

흰쥐 모델에서 공여항원에 감작된 수지상세포가 피부동종이식의 생착에 미치는 영향

은석찬 · 김병준 · 김진희 · 허찬영 · 백룡민 · 장 학 · 민경원

서울대학교 의과대학 성형외과학교실

The Effect of Donor Antigen-pulsed Dendritic Cells on Survival of Skin Allograft in a Rat Model

Seok Chan Eun, M.D., Byung Jun Kim, M.D.,
Jin Hee Kim, M.D., Chan Yeong Heo, M.D.,
Rong Min Baek, M.D., Hak Chang, M.D.,
Kyung Won Minn, M.D.

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Seoul
National University College of Medicine, Gyeonggi, Korea

Purpose: Prevention of acute rejection in skin allografts without continuous immunosuppression lacks reports in worldwide literature. Needs for chronic immunosuppression preclude the use of tissue allograft as a routine surgical reconstructive option. Recently dendritic cells(DC) gained considerable attention as antigen presenting cells that are also capable of immunologic tolerance induction. This study assesses the effects of alloantigen-pulsed dendritic cells in induction of survival increase in a rat skin allograft model.

Methods: Recipient-derived dendritic cells were harvested from rat whole blood and cultured with GM-CSF(200 ng/mL) and IL-4(8 ng/mL) for 2 weeks. Then donor-specific alloantigen pulsed dendritic cells were reinjected into tail vein before skin graft. The rat dorsal skin allografts were transplanted in 5 subgroups. Groups: I) untreated, II) anti-lymphocyte serum(ALS, 0.5 mL), III) FK-506(2 mg/kg), IV) DCp, VI) DCp and FK-506. Graft appearance challenges were assessed postoperatively.

Results: The group V(DC and FK-506 treated) showed longest graft survival rate(23.5 days) than other groups; untreated(5.8 days), ALS(7.2 days), FK-506(17.5 days), DCp(12.2 days).

Received January 22, 2008

Revised March 6, 2008

Accepted April 30, 2008

Address Correspondence: Seok Chan Eun, M.D., Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Seoul National University College of Medicine, Seoul National University Bundang Hospital, 300 Gumi-dong, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do 463-707, Korea. Tel: 031) 787-7223 / Fax: 031) 787-4055 / E-mail: sceun@snuh.org

* 본 연구는 과학기술부/한국과학재단 우수 연구센터 육성사업의 지원으로 수행되었음(R11-2005-065).

Conclusion: Donor antigen pulsed host dendritic cell combined with short-term immunosuppression prolong skin allograft survival and has potential therapeutic application for induction of donor antigen specific tolerance.

Key Words: Skin allograft, Dendritic cell, Immune tolerance

I. 서 론

면역억제제의 발달과 더불어 인간의 병들고 손상된 신체 일부분을 정상적인 조직으로 교체하고자 하는 수많은 연구가 진행되었고 최근에는 여러 가지 면역억제제의 개발과 새로운 수술 기술의 발전으로 복합조직 이식술에 획기적인 발전을 가져왔다. 그러나 비특이적이며 지속적인 면역억제요법은 감염, 악성종양 등을 야기하며 그럼에도 만성 거부반응을 막을 수 없다는 단점을 가지고 있다. 특히 피부의 동종이식은 다른 장기이식과는 달리 거부반응이 매우 강하여 임상적 이용이 아주 제한되어 있는 실정이다. 따라서 동종이식에 있어서 문제 해결의 가장 핵심적이고 유일한 방법은 면역 관용의 유도일 것이다.¹

항원전달세포는 면역반응의 초기 단계에서 항원을 T 세포에 전달한다는 측면에서 중요한 의미를 지니고 있는데 같은 항원을 전달하더라도 반응하는 T세포의 활성화를 유발하기도 하고 또는 관용을 유도하기도 한다.² 지금까지 알려진 인간의 면역 체계에서 가장 강력한 항원전달세포는 수지상세포(DC, dendritic cell)로서 체외 및 체내에서 특이항원으로 자극 후 원시 T보조림프구 활성화 및 세포독성 T림프구를 증식시켜 항원을 이용한 면역치료에서 항원감작의 효과적인 매개체로 알려져 있다. 지금까지는 이러한 수지상세포를 이용하는데 제한점이 많았으나 최근 배양기술의 발전, 수지상세포를 이용한 자연발생적인 T림프구의 증식 및 이식장기의 면역관용에 조절 림프구의 역할이 있을 것으로 받아들여지고 있다는 점에서 이를 이용한 항원에 대한 면역 반응을 증가시키고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다.^{3,4} 본 연구는 수용자의 항원전달세포인 수지상세포

를 공여자 특이 동종항원과 감각시키는 전처리 과정을 통해 면역관용반응을 유도함으로써 피부이식 시 생착에 미치는 효과를 확인하고자 시행하였다.

II. 재료 및 방법

가. 수지상세포의 분리 배양 및 감각

Sprague-Dowley계의 쥐에서 5 mL의 혈액을 채취한 뒤 바로 5000 IU의 헤파린과 혼합하여 혈액응고를 예방하였고 DMEM(GIBCO, Grand island, NY, USA)과 1:1 비율로 섞은 다음 1.077 밀도의 Ficoll-Paque density gradient solution을 첨가하고 1500 rpm으로 20°C에서 30분간 원심분리하였다. 그 후 적혈구, 다핵구 및 혈소판의 오염을 최소화하면서 중간층에서 버피코트층(buffy coat layer)을 추출한 후 1800 rpm, 1200 rpm, 800 rpm으로 각각 20°C에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 가라앉은 세포를 10% 우태아 혈청과 100 Unit/mL의 penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM Medium (GIBCO, Grand island, NY, USA)에 부유시켜 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3-5일간 배양하여 바닥에 부착 성장하는 간엽줄기세포만을 선택적으로 지속 배양하였으며, 수지상세포로의 분화유도를 위해 GM-CSF(200 ng/mL, Sigma, St. Louis, U.S.A.)와 IL-4 (8 ng/mL, Sigma, St. Louis, U.S.A.)를 첨가하였고 배지는 1주일에 2회 교환하였다. 배양 중인 세포는 형태학적 변화를 관찰하기 위하여 위상차 현미경으로 관찰하였고, 세포 표면 항원의 발현을 알아보기 위해 항 CD80, 항 CD86 단클론항체와 반응시킨 후 유세포분석기(Coulter Electronics, St Louis, MO)를 통하여 관찰하였다. 수용자 쥐의 전처리로 공여자인 Lewis계의 쥐의 꼬리에서 혈액 2 mL를 채취하여 위에서와 같은 밀도구배원심분리법으로 분리, 배양하여 단핵세포층을 얻었으며 이를 Sprague-Dowley계의 쥐에서 채취하여 배양한 수지상세포와 배양 2주째 동종항원으로 24시간동안 감각시킨 후 수용자 쥐에 꼬리정맥을 통하여 이식 1주일 전에 주입하였다.

나. 피부이식

본 실험의 실험동물로는 평균 8주령, 300-350 g의 수컷 Lewis계를 공여자로, Sprague-Dowley계를 수용자로 하였으며 사료 및 생활조건을 동일하게 하였다.

먼저 Sprague-Dowley계의 쥐를 Ketamine을 복강 내 주사하여 마취한 후 배부를 삭모하고 배부에서 2×3 cm 크기로 피부를 절제해 낸 뒤, Lewis계 쥐의 배부에서 같은 크기의 피부를 떼어 내 4-0 black silk로 봉합하여 피부이식 마무리하였다.

그 후 6마리씩 5개의 군으로 나누어 제 1군은 피부이식 후 아무런 처치를 시행하지 않은 군, 제 2군은 면역중화항체인 ALS(anti-lymphocyte serum) 0.5 mL를 이식 1주일 전에 투여한 군, 제 3군은 피부이식 후 면역억제제인 FK-506(Astellas, Fujisawa pharmaceutical Co. Ltd Tsukuba, Ibaraki, Japan)을 투여한 그룹으로 피부이식 후 매일 0.2 mL씩 2주간 근육내 투여하였다. 제 4군은 공여자 동종 항원과 감각된 수지상세포를 피부이식 일주일 전에 주입한 군이고, 제 5군은 실험군으로 수지상세포를 주입하고 피부이식 후 면역억제제 FK-506을 0.2 mL씩 2주간 투여하였다. 이식 후 이식 부위를 매일 육안으로 관찰하여 거부반응 유무를 판정하였고 이식편의 생착기간 산정은 표피탈락, 궤양, 가피화 및 괴사 등이 전체면적의 50%가 되는 때를 거부반응에 의한 탈락의 시기로 판정하였다.

다. 통계

피부이식술 후 실험군과 대조군간의 평균 생존기간에 대한 비교는 윈도우 통계프로그램 SPSS 10.0을 이용한 비모수적 two independent sample test인 Mann-Whitney U-test를 이용하여 분석하였으며, *p*-values가 0.05 이하인 경우 통계학적으로 유의한 것으로 평가하였다.

III. 결 과

가. 수지상세포의 분화 유도

5 mL의 Sprague-Dowley 말초혈액에서 Ficoll-Hypaque로 분리한 약 1×10^6 개의 단핵세포층을 얻어 14일간의 배양을 통하여 배양 용기 바닥에 부착하여 성장하는 수지상세포만을 선택적으로 지속 배양할 수 있었다. 배양 3-5일째 세포는 균락을 형성하여 증식하는 양상을 나타내었으며 기간이 지남에 따라 점차 다각형을 띄우며 증식하였고 최종적으로 섬유모세포와 유사한 형태를 보였다(Fig. 1). 배양 2주째 세포 표면 항원의 발현을 알아보기 위해 항 CD80, CD86 단클론항체와 반응시킨 후 유세포 분석기를 통하여 관찰한 결과 CD80/86(+/-)의 반응을 나타내 비성숙 수지상세포의 특성을 나타낼 수 있었다(Fig. 2).

나. 피부이식

피부이식을 시행했던 쥐들을 5개 그룹으로 나누어 이식피부의 생존 여부를 관찰한 결과, 제 1군은 이식 후 아무런 처치를 시행하지 않은 쥐들로서 조기 발적과 부종이 대개 수술 후 24시간 안에 관찰되었다. 이후 거부반응은 빠르게 진행하여 이후 2-4일 동안에 털이 소실

되고 가피 형성 및 궤양이 관찰되었고 피부의 부분적 괴사 소견이 나타나는 일련의 거부반응이 나타났으며 평균 생착기간은 5.8일이었다. 제 2군은 피부이식 6일 전에 ALS를 투여한 그룹으로 피부괴사가 일어나는 거부반응은 아무런 처치를 시행하지 않은 제 1군보다 더



Fig. 1. Experiment protocol. A peripheral blood dendritic cell is cultured from recipient SD. Then Lewis donor lymphocyte alloantigen-pulsed dendritic cell is reinjected into SD tail vein 1 week before skin graft.

디게 진행하였으나 1주일 이후 거부반응이 진행되어 평균 생착기간은 7.2일이었다. 제 3군은 피부이식 후 면역억제제 FK-506(2 mg/kg)을 투여한 그룹으로 평균 생착기간이 17.5일로 나타나 제 1군에 비해 생착기간이 현저히 증가하였으나, 면역억제제를 중지한 이후 갑자기 발적과 괴사가 나타나 이후 진행하는 거부반응을 막을 수 없었다. 제 4군은 이식 일주일 전에 수지상세포를 주입한 후 피부이식을 진행한 그룹으로 평균 생착기간은 12.2일로 나타나 제 1군보다는 거부반응이 지연되었으나 면역억제제를 투여한 군보다는 빨리 거부반응이 나타남을 알 수 있었다. 제 5군은 일주일 전에 수지상세포를 주입하고 이와 함께 피부이식 후 면역억제제 FK-506을 14일간 투여한 그룹으로서 평균 생착기간은 23.5일로 가장 길게 나타났으며, 이는 4개 대조군의 생착기간과 비교하여 통계학적으로도 유의적인 차이를 나타냈다($p < 0.05$, Table I, Fig. 3-5).

IV. 고 찰

피부이식술은 성형외과 영역에서 매우 광범위하게 시행되고 있는 술기로서 일반적인 피부이식술 외에 심한 조직손상이나 광범위한 화상 등으로 자가공여피부

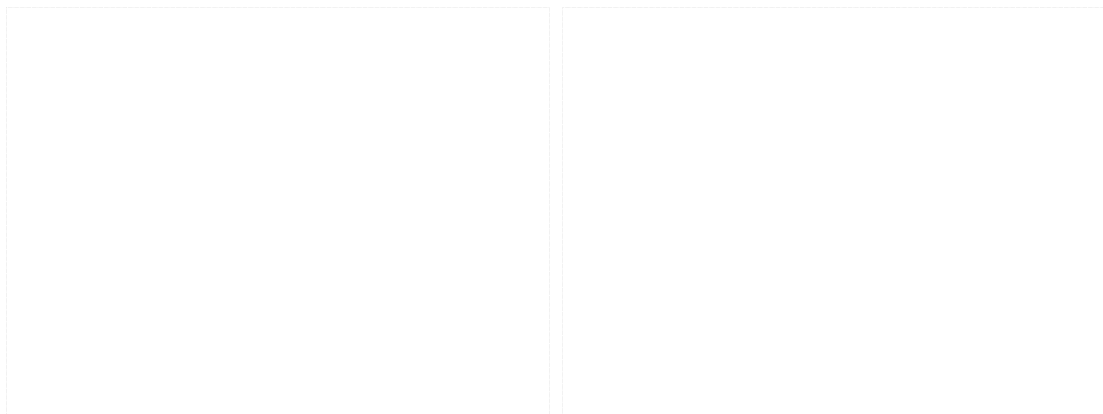


Fig. 2. (Left) Rat dendritic cell culture. (Right) Alloantigen-pulsed dendritic cell.

Table I. Survival Times of Skin Allografts and Mean Survival Times

Group	No. of grafts	Survival times(days)	Mean survival time(days)	*p-value
I	6	7, 5, 7, 6, 5, 5	5.8	< 0.01
II	6	8, 7, 9, 6, 7, 6	7.2	< 0.01
III	6	17, 19, 16, 18, 19, 16	17.5	< 0.05
IV	6	11, 12, 14, 11, 12, 13	12.2	< 0.05
V	6	21, 23, 24, 22, 26, 25	23.5	

* Mann-Whitney U-test(SPSS ver 15.0)

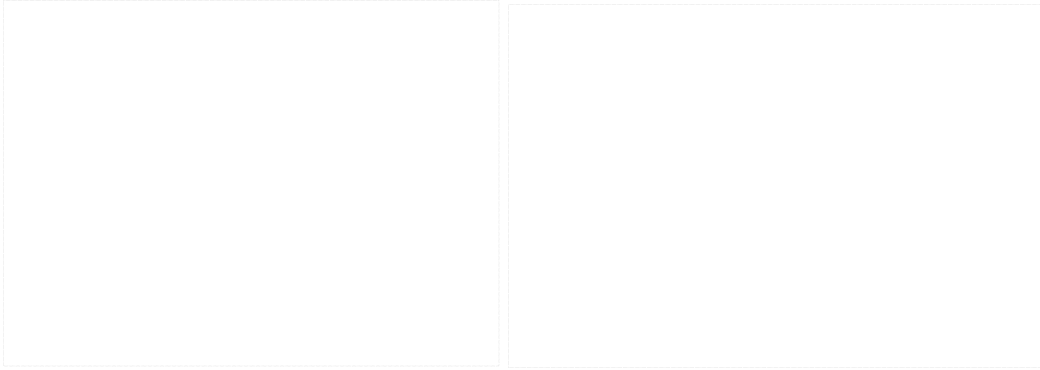


Fig. 3. Surface marker phenotype of rat blood derived dendritic cell.

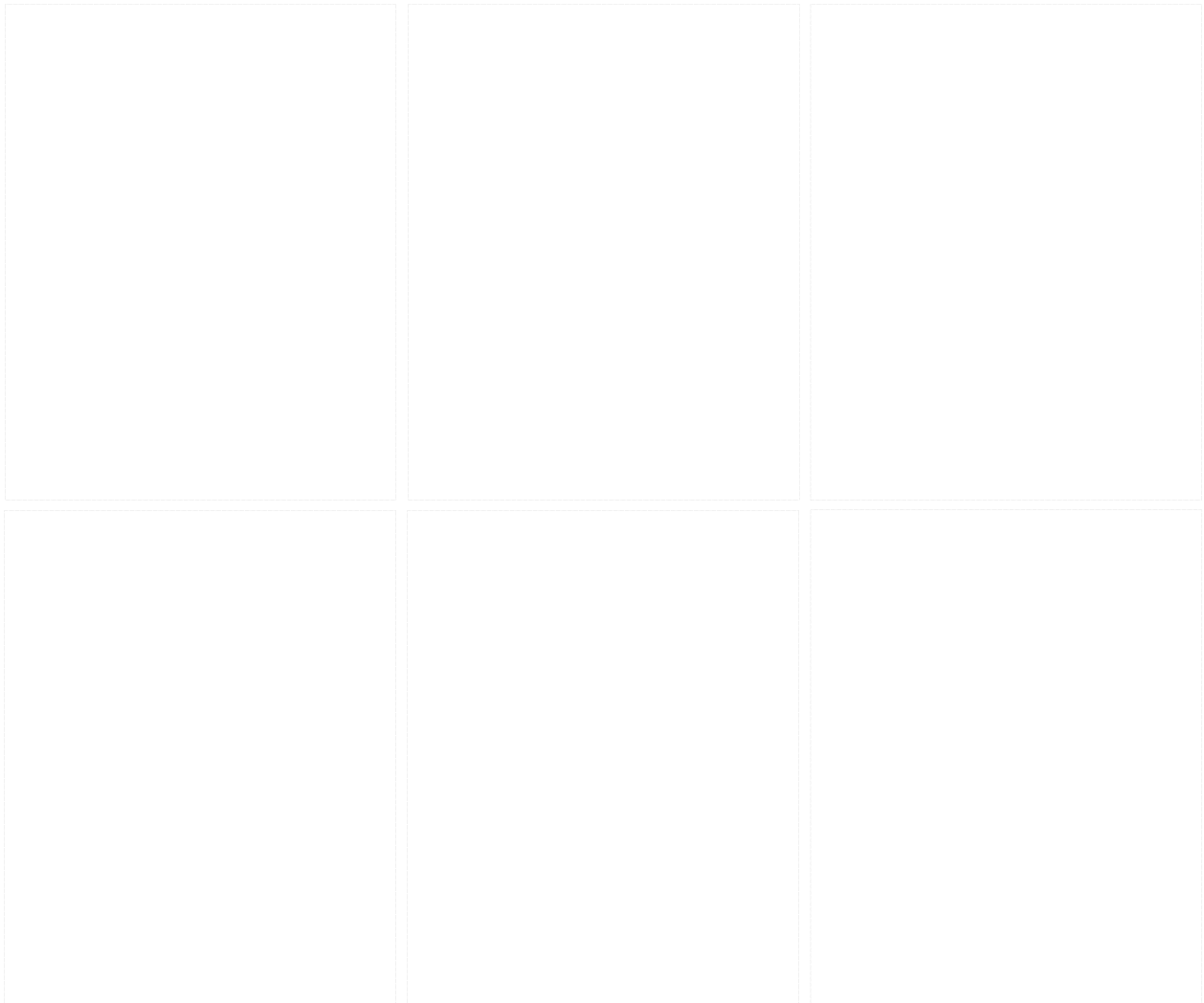


Fig. 4. (Above, left) Skin graft design on rat dorsum. Macroscopic view of a rat skin allograft rejection response from (Above, center) group I, (Above, right) group II, (Below, left) group III, (Below, center) group IV and (Below, right) group V.

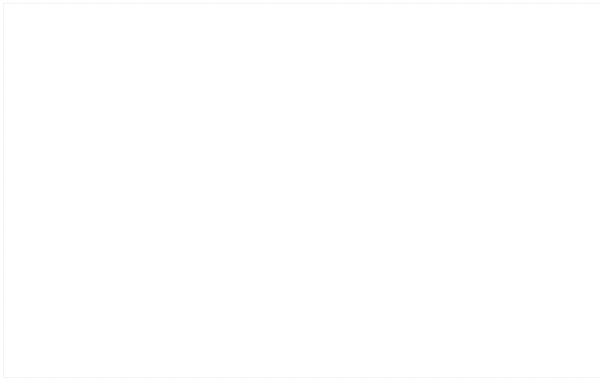


Fig. 5. Mean survival and standard deviation in each group. Survival was calculated as the number of days between skin graft and the first signs of rejection.

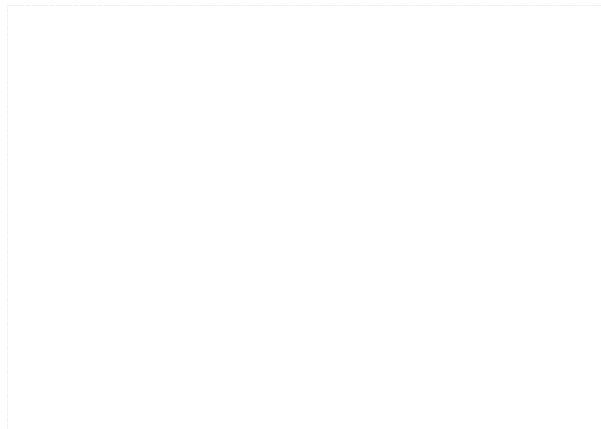


Fig. 6. Skin allograft survival times(mean and SD).

가 부족한 경우에 최근 자가상피세포 배양, 이종 및 동종이식 등이 연구되고 일부 사용되고 있는 실정이다. 자가상피세포 배양은 자가피부 일부를 채취하여 체외 배양하여 재이식함으로써 거부반응 없이 대치할 수 있는 좋은 방법이지만 배양기간이 다소 오래 소요된다는 단점이 있으며, 이종 피부이식은 동종이식시보다 거부반응이 훨씬 심하여 단지 생물학적 드레싱의 목적으로만 사용되고 있다. 피부 동종이식이란 동종의 다른 개체로부터 채취한 피부조직을 이식하는 것으로 최근 많은 연구가 거듭되고 있는 수술방법이다.

일반적으로 이러한 동종이식은 조직에 대한 면역반응이 강하게 일어나며 피부, 근육, 골, 연골의 순으로 나타나 피부에 대한 거부반응이 가장 심한 것으로 알려져 있는데, 피부조직은 주조직 복합유전자 복합체와는 별개의 피부 특이성 항원을 갖고 있어서 이러한 거부반응이 심하게 나타나는 것으로 알려져 있으며 표피에 있는 Langerhans세포가 수용자의 T세포를 자극하고 감각시

키는 중요한 요소라고 추정되고 있다.⁵ 이러한 거부반응을 억제하고 이식편의 생착기간을 연장하기 위하여 전신 방사선 조사를 시행하거나 steroid의 사용, 림프구 기능을 저하시킴으로서 세포성 면역을 저하시키기 위한 여러 가지 항암제의 사용, 항 림프구 혈청, 항 흉선 세포 혈청 등이 사용되어져 왔다.^{6,7}

최근에 새로이 개발된 항 림프성 면역억제제인 FK-506은 *Streptomyces tsukubansis*의 발효즙에서 추출하였으며 CsA(cyclosporine)보다 100배 정도 강력하고 부작용은 더 적은 것으로 알려져 있는 면역억제제이다. 이는 구조적으로는 CsA와 완전히 다르지만 작용기전은 비슷하며 CsA와 마찬가지로 T림프구에 특이성을 가져 IL-2 수용체와 IL-2, interferon, IL-3를 포함한 lymphokine의 분비를 억제한다.^{8,9}

최근에는 항원전달 능력이 대식세포보다 100배나 강한 수지상세포가 T림프구 면역반응의 내성 혹은 활성을 조절하는 것으로 알려져 있어 면역질환 치료 등 방면에서 연구대상으로 주목받고 있다. 수지상세포의 이러한 능력은 과거에서부터 잘 알려져 왔으나 배양하기 까다로워 면역치료에 이용하는 연구가 활발하게 진행되지 못했다. 하지만 1994년 Romani 등¹⁰이 말초혈액 단핵세포로부터 배양한 수지상세포가 조혈모세포에서 배양한 것과 기능적으로 차이가 없음을 보고하면서 다량의 수지상세포를 말초혈액으로부터 쉽게 배양할 수 있게 되었고 따라서 면역치료법에 이용하려는 연구가 활성화되었다.

1950년대 Bellinghan¹¹의 연구에서 처음으로 혈액 성분을 주입한 쥐의 이식피부의 면역거부반응이 현저하게 감소하는 것을 발견하였으며 이는 주입한 혈액에 포함된 일부 세포에 의해 적극적인 면역관용이 유도될 수 있음이 시사되었다. 또한 간이식 후 수용체로부터 유래한 수지상세포가 피부, 림프절, 혈액 등 다양한 장기에서 발견됨에 따라 장기이식 과정에서 키메리즘(chimerism)이 형성되는 것을 발견했다는 보고도 있으며, 이는 각 기관에 있던 면역세포들 중 일부가 흉선으로 유입되며 흉선을 통하여 공여자의 세포에 대한 면역관용이 유도되어 이식편의 생존을 증가시킨다고 알려져 있다.¹² 면역관용을 유도하기 위한 수지상세포의 배양은 본 실험의 유세포분석의 결과를 통해서도 나타났듯이 CD80/86(+/-)의 비성숙수지상세포의 특성을 유지해야 하며, 이는 APC(Antigen Presenting Cell)가 아닌 포획(Capture)과 가공(Processing)만을 담당하는 세포임을 의미한다. 이 비성숙수지상세포 또는 성숙저항성 수지상세포는 말초혈액 유래 줄기세포와 공통적인 특성을 많이 보유하고 있으며, 면역관용을 지속적으로 유도

하는 열쇠가 된다고 할 수 있다.^{2,4,13}

본 실험에서 동종 항원에 감각된 수지상세포 투여군에서 생착기간이 길어지고 거부반응이 지연된 것은 동종항원의 유입을 통해 혈액 내 미세 키메리즘(chimerism)이 형성되었고 이를 통하여 면역관용이 유도되었음을 짐작할 수 있다. 본 실험에서 피부동종이식의 생착기간의 기준은 저자에 따라 차이가 있지만 육안으로 이식 면적의 50-90%가 거부반응으로 인하여 표피 탈락, 궤양, 괴사 및 괴사를 보일 때를 거부반응의 시기로 판정하였다. 수지상세포를 주입하고 동시에 면역억제제인 FK-506을 함께 투여했던 제 5군이 생착기간 23.5일로 가장 거부반응이 늦게 나타난 것을 확인할 수 있었지만 수지상세포만을 투여한 제 4군에서는 생착기간 12.2일로 거부반응이 상대적으로 빨리 나타나 이식 후 초기에 면역억제제의 사용이 현 단계에서는 필수적임을 시사한다고 할 수 있다. 또한 수지상세포의 보다 많은 양적 증가 및 체내에 주입되었을 때 성숙과 과정을 차단함으로써 T세포의 무반응 상태를 보다 효율적으로 유도하는 기술이 발전되어야 함을 나타낸다고 할 수 있다.¹³⁻¹⁵

향후 동종이식은 인간의 병들고 손상된 신체 일부분을 정상적으로 대체할 수 있는 가장 적합한 방법으로 생각되며 앞으로 보다 향상된 면역억제제의 개발과 면역관용 유도기술을 통해 새로운 수술기법으로서의 발전을 기대해 본다.

V. 결 론

이상의 실험결과를 종합해 보면 동종피부이식에 있어서 술전 처치로 수용부에서 추출한 수지상세포를 동종공여항원에 감각시킨 후 재주입해 주는 면역관용유도라는 새로운 방법을 통해서 이식피부의 생착기간을 연장시킬 수 있음을 알 수 있었다. 따라서 이 방법은 앞으로 성형외과 영역에서 피부, 기관 및 복합조직의 동종이식에 유용하게 이용될 수 있으리라 생각된다.

REFERENCES

- White E, Hildeman WH: Allografts in genetically defined rats: difference in survival between kidney and skin. *Science* 162: 1293, 1968
- Lechler R, Ng WF, Steinman RM: Dendritic cell in transplantation-friend or foe? *Immunity* 14: 357, 2001
- Austyn JM, Phil MA: Dendritic cells. *Cur Opin Hematol* 5: 3, 1998
- Van Schooten WC, Strang G, Palathumpat V: Biological properties of dendritic cells: implications to their use in the treatment of cancer. *Mol Med Today* 3: 254, 1997
- Buttemeyer R, Jones NF, Min Z, Rao U: Rejection of the component tissues of limb allografts in rats immunosuppressed with FK-506 and cyclosporine. *Plast Reconstr Surg* 97: 139, 1996
- Hardin CA, Werder AA: A one year study of surviving homografted mouse skin. *Plast Reconstr Surg* 15: 107, 1955
- Bilingham RE, Krohn PL, Medawar PB: Effect of cortisone on survival of skin homografts in rabbits. *Br Med J* 1: 1157, 1951
- Goto T, Kino T, Hatanaka, Nishiyama M, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H: Discovery of FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces tsukubaensis*. *Transplant Proc* 19: 4, 1987
- Murase N, Starzl TE, Demetris AJ, Valdivia L, Tanabe M, Cramer D, Makowka L: Hamster-to-rat heart and liver xenotransplantation with FK-506 plus antiproliferative drugs. *Transplantation* 55: 701, 1993
- Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G: Proliferation dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 180: 83, 1994
- Billingham RE, Brent L, Medawar PB: Actively acquired tolerance of foreign cells. *Transplantation* 76: 1409, 2003
- Starzl TE, Demetris AJ, Trucco M, Ramos H, Zeevi A, Rudert WA, Kocova M, Ricordi C, Ildstad S, Murase N: Systemic chimerism in human female recipients of male livers. *Lancet* 340: 876, 1992
- Lee JE, Kang HK, Seoung EY, Yang SH, Kim SJ, Shin SJ, Kim YS, Lee JS, Kim S: The effects of maturation resistant donor dendritic cells on alloimmune response in mice. *Korean J Nephrol* 24: 514, 2005
- Coates PT, Thomson AW: Dendritic cells, tolerance induction and transplant outcome. *Am J Transplant* 2: 299, 2002
- Nguyen VT, Taieb A, Sacks JM, Unadkat JV, Clavijo JA, Kim H, Feili-Hariri M, Lee WP: Alloantigen-pulsed dendritic cells and composite tissue allograft survival. *Microsurgery* 27: 105, 2007

1. White E, Hildeman WH: Allografts in genetically defined rats: difference in survival between kidney