

집먼지 진드기 항원으로 아토피 피부염을 유발한 NC/Nga 생쥐에 미치는 γ -PGA의 효과

장순남¹ · 김금란¹ · 윤미영² · 강상모^{1,3*}

¹건국대학교 대학원 생물공학과, ²대전대학교 뷰티건강관리학과

³건국대학교 미생물공학과

The Effect of γ -PGA on NC/Nga Mice, a Mouse Model for Mite Antigen-induced Atopic Dermatitis.

Jang, Soon-Nam¹, Kum-Lan Kim¹, Mi-Young Yun², and Sang-Mo Kang^{1,3*}. ¹Department of Bioengineering, Graduate School at Konkuk University Seoul 143-701, Korea, ²Department of Beauty Health Care, Daejeon University, Daejeon 301-716, Korea ³Department of Microbial Engineering, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea - As one of the mucous components of Cheonggukjang, traditional fermented soybean paste, γ -PGA is a natural substance with diverse functions. In this paper, an *in-vivo* experiment has been performed using NC/Nga mice in order to find out the efficacy of γ -PGA in human atopic dermatitis. The NC/Nga mice with BMAC-induced atopic dermatitis were administered γ -PGA (PGA-HM) with 300 kDa and low-molecular γ -PGA (PGA-LM), respectively. As a result, a significant decrease in clinical skin severity score was detected in the group that was administered PGA-LM. In terms of serum IgE levels, a significant decline was observed in PGA-LM, compared to the control group. The serum IgG1 levels also decreased more in PGA-LM than in the control group. However, no significant difference was observed in both groups. To witness the induction of CD4⁺CD25⁺foxp3⁺ Treg cells, mRNA was sampled from the back of PGA-HM- and PGA-LM-administered NC/Nga mice with atopic dermatitis. In terms of the production amount of foxp3 mRNA, which was measured in real-time PCR, the group that was administered PGA-LM was twice as high as the control group. According to a biopsy on the skin on the backs of the mice, the experimental group was also far lower than the control group in terms of epidermis thickness, mast cell infiltration and the number of CCR3⁺ cells. Therefore, it has been confirmed that the atopic dermatitis symptoms decreased more in the PGA-LM-administered NC/Nga mice than the PGA-HM-administered group by facilitating CD4⁺CD25⁺foxp3⁺ Treg cells and suppressing the activity of eosinophils and production of IgE and pro-inflammatory cytokines.

Key words: γ -PGA, CD4⁺CD25⁺foxp3⁺ (Treg), BMAC, NC/Nga

서 론

인체의 원활한 면역반응의 수행을 위해서는 면역체계가 숙주와 외부항원을 적절히 식별할 수 있어야 한다[54]. 따라서 면역체계는 자가 항원을 인식하는 면역세포를 선택적으로 제거하고, 면역 반응의 조건이 충족되지 않았을 때는 알레르기(allergy)를 유도하여 숙주를 보호한다[10]. 면역반응을 직접적으로 억제할 수 있는 세포가 있을 것이라는 의견이 오래 전부터 제기되어 왔으나 이 세포의 존재는 오랫동안 논쟁거리가 되어왔고, 최근의 연구 결과에 의해서야 비로소 조절 T 세포(regulatory T cell, Treg)의 존재가 드러났다[5, 49]. Treg는 흥선으로 부터 직접 유래한 자연(natural) Treg과 말초에서 처녀(naive) T 세포가 항원의 자극을 받아

유도되는 유도(inducible) Treg가 존재한다고 알려져 있다 [10]. 이러한 Treg의 특징은 세포표면에 CD25(IL-2Ra)를 지속적으로 발현시키며, foxp3라는 전사인자를 특이적으로 발현한다. 따라서 Treg 세포는 CD25와 foxp3을 marker로 CD4⁺CD25⁺foxp3⁺ Treg 세포를 식별할 수 있고, Treg 세포가 직접적으로 다양한 면역반응을 억제하는 역할을 한다는 연구 결과들이 발표되었다[42]. 또한 foxp3⁺ Treg 세포는 처녀(naive) T 세포의 활성화와 성장 및 다양한 면역 반응을 주관하는 Th1, Th2, Th17을 포함한 효과(effect) T 세포로의 분화를 억제한다는 연구 결과도 있다[42]. 이처럼 Treg 세포는 자가 면역질환, 알레르기, 장기 이식 및 만성 감염(chronic infection)에 있어서 매우 중요한 역할을 하는데, foxp3은 Treg 세포에 있어서 현재까지 가장 잘 알려진 혈통인자(lineage marker)이며 전사인자로서의 세포고사 프로그램(cell fate programming)에 관여하므로 Treg 세포에 대한 연구의 중요성은 매우 크다[39].

아토피 피부질환은 주로 유아와 소아에 발생하는 만성적

*Corresponding author

Tel: 82-2-450-3524, Fax: 82-2-3437-8360

E-mail: kangsm@konkuk.ac.kr

또는 재발성 염증 피부질환이다[14, 22]. 아직까지 정확한 원인을 규명하지 못하고 있으나, 유전적인 가족력과 음식섭취 등으로 인한 생활·환경의 영향, 결손된 피부층을 통해 유입된 항원물질에 대한 면역반응에 따른 혈중 IgE 항체의 수준이 증가함으로써 나타나는 복합적 질환이다[38, 48]. 아토피 질병 초기단계에서 Th2 타입의 T 세포들에서 IL-4와 IL-10이 과도하게 분비되고, 따라서 IL-12가 불안정하게 생산되어 IFN- γ 분비가 감소된다[28, 51]. 아토피 피부질환은 Th2 면역반응에 의하여 개시되어 점차 만성적인 Th1 면역반응으로 전환된다고 믿고 있다[25, 29].

아토피 피부질환의 동물모델로는 NC/Nga 생쥐가 잘 알려져 있다[50]. NC/Nga 생쥐는 1957 Kondo[17]에 의해서 구축된 모델로서, 사람의 아토피 피부염과 매우 유사한 아토피 동물 모델이다. NC/Nga 생쥐의 임상 증상은 열굴, 코와 등피부에 사람의 아토피 피부염과 매우 유사한 홍반, 태선화, 부종, 짓무름이 나타나며 심한 가려움을 동반한다[55]. 그리고 피부염이 발생함에 따라 피부 조직의 극적인 병리적 변화가 나타나는데, 심한 피부발진 현상은 진피에 다량으로 유입되는 호산구의 침윤과 비만세포의 탈과립화에 의한 히스타민(histamine) 방출, leukotrienes(LTs) 및 prostaglandin (PG)의 생산이 증가되어 염증반응이 가속화되며, 또한 활성화된 T 세포 및 키모카인 수용체의 발현증가로 Th2 세포와 호산구 세포들이 다량으로 침윤이 일어나 발열, 피로 및 통증, 과민과 같은 염증에 대한 전신적 반응을 유발하는 것으로 알려져 있다[16].

폴리감마글루탐산(poly- γ -glutamic acid, γ -PGA)은 한국의 전통 콩 발효식품인 청국장의 끈적끈적한 점액성 성분의 하나로, *Bacillus subtilis*에 의한 콩 발효 과정 중에 생성된다[3, 34]. γ -PGA는 수용성, 음이온성, 생분해성 및 식용의 아미노산 고분자소재로 고부가가치의 의약품, 화장품, 기능성 식품, 환경용, 공업용 등으로 적용 범위가 매우 다양하다[42]. 최근 이 등[21]의 연구에서는 γ -PGA가 대식세포를 자극하여 TNF- α 와 IL-1 β 의 분비를 유도하여 면역기능을 증강시키는 역할을 하며, 함 등[12]의 연구에서 γ -PGA는 T-임파구에서 IFN- γ 의 분비를 촉진하여 T 세포 및 B 세포, 대식세포, 자연살해세포(natural killer cell, NK cell) 등을 활성화시켜 세포 내 세균 및 바이러스 감염에 대한 억제효능 및 암세포 살해에 대한 효능을 가지고 있다는 것이 보고되었다[12, 21]. 이와 같이 γ -PGA가 체내 면역세포를 활성화시켜 면역증강 효과를 가지고 있다는 것이 확인되었으나, γ -PGA의 알레르기 면역질환에 관한 연구는 부족한 상태이다.

전보(*in vitro*)[15]에서는 NC/Nga 생쥐의 비장에서 B 세포와 T 세포를 순수 분리하여 항알레르기 작용에 대한 실험을 실시하였다. 그 결과 PGA-HM과 PGA-LM은 IL-1 β , IL-6, 그리고 TNF- α mRNA 유전자 발현을 억제하고 IL-10, mRNA 유전자 발현을 증가시켜 염증유전자 발현을 억제하였다. 그리고 IFN- γ +의 증가 및 조절 T 세포가 증가하는 결

과를 얻었다.

본 연구에서는 평균 분자량이 300 kDa의 고분자(high molecular) γ -PGA(이하 PGA-HM이라 한다)를 저분자화시켜 저분자(low molecular) γ -PGA(이하 PGA-LM이라 한다)를 만들고, *in vivo*에서 NC/Nga 생쥐에 Biostir mite antigen cream (BMAC)을 3주간 도포하여 피부발진을 유발시킨 후 양성대조군으로 FK506 0.3%를 도포하였고, PGA-HM과 PGA-LM을 경구 투여한 후 면역글로불린 측정, 면역조직화학분석 및 foxp3 $^{+}$ mRNA 유전자 발현 측정 등을 분석하여 아토피 피부발진에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용된 동물은 수컷 7주령의 SPF(specific pathogen-free) NC/Nga mouse(15~20 g)로 Charles River Japan (Yokohama, Japan)사에서 공급받았다. 각 실험군마다 6마리씩 사용하였다. BMAC는 Dermatophagoides farinae crude extract (mite antigen, lyophilized)를 진드기 항원으로 제조된 것으로 진드기 항원을 0.5% tween 20이 포함된 ointment base로 제작된 것을 사용하였다(Biostir, Hiroshima, Japan). IgE, IgG1 ELISA kit는 Shibayagi사(Shibukawa, Japan)제품, γ -PGA는 바이엘(주)에서 구입하였으며 평균 분자량은 300 kDa이다. CD4 $^{+}$ T isolation kit는 MACS(Mill. Biotech, USA)에서, GolgiStop kit는 BD bioscience(CA, USA)에서 각각 구매하였다. 그 외에 사용된 시약은 따로 언급이 없는 한 시판중인 특급시약을 사용하였다.

저분자 γ -PGA의 제조

증류수(distilled water)에 PGA-HM을 10%(w/v)가 되도록 녹여 sonicator(Branson사)에 60분간 high level(40 khz)로 sonication하여[35] 분자량 30 kDa 이하 분리 가능한 밀리포어 필터로 여과하여 여과액을 deep freezer에서 24 hr 동안 냉동시킨 후 freeze dryer(Ilshin사)에 넣어 3~4일 동결 건조하고 결정화시켜 사용하였다.

NC/Nga 생쥐에서 피부발진 유발 및 임상평가

7주령의 NC/Nga 생쥐를 1주일 동안 적응시키고 이미 피부염이 발생된 18주령의 NC/Nga 생쥐와 2주 동안 동시 사육하여 항원 감작시킨 후 capillary 관을 이용하여 눈에서 100 μ L의 혈액을 채혈하였다. 그 후 마취제인 chloral hydrate(10%)로 마취한 후 귀와 등쪽 목 부위를 깨끗하게 제모제로 제모한 후, 피부의 미세 상처가 치유되도록 24시간 방치하였다. BMAC는 주 2회 3주간(10~13주령) 등과 목 부분에 고르게 도포하였고, 도포 2~3시간 전에 4% SDS를 분무하여 피부층을 파괴하였다. 2주 후(12주령) 등 부위에 피

부엽이 충분히 유발되면서 긁는 행동이 심화되면 육안 평가를 실시하였다. BMAC 도포 2주 후 동시에 PGA-HM과 PGA-LM(각각 2 mg/25 g/day)을 12주부터 15주까지 3주간 오전 11시에 1회 경구 투여하였다. 또한 양성 대조 약물로 FK506 (tacrolimus) 0.3%를 매주 5회 발진된 등 부위에 도포하였다. 임상평가는 NC/Nga 생쥐의 피부염은 아토피성 피부염에서 일반적으로 사용되는 Dogru M[8]의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. BMAC를 바르고 약물 투여 종료 후 15주령에서 육안평가를 실시하였다. 육안평가 항목은 소양 행동을 동반한 홍반(erythema/hemorrhage), 인설 및 가피(dryness/scarring), 부종(edema), 표피박탈/미란(excoriation/erosion), 태선화/lichenification) 5가지 항목으로 하고, 육안 평가 결과는 각각 평가한 점수의 총합으로 나타내었다. 각각의 항목은 없음(0), 약함(1), 중증(2), 심함(3)으로 채점하였으며 최소 0점에서, 최고 15점 사이의 점수를 측정하였다[44](Fig. 1. 참고).

혈액채혈 및 immunoglobulin 측정

NC/Nga 생쥐의 눈에서 8주, 12주, 15주에 각각 capillary 관을 이용하여 약 100 μ L의 혈액을 채혈한 후 6,500 rpm에서 20분 동안 원심분리한 후 30 μ L의 혈청을 분리하였다. 혈청은 -70°C에 냉동 보관하였다. NC/Nga 생쥐의 혈청내 IgE와 IgG1 농도 측정은 Enzyme-linked immuno-sorbent assay kit(Shibayagi, Japan)로 측정하였다. 각 well에 NC/Nga 생쥐에서 채혈한 혈청 5 μ L(1/10 dilution)과 dilution buffer 45 μ L를 혼합하여 각 well에 분주하고, 2시간 동안 25°C 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody biotin-conjugated를 넣고 2시간 방치하였다. 다시 2회 수세 후 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ L를 처리하고 1시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. TMB 기질을 100 μ L씩 분주하고 암소에서 30분 방치한 후 100 μ L의 stop용액을 처리하여 ELISA reader 450 nm에서 각각 IgE와 IgG1에 대한 흡광도를 측정하였다[26].

피부조직에서 foxp3⁺ mRNA 유전자 발현 측정

등피부 조직과 axillary lymph node(ALN)에서 RNA 분리 – Atopic dermatitis-like skin NC/Nga 생쥐의 등피부 조직과 ALN를 적출하여 각각에 RNAzol^B 500 mL를 넣고 용해될

때까지 homogenizer로 분쇄하였다. 이 혼합 부유액에 chloroform 50 mL를 첨가한 후 15초 동안 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15분 동안 방치한 후 13,000 rpm에서 원심분리하고 약 200 mL의 상층액을 회수하였다. 여기에 2-propanol 200 mL와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15분 동안 방치하였다. 이 혼합액을 다시 13,000 rpm에서 원심분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분 동안 vaccum pump에서 전조하여 RNA를 얻었다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate(DEPC)를 처리한 20 mL의 중류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다[31].

역전사중합효소 연쇄반응 – 역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 2 μ g을 DNase I(10 U/mL) 2 U/tube를 37°C heating block에서 30분 동안 반응한 후 75°C에서 10분 동안 변성시키고, 이에 2.5 mL 10 mM dNTPs mix, 1 mL random sequence hexanucleotides(25 pmole/25 mL), RNA inhibitor로서 1 mL RNase inhibitor(20 U/mL), 1 mL 100 mM DTT, 4.5 mL 5 \times RT buffer(250 mM Tris-HCl(pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 mL의 M-mLV RT(200 U/mL)를 다시 가하고 DEPC 처리된 중류수로서 최종 부피가 20 mL가 되도록 하였다. 이 20 mL의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초 동안 원심 침강하여 37°C heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 다음, 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-mLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다[20].

Quantitative real-time PCR(RT-PCR) – Real time quantitative PCR(RT-PCR)[24]은 Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 수행하였다. 사용된 foxp3 probe는 GCCACTCCAGCT-CCCGGGCAACTTCT(FAM)을 사용하였으며(probe는 Bio-systems사에서 제공되는 product임), Sper-Taqman PCR Master mix(ABI)를 사용하였고, primer의 최종 농도가 200 nM이 되게 반응시켰다. RT-PCR의 조건으로는 pre-denaturation은 50°C에서 2 min, 94°C에서 10 min, 그리고 40 cycles은 95°C에서 0.15 min, 60°C에서 1 min 수행하였다. PGA-HM과 PGA-LM 투여군들과 대조군은 internal standard로 G3PDH를 사용하여 target group의 Quantitative

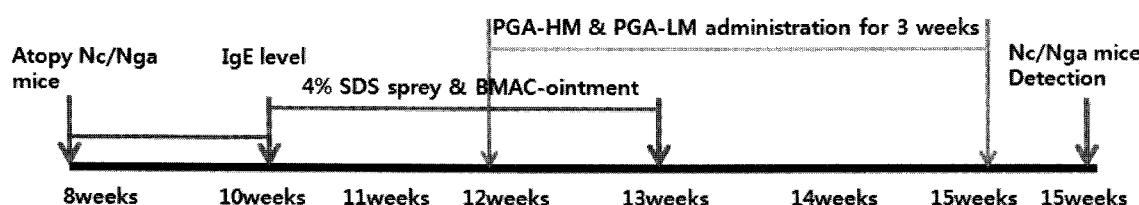


Fig. 1. Experimental design for the induction of atopic dermatitis like lesions in NC/Nga mice.

PCR $y=x(1+e)^n$, x = starting quantity, y =yield n =number of cycles e =efficiency로 계산하여 RQ(relative quantitative)를 측정하였다.

조직검사 분석

NC/Nga 생쥐의 등부위의 피부조직을 적출하여 10% paraform-aldehyde에서 24시간 동안 포르밀린에 고정한 후 파라핀으로 포매하였고, 5 μM 두께로 block을 만들었다. 이렇게 분리한 조직부분은 염증을 일으키는 표피(epidermis), 진피(dermis), 각질형성세포(keratinocytes), 호중구(neutrophils)/호산구(eosinophil) 그 외 다른 세포와 부종을 식별하는 hematoxyline/eosin(H&E) 염색과 비만세포를 염색하는 toluidine blue 염색으로 비만세포의 침윤을 광학현미경(Nikon, Japan, $\times 200$)으로 관찰하였다[13].

면역화학조직염색(immunohistochemical staining)

모든 NC/Nga 생쥐는 15주령에서 면역화학조직염색을 위하여 ALN을 적출하여 10% 포르밀린 용액에 고정한 후 파라핀 블록을 만든 후 rat anti-mouse CCR3 mAb를 사용하였다. 조직절편을 4 μM 두께로 세절한 후 probe-on plus slide에 부착시켜 전조시켰다. 세포내 조직의 원활한 형태학적 관찰을 위해 탈파라핀(deparaffinized) 후 함수시키고 조직염색을 위하여 0.01 M citrate buffer(pH 6.0)를 이용해 microwave oven에 15분 동안 전 처리하였다. 조직내 과산화효소의 작용을 억제하기 위하여 3% H_2O_2 에 10분 동안 처리한 후, 조직 내의 항원과 비특이적 단백질결합을 억제하기 위해 정상 혈청으로 단백질을 차단시켰다. 그리고 일차 단일항체에 1시간 동안 부착시킨 다음 완충액으로 수세하였다. LSAB kit를 이용하여 PE-conjugated goat anti-rat IgG에 30분간 반응시켰다. 3회 0.1% tween 20함유 Tris-buffered saline(TBST)용액으로 수세한 후 잘 전조하였다. 현미경은 형광위상차현미경을 사용하여 $\times 400$ 배율로 관찰하였다[18].

통계처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean \pm standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's *t*-test 분석방법을 이용하여 결정하였다.

결과 및 고찰

NC/Nga 생쥐의 아토피 피부염 억제 효과

아토피 동물모델인 NC/Nga 생쥐의 얼굴, 코와 등피부에 나타나는 임상 증상은 사람의 아토피 피부염과 매우 유사한 홍반, 태선화, 부종, 짓무름이 나타나며 심한 가려움을 동반한다[55].

본 실험에서는 PGA-HM과 PGA-LM의 아토피 피부염 억

제작용을 확인하기 위하여 NC/Nga 생쥐를 이용하여 실험하였다. 제모한 NC/Nga 생쥐의 피부에 BMAC를 도포하여 아토피 피부발진을 유발하였다. 양성대조군에는 FK506(tacrolimus) 0.3%를 등 부위에 도포하였고[40], 실험군에는 PGA-HM과 PGA-LM을 매일 2 mg/25 g/day의 농도로 경구 투여한 후 4주 후 피부염 지수를 측정하였다. Fig. 2A는 12주령이 된 NC/Nga 생쥐의 등부위를 깨끗하게 제모한 사진이며, Fig. 2B는 제모한 후 BMAC를 1주간 도포한 후 사

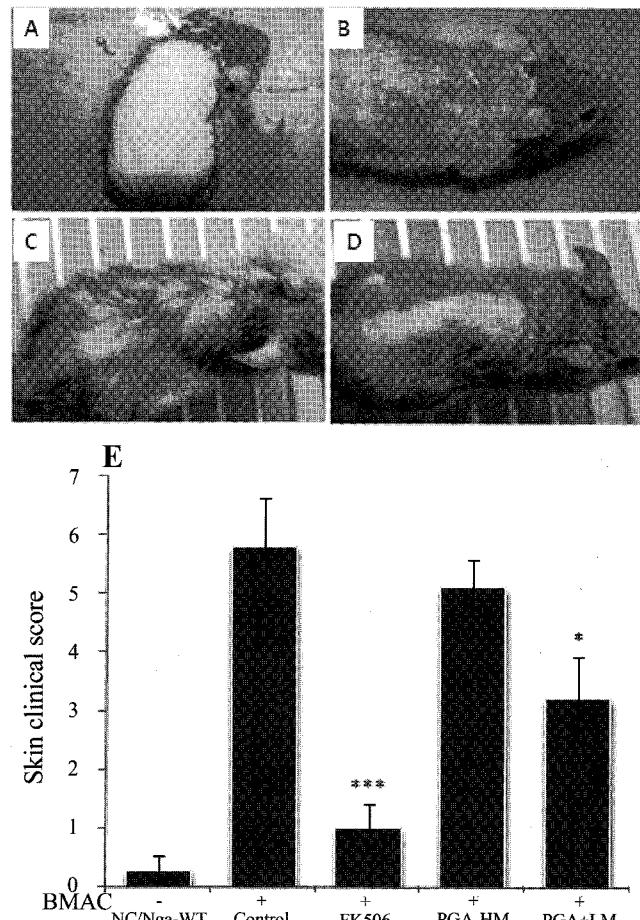


Fig. 2. Comparison of skin manifestations, clinical features, and severity of atopic dermatitis skin lesions induced in the NC/Nga mice. Atopic dermatitis was induced in the dorsal skin of NC/Nga mice by treating them with BMAC. A, before treatment (normal, NC/Nga-WT) B, BMAC treatment for 3 weeks (BMAC-control) C, BMAC treatment for 4 weeks with FK506 ointment (BMAC-FK506) D, BMAC treatment for 3 weeks with oral administration of PGA-LM (2 mg/day) (BMAC-PGA-LM) E, A total clinical severity score for AD-like lesions was defined as the sum of the individual scores graded as 0 (none), 1 (mild), 2 (moderate), and 3 (severe) for each of the 5 signs and symptoms (erythema/hemorrhage, scarring/dryness, edema, excoriation/erosion, and lichenification) on the following 3 parts of the body: ear, face and head, and back. Each point represents the mean \pm SE of 6 mice. Statistically significant values compared with the BMAC-Control group were analyzed by Student's *t*-test (** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

진으로 가피가 모두 벗겨지고 피부 염증이 나타나기 시작하였다. BMAC를 3주간 도포한 결과 피부염과 긁는 행동이 심화되었다. Fig. 2C는 0.3%의 FK506을 도포한 것으로 대조군에 비하여 현저하게 피부 발진이 줄어 정상군에 가깝게 억제되었다. 또한 Fig. 2D는 PGA-LM을 12주부터 15주간 경구 투여한 실험군은 대조군에 비하여 긁는 행동 및 피부 염 또한 현저하게 감소하였다. 그러나 PGA-HM은 상대적으로 긁는 행동은 감소하였지만 피부염은 크게 감소하지 않았다(Data not shown).

Fig. 2E는 보는 바와 같이 BMAC를 NC/Nga mouse에 3주간 도포하고 최종 5주 후 등피부에 나타난 소양행동을 동반한 홍반, 부종, 인설, 가피, 태선화 등의 단계를 0(none), 1(mild), 2(moderate), 3(severe)로 개체마다 평가 기록하여 피부발진 점수로 평가한 결과 대조군의 skin clinical score는 5.8 ± 0.85 로 BMAC를 도포하지 않은 정상군(NC/Nga-WT)의 0.3 ± 0.25 에 비하여 5배 이상 skin clinical score 값이 증가하였고, FK506 0.3% 도포군은 1 ± 0.41 로 대조군에 비해 4배 이상 유의성 있게 감소하였다($p < 0.001$). 또한 PGA-LM을 투여한 실험군도 3.2 ± 0.71 로 대조군에 비해 2배 이상 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$). 그러나 PGA-HM 투여군은 5.1 ± 0.48 로 대조군에 비하여 약간 감소를 나타내었으나 통계학적 유의성은 없었다.

혈청중 immunoglobulin 측정

아토피는 Th2의 활성화에 기초를 둔 면역 시스템으로 특징지어진다. 즉, 미분화된 Th cell이 Th2 cell로의 분화가 과다 촉진되면서 발생한다. 이때 Th2 cell은 IL-4, IL-5, IL-13, IL-9과 IL-10 등을 생산 한다[9]. 이중에 IL-4와 IL-13이

mouse에서는 IgE와 IgG1의 합성을 촉진하고, 인간의 경우에서는 IgE와 IgG4의 합성을 촉진하는 것으로 알려져 있다 [1]. 아토피 피부염 발생시 알레르기 유발 물질을 가장 먼저 인지하는 것은 피부에 존재하는 IgE이다[37, 53].

본 연구에서 Fig. 3은 혈청내 IgE의 양과 혈장내 IgG1를 측정한 결과이다. Fig. 3A는 혈청의 IgE 양을, B는 혈장내 IgG1을 측정한 것이다. Fig. 3A에서 IgE의 양은 8주령 이후 NC/Nga 생쥐에서 자연적으로 증가되고, BMAC를 도포한 대조군은 15주에서 293.5 ± 21.2 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)를, BMAC를 도포하지 않은 정상군은 283.2 ± 5.3 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)과 큰 차이 없이 증가되었다. 그리고 3주간 FK506과 PGA-HM과 PGA-LM을 투여한 양성대조군과 실험군들은 12주 이후 감소하여 15주에는 대조군에 비하여 FK506은 201.3 ± 2.2 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)를, PGA-LM 투여군은 232.9 ± 16.1 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)로 혈장내 IgE 수준이 유의성 있게 감소하였다($p < 0.05$, $p < 0.01$). PGA-HM은 265.6 ± 30.7 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)로 대조군과 큰 차이가 없었다. Fig. 3B에서 나타난 혈장내 IgG1의 수준(level)은 B세포가 IL-4의 반응으로 분화되어 IgE가 분비될 때 같이 증가되는 Ig로 혈장내 IgG1의 수준은 양성대조군인 FK506 도포군이 대조군에 비하여 약 3배 이상 유의성 있게 감소하였다($p < 0.01$). 또한 PGA-LM투여군은 대조군에 비해 IgG1 수준이 통계학적으로 유의성 없는 감소가 나타났다. PGA-HM은 대조군과 차이가 없었다.

최근 Kotani[19], Matsumoto[27] 등의 연구에서 persimmon leaf extract(감잎)과 그 추출 성분인 astragalalin을 아토피성 피부발진 NC/Nga 생쥐에 투여하여 혈중 IgE와 IgG1이 현저하게 감소하였고, 조직학적, Th2 cytokine 등의 감소로 타월한 항아토피 효과가 있다고 보고하였다. 본 실험의 결과

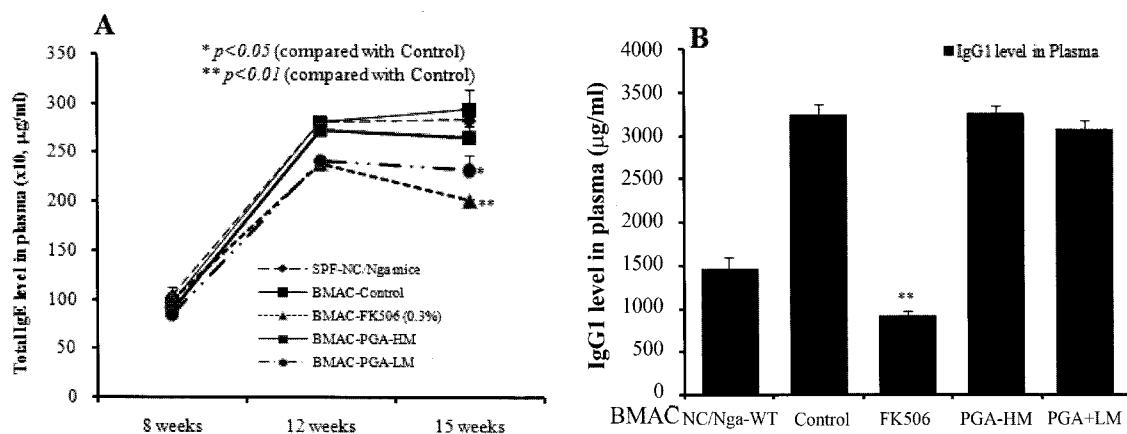


Fig. 3. Serum IgE and IgG1 elevation and development of BMAC-induced atopic dermatitis skin lesions in NC/Nga mice. Atopic dermatitis was induced in the dorsal skin of NC/Nga mice by BMAC treatment. NC/Nga-WT, before treatment with BMAC (normal) BMAC-Control, BMAC treatment for 3 weeks BMAC-FK506, BMAC treatment for 3 weeks with FK506 ointment application (0.3%) BMAC-PGA-HM, BMAC treatment for 3 weeks with oral administration of PGA-HM (2 mg/day/mouse) and BMAC-PGA-LM, BMAC treatment for 3 weeks with oral administration of PGA-LM (2 mg/day/mouse). Blood was collected from the retro-orbital plexus under ether anesthesia and heparinized immediately. Plasma samples were obtained by centrifugation and stored at -20°C until use. Total IgE and IgG1 levels were measured by sandwich ELISA using an ELISA kit (Shibayagi, Japan). Each point represents mean \pm SE of 6 mice. Statistically significant values compared with the BMAC-Control group were analyzed by Student's *t*-test ($**p < 0.05$, $***p < 0.01$, $****p < 0.001$).

도 PGA-HM보다 PGA-LM이 아토피 피부염의 관능평과와 더불어 IgE의 발현도 유의적인 효과를 나타내었다. 이는 PGA-LM이 IgE 매개형 아토피 피부염에 효과적일 것이라 생각된다.

피부 조직에서 foxp3 mRNA 유전자 발현 분석

면역질환에 사용되는 면역억제제는 calcineurin inhibitor인 사이클로스포린(cyclosporine A, CsA)과 FK506(tacrolimus)이 널리 쓰이고 있다. CsA나 FK506은 T 림프구 내의 신호 전달 과정을 억제하는 세균이나 진균 등에서 유래한 면역억제제로 세포 내에서 immunophilin이라는 수용체와 결합한다. CsA는 cyclophilin과, FK506은 FK506-binding protein(FKBP)과 결합한다[6, 23]. 이 세포내 수용체들은 peptidyl-prolyl isomerase 활성을 가지고 있어서 세포내에서 단백질-사페론으로 작용한다. 즉, immunophilin의 복합체는 calcineurin과 결합하여 calcineurin의 기질인 nuclear factor of activated T cells(NF-AT)의 탈인산화를 억제함으로써, NF-AT에 의한 각종 염증 유발성 사이토카인의 전사를 억제함이 보고되었다[33]. 따라서 FK506의 항아토피 활성을 Treg 세포활성화 무관하게 작용한다. Treg은 흥선으로부터 직접 유래한 natural Treg와 말초에서 미성숙 T 세포에 항원의 자극을 받아 유도되는 유도(inducible) Treg가 존재한다고 알려져 있다[7, 36]. Treg세포에서 발현되는 foxp3 전사인자는 자가면역 질환들을 조절하는데 필수적이다[4].

본 연구는 PGA-HM과 PGA-LM투여로 활성화된 CD4⁺CD25⁺foxp3⁺ Treg 세포가 BMAC로 유도된 NC/Nga 아토피 생쥐의 피부발진 부위로 이동하여 피부발진을 억제하는지를 증명하기 위하여, 등피부를 biopsy하여 real-time PCR로 foxp3 mRNA유전자 발현량을 측정하였다(Fig. 4). 그 결과 대조군에 대한 foxp3 mRNA의 유전자발현의 상대 정량 값(RQ)은 BMAC를 도포하지 않은 정상 NC/Nga 생쥐 군 0.61±0.064에 비하여 대조군 0.992±0.021, FK506 0.3% 도포군 0.991±0.083, PGA-HM 투여군 0.991±0.083으로 차이가 나타나지 않았으나 PGA-LM은 foxp3 mRNA 유전자발현의 RQ값이 2.284±0.221로 대조군에 비하여 약 2배 이상 유의성 있게 증가하였다($p<0.001$).

Treg가 직접적으로 다양한 면역 반응을 억제하는 역할을 한다는 연구 결과들이 발표되었다[32]. 이러한 이유 때문에 흥선이나 흥선외 주변 조직에서 foxp3의 발현 조절에 관여하는 약물과 사이토카인들은 상당한 연구의 관심이 되고 있다. 최근 Tone 등[47]은 전사인자인 NFAT(nuclear factor of activated T-cells)와 Smad3가 foxp3 enhancer에 붙어 foxp3 프로모터의 활성화를 촉진시키는데 중요하고 NFAT와 Smad3의 시너지 작용이 foxp3 발현을 위해 필수적이라고 보고하였다. 최근 Miyara 등[30]의 연구결과에 따르면 Treg은 대식세포나 B 세포와 같은 다양한 면역세포들에 대하여 Treg가 세포표면에 발현하는 CTLA4, GITR, CD25 그리고

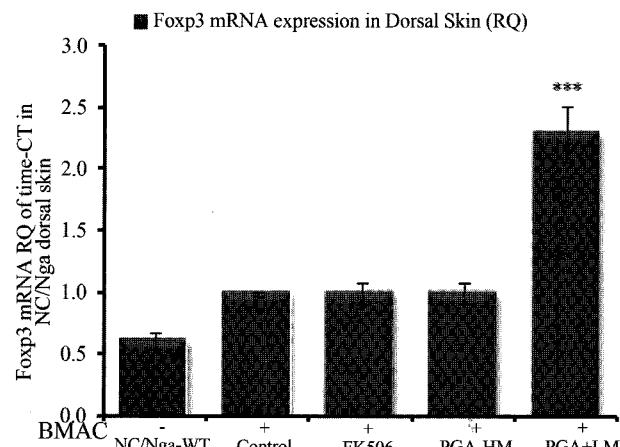


Fig. 4. Effects of PGA-LM and PGA-HM treatment on foxp3+ mRNA expression in the dorsal skin of NC/Nga mice with BMAC-induced atopic dermatitis skin lesions. Atopic dermatitis was induced in the dorsal skin of NC/Nga mice by BMAC treatment. NC/Nga-WT, before the treatment with BMAC (normal) Control, BMAC treatment for 3 weeks FK506, BMAC treatment for 3 weeks with FK506 ointment (0.3%) PGA-HM, BMAC treatment for 3 weeks with oral administration of PGA-HM (2 mg/day/mouse) and PGA-LM, BMAC treatment for 3 weeks with oral administration of PGA-LM (2 mg/day/mouse). The expression of foxp3+ mRNA was quantified by real-time PCR. The amount of Taqman probe was measured at the end of each PCR cycle. The cycle number at which the emission intensity of the sample rose above the baseline was referred to as the RQ (relative quantitative) value and is proportional to the target concentration. Real-time PCR was performed in duplicate using an Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR system. Each point represents the mean±SE of 6 mice. Statistically significant values compared with the BMAC-Control group data were analyzed by Student's *t*-test (** $p<0.01$, *** $p<0.001$).

LAG3 등을 통하여 면역억제 신호를 전달하거나 면역세포들 사이의 상호작용을 저해한다고 한다.

본 연구결과는 PGA-LM를 투여한 실험군에서 foxp3 mRNA의 유전자발현의 RQ값이 대조군에 비하여 약 2배 이상 유의성 있게 증가하였다. 이는 PGA-LM에 의하여 유도된 Treg 세포가 피부발진부위로 recruitment되어 Th2 세포, 호산구세포, 비만세포, 그리고 염증세포의 증식 및 활성을 억제하여 피부발진이 감소한 결과를 가져온 것으로 생각된다. 그러나 PGA-LM이 Treg 세포를 활성화시키는데 있어서 NFAT와 Smad3의 시너지 작용에 의한 기전인지는 더 연구가 필요하다고 생각된다.

피부조직 분석

PGA-LM 투여로 아토피유발 NC/Nga 생쥐의 등피부 발진 부위에서 foxp3 mRNA 유전자 발현량이 대조군에 비하여 약 2배 이상 증가를 나타내는 것을 확인한 후, PGA-HM과 PGA-LM이 등피부 조직에 미치는 영향을 알아보기 위하여 등피부를 적출한 후 H&E 염색과 dermis에 침윤된 비만세포(mast cell)를 관찰하기 위하여 toluidine blue 염색을 실

시하였다(Fig. 5, Fig. 6). 그 결과 Fig. 5A와 Fig. 6A는 SPF 조건에서 사육한 15주령의 정상 NC/Nga 생쥐의 피부 조직으로 epidermis가 얕게 분포하고 비만세포는 거의 관찰이 안 되는 것을 알 수 있다. 그러나 Fig. 5B와 Fig. 6B는 conventional 조건에서 사육하고 BMAC를 도포하여 아토피

피부발진을 유도한 대조군으로 epidermis의 두께가 비후(hyperplasia)로 현저하게 확장되어(long arrow), 그 주변에 과각화증(hyperkeratosis), 표피증식증(acanthosis), 과과립증(hypergranulosis) 그리고 비만세포(Fig. 6B, arrow)의 침윤 등이 정상군에 비하여 현저하게 증가되었다[11]. BMAC를

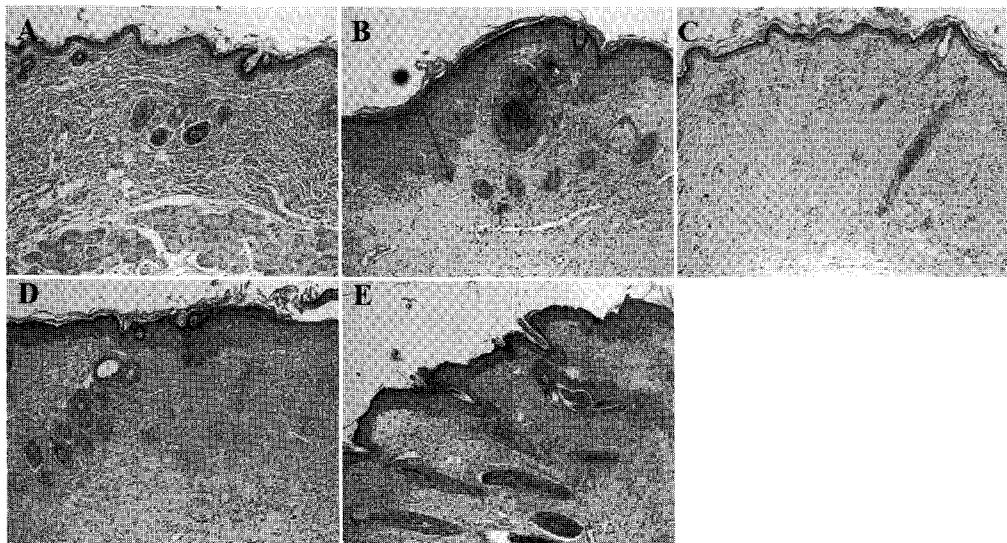


Fig. 5. Histological features of the dorsal skin of NC/Nga mice with BMAC-induced atopic dermatitis lesions. Atopic dermatitis was induced in the dorsal skin of NC/Nga mice by BMAC treatment. A, before treatment with BMAC (SPF-normal, NC/Nga-WT) B, BMAC treatment for 3 weeks (BMAC-Control) C, BMAC treatment for 3 weeks with FK506 ointment (0.3%) (BMAC-FK506) D, BMAC treatment for 3 weeks with oral administration of PGA-HM (2 mg/day/mouse) (BMAC-PGA-HM); E, BMAC treatment for 3 weeks with oral administration of PGA-LM (2 mg/day/mouse) (BMAC-PGA-LM). The skin biopsy samples from NC/Nga mice were stained with hematoxylin and eosin (H&E) for histological assay the sections show thickening of the epidermis (red arrows) under light microscope ($\times 200$).

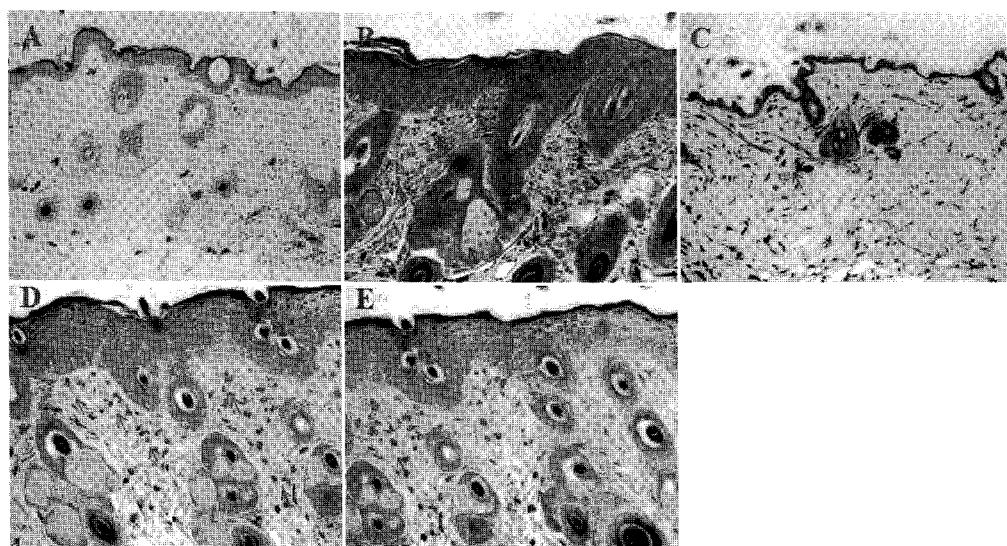


Fig. 6. Histological sections of the dorsal skin stained with toluidine blue in NC/Nga mice with BMAC-induced atopic dermatitis lesions. Atopic dermatitis was induced in the dorsal skin of NC/Nga mice by BMAC treatment. A, before the treatment with BMAC (SPF-normal, NC/Nga-WT) B, BMAC treatment for 3 weeks (BMAC-Control) C, BMAC treatment for 3 weeks with FK506 ointment (0.3%) (BMAC-FK506) D, BMAC treatment for 3 weeks with oral administration of PGA-HM (2 mg/day/mouse) (BMAC-PGA-HM); E, BMAC treatment for 3 weeks with oral administration of PGA-LM (2 mg/day/mouse) (BMAC-PGA-LM). Skin biopsy samples from NC/Nga mice processed for histology were stained with toluidine blue the sections show degranulated mast cells in the dermis (red arrows) under light microscope ($\times 200$). Sections are representative samples from 4 individual mice included in each group.

도포하여 아토피 피부발진을 유도한 NC/Nga 생쥐에 양성대조군으로 FK506 0.3%를 피부발진 부위에 도포한 Fig. 5C 와 Fig. 6C는 대조군에 비하여 정상군에 가깝게 epidermis의 두께(arrow)가 줄어들었고, 그 주변에 hyperkeratosis, acanthosis, hypergranulosis 그리고 비만세포(Fig. 6C, arrow)의 침윤이 현저하게 감소하였다. 그러나 Fig. 5D와 Fig. 6D는 BMAC를 NC/Nga 생쥐의 등 부위에 도포하여 아토피 피부발진을 유도한 NC/Nga 생쥐모델에 PGA-HM을 3주간 경구 투여한 결과로, 대조군에 비하여 epidermis의 두께가 약간 줄어들었으나, epidermis의 두께(arrow)와 그 주변에 hyperkeratosis, acanthosis, hypergranulosis 그리고 비만세포(Fig. 6D, arrow)의 침윤 등이 대조군과 차이가 없었다. Fig. 5E와 Fig. 6E는 PGA-LM을 3주간 투여한 결과로, 대조군에 비하여 epidermis의 두께가 현저하게 줄었고, hyperkeratosis, acanthosis, hypergranulosis 그리고 비만세포(Fig. 6E, arrow)의 침윤 등이 감소하였다.

이러한 결과는 Yoshifumi 등[46]이 royal jelly를 피부발진 된 NC/Nga 생쥐에 경구 투여하여 피부조직과 ear의 H&E 조직검사에서 epidermis의 두께가 현저하게 대조군에 비하여 줄어들었고, 호산구 및 비만세포의 침윤도 억제하였다는 결과와 일치하였다.

면역화학조직염색

아토피 질환에서는 호산구, 비만세포, 호염기구, 그리고 Th2 세포의 표면분자인 CCR3가 다량 발현된다. 또한 eotaxin, RANTES(regulated and normal T cell expressed

and secreted), 단핵구 화학조성 단백질(monocyte chemotactic protein(MCP)-3) 및 MCP-4와 높은 친화력으로 결합한다 [52]. 그 중 비만세포는 세포질 내에 과립을 풍부하게 가지고 있는 세포로서 주로 결체조직과 점막에 존재하면서 알레르기 염증반응에 관여하고 IgE-Fc ϵ RI 반응에 의해 과립내의 화학매개체(histamine, cysteinyl leukotrienes, prostaglandins)와 사이토카인(IL-5, TNF-alpha) 등을 분비하면서 알레르기 염증의 초기반응과 후기 반응을 일으키고 만성적으로 염증을 지속시키는 데에 주요한 역할을 한다[43, 51]. 그리고 아토피 피부발진이 심화되면 ALN(axillary lymph node)으로 Th2 세포, 호산구, 호염기구, 단핵구, 비만세포 등 면역 염증세포가 증가하게 되어 만성피부질환 동물의 피부발진을 계속 유지하고 악화시키는데 기여하게 된다[45].

NC/Nga 생쥐의 ALN을 적출하여 면역 조직화학염색을 한 후 조직에 침윤된 CCR3 $^{+}$ 호산구 세포(strong brown color, arrow)를 광학현미경으로 관찰하였다. 그 결과 Fig. 7에서 보듯이 BMAC를 도포하지 않은 정상 NC/Nga 생쥐군(Fig. 7A)에 비하여 대조군(Fig. 7B)의 ALN에서 CCR3 $^{+}$ 호산구 세포들이 ALN 조직사이에 침윤되어 현저하게 증가하였다. 또한 0.3%의 FK506 도포군(Fig. 7C)은 정상군에 가깝게 CCR3 $^{+}$ 호산구 세포들이 ALN의 조직사이에서 감소되었다. PGA-LM 투여군(Fig. 7E)은 ALN에서 CCR3 $^{+}$ 호산구 세포가 대조군에 비하여 감소하였고, PGA-HM 투여군(Fig. 7D)은 대조군과 차이가 없었다. 이러한 결과는 NC/Nga 생쥐에 PGA-LM 투여로 CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ foxp3 $^{+}$ Treg 세포가 유도되어 Treg 세포에 의한 Th2 세포의 면역조절 작용으로 IL-5의 분

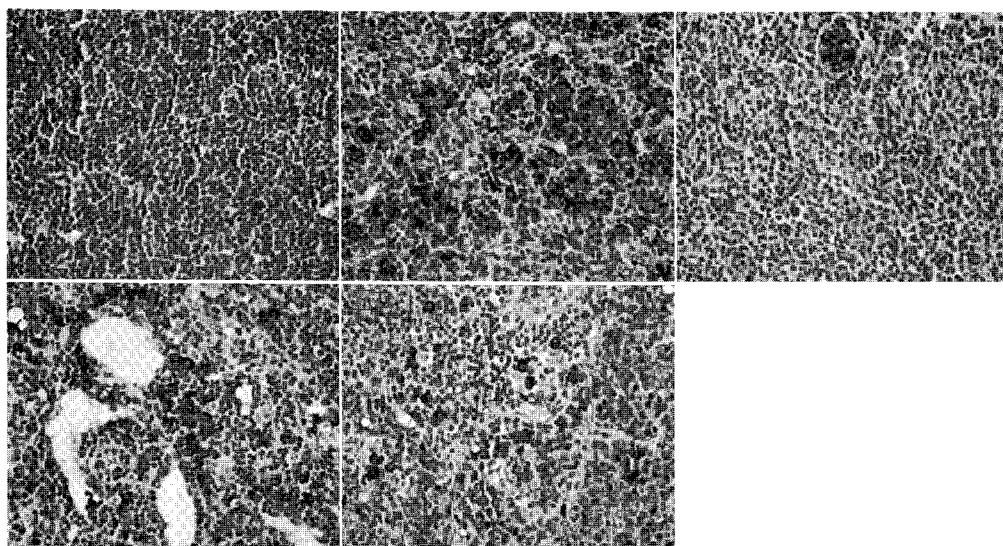


Fig. 7. Immunohistochemical staining for CCR3+ cells in the ALN of NC/Nga mice with atopic dermatitis skin lesions. Atopic dermatitis was induced in the dorsal skin of NC/Nga mice by BMAC treatment. NC/Nga-WT, before treatment with BMAC (normal) BMAC-Control, BMAC treatment for 3 weeks BMAC-FK506, BMAC treatment for 3 weeks with FK506 ointment application (0.3%) BMAC-PGA-HM, BMAC treatment for 3 weeks with oral administration of PGA-HM (2 mg/day/mouse) and BMAC-PGA-LM, BMAC treatment for 3 weeks with oral administration of PGA-LM (2 mg/day/mouse). After 3 weeks of treatment, mouse ALN biopsy samples were analyzed with LSAB2 HRP rabbit/mouse (DAB) kit. The section was stained anti-mouse CD4 mAb and an HRP-conjugated antibody. The sections show CCR3+ cells in the dermis (red arrow) under a light microscope ($\times 400$).

비가 억제되어 CCR3⁺ 세포의 증식과 활성화가 억제되어 아토피 피부발진의 완화를 가져오는 것으로 생각된다[2].

이상의 결과로 아토피 피부염을 유발한 NC/Nga 생쥐에서 PGA-HM과 PGA-LM을 경구투여한 후 면역글로불린 측정, 면역조직화학분석 및 foxp3⁺ mRNA 유전자 발현 측정 등을 분석하였다. 그 결과 PGA-HM보다 PGA-LM이 아토피 피부발진 NC/Nga 생쥐 모델에서 Treg를 유도하여 IgE 및 염증 사이토카인의 생산 및 CCR3⁺ 호산구의 증식과 활성화가 억제되어 아토피조절 효과를 나타내는 것으로 생각되었다. Selliah 등[41]의 연구결과를 보면 *in vitro*에서 고분자 물질보다 저분자 물질을 투입했을 때 자극받은 T 세포의 anti-CD3 mAb가 눈에 띄게 증가하였다. 이렇듯 *in vitro*에서는 고분자 저분자의 실험은 몇 가지 있으나 아직 *in vivo* 실험은 없으며, *in vivo*에서 고분자인 PGA-HM보다 저분자인 PGA-LM이 아토피 피부발진 억제에 효과적인 결과는 없다.

요 약

γ -PGA는 우리 전통 콩 발효식품인 청국장의 끈적끈적한 점액성 성분의 하나로, 매우 다양한 기능을 가지고 있는 천연물질이다. 이러한 γ -PGA의 아토피발진 억제 효과를 알아보기 위해 NC/Nga 생쥐를 사용하여 *in vivo* 실험을 하였다. BMAC로 유도된 NC/Nga 아토피 피부발진 생쥐에 분자량 300 kDa인 γ -PGA(PGA-HM)와 이를 저분자화 시킨 저분자 γ -PGA(PGA-LM)을 경구 투여한 결과 PGA-LM 투여군에서 clinical skin severity score가 유의성 있게 감소하였다. 혈청 IgE 수준은 PGA-LM이 대조군에 비하여 유의적으로 감소하였고, 혈청 IgG1 수준은 대조군에 비하여 감소하였으나 두 군 모두 유의성이 없었다. CD4⁺CD25⁺foxp3⁺ Treg 세포가 유도되는 것을 확인하기 위하여, PGA-HM과 PGA-LM를 투여한 NC/Nga 아토피 피부발진 생쥐의 등 부위에서 mRNA를 분리하여 real-time PCR로 foxp3 mRNA 유전자 발현량을 측정한 결과는 대조군에 비하여 PGA-LM 투여군이 약 2 배 이상 증가를 나타내었다. 또한 등피부 조직의 조직검사에서도 epidermis의 두께, 비만세포 침윤, 그리고 CCR3⁺ 세포수 등이 대조군에 비하여 현저히 억제됨을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로 PGA-HM보다 PGA-LM이 BMAC로 아토피 피부염이 유발된 NC/Nga 생쥐에 CD4⁺CD25⁺foxp3⁺ Treg 세포를 활성화하여 IgE 및 염증 사이토카인의 생산 및 CCR3⁺ 호산구의 활성화가 억제되어 아토피조절 효과를 나타내는 것으로 사료되었다.

REFERENCES

- Aversa, G., J. Punnonen, B. G Cocks, R. de Waal Malefyt, F. Vega, S. M. Jr., Zurawski, G. Zurawski, and J. E. de Vries. 1993. An interleukin 4 (IL-4) mutant protein inhibits both IL-4 or IL-13-induced human immunoglobulin G4 (IgG4) and IgE synthesis and B cell proliferation: support for a common component shared by IL-4 and IL-13 receptors. *J. Exp. Med.* **178**: 2213-2218.
- Barnes, P. J. 2008. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Nat. Rev. Immunol.* **8**: 183-192.
- Bordi, F., C. Cametti, and G. Paradossi. 1996. A comparative study of the high-frequency dielectric properties of poly (alpha-glutamate) and poly (gamma-glutamate) aqueous solutions. *Biopolymers* **40**: 485-494.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, K. A. Hjerrild, B. Paepke, L. B. Clark, S. A. Yasayko, J. E. Wilkinson, D. Galas, S. F. Ziegler, and F. Ramsdell. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* **27**: 68-73.
- Chernajovsky, Y., D. J. Gould, and O. L. Podhajcer. 2004. Gene therapy for autoimmune diseases: quo vadis? *Nat Rev Immunol.* **4**: 800-811.
- Clipstone, N. A. and G. R. Crabtree. 1992. Identification of calcineurin as a key signalling enzyme in T-lymphocyte activation. *Nature* **357**: 695-697.
- Dieckmann, D., C. H. Bruett, H. Ploettner, M. B. Lutz, and G. Schuler. 2002. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J. Exp. Med.* **196**: 247-253.
- Dogru, M., C. Katakami, N. Nakagawa, K. Tetsumoto, and M. Yamamoto. 1998. Impression cytology in atopic dermatitis. *Ophthalmology* **105**: 1478-1484.
- Ferrick, D. A., M. D. Schrenzel, T. Mulvania, B. Hsieh, W. G. Ferlin, and H. Lepper. 1995. Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells *in vivo*. *Nature* **373**: 255-257.
- Gonzalez-Rey, E., A. Chorny, and M. Delgado. 2007. Regulation of immune tolerance by anti-inflammatory neuropeptides. *Nat. Rev. Immunol.* **7**: 52-63.
- Gutermuth, J., M. Ollert, J. Ring, H. Behrendt, and T. Jakob. 2004. Mouse models of atopic eczema critically evaluated. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **135**: 262-276.
- Hahm, J. H., T. Y. Lee, J. S. Lee, C. Park, M. H. Sung, and H. Poo. 2004. Antitumor effect of Poly- γ -glutamic acid by modulating cytokine production and NK cell activity. *International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies*, p. 21-22.
- Hashimoto, Y., I. Arai, Y. Nakanishi, T. Sakurai, A. Nakamura, and S. Nakaike. 2004. Scratching of their skin by NC/Nga mice leads to development of dermatitis. *Life Sci.* **76**: 783-794.
- Heinzmann, A. and A. Daser. 2002. Mouse models for the genetic dissection of atopy. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **127**: 170-180.
- Jang, S. N., K. L. Kim, S. M. Kang. 2009. Effects of PGA-

- LM on CD4+/CD25+/foxp3+ Treg cell activation in isolated CD4+ T cells in NC/Nga mice. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **37**: 160-169.
16. Johrens, K., I. Anagnostopoulos, H. Durkop, and H. Stein. 2006. Different T-bet expression patterns characterize particular reactive lymphoid tissue lesions. *Histopathology*. **48**: 343-352.
 17. Kidd, P. 2003. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. *Altern. Med. Rev.* **8**: 223-246.
 18. Kondo, E. and K. Yamada. 1957. End results of focal debriement in bone and joint tuberculosis and its indications. *J. Bone Joint Surg. Am.* **39-A**: 27-31.
 19. Kotani, M., M. Matsumoto, A. Fujita, S. Higa, W. Wang, M. Suemura, T. Kishimoto, and T. Tanaka. 2000. Persimmon leaf extract and astragalin inhibit development of dermatitis and IgE elevation in NC/Nga mice. *J. Allergy Clin. Immunol.* **106**: 159-166.
 20. Kuhn, J. and S. Binder. 2002. RT-PCR analysis of 5' to 3'-end-ligated mRNAs identifies the extremities of cox2 transcripts in pea mitochondria. *Nucleic Acids Res.* **30**: 439-446.
 21. Lee, J. S., H. Poo, C. J. Kim, Y. H. Choi, C. Park, T. Y. Lee, and M. H. Sung. 2004. Effect of poly-gamma-glutamic acid as an adjuvant and immune response stimulatory factor *in vitro* and *in vivo*. *The 16th Annual Meeting of the Korean Society for Molecular and Cellular Biology*, pp. 14-15.
 22. Leung, D. Y. 2000. Atopic dermatitis: new insights and opportunities for therapeutic intervention. *J. Allergy Clin. Immunol.* **105**: 860-876.
 23. Liu, J., J. D. Farmer, W. S. Jr., Lane, J. Friedman, I. Weissman, and S. L. Schreiber. 1991. Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* **66**: 807-815.
 24. Loser, K., W. Hansen, J. Apelt, S. Balkow, J. Buer, and S. Beissert. 2005. In vitro-generated regulatory T cells induced by Foxp3-retrovirus infection control murine contact allergy and systemic autoimmunity. *Gene Ther.* **12**: 1294-1304.
 25. Mastrandrea, F. 2004. The potential role of allergen-specific sublingual immunotherapy in atopic dermatitis. *Am. J. Clin. Dermatol.* **5**: 281-294.
 26. Matsuda, H., N. Watanabe, G. P. Geba, J. Sperl, M. Tsudzuki, J. Hiroi, M. Matsumoto, H. Ushio, S. Saito, P. W. Askenase, and C. Ra. 1997. Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. *Int. Immunol.* **9**: 461-466.
 27. Matsumoto, M., M. Kotani, A. Fujita, S. Higa, T. Kishimoto, M. Suemura, and T. Tanaka. 2002. Oral administration of persimmon leaf extract ameliorates skin symptoms and transepidermal water loss in atopic dermatitis model mice, NC/Nga. *Br. J. Dermatol.* **146**: 221-227.
 28. Matsumoto, M., C. Ra, K. Kawamoto, H. Sato, A. Itakura, J. Sawada, H. Ushio, H. Suto, K. Mitsuishi, Y. Hikasa, and H. Matsuda. 1999. IgE hyperproduction through enhanced tyrosine phosphorylation of Janus kinase 3 in NC/Nga mice, a model for human atopic dermatitis. *J. Immunol.* **162**: 1056-1063.
 29. Miyamoto, K., S. Miyake, and T. Yamamura. 2001. A synthetic glycolipid prevents autoimmune encephalomyelitis by inducing TH2 bias of natural killer T cells. *Nature* **413**: 531-534.
 30. Miyara, M. and S. Sakaguchi. 2007. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol. Med.* **13**: 108-116.
 31. Montagne, A., O. Grepinet, M. Peloille, F. Lantier, and A. C. Lalmanach. 2001. Quantification of ovine cytokine gene expression by a competitive RT-PCR method. *J. Immunol. Methods* **253**: 83-93.
 32. Nakamura, K., A. Kitani, and W. Strober. 2001. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.* **194**: 629-644.
 33. O'Keefe, S. J., J. Tamura, R. L. Kincaid, M. J. Tocci, and E. A. O'Neill. 1992. FK-506 and CsA-sensitive activation of the interleukin-2 promoter by calcineurin. *Nature* **357**: 692-694.
 34. Obst, M. and A. Steinbuchel. 2004. Microbial Degradation of Poly(amino acid)s. *Biomacromolecules* **5**: 1166-1176.
 35. Perez-Camero, G., F. Congregado, J. J. Bou, and S. Munoz-Guerra. 1999. Biosynthesis and ultrasonic degradation of bacterial poly(gamma-glutamic acid). *Biotechnol. Bioeng.* **63**: 110-115.
 36. Piccirillo, C. A., J. J. Letterio, A. M. Thornton, R. S. McHugh, M. Mamura, H. Mizuhara, and E. M. Shevach. 2002. CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J. Exp. Med.* **196**: 237-246.
 37. Robinson, D. S., Q. Hamid, S. Ying, A. Tsicopoulos, J. Barkans, A. M. Bentley, C. Corrigan, S. R. Durham, and A. B. Kay. 1992. Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N. Engl. J. Med.* **326**: 298-304.
 38. Rousset, F., J. Robert, M. Andary, J. P. Bonnin, G. Souillet, I. Chretien, F. Briere, J. Pene, and J. E. de Vries. 1991. Shifts in interleukin-4 and interferon-gamma production by T cells of patients with elevated serum IgE levels and the modulatory effects of these lymphokines on spontaneous IgE synthesis. *J. Allergy Clin. Immunol.* **87**: 58-69.
 39. Sakaguchi, S. and F. Powrie. 2007. Emerging challenges in regulatory T cell function and biology. *Science* **317**: 627-629.
 40. Sasakawa, T., Y. Higashi, S. Sakuma, Y. Hirayama, Y. Sasakawa, Y. Ohkubo, and S. Mutoh. 2004. Topical application of FK506 (tacrolimus) ointment inhibits mite antigen-induced dermatitis by local action in NC/Nga mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **133**: 55-63.
 41. Selliah, N., W. H. Brooks, and T. L. Roszman. 1996. Proteolytic cleavage of alpha-actinin by calpain in T cells stimulated with anti-CD3 monoclonal antibody. *J. Immunol.*

- 156: 3215-3221.
42. Shih, I. L. and Y. T. Van. 2001. The production of poly-(gamma-glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresour. Technol.* **79**: 207-225.
 43. Takakura, M., F. Takeshita, M. Aihara, K. Q. Xin, M. Ichino, K. Okuda, and Z. Ikezawa. 2005. Hyperproduction of IFN-gamma by CpG oligodeoxynucleotide-induced exacerbation of atopic dermatitis-like skin lesion in some NC/Nga mice. *J. Invest. Dermatol.* **125**: 1156-1162.
 44. Takano, N., I. Arai, and M. Kurachi. 2006. A method to induce stable atopic dermatitis-like symptoms in NC/Nga mice housed with skin-lesioned mice. *Br. J. Dermatol.* **154**: 426-430.
 45. Tanaka, A., S. Muto, K. Jung, A. Itai, and H. Matsuda. 2007. Topical application with a new NF-kappaB inhibitor improves atopic dermatitis in NC/NgaTnd mice. *J. Invest. Dermatol.* **127**: 855-863.
 46. Taniguchi, Y., K. Kohno, S. Inoue, S. Koya-Miyata, I. Okamoto, N. Arai, K. Iwaki, M. Ikeda, and M. Kurimoto. 2003. Oral administration of royal jelly inhibits the development of atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. *Int. Immunopharmacol.* **3**: 1313-1324.
 47. Tone, Y., K. Furuuchi, Y. Kojima, M. L. Tykocinski, M. I. Greene, and M. Tone. 2008. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat. Immunol.* **9**: 194-202.
 48. Van der Kleij, H. P., A. D. Kranefeld, A. H. van Houwelingen, M. Kool, A. C. Weitenberg, F. A. Redegeld, and F. P. Nijkamp. 2004. Murine model for non-IgE-mediated asthma. *Inflammation* **28**: 115-125.
 49. Vanderlugt, C. L. and S. D. Miller. 2002. Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy. *Nat. Rev. Immunol.* **2**: 85-95.
 50. Vestergaard, C., H. Yoneyama, and K. Matsushima. 2000. The NC/Nga mouse: a model for atopic dermatitis. *Mol. Med. Today* **6**: 209-210.
 51. Vestergaard, C., H. Yoneyama, M. Murai, K. Nakamura, K. Tamaki, Y. Terashima, T. Imai, O. Yoshie, T. Irimura, H. Mizutani, and K. Matsushima. 1999. Overproduction of Th2-specific chemokines in NC/Nga mice exhibiting atopic dermatitis-like lesions. *J. Clin. Invest.* **104**: 1097-1105.
 52. Wang, G., T. Savinko, H. Wolff, M. C. Dieu-Nosjean, L. Kemeny, B. Homey, A. I. Lauferma, and H. Alenius. 2007. Repeated epicutaneous exposures to ovalbumin progressively induce atopic dermatitis-like skin lesions in mice. *Clin. Exp. Allergy* **37**: 151-161.
 53. Watanabe, A., H. Mishima, P. M. Renzi, L. J. Xu, Q. Hamid, and J. G. Martin. 1995. Transfer of allergic airway responses with antigen-primed CD4+ but not CD8+ T cells in brown Norway rats. *J. Clin. Invest.* **96**: 1303-1310.
 54. Xavier, R. J. and D. K. Podolsky. 2007. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* **448**: 427-434.
 55. Yawalkar, N., M. Uggioni, J. Scharer, J. Braunwalder, S. Karlen, B. Dewald, L. R. Braathen, and M. Baggolini. 1999. Enhanced expression of eotaxin and CCR3 in atopic dermatitis. *J. Invest. Dermatol.* **113**: 43-48.

(Received Sep. 7, 2009/Accepted Dec. 8, 2009)