

□ 원 저 □

## 결핵성 림프절에서 $\gamma\delta$ T 림프구의 분포에 관한 연구<sup>+</sup>

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 결핵연구소

심태선 · 유철규 · 김영환 · 한성구  
심영수 · 김건열\* · 한용철\*\*

= Abstract=

### The Distribution of $\gamma\delta$ T Cells in Tuberculous Lymphadenopathy

Tae Sun Shim, M.D., Chul-Gyu Yoo, M.D., Young Whan Kim, M.D., Sung Koo Han, M.D.,  
Young-Soo Shim, M.D., Keun Youl Kim, M.D.\* and Yong Chol Han, M.D.\*\*

*Department of Internal Medicine and Tuberculosis Research Institute,  
Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea*

**Background :** The antigen-specific receptor on the surface of most peripheral T lymphocytes is a disulfide-linked heterodimer composed of  $\alpha$  and  $\beta$  subunits, noncovalently associated with CD3 polypeptides. Recently, a novel type of CD3-associated heterodimer was described on a T cell subset that does not express CD4 or CD8 molecules. This second type of TCR dimer is composed of chains encoded for by the  $\gamma$ - and  $\delta$ -TCR genes. These cells may exert both cytotoxic and lymphokine producing functions. Although it was reported that some  $\gamma\delta$ -TCR might recognize an MHC-linked determinant, the function or physiologic ligand for this new receptor is not yet clear. It was found that  $\gamma\delta$ -TCR can react with 65 kD heat shock protein of *M. tuberculosis*, which suggests the possible protective role of  $\gamma\delta$  T lymphocytes against tuberculosis. In our previous study, there was neither the increase in number nor the functional activation of  $\gamma\delta$  T cells in the peripheral blood from patients with pulmonary tuberculosis. Now we report the distribution of  $\gamma\delta$  T cells in the regional sites of *M. tuberculosis* infection, especially tuberculous lymphadenitis.

**Methods :** Lymph nodes from patients with pathologically-proven tuberculous lymphadenopathy (n=5) and reactive hyperplasia (n=3) were used. Tissues were frozen in liquid nitrogen immediately after removal and stored below  $-70^{\circ}\text{C}$ . The cryostat sections of these frozen specimens were stained with anti-Leu-4 Ab, Identi-T TCR  $\delta 1$ , and Identi-T  $\beta F1$ . The number of positively stained cells were counted at high power field.

**Results :** The infiltration of  $\gamma\delta$  T cells was significantly higher in the lymph nodes from patients

+ 본 연구는 1992년도 서울대학교병원 지정연구비의 보조로 이루어 졌음.

\* 현재는 단국대학교 의과대학 내과 근무

\*\* 현재는 삼성의료원 내과 근무

with tuberculous lymphadenopathy than that with reactive hyperplasia (16.3 = 10.3% vs. 1.7 = 1.5%).

**Conclusion :** These results suggest that  $\gamma\delta$  T cells may play a role in the defense against M. tuberculosis infection, especially in the regional sites of infection.

**Key Words:** Tuberculosis, Lymph Node,  $\gamma\delta$  T cell

## 서 론

국내 폐결핵 환자의 유병률은 체계적인 결핵관리로 1990년에 1.8%<sup>1)</sup>까지 감소하였지만 아직도 선진국에 비하면 높은 편이다. 최근 서구에서도 후천성 면역결핍증 후군 환자의 증가와 함께 폐결핵의 유병률이 다시 증가하여 큰 사회적 문제가 되고 있다. 결핵균에 감염되면 개개인의 면역상태에 따라 다양한 임상경과를 거치게 되는데 결핵균 감염에 대한 신체의 방어기전에서 세포매개성 면역기전이 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려져 있다. T 림프구는 세포매개성 면역기전에서 중추적 역할을 하는 세포이다.

T 림프구는 세포표면에 있는 CD3와 비공유결합되어 있는(noncovalently linked) T 림프구 수용체(T cell receptor, 이하 TCR로 약함)가 항원전달세포(antigen presenting cell)의 세포표면에 있는 주조직항원(MHC)과 결합하여 항원을 인지하는 것으로 알려져 있다. 과거부터 TCR은  $\alpha$ 와  $\beta$  폴리펩타이드가 결합된 heterodimer로 알려져 왔다. 최근에  $\alpha\beta$ -TCR(TCR-2)과 다른  $\gamma$ 와  $\delta$ 의 두 폴리펩타이드로 구성된  $\gamma\delta$  TCR를 갖는 T 림프구가 발견되어 기능과 구조에 관해 많은 사람의 관심을 끌고 있다.  $\gamma\delta$  T 림프구는 정상인 말초혈액 T 림프구의 1~10%<sup>2,3)</sup>를 차지하며, 그 외의 림프기관에서도 비슷한 분포를 나타내고 있음이 밝혀졌다.  $\gamma\delta$  T 림프구의 비특이적 세포살해능과 Lymphokine 생성능<sup>4)</sup>이 알려져 있지만 아직 자세한 기능은 밝혀지지 않은 상태이다.

최근에 여러가지 자극에 반응하여 세포내에서 증가하는 heat shock protein(이하 HSP으로 약함)이 여러 병원체의 주요 항원이 되며,  $\gamma\delta$  T 림프구가 결핵균의 65kD HSP과 반응한다는 보고가 있어<sup>5)</sup>,  $\gamma\delta$  T 림프구가 결핵균에 대한 방어기전에 관여할 가능성을 시사하고 있다.

반면에 본 교실의 연구와 다른 연구에 의하면 폐결핵 환자의 말초혈액에서  $\gamma\delta$  T 림프구의 숫적 증가나 기능의 활성화가 관찰되지 않아<sup>6)</sup> 폐결핵 환자에서  $\gamma\delta$  T 림프구는 전신적으로 활성화되지 않고 국소병변에서 방어기능을 나타내는 것으로 생각할 수 있다. 이에 저자들은 일차적으로 결핵의 국소병변으로 조직을 얻기가 쉬운 결핵성 림프절에서  $\gamma\delta$  T 림프구의 분포를 관찰하고자 본 연구를 시행하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대 상

1991년 3월부터 1991년 10월까지 조직검사를 시행하여 결핵성 림프절염(n=5)과 반응성 과형성(reactive hyperplasia)(n=3)으로 진단된 환자의 림프절을 대상으로 하였다.

### 2. 방 법

신선한 조직을 얻은 즉시 -70℃의 액화질소에 얼려 보관하였다. 얼린 조직을 4-6 $\mu$ m의 두께로 얇게 연속절편을 내어 슬라이드를 4장씩 만들었다. 염색에 사용된 일차 단일클론 항체는 anti-Leu-4 Ab(Becton & Dickinson, USA), Identi-T TCR  $\delta$ 1(T Cell Sciences, USA)과 Identi-T  $\beta$ F1(T Cell Sciences, USA)를 사용하였고 염색에는 DAKO사의 LSAB Kit를 사용하였다. 연속절편의 나머지 1장은 H & E염색을 시행하여, 단일클론항체로 염색한 3장의 슬라이드와 함께 광학현미경으로 관찰하였다. 연속절편의 같은 부위를 400배 배율하에서 관찰하여 총 T 림프구,  $\alpha\beta$  T 림프구, 그리고  $\gamma\delta$  T 림프구의 수를 세어  $\alpha\beta$  T 림프구와  $\gamma\delta$  T 림프구의 비율을 계산하였다.

### 3. 통계처리 및 결과분석

통계처리 및 자료의 분석은 SPSSPC\* 통계 package

Table 1. Comparison of  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T Cell Ratio between Reactive Hyperplasia and Tuberculous Lymphadenopathy Group

	$\alpha\beta$ T cell ratio(%)	$\gamma\delta$ T cell ratio(%)
Reactive hyperplasia	69.3±28.3	1.7±1.5
Tuberculous lymphadenopathy	76.4±19.8	16.3±10.3

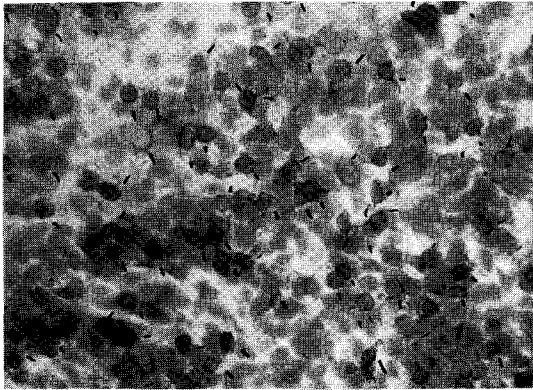


Fig. 1. Immunohistochemical staining for  $\gamma\delta$  T cell in lymph nodes from patients with tuberculous lymphadenopathy. Dots indicate positively-stained  $\gamma\delta$  T cells.

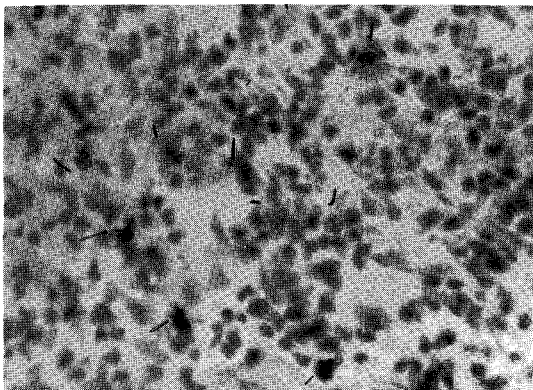


Fig. 2. Immunohistochemical staining for  $\gamma\delta$  T cell in lymph nodes from patients with reactive hyperplasia. Dots indicate positively-stained  $\gamma\delta$  T cells.

를 이용하였으며, 유의성 검정은 Mann-Whitney U test 를 사용하였다.

## 결 과

반응성 과형성 림프절에서는 총 T 림프구중  $\gamma\delta$  T 림프구의 비율이  $1.7 \pm 1.5\%$ 였고 결핵성 림프절에서는  $\gamma\delta$  T 림프구가 전체 T 림프구의  $16.3 \pm 10.3\%$ 를 차지하고 있어 결핵성 림프절에서 반응성 과형성 림프절에 비해  $\gamma\delta$  T 림프구의 침윤이 유의하게 증가되어 있었다 ( $p < 0.05$ , Table 1, Fig. 1, 2).

## 고 찰

항원을 인식하는데 중요한 TCR는  $\alpha$ 와  $\beta$ 의 두 폴리펩타이드로 이루어진  $\alpha\beta\gamma$  heterodimer로 알려져 있었는데, 최근에 이와 다른  $\gamma$ 와  $\delta$ 의 두 폴리펩타이드로 이루어진  $\gamma\delta$ 수용체(TCR-1)를 갖는 T 림프구가 발견되어  $\gamma\delta$  T 림프구로 명명되었다<sup>7,8)</sup>.  $\gamma\delta$  T 림프구는 세포의 표면에 CD2, CD5, CD7의 표식자를 갖고 있지만 CD1, CD4, CD28, CD11b, CD16등은 부분적으로 소유하고 있는 이질적인 세포의 집단이다<sup>2)</sup>.  $\gamma\delta$  T림프구 발견 초기에는 흉선에 있는  $\gamma\delta$  T 림프구가 모두 세포 표면에 CD4와 CD8을 가지고 있지 않아서 이중음성(CD4/CD8 double negative)을  $\gamma\delta$  T 림프구의 특징적인 소견으로 생각하였으나 그 후 비장의  $\gamma\delta$  T 림프구의 50%, 말초 혈액  $\gamma\delta$  T 림프구의 30% 정도가 CD8 양성임이 밝혀져 이중음성이  $\gamma\delta$  T 림프구의 공통적인 특징이 아닌 것이 밝혀졌다<sup>9)</sup>.

사람에서는  $\gamma\delta$  T 림프구는 흉선, 편도, 림프절, 비장 등의 조직화된 림프선 장기와 장 또는 피부에 산재한 림프조직에  $1\sim 10\%$ <sup>2)</sup>의 빈도로 균등하게 분포하고 있다. 반면에 mouse에서는 조직화된 림프선 조직(비장, 임파절, 흉선등)이나 말초혈액에는 낮은 비율(5% 이하)로 분포하지만 상피세포를 갖는 기관들, 즉, 피부, 소장, 그리고 생식기관(자궁, 질) 등에 많이 존재하는 국소적 우세를 보여주고 있다. 또한 표피의 수지상세포도  $\gamma\delta$  TCR를 갖고 있으며, 폐의 총 림프구 중  $\gamma\delta$  T 림프구의 비율이  $8\sim 20\%$ 를 차지하여 정상 림프조직( $1\sim 10\%$ ) 보다 높

은 비율을 나타내고 있다<sup>10)</sup>.  $\gamma\delta$  T 림프구의 다양성과 함께 mouse에서의 이러한 국소 장기 우세성은  $\gamma\delta$  T 림프구가 계통발생학적으로 아주 오래된 방어기전으로서 세포의 원상태를 감시하거나, 변형되거나 세균이 침입한 세포를 파괴하는데 관여함을 시사하는 소견이다<sup>11)</sup>. 즉, 상피세포층에 많은 수의  $\gamma\delta$  T 림프구가 존재하는 mouse에서는 병원균의 입구인 상피세포에서  $\gamma\delta$  T 림프구가 일차적인 방어기전에 관여하리라 생각된다.

거의 모든 생물에서 유전자 염기서열 및 아미노산 서열이 잘 보존되어 있는 HSP이 여러 병원체의 중요 항원으로 작용하는 사실이 알려졌는데,  $\gamma\delta$  T 림프구가 결핵균의 65kD HSP과 반응한다는 보고는<sup>5)</sup>,  $\gamma\delta$  T 림프구가 결핵균에 대한 방어기전에 관여할 가능성을 시사하는 소견이라 하겠다. 또한 일차 M. tuberculosis 접종시에는  $\gamma\delta$  T 림프구가 증가하지만 이차로 M. tuberculosis 접종 후에는  $\gamma\delta$  T 림프구가 증가하지 않는다는 사실로부터  $\gamma\delta$  T 림프구는 결핵균 항원 특이적인  $\alpha\beta$  T 림프구가 체내에서 증가되기 전에 결핵균 항원에 반응하는 것으로 생각할 수 있다.

본 교실의 연구와 다른 연구에 의하면 폐결핵 환자의 말초혈액에서  $\gamma\delta$  T 림프구의 숫적 증가나 기능의 활성화가 관찰되지 않아 폐결핵 환자에서  $\gamma\delta$  T 림프구는 전신적으로 활성화되지 않음을 알 수 있어<sup>6)</sup>,  $\gamma\delta$  T 림프구는 국소병변에서 결핵균에 대한 방어기전에 관여할 가능성을 생각할 수 있고 이는 결핵균에 감염된 국소병변에서  $\gamma\delta$  T 림프구가 증가된 사실로 뒷받침된다. 즉, M. tuberculosis로 immunize시킨 mice의 draining 림프절에서  $\gamma\delta$  T 림프구의 수와 활성도가 증가되어 있고<sup>12)</sup>, 결핵성 늑막염에서 늑막액의  $\gamma\delta$  T 림프구가 증가되어 있으며<sup>13)</sup>, lepromin 피하주사시 조직의  $\gamma\delta$  T 림프구가 전체 T 림프구의 25~30%를 차지하여 정상 조직에서 보다 5~8배 증가하는 사실들이 알려져 있다<sup>14)</sup>.

Inoue 등<sup>15)</sup>은 mice의 복강내에 생 결핵균을 투여하고 복수, 림프절, 비장 등에서  $\gamma\delta$  T 림프구를 관찰하였다. 결핵균은 28일째에 최고로 증가하였고 그후 점차 감소하였다. 7일째 복강내의 T 림프구중 25%가 CD4 음성, CD8 음성이었고 이중 대다수가  $\gamma\delta$  T 림프구였다. 그런데 28일째에는 오히려  $\alpha\beta$  T 림프구가 증가하고  $\gamma\delta$  T 림프구의 비율은 오히려 감소하였다. 이런 현상은 림프절

과 비장에서도 마찬가지였다. 이는  $\gamma\delta$  T 림프구가 결핵균 감염 초기의 면역기전에 관여함을 시사하는 소견이다. 그러나 EB 바이러스에 의한 전염성 단핵구증 환자의 말초혈액에서  $\gamma\delta$  T 림프구는 급성기에 증가하고 회복기에도 여전히 증가( $\alpha\beta$  T 림프구의 감소로  $\gamma\delta$  T 림프구의 비율은 상대적으로 더 증가함)한 상태로 지속되어 위의 결과와는 상반된 결과를 보이고 있다<sup>3)</sup>. 또한 본 연구에서도 반응성 과형성 림프절에서는 총 T 림프구중  $\gamma\delta$  T 림프구의 비율이  $1.7 \pm 1.5\%$ 였고 결핵성 림프절에서는  $\gamma\delta$  T 림프구가 전체 T 림프구의  $16.3 \pm 10.3\%$ 를 차지하고 있어 결핵성 림프절에서 반응성 과형성 림프절에 비해  $\gamma\delta$  T 림프구의 침윤이 유의하게 증가되어 있었다. 이상의 결과로  $\gamma\delta$  T 림프구가 결핵균 감염 국소 병변부위에서 방어기전에 관여할 가능성이 있을 것으로 생각되지만 국소 결핵 병변내의  $\gamma\delta$  T 림프구의 숫적 증가가 결핵에 대한 방어기전과는 무관하게 이차적인 부수 현상일 가능성을 배제할 수 없어 향후 국소 결핵 병변에서의  $\gamma\delta$  T 림프구 기능에 관한 연구가 필요 할 것으로 생각된다.

## 요 약

**연구배경** : 최근에  $\gamma\delta$  T 림프구가 결핵균의 항원과 반응함이 알려져  $\gamma\delta$  T 림프구가 결핵균에 대한 방어기전에 관여할 가능성이 제시되고 있다. 본 교실의 연구와 다른 연구에 의하면 폐결핵 환자의 말초혈액에서  $\gamma\delta$  T 림프구의 숫적 증가나 기능의 활성화가 관찰되지 않아 폐결핵 환자에서  $\gamma\delta$  T 림프구는 전신적으로 활성화되지 않고 국소병변에서 방어기능을 나타내는 것으로 생각할 수 있다. 이에 저자들은 일차적으로 결핵의 국소병변으로 조직을 얻기가 쉬운 결핵성 림프절에서  $\gamma\delta$  T 림프구의 분포를 관찰하고자 본 연구를 시행하였다.

**방법** : 조직검사상 결핵성 림프절염(n=5)과 반응성 과형성(reactive hyperplasia) (n=3)으로 진단된 환자의 림프절을 대상으로 CD4,  $\alpha\beta$  TCR,  $\gamma\delta$  TCR에 대한 단일 클론항체를 이용해 면역조직화학검사를 시행하였다.

**결과** : 반응성 과형성 림프절에서는 총 T 림프구중  $\gamma\delta$  T 림프구의 비율이  $1.7 \pm 1.5\%$ 였고 결핵성 림프절에서는  $\gamma\delta$  T 림프구가 전체 T 림프구의  $16.3 \pm 10.3\%$ 를 차

지하고 있어 결핵성 림프절에서 반응성 과형성 림프절에 비해  $\gamma\delta$  T 림프구의 침윤이 유의하게 증가되어 있었다( $p < 0.05$ ).

**결론:**  $\gamma\delta$  T 림프구가 결핵균 감염 국소 병변부위에서 방어기전에 관여할 가능성이 있을 것으로 생각되고 향후 국소 결핵 병변에서의  $\gamma\delta$  T 림프구 기능에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## REFERENCES

- 1) 홍영포: 제 6차 한국 결핵 실태조사 결과. 1990
- 2) Groh V, Porcelli S, Fabbi M, Lanier LL, Picker LJ, Warnke RA, Bhan AK, Strominger JL, Brenner MB: Human lymphocytes bearing T cell receptor  $\gamma\delta$  are phenotypically diverse and evenly distributed throughout the lymphoid system. *J Exp Med* **169**:1277, 1989
- 3) Paoli PD, Gennari D, Martelli P, Cavarzerani V, Comoretto R, Santini G:  $\gamma\delta$  T cell receptor-bearing lymphocytes during EBV infection. *J Infect Dis* **161**:1013, 1990
- 4) Brenner MB, McLean J, Dialynas DP, Strominger JL: Identification of a putative second T-cell receptor. *Nature* **322**:145, 1986
- 5) Born W, Happ MP, Dallas A, Reardon C, Kubo R, Shinnick T, Brennan P, O'Brien R: Recognition of heat shock proteins and  $\gamma\delta$  cell function. *Immunol Today* **11**:40, 1990
- 6) 심태선, 유철규, 김영환, 한성구, 심영수, 김건열, 한용철: 폐결핵환자의 말초혈액에서의  $\gamma\delta$  T 림프구에 관한 연구. *결핵 및 호흡기질환* **41**:239, 1994
- 7) Raulet DH: The structure, function, and molecular genetics of the  $\gamma\delta$  T cell receptor. *Annu Rev Immunol* **7**:175, 1989
- 8) Brenner MB, McLean J, Scheft H, Riberdy J, Ang SL, Seidman JG, Delvin P, Krangel MS: Two forms of the T-cell receptor  $\gamma\delta$  protein found on peripheral blood cytotoxic T lymphocytes. *Nature* **325**:689, 1987
- 9) Bucy RP, Chen CH, Cooper MD: Tissue localization and CD8 accessory molecule expression of  $\gamma\delta$  T cells in humans. *J Immunol* **142**:3045, 1989
- 10) Augustin A, Kubo RT, Sim GK: Resident pulmonary lymphocytes expressing the  $\gamma\delta$  T-cell receptor. *Nature* **340**:20, 1989
- 11) Kabelitz D, Bender A, Schondelmaier S, Schoel B, Kaufmann SH: A large fraction of human peripheral blood  $\gamma\delta^+$  T cells is activated by Mycobacterium tuberculosis but not by its 65kD heat shock protein. *J Exp Med* **171**:667, 1990
- 12) Janis EM, Kaufmann SH, Schwartz RH, Pardoll DM: Activaton of  $\gamma\delta$  T cells in the primary immune response to Mycobacterium tuberculosis. *Science* **244**:713, 1989
- 13) Okubo Y, Kusamas, Yano A: PPD-specific proliferative response in humans. *Microbiol Immunol* **26**:511, 1982
- 14) Modlin RL, Pirmez C, Hofman FM, Torigian V, Uyumura K, Rea TH, Bloom BR, Brenner MB: Lymphocytes bearing antigen-specific  $\gamma\delta$  T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature* **339**:544, 1989
- 15) Inoue T, Yoshikai Y, Matsuzaki G, Nomoto K: Early appearing  $\gamma\delta$ -bearing T cells during infection with Calmette Guerin bacillus. *J Immunol* **146**:2754, 1991