

## 마우스 B세포에서의 Interleukin 4에 의한 IgG1 및 IgE 생산조절에 관한 연구

울산의대 서울중앙병원 내과

문 회 범

### 서 론

Schimpl 과 Wecker(1975)가 B세포의 활성화(activation)는 3 단계, 즉 항원인지, 증식, 성숙의 과정을 밟는다는 모델을 제시한 이래, 증식과 성숙단계의 신호(signal)로 작용하는 수많은 종류의 수용성 T세포인자(soluble T cell factors)들이 기술되고 동정되었으며, Leanderson등(1982), Petterson등(1983)은 이와 관련하여 세포의 증식인자와 성숙인자가 각기 다른 T세포계(T cell line)에서 생산됨을 증명하였다.

한편 Howard등(1982)은 항-IgM항체에 의한 B세포 증식을 증강시키는 T세포인자를 기술하고 이를 B cell growth factor(BCGF/BCGFI)로 불렀으며, Isakson등(1982)은 lipopolysaccharide(LPS)배양에서 IgG1의 생산을 증가시키는 T세포인자를 발견하고 이를 B cell differentiation factor for IgG1(BCDF $\gamma$ )로 불렀다. 그뒤 Ohara등(1985)은 B cell stimulatory factor 1(BSF-1)으로 재명명된 BCGF 정제분리하였으며, 이것이 BCDF $\gamma$ 와 같은 물질임이 알려졌다(Vitetta et al., 1985). Sideras등(1985)이 그들이 IgG1 induction factor라고 부른 인자의 생화학적 특성을 밝히고 Noma등(1986)이 이 인자의 cDNA cloning에 성공한 뒤 이를 모든 인자는 한 물질로서 interleukin 4(IL-4)로 불리게 되었다.

다른 interleukin과 마찬가지로 IL-4 역시 여러 종류의 세포에 작용하여 다양한 기능을 나타낸다. 그중 일부만 열거하면 휴지기 B세포(resting B cell)에서 Ia항원의 발현을 증가시키고(Noelle et al., 1984), 세포주기 G0에서 G1으로의 이행을 유도하며(Rabin et al., 1985), 저친화성 IgE수용체를 증가시킨다(Hudak et al., 1987). 그 밖에 T세포와 비만세포의 growth factor로도 작용하는 것으로 알려져 있다(Fernandez-Botran et al., 1986; Lee et al., 1986; Severinsson et al., 1987).

본 연구의 주 목적은 LPS 등으로 활성화 혹은 자극된 마우스 B세포로부터 생산되는 면역글로불린 isotype의 조절(regulation)에 IL-4가 어떻게 관여하는가를 규명하는 데 있었다. LPS는 기전은 확실치 않지만 B세포의 대부분을 활성화시켜 IgM, IgG3 및 IgG2b의 생산을 유도하며, 미량의 IgG1 반응은 있으나 IgG2a의 분비는 유도하지 않는다(Andersson et al., 1977; Severinsson et al., 1979). 전술한 바와 같이 IL-4는 LPS로 활성화된 B세포로부터 IgG1의 생산을 증가시키는 반면 IgG3와 IgG2b의 생산은 감소시키는 것으로 알려졌으며(Isakson et al., 1982; Bergstedt-Lindqvist et al., 1984), Coffmann과 Carty(1986)는 IL-4가 동시에 IgE의 생산을 유도하는 사실을 밝혀 내었다.

이와 같이 isotype생산의 증감이 동시에 일어나며,

그 밖에 IL-4에 의한 첨가와 IgG1 반응에 시간이 걸리고, IL-4를 제거한 후에도 IgG1 반응이 지속된다는 소견(Bergstedt-Lindqvist et al., 1984)은 IL-4가 단순한 증식 내지 성숙인자가 아니라 유도인자(induction factor)로 작용한다는 추측을 가능케한다. 또한 세포막 표면에 IgM & IgD-positive, IgG-negative인 세포 역시 LPS와 IL-4에 반응한다는 사실(Layton et al., 1984; Snapper & Paul, 1987)은 배양도중 switch recombination이 일어난다는 사실을 뒷받침하는 것으로 보인다. 그러나 LPS로 활성화된 세포의 대부분 또는 일부가 IgG1-positive cell이라는 보고들(Forni & Coutinho, 1982; Yuan & Vitetta, 1983)은 이에 대한 반론의 근거가 되기에 충분한 것은 아니라 할 지라도 IL-4가 이미 IgG1이나 IgE로 switch된 precommitted B cell에 선택적으로 작용해서 이를 증식시킬 가능성도 완전히 배제할 수는 없다.

이와 함께 다른 미해결의 문제점으로는 첫째, IL-4에 의해서 isotype switch가 일어날 경우 어떤 조건들에 의해서 그것이 IgG1 또는 IgE로 정해지는지가 불분명하다는 점과, 둘째, 이 경우 switch의 과정이 IgM에서 IgG1을 거쳐 IgE로 순차적으로 일어나는지, 아니면 IgM에서 바로 IgG1이나 IgE로 switch되는지가 역시 알려져 있지 않다는 점이다.

본 연구는 이러한 문제점들에 착안해서 마우스의 비장세포 배양을 통하여 IL-4의 작용기전과 나아가서는 isotype switch의 기전을 밝혀 보고자 시도되었다.

## 연구목적

본 연구는 첫째, IL-4의 작용기전을 규명하는 과정의 하나로 우선 IL-4가 어떤 분화단계의 B세포에 작용하는지를 밝히고자 하였으며, 이를 위해 limiting-dilution analysis를 계획하였다. 즉 IL-4에 의해 어떤 종류의 면역글로불린을 생산하는 B세포의 precursor frequency가 증가하고 clone size의 증가가 없으면 IL-4가 uncommitted B cell에 induction factor로 작용한다고 가정할 수 있으며, 반대일 경우에는 IL-4가 precommitted cell을 선택적으로 증식시키는 인자

로 작용할 것이라는 가정 하에 이를 입증하고자 하였다.

둘째, IL-4에 의해 IgG1과 IgE의 생산이 유도된다면 어떤 조건들에 의해서 이 두 가지 isotype으로의 switch가 결정되는가를 규명하고, switch의 순서 내지 기전에 대한 정보를 줄 수 있는 자료를 얻고자 하였다. 이를 위해 먼저 IL-4의 dose-response relationship, kinetics, T cell의 존재 여부가 주는 영향, ontogeny의 양상 등을 관찰하였으며, 또한 special kinetic study로 pulsing experiment를 계획하여 IgG1 반응과 IgE 반응이 일어나기 위한 조건의 차이점을 분석하고자 하였다.

## 연구재료 및 방법

### 1. 실험동물

스톡홀름대학 면역학교실의 동물실에서 계대번식된 생후 2주에서 12주까지의 CBA, C57 BL/6, (CBA×C57 BL/10)F1, Balb/c 및 Balb/c nu/nu 등의 마우스가 사용되었으며, 그 밖에 Wistar, Sprague Dawley, (Ao-Lou)F1 등 rat의 일부는 ALAB(Stockholm, Sweden)에서 구입하였고, 그 연령은 생후 4주에서 7주 사이였다.

### 2. 세포

적출된 비장을 chopping하여 얻은 전비장세포(total spleen cells), 혹은 Percoll로 분리한(53/64% interphase)small spleen cells을 사용하였으며, B세포를 분리할 경우에는 0.84% NH<sub>4</sub>Cl로 적혈구를 용해하고 Petri dish에 붙은 adherent cells을 제거한 후 부유세포를 항-Thy 1, 2항체(AT83)와 토끼보체(rabbit complement)로 2시간 처리하였으며 그 농도는 실험에 따라 조절하였다. 이와 같이 분리한 B세포는 전비장세포에 비하여 concanavaline A에 의한 증식반응이 98%이상 감소하였다.

### 3. IL-4 및 항 IL-4항체

대부분의 실험에서 IL-4의 source로는 mouse IL-4 cDNA(pKCR, IL-4, Neo)를 tranfect시킨 HeLa세포(H28)의 배양상청액을 사용하였으며, 그밖

에 IL-4를 분비하는 T세포(2.19)의 배양상청액, 또는 DNAX(Palo Alto, CA)와 Genzyme(Boston, MA)사에서 구입한 정제된 recombinant IL-4(rIL-4)를 사용하였다.

IL-4의 역가는 protein A plaque assay (Gronowicz, 1976)에서 IgG1의 half-maximal expression에 필요한 IL-4농도를 1 U/ml로 정하여 표시하였다. 음성 대조로는 transfect되지 않은 HeLa 세포의 배양상청액을 사용하였다. IL-4 활성의 억제 실험에는 항IL-4 항체를 생산하는 hybridoma세포(11 B 11)의 배양상청액을 사용하였다.

#### 4. 배양조건

배양액으로는 RPMI 1640 medium(Gibco, Paisky, U. K.)에 15% fetal calf serum, 2-mercaptoethanol( $5 \times 10^{-5}$ M), L-glutamine(2mM), sodium pyruvate(1mM), penicillin(50IU/ml), streptomycin(50ug/ml)을 혼합하여 사용하였다. 특별한 목적이 없는 한 25ug/ml의 LPS(E. coli 055 : B5에서 추출)와 여러 농도의IL-4가 배양시작시 첨가되었다. Limiting dilution assay의 경우를 제외하고는  $4 \times 10^5$ /ml 농도의 세포로 배양을 시작하였으며, 1.5ml 또는 6ml의 flat-bottomed multi-well plate (Nunc, Roskilde, Denmark)를 배양용기로 사용하여 5% CO<sub>2</sub>/95% air의 humidified incubator에서 37°C 항온배양하였다.

Pulsing experiment의 경우는 LPS 또는 IL-4, 또는 LPS와 IL-4가 첨가된 배양액에서 세포를 각각 24시간에서 72시간까지 전배양(pre-incubation)한 후 balanced salt solution(BSS)에 3회 세척하고 다시 세포농도를  $4 \times 10^5$ /ml로 맞추어 LPS 또는 LPS와 IL-4가 같이 첨가된 배양액에 재배양하였다. 모든 실험은 3회 이상 반복 시행하였다.

#### 5. Limiting dilution analysis

Round-bottom microplates(Nunc, Roskilde, Denmark)에 0.2ml에 배양용량으로 각 well당 0내지  $10^5$ 개의 total spleen cell 또는 Percoll로 분리한 small spleen cell을 배양하였다. LPS와 함께 여러 농도의IL-4(H28, rIL-4 또는 2.19 상청액)를 배양 조

기에 첨가하였으며, Julius 등 (1973)의 방법에 따라 nylon wool로 분리한 rat 흉선세포(thymocyte)를 filler cell로 사용하였다( $1.5 \times 10^5$  cells/well). 면역글로불린의 각 isotype을 분비하는 세포의 숫자는 protein A plaque assay로 측정하였으며, 2개 이상의 plaque가 나온 well을 양성으로 간주하였다. 배양상청액의 면역글로불린의 농도는 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA, Engvall & Perlmann, 1971)로 측정하였으며, background 평균치에 5표준차 이상 높은 absorbance치를 보이는 well을 양성으로 간주하였다. Clone size는 Lefkovits와 Waldmann(1979)의 방법으로 계산하였으며, clone당 평균 plaque forming cell의 숫자나 clone당 분비된 isotype의 농도(ng/ml)로 표시하였다.

#### 6. Protein A plaque assay

IgM 분비세포의 측정을 위해서는 배양 제5일에, IgG1, IgG3 및 IgE분비세포의 측정을 위해서는 배양 제6일에 microplate로부터 세포를 수확, 세척하여 4°C에 보관하였다. Petri dish에 0.2ml의 protein A coupled sheep RBC, 같은 양의 cell suspension 및 항혈청을 잘 혼합하여 떨어뜨린 후 cover glass로 덮고, 37°C humidified air incubator에서 4시간 경과시킨 후 판독하였다. 여기에 사용한 항 면역글로불린혈청은 rabbit anti-mouse 항체(Bionetics, Kensington, MD)로 최종 농도는 1:100 내지 1:200이었다.

#### 7. 면역글로불린의 정량

면역글로불린의 각 isotype의 농도는 ELISA로 측정하였다. 96 well ELISA plate(Dynatech, Alexandria, VA)를 목적에 따라 각기 goat anti-mouse IgM 또는 IgG1(Southern Biotechnology, Birmingham, AL), rabbit anti-mouse IgG3(Bionetics, Kensington, MD) 및 rabbit anti-mouse IgE(MIAB, Uppsala, Sweden)로 coating한 후, 배양상청액의 계단희석(serial dilution)액과 표준액(IgM, IgG1, and IgG3 from Southern Biotechnology, IgE from C. Magnuson, Karolinska Hospital, Stockholm, Sweden)를 넣어 실온에서

12내지 24시간 반응시키고 세척한 다음 다시 goat anti-mouse IgM, IgG1, IgG3(Southern biotechnology) 및 monoclonal rat anti-mouse IgE (R641 46-48)(Ciba-Geigy, Basel, Switzerland)의 alkaline phosphatase-conjugate를 첨가하였다. 8 내지 16시간 후 disodium p-nitrophenyl phosphate (Sigma, St. Louis, MO)를 기질(substrate)로 하여 반응시키고 분광비색계로 판독하였다. 각 isotype간의 교차반응 정도는 Table 1에 표시한 바와 같았으며, 배양액의 면역글로불린 농도측정에 영향을 미치지 않는 범위였다.

Table 1. Degree of cross-reactivity of anti-isotype antibodies used in the ELISA<sup>1)</sup>.

|           | IgM   | IgG1  | IgG2a | IgG2b | IgG3  | IgE  | IgA                 |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|---------------------|
| anti-IgM  | -     | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.1 | <N.T. <sup>2)</sup> |
| anti-IgG1 | <0.01 | -     | <0.01 | 0.3   | 0.05  | <0.1 | 0.05                |
| anti-IgG3 | <0.01 | <0.01 | 0.07  | 0.3   | -     | <0.1 | 0.04                |
| anti-IgE  | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | <0.01 | -    | <0.01               |

1) expressed as the percentage of specific/cross-reactive isotype concentrations which give rise to the same degree of reaction in each anti-isotype system

2) N.T.=not tested

## 연구성적

### 1. Limiting dilution analysis

Limiting dilution experiment에서는 IgM, IgG1, IgG3 또는 IgE를 분비하는 세포들의 precursor frequency(per B cell)와 clone size를 계산하였으며, 그 결과는 Table 2에 표시된 바와 같다. 즉 LPS배양에 IL-4를 추가하면 IgG1과 IgE를 분비하는 세포들의 precursor frequency가 현저하게 증가하는 것을 볼 수 있었으며, IL-4의 source, mouse의 종, cell preparation에 따른 차이는 없었다.

IgG1의 경우, IL-4의 농도에 비례하여 수십배 내지 4,000배까지도 precursor frequency가 증가하였으며, 때로는 IgM의 precursor frequency를 능가하였다. 그러나 clone size는 변화가 거의 없거나 미미하였

다. IgE의 precursor frequency 역시 LPS배양에 비해

대개 5,000배 이상 증가하여 IgG1이나 IgM 분비세포와 비슷한 수준에까지 이르렀다. 실제로 LPS 배양에서는  $10^5$  cell/well의 농도에 이르기까지 IgE positive well을 찾을 수 없는 경우가 대부분이어서 정확한 precursor frequency나 clone size를 계산할 수 없었지만, 실험4(Table 2)에서와 같이 일부 실험의 성적은 IL-4에 의해 clone size가 증가하지 않음을 보여주었다.

이와 대조적으로 IL-4는 IgM precursor frequency에는 큰 영향을 미치지 않거나 때로는 다소 감소시키는 결과를 보였으며, IgG3의 경우도 IL-4의 농도 증가에 따라 precursor frequency가 감소하였다 (Table 2).

Table 2. Effect of IL-4 on precursor frequency and clone size of IgM, IgG1, IgG3 and IgE secreting cells.

|                 | IgM   |      | IgG1     |      | IgG3    |      | IgE      |       |
|-----------------|-------|------|----------|------|---------|------|----------|-------|
|                 | P.F.  | C.S. | P.F.     | C.S. | P.F.    | C.S. | P.F.     | C.S.  |
| <u>Exp1</u>     |       |      |          |      |         |      |          |       |
| LPS             | 1:20  | 92   | 1:59,000 | 2.4  | N.T.    | N.T. | N.T.     | N.T.  |
| LPS+2U/ml rIL-4 | 1:14  | 134  | 1:15     | 4.2  | N.T.    | N.T. | N.T.     | N.T.  |
| <u>Exp2</u>     |       |      |          |      |         |      |          |       |
| LPS             | 1:65  | 40   | 1:1,900  | 8.3  | 1:290   | 17.5 | N.T.     | N.T.  |
| LPS+5U/ml rIL-4 | 1:260 | 15   | 1:260    | 6.3  | 1:1,600 | 18.5 | N.T.     | N.T.  |
| <u>Exp3</u>     |       |      |          |      |         |      |          |       |
| LPS             | 1:41  | 213  | 1:3,000  | 10.5 | N.T.    | N.T. | 0:10,000 | -     |
| LPS+5U/ml rIL-4 | 1:131 | 76   | 1:41     | 26.0 | N.T.    | N.T. | 1:65     | 1,245 |
| <u>Exp4</u>     |       |      |          |      |         |      |          |       |
| LPS             | 1:229 | 93   | 1:1,000  | 1.6  | N.T.    | N.T. | 0:10,000 | 75    |
| LPS+2U/ml rIL-4 | 1:225 | 56   | 1:170    | 2.3  | N.T.    | N.T. | 1:200    | 81    |

P.F.=precursor frequency/B cells C.S.=clone size(ng/ml) N.T.=not tested

Table 3은 IgG1 및 IgE를 생산하는 세포의 clonal-origin을 알아보기 위하여 세 가지 isotype(IgM, IgG1, IgE 이외의 다른 isotype은 frequency 낮아 무시함)을 분비할 전구세포들이 각 well마다 평균 1개 미만이 되도록 세포농도를 낮추어 배양하였을 때, well마다의 각 isotype의 생산 양상을 나타낸 것이다.

Table 3의 A는 IgM, IgG1, IgE중 한개 또는 그이상의 isotype에 양성인 well의 숫자를 나타내고 있으며, B 및 C는 IL-4에 의해서 전구세포의 대부분의 IgG1이나 IgE로 switch되고 있음을 보여주고 있다.

Table 3. Analysis of individual precursors.

| A. Ig isotypes detected in a single well       |      |     | No. of wells |       |
|------------------------------------------------|------|-----|--------------|-------|
| IgM                                            | IgG1 | IgE | Exp.1        | Exp.2 |
| -                                              | -    | -   | 467          | 622   |
| +                                              | -    | -   | 14           | 28    |
| -                                              | +    | -   | 90           | 104   |
| -                                              | -    | +   | 91           | 78    |
| +                                              | +    | -   | 9            | 21    |
| +                                              | -    | +   | 7            | 8     |
| -                                              | +    | +   | 147          | 84    |
| +                                              | +    | +   | 39           | 15    |
| Total no. of wells                             |      |     | 864          | 960   |
| B. Number of wells containing IgM, IgG1 or IgE |      |     | 397          | 960   |
| C. % of positive wells containing              |      |     |              |       |
| IgM                                            |      |     | 17           | 21    |
| IgG1                                           |      |     | 72           | 66    |
| IgE                                            |      |     | 72           | 55    |

2. IL-4 용량과 면역글로불린 생산반응의 관계  
LPS와 여러 농도의 IL-4를 첨가하여 배양한 B세포의 배양상청액을 배양 제6일에 분리하여 각 면역글로불린 isotype의 농도를 측정 한 결과는 Figure 1에 예시한 바와 같다. 정제된 rIL-4를 사용한 이 실험에서 IgG1과 IgE의 분비는 IL-4의 농도의 증가함에 비례하여 증가한 반면 IgM과 IgG3는 감소하는 것을 알 수 있다.

한편 IgG1의 증가를 유도하는 IL-4의 농도가 0.1 내지 0.3 U/ml인 반면, IgE 반응을 유도하기 위해서는 이보다 3배 내지 10배 높은 농도의 IL-4가 필요하였다. IL-4에 의해서 IgG1의 생산은 20배 내지 30배 증가하였으며, IgE의 경우는 LPS배양에서는 그 농도가 검출한계(약 2ng/ml)이하였다가 IL-4의 존재로 인하여 적어도 500배 이상의 증가를 보였다.

여러 종의 mouse 비장세포에 있어서 bacteria, mouse 및 human cell등 여러 source의 IL-4가 모두 이와 유사한 용량-반응 곡선을 보였으며(개별 결과는 예시 안함), Table 4에서 보는 바와 같이 항-Thy 1, 2항체와 Petri dish adhesion으로 T세포나 adherent cell을 제거하는 것이 IL-4의 작용에 영향을 주지는 않는 것으로 나타났다.

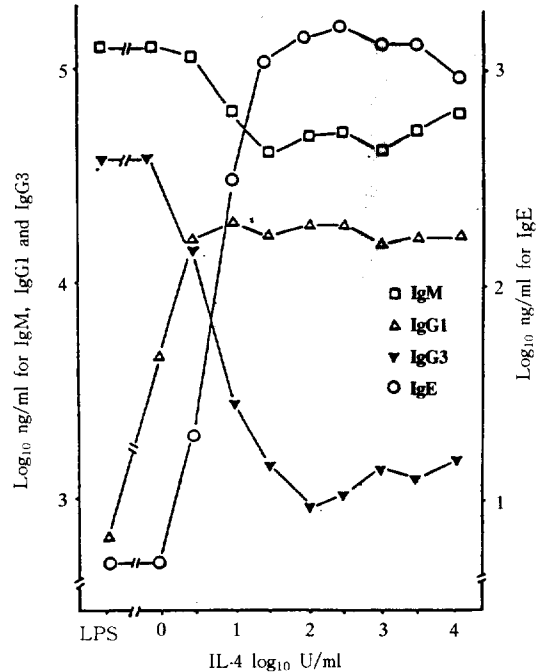


Figure 1. Dose-response curves of IL-4 induced Ig secretion.

Table 4. The effect of T or adherent cells for the LPS of LPS or LPS plus IL-4 induced responses.

| Cells                  | IgM(ug/ml) |          | IgG1(ug/ml) |          | IgE(ug/ml) |          |
|------------------------|------------|----------|-------------|----------|------------|----------|
|                        | LPS        | LPS+IL-4 | LPS         | LPS+IL-4 | LPS        | LPS+IL-4 |
| untreated              | 90         | 59       | 1.2         | 72       | <2         | 480      |
| anti-Thy 1.2           | 95         | 32       | 1.6         | 56       | <2         | 720      |
| adherence+anti-Thy 1.2 | 95         | 29       | 1.7         | 84       | <2         | 460      |

3. 항-IL-4 항체에 의한 IL-4 활성의 억제실험  
대개의 실험에서 정제되지 않은 transfected HeLa cell의 배양액을 IL-4의 source로 사용했기 때문에 면역글로불린 isotype의 생산 조절에 대한 전술한 모든 효과가 과연 실제로 IL-4에 의한 것인지를 확인하기 위해 항-IL-4 항체(11 B 11)를 이용하여 억제실험을 시행하였다. Figure 2에서 보는바와 같이 이 단세포군 항체는 용량에 비례해서 IL-4에 의한 IgG1 및 IgE에 반응을 최대 98% 이상 억제하였으며, IgE는 IgG1보다 낮은 농도의 항-IL-4 항체에 의해 쉽게 억제되는 경향을 보였다

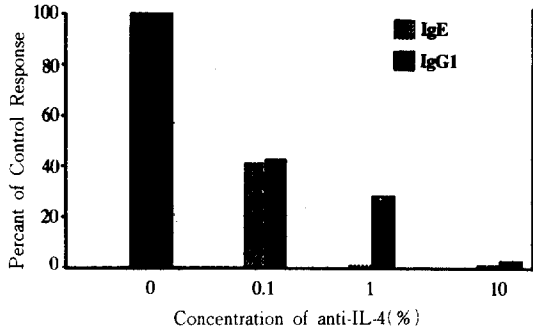


Figure 2. Inhibition of IL-4 activities by anti-IL-4 antibodies.

#### 4. IL-4에 대한 연령별 반응

IL-4에 의한 면역글로불린 생산의 조절에 마우스의 연령과 관련된 요인이 관여하는지를 알아보기 위해, 생후 2, 4, 6, 8, 10, 12주 되는 마우스의 비장 B세포가 여러 농도의 IL-4에 대해 나타내는 반응을 비교하여 보았다.

Table 5는 C57 BL/6 mouse의 비장 B세포가 10U/ml의 IL-4에 대해 연령에 따른 큰 차이없이 반응하는 것을 나타내고 있으며, 용량-반응곡선의 양상에도 연령에 따른 차이는 없었다 (개별결과는 예시 안함).

Table 5. Ontogeny of Ig production regulated by IL-4.

| Age(wk) | IgM(ug/ml) |          | IgG1(ug/ml) |          | IgE(ug/ml) |          |
|---------|------------|----------|-------------|----------|------------|----------|
|         | LPS        | LPS+IL-4 | LPS         | LPS+IL-4 | LPS        | LPS+IL-4 |
| 2       | 73         | 4.3      | 0.12        | 5.1      | <2         | 1600     |
| 4       | 67         | 11       | 0.11        | 3.7      | <2         | 800      |
| 6       | 61         | 10       | 0.10        | 4.5      | <2         | 800      |
| 8       | 54         | 8.0      | 0.10        | 4.2      | <2         | 800      |
| 10      | 61         | 7.5      | 0.10        | 2.4      | <2         | 800      |
| 12      | 52         | 7.5      | 0.10        | 3.8      | <2         | 800      |

#### 5. IL-4에 의해 유도되는 IgG1과 IgE반응의

##### Kinetics

IL-4에 의해 유도되는 각 isotype 분비의 Kinetics 실험에 있어서는 특히 IgG1과 IgE가 순차적으로 생산되는지의 여부를 알아 보기 위하여 배양 제1일부터 제9일까지 배양상청액을 매일 분리하여 각각의 농도를 측정하였다. Figure 3은 6주된 CBA마우스의 B세포를

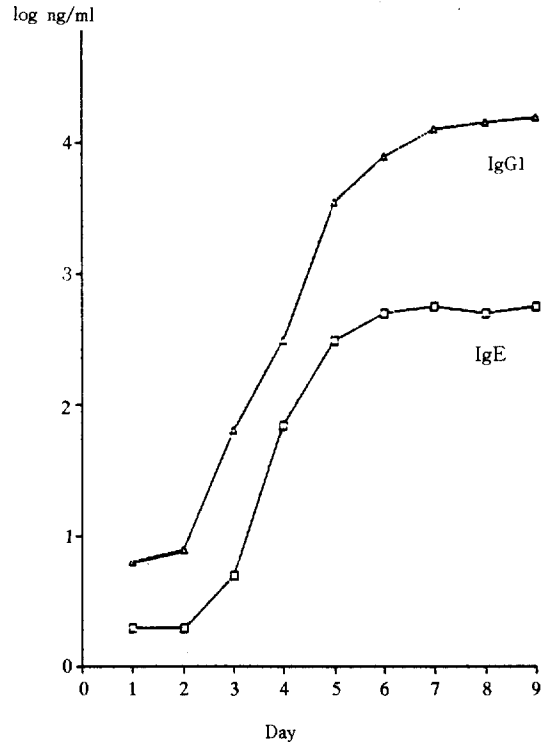


Figure 3. Kinetics of IgG1 and IgE isotypes induced by IL-4.

포를 LPS와 10U/ml의 IL-4로 배양한 결과이며, 두 isotype의 kinetics가 매우 유사한 것을 알 수 있다.

배양초기에 12시간 간격으로 상청액을 수거하여 측정 한 실험에서도 같은 소견을 보였으며, 대개 IgG1과 IgE농도의 증가는 배양 시작후 2.5일 내지 3일에 나타나서 6일 내지 7일 후에는 최고치에 도달하였다.

#### 6. LPS와 IL-4를 사용한 pulsing experiments

Table 6은 4주된 CBA 마우스의 비장 B세포를 배양액에 LPS단독 첨가, rIL-4(30 U/ml) 단독 첨가, 또는 LPS와 rIL-4를 같이 첨가하여 24시간 또는 48시간 동안 전배양한 후 다시  $4 \times 10^5$ /ml의 세포농도로 LPS 단독 또는 LPS와 rIL-4 공존의 배양액에 재배양하고, 재배양후 제7일에 상청액을 분리, IgG1과 IgE를 측정한 결과를 예시한 것이다.

그 결과를 보면, IgG1의 경우는 IL-4 단독으로 24시간 이상 전배양하고 나서 LPS에 재배양한 결과 높

은 생산반응을 보였으나, IgE의 경우는 30U/ml로 24시간 전배양했을 때는 물론, 100U/ml의 IL-4로 72시간까지 전배양해도 LPS 재배양시 분비가 유발되지 않았으며(결과는 예시안함), LPS와 IL-4가 동시에 48시간 동안 존재하거나 둘 중 하나도 24시간 전배양하고 나머지를 24 공존시킨 경우에만 정도의 반응을 볼 수 있었다. 최적의 IgE생산을 위해서는 LP와 IL-4 공히 72시간 이상 존재해야 하였으며, 이는 이때 IgG1 생산이 오히려 억제되는 경향을 보이는 것과 대조적이었다. IgG1과 IgE 모두 IL-4만으로 24시간 전배양한 경우보다는 이미 LPS로 전배양된 세포에 24시간 동안 IL-4를 추가한 경우가 높은 반응을 보였다(Table 6).

Table 6. Effects of IL-4 added on different days of LPS cultures.

| Days of addition of LPS and/or IL-4 |   |   |   |   |   | Ig synthesis (ng/ml) |       |
|-------------------------------------|---|---|---|---|---|----------------------|-------|
| 0                                   | 1 | 2 | 7 | 8 | 9 | IgE                  | IgG1  |
|                                     |   |   |   |   |   | < 2                  | 100   |
|                                     |   |   |   |   |   | < 2                  | 100   |
|                                     |   |   |   |   |   | < 2                  | 100   |
|                                     |   |   |   |   |   | < 2                  | 100   |
|                                     |   |   |   |   |   | < 2                  | 7,700 |
|                                     |   |   |   |   |   | < 2                  | 7,700 |
|                                     |   |   |   |   |   | < 2                  | 7,700 |
|                                     |   |   |   |   |   | < 2                  | 7,700 |
|                                     |   |   |   |   |   | < 2                  | 7,700 |
|                                     |   |   |   |   |   | < 2                  | 7,700 |
|                                     |   |   |   |   |   | 4,000                | 5,400 |

## 고 찰

Interleukin은 면역세포 사이에 신호전달(signalling)의 역할을 수행하는 조절인자(regulatory factor)로서, 그 특징 중의 하나는 한 가지 interleukin이 여러 종류의 세포에 작용하여 다양한 기능을 나타내며 interleukin 상호간에도 상승 또는 억제작용이 있다는 점이다. 마우스 B세포의 면역글로불린 생산에 관여하는 lymphokine만 보더라도 IL-4가 IgG1과 IgE의 생산을 증가시키는 반면 interleukin 5는 IgA의 생산을 증가시키고, gamma interferon은 IL-4의 작용을 억제하면서 IgG2a의 생산을 증가시킨다.

IL-4는 IgE의 생산에 관계하므로 제 I 형 과민반응이나 기생충 감염에 대한 면역반응을 이해하는 데 중요하며, 또한 면역글로불린 isotype switch의 기전연구에 이용될 수 있다는 점에서 관심의 대상이 되고 있다.

본 연구에서 limiting dilution analysis의 결과는 결론적으로 IL-4가 uncommitted B cell을 유도(instruct)하여 IgG1과 IgE로 switch시킨다는 가설을 입증 가능케하였다. 이는 Layton등(1984)의 결과와도 상통하는 것인데 본 연구성과 비교할 때 precursor frequency나 clone size에 차이를 보이는 것은 투여한 IL-4용량의 차이에 일부원인이 있을 것으로 사료된다.

Individual precursor analysis의 결과는 한 개의 전구세포로부터 여러 isotype을 분비하는 세포가 유래할 수 있다는 가능성과 함께 IL-4에 의해서 전 면역글로불린 전구세포의 60% 이상이 IgG1 및 IgE로 switch됨을 보여 주었다. 그러나 이 성적은 IgG1로부터 IgE로의 sequential switch가 일어나는지 여부에 관해서는 어떤 추론적 정보도 제공하지 않고 있다.

IgG1과 IgE반응의 조건에 관한 일련의 실험결과중 용량-반응 관계에 관한 것은 Snapper등(1988)의 성적과 비교할 수 있는데, IgE보다 IgG1의 생산이 낮은 농도의 IL-4에 의해 유도된다는 것은 서로 일치하는 소견이었으나, 본 연구에서는 일부 실험에서 고농도의 IL-4에 IgG1 반응이 감소하는 경향을 보이기는 했지만 그들의 보고와 같은 biphasic curve는 관찰되

지 않았다. 이와 같은 차이의 이유는 분명하지 않으나 IL-4가 source에 따라 glycosylation등 구조상의 차이로 인하여 기능상의 차이를 보이기 때문이거나, 아니면 가능성은 희박하지만 마우스의 종에 따른 반응의 다양성도 고려해 볼 수 있을 것이다.

정제된 B세포가 total spleen cell과 다른 반응을 보이지 않은 것은 IL-4의 작용이 T세포나 adherent cell등 기타 다른 세포에 의해 매개되거나 조절되지 않음을 뜻한다고 해석할 수 있다.

항-IL-4 항체의 억제시험 결과는 마우스 면역글로불린 생산 조절과 본 연구의 소견이 IL-4 이외의 다른 물질에 의한 것이 아니라는 증거가 되며, IgE반응이 IgG1보다 쉽게 억제되는 것은 용량-반응곡선에서 보듯이 IgE반응에 더 많은 IL-4가 요구되기 때문으로 풀이된다.

또한 생후 2주일의 어린 마우스 역시 IL-4에 반응하여 IgE생산이 증가되는 것은 이 반응이 기억반응(memory response)일 가능성을 배제하는 것이다.

Pulsing experiment는 IgG1과 IgE 반응에 필요한 조건들, 예를 들면 LPS와 IL-4의 공존여부, 배양시간 등이 각기 상이하다는 것을 잘 드러내고 있다. IgE반응은 IL-4만의 전배양으로는 유도되지 않으며 적어도 24시간 이상 LPS와 IL-4가 공존하는 조건이어야 가능하다. 반면 IgG1의 생산은 IL-4 LPS가 48시간 이상 공존하면 오히려 감소하는 경향을 보인다. 따라서 LPS가 IL-4 수용체의 숫자를 증가시킨다는 사실(Ohara & Paul, 1987; Park et al., 1987)로 이상의 소견이 설명될 수는 없다.

한편 이러한 pulsing experiment의 소견은 이미 IgG1으로 switch되었던 세포에서 다시 IgE로의 swich가 일어난다는 가설에 합당하다고 할 수 있지만, kinetic study에서 IgG1과 IgE 반응이 나타나는데 시간적 차이가 없다는 사실은 이 가설에 위배되는 소견이라 할 수 있다. 결국 본 연구성적은 이에 관한 단정적인 자료를 제공하지 못하였다.

IL-4가 어떻게 IgG1과 IgE생산을 유도(induction)하느냐 하는 기전에는 아직도 밝혀져야 할 부분이 많다. Switch recombination보다 선행하는 transcriptional activity의 중요성을 시사하는 최근의 보고들(Lutzker & Alt, 1988; Ltuzker et al., 1988;

Stavnezer et al., 1988)은 transformed B cell line이나중에 switch 할 CH gene의 sterile transcript를 미리 만드는 것을 보여주고 있으며, 이것이 IL-4의 작용기전과 관련하여 어떻게 설명될 수 있는지는 흥미로운 문제가 아닐 수 없다.

## 결 론

본 연구에서는 IL-4가 어떤 분화단계의 B세포 작용하는지를 밝히고자 limiting dilution analysis를 시행하였다. 그 결과, IL-4가 IgG1및 IgE를 분비하는 B세포의 전구세포 빈도는 현저하게 증가시키나 clone size에는 별 영향을 주지 않는다는 것을 밝혀내어, IL-4가 uncommitted B cell에 작용하여 IgG1 또는 IgE로의 class switch를 유도한다는 가설을 입증할 수 있는 자료를 제시하였다.

또한 LPS로 활성화된 B세포에서 IL-4에 의해 유도되는 IgG1과 IgE의 반응양상과 조건에는 어떤 특성이 있는지를 밝히고자 IL-4의 source, 용량 및 투여시기, 마우스의 연령 및 종, 비장세포 분리방법 등을 달리하여 배양실험을 시행하였다. 그 결과, IL-4의 작용에는 T세포의 존재유무, 마우스의 연령 및 종 등은 영향을 주지 않으며, IL-4에 의한 IgG1과 IgE 반응의 kinetics는 서로 유사하나 IgE 생산을 위해서는 IgG1의 경우보다 3배 내지 10배 높은 농도의 IL-4가 요구되며 특히 IgE의 생산에는 적어도 배양초기에 24시간 이상 IL-4와 LPS가 동시에 요구된다는 사실을 밝혀내어, IL-4에 의해 유도되는 IgG1과 IgE의 생산 양상에는 일부 유사점이 있으나 그 조건에는 상이점이 있음을 증명하였다.

향후 면역글로불린 class switch에 대한 IL-4의 유전자 차원에서의 작용기전을 밝히기 위하여 분자생물학적 접근방법이 요망되는 바이다.

— Abstract —

## Regulation of IgG1 and IgE Synthesis by Interleukin 4 in Mouse B Cells

Hee-Bom Moon, M.D.

*Department of Medicine, Asan Medical Center,  
University of Ulsan*

Mouse interleukin 1(IL-4) is a T cell-produced lymphokine with multiple effects on different cell types of the hematopoietic lineages. IL-4 has pronounced effects on B lymphocytes, where it induces high levels of IgG1 and IgE secretion in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated cultures that would otherwise secrete predominantly IgG3 and IgG2b.

An important question which been asked is how IL-4 exerts its effect. Two main possibilities exist; (a) IL-4 instructs uncommitted B lymphocytes to produce IgG1 and IgE; (b) IL-4 selects and expands an already precommitted B cell. In this study, the limiting dilution analysis showed that IL-4 dramatically increased the precursor frequency of IgG1 and IgE-secreting cells with no significant effect on the clone size, and it clearly suggested that IL-4 instructs uncommitted B cells to switch to IgG1 and IgE.

The characteristics of IL-4-regulated Ig isotype production in LPS-stimulated splenic B cell cultures also were studied with emphasis on the comparison between the IgG1 and IgE responses. The results showed that the kinetics for the appearance of IgG1 and IgE isotypes was similar, but the dose of IL-4 required for the induction of an IgE response is 3 to 10 times higher than that for an IgG1

response. No requirement for T cells was found for the induction of either isotype IL-4 alone was sufficient to induce an IgG1 response when cells were recultured with LPS from day 1 to day 6. However, the simultaneous presence of both IL-4 and LPS for more than 24 hours was required for a detectable IgE response. For an optimal IgE response, IL-4 needed to be present for more than 72 hours in LPS-activated cultures. The possible reasons for the different regulation of IgG1 and IgE responses are discussed.

## REFERENCES

- 1) Andersson J, Coutinho A, Lernhardt W, et al. Clonal growth and maturation to immunoglobulin secretion in vitro of every growthinducible B lymphocyte. *Cell* 1977, 10 : 27-34.
- 2) Bergstedt-Lindqvist S, Siceras P, MacDonald HR, et al. Regulation of Ig class secretion by soluble products of certain T cell lines. *Immunol Rev.* 1984, 78 : 25-50.
- 3) Coffman RL, Carty J, A T cell activity that enhances polyclonal IgE production and its inhibition by interferon-gamma. *J Immunol.* 1986, 136 : 949-54.
- 4) Fernandez-Botran R, Krammer PH, Diamantstein T, et al. B cell stimulatory factor 1(BSF-1) promotes growth of helper T cell lines. *J Exp Med.* 1986, 164 : 580-93.
- 5) Forni L, Goutinho A. The production of

- membrane or secretory forms of immunoglobulins is regulated by C-gene-specific signals. *Nature* 1982, 299 : 173-5.
- 6) Gronowicz E, Coutinho A, Melchers F. A plaque assay for all cells secreting Ig of a given type or class. *Eur J Immunol*. 1976, 6 : 588-90.
- 7) Howard M, Farrar J, Hilfiker M. et al. Identification of a T cell derived B cell growth factor distinct from interleukin-2. *J exp Med*. 1982, 155 : 914-23.
- 8) Hudak SA, Gollnick So, Conrad DH, et al. B-cell stimulatory factor 1(interleukin 4)increases expression of the Fc receptor for IgE on mouse B cells. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1987, 84 : 4606-10.
- 9) Isakson PC, Pure E, Vitetta ES, et al. T cell-derived B cell differentiation factor (s). Effect of the isotype switch of murine B cells. *J Exp Med*. 1982, 155 : 734-48.
- 10) Julius MH, Simpson E, Herzenberg LA. A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *Eur J Immunol*. 1973, 3 : 645-9.
- 11) Layton JE, Vitetta ES, Uhr JW, et al. Clonal analysis of B cells induced to secrete IgG by T cell-derived lymphokine (s). *J Exp Med*. 1984, 160 : 1850-63.
- 12) Lee F, Yokota T, Otsuka T, et al. Isolation and Characterization of a mouse interleukin cDNA clone that expresses B-cell stimulatory factor 1 activities and T-cell and mast-cell-stimulating activities. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1986, 83 : 2061-5.
- 13) Leanderson T, Lundgren E, Ruuth E, et al. B-cell growth factor : Distinction from T-cell growth factor B-cell maturation factor. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1982, 79 : 7455-9.
- 14) Lefkovits I, Waldmann H. Limiting dilution analysis of cells in The immune system. Cambridge University Press, Cambridge, 1979.
- 15) Lutzker S, Alt FW. Structure and expression of germ line immunoglobulin alpha-2b transcripts. *Mol Cell Biol*. 1988, 8 : 1849-52
- 16) Lutzker S, Rothman P, Pollock R, et al. Mitogen and IL-4-regulated expression of germ-line Ig alpha-2b transcripts : evidence for directed heavy chain class switching. *Cell* 1988, 53 : 177-84.
- 17) Neolle R, Krammer PH, Ohara J, et al. Increased expression of Ia antigens on resting B cells : An additional role for B-cell growth factor. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1984, 81 : 6149-53.
- 18) Noma Y, Sideras P, Naito T, et al. Cloning of cDNA encoding the murine IgG1 induction factor by a novel strategy using SP6 promoter. *Nature* 1986, 319 : 640-7.
- 19) Ohara J, Laher S, Inman J, et al. Partial purification of BSF-1 by HPLC. *J Immunol*. 1985, 2518-23.
- 20) Ohara J, Paul WE. Receptors for B-cell stimulatory factor-1 expressed on cells of haematopoietic lineage. *Nature* 1987, 325 : 537-40.
- 21) Park LS, Friend D, Grastein K, et al. Characterization of the highaffinity cell-surface receptor for murine B-cell stimulating factor-1. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1987, 84 : 1669-73.
- 22) Pettersson S, Pober G, Bandeira A, et al. Distinct helper activities control

- growth or maturation. 1983, 13 : 249–54.
- 23) Rabin EM, Ohara J, Paul WE. B-cell stimulatory factor 1 activates resting B cells. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1985, 82 : 2935–9.
- 24) Schimpl A, Wecker E. A third signal in B cell activation given by TRF. *Transplant Rev.* 1975, 23 : 176–88.
- 25) Severinson Gronowicz E, Doss C, Assisi F, et al. Activation to IgG secretion by lipopolysaccharide requires several proliferation cycles. *J Immunol.* 1979, 123 : 2049–56.
- 26) Severinson E, Naito T, Tokumoto H, et al. Interleukin 4 : (IgG1 induction factor) A multifunctional lymphokine acting also on T cells. *Eur J Immunol.* 1987, 17 : 67–72.
- 27) Sideras P, Bergstedt-Lindqvist S, Severinson E. Partial biochemical characterization of IgG1 inducing factor. *Eur J Immunol.* 1985, 15 : 593–8
- 28) Snapper CM, Paul WE. B cell stimulatory factor-1(interleukin 4)prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* 1987. 139 : 10–7.
- 29) Snapper CM, Finkelaman FD, Paul WE. Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by interleukin 4. *J Exp Med.* 1988. 167 : 183–96.
- 30) Stavnezer J. Radcliffe G. Lin Y-C, et al. Immunoglobulin heavychain switching may be directed by prior induction of transcript from constant-region genes. *Proc Natl Acad Sci. USA* 1988, 85 : 7704–8.
- 31) Vitetta ES, Ohara J, Myers CD et al. Serological, biochemical and functional identity of B cell-stimulatory factor 1 and B cell differentiation factor for IgG1. *J Exp Med.* 1985, 162 : 1726–31.
- 32) Yuan D, Vitetta ES. Structural studies of cell surface and secreted IgG in LPS-stimulated murine B cells. *Mol Immunol.* 1983, 20 : 367–75.