



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0100077
(43) 공개일자 2010년09월15일

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01) C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0018760

(22) 출원일자 2009년03월05일

심사청구일자 2009년03월05일

(71) 출원인

울산대학교 산학협력단

울산 남구 무거2동 산29

(72) 발명자

고명석

제주특별자치도 제주시 구좌읍 행원리 742번지

김효정

울산광역시 남구 삼산동 평창2차 현대아파트 505동 1102호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

오국진

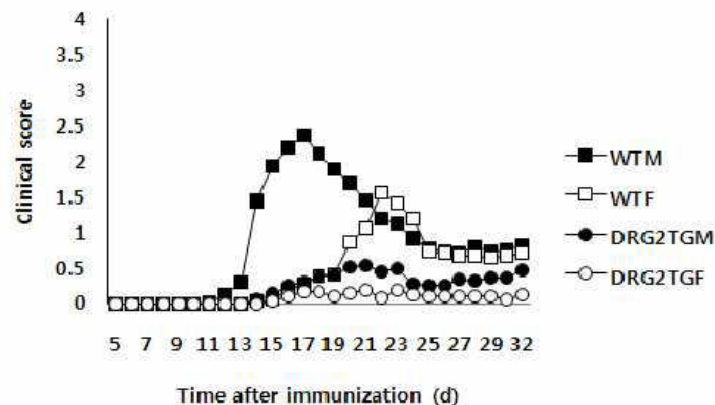
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 다발성 경화증의 예방 또는 치료 활성을 갖는 물질의 스크리닝 방법

(57) 요약

본 발명은 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질(DRG2)에 후보 물질을 처리하는 단계; 및 (b) 단계(a)에서 얻어진 DRG2의 활성 변화를 측정하고, DRG2의 활성을 증가시키는 물질을 선별하는 단계를 포함하는, 다발성 경화증(multiple sclerosis)의 예방 또는 치료 활성을 갖는 물질의 스크리닝 방법; 또는 (a') DRG2를 과발현하는 세포에 후보 물질을 처리하고 배양하는 단계; 및 (b') 단계(a')에서 배양물 중의 상기 DRG2의 생성량을 측정하고, DRG2의 생성량을 증가시키는 물질을 선별하는 단계를 포함하는, 다발성 경화증의 예방 또는 치료 활성을 갖는 물질의 스크리닝 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 DRG2를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현량을 측정할 수 있는 분자를 포함하는 다발성 경화증 진단용 키트로서, 상기 분자가 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 기질, 리간드, 또는 보조인자(cofactor); 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 상보적 서열을 갖는 프라이머인, 다발성 경화증 진단용 키트를 제공한다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

김홍경

울산광역시 남구 무거동 삼호아파트 103동 1004호

조화자

울산광역시 남구 무거동 815-1 아성 홈토피아 805호

정대균

서울특별시 강남구 청담동 11-23

박정우

울산광역시 남구 무거동 무거현대아파트 101동 703호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 KRF-2005-070-C00088

부처명 한국학술진흥재단

연구관리전문기관

연구사업명 순수기초연구그룹지원사업

연구과제명 다핵세포 분화에서 새로운 G protein의 역할

기여율

주관기관 울산대학교 산학협력단

연구기간 2005년 9월 1일 ~ 2008년 8월 31일

특허청구의 범위

청구항 1

(a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질에 후보 물질을 처리하는 단계; 및 (b) 단계(a)에서 얻어진 단백질의 활성 변화를 측정하고, 단백질의 활성을 증가시키는 물질을 선별하는 단계를 포함하는, 다발성 경화증(multiple sclerosis)의 예방 또는 치료 활성을 갖는 물질의 스크리닝 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단백질의 활성 변화 측정이 GPT-결합 분석법에 의해 수행되는 것을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 3

(a') 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 과발현하는 세포에 후보 물질을 처리하고 배양하는 단계; 및 (b') 단계(a')에서 배양물 중의 상기 단백질의 생성량을 측정하고, 상기 단백질의 생성량을 증가시키는 물질을 선별하는 단계를 포함하는, 다발성 경화증의 예방 또는 치료 활성을 갖는 물질의 스크리닝 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 과발현하는 세포가 서열번호 2의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포임을 특징으로 하는 스크리닝 방법.

청구항 5

서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현량을 측정할 수 있는 분자를 포함하는 다발성 경화증 진단용 키트로서, 상기 분자가 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 기질, 리간드, 또는 보조인자(cofactor); 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 상보적 서열을 갖는 프라이머인, 다발성 경화증 진단용 키트.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 서열번호 2의 염기 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 다발성 경화증 진단용 키트.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 분자는 검출가능한 표지로 표지된 것임을 특징으로 하는 다발성 경화증 진단용 키트.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 다발성 경화증(multiple sclerosis)의 예방 또는 치료 활성을 갖는 물질의 스크리닝 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 다발성 경화증 진단용 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] GTP-결합 단백질(G protein)은 세포 내의 여러 가지 조절에 관여하는 단백질로서 트리머릭(trimeric) G 단백질(예를 들어, 트랜스듀신(transducin)), 모노머릭(monomeric) G 단백질(예를 들어, ras), 및 단백질 합성에 관여하는 GTPase (예를 들어, elongation factor Tu) 등과 같은 중요한 3개의 서브타입이 존재하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 최근 들어 염기서열 및 기능이 다른 새로운 형태의 G 단백질들이 보고되고 있으며, 이 중 DRG (developmentally

regulated GTP-binding protein)은 GTP와 결합에 필요한 G1부터 G5까지의 5개의 부위를 모두 지니고 있고 크기는 트리머릭 G 단백질과 유사하다. 그러나 아미노산 서열이 트리머릭 G 단백질 뿐만 아니라 기존의 G 단백질 서브타입들과 전혀 다른 특성을 지니고 있어 새로운 서브타입으로 구분되고 있다.

[0004] DRG는 또한, 서열 및 기능이 상이한 DRG1 및 DRG2가 있으며(Schenker & Trueb (1997) *Cytogenet. Cell Genet.* 79, 274-275), 세균으로부터 사람에 이르기까지 거의 모든 종류의 세포에 존재한다. DRG 단백질은 진화적으로 매우 보존(conserved)되어 있으며, 예를 들어 사람의 DRG2 아미노산 서열은 마우스 및 소의 DRG2와 98%, 제노푸스(Xenopus)의 DRG2와 95%, 그리고 제브라피쉬(zebrafish)의 DRG2와 91%의 상동성을 보인다. 이와 같이 다양한 종류의 세포에 공통으로 존재하며 진화적으로 보존된 단백질(conserved protein)이라는 사실은 DRG protein이 세포의 성장이나 분화의 조절에 매우 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.

[0005] DRG 단백질은 비교적 최근에 발견되었고 대부분이 게놈 DNA 혹은 cDNA 클로닝 중에 우연히 발견된 것들이기 때문에 아직까지 그 기능이 잘 밝혀져 있지 않다. 마우스와 제노푸스의 경우 DRG 단백질은 뇌의 분화 초기에 발현이 증가했다가 분화가 진행됨에 따라 발현이 감소하는 특성이 관찰되었고 (Sazuka et al., (1992a) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 363-370 및 Sazuka et al., (1992b) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 371-377), 사람의 경우 정상적인 섬유아세포(fibroblast)에서는 발현이 되다가 SV40에 의하여 형질전환된 섬유아세포에서 발현이 감소하는 현상이 확인되었다 (Schenker et al., (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 25447-25453).

[0006] 본 발명자들은 라브도바이러스(rhabdovirus)에 감염된 어류세포에서 바이러스가 세포 밖으로 방출되기 시작할 즈음 DRG2의 발현이 증가함을 보고한 바 있고(Lee et al., (1998) *FEBS Lett* 429, 407-411), DRG2가 과발현된 사람의 T 세포인 JURKAT 세포(Jurkat cell)의 세포 주기가 G2/M phase에서 억제됨을 보고한 바 있다 (Song et al., (2004) *J. Biochem.* 135, 331-335). 또한, 세포 주기의 억제 결과, 세포의 성장이 억제되는 반면, 세포의 아포토시스(apoptosis)가 감소하는 것을 보고한 바 있다 (Ko MS et al. (2004) *Arch. Biochem. Biophys.* 422, 137-144). 이와 같은 결과들은 DRG2가 세포의 세포 주기(cell cycle)를 억제하고 아포토시스를 억제하여 세포의 분화에 중요한 역할을 담당할 가능성이 높음을 시사한다. 또한, 본 발명자들은 DRG2를 과발현하는 transgenic mouse (TG)를 제조하여, 얻어진 DRG2-과발현 TG를 이용하여 흉선 분화, 특히 에스트로젠-유도성 흉선 위축(estrogen-induced thymic atrophy)에 있어서의 DRG2 기능 분석을 수행한 바 있으며, DRG2가 흉선의 T-세포 분화에 관여한다는 것을 보고한 바 있다 (한국분자세포생물학회 추계학술대회, F-110, October 2006).

[0007] 한편, 다발성 경화증(multiple sclerosis, MS)은 중추신경계(central nerve system, CNS)에서 발병하는 염증성 수초탈락질환(demyelinating disorder)으로서 감각, 운동, 그리고 인식 장애 등을 수반한다(Ransohoff, R.M. (2006) *Trends Immunol.* 27:167-168). 다발성 경화증은 아직까지 세포수준이나 분자적인 수준에서 정확하게 밝혀지지 않았으나, 다발성 경화증의 동물모델인 실험적 자가면역성 뇌척수염(Experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)은 지난 80년간 많은 연구자들에 의해서 개발, 발전되어왔다.

[0008] EAE는 수초 항원(myelin antigens)의 일종인 수초염기성단백질(myelin basic protein, MBP), 단백질질단백질(proteolipidprotein, PLP), 그리고 수초 희소돌기아교세포 당단백질(myelin oligodendrocyte glycoprotein, MOG)등을 면역보강제(adjuvants)와 함께 주사함으로써 유도시킨다(Zamvil, S.S., et al. (1986) *Nature.* 324:258-260; Sobel, R.A., et al. (1994) *Neurochem. Res.* 19:915-921; Mendel, I., et al. (1995) *Eur. J. Immunol.* 25:1951-1959). EAE는 수초 항원 특이적인 Th-17 세포에 의해 유도되는 자가면역질환이다 (Langrish, C.L., et al. (2005) *J. Exp. Med.* 201:233-240; Park, H., et al. (2005) *Nat. Immunol.* 6:1133-1141).

[0009] 유전자 적중 결손된 쥐나 유전자 도입 쥐를 이용하여 EAE 병리에 중요한 역할을 담당하는 케모카인들과 사이토카인들이 보고된 바 있으며, 중추 신경계로 침윤한 면역 세포들과 주변에 위치한 글리아(glial) 세포들에 의해 생산되는 염증성 사이토카인들(TNF, IL1-1 β , Fas 리간드, 및 IFN- γ)과 케모카인들(MCP-1, MIP-1 α , Mig, IP-10 및 RANTES)은 조직화되어 병리적인 순서에 따라 염증 반응(inflammation)과 탈수초(demyelination) 그리고 액손 손상(axonal damage)을 일으키는 것으로 보고된 바 있다 (Lock, C. et al. (2002) *Nat. Med.* 8:500-508; Ibrahim, S.M. et al. (2001) *Brain* 124:1927-1938).

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

[0010] 본 발명자들은 DRG2의 기능을 밝혀내기 위하여 다양한 연구를 수행하던 중, 놀랍게도, DRG2를 과발현시킬 경우, 면역세포들의 IL-17발현이 감소되고, 그 결과 척수로의 면역세포 침투가 억제되어 탈수초 현상이 저해됨으로써

EAE 증세가 완화된다는 것을 발견하였다. 이는 DRG2가 과발현될 경우 다발성 경화증의 발생을 억제시킬 수 있으며, 또한 생체내 DRG2 발현량을 측정함으로써, 다발성 경화증의 발병 진단이 가능함을 나타낸다.

[0011] 따라서, 본 발명은 DRG2의 활성을 증가시키거나 DRG2를 과발현하는 세포에서의 DRG2 발현량(즉, 생성량)을 증가시킬 수 있는 물질 즉, 다발성 경화증의 예방 또는 치료 활성을 갖는 물질의 스크리닝 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 또한, 본 발명은 DRG2를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현량을 측정할 수 있는 분자를 포함하는 다발성 경화증 진단용 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

[0013] 본 발명의 일 태양에 따라, (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질에 후보 물질을 처리하는 단계; 및 (b) 단계(a)에서 얻어진 단백질의 활성 변화를 측정하고, 단백질의 활성을 증가시키는 물질을 선별하는 단계를 포함하는, 다발성 경화증(multiple sclerosis)의 예방 또는 치료 활성을 갖는 물질의 스크리닝 방법이 제공된다.

[0014] 본 발명의 다른 태양에 따라, (a') 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 과발현하는 세포에 후보 물질을 처리하고 배양하는 단계; 및 (b') 단계(a')에서 배양물 중의 상기 단백질의 생성량을 측정하고, 상기 단백질의 생성량을 증가시키는 물질을 선별하는 단계를 포함하는, 다발성 경화증의 예방 또는 치료 활성을 갖는 물질의 스크리닝 방법이 제공된다.

[0015] 본 발명의 또 다른 태양에 따라, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현량을 측정할 수 있는 분자를 포함하는 다발성 경화증 진단용 키트로서, 상기 분자가 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 기질, 리간드, 또는 보조인자(cofactor); 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 상보적 서열을 갖는 프라이머인, 다발성 경화증 진단용 키트가 제공된다.

효과

[0016] 본 발명에 의해 GPT-결합 단백질의 서브타입 중 하나인 DRG2가 과발현될 경우, 면역세포들의 IL-17발현이 감소되고, 그 결과 척수로의 면역세포 침투가 억제되어 탈수초 현상이 저해됨으로써 다발성 경화증의 발생을 억제시킬 수 있다는 것이 밝혀졌다. 따라서, 본 발명의 스크리닝 방법에 따르면, DRG2의 활성을 증가시키거나 DRG2의 발현량 (또는 생성량)을 증가시킬 수 있는 물질, 즉 다발성 경화증을 예방하거나 치료할 수 후보 물질을 검색할 수 있다. 또한, 환자로부터 분리한 검체(예를 들어, 혈액, 모발 등) 중의 DRG2 발현량을 측정할 경우 다발성 경화증의 진단이 가능하다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0017] 본 명세서에서 다발성 경화증(multiple sclerosis, MS)이라 함은 중추신경계(central nerve system, CNS)에서 발병하는 염증성 수초탈락질환(demyelinating disorder)으로서 감각, 운동, 그리고 인식 장애 등을 수반하는 질환을 말하며, 자가면역성 뇌척수염(autoimmune encephalomyelitis)을 포함한다.

[0018] 본 발명자들은 세포 분화에 있어서 DRG2의 역할을 밝히기 위하여 DRG2를 과발현하는 형질전환 마우스(transgenic mouse, DRG2 TG mouse)를 제조하여 DRG2 과발현에 의한 변화를 분석하였다. 놀랍게도, DRG2 과발현이 MOG 처리에 의하여 유도시킨 EAE 발생에 미치는 영향을 분석한 결과, EAE 발생이 유의성있게 억제된다는 것이 발견되었다. EAE는 IL-17을 분비하는 Th-17 세포에 의하여 유도되는데, DRG2 TG mouse의 경우 면역세포에서 IL-17의 분비가 현저하게 감소되었다. 이는 DRG2가 Th-17세포의 분화를 억제하여 EAE 발생을 억제함을 나타낸다. 또한 상기 결과는 DRG2의 발현량을 바탕으로 EAE 발생 가능성을 예측(즉, 진단)할 수 있음을 의미하며, DRG2 발현 혹은 활성을 증가시키는 물질을 스크리닝함으로써 다발성 경화증의 예방 또는 치료용 물질을 검색할 수 있음을 의미한다.

[0019] 본 발명의 스크리닝 방법은 DRG2 또는 DRG2를 과발현하는 세포에 후보물질을 처리하고, DRG2의 활성 변화 또는 세포로부터의 DRG2 생성량을 측정함으로써 DRG2의 활성을 증가시키는 물질을 선별하는 과정을 포함한다. DRG2의 아미노산 서열 및 염기서열은 GenBank 에 공지되어 있으며(accession number NM_001388), 각각의 서열은 서열번호 1 및 2와 같다.

[0020] 본 발명은 (a) 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질에 후보 물질을 처리하는 단계; 및 (b) 단계(a)에서

언어진 단백질의 활성 변화를 측정하고, 단백질의 활성을 증가시키는 물질을 선별하는 단계를 포함하는, 다발성 경화증의 예방 또는 치료 활성을 갖는 물질의 스크리닝 방법을 포함한다.

- [0021] 상기 DRG2에 후보물질을 처리하는 단계는 DRG2를 적절한 매질 (예를 들어, PBS 등)에 분산시킨 후, 후보 물질을 가함으로써 수행될 수 있다.
- [0022] 상기 후보 물질 처리 후, DRG2 활성 변화의 측정은 DRG2 활성을 측정할 수 있는 방법이라면 제한 없이 사용될 수 있다. 예를 들어, Sazuka, T. et al., "Expression of DRG During Murine Embryonic Development", *Biochem. Biophys., Res. Comm.*, 189:371-377 (1992) 등에 공지된 GPT-결합 분석법(GPT-binding assay)에 의해 DRG2 활성을 측정할 수 있다. 구체적으로는, 정제된 DRG2를 결합 완충액(예를 들어, 20 mM 트리스-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 2 mM MnCl₂, 1 mM 디티오쓰레이톨(dithiothreitol), 10 uM ATP) 중에 [³²P]-GPT와 함께 배양한 후, 얼음 중에서 약 30 분 동안 UV로 조사한다. 언어진 샘플을 항-DRG2 항혈청과 함께 배양한 후, 얼음 상에서 단백질 A-세파로스 정제 수지와 함께 배양하고, 단백질 A-항체 복합체를 필요에 따라 TNE 완충액 (10 mM 트리스-HCL, pH 7.8, 1% NP-40, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 ug/ml 아프로티닌) 등으로 세척한 후, SDS-폴리아크릴아미드 겔 상에서 전기영동함으로써, DRG2 활성 변화를 측정할 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 (a') 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 과발현하는 세포에 후보 물질을 처리하고 배양하는 단계; 및 (b') 단계(a')에서 배양물 중의 상기 단백질의 생성량을 측정하고, 상기 단백질의 생성량을 증가시키는 물질을 선별하는 단계를 포함하는, 다발성 경화증의 예방 또는 치료 활성을 갖는 물질의 스크리닝 방법을 포함한다.
- [0024] 상기 DRG2를 과발현하는 세포는 서열번호 2의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포일 수 있다. 상기 서열번호 2의 염기 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로 형질전환된 세포는 본 발명자들의 선행 논문 즉, Ko MS et al. (2004) *Arch. Biochem. Biophys.* 422, 137-144 및 Song H et al. (2004) *J. Biochem.* 135, 331-335에 개시된 세포 즉, Jurkat-LNCX2-DRG2 를 사용할 수 있다. 상기 세포는 서열번호 2의 DRG2 유전자를 pLNCX2 벡터에 삽입시켜 제조한 pLNCX2-DRG2 벡터로 주르카트(Jurkat) 세포를 형질전환시킨 세포로서, 당업자는 상기 본 발명자들의 논문으로부터 서열번호 2의 DRG2 유전자 및 pLNCX2 벡터 등을 사용하여 아무런 어려움 없이 Jurkat-LNCX2-DRG2를 제작할 수 있을 것이다.
- [0025] DRG2를 과발현하는 세포에 후보 물질을 처리한 후, 배양하는 단계는 통상의 주르카트 세포 배양 조건하에서 수행될 수 있으며, 바람직하게는 상기 본 발명자들의 선행 논문에 개시한 배양 조건, 예를 들어 10% 소 태아 혈청 (fetal bovine serum)과 100 μg/ml의 페니실린-스트렙토마이신이 보충된(supplemented) Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) 배지에서 수행될 수 있다.
- [0026] 배양물 중의 DRG2의 생성량을 측정하고, DRG2의 생성량을 증가시키는 물질을 선별하는 단계[즉, 단계(b')]는 DRG2의 생성량을 측정할 수 있는 방법이라면 제한 없이 사용될 수 있으며, 예를 들어 상기한 GTP-결합 분석법에 의해서 수행될 수도 있다.
- [0027] 본 발명의 다른 태양에 따라, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현량을 측정할 수 있는 분자를 포함하는 다발성 경화증 진단용 키트로서, 상기 분자가 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 기질, 리간드, 또는 보조인자(cofactor); 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 상보적 서열을 갖는 프라이머인, 다발성 경화증 진단용 키트가 제공된다.
- [0028] 상기 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 단백질(즉, DRG2)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 서열번호 2의 염기 서열을 갖는 것이 바람직하다.
- [0029] 상기 DRG2를 코딩하는 유전자의 발현량을 측정할 수 있는 분자로는, 상기 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 기질, 리간드, 또는 보조인자(cofactor); 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자에 특이적인 상보적 서열을 갖는 프라이머일 수 있다.
- [0030] 생명공학 분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 따라 DRG2를 특이적으로 인식하는 폴리클론 항체 또는 단일클론 항체를 제조할 수 있으며, 해당 항체를 포함하는 진단용 키트를 제조할 수 있다. 또한, DRG2에 대한 기질(예를 들어, GTP), 리간드, 또는 보조인자를 포함하도록 본 발명의 키트를 제작할 수도 있다. 또한, DRG2를 코딩하는 유전자(예를 들어, 서열번호 2의 염기서열을 갖는 유전자)에 특이적인 상보적 서열을 갖는 프라이머를 생명공학 분야에서 통상적으로 사용되는 방법에 따라 제조할 수 있으며, 해당 프라이머를 포함한 진단용 키트를 제조할 수도 있다.

[0031] 본 발명의 진단용 키트에 있어서, 상기 DRG2를 코딩하는 유전자의 발현량을 측정할 수 있는 분자는 검출가능한 표지(예를 들어, 발색단 등)로 표지될 수 있다. 또한, 본 발명의 진단용 키트는 상기 프라이머 또는 상기 프라이머로부터 제작된 프로브가 기관상에 고정화되어 있는 마이크로어레이 형태, 즉 DNA 칩 등의 칩(chip) 형태일 수도 있다.

[0032] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명을 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0033] <재료 및 시험방법>

[0034] 1. DRG2 과발현 마우스 제조

[0035] C57BL6 생쥐 비장(spleen)의 mRNA로부터 합성한 cDNA를 주형으로하고 BamHI 제한효소 부위가 들어 있는 mDRG2-U (5'-CGCGGATCCACTATGGGGATCTTGA-3', 서열번호 3), 및 XhoI 제한효소 부위가 들어 있는 mDRG2-D (5'-CCGCTCGAGCTACTTCTTCAATCTGGA-3', 서열번호 4)의 프라이머를 사용하여 생쥐의 DRG2 cDNA (Genbank accession number BC082564)를 증폭하였다. 증폭된 PCR 산물을 BamHI과 XhoI으로 자른 후 pcDNA3 (Invitrogen)의 BamHI/XhoI 부위에 서브클로닝하여, CMV (cytomegalovirus) promoter-T7 promoter-mouse DRG2 cDNA-SP6 promoter-BGH polyA 의 구조를 지니는 플라스미드 pcDNA/mDRG2를 제작하였다(도 1A 참조). 상기 플라스미드 구조체를 사용하여 DRG2 과발현 마우스를 (주)마크로젠에 의뢰하여 다음과 같이 제작하였다. 상기 플라스미드 구조체를 C57BL 생쥐의 수정란 융성 전핵에 주입한 후 C57BL/6 대리모에 이식하였다. 여기에서 태어난 58 마리의 생쥐 꼬리를 잘라 DNA를 추출한 다음 pcDNA 특이 프라이머인 T7 프라이머 (5'-AATACGACTCACTATAGGGA-3', 서열번호 5)과 mouse DRG2 특이 프라이머인 mDRG2-694D (5'-TGTATTTCATGTAGGATGAGC-3', 서열번호 6) (도 1A)를 사용하여 PCR을 수행하였다. 그 결과, 도 1B와 같이 8, 33, 38, 45, 48, 50번째 생쥐가 DRG2 transgene을 지니고 있음을 확인하였다. 이들의 비장 mRNA에서 cDNA를 합성한 다음 mouse DRG2 특이 PCR 프라이머 (mDRG2-570U, 5'-CTCAACAGTCACACTGACAC-3'(서열번호 7); mDRG2-817D, 5'-TACCGCAACTGATAACTACA-3'(서열번호 8)를 사용하여 DRG2 발현을 확인 한 결과 45와 50번 생쥐에서 DRG2 발현이 증가하였음을 확인하였다 (도 1C). 따라서 45번과 50번을 C57BL 생쥐와 교배를 시켜서 이후의 연구에 사용하였다.

[0036] 2. EAE 유도

[0037] 8-12주령의 DRG2가 과발현 마우스(DRG2 transgenic mice)와 야생형(wild-type) 마우스에 한마리당 200 μ g MOG(35-55) (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) 펩타이드를 완전 프로인트 어쥬반트(complete freund's adjuvant) 및 5 mg/ml의 *Mycobacterium tuberculosis* H37RA를 혼합하여 피하 주사하였다. 같은 날과 MOG (35-55) 주사 후 이틀 후에 마리당 200 ng의 pertussis toxin 을 100 μ l의 인산 완충 식염수(phosphate buffered saline, PBS)에 희석하여 마우스의 복강에 주사하였다.

[0038] 3. 조직학적 분석 및 면역조직화학적 분석(Histology and Immunohistochemistry)

[0039] MOG(35-55) 주사한 후 17일 후에 쥐에서 척수(spinal cords)를 분리하여 10% 중성 완충 포르말린(neutral buffered formalin)으로 고정하여 파라핀으로 embedding 한 후 5 μ m 두께의 절편을 만들었다. 이 절편에 헤마토톡신 및 에오신(hematoxylin and eosin) 염색과 룩솔 패스트 블루(Luxol fast blue) 염색을 통해 척수 조직의 병변 정도를 확인하였다.

[0040] 4. 사이토카인 발현 분석

[0041] MOG(35-55) 주사한 후 14일 후에 쥐의 비장에서 세포를 분리하여 96 웰 세포배양 플레이트에 세포를 분주한 후 0-100 μ g/ml MOG(35-55) 펩타이드를 10% FBS가 함유된 RPMI-1640 배지에 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 세포 배양액을 수거한 후 IL-17의 발현 차이를 DuoSet ELISA development Systems (R&D Systems)으로 확인하였으며, 실험방법은 각각의 제조회사에서 정하는 프로토콜에 준하여 시행하였다.

[0042] <결과 및 고찰>

1. 발병지수(clinical score)

DRG2 과발현이 면역반응에 변화가 있는지 확인하기 위하여 정상마우스(WT) 및 DRG2 TG 마우스의 암컷(F)와 수컷(M)에 MOG를 주사하였다. 이후 일정 시간 간격으로 발병지수(clinical score)를 분석하였다. 그 결과는 표 1 및 도 2와 같다.

표 1

Genotype	발병	발병일(일)	최대 발병지수 (Maximum clinical score)
WT 수컷	5 중 5 (100%)	13.4	2.6±0.245
WT 암컷	5 중 5 (100%)	18.0	2.4±0.307
DRG2TG 수컷	5 중 4 (80%)	16.3	0.83±0.092
DRG2TG 암컷	5 중 2 (40%)	17.5	0.4±0.063

표 1의 결과로부터 알 수 있는 바와 같이, DRG2 과발현 마우스에서 암컷(0.4±0.063)과 수컷(0.83±0.092) 모두 정상마우스에서보다 (암컷, 2.4±0.307; 수컷, 2.6±0.245) 발병지수가 현저하게 감소하였다. 또한, 발병 빈도에 있어서 정상마우스는 암수 모두 100 % 인데 비하여 DRG2 TG 마우스는 암컷 40%, 수컷 80%로 감소하였다.

2. H&E 염색에 의한 분석

다발성 경화증 및 EAE는 신경세포의 축색돌기를 감싸고 있는 myelin sheath가 면역세포의 공격을 받아 제거되어 생기는 자가면역질환이다. 즉, 중추신경계에 염증반응이 일어나 신경세포 주변으로 면역세포가 침입(infiltration)되고 신경 세포 주변으로 불러 모아진 면역세포들이 신경세포의 축색돌기를 감싸고 있는 myelin sheath를 공격하여 파괴함으로써 생기는 뇌질환이다. DRG2 TG 마우스의 EAE 감소가 신경세포 주변에 면역세포의 침입 차이에 의한 것인지를 확인하기 위하여 EAE 유도 17일 후 각각의 마우스에서 척수를 분리하여 척수 내의 면역세포의 침입(infiltration)을 보기 위하여 H&E 염색을 하였다. 그 결과는 도 3과 같다. 도 3에서 알 수 있는 바와 같이, EAE를 유도하지 않은 경우 정상마우스와 DRG2 TG 마우스 모두 EAE 병변 현상이 나타나지 않았으나, EAE를 유도하였을 때 정상마우스에서는 많은 수의 면역 세포들이 척수 내로 침입하였다. 그러나 DRG2 TG 마우스의 경우 척수로 침입하여 들어온 면역세포의 수가 현저하게 감소하였다.

3. 룩솔 패스트 블루(Luxol fast blue) 염색에 의한 분석

DRG2 TG 쥐 척수의 신경세포 주위에 불러 모아진 면역세포 수가 감소한 결과 실제 탈수초(demyelinating) 현상을 억제하였는지 확인하기 위하여, 상기에서와 같이 척수의 절편을 대상으로 룩솔 패스트 블루(Luxol fast blue) 염색을 수행하여 탈수초 정도를 관찰하였다. 그 결과는 도 4와 같다. 도 4에서 알 수 있는 바와 같이, 정상마우스의 경우 MOG 처리에 의하여 심한 탈수초 현상이 발생한 반면, DRG2 TG 마우스의 경우 탈수초 현상이 거의 관찰되지 않았다.

4. 사이토카인 분석

사람의 다발성 경화증 및 이의 동물 모델인 EAE 모두 IL-17에 의한 염증반응이 중요한 원인으로 알려져 있다. 따라서 DRG2 TG 마우스의 경우 IL-17의 발현에 변화가 있는지를 확인하기 위하여, DRG2 TG 마우스 및 정상마우스의 임파절(lymph node) 및 비장(spleen)에서 면역세포들을 추출한 다음, 배양을 하면서 MOG를 처리하였다. 이후 [3H]티미딘 혼입 분석([3H]thymidine incorporation assay)를 통하여 면역세포들의 증식(proliferation)을 분석하였으며, ELISA를 통하여 배양액에 존재하는 IL-17의 양을 분석하였다. 그 결과는 도 5와 같다. 도 5로부터, DRG2의 비장세포에서 T 세포의 증식 및 IL-17 발현이 감소함을 확인할 수 있다.

이상의 결과들은 DRG2가 과발현되면 면역세포들의 IL-17발현이 감소되고, 그 결과 척수로의 면역세포 침투가 억

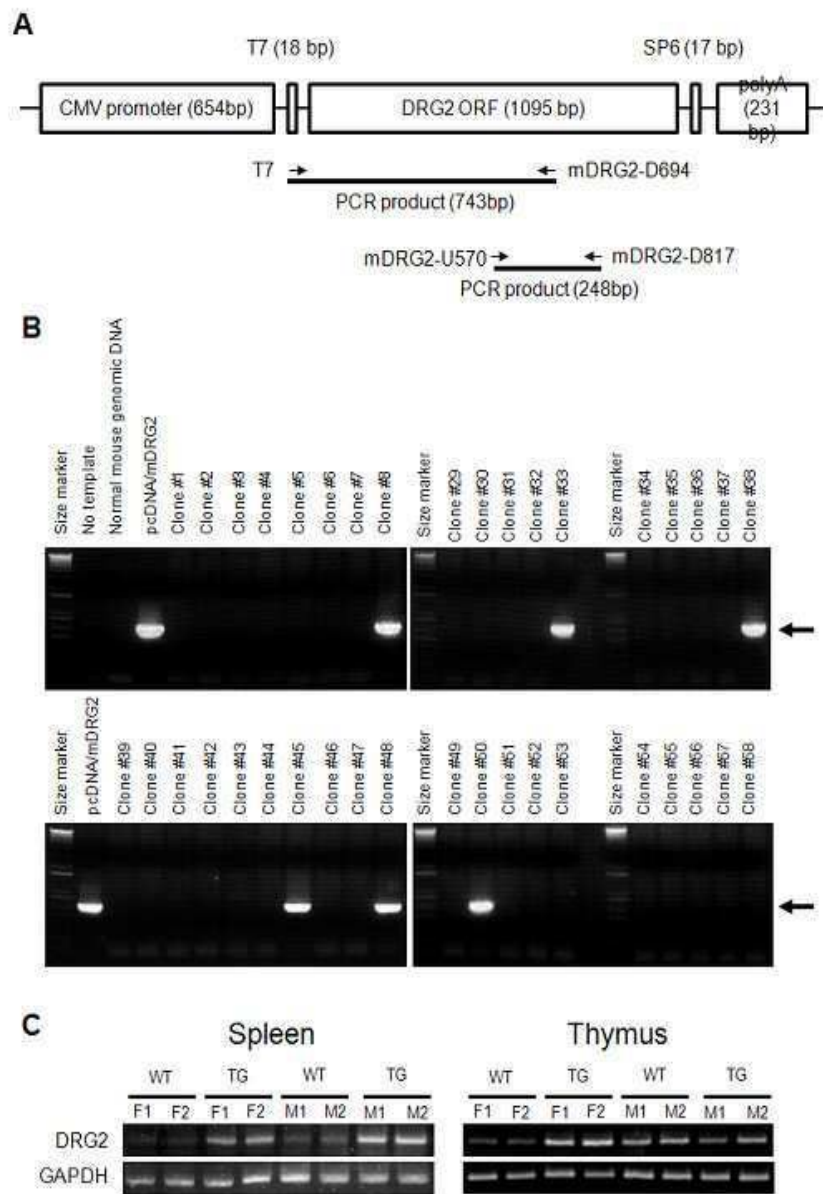
제되어 탈수초 현상이 저해됨으로써 EAE 증세가 완화된다는 것을 나타낸다. 따라서, DRG2가 과발현될 경우 다발성 경화증의 발생을 억제시킬 수 있으며, 또한 생체내 DRG2 발현량을 측정함으로써, 다발성 경화증의 발병 진단이 가능함을 시사한다.

도면의 간단한 설명

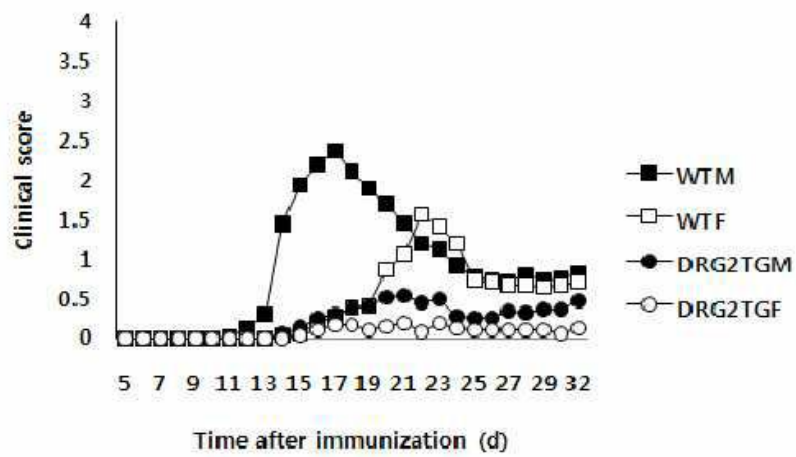
- [0054] 도 1A는 DRG2 과발현 마우스 제작에 사용한 DRG2 플라스미드 구조체를 나타낸다. T7 프라이머 및 mDRG2-D694 프라이머를 마우스의 DNA에 존재하는 DRG2 transgene 확인을 위한 PCR에 사용하였고, mDRG2-U570 및 mDRG2-D817 프라이머는 마우스 세포에서 DRG2의 mRNA 발현 분석을 위한 RT-PCR에 사용하였다. 도 1B는 수정란을 이식한 C57BL/6 대리모에서 태어난 58 마리의 생쥐 꼬리의 DNA를 대상으로 T7과 mDRG2-694D primer들을 사용하여 PCR을 수행한 결과이다. 화살표는 DRG2의 PCR 산물을 나타낸다. 도 1C는 DRG2 과발현 마우스 clone #45의 비장(spleen) 및 흉선(thymus) mRNA에서 cDNA를 합성한 다음 mDRG2-570U 및 mDRG2-817D 프라이머들을 사용하여 RT-PCR을 수행한 결과이다.
- [0055] 도 2는 DRG2 과발현이 면역반응에 변화가 있는지 확인하기 위하여 정상마우스(WT) 및 DRG2 TG 마우스의 암컷(F)와 수컷(M)에 MOG를 주사한 후, 일정 시간 간격으로 발병지수(clinical score)를 분석한 결과이다.
- [0056] 도 3은 EAE 유도 17일 후 정상마우스 및 DRG2 TG 마우스에서 척수를 분리하여 척수 내의 면역세포를 H&E 염색을 한 결과이다.
- [0057] 도 4는 EAE 유도 17일 후 정상마우스 및 DRG2 TG 마우스에서 척수를 분리하여 척수 내의 면역세포를 룩솔 패스트 블루(Luxol fast blue) 염색을 한 결과이다.
- [0058] 도 5는 DRG2 TG 마우스 및 정상마우스의 비장세포의 증식(A) 및 IL-17의 양(B)을 분석한 결과이다.

도면

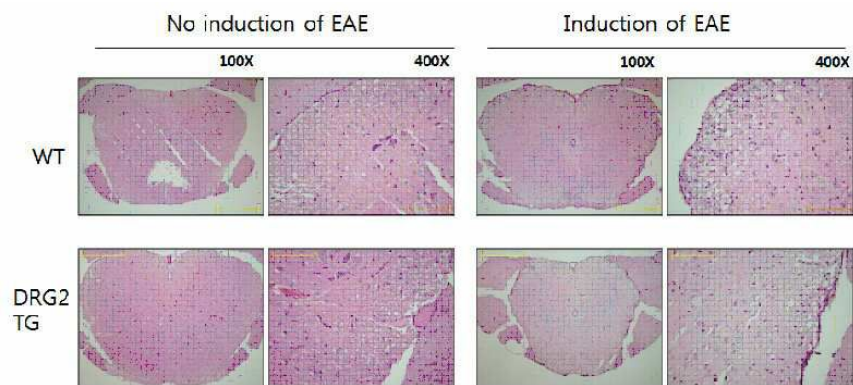
도면1



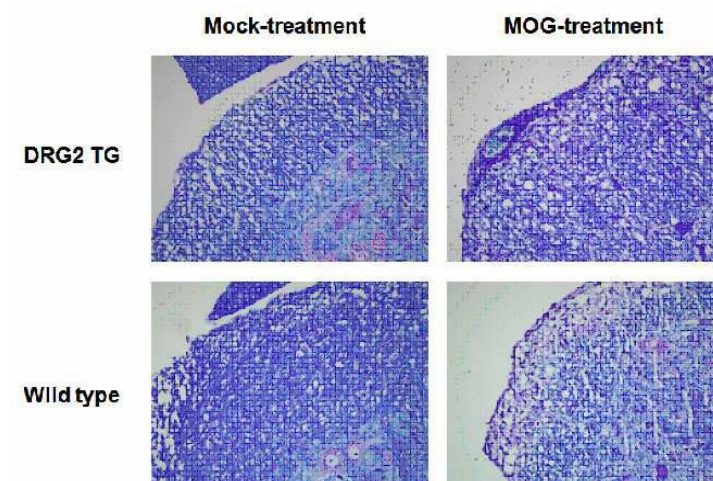
도면2



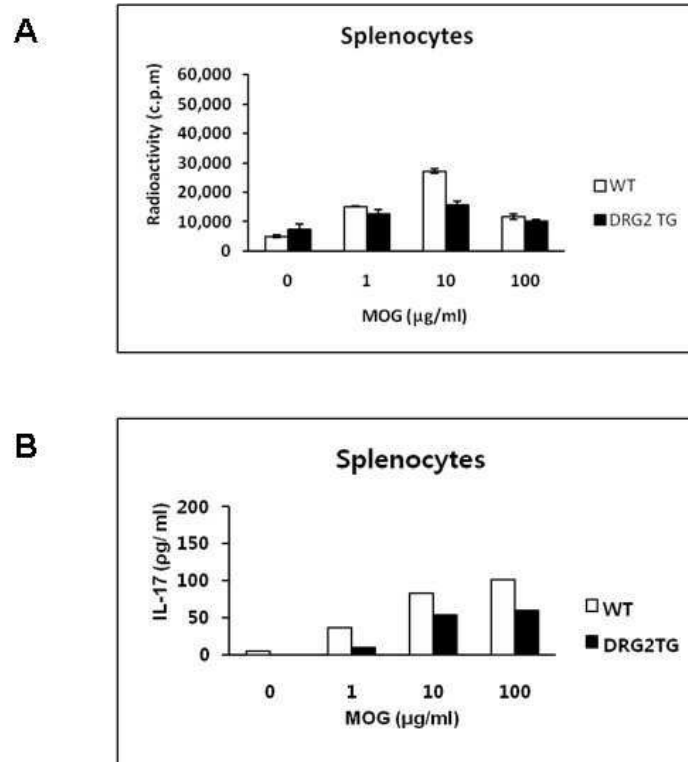
도면3



도면4



도면5



서열목록

<110> University of Ulsan Foundation For Industry Cooperation
 <120> Screening methods for candidate materials having a prophylactic or treating activity of multiple sclerosis

<130> PN0248

<160> 8

<170> Kopatent In 1.71

<210> 1
 <211> 364
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 Met Gly Ile Leu Glu Lys Ile Ser Glu Ile Glu Lys Glu Ile Ala Arg
 1 5 10 15

Thr Gln Lys Asn Lys Ala Thr Glu Tyr His Leu Gly Leu Leu Lys Ala
 20 25 30

Lys Leu Ala Lys Tyr Arg Ala Gln Leu Leu Glu Pro Ser Lys Ser Ala
35 40 45

Ser Ser Lys Gly Glu Gly Phe Asp Val Met Lys Ser Gly Asp Ala Arg
50 55 60

Val Ala Leu Ile Gly Phe Pro Ser Val Gly Lys Ser Thr Phe Leu Ser
65 70 75 80

Leu Met Thr Ser Thr Ala Ser Glu Ala Ala Ser Tyr Glu Phe Thr Thr
85 90 95

Leu Thr Cys Ile Pro Gly Val Ile Glu Tyr Lys Gly Ala Asn Ile Gln
100 105 110

Leu Leu Asp Leu Pro Gly Ile Ile Glu Gly Ala Ala Gln Gly Lys Gly
115 120 125

Arg Gly Arg Gln Val Ile Ala Val Ala Arg Thr Ala Asp Val Ile Ile
130 135 140

Met Met Leu Asp Ala Thr Lys Gly Glu Val Gln Arg Ser Leu Leu Glu
145 150 155 160

Lys Glu Leu Glu Ser Val Gly Ile Arg Leu Asn Lys His Lys Pro Asn
165 170 175

Ile Tyr Phe Lys Pro Lys Lys Gly Gly Gly Ile Ser Phe Asn Ser Thr
180 185 190

Val Thr Leu Thr Gln Cys Ser Glu Lys Leu Val Gln Leu Ile Leu His
195 200 205

Glu Tyr Lys Ile Phe Asn Ala Glu Val Leu Phe Arg Glu Asp Cys Ser
210 215 220

Pro Asp Glu Phe Ile Asp Val Ile Val Gly Asn Arg Val Tyr Met Pro
225 230 235 240

Cys Leu Tyr Val Tyr Asn Lys Ile Asp Gln Ile Ser Met Glu Glu Val
245 250 255

Asp Arg Leu Ala Arg Lys Pro Asn Ser Val Val Ile Ser Cys Gly Met

260	265	270
Lys Leu Asn Leu Asp Tyr Leu Leu Glu Met Leu Trp Glu Tyr Leu Ala		
275	280	285
Leu Thr Cys Ile Tyr Thr Lys Lys Arg Gly Gln Arg Pro Asp Phe Thr		
290	295	300
Asp Ala Ile Ile Leu Arg Lys Gly Ala Ser Val Glu His Val Cys His		
305	310	315 320
Arg Ile His Arg Ser Leu Ala Ser Gln Phe Lys Tyr Ala Leu Val Trp		
325	330	335
Gly Thr Ser Thr Lys Tyr Ser Pro Gln Arg Val Gly Leu Thr His Thr		
340	345	350
Met Glu His Glu Asp Val Ile Gln Ile Val Lys Lys		
355	360	
<210>	2	
<211>	1888	
<212>	DNA	
<213>	Homo sapiens	
<400>	2	
cggaattgcc ggtgccgccg ccaccgctgt ctgtgcgcc accctctgctg ctaccatggg		60
gatcttagag aagatctcgg agatcgagaa ggagatcgct cggacacaga agaacaaggc		120
cactgagtat catctgggcc tgctgaaagc taagctcgcc aagtatcggg cccagctcct		180
ggaaccgtcc aaatcggcct cgtccaaagg agagggcttt gatgtcatga agtcgggtga		240
tgcccggtgtg gcgctgattg gatttccttc tgtgggtaag tccacattct tgagtctgat		300
gacctccacg gccagcgagg cagcgtccta tgagttcacc actctgacgt gtattcctgg		360
ggtcattgaa taaaagggtg ccaacatcca gtcctggac cttcctggaa tcattgaagg		420
cgcagcccaa ggaaaaggcc gtggccggca ggtgatcgct gtggcgcga cggctgacgt		480

catcatcatg atgttgatg ccaccaagg agaggtgcag aggtctctgc tggagaagga	540
gttgaggtct gtggcatcc gcctcaacaa gcacaagcct aacatctact tcaagcccaa	600
gaaaggtggt ggcatctcct ttaactcgac agtcacgtg acccagtgtc cggaaaagct	660
ggtgcagctc atcctgcacg aatacaagat ctcaatgca gaagtgttt tccgagaaga	720
ctgtccccg gacgagttca tcgatgtgat ctggggcaac cgggtgtaca tgccctgcct	780
glatgtttat aacaaaatcg accagatctc catggaagag gtggaccgcc tggcccgaaa	840
acccaacagt gtggtcatca gctgcggcat gaagctgaac ctggactatc tgctggagat	900
gctttgggag tacttggccc tgacctgcat ctacaccaag aagagaggac agaggccaga	960
cttcacagac gccatcattc tccgaaagg ggctcagtg gagcacgtgt gccaccgcat	1020
ccaccggtca ctgcccagcc agttcaagta cgccttggtg tggggcacca gcaccaagta	1080
cagtcgcgag cgggtgggcc tgaccacac catggagcat gaggacgtca tccagatcgt	1140
gaagaagtaa cggcgctgc cgggcctccc gccacctgc ctgtctccc tggggaggtg	1200
gtcccactgg gacacacaaa cacccaaaca gaaaaataca aatacacgta cccaggaag	1260
gggtccctca agtctctgct atttacagaa gtttcttcag taggcagacg aagagtgtgt	1320
tggggcaaag gggctcggtt ggaggcattt ccataagac tgagccctct catgggggtt	1380
ttgagtttgt agtctgagc ctgcatctgt gcctcccagc cccctgcact gagggagcaa	1440
gttccccaca tggccgccag ccagggccta aagcagatgg catgctcagt gccaggttg	1500
tagctgggcc tgtttgggtc cctggaggct gtggtctgtg tcatggcacc tcactccctc	1560
agctcttgcc agcttctctg acacttgggt tgggggccct tccaggagga aaccccttg	1620

ggtgccccac acagggctct ccatgatggg aaccagtggg tagtggcttc aaagggccag 1680

ctgacaccct ccacagccta aggggtgtcc taaagtcct cccctgtat tccccctccc 1740

agggcagccc ctgcccagca caaaaccca ggaccctggc tctgcacgcc tggggcaggg 1800

acttttgagt ttaggatctg tattttctaa gtccccagtt ctctggctc tcctttctga 1860

aataaaggat tgaaaacggt tcctgttc 1888

<210> 3
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 3
 cgcgatcca ctatgggat cttgga 26

<210> 4
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 4
 ccgctcgagc tacttcttca caatctgga 29

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Primer

<400> 5
aatacgactc actatagga 20

<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 6
tgtattcatg taggatgagc 20

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 7
ctcaacagtc aactgacac 20

<210> 8
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

<400> 8
taccgcaact gataactaca 20