



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

(45) 공고일자 2016년07월28일  
 (11) 등록번호 10-1643716  
 (24) 등록일자 2016년07월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 C12N 5/0784 (2010.01) C12Q 1/68 (2006.01)  
 G01N 33/68 (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2014-0052952  
 (22) 출원일자 2014년04월30일  
 심사청구일자 2014년04월30일  
 (65) 공개번호 10-2015-0125483  
 (43) 공개일자 2015년11월09일  
 (56) 선행기술조사문헌  
 The Journal of Immunology, 2011, Vol.186, p.  
 3966-3976

(73) 특허권자  
 차의과학대학교 산학협력단  
 경기도 포천시 해룡로 120, 차의과학대학교내 (동교동)  
 (72) 발명자  
 임대석  
 경기도 성남시 분당구 판교로 430, 309동 1605호 (이매동, 아름마을태영아파트)  
 이은계  
 경기도 성남시 분당구 벌말로50번길 14, 701동 404호 (야탑동, 매화마을화성빌리지)  
 (뒷면에 계속)  
 (74) 대리인  
 리엔목특허법인

전체 청구항 수 : 총 6 항

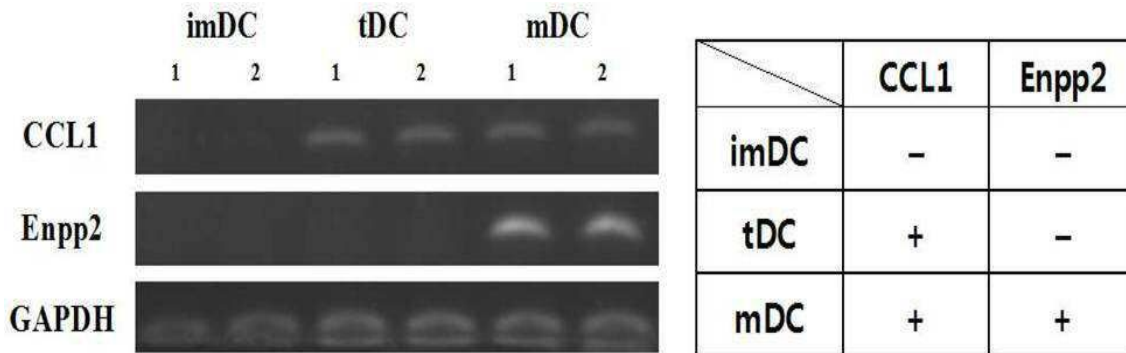
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **면역관용 수지상 세포 확인용 마커 및 이의 용도**

**(57) 요약**

본 발명은 CCL1+ 및 Enpp2-인 면역관용 수지상 세포 및 면역관용 수지상 세포에 특이적인 유전자 마커에 관한 것으로, 마우스 골수유래 세포로부터 미성숙, 준성숙, 성숙 수지상 세포를 제조하고, 마이크로어레이 및 실시간 PCR 분석을 통하여, 준성숙, 즉, 면역관용 수지상 세포 특이적인 유전자 마커의 발현을 확인하였다. 상기 유전자 마커를 이용할 경우 면역관용 수지상 세포를 용이하게 획득할 수 있어, 다양한 세포 치료용 조성물 등 산업적으로 활용가능성이 높다.

**대표도** - 도4



(72) 발명자

**황성욱**

경상남도 창원시 성산구 대정로 73, 111동 1403호  
(남양동, 성원1차아파트)

**정남철**

경기도 성남시 분당구 내정로119번길 9, 201호 (정  
자동)

**이준호**

경기도 성남시 중원구 도촌로7번길 27, 302호 (도  
촌동)

**변세희**

서울특별시 관악구 신림로15길 58, 102호 (신림동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013005054

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 자가면역질환 치료를 위한 면역관용 수지상세포 특이마커 발굴

기 여 율 1/1

주관기관 차의과학대학교 산학협력단

연구기간 2013.03.01 ~ 2016.05.31

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

삭제

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

CCL1의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제, 및 Enpp2의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 제제를 포함하는 면역관용 수치상 세포를 확인하기 위한 마커 검출용 조성물.

**청구항 6**

청구항 5의 조성물을 포함하는 면역관용 수치상 세포 여부를 확인하기 위한 마커 검출용 키트.

**청구항 7**

CCL1 및 Enpp2의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 면역관용 수치상 세포 확인 방법.

**청구항 8**

청구항 7에 있어서, 상기 방법은 CCL1 유전자 및 Enpp2의 유전자 mRNA 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 것인 방법.

**청구항 9**

청구항 7에 있어서, 상기 방법은 CCL1 유전자의 mRNA 또는 단백질의 양이 대조군인 미성숙 수치상 세포보다 많고, Enpp2 유전자의 mRNA 또는 단백질의 양이 대조군인 성숙 수치상 세포보다 적으면 면역관용 수치상 세포로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것인 면역관용 수치상 세포 확인 방법.

**청구항 10**

CCL1 유전자가 발현되고, Enpp2 유전자가 발현되지 않는 수치상 세포를 선별하는 단계를 포함하는 면역관용 수치상 세포를 선별하는 방법.

**청구항 11**

삭제

**발명의 설명**

**기술분야**

본 발명은 면역관용 수치상 세포에 특이적인 유전자 마커 및 이의 이용에 대한 것이다.

**배경기술**

[0001]

- [0002] 수지상 세포는 주로 T 세포에 항원제시 기능을 수행하는 전문적 항원 제시 세포의 일종으로서, 림프절, 비장, 흉선, 피부 밀 또는 여러 조직의 세포 간극에서 나뭇가지 모양으로 존재한다. 수지상 세포는 항원을 세포 내부로 흡수하여 MHC (major histocompatibility complex) 클래스 I 분자 또는 MHC 클래스 II 분자와 함께 다양한 항원 샘플을 T 세포에 제시함으로써, T 세포 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.
- [0003] 또한, 수지상 세포는 주위에 존재하는 환경적 신호와 종류에 따라 성숙도가 상이한 상태로 분화되며, 미성숙 (immature), 준성숙(semi-mature) 또는 성숙(mature) 수지상 세포로 존재한다. 미성숙 수지상 세포는 초기 성숙 단계에서 발견되는 것으로서 세포 간액으로부터 데브리스(debris)들을 수집하고 제거하는 1차적인 기능을 수행하나, 이 세포의 염증성 사이토카인의 발현 수준은 낮기 때문에 T 세포와 접촉하여도 T 세포를 활성화 시키지 못한다. 반면, 성숙 수지상 세포는 원시 T 세포 (naive T cell)를 활성화시켜 면역반응을 유도할 수 있는 능력을 가진다. 미성숙 수지상 세포가 성숙 수지상 세포로 분화되기 위해서는 다수의 특정 신호에 노출되어 TLR(toll-like receptor)이 활성화되어야 한다. TLR의 활성화에 의하여 다수의 공동 자극분자 (co-stimulatory molecule)들과 IL-12와 같은 친-염증성 사이토카인 (pro-inflammatory cytokine)이 상향 조절되고 조직으로부터 림프절로 이동하게 된다.
- [0004] 한편, 미성숙 수지상 세포가 다른 환경 조건에 놓일 경우 준성숙 수지상 세포로 분화할 수 있는데, 예를 들어, 세포사멸 (apoptosis) 과정 중 세포에서 방출되는 TNF- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ )가 준성숙 수지상 세포로의 분화에 기여하는 것으로 여겨지고 있다 (Manfred B. et al., Trends in Immunology, 23(9):991-1045, 2002).
- [0005] 한편 최근 수지상 세포를 이용한 암 또는 면역 관련 질환의 치료 요법에 대한 연구가 이루어지고 있다. 예를 들어, 국내공개특허 10-2010-0109099는 미성숙 수지상 세포를 암 특이 항원 단백질에 감작하여 성숙화시킨 암 치료용 성숙 수지상 세포를 제공하고 있으며, 국내등록특허 10-0542817은 미성숙 임파성 수지상 세포에 인터페론-감마를 처리하여 제조한 수지상 세포를 제1형 당뇨병 및 류마티스성 관절염 치료 용도로 제공하고 있다. 또한, 면역관용 수지상 세포(Tolerogenic DC, tDC)의 치료 효능에 대하여 많은 연구가 진행되고 있다.
- [0006] 그러나 현재까지 면역관용 수지상 세포를 규명할 수 있는 특성에 대하여 명확히 밝혀진 바가 없다. 이에, 본 발명자들은 면역치료를 효율적으로 활용할 수 있는 면역관용 수지상 세포의 특징을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

- [0007] (특허문헌 0001) 대한민국공개특허 10-2010-0109099  
(특허문헌 0002) 대한민국등록특허 10-0542817

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0008] 일 측면은 CCL1의 mRNA 또는 이의 단백질이 미성숙 수지상 세포에 비해 높은 수준으로 발현되고, Enpp2의 mRNA 또는 이의 단백질이 성숙 수지상 세포에 비해 낮은 수준으로 발현되는 면역관용 수지상 세포를 제공하는 것이다.
- [0009] 다른 측면은 CCL1 또는 Enpp2를 포함하는 면역관용 수지상 세포 확인용 마커 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 또 다른 측면은 CCL1 또는 Enpp2의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 면역관용 수지상 세포 확인 방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

- [0011] 일 측면은 CCL1의 mRNA 또는 이의 단백질이 미성숙 수지상 세포에 비해 높은 수준으로 발현되고, Enpp2의 mRNA 또는 이의 단백질이 성숙 수지상 세포에 비해 낮은 수준으로 발현되는 면역관용 수지상 세포를 제공한다.
- [0012] 본 명세서에서 사용된 용어 "수지상 세포 (dendritic cell, DC)"는 항원을 세포 내부로 흡수하여 MHC(major

histocompatibility complex) 클래스 I 복합체 또는 MHC 클래스 II 복합체와 함께 다양한 항원 샘플을 T 세포에 제시하는 전문적 항원 제시 세포(professional antigen presenting cell)를 의미한다. 또한 본 발명에서의 수지상 세포는 Steinman et al., Annual Rev. Immunol. 9:271-296, 1991 및 Banchereau and Steinman Nature 392:245-252, 1998.에 기재된 수지상 세포의 전형적인 표현형과 특성을 갖는 세포를 의미한다. 수지상 세포는 면역원성(immunogenic) 및 면역관용성(tolerogenic) 항원 제시 세포를 모두 포함하며, 성숙도에 따라 미성숙 수지상 세포(immature dendritic cells; "imDC"), 준성숙 수지상 세포(semimature dendritic cells; "smDC") 및 성숙 수지상 세포(mature dendritic cells; "mDC")로 분류할 수 있다.

- [0013] 용어, "성숙 수지상 세포"는 미성숙 수지상 세포가 성숙화되어 형성된 세포를 의미한다. 성숙 수지상 세포는 DC-LAMP 뿐만 아니라 MHC 클래스 II, CD40, CD54, CD80, CD86 및 CD274의 발현이 높으며, 프로염증성 사이토카인(proinflammatory cytokine)을 방출하며, 혼합림프구 반응(mixed lymphocyte reaction)에서 원시 동종이계 T 세포(allogeneic T cells) 및 동종동계 T 세포(syngeneic T cells)의 증식의 증가 및/또는 수지상 세포 싸이토카인의 증가된 생성을 발생시키는 능력을 갖는 것을 특징으로 한다. 성숙 수지상 세포는 전형적으로 CCR7 및 CXCR4를 높은 수준으로 발현한다.
- [0014] 용어, "미성숙 수지상 세포"는 수지상 세포의 초기 성숙 단계에 발견되는 것으로, 단핵구 세포의 표면 표현형인 CD14를 발현하지 않으며, 또한, 공동 자극 분자 CD40, CD54, CD80, CD86 및 CD274의 어느 하나가 성숙 수지상 세포에 비해 낮은 수준으로 발현된다.
- [0015] 용어, "준성숙 수지상 세포"는 미성숙 수지상 세포의 특성의 일부를 상실하고, 성숙 수지상 세포의 표현형의 일부 특성을 갖는 수지상 세포로서, 부분적으로 또는 불완전하게 성숙된 형태 및 표현형적 특성을 나타내는 수지상 세포를 의미한다. 준성숙 수지상 세포는 일반적으로 자가-항원(self-antigen)에 대응하여 면역관용 반응을 유도하는 능력을 갖는다.
- [0016] 용어, "면역관용"이란 특정 항원에 대하여 면역 반응을 나타내지 않는 상태를 의미한다. 본 명세서에 있어서, "면역관용 수지상 세포 (tolerogenic dendritic cell)"는 자가 항원에 대한 관용을 유도하고 T 세포의 증식을 억제하는 수지상 세포를 의미한다.
- [0017] 본 명세서에서 사용된 용어 "CCL1"은 케모카인 (C-C 모티프) 리간드 1 (Chemokine (C-C motif) ligand 1)이라고 하며, 이는 활성화된 T 세포에서 분비되는 글리코프로테인으로 알려져 있다. 상기 케모카인은 염증성 싸이토카인에 속한다. CCL1은 세포 표면에 있는 케모카인 리셉터에 반응하여 모노사이트, 자연살해세포, 성숙 B 세포 및 수지상 세포를 유인하는 작용을 한다.
- [0018] 본 발명의 면역관용 수지상 세포는 CCL1의 유전자 mRNA 또는 이의 단백질이 미성숙 수지상 세포에 비하여 높은 수준으로 발현되는 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 면역관용 수지상 세포내에서 CCL1 단백질의 수준이 성숙 수지상 세포에서 발현되는 정도 또는 그 이상일 수 있다.
- [0019] 본 명세서에서 사용된 용어 "Enpp2"는 엑토뉴클레오티드 피로포스파타제 또는 포스포디에스테라제 패밀리 멤버 2 (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase family member 2)로 알려진 효소이다. 이는 옥토타신 (autotaxin)으로 불리기도 한다. 상기 효소는 종양 세포 이동 자극물질(tumor cell-motility-stimulating factor)로 알려져 있었으나, 후에 지질 신호에 관련되어 있는 것으로 밝혀졌다.
- [0020] 본 발명에 따른 면역관용 수지상 세포에서 발현되는 Enpp2의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준은 성숙 수지상 세포에 비하여 낮은 것일 수 있다. 바람직하게는 상기 면역관용 수지상 세포 내에서 Enpp2의 mRNA 또는 이의 단백질이 전혀 발현되지 않는 것일 수 있다.
- [0021] 상기 면역 관용 수지상 세포는 CCL1의 mRNA 또는 이의 단백질이 미성숙 수지상 세포에 비해 높은 수준으로 발현되고, Enpp2의 mRNA 또는 이의 단백질이 성숙 수지상 세포에 비해 낮은 수준으로 발현되는 것일 수 있다. 또한, 상기 면역관용 수지상 세포는 예를 들면 CCL1+ 및 Enpp2-의 표현형을 가질 수 있다. 이 때, CCL1+는 상기 면역관용 수지상 세포에서 CCL1의 발현 정도가 성숙 수지상 세포의 발현정도와 유사 또는 그 이상이거나 또는 미성숙 수지상 세포의 발현 정도에 비해 많은 양이 발현되거나 또는 상기 면역관용 수지상 세포내에서 CCL1 단백질 또는 CCL1 유전자의 mRNA가 존재하는 것을 의미한다. Enpp2-는 상기 면역관용 수지상 세포내에서 Enpp2가 존재하지 않거나 존재하더라도 일반적으로 공지되어 있는 방법에 의해 확인이 어려울 정도로 미량 존재하는 것을 의미한다. 이때, Enpp2가 세포내에서 존재하지 않는다는 것은 Enpp2 단백질이 존재하지 않거나, Enpp2의 mRNA가 발현되지 않는 것을 의미한다.

- [0022] 상기 면역관용 수지상 세포는 바람직하게는 준성숙 수지상 세포일 수 있다.
- [0023] 다른 측면은 CCL1 또는/및 Enpp2를 포함하는 면역관용 수지상 세포 확인용 마커 조성물을 제공한다. 상기 면역관용 수지상 세포 확인용 마커 조성물에 있어서, 상기 면역관용 수지상 세포는 예를 들면 준성숙 수지상 세포일 수 있다. 상기 마커 조성물에 있어서, CCL1 및 Enpp2는 상기한 바와 같다.
- [0024] 본 발명의 일 구체예에서, 면역관용 수지상 세포의 CCL1 또는 Enpp2의 발현정도가 미성숙 수지상 세포 및 성숙 수지상 세포와 차이가 있음을 확인하였다. 구체적으로 CC11은 미성숙 수지상 세포에서 발현되지 않는 반면, 면역관용 수지상 세포에서 발현됨을 확인하였다. 또한, Enpp2는 성숙 수지상 세포에서는 발현되나, 면역관용 수지상 세포에서 발현되지 않는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 상기 CCL1 또는 Enpp2의 발현 정도를 면역관용 수지상 세포를 확인하기 위한 마커로 활용할 수 있음을 입증하였다. 상기 마커 조성물은 바람직하게는 CCL1 및 Enpp2를 포함할 수 있다.
- [0025] 또 다른 측면은 CCL1 또는/및 Enpp2를 포함하는 면역증진용 수지상 세포 확인용 마커 조성물을 제공한다. 상기 면역증진용 수지상 세포 확인용 마커 조성물에 있어서, CCL1 및 Enpp2는 상기한 바와 같다. 상기 면역증진용 수지상 세포 확인용 마커 조성물은 상기 면역증진용 수지상 세포는 예를 들면 성숙 수지상 세포일 수 있다. 상기 마커 조성물은 바람직하게는 CCL1 및 Enpp2를 포함할 수 있다. 본 발명의 일 구체예에서, 성숙 수지상 세포의 CCL1 및 Enpp2가 모두 발현되는 반면, 미성숙 세포는 모두 발현되지 않으며, 또한 준성숙 세포는 CC11만 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 상기 CCL1 또는 Enpp2는 면역 증진용 수지상 세포 확인용 마커로서 활용될 수 있다.
- [0026] 또 다른 측면은 CCL1 또는/및 Enpp2의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는 면역 관용 수지상 세포를 확인하기 위한 마커 검출용 조성물을 제공한다. 상기 마커 검출용 조성물에 있어서, 상기 CCL1 및 Enpp2는 상기한 바와 같다. 상기 면역관용 수지상 세포는 예를 들면 준성숙 수지상 세포일 수 있다. 상기 마커 검출용 조성물은 예를 들면 CCL1 및 Enpp2의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 체제를 포함하는 것일 수 있다.
- [0027] 상기 조성물에 있어서, 상기 mRNA의 발현 수준을 측정하는 체제는 상기 mRNA와 혼성화 할 수 있는 프로브 또는 프라이머일 수 있다. 본 발명에서 "프라이머"는 당해 분야에서 공지된 용어로서 적절한 버퍼 중의 적절한 조건 (예를 들면, 4개의 다른 뉴클레오타이드 트리포스페이트(ATP, GTP, CTP, TTP) 및 DNA 폴리머라제) 및 적당한 온도 하에서 주형-지시 DNA 합성의 시작점으로서 작용할 수 있는 단일 가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 본 발명에서 "프로브"란 mRNA와 특이적 결합을 이룰 수 있는 짧게는 수 염기 내지 길게는 수십 염기에 해당하는 RNA 또는 DNA 등의 핵산 단편을 의미한다. 프로브 또는 프라이머의 염기서열은 주형과 완전하게 상보적일 필요는 없으나, 주형과 혼성화될 정도로 충분히 상보적인 염기서열을 가져야 한다. 상기 조성물에 있어서, 상기 단백질의 발현 수준을 측정하는 체제는 상기 단백질과 특이적으로 결합하는 항체일 수 있다. 본 발명에서, 항체란 다클론 항체, 단클론 항체 및 재조합 항체를 모두 포함한다. 또한, 본 발명의 항체는 2개의 전체 길이의 경쇄 및 2개의 전체 길이의 중쇄를 가지는 완전한 형태 뿐만 아니라, Fab, F(ab'), F(ab')<sub>2</sub> 및 Fv 등의 항체 분자의 항원 결합 기능을 보유하고 있는 기능적인 단편일 수 있다.
- [0028] 또 다른 측면은 상기 마커 검출용 조성물을 포함하는 면역관용 수지상 세포 여부를 확인하기 위한 마커 검출용 키트를 제공한다. 본 발명에 있어서, 상기 키트는 면역관용 수지상 세포를 확인하기 위한 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하는 체제뿐만 아니라 면역학적 분석에 사용되는 당 분야에서 일반적으로 사용되는 도구, 시약 등이 포함된다. 이러한 도구나 시약으로는 적합한 담체, 검출 가능한 신호를 생성할 수 있는 표지 물질, 용해제, 세정제, 완충제, 안정화제 등을 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 예컨대, 표지 물질이 효소인 경우에는 효소 활성을 측정할 수 있는 기질 및 반응 정지제를 포함할 수 있으며, 적합한 담체로는, 이에 한정되지는 않으나, 가용성 담체, 예를 들어 당 분야에 공지된 생리학적으로 허용되는 완충액, 예를 들어 PBS, 불용성 담체, 예를 들어 폴리스틸렌, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리에스테르, 폴리아크릴로니트릴, 불소수지, 가교 텍스트란, 폴리카라이드, 라텍스에 금속을 도금한 자성 미립자와 같은 고분자, 기타 종이, 유리, 금속, 아가



로스 및 이들의 조합일 수 있다.

- [0029] 본 발명에서 CCL1 또는 Enpp2의 mRNA 또는 이의 단백질의 발현 수준을 측정하기 위하여 특정 유전자의 발현 정도를 측정하는 공지된 방법들을 제한 없이 사용할 수 있으며, 예컨대, 역전사 중합효소연쇄반응(RTPCR) 또는 실시간 중합효소연쇄반응(Real time PCR)을 이용하여 유전자 수준의 발현 정도를 측정하거나, 웨스턴 블롯팅 방법을 이용하여 단백질 수준의 발현 정도를 측정할 수 있다.
- [0030] 또 다른 측면은 CCL1 또는 Enpp2의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 면역관용 수치상 세포 확인 방법을 제공한다. 상기 면역관용 수치상 세포 확인 방법은 예를 들면 CCL1 및 Enpp2의 유전자 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 것일 수 있다. 상기 면역관용 수치상 세포는 예를 들면 준성숙 수치상 세포일 수 있다.
- [0031] 또한, 상기 확인 방법은 CCL1의 유전자 mRNA 또는 단백질의 양이 대조군의 미성숙 수치상 세포보다 많고, Enpp2의 유전자 mRNA 또는 단백질의 양이 대조군인 성숙 수치상 세포보다 작으면 면역관용 수치상 세포로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0032] 또 다른 측면은 CCL1 또는 Enpp2의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는 면역증진 수치상 세포 확인 방법을 제공한다. 상기 면역증진 수치상 세포 확인 방법은 예를 들면 CCL1 및 Enpp2의 유전자 또는 이의 단백질의 수준을 측정하는 것일 수 있다. 상기 면역관용 수치상 세포는 예를 들면 성숙 수치상 세포일 수 있다. 상기 면역증진 수치상 세포 확인 방법은 CCL1 및/또는 Enpp2의 유전자 mRNA 또는 단백질의 발현 수준이 미성숙 수치상 세포보다 높으면 면역증진 수치상 세포로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.
- [0033] 또 다른 측면은 CCL1의 유전자가 발현되고, Enpp2의 유전자가 발현되지 않는 수치상 세포를 선별하는 단계를 포함하는 면역관용 수치상 세포를 선별하는 방법을 제공한다.
- [0034] 상기 선별 방법을 구체적으로 설명하면 다음과 같다.
- [0035] 상기 선별 방법은 수치상 세포에서 cc11 유전자가 발현되고, enpp2 유전자가 발현되지 않는 수치상 세포를 선별하는 단계를 포함할 수 있다. 유전자의 발현 여부는 마이크로어레이나 PCR 등을 이용하여 확인할 수 있다. 상기 CCL1 및 Enpp2는 상기한 바와 같다.
- [0036] 또한, 상기 선별방법은 수치상 세포에서 공동 자극 분자인 CD11c, CD14, CD40, CD54, CD80 및 CD86의 발현 여부를 확인하는 단계를 추가적으로 더 포함할 수 있다. 상기 공동 자극 분자는 세포 표면에 발현되므로, 항체를 이용하여 확인할 수 있다. 또한, mRNA 수준에서 발현을 확인할 수 있다. 상기 면역관용 수치상 세포는 공동 자극 분자인 CD11c, CD14, CD40, CD54, CD80 및 CD86의 어느 하나가 발현되는 것일 수 있다. 바람직하게는 면역관용 수치상 세포에서 상기 세포 표면 항원이 모두 발현되는 것일 수 있다.
- [0037] 또 다른 측면은 CCL1의 유전자 mRNA 또는 단백질의 양을 증가시키고, Enpp2의 유전자 mRNA 또는 단백질의 양을 감소시키는 단계를 포함하는 면역관용 수치상 세포로의 분화를 조절하는 방법을 제공한다.
- [0038] 상기 조절 방법은 골수로부터 분리한 단핵구에 싸이토카인 및 항원을 접촉시켜 배양하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 먼저, 골수로부터 분리한 미성숙 수치상 세포에 싸이토카인 및 항원을 접촉시켜 배양하는 단계를 포함한다. 상기 골수는 자가 또는 타가 골수세포에서 수득될 수 있다. 또한, 상기 싸이토카인은 미성숙 수치상 세포를 수치상 세포로 분화시키기 위한 것으로서, 예를 들면 TNF- $\alpha$  일 수 있다. 또한, 항원은 상기에서 기재한 바와 같은 자가 면역 반응의 타겟 항원, 알러젠 (allergen), 이식체 항원 (transplantation antigen) 등이 될 수 있다. 일 구체예로는 콜라겐일 수 있다.
- [0039] 또한, 상기 분화 조절 방법은 cc11 유전자가 발현되고, enpp2 유전자가 발현되지 않는 수치상 세포를 선별하는 단계를 포함할 수 있다. 유전자의 발현 여부는 마이크로어레이나 RT-PCR을 이용하여 확인할 수 있다.
- [0040] 일 구체예로 상기 미성숙 수치상 세포는 골수유래 단핵구에서 적혈구를 제거한 후 분화시키는 방법으로 수득할 수 있다. 상기 골수유래 단핵구는 포유류의 뼈에서 수득할 수 있으며, 특히, 치료를 위한 개체의 골수에서 수득할 수 있다. 또한, 상기 골수유래 단핵구는 줄기세포를 분화시켜 수득할 수 있다. 상기 분화는 RPMI, FBS, GM-

CSF 및 머캅토에탄올을 포함한 배지에서 수행될 수 있다.

- [0041] 또한, 상기 준성숙 수지상 세포를 얻기 위해서는 항원을 접촉시킬 수 있다. 상기 항원은 자가 항원일 수 있다. 상기 자가-항원은 자가 면역 반응의 타겟 항원, 알러젠(allergen), 이식체 항원(transplantation antigen) 등이 될 수 있다.
- [0042] 상기 타겟 항원으로는 루푸스 자가항원(lupus autoantigen), 스미스(Smith), Ro, La, U1-RNP, 피브릴린(피부경화증, scleroderma), GAD65 (당뇨병 관련), 인슐린, 미엘린 단백질, 히스톤, PLP, 콜라겐, 글루코오스-6-포스페이트 이소머라아제, 시트룰리네이트드(citrullinated) 단백질 및 펩티드, 타이로글로불린, 다양한 tRNA 썬세타아제, 아세틸 콜린 수용체(AchR), MOG, 프로테아아제-3, 미엘로퍼옥시다아제 등이 있다.
- [0043] 상기 알러젠은 Fel d1 (아미노산 서열이 WO 91/06571에 공개되어 있는 애완용 고양이 Felis domesticus 의 고양이 피부 및 침샘의 알러젠), Der p I, Der p II, Der fI or Der fII (아미노산 서열이 WO 94/24281에 공개되어 있는 집 먼지 진드기로부터의 주요 단백질 알러젠), 잔디, 풀, 나무 및 잡초, 꽃가루로부터 유래되는 알러젠; 균류 및 곰팡이로부터 유래되는 알러젠; 물고기, 갑각류, 게, 롱스터, 땅콩, 콩, 밀, 글루텐, 달걀 및 우유와 같은 식품으로부터 유래되는 알러젠; 벌, 말벌, 호박벌과 같은 찌르는 곤충, 집파리, 초파리, 선박파리, 곡물 바구미, 누에, 꿀벌, 날벌레 유충, 벌 유충, 테니브리오 물리터 유충, 딱정벌레와 같은 곤충 및 거미 및 집 먼지 진드기를 포함하는 진드기 등으로부터 유래되는 알러젠; 소, 개, 고양이, 돼지, 염소, 말, 토끼, 랫트, 기니아 피그, 마우스 및 게르빌루스쥐와 같은 포유류의 비듬, 오줌, 타액, 혈액 또는 다른 체액에서 발견되는 알러젠; 일반적으로 공기중의 입자; 라텍스(latex); 및 단백질 세척제 첨가제 등을 포함한다.
- [0044] 상기 이식체 항원은 공여자 세포 또는 조직으로부터 유래될 수 있고 외인성 항원의 부존재 하에서 자가-항원으로 로딩된 MHC를 갖는 공여자 항원-제시 세포로부터 유래될 수 있다.
- [0045] 상기 자가 항원은 바람직하게는 류마티스 관절염 특이 자가 항원일 수 있으며, 타입 II 콜라겐일 수 있다. 또한, 상기 TNF-알파와 항원을 동시에 접촉시킴으로서 미성숙 수지상 세포에서 준성숙 수지상 세포를 얻을 수 있다.
- [0046] 또 다른 측면은 CCL1이 미성숙 수지상 세포에 비해 높은 수준으로 발현되며, Enpp2가 성숙 수지상 세포에 비하여 낮은 수준으로 발현하는 면역관용 수지상 세포를 포함하는 세포 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다. 일 구체예로는 CCL1+ 및 Enpp2-인 면역관용 수지상 세포를 이용한 세포 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0047] 이때, 상기 조성물은 면역 질환 치료용 또는 암 치료용으로 활용될 수 있다. 또한, 상기 면역관용 수지상 세포를 포함하는 약학적 조성물에 의해 치료 가능한 질환은 자가 면역 질환일 수 있다. 상기 자가 면역 질환은 생체 내에서의 자가 면역 반응에 의해 유발되는 모든 질병 또는 질환을 포함한다. 예를 들어, 제 1 형 당뇨병, 류마티스 관절염, 다발성 경화증, 전신성 홍반성 낭창, 쇼그렌 증후군, 피부 경화증, 다발성 근염, 만성 활동성 간염, 혼합 결체 조직 질환, 원발성 담즙성 간경변, 악성 빈혈, 자가면역 갑상선염, 특발성 에디슨 병, 백반, 글루텐 감수성 장병증, 그레이브병, 중증 근무력증, 자가면역성 호중구 감소증, 특발성 혈소판 감소 자반증, 간경변증, 심상성천포창, 자가면역 불임증, 구드페이스슈어 증후군, 수포성 유천포창, 원판상 홍반 루푸스, 케양성 대장염 및 고밀도 침착병 등이 있다. 일 구체예에 따르면, 본 발명의 약학적 조성물이 적용되는 질병 또는 질환은 류마티스 관절염 일 수 있다. 또한, 상기 암은 간암, 폐암, 대장암, 유방암, 갑상선암, 또는 혈액암 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있다.
- [0048] 본 명세서에서 “약학적 유효량”은 약학적 효능을 발휘하는 데 충분한 양을 의미한다. 본 발명의 바람직한 구체예에 따르면, 본 발명의 조성물에 포함되는 상기 준성숙 수지상 세포의 수(number)는 특정의 세포수로 한정되지 않는다, 그러나, 바람직하게는  $2 \times 10^6$  세포수 미만, 더욱 바람직하게는  $1 \times 10^6$  세포수 미만, 더욱 바람직하게는  $5 \times 10^5$  세포수 미만, 더욱 바람직하게는  $5 \times 10^5$  내지  $2 \times 10^5$  세포수 일 수 있다.
- [0049] 본 발명의 약학적 조성물에 포함되는 약학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아 고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세결정성 셀룰로스, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 약학적 조성물은 상기 성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다. 적합한 약학적으로 허용되는 담체 및 제제는 Remington's Pharmaceutical



Sciences (19th ed., 1995)에 상세히 기재되어 있다.

- [0050] 본 발명의 약학적 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다. 한편, 본 발명의 약학적 조성물의 경구 투여량은 바람직하게는 1일 당 0.001-100 mg/kg(체중)이다.
- [0051] 본 발명의 약학적 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 부형제를 이용하여 제제화함으로써 단위 용량 형태로 제조되거나 또는 다용량 용기 내에 내입시켜 제조될 수 있다. 이때 제형은 오일 또는 수성 매질중의 용액, 현탁액 또는 유화액 형태이거나 엑스제, 분말제, 과립제, 정제 또는 캡슐제 형태일 수도 있으며, 분산제 또는 안정화제를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0052] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있고, 비경구 투여인 경우, 정맥내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다. 본 발명의 조성물은 류마티스 관절염에 적용하는 것이므로 국부적으로 관절 내 혹은 피하 주입이 가장 바람직하다. 상기 약학적 조성물의 투여량은 상기 기술된 바와 같다. 또한, 개체는 포유류일 수 있으며, 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [0053] 또 다른 측면은 CCL1이 미성숙 수지상 세포에 비해 높은 수준으로 발현되며, Enpp2가 성숙 수지상 세포에 비해 낮은 수준으로 발현하는 면역관용 수지상 세포를 포함하는, 세포 치료용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 질환 치료 방법을 제공한다. 일 구체예로는 CCL1+ 및 Enpp2-인 면역관용 수지상 세포를 이용한 투여하는 질환 치료 방법을 제공한다. 상기 치료 방법은 인간 또는 인간이 아닌 개체를 치료하는 데 적용할 수 있다. 상기 치료방법이 적용되는 질환은 면역질환 또는 암일 수 있다.

**발명의 효과**

- [0054] 본 발명의 양상에 따르면, 면역관용 수지상 세포에서 발현하는 바이오 마커를 정립함으로써, 면역 관용 수지상 세포의 정체성을 쉽게 확립할 수 있으며, 수지상 세포의 성숙도에 따른 유전자 발현 양상을 확립할 수 있다. 또한 면역 질환에 대한 특이 진단 마커로서 이용할 수 있으며, 세포치료제에 활용되는 수지상 세포를 보다 용이하게 제조하고, 효율적으로 검출, 탐색 및 수득할 수 있으므로, 산업적으로 활용가능성이 높다.

**도면의 간단한 설명**

- [0055] 도 1은 미성숙(imDC), 준성숙(tDC) 및 성숙(mDC) 수지상 세포의 세포 표현형 확인 시험한 결과를 나타낸 것이다. 구체적으로 Balb/c 및 DBA1/J 마우스로부터 각각 상기 3종의 수지상 세포를 제조하여 세포 표면 분자들에 대해 분석한 FACS 분석 결과이다.
- 도 2는 미성숙, 준성숙 및 성숙 수지상 세포의 마이크로어레이 분석 결과를 나타낸 것으로서, 세 가지 수지상 세포에서 마이크로어레이를 통해 수지상 세포에서 발현되는 mRNA 수준을 확인한 결과를 보여준다.
- 도 3은 마이크로어레이 결과를 통해 발굴된 면역관용 수지상 세포 특이 마커 CCL1 및 성숙 수지상 세포 특이 마커 Enpp2의 실시간 PCR 결과를 나타낸 것이다. 선별된 특이 마커 CCL1은 케모카인 리간드로써 활성화된 T 세포에 의해 분비되는 작은 당단백질이며, Enpp2는 지질 신호 분자로 알려진 물질이다.
- 도 4는 PCR 기법을 이용하여 CCL1 및 Enpp2의 발현 여부를 확인한 것이다.
- 도 5는 수지상 세포 아형별 사이토카인 (IL-β, IL-6, IL-12p70) 발현량 (도 5 (A)) 및 수지상 세포 아형별 T 세포와 공동 배양시 사이토카인(IL-4, IL-10, IL-17, 및 IFN-γ) 발현량 (도 5 (A))을 ELISA로 측정된 결과를 보여준다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0056] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

**[0057] 실시예 1. 마우스 수지상 세포아형 제조 (미성숙/준성숙/성숙 수지상 세포제조)**

[0058] 마우스에서 수지상 세포를 수득하기 위하여 C57BL6 (마우스 기본 유전자 정보의 기준이 되는 strain), Balb/c

(일반적으로 사용하는 strain), 및 DBA (관절염 모델로 많이 사용됨, CIA-RA 모델용으로 사용) 마우스를 구입하였다. 상기 마우스의 앞다리의 경골 및 비골을 분리한 후 골수유래 단핵구를 채취하였다. 채취된 단핵구를 세척 후 cell strainer 통과 후 세포 펠릿을 수지상 세포 전용 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였다. 상기 수지상 세포 전용 배지는 RPMI1640 (Lonza®), 10% FBS (Gibco®), 2 ng/ml rmIL-4 & 20 ng/ml rmGM-CSF (JW creagene®) 및 55 nM 2-Mercaptoethanol (2-ME)을 포함한다.

[0059] 총 8일간의 수지상 세포의 분화 과정을 거치며, 그 기간 중 3일 및 6일에 동일 배지로 교체하였다. 면역관용 (tolerogenic, 준성숙) 수지상 세포 및 면역증진(immunogenic, 성숙) 수지상 세포로 분화시키기 위해서, 성숙 수지상 세포는 7일에 1 ug/ml LPS (Sigma-Aldrich) 및 50 ug/ml 특이항원(콜라겐) (Sigma-Aldrich)을 처리하였다. 이후 16 내지 20 시간 후에 수지상 세포를 수확하였다. 이에 반해 관용 수지상 세포는 8일, 수확 당일 10 ng/ml TNF- $\alpha$  (BD Bioscience) 및 50 ug/ml 특이항원(콜라겐)으로 4시간 처리한 후 수확하였다. 이와 동반해서 대조군으로 사용할 미성숙(immature) 수지상 세포(전처리 없는 8일 수지상 세포)도 함께 수확하였다.

[0060] **실시예 2. 수지상 세포 아형별 표현형 분석(phenotyping)**

[0061] 상기 실시예 1에서 각각 수확한 수지상 세포 아형에서 CD11c, CD14, CD40, CD80, CD86, MHC class II 및 MHC class I (BD, Pharmingen) 등의 세포 표면 부착 인자의 발현을 FACS( FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences))로 측정 후 FLOWJO 프로그램으로 분석하였다. 수지상세포 표면 표현형 중 CD11c의 발현 정도는 미성숙, 준성숙, 성숙 수지상세포간의 차이는 없었으며, 단핵구 마커인 CD14의 경우 모두 사라진 것을 확인하였다. 또한 공동 자극 분자인 B7-1 (CD80), B7-2 (CD86) 및 CD40의 경우 준성숙 수지상세포가 미성숙 및 성숙 수지상세포의 중간형을 가지는 것을 확인하였다. 세포의 생존율 역시 95%이상 높은 생존율을 보였다.

[0062] **실시예 3. 수지상 세포 아형별 사이토카인(cytokine) 분비능 확인**

[0063] 상기 실시예 1에서 각각 수확한 아형별 세포배양액의 상층액을 채취 후 0.22  $\mu$ m 포어로 필터링을 한 후 ELISA 방법을 이용하여, 세포 상층액에서 관련된 사이토카인 (IL-1beta, IL-6, IL-12p70)의 발현량을 측정하였다. 염증성 사이토카인인 IL-1beta와 IL-6의 경우 준성숙 수지상 세포는 성숙 수지상 세포에 비해 낮은 수준으로 발현을 하였다. 또한 type I helper T cell을 유도하는 IL-12의 경우도 준성숙 수지상 세포가 성숙 수지상 세포에 비해 낮은 수준으로 발현하는 것을 확인하였다 (도 5 (A)).

[0064] **실시예 4. 수지상 세포 아형별 T 세포와 공동 배양시 사이토카인 분비 및 T 조절세포(Treg) 유도능 확인**

[0065] 각각의 수지상 세포의 아형을 수확하는 날, 감각되지 않은 마우스 (naive mouse)에서 비장세포 (splenocyte)를 분리 후 나일론 컬럼 (Nylon column)을 통과시켜, T 세포를 분리하였다. 각각의 수지상 세포 아형과 분리된 T 세포를 3일간 (72시간) 공동 배양하였다. 공동 배양 후 세포 집단과 세포배양 상층액을 채취하였다. 세포 집단은 세척 후 CD4+, CD25+인 세포를 수거한 후 FoxP3 (forkhead box P3)로 염색하여, 수지상 아형별 Treg 세포 유도능을 확인하였다. 또한, 세포 상층액에서 관련된 사이토카인 (IL-4, 10, 17, IFN- $\gamma$ )의 발현량을 ELISA (Elisa kit : R&D, eBioscience)로 측정하였다. 염증을 유발하는 IFN- $\gamma$ 와 IL-17의 경우 준성숙 수지상세포와 공동배양한 T 세포가 성숙 수지상세포와 공동배양한 배양한 T 세포에서 낮게 발현하는 반면 type II helper T cell이 분비하는 IL-4와 IL-10의 경우 준성숙 수지상세포와 공동배양한 T 세포에서 분비량이 증가하는 것을 확인하였다 (도 5(B)).

[0066] **실시예 5. 수지상 세포 아형별 유전자 프로파일링(GENE Profiling)**

[0067] 수지상 세포의 RNA를 분리하기 위하여, Trizol(Gibco®)을 이용하여 바로 뽑거나, RNeasy 키트를 이용하여 RNA 분리 후 나노드랍(nanodrop)으로 농도 측정 후 사용하였다. 구체적으로, 먼저 트리졸(Trizol)을 직접 디시(dish)-세포 펠릿에 첨가하여 세포 펠릿을 현탁시켰다. 이후 마이크로 튜브로 상기 세포 현탁액을 옮긴 후, 클로로포름 200 ul (트리졸 1 ml 당)을 넣고 약 15초간 세계 혼합하였다. 그 후, 5분간 락에 꽂아 놓은 후 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 상등액만 따서 새 튜브로 옮겨 담고 동량의 이소프로판올을 넣고 잘 섞일 정도로만 몇 번 혼합하였다. 그 후, 12,000 rpm에서 10분간 혼합하였다.

[0068] 그 후, RNA 펠릿이 떨어져오지 않게 하여 이소프로판올을 제거한 다음 75% 에탄올 1 ml로 세척하였다. 그 후, 12,000 rpm으로 10 분간 원심분리하였다. 그 후, 에탄올을 제거한 후 펠릿을 건조시켰다. 그 후, DEPC 물을 적당량 넣고 RNA 펠릿을 현탁시켰다. 그 후, qRT-PCR 또는 실시간 PCR을 이용하여 CCL1 및 Enpp2의 발현 여부를 측정하였다. 하기 프라이머 쌍을 이용하여 유전자를 증폭하였으며, BioRad C1000™ Thermal Cycler / CFX96™ Real-Time System 의 qRT-PCR을 이용하여 증폭하였다. 또한, qRT-PCR은 95℃에서 15분, 95℃에서 20초, 60℃에서 20초, 72℃에서 20초 반응을 시켰으며, 45 사이클을 반복하였다. 그 후, 72℃에서 5분 반응시키고, 95℃에서 10초 반응시켰다. Conventional PCR기법을 이용하여 CCL1, Enpp2의 유전자를 증폭시킨 후, 이를 확인하기 위해 2% agarose gel 상에서 확인하였다 (도 4 참조).

표 1

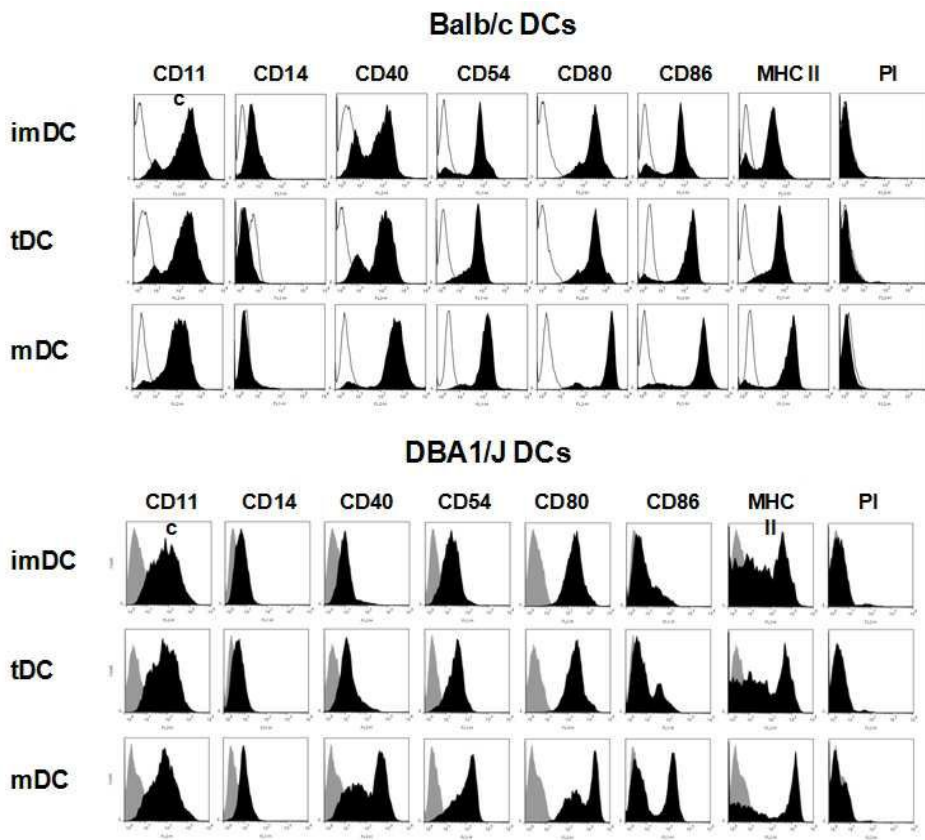
구분	서열	서열번호
mCCL1(정방향)	GCA TGC TTA CGG TCT CCA ATA	서열번호 1
mCCL1(역방향)	GAG GAG CCC ATC TTT CTG TAAC	서열번호 2
mEnpp2(정방향)	GTC CTC TCT CTG TGT CTT CTT TC	서열번호 3
mEnpp2(역방향)	CAT GAG TTC CTC TAC CCA CTT C	서열번호 4
mGAPDH(정방향)	AAC AGC AAC TCC CAC TCT TC	서열번호 5
mGAPDH(역방향)	CCT GTT GCT GTA GCC GTA TT	서열번호 6

산업상 이용가능성

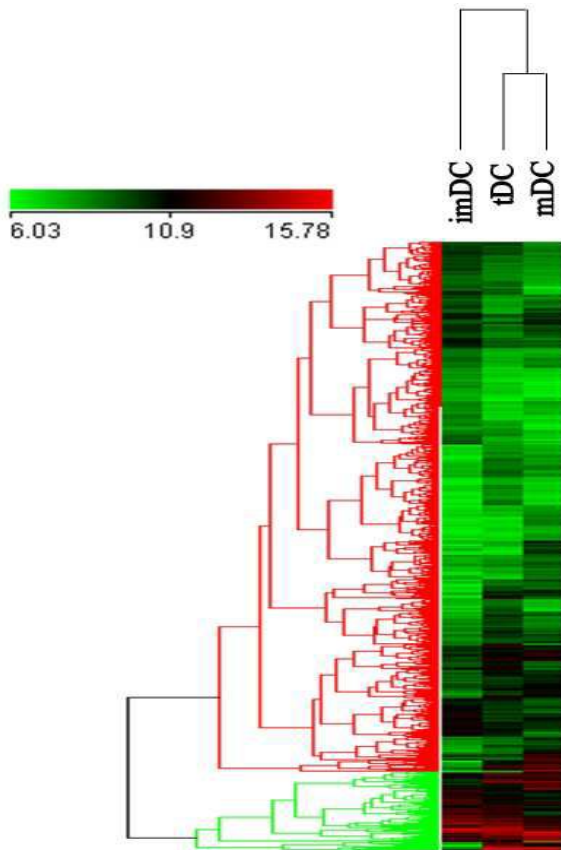
[0070] 면역질환이나 여러가지 질환 치료에 세포 치료제의 활용이 많아지고 있다. 특히, 수지상 세포가 다양한 면역질환 등에 관련되어 있음이 밝혀짐에 따라 다양한 용도로 활용될 수 있는 가능성이 높아지고 있다. 그러나, 의학적으로 가장 효과적으로 활용될 수 있는 수지상 세포에 대하여 밝혀진 바 없다. 본 발명의 마커를 이용할 경우 질환치료에 가장 효과적인 수지상 세포를 용이하게 획득할 수 있으며, 이렇게 획득된 수지상 세포를 이용할 경우 다양한 세포 치료제로 활용할 수 있으므로 산업적으로 활용 가능성이 다양하다.

도면

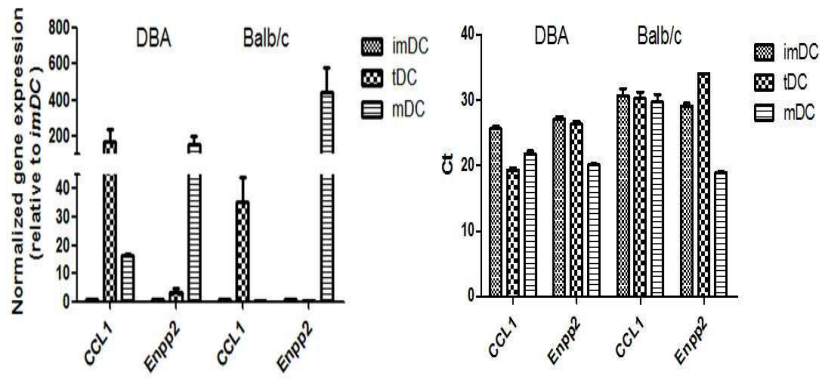
도면1



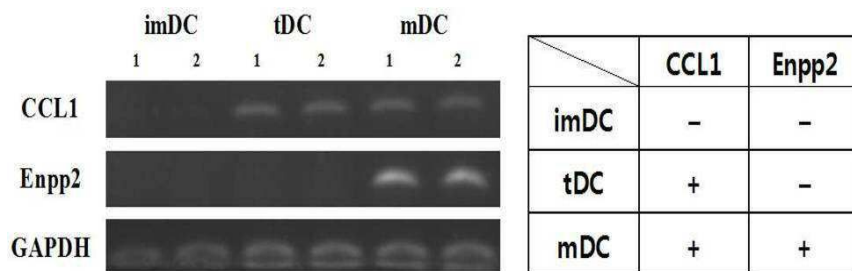
도면2



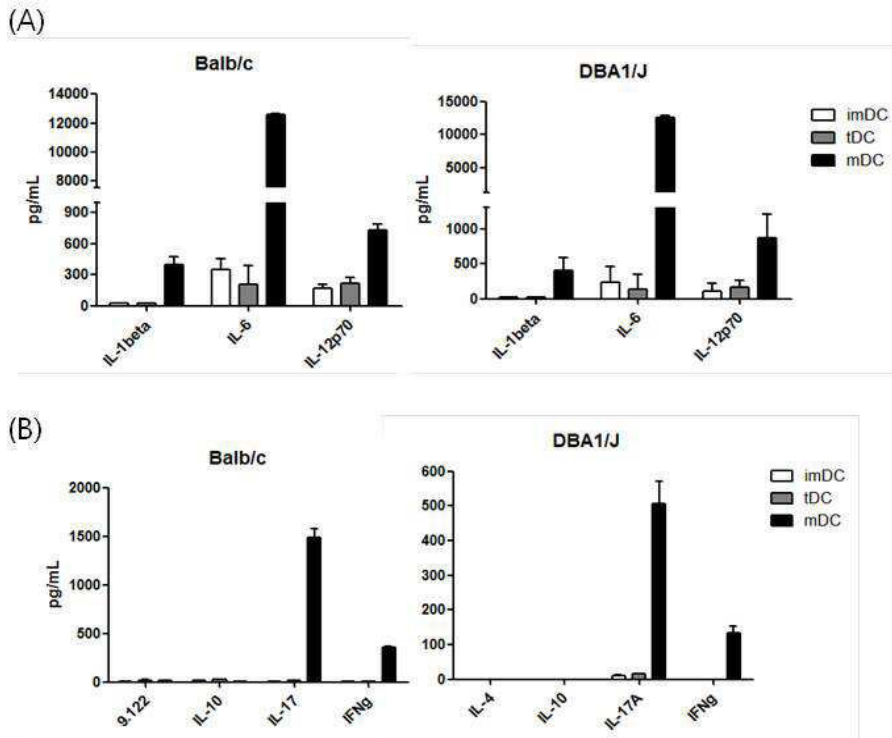
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> CHA University Industry Academic Cooperation Foundation
- <120> Markers for identifying Tolerogenic dendritic cells and uses thereof
- <130> PN1028363
- <160> 6
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> mCCL1 forward
- <400> 1
- gcatgcttac ggtctccaat a
- <210> 2
- <211> 22
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence



<220><223> mCCL1 reverse

<400> 2  
gaggagccca tctttctgta ac 22

<210> 3  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220><223> mEnpp2 forward

<400> 3  
gtcctctctc tgtgtcttct ttc 23

<210> 4  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220><223> mEnpp2 reverse

<400> 4  
catgagttcc tctaccact tc 22

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

<220><223> mGAPDH forward

<400> 5  
aacagcaact cccactcttc 20

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

<220><223> mGAPDH reverse

<400> 6  
cctgttgctg tagccgtatt 20