



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년06월13일

(11) 등록번호 10-2408192

(24) 등록일자 2022년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/202 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/202 (2013.01)

A61P 29/00 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2020-0107409

(22) 출원일자 2020년08월25일

심사청구일자 2020년08월25일

(65) 공개번호 10-2022-0026425

(43) 공개일자 2022년03월04일

(56) 선행기술조사문헌

Frontiers in Immunology, 10, 2241/1-14, 2019.*

(뒷면에 계속)

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

이상학

서울특별시 강남구 압구정로29길 71, 33동 102호 (압구정동, 현대아파트)

안수진

서울특별시 용산구 효창원로 17, 107동 2003호(산천동, 리버힐삼성아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 5 항

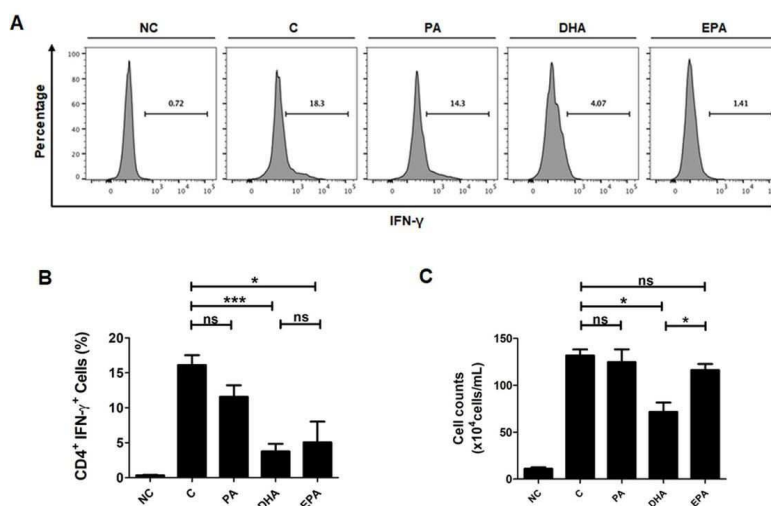
심사관 : 성선영

(54) 발명의 명칭 도코사헥사엔산 및 에이코사펜타엔산, 또는 이들의 조합을 이용하여 적응성 면역을 조절하는 방법

(57) 요약

도코사헥사엔산 및 에이코사펜타엔산, 또는 이들의 조합을 이용하여 적응성 면역을 조절하는 방법, 및 면역질환 또는 염증질환을 치료하는 방법에 관한 것이다. 일 양상에 따르면, DHA 및 EPA 각각은 적응성 면역의 조절 방식, 구체적으로는 수지상 세포에 의존한 방식인지 여부에 따라 면역 조절 효과가 달라질 수 있으므로, 이를 활용하여 보다 효율적으로 적응성 면역을 조절하고, 면역질환 및 염증질환의 치료 효과를 극대화할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 37/00 (2018.01)

(72) 발명자

이재호

서울특별시 서대문구 연세로 50, 제중학사동(신촌동)

최유리

서울특별시 양천구 목동동로 50, 1219동 702호(신정동, 목동신시가지아파트12단지)

(56) 선행기술조사문헌

Kidney International, 67, 867-874, 2005.*

Nutrients, 11, 1400/1-17, 2019.

Toxicology and Applied Pharmacology, 282, 61-67, 2015.

Journal of Surgical Research, 173, 161-170, 2012.

Brain, Behavior, and Immunity, 25, 872-882, 2011.

J. Am. Coll. Nutr., 23(1), 71-78, 2004.

Frontiers in Immunology, 11, 1249/1-10, 2020.

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711095803

과제번호 2019R1F1A1057952

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 유전자 적중 마우스를 통한 환자발굴 CDKAL1의 지단백 대사조절 분자기전 규명

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교

연구기간 2019.06.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345281594

과제번호 2018R1D1A1B07043855

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(교육부)(R&D)

연구과제명 죽상동맥경화증 고위험 환경에서 clec4d 역할규명 기반 혈관질환 제어기전 탐색

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교

연구기간 2018.06.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

시험관 내(*in vitro*)에서 도코사헥사엔산 (DHA: docosahexaenoic acid), 에이코사펜타엔산 (EPA: eicosapentaenoic acid) 또는 이들의 조합을 $CD4^{+}$ 미감작 T 세포에 투여하는 단계를 포함하는 적응성 면역 (adaptive immunity)을 조절하는 방법으로서,

상기 적응성 면역을 조절하는 것은 $CD4^{+}$ 미감작 T 세포로부터 보조 T 세포로의 분화, 보조 T 세포의 증식, 보조 T 세포에서의 사이토카인 분비, 또는 수지상 세포 상의 공동-자극 분자의 발현을 조절하는 것인 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 수지상세포의 존재 하에 수지상세포-의존적 방식으로 적응성 면역을 조절하는 경우, DHA에 의한 적응성 면역 조절 효과가 EPA에 비해 더 높은 것이고; 수지상세포의 비존재 하에 수지상세포-비의존적 방식으로 적응성 면역을 조절하는 경우, EPA에 의한 적응성 면역 조절 효과가 DHA에 비해 더 높은 것인 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 DHA 및 EPA에 의한 적응성 면역 조절은 G 단백질 연결 수용체 120 (GPR 120: G-protein coupled receptor 120)에 의해 영향을 받지 않는 것인 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 DHA에 의해 보조 T 세포에서 Tiam1, Efna5, 또는 Igf1 유전자는 상향-조절되는 것이고; Prkacb, Gng2, Grin1, 또는 Vegfa 유전자는 하향-조절되는 것인 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 EPA에 의해 보조 T 세포에서 Cpt1a 유전자는 상향-조절되는 것이고; Runx2, Vegfa, Itga2, 또는 Slc27a2 유전자는 하향-조절되는 것인 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 도코사헥사엔산 및 에이코사펜타엔산, 또는 이들의 조합을 이용하여 적응성 면역을 조절하는 방법, 및 면역질환 또는 염증질환을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 오메가-3 지방산은 인간의 간, 세포막, 혈관 및 심장과 같은 다양한 부위에서 작용하는 것으로 알려져 있다 (Goel, Int J Mol Sci 2018). 리포단백질 대사, 항-염증, 항-산화, 항-혈전증, 및 플라크 안정화에 대한 효과 등이 보고된 바 있다 (Kawashiri, Circ J 2018). 도코사헥사엔산 (DHA: docosahexaenoic acid) 및 에이코사펜타엔산 (EPA: eicosapentaenoic acid)은 대식세포 및 호중구의 기능에 영향을 미칠 수 있고 (Hua, IOVS 2014; Gutierrez, IJMS 2019), 이러한 효과들에 기초하여, 호흡기 질환 (Farjadian, Cytokine 2016), 류마티스 관절염 (Jeffery, J Rheumatol 2017), 암 (Paixao, Nutr J 2017)과 같은 다양한 병리학적 조건에 적용을 시도된 바 있었다. 그러나, DHA 또는 EPA의 심혈관에 대한 효과 및 이들의 작용 메커니즘, 특히 T 세포에서의 작용에 대한 연구는 매우 제한적이었다.

[0004] 또한, T 세포의 기능적 표현형의 균형은 죽상동맥경화증 진행에 기여하는 것으로 알려져 있다 (Tabas, Immunity 2017). 오메가-3 지방산이 T 세포를 포함한 세포에서 면역 억제제로 작용하는 것으로 보고된 바 있으나, 이들 세포에서의 효과에 대해서는 많은 것이 알려진 바 없다. 특히, T 세포 반응에 대한 특정 오메가-3 지방산 간의 차별적인 효과가 있는지 여부에 대해서는 연구된 바 없다 (Duffney, JCI 2018).

[0005] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 보조 T 세포의 분화, 증식, 및 사이토카인 분비를 포함한 다양한 적응성 면역 반응에 대한 DHA 및 EPA의 효과를 평가하였다. 구체적으로, 지방산의 적응성 면역 조절에 대한 효과가 수지상 세포에 의해 영향을 받는지 평가하기 위해, 수지상 세포의 존재 또는 부재 하의 효과를 측정하였다. 그 결과, DHA 및 EPA가 조절하는 보조 T 세포에서의 경로 및 유전자에 차이가 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 일 양상은 도코사헥사엔산 (DHA: docosahexaenoic acid), 에이코사펜타엔산 (EPA: eicosapentaenoic acid) 또는 이들의 조합을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체의 적응성 면역 (adaptive immunity)을 조절하는 방법을 제공하는 것이다.

[0008] 다른 양상은 DHA, EPA 또는 이들의 조합을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 면역질환 또는 염증질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 일 양상은 도코사헥사엔산 (DHA: docosahexaenoic acid), 에이코사펜타엔산 (EPA: eicosapentaenoic acid) 또는 이들의 조합을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 개체의 적응성 면역 (adaptive immunity)을 조절하는 방법을 제공한다.

[0011] 본 명세서에서 용어, "개체"는 인간 및 가축 예컨대 실험실 동물 및 애완동물 (예를 들면, 고양이, 개, 돼지, 소, 양, 염소, 말, 토끼), 및 비가축 예컨대 야생동물 등 모두를 포함하는 포유동물을 포함한다. 상기 용어 "개체"는 DHA, EPA 또는 이들의 조합이 투여될 수 있는 임의의 포유동물 환자 또는 대상체를 의미한다.

[0012] 본 명세서에서 용어, "도코사헥사엔산 (DHA: docosahexaenoic acid)"은 사람의 뇌, 대뇌 겹질, 피부, 망막의 주요 구조적 성분인 오메가-3 지방산으로, $C_{22}H_{32}O_2$ 의 화학식을 갖는 다중불포화지방산 중 하나이다. α -리놀렌산으로부터 합성되거나, 모유, 생선 기름, 조류 기름으로부터 직접적으로 얻을 수 있다. 도코사헥사엔산의 관용명은 세르본산 (cervonic acid)이다. 이와 관련하여, 알츠하이머병의 메커니즘에서의 잠재적인 역할이 활발히 연구된 바 있으나, 적응성 면역 조절과 관련한 구체적인 작용 기전은 본 발명을 통해 새롭게 밝혀진 것이다.

[0013] 상기 DHA가 수지상세포-의존적 방식으로 적응성 면역을 조절하는 경우, DHA에 의한 적응성 면역 조절 효과가 EPA에 의한 효과 보다 더 높을 수 있다. 또한, 상기 DHA는 보조 T 세포에서 Tiam1, Efna5, 또는 Igf1 유전자들

상향-조절할 수 있고; Prkacb, Gng2, Grin1, 또는 Vegfa 유전자를 하향-조절할 수 있다.

[0014] 일 구체예에서, 수지상세포-의존적인 Th1 세포 분화 및 증식 모델에서 DHA, EPA, 및 팔미트산 (PA, 대조군)의 효과를 확인한 결과, 세포 마커인 IFN- γ 양성 세포의 수는 DHA 또는 EPA 처리시 유의적으로 낮았으나, PA 처리시에는 그렇지 않음; 및 DHA 처리시 Th1 세포 수가 감소한 반면, PA 또는 EPA 처리 후에는 세포 수의 유의적인 변화가 없음을 확인하였다. 일 구체예에서, 수지상세포-의존적인 Th1 세포 분화 및 증식 모델에서, DHA는 IFN- γ 및 TNF- α 의 분비를 억제하고, EPA는 IFN- γ 의 분비를 감소시킨 반면에, PA는 사이토카인 분비를 변화시키지 않았고, IFN- γ 분비 조절에 대한 효과는 DHA가 EPA에 비해 현저히 높음을 확인하였다. 또한, Ifng에 대한 전사인자인 Tbx21의 발현은 DHA에 의해서만 억제됨을 확인하였다. 일 구체예에서, DHA는 수지상 세포의 공동-자극 분자 (co-stimulatory molecules)인 CD80 및 MHC II를 감소시킨 반면, EPA는 MHC II만을 감소시킴을 확인하였다.

[0015] 본 명세서에서 용어, "에이코사펜타엔산 (EPA: eicosapentaenoic acid)"은 프로스타글란딘(혈소판의 응집을 억제함), 트롬복산, 류코트라이엔과 같은 에이코사노이드들의 전구체로 작용하는 다불포화 지방산으로, 이코사펜타엔산 (icosapentaenoic acid)이라고도 하며, 관용명은 틴노돈산 (timnodonic acid)이다. 화학 구조에서 에이코사펜타엔산은 20개의 탄소로 구성된 사슬에 5개의 시스 이중 결합을 가지고 있는 카복실산으로 첫 번째 이중 결합은 메틸 말단인 오메가 말단에서부터 세 번째 탄소에 위치한다. 이와 관련하여, 관절에 염증을 일으키는 물질의 생성을 방해하여 증세를 완화하므로 만성 류마티스 관절염에 치료에 효과가 있음이 연구된 바 있으나, 적응성 면역 조절과 관련한 구체적인 작용 기전은 본 발명을 통해 새롭게 밝혀진 것이다.

[0016] 상기 EPA가 수지상세포-비의존적 방식으로 적응성 면역을 조절하는 경우, EPA에 의한 적응성 면역 조절 효과가 DHA에 의한 효과 보다 더 높을 수 있다. 또한, 상기 EPA는 보조 T 세포에서 Cpt1a 유전자를 상향-조절할 수 있고; Runx2, Vegfa, Itga2, 또는 Slc27a2 유전자를 하향-조절할 수 있다. 일 구체예에서, 수지상세포-비의존적인 Th1 세포 분화 및 증식 모델에서, DHA 및 EPA는 Th1 세포의 분화를 감소시킨 반면, PA는 아무런 효과를 나타내지 않음을 확인하였다. 일 구체예에서, Th1 세포에 의한 사이토카인 분비 및 유전자 발현에 대한 PA, DHA, 및 EPA의 효과를 BMDC-비의존적인 방식으로 측정된 결과, PA 및 EPA는 TNF- α 분비를 억제하였고, 특히 EPA의 효과가 보다 두드러졌으나, TNF- α 분비에 대한 DHA의 효과는 유의적이지 않음을 확인하였다.

[0017] 본 명세서에서 용어, "적응성 면역 (adaptive immunity)"은 후천성 또는 획득성 면역(acquired immunity)이라고도 불리며, 선천성 면역(innate immunity)과 더불어 척추동물에서 나타나는 두 종류의 면역체계 중의 하나로 감염균과 같은 외부 항원에 노출된 후에 형성되며, 특정 항원에 특이한 수용체를 발현하는 B 림프구, T 림프구 또는 두 종류의 림프구 모두에 의해 매개되는 면역을 의미한다. 적응성 면역은 항체반응과 세포매개면역반응의 두 종류로 나뉘는데, 각각 B 세포와 T세포에 의해서 수행된다. 항체반응에서는 B세포가 항원에 의해 활성화되어 항체를 생산하며, 항체는 혈액을 통해 이동하여 항원에 결합함으로써 이를 불활성화 시키거나 제거한다. 세포매개면역반응은 주로 T세포에 의해 수행되어 바이러스에 감염된 세포나 암세포 등을 제거하거나, 세포 내부에 감염하고 있는 병원균을 제거하는 기능을 한다.

[0018] 상기 적응성 면역을 조절하는 것은 보조 T 세포의 분화, 보조 T 세포의 증식, 보조 T 세포에서의 사이토카인 분비, 또는 수지상 세포 상의 공동-자극 분자의 발현을 조절하는 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0019] 상기 DHA 및 EPA에 의한 적응성 면역 조절은 G 단백질 연결 수용체 120 (GPR 120: G-protein coupled receptor 120)에 의해 영향을 받지 않는 것일 수 있다. 일 구체예에서, Th1 세포에 대한 DHA 및 EPA의 수지상세포-의존적인 면역 조절 효과가 GPR120에 의해 매개되는 것인지를 확인한 결과, DHA 또는 EPA에 의한 IFN- γ 분비의 감소는 GPR120 억제에 의해 변화하지 않음을 확인하였다.

[0021] 다른 양상은 DHA, EPA 또는 이들의 조합을 유효성분으로 포함하는 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 면역질환 또는 염증질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다. 상기 DHA, EPA 등의 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.

[0022] 상기 면역질환 또는 염증 질환을 예방 또는 치료하는 방법에 있어서, 수지상세포-의존적 방식으로 예방 또는 치료하는 경우, DHA에 의한 효과가 EPA에 비해 더 높을 수 있고; 수지상세포-비의존적 방식으로 예방 또는 치료하는 경우, EPA에 의한 효과가 DHA에 비해 더 높을 수 있다. 예를 들어, 수지상세포를 다수 포함하는 혈관 또는 조직 환경에서, DHA 및 EPA간의 면역조절 효과의 차이가 보다 강하게 나타날 수 있다. 따라서, 치료나 면역 조절 목적으로 하여 EPA 및 DHA를 각각 사용하는 경우, 상기한 바와 같은 면역조절 효과의 차이를 기초로 하여 보

다 정밀한 면역질환 또는 염증질환의 치료 및 예방 효과를 피할 수 있다.

- [0023] 본 명세서에서 용어, "개체"는 면역질환 또는 염증질환이 이미 발병하였거나 발병할 수 있는 인간을 포함하거나 또는 인간을 비포함한 모든 동물을 포함한다. 일 양상에 따른 DHA, EPA 또는 이들의 조합을 유효성분으로 포함하는 조성물을 상기 개체에게 투여함으로써, 상기 질환을 효과적으로 예방 및 치료할 수 있다. 상기 개체는 개, 소, 말, 토끼, 마우스, 랫트, 닭 또는 인간을 포함하는 포유류 전체를 의미하나, 상기 예에 의해 상기 포유류가 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 본 명세서에서 용어, "예방"은 DHA, EPA 또는 이들의 조합을 유효성분으로 포함하는 조성물의 투여로 면역질환 또는 염증질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다. 본 명세서에서 용어, "치료"는 DHA, EPA 또는 이들의 조합을 유효성분으로 포함하는 조성물의 투여로 상기 질환들의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 말한다.
- [0025] 본 명세서에서 용어, "면역질환"이란 특정 면역 반응이 일어날 경우 문제가 되는 질환을 의미로서, 이에 제한되지는 않으나, 바람직하게는 자가면역질환, 이식거부, 이식편대숙주병 일 수 있다.
- [0026] 상기 자가면역질환은 자기의 생체내 물질 또는 체조직에 대해 생산된 항체로 인한 항원항체 반응으로 야기되는 질환의 총칭을 의미한다. 상기 자가면역질환은 임상 증상이 여러 장기 또는 조직에 걸쳐 나타나는 전신성 자가면역질환을 의미할 수 있고, 예를 들어, 강직성 척추염, 쇼그렌 증후군(Sjogren's syndrome), 전신성 홍반성 루푸스, 류마티스 관절염, 염증성 장 질환, 크론병, 홍반병, 아토피, 하시모토 갑상선염, 악성빈혈, 에디슨씨 병, 제1형 당뇨병, 만성피로증후군, 섬유근육통, 갑상선기능저하증과 항진증, 경피증, 베체트병, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 메니에르 증후군(Meniere's syndrome), 길리안-바레 증후군(Guillian-Barre syndrome), 백반증, 자궁내막증, 건선, 백반증, 전신성 경피증, 천식 또는 궤양성 대장염 등일 수 있다.
- [0027] 본 명세서에서 용어, "염증질환"은 염증을 주병변으로 하는 질병을 총칭하는 의미로서, 이에 제한되지는 않으나 바람직하게는 부종, 피부염, 알레르기, 아토피, 천식, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 간직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통(fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome) 또는 다발성 경화증일 수 있다.
- [0028] 상기 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 상기 용어 "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 개체 종류 및 중증도, 연령, 성별, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [0029] 상기 면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료용 조성물은, 매일 투여 또는 간헐적으로 투여해도 좋고, 1일당 투여 횟수는 1회 또는 2-3회로 나누어 투여하는 것이 가능하다. 두 유효성분이 각각 단체인 경우의 투여횟수는 같은 횟수여도 좋고, 다른 횟수로 해도 된다. 또한, 상기 조성물은 면역질환 또는 염증질환의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 다른 약물 치료와 병용하여 사용할 수 있다. 상기 요소를 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0030] 상기 조성물의 개별적인 투약의 최적량 및 투약 간격은 치료되고 있는 병의 성질 및 정도, 투여 제형, 경로 및 부위, 그리고 치료되고 있는 특정 환자의 나이와 건강상태에 의해 결정될 것이고, 의사가 궁극적으로 사용될 적절한 투약을 결정할 것이라는 것은 당해 분야의 당업자가 알 수 있다. 이러한 투약은 적절한 정도로 자주 반복될 수 있다. 부작용이 생긴다면, 보통의 임상 진료에 따라서 투여량 및 빈도를 변경하거나 또는 감소시킬 수 있다.
- [0031] 상기 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 어떠한 일반적인 경로를 통하여 투여될 수 있다. 상기 조성물은 목적하는 바에 따라 복강내 투여, 정맥내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경구 투여될 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 또한 상기 조성물은 활성 물질이 표적 세포로 이동할 수 있는 임의의 장치에 의해 투여될 수 있다.

발명의 효과

- [0033] 일 양상에 따른 방법은 DHA 및 EPA 각각은 적응성 면역의 조절 방식, 구체적으로는 수지상 세포에 의존한 방식인지 여부에 따라 면역 조절 효과가 달라질 수 있으므로, 이를 활용하여 보다 효율적으로 적응성 면역을 조절할

수 있다.

[0034]

다른 양상에 따른 방법은 DHA 및 EPA의 적응성 면역 조절 효과 및 작용 기전에서의 차이를 근거로 하여, EPA 및 DHA의 용량을 조절하여 면역질환 및 염증질환의 치료 효과를 극대화할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0036]

도 1은 Th1 세포의 분화 및 증식에 대한 수지상 세포 (DC)-의존적인 팔미트산 (PA), 도코사헥사엔산 (DHA) 및 에이코사헥사엔산 (EPA)의 효과를 확인한 도면이다. 구체적으로, DHA 또는 EPA는 Th1 세포의 분화를 억제한 반면, PA는 그렇지 않음 (A 및 B); DHA는 Th1 세포 증식을 감소시킨 반면, EPA 또는 PA는 그렇지 않음 (C). 데이터는 적어도 3번의 독립적인 실험으로부터 얻음. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: 대조군과 비교하여 비-유의적임; NC: 음성 대조군; C: 대조군.

도 2는 공생-배양 모델에서 사이토카인 분비에 대한 PA, DHA, 및 EPA의 효과를 확인한 도면이다. 구체적으로, DHA는 IFN- γ 및 TNF- α 의 분비를 감소시키고, EPA는 IFN- γ 의 분비를 감소시킴 (A). DHA 또는 EPA에 의해 Ifng의 mRNA 발현이 감소됨 (B). PA는 IFN- γ 및 TNF- α 의 분비 또는 유전자 발현에 영향을 미치지 않음 (A 및 B). DHA 및 EPA는 IL-2 단백질 분비의 유의적인 상승 없이 Il2의 mRNA 발현을 증가시킴 (A 및 B). Ifng에 대한 전사 인자인 Tbx21의 발현은 DHA 또는 EPA에 의해 감소됨 (B). ELISA 및 qPCR은 기술적 복제물로 수행되고, 데이터는 적어도 3개의 독립적인 실험으로부터 얻음. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: 대조군과 비교하여 비-유의적임; NC: 음성 대조군; C: 대조군.

도 3은 BMDC에서 MHCII, CD80, CD86의 발현, 및 IL-12p40의 분비에 대한 PA, DHA 및 EPA의 효과를 확인한 도면이다. 구체적으로, DHA 및 EPA는 MHC II의 발현을 감소시킨 반면에, DHA만이 수지상 세포 상의 공동-자극 분자인 CD80 및 CD86을 감소시킴 (A). PA는 이들 3개 분자에 대해 영향을 미치지 않음 (A). IL-12p40의 수준은 3개의 지방산에 의해 변화되지 않음 (B). 데이터는 적어도 3개의 독립적인 실험으로부터 얻음. *: $p < 0.05$; **: $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: 대조군과 비교하여 비-유의적임; NC: 음성 대조군; C: 대조군.

도 4는 Th1 세포의 분화 및 증식에 대한 BMDC-비의존적인 PA, DHA 및 EPA의 효과를 확인한 도면이다. 구체적으로, DHA 및 EPA는 Th1 세포의 분화를 감소시킨 반면, PA는 그렇지 않음 (A 및 B). 이와 유사하게, DHA 및 EPA는 Th1 세포의 증식을 감소시킨 반면, PA는 증식에 유의적인 영향을 미치지 않음 (C). 데이터는 적어도 3개의 독립적인 실험으로부터 얻음. 대조군과 비교하여 * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, 및 *** $P < 0.0001$. NC: 음성 대조군; C: 대조군; ns: 비-유의적임.

도 5는 사이토카인 분비에 대한 BMDC-비의존적인 PA, DHA 및 EPA의 효과를 확인한 도면이다. 구체적으로, DHA는 IFN- γ 및 TNF- α 의 분비를 억제한 반면, EPA는 TNF- α 의 분비를 감소시킴 (A). Ifng의 mRNA 발현은 2개의 불포화 지방산에 의해 감소됨 (B). PA는 IFN- γ 및 TNF- α 의 분비에 영향을 미치지 않음 (A). DHA 및 EPA는 IL-2의 분비를 증가시킴 (A). Tbx21의 발현은 DHA 또는 EPA에 의해 감소됨 (B). ELISA 및 qPCR은 기술적 복제물로 수행되고, 데이터는 적어도 3개의 독립적인 실험으로부터 얻음. 대조군과 비교하여 * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, 및 *** $P < 0.0001$. NC: 음성 대조군; C: 대조군; ns: 비-유의적임.

도 6은 DHA 및 EPA-유도된 유전자의 하향-조절에 대한 GPR120의 억제제인 AH7614의 효과를 확인한 도면이다. 구체적으로, DHA 또는 EPA에 의한 IFN- γ 분비의 감소는 GPR120의 억제에 의해 영향을 받지 않음. ELISA는 기술적 복제물로 수행되고, 데이터는 적어도 3개의 독립적인 실험으로부터 얻음.

도 7은 DHA에 의해 유도된 유전자 발현 변화의 히트맵 (A), 및 마이크로어레이 결과를 입증하기 위해, Tiam1, Efna5, Igfl, Prkacb, Gng2, Grin1, Vegfa, 및 β -actin의 발현을 평가한 독립적인 qPCR 결과 (B)를 나타낸 도면이다. qPCR은 기술적 복제물로 수행되고, 데이터는 적어도 3개의 독립적인 실험으로부터 얻음.

도 8은 EPA에 의해 유도된 유전자 발현 변화의 히트맵 (A), 및 마이크로어레이 결과를 입증하기 위해 Cpt1a, Runx2, Vegfa, Itga2, Slc27a2, 및 β -actin의 발현을 평가한 독립적인 qPCR 결과 (B)를 나타낸 도면이다. qPCR은 기술적 복제물로 수행되고, 데이터는 적어도 3개의 독립적인 실험으로부터 얻음.

모든 데이터는 평균 \pm 평균의 표준 오차로 표시하였다. 그룹 간의 비교를 위해 t-검정을 수행하였다. $p < 0.05$ (양측)은 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다. 모든 데이터 분석을 위해 소프트웨어 패키지 Prism 5.0을 사용하였다 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0039] **실시예 1. DHA 및 EPA의 수지상 세포-의존적인 면역 조절 효과 확인**
- [0040] **1.1 수지상 세포-의존적인 Th1 세포의 분화 및 증식 억제 효과**
- [0041] 각 지방산의 효과를 평가하기 위해, 수지상세포 (DC: Dendritic cell)-의존적인 Th1 세포 분화 모델을 이용하였다. PA, DHA 또는 EPA (각각 50 M)의 존재 또는 부재 하에 BMDC와 함께 4일 동안 미감작 (NaI^{ve}) CD4^+ T 세포를 공생-배양하였다.
- [0042] 구체적으로, 8주령 수컷 C57BL/6 마우스를 Orient Bio (경기도 성남시, 한국)로부터 구매하였다. 모든 마우스에 대하여 바이러스, 미생물학, 병리학, 및 기생충학에 대한 시험을 수행하였고, 부정적 (negative) 결과를 나타내었다. 모든 실험은 연세대학교 의과대학, 동물 관리 및 사용 위원회에 의해 승인된 프로토콜에 따라 수행하였다. 골수-유래 수지상 세포 (BMDCs: Bone marrow-derived dendritic cells)를 1.5% 소 태아 혈청 (FBS)을 포함하는 인산 완충 식염수 (PBS) (Welgene, 경상북도 경산시, 한국)로 플러싱(flushing)함으로써, 마우스의 대퇴골 및 경골로부터 수득하였다. 적혈구는 RBC Lysis 용액 (Qiagen, Venlo, Netherlands)을 이용하여 용해되었다. RBC-용해된 세포를 10% FBS, 페니실린, 스트렙토마이신, 암포테리신 B (Thermo Fisher Scientific), 및 10 ng/mL의 재조합 murine GM-CSF (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)가 보충된 Gibco RPMI-1640 배지 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 2 mL/웰을 갖는 6-웰 플레이트 상에 시딩하였다. 배지의 절반을 2일 내지 3일 마다 10 ng/mL GM-CSF를 함유하는 신선한 배지로 교체하였다. 7일 차에는, 느슨하게 부착되거나 (loosely attached) 비-부착된 (non-adherent) 세포를 수집하고, CD11c 마이크로비드 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)를 이용하여 더 농축시켰다. 미감작 CD4^+ T 세포를 제조사의 프로토콜에 따라 미감작 CD4 마이크로비드 (Miltenyi Biotec)를 사용하여 C57BL/6 마우스의 자궁경부- (cervical-), 겨드랑이- (axillary-), 장간막 (mesenteric), 살고랑 림프절 (inguinal lymph nodes) 및 비장으로부터 분류하였다.
- [0043] 이후, 항원 제시 세포 (APC: antigen presenting cell)-매개된 Th1 분화를 위해, 미감작 CD4^+ T 세포 (1×10^5 /웰) 및 CD11c+ 수지상 세포 (1×10^4 /웰)는 가용성 항-CD3 0.3 g/mL (Bio X cell, West Lebanon, NH, USA) 및 지질다당류 100 ng/mL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)와 함께 4일 동안 공생 배양 하였다. 팔미테이트 (PA: palmitate), 도코사헥사엔산 (DHA), 및 에이코사헥타엔산 (EPA)의 저장 용액은 100% 에탄올에 용해함으로써 제조하였다. 모든 실험에서 동량의 에탄올은 대조군으로 사용하였다. APC-매개된 분화 동안, CD4^+ 미감작 T 세포는 지방산의 존재 또는 부재 하에 4일 동안 배양하였다. 지방산의 효과를 확인하기 위해, BMDC는 지방산의 존재 또는 부재 하에 2일 동안 배양하였다. 4일 동안 배양한 후, 혈구계산판 (hemocytometer)을 이용하여 상기 세포들을 계수하였다. 샘플 10 mL는 트립판 블루 (Sigma-Aldrich) 10 mL와 혼합하고, 상기 혼합물을 혈구계산판에 로딩하였다. 계수는 표준 방식에 따라 한 분석가에 의해 3번 수행하였다.
- [0044] 그 결과, 도 1A 및 1B에 나타난 바와 같이, Th1 세포 마커인 IFN- γ 양성 세포의 수는 DHA 또는 EPA 처리시 유의적으로 낮았으나, PA 처리시에는 그렇지 않음을 확인하였다. 또한, IFN- γ 양성 세포 수에 있어 DHA 및 EPA 처리군 간의 차이가 없음을 확인하였다.
- [0045] 또한, 3종 지방산 (PA, DHA 및 EPA)의 Th1 세포 증식에 대한 효과를 혈구계산판을 이용하여 측정한 결과, 도 1C에 나타난 바와 같이, 양성 대조군과 비교하여, DHA 처리시 Th1 세포 수가 감소한 반면, PA 또는 EPA 처리 후에는 세포 수의 유의적인 변화가 없음을 확인하였다.
- [0047] **1.2 수지상 세포-의존적인 사이토카인 분비 및 유전자 발현 조절 효과**
- [0048] 상기 실시예 1.1에서 언급한 수지상 세포-의존적인 공생-배양 모델에서, 배지를 수집하고 ELISA에 의해 사이토카인을 측정하였다.
- [0049] 구체적으로, 세포 배양 상층액을 수집하고, 분비된 IFN- γ , IL-2, TNF(tumor necrosis factor)- α 및 IL-12p40의 양을 ELISA에 의해 정량화하였다. IFN- γ , IL-2, TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 및 IL-12p40 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)의 수준은 상응하는 ELISA 키트에 의해 측정하였다. 모든 결과는 기술적 복제 샘플 (technical duplicate samples)로 수행하였다.
- [0050] 그 결과, 도 2A에 나타난 바와 같이, DHA는 IFN- γ 및 TNF- α 의 분비를 억제하고, EPA는 IFN- γ 의 분비를 감소

시킨 반면에, PA는 사이토카인 분비를 변화시키지 않았다. 보다 구체적으로는 IFN- γ 분비 조절에 대한 효과는 DHA가 EPA에 비해 현저히 높았고, PA를 제외한 DHA 및 EPA 모두 IL-2의 분비를 증가시킴을 확인하였다.

[0051] 또한, 도 2B에 나타난 바와 같이, DHA 및 EPA는 Ifng의 mRNA 발현을 감소시킨 반면, 이들은 IL2의 mRNA 발현을 증가시킴을 확인하였다. 보다 구체적으로는 Ifng에 대한 전사 인자인 Tbx21의 발현은 DHA에 의해서만 억제됨을 확인하였다.

[0053] 1.3 수지상 세포 상의 표면 분자, MHC II의 감소 효과

[0054] BMDC는 PA, DHA, 또는 EPA 존재 또는 부재 하에 LPS (100 ng/mL)에 의해 자극되었다. 실험 결과를 평균 형광 강도 (MFI: mean fluorescence intensities, 대조군의 %)로 도 3에 나타내었다. 배지에서 IL-12p40의 수준은 상기 실시예 1.2에 기재된 바와 같은 ELISA 방법에 의해 측정하였다.

[0055] 구체적으로, 세포 표면 분자는 1.5% FBS를 함유하는 PBS로 20분 동안 4°C에서 염색하였다. 이후, 상기 세포들은 10% 포르말린 (Biosesang, 경기도 성남시, 한국)으로 고정하였다. 세포 내 염색을 위해, 세포를 PMA (phorbol. 12-myristate 13-acetate), 이오노마이신, 모넨신 (eBioscience, San Diego, CA, USA), 및 브레펠딘 A (eBioscience)로 인큐베이션하였다. 제조사 지침에 따라 Foxp3/Transcription Factor Fixation/Permeabilization Kit (Thermo Fisher Scientific)에 의해 세포들을 투과시켰다. 세포 내 사이토카인은 투과성 완충액 (permeabilization buffer, Thermo Fisher Scientific)에서 염색시켰다. 다음의 항체들을 사용하였다: PerCP/Cy5.5 항-CD4 (BioLegend, San Diego, CA, USA), Alexa488 항-IFN- γ (BioLegend), APC 항-CD11c (Miltenyi Biotec), PE 항-CD80 (BioLegend), APC/Cy7 항-CD86 (BioLegend), 및 Alexa488 항-I-Ad (BioLegend).

[0056] 그 결과, 도 3A에 나타난 바와 같이, DHA는 수지상 세포의 공동-자극 분자 (co-stimulatory molecules)인 CD80 및 MHC II를 감소시킨 반면, EPA는 MHC II만을 감소시켰다. DHA 및 EPA 둘다 CD11c 또는 CD86의 발현에는 영향을 미치지 않았다. PA는 CD80 (PA에 의해 약간 증가됨)을 제외하고는 어떤 분자에도 영향을 미치지 않았다. 또한, 도 3B에 나타난 바와 같이, IL-12p40은 어떤 지방산에 의해서도 변화하지 않음을 확인하였다.

[0057] DHA 또는 EPA 처리는 MCH II 분자의 발현을 현저하게 감소시켰고, 이는 2개의 지방산과 이들의 DC-의존적 효과 간의 중추적인 연결고리로 간주할 수 있다. 이러한 결과는 오메가-3 지방산에 의한 MHC II를 포함한 공동-자극 분자의 억제 효과를 확인한 다른 연구 결과 (Hoppenbrouwers, Front Immunol 2019)와도 일치하는 것이다. 특히, 상기 결과로부터 DHA가 EPA에 비해 수지상 세포의 공동-자극 분자를 보다 효과적으로 감소시킬 수 있음을 확인할 수 있다.

[0059] 실시예 2. DHA 및 EPA의 수지상 세포-비의존적인 면역 조절 효과 확인

[0060] 2.1. 수지상 세포-비의존적인 Th1 세포의 분화 및 증식 억제 효과

[0061] BMDC-비의존적인 Th1 세포 분화를 측정하기 위해, 플레이트를 항-CD3 ϵ 및 항-CD28로 코팅하고, 미감작 CD4⁺ T 세포를 PA, DHA, 또는 EPA (50 M)의 존재 또는 부재 하에 4일 동안 배양하였다.

[0062] 구체적으로, APC-없는 (APC-free) Th1 세포 분화를 위해, 상기 플레이트는 4°C에서 하룻밤 동안 항-CD3 1 g/mL 및 항-CD28 2 g/mL (Bio X cell)으로 코팅하였다. 이후, 미감작 CD4⁺ T 세포 (1×10^6)는 인터류킨-2 (IL-2) 2 ng/mL 및 IL-12 10 ng/mL (PeproTech Korea)와 함께 4일 동안 배양하였다. PA, DHA, 및 EPA의 저장 용액은 100% 에탄올에 용해함으로써 제조하였다. 모든 실험에서 동량의 에탄올은 대조군으로 사용하였다. APC-없는 분화 동안, CD4⁺ 미감작 T 세포는 지방산의 존재 또는 부재 하에 4일 동안 배양하였다. 지방산의 효과를 확인하기 위해, BMDC는 지방산의 존재 또는 부재 하에 2일 동안 배양하였다. 이후 세포 계수 및 혈구계산판을 이용한 방법은 실시예 1과 동일하다.

[0063] 그 결과, 도 4A 및 4B에 나타난 바와 같이, DHA 및 EPA는 Th1 세포의 분화를 감소시킨 반면, PA는 아무런 효과를 나타내지 않았다. 다만, 도 4C에 나타난 바와 같이, 이들 지방산에 의한 Th1 세포의 증식에 대한 효과는 유의적이지 않음을 확인하였다.

[0065] 2.2. 수지상 세포-비의존적인 사이토카인 분비 조절 효과

[0066] Th1 세포에 의한 사이토카인 분비 및 유전자 발현에 대한 PA, DHA, 및 EPA의 효과를 BMDC-비의존적인 방식으로 측정하기 위해, 상기 실시예 2.1에서 언급한 수지상 세포-비의존적인 공생-배양 모델에서 배지를 수집하고

ELISA에 의해 사이토카인을 측정하였다.

[0067] 구체적으로, 미감작 $CD4^{+}$ T 세포를 항-CD3 ϵ 및 항-CD28와 함께 PA, DHA, 또는 EPA (50 M)의 존재 또는 부재 하에 4일 동안 배양하였다. 세포 배양 상층액을 수집하고, 분비된 IFN- γ , IL-2, TNF(tumor necrosis factor)- α 및 IL-12p40의 양을 ELISA에 의해 정량화하였다. IFN- γ , IL-2, TNF- α (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) 및 IL-12p40 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)의 수준은 상응하는 ELISA 키트에 의해 측정하였다. 모든 결과는 기술적 복제 샘플 (technical duplicate samples)로 수행하였다.

[0068] 그 결과, 도 5A에 나타난 바와 같이, 3개의 지방산, 특히 DHA 및 EPA는 IFN- γ 의 분비를 수치적으로는 감소시켰으나, 감소의 정도가 통계적으로 유의하지 않았다. PA 및 EPA는 TNF- α 분비를 억제하였고, 특히 EPA에 의한 효과가 보다 두드러졌다. 이와 달리, TNF- α 분비에 대한 DHA의 효과는 유의적이지 않았다. 3개의 지방산 모두 IL-2의 분비에 대해서는 유의적인 영향을 미쳤다. 또한, 도 5B에 나타난 바와 같이, DHA 및 EPA는 Ifng의 mRNA 발현을 억제하였다. DHA는 Tnf 유전자 발현을 유의적으로 억제하였다. IFN- γ 를 조절하는 전사 인자인 Tbx21의 발현은 PA 및 DHA에 의해 감소되었다.

[0069] 종합하면, 상기 결과로부터, 수지상 세포가 매개되지 않고 Th1 세포를 분화시킨 수지상 세포-비의존적인 배양 모델에서는, EPA가 DHA에 비해 사이토카인 분비를 보다 효과적으로 감소시킴을 확인할 수 있다.

[0071] 실시예 3. DHA 및 EPA의 면역 조절 효과 및 GPR120 저해제의 연관성 확인

[0072] G 단백질 연결 수용체 120 (GPR120: G-protein coupled receptor 120)은 대식 세포에서 염증 억제 및 인슐린-감작화 (insulin-sensitization)를 매개하는 오메가-3 지방산에 대한 수용체로 알려져 있다 (Oh, Cell 2010). GPR120은 DHA와의 상호작용을 통해 수지상세포 내성 (DC toleration)을 유도하고, 실질적으로 T 세포 아형의 비율을 조절시키는 것으로 보고되어 있다 (Zhao, Int J Biol Sci 2020). 그러나, T 세포에 대한 DHA 및 GPR120의 직접적인 영향은 연구된 바 없다. 따라서, 본 실시예에서는 Th1 세포에 대한 DHA 및 EPA의 수지상세포-의존적인 효과가 GPR120에 의해 매개되는 것인지를 확인하고자 하였다.

[0073] 구체적으로, 미감작 $CD4^{+}$ T 세포를 GPR120에 대한 저해제인 AH7615 (5 M)의 존재 또는 부재 하에, DHA 또는 EPA (50 M) 존재 또는 부재 하에 BMDC와 함께 4일 동안 공생 배양하였다. ELISA의 구체적인 실험 방법은 상기 실시예 1.2 또는 2.2에 기재된 바와 같다.

[0074] ELISA 분석 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, DHA 또는 EPA에 의한 IFN- γ 분비의 감소는 GPR120 억제에 의해 변화하지 않음을 확인하였다. 즉, GPR120은 DHA 및 EPA에 의한 면역 조절 효과에 있어 중요한 역할을 하지 않으며, 상기 결과로부터, DHA 및 EPA 작용 기전은 GPR120에 비의존적임을 확인할 수 있다.

[0076] 실시예 4. DHA에 의해 조절되는 Th1 세포의 유전자 및 경로 확인

[0077] DHA에 의해 조절되는 Th1 세포의 유전자를 동정하기 위해, 미감작 $CD4^{+}$ T 세포를 DHA (50 M)의 존재 또는 부재 하에 4일 동안 BMDC와 함께 공생 배양하였다. 구체적으로, 제조사의 프로토콜에 따라 Trizol 시약 (Invitrogen)을 이용하여 세포들로부터 RNA를 추출하였다. RNA 100 ng을 iScript cDNA 합성 키트 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용한 cDNA 합성을 위해 사용하였다. 유전자 발현 분석은 표준 프로토콜에 따라 SYBR-Green 시스템 및 7500 실시간 PCR 시스템 (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA)을 이용하여 수행하였다. 모든 데이터는 GAPDH 발현에 대하여 정규화하였다. 모든 결과는 기술적 복제물에서 수행된 실험을 기초로 한다.

[0078] RNA 순도 (RNA purity)는 NanoDrop ND-1000 분광광도계 (Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 측정하였다. RNA 무결성 (RNA integrity)은 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)에 의해 측정하였다. RNA 1 μ g은 Ribo-zero rRNA 제거 키트 (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA)를 사용하여 rRNA 고갈에 대해 추가로 처리하였다. 이후, rRNA-고갈된 RNA는 94°C에서 8분 동안 2가 양이온을 사용하여 작은 조각으로 단편화하였다. 절단된 RNA 단편은 제1 가닥 cDNA에 복사되고, 이어서 제2 가닥 cDNA 합성이 수행되었다. 마이크로 어레이는 Mouse Gene 2.0 ST 어레이 (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라 수행하였다.

[0079] Affymetrix GeneChip Command Console 소프트웨어 (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 부형제(vehicle) 및 DHA 또는 EPA 처리군의 차별 발현 유전자 (DEG: differentially expressed genes)를 비교하였다. 양측 스튜던트 t-검정에 의해 $p < 0.05$ 인 \log_2 fold change > 1.5 를 갖는 상향- 또는 하향-조절된 유전자를 선별하였다.

DHA 또는 EPA 처리에 의해 조절되는 신호 전달 경로 및 관련 유전자를 식별하기 위해, DAVID Bioinformatics Resources Webpage Tool 버전 6.7을 사용하여 DEG의 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 경로 분석을 수행하였다. $q < 0.05$ 에 의해 통계적으로 유의한 경로로 선별하였다.

[0080] 유전자의 표적-특이적인 녹다운을 스크램블드 컨트롤 (scrambled control)과 함께 Igf1 및 Cpt1a에 대한 작은 간섭 RNA (siRNA)를 사용하여 수행하였다 (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA). 1차 Th1 세포 (Primary Th1 cells)를 제조사 지침에 따라 Lipofectamine RNAiMAX (Invitrogen)을 사용하여 siRNA로 형질주입시켰다. 형질주입은 지방산의 처리 24시간 전에 개시하였다. 각 유전자의 녹다운 효율은 실시간 PCR에 의해 검사하였다.

[0081] 마이크로어레이를 이용하여 부형제 또는 DHA 처리 후의 차별 발현 유전자 (DEG)를 비교한 결과를 도 7A에 나타내었다. DHA에 의해 영향을 받는 생물학적으로 관련 있는 유전자를 결정하기 위해, KEGG 분석을 이용하여 상위 10개 경로에서 유전자를 선별한 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

DHA			
경로	EASE 스코어	상향-조절된 유전자	하향-조절된 유전자
사이토카인-사이토카인 수용체 상호작용	8.4E-06	Cd27, Ccr5, Ccr6, Ccr8, Csf1, Il13, Il21, Il4, Pdgfb, Tnfsf8	Cd40, Fas1, Ccr2, Cxcr1, Cxcr6, Ifng, Il12rb2, Il18rap, Il17r, Vegfa
케모카인 신호전달	5.8E-04	Tiam1, Ccl9, Ccr5, Ccr6, Ccr8,	Ccr2, Cxcr1, Cxcr6, Gng2, Pik3r1, Prex1, Pik3r5, Prkacb
지방산 대사	6.3E-04	Cpt1a, Hsd17b12, Ppt1	Acsbg1, Acadl, fads2, Scd1, Scd2
퓨린 대사	2.1E-03	Adk, Ak2, Polr1b, Prps1, Gucyl1a3, Ppat	Pde2a, Xdh, Polr3g1, Pde3b, Pold4, Entpd1, Dguok, Pde7a
Ras 신호전달	2.7E-03	Tiam1, Efna5, Csf1, Fgf2, Pdgfb, Igf1	Fas1, Prkacb, Gng2, Pik3r1, Plcg1, Grin1, Pla2g16, Vegfa, Pak6, Pik3r5
T 세포 수용체 신호전달	3.2E-03	Il4	Pik3r5, Cblb, Pak6, Nck2, Ppp3ca, Plcg1, Pik3r1, Prkcg, Ifng
Jak-STAT 신호전달	3.3E-03	Il4, Il24, Il13, Il21, Stat5a	Pik3r5, Pik3r1, Socs3, Il17r, Stat4, Il12rb2, Ifng
ErbB 신호전달	3.7E-03	Stat5a	Pik3r5, Cblb, Pak6, Nck2, Erbb3, Plcg1, Pik3r1, Cdkn1b
Rap1 신호전달	3.9E-03	P2ry1, Tiam1, Efna5, Csf1, Fgf2, Pdgfb, Igf1	Pik3r5, Adora2a, Vegfa, Plcg1, Grin1, Pik3r1, Rapgef4, Sipall1
Epstein-Barr 바이러스 감염	4.0E-03	Ccr2, Traf6, Psmc4, Cd40	Pik3r5, Traf1, Entpd1, Pik3r1, H2-Q7, Cdkn1b, Polr3g1, Prkacb, Eif2ak3, Ifng

[0085] 그 결과, 도 7A 및 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 연관 경로는 사이토카인-사이토카인 수용체 상호작용, 케모카인 신호전달, 및 지방산 대사를 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들 경로 중에서, Ras 신호전달 경로에 중점을 두었다. Tiam1, Efna5, 및 Igf1을 포함한 유전자는 DHA에 의해 상향-조절된 반면에, Prkacb, Gng2, Grin1, 및 Vegfa를 포함한 유전자는 DHA에 의해 하향-조절되었다.

[0086] 또한, 상기 마이크로어레이 결과를 입증하기 위해 qPCR을 수행한 결과, 도 7B에 나타난 바와 같이, Igf1은 유익적으로 증가한 반면, Prkacb, Gng2, 및 Vegfa는 감소하였다.

[0088] 실시예 5. EPA에 의해 조절되는 Th1 세포의 유전자 및 경로 확인

[0089] EPA에 의해 조절되는 Th1 세포의 유전자를 동정하기 위해, 상기 실시예 4에서 사용된 동일한 공생 배양 모델, 마이크로어레이 및 비교를 수행하였다.

[0090] 마이크로어레이를 이용하여 부형제 또는 EPA 처리 후의 차별 발현 유전자 (DEG)를 비교한 결과를 도 8A에 나타내었다. EPA에 의해 영향을 받는 생물학적으로 관련 있는 유전자를 결정하기 위해, KEGG 분석을 이용하여 상위 10개 경로에서 유전자를 선별한 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0091]

EPA			
경로	EASE 스코어	상향-조절된 유전자	하향-조절된 유전자
조혈세포 계보	5.7E-05	Cd36, Anpep, Csflr, Tfrc, Il13	Itga2, Cd7
사이토카인-사이토카인 수용체 상호작용	3.2E-03	Il12, Ccl16, Ccl9, Csflr, Il13	Tgfb3, Fas1, Ccr2
PPAR 신호전달	3.8E-03	Lpl, Cd36, Olr1, Cpt1a, Slc27a	
암에서의 프로테오글리칸	5.7E-03	Mmp9, Met, Cd63, Tiam1	Vegfa, Itga2, Fas1
암에서의 전사 탈조절 (misregulation)	1.0E-02	Mmp9, Met, Csflr, Il13	Mycn, Runx2
암에서의 경로	1.3E-02	Mmp9, Met, Csflr	Dapk2, Vegfa, Itga2, Tgfb3, Fas1, Nos2
제1형 당뇨병	1.4E-02	Il12, Hspd1	Prf1, Fas1
PI3K-Akt 신호전달 경로	2.2E-02	Il12, Met, Csfr1, Il13	Vegfa, Itga2, Fas1, Itga7
폐육시증	2.9E-02	Abcd2, Slc27a2, Abcd3	Nos2
방광암	4.3E-02	Mmp9	Dapk2, Vegfa

[0093]

그 결과, 도 8A 및 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 연관 경로는 조혈세포 계보 (hematopoietic cell lineage), 사이토카인-사이토카인 수용체 상호작용, 및 PPAR 신호전달을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. Cpt1a를 포함한 유전자는 EPA에 의해 상향-조절된 반면에, Runx2, Vegfa, Itga2, 및 Slc27a2를 포함한 유전자는 EPA에 의해 하향-조절되었다.

[0094]

또한, 상기 마이크로레이 결과를 입증하기 위해 qPCR을 수행한 결과, 도 8B에 나타난 바와 같이, Cpt1a의 상향조절 및 Runx2, Vegfa, 및 Itga2의 하향 조절이 입증되었다.

[0096]

상기 실시예 4 및 5로부터 DHA 및 EPA에 의해 조절되는 유전자 및 경로를 확인하였다. 구체적으로, DHA에 의해 상향 조절되는 유전자로서 Igf1을 확인하였다. 이와 관련하여, 죽상동맥경화증에 대한 Igf 신호 전달의 효과는 논쟁이 있고 (Yu, Ath 2018), 이 유전자의 민무늬 근 세포 (smooth muscle cells) (Sukhanov, ATVB 2018) 및 대식세포 (Higashi, Circ 2016)를 포함한 세포에서의 역할에 대해서는 평가된 바 있으나, T 세포에서의 역할에 대해서는 연구된 바 없다. 즉, 본 발명을 통해, DHA에 의해 유도된 Igf1의 상향조절의 Th1 세포에서의 잠재적인 역할이 처음으로 제시되었다.

[0097]

또한, 미토콘드리아 지방산 산화에 기여하는 PPAR α 의 표적 유전자인 CPT1을 코딩하는 Cpt1a 유전자가 EPA에 의해 상향조절됨을 확인하였다. 이와 관련하여, EPA가 장 세포 (intestinal cells)에서 CP1A의 발현을 유도하는 것으로 보고된 바 있다 (Mashurabad, Arch Biochem Biophys 2016). 마우스 연구에서 내피 세포 (endothelial cells)에서 Cpt1a의 녹-아웃은 백혈구 침투를 촉진시킴을 확인하였고, 이러한 결과는 Cpt1a가 죽상경화보호 (atheroprotective) 효과가 있음을 시사하는 것이다 (Nomura, JMCC 2019). 또한, CPT1A가 중요한 역할을 하는 미토콘드리아 지방산 산화는 CD8⁺ T 세포의 생존 및 활성화를 위해 필수적인 것으로 보고된 바 있다 (Raud, Immunol Res 2018). 종합하면, 상기 실시예에서 확인된 Cpt1a의 CD4⁺ T 세포에서의 작용뿐만 아니라, 다른 T 세포 아형에서의 작용 역시 혈관 상태에 영향을 미칠 수 있다.

[0099]

종합하면, 상기 실시예 결과로부터 다음과 같은 DHA 및 EPA 면역 조절 효과 및 작용 기전을 입증하였다:

[0100]

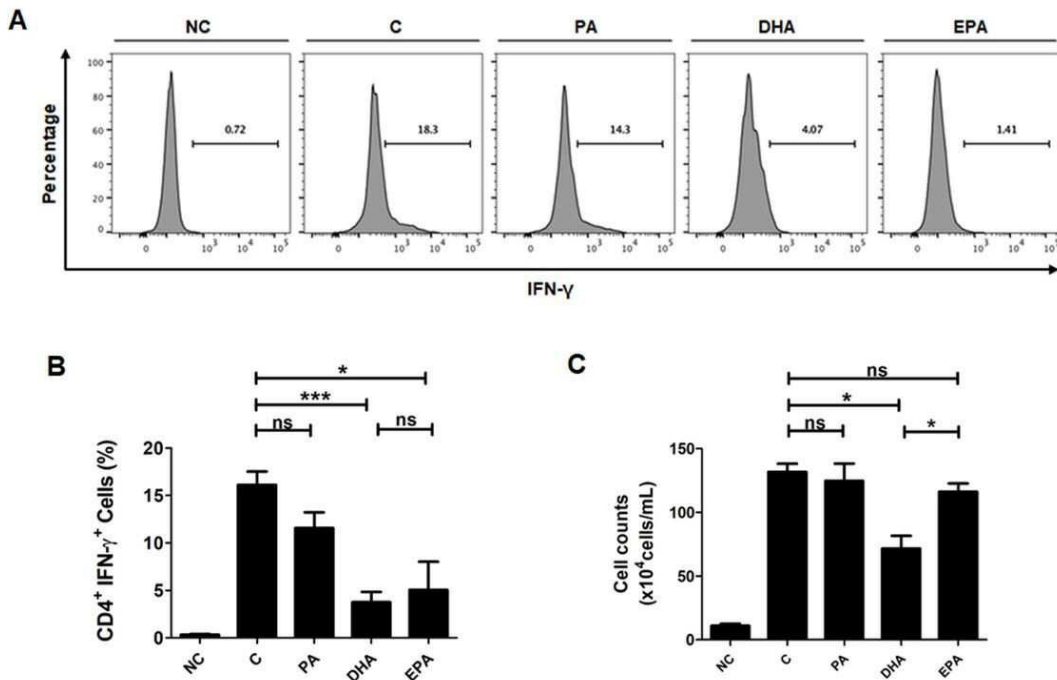
1) DHA 및 EPA는 Th1 세포의 분화를 억제한다. 특히, DHA는 EPA에 비해 DC-의존적인 Th1 세포의 증식을 보다 효과적으로 억제한다. 반면에, PA는 상기 효과를 갖지 않는다; 2) DHA 및 EPA는 DC-의존적으로 Th1 세포에서 IFN- γ 및 IL-2와 같은 사이토카인 분비 및 관련 유전자 발현을 조절할 수 있다. 특히, DHA는 EPA에 비해 더 현저한 효과를 나타낸다. 반면에, PA는 상기 효과를 갖지 않는다; 3) DHA 및 EPA의 DC-의존적인 효과는 적어도 부분적으로는 MHC II의 하향-조절에 의해 매개되는 것이다; 4) DHA 및 EPA는 또한 DC-비의존적인 방식으로 IFN- γ 및 TNF- α 와 같은 사이토카인의 분비, 또는 유전자 발현에 대한 억제 효과를 가진다. 특히, EPA는 DHA에 비해 더 현저한 효과를 나타낸다; 5) DHA 및 EPA의 Th1 세포에 대한 DC-의존적인 효과는 GPR120에 의해 매개되는 것이 아니다; 6) Th1 세포에서 DHA 및 EPA의 작용 경로는 염증, 면역, 대사, 및 증식을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, Igf1 및 Cpt1a를 포함한 일부 유전자의 조절이 상기 실시예를 통해 입증되었다.

[0101] 이와 관련하여, 최근 연구에 따르면 EPA 및 DHA가 $CD4^+$ T 세포에 대하여 유사한 항-염증 효과를 나타내는 것으로 평가되었다. 그러나, T 세포에 대한 EPA 및 DHA의 효과 간의 차이점에 대해서는 명확하게 연구된 바 없다. 즉, DHA 및 EPA가 Th1 세포의 반응을 조절하는 데 있어 수지상 세포의 존재에 따라 차이가 있음은 본 발명을 통해 처음으로 입증된 것이다. 구체적으로, 상기 실시예 결과로부터, EPA 및 DHA는 Th1 세포에 대하여 동일한 방향으로 작용을 하나, 수지상 세포 존재하에서는 DHA의 효과가 더 우세하고, 반면에 수지상 세포-비의존적인 방식으로는 EPA의 효과가 더 우세한 것임을 확인할 수 있다.

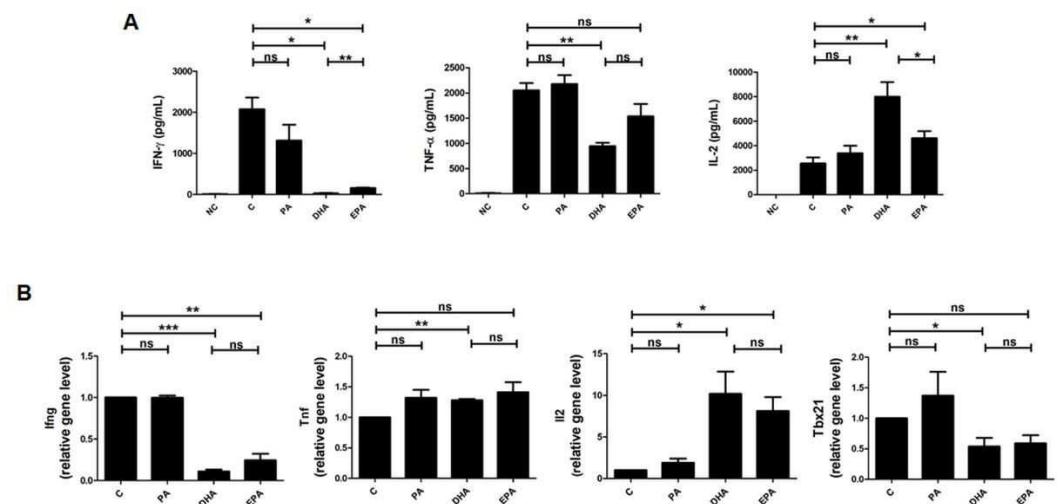
[0102] 따라서, 본 발명에서 새롭게 밝혀낸 DHA 및 EPA의 작용 기전에서의 차이를 이용하여, 면역 조절 치료시 EPA 또는 DHA의 단일용법 (monotherapy)을 조절하여 치료 효과를 극대화할 수 있음을 확인할 수 있다.

도면

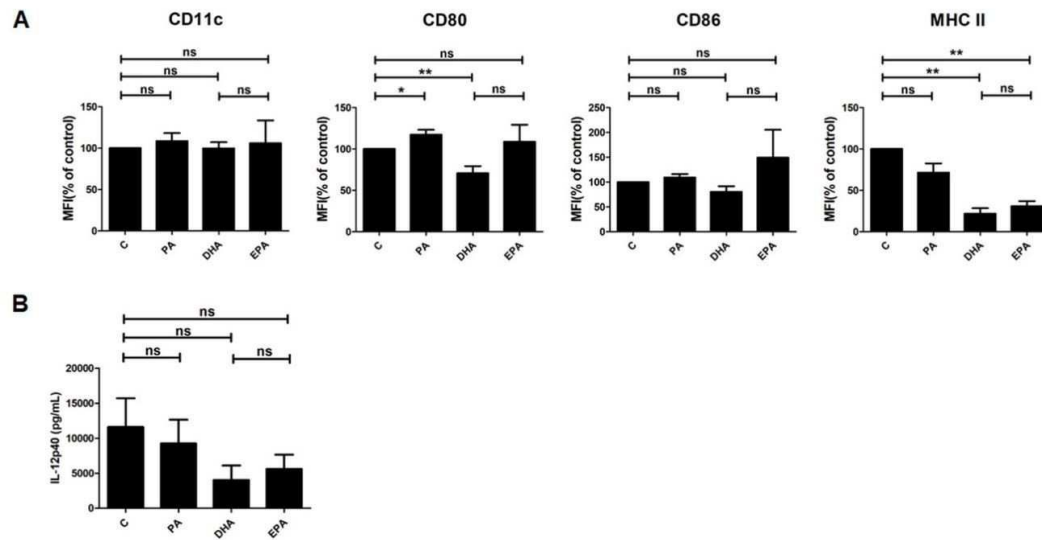
도면1



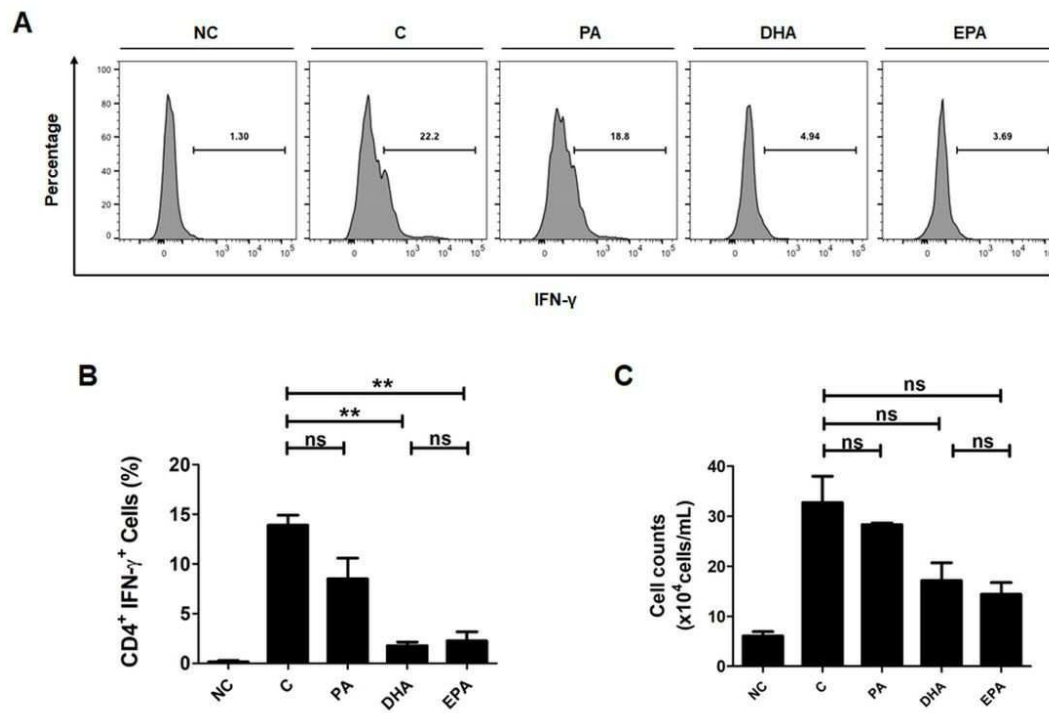
도면2



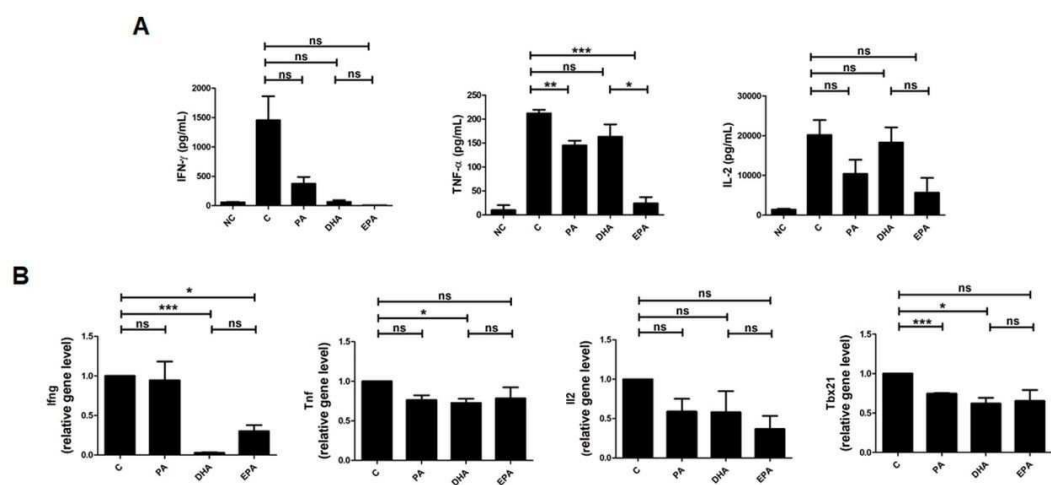
도면3



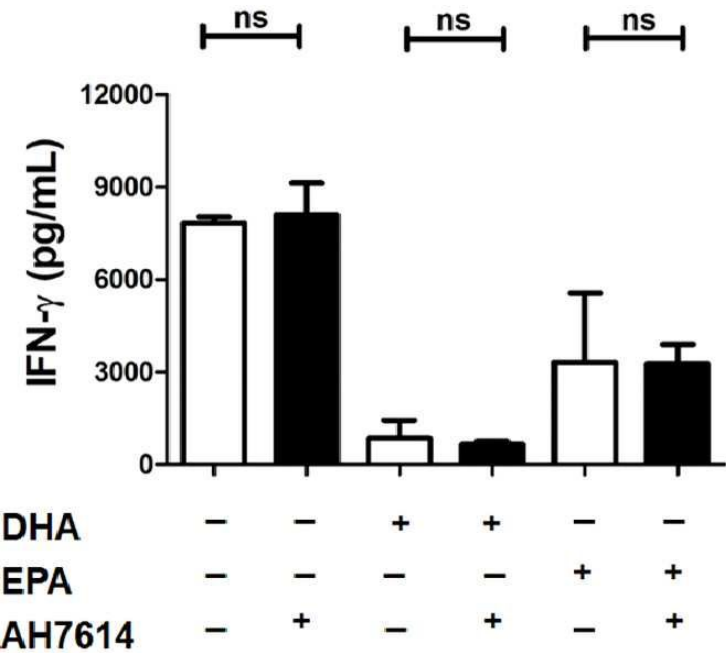
도면4



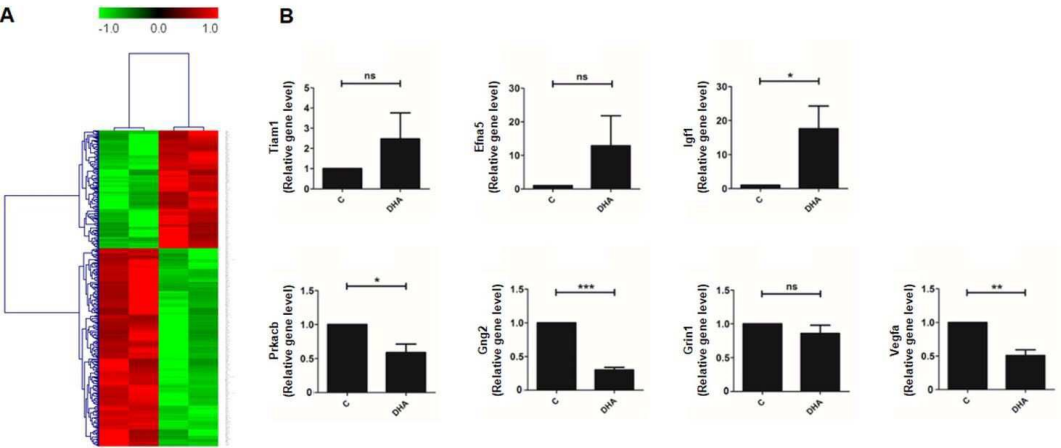
도면5



도면6



도면7



도면8

