



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학박사 학위논문

면역억제제가 면역감작 후 T세포의
Foxp3⁺세포와 IL-17⁺ 세포로의 분화와
증식에 미치는 영향

2014년 8월

서울대학교 대학원
의학과 면역학 전공
이 정 훈

면역억제제가 면역감작 후 T세포의
Foxp3⁺세포와 IL-17⁺세포로의 분화와
증식에 미치는 영향

지도교수 하 중 원

이 논문을 의학박사학위논문으로 제출함

2014년 7월

서울대학교 대학원

의학과 면역학전공

이 정 훈

이정훈의 박사학위 논문을 인준함.

2014년 7월

위 원 장 _____ (인)

부 위 원 장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

Effect of immunosuppressive agents
on differentiation and proliferation of
Foxp3⁺ cells and IL-17⁺ cells after
allogeneic stimulation of T cells

by

Jeong Hoon Lee

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirements for the degree of doctor of philosophy in
medical science (Immunology)

in the Seoul National University College of Medicine

July 2014

Approved by Thesis Committee:

Professor _____ Chairman

Professor _____ Vice chairman

Professor _____

Professor _____

Professor _____

초 록

서론: T 세포는 면역반응의 발생과정 중 다양한 역할은 하며 이들 중 $T_{reg}(CD4^+CD25^+Foxp3^+)$ 세포와 $Th17(CD4^+CD25^+IL-17^+)$ 세포는 각각 면역반응의 억제와 활성화에 관여하는 중요한 세포이다. T_{reg} 세포와 $Th17$ 세포에 대한 선택적인 억제작용을 통해 면역관용의 유도를 얻을 수 있다. 본 연구에서는 다양한 면역억제제가 두 세포에 미치는 영향을 분석하여 효율적인 면역억제제에 대해 알아보았다.

방법: C57BL/6 마우스의 비장으로부터 $CD4^+CD25^-$ T 세포를 분리하였다. BALBc 마우스의 비장으로부터 림프구를 분리하여 방사선을 조사한 후 동종면역자극에 사용하였다. 분리된 세포는 응답세포(C57BL/6) : 자극세포(BALBc)의 비율을 1:4로 하여 CO_2 배양기에서 $37^\circ C$ 로 배양하였다. 각 세포들은 Mycophenolate mofetil(10 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml), Tacrolimus, Sirolimus(1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml)을 각각 첨가한 배지에서 세포배양을 시행하였다. 각각의 군은 다시 IL-2, $TGF-\beta$ 를 첨가하여 T_{reg} 세포의 분화를 촉진하는 군과 $TGF-\beta$, IL-6, neutral INF- γ 그리고 IL-4를 첨가하여 $Th17$ 세포의 분화를 촉진하는 군으로 나누었다. T_{reg} 세포는 3일 $Th17$ 세포는 5일간 배양 후 Foxp3, $ROR\gamma-T$, IL-17의 발현을 유세포분석을 통해 측정하였다.

결과: Mycophenolate mofetil은 농도 증가에 따라 T_{reg} 세포와 $Th17$ 세포의 분화를 동시에 억제하였다. 특히 1000 ng/ml군에서는 두 세포의 발현이 완전히 억제되었다. Tacrolimus는 모든 농도에서

두 세포의 활성을 모두 억제하였다. 단 약제의 투여를 시점을 24시간 지연한 경우 T_{reg} 세포이 분화억제가 동시 투여군에 비해 억제의 정도가 낮았고 특히 T_{reg} 세포의 분화가 동시 투여군에 비해 높게 나타났다. Sirolimus는 다른 면역억제제에 비해 두 세포의 억제가 강하게 나타나지 않았다. Sirolimus는 다른 두 면역억제제에 비해 세포의 증식의 지표로 볼 수 있는 전구세포비율 또한 높게 나타났다.

결론: Mycophenolate Mofetil 과 Tacrolimus는 면역감작 후 T세포의 T_{reg} 세포 및 Th17세포로의 분화 및 증식을 억제하였다. 하지만 tacrolimus군에서 약물의 투여를 지연하면 T_{reg} 세포의 활성이 동시 투여한 군에 비해 증가하는 양상을 보여 면역억제제의 투여시기를 적절하게 조절하여 면역세포의 분화를 조절할 수 있는 가능성을 보였다. 반면 sirolimus는 두 세포에 대한 억제효과가 크지 않았으며 세포의 분화와 증식을 다른 면역억제제와 비교하여 높게 유지하였다. 이는 sirolimu가 T_{reg} 및 Th17세포에 대한 직접 억제와는 다른 방법으로 면역관용을 유지하는 것으로 판단된다. 이들 결과는 모두 시험관환경에서 이루어진 것으로 생체 내에서 반응을 모두 대변할 수는 없다. 이들 결과를 토대로 추가적인 연구가 필요하다.

핵심단어; Foxp3, ROR γ -T, IL-17, T_{reg} , Th17

학 번; 2004-31180

목 차

| | | |
|---|-------------------------|-----|
| 초 | 록 | i |
| 목 | 차 | iii |
| 표 | 및 그림목차 | iv |
| | Regends of figures..... | iv |
| 서 | 론 | 1 |
| 실 | 험목적 | 7 |
| 실 | 험방법 | 8 |
| 실 | 험결과 | 14 |
| 고 | 찰 | 29 |
| 결 | 론 | 37 |
| 참 | 고문헌 | 38 |
| 초 | 록(영문) | 46 |

Regends of figures

| | |
|---|----|
| Fig. 1) Differentiation of Foxp3 ⁺ cells in 0h group..... | 19 |
| Fig. 2) Differentiation of Foxp3 ⁺ cells in 24h group..... | 20 |
| Fig. 3) Differentiation of RORr-t ⁺ cells in 0h group..... | 21 |
| Fig. 4) Differentiation of RORr-t ⁺ cells in 24h group..... | 22 |
| Fig. 5) Differentiation of IL-17A ⁺ cells at 0h..... | 23 |
| Fig. 6) Differentiation of IL-17A ⁺ cells at 24h..... | 24 |
| Fig. 7) Precursor frequency ratio of RORr-T ⁺ cell proliferation..... | 25 |
| Fig. 8) Precursor frequency ratio of IL-17 ⁺ cell proliferation..... | 26 |
| Fig. 9) Expression of FoxP3 ⁺ T cell and IL-17 ⁺ T cell in TGF-β with immunosuppressants..... | 27 |
| Fig. 10) Expression of FoxP3 ⁺ T cell and IL-17 ⁺ T cell in TGF-β ⁺ IL-6 with immunosuppressants..... | 28 |

1. 서 론

면역관용은 장기이식 후 수혜자의 면역체계가 이식편에 대한 면역반응의 발현을 억제하고 기능을 유지하여 이식편에 대한 장기생존을 유지하는데 중요하다. 면역관용을 획득하기 위한 다양한 시도들이 있었고 효과적인 면역억제를 위한 연구의 결과 다양한 종류의 면역억제방법이 개발되었으며 그 중 가장 널리 사용되는 방법이 면역억제 약물을 이용한 방법이다. 그 중 가장 대표적인 약물이 사이클로스포린 (cyclosporine) 이며 이 약물의 개발결과 이식장기 생존기간의 비약적인 증가를 가져왔고 이 후에도 다양한 종류의 면역억제제가 개발되어 임상에서 사용되고 있다. 그러나 현재 사용하는 면역억제제들은 이식장기에 대한 면역반응뿐 아니라 다른 모든 면역자극에 대한 면역반응을 억제 하여 정상인에 비해 기회감염 및 악성종양의 발생률을 상대적으로 높인다. 따라서 현재의 연구자들은 이러한 부작용을 줄이기 위한 면역억제 요법을 개발하기 위한 연구에 몰두하고 있다.

T 세포는 이식 후 발생하는 면역반응에서 가장 핵심적인 역할을 한다. T 세포는 항원제시세포로부터 신호를 전달받아 이식편을 직접 공격하거나 면역반응과 관련한 다른 면역세포를 활성화하여 이식편에 대한 면역반응을 촉진하게 되는데 전자를 세포독성 T 세포(cytotoxic T cell)라 부르며 후자를 도움 T 세포(helper T cell)라 부른다. 이식 후 면역반응은 이식장기의 혈관 재관류 후 수혜자의 혈류속에 나타난 항원을 항원제시세포가 인식하거나 이식편을 직접 인식하여 이식편에 대한 항원정보를 T 세포에 전달 하거나 T 세포가 항원을 직접 인식함으로써 시작된다(1). 도움 T 세포는 이러한 과정을 통해 항원을 인식하고

면역세포의 활성화를 조절하는 사이토카인 등을 분비 하거나 면역세포에 활성화 신호를 직접 전달하며, 항원을 직접공격하기 보다는 세포독성 세포의 활성화와 증식 및 항체 매개면역반응의 활성화를 촉진한다. 또한 항원전달세포가 전달한 항원을 인식하여 면역반응의 발생을 조절하는 역할을 한다. 즉 도움 T 세포는 면역반응의 조절자로서 역할 하고 있으며 이를 적절하게 이용함으로써 이식편에 대한 수혜자의 면역관용을 유도할 수 있다는 가정이 성립한다. 이러한 가정에 따라 도움 T 세포들이 가지는 특성과 그 종류에 대한 연구들이 진행 되었으며 연구과정 중 생쥐의 자가면역질환 유도모델에서 서로 상반되는 역할을 하는 두 가지 형태의 도움 T 세포를 발견하게 되는데 하나는 활성화 시 자가면역 질환의 발생과 염증반응을 유도하고 다른 하나는 면역반응 및 염증 반응을 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다(2-5). 또한 이 두 세포는 서로 다른 특성을 가지고 있는 데 전자는 IL-17 을 분비하고 후자는 Foxp3 항원을 가지고 있으며 공통 항원으로 CD4 와 CD25 항원을 가진다. 이에 따라 전자를 $CD4^+CD25^+IL-17^+$ 세포, 후자를 $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ 세포라 명명 하였으며 간단히 Th17 세포 후자를 Foxp3⁺ T 세포 혹은 regulatory T (T_{reg}) 세포라 부른다.

이 두 세포는 서로 상반관계를 가지며 T_{reg} 세포는 Th17 세포의 활성을 억제하고 역으로 Th17 세포는 T_{reg} 세포의 활성을 억제하는 방향으로 작용한다(5). T_{reg} 세포의 활성화는 Th17 세포 및 기타 면역반응에 관여하는 T 세포의 활성을 억제할 수 있는 환경을 조성하며 이러한 증거는 자가면역질환 모델에서 입증되었는데 면역질환의 발생유도 단계에서 T_{reg} 세포의 활성화가 Th17 세포의 활성 및 염증반응을

억제하여 면역질환의 발생을 막음을 확인하였다(6). 이러한 결과들이 보여주듯이 T_{reg} 세포와 Th17 세포의 적절한 조절을 통해 조직 혹은 기관특이적 면역반응의 억제를 가져올 수 있어 이러한 특성을 장기이식 분야에서도 적용할 수 있음을 알았다(7, 8).

T_{reg} 세포 및 Th17 세포의 활성 조절을 통해 이식 장기의 면역관용을 유도할 수 있다는 가정을 바탕으로 T_{reg} 세포 및 Th17 세포의 특성을 이용한 장기이식 후 면역억제에 관한 연구들이 진행되었으며 특히 면역반응의 억제기능을 가진 것으로 알려진 T_{reg} 세포에 대한 관심이 증가하였으며 이를 이용한 면역억제 치료에 관한 연구들이 진행되었고 일부 에서 그 효과를 증명 하였다(9-11). 비록 동물실험에서 면역감작된 T_{reg} 세포를 투여하여 이식편에 대한 면역관용을 이루는데 성공하였으나 이를 위해서는 다량의 활성화된 T_{reg} 세포를 얻기 위한 세포배양이 필요하다. 하지만 공여자에서 얻을 수 있는 T_{reg} 세포의 수는 상당히 제한적이며 실제로 혈액 내에서 T_{reg} 세포는 소량만 존재하여 이를 면역관용의 유도에 필요한 만큼의 유효한 수의 T_{reg} 세포를 얻기 위해서는 상당한 시간과 노력이 필요하여 T_{reg} 세포를 이용한 직접적인 면역관용의 유도는 실제 임상에서 사용하기에는 제한이 있다(7). 또한 최근 연구에서 면역감작된 T 세포가 직접적으로 Th17 세포의 발생을 유도하거나 심지어는 T_{reg} 세포 자신이 Th17 세포로 변환한다는 사실이 밝혀져 T_{reg} 세포와 Th17 세포의 역할과 치료적 용도로의 이용에 대한 새로운 생각이 필요하게 되었다(12, 13).

활성화된 T_{reg} 를 투여하여 면역관용을 유도하는 치료법외에 두 세포가 가지는 상호보완적인 관계를 이용하여 체내의 T_{reg} 세포의 활성을

증진시키고 Th17 세포의 활성을 억제하여 면역관용을 유도 할 수 있는지에 대한 고민들이 있었고 레티노산(retinoic acid)이 Th17 세포의 활성을 억제하고 T_{reg} 세포의 활성을 촉진함이 확인되었다(14). 이 연구결과를 통해 특정약물이 각각의 세포에 활성화에 서로 다른 영향을 미칠 수 있음을 알게 되었고 이에 따른 연구들이 진행되었다.

현재 가장 널리 사용되는 면역억제제에 대해서도 연구가 진행되었으며 각각의 면역억제제가 T_{reg} 세포 및 Th 세포에 미치는 영향에 대한 관심이 늘어났다. Demirakan 등(15)은 면역억제제의 변화를 통한 T_{reg} 세포 수의 증가를 보고하였고 Ma 등(16)은 동종감작된 T_{reg} 세포를 수혜자에 이식 후 소량의 면역억제제를 투여 함으로써 이식된 T_{reg} 세포의 활성이 유지됨을 확인하여 약물을 이용하여 T_{reg} 세포의 활성을 유지할 수 있는 가능성을 시사하였다. 각각의 약물이 면역세포에 서로 다른 영향을 미치고 일부 면역억제에 관여하는 세포를 억제하지 않거나 면역반응에 관여하는 세포를 선택적으로 억제할 수 있다면 이에 적합하고 효과적인 면역억제제를 사용함으로써 보다 효율적인 면역억제에 이를 수 있다는 가정하에 면역억제제들이 T_{reg} 세포에 미치는 영향에 대한 연구들이 진행되었다(15-18). 각 연구의 결과 각각 약물들이 T_{reg} 세포의 활성화에 서로 다른 영향을 미치는 것이 확인되었으며 가장 널리 사용되는 대표적인 면역억제제인 칼시뉴린억제제는 T_{reg} 세포 활성을 억제하였으나 sirolimus 는 T_{reg} 세포의 활성을 억제하지 않는 것으로 보인다(18). mycophenolate mofetil (MMF)은 대사억제제(antimetabolite)로 T 세포의 세포분열 과정에 관여하여 억제 효과를 보인다. 칼시뉴린억제제와 함께 병합요법으로 널리 쓰이는 약제이지만 장기이식

후 T 세포에 선택적으로 미치는 영향에 대한 연구에서 mycophenolate mofetil 은 T_{reg} 세포와 Th17 세포에는 영향을 미치지 못하는 것으로 보였다(19). 하지만 이식환자에서 칼시뉴린억제제를 mycophenolate mofetil 로 전환하였을 때 $CD4^{+}FOXP3^{+}$ 세포 발현의 증가가 보고되었으며 T_{reg} 세포의 adoptive transfer 후 단기간 소량의 mycophenolate mofetil 을 투여함으로써 이식된 T_{reg} 세포의 활성을 유지하여 이식편의 생존을 지속할 수 있다는 보고가 있어 mycophenolate mofetil 의 T_{reg} 세포 및 Th17 세포에 대한 선택적인 효과를 보이며 mycophenolate mofetil 이 T_{reg} 세포의 활성을 유지하여 T_{reg} 세포의 면역 조절자로서의 기능을 증진시킬 수 있을 가능성을 보였다(15, 16, 20, 21). 대부분의 결과는 각각의 면역억제제가 T_{reg} 세포에 미치는 영향에 중점을 두고 있으며 비록 T_{reg} 세포가 면역억제와 조절에 영향을 미치고 있다고는 하나 실질적으로 면역반응의 발생에 관여하는 Th17 세포의 에 미치는 영향에 대해서는 충분한 검증이 이루어 지지 않았었으나 최근 연구에서 Th17 세포 또한 면역반응의 발생에 중요한 역할을 하며 이 세포의 기능에 대한 연구를 통해 자가면역질환, 암, 감염 그리고 이식분야에서 가능성 있는 치료의 목표가 될 수 있다는 연구결과들 보여 이들에 대한 관심이 증가하고 있다(22, 23).

또한 두 세포의 상호 배타적인 균형이 면역관용유지에 중요한 역할을 하며 초기 면역반응에서 Th17 세포의 증가는 염증반응을 촉진하며 면역반응 초기 T_{reg} 세포의 활성 증가가 Th17 세포의 활성을 억제한다는 연구 결과에 따라 두 세포 각각에 미치는 면역억제제의 영향을 검증할 필요가 있다(24, 25). 또한 염증성 사이토카인이 증가하여 Th17 세포의

활성이 증가된 상황에서 각각의 면역억제제가 T_{reg} 세포 및 Th17 세포의 발현이 미치는 영향 특히 염증성 환경하에서 T_{reg} 세포의 활성을 유지하고 Th17 세포의 발현을 억제하는지에 대해 알아 봄으로써 T_{reg} 세포 와 Th17 세포에 대해 가장 효율적인 면역억제제에 대해 알 수 있을 것이다.

2. 실험의 목적

앞서 언급한 바와 같이 대표적이 면역억제제인 칼시뉴린억제제와 sirolimus 의 T_{reg} 세포에 대한 역할은 익히 알려져 있다. 반면 mycophenolate mofetil 의 T_{reg} 세포 및 Th17 세포에 대한 영향은 명확하지 않다. 또한 대부분의 연구들이 면역억제제와 Treg 세포와의 연관을 다루고 있으며 Th1 세포의 분화에 미치는 영향에 대해서는 알려진 바가 없다. 본 실험에서는 mycophenolate mofetil 와 칼시뉴린억제제 및 sirolimus 이 동종 면역감작 후 T_{reg} 세포 와 Th17 세포의 분화 환경에서 각각의 세포 증식에 미치는 영향을 확인하고 T 세포 활성화 시 각각의 면역억제제가 T_{reg} 세포 와 Th17 세포 상호간에 미치는 영향을 확인 함으로써 면역자극후 T 세포 활성화 상황에서 면역억제제가 T_{reg} 세포와 Th17 세포의 증식과 분화에 미치는 결과를 확인해 보고자 하였으며 기존 연구결과와의 차이를 비교하였다.

3. 실험방법

(1) 마우스

male wild type C57BL/6 마우스(SLC, Tokyo, Japan)와 male wild type BALB/c 마우스(SLC, Tokyo, Japan)를 사용하여 실험을 하였다. 두 개체는 SPF(specific pathogen free) 환경에서 사육하였으며 8 주에서 12 주령 개체를 실험대상으로 하였다. 동물실험 윤리위원회 (IACUC No. 10-0217)의 승인을 얻어 실험을 시행하였다.

(2) 면역억제제에 따른 T_{reg} 세포 및 Th17 세포의 발현과 증식에 미치는 영향

가) 세포 분리

a) $CD4^+CD25^-$ T cell 분리

C57BL/6 마우스의 비장과 장간막 림프절에서 림프구를 채취하여 $CD4^+$ T cell isolation Kit II(Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany)과 autoMACS Pro Separator - Starter Kit(Miltenyi Biotec, Bergish Gladbach, Germany)을 이용하여 $CD4^+CD25^-$ Tcell 을 분리하였다. 분리된 세포는 RPMI 1640 완충액이 든 시험관에 세포를 분주하여 4°C에 보관하였다.

b) 자극세포 (stimulator cell) 준비

BALB/c 마우스의 비장을 적출하여 세포를 채취하였다. 채취된 세포는 30Gy 방사능을 처리한 후 RPMI 1640 완충액 시험관에 분주하여 4°C 로 보관하였다.

나) 세포배양

분리된 C57BL/6 마우스의 $CD4^+CD25^-$ T cell 은 $5 \mu M$ CFSE(Carboxyfluorescein succinimidyl ester, ebioscience, SanDiego, CA) 로 표지 하였다(1×10^7 cell/ml $5 \mu M$ CFSE). 분리된 세포들은 T_{reg} 세포군과 Th17 세포군으로 나누어 T_{reg} 세포 발현군은 IL-2(100 unit/ml; ebioscience, SanDiego, CA)+TGF- β (5 ng/ml, ebioscience, SanDiego, CA)이 첨가된 배양액(DMEM/high glucose supplemented HEPES 10 mM, β -mercpatoethanol 10 mM, MEM 1x, FBS 10%, gentamycin 50 $\mu g/ml$, I-glutamex 1x)에 반응세포와 자극세포를 1:4 ($5 \times 10^4 : 2 \times 10^5$)의 비율로 혼합하여 anti-CD3 antibody(5 $\mu g/ml$, ebioscience, SanDiego, CA)로 코팅된 96 well plate 에 각각 200 μl 씩 분주하였다. T_{reg} 세포 발현군을 약제에 따라 다시 tacrolimus (5 mg/ml, Astellas, Tokyo, Japan)군, Mycophenolate mofetil (50 mg/ml, Sigma, St. Louis, USA)군, Rapamycin(1 mg/ml, Sigma, St. Louis, USA)군으로 나누었다. Th17 세포발현군은 IL-6(20 ng/ml, ebioscience, SanDiego, CA)+TGF- β (1 ng/ml, ebioscience, SanDiego, CA) + IFN- γ (9 $\mu g/ml$, ebioscience, SanDiego, CA) + IL-4(9 $\mu g/ml$, ebioscience, SanDiego, CA)이 첨가된 배양액에 반응세포와 자극세포를 1:4 ($3 \times 10^4 : 1.2 \times 10^5$)의 비율로 혼합하여 96 well plate 에 분주하였으며 이를 다시 각각의 면역억제제에 따라 T_{reg} 세포의 경우와 같이 세 군으로 나누었다. 나누어진 세 개의 군은 다시 약제의 투여시간과 용량에 따라 6 개의 아군으로 재 분류 하였으며 약물은 반응세포와 자극세포 혼합과 동시에 약물을 투여한 군(0 h)과 각 세포를 혼합하여 24 시간 배양 후 면역억제제를 투여한 군(24 h)으로 분류하였다. mycophenolate mofetil 은 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1000 ng/ml을 투여하였으며 sirolimus 과 tacrolimus 는

1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml을 투여하였다. 각각의 약물은 DMSO 로 용해한 다음 목표 농도까지 배양액으로 희석해 사용하였다. 준비된 세포들은 37°C의 CO₂ 배양기에서 배양하였으며 T_{reg} 세포는 3 일 간 Th17 세포는 5 일 간 배양 하였다. T_{reg} 세포는 배양 3 일째 Foxp3 염색 완충액 세트(eBioscience, SanDiego, CA)를 이용하여 염색을 한 다음 항체를 이용한 유세포 분석 (FACSCANTO II; BD, USA)을 하였으며 Th17 세포에 대하여는 배양 후 5 일째 T_{reg} 세포와 동일한 방법으로 ROR γ -T 및 IL-17 에 대한 FACS 분석을 시행하였다.

(3) 동종감작 후 T 세포의 활성화 단계에서 T_{reg} cell 및 Th17 세포의 발현 미치는 면역억제제의 영향

가) CD4⁺CD25⁻ T cell 분리

C57BL/6 마우스의 spleen 세포와 장간막 림프절에서 림프구를 채취하여 mouse ant-CD4 antibody-bead 를 이용하여 MACS sorting(autoMACS Pro Separator - Starter Kit, eBioscience, SanDiego, CA) 하여 CD4⁺CD25⁻Tcell 을 분리하였다. 분리된 세포는 RPMI 1640 완충액 시험관에 세포를 분주하여 4°C로 냉장 보관하였다.

나) 자극세포 (Stimulator cell) 준비

BALB/c 마우스의 비장을 적출하여 세포를 채취하였다. 채취된 세포는 30Gy 방사능을 처리한 후 RPMI 1640 완충액 시험관에 분주하여 4°C 로 냉장 보관 하였다.

다) 세포 배양

분리한 두 세포를 응답군(reaponder; C57BL/6) : 자극군(stimulator;

BALB/c) = 1 : 4 (5×10^4 : 2×10^5)의 비율로 anti-CD3 antibody-coated 96 well plate 에 분주하였다. 각각의 plate 는 다시 (1) 사이토카인을 투여하지 않은 군, (2) TGF- β 투여군, (3) TGF- β + IL-6 투여군으로 구분하였다. 이때 투여한 TGF- β 는 20 μ l (2 ng/ml, eBioscience, San Diego, CA), IL-6 는 1 μ l (10 ng/ml, eBioscience, San Diego, CA)였다. 이렇게 분류한 세 군에 대해 각각의 면역억제제에 따라 다시 세 개의 아군(subgroup)으로 구분하였다 (tacrolimus 군, mycophenolate mofetil 군, sirolimus 군). tacrolimus 군 에서는 각 well 에 각각 1, 10, 100 ng/ml의 tacrolimus 를 투여하여 배양하였으며 mycophenolate mofetil 군에서는 각각 100, 1000, 10000 ng/ml의 농도로 sirolimus 또한 각각 1, 10, 100ng/ml의 농도로 투여하였다. 각각의 약제는 적정 용매를 이용하여 녹인 후 배양액을 이용하여 희석하여 실험에 필요한 농도를 구성하였으며 최초 사용한 용매의 독성이 최소화 할 수 있도록 시약을 조성하였다. 이 후 각각의 플레이트는 37 $^{\circ}$ C 의 CO₂ 배양기에서 배양하였으며 배양 3 일째 배양액의 교환을 시행하였다.

라) 유세포분석

각각의 실험군은 배양 후 3 일과 7 일 짜 T_{reg} 세포 및 Th-17 에 대한 유세포분석을 시행하였다. 세포의 표면은 PerCP-conjugated anti-CD4 mAb(RM45; BD phamingen, San Diego, CA)와 1% 소혈청알부민(BSA)과 0.2% sodium azide 가 첨가된 PBS 를 이용하여 섭씨 4 도에서 약 20 분 간 세포의 표면을 염색하였다. APC-cy7 anti-mouse CD45.1 antibody(ebioscience, San Diego, CA)를 이용하여 CD45.2⁺ 세포를 분리하였다. T 세포를 cytofix/cyperm(BD pharmingen,

SanDiego, CA) 용액으로 고정하였으며 IL-17⁺세포에 대해서 PE conjugated anti IL-17 (TC11-18H10; ebioscience, SanDiego, CA)를 이용하여 세포 내 염색을 하였다. Foxp3 또한 FITC-conjugated anti-Foxp3 antibody(ebioscience, SanDiego, CA)를 이용하여 염색 하였다. 세포의 분석은 FACScan cytometer 와 CellQuest software(BD Bioscience SanDiego, CA)를 이용하여 시행하였다.

(4) 데이터 분석

각 실험조건에 따라 세포의 발현을 유세포 분석을 통해 세포의 수를 측정하였으며 동일 조건에서 배양된 서로 다른 세 개의 well로부터 세포를 획득하여 이를 평균하였다. 세포의 발현율은 유세포분석에서 측정된 CD4⁺세포 중 Foxp3⁺, ROR γ -T⁺, IL-17A⁺의 상대적인 비율을 측정하였다. 또한 각 약제에 따른 T_{reg} 세포와 Th17 세포의 증식에 미치는 실질적인 영향을 확인하기 위해 전구세포빈도율 (precursor cell frequency rate)을 측정하였다. 전구세포빈도율은 세포분화 이후 증식한 세포 중 실질적으로 분열한 세포의 수와 증식이 일어나기 전 즉 세포의 면역자극 후 분열이 시작되기 전 시점의 모세포 비율을 측정함으로써 실질적인 세포증식의 여부를 확인할 수 유효한 분석방법으로 이 실험에서는 면역억제제가 각각 세포의 증식에 미치는 영향을 비교하였다(26). 면역억제제의 효과가 커서 충분한 억제가 이루어질 경우 증식한 세포의 전구세포 수는 현저하게 감소할 것이다. 계산 방법은 세포분열 각 구간에서의 세포 수를 구하였고 이를 다시 2ⁿ (n=분열횟수)로 나누어 전구세포수를 구하였다(27). 이들 중 4-8 구간을 세포증식을 실질구간으로 하였으며 이를 전체 전구세포수로 나누어 그 비율을 측정하였다.

얻어진 데이터의 통계적 유의성은 Mann-Whitney U test 을 이용하여 통계적 유의성을 검증하였으며 95% 신뢰구간 ($p < 0.05$)에서 검증을 실시하였다. 검증은 SPSS. Ver.18 (SPSS Inc.) 프로그램을 이용하였다.

4. 실험결과

1) 면역억제제가 T_{reg} 세포 및 Th17 세포 증식에 미치는 영향

Foxp3⁺ 세포의 발현에 미치는 면역억제제의 영향을 보면 면역자극과 동시에 면역억제제를 투여한 군(0h; 이하 0h 군)에서 mycophenolate mofetil 는 고농도(1000 ng/ml)에서만 Foxp3⁺세포의 증식을 억제하였다. Tacrolimus 투여군은 모든 농도에서 T_{reg} 세포 활성의 완전한 억제를 보였으나 sirolimus 는 유의한 억제를 보이지 않았다(Fig. 1). 자극 24 시간 후 투여군(24h; 이하 24h 군) 에서도 mycophenolate mofetil 은 동시 투여군에서와 같이 T_{reg} 세포증식의 억제를 보여주었다. 반면 tacrolimus 는 비투여군에 비해 증식이 억제되었으나 0h 군에 비해 상대적으로 높은 T_{reg} 세포의 분화 및 증식이 보였다. sirolimus 는 0h 군에서와 같이 강한 억제는 나타나지 않았다 (Fig. 2). ROR γ -T 및 IL-17 항원은 Th17 세포의 분화의 증거를 나타내는 중요한 표지자이며 Th17 세포는 면역반응 및 염증반응의 유도에 중요한 역할을 한다. 따라서 Th17 세포 분화 및 증식의 효과적인 억제 또한 이식 후 면역관용 유도에 중요한 열쇠이다. mycophenolate mofetil 군에서 ROR γ -T⁺ 및 IL-17⁺세포의 분화는 Foxp3⁺세포에서와 같이 고농도 그룹에서 완전한 억제를 보였다. 하지만 저농도 군에서는 세포의 발현 및 분열양상이 약물을 투여하지 않은 비투여군과 유사한 양상으로 나타났다(Fig. 3). tacrolimus 투여 군은 ROR γ -T⁺ 세포에 대한 강한 억제를 보였다. 이에 비해 sirolimus 는 억제 정도가 낮았으며 모든 농도군에서 고농도 mycophenolate mofetil 이나 tacrolimus 에서와 같은 강한 억제를 보이지 않았다(Fig. 3). 24 시간 후 투여 군에서 tacrolimus 는 동시 투여 군과

비교하여 세포의 발현 및 분열이 관찰 되었으나 다른 약물군에 비해 현저히 낮은 발현을 보였다. sirolimus 의 경우 고농도 mycofenolate mofetil 군 및 tacrolimus 군과 비교하여 비교적 높은 세포 발현을 보였으며 1 ng/ml군에서는 비투여군과 거의 유사한 발현을 보였다. (Fig. 4). IL-17⁺세포 또한 ROR γ -T⁺ 세포에서와 유사한 결과를 보여 주었다. tacrolimus 는 동시투여군(0h)의 모든 농도에서 발현을 강하게 억제하였으며 고농도의 mycofenolate mofetil 또한 낮은 발현율을 보였다. Sirolimus 는 IL-17⁺세포의 발현이 거의 억제되지 않았다. 이러한 현상은 24h 군에서도 유사하게 나타났다. 다만 tacrolimus 는 24h 군에서의 세포발현의 억제가 0h 군에서보다 약하게 나타났으며 이 현상은 T_{reg}⁺세포와 ROR γ -T⁺세포에서도 유사하게 나타났다.

전구세포빈도(precursor cell frequency)는 세포의 실질적인 증식을 여부를 반영할 수 있는 효과적인 방법이다. 세포 분열한 각 세포의 분열시점에서 분열에 참여한 세포의 수를 계산하여 전체 전구세포에 대한 비율을 확인하면 실질적으로 약물이 세포의 증식에 영향을 미쳤는지를 알 수 있다. 전구세포빈도는 Foxp3⁺세포의 경우 세포의 발현은 확인하였으나 CFSE 염색 하 세포분열에 의한 증식양상은 구분하기 어려웠다 (Fig. 1). 따라서 약물과 전구세포비율과의 연관성에 대한 분석은 ROR γ -T⁺세포와 IL-17⁺세포에 한하였다. 비투여군에서 증식한 ROR γ -T⁺세포의 전구세포의 비율은 86.8%로 측정되었으며 이는 발현한 세포의 대부분이 증식에 관여함을 시사한다. mycofenolate mofetil 1000 ng/ml군에서 전구세포비율은 0h 군과 24h 군에서 각각 0.1%와 0.3%를 보여 비투여군에 비해 강력한 증식억제를 시사하였으나(p<0.05)

저농도군 에서는 효과적인 증식의 억제가 이루어지지 않았다(Fig. 7A, 7B). tacrolimus 의 경우 자극과 동시에 투여한 군에서는 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml 군에서 각각 5.1%, 1.8%, 2.1%의 전구세포비율을 보였으나 24 시간 군에서는 35%, 33.8%, 35%로 증가하여 투여시간이 지연되었을 때 투여 전 활성화된 T 세포의 증식에 대한 억제에는 충분한 효과를 보이지 않았다(Fig. 7C, 7D). sirolimus 는 비록 약물의 농도에 따라 증식이 상대적으로 감소하였지만 tacrolimus 와 비교하여 투여시간에 관계없이 동시 투여군(1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml)에서 58.7%, 50.8%, 46.6%로 높은 전구세포비율을 보였다. 특히 24 시간 후 투여군에서 각각 85%, 79.1%, 74.9%로 전구세포비율이 높게 나타나 충분한 세포의 증식억제가 되지 않음을 시사하고 있다(Fig. 7E, 7F). 또한 IL-17⁺세포의 증식에서도 유사한 결과를 보였다. mycofenolate mofetil 10 ng/ml 군에서의 세포증식은 비투여군과 비교하여 억제를 보이지 않았으나 mycofenolate mofetil 1000 ng/ml군에서는 0.1%로 강한 억제를 보였다(Fig. 8A, 8B). tacrolimus 군 또한 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml 농도에 대해 각각 5.1%, 1.8%, 2.1%의 비율로 강한 억제를 보였다. 반면 24 시간 군에서는 증가하여 각각 35%, 33.8%, 35%로 상대적으로 증가된 비율을 보였으나 투여하지 않은 군에 비해 낮은 비율을 보였다(Fig. 8C, 8D). 반면 sirolimus 는 ROR γ -T⁺세포에서와 같이 다른 두 군과 비교하여 높은 증식율을 보였으며 동시 투여군 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml군에서 각각 58%, 49%, 67%로 나타났으며 24 시간 군에는 83.8%, 77.9%, 63.6%로 비투여군과 차이가 농도가 낮을수록 작았다 (Fig. 8E, 8F). 이러한 결과적으로 tacrolimus 와 sirolimus 에서 ROR γ -T⁺와 IL-17⁺세포의 증식은 투여시간에 따라 그 정도가 달라지며 적절한

투여시기의 선정이 효과적인 면역세포의 활성화와 관련되어 있음을 알 수 있었다.

실질적으로 생체에서는 면역반응 발생시 두 세포가 동시에 발현된다. 그리고 이 두 세포는 서로에게 영향을 미치게 되는데 이 환경에서 각각의 면역억제제가 두 세포의 발현과 상호작용에 어떤 영향을 미칠 수 있는지에 대해서도 알아볼 필요가 있다. 따라서 저자는 T 세포를 활성화하여 두 세포의 활성화에 면역억제제가 미치는 영향과 극단적으로 Th17 세포의 활성을 촉진한 상황에서 면역억제제의 영향을 보고자 하였다.

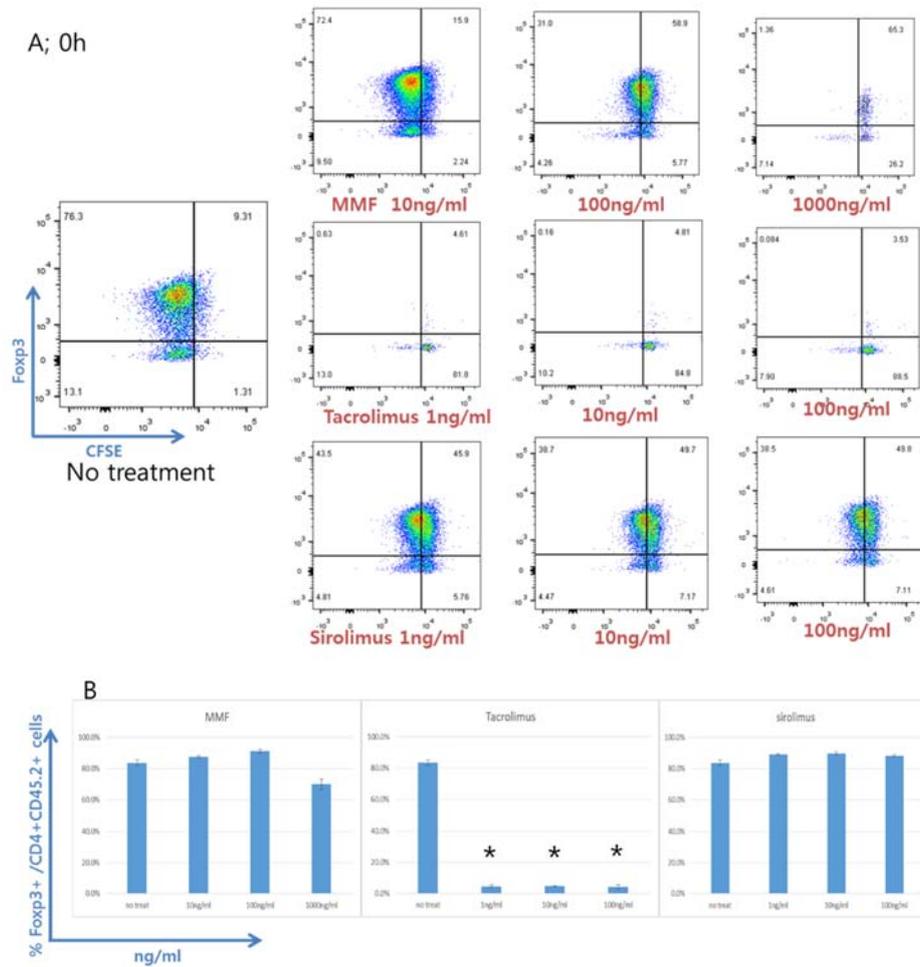
2) T 세포 활성화 조건에서 면역억제제가 T_{reg} 및 Th17 세포에 미치는 영향

TGF- β 는 동종감작된 T 세포에서 T_{reg} 세포 및 Th17의 활성화에 관여하며 특히 T_{reg} 세포의 활성화에 중요한 역할을 하는 사이토카인(cytokine)이다(28, 29). TGF- β 를 투여한 군의 경우 Tacrolimus 군은 T_{reg} 세포 및 Th17 세포를 초기(배양 후 3 일)째는 모두 억제 하였으나 시간의 경과에 따라 Th17 세포의 활성화는 비투여군에 비해 차이가 없게 나타났고 T_{reg} 세포에 대해서는 강한 억제를 보였다. 반면 sirolimus 는 초기 Th17 세포의 발생은 유의한 억제를 보였고 Foxp3⁺세포의 발현은 고농도에서만 일부 억제를 보였으나 유의하지는 않았다. 배양 후 7 일 째 Foxp3⁺세포 비투여군에 비해 유의한 억제를 보였고 Th17 세포에 대해서는 비투여군과 유사한 발현을 보였다. mycofenolate mofetil 은 두 세포 모두 고농도에서 억제를 보였고 배양 후 7 일째에는 T_{reg} 세포의 활성화가 Th17 세포와 비교하여 더 억제되는 양상을

보였다. 저농도에서는 오히려 Th17 세포의 활성이 비투여군에 비해 증가되는 양상을 보였다(Fig 9).

3) Th17 세포 활성화 환경에서 면역억제제가 T_{reg} 및 Th17 세포에 미치는 영향

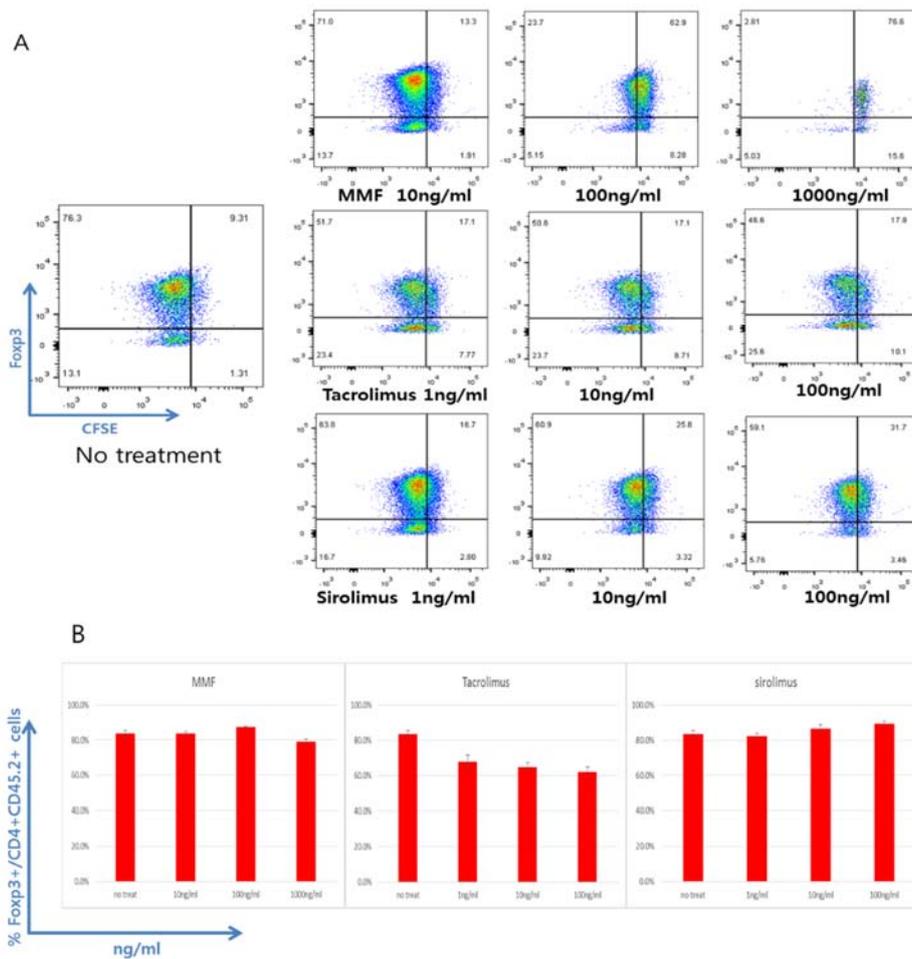
IL-6 는 T 세포의 활성화 과정 중 면역감작된 T 세포를 Th17 세포로 분화시킬 수 있는 강력한 염증성 사이토카인이다. 또한 IL-6 는 활성화된 T_{reg} 세포를 Th17 세포로의 변환을 촉진하는 기능을 한다(5, 13). 따라서 TGF- β 와 IL-6 는 동종감작된 T 세포를 Th17 세포로 분화시키는 강력한 효과를 발휘한다. 이식 후 장기는 재관류 손상 및 항원 표지세포에 의해 면역반응 및 염증반응이 발생하며 이 과정에서 TGF- β 와 IL-6 는 Th17 세포의 활성화에 중요한 역할을 한다. 이러한 환경에서 각각의 면역억제제가 T_{reg} 세포와 Th17 세포에 미치는 영향을 보고자 하였다. 실험군에서 tacrolimus 는 초기(배양 후 72 시간)부터 모든 T_{reg} 세포와 Th17 세포에 대한 강한 억제를 보여주었고 배양 후 7 일째 에도 두 세포에 대한 지속적인 억제를 보였다. sirolimus 는 초기 T_{reg} 세포 및 Th17 세포의 활성화억제는 보이지 않았다. 하지만 시간경과에 따라 배양 후 7 일 째 오히려 Th17 세포의 활성이 증가하였으며 이와는 반대로 T_{reg} 세포의 활성은 억제 되었다. mycophenolate mofetil 는 초기 T_{reg} 세포 및 Th17 세포의 억제를 보여주었고 억제의 정도는 농도에 비례하여 증가하였다. 특히 T_{reg} 세포의 경우 고농도에서 유의한 활성의 억제를 보여 T_{reg} 세포에 대해 강력한 억제작용을 보이고 있었다. 배양 후 7 일째 Th17 세포의 활성은 비투여군에 비해 오히려 증가하는 양상을 보이고 있으며 T_{reg} 세포는 농도에 비례하여 억제 되었다(Fig. 10).



(Fig. 1) Differentiation of Foxp3⁺ cells in 0h group

A: Foxp3⁺ cell expression at each drugs. Expression of foxp3⁺ cell is significantly suppressed on Tacrolimus group, and 1000ng/ml mycophenolate mofetil group also suppressed.

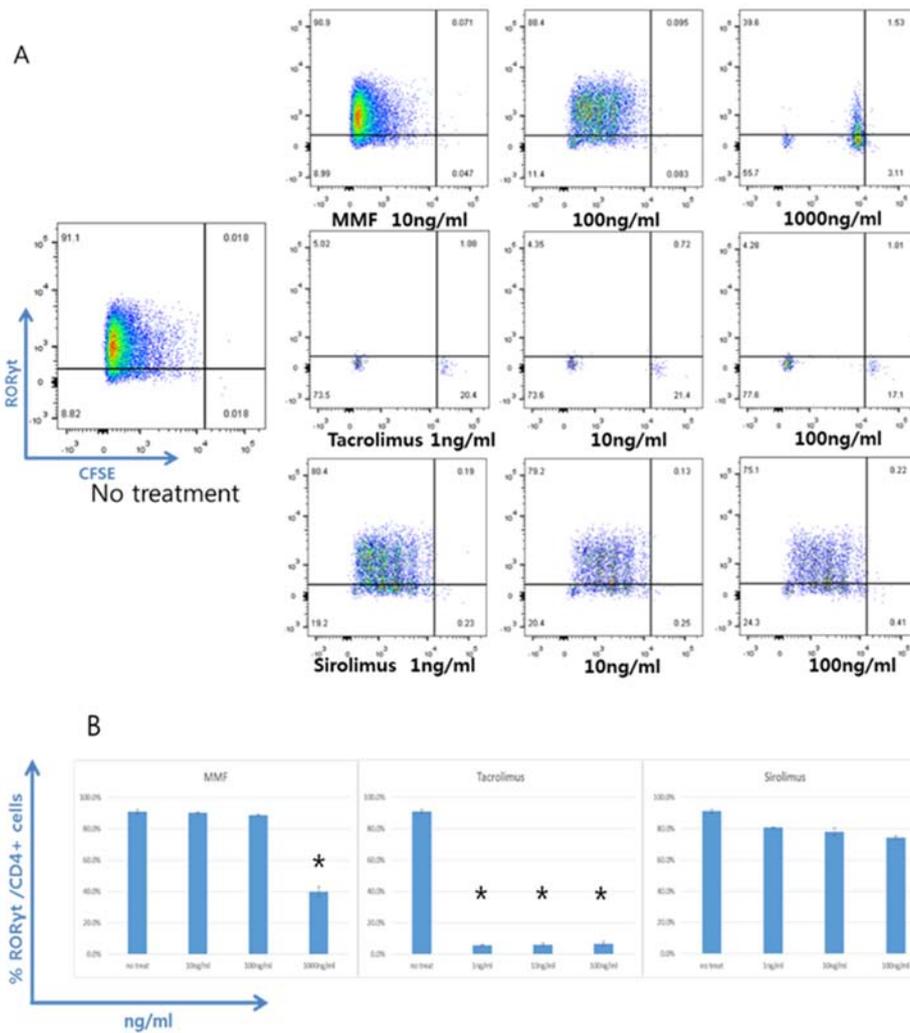
B: relative ratio for Foxp3⁺ cells in CD4⁺ cell group. CD4⁺ and CD45.2 cells are selected by negative selection method using anti-mouse CD45.1 Ab Tacrolimus group rarely express the Foxp3⁺ cells. (*; p < 0.05)



(Fig. 2) Differentiation of Foxp3⁺ cells in 24h group

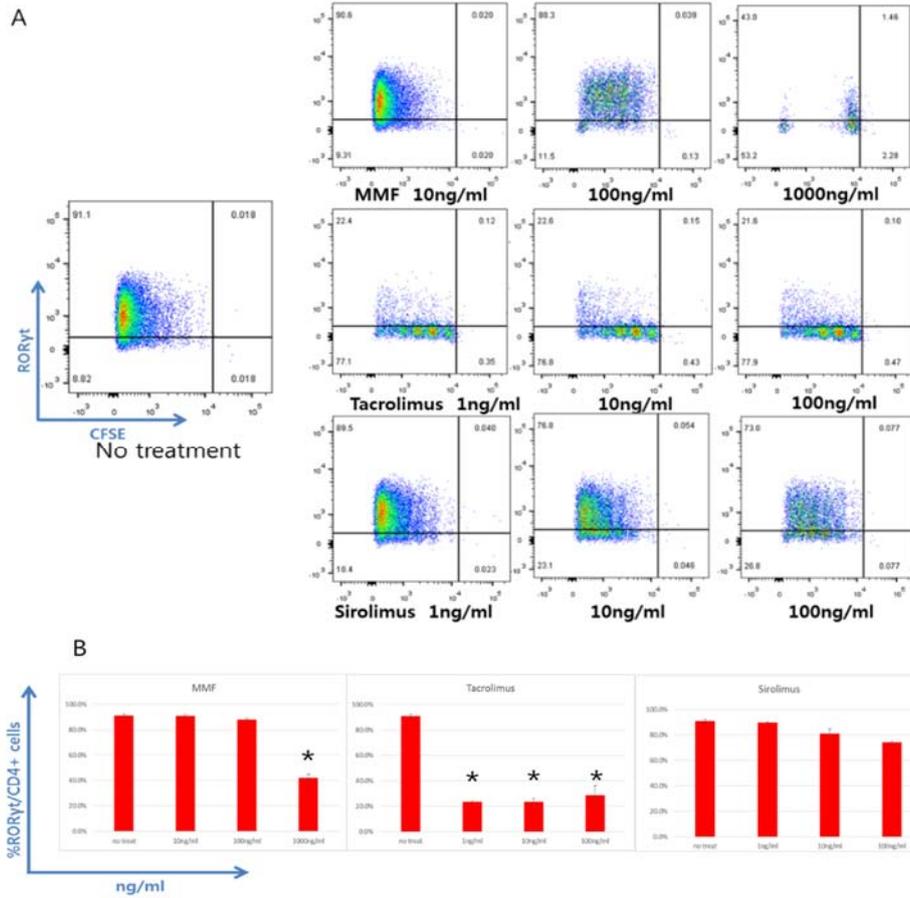
A; Foxp3⁺ cell expression at each drugs. Expression of foxp3⁺ cell is less suppressed on Tacrolimus group, although 1000ng/ml mycophenolate mofetil group also suppressed.

B; relative ratio for Foxp3⁺ cells in CD4⁺ cell group. Foxp3⁺ cell expression on Tacrolimus group is relatively increased in 24h group. Although the total population of CD4⁺ cell is smaller the other groups compared to mycophenolate mofetil 1000ng/ml group, ratio for Foxp3⁺cell/CD4⁺ cells are similar compared to others. CD4⁺ cells are selected by negative selection method by anti-mouse CD45.1 Ab and select the CD45.2⁺ cells that represent C57BL/6 mouse. (*; p < 0.05)



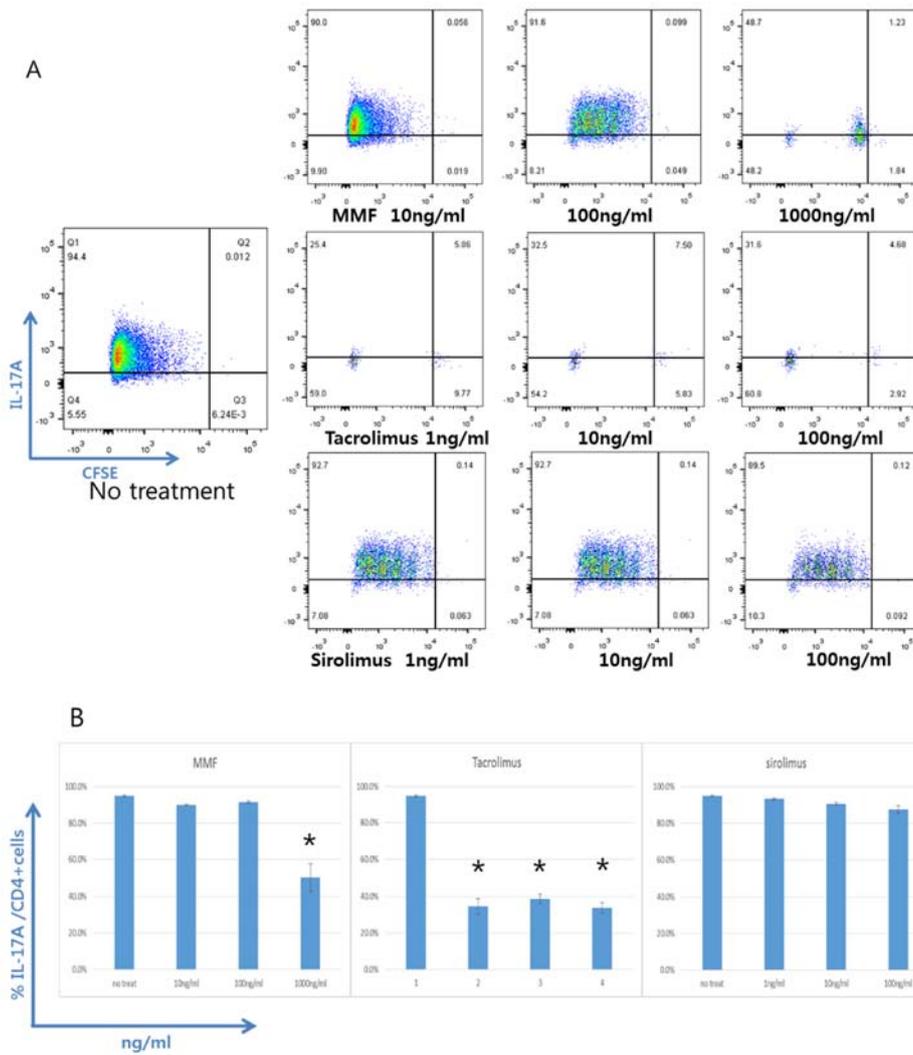
(Fig. 3) Differentiation of ROR γ -T⁺ cells in 0h group

A; ROR γ -T⁺ cell expression at each drugs. Expression of ROR γ -T⁺ cell is significantly suppressed on tacrolimus group, and 1000ng/ml mycophenolate mofetil group also suppressed. B; relative ratio for ROR γ -T⁺ cells in CD4⁺ cell group. Expression of ROR γ -T⁺ cells are suppressed on 1000ng/ml mycophenolate mofetil group and tacrolimus group. (*; p < 0.05)



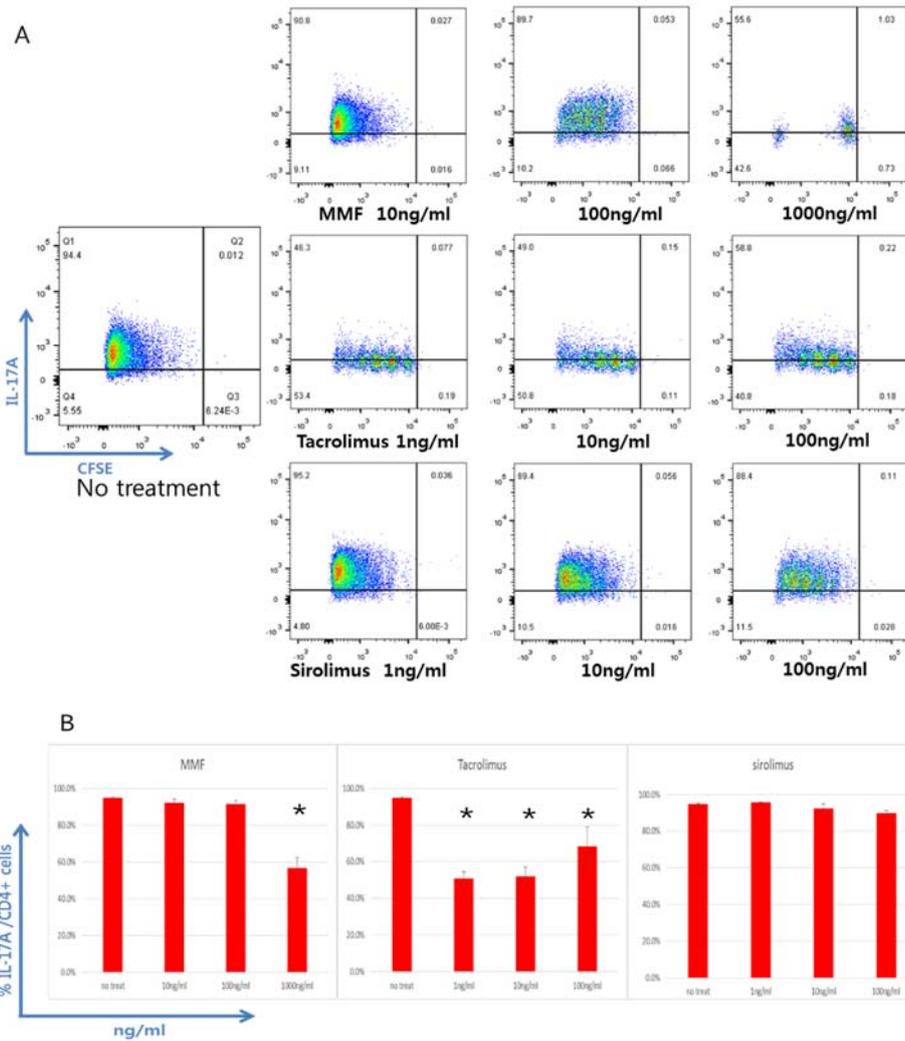
(Fig. 4) Differentiation of ROR γ - T⁺ cells in 24h group

A; ROR γ - T⁺ cell expression at each drugs. Expression of ROR γ - T⁺ cell is significantly suppressed on tacrolimus group, and 1000ng/ml mycophenolate mofetil group also suppressed. B; relative ratio for ROR γ - T cells in CD4⁺ cell group. Each group shows expression and division of ROR γ - T cells. Although relative cell counts are reduced but cell division did not suppressed by immunosuppressants. (*; p < 0.05)



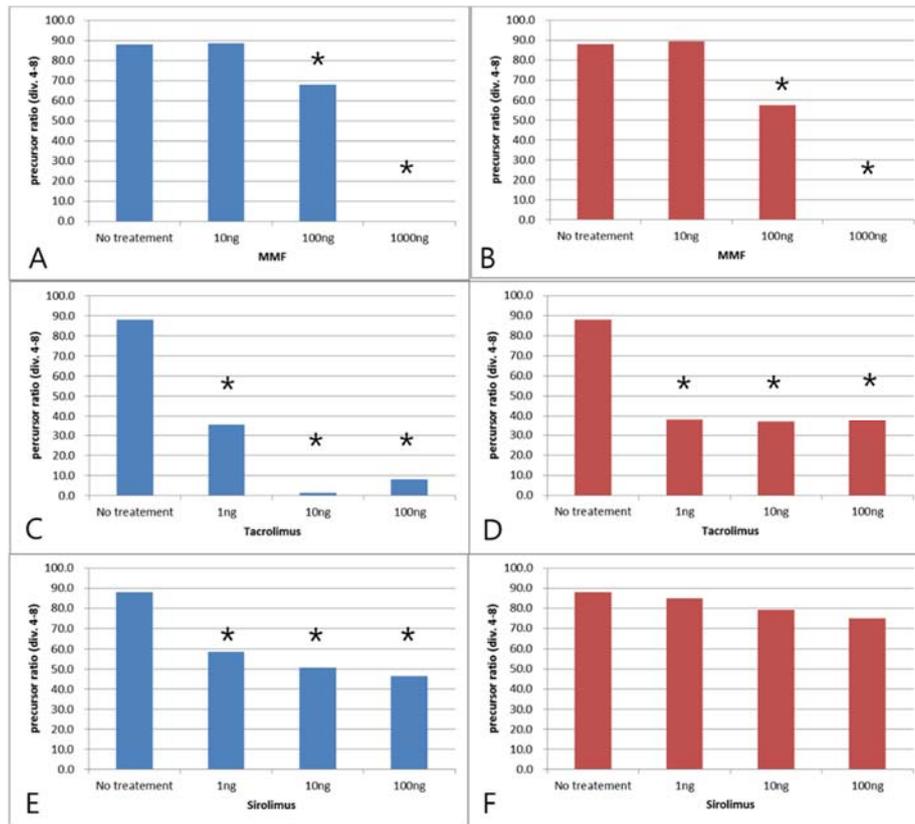
(Fig. 5) Differentiation of IL-17A⁺ cells at 0h

A; IL-17A⁺ cell expression at each drugs. Expression of IL-17A⁺ cell is significantly suppressed on tacrolimus group, and 1000ng/ml mycophenolate mofetil group also suppressed. B; relative ratio for IL-17A⁺ cells in CD4⁺ cell group. Same patterns are shown compare to ROR γ -T group. (*; p < 0.05)



(Fig. 6) Differentiation of IL-17A⁺ cells at 24h

A; IL-17A⁺ cell expression at each drugs. Expression of IL-17A⁺ cell is significantly suppressed on tacrolimus group, and 1000ng/ml mycophenolate mofetil group also suppressed. But cell division does not suppressed by drugs. B; relative ratio for IL-17A⁺ cells in CD4⁺ cell group. Relative increase of IL-17A⁺ expression on 24h group compare to 0h group. (*; p < 0.05)

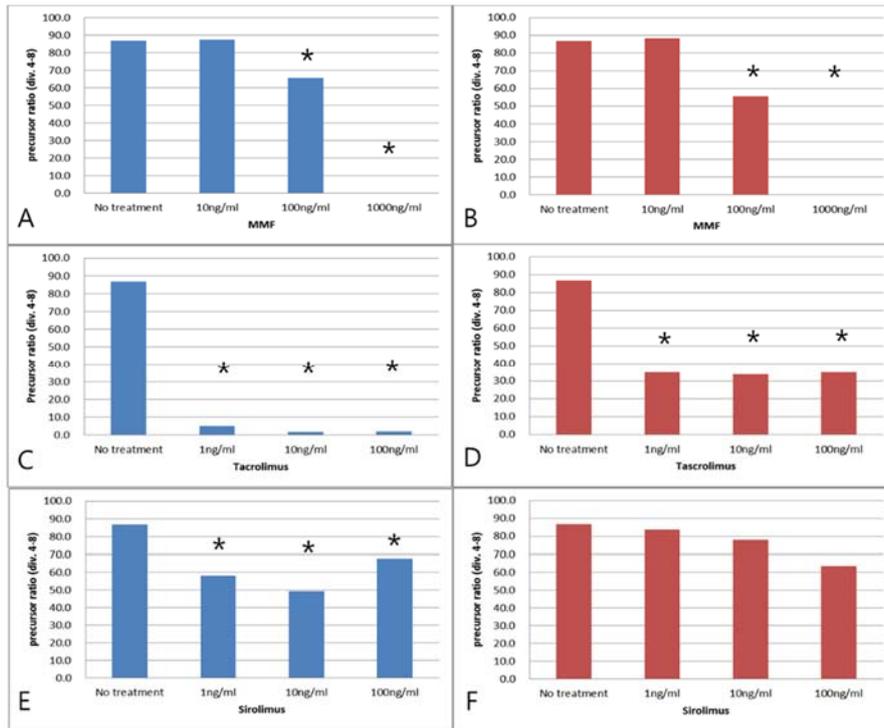


(Fig. 7) Precursor frequency ratio of ROR γ - T⁺ cell proliferation

Lower precursor frequency means inhibition of proliferation affected by drugs. tacrolimus shows inhibition of cell proliferation of ROR γ - T⁺ cells (C, D). High dose mycophenolate mofetil also shows inhibition of ROR γ - T⁺ cell proliferation (A, B). But precursor frequency rate is relatively higher in sirolimus group. In 24h group (F, red), precursor frequency rates are similar that of no treatment group. (*; p < 0.05)

Blue; Simultaneous administration of immunosuppressants and allogeneic stimulation (blue)

Red: Administration of immunosuppressants 24 hours after allogeneic stimulation (red)

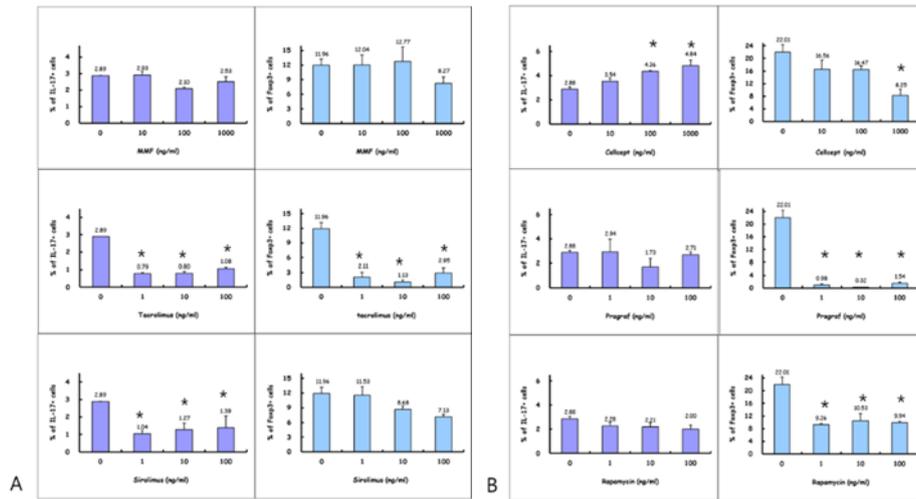


(Fig. 8) Precursor frequency ratio of IL-17⁺ cell proliferation

Sirolimus group does not suppress the proliferation of IL-17⁺ cells especially in 24h group (red). In high dose mycophenolate mofetil (A, B) and tacrolimus (C, D) group suppress the proliferation of IL-17⁺ cells. (*; p < 0.05)

Blue; Simultaneous administration of immunosuppressants and allogeneic stimulation (blue)

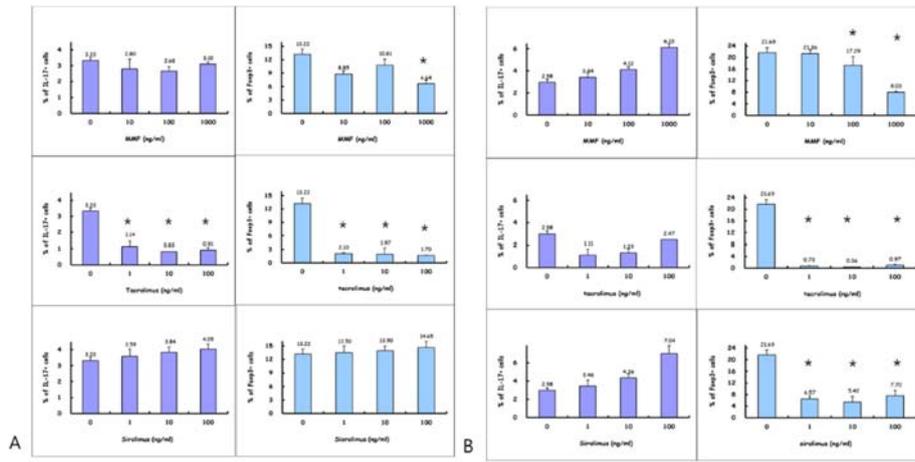
Red; Administration of immunosuppressants 24 hours after allogeneic stimulation



(Fig. 9) Differentiation of FoxP3⁺ T cell and IL-17⁺ T cell in TGF- β with immunosuppressants.

A) At 3rd day, Mycophenolate mofetil and tacrolimus shows both suppression of FoxP3⁺ and IL-7⁺ cells. But sirolims shows more suppressive effects on IL-17⁺ cells and protective effect on FoxP3⁺ cells.

B) At 7th day, all agents show suppression of FoxP3⁺ cells expression but the suppression for IL-7⁺ cells are not significant. Furthermore low dose mycophenolate mofetil show enhancement of IL-17⁺ cell expression. (*; p < 0.05)



(Fig. 10) Differentiation of Foxp3⁺ T cell and IL-17⁺ T cell in TGF- β + IL-6 with immunosuppressants

In the circumstance under IL-6, inflammatory cytokine, differentiation of IL-17⁺ cells are accelerated. At 3rd day both sirolimus and mycophenolate mofetil did not successfully suppress the activity of IL-17⁺ cells (A). At 7th day Foxp3⁺ cells are suppressed by all type of immunosuppressants but only tacrolimus had suppressive effect on IL-17⁺ cell differentiation. Even certain concentration of immunosuppressants the activity of IL-17 is up regulated compared to control (B). (*; p < 0.05)

5. 고 찰

T_{reg} 세포와 Th17 세포는 도움 T 세포중 면역반응의 조절에 직접적으로 영향을 미치는 세포로 알려져 있고 이 세포 중 T_{reg} 세포는 면역반응의 발현을 억제할 수 있는 능력을 가지고 있으며 자가면역질환 동물 모델에서 활성화된 T_{reg} 세포가 면역염증 반응유도를 억제하여 면역질환의 발생을 막을 수 있음을 보여 줌으로써 T_{reg} 세포를 이용한 이식 후 면역반응의 억제와 궁극적으로는 면역관용을 유도할 수 있는 가능성에 대한 논의 들이 있었고 실제로 T_{reg} 세포를 이용한 면역억제 실험들을 통해 그 가능성을 보였다(7-9, 30). 비록 T_{reg} 세포의 면역억제기능이 동종이식편의 생존을 증가 시킬 수 있다고는 하나 이를 실제 임상에 적용하기에는 많은 난관이 있으며 세포의 추출 및 배양을 위해 많은 시간과 노력이 필요하고 동물이 아닌 인간을 대상으로 하였을 때 면역억제에 필요한 적절한 세포수량을 얻기는 어렵다(7). T_{reg} 을 이용한 실험들 중 아토피 피부염 유발실험에서 T_{reg} 과 tacrolimus 가 아토피 피부염의 발현의 억제에 상승효과를 나타낸다는 연구가 있어 약물을 이용한 T_{reg} 세포의 발현을 통해 면역관용에 이르는 데 대한 연구의 필요성이 대두되었다(31). Mucida 등(14)이 레티노산(retinoic acid)이 TGF- β 에 의해 유도되는 T_{reg} 세포의 분화를 촉진함을 보고하고 Gregori 등(20)이 $1\alpha,25$ -dihydroxyvitamin D_3 와 mycophenolate mofetil 에 의해 유도된 T_{reg} 세포가 이식편에 대한 면역관용을 유도함을 보고함으로써 이식 후 약물을 이용한 T_{reg} 세포의 유도와 이에 따르는 면역관용의 유도 가능성을 보여주어 이 후 면역억제제와 T_{reg} 세포에 미치는 영향에 대한 증거 와 연구들이 진행되었다.

T_{reg} 세포에 대해 면역억제제가 미치는 영향은 다양하게 나타나는데 이들 중 tacrolimus 는 T_{reg} 세포의 활성을 강하게 억제한다. tacrolimus 는 NF κ B 와 관련한 T 세포 신호전달체계를 억제하여 T 세포의 활성을 억제한다(32). NF κ B 는 또한 T_{reg} 세포의 발현을 위한 신호 전달체계 중 T_{reg} 세포의 발현을 증가시키는 경로에 존재하여 NF κ B 의 억제는 곧 T_{reg} 세포의 발현을 억제하는 방향으로 작용함을 의미한다(18, 33). 본 실험에서도 tacrolimus 는 면역자극과 동시에 투여 한 경우 T_{reg} 세포에 대한 강한 억제효과를 보였다. 하지만 면역자극 24 시간 후 투여군에서는 T_{reg} 세포의 발현의 억제가 동시 투여군에 비해 낮은 억제를 보였다. sirolimus 는 현재까지 알려진 면역억제제 중 T_{reg} 세포의 활성을 가장 잘 유지하며 T_{reg} 세포 활성유지에 긍정적인 효과를 발하는 것으로 알려졌다(17).

sirolimus 는 mTOR 억제를 통해 T 세포의 활성을 억제한다. 하지만 T_{reg} 세포의 활성과 관련한 세포신호전달체계에서 mTOR 는 T_{reg} 세포의 활성화를 억제하는 경로에 존재하고 있어 mTOR 억제제인 sirolimus 는 오히려 T_{reg} 세포의 활성을 유지하는 방향으로 작용한다(33, 34). 본 연구에서도 이러한 사실이 입증됨을 알 수 있었으며 sirolimus 투여군에서 T_{reg} 세포의 발현은 비투여군과 비교하여 차이가 없었다.

mycophenolate mofetil 은 세포대사 억제제이며 purine 및 pyrimidine 의 합성과 관련하여 T_{reg} 세포의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다(20). mycophenolate mofetil 10 ng/ml, 100 ng/ml 투여군에서 T_{reg} 세포의 활성은 크게 억제되지 않는 반면 1000 ng/ml 투여군에서는 강한 억제를 보였다. 약제의 농도가 증가함에 따라 T_{reg} 세포의 활성이

비투여군에 비해 억제되는 양상을 보였고 1000 ng/ml군에서는 세포의 발현이 거의 나타나지 않을 정도의 억제를 보였으며 이는 tacrolimus 군에서와 유사한 결과였다. mycophenolate mofetil 이 T_{reg} 세포의 활성화에 미치는 영향에 대해서는 상반된 의견이 존재하였으나(15, 19). 최근의 연구들은 mycophenolate 가 T_{reg} 세포의 활성을 억제하는 것으로 보고 있어 본 연구의 결과를 뒷받침 한다고 볼 수 있다(18).

Th17 세포는 T_{reg} 세포와 달리 염증성 사이토카인에 의해 유도되며 IL-17 을 분비하여 면역세포의 활성화 하며 염증세포의 활성을 유도하는 역할을 하여 이의 효과적인 억제를 통해 이식편에 대한 면역관용을 이룰 수 있으며 T_{reg} 세포와 함께 면역억제치료의 목표로서 조명되고 있다. Th17 세포 발현의 표지자로서 IL-17 과 ROR γ -T 표면항원을 가지며 이를 통해 Th17 세포의 발현유무를 알 수 있다. Th17 세포 발현을 위한 세포 내 신호 전달체계 중 mTOR는 T_{reg} 세포에서와는 달리 Th17 세포의 활성을 증진하는 역할을 한다(35, 36). 따라서 mTOR 억제제인 sirolimus 는 Th17 세포에 대해 선택적인 억제기능을 가진다. 그 결과 Th17 세포의 표지자인 IL-17 과 ROR γ -T 의 발현을 억제한다. 하지만 본 실험에서 sirolimus 는 이 두 가지 Th17 세포 표지자에 대한 충분한 억제를 보이지 않았다. 억제 정도는 투여시간의 지연에 따라 감소하였다. tacrolimus 는 Th17 세포의 발현과 증식을 강하게 억제하였으며 알려진 바와 같이 T 세포 전반에 대한 강한 억제작용을 나타내었다. mycophenolate mofetil 의 Th17 세포에 대한 억제의 양상은 T_{reg} 세포의 그것과 유사하게 나타났다.

면역반응에서 면역감작에 의해 면역세포가 활성화되고 활성화된

면역세포들이 분열을 통해 증식하여 면역반응을 유도하게 된다. 이러한 세포의 증식에 대해 면역억제가 미치는 영향에 대한 분석을 할 수 있는 지표로서 전구세포비율이 있다(26). 이는 각 분열단계의 세포수로부터 분열한 원래의 세포 수를 구하고 전체 전구세포 수 대비 활성 분열한 전구세포수의 비율을 구하여 각각의 약제가 세포의 분열증식의 억제 조절에 기여한 정도를 파악할 수 있다. T_{reg} 세포의 경우 발현의 증가는 보였으나 세포의 분열은 뚜렷이 나타나지 않았다. Th17 세포의 경우 세포의 발현과 분열의 양상이 비교적 분명하게 확인되어 전구세포비율을 구할 수 있었다. 전구세포비율은 sirolimus 군에서 높은 비율을 보였으며 tacrolimus 군에서 가장 낮게 나타났다. mycofenolat mofetil 군에서는 저농도에서 전구세포비율이 비투여군과 유사하였으며 용량의 증가에 따라 비율은 감소하였다. 특히 고농도에서는 전구세포의 비를 구할 수 없을 정도의 강한 억제를 보이고 있다.

mycofenolate mofetil 의 T_{reg} 및 Th17 세포에 대한 작용은 선택적이 아닌 두 세포 모두를 억제하는 양상으로 보였다. T_{reg} 세포 활성유지와 관련한 이전의 연구들을 종합하여 볼 때 mycofenolate mofetil 은 세포의 활성 유지난 증식에 기여하지 않는 것으로 판단하고 있었으며 본 연구에서도 모든 T 세포에 대한 억제효과를 보였다. 이는 T_{reg} 세포 및 Th17 세포의 발현과 관련하는 세포신호 체계에서 mycofenolate mofetil 은 T 세포의 활성화 신호전달체계의 중간과정이 아닌 최종단계의 세포대사를 억제함으로써 비 특이적인 세포의 억제성향을 보인다고 할 수 있다. 본 실험에서 mycofenolate mofetil 는 1000 ng/ml농도에서 강한 억제를 보였다. 하지만 저농도인 10 ng/ml에서는 거의 억제가 일어나지

않았으며 1000 ng/ml군에서만 강한 억제를 보였다. 다른 약물에 비해 mycofenolat mofetil 군에서는 고농도에서의 억제가 강하게 나타났으며 세포의 증식 또한 강하게 억제 되었다. 타 약제에 비해 높은 강도의 면억억제제가 가지는 약제고유의 작용 때문인지 아니면 약제 나 약제를 운반한 운반체의 독성인지를 구분할 필요가 있다. 본 실험에서 약제는 소량의 DMSO 를 이용하여 용해하였으며 이를 배양액을 이용 단계별로 희석하여 실험에 필요한 농도로 조절하였다. 이 과정을 통해 최초 사용한 용매가 세포에 미칠 영향을 최소화 하도록 하였다. 일반적으로 알려진 mycofenolate mofetil 의 세포 억제농도(IC₅₀; 50% inhibitory concentration)는 25 nM로 보고하고 있다(37). mycofenolate mofetil 의 1 mole 농도는 433 g/L 로 mycofenolat mofetil 의 IC₅₀ 인 25 nM 은 약 0.108 mg/L 의 무게/부피 농도로 환산될 수 있으며 108 ng/ml의 값을 가진다. 하지만 실질적으로 mycofenonlate mofetil 의 인체에서 유효 농도는 1 µg/ml 에서 23 µg/ml의 범위를 가지며 본 실험에서 사용된 최대 용량은 일반적인 인체 유효농도의 최소량이므로 본 실험의 결과가 약제나 용매의 독성에 의한 결과로 보기는 어려우며 오히려 실험과정에서의 약제의 유효농도범위를 비교적 낮게 책정되었다. 또한 mycofenolat mofetil 은 약제에 의한 세포자멸 유도가 세포 활성화억제의 주된 작용기전으로 보인다(38). 하지만 (Fig. 9 - 10)에서의 결과를 보면 동일 농도에서 T_{reg} 세포의 활성을 억제하였으나 Th17 세포이 활성화는 오히려 비투여군에 비해 증가하는 양상 또한 보여주었다. 이러한 결과들로 보아 1000 ng/ml농도에서 T 세포에 대한 mycofenolat mofetil 자체의 세포독성은 크지 않을 것으로 판단할 수 있으며 결론적으로 mycofenolate mofetil 에 의한 T 세포의 억제는 T_{reg} 세포 또는 Th10 세포의 발현억제뿐 아니라

고농도에서의 T 세포의 세포자멸 또한 세포억제 에 기여하는 것으로 판단된다.

본 실험에서 T_{reg} 세포 및 Th17 세포의 분화는 다른 실험과 비교하여 전반적으로 높게 나타났다. 실험조건에서 일반적으로 T cell 활성화의 주요 사이토카인인 $TGF-\beta$ 를 이용하여 T_{reg} 세포를 활성화 하였고 활성화된 T 세포의 증식을 촉진하기 위해 IL-2 를 동시 투여하였다. Mucida((14)등은 $TGF-\beta$ 와 IL-2 조합이 $TGF-\beta$ 단독 투여의 경우보다 T_{reg} 세포발현이 더높게 나타나는 것을 보고하였다. IL-2 는 Th1 세포와 t_{reg} 세포의 활성을 촉진하는 역할을 한다(25). T_{reg} 세포와 Th17 세포의 상호작용과 면역억제제의 영향을 본 실험에서는 $TGF-\beta$ 만을 사용하여 T_{reg} 세포의 발현을 유도함으로써 그 발현율이 IL-2 를 동시에 투여한 군보다는 낮게 나타난 것으로 판단된다. $CD4^+CD25^-$ T 세포로부터 Th17 세포로의 분화에는 $TGF-\beta$ 와 IL-6 가 중요한 역할을 한다. Bedoya 등(39)은 Th17 을 성공적으로 유도하기 위한 조건으로 IL-6 와 $TGF-\beta$ 중요성을 이야기 하고 있으며 $CD4^+CD25^-$ 세포로부터 성공적으로 Th17 세포의 발현(4.5%)을 유도하였음을 보고하였다. 이 연구과정과 본 연구에서의 차이점을 Bedoya 등(39)은 Th17 세포의 발현을 IL-6 와 $TGF-\beta$ 만을 이용하여 유도하였으나 본 실험에서는 동종면역 자극세포(BALBc)를 이용하여 T 세포를 활성화 한 다음 $TGF-\beta$ 와 IL-6 를 투여하였으며 anti- $INF-\gamma$ antibody 와 anti-IL-4 를 동시에 투여하여 Th17 세포의 활성을 촉진하였다. 자극세포의 활용과 anti- $IFN-\gamma$ antibody 및 anti-IL-4 antibody 의 활용이 본 실험에서 Th17 의 높은 활성의 결과로 볼 수 있다. 이전의 Th17 세포

분화의 방법은 사이토카인을 주로 이용한 발현의 중심이었다. 본 연구에서와 같은 면역자극과 사이토카인을 병용하는 방법으로 Th17 세포의 분화율을 높일 수 있는 가능성을 보였으며 기존의 실험실 내 실험조건에서도 비교적 높은 분화율(자료 미 제시)을 보이는 결과가 있어 분화조건에 따른 분화율의 증가로 판단된다.

본 실험에서 주목할 점은 sirolimus의 T_{reg} 세포와 Th17 세포에 대한 영향이다. sirolimus는 이전의 연구결과들에서 T_{reg} 세포의 발현을 억제하지 않아 타 약제 특히 칼시뉴린억제제와 비교하여 T_{reg} 세포의 상대적인 비율을 높이는 것으로 알려져 있다. 이는 sirolimus가 억제하는 mTOR 신호전달체계가 T_{reg} 세포 발현을 억제하는 기능을 하며 이의 억제를 억제함으로써 T_{reg} 세포에 대한 활성을 유지할 수 있게 한다(33). Bocian 등(17)은 T_{reg} 세포의 활성을 다른 면역억제제에 비해 덜 억제하고 T_{reg} 세포의 기능을 유지하여 면역관용을 유도하는데 기여하는 것으로 보고하였다.

또한 mTOR는 Th17 세포의 활성화 과정에도 관여하여 mTOR의 억제는 곧 Th17 세포의 활성을 억제함을 시사한다(34, 40). 그러나 본 실험에서 Th17 세포에 대한 sirolimus의 영향은 기존의 알려진 바와는 다르게 Th17 세포의 표지자인 ROR γ -T 및 IL-17⁺ 세포의 활성이 나 증식의 억제가 다른 면역억제제와 비교하여 약하게 나타났다. 비록 시험관 실험이기는 하나 sirolimus는 세포신호 전달체계 차단에 의한 선택적인 세포활성의 조절은 보여 주지 않았다. 이러한 현상은 sirolimus가 T_{reg} 및 Th17 세포에 관여하여 면역기능의 조절을 하는 기전은 다른 면역억제제가 보여주는 것과 같은 세포의 억제를 통한 면역억제가

아닌 두 세포의 균형 유지를 통한 면역반응 조절이 이루어 지는 것으로 보이며 두 세포 각각에 대한 분화비율의 적절한 유지가 염증과 면역반응의 억제에 유효하다는 연구결과가 이를 뒷받침 해 주고 있다(24, 41, 42).

tracrolimus 는 강력한 T 세포 억제작용을 보이며 본 실험에서도 같은 결과를 보였다. 하지만 면역억제제를 24 시간 지연 투여한 경우 T_{reg} 세포의 발현이 동시에 투여한 경우보다 높게 나타났다. 이는 최초 면역자극 감작 후 진행된 면역반응의 억제가 충분히 이루어지지 못함을 시사하는 결과로 볼 수 있다. 따라서 T_{reg} 세포의 활성을 유지하는 면에서 tacrolimus 의 지연투여가 유리 할 것으로 보인다. 하지만 후반부 실험에서 tacrolimus 는 T_{reg} 세포와 Th17 세포에 대해 강력하고 지속적인 억제작용을 보이고 있어 생체에서의 가능성은 검증이 필요하다.

지금까지의 결과로 보아 T_{reg} 세포의 활성을 보다 잘 유지할 수 있는 면역억제제로는 이전의 연구결과에서도 언급되었듯이 sirolimus 가 가장 적당한 약물로 판단된다. 면역자극의 발생과 함께 높은 T_{reg} 세포의 활성을 유지함으로써 면역반응의 발현을 억제할 수 있다. tacrolimus 의 경우 투여 시기를 지연함으로써 T_{reg} 세포의 활성유지를 기대할 수 있다. 하지만 이러한 투여방법의 변화를 위해서는 면역억제제의 새로운 조합과 투여에 대한 추가적인 연구가 더 필요하다.

6. 결론

mycofenolate mofetil 은 본 연구에서 T_{reg} 세포와 Th17 세포에 대한 선택적인 영향을 나타내지 않았다. 이 전의 연구들에서 보였던 선택적인 T_{reg} 세포에 대한 선택적인 효과는 보이지 않았다. sirolimus 는 T_{reg} 세포에 대한 억제가 다른 면역억제제에서 억제 정도보다 낮게 나타났다. 동시에 Th17 세포의 활성화 또한 강한 억제를 보이지 않았다. 이러한 사실로 볼 때 sirolimus 의 면역억제 기전은 면역세포의 활성을 억제할 뿐 아니라 T_{reg} 세포와 Th17 세포사이의 균형을 유지함으로써 면역관용에 기여함을 유추할 수 있으며 이에 대한 추가 검증이 필요하다. tacrolimus 는 T 세포에 대해 전반적으로 강한 억제를 보였다. 하지만 면역자극 24 시간 후 tacrolimus 를 투여한 군에서 T_{reg} 세포의 발현이 확인되어 적절한 T_{reg} 세포분화 및 유지를 통한 면역관용의 유도를 이루기 위해 각각의 면역억제제에 대한 특성에 따른 면역억제제의 구성과 적절한 투여 시기에 대한 보다 정밀한 연구가 필요하다.

7. 참고 문헌

1. Dallman MJ. Kidney transplantation: principles and practice. In: Morris PJ, Knechtle SJ, editors. Kidney transplantation: principles and practice. 6th edition ed: Elsevier; 2008. p. 9–32.
2. Nishimoto T, Satoh T, Takeuchi T, Ikeda Y, Kuwana M. Critical role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in preventing murine autoantibody-mediated thrombocytopenia. *Exp Hematol*. 2012 Apr;40(4):279–89. PubMed PMID: 22240606. Epub 2012/01/14. eng.
3. Michels-van Amelsfort JM, Walter GJ, Taams LS. CD4+CD25+ regulatory T cells in systemic sclerosis and other rheumatic diseases. *Expert Rev Clin Immunol*. 2011 Jul;7(4):499–514. PubMed PMID: 21790293. Epub 2011/07/28. eng.
4. Dardalhon V, Korn T, Kuchroo VK, Anderson AC. Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J Autoimmun*. 2008 Nov;31(3):252–6. PubMed PMID: 18502610. Pubmed Central PMCID: 3178062. Epub 2008/05/27. eng.
5. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006 May 11;441(7090):235–8. PubMed PMID: 16648838. Epub 2006/05/02. eng.
6. Afzali B, Lombardi G, Lechler RI, Lord GM. The role of T helper 17 (Th17) and regulatory T cells (Treg) in human organ transplantation and

autoimmune disease. *Clin Exp Immunol.* 2007 Apr;148(1):32–46. PubMed PMID: 17328715. Pubmed Central PMCID: 1868863. Epub 2007/03/03. eng.

7. Cohen JL, Salomon BL. Therapeutic potential of CD4+ CD25+ regulatory T cells in allogeneic transplantation. *Cytotherapy.* 2005;7(2):166–70. PubMed PMID: 16040396. Epub 2005/07/26. eng.

8. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nature reviews Immunology.* 2003 Mar;3(3):199–210. PubMed PMID: 12658268. Epub 2003/03/27. eng.

9. Zheng SG, Meng L, Wang JH, Watanabe M, Barr ML, Cramer DV, et al. Transfer of regulatory T cells generated ex vivo modifies graft rejection through induction of tolerogenic CD4+CD25+ cells in the recipient. *International Immunology.* 2006 Feb;18(2):279–89. PubMed PMID: 16415106. Epub 2006/01/18. eng.

10. Bozulic LD, Wen Y, Xu H, Ildstad ST. Evidence that FoxP3+ regulatory T cells may play a role in promoting long-term acceptance of composite tissue allotransplants. *Transplantation.* 2011 Apr 27;91(8):908–15. PubMed PMID: 21304439. Epub 2011/02/10. eng.

11. Velasquez-Lopera MM, Eaton VL, Lerret NM, Correa LA, Decresce RP, Garcia LF, et al. Induction of transplantation tolerance by allogeneic donor-derived CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells. *Transpl Immunol.* 2008 May;19(2):127–35. PubMed PMID: 18503888. Epub 2008/05/28. eng.

12. Yuan X, Paez-Cortez J, Schmitt-Knosalla I, D'Addio F, Mfarrej B, Donnarumma M, et al. A novel role of CD4 Th17 cells in mediating cardiac allograft rejection and vasculopathy. *Journal of experimental medicine*. 2008;205(13):3133–44.
13. Xu L, Kitani A, Fuss I, Strober W. Cutting Edge: Regulatory T Cells Induce CD4CD25Foxp3T Cells or Are Self-Induced to Become Th17 Cells in the Absence of Exogenous TGF- β . *the journal of immunology*. 2007;178:6725–9.
14. Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science*. 2007 Jul 13;317(5835):256–60. PubMed PMID: 17569825. Epub 2007/06/16. eng.
15. Demirkiran A, Sewgobind VD, van der Weijde J, Kok A, Baan CC, Kwekkeboom J, et al. Conversion from calcineurin inhibitor to mycophenolate mofetil-based immunosuppression changes the frequency and phenotype of CD4+FOXP3+ regulatory T cells. *Transplantation*. 2009 Apr 15;87(7):1062–8. PubMed PMID: 19352129. Epub 2009/04/09. eng.
16. Ma A, Qi S, Wang Z, Massicotte E, Dupuis M, Daloz P, et al. Combined therapy of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells with low-dose sirolimus, but not calcineurin inhibitors, preserves suppressive function of regulatory T cells and prolongs allograft survival in mice. *Int Immunopharmacol*. 2009 May;9(5):553–63. PubMed PMID: 19539558. Epub 2009/06/23. eng.

17. Bocian K, Borysowski J, Wierzbicki P, Wyzgal J, Klosowska D, Bialoszewska A, et al. Rapamycin, unlike cyclosporine A, enhances suppressive functions of in vitro-induced CD4+CD25+ Tregs. *Nephrol Dial Transplant*. 2010 Mar;25(3):710–7. PubMed PMID: 19903662. Epub 2009/11/12. eng.
18. Wu T, Zhang L, Xu K, Sun C, Lei T, Peng J, et al. Immunosuppressive drugs on inducing Ag-specific CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) Treg cells during immune response in vivo. *Transpl Immunol*. 2012 Aug;27(1):30–8. PubMed PMID: 22613676. Epub 2012/05/23. eng.
19. Lim DG, Joe IY, Park YH, Chang SH, Wee YM, Han DJ, et al. Effect of immunosuppressants on the expansion and function of naturally occurring regulatory T cells. *Transpl Immunol*. 2007 Nov;18(2):94–100. PubMed PMID: 18005851. Epub 2007/11/17. eng.
20. Gregori S, Casorati M, Amuchastegui S, Smiroldo S, Davalli AM, Adorini L. Regulatory T Cells Induced by 1,25-Dihydroxyvitamin D3 and Mycophenolate Mofetil Treatment Mediate Transplantation Tolerance. *the journal of immunology*. 2001;167:1945–53.
21. Wekerle T. T-regulatory cells—what relationship with immunosuppressive agents? *Transplant Proc*. 2008 Dec;40(10 Suppl):S13–6. PubMed PMID: 19100898. Epub 2009/04/11. eng.
22. Jin D, Zhang L, Zheng J, Zhao Y. The inflammatory Th 17 subset in immunity against self and non-self antigens. *Autoimmunity*. 2008

Mar;41(2):154–62. PubMed PMID: 18324485. Epub 2008/03/08. eng.

23. Abadja F, Sarraj B, Ansari MJ. Significance of T helper 17 immunity in transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2012 Feb;17(1):8–14. PubMed PMID: 22186097. Epub 2011/12/22. eng.

24. Hanidziar D, Koulmanda M. Inflammation and the balance of Treg and Th17 cells in transplant rejection and tolerance. *Curr Opin Organ Transplant*. 2010 Aug;15(4):411–5. PubMed PMID: 20613526. Epub 2010/07/09. eng.

25. Lohr J, Knoechel B, Caretto D, Abbas AK. Balance of Th1 and Th17 effector and peripheral regulatory T cells. *Microbes Infect*. 2009 Apr;11(5):589–93. PubMed PMID: 19376259. Pubmed Central PMCID: 2720614. Epub 2009/04/21. eng.

26. Ford ML, Koehn BH, Wagener ME, Jiang W, Gangappa S, Pearson TC, et al. Antigen-specific precursor frequency impacts T cell proliferation, differentiation, and requirement for costimulation. *J Exp Med*. 2007 Feb 19;204(2):299–309. PubMed PMID: 17261633. Pubmed Central PMCID: 2118720.

27. Williams MA, Trambley J, Ha J, Adams AB, Durham MM, Rees P, et al. Genetic Characterization of Strain Differences in the Ability to Mediate CD40/CD28-Independent Rejection of Skin Allografts. *The journal of immunology*. 2000;165:6849 – 57.

28. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor- β induces development of the TH17

lineage. *Nature*. 2006;441(7090):231–4.

29. Huber S, Schramm C, Lehr HA, Mann A, Schmitt S, Becker C, et al. Cutting Edge: TGF- Signaling Is Required for the In Vivo Expansion and Immunosuppressive Capacity of Regulatory CD4CD25T Cells. *The journal of immunology*. 2004;173:6526–31.

30. Albert MH, Anasetti C, Yu XZ. T regulatory cells as an immunotherapy for transplantation. *Expert Opin Biol Ther*. 2006 Apr;6(4):315–24. PubMed PMID: 16548760. Epub 2006/03/22. eng.

31. Vukmanovic-Stejic M, McQuaid A, Birch KE, Reed JR, Macgregor C, Rustin MH, et al. Relative impact of CD4+CD25+ regulatory T cells and tacrolimus on inhibition of T-cell proliferation in patients with atopic dermatitis. *Br J Dermatol*. 2005 Oct;153(4):750–7. PubMed PMID: 16181456. Epub 2005/09/27. eng.

32. Zeiser R, Nguyen VH, Beilhack A, Buess M, Schulz S, Baker J, et al. Inhibition of CD4+CD25+ regulatory T-cell function by calcineurin-dependent interleukin-2 production. *Blood*. 2006 Jul 1;108(1):390–9. PubMed PMID: 16522809. Pubmed Central PMCID: 1895845. Epub 2006/03/09. eng.

33. Feuerer M, Hill JA, Mathis D, Benoist C. Foxp3+ regulatory T cells: differentiation, specification, subphenotypes. *Nat Immunol*. 2009;10(7):689–95. Epub 18 June 2009.

34. Kopf H, de la Rosa GM, Howard OM, Chen X. Rapamycin inhibits

differentiation of Th17 cells and promotes generation of FoxP3+ T regulatory cells. *Int Immunopharmacol.* 2007 Dec 15;7(13):1819–24. PubMed PMID: 17996694. Pubmed Central PMCID: PMC2223142. Epub 2007/11/13. eng.

35. Shaw LM, Kaplan B, DeNofrio D, Korecka M, Brayman KL. Pharmacokinetics and concentration–control investigations of mycophenolic acid in adults after transplantation. *Therapeutic drug monitoring.* 2000 Feb;22(1):14–9. PubMed PMID: 10688251. Epub 2000/02/25. eng.

36. Sankatsing SU, Prins JM, Yong SL, Roelofsen J, van Kuilenburg AB, Kewn S, et al. Mycophenolate mofetil inhibits T–cell proliferation in kidney transplant recipients without lowering intracellular dGTP and GTP. *Transpl Int.* 2008 Nov;21(11):1066–71. PubMed PMID: 18699845. Epub 2008/08/14. eng.

37. Yashima Y, Ohgane T. [Pharmacological profiles of mycophenolate mofetil (CellCept), a new immunosuppressive agent]. *Nihon yakurigaku zasshi Folia pharmacologica Japonica.* 2001 Feb;117(2):131–7. PubMed PMID: 11233304. Epub 2001/03/10. jpn.

38. Allison AC, Eugui EM. Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology.* 2000;47:85–118.

39. Bedoya SK, Wilson TD, Collins EL, Lau K, Larkin J, 3rd. Isolation and th17 differentiation of naive CD4 T lymphocytes. *Journal of visualized experiments : JoVE.* 2013 (79):e50765. PubMed PMID: 24121559. Pubmed Central PMCID: PMC3935776. Epub 2013/10/15. eng.

40. Kim JS, Sklarz T, Banks LB, Gohil M, Waickman AT, Skuli N, et al. Natural and inducible TH17 cells are regulated differently by Akt and mTOR pathways. *Nat Immunol.* 2013 Jun;14(6):611–8. PubMed PMID: 23644504. Pubmed Central PMCID: PMC3711189. Epub 2013/05/07. eng.
41. Noack M, Miossec P. Th17 and regulatory T cell balance in autoimmune and inflammatory diseases. *Autoimmunity reviews.* 2014 Jun;13(6):668–77. PubMed PMID: 24418308. Epub 2014/01/15. eng.
42. Chung BH, Oh HJ, Piao SG, Sun IO, Kang SH, Choi SR, et al. Higher infiltration by Th17 cells compared with regulatory T cells is associated with severe acute T-cell-mediated graft rejection. *Exp Mol Med.* 2011 Nov 30;43(11):630–7. PubMed PMID: 21865860. Pubmed Central PMCID: 3249589. Epub 2011/08/26. eng.

Abstract

Effect of immunosuppressive agents on differentiation and proliferation of Foxp3⁺ cells and IL-17⁺ cells after allogeneic stimulation of T cells

Jeong Hoon Lee

Immunology, Department of medicine

The Graduate School of

Seoul National University

Introduction; T cells play important role in the development of immune reaction. Among them T_{reg}(CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺) and Th17(CD4⁺CD25⁺IL-17⁺) cell are important in regulation of immune reaction. Selective suppression or activation of two cells may obtain suitable immune suppression and it can be achieved by using adequate immunosuppressive agents. In this report, I investigated the effects of variable immune-suppressive agents on T_{reg} and Th17 cell differentiation and proliferation after allogeneic stimulation of T cells.

Material and methods; CD4⁺CD25⁻ T cells were separated from the spleen of C57BL/6 mouse as the responder and stained with CFSE. Allogeneic stimulator cells were separated from the spleen and lymph node of BALB/c mouse and irradiated. Responder and stimulator cells were mixed with 1:4 ratio and cultured with 37°C in CO₂ incubator in 96 well plate. They divided in two groups, one is T_{reg} differentiation

group stimulated by TGF- β and IL-2, the other group is Th17 differentiation group stimulated with TGF- β , IL-6, anti-IFN- γ and IL-4 antibodies. Each cell groups are divided into three subgroups depending on immunosuppressive agents (mycophenolate mofetil, tacrolimus and sirolimus). 3 days after cell culture, Foxp3⁺ cell differentiation and proliferation were analyzed with Flow cytometry. ROR γ -T and IL-17 expressions were analyzed at day 5 of cell culture in Th17 cell group. Precursor frequency ratio was analyzed in ROR γ -T and IL-17 cell expression group.

Results; Mycophenolate mofetil suppressed the differentiation of T_{reg} and Th17 cells with dose dependent manner. In 1000 ng/ml group cell differentiation were significantly suppressed compare to other concentration groups. Tacrolimus showed suppression of differentiation and proliferation in all types of cells. However in delayed administration (24hr after allostimulation) group, T_{reg} cell differentiation was increased compared to simultaneous group. No significant suppression of T_{reg} and Th17 cells was shown in sirolimus group compared to the others. Precursor frequency ratio for ROR γ -T⁺ and IL-17⁺ cells did not significantly suppressed in sirolimus group compare to others.

Conclusion; Mycophenolate mofetil and tacrolimus showed non-specific suppression of T_{reg} and Th17 cell differentiation and proliferation. However, delay administration of tacrolimus showed increased differentiation of Foxp3⁺ cells compared to simultaneous group. Sirolimus

did not significantly suppress the differentiation and proliferation of T_{reg} and Th17 cells, suggesting that sirolimus is a candidate of suitable immunosuppressive agents to maintain the immune tolerance without significant suppression of T_{reg} and Th17 cell differentiation. In this study, immunosuppressive agents showed variable effects on differentiation of Treg and Th17 cells. To enhance the selective effect for the Treg and Th17 cell differentiation, Study for combination and timing of immunosuppressive agents administration are necessary.

Keywords; ROR γ -T, Foxp3, IL-17, T_{reg} , Th17

Student Number: 2004-31180