

자폐증 유사증상 발현 마우스의 점액 면역에 대한 연구

황소련 · 조지훈 · 신경민 · 장윤영 · 김지연 · 여경욱 · 김형아* · 허용†
대구가톨릭대학교 자연대학 산업보건학과, *가톨릭대학교 의과대학 예방의학교실

Evaluation of Mucosal Immunity in BTBR T+tf/J Mice Resembling Autism Spectrum Disorder

So Ryeon Hwang, Ji Hoon Jo, Kyeong Min Shin, Yun Young Jang,
Ji Youn Kim, Kyeong Uk Yeo, Hyoung Ah Kim*, and Yong Heo†

Catholic University of Daegu, College of Natural Sciences, Dept. Occupational Health, Gyeongbuk, Korea
*The Catholic University of Korea, College of Medicine, Dept. Preventive Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Objectives: This study was undertaken in order to evaluate a potential mechanism involved in gastro-intestinal problems observed in autistic subjects and uses an animal model of autism investigation.

Methods: BTBR T+tf/J, a mouse strain with typical socio-behavioral characteristics of autistic subjects and FVB mice with highly social behaviors as the control strain were used. Both genders of mice aged three weeks and six months were used from four separate litters for each strain. Serum was prepared following cardiac puncture, and mesenteric lymph nodes were collected for *in vitro* stimulation and enumeration of major immune cell proportion.

Results: The level of serum IgA was significantly enhanced in six-month-old BTBR mice compared with three-week-old BTBR, which was not observed with the FVB control mice. The serum IgE level was also higher among BTBR mice than among age-sex matched FVB mice, respectively. Considering the ratio of interleukin-4 vs interferon-gamma production from mesenteric lymph node T cells, skewedness toward type-2 reactivities was observed. In addition, the proportion of B cells in mesenteric lymph nodes was significantly higher in BTBR mice than in FVB mice.

Conclusion: Upregulation of mucosal immunity related with enhanced type-2 immune reactivity observed in BTBR mice could be involved with the etiology of gastro-intestinal abnormalities in autism.

Keywords: autism, mucosal immunity, BTBR T+tf/J mice, IgA

I. 서 론

산업화 및 도시화와 더불어 특히 어린이들에게서 지속적으로 발생률이 증가하고 있는 대표적인 질환으로 천식, 아토피 피부염 등 아토피성 질환과 자폐증이 꼽히고 있다.¹⁾ 이들 질환 중에서 자폐증 혹은 자폐증 증후군 (autism spectrum disorder; ASD)은

치명적인 뇌발달장애에 기인하는 만성퇴행성 뇌질환으로서 대인관계형성 장애, 의사소통 장애, 반복적이고 자극적인 행동 등을 특성으로 한다.²⁻⁵⁾ 본 질환은 지난 십수년간 지속적으로 발생이 증가하여 본격적인 연구가 진행되고 있는 미국의 경우 출생아 110명중 1명꼴의 높은 비율로 자폐아로 진단되고 있는 상황이다.^{4,5)} 특히 여아에 비해 남아가 4.5배 높은 발

†Corresponding author: Dept. Occupational Health, College of Natural Sciences, Catholic University of Daegu, 13-13 Hayang-ro, Hayang-eup, Gyeongsan si, Gyeongbuk, 712-702, Korea, Tel: +82-53-850-3737, Fax: +82-53-850-3736, E-mail: yheo@cu.ac.kr
Received: 05 November 2012, Revised: 22 November 2012, Accepted: 28 November 2012

생물을 보이고 있고 일관성 쌍생아의 경우 두 아이가 동시에 자폐증을 보이는 경우는 80-100%로 유전적 영향의 가능성이 예측되고 있다. 우리나라의 경우도 경기도 일개 지역에서 초등학교들을 대상으로 한 연구에 의하면 일반 초등학교들의 경우 1.89%라는 놀라운 유병률을 보여 문제의 심각성을 보여주고 있다.⁶⁾ 현재까지 자폐증에 대한 원인은 명확하게 밝혀져 있지 않지만 유전적 변이, 면역학적 기능 이상, 환경적 유해인자 노출 등 다양한 요인이 관련되는 것으로 추론되고 있다.⁷⁻⁹⁾ 행동학적 이상과 더불어 자폐증 관련 신체 여러 부위의 이상 중에서 자폐아들의 18-40%정도에서 복통, 고창, 설사, 변비와 같은 위장관계 이상이 있음이 발표되었다.¹⁰⁾ 이러한 위장관계 이상은 주로 회장 및 결장 부위의 여러 면역병리학적 이상과 연관되어 있을 가능성이 예측되고 있지만 구체적인 연구 결과는 발표된 바 없다.

자폐증에 대한 원인구명 및 치료방법 개발 등 본 질환에 대한 우리의 지식을 넓히는데 적절한 실험동물모델을 개발하는 것은 절대적으로 중요하다. 이에 설치류를 대상으로 각종 행동학적 검사를 수행한 결과 BTBR T+tf/J (BTBR) 마우스가 사람의 자폐증과 매우 흡사한 이상을 보임이 2007년 처음 발표되었다.^{11,12)} 즉, 다른 마우스에 접근을 꺼리는 폐쇄성, 반복적인 행동 (self-grooming), 먹이의 특성을 다른 쥐에게 알려주는 것으로 대변되는 의사소통에 있어서 저하 등을 보이는 BTBR 마우스는 추후 연구를 통하여 2008년 미국 National Institute of Mental Health에서 자폐증 연구에 적합한 실험동물로 제시되었다.¹³⁾ 최근 본 연구진은 BTBR 마우스가 사회성이 높은 대조군 마우스에 비해 뇌조직 항원에 대한 항체 수준이 유의하게 높고, 뇌조직에서 interleukin-33, interleukin-18, interleukin-1 β 등 친염증성 사이토카인 발현이 높으며, 뇌에 존재하는 탐식세포인 소교세포가 증가되는 점 등을 토대로 자폐증 발현의 기전으로 자가면역질환 가능성을 제시한 바 있다.¹⁴⁾

우리나라의 경우 자폐증에 대해 아직까지 우리나라 전체 발생률이나 유병률에 대한 조사는 이루어지지 못하고 있다. 또한 임상적, 역학적, 사회교육학적 연구는 일부 수행되고 있지만 원인구명 혹은 기전과약을 위한 연구는 전무한 상태이다. 또한 자폐증 발현에 미치는 환경유해인자의 영향에 대한 연구 역시 전혀 수행된 바 없다. 그러나 미국, 유럽 등 산업화

가 앞선 국가들에서 자폐증은 발달성 뇌장애와 관련하여 주요한 문제로 떠오르고 있다는 점을 감안하면 우리나라 역시 추후 국민건강 특히 어린이들의 건강과 관련하여 중대한 질환으로 대두될 것으로 예측된다.

이에 본 연구는 자폐증 질환을 유발하고 있는 사람들에서 나타나는 위장관계 이상의 면역병리학적 배경이 되리라 추측되는 점액면역 (mucosal immunity) 기능 변화 가능성을 탐색하기 위하여 자폐증 연구동물 모델인 BTBR 마우스의 점액면역학적 특성을 행동사회학적 특성에서 대조군으로 여겨지고 있는 FVB 마우스와 비교분석하였다. 본 연구는 추후 사람을 대상으로 한 체계적이고 본격적인 연구를 수행하기 위한 기초자료를 제공할 것이라 생각된다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

BTBR T+tf/J 마우스는 Jackson Laboratory에서 구입하였다. 행동학적 측면에서 사회성이 높은 것으로 보고된 FVB 마우스는^{11,12)} (주)나라바이오에서 구입하였다. 마우스는 온도 23 \pm 2°C, 상대습도 50 \pm 10%, 환기횟수 12~15회/시간, 조명시간 12시간 (오전 8시~오후 8시), 조도 150~300 Lux로 조건이 설정된 대구가톨릭대학교 실험동물사육실에서 사육하였다. 사료는 (주)퓨리나에서 공급받은 방사선조사 멸균된 실험동물용 고형사료를 자유섭취시켰다. 음용수는 고압증기멸균하여 자유 섭취시켰으며 사육케이지 역시 고압증기멸균후 사용하였다. 점액면역학적 특성의 성장 시기별 변화를 관찰하기 위하여 3주령 군 (young) 과 6개월령 군 (old)으로 나누었으며 각 군은 암수 각각 4마리씩 구성되었다. 또한 실험 결과의 일반화를 고려하여 사용된 마우스는 서로 어미가 다른 마우스를 사용하였다. 모든 실험 과정은 대구가톨릭대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받고 진행하였다 (CUD IACUC 2012-008).

2. 혈액 및 장간막 림프절 채취

마우스를 CO₂ 마취하에서 심장 채혈을 실시하였고 이후 혈청을 분리하였다. 장간막 림프절은 각 마우스로부터 최소한 3개 이상 채취하였다. 채취된 림프절은 단일세포화작업 (single cell suspension preparation)을¹⁵⁾ 거친 뒤 24구 배양접시에서 배양을

하였다. 림프절 세포내 T 림프구를 활성화시키기 위하여 polyclonal stimulator로서 immobilized anti-CD3 mAb (5 µg/5×10⁵ cells, BD PharMingen, San Jose, CA, USA)를 사용하였고 5% CO₂ incubator에서 48시간 배양하였다.¹⁶⁾

3. 혈청 항체 및 세포배양액내 사이토카인 측정

혈청내 존재하는 IgE 수준은 sandwich ELISA 방법에 의해 정량하였다.¹⁵⁾ 즉, rat anti-mouse IgE capture antibody (BD PharMingen)를 Immulon 2 plate (Dynex, Chantilly, VA)에 2 µg/ml (각 well당 100 µl) 첨가한 다음 냉장상태에서 24시간 정치시키고 이후 1% BSA-PBS로 non-specific binding을 차단한 다음 희석된 실험혈장 및 표준 IgE (purified mouse IgE mAb isotype standard, BD PharMingen)을 첨가하고 냉장상태에서 24시간 정치시켰다. 다음 날, biotinylated rat anti-mouse IgE antibody (1 µg/ml 1% BSA-PBS, BD PharMingen)를 첨가하여 2시간 실온에서 정치시켜 detection antibody가 부착하게 한 다음 avidin-peroxidase를 넣고 다시 1시간 실온에서 정치시켰다. 이후 ABTS (Sigma, St. Louis, MO)로 발색을 유도한 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈청내 IgA 역시 IgE 측정 방법과 동일한 원리로 rat anti-mouse IgA capture-detection antibody pair (BD PharMingen)를 이용하여 측정하였다. 혈청내 존재 IgG isotype인 IgG1, IgG2a 수준을 평가하기 위하여 goat-anti mouse IgG1과 IgG2a (Serotec, Raleigh, NC, USA) capture antibody와 peroxidase conjugated anti-mouse IgG detection antibody를 사용하여 sandwich ELISA 방법을 수행하였다. IgE는 혈청을 1/5로 희석한 뒤, IgA는 1/50,000, IgG1과 IgG2a는 1/100,000 희석한 뒤 사용하였다.

배양액에 존재하는 interleukin-4 (IL-4) 및 interferon-gamma (IFNγ) 역시 BD PharMingen 회사로부터 sandwich ELISA set를 구입하여 측정분석하였다.^{15,16)} IL-4의 검출한계는 4 pg/ml, IFNγ는 100 pg/ml 이었다.

4. 장간막 림프절 존재 면역세포들의 구성비 분석

단일 세포화작업 이후 유세포분석기 (flow cytometry)를 이용하여 림프절 존재 보조 T 림프구, 세포 파괴 T 림프구, B 림프구의 구성비를 분석하였다. 보조 T 림프구는 anti-CD3 PE antibody와 anti-

CD4 FITC antibody (BD PharMingen)를 이용하여 분석하였고, 세포 파괴 T 림프구는 anti-CD3 FITC antibody와 anti-CD8 PE antibody (BD PharMingen)를 이용하여 분석하였다.¹⁷⁾ B 림프구는 anti-B220 FITC antibody를 이용하여 분석하였다. 비특이적 항체 결합을 제어하기 위하여 FcBlock (1 µg/10⁶ cells)을 넣고 30분이 지난 뒤 CD4, CD8, B220 항체를 넣고 형광 염색을 하였다. 형광 항체의 비특이적인 결합률을 (%) 최종 분석시 빼주기 위하여 PE-, FITC-conjugated isotype control 항체로도 염색하였다.

5. 통계처리

마우스 strain간 차이 및 3주령-6개월령 간 측정치의 차이는 SigmaPlot 통계프로그램(SPSS, Chicago, USA)을 이용하여 검정하였다. 일차적으로 자료의 정규분포 여부를 검증한 뒤 single factor ANOVA와 Dunnett's *t*-test 혹은 Kruskal-Wallis ANOVA와 Dunn's test로 유의성을 검정하였다. 필요에 따라 Student's *t*-test 또는 Mann-Whitney test로 추가 유의성 검정을 시행하였고 *p* value가 0.05 이하일 때를 유의한 차이로 판정하였다.

III. 결 과

1. 혈청내 IgA 및 IgE 수준 비교

본 연구에서는 일부 자폐증 환자에서 나타나는 장관계 이상에 대한 면역체계의 연관성을 검토하는 초기 단계의 연구로서 자폐증 질환 모델 마우스인 BTBR 마우스의 혈청내 IgA 수준을 평가하였다 (Fig. 1). 이유기가 막 지난 어린 마우스들에서는 BTBR 마우스와 대조군 FBV 마우스간 IgA 수준의 차이가 없었다. 그러나 6개월령 된 마우스의 경우 FVB 마우스는 3주령 FVB 마우스에 비해 낮아지는 경향을 보였으나 BTBR 마우스는 오히려 3주령 BTBR 마우스에 비하여 5배 이상 IgA 수준이 증가하였고 6개월령의 FVB 마우스에 비해서도 거의 10배정도 높은 IgA 수준을 보였다.

다음으로 본 연구에서는 BTBR 마우스와 FVB 마우스의 혈청 IgE 수준을 측정비교하였다 (Fig. 1). IgA 결과와 유사하게 6개월령 된 BTBR 마우스의 IgE 수준은 같은 나이의 FVB 마우스, 3주령된 BTBR 마우스 및 FVB 마우스 보다 유의하게 높았다. 3주령 마

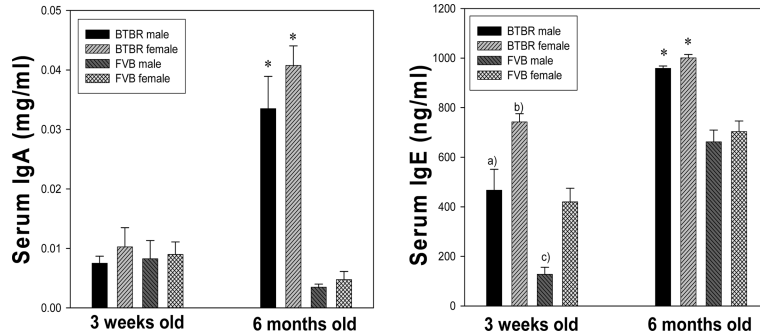


Fig. 1. Upregulation of serum level of IgA and IgE in 6 months old BTBR T+tf/J mice. Statistical significances ($p < 0.05$) are as follows; *: vs 3 weeks old BTBR & FVB ♂ and ♀ mice, 6 months old FVB ♂ and ♀ mice, a): vs 3 weeks old BTBR ♀ and FVB ♂ mice, b): vs 3 weeks old FVB ♂ and ♀ mice, c): vs 3 weeks old FVB ♀ mice. Data were expressed with mean ± SE.

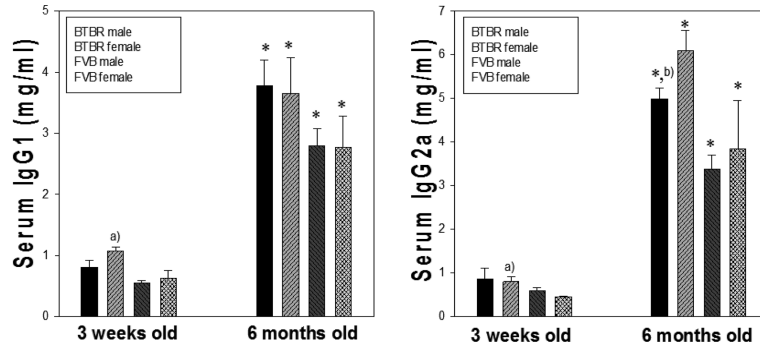


Fig. 2. Level of serum IgG1 and IgG2a in BTBR T+tf/J and FVB mice. Statistical significances ($p < 0.05$) are as follows; *: vs 3 weeks old BTBR & FVB ♂ and ♀ mice, 6 months old FVB ♂ and ♀ mice, a): vs 3 weeks old FVB ♀ mice, b): vs 6 months old FVB ♂ mice. Data were expressed with mean ± SE.

우스들에 있어서도 BTBR 마우스 암수 모두 FVB 마우스 암수 각각 보다 유의하게 높은 IgE 수준을 보였다.

2. 혈청내 IgG1 및 IgG2a 수준 비교

혈청내 IgG1 수준은 BTBR 마우스 및 FVB 마우스 모두에서 나이가 들어감에 따라 4배 정도 유의하게 증가하였다 (Fig. 2). 3주령 및 6개월령된 BTBR 마우스의 경우 비록 통계적으로는 유의하지는 않았지만 각각 3주령, 6개월령 FVB 마우스보다 높은 IgG1 수준을 보였다 (단, 3주령 암컷 BTBR 마우스에서는 3주령 암컷 FVB 마우스보다 통계적으로도 유의하였음). IgG2a의 경우도 IgG1과 유사하게 BTBR 마우스 및 FVB 마우스 모두에서 나이가 들어감에 따라 5배 정도 유의하게 증가하였다. 또한 3주령 및

6개월령된 BTBR 마우스의 경우 각각 3주령, 6개월령 FVB 마우스보다 높은 IgG2a 수준을 보였는데 3주령 암컷 BTBR 마우스와 암컷 FVB 마우스, 6개월령 수컷 BTBR 마우스와 수컷 FVB 마우스 간 차이는 통계적으로도 유의하였다.

한편, IgG1과 IgG2a 농도비(IgG1/IgG2a ratio) 계산 결과 3주령 어린 마우스에서 6개월령 성숙 마우스에 비해 IgG2a 대비 IgG1의 수준이 상대적으로 높았다 (3주령 BTBR: ♂, 1.06 ± 0.15 , ♀, 1.48 ± 0.35 , 6개월령 BTBR: ♂, 0.75 ± 0.06 , ♀, 0.60 ± 0.08 , 3주령 FVB: ♂, 0.99 ± 0.17 , ♀, 1.41 ± 0.28 , 6개월령 FVB: ♂, 0.84 ± 0.11 , ♀, 0.97 ± 0.32). 그러나 BTBR 마우스와 FVB 마우스 사이에서는 유의한 IgG1/IgG2a ratio 차이를 발견할 수 없었다.

Table 1. Levels of IL-4 and IFN γ in the culture supernatants from *in vitro* activation of mesenteric lymph node T cells

		IL-4 (pg/ml)	IFN γ (ng/ml)	Ratio (IL-4/IFN γ)
BTBR mouse	3 wk ♂	181.9±71.6	60.3±11.0*	3.6±1.6
	3 wk ♀	175.7±132.7	85.7±13.9*	2.5±2.1
	6 month ♂	54.0±50.6	12.1±8.4	3.2±2.3
	6 month ♀	144.4±72.6	20.7±7.5	8.0±4.6
FVB mouse	3 wk ♂	21.9±1.6	11.0±5.0	3.4±1.3
	3 wk ♀	10.0±9.9	14.7±4.2	0.5±0.5
	6 month ♂	49.2±13.5	40.3±9.0†	1.2±0.3
	6 month ♀	32.9±12.1	27.8±7.4	1.6±0.6

Mesenteric lymph node lymphocytes were stimulated with immobilized anti-CD3 mAb for 48 hours, and the culture supernatants were collected for cytokine ELISA. Values represent mean±SE. The ratios (IL-4/IFN γ) were obtained through dividing amount of IL-4 by amount of IFN γ in the same culture supernatants. Statistical significances (p<0.05) as followings; *: vs 3 weeks old FVB ♂ and ♀, 6 months old BTBR ♂ and ♀ mice, †: vs 6 months old BTBR ♂ mice. Data were expressed with mean±SE.

Table 2. Distribution (%) of CD4 helper T cell, CD8 cytotoxic T cell., and B cell in mesenteric lymph node

		helper T cell	Cytotoxic T cell	B cell
BTBR mouse	3 wk ♂	60.6±0.8*	30.6±1.9‡	4.8±1.9
	3 wk ♀	53.5±0.8‡	29.0±0.8‡	11.9±3.3
	6 month ♂	54.4±2.7†	22.6±0.1	10.3±0.8 [¶]
	6 month ♀	54.7±2.0†	22.2±1.3	14.2±0.4 [¶]
FVB mouse	3 wk ♂	66.5±1.2	26.3±0.9§	5.1±1.1
	3 wk ♀	67.2±0.5	27.4±0.1§	3.7±0.7
	6 month ♂	66.2±1.4	18.9±0.3	7.0±0.5
	6 month ♀	65.2±1.5	19.7±0.8	6.6±1.4

Mesenteric lymph node lymphocytes were stimulated with immobilized anti-CD3 mAb for 48 hours, and the culture supernatants were collected for cytokine ELISA. Values represent mean±SE. The ratios (IL-4/IFN γ) were obtained through dividing amount of IL-4 by amount of IFN γ in the same culture supernatants. Statistical significances (p<0.05) as followings; *: vs 3 weeks old BTBR ♀, 6 months old BTBR ♂ and ♀, 3 weeks & 6 months old FVB ♂ and ♀ mice, †: vs 3 weeks & 6 months old FVB ♂ and ♀ mice, ‡: vs 6 months old BTBR ♂ and ♀, 3 weeks & 6 months old FVB ♂ and ♀ mice, §: vs 6 months old BTBR & FVB ♂ and ♀ mice, ¶: vs 6 months old BTBR ♀, 3 weeks & 6 months old FVB ♂ and ♀ mice, ¶: 3 weeks & 6 months old FVB ♂ and ♀ mice. Data were expressed with mean±SE.

3. 장간막 림프절 T 림프구 *in vitro* 활성화에 따른 사이토카인 생성 수준 분석

장간막 림프절 세포 중에서 T 림프구만을 anti-CD3 mAb를 이용하여 활성화시켰다. IL-4와 IFN γ 모두에서 3주령 마우스의 경우 BTBR 마우스가 FVB 대조군 마우스에 비해 높은 생성 수준을 보였다 (Table 1). 그러나 6개월령 마우스에서는 BTBR 수컷 마우스가 FVB 수컷 마우스에 비해 유의하게 저하된 IFN γ 수준을 보인 것을 제외하고는 두 strain간 IL-4, IFN γ 생성의 유의한 차이는 없었다. Th1 보조 T 림프구에 비해 Th2 보조 T 림프구가 상대적으로 활성화되었는지를 평가하기 위하여 동일 세포 배양액내에 생성분비

된 IL-4 (pg/ml)양을 IFN γ (ng/ml)양으로 나눈 비를 구하였다 (Table 1). 성.연령별로 각각 비교하였을 때 3주령 수컷 마우스를 제외하고 통계적으로 유의하지는 않았지만 BTBR 마우스가 FVB 마우스에 비해 높은 ratio를 보였다. 이러한 결과는 대조군 FVB 마우스와 비교하였을 때 BTBR 마우스의 장간막 림프절 내 존재하는 보조 T 림프구들 중에서 type-1 helper T cell (Th1)에 비해 type-2 helper T cell (Th2)의 기능이 상대적으로 우세할 가능성을 추측케 한다.

4. 장간막 림프절 주요 면역 세포 구성비

장간막 림프절내 주요 면역세포의 구성비를 분석

한 결과 FVB 마우스에 비해 BTBR 마우스에서 보조 T 림프구의 비율이 낮았다 (Table 2). 그러나 세포 파괴 T 림프구의 비율은 3주령 BTBR, FVB 마우스가 각각 6개월령 BTBR, FVB 마우스에 비해 유의하게 높았다. 또한 같은 연령대에서는 BTBR 마우스가 FVB 마우스보다 높은 세포 파괴 T 림프구 비율을 보였다. B 림프구의 경우 3주령 BTBR 수컷 마우스를 제외하고 3주령 BTBR 암컷 마우스, 6개월령 BTBR 암컷, 수컷 마우스가 각각 동일한 성 및 연령군 FVB 마우스보다 높은 비율이었는데 특히 6개월령의 경우는 통계적으로 유의한 차이를 보였다.

IV. 고 찰

본 연구는 자폐증 환자들 중 일부분에서 나타나는 위장관계 이상에 대한 점액면역체계의 이상여부를 분석하기 위하여 수행되었다. 최근 자폐증 연구 질환 동물 모델로 보고된 BTBR T+tf/J 마우스와 사회성이 높은 것으로 알려진 FVB 마우스를 대조군 마우스로 사용하였고, 점액면역의 연령대별 변화 추이를 관찰하기 위하여 이유기가 지난 3주령 마우스 (사람의 경우 1~2세 정도) 및 6개월령 마우스 (사람의 경우 성인)를 비교하였다. 실험 결과 대조군 마우스에 비해 유의하게 항진된 혈청 중 IgA, IgE 수준이 BTBR 마우스에서 관찰되었고 또한 3주령에 비해 6개월령 나이든 BTBR 마우스에서 이러한 현상이 두드러짐을 알 수 있었다. 이 결과는 장간막 림프절 주요면역세포를 분석하였을 때 대조군 마우스에 비해 BTBR 마우스가 B 림프구 비율이 상대적으로 높았던 결과와도 연계되어 BTBR 마우스에서 비특이적인 체액면역 항진이 있음을 추측케 한다. 또한 3주령 어린 BTBR 마우스의 장간막 림프절 T 림프구에서는 6개월령 나이든 BTBR 마우스 및 3주령, 6개월령 대조군 마우스보다 IL-4, IFN γ 를 더 많이 생성하고 있음을 알 수 있었다. 특히 천식, 아토피 피부염 등 1형 과민반응 발현을 주도하는 것으로 알려진 IL-4를 생성분비하는 type-2 helper T cell 기능과 바이러스 감염, 암 발생에 주로 대처하면서 Th2 림프구에 길항작용이 있는 것으로 알려진 IFN γ 생성 type-1 helper T cell 기능 사이의 항상성을^{18,19)} 평가한 결과, BTBR 마우스가 대조군 마우스에 비해 Th2 림프구 기능이 상대적으로 항진되어

있음도 알 수 있었다.

본 연구진은 최근 사회성이 높은 strain으로 알려진 C57BL/6 마우스에 비해 BTBR 마우스가 혈청 중에 total IgG 수준이 유의하게 높고 뇌조직에 축적된 IgG 수준 역시 높음을 보고하였다.¹⁴⁾ 또한 혈청 중에 존재하는 뇌조직 항원에 대한 항체 역시 대조군에 비해 유의하게 높은 수준이었으며 특정 항원 (keyhole limpet hemocyanin)에 대한 항체 역시 대조군 마우스에 비해 많이 생성됨을 관찰하였다. 이러한 결과를 토대로 BTBR 마우스에서 사람의 자폐증과 유사한 행동 양상을 보이는 것과 체액면역의 과다한 항진이 연계되어 있는 자가면역질환의 가능성을 제시하였다. 이번 연구에서도 FVB 대조군 마우스에 비해 항진된 체액면역 현상을 확인할 수 있었다 (Fig. 1, Fig. 2). 혈청내 IgG1, IgG2a, IgE, IgA 수준을 분석하였을 때 대조군 마우스에 비해 BTBR 마우스에서 유의하게 높은 수준을 관찰하였다. 특히 이러한 체액면역능의 항진이 BTBR 마우스가 나이가 들어감에 따라 더욱 두드러지게 관찰되었다는 점은 추후 6개월령 정도 된 나이든 BTBR 마우스를 이용하여 자폐증 유사 사회행동학적 특성의 변화를 추적할 필요가 있음을 제시한다. 과거 BTBR 마우스에 대한 사회행동학적 특성은 주로 3-4주령의 마우스를 이용한 연구였다.¹¹⁻¹³⁾

자폐증 환자에서 보이는 대표적인 면역병리학적 특성은 소장 점막 상피세포에 IgG가 축적되어 있는 것으로 소장내 다양한 세균들의 과다 증식에 대항하는 과정에서 생성된 항체로 생각하고 있다.^{20,21)} 소장, 비강, 구강, 기도 등과 같은 여러 기관의 점막에서 분비되는 IgA는 점액면역의 기능을 평가하는데 주요 지표로 활용된다. IgA는 장점막을 포함한 신체 여러 점막표면에 분비되는 항체로서 외부 물질이 침입시 이에 대한 방어기능을 수행하는 점액면역의 핵심이다. 특히 장간막 림프절에 존재하는 B 림프구 혹은 plasma cell이 IgA의 주요 생성 세포로 알려져 있다.²²⁾ IgA와 자폐증 발현간의 상관성에 대해서는 아직까지 본격적인 연구는 수행되고 있지 않지만 일부 자폐증 환자를 대상으로 한 연구들에서는 혈청내 IgA 수준의 변화에 대해 일치되는 결과를 내놓지 못하고 있다.¹⁰⁾ 본 연구에서 IgA의 경우 3주령 마우스에서는 대조군과 차이가 없지만 6개월령에서는 BTBR 마우스의 혈청 IgA 수준이 대조군에 비해 유의하게

증가하였고 3주령 BTBR 마우스에 비해서도 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는 BTBR 마우스의 경우 나이가 들어감에 따라 IgA 항체 생성을 증진시키는 환경이 소장과 같은 점액면역이 이루어지는 신체 조직에서 활성화될 가능성을 시사하고 있다. 자폐증과 같은 뇌신경질환 중의 하나인 정신분열증 (schizophrenia) 환자들에게서 gliadin, beta-lactoglobulin, casein과 같은 식이성 단백질에 대한 특이 IgA 수준이 유의하게 증가되었다는 보고가 있다.²³⁾ 또한 장에서 그람 음성세균에서 기인하는 내독소 흡수가 많아질수록 사람의 혈청 중에 IgA 수준이 증가한다는 보고도 있다.²⁴⁾ 이러한 기존의 보고들을 참조하면 본 연구 결과 보여준 BTBR 마우스에서 IgA 수준 항진과 자폐증 증상 중 하나인 위장관계 이상과의 상관성에 대한 연구는 앞으로 본격적으로 수행할 필요가 있다고 본다.

본 연구진은 최근 BTBR 마우스의 면역체계가 사회성이 높은 strain으로 알려진 C57BL/6 마우스에 비하여 천식, 아토피 피부염과 같은 알레르기성 질환 발현의 배경 기전이 되는 1형 과민반응에 대한 감수성이 높은 쪽으로 치우쳐 있음을 보고하였다.¹⁴⁾ 혈청내 total IgE 혹은 항원 특이 IgE 수준 증가는 1형 과민반응 발현에 대한 대표적인 면역학적 지표치로 인용된다. BTBR 마우스의 점액면역 특성을 분석한 이번 연구에서도 BTBR 마우스가 대조군 마우스에 비하여 천식, 아토피 피부염, 아나필락시스 과민반응 등 1형 과민반응의 배경인 type-2 helper T cell 기능 편향성이 있음을 확인할 수 있었다. FVB 대조군 마우스에 비해 유의하게 높은 혈청내 IgE 수준이 BTBR 마우스에서 관찰되었고, 장간막 림프절 T 림프구를 활성화한 결과에서도 type-2 helper T cell 기능의 상대적 우위가 관찰되었다 (Fig. 1, Table 1). 본 연구진은 최근 발표한 연구에서 리스테리아 (*Listeria monocytogenes*) 세균을 감염시켰을 때 BTBR 마우스가 대조군인 C57BL/6J 마우스에 비해 리스테리아 세균에 대한 항체 생성 수준이 낮다는 점을 보고하였다.¹⁴⁾ 리스테리아 세균은 IFN γ , interleukin-12와 같은 싸이토카인을 생성하는 type-1 helper T cell에 의한 면역반응을 촉진하는 것으로 알려져 있다.²⁵⁾ BTBR 마우스에서 리스테리아 세균 감염시 이에 대한 항체 생성 수준이 낮다는 것은 type-2 helper T cell 기능이 우위에 있어 type-1

helper T cell의 기능이 상대적으로 저하됨을 의미하는 것이다. IgG1은 보조 T 림프구 중 하나인 type-2 helper T cell에서 분비되는 IL-4에 의하여 isotype switching이 유도되는 항체로서 알레르기성 과민반응 발생시 증가되는 항체이며, IgG2a는 type-1 helper T cell에서 분비되는 IFN γ 에 의해서 isotype switching이 유도되는 항체로 IL-4의 생성 수준이 항진되면 감소되는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾ IgG1과 IgG2a 농도비(IgG1/IgG2a ratio)는 type-2 helper T cell의 기능과 type-1 helper T cell의 기능에 대한 체내 균형을 평가할 수 있는 지표치로 활용되곤 한다. 즉, IgG1/IgG2a ratio가 비교군에 비해 높으면 천식, 아나필락시스와 같은 알레르기 반응으로 대표되는 type-2 helper T cell의 기능이 상대적으로 우세한 것으로 추측할 수 있는 것이다.¹⁹⁾ BTBR 마우스와 FVB 마우스의 혈청내 IgG1, IgG2a 수준을 측정한 이번 연구에서는 두 마우스군간 유의한 IgG1/IgG2a ratio 차이를 발견할 수 없었다. BTBR 마우스가 대조군 마우스에 비해 상대적으로 IgE 수준 및 IL-4/IFN γ ratio가 높았던 결과와 비교하면 (Fig. 1, Table 1) IgG1/IgG2a ratio 결과는 type-2 helper T cell 기능의 편향성을 반영하지 못하고 있다. 이러한 차이점에 대해 현재로서는 정확한 해석을 내리기는 힘들며 관련한 지속적인 추적 연구가 필요하리라 본다.

결론적으로 자폐증 유사 행동학적 특성을 보이는 BTBR 마우스의 면역체계는 type-2 helper T cell의 상대적 기능 항진에 연계된 B 림프구의 IgE를 포함한 여러 항체 생성 촉진을 특징을 갖고 있다고 판단된다.

V. 결 론

본 연구에서는 산업화, 도시화와 더불어 증가하고 있는 자폐증의 발생과 관련하여 자폐증 환자에서 보고되고 있는 위장관계 이상에 대한 배경 기전을 탐색하고자 자폐증 질환 모델로 사용되고 있는 BTBR T+tf/J 마우스의 점액면역의 특성을 분석하였다. 실험을 통하여 얻어진 주요 결과는 다음과 같다.

1. 점액면역의 핵심 지표라 할 수 있는 IgA의 경우 3주령 BTBR 마우스에 비해 6개월령 BTBR 마우스에서 혈청 IgA 수준이 증가한 반면 대조군인 FVB 마우스에서는 3주령에 비해 6개월령 마우스에

서 감소하였다. 이러한 결과는 BTBR 마우스에서 나이가 들어감에 따라 비특이적인 점액면역 항진이 이루어지고 있을 가능성을 제시하는 것이다.

2. 천식, 아토피 피부염 등 알레르기성 질환의 배경 기전인 1형 과민반응의 대표적인 지표치인 IgE 증가가 BTBR 마우스에서 관찰되었다. 혈청 IgE 수준을 대조군 마우스와 비교하였을 때 3주령, 6개월령 모두에서 BTBR 마우스에서 높았으며 또한 3주령에 비해 6개월령 BTBR 마우스에서 유의하게 높은 IgE 수준을 보여 나이가 들에 따라 알레르기성 체질로 진행될 가능성을 제시하고 있다.

3. 장간막 림프절 T 림프구를 *in vitro*에서 활성화시킨 결과, 대조군 FVB 마우스에 비해 BTBR 마우스에서 IL-4 생성은 상대적으로 높았던 반면 IFN γ 생성은 낮았다. 이 결과 역시 장간막 림프절내 보조 T 림프구들의 기능이 1형 과민반응의 배경이 되는 type-2 helper T cell 기능 활성화로 진행되고 있음을 제시하는 것으로 판단된다.

4. 장간막 림프절 주요 면역세포 구성비를 분석한 결과 대조군 마우스에 비해 낮은 보조 T 림프구 비율이 BTBR 마우스에서 관찰된 반면, B 림프구의 비율은 오히려 높았다. 이 결과는 IgA, IgE 혈청 수준이 대조군 마우스에 비해 BTBR 마우스에서 높았던 결과와 연계되어 BTBR 마우스에서 비특이적인 B 림프구 기능 항진이 있음을 뒷받침하는 것이라 여겨진다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 일반연구지원사업 (과제번호:2010-0022169) 및 대구가톨릭대학교 교내연구지원사업 (과제번호:20121246) 지원에 의하여 수행되었습니다

참고문헌

1. Becker KG. Autism, asthma, inflammation, and the hygiene hypothesis. *Med Hypotheses*. 2007; 69: 731-740.
2. Geschwind DH. Advances in autism. *Annu Rev Med*. 2009; 60: 367-380.
3. Grigorenko EL. Pathogenesis of autism: a patchwork of genetic causes. *Future Neurol*. 2009; 4: 591-599.
4. Rosenberg RE, Law JK, Yenokyan G, McGready J, Kaufman WE, Law PA. Characteristics and concordance of autism spectrum disorders among 277 twin pairs. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2009; 163: 907-914.
5. CDC. Prevalence of autism spectrum disorders - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, United States, 2006. *MMWR Surveill Summ*. 2009; 58: 1-20.
6. Kim YS, Leventhal BL, Koh YJ, Fombonne E, Laska E, Lim EC, et al. Prevalence of autism spectrum disorders in a total population sample. *Am J Psychiatry*. 2011; 168: 904-912.
7. Blaylock RL. A possible central mechanism in autism spectrum disorders, part 1. *Altern Ther Health Med*. 2008; 14(6): 46-53.
8. Blaylock RL. A possible central mechanism in autism spectrum disorders, part 2: immunoexcitotoxicity. *Altern Ther Health Med*. 2009; 15(1): 60-67.
9. Blaylock RL. A possible central mechanism in autism spectrum disorders, part 3: the role of excitotoxin food additives and the synergistic effects of other environmental toxins. *Altern Ther Health Med*. 2009; 15(2): 56-60.
10. Stigler KA, Sweeten TL, Posey DJ, McDougle CJ. Autism and immune factors: a comprehensive review. *Res Autism Spectr Disord*. 2009; 3: 840-860.
11. Moy SS, Nadler JJ, Young NB, Perez A, Holloway LP, Barbaro RP, et al. Mouse behavioral tasks relevant to autism: phenotypes of 10 inbred strains. *Behav Brain Res*. 2007; 176: 4-20.
12. Bolivar VJ, Walters SR, Phoenix JL. Assessing autism-like behavior in mice: variations in social interactions among inbred strains. *Behav Brain Res*. 2007; 176: 21-26.
13. McFarlane HG, Kusek GK, Yang M, Phoenix JL, Bolivar VJ, Crawley JN. Autism-like behavioral phenotypes in BTBR T+tf/J mice. *Genes Brain Behav*. 2008; 7: 152-163.
14. Heo Y, Zhang Y, Gao D, Miller VM, Lawrence DA. Aberrant immune responses in a mouse with behavioral disorders. *PLoS One*. 2011; 6(7): e20912.
15. Park H-S, Heo Y-J, Byun J-A, Heo Y. Immunotoxicological evaluation of pollen intake using mice model. *J Environ Health Sci*. 2005; 31(4): 287-293.
16. Lee S-H, Baek S-J, Kim H-A, Heo Y. 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis like immune

- alteration in mice. *J Toxicol Pub Health*. 2006; 22(4): 357-364.
17. Kim S-N, Kim Y-C, Kim H-A, Heo Y. A potential mechanism of 2,4-dinitrochlorobenzene-mediated immune alterations resembling human atopic dermatitis in mice. *Quant Bio-Sci*. 2011; 30(2): 85-90.
 18. Heo Y, Saxon A, Hankinson O. Effect of diesel exhaust particles and their components on the allergen-specific IgE and IgG1 response in mice. *Toxicology*, 2001; 159: 143-158.
 19. Gans H, De Hovitz R, Forghani B, Beeler J, Maldonado Y, Arvin AM. Measles and mumps vaccination as a model to investigate the developing immune system: passive and active immunity during the first year of life. *Vaccine*. 2003; 21: 3398-3405.
 20. Ashwood P, Van de Water J. A review of autism and the immune response. *Clin Develop Immunol*. 2004; 11(2): 165-174.
 21. Torrente F, Ashwood P, Day R, Machado N, Furlano RI, Anthony A, et al. Small intestinal enteropathy with epithelial IgG and complement deposition in children with regressive autism. *Mol Psychiatry*. 2002; 7: 375-382.
 22. Sutherland DB, Fagarasan S. IgA synthesis: a form of functional immune adaptation extending beyond gut. *Curr Opin Immunol*. 2012; 24: 261-268.
 23. Reichelt KL, Landmark J. Specific IgA antibody increases in schizophrenia. *Biol Psychiatry*. 1995; 37: 410-413.
 24. Maes M, Mihaylova I, Leunis JC. Increased serum IgA and IgM against LPS of enterobacteria in chronic fatigue syndrome (CFS): indication for the involvement of gram-negative enterobacteria in the etiology of CFS and for the presence of an increased gut-intestinal permeability. *J Affective Disorders*. 2007; 99: 237-240.
 25. Edelson BT, Unanue ER. Immunity to listeria infection. *Curr Opin Immunol*. 2000; 12: 425-431.