

C형 간염 바이러스 감염 간암 세포주와 T 림프구의 상호작용에 대한 연구

강효정¹ · 조효선^{2*}

¹경북대학교 약학대학 약학과, ²덕성여자대학교 약학대학 약학과

The Interaction between HCV-Infected huh7.5 Cells and HCV-Specific T Cells

Hyojeung Kang¹ and Hyosun Cho^{2*}

¹Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Republic of Korea

²Department of Pharmacy, College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Republic of Korea

(Received March 28, 2014 / Accepted May 30, 2014)

Recently, Hepatitis C virus (HCV) replication system has been established using human hepatoma cells (huh cell) and a variety of HCV clones. In this study, we established an infectious HCV replication system using huh7.5 cells and J6/JFH1 clone (genotype 2a). In addition, we investigated the antigen presentation capability of HCV-infected huh7.5 cells to HCV-specific T cells. Interestingly, HCV-infected huh7.5 cells were not capable of activating HCV-specific T cells. However, huh7.5 cells stimulated by exogenous HCV peptide were able to activate HCV-specific T cells, which was shown to produce TNF- α and IFN- γ . We further examined if HCV infection has an inhibitory effect on the expression of MHC class I molecule of huh7.5 cells. We found that HCV infection did not change the expression level of MHC class I molecule on huh7.5 cells.

Keywords: HCV-specific T cells, hepatoma cell 7.5 (huh7.5), IFN- γ , J6/JFH1 clone, TNF- α

C형 간염 바이러스 감염자는 현재 전세계적으로 약 1억 7천만 명으로 추정되며 바이러스 감염은 일반적으로 혈액을 통해 이루어진다. 질병양상은 급성(15%)과 만성(85%)으로 나누어지며 급성의 경우 10-50%의 회복률을 보이나 만성으로 이행될 경우 간부전, 간경변, 간암 등으로 진행하게 된다(Kim and Park, 1993; Liang *et al.*, 2000). C형 간염 바이러스의 인체내 주요 표적지는 간이며, 간세포 표면에서 발현되는 CD81, SR-B1, claudin-1, occludin 등의 수용체를 통해 간세포에 침입한다(Lauer and Walker, 2001).

지난 수십 년간 인간 간세포(primary hepatocytes)의 인체외 실험적 배양이 난항을 겪고, RNA형 바이러스인 C형 간염 바이러스에 대한 복제시스템(*in vitro* replication system)의 부재로 간세포와 C형 간염 바이러스의 상호작용에 대한 연구가 활발하지 못했으나 최근 인간 간세포에서 분화된 간암세포주를 이용하여 C형 간염 바이러스의 실험적 복제시스템을 구축하는데 성공하였다(Binder *et al.*, 2007). 간암세포주에 C형 간염바이러스를 도입하여 C형 간염 바이러스 감염체(virions)를 수확할 수 있는

세포배양 시스템을 HCVcc (hepatitis C virus cell culture)라 명명하며 C형 간염 바이러스 2a형 유전자형에서 유래한 J6/JFH1과 1형 유전자형에서 유래한 H77s을 도입한 HCVcc가 국외 연구그룹에 의해 확립되었다(Wakita *et al.*, 2005; Yi and Lemon, 2009). C형 간염 바이러스 복제가 가능한 간암세포주 중 특히 huh 7.5 cell은 제 1형 IFN (interferons) 발현과 관련있는 RIG-I (retinoic-acid inducible gene-I) 부위의 결함으로 기존 이용되어 왔던 간암세포주(huh 7)에 비해 높은 C형 간염 바이러스의 복제율을 보이는 것으로 보고 되었다(Keril *et al.*, 2002). 간세포를 표적으로 침입한 C형 간염 바이러스는 간세포 내에서 복제 및 바이러스 단백질을 생성, 방출하여 T 림프구의 항바이러스 작용을 활성화 시키게 된다. 따라서 간세포 주위의 T 림프구와 C형 간염 바이러스의 복제가 일어나고 있는 간세포의 상호작용은 숙주의 면역반응에서 중요한 역할을 한다.

본 연구자의 연구그룹은 최근 외부에서 가해진 C형 간염 바이러스의 항원에 의해 촉진된 huh7.5 cell이 HCV 특이 T 림프구를 활성화시킬 수 있음을 IFN- γ 와 TNF- α 의 생성으로 확인하여 huh7.5 cell의 항원제시능력을 시사하였다(Cho, 2011). 본 연구에서는 C형 간염 바이러스 중 J6/JFH1 (2a 유전자형)을 이용하여 HCVcc를 구축, C형 간염 바이러스에 감염된 huh 7.5 cell에

*For correspondence. E-mail: hyosun1102@duksung.ac.kr; Tel.: +82-2-901-8678; Fax: +82-2-901-8386

의한 HCV 특이 T 림프구의 활성화 여부를 확인하고자 하였다.

C형 간염 바이러스 RNA clone으로 pFL-J6/JFH는 TMIN/Toray, 인간 간암 세포주 huh7.5 cell은 Apath, L.L.C.로부터 제공받아 간암 세포주는 10% fetal bovine serum과 1% penicillin/streptomycin을 함유한 DMEM을 사용하여 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다(Keril *et al.*, 2002). HLA A2를 발현하는 lentiviral 벡터는 James Riley 박사(The University of Pennsylvania)로부터 제공받았다(Varela-Rohena *et al.*, 2008). HCVcc 시스템은 J6/JFH1 cDNA를 플라스미드로 증폭한 후 RNA로 전사시키고 전기천공법(electroporation)을 이용해 간암세포주인 huh7.5 cell에 유전자감염(transfection) 시킨 후, 48-72시간 이후부터 적정 시간별로 HCV 입자(virions)가 있는 세포배양액(supernatant)을 모아 HCV RNA를 Real time PCR로 정량 또는 감염되지 않은 huh7.5 cell에 가하여 감염(infectivity)이 가능함을 확인하였다(Wakita *et al.*, 2005).

HCV 특이 T 림프구는 필라델피아 보훈병원에서 HCV 감염 후 회복한 환자들 중 HCV NS3 항원결정기(epitope)에 반응하는 HCV 특이 T 림프구의 양이 많은 대상이 선별되었으며, 환자로부터의 샘플 채취는 필라델피아 보훈병원 IRB (institutional

review boards)에 의해 승인된 프로토콜에 따라 이루어졌다(Cho, 2011).

구축된 HCVcc에서의 HCV(J6/JFH1) 발현율은 HCV NS5 및 core 단백질을 이용하여 측정하였다. 면역화학적염색(Immunohistochemistry staining, IHC)은 HCV 감염 간암세포주에 biotin이 결합된 항체를 처리, enzyme-avidin을 결합한 후, enzyme에 의해 분해된 기질이 침착된 부위를 확인하였으며, 면역형광법(Immunofluorescence)은 enzyme 대신 형광물질(fluorophore)이 결합된 항체를 사용하여 형광현미경 하에서 HCV 발현율을 확인하였다.

간암세포주와 T 림프구의 혼합세포배양은 먼저 A2 발현 간암세포주를 HCV NS3 1406 펩티드와 24시간 배양한 후 PBS (phosphate buffered saline)로 세번 이상 세척하여 펩티드의 잔유물을 완전히 제거한 다음 C형 간염 회복 환자로부터 분리한 T 림프구와 세포내 단백질 분비과정을 억제하는 brefeldin A을 넣어 혼합 배양하였다. 6시간 후, T 림프구에서 생성된 IFN- γ 와 TNF- α 를 유세포분광기를 이용하여 측정 분석하였다(Nakamoto *et al.*, 2008, 2009).

우선 본 연구에서는 C형 간염 바이러스 중 유전자형이 2a인 J6/JFH1 clone을 이용하여 HCVcc 시스템 구축을 시도하였다. Fig. 1A는 간암세포주 huh7.5 cell에 J6/JFH1 RNA를 유전자 감염시킨 후 9일째의 면역화학적 염색으로 HCV RNA를 유전자 감염시키지 않은 huh7.5 cell (왼쪽)과 비교하여 HCV RNA를 유전자 감염시킨 huh7.5 cell에서 갈색의 HCV NS5 단백질이 두드러지게 발현되고 있음을 알 수 있다. 또한 Fig. 1B는 HCV RNA가 유전자 감염된 huh7.5 cell을 형광현미경으로 확인한 것으로 청색으로 염색된 huh7.5 cell의 핵(Nuclei) 주변에 붉은색의 HCV NS5가 세포질내(cytoplasm)에서 강하게 발현되고 있음을 관찰할 수 있다. Fig. 1C는 HCV의 huh7.5 cell 유전자 감염 후 세포 배양액과 세포를 각각 분리하여 HCV RNA 양을 정량한 것으로 HCV의 세포 내 발현과 배양액으로의 바이러스 입자 생성이 안정적임을 알 수 있다.

Fig. 2A는 간암세포주 huh7.5 cell의 항원제시세포 가능성을 살펴본 것으로 본 저자의 이전 발표에서 처음 보고되었던 것을 확인하였다. 즉, huh7.5 cell이 외부에서 제공받은 HCV 펩티드를 항원제시를 통하여 HCV에 특이적으로 반응하는 T 림프구를 활성화한 결과 생성되는 IFN- γ 와 TNF- α 를 측정하였다. 본 연구에서는 직접 HCV에 감염되어 HCV 단백질의 항원처리 및 항원제시가 가능한 huh7.5 cell을 이용하여 HCV 특이 T 림프구의 활성화 여부를 분석하였다. 흥미롭게도, Fig. 2B에서 보는 바와 같이 HCV 감염 huh7.5 cell과 반응한 T 림프구의 경우(왼쪽), IFN- γ (0.131%)와 TNF- α (0.772%)의 생성이 미미함을 알 수 있다. 그러나 HCV 감염 huh7.5 cell이 외부 HCV 펩티드를 제공받는 경우(오른쪽)에는 T 림프구를 활성화시켜 IFN- γ (3.98%)와 TNF- α (6.49%)의 생성이 가능함을 알 수 있다.

이러한 결과는 항원에 의해 자극된 huh7.5 cell이 T 림프구를 활성화시키는 것이 가능함에도 huh7.5 cell 세포 내에서 발현 및 복제되고 있는 HCV가 huh7.5 cell의 항원처리과정 또는 항원제시의 억제 가능성을 제시한다. 일반적으로 세포 내 미생물인 바이러스는 인체세포 침입 시 감염된 숙주세포의 내부항원 제시경

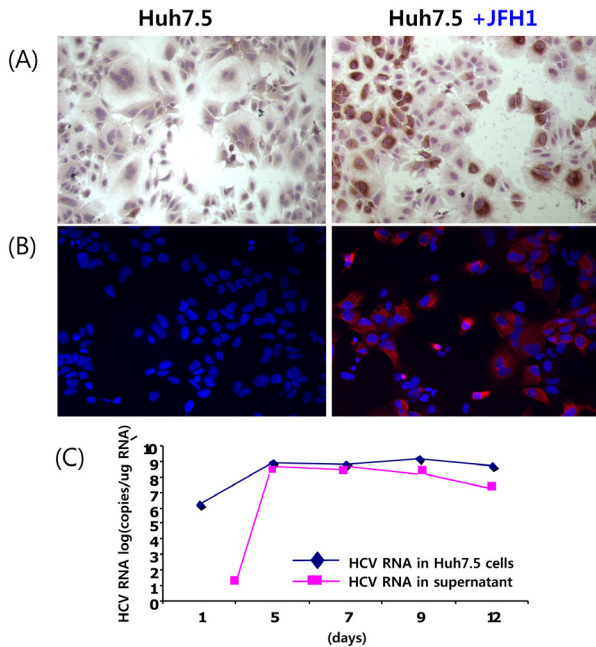


Fig. 1. Establishment of infectious HCV cell culture with JFH1 (HCV genotype 2a) in huh7.5 cells. Huh7.5 cells expressing HLA A2 are transfected with HCV RNA (J6/JFH1 clone). On day 2 post-transfection, cell media was changed to remove residual HCV RNA. On day 5, 7, 9, 12 post-transfection, HCV RNAs from huh7.5 cells as well as cell supernatants were extracted. (A) Immuno-histochemistry staining with HCV(NS5) specific antibody on day 9 post-transfection from JFH1-transfected huh7.5 cells (right) and naive huh7.5 cells (left). (B) Indirect immunofluorescence with HCV(NS5) specific antibody from JFH1-transfected huh7.5 cells (right) and naive huh7.5 cells (left). (C) HCV(JFH1) RNA copies in huh7.5 cells (blue diamond) and cell culture supernatant (pink square).

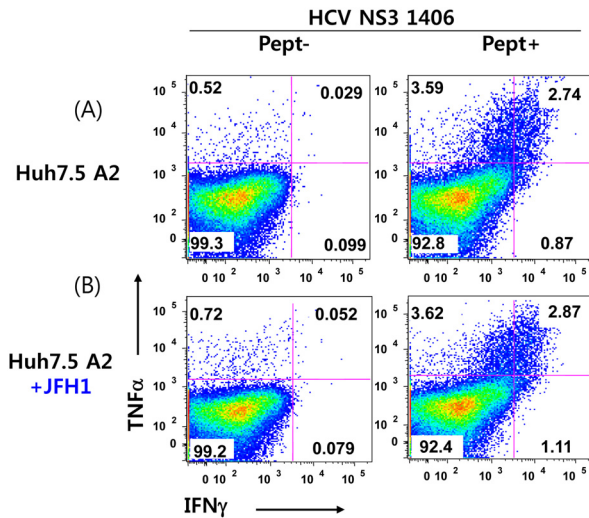


Fig. 2. The absence of HCV-specific T cell IFN- γ and TNF- α expression upon stimulation by huh7.5 cells infected with JFH1. (A) Huh7.5 (A2+) cells are stimulated with (or without) HCV NS3 1406 peptide and cocultured with peripheral lymphocytes from HCV patients (A2+) in presence of BFA (brefeldin A) for 6 h. The expression of IFN- γ and TNF- α are measured by intracellular cytokine staining using flow cytometry. (B) JFH1 infected huh7.5 (A2+) cells are pulsed with (or without) HCV NS3 1406 peptide and peripheral lymphocytes from HCV patients are added. The expression of IFN- γ and TNF- α are measured in the same way.

로에 따라 프로테오솜에 의해 처리된 후, MHC와 결합하여 T 림프구의 활성을 위해 제시된다.

따라서 본 연구에서는 HCV에 의한 huh7.5 cell의 항원제시 억제제의 기전을 규명하고자 MHC 발현율을 살펴보았다. Fig. 3은 HCV에 의한 감염된 huh7.5 A2 cell (오른쪽)과 감염되지 않은 huh7.5 A2 cell (왼쪽)의 HLA A2 발현 정도를 측정한 결과로 HCV 감염은 huh7.5 A2 cell의 HLA A2 발현 정도에 영향을 미치지 않았다. 이상의 결과는 여러 종류의 HCV replicon을 유전자 감염시킨 huh7 또는 huh7.5 cells이 HCV 특이 T 림프구를 자극하여 IFN- γ 를 생성시킨다는 최근의 연구결과와 상반되나 Juandy 그룹의 경우 세포배양액으로의 바이러스 입자 방출이 불가능한 replicon을 사용하여 실제 세포간 전염이 가능한 본 연구 그룹의 모델과는 차이가 있다(Juandy *et al.*, 2009). 즉, 간암세포주 huh7.5 cell이 외부항원의 자극으로 효과적인 항원제시세포가 될 수 있으나 실제 바이러스 입자 방출이 가능한 HCV에 감염된 경우에는 HCV 특이 T 림프구의 활성유도에 실패하여 HCV의 면역회피 기전이 될 수 있음을 시사한다.

적요

최근 인간 간암세포주(human hepatoma cells)를 이용하여 C형 간염 바이러스(hepatitis C virus, HCV)의 복제가 가능한 세포배양모델(cell culture system)이 확립되었다. 본 연구에서는 인간 간암세포주 중 huh7.5 cell (human hepatoma 7.5 cells)과

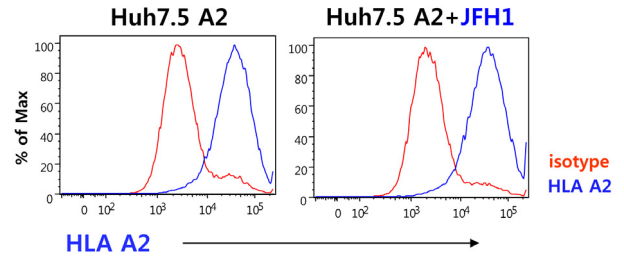


Fig. 3. Steady expression of HLA A2 on huh7.5 cells infected with JFH1. The expression of HLA A2 on JFH1-infected (or uninfected) huh7.5 cells are measured by flow cytometry.

C형 간염 바이러스인 J6/JFH1 clone (2a 유전자형)를 이용하여 감염 가능한 세포배양모델을 확립하였다. 또한, HCV 감염 간암세포주의 HCV 특이 T 림프구에 대한 항원제시(antigen presentation) 가능성을 살펴보았다. 외부에서 전달된 HCV 항원일 경우 간암세포주의 HCV 특이 T 림프구에 대한 항원제시로 T 림프구의 활성이 가능하였으나, HCV 감염 간암세포주의 경우 T 림프구의 활성을 억제하였다. 이러한 HCV 특이 T 림프구의 활성억제와 HCV 감염 간암세포주 항원제시능의 상관성을 알아보기 위해 HCV 감염 간암세포주의 주요조직합성복합체(major histocompatibility complex, MHC) 발현변화를 측정하였으나 HCV 감염은 간암세포주의 MHC 발현변화에 영향을 미치지 않았다.

감사의 말

pFL-J6/JFH를 제공해 준 TMIN/Toray, 간암 세포주 huh7.5 cell을 제공한 Apath, L.L.C. 그리고 HLA A2 발현 lentiviral 벡터를 제공해 주신 James L. Riley 박사(University of Pennsylvania)께 감사드립니다. 또한 HCV 펩티드와 전반적인 연구계획에 도움을 주신 Kyong-Mi Chang (University of Pennsylvania)께도 감사의 말씀을 전한다.

본 연구는 덕성여자대학교 2013년도 교내연구비(3000001902) 지원에 의해 수행되었음.

References

Binder, M., Kochs, G., Bartenschlager, R., and Lohmann, V. 2007. Hepatitis C virus escape from the interferon regulatory factor 3 pathway by a passive and active evasion strategy. *Hepatology* **46**, 1365-1374.

Cho, H. 2011. The activation of HCV-specific CD8 T cells by HCV peptide pulsed Huh7.5 cells. *Korean J. Microbiol.* **47**, 342-347.

Juandy, J., Aichele, U., Kersting, N., Klein, R., Aichele, P., Bisse, E., Sewell, A.K., Blum, H.E., Bartenschlager, R., Lohmann, V., and *et al.* 2009. Analysis of CD8+ T-cell-mediated inhibition of hepatitis C virus replication using a novel immunological model. *Gastroenterology* **136**, 1391-1401.

Keril, J.B., McKeating, A.J., and Rice, M.C. 2002. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C Virus RNA replication. *J. Virol.* **76**, 13001-13014.

- Kim, B.S. and Park, Y.M.** 1993. Prevalence of hepatitis C virus related to liver diseases in Korea. *Gastroenterol. Jpn* **28**, (suppl5) 17S–22S.
- Lauer, G.M. and Walker, B.D.** 2001. Hepatitis C virus infection. *New Engl. J. Med.* **345**, 41–52.
- Liang, T.J., Rehermann, B., Seeff, L.B., and Hoofnagle, J.H.** 2000. Pathogenesis natural history, treatment, and prevention of hepatitis C. *Ann. Intern. Med.* **132**, 296–305.
- Nakamoto, N., Cho, H., Shaked, A., Olthoff, K., Valiga, M.E., Kaminski, M., Gostick, E., Price, D.A., Freeman, G.J., Wherry, E.J., and Chang, K.M.** 2009. Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog.* **5**, e1000313.
- Nakamoto, N., Kaplan, D.E., Coleclough, J., Li, Y., Valiga, M.E., and Chang, K.M.** 2008. Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology* **134**, 1927–1937.
- Varela-Rohena, A., Carpenito, C., Perez, E.E., Richardson, M., Parry, R.V., Milone, M., Scholler, J., Hao, X., Mexas, A., Carroll, R.G., and et al.** 2008. Genetic engineering of T cells for adoptive immunotherapy. *Immunol. Res.* **42**, 166–181.
- Wakita, T., Pietschmann, T., Kato, T., Date, T., Miyamoto, T., Zhao, Z., Murthy, K., Habermann, A., Kräusslich, H.G., Mizokami, M., and et al.** 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* **11**, 791–796.
- Yi, M. and Lemon, S.M.** 2009. Genotype 1a HCV (H77S) infection system. *Methods Mol. Biol.* **510**, 337–346.