



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년07월27일
(11) 등록번호 10-1052350
(24) 등록일자 2011년07월21일

(51) Int. Cl.

C07K 14/35 (2006.01) *C12N 5/0784* (2010.01)

(21) 출원번호 10-2010-0009747

(22) 출원일자 2010년02월02일

심사청구일자 2010년02월02일

(56) 선행기술조사문헌

논문1:NAT MED.

(73) 특허권자

부산대학교 산학협력단

부산 금정구 장전동 산30 부산대학교 내

충남대학교산학협력단

대전 유성구 궁동 220 충남대학교

(72) 발명자

박영민

서울특별시 은평구 불광동 미성아파트 3동 702호

정인덕

경상남도 양산시 남부동 주공아파트8단지 805동 1902호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순용

전체 청구항 수 : 총 5 항

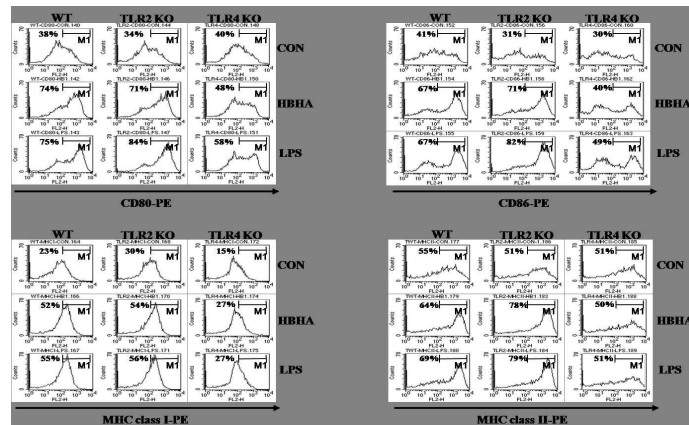
심사관 : 이효진

(54) 헤파린 결합 헤마글루틴 (HBHA) 을 이용한 수지상 세포의 성숙방법

(57) 요약

본 발명은 수지상 세포를 성숙시키는 방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는 결핵균의 HBHA를 이용하여 미성숙 수지상 세포를 성숙 수지상 세포로 분화시키는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 방법에 의해 수지상 세포에 의한 신체의 면역 반응을 증강시킬 수 있다.

대표도 - 도8



(72) 발명자

신성재

대전광역시 중구 문화1동 6번지 충남대학교 의학전
문대학원 미생물학교실

김화중

대전광역시 중구 문화1동 6번지 충남대학교 의학전
문대학원 미생물학교실

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R13-2007-020-01000-0/A091047-0911-0000300

부처명 한국연구재단/보건복지부

연구관리전문기관

연구사업명 기초의과학 연구센터/병원특성화센터 지원사업

연구과제명 감염신호네트워크응용연구센터/수지상세포 기반 항암면역요법 개발

기여율

주관기관 충남대학교 산학협력단/양산부산대학병원

연구기간 2009년 03월 01일~ 2010년 02월 28일/2009년 05월 01일~2010년 03월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

미성숙 수지상 세포에 결핵균의 HBHA(heparin-binding hemagglutinin)를 처리하는 것을 포함하는 수지상 세포의 성숙 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 HBHA는 *M. smegmatis*에 발현시킨 재조합 HBHA(rMS-HBHA)인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 HBHA를 넣고 24시간 배양하여 성숙시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 HBHA는 미성숙 수지상 세포의 배지에 0.5~1 $\mu\text{g/ml}$ 의 용량으로 첨가되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 미성숙 수지상 세포의 성숙은 HBHA가 TLR(toll-like receptor)-4를 자극하여 일어나는 것을 특징으로 하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 수지상 세포를 성숙시키는 방법에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는 결핵균의 HBHA를 이용하여 미성숙 수지상 세포를 성숙 수지상 세포로 분화시키는 방법에 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 엔도시토시스 활성 및 T-세포 활성 능력을 특징으로 한다. 미성숙 수지상 세포는 주변에 있는 바이러스와 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 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. 미성숙 수지상 세포는 병원체를 탐식하고 자신의 단백질을 작은 조각들로 분해해서, 성숙하였을 때 이 조각들이 MHC 분자를 이용하여 그

세포 표면에 나타나게 된다. 동시에, 그것은 CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), 및 CD40과 같이 T-세포 활성화에서의 공동-수용체로 작용하는 세포 표면 수용체를 증가시킨다. 그것들은 또한 수지상 세포가 혈류를 통해 비장으로 가거나 림프계를 통해 림프절로 이동하게 유도하는 주화성 수용체인 CCR7를 증가시킨다. 여기서 이 세포들은 항원 발현 세포로 작용한다: 그것들은 비항원성 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 수지상세포)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] 수지상 세포는 흔히 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 증추와 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 생체에의 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.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자들은 상기와 같은 요구를 충족시키기 위하여 연구를 거듭한 결과 결핵균에서 유래한 HBHA가 수지상 세포를 효과적으로 성숙시킨다는 사실을 발견했다.

[0012] HBHA(heparin-binding hemagglutinin)은 결핵균 항원의 28-kDa의 메인 단백질로 표적 세포의 표면에서 HS(heparan sulfate) 함유 프로테오글리칸과 상호작용하는 C-말단 리신 풍부 도메인을 통해서 상피세포에 부착

한다. HBHA는 최근에 표면에 노출되고 및 표면으로 분비되는 항원으로 밝혀졌는데, 잠복성 결핵을 가진 건강한 개체에서는 혈중 CD4+ 및 CD8+ T 림프구에 의한 강력한 IFN- γ 의 생산을 유도하지만 활성 결핵 환자에서는 그렇지 않다고 알려졌다. 본 발명자들은 이러한 HBHA를 수지상 세포의 성숙에 이용할 수 있을 것이라고 생각하고 연구한 결과 HBHA를 가지고 수지상 세포를 효과적으로 성숙시킬 수 있다는 사실을 발견하게 된 것이다.

- [0013] 따라서 본 발명은 미성숙 수지상 세포를 결핵균의 HBHA로 처리하여 성숙시키는 방법을 제공한다.
- [0014] 바람직하게는 상기 HBHA는 *M. smegmatis*에 발현시킨 재조합 HBHA(rMS-HBHA)이다.
- [0015] 바람직하게는 상기 HBHA를 넣고 24시간 배양하여 수지상 세포를 성숙시킨다. 또한 바람직하게는 수지상 세포의 배지에 HBHA를 0.5~1 $\mu\text{g/ml}$ 의 용량으로 첨가하여 성숙시킨다.
- [0016] 바람직하게는 상기 수지상 세포의 성숙은 HBHA가 TLR(toll-like receptor)-4를 자극하여 일어난다.
- [0017] 본 발명자들은 수지상 세포를 성숙시키는 HBHA의 효능 실험을 하기 전에 우선 HBHA의 수지상 세포에 대한 독성 실험을 하였다. 도 2에 나타낸 바와 같이 수지상 세포에 HBHA를 1 $\mu\text{g/ml}$ 까지 처리하여 아빅신-V로 염색하였는데 그 결과 1 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 수지상 세포에 세포독성이 나타나지 않았으므로 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 HBHA는 수지상 세포에 독성이 없다고 할 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에서는 HBHA가 미성숙 수지상 세포를 성숙시키는지에 대한 실험을 했다. 수지상 세포가 성숙하면 보조자극인자와 MHC class I, II와 같은 분자의 발현이 현저히 증가하므로 수지상 세포에 HBHA를 각각 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후 24시간 동안 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 배양했다. 여기서 LPS를 양성 대조군으로 사용하여 HBHA의 효과를 비교하였다. 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이 HBHA는 수지상 세포의 표면 분자를 용량 의존적으로 증가시켰다. 그러므로 HBHA는 수지상 세포의 표면 분자 변화에 영향을 끼침을 알 수 있다.
- [0019] 본 발명의 다른 실시예에서는 HBHA가 수지상 세포를 성숙시킨다는 것을 더욱 확실하게 확인하기 위해서 수지상 세포가 항원을 포식하는 능력을 측정하였다. 수지상 세포는 미성숙한 상태에서는 포식 작용이 활발하지만 항원을 포식하여 성숙하게 되면 더 이상 탐식작용이 일어나지 않는다. 그러므로 성숙하게 된 수지상 세포일수록 항원 탐식 능력이 떨어지게 된다. 항원 탐식능력은 FITC로 염색된 텍스트란을 이용하여 실험하였다. 6일 동안 배양시킨 수지상 세포를 두 그룹으로 나누어서 하나는 HBHA를 24시간 처리하고 하나는 처리하지 않았다. 상기 두 그룹의 수지상 세포에 FITC로 염색한 텍스트란을 처리한 뒤 다시 수지상 세포를 CD11c-PE로 염색하여 유세포분석기로 분석하였다. 도 4에 나타낸 바와 같이, HBHA를 처리한 수지상 세포가 그렇지 않은 것보다 항원 포식 능력이 감소하였다. 이러한 점에서 HBHA가 기능적인 면에서 수지상 세포를 성숙시킴을 알 수 있다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 HBHA가 수지상 세포의 사이토카인 분비에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험을 했다. 수지상 세포가 성숙하게 되면 분비하는 사이토카인 역시 변하게 된다. 그러므로 수지상 세포를 HBHA로 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 5에 나타낸 바와 같이 IL-12와 IL-10이 증가했고 전염증 사이토카인인 TNF- α , IL-6, IL-1 β 또한 증가하였으므로, HBHA가 수지상 세포를 성숙하게 하여 사이토카인의 양에 변화를 준다는 것을 알 수 있다.
- [0021] 본 발명의 또 다른 실시예에서는 HBHA를 처리한 수지상 세포에서 CCL7의 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 HBHA를 처리한 것과 양성대조군으로 LPS를 처리한 것, 그리고 아무 처리도 하지 않은 음성 대조군을 CCR7-PE 및 CD11c-FITC로 염색하여 유세포분석기로 측정하였다. 도 6에서 알 수 있는 바와 같이, HBHA를 처리하였을 때 처리하지 않은 수지상 세포보다 CCR7의 수치가 증가하였으므로 HBHA가 수지상 세포의 이동 능력을 증가시킨다고 할 수 있다.
- [0022] 이를 더욱 확실하게 확인하기 위하여 본 발명의 다른 실시예에서는 HBHA로 처리한 수지상 세포의 CCR19에 대한 주화성을 실험하였다. CCR7의 결합 리간드는 CCR19라는 점을 이용해 300ng/ml의 CCR19에 반응해서 이동하는 수지상 세포의 수를 측정한 결과 HBHA로 처리한 수지상 세포가 음성 대조군에 비해서 더 많이 이동하였음을 알 수 있었다(도 7). 결론적으로 HBHA는 수지상 세포를 성숙하게 만들어서 2차 림프기관으로 이동한 뒤 T 세포와 반응하는데 필요한 이동능력을 증가시킨다고 할 수 있다.
- [0023] 수지상 세포의 TLR(toll-like receptor)은 미생물 산물을 인식하여 수지상 세포가 적응 면역(adaptive

immunity) 상태로 변화하는데 중요한 역할을 한다. TLR의 신호를 통해서 전염증 또는 항염증성 사이토카인이 발현되거나 여러 공동 자극 분자들이 나타난다.

[0024] 본 발명의 다른 실시예에서는 HBHA가 수지상 세포를 성숙시키는 것과 TLR과의 연관성을 보기 위해 TLR2-/-, TLR4-/- 마우스 및 일반 WT 마우스의 골수 유래 수지상 세포를 이용해서 실험하였다. TLR2-/-, TLR4-/- 및 WT 마우스의 골수 수지상 세포를 6일 동안 배양한 뒤 HBHA를 처리한 수지상 세포와 음성 대조군 수지상 세포의 공동 자극 분자인 CD80, CD86, MHC I, MHC II를 유세포분석기로 분석하였다. 그 결과 HBHA에 의해서 TLR4-/- 마우스의 수지상 세포보다는 TLR2-/- 와 WT 마우스의 수지상 세포에서 공동 자극 분자들이 더 많이 나타났으므로 HBHA에 의한 수지상 세포의 성숙은 TLR-4를 통해서 일어난다고 할 수 있다(도 8).

발명의 효과

[0025] 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

[0026] 도 1은 실시예 1에 따라 분리해낸 HBHA에 대한 A: CB 염색, B: 항 His 항체면역블롯팅 결과를 나타낸 도면으로 약 28kDa인 HBHA를 확인할 수 있다.

도 2는 실시예 2에 따른 본 발명의 HBHA를 처리한 수지상 세포의 생존율 측정 실험의 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 실시예 3에 따른 본 발명의 HBHA를 처리한 수지상 세포의 보조자극인자와 MHC class I, II의 발현 분석 실험의 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 실시예 4에 따른 본 발명의 HBHA를 처리한 수지상 세포의 텍스트란-FITC 탐식능 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 실시예 5에 따른 본 발명의 HBHA를 처리한 수지상 세포의 사이토카인(IL-6, IL-12, IL-1, TNF- α 및 IL-10) 분비 실험 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 실시예 6에 따른 본 발명의 HBHA를 처리한 수지상 세포의 CCR7 발현 정도 실험 결과를 나타낸 그래프이다. CON:대조군.

도 7은 실시예 7에 따른 본 발명의 HBHA를 처리한 수지상 세포의 주화성 분석 실험의 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 실시예 8에 따른 본 발명의 HBHA를 처리한 수지상 세포의 성숙 관련 TLR 실험 결과를 나타낸 그래프이다. CON:음성대조군.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 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.

[0028] <실시예 1>

[0029] 수지상 세포 및 HBHA 준비

[0030] 1. 1 수지상 세포의 분리 및 유도

[0031] 수지상세포는 이전에 알려진 방법과 같이 마우스의 골수세포로부터 유도한다.

[0032] 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-글

루타민, 100 U/ml 페니실린, 100 $\mu\text{g/ml}$ 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.

[0033] 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)를 이용하여 분리 후 사용하였다. LPS(*E.coli* 055:B 타입, Sigma)는 HBHA에 대한 양성대조군으로 사용하였다.

[0034] 1.2 HBHA의 제조

[0035] *M. smegmatis*에 발현 시킨 재조합 HBHA(rMS-HBHA)를 제조하였다.

[0036] 이태리 사사리 대학의 G. DeLogu로부터 제공받은 전체 길이의 HBHA ORF(open reading frame)을 포함하고 있는 pMV3-38 플라스미드(pMV261벡터)를 전기천공법(electroporation)에 의해 *M. smegmatis*에 삽입했다. 히스티딘으로 표지된 HBHA를 발현하는 *M. smegmatis*(pMV3-38) 재조합 균주를 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 히그로마이신(hygromycin)을 함유하는 소튼즈 배지(Sauton's medium)에서 37°C에서 4일간 배양하고, 원심분리를 하여 세포를 수거하였다.

[0037] 4 mM의 페닐메틸설포닐 플루오라이드 및 0.1 mg/ml의 라이소자임을 함유하는 10 mM의 포타슘 포스페이트 완충액(pH 7.0)에 세포를 재현탁시키고 얼음 위에서 초음파 처리하여 세포를 용해시켰다. 원심분리 후에, 상층액을 10 mM 포타슘 포스페이트 완충액으로 평형 시킨 포스포셀룰로스 칼럼(Whatman P11)에 넣었다. 칼럼을 150 mM 포타슘 포스페이트 완충액으로 씻은 다음, 부착된 물질은 750 mM 포타슘 포스페이트 완충액으로 용출시켰다.

[0038] 용출액을 농축시키고 500 mM NaCl 및 20 mM 이미다졸을 함유하는 20 mM 트리스-HCl(pH 8.0)을 이용하여 투석한 다음, 사용설명서에 따라 니켈-니트릴로트리아세트산(Ni-NTA) 아가로스 크로마토그래피(Invitrogen, Carlsbad, CA)로 정제했다. 정제가 잘 되었는지 확인하기 위해서 SDS-PAGE 및 쿠마시 블루 염색을 이용하였고, 면역블로팅을 수행했다 (도 1).

[0039] <실시예 2>

[0040] 수지상 세포의 생존율 측정

[0041] LPS 또는 HBHA로 자극한 수지상 세포의 세포 생존율을 측정하기 위해서, 수지상 세포를 200 ng/ml 농도의 LPS 또는 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 및 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 HBHA로 24시간 동안 처리 후에 5 μgml^{-1} 의 요오드화 프로피디움(propidium iodide, PI) 및 아넥신-V로 이중 염색하고 유세포분석기(flow cytometry)를 통해 분석하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0042] <실시예 3>

[0043] 보조자극인자와 MHC class I, II의 발현 분석

[0044] 수지상 세포에 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 및 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 HBHA 및 200 ng/ml 농도의 LPS를 각각 24시간 처리한 후 수지상 세포를 회수하였다. 비특이적인 결합을 억제하기 위하여 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 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 $\mu\text{g/ml}$ 씩 처리하여 4°C에서 30분간 염색했다. PBS 완충액(2% FBS와 0.01% 아지드 나트륨 함유)로 2회 세척하고, 1% 파라포름알데히드로 고정 후에 FACSallibur(Beckson Dickinson, USA)로 분석하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0045] <실시예 4>

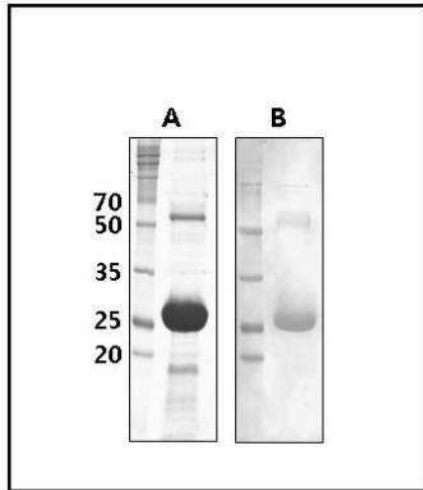
- [0046] **수지상 세포의 텍스트란-FITC 탐식능 측정**
- [0047] 수지상 세포의 엔도시토시스는 종래 알려진 방법에 의해 측정하였다.
- [0048] 각각 1×10^6 세포/ml의 수지상 세포를 포함하는 배지 1ml씩을 37℃와 0℃에서 평형화시킨 후, 각 평형화된 세포의 그룹을 각각 네 그룹으로 나누어서 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 의 HBHA, 1.0 $\mu\text{g/ml}$ 의 HBHA 및 200 ng/ml 농도의 LPS를 첨가하고 나머지 하나는 음성 대조군으로 아무 처리도 하지 않고 24시간 동안 배양하였다. 각 그룹의 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℃와 0℃에서 각각 1시간 동안 배양한 후 쿨드 스테이닝 완충액을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 그 다음 세포를 3회 세척한 후에 PE(Phycoerythrin)-결합 CD11c(BD bioscience)로 염색한 후에 FACSCalibur를 이용하여 텍스트란-FITC(Fluorescein isothiocyanate) 탐식능을 측정하였다. 텍스트란의 수지상 세포에 대한 비특이적 결합을 측정하기 위해서 4℃에서도 측정하였다. 그 결과를 도 4에 나타냈다.
- [0049] **<실시예 5>**
- [0050] **HBHA가 수지상 세포의 사이토카인 분비에 미치는 영향: IL-6, IL-12, IL-1, TNF- α 및 IL-10**
- [0051] 수지상 세포에 실시예 4와 같이 HBHA나 LPS를 24시간 처리한 후, 상층액을 IL-6, IL-12, IL-1, TNF- α 및 IL-10에 대한 ELISA 키트(BD PharMingen, USA)에 적용하여 사이토카인 분비를 측정하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0052] **<실시예 6>**
- [0053] **CCR7 발현정도 측정**
- [0054] 수지상 세포에 실시예 4와 같이 HBHA 및 LPS를 24시간 처리한 후 세포를 회수하였다. 비특이적인 결합을 억제하기 위하여 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 Fc γ I/III을 4℃에서 20분간 처리한 후, 수지상 세포 분석을 위해 CD11c-FITC로 4℃에서 20분간 염색하였다. 그 다음 다시 항CCR7-PE처리하여 4℃에서 30분간 염색하였다. PBS 완충액 (2% FBS와 0.01% 아지드 나트륨 함유)로 2회 세척하고, 1% 파라포름알데히드로 고정 후에 FACScalibur (Beckson Dickinson, USA)로 분석하였다. 그 결과를 도 6에 도시하였다.
- [0055] **<실시예 7>**
- [0056] **주화성 분석**
- [0057] 정제된 수지상 세포를 24시간 동안 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 HBHA 및 200ng/ml의 LPS로 처리하거나 하지 않고(음성 대조군), 케모킨 CCL19 (300 ng/mL)에 반응하여 이동하는 것을 측정하였다. 트랜스웰 플레이트(세공 크기 8.0 μm ; Corning, Acton, MA)의 아래쪽 챔버에는 500 μl 의 CCL19를 포함하는 것과 포함하지 않는 무혈청(serum-free) 배지를 넣었다. 무혈청 배지에 재현탁된 수지상 세포(0.1 mL에 1×10^5 세포)를 트랜스웰 플레이트의 위쪽 챔버에 넣고 5% CO₂ 하에 37℃에서 3시간 동안 이동하도록 두었다. 아래쪽 챔버에서 거둔 이동한 수지상 세포의 수는 FACS(60-second counts)로 셸다. 그 결과를 도 7에 도시하였다.
- [0058] **<실시예 8>**
- [0059] **수지상 세포 성숙 관여 TLR 실험**
- [0060] HBHA에 의한 수지상 세포를 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 CD80, CD86, MHC I 및 MHC II의 발현을 측정하였다. 그 결과는 도 8에 도시하였다.

[0061]

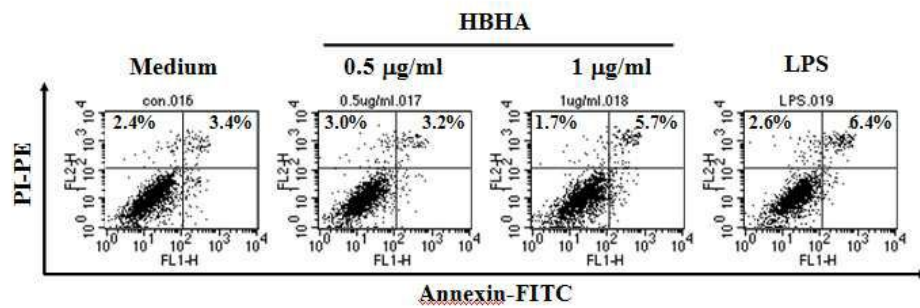
이상 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 실시예들을 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

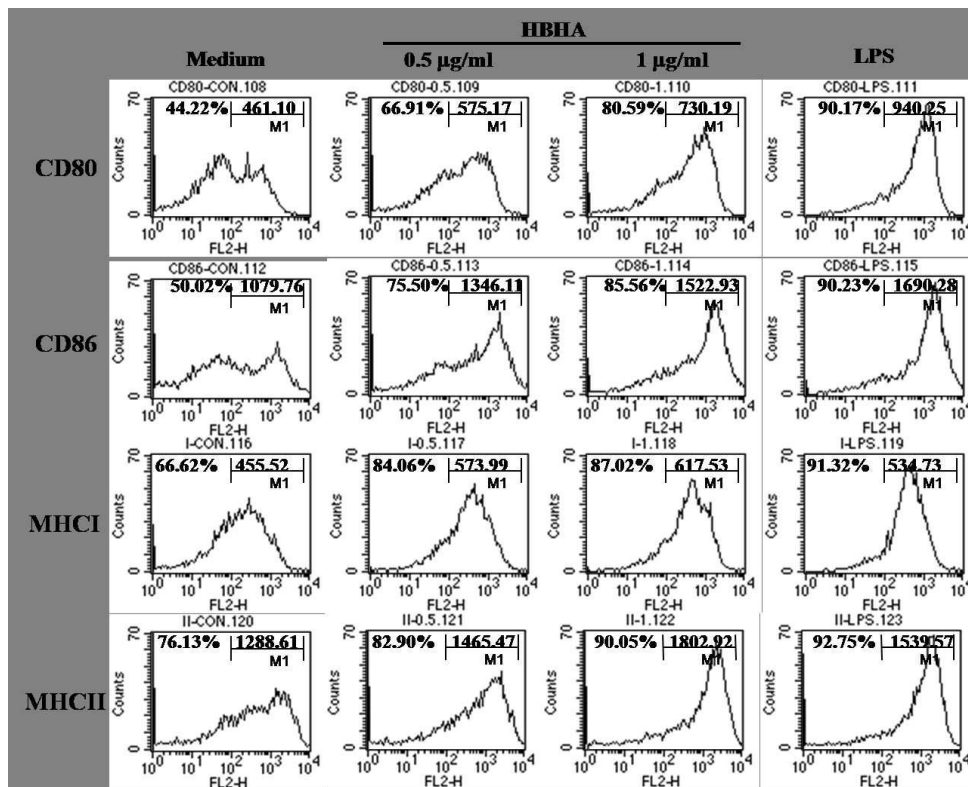
도면1



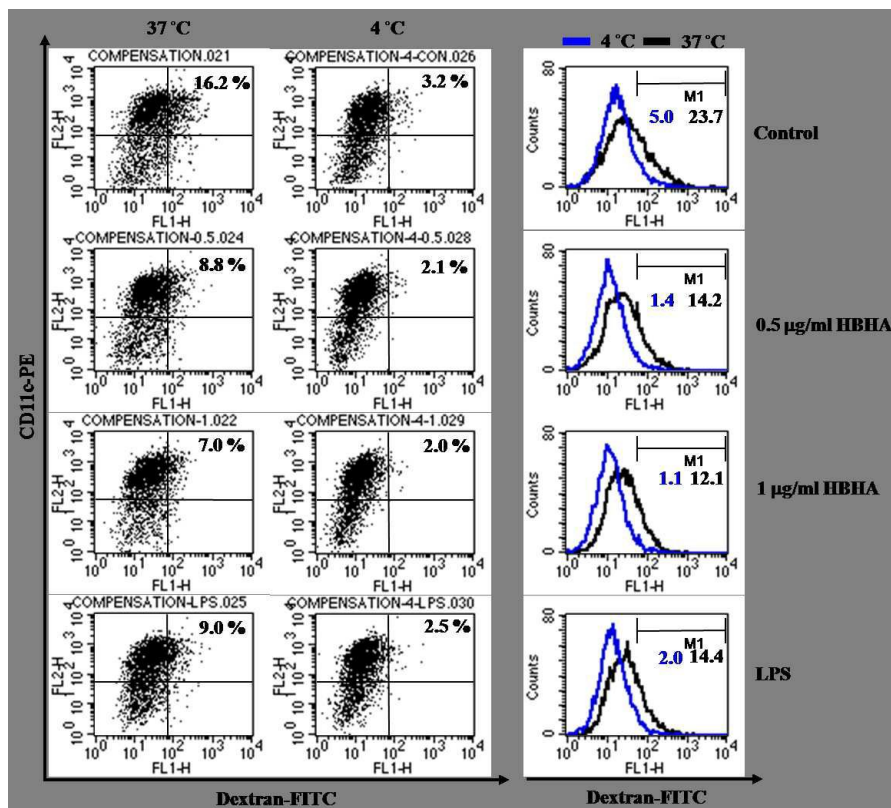
도면2



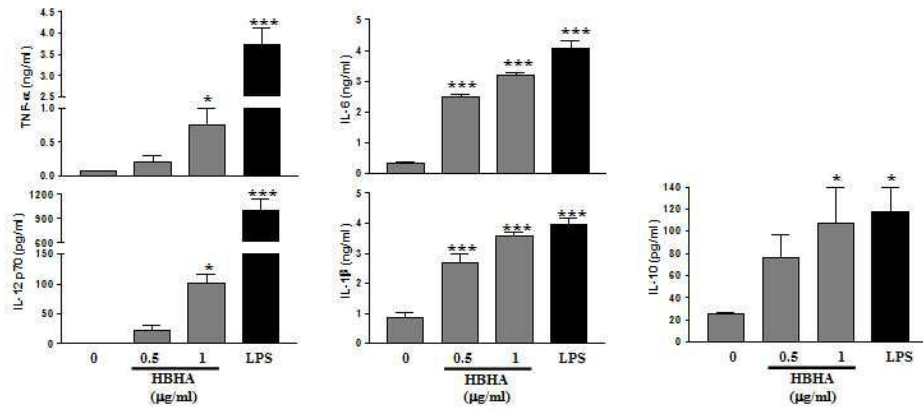
도면3



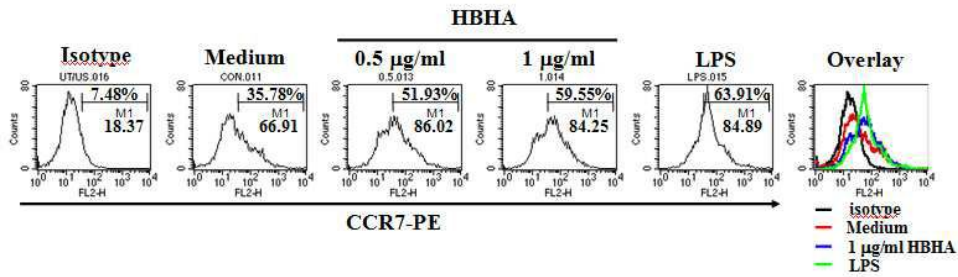
도면4



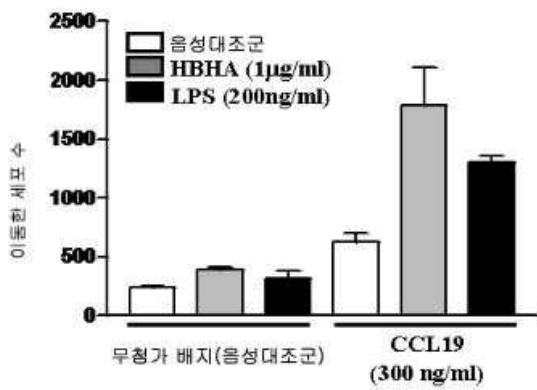
도면5



도면6



도면7



도면8

