

천식 마우스모델에서 Human Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4-immunoglobulin (Hu.CTLA4-Ig) 융합단백의 기도 염증과 기도과민성 억제

¹울산대학교 의과대학 서울아산병원 아산생명과학연구소, ²서울아산병원 소아청소년과, ³한림대학교 의과대학 한강성심병원 소아과

장성옥¹ · 김병주² · 유진호² · 송영화² · 강미진¹ · 최원아¹ · 정현돈¹ · 이소연³ · 홍수종²

Human Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4-immunoglobulin Fusion Protein Inhibits Airway Inflammation and Hyperresponsiveness in a Murine Model of Asthma

Seong-Ok Jang¹, Byoung-Ju Kim², Jinho Yu², Young-Hwa Song², Mi-Jin Kang¹, Won-Ah Choi¹, Hyun-Don Jung¹, So-Yeon Lee³ and Soo-Jong Hong²

¹Asan Institute for Life Sciences, University of Ulsan College of Medicine, ²Department of Pediatrics, Asan Medical Center, University of Ulsan College of Medicine, ³Department of Pediatrics, Hangeul Sacred Heart Hospital, Hallym University College of Medicine, Seoul, Korea

Background: CD4⁺ T helper cells which differentiate into the Th2 cells are crucial for the initiation and progression of allergic asthma. Human Cytotoxic T Lymphocyte-associated Antigen 4-immunoglobulin (CTLA4-Ig) has been widely used in order to block T-cell costimulation in an array of experimental animal models of T-cell-mediated diseases.

Objective: To evaluate whether human CTLA4-Ig fusion protein inhibits airway inflammation in a murine model of OVA-induced asthma.

Method: Six-weeks-old BALB/c mice were used and airway inflammation was induced by OVA. Human CTLA4-Ig fusion protein was administered intravenously before and after sensitization with OVA. Airway responsiveness to methacholine was measured after antigen challenge. Total IgE, OVA-specific IgE, IgG₁ and IgG_{2a} in

serum samples were assessed by ELISA. Bronchoalveolar lavage (BAL) and lung section were also performed.

Result: In mice which were treated with the human CTLA4-Ig fusion protein before and after sensitization with OVA, airway hyperresponsiveness and eosinophil count of BAL were markedly decreased. In mice which were treated with human CTLA4-Ig before sensitization with OVA, serum total IgE level were more significantly reduced than that of positive control mice. Peribronchial inflammatory cell infiltration was decreased by the treatment of human CTLA4-Ig before and after sensitization with OVA.

Conclusion: These results suggest that human CTLA4-Ig fusion protein may inhibit eosinophilic airway inflammation and airway hyperresponsiveness in OVA-sensitized and airway challenged mice. (*Korean J Asthma Allergy Clin Immunol* 2008;28:205-213)

Key words: CTLA4-Ig fusion protein, Asthma, Mouse, Allergic inflammation, Airway hyperresponsiveness

서 론

기관지 천식은 소아와 성인에서 가장 많이 증가하고 있는 기도의 만성 염증성 질환으로 기도 개형(airway remodeling),

기도과민성(airway hyperresponsiveness) 및 기도 내 염증반응이 주요 병태생리다. 이 과정에 T 세포는 천식의 초기발생과 만성염증의 조절에서 중요한 역할을 하는데, 이중 interleukin (IL)-4, -5, -13 등을 생산하는 제2형 조력 T (Th2) 세포가 핵심적인 역할을 한다.¹⁻³⁾ 이중 IL-4는 면역글로불린 E (IgE)의 생산을 증가시키며, naive T 세포를 Th2 세포로의 분화를 촉진한다.^{4,5)} 한편, IL-13은 기도과민성과 염증을 유발하며, IgE 생산을 증가시킨다.⁶⁾ 이와 같이 Th2 세포의 유입과 분화는 천식의 발생과 악화의 중요 원인으로 작용하므로 naive T 세포의 활성화 억제는 천식의 예방과 치료를 위한 주요 타겟으로 관심을 받고 있다.

항원-특이적 CD4⁺ T 세포 활성화를 억제하는 효과적인

본 논문은 아산생명과학연구소의 연구비 지원에 의하여 수행되었음 (2004-091)

책임저자 : 홍수종, 서울시 송파구 풍납 2동 388-1
서울아산병원 소아청소년과, 우: 138-736
Tel: 02) 3010-3379, Fax: 02) 473-3725
E-mail: sjhong@amc.seoul.kr

투고일: 2008년 5월 26일, 심사일: 2008년 6월 26일
게재확정일: 2008년 9월 1일

방법 중 T 세포의 보조자극 신호를 억제하는 방법이 있다. CD4+ T 세포의 완전한 활성화를 위해서는 2가지 신호전달이 필요한데, 첫 번째는 T 세포의 수용체와 항원제시세포의 주조직적합복합체(major histocompatibility complex, MHC)/항원 펩티드(antigenic peptide) 사이의 항원-특이적 신호전달이며 두 번째는 T 세포와 항원제시세포간의 항원-비특이적인 보조자극 신호가 필요하다.^{7,8)} 이중 두 번째 신호에서 T 세포의 보조자극인자인 CD28과 항원제시세포의 B7-1 (CD80) 또는 B7-2 (CD86)간의 신호가 보조자극 신호로서 매우 중요한 역할을 한다. CD28 항원은 T 세포의 증식, 사이토카인 생산, T 세포 반응 지속 등의 신호를 매개하는 중요한 물질로서, CD28-B7 간의 신호가 정상적으로 작동하지 않으면, T 세포는 면역무반응(anergy)이나 면역관용(immune tolerance)에 이르게 된다.^{9,10)} 한편 CD28과 31% 가량의 유사성을 가지며, B7에 대한 또 다른 수용체인 CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, CD152)는 T 세포가 활성화되고 24시간 후에 T 세포 표면에서 발현이 되며, CD28에 비해 B7에 대한 결합력이 16배 이상인 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ CD28이 보조자극신호를 통해 T 세포의 활성화를 증대시키는 반면에 CTLA-4는 T 세포의 활성화를 억제하는 것으로 알려져 있어,¹²⁻¹⁵⁾ CD28-B7간의 보조자극신호를 매우 효과적으로 차단하는 것으로 알려져 있다.^{16,17)}

최근에는 CTLA-4의 세포외 영역(extracellular domain)과 면역글로불린 G1의 상쇄영역(constant region, hinge+Fc 영역)을 결합한 CTLA4-Ig 융합단백을 마우스에 *in vivo* 투여한 연구에서 T 세포-의존성 항체 반응을 억제하였으며,¹⁸⁾ 췌장도세포(pancreatic islet cell) 이종이식(xenograft)과 쥐의 심장 동종이식(allograft) 모델에서 이식 생존률을 높이는 것으로 보고 되었다.¹⁹⁾ 또한 동물모델을 이용한 *in vivo* 연구에서는 마우스 유래의 CTLA4-Ig 융합단백을 난알부민(ovalbumin, OVA)-유발 천식 마우스모델에 투여했을 때 기도과민성 억제, 난알부민-특이 IgE 생산 감소, Th2 사이토카인의 생산 감소 등을 보고한 연구들이 있다.²⁰⁻²⁴⁾ 그러나 이와 같은 연구결과는 천식 마우스모델의 확립과정에서 난알부민 감작 후 CTLA4-Ig를 처리하였거나 1% 난알부민을 흡입시켜 기도 염증을 유발 시에 융합단백을 처리하여 그 효과를 관찰하였으나, 연구방법에 따라 기도과민성의 억제 여부, 기관지폐포세척액 내 세포분획의 차이, 난알부민-특이 IgE 생산 등의 결과들이 서로 다른 점이 있어서 아직 정확한 작용기전이 밝혀지지 않고 있다.²⁰⁻²⁴⁾

본 연구자들은 사람 유래의 hu.CTLA4-Ig 융합단백을 chinese hamster ovary (CHO)-K1 세포주에서 생산하여 마우스의 실험적 알레르기성 뇌척수염(experimental autoimmune encephalomyelitis; EAE) 모델과 이식편대 숙주질환(graft versus host

disease; GVHD) 모델에 투여했을 때, EAE 증상의 완화(clinical symptom score 감소)와 GVHD 억제(cytotoxicity 감소)를 관찰한 바 있다.²⁵⁾

이에 본 연구에서는 앞선 hu.CTLA4-Ig 융합단백을 사용한 다른 질환 연구들²⁵⁾ 토대로 천식마우스 모델에서 보조자극 신호의 차단에 의한 T 세포의 활성화 억제뿐만 아니라, CD4+ T 세포에서 Th1 또는 Th2 세포로의 분화를 억제할 수 있으리라 예측하여, 난알부민-유발성 천식 마우스모델 감작전(sensitization전)과 후에(sensitization후)에 융합단백을 정맥내 투여하여 천식의 특징적 병태생리인 기도과민성 감소, 기관지폐포세척액내 염증세포의 감소, 폐조직내 염증 감소에 대한 효과를 관찰하였다. 또한 사람 말초혈액단핵구에서 Concanavalin A (Con A) 자극에 의한 직접적인 T 세포 증식 억제 효과를 확인하였다.

위와 같은 결과들은 향후 사람의 T 세포 관련 질환 연구에 좋은 기초 자료로 활용이 가능할 것으로 생각되며, 이러한 천식 마우스 모델에서의 연구결과를 토대로 향후 hu.CTLA4-Ig를 사용하여 사람 T 세포 관련 질환에서의 연구에 적용하고자 한다.

대상 및 방법

1. Hu.CTLA4-Ig 융합단백 생산

사람 말초혈액단핵구를 추출 후 CTLA-4와 면역글로불린 G₁ 각각에 대한 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 실시 후 서로 결합시켜 hu.CTLA4-Ig 융합 유전자를 제조하였다.²⁵⁾ 이후 CHO-K1 세포주에 유전자전달감염(gene transfection)을 실시하고, 무혈청배지(serum-free media)에서 배양하여 상등액을 수거 후 rProtein A sepharose CL-4B column (Amersham-Pharmacia, Upsala, Sweden)을 이용하여 순수한 hu.CTLA4-Ig 융합단백을 정제하였다.

2. 천식마우스 모델 확립

Steinmetz 등²⁶⁾이 이용한 방법을 일부 변형하여 마우스의 기관지천식을 유발하였다. 요약하면, 6주령의 암컷 BALB/c 마우스에 난알부민(chicken egg albumin grade V, Sigma, St. Louis, USA) 10 μ g을 2.25 mg의 백반(AlumImject, Pierce, Rockford, USA)과 혼합하여 복강(i.p)내 투여하여 감작시키고, 1주일 후 다시 한 번 복강 내 투여하였다. 7일 후 3일간 연속적으로 1% 난알부민 용액을 초음파분무기(Nescosonic UN-511, Alfresa, Osaka, Japan)을 사용하여 30분간 흡입시켜 천식 마우스모델을 확립하였다. 이때 각 군을 아래와 같이 나누어 3회 반복 실험을 실시하였으며, 각 군당 마우스는 7마리로 하였다.

Group 1: 양성대조군(positive group-난알부민으로 천식을 유발한 군)

Group 2: 음성대조군(negative group-난알부민을 처치하지 않은 군)

Group 3: Hu.CTLA4-Ig 처리군(난알부민으로 천식을 유발하였으며, 난알부민 감각 전에 CTLA4-Ig 1 mg/kg을 2회 정맥내 투여한 군)

Group 4 : Hu.CTLA4-Ig 처리군(난알부민으로 천식을 유발하였으며, 난알부민 감각 후에 CTLA4-Ig 1 mg/kg을 2회 정맥내 투여한 군)

3. Hu.CTLA4-Ig 융합단백 처리

Group 3에서는 난알부민 1차 감각 7일 전과 1일 전 두 번에 걸쳐 마우스 정맥내로 1 mg/kg의 hu.CTLA4-Ig 융합단백을 처리하였으며, group 4에서는 난알부민 2차 감각 1일 후와 6일 후에 마우스 정맥내로 1 mg/kg의 hu.CTLA4-Ig 융합단백을 처리하였다.

4. 기도과민성 측정

3일에 걸친 1% 난알부민 흡입 24시간 후에 동물용 기도저항 측정기(체용적 변동 기록기, 울 메디쿠스, 한국)를 이용하여 생리식염수와 5, 10, 25, 50 mg/mL 각각의 메타콜린을 3분간 흡입시켰다. 각 농도에서의 메타콜린 흡입 후 3분 동안 10초 간격으로 Penh (enhanced pause)를 측정하였으며, 각각의 평균값을 기도의 수축 정도를 나타내는 지표로 사용하였다.

5. 기관지폐포세척 및 세포분획

기도과민성 측정 후 Ketamine-Xylazine을 마우스 복강내 투여하여 마취한 후 바로 개흉하여 기도를 노출시켰다. 노출된 기도내로 카테터(24-gauge)를 삽입하고 37°C의 생리식염수 2 mL를 주입하여 기관지폐포세척을 시행하였다. 이후 기관지폐포세척액을 4°C, 1500 rpm에서 2분간 원심분리 후 cytopsin을 시행하여 슬라이드에 도말하고, Diff-Quik 염색을 시행하여 대식세포, 호산구, 호중구 및 림프구 수를 동일한 측정자에 의해 각각 분류하여 세포수를 판정하였다.

6. 혈청 내 면역글로불린 측정

마우스의 혈액을 안와정맥총에서 채혈 후 2,500 rpm에서 20분간 원심분리 후 혈청을 분리하고, 혈청 내 총 IgE와 난알부민-특이 IgE, IgG₁, IgG_{2a}을 효소결합면역흡착검사(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 방법을 사용하여 측정하여 ELISA 판독기로 450 nm에서 흡광도(absorbance)를 측정하였다.

7. 면역조직화학 염색

기관지폐포세척 시행 후 마우스 폐를 적출하여 10% 포르말린에 고정시킨 후 파라핀으로 포매(embedding) 하였다. 이후 4 µm 두께의 조직 절편을 만들어 hematoxyline-eosin 염색(H&E 염색)을 시행하여 폐조직내 염증 정도를 현미경하 100배의 배율에서 관찰하였다.

8. 말초혈액단핵구 증식반응 억제

사람의 혈액 10 cc를 채혈한 후 Histopaque (Sigma, St. Louis, USA)을 이용한 밀도구배 원심분리(density-gradient centrifuge)를 실시하여 말초혈액단핵구를 수거하였다. 세포수가 5×10^5 /well이 되게 96-well plate에 분주하고 T 세포의 유사분열 물질(mitogen)인 Con A를 1 µg/mL의 농도로 첨가하여 5% CO₂, 37°C 조건에서 72시간 배양하였다. 이 배양액에 hu.CTLA4-Ig 융합단백의 농도를 0.05, 0.5, 5.0 µg/mL이 되게 각각 첨가하여 T 세포의 증식반응에 미치는 영향을 조사하였다. 배양이 끝나기 8시간 전에 1 µCi의 [³H]-thymidine을 첨가한 후 thymidine의 T 세포내로 합일화(incorporation)을 scintillation beta-counter로 측정하여 T 세포의 증식정도를 cpm (count per minute) 값으로 표시하였다.

9. 통계처리

본 연구에서의 통계는 양성대조군과 hu.CTLA4-Ig 융합단백 투여군 간의 차이를 Kruskal-Wallis test를 이용하여 분석하였으며, 통계처리는 SPSS v 11.0을 사용하였고, P값이 0.05 이하인 경우를 통계학적으로 유의하다고 정의하였다.

결 과

1. 기도과민성

메타콜린 50 mg/mL의 최고 농도에서 음성대조군의 Penh 평균값은 5.8 ± 0.6 이었으며, 양성대조군의 평균값은 10.7 ± 2.3 이었다. 한편 난알부민 감각전 hu.CTLA4-Ig 처리군(group 3)의 평균값은 6.9 ± 1.9 이었으며, 난알부민 감각 후 hu.CTLA4-Ig 처리군에서의 평균값은 5.7 ± 1.1 로 양성대조군에 비해 각각 35%와 46% 가량의 기도과민성 억제 효과를 보였다($P < 0.05$) (Fig. 1).

2. 총 세포수(Total cell count)

양성대조군에서의 기관지폐포세척액 내 전체 세포수의 평균값은 $9.2 \pm 2.3 \times 10^5$ /mL이었으며, 음성대조군에서의 세포수는 $2.7 \pm 0.8 \times 10^5$ /mL이었다. 한편 난알부민 감각전과 후에 hu.CTLA4-Ig 처리군에서의 세포수는 각각 $4.4 \pm 1.2 \times 10^5$ /mL과

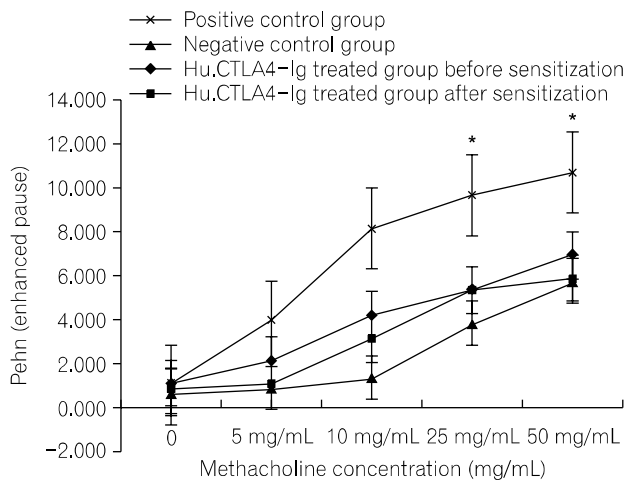


Fig. 1. Inhibitory effect of hu.CTLA4-Ig fusion protein before and after OVA sensitization on airway hyperresponsiveness. * $P < 0.05$, compared with positive control group. Data are expressed as the averages of seven mice per group.

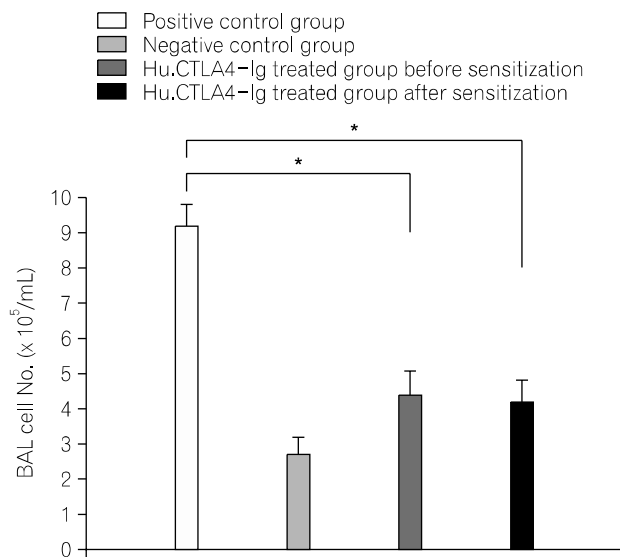


Fig. 2. Total cell counts in bronchoalveolar lavage fluid of OVA-sensitized mice treated with hu.CTLA4-Ig fusion protein. * $P < 0.05$, compared with positive control group. Data are expressed as the averages of seven mice per group.

$4.2 \pm 1.3 \times 10^5/\text{mL}$ 로서 양성대조군에 비해 의미있게 감소하였다($P < 0.05$) (Fig. 2).

3. 세포분획(Differential cell count)

음성대조군에서의 기관지폐포세척액 내 대식세포, 호산구, 호중구, 림프구수의 비율은 각각 $92.8 \pm 1.7\%$, $1.6 \pm 0.2\%$, $2.2 \pm 1.2\%$, $3.4 \pm 0.4\%$ 이었으며, 양성대조군에서의 비율은 $71.3 \pm 1.4\%$, $13.4 \pm 3.0\%$, $11.6 \pm 1.9\%$, $3.7 \pm 0.6\%$ 이었다. 한편, 난알부민

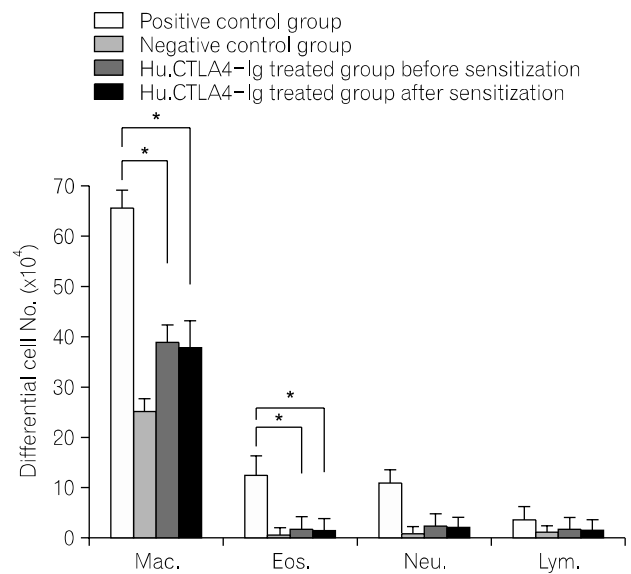


Fig. 3. Differential cell counts in bronchoalveolar lavage fluid of OVA-sensitized mice treated with hu.CTLA4-Ig fusion protein. Mac. = macrophage; Eos. = eosinophil; Neu. = neutrophil; Lym. = lymphocyte. * $P < 0.05$, compared with positive control group. Data are expressed as the averages of seven mice per group.

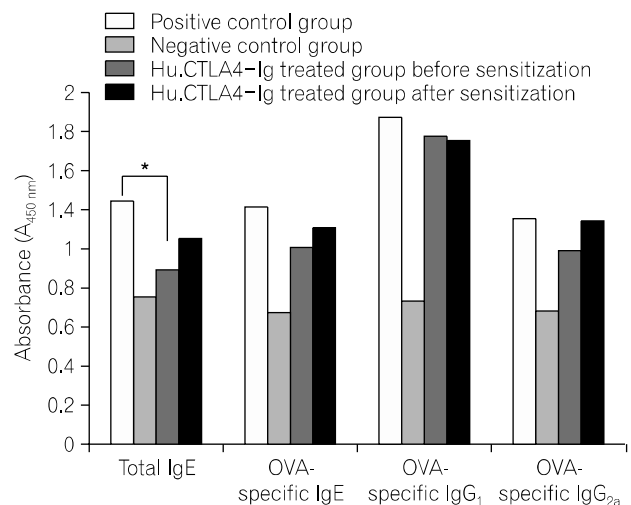


Fig. 4. Levels of total IgE, OVA-specific IgE, OVA-specific IgG₁ and OVA-specific IgG_{2a} as determined by ELISA in serum of OVA-sensitized mice treated with hu.CTLA4-Ig fusion protein. * $P < 0.05$, compared with positive control group. Data are expressed as the averages of seven mice per group.

감작전 hu.CTLA4-Ig 처리군에서의 비율은 각각 $88.4 \pm 3.0\%$, $3.2 \pm 0.3\%$, $5.3 \pm 3.3\%$, $3.1 \pm 0.2\%$ 이었으며, 난알부민 감작 후 처리군에서의 비율은 $89.7 \pm 2.8\%$, $2.8 \pm 0.2\%$, $4.6 \pm 2.7\%$, $2.9 \pm 0.2\%$ 으로 두 처리군 모두 양성대조군에 비해 호산구수의 비율이 의미있게 감소하였다($P < 0.05$) (Fig. 3).

4. 혈청 내 총 IgE와 난알부민-특이 IgE

난알부민 감작전 hu.CTLA4-Ig 융합단백을 2회 정맥주사 했을 때 총 IgE 생산($A_{450\text{ nm}}$)은 0.99 ± 0.6 으로 양성대조군에서의 측정값 1.38 ± 0.2 에 비해 의미있게 억제되었으며($P < 0.05$), 난알부민 감작 후 투여군에서의 생산($A_{450\text{ nm}}$)은 1.17 ± 0.5 으로서 양성대조군에 비해 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다($P > 0.05$). 이때 음성대조군에서는 0.84 ± 0.5 이었다(Fig. 4).

또한 난알부민 감작전 hu.CTLA4-Ig 융합단백을 2회 정맥주사 했을 때 난알부민-특이 IgE 측정값($A_{450\text{ nm}}$)은 1.12 ± 0.4 이었으며, 난알부민 감작 후 투여군에서의 측정값은 1.23 ± 0.8 으로서 양성대조군에서의 측정값인 1.35 ± 0.1 에 비해 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다($P > 0.05$). 이때 음성대조군의 측정값은 0.75 ± 0.1 이었다(Fig. 4).

5. 혈청 내 난알부민-특이 IgG₁, IgG_{2a}

난알부민 감작 전 hu.CTLA4-Ig 융합단백을 2회 정맥주사 했을 때 난알부민-특이 IgG₁ 측정값($A_{450\text{ nm}}$)은 1.75 ± 0.6 이었고 난알부민 감작 후 투여군에서의 측정값은 1.72 ± 0.1 로서 양성대조군에서의 측정값인 1.86 ± 0.5 와 유사하였으며, 음성대조군은 0.81 ± 0.6 이었다(Fig. 4). 한편 난알부민 감작전 hu.CTLA4-Ig 융합단백을 2회 정맥주사 했을 때 난알부민-특이 IgG_{2a} 측정값($A_{450\text{ nm}}$)은 1.10 ± 0.3 이었으며, 난알부민 감작 후 투여군에서의 측정값은 1.27 ± 0.5 로서 양성대조군에서의 측정값인 1.29 ± 0.1 와 유사하였으며, 음성대조군은 0.81 ± 0.1 이었다(Fig. 4). 이때 양성대조군에 대한 각각의 처리군에서의 측정값은 통계적 유의성은 없었다($P > 0.05$).

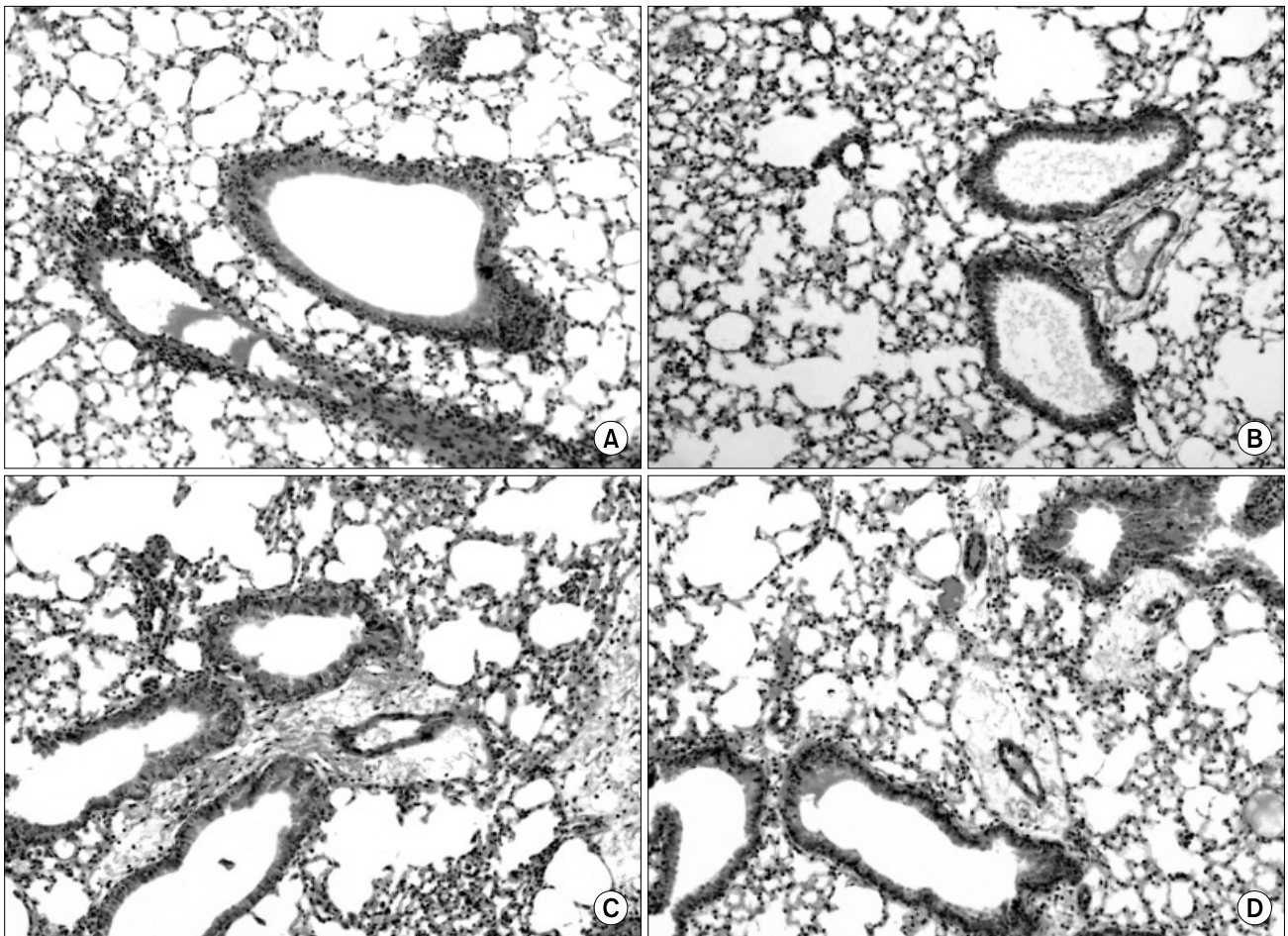


Fig. 5. Effects of hu.CTLA4-Ig treatment on pulmonary inflammation in BALB/c mice (A) positive control mice, (B) negative control mice, (C) OVA-challenged mice given hu.CTLA4-Ig treatment before OVA-sensitization, (D) OVA-challenged mice given hu.CTLA4-Ig treatment after OVA-sensitization. Original magnifications: $\times 100$ (A-D).

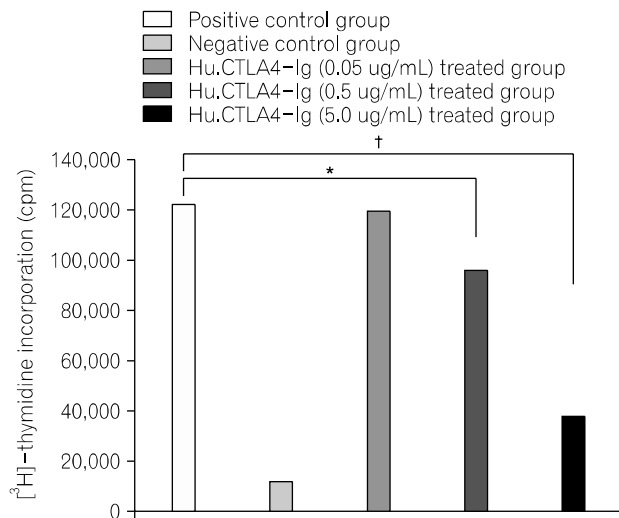


Fig. 6. Inhibitory effect of hu.CTLA4-Ig fusion protein on Con A-induced human peripheral blood mononuclear cell proliferation. * $P < 0.05$ and † $P < 0.01$, compared with positive control group. Data are expressed as the averages of seven mice per group.

6. 폐조직 분석

각각의 hu.CTLA4-Ig 융합단백 처리군과 대조군 마우스의 폐조직을 H&E 염색을 실시한 결과 난알부민 처리 전(Fig. 5C)과 후(Fig. 5D)에 hu.CTLA4-Ig 융합단백을 투여했을 때 폐조직내 기관지와 혈관주위에서의 호산구 침윤이 양성대조군(Fig. 5A)에 비해 감소하였다. 한편 음성대조군(Fig. 5B)에서도 호산구 침윤이 거의 관찰되지 않았다.

7. 사람 말초혈액 단핵구 활성화 억제 효과

사람 말초혈액 단핵구를 Con A로 자극하고 72시간 배양했을 때 양성대조군에서의 cpm값은 $121,878 \pm 16,004$ 이었으며, Con A 자극과 동시에 hu.CTLA4-Ig 융합단백 0.05, 0.5, 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 을 농도별로 처리했을때의 cpm 값은 각각 $119,591 \pm 27,044$, $95,868 \pm 25,814$, $37,898 \pm 19,330$ 으로 T 세포의 활성화가 억제되었다. 이러한 억제 효과는 hu.CTLA4-Ig 융합단백의 농도별 처리에 따라 농도 의존적으로 나타났으며, 특히 5.0 $\mu\text{g/mL}$ 의 처리군은 양성대조군에 비해 70% 가량 억제되었다($P < 0.01$). 이때 Con A와 hu.CTLA4-Ig 모두 처리하지 않은 음성대조군의 cpm 값은 $11,907 \pm 7,736$ 이었다(Fig. 6).

고 찰

본 연구자들은 이전 연구에서 hu.CTLA4-Ig 융합단백을 사용하여 다양한 T 세포 관련 질환 모델에서 억제 효과를 보여준 바 있다.²⁵⁾ 본 연구에서는 이를 기초로 하여 BALB/c 마우스를 대상으로 난알부민-유발성 천식 마우스모델에서 예방 및 억제 효과를 검증하고자 하였다.

본 연구 결과에서 기도과민성은 메타콜린 최고 농도인 50 mg/mL에서 난알부민 감작 전과 후 hu.CTLA4-Ig 융합단백 처리군이 양성대조군보다 의미있게 낮았으며, 이러한 결과는 hu.CTLA4-Ig이 천식 마우스모델에서 알레르기 염증반응을 억제하는 효과가 있음을 시사한다. 특히 난알부민 감작 전과 후 hu.CTLA4-Ig 처리군에서의 마우스 폐조직 내 호산구 침윤 정도는 양성대조군에 비해 크게 감소하였다. 이는 천식 마우스모델에서 기도과민성 증가와 염증세포의 기도내로의 유입 등에 보조자극물질인 B7 수용체에 의한 보조자극신호가 중요한 역할을 하며, hu.CTLA4-Ig 융합단백은 보조자극신호 차단에 의해 T 세포의 활성화를 직접적으로 억제하여 기도 내 염증반응과 기도과민성을 효과적으로 억제함을 시사한다.

지금까지 알레르기 질환인 천식과 관련된 연구 중 천식 마우스모델 유발 이전(난알부민 감작 후) 또는 천식이 진행중인 마우스(ongoing murine model)에 마우스 유래의 CTLA4-Ig 융합단백을 투여했을 때 기도 내 염증세포의 감소, 혈청 내 Th2 사이토카인과 난알부민-특이 IgE 생산 억제 등과 같은 천식의 특징적인 병리생태와 관련된 연구결과가 보고되었다.²⁰⁻²⁴⁾ 그러나 본 연구에서와 같이 난알부민 감작전과 난알부민 감작후에 CTLA4-Ig 융합단백을 투여하여 억제 효과를 보인 연구는 많지 않을 뿐만 아니라, 본 연구에서와 같은 사람 유래의 CTLA4-Ig 융합단백을 사용하여 천식 마우스모델에서의 기도과민성, 기도 염증 등의 억제 효과를 연구한 결과는 없었다.

마우스 유래 CTLA4-Ig을 처리한 다른 천식 마우스모델 연구와 본 연구를 비교하면, 난알부민 감작전과 후 CTLA4-Ig 융합단백 처리군에서 기도과민성 억제, 기관지폐포세척액내 호산구수 감소와 혈청 내 총 IgE 생산 억제에 대한 결과는 일치하나, 혈청 내 난알부민-특이 IgE, IgG₁, IgG_{2a}의 생산에 미치는 영향은 본 연구와 차이를 보인다.²²⁾ 본 연구에서는 난알부민-특이 IgE 값은 난알부민 감작 전과 후에 hu.CTLA4-Ig 처리군이 양성대조군에 비해 다소 낮았으나 통계적인 의미가 있지는 않았으며, 난알부민 감작 전과 후 hu.CTLA4-Ig 처리군에서 각각 난알부민-특이 IgG₁과 IgG_{2a}의 값은 양성대조군과 비교시 차이가 없었다. 이러한 결과의 차이는 실험에 사용한 CTLA4-Ig 융합단백의 종류와 투여 시기의 차이와 관련이 있거나 조절 T 세포(regulatory T cell, Treg)의 작용과 연관이 있을 것으로 예상된다. 유사한 연구에서는 CTLA4-Ig 융합단백을 첫 번째 난알부민 감작 12시간과 1시간 전 2회에 걸쳐 투여하였으나,^{20,21,23,24)} 본 연구에서는 첫 번째 난알부민 감작 7일과 1일전 2회 투여한 처리군과 2차 난알부민 감작 1일 후와 6일후 처리하였다. 이는 IgG₁과 IgG_{2a}의 생산이 IL-4

에만 의존적이지 않거나,²⁷⁾ IL-4와 IL-5와 같은 Th2 사이토카인의 생산이 항원 자극에 대한 T 세포 활성화 후 바로 생산되지 않고, 일정한 횟수의 세포 분열을 걸친 후에 이루어지므로²⁸⁾ 본 연구에서와 같은 난알부민 감작 훨씬 이전에 CTLA4-Ig 융합단백을 처리하면 Th1/Th2 사이토카인의 생산 변화에 의한 조절보다는 직접적으로 T 세포를 억제할 가능성이 있을 것으로 추정된다. 실제로 CTLA4-Ig을 사용하여 천식 마우스모델에서의 효과를 연구한 일부의 보고에 의하면, CTLA4-Ig의 투여 시기에 따라 Th1/Th2 면역반응의 억제 효과가 서로 다르게 나타난다는 보고가 있다.^{22,29)} 이는 항원 자극에 따른 T 세포 활성화의 시기와 관련이 있을 것으로 naive T 세포가 활성화되어 Th2 세포로 분화되는 과정의 어느 시기에 CTLA4-Ig을 투여 하는가에 따라 면역반응의 억제 효과가 다르게 나타날 수 있으리라 생각된다.

또한 최근의 다른 여러 연구에 의하면 마우스 질환모델에서 CTLA4-Ig의 투여에 의해 수지상세포에 의한 indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) 활성이 증가하여 면역억제나 면역관용 등이 유발된다는 보고가 있었으며,³⁰⁻³²⁾ 다른 연구에 의하면 작용기전에 조절 T 세포가 관련되어 천식 유발에 의한 Th1/Th2 면역체계의 불균형을 직접적으로 조절하기 보다는 활성화된 T 세포를 억제한다는 결과들이 보고된 바 있다.³³⁻³⁶⁾

이와 같이 CTLA4-Ig의 작용기전이 아직 정확히 규명되지 않았으나, 최근에는 건선, 류마티즘, 골수이식에서의 거부반응 억제 등 다양한 질환에서의 임상실험이 진행되어 왔다. 그러나 CTLA4-Ig의 가장 큰 한계는 생체내에서 자연적으로 유발되는 CTLA-4에 의한 억제 작용을 저해하고, CD28의 활성화에 의해 유도되는 T 세포 자극을 억제한다는 문제점들이 있다.

CTLA4-Ig 융합단백은 CD28 항원보다 강한 친화력으로 항원제시세포의 B7-1 (CD80)이나 B7-2 (CD86)와 결합하여 T 세포의 보조자극신호를 효과적으로 차단한다. CD28은 T 세포에서 항상 발현되어 있는 항원으로서 T 세포의 활성화와 사이토카인 생산에 중요한 역할을 하며,³⁷⁾ CTLA-4는 활성화된 T 세포 표면에서 발현되어 T 세포 활성화 과정에서 역조절인자(negative regulator)로서 작용한다.¹²⁻¹⁵⁾ 기존에 보고된 연구결과에 의하면 CD28에 의한 보조자극은 naive CD4+ T 림프구의 활성화 유도나 면역무반응 유도의 억제에서 중요한 역할을 하는^{34,35)} 반면 CTLA4-Ig은 보조자극신호를 매우 효과적으로 차단하여 다양한 이식반응에서 면역억제 효과와 실험적 알레르기성 뇌척수염, 건선 등과 같은 자가면역질환에서 효과가 크다는 연구 결과가 보고되었다.^{19,39-41)}

난알부민 감작 전과 후 hu.CTLA4-Ig 융합단백 처리 시 기도과민성이 음성대조군의 Pehn 평균값에 비해 유사하거나

다소 높았지만, 양성대조군에 비해서는 약 35%와 46% 가량 억제되었다($P<0.05$). 이와 같은 효과는 CTLA4-Ig 융합단백이 항원 자극에 의한 naive CD4+ T 세포의 Th2 세포로의 분화를 억제함으로써 CD4+ T 세포를 면역무반응 상태로 유도하는 것으로 알려져 있다.⁴¹⁾

또한 마우스 혈청 내 총 IgE의 생산도 양성대조군에 비해 억제되었으며, 이러한 결과 역시 T 세포 활성화 억제에 기인하는 것으로 생각된다.^{20,21)}

또한 기도과민성의 병태생리와 관련하여 T 세포의 보조자극신호가 난알부민-유발성 천식 마우스모델에서 기도과민성 유도 과정 초기에 관여함을 시사한다. 즉, 본 연구 모델과 같은 방법으로 hu.CTLA4-Ig 융합단백을 투여하면, 폐에서 T 세포 활성화가 억제되어 기도과민성과 기도 내 염증 반응이 억제되는 것으로 추측된다. Hu.CTLA4-Ig 융합단백 처리군에서 기관지폐포세척액 내 호산구가 양성대조군에 비해 70% 이상 감소하였다($P<0.05$). 이 결과도 T 세포 활성화 억제에 의해 기도내 알레르기 염증반응이 억제되어 호산구 감소가 나타난 것으로 추정된다.^{20,21,23,24)}

마우스 폐조직 내 염증 소견도 기관지(peribronchial)와 혈관주위(perivascular)의 염증 소견이 양성대조군에 비해 의미있게 감소되었다. 이는 기존에 보고된 천식 마우스모델에서 CTLA4-Ig 융합단백을 사용한 연구 결과들과 일치한다.²⁰⁻²⁴⁾

이와 같이 마우스모델에서 hu.CTLA4-Ig 융합단백이 알레르기 염증반응을 억제하였기에 사람 말초혈액단핵구를 Con A 자극에 의한 활성화 정도를 hu.CTLA4-Ig 융합단백이 억제하는지 확인하기 위해 농도별로 처리했을 때 농도-의존적으로 T 세포의 활성화가 억제되었다. 이는 hu.CTLA4-Ig 융합단백이 사람 T 세포의 항원-비특이적 활성화 과정을 직접적으로 억제함을 시사한다.

결론적으로 본 연구결과에 의하면 CD28:B7 보조자극신호가 난알부민 유발에 의한 기도과민성 증가와 폐조직내 알레르기 염증 발달 과정에 중요한 역할을 하며, 본 연구에 사용된 hu.CTLA4-Ig 융합단백은 이 과정을 효과적으로 억제하였다. 특히 천식 유발전과 후에 hu.CTLA4-Ig 융합단백을 처리하면 천식 마우스모델의 면역학적 특징 및 병태생리 과정을 효과적으로 억제하였다. 그러나 이러한 억제과정은 기존에 알려진 Th1/Th2 사이토카인의 조절에 의한 작용기전과 달리 다른 과정일 가능성도 있어, 향후 천식의 병태생리에서 CTLA4-Ig 융합단백의 정확한 억제 작용기전에 대한 연구가 더 필요할 것으로 생각된다.

결론

Hu.CTLA4-Ig 융합단백은 천식 마우스모델에서 기도과민

성, 기도와 폐조직 내 염증반응을 효과적으로 억제하였다. 특히, hu.CTLA4-Ig 융합단백을 천식모델 유발 전과 후에 각각 투여시 유사한 억제 효과를 나타내었다. 그러나 마우스 혈청내 면역글로불린의 생산에는 크게 영향을 미치지 못한 점으로 미루어 이러한 억제효과는 Th1/Th2 면역 불균형의 조절과는 다른 기전이 작용할 것으로 생각한다.

참 고 문 헌

- 1) Azzawi M, Bradley B, Jeffery PK, Frew AJ, Assoufi B, Kay AB, et al. Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. *Am Rev Resp Dis* 1990;142:1407-13
- 2) Wardlaw AJ, Dunnette S, Gleich GJ, Collins JV, Kay AB. Eosinophils and mast cells in bronchoalveolar lavage in mild asthma: relationship to bronchial hyperreactivity. *Am Rev Resp Dis* 1989;137:62-9
- 3) Walker C, Bode E, Boer L, Hansel T, Blaser K, Virchow J. Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Resp Dis* 1992;146:109-15
- 4) Bmselle GG, Kips JC, Tavemier JH, Heyden JGVD, Cuvelier CA, Bluethmann H, et al. Attenuation of allergic airway inflammation in IL-4 deficient mice. *Clin Exp Allergy* 1994; 24:73-80
- 5) Lukacs NW, Strieter RM, Chensue SW, Kunkel SL. Interleukin-4 dependent pulmonary eosinophil infiltration in a murine model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;10:526-32
- 6) Wills-Karp M. Interleukin-13 in asthma pathogenesis. *Immunol Rev* 2004;202:175-90
- 7) Schwartz RH. Costimulation of T lymphocytes: the role of CD28, CTLA-4, and B7/BB1 in interleukin-2 production and immunotherapy. *Cell* 1992;71:1065-8
- 8) Guinan EC, Gribben JG, Boussiotis VA, Freeman GJ, Nadler LM. Pivotal role of the B7: CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood* 1994;84:3261-82
- 9) Linsley PS, Clark EA, Ledbetter JA. T-cell antigen CD28 mediates adhesion with B cells by interacting with activation antigen B7/BB-1. *Proc Natl Acad Sci* 1990;87:5031-5
- 10) Linsley PS, Brady W, Grosmaire LS, Aruffo A, Damle NK, Ledbetter JA. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J Exp Med* 1991;173:721-30
- 11) Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med* 1991;174:561-9
- 12) Green JM, Thompson CB, Bluestone JA. CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation. *Immunity* 1994;1: 405-13
- 13) Krummel MF, Allison JP. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation [see comments]. *J Exp Med* 1995;182:459-65
- 14) Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Mak TW, et al. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science* 1995;270:985-8
- 15) Tivol EA, Borriello F, Schweitzer AN, Lynch WP, Bluestone JA, Sharpe AH. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* 1995;3:541-7
- 16) Wallace PM, Johnson JS, MacMaster JF, Kennedy KA, Gladstone P, Linsley PS. CTLA4-Ig treatment ameliorates the lethality of murine graft-versus host disease across major histocompatibility complex barriers. *Transplantation* 1994;58:602-10
- 17) Waterhouse P, Penninger JM, Timms E, Wakeham A, Shahinian A, Mak TW, et al. Lymphoproliferative disorders with lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science* 1995;270:985-8
- 18) Linsley PS, Wallace PM, Johnson J, Gibson MG, Greene JL, Tepper MA, et al. Immunosuppression in vivo by a soluble form of the CTLA-4 T cell activation molecule. *Science* 1992;257: 792-5
- 19) Lenschow DJ, Zeng Y, Thistlewaite JR, Montag A, Brady W, Bluestone JA, et al. Long-term survival of xenogeneic pancreatic islet grafts induced by CTLA4-Ig. *Science* 1992;257:789-92
- 20) Krinzman SJ, De Sanctis GT, Cernadas M, Mark D, Wang Y, Finn PW, et al. Inhibition of T cell costimulation abrogates airway hyperresponsiveness in murine model. *J Clin Invest* 1996;98:2693-9
- 21) Van Oosterhout AJM, Hofstra CL, Shields R, Chan B, Van Ark I, Nijkamp FP, et al. Murine CTLA4-IgG treatment inhibits airway eosinophilia and hyperresponsiveness and attenuates IgE upregulation in a murine model of allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997;17:386-92
- 22) Keane-Myers A, Cause WC, Linsley PS, Chen SJ, Wills-Karp M. B7-CD28/CTLA-4 costimulatory pathways are the development of T helper cell 2-mediated responses to inhaled antigens. *J Immunol* 1997;158:2042-9
- 23) Padrid PA, Mathur M, Li X, Herrmann K, Qin Y, Bluestone JA, et al. CTLA4Ig inhibits airway eosinophilia and hyperresponsiveness by regulating the development of Th1/Th2 subsets in a murine model of asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1998;18: 453-62
- 24) Deurloo DT, Van Esch BC, Hofstra CL, Nijkamp FP, Antoon JM, Van Oosterhout AJ. CTLA4-IgG reverses asthma manifestations in a mild but not in a more "severe" ongoing murine model. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:751-60
- 25) Jang SO, Hong SJ, Cho HS, Chung YH. Immunotherapeutic effects of CTLA4Ig fusion protein on murine EAE and GVHD. *Immune Network* 2003;3:302-9
- 26) Neuhaus-Steinmetz U, Glaaba T, Daser A, Braun A, Lommatzsch M, Renz H, et al. Sequential development of airway hyperresponsiveness and acute airway obstruction in a mouse model of allergic inflammation. *Int Arch Allergy Immunol* 2000;121:57-67

- 27) Ohara J, Finkelman FD, Katona IM, Urban JF Jr, Holmes J, Paul WE, et al. Interleukin-4 is required to generate and sustain in vivo IgE responses. *J Immunol* 1988;141:2335-41
- 28) Gett AV, Hodgkin PD. Cell division regulated the T cell cytokine repertoire, revealing a mechanism underlying immune class regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:9488-93
- 29) Corry DB, Reiner SL, Linsley PS, Locksley RM. Differential effects of blockade of CD28-B7 on the development of Th1 or Th2 effector cells in experimental Leishmaniasis. *J Immunol* 1994;153: 4142-8
- 30) Calcimaro F, Grohmann U, Orabona C, Fallarino F, Vacca C, Fioretti MC, et al. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat Immunol* 2002;3:985-7
- 31) Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Puccetti P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:1206-12
- 32) David HM, Madhav DS, Andrew LM. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J Immunol* 2004;172:4100-10
- 33) Claire NM, Helen T, Laura CA, Karen IM, Patrick JB, David MS. Inhibition of human T cell proliferation by CTLA-4 utilizes CD80 and requires CD25+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2002;32:2888-96
- 34) David HM, Madhav DS, Andrew LM. Ligation of B7-1/B7-2 by human CD4+ T cells triggers indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dendritic cells. *J Immunol* 2004;172:4100-10
- 35) Andrew LM, Phillip C, Babak B, Anna MH, Brendan M, David HM, et al. Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4- mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. *Int Immunol* 2004;16:1391-401
- 36) Nianqiao G, Yongxiang Z, Chong D, Zhonghua KC. Negative costimulatory molecules: the proximal of regulatory T cells? *Med Hypo* 2006;67:841-7
- 37) Hathcock KS, Laszlo G, Pucillo C, Linsley P, Hodes RJ. Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J Exp Med* 1994;180:631-40
- 38) Van Gool SW, Barcy S, Devos S, Vandenberghe P, Ceuppens JL, De Boer M, et al. CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2): potential targets for immunotherapy? *Res Immunol* 1995;146:183-206
- 39) Abrams JR, Lebwohl MG, Guzzo CA, Jegasothy BV, Goldfarb MT, Brown MJ, et al. CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. *J Clin Invest* 1999;103:1243-52
- 40) Kosuge H, Suzuki J, Gotoh R, Koga N, Ito H, Uede T, et al. Induction of immunologic tolerance to cardiac allograft by simultaneous blockade of inducible costimulator and cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 pathway. *Transplantation* 2003;75: 1374-9
- 41) Gavett SH, Chen X, Finkleman F, Wills-Karp M. Depletion of murine CD4+ T lymphocytes prevents antigen-induced airway hyperreactivity and pulmonary eosinophilia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994;10:587-93