

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2013-0012455 (43) 공개일자 2013년02월04일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 5/0784 (2010.01) C12N 1/38 (2006.01) C07K 14/195 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0073680 (22) 출원일자 2011년07월25일 심사청구일자 2011년07월25일		(71) 출원인 충남대학교산학협력단 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교) (72) 발명자 신성재 대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의학전 문대학원 미생물학교실 (문화동) 김화중 대전광역시 중구 문화로 266, 충남대학교 의학전 문대학원 미생물학교실 (문화동) (뒷면에 계속) (74) 대리인 김순웅

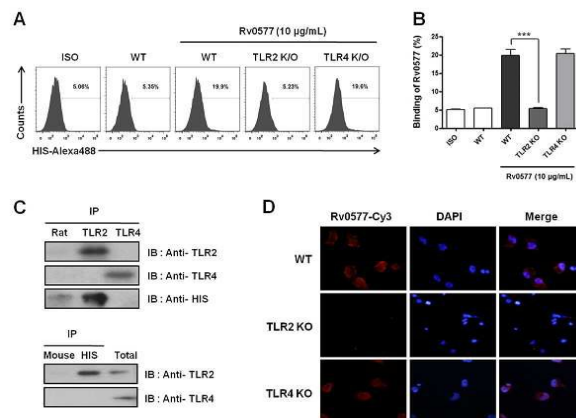
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **결핵균의 Rv0577 단백질을 이용한 수지상 세포의 성숙방법**

(57) 요약

본 발명은 RV0577 단백질을 유효 성분으로 포함하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물에 관한 것이다. 또한 본 발명은 미성숙 수지상 세포를 분리하는 단계; 분리된 미성숙 수지상 세포에 RV0577 단백질을 처리하는 단계; 를 포함하는 미성숙 수지상 세포의 성숙화 유도방법에 관한 것이다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

변의홍

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

김우식

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

김중석

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

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-0017906
부처명	교육과학기술부
연구사업명	기초연구사업-중견연구자지원사업-핵심연구지원사업
연구과제명	항산균의 병원성인자에 의한 면역세포의 분화조절 기전 연구
주관기관	충남대학교 산학협력단
연구기간	2011.05.01 ~ 2012.04.30이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호	2011-0006228
부처명	교육과학기술부
연구사업명	기초의과학 연구센터
연구과제명	감염신호네트워크응용연구센터
주관기관	충남대학교 산학협력단
연구기간	2011.03.01 ~ 2012.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

RV0577 단백질을 유효 성분으로 포함하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 RV0577 단백질은 결핵균 (*M.tuberculosis*) 유래의 단백질인 것을 특징으로 하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 RV0577 단백질은 수지상 세포의 CD(Cluster of Differentiation)80, CD86, MHC (Major Histocompatibility Complex)-클래스 I, II의 발현을 증가시키는 단백질임을 특징으로 하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 RV0577 단백질은 1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 포함되는 것을 특징으로 하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물.

청구항 5

- a) 미성숙 수지상 세포를 분리하는 단계;
- b) 분리된 미성숙 수지상 세포에 RV0577 단백질을 처리하는 단계; 를 포함하는 미성숙 수지상 세포의 성숙화 유도방법.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 유도 방법은 수지상 세포를 인터루킨-12의 분비량이 증가된 수지상 세포로 성숙 유도하는 방법임을 특징으로 하는 미성숙 수지상 세포의 성숙화 유도 방법.

청구항 7

제5항에 있어서, 상기 RV0577 단백질을 1 내지 10 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하는 것을 특징으로 하는 미성숙 수지상 세포의 성숙화 유도방법.

명세서

기술분야

본 발명은 수지상 세포 성숙화 유도 조성물 및 수지상 세포를 성숙시키는 방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는 결핵균 (*M.tuberculosis*) 유래의 Rv0577 단백질을 유효 성분으로 포함하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물 및 이를 이용하여 미성숙 수지상 세포를 성숙 수지상 세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 수지상 세포 또는 수상돌기 세포 (dendritic cell, DC)는 포유동물의 면역 계의 일부를 이루는 면역 세포이다. 이 세포들은 항원 물질을 처리하여 그것을 표면에 나타나게 함으로써 면역 계의 다른 세포가 인식하게 하는 항원 발현 세포의 역할을 한다. 수지상 세포는 주로 피부, 코, 폐, 위 및 장의 내벽과 같이 외부 환경과 접하는 조직에 소량 존재하며 특히 피부에 있는 세포를 랑게르한스 세포라 한다. 수지상 세포는 혈액 중에서 미성숙한 상태로 발견될 수 있으며, 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 변화하며, 높은 엔도시토시스 활성 및 T-세포 활성 능력을 특징으로 한다. 미성숙 수지상 세포는 주변에 있는 바이러스 및 박테리아와 같은 병원체를 끊임없이 탐식한다. 이것은 TLR (toll-like receptor)와 같은 패턴 인식 수용체 (pattern recognition receptor, PRR)를 통해서 가능하다. TLR은 병원체의 서브셋 상에서 발견되는 특정 화학적 특징을 인식하며, 미성숙 수지상 세포는 살아있는 자가세포로부터 니블링 (nibbling)이라는 과정을 통해 세포막을 탐식한다. 이들이 현존하는 항원과 접하게 되면, 성숙 수지상 세포로 활성화되어 림프절로 이동한다. 미성숙 수지상 세포는 병원체를 탐식하고 자신의 단백질을 작은 조각들로 분해해서, 성숙하였을 때 이 조각들이 MHC (Major Histocompatibility Complex) 분자를 이용하여 그 세포 표면에 나타나게 된다. 동시에, 그것은 CD (Cluster of Differentiation)80, CD86, 및 CD40과 같이 T-세포 활성화에서의 공동-수용체로 작용하는 세포 표면 수용체를 증가시킨다. 그것들은 비 항원성 특정 공동자극 신호와 함께 병원체에서 유래한 항원을 나타냄으로써 헬퍼 T-세포, 킬러 T-세포 뿐만 아니라, B 세포를 활성화시킨다.
- [0004] 모든 헬퍼 T-세포는 하나의 특정 항원에 대해 특이적이다. 오직 전문적인 항원 발현 세포(대식세포, B림프구 및 수지상 세포)만이 맞는 항원이 존재할 때 나머지 헬퍼 T-세포를 활성화시킨다. 그러나 대식세포와 B림프구는 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] 완전히 성숙한 수지상 세포는 미숙한 DC와는 정성적 및 정량적으로 상이하다. 완전히 성숙한 DC는 고 수준의 MHC (Major Histocompatibility Complex)I형 및 II형 항원, 및 고수준의 T 세포 공동자극성 분자, 즉 CD80 및 CD86을 발현시킨다. 이들 변화는 수지상 세포의 T 세포 활성화 능력을 증가시키는데, 이는 이들이 세포 표면상의 항원 밀도를 증가시킬 뿐만 아니라, 예를 들어 CD28과 같은 T 세포 상의 공동자극성 분자의 대응물을 통한 T 세포 활성화의 양을 증가시키기 때문이다. 추가로, 성숙한 DC는 다량의 사이토카인을 생성하며, 이 사이토카인은 T 세포 반응을 자극하고 유도한다. 이들 사이토카인 중 2 가지는 인터루킨 10 (IL-10) 및 인터루킨 12 (IL-12)이다. 이들 사이토카인은 유도된 T 세포 반응의 방향에 대해 정반대의 효과를 갖는다. IL-10이 생성되면 Th-2형 반응이 유도되는 반면, IL-12가 생성되면 Th-1 형 반응이 유도된다. 후자의 반응이 세포 면역 반응이 요구되는 경우, 예를 들면 암 면역요법에서 특히 바람직하다. Th-1형 반응에 의해 세포 면역계의 작동인자 공격수단인 세포독성 T 림프구(CTL)가 유도 및 분극화된다. 이러한 작동인자 공격수단은 종양 성장을 억제하는 데 가장 효과적이다. IL-12는 또한 천연 킬러 (NK) 세포의 성장을 유도하고, 항-혈관신생 활성을 갖고, 이는 모두 효과적인 항-종양 공격수단이다. 따라서, IL-12를 생성하는 수지상 세포의 사용은 면역자극에 사용하는데 이론상 최적으로 적합하다.
- [0007] 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.

- [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 탐식 작용을 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, 알레르기성 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 수지상 세포의 분화를 조절(활성화)하는 물질들(LPS, TNF- α , IL-1 β)은 많이 알려져 있으나 생체독성의 부작용으로 생체への 직접적인 응용에 문제가 많다.
- [0010] 마이코박테리움 (Mycobacterium) 속(屬)에는 결핵, 우형결핵 (牛形結核), 나병 (癩病)과 같이 사람과 동물에 심각한 질병을 일으키는 균종 (species)뿐 아니라, 기회감염균으로 일컬어지는 균종, 그리고 자연환경에서 볼 수 있는 사물 (死物)기생의 균종 (saprophytic species) 등 현재까지 약 72 종(species)이 알려져 있으며, 그 중 인체 질환과 관련된 것이 25종에 이르는 것으로 알려져 있다.
- [0011] 마이코박테리아 감염증 가운데 가장 많은 질병은 결핵 (Tuberculosis)으로, 강한 병원성을 갖는 결핵균군 (群)(M.tuberculosis complex: TB complex)으로 구분되는 M. tuberculosis, M. bovis, M.africanum, M. microti의 4 종이 원인균이며, 이 중 결핵균 (M. tuberculosis)이 가장 흔하고 중요한 원인균으로 알려져 있다. 결핵은 국내에서 아직까지도 중요시되는 질환이며, 전세계적으로는 해마다 약 8 백만의 새로운 환자가 발생하는 것으로 보고되고 있다.
- [0012] 상기와 같이 수지상 세포는 신체 자체의 면역 기능을 높이는데 중요한 역할을 하고 있어, 수지상 세포의 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
- [0013] 본 발명자들은 상기와 같은 요구를 충족시키기 위하여 연구를 거듭한 결과 결핵균에서 유래한 Rv0577이 수지상 세포를 효과적으로 성숙시킨다는 사실을 발견함으로써 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0014] 본 발명은 Rv0577 단백질을 유효성분으로 포함하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물을 제공하고 Rv0577 단백질을 이용하여 수지상 세포의 성숙화를 유도하는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 Rv0577 단백질을 유효성분으로 포함하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물을 제공한다.
- [0016] 또한 본 발명은 a) 미성숙 수지상 세포를 분리하는 단계; b) 분리된 미성숙 수지상 세포에 Rv0577 단백질을 처리하는 단계; 및 c) 미성숙 수지상 세포가 성숙 수지상 세포로 성숙하는 단계; 를 포함하는 미성숙 수지상 세포의 성숙화 유도 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명의 결핵균 유래의 Rv0577 단백질을 이용하면 미성숙 수지상 세포가 성숙 수지상 세포로 분화가 유도됨으로써 신체의 면역 반응을 효과적으로 활성화시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1A는 클로닝을 통해 분리한 재조합 단백질 Rv0577을 나타낸 것이다. (a: His-tagged Rv0577에 대한 SDS-PAGE, b: NTA로 정제한 후 SDS-PAGE, c: 웨스턴 블롯 분석). 도 1B는 Rv0577을 처리한 수지상 세포의 생존률 측정 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 Rv0577을 처리한 수지상 세포에서 특이적인 단백질 표면 인자인 CD80, CD86과 MHC class I, II의 발현을 분석한 그래프이다.
- 도 3는 Rv0577을 처리한 수지상 세포의 사이토카인(IL-12p40/p70, IL-10, TNF- α , IL-6, IL-1 β) 분비 실험 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 Rv0577을 처리한 수지상 세포의 텍스트란-FITC 탐식능 측정 결과를 나타낸다.
- 도 5는 Rv0577을 처리한 수지상 세포의 성숙 관여 TLR 실험 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6는 Rv0577을 처리한 수지상 세포의 성숙 관여 TLR 실험 결과를 나타낸 것이다.
- 도 7은 Rv0577을 처리한 수지상 세포에서 신호 전달계의 변화를 확인한 그래프이다.
- 도 8은 Rv0577을 처리한 수지상 세포에서 신호 전달계의 변화를 억제인자들을 통하여 사이토카인(TNF- α , IL-6, IL-1 β) 분비와 단백질 표면 인자인 CD80, CD86을 통하여 확인한 그래프이다.
- 도 9A는 Rv0577에 의해 유도되는 수지상 세포의 TNF- α 및 IL-6 방출에 대한 열변성의 영향 분석 결과를 나타내며, 도9B는 Rv0577에 의해 유도되는 수지상 세포의 사이토카인 생산 (TNF- α 및 IL-6)에 대한 PMB의 영향 분석 결과를 나타낸다. 도 9C는 Rv0577에 의해 유도되는 수지상 세포의 사이토카인의 생산 (TNF- α 및 IL-6)에 대한 프로테아제 K 소화의 영향 분석 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명은 RV0577 단백질을 유효성분으로 포함하는 수지상 세포 성숙화 유도 조성물에 관한 것이다.
- [0020] 본 발명의 “Rv0577 단백질”은 결핵균으로부터 유래되는 단백질이며 780 뉴클레오티드와 261개의 아미노산으로 이루어진 단백질이다.
- [0021] 미숙한 수지상 세포는 성숙하여 성숙한 수지상 세포를 형성한다. 성숙한 수지상 세포는 항원을 포획하고 동시 자극하는 세포 표면 분자 및 각종 사이토카인의 상향-조절된 발현을 나타내는 능력을 상실한다. 특히, 성숙한 수지상 세포는 MHC I형 및 II형 항원을 미숙한 수지상 세포보다 더 높은 수준으로 발현시키고, CD (Cluster of Differentiation) 80+, CD83+, CD86+ 및 CD14-을 조절한다. 더 많은 MHC 발현으로 수지상 세포 표면상에서 항원 밀도의 증가를 유도하는 반면, 동시-자극의 분자 CD80 및 CD86의 상향 조절로, T 세포 상에 CD28과 같은 동시-자극의 분자 상응물을 통해서 T 세포 활성화 시그널을 강화한다.
- [0022] 수지상 세포의 성숙은 당해 기술분야에 공지된 방법으로 모니터링할 수 있다. 세포 표면 마커를 유세포 분석기 (flow cytometry) 및 면역 조직 화학법 등과 같은 당해 기술분야에 친숙한 검정으로 검출할 수 있다. 상기 세포를 또한 사이토카인 생성 (예, ELISA, FACS 및 다른 면역 검정)을 통해 모니터링할 수 있다.
- [0023] 또한 본 발명에 따르면 Rv0577 단백질을 처리함으로써 미성숙 수지상 세포를 성숙한 수지상 세포로 성숙시킬 수 있으며, 수지상 세포를 성숙화 하기 위한 Rv0577의 처리 농도는 이에 제한되지는 않으나 1 $\mu\text{g/ml}$ 내지 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도일 수 있다. 또한 더욱 바람직하게는 5 $\mu\text{g/ml}$ 내지 10 $\mu\text{g/ml}$ 일 수 있다.
- [0024] 본 발명은 a) 미성숙 수지상 세포를 분리하는 단계; b) 분리된 미성숙 수지상 세포에 RV0577 단백질을 처리하는 단계; 및 c) 미성숙 수지상 세포가 성숙 수지상 세포로 성숙하는 단계; 를 포함하는 미성숙 수지상 세포의 성숙화 유도방법에 관한 것이다.
- [0025] 본 발명의 수지상 세포의 성숙화 유도는 일반적으로 당업계에 정의되는 모든 성숙한 수지상 세포로의 성숙화 유도일 수 있으나, 바람직하게는 인터루킨-12의 분비량이 증가되는 수지상 세포로의 성숙 유도이다.
- [0026] 또한, 본 발명의 Rv0577을 미성숙 수지상 세포에 처리하여 세포를 성숙화 시킴에 있어서 이에 제한되는 것은 아니나 Rv0577이 TLR(toll-like receptor)2과의 결합을 함으로써 성숙화를 유도할 수 있다.
- [0027] 이하, 본 발명을 실시 예에 의하여 더욱 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시 예들은 본 발명을 더욱 쉽게 이해할

수 있도록 예시하는 것으로 본 발명의 내용이 실시 예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0028] 실시 예 1. 수지상 세포 및 Rv0577 준비

[0029] 1. 1 수지상 세포의 분리 및 유도

[0030] 수지상 세포는 마우스의 골수세포로부터 표준 프로토콜에 따라 제조하였다.

[0031] C57BL/6마우스로부터 골수 채취용 주사를 이용해 대퇴부 골수를 채취하였다. 채취한 골수를 세척한 후 적혈구를 염화암모늄을 이용하여 제거하였다. 분리한 세포를 6-웰 플레이트에서 RPMI 1640 (10 % FBS(Fetal bovine serum, 송아지 혈청), 2 mM L-글루타민, 100 U/ml 페니실린/스트렙토마이신, 50 μ M 머캅토에탄올, 0.1 mM 비필수 아미노산, 1 mM 피루브산 나트륨, 20 ng/ml GM-CSF, 20 ng/ml IL-4)을 첨가하여 8 일 동안 배양하였다. GM-CSF 및 IL-4은 수지상 세포로의 분화를 유도하기 위하여 사용하였다.

[0032] 1.2 재조합 Rv0577의 클로닝

[0033] 결핵균 게놈 DNA로부터 Rv0577를 분리하여 클로닝하였다. 정방향 프라이머의 (5' - GGGCCCCATATGCCGTCCCGGCCGCGCCG-3') 및 역방향 프라이머 (5' -GGGCCCAAGCTTAAGACGCGCACCCAGTCGAC-3')를 이용해 Rv0577 부위를 증폭시켰다. PCR 산물을 NdeI 과 HindIII로 절단하고, 발현벡터인 pET22b(+)벡터 (Novagen, Madison, WI)에 삽입하였다. Rv0577 유전자가 삽입된 pET22b(+) 벡터로 형질 전환시킨 E. coli BL21 을 37℃에서 600 nm에서의 흡광도 (OD)가 0.4 내지 0.5가 되도록 배양한 후에 1 mM의 이소프로필-D-티오갈락토 피라노사이드 (IPTG)를 첨가하고 6시간 동안 배양하였다. 발현된 단백질은 니켈-니트릴로트라이아세트산 (Ni-NTA, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 아가로스를 이용하여 제조사의 방법에 준하여 정제하였다. 최종적으로 정제한 재조합 단백질은 SDS-PAGE로 분석하였으며, 27 kDa 위치에서 확인하였다 (도 1A-b, c).

[0034] 실시 예 2. Rv0577의 세포 독성 확인

[0035] Rv0577로 자극한 수지상 세포의 세포 생존율을 측정하기 위해서, 수지상 세포를 10 μ g/ml 농도의 RV0577 또는 대조군으로 1000 ng/ml 농도의 LPS (lipopolysaccharide)를 24 시간 동안 처리하였다. 이 후 요오드화 프로피듐 (propidium iodide, PI) 및 아넥신-V로 이중 염색하고 유세포 분석기 (flow cytometry)를 통해 분석하였다. 도 1B에 나타난 바와 같이 10 μ g/ml 농도의 RV0577는 수지상 세포에서 독성을 나타내지 않았다.

[0036] 실시 예 3. Rv0577에 의한 수지상 세포의 표면 인자 발현 분석

[0037] 먼저 모든 세포의 성숙도를 균일하게 하기 위하여 GM-CSF 와 IL-4가 함유된 OptiMEM 배지에서 유지한 후, 수지상 세포에 5 μ g/ml 및 10 μ g/ml 농도의 Rv0577 및 100 ng/ml 농도의 LPS를 각각 24시간 처리한 후 수지상 세포를 회수하였다. 비 특이적인 결합을 억제하기 위하여 1 μ g/ml의 Fc γ I/III(BD bioscience)을 4℃에서 20분간 처리한 후, 수지상 세포 분석을 위해CD11c-FITC(BD bioscience)로 4℃에서 20분간 염색하였다. 이 후 항-CD80-PE(BD bioscience), 항-CD86-PE(BD bioscience), 항-MHC I 및 II-PE(BD bioscience)와 같은 세포 표면 인자 항체를 이용하여 염색한 후 유세포 분석기 FACScallibur (Beckson Dickinson, USA)로 분석하였다(도 2). 도 2에 나타난 바와 같이 Rv0577은 수지상 세포의 단백질 표면 인자인 CD80, CD86와 MHC class I, II의 발현을 용량 의존적으로 증가시켰다. 이를 통해Rv0577에 의해 수지상 세포의 성숙이 이루어졌음을 확인할 수 있었다.

[0038] 실시 예 4. Rv0577 가 수지상 세포의 사이토카인 분비에 미치는 영향 분석

[0039] 수지상 세포의 성숙 여부에 따라 분비되는 사이토카인의 종류가 달라진다. 이를 확인하기 위해 수지상 세포에 5 μ g/ml 또는 10 μ g/ml 농도의 Rv0577 또는 대조군으로 100 ng/ml의 LPS 를 처리한 후 24 시간 동안 배양하였다. 상층액을 TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-10 및 IL-12 에 대한 ELISA 키트에 적용하여 사이토카인 분비량을 측정하였다(도 3A, B, C, D, E). IL-12와 IL-10은 수지상 세포에서 분비되는 주요 사이토카인으로 각각 T 세포가 Th1과 Th2로 분화되는데 중요한 역할을 한다. IL-12는 대표적인 Th1형 사이토카인이며, IL-10은 활성화 된 단핵구, NK

세포 및 Th1 세포에 의해 생산되는 사이토카인 (IL-12 포함)의 활성을 방해하는 것으로 알려져 있다. 도 3에 나타난 바와 같이 IL-12가 증가했고 전염증 사이토카인인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 또한 증가하였으므로, Rv0577이 수지상 세포를 성숙하게 하여 사이토카인의 양에 변화를 준다는 것을 알 수 있었다. 반면 IL-10의 분비에는 유의성 있는 증가를 보이지 않아, Rv0577이 수지상 세포를 Th1형 세포로 편향할 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다.

[0040] 실시 예 5. Rv0577에 의한 수지상 세포의 항원 취득 능력 분석

[0041] 미성숙 수지상 세포는 항원 취득을 잘하지만, 성숙한 수지상 세포는 항원 취득 능력이 감소한다고 알려져 있다. 따라서 Rv0577 단백질이 수지상 세포의 대식 활동 (endocytic activity)에 미치는 영향을 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 미성숙 수지상 세포를 5 및 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 Rv0577 또는 100 ng/ml LPS를 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 이 수지상 세포에 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 플루오레신 결합 텍스트란(fluorescein conjugated dextran, 분자량 40,000; Molecular Probes, Eugene, OR)을 1시간 동안 첨가하였다. 37 $^{\circ}\text{C}$ 와 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 각각 30분 동안 배양한 후 콜드 스테이닝 완충액을 첨가하여 반응을 정지 시킨 후 세포를 세척하였다.

[0042] 이 후 PE(Phycoerythrin)-결합 CD11c(BD bioscience)로 염색한 후에 FACSCanto2를 이용하여 텍스트란-FITC(Fluorescein isothiocyanate) 탐식능을 측정하였다(도 4). 도 4에 나타난 바와 같이, Rv0577을 처리한 수지상 세포가 그렇지 않은 것보다 텍스트란(항원) 포식 능력이 감소하였다. 이러한 점에서 Rv0577이 기능적인 면에서 수지상 세포를 성숙시킴을 알 수 있었다. 텍스트란의 수지상 세포에 대한 비특이적 결합을 측정하기 위해서 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서도 측정하여 결과값을 보정하였다. 이를 통해 Rv0577 처리에 의해 수지상 세포의 성숙도가 증가하였음을 기능적으로 확인할 수 있었다.

[0043] 실시 예 6. Rv0577 결합 Toll-like receptor (TLR) 분석

[0044] 결핵균은 TLR2와 TLR4를 통하여 항원제시세포를 in vitro 실험에서 활성화 및 분화를 시킨다고 보고되고 있다. 따라서 Rv0577이 어떠한 TLR과 결합하여 신호전달을 하는지 확인하였다. 첫째로 TLR2-/-, TLR4-/- 및 WT 마우스로부터 실시 예 1.1과 같은 방법으로 수지상 세포를 분리하였다. 각각의 수지상 세포에 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 Rv0577을 자극을 주고, Alexa488-결합 항-HIS-Rv0577 마우스 항체를 이용하여 유세포 계측 분석법을 시행하였다(도 5 A, B). 그 결과 Rv0577은 WT 및 TLR4-/-로부터 분리된 수지상 세포에 결합하였지만 TLR2-/-에서 분리된 수지상 세포에는 결합하지 않았다. 이를 다른 방법으로 검증하기 위해 면역 침강 방법을 이용하여 직접적으로 어떠한 TLR과 결합하는지를 확인하였다. 면역 침강 방법을 이용한 결과 TLR2 항체를 이용한 면역침강을 하였을 때 Rv0577이 결합되는 것을 확인 하였다. 또한 HIS 항체를 이용한 면역 침강에서도 TLR2가 결합되었다. 면역 형광 염색에서도 WT과 TLR4-/-에서는 Rv0577이 수지상 세포와 결합하였지만, TLR2-/-에서 분리한 수지상 세포와는 결합하지 않았다. 이에 따라 Rv0577이 TLR2와 직접적으로 결합한다는 것을 확인하였다.

[0045] 실시 예 7. Rv0577에 의한 수지상 세포의 성숙과 TLR과의 연관성 분석

[0046] Rv0577에 의한 수지상 세포의 성숙과 TLR의 연관성을 보기 위해서 TLR2-/-, TLR4-/- 및 WT 마우스로부터 실시 예 1.1과 같은 방법으로 수지상 세포를 분리하였다. 분리한 각 수지상 세포에 대하여 실시 예3과 같은 방법으로 CD86 및 MHC II의 발현을 측정하였으며, 실시 예 4와 같은 방법으로 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성 정도를 측정하였다. Rv0577은 WT이나 TLR2-/-에서 분리한 수지상 세포의 경우 CD86 및 MHC II의 발현과 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성이 크게 감소되었지만, TLR4-/-에서 분리한 수지상 세포의 경우 CD86 및 MHC II의 발현과 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성이 증가하였다(도 6A). 또한 TLR의 하위 신호인 MyD88 또는 TRIF의 녹아웃 마우스를 이용해서 TNF- α , IL-6, IL-1 β 의 생성을 확인하였을 때 MyD88-/-에서는 사이토카인 생성이 크게 감소하는 것을 확인할 수 있었지만 TRIF-/-에서는 WT과 유의성 차이를 보이지 않았다. 이에 따라 Rv0577이 TLR2-MyD88를 경유하여 수지상 세포를 활성화시키는 것을 확인하였다.

[0047] 실시 예 8. Rv0577 가 수지상 세포의 신호 전달계에 미치는 영향 분석

[0048] 수지상 세포는 성숙 과정 중에 ERK, JNK, p38 등의 MAPK(mitogenactivated protein kinases) 및 NF- κ

B(nuclear factor-kappa B) 신호 전달계가 활성화된다고 알려져 있다.

- [0049] 미성숙 수지상 세포에 Rv0577를 5 분, 15 분, 30 분, 60 분간 처리한 후, 세포를 파괴하여 단백질을 모두 분리하고, MAPK (mitogen-activated protein kinases) 및 NF- κ B (nuclear factor-kappa B) 신호 전달계와 관련된 인자인 ERK, JNK, p38, I κ B- α , NF- κ B p65 의 인산화 및 분해 여부를 확인하였다. 단백질양은 특정항체를 이용하는 웨스턴 블랏 방법으로 측정하였다(도 7).
- [0050] 도 7에서 나타난 바와 같이 인산화되어 있는 p-p38, p-ERK, p-JNK의 양이 Rv0577 처리에 의해 증가하였음을 확인하였다. 또한 p-I κ B- α 가 증가하고 I κ B- α 는 분해되는 것을 확인하였다. 최종 신호전달 인자인 NF- κ B p65 도 Rv0577처리에 의해 핵 안으로 전사된 것을 확인하였다. 이를 통해 Rv0577는 수지상 세포의 MAPKs 및 NF- κ B 신호 전달 체계에 관여한다는 것을 확인하였다.
- [0051] **실시 예 9. Rv0577에 의한 MAPK 및 NF- κ B 의 영향 분석**
- [0052] Rv0577에 의해 활성화된 수지상 세포가 MAPK 및 NF- κ B의 신호 전달 체계에 의해 유도되었는지를 알아보기 위해 U0126 (ERK1/2), SB203580 (p38), SP600125 (JNK), Bay 11-0782 (NF- κ B)과 같은 MAPK 및 NF- κ B 억제 물질을 이용하여 분석하였다. 수지상 세포에 MAPK 및 NF- κ B 억제 물질을 1시간 동안 처리한 후 10 μ g/ml 농도의 Rv0577 또는 대조군으로 100 ng/ml의 LPS 를 처리한 후 24 시간 동안 배양하였다. 수지상 세포의 표면 인자 발현 분석을 위해 CD11c-FITC(BD bioscience)로 4℃에서 30분간 염색하였다. 이 후 항-CD80-PE(BD bioscience), 항-CD86-PE(BD bioscience)와 같은 세포 표면 인자 항체를 이용하여 염색한 후 유세포 분석기 FACScallibur (Beckson Dickinson, USA)로 분석하였다(도 8A). 또한 수지상 세포의 성숙 여부에 따라 분비되는 사이토카인을 분석하기 위해 상층액을 통하여 TNF- α , IL-6, IL-1 β 에 대한 ELISA 키트(BD PharMingen, USA)를 적용하여 사이토카인 분비량을 측정하였다(도 8B).
- [0053] 도 8A에 나타난 바와 같이 MAPK 및 NF- κ B 억제 물질들은 Rv0577에 의한 수지상 세포의 보조 자극 인자인 CD80 과 CD86 발현을 감소시켰다. 또한 도 8B에 나타난 바와 같이 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 들을 감소시켰다. 이를 통해Rv0577의한 수지상 세포의 활성화는 MAPK 및 NF- κ B 신호 전달 체계에 의존한다는 것을 확인할 수 있었다.
- [0054] **실시 예 10. LPS 및 Rv0577에 의해 유도되는 수지상 세포의 TNF- α 및 IL-6 방출에 대한 열변성의 영향분석.**
- [0055] LPS 및 Rv0577에 의해 유도되는 수지상 세포의 TNF- α 및 IL-6 방출에 대한 LPS 및 Rv0577의 열변성의 영향을 분석하기 위해, C57BL/6 마우스의 미성숙 수지상 세포를 100 ng/ml LPS 또는 10 μ g/ml Rv0577, 또는 끓인 LPS 또는 Rv0577로 처리하거나, 처리하지 않았다. 24시간 후에 상기 수지상 세포의 상층액 내 TNF- α , IL-6의 양을 ELISA를 이용하여 분석하였다.
- [0056] 도9A에 나타난 바와 같이 Rv0577은 단백질이므로 끓이면 분해되기 때문에 끓인 Rv0577의 경우 TNF- α , IL-6의 분비가 억제되었다. 반면, LPS의 경우에는 끓이더라도 TNF- α , IL-6의 분비에 차이가 없음을 확인하였다.
- [0057] **실시 예 11. LPS 및 Rv0577에 의해 유도되는 수지상 세포의 사이토카인 생산에 대한 PMB의 영향 분석**
- [0058] Rv0577의 수지상 세포 활성화의 효과가 LPS의 오염에 의한 것이 아닌지 확인하기 위해, C57BL/6 마우스의 미성숙 수지상 세포를 LPS 억제제인 polymyxin B (PMB)로 전 처리한 후 또는 전처리 없이 100 ng/ml LPS 또는 10 μ g/ml Rv0577로 24시간 동안 처리하였다. 24시간 후에 상기 수지상 세포의 상층액 내 TNF- α , IL-6의 양을 ELISA를 이용하여 분석하였다.
- [0059] 도9B. 에 나타난 바와 같이 LPS의 경우 LPS에 의한 TNF- α 나 IL-6의 분비가 PMB에 의해 감소되는 반면, Rv0577의 경우 PMB를 처리하더라도 TNF- α 나 IL-6의 분비에는 영향이 없었다. 이는 Rv0577이 LPS 오염에 의한 것이 아님을 증명한다.
- [0060] **실시 예 12. LPS 및 Rv0577에 의해 유도되는 수지상 세포의 사이토카인의 생산에 대한 프로테아제 K 소화의 영향 분석**

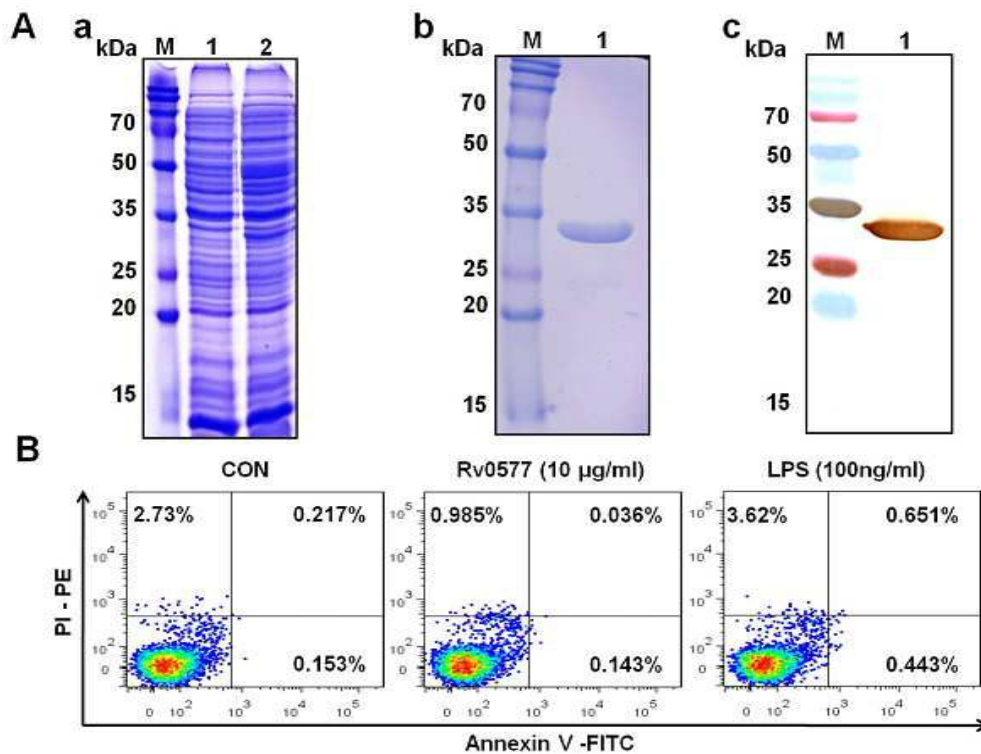
[0061] 배지, 100 ng/ml LPS 또는 10 μ g/ml Rv0577 프로테이나제 K로 처리한 후 미성숙 수지상 세포의 배양물에 첨가하였다. 프로테이나제 K의 농도를 LPS와 Rv0577 농도의 1/20로 처리한 후 50℃에서 1시간 활성화시키고 100℃에서 비활성 시켰다. 상기 수지상 세포의 상층액 내 TNF- α , IL-6 양을 ELISA를 이용하여 분석하였다.

[0062] 도 9C에 나타낸 바와 같이 Rv0577은 단백질이므로 단백질 분해효소인 프로테이나제 K로 처리하면 분해되기 때문에 프로테이나제 K를 처리한 Rv0577의 경우 TNF- α , IL-6의 분비가 억제되었다. 반면 LPS의 경우에는 프로테이나제 K를 처리하여도 TNF- α , IL-6의 분비에 차이가 없는 것을 확인하였다.

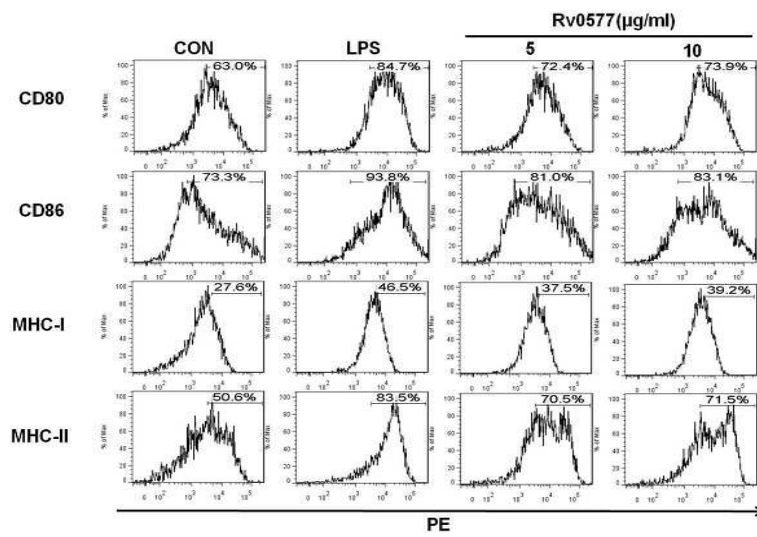
[0063] 이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시 예들을 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

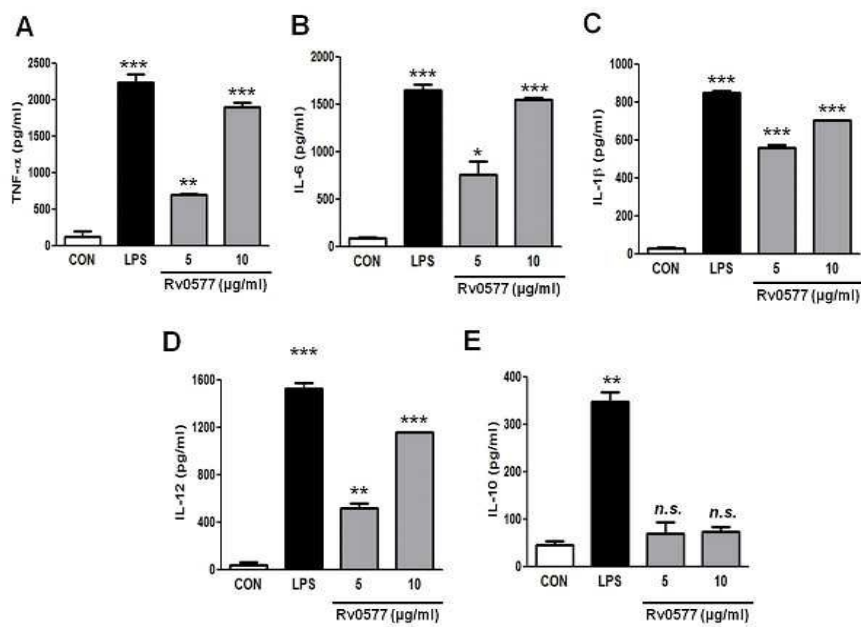
도면1



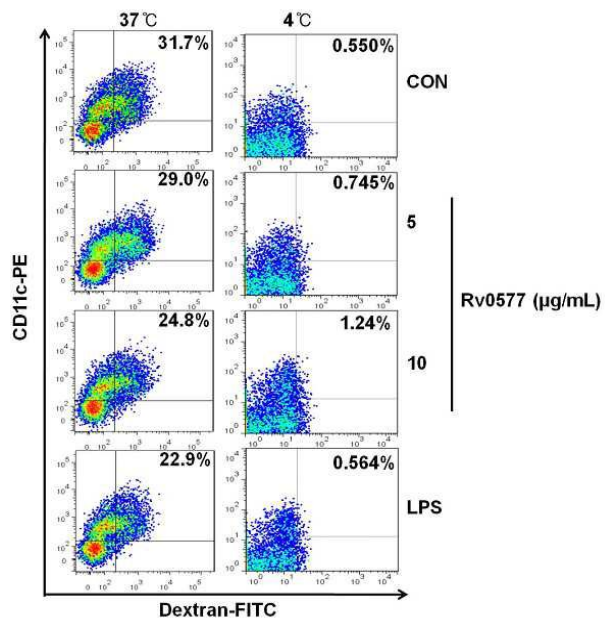
도면2



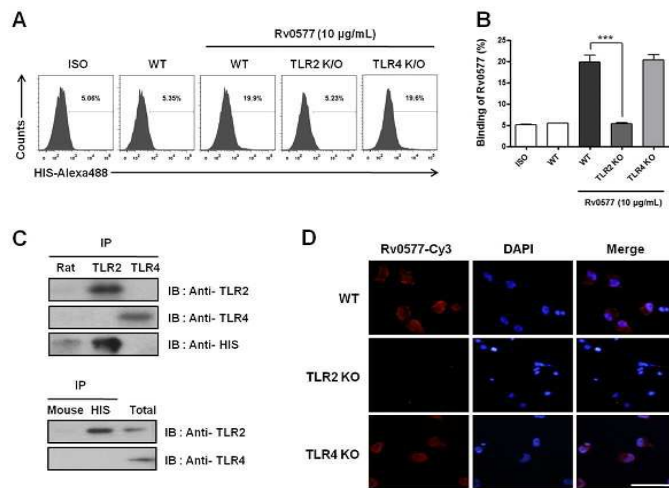
도면3



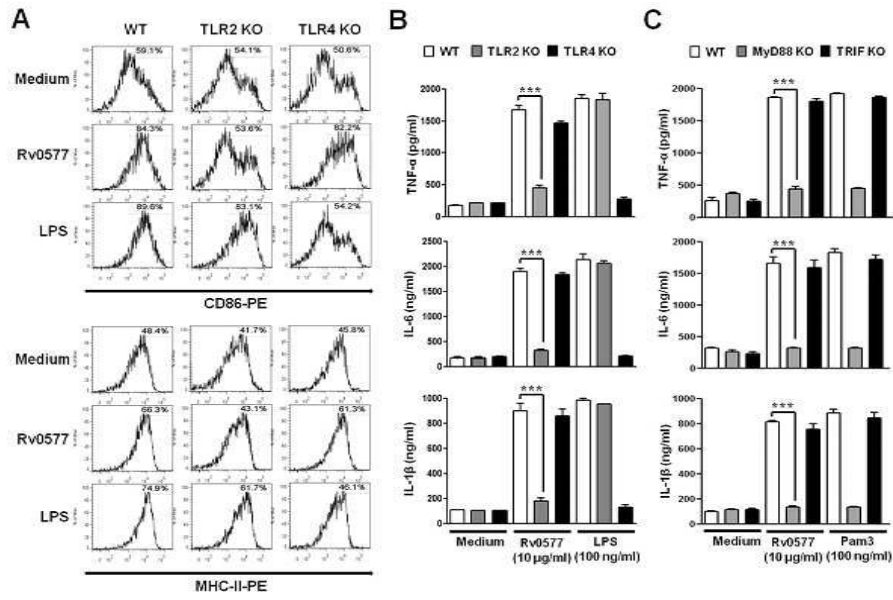
도면4



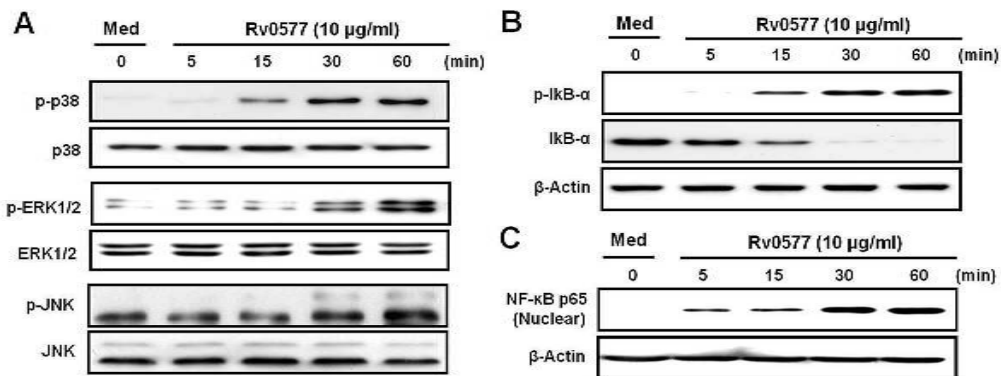
도면5



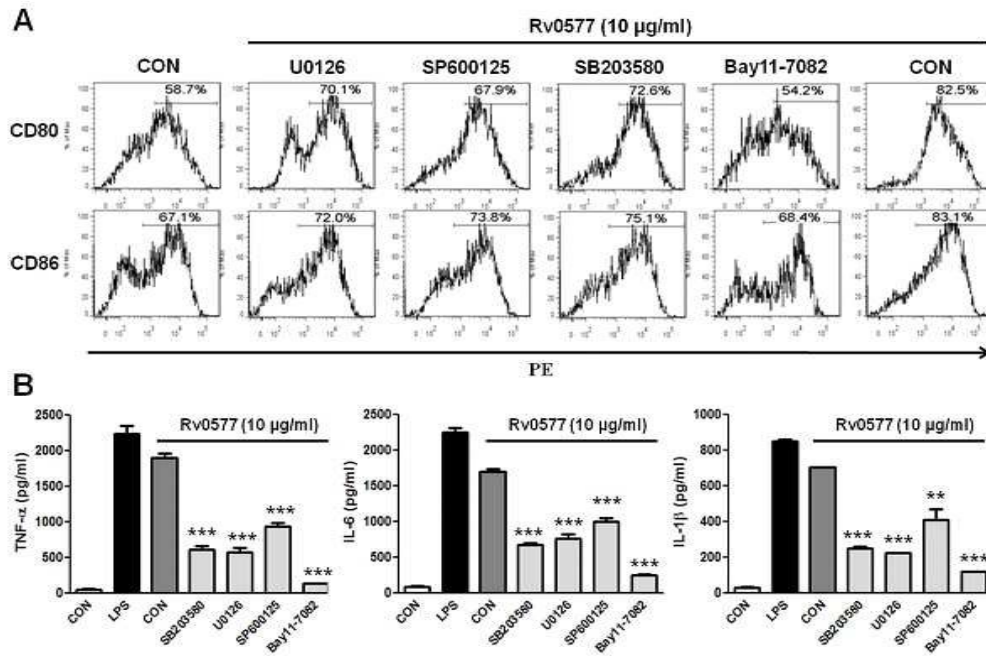
도면6



도면7



도면8



도면9

