

피부이식동물 생산을 위한 인체 cytokine발현이
면역체계에 미치는 영향성에 관한 연구

Immunological characteristics of the transgenic mice
expressing a cytokine in the skin for the production of
skin grafted animals

가톨릭 대학교 의과대학

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “ 피부이식동물 생산을 위한 인체 cytokine의 발현이 면역체계에 미치는 영향성에 관한 연구”과제의 보고서로 제출합니다.

2000 . 8. 31.

주관연구기관명 : 가톨릭 대학교 의과대학

주관연구책임자 : 김 태 운

연 구 원 : 류 재 응

“ : 이 정 응

“ : 김 경 은

“ : 박 영 일

협동연구기관명 : 생명공학 연구소

협동연구책임자 : 김 선 정

요 약 문

I. 제 목

피부이식동물 생산을 위한 인체 cytokine발현이 면역체계에 미치는 영향성에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

IL-10 은 항염증에 작용하는 주요 면역조절인자로서 광범위한 면역 반응의 억제를 유도한다. 형질 전환 생쥐의 피부 조직에서 IL-10을 발현하여 이의 피부 면역반응에 미치는 기능을 규명하고, 궁극적으로 피부 이식의 모델동물을 제조하는 것이 본 연구의 최종목표이다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. IL-10의 면역 지연반응에대한 효과 검색
2. mouse IL-10을 피부에서 발현하기위한 벡터 제조 및 이의 검증
3. mouse IL-10을 피부에서 발현하는 형질전환 생쥐의 제조
4. IL-10 형질전환 동물을 이용한 인체 피부질환 모델의 확립
5. 사람 interleukin-10 유전자의 screening 및 유전자 구조 분석
6. 형질전환생쥐의 유선에서 인체 IL-10 조직특이적 발현

IV. 연구개발결과

1. mIL-10의 생쥐 피부 특이적 발현을 위한 **human keratin 14 promoter**를 이용한 **vector** 제조 및 이를 cell culture 단계에서 검증함.
2. **Ecdysone-inducible expression system**을 도입하여 mIL-10의 발현을 조절할 수 있음을 cell culture에서 증명함.
3. mIL-10을 피부에서 발현하는 형질전환 생쥐를 2 계통 개발하였고, 이종간의 피부 이식후 이들 생쥐에서는 **rejection response**가 지연됨을 보임.

4. Ecdysone-inducible expression system을 이용한 형질 전환 생쥐를 제조함.
5. 피부 이식된 생쥐의 피부 조직에서 mouse C1r 유전자를 cloning 함.
6. 젖소 b-casein/인체 IL-10 발현백터를 생쥐 수정란에 미세주입하여, 형질전환 생쥐 8 계통을 개발하였음
7. 수유기에 있는 형질전환생쥐의 유선조직에서만 인체 IL-10 RNA의 발현을 확인하고, 6 계통의 형질전환생쥐에서 모두에서 IL-10 단백질의 발현을 확인하였으며 최대 발현량은 1,620 ug/ml 에 이르렀다.
8. 형질전환생쥐의 유선조직에 대한 면역화학 연구 완료: IL-10 이 유선조직의 이유기에 유선 상피세포의 apoptosis 에 작용함을 밝힘.

V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구에서 개발한 형질전환동물은 피부 질환 및 이식 모델동물을 개발하기 위한 기초적 정보를 제공하여 피부 질환의 치료를 위한 연구에 활용될 것이며, 또한 유선 상피세포에서 cytokine의 기능을 규명하는 질환모델동물로 활용할 수 있다. 또한 중앙 면역학 및 자가면역 질환의 연구에도 커다란 가치를 가진 유용한 자원으로 활용될 수 있다.

S U M M A R Y

Interleukin-10 (IL-10) is a homodimeric protein with a wide spectrum of anti-inflammatory/immune activities. It inhibits cytokine production and immune surface molecule expression by various cell types. In addition, IL-10 induces expression of cell adhesion molecules on endothelial cells and apoptotic cell death of B-chronic lymphocytic leukemia cells. These properties of IL-10 indicate that IL-10 is a potent immunosuppressant and has great potential therapeutic utility in the treatment of diseases, such as chronic inflammation, autoimmune diseases, transplant rejection, graft-versus-host disease and sepsis.

In order to investigate its role in immune responses associated with transplant rejection and to produce an animal model for skin diseases and transplant, we have generated a transgenic mouse which expresses mouse IL-10 in its skin. Human keratin 14 promoter was used for constitutive expression of IL-10 and by using this, two lines of transgenic mice were produced. They showed skin-specific expression of mIL-10 as analyzed by RT-PCR and immunohistochemistry. Furthermore, significant delay of rejection responses upon skin transplant was demonstrated, indicating that IL-10 suppressed the immune responses in the transgenic mouse.

In the salivary and lacrimal glands, it was recently found that interleukin-10 induced apoptosis of the cells via Fas pathway. Being different from other exocrine gland cells, mammary cells cycle the growth, differentiation, and involution during the pregnancy age of the mammals. During the growth and differentiation of epithelial cells, combination of hormones and growth factors including estradiol and progesterone play important roles. In this study, we cloned the IL-10 gene and generated transgenic mice to reveal the role of IL-10 in the mammary epithelial cells.

C O N T E N T S

I. Introduction	p. 7 - p. 10
II. State of the Art	p. 11 - p. 15
III. Results and discussion	p. 16 - p. 32
1. Production of transgenic mouse expression mIL-10 in its skin	
2. Effect of IL-10 on immune suppression	
3. Expression of IL-10 in the mammary epithelial cells of transgenic mouse	
4. Cloning of mouse C1r in grafted skin biopsy	
5. Generation of transgenic mouse using ecdysone-inducible regulation system	
6. Functional characterization of mSOCS on signalling pathways associated with immune responses	
7. Identification of the genes whose expression is induced upon UV-induced immune suppression	
IV. Achievements of the research goal and contribution	p. 33 - p. 34
V. Application of the Results	p. 35
VI. References	p. 36 - p. 40

여 백

제 1 장 서론

제 1 절: 목적

본 연구의 최종 목적은 피부 이식 모델 동물의 생산을 위한 cytokine 유전자의 기능을 파악하고, 이들 cytokine이 피부 이식에 미치는 영향을 분자 생물학적, 면역학적 및 병리조직학적으로 관찰하고, 각종 피부 질환의 진단, 병인 연구 및 치료를 위한 피부 질환모델동물의 개발, 유지 및 보존기술의 개발이다. 이를 수행하기 위해 cytokine의 일종으로 면역 억제 효과를 일으키는 IL-10을 피부에서 과발현하는 생쥐를 생산하여 이의 피부 이식에 미치는 영향에 대한 분자 생물학적, 면역학적 연구를 수행한다.

제 2 절: 필요성

피부는 생명체의 최외층이며, 외부로부터의 화학적 · 물리적 자극으로부터 체내의 제기관을 방어하는 역할을 한다. 피부의 구성 성분인 표피, 한관, 진피 및 피하지방조직은 각각의 기능이 다른 여러 종류의 세포들로 이루어져 있으며, 이들 세포들간의 원활한 신호전달기작은 궁극적으로 생명체의 유지에 필수적인 요소이다. 또한 피부는 외부의 복잡한 환경에 직접적으로 노출이 되어있으므로 감염성 질환, 유전병, 종양, 면역계의 이상과 같은 다양한 질환들이 존재한다. 최근 피부가 단순한 물리적 방어 역할 외에 인체 질환 발생에 직접적으로 관여하는 증거로서 피부 상피의 95%를 차지하고 있는 각질 형성 세포가 면역 물질을 유리함으로써 생체내 면역 체계에 변화를 주어 질병발생을 야기하며 이로 인해서 전신적 질환을 초래한다는 보고와 함께 피부에 산재되어있는 여러 면역 세포들이 가장 손쉽게 외부 환경에 노출되어 있으며 강력한 면역 반응을 초래할 수 있다는 것이 입증되고 있다. 또한 직접관찰이 용이하기 때문에 조직을 직접 생검하기 쉬운데도 불구하고 아직까지 병인을 모르는 피부질환이 많다. 따라서 이러한 질환의 원인 해명을 위해서는 발생 공학에 의해 제작된 피부질환 모델 생쥐를 이용, 피부질환의 원인 규명을 해 왔으나 아직까지도 주요인자 규명에는 미치지 못하고 있다. 따라서 피부 각질 형성 세포에서 유리되어 직 · 간접적으로 생체내 면역 반응에 관여하는 cytokine의 기능을 분석하는 것이 질병 예방 및 이해를 돕고 궁극적으로 질병 치료에 중요하다고 하겠다. 또한 타 장기에 비해 피부에 특이 유전자 과발현 연구는 육안으로 나타나는 병

리 현상을 직접 관찰할 수 있으며, 장기 이식에 있어서 가장 강력한 거부반응을 나타내는 장기가 피부인 관계로 우월하다고 사료된다. 본 연구의 최종목표는 피부이식동물 생산을 위하여 cytokine 유전자의 기능을 파악하고, cytokine이 피부이식에 미치는 영향을 분자생물학적, 면역학적 및 병리조직학적으로 관찰하는 것이다. 이러한 과제를 수행하기 위해서 각종 cytokine 유전자를 특이적으로 과 발현시키는 형질전환 모델동물을 개발하여, 피부질환의 유전자 치료연구에 이용한다면 피부이식분야에 절대적 가치를 발휘할 수 있으리라 사료된다.

인체 IL-10 은 항염증에 작용하는 주요 면역조절인자로서 최근에는 모유에서 그 존재가 밝혀졌다 (Go, 1990; Howard, 1994; de Vries, 1995; Garofalo, 1995). IL-10의 이러한 항염기능은 IL-10이 항염제로서 작용할 수 있음을 시사하며, 만성염증, 자가면역 질환, 이식 거부 등의 분야에 치료제로서 개발이 가능하다. 침선과 눈물샘에서 IL-10은 Fas 경로를 통하여 apoptosis를 유발함이 최근에 밝혀졌다. IL-2 promoter를 이용한 형질전환모델생쥐에서 IL-10은 CD4+ T 세포에서 Fas-L의 발현을 유도하며, Fas-L을 발현하는 세포가 Fas를 발현하는 세포에 작용하여 apoptosis를 유발하게 된다. 위의 사실은 IL-10의 과발현이 Sjogren's syndrome을 일으키는 요인으로 작용할 수 있음을 보여 준다 (Fox, 1994; Saito, 1999).

침선이나 눈물선과는 달리, 유선조직의 세포들은 성장과 분화, 퇴화를 반복한다. 사람의 모유에는 TNF, TGF, IL-1, IL-6 등이 생리적으로 충분히 유의할 정도의 양이 포함되어 있다 (Basolo, 1996; Wiley, 1995). 모유에는 60 - 9,300 pg/ml 정도의 IL-10이 포함되어 있다 (de Vries, 1995). 그러나, 이의 정확한 생리적 기능은 아직 밝혀지지 않고 있다. 유선 상피세포에서 IL-10의 기능을 규명하는 것이 본 연구의 또다른 최종목표이다. 이를 위하여 동물 상피세포의 유전자적 조작과 β -casein promoter를 이용한 IL-10이 유선에 특이적으로 발현되는 형질전환동물을 개발하여 모델시스템으로 활용한다. 연구방법으로는 첫째, 인체 IL-10 유전자를 생쥐의 유선 상피세포에 도입하여 in vitro에서 발현시스템을 확립한다. 둘째, IL-10 발현벡터를 형질전환생쥐의 유선상피세포에서 발현시킨다.

형질전환동물 생산기법은 in vivo에서 유전자의 기능을 조사할 수 있을 뿐만 아니라 인체질환 모델동물의 생산을 통한 질병의 원인규명 및 치료제 개발에 기여할 수 있는 방법으로써 주목을 받고 있다. 형질전환동물의 제작법은 외래유전자를 수정란의 전핵속에 미세주입하는 방법과 embryonic stem (ES) 세포를 이용하는 방법이 있다. 두 가지 방법 모두 인체질환 모델동물 개발에 중요한 역할을 하고 있으며, 전자는 도입유전자의 과발현에 의한 병태생리학적 변화를 살펴봄으로써 도입유

전자의 기능을 조사하는데 널리 사용되고 있고, 후자는 특정 유전자의 기능을 소실 시킴으로써 병태생리학적 변화를 살펴보는데 이용되고 있다. 현재까지 수많은 유용유전자를 이용하여 형질전환동물을 개발함으로써 그 유전자의 *in vivo*에서의 기능을 해석하고 유전자의 기능을 분자생물학적으로 해석하는데 큰 공헌을 하여 왔다.

또한 일반적으로 약리성 및 신기능성 식품의 개발에 대한 평가는 폐쇄군 (random bred stock)의 실험동물을 사용하므로 질환에 대한 특정효과를 검정하기가 어렵다. 특정질환을 자연발증적 또는 인위유발적으로 생성된 모델동물을 개발 육성하여 질환발생기전을 규명한다면 인체질환 치료를 위한 약제 및 질환자체를 대상으로 한 효과적이고 신속한 시험계를 개발할 수 있을 것이다. 일반 실험동물에 의한 검사성적과 임상결과 간의 적용 또는 상관성의 검토를 위해서는 시간적, 경제적, 기술적 부담이 많이 소요된다. 특정질환의 연구에 적절한 모델동물을 사용한다면 개발된 약리성 및 신기능성 식품개발의 신속하고 정확한 효능검색이 가능하며, 전 임상 단계에서부터 임상단계의 적용에도 시간적, 경제적 손실을 줄일 수 있다. 미국의 경우 BioSurface Technology사에서는 'Epicel'이란 상품명으로 피부조직 1 ft²를 15,000달러에 시판하고 있는데, 1992년에는 이 Epicel만으로 770만 달러의 판매고를 달성하였다. Advanced Tissue Science사는 'Derma fraft-TC'를 개발하여 미국 특허를 받았고, Organogenesis사는 1989년에 Western Pennsylvania병원의 Burn센터에서 시작된 임상시술을 기반으로 피부의학연구의 *in vitro*모델로서 피부조직의 다양한 testing kits를 제공하고 있다. 그밖에 basement막을 포함하는 피부대체물을 개발한 Life Cell사는 FDA승인하에 'AlloDerm'을 1 ft²에 10,000 달러로 시판하여 미국 Burn센터 화상환자의 이식시술 및 성형외과에서의 만성피부궤양 환자의 치료에도 이용하고 있다. 일본의 자생당 제품연구소에서도 인공피부개발에 관한 연구가 진행되고 있으며, Kirin맥주·Mitsubishi Kasei·Cell Genesys사와 계약을 맺고 피부대체물 및 간조직·골수 등의 연구개발에 응용하고 있으며, Toho Pharmaceutical사는 일본에서의 'Epicel'시장을 마련하였다. 현재 국내에서는 몇 군데의 연구소 및 학계에서 각기 기초연구를 진행하고 있으나, 상업화까지는 더욱 많은 시험단계를 거쳐야 할 것이다.

앞으로 유용물질의 탐색, 약리성 및 신기능 식품의 개발, 유전자 치료 및 인체 장기이식동물의 개발을 위해서는 산학연의 다양한 분야에서 다각적인 질환모델동물의 개발과 이용이 필요하며, 이에 따른 대량 생산체제도 구축되어야 한다. 한편, 질환모델동물의 생산은 부가가치가 높고 국내에는 생산, 유지, 개발기술을 발전시켜 기업체에 이전함으로써 WTO의 높은 파고를 막을 수 있으리라 사료된다.

제 3 절: 범위

연구범위는 아래와 같다.

1. IL-10의 면역 지연반응에대한 효과 검색
2. mouse IL-10을 피부에서 발현하기위한 벡터 제조 및 이의 검증
3. mouse IL-10을 피부에서 발현하는 형질전환 생쥐의 제조
4. IL-10 현질전환 동물을 이용한 인체 피부질환 모델의 확립
5. 사람 interleukin-10 유전자의 screening 및 유전자 구조 분석
6. 형질전환생쥐의 유선에서 인체 IL-10 조직특이적 발현

제 2 장: 국내외 기술개발 현황

제 1 절: 국외 기술 개발 현황

1. IL-10 형질전환 생쥐

가. IL-10이 과발현된 형질 전환 생쥐

IL-10을 발현하는 transgenic mouse로서 hIL-2 promoter를 이용하여 activation 된 T cell에서만 IL-10이 특이적으로 발현되는 생쥐가 제조되었다 (Hagenbaugh et al., 1997; Pauza et al., 1999). 이 중 Hagenbaugh 등의 연구 결과에 따르면 IL-10 transgenic mouse는 stimulus-dependent한 형태로 면역 반응의 변화를 보였으며, Pauza 등은 이들 autoimmune diabetes 모델에서, T-cell로부터 IL-10 생산은 autoimmune diabetes의 발병을 지연시킴을 보였다. 또한 중앙면역학적 측면에서, IL-10 형질 전환 동물에서 폐암 조직의 성장에 대한 IL-10의 효과를 조사해본 결과 폐암 세포들의 성장은 IL-10 형질 전환 동물에서 훨씬 더 촉진되었음이 관찰되었는데, 이는 T cell에서 생산된 IL-10이 체내에서 항암 면역 작용을 저하시킨 것으로 시사되었다 (Sharma et al., 1999). 현재까지 피부각질세포에서 IL-10을 발현시킨 실험동물에 대한 보고는 전무하며, 더욱이 피부질환과의 연관성에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

나. Ecdysone-inducible regulatable expression system을 이용한 형질전환 생쥐

Ecdysone-inducible mammalian expression system은 현재 이용할 수 있는 과발현 system중에서 가장 엄격한 조절기전을 가진 system중의 하나이다. 이 system은 1996년 University of California at San Diego의 Dr. Ronald M. Evans에 의하여 mammalian cell과 형질전환동물의 생성에 이용하기 시작한 이래 많은 연구자들에 의하여 이용되고 있는 system이다 (No et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 3346-3351, 1996). 그러나 현재까지의 보고에 의하면 E. coli β -galactosidase를 과발현시켜 이들의 발현 양상을 관찰한 것과 함께 일반적인 유전자들의 과발현 사례는 보고가 되고 있으나, 생체의 면역체계에 관여하는 cytokine를 발현시킨 형질전환동물의 생산에 대한 연구보고는 없는 듯하다. 이 system의 문제점으로는 시판되는 ecdysone의 가격이 대단히 비싼 점에 있으나, 그 유전자의 발현을 엄격히 조절할 수 있는 장점이 있어, 본 연구실에서 피부조직에 특이적인 promoter의 영향하에서의 발현은 생쥐에 대단히 치명적인 유전자조작의 경우에는 상대적으로 유리한 점이라 사료된다.

다. IL-10에 의한 면역조절 반응의 조절

최근 보고에 의하면 IL-10을 T-cell에서 생산하는 형질 전환 동물에서 IL-10은 autoimmune diabetes의 발병을 억제하는 효과를 보였다 (Pauza et al., 1999). 또한 인체의 폐암 결절은 정상 폐의 결절 보다 훨씬 많은 양의 IL-10을 생산하는 것이 보고되었다. IL-10 형질 전환 동물에서 폐암 조직의 성장에 대한 IL-10의 효과를 조사해본 결과 폐암 세포들의 성장은 IL-10 형질 전환 동물에서 훨씬 더 촉진되었음이 관찰되었는데, 이는 T cell에서 생산된 IL-10이 체내에서 항암 면역 작용을 저하시킨 것으로 시사되었다 (Sharma et al., 1999). 이와 달리 Human melanoma 세포에 IL-10을 transfection 시킨 후 얻어진 세포들을 nude mice에 정맥 및 피하 주사로 주입하여 관찰한 실험 결과에 의하면, IL-10의 발현은 이들 melanoma 세포들의 성장 및 전이를 억제한 것으로 보고되었다. IL-10의 생산은 활성화된 macrophage에서 유도되는 angiogenic factor들의 생산을 억제함으로써 암의 성장이나 전이를 억제한 것으로 시사되었다 (Huang et al., 1996). 상기 기술한 바와같이 IL-10은 proinflammatory signal에 의한 면역 촉진 반응을 다양한 측면에서 조절 및 억제할 수 있다. 따라서 피부에 IL-10이 특이적으로 발현되는 형질전환동물을 이용함으로써 이 IL-10의 생체내에서의 상호 면역 작용을 조사함으로써 면역 억제 체계의 분자 생물학적 이해에 많은 도움을 줄 것이다. 또한 이는 궁극적으로 면역 질환 및 항암치료를 위한 의약품 개발에도 기여를 할 것이다.

라. IL-10에 의한 신호 전달 체계에 대한 보고

Interlukin-10 (IL-10)은 다양한 기능을 가진 cytokine으로써 monocytes/macrophage를 포함한 면역 반응에 관련된 많은 종류의 세포들에서 생산된다 (Adib-Conquy, 1999 and Asseman, 1999). IL-10에 의한 면역 억제 효과 (anti-inflammatory effect)는 macrophage로부터의 IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, TNF- α , granulocyte-macrophage colony stimulating factor, MHC class II molecule, B7, 그리고 intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)의 생산을 억제함으로써, 또한 IL-2와 interferon- γ 의 면역 작용의 억제를 통한 Th1 세포의 활성화도 (activity)를 감소 시킴으로써 이루어진다. IL-10 유전자가 homologous recombination 방법을 통해 제거된 mouse에서는 inflammatory bowel disease와 유사한 chronic enterocolitis가 유발되며 (Kuhn et al., 1993), Crohn's disease 환자에게 IL-10을 투여한 결과 임상적인 효과를 보았다는 보고도 있다 (van Deventer et al., 1997).

현재까지 알려진 cytokines의 target genes으로써 CIS/SOCS family가 expression cloning 방법으로 발견되었다 (Starr et al., 1997; Endo et al., 1997; Naka et al., 1997). 이들은 SH2 domain과 SOCS box를 가지며 일종의 Jak의 pseudosubstrate로써 작용하여 이의 역할을 저해하여 궁극적으로 cytokine에 의한

signal을 억제하는 것으로 이는 일종의 feedback 기작이 존재함을 밝힌다. IL-10도 위의 작용들을 통해 그 특정 신호를 전달하는 것으로 밝혀졌으며, cytokine들에 의해 활성화되는 단백질들 (STAT)은 서로 중복되는 것들이 있으나, 어떤 기작을 통해 IL-10이 interferon의 작용을 저해하는지는 정확히 알려져 있지 않다.

마. IL-10에 의한 면역 억제 반응에 대한 보고

IL-10의 면역작용으로 최초로 보고된 바에 의하면 IL-10은 helper T cell의 Th2 clone에서 분비된 cytokine으로써, Th1 clone에서 생산되는 cytokine의 생성을 억제하는 것으로 알려졌다 (Fiorentino et al., 1989). 이 후, IL-10은 면역 반응에 관여하는 다양한 종류의 세포들에서 여러 종류의 cytokine들의 생성을 억제함이 보고되었고, 이들 연구로부터 IL-10을 다른 cytokine들과 구분하여, 면역 반응을 억제하는 cytokine으로 규정하게 되었다. IL-10이 다양한 system에서 면역 억제 반응을 유도한다는 보고들에는 다음의 것들이 있다.

(1) LPS에 의해 유도된 proinflammatory signalling에는 $p56^{lyn}$ 이 관여하며, LPS는 Ras도 활성화시켜 mitogen-activated kinase pathway도 유도함이 보고되었다. IL-10은 $p56^{lyn}$ 의 역할을 감소시켜, Ras 활성화를 비롯한 이 후의 연차적인 모든 현상들을 억제함이 알려졌다 (Geng et al., 1994).

(2) LPS는 I κ B kinase (IKK)의 역할을 증가시켜 NF- κ B signaling pathway를 activation 시켜, proinflammatory cytokine의 발현을 촉진한다. IL-10을 전처리 한 후 LPS를 처리하면 IKK의 작용을 억제하여, NF- κ B의 핵으로의 이동이 저해되어, 궁극적인 proinflammatory cytokines (ex: IL-2, IL-8, and IL-12 etc)와 ICAM-1 등의 발현이 저해된다 (Riley et al., 1999).

(3) intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)은 다양한 종류의 세포들에서 소량이 생산되며, LPS나 IFN- γ 에 의해 그 발현이 유도되어, 세포간의 흡착을 향상시켜, 면역 반응을 도와주는 역할을 한다. Song et al. 의 보고에 의하면 IL-10은 NF- κ B를 포함하는 조절 기작을 통해 IFN- γ 에 의한 ICAM-1 유전자의 발현을 억제하여, 면역 반응을 저해하는 요인이 된다 (Song et al., 1997).

(4) IL-10을 T-cell에서 생산하는 형질 전환 동물에서 IL-10은 autoimmune diabetes의 발병을 억제하는 효과를 보였다 (Pauza et al., 1999).

(5) 인체의 폐암 결절은 정상 폐의 결절 보다 훨씬 많은 양의 IL-10을 생산하는 것이 보고되었다. IL-10 형질 전환 동물에서 폐암 조직의 성장에 대한 IL-10의 효과

를 조사해본 결과 폐암 세포들의 성장은 IL-10 형질 전환 동물에서 훨씬 더 촉진되었음이 관찰되었는데, 이는 T cell에서 생산된 IL-10이 체내에서 항암 면역 작용을 저하시킨 것으로 시사되었다 (Sharma et al., 1999).

(6) human melanoma 세포에 IL-10을 transfection 시킨 후 얻어진 세포들을 nude mice에 정맥 및 피하 주사로 주입하여 관찰한 실험 결과에 의하면, IL-10의 발현은 이들 melanoma 세포들의 성장 및 전이를 억제한 것으로 보고되었다. IL-10의 생산은 활성화된 macrophage에서 유도되는 angiogenic factor들의 생산을 억제함으로써 궁극적인 암의 성장이나 전이를 억제한 것으로 시사되었다 (Huang et al., 1996).

위에서 나열했듯이 IL-10은 proinflammatory signal에 의한 면역 촉진 반응을 다양한 측면에서 조절 및 억제한다. 이러한 작용은 IL-10 신호전달의 궁극적인 target gene의 발현을 통해 이루어질 것이며, 이와 관련하여 IL-10의 target gene으로 밝혀진 SOCS-1, -2 와 -3의 각 domain 들이 signaling에 미치는 영향 규명은 면역 억제 체계의 분자 생물학적 이해에 많은 도움을 줄 것이다. 또한 이는 궁극적으로 면역 질환 및 항암치료를 위한 의약품 개발에도 기여를 할 것이다.

제 2 절: 국내 기술 개발 현황

1. Regulatable-expression system을 이용한 형질 전환 생쥐의 제조

현재 국내에서 regulatable expression system을 이용해 형질 전환 동물에서 유전자 발현을 인위적으로 조절하는 기술에 대한 관심이 고조되고 있는 실정이다. 생명과학연구소의 이태훈 박사는 peroxiredoxin을 tetracycline responsible element를 이용한 system (tTA system)으로 과발현한 형질전환 생쥐의 제조를 실시하고 있으며, 포항공과대학교 생명과학과 서판길, 류성호교수팀에서도 tTA system을 이용하여 phospholipase C를 과발현시키는 형질전환 생쥐의 생산에 힘을 기울이고 있다. 그러나 이들 tTA system의 경우 ecdysone inducible system에 비하여 엄격한 조절을 받지 않는 경우가 많은 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구실에서 시행한 실험 결과 적은 양의 단백질만으로도 생체에 치명적인 효과를 보이는 경우 tTA system의 사용이 제한적일 수 밖에 없다. 이와 달리 ecdysone에 의해 발현이 조절되는 system은 소량의 발현으로도 치명적인 영향을 줄 수 있는 유전자의 발현에 적합하다고 사료되고 이에 본 연구의 목적에 부합하다고 사료된다.

현재까지 피부에서 IL-10을 과발현하는 생쥐에 대한 보고는 전무하다. 본 연구진은 keratin promoter를 이용하여 피부에서 IL-10 및 IL-4를 발현하는 형질 전환 생

취를 생산하였으나, 비록 발현은 확인되어, skin graft시 rejection response가 대조군에 비해 2배 지연된 효과는 보였으나, 그 발현되는 정도는 그다지 높지 않았다. 또한 IL-10이 강하게 발현된 생쥐는 태어나기 전 사산되는 것으로 나타났다. 그리고, IL-4 과발현 형질전환 생쥐도 같은 양상을 보였으며, 이들 이유로 인해 세계적으로 현재까지 IL-10, IL-4 가 피부에 특이적으로 과발현된 형질전환 생쥐에 대한 보고가 없는 듯 하다. 이는 피부에서의 IL-10 의 지속적인 과발현은 생쥐의 발생에 해로운 영향을 줄 수 있음을 시사한다. IL-10과 IL-4가 피부에서 과발현된 생쥐 생산을 위해 본 연구진은 regulatable-expression system인 Ecdysone-inducible gene expression system을 본 연구 과제에 적용하였다.

2. IL-10-에 의한 신호 전달 체계

현재 국내에서는 자가 면역 질환에서의 JAK/STAT 신호 전달 체계에 대한 연구가 진행중이다. 여기에서는 cytokine처리시 STAT1 과 STAT3의 활성화 특성을 분석하고, 이에 대한 감상선 호르몬의 효과를 검색하며 이 에 의한 SOCS-1, -2, 그리고 -3 의 조절을 고찰하여 궁극적으로 cytokine에 의한 STAT 활성화 과정에서 감상선자극 호르몬의 조절작용을 분석한다. 이 실험 결과를 통하여 인체에서 자가 면역 질환 치료제에 의한 JAK/STAT 활성화 조절 기작을 규명할수 있으리라 생각된다.

본 연구 과제에서는 cytokine의 신호 전달 체계의 negative regulator이고 또한 IL-10의 처리시 발현이 유도되는 SOCS-3를 포함한 SOCS 유전자들을 호주의 Dr. Douglas Hilton으로부터 제공받아 이들의 분자 생물학적 및 면역학적 기능을 고찰하고, 나아가 이와 다른 세포내 signalling pathway와의 상호 관계 규명을 통해, IL-10 신호 전달 체계에 대한 이해를 증진시켜 궁극적으로 면역 질환 치료제 및 항암 물질 개발에 기여한다.

제 3 장: 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절: mIL-10을 피부에서 과발현 하는 형질전환 생쥐 제조

1. 이론적, 실험적 접근 방법

피부 특이적 유전자 발현을 위한 human keratin-14 (hk14) promoter 와 hk14 poly A signal을 포함하는 vector인 phk14은 미국 Chicago 대학의 Dr. Elaine Fuchs에 의해 제작되어 검증되었으며 (Gat et al., 1998), 본 연구진은 ATCC로부터 구입한 mouse IL-10 cDNA를 유전자 재조합 방법으로 phk14 vector에 cloning 하였다. 또한 사용한 생쥐는 BDF1이고, 가톨릭 대학교 실험동물실에서 생쥐의 수정란에 expression cassette DNA를 주입하여 궁극적인 형질전환 동물을 생산 하는 것으로 하였다.

2. 연구 내용 및 결과

가. mouse IL-10 expression vector construction 및 *in vitro* 세포 배양 단계에서의 mIL-10 발현 검증

ATCC로부터 구입한 mouse IL-10 cDNA를 Sac I 으로 절단하여 이를 pSP73 vector 의 Sac I 위치에 cloning 하였다. 이로부터 mIL-10 cDNA를 포함하는 569 bp Bgl II/Bam HI fragment를 분리해서 phk14 vector의 Bam HI 위치에 cloning 하여, 최종 construct인 phk14-mIL-10을 제조하였다 (그림 1). 이렇게 제조된 vector의 mouse cell에서의 적절한 발현 여부를 확인 하고자 NIH3T3 cell에 Superfectin (QIAGEN Inc.)을 이용해 transfection 한 후 48 시간 이후에 Trizol (Gibco BRL)을 이용하여 total RNA를 분리하고 Northern blot hybridization을 통해 mIL-10의 발현여부를 확인 하였다. 그림 2에서 보듯이 phk14-mIL-10을 transfection 시킨 세포에서는 mIL-10의 과 발현이 나타났다. 또한, phk14-mIL-4를 transfection한 세포에서도 예상했던 대로 mIL-4의 과발현이 나타났다. 이로써, phk14-mIL-10 vector는 *in vitro* 단계에서 mIL-10을 적절하게 발현함이 증명되었다.

나. 생쥐 수정란으로의 mIL-10 발현 cassette 주입

phk14-IL-10을 Sal 1/Kpn 1으로 절단한 후 hk14 promoter-mIL-10-hk14 poly A signal을 포함하는 약 4 kb의 DNA절편을 분리 및 정제한 후 TE에서 dialysis하여 최종 농도가 4 ng/ μ l가 되게 하였다. 그리고, 이를 수정된 one-cell embryo의 전핵에 주입하였다.

다. mIL-10을 피부에서 과발현하는 형질 전환 생쥐의 생산

One-cell embryo의 전핵에 mIL-10 발현 cassette를 주입한 후 M16 배양액에서 24 시간 배양한 후 two-cell로 발달한 수정란을 가임신된 대리모에 이식하였다. 이식후 태어난 산자의 꼬리를 10-15일 경에 절단하여 genomic DNA를 분리후 PCR을 통해 형질전환 동물을 선별하였다. PCR에 사용된 primer는 아래와 같다.

forward primer 5'-ttccagtgggatctgtgtccac-3'

reverse primer 5'-ctctgctaaccatgttcatgcc-3'

이렇게 선별된 생쥐들은 mating을 통해 번식시켜 나갔다. 그리고, 이 들중 mIL-10을 피부에서 발현하는 생쥐들은 back skin에서 추출한 total RNA를 이용한 reverse-transcriptase PCR를 통해 선별되었는데, 두 종류의 founder mice가 선별되었다 (그림 3). 그러나, mIL-10-specific antibody를 이용한 immunohistochemistry 수행 결과 한 line의 생쥐 (male)의 피부 최외상층에서 IL-10의 발현이 검출되었다 (그림 4). 이들의 경우에서도 RNA level에서 발현량은 그다지 높지 않았으며, 태어나기전 사산되는 case가 빈번하였다. 또한 이들을 분석한 결과 피부 조직에서의 constitutive한 IL-10의 과발현은 생쥐의 development과정에 치명적인 영향을 끼쳐, embryonic lethality를 보임이 시사되었고, 따라서 태어난 산자들은 mIL-10의 발현이 그다지 높지 않은 것이라고 보여졌다. 이를 보완하고자 본 연구진은 regulatable-expression을 도입하여 적용하였다 (제 4 절).

라. mIL-10 형질전환생쥐의 수정란 동결보존

(1) 재료 및 실험방법

(가) 실험동물

형질전환 생쥐의 수정란 동결보존을 위해 사용된 동물은 C57BL/6 종과 DBA 종의 교잡종 BDF1을 이용해 만든 mIL-10 형질전환 생쥐를 사용하였다. 사용된 모든 동물은 대한실험동물센터에서 공급받았으며, SPF (Specific Pathogen Free) 환경하에서 사육되었고, 멸균된 음수와 사료를 자유급여하였다.

(나). 과배란 유기 및 수정란 회수

수정된 난자를 획득하기 위하여 4-7주령의 암컷 마우스에 PMSG (pregnant mare's serum gonadotropin, Sigma Co.) 를 한 마리 당 5 IU를 복강 내로 주사하여 난포를 성숙 시킨 후 48시간만에 hCG (human chorionic gonadotropin, Sigma Co.) 를 5 IU 주사하여 과배란을 유도하였다. 주사 후 정상적인 슛컷과 교배하여 20시간 정도 후에 암컷의 난관을 회수한 다음 M2 배양액에서 난관 팽대부로부터 난구세포 덩어리를 채취하여 이를 hyaluronidase solution을 처리하여 난구세포를 제거한 후, M2로 세척하여 수정란만을 회수하였다. 외래유전자 주입용 수정란의 경우, 수정란을 회수한 다음 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 두 개의 전핵이 확실히 보이는 것만을 실험에 사용하였다. 수정란의 취급 및 세척시에는 mouthpiece에 pipette을 부착하여 사용하였다.

(다). 수정란 배양

수정란 배양을 위한 배양액은 M16 (표 1) 을 사용하였고, 수정란의 회수 및 세척시에는 M2 (Table 1) 를 사용하였다. M16은 배양 전 최소 3시간 전에 35mm petri dish에 50 μ l의 drop을 만들어 mineral oil (Sigma Co, M8410) 을 도포한 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 전배양을 하였다. 수정란 배양시에는 세 번 세척후 각 drop 당 50개 이하의 수정란을 넣었으며 24시간 마다 배발달 상태를 확인하였다.

표 1. Composition of synthetic M2 and M16 medium

Component	Concentrate	
	M2	M16
NaCl	94.66 mM	94.66 mM
KCl	4.78 mM	4.78 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	1.71 mM	1.71 mM
KH ₂ PO ₄	1.19 mM	1.19 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1.19 mM	1.19 mM
NaHCO ₃	4.15 mM	4.15 mM
HEPES	20.85 mM	-
Sodium lactate	23.28 mM	23.28 mM
Sodium pyruvate	0.33 mM	0.33 mM
Glucose	5.56 mM	5.56 mM
BSA	4.00 g/L	4.00 g/L
Phenol red	0.01 g/L	0.01 g/L

(라). 외래유전자 주입

미세주입용 slide에 놓여진 수정란에 DNA가 첨가된 pipette을 이용하여 수정란의 용성전핵으로 pipette을 찢어넣어 유전자를 삽입하였다. DNA가 들어가면서 핵막이 팽창되는 것을 확인한 후 살아남은 수정란을 다시 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양후 3시간 정도 지난후 살아남은 수정란을 이용해 동결을 행하였다. 이때 사용된 유전자는 mL-10을 피부에 발현할 수 있도록 조작된 DNA단편으로서 EDTA가 포함된 tris buffer에 녹여 사용하였다.

(마). 수정란의 동결과 용해

수정란의 동결은 완만동결법을 이용하였으며, 기본 동결액은 PB1 solution (표

1) 을, 동결보호제는 1M DMSO (Dimethyl sulphoxide, Sigma, D2650, USA) 를 사용하였다. 생존한 수정란을 고른다음 0.5M DMSO가 포함된 PB1용액에서 2분간 평형하고 최종농도인 1M DMSO가 포함된 PB1용액에서 10분간 방치하였다. 최종동결보존액으로 평형된 수정란을 미리 동결보존액으로 충전하여 준비한 0.25ml의 plastic straw에 각각 20개씩 주입하여 sealing하였다. 실온에서 4℃까지 10분동안 온도를 서서히 내린후, 4℃에서 0℃까지 10분간 다시 내린다음 programmable freezer (CryoLogic, Australia) 를 사용하여 -70℃까지 동결하였다 (그림 5). 프로그램이 끝난 straw들은 즉시 액체질소 컨테이너에 옮겨 보관하였다.

(바). 용해후 배양 및 생존율 분석

동결 이틀후 수정란을 용해하였다. 용해는 동결의 역순으로 평형시키고 미리 준비해 둔 mineral oil에 도포하여 전배양한 M16 배양액 drop에 옮겨 세척후 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배반포기까지 배양하였다. 24시간마다 생존·발달율을 확인하였다.

(사). 형질전환 생쥐의 수정란 동결

형질전환 생쥐의 수정란은 4-7주령의 BDF1 (C57BL/6×DBA) 암컷을 PMSG와 hCG를 이용하여 과배란하여 형질전환 생쥐의 수컷과 교배를 시켰다. 20시간 후 암컷의 질전을 확인하여 난관으로부터 수정란을 회수하였으며, 수정란 동결방법은 재료 및 방법의 설명과 같은 방법으로 수행하였다. 이때 사용된 생쥐는 m-IL10를 발현하는 형질전환 생쥐로서 사육시 특정 증상이 보이지 않았으며 정상적인 생식능력을 가지고 있었다.

(아). 통계 분석

실험결과의 통계학적 분석은 Chi-square test를 실시하여 유의성을 검정하였다.

(2). 연구 내용 및 결과

(가). 외래유전자 주입후 배발달

BDF1 생쥐의 과배란시 평균 회수된 수정란은 20개정도였으며, 형질전환 생쥐에서 채취된 수정란의 경우도 별다른 유의차가 없었다. 외래유전자는 4ng/μl의 농도로 준비한 후 1세포기 수정란에 미세주입하였으며 주입후 살아남은 수정란의 배반포기까지의 배발달율은 표 2에서 보는 바와 같이 47.2%로 미세주입하지 않은 정상 수정란의 배반포기까지의 배발달율 57.1% 보다는 조금 낮았으나 유의차는 인정되지 않았다. 따라서 1세포기 수정란에 외래유전자를 미세주입하여도 수정란의 배발달율에는 큰 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

표 2. *In vitro* development of DNA-injected embryos cultured for 3 days

	No. of injected embryos	2-cell (%)	4,8-cell (%)	morular (%)	blastocysts (%)
Injected embryos	125	87(69.6)	78(62.4)	66(52.8)	59(47.2)
Non-injected embryos	147	99(67.3)	97(66.7)	89(60.5)	84(57.1)

(나). 외래유전자가 주입된 수정란 동결 및 융해

외래 유전자를 1세포기배에 주입한 후, 완만동결법에 의해 수정란을 이틀간 동결 보존한 후 동결의 역순으로 평형시키고 융해하여 배반포기까지의 배발달율을 관찰하였다. 외래유전자를 주입하지않은 1세포기 수정란을 대조군으로 사용하였다. 외래 유전자를 주입한 1세포기배를 동결·융해한 후 배반포기까지의 배발달율은 36.9%로 대조군 32.3%보다 높은 배발달율을 보였으나 유의차는 인정되지 않았다 (표 3). 이와 같은 결과로 외래유전자를 주입한 후 동결·융해하여도 배반포기까지의 배발달에는 영향을 미치지 않는다는 사실을 알 수 있었다.

표 3. *In vitro* development of DNA-injected 1 cell mouse embryos after freezing and thawing

	No. of freezing embryos	No. of survival embryos	No. of 2cell stage embryos	No. of blastocysts (%)
Injected embryos	84	57(67.9)	54(64.3)	31(36.9)
Non-injected embryos	127	107(84.3)	82(64.5)	41(32.3)

(다). 형질전환 생쥐의 수정란 동결 및 용해

형질전환 생쥐의 1세포기 수정란을 채란하여 동결·용해하여 배반포기까지의 발달율은 24.7%로 형질전환 생쥐가 아닌 대조군 수정란의 배반포기까지의 발달율 22.0%와는 유의차가 인정되지 않았다 (표 4). 이와같은 결과로 형질전환 생쥐의 수정란 동결·용해 후 배반포기까지의 배발달율이 일반 생쥐의 수정란 동결·용해 후 배반포기까지의 배발달율과 비슷하며, 이는 발생공학 기법에 의해 생산된 형질전환 동물도 수정·용해 후 정상적으로 배반포기까지 배발달이 진행된다는 사실을 확인할 수 있었다.

표 4. *In vitro* development of transgenic mouse embryos after freezing and thawing

	No. of freezing embryos	No. of survival embryos	No. of 2cell stage embryos	No. of blastocyst (%)
Transgenic mouse	239	149(62.3)	90(37.7)	59(24.7)
Control	82	34(41.5)	25(30.5)	18(22.0)

이와 같은 결과를 요약한다면, 첫째, 생쥐의 1세포기 수정란에 외래 유전자를 주입하여도 배반포기까지의 배발달율에는 큰 영향을 미치지 않았으며 둘째, 1세포기 배에 외래 유전자를 주입한 후, 동결·융해하여도 배반포기까지 배발달율 또한 외래 유전자를 주입하지 않은 1세포기 수정란의 동결·융해후 배반포기 발달율과 비슷하다는 결과를 얻었다. 셋째로 발생공학적인 기법에 의해 생산된 형질전환 생쥐의 1세포기 배의 동결·융해후 배반포기까지의 배발달율 또한 일반 생쥐의 1세포기 배의 동결·융해 후 배반포기까지의 배발달율과 비슷하다는 사실을 알 수 있었다.

따라서, 본 연구를 통하여 유전적 변이 방지와 최소한의 제한된 사육공간에서 보다 많은 발생공학적인 기법에 의해 생산된 형질전환 생쥐 계통 및 계대가 어려운 특수한 생쥐 계통 등의 효율적 관리를 위하여 완만동결에 의한 이들 수정란의 동결 보존이 가능하다는 사실을 알 수 있었다.

마. 형질전환생쥐 피부의 각질조직에서 mIL-10 단백질의 발현이 피부이식에 미치는 영향 고찰

형질 전환 생쥐에서 피부 특이적인 mIL-10의 발현이 skin transplantation 후 rejection response에 미치는 영향을 조사하기 위해 allograft를 수행한 결과, immunohistochemistry방법으로 mIL-10 단백질이 검출되었던 형질전환생쥐에서 graft rejection response가 대조군 (14 일)에 비해 28일 까지 생존하는 것을 보였다 (그림 6). 이 line의 생쥐를 유지하고자 female mice와 교배를 시켜 그의 산자들을 얻었다.

제 2 절: IL-10의 면역 지연반응에 대한 효과

1. 이론적, 실험적 접근 방법

생체내 항원 전달능력을 갖는 피부에 상주하는 랑그한스 세포와 lymph node에 존재하는 dendritic cell에 대한 IL-10의 직접적인 영향을 관찰하였으며, 피부 이식을 위한 모델 동물의 개발을 위하여 이중간의 피부 이식시 시간대에 따르는 여러 cytokine의 발현 변화를 total RNA를 분리하여 각종 cytokine-specific primer들을 사용하여 RT-PCR을 통해 수행하였다.

2. 연구 내용 및 결과

가. 랑그한스 세포의 분리 및 IL-10 첨가에 따른 T lymphocyte 증식 변화

Balb/C 생쥐로부터 얻은 피부 조직으로부터 상피조직을 분리한 후 분리된 조직으로부터 anti-Ia antibody, anti-mouse IgG microbeads, 그리고 MACS magnetic column (LS)와 를 이용해 랑그한스 세포를 분리한 후 GM-CSF (5 ng/ml) 과 TNF- α (2 ng/ml) 가 포함된 complete RPMI media에서 배양하였다. 이렇게 분리된 랑그한스 세포의 배양액에 mIL-10을 첨가한 후 Balb/c lymph node에서 분리한 T lymphocyte와 함께 96 well plate에서 배양한 후, cell harvest 18 시간 전에 ^3H -thymidine을 넣어 scintillation counter를 이용해 T lymphocyte의 증식을 관찰하였다. 이 결과 랑그한스세포에 의한 T 림프구의 증식은 IL-10의 양에 의존적인 양상으로 억제되었다 (그림 7). 또한 allogenic cell stimulation에 의한 T 림프구의 증식도 IL-10의 양에 의존적인 양상으로 억제되었다 (그림 8).

나. 이종간 피부 이식후 cytokine 유전자의 발현 변화 비교

생쥐에 이종 및 동종간의 피부이식 시술 후 day1, 8, 그리고 15에 total RNA를 분리 후 그림 8에 명시된 cytokine들의 primer를 이용해 RT-PCR을 수행한 후 각각을 정량하였다.

다. 면역학적 관용 혹은 탈감작후 lymph node의 dendritic cell의 cytokine 유전자의 발현 변화 비교

본 실험은 접촉 피부염이 야기되고 또한 억제되는 과정에서 dendritic cell이 발현하는 특정 cytokine 유전자의 발현 관찰을 통해 dendritic cell의 역할을 알아 보기 위해 수행되었다. Cytokine의 발현 정도를 알아보기 이전에 in vivo에서 접촉 피부염이 야기되는지를 알아보고, 이를 확인한 후 억제반응이 일어난 실험군의 lymph node에서 dendritic cell을 분리하였다. TNCB로 감작된 생쥐에게 감작 7일 전, 3시간 후 그리고 5 일 후에 TNBSO₃를 꼬리 정맥을 통하여 주입하였을 때 면역 억제반응이 일어났으며, 시간에 따른 cytokine의 발현 변화를 알아보기 위해 1일, 3일, 5일이 경과한 후 lymph node에서 dendritic cell을 분리하여 RT-PCR을 수행하였다. 본 실험을 통하여 조사한 cytokine은 IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p35, IL-12p40, TNF- α , 그리고 GM-CSF 이다. 그림 9에서 보듯 IL-1 α 는 감작 후 5일 째에 발현이 두드러지게 증가하였다. IL-1 β 는 전반적으로 발현량이 증가하였다. IL-10은 감작후 5일째에 발현량이 다소 증가하였으나, 5일째는 감소하였다. IL-12p35는 감작후 3일째에 발현이 증가해서 5일째까지 발현 정도가 유지되었다.

IL-12p40는 감염후 5일째에 발현량이 현저하게 증가하였고, TNF- α 는 모든 실험군에서 전체적으로 고르게 발현되었다. IL-6와 GM-CSF는 모든 실험군에서 발현되지 않았다.

제 3 절. 인체 인터루킨-10 유전자의 동물유선상피세포 시스템에서의 발현

1. 이론적, 실험적 접근 방법

2. 연구 내용 및 결과

가. IL-10 유전자의 cloning

정상인의 혈액세포에서 chromosomal DNA를 분리정제하여 PCR 반응으로 IL-10 엑손 380 bp를 증폭하였다. 사용한 primer 는 아래와 같다.

5'-TGCAGA AGTTCATGTTCA-3'

5'-TCTCGAAGCATGTTAGGC-3'

그리고, 인체의 genomic library를 위의 탐침을 이용하여 screening 하였다. Positive plaque에서 phage를 정제하여 pBluescript SK 벡터에 클로닝 한 후 (p1110 으로 명명) 제한효소를 이용하여 유전자지도를 작성하였다. 정상인의 혈액 세포에서 chromosomal DNA를 정제한 후, PCR 방법으로 IL-10 유전자의 엑손부분을 증폭해 내었다. 이를 탐침으로 이용하여 파지 DNA library를 screening 하여 IL-10 유전자를 찾아 내었다. 엑손/인트론 경계부위를 primer를 이용하여 sequencing으로 결정하였다. 클로닝된 인체 IL-10 유전자의 intron 의 크기를 PCR 방법으로 결정하였으며 그 길이는 아래와 같다.

Intron I : 950 bp, Intron II : 450 bp, Intron III : 600 bp, Intron IV : 1200 bp

IL-10 유전자는 6 kb 의 5'-flanking sequence 와 12 kb의 structural region 으로 구성되어 있었다. 12 kb 의 DNA fragment 는 부분적인 염기서열 결정 결과, IL-10 유전자의 모든 엑손과 인트론을 가진 완전한 유전자임이 판명되었다.

나. 발현벡터의 제조

β -casein promoter 10 kb 에 IL-10 유전자 12 kb를 연결하였다. 이를 위하여 연결부위에 SacII adaptor를 삽입하였으며 adaptor 의 sequence는 5'-GGCATGCCGC-3'

이다. 발현벡터의 길이는 총 22 kb로서 in vitro 동물세포와 생쥐수정란의 미세주입에 직접 이용될 수 있다. IL-10 유전자를 구조분석한 후, 12 kb를 β -casein promoter에 연결하여 발현벡터를 제조하였다. Promoter 의 길이는 약 10 kb로서 생쥐의 유선 상피세포에서 외래유전자를 조직특이적으로 발현시킬 수 있는 충분한 길이이다.

SphI site에 Translation initiation codon 인 ATG 가 존재하였으며 이를 이용하여 ATG 가 promoter 바로 아래에 위치하도록 벡터를 제조하였다. 생쥐의 유선상피세포에서 인체의 IL-10을 발현시키기 위하여 젖소의 베타-카제인 프리모터 10 kb 에 IL-10 유전자 12 kb를 연결하였다. 인체 IL-10 유전자의 genomic sequence 는 본 연구에서 처음으로 클로닝하였으며, 제한효소지도 및 엑손/인트론의 구조를 밝혔다. IL-10 발현 cassette 는 약 22 kb에 이르며 벡터로부터 SacI 과 SalI 으로 처리하여 분리정제하였다 (그림 10).

다. 생쥐의 유선 상피세포에서 인체 IL-10 의 발현

생쥐 유선 상피세포의 배양에는 생쥐의 임신시기에서 유래한 세포주인 HC11 세포를 사용하였다. HC11 세포는 포유동물의 유선 상피세포에 대한 생리적 유사 환경을 제공한다. HC11 세포에 IL-10 발현벡터의 도입은 Lipofectin 방법을 이용하였고, 이로부터 IL-10 vector를 가진 세포만을 neomycin을 이용하여 수 백개 선별하였다.

포유동물의 유선 상피세포는 성장, 분화, 퇴화 (Apoptosis) 과정을 되풀이한다. Lactation 시기에 해당하는 분화상태를 유도하기 위하여 Prolactin 호르몬을 처리하였다. 분화된 HC11 세포에서 total RNA를 정제하여 RT-PCR을 수행하였다. IL-10 에 특이한 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하였을 때, IL-10 RNA가 정상적인 크기로 합성됨을 확인하였다. HC11 세포의 배양액을 농축하여 SDS-PAGE를 수행하고 western blot 분석으로 단백질의 발현을 검증하였다. 한편, IL-10 의 발현량은 ELISA 방법으로 결정한다.

라. 형질전환 생쥐의 생산 및 유선상피 세포에서 IL-10 의 발현

미세주입된 수정란을 대리모에 이식하여 산자를 얻었다. 태어난 산자의 귀조직 또는 발톱조직에서 DNA를 정제하여 PCR을 수행하였다. 사용한 프라이머는 아래와 같이 합성하여 94 °C, 30 초; 55 °C, 1 분; 72 °C, 30 초의 조건으로 30 회 반복하여 반응하였다.

프라이머 1: 5'-TGG CAA CCC ACT TCA GTA

프라이머 2: 5'-ATA GCC CCT AGA GTT CTA

현재까지 총 6 마리의 형질전환생쥐를 개발하였으며 암컷이 2 마리, 수컷이 4 마리로 판명되었다. 이들의 계대번식을 위하여 형질전환생쥐를 보통생쥐와 교배하여 F1 또는 F2 세대를 확보하였다. 이 중에서 형질전환생쥐 3 계통에서 수유 10 일 쯤에 유선조직을 포함한 여러 장기 조직을 채취하였다.

형질전환생쥐에서 인체 IL-10의 조직 특이적 발현을 조사하기 위하여 각각의 조직에서 추출한 RNA 에 대하여 Northern blot 분석을 수행하였다. Probe 는 베타-카제인의 엑손 1과 2, IL-10의 엑손 2 에 이르는 발현벡터에 특이한 부위를 PCR로 증폭하여 이용하였다. 형질전환생쥐 계통 28 에 대하여 Northern blot 분석을 수행한 결과, 인체의 IL-10 은 오로지 생쥐의 유선조직에서만 발현되었다 (그림 11).

마. 형질전환생쥐의 유즙에서 IL-10 단백질의 발현

수유기에 있는 생쥐의 유즙을 채취하여 IL-10 단백질의 발현양을 검증하였다. Western 및 ELISA 분석을 시행하여, 6 계통 모두에서 IL-10 단백질의 발현을 확인하였고 최대 발현양은 1,620 ug/ml 에 이르렀다 (그림 11-14, 표 5).

표 5. Profiles of transgenic mice harboring human IL-10 gene

Line	Sexa	Copy no.	Protein (g/ml)
2(1)	M	1	74
6(5)	F	2	408
9(6)	F	21	1020
17(2)	M	4	270
22(3)	M	2	1.4
24(7)	F	10	198
26(8)	F	1	1620
35(25)	F	2	56

Sex of founder animals are: F, female; M, male.

또한 형질 전환 생쥐의 유즙으로 분비된 IL-10의 생물학적 역가는 그림 11에서 보듯이 mouse peritoneal macrophages를 이용하여 검증되었다.

제 4 절: 피부이식조직에서 새로운 C1r 유전자 확립

1. 이론적, 실험적 접근 방법

생후 8-12주 사이의 Balb/C와 C3H/HeN 생쥐의 피부로 autograft 및 allograft를 수행후, 각각 1일, 8일, 그리고 15일 째에 이식된 피부들을 채취하여 total RNA를 분리한 후 differential display RT-PCR을 이용해 각 graft 수행시 그 발현량이 변하는 유전자를 탐색 규명하였다.

2. 연구 내용 및 결과

가. 피부이식시 발현량이 증가하는 mouse C1r 유전자의 cloning

Balb/C와 C3H/HeN 생쥐의 피부로 autograft 및 allograft를 수행후, 각각 RNA를 분리하여, dd-RT-PCR을 수행 후 band intensity의 차이를 보이는 18개의 cDNA를 별하여 이들을 재증폭한후 T-vector에 cloning 과 sequencing 과정을 거쳐 data base를 search 하였다. 선별된 18개의 partial sequence중 14개는 지금까지 Gene Bank에 등록되어있지 않은 sequence 였다. 그리고, 나머지 4개의 partial sequence는 차례로 human complement C1r mRNA, mouse cystatin C mRNA, murine mRNA for TIS7 protein, 그리고 mouse mRNA for alpha mannosidase II등의 유전자들과 동일하거나, 매우 높은 유사성을 나타냈다. 이 4종류의 유전자들의 피부이식의 결과 발현량의 변화를 확인 하고자 Northern blot analysis를 수행하였다. Human complement C1r mRNA와 큰 유사성을 가지는 것은 8일째의 allografted skin과 autografted skin 모두에서 발현량이 현저히 증가 했다 (그림 15-가). 그러나, 나머지 3개의 유전자들의 경우는 발현량의 변화를 확인하지 못했다.

Human complement C1r cDNA는 이미 사람의 경우에는 완전한 유전자가 밝혀졌지만, 아직까지 생쥐의 경우에는 밝혀지지 않았으므로, 본 연구 결과로 얻어진 mouse homologue of human C1r은 최초의 cloning이었다. C1r은 피부 이식의 결과 나타나는 거부반응에서 작용하는 여러 반응들중 하나인, 항원 항체 반응에 관련된 인자의 유전자로 사료된다. 여기서 cloning된 mouse C1r의 full length cDNA의 sequencing 결과, 이는 human C1r과 DNA sequence상에서는 85%의 유사성을, 그리고 amino acid 수준에서 일치하는 경우는 81% (573/707), 그리고 유사한 성질을 가지는 amino acid를 포함하는 경우는 89% (630/707) 의 유사성을 나타내었다 (그림 16). mouse C1r의 full length cDNA sequence는 GENBANK에 등록하였으며, 이의 accession number는 #AF148216 이다.

나. mouse Clr (mClr) 단백질에 대한 antibody 제조

mouse Clr cDNA를 GST-purification 방법을 통해 *E. coli*에서 expression 시킨 후 이를 정제하여 mClr을 인지하는 rabbit polyclonal antibody를 제조 및 부분 정제 하였다. 이 antibody를 이용하여, auto- 와 allo-grafted mouse skin 조직에서 mClr의 발현이 유도됨을 immunohistochemistry를 통해 검증하였으며 (그림 15-나), 현재 monoclonal antibody 제조중에 있다.

이 연구 결과는 *Journal of Investigative Dermatology*에 revised version 을 submit 하였다.

제 5 절: Regulatable-expression system을 이용한 mIL-10 형질전환 생쥐의 제조

1. 이론적, 실험적 접근 방법

Ecdysone-inducible expression system을 도입하여, keratin-14 promoter로부터 IL-10이 constitutive 하게 over-expression이 되어 야기되는, 즉 피부조직에서 IL-10의 과발현시 쥐의 발생과정중 나타날 수 있는 embryonic lethality를 포함하는 문제점의 해결을 위해 인위적으로 ecdysone (일명 Ponasterone A; Invirogen Inc.)을 주입시에만 피부 특이적으로 mIL-10의 과발현이 유도되는 형질전환 생쥐를 구축하고자 하였다.

2. 연구 내용 및 결과

가. Ecdysone-inducible mIL-10 expression vector의 제조

ecdysone-inducible expression system (Invitrogen Inc.)은 두 개의 서로 다른 plasmid DNA vector (pIND와 pVgRXR)을 필요로 한다. 본 연구진은 phk14-mIL-10으로부터 Bam HI/Bgl II digestion을 통해 mIL-10 ORF를 분리후 Bam HI으로 절단된 pIND vector에 cloning 하여, pIND-mIL-10을 제조하였다. pVgRXR은 CMV promoter로부터 ecdysone receptor가 발현되고, RSV LTR로부터 retinoic acid X receptor (RXR)이 발현되어 ecdysone 첨가시, 이들로 구성된 heterodimer가 pIND의 ecdysone-reponsive element에 결합하여 target gene의 발현을 유도하며, 본 연구

의 경우는 mIL-10의 과발현을 유도한다. 본 연구에서는 피부 특이적인 과발현을 유도하고자 RSV LTR을 huamn keratin-14 promoter로 교체하였다.

위 system의 mIL-10 발현을 위한 타당성을 검증하고자, *in vitro* cell culture 단계에서 NIH3T3 cell을 pIND-mIL-10과 pVgRXR로 cotransfection한 후 다음 날, split 시켜 한 실험군은 5 μ M의 Ponasterone A를 처리하고, 다른 한 군은 동일한 양의 Ponasterone A의 용매로 처리한 후 24시간 후에 total RNA를 추출하여 Northern blot hybridization을 실시하였다. 그림 17에서와 같이 Ponastarone A를 처리한 sample에서만 mIL-10의 과발현이 유도됨을 알 수 있다.

나. 형질전환 생쥐의 제조

pIND-mIL-10에서 promoter-mIL-10 cDNA-poly A signal을 포함하는 expression cassette를 분리하여 제 1 절에서 언급되었듯이 dialysis를 한 후 one cell embryo에 주입하였다. 이들이 two-cell stage가 된 후 대리모에 이식시켜 이로부터 나온 산자들을 tail biopsy PCR을 통해 형질전환 생쥐를 선별하였다 (그림 18). 현재까지 pIND-mIL-10을 가진 2마리의 산자가 생산되었다. 이들과 pVg + phK14-RXR cassette의 주입으로 제조된 형질전환 생쥐들간의 교배를 통하여 ecdysone-inducible expression system에 필요한 모든 유전자를 포함하는 생쥐를 생산하여, 이 들에서 Ponasterone A의 주입시 발현되는 mIL-10을 검증한다. pVg + phk14RXR의 expression cassette가 주입된 산자들이 현재 제조되는 중에 있는데, 본 과정의 총괄적 모식도는 그림 19와 같다. 이들 각각으로부터 제조되는 형질전환 생쥐들은 다시 이 들간의 교배를 통해 위의 두 가지 expression cassette를 모두 가지는 산자들을 선별한다.

제 6 절: SOCS의 역할에 대한 분자 생물학적 규명

1. 이론적, 실험적 접근 방법

IL-10은 그 특이적 receptor와 결합한 후 이로부터 시작되는 JAK-STAT pathway를 포함하는 signalling cascade를 거쳐 궁극적으로 그 세포의 유전자 발현에 영향을 준다. 세포내의 cytokine들에 의한 신호 전달 체계는 복잡한 그물망처럼 연결되어 있고, 이러한 관점에서 IL-10에 의해 발현이 유도되는 SOCS (Sppressor of Cytokine Siganlling) 유전자들의 역할에 대한 분자 생물학적 규명 및 고찰은 IL-10 signalling의 이해에 필수적이며, 곧 이와 연관된 다른 신호 전달 체계와의 상호 작용을 이해하기 위한 연구에 큰 도움이 될 것이다. mouse SOCS (1-7)는

CIS/JAB등의 알려진 cytokine signalling inhibitor들과 amino acid 차원에서 매우 높은 유사성을 가지며, SOCS-1 과 SOCS-3는 직접적으로 IL-6 또는 IFN- γ 의 signalling을 억제하는 효과를 가짐이 밝혀졌다. 본 연구진은 IL-10의 면역 억제 현상에 관련된 분자 생물학적 기작을 연구하고자 proinflammatory signal의 전달체인 NF-kB와 inflammatory cytokine signalling에 억제 효과가 있는 SOCS-1, -3와의 상호 관계를 연구하였다. 이 연구를 위해 mouse monocyte/macrophage cell line인 RAW264.7이 사용되었다.

2. 연구 내용 및 결과

가. mSOCS-1, -2, -3의 발현에 미치는 mIL-10의 영향

RAW264.7 세포에 mIL-10을 500, 1000 U/ml (Leinco Inc.)과 LPS (2 ng/ml)를 처리 후 6, 12시간 이후 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 한 결과 SOCS-1 과 SOCS-2는 그 발현이 없었으나, mSOCS-3는 mIL-10의 양에 비례하여 mRNA 양이 증가함을 나타내었다 (그림 19). 이를 검증하고자 Northern blot을 하였을때도 역시 같은 결과가 얻어졌으며 (그림 20), LPS 와 IL-10은 상호 synergistic하게 SOCS-3의 발현을 증가시켰다. 이와 유사한 결과는 Cassatella et al. (1999)에 의해 나타났으며, 이들은 human neutrophil에서는 STAT-independent한 기작으로 IL-10이 SOCS-3의 발현을 증가시킴을 보였다.

나. NF-kB의 활성화에 대한 mSOCS의 영향

LPS는 세포내 다양한 signalling cascade를 활성화시켜 궁극적인 proinflammatory response를 유도하는데, 그 중 대표적인 pathway가 NF-kB를 포함한다. IL-10의 처리는 NF-kB의 활성화를 억제함이 발표되었고 (Schottelius et al., 1999), 이에 본 연구진은 IL-10의 target gene중 하나로 알려진 SOCS-3의 NF-kB에 미치는 영향을 고찰하고자 RAW264.7 cell을 kB-Luc reporter plasmid, pCMV-p65, 그리고 여러 가지 양의 pEF1-FLAG/SOCS-1, /SOCS-2, 그리고 /SOCS-3로 cotransfection 시킨 후 36시간 후에 cell lysate를 얻어 luciferase activity를 측정하고, 이를 cell protein으로 normalization 하였다. 그림 21 에서 보듯 mSOCS-1과 mSOCS-3는 그 양에 의존적으로 NF-kB promoter를 매우 활성화 시켰다 (>10). mSOCS-2도 NF-kB를 활성화 함을 보였는데, 그 정도는 mSOCS-1 또는 mSOCS-3의 경우보다는 낮았다. 현재 본 연구진은 mSOCS의 각 domain 별로 deletion mutant를 제조하여 이들이 NF-kB 활성화에 미치는 영향에 대한 고찰을 수행하고 있다.

제 7 절: 자외선 조사로 유도되는 면역 억제반응에 관련하는 유전자 탐색

1. 이론적, 실험적 접근 방법

면역 억제 현상을 유발함으로써 피부암을 유발하는 것으로 알려진 자외선은 특히 항원에 대한 면역 반응을 억제하는 것으로 알려져 있다. 자외선에 의해 발현이 유도되는 유전자들을 알아내어 그들의 역할을 규명함으로써, 이 들과 IL-10에 의한 면역 억제 작용 기작을 비교할 수 있다. 또한 장기 이식시의 거부반응과 같은 특이 면역 반응의 억제 연구에도 자외선 조사로 유도되는 면역 억제 관련 유전자의 탐색은 중요한 역할을 할 것이다.

2. 연구 내용 및 결과

가. 자외선 조사후 면역 억제반응의 유도 및 이로부터 면역 세포 분리

8-12주령의 C₃H 웅성 생쥐에 20 kJ/m² 로 UVB를 조사하고, 3일후 3% TNCB 100 μ l 를 생쥐의 배부에 도포한 후 24시간 후 lymph node를 분리하였다. Lymph node에서 single cell을 mechanical aggregation 방법으로 분리한 후, Ficoll-Hypaque density centrifugation법으로 면역 세포들을 분리하였다.

나. 자외선 조사로 발현이 유도되는 유전자 탐색

면역억제반응이 유도된 생쥐와 면역반응만을 유도한 대조군 생쥐에서 분리한 면역세포에서 mRNA를 분리한 후 Clontech사의 PCR-Select kit를 이용하여 cDNA subtraction analysis를 수행하였다. 이 방법으로 탐색된 유전자들을 sequencing을 통해 규명하였으며, Northern blot hybridization을 통해 이 들을 검증하는 연구를 수행중이다.

제 4 장: 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

구분	연구목표	연구내용 및 기여도	달성도(%)
1차년도 ('97)	Interleukin-10의 면역 지연반응에 대한 효과 검색	· 랑그한스세포에 대한 IL-10의 효과 · Draining lymph node에 대한 IL-10의 효과	100
	외래유전자 주입용 1세포기 수정란의 확보	· 생쥐 1 마리당 15이상의 1세포기 수정란의 확보	100
	외래유전자가 주입된 수정란의 체외발달을 제고방안 연구	· 90% 이상으로 미세주입직후의 수정란 생존율 향상 · 80% 이상의 외래유전자 주입 수정란의 배반포기로의 발달을 향상	100
	외래유전자 도입에 영향을 주는 제반요인들에 대한 고찰	· 외래유전자주입에 적합한 조건확립	100
	생쥐 interleukin-10 유전자의 cloning	· PCR을 통한 IL-10 cDNA cloning 및 검증	100
	사람 interleukin-10 유전자의 클로닝	· 사람 interleukin-10 유전자 프로브의 제조 · 사람 유전자 library 의 screening	100
2차년도 ('98)	피부세포특이적 발현 promoter 확보	· human keratin-14 promoter (phK14) 확보	100
	피부조직에서 interleukin-10의 발현을 위한 vector 개발	· phK14 과 IL-10 유전자의 재조합 · 재조합 vector 검증	100
	외래유전자가 주입된 수정란의 판별	· 할구분리후의 수정란생존율 향상(70% 이상) · 외래유전자 검색법 확립	100
	질환모델동물 수정란 동결법 확립	· 동결 및 융해후의 수정란 생존율 향상(50%이상)	100
	형질전환생쥐에서 피부세포에 대한 기능	· 피부각질세포의 면역체계에 대한 영향 -면역지연반응 관찰 -T 림파구에 대한 영향 -배양전 피부각질세포의 특징 · 랑그한스세포의 기능 · Draining lymph node의 변화	100
	사람 interleukin-10 유전자의 구조 결정	· 제한효소 지도의 작성 · 엑손/인트론 구조 분석 · 사람 interleukin-10 유전자의 염기서열 결정	100

3차년도 ('99)	동물세포배양을 통한 발현 vector의 검증	·생쥐 상피세포주에서 vector의 발현 ·최적의 interleukin-10 발현vector의 선정	100
	피부질환모델 개발	·IL-10 형질전환 생쥐와 피부질환과의 관련성 연구	80
	피부질환모델 수정란의 banking	·질환모델 수정란의 동결보존 확립 ·동결보존된 질환모델 수정란의 이식 및 확인 (50%이상)	80
	피부질환모델생쥐의 상용화	·동결보존된 질환모델 수정란의 상용화 ·인체질환모델의 계통보존 및 상용화	80
	형질전환생쥐에서 인체 IL-10의 발현	·형질전환 생쥐 5 계통 이상 개발 ·형질전환생쥐에서 인체 IL-10 RNA 의 조직특이적 발현 ·형질전환생쥐의 유즙에서 인체 IL-10 단백질의 발현	100

제 5 장: 연구 개발결과와 활용계획

- 지금까지의 연구 결과로 피부 특이적 mIL-10 발현을 위한 형질전환동물을 제조하였다. 피부조직에서 mIL-10의 발현은 RT-PCR 과 immunohistochemistry를 통해 알 수 있으나, 그 발현 정도는 그 다지 높지 않았고, 또한 mIL-10의 지속적인 발현이 생쥐의 발생 과정에 미칠 수 있는 영향을 고려하여, ecdysone-inducible system을 이용하여 mIL-10을 피부에서 특정 시기에만 발현하는 형질전환 생쥐를 현재 제조중에 있다. 이러한 기법의 형질전환 생쥐의 제조는 IL-10의 발현이 피부 면역 체계에 미치는 영향에 대한 연구를 보다 활성화 시키고 또한 실험동물학 측면에서 큰 발전을 창출한다.

- 면역 억제 현상을 유발함으로써 피부암을 유발하는 것으로 알려진 자외선은 특이 항원에 대한 면역 반응을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 이들 자외선에 의해 발현이 유발되는 유전자들을 알아내어, 그 들의 역할을 규명함으로써, 이 들과 IL-10에 의한 면역 억제 작용 기작을 비교할 수 있을 뿐 아니라, 장기 이식 거부 반응과 같은 특이 면역 반응을 억제 할 수 있을 것으로 사료되어 자외선 유도 유전자 발현을 연구 하고자 한다.

- 유선세포는 성장기, 임신기, 수유기, 이유기 등의 복잡한 세포변화과정을 거치며, 각 단계마다 다양한 호르몬, cytokine 등이 상호작용하게 된다. 이들의 비정상적인 작용은 곧바로 유선조직의 질환을 일으킬 수 있으며, 따라서 이들의 작용 메카니즘을 규명하는 것은 유방질환의 진단, 예방 및 치료에 필수적이다. 본 연구에서는 지난 3 년 동안의 연구결과, IL-10 이 포유동물 유선의 상피세포에서 apoptosis에 작용함을 보여주었다. 향후, IL-10에 의한 세포신호전달체계를 분자 수준에서 정확하게 이해하여 유선 조직의 생리현상의 이해를 위한 기초자료로 활용 하고자 한다.

- IL-10은 proinflammatory signal에 의한 면역 촉진 반응을 다양한 측면에서 조절 및 억제한다. IL-10을 발현하는 형질전환 생쥐는 중앙 면역학 연구 및 자가 면역 질환의 연구에도 필수적으로 요구되며, 궁극적으로 이 들 질환의 치료 연구에도 사용될 수 있다.

- 본 연구 수행결과 생산된 IL-10 형질전환 동물은 (주) Bio CS가 지속적으로 연구하여 이들의 기업화 및 산업화를 추진한다.

제 6 장. 참고문헌

- Adib-Conquy, M., Petit, A.-F., Marie, C., Fitting, C., and Cavailon, J.-M. (1999) Paradoxical priming effects of IL-10 on cytokine production. *International Immunology* 11:689-609.
- Asseman, C., Mauze, S., Leach, M.W., Coffman, R.L., and Powrie, F. AN essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 190:995-1003
- Basolo, F., L. Fiore, G. Fontanini, P. G. Conaldi, S. Calvo, V. Falcone, and A. Toniolo. 1996. Expression of and response to interleukin 6 (IL6) in human mammary tumors. *Cancer Res* 56:3118-22.
- Cassatella, M.A., Gasperini, S., Bovolenta, C., Calzetti, F., Vollebregt, M., Scapini, P., Marchi, M., Suzuki, R., Suzuki, A., and Yoshimura, A. (1999) Interleukin-10 (IL-10) selectively enhances CIS3/SOCS3 mRNA expression in human neutrophils: evidence for an IL-10-induced pathway that is independent of STAT protein activation. *Blood* 94:2880-2889
- de Vries, J. E. 1995. Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10. *Ann Med* 27:537-41.
- Dummer, R., Yue, F.-Y., Pavlovic, J., Geertsen, R., Dohring, C., Moelling, K., and Burg, G. (1997) Immune stimulatory potential of B7.1 and B7.2 retrovirally transduced melanoma cells: suppression by interleukin 10. *British Journal of Cancer* 77:1413-1419
- Endo, T.A., Masuhara, M., Yokouchi, M. et al. (1997) A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 387:921-924
- Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T.R., Howard, M., Moore, K.W., and O'Garra, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol.* 146:3444-51.

- Fox, R. I., and I. Saito. 1994. Criteria for diagnosis of Sjogren's syndrome. *Rheum Dis Clin North Am* 20:391-407.
- Gat, U., DasGupta, R., Degenstein, L., and Fuchs, E. (1998) De novo hair follicle morphogenesis and hair tumors in mice expressing a truncated b-catenin in skin. *Cell* 95:605-614.
- Garofalo, R., S. Chheda, F. Mei, K. H. Palkowetz, H. E. Rudloff, F. C. Schmalstieg, D. K. Rassin, and A. S. Goldman. 1995. Interleukin-10 in human milk. *Pediatr Res* 37:444-9.
- Geng, Y., Gulbins, E., Altman, A., and Lotz, M. (1994) Monocyte deactivation by interleukin-10 via inhibition of tyrosine kinase activity and the Ras signalling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:8602-8606
- Go, N. F., B. E. Castle, R. Barrett, R. Kastelein, W. Dang, T. R. Mosmann, K. stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked W. Moore, and M. Howard. 1990. Interleukin 10, a novel B cell immunodeficiency B cells. *J Exp Med* 172:1625-31.
- Hagenbaugh, A., Sharma, S., Dubinett, S.M., Wei, S.H.Y., Aranda, R., Cheroutre, H., Fowell, D.J., Binder, S., Tsao, B., Locksley, R.M., Moore, K.W., and Kronenberg, M. (1997) Altered immune responses in interleukin 10 transgenic mice. *J Exp Med.* 185:2101-10.
- Ho, A.-Y., Wei, S., Mui, A., Miyajima, A., and Moore, K.W. (1995) Functional regions of the mouse interleukin-10 receptor cytoplasmic domain. *Mol. Cell Biol.* 15:5043-5053
- Howard, M., T. Muchamuel, S. Andrade, and S. Menon. 1993. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med* 177:1205-8.
- Huang, S., Xie, K., Bucana, C.D., Ullrich, S.E., and Bar-Eli, M. (1996) Interleukin 10 suppresses tumor growth and metastasis of human melanoma cells: potential inhibition of angiogenesis. *Clinical Cancer*

Research 2:1969-1979

- Ito, S., Ansari, P., Sakatsume, M., Dickensheets, H., Vasquez, N., Donnelly, R.P., Larner, A.C., and Finbloom, D.S. (1999) Interlukin-10 inhibits expression of both interferon α - and interferon γ -induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood*, 93:1456-1463
- Jurlander, J., Lai, C.-F., Tan, J., Chou, C.-C., Geisler, C.H., Schriber, J., Blumenson, L.E., Narula, S.K., Baumann, H., and Caligiuri, M.A. (1997) Characterization of interlukin-10 receptor expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 89:4146-4152
- Kuhn, R., Lohler, J., Rennick, D., Rajewsky, K. and Muller, W. (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis.. *Cell* 75:263-74.
- Matsumoto, A., Masuhara, M., Mitsui, K., Yokouchi, M., Ohtsub, M., Misawa, H., Miyajima, A., and Akihiko, Y. (1997) CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. *Blood* 89:3148-3154
- Muschen, A., Miromohammadsadegh, A., Jarzebska-Deussen, B., Abts, H.F., Ruzicka, T., and Michel, G. (1999) Differential IL-10 receptor gene expression in acute versus chronic eczema. Modulation by immunosuppressive drugs and cytokines in normal cultured keratinocytes. *Inflamm. Res.* 48:539-543
- Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M. et al. (1997) Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* 387:924-929
- No, D., Yao, T.P., and Evans, R.M. (1996) Ecdysone-inducible gene expression in mammalian cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:3346-51
- Opal, S.M., Wherry, J.C., and Grint, P. (1998) Interlukin-10: potential

benefits and possible risks in clinical infectious diseases. *Clinical Infectious Diseases* 27:1497-1507

Pauza, M.E., Neal, H., Hagenbaugh, A., Cheroutre, H., and Lo, D. T-cell production of an inducible interleukin-10 transgene provides limited protection from autoimmune diabetes. *Diabetes* 48:1948-1953

Riley, J.K., Takeda, K., Akira, S., and Schreiber, R.D. (1999) Interleukin-10 receptor signalling through JAK-STAT pathway. *Journal. Biol. Chem.* 274:16513-16521

Saito, I., K. Haruta, M. Shimuta, H. Inoue, H. Sakurai, K. Yamada, N. Ishimaru, H. Higashiyama, T. Sumida, H. Ishida, T. Suda, T. Noda, Y. Hayashi, and K. Tsubota. 1999. Fas ligand-mediated exocrinopathy resembling Sjogren's syndrome in mice transgenic for IL-10. *J Immunol* 162:2488-94.

Sato, T., McCue, P., Masuoka, K., Salwen, S., Lattime, E.C., Mastrangelo, M.J., and Berd, D. (1996) Interleukin 10 production by human melanoma. *Clinical Cancer Research* 2:1383-1390

Schottelius, A.J., Mayo, M.W., Balfour Sartor, R., and Baldwin Jr., A.S. (1999) Interleukin-10 signaling blocks inhibitor of κ B kinase activity and nuclear factor κ B DNA binding. *Journal. Biol. Chem.* 274:31868-31874

Sharma, S., Stolina, M., Lin, Y., Gardner, B., Miller, P.W., Kronenberg, M., and Dubinett, S.M. (1999) T cell-derived IL-10 promotes lung cancer growth by suppressing both T cell and APC function. *J. Immunol.* 5019-5028

Song, S., Ling-Hu, H., Roebuck, K.A., Rabbi, M.F., Donnelly, R.P., and Finnegan, A. (1997) Interleukin-10 inhibits interferon- γ -induced intercellular adhesion molecule-1 gene transcription in human monocytes. *Blood* 89:4461-4469

Starr, R., Willson, T.A., Viney, E.M. et al. (1997) A family of

cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 387:917-921

van Deventer, S.J., Elson, C.O., and Fedorak, R.N. (1997) Multiple doses of intravenous interleukin 10 in steroid-refractory Crohn's disease. Crohn's Disease Study Group. *Gastroenterology* 113:383-9.

Wiley, S. R., K. Schooley, P. J. Smolak, W. S. Din, C. P. Huang, J. K. Nicholl, G. R. Sutherland, T. D. Smith, C. Rauch, C. A. Smith, and et al. 1995. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 3:673-82.

Yue, F.Y., Dummer, R., Geertsen, R., Hofbauer, G., Laine, E., Manolino, S., and Burg, G. (1997) Interlukin-10 is a growth factor for human melanoma cells and down-regulates HLA class-I, HLA class-II, and ICAM-1 molecules. *Int. J. Cancer* 71:630-637

Zong, W.X., Edelstein, L.C., Chen, C., Bash, J., Gelinas, C. (1999) The prosurvival Bcl-2 homolog Bfl-1/A1 is a direct transcriptional target of NF-kappaB that blocks TNFalpha-induced apoptosis. *Genes Dev.* 13:382-387.

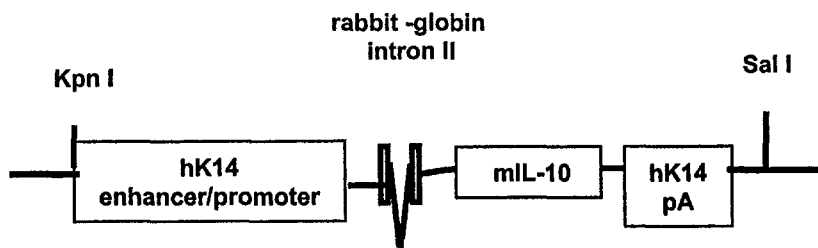


그림 1. Diagram of the construct for skin-specific expression of mIL-10

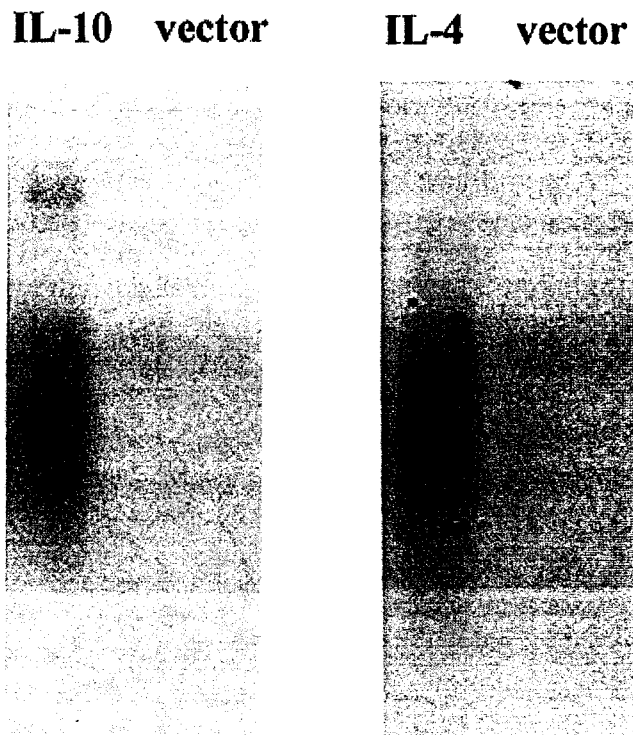


그림 2. Expression of mIL-4 and mIL-10 in NIH 3T3 cells upon transfection with the transgenic constructs

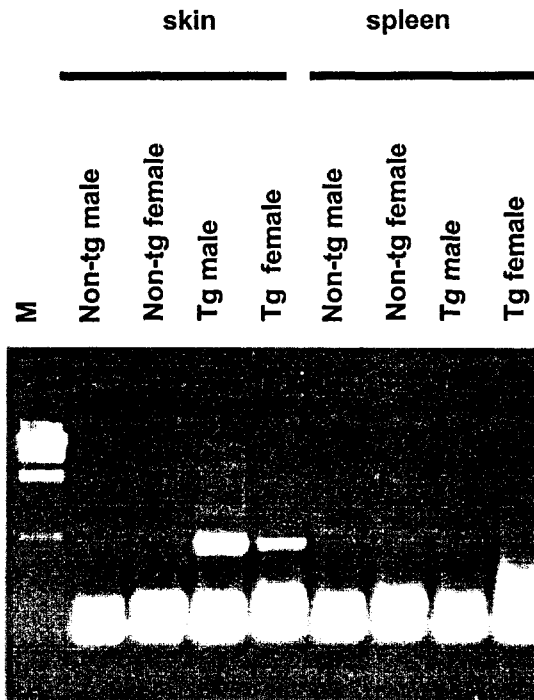


그림 3. RT-PCR analysis of total RNA from IL-10 tg mice



(A)

(B)

그림 4. Immunohistochemistry of skin biopsy from mIL-10-transgenic- (A) and normal-mouse (B),

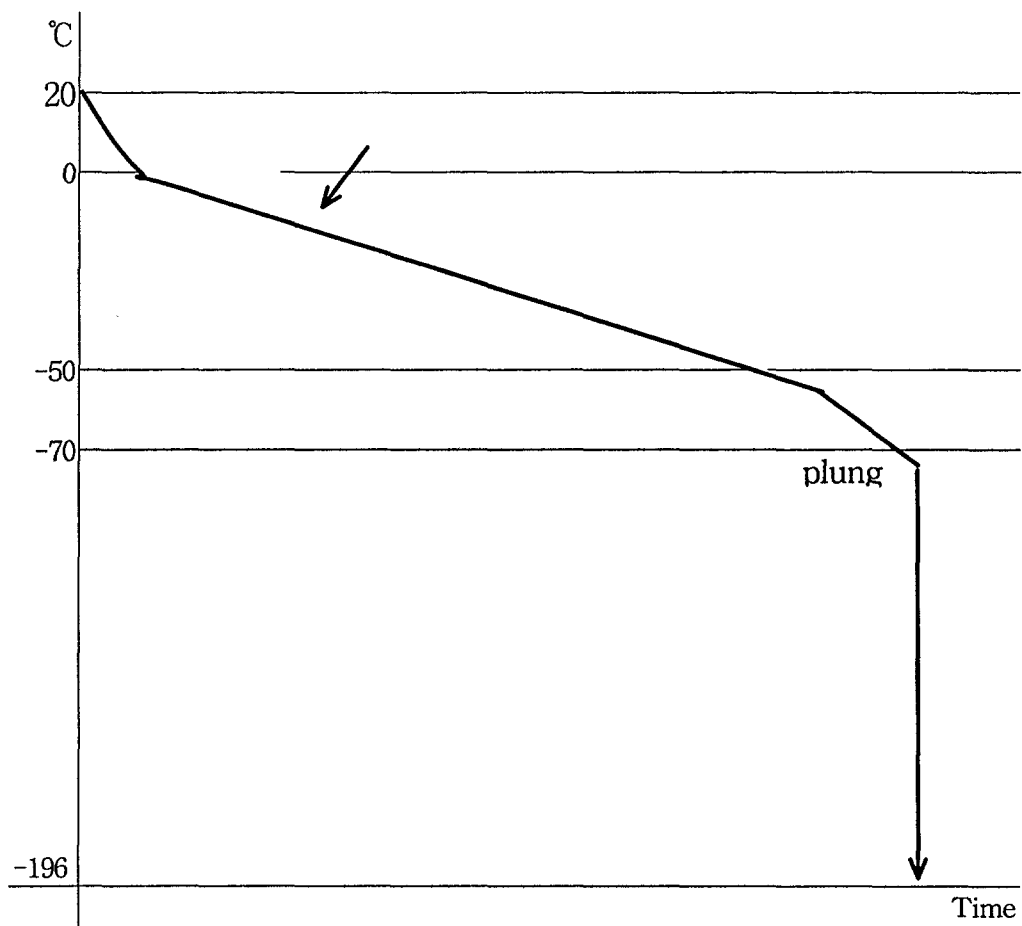
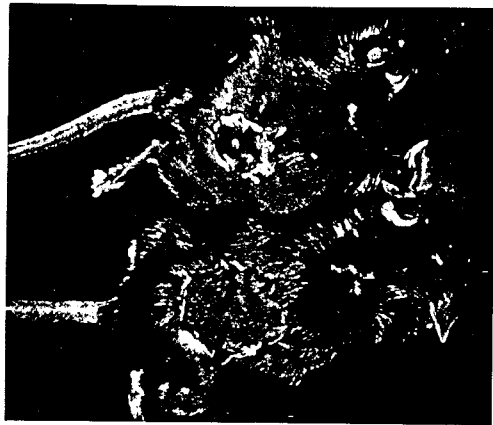


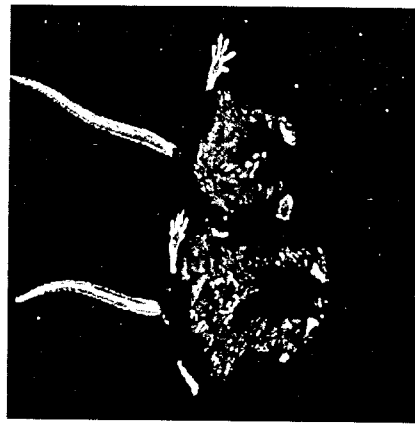
그림 5. 수정란 동결 온도 변화 curve

Non-Tg

mIL-10 Tg



14 days after
transplantation



25 days after
transplantation

그림 6. Delayed rejection response upon allograft in mIL-10 transgenic mouse

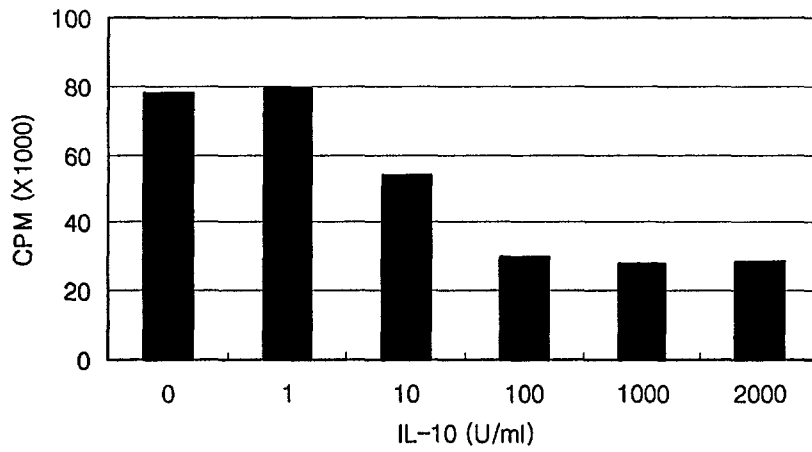


그림 7. IL-10에 의한 T 림프구의 증식 억제

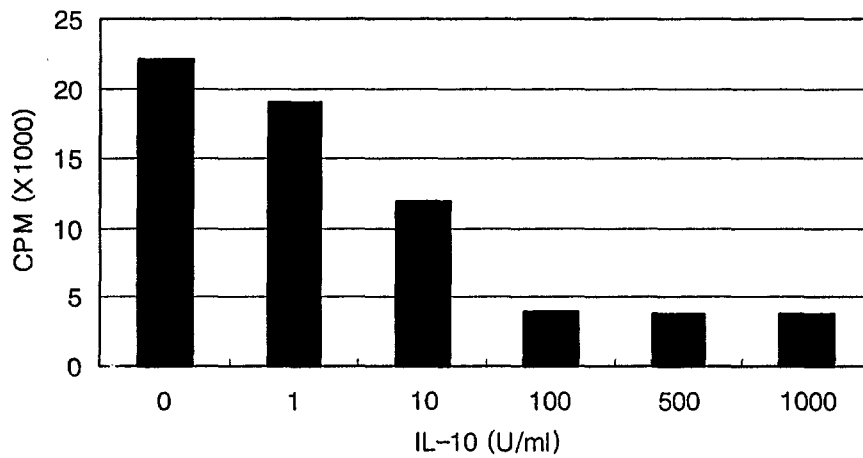


그림 8. IL-10에 의한 allogeneic cell stimulation-induced T 림프구의 증식억제

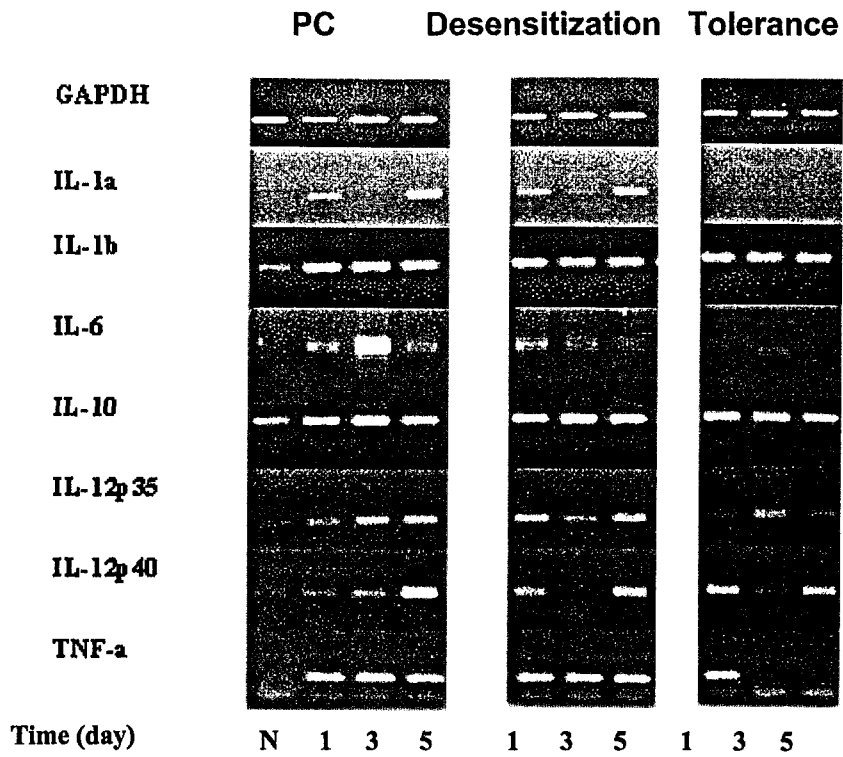


그림 9. (가) The expression of cytokine in dendritic cells from lymph node

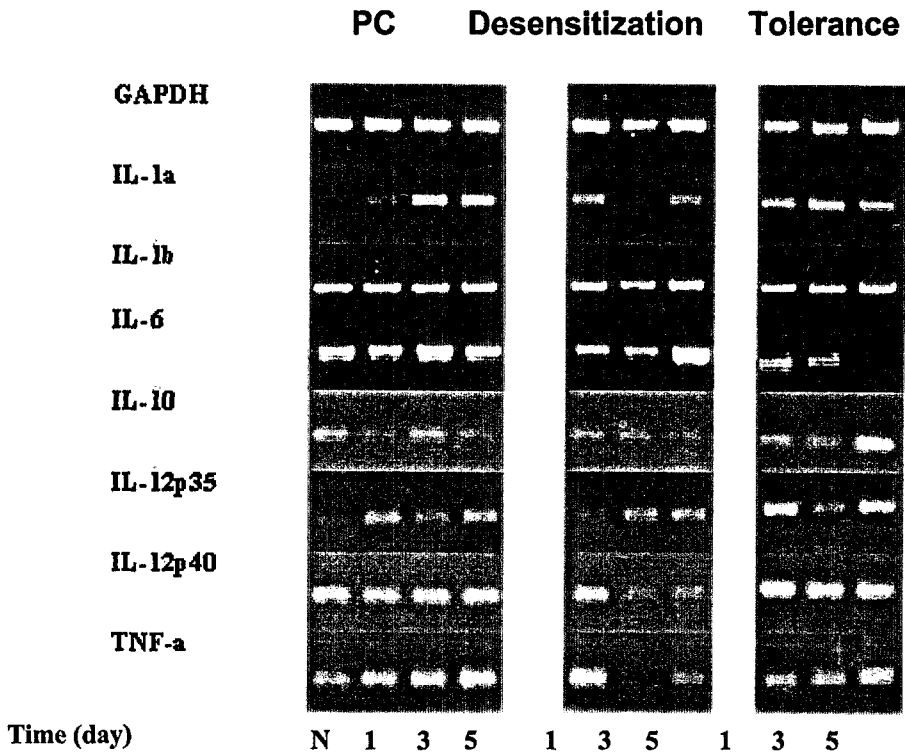


그림 9. (나) The expression of cytokine in dendritic cells from spleen

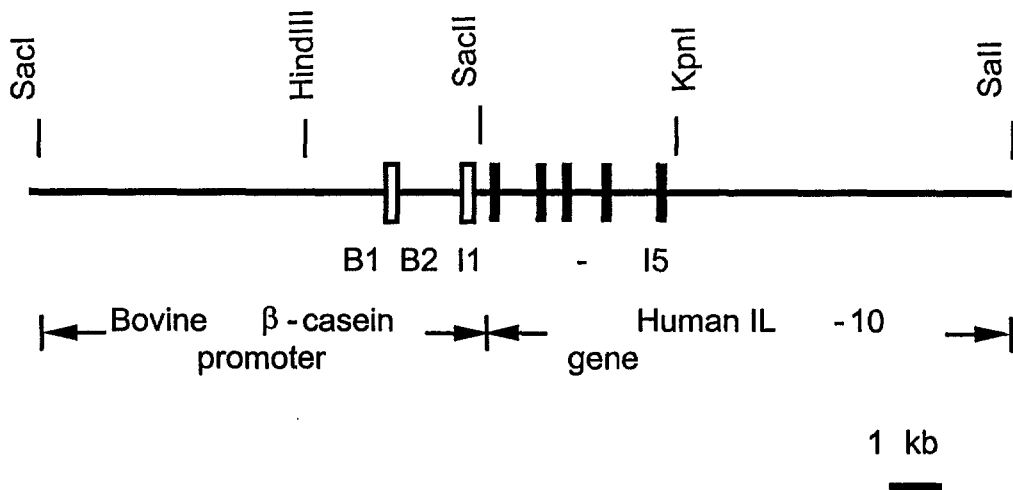


그림 10. An hIL-10 expression vector. The promoter contains 8 kb of the 5-flanking sequence, the untranslated exon 1 and 2 (vertical open boxes indicated as B1 and B2), and 2 kb of intron 1 of the bovine beta-casein gene. The hIL-10 gene contains all of the coding regions spanning from exon 1 to 5 (vertical thick lines indicated as I1 to I5) and 7 kb of the 3'-flanking sequences.

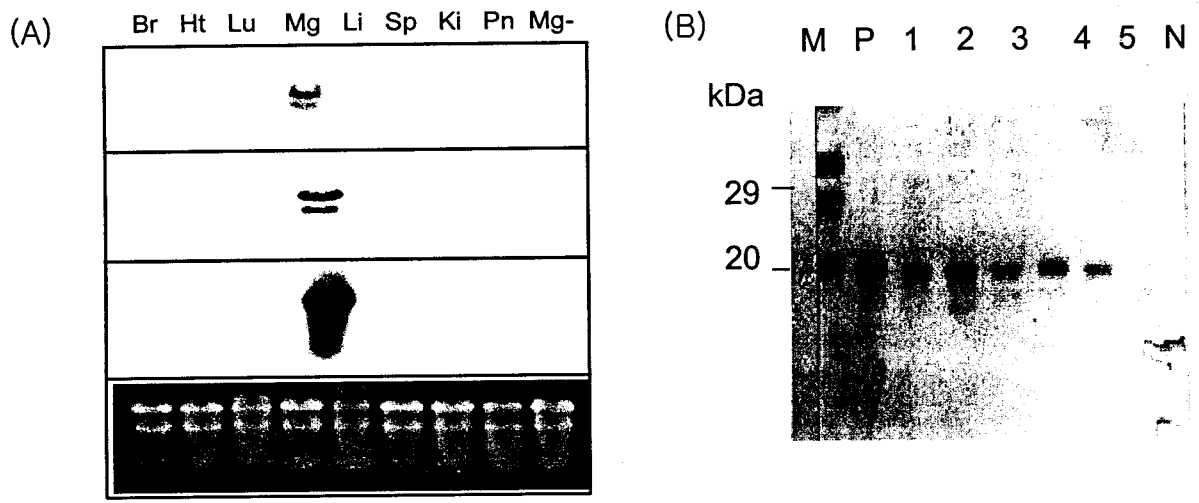


그림 11. (A) Northern blot analysis of total RNA from tissues of transgenic mice. Tissues analyzed are brain (Br), kidney (Ki), liver (Li), mammary gland (Mg), heart (Ht), spleen (Sp), lung (Lu), pancreas (Pa), salivary gland (Sg), and mammary gland of a normal mouse (Mg-). Ethidium bromide staining of the gel is shown at the bottom to indicate loading. (B) Immunoblot analysis of hIL-10 in milk of transgenic mice. Lanes are: P, 200 ng of purified hIL-10; 1-5, whey from five transgenic mice; N, normal whey.

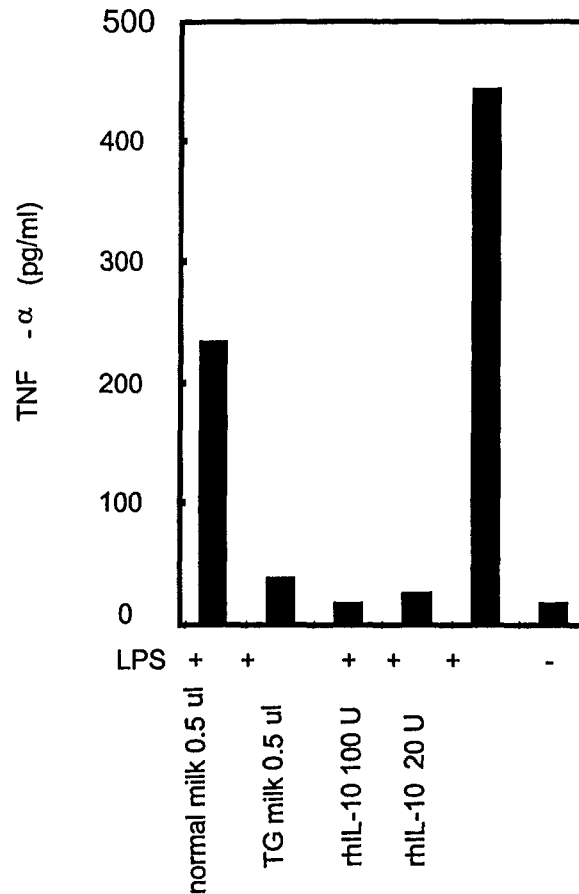


그림 12. Bioactivity of the recombinant hIL-10 expressed in milk of transgenic mice. Mouse peritoneal macrophages were treated with recombinant hIL-10 (20-100 units/ml) or milk of transgenic mice and then stimulated with endotoxin. The resultant supernatants were assayed for murine TNF- α by ELISA. Results are expressed as means of triple experiments per treatment.

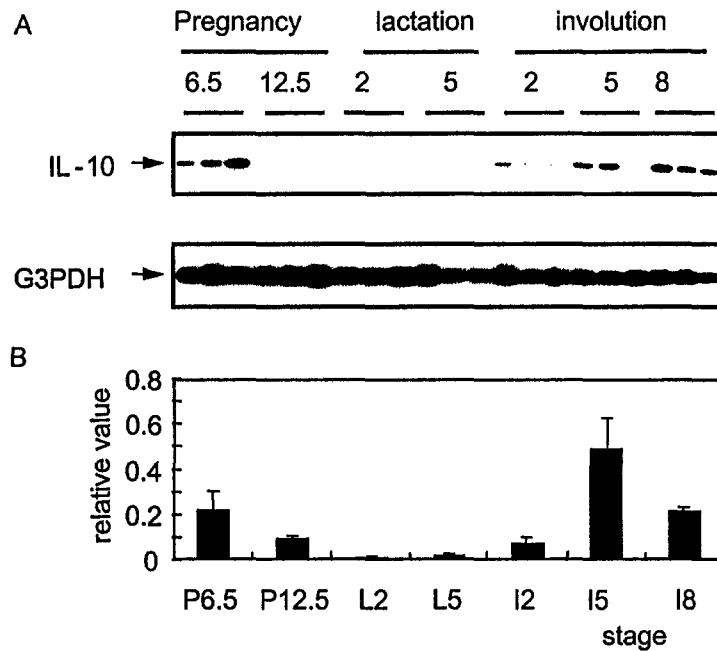


그림 13. Expression profiles of mIL-10 RNA at the mammary glands during mammary cycles in normal mice. (A) The level of the mIL-10 was evaluated by quantitative RT-PCR at the pregnancy, lactation, and involution period through the mammary cycle. The numbers below the stage denote for the specific day of each stage. Three independent results of three mice per each stage were presented. Mouse G3PDH was used as an internal control. (B) Graphical representation of the signals of the RT-PCR. Quantification was carried out using a Phosphoimager. To determine the relative degree of expression, signal levels were normalized by those of G3PDH and the mean values were shown with the standard error bars.

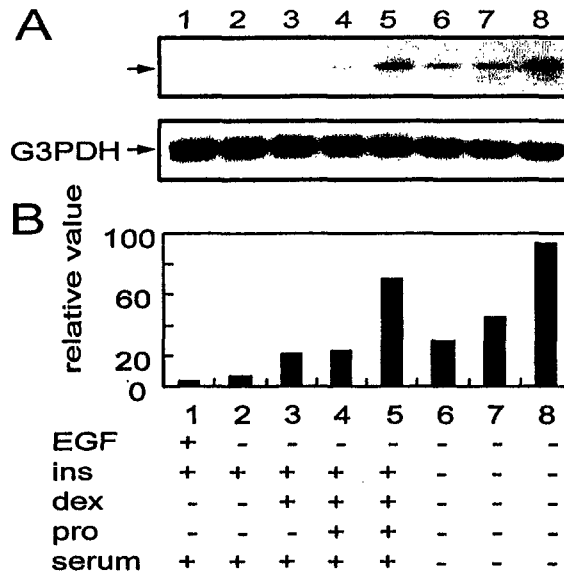


그림 14. Expression profiles of mIL-10 RNA in the HC11 cells at different culture conditions. (A) The level of the mIL-10 was evaluated by quantitative RT-PCR through the culture period. After the cells were confluent in the serum-containing media with EGF and insulin (ins), they were serially treated with the media containing combinations of the hormones indicated. Dexamethasone (dex) was treated for 72 hr in lane 3. Prolactin (pro) was treated for 36 and 60 hr in lanes 4 and 5. In lanes 6-8, the cells were starved for serum for 24, 36, and 48 hr. Mouse G3PDH was used as an internal control. (B) Graphical representation of the signals of the RT-PCR. Quantification was carried out using a Phosphoimager. To determine the relative degree of expression, signal levels were normalized by those of G3PDH.

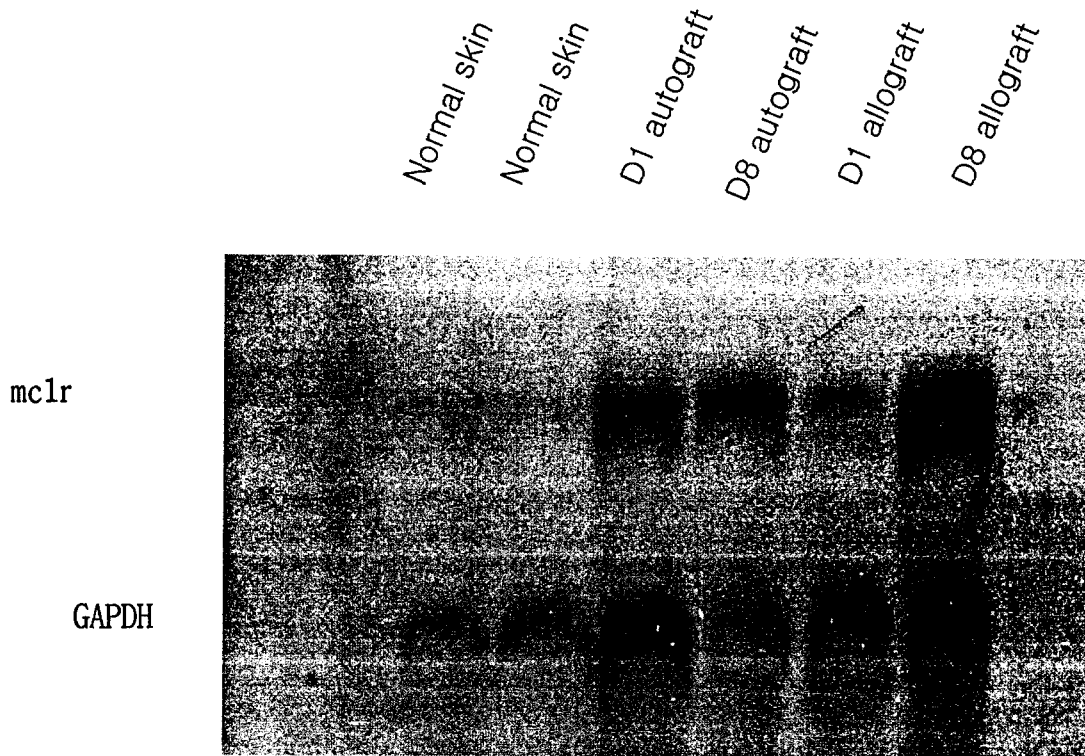


그림 15. (가) Northern blot을 통해 graft 한 후 mclr mRNA의 발현이 유도됨을 알 수 있다.

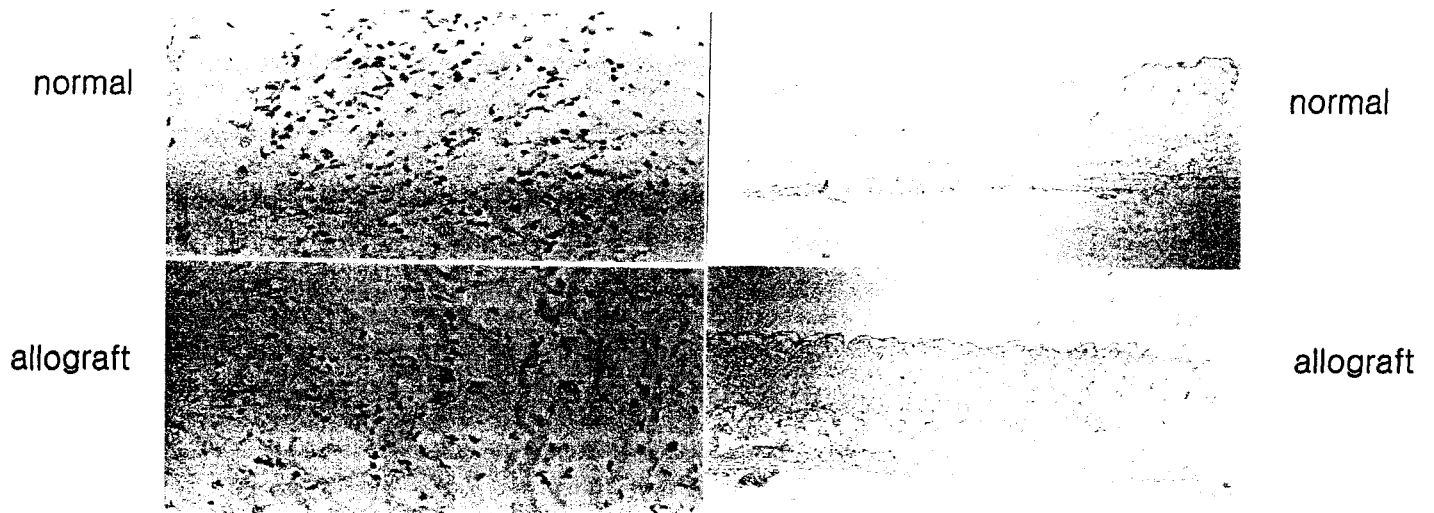


그림 15. (나) Allograft한 skin에서 mclrprotein의 발현이 유도됨을 polyclonal anti mclr antibody를 이용한 immunohistochemistry에서 알 수 있다.

mouse: 167 MWLFALLV-TLFYGVESIYLPQKLYGEVTSPLYPKPYPSDLETTTIVITVPMGYRVKLVF 343
 MWL LLV LF GSI +PQKL+GEVTSPL+PKPYP++ ETTTIVITVP GYRVKLVF
 human: 1 MWLLYLLVPALFCRAGGSIPQPQLFGEVTSPLFPKPYPNFETTTIVITVPTGYRVKLVF 60

mouse: 344 WQFDVEPSEGCFYDYVKISADKQTLGRFCGQLDSPLGNPPGRKEFMSQGNKMLLTFTHTDF 523
 QFD+EPSEGCFYDYVKISADK++LGRFCGQL SPLGNPPG+KEFMSQGNKMLLTFTHTDF
 human: 61 QQFDLEPSEGCFYDYVKISADKKSLGRFCGQLGSPLGNPPGKKEFMSQGNKMLLTFTHTDF 120

mouse: 524 SNEENGTIMFYKGFLLAYYQAVDLDECASQPNVVEGLQPRCQHLCHNYVGGYFCSCHPGY 703
 SNEENGTIMFYKGFLLAYYQAVDLDECAS+ S EE QP+CQHLCHNYVGGYFCSC PGY
 human: 121 SNEENGTIMFYKGFLLAYYQAVDLDECASRSKSGEEDPQPQCQHLCHNYVGGYFCSCRPGY 180

mouse: 704 ELQKDGQSCQAECSSSELYTEPSGYVSSLEYQPYPDLRCNYSIRVERGLTVHLKFLDPF 883
 ELQ+D SCQAECSSSELYTE SGY+SSLEY+ YPDLRCNYSIRVERGL+HLKFL+PF
 human: 181 ELQEDRHSCQAECSSSELYTEASGYISSLEYPRSYPPDLRCNYSIRVERGLTLHLKFLFPF 240

mouse: 884 EIDDHQQVHCPYDQLQIYANGKNLGEFCGKQRPPDLTSSNAVDLLFFTDESGDSRGWKL 1063
 +IDDHQQVHCPYDQLQIYANGKN+GEFCGKQRPPDLTSSNAVDLLFFTDESGDSRGWKL
 human: 241 DIDDHQQVHCPYDQLQIYANGKNIGFCGKQRPPDLTSSNAVDLLFFTDESGDSRGWKL 300

mouse: 1064 HYTTETIKCPQPKALDEFTIIQDPQYQFRDYFIVTCKQGYQLMEGNQALLSFTAVCQN 1243
 YTTE IKCPQPK LDEFTIIQ+ QPQYQFRDYFI TCKQGYQL+EGNQ L SFTAVCQ+
 human: 301 RYTTEIKCPQPKTLDEFTIIQNLQPYQFRDYFIATCKQGYQLIEGNQVLHSFTAVCQD 360

mouse: 1244 DGTWHRAMPKCKIKNCGQPQSLNNGDFRYITTKGVTTYEASIQYHCHEPYKMLTRAGSS 1423
 DGTWHRAMPKCKIK+CGQP++L NGDFRY TT GV TY+A IQY+CHEPYKML TRAGS
 human: 361 DGTWHRAMPKCKIKDCGQPRNLPNGDFRYTTMGNVNTYKARIQYHCHEPYKMLTRAGSR 420

mouse: 1424 ESMRGIYTCTAAGIWKNEEKEKMPRCLPVCCKPVNPVTQKERIIRGQPARGNFPWQAF 1603
 ES +G+YTCTAAGIWKNE++GEK+PRCLPVCCKPVNPV Q++RII GQ A+ GNFPWQ F
 human: 421 ESEQGVYTCTAAGIWKNEQKGEKIPRCLPVCCKPVNPVEQRQRIIGGQKAKMGNFPWQVF 480

mouse: 1604 TTTHGRGGGALLGDRWILTAHTIYPKHHNKENDNANPKMLVFLGHTNVEQIKKLGHPV 1783
 T HGRGGGALLGDRWILTAHT+YPK H + +N + VFLGHTNVE++ KLG+HP+
 human: 481 TNIHGRGGGALLGDRWILTAHTLYPKEHEAQ---SNASLDVFLGHTNVEELMKLGNHPI 537

mouse: 1784 RRVIIHPDYRQDEPNNEFGDIALLELENSVTLGPELLPICLPDNETFYGGQLMGYVSGFG 1963
 RRV +HPDYRQDE NFEVDIALLELENSVTLGP LLPICLPDN+TFY GLMGYVSGFG
 human: 538 RRVSVHPDYRQDESYNNEFGDIALLELENSVTLGNLLPICLPDNETFYDLGLMGYVSGFG 597

mouse: 1964 ITEDKLAFLDLRFVRLPVADSEACQRWLQTKKDTSPFSQNMFCSDPAVQQDACQDSSGGV 2143
 + E+K+A DLRVRLPVA+ +AC+ WL+ K FSQNMFC+G P+++QDACQDSSGGV
 human: 598 VMEEKIAHDLRFVRLPVANPQACENWLRGKNRMDVFSQNMFCAGHPSLQDACQDSSGGV 657

mouse: 2144 FAVRDRNRDIWVATGIVSWGIGCGEGYGYFTKVLNYVDWIKKEMGDEN 2287
 FAVRD N D WVATGIVSWGIGC GYGYFTKVLNYVDWIKKEM +E+
 human : 658 FAVRDPNTDRWVATGIVSWGIGCSRGYGYFTKVLNYVDWIKKEMEEED 705

그림 16. Sequence similarity between mouse and human Clr

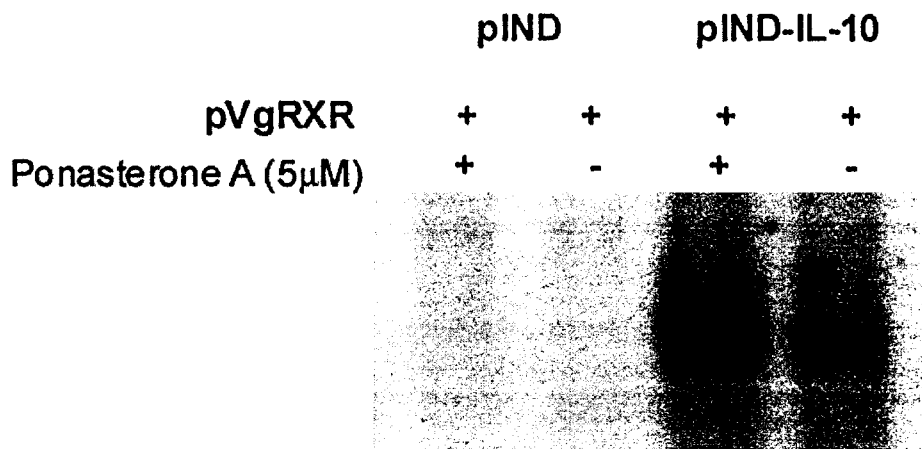


그림 17. Ecdysone-inducible expression of mIL-10 in transfected NIH3T3 cells

M N N Tg control

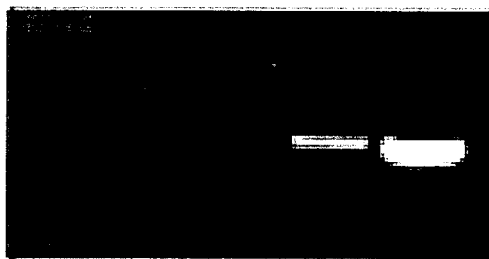


그림 18. Ecdysone-inducible expression system에서의 pIND-mIL-10 형질 전환 생쥐의 제조.

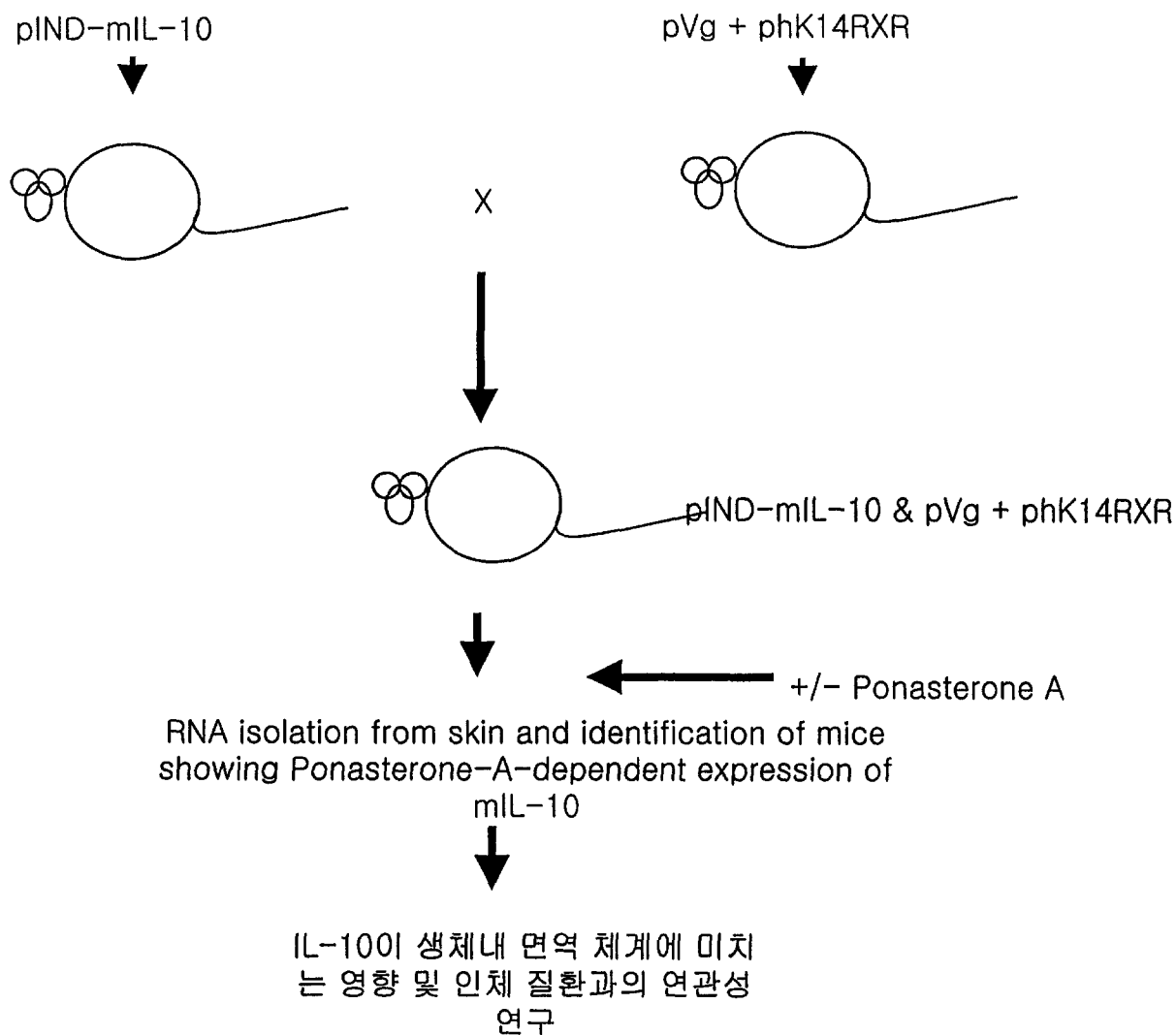


그림 19. (가) Ecdysone-regulatable expression system을 이용한 mIL-10 형질 전환 생쥐의 제조

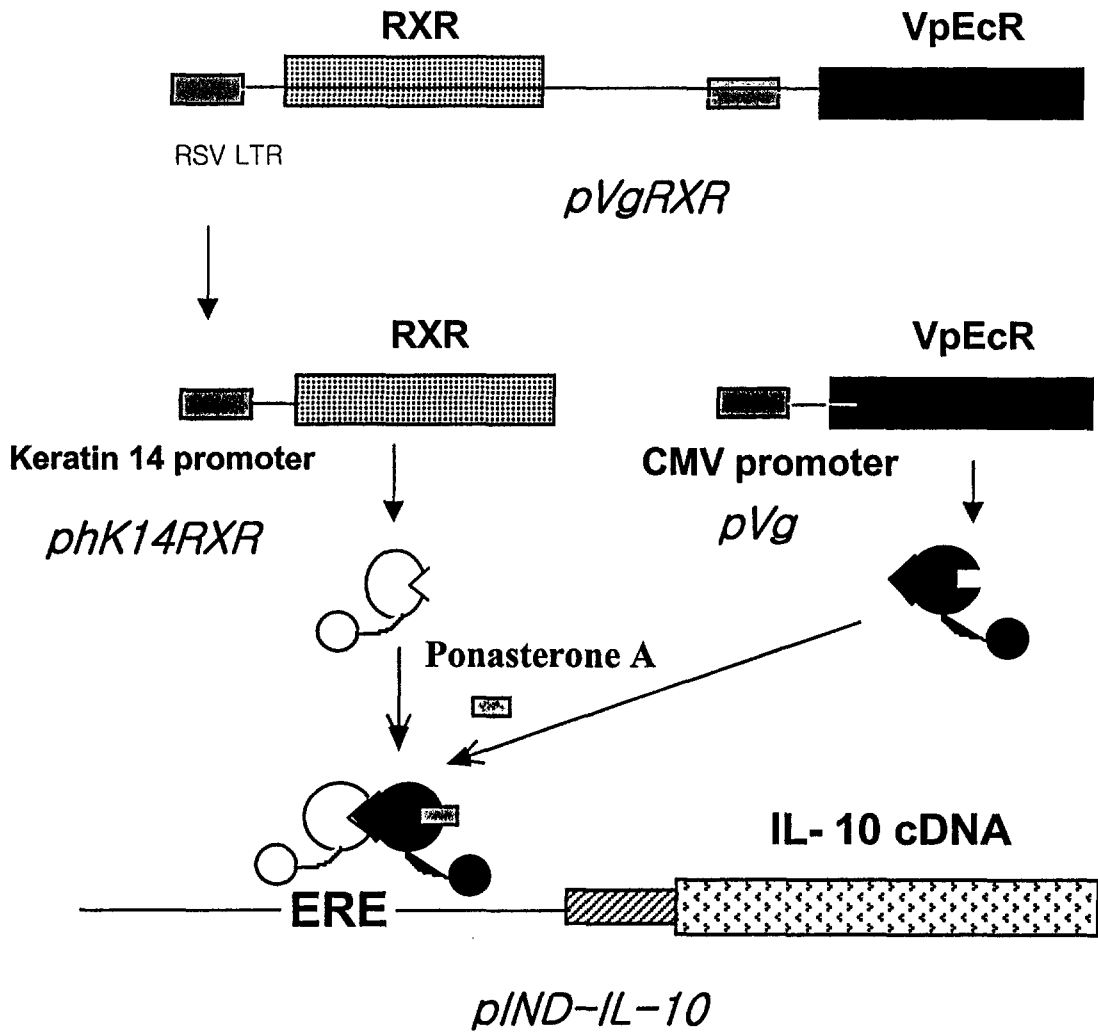


그림 19. (나). Ecdysone-inducible expression system에서의 IL-10 발현 조절 기작

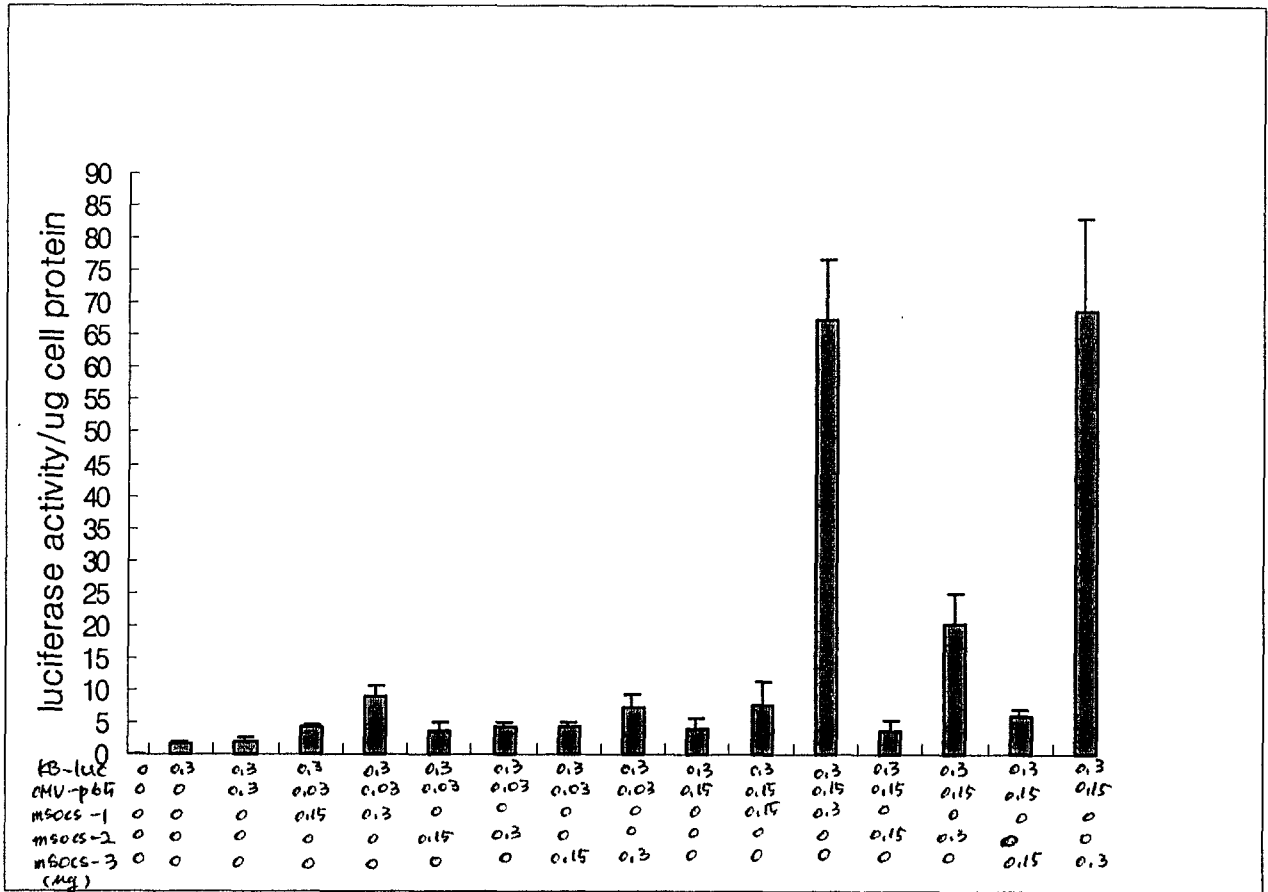


그림 20. The effects of mSOCS expression on p65-mediated transcriptional activation