



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0045312
(43) 공개일자 2012년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 5/0784 (2010.01) C12N 5/02 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0106773
(22) 출원일자 2010년10월29일
심사청구일자 2010년10월29일

(71) 출원인
부산대학교 산학협력단
부산광역시 금정구 부산대학로63번길 2 (장전동, 부산대학교)
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박영민
서울특별시 은평구 통일로 780, 3동 702호 (불광동, 미성아파트)
정인덕
경상남도 양산시 양주로 39, 주공아파트 8단지 805동 1902호 (남부동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순용

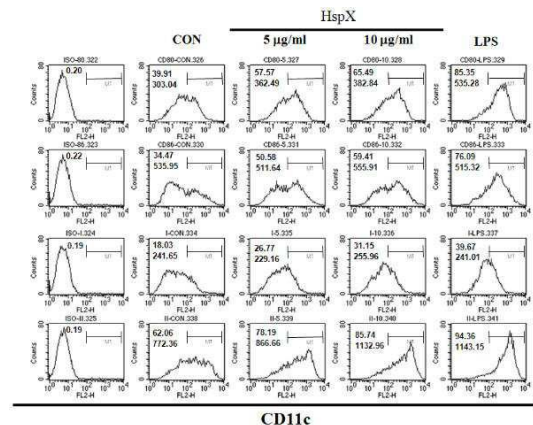
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 H s p X를 포함하는 수지상 세포의 성숙화 촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 수지상 세포의 성숙을 유도하는 조성물, 이를 이용한 수지상 세포의 성숙화 방법 및 세포 치료제에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는, HspX를 유효성분으로 함유하는 수지상 세포의 성숙화 촉진용 조성물, 상기 조성물을 처리하여 미성숙 수지상 세포를 성숙화하는 방법 및 상기 방법에 의해 성숙화된 수지상 세포를 함유하는 암 치료용 세포 치료제에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 의해 성숙된 수지상 세포로 신체의 면역 반응을 효과적으로 증강시킬 수 있다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

신성재

대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의학전문
대학원 미생물학교실 (문화동)

김화중

대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의학전문
대학원 미생물학교실 (문화동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 A091047-0911-0000300

부처명 보건복지부

연구사업명 병원특성화센터 지원사업

연구과제명 수지상세포 기반 항암면역요법 개발

주관기관 양산부산대학병원

연구기간 2009.05.01 ~ 2010.03.31이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2010-0008728

부처명 교육과학기술부

연구사업명 기초연구사업-중견연구자지원사업-핵심연구지원사업

연구과제명 항산균의 병원성인자에 의한 면역세포의 분화조절 기전 연구

주관기관 충남대학교 산학협력단

연구기간 2010.05.01 ~ 2011.04.30

특허청구의 범위

청구항 1

HspX을 유효성분으로 함유하는, 수지상 세포의 성숙화 촉진용 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 HspX는 1 내지 20 μ g/ml의 양으로 포함되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

미성숙 수지상 세포에 HspX을 처리하여 성숙시키는, 수지상 세포의 성숙화 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 HspX를 넣고 24시간 배양하여 성숙시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 HspX는 미성숙 수지상 세포의 배지에 1 내지 20 μ g/ml의 용량으로 첨가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 미성숙 수지상 세포의 성숙은 HspX가 TLR(toll-like receptor)-4를 자극하여 일어나는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제 3 내지 제 6항 중 어느 한 항의 방법에 의해 성숙화된 수지상 세포를 함유하는 암치료용 세포 치료제.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 수지상 세포의 성숙을 유도하는 조성물, 이를 이용한 수지상 세포의 성숙화 방법 및 세포 치료제에 관한 것이다.

배경기술

[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 (피부에 있는 세포를 특히 랑게르한스 세포라 부름), 코, 폐, 위 및 장의 내벽과 같이 외부 환경과 접하는 조직에 소량 존재한다. 그것들은 또한 혈액 중에서 미성숙한 상태로 발견될 수 있다. 일단 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 변화한다. 이 세포들은 높은 엔도사이토시스 활성 및 T-세포 활성 능력을 특징으로 한다. 미성숙 수지상 세포는 주변에 있는 바이러스, 박테리아와 같은 병원체를 끊임없이 탐식한다. 이것은 TLR (toll-like receptor)과 같은 패턴 인식 수용체 (pattern recognition receptor, PRR)를 통해서 가능하다. TLR은 병원체의 서브셋 상에서 발견되는 특정 화학적 특징을 인식한다. 미성숙 수지상 세포는 또한 살아있는 자가 세포로부터 니블링 (nibbling)이라는 과정을 통해 약간의 세포막을 탐식한다. 일단 그것들이 현존하는 항원과 접하게 되면, 그것은 성숙 수지상 세포로 활성화되어 림프절로 이동한다.

[0004] 모든 헬퍼 T-세포는 하나의 특정 항원에 대해 특이적이다. 오직 전문적인 항원 발현 세포 (대식세포, B림프구 및 수지상세포)만이 맞는 항원이 존재할 때 나머지 헬퍼 T-세포를 활성화시킨다. 그러나 대식세포와 B 림프구는

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 TNF α 로 처리하면 미성숙 수지상 세포가 성숙 수지상 세포로 분화된다.

[0006] 수지상 세포는 혼치 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. 예를 들면, 수지상 세포의 수용체 B7과 림프구의 CD28과의 상호작용을 들 수 있다.

[0007] 그러나 세포 간 상호작용은 사이토카인을 통해서 떨어진 상태로도 일어날 수 있다. 생체 실험에서 미생물 추출물에 의해 수지상 세포를 자극함으로써 수지상 세포가 빠르게 IL-12를 생산하게 했다. IL-12는 처녀 CD4 T 세포가 Th1 표현형이 되게 한다. 최적의 결과는 수지상 세포가 표면에 나타낸 항원에 대해 공격하도록 면역계를 활성화시키는 것이다.

[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 탐식작용을 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, 알러지성 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 수지상세포의 분화를 조절(활성화)하는 물질들 (LPS, TNF- α , IL-1 β)은 많이 알려져 있으나 생체독성의 부작용으로 생체에서의 직접적인 응용에 문제가 많다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 상기와 같이 수지상 세포는 신체 자체의 면역 기능을 높이는데 중요한 역할을 하고 있어, 수지상세포의 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.

[0011] 따라서 본 발명의 목적은 수지상 세포의 성숙화 촉진용 조성물을 제공하는데 있다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 수지상 세포의 성숙화 방법을 제공하는데 있다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법으로 성숙화된 수지상 세포를 함유하는 세포 치료제를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기의 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 HspX을 유효성분으로 함유하는, 수지상 세포의 성숙화 촉진용 조성물을 제공한다.

[0015] 상기 HspX는 1 내지 20 μ g/ml의 양으로 포함되는 것이 바람직하다.

[0016] 또한 본 발명은 미성숙 수지상 세포에 HspX을 처리하여 성숙시키는, 수지상 세포의 성숙화 방법을 제공한다.

[0017] 상기 방법은 HspX를 넣고 24시간 배양하여 성숙시키는 것이 바람직하며, 상기 HspX는 미성숙 수지상 세포의 배지에 1 내지 20 μ g/ml의 용량으로 첨가되는 것이 바람직하다.

[0018] 또한 본 발명에서 HspX의 수지상 세포 성숙화는 TLR(toll-like receptor)-4를 자극하여 일어나는 것을 특징으로 한다.

[0019] 또한 본 발명은 상기 방법에 의해 성숙화된 수지상 세포를 함유하는 암치료용 세포 치료제를 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 수지상 세포를 성숙시키는 방법에 의해 미성숙 세포가 성숙 수지상 세포로 잘 분화될 수 있어서 신체의 면역 반응을 효과적으로 활성화시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 HspX를 처리한 수지상 세포의 생존률 측정 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 HspX를 처리한 수지상 세포의 보조자극인자와 MHC class I, II의 발현 분석 실험의 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 HspX를 처리한 수지상 세포의 사이토카인(IL-6, IL-12, IL-1, TNF- α 및 IL-10) 분비 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4a는 HspX를 처리한 수지상 세포의 CCR7 발현 정도 실험 결과를 나타낸 그래프이다. 4b는 HspX를 처리한 수지상 세포의 주화성 분석 실험의 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 HspX를 처리한 수지상 세포의 CD8⁺ T 세포 증식 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 HspX를 처리한 수지상 세포의 INF- γ 발현 촉진 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 HspX를 처리한 수지상 세포의 성숙 관련 TLR 실험 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 본 발명은 HspX를 유효성분으로 함유하는, 수지상 세포의 성숙화 촉진용 조성물에 관한 것이다.

[0023] HspX (heat shock protein X, Rv2031c)는 144 아미노산 서열로 이루어진 16-kDa 세포질 항원으로서 정지거나 저산소 조건에서 발현이 증가되는 진단적인 유의성을 가진 항원으로 알려져 있다. 또한 *in vivo* 결핵균의 감염에 따른 성장을 늦춰주는데 중요한 역할을 할 것으로 보여지고 있다.

[0024] 본 발명의 HspX는 1 내지 20 μ g/ml의 양으로 포함되는 것이 바람직하다.

[0025] 또한 본 발명은 미성숙 수지상 세포에 HspX를 처리하여 성숙시키는, 수지상 세포의 성숙화 방법을 제공한다.

[0026] 상기 미성숙 수지상 세포는 종래 알려진 방법으로 채취하여 분화시킬 수 있다. 즉, 골수 세포 또는 단핵구에 GM-CSF 및 IL-4를 넣고 6일간 배양하여 미성숙 수지상 세포로 분화시킬 수 있다.

[0027] 상기 성숙화 방법은 HspX를 넣고 24시간 배양하여 성숙시키는 것을 특징으로 한다. 또한 HspX는 미성숙 수지상 세포의 배지에 1 내지 20 μ g/ml의 용량으로 첨가되는 것이 바람직하다.

[0028] 본 발명자들은 우선 수지상 세포를 성숙시키는 HspX의 효능 실험을 하기 전에 HspX의 수지상 세포에 대한 독성 실험을 하였다. 도 1에 나타난 바와 같이 수지상 세포에 HspX를 10 μ g/ml까지 처리하여 아넥신-V로 염색하였는데 그 결과 10 μ g/ml까지는 수지상 세포에 세포독성이 나타나지 않았으므로 10 μ g/ml의 HspX는 수지상 세포에 독성이 없다고 할 수 있다.

[0029] 본 발명의 일 실시예에서는 HspX가 미성숙 수지상 세포를 성숙시키는지에 대한 실험을 했다. 수지상 세포가 성숙하면 보조자극인자와 MHC class I, II와 같은 분자의 발현이 현저히 증가하므로 수지상 세포에 HspX를 각각 5 μ g/ml, 10 μ g/ml의 농도로 처리한 후 24시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양했다. 여기서 LPS를 양성 대조군으로 사용하여 HspX의 효과를 비교하였다. 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이 HspX는 수지상 세포의 표면 분자를 용량 의존적으로 증가시켰다. 그러므로 HspX는 수지상 세포의 표면 분자 변화에 영향을 끼침을 알 수 있다.

[0030] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 HspX가 수지상 세포의 사이토카인 분비에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험을 했다. 수지상 세포가 성숙하게 되면 분비하는 사이토카인 역시 변하게 된다. 그러므로 수지상 세포를 HspX로 처리했을 때 T-세포에 영향을 주는 전염증 또는 항염증성 사이토카인 분비의 변화에 영향을 주는지를 실험하였다. IL-12와 IL-10은 수지상 세포에서 분비되는 주요 사이토카인으로 각각 T 세포가 Th1과 Th2로 분화되는데 중요한 역할을 한다. 수지상 세포에서 분비되는 TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-12p70, IL-10을 ELISA로 측정하였다. 도 3에 나타난 바와 같이 IL-12와 IL-10이 증가했고 전염증 사이토카인인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 또한 증가하

였으므로, HspX가 수지상 세포를 성숙하게 하여 사이토카인의 양에 변화를 준다는 것을 알 수 있다.

[0031] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 HspX를 처리한 수지상 세포에서 CCR7의 발현이 어떻게 달라지는지 실험하였다. 수지상 세포가 성숙하게 되면 이동 능력이 증가하게 되므로 이동과 관련된 수용체를 수지상 세포가 성숙하였는지를 나타내는 지표로 이용할 수 있다. 수지상 세포의 이동 관련 수용체 중 CCL19와 반응하는 CCR7이 성숙 시에 증가하기 때문에 수지상 세포에 HspX를 처리한 것과 양성대조군으로 LPS를 처리한 것, 그리고 아무 처리도 하지 않은 음성 대조군을 CCR7-PE 및 CD11c-FITC로 염색하여 유세포측정기로 측정하였다. 도 4a에서 알 수 있는 바와 같이, HspX를 처리하였을 때 처리하지 않은 수지상 세포보다 CCR7의 수치가 증가하였으므로 HspX가 수지상 세포의 이동 능력을 증가시킨다고 할 수 있다.

[0032] 이를 더욱 확실하게 확인하기 위하여 본 발명의 다른 실시예에서는 HspX로 처리한 수지상 세포의 CCR19에 대한 주화성을 실험하였다. CCR7의 결합 리간드는CCR19라는 점을 이용해 300ng/ml의 CCR19에 반응해서 이동하는 수지상 세포의 수를 측정한 결과 HspX로 처리한 수지상 세포가 음성 대조군에 비해서 더 많이 이동하였음을 알 수 있었다 (도 4b). 결론적으로 HspX는 수지상 세포를 성숙하게 만들어서 2차 림프기관으로 이동한 뒤 T 세포와 반응하는데 필요한 이동능력을 증가시킨다고 할 수 있다.

[0033] 또한 본 발명의 일 실시예에서는 동종 T 세포 자극에 HspX가 탐지 가능한 영향을 주는지를 확인하기 위해 본 발명자들은 HspX 또는 LPS를 처리하여 DC 성숙을 유도하기 전과 후의 DC의 allostimulatory 능력을 비교하였다. 그 결과, HspX 처리로 유도된 성숙이 미처리된 DC의 allostimulatory 능력을 현저히 증가시켰음을 확인할 수 있었다 (도 5). 또한 HspX에 의해 성숙된 DC는 CD8+ T세포내 IFN- γ 생성을 증가시켰다 (도 6). 상기와 같은 HspX에 의한 수지상 세포의 성숙방법은 TLR4를 경유하여 일어남을 확인하였다 (도 7).

[0034] 또한 본 발명은 상기 수지상 세포 성숙화 방법에 의해 성숙화된 수지상 세포를 함유하는 암치료용 세포 치료제에 관한 것이다.

[0035] 본 발명의 HspX를 아췌반트로 이용하여 암치료용 세포 치료제로 사용될 수 있다.

[0036] 상기 암치료용 세포 치료제에서 성숙화된 수지상 세포는 CD80, CD86, MHC class I 및 MHC class II에 대해서 양성을 나타내는 것을 특징으로 한다.

[0037] 본 발명의 암치료용 세포 치료제는 비경구적으로 예를 들어, 피하, 복강, 근육 내, 경피(transdermal/transcutaneous) 주사로 투여될 수 있으나 이에 한정되지는 않는다. 본 발명의 세포 치료제는 직접 종양의 병변 부위에 투여될 수도 있다. 본 발명의 세포 치료제는 단일 투여 또는 다중 투여 스케줄에 따라 투여될 수 있다. 본 발명의 세포 치료제는 기타 면역조절제와 함께 투여될 수 있다.

[0038] 본 발명의 세포 치료제는 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 희석제와 함께 본 발명의 수지상세포를 포함하는데, 이러한 담체는 그 자체로 치료제를 투여 받는 개체에 유해한 반응을 일으키지 않는 임의의 담체인 것이 바람직하다. 적합한 담체는 통상적으로 크고 느리게 대사화되는 거대분자, 예를 들어 단백질, 다당류, 폴리락트산, 폴리글리콜산, 중합체 아미노산, 아미노산 공중합체, 지질 응집체(예를 들어, 오일 소적 또는 리포솜) 및 불활성 바이러스 입자를 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 이러한 담체는 당업자에게 잘 알려져 있으며, 수지상세포 자체의 면역보강제 효과 이외에 면역자극제 또는 면역보강제로서 작용할 수 있다.

[0039] 본 발명의 세포 치료제는 또한 치료제의 유효성을 증강시키는 추가의 면역보강제를 포함할 수도 있다.

[0040] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예들은 본 발명을 더욱 쉽게 이해할 수 있도록 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0041] <실시예 1> 수지상 세포 및 HspX의 준비

[0042] 1. 1 수지상 세포의 분리 및 유도

[0043] 수지상세포는 이전에 알려진 방법과 같이 마우스의 골수세포로부터 유도했다. 우선 C57BL/6마우스로부터 골수 채취용 주사를 이용해 골수를 채취하였다. 채취한 골수를 세척한 후 적혈구를 염화암모늄을 이용하여 제거하였다. 분리한 세포를 6-웰 플레이트에서 RPMI 1640(10% 열-불활화 FBS, 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린, 100 μ g/ml 스트렙토마이신, 5×10^{-5} M 2-ME, 10mM HEPES (pH 7.4), 10 ng/ml GM-CSF, 10 ng/ml IL-4)를 첨가하여 배양하였다. 배양 후 3일과 5일째에는 부유 세포를 제거하고 새로운 배지를 첨가하였다.

[0044] 이후에 기술될 실험들에서는 배양 6일째의 부착되지 않은 수지상 세포를 사용하였다. 일부 실험에서 CD11c⁺ 수지상세포를 항-CD11c(N418) 마이크로비드와 자기 세포 분류 시스템(Vario MACS: Miltenyi Biotec, Auburn, CA)을 이용하여 분리 후 사용하였다. LPS(*E.coli* 055:B 타입, Sigma)는 HspX에 대한 양성대조군으로 사용하였다.

[0045] 1.2 HspX의 제조

[0046] 결핵균 (*M. tuberculosis* H37Rv)의 게놈 DNA를 주형으로 HspX (Rv2031c) 유전자를 증폭시켰다. 증폭시킨 유전자는 각각 NdeI과 XhoI 제한효소 부위를 갖고 있으며 히스티딘 잔기 (histidine)가 포함되도록 설계하였다. 증폭된 PCR 유전자 산물을 T-벡터 (Promega, Madison, WI, USA)에 클로닝 한 후, NdeI과 XhoI 제한효소로 절단하여 정제한 후, 같은 제한효소로 처리된 pET15b 발현벡터에 삽입하였다. HspX 유전자가 삽입된 pET15b 벡터를 *E. Coli* BL21에 42°C 온도조건에서 90초간 충격을 가하여 형질전환시켜 항생제 (ampicillin)가 포함된 LB배지에서 형질전환된 균주만을 선택적으로 얻었다. Histidine이 tagging 되어 있는 recombinant 균주를 600nm에서의 흡광도(OD)가 0.4-0.6가 되도록 배양한 후에 1mM IPTG를 첨가하여 6시간 대량배양한 후, 셀을 용해하여 Ni-NTA (Ni-nitriacetic acid, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 아가로스를 통해 단백질을 정제하였다. 정제된 단백질은 PBS로 투석한 후, polymyxin B 아가로스를 통과시켜 LPS를 제거하여 순수 재조합단백질을 얻었다.

[0047]

[0048] <실시예 2> 수지상 세포의 생존율 측정

[0049] LPS 또는 HspX로 자극한 수지상 세포의 세포 생존율을 측정하기 위해서, 수지상 세포를 200 ng/ml 농도의 LPS 또는 5 μ g/ml 및 10 μ g/ml의 HspX로 24시간 동안 처리 후에 5 μ gml⁻¹의 요오드화 프로피듐 (propidium iodide, PI) 및 아넥신-V로 이중 염색하고 유세포분석기 (flow cytometry)를 통해 분석하였다. 그 결과, HspX는 수지상 세포에 독성을 나타내지 않았으며, 이를 도 1에 나타내었다.

[0050] <실시예 3> 보조자극인자와 MHC class I, II의 발현 분석

[0051] 수지상 세포에 5 μ g/ml 및 10 μ g/ml 농도의 HspX 및 200 ng/ml 농도의 LPS를 각각 24시간 처리한 후 수지상 세포를 회수하였다. 비특이적인 결합을 억제하기 위하여 1 μ g/ml의 Fc γ I/III(BD bioscience)을 4°C에서 20분간 처리한 후, 수지상 세포 분석을 위해 CD11c-FITC(BD bioscience)로 4°C에서 20분간 염색하였다. 추가적으로, 보조자극인자와 MHC분자의 발현 양상을 측정하기 위하여 항-CD80-PE(BD bioscience), 항-CD86-PE(BD bioscience), 항-MHC I 및 II-PE(BD bioscience)를 1 μ g/ml씩 처리하여 4°C에서 30분간 염색했다. PBS 완충액(2% FBS와 0.01% 아지드 나트륨 함유)로 2회 세척하고, 1% 파라포름알데히드로 고정 후에 FACScallibur(Beckson Dickinson, USA)로 분석하였다. 그 결과, 수지상 세포가 성숙하면 발현이 증가하는 보조자극인자와 MHC class I, II의 발현이 증가하였다 (도 2).

[0052] <실시예 4> HspX가 수지상 세포의 사이토카인 분비에 미치는 영향: IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10 및 IL-12

[0053] 그러므로 수지상 세포를 HspX로 처리했을 때 T-세포에 영향을 주는 전염증 또는 항염증성 사이토카인 분비의 변화에 영향을 주는지를 실험하였다. IL-12와 IL-10은 수지상 세포에서 분비되는 주요 사이토카인으로 각각 T 세포가 Th1과 Th2로 분화되는데 중요한 역할을 한다.

[0054] 각각 1×10^6 세포/ml의 수지상 세포를 포함하는 배지 1ml씩을 37°C와 0°C에서 평형화시킨 후, 각 평형화된 세포의 그룹을 각각 네 그룹으로 나누어서 5 μ g/ml의 HspX, 10 μ g/ml의 HspX 및 200 ng/ml 농도의 LPS를 첨가하고

나머지 하나는 음성 대조군으로 아무 처리도 하지 않고 24시간 동안 배양하였다.

[0055] <실시예 5> CCR7 발현정도 측정

[0056] 수지상 세포에 실시예 4와 같이 HspX 및 LPS를 24시간 처리한 후 세포를 회수하였다. 비특이적인 결합을 억제하기 위하여 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 Fc γ I/III을 4°C 에서 20분간 처리한 후, 수지상 세포 분석을 위해 CD11c-FITC로 4°C 에서 20분간 염색하였다. 그 다음 다시 항 CCR7-PE 처리하여 4°C 에서 30분간 염색하였다. PBS 완충액 (2% FBS와 0.01% 아지드 나트륨 함유)으로 2회 세척하고, 1% 파라포름알데히드로 고정 후에 FACScallibur (Beckson Dickinson, USA)로 분석하였다. 그 결과, HspX를 처리하였을 때 처리하지 않은 수지상 세포보다 CCR7의 수치가 증가하였으므로 HspX가 수지상 세포의 이동 능력을 증가시킨다고 할 수 있다 (도 4a).

[0057] <실시예 6> 주화성 분석

[0058] 정제된 수지상 세포를 24시간 동안 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 HspX 및 200 ng/ml 의 LPS로 처리하거나 하지 않고(음성 대조군), 케모킨 CCL19 (300 ng/ml)에 반응하여 이동하는 것을 측정하였다. 트랜스웰 플레이트 (세공 크기 $8.0 \mu\text{m}$; Corning, Acton, MA)의 아래쪽 챔버에는 $500 \mu\text{l}$ 의 CCL19를 포함하는 것과 포함하지 않는 무혈청(serum-free) 배지를 넣었다. 무혈청 배지에 재현탁된 수지상 세포 (0.1 mL 에 1×10^5 세포)를 트랜스웰 플레이트의 위쪽 챔버에 넣고 5% CO_2 하에 37°C 에서 3시간 동안 이동하도록 두었다. 아래쪽 챔버에서 거둔 이동한 수지상 세포의 수는 FACS (60-second counts)로 션다. 그 결과 HspX로 처리한 수지상 세포가 음성 대조군에 비해서 더 많이 이동하였음을 알 수 있었다 (도 4b).

[0059] <실시예 7> HspX의 CD8+ T 세포 증식효과

[0060] 동종 T 세포 증식을 촉진하는 능력은 in vitro에서 수지상 세포의 성질이다. 동종 T 세포 자극에 HspX가 탐지 가능한 영향을 주는지를 확인하기 위해 본 발명자들은 HspX 또는 LPS를 처리하여 DC 성숙을 유도하기 전과 후의 DC의 allostimulatory 능력을 비교하였다. 특히, HspX에 의한 성숙한 DC가 특이적으로 CD8+ T세포의 증식에 영향을 주는지를 확인하기 위해 CD8+ T세포를 OVA특이적 OT-1 T세포 수용체 트랜스제닉 마우스에 분리하였다. 또한 정제된 수지상 세포를 $5 \mu\text{g/ml}$ 의 HspX, $10 \mu\text{g/ml}$ 의 HspX 및 200 ng/ml 농도의 LPS로 처리하거나 하지 않고(음성 대조군) 24시간 동안 배양 후 OVA특이 CD8+ T세포와의 증식여부를 확인하기 위해 HspX 및 LPS를 처리한 수지상세포에 OVA257-264 펩타이드를 1시간동안 자극시킨 후 분리한 OVA특이 CD8+ T세포에 CFSE 형광다이를 염색한 후 4일간 동시 배양하였다.

[0061] DC에 의해 자극되어진 T세포는 DC와 클러스터를 형성하게 되는데 DC/T 세포 클러스터 크기는 미처리된 세포에 의해 형성된 클러스터와 비교해서 HspX에 노출된 반응에서 더 증가되었다 (도 5 윗그림). 또한 T 세포의 증식에 대한 효과는, HspX를 처리한 DC와 배양한 동종 CD8+ T 세포의 증식률이 미처리 DC와 배양한 T 세포보다 빨라 보였으며, LPS 처리 BMDC에서 관찰된 레벨과 유사하였다 (도 5 아래그림). 이러한 결과는 HspX 처리로 유도된 성숙이 미처리된 DC의 allostimulatory 능력을 현저히 증가시켰음을 뒷받침해준다.

[0062] <실시예 8> HspX의 IFN- γ 생성촉진 효과

[0063] DC에서 HspX의 IL-12 (사이토카인을 포함하는 Th1) 생성에 대한 촉진효과를 확인하기 위해, 본 발명자들은 HspX 존재 하에 성숙된 DC에서 초기의 T세포 반응의 특성을 조사하였다. 실시예 7과 같은 방법으로 DC와 T세포를 배양한 후 동시 배양 2일째에 배양액을 수거해 Th1 반응을 촉진하는 IFN-g의 생성정도를 ELISA방법으로 측정하였다. HspX에 의해 성숙된 DC는 CD8+ T세포내 IFN-g 생성을 증가시켰다 (도 6).

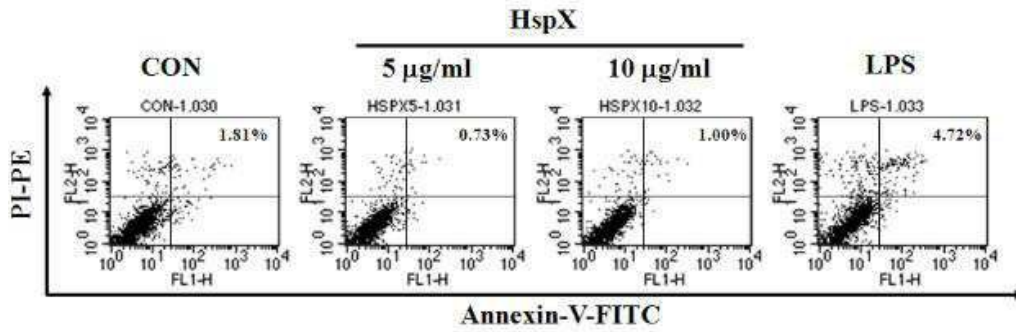
[0064] <실시예 9> 수지상 세포 성숙 관여 TLR 실험

[0065] HspX에 의한 수지상 세포 성숙과 TLR과의 연관성을 보기 위해서 TLR2-/-, TLR4-/- 및 WT 마우스로부터 실시예 1.1과 같은 방법으로 수지상 세포를 분리했다. 분리한 각 수지상 세포에 대하여 실시예 3과 같은 방법으로 CD86

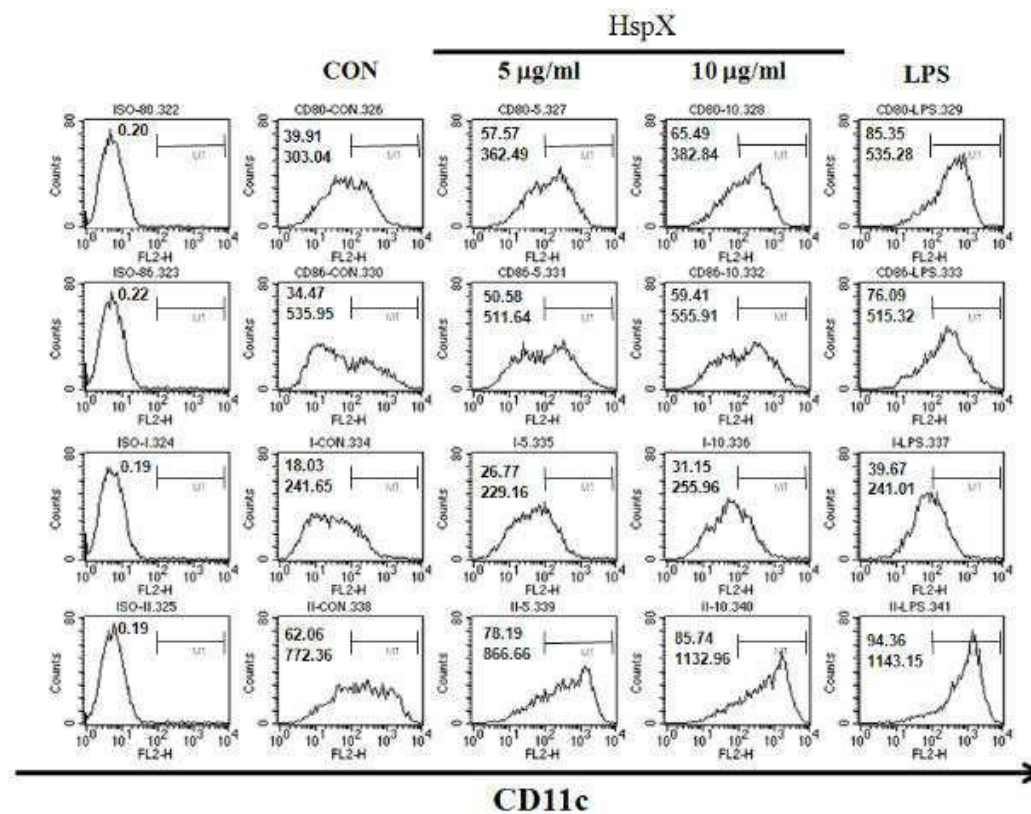
및 MHC II의 발현을 측정하였으며 실시예 4와 같은 방법으로 TNF- α 의 생성정도를 측정하였다. HspX는 WT이나 TLR2-/-에서 분리한 수지상세포의 경우 CD86 및 MHC II의 발현과 TNF- α 의 생성을 증가시켰지만 TLR4-/-에서 분리한 수지상세포의 경우 D86 및 MHC II의 발현과 TNF- α 의 생성이 크게 감소되었다 (도 7). 이러한 결과는 Hsp X가 TLR4를 경유하여 수지상세포를 활성화시켰음을 뒷받침해준다.

도면

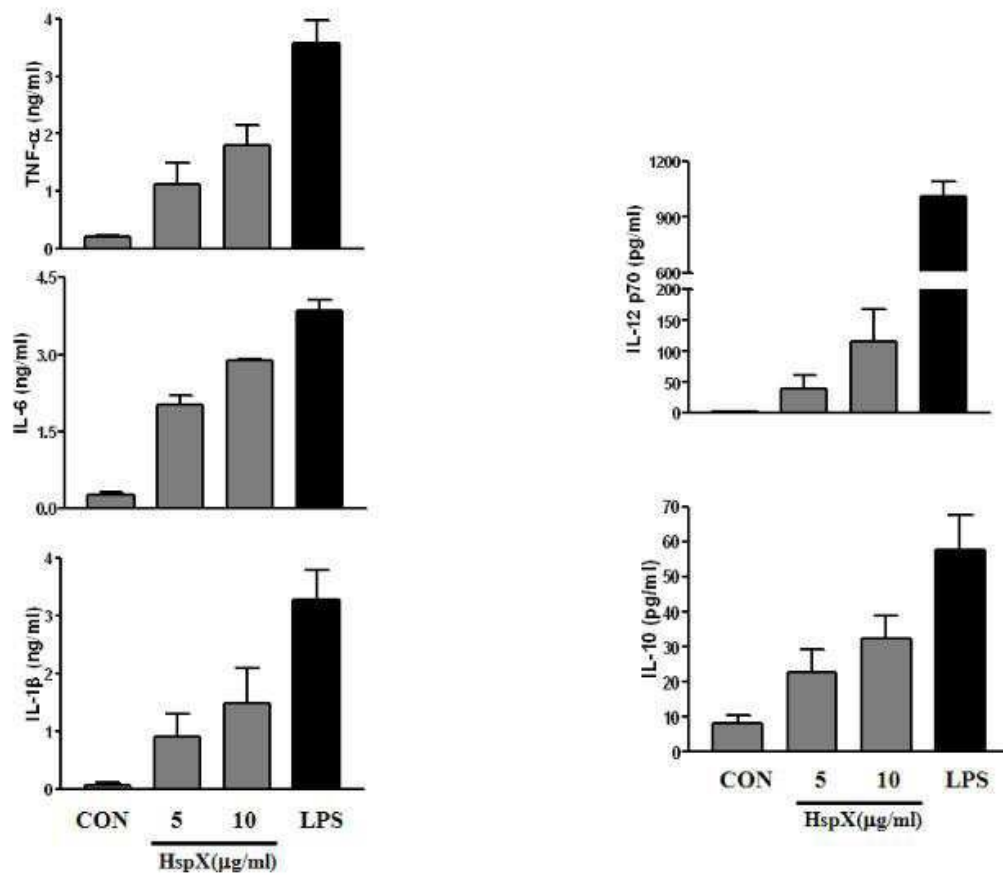
도면1



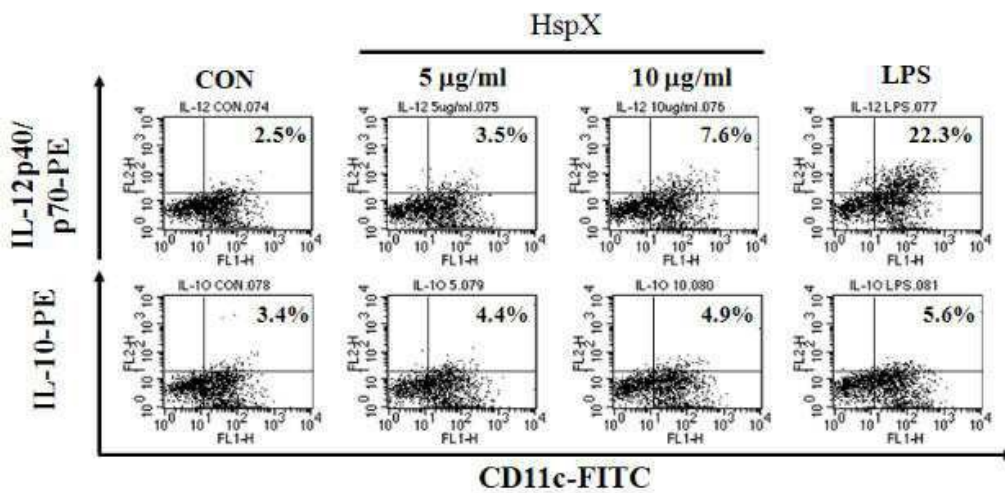
도면2



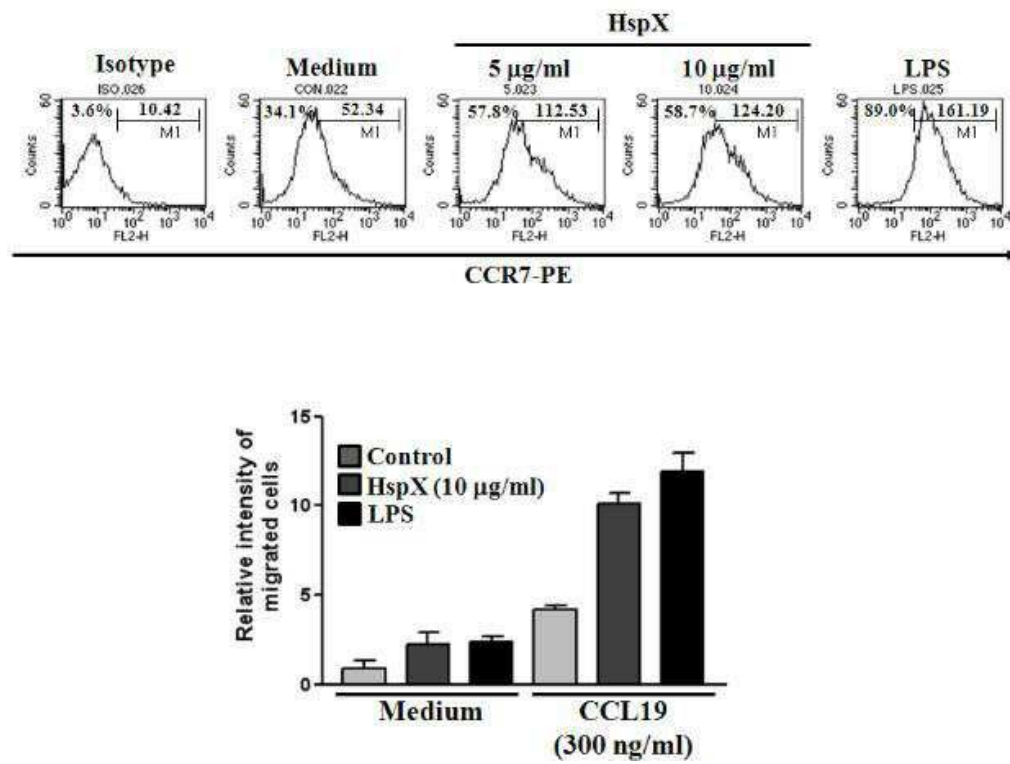
도면3a



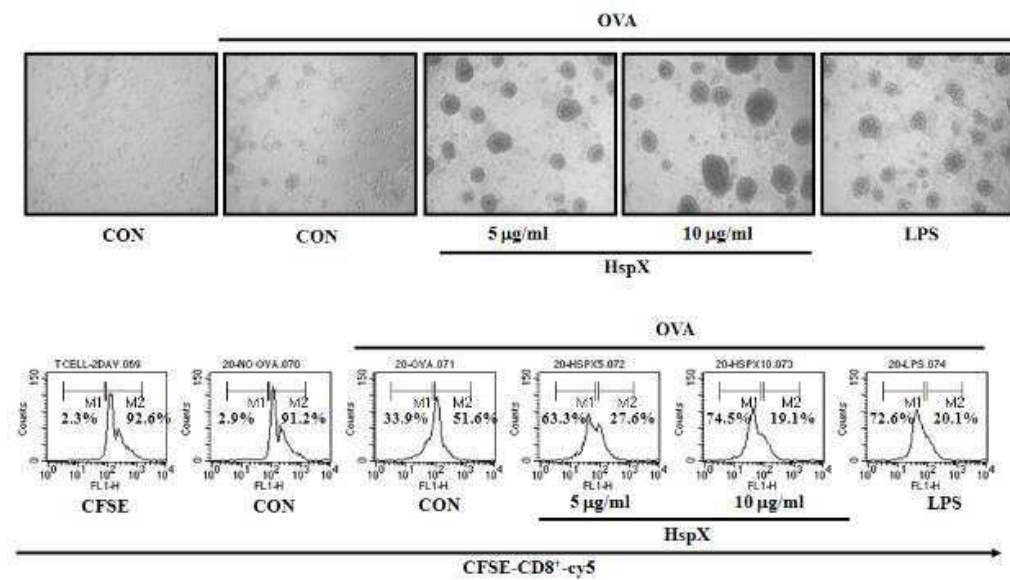
도면3b



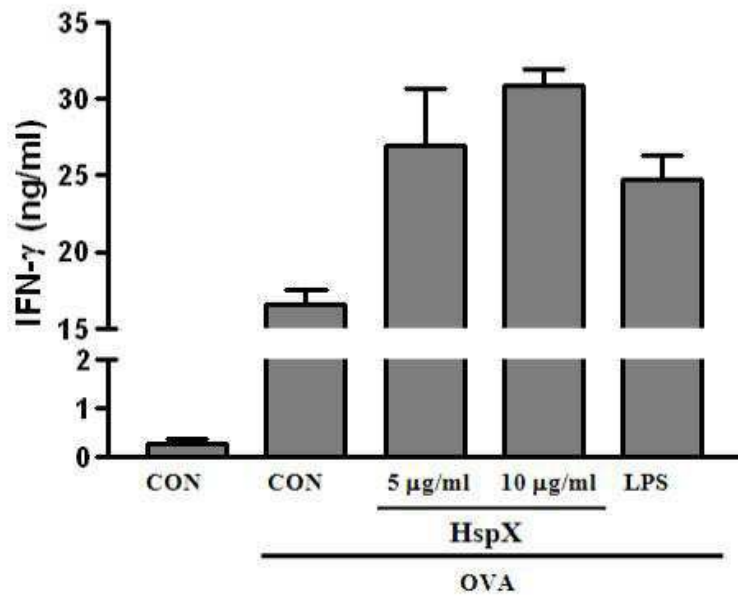
도면4



도면5



도면6



도면7

