

## 알레르기 질환의 치료로서의 CpG DNA

동국대학교 의과대학 소아과학교실

최 성 민

### CpG DNA for Treatment of Allergic Diseases

Sung Min Choi, M.D.

Department of Pediatrics, Dongguk University College of Medicine, Gyeongju, Korea

Atopy is a highly prevalent and serious health problem. The prevalence and severity of asthma and allergic diseases have increased over recent decades, particularly in industrialized nations. Early life infections may protect against the development of atopy and allergic diseases like asthma. The inverse relationship between the incidence of atopy and childhood infections has led to the 'hygiene hypothesis', which suggests that diminished exposure to childhood infections in modern society has led to decreased Th1-type responses. Th1 and Th2 responses are counter-regulatory. Reduced Th1 may lead to enhanced Th2-type inflammation, which is important in promoting asthma and allergic disease via up-regulation of IL-4, IL-5, and IL-13. It is now widely accepted that altered regulation of Th2 responses (and possibly the balance between Th1 and Th2 responses) is an important factor in the development of atopy. CpG DNA represent a novel class of drugs with substantial immunomodulatory properties. CpG DNA contain unmethylated motifs centered on the CpG dinucleotides, like bacterial DNA. These CpG DNA promote Th1 and regulatory type immune responses and suppress Th2 responses. In murine studies, CpG DNA are effective in prevention and treatment of asthma and allergic diseases. CpG DNA are just beginning to be tested in human asthma. While its precise mechanisms continue to be fully studied, CpG DNA offers considerable promise as a novel treatment for atopic inflammation. It may prove to be an important disease modifying therapy, or even curative therapeutic agent for asthma and allergic diseases. (*Korean J Pediatr* 2005;48:251-259)

**Key Words :** Allergic diseases, Asthma, CpG DNA, Immunomodulation

### 서 론

알레르기의 유병률은 산업이 발달한 나라일수록 증가하여 지난 세기동안 20배까지 증가하였으며, 어린이의 알레르기 질환의 빈도는 약 20%가 되는 것으로 보고되고 있다. 밀집된 집단 생활의 감소와 위생 상태의 개선 등으로 인한 소아의 자연적인 감염의 기회가 감소하면서 알레르기 질환의 빈도가 급속하게 증가하고 있다. 이러한 현상의 해석과 치료로 알레르기 염증의 핵심적인 역할을 담당하는 T 세포의 면역 조절기능에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그 중에서 CpG DNA는 실질적인 면역 조절성을 가진 새로운 종류의 대표적 치료제로 기대를 모으고 있다.

임상 전 생쥐 모델에 의한 연구들에서 CpG DNA는 T helper(Th) 1 면역 반응을 유도하고 Th2 면역 반응을 억제함으로써 알레르기성 염증질환의 예방과 치료에 효과를 나타냈다. 현재 시행되고 있는 CpG DNA를 이용한 임상시험으로부터 얻은 자료에 의하면 CpG DNA는 안전하고 효력이 좋은 치료제로서 알레르기성 호흡기 질환의 치료에 유망할 것으로 밝혀졌다.

기관지 천식은 기도 염증성 질환으로 호산구성 염증반응, 기도 과민성, 간헐적 기관지의 폐쇄, IgE의 증가를 특징으로 한다. 현재까지 CD4<sup>+</sup> T 림프구가 알레르기성 기도의 면역반응을 일으키는데 중요한 역할을 한다는 사실은 의심할 여지가 없다. CD4<sup>+</sup> T 세포들은 사이토카인 표현 양상에 따라 Th1과 Th2로 분류된다. 그리고 조절되지 않는 T 세포 반응의 양과 기질을 조절한다고 알려진 조절 T 세포도 존재한다. Th2 반응은 IL-4, IL-5, IL-13의 상향조절에 의해 천식성 면역반응을 증대시키고 Th1 반응은 이러한 반응에 길항적이다. 알레르기 반응은 Th1과 Th2 세포에서 분비되는 사이토카인에 의해 조절되나 주로 Th2 세포와 항원과의 관계로 이해된다. 이러한 Th2 가설은 지난 10

접수 : 2005년 2월 14일, 승인 : 2005년 2월 17일  
 책임저자 : 최성민, 동국대학교 의과대학 소아과학교실  
 Correspondence : Sung Min Choi, M.D.  
 Tel : 054)770-8252 Fax : 054)741-2093  
 E-mail : csm21@dongguk.ac.kr

여년간 알레르기의 기전을 설명하는 주된 이론으로 사용되어 왔다. 최근에는 조절 T 세포의 유도가 Th2 편위나 Th2 의존성 알레르기 질환의 감소에 비슷하거나 어쩌면 더 중요한 역할을 한다고 알려졌다. 타당성은 더 속고가 되어야 하겠지만 현재는 Th2 반응의 조절의 변화가 아토피의 발달에 중요한 요인이라는 것이 널리 받아들여지고 있다<sup>1)</sup>.

그러나 알레르기성 천식에 대한 치료제의 선택은 류코트리엔 조절제를 제외하고 20년 이상 크게 바뀌지 않았다. 물론 최근 지속성 천식에 대한 스테로이드와 같은 항염증 치료의 중요성이 강조되면서 유병률과 사망률의 감소, 그리고 기도 개형의 감소를 기대하고 있지만 이 치료 전략은 천식의 일차적 예방이나 완치적 치료를 겨냥하고 있지는 않다. 천식은 복합적이고, 수많은 유발요인이 있는 질환으로 알레르기성 염증의 발달에 관여하는 사이토카인, 키모카인, 면역 글로불린, 펩타이드 매개체, 프로테아제 등을 포함한 수백 가지의 매개체가 있다. 이러한 매개체의 영향을 제거하는 임상 전 연구와 임상실험이 계속되고 있지만 하나의 매개체를 제한하는 것이 알레르기 염증반응에 과연 큰 영향을 줄 수 있는지 의심해 보는 것이 합리적일 것이다.

그래서 항원 면역치료를 이용한 아토피 반응의 억제와 역전이 최근 몇몇 의사들에게 다시 선호되고 있다. 면역치료는 전통적으로 항원의 용량을 차츰 증량하여 피하로 투약함으로써 이루어진다. 천식에 대한 항원 면역치료의 사용에 관한 여러 연구에서 의견이 나누어져 있지만 최근 분석에서 주목할 만한 좋은 결과들이 보고되고 있다<sup>2)</sup>. 이러한 결과가 더 널리 받아들여지기 위해 안전성과 효율성을 더욱 강화시킨 새로운 치료제 개발이 필수적이다.

이에 저자는 알레르기 질환에서 이러한 치료제에 근접하면서 Th2/Th1 세포의 불균형을 조절할 수 있는 CpG DNA에 대하여 논하고자 한다.

### 알레르기의 발현과 Th1/Th2 세포

일반적으로 Th1 세포는 지연성 과민반응에 관계하고 Th2 세포는 IgE 항체의 생성과 알레르기성 염증 반응에 관계하는 것으로 알려져 있다. 그래서 알레르기 발현에 작용하는 Th2 세포의 역할에 관심이 높아졌다. Th2 세포들은 천식의 여러 가지 증상에 상응하는 사이토카인과 키모카인들을 생산하나, CD4<sup>+</sup> T 세포가 결여된 생쥐에서는 기도 호산구증가증이나 기도 과민성을 유도하지 못한다. CD4<sup>+</sup> T 세포에서 분비되는 IL-4는 Th2 세포 발달과 IgE 항체와 IL-5 생성에 필수적이다.

IL-4는 IL-4 수용체와 결합한 뒤, STAT6를 통해 세포내로 신호를 전달한 후 GATA3, c-Maf, NFATc, NIP45 등의 전사 인자를 활성화시켜 Th2 세포로의 분화를 유도한다. 분화된 Th2 세포는 항원제시세포와 접촉하여 알레르겐의 펩타이드를 공여받게 되면 IL-4, IL-5, IL-13 등의 사이토카인을 분비하여 알레르기 병인의 중심적인 역할을 담당한다. IL-4는 IgE 동종전환 뿐

만 아니라, IL-5, eotaxin, RAREs, MIP-1 $\alpha$  등에 의해 기도내 조직으로 호산구가 이동하는데 관여하며, IL-5, IL-3 및 GM-CSF을 분비하여 호산구의 분화, 성숙, 활성화, 생존을 증가에 관계한다. 또한 Th2 세포는 IL-4, IL-13, IL-9을 통해 점막세포에 의한 점액분비를 자극하며, 특히 IL-13은 항원에 의한 기도 과민성에 중요하다. IFN- $\gamma$ 를 강력히 유도하는 중요한 Th1 조절인자인 IL-12는 알레르기성 기도 염증을 억제한다. 그것은 IL-4와 IL-13을 억제시킴으로써 형성된 기도 염증과 기도 과민 반응을 역전시킬 수 있다. 그러나 실제 임상에서 흡입성 IL-12에 대한 초기 연구는 부작용 때문에 중절되었고, 경한 천식에서의 전신적 사용은 실망적이었다<sup>3)</sup>.

여러 연구에서 출생 전후 여러 환경요인이 알레르기 발달과 알레르겐 특이 T 세포의 분화에 영향을 미칠 수 있음이 확인되었다. 특히 산모의 T 세포는 Th1에서 Th2로 이행하는 경향이 있으며 출생시 면역계통은 Th2 쪽으로 기울어져 있고, 영아 후기에는 Th2 반응이 하향 조절되는 소견을 보인다. 그러나 아토피성 소아들은 영아기와 소아 초기에 Th1 세포의 성숙 결함을 초래하는 유전적 소인을 가지고 있는 것으로 보인다.

최근에 영유아기의 감염은 알레르기 반응과 서로 상반된 작용을 하는 것으로 알려져 왔다. 어렸을 때 홍역을 앓았거나 A형 간염에 걸린 후에는 아토피 질환의 발생이 감소하였고, tuberculin 검사에 양성인 소아에서 아토피 질환의 발생률이 낮았다. BCG 접종 이후 Th1 면역반응에 의해 생성된 IFN- $\gamma$ 는 폐 조직의 Th2 염증반응의 발달을 억제하였으며, 농촌 소아에서 노출된 환경의 endotoxin 농도가 높을수록 말초혈액의 T 세포의 IFN- $\gamma$ 의 생성이 높았다. 이에 대해 수많은 해설이 대두되었지만 그 중 '위생 가설'은 선진국에서 증가하고 있는 아토피, 천식 유병률에 대해서 설명한 가장 많이 논의되고 있는 이론이다. 이 가설에 의하면 개발도상국에서는 어릴 때의 미생물 노출의 증가가 어린 T 세포를 Th1 세포 쪽으로 분화시킴으로써 아토피성 감각으로부터 보호된다고 한다. 선진국에서는 영유아기에 감염의 기회가 감소하면서 Th1 분화에 필요한 자극을 받지 못해 Th2 면역반응이 항진되어 아토피가 증가한다는 것이다<sup>4)</sup>. 따라서 알레르기 염증반응의 Th1/Th2 불균형을 조절함으로써 알레르기 질환의 예방과 치료에 이용할 수 있으리라는 기대를 갖게 되었다.

이러한 Th1과 Th2 면역반응을 통한 알레르기 기전의 해석은 기생충 감염이나 자가면역 질환 등의 역학적 연구들에 의해 도전을 받게 되었다. 기생충 감염시 강력한 Th2 면역반응을 나타냈으나 오히려 알레르기 질환의 발생은 억제되었다. 최근 20여년간 아토피 인구의 증가와 더불어 Th1 면역반응으로 여겨지는 제 1형 당뇨병 같은 자가 면역질환도 감소하지 않고 오히려 증가하였다. 이러한 현상들은 Th1과 Th2 세포 사이의 상호 조절 기전으로는 설명할 수 없었으나 최근에 조절 T 세포의 발견으로 이에 대한 이해의 폭이 넓어져 설명할 수 없었던 부분을 이해할 수 있을 것으로 기대한다<sup>5)</sup>.

## CpG DNA

CpG 백신인 CpG oligonucleotides는 박테리아의 20개 정도의 DNA 염기서열로 구성되며, 이 짧은 DNA 염기서열은 고등동물의 면역 체계로부터 이물질로 인식되어 면역 반응을 유발하게 된다. 이에 대한 연구는 1937년경에 결핵균 추출물 전체를 파라인 기름과 섞은 Complete Freund's adjuvant(CFA)를 사용하여 많은 면역학적 반응의 활성화를 유도했으나 작용기전은 알 수 없었다. 1980년 후반에 Tokunaga 등은 결핵균에서 정제된 DNA가 비장 세포에서 인터페론 분비를 유도한다는 사실을 밝혀 처음으로 박테리아 DNA의 면역 자극성을 보고하였다. 결핵균 DNA는 면역 반응을 조절하는 여러 개의 DNA 염기서열로 되어 있고, 단핵구에서 주로 IFN- $\alpha$ ,  $\beta$ , IL-6, IL-12와 natural killer(NK) 세포에서 IFN- $\gamma$ 의 분비를 유도하는 것도 밝혀졌다.

결핵균의 DNA가 이러한 면역 증강효과와 관련된다고 알려진 이후에 중심부의 C-G nucleotide가 있는 45-mer oligonucleotides의 palindromic 서열에서만 B 세포에서 IFN- $\gamma$ 의 생성을 유도하고 NK 세포의 활성화를 촉진시키는 필수적인 motif임이 밝혀졌다. 또한 B 세포의 증식과 MHC 분자의 발현 증대, 비장 비대를 초래한다. Krieg 등<sup>6)</sup>은 중심부에 비메틸화된 C-G dinucleotide가 위치하고 5' 쪽에 2개의 purine이, 3' 쪽에 2개의 pyrimidine이 위치하는 짧은 길이의 DNA가 B 세포에서 면역 항진능을 나타내는 motif임을 규명하고 'CpG motif'라고 명명하였다.

즉 CpG motif는 5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-3'의 palindromic hexamer를 가지는 기본 구조로 Th1 세포의 기능을 증진시키는 immunostimulatory DNA sequence로 제시되고 있다. 그러나 이러한 NK 세포에 대한 면역자극 효과는 단지 박테리아 DNA에서만 유도되고 척추동물의 DNA에서는 유도되지 않았다. 이러한 차이점은 척추동물의 DNA는 80% 정도에서 CpG 속에 있는 cytosine이 메틸화되어 있지만 오히려 박테리아 DNA는 70-90% 정도에서 비메틸화되어 있다. 또한 척추동물의 DNA보다 박테리아 DNA에서 CpG motif의 빈도가 20배 가량 더 풍부하게 존재한다. 이러한 CpG motif는 생쥐에서는 GACGTT 서열이, 인간에서는 GTCGTT 서열이 최적으로 알려져 있으며, 종간의 차이는 유전적으로 CpG DNA의 수용체로 알려진 Toll-like receptor 9(TLR9)에 의해 결정된다. 이와 더불어 최적의 서열을 찾는 실험이 진행 중에 있다.

그 외에 CpG DNA는 주변의 염기 서열 뿐만 아니라 backbone 구조에 따라서도 면역증강의 다양성을 나타낸다. Backbone 구조는 phosphodiester 형태와 phosphorothioate 형태로 존재한다. 이들 중에 phosphorothioate 형태가 면역증강 능력이 강하나 인간의 B 세포에서는 이와 다른 보고도 있어 연구가 필요할 것으로 생각된다<sup>6)</sup>.

## CpG DNA의 작용기전

CpG DNA를 투여할 경우 30분 이내에 사이토카인 mRNA를 유도하고, 투여 4시간 내에 IL-6, IL-12 등을 분비한다. 이러한 CpG DNA에 대한 세포내 단백질 수용체의 종류 및 기전에 대해서는 논란이 있으나 그 수용체는 TLR9로 알려져 있다.

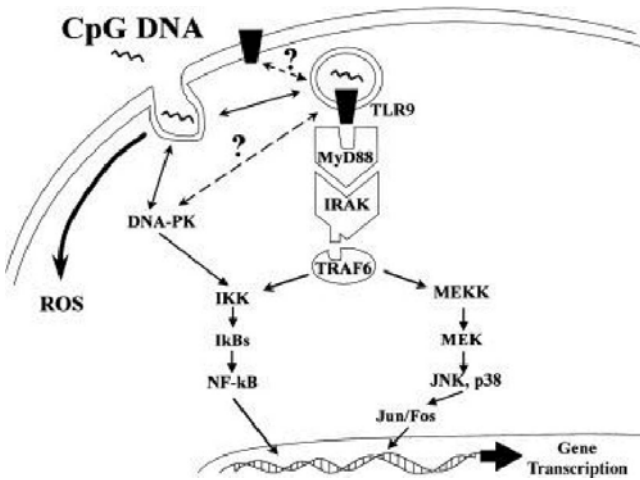
CpG DNA는 세포 내로 이입되면 대부분의 DNA는 소포체에 남아 있게 되지만 일부는 핵까지 도달한다. 세포내 DNA-dependent protein kinase(DNA-PK)는 세포질과 핵 모두에 분포하며 CpG DNA의 내재면역계 활성화에 필요한 것으로 보고되고 있다. DNA-PK가 없는 생쥐에 CpG DNA를 투여하면 NF- $\kappa$ B의 활성화가 억제되고 IL-6와 IL-12의 생산을 억제한다.

TLR9는 CpG DNA에 의한 비장세포의 증식, 수지상세포의 성숙, 대식세포에서 TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12의 분비에 관여하며 TLR9이 결핍된 생쥐에서는 CpG DNA에 의한 JNK(c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase)와 IL-1 receptor kinase(IRAK)의 활성화가 감소되며 CpG DNA에 의해 증가된 독성충격에도 저항성을 보였다. TLR9의 세포내 위치는 아직 알려지지 않았으나 TLR9 유전자에 전달막 부분이 있어 막단백질로 추정되며 소포체의 막에 위치할 수 있다.

세포내 신호전달은 통상의 toll 전달 경로로 이루어지며, 이에 관여하는 물질로는 차례로 myeloid differentiation marker 88(MyD88), IRAK, TNF receptor associated factor(TRAF6), mitogen activated protein kinase(MAPK), p38, JNK로 전달되며, 또한 전사인자인 NF- $\kappa$ B, c-myc, Ets-2 등을 활성화시킨다. MyD88는 CpG DNA에 의한 IL-12와 TNF- $\alpha$ 의 생성에 관여하며 TRAF6는 마우스의 대식세포에서 CpG DNA에 의한 IL-12의 생성에 관여한다. 또한 CpG DNA는 세포내에서 reactive oxygen species(ROS)를 생성시켜 IL-6의 생산에 관여하며 그 외 다양한 신호표시 분자들은 CpG DNA 투여시 사이토카인 생성의 신호 전달 체계를 향상시키는데 기여할 것으로 생각된다<sup>7)</sup>(Fig. 1).

## 알레르기 세포와 CpG DNA

CpG DNA는 직접적으로 항원제시세포인 대식세포와 수지상세포를 활성화시킨다. CpG DNA의 면역조절 효과는 수지상세포, 대식세포, B 세포에 대한 TLR9의 발현에 의한 것으로 알려져 있다. CpG DNA에 의해 활성화된 대식세포는 Th1 사이토카인인 IL-12, IL-18, TNF- $\alpha$  및 IFN- $\alpha/\beta$ 를 유도한다. 이러한 사이토카인은 강력하게 NK 세포들과 IFN- $\gamma$ 의 생산을 자극한다. INF- $\gamma$ 는 양성되먹임기전을 형성하여 더욱 더 대식세포를 활성화시켜 대식세포의 IL-12와 IL-18의 생산을 자극한다. 골수에서 생성된 대식세포는 CpG DNA와 반응하여 MHC class I, CD40, ICAM-1, CD16/32의 표현을 상승 조절한다. 생쥐의 대



**Fig. 1.** CpG DNA signaling pathways. This diagram summarizes the intracellular molecules and pathways that are thought to mediate CpG DNA signal transduction.

식세포와 같이 인간의 대식세포도 CpG DNA에 의해서 활성화되어진다.

수지상세포는 폐의 주요한 항원제시세포이며 면역반응의 초기에 중요한 역할을 한다. CpG DNA는 수지상세포를 자극하여 IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ 를 생산할 뿐만 아니라 MHC class II, CD40, CD54, CD86 분자의 표면 표현을 증가시킨다. 또한 혼합된 입과구 반응에서 CpG DNA를 투여한 수지상세포는 활동이 왕성해지면서 T 세포에서 Th1 사이토카인 분비 증가를 유도한다. 인간의 일차적인 수지상장구세포와 말초혈액 수지상세포들도 CpG DNA에 의하여 활성화된다.

그리고 CpG DNA는 생쥐의 B 세포를 자극하여 IL-6, IL-10, IL-12를 생산한다. 이러한 CpG DNA 투여에 의해 생성된 IL-12는 Th1 분화에 영향을 줄 수 있으나, 대식세포나 수지상세포에 비하여 B 세포는 IL-12 생산에 기여하는 바가 상대적으로 알려지지 않았다. CpG DNA 투여시 B 세포의 IL-6 생산은 INF- $\gamma$ 에 의해 증가된다. 또한 CpG DNA는 B 세포의 기능과 생존을 강화시키고 B 세포의 항원 제시를 향상시킨다. CpG DNA에 활성화된 B 세포는 IL-6의 도움으로 IgM 분비를 유도한다. CpG DNA는 저친화성 IgE 수용체, CD23을 하강 조절한다. 인간의 B 세포도 생쥐의 B 세포와 같이 CpG DNA에 반응을 한다.

NK 세포는 마우스에서 항원특이 IgE 발현과 기관지폐세척액의 IL-4, IL-5의 증가, 기도 호산구성 염증에 기여한다. 생쥐나 인간에서 NK 세포는 CpG DNA에 반응하여 항원제시세포로부터 형성된 IL-12, TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha/\gamma$ 의 존재 하에 INF- $\gamma$ 를 생산하며, 초기 INF- $\gamma$ 의 90% 이상은 NK 세포에서 나온다. 그래서 NK 세포에 대한 CpG DNA의 효과는 간접적으로 보인다<sup>7)</sup>.

CpG DNA는 기관지주위 비만세포의 축적과 IL-4, IL-9과 같은 비만세포 성장요소의 발현을 억제한다. 마우스 골수유래비

만세포는 TLR9을 강력하게 발현하여 CpG DNA와 결합한다. CpG DNA와 마우스 골수유래비만세포를 같이 실험실에서 배양했을 때 마우스 골수유래비만세포의 증식도 억제하지 못했으며 항원과 IgE 반응에 의한 마우스 골수유래비만세포의 탈과립도 억제하지 못했다. 이는 비만세포는 TLR9을 발현하지만 CpG DNA가 비만세포의 증식을 직접 억제하지 않고 CpG DNA가 Th2 세포에서 유래되는 비만세포 성장요소의 발현을 제어함으로써 간접적으로 기관지주위 비만세포의 축적을 억제함을 시사한다<sup>8)</sup>.

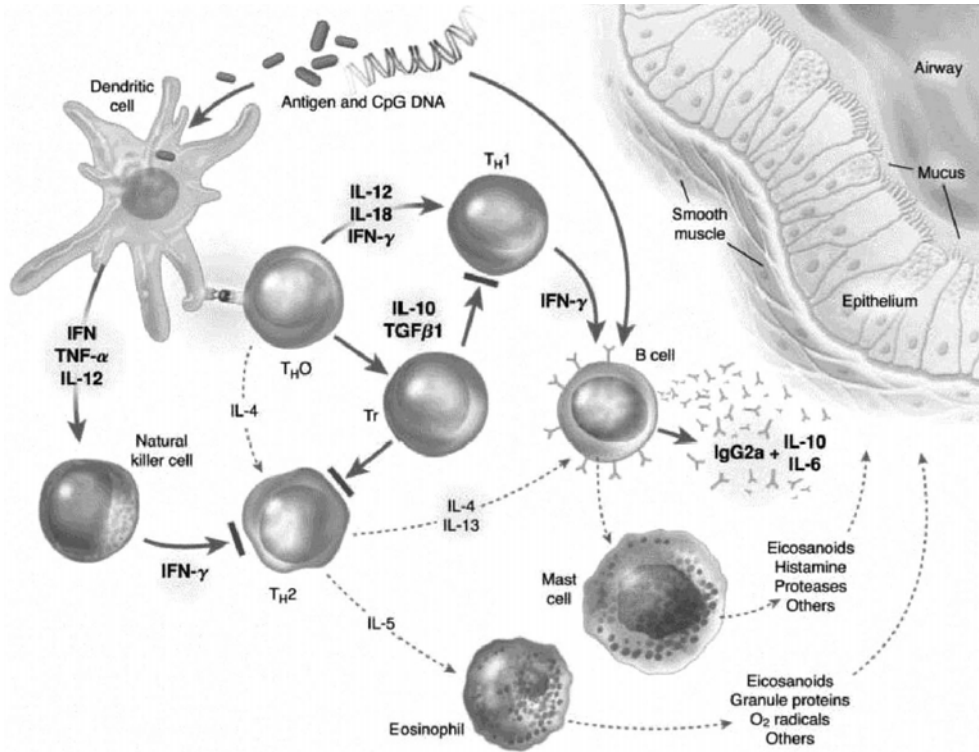
근래에 조절 T 세포(Tr 혹은 Th3 세포 : CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD45RB<sup>Lo</sup>, 말초 T 세포의 약 10%)의 역할에 대하여 관심이 쏠리고 있다. 조절 T 세포는 IL-10과 TGF- $\beta$ 에 의존적이며 특히 이 세포의 발달에는 Th1 세포의 IFN- $\gamma$ 와 같이 IL-10을 필요로 한다. 알레르기에서 CpG DNA는 IL-10을 강력하게 유도하고, IL-10은 조절 T 세포의 발현을 증가시켜 Th1과 Th2 면역반응을 동시에 억제하여 면역을 조절한다. 조절 T 세포는 주로 Th2 면역반응을 조절하고 항원특이 IgE 반응을 하향조절하며 알레르겐에 대한 내성을 증가시켜 지금까지 설명할 수 없었던 T 세포 반응에 대한 이해가 가능하게 되었다. 알레르겐에 대한 내성은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 세포에 의해 전달되며 이 세포는 항원특이 IgE와 T 림파구 증식을 억제하고, IL-4와 IL-5를 억제한다<sup>5)</sup>(Fig. 2).

## 천식 치료로서의 CpG DNA

CpG DNA가 기도염증반응을 억제하는 기전은 아직 완전하게 이해되어지고 있지는 않다. 그러나 현재까지 연구된 바에 의하면 항원으로 유발된 기관지 천식 생쥐 모델에서 CpG DNA 투여는 호산구성 기도염증과 IgE 생성, Th2 사이토카인 발현과 기도 과민성을 감소시키고, Th1 및 항염증(TGF- $\beta$ 1) 사이토카인 발현을 증가시킨다. CpG DNA에 의한 호산구성 면역반응과 기도 과민반응의 예방이나 치료에 대한 효과는 스테로이드 만큼 효과적이며, CpG DNA를 전신적으로 한 번만 투여할 시에도 천식 기도내 Th2의 반응을 적어도 4주까지 억제하였다.

### 1. CpG DNA와 호산구 및 사이토카인

CpG DNA의 면역반응은 Th1 사이토카인(IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, IFNs  $\alpha$  &  $\beta$ )의 발현과 IL-4, IL-5, IL-9, IL-13과 같은 Th2 사이토카인의 발현억제로 특징지어진다. Serebrisky 등<sup>9)</sup>은 난알부민으로 감작 및 기도 염증이 유발된 생쥐 기관지천식 모델에서 항원 유발 24시간 후에 CpG DNA를 투여하였을 때, 기도 과민성, 기관지폐포세척액내의 호산구 비율, 혈청 항원 특이 IgE 및 기관지의 과민성이 감소하였고 기관지폐포세척액 및 비장세포에서 Th2 사이토카인인 IL-13, IL-4, IL-5의 생성이 감소하였으며, Th1 사이토카인인 IL-12, IFN- $\gamma$ 가 증가되어 CpG DNA가 기관지천식에 치료효과가



**Fig. 2.** Immunomodulatory effects of CpG DNA. CpG DNA activated pathways and critical mediator are shown in bold. CpG DNA-inhibited pathways are shown with dashed lines. CpG DNA increase production of TH1 cytokines interleukin(IL)-12, IL-18, interferon- $\gamma$ , and IL-6, and decreased production of TH2 cytokines IL-4 and IL-5. T cells are inactivated by increased production of anti-inflammatory cytokines IL-10 and TGF-1 by dendritic and T regulatory(Tr) cells. B-cells proliferate and produce IgG2 antibody. Natural killer(NK) cells are activated by IL-12 and IL-18. Reprinted with permission from author.

있다고 보고하였다. 본 교실에서도 난알부민을 이용해 기도 염증이 유발된 생쥐에서 CpG DNA를 투여하여 기관지폐포세척액내의 호산구 비율의 감소와 기관지폐포세척액 및 비장세포에서 IL-13, IL-4, IL-5의 생성 감소 및 IL-12 증가를 보고한 바 있다<sup>10, 11)</sup>(Fig. 3).

CpG DNA는 IL-13의 억제제를 통하여 이미 형성된 알레르기성 기도 염증의 조절인자로 관여할 가능성이 있다. IL-13은 최근에 항원 유발성 기도 과민성의 발달에 중요함이 밝혀졌다. IL-13이 결핍된 생쥐는 호산구성 기도염증은 유도할 수 있으나, 항원 유발성 기도 과민반응은 유도하지 못했다. 흥미롭게도, 스테로이드는 IL-13 유발성 기도 과민성을 억제하는 데에 비효과적인 것으로 나타났다. CpG DNA는 천식의 생쥐 모델에서 IL-13을 억제하고 배상세포의 과증식을 억제한다. CpG DNA는 IL-13의 억제에 의해 이미 형성된 기도 과민성을 역전시킬 수 있음을 시사한다<sup>12)</sup>.

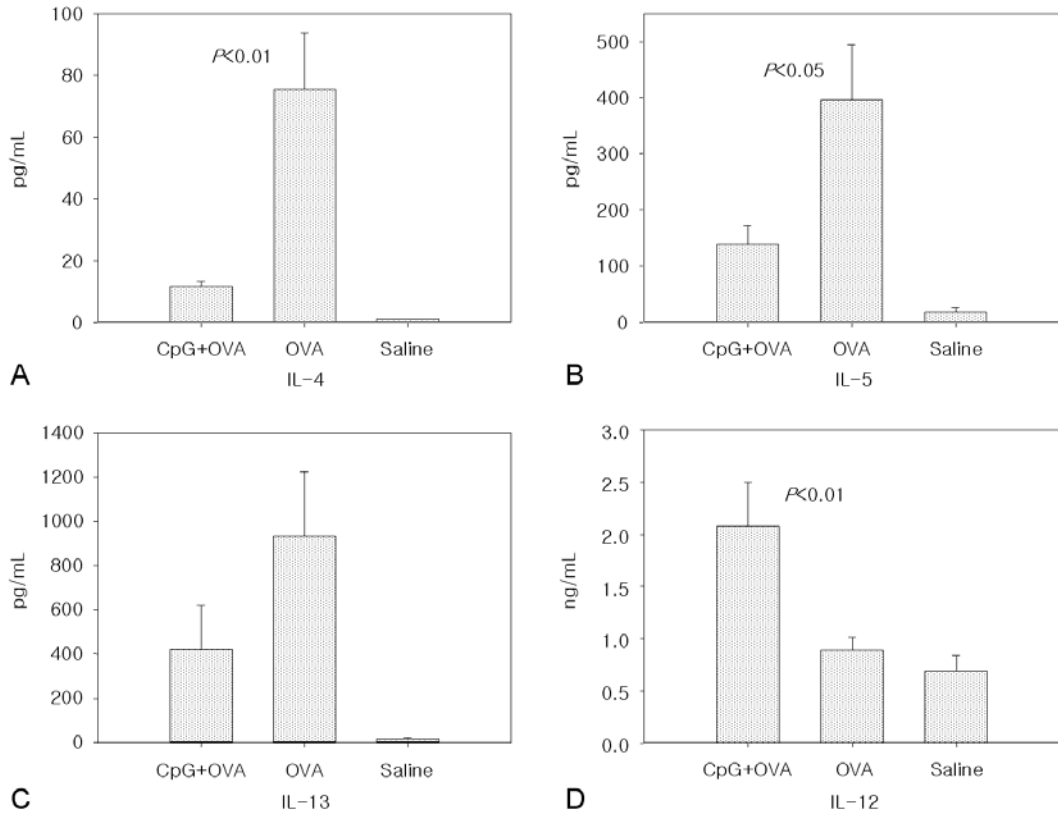
CpG DNA의 효과는 Th1 사이토카인(IL-12와 IFN- $\gamma$ )을 통해 부분적으로 조절되지만, 최근에 이들이 보여주는 보호적 효과는 중요성이 떨어진다. CpG DNA는 IFN- $\gamma$ 와 IL-12가 모두 없거나 두 가지 중 하나가 없는 경우에서도 기도의 호산구와 기관지 과민성을 감소시킬 수 있었으며 또한 이들 사이토카인이

없는 상태에서 기관지 천식을 치료할 경우는 단지 고농도의 CpG DNA가 필요하였다.

## 2. 예방적 차원에서의 CpG DNA

CpG DNA를 이용한 기관지 천식의 예방에 관한 연구들을 보면 생쥐에서 항원 감작 단계에서 CpG DNA와 항원을 함께 투여한 후에 기관지 천식을 유발하여 분석한 결과는 기도과민성, 기관지폐포세척액(BALF)내의 호산구 비율의 감소, 혈청 IgE, BALF IL-4 등을 감소시켰고 BALF IFN- $\gamma$ 와 IL-12를 증가시켰다. 다른 연구에 의하면 생쥐를 항원으로 감작시키기 1주일 전에 CpG DNA의 예방적 투여에 의해 혈청 IgE는 억제되었고 혈청 IgG2a는 현저히 증가되었으며, 이러한 결과는 최소한 7주까지는 지속되었다. Broide 등은 항원 노출 6일 전에 전처치로 CpG DNA를 투여하였을 때 가장 효과적으로 기도 염증을 억제한다고 하였다. 즉 CpG DNA는 기관지 천식의 발생에 대해 예방의 효과가 있음을 시사한다<sup>13)</sup>.

최근에 CpG DNA가 감염성 질환에 의해 야기된 기도염증 예방에 효과적일 수 있다는 보고도 있다. 즉 respiratory syncytial 바이러스 감염 전에 CpG DNA를 투여하였을 경우 바이러스 증식의 억제와 동시에 기도염증을 억제하는 소견을 보였으



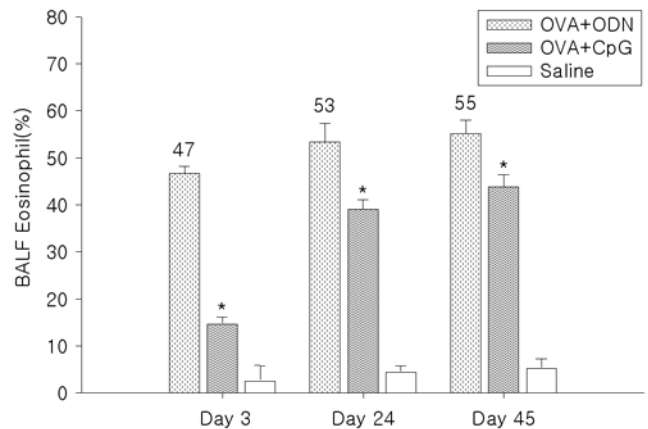
**Fig. 3.** The effect of CpG DNA treatment on allergen-induced Th1 and Th2 cytokine induction. The level of IL-4(A), IL-5(B), IL-13(C), and IL-12(D) were analyzed by ELISA. The results revealed decreased production of IL-4( $P<0.01$ ), IL-5( $P<0.05$ ), IL-13 and increased production of IL-12 in the CpG DNA treated group as compared to the untreated groups; each bar indicates the mean( $\pm$ SEM) value for mice. CpG+OVA:OVA induce airway inflammation and CpG DNA treatment. OVA:OVA induce airway inflammation in the absence of CpG DNA. Saline:Mice receiving saline injections served as negative controls.

며, 기도내 점액의 분비도 감소시키는 효과를 보였다.

CpG DNA의 장기적 효과에 대한 여러 보고들이 있다. 두드러기췌 항원을 이용한 생쥐 천식 연구에서 감작 후 항원으로 유발하기 48시간 전에 CpG DNA를 기관 내로 투여했을 때 기관지천식 발생 억제 효과가 최소 6주 이상 지속되었다. CpG DNA를 돼지풀 항원과 결합시켜서 피내로 주사한 연구에서는 최소한 16주까지 비장세포에서 효과를 지속시켰다. 본 교실에서의 기관지천식모델에서 난알부민 항원 유발 후 8주째에 CpG DNA를 비강 내 투여한 군에서 기관지폐포세척액내의 호산구증이 45일까지 억제되었다(Fig. 4). 그래서 CpG DNA를 전신적으로 한 번만 투여하여도 천식 기도내 Th2의 반응 억제는 적어도 한달 이상 지속된다<sup>14)</sup>.

### 3. CpG DNA와 스테로이드

동물 모델에서 CpG DNA는 현재 사용 중인 천식치료제와 유사한 효과를 나타낸다. 기도 염증이 유발된 생쥐에서 CpG DNA의 1회 투여가 dexamethasone 7일간 투여와 동일한 효과가 있었다. CpG DNA와 스테로이드를 동시에 투여시 각각의



**Fig. 4.** Long term effects on Bronchoalveolar lavage fluid (BALF) eosinophil at 3 days, 24 days, 45 days after ovalbumin(OVA) challenge in the presence of CpG DNA or control oligodeoxynucleotides(ODN). BALF eosinophils were significantly inhibited in the CpG DNA treated mice compared to the untreated mice till at least 45days. \* $P<0.05$ : OVA+CpG group compared with OVA+ODN(control ODN) group at each days.

단독 투여보다 더 효과적이었고 CpG DNA과 스테로이드의 작용기전의 일부는 공유의 항염증 경로에 의한 것으로 추론하였다. 스테로이드는 기도 염증이 있는 생쥐에서 호산구수를 억제시키고 Th2 사이토카인의 생성을 억제하지만, CpG DNA의 투여는 호산구수와 Th2 사이토카인의 억제 뿐만 아니라 Th1 사이토카인의 생성을 효과적으로 증가시키는 능력을 보였다<sup>15)</sup>.

본 교실에서도 dexamethasone을 난알부민 항원 유발 후 8주째에 3일간 투여하여 동일한 결과를 얻었으나, IL-12의 분석결과에서는 CpG DNA의 투여군에서는 IL-12의 농도를 강력하게 증가시켰으나 dexamethasone 투여군에서 IL-12의 농도는 의미있게 증가하지 못한다는 결과를 얻었다.

#### 4. 투여방법에 따른 CpG DNA의 효과

CpG DNA의 투여 경로와 투여한 시기를 비교했을 경우 기관지폐포세척액내의 호산구 백분율은 항원 유발 전에 복강 내로 CpG DNA를 투여했을 때가 가장 많이 억제되었으며, 투여 경로는 국소적 투여(비강 내)나 전신적 투여(복강 내) 모두에서 비슷한 효과를 보였다. 또한 비장 세포의 사이토카인 분석에서도 비슷한 결과로 나왔다. 본 교실에서도 투여 경로에 따른 차이를 보기 위하여 난알부민으로 항원 유발과 동시에 CpG DNA를 비강 내로 투여한 군과 복강 내로 투여한 군으로 분류하여 연구하였다. Th2 사이토카인 분석에서는 두 군에서 큰 차이가 없었으나 기관지폐포세척액내의 호산구 비율은 비강 내 투여 군이 더 많이 억제된 결과를 보여 좀 더 연구가 필요할 것으로 생각된다<sup>10)</sup>.

#### 5. 항원-CpG DNA conjugate

최근에는 CpG DNA의 투여 효과를 높이기 위하여 항원과 CpG DNA가 혼합된 항원-CpG DNA conjugate를 투여할 경우에 CpG DNA 단독보다 더 강력하고, 더 오래 동안 지속할 수 있으며, 항원 특이적 보호도 할 수 있었다. Shirota 등<sup>16)</sup>에 의하면 알레르겐과 CpG DNA를 혼합하여 투여할 경우 CpG DNA 단독 투여보다 100배 정도의 기관지천식 억제 효과가 있으며 그 효과는 최소 2개월간 지속되었다.

### CpG DNA와 기도 개형

심한 아토피성 천식은 완전회복이 가능한 것처럼 보이지만, 증상이 반복되면 장기간에 걸친 만성 염증상태를 겪게 되어 기도 개형을 일으킬 수도 있다. 기도 개형에서 흔히 나타나는 증상으로는 내피하층에서의 교원질의 과다침착, 평활근의 증식, 그리고 배상세포의 과증식이다. 생쥐에서 CpG DNA는 이러한 기도 개형을 어느 정도는 치료 및 예방을 할 수 있다.

만성천식의 생쥐 모델 실험에서 만성 염증에 노출된 마우스에 비해 CpG DNA에 노출되었던 생쥐들은 얇아진 내피하층의 교원질 침착, 낮아진 총폐교원질, 그리고 배상세포 비대증의 감소 등의 현저히 호전된 기도개형 소견을 보였다. 이 결과는 CpG

DNA가 만성천식에서 흔히 발견되는 만성 염증성의 변화를 막을 수 있다는 것을 보여주고 있다. 기도 개형의 면역 반응이 아직 명확하지 않지만, 내피하층의 교원질 과다침착과 배상세포 비대증을 포함한 여러 양상들의 조절에 IL-13이 관련됨을 알 수 있다. 만성 천식에서 CpG DNA에 의한 IL-13의 억제는 Th2 세포와 조절 T 세포의 사이토카인을 통해 일어날 수 있다.

다른 연구에서 섬유모세포는 CpG DNA 수용체인 TLR9을 발현시키지 않는 것으로 미루어 볼 때 기도의 교원질을 감소시키는 CpG DNA의 능력은 섬유아세포에 대한 CpG DNA의 직접적인 효과 같지는 않다. 이는 CpG DNA는 대식세포에 의한 TGF- $\beta$ 1 발현의 감소와 기도에서 TGF- $\beta$ 1 양성 호산구와 단핵구의 수를 감소시켜 섬유모세포의 교원질 발현을 간접적으로 억제함을 시사한다<sup>17)</sup>.

### 피부 질환의 치료로서의 CpG DNA

아토피 피부염의 환자는 혈청 IgE 증가와 호산구증의 면역조절 이상소견을 보이며, 특히 급성기에는 Th2 사이토카인 IL-4, IL-5, IL-13의 증가와 IFN- $\gamma$ 의 감소를 보인다. 아토피 질환에서 IL-10 조절의 이상이 보고되어 있으며, 천식과 아토피성 피부염에서 IL-10 mRNA의 증가 소견을 보였다. 국소적인 IL-10의 증가는 아토피성 피부염에서 지속된 손상과 세균감염으로 인한 이차적인 결과로 생각된다. 항원발현세포, 수지상세포, 랑게르한스세포는 아토피 피부염에서 증가된다.

Jakob 등<sup>18)</sup>은 동물 태아피부에서 유래된 수지상세포와 랑게르한스세포에 CpG DNA를 투여하여 IL-12의 활성화와 이동 및 생산 증가를 확인하였다. 이는 CpG DNA를 진피나 피부표면에도포시에 알레르겐과 리포다당체와 유사하게 랑게르한스세포의 이동을 야기함을 시사한다. 피부에서 CpG DNA의 효과는 항원과 결합되었을 때 강하게 나타나며, IFN- $\gamma$ 의 증가와 IL-4의 감소, 현저한 혈청 IgG2a anti-CT 항체, 총혈청 IgE의 하향조절 소견을 보인다. 한편으로는 만성 아토피 피부염의 피부에서 면역반응은 급성 아토피 피부염에서보다 IL-4, IL-13 mRNA의 발현이 의미있게 감소하였고 IL-5, GM-CSF, IL-12, IFN- $\gamma$  mRNA의 발현은 증가하는 소견을 보여 좀 더 많은 연구가 필요한 상태이다.

이러한 피부에 대한 연구 자료를 종합하여 보면 CpG DNA는 급성 아토피 피부염의 치료에는 매력적인 요법이나, 만성 아토피 피부염에 대한 CpG DNA 치료는 아직 관망적이다.

### 알레르기성 결막염 치료로서의 CpG DNA

알레르기성 결막염은 소양감, 눈물의 과다 분비, 결막 충혈, 안검의 부종 등을 특징으로 한다. 알레르기성 결막염의 조기 및 후기 반응에서 CpG DNA 투여는 매우 효과적이었다. 알레르기성 결막염의 조기반응은 CpG DNA를 국소 혹은 전신에 투여할

**Table 1.** Effects of CpG DNA on Animal Models of Allergic Diseases

Disease modal	CpG DNA + Ag and route	Effects on physiology	Cellular inflammation	TH2 cytokines	TH1 cytokines	Antibodies & Chemokines
Asthma (Broide, 1998)	Ova + CpG i.p.	↓AHR	↓Lung Eos. ↓BALF Eos. ↓Bone marrow	↓IL-5 ↓GM-CSF ↓IL-3	↑IFN- $\gamma$ Splenocytes	Not done
Asthma (Sur, 1999)	Ragweed + CpG	↓AHR	↓BALF Eos.	↓IL-4 BALF & splenocytes	↑IFN- $\gamma$ BALF ↑IFN- $\gamma$ Splenocytes	↓Total IgE
Allergic conjunctivitis (Magone, 2000)	Ragweed + CpG mucosal or i.p.	↓Clinical score ↓Early and late phase response	Not done	Not done	↑IFN- $\gamma$ LN	↓Specific IgE
Immunogenicity & Allergenicity (Tighe, 2000)	Amb a 1 + CpG (conjugated) intradermal or i.p.	↓Histamine release with conjugate but not with CpG	Not done	↓IL-5 Splenocytes	↑IFN- $\gamma$ Splenocytes	↓IgG1 ↓Specific IgE ↑IgG 2a
Asthma (Kline, 2002)	Ova + CpG and SEA + CpG	↓AHR	↓BALF Eos. ↓Lung Eos.	↓IL-5 Splenocytes	↑IFN- $\gamma$ Splenocytes	↑IP 10 ↑RANTES ↓Eotaxin
Allergic rhinitis (Hussain, 2002)	Ova + CpG	↓nasal scratching	↓Eos. Submucosal & Bone marrow	↓IL-5 ↓IL-4 Splenocytes	↑IFN- $\gamma$ Splenocytes	Not done

BALF : Bronchoalveolar lavage fluid, LN : Regional lymph nodes, AHR : Airway hyperreactivity, Eos. : Eosinophils

경우 스테로이드만큼 알레르기성 결막염의 증상을 호전시켰다. 또한 CpG DNA는 알레르기성 결막염에 의한 후기반응 염증도 호전시켰으나 스테로이드는 후기반응 염증을 억제하지 못하였다. 알레르기성 결막염에 대한 CpG DNA의 면역반응은 항원 특이 IgE 반응과 호산구증을 억제하였으며, Th1 사이토카인 IFN- $\gamma$  와 IL-12를 유도하였다(Table 1).

### CpG DNA의 장단점

기존의 원인 항원을 일정한 간격을 두고 소량씩 증량 시켜 환자에게 주사하여 면역학적 변화를 유도하는 전통적인 면역 요법은 비교적 유효성이 낮고 아나필락시스 등의 심각한 부작용을 일으키며, 불편하고 시간이 많이 들고, 때로는 알레르기 질환이 악화될 수 있으나 CpG DNA는 전신적 및 기도 내 흡입 등의 경로로 환자에게 투여할 수 있는 장점과 특별한 부작용 없이 Th1 면역 반응을 유도해 줌으로써 면역 조절을 하는 장점을 가지고 있다. 그러나 CpG DNA는 세균의 DNA에 존재하는 위험신호를 구성하는 한 부분으로 Th1 면역반응을 유도하여 Th2 면역반응을 억제함으로써, 이에 따르는 부작용에 대한 우려도 있다.

CpG DNA의 투여 방법에서, CpG DNA 단독 투여는 다양한 항원들에는 효과적이지만 잠재적으로 자가 면역 질환을 유발시킬 수 있는 단점이 있으며, CpG DNA와 항원 펩타이드와 결합시켜서 투여했을 경우에는 항원에 대한 과민 반응을 줄일 수 있지만, 다양한 항원들에 대해 적용하기 어려운 점이 있다. CpG DNA의 투여 목적에서 볼 때, 알레르기의 예방 목적으로 투여하면 장기적으로 면역체계를 바꾸어 놓을 수는 있지만 자가 면역

질환의 유도를 잠재적으로 일으킬 수 있고, 또 알레르기를 일으키는 민감한 항원을 예측할 수 없다. 또 이미 존재하는 알레르기의 치료 목적으로 CpG DNA 투여하면 민감한 항원에 대해 미리 선별할 수는 있지만 이미 형성된 면역 반응을 바꾸기는 어려운 단점을 가지고 있다. CpG DNA의 투여 장소에 발생할 수 있는 염증 반응, TNF- $\alpha$  발생 등에 의한 폐혈증성 속의 발생, 그 외에 비장 비대와 유발 등이 우려되고 있다<sup>19)</sup>.

이런 단점들은 CpG DNA에 대한 보다 많은 연구와 임상 적용을 할 경우에 환자의 가족력과 개개인의 환경적 노출인자에 근거를 둔 충분한 교육을 통해서 해결할 수 있을 것이다.

### 결론

알레르기 질환의 유병률과 중증도는 산업화된 선진국에서 더 증가하고 있다. 이러한 현상은 알레르기 염증에서 핵심적인 역할을 담당하는 T 세포의 면역 조절기능의 이상, Th1 세포와 Th2 세포간의 상호 불균형으로 받아들여지고 있다. 면역학적 기전에 대한 이해와 연구에도 불구하고 알레르기 질환들은 현재까지 완치가 불가능하나, 최근 발달된 면역 조절을 겨냥한 치료법이 아토피 치료의 가능성을 제시하고 있다. 그 중에서 Th1과 조절 면역 반응을 유도하고 Th2 면역 반응을 억제하는 CpG DNA가 새로운 종류의 대표적 치료제이다.

현재까지 연구된 바에 의하면 CpG DNA는 동물 모델에서 호산구성 염증반응과 기도 과민성을 억제하고 기도 염증반응과 기도 점막의 발현을 감소시켜 알레르기 질환의 치료제로서 중요한 의미를 가진다. 최근 CpG DNA를 이용한 인체실험에서 얻



은 자료에 의하면 CpG DNA는 효능이 좋은 강력한 면역 조절제가 될 수 있음을 시사한다. 그러나 천식과 아토피성 염증에 대한 CpG DNA의 효능의 이해는 대부분 동물실험을 통해서 이루어져 직접 임상 적용에는 한계가 있다. 그 정확한 기전이 아직 더 밝혀져야 하지만, 앞으로 CpG DNA는 천식과 알레르기성 염증을 완화시키거나 어쩌면 완치까지도 할 수 있는 유망한 새로운 치료제가 될 수 있을 것이다.

## References

- 1) Hussain I, Kline JN. DNA, the immune system, and atopic disease. *J Invest Dermatol Symp Proc* 2004;9:23-8.
- 2) Norman PS. Immunotherapy : 1999-2004. *J Allergy Clin Immunol* 2004;113:1013-23.
- 3) Bryan SA, O'Connor BJ, Matti S, Leckie MJ, Kanabar V, Khan J, et al. Effects of recombinant human interleukin-12 on eosinophils, airway hyperresponsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet* 2000;356:2149-53.
- 4) Ramsey CD, Celedon JC. The hygiene hypothesis and asthma. *Curr Opin Pulm Med* 2005;11:14-20.
- 5) Akbari O, Stock P, DeKruyff RH, Umetsu DT. Role of regulatory T cells in allergy and asthma. *Curr Opin Immunol* 2003;15:627-33.
- 6) Hartmann G, Krieg AM. Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells. *J Immunol* 2000;164:944-53.
- 7) Hacker H, Vabulas RM, Takeuchi O, Hoshino K, Akira S, Wagner H, et al. Immune cell activation by bacterial CpG DNA through myeloid differentiation marker 88 and tumor necrosis factor receptor associated factor (TRAF) 6. *J Exp Med* 2000;192:595-600.
- 8) Ikeda RK, Miller M, Nayar J, Walker L, Cho JY, McElwain K, et al. Accumulation of peribronchial mast cells in a mouse model of OVA allergen induced chronic airway inflammation: modulation by immunostimulatory DNA sequences. *J Immunol* 2003;171:4860-7.
- 9) Serebrisky D, Teper DD, Huang CK, Lee SY, Zhang TF, Schofield BH, et al. CpG oligodeoxynucleotides can reverse Th2-associated allergic airway responses and alter B7.1/B7.2 expression in a murine model of asthma. *J Immunol* 2000;165:5906-12.
- 10) Mok JS, Choi SM. Modulation of eosinophilia and cytokines of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) by CpG oligodeoxynucleotides (ODN) in a mouse model of established airway inflammation. *J Korean Pediatr Allergy Respir Dis* 2002;12:93-104.
- 11) Hwang HW, Kim SJ, Kim WD, Cho SM, Lee DS, Choi SM. Effect of CpG oligodeoxynucleotides on airways of mice with established airways inflammation. *J Korean Pediatr Soc* 2002;45:875-83.
- 12) Kibe A, Inoue H, Fukuyama S, Machida K, Matsumoto K, Koto H, et al. Differential regulation by glucocorticoid of interleukin-13 induced eosinophilia, hyperresponsiveness, and goblet cell hyperplasia in mouse airways. *Am J Respir Crit Care Med* 2003;167:50-6.
- 13) Broide D, Schwarze J, Tighe H, Gifford T, Nguyen MD, Malek S, et al. Immunostimulatory DNA sequences inhibit IL-5, eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 1998;161:7054-62.
- 14) Choi SM. CpG ODNs for treatment of bronchial asthma. *J Korean Pediatr Allergy Respir Dis* 2003;13:207-15.
- 15) Ikeda RK, Nayar J, Cho JY, Miller M, Rodriguez M, Raz E, et al. Resolution of airway inflammation following ovalbumin inhalation: comparison of ISS DNA and corticosteroids. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2003;28:655-63.
- 16) Shirota H, Sano K, Kikuchi T, Tamura G, Shirata K. Regulation of murine airway eosinophilia and Th2 cells by antigen conjugated CpG oligodeoxynucleotides as a novel antigen specific immunomodulator. *J Immunol* 2000;164:575-82.
- 17) Jain VV, Kline JN. CpG DNA: immunomodulation and remodelling of the asthmatic airway. *Expert Opin Biol Ther* 2004;4:1533-40.
- 18) Jakob T, Walker PS, Krieg AM, Udey MC, Vogel JC. Activation of cutaneous dendritic cells by CpG-containing oligodeoxynucleotides: A role for dendritic cells in the augmentation of Th1 responses by immunostimulatory DNA. *J Immunol* 1998;161:3042-9.
- 19) Wild JS, Sur S. CpG oligonucleotide modulation of allergic inflammation. *Allergy* 2001;56:365-76.