(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0077804
(43) 공개일자 2017년07월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A01K 67/027* (2006.01) *C12N 5/0783* (2010.01)
(52) CPC특허분류
*A01K 67/0275* (2013.01)
*C12N 5/0636* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0175708
(22) 출원일자 2016년12월21일
심사청구일자 2016년12월21일
(30) 우선권주장
1020150187227 2015년12월28일 대한민국(KR)

(71) 출원인
**세종대학교산학협력단**
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
**홍석만**
경기도 성남시 분당구 판교원로 237, 703동 504호 (판교동, 모아미래도아파트7단지아파트)
**이성원**
충청남도 천안시 서북구 성정8길 14, 206호 (성정동, 활림2차목련아파트)
**박현정**
경기도 안산시 단원구 와동공원로8길 54 (와동)
(74) 대리인
**특허법인태백**

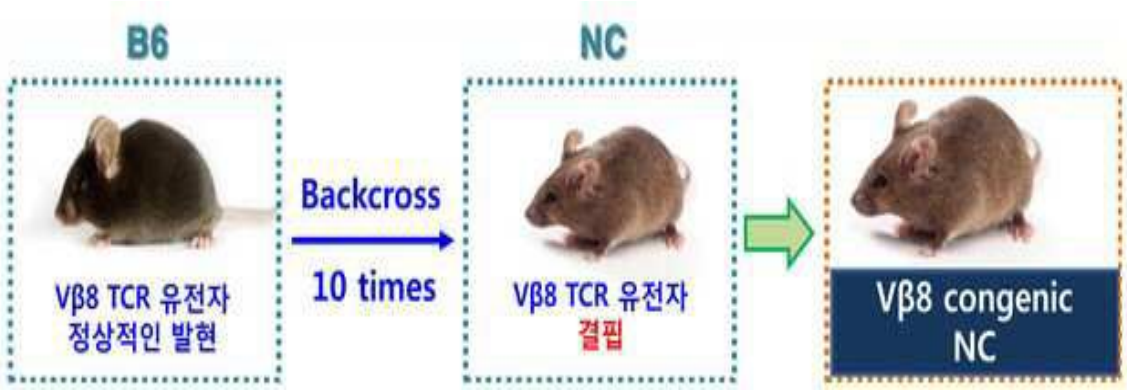
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **Vβ8 유전자를 포함하는 아토피 피부염 동물모델 및 이를 이용한 약제 스크리닝 방법**

## (57) 요 약

본 발명은 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 포함하는 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 교배하여 얻어진 이형접합 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 역 교배하여 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포를 갖는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 동물모델에 관한 것으로, NC/Nga 생쥐를 활용한 아토피 질환 연구에 있어서, TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현시키는 인간 아토피 피부염과 가장 유사한 동물모델을 제공할 수 있다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
*C12N 5/0646* (2013.01)
*A01K 2227/105* (2013.01)
*A01K 2267/0393* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2013R1A1A2010772
부처명 교육과학기술부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 일반연구자지원사업
연구과제명 아토피 피부염에서 SRG3의 면역조절 기능 연구
기 여 율 1/1
주관기관 세종대학교 산학협력단
연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 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, TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포를 갖는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 동물모델.

### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 포함하는 동물은 B6 생쥐인 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 동물모델.

### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 아토피 피부염 유발 동물은 NC/Nga 생쥐인 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 동물모델.

### 청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 이형접합 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 역 교배하는 단계는 10세대 이상 진행하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 동물모델.

### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포는 아토피 피부염을 유발하는 포도상구균 또는 상기 포도상구균에서 분비되는 장내독소 B(Staphylococcal enterotoxin B; SEB)에 의해 활성화되는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 동물모델.

### 청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포는 CD4 T 세포, CD8 T 세포 및 자연살해 T (NKT)세포로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 동물모델.

### 청구항 7

청구항 1에서 제조된 아토피 피부염 동물모델에 아토피 피부염 치료 후보 물질을 투여하는 단계; 및

상기 아토피 피부염 치료 후보 물질의 아토피 치료 효과를 측정하는 단계를 포함하는 아토피 피부염 치료제 스크리닝 방법.

### 청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 아토피 피부염 치료 후보 물질의 효과를 측정하는 단계는 출혈, 홍반, 흉터, 건조, 벗겨짐, 진무름, 부종 및 태선화로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상을 측정하여 아토피 피부염 치료 효과를 확인하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 치료제 스크리닝 방법.

### 청구항 9

청구항 1에서 제조된 아토피 피부염 동물모델에 아토피 피부염 치료 후보 물질을 투여하는 단계; 및

상기 아토피 피부염 치료 후보 물질에 의한 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포의 활성 감소를 확인하는 단계를 포함하는 아토피 피부염 치료제 스크리닝 방법.

### 청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포는 CD4 T 세포, CD8 T 세포 및 자연살해 T (NKT)세포로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 치료제 스크리닝 방법.

**청구항 11**

청구항 9에 있어서, 상기 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포는 아토피 피부염을 유발하는 포도상구균 또는 상기 포도상구균에서 분비되는 장내독소 B(Staphylococcal enterotoxin B; SEB)에 의해 활성화되는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 치료제 스크리닝 방법.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 Vβ8(TCR variable beta 8 chain) 유전자를 갖는 아토피 피부염 동물 모델 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 환자에게는 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 제2형 T세포(Th2)에 의하여 분비되는 면역글로블린E(IgE)의 혈중수준이 증가할 뿐 아니라, Th2에 의해 분비되는 인터루킨-4(IL-4). 인터루킨-5(IL-5)의 혈중수준이 증가하는 것으로 보고되어 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] 포도상구균은 그람 양성균으로서 30종류 이상의 세포외 단백질을 생산한다. 이들 대부분이 포도상구균의 병원성에 기여하거나 독성력을 증가시키는 것으로 알려져있다. 이들 물질에는 여러 종류의 외독소가 포함되어 있는데, 이들 외독소는 모두 초항원으로 작용할 수 있다. 초항원이란 T 세포를 활성화시키는 세균성 및 바이러스성 단백질로, T 세포를 활성화시키는데 있어 고유한 특성을 가지고 있다.

[0005] 보통의 항원은 항원제시세포를 통해 주조직적합복합체(MHC) Class Ⅱ 항원으로 제시되어 T 세포 수용체의 MHC Class Ⅱ 분자/펩타이드와의 결합부위에 결합하는 반면, 초항원은 항원제시세포의 MHC Class Ⅱ 항원과 T 세포 수용체(TCR) β 사슬의 variable chain에 직접 결합이 가능하다.

[0006] 포도상구균 장내독소 B(Staphylococcal enterotoxin B; SEB)역시 초항원으로 T 세포 수용체(TCR)의 variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 활성화시켜 아토피 를 유도하는 것으로 확인되었다.

[0007] 그러나 인간 아토피 피부염과 유사한 임상적, 병리적, 조직학적 특징을 나타내는 것으로 확인되어 현재까지 아토피 피부염의 동물 모델로 사용된 NC/Nga 생쥐는 T 세포 수용체(T Cell Receptor, TCR) 유전자 중 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자가 자연적으로 제거되어 있으며, Vβ8 유전자의 결핍으로 인하여 NC/Nga 생쥐는 Vβ8 chain을 발현하는 CD4 T 세포, CD8 T세포 및 자연살해 T 세포가 제거되어 있는 것이 확인되었다.

[0008] 따라서, 기존의 NC/Nga 생쥐는 $V\beta8^{+}$ T 세포군의 결핍으로 인하여 정상적인 T 세포군을 가지고 있지 않아 포도상구균 장내독소 B에 의해 발병되는 아토피를 치료하거나 예방할 수 있는 신물질의 탐색 및 효능 평가에서 있어, in vivo 모델에서 아토피 피부염에 대한 $V\beta8^{+}$ T 세포의 면역학적 영향을 조사하는 데에 한계가 있었다. 그러나 현재까지 Vβ8 유전자를 발현하는 NC/Nga 생쥐의 개발 또는 실험적 보고가 전무한 상황이다.

## *선행기술문헌*

### *특허문헌*

[0009] (특허문헌 0001) 일본공개특허 제2005-304365호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 포함하는 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 교배하여 얻어진 이형접합 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 역 교배하여 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포를 갖는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 동물모델을 제공하여, NC/Nga 생쥐를 활용한 아토피 질환 연구에 있어서, 가장 인간 아토피 피부염과 유사한 동물모델을 제공하고자 한다.

### 과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 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, TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포를 갖는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 동물모델을 제공한다.

### 발명의 효과

[0012] 본 발명은 TCR variable beta 8 chain(Vβ8)가 발현되는 T 세포가 자연적으로 제거된 NC/Nga 생쥐에 Vβ8 유전자를 발현시키면서 아토피 피부염을 나타낼 수 있는 동물모델을 제공함으로써, TCR variable beta 8 chain(Vβ8)이 발현되는 T 세포를 가진 인간 아토피 피부염에 대한 질병 연구 및 치료제 개발에 효과적으로 사용될 수 있으며, Vβ8 유전자와 아토피 피부염 질환과의 상관관계를 연구하는데 매우 유용하게 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐 제작과정에 대한 모식도이다.

도 2는 NC/Nga 생쥐에서 TCR Vβ8 chain 유전자를 가진 NC/Nga 생쥐를 선별하기 위한 PCR 결과로, 겔(Gel) 사진의 첫 번째 줄은 DNA 사이즈를 측정하는 DNA ladder를 보여주며 두 번째 칸은 양성대조군인 B6 생쥐의 genomic DNA에서 150 base pair 사이즈의 Vβ8 유전자가 증폭된 것이 확인되었으며, 세 번째 칸에서는 음성대조군인 NC/Nga 생쥐에서 뽑은 genomic DNA는 Vβ8 유전자가 증폭되지 않은 것을 확인하였으며, 네 번째 칸부터 여덟 번째 칸은 Vβ8 congenic NC/Nga을 선별할 생쥐의 PCR 결과로, 이 중 네 번째와 여섯 번째 칸은 Vβ8 유전자를 발현하는 Vβ8 congenic NC/Nga로 확인되었으며 (①, ③), 나머지는 Vβ8 유전자를 발현하지 않는 littermate NC/Nga 생쥐(②, ④, ⑤)를 확인한 결과이다.

도 3은 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐의 T 세포에서 Vβ8 chain 발현 확인한 결과로, 도 3A는 littermate NC/Nga와 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐에서 CD4 T 세포와 CD8 T 세포의 발현 여부를 확인한 결과이며, 도 3B는 littermate NC/Nga와 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐에서 Vβ8 TCR을 발현하는 면역세포의 존재 여부를 확인한 결과이다.

도 4는 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐에서 Vβ8 chain을 발현하는 NKT 세포를 확인한 결과이다.

도 5는 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐에서 아토피 피부염 유도를 확인한 결과로, 도 5A는 Vβ8 congenic NC/Nga (N10) 생쥐의 아토피 피부염 증상인 출혈, 홍반, 흉터, 건조, 벗겨짐, 진무름, 부종 및 태선화를 확인한 사진이며, 도 5B는 12주 동안 2주 간격으로 아토피 피부염 clinical score를 측정한 결과이다.

도 6은 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐에 포도상구균 장내독소 B(SEB) 주입 후 Vβ8 TCR을 발현하는 CD4 T 세포와 CD8 T 세포의 비장 내 분포를 확인한 결과이다.

도 7은 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐에 포도상구균 장내독소 B(SEB) 주입 후 Vβ8 TCR을 발현하는 CD4 T 세포와 CD8 T 세포에서 Nur77 활성화 분자의 발현을 확인한 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 본 발명은 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 포함하는 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 교배하는 단

계; 및 상기 교배를 통하여 얻어진 이형접합 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 역 교배하는 단계를 포함하여 이루어지며, TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포를 갖는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 동물모델을 제공한다.

[0015] 상기 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 포함하는 동물은 B6 생쥐일 수 있다.

[0016] 또한, 본 발명에서 상기 아토피 피부염 유발 동물모델은 인간 아토피 피부염과 유사한 임상적, 병리적, 조직학적 특징을 나타내는 어떠한 동물모델이라도 무방하나, 보다 바람직하게는 NC/Nga 생쥐이다.

[0017] 상기 이형접합 동물에 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자가 포함되어 있는지 여부는 Vβ8 유전자를 검출할 수 있는 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction; PCR)을 통하여 확인이 가능하다.

[0018] 상기 이형접합 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 역 교배하는 단계는 10세대 이상 진행할 수 있다. 이는 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 포함하는 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 교배하여 얻어진 이형접합 동물모델이 완전한(99% 이상) 아토피 피부염 형질로 전환하도록 하기 위함이다.

[0019] 상기 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포는 아토피 피부염을 유발하는 포도상구균 또는 상기 포도상구균에서 분비되는 장내독소 B(Staphylococcal enterotoxin B; SEB)에 의해 활성화될 수 있으며, 상기 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포는 CD4 T 세포, CD8 T 세포 및 자연살해 T(NKT)세포로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 아토피 피부염 동물모델에 아토피 피부염 치료 후보 물질을 투여하는 단계; 및 상기 아토피 피부염 치료 후보 물질의 아토피 치료 효과를 측정하는 단계를 포함하는 아토피 피부염 치료제 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.

[0021] 보다 상세하게는 상기 아토피 피부염 치료 후보 물질의 효과를 측정하는 단계는 출혈, 홍반, 흉터, 건조, 벗겨짐, 진무름, 부종 및 태선화로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상을 측정하여 아토피 피부염 치료 효과를 확인할 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 아토피 피부염 동물모델에 아토피 피부염 치료 후보 물질을 투여하는 단계; 및 상기 아토피 피부염 치료 후보 물질에 의한 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포의 활성 감소를 확인하는 단계를 포함하는 아토피 피부염 치료제 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.

[0023] 상기 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포는 CD4 T 세포, CD8 T 세포 및 자연살해 T(NKT)세포로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0024] 상기 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포는 아토피 피부염을 유발하는 포도상구균 또는 상기 포도상구균에서 분비되는 장내독소 B(Staphylococcal enterotoxin B; SEB)에 의해 활성화될 수 있다.

[0026] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0028] **<실시예 1> Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐 모델 제작**

[0029] 도 1과 같은 과정으로 Vβ8 TCR 유전자를 발현하는 NC/Nga 생쥐 모델을 제작하였다.

[0030] 먼저, Vβ8 TCR 유전자와 아토피 피부염 유발 형질을 함께 갖는 이형접합 동물을 얻기 위해, B6 와 NC/Nga (NC) 야생형(WT) 생쥐를 중앙실험동물 회사(Seoul, Korea)로부터 구입한 후 교배시켰다.

[0031] 교배 후 TCR Vβ8 chain (TCRBV8) 유전자가 결실되어 있는 NC/Nga 생쥐와 TCRBV8 유전자가 정상적으로 발현하는 B6 생쥐를 교배하여 태어난 자손 생쥐의 꼬리 일부를 잘라내었다.

[0032] 세포 용해 버퍼((0.5M EDTA+1M Tris-HCl+1M NaCl+10% SDS) 500 μl와 프로테아제 K 5 μl를 이용하여 잘라낸 꼬리를 용해시킨 후, 2-아이소프로판올을 이용하여 DNA를 응집시키고, 응집된 DNA를 Tris-Cl 버퍼에 용해시켜 genomic DNA를 추출하였다.

[0033] 추출된 genomic DNA와 TCR Vβ8 chain 유전자인 TCRBV8에 특이적으로 결합하는 프라이머(Forward=TCA AGT GAG

TGC TGG TCA GG, Reverse=ACT GCC ACC TTG TTT CTT GG)를 이용하여 표 1과 같은 PCR 조성물을 이용하여 PCR 방법으로 유전자를 증폭시키고, 증폭된 유전자를 아가로스 겔에서 전기영동하여 이동시켰다.

[0034] 이동된 DNA를 에티듐 브로마이드로 형광 염색한 후 UV 조사장치를 통하여 PCR 밴드 크기를 측정하여 유전자 증폭 여부를 확인하였다.

표 1

[0035]

| 성분 | 용량 |
|---|---|
| 3DW | 25 μl |
| 10×buffer | 3 μl |
| 10mM dNTP | 0.6 μl |
| Forward primer(100 pmole/μl) | 0.1 μl |
| Reverse primer(100 pmole/μl) | 0.1 μl |
| Tag polymerase(5 Unit/μl) | 0.2 μl |
| Total | 30 μl |

[0036] 그 결과, 도 2와 같이 세 번째 칸에서는 음성대조군인 NC/Nga 생쥐에서 뽑은 genomic DNA는 Vβ8 유전자가 증폭되지 않은 것이 확인된 반면, 네 번째 칸부터 여덟 번째 칸은 Vβ8 congenic NC/Nga을 선별할 생쥐의 PCR 결과로, 이 중 네 번째와 여섯 번째 칸은 Vβ8 유전자를 발현하는 Vβ8 congenic NC/Nga로 확인되었으며 (①, ③), 나머지는 Vβ8 유전자를 발현하지 않는 littermate NC/Nga 생쥐에 해당된다(②, ④, ⑤).

[0037] 상기와 같은 방법으로 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐를 선별하여 10 세대 이상 역 교배 선별과정을 수행하여 Vβ8 유전자를 제외한 나머지 유전자를 NC/Nga 유전자로 전환된 NC/Nga 생쥐를 제작하였다.

[0039] **<실시예 2> Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐에서 T세포의 Vβ8 chain 발현 확인**

[0040] B6 생쥐, Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐 및 한배 새끼(littermate) NC/Nga 생쥐의 비장 내 면역세포를 각각 추출 후 ACK 용해 버퍼(red cell lysis buffer)를 이용하여 적혈구를 제거하였다.

[0041] CD4 T 세포와 CD8 T 세포에서 Vβ8 chain의 발현을 확인하기 위해서 CD3, CD4, CD8 및 Vβ8에 특이적인 항체(BD Bioscience사)를 이용하여, 표면염색( surface staining) 방법으로 염색하고 FACS-Calibur 유세포 분석기(flow cytometer)를 이용하여 정량하였다.

[0042] 그 결과, 도 3A와 같이 littermate NC/Nga와 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐 모두에서 CD4 T 세포와 CD8 T 세포가 정상적으로 발현되는 것이 확인되었으나, 도 3B를 참고하면 littermate NC/Nga 생쥐에서는 알려진대로 Vβ8 TCR가 발현되지 못한 반면, 실시예 1에서 제작된 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐에서는 B6 생쥐와 같이 정상적으로 Vβ8 TCR을 발현하는 면역세포가 확인되었다.

[0043] 또한, ittermate NC/Nga와 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐의 비장에서 Vβ8 TCR를 주로 발현하는 것으로 알려진 NKT 세포의 유무를 확인하기 위해, 혈구를 제거한 비장 내 면역세포를 CD3 특이적인 항체와 alpha-galactosylceramide(α-GalCer, Enzo life sciences사)와 CD1d-dimer (BD Bioscience사)를 결합시킨 후 PE 형광이 결합된 IgG에 특이적 항체를 추가로 결합한 α-GalCer/CD1d-dimer PE로 표면 염색방법으로 염색하고 FACS-Calibur 유세포 분석기로 정량하였다.

[0044] 그 결과, 도 4와 같이 littermate NC/Nga 생쥐는 Vβ8 유전자의 결핍에 의해서 NKT 세포가 거의 존재하지 않는 반면, Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐는 Vβ8 유전자를 발현함에 따라 NKT 세포가 발달하여 빈도가 크게 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0046] **<실시예 3> Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐의 아토피 피부염 유도 및 확인**

[0047] 실시예 1의 방법으로 역교배된 Vβ8 congenic NC/Nga (N10) 생쥐의 아토피 피부염 동물 모델 적합성을 확인하기 위해, 무균(SPF)상태에서 자란 6주령의 역교배된 Vβ8 congenic NC/Nga (N10) 생쥐와 littermate 대조군 NC/Ng 생쥐를 일반 사육 조건으로 옮기고 12주간 멸균(γ선 조사)한 사료와 가압 멸균한 물을 섭취시키면서 유지시키고, 일반 사육 조건에서 아토피 피부염 유도 후 0주부터 12주까지 clinical score를 관찰 및 측정하였는데, 임

상적 병징은 표 2와 같은 스코어링 시스템을 따라 기록하였다.

*표 2*

[0048]

| | 항목별 점수 | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 없음 | 약함 | 중증도 | 심함 |
| 출혈, 홍반 | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 흉터, 건조 | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 벗겨짐, 진무름 | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 부종 | 0 | 1 | 2 | 3 |
| 태선화 | 0 | 1 | 2 | 3 |
| | 총점=15점 | | | |

[0050] 그 결과, 도 5A와 같이 음성대조군인 무균(SPF)상태 NC/Nga 생쥐의 경우 아토피 피부염 증세가 관찰되지 않았으나, Vβ8 congenic NC/Nga (N10) 생쥐는 양성대조군인 littermate NC/Nga 생쥐와 유사하게 아토피 피부염의 증상인 출혈, 홍반, 흉터, 건조, 벗겨짐, 진무름, 부종 및 태선화가 나타났으며, 도 5B와 같이 아토피 피부염 clinical score는 12주 동안 2주 간격으로 측정한 결과, 양성대조군과 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐 모두에서 8주~12주 사이에 급격하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0052] **<실시예 4> Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐에서 T 세포의 Vβ8 chain 발현 확인**

[0053] 아토피 피부염을 유발하는 포도상구균의 장내독소 B(Staphylococcal enterotoxin B; SEB)의 MHC Ⅱ 분자는 T 세포 수용체(TCR) β 사슬의 Vβ8과 직접 결합하여 Vβ8 발현 T 세포를 활성화시키는 것으로 알려져 있다.

[0054] SEB 주입 후 TCR 자극을 통하여 활성화된 Vβ8 TCR 발현 T 세포는 빠른 시간 안에 세포분열과 함께 다량의 염증성 사이토카인을 분비한다. SEB와 같은 초항원에 의해 증폭된 T 세포는 이후 activation-induced cell death을 거쳐 대부분 제거되고 일부 세포만이 anergy 상태로 전환되는 것으로 알려져 있다. 따라서 Vβ8 TCR 발현 T 세포는 SEB에 의해 활성화되면 약 6시간 안으로 빠르게 사이토카인을 다량 분비한 후 apoptosis와 anergy 반응으로 세포수 및 활성이 크게 감소하게 된다.

[0055] Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐에서 존재하는 Vβ8 발현 세포의 SEB 반응 여부를 확인하기 위해, 실시예 1의 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐의 복강 내로 SEB 25㎍을 주입하고 16시간 후 생쥐의 비장에서 CD4 T 세포와 CD8 T 세포의 Vβ8 TCR 발현 비율을 FACS-Calibur 유세포 분석기(flow cytometer)를 이용하여 확인하였다.

[0056] 그 결과, 도 6과 같이 Vβ8 TCR이 발현된 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포 모두 SEB에 의해 유도되는 apoptosis와 anergy 반응에 의해 SEB가 처리되지 않은 대조군보다 약 1/3으로 감소하였다.

[0057] 또한, TCR을 통한 신호전달이 고아 핵 수용체(orphan nuclear receptor) 중의 하나인 Nur77의 발현 여부를 통해 알 수 있다는 것이 보고됨에 따라, Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐에 주입된 SEB에 의해서 Vβ8 TCR 발현 T 세포가 TCR을 통해 활성화되는지 여부를 확인하기 위해 CD4 T 세포와 CD8 T 세포에서 Nur77 발현을 세포내 염색(intracellular staining)하여 FACS-Calibur 유세포 분석기(flow cytometer)를 이용하여 확인하였다.

[0058] 그 결과, 도 7과 같이 CD4 T 세포와 CD8 T 세포 모두 Nur77의 세포 내 발현이 SEB가 처리되지 않은 대조군보다 높게 증가한 것이 확인되었다.

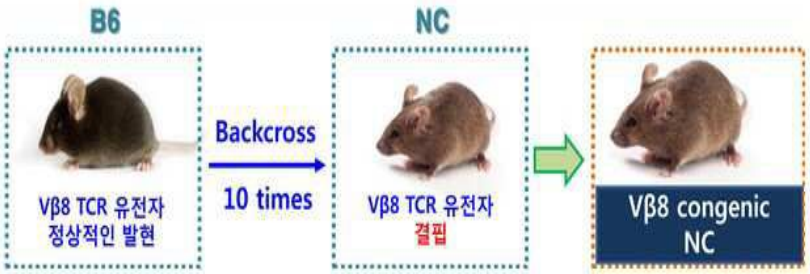
[0060] 상기 결과들로부터 실시예 1에서 제작된 Vβ8 congenic NC/Nga (N10) 생쥐는 정상적인 T 세포군을 재확립한 이후에도 기존의 NC/Nga 생쥐와 마찬가지로 아토피 피부염이 유도되는 것으로 확인되었으며, Vβ8을 발현하는 T 세포는 SEB와 같은 세균의 독소에 의해 활성화되는 것이 확인됨에 따라, 정상적인 T 세포군을 가진 사람의 아토피 피부염 모델로서 매우 적합한 새로운 아토피 피부염 동물모델로 사용될 수 있다.

[0062] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서,

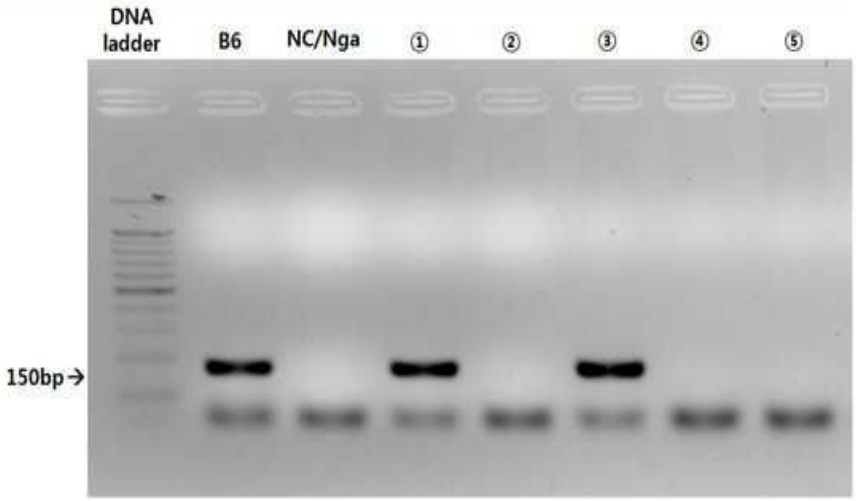
이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 도면

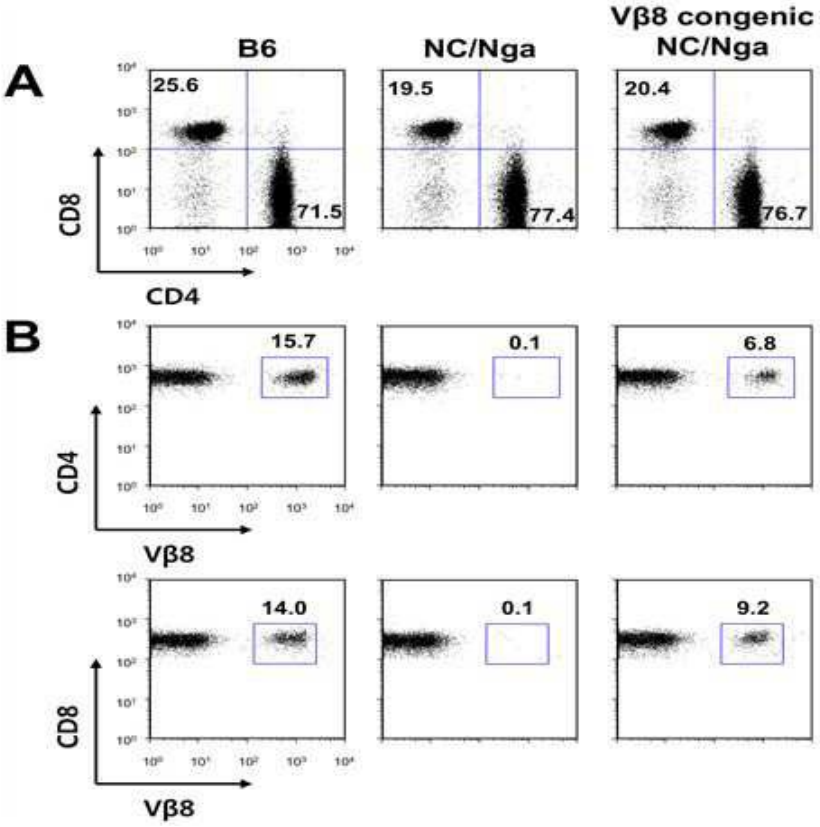
### 도면1



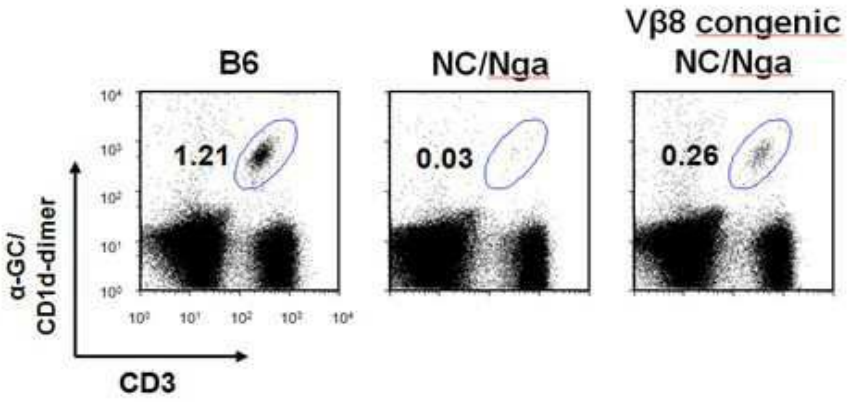

### 도면2



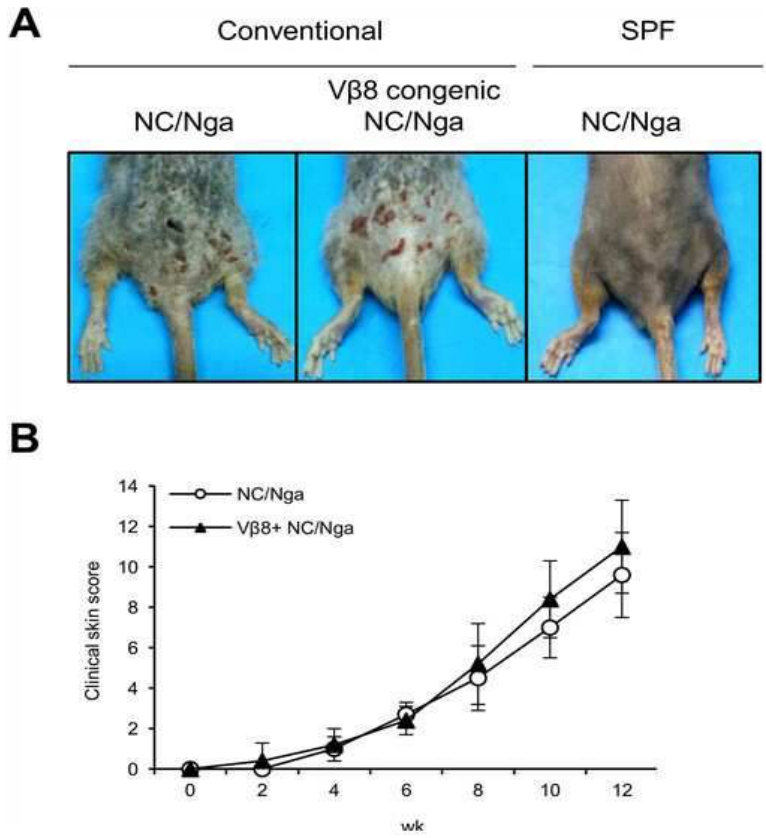
도면3


B6
NC/Nga
Vβ8 congenic
NC/Nga
A
25.6
71.5
19.5
77.4
20.4
76.7
CD8
CD4
B
15.7
0.1
6.8
CD4
Vβ8
14.0
0.1
9.2
CD8
Vβ8

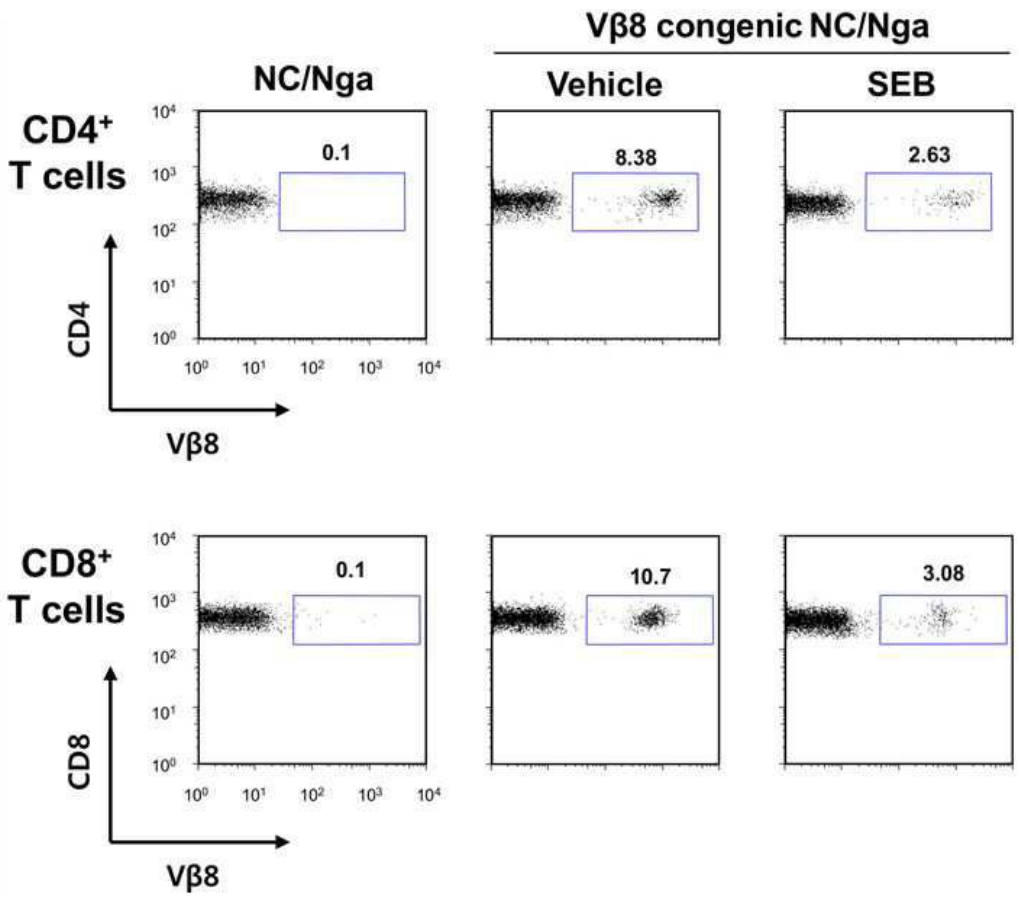
도면4


B6
NC/Nga
Vβ8 congenic
NC/Nga
1.21
0.03
0.26
α-GC/
CD1d-dimer
CD3

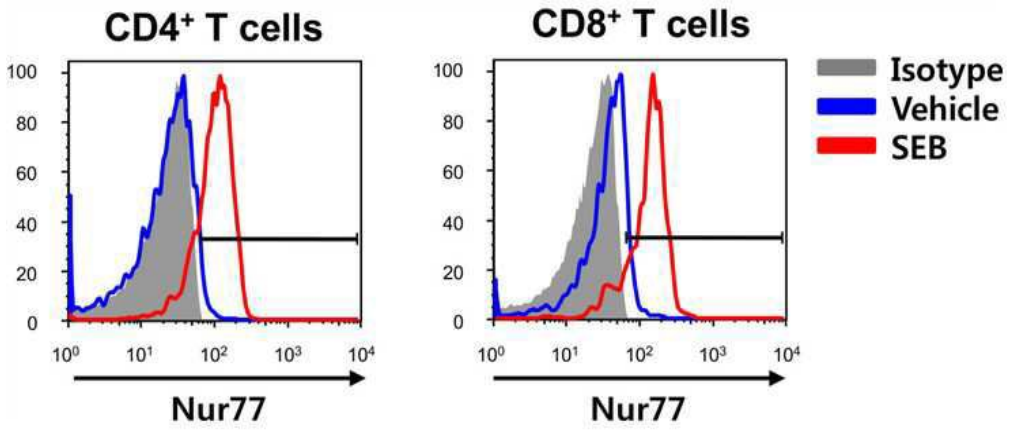
도면5


A
Conventional
SPF
Vβ8 congenic
NC/Nga
NC/Nga
NC/Nga
B
NC/Nga
Vβ8+ NC/Nga
Clinical skin score
wk

도면6


Vβ8 congenic NC/Nga
NC/Nga
Vehicle
SEB
CD4+
T cells
0.1
8.38
2.63
CD4
Vβ8
CD8+
T cells
0.1
10.7
3.08
CD8
Vβ8

도면7


CD4+ T cells
CD8+ T cells
100
80
60
40
20
0
10⁰
10¹
10²
10³
10⁴
Nur77
Isotype
Vehicle
SEB