

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0104687

(43) 공개일자 2020년09월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01K 67/027 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01K 67/027 (2013.01)

A01K 2207/12 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0023329

(22) 출원일자 2019년02월27일

심사청구일자 2019년02월27일

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

신성재

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세대학교 의과대학 미생물학교실

박상철

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세대학교 의과대학 이비인후과학교실

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이재영

전체 청구항 수 : 총 17 항

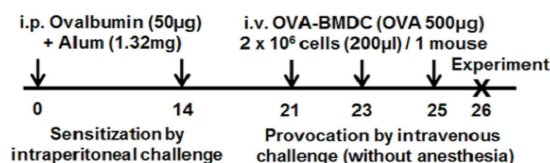
(54) 발명의 명칭 알레르기성 호흡기 질환의 동물 모델 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 알레르기성 호흡기 질환의 동물 모델의 제조 방법, 이에 의해 제조된 알레르기성 호흡기 질환의 동물 모델과 이의 다양한 용도에 관한 것이다.

본 발명에서 제공하는 동물 모델은 알레르기성 호흡기 질환의 연구에 유용한 동물 모델로 활용될 수 있을 뿐만 아니라 상기 알레르기성 호흡기 질환의 병태 생리 규명과 치료 약제 개발에도 널리 응용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A01K 2207/20 (2013.01)
A01K 2227/105 (2013.01)
A01K 2267/03 (2013.01)

(72) 발명자

윤주현

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세대학교 의과
대학 이비인후과학교실

김창훈

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세대학교 의과
대학 이비인후과학교실

김홍민

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세대학교 의과
대학 미생물학교실

심다희

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세대학교 의과
대학 미생물학교실

박예은

서울특별시 서대문구 연세로 50-1 연세대학교 의과
대학 미생물학교실

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2018RIC1B6007431
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	신진연구자지원사업
연구과제명	호흡기 알레르기 질환의 발병 기전에 관여하는 병인성 수지상세포의 형성 기전과 조
절기작 연구	
기여율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2018.03.01 ~ 2021.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016K1A1A2910779
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	글로벌 연구실 사업
연구과제명	난치성 알레르기 호흡기질환의 바이오마커 개발
기여율	1/2
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2016.09.01 ~ 2022.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

수지상 세포를 동물 개체에 주입하는 단계를 포함하는, 알레르기성 호흡기 질환의 동물 모델의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 수지상 세포는 동물 개체의 정맥을 통해 주입되는, 제조 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 동물 개체는 래트, 마우스, 모르모트, 햄스터, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 및 염소로 구성된 군으로부터 선택되는 것인, 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 수지상 세포를 동물 개체에 주입 시 알레르겐(allergen)을 추가로 주입하는, 제조 방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 알레르겐은 난알부민(ovalbumin; OVA), 꽃가루, 벌레 유래 알레르겐, 미생물 유래 알레르겐, 동물의 비듬 또는 동물의 털인, 제조 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 수지상 세포는 동물 개체에 알레르겐을 주입하여 얻어진 것인, 제조 방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 알레르겐을 상기 동물 개체에 주입하는 경로는 구강, 정맥내, 근육내, 동맥내, 골수내, 경막 내, 심장 내, 경피, 피하, 복강 내, 비강 내, 장관, 국소, 설하 또는 직장인, 제조 방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 동물 개체에 알레르겐의 주입 시 아쥬번트(adjuvant)를 추가로 주입하는, 제조 방법.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 아쥬번트는 프로인드 아쥬번트(Freund's adjuvant), 알룸(alum), 면역 자극 복합체(immune stimulatory complex; ISCOM), 산소 함유 금속염(oxygen-containing metal salts), 이열성 엔테로톡신(heat-labile enterotoxin; LT), 콜레라 독소(cholera toxin; CT), 콜레라 독소 B 서브유닛(cholera toxin B subunit; CTB), 고분자화된 리포솜(polymerized liposomes), LTK63, LTR72, 마이크로캡슐(microcapsules), 인터류킨(interleukins), GM-CSF, MDF 유도체, CpG 올리고뉴클레오티드(oligonucleotides), LPS, MPL, 포스포파젠

(phosphophazenes), 글루칸(glucan), 항원 제제, 리포솜, DDE, DHEA, DMPC, DMPG, DOC/알루미늄(Alum) 복합체, 프로인트 불완전 보조약(Freund's incomplete adjuvant), LT 경구 보조약, 뮤라밀 디펩티드(muramyl dipeptide), 모노포스포릴 지질 A(monophosphoryl lipid A), 뮤라밀 트리펩티드(muramyl tripeptide) 및 포스파티딜에타놀아민(phosphatidylethanolamine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 제조 방법.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 알레르겐을 상기 동물 개체에 주입하는 횟수는 1 내지 5회인, 제조 방법.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 수지상 세포는 골수 유래인 것인, 제조 방법.

청구항 12

제1항에 있어서,

상기 수지상 세포는 1×10^6 내지 1×10^7 세포의 양으로 주입되는, 제조 방법.

청구항 13

제1항에 있어서,

상기 알레르기성 호흡기 질환은 알레르기성 천식, 기관지염, 알레르기성 비염, 부비강염, 하기도 감염증 및 상기도 감염증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것인, 제조 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 제조 방법으로 제조된 알레르기성 호흡기 질환의 동물 모델.

청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항의 제조 방법으로 제조된 알레르기성 호흡기 질환의 동물 모델을 이용하여 알레르기성 호흡기 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 스크리닝하는 방법은, 상기 동물 모델에 알레르기성 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 후보 물질을 처리하는 단계; 및

상기 후보 물질을 처리한 동물 모델을 사육하면서 예후를 확인하는 단계를 포함하는, 스크리닝 방법.

청구항 17

제16항에 있어서,

상기 후보 물질에 의하여 상기 동물 모델의 알레르기성 호흡기 질환이 예방되거나, 치료되거나, 대조군 물질에 비하여 예후가 증진된 경우에 상기 후보 물질을 알레르기성 호흡기 질환의 예방제 또는 치료제로 결정하는 것인, 스크리닝하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 알레르기성 호흡기 질환의 동물 모델의 제조 방법, 이에 의해 제조된 알레르기성 호흡기 질환의 동물 모델과 이의 다양한 용도에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 기관지 천식과 알레르기 비염으로 대표되는 호흡기 알레르기 질환은 최근 미세먼지와 대기오염 등에 의한 알레르기 유발인자들이 증가함에 따라, 유병률이 증가하고 있다. 기관지 천식은 기도의 만성적인 염증으로 호흡 곤란, 천명, 가슴답답함, 기침과 같은 증상이 기도 과민성과 함께 동반된다. 기관지 천식은 전 세계적으로 3억 3천명 이상이 이환되어 있는 주요 만성 질환으로 급성 악화될 시 생명을 위협할 수 있으며, 매년 34만 명이 천식으로 인해 사망하고 있다. 또한 만성적인 경과로 인해 일상생활에 지장을 초래하여 사회 경제적인 부담을 초래하고 있다. 천식의 증상은 개인의 항원 감작 정도에 따라 증상의 경중이 다양하게 나타나서 경증, 중등증, 중증 천식으로 나눌 수 있으며, 염증 세포의 침윤에 따라 호산구성 천식과 비호산구성 천식으로 나눌 수 있으며, 이는 병인에 다양한 면역반응이 작용함을 의미함. 따라서 천식의 병태생리에 어떠한 면역학적 기전이 작용하는지에 대한 기초 연구가 중요하다.
- [0003] 천식의 병태 생리를 밝히기 위한 연구를 환자를 대상으로 반복적으로 시행하는 것은 윤리적인 문제로 현실적으로 불가능하기 때문에, 대부분의 생체 내 연구는 동물 모델을 기반으로 이루어지고 있다. 기관지 천식 동물 모델은 면역계와 호흡기계에서 천식의 발병 상황을 구현함으로써 병태 생리를 이해할 수 있도록 해주며, 치료 약제의 효능을 검증하는데도 유용하게 사용되고 있다. 마우스는 가장 널리 사용되는 동물인데 그 이유는 형질 전환 (transgenic), 유사 유전자형 (congenic), 유전자 결핍 (knock out) 동물을 얻기가 용이하여 특정 유전자를 표적으로 질환의 발병에 유전자가 미치는 영향을 잘 관찰할 수 있으며 유전자 정보가 잘 밝혀져 있기 때문이다. 다양한 근교계 마우스 형질이 존재하고, 면역학적 연구에 사용가능한 단클론항체를 비롯한 특정 시약의 이용이 다른 동물에 비해 쉬우며, 사이토카인, 성장인자, 세포표면물질 등을 측정하기 용이하다는 장점이 있다. 또한 실험자 입장에서 크기가 작아 다루기에 편하고, 값이 다른 동물보다 저렴할 뿐만 아니라 키우는 데 비용이 덜 들어가서 경제적으로 유리한 장점이 있어서 천식뿐만 아니라 여러 질환의 연구에 가장 널리 사용되고 있다.
- [0004] 마우스를 비롯한 동물은 천식이 저절로 발병하지는 않아서 인위적으로 항원을 투여하여 감작 반응을 유도하여 기관지에 천식 유사 상황을 만들어야 한다. 그런데 천식 마우스 모델을 제작하는 기존의 방법은 몇 가지 한계점이 있다. 호흡기로 투여한 항원이 하기도까지 도달하기 위해서는 마우스를 전신마취 시켜야 하는데, 며칠 동안 반복되는 마취와 항원 투여는 실험자 뿐만 아니라 마우스에게도 스트레스를 주는 상황으로 작용할 뿐만 아니라 마취 자체가 인위적으로 조절을 해야하는 상황으로 이에 의한 변수가 발생할 수 있다. 또한 항원의 흡입 정도가 개체간에 차이가 있어서 같은 실험군 내에서도 표현형의 차이가 발생하는 문제가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명의 일 목적은 간단하고 용이하면서도 제작되는 개개의 동물 모델 간에 편차가 적도록 알레르기성 호흡기 질환의 동물 모델을 제조하는 방법을 제공하고자 한다.
- [0006] 본 발명의 다른 목적은 본 발명의 방법에 따라 제조된 알레르기성 호흡기 질환의 동물 모델을 제공하고자 한다.
- [0007] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 방법에 따라 제조된 알레르기성 호흡기 질환의 동물 모델의 다양한 용도에 관한 것이다.
- [0008] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 수지상 세포를 동물 개체에 주입하는 단계를 포함하는, 알레르기성 호흡기 질환의 동물 모델의 제조 방법에 관한 것이다.
- [0010] 본 발명에서는 동물 개체에 알레르기성 호흡기 질환의 병태 생리에 관여하는 수지상 세포를 직접 주입함으로써 상기 질환의 면역 반응을 효과적으로 유도할 수 있다.
- [0011] 본 발명에서는 상기와 같이 수지상 세포를 상기 동물 개체에 주입하는 방법에 따라 제조되는 알레르기성 호흡기 질환의 동물 모델의 생리학적 특성이 달라질 수 있다. 본 발명에서는 상기 수지상 세포를 상기 동물 개체의 정맥을 통해 주입함으로써, 비강 내 투여로 인하여 동물 개체를 전신 마취시켜야 하는 번거로움을 줄일 수 있고, 적은 감작(challenge) 횟수로도 충분한 알레르기성 호흡기 질환, 특히 천식의 병태 생리 환경을 구현할 수 있

을 뿐만 아니라, 제작되는 각각의 동물 모델의 개체 간의 질환 정도의 편차를 줄일 수 있는 큰 장점이 있다.

- [0012] 본 발명에서 이용되는 동물 개체의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 인간을 제외한 동물일 수 있으나, 바람직하게는 인간을 제외한 포유 동물로, 예를 들면, 래트, 마우스, 모르모트, 햄스터, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 및 염소로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 보다 바람직하게는 마우스일 수 있다.
- [0013] 본 발명에서 상기 수지상 세포는 골수 유래 또는 비장 유래일 수 있지만, 골수 유래인 것이 질환 유도 효율이 좋고, 동물 개체로 예를 들어 마우스 한 마리의 골수에서 유래한 수지상 세포로 최대 100 마리의 알레르기성 호흡기 질환의 동물 모델을 제작할 수 있어 매우 경제적인 장점이 있다.
- [0014] 본 발명에서 상기 수지상 세포는 1×10^6 내지 1×10^7 세포의 양으로 동물 개체에 주입될 수 있고, 바람직하게는 2×10^6 내지 1×10^7 세포, 또는 2×10^6 내지 5×10^6 세포의 양으로 주입될 수 있다.
- [0015] 본 발명에서는 상기와 같이 동물 개체에 수지상 세포를 주입할 때 알레르겐을 함께 주입함으로써, 수지상 세포를 활성화시켜 알레르기성 호흡기 질환을 보다 효과적으로 유도할 수 있다.
- [0016] 본 발명에서 상기 "알레르겐(allergen)"은 알레르기성 질환의 원인이 되는 항원으로, 알레르겐의 섭취 또는 접촉으로 생체 내에서 항체가 만들어져 같은 물질의 재섭취 또는 재접촉이 일어날 경우에 항원 항체 반응이 일어나는 것으로, 구체적인 종류를 특별히 제한하지 않으나, 난알부민(ovalbumin; OVA), 꽃가루, 벌레 유래 알레르겐, 미생물 유래 알레르겐, 동물의 비듬 또는 동물의 털 등일 수 있다.
- [0017] 본 발명에서 상기 꽃가루는 개체에 투여 시 알레르기성 질환을 유발시키는 것이라면 그 유래를 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면, 아카시아(Acacia), 오리나무(Alder), 서양물푸레나무(Ash), 미국 너도밤나무(Beech American), 자작나무(Birch), 네균도 단풍나무(Box Elder), 연필향 나무(Cedar Red), 미루나무(Cottonwood), 노송나무(Japanese Cypress), 북미산 느릅나무(Elm American), 참느릅나무(Elm Chinese), 일본 미송나무(Japanese Douglas fir), 소합향 나무(Sweetgum), 유칼립투스(Eucalyptus), 팽나무(Hackberry), 히코리(Hickory), 린덴(Linden), 단풍 당(Maple Sugar), 메스키투(Mesquite), 뽕나무(Mulberry), 오크나무(Oak), 올리브나무(Olive), 피칸나무(Pecan), 후추나무(Pepper Tree), 소나무(Pine), 쥐똥나무(Privet), 가는잎보리수나무(Olive Russian), 양버즘나무(Sycamore American), 가죽나무(Tree of Heaven), 호두나무(Walnut), 또는 흑버드나무(Willow Black)의 나무나, 목화(Cotton plant), 버뮤다(Bermuda), 왕포아폴(Kentucky Blue), 스무스 브롬그라스(Smooth Brome), 경작된 옥수수(Cultivated Corn), 메도우 페스큐우(Meadow Fescue), 존슨(Johnson), 경작된 귀리(Cultivated Oats), 새밭풀(Orchard), 외겨이삭(Red top), 다년생 호밀(Rye Perennial), 쌀(Rice), 유라시아산 벼과 목초(Sweet Vernal), 티모시(Timothy), 잡초(Careless weed), 벼들잎명아주(Chenopodium), 우영(Cocklebur), 메역취(Goldenrod), 땀싸리(Kochia), 명아주(Lambs Quarters), 천수국(Marigold), 쟁기풀(Nettle), 거친 명아주(Pigweed Rough), 창질경이(Plantain English), 돼지풀(Ragweed), 러시아 엉겅퀴(Russian Thistle), 산쭉(Sagebrush Common), 골담초(Scotch bloom), 또는 애기수영(Sheep Sorrel)의 풀 유래의 것일 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 상기 벌레 유래 알레르겐의 경우, 누에(silkworm), 진드기(mite), 꿀벌(honeybee), 말벌(wasp), 개미(ant) 및 바퀴벌레(cockroach) 유래 알레르겐일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명에서 상기 미생물 유래 알레르겐은 알터나리아 테누이스(Alternaria tenuis), 아스피질러스 푸미가투스(Aspergillus fumigatus), 보트리티스 시네레아(Botrytis cinerea), 캔디다 알비칸스(Candida albicans), 세팔로스포리움 아크레모니움(Cephalosporium acremonium), 쿠르불라리아 스피시페라(Curvularia spicifera), 에피포쿰 니그럼(Epicoccum nigrum), 에피도모피톤 플로코섬(Epidermophyton floccosum), 푸사리움 바싹팍툼(Fusarium vasinfectum), 헬민토스포리움 인테르세미나툼(Helminthosporium interseminatum), 포르모덴드럼 클라도스포리오데스(Hormodendrum cladosporioides), 뮤코 라세모서스(Mucor rasemosus), 페니실린 노트툼(Penicillium notatum), 포마 헤르바리움(Phoma herbarium), 풀루라리아 풀루란스(Pullularia pullulans), 또는 리조푸스 니그리칸스(Rhizopus nigricans) 유래 알레르겐일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명에서 상기 동물의 비듬 또는 동물의 털은 개, 고양이 또는 새 유래 털이나 비듬일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0021] 또한, 본 발명에서는 상기 동물 개체에 상기 수지상 세포를 주입할 때에 아쥘번트(adjuvant)를 추가로 주입하여, 상기 수지상 세포의 면역 활성화 효과를 증강시킬 수 있다.

- [0022] 본 발명에서 상기 아쥘번트의 종류는 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면, 프로인드 아쥘번트(Freund's adjuvant), 알룸(alum), 면역 자극 복합체(immune stimulatory complex; ISCOM), 산소 함유 금속염(oxygen-containing metal salts), 이열성 엔테로톡신(heat-labile enterotoxin; LT), 콜레라 독소(cholera toxin; CT), 콜레라 독소 B 서브유닛(cholera toxin B subunit; CTB), 고분자화된 리포솜(polymerized liposomes), LTK63, LTR72, 마이크로캡슐(microcapsules), 인터류킨(interleukins(e.g. IL-1 β , IL-2, IL-7, IL-12, INF γ)), GM-CSF, MDF 유도체, CpG 올리고뉴클레오티드(oligonucleotides), LPS, MPL, 포스포파젠(phosphophazenes), Adju- Phos®, 글루칸(glucan), 항원 제제, 리포솜, DDE, DHEA, DMPC, DMPG, DOC/알룸(Alum) 복합체, 프로인드 불완전 보조약(Freund's incomplete adjuvant), ISCOMs®, LT 경구 보조약, 뮤라밀 디펩티드(muramyl dipeptide), 모노포스포릴 지질 A(monophosphoryl lipid A), 뮤라밀 트리펩티드(muramyl tripeptide) 및 포스파티딜에타놀아민(phosphatidylethanolamine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다.
- [0023] 본 발명에서 상기 수지상 세포는 동물 개체에 알레르겐을 주입한 뒤 골수 세포로부터 분화가 유도된 것이 동물 개체 내에서 면역 반응을 보다 활성화시켜 알레르기성 호흡기 질환을 보다 효과적으로 유도할 수 있어 바람직하다. 여기서, 상기 알레르겐이 주입되어 골수 세포가 분리될 동물 개체와 상기 수지상 세포가 주입될 동물 개체는 서로 동일하거나 상이할 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 상기 수지상 세포를 얻기 위하여 상기 동물 개체에 주입되는 알레르겐의 종류는 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면, 난알부민(OVA), 꽃가루, 벌레 유래 알레르겐, 미생물 유래 알레르겐, 동물의 비듬 또는 동물의 털 등일 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명에서는 상기 수지상 세포를 얻기 위하여 상기 동물 개체에 알레르겐을 주입할 때 아쥘번트(adjuvant)를 추가로 주입하여, 최종 분리될 수지상 세포의 동물 개체 내 면역 활성화 효과를 증강시킬 수 있다.
- [0026] 본 발명에서는 상기 아쥘번트의 종류는 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면, 프로인드 아쥘번트(Freund's adjuvant), 알룸(alum), 면역 자극 복합체(immune stimulatory complex; ISCOM), 산소 함유 금속염(oxygen-containing metal salts), 이열성 엔테로톡신(heat-labile enterotoxin; LT), 콜레라 독소(cholera toxin; CT), 콜레라 독소 B 서브유닛(cholera toxin B subunit; CTB), 고분자화된 리포솜(polymerized liposomes), LTK63, LTR72, 마이크로캡슐(microcapsules), 인터류킨(interleukins(e.g. IL-1 β , IL-2, IL-7, IL-12, INF γ)), GM-CSF, MDF 유도체, CpG 올리고뉴클레오티드(oligonucleotides), LPS, MPL, 포스포파젠(phosphophazenes), Adju- Phos®, 글루칸(glucan), 항원 제제, 리포솜, DDE, DHEA, DMPC, DMPG, DOC/알룸(Alum) 복합체, 프로인드 불완전 보조약(Freund's incomplete adjuvant), ISCOMs®, LT 경구 보조약, 뮤라밀 디펩티드(muramyl dipeptide), 모노포스포릴 지질 A(monophosphoryl lipid A), 뮤라밀 트리펩티드(muramyl tripeptide) 및 포스파티딜에타놀아민(phosphatidylethanolamine)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다.
- [0027] 또한, 본 발명에서 상기 수지상 세포를 얻기 위하여 상기 동물 개체에 상기 알레르겐 또는 아쥘번트를 주입하는 경로는 특별히 제한하지는 않지만, 예를 들면, 구강, 정맥 내, 근육 내, 동맥 내, 골수 내, 경막 내, 심장 내, 경피, 피하, 복강 내, 비강 내, 장관, 국소, 설하 또는 직장을 통해 주입할 수 있고, 바람직하게는 복강 내로 주입할 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명에서 상기 수지상 세포를 얻기 위하여 상기 동물 개체에 상기 알레르겐 또는 아쥘번트를 주입하는 횟수는 특별히 제한하지 않으나, 예를 들면, 1 내지 5회 주입할 수 있고, 바람직하게는 1 내지 3회 주입할 수 있다.
- [0029] 본 발명에서는 상기와 같이 동물 개체에 알레르겐 또는 아쥘번트를 주입한 뒤 골수 유래 수지상 세포를 얻을 수 있고, 바람직하게는 상기 동물 개체로부터 골수 세포를 분리하여 동물 개체의 체외에서 수지상 세포로 분화를 유도할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 상기 알레르기성 호흡기 질환은 호흡기를 통해 알레르겐이 유입되어 개체 내에 유발될 수 있는 염증 반응으로서, 알레르기성 천식, 기관지염, 알레르기성 비염, 부비강염, 하기도 감염증 및 상기도 감염증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것일 수 있고, 바람직하게는 알레르기성 천식일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0032] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 본 발명의 제조 방법에 따라 제조된 알레르기성 호흡기 질환의 동물 모델에 관한 것이다.
- [0033] 본 명세서에서 사용되는 용어, "동물 모델"은 질환 동물 모델을 의미한다. 구체적으로, 동물 모델은 인간의 질병과 유사한 상태의 질병에 걸리거나 선천적으로 그 질병에 걸리도록 만들어진 동물 모델일 수 있다. 본 명세서에서 동물 모델은 알레르기성 호흡기 질환의 동물 모델일 수 있다. 또한, 본 발명의 알레르기성 호흡기 질환의 동물 모델로 이용될 수 있는 동물은 인간을 제외한 포유 동물로, 예를 들면, 래트, 마우스, 모르모트, 햄스터, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 및 염소로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 보다 바람직하게는 마우스일 수 있다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 본 발명에서 제공하는 동물 모델을 이용하여 알레르기성 호흡기 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.
- [0036] 본 발명에서 상기 "스크리닝"이란, 여러 물질로 이루어진 후보군으로부터 목적으로 하는 어떤 특정한 성질을 갖는 물질을 특정한 조작 또는 평가 방법으로 선별하는 것이다.
- [0037] 본 발명에서 제공하는 스크리닝 방법은 우선, 본 발명에서 제공하는 동물 모델에 알레르기성 호흡기 질환의 예방 또는 치료용 후보 물질을 처리하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0038] 여기서, 상기 후보 물질은 천연 화합물, 합성 화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사 산물 및 생활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0039] 본 발명에서는 상기 후보 물질을 처리한 동물 모델을 사육하면서 예후를 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 즉, 상기 후보 물질에 의하여 알레르기성 호흡기 질환이 예방되거나, 치료되거나, 대조군 물질에 비하여 예후가 증진된 경우에 상기 후보 물질을 알레르기성 호흡기 질환의 예방제 또는 치료제로 결정하는 것이다.
- [0040] 본 발명의 상기 알레르기성 호흡기 질환은 호흡기를 통해 알레르겐이 유입되어 개체 내에 유발될 수 있는 염증 반응으로서, 알레르기성 천식, 기관지염, 알레르기성 비염, 부비강염, 하기도 감염증 및 상기도 감염증으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나인 것일 수 있고, 바람직하게는 알레르기성 천식일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

- [0041] 본 발명에서 제공하는 동물 모델은 알레르기성 호흡기 질환의 연구에 유용한 동물 모델로 활용될 수 있을 뿐만 아니라 상기 알레르기성 호흡기 질환의 병태 생리 규명과 치료 약제 개발에도 널리 응용될 수 있다.
- [0042] 더욱이, 본 발명에서 제공하는 알레르기성 호흡기 질환의 동물 모델의 제조 방법은 간단하고 용이하면서도 제조되는 각각의 질환의 동물 개체 간에 편차가 적고 재현성이 우수하여 이를 이용한 실험에 있어서 신뢰도가 높은 장점이 있다.
- [0043] 또한, 본 발명에서 제공하는 알레르기성 호흡기 질환의 동물 모델의 제조 방법은 동물 모델을 제작하기 위해 마취를 하지 않아도 되어, 반복되는 마취로 인해 동물 개체에게 가해지는 스트레스를 줄일 수 있고, 인위적으로 조절되는 상황인 마취에 의한 변수의 발생 가능성을 줄일 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1은 실시예 1에서 천식 마우스 모델의 제작을 위한 실험 설계도이다.
- 도 2는 실시예 2에서 천식 마우스 모델의 제작을 위한 실험 설계도이다.
- 도 3은 비교예 1에서 천식 마우스 모델의 제작을 위한 실험 설계도이다.
- 도 4는 실험예 1에서 마우스의 비강으로 인산화 완충 수용액(PBS)를 투여한 정상 대조군(i.p.+i.n. PBS)과, 상기 실시예 1에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델(i.p.+i.v. OVA-BMDC)과, 상기 비교예 1에서 기존 방법을 이용하여 유도한 천식 마우스 모델(i.p.+i.n. OVA)의 세 그룹에서 폐 조직을 헤마톡실린-에오신(hematoxylin and eosin) 염색 방법으로 염색한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 실험예 1에서 마우스의 비강으로 인산화 완충 수용액(PBS)를 투여한 정상 대조군(i.p.+i.n. PBS)과, 상기 실시예 1에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델(i.p.+i.v. OVA-BMDC)에서 각 마우스의 폐 조직에서 염증 지수를 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 실험예 2에서 마우스의 비강으로 인산화 완충 수용액(PBS)를 투여한 정상 대조군(i.p.+i.n. PBS)과, 상기 실시예 1에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델(i.p.+i.v. OVA-BMDC)과, 상기 비교예 1에서 기존 방법을 이용하여 유도한 천식 마우스 모델(i.p.+i.n. OVA)의 세 그룹에서 각 마우스의 폐 조직을 과요오드산-쉬프(periodic acid-Schiff) 염색 방법으로 염색한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 실험예 2에서 마우스의 비강으로 인산화 완충 수용액(PBS)를 투여한 정상 대조군(i.p.+i.n. PBS)과, 상기 실시예 1에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델(i.p.+i.v. OVA-BMDC)에서 각 마우스의 폐 조직에 대하여 PAS(periodic acid-Schiff) 지수를 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 8은 실험예 3에서 마우스의 비강으로 인산화 완충 수용액(PBS)를 투여한 정상 대조군(i.p.+i.n. PBS)과, 상기 실시예 1에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델(i.p.+i.v. OVA-BMDC)에서 각 마우스의 폐 조직을 부검하여 조혈모세포(hematopoietic cell)인 CD45 양성인 세포 중에 호산구(eosinophil)의 비율을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 실험예 4에서 마우스의 비강으로 인산화 완충 수용액(PBS)를 투여한 정상 대조군(i.p.+i.n. PBS)과, 상기 실시예 1에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델(i.p.+i.v. OVA-BMDC)과, 상기 비교예 1에서 기존 방법을 이용하여 유도한 천식 마우스 모델(i.p.+i.n. OVA)의 세 그룹에서 기관지 폐포 세척액을 통해 IL-4 및 IL-5의 발현 수준을 측정된 결과를 나타낸 것이다.

도 10은 실험예 5에서 마우스의 비강으로 인산화 완충 수용액(PBS)를 투여한 정상 대조군(i.p.+i.n. PBS)과, 상기 실시예 1에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델(i.p.+i.v. OVA-BMDC)과, 상기 비교예 1에서 기존 방법을 이용하여 유도한 천식 마우스 모델(i.p.+i.n. OVA)의 세 그룹에서 혈액을 채취하여 항원 (OVA) 특이적인 면역글로불린(immunoglobulin) E와 G1의 발현 수준을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 11은 실험예 6에서 마우스의 비강으로 인산화 완충 수용액(PBS)를 투여한 정상 대조군(i.p.+i.n. PBS)과, 상기 실시예 1에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델(i.p.+i.v. OVA-BMDC), 상기 실시예 2에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델(i.v. OVA-BMDC)과, 상기 비교예 1에서 기존 방법을 이용하여 유도한 천식 마우스 모델(i.p.+i.n. OVA)의 네 그룹에서 폐 조직을 채취하여 난알부민(OVA) 항원으로 재자극을 주었을 때 IL-5 및 IL-13의 발현 수준을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 12는 실험예 7에서 마우스의 비강으로 인산화 완충 수용액(PBS)를 투여한 정상 대조군(i.p.+i.n. PBS)과, 상기 실시예 1에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델(i.p.+i.v. OVA-BMDC), 상기 실시예 2에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델(i.v. OVA-BMDC)과, 상기 비교예 1에서 기존 방법을 이용하여 유도한 천식 마우스 모델(i.p.+i.n. OVA)의 네 그룹에서 비장 조직을 채취하여 난알부민(OVA) 항원으로 재자극을 주었을 때 IL-5 및 IL-13의 발현 수준을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

도 13은 실험예 8에서 마우스의 비강으로 인산화 완충 수용액(PBS)를 투여한 정상 대조군(i.p.+i.n. PBS)과, 상기 실시예 1에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델(i.p.+i.v. OVA-BMDC), 상기 실시예 2에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델(i.v. OVA-BMDC)과, 상기 비교예 1에서 기존 방법을 이용하여 유도한 천식 마우스 모델(i.p.+i.n. OVA)의 네 그룹에서 종격동 림프절 조직을 채취하여 난알부민(OVA) 항원으로 재자극을 주었을 때 IL-5 및 IL-13의 발현 수준을 분석한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0045]

[0047] 실시예

[0049] [실시예 1] 천식 마우스 모델의 제작

[0050] 도 1에 나타난 실험 설계도에 따라 본 발명에 따른 천식 마우스 모델을 제작하였다. 구체적으로, 난알부민(OVA) 50 μ g을 항원보강제(adjuvant)인 알룸(Alum) 1.32mg과 함께 2주 간격으로 2회 마우스의 복강 내로 투여하였다. 이후 상기 마우스의 골수 유래 수지상 세포를 분리하여, 상기 수지상 세포 2 x 10⁶ 세포(cells)(200 μ l)를 난알부민(OVA) 150 μ g과 함께 천식을 유도할 마우스의 정맥을 통해 21일, 23일, 25일에 투여하였다.

[0052] [실시예 2] 천식 마우스 모델의 제작

[0053] 도 2에 나타난 실험 설계도에 따라 본 발명에 따른 천식 마우스 모델을 제작하였다. 마우스의 골수 유래 수지상 세포 2 x 10⁶ 세포(cells)(200 μ l)를 난알부민(OVA) 500 μ g과 함께 천식을 유도할 마우스의 정맥을 통해 21일, 23일, 25일에 투여하였다.

[0055] [비교예 1] 천식 마우스 모델의 제작

[0056] 도 3에 나타난 실험 설계도에 따라 종래의 방법에 의해 천식 마우스 모델을 제작하였다. 난알부민(OVA) 50 μ g을 항원보강제(adjuvant)인 알룸(Alum) 1.32mg과 함께 2주 간격으로 2회 마우스의 복강 내로 투여하였다. 이후 21 일째부터 5일동안 마우스를 전신 마취시킨 뒤 난알부민(OVA)를 마우스의 비강 내로 투여하였다.

[0058] [실험예 1] 천식 마우스 모델의 폐 조직 병리 소견 분석(1)

[0059] 마우스의 비강으로 인산화 완충 수용액(phosphate buffer saline, PBS)을 투여한 정상 대조군과, 상기 실시예 1에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델과, 상기 비교예 1에서 기존 방법을 이용하여 유도한 천식 마우스 모델의 세 그룹에서 폐 조직의 병리 조직 소견을 분석하였다. 각 마우스의 폐 조직을 헤마톡실린-에오신(hematoxylin and eosin) 염색 방법으로 염색하여 그 결과를 도 4에 나타내었다. 또한, 상기 정상 대조군과, 상기 실시예 1에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델 마우스의 폐 조직에서 염증 지수를 측정하여 그 결과를 도 5에 나타내었다. 이때 염증 지수는 기관지 주변의 염증 세포 침윤 정도를 5단계로 점수화 한 수치로 평가 기준은 아래의 평가 기준에 따라 평가하였다(Sci Rep. 2015 Oct 20;5:15396. doi: 10.1038/srep15396). 이때 마우스 마다 각 조직 슬라이드에서 동일한 해부학적 부위 8곳을 찾아서 광학현미경 x100배율에서 염증 정도 수치를 구하고, 그 수치의 평균 값을 마우스의 염증 지수로 간주하였으며, 한 실험군당 6마리 마우스의 염증 지수를 평균 값으로 하여 도 5에 나타내었다.

[0060] <염증 지수 평가 기준>

[0061] 0: 정상

[0062] 1: 적은 세포

[0063] 2: 염증세포가 한층 두께로 침윤

[0064] 3: 염증세포가 2~4층 두께로 침윤

[0065] 4: 염증세포가 4층 이상의 두께로 침윤.

[0066] 도 4에서 보는 바와 같이, 실시예 1에서 제작한 마우스 모델에서는 정상 대조군이나 비교예 1에서 제작한 마우스 모델에 비하여 기관지와 폐 실질 조직에서 염증 세포의 침윤이 관찰되어 천식이 유도된 것을 확인할 수 있었다.

[0067] 또한, 도 5에서 염증 정도를 정량화 하여 비교한 결과, 정상 대조군에 비하여 실시예 1에서 제작한 마우스 모델에서 염증 지수가 더욱 높게 나타났으며, 개체간의 변이도 더욱 적은 것을 확인할 수 있었다.

[0069] [실험예 2] 천식 마우스 모델의 폐 조직 병리 소견 분석(2)

[0070] 마우스의 비강으로 인산화 완충 수용액(PBS)을 투여한 정상 대조군과, 상기 실시예 1에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델과, 상기 비교예 1에서 기존 방법을 이용하여 유도한 천식 마우스 모델의 세 그룹에서 폐 조직을 과요오드산-쉬프(periodic acid-Schiff) 염색 방법으로 염색한 결과를 도 6에 나타내었다. 또한, 정상 대조군과 상기 실시예 1에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델의 폐 조직에서 PAS(periodic acid-Schiff) 지수를 측정하여 그 결과를 도 7에 나타내었다. PAS 지수는 술잔 세포(goblet cell)의 침윤 정도를 5단계로 점수화한 수치로, PAS+인 술잔 세포(goblet cell)의 비율에 따라 아래의 기준으로 평가하였다(Sci Rep. 2015 Oct 20;5:15396. doi: 10.1038/srep15396). 이 때 마우스마다 각 조직 슬라이드에서 동일한 해부학적 부위 8곳을 찾아서 광학현미경 x200배율에서 침윤 정도 수치를 구하고, 그 수치의 평균 값을 마우스의 PAS 수치로 간주하였으며, 한 실험군당 6마리 마우스의 PAS 수치를 평균값으로 하여 도 7에 나타내었다.

[0071] <PAS 수치 평가 기준>

[0072] 0: <0.5%

[0073] 1: 0.5~25%

[0074] 2: 25~50%

[0075] 3: 50~75%

[0076] 4: >75%

[0077] 도 6에서 보는 바와 같이, 실시예 1에서 제작한 마우스 모델에서는 정상 대조군과는 달리 술잔 세포(goblet cell)의 발현이 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0078] 또한, 도 7에서 PAS 지수로 정량화한 결과, 정상 대조군에 비하여 실시예 1에서 제작한 마우스 모델에서 배상 세포의 증식이 더욱 높게 나타났으며, 개체간의 변이도 적은 것을 확인할 수 있었다.

[0080] [실험예 3] 천식 마우스 모델의 폐에서 세포의 발현 양상 분석

[0081] 마우스의 비강으로 인산화 완충 수용액(PBS)을 투여한 정상 대조군과, 상기 실시예 1에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델과, 상기 비교예 1에서 기존 방법을 이용하여 유도한 천식 마우스 모델의 세 그룹의 폐에서 면역 세포의 발현 양상을 분석하였다. 각 마우스 모델의 폐 조직을 부검하여 조혈 모세포(hematopoietic cell)인 CD45 양성인 세포 중에 호산구(eosinophil)의 비율을 분석하여 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0082] 도 8에서 보는 바와 같이, 알레르기 천식의 병태 생리에 가장 핵심적인 역할을 하는 세포는 호산구에 해당하는데, 정상 대조군에 비하여 실시예 1에서 제작한 마우스 모델에서 그 발현이 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0084] [실험예 4] 천식 마우스 모델의 기관지 폐포 세척액 분석(1)

[0085] 마우스의 비강으로 인산화 완충 수용액(PBS)을 투여한 정상 대조군과, 상기 실시예 1에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델과, 상기 비교예 1에서 기존 방법을 이용하여 유도한 천식 마우스 모델의 세 그룹에서 기관지 폐포 세척액을 통해 사이토카인의 발현 양상을 분석하였다. 각 마우스 모델의 기관지를 통해 얻은 기관지 폐포 세척액을 원심 분리하여 상층액을 얻은 뒤 ELISA를 Th2 면역반응에 관여하는 IL-4 및 IL-5의 발현 수준을 측정하여 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0086] 도 9에서 보는 바와 같이, 정상 대조군이나 기존 방법을 이용하여 유도된 비교예 1의 마우스 모델에 비하여 수지상 세포를 정맥 내로 투여하여 유도된 실시예 1의 마우스 모델에서 IL-4 및 IL-5의 발현 수준이 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었고, 특히 IL-5의 경우 정상 대조군이나 기존 방법을 이용하여 유도된 비교예 1의 마우스 모델에서는 거의 발현되지 않는 것을 확인할 수 있었다.

- [0088] [실험예 5] 천식 마우스 모델의 항원 특이 면역글로불린(Immunoglobulin) 발현 양상의 분석
- [0089] 마우스의 비강으로 인산화 완충 수용액(PBS)을 투여한 정상 대조군과, 상기 실시예 1에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델과, 상기 비교예 1에서 기존 방법을 이용하여 유도한 천식 마우스 모델의 세 그룹에서 혈액을 채취하여 항원 (OVA) 특이적인 면역글로불린(immunoglobulin) E와 G1의 발현을 분석하여 그 결과를 도 10에 나타내었다.
- [0090] 도 10에서 보는 바와 같이, 난알부민으로 활성화된 수지상 세포를 정맥 내로 투여하여 유도된 실시예 1의 마우스 모델에서 난알부민 특이적인 IgE 및 IgG1의 발현이 가장 유의하게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 이는 실시예 1에서 유도된 마우스 모델에서 천식으로 인한 전신적인 면역 반응이 잘 활성화 되었음을 의미하는 것이다.
- [0091] 이상의 결과는 난알부민 항원이 천식 반응의 유도에 중요한 역할을 하는 것으로, 상기 난알부민으로 활성화된 수지상 세포가 마우스 체내에서 전신적인 면역 반응을 활발히 일으키는 것임을 알 수 있었다.
- [0093] [실험예 6] 천식 마우스 모델의 폐에서 항원에 대한 사이토카인 발현 양상 분석
- [0094] 마우스의 비강으로 인산화 완충 수용액(PBS)을 투여한 정상 대조군과, 상기 실시예 1 및 2에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델, 상기 비교예 1에서 기존 방법을 이용하여 유도한 천식 마우스 모델의 네 그룹에서 폐 조직을 채취하여 난알부민(OVA) 항원으로 재자극을 주었을 때 IL-5 및 IL-13의 사이토카인의 발현을 조사해 T 세포 면역 반응을 분석하였다. 각 사이토카인 별 결과는 도 11에 나타내었다.
- [0095] 도 11에서 보는 바와 같이, 정상 대조군이나 기존 방법을 이용하여 유도된 비교예 1의 마우스 모델에 비하여, 수지상 세포를 정맥 내로 투여하여 유도된 실시예 1 및 2의 마우스 모델의 폐에서 IL-5 및 IL-13의 발현 수준이 현저하게 증가한 것을 확인할 수 있었다. 특히는 난알부민 및 알럼을 마우스의 복강 내로 주입하여 얻어진 골수 유래 수지상 세포를 주입한 실시예 1의 마우스 모델의 폐에서 상기 IL-5 및 IL-13의 발현 수준이 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다.
- [0096] 이를 통하여 천식의 면역 반응에 핵심적인 Th2 면역반응을 나타내는 사이토카인인 IL-5 및 IL-13의 발현이 수지상 세포를 이용하여 유도된 천식 마우스 모델에서 유의하게 증가하였으며, 폐에서 천식이 잘 유도되었음을 알 수 있었다.
- [0098] [실험예 7] 천식 마우스 모델의 비장에서 항원에 대한 사이토카인 발현 양상 분석
- [0099] 마우스의 비강으로 인산화 완충 수용액(PBS)을 투여한 정상 대조군과, 상기 실시예 1 및 2에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델, 상기 비교예 1에서 기존 방법을 이용하여 유도한 천식 마우스 모델의 네 그룹에서 비장 조직을 채취하여 난알부민(OVA) 항원으로 재자극을 주었을 때 IL-5 및 IL-13의 발현을 조사하여 그 결과를 도 12에 나타내었다.
- [0100] 도 12에서 보는 바와 같이, 정상 대조군이나 기존 방법을 이용하여 유도된 비교예 1의 마우스 모델에 비하여 수지상 세포를 정맥 내로 투여하여 유도된 실시예 1 및 2의 마우스 모델의 비장에서도 IL-5 및 IL-13의 발현 수준이 현저하게 증가한 것을 확인할 수 있었고, 특히는 난알부민 및 알럼을 마우스의 복강 내로 주입하여 얻어진 골수 유래 수지상 세포를 주입한 실시예 1의 마우스 모델의 비장에서 상기 IL-5 및 IL-13의 발현 수준이 현저히 증가한 것을 확인할 수 있었다.
- [0101] 이를 통하여 천식의 면역 반응에 핵심적인 Th2 면역반응을 나타내는 사이토카인인 IL-5 및 IL-13의 발현이 수지상 세포를 이용하여 유도된 천식 마우스 모델에서 유의하게 증가하였으며, 비장에서도 천식이 잘 유도되었음을 알 수 있었다.
- [0103] [실험예 8] 천식 마우스 모델의 종격동 림프절에서 항원에 대한 사이토카인 발현 양상 분석
- [0104] 마우스의 비강으로 인산화 완충 수용액(PBS)을 투여한 정상 대조군과, 상기 실시예 1 및 2에서 수지상 세포를 마우스의 정맥 내로 투여하여 유도한 천식 마우스 모델과, 상기 비교예 1에서 기존 방법을 이용하여 유도한 천식 마우스 모델의 네 그룹에서 종격동 림프절 조직을 채취하여 난알부민(OVA) 항원으로 재자극을 주었을 때 IL-5 및 IL-13의 발현을 조사하여 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[0105] 도 13에서 보는 바와 같이, 정상 대조군이나 기존 방법을 이용하여 유도된 비교예 1의 마우스 모델에 비하여 수지상 세포를 정맥 내로 투여하여 유도된 실시예 1 및 2의 마우스 모델의 종격동 림프절에서 IL-5 및 IL-13의 발현 수준이 현저하게 증가한 것을 확인할 수 있었다.

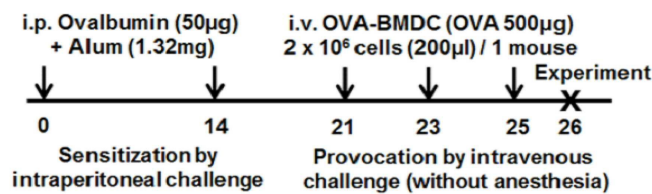
[0106] 이를 통하여 종격동 림프절은 수지상 세포가 이동하여 T 세포를 활성화시켜서 면역 반응을 개시하는 곳으로, 수지상 세포를 이용한 천식 마우스에서 천식이 잘 유도되었음을 시사한다.

[0108] [실험예 9] 알러지성 비염 마우스 모델의 제작

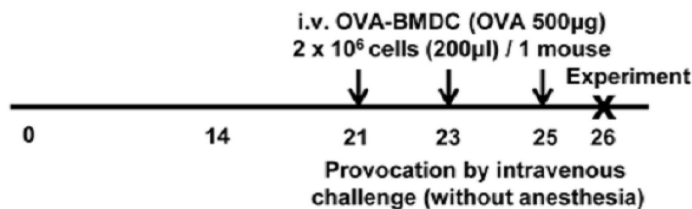
[0109] 상기 실시예 1 및 2에서 제작한 마우스 모델을 케이지에 가둔 후 3일간 행태를 관찰한 결과, 실시예 1 및 2의 마우스 모델에 있어서 10분간 코를 대략 50회 이상 반복적으로 긁는 행태를 보였고, 재채기 횟수는 대략 30회 이상인 것으로 볼 때 알러지성 비염 또한 유도되었음을 알 수 있었다(단, 도면으로 그 결과를 도시하지는 않았다).

도면

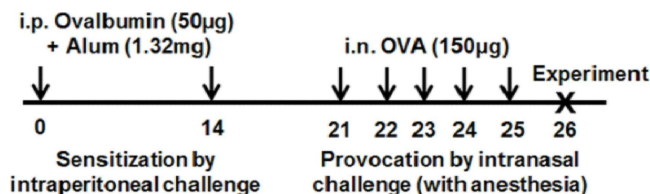
도면1



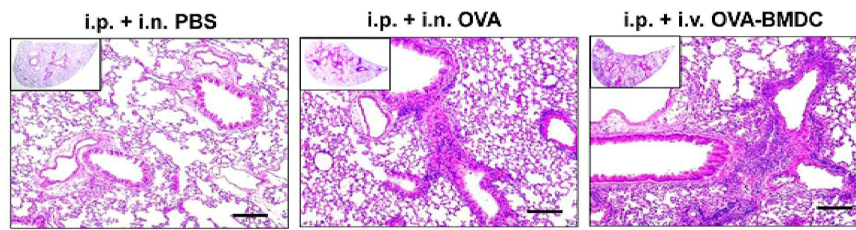
도면2



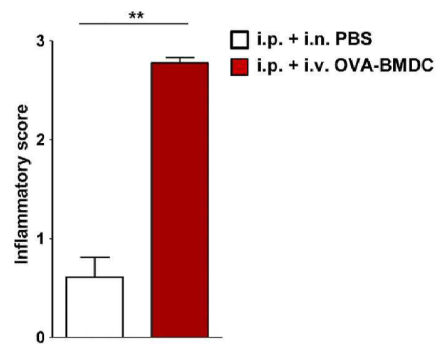
도면3



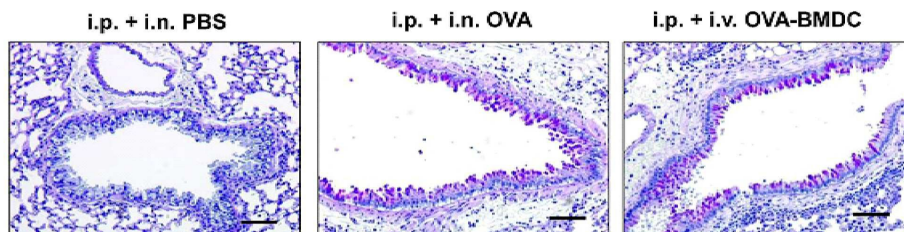
도면4



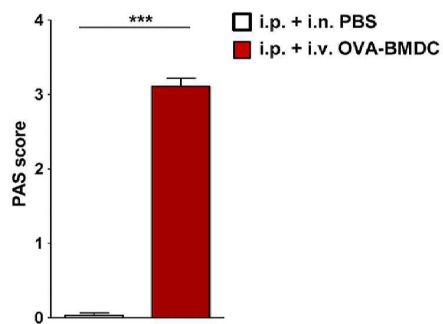
도면5



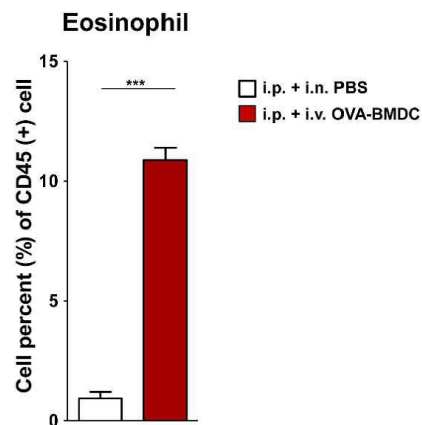
도면6



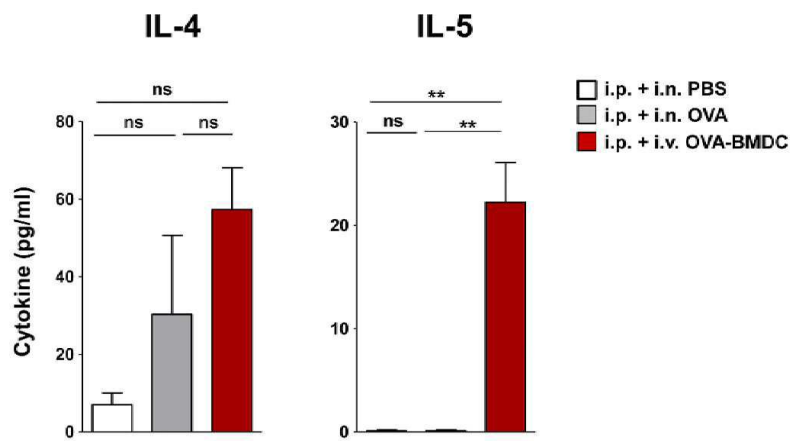
도면7



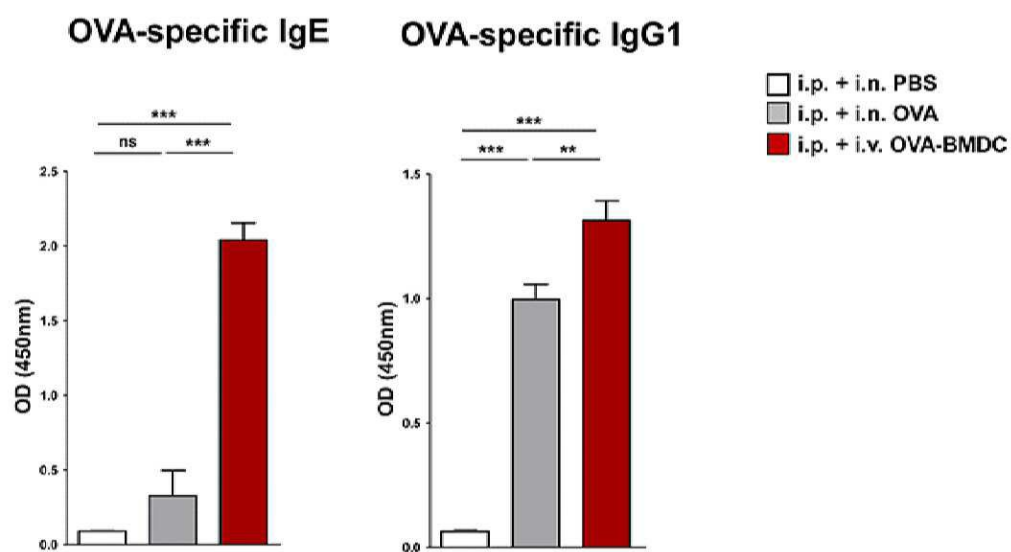
도면8



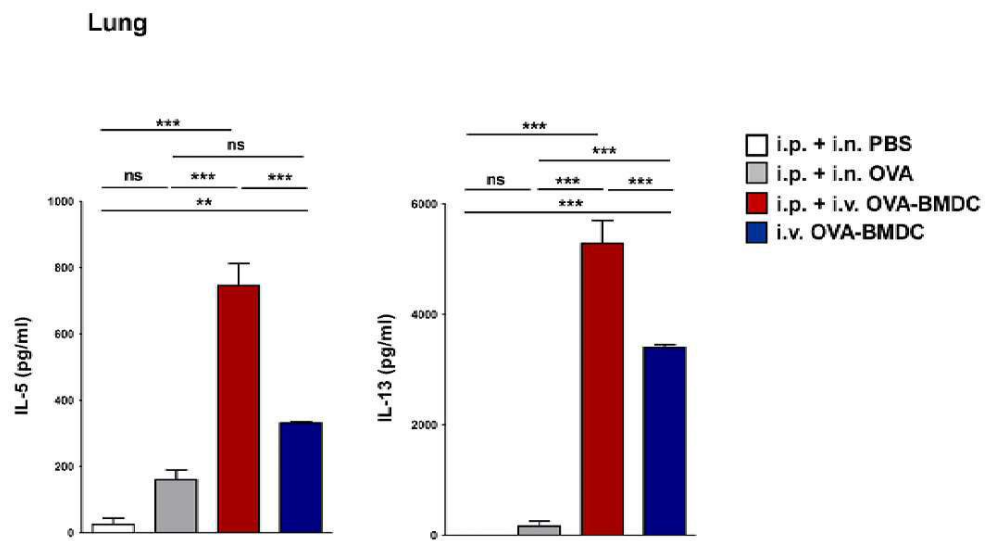
도면9



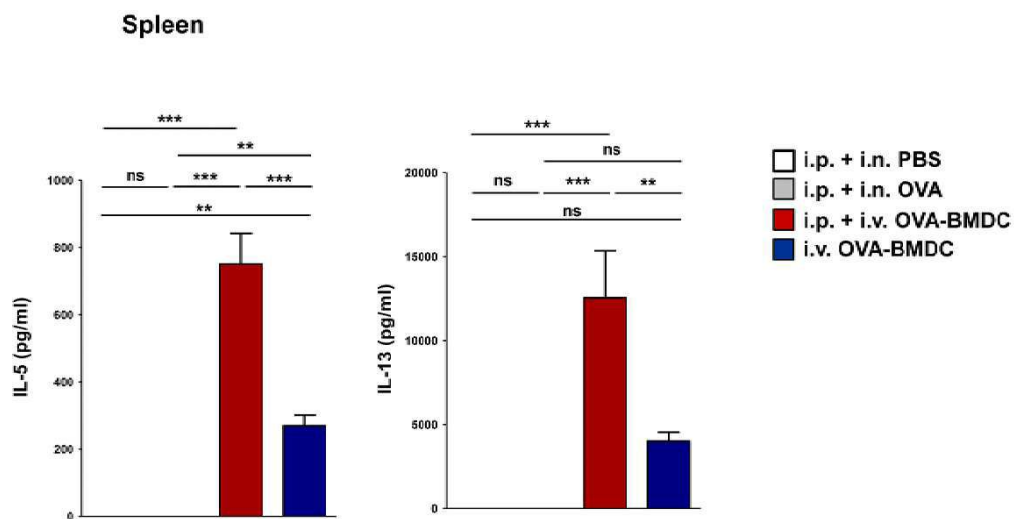
도면10



도면11



도면12



도면13

