현, 단백질 분비 및 기능적 활성화 측면에서 특징되는 헬퍼 T 세포 림프사이트의 서브세트를 의미한다.
- [0016] 본 발명의 조성물이 적용되는 Th2-매개 면역 질환은 특별하게 한정되지 않으나, 구체적으로는 알레르기 질환에 적용된다. 본 발명의 조성물이 적용되는 Th2-매개 면역 질환은 아토피와 관련된 피부질환, 알레르기 비염(급성 또는 만성), 고초열 및 알레르기 기관지 천식을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0017] 한편, 본 발명의 Th2-매개 면역 질환의 예방 또는 치료 조성물은 식품, 특히 기능성 식품 조성물로 제조될 수 있다. 본 발명의 기능성 식품 조성물은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함할 수 있다. 구체적으로, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효 성분으로서의 후박나무 추출물 이외에 향미제 또는 천연 탄수화물을 추가 성분으로 포함시킬 수 있다. 예를 들어, 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등); 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등); 올리고당; 폴리사카라이드(예컨대, 텍스트린, 시클로텍스트린 등); 및 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등)을 포함한다. 향미제로서 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등) 및 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.
- [0018] 한편, 본 발명의 Th2-매개 면역 질환의 예방 또는 치료 조성물은 약제학적 조성물로 제조될 수 있으며, 이 경우 유효성분으로서의 상기 성분들 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함한다. 본 발명의 약제학적 조성물에 포함되는 약제학적으로 허용되는 담체는 제제시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약제학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.
- [0019] 본 발명의 약제학적 조성물은 경구로 투여하는 것이 바람직하다.
- [0020] 본 발명의 약제학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 질병 증상의 정도, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하며, 보통으로 숙련된 의사는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정 및 처방할 수 있다. 한편, 본 발명의 약제학적 조성물의 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.001-2000 mg/kg(체중)이다.
- [0021] 본 발명의 약제학적 조성물은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약제학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화 됨으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡셀제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [0022] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0023] (a) 본 발명은 Th2-매개 면역반응 조절 활성을 가지는 신규한 균주를 제공한다.
- [0024] (b) 본 발명의 신규한 균주 또는 그의 배양액은 Th2-매개 면역 질환인 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 조성물로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 OVA 감작실험 및 *Leuconostoc citreum* EFEL2061(LC 61) 균주처리 실험의 개요도이다.

도 2는 김치에서 분리한 다양한 *Leuconostoc citreum* 균주들의 사이토카인 분비유도 효과를 분석한 도표이다.

도 3은 *Leuconostoc citreum* EFEL2061(LC 61) 균주의 IFN- γ 또는 IL-4 분비에 미치는 영향을 분석한 도표이다.

도 4는 *Leuconostoc citreum* EFEL2061(LC 61) 균주가 OVA 감작된 마우스에서 혈청 내 IgE 레벨과 OVA-재자극된 사이토카인 생성에 미치는 영향을 분석한 도표이다.

도 5는 *Leuconostoc citreum* EFEL2061(LC 61) 균주가 OVA 감작된 마우스에서 항원제시세포 활성화에 미치는 영향을 분석한 도표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0027] 실시예

[0028] 실험재료 및 방법

[0029] 류코노스톡 시트리움 균주의 분리

[0030] 김치로부터 류코노스톡 시트리움 균주를 분리하기 위하여 판매용 김치(대한민국, 청주)를 구입하였다. 발효된 김치로부터 생성된 액체를 희석하여 락토바실리(lactobacilli) MRS (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 한천 배지에 바른 다음, 28°C에서 48시간 동안 배양하였다. 그 후에 콜로니(colony)를 페닐에틸알코올(phenylethyl alcohol, Difco)에 2% 수크로오스(sucrose)를 첨가한 PES 한천 배지 또는 노보비오신 류코노스톡 선택 배지(novobiocin leuconostoc selective (NLS) agar)로 옮겨 20°C에서 48시간 동안 배양하였다. PES 한천배지는 류코노스톡 종이 당(sugar)을 텍스트란(dextran)으로 전환하는 능력을 검증하는 목적으로 이용되었고, NLS 한천배지는 류코노스톡 종이 반코마이신(vancomycin) 및 노보비오신에 강한 내성을 가진다는 점을 이용하기 위해 선택하였다. PES 한천배지와 NLS 한천배지 모두에서 자란 콜로니를 류코노스톡 종으로 확인할 수 있었다. PES 평면 한천배지에서는 젤 형태의 텍스트란이 형성되어 단일 콜로니를 분리하는 것이 어려웠기 때문에, 글루코오스(glucose)를 탄소원으로 이용하는 NLS 한천배지로부터 콜로니를 분리하였다. 콜로니의 16s rRNA 유전자를 유니버설 프라이머 쌍인 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')을 이용하여 PCR로 증폭하였고, PCR 산물의 염기서열을 분석하였다. 분석한 16s rRNA 유전자 염기서열을 Fasta 프로그램을 이용하여 일본 DNA 정보은행(DNA Data Bank of Japan, <http://www.ddbj.nig.ac.jp>)에 등록된 관련 표준균주(reference strain)와 비교하는 방법으로 종(species)을 확인하였다. 추가적인 실험이 필요한 경우 균주를 MRS broth 배지에 접종하여 30°C에서 18시간 동안 배양하였으며, 세포를 수확한 후 0.85% 염류용액(saline)으로 세척하고 동결건조를 하였다. 실험시에는 세포를 PBS에 현탁하여 사용하였다.

[0031]

[0032] 실험동물

[0033] 7주령의 수컷 Balb/c 마우스를 Charles River Korea(Orient, 대한민국)에서 구입하여 사용하였다. 마우스는 경희대 병원의 병원체 부재 동물시설(pathogen-free animal facility)에서 온습도 제어와 12시간 명암주기 조건 하에 설치류용 사료(rodent chow)와 물을 자율급식하며 사육하였다. 실험계획서는 경희의료원 동물관리 및 사용위원회(Kyung Hee University Medical Center Institutional Animal Care and Use committee)의 승인을 받았으며, 마우스의 관리는 미국 국립 연구위원회 의 실험동물 관리 및 사용 안내서(US National Research Council Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)의 규정을 따랐다.

[0034]

[0035] 복강대식세포의 배양

[0036] 아무것도 처리하지 않은 마우스에 살균된 티오글리콜레이트 배지(thioglycollate medium, BD, Sparks, MD, USA) 2 ml을 복강 내 주사하였다. 3일 후, DMEM(Hyclone, Logan, Utah, USA)으로 복막투석(peritoneal

lavage)을 실시하여 대식세포를 수집하였다. 세포를 원심분리한 다음, 10%의 소 태아혈청(fetal bovine serum (FBS), Hyclone)과 1%의 페니실린(penicillin)-스트렙토마이신(streptomycin) 항생제를 첨가한 DMEM에 현탁하고, 37° C, 5% CO₂의 가습환경에서 하룻밤 동안 배양하였다. 이후 추가적인 분석을 위하여 비부착 세포를 제거하였다. 5 × 10⁵ cell/ml 농도의 대식세포에 각각 4 μg/ml, 20 μg/ml, 100 μg/ml의 박테리아 또는 1 ng/ml, 10 ng/ml의 지질다당류(lipopolysaccharides, LPS)를 24시간 동안 처리하였고, 상등액(supernatant)을 수집하여 사이토카인을 분석에 이용하였다.

[0037]

[0038] ***In vitro*에서의 LC61 균주를 이용한 마우스 비장세포(splenocytes) 자극**

[0039] 10%의 소 태아혈청과 1%의 페니실린-스트렙토마이신 항생제를 첨가한 RPMI 1640 배지(Hyclone, USA) 속에 두 개의 유리 슬라이드 넣고, 그 사이에 아무것도 처리하지 않은 마우스의 비장(spleen)을 끼워 분쇄하는 방법을 이용하여 비장세포를 수집하였다. 적혈구를 용해시킨 후, 세포를 다시 현탁한 다음, 2 μg/ml의 CD3e 항체(BD Pharmingen, USA)와 박테리아를 첨가하여 48시간 동안 비장세포를 자극하였다. 일부 실험의 경우, 5 ng/ml의 제조함 인터류킨-4(BD Pharmingen) 또는 래트(rat)의 인터류킨-12(rIL-12, BD Pharmingen)를 배양액에 첨가하였다. 상등액을 수집하여 사이토카인 분석에 이용하였다.

[0040]

[0041] **마우스 OVA 감작(sensitization) 실험**

[0042] 동량의 Al(OH)₃ gel(alum)(Sigma, USA)과 PBS를 섞은 용액에 200 μg의 오브알부민(ovalbumin (OVA), Grade V, Sigma, St. Louis, MO, USA)을 녹인 다음, 이를 7일 간격으로 세 차례 마우스의 복강 내에 주사하여 마우스를 감작시켰다. 마지막 주사 후 7, 9, 11, 13일째에 1 % OVA 용액 200 μl를 마우스의 비강 내에 주입하였다(도 1). 허위 대조군(sham group)의 경우, 동일한 부피의 PBS로 감작시켰다. OVA 용액 외에도 마우스 당 1 × 10¹⁰ CFU의 살아있는 *Leuconostoc citreum* EFEL2061(LC 61)균주를 매일 경구 투여하였다. LC61의 투여는 첫 번째 OVA 감작 2주 전에 시작하였고 실험 종료 시까지 총 6주간 지속하였다. 이후 분석을 위하여 마우스를 에테르를 이용하여 안락사 시킨 후, 심장천자(cardiac puncture) 방법으로 혈청을 채취하였다.

[0043]

[0044] **OVA 재자극에 의한 사이토카인(OVA-restimulated cytokine) 분석을 위한 세포배양**

[0045] 상기 방법을 이용한 실험을 종료한 후, OVA-감작된 마우스로부터 비장세포를 수집하였다. OVA 재자극을 위하여 24-well 플레이트에 5 × 10⁶ cell/ml 농도로 세포를 분주하고, 배양액에 1 mg/ml의 OVA를 첨가하여 72시간 동안 배양하였다.

[0046]

[0047] **사이토카인과 IgE 분석**

[0048] 제조사의 방법(BD OptEIA Set for Mouse IL-12p70, TNF-α, IL-6, IL-4, IFN-γ, total IgE, BD Biosciences, USA)에 따라 ELISA를 수행하여 사이토카인과 총 IgE의 양을 측정하였다. OVA 특이적 IgE를 측정하기 위해서, 2 μg/ml의 rat anti-mouse IgE 항체(BD OptEIA Set Mouse IgE Set)를 포획항체(capture antibody)로 이용하였다. 비오틴 결합 OVA(biotinylated OVA)는 10 mg/ml의 OVA와 2.66 μmole의 비오틴(EZ-Link NHS-PEG4-Biotin, Thermo-Scientific, USA)을 섞어 준비하였다. 마이크로 플레이트 리더(Molecular Devices, Sunnyvale, USA)를 이용하여 450-570 nm에서 광학밀도(optical density)를 측정하였다.

[0049]

[0050] **유동세포 계수법(Flow cytometry)**

[0051] 허위 대조군과 OVA에 감작된 실험군으로부터 얻은 비장세포를 1%의 소 태아혈청과 0.1%의 아지드화나트륨(sodium azide)을 첨가한 PBS 완충용액에 현탁하였다. 비장세포에 FITC rat anti-mouse CD19(clone 1D3, BD Biosciences)와 PE hamster anti-mouse CD80 (clone 16-10A1, BD Biosciences) 항체 또는 FITC rat antimouse CD40 (clone 3/23)와 PE rat anti-mouse CD86 (clone GL1, BD Biosciences) 항체를 섞은 다음, 4° C에서 30분 동안 처리하였다. FACSCalibur(BD Biosciences)와 CellQuest 소프트웨어를 이용하여 유동세포 계수법을 수행하

였다.

[0052]

[0053]

통계분석

[0054]

통계적 평가는 student t-test를 통하거나 IBM SPSS Statistics version 21을 이용한 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance) 후 LSD test를 실시하여 수행하였다. 유의확률(P-value)이 0.05미만인 경우에 통계적으로 유의미하다고 판단하였다.

[0055]

[0056]

실험결과

[0057]

류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*, LC) 균주의 동정 및 균주 선택

[0058]

상기 방법으로 김치로부터 균주를 분리하였으며, 16s rRNA 유전자를 유니버설 프라이머 쌍인 27F와 1492R을 이용하여 PCR로 증폭하여 염기서열을 분석하였다. 분석한 16s rRNA 유전자 염기서열을 Fasta 프로그램을 이용하여 일본 DNA 정보은행(DNA Data Bank of Japan, <http://www.ddbj.nig.ac.jp>)에 등록된 관련 표준균주(reference strain)와 비교하는 방법으로 종(species)을 확인하였다. 확인결과, 새로운 류코노스톡 시트리움 균주를 동정하였으며, 이를 LC95, LC73, LC74, LC61, LC64라고 임시적으로 명명하였다. 동결건조된 균주를 다양한 농도로 희석하여 마우스의 복강대식세포와 24시간 동안 공동배양을 하였으며, 기준물질(reference compound)로서 LPS를 처리하였다. 실험 결과, 새로 동정된 류코노스톡 시트리움 균주가 투여량에 비례하여 IL-12, TNF- α 및 IL-6의 분비를 증가시키는 것을 확인하였다(도 2). 류코노스톡 시트리움 균주는 그람음성균의 구성성분인 LPS과 비교하여 TNF- α 또는 IL-6의 분비를 비슷한 수준으로 유도한 반면, IL-12의 분비를 뚜렷하게 증가시켰다. 새로 동정한 류코노스톡 시트리움 균주 가운데 LC61 균주가 IL-12 및 TNF- α 의 분비 촉진과 관련하여 가장 높은 효과를 나타내는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과를 바탕으로, LC61 균주를 선택하였다. LC61 균주의 균주명을 *Leuconostoc citreum* EFEL2061로 하여 2015년 05월 26일자로 국립농업과학원 농업유전 자원센터에 기탁하였다(기탁번호 KACC92070P).

[0059]

[0060]

류코노스톡 시트리움 EFEL2061(LC61) 균주가 활성화된 비장세포의 IFN- γ , IL-4의 레벨에 미치는 영향

[0061]

LC61 균주가 활성화된 비장세포의 IFN- γ 의 레벨에 미치는 영향을 분석하고자 하였다(도 3a). 이전의 연구를 통하여 IL-4가 IL-12 수용체 신호전달 경로를 억제함으로써 IFN- γ 의 생산을 감소시키는 것이 보고된 바가 있다. 활성화된 비장세포에 rIL-4를 처리한 경우, 미처리 대조군에 비해 IFN- γ 의 분비가 52% 정도 감소하였다. 한편, 세포에 CD3 항체 및 rIL-4과 함께 LC61 균주를 처리한 경우, CD3 항체와 IL-4만 처리한 세포에 비해 IFN- γ 의 분비가 3.5배 증가하였다($66,487 \pm 1941$ pml). 한편, 활성화된 비장세포에 rIL-12를 처리한 경우, rIL-12를 넣지 않은 활성화 비장세포에 비해 IFN- γ 의 생산이 3배 증가하는 결과를 나타내었다($58,824 \pm 1,828$ pg/ml). 비장세포에 LC61만을 처리한 경우, 상대적으로 적은 양의 IFN- γ 를 유도하였다(609 ± 41 pg/ml). 이러한 결과는 LC61 균주가 비장세포에 존재하는 대식세포나 수지상세포에서의 IL-12 분비를 유도함으로써 IFN- γ 의 양을 증가시킬 수 있는 가능성을 보여주는 것이다.

[0062]

LC61 균주가 활성화된 비장세포의 IL-4의 레벨에 미치는 영향을 분석하고자 하였다(도 3b). CD3 항체만 처리한 세포에 비해, CD3 항체와 rIL-4를 같이 처리한 세포에서 IL-4의 양이 50% 증가하였다. 한편, LC61 균주를 처리한 경우, IL-4의 양에 크게 영향을 미치지 않았다.

[0063]

류코노스톡 시트리움 EFEL2061(LC61) 균주가 OVA에 감작된 마우스에서 IgE 레벨에 미치는 영향

[0064]

LC61 균주가 *in vivo*에서 Th2 반응의 조절에 미치는 영향을 알아보기 위하여, OVA에 의해 유도된 Th2 반응 모델(OVA-induced Th2 response model)을 이용하였다. OVA(ovalbumin)은 Th 세포가 Th2 유형으로 분화하도록 유도하는 항원이다. Th2 세포는 Th1 세포에 비해 상대적으로 IL-4, IL-13 등을 많이 생성하며, 이러한 사이토카인은 B 세포가 IgE를 생성하게 하는 신호를 제공한다. IgE는 피하조직 또는 다른 점막조직 안의 혈관주위에 분포하는 비만세포와 강하게 결합하여 염증반응을 유발함으로써 점막부종, 점액과잉 분비 또는 평활근수축 등의 알레르기 반응이 일어나도록 한다. 따라서 OVA 감작한 마우스의 경우, 대조군에 비해 총 IgE 레벨이 증가하게 되며, IgE 레벨의 변화를 통해 알레르기 반응의 심화, 완화 정도를 예상할 수 있다.

- [0065] 마우스 OVA 감작(sensitization) 실험의 방법으로 수집한 마우스의 혈청에서 총 IgE 레벨과 OVA 특이적 IgE 레벨을 측정하였다. 혈청 내 총 IgE의 레벨이 증가한 것으로 보아 OVA 감작이 성공적으로 Th2 반응을 일으켰음을 알 수 있었다(도 4a). LC61 군주를 처리한 경우, 혈청 내 총 IgE의 양이 17% 정도 감소하였으나(OVA 그룹: 5799 ± 308 ng/ml, OVA/LC61 그룹: 4864 ± 368 ng/ml, $P=0.046$), OVA 특이적 IgE의 양은 변하지 않았다(OVA 그룹: 0.898 ± 0.053 , OVA/LC61 그룹: 0.842 ± 0.062 , $P=0.504$)(도 4a 및 b).
- [0066] 이와 같은 결과는, 혈액 내 총IgE의 생성과 OVA 특이적 IgE 생성을 담당하는 B 세포의 분포가 다르다는 것을 고려할 때 LC61군주가 장간막내 림프노드의 B 세포에는 영향을 주지 않고 비장세포의 B 세포 활성을 억제한 것으로 추정할 수 있다. OVA를 복강 내로 자극하면 장간막 림프노드의 B 세포는 OVA-IgE를 만들어내지만 비장조직에 있는 B 세포중 OVA 특이적인 B 세포 대신 주위의 다른 B 세포가 IgE를 만들어내기 때문이다(18). 다만, OVA 특이적 IgE의 양은 변화가 없는 것으로 보아, OVA에 특이적인 반응이 아니라 IgE 전체에 대한 비특이적인 경로를 통해 일어난 것으로 추정된다.
- [0067] 이와 같이 본 발명의 LC61 군주는 IgE의 레벨을 감소시키는 효과를 나타내므로, 알레르기의 치료 및 예방에도 효과를 나타낼 것으로 기대할 수 있다.
- [0068] **류코노스톡 시트리움 EFEL2061(LC61) 군주의 OVA 감작 마우스의 항원제시세포 활성화에 대한 영향**
- [0069] LC61 군주의 처리가 OVA에 감작된 마우스의 항원제시세포의 활성화에 영향을 주는지 알아보기 위하여, 비장세포 표면에 존재하는 CD80 및 CD19의 발현을 조사하였다.
- [0070] 대부분의 비장 항원제시세포는 B 세포이기 때문에, 먼저 비장세포를 FITC-CD80와 PE-CD19 항체를 이용하여 이중 염색하였다. 그 결과, B 세포의 마커인 CD19를 발현하는 세포의 비율은, 그룹 간에 차이가 없었다(도 5a 및 b). 그러나 CD80와 CD19를 동시에 발현하는 세포의 비율은 허위 대조군과 비교하여 OVA 그룹에서 유의미하게 증가하였다(허위 대조군: 11.72 ± 0.69 %, OVA 그룹: 21.36 ± 0.62 %). OVA/LC61 그룹은 OVA 그룹에 비해 CD80(+)CD19(+) 세포의 비율이 적게 나타났다(18.09 ± 1.1 %). 이러한 결과는 LC61 군주가 B 세포가 항원제시세포로 기능하는 것을 억제함으로써, B 세포와 보조 T 세포의 상호작용을 감소시킬 수 있다는 것을 보여주는 것이다.
- [0071] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 통상의 기술자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 구체적인 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.
- [0072] **참고문헌**
- [0073] 1. Umesaki Y., Setoyama H.(2000) Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model. *Microbes Infect* 2:1343-51.
- [0074] 2. Wjst M., Hoelscher B., Frye C., Wichmann H.E., Dold S., Heinrich J.(2001) Early antibiotic treatment and later asthma. *Eur J Med Res* 6:263-71.
- [0075] 3. McKeever T.M., Lewis S.A., Smith C., Collins J., Heatlie H., Frischer M., Hubbard R.(2002) Early exposure to infections and .antibiotics and the incidence of allergic disease: a birth cohort study with the West Midlands
- [0076] General Practice Research Database. *J Allergy Clin Immunol* 109:43-50.
- [0077] 4. Ouwehand A.C.(2007) Antiallergic effects of probiotics. *J Nutr* 137:794S-7S.
- [0078] 5. Kaiko G.E., Horvat J.C., Beagley K.W., Hansbro P.M.(2008) Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response? *Immunology* 123:326-38.
- [0079] 6. Stout R.D., Suttles J.(1996) The many roles of CD40 in cell-mediated inflammatory responses. *Immunol today* 17:487-92.

- [0080] 7. Kidd P.(2003) Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Alter Med Rev* 8:223-46.
- [0081] 8. Maldonado-Lopez R., Moser M.(2001) Dendritic cell subsets and the regulation of Th1/Th2 responses. *Semin Immunol* 13:275-82.
- [0082] 9. Kang H., Myung E.J., Ahn K.S., Eom H.J., Han N.S., Kim Y.B., Sohn N.W. (2009) Induction of Th1cytokines by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*(KCTC 3100) under Th2-type conditions and the requirement of NF-kappaB and p38/JNK. *Cytokine*. 46:283-9.
- [0083] 10. Kang H., Oh Y..J, Ahn K.S., Eom H.J., Han N.S., Kim Y.B., Sohn N.W. (2009) *Leuconostoc citreum* HJ-P4(KACC 91035) regulates immunoglobulin E in an ovalbumin-induced allergy model and induces interleukin-12 through nuclear factor-kappa B and p38/c-Jun N-terminal kinases signaling in macrophages. *Microbiol Immunol* 53:331-9.
- [0084] 11. Eom H.J., Seo D.M., Han N.S.(2007) Selection of psychrotrophic *Leuconostoc* spp. producing highly active dextransucrase from lactate fermented vegetables. *Int J Food Microbiol* 117:61-7.
- [0085] 12. Hessle C., Andersson B., Wold A.E.(2000) Gram-positive bacteria are potent inducers of monocytic interleukin-12 (IL-12) while gram-negative bacteria preferentially stimulate IL-10 production. *Infect Immun* 68:3581-6.
- [0086] 13. Szabo S.J., Jacobson N.G., Dighe A.S., Gubler U., Murphy K.M.(1995) Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling. *Immunity* 1995 2:665-75.
- [0087] 14. Park K.Y., Jeong J.K., Lee Y.E., Daily J.W., 3rd.(2014) Health benefits of kimchi (Korean fermented vegetables) as a probiotic food. *J Med Food* 17:6-20.
- [0088] 15. Shang X.Z., Armstrong J., Yang G.Y., Volk A., Li J., Griswold D.E., Emmell E., Li L.(2004). Regulation of antigen-specific versus by-stander IgE production after antigen sensitization. *Cell Immunol* 229:106-16.
- [0089] 16.Morris S.C., Madden K.B., Adamovicz J.J., Gause W.C., Hubbard B.R., Gately M.K., Finkelman F.D.(1994)
- [0090] Effects of IL-12 on in vivo cytokine gene expression and Ig isotype selection. *J Immunol* 152:1047-56.
- [0091] 17. Fujiwara D., Inoue S., Wakabayashi H., Fujii T.(2004) The anti-allergic effects of lactic acid bacteria are strain dependent and mediated by effects on both Th1/Th2 cytokine expression and balance. *Int Arch allergy Immunol* 135:205-15.
- [0092] 18. Shang X.Z., Armstrong J., Yang G.Y., Volk A., Li J., Griswold D.E.(2004) Regulation of antigen-specific versus by-stander IgE production after antigen sensitization. *Cellular immunology*. 229(2):106-16.
- [0093] 19. Morris S.C., Madden K.B., Adamovicz J.J., Gause W.C., Hubbard B.R., Gately M.K.(1994) Effects of IL-12 on in vivo cytokine gene expression and Ig isotype selection. *Journal of immunology*. 152(3):1047-56.

수탁번호

[0094]

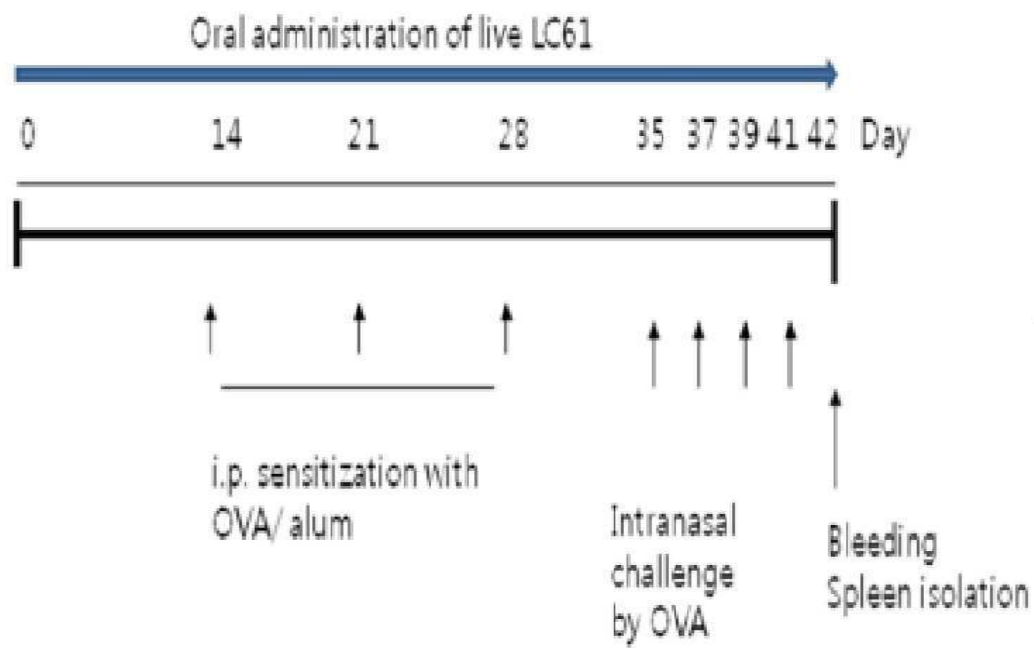
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC92070

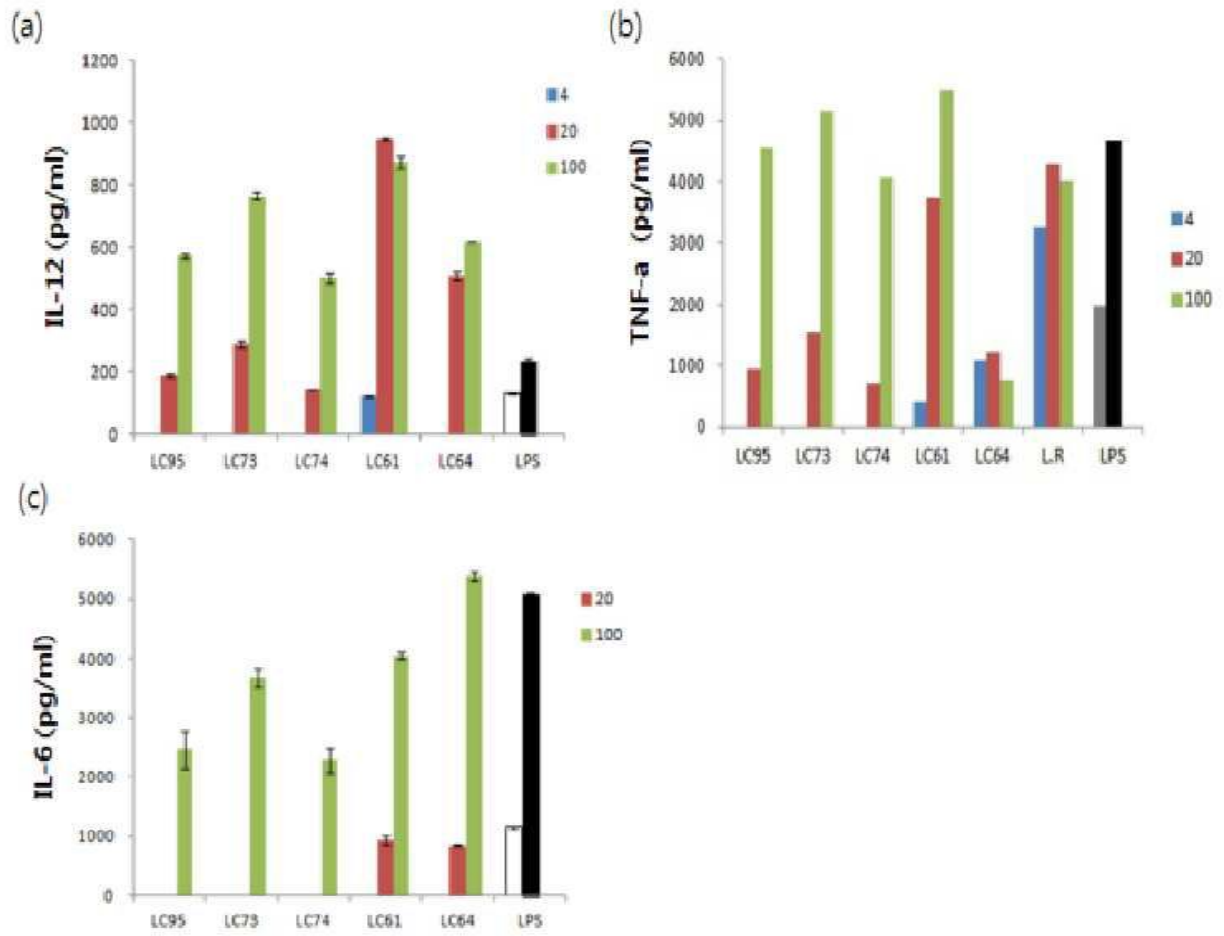
수탁일자 : 20150526

도면

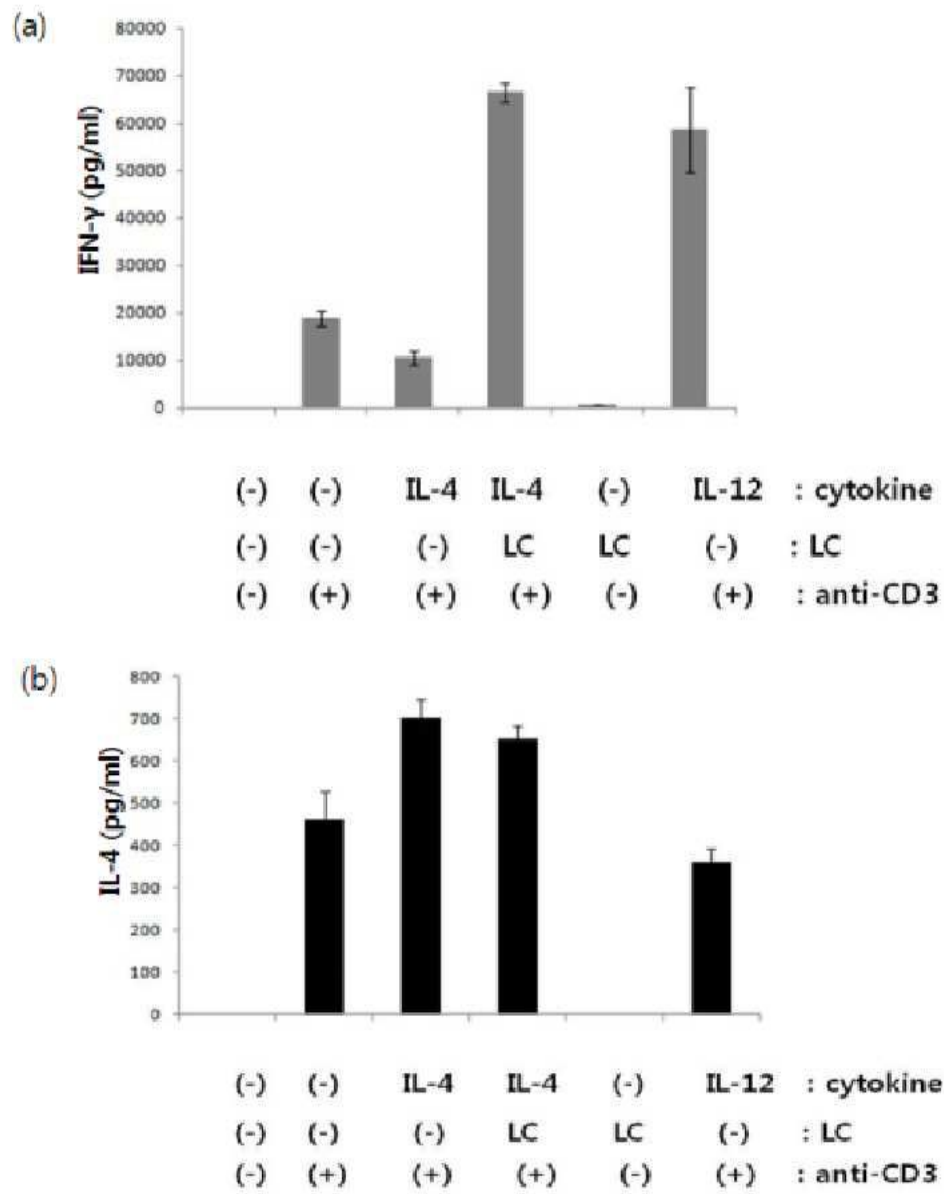
도면1



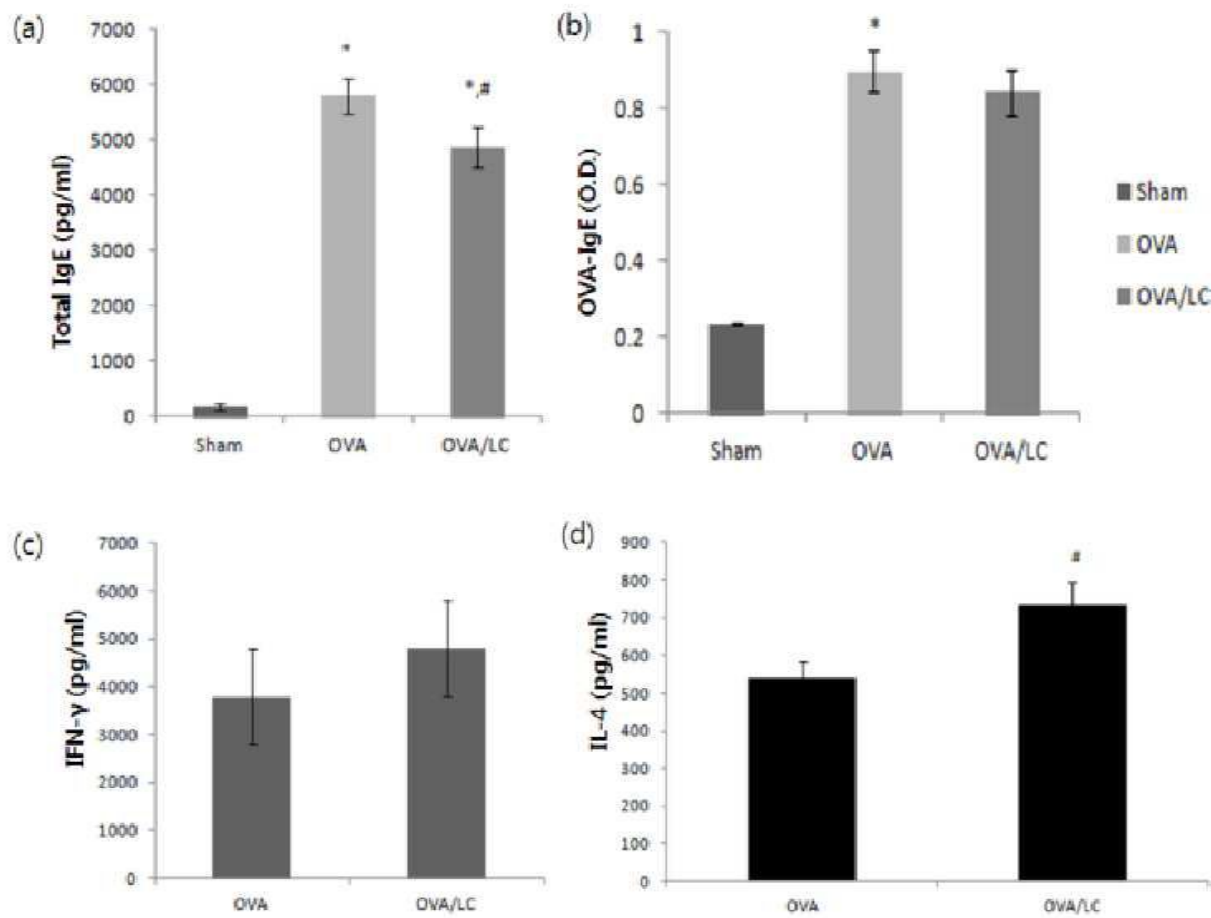
도면2



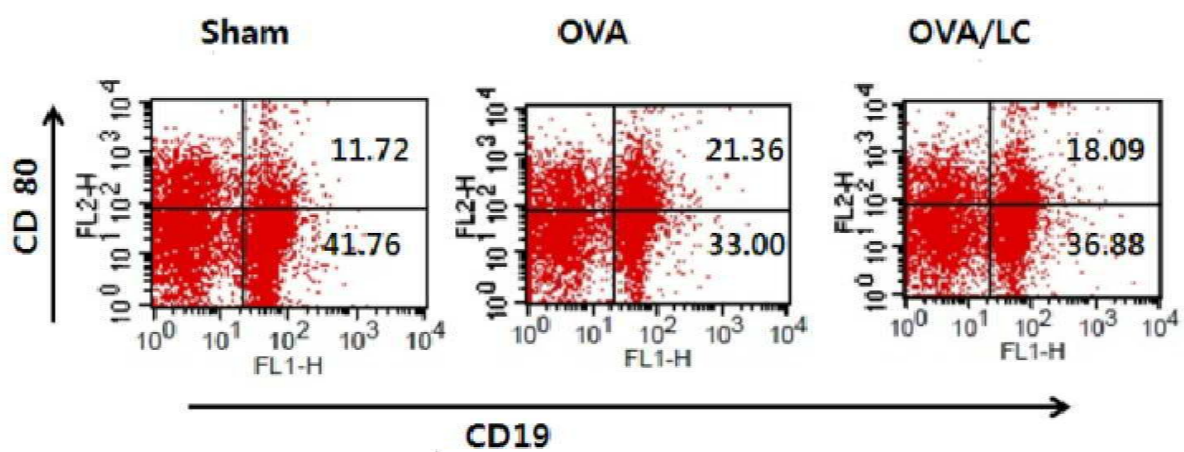
도면3



도면4



도면5a



도면5b

