



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년04월17일

(11) 등록번호 10-1512121

(24) 등록일자 2015년04월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0028186

(22) 출원일자 2013년03월15일

심사청구일자 2013년03월15일

(65) 공개번호 10-2014-0113152

(43) 공개일자 2014년09월24일

(56) 선행기술조사문헌

Human Molecular Genetics, 13권, Review Issue 1, R43-R55면(2004)*

EP1908476 A

WO2008112559 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

이광훈

서울 영등포구 국제금융로7길 1, A동 1106호 (여의도동, 수정아파트)

(74) 대리인

양부현

전체 청구항 수 : 총 16 항

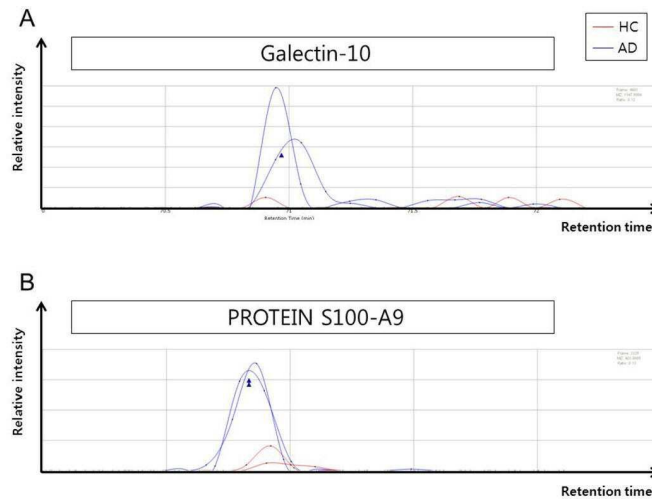
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 아토피 피부염 진단 또는 예후 분석용 키트

(57) 요약

본 발명은 아토피 피부염의 진단 방법 및 진단키트에 관한 것이다. 본 발명의 진단방법은 갈렉틴-10 (Galectin-10) 또는 S100A9의 발현이 아토피 피부염 환자군에서 현저히 증가되므로, 이를 이용하여 아토피 피부염의 발병 유무 및 재발 유무를 빠르고 신속히 알 수 있다. 본 발명에 따르면, 갈렉틴-10 (Galectin-10) 또는 S100A9의 단백질 발현이 아토피 피부염 환자군에서 현저하게 증가되므로, 이를 이용하여 상기 단백질의 발현을 억제시키는 물질을 스크리닝함으로써, 아토피 피부염 치료제를 개발할 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20110016636

부처명 교육과학기술부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 중견연구자지원사업

연구과제명 아토피피부염에서의 선천성 알레르기 면역 조절 기능 연구

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2011.05.11 ~ 2014.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

아토피 피부염(atopic dermatitis) 진단에 필요한 정보를 제공하기 위하여, 체외로 분리된 동물의 생물학적 시료 내 갈렉틴-10 (Galectin-10)의 존재를 확인하는 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 동물은 포유류인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 포유류는 인간, 래트, 마우스, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 또는 염소인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 혼성화법, 유전자 증폭방법 또는 면역분석 방법을 이용하여 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 방법은 체외로 분리된 동물의 시료 내 인터루킨-22 또는 인터루킨-17의 존재를 확인하는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 생물학적 시료는 혈액, 혈장, 혈청, 세포 또는 조직 시료인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

(a) 갈렉틴-10 (Galectin-10) 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 (b) 갈렉틴-10 단백질을 코딩하는 핵산 분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 아토피 피부염(atopic dermatitis) 진단 또는 예후 분석용 키트.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 키트는 면역분석(immunoassay)용 키트인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 9

제 7 항에 있어서, 상기 키트는 유전자 증폭 키트인 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 10

제 7 항에 있어서, 상기 갈렉틴-10은 혈액, 혈장, 혈청, 뇨, 세포 또는 조직 시료에 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 11

제 7 항에 있어서, 상기 키트는 인터루킨-22 또는 인터루킨-17 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머, 또는 인터루킨-22 또는 인터루킨-17 단백질을 코딩하는 핵산분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 키트.

청구항 12

다음의 단계를 포함하는 아토피 피부염(atopic dermatitis)의 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법:

(a) 갈렉틴-10(Galectin-10) 단백질, 또는 갈렉틴-10 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 세포 또는 조직에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 단백질의 양 또는 단백질의 활성을 측정하는 단계로서, 상기 시료에 의해 상기 단백질의 양 또는 단백질의 활성이 감소-조절(down-regulation)되는 것으로 측정되는 경우에는 상기 시료는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 물질로 판정된다.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 상기 방법은 항원-항체 반응 방식으로 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 14

제 12 항에 있어서, 상기 방법은 유전자 증폭 방식으로 실시되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제 12 항에 있어서, 상기 단계 (a)는 인터루킨-22 또는 인터루킨-17 단백질, 또는 인터루킨-22 또는 인터루킨-17 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 세포 또는 조직에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계를 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 16

제 12 항에 있어서, 상기 세포는 T 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 아토피 피부염 진단 또는 예후 분석용 키트에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 아토피 피부염(Atopic dermatitis, AD)은 매우 가려운 만성 재발성 피부질환으로서 일반적으로 피부 병변이 광범위하게 분포한다. 아토피 피부염의 발병율은 매우 높다; 유아 15-30%, 성인 2-10% (1). 아토피 피부염의 병태생리(pathophysiology)에 대하여 많은 연구가 이루어졌음에도 아직 정확히 알려져 있지 않다. 한 가지 요인이 아닌 여러 가지 요인, 예컨대 유전적, 환경적 및 면역학적 요인들이 아토피 피부염의 발달(development) 및 병태생리에 영향을 주는 것으로 예상된다. 최근 T 세포의 새로운 아형(subset)이 아토피 피부염의 면역 장애에 영향을 주는 요소임이 밝혀졌으며, 다양한 T 세포의 아형, 예컨대 Th1, Th2, Th17, Th22, NK-T 및 Treg가 아토피 피부염의 발병에 중요한 역할을 함이 밝혀졌다(2-7).
- [0003] 아토피 피부염 환자들은 일반적으로 외인성 아토피 피부염 및 내인성 아토피 피부염의 두 그룹으로 분류된다(8, 9). 외인성 아토피 피부염(EAD) 환자들은 혈청(serum)의 전체 이뮤노글로불린 E(IgE) 및 알레르겐-특이적 IgE 레벨이 증가한다. 알레르겐-특이적 IgE가 없는 정상 혈청의 전체 IgE 레벨을 가진 환자들은 내인성 아토피 피부염(IAD) 또는 아토피양 습진(atopiform dermatitis)이라 한다.
- [0004] 정량적 프로테오믹스(proteomics)로 다수 샘플 간의 단백질 발현 차이를 높은 효율(high-throughput)로서 측정할 수 있다. 신속하고 정확한 정량 및 다양한 종류의 샘플에의 광범위한 적용을 위한 정량적 프로테오믹스를 위해 다양한 방법이 개발되었다.
- [0005] 초창기에는 2-차원 겔 전기영동(2D-GE)(10)이 사용되었지만 겔 스팟이 다양한 단백질을 포함하고 있어 단백질 동정 및 정량에 어려움이 있었다(11, 12). 따라서 광범위한 프로테오믹스 유효범위(proteome coverage) 및 보다 정확하고 재현성있는 정량을 위해 비표지 방법(13, 14) 및 등압(isobaric) 화학적 표지방법(15, 16)이 개발되었다.
- [0006] 서로 다른 AD 아형을 가진 환자 및 건강한 대조군(healthy controls, HC)에서 T 림프구의 역할을 연구하기 위하여, EAD, IAD 및 대조군(HC)에서 비표지 방법 및 화학적 표지방법을 이용한 비교 연구를 실시하였다.
- [0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명자들은 아토피 피부염(atopic dermatitis) 진단을 위한 진단방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 아토피 피부염 환자의 혈액 내 T 세포에서 특이적으로 과발현되는 단백질을 발견하였으며, 특히 갈렉틴-10 (Galectin-10) 및 S100A9 단백질의 발현이 유의적으로 증가됨을 확인하였다. 본 발명자들은 대조군과 비교하여 아토피 피부염 환자에서 상기 단백질들이 과발현됨을 이용하여 아토피 피부염의 진단 또는 예후 분석용 키트 및 진단방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0009] 따라서 본 발명의 목적은 아토피 피부염(atopic dermatitis)의 진단방법을 제공하는데 있다.
- [0010] 본 발명의 다른 목적은 아토피 피부염(atopic dermatitis) 진단 또는 예후 분석용 키트를 제공하는데 있다.
- [0011] 본 발명의 다른 목적은 아토피 피부염(atopic dermatitis)의 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공하는데 목적이 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0013] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 체외로 분리된 동물의 생물학적 시료 내 갈렉틴-10 (Galectin-10) 또는 S100A9의 존재를 확인하는 단계를 포함하는 아토피 피부염(atopic dermatitis)의 진단방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 (a) 갈렉틴-10 (Galectin-10) 또는 S100A9 단백질에 특이적으로 결합하는 항체, 또는 (b) 갈렉틴-10 또는 S100A9 단백질을 코딩하는 핵산분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브를 포함하는 아토피 피부염(atopic dermatitis) 진단 또는 예후 분석용 키트를 제공한다.
- [0015] 본 발명자들은 아토피 피부염(atopic dermatitis) 진단을 위한 진단방법을 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 아토피 피부염 환자의 혈액 내 T 세포에서 특이적으로 과발현되는 단백질을 발견하였으며, 특히 갈렉틴-10 (Galectin-10) 및 S100A9 단백질의 발현이 유의적으로 증가됨을 확인하였다. 본 발명자들은 대조군과 비교하여 아토피 피부염 환자에서 상기 단백질들이 과발현됨을 이용하여 아토피 피부염의 진단 또는 예후 분석용 키트 및 진단방법을 개발하였다.
- [0016] 아토피피부염은 매우 가려운 재발성의 염증성 피부 질환으로, 피부 장벽 이상 및 면역 부전 등이 주요 병인으로 생각되고 있다. 최근에는 여러 T 세포의 아형들이 아토피피부염의 중요한 병인으로 생각되고 있다. 이에 본 발명자들은 아토피 피부염에서의 T 세포의 역할을 알아보기 위하여, 프로테오믹스 기법을 이용하여 아토피피부염 환자와 정상 환자의 T 세포에서 서로 다르게 발현되는 단백질을 살펴보았다. 즉, 프로테오믹스 기법으로서 정규형 스펙트럼 지수(normalized spectral index), TMT 표지 기반 정량기법(TMT labeling based quantification), 웨스턴 블로팅(western blotting) 및 형광면역분석법(fluorescence activated cell sorting)을 이용하여 외인성, 내인성 아토피피부염환자와 정상인과의 비교에서 발현에 차이가 나는 단백질인 갈렉틴-10(galectin-10) 및 S100A9를 발견하였으며, 또한 갈렉틴-10을 발현시키는 CD3⁺ T 세포는 정상인에 비해 아토피 피부염 환자에서 사이토카인 IL-22를 더 많이 분비한다는 것을 규명하였다. 본 발명자들은 아토피 피부염의 병인과 관계되는 새로운 단백질을 발견함과 동시에, 갈렉틴-10 이 아토피피부염에서 T22 세포와 연관되어 아토피 피부염의 병인에 중요할 수 있다는 점에 착안하여 아토피 피부염의 진단방법을 개발하게 되었다.
- [0017] 본 발명의 방법에 따르면, 동물로부터 채취한 생물학적 시료 내의 갈렉틴-10 (Galectin-10) 또는 S100A9 단백질의 존재 여부, 활성 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현을 분석함으로써, 아토피 피부염을 진단한다.
- [0018] 본 발명의 아토피 피부염(atopic dermatitis)의 진단 방법에서, 상기 아토피 피부염은 공지된 다양한 아토피 피부염, 예컨대 내인성(intrinsic) 및 외인성(extrinsic) 아토피 피부염을 포함하며, 소양증, 피부건조증 또는 습진 등 일반적인 염증성 피부질환을 포함한다.
- [0019] 본 명세서에서 동물은 포유류를 포함하고, 예컨대 인간, 래트, 마우스, 원숭이, 개 고양이, 소, 말, 돼지, 양 및 염소를 포함하며 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0020] 본 명세서에서 용어 “생물학적 시료”는 혈액, 혈장, 혈청, 세포 및 조직 시료를 포함하며 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 본 명세서에서 용어 “핵산분자”는 DNA (gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 갖으며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다 (Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).
- [0022] 본 발명의 아토피 피부염 진단방법은 공지된 다양한 시험방법을 사용할 수 있으며, 예컨대 혼성화법, 면역분석 (immunoassay) 방법 또는 유전자 증폭방법을 이용하여 실시할 수 있고 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 상기 혼성화법은 프로브를 이용하여 갈렉틴-10 (Galectin-10) 또는 S100A9의 존재를 확인한다.
- [0024] 본 명세서에서 사용된 용어 “프로브”는 자연의 또는 변형된 모노머 또는 연쇄(linkages)의 선형 올리고머를 의미하며, 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하고 타깃 뉴클레오타이드 서열에 특이적으로 혼성화할 수 있으며, 자연적으로 존재하거나 또는 인위적으로 합성된 것이다. 본 발명의 프로브는 바람직하게는 단일체이며, 올리고디옥시리보뉴클레오타이드이다.
- [0025] 본 발명의 방법이 혼성화 방식 중 마이크로어레이 방식으로 실시되는 경우, 상기한 프로브는 혼성화 어레이 요소(hybridizable array element)로서 이용되며, 기질(substrate) 상에 고정화 된다. 바람직한 기질은 견고성 또는 반-견고성 지지체로서, 예컨대, 막, 필터, 칩, 슬라이드, 웨이퍼, 파이버, 자기성 비드 또는 비자기성 비

드, 겔, 튜빙, 플레이트, 고분자, 미소입자 및 모세관을 포함한다. 상기 혼성화 어레이 요소는 상기의 기질 상에 배열되고 고정화 된다. 이와 같은 고정화는 화학적 결합 방법 또는 UV와 같은 공유 결합적 방법에 의해 실시된다. 예컨대, 상기 혼성화 어레이 요소는 에폭시 화합물 또는 알데히드기를 포함하도록 변형된 글래스 표면에 결합될 수 있고, 또한 폴리라이신 코팅 표면에서 UV에 의해 결합될 수 있다. 또한, 상기 혼성화 어레이 요소는 링커(예: 에틸렌 글리콜 올리고머 및 디아민)를 통해 기질에 결합될 수 있다.

[0026] 한편, 본 발명의 마이크로어레이에 적용되는 시료 DNA는 표지(labeling)될 수 있고, 마이크로어레이상의 어레이 요소와 혼성화된다. 혼성화 조건은 다양하게 변경할 수 있다. 또한, 혼성화 정도의 검출 및 분석은 표지 물질에 따라 다양하게 실시될 수 있다.

[0027] 프로브의 표지는 혼성화 여부를 검출케 하는 시그널을 제공할 수 있으며, 이는 올리고뉴클레오타이드에 연결될 수 있다. 적합한 표지는 형광단(예컨대, 플루오리신 (fluorescein), 피코에리트린 (phycoerythrin), 로다민, 리사민(lissamine), 그리고 Cy3와 Cy5 (Pharmacia)), 발색단, 화학발광단, 자기입자, 방사능동위원소(P^{32} 또는 S^{35}), 매스 표지, 전자밀집입자, 효소(알칼린 포스파타아제 또는 호스레디쉬 퍼옥시다아제), 조인자, 효소에 대한 기질, 중금속(예컨대, 금) 그리고 항체, 스트렙타비딘, 바이오틴, 디곡시게닌과 킬레이팅기와 같은 특정 결합 파트너를 갖는 헵텐을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 표지는 당업계에서 통상적으로 실시되는 다양한 방법, 예컨대, 닉 트랜스레이션 (nick translation) 방법, 무작위 프라이밍 방법 (Multiprime DNA labelling systems booklet, "Amersham"(1989)) 및 카이네이션 방법 (Maxam & Gilbert, Methods in Enzymology, 65:499(1986))을 통해 실시될 수 있다. 표지는 형광, 방사능, 발색 측정, 중량 측정, X-선 회절 또는 흡수, 자기, 효소적 활성, 매스 분석, 결합 친화도, 혼성화 고주파, 나노크리스탈에 의하여 검출할 수 있는 시그널을 제공한다.

[0028] 혼성화 방법에서 분석 대상이 되는 핵산 시료는 다양한 생물학적 시료(biosamples)에서 얻은 mRNA를 이용하여 제조할 수 있다. 상기 생물학적 시료는, 바람직하게는 T 세포이다. 프로브 대신에 분석 대상이 되는 cDNA를 표지하여 혼성화 반응-기초 분석을 실시할 수도 있다.

[0029] 프로브를 이용하는 경우, 프로브를 cDNA 분자와 혼성화시킨다. 본 발명에서, 적합한 혼성화 조건은 최적화 절차에 의하여 일련의 과정으로 결정될 수 있다. 이런 절차는 연구실에서 사용을 위한 프로토콜을 수립하기 위하여 당업자에 의하여 일련의 과정으로 실시된다. 예를 들어, 온도, 성분의 농도, 혼성화 및 세척 시간, 완충액 성분 및 이들의 pH 및 이온세기 등의 조건은 프로브의 길이 및 GC 양 및 타겟 뉴클레오타이드 서열 등의 다양한 인자에 의존한다. 혼성화를 위한 상세한 조건은 Joseph Sambrook, et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001); 및 M.L.M. Anderson, Nucleic Acid Hybridization, Springer-Verlag New York Inc. N.Y.(1999)에서 확인할 수 있다.

[0030] 혼성화 반응 이후에, 혼성화 반응을 통하여 나오는 혼성화 시그널을 검출한다. 혼성화 시그널은 예컨대, 프로브에 결합된 표지의 종류에 따라 다양한

[0031] 방법으로 실시할 수 있다. 예를 들어, 프로브가 효소에 의해 표지된 경우, 이 효소의 기질을 혼성화 반응 결과물과 반응시켜 혼성화 여부를 확인할 수 있다. 이용될 수 있는 효소/기질의 조합은, 퍼옥시다아제(예컨대, 호스레디쉬퍼옥시다아제)와 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), o-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌; 알칼린 포스파타아제와 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF 기질; 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate) 등이다. 프로브가 금 입자로 표지된 경우에는 실버 나이트레이트를 이용하여 실버 염색 방법으로 검출할 수 있다.

[0032] 생물학적 시료에서 갈락틴-10 또는 S100A9의 뉴클레오타이드 서열에 대한 혼성화 시그널이 정상 시료(예컨대, 아토피 피부염이 아닌 인간의 혈액)보다 높게 나오는 경우에는 아토피 피부염으로 진단된다.

[0033] 본 발명의 아토피 피부염 진단방법은 면역분석 방법에 의해 실시될 수 있다. 상기 면역분석 방법은 방사능면역분석, 방사능면역침전, 면역침전, ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay), 캡처-ELISA, 억제 또는 경쟁

분석, 샌드위치 분석, 유세포 분석(flow cytometry), 면역형광염색 및 면역친화성 정제를 포함하지만, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 면역분석의 방법은 *Enzyme Immunoassay*, E. T. Maggio, ed., CRC Press, Boca Raton, Florida, 1980; Gaastra, W., *Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), in Methods in Molecular Biology*, Vol. 1, Walker, J.M. ed., Humana Press, NJ, 1984; 및 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies:A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조로서 삽입된다.

[0034] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})로 레이블링된 항체(상기 마커에 특이적으로 결합하는 항체)가 이용될 수 있다.

[0035] 본 발명의 방법이 ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 분석하고자 하는 미지의 시료를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 일차항체로서의 상기 마커-특이 항체와 상기 시료를 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 효소가 결합된 이차항체와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 효소의 활성을 측정하는 단계를 포함한다.

[0036] 상기 고체 기질로 적합한 것은 탄화수소 폴리머(예컨대, 폴리스틸렌 및 폴리프로필렌), 유리, 금속 또는 젤이며, 가장 바람직하게는 마이크로타이터 플레이트이다.

[0037] 상기 이차항체에 결합된 효소는 발색반응, 형광반응, 발광반응 또는 적외선 반응을 촉매하는 효소를 포함하나, 이에 한정되지 않으며, 예를 들어, 알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제, 루시페라아제 및 사이토크롬 P₄₅₀을 포함한다. 상기 이차항체에 결합하는 효소로서 알칼린 포스파타아제가 이용되는 경우에는, 기질로서 브로모클로로인돌일 포스페이트(BCIP), 니트로 블루 테트라졸리움(NBT), 나프톨-AS-B1-포스페이트(naphthol-AS-B1-phosphate) 및 ECF(enhanced chemifluorescence)와 같은 발색반응 기질이 이용되고, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제가 이용되는 경우에는 클로로나프톨, 아미노에틸카바졸, 디아미노벤지딘, D-루시페린, 루시게닌(비스-N-메틸아크리디늄 니트레이트), 레소루핀 벤질 에테르, 루미놀, 암플렉스 레드 시약(10-아세틸-3,7-디하이드록시페녹사진), HYR(p-phenylenediamine-HCl and pyrocatechol), TMB(tetramethylbenzidine), ABTS(2,2'-Azine-di[3-ethylbenzthiazoline sulfonate]), *o*-페닐렌디아민(OPD) 및 나프톨/파이로닌, 글루코스 옥시다아제와 t-NBT(nitroblue tetrazolium) 및 m-PMS(phenzaine methosulfate)과 같은 기질이 이용될 수 있다.

[0038] 본 발명의 방법이 캡처-ELISA 방식으로 실시되는 경우, 본 발명의 특정 실시예는 (i) 포획항체(capturing antibody)로서 상기 분자 마커에 대한 항체를 고체 기질의 표면에 코팅하는 단계; (ii) 포획항체와 시료를 반응시키는 단계; (iii) 상기 단계 (ii)의 결과물을 시그널을 발생시키는 레이블이 결합되어 있고, 상기 분자 마커에 대한 검출항체(detecting antibody)와 반응시키는 단계; 및 (iv) 상기 레이블로부터 발생하는 시그널을 측정하는 단계를 포함한다.

[0039] 상기 검출 항체는 검출 가능한 시그널을 발생시키는 레이블을 가지고 있다. 상기 레이블은 화학물질(예컨대, 바이오틴), 효소(알칼린 포스파타아제, β -갈락토시다아제, 호스 래디쉬 퍼옥시다아제 및 사이토크롬 P₄₅₀), 방사능물질(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35}), 형광물질(예컨대, 플루오레신), 발광물질, 화학발광물질(chemiluminescent) 및 FRET(fluorescence resonance energy transfer)을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 다양한 레이블 및 레이블링 방법은 Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies:A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999에 기재되어 있다.

[0040] 상기 ELISA 방법 및 캡처-ELISA 방법에서 최종적인 효소의 활성 측정 또는 시그널의 측정은 당업계에 공지된 다양한 방법에 따라 실시될 수 있다. 이러한 시그널의 검출은 생물학적 시료에 상기 갈렉틴-10 또는 S100A9가 존재한다는 것을 가리키는 것이며, 이는 결국 아토피 피부염이 발병되었음을 보여주는 것이다. 만일, 레이블로서 바이오틴이 이용된 경우에는 스트렙타비딘으로, 루시페라아제가 이용된 경우에는 루시페린으로 시그널을 용이하게 검출할 수 있다.

[0041] 한편, 본 발명의 방법은 종래의 유세포 분석 방법(flow cytometry; Ormerod, M. G., ed. 1990, *Flow Cytometry: A Practical Approach*. IRL Press), MACS(magnetic-activated cell sorting; Robert David, et al., *Stem Cells*, 23:477-482(2005) 또는 면역친화성 정제방법(Ed Harlow and David Lane, *Using Antibodies:A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)에 따라 실시될 수 있다.

- [0042] 본 발명의 아토피 피부염 진단방법은 유전자 증폭방법에 의해 실시될 수 있다. 유전자 증폭방법을 이용한 갈렉틴-10 (Galectin-10) 또는 S100A9의 검출은 당업계에 공지된 다양한 방법을 이용하여 실시할 수 있으며, 이 경우 갈렉틴-10 (Galectin-10) 또는 S100A9의 프라이머 또는 프로브가 이용될 수 있다.
- [0043] 프라이머를 이용하는 경우에는, 유전자 증폭 반응을 실시하여 상기 갈렉틴-10 (Galectin-10) 또는 S100A9의 유전자의 발현 정도를 조사한다. 본 발명은 상기 유전자의 발현 정도를 분석하는 것이기 때문에, 분석 대상의 시료(예컨대, 세포)에서 상기 마커의 mRNA 양을 조사하여 상기 마커의 유전자의 발현 정도를 결정한다.
- [0044] 따라서 본 발명은 원칙적으로 생물학적 시료 내의 mRNA를 주형으로 하고 mRNA 또는 cDNA에 결합하는 프라이머를 이용하여 유전자 증폭 반응을 실시한다.
- [0045] 우선, mRNA를 얻기 위하여 시료에서 총 RNA를 분리한다. 총 RNA를 분리하는 것은 당업계에 공지된 통상의 방법에 따라 실시될 수 있다(참조: Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001); Tesniere, C. et al., *Plant Mol. Biol. Rep.*, 9:242(1991); Ausubel, F.M. et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Willey & Sons(1987); 및 Chomczynski, P. et al., *Anal. Biochem.* 162:156(1987)). 예컨대, Trizol을 이용하여 용이하게 세포내의 총 RNA를 분리할 수 있다.
- [0046] 이어, 분리된 mRNA로부터 cDNA를 합성하고, 이 cDNA를 증폭한다. 본 발명의 총 RNA는 인간의 시료로부터 분리되는 것이기 때문에, mRNA의 말단에는 폴리-A 테일을 갖고 있으며, 이러한 서열 특성을 이용한 올리고 dT 프라이머 및 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 용이하게 합성할 수 있다(참조: *PNAS USA*, 85:8998(1988); Libert F, et al., *Science*, 244:569(1989); 및 Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)). 이어, 유전자 증폭 반응을 통하여 합성된 cDNA를 증폭한다. 본 발명에 이용되는 프라이머는 주형의 한 부위에 혼성화 또는 어닐링되어, 이중체 구조를 형성한다. 이러한 이중체 구조를 형성하는 데 적합한 핵산 혼성화의 조건은 Joseph Sambrook, 등, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., 등, *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C. (1985)에 개시되어 있다.
- [0047] 다양한 DNA 증합효소가 본 발명의 증폭에 이용될 수 있으며, *E. coli* DNA 증합효소 I의 “클레나우” 단편, 열안정성 DNA 증합효소 및 박테리오파아지 T7 DNA 증합효소를 포함한다. 증합효소는 다양한 박테리아 종으로부터 얻을 수 있는 열안정성 DNA 증합효소이고, 이는 *Thermus aquaticus*(Taq), *Thermus thermophilus*(Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis*, 및 *Pyrococcus furiosus*(Pfu)를 포함한다. 증합 반응을 실시할 때, 반응 용기에 반응에 필요한 성분들을 과량으로 제공하는 것이 바람직하다. 증폭 반응에 필요한 성분들의 과량은, 증폭반응이 성분의 농도에 실질적으로 제한되지 않는 정도의 양을 의미한다. Mg²⁺와 같은 조인자, dATP, dCTP, dGTP 및 dTTP를 소망하는 증폭 정도가 달성될 수 있을 정도로 반응 혼합물에 제공하는 것이 소망된다. 증폭 반응에 이용되는 모든 효소들은 동일한 반응 조건에서 활성 상태일 수 있다. 사실, 완충액은 모든 효소들이 최적의 반응 조건에 근접하도록 한다. 따라서 본 발명의 증폭 과정은 반응물의 첨가와 같은 조건의 변화 없이 단일 반응물에서 실시될 수 있다.
- [0048] 본 발명에 있어서 어닐링 또는 혼성화는 타겟 뉴클레오타이드 서열과 프라이머 사이에 특이적 결합을 가능하게 하는 엄격조건 하에서 실시된다. 어닐링을 위한 엄격조건은 서열-의존적이며 주위 환경적 변수에 따라 다양하다.
- [0049] 본 명세서의 용어 “증폭 반응”은 핵산 분자를 증폭하는 반응을 의미한다. 다양한 증폭 반응들이 당업계에 보고되어 있으며, 이는 증합효소 연쇄반응(이하 PCR이라 한다)(미국 특허 제4,683,195, 4,683,202, 및 4,800,159호), 역전사-증합효소 연쇄반응(이하 RT-PCR로 표기한다)(Sambrook 등, *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001)), Miller, H. I.(WO 89/06700) 및 Davey, C. 등(EP 329,822)의 방법, 리가아제 연쇄 반응(ligase chain reaction; LCR)(17, 18), Gap-LCR(WO 90/01069), 복구 연쇄 반응(repair chain reaction; EP 439,182), 전사-중재 증폭(transcription-mediated amplification; TMA)(19) (WO 88/10315), 자가 유지 염기서열 복제(self sustained sequence replication)(20)(WO 90/06995), 타겟 폴리뉴클레오타이드 염기서열의 선택적 증폭(selective amplification of target polynucleotide sequences)(미국 특허 제6,410,276호), 컨센서스 서열 프라이밍 증합효소 연쇄 반응(consensus sequence primed polymerase chain reaction; CP-PCR)(미국 특허 제4,437,975호) 및 고리-중재 항온성 증폭(loop-mediated isothermal amplification; LAMP)를 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 사용 가능한 다른 증폭 방

법들은 미국특허 제5,242,794, 5,494,810, 4,988,617호 및 미국 특허 제09/854,317호에 기술되어 있다. 본 발명의 유전자 증폭방법은 미국특허 제4,683,195호, 제4,683,202호 및 제4,800,159호에 개시된 PCR(polymerase chain reaction)에 따라 실시된다.

- [0050] PCR은 가장 잘 알려진 핵산 증폭 방법으로, 그의 많은 변형과 응용들이 개발되어 있다. 예를 들어, PCR의 특이성 또는 민감성을 증진시키기 위해 전통적인 PCR 절차를 변형시켜 터치다운(touchdown) PCR, 핫 스타트(hot start) PCR, 네스티드(nested) PCR 및 부스터(booster) PCR이 개발되었다. 또한, 실시간(real-time) PCR, 분별 디스플레이 PCR(differential display PCR: DD-PCR), cDNA 말단의 신속 증폭(rapid amplification of cDNA ends: RACE), 멀티플렉스 PCR, 인버스 중합효소 연쇄반응(inverse polymerase chain reaction: IPCR), 벡토레트(vectorette) PCR, TAIL-PCR(thermal asymmetric interlaced PCR) 및 멀티플렉스 PCR이 특정한 응용을 위해 개발되었다. PCR에 대한 자세한 내용은 McPherson, M.J., 및 Moller, S.G. *PCR*. BIOS Scientific Publishers, Springer-Verlag New York Berlin Heidelberg, N.Y. (2000)에 기재되어 있으며, 그의 교시사항은 본 명세서에 참조로 삽입된다.
- [0051] 본 발명에서 유전자 증폭방법에 이용되는 프라이머는 상기 갈렉틴-10 또는 S100A9의 cDNA 서열에 상보적인 서열을 갖는 올리고뉴클레오타이드이다. 본 명세서에서 용어 “프라이머”는 적합한 온도에서 적합한 완충액 내에서 적합한 조건(즉, 4종의 다른 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 중합반응 효소) 하에서 주형-지시 DNA 합성의 개시점으로 작용할 수 있는 단일-가닥 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 프라이머의 적합한 길이는 다양한 인자, 예컨대, 온도와 프라이머의 용도에 따라 변이가 있지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 하이브리드 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다.
- [0052] 프라이머의 서열은 주형의 일부 서열과 완전하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 주형과 혼성화 되어 프라이머 고유의 작용을 할 수 있는 범위 내에서의 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 따라서, 본 발명에서의 프라이머 세트는 주형인 상기 마커의 cDNA 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 가질 필요는 없으며, 이 서열에 혼성화되어 프라이머 작용을 할 수 있는 범위 내에서 충분한 상보성을 가지면 충분하다. 바람직하게는, 본 발명에서 이용되는 프라이머는 상기 마커의 cDNA 서열에 완벽하게 상보적인 서열을 갖는 것이다. 본 발명의 프라이머는 예컨대, NCBI GenBank 접근번호 NM_001828.5(갈렉틴-10의 경우), NM_002965.3(S100A9의 경우)의 서열을 주형으로 디자인될 수 있다.
- [0053] 이러한 프라이머의 디자인은 상기 갈렉틴-10 및 S100A9의 cDNA 서열을 참조하여 당업자에 의해 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.
- [0054] 이렇게 증폭된 상기 마커의 cDNA를 적합한 방법으로 분석하여 상기 마커의 유전자의 발현 정도를 조사한다. 예를 들어, 상술한 증폭 반응 결과물을 젤 전기영동을 하고, 그 결과 형성되는 밴드를 관찰 및 분석함으로써 상기 마커의 유전자의 발현 정도를 조사한다.
- [0055] 이러한 증폭 반응을 통하여, 생물학적 시료에서 상기 유전자의 발현이 정상 시료 보다 높게 나오는 경우에는 아토피 피부염으로 진단된다.
- [0056] 본 발명에서 갈렉틴-10 및 S100A9는 아토피 피부염에서 고발현 되는 생체 분
- [0057] 자이다. 이러한 생체 분자의 고발현은 mRNA 또는 단백질 수준에서 측정될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 “고발현(또는 과발현)”은 조사 대상의 생물학적 시료에서 대상 뉴클레오타이드 서열 또는 단백질의 발현 정도가 정상 시료와 비교하여 높은 경우를 의미한다. 예컨대, 당업계에서 통상적으로 이용되는 발현 분석 방법, 예컨대 RT-PCR 방법 또는 ELISA 방법(참조: Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Press(2001))에 따라 발현 분석을 한 경우, 발현이 높은 것으로 분석되는 경우를 의미한다. 예컨대, 상술한 진단 방법에 따라 분석한 결과, 본 발명의 갈렉틴-10 또는 S100A9이 정상 시료와 비교하여 2-10 배 정도 고발현되는 경우, 본 발명에서의 “고발현”으로 판정하고 아토피 피부염으로 판정한다.
- [0058] 본 발명의 구체적인 일 실시예에 따르면, 아토피 피부염 환자군에서 갈렉틴-10 (Galectin-10) 또는 S100A9 단백질이 과발현되며, 특히 갈렉틴-10이 과발현된 CD3+ T 세포에서는 인터루킨-22 또는 인터루킨-17의 생성이 증가됨을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 진단방법은 상기 방법 외에 체외로 분리된 동물의 시료 내 인터루킨-22 또는 인터루킨-17의 존재를 확인하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있으며, 인터루킨-22 또는 인터루킨-17의 생성이 증가됨을 확인함으로써 보다 정확한 아토피 피부염의 진단 및 예후 분석이 가능하다.

- [0059] 본 발명의 아토피 피부염의 진단 및 예후 분석용 키트는 상기 언급된 본 발명의 진단방법을 이용하기 때문에, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0060] 본 발명의 아토피 피부염의 진단 및 예후 분석용 키트는 공지된 다양한 종류의 키트로 제작될 수 있으며, 예컨대 면역분석(immunoassay)용 키트, 유전자 증폭 키트를 포함하며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0061] 본 발명의 아토피 피부염의 진단 및 예후 분석용 키트가 만일 PCR 증폭 과정에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, PCR 증폭에 필요한 시약, 예컨대, 완충액, DNA 중합효소 (예컨대, *Thermus aquaticus* (Taq), *Thermus thermophilus* (Tth), *Thermus filiformis*, *Thermis flavus*, *Thermococcus litoralis* 또는 *Pyrococcus furiosus* (Pfu)로부터 수득한 열 안정성 DNA 중합효소), DNA 중합 효소 조인자 및 dNTPs를 포함할 수 있다. 본 발명의 아토피 피부염의 진단 및 예후 분석용 키트가 면역 분석에 적용되는 경우, 본 발명의 키트는 선택적으로, 이차항체 및 표지의 기질을 포함할 수 있다.
- [0062] 본 발명의 키트는 상기한 시약 성분을 포함하는 다수의 별도 패키징 또는 컴파트먼트로 제작될 수 있다.
- [0063] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 아토피 피부염(atopic dermatitis)의 예방 또는 치료용 물질의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [0064] (a) 갈렉틴-10(Galectin-10) 또는 S100A9 단백질, 또는 갈렉틴-10 또는 S100A9 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 세포 또는 조직에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계; 및
- [0065] (b) 상기 단백질의 양 또는 단백질의 활성을 측정하는 단계로서, 상기 시료에 의해 상기 단백질의 양 또는 단백질의 활성이 감소-조절(down-regulation)되는 것으로 측정되는 경우에는 상기 시료는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 물질로 판정된다.
- [0066] 본 발명의 스크리닝 방법은, 예컨대 항원-항체 반응 방식 또는 유전자 증폭 방식으로 실시될 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0067] 본 발명의 스크리닝 방법에서 상기 단계 (a)는 인터루킨-22 또는 인터루킨-17 단백질, 또는 인터루킨-22 또는 인터루킨-17 단백질을 코딩하는 핵산분자를 포함하는 세포 또는 조직에 분석하고자 하는 시료를 접촉시키는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0068] 상기 세포는 생체에서 채취한 세포를 포함하며, 예컨대 혈액에 존재하는 면역세포인 T 세포를 분리하여 사용할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 방법에 따르면, 아토피 피부염 환자의 T 세포는 갈렉틴-10 또는 S100A9를 과발현하며, 특히 갈렉틴-10 발현된 CD3+ T 세포에서 인터루킨-22 또는 인터루킨-17의 생성이 증가되므로, 갈렉틴-10, S100A9, 인터루킨-22 및/또는 인터루킨-17의 발현을 저하시키는 물질은 새로운 아토피 피부염(atopic dermatitis)의 예방 또는 치료제로서 판정될 수 있다.

발명의 효과

- [0070] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0071] (a) 본 발명은 아토피 피부염의 진단 방법 및 진단키트를 제공한다.
- [0072] (b) 본 발명의 진단방법은 갈렉틴-10 (Galectin-10) 또는 S100A9의 발현이 아토피 피부염 환자군에서 현저히 증가되므로, 이를 이용하여 아토피 피부염의 발명 유무 및 재발 유무를 빠르고 신속히 알 수 있다.
- [0073] (c) 본 발명에 따르면, 갈렉틴-10 (Galectin-10) 또는 S100A9의 단백질 발현이 아토피 피부염 환자군에서 현저하게 증가되므로, 이를 이용하여 상기 단백질의 발현을 억제시키는 물질을 스크리닝함으로써, 아토피 피부염 치료제를 개발할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0074]

도 1은 정상 대조군(HC) 및 아토피 피부염 환자군의 차등 발현 단백질(DEP)의 볼케이노 플롯을 나타낸다. X축은 변화율, Y축은 P-value를 나타낸다. P-value는 0.05를 컷오프 값으로 하였다. 도 1a: 정상군 및 AD1, 도 1b: 정상군 및 AD2

도 2는 AD에서 과발현된 단백질의 발현정도를 나타내는 이온 크로마토그램이다. A: 갈렉틴-10, B: S100A9.

도 3은 HC, EAD 및 IAD 그룹의 프로테오믹 프로파일링을 비교한 것이다. 도 3a: 코마시블루-염색(n=3), 도 3b: 벤다이어그램, 도 3c: HC 1, 2, 3의 1DLC-MS/MS 크로마토그램, 도 3d: EAD 1, 2, 3의 1DLC-MS/MS 크로마토그램, 도 3e: IAD 1, 2, 3의 1DLC-MS/MS 크로마토그램.

도 4는 정상 대조군 및 환자군의 T 세포에서 코로닌-1A, S100A9, S100A8 및 갈렉틴-10의 웨스턴 블로팅 분석 결과를 나타낸 것이다. S100A9, S100A8 및 갈렉틴-10은 EAD 및 IAD에서 과발현되었으나, 코로닌-1A는 변화가 없었다.

도 5는 정상 대조군 및 환자군의 T 세포에서 갈렉틴-10의 발현정도를 나타낸 것이다. 정상 대조군 및 환자군의 PBMC로부터 CD3+ T 세포에서의 갈렉틴-10 단백질 발현정도를 나타낸 것이다.

도 6은 정상 대조군 및 환자군의 갈렉틴-10 발현 CD3+ T 세포에서 사이토카인의 발현을 나타낸 것이다. IFN- γ , IL-4, CD25 및 IL-17의 발현에는 차이가 없었으나, IL-22는 환자군의 갈렉틴-10 발현 CD3+ T 세포에서 과발현되었다.

도 7은 정상 대조군 및 환자군의 갈렉틴-10 발현 CD3+ T 세포에서 IL-17 및 IL-22의 유세포분석 결과를 나타낸 것이다. 그래프는 유세포 분석 결과를 정량적으로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0075]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 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 자에 있어서 자명할 것이다.

[0076]

실시예

[0077]

실험재료 및 방법

[0078]

1. 환자군 및 아토피 피부염 타입의 분류

[0079]

연세대학교 세브란스 병원 피부과를 내원한 아토피 피부염을 가진 15명의 환자 및 건강한 7명의 대조군(healthy control, HC)이 본 연구에 참여하였다. 진단은 ‘Hanifin and Rajka’ 진단방법에 따라 이루어졌다(17). 아토피 피부염의 심각도(severity)는 EASI (eczema area and severity index)에 따라 평가하였다(18). 본 연구는 임상시험심사위원회의 승인 하에 실시되었으며, 각 환자로부터 사전 동의를 받은 후 실시되었다. 소아과 환자는 부모의 사전 동의하에 참여하였다.

[0080]

병력에 기반하여, 혈청의 전체 IgE 및 알레르겐-특이적 IgE 레벨을 측정한 후, EAD(외인성 아토피 피부염) 및 IAD(내인성 아토피 피부염)으로 분류하였다. 알레르겐-특이적 IgE 레벨은 피부단자시험(skin prick test) 또는 상업적으로 사용가능한 형광 효소 면역분석법을 이용하여 제조자의 매뉴얼에 따라 측정하였다(UniCAP™, 스웨덴).

[0081]

IAD는 다음 기준에 따라 진단하였다: (i) 아토피 피부염의 임상적 표현형, (ii) 낮은 또는 적절한 전체 혈청 IgE 레벨(<150 kU l)과 공기 알레르겐(aeroallergen) 및 음식 알레르겐의 음성 인비트로 IgE 스크리닝과의 결합, 또는 표준 공기 알레르겐 및 음식 알레르겐을 위한 음성단자시험(negative prick test) 결과, (iii) 다른 아토피 질환, 예컨대 알러지성 천식(allergic asthma) 및 비결막염(rhinoconjunctivitis)의 여부. 표 1은 대조군, EAD 및 IAD 환자의 임상 양상(Clinical feature)을 나타낸다.

표 1

대조군(HC) 및 환자군(EAD 및 IAD)의 임상양상

-	HC (n=7)	EAD (n=8)	IAD (n=6)
연령 (평균 ± 오차)	27±2.1	23.3±6.8	29.7 ± 16.2
성별 (여:남)	4:3	5:3	3:3
알레르기 비염	0%	75%	0%
알레르기 천식	0%	25%	0%
EASI	0	28 ± 7.3	16.8 ± 3.1
혈청 IgE 레벨 (kU L1, 평균 ± 오차)	51.6 ± 27.1	2796±1814	64.2 ± 48.6
아토피의 가족력	0%	62.5%	16.6%
CAP 또는 피부단자실험의 양성 반응	0%	100%	0%

2. 혈액으로부터의 T 세포 단백질 추출

아토피 피부염 환자 및 대조군으로부터 혈액 샘플을 채취하였다. 5U/ml 헤파린 및 2 mM EDTA이 포함된 20 ml PBS와 상기 혈액을 혼합하였다. 피콜-하이파크(Ficoll-Hypaque) 밀도 원심분리법을 사용하여 말초 혈액 단핵 세포(Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)을 추출하였다. T 세포 추출을 위해, CD12, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123 및 글리코포린 A에 대한 비오틴-컨쥬게이션된 항체 카테일 및 항-비오틴 마이크로비드를 이용하는 음성 선별법을 실시하였다(밀텐이 바이오텍, 독일). 선별된 T 세포를 5 mM PBS/EDTA에 2회 세척한 뒤, -20℃에서 표준 단백질 용균 버퍼로 용해시켰다.

3. 프로테움 준비

T 세포의 단백질을 8 M 우레아에서 변성시켰다. 상기 단백질을 37℃, 10 mM DTT에서 30분간 환원시켰다. 상기 단백질에 IAA(인돌-3-아세트산)를 최종 농도 20 mM으로 첨가한 후, 최종 혼합물을 37℃의 암실에서 30분간 반응시켰다. 과량의 시약을 제거하기 위하여, 샘플을 5,000 분획분자량(molecular weight cut off) PES 멤브레인을 가진 비바스핀(Vivaspin) 컬럼에 주입하여 100 mM의 트리에틸 암모늄 비카보네이트(TEAB) 버퍼로 세척하였다. 상기 결과물인 단백질을 정량한 후, 100 mM의 TEAB (pH 8.0)에 녹여 최종 농도 1 µg/µL로 제조하였다. 단백질 분해(digestion)를 위해 트립신(1:20, 프로테아제:단백질 비율)을 첨가하고 상기 혼합물을 37℃에서 하루동안 반응시켰다.

4. TMT 표지

TMT 식스플렉스 시약은 써모 사이언티픽(Thermo Scientific)으로부터 구입하였다. 단백질 100 µg을 포함하고 있는 샘플을 2 분획으로 일정하게 나눈 뒤, 두 가지 다른 TMT 시약으로 표지하였다. 예컨대, 대조군의 단백질 샘플은 TMT-126 및 TMT-129, 또는 TMT-127 및 TMT-130으로 표지하고, 환자군의 샘플은 TMT-127 및 TMT-130, 또는 TMT-128 및 TMT-131으로 각각 표지하였다. 서로 다른 TMT 시약으로 표지된 6개의 샘플을 혼합한 뒤, 건조시키고, LC/MS/MS 분석을 위해 0.5% 포름산을 포함하는 물에 재-가용(re-solubilized)시켰다.

5. 나노LC-MS/MS 분석

1차원 액체크로마토그래피/이중질량분석기(one dimensional liquid chromatography/tandem mass spectrometry, 1DLC-MS/MS)를 이용하여 펩타이드 분석을 실시하였다. 나노 액쿼티(Acquity) U7PLC 시스템(워터스, 미국) 및 나노-전기분사 소스를 구비한 LTQ 오비트랩 엘리트 질량분석기(써모 사이언티픽, 미국)으로 구성된 나노-LC-MS 시스템을 가진 MS/MS를 이용하여 펩타이드를 동정하였다. 자동 샘플러를 이용하여, 펩타이드 용액을 C18 트랩-컬럼(내경 300 , 길이 5 mm, 및 입자 크기 5 ; 워터스, 미국)에 5 씩 분주하였다. 펩타이드를 컬럼상에서 유속 5 /분의 속도로 탈염화 및 농축하였다. 이어, 트래핑된(trapping) 펩타이드를 백플러쉬(back-flush)한 후, C18 (아쿠아; 입자 크기 3) 패키징된 100-실리카 튜브(오리피스 내경 약 6)로 구성된 200 mm 미세관 컬럼 상에

서 분리하였다.

[0091] 이동상 A 및 B는 0% 및 100% 아세토니트릴로 구성되고, 모두 0.1% 포름산이 포함된다. LC 구배(gradient)는 5% B, 5분으로 시작하였고, 15% B로 5분 이상, 50% B로 100분 이상, 95% B로 5분 이상 실시한 후, 95% B로 5분 이상 유지하고 5% B로 다시 5분 실시하였다. 다른 단계 실시 전, 5% B로 15분간 컬럼을 재안정화(re-equilibrated) 시켰다. 전기분무에 적용된 전압은 2.2 kV이다. 펩타이드가 크로마토그래피로 분리되는 동안, 데이터-의존 모드 및 직접 조절 Xcalibur 소프트웨어 하에서 LTQ 오비트랩 엘리트 질량분석을 실시하였다. MS 데이터는 다음의 파라미터들을 이용하여 얻었다: 비표지에서 각 전체 스캔별 10 데이터-의존성 충돌유도분리 (collision-induced dissociation, CID) MS/MS 스캔; TMT에서 각 전체 스캔별 10 데이터-의존성 고에너지 충돌 유도분리(higher energy collision induced dissociation, HCD) MS/MS 스캔; 평균 2-마이크로스캔 LTQ에서 CID 스캔을 얻음; 해상도 30,000 및 15,000의 오비트랩(Orbitrap)에서 전체 스캔 및 HCD 스캔; CID 및 HCD에서 35% 정규화 충돌 에너지; ± 1.5 Da 추출창(isolation window); ± 1.5 Da 차단창에 가능한 동적 차단. 모든 비표지 정량 1DLC-MS/MS 분석은 각 샘플마다 3회 실시하였다.

[0092]

[0093] 6. 데이터 분석

[0094] MS/MS 스펙트럼 데이터는 다음의 소프트웨어 분석 프로토콜을 이용하여 분석하였다. 원본 데이터베이스에서 각 엔트리의 서열이 반전되는 유인 데이터베이스에 연관된 IPI 인간 단백질 데이터베이스(3.87, 2011)에 대한 in-house ProLucid 소프트웨어를 이용하여 MS/MS 스펙트럼을 검색하였다. 모든 단백질의 반전된 서열은 FDR (false discovery rate)를 계산하기 위해 데이터베이스에 첨부되었다. ProLucid는 단동위 질량(monoisotopic mass) 선별에 이용되었으며, 전구체 질량 에러는 25 ppm, 단편 이온 질량 에러는 0.8 Da이다. 모든 트립신 분해된 펩타이드는 잘못된 분해가 한 곳만 존재하는 펩타이드로 선별하였다. 비표지 정량을 위해, 카바미도메틸 레이트 시토신을 고정된 변이로 선택하였다. 산화된 메티오닌을 가변적인 변이로 선택하였다. 한편, TMT 런닝에서 표지 시약에 의한 N-말단 및 리신 잔기에서 고정된 변이가 추가적으로 선택되었다. 스펙트럼의 매치를 모아 DTASelect를 이용하여 펩타이드 실패-양성 비율(false-positive rate) 1%로 필터링하였다. 동정된 단백질리스트는 단일 펩타이드를 포함한다. 공유된 펩타이드를 하나의 단백질로 카운팅하여 단백질을 동정하였다.

[0095] 비표지 정량을 위해 스펙트럼 인덱스(spectral index, SI_N)를 산출한 후, 그리핀법(Griffin's method)을 이용하여 정규화 하였다(14). 3번의 측정에서 검출된 두 개 또는 그 이상의 펩타이드를 단백질의 SI_N 산출에 사용하였다. 1개 또는 그 이상의 특이한 SI_N 값을 가지는 펩타이드를 포함하는 단백질을 비표지 정량에 사용하였다. 단백질 \log_2 비율의 분포를 고려하여, ≤ -2 또는 ≥ 2 의 값을 나타내는 단백질을 차등 발현되는 (differentially expressed) 단백질로 판단하였다.

[0096] TMT 실험에서 펩타이드 동정을 위한 리포터 이온은 HCD 스캔에서 예상 m/z 값 근처의 스몰 윈도우(± 20 ppm)로부터 추출되었다. 같은 샘플을 각각 두 개의 TMT 시약으로 표지했기 때문에, 리포터 이온의 강도를 비교했을 때 30%내에서 유사한 비율을 나타내는 펩타이드를 선별하여 단백질 양을 측정하였다. 단백질의 존재비(abundance ratio)는 다른 리포터 이온 채널에서 단백질의 전체 강도 간의 비율을 이용하여 산출되었다. 단백질 \log_2 비율의 분포를 고려하여 ≤ -1 또는 ≥ 1 의 값을 나타내는 단백질을 차등 발현되는 단백질로 판단하였다.

[0097]

[0098] 7. 웨스턴 블로팅

[0099] 동량의 세포 단백질을 5X 샘플 버퍼와 혼합한 후, 100°C에서 5분간 가열하고, 이어 12% SDS-폴리아크릴아마이드 겔에서 분리하였다. 상기 전기영동 후, 단백질을 Tris 버퍼(0.025 M Tris-HCl, 0.192 M 글리신 및 20% MeOH) 하에서 ECL 니트로셀룰로오스 멤브레인(GE 헬스케어, 영국)에 옮겼다. 상기 멤브레인을 TBS-트윈 20 하의 5% 탈지유를 이용하여 상온에서 1시간동안 블로킹하였다. 이어 멤브레인에 1차 항체(S100A8 및 S100A9: 산타크루즈 바이오테크놀로지, 1:750; 갈락틴-10: Abcam, 1:10; 코로닌1a: Abcam, 1:500)를 처리하고 4°C에서 하루동안 반응시킨 후, HRP (horseradish peroxidase)-컨쥬게이션된 항-마우스 또는 항-레빗 이차 항체(산타크루즈 바이오테크놀로지, 1:2000)를 처리하여 상온에서 1시간동안 반응시켰다. 최종적으로 상기 멤브레인에 ECL (enhanced chemiluminescence) 웨스턴 블로팅 검출시약(산타크루즈 바이오테크놀로지)을 처리하였다.

[0100]

8. 유세포분석

[0101]

세포 표면을 염색하기 위하여, 분리된 PBMC를 마우스 항-인간 CD3 단일클론항체(mAb)(eBioscience), APC-항 마우스 IgG2a (서던 바이오테크), PE항 인간 CD3 및 CD25 단일클론항체(eBioscience)로 염색하였다. 세포 내부를 염색하기 위하여, 세포를 고정한 뒤 Cytotfix/Cytoperm 용액(eBioscience)으로 처리하고, 이어 상기 세포를 마우스 항 인간 갈렉틴 10 mAb (Abcam), PE-항 마우스 IgG 및 FITC-항 마우스 IgG (산타크루즈 바이오테크놀로지), PE-항 인간 IL-4, FITC-항 인간 IFN- γ , APC-항 인간 IL-17A 및 perCP-eFluor 710-항 인간 IL-22 mAbs (eBioscience)으로 염색하였다. BD LSR II 유세포분석기를 이용하여 실험을 실시하였으며, 매킨토시 FLOWJO 소프트웨어 버전 7.6.5 (트리스타, 미국)를 이용하여 분석하였다.

[0102]

실험결과

[0103]

1. 정상대조군 및 아토피 피부염 환자의 T 세포 분석을 통한 프로테오믹 프로파일링

[0104]

첫 번째 분석은, 대조군 및 두 가지 타입 아토피 피부염 환자군(AD1: EAD, AD2: IAD)의 T 세포 비표지 정량을 기반으로 한, 정규화된 스펙트럼 인덱스(SI_N)를 이용한 프로테오믹 프로파일링을 수행하였다. 전체 919개의 단백질이 동정되었으며, 그 중 261개의 단백질은 상기 세 가지 군에서 모두 발현되었다.

[0105]

대조군 및 AD1 간에는 차등 발현되는 단백질(differentially expressed proteins, DEP)이 35개(아토피 피부염 환자에서 하향 발현 15개, 상향 발현 20개)로 나타났다(표 2). 대조군 및 AD2 간에는 DEP가 38개(아토피 피부염 환자에서 하향 발현 16개, 상향 발현 22개)로 나타났다(표 3 및 표 4). 볼케노 플롯(20)은 P-value 대비 log 폴드 변화를 나타내는 스캐터 플롯으로서, 정상군(HC), AD1 및 AD2 군간의 DEP를 나타낸다(도 1a 및 도 1b). 코로나-1a가 동정되었으며 정상군 대비 AD1 및 AD2에서 높게 발현되었다(AD1 12배, AD2 4.7배). 단백질 S100A9는 AD 환자군에서 매우 높게 발현된 단백질 중의 하나이다.

표 2

[0106]

대조군(HC) 및 환자군(AD1)의 차등 발현 단백질(DEP)

-	주석	설명	SI _N (AD1)	SI _N (HC)	비율	P-value
1	IPI00295339	P-선택틴	2.522	6.937	-4.415	0.0306
2	IPI00644144	선택틴 P (과립막단백질 140 kDa, 항원 CD62), 아이소폼 CRA _a	2.522	6.937	-4.415	0.0306
3	IPI00008274	아데닐사이클라아제-연관 단백질 1의 아이소폼 1	5.809	10.107	-4.298	0.0003
4	IPI00219682	적혈구 밴드 7 막관통단백질	5.068	9.23	-4.162	0.0255
5	IPI00219757	글루타치온 S-트랜스퍼라아제 P	5.626	9.557	-3.93	0.0292
6	IPI00297550	응고인자 XIII A 체인	4.286	7.753	-3.467	0.0393
7	IPI00377081	적혈구 밴드 7 막관통단백질 아이소폼 b	5.068	7.917	-2.849	0.0330
8	IPI00022432	트랜스티레틴	5.74	8.156	-2.417	0.0360
9	IPI00059300	단백질 G6b의 아이소폼 E	3.982	6.214	-2.232	0.0053
10	IPI00059301	단백질 G6b의 아이소폼 D	3.982	6.214	-2.232	0.0053
11	IPI00892515	크로모솜 6 오픈리딩프레임 25	3.982	6.214	-2.232	0.0053
12	IPI00908754	cDNA FLJ50714, Ras-연관 단백질 Rap-1b와 유사	6.143	8.353	-2.21	0.0050
13	IPI00877120	RAS 온코진 패밀리 멤버	6.143	8.324	-2.182	0.0037
14	IPI00026314	겔솔린의 아이소폼 1	8.33	10.377	-2.046	0.0006
15	IPI00301058	혈관이완제-자극 인단백질	7.768	9.805	-2.037	0.0206
1	IPI00607577	수퍼옥사이드 디스뮤타아제 2, 미토콘드리아 아이소폼 B 전구체	6.805	4.732	2.073	0.0468
2	IPI00847322	수퍼옥사이드 디스뮤타아제 2, 미토콘드리아 아이소폼 A 전구체	6.805	4.732	2.073	0.0468
3	IPI00010133	코로나-1a	6.193	3.965	2.228	0.0334
4	IPI00847665	cDNA FLJ55165, 특히 새로운 Cys-His 단백질과 매우 유사	6.96	4.655	2.305	0.0020

5	IPI00917064	cDNA FLJ55509, 특히 새로운 Cys-His 단백질과 매우 유사	6.96	4.655	2.305	0.0020
6	IPI00028888	이중성 핵 리보뉴클레오단백질D0의 아이소폼 1	8.345	5.968	2.377	0.0088
7	IPI00903278	P37 AUF1	8.345	5.968	2.377	0.0088
8	IPI00789107	RPS27A; UBC 30 kDa 단백질	10.253	7.688	2.565	0.0392
9	IPI00010471	플라스틴-2	10.882	8.296	2.585	0.0200
10	IPI00878218	ATP 합성효소 (단편)	7.949	5.036	2.913	0.0049
11	IPI00220740	뉴클레오포스민의 아이소폼 2	11.857	8.909	2.948	0.0075
12	IPI00549248	뉴클레오포스민의 아이소폼 1	11.857	8.909	2.948	0.0075
13	IPI00798127	RPS27A; UBC 유비퀴틴 C	12.126	9.174	2.951	0.0182
14	IPI00604620	뉴클레올린	8.367	5.246	3.121	0.0007
15	IPI00297779	T-복합체 단백질 1 서브유닛 베타	6.607	3.318	3.289	0.0238
16	IPI00017367	래딕신, 아이소폼 CRA_a	5.572	1.929	3.643	0.0244
17	IPI00007765	스트레스-70 단백질, 미토콘드리아	6.884	3.123	3.761	0.0483
18	IPI00027462	단백질 S100-A9	9.058	5.252	3.807	0.0248
19	IPI00784614	젠티-9 아이소폼 a	7.551	2.585	4.966	0.0024
20	IPI00883870	젠티-9 아이소폼 d	7.551	2.585	4.966	0.0024

표 3

대조군(HC) 및 환자군(AD2)의 차등 발현 단백질-1

[0107]

-	주석	설명	SI _N (AD1)	SI _N (HC)	비율	P-value
1	IPI00021885	피브리노겐 알파 체인의 아이소폼 1	4.786	11.672	-6.886	0.0008
2	IPI00298497	피브리노겐 베타 체인	7.664	12.655	-4.991	0.0002
3	IPI00218733	수퍼옥사이드 디스뮤타아제 [Cu-Zn]	3.444	8.124	-4.68	0.0453
4	IPI00295976	인테그린 알파-IIb의 아이소폼 1	8.383	12.583	-4.2	0.0003
5	IPI00022445	혈소판 엽기성 단백질	8.866	13.033	-4.168	0.0161
6	IPI00026314	겔솔린의 아이소폼 1	6.383	10.377	-3.994	0.0113
7	IPI00552858	필라민 A, 알파	7.761	11.467	-3.706	0.0127
8	IPI00910496	cDNA FLJ55698, 빈쿨린과 매우 유사	7.278	10.412	-3.135	0.0087
9	IPI00306311	플렉스트린	7.639	10.721	-3.081	0.0226
10	IPI00647915	24 kDa 단백질	8.956	12.031	-3.076	0.0127
11	IPI00005809	혈청 결핍-반응 단백질	8.508	11.488	-2.98	0.0016
12	IPI00179589	14 kDa 단백질	6.435	9.237	-2.802	0.0405
13	IPI00307162	빈쿨린의 아이소폼 2	9.774	12.509	-2.735	0.0045
14	IPI00012269	멜티메린-1의 아이소폼 1	6.995	9.696	-2.701	0.0308
15	IPI00023860	뉴클레오좀 어셈블리 단백질 1-like 1	7.094	9.587	-2.493	0.0284
16	IPI00298994	탈린-1	12.711	14.93	-2.219	0.0001

[0108]

표 4

대조군(HC) 및 환자군(AD2)의 차등 발현 단백질-2

[0109]

-	주석	설명	SI _N (AD1)	SI _N (HC)	비율	P-value
1	IPI00027626	T-복합체 단백질 1 서브유닛 제타	7.59	5.482	2.108	0.0061
2	IPI00013122	CDC37 Hsp90 co-샤페론 Cdc37	7.767	5.515	2.252	0.0095
3	IPI00735319	SET 전좌와 유사	10.314	8.058	2.256	0.0340
4	IPI00301311	단백질 SET의 아이소폼 2	10.323	8.058	2.265	0.0338
5	IPI00216318	14-3-3 단백질 베타/알파의 아이소폼 Long	9.771	7.382	2.389	0.0426
6	IPI00218570	포스포글리세라이트 뮤타아제 2	8.605	6.144	2.461	0.0012

7	IPI00549725	포스포글리세라이트 뮤타아제 1	9.179	6.61	2.569	0.0223
8	IPI00219217	L-락테이트 디하이드로게나아제 B 체인	11.061	8.44	2.62	0.0120
9	IPI00179330	RPS27A; UBC 유비퀴틴 및 리보솜 단백질 S27a 전구체	9.12	6.292	2.828	0.0360
10	IPI00456429	유비퀴틴 및 리보솜 단백질 L40 전구체	9.12	6.292	2.828	0.0360
11	IPI00654754	RPS27A; UBC RPS27A 단백질	9.12	6.292	2.828	0.0360
12	IPI00792139	RPS27A; UBC 유비퀴틴 C	9.12	6.292	2.828	0.0360
13	IPI00003881	이중성 핵 리보뉴클레오단백질 F	9.992	7.099	2.893	0.0138
14	IPI00943181	프로테아좀 활성화자 복합체 서브유닛 2	10.231	7.154	3.077	0.0225
15	IPI00418471	비멘틴	11.662	8.518	3.144	0.0357
16	IPI00418313	인터루킨 인핸서-결합 인자 3 아이소폼 d	8.532	5.309	3.223	0.0239
17	IPI00010133	코로나-1A	7.55	3.965	3.585	0.0187
18	IPI00554652	cDNA FLJ34752 fis, 클론 NESOP2000452, 림프 사이트-특이 단백질 1과 매우 유사	10.299	6.1	4.199	0.0269
19	IPI00297779	T-복합체 단백질 1 서브유닛 베타	7.952	3.318	4.634	0.0139
20	IPI00007423	산성 류신-rich 핵 인단백질 32 패밀리멤버 B	9.748	4.848	4.9	0.0033
21	IPI00025849	LOC723972 산성 류신-rich 핵 인단백질 32 패밀리멤버 A	9.748	4.848	4.9	0.0033
22	IPI00759824	LOC723972 산성 류신-rich 핵 인단백질 32 패밀리멤버 B의 아이소폼 2	9.748	4.848	4.9	0.0033

[0110] 다음으로, 정상군 및 환자군의 T 세포에서 각 단백질의 발현을 알아보기 위해 이온 크로마토그램을 실시하였다. S100A9를 동정하였으며, 이 단백질은 환자군에서 높게 발현되었고, 이는 SI_N 기반 비표지 정량을 이용한 선행 데이터와 일치하는 결과이다. SI_N 기반 비표지 정량을 이용해서는 단백질을 동정할 수 없었지만, 이온 크로마토그램법을 이용하여 대조군 대비 환자군에서 높게 발현되는 갈렉틴-10을 동정 및 정량하였다.

[0111] 2. 정상대조군 및 아토피 피부염 환자군의 프로테오믹 프로파일링

[0112] SI_N 기반 비표지 정량을 수행하여 정상대조군(HC), EAD 및 IAD 환자군 T 세포의 프로테오믹 프로파일링을 분석하였다. 각 군에서 3개의 샘플을 선별하여 동량의 수용성 단백질(15 µg)을 SDS-PAGE를 이용하여 분리하였다(도 3A). 이어 같은 그룹 내의 3개의 샘플을 하나로 혼합한 뒤, 이를 각 그룹에서 3번 반복된 데이터 샘플에 재배치하였다(relocate). 1DLC-MS/MS 크로마토그램을 이용하여 반복된 펩타이드 스펙트럼 피크를 얻었다(도 3c 내지 도 3e). 이러한 크로마토그램은 SI_N 기반 비표지 정량의 우수한 재현성을 보여준다. 상기 분석 후, 616개의 nonredundant 단백질을 동정하고 정량하였다. 상기 단백질 중, 246개 단백질이 세 가지 군 모두에서 동정 및 정량되었다(도 3b). 유의한 P-value (<.05)를 가지는 DEPS를 표 5 및 표 6에 나타내었다.

[0113] 세 그룹의 T 세포 프로테오믹의 TMT (tandem mass tag) 표지-기반 정량을 실시하였다. 상기 방법을 통해 얻은 유의한 P-value (<.05)를 가지는 차등 발현 단백질(differentially expressed protein, DEP)을 표 7 및 표 8에 나타내었다. S100A9는 IAD 그룹과 비교하여 EAD 및 대조군에서 매우 과발현되었다. 이는 프로테오믹 프로파일링의 결과와는 일치하지 않는 결과이다.

표 5

[0114] SI_N 기반 비표지 정량을 이용한 HC, IAD 및 EAD 그룹간의 차등 발현 단백질-1

-	주석	설명	SI _N			비율(ratio)		
			HC	IAD	EAD	IAD-HC	EAD-HC	EAD-IAD
1	IPI00216319	14-3-3 단백질 베타	5.93	0	5.36	-5.93	-0.58	5.36
2	IPI00006378	coiled-coil 도메인-포함 단백질 72	5.65	0	0	-5.65	-5.65	0
3	IPI00855741	리파아제 멤버 N	5.48	0	0	-5.48	-5.48	0
4	IPI00027409	미엘로블라스틴	5.23	0	0	-5.23	-5.23	0

5	IPI00179330	유비퀴틴-40S 리보솜 단백질 S27a	5.06	0	0	-5.06	-5.06	0
6	IPI00027462	단백질 S100-A9	4.96	0	4.37	-4.96	-0.59	4.37
7	IPI00642816	시그널 인지 파티클 9 kDa 단백질의 아이소폼 1	4.63	0	0	-4.63	-4.63	0
8	IPI00304409	칼슘-조절 내열성 단백질 1	4.52	0	3.81	-4.52	-0.71	3.81
9	IPI00030131	라미나-연관 폴리펩타이드 2의 아이소폼 베타, 아이소폼 베타/감마	4.45	0	3.75	-4.45	-0.7	3.75
10	IPI00103387	GTPase IMAP 패밀리 멤버 1	4.25	0	4.17	-4.25	-0.08	4.17
11	IPI00019755	글루타치온 S-트랜스퍼라아제 오메가-1	4.25	0	0	-4.25	-4.25	0
12	IPI00019755	시스테인-rich 단백질 1	4.21	0	0	-4.21	-4.21	0
13	IPI00024993	에노일-CoA 하이드라타아제, 미토콘드리아	2.58	-1.6	2.02	-4.18	-0.56	3.62
14	IPI00005778	프로테오글리칸 3	4.04	0	0	-4.04	-4.04	0
15	IPI00418471	비멘틴	4.01	0	3.1	-4.01	-0.92	3.1

표 6

[0115]

SIN 기반 비표지 정량을 이용한 HC, IAD 및 EAD 그룹간의 차등 발현 단백질-2

-	주석	설명	SIN			비율(ratio)		
			HC	IAD	EAD	IAD-HC	EAD-HC	EAD-IAD
1	IPI00025804	고친화 이뮤노글로불린 엡실론 수용체 서브유닛 감마	0	4.02	0	4.02	0	-4.02
2	IPI00219299	탈린-2	0	4.13	4.6	4.13	4.6	0.46
3	IPI00010491	Ras-연관 단백질 Rab-27B	0	4.17	0	4.17	0	-4.17
4	IPI00028931	테스모글레인-2	0	4.22	3.53	4.22	3.53	-0.68
5	IPI00015954	GTP-결합 단백질 SAR1a	0	4.24	3.49	4.24	3.49	-0.76
6	IPI00023549	갈렉틴-연관 단백질	0	4.52	1.63	4.52	1.63	-2.89
8	IPI00297550	응고인자 XIII A 체인	0	4.72	4.46	4.72	4.46	-0.27
9	IPI00966485	증식성(Propagated)	0	4.78	0	4.78	0	-4.78
10	IPI00027502	혈소판 당단백질 IX	0	4.84	1.94	4.84	1.94	-2.9
11	IPI00465140	전사조절자 카이소	0	4.85	0	4.85	0	-4.85
12	IPI00010101	폴리펩타이드 N-아세틸갈락토사미닐트랜스퍼라아제 8로 예상	0	4.98	0	4.98	0	-4.98
13	IPI00216975	트로포미오신 알파-4 체인의 아이소폼 2	0	4.99	5.71	4.99	5.71	0.72
14	IPI00339269	열충격 70 kDa 단백질 6	0	0	4.06	0	4.06	4.06
15	IPI00374975	포스포글리세라이트 뮤타아제 4로 예상	0	0	4.12	0	4.12	4.12
16	IPI00007611	ATP 합성효소 서브유닛 0, 미토콘드리아	0	0	4.15	0	4.15	4.15
17	IPI00219160	60S 리보솜 단백질 L34	0	0	4.97	0	4.97	4.97

[0116]

표 7

[0117]

TMT 표지-기반 정량을 이용한 HC, IAD 및 EAD 그룹간의 차등 발현 단백질-1

-	주석	설명	SIN			비율(ratio)		
			HC	IAD	EAD	IAD-HC	EAD-HC	EAD-IAD
1	IPI00021827.3	호중구 디펜신	0.92	-1.18	-0.58	-2.10	-1.50	0.61
2	IPI00790831.1	LMNB1 단백질	0.62	-0.51	-0.40	-1.14	-1.02	0.12
3	IPI00019038.1	리소자임 C	0.60	-0.46	-0.41	-1.07	-1.01	0.06
4	IPI00181409.6	라미나-연관 폴리펩타이드 2의 아이소폼 감마, 아이소폼 베타/감마	0.61	-0.44	-0.43	-1.05	-1.04	0.01

5	IPI00025849.1	산성 류신-rich 핵 인단백질 32 패밀리 멤버 A	0.64	-0.39	-0.57	-1.03	-1.21	-0.18
6	IPI00215611.5	시스테인-rich 단백질 1	0.42	-0.34	-0.21	-0.76	-0.63	0.13
7	IPI00442038.3	프로-인터루킨-16의 아이소폼 1	0.51	-0.21	-0.48	-0.72	-0.99	-0.27

표 8

TMT 표지-기반 정량을 이용한 HC, IAD 및 EAD 그룹간의 차등 발현 단백질-2

-	주석	설명	SIN			비율(ratio)		
			HC	IAD	EAD	IAD-HC	EAD-HC	EAD-IAD
1	IPI00022445.1	혈소판 염기성 단백질	-1.86	0.73	0.10	2.59	1.97	-0.62
2	IPI00303283.2	인테그린 베타-3의 아이소폼 메타-3A	-1.79	0.62	0.22	2.41	2.01	-0.40
3	IPI00296099.6	토포보스폰딘-1	-1.62	0.75	-0.01	2.37	1.61	-0.76
4	IPI00306311.8	플렉스트린	-1.64	0.67	0.12	2.31	1.77	-0.54
5	IPI00295976.6	인테그린 알파-IIb	-1.58	0.72	0.02	2.30	1.60	-0.70
6	IPI00943099.2	혈소판 당단백질 Ib 알파체인 전구체	-1.27	0.69	-0.05	1.96	1.22	-0.74
8	IPI00552089.1	TIMP 메탈로헵타다아제 억제제 1	-1.10	0.77	-0.29	1.88	0.82	-1.06
9	IPI00014572.2	분비단백질, 산성, 시스테인-rich (오스테오넥틴), 아이소폼 CRA a	-1.15	0.71	-0.13	1.86	1.02	-0.84
10	IPI00307162.2	빈클린의 아이소폼 2	-1.06	0.66	-0.09	1.72	0.97	-0.75
11	IPI00889679.1	혈소판 당단백질 Ib 베타 체인의 아이소폼 1	-0.97	0.66	-0.14	1.63	0.83	-0.80
12	IPI00010414.4	PDZ 및 LIM 도메인 단백질 1	-0.86	0.59	-0.09	1.45	0.77	-0.68
13	IPI00219682.6	적혈구 밴드 7 막관통 단백질	-0.82	0.63	-0.16	1.45	0.66	-0.79
16	IPI00019345.1	Ras-연관 단백질 Rap-1A	-0.79	0.55	-0.07	1.34	0.71	-0.62
17	IPI00298994.6	탈린-1	-0.79	0.51	0.00	1.30	0.79	-0.51
18	IPI00006510.1	튜블린 베타-1 체인	-0.69	0.53	-0.09	1.22	0.60	-0.62
19	IPI00297550.8	응고 인자 XIII A 체인	-0.58	0.46	-0.07	1.04	0.51	-0.53

[0119]

[0120]

3. 동정된 단백질의 웨스턴 블로팅(*coronin-1A*, *S100A9* 및 *갈렉틴-10*)

[0121]

상술한 3 가지의 프로테오믹스 분석 방법에 의해 여러 가지 단백질을 동정하였다. 코로닌-1A, S100A9 및 갈렉틴-10은 웨스턴 블로팅으로 확인하였다. T 세포에서 각각의 단백질 발현을 알아보기 위하여, 대조군, EAD 및 IAD 환자군의 T 세포에서 웨스턴 블로팅을 이용하여 코로닌-1A, S100A9, S100A8 (S100A9의 이종이합체 파트너) 및 갈렉틴-10의 발현을 확인하였다(도 4). S100A9 및 갈렉틴-10은 대조군(HC)보다 환자군(EAD 및 IAD)의 T 세포에서 더 높게 발현되었으며, 코로닌-1A의 발현은 대조군과의 유의적인 발현 차이가 없었다. S100A8A9 및 갈렉틴-10의 발현은 EAD 및 IAD 그룹 간 차이를 나타내지 않았다.

[0122]

4. 정상대조군(HC) 및 환자군(AD)의 갈렉틴-10을 발현하는 CD3+ T 세포의 유세포분석

[0123]

갈렉틴-10은 최근 Treg 세포에서 발현되며, Treg 세포의 억제 기능과 연관된 것으로 밝혀졌기 때문에(21), 본 발명에서는 아토피 피부염(AD)에서의 갈렉틴-10의 역할에 대해 연구하였다. EAD 및 IAD 간의 갈렉틴-10의 발현 차이는 없었으며, 아토피 피부염의 아형(subtype)은 고려하지 않았다.

[0124]

아토피 피부염 환자에서 갈렉틴-10을 발현하는 CD3+ T 세포의 비율을 알아보기 위하여 아토피 피부염 환자군 및 정상대조군에서 세포내 사이토카인 염색 및 유세포분석을 이용하여 갈렉틴-10을 발현하는 CD3+ T 세포를 비교하였다. 환자군의 CD3+ T 세포는 정상대조군보다 갈렉틴-10이 높게 발현되었다(도 5).

[0125]

갈렉틴-10을 발현하는 CD3+ T 세포의 집합(subset)을 찾기 위하여 다음의 세포내 사이토카인 및 표면 염색을 실

시하였다: Th1의 IFN- γ , Th2의 IL-4, Treg의 CD25, Th17의 IL-17, 및 Th22의 IL-22.

[0126] 세포내 사이토카인 염색 및 유세포분석에서 IFN- γ , IL-4, CD25, 및 IL-17의 생성에는 차이점이 없었으나, IL-22는 대조군 대비 환자군의 갈렉틴-10을 발현하는 CD3+ T 세포에서 높게 발현되었다(도 6).

[0127] 그러나, 대조군 대비 환자군의 갈렉틴-10을 발현하는 CD3+ T 세포에서 IL-17 및 IL-22의 생성이 증가되었으며, 이러한 차이는 IL-22의 발현에서 통계적으로 유의하다(도 7).

[0128] **논의**

[0129] 정량적 프로테오믹스는 세포 수준에서 대조군 및 환자군 샘플의 프로테옴 발현을 비교하는데 사용되며, 질병의 바이오마커 및 치료 마커를 탐색하는데 사용된다(12, 14, 22-25). 2-차원 겔 전기영동은 초창기의 프로테오믹스에서 사용되었으며, 정량적 프로테오믹스를 위한 다양한 방법, 예컨대 비표지, TMT 또는 iTRAQ를 이용한 동중원소 화학적 표지법 및 대사적 표지법이 개발되었다(10, 11, 13-16, 26, 27). 본 발명에서는 정규화된 스펙트럼 인덱스(normalized spectral index, SIN), TMT 표지 분석 및 이온 크로마토그램을 사용하였다. 정규화된 스펙트럼 인덱스(normalized spectral index, SI_N)는 그리핀(Griffin)법으로 나타낼 수 있으며, SI_N 은 높은 신뢰성 및 접근성으로 인해 정량적 비교에 있어 유용하다(14). TMT 표지법은 동중 원소 화학적 표지법이며 정확성 및 재현성이 향상된 방법이다(16, 19). 이러한 방법들을 사용함으로써, 대조군 및 환자군 간의 약 30-40 가지의 차등 발현 단백질(differentially expressed proteins, DEP)을 동정 및 정량하였다.

[0130] 본 발명에서와 같이, 프로테오믹스 분석에 있어 몇 가지의 한계점이 있다. 세 번의 프로테오믹스 분석시험에서의 데이터의 변동이다. 예컨대, 코로닌-1A는 첫 번째 분석에서 아토피 피부염 환자군에서 더 높게 발현되었으나, 두 번째 분석에서는 동일한 결과를 얻을 수 없었다. 이러한 데이터의 변동은 웨스턴 블로팅 분석에서도 나타났으며, 대조군(HC), EAD 및 IAD의 환자군 간의 코로닌-1A 발현에 차이가 없었다. 또한, S100A9는 첫 번째 분석에서는 환자군에서 높게 발현되었으나, 두 번째 분석에서는 동일한 결과를 얻을 수 없었다. 상기 코로닌-1A 및 S100A9의 경우와 마찬가지로, 각 분석에서 얻어진 대부분의 차등 발현 단백질(differentially expressed protein, DEP)은 다른 분석기법에 의한 결과와 일관적이지 않았다. 이러한 단백질 분석의 불일관성으로 인해 정량적 프로테오믹스의 신뢰성과 재현성에 대한 의문이 제기되었으며, 데이터의 유효성 및 정확성에 대한 연구의 필요성을 대두시켰다.

[0131] 정규화된 스펙트럼 인덱스 방법 및 TMT 표지법과 같은 대량(large-scale)의 프로테오믹스와는 달리, 이온 크로마토그램은 펩타이드의 양을 결정하는 국소 접근법(local approach)이며 및 질량분석-유래의 펩타이드 데이터로부터 전환된다(28, 29). 이러한 방법은 대량의 프로테오믹스에 의해 발생하는 오류를 최소화하는 것으로 알려져 있다. 이러한 방법을 사용함으로써 S100A9 및 갈렉틴-10의 발현이 대조군 대비 아토피 피부염 환자군에서 높게 발현됨을 확인하였다. 이 방법은 대량의 프로테오믹스에서 보다 신뢰성 있으며, 상기 방법의 결과에 따라 추후 연구에서 갈렉틴-10 및 S100A9에 중점을 두었다. 웨스턴 블로팅을 이용하여 대조군 대비 EAD 및 IAD의 환자군에서 갈렉틴-10 및 S100A9의 상향조절을 확인하였다.

[0132] 갈렉틴(Galectin)은 N-아세틸락토사민-포함 글리칸에 결합하는 동물 렉틴 패밀리로, 선천성 및 후천성 면역에 있어 다양한 역할을 한다. 'Gabriel' 이 발표한 바와 같이, 갈렉틴은 자가면역, 만성 염증 및 항암 면역에 관여하는 것으로 알려져 있다(30). 현재까지 포유동물에서 15 가지의 갈렉틴이 동정되었으며 각각의 갈렉틴의 차이점에 대해 연구되어 왔다. 예컨대, 갈렉틴 1의 결실은 항원-특이적 Th1 및 Th17 반응 및 자가면역 염증을 증진시키며(31, 32), 반면 갈렉틴 3의 결실은 신경염증을 감소시키는 병원성(pathogenic) Th1 및 Th17 반응을 감소시킨다(33). 또한, 갈렉틴 패밀리의 멤버들은 알레르기성 점막 염증에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(34). 갈렉틴 패밀리의 멤버 중, 갈렉틴-10은 처음에는 호산구(eosinophils) 및 호염구(basophils)에서만 나타나는 것으로 알려졌다(35-37). 그러나 최근 연구에서 아스피린-유도된 천식(asthma) 환자의 말초혈액에서 갈렉틴-10 mRNA가 과발현됨이 밝혀졌다(34). 또한, 갈렉틴은 인간 CD25+ Treg 세포에서 발현되며, 상기 세포의 억제 기능에 중요함이 밝혀졌다(21).

[0133] 본 발명에서는 대조군 대비 아토피 피부염 환자군에서 갈렉틴-10을 발현하는 CD3+ T 세포가 상당히 많음을 발견하였다. 갈렉틴-10을 발현하는 CD3+ T 세포의 아형(subtype)을 연구하기 위하여, 세포내 사이토카인 염색을 이용하여 갈렉틴-10을 발현하는 CD3+ T 세포에 의한 다양한 사이토카인 양을 측정하였다. 이로써, IL-22가 아토피 피부염 환자군의 갈렉틴-10을 발현하는 CD3+ T 세포에서 매우 과발현됨을 밝혔다. 비록 통계적 유의성은 밝히지 못했지만, IL-17의 생산량 또한 아토피 피부염 환자군의 갈렉틴-10을 발현하는 CD3+ T 세포에서 높게 측

정되었다. 다른 사이토카인 또는 표면 분자, 예컨대 IFN- γ , IL-4 및 CD25는 대조군과 환자군 사이에 차이가 없었다.

[0134] IL-22는 IL-10 패밀리 멤버이며, Th17 세포에서 주로 생산된다(38, 39). IL-11의 수용체는 주로 위장관의 상피 세포 또는 피부의 케라틴 세포에서 발현된다(40). IL-22는 케라틴 세포를 자극하여 항균성 펩타이드, 사이토카인 및 케모카인을 생산하며, 건선(psoriasis)의 발병에서 중요한 사이토카인으로 알려져 있다(42).

[0135] “Nograles”는 아토피 피부염 환자의 피부에서 IL-17을 생산하지 않고 IL-22를 생산하는 T 세포의 아형을 최초로 밝혔으며, 이들은 스킨-호밍(skin-homing) CCR4 및 CCR10 수용체를 발현하는 것으로 밝혀졌다(6, 43, 44). 이들 아형은 'T22' T 세포로 불리며, 인간의 피부에서 대부분의 IL-22를 생산한다(44, 45). T22 세포는 아토피 피부염의 발병 특히 만성기의 아토피 피부염과 관련있는 것으로 보인다. T22 세포의 수는 건선 환자와 비교하여 아토피 피부염 환자의 피부에서 증가되며, 아토피 피부염의 심각도는 T22 세포의 수와 관련있다(6). T22 세포는 또한 만성 아토피 피부염 환자에서 상피세포 이상증식(epidermal hyperplasia)에 영향을 주는 것으로 보인다. 케라틴 세포에 의한 항균성 펩타이드 생산의 IL-22-의존적 상향조절은 Th2 미세환경(micromilieu)에 의해 감소한다(7, 47). Th2의 발견으로 아토피 피부염, 특히 만성기의 아토피 피부염이 Th2 및 T22 세포에 의해 매개되고, Th2 및 Th17이 급성 아토피 피부염 관련된다는 가설에 이르렀다(7, 42). 결과적으로 Th22 세포는 아토피 피부염의 발병에 있어 중요한 효과 T 세포(effector T cell)이다.

[0136] 본 발명에서는 대조군 대비 아토피 피부염 환자군의 갈렉틴-10을 발현하는 CD3+ T 세포에서 IL-22의 발현량이 더 높은 것으로 나타났다. 이러한 결과는 IL-22의 생산이 갈렉틴-10과 관련됨을 시사한다. 갈렉틴-10 및 IL-22에 대한 최근 이론으로는, 이들의 관계가 아직 불분명하다. 갈렉틴-10의 처치 또는 역제가 IL-22의 생산에 영향을 주는지에 대한 연구가 IL-22 및 갈렉틴-10의 연관성을 밝히는데 도움이 될 것이다.

[0137] 웨스턴 블로팅에서 상향조절되는 것으로 확인된 S100A8 및 S100A9는 두 개의 칼슘-결합 단백질인 S100A8 (MRP8) 및 S100A9 (MRP14)의 이형이합체이다. 이들은 선천성 면역의 중요한 부분에 영향을 주고, 손상-연관 분자적 패턴 분자(damage-associated molecular pattern molecules, DAMPs)의 새로운 그룹에 속하며, 당화반응(glycation) 최종 생성물의 수용체 및 패턴 인지 수용체에 대한 내생적(endogenous) 리간드로서 기능한다. S100A8 및 S100A9는 식세포(phagocyte)에서 분비되는 것으로 알려져 있으며 toll-유사 수용체(4)에 결합하는 것으로 알려져 있으며, 이로써 염증 반응(48) 및 자가면역반응(49)을 나타낸다. 본 발명에서는 대조군 대비 아토피 피부염 환자군의 CD3+ T 세포에서 S100A8 및 S100A9의 발현이 높은 것을 발견하였다. T 세포는 S100A8 및 S100A9의 자극에 의해 IL-17 생산을 증가시키고(49), T 세포에 의한 S100A8 및 S100A9의 상향 조절은 T 세포간의 DAMP 분자의 양성 피드백 메커니즘(feedback mechanism)의 가능성을 제시한다. S100A8 및 S100A9는 아토피 피부염 발병의 일부 메커니즘에 있어 중요하지만, 이들의 역할을 밝히기 위해서는 추가적인 연구가 필요하다.

[0138] 요약컨대, 정규화 스펙트럼 인덱스(SI_N) 기반 비표지 정량, TMT 표지 기반 정량 및 이온 크로마토그램을 이용한 단백질 분석을 실시하여 대조군, EAD 및 IAD 환자군 간의 차등 발현 단백질이 동정, 정량되었다. 갈렉틴-10, S100A8 및 S100A9는 대조군 대비 아토피 피부염 환자군에서 더 높게 발현되었다. 또한 대조군 대비 아토피 피부염 환자군에서 갈렉틴-10을 발현하는 CD3+ T 세포의 IL-22 생산이 현저히 높은 것으로 나타났다.

[0139] **결론**

[0140] 외인성 및 내인성 아토피 피부염 환자군 및 대조군에서의 단백질 분석에 의해, 발병 관련 여러 차등 발현 단백질(DEP)이 동정되었다. 또한, 이후의 확인 시험에서 갈렉틴-10이 환자군에서 높게 발현되었고, 갈렉틴-10은 Th2와 관련하여 아토피 피부염의 발병에서 중요한 역할을 하는 것으로 예상된다.

[0141] **참조문헌**

[0142] 1. Williams H, Flohr C. How epidemiology has challenged 3 prevailing concepts about atopic dermatitis. J Allergy Clin Immunol 2006;118:209-213

[0143] 2. Ou LS, Goleva E, Hall C, Leung DY. T regulatory cells in atopic dermatitis and subversion of their activity by superantigens. J Allergy Clin Immunol 2004;113:756-763

- [0144] 3. Wu WH, Park CO, Oh SH, Kim HJ, Kwon YS, Bae BG, et al. Thymic stromal lymphopoietin-activated invariant natural killer T cells trigger an innate allergic immune response in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2010;126:290-299, 299 e291-294
- [0145] 4. Koga C, Kabashima K, Shiraishi N, Kobayashi M, Tokura Y. Possible pathogenic role of Th17 cells for atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2008;128:2625-2630
- [0146] 5. Werfel T. The role of leukocytes, keratinocytes, and allergen-specific IgE in the development of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 2009;129:1878-1891
- [0147] 6. Nograles KE, Zaba LC, Shemer A, Fuentes-Duculan J, Cardinale I, Kikuchi T, et al. IL-22-producing "T22" T cells account for upregulated IL-22 in atopic dermatitis despite reduced IL-17-producing TH17 T cells. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:1244-1252 e1242
- [0148] 7. Souwer Y, Szegedi K, Kapsenberg ML, de Jong EC. IL-17 and IL-22 in atopic allergic disease. *Curr Opin Immunol* 2010;22:821-826
- [0149] 8. Wuthrich B. Atopic dermatitis flare provoked by inhalant allergens. *Dermatologica* 1989;178:51-53
- [0150] 9. Akdis CA, Akdis M, Simon D, Dibbert B, Weber M, Gratzl S, et al. T cells and T cell-derived cytokines as pathogenic factors in the nonallergic form of atopic dermatitis. *J Invest Dermatol* 1999;113:628-634
- [0151] 10. O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975;250:4007-4021
- [0152] 11. Gygi SP, Corthals GL, Zhang Y, Rochon Y, Aebersold R. Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:9390-9395
- [0153] 12. Shio Y, Donohoe S, Yi EC, Goodlett DR, Aebersold R, Eisenman RN. Quantitative proteomic analysis of Myc oncoprotein function. *EMBO J* 2002;21:5088-5096
- [0154] 13. Wang W, Zhou H, Lin H, Roy S, Shaler TA, Hill LR, et al. Quantification of proteins and metabolites by mass spectrometry without isotopic labeling or spiked standards. *Anal Chem* 2003;75:4818-4826
- [0155] 14. Griffin NM, Yu J, Long F, Oh P, Shore S, Li Y, et al. Label-free, normalized quantification of complex mass spectrometry data for proteomic analysis. *Nat Biotechnol* 2010;28:83-89
- [0156] 15. Ross PL, Huang YN, Marchese JN, Williamson B, Parker K, Hattan S, et al. Multiplexed protein quantitation in *Saccharomyces cerevisiae* using amine-reactive isobaric tagging reagents. *Mol Cell Proteomics* 2004;3:1154-1169
- [0157] 16. Thompson A, Schafer J, Kuhn K, Kienle S, Schwarz J, Schmidt G, et al. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal Chem* 2003;75:1895-1904
- [0158] 17. Hanifin JM, Rajka G. Diagnostic features of atopic dermatitis. *Acta Derm Venereol (Stockh)* 1980;s92:44-47
- [0159] 18. Cherill R, Graeber M, Hanifin JM, Omoto M, Thurston M, Tofte S. Eczema area and severity index (EASI): a new tool to evaluate atopic dermatitis [abstract]. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 1998;11(s2)
- [0160] 19. Li Z, Adams RM, Chourey K, Hurst GB, Hettich RL, Pan C. Systematic comparison of label-free, metabolic labeling, and isobaric chemical labeling for quantitative proteomics on LTQ Orbitrap Velos. *J Proteome Res* 2012;11:1582-1590
- [0161] 20. Jin W, Riley RM, Wolfinger RD, White KP, Passador-Gurgel G, Gibson G. The contributions of sex, genotype and age to transcriptional variance in *Drosophila melanogaster*. *Nat Genet* 2001;29:389-

395

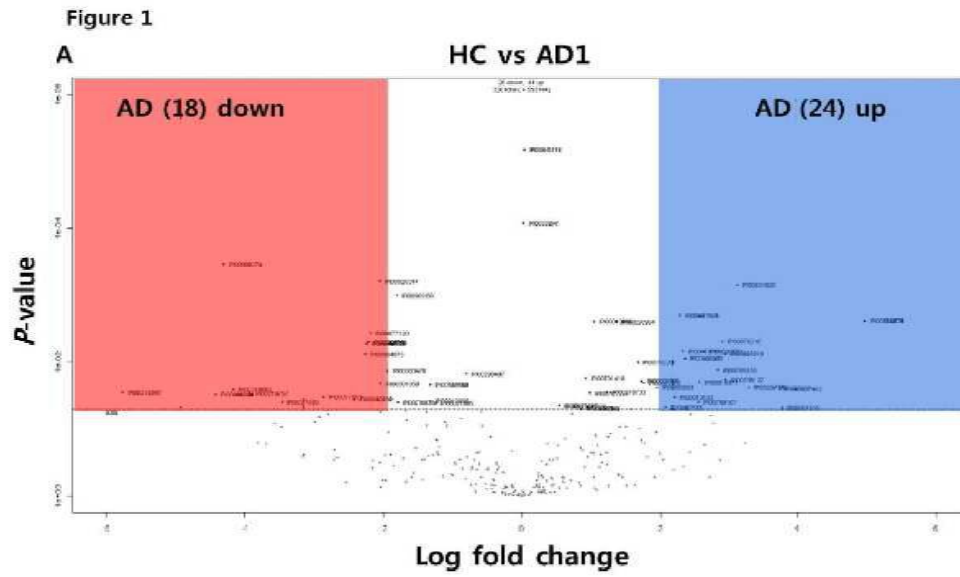
- [0162] 21. Kubach J, Lutter P, Bopp T, Stoll S, Becker C, Huter E, et al. Human CD4+CD25+ regulatory T cells: proteome analysis identifies galectin-10 as a novel marker essential for their energy and suppressive function. *Blood* 2007;110:1550-1558
- [0163] 22. Oh P, Li Y, Yu J, Durr E, Krasinska KM, Carver LA, et al. Subtractive proteomic mapping of the endothelial surface in lung and solid tumours for tissue-specific therapy. *Nature* 2004;429:629-635
- [0164] 23. Oh P, Borgstrom P, Witkiewicz H, Li Y, Borgstrom BJ, Chrastina A, et al. Live dynamic imaging of caveolae pumping targeted antibody rapidly and specifically across endothelium in the lung. *Nat Biotechnol* 2007;25:327-337
- [0165] 24. Shii Y, Suh KS, Lee H, Yuspa SH, Eisenman RN, Aebersold R. Quantitative proteomic analysis of myc-induced apoptosis: a direct role for Myc induction of the mitochondrial chloride ion channel, mtCLIC/CLIC4. *J Biol Chem* 2006;281:2750-2756
- [0166] 25. Chiang MC, Juo CG, Chang HH, Chen HM, Yi EC, Chern Y. Systematic uncovering of multiple pathways underlying the pathology of Huntington disease by an acid-cleavable isotope-coded affinity tag approach. *Mol Cell Proteomics* 2007;6:781-797
- [0167] 26. Rabilloud T, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: a tutorial. *J Proteomics* 2011;74:1829-1841
- [0168] 27. Shevchenko A, Jensen ON, Podtelejnikov AV, Sagliocco F, Wilm M, Vorm O, et al. Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:14440-14445
- [0169] 28. MacCoss MJ, Wu CC, Liu H, Sadygov R, Yates JR, 3rd. A correlation algorithm for the automated quantitative analysis of shotgun proteomics data. *Anal Chem* 2003;75:6912-6921
- [0170] 29. Zybailov B, Coleman MK, Florens L, Washburn MP. Correlation of relative abundance ratios derived from peptide ion chromatograms and spectrum counting for quantitative proteomic analysis using stable isotope labeling. *Anal Chem* 2005;77:6218-6224
- [0171] 30. Rabinovich GA, Toscano MA. Turning 'sweet' on immunity: galectin-glycan interactions in immune tolerance and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2009;9:338-352
- [0172] 31. Toscano MA, Bianco GA, Ibarregui JM, Croci DO, Correale J, Hernandez JD, et al. Differential glycosylation of TH1, TH2 and TH-17 effector cells selectively regulates susceptibility to cell death. *Nat Immunol* 2007;8:825-834
- [0173] 32. Blois SM, Ibarregui JM, Tometten M, Garcia M, Orsal AS, Cordo-Russo R, et al. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med* 2007;13:1450-1457
- [0174] 33. Jiang HR, Al Rasebi Z, Mensah-Brown E, Shahin A, Xu D, Goodyear CS, et al. Galectin-3 deficiency reduces the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2009;182:1167-1173
- [0175] 34. Devouassoux G, Pachot A, Laforest L, Diasparra J, Freymond N, Van Ganse E, et al. Galectin-10 mRNA is overexpressed in peripheral blood of aspirin-induced asthma. *Allergy* 2008;63:125-131
- [0176] 35. Ackerman SJ, Weil GJ, Gleich GJ. Formation of Charcot-Leyden crystals by human basophils. *J Exp Med* 1982;155:1597-1609
- [0177] 36. Archer GT, Blackwood A. Formation of Charcot-Leyden Crystals in Human Eosinophils and Basophils and Study of the Composition of Isolated Crystals. *J Exp Med* 1965;122:173-180
- [0178] 37. Ackerman SJ, Corrette SE, Rosenberg HF, Bennett JC, Mastrianni DM, Nicholson-Weller A, et al. Molecular cloning and characterization of human eosinophil Charcot-Leyden crystal protein (lysophospholipase). Similarities to IgE binding proteins and the S-type animal lectin superfamily. *J*

Immunol 1993;150:456-468

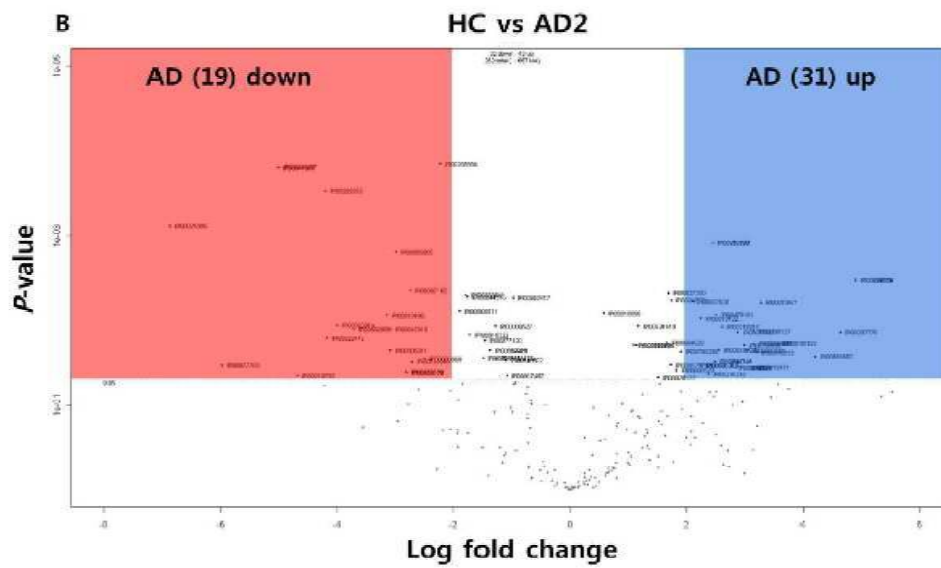
- [0179] 38. Ouyang W, Kolls JK, Zheng Y. The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation. *Immunity* 2008;28:454-467
- [0180] 39. Spolski R, Leonard WJ. Cytokine mediators of Th17 function. *Eur J Immunol* 2009;39:658-661
- [0181] 40. Boniface K, Bernard FX, Garcia M, Gurney AL, Lecron JC, Morel F. IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes. *J Immunol* 2005;174:3695-3702
- [0182] 41. Wolk K, Witte E, Wallace E, Docke WD, Kunz S, Asadullah K, et al. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol* 2006;36:1309-1323
- [0183] 42. Guttman-Yassky E, Nograles KE, Krueger JG. Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis--part II: immune cell subsets and therapeutic concepts. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:1420-1432
- [0184] 43. Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 2009;10:857-863
- [0185] 44. Trifari S, Kaplan CD, Tran EH, Crellin NK, Spits H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat Immunol* 2009;10:864-871
- [0186] 45. Fujita H, Nograles KE, Kikuchi T, Gonzalez J, Carucci JA, Krueger JG. Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4+ T cells lacking IL-17 production. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:21795-21800
- [0187] 46. Nograles KE, Zaba LC, Guttman-Yassky E, Fuentes-Duculan J, Suarez-Farinas M, Cardinale I, et al. Th17 cytokines interleukin (IL)-17 and IL-22 modulate distinct inflammatory and keratinocyte-response pathways. *Br J Dermatol* 2008;159:1092-1102
- [0188] 47. Onoue A, Kabashima K, Kobayashi M, Mori T, Tokura Y. Induction of eosinophil- and Th2-attracting epidermal chemokines and cutaneous late-phase reaction in tape-stripped skin. *Exp Dermatol* 2009;18:1036-1043
- [0189] 48. Vogl T, Tenbrock K, Ludwig S, Leukert N, Ehrhardt C, van Zoelen MA, et al. Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock. *Nat Med* 2007;13:1042-1049
- [0190] 49. Loser K, Vogl T, Voskort M, Lueken A, Kupas V, Nacken W, et al. The Toll-like receptor 4 ligands Mrp8 and Mrp14 are crucial in the development of autoreactive CD8+ T cells. *Nat Med* 2010;16:713-717

도면

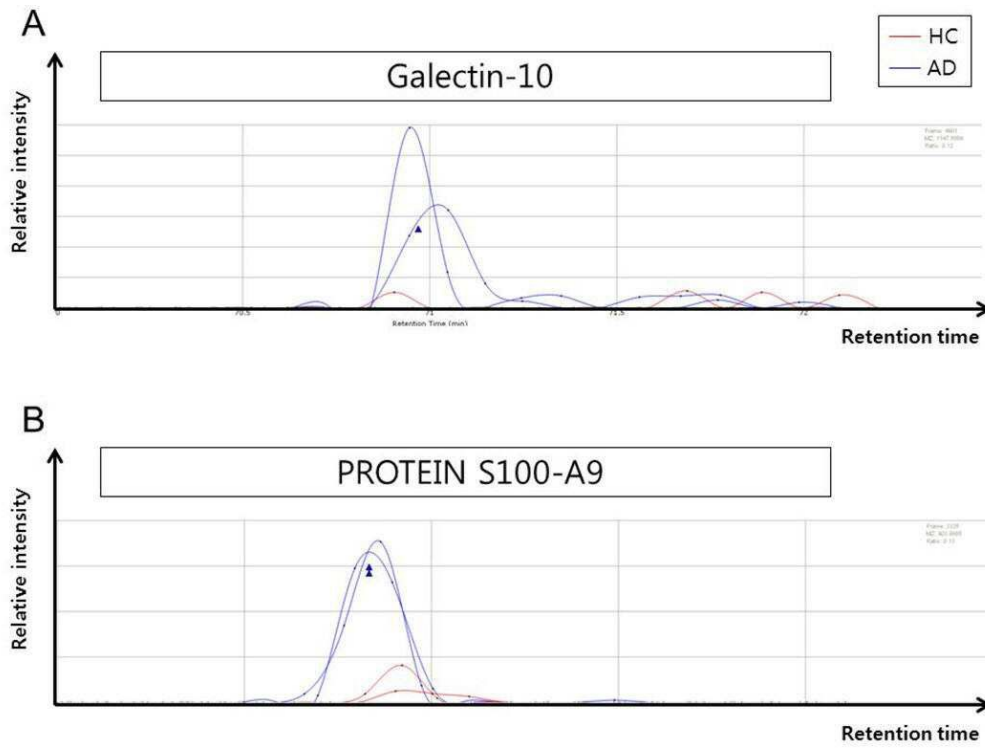
도면1a



도면1b

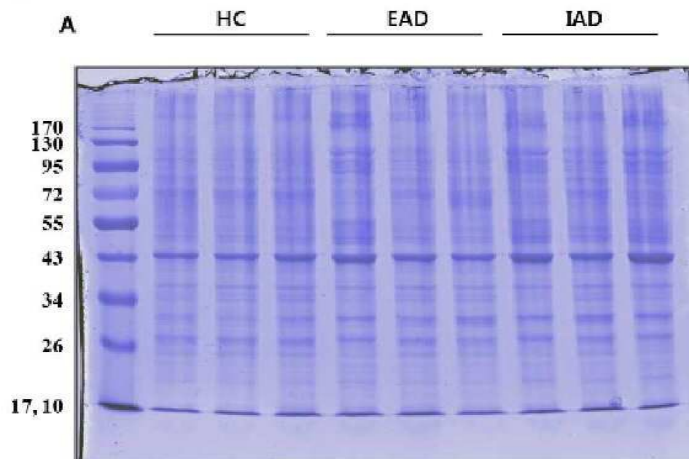


도면2

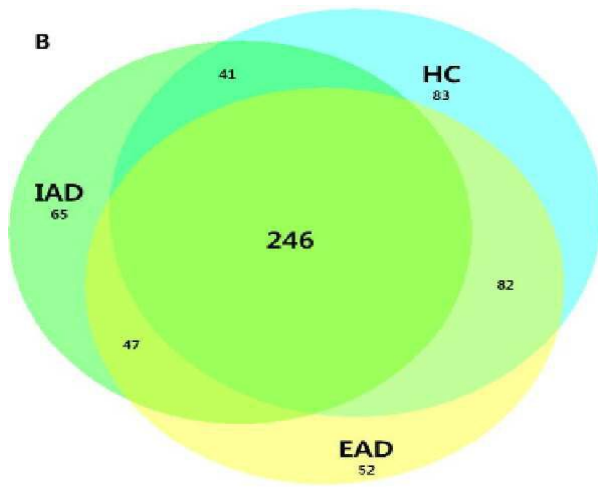


도면3a

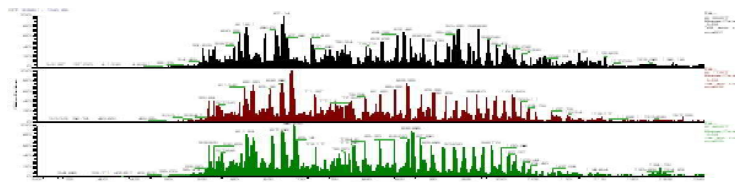
Figure 3



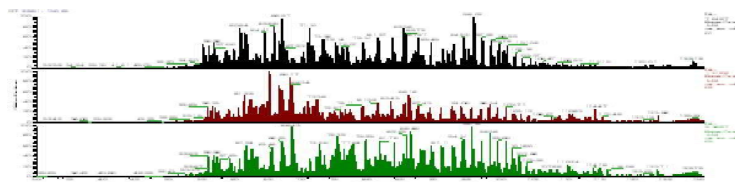
도면3b



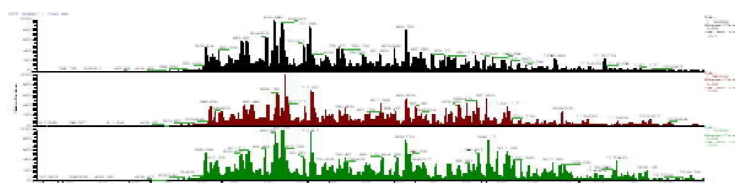
도면3c



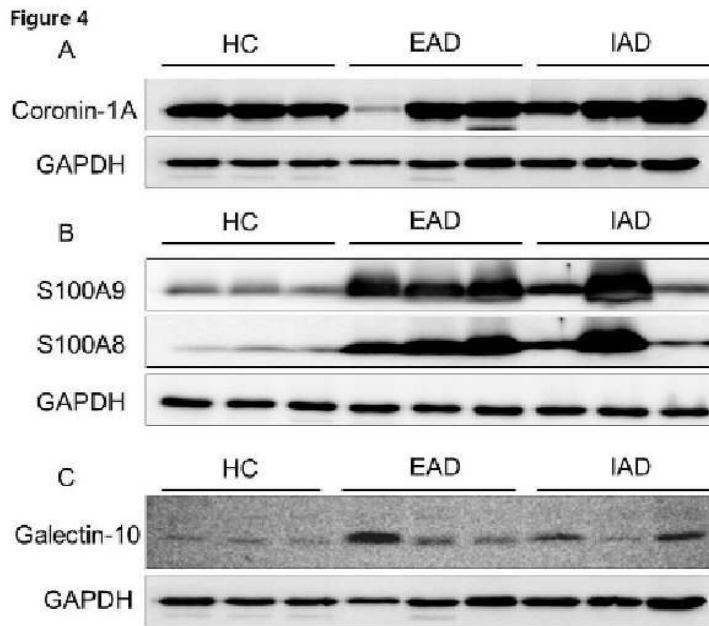
도면3d



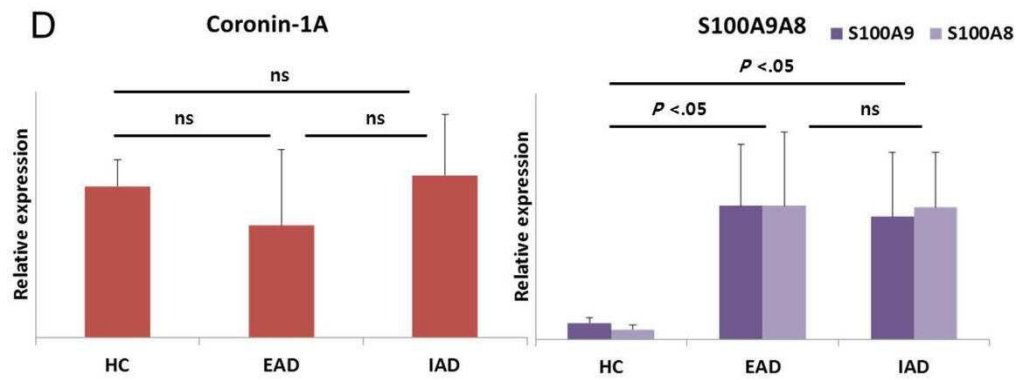
도면3e



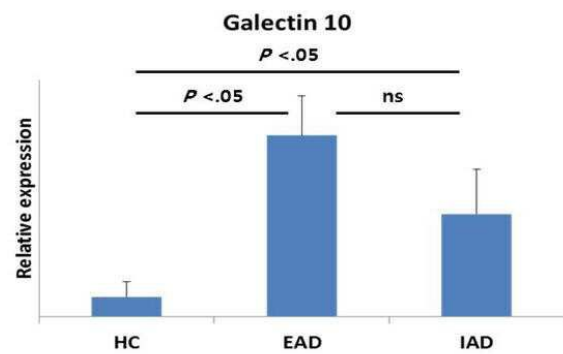
도면4a



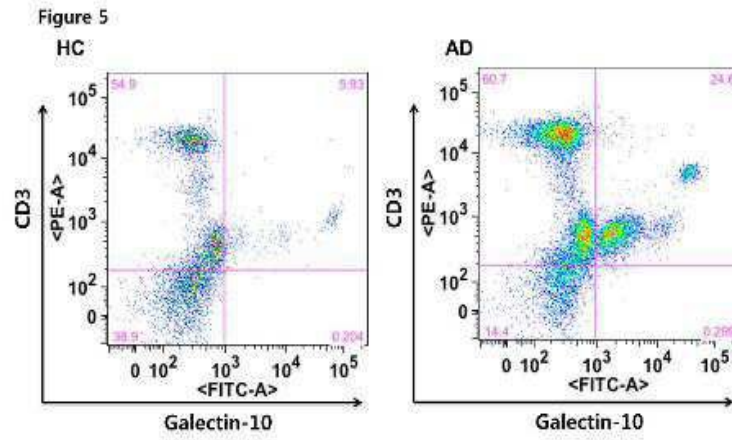
도면4b



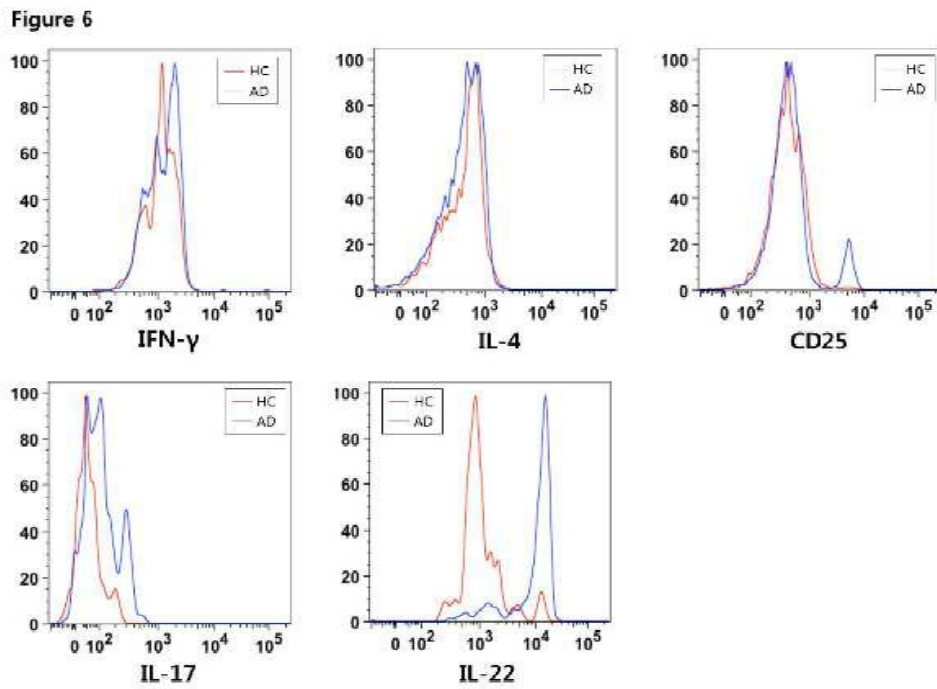
도면4c



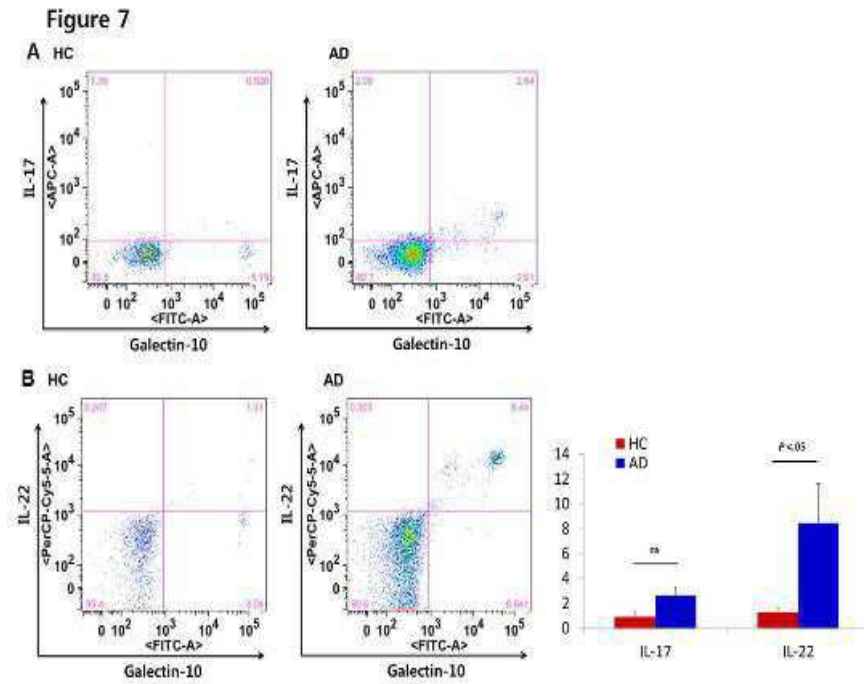
도면5



도면6



도면7



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 3

【변경전】

개 고양이

【변경후】

개, 고양이