

주조직적합항원이 불일치하는 마우스 동종 조혈모세포이식에서 IL-2로 유도된 CD4+CD25+ T세포를 이용한 이식편대숙주병의 억제

가톨릭대학교 의과대학 ¹소아과학교실, ²내과학교실, ³미생물학교실, ⁴치료방사선과학교실, ⁵진단병리과

현재호¹ · 정대철¹ · 정낙균¹ · 박수정² · 민우성² · 김태규³ · 최병옥⁴ · 김원일⁵
한치화² · 김학기¹

Inhibition of Graft Versus Host Disease Using CD4+CD25+ T Cells Induced with Interleukin-2 in Mismatched Allogeneic Murine Hematopoietic Stem Cell Transplantation

Jae Ho Hyun¹, Dae Chul Jeong¹, Nak Gyun Chung¹, Soo Jeong Park², Woo Sung Min², Tai Gyu Kim³, Byung Ock Choi⁴, Won Il Kim⁵, Chi Wha Han², Hack Ki Kim¹

Departments of ¹Pediatrics, ²Internal Medicine, ³Microbiology, ⁴Radiation Oncology and ⁵Laboratory Medicine, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: In kidney transplantation, donor specific transfusion may induce tolerance as a result of some immune regulatory cells against the graft. In organ transplantation, the immune state arises from a relationship between the immunocompromised graft and the immunocompetent host. However, a reverse immunological situation exists between the graft and the host in hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). In addition, early IL-2 injections after an allogeneic murine HSCT have been shown to prevent lethal graft versus host disease (GVHD) due to CD4+ cells. We investigated the induction of the regulatory CD4+CD25+ cells after a transfusion of irradiated recipient cells with IL-2 into a donor. **Methods:** The splenocytes (SP) were obtained from 6 week-old BALB/c mice (H-2^d) and irradiated as a single cell suspension. The donor mice (C3H/He, H-2^k) received 5×10⁶ irradiated SP, and 5,000 IU IL-2 injected intraperitoneally on the day prior to HSCT. The CD4+CD25+ cell populations in SP treated C3H/He were analyzed. In order to determine the *in vivo* effect of CD4+CD25+ cells, the lethally irradiated BALB/c were transplanted with 1×10⁷ donor BM and 5×10⁶ CD4+CD25+ cells. The other recipient mice received either 1×10⁷ donor BM with 5×10⁶ CD4+CD25- cells or the untreated SP. The survival and GVHD was assessed daily by a clinical scoring system. **Results:** In the MLR assay, BALB/c SP was used as a stimulator with C3H/He SP, as a responder, with or without treatment. The inhibition of proliferation was 30.0±13% compared to the control. In addition, the MLR with either the CD4+CD25+ or CD4+CD25- cells, which were isolated by MidiMacs, from the C3H/He SP treated with the recipient SP and IL-2 was evaluated. The donor SP treated with the recipient cells and IL-2 contained more CD4+CD25+ cells (5.4±1.5%) than the untreated mice SP (1.4±0.3%) (*P*<0.01). There was a profound inhibition in the CD4+CD25+ cells (61.1±6.1%), but a marked proliferation in the CD4+CD25- cells (129.8±65.2%). Mice in the CD4+CD25+ group showed low GVHD scores and a slow progression from the post-HSCT day 4 to day 9, but those in the control and

책임저자 : 정대철, 성모자애병원 소아과, ☎ 403-720, 인천시 부평구 부평 6동 665

Tel: 032-510-5687, Fax: 032-503-9724, E-mail: dcjeong@olmh.cuk.ac.kr

이 논문은 2003년 가톨릭중앙의료원 성의장학 연구비원과제비에 의해 이루어졌음.

CD4+CD25- groups had a high score and rapid progression ($P < 0.001$). The probability of survival was 83.3% in the CD4+CD25+ group until post-HSCT day 35 and all mice in the control and CD4+CD25- groups died on post-HSCT day 8 or 9 ($P = 0.0105$).

Conclusion: Donor graft engineering with irradiated recipient SP and IL-2 (recipient specific transfusion) can induce abundant regulatory CD4+CD25+ cells to prevent GVHD. (*Immune Network* 2003;3(4):287-294)

Key Words: CD4+CD25+ T cells, interleukin-2, recipient specific transfusion, GVHD

서 론

이식면역학의 발달로 동종 장기이식이 많은 환자에게서 시행되고 있으며 중요한 치료방법으로 자리를 잡고 있다. 그러나, 장기이식의 성공여부는 이식편 거부(graft rejection)나 이식편대숙주병(graft versus host disease, GVHD)과 같은 면역반응에 대한 조절에 의해 좌우된다. 이를 위하여 cyclosporin A나 스테로이드제와 같은 면역억제제가 사용되고 있지만 약제의 부작용과 면역억제 효과로 인한 감염 등의 심각한 문제가 발생하고 있다(1). 최근 동종이식 후 발생하는 면역반응을 조절하기 위하여 동종 조혈모세포이식에서 GVHD에 관여하는 T세포를 제거한 골수이식이나(2) 선택적인 공여자 혈액의 수혈로 이식된 신장의 장기 생존 등(3)의 면역조절을 위한 많은 연구가 세포치료의 관점에서 진행되고 있다(4).

생체 내에서 동종항원에 대한 면역관용(immune tolerance)을 유도하는 데 있어 여러 가지 기전이 관여한다. 이러한 기전 중 공동자극신호(co-stimulatory signal)의 발현 결손, veto 세포와 CD4+ T세포가 관여한다(5). 특히, CD4+CD25+ 세포는 동종이나 자가항원에 대한 강력한 면역억제능을 나타내고 있으며 자가면역, 종양면역 및 이식 후 면역관용에 연관된 것으로 알려져 있다(6). CD4+CD25+ T세포는 T세포의 활성화 억제 신호를 전달하는 cytotoxic T-lymphocyte associated antigen 4 (CTLA-4)를 통하여 항원을 제시 받은 미경험 T세포(naive T cells)의 활성화를 억제하고 IL-10을 분비하여 면역억제 기능을 나타낸다(7,8). CD25는 IL-2의 수용체 중 α subunit에 대한 표지자로서 CD4+ 세포를 IL-2와 함께 증식시키면 약 80%에서 CD25+ 항원을 발현하게 된다.

IL-2는 활성화된 T세포에서 분비되며 미경험 T세포, 자연살해세포의 활성화에 관여하여 면역반응을 유도하는 강력한 사이토카인이다. 동종 장기이식에서 동종항원을 인지한 T세포가 IL-2를 분비하면서 T세포의 분화와 증식을 유도하게 되어 면역반응이 진행된다. 이러한 기전을 차단하기 위하여 다양한 면역억제제로서 IL-2의 생산과 역할을 조절하게 되어 면

역반응을 최소화하게 된다. 한편, 마우스 조혈모세포 이식에서 이식 초기에 IL-2를 수혜자 마우스에게 투여하면 오히려 GVHD가 억제되며 이런 기전이 수혜자 마우스에서 IL-2로 인하여 CD4+ T세포 중 다량의 세포가 CD25+를 발현하면서 사이토카인의 변화가 일어난다(9,10).

신장 이식에서 공여자의 혈액을 미리 수혈받은 환자에게 이식된 장기가 수혈받지 않은 환자보다 장기간 생존한다. 이러한 현상은 공여자의 항원을 인지한 면역세포가 나중에 이식된 장기의 항원에 대한 반응을 조절하여 면역관용이 이루어진다(11). 장기이식에서는 수혜자가 이식편보다 강력한 면역상태를 나타내고 있어 면역조절세포를 수혜자로부터 유도할 수 있다. 그러나, 동종 조혈모세포이식에서는 장기이식과 달리 치사량의 전처치를 받은 수혜자가 공여자에 비해 면역이 약한 상태이다. 따라서, 동종 조혈모세포 이식에서는 공여자의 골수로부터 수혜자의 동종항원에 대한 면역조절세포를 유도할 수 있으며 이를 이용한 세포치료가 가능하다.

이에 저자들은 공여자의 골수로부터 효과적인 면역조절 세포인 CD4+CD25+ 세포를 유도하기 위하여 IL-2의 효과를 확인하고자 하였다. 또한, 수혜자의 항원을 공여자에게 미리 투여하여 동종항원에 대해 면역조절기능이 있는 CD4+CD25+ 세포를 유도하고자 하였으며 구조적 적합항원이 일치하지 않는 마우스 동종 조혈모세포이식에서 나타나는 면역반응인 치명적인 GVHD를 효과적으로 예방할 수 있는지 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물. 4~6주 된 암컷 BALB/c (H-2^d) 마우스와 수컷 C3H/He (H-2^k) 마우스를 이용하였다. 모든 마우스는 Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME)에서 구입하였다. 특정 병원체가 없는 마우스를 무균 사육기에서 멸균된 사료와 물을 사용하여 실험에 들어가기 전 1주의 적응기간을 거쳐 실험에 이용하였다.

골수와 비장 채취. 공여자 마우스를 경골 탈골시켜 도살시킨 후에 대퇴골과 경골을 분리하여 RPMI-1640으

로 골수를 추출하고 골편을 제거하였다. D-phosphate buffered saline (D-PBS)로 2차례 세척하고 세포 수를 확인한 후 생존율을 trypan blue 염색으로 확인하였다. 골수를 채취하면서 공여자 마우스의 비장을 적출하여 조직분쇄기와 mesh를 이용하여 비장세포를 분리하였고 D-PBS로 세척하여 세포의 생존을 확인하였다. 수혜자 마우스도 같은 방법으로 골수와 비장세포를 분리하였다.

CD4+CD25+ T세포의 분리. 비장에서 분리된 단핵세포를 면역자기방법인 MidiMacs (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)를 이용하여 CD4+CD25+ 세포와 CD4+CD25- 세포를 분리한 후 유세포분석으로 확인하였다. 분리방법을 간단히 기술하면, 비장 단핵세포 1×10^7 의 세포에 CD8, CD11b, CD45R, CD19b, Ter-119의 biotin이 결합되어 있는 혼합 항체를 혼합하여 4°C에서 10분간 배양한 후 anti-biotin microbead와 anti-CD25-PE를 첨가하여 암실에서 4°C 상태로 배양하고 buffer로 세척한다. LD Column에 buffer를 넣고 시료를 첨가하여 CD4에 대한 음성선택(negative selection)을 시행한 후 anti-PE-bead를 첨가하여 4°C에서 15분간 암실에서 배양하고 MS column으로 CD25+세포를 양성선택(positive selection)하여 CD4+CD25+ 세포를 얻었다.

혼합림프구반응. 면역억제효과를 알아보기 위하여 혼합림프구반응을 시행하였다. BALB/c 마우스의 비장세포에 2,500 cGy의 방사선을 조사하여 자극세포로, C3H/He 마우스의 비장세포, 분리된 CD4+CD25+ T세포, CD4+CD25- 세포 등을 반응세포로 이용하였다. 반응세포를 비활성화시킨 10% 우태아혈청(fetal bovine serum)이 함유된 RPMI-1640 배양액에 부유시켜 100 μ L에 각각 5×10^5 의 세포를 96 well flat bottom culture plate에 넣었다. 자극세포와 함께 1:1로 혼합한 후 triplicate 상태에서 72시간, 37°C로 CO₂ 배양기에서 배양하고 72시간 이후에 Bromo-deoxyuridine을 첨가하여 12~18시간 배양하였다. 혼합림프구반응은 Roche사의 BrdU 방법(Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)을 이용하여 ELISA 방법으로 흡광도에 따른 세포증식정도를 확인하였다. 아무런 처치를 하지 않은 공여자 마우스의 비장세포와 수혜자 비장세포의 반응을 대조군으로 하였다. 림프구 증식 정도는 다음과 같은 공식을 이용하여 림프구 증식 정도를 확인하였다.

$$\text{림프구 증식증가(\%)} = \frac{(\text{실험군의 흡광도} - \text{대조군의 흡광도})}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

유세포 분석. 골수와 비장세포에서 분리된 세포는 fluorescein isothiocyanate (FITC)가 결합된 항CD4 항체와 Phycoerythrin (PE)가 결합된 항CD25 항체를 이용하여 성분을 분석하였다. 유세포분석은 EPICS-XII (Beckman Coulter, Miami, FL, USA)를 이용하여 분석하였다. 모든 항체는 각각에 해당되는 isotype control antibody를 이용하며 모든 항체를 BD Pharmingen (Becton Dickison, Mountain View, CA)으로부터 구입하여 사용하였다. 5×10^5 세포를 각 항체에 염색한 후 4°C의 암실에서 30분간 반응시킨 후 0.1% bovine serum albumin과 0.02% sodium azide가 함유된 PBS로 2차례 세척하고 분석할 때까지 500 μ L의 1% paraformaldehyde를 혼합하여 고정시켜 4°C에서 보관하였다. 또한, 동종골수이식 후 35일에 이식된 마우스에서 골수, 흉선 및 비장을 적출하여 항H-2^d-FITC와 H-2^k-PE로 염색한 후 유세포분석을 시행하여 키메리즘을 확인하였다.

IL-2 치료로 인한 조혈기능에 대한 효과분석. 조혈기능을 확인하기 위해서 과립구-단구 집락형성단위 분석(colony forming unit for granulocytes and monocytes assay, CFU-GM assay)을 시행하였다. MethoCultTM M3434 media (StemCell Tech. Inc., Vancouver, BC, Canada)를 이용하여 1 mL의 배지에 골수세포 1.5×10^5 를 혼합하여 각각의 용기에 넣어 37°C, 5% CO₂ 농도의 배양기에서 배양하여 각 군에서 과립구-단구 집락형성단위의 집락수를 배양 12일에 역상현미경으로 관찰하였다. 과립구-단구 집락형성단위의 집락은 세포가 40~50개 모여 있는 것으로 정의하였다.

IL-2 투여와 수혜자 세포의 수혈. C3H/He 마우스에게 이식 24시간 전에 대조군은 phosphate buffered saline (PBS) 0.2 mL를, 실험군에서는 IL-2 (0.2 mL, R&D system, Minneapolis, MN) 5,000 IU와 10,000 IU를 각각 복강 내로 주사하였다. 골수 채취 시 골수와 함께 적출된 비장세포를 유세포 분석을 통하여 면역세포의 분포를 확인하였다. 또한, 수혜자 세포를 공여자에게 수혈하기 위하여 수혜자 마우스에서 분리한 비장세포를 2,500 cGy의 방사선을 조사한 후 5×10^6 과 4×10^7 의 세포를 공여자 마우스의 꼬리정맥에 주입하면서 동시에 IL-2 5,000 IU를 복강 내 주사하고 이식하는 당일에 공여자로부터 골수와 비장세포를 얻어 혼합림프구반응 및 유세포분석을 시행하였다.

마우스 골수이식. BALB/c 마우스를 선형가속기(linear accelerator) (Clinac, 6MeV, Varion[®], CA)를 이용하여 방사선 조사속도 75 cGy/min으로 875 cGy에 노출시킨 후 3~4시간 이내에 C3H/He 골수세포 1×10^7 과 함께 5×10^5 CD4+CD25+ 세포와 CD4+CD25- 세포를 각각 혼합하여 꼬리 정맥으로 주사하였다.

GVHD의 대조군으로 세포를 분리하지 않은 공여자의 1×10^7 골수세포와 5×10^5 비장세포를 혼합하여 이식하여 GVHD의 진행과 생존율을 확인하였다. GVHD의 진행정도의 평가는 GVHD 임상점수체계를 이용하여 매일 마우스를 관찰하면서 평가하였다(12). 체중 감소, 털의 상태, 자세, 활동 정도 그리고 발이나 꼬리 부위의 피부상태를 관찰하여 각각의 항목을 0, 1, 2점으로 부여한 다음 이들의 합계를 표시하는 방법으로 GVHD의 변화를 확인하였고 총점이 4점 미만이면 경도(mild), 4~6점까지는 중등도(moderate), 7~10점까지는 중증(severe)으로 정하였다. 동종 조혈모세포이식을 받은 마우스는 각 군마다 6마리이었다.

통계 분석. 통계 분석은 paired t-test와 ANOVA를 이용하여 분석하고 P 값이 0.05 이하일 경우 통계적 유의성으로 인정하였다. 또한, 생존율은 Kaplan-Meier 생존분석으로 대조군과 실험군의 생존을 분석하였고 GVHD의 심각도와 진행 속도는 general measured repeated ANOVA 중 Bonferonni 방법을 이용하여 분석하였다.

결 과

IL-2를 투여한 후 혼합림프구반응. 면역조절세포가 IL-2를 투여한 후 증가되어 혼합림프구반응이 대조군에 비하여 감소하는지 알아보기 위하여 C3H/He 마우스 복강 내로 IL-2를 5,000 IU와 10,000 IU씩 각각 투여한 24시간에 비장을 적출하여 BALB/c 마우스의 비장세포와 혼합림프구반응을 시켰다. 5,000 IU의 IL-2를 투여한 군에서 약 $18.1 \pm 6.1\%$, 10,000 IU를 투여한 군에서는 $22.9 \pm 13.9\%$ 씩 대조군에 비해 림프구 증식이 일어났다(Fig. 1). 공여자 마우스에게 투여된 IL-2의 용량에 비례하여 혼합림프구증식이 일어나는 것을 확인하였다.

IL-2와 수혜자 마우스의 비장세포를 주입한 후 혼합림프구반응. 수혜자 마우스의 비장세포를 방사선을 조사한 후 공여자 마우스의 꼬리 정맥을 통하여 주입하고 동시에 5,000 IU의 IL-2를 복강으로 투여한 지 24시간 후 공여자 마우스의 비장세포를 적출하여 수혜자의 비장세포와 혼합림프구반응을 하였다. 한편, IL-2의 영향을 확인하기 위하여 방사선을 조사한 수혜자 마우스의 비장세포만을 정맥 주사하고 다음날 공여자의 비장세포를 적출하여 혼합림프구반응을 하였다. IL-2와 함께 5×10^6 의 비장세포를 주입한 마우스에서는 대조군에 비해 약 $23.2 \pm 0.5\%$ 의 림프구증식이 감소되었고 4×10^7 의 비장세포를 주입한 마우스에서는 $36.7 \pm 0.4\%$ 의 림프구증식이 감소되었으나 두 군간의 유의한 차이는 없었다($P > 0.05$). 그렇지만, IL-2의 투여 없이 수혜자의 비장세포만을 주사하였던 경

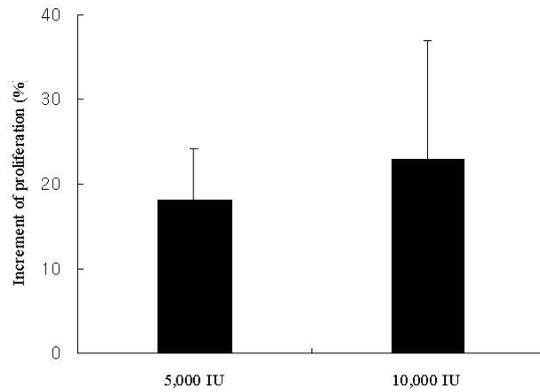


Figure 1. The effect of C3H/He splenocytes received IL-2 on mixed lymphocytes reaction. There was shown IL-2 dose-dependent proliferation of C3H/He splenocytes against irradiated BACB/c splenocytes. There were four experiments.

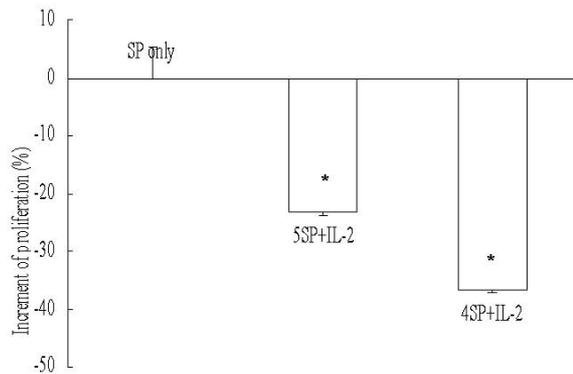


Figure 2. The effect of C3H/He splenocytes received irradiated BALB/c splenocytes with or without IL-2 (SP: C3H/He splenocytes received with irradiated BALB/c splenocytes, 5SP: C3H/He splenocytes received with 5×10^6 BALB/c splenocytes, 4SP: C3H/He splenocytes re received with 4×10^7 BALB/c splenocytes, IL-2: 5,000 IU of IL-2).

우에서는 림프구증식이 대조군에 비해 $0.2 \pm 5.5\%$ 정도로 감소하여 IL-2가 없는 상태에서는 림프구증식의 억제효과가 없었다(Fig. 2).

2,500 cGy의 방사선을 조사 받은 수혜자 마우스의 5×10^6 비장세포와 5,000 IU의 IL-2를 투여한 공여자 마우스에서 분리한 비장세포에서 면역자기방법으로 분리한 CD4+CD25+ 세포와 CD4+CD25- 세포를 반응세포로 하여 혼합림프구반응을 시도하였다. CD4+CD25+ 세포는 대조군에 비해 림프구 증식이 $61.1 \pm 6.1\%$ 감소하였으나 CD4+CD25- 세포는 $129.8 \pm 65.2\%$ 의 림프구 증식을 보였다(Fig. 3, $P < 0.01$).

수혜자 마우스의 비장세포와 IL-2를 처치한 공여자 마우스의 조혈기능. 수혜자 마우스의 비장세포와 IL-2로 처치한 지 24시간 후 공여자 마우스의 골수를

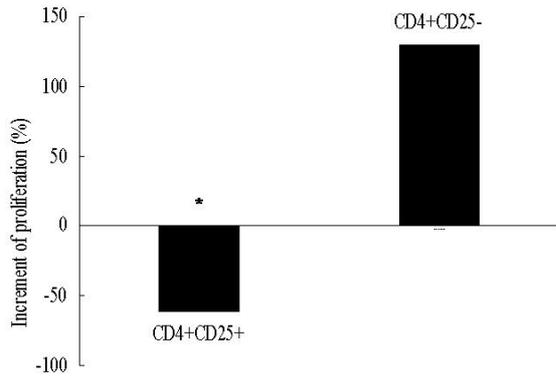


Figure 3. C3H/He CD4+CD25+ or CD4+CD25- T cells isolated by immunomagnetic method were reacted with irradiated BALB/c splenocytes.

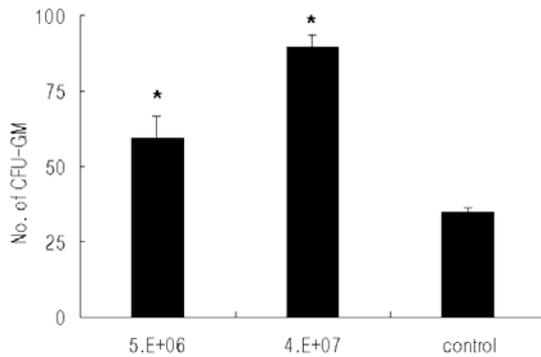


Figure 4. The bone marrow (BM) from C3H/He received irradiated BALB/c splenocytes and IL-2 did not lose CFU-GM as hematopoietic function, compared with control. The colonies in BM treated with cells and IL-2 were rather higher than in untreated BM ($P < 0.01$). 5.E+06: BM from C3H/He received 5×10^6 irradiated BALB/c splenocytes with 5,000 IU of IL-2, 4.E+07: BM from C3H/He received 4×10^7 irradiated BALB/c splenocytes with 5,000 IU of IL-2.

얻어 과립구-단구 집락형성 단위 배양을 시행하였다. 배양 12일에 확인한 과립구-단구 집락형성단위의 집락수는 대조군이 34.7 ± 1.7 개의 집락, IL-2와 함께 5×10^6 의 비장세포를 주입하였던 군이 59.3 ± 7.5 개의 집락, 또한, IL-2와 함께 4×10^7 의 비장세포를 주입하였던 군이 89.5 ± 1.4 개의 집락을 형성하여 비장세포와 IL-2를 투여하였던 군에서 조혈기능이 유의하게 증가되었다(Fig. 4, $P < 0.01$).

CD4+CD25+ 세포의 분포. 수혜자의 비장세포와 IL-2로 처치받은 공여자 마우스의 비장세포에서 CD4+CD25+ 세포의 분포를 조사하였다. PBS만 처리 C3H/He 마우스의 비장세포에서는 $1.4 \pm 0.3\%$ 의 CD4+CD25+ 세포가 확인되었으나 5×10^6 의 비장세포와 IL-2로 처치받은 공여자 마우스 비장에서는 $5.4 \pm 1.5\%$ 의 CD4+CD25+ 세포가 분포하여 유의하게 수

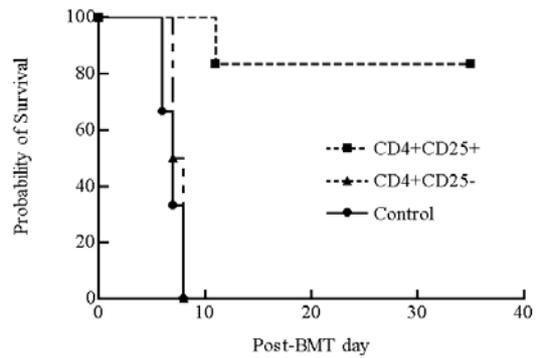


Figure 5. Survival in BALB/c mice receiving C3H/He bone marrow according to experimental group. All mice in control and CD4+CD25- group died due to lethal GVHD within post-HSCT 8 day. Five of six mice transplanted with CD4+CD25+ T cells survived until post-HSCT 35 day. The survival was significantly better in CD4+CD25+ group than in CD4+CD25- group and control ($P = 0.0105$).

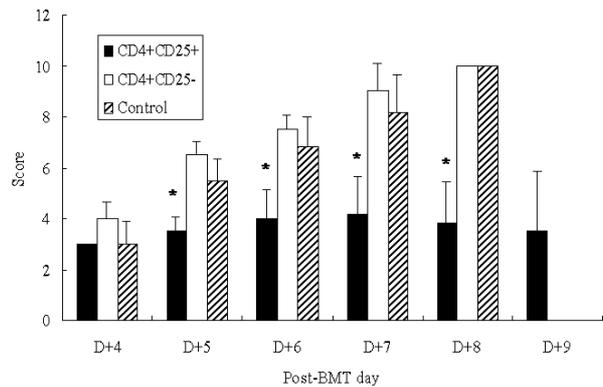


Figure 6. The progression and severity of GVHD patterns in the experimental groups using scoring system. The severity of GVHD in CD4+CD25+ group was milder than in control and CD4+CD25- group ($P < 0.01$). The progression of GVHD in control and CD4+CD25- group was rapid until post-HSCT 8 day ($P < 0.01$).

혜자 비장세포를 수혈받으면서 IL-2를 투여하였던 마우스에서 CD4+CD25+ 세포가 많이 있음을 확인하였다($P < 0.01$).

CD4+CD25+ 세포를 이용한 마우스 동종 조혈모세포 이식. 동종 조혈모세포이식 후 각 군의 생존율은 CD4+CD25+ 이식군에서 이식 후 11일에 한 마리가 사망하였으나 관찰기간인 이식 35일까지 나머지 마우스가 생존하여 83.3%의 생존율을 보였다. 그러나 CD4+CD25- 이식군과 GVHD 대조군에서는 이식 후 6~8일 사이에 모두 사망하여 CD4+CD25+ 이식군이 다른 군에 비하여 장기간 생존하였다(Fig. 5, $P = 0.0105$).

이식군 간에 GVHD의 변화는 CD4+CD25+ 이식

군에서 이식 후 초기에 4점 미만의 정도의 GVHD를 보인 반면에, CD4+CD25- 이식군과 GVHD 대조군에서는 이식 5일째부터 현저히 점수가 증가하면서 사망하였다($P < 0.01$). CD4+CD25- 이식군에서 관찰된 GVHD의 진행속도는 GVHD 대조군과 큰 차이가 없었으나 CD4+CD25+ 이식군에 비해 GVHD의 진행이 매우 빨랐다(Fig. 6, $P < 0.01$).

동종골수이식 35일에 골수, 흉선 및 비장에서 시행한 키메리즘 분석에서 CD4+CD25+ 이식군에서는 12.5%, 46.3%, 26.8%의 H-2^k 양성세포를 확인하였다.

고 찰

동종이식이 많은 환자에서 중요한 치료로 자리를 잡으면서 이식면역학에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. 동종 장기이식에 있어 공여자의 이식편과 환자 사이의 면역균형이 안정되는 면역관용을 유지하는 것이 이식의 성공여부를 결정한다(13). 주조직적합 항원의 일치 정도와 이식편과 숙주 사이의 면역균형에 의해 장기이식의 경우에는 이식편거부반응이(14), 조혈모세포이식에서는 GVHD가 문제가 되고 있다(15). 장기이식에서는 숙주의 면역력이 이식편에 대하여 강한 반면에, 조혈모세포이식에서는 전처치를 시행하여 면역성이 억제된 숙주에 비해 공여자 골수의 면역력이 강한 상태를 나타낸다. 결국 동종이식의 성공여부는 이식편과 숙주 사이의 면역균형을 유지하는 것에 달려있다고 할 수 있다.

본 연구에서는 마우스 동종 조혈모세포이식에서 IL-2를 이식 초기에 수혜자 마우스에게 투여하면 GVHD가 예방되며 IL-2가 면역조절능력을 가진 CD4+세포를 유도한다는 보고에 따라(10) 공여자에게 IL-2를 이식 전에 투여하여 골수 내에서 면역조절세포를 유도하고자 하였다. IL-2로 처리한 공여자 비장세포는 수혜자에 대하여 IL-2 용량에 따라 혼합림프구반응이 증가함을 확인하였다. 이러한 결과는 공여자에게 투여된 IL-2가 수혜자에 대한 림프구증식을 유도하여 면역반응이 더 증가된다고 할 수 있다. Sykes들과 Wang들은 마우스 동종 조혈모세포이식에서 IL-2를 수혜자에게 투여함으로써 면역조절세포를 활성화시켜 치명적인 GVHD를 예방한다고 하였으나(9,10) 본 연구에서 공여자에게 투여한 IL-2는 오히려 수혜자에 대한 면역반응만 증가시키는 결과를 보였다.

IL-2만을 투여하여 면역반응이 증가된 결과를 보였기에, 공여자에게 미리 수혜자의 면역세포를 주입하여 수혜자에 대한 면역조절세포를 얻기 위해 수혜자의 비장세포를 방사선 조사 후 투여하였는데 림프구증식이 매우 약하였으나 IL-2만을 투여하였던 경우에 비해 림프구증식이 없었던 결과를 확인하였다. Fast

는 동종 마우스에서 자외선이나 방사선을 조사한 혈액을 수혈하면 공여자와 수혜자 사이의 면역반응이 수혈된 혈액에 조사된 방사선의 용량에 따라 억제된다고 하였다(16). 본 연구에서는 일정한 방사선을 조사하였기에 방사선의 용량을 증가시킨다면 보다 강력한 억제능이 확인되었을 것으로 생각된다.

방사선을 조사 받은 수혜자 세포의 수혈만으로 면역억제능이 미약하여 본 연구에서는 면역조절세포인 CD4+CD25+세포를 유도하기 위하여 IL-2를 동시에 투여하였으며 CD4+CD25+ 세포를 분리하기 전에 비장세포를 얻어 혼합림프구반응을 확인하였다. 수혜자 비장세포와 IL-2로 처리받은 공여자의 비장세포는 수혜자 비장세포에 대하여 면역억제능이 있음을 확인하였다. 공여자에게 주입한 수혜자의 비장세포 용량에 관계없이 IL-2를 같이 투여함으로써 면역억제능이 증가하였다. 이러한 결과는 IL-2에 의하여 수혜자 세포에 대한 면역조절세포인 CD4+CD25+ 세포가 생체 내에서 증식되었을 것으로 생각된다. CD4+CD25+ 세포는 체외에서 IL-2와 함께 배양하면 증식하면서 면역조절 능력이 지속되고 체외 증식된 세포를 이용하여 동종 조혈모세포이식을 하면 치명적인 GVHD가 발생하지 않는다(17). 수혜자 세포를 수혈하여 면역조절세포가 발현되고 IL-2의 투여로 면역조절세포가 체내에서 유도된다고 생각된다.

CD4+CD25+ 세포의 분포 결과에서 수혜자 세포를 수혈하고 IL-2를 투여한 경우 아무런 처치를 받지 않은 공여자 마우스의 비장보다 유의하게 증가된 것을 보여주었다. 따라서 수혜자 마우스의 세포를 수혈하고 IL-2를 투여하면 체내에서 CD4+CD25+ 세포가 유도되고 증식된다는 사실을 알 수 있었다. 신장이식에서 공여자의 혈액을 수혈받은 환자에서 면역조절세포가 존재하여 이식된 신장이 장기간 생존한다는 결과는 CD4+CD25+ 세포가 발현되어 이식편에 대한 항원에 대하여 중추면역관용(central immune tolerance)이 일어난다는 것을 의미한다(18). 동종이식에서 면역성이 강한 쪽에 면역조절세포를 유도하여 면역성이 약한 쪽에 대한 면역조절이 이루어진다고 할 수 있다. 장기이식에서는 숙주의 면역력이 강하기 때문에 공여자 항원을 미리 처리하여 면역조절세포를 유도하게 되지만, 동종 조혈모세포이식에서는 반대의 상황이 이루어지게 된다. 즉, 수혜자는 전처치로 인하여 이식편에 비해 면역성이 약하기 때문에 공여자의 골수에서 면역조절세포를 유도하여 이식 후 나타나는 면역반응을 조절한다고 할 수 있다.

한편, 수혜자 세포와 IL-2를 투여받은 공여자 마우스의 조혈기능을 과립구-단구 집락형성단위의 형성으로 확인한 결과 대조군에 비해 유의하게 과립구-단

구 집락형성단위의 집락이 되었다. 단기간 IL-2와 배양된 조혈모세포는 과립구-단구 집락형성단위의 형성이 자극되지만 장기간 IL-12와 같이 투여하면 조혈모세포의 소실이 오게 되고(19), IL-2를 짧은 기간동안 생체에 투여한 후 과립구-단구 집락형성단위의 집락수가 4.5~12배까지 매우 현저히 증가된다(20). 백혈병세포가 함유된 조혈모세포를 실험실에서 6,000 IU의 IL-2와 같이 배양한 후 과립구-단구 집락형성단위는 IL-2로 처리하지 않은 경우보다 적게 형성된다(21). 그러나 본 연구에서는 정상 마우스에게 단기간 IL-2로 처리하여 공여자 골수 내의 미세환경에서 조혈기능을 억제하는 세포가 조절되어 과립구-단구 집락형성단위의 집락수가 증가되었을 것으로 생각된다.

CD4+CD25+ 세포를 공여자 골수와 같이 혼합하여 동종 조혈모세포이식을 시행한 경우 CD4+CD25- 세포를 이식한 군에 비해 장기간 생존하였다. 반면, CD4+CD25- 세포이식군은 GVHD 대조군과 같이 이식 후 8일 이내에 모두 사망하여 생존기간에 차이가 없었다. CD4+CD25+ 세포의 강력한 면역조절 능력으로 GVHD에 관여하는 면역기전에 대한 관용을 유도하였을 것으로 생각된다. CD4+CD25+ 세포이식이 GVHD에 대한 새로운 치료법으로서 제시되었는데(22), 그 기전을 보면 CD4+CD25+ 세포는 항원에 반응하는 면역세포에 대하여 CTLA-4를 통하여 활성화되는 T 세포를 억제하게 되고(7), IL-10을 분비하여 면역반응을 억제한다(8). Hoffman들과 Johnson들이 이미 동종 조혈모세포이식에서 CD4+CD25+ 세포의 이식을 통하여 치명적인 GVHD를 예방한다고 하였는데(23,24) 이는 본 연구 결과와 일치한다고 할 수 있다. 또한, CD4+CD25+ 이식군에서는 경도의 GVHD가 나타난 반면, CD4+CD25- 이식군과 GVHD 대조군은 이식 후 5일부터 중등도 이상의 GVHD를 보였으며 진행속도가 매우 빠르게 나타났다. 마우스 동종 조혈모세포이식에서 CD4+CD25+ 세포를 이식하였을 경우 이식 후 GVHD의 징후로 나타나는 체중감소는 미약하지만 이식편대백혈병효과가 있다(25). CD4+CD25+ 이식군에서는 면역조절세포가 GVHD가 일어나는 면역반응에 관여하여 치명적인 GVHD가 예방되었다고 생각된다.

이식 후 35일에 시행한 키메리즘 분석에서 골수보다 비장이나 흉선에서 공여자의 세포가 분포되었음을 확인하였다. 이러한 결과는 아마도 CD4+CD25+ 세포가 중추면역관용에 관여한다는 사실을 뒷받침한다고 할 수 있다. 따라서 CD4+CD25+ 세포는 이식 초기에는 CTLA-4의 발현이나 IL-10의 분비와 같은 세포 자체의 특성으로 면역반응에 관여하는 세포에

대한 조절능력을 나타내고(8), 이식 후 일정 시간이 지나면 흉선이나 비장과 같은 림프조직에 분포하여 중추면역관용에 관여한다고 생각된다(18).

이와 같은 연구결과를 토대로 신장이식과 같은 장기이식에서 이식편의 장기 생존을 위해 공여자 특이 수혈의 기전과 유사하게 동종 조혈모세포이식에서 수혜자 특이 수혈을 통하여 치명적인 GVHD가 조절될 수 있음을 확인하였다. 동종이식에서 면역균형을 이루는 방법으로서 CD4+CD25+ 세포를 유도할 수 있고 동종 조혈모세포이식에서 치명적인 GVHD를 예방할 수 있다고 생각된다.

감사의 글

본 연구를 위해 도움을 주신 성모자애병원 임상의학연구소 이희철, 염미영, 손유미 연구원에게 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Gaston R: Maintenance immunosuppression in the renal transplant recipient: an overview. *Am J Kidney Dis* 38(6 Suppl 6):S25-35, 2001
- Ho VT, Soffier R: The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 98;3192-3204, 2001
- Satoh S, Sugimura J, Omori S, Seino K, Fujizuka I: Long-term graft survival with or without donor-specific transfusion in cyclosporine era in one haplo-identical living-related renal transplant recipients beyond the first year: a 19-year experience. *Tohoku J Exp Med* 197;201-227, 2002
- Bordignon C, Carlo-Stella C, Colombo MP, De Vincentiis A, Lanata L, Lemoli RM, Locatelli F, Olivieri A, Rondelli D, Zanon P, Tura S: Cell therapy: Achievements and Perspectives. *Haematologica* 84;1110-1149, 1999
- Wood KJ, Sakaguchi S: Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nature Rev* 3;199-210, 2001
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T: Immunologic tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 182;18-32, 2001
- Read S, Malmstrom V, Powrie F: Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)/CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. *J Exp Med* 192;295-302, 2000
- Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ: CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 168;1080-1086, 2002
- Sykes M, Pearson D, Szot GL: IL-2-induced GVHD protection is not inhibited by cyclosporine and is maximal when IL-2 is given over a 25 h period beginning on the day following bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant* 15;395-399, 1995
- Wang MG, Szebeni J, Pearson DA, Szot GL, Sykes M: Inhibition of graft-versus-host disease by interleukin-2 treatment is associated with altered cytokine production by expanded graft-versus-host-reactive CD4+ helper cells. *Transplantation* 60;481-490, 1995

11. Bushell A, Karim M, Kingsley CI, Wood KJ: Pretransplant blood transfusion without additional immunotherapy generates CD25+CD4+ regulatory T cells: a potential explanation for the blood-transfusion effect. *Transplantation* 76;449-455, 2003
 12. Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, Brewer J, Delmonte J Jr, Crawford JM, Ferrara JL: An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* 88;3230-3239, 1996
 13. Game DS, Lechler R: Pathways of allorecognition: implications for transplantation tolerance. *Transpl Immunol* 10;101-108, 2002
 14. Debray D, Furlan V, Baudouin V, Houyel L, Lacaille F, Chardot C: Therapy for acute rejection in pediatric organ transplant recipients. *Paediatr Drugs* 5;81-93, 2003
 15. Gross TG, Egler R, Smith FO: Pediatric hematopoietic stem cell transplantation. *Hematol Oncol Clin North Am* 15;795-808, 2001
 16. Fast L: The effect of exposing murine splenocytes to UVB light, psoralen plus UVA light, or -irradiation on in vitro and in vivo immune responses. *Transfusion* 43;576-583, 2003
 17. Taylor PA, Lee CJ, Blazar BR: The infusion of ex vivo activated and expanded CD4+CD25+ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 99;3493-3499, 2002
 18. Trani J, Moore DJ, Jarrett BP, Markmann JW, Lee MK, Singer A, Lian M, Tran B, Caton AJ, Markmann JF: CD25+ immunoregulatory CD4 T cells mediate acquired central transplantation tolerance. *J Immunol* 170;279-286, 2003
 19. Verma UN, Mazumder A: Interleukin-12 (IL-12) alone or in synergistic combination with IL-2 for in vitro activation of human bone marrow: differential effects at different time points. *Bone Marrow Transplant* 16;365-372, 1995
 20. Gambacorti-Passerini C, Hank JA, Borchert A, Moore K, Malkovska V, Sondel P: In vivo effects of multiple cycles of recombinant interleukin-2 (IL-2) on peripheral granulocyte-macrophage hematopoietic progenitors circulating in the blood of cancer patients. *Tumori* 77;420-422, 1991
 21. Hajek R, Korstek Z, Vinklarkova J, Janovska E, Klabusay M, Doubek M, Dvorakova D, Bourkova L, Dusek L, Buchler T, Adler J, Adam Z, Penka M, Mayer J, Vorlicek J: Interleukin-2 activation of haematopoietic stem cells. *Acta Med Austriaca* 29;61-67, 2002
 22. Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL: CD4+CD25+ immunoregulatory T cells: New therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 196;401-406, 2002
 23. Hoffman P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S: Donor-type CD4+CD25+ regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 196;389-399, 2002
 24. Johnson BD, Kornold MC, Truitt RL: CD25+ immunoregulatory T-cells of donor origin suppress alloreactivity after BMT. *Biol Blood Marrow Transplant* 8;525-535, 2002
 25. Jones SG, Murphy GF, Korngold R: Post-hematopoietic cell transplantation control of graft-versus-host disease by donor CD4+CD25+ T cells to allow an effective graft-versus-leukemia response. *Biol Blood Marrow Transplant* 9;243-256, 2003
-