

아스피린 과민성 천식 환자에서 *TLR3* 유전자 다형성에 따른 IgG 아형 결핍 및 천식 중증도의 연관성 연구

김승현,^{1,2} 양은미,² 정혜민,² Duy Le Pham,¹ 최현나,² 반가영,¹ 박해심^{1,2}

¹아주대학교 의과대학 알레르기내과학교실, ²아주대학교병원 임상시험센터

Association of *TLR3* gene polymorphism with IgG subclass deficiency and the severity in patients with aspirin-intolerant asthma

Seung-Hyun Kim,^{1,2} Eun-Mi Yang,² Hye-Min Jung,² Duy Le Pham,¹ Hyun-Na Choi,² Ga-Young Ban,¹ Hae-Sim Park^{1,2}

¹Department of Allergy and Clinical Immunology, Ajou University School of Medicine, Suwon; ²Clinical Trial Center, Ajou University Hospital, Suwon, Korea

Purpose: Toll-like receptor 3 (*TLR3*) recognizes viral double-stranded RNA and is involved in antiviral defenses. A probable role of *TLR3* gene variants in the pathogenesis of aspirin-intolerant asthma (AIA) has been suggested. AIA patients present more frequent asthma exacerbations in which respiratory viral infections could be an exacerbating factor. IgG subclass deficiency was commonly present with bronchial asthma. Based on previous findings, we investigated whether *TLR3* variants could affect IgG3 subclass deficiency in AIA.

Methods: We enrolled 279 AIA patients, 403 aspirin-tolerant asthma (ATA) patients, and 315 normal healthy controls (NC) in this study. *TLR3* polymorphism at the promoter region -299698G > T was genotyped. The serum levels of IgG subclasses were determined by the single radial immunodiffusion method. Expressions of IgG3 and *TLR3* on Epstein-Barr virus transformed-B cells isolated from asthmatic patients were evaluated by flow cytometry to investigate B-cell functions.

Results: The *TLR3* -299698 T allele was significantly associated with severity and IgG3 deficiency in the AIA group ($P=0.044$ and $P=0.010$, respectively), but not in the ATA group. IgG3 expression on B cells from asthmatics with IgG3 deficiency was significantly lower compared to those without ($P=0.025$). There was a positive correlation between IgG3 expression levels on B cells and serum IgG3 levels ($r^2=0.434$, $P=0.002$).

Conclusion: These results suggest that the *TLR3* -299698G > T polymorphism may be associated with IgG3 subclass deficiency and severity in AIA. (*Allergy Asthma Respir Dis* 2016;4:264-270)

Keywords: Asthma, Genetic polymorphism, Immunoglobulin G, Immunodeficiency, Toll-like receptor 3

서론

아스피린 과민성 천식(aspirin-intolerant asthma, AIA)은 기관지 천식과 비강용종을 동반하는 만성 부비동염을 특징으로 하며, 그 임상적 중증도도 아스피린 내성 천식(aspirin-tolerant asthma, ATA) 환자에 비해 더 심하고 작은 악화를 보인다.^{1,2} AIA환자에서

바이러스 감염은 질병 발달 및 악화의 주요 인자로 보고되었다.³⁻⁵

바이러스로부터 유래된 병원체를 인식할 수 있는 톨유사수용체(Toll-like receptor, TLR) 3는 바이러스에 의한 천식 악화에서 조절자로 알려져 왔다. 바이러스의 이중가닥 RNA는 TLR3에 결합하며, nuclear factor-kappa B (NF-κB) 전사 인자와 인터페론조절인자(interferon regulatory factor) 3의 활성화를 통해 염증성 사이토카

Correspondence to: Hae-Sim Park <http://orcid.org/0000-0003-2614-0303>

Department of Allergy and Clinical Immunology, Ajou University School of Medicine, 206 World cup-ro, Yeongtong-gu, Suwon 16499, Korea

Tel: +82-31-219-5196, Fax: +82-31-219-4407, E-mail: hspark@ajou.ac.kr

*This research was supported by grants of the Korea Health Technology R&D Project through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), funded by the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (grant number: HI14C2628, HI16C0992).

Received: October 30, 2015 Revised: May 25, 2016 Accepted: May 31, 2016

© 2016 The Korean Academy of Pediatric Allergy and Respiratory Disease
The Korean Academy of Asthma, Allergy and Clinical Immunology
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>).

인과 제1형 인터페론의 생산을 조절한다.^{6,7} 또한, TLR3 리간드는 B 세포의 증식, 활성화, 그리고 B 세포의 항체 생성 등을 유도할 수 있다.^{8,9}

TLR3 유전자 다형성 -299698G>T와 293391G>A (Leu412Phe)는 바이러스 감염뿐만 아니라 AIA 표현형과의 연관성이 보고되었다.^{10,11} 소아 천식 환자들에서 TLR3 유전자의 단일염기 다형성(single nucleotide polymorphism)은 피코르나바이러스(picornavirus) 감염 및 천식의 중증도와 연관성이 있었다.¹² 또한 TLR3의 유전자 다형성 293391G>A (Leu412Phe)는 인간면역결핍바이러스(human immunodeficiency virus)-1 감염에 대한 면역 매개성 방어기작과 관련이 있었다.¹³

면역-결핍은 재발성 감염 및 자가 면역 질환뿐만 아니라 악성 종양을 일으킬 수 있다.¹⁴ 적어도 한 개 이상의 면역글로불린(Ig)의 아형이 감소된 IgG 아형 결핍은 천식과 만성 부비동염 환자에서 주로 관찰된다.¹⁵ 즉, 한국 성인 면역 결핍 환자에서 천식은 가장 흔한 동반 질환이며, 이 중 IgG3 아형 결핍이 가장 흔하게 관찰되었다.¹⁶ 또한, IgG 아형 결핍은 반복적인 상부 및 하부 호흡기 감염과 관련이 있다고 알려져 왔으며,^{16,17} 이는 천식 병인기전에 기여할 수 있다. 이전의 보고에 의하면, IgG와 IgG 아형 결핍이 중증 천식^{18,19}뿐만 아니라 B 세포의 기능 장애와의 연관성이 제안되었다.²⁰

이러한 연구 결과를 바탕으로, TLR3 유전자 다형성이 AIA 환자와 IgG 아형 결핍의 병인기전에 영향을 줄 것이라는 가설하에, 성인 AIA 환자에서 TLR3 유전자 다형성에 따른 IgG 아형 결핍 및 질병 중증도의 관련성을 조사하였다. 또한, 본 연구에서는 환자의 말초 혈액으로부터 구축된 B 세포주에서 IgG3와 TLR3 발현을 측정하였다.

대상 및 방법

1. 연구 대상

수원 아주대학교병원의 알레르기내과에 방문한 환자 중 AIA 환자 279명, ATA 환자 403명, 정상대조군 315명을 대상으로 하였다. 본 연구는 아주대학교 병원 기관연구윤리심의위원회(Institutional Review Board)에 검토 및 승인을 받았다. 천식은 세계천식기구(International Global Initiative for Asthma)의 지침에 따라 진단하였고, AIA는 아스피린(lysine-acetyl salicylic acid) 기관지유발시험 결과로 진단하였다.²¹ 그리고 중증 천식은 미국흉부학회(American Thoracic Society)의 지침에 따라 정의 및 분류하였다.²² 정상 대조군은 호흡기 증상의 병력이 없는 일반대상자로 선정하였다. 아토피는 집먼지진드기항원(*Dermatophagoides pteronyssinus*, *Dermatophagoides farinae*) 2종류, 동물털항원(cat, dog) 2종류, 화분항원(tree pollen mixture, grass pollen mixture, mugwort, ragweed, Hop Japanese) 5종류, 곰팡이항원(*Alternaria*, *Aspergillus*) 2종류

와 바퀴벌레항원을 포함하는 12가지 일반적인 항원(Bencard, Brendford, UK)을 사용하여 피부단자시험(skin prick test)을 수행하여 적어도 1개 이상의 양성 반응을 보이는 경우로 진단하였다. 혈청 내 총 IgE 및 호산구 양이온 단백질(eosinophil cationic protein) 양은 ImmunoCAP (ThermoFisher Scientific, Uppsala, Sweden)으로 측정하였다. 부비동염과 비강용종의 존재는 부비동 X선, CT스캔 또는 비경검사법으로 결정하였다. Lund-Mackay 지수가 3점 이상이면 심각한 만성 부비동염으로 정의하였다.²³

2. TLR3 유전자의 단일염기 다형성 조사

연구 대상자의 말초혈액에서 DNA 추출키트(Puregene DNA purification kit, QIAGEN, Minneapolis, MN, USA)를 사용하여 게놈 DNA를 추출하였다. TLR3 유전자의 2개의 유전자 다형성(299698 G>T과 293391 G>A)의 유전자형은 이전 논문에서 언급한 방법을 이용하여 분석하였다.¹¹ 2개의 타겟 유전자 다형성 중 TLR3 -299698G>T 유전자 다형성만이 천식의 중증도뿐만 아니라 IgG3 결핍 유무의 연관성을 보였다.

3. IgG 아형 측정과 IgG아형 결핍 진단

면역글로불린 (Ig) G, A, M은 면역혼탁도측정법(immunoturbidimetric assays)으로 ROCHE COBAS INTEGRA 800 (Roche, Marlborough, MA, USA)을 사용하여 측정하였다. IgG 아형(IgG1-IgG4)은 일원평판면역확산법(single radial immunodiffusion method, nephelometry, BNII, SIEMENES, Newark, DE, USA)을 사용하여 서울의과학연구소(Seoul Medical Science Institute, Korea)에서 측정하였다. 혈청 IgG, IgM, IgA, IgG 아형에 대한 정상 범위는 다음과 같다: 총IgG, 916-1,796 mg/dL; IgM, 40-260 mg/mL; IgA, 93-365 mg/mL; IgG1, 382.4-928.6 mg/dL; IgG2, 241.8-700.3 mg/dL; IgG3, 21.82-176.06 mg/dL; IgG4, 3.92-86.4 mg/dL. 정상 범위 이하의 수준을 면역글로불린(Ig) 결핍 환자로 정의하였다.^{24,25}

4. EBV로 변형시킨 B 세포주 구축

연구 대상자의 말초 혈액 10 mL에서 Ficoll-paque (GE Healthcare, Uppsala, Sweden)을 사용하여 말초혈액 단핵 세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)를 추출하였다. 인체 유래 B 림프구는 Epstein-Barr virus (EBV)로 변형화 시킨 후 장기적으로 배양이 가능하다.²⁶ EBV를 분비하는 마모셋(marmoset) B 세포인 B95-8 세포(ATCC, Manassas, VA, USA)를 10% 비활성화한 소태아혈청(fetal bovine serum)과 1% 페니실린(penicillin)/스트렙토마이신(streptomycin)을 첨가한 Rosewell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 배양액에서 5% CO₂, 37°C 인큐베이터에서 5-7일 배양하였다. 배양 중인 B95.8 세포주로부터 노란색 상층액을 수집하고, 그 상층액을 5 × 10⁶ 세포 수의 PBMC에 추가하여 EBV로 감염

시켰다. 시클로스포린(cyclosporine A, 1 µg/mL)이 포함된 RPMI 1640 배양액으로 한 달 동안 배양 후, 변형화된 B 세포주를 광학현미경을 통해 관찰하였다.

5. B 림프구 내 IgG3와 TLR3 발현 분석

각 환자의 B 세포주를 CD19-allophycocyanin (BD Bioscience, San Jose, CA, USA), CD27-perCP efluor 710 (eBioscience, San Diego, CA, USA), IgG3-R-phycoerythrin (Southern Biotech, Birmingham, AL, USA), TLR3-R-phycoerythrin로 얼음에서 30분간 표지하였고, 인산완충식염수(phosphate buffered saline)로 씻어 준 후 FACS canto II flow cytometer (BD Bioscience)를 사용하여 분석하였다. 모든 결과는 FACS Diva 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

6. 통계 분석

유전자형 빈도가 하디바인베르크 평형(Hardy-Weinberg equilibrium)을 따르는지 카이제곱(chi-square) 검정으로 확인하였다. 연구 그룹 간 표현형 특성의 평균값 차이는 Student *t*-test를 사용하여 비교 분석하였다. 각 군 간의 유전자형 빈도를 chi-square 테스트를 사용하여 분석하였고 95% 신뢰구간(confidence interval)과 오즈비(odds ratio)를 계산하였다. 나이와 성별을 공변수(covariants)로 보정하였고, 세가지 유전 모델(codominant, dominant, recessive)을 로지스틱 회귀분석(logistic regression analysis)으로 분석하

였다. 모든 통계적 분석은 IBM SPSS Statistics ver. 19.0 (IBM Co., Armonk, NY, USA)을 사용하였다.

결 과

1. 연구 대상자의 임상적 특성

연구 대상자의 임상적 특성을 Table 1에 제시하였다.

여성의 비율은 정상 대조군보다 AIA 환자군에서 더 높았지만 ($P = 0.025$), AIA 환자군과 ATA 환자군에서는 성별의 차이가 없었다. 아토피와 혈청 내 총IgE 발현은 정상 대조군보다 AIA 환자군과 ATA 환자군에서 높았다($P < 0.001$ 각각). AIA 환자군은 ATA 환자군보다 천식의 중증도와 만성 부비동염이 높게 관찰되었고($P = 0.02$ and 0.002 , 각각), 1초간노력성호기량(forced expiratory volume in one second) 값(%)이 ATA 환자군($P = 0.020$) 및 정상 대조군($P < 0.001$)보다 유의하게 낮았다. 적어도 1개 이상의 IgG 아형 결핍을 가진 환자의 빈도는 AIA 환자군(6.1%)과 ATA 환자군(5.2%) 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었다($P = 0.621$).

2. 천식 환자에서 IgG 아형 결핍 분포

4가지 IgG 아형(IgG 1, 2, 3, 4) 결핍을 가진 환자의 빈도 수를 2개의 천식 환자군(AIA군, ATA군)에서 확인한 결과, IgG3 결핍이 AIA 환자군(5.02%)과 ATA 환자군(4.96%) 모두에서 가장 높은 빈도로 관찰되었다(Table 2). IgG3 결핍된 AIA 환자 14명 가운데 2명

Table 1. Clinical characteristics of the study subjects

Characteristic	AIA (n=279)	ATA (n=403)	NC (n=315)	P-value		
				AIA vs. ATA	AIA vs. NC	ATA vs. NC
Age (yr)	44.5 ± 13.3	45.1 ± 14.3	31.8 ± 12.1	0.606	<0.001	<0.001
Male sex	95 (34.1)	165 (40.9)	137 (43.5)	0.088	0.025	0.492
Atopy, positive	139/255 (54.5)	194/320 (60.6)	29/207 (14.0)	0.194	<0.001	<0.001
Serum total IgE (IU/mL)	359.7 ± 560.5	370.9 ± 724.7	93.2 ± 157.1	0.846	<0.001	<0.001
Blood eosinophil count (/µL)	408.7 ± 397.5	472.39 ± 1085	NA	0.438	NA	NA
Sputum eosinophil count (range, 0%–100%)	25.2 ± 36.8	21.8 ± 33.2	NA	0.467	NA	NA
Sputum neutrophil count (range, 0%–100%)	56.9 ± 35.1	56.5 ± 33.4	NA	0.946	NA	NA
PC ₂₀ methacholine (mg/mL)	8.1 ± 18.1	10.4 ± 17.5	NA	0.223	NA	NA
FEV ₁ (%)	81.1 ± 25.1	86.1 ± 22.4	97.8 ± 7.1	0.020	<0.001	<0.001
Severe asthma (%)	34/163 (20.9)	35/302 (11.6)	NA	0.022	NA	NA
Chronic rhinosinusitis (LM score, 3–4)	64/90 (71.1)	20/46 (43.5)	NA	0.002	NA	NA
IgG subclass deficiency (%)	17 (6.1)	21 (5.2)	NA	0.621	NA	NA

Values are presented as mean ± standard deviation or number (%).

AIA, aspirin-intolerant asthma; ATA, aspirin-tolerant asthma; NC, normal control; ECP, eosinophil cationic protein; PC₂₀, provocative concentration of methacholine causing a 20% fall in forced expiratory volume in 1 second; FEV₁, forced expiratory volume in 1 second; LM score, Lund-Mackay computed tomography score; IgG subclass deficiency, asthmatic patients who had at least one of IgG subclass deficiencies; NA, not applicable.

P-values were determined using Pearson chi-square test for categorical variables and the independent *t*-test for continuous variables.

은 IgG2 결핍이 동반되었고, ATA 환자군에서 IgG1 (n=2)와 IgG2 (n=1) 결핍인 환자는 모두 IgG3 결핍이었다. ATA 환자군 중 IgM 결핍인 환자는 1명(0.2%)이었고, 본 연구 대상자에서는 IgA 결핍인 경우는 없었다.

AIA 환자군과 ATA 환자군에서 IgG 아형 결핍과 관련된 임상적 특성 비교를 한 결과(Table 3), 두 군 간 IgG 아형 결핍 유무에 따른 환자의 평균 연령 차이는 없었다. ATA 환자군에서, IgG 아형 결핍을 가진 경우 여성의 비율은 결핍이 없는 환자보다 더 높았다($P=0.001$).

Table 2. Distribution of immunoglobulin G subclass deficiency

IgG subclass deficiency	AIA (n=279)	ATA (n=403)
IgG1	2 (0.71)	2 (0.50)
IgG2	3 (1.08)	1 (0.25)
IgG3	14 (5.02)	20 (4.96)
IgG4	0 (0)	1 (0.25)

IgG subclass deficiency was defined if the patient's immunoglobulin levels below the normal range as described in the Method section.

AIA, aspirin-intolerant asthma; ATA, aspirin-tolerant asthma.

Table 3. Clinical characteristics of asthma patients with IgG subclass deficiency

Characteristic	AIA		P-value	ATA		P-value
	Deficiency (n=17)	Normal (n=262)		Deficiency (n=21)	Normal (n=382)	
Age (yr)	44.4±14.3	45.1±14.0	0.832	45.1±14.0	42.6±14.2	0.424
Female sex	10 (58.8)	169 (66.0)	0.546	18 (85.7)	220 (57.6)	0.001
Atopy, positive	10 (58.8)	129 (54.2)	0.907	12 (60.0)	182 (60.7)	0.953
Serum total IgE (IU/mL)	537.2±730.2	345.1±543.9	0.303	269.9±353.3	382.5±755.1	0.701
Blood eosinophil count (/μL)	460.7±328.2	405.4±405.4	0.583	457.1±435.7	473.4±1,114	0.951
ECP (μg/mL)	28.2±18.9	31.7±39.1	0.325	31.6±32.6	33.8±41.0	0.853
Sputum eosinophil count (range, 0%–100%)	34.4±39.3	24.1±36.5	0.325	21.0±36.9	21.9±31.0	0.942
Sputum neutrophil count (range, 0%–100%)	67.0±24.5	56.2±35.7	0.349	58.8±37.0	56.8±33.4	0.858
Severe asthma	4/11 (36.4)	30/152 (19.2)	0.190	3/18 (16.7)	32/284 (11.3)	0.764
Chronic rhinosinusitis (LM score, 3–4)	9/13 (69.2)	55/77 (71.4)	0.872	4/10 (40.0)	16/36 (44.4)	0.802

Values are presented as mean±standard deviation or number (%).

AIA, aspirin-intolerant asthma; ATA, aspirin-tolerant asthma; ECP, eosinophil cationic protein; LM score, Lund-Mackay computed tomography score.

Deficiency group included the asthma patients who had at least one IgG subclass deficiency. Normal group included the asthma patients who did not have any IgG subclass deficiency.

P-values were determined using Pearson chi-square test for categorical variables and the independent t-test for continuous variables.

Table 4. Genotype frequency of *TLR3*-299698G>T

Genotype	AIA (n=279)	ATA (n=403)	NC (n=315)	P-value		
				AIA vs. ATA	AIA vs. NC	ATA vs. NC
GG	174 (62.4)	220 (54.6)	179 (56.8)	0.091	0.340	0.393
GT	91 (32.6)	163 (40.4)	113 (35.9)	0.785	0.345	0.212
TT	14 (5.0)	20 (5.0)	23 (7.3)	0.066	0.308	0.122
q	0.213	0.252	0.252	0.099	0.119	0.990

Values are presented as number (%).

AIA, aspirin-intolerant asthma; ATA, aspirin-tolerant asthma; NC, normal control; q, minor allele frequency.

Each P-value was calculated with codominant, dominant, and recessive models. Logistic regression analysis was applied to control for age and genders as covariables.

3. AIA 환자에서 *TLR3* 유전자 다형성 -299698G>T 과 IgG 아형 결핍 및 천식의 중증도와의 연관성

본 연구의 대상군(AIA, ATA, NC) 간 *TLR3* -299698G>T 유전자형의 빈도는 통계적으로 유의한 차이가 없었다(Table 4). 그러나 AIA 환자군에서 *TLR3* 유전자 다형성에 따른 IgG 아형 결핍 및 천식의 중증도에 유의한 차이가 관찰되었다(Table 5). 총 279명의 AIA 환자 중 14 (5.02%)명이 IgG3 결핍을 보였다. T 대립 형질을 가진 환자가 G 대립 형질을 가진 환자보다 IgG3 결핍의 빈도가 통계적 유의하게 더 높게 관찰되었고(9.5% vs. 2.3%, $P=0.010$), 또한, 천식의 중증도도 더 높게 나타났다($P=0.044$) (Table 5). 그러나 ATA 환자군에서는 *TLR3* 유전자 다형성에 따른 IgG 아형 결핍 및 천식의 중증도에 통계적으로 유의한 차이를 발견할 수 없었다.

4. EBV로 변형된 B 세포주에서 IgG3와 *TLR3*의 발현

본 연구에서는 천식 환자 유래 B 세포주를 이용하여, IgG3와 *TLR3*의 발현을 조사하였다. IgG3 결핍이 있는 천식 환자에서 B 세포 내 IgG3 발현이 정상대조군에 비해 낮음을 확인하였다($P=$

Table 5. Association of immunoglobulin G3 deficiency as well as severe asthma according to the genotype of *TLR3*-299698 G>T in AIA group

<i>TLR3</i> -299698G>T	IgG3		Severity	
	Deficiency (n=14)	Normal (n=265)	Severe (n=34)	Nonsevere (n=129)
GG (%)	4 (2.3)	170 (97.7)	16 (47.1)	87 (67.4)
GT+TT (%)	10 (9.5)	95 (90.5)	18 (52.9)	42 (32.6)
P-value	0.010		0.044	

Normal group included the AIA patients who did not have IgG3 deficiency. P-values were obtained by Fisher exact test.

AIA, aspirin-intolerant asthma.

0.025) (Fig. 1A). 또한, B 세포주의 IgG3 발현은 환자의 혈청 내 IgG3 수치와 양의 상관관계를 보였다($P=0.002$, $R^2=0.434$) (Fig. 1B). 그러나 B 세포주의 IgG3 발현은 TLR3 발현과는 유의적인 상관관계가 없었다.

고 찰

이번 연구에서는 AIA 환자와 ATA 환자를 포함한 한국 성인 천식 환자들에서 IgG 아형 결핍 중 IgG3 결핍이 가장 흔하게 관찰된다는 것을 확인하였다. 또한, AIA 환자군에서 *TLR3*-299698G>T 유전자 다형성은 IgG3 결핍 및 천식의 중증도와 연관성이 있었다. IgG3 결핍 환자의 B 세포주에서 IgG3 발현은 IgG3 결핍이 아닌 환자보다 저하되어 있음을 확인하였다.

IgG3는 바이러스의 감염에 반응하는 항체이며 바이러스 중화에 가장 효과적이라고 이전 연구들에서 보고하였다.^{27,28} IgG 아형 결핍은 기관지 천식의 발생과 중증 천식의 주요 원인인 재발성 호흡기 감염과 관련이 있다고 보고되었다.¹⁵ 게다가 IgG 아형 결핍이 중증 소아 천식에서도 발견되었고, 혈청 내 IgG 항체 수치가 중증 천식에서 일반 천식 환자에 비해 더 낮게 관찰되었다.^{18,19} 혐기성 박테리아 (gram-negative organisms, *Staphylococcus aureus*)뿐만 아니라 바이러스로 인한 호흡기 감염은 AIA 환자의 발병, 진행, 증상 악화에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.¹³ 이번 연구에서는 이전 연구 결과와 동일하게 AIA 환자군에서 중증 천식 환자의 분포가 ATA 환자군보다 더 높게 관찰되었다.¹²⁹ 게다가 IgG3 결핍이 AIA 환자에서 가장 흔한 IgG 아형 결핍이었다. 비록 AIA와 ATA 환자군 간 IgG3 결핍 유무의 차이는 없었지만, IgG3 결핍이 재발성 상부 및 하부 호흡기 감염과 관련이 있고, 원발성 면역 결핍 증후군(primary immunodeficiency disease)을 가진 한국 성인 환자에서 가장 일반적이라는 이전의 연구와 동일한 결과이다.¹⁶ AIA 환자에서 IgG 아형 결핍은 천식 중증도와 밀접한 연관성을 보이며, 이는 빈번한 호흡기 감염으로 인한 천식 증상의 악화로 설명되어진다.

이번 연구에서는, AIA 환자군에서 *TLR3* 유전자 다형성이 IgG3

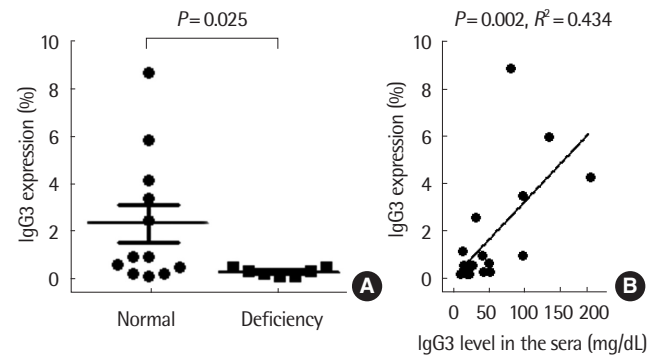


Fig. 1. IgG3 expression in the Epstein-Barr virus-transformed B-cell lines isolated from asthmatic patients. (A) IgG3 surface expression on B cells. (B) Correlation between IgG3 expression levels on B cells and IgG3 serum levels. P-values were determined using the independent t-test and Pearson correlation coefficient. The deficiency group included asthmatic patients who had at least one IgG subclass deficiencies; the normal control group included asthmatic patients who did not have any IgG subclass deficiency.

결핍 및 천식의 중증도와 연관되어 있다는 것을 확인하였다. TLR3는 바이러스의 이중가닥 RNA를 인지하는 패턴인식수용체이며, NF- κ B 전사인자 활성화 및 인터페론(interferon)- γ 생성을 유도한다.^{30,31} 또한 AIA환자 유래 PBMC에서 TLR3 mRNA발현을 확인한 결과 T 대립형질을 가진 환자가 G 대립형질을 가진 환자보다 TLR3 mRNA발현이 낮게 관찰되었다. 연골 세포 내 TLR3 mRNA 발현이 덱사메타손(dexamethasone) 자극 후 *TLR3*-299698T 대립형질을 가진 경우 G 대립형질을 가진 경우보다 유의하게 감소된 것이 보고되었다.³² 또한, 바이러스의 이중가닥 RNA는 TLR3에 의해 B 세포로부터 IgG 항체의 생산을 유도한다고 알려져 있다.⁸ 이러한 연구 결과는 *TLR3*-299698G>T 유전자 다형성에 따른 *TLR3* 유전자 발현의 변화가 IgG3 결핍에 기여할 수 있음을 제안한다. 더욱이, IgG3 결핍은 천식 증상의 중증도를 높일 수 있다고 알려져 있다.¹⁴ 결론적으로 *TLR3*-299698G>T 유전자 다형성은 IgG3 결핍과 관련하여 AIA 환자에서 천식의 중증도에 기여한다.

흥미롭게도, *TLR3*-299698G>T 유전자 다형성과 IgG3 결핍 및 중증 천식과의 연관성은 AIA 환자군에서 관찰되었으나 ATA 환자군에서는 관찰되지 않았다. 또한, 중증 천식은 AIA 환자군이 ATA 환자군보다 더 높았다(Table 1). 비록 적은 수의 대상으로 인해 통계적 유의성은 관찰되지 못했지만, IgG3 결핍을 가진 AIA 환자군에서 중증 천식의 빈도가 IgG3 결핍을 가진 ATA 환자군보다 더 높은 경향을 보였다(33.3% vs. 17.6%). 이 결과는 ATA 환자군보다 AIA 환자군에서 IgG3 결핍 및 중증 천식의 발병에서 *TLR3* 유전자 다형성이 주요하게 기여한다는 것을 시사한다.

AIA 환자에서 관찰된 *TLR3*-299698T 대립형질과 IgG3 결핍의 연관성은 *TLR3* 유전자 다형성이 IgG3 항체 생성에 영향을 미칠 수 있음을 제안한다. 이 가설을 규명하기 위해, 연구 대상자로부터 분

리된 B 세포주에서 *TLR3* -299689G>T 다형성에 따른 *TLR3* 발현 및 IgG3 발현을 조사하였다. IgG3 결핍 천식 환자의 B 세포주 내 IgG3 발현은 결핍이 아닌 천식 환자보다 크게 감소되었다(Fig. 1). 게다가, B 세포주 내 IgG3 발현 수치는 천식 환자의 혈청 내 IgG3의 측정값과 밀접한 연관성이 있었다. 이러한 연구 결과는 B 세포주 내 IgG3 발현의 감소가 IgG3 결핍의 주요 기전의 하나로 제시된다.

EBV로 변형된 B 세포주에서 *TLR3* 유전자 발현과 IgG3 발현의 직접적인 연관성은 관찰되지 않았다. 이는 *TLR3*가 B 세포로부터 IgG3의 생성에 직접적인 영향을 미치지 않는다는 것을 의미한다. 보조 T 세포는 B 세포의 활성화 및 IgG 항체의 생성에 중요하게 기여한다고 알려져 있다. 또한, *TLR3* 리간드는 직접적으로 naïve와 memory B 세포를 활성화시킬 수는 없지만 보조 T 세포의 도움으로 B 세포를 자극할 수 있다고 보고되었다.⁹ 게다가 T 세포에서 *TLR3*의 발현이 관찰되었고, *TLR3* 리간드는 T 세포 내 보조 자극 분자(co-stimulatory molecules) 발현의 조절뿐만 아니라 CD4 T 세포의 생존을 높일 수 있다.^{33,34} 또한 수지상 세포나 대식 세포에서 *TLR* 신호 전달이 B 세포의 IgG3 반응에 필수적이라고 알려져 있다.³⁵ 이러한 결과를 바탕으로 *TLR3*가 B 세포를 통한 IgG3 항체 생성에 간접적으로 영향을 미칠 수 있을 것으로 제한한다.

이번 연구는 IgG3 결핍을 가지고 있는 연구 대상자의 수가 적은 제한점을 갖고 있다. 그러나 기존 연구에서는 밝힐 수 없었던 IgG3 결핍뿐만 아니라 AIA 환자의 기전에서 *TLR3* 유전자 다형성의 연관성을 규명하였다.

결론적으로, 이번 연구에서는 한국 성인 천식 AIA 환자의 IgG3 아형 결핍과 중증 천식이 *TLR3* -299689G>T 유전적 다형성과 관계가 있음을 제시한다.

REFERENCES

- Lee RU, Stevenson DD. Aspirin-exacerbated respiratory disease: evaluation and management. *Allergy Asthma Immunol Res* 2011;3:3-10.
- Holgate ST. Mechanisms of asthma and implications for its prevention and treatment: a personal journey. *Allergy Asthma Immunol Res* 2013;5:343-7.
- Szczeklik A. Aspirin-induced asthma as a viral disease. *Clin Allergy* 1988;18:15-20.
- Szczeklik A, Stevenson DD. Aspirin-induced asthma: advances in pathogenesis, diagnosis, and management. *J Allergy Clin Immunol* 2003;111:913-21.
- Szczeklik A, Schmitz-Schumann M, Nizankowska E, Milewski M, Roehlig F, Virchow C. Altered distribution of IgG subclasses in aspirin-induced asthma: high IgG4, low IgG1. *Clin Exp Allergy* 1992;22:283-7.
- Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:979-87.
- Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* 2004;5:975-9.
- Xu W, Santini PA, Matthews AJ, Chiu A, Plebani A, He B, et al. Viral double-stranded RNA triggers Ig class switching by activating upper respiratory mucosa B cells through an innate *TLR3* pathway involving BAFF. *J Immunol* 2008;181:276-87.
- Sackesen C, van de Veen W, Akdis M, Soyer O, Zumkehr J, Ruckert B, et al. Suppression of B-cell activation and IgE, IgA, IgG1 and IgG4 production by mammalian telomeric oligonucleotides. *Allergy* 2013;68:593-603.
- Park SM, Park JS, Park HS, Park CS. Unraveling the genetic basis of aspirin hypersensitivity in asthma beyond arachidonate pathways. *Allergy Asthma Immunol Res* 2013;5:258-76.
- Palikhe NS, Kim SH, Kim JH, Losol P, Ye YM, Park HS. Role of toll-like receptor 3 variants in aspirin-exacerbated respiratory disease. *Allergy Asthma Immunol Res* 2011;3:123-7.
- Daley D, Park JE, He JQ, Yan J, Akhbari L, Stefanowicz D, et al. Associations and interactions of genetic polymorphisms in innate immunity genes with early viral infections and susceptibility to asthma and asthma-related phenotypes. *J Allergy Clin Immunol* 2012;130:1284-93.
- Sironi M, Biasin M, Cagliani R, Forni D, De Luca M, Saulle I, et al. A common polymorphism in *TLR3* confers natural resistance to HIV-1 infection. *J Immunol* 2012;188:818-23.
- Lim MS, Elenitoba-Johnson KS. The molecular pathology of primary immunodeficiencies. *J Mol Diagn* 2004;6:59-83.
- Popa V, Nagy SM Jr. Immediate hypersensitivity in adults with IgG deficiency and recurrent respiratory infections. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1999;82:567-73.
- Kim JH, Park HJ, Choi GS, Kim JE, Ye YM, Nahm DH, et al. Immunoglobulin G subclass deficiency is the major phenotype of primary immunodeficiency in a Korean adult cohort. *J Korean Med Sci* 2010;25:824-8.
- Abrahamian F, Agrawal S, Gupta S. Immunological and clinical profile of adult patients with selective immunoglobulin subclass deficiency: response to intravenous immunoglobulin therapy. *Clin Exp Immunol* 2010;159:344-50.
- de Moraes Lui C, Oliveira LC, Diogo CL, Kirschfink M, Grumach AS. Immunoglobulin G subclass concentrations and infections in children and adolescents with severe asthma. *Pediatr Allergy Immunol* 2002;13:195-202.
- Loftus BG, Price JF, Lobo-Yeo A, Vergani D. IgG subclass deficiency in asthma. *Arch Dis Child* 1988;63:1434-7.
- Soderström T, Soderström R, Avanzini A, Brandtzaeg P, Karlsson G, Hanson LA. Immunoglobulin G subclass deficiencies. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1987;82:476-80.
- Kim YJ, Lim KH, Kim MY, Jo EJ, Lee SY, Lee SE, et al. Cross-reactivity to acetaminophen and celecoxib according to the type of nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity. *Allergy Asthma Immunol Res* 2014;6:156-62.
- Proceedings of the ATS workshop on refractory asthma: current understanding, recommendations, and unanswered questions. American Thoracic Society. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:2341-51.
- Hopkins C, Browne JP, Slack R, Lund V, Brown P. The Lund-Mackay staging system for chronic rhinosinusitis: how is it used and what does it predict? *Otolaryngol Head Neck Surg* 2007;137:555-61.
- Agarwal S, Cunningham-Rundles C. Assessment and clinical interpretation of reduced IgG values. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2007;99:281-3.
- Jolliffe CR, Cost KM, Stivins PC, Grossman PP, Nolte CR, Franco SM, et al. Reference intervals for serum IgG, IgA, IgM, C3, and C4 as determined by rate nephelometry. *Clin Chem* 1982;28:126-8.
- Tosato G, Cohen JL. Generation of Epstein-barr virus (EBV)-immortalized B cell lines. *Curr Protoc Immunol* 2007;Chapter 7:Unit 7.22.
- Skvaril F. IgG subclasses in viral infections. *Monogr Allergy* 1986;19:134-43.

28. Hanson LA, Soderstrom R, Avanzini A, Bengtsson U, Bjorkander J, Soderstrom T. Immunoglobulin subclass deficiency. *Pediatr Infect Dis J* 1988;7(5 Suppl):S17-21.
29. Laidlaw TM, Boyce JA. Pathogenesis of aspirin-exacerbated respiratory disease and reactions. *Immunol Allergy Clin North Am* 2013;33:195-210.
30. Edelmann KH, Richardson-Burns S, Alexopoulou L, Tyler KL, Flavell RA, Oldstone MB. Does Toll-like receptor 3 play a biological role in virus infections? *Virology* 2004;322:231-8.
31. Ranjith-Kumar CT, Miller W, Sun J, Xiong J, Santos J, Yarbrough I, et al. Effects of single nucleotide polymorphisms on Toll-like receptor 3 activity and expression in cultured cells. *J Biol Chem* 2007;282:17696-705.
32. Yang HY, Lee HS, Lee CH, Fang WH, Chen HC, Salter DM, et al. Association of a functional polymorphism in the promoter region of TLR-3 with osteoarthritis: a two-stage case-control study. *J Orthop Res* 2013;31:680-5.
33. Gelman AE, Zhang J, Choi Y, Turka LA. Toll-like receptor ligands directly promote activated CD4+ T cell survival. *J Immunol* 2004;172:6065-73.
34. Simone R, Floriani A, Saverino D. Stimulation of human CD4+ T lymphocytes via TLR3, TLR5 and TLR7/8 up-regulates expression of co-stimulatory and modulates proliferation. *Open Microbiol J* 2009;3:1-8.
35. Pasare C, Medzhitov R. Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* 2005;438:364-8.