

스테로이드와 TNF에 의한 항원 비특이적 미성숙 흉선세포 사멸

서울대학교 의과대학 ¹암연구소, ²해부학교실, ³서울대학교 치과대학

오근희^{1,2} · 서동철¹ · 조재진³ · 이동섭^{1,2}

Antigen Nonspecific Death of Immature Thymocytes by Corticosteroids and TNF

Keunhee Oh^{1,2}, Charles D Surh¹, Jaejin Cho³ and Dong-Sup Lee^{1,2}

¹Cancer Research Institute, ²Department of Anatomy, College of Medicine, ³College of Dentistry, Seoul National University, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: In the thymus, developing thymocytes continually interact with thymic epithelial cell components. Self MHC restriction of mature T cells are imposed in the thymus through interaction of immature double positive thymocytes and thymic cortical epithelial cells. The site of negative selection, however, is a matter of debate. Through systemic injection of anti-TCR antibody or antigenic peptides, investigators suggested that most of the negative selection occurs in the thymic cortex. But the requirements for negative selection, i.e cellular counterparts and costimulatory molecules are more available in the medulla or cortico-medullary junction rather than in the thymic cortex. **Methods:** The direct and indirect pathways of thymocyte death after systemic anti-TCR antibody injection were separated through several experimental systems. B6 mice were either adrenalectomized or sham-adrenalectomized to evaluate the role of endogenous glucocorticoids from adrenal gland. Role of TNF were evaluated through using TNF receptor double knockout mice. **Results:** We found that without indirectly acting mediators such as TNF- α or corticosteroid, double positive thymocyte death were minimal by systemic injection of anti-TCR antibody in TNF receptor double knockout neonatal mice. Also by analyzing neonatal wild-type mice with adoptively transferred mature T cells, only peripheral activation of mature T cells could induce extensive double positive thymocyte death. **Conclusion:** Thus, systemically injected anti-TCR antibody mediated thymocyte death are mostly induced through indirect pathway. (*Immune Network* 2004;4(2):81-87)

Key Words: Thymocyte death, negative selection, TNF, corticosteroid

서 론

세포성 면역의 중심세포인 T 세포는 흉선(thymus)에서 선택의 과정을 거쳐서 생성된다. 발달하는 동안 자기 MHC 분자와 펩티드에 중간 정도의 친화도를 가진 세포는 양성선택(positive selection)을 거쳐서 CD4 또는 CD8

T 세포로 성숙하고, 이보다 낮은 친화도를 가진 세포는 생존 신호를 받지 못해서 사멸한다(1,2). 또한 친화도가 아주 높은 세포는 자가 항원에 과도한 반응을 보이는 것으로 이들은 말초에서 자가 면역 반응을 일으킬 소지가 있어서 세포의 사멸과정을 통해서 제거되는데 이를 음성선택(negative selection)이라고 한다(3,4).

양성선택의 경우는 흉선의 피질에서 일어나는 것으로 알려져 있으며, 피질 상피세포(cortical epithelial cell)와의 상호작용이 중요하다(5-8). 반면에 자가 반응 T 세포를 제거하는 음성선택의 경우는 일어나는 장소에 대해서 논란이 있어서, 전적으로 흉선의 수질에서 일어난다는

책임저자 : 이동섭, 서울대학교 의과대학 암연구소, 해부학교실
☎ 110-799, 서울시 종로구 연건동 28 삼성암연구소
Tel: 02-3668-7945, Fax: 02-741-7947
E-mail: dlee5522@snu.ac.kr

본 연구는 2001년도 서울대학교병원 일반연구과제(신진교수) 연구비의 지원으로 이루어짐

견해와 일부의 경우는 흉선 피질에서도 일어날 수 있다는 의견이 있다.

*In vitro*에서 여러 종류의 세포를 비교해보면, 수지상 세포가 가장 강력한 흉선세포의 사멸을 촉진시키는데, 흉선의 수지상세포는 주로 피질-수질 경계부와 수질에 존재한다. 골수 키메라를 작성하는 경우, 대부분의 수지상세포는 골수성분을 제공하는 공여자 유래인데, 음성선택은 주로 공여자에 대한 것이 강력하게 일어난다(2). 또한 MHC 분자를 전적으로 흉선피질에서만 발현시킨 경우, 음성선택이 제대로 일어나지 않는다는 보고가 있다(7). 이 밖에 음성선택에는 T세포수용체(T cell receptor, TCR)를 통한 신호뿐만 아니라 보조신호도 필요하며, 이를 제공할 수 있는 것은 수질에 존재하는 수지상세포라고 보고되었다(9-11).

In vivo 실험으로는 주로 T세포수용체 형질전환 마우스를 이용하여 선택적인 항원 펩티드를 주입하는 실험이 많이 보고되었는데, 이 경우 흉선피질의 double positive (DP) 흉선세포가 선택적으로 다수 사멸되어서, 미성숙 흉선세포의 항원에 의한 사멸의 상당 부분이 흉선피질에서 일어난다는 의견이 제시되었다(12). 그러나 이러한 실험은 보통의 마우스에 항 $\alpha\beta$ TCR 항체를 주입하는 실험과 마찬가지로 말초에 주입한 항원 또는 항 $\alpha\beta$ TCR 항체에 반응하여 활성화되는 T 세포가 대부분을 차지하고 있기 때문에 말초의 활성화에 따른 이차적인 미성숙 흉선세포의 사멸이라는 논란이 존재한다. 실제로 다수의 T 세포가 활성화되면 TNF- α 등의 사이토카인이 다량 분비되고 분비된 사이토카인들이 미성숙세포의 사멸을 촉진시킬 수 있다. 예로 세균이나 바이러스의 감염이 활발하게 되면 흉선의 미성숙세포가 급격히 감소하게 된다(13).

본 연구는 미성숙 흉선세포의 사멸과정에 미치는 흉선 및 말초의 영향을 고찰하여 흉선의 음성선택이 주로 일어나는 장소에 대한 증거를 얻기 위해서 고안하였다. 말초의 성숙 T 세포를 항 $\alpha\beta$ TCR 항체로 활성화시키는 경우, 미성숙 흉선세포의 사멸이 관찰되었다. 신생 마우스와 같이 말초의 성숙 T 세포가 적고, 부신피질 스테로이드의 생산이 미약한 경우는 항 TCR 항체에 의해 미성숙 흉선세포가 감소하지 않았다. 특히 신생 마우스에 성숙 T 세포를 이식한 후에는 항 $\alpha\beta$ TCR 항체에 의한 미성숙 흉선세포의 사멸을 관찰할 수 있어서 말초의 활성화만으로도 미성숙 흉선세포의 사멸에 이르는 것을 알 수 있으며, 항 $\alpha\beta$ TCR 항체에 의한 미성숙 흉선세포의 사멸은 대부분 말초의 성숙 T 세포의 광범위한 활성화에 뒤이은 이차적인 결과임을 알 수 있다.

재료 및 방법

실험동물. 실험동물은 Specific pathogen free (SPF)의 환

경에서 사육하였다. C57BL/6 (B6) 및 BALB/c 마우스는 Jackson Laboratory에서 구입하여 번식 후 사용하였다. 신생 마우스는 교배를 시킨 후 vaginal plug를 확인하여 출생 시기를 예측하고, 태어난 지 3일 이내의 것을 사용하였다. TNF 수용체 double knockout 마우스는 원저자에게 얻어서(14), 번식 후 사용하였다. 낮밤 주기는 12시간: 12시간으로 고정하고 물과 사료는 제한 없이 제공하였다. **항체 및 시약.** 항 $\alpha\beta$ TCR 항체는 H57-597 clone을 사용하였으며 ascitic fluid를 saturated ammonium sulfate를 이용한 salt precipitation한 후 FPLC system을 이용하여 protein A affinity column으로 정제하여 사용하였다(15). 유세포 분석에 사용한 FITC- conjugated anti-CD4, Cy5-conjugated anti-CD8, PE-conjugated anti-HSA 항체는 BD-Pharmingen에서 구입하여 사용하였다.

부신적출술(adrenalectomy). 7~8주령의 마우스를 사용하였다. Avertin 복강주사로 전신 마취시켰다. 먼저 좌측의 flank를 절개하여 열어 신장을 노출시킨 후 신장 위의 부신을 curved forceps을 이용하여 제거하였다. 지혈을 시킨 후 절개부위를 봉합한 후, 우측의 부신도 동일한 방법으로 제거하였다. 수술 후 염분과 당을 보충하여 주었다.

Sham-adrenalectomy. 7~8주령의 마우스를 사용하였다. Avertin 복강주사로 전신 마취시켰다. 먼저 좌측의 flank를 절개하여 열어 신장을 노출시킨 후 신장 위의 부신을 노출하여 curved forceps을 이용하여 부신적출술에 해당하는 동일한 스트레스를 준 후에 지혈을 시킨 후 절개부위를 봉합하였다. 우측도 절개하여 동일한 방법으로 수술 스트레스를 가하였다.

신생 마우스에서 항 $\alpha\beta$ TCR 항체의 주입. 생후 2일된 신생 마우스를 사용하였다. 뒷다리의 발바닥을 통해서 30 G needle로 혈관의 손상 없이 복강 내로 접근하여 항 $\alpha\beta$ TCR 항체를 주입하였다.

흉선 내 미성숙 흉선세포의 사멸 분석. 흉곽을 노출한 후 흉선을 적출하였다. 세포분리기를 이용하여 흉선을 단세포로 분리하였다. FITC-conjugated anti-CD8, PE-conjugated anti-TCR, Cychrome-conjugated anti-CD4 항체(BD Pharmingen, La Jolla)를 사용하여 염색하였다. Flowcytometer로 미성숙 흉선세포의 사멸을 평가하기 위해 FITC-conjugated annexin V, Propidium iodide, PE-conjugated anti-CD8, Cychrome-conjugated anti-CD4 항체를 사용하여 미성숙 흉선세포의 apoptosis와 necrosis를 구별하였다(16).

결 과

항 $\alpha\beta$ TCR 항체 투여에 의한 미성숙 DP 흉선세포의 사멸. 7~8주령의 성숙한 정상 C57BL/6 마우스에 100 μ g의 항 $\alpha\beta$ TCR 항체를 복강으로 투여한 경우는 기존에 보고된 바와 같이 흉선세포의 감소, 특히 미성숙 DP 흉

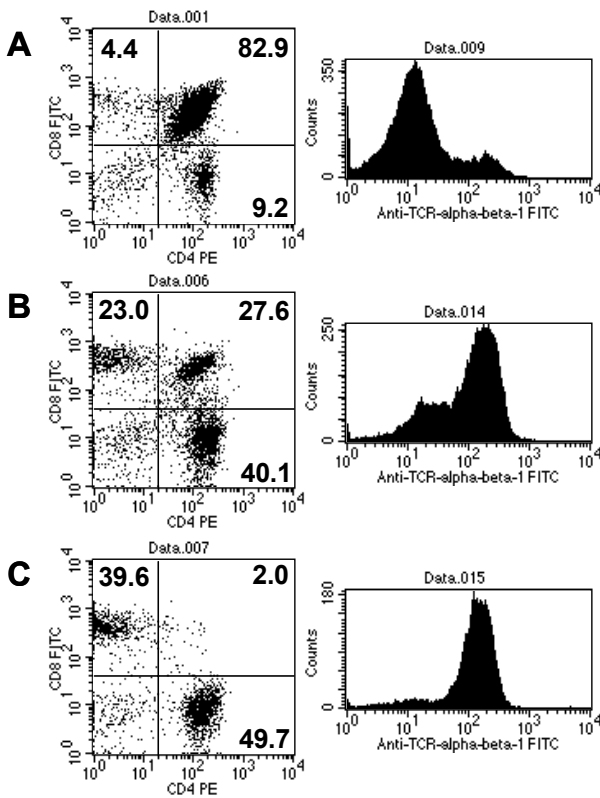


Figure 1. 8-week-old C57BL/6 mice were intraperitoneally injected either with (A) PBS (B) 100 ug anti-TCR antibody or with (C) 2.0 mg cortisone acetate 3 days before analysis. Thymi were removed and thymocytes were analyzed by flowcytometer after stained with anti-murine CD8, anti-murine CD4 and anti-alpha-beta-TCR antibodies.

선세포의 감소가 현저하였다(Fig. 1B). 미성숙 흉선세포의 감소는 항체 투여 3일 후에 가장 심하였다. 미성숙 DP 흉선세포의 선택적인 감소로 정상 대조군에서 관찰되는 80~90%의 DP 흉선세포의 비율이 20~30% 이하로 감소하였고 상대적으로 single positive (SP) 흉선세포의 비율이 증가하였다. $\alpha\beta$ TCR의 발현 정도로 비교한 결과도 역시 중간정도의 발현을 보이는 DP 흉선세포의 선택적인 감소로 $\alpha\beta$ TCR의 발현정도가 높은 SP 흉선세포의 선택적인 생존에 따른 $\alpha\beta$ TCR high 세포의 증가 양상을 보이고 있다(Fig. 1B).

미성숙 DP 흉선세포의 사멸에 의한 감소는 주입한 항 $\alpha\beta$ TCR 항체에 의해 흉선 피질에 존재하는 DP 흉선세포가 직접 반응하여 activated induced cell death의 형태, 즉 음성선택에 의한 경우이거나, 주입한 항 $\alpha\beta$ TCR 항체에 의해서 말초의 성숙 T 세포의 대부분이 활성화되어 많은 양의 사이토카인이 분비되어 간접적으로 사이토카인에 의한, 또는 이에 의해서 분비가 촉진된 부신피질의 스테로이드 호르몬에 의해서 촉진되었을 수 있다.

이와 같은 가능성을 검증하기 위해서 먼저 부신피질

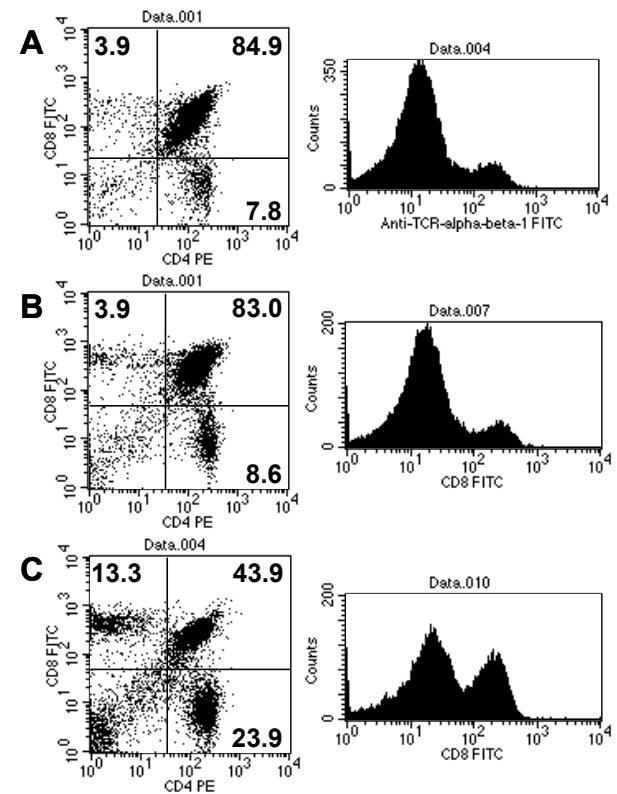


Figure 2. Effect of adrenalectomy and sham-adrenalectomy on double positive thymocyte death. 8-week-old C57BL/c mice were either adrenalectomized or sham-adrenalectomized 3 days before analysis. Thymi were removed and thymocytes were analyzed by flowcytometer after stained with anti-murine CD8, anti-murine CD4 and anti-alpha-beta-TCR antibodies.

스테로이드의 영향을 살펴보았다. 부신피질 스테로이드(cortisone acetate) 2 mg을 복강으로 투여하고 3일 후에 관찰한 결과 미성숙 DP 흉선세포는 95% 이상 감소하였다 (Fig. 1C).

부신 적출술(adrenalectomy)이 미성숙 흉선세포의 사멸에 미치는 영향. 생체 내에서 생성되는 부신피질 스테로이드의 작용이 미성숙 DP 흉선세포에 미치는 영향을 살펴보기 위해 수술적으로 양측의 부신을 제거하였다. 부신 적출술에 대한 대조군으로 sham-operation을 하였는데, 마취, 피부 절개, 부신의 노출과 조작 및 봉합 등은 모두 부신 적출술의 경우와 동일하게 하여 부신 적출술과 동일한 수술적인 스트레스가 가해지도록 하였다.

부신 적출술을 시행한 경우는 수술을 하지 않은 정상 마우스와 비슷한 흉선의 크기 및 DP 흉선세포의 비율을 유지하였다(Fig. 2B, Table I). 이와 같은 결과는 수술의 스트레스에 의해 감소되는 흉선세포, 특히 DP 흉선세포의 경우는 대부분 부신 피질에서 분비되는 스테로이드에 의한 것이며, 부신 적출술을 한 경우와 같이 수술적인 스트레스를 가해도 분비되는 부신피질 스테로이드가

Table I. Effect of adrenalectomy and sham-adrenalectomy on the death of double positive thymocytes. 8-week-old C57BL/c mice were either adrenalectomized or sham-adrenalectomized 3 days before analysis. Thymi were removed and thymocytes were analyzed by flowcytometer after stained with anti-murine CD8 and anti-murine CD4 antibodies. Each group of experiments is composed of 5 mice

Strain	Pretreatment	Treatment	DP thymocytes ($\times 10^6$)	% depletion of DP
Exp#1				
Balb/c (8 wks)			167.4 \pm 20.4	-
Balb/c (8 wks)	Adrenalectomy		169.1 \pm 36.1	-1.0 \pm 21.5
Balb/c (8 wks)	Sham-adrenalectomy		38.6 \pm 37.4	76.7 \pm 22.1*
Exp#2				
B6 (7 wks)			165.7 \pm 9.4	-
B6 (7 wks)	Adrenalectomy		158.3 \pm 53.5	4.4 \pm 32.1
B6 (7 wks)	Sham-adrenalectomy		31.9 \pm 24.0	80.8 \pm 14.5*
Exp#3				
B6 (8 wks)		PBS	102.9	-
B6 (8 wks)	Sham-adrenalectomy	PBS	26.5	74.3 \pm 20.3*
B6 (8 wks)	Sham-adrenalectomy	RU486	56.4 \pm 16.1	44.7 \pm 14.6**

*statistically significant ($P < 0.01$) when compared with either adrenalectomy group or control group, **statistically significant ($P < 0.05$) when compared with sham-adrenalectomy group with PBS treatment.

Table II. Effect of adrenalectomy on the anti-TCR antibody-induced double positive thymocyte death. 8-week-old C57BL/6 mice were adrenalectomized 3 days before anti-TCR antibody treatment. 21 hours after anti-TCR antibody treatment, thymi were removed and thymocytes were analyzed by flowcytometer after stained with anti-murine CD8 and anti-murine CD4 antibodies. Each group of experiments is composed of 5 mice

Strains	Pretreatment (3 days before)	Treatment	DP thymocytes ($\times 10^6$)	% depletion of DP
Exp#1				
B6 (8 wks)	Adrenalectomy	PBS	155.7 \pm 24.3	-
B6 (8 wks)	Adrenalectomy	anti-TCR Ab (21 hr)	100.8 \pm 11.2	35.3 \pm 8.7*
B6 (8 wks)		PBS	143.93 \pm 7.1	-
B6 (8 wks)		anti-TCR Ab (21 hr)	41.6 \pm 30.4	71.1 \pm 16.5*
Exp#2				
B6 (8 wks)	Adrenalectomy	PBS	155.3 \pm 12.9	-
B6 (8 wks)	Adrenalectomy	anti-TCR Ab (21 hr)	108.8 \pm 29.4	30.0 \pm 17.4*

*statistically significant ($P < 0.05$) when compared with PBS-treated control group.

없는 경우에는 흉선세포, 특히 DP 흉선세포의 감소는 미약함을 알 수 있다. 이와 같은 수술적인 스트레스와 부신피질 스테로이드의 역할은 sham-adrenalectomy를 한 경우에 뚜렷하여, 수술적인 스트레스를 가하고 부신을 그대로 둔 경우, 부신피질에서 분비된 스테로이드에 의해서 흉선세포, 특히 DP 흉선세포의 사멸이 현저하였다 (Fig. 2C). 또한 스테로이드의 작용을 차단할 수 있는 약제인 RU486을 동시에 투여한 경우에는 미성숙 DP 흉선세포의 사멸이 감소됨을 보아서 미성숙 흉선세포의 사멸에 부신피질 스테로이드가 중요한 역할을 함을 알 수 있다 (Table I).

부신피질 스테로이드가 항 $\alpha\beta$ TCR 항체의 투여 후에 일어나는 미성숙 DP 흉선세포의 사멸에 미치는 영향을 평가하기 위해서 부신 적출술을 시행한 후에 항 $\alpha\beta$ TCR

항체를 투여하여 비교하였다.

부신 적출술을 하지 않은 경우, 항 TCR 항체의 투여에 의해서 약 71%의 DP 흉선세포의 감소가 초래되었다. 이에 반해서 부신 적출술을 한 경우는 30~35%의 감소를 보여서 감소의 정도가 경감하였다 (Table II). 이는 항 $\alpha\beta$ TCR 항체의 투여에 의한 DP 흉선세포의 사멸에 부신피질에서 유래하는 스테로이드가 중요한 역할을 함을 보여주는 것이다.

TNF- α 가 미성숙 흉선세포의 사멸에 미치는 영향. 항 $\alpha\beta$ TCR 항체의 투여에 의한 부신피질 스테로이드의 분비는 말초의 성숙 T 세포의 대부분이 항체에 의해 활성화되어 많은 사이토카인이 분비되고 이에 의해 시상하부-뇌하수체-부신피질계가 활성화되어 분비되는 것으로 알려져 있다. 이와 같이 성숙 T 세포에 의해 분비되는

다량의 사이토카인은 또한 직접적으로 미성숙 흉선세포의 사멸에 관여하는 것으로 보고되었는데, 대표적인 사이토카인이 TNF- α 이다.

TNF- α 가 미성숙 흉선세포의 사멸에 미치는 영향을 보기 위해서 말초의 성숙 T 세포가 발달하지 않은 신생 마우스에 TNF- α 를 주입하였다. TNF- α 를 주입한 경우, 오히려 통계적으로 미성숙 흉선세포의 증가가 관찰되었는데(our unpublished data), 이는 TNF- α 가 미성숙 흉선세포의 사멸뿐 아니라 trophic factor로도 작용할 수 있다는 보고(17)와 오히려 상충하는 것으로 외부에서 주입한 TNF- α 에 의한 작용기전의 규명은 해석에 난점이 있다. 이와 마찬가지로 신생 마우스에 TNF- α 차단항체를 가하고 항 $\alpha\beta$ TCR 항체를 주입한 경우도 역시 TNF- α 차단항체의 작용이 완전하지 않아서 생체 내에서의 TNF- α 의 작용을 완전히 규명하기 힘들었다.

이와 같은 한계점을 극복하기 위해서 TNF 수용체 결핍 마우스를 사용하였다. TNF 수용체의 경우는 p55 form과 p75 form이 있어서 TNF- α , lymphotoxin 등이 결합하여 작용하는데, 실험에는 p55 form과 p75 form이 모두 결합된 double knockout (DKO) 마우스를 사용하였다(14). 또한 말초의 성숙 T 세포의 활성화에 의한 역할을 배제하고, 부신피질에서 분비하는 스테로이드의 영향을 배제하기 위해서 성숙 T 세포가 발달하지 않고, 스테로이드 분비능이 적은 신생 마우스를 사용하였고, 인위적으로 20×10^6 의 성숙 림프절 T 세포를 주입하여 말초 성숙 T 세포를 보충한 실험을 하였다(Table III).

성숙 T 세포를 보충하지 않은 신생 마우스의 경우, 항 $\alpha\beta$ TCR 항체에 의한 미성숙 흉선세포의 사멸이 미약하였다. 신생 마우스의 경우는 말초의 성숙 T 세포가 발달하지 않아서 주입한 항 $\alpha\beta$ TCR 항체에 의한 성숙 T 세포의 활성화에 따른 사이토카인의 분비가 적다. 또한 부신피질의 발달이 미약하여 부신피질에서 분비되는 스테로이드의 양도 성체에 비해서 매우 적다. 항 $\alpha\beta$ TCR 항체의 투여에 의해서 신생생쥐에서 미성숙 흉선세포가 사멸하는 방법은 항체가 직접 흉선의 피질로 들어가서 미성숙 흉선세포에서 발현하는 T 세포 수용체에 작용하는 경우로 국한되는데 항 $\alpha\beta$ TCR 항체의 투여에 의해서 신생 마우스에서 미성숙 흉선세포의 사멸이 미약한 것은 항 $\alpha\beta$ TCR 항체가 직접 흉선피질에서 미성숙 흉선세포를 만나도 T 세포 수용체의 활성화를 통한 음성선택이 일어나지 않음을 의미한다. 또 다른 해석으로는 주입한 항체가 흉선피질에 도달하지 않았기 때문에 작용하지 않았을 것이라는 것이고 이는 흉선 특히 흉선피질이 일차면역기관으로 blood thymus barrier 등이 있어서 외부의 물질이 쉽게 들어가지 못한다는 기존의 보고에 따른 것이다. 그러나 항체를 복강으로 주입하는 경우는 복강과 흉강이 연결되어 있고 흉강 속의 흉선의 capsule에는 일종의 통로가 있어서(transcapsular route), 주입한 항체가 흉선피질로 잘 전달된다는 보고도 있어서(18) 논란의 여지가 있다.

TNF 수용체 DKO 신생 마우스의 경우도 정상의 신생 마우스와 유사하게 항 $\alpha\beta$ TCR 항체의 투여만으로는 미

Table III. Anti-TCR antibody induced DP death in TNFR^{-/-} neonates. 2-day-old TNF receptor double knockout neonate were adoptively transferred with 20×10^6 mature lymphocytes from adult B6 mice 1 days before anti-TCR antibody treatment. 3 days after anti-TCR antibody treatment, thymi were removed and thymocytes were analyzed by flowcytometer after stained with anti-murine CD8 and anti-murine CD4 antibodies. Each group of experiments is composed of 5 mice

Strains	Pretreatment	Treatment	DP thymocytes ($\times 10^6$)	% depletion of DP
Exp#1				
B6	DMEM	anti-TCR Ab	33.5 \pm 4.2	-
Neonate	B6 LN	anti-TCR Ab	20.9 \pm 3.1	37.4 \pm 3.9*
TNFR ^{-/-}	DMEM	anti-TCR Ab	56.4 \pm 4.3	-
Neonate	B6 LN	anti-TCR Ab	56.5 \pm 3.2	-0.1 \pm 2.3
Exp#2				
TNFR ^{-/-}	DMEM	PBS	78.6 \pm 6.2	-
Neonate	DMEM	anti-TCR Ab	79.7 \pm 3.6	7 \pm 1.4
	B6 LN	anti-TCR Ab	71.5 \pm 3.7	11.5 \pm 2.1
Exp#3				
B6	DMEM	anti-TCR Ab	39.2 \pm 6.3	-
Neonate	B6 LN	anti-TCR Ab	11.9 \pm 3.4	69.7 \pm 5.1*
Exp#4				
TNFR ^{-/-}	DMEM	PBS	68.2	-
Neonate	DMEM	anti-TCR Ab	70.2 \pm 3.1	2.7 \pm 0.5
	B6 LN	anti-TCR Ab	59.2 \pm 4.6	10.5 \pm 2.9

*statistically significant ($P < 0.05$) when compared with DMEM-pretreated control group.

성숙 흉선세포의 사멸이 미약하였다(Table III). 정상 신생 마우스의 경우는 성숙 T 세포를 보충한 후 항 $\alpha\beta$ TCR 항체를 투여한 경우, 흉선의 크기가 현저하게 감소하였고 미성숙 DP 흉선세포의 감소가 현저하였다(37~70%, Table III). 반면에 TNF 수용체 DKO 신생 마우스의 경우는 정상 wild type의 성숙 T 세포를 보충하고 항 $\alpha\beta$ TCR 항체를 투여한 경우에 미성숙 흉선세포의 사멸이 거의 관찰되지 않았다(0~11%, Table III). 전술한 바와 같이 신생 마우스의 경우에는 부신의 발달이 미약하여 부신피질 스테로이드의 분비가 미약하다. 신생 마우스에 성숙 T 세포를 첨가하고 항 TCR 항체를 가한 경우, 성숙 T 세포의 활성화에 따른 사이토카인의 분비가 주된 작용을 하고 이에 따른 이차적인 부신피질 스테로이드의 작용은 미약해진다. TNF 수용체 DKO 마우스에서 미성숙 흉선세포의 사멸이 미미한 것은 성숙 T 세포의 활성화에 의해 미성숙 흉선세포를 사멸시킬 수 있는 사이토카인 중에서는 TNF 수용체를 통해 작용하는 사이토카인이 지배적인 역할을 함을 시사하는 것이다.

고 찰

이번 연구의 결과는 항 $\alpha\beta$ TCR 항체의 투여에 의해 나타나는 미성숙 흉선세포의 사멸이 항원의 자극에 의한 사멸, 즉 음성선택의 기전을 통해서 일어나는 것과 말초의 성숙 T 세포를 활성화시킴으로써 야기되는 비특이적인 사멸이 복합적으로 일어날 수 있음을 시사하고 있다. 또한 T세포수용체 형질전환 마우스에 항원 펩티드를 주입하여 일어나는 미성숙 흉선세포의 사멸의 경우도 이와 같은 복합적인 작용 기전에 의한 현상으로 해석할 수 있다.

항 $\alpha\beta$ TCR 항체의 투여에 의한 미성숙 흉선세포의 사멸은 T세포수용체 low 수준의 미성숙 흉선세포의 사멸을 특징으로 하며, 항체의 투여 후 2일에 현저하고 3일에 최고치를 나타내었다. *In vitro* 실험에서 직접적인 항원의 자극에 의한 미성숙 흉선세포의 사멸은 이미 2일에 최고치를 나타내며, 미성숙 흉선세포에 직접 작용하는 부신피질 스테로이드의 투여의 경우도 역시 투여 2일 이내에 최고치의 세포 사멸을 보였기 때문에 항 $\alpha\beta$ TCR 항체의 투여에 의한 미성숙 흉선세포의 사멸은 항체에 의한 직접적인 자극, 즉 항원 자극에 의한 것보다는 시간적으로 지연됨을 알 수 있다. 이와 같은 작용의 지연은 복강으로 투여한 항체가 흉선으로 도달하기까지 많은 시간이 걸릴 가능성과 투여한 항체가 직접 작용하기보다는 또 다른 매개물질을 통해서 간접적으로 작용할 가능성을 고려해 볼 수 있다. 실제 복강과 흉강은 서로 연결이 되어서 투여한 물질의 이동은 매우 신속하며, 흉선의 경우는 흉강에 직접적으로 노출되어 있기 때문에 복강으로 주입한 물질은 신속하게 흉선으로 이동하게 된

다. 특히 transcapsular route가 보고되어서 흉선의 혈관-흉선 장벽이 복강으로 투여한 물질에 대해서는 적용되지 않는다는 보고도 있다(18).

특히 항 $\alpha\beta$ TCR 항체를 투여한 경우에 lipopolysaccharide (LPS)의 투여에 의한 쇼크와 유사한 증상이 보고되었는데(13), LPS 투여 후 전신적인 염증 반응에 관여하는 cytokine, 특히 TNF- α 가 또한 T 세포의 활성화에 의해서 다량 분비될 수 있기 때문에, 항체 투여 후의 전신의 반응 및 미성숙 흉선세포의 사멸에 관여할 수 있다. 또한 TNF- α 는 신경내분기계의 다른 염증 관련 cytokine과 같이 작용함으로써 작용의 효과가 증대될 수 있다. 한편 활성화된 T 세포에 의해서 부신피질 자극호르몬(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)이 분비되고 이에 의해서 부신피질의 부신피질 스테로이드의 합성이 촉진된다(19).

즉 항 $\alpha\beta$ TCR 항체의 전신 투여에 의한 작용은 전신적으로 분비되어 간접적으로 작용할 가능성이 있는 TNF- α 와 부신피질 스테로이드의 역할을 규명함으로써 항체에 의한 직접적인 작용과 간접적인 작용의 역할을 가능할 수 있다.

외부에서 투여한 부신피질 스테로이드에 의해서 미성숙 흉선세포는 거의 대부분 사멸되었다. 생체 내에서 정상적으로 생성되는 부신피질 스테로이드에 의한 영향을 보기 위해서 양측의 부신을 제거하는 부신 적출술과 동일한 수술적 스트레스만을 가해주는 sham adrenalectomy를 시행한 결과 수술적 스트레스에 의한 반응으로 분비된 부신피질 스테로이드에 의해서 미성숙 흉선세포가 사멸되었다. RU486에 의해서 흉선세포의 사멸이 감소된 것은, sham adrenalectomy 군의 경우 미성숙 흉선세포가 감소된 것은 수술적 스트레스에 의해 생성된 부신피질 스테로이드가 주된 역할을 함을 알 수 있다. RU486는 항원특이적인 미성숙 흉선세포의 사멸에는 영향을 미치지 않으므로(20) 부신피질 스테로이드에 의한 미성숙 흉선세포의 사멸은 대부분 간접적인 경로에 의한 것이다.

한편 부신피질 스테로이드의 생성을 차단한 군, 즉 부신 적출술 시행군에서도 항 $\alpha\beta$ TCR 항체를 투여한 경우에 의해 미성숙 흉선세포의 사멸이 나타나는 것은 항체에 의한 직접적인 사멸 또는 다른 간접적인 사멸의 기전이 존재함을 의미한다. 특히 부신 적출술을 시행한 경우는 정상에 비해서 항 $\alpha\beta$ TCR 항체에 의한 흉선세포의 사멸의 정도가 감소하였으므로(71% \rightarrow 35%), 항 $\alpha\beta$ TCR 항체 투여 후 생성되는 부신피질 스테로이드가 간접적인 미성숙 흉선세포의 사멸을 유도함을 알 수 있다.

항 $\alpha\beta$ TCR 항체에 의한 직접적인 작용 및 다른 간접적인 경로를 추적하기 위하여 활성화된 T 세포에서 분비되어 전신적인 작용을 하는 cytokine인 TNF의 영향을 살펴볼 필요가 있다. TNF의 작용은 주로 TNF 수용체 p55 형과 p75 형에 의하기 때문에 p55와 p75의 DKO 마우스

를 사용하여 검증하였다(14). 성체 TNF 수용체 DKO 마우스에 항 $\alpha\beta$ TCR 항체를 주입하면 미성숙 흉선세포의 사멸이 관찰된다. 이를 통해서 TNF 외의 다른 간접적인 작용의 가능성과 직접적으로 미성숙 흉선세포의 사멸이 TNF 수용체를 통하지 않고 일어나는 가능성을 모두 생각해 볼 수 있다. 이 중에서 직접적인 항원특이적인 흉선세포 사멸의 가능성을 보는 모델, 즉 TNF 수용체를 통한 간접적인 가능성과 활성 성숙 T 세포에서 유래하는 다른 간접적인 인자, 특히 앞서 기술한 실험에서 중요성이 인정된 부신피질 스테로이드의 영향을 배제한 모델을 사용하기 위해서 TNF 수용체 DKO 신생 마우스를 사용하여 항 $\alpha\beta$ TCR 항체를 투여한 결과 미성숙 흉선세포의 사멸은 거의 일어나지 않았다. 이는 항 $\alpha\beta$ TCR 항체의 전신 투여에 의한 미성숙 흉선세포의 작용은 TNF 수용체 DNK 신생 마우스에서는 작용하지 않는 TNF- α 또는 부신피질 스테로이드에 의한 간접적인 경로가 대부분이라는 것을 의미한다. 실제로 TNF 수용체 DKO 신생 마우스에 야생형 동계 마우스의 성숙 T 세포를 주입한 후에 항 $\alpha\beta$ TCR 항체를 투입하여도 간접적으로 작용하는 부분 즉 성숙 T 세포의 활성화에 의해서 생성되는 TNF의 경우는 흉선세포에 수용체가 존재하지 않아서 작용을 하지 않고, 신생 마우스의 경우에는 부신피질의 기능이 미약하여 부신피질 스테로이드의 생성이 부족하므로 작용하지 않게 되어, 항 $\alpha\beta$ TCR 항체의 전신투여에 의한 것은 직접적인 항원 특이적인 반응보다는 간접적인 작용이 대부분이며, 간접 작용을 하는 경우도 대부분의 작용이 활성화된 성숙 T 세포에서 직접 또는 간접적으로 생성되는 TNF 또는 부신피질 스테로이드에 의한 작용임을 알 수 있다. 정상 wild-type의 신생 마우스에 성숙 T 세포를 이식한 후 항 $\alpha\beta$ TCR 항체를 투여하면 미성숙 흉선세포의 사멸을 관찰할 수 있다. 이와 같은 실험 결과는 정상 syngeneic 마우스에 T세포수용체 형질전환 마우스의 성숙 T 세포를 adoptive transfer한 후에 항원 펩티드를 주입하여 말초의 성숙 T 세포만을 활성화시킨 모델에서 광범위한 미성숙 흉선세포의 사멸이 보고된 것(13)과 일관된 결과를 보이는 것으로 항 $\alpha\beta$ TCR 항체에 의한 말초의 활성화만으로도 미성숙 흉선세포가 사멸됨을 의미한다.

즉 항 $\alpha\beta$ TCR 항체의 전신투여에 의한 미성숙 흉선세포의 사멸은 기존에 보고된 것과는 달리(21), 항원 특이적인 사멸, 즉 흉선의 음성선택에 의한 것이라기보다는 말초의 성숙 T 세포의 활성화에 따른 간접적인 결과이며, 이에 따라 흉선의 음성선택이 주로 흉선피질의 DP 흉선세포의 과정에서 일어난다는 주장은 재검토되어야 한다.

참 고 문 헌

1. Fink PJ, Bevan MJ: Positive selection of thymocytes. *Adv Immu-*

- nol 59;99-133, 1995
2. Sprent J, Lo D, Gao EK, Ron Y: T cell selection in the thymus. *Immunol Rev* 101;173-190, 1988
3. Kappler JW, Roehm N, Marrack P: T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell* 49;273-280, 1987
4. Sprent J, Webb S: Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells. *Curr Opin Immunol* 7;196-205, 1995
5. Lo D, Sprent J: Identity of cells that imprint H-2-restricted T-cell specificity in the thymus. *Nature* 319;672-675, 1986
6. Ernst BB, Surh CD, Sprent J: Bone marrow-derived cells fail to induce positive selection in thymus reaggregation cultures. *J Exp Med* 183;1235-1240, 1996
7. Laufer TM, DeKoning J, Markowitz JS, Lo D, Glimcher LH: Unopposed positive selection and autoreactivity in mice expressing class II MHC only on thymic cortex. *Nature* 383;81-85, 1996
8. Laufer TM, Glimcher LH, Lo D: Using thymus anatomy to dissect T cell repertoire selection. *Semin Immunol* 11;65-70, 1999
9. Page DM, Kane LP, Allison JP, Hedrick SM: Two signals are required for negative selection of CD4+ CD8+ thymocytes. *J Immunol* 151;1868-1880, 1993
10. Tarakhovsky A, Kanner SB, Hombach J, Ledbetter JA, Muller W, Rajewsky K: A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science* 269;535-537, 1995
11. Kishimoto H, Sprent J: Several different cell surface molecules control negative selection of medullary thymocytes. *J Exp Med* 190;65-73, 1999
12. Murphy KM, Heimberger AB, Loh DY: Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+ CD8+ TCRlo thymocytes in vivo. *Science* 250;1720-1723, 1990
13. Martin S, Bevan MJ: Antigen-specific and nonspecific deletion of immature cortical thymocytes caused by antigen injection. *Eur J Immunol* 27;2726-2736, 1997
14. Page DM, Roberts EM, Peschon JJ, Hedrick SM: TNF receptor-deficient mice reveal striking differences between several models of thymocyte negative selection. *J Immunol* 160;120-133, 1998
15. Lee D-S, Ahn C, Ernst B, Sprent J, Surh CD: Thymic selection by a single MHC/peptide ligand: autoreactive T cells are low-affinity cells. *Immunity* 10;83-92, 1999
16. Surh CD, Lee D-S, Fung-Leung W-P, Karlsson L, Sprent J: Thymic selection by a single MHC/peptide ligand produces a semidiverse repertoire of CD4+ T cell. *Immunity* 7;209-219, 1997
17. de Kossodo S, Grau GE, Daneva T, Pointaire P, Fossati L, Ody C, Zapf J, Piguat PF, Gaillard RC, Vassalli P: Tumor necrosis factor alpha is involved in mouse growth and lymphoid tissue development. *J Exp Med* 176;1259-1264, 1992
18. Nieuwenhuis P, Stet RJ, Wagenaar JP, Wubbena AS, Kampinga J, Karrenbeld A: The transcapillary route: a new way for (self-) antigens to by-pass the blood-thymus barrier? *Immunol Today* 9;372-375, 1988
19. Clarke BL, Gebhardt BM, Blalock JE: Mitogen-stimulated lymphocytes release biologically active corticotropin. *Endocrinology* 132;983-988, 1993
20. Xue Y, Murdjava M, Okret S, McConkey D, Kioussis D, Jondal M: Inhibition of I-Ad-, but not Db-restricted peptide-induced thymic apoptosis by glucocorticoid receptor antagonist RU486 in T cell receptor transgenic mice. *Eur J Immunol* 26;428-434, 1996
21. Shi Y, Bissonnette RP, Parfrey N, Szalay M, Kubo RT, Green DR: In vivo administration of monoclonal antibodies to the CD3 T cell receptor complex induces cell death (apoptosis) in immature thymocytes. *J Immunol* 146;3340-3346, 1991