



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0025476
(43) 공개일자 2020년03월10일

- | | |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12N 5/0783</i> (2010.01) <i>A61K 31/7088</i> (2006.01)
 <i>A61P 37/00</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C12N 5/0646</i> (2013.01)
 <i>A61K 31/7088</i> (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-0102885
 (22) 출원일자 2018년08월30일
 심사청구일자 2018년08월30일</p> | <p>(71) 출원인
 고려대학교 산학협력단
 서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)</p> <p>(72) 발명자
 전태훈
 서울특별시 송파구 양재대로 1218, 236동 1802호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)</p> <p>박인병
 서울특별시 마포구 마포대로4라길 30, 102동 202호 (마포동, 마포쌍용황금아파트)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인 남앤남</p> |
|--|--|

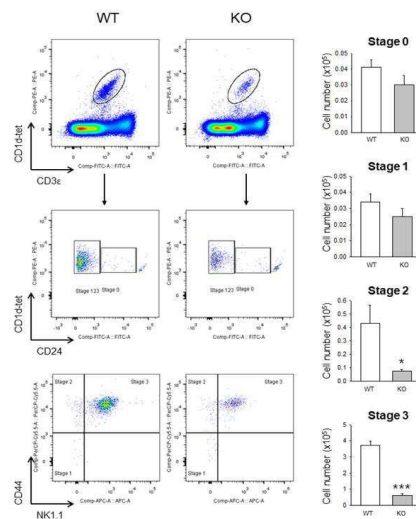
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **불변 자연살해세포의 분화 조절기능을 갖는 LDB1의 용도**

(57) 요약

본 발명은 본 발명은 불변 자연살해세포 세포 분화 조절기능을 갖는 LDB1의 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로 본 발명은 Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제를 유효성분으로 포함하는 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달 억제용 조성물, 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 미분화 T 세포에 Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제를 처리하는 단계를 포함하는, 시험관 내에서 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달을 억제하는 방법에 관한 것이다. 본 발명에 따른 LDB1의 발현 또는 활성 억제를 통해 그 기능을 차단할 경우, 불변 자연살해세포의 분화 또는 발달을 효과적으로 억제할 수 있어 과도한 불변 자연살해세포 세포의 활성화로 유발될 수 있는 자가면역질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A61P 37/00 (2018.01)

C12N 2501/60 (2013.01)

C12N 2501/65 (2013.01)

C12N 2506/11 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711064799

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 (원천) 바이오의료기술개발사업

연구과제명 신규 전사조절인자를 이용한 인간 유도만능 줄기세포 유래 조혈모 줄기세포 기능 고도화

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달 억제용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제는 Ldb1 유전자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 또는 Ldb1 유전자 결손을 위한 도 4의 개열지도는 갖는 재조합 벡터인 것을 특징으로 하는, 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달 억제용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 Ldb1(LIM domain-binding protein 1)는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 것을 특징으로 하는, 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달 억제용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

불변 자연살해세포의 분화 또는 발달억제는 미분화 T 세포로부터 불변 자연살해세포로의 분화 억제; 또는 불변 자연살해세포의 발달단계 2(stage 2) 및 발달단계 3(stage 3)의 세포수를 감소시키는 것을 특징으로 하는, 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달 억제용 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 발달단계 2(stage 2)는 CD1d-tetramer 양성, CD3ε 양성, CD24 음성, CD44 양성 및 NK1.1 음성을 나타내는 불변 자연살해세포이고,

상기 발달단계 3(stage 3)은 CD1d-tetramer 양성, CD3ε 양성, CD24 음성, CD44 양성 및 NK1.1 양성을 나타내는 불변 자연살해세포인 것을 특징으로 하는, 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달 억제용 조성물.

청구항 6

Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 Ldb1 유전자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 또는 Ldb1 유전자 결손을 위한 도 4의 개열지도는 갖는 재조합 벡터인 것을 특징으로 하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제는 미분화 T세포의 불변 자연살해세포(iNKT)로의 분화 또는

발달을 억제하는 것을 특징으로 하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 자가면역질환은 류마티스 관절염, 골 관절염, 베체트병, 자가면역 혈구감소증, 자가면역 심근염, 아토피 피부염, 천식, 일차성간경변, 피부근염, 굿파이치 증후군, 자가면역 뇌수막염, 쇼그렌 증후군, 전신 홍반성 루프스, 에디슨병, 원형 탈모증, 강직성 척수염, 자가면역성 간염, 자가면역성 이하선염, 크론병, 인슐린 의존성 당뇨병, 이영양성 수포성 표피박리증, 부고환염, 사구체 신염, 그레이브스병, 길랑바레 증후군, 하시모토병, 용혈성 빈혈, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 심장천포창, 건선, 유육종증, 피부 경화증, 척추관절증, 악성빈혈, 공포증 및 염증성 장질환으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

미분화 T 세포에 Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제를 처리하는 단계를 포함하는, 시험관 내에서 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달을 억제하는 방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 Ldb1 유전자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 또는 Ldb1 유전자 결손을 위한 도 4의 개열지도는 갖는 재조합 벡터인 것을 특징으로 하는, 시험관 내에서 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달을 억제하는 방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

불변 자연살해세포의 분화 또는 발달억제는 미분화 T 세포로부터 불변 자연살해세포로의 분화 억제; 또는 불변 자연살해세포의 발달단계 2(stage 2) 및 발달단계 3(stage 3)의 세포수를 감소시키는 것을 특징으로 하는, 시험관 내에서 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달을 억제하는 방법.

청구항 13

제10항에 있어서,

상기 미분화 T 세포는 CD4⁺ 양성 및 CD8⁺ 양성 세포인 것을 특징으로 하는, 시험관 내에서 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달을 억제하는 방법.

청구항 14

제12항에 있어서,

상기 발달단계 2(stage 2)는 CD1d-tetramer 양성, CD3 ϵ 양성, CD24 음성, CD44 양성 및 NK1.1 음성을 나타내는 불변 자연살해세포이고,

상기 발달단계 3(stage 3)은 CD1d-tetramer 양성, CD3 ϵ 양성, CD24 음성, CD44 양성 및 NK1.1 양성을 나타내는 불변 자연살해세포인 것을 특징으로 하는, 시험관 내에서 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달을 억제하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 불변 자연살해세포(iNKT: invariant natural killer T) 세포의 분화 조절기능을 갖는 LDB1의 용도에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 각종 병원체에 대한 생체 방어 시스템으로 면역계에서 중심적 역할을 담당하는 세포군의 하나로 T 세포가 있다. T 세포는 인체의 흉선에서 생성되며 일련의 분화 과정을 거치면서 고유의 특성을 지닌 T 세포로 분화하게 되는데, 분화를 완료한 T 세포는 그 기능에 따라 크게 1형 보조 세포(Th1)와 2형 보조 세포(Th2)로 구분된다. 이 중에서 Th1 세포의 주된 기능은 세포 매개성 면역에 관여하고, Th2 세포는 체액성 면역에 관여하며, 면역계에서 이러한 두 세포 집단은 과활성화되지 않도록 서로 견제를 통해 면역계의 균형을 유지하고 있다.
- [0003] 따라서 면역질환의 대부분은 이러한 두 면역 세포간의 불균형에 기인하는 것으로 볼 수 있는데, 예를 들어 Th1 세포의 활성이 비정상적으로 증가하는 경우 자가면역질환이 발생할 수 있고, Th2 세포의 활성이 비정상적으로 증가하는 경우 과민반응에 의한 면역질환이 발생하는 것으로 알려져 있다.
- [0004] 한편, 자연살해세포(Natural Killer cell 또는 ; Natural Killer T cell, 이하 ‘NKT 세포라 함’)는 형태학적으로 세포질에 큰 과립을 가지는 세포(Large Granular Lymphocyte; LGL)로 혈액 내 림프구의 약 10~20%를 차지하며, T 세포 수용체, CD4, CD5 또는 면역글로불린과 같은 세포표면 수용체를 가지고 있지 않아서, 기존의 T 림프구 및 B 림프구와는 구별되는 독특한 림프구를 말한다(Trinchieri, G., Adv. Immunol., 47, 187, 1989). 이러한 NKT 세포는 흉선에서 만들어지며 혈액 이외에도 비장, 간, 폐, 편도선, 임파선 등에서도 발견되고, 골수 조직이 자연살해세포의 형성과 분화 과정에 중요한 것으로 알려져 있다.
- [0005] 또한, NKT 세포의 기능으로는 종양세포를 살해할 수 있고(Scala, G. et al., J. Immunol., 134, 3049, 1985), 바이러스가 감염된 세포에 대하여 세포독성을 나타내며, 세균과 진균을 살해하는 능력도 가지고 있다고 보고되어 있어, 항종양 면역과 미생물에 대한 보호면역에 대하여 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있으며(Walsh, C. M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 91, 10854, 1994), 또한 림포카인 등을 생산하여 면역계의 조절과정에 깊은 관련이 있고, CD16 세포 표면 수용체를 통하여 항체의존성 세포매개 세포독성(Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity; ADCC)의 기능을 나타내는 것으로 알려져 있다 (Ortaldo, J. R., Pathol. Immunol. Res., 5, 2203, 1986).
- [0006] 그러나 이러한 NKT 세포는 암세포를 공격할 수 있는 유익한 작용 이면에 allogenic graft 이식 전에 수용자(Host)의 자연살해세포에 의해 공여 세포가 거부 반응을 증가시키는 등 자연살해세포가 가지는 독성으로 인해 정상세포의 손상 및 이식과 같은 치료 과정 시 여러 가지 부작용이 발생할 수 있는 문제점이 있다.
- [0007] 따라서 면역계에서 중추적인 역할을 하고 있는 NKT 세포의 활성을 조절하는 것은 매우 중요한 일이며, 특히 과도한 면역반응으로 유발되는 면역거부질환 및 자가면역질환과 같은 질병 치료를 위한 방법으로 NKT 세포의 활성을 조절하는 연구가 필요하다고 할 수 있다.
- [0008] 나아가, NKT 세포는 현재 4가지로 분류되며 제1형 NKT 세포에 대한 연구가 가장 많이 진행되고 있다. 제1형 NKT 세포는 생쥐에서 invariant V α 14-J α 18 rearrangement를 통한 제한된 TCR을 가지고 있어 ‘invariant NKT (iNKT) cell’ 라고 부르기도 한다. MHC class Ib molecule인 CD1d에 제시된 당지질 항원에 의해 활성화 되고, iNKT 세포를 활성화 시킬 수 있는 exogenous lipid인 α -galactosylceramide (α -Galcer)와 CD1d를 결합한 복합체가 만들어지게 되면서 iNKT 세포를 쉽게 활성화 또는 인식하게 되었다. 또한 활성화된 iNKT 세포는 다양한 사이토카인 (cytokine)을 빠르게 분비하는 능력과 함께 Th1 면역반응과 Th2 면역반응 모두를 유도할 수 있는 능력이 있어 다양한 질환 모델에서 연구가 진행되고 있으나, 아직 그 기능에 대한 연구가 미비한 실정이다.
- [0009] 한편, Ldb1(LIM domain-binding protein 1)은 핵 어댑터 단백질(nuclear adaptor protein) 중 하나로, 특정 단백질간의 상호작용을 매개하는 것으로 알려져 있다. 즉, Ldb1은 LIM domain-only protein 2 (LMO2)와 결합하고, LMO2가 Gata, basic helix-loop-helix (bHLH) 등의 전사인자와 결합하여 HSC (hematopoietic cell) maintenance genes 및 erythroid genes의 발현을 조절한다고 알려져 있다. 특히 Ldb1은 N-terminal self-association (dimerization) domain을 가지고 있어 동형2합체화(homodimerization)를 통해 프로모터(promoters)와 distant regulatory elements와의 long-range interactions을 매개한다.
- [0010] 그러나 아직까지 Ldb1과 NKT 세포와의 관련성 및 면역반응 조절과의 관련성에 대한 연구는 진행된 바 없다.
- [0011] 이에 본 발명자들은 과도한 면역반응으로 유발되는 자가면역질환의 새로운 치료방법을 연구하던 중, Ldb1 유전자의 기능을 상실시킬 경우, NKT 세포의 분화가 억제된다는 사실을 처음으로 확인하였고, 따라서 Ldb1를 통한 NKT의 세포 분화 및 활성화 조절로 자가면역질환을 예방, 치료 또는 개선할 수 있음을 알 수 있었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0012] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2017-0042802호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 따라서 본 발명의 목적은 Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달 억제용 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 다른 목적은 Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 미분화 T 세포에 Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제를 처리하는 단계를 포함하는, 시험관 내에서 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달을 억제하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해 본 발명은, Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달 억제용 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제는 Ldb1 유전자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 또는 Ldb1 유전자 결손을 위한 도 4의 개열지도를 갖는 재조합 벡터일 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 Ldb1(LIM domain-binding protein 1)는 서열번호 1로 표시되는 염기서열로 이루어진 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 불변 자연살해세포의 분화 또는 발달억제는 미분화 T 세포로부터 불변 자연살해세포로의 분화 억제; 또는 불변 자연살해세포의 발달단계 2(stage 2) 및 발달단계 3(stage 3)의 세포수를 감소시키는 것일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 발달단계 2(stage 2)는 CD1d-tetramer 양성, CD3 ϵ 양성, CD24 음성, CD44 양성 및 NK1.1 음성을 나타내는 불변 자연살해세포이고, 상기 발달단계 3(stage 3)은 CD1d-tetramer 양성, CD3 ϵ 양성, CD24 음성, CD44 양성 및 NK1.1 양성을 나타내는 불변 자연살해세포 일 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 Ldb1 유전자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 또는 Ldb1 유전자 결손을 위한 도 4의 개열지도를 갖는 재조합 벡터일 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제는 미분화 T세포의 불변 자연살해세포(iNKT)로의 분화 또는 발달을 억제하는 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 자가면역질환은 류마티스 관절염, 골 관절염, 베체트병, 자가면역 혈구감소증, 자가면역 심근염, 아토피피부염, 천식, 일차성간경변, 피부근염, 굿파이처 증후군, 자가면역 뇌수막염, 쇼그렌 증후군, 전신 홍반성 루프스, 애디슨병, 원형 탈모증, 강직성 척수염, 자가면역성 간염, 자가면역성 이하선염, 크론병, 인슐린 의존성 당뇨병, 이영양성 수포성 표피박리증, 부고환염, 사구체 신염, 그레이브스병, 길랑바레 증후군, 하시모토병, 용혈성 빈혈, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 심상천포창, 건선, 유육종증, 피부경화증, 척추관절증, 악성빈혈, 공피증 및 염증성 장질환으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것일 수 있다.

[0025] 또한 본 발명은 미분화 T 세포에 Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제를 처리하는 단계를 포함하는, 시험관 내에서 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달을 억제하는 방법을 제공한다.

- [0026] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제는 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 Ldb1 유전자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 또는 Ldb1 유전자 결손을 위한 도 4의 개열지도를 갖는 재조합 벡터일 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일실시예에 있어서, 불변 자연살해세포의 분화 또는 발달억제는 미분화 T 세포로부터 불변 자연살해세포로의 분화 억제; 또는 불변 자연살해세포의 발달단계 2(stage 2) 및 발달단계 3(stage 3)의 세포수를 감소시키는 것일 수 있다.
- [0028] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 미분화 T 세포는 CD4⁺ 양성 및 CD8⁺ 양성 세포일 수 있다.
- [0029] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 발달단계 2(stage 2)는 CD1d-tetramer 양성, CD3 ϵ 양성, CD24 음성, CD44 양성 및 NK1.1 음성을 나타내는 불변 자연살해세포이고, 상기 발달단계 3(stage 3)은 CD1d-tetramer 양성, CD3 ϵ 양성, CD24 음성, CD44 양성 및 NK1.1 양성을 나타내는 불변 자연살해세포일 수 있다.

발명의 효과

- [0030] 본 발명은 iNKT 세포 분화 조절기능을 갖는 LDB1의 용도에 관한 것으로, LDB1의 발현 또는 활성을 억제할 경우, 불변 자연살해세포의 분화 또는 발달을 효과적으로 억제할 수 있어 과도한 iNKT 세포 활성화로 유발될 수 있는 자가면역질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 Ldb1 유전자 결핍 시의 면역기관 및 면역세포에 미치는 영향을 분석한 것으로, 1a는 8주령의 정상 생쥐(WT, Ldb1^{f1/f11} CD4-Cre-)와 DP 흉선세포 특이적 Ldb1 유전자 적중 생쥐(KO, Ldb1^{f1/f11} CD4-Cre+)의 면역기관인 흉선(thymus)과 비장(spleen)의 크기를 육안으로 관찰한 것을 나타낸 것이고, 1b는 8주령의 정상 생쥐(WT, Ldb1^{f1/f11} CD4-Cre-)와 DP 흉선세포 특이적 Ldb1 유전자 적중 생쥐(KO, Ldb1^{f1/f11} CD4-Cre+)의 흉선, 비장 및 간에서의 면역세포수를 측정하여 분석한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2a는 정상 생쥐(WT, Ldb1^{f1/f11} CD4-Cre-)와 DP 흉선세포 특이적 Ldb1 유전자 적중 생쥐(KO, Ldb1^{f1/f11} CD4-Cre+)의 흉선 내에서의 DP 흉선세포(CD4⁺CD8⁺), CD4⁺ T 세포(CD4⁺) 및 CD8⁺ T 세포(CD8⁺)를 유세포 분석기를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2b는 정상 생쥐(WT)와 DP 흉선세포 특이적 Ldb1 유전자 적중 생쥐(KO)의 비장내에서의 T 세포(CD3 ϵ ⁺), B 세포(B220⁺), CD4⁺ T 세포(CD4⁺), CD8⁺ T 세포(CD8⁺), 대식세포(macrophage, F4/80⁺CD11⁺), 수지상세포(dendritic cell, CD11b⁺CD11c⁺) 및 과립구(granulocyte, Gr-1⁺)를 유세포 분석기를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2c는 정상 생쥐(WT)와 DP 흉선세포 특이적 Ldb1 유전자 적중 생쥐(KO)의 흉선, 비장 및 간에서의 iNKT 세포 비율 및 절대 세포수를 CD1d-tetramer 염색으로 정량화하여 나타낸 것이다.
- 도 3은 정상 생쥐(WT)와 DP 흉선세포 특이적 Ldb1 유전자 적중 생쥐(KO)의 흉선에서 iNKT 세포(CD1d-tet⁺CD3 ϵ ⁺)를 유세포 분석기를 통해 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- 도 4는 Ldb1유전자 적중 생쥐 제조를 위해 생쥐에 주입한 Ldb1 유전자 제거용 재조합 벡터의 개열지도를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 본 발명은 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달 조절 기능을 갖는 Ldb1(LIM domain-binding protein 1)의 신규한 용도를 제공함에 특징이 있다.
- [0033] 자연살해세포(NKT) 세포는 현재 4가지로 분류되고 있는데, 본 발명의 Ldb1의 억제는 제1형 NKT 세포 즉, 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달을 억제할 수 있음을 본 발명자들은 최초로 규명하였다.
- [0034] 한편, 불변 자연살해세포(iNKT)는 천식, 루프스 및 제1형 당뇨병 등을 포함하는 자가면역질환에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데, 특히 자가면역질환이 발병된 환자에서 불변 자연살해세포(iNKT)의 과활성 현상 및

세포수의 증가가 관찰되고 있다.

- [0035] 따라서 불변 자연살해세포(iNKT)에 대한 억제제는 자가면역질환의 새로운 치료제로서 사용 가능하다.
- [0036] 이에 본 발명자들은 Ldb1(LIM domain-binding protein 1)과 불변 자연살해세포(iNKT)와의 연관성을 분석하였는데, Ldb1의 발현 또는 활성을 억제할 경우, 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달을 효과적으로 억제할 수 있음을 확인하였다.
- [0037] 본 발명의 일실시예에 의하면, 타겟 유전자의 결손(결핍)을 위한 방법으로 당업계에서 사용되고 있는 Cre-Lox 시스템을 사용하여 Ldb1 유전자가 결핍된 생쥐 동물모델을 제조한 후, Ldb1 유전자가 발현되는 정상 생쥐와 면역기관의 형태, 면역세포수 및 불변 자연살해세포의 분화와 발달단계에서의 세포수를 분석하였다.
- [0038] 그 결과, Ldb1 유전자가 발현되는 정상 생쥐 및 Ldb1 유전자가 결핍 생쥐에서 흉선, 비장 및 간의 외형에는 큰 차이가 없었고, $CD4^+$ T 세포, $CD8^+$ T 세포, T 세포, B 세포, 대식세포(macrophage), 수지상세포(dendritic cell) 및 과립구(granulocyte)의 세포수에도 큰 차이가 없었다(도 2a 및 2b 참조). 그러나 불변 자연살해세포(iNKT)의 세포수 및 절대세포수는 정상 생쥐에 비해 Ldb1 유전자가 결핍 생쥐에서 4배 이상 감소되어 있는 것으로 나타났다(도 2c 참조).
- [0039] 또한, 본 발명의 다른 일실시예에 의하면, Ldb1 유전자의 iNKT 세포에 대한 세포분화 및 세포발달에 미치는 영향을 분석하였는데, 보다 구체적인 분석을 위해 Ldb1 유전자가 발현되는 정상 생쥐 및 Ldb1 유전자가 결핍된 생쥐를 대상으로, 미분화 T 세포에서 분화가 된 불변 자연살해세포의 세포수를 측정하였고, 또한 iNKT의 세포발달 단계에 해당하는 세포수도 각각 측정하였다.
- [0040] 여기서 상기 iNKT의 세포발달 단계는, 발달단계 0(stage 0)은 분화대상의 세포가 CD1d-tetramer 양성, $CD3\epsilon$ 양성, CD24 음성, CD44 음성 및 NK1.1 음성을 나타내는 단계이고, 발달단계 1(stage 1)은 CD1d-tetramer 양성, $CD3\epsilon$ 양성, CD24 음성, CD44 음성 및 NK1.1 음성을 나타내는 단계이며, 발달단계 2(stage 2)는 CD1d-tetramer 양성, $CD3\epsilon$ 양성, CD24 음성, CD44 양성 및 NK1.1 음성을 나타내는 단계를 말하며, 발달단계 3(stage 3)은 CD1d-tetramer 양성, $CD3\epsilon$ 양성, CD24 음성, CD44 양성 및 NK1.1 양성을 나타내는 단계를 말한다.
- [0041] 분석 결과, Ldb1 유전자가 결핍된 생쥐의 경우 정상 생쥐에 비해 분화된 iNKT의 세포수가 현저하게 감소되어 있는 것으로 나타났고, 세포 발달단계 분석 결과, 특히 발달단계 2 및 3에서 iNKT 세포의 절대 세포수가 모두 현저하게 감소된 것으로 나타났다.
- [0042] 그러므로 이러한 결과를 통해 본 발명자들은 Ldb1(LIM domain-binding protein 1)의 발현 또는 활성을 억제할 경우, 불변 자연살해세포(iNKT)의 세포분화 또는 세포발달(세포성숙)을 효과적으로 억제할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0043] 따라서 본 발명은 Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달 억제용 조성물을 제공할 수 있다.
- [0044] 본 발명에서 상기 Ldb1(LIM domain-binding protein 1)은 서열번호 1의 염기서열로 이루어진 것일 수 있으며, 상기 Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제는 Ldb1의 발현을 억제할 수 있거나 또는 활성(기능)을 억제할 수 있는 것으로, 이에 제한되지는 않으나, Ldb1 유전자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 또는 Ldb1 유전자 결손을 위한 재조합 벡터일 수 있다.
- [0045] 본 발명의 일실시예에서는 Ldb1 유전자 결손을 위한 재조합 벡터를 사용하여 Ldb1 유전자 결손 동물모델을 제조하였는데, Ldb1 유전자 결손을 위한 재조합 벡터는 Cre-Lox 시스템에 사용될 수 있는 벡터를 사용할 수 있다.
- [0046] 상기 Cre-Lox 시스템은 특정 유전자의 기능을 확인할 수 있는 시스템으로, Cre는 Cre 재조합 효소를 의미하며, LoxP 염기서열을 인식하여 재조합을 일으키는 효소로서, Cre는 LoxP 사이에 특정 유전자가 삽입된 구조체에 작용하여 LoxP 사이의 특정 유전자를 제거하여, 특정 유전자의 제거로 인한 현상을 확인할 수 있다.
- [0047] 본 발명에서는 LoxP 사이에 특정 유전자로서 Ldb1 유전자를 삽입한 재조합 벡터를 사용하였으며, 이때 사용한 상기 재조합 벡터(Ldb1 floxed recombinant vector)의 개열지도는 도 4에 나타내었다.
- [0048] 또한 본 발명은 Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 자가면역질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공할 수 있다.

- [0049] 상기 억제제는 앞서 기술한 바와 같이 Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제는 Ldb1의 발현을 억제할 수 있거나 또는 활성(기능)을 억제할 수 있는 것으로, 이에 제한되지는 않으나, Ldb1 유전자에 대한 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA, shRNA 또는 Ldb1 유전자 결손을 위한 재조합 벡터를 사용할 수 있다.
- [0050] 본 발명의 일실시예에서는 상기 억제제로 도 4의 개열지도를 갖는 Ldb1 유전자 제거용 재조합 벡터를 사용하고, 서열번호 6 내지 15로 이루어진 군 중에서 선택되는 Ldb1 특이적 shRNA를 사용하였다.
- [0051] 상기 "안티센스 올리고뉴클레오타이드란 용어는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 핵산 서열을 함유하고 있는 DNA 또는 RNA 또는 이들의 유도체를 의미하고, mRNA 내의 상보적인 서열에 결합하여 mRNA의 단백질로의 번역을 저해하는 작용을 한다. 본 발명의 안티센스 서열은 상기 타겟 유전자의 mRNA에 상보적이고 상기 mRNA에 결합할 수 있는 DNA 또는 RNA 서열을 의미하며, 상기 mRNA의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해할 수 있다.
- [0052] 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 통상의 방법으로 시험관에서 합성되어 생체 내로 투여하거나 생체 내에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 합성되도록 할 수 있다. 시험관에서 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 합성하는 일에는 RNA 중합효소 I를 이용하는 것이다. 생체 내에서 안티센스 RNA가 합성되도록 하는 한 가지 예는 인식부위(MCS)의 기원이 반대 방향에 있는 벡터를 사용하여 안티센스 RNA가 전사되도록 하는 것이다. 이런 안티센스 RNA는 서열 내에 번역 중지 코돈이 존재하도록 하여 펩타이드 서열로 번역되지 않도록 하는 것이 바람직하다.
- [0053] 또한 상기 "siRNA라는 용어는 RNA 방해 또는 유전자 사일런싱을 매개할 수 있는 핵산 분자를 의미한다(국제공개특허번호 00/44895, 01/36646, 99/32619, 01/29058, 99/07409 및 00/44914 참조). siRNA는 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있기 때문에 효율적인 유전자 녹다운(knock-down) 방법으로서 또는 유전자치료 방법으로 제공된다.
- [0054] 또한, 상기 siRNA 분자는 자기-상보성(self-complementary) 센스 및 안티센스 가닥 사이에 짧은 뉴클레오타이드 서열이 삽입된 형태를 가질 수 있으며, 이 경우 뉴클레오타이드 서열의 발현에 의해 형성된 siRNA 분자는 분자 내 혼성화에 의하여 헤어핀 구조를 형성하게 되며, 전체적으로는 스템-앤드-루프 구조를 형성하게 된다. 이 스템-앤드-루프 구조는 인 비트로 또는 인 비보에서 프로세싱되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성의 siRNA 분자를 생성한다. siRNA를 제조하는 방법은 시험관에서 siRNA를 직접 합성한 뒤, 형질전환 과정을 거쳐 세포 안으로 도입시키는 방법과 siRNA가 세포 안에서 발현되도록 제조된 siRNA 발현 벡터 또는 PCR-유래의 siRNA 발현 카세트 등을 세포 안으로 형질전환 또는 감염(infection)시키는 방법이 있다.
- [0055] 본 발명에 따른 상기 약학적 조성물은 자가면역질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있는 조성물로서, 상기 자가면역질환은 iNKT 세포의 과도한 활성 및 작용으로 유발될 수 있는 질환으로 이에 제한되지는 않으나, 류마티스관절염, 골 관절염, 베체트병, 자가면역 혈구감소증, 자가면역 심근염, 아토피피부염, 천식, 일차성간경변, 피부근염, 굿파이처 증후군, 자가면역 뇌수막염, 쇼그렌 증후군, 전신 홍반성 루프스, 애디슨병, 원형 탈모증, 강직성 척수염, 자가면역성 간염, 자가면역성 이하선염, 크론병, 인슐린 의존성 당뇨병, 이영양성 수포성 표피박리증, 부고환염, 사구체 신염, 그레이브스병, 길랑바레 증후군, 하시모토병, 용혈성 빈혈, 다발성 경화증, 중증근무력증, 심상천포창, 건선, 유육종증, 피부 경화증, 척추관절증, 악성빈혈, 공피증 및 염증성 장질환일 수 있다.
- [0056] 또한 본 발명의 약학적 조성물은 Ldb1 억제제를 약학적으로 허용되는 담체와 함께 약제학적으로 유용한 양으로 포함할 수 있다.
- [0057] 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다. 약학적으로 허용되는 담체로는 예를 들면, 락토스, 전분, 셀룰로스 유도체, 마그네슘 스테아레이트, 스테아르산 등과 같은 경구 투여용 담체 및 물, 적합한 오일, 식염수, 수성 글루코스 및 글리콜등과 같은 비경구 투여용 담체 등이 있으며 안정화제 및 보존제를 추가로 포함할 수 있다. 적합한 안정화제로는 아황산수소나트륨, 아황산나트륨 또는 아스코르브산과 같은 항산화제가 있다. 적합한 보존제로는 벤즈알코늄 클로라이드, 메틸- 또는 프로필-파라벤 및 클로로부탄올이 있다. 그 밖의 약학적으로 허용되는 담체로는 다음의 문헌에 기재되어 있는 것을 참고로 할 수 있다 (Remington's Pharmaceutical Sciences, 19th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1995). 본 발명에 따른 약학적 조성물은 상술한 바와 같은 약학적으로 허용되는 담체와 함께 당업계에 공지된 방법에 따라 적합한 형태로 제형화 될 수 있다. 즉, 본 발명의 약학적 조성물은 공지의 방법에 따라 다양한 비경구 또는 경구 투여용 형태로 제조될 수 있으며, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것으로는 주사용 제형으로 등장성 수용액 또는 현

탁액이 바람직하다. 주사용 제형은 적합한 분산제 또는 습윤제 및 현탁화제를 사용하여 당업계에 공지된 기술에 따라 제조할 수 있다. 예를 들면, 각 성분을 식염수 또는 완충액에 용해시켜 주사용으로 제형화될 수 있다. 또한, 경구 투여용 제형으로는, 이에 한정되지는 않으나, 분말, 과립, 정제, 환약 및 캡슐 등이 있다.

[0058] 상기와 같은 방법으로 제형화된 약학적 조성물은 유효량으로 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있는데, 상기 투여란 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 도입하는 것을 의미하며 물질의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다.

[0059] 또한, 상기에서 유효량 이란 환자에게 투여하였을 때, 예방 또는 치료 효과를 나타내는 양을 말한다. 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여량은 환자의 질환 종류 및 중증도, 연령, 성별, 체중, 약물에 대한 민감도, 현재 치료법의 종류, 투여방법, 표적 세포 등 다양한 요인에 따라 달라질 수 있으며, 당 분야의 전문가들에 의해 용이하게 결정될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 종래의 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 바람직하게는 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 1~10000 μ g/체중kg/day, 더욱더 바람직하게는 10~1000mg/체중kg /day의 유효용량으로 하루에 수회 반복 투여될 수 있다.

[0060] 나아가 본 발명은 미분화 T 세포에 Ldb1(LIM domain-binding protein 1) 억제제를 처리하는 단계를 포함하는, 시험관 내에서 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달을 억제하는 방법을 제공할 수 있다.

[0061] 상기 미분화 T 세포는 바람직하게 흉선에서 분리된 CD4 양성 및 CD8 양성을 나타내는 이중양성(DP) 세포로서, Ldb1 억제제를 상기 미분화 T 세포에 처리할 경우 상기 세포의 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달을 효과적으로 억제할 수 있다.

[0062] 특히 Ldb1 억제를 통한 불변 자연살해세포(iNKT)의 분화 또는 발달 억제는 미분화 T 세포가 불변 자연살해세포(iNKT)로의 분화를 억제하는 것일 수 있고, 또한 불변 자연살해세포의 세포발달 단계를 억제하는 것일 수 있으며, 바람직하게 상기 불변 자연살해세포의 세포발달 단계 억제는 발달단계 2(stage 2) 및 발달단계 3(stage 3)에서 불변 자연살해세포의 세포수를 감소시키는 것일 수 있다.

[0063] 여기서 상기 발달단계 2(stage 2)는 CD1d-tetramer 양성, CD3 ϵ 양성, CD24 음성, CD44 양성 및 NK1.1 음성을 나타내는 불변 자연살해세포이고, 상기 발달단계 3(stage 3)은 CD1d-tetramer 양성, CD3 ϵ 양성, CD24 음성, CD44 양성 및 NK1.1 양성을 나타내는 불변 자연살해세포이다.

[0065] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0067] <실시예 1>

[0068] Ldb1 유전자가 결핍된 생쥐(Ldb1^{f1/f1} CD4-Cre+) 모델에서의 면역 기관 분석

[0069] Ldb1이 면역세포의 분화 및 기능에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해, Cre-Lox 재조합 시스템을 이용한 DP(double positive; CD4+ 및 CD8+) 흉선세포 특이적 Ldb1 유전자 적중생쥐(Ldb1^{f1/f1}) 모델을 구축하였다. 이때 Ldb1 유전자 적중생쥐(Ldb1^{f1/f1})의 제조는 당업계에 알려진 Cre-Lox 재조합 시스템의 유전자 적중법을 통해 조건적으로 Ldb1 유전자가 삭제된 생쥐를 제조하였으며, 이를 위해 도 4의 개열지도를 갖는 Ldb1 유전자 삭제용 재조합 벡터를 생쥐에 주입시켜 Ldb1 유전자 적중 생쥐 모델을 제조하였다. 이후 DP 흉선세포 특이적 Ldb1 유전자 적중생쥐(Ldb1^{f1/f1} CD4-Cre+) 모델 구축을 위해, Ldb1^{f1/f1} 표현형 생쥐와 Ldb1^{f1/+} CD4-Cre+ 표현형 생쥐의 교배를 수행하였고, 이로부터 나온 자손 생쥐가 4주령이 되었을 때, 꼬리에서 게놈(genomic) DNA를 채취하여 생쥐의 유전자형을 하기 표 1의 프라이머들을 이용하여 상기 교배하여 얻은 생쥐가 Ldb1 유전자가 결핍된 적중생쥐(Ldb1^{f1/f1} CD4-Cre+)임을 확인하였고, 이후 8주령이 되었을 때에 Ldb1 유전자 적중생쥐(Ldb1^{f1/f1} CD4-Cre+)와 정상생쥐(Ldb1^{f1/f1} CD4-Cre-)에 대한 면역기관을 분석하였다. 또한, 하기 표 1의 프라이머들을 이용한 중합효소 연쇄반응(polymerase chain reaction)을 통해 유전자형 분석을 수행하였고 정상생쥐(Ldb1^{f1/f1} CD4-Cre-)와 DP 흉선세

또 특이적 Ldb1 유전자 적중생쥐(Ldb1^{f1/f1}CD4-Cre+)를 구분하였다.

표 1

[0070]

Ldb1 유전자 적중생쥐의 유전자형 분석을 위한 프라이머

유전자	프라이머 서열	
Ldb1 ^{f1/f1}	정방향	5'- CTT ATG TGA CCA CAG CCA TGC ATG CAT GTG 3' [서열번호: 2]
	역방향	5'- CAG CAA ACG GAG GAA ACG GAA GAT GTC AG -3' [서열번호: 3]
CD4-cre	정방향	5'- GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC -3' [서열번호: 4]
	역방향	5'- GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT -3' [서열번호: 5]

[0072]

분석결과, 도 1a에 나타난 바와 같이, 정상 생쥐(WT, Ldb1^{f1/f1}CD4-Cre-)와 Ldb1 유전자 적중 생쥐(KO, Ldb1^{f1/f1}CD4-Cre+)에서의 흉선, 비장 및 간의 외형은 유의미한 차이가 있지 않는 것으로 나타났다.

[0074]

또한, 본 발명자들은 흉선, 비장 및 간에 서의 면역세포수를 분석하였는데, 면역세포수의 분석은 상기 실험에 사용한 생쥐들의 면역기관인 흉선 및 비장을 각각 적출하고 단일세포를 분리한 후 적혈구를 제거하였다. 이후 혈구계수기(hemacytometer)를 이용하여 흉선과 비장에서 면역세포의 수를 비교하였다. 흉선과 비장 이외에도 간을 적출하여 단일세포를 분리하고, 상기 단일세포에서 면역세포의 분리를 위해 40% percoll 용액을 첨가한 후, 세포밀도농도구배(cell density gradient)를 이용하여 면역세포를 분리하였다. 이후 혈구계수기를 이용하여 간에서의 면역세포수를 측정하였다.

[0076]

그 결과, 도 1b에 나타난 바와 같이, 정상 생쥐(WT, Ldb1^{f1/f1}CD4-Cre-)와 DP 흉선세포 특이적 Ldb1 유전자 적중 생쥐(KO, Ldb1^{f1/f1}CD4-Cre+)의 면역기관에서의 면역세포의 수에는 유의미한 차이가 발생하지 않는 것을 확인할 수 있었다.

[0078]

<실시예 2>

[0079]

Ldb1 유전자가 결핍된 생쥐(Ldb1^{f1/f1}CD4-Cre+) 모델에서의 면역 세포 분석

[0080]

Ldb1 유전자의 결핍 시, 어떠한 면역세포가 결핍되는지의 확인을 위해 정상생쥐(WT)와 DP 흉선세포 특이적 Ldb1 유전자 적중 생쥐(KO)[Ldb1 유전자가 결핍된 생쥐(Ldb1^{f1/f1}CD4-Cre+)]의 면역기관인 흉선 및 비장에서 면역세포를 분리한 후, 면역세포의 세포표지 인자인 CD4, CD8, B220, CD3ε, F4/80, CD11b, CD11c, Gr1의 발현 정도를 유세포분석기를 이용하여 분석하였다.

[0082]

그 결과, 도 2a 및 도 2b에 나타난 바와 같이, 정상생쥐(WT)와 DP 흉선세포 특이적 Ldb1 유전자 적중생쥐(KO)의 흉선 내 DP 흉선세포, CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포와 비장 내의 CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, T 세포, B 세포, 대식세포(macrophage), 수지상세포(dendritic cell) 및 과립구(granulocyte)에 대한 비율은 유의미한 차이를 발생하지 않았다. 따라서 이들 면역세포들에 대해서는 Ldb1 유전자 결핍으로 인한 면역세포의 결핍이 발생하지 않는 것으로 나타났다.

[0084]

한편, Ldb1 유전자가 DP 흉선세포로부터 분화되는 iNKT(invariant natural killer T) 세포에 어떠한 영향을 미치는지 확인하기 위해, iNKT 세포 표면 인자로 알려진 CD1d-tetramer와 CD3ε를 이용하여 상기 실험과 같이 유세포 분석기로 분석하였고, 흉선, 비장 및 간에서의 iNKT 세포 비율 및 절대 세포수(absolute cell number)를 비

교하였다.

[0086] 그 결과, 도 2c에 나타난 바와 같이, DP 흉선세포 특이적 Ldb1 유전자 적중 생쥐(KO)에서는 정상생쥐(WT)에 비해 *i*NKT 세포비율 및 절대 세포수가 4배 이상 감소되어있는 것으로 나타났다.

[0087] 따라서 본 발명자들은 이러한 결과를 통해 Ldb1 유전자의 결핍 시, 면역세포들 중에서 특이하게 *i*NKT 의 세포수를 현저하게 감소시키는 것을 알 수 있었다.

[0089] <실시예 3>

[0090] Ldb1 유전자의 결핍에 *i*NKT 분화 및 발달에 미치는 영향 분석

[0091] 상기 실시예의 결과를 통해 Ldb1 유전자가 *i*NKT 세포의 분화 및 세포성장에 영향을 미칠 수 있음을 예상할 수 있었다. 이에 본 발명자들은 실제로 Ldb1 유전자가 *i*NKT 분화과정 중 어느 단계에서 영향을 미치는지 확인해 보기 위해, *i*NKT 세포 표면 인자인 CD1d-tetramer 및 CD3ε에 대해, 발달단계의 *i*NKT 세포표면 마커인 CD24, CD44, NK1.1을 이용하여 유세포 분석기를 통해 흉선 내에서의 *i*NKT 세포 분석을 수행하였다.

[0093] 그 결과, DP 흉선세포 특이적 Ldb1 유전자 적중생쥐(KO)에서의 흉선 내에 존재하는 stage 0 (CD1d-tetramer⁺CD3ε⁺CD24⁺CD44⁻NK1.1⁻), stage 1 (CD1d-tetramer⁺CD3ε⁺CD24⁻CD44⁻NK1.1⁻), stage 2 (CD1d-tetramer⁺CD3ε⁺CD24⁻CD44⁺NK1.1⁻) 및 stage 3 (CD1d-tetramer⁺CD3ε⁺CD24⁻CD44⁺NK1.1⁺) 단계의 *i*NKT 세포 각각에 대한 차이를 분석한 결과, DP 흉선세포 특이적 Ldb1 유전자 적중생쥐(KO)에서는 정상생쥐(WT)에 비해 *i*NKT 세포 분화 단계 중, stage 2 및 3에서 *i*NKT 세포의 절대 세포수가 모두 현저하게 감소되어 있는 것으로 나타났다(도 3 참조).

[0095] 그러므로 이상의 결과를 종합하여 볼 때, DP 흉선세포 특이적 Ldb1 유전자 적중생쥐(KO, Ldb1^{fl/fl}CD4-Cre+)의 흉선에서 Ldb1 유전자 결핍에 따른 Ldb1의 기능이 차단되었을 때, 흉선 내 발달단계에 있는 *i*NKT의 세포수가 감소하는 것으로 나타났고, 또한 비장과 간에서 성숙한 *i*NKT 세포수가 감소하는 것으로 나타남에 따라 Ldb1 유전자는 DP 흉선에서 *i*NKT의 세포분화에 관여함을 알 수 있었으며, Ldb1 유전자의 발현 또는 기능을 차단할 경우, *i*NKT의 세포분화 억제를 통해 과도한 면역세포의 활성화로 유발되는 자가면역질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있음을 알 수 있었다.

[0096]

[0097] <실시예 4>

[0098] Ldb1에 대한 shRNA를 이용한 Ldb1 발현억제에 따른 면역활성 억제 효과분석

[0099] 나아가 본 발명자들은 Ldb1의 발현을 억제할 수 있는 억제제로서 Ldb1 특이적인 shRNA를 제작한 후, 이를 DP 흉선세포에 처리하여 Ldb1 발현 억제에 따른 *i*NKT의 세포분화 억제 정도를 분석하였다. 이때 사용한 shRNA의 서열들은 하기 표에 기재된 바와 같다.

표 2

[0100] Ldb1에 대한 shRNA

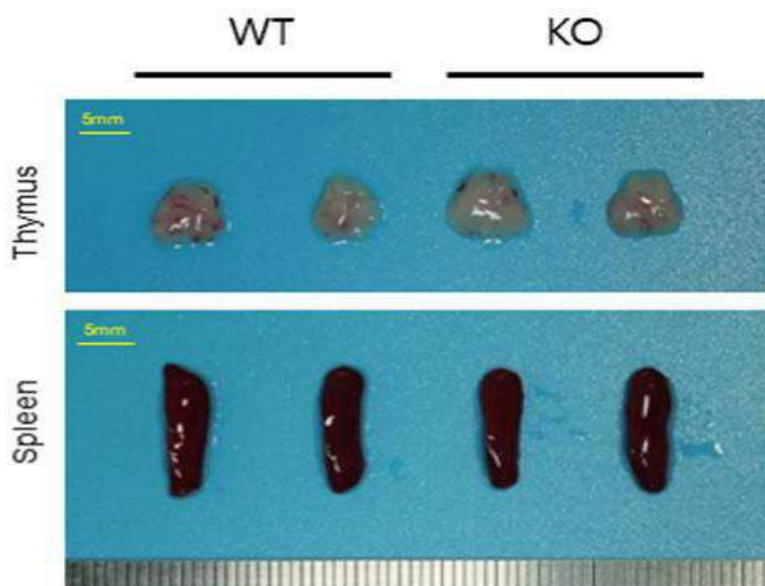
번호	서열번호	shRNA 서열
Ldb1 shRNA 1	6	CCGGAGGGAGCAGAAGACGGAATAACTCGAGTTATCCGTCCTTCTGCTCCCTTTTGTG
Ldb1 shRNA 2	7	CCGGCACACACCATATGGTAACCAACTCGAGTTGGTTACCATATGGTGTGTGTTTTG
Ldb1 shRNA 3	8	CCGGGCTTAACAAACGGCTACAGAAGCTCGAGTTCTGTAGCCGTTTGTAAAGCTTTTTG
Ldb1 shRNA 4	9	CCGGCACGCTACTTCCGAAGCATTCTCGAGAAATGCTTCGGAAGTAGCGTGTTTTTG
Ldb1 shRNA 5	10	CCGGCCAAGAGAGCAAATCGGAGAAGCTCGAGTTCTCGATTGCTCTCTTGGTTTTTG
Ldb1 shRNA 6	11	CCGGCACGCTACTTCCGAAGCATTCTCGAGAAATGCTTCGGAAGTAGCGTGTTTTTG
Ldb1 shRNA 7	12	CCGGTGACGACATGATGCGGATAAACTCGAGTTTATCCGCATCATGTCTGTCATTTTTG

Ldb1 shRNA 8	13	CCGGGGGAGCAGAAGACGGAATAAACTCGAGTTTATTCCGTCTTCTGCTCCCTTTTGG
Ldb1 shRNA 9	14	CCGGAGCACGGCAAACCCATGTTTACTCGAGTAAACATGGGTTTGCCGTGCTTTTGG
Ldb1 shRNA 10	15	CCGGATGGTAACCAAACCGACTATACTCGAGTATAGTCGGTTTGGTTACCATTTTTGG

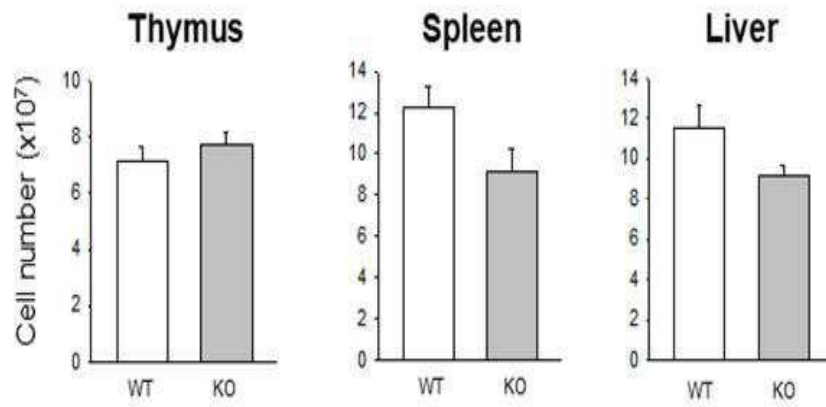
- [0102] 분석 결과, 상기 실시예 3의 결과와 유사하게 shRNA을 처리한 군은 shRNA을 처리하지 않은 군에 비해 iNKT의 세포분화 및 세포수가 감소되어 있는 것으로 나타났다.
- [0103] 이러한 결과 역시 Ldb1 유전자의 발현 또는 기능을 차단할 경우, iNKT의 세포분화 억제를 통해 과도한 면역세포의 활성화로 유발되는 자가면역질환을 예방, 개선 또는 치료할 수 있음을 의미한다.
- [0105] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

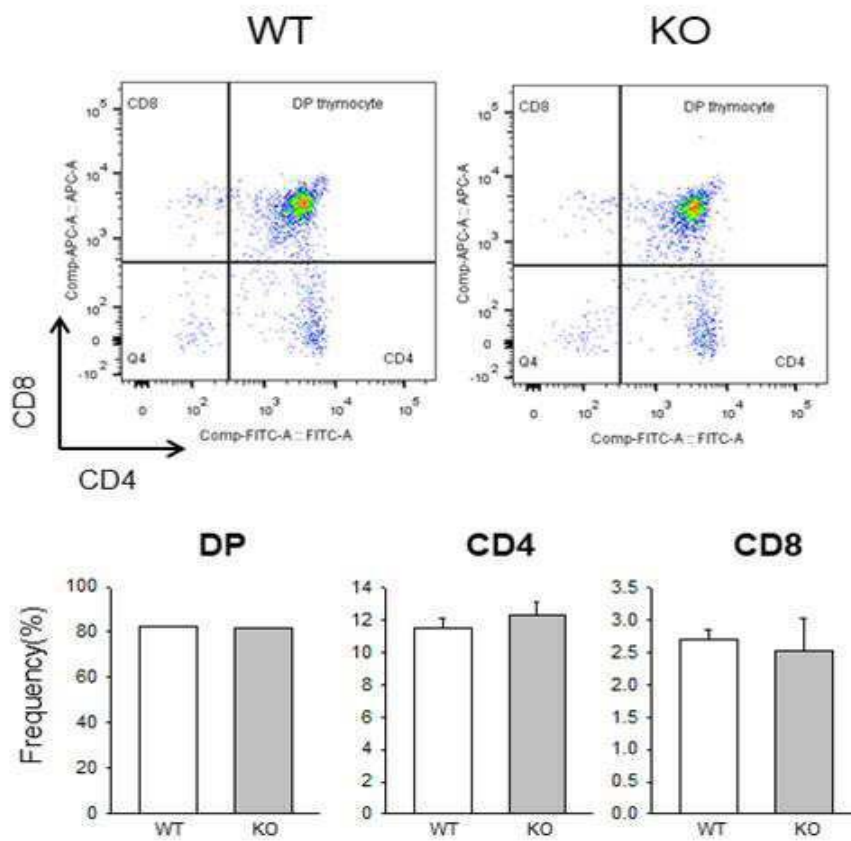
도면1a



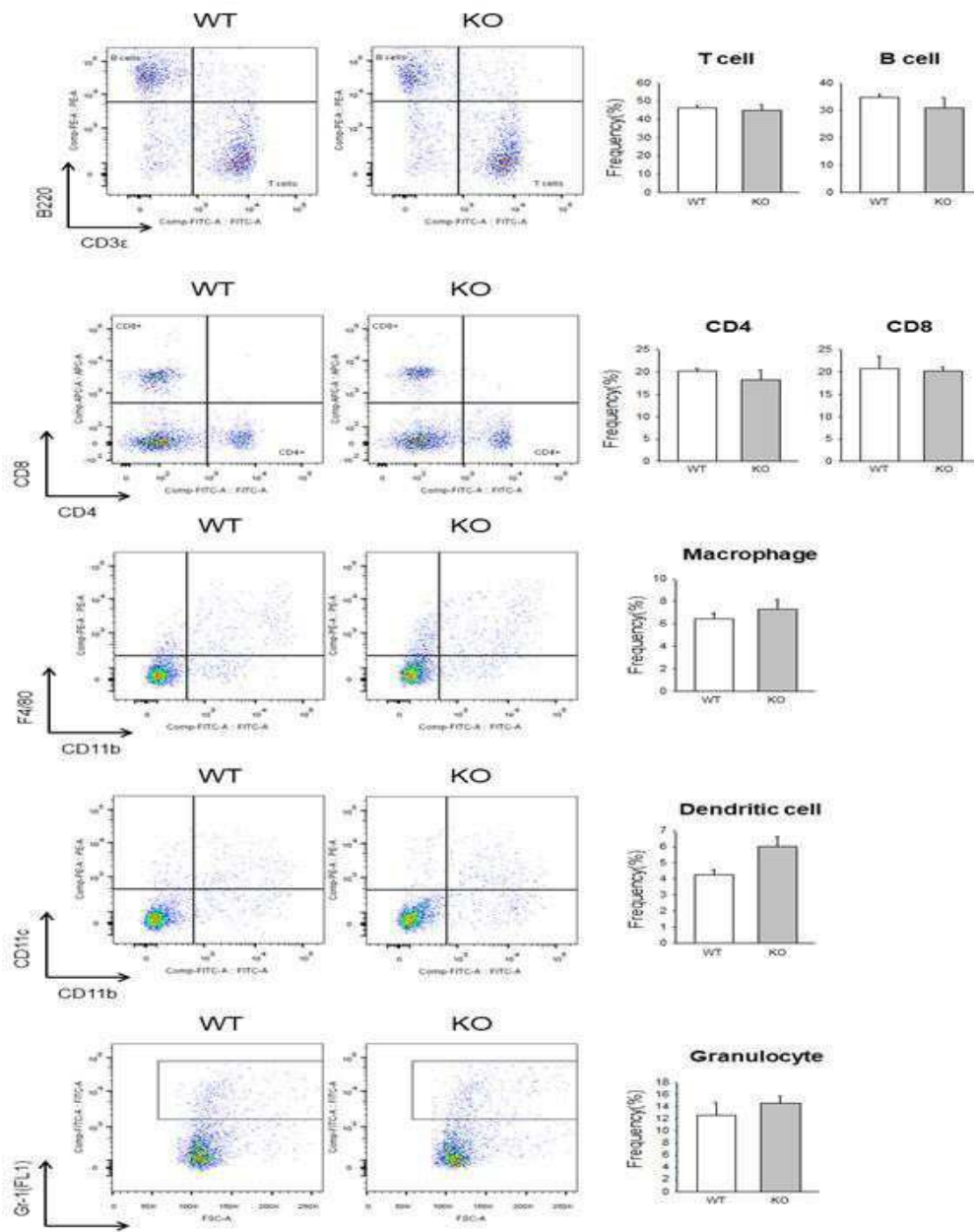
도면1b



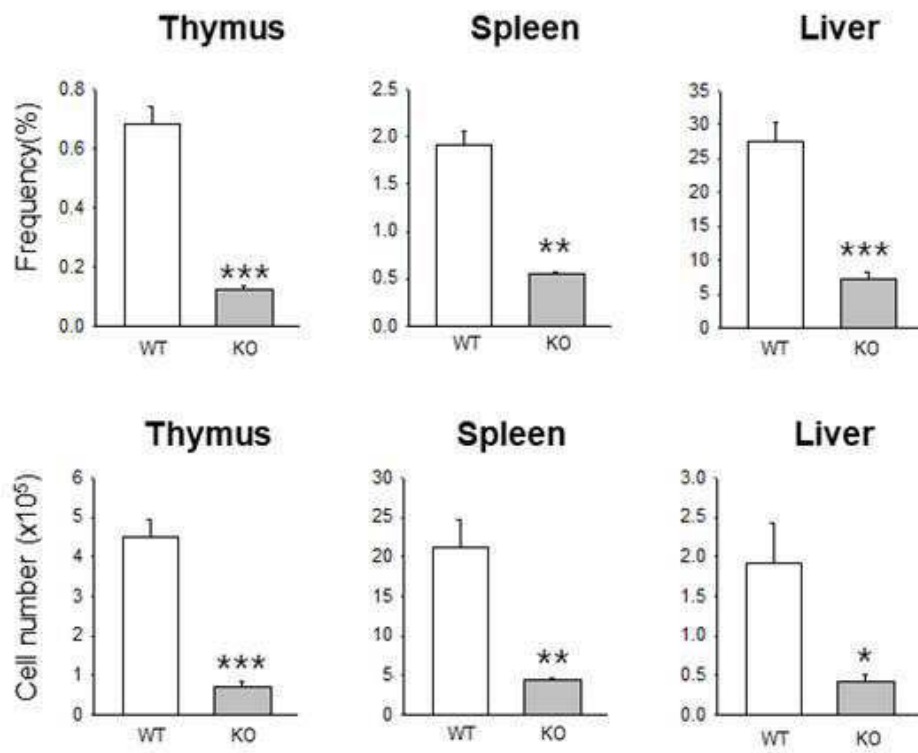
도면2a



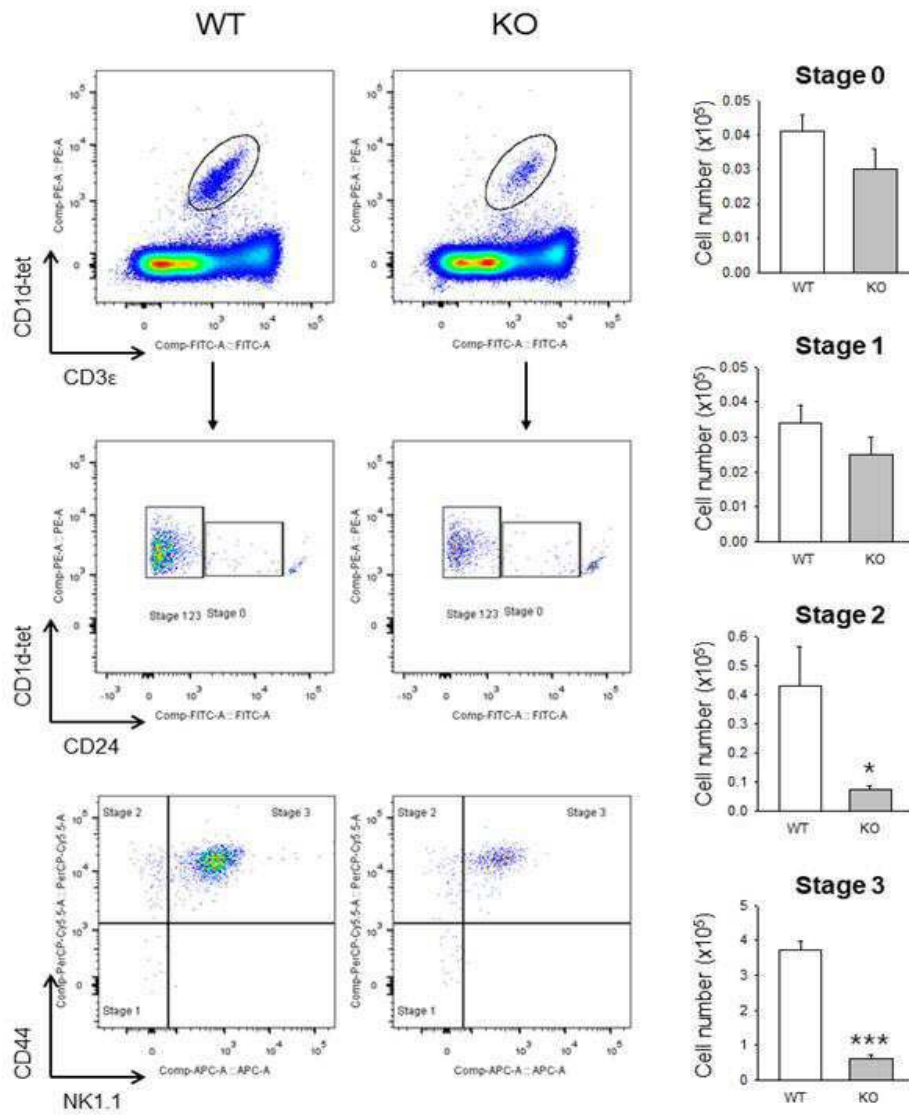
도면2b



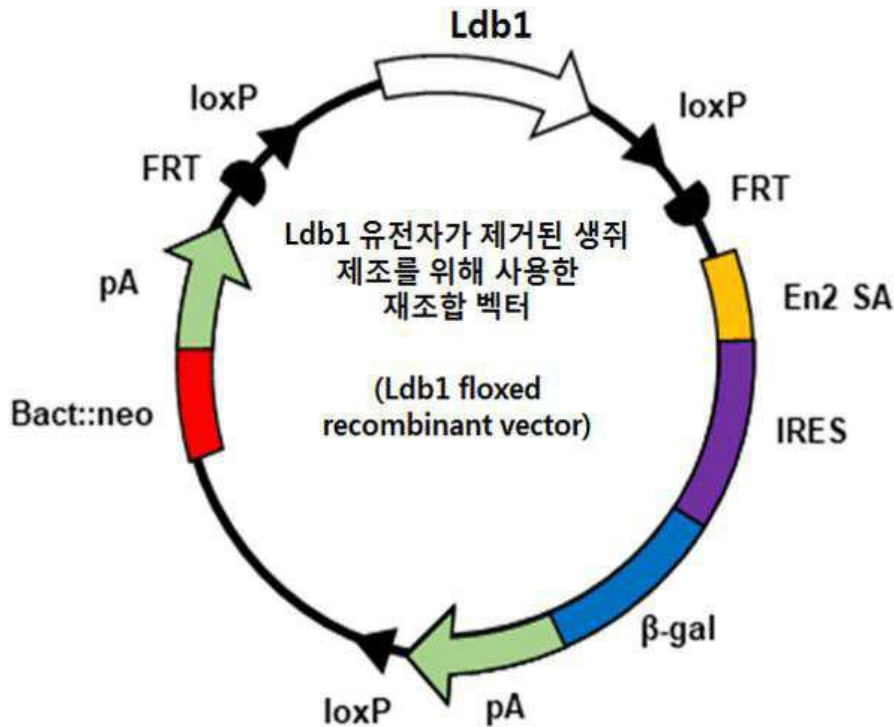
도면2c



도면3



도면4



서열 목록

<110>	Industry Academic Cooperation Foundation of Korea University	
<120>	Use of LDB1 having regulation of differentiation of invariant NKT cell	
<130>	NPDC70667	
<160>	15	
<170>	KoPatent In 3.0	
<210>	1	
<211>	1236	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	LDB1 gene sequence	
<400>	1	
atgtcagtgg gctgtgcctg tcttggttgt tctcaaagt cattcaagct gtactcgccg		60
aaggagcccc cgaacggcaa cgctttcct cctttccacc ccggcaccat gctggatcgg		120
gatgtgggccc caactcccat gtaccacact acatacctgg agcctgggat cgggaggcac		180
acaccatatg gtaaccaaac cgactataga atatttgagc ttaacaaacg gctacagaac		240
tggacagagg agtgtgacaa tctctggtgg gatgctttca caactgagtt ctttgaagat		300

gacgccatgc tgaccatcac tttctgcttg gaggatggac caaagagata taccattggc 360
 cggaccctga taccacgcta cttccgaagc atttttgagg ggggtgccac agagctgtac 420
 tacgtgctca agcaccctca ggaggcattc cacagcaact tcgtgtccct cgactgtgac 480
 cagggcagca tggtagacca gcacggcaaa cccatgttta cccaggtgtg tgtggaaggc 540
 cggttgtacc tggagttcat gtttgacgac atgatgcgga taaagacgtg gcacttcagc 600

atccggcaac acagagagct cateccccaga agtatcctgg ccatgcacgc ccaggacccc 660
 cagatgctgg atcagctgtc caaaaacatt acccgggtgtg ggctgtccaa ttccactctc 720
 aactacctcc gactctgtgt gatactagag cccatgcagg aacttatgtc ccgccacaag 780
 acctacagcc tcagcccccg agactgcctc aagacctgcc tcttcagaa gtggcagcga 840
 atggtagcgc ctcccgcgga gcccgcacga cagcagccca gcaaacggag gaaacggaag 900
 atgtcagggg gtagcccat gagctcgggg ggtggcaaca ccaacaacag caacagcaag 960
 aagaagagcc cagccagcac cttcgtcttc tccagccagg tacctgatgt gatggtggtg 1020

ggggagccca cctgatggg cggggagtgc ggggacgagg acgagaggct catcacccgg 1080
 ctggagaaca cccagtttga cgcgccaac ggcatgtacg acgaggacag ctttaacaac 1140
 tccccgcac tgggcgcca cagcccctgg aacagcaagc ctccatccag ccaagagagc 1200
 aaatcggaga atcccacgtc acaggttcc cagtga 1236

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ldb1f1/fl F primer

<400> 2

cttatgtgac cacagccatg catgcatgtg 30

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ldb1f1/fl R primer

<400> 3

cagcaaacgg aggaacgga agatgtcag 29

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD4-cre F primer

<400> 4

gcggtctggc agtaaaaact atc 23

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CD4-cre R primer

<400> 5

gtgaaacagc attgctgtca ctt 23

<210> 6

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ldb1 shRNA 1

<400> 6

ccggaggaggag cagaagacgg aataactcga gttattccgt cttctgctcc cttttttg 58

<210> 7

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ldb1 shRNA 2

<400> 7

ccggcacaca ccatatggta accaactcga gttggttacc atatgggtgtg tgtttttg 58

<210> 8

<211> 58

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Ldb1 shRNA 3

<400> 8

ccgggcttaa caaacggcta cagaactcga gttctgtagc cgtttggtta gctttttg 58

<210> 9
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ldb1 shRNA 4
 <400> 9
 ccggcacgct acttccgaag catttctcga gaaatgcttc ggaagtagcg tgtttttg 58
 <210> 10
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ldb1 shRNA 5
 <400> 10
 ccggccaaga gagcaaatcg gagaactcga gttctccgat ttgctctctt ggtttttg 58

 <210> 11
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ldb1 shRNA 6
 <400> 11
 ccggcacgct acttccgaag catttctcga gaaatgcttc ggaagtagcg tgtttttg 58
 <210> 12
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ldb1 shRNA 7
 <400> 12
 ccggtgacga catgatgcgg ataaactcga gtttatccgc atcatgtcgt catttttg 58
 <210> 13
 <211> 58
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Ldb1 shRNA 8
 <400> 13

ccgggggagc agaagacgga ataaactcga gtttattccg tcttctgctc cctttttg 58

<210> 14

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ldb1 shRNA 9

<400> 14

ccggagcacg gcaaaccat gtttactcga gtaaacaatgg gtttgccgtg cttttttg 58

<210> 15

<211> 58

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Ldb1 shRNA 10

<400> 15

ccggatggta accaaaccga ctatactcga gtatagtcgg tttggttacc attttttg 58