

말초혈액 자연살해세포가 증가된 반복유산 환자의 탈락막 자연살해세포의 발현

관동대학 의과대학 제일병원 산부인과¹, 고려대학교 의과대학 산부인과학교실²,
생식생물학물 불임연구실³, 진단병리과⁴, 임상병리과⁵

이현주¹ · 김선행^{2*} · 양광문¹ · 박동욱³ · 박찬우¹ · 홍성린⁴
조동희⁵ · 송인옥¹ · 궁미경¹ · 강인수¹

Expression of Decidual Natural Killer (NK) Cells in Recurrent Abortion Patients with Increased Peripheral NK Cells

Hyun Joo Lee¹, Sun Haeng Kim^{2*}, Kwang Moon Yang¹, Dong Wook Park³, Chan Woo Park¹,
Sung Ran Hong⁴, Dong Hee Cho⁵, In Ok Song¹, Mi Kyoung Koong¹, Inn Soo Kang¹

¹Department of Obstetrics & Gynecology, Cheil General Hospital & Women's Healthcare Center,

²Department of Obstetrics and Gynecology School of Medicine, Korea University,

³Laboratory of Reproductive Biology & Infertility, ⁴Department of Pathology,

⁵Department of Clinical Pathology

Objectives: The purpose of this study was to compare the decidual NK cell populations between increased pre-conceptional peripheral NK cell population and normal pre-conceptional peripheral NK cell population in women with a history of recurrent abortion.

Methods: Fourteen women with history of recurrent abortion and elevated pre-conceptional peripheral NK cell, above 15% of peripheral lymphocyte population were included in this study. As a control, twelve women with history of recurrent abortion and their peripheral NK cell percentage showed below 15% were included. Distribution of CD56⁺ and CD16⁺ NK cells in paraffin embedded decidual tissues including implantation sites were examined by immunohistochemical staining using anti-CD56, 16 monoclonal antibodies. After immunohistochemical staining, the numbers of decidual NK cells were counted and compared these results between study and control groups.

Results: There was significant difference in decidual CD56⁺ NK cell count (170.1±132.1 vs. 68.3±66.1, p=0.02) between increased peripheral CD56⁺ NK cell group and control group. But, there showed no statistically significant correlation between decidual CD56⁺ NK cell count and peripheral CD56⁺ NK cell percentage (r=0.229, p=0.261). Also there was no statistically difference decidual CD16⁺ NK cell count between study and control group (25.70±11.72 vs. 31.17±22.67), and no correlation between decidual CD16⁺ NK cell and peripheral CD16⁺ NK cell percentage (r=-1.40, p=0.535).

Conclusions: This study shows that decidual CD56⁺ NK cell are significantly increased in decidua of women exhibiting a history of recurrent abortion with increased CD56⁺ peripheral NK cell. This study suggests that the percentage of peripheral NK cell reflect the expression of decidual NK cell. Consequently, pre-conceptional peripheral blood NK cell population can be the useful marker for detecting the risk of subsequent miscarriage. [Korean. J. Reprod. Med. 2009; 36(3): 199-207.]

Key Words: Peripheral CD56⁺ NK cell, Decidual CD56⁺ NK cell, Recurrent abortion

반복유산 (recurrent spontaneous abortion, RSA)은 임신 20주 이전에 2번¹ 또는 3번 이상² 자연적으로 임신이 소실되는 경우를 말하며 전체 임신부의 약 1%의 빈도로 보고된다.³ 그 원인으로는 태아의 염색체 이상이 2.6~7.7%, 모체의 해부학적 이상이 15.4~27%, 내분비학적 요인이 5.1~35%, 면역학적 요인이 40%, 원인불명이 30~50%를 차지하고 있다.⁴

자연유산의 원인 중 하나로 거론되는 면역학적 요인은 자신의 세포 혹은 조직을 공격하는 특징을 가진 자가항체에 의한 자가면역과 유전적으로 반동종이식 (semi-allograft)인 배아를 공격하는 모체의 면역세포들로 이루어진 동종면역이 있는데 최근에는 동종면역 거부반응에 대한 연구 및 중요성이 점차 증가되고 있다. 한편 반복유산의 동종면역학적 기전에 관련된 면역세포는 자연살해세포 (Natural killer cell, NK cell), T 세포 (T cell), B 세포 (B cell), 대식세포 (Macrophage) 그리고 수지상세포 (Dendritic cell) 등이 있으며 이들의 세포는 각각 고유의 역할을 담당하면서 상호 보완 또는 경쟁적으로 작용하여 반이소성 태아에 대한 모체의 면역 거부 및 면역 관용에 효과적인 역할을 수행한다.⁵ 반복유산의 동종면역의 기전으로 자연살해세포의 역할에 대한 보고가 여러 연구자에 의해 제시되었는데, Aoki 등 (1995)은 반복적으로 유산을 경험한 여성에서 말초혈액 자연살해세포 (peripheral blood natural killer cell, pNK cell)가 증가되어 있음을 관찰하였으며, 임신 전에 말초혈액 자연살해세포가 증가되어 있는 경우 다음 임신 시에도 유산이 될 가능성이 높다고 보고하였다.⁶ Yamada 등 (2003)은 화학적 임신이나 유산이 되는 환자군에서 정상적으로 분만을 하는군 보다 임신 전 말초혈액 자연살해세포가 높아져 있다고 보고하였고,⁷ Perricone 등 (2006)은 건강한 비임신 상태의 여성보다 반복유산군의 비임신 상태의 여성이 말초혈액 자연살해세포가 증가되어 있음을 보고하였다.⁸

하지만 여러 연구에도 불구하고 말초혈액 자연살해세포의 증가가 태아의 소실을 초래하는 기전

에 대해서는 이견이 많고 고려해야될 점이 많다. 태아의 용모막세포와 모체 혈액간의 태반장벽의 존재와, 말초혈액 자연살해세포의 표적세포에 대한 직접적인 영향에 대한 연구가 부족한 점, 또한 대부분이 생체의 실험의 결과라는 점등이 말초혈액 자연살해세포의 증가가 반복유산의 직접적인 원인으로 인식되는데 한계점이 되어 왔다. 따라서 extravillous trophoblast와 직접 접하게 되는 자궁 내 탈락막의 면역세포의 대부분 (75% 이상)을 차지하는 자궁 내 자연살해세포의 역할 및 그 기원에 대한 연구가 반복유산과의 연관성 하에 많은 연구자들에 의해 시행되었다.

말초혈액 자연살해세포의 대부분이 CD56, CD16 marker를 발현하고 강한 세포독성 (cytotoxicity)을 가지는데 비해^{9,10} 자궁 자연살해세포는 CD56 marker를 강하게 발현하며 CD16 marker를 발현하지 않으며, 세포독성은 약하며 다양한 종류의 싸이토카인을 분비한다.^{11,12} 자궁 자연살해세포는 생리 주기에 따라 그 수와 비율이 변하여 배란 전의 증식기에는 거의 보이지 않다가 배란 후 중기 황체기에 증가하기 시작하여 후기 분비기에 가장 많이 보인다.¹³ 임신이 되지 않고 생리가 시작되려 하면 자궁 자연살해세포는 세포자멸사 (apoptosis)와 유사한 변화를 보이며 거의 관찰되지 않지만 임신이 될 경우 지속적으로 존재하여 태반이 형성되는 임신 초기에는 탈락막 전체 림프구의 약 70%를 이루며 임신 20주 이후에는 감소하기 시작하여 임신 말기에는 관찰되지 않는다.¹⁴ 또한, 자궁 자연살해세포는 초기 태반형성에 관여하여 반복 착상실패 (recurrent implantation failure), 반복 자연유산 (recurrent spontaneous abortion), 전자간증 (preeclampsia) 등에 관계되어 있을 것이라는 여러 가설¹⁵들이 발표되기는 하지만 검체채취의 윤리성과 검사방법의 어려움으로 아직까지 이에 대한 연구가 쉽지 않은 실정이다.

한편 자궁 내 자연살해세포는 그 기원에 있어 첫째, 말초혈액 자연살해세포가 배란 시기와 임신 초기에 용모세포 및 자궁내막세포에 화학적 물질 (chemokine) 및 세포 접착 물질 (cell adhesion mole-

cule)의 작용에 의해 자궁 내로 이동하며 그 표현형이 세포독성이 강한 CD56^{dim}CD16⁺에서 세포독성이 약하고 사이토카인 등 용모막 침습과 혈관 생성에 필수적인 물질을 분비하는 역할을 가진 CD56^{bright}16⁻ 세포로 진화한다는 것과 이 시기에 불완전한 진화와 동반된 말초혈액 자연살해세포의 자궁 내로의 이동은 반복유산의 원인이 된다는 설, 둘째, 혈액 내의 전구세포에서 기원한다는 설, 셋째, 임파구 내의 CD56^{bright}16⁻ 자연살해세포가 이동한다는 설, 넷째, 줄기세포에서의 기원설 등 여러 가지 학설이 제시되었는데 이 중 말초혈액의 자연살해세포의 기원 및 진화에 관한 학설이 가장 많이 연구되어 왔다.¹⁶⁻¹⁹

따라서 본 연구에서는 말초혈액의 자연살해세포가 증가된 경우 자궁 내로 이동하는 자연살해세포의 수적 증가가 있으며 특별히 세포독성이 없는 표현형으로의 진화가 부진한 경우 반복유산의 원인이 된다는 가설하에 반복 자연유산 환자에서 자궁 내 탈락막 자연살해세포의 발현양상을 관찰하여 그 양상이 말초혈액 자연살해세포의 증가 양상과 어떠한 관련이 있는지를 보고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

2005년 3월 1일부터 2008년 6월 30일까지 관동 의대 제일병원 습관성 유산 클리닉을 방문한 여성 중 임신 20주 이전에 2번 이상의 반복유산을 경험한 유산 환자를 대상으로 하였다. 습관성유산의 원인을 규명하기 위한 여러 가지 검사 (자궁난관 조영술, 복강경 및 자궁경 검사, 자궁경부 균 배양검사, 부부염색체 검사, 자가항체검사 (anticardiolipin antibody, antinuclear antibody, antimicrosomal antibody, antithyroglobulin antibody, lupus anticoagulant), 동종면역 진단을 위한 말초혈액 자연살해세포의 백분율 측정, 배란 7일 후 황체호르몬 검사, 자궁내막검사를 시행하여 그 중 원인이 자연살해세포의 증가에 기인한 면역학적 요인의 경우를 실험군에 포함하

였다. 자연살해세포의 증가에 의한 반복유산 진단 시 정의는 임신 전 말초혈액을 채취하고 자연살해세포의 백분율을 측정하여 15% 이상이 되는 경우로 정의하였다.²⁰ 반복유산 진단 후 임신 6~12주 사이에 다시 계류유산이 된 환자들을 대상으로 자궁경부 확장 배출술과 배아염색체 검사를 시행하였고 이 중 임신 전 말초혈액 자연살해세포의 백분율이 15% 이상 증가된 14명을 실험군으로 선택하였으며, 대조군으로는 같은 검사를 시행한 군 가운데 말초혈액에서 자연살해세포의 백분율이 15% 미만인 12명을 포함하였다. 이들의 계류유산 검체에서 착상부위를 포함한 자궁 탈락막 조직을 확인하고, 탈락막 조직이 매우 작거나 용모만 있는 경우 그리고 내막 조직만 있는 경우는 연구에서 제외하였다. 이 연구는 제일병원의 연구 윤리 위원회의 심의를 거쳐 수행되었다.

2. 말초혈액 자연살해세포 이형검사 (peripheral NK cell subtype test)

각각의 환자로부터 말초혈액 10 ml를 채취한 후 F-H gradient solution 2000 μ l를 이용하여 림프구나 큰 단핵세포를 세척, 분리하였다. CD16⁺ 및 CD56⁺ 자연살해세포에 간접 형광염색하여 유세포 분석기 (FACscan Becton-Dickinson Co, mautainview, USA)를 사용하여 분석하였다. 항체는 CD16⁺FITC/CD56⁺ PE를 사용하였다. 간접 형광염색법에서는 모두 FITCIgG1/PE-IgG2를 음성 대조물질로 사용하였다. 즉, sodium heparin 진공시험관에 채취한 전혈 50 μ l에 형광색소가 부착된 해당 세포의 항체 20 μ l를 첨가하고 잘 혼합한 후 실온 암소에서 15분간 반응시켰다. 적혈구 용혈용액 2 ml를 넣고 소용돌이 반응 (vortex)를 시키고 실온 암소에서 10분간 반응시켰다. 5분간 원심 분리하여 상층액은 버리고 PBS로 1회 세척한 후 1% paraformaldehyde 용액을 넣어 잘 섞어준 후 분석에 사용하였다. 결과 분석은 LYSISTMII sort program 을 이용하였으며 백분율을 구하였다.

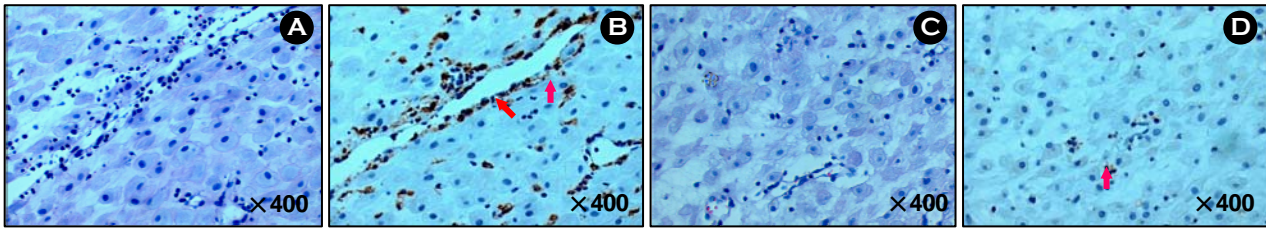


Figure 1. Immunohistochemical staining for CD56⁺ NK cells in deciduas. Red arrows indicate positive stained CD56⁺ NK cells. (A), H-E staining in decidua of study group; (B), anti-CD56 positive staining in serial section of (A); (C) H-E staining in decidua of control group; (D), anti-CD56 positive staining in serial section of (C).

Hyun Joo Lee. Expression of Decidual Natural Killer (NK) Cells in Recurrent Abortion Patients with Increased Peripheral NK Cells. Korean J Reprod Med 2009.

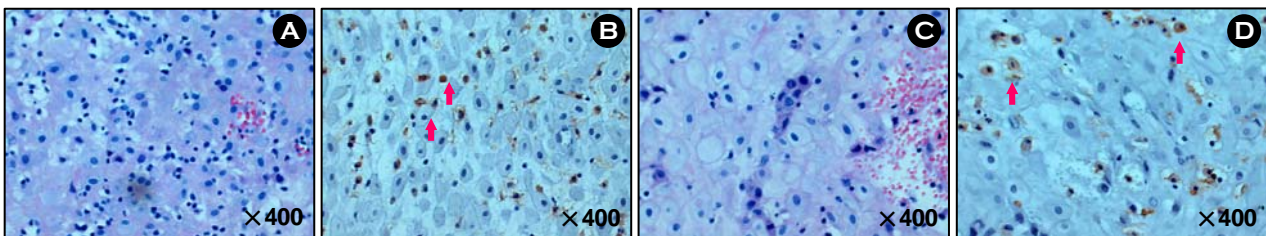


Figure 2. Immunohistochemical staining for CD16⁺ NK cells in deciduas. Red arrows indicate positive stained CD16⁺ NK cells. (A), H-E staining in decidua of study group; (B), anti-CD16 positive staining in serial section of (A); (C) H-E staining in decidua of control group; (D), anti-CD16 positive staining in serial section of (C).

Hyun Joo Lee. Expression of Decidual Natural Killer (NK) Cells in Recurrent Abortion Patients with Increased Peripheral NK Cells. Korean J Reprod Med 2009.

3. 탈락막 자연살해세포의 아형검사 (Decidual NK cell subtype test)

1) 탈락막 자연살해세포의 면역조직화학염색 (Immunohistochemical staining)

(1) 조직 선택

계류유산된 연구대상에서 자궁경부 확장배출술로 얻은 조직을 formalin으로 고정 후 paraffin으로 포매한 (embed) 검체를 대상으로, hematoxylin-eosin으로 염색하여 착상부위의 탈락막을 확인하였다.

(2) 면역조직화학염색

연구에 사용한 일차 항체로는 CD56과 CD16에 대한 mouse monoclonal antibody인 항체 (novocastraTM, Vision BioSystems Ltd.)를 1:200으로 희석하여 이용하였다.

대표적인 조직절편을 선택한 후 5 μm 두께로 잘라 xylene으로 탈파라핀화 (deparafinization)를 하고

graded alcohol로 rehydration을 했다. 10 mM citrate buffer (pH 6.0)에서 5분간 microwave를 이용하여 항원을 추출하고, 1차 항체를 4시간 동안 반응시킨 후 LSAB kit과 DAB solution (DAKO cytomation, Carpinteria, CA)을 이용하여 발색시켰다.

(3) 면역조직화학염색의 판독

검경은 400배 배율로 탈락막 부위 4부위를 검경하여 갈색으로 염색된 CD56 양성 반응, CD16 양성 반응 세포의 수를 각각 세었다. 한편, 판독 시 가능한 개인의 오차범위를 최대한 줄이기 위해 숙련된 병리학전공 의사와 각각 분리하여 2회 실시 후 그 결과를 처리하였다 (Figure 1, Figure 2).

2) 통계학적 분석

연구 결과는 SPSS version 12.0 통계 패키지 (Windows, Microsoft.WA, U.S.A)를 사용하여 통계학적으로 분석하였다. 두 군간의 비교는 Student's t-test를 이용하였고 상관관계에는 Pearson's corre-

Table 1. Characteristics of patients with elevated peripheral NK cell group and normal peripheral NK cell group

	Peripheral NK cell <15%	Peripheral NK cell ≥15%	Significance
Age (years)	32.0±2.8	33.4±3.6 ^a	NS ^b
Gravidity	3.6±1.8	2.7±0.7	NS
Parity	0.2±0.4	0.1±0.3	NS
No. of SA ^c	3.0±1.4	2.4±0.7	NS
Peripheral CD56 ⁺ NK cell	12.3±1.8	24.3±6.3	p<0.00
Peripheral CD16 ⁺ NK cell	10.4±3.9	18.4±7.2	p=0.004

a; mean ± SD (standard deviation) b; NS, not significant c; SA, spontaneous abortion
p<0.05 mean significant

Hyun Joo Lee. Expression of Decidual Natural Killer (NK) Cells in Recurrent Abortion Patients with Increased Peripheral NK Cells. Korean J Reprod Med 2009.

lation test를 이용하였다. p<0.05인 경우 통계적으로 유의하다고 정의하였다.

결 과

1. 대상 환자의 특성

말초혈액의 CD56⁺CD16⁺ NK cell이 증가되어 있는 반복유산균 14명과 증가되지 않은 반복유산균 12명의 환자군 사이에는 평균 연령 (33.4±3.6, 32.0±2.8), 임신력 (2.7±0.7, 3.6±1.8), 출산력 (0.1±0.3, 0.2±0.4), 평균 자연유산 횟수 (2.4±0.7, 3.0±1.4)에 차이가 없었고 말초혈액 CD56⁺ 자연살해세포의 평균은 각각 24.3±6.3, 12.3±1.8(%)이고 CD16⁺의 평균은 각각 18.4±7.2, 10.4±3.9(%)이었다 (Table 1).

2. 탈락막 조직에서의 면역염색

말초혈액 자연살해세포가 증가되어 있는 반복유산 환자군과 대조군 사이에 탈락막 CD56⁺ 자연살해세포의 숫자에 있어 말초혈액 자연살해세포가 증가된 군에서 170.1±132.1이며 대조군에서 68.3±66.1를 보여 통계적으로 유의한 차이를 보였다 (p=0.02, Figure 3). 반면, 탈락막 조직의 CD16⁺ 자연살해세포는 말초혈액 자연살해세포가 증가된 군과 대조군 사이에 유의한 차이를 볼 수는 없었다 (25.70±11.72 vs. 31.17±22.67, p=0.49, Figure 4).

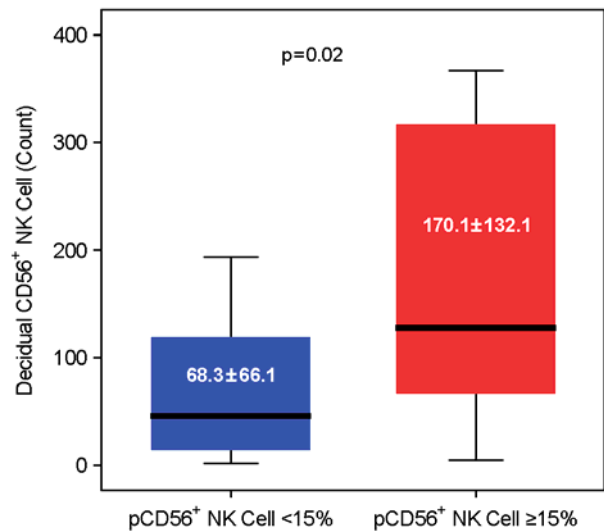


Figure 3. Comparison of total count of decidual CD56⁺ NK cell in each group. Box and whisker plot showing quantification of total decidual CD56⁺ NK cells. Mean values represented in each boxes (p=0.02).

Hyun Joo Lee. Expression of Decidual Natural Killer (NK) Cells in Recurrent Abortion Patients with Increased Peripheral NK Cells. Korean J Reprod Med 2009.

3. 말초혈액 자연살해세포와 탈락막 자연살해세포의 상관관계

말초혈액 자연살해세포와 탈락막 자연살해세포와의 상관관계 분석 결과, 말초혈액 CD56⁺ 자연살해세포의 백분율과 자궁 내 CD56⁺ 자연살해세포의 총 수와는 직접적인 상관관계를 볼 수 없었다

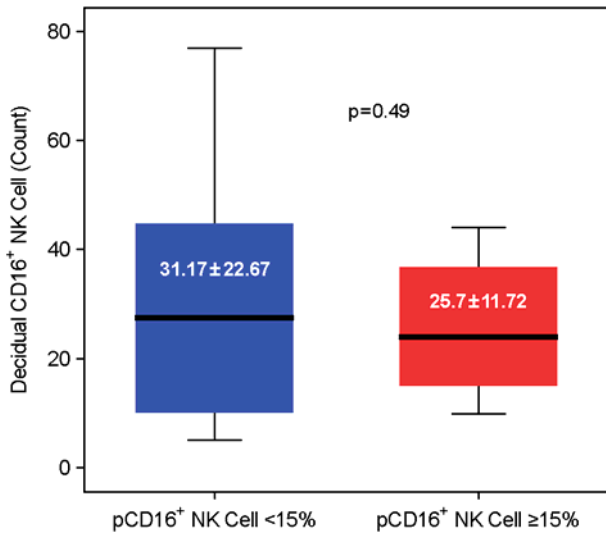


Figure 4. Comparison of total count of decidual CD16⁺ NK cell in each group. Box and whisker plot showing quantification of total decidual CD16⁺ NK cells. Mean values represented in each boxes (p=0.49).

Hyun Joo Lee. Expression of Decidual Natural Killer (NK) Cells in Recurrent Abortion Patients with Increased Peripheral NK Cells. Korean J Reprod Med 2009.

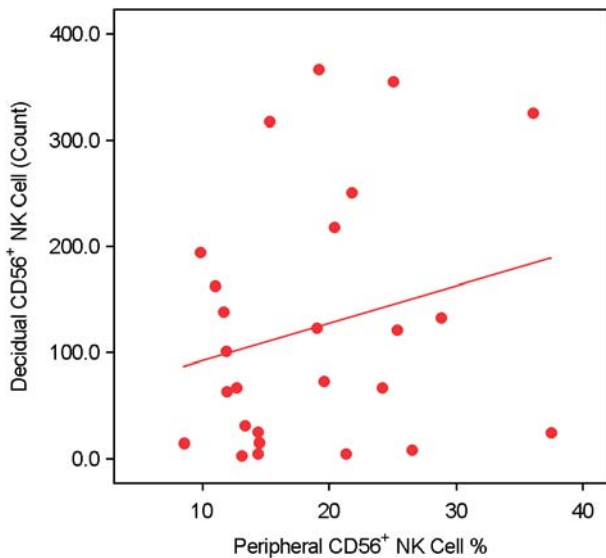


Figure 5. Correlation between decidual CD56⁺ NK cell and peripheral CD56⁺ NK cell. Scatter plot showing positive correlation between the peripheral and decidual CD56⁺ NK cell population, which was not statistically significant Pearson's correlation coefficient (r)=0.229, r²=0.052, p=0.261

Hyun Joo Lee. Expression of Decidual Natural Killer (NK) Cells in Recurrent Abortion Patients with Increased Peripheral NK Cells. Korean J Reprod Med 2009.

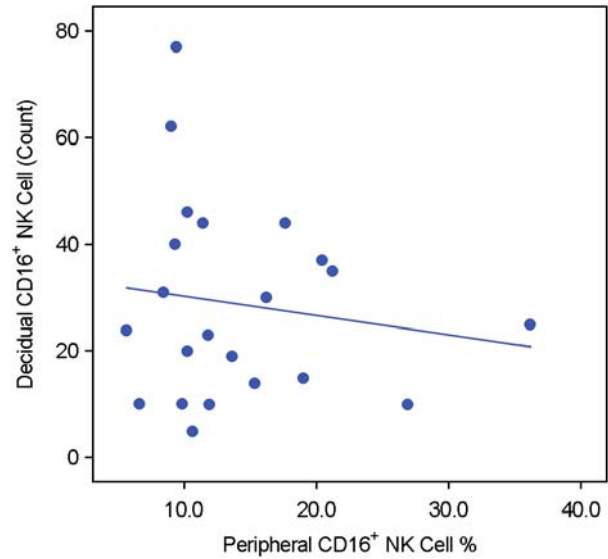


Figure 6. Correlation between decidual CD16⁺ NK cell and peripheral CD16⁺ NK cell. Scatter plot showing negative correlation between the peripheral and decidual CD16⁺ NK cell population, which was not statistically significant Pearson's correlation coefficient (r)=-1.40, r²=0.02, p=0.535

Hyun Joo Lee. Expression of Decidual Natural Killer (NK) Cells in Recurrent Abortion Patients with Increased Peripheral NK Cells. Korean J Reprod Med 2009.

(r=0.229, p=0.261, Figure 5).

또한 말초혈액 CD16⁺ 자연살해세포와 탈락막 CD16⁺ 자연살해세포와도 통계적으로 유의한 상관관계가 없었다 (r=-1.40, p=0.535, Figure 6).

고 찰

NK cell은 선천면역계 (innate immune system)의 핵심적인 요소로서 각종 바이러스, 박테리아와 같은 외부항원들에 대응하여 초기의 면역반응을 유발하는데 중요한 역할을 하며, 표적세포에 대한 세포 살해기능 및 cytokine을 포함한 여러 가지 단백질을 분비하는 기능을 갖고 있다.^{9,10}

말초혈액 자연살해세포 (peripheral NK cell)는 혈액 내 백혈구의 10% 정도를 차지하며 유세포 분석에서 대부분이 CD56 marker가 약하게 염색되며 CD16 marker가 양성인 세포 (CD56^{dim}CD16⁺)소견을 보이며 강한 세포독성을 가지는 것으로 알려져 있

다. 하지만 말초혈액 NK cell의 일부 (5% 미만)의 경우 CD56 marker가 강하게 나타나는 반면 CD16 marker가 보이지 않는 세포 (CD56^{bright}CD16⁻)가 관찰되는데 이들은 세포독성은 거의 없으며 여러 종류의 cytokine을 분비하는 기능이 있는 것으로 보고되었다.^{9~12} 말초혈액 NK cell과 습관성 유산과의 관련성에 대해서는 여러 논문이 발표되었는데, Kwak (1995) 등은 RSA 환자의 임신 전과 임신 중 말초혈액을 관찰하여 CD56⁺CD16⁺ NK cell이 정상군에 비해서 증가되었음을 보고하였고, 임신 전 말초혈액 자연살해세포의 활동성 (NK cell activity)의 증가를 보이는 반복유산 환자에서 다음 임신 시 유산율이 유의하게 높음을 보고하였다.²¹ Yamada (2003) 등은 말초혈액 내 CD56⁺ NK cell의 activity와 백분율을 각각 46%와 16.4%로 Cut-off value를 정했을 때 화학적 임신 및 자연유산의 위험도가 3.6배 및 4.9배로 증가한다고 보고하였으며,⁷ 차 등 (2005)²⁰은 말초혈액 CD56⁺ NK cell 백분율 15%를 cut-off value로 하여 조사해 본 결과 반복유산을 진단하는 sensitivity와 specificity가 각각 68.8%, 92.9%이며 위험도는 3.4배 증가한다고 보고하였으며²⁰ 저자들은 위 논문을 본 실험의 실험군과 대조군의 설정의 기준으로 정하였다.

자궁 내 NK cell은 CD56 marker 뿐 아니라 CD9를 일정하게 발현하며,²² 태아의 융모막세포와의 결합에 작용하는 KIR 수용체 (CD19)를 특징적으로 발현하는 것으로 알려져 있다. 즉, 태아의 extravillous trophoblast의 nonclassical MHC Ib와 상호작용하여 국소적 면역 관용 (local immune tolerance) 상태를 만들어 융모막세포의 침윤을 가능하게 한다. 이러한 Semi-allograft인 배아의 착상을 가능하게 하는 탈락막의 CD56⁺CD16⁻ NK cell은 비임신 시나 증식기에는 관찰되지 않다가 착상을 준비하는 후기 분비기나 태반이 형성되는 초기 임신 시에 급격히 증가하여 그 기원과 분화에 관해서 여러 가지 가설이 제시되고 있다. 즉, 자궁 내 NK cell의 기원에 대한 가설에는 혈액 내의 전구세포 (progenitor cell)에서 기원한다는 설²²과 줄기세포 (stem cell)

에서 기원한다는 설 등의 여러 가지 의견이 있지만, 현재로서는 말초혈액 NK cell에서 자궁 내로 이동, 분화한다는 연구 결과에 무게가 실리고 있다. Heuvel 등 (2008)은 circulating CD56⁺ NK cell은 배란기 및 임신 초기의 두 기간에 걸쳐 자궁조직으로 이동하는데 첫째는 배란 시기의 호르몬에 영향에 의한 CXCR3 ligand를 통하여 두 번째는 trophoblast에서 분비하는 SDF-1b가 NK cell의 CXCR4 ligand에 작용하는 것과 같은 화학주성을 통하여 이루어진다고 보고하였다.¹⁶ 한편, Xia Wu 등 (2005)은 임신 제 1분기 시 탈락막의 CD56^{bright}CD16⁻ NK cell은 CXCR4, CXCR3라는 receptor를 발현한다고 하였으며 trophoblast는 그의 ligand인 CXCL12/stromal cell-derived factor 1을 발현하여 NK cell의 이동을 유도하는 세포주화성인자 (chemoattractors)로서 작용한다고 하였다.¹⁷ 다른 연구에 의하면 Claudia Carlino 등 (2008)은 임신 제 1분기의 말초혈액 NK cell이 receptor들을 비임신 시의 여성이나 남성보다 더 많이 발현하며 이동능력이 더 높다고 보고하였으며,¹⁸ 또한 Keskin 등 (2007)은 배양된 탈락막 기질세포에서 분비되는 TGF-β가 말초혈액 유래 CD16⁺ NK cell을 CD16⁻ NK cell로 분화시킴을 보고하였다.¹⁹

결과적으로 다수의 연구 결과가 말초혈액 NK cell이 임신 시 탈락막과 trophoblast가 분비하는 여러 사이토카인에 반응하여 자궁 내로 이동한다는 가설 즉, 임신 시 자궁내막에 존재하는 낮은 세포독성을 갖는 CD16⁻ NK cell의 기원이 말초혈액의 CD16⁺ NK cell임을 시사한다. 본 연구에서는 말초혈액 NK cell이 증가되어 있는 반복유산 환자에서 자궁 내 NK cell의 수를 분석하였다. 그 결과 말초혈액과 탈락막의 NK cell 수간의 일치되는 상관관계를 볼 수는 없었고, 탈락막 내 CD16⁺를 가진 NK cell의 수는 말초혈액에서 검사된 CD16⁺의 수와는 상관관계 또한 볼 수 없었으나 이는 자궁내막의 NK cell의 대부분이 CD56⁺CD16⁻인 점을 본다면 말초혈액에서 자궁내막 조직으로 침습한 CD56⁺CD16⁺ NK cell이 여러 요인에 의해 CD56⁺CD16⁻ NK cell로 분화되어 CD16⁺ 표현형의 경우 상관관

계를 관찰할 수 없었던 것이 아닌가 유추해 볼 수 있다.¹⁹ 반면, 말초혈액 CD56⁺ NK cell이 증가되어 있는 군에서 자궁 내 CD56⁺ NK cell이 유의하게 증가되어 있는 결과를 볼 수 있었으며, 이는 말초혈액의 NK cell이 자궁 내 탈락막의 NK cell의 발현을 반영한다고 볼 수 있다.

본 연구에서는 연구대상군과 대조군에서 염색체 정상인 군과 비정상인 군을 따로 분류하지 않은 상태에서 실험을 진행하였으며 통계분석 결과에서도 염색체가 정상인 군과 비정상인 군간에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다. 이는 태아 염색체 이상이 있는 군에서도 말초혈액 NK cell의 백분율이 높으면 면역학적 요인이 있다고 분류하였기 때문이다.

결론적으로, 말초혈액 CD56⁺ NK cell의 백분율이 높은 반복유산 환자군에서 자궁 내 CD56⁺ NK cell도 역시 증가되어 있다는 본 연구의 결과는, 말초혈액의 NK cell의 백분율이 자궁 내 NK cell의 발현을 반영한다는 근거를 마련해 주는 연구라 볼 수 있다. 하지만 이미 밝혀진 NK cell의 다른 marker들을 비롯하여 염색체 이상이 면역학적 기전에 미치는 영향을 배제하지 않은 것은 본 연구의 한계점이라 할 수 있으며, 연구대상군의 수가 많아져 말초혈액과 탈락막 NK cell간의 상관관계를 볼 수 있다면 말초혈액의 NK cell이 자궁 내 탈락막 NK cell의 기원이라는 가설을 뒷받침할 수 있을 것이라 본다. 앞으로도 본 연구를 뒷받침하는 반복유산의 동종면역학적 요인인 NK cell의 기원과 세포살해능, 분비능에 관한 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

참 고 문 헌

- Hogge WA, Byrnes AL, Lanasa MC, Surti U. The clinical use of karyotyping spontaneous abortions. *Am J Obstet Gynecol* 2003; 189: 397-400.
- Hannes M, Engler J, Gotlieb W, Dupont E. Recurrent spontaneous miscarriage. *Rev Med Brus* 1992; 13: 103-6.
- Regan L. Recurrent miscarriage. *Br Med J* 1991; 302: 543-4.
- Stray-Pedersen B, Stray-Pedersen S. Etiologic factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion. *Am J Obstet Gynecol* 1984; 148: 140-6.
- Choudhury SR, Knapp LA. Human reproductive failure I: Immunological factors. *Hum Reprod Update* 2001; 7: 113-34.
- Aoki K, Kajiura S, Matsumoto Y, Ogasawara M, Okada S, Yagami Y, et al. Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet* 1995; 345: 1340-2.
- Yamada H, Morikawa M, Kato EH, Shimada S, Kobashi G, Minakami H, et al. Preconceptional natural killer cell activity and percentage as predictors of biochemical pregnancy and spontaneous abortion with normal chromosome karyotype. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50: 351-4.
- Perricone R, Muzio G, Perricone C, Ciacomelli R, De Nardo D, Fontanna L, et al. High levels of peripheral blood NK cells in women suffering from recurrent spontaneous abortion are reverted from high-dose intravenous immunoglobulins. *Am J Reprod Immunol* 2006; 55: 232-9.
- Lanier LL, Le AM, Ding A, Evans EL, Krensky AM, Clayberger C, Phillips JH. Expression of Leu-19 (NKH-1) antigen on IL2-dependent cytotoxic and non-cytotoxic T cell lines. *J Immunol* 1987; 138: 2019-23.
- Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; 22: 633-40.
- Orange JS, Ballas ZK. Natural killer cells in human health and disease. *Clin Immunol* 2006; 118: 1-10.
- Cooper MA, Fehniger TA, Turner SC, Chen KS, Ghaheri BA, Ghayur T, et al. Human natural killer cells: a unique innate immunoregulatory role for the CD56(bright) subset. *Blood* 2001; 97: 3146-51.
- King A, Burrows T, Verma S, Hiby S, Loke YW. Human uterine leukocytes. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 480-5.
- Trundle A, Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 2004; 63: 1-12.
- Loke YW, King A. Human implantation: cell biology and immunology. Cambridge: Cambridge University Press 1995; 256-61.
- van den Heuvel MM, Hatta K, Peralta CG, Han VK, Clark DA. CD56⁺ cells are recruited to the uterus in two waves: at ovulation and during the first 2 weeks after missed menses.

- Am J Reprod Immunol 2008; 59: 90-8.
17. Xia Wu, Li-Ping Jin, Min-Min Yuan, Ying Zhu, Ming-Yan Wang, Da-Jin Li. Human first-trimester trophoblast cells recruit CD56^{bright} CD16⁻ NK cells into deciduas by way of expressing and secreting of CXCL12/stromal cell-derived factor 1. The Journal of Immunology 2005; 175: 61-8.
 18. Carlino C, Stabile H, Morrone S, Bulla R, Soriani A, Agostinis C, et al. Recruitment of circulating NK cells through decidual tissues: a possible mechanism controlling NK cell accumulation in the uterus during early pregnancy. Blood 2008; 111: 3108-115.
 19. Keskin DB, Allan DSJ, Rybalov B, Andzelm MM, Stern JNH, Kopcow HD, et al. TGF β promotes conversion of CD16⁺ peripheral blood NK cells into CD16⁻ NK cells with similarities to decidual NK cells. PNAS 2007; 104: 3378-83.
 20. 차선화, 김해숙, 김혜옥, 송인옥, 유근재, 궁미경, 강인수, 양광문. 습관성 유산 환자에서 저용량 면역 글로블린 치료와 말초혈액 내 Natural Killer(NK) 세포의 임계치에 관한 연구. Kor J Fertil Steril 2005; 132: 217-22.
 21. Kwak JY, Beaman KD, Gilman-Sachs A, Ruiz JE, Schewitz D, Beer AE. Up-regulated expression of CD56⁺, CD56⁺ / CD16⁺, and CD19⁺ cells in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses. Am J Reprod Immunol 1995; 34: 93-9.
 21. Moffett-King A. Natural killer cells and pregnancy. Nat Rev Immunol 2002; 2: 656-63.
 22. Chantakru S, Miller C, Roach LE, Kuziel WA, Maeda N, Wang WC, et al. Contributions from self-renewal and trafficking to the uterine NK cell population of early pregnancy. J Immunol 2002; 168: 22-8.

= 국문초록 =

목 적: 말초혈액 자연살해세포가 증가된 반복유산 환자군과 증가되지 않은 반복유산 환자군에서 다음 번 유산 시 탈락막의 자연살해세포의 발현양상을 관찰하여 말초혈액 자연살해세포와 상관관계가 있는지 보고자 하였다.

연구방법: 말초혈액 자연살해세포가 15% 이상 증가된 반복유산 환자군 14명을 실험군으로, 15% 이하인 군 12명을 대조군으로 하여 연구를 진행하였다. 이 환자들에게서 다음 번 유산 시 착상부위를 포함한 자궁 탈락막 세포를 확인하여 면역조직화학염색을 통해 CD56⁺와 CD16⁺ 자연살해세포의 수를 세어 실험군과 대조군을 비교하였다.

결 과: 실험군과 대조군은 탈락막 내 CD56⁺ 자연살해세포의 수 간에 통계적으로 유의한 차이 (170.1±132.1 vs. 68.3±66.1, p=0.02)를 보였으나 둘 간의 상관관계 (r=0.229, p=0.261)는 없었다. 또한 두 군간에 CD16⁺ 자연살해세포는 통계적으로 유의한 차이 (25.70±11.72 vs. 31.17±22.67)를 보이지 않았다.

결 론: 본 연구는 말초혈액 CD56⁺ 자연살해세포가 증가된 반복유산 환자군에서 말초혈액 자연살해세포가 증가되지 않은 군에 비하여 탈락막의 CD56⁺ 자연살해세포가 증가되어 있음을 알 수 있었다. 이는 탈락막 자연살해세포가 반복유산의 면역학적 기전에서 중요한 역할을 할 것이라는 가능성을 제시해 주는 연구 결과이며 또한 말초혈액 자연살해세포의 측정이 반복유산 환자에서 다음 번 유산을 예측할 수 있는 유용한 지표임을 알 수 있다.

중심단어: 말초혈액 CD56⁺ 자연살해세포, 탈락막 CD56⁺ 자연살해세포, 반복유산
