



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2019년01월11일  
 (11) 등록번호 10-1936481  
 (24) 등록일자 2019년01월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**A01K 67/027** (2006.01) **C12N 5/0783** (2010.01)  
 (52) CPC특허분류  
**A01K 67/0275** (2013.01)  
**C12N 5/0636** (2013.01)  
 (21) 출원번호 10-2016-0175708  
 (22) 출원일자 2016년12월21일  
 심사청구일자 2016년12월21일  
 (65) 공개번호 10-2017-0077804  
 (43) 공개일자 2017년07월06일  
 (30) 우선권주장  
 1020150187227 2015년12월28일 대한민국(KR)  
 (56) 선행기술조사문헌  
 Innate Immun. 2012 Feb;18(1):35-43(Epub 2010  
 Nov 26.)  
 (뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
**세종대학교산학협력단**  
 서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)  
 (72) 발명자  
**홍석만**  
 경기도 성남시 분당구 판교원로 237, 703동 504호  
 (판교동, 모아미래도아파트7단지아파트)  
**이성원**  
 충청남도 천안시 서북구 성정8길 14, 206호 (성정동, 활림2차목련아파트)  
**박현정**  
 경기도 안산시 단원구 와동공원로8길 54 (와동)  
 (74) 대리인  
**특허법인태백**

전체 청구항 수 : 총 11 항

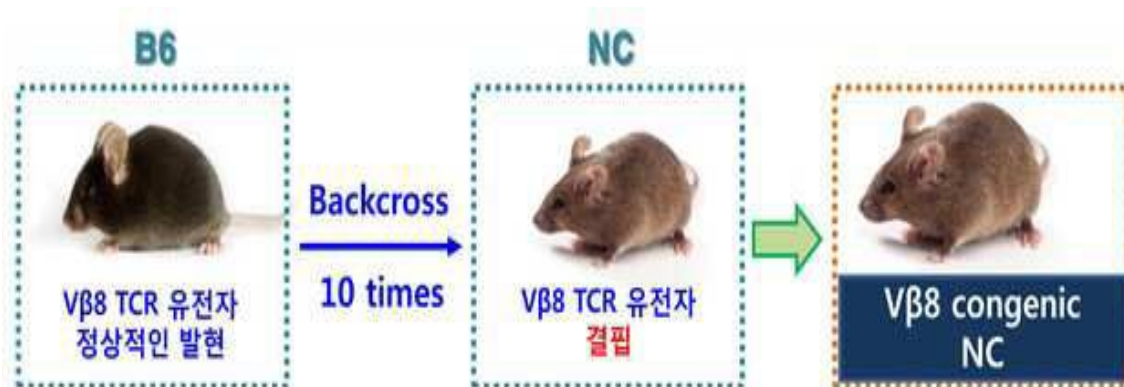
심사관 : 박영관

(54) 발명의 명칭 **Vβ8 유전자를 포함하는 아토피 피부염 동물모델 및 이를 이용한 약제 스크리닝 방법**

**(57) 요약**

본 발명은 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 포함하는 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 교배하여 얻어진 이형접합 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 역 교배하여 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포를 갖는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 동물모델에 관한 것으로, NC/Nga 생쥐를 활용한 아토피 질환 연구에 있어서, TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현시키는 인간 아토피 피부염과 가장 유사한 동물모델을 제공할 수 있다.

**대표도 - 도1**



(52) CPC특허분류

**C12N 5/0646** (2013.01)  
A01K 2227/105 (2013.01)  
A01K 2267/0393 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR101294540 B1  
International Immunology, vol.21(8),  
pp.977-90.  
J Med Invest. 2006 Feb;53(1-2):29-33.  
KR1020120080407 A  
Journal of Investigative Dermatology, 126,  
2664-2672(published online 20 July 2006)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A2010772  
부처명 교육과학기술부  
연구관리전문기관 한국연구재단  
연구사업명 일반연구자지원사업  
연구과제명 아토피 피부염에서 SRG3의 면역조절 기능 연구  
기 여 율 1/1  
주관기관 세종대학교 산학협력단  
연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31  
공지예외적용 : 있음

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 포함하는 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 교배하는 단계; 및 상기 교배를 통하여 얻어진 이형접합 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 역 교배하는 단계를 포함하여 이루어지며, TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포를 갖는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 동물모델.

**청구항 2**

청구항 1에 있어서, 상기 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 포함하는 동물은 B6 생쥐인 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 동물모델.

**청구항 3**

청구항 1에 있어서, 상기 아토피 피부염 유발 동물은 NC/Nga 생쥐인 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 동물모델.

**청구항 4**

청구항 1에 있어서, 상기 이형접합 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 역 교배하는 단계는 10세대 이상 진행하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 동물모델.

**청구항 5**

청구항 1에 있어서, 상기 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포는 아토피 피부염을 유발하는 포도상구균 또는 상기 포도상구균에서 분비되는 장내독소 B(Staphylococcal enterotoxin B; SEB)에 의해 활성화되는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 동물모델.

**청구항 6**

청구항 1에 있어서, 상기 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포는 CD4 T 세포, CD8 T 세포 및 자연살해 T (NKT)세포로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 동물모델.

**청구항 7**

청구항 1에서 제조된 아토피 피부염 동물모델에 아토피 피부염 치료 후보 물질을 투여하는 단계; 및 상기 아토피 피부염 치료 후보 물질의 아토피 치료 효과를 측정하는 단계를 포함하는 아토피 피부염 치료제 스크리닝 방법.

**청구항 8**

청구항 7에 있어서, 상기 아토피 피부염 치료 후보 물질의 효과를 측정하는 단계는 출혈, 홍반, 흉터, 건조, 벗겨짐, 진무름, 부종 및 태선화로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상을 측정하여 아토피 피부염 치료 효과를 확인하는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 치료제 스크리닝 방법.

**청구항 9**

청구항 1에서 제조된 아토피 피부염 동물모델에 아토피 피부염 치료 후보 물질을 투여하는 단계; 및 상기 아토피 피부염 치료 후보 물질에 의한 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포의 활성 감소를 확인하는 단계를 포함하는 아토피 피부염 치료제 스크리닝 방법.

**청구항 10**

청구항 9에 있어서, 상기 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포는 CD4 T 세포, CD8 T 세포 및 자연살해 T (NKT)세포로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 치료제 스크리닝 방법.

**청구항 11**

청구항 9에 있어서, 상기 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포는 아토피 피부염을 유발하는 포도상구균 또는 상기 포도상구균에서 분비되는 장내독소 B(Staphylococcal enterotoxin B; SEB)에 의해 활성화되는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 치료제 스크리닝 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 Vβ8(TCR variable beta 8 chain) 유전자를 갖는 아토피 피부염 동물 모델 및 이를 이용한 약제 스크리닝 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 아토피성 피부염(Atopic dermatitis)은 주로 유아기 혹은 소아기에 시작되는 만성적이고 재발성의 염증성 피부 질환으로 소양증과 피부 건조증, 특징적인 습진을 동반하며, 일부 환자에게는 천식, 고초열, 알러지성 비염 등의 다양한 알러지 질환이 유발되기도 한다.

[0003] 현재까지도 아토피성 피부염의 발생 기전에 대해서는 명확히 규명되지 않고 있으나, 대부분의 환자에서 체내의 체액성 면역반응을 강화하는 제2형 T세포(Th2)에 의하여 분비되는 면역글로블린E(IgE)의 혈중수준이 증가할 뿐 아니라, Th2에 의해 분비되는 인터루킨-4(IL-4), 인터루킨-5(IL-5)의 혈중수준이 증가하는 것으로 보고되어 있어, 아토피성 피부염의 발명에 체액성 면역반응이 전반적으로 관여될 가능성이 높은 것으로 보고되고 있다. 이에 따라 체액성 면역반응을 조절하여 아토피 피부염을 치료하는 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0004] 포도상구균은 그람 양성균으로서 30종류 이상의 세포외 단백질을 생산한다. 이들 대부분이 포도상구균의 병원성에 기여하거나 독성력을 증가시키는 것으로 알려져있다. 이들 물질에는 여러 종류의 외독소가 포함되어 있는데, 이들 외독소는 모두 초항원으로 작용할 수 있다. 초항원이란 T 세포를 활성화시키는 세균성 및 바이러스성 단백질로, T 세포를 활성화시키는데 있어 고유한 특성을 가지고 있다.

[0005] 보통의 항원은 항원제시세포를 통해 주조직적합복합체(MHC) Class II 항원으로 제시되어 T 세포 수용체의 MHC Class II 분자/펩타이드와의 결합부위에 결합하는 반면, 초항원은 항원제시세포의 MHC Class II 항원과 T 세포 수용체(TCR) β 사슬의 variable chain에 직접 결합이 가능하다.

[0006] 포도상구균 장내독소 B(Staphylococcal enterotoxin B; SEB)역시 초항원으로 T 세포 수용체(TCR)의 variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 활성화시켜 아토피 를 유도하는 것으로 확인되었다.

[0007] 그러나 인간 아토피 피부염과 유사한 임상적, 병리적, 조직학적 특징을 나타내는 것으로 확인되어 현재까지 아토피 피부염의 동물 모델로 사용된 NC/Nga 생쥐는 T 세포 수용체(T Cell Receptor, TCR) 유전자 중 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자가 자연적으로 제거되어 있으며, Vβ8 유전자의 결핍으로 인하여 NC/Nga 생쥐는 Vβ8 chain을 발현하는 CD4 T 세포, CD8 T세포 및 자연살해 T 세포가 제거되어 있는 것이 확인되었다.

[0008] 따라서, 기존의 NC/Nga 생쥐는 Vβ8<sup>+</sup> T 세포군의 결핍으로 인하여 정상적인 T 세포군을 가지고 있지 않아 포도상구균 장내독소 B에 의해 발병되는 아토피를 치료하거나 예방할 수 있는 신물질의 탐색 및 효능 평가에서 있어, in vivo 모델에서 아토피 피부염에 대한 Vβ8<sup>+</sup> T 세포의 면역학적 영향을 조사하는 데에 한계가 있었다. 그러나 현재까지 Vβ8 유전자를 발현하는 NC/Nga 생쥐의 개발 또는 실험적 보고가 전무한 상황이다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0009] (특허문헌 0001) 일본공개특허 제2005-304365호

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0010] 본 발명은 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 포함하는 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 교배하여 얻어진 이형접합 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 역 교배하여 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포를 갖는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 동물모델을 제공하여, NC/Nga 생쥐를 활용한 아토피 질환 연구에 있어서, 가장 인간 아토피 피부염과 유사한 동물모델을 제공하고자 한다.

**과제의 해결 수단**

[0011] 본 발명은 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 포함하는 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 교배하는 단계; 및 상기 교배를 통하여 얻어진 이형접합 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 역 교배하는 단계를 포함하여 이루어지며, TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포를 갖는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 동물모델을 제공한다.

**발명의 효과**

[0012] 본 발명은 TCR variable beta 8 chain(Vβ8)가 발현되는 T 세포가 자연적으로 제거된 NC/Nga 생쥐에 Vβ8 유전자를 발현시키면서 아토피 피부염을 나타낼 수 있는 동물모델을 제공함으로써, TCR variable beta 8 chain(Vβ8)이 발현되는 T 세포를 가진 인간 아토피 피부염에 대한 질병 연구 및 치료제 개발에 효과적으로 사용될 수 있으며, Vβ8 유전자와 아토피 피부염 질환과의 상관관계를 연구하는데 매우 유용하게 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0013] 도 1은 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐 제작과정에 대한 모식도이다.

도 2는 NC/Nga 생쥐에서 TCR Vβ8 chain 유전자를 가진 NC/Nga 생쥐를 선별하기 위한 PCR 결과로, 겔(Gel) 사진의 첫 번째 줄은 DNA 사이즈를 측정하는 DNA ladder를 보여주며 두 번째 칸은 양성대조군인 B6 생쥐의 genomic DNA에서 150 base pair 사이즈의 Vβ8 유전자가 증폭된 것이 확인되었으며, 세 번째 칸에서는 음성대조군인 NC/Nga 생쥐에서 뽑은 genomic DNA는 Vβ8 유전자가 증폭되지 않은 것을 확인하였으며, 네 번째 칸부터 여덟 번째 칸은 Vβ8 congenic NC/Nga를 선별할 생쥐의 PCR 결과로, 이 중 네 번째와 여섯 번째 칸은 Vβ8 유전자를 발현하는 Vβ8 congenic NC/Nga로 확인되었으며 (①, ③), 나머지는 Vβ8 유전자를 발현하지 않는 littermate NC/Nga 생쥐(②, ④, ⑤)를 확인한 결과이다.

도 3은 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐의 T 세포에서 Vβ8 chain 발현 확인한 결과로, 도 3A는 littermate NC/Nga와 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐에서 CD4 T 세포와 CD8 T 세포의 발현 여부를 확인한 결과이며, 도 3B는 littermate NC/Nga와 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐에서 Vβ8 TCR을 발현하는 면역세포의 존재 여부를 확인한 결과이다.

도 4는 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐에서 Vβ8 chain을 발현하는 NKT 세포를 확인한 결과이다.

도 5는 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐에서 아토피 피부염 유도를 확인한 결과로, 도 5A는 Vβ8 congenic NC/Nga (N10) 생쥐의 아토피 피부염 증상인 출혈, 홍반, 흉터, 건조, 벗겨짐, 진무름, 부종 및 태선화를 확인한 사진이며, 도 5B는 12주 동안 2주 간격으로 아토피 피부염 clinical score를 측정한 결과이다.

도 6은 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐에 포도상구균 장내독소 B(SEB) 주입 후 Vβ8 TCR을 발현하는 CD4 T 세포와 CD8 T 세포의 비장 내 분포를 확인한 결과이다.

도 7은 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐에 포도상구균 장내독소 B(SEB) 주입 후 Vβ8 TCR을 발현하는 CD4 T 세포와 CD8 T 세포에서 Nur77 활성화 분자의 발현을 확인한 결과이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0014] 본 발명은 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 포함하는 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 교배하는 단

계; 및 상기 교배를 통하여 얻어진 이형접합 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 역 교배하는 단계를 포함하여 이루어지며, TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포를 갖는 것을 특징으로 하는 아토피 피부염 동물모델을 제공한다.

- [0015] 상기 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 포함하는 동물은 B6 생쥐일 수 있다.
- [0016] 또한, 본 발명에서 상기 아토피 피부염 유발 동물모델은 인간 아토피 피부염과 유사한 임상적, 병리적, 조직학적 특징을 나타내는 어떠한 동물모델이라도 무방하나, 보다 바람직하게는 NC/Nga 생쥐이다.
- [0017] 상기 이형접합 동물에 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자가 포함되어 있는지 여부는 Vβ8 유전자를 검출할 수 있는 중합효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction; PCR)을 통하여 확인이 가능하다.
- [0018] 상기 이형접합 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 역 교배하는 단계는 10세대 이상 진행할 수 있다. 이는 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 포함하는 동물과 아토피 피부염 유발 동물을 교배하여 얻어진 이형접합 동물모델이 완전한(99% 이상) 아토피 피부염 형질로 전환하도록 하기 위함이다.
- [0019] 상기 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포는 아토피 피부염을 유발하는 포도상구균 또는 상기 포도상구균에서 분비되는 장내독소 B(Staphylococcal enterotoxin B; SEB)에 의해 활성화될 수 있으며, 상기 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포는 CD4 T 세포, CD8 T 세포 및 자연살해 T(NKT)세포로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 아토피 피부염 동물모델에 아토피 피부염 치료 후보 물질을 투여하는 단계; 및 상기 아토피 피부염 치료 후보 물질의 아토피 치료 효과를 측정하는 단계를 포함하는 아토피 피부염 치료제 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.
- [0021] 보다 상세하게는 상기 아토피 피부염 치료 후보 물질의 효과를 측정하는 단계는 출혈, 흥반, 흉터, 건조, 벗겨짐, 진무름, 부종 및 태선화로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상을 측정하여 아토피 피부염 치료 효과를 확인할 수 있다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 아토피 피부염 동물모델에 아토피 피부염 치료 후보 물질을 투여하는 단계; 및 상기 아토피 피부염 치료 후보 물질에 의한 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포의 활성 감소를 확인하는 단계를 포함하는 아토피 피부염 치료제 스크리닝 방법을 제공할 수 있다.
- [0023] 상기 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포는 CD4 T 세포, CD8 T 세포 및 자연살해 T(NKT)세포로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0024] 상기 TCR variable beta 8 chain(Vβ8) 유전자를 발현하는 T 세포는 아토피 피부염을 유발하는 포도상구균 또는 상기 포도상구균에서 분비되는 장내독소 B(Staphylococcal enterotoxin B; SEB)에 의해 활성화될 수 있다.
- [0026] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0028] **<실시예 1> Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐 모델 제작**
- [0029] 도 1과 같은 과정으로 Vβ8 TCR 유전자를 발현하는 NC/Nga 생쥐 모델을 제작하였다.
- [0030] 먼저, Vβ8 TCR 유전자와 아토피 피부염 유발 형질을 함께 갖는 이형접합 동물을 얻기 위해, B6 와 NC/Nga (NC) 야생형(WT) 생쥐를 중앙실험동물 회사(Seoul, Korea)로부터 구입한 후 교배시켰다.
- [0031] 교배 후 TCR Vβ8 chain (TCRBV8) 유전자가 결실되어 있는 NC/Nga 생쥐와 TCRBV8 유전자가 정상적으로 발현하는 B6 생쥐를 교배하여 태어난 자손 생쥐의 꼬리 일부를 잘라내었다.
- [0032] 세포 용해 버퍼((0.5M EDTA+1M Tris-HCl+1M NaCl+10% SDS) 500 μl와 프로테아제 K 5 μl를 이용하여 잘라낸 꼬리를 용해시킨 후, 2-아이소프로판올을 이용하여 DNA를 응집시키고, 응집된 DNA를 Tris-Cl 버퍼에 용해시켜 genomic DNA를 추출하였다.
- [0033] 추출된 genomic DNA와 TCR Vβ8 chain 유전자인 TCRBV8에 특이적으로 결합하는 프라이머(Forward=TCA AGT GAG TGC TGG TCA GG, Reverse=ACT GCC ACC TTG TTT CTT GG)를 이용하여 표 1과 같은 PCR 조성물을 이용하여 PCR 방법으로 유전자를 증폭시키고, 증폭된 유전자를 아가로스 겔에서 전기영동하여 이동시켰다.



[0034] 이동된 DNA를 에티뮴 브로마이드로 형광 염색한 후 UV 조사장치를 통하여 PCR 밴드 크기를 측정하여 유전자 증폭 여부를 확인하였다.

표 1

성분	용량
3DW	25 $\mu$ l
10 $\times$ buffer	3 $\mu$ l
10mM dNTP	0.6 $\mu$ l
Forward primer(100 pmole/ $\mu$ l)	0.1 $\mu$ l
Reverse primer(100 pmole/ $\mu$ l)	0.1 $\mu$ l
Tag polymerase(5 Unit/ $\mu$ l)	0.2 $\mu$ l
Total	30 $\mu$ l

[0036] 그 결과, 도 2와 같이 세 번째 칸에서는 음성대조군인 NC/Nga 생쥐에서 뽑은 genomic DNA는 V $\beta$ 8 유전자가 증폭되지 않은 것이 확인된 반면, 네 번째 칸부터 여덟 번째 칸은 V $\beta$ 8 congenic NC/Nga를 선별할 생쥐의 PCR 결과로, 이 중 네 번째와 여섯 번째 칸은 V $\beta$ 8 유전자를 발현하는 V $\beta$ 8 congenic NC/Nga로 확인되었으며 (①, ③), 나머지는 V $\beta$ 8 유전자를 발현하지 않는 littermate NC/Nga 생쥐에 해당된다(②, ④, ⑤).

[0037] 상기와 같은 방법으로 V $\beta$ 8 congenic NC/Nga 생쥐를 선별하여 10 세대 이상 역 교배 선별과정을 수행하여 V $\beta$ 8 유전자를 제외한 나머지 유전자를 NC/Nga 유전자로 전환된 NC/Nga 생쥐를 제작하였다.

[0039] <실시예 2> V $\beta$ 8 congenic NC/Nga 생쥐에서 T세포의 V $\beta$ 8 chain 발현 확인

[0040] B6 생쥐, V $\beta$ 8 congenic NC/Nga 생쥐 및 한배 새끼(littermate) NC/Nga 생쥐의 비장 내 면역세포를 각각 추출 후 ACK 용해 버퍼(red cell lysis buffer)를 이용하여 적혈구를 제거하였다.

[0041] CD4 T 세포와 CD8 T 세포에서 V $\beta$ 8 chain의 발현을 확인하기 위해서 CD3, CD4, CD8 및 V $\beta$ 8에 특이적인 항체(BD Bioscience사)를 이용하여, 표면염색(surface staining) 방법으로 염색하고 FACS-Calibur 유세포 분석기(flow cytometer)를 이용하여 정량하였다.

[0042] 그 결과, 도 3A와 같이 littermate NC/Nga와 V $\beta$ 8 congenic NC/Nga 생쥐 모두에서 CD4 T 세포와 CD8 T 세포가 정상적으로 발현되는 것이 확인되었으나, 도 3B를 참고하면 littermate NC/Nga 생쥐에서는 알려진대로 V $\beta$ 8 TCR가 발현되지 못한 반면, 실시예 1에서 제작된 V $\beta$ 8 congenic NC/Nga 생쥐에서는 B6 생쥐와 같이 정상적으로 V $\beta$ 8 TCR을 발현하는 면역세포가 확인되었다.

[0043] 또한, littermate NC/Nga와 V $\beta$ 8 congenic NC/Nga 생쥐의 비장에서 V $\beta$ 8 TCR를 주로 발현하는 것으로 알려진 NKT 세포의 유무를 확인하기 위해, 혈구를 제거한 비장 내 면역세포를 CD3 특이적인 항체와 alpha-galactosylceramide( $\alpha$ -GalCer, Enzo life sciences사)와 CD1d-dimer (BD Bioscience사)를 결합시킨 후 PE 형광이 결합된 IgG에 특이적 항체를 추가로 결합한  $\alpha$ -GalCer/CD1d-dimer PE로 표면 염색방법으로 염색하고 FACS-Calibur 유세포 분석기로 정량하였다.

[0044] 그 결과, 도 4와 같이 littermate NC/Nga 생쥐는 V $\beta$ 8 유전자의 결핍에 의해서 NKT 세포가 거의 존재하지 않는 반면, V $\beta$ 8 congenic NC/Nga 생쥐는 V $\beta$ 8 유전자를 발현함에 따라 NKT 세포가 발달하여 빈도가 크게 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0046] <실시예 3> V $\beta$ 8 congenic NC/Nga 생쥐의 아토피 피부염 유도 및 확인

[0047] 실시예 1의 방법으로 역교배된 V $\beta$ 8 congenic NC/Nga (N10) 생쥐의 아토피 피부염 동물 모델 적합성을 확인하기 위해, 무균(SPF)상태에서 자란 6주령의 역교배된 V $\beta$ 8 congenic NC/Nga (N10) 생쥐와 littermate 대조군 NC/Nga 생쥐를 일반 사육 조건으로 옮기고 12주간 멸균( $\gamma$ 선 조사)한 사료와 가압 멸균한 물을 섭취시키면서 유지시키고, 일반 사육 조건에서 아토피 피부염 유도 후 0주부터 12주까지 clinical score를 관찰 및 측정하였는데, 임상적 병징은 표 2와 같은 스코어링 시스템을 따라 기록하였다.

표 2

	항목별 점수			
	없음	약함	중증도	심함

출혈, 홍반	0	1	2	3
흉터, 건조	0	1	2	3
벗겨짐, 진무름	0	1	2	3
부종	0	1	2	3
태선화	0	1	2	3
총점=15점				

[0050] 그 결과, 도 5A와 같이 음성대조군인 무균(SPF)상태 NC/Nga 생쥐의 경우 아토피 피부염 증세가 관찰되지 않았으나, Vβ8 congenic NC/Nga (N10) 생쥐는 양성대조군인 littermate NC/Nga 생쥐와 유사하게 아토피 피부염의 증상인 출혈, 홍반, 흉터, 건조, 벗겨짐, 진무름, 부종 및 태선화가 나타났으며, 도 5B와 같이 아토피 피부염 clinical score는 12주 동안 2주 간격으로 측정된 결과, 양성대조군과 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐 모두에서 8주~12주 사이에 급격하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0052] <실시예 4> Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐에서 T 세포의 Vβ8 chain 발현 확인

[0053] 아토피 피부염을 유발하는 포도상구균의 장내독소 B(Staphylococcal enterotoxin B; SEB)의 MHC II 분자는 T 세포 수용체(TCR) β 사슬의 Vβ8과 직접 결합하여 Vβ8 발현 T 세포를 활성화시키는 것으로 알려져 있다.

[0054] SEB 주입 후 TCR 자극을 통하여 활성화된 Vβ8 TCR 발현 T 세포는 빠른 시간 안에 세포분열과 함께 다량의 염증성 사이토카인을 분비한다. SEB와 같은 초항원에 의해 증폭된 T 세포는 이후 activation-induced cell death을 거쳐 대부분 제거되고 일부 세포만이 anergy 상태로 전환되는 것으로 알려져 있다. 따라서 Vβ8 TCR 발현 T 세포는 SEB에 의해 활성화되면 약 6시간 안으로 빠르게 사이토카인을 다량 분비한 후 apoptosis와 anergy 반응으로 세포수 및 활성이 크게 감소하게 된다.

[0055] Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐에서 존재하는 Vβ8 발현 세포의 SEB 반응 여부를 확인하기 위해, 실시예 1의 Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐의 복강 내로 SEB 25 μg을 주입하고 16시간 후 생쥐의 비장에서 CD4 T 세포와 CD8 T 세포의 Vβ8 TCR 발현 비율을 FACS-Calibur 유세포 분석기(flow cytometer)를 이용하여 확인하였다.

[0056] 그 결과, 도 6과 같이 Vβ8 TCR이 발현된 CD4 T 세포 및 CD8 T 세포 모두 SEB에 의해 유도되는 apoptosis와 anergy 반응에 의해 SEB가 처리되지 않은 대조군보다 약 1/3으로 감소하였다.

[0057] 또한, TCR을 통한 신호전달이 고아 핵 수용체(orphan nuclear receptor) 중의 하나인 Nur77의 발현 여부를 통해 알 수 있다는 것이 보고됨에 따라, Vβ8 congenic NC/Nga 생쥐에 주입된 SEB에 의해서 Vβ8 TCR 발현 T 세포가 TCR을 통해 활성화되는지 여부를 확인하기 위해 CD4 T 세포와 CD8 T 세포에서 Nur77 발현을 세포내 염색 (intracellular staining)하여 FACS-Calibur 유세포 분석기(flow cytometer)를 이용하여 확인하였다.

[0058] 그 결과, 도 7과 같이 CD4 T 세포와 CD8 T 세포 모두 Nur77의 세포 내 발현이 SEB가 처리되지 않은 대조군보다 높게 증가한 것이 확인되었다.

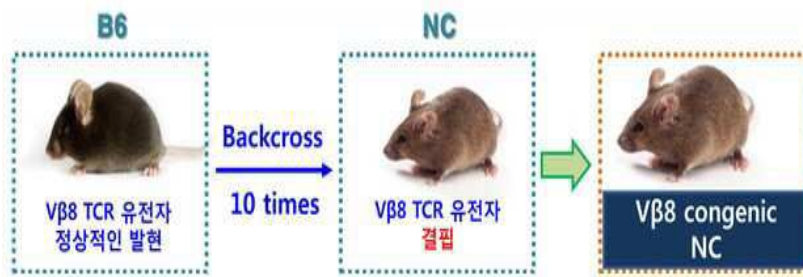
[0060] 상기 결과들로부터 실시예 1에서 제작된 Vβ8 congenic NC/Nga (N10) 생쥐는 정상적인 T 세포군을 재확립한 이후에도 기존의 NC/Nga 생쥐와 마찬가지로 아토피 피부염이 유도되는 것으로 확인되었으며, Vβ8을 발현하는 T 세포는 SEB와 같은 세균의 독소에 의해 활성화되는 것이 확인됨에 따라, 정상적인 T 세포군을 가진 사람의 아토피 피부염 모델로서 매우 적합한 새로운 아토피 피부염 동물모델로 사용될 수 있다.

[0062] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

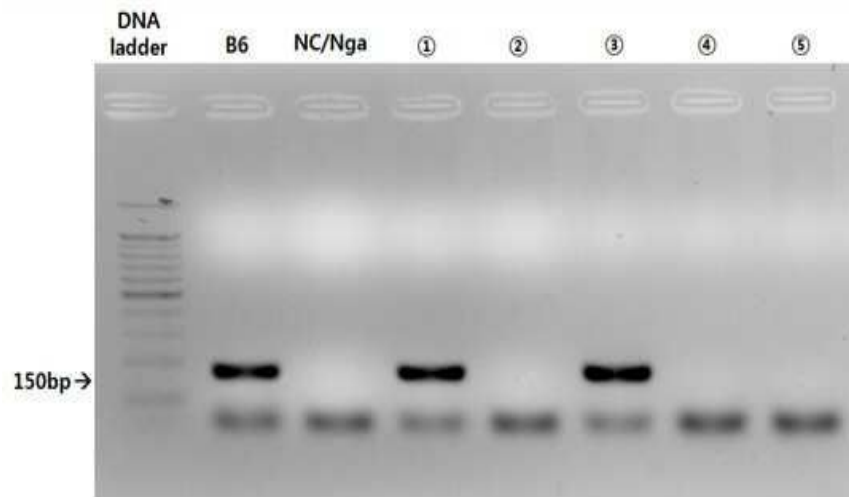


도면

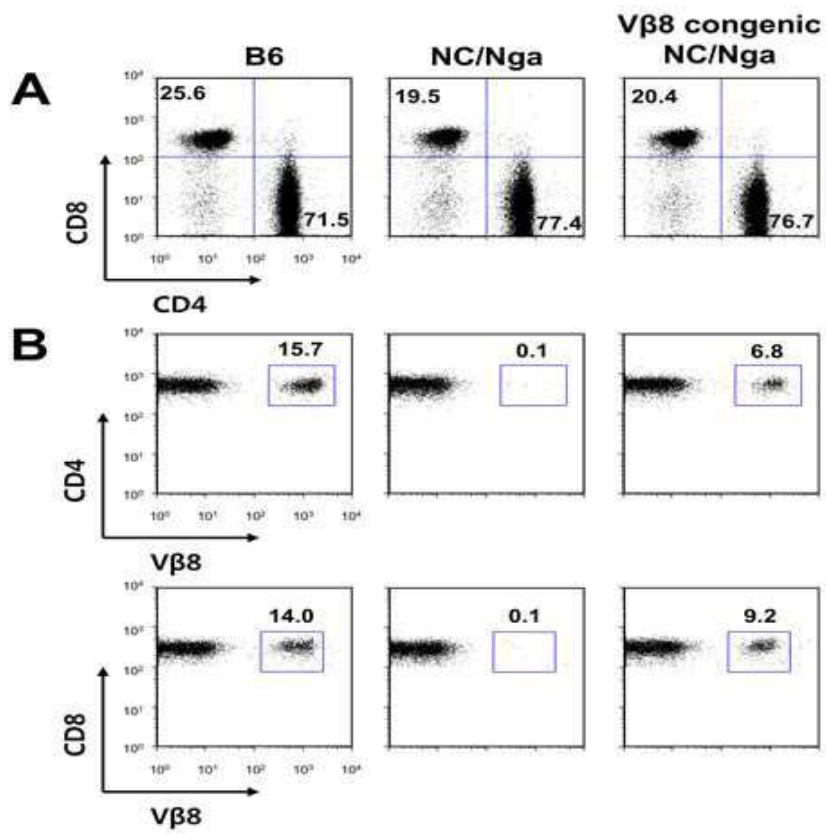
도면1



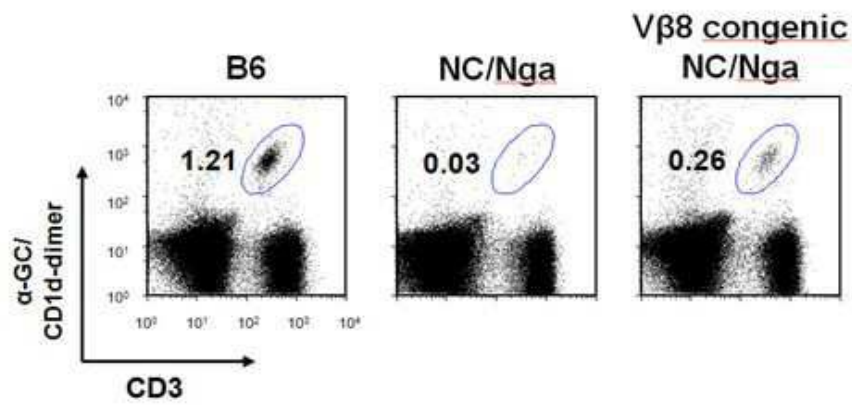
도면2



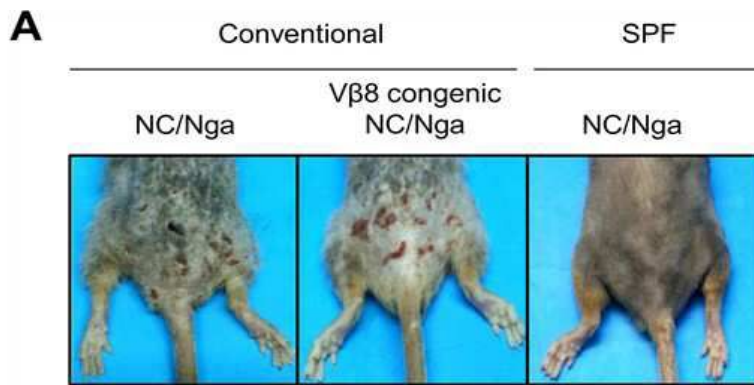
도면3



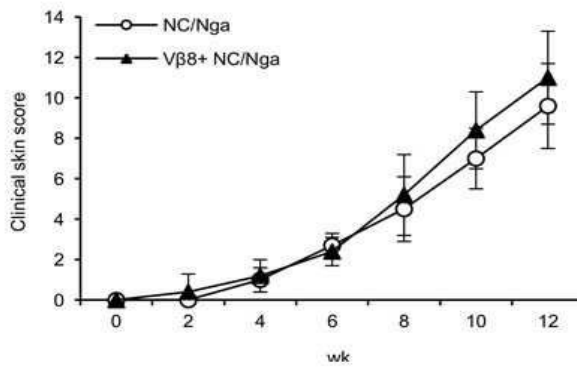
도면4



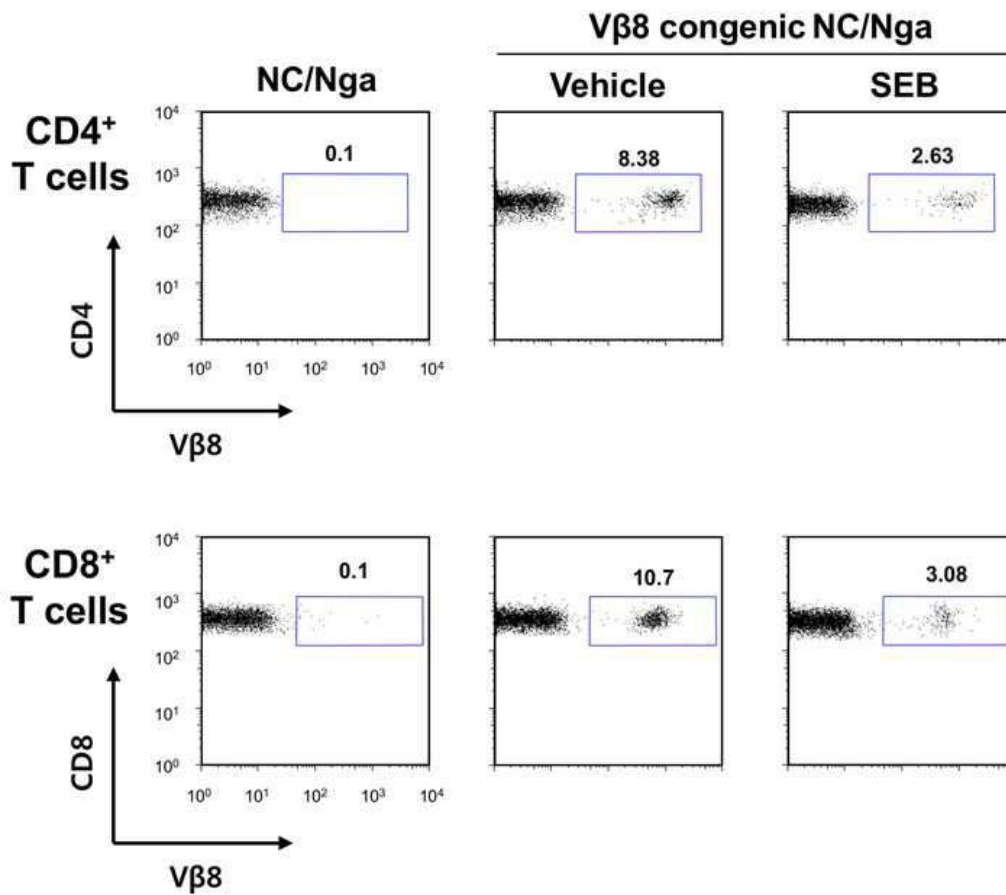
도면5



**B**



도면6



도면7

