

CpG-ODNs를 이용한 천식의 새로운 면역 조절 요법

서울의대 내과

조상현 · 장윤석

서 론

기관지천식의 과민반응을 조절하기 위한 치료 방법으로 원인 알레르겐에 대한 회피 요법과 탈감작요법이 시도되고 있다. 그러나 원인 알레르겐을 회피하는 것은 실제로 불가능한 경우가 많으며 회피 불가능한 알레르겐에 대한 면역치료로서 탈감작요법이 시행되고 있다. 기존의 탈감작요법은 몇몇 알레르겐에 의한 아토피성 기관지천식 환자에게만 제한적으로 시행되며, 아나필락시스와 같은 심각한 부작용이 있을 수 있다는 문제점이 있어 새로운 면역치료법의 개발이 필요한 실정이다. 특히 알레르기 염증에서 핵심적인 역할을 담당하는 T 세포의 면역 기능 이상을 조절하고자 하는 연구가 활발히 이루어지고 있으며 기존의 BCG vaccination에 대한 재조명과 함께, peptide immunotherapy, DNA vaccination, CpG-ODNs (oligodeoxynucleotides) therapy 등 특이적 치료법들이 개발되고 있다¹⁾.

이 글에서는 최근 연구에서 얻은 성공적인 동물 실험 결과를 바탕으로 Th1 면역 반응을 유도하여 기관지천식의 Th1/Th2 불균형을 조절할 수 있는 CpG-ODNs를 중심으로 소개하고자 한다.

알레르기 염증과 T 세포

1970년대 말부터 시행된 천식 환자에서의 기관지점막 생검은 경증의 천식 환자에서도 기도 염증 반응이 존재한다는 것을 밝혔으며, 일반 염증과 달리 호산구와 림프구의 침윤이 뚜렷이 증가되어 있는 알레르기 염증 소견을 관찰하였다. 본 교실에서도 기관지점막 생검을 통해 천식의

중증도에 따라서 기도 염증 반응이 심해지며 기도 상피세포의 탈락, 상피세포 기저막하 콜라겐 침착, 기도 평활근 및 점액선의 증식 등의 소견을 보고한 바 있다²⁾. 현재 천식은 기존의 가역적인 기도 폐색과 기관지과민성 이외에 만성 호산구성 기도 염증 질환으로 정의된다.

알레르기성 염증 반응에서 중요한 세포는 T 세포와 호산구로 T 세포는 알레르기성 염증 반응의 양상을 결정하는 조정자의 역할을 담당하는데 이는 주로 T 세포에서 생성되는 cytokine을 통해 이루어진다. 그리고 활성화된 호산구에서는 여러가지 화학매체를 분비하여 천식 기관지의 손상을 유도한다.

Th2 가설

1986년 Mosmann 등은 설치류의 T 세포 클론에서 IL-2와 IFN- γ 를 생성하는 Th1 세포와 IL-3, IL-5, IL-6 및 IL-10 등을 생성하는 Th2 세포가 존재함을 보고하였다³⁾. 대략적으로 Th1 세포는 지연성 과민반응에 관계하고, Th2 세포는 IgE 항체의 생성을 증가시키며 알레르기성 염증 반응에 관계한다⁴⁾. 또한 Th1과 Th2 cytokine을 동시에 생성하는 Th0 세포도 보고되었다⁵⁾.

Th2 세포는 eotaxin, RANTES, MIP-1 α 와 MCP-5와 같은 C-C (또는 β) chemokine들을 생성하여 호산구를 기도내로 주유하며, IL-5, IL-3 및 GM-CSF를 분비하여 호산구의 분화, 성숙, 활성화 및 생존을 증가에 관계한다¹⁾. 기도에 침윤된 호산구에서는 MBP, ECP, eosinophil-

통신저자 : 서울의대 내과 조상현
서울시 종로구 연건동 28 (☎ 110-744)
e-mail : shcho@plaza.snu.ac.kr

면 IL-12가 증가된 상황에서는 Th1세포로의 분화가 촉진된다. IL-4는 Th2 세포, 비만세포, 호산구, 호염구 및 CD4+ NK 1.1 세포에서 분비되며, IL-12는 dendritic cell을 비롯한 항원제시세포에서 분비된다. 이와 같은 관점에서 볼 때, 알레르기 질환의 발생을 결정하는 가장 중요한 시점은 알레르겐에 특이적인 CD4+ Th2 세포가 생성되는 시점이라고 할 수 있다.

분비된 IL-4는 IL-4 수용체와 결합한 뒤, STAT6(signal transducer and activator of transcription 6)를 통해 세포내로 신호를 전달하며 이어서 GATA3, c-Maf, NFATc (nuclear factor of activated T cell), NIP45 (NFAT-interacting protein 45) 등의 전사인자를 활성화시켜 Th2 세포로의 분화를 유도한다¹⁴⁾.

분화된 Th2 세포는 항원제시세포와 만나 알레르겐의 펩타이드를 공여 받게되면 IL-4, IL-5, IL-13 등의 cytokine을 분비하여 알레르기 염증을 발생시키는데 있어 중심적인 역할을 담당한다.

그리고 같은 항원에 대해서도 항원의 양이나 항원제시세포의 종류에 따라 Th0 세포의 분화양상이 틀릴 수 있는데, 아주 고농도나 저농도의 항원을 투여했을 때는 Th2 반응이 유도되는 반면, 적당량의 항원에는 Th1 반응을 일으키게 된다. 또 저농도의 항원을 투여하고 항원제시세포로 B 림프구를 이용한 경우 Th2 반응이 특히 잘 유도되며, 적당량의 항원을 단핵구와 같이 반응시키면 Th1 반응이 잘 유도된다¹⁵⁾.

항원이 항원제시세포 내에서 처리가 되어 펩타이드 상태로 MHC 분자와 함께 T 세포 수용체 (T cell receptor: TCR)에 결합한 후 면역 반응이 일어나기 위해서는 항원제시세포 표면의 CD80 (B7.1)이나 CD86 (B7.2) 분자가 T 세포 표면의 CD28과 결합이 일어나야 하는데, CD80과 CD28의 결합은 Th1 세포 반응을 유도하고, CD86과 CD28의 결합은 Th2 세포 반응을 유도한다. CD80/CD86이 T 세포 표면의

CD28 대신에 CTLA-4와 결합시에는 면역 반응이 일어나지 못하고 관용이 유도된다¹⁵⁾. 그리고 호스트의 유전적 반응 차이에 의해서도 면역 반응의 양상이 달라질 수 있어서 우리나라의 집먼지진드기 과민성 천식 환자에서 HLA-DRB1*07 구역의 유전자가 과민반응의 발생에 관계하며 HLA-DRB1*04는 방어적인 관계가 있다¹⁶⁾.

CpG-ODNs

1. CpG-ODNs의 면역 기능 증강 효과

CpG motif는 5'-purine-purine-Cytosine-Guanine-pyrimidine-pyrimidine-3'의 기본 구조를 가지는 immunostimulatory sequence로서 비메틸화된 형태로 주로 세균의 DNA에 많이 분포하고 있다. 척추동물의 DNA에도 CpG motif가 존재하나 대부분 메틸화된 형태이며 훨씬 적은 양이 분포한다. 비메틸화된 CpG motif는 면역 항진 능력이 있어 림프구의 증식을 유도하지만 메틸화된 CpG motif는 면역 항진 능력이 없어 림프구의 증식을 유도하지 못한다. CpG motif를 포함하는 oligodeoxynucleotides를 CpG-ODNs라고 하며 면역 항진 능력이 있기에 ISS-ODNs (immunostimulatory oligodeoxynucleotides)라고도 한다.

역사적으로 1970년대에 *Mycobacterium bovis*가 동물 모델과 사람에서 항암작용이 있음이 보고된 이후¹⁷⁾, 1980년대 중반에 Tokunaga 등이 *Bacillus Calmette Guerin* (BCG) 균에서 추출한 DNA가 NK 세포를 활성화하여 종양을 억제하는 작용이 있음을 관찰하여 세균의 DNA가 면역 항진능을 가진다는 사실을 최초로 보고하였다^{18,19,20)}. 이후 척추동물의 DNA가 아닌 세균에서 추출한 DNA만이 NK 세포를 활성화시키고 IFN- γ 의 분비능을 항진시키는 것이 보고되었으며²¹⁾, 중심부에 C-G nucleotide가 있는 45-mer 길이의 oligodeoxynucleotides의 palindromic sequence가 면역 항진능에 필수적인 motif임이 밝혀졌다²²⁾.

또한 합성 ODNs를 이용하여 목표 mRNA가 번역되는 단계를 특이적으로 억제하는 anti-sense ODNs를 연구하던 그룹에서 목표 단백질 억제 뿐만 아니라, 특정한 ODNs이 B 세포의 증식과 MHC 분자의 발현 증대, 비장 비대를 초래한다는 사실을 밝혔고 Krieg 등은 중심부에 비메틸화된 C-G dinucleotide가 위치하고 5' 쪽에 2개의 purine이, 3' 쪽에 두 개의 pyrimidine이 위치하는 짧은 길이의 ODNs가 B 세포에서 면역 항진능을 나타내는 motif임을 규명하고 CpG motif라고 명명하였다²³⁾.

이와 같은 CpG motif는 NK 세포와 IFN- γ 의 생산을 항진시키는 BCG DNA에서 추출한 45-mer의 ODNs와 거의 유사하였으며²⁴⁾, CpG motif는 척추동물의 DNA보다 세균의 DNA에서 약 20배 가량 더 풍부하게 존재하고 척추동물에서는 CpG motif를 이루는 cytosine의 대부분이 (약 80%) 메틸화되어 있음이 밝혀졌다. CpG-ODNs에서 비메틸화된 cytosine을 메틸화시키거나 세균의 DNA를 methylase를 이용하여 메틸화시키는 경우에는 척추동물에서 추출한 DNA와 유사하게 면역 항진능을 소실한다²⁵⁾. 즉 비메틸화된 CpG motif는 세균의 DNA에 존재하며 척추동물에서 '위험 신호'로 인식되어 Th1 면역 기능을 항진시킬 수 있는 부분이다. 따라서 innate 면역 시스템이 CpG-motif를 인지하게 되며 현재까지의 연구 결과에 따르면 Toll like receptor 9 (TLR9)이 CpG-ODNs의 수용체 역할을 한다고 알려져 있다²⁶⁾.

CpG-ODNs는 알레르기 질환 뿐만 아니라 암, 감염 질환에서 치료 효과가 기대되고 있으며, 최근 각광받고 있는 DNA 백신에서도 CpG motif가 하나의 구성 요소로서 Th1 면역 반응을 항진시켜주는 adjuvant의 역할을 담당하고 있다.

2. CpG-ODNs의 작용기전

CpG-ODNs에 특이적인 수용체에 대해서는 많은 논란이 있었다. Sepharose beads에 CpG

-ODNs를 고정 한 뒤 B 세포를 자극하여도 고정하지 않은 CpG-ODNs와 같은 정도로 B 세포를 자극하기에 세포 표면에 존재하는 수용체가 있을 것으로 추정되었다. 그러나 DNA는 모든 세포에서 능동적으로 흡수되며 CpG-ODNs의 효과가 나타나기 위해서는 능동적인 세포내이입(endocytosis)라는 과정이 필수적이라는 일부의 보고가 있다. CpG-ODNs이 세포내로 이입되면 대부분의 DNA는 endosome에 남아 있게 되지만 일부는 핵까지 도달한다. CpG-ODNs의 면역 증강 능력이 endosome의 산성화를 억제하는 chloroquine 등의 약제에 의해 억제되므로 endosome의 산성화가 CpG-ODNs의 작용에 있어 필수적인 단계임을 알 수 있다. 그러나 현재까지 endosome의 산성화가 CpG-ODNs의 작용에 관여하는 정확한 기전에 대해 알려진 바가 없다²⁷⁾.

세포내에서 CpG-ODNs과 결합하는 수용체에 대해서 역시 많이 알려진 바는 없으나 DNA-dependent protein kinase (DNA-PK)가 CpG-ODNs의 작용을 나타내는데 있어 필수적임이 보고되었다²⁸⁾. DNA-PK는 세포질과 핵, 모두에 분포하며, catalytic subunit가 없는 마우스에 세균의 DNA나 CpG-ODNs를 투여하면 NF- κ B의 활성화가 억제되고 IL-6와 IL-12의 생산이 억제되었다.

Toll-like receptor 9 (TLR9)는 CpG-ODNs에 의한 비장세포의 증식, 수지상세포의 성숙, 대식세포에서 TNF- α , IL-6, IL-12의 분비에 관여하며 TLR9 결핍 마우스에서는 CpG-ODNs에 의한 c-JUN NH2-terminal kinase (JNK)와 IL-1 receptor kinase (IRAK)의 활성화가 감소되며 CpG-ODNs에 의해 증가된 toxic shock에 저항성을 보였다. TLR9의 세포내 위치는 아직 알려지지 않았으나 TLR9 유전자에 transmembrane segment가 있기에 막단백질임에는 틀림이 없고 endosome의 막에 위치할 가능성도 있다²⁶⁾.

세포내 신호 전달은 common Toll receptor signaling pathway를 따르며, 이에 관여하는 물질로는 MyD88 (myeloid differentiation marker 88), IRAK, TRAF6 (TNF receptor associated factor), MAPK (mitogen activated protein kinase) p38, JNK, NF- κ B, c-myc, Ets-2 등이 관여한다. MyD88는 CpG-ODNs에 의한 IL-12와 TNF- α 의 생성에 관여하며 TRAF6는 마우스 대식세포에서 CpG-ODNs에 의한 IL-12의 생성에 관여한다. 또한 CpG-ODNs는 세포내에서 reactive oxygen species를 생성시켜 IL-6의 생산에 관여한다²⁷⁾.

CpG motif가 체내로 들어오면 수지상세포 (dendritic cell)와 같은 항원제시세포에서 MHC II 분자와 CD80 및 CD86의 costimulatory molecule의 발현이 증가되고 IFN- α , IFN- β , IL-12, IL-18, TNF- α 등을 분비하여 NK 세포를 활성화시키며 Th1 면역반응 쪽으로 T 세포를 활성화시킨다. 또한 cytotoxic T 세포 생성과 IFN- γ 의 분비가 증가되며 B 세포에서는 IgE의 생성이 감소하고 IgM과 IgG2a의 생산이 증가된다(Fig. 2). 또한 CpG-ODNs는 phosphatidylinositide-3'-OH kinase pathway를 통해 cIAP(cellular inhibitor of apop-

tosis proteins)를 증가시켜 수지상세포의 apoptosis를 억제하여 innate 면역 체계에서의 반응을 증가시킨다²⁹⁾.

3. CpG-ODNs의 알레르기 질환 예방 및 치료 효과

기관지천식에서 CpG-ODNs를 이용한 면역 조절 요법은 크게 예방과 치료의 관점으로 볼 수 있다. 기관지천식에 있어서 최초의 보고는 1998년 *Schistosoma mansoni* 충란을 이용한 기관지천식 C57BL/6 마우스 모델에서 CpG-ODNs를 감작 단계에서 복강내로 알레르겐과 함께 투여시에 기도과민성, BALF (bronchoalveolar lavage fluid) 호산구 비율의 감소, 혈청 IgE, BALF IL-4 등이 감소하고 BALF IFN- γ 와 IL-12가 증가하는 등 기관지천식의 발생이 성공적으로 억제되어 기관지천식의 발생에 대해 예방의 효과가 있음을 보고한 것이다³⁰⁾. 본교실에서도 난알부민을 사용한 기관지천식 마우스 모델에서 항원 감작 당시 다양한 CpG-ODNs를 함께 투여하여 기도과민성, 호산구성 기도 염증, 알레르겐 특이 IgE가 유의하게 감소하고 알레르겐 특이 IgG2a가 증가함을 보고한 바 있다^{31,32)}.

기관지천식에 대한 CpG-ODNs의 예방 효과가 밝혀진데 이어 난알부민을 사용한 기관지천식 BALB/c 마우스 모델에서 감작 후에 난알부민으로 유발하기 24시간 전에 전신적 (복강) 또는 점막 (비강 또는 기관) 투여로 기관지천식의 발현이 억제되며, CpG-ODNs를 복강 또는 비강내로 1회 투여한 경우가 dexamethasone을 7일간 매일 투여한 경우와 비슷한 치료 효과가 있음이 보고되었다³³⁾. 최근 이와 같이 난알부민으로 유발하기 전에 CpG-ODNs를 투여하는 경우는 NK 세포 없이도 치료 효과를 나타냄이 보고되었다³⁴⁾.

또한 AKR/J 마우스에서 conalbumin으로 감작시킨 후 기관으로 투여하여 기관지천식을 유발하고 24시간 후에 CpG-ODNs를 30 또는

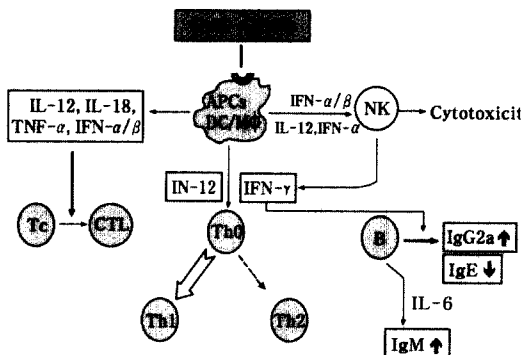


Fig. 2. Intercellular mechanism of CpG-ODNs activation. Direct effects of CpG-ODNs are apparently limited to the stimulation of professional APCs and B cells and then the products of these stimulations such as IFN- α/β , IL-12, IL-18, and IL-6 drive the characteristic Th1 development.

100 μ g을 투여하였을 때 기도 과민성, BALF 호산구 비율, 혈청 항원 특이 IgE가 유의하게 감소하고 BALF 및 비장세포에서 IL-13, IL-4, IL-5의 생성이 감소하고 IFN- γ 가 증가하였으며 폐조직에서 B7.1의 발현이 증가하고 B7.2의 발현이 감소하는 등 기관지천식에 대한 치료 효과가 보고되었다³⁵⁾.

이전의 보고가 주로 CpG-ODNs의 단기간 효능에 대해 보고한 것이라면 Sur 등은 두드러기 속 항원을 이용한 마우스 모델에서 감작 후 항원으로 유발하기 48 시간 전에 CpG-ODNs를 기관내로 투여하였을 때 기관지천식 발생 억제 효과가 최소 6주 이상 지속됨을 보고하였다³⁶⁾. 또한 IFN- γ 가 결핍된 형질전환 마우스에서는 기관지천식에 대한 치료 효과가 없어 이러한 Th2 면역 반응에서 Th1 면역 반응으로의 전환을 일으키는 CpG-ODNs의 효능은 IFN- γ 에 의해 매개됨을 보고하였다. 그러나 알레르기 반응을 억제하는 CpG-ODNs의 효능에 IFN- γ 와 IL-12가 필수적이지 않다는 보고도 있어 차후의 연구 결과가 기대된다³⁷⁾.

4. CpG-ODNs의 backbone 구조에 따른 효과

CpG-ODNs는 주변의 염기 서열 뿐만 아니라 backbone의 구조에 따라 면역 증강 정도의 다양성을 보인다. Backbone 구조는 phosphodiester 형태와 phosphorothioate 형태가 있다. Phosphodiester 형태는 자연적으로 존재하나 exonuclease에 의해 쉽게 분해가 되기에 면역 증강 능력이 떨어지며³⁸⁾, phosphorothioate 형태가 exonuclease에 대한 내성이 최고 200배정도 강하며 반감기가 길어 면역 증강 능력이 강하다. 따라서 CpG-ODNs를 이용한 실험의 대부분이 phosphorothioate backbone 구조의 ODNs를 사용하여 이루어졌다. 그러나 phosphorothioate backbone 구조의 ODN을 사용하는 경우에서 골수의 조혈 기능이 항진되며 비장 비대가

일어나고, 국소 염증 반응 등 부작용이 더 높을 수 있다고 알려져 있다^{39,40)}. 또한 인간 B 세포에서 특정 CpG-ODNs으로 시행한 연구에 따르면, backbone 구조가 phosphodiester인 경우에는 CD86의 발현이 증가되는 등 면역 증진 능력이 있었으나 그 backbone 구조를 phosphorothioate 형태로 바꾸자 면역 증강 능력이 감소되었음이 보고되어 있어⁴¹⁾ phosphodiester backbone 구조의 CpG-ODNs를 이용한 연구에 대한 요구가 높아지고 있다.

한편 deoxyriboguanosine을 연속적으로 연결한 deoxyriboguanosine run (dG run)은 주로 단핵구 계에서 발현하는 scavenger receptor에 결합한다고 알려져 있으며^{42,43)}, tetraplex 구조를 형성하여 exonuclease에 저항성을 가진다⁴⁴⁾. 또한 backbone 구조 중 일부만을 phosphorothioate로 치환하고 양쪽 말단에 poly(dG)를 첨부한 경우에는 사람의 PBMC (말초혈액 단핵구)에서 NK 세포의 활성화를 증진시킬 수 있었으나, 모든 backbone 구조를 phosphorothioate화하는 경우에는 오히려 활성화를 저해시킴이 보고되었다⁴⁵⁾.

이러한 사실은 dG run이 scavenger receptor를 통해 표적 세포로 CpG-ODNs이 들어갈 수 있도록 도와주어서 CpG-motif로 인한 신호 전달을 증강시킨다는 사실을 시사해준다. 그러나 어떤 종류의 세포가 dG run이 첨가된 CpG-ODNs의 직접적인 표적 세포인지 명확하지 않으며, 가장 이상적인 형태의 dG run, 그리고 dG run의 in vivo에서의 기능은 알려지지 않았다. 최근의 연구에서 phosphodiester backbone 구조의 CpG-ODNs의 5' 말단이 아닌 3' 말단에 deoxyriboguanosine run (dG run)을 첨가하면 dG run의 크기에 따라 dendritic cell (in vitro)에서의 TNF- α 와 IL-12의 생성이 증가될 수 있고 hexameric deoxyriboguanosine run (dG₆ run)이 가장 이상적인 형태임을 보고하였다⁴⁶⁾.

본 연구자 등은 최초로 기관지천식의 마우스 모델에서 phosphodiester backbone 구조의 CpG-ODNs의 3' 말단에 dG₆ run을 첨가하여 알레르겐에 대한 감작 단계에서 투여한 결과 phosphorothioate backbone 구조의 CpG-ODNs에 필적할 정도로 기관지천식의 발생을 억제하는 예방 효과가 있음을 보고하였으며, 또한 난알부민에 대한 특이적 T 세포 수용체를 가진 형질전환 마우스인 OT-II의 림프절 세포를 이용하여 phosphodiester backbone 구조의 CpG-ODNs의 3' 말단에 dG₆ run을 첨가하는 경우 IFN- γ 의

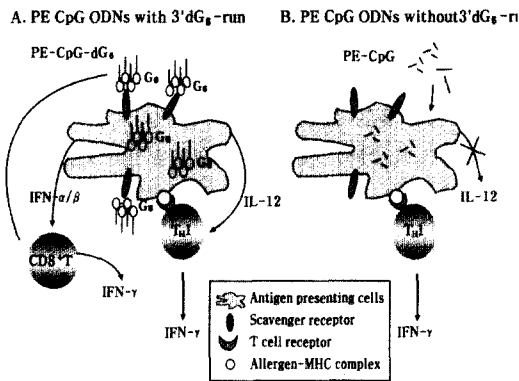


Fig. 3. Proposed mechanism for the enhanced antiallergic effect of a hexameric deoxyriboguanosine run (dG₆ run) conjugation to CpG-ODNs. **A.** Run of deoxyriboguanosines are known to form 4-stranded G-quartet structure that bind to the scavenger receptors of macrophage and confer nuclease resistance. 3' dG₆ run might efficiently target phosphodiester backbone CpG-ODNs into antigen presenting cells via scavenger receptors and extend the half-life. Increased intracellular concentration of phosphodiester CpG-ODNs thus promotes activation of antigen presenting cells to produce IL-12, which induces IFN- γ -producing Th1 cell development. Phosphodiester CpG-ODNs also activate CD8⁺ T cells via antigen presentation cell derived type I IFN; in addition, 3' dG₆ run might directly costimulate CD8⁺ T cells. **B.** Most phosphodiester CpG-ODNs were degraded by nucleases and were thus unable to activate antigen presenting cells to produce cytokines such as IL-12. Therefore, allergen-specific Th cells fail to differentiate into the Th1 phenotype. *PE CpG : phosphodiester CpG-ODNs*

분비가 phosphorothioate backbone 구조의 CpG-ODNs에 필적할 정도로 증가됨을 보고하였다⁴⁷⁾. dG₆ run이 면역 증강 능력을 강화할 수 있는 기전에 대해서는 dG run이 G-quartet을 형성하여 exonuclease의 공격에서 ODNs을 보호해주는 역할과 scavenger 수용체(SR-A)에 대한 결합능을 향진시켜 세포내로 유입을 증가시켜주는 역할, 그리고 dG₆ run 자체가 CD8⁺ T 세포를 활성화시키는 역할을 제시하였다(Fig. 3). 그리고 backbone 구조에 따라 항체 생성에도 차이가 있었는데 특히 IgG2a의 생성은 phosphorothioate backbone 구조와 밀접한 관계가 있었다⁴⁷⁾. 최근 phosphorothioate backbone 자체가 거대세포에 대한 화학주성 효과가 있으며 phosphoinositide 3-kinase에 의존적이며 ERK(extracellular signal-related kinases), p38 MAP kinase, endosome의 숙성 등의 요소가 관여됨이 보고되었다⁴⁸⁾.

5. CpG-ODNs의 부작용과 해결 방안

이와 같은 동물 실험의 성공적인 결과로, 앞서 설명한 'hygiene hypothesis'에 근거하여 Th1 면역 반응을 유도해 줌으로써 기관지천식의 발생을 예방하거나 치료하는 면역요법으로 CpG-ODNs을 이용한 성공적인 치료법 개발의 가능성이 매우 높다. 그러나 CpG-ODNs는 세균의 DNA에 존재하는 '위험신호'를 구성하는 한 부분으로 Th1 면역 반응을 유도하여 Th2 면역 반응을 억제함으로써 기관지천식에 대한 예방 또는 치료 효과를 나타내므로 CpG-ODNs 사용에 따르는 부작용에 대한 우려도 있다.

가능한 부작용으로는 CpG-ODNs의 투여 장소에 발생할 수 있는 염증 반응⁴⁹⁾, TNF- α 발생 등에 의한 septic shock의 발생⁵⁰⁾, 비장비대의 유발⁵¹⁾, 자가면역 질환의 발생^{52,53)} 등이 우려되고 있으나, 현재까지의 데이터로는 기관지천식의 치료에 사용되는 용량으로는 큰 부작용이 없이 사용될 수 있으리라 기대되며 기존의 IL-12에

비해서 안전성, 비용 및 장기 지속력 등 모든 분야에서 우월한 치료법으로 기대된다.

이러한 부작용을 줄이기 위한 노력이 함께 이루어지고 있는데 대표적인 방법이 국소적 투여법 개발과 알레르겐과 CpG-ODNs를 conjugation시키는 방법이다. Shirota 등에 의하면 알레르겐과 CpG-ODNs를 conjugation하여 폐로 직접 투여하는 경우에는 단순히 알레르겐과 CpG-ODNs를 혼합하여 투여할 경우보다 100분의 1의 용량으로 기관지천식의 발현을 억제하였으며 그 효과는 최소 2개월간 지속되었다⁵⁴⁾. 본 교실에서 연구한 phosphodiester backbone을 이용한 CpG-ODNs 치료법도 이러한 부작용을 줄일 수 있는데 공헌을 할 수 있으리라 기대하고 있다.

6. 인체 세포에서의 CpG-ODNs의 효과

CpG-ODNs는 아토피 환자의 PBMC에서 IL-12와 IL-18의 발현과 IFN- γ 의 생산이 증가시켰으며 total IgE의 생산을 감소시켰다⁵⁵⁾. 또한 phosphorothioate backbone 구조의 ODNs가 아토피 환자에서 추출한 알레르겐 특이 CD4+ T 세포를 Th2 세포에서 Th1 세포으로 분화시킬 수 있고 이 효과는 IL-12, IFN- γ , IFN- α 에 대한 중화항체를 투여할 경우 소멸됨이 보고되었다⁵⁶⁾. 이러한 결과는 CpG-ODNs이 마우스에서와 유사한 기전을 통해 효과를 나타낼 수 있음을 시사한다²⁷⁾.

현재까지 최적의 CpG motif는 마우스에서는 GACGTT, 인간에서는 GTCGTT로 알려져 있으며^{41,57)} 주변 염기 서열의 변화에 의해 면역 증강 정도가 차이가 있어 최적의 서열을 찾는 노력이 현재도 계속되고 있으며 CpG-ODNs를 이용한 임상 시험이 진행 중에 있다.

맺음말

기관지천식과 알레르기 질환의 발병 기전에 대한 이해와 생명공학의 눈부신 발전에 힘입어 발병 단계별로 효과적인 치료법을 개발하고자하는

노력이 경주되고 있다. 특히 알레르기 염증에서 핵심적인 역할을 담당하는 T 세포의 면역 기능을 조절하고자 하는 연구가 활발히 이루어지고 있으며, CpG-ODNs는 Th1 면역 반응을 유도함으로써 Th2 면역 반응을 억제하여 동물 모델에서 기관지천식에 대한 탁월한 효능으로 임상에서의 효과가 기대되는 면역조절 요법이다. 현재 임상 시험이 진행 중에 있으며 가능한 부작용을 줄이고 더 효과적인 방법을 개발하기 위해 conjugation 형태의 개발과 backbone 구조에 대한 관심이 높아지고 있다.

참고 문헌

- 1) Wohlleben G, Erb KJ: Atopic disorders: a vaccine around the corner? Trends Immunol 22: 618-26, 2001
- 2) Cho SH, Seo JY, Choi DC, Yoon HJ, Cho YJ, Min KU et al: Pathological changes according to the severity of asthma. Clin Exp Allergy 26: 1210-9, 1996
- 3) Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL: Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 136: 2348-57, 1986
- 4) Coffman RL, Mocci S, O'Garra A: The stability and reversibility of Th1 and Th2 populations. Curr Top Microbiol Immunol 238: 1-2, 1999
- 5) Firestein GS, Roeder WD, Laxer JA, Townsend KS, Weaver CT, Hom JI et al: A new murine CD4+ T-cell subset with an unrestricted cytokine profile. J Immunol 143: 518-25, 1989
- 6) Longpre M, Li D, Gallup M, Drori E, Ordonez CL, Redman T et al: Allergen induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells. J Clin Invest 104: 1375-82, 1999
- 7) Shim JJ, Dabbagh K, Ueki IF, Dao-Pick

- T, Burgel PR, Takeyama K et al: IL-13 induces mucin production by stimulating epidermal growth factor receptors and by activating neutrophils. *Am J Physiol* 280: L134-40, 2000
- 8) Shaheen SO, Aaby P, Hall AJ et al: Measles and atopy in Guinea-Bissau. *Lancet* 347: 1792-6, 1996
- 9) Matricardi PMN, Rosmini F, Ferrigno L, Nisini U, Uapicetta M, Chionne P et al: Cross sectional retrospective study of prevalence of atopy among Italian military students with antibodies against hepatitis A virus. *BMJ* 314: 999-1003, 1997
- 10) Shirakawa T, Enomoto T, Shimazu S, Hopkin JM: The inverse association between tuberculin responses and atopic disorder. *Science* 275: 77-9, 1997
- 11) von Mutius E, Martinez FD, Fritzsche C, Nicolai T, Reitmer P, Thiernann HH: Skin test reactivity and number of siblings. *BMJ* 308: 692-5, 1994
- 12) Strachan DP: Family size, infection and atopy: the first decade of the 'hygiene hypothesis'. *Thorax* 55: S2-10, 2000
- 13) Martinez FD: The coming-of-age of the hygiene hypothesis. *Respir Res* 2: 129-32, 2001
- 14) Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH: Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* 21: 479-83, 2000
- 15) Constant SL, Bottomly K: Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu Rev Immunol* 15: 297-322, 1997
- 16) Kim YK, Oh HB, Oh SY, Cho SH, Kim YY, Min KU: HLA-DRB1*07 may have a susceptibility and DRB1*04 a protective effect upon the development of a sensitization to house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus*. *Clin Exp Allergy* 31: 110-5, 2001
- 17) Bast RC Jr, Zbar B, Borsos T, Rapp HJ: BCG and cancer. *N Eng J Med* 290: 1458-69, 1974
- 18) Tokunaga T, Yamamoto H, Shimada S, Abe H, Fukuda T, Fujisawa Y et al: Antitumor activity of deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. I. Isolation, physicochemical characterization, and antitumor activity. *J Nat Cancer Inst* 72: 955-62, 1984
- 19) Tokunaga T, Yamamoto S, Namba K: A synthetic singlestrand DNA, poly(dG, dC), induces interferon -alpha/beta and -gamma, augments natural killer activity, and suppresses tumor growth. *Jpn J Cancer Res* 79: 682-6, 1988
- 20) Yamamoto S, Kuramoto E, Shimada S, Tokunaga T: *In vitro* augmentation of natural killer cell activity and production of interferon-alpha/beta and -gamma with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. *Jpn J Cancer Res* 79: 866-73, 1988
- 21) Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T et al: DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cell and inhibits tumor growth. *Microbiol Immunol* 36: 983-97, 1992
- 22) Yamamoto S, Yamamoto T, Kataoka T, Kuramoto E, Yano O, Tokunaga T: Unique palindromic sequences in synthetic oligonucleotides are required to induce IFN and augment IFN-mediated natural killer activity. *J Immunol* 148: 4072-6, 1992
- 23) Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA et al: CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B cell activation. *Nature* 374: 546-9, 1995
- 24) Heeg K, Zimmermann S: CpG DNA as a Th1 trigger. *Int Arch Allergy Immunol*

- 121: 87-97, 2000
- 25) Krieg AM, Wagner H: Causing a com-
motion in the blood: immunotherapy pro-
gresses from bacteria to bacterial DNA.
Immunol Today 21: 521-6, 2000
- 26) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T et al: A
toll-like receptor recognizes bacterial DNA.
Nature 408: 740-5, 2000
- 27) Wild JS, Sur S: CpG oligonucleotide mo-
dulation of allergic inflammation. *Allergy*
56: 365-76, 2001
- 28) Chu W, Gong X, Li Z et al: DNA-PKcs is
required for activation of innate immunity
by immunostimulatory DNA. *Cell* 103: 909
-18, 2000
- 29) Park Y, Lee SW, Sung YC: CpG DNA
inhibits dendritic cell apoptosis by upre-
gulating cellular inhibitor of apoptosis
proteins through the phosphatidylinositide-
3'-OH kinase pathway. *J Immunol* 168:
5-8, 2002
- 30) Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga TR,
Lemish JE, Weinstock JV, Thorne PS et
al: Modulation of airway inflammation by
CpG oligodeoxynucleotides in a murine
model of asthma. *J Immunol* 160: 2555-9,
1998
- 31) Cho SH, Lee BJ, Chang YS, Kim YK, Min
KU, Kim YY: DNA vaccination and
immunostimulatory oligodeoxynucleotides
for asthma. *J Asthma Allergy Clin Im-
munol* 20: S54-60, 2000
- 32) 장윤석, 이병재, 김윤근, 조상현, 민경업, 김유영
등: ISS-ODNs를 이용한 기관지천식의 예방, 천식
및 알레르기 (춘계 학회 초록) 20: 401, 2000
- 33) Broide D, Schwarze J, Tighe H, Gifford T,
Nguyen M, Raz E et al: Immunostimu-
latory DNA sequences inhibit IL-5, eo-
sinophilic inflammation, and airway hype-
rresponsiveness in mice. *J Immunol* 161:
7054-62, 1998
- 34) Broide DH, Stachnick G, Castaneda D,
Nayar J, Miller M, Cho J et al: Immuno-
stimulatory DNA mediates inhibition of
eosinophilic inflammation and airway hy-
perreactivity independent of natural killer
cells in vivo. *J Allergy Clin Immunol* 108:
759-63, 2001
- 35) Serebrisky D, Teper AA, Huang CK, Lee
SY, Zhang TF, Schofield BH et al: CpG
oligodeoxynucleotides can reverse Th2-
associated allergic airway responses and
alter the B7.1/B7.2 expression in a murine
model of asthma. *J Immunol* 165: 5906-
12, 2000
- 36) Sur S, Wild JS, Choudhury BK, Sur N,
Alam R, Klinman DM: Long term pre-
vention of allergic lung inflammation in a
mouse model of asthma by CpG oli-
gonucleotides. *J Immunol* 162: 6284-93, 1999
- 37) Kline JN, Krieg AM, Waldschmidt TJ,
Ballas ZK, Jain V, Businga TR: CpG
oligodeoxynucleotides do not require Th1
cytokines to prevent eosinophilic airway
inflammation in a murine model of asth-
ma. *J Allergy Clin Immunol* 104: 1258-64,
1999
- 38) 장윤석, 김윤근, 조상현, 성영철, 민경업, 김유영
등: 마우스 모델에서 CpG-ODNs의 backbone 구
조에 따른 기관지천식의 예방 효과 연구, 천식 및
알레르기 (춘계 학회 초록) 20: 289, 2001
- 39) Monteith DK, Henry SP, Howard RB,
Flournoy S, Levin AA, Bennett CF et al:
Immune stimulation: a class effect of
phosphorothioate oligodeoxynucleotides in
rodents. *Anticancer Drug Des* 12: 421-32,
1997
- 40) Sarmiento UM, Perez JR, Becker JM,
Narayanan R: In vivo toxicological effects
of rel A antisense phosphorothioates in
CD-1 mice. *Antisense Res Dev* 4: 99-107,
1994
- 41) Hartmann G, Krieg AM: Mechanism and
function of an newly identified CpG DNA

- motif in human primary B cells. *J Immunol* 164: 944-52, 2000
- 42) Pietsky DS: Immune activation by bacterial DNA : a new genetic code. *Immunity* 5: 303, 1996
- 43) Kimura Y, Sonehara K, Kuramoto E, Makino T, Yamamoto S, Yamamoto T et al: Binding of oligoguanulate to scavenger receptors is required for oligonucleotides to augment NK cell activity and induce IFN. *J Biochem* 116: 991, 1994
- 44) Bishop JS, Guy-Caffey JK, Ojwang JO, Smith SR, Hogan ME, Cossum PA et al: Intramolecular G-quartet motifs confer nuclease resistance to a potent anti-HIV oligonucleotide. *J Biochem* 271: 5698-703, 1996
- 45) Ballas ZK, Rasmussen WL, Krieg AM: Induction of NK activity in murine and human cells by CpG motifs in oligodeoxynucleotides and bacterial DNA. *J Immunol* 157: 1840-5, 1996
- 46) Lee SW, Song MK, Baek KH, Park Y, Kim JK, Sung YC et al: Effects of a hexameric deoxyriboguanosine run conjugation into CpG oligodeoxynucleotides on their immunostimulatory potentials. *J Immunol* 165: 3631-9, 2000
- 47) Park Y, Chang YS, Kim YK, Kim YY, Sung YC, Cho SH et al: The enhanced effect of a hexameric deoxyriboguanosine run conjugation to CpG oligodeoxynucleotides on protection against allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 108: 570-6, 2001
- 48) Baek KH, Ha SJ, Sung YC: A novel function of phosphorothioate oligodeoxynucleotides as chemoattractants for primary macrophages. *J Immunol* 167: 2847-54, 2001
- 49) Deng GM, Nilson IM, Verdrengh M, Collins LV, Tarkowski A: Intra-articularly localized bacterial DNA containing CpG motifs induces arthritis. *Nat Med* 5: 702-5, 1999
- 50) Sparwasser T, Hultner, Koch ES, Luz A, Lipford GB, Wagner H: Bacterial DNA causes septic shock. *Nature* 386: 336-7, 1997
- 51) Sparwasser T, Hultner L, Koch ES, Luz A, Lipford GB, Wagner H: Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides cause extramedullary murine hemopoiesis. *J Immunol* 162: 2368-74, 1999
- 52) Bachmaier K, Neu N, de la Maza LM, Pal S, Hessel A, Penninger JM: Chlamydia infections and heart disease linked through antigenic mimicry. *Science* 283: 1335-9, 1999
- 53) Tsunoda I, Tolley ND, Theil DJ, Whitton JL, Kobayashi H, Fujinami RS: Exacerbation of viral and autoimmune animal models for multiple sclerosis by bacterial DNA. *Brain Pathol* 9:481-93, 1999
- 54) Shirota H, Sano K, Kikuchi T, Tamura G, Shirato K: Regulation of murine airway eosinophilia and Th2 cells by antigen-conjugated CpG oligodeoxynucleotides as a novel antigen-specific immunomodulator. *J Immunol* 164: 575-82, 2000
- 55) Bohle B, Jahn-Schmid B, Maurer D et al: Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce IL-12, IL-18 and IFN-gamma production in cells from allergic individuals and inhibit IgE synthesis in vitro. *Eur J Immunol* 29: 2344-53, 1999
- 56) Parronchi P, Brugnolo F, Annunziato F et al: Phosphorothioate oligodeoxynucleotides promote the in vitro development of human allergen-specific CD4+ T cells into Th1 effectors. *J Immunol* 163: 5946-53, 1999
- 57) Krieg AM, Wagner H: Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA. *Immunol Today* 2000