

HY 항원 불일치 체계 이식에 의한 면역 관용의 유도

¹서울대학교 의과대학 미생물학교실, ²종양면역의과학센터, ³이종장기이식연구센터,
⁴서울대학교의학원 장기이식연구소

최승은^{1,2,3,4} · 박정규^{1,2,3,4}

Immune Tolerance in Murine Islet Transplantation Across HY Disparity

Seung-Eun Choi^{1,2,3,4} and Chung-Gyu Park^{1,2,3,4}

¹Department of Microbiology and Immunology, ²Tumor Immunity Medical Research Center,
³Xenotransplantation Research Institute, ⁴The Transplantation Research Institute, SNUMRC,
Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: Minor histocompatibility HY antigen, as a transplantation antigen, has been known to cause graft rejection in MHC (major histocompatibility complex) matched donor-recipient. The aim of our study is to investigate the role of male antigen (HY) disparity on MHC matched pancreatic islet transplantation and to examine the mechanism of the immune reaction. **Methods:** Pancreatic islets were isolated and purified by collagen digestion followed by Ficoll gradient. The isolated islets of male C57BL/6/J were transplanted underneath the kidney capsule of syngeneic female mice rendered diabetic with streptozotocine. Blood glucose was monitored for the rejection of engrafted islets. After certain period of time, tail to flank skin transplantation was performed either on mouse transplanted with HY mismatched islets or on sham treated mouse. The rejection was monitored by scoring gross pathology of the engrafted skin. **Results:** HY mismatched islets survived more than 300 days in 14 out of 15 mice. The acceptance of second party graft (male B6 islets) and the rejection of third party graft (male BALB/c islets) in these mice suggested the tolerance to islets with HY disparity. B6 Skin with HY disparity was rejected on day 25±7. However, HY mismatched skin transplanted on the mice tolerated to HY mismatched islets survived more than 240 days. Tetramer staining in these mice indicated the CTL recognizing MHC Db/Uty was not deleted or anergized. **Conclusion:** The islet transplantation across HY disparity induced tolerance to HY antigen in C57BL/6 mouse, which in turn induced tolerance to HY mismatched skin, which otherwise would be rejected within 25 days. The MHC tetramer staining suggested the underlying mechanisms would not be clonal deletion or anergy. (*Immune Network* 2004;4(1):53-59)

Key Words: Minor histocompatibility, HY disparity, islet transplantation, skin transplantation, immune tolerance

서론

2000년 Edmonton protocol이 발표된 이래로 체계 이식은 당뇨병을 완치할 수 있는 가장 중요한 치료 모델로 인정받고 있다(1). 그러나 성공적인 체계 이식을 위해서는 아직도 극복되어야 할 문제점이 있으며, 이식할 공여 체계의 부족과 공여 체계의 면역 거부 반응은 가장 큰 문제점 중의 하나이다(2-4). 체계 중 인슐린을 분비하는 베타세포는 흔히 사용되는 면역억

책임저자 : 박정규, 서울대학교 의과대학 미생물학교실, 종양면역의과학센터, 바이오이종장기이식연구센터, 의학연구원 장기이식연구소 교실
☎ 110-799, 서울시 중로구 연건동 28
Tel: +82-2-740-8308, Fax: +82-2-743-0881
E-mail: chgpark@plaza.snu.ac.kr
이 논문은 2003년 서울대학병원 일반연구과제(과제번호: 04-2003-018) 연구비 지원에 의해 이루어졌음.

제제인 cyclosporine에 의해 쉽게 손상되며 FK 506은 그 자체가 diabetogenic effect를 가진다(5-7). 따라서 췌도 이식 후 면역 거부 반응을 극복하기 위해서는 새로운 면역억제제 혹은 면역 조절 물질의 개발이 절실하다. 새로운 면역 조절 물질의 개발을 위해서는 췌도 이식 시 발생하는 거부 반응의 기전을 파악해야 한다. 췌도이식 후 발생하는 면역 거부 반응은 주로 T 림프구에 의해서 매개되며 Th1 세포의 역할이 중요한 것으로 알려져 있다. 다른 면역 반응과는 달리 장기 혹은 조직을 이식한 경우에는 크게 두 가지 기전에 의해서 면역세포의 활성화가 일어난다(8). 첫 번째는 췌도 이식의 경우 분리된 췌도에 포함된 passenger leukocyte의 주 조직적합 항원이 직접 T 세포를 활성화시키는 direct presentation pathway이고 두 번째는 이식된 췌도의 항원이 수혜자 항원제공세포에 의해 T 세포를 활성화시키는 indirect presentation pathway이다(9). 각 장기마다 direct presentation과 indirect presentation이 차지하는 비중이 다르며 췌도의 경우 indirect presentation이 더 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(10). 따라서 췌도이식에 있어서 indirect presentation에 의한 림프구 활성화 기전을 밝히는 것은 새로운 면역 조절 물질의 개발에 매우 중요하다.

성 특이 항원인 HY 항원은 생쥐에서는 성 염색체인 Y 염색체에 발현 유전자가 존재하며 *Smcy*, *Uty* 항원이 알려져 있고 발현은 H-2 면역 조절 유전자에 의해 조절된다(11-13). 사람에서도 성 염색체인 Y 염색체에 발현 유전자가 있고 *SMCY* 항원은 HLA 면역 조절 유전자에 의해 발현이 조절되며(13), 또한 남성의 성 발달에 생리적인 기능을 한다(14). 다른 한편으로는 이식항원으로 작용하여, 주 조직적합 항원이 유사한 동 품종 사이의 이식 절편에 대해 면역 거부 반응을 일으킬 수 있으며, 세포 독성 T 세포를 생산할 수 있다(15-24). 현재 HY 항원으로서 생쥐에서는 HY/ K^kSmcy , HY/ D^bUty , HY/ D^bSmcy , HY/ A^bDby , HY/ E^kDby 가 알려져 있으며, 사람에서는 *SMCY*, *UTY*, *DBY*, *DFFRY* 등이 알려져 있다(25). HY 항원이 이식항원으로 작용할 경우 주 조직적합항원의 펩타이드 groove에 부착된 형태로 존재하여 T 세포를 활성화시키며, 이는 장기 이식에서의 indirect presentation pathway의 전형적인 모델이라고 할 수 있다. 따라서 동일한 계 생쥐의 수컷 췌도를 암컷에 이식하면 췌도이식에서의 indirect pathway의 기전을 밝힐 수 있는 이상적인 모델이 될 수 있다. 현재 췌도이식 후 면역 거부 반응에 HY 항원이 어떤 역할을 하는지에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 HY 항원의 특성을 이용하여 C57-*BL6* 생쥐에서 HY 항원 불일치 췌도 이식 모델(stre-

ptozotocine을 이용하여 당뇨병을 유발한 암컷 생쥐에 수컷 생쥐의 췌도를 이식)을 확립하였다. 이를 이용하여 췌도에 표현된 HY 항원에 대한 이식 면역 반응을 분석하고 기존의 잘 알려진 HY 항원에 대한 피부이식 면역 반응과 비교함으로써 췌도 이식 시 indirect pathway에 의한 이식 면역 반응의 기전을 분석하였다.

재료 및 방법

실험 동물. B6 (C57BL6/J)마우스를 Jackson Laboratory (Bar Harbor, MI)로부터 구입하여, 서울대학교 의과대학 기초 연구동 동물실험실에서 Committee Guidelines에 따라 사육하였다. 8주령 암컷 생쥐에게 200 mg/kg streptozotocine (STZ; Sigma, St. Louis, MO)을 citrate buffer에 주사 바로 직전에 녹여 이를 복강 주사하여 당뇨병을 유발하였다. 동품종의 수컷 생쥐가 12주령일 때 췌도를 적출하였다. Streptozotocine을 주사한 후 7일이 지나 당노가 유발된 8주령 암컷 생쥐에게 동 품종 수컷의 췌도를 이식하였다. 생쥐의 당뇨유발 확인은 2번의 연속적인 혈당 검사를 통해 혈당이 250 mg/dl 이상일 때 당노가 유발된 것으로 판단하였다.

췌도 분리. 선행 연구(26)에서 이미 언급된 대로, 생쥐의 췌도를 적출하였다. 요약하면, 경추 탈골로, 생쥐를 희생시킨 뒤, 췌장을 노출시키고 0.5 mg/ml collagenase (Roche, Indianapolis, IN)를 포함하고 있는 Hanks' balanced salt solution (HBSS; Mediatech, Herndon, VA)을 총담관을 통해 주사하여, 췌관이 부풀어 오르는 것을 확인하였다. 37°C 항온 수조기에서 17분 동안 소화시킨 뒤, 차가운 RPMI-10% FCS and 2 mmol/L L-glutamine (GIBCO-BRL, Grand Island, NY)을 첨가하여 반응을 종료시켰다. 소화된 췌도를 철로 된 망을 통과시킨 뒤, Euro-Ficoll (Sigma, St. Louis, MO)을 이용해 90% 이상의 순수 췌도를 분리하였다. 췌도는 하나하나 손으로 집어 수를 세었으며, 150 μ m 지름의 췌도 평균수(IE)를 기준으로 삼았다. 췌도 이식 전에 2시간 동안, 11 mM glucose, 2 mM L-glutamine, 10% FCS, 100 U/ml penicillin, and 100 g/ml streptomycin 이 포함된 RPMI 1640배지에 췌도를 안정시키기 위해 배양하였다.

췌도 이식. 지름이 100~200 μ m 크기의 건강한 췌도 300 IE (Islet Equivalents)를 micropipette를 이용하여 분리한 후, 분리된 췌도를 p50 튜브에 옮겼다. citrate buffer (pH 4.5)에 새로 녹여 준비한 200 mg/kg streptozotocin (STZ) (Sigma, St. Louis, MO)을 복강 주사하여, 당뇨를 유발한 동품종의 암컷 생쥐의 신장 막하에 분리해 놓은 췌도를 이식하였다. 방법은 생쥐를 ketamine-xylazine을 이용하여 마취시키고 수술대 위에서 고정한 후, 옆구리를 절개하고 신장을 노출시켰

다. 주사 바늘을 이용하여 신장캡슐을 절개하고 p50 튜브를 조심스럽게 캡슐 밑에 삽입하고 Hamilton 주사기를 이용하여 췌도를 옮긴 후, 신장을 제자리에 복원시키고 복막을 봉합하였다. 300 IE는 발표된 연구에 따라, 이식하는 경우 당뇨를 치유 가능케 하는 최소 용량이며, 이를 따라 시행하였다. 이식 전에 당뇨는 고혈당, 빈뇨, 체중감소로 진단하였다. 비공복 시 혈당이 연속적으로 두 번 검사했을 때 250 mg/dl 이상인 생쥐를 수혜자로 선택하였다. 이식 후 혈당은 수술 당일, 그리고 수술 후 2, 4, 7일, 이후는 격주로 측정하였다. 혈당은 꼬리 끝을 조금 잘라 이로부터 혈액을 얻어, portable glucose meter (LIFESCAN INC., Milpitas, CA)를 이용하여, 오전 9시에서 11시 사이에 비공복 시 혈당을 측정하였다.

비장 및 림프절에서 림프세포의 분리 및 복강 내 주사. 10일 전에 streptozotocine (STZ) (Sigma, St. Louis, MO) 200 mg/kg을 주사하여 당뇨병을 유발시킨 동 품종의 암컷 생쥐의 복강에 수컷 생쥐의 비장 및 림프절로부터 림프 세포 및 비장세포를 분리하여, 5×10^6 개의 세포를 주사하였다. 생쥐의 림프구 및 비장세포는 B6 생쥐를 경추 탈골시켜 희생시킨 뒤, 서혜부 림프절, 액와 림프절, 경부 림프절, 복강 림프절 및 비장을 single cell suspension으로 만들고 인산 완충 용액으로 세척한 후, 11 mM glucose, 2 mM L-glutamine, 10% FCS, 100 U/ml penicillin, and 100 g/ml streptomycin이 포함된 RPMI 1640 배지 10 ml에 세포 부유액으로 만들었다. 세포 수를 세어, 5×10^6 개의 세포를 200 μ l의 생리 식염수에 섞어 복강 주사하였다.

Db/Uty MHC tetramer 염색 및 FACS 분석. 생쥐의 눈 주위 정맥혈을 모세관을 이용해 채취하였다. NH₄Cl 용액(적혈구 용혈 액) 1 ml에 1분간 반응시켜 적혈구를 녹인 뒤에, 인산 완충용액 10 ml로 1,000 rpm에 10 분간 세포를 침강시켜 세척하였다. 침강시킨 세포에 tetramer-PE (Proimmune, H-2Db/WMHHNMDLI, Littlemore, Oxford, UK) 0.25 μ L, CD8 Per-CP (Pharmingen, Becton and Dickinson Company, Franklin lakes, NJ) 0.5 μ L, FcR blocking Ab (2.4G2, tissue culture supernatant) 1 μ L를 섞어 30분간 37°C 항온기에서 반응시켰다. 인산완충액으로 세척한 후 FACS (FACS caliber, Becton and Dickinson Company, Franklin lakes, NJ) 분석하였다.

Ex vivo HY 항원 특이 세포 독성 T 세포의 확장. B6 암컷 생쥐의 눈 주위 정맥혈로부터 혈액을 채취하여, NH₄Cl 용액 처리를 하여 적혈구를 녹인 뒤, 2.5×10^6 개의 림프구를 준비하였다. 수컷의 비장세포를 방사선 처리(2,000 rad)하여, 같은 개수의 세포를 준비하고, 전체 배지 2 ml에 두 가지 세포를 잘 섞은 뒤, 7일간 37°C 항온기에서 배양하였다.

피부 이식. 수컷 생쥐의 꼬리를 자른 후 꼬리의 피부를 박리하여 잘 편 후 보관하고, 수술대를 준비하고 암컷 생쥐 등의 털을 넓게 깎은 후, 수술 부위를 멸균하였다. 종이 테이프로 생쥐를 수술대에 고정하고 척추가 될 수 있으면 펴지게 하였다. 가위와 집자를 이용하여, 수혜자의 이식받을 부위의 피부를 1×1 cm크기로 떼어낸 후, 준비한 피부 판을 수혜자의 준비된 수술부위에 부착시키고 수술부위를 멸균된 봉대로 감쌌다. 이때 생쥐가 제대로 숨을 쉴 수 있는지 확인하고, 다리가 충분히 움직여지는지 확인하였다.

이식절편 기능 분석. 췌도 이식 후에 말초 혈액을 채취하여, 이식된 췌도의 기능을 평가하였다. 이식 후 첫 5일 동안 연속적으로 혈당을 측정하여, 혈당이 200 mg/dl 이하일 때 이식절편이 기능을 한다고 하였다. 혈당 유지 기능이 수혜자 생쥐의 이식된 췌도의 기능으로 인한 것인지를 확인하기 위해 이식된 신장을 제거하는 수술을 이식 후 57일째에 시행하였다.

실험 결과의 분석과 통계 처리. 실험 결과 수치는 일반적으로 평균 \pm 표준편차(mean \pm SD)로 표시하였다.

결과

C57BL/6 수컷 췌도를 동 품종의 암컷 생쥐에게 이식하여 HY 항원에 대한 면역 관용이 유도됨. 췌도 이식 7일 전에 Streptozotocine 200 mg/kg을 생쥐의 복강 내 주사하여 당뇨병을 유발시켰다. 꼬리 정맥혈을 이용하여 혈당을 측정하였고 연속 2회 측정한 값이 250 mg/dl 이상인 경우 이식 실험에 사용하였다. 30마리의 수컷 생쥐로부터 췌도를 분리하여 당뇨병이 유발된 15마리의 암컷 생쥐에게 300 IE (islet equivalent)의 췌도를 좌측 신장의 캡슐 아래 polyethylene tube를 이용하여 이식하였다. 이식 후 혈당은 오전 9시의 일정한 시각에 측정하였다. 이 중 1마리는 기술적인 실패로 인해 당 수치가 수술 후에도 계속 높게 유지되었으며, 14마리는 수술 후 5일 이내에 모두 정상 혈당수치를 보였다(Fig. 1). 이 중 2마리는 정상 혈당조절이 이식된 췌도 절편에 의한 것인지를 확인하기 위해 이식 후 104일에 췌도가 이식된 신장적출을 시행하였다. 그 결과 각각 수술 후 1일과 3일 후 혈당 수치가 250 mg/dl 이상으로 상승하였고 따라서 이식된 췌도에 의해 정상혈당이 유지되었음을 확인하였다. 신장 적출을 시행한 생쥐 중 1마리에서 두 번째 세트의 동 품종의 수컷 췌도이식을 시행하였고 1 마리에서는 두 번째 세트의 동종 수컷 췌도(BALB/c 수컷 췌도)이식을 시행하였다. 그 결과 동 품종의 수컷 췌도를 이식한 생쥐에서는 거부 반응을 관찰할 수 없었으며 두 번째 세트의 동종 수컷 췌도를 이식한 경우 이식 후 15일까지도 혈당 수치가 계속 250 mg/dl를 넘어서 이식된

췌도가 거부되었음을 확인하여 동 품종의 수컷 췌도 이식에 의해 면역 관용이 유도되었음을 확인하였다. B6 수컷 생쥐의 비장세포를 미리 면역한 암컷 생쥐

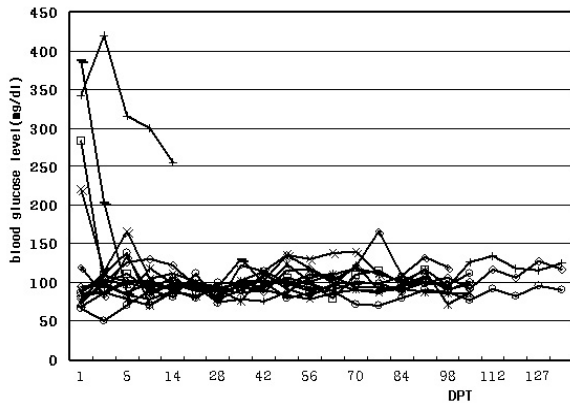


Figure 1. Male islets of C57BL/6 were transplanted to syngeneic female mice (n=15). 300 IE of isolated islets of male C57BL/6/J were transplanted underneath the kidney capsule of syngeneic female mice rendered diabetic with streptozotocine. Blood glucose was monitored for the rejection of engrafted islets (n=15). Normal blood glucose level was defined as <200 mg/dl (DPT: Day post transplantation).

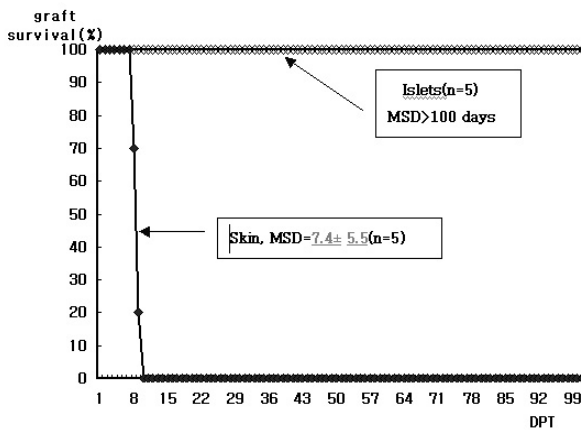


Figure 2. C57BL/6 male islets or skin were transplanted into syngeneic female mice preimmunized with male splenocytes 7 days prior to the transplantation. Female C57BL/6 mice were rendered diabetic with streptozotocine and were given male splenocytes (5×10^6) intraperitoneally 7 days prior to the either islet or skin transplantation as described in Materials and Methods. Blood glucose was monitored for the rejection of engrafted islets and gross pathology of skin was monitored for the rejection of engrafted skin. The pathology was scored according to the amount of blood clotting (+/-), the degree of graft shrinkage from the original size, and the ischemic change of graft (+/-). The rejection of skin graft was determined when 2 out of 3 changes of pathology were definite (DPT: Day post transplantation, MSD: mean survival day of grafts in same experimental group).

에 췌도를 이식한 경우에도 췌도에 대한 이식 거부 반응이 발생하지 않음. B6 암컷 생쥐 5마리에게 Streptozotocine 200 mg/kg을 생쥐의 복강 내 주사하여 당뇨병을 유발시킨 후, 7일이 지나, 수컷 생쥐의 비장세포를 분리하여, 5×10^6 개의 비장세포를 복강에 주사하였다. 주사한 지 7일 후 동 품종 수컷 췌도 300 IE를 이식하였다. 췌도를 이식한 후, 5마리 모두 1일째부터 혈당은 정상으로 돌아와서 100일까지 5마리 모두 정상 혈당을 유지하였다. 반면, 수컷 생쥐의 비장세포를 미리 면역한 5마리의 암컷 생쥐에 동 품종 수컷 생쥐의 피부를 이식한 경우에는 이식한 후 7.4 ± 5.5 일(7,8)째에 모두 면역 거부 반응이 일어났다(Fig. 2).

B6 수컷 생쥐의 췌도에 대한 면역관용이 일어난 암컷 생쥐에 수컷 생쥐의 피부를 이식한 경우 거부 반응이 발생하지 않음. 30일 전, 동 품종의 수컷 생쥐의 췌도를 이식받은 5마리의 B6 암컷 생쥐에게, 동 품종의 수컷 피부를 이식하였다. 5마리 모두 피부 이식 절편에 100일 이상 거부 반응을 보이지 않았다. 대조군으로 4마리의 B6 암컷 생쥐에게 피부 이식을 시행하였다. 면역 관용이 일어난 암컷 생쥐에게 이식한 결과와는 달리, 4마리 모두 수술 후 29.2 ± 5.3 (23.5, 34) 일에 모든 이식 절편이 거부 반응을 보였다(Fig. 3).

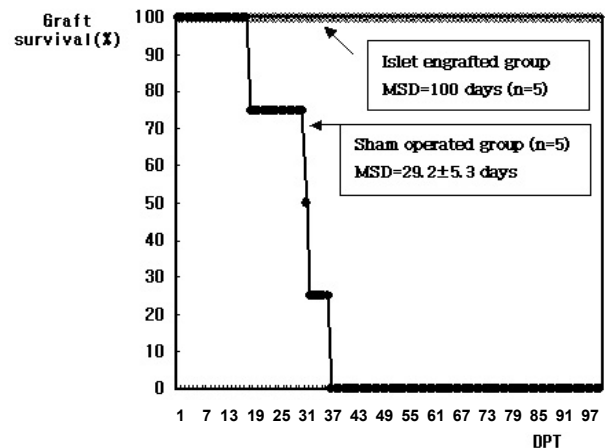


Figure 3. C57BL/6 male skin were transplanted onto the flank of syngeneic female mice either engrafted with syngeneic male islets or sham operated. Female C57BL/6 mice were either engrafted with 300 IE of syngeneic male islets or sham operated. 30 days after the transplantation, male skin was transplanted to each group as described in Materials and Methods. Gross pathology of skin was monitored for the rejection of engrafted skin. The pathology was scored according to the amount of blood clotting (+/-), the degree of graft shrinkage from the original size, and the ischemic change of graft (+/-). The rejection of skin graft was determined when 2 out of 3 changes of pathology were definite (DPT: Day post transplantation, MSD: mean survival day of grafts in same experimental group).

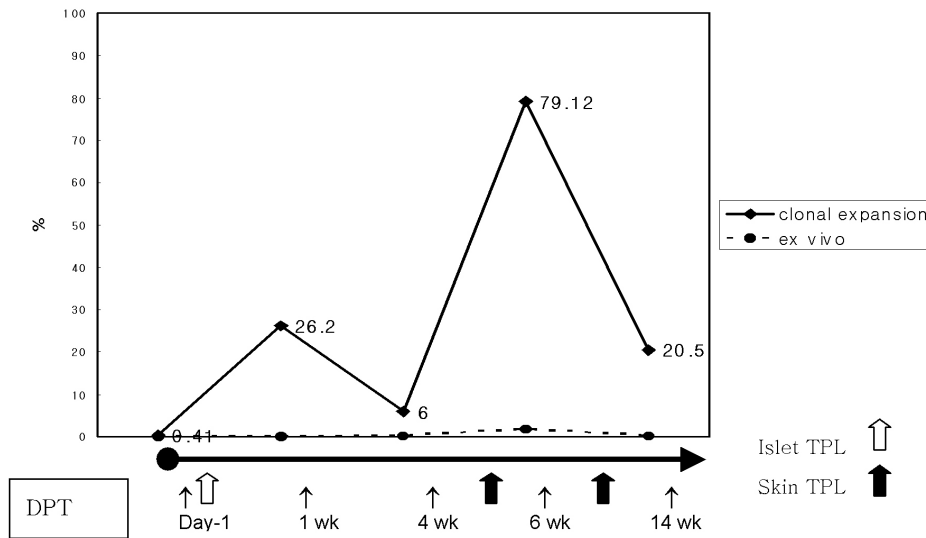


Figure 4. *Ex vivo* HY/D^bUty-tetramer staining was done to trace HY specific CTL clones in female C57BL/6 mice engrafted either syngeneic male islets or skin or both in time sequence indicated on the graph. PBMC (Peripheral blood mononuclear cell) was isolated from the 200 μ l of blood drawn from the retrobulbar venous plexus. Isolated PBMC was directly stained with perCP labeled HY/D^bUty-tetramer along with PE labeled antiCD8 Ab or was expanded in vitro by stimulating 100 nM of Uty peptide on APC followed by the same tetramer staining (DPT: Day post transplantation, TPL: transplantation).

B6 수컷 생쥐의 췌도에 대한 면역관용이 일어난 암컷 생쥐의 HY/D^bUty에 대한 CTL clone은 정상적으로 존재함. 췌도 이식 하루 전 B6 암컷 생쥐의 눈 주위 정맥혈을 채취하여 HY/D^bUty-tetramer 염색을 시행하였다. 1일 후, B6 수컷 생쥐의 췌도를 B6 암컷 생쥐에게 이식하고, 1주, 4주에, B6 암컷 생쥐의 눈 주위 정맥혈을 채취하여, HY/D^bUty-tetramer 염색을 시행하였다. 췌도 이식한 후 5주째에 B6 암컷 생쥐에게 수컷 생쥐의 피부를 이식하고, 1주 지나 6주째에 다시 HY/D^bUty-tetramer 염색을 시행하였으며, 1주 후인 7주째에 다시 수컷 생쥐의 피부를 이식하였다. 그 후 7주가 지난 췌도 이식 후 14주째에, HY/D^bUty-tetramer 염색을 시행하였다. Tetramer 염색은 두 가지로 시행하였다. B6 암컷 생쥐의 눈 주위 정맥혈을 채취한 후, 둘로 나누어 한 가지는 그대로 염색을 시행하였고 다른 한 쪽은 수컷의 비장 세포로 자극한 뒤, 1주일 후에 Tetramer 염색을 하였다. 염색 결과 수컷의 췌도 항원에 대한 HY 항원 특이 세포 독성 T 세포가 존재하였고, HY 항원 특이 세포 독성 T 세포가 수컷의 비장 세포로 자극하여 clonal expansion이 일어나는 것을 확인함으로써 면역관용이 유도된 생쥐의 생체 내 존재하는 HY 항원 특이 세포 독성 T 세포의 기능 이상(anergy)이 아님을 확인하였다(Fig. 4).

고 찰

본 연구에서는 HY 항원의 특성을 이용하여 C57BL/6 생쥐에서 HY 항원 불일치 췌도 이식 모델(streptozotocine을 이용하여 당뇨병을 유발한 암컷 생쥐에게 수컷 생쥐의 췌도를 이식)을 확립하였다. 이를 이용하여 췌도에 표현된 HY 항원에 대한 이식 면역 반응을 분석하고 기존에 잘 알려진 HY 항원에 대한 피

부이식 면역 반응과 비교함으로써 췌도 이식 시 indirect pathway에 의한 이식 면역 반응의 기전을 분석하였다. 현재 알려진 B6 생쥐의 HY 항원은 HY/D^bUty, HY/D^bSmcy, HY/A^bDby이다(13,25). B6 동 품종 간에 수컷의 피부를 암컷에게 이식한 경우, 거부 반응이 나타나는 것은 잘 알려져 있으며, 다른 품종의 생쥐에서도 HY 항원에 의한 피부 이식 거부 반응이 이루어진 결과 HY 항원에 의해 피부이식 거부 반응을 일으키는 생쥐와 거부 반응을 일으키지 않는 생쥐 품종이 있음이 알려졌다, 이들 항원은 Y 염색체의 H-2에 의해 발현이 조절됨이 밝혀졌다. 1981년 Naji A 등은 HY 항원의 불일치를 이용하여, B6 생쥐에서 수컷의 췌도를 암컷에게 이식한 결과 14마리 모두에서 거부 반응이 일어났다고 보고하였다(27). Naji 등의 실험 결과가 본 연구의 실험결과와 반대로 나온 이유는 우선 이식된 췌도의 질적인 차이에 기인한다고 볼 수 있다. 췌도 이식 시 exocrine gland의 오염은 이식된 췌도가 제 기능을 하는데 많은 영향을 미친다고 알려져 있다(28,29). 본 연구에서는 췌도를 hand-pick up 하여 이식을 함으로써 exocrine gland의 오염을 최소화 하였다. 두 번째는 이식된 장소가 달라서 다른 결과를 유도했을 가능성이 있다. 췌도는 이식 후 신생 혈관에 의해 혈액을 공급받아서 생착을 해야 제 기능을 할 수 있다. 복강 내 췌도를 이식했을 경우 이러한 생착이 제대로 이루어지지 않았을 것이고 복강 내에 있는 많은 수의 대식세포가 오염된 exocrine gland에 의해 활성화되어 췌도에 손상을 초래했을 가능성이 높다. 반면 본 연구에서 채택한 신장막하 이식은 신장 자체가 풍부한 혈관을 제공할 수 있어 이식된 췌도가 생착되는 데 많은 도움을 줄 수 있고 따라서 생리적인 변화에 의한 췌도의 손실을 배제하고 면역학적인 췌

도 거부 반응을 관찰할 수 있었다.

본 연구에서는 췌도 이식에 의해 유도된 면역 관용이 췌도에 발현된 HY 항원의 항원성의 결여인지 다른 말초 면역 관용의 기전에 의한 것인지를 알아보기 위해 췌도 이식 전 수컷 비장세포를 복강 내 주사하고 췌도 이식을 시행하였고 이미 췌도가 이식되어 관용을 나타낸 생쥐에 피부 이식 및 비장세포 이식을 통하여 생체 내 자극을 하고 HY 항원 특이 CTL을 HY/D^bUty-tetramer staining을 이용하여 추적하였다. 말초 면역 관용 유도 기전은 항원의 제거(Deletion), 작용 T 세포의 기능 이상(Anergy), 항원의 무시(Ignorance), 조절 T 세포에 의한 능동적 억제 기전 등이 있을 수 있다. 수컷의 췌도 이식으로부터 면역 관용이 유발된 B6 암컷 생쥐의 비장 세포 및 말초 혈액으로부터 림프구를 분리하여 HY/D^bUty-tetramer 염색을 시행함으로써 면역 관용 기전이 작용 T 세포의 기능 이상이나 항원의 제거 기전에 의함이 아님을 알 수 있었다. 췌도의 HY 항원을 추가하기 위하여 B6 생쥐와 CBA 생쥐를 교배하여, 생쥐의 HY 항원 중, HY/K^k-Smcy와 HY/E^kDby를 첨가한 F1 (CBA×C57BL6/J) 생쥐를 만들어 동계의 수컷 췌도를 B6 생쥐에서와 같은 방법으로 당뇨를 유발시킨 암컷 생쥐에게 이식하였다. 결과는 B6 생쥐에서의 췌도 이식의 결과와 같이 모두 100일 이상 면역 거부 반응이 일어나지 않았다(실험 결과 보고하지 않음). 본 실험의 HY항원 불일치를 이용한 B6 생쥐 췌도 이식실험의 면역 관용 유도현상에는 조절 T 세포에 의한 능동적 조절 기전이 관여할 것이며 향후 연구가 필요할 것이다. B6 수컷 생쥐의 비장세포를 암컷에게 미리 면역한 뒤에 수컷 생쥐의 췌도를 암컷 생쥐에게 이식한 후에도 췌도에 대한 거부 반응이 발생하지 않았다. HY 특이 T 세포가 활성화되기 위해서는 반드시 미리 priming이 되어 있어야, HY 항원에 의한 자극 시 활성화된다(12,14,15,17). 이 실험에서 미리 수컷의 비장세포로 면역했을 때, 수컷 생쥐의 피부를 이식한 경우 거부 반응이 더 빠르게 진행된 결과로 보아, 수컷의 비장세포에 의해 HY 특이 T 세포가 priming되어 있음을 알 수 있다. 반면에 췌도 이식을 한 경우에는 면역 거부 반응이 발생하지 않았다. HY 항원 불일치를 이용한 췌도나 피부 이식에서 보조 조직 접합 항원의 항원 제공은 간접경로(indirect pathway)를 통해서 수혜 생쥐의 항원 제공 세포에 의해 작용 T 세포에게 이루어진다. 수혜 생쥐의 항원 제공 세포의 표면에 발현되는 MHC는 MHC I, II 모두 가능하며, 각각 CD8 T세포, CD4 T세포를 활성화시킨다. 미리 수컷의 비장세포로 면역한 암컷 생쥐에게 피부를 이식한 경우와 췌도를 이식한 경우가 면역 반응에 차이를 보인 것은 작용

T 세포의 기전에서 차이가 있을 것으로 판단되며 향후 연구가 요구된다. 본 실험에서는 HY 항원 불일치 생쥐에게 췌도를 이식하여, 면역 관용을 유도하였고, 면역 관용이 유도된 생쥐에게 피부를 이식하는 경우 면역 거부 반응이 일어나지 않았으며, 피부절편에도 면역 관용을 유도할 수 있는 능동적인 면역 억제 시스템이 있음을 보였다. 췌도에 의해 유발된 면역 관용이 동 품종의 피부를 이식하는 경우에 감염되는 현상은 감염 관용 현상(infectious tolerance)으로 설명할 수 있다. 1993년, Qin 등의 ‘관용 감염(infectious tolerance)’ 기전에 의하면, 피부이식 모델을 이용하여, 이식된 피부 절편의 면역 관용은 CD4+ T 세포에 의해 매개되며, 관용이 유도된 생쥐로부터의 비장 세포를 수동 전이(adoptive transfer)하는 경우, 일반적인 T 세포의 작용을 억제하여, ‘관용 감염(infectious tolerance)’을 유도한다고 하였다(30). Onodera 등은 1996년 HY 항원이 일치하지 않는 개체 사이에 공여자의 비장 세포를 수혜자에게 주입함으로써, 이종 간의 심장 이식 때, 면역 관용이 감염됨을 보였다(31). 본 실험에서 동 품종의 수컷 췌도를 암컷에게 이식한 경우, 면역 관용이 유도된 기전은 실험 결과로부터 작용 T 세포의 기능 이상(anergy)이나, 항원제거(deletion) 현상에 의함이 아니며, 항원무시(ignorance)도 아님을 보였다. 또한 관용이 유도된 생쥐에게 HY 항원이 일치하지 않은 피부이식도 관용이 감염됨으로 보아 면역 반응을 능동적으로 억제하는 기전이 존재하며, 선행한 실험들로 보아 비장 세포 중에 포함되어 있는 억제 기전으로 판단되며, HY 항원의 불일치를 이용한 췌도 이식에 의해 indirect presentation pathway로 항원이 전달되고 이에 따라 면역 관용이 유도되는 현상의 기전으로 억제 T세포의 기능이 매우 중요한 부분을 차지하리라 판단되며 이에 대한 연구가 필요하다.

감사의 글

본 연구를 위해 도움을 주신 서울대학교 의과대학 미생물학교실 소속의 김정식, 윤일희, 심수경, 김봉규, 오영준, 신진영 연구원 및 학위 과정생 여러분께 감사 드립니다.

참 고 문 헌

- Shapiro AM, Lakey JR, Ryan EA, Korbutt GS, Toth E, Warnock GL, Kneteman NM, Rajotte RV: Islet transplantation in seven patients with type 1 diabetes mellitus using a glucocorticoid-free immunosuppressive regimen. *N Engl J Med* 343;230-238, 2000
- Kaufman DB, Platt JL, Rabe FL, Dunn DL, Bach FH, Sutherland DE: Differential roles of Mac-1+ cells, and CD4+ and CD8+ T lymphocytes in primary nonfunction and classic rejection of islet allografts. *J Exp Med* 172;291-302,

- 1990
3. Kaufman DB, Gores PF, Field MJ, Farney AC, Gruber SA, Stephanian E, Sutherland DE: Effect of 15-deoxyspergualin on immediate function and long-term survival of transplanted islets in murine recipients of a marginal islet mass. *Diabetes* 43;778-783, 1994
4. Saldeen J: Cytokines induce both necrosis and apoptosis via a common Bcl-2-inhibitable pathway in rat insulin-producing cells. *Endocrinology* 141;2003-2010, 2000
5. Drachenberg CB, Klassen DK, Weir MR, Wiland A, Fink JC, Bartlett ST, Cangro CB, Blahut S, Papadimitriou JC: Islet cell damage associated with tacrolimus and cyclosporine: morphological features in pancreas allograft biopsies and clinical correlation *Transplantation* 68;396-402, 1999
6. Metrakos P, Hornby L, Rosenberg L: Cyclosporine and islet mass--implications for islet transplantation. *J Surg Res* 54; 375-80, 1993
7. Ryu S, Yasunami Y: Prevention of immune rejection in rat islet allografts by continuous SC administration of FK 506 using a mini-osmotic pump. *Transplant Proc* 23;1, 1991
8. Benichou G, Valujskikh A, Heeger PS: Contributions of direct and indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice. *J Immunol* 162;352-358, 1999
9. Dina SG, Auchincloss JH: Direct and indirect recognition: the role of MHC antigens in graft rejection. *Immunol today* 20;77-82, 1999
10. Nicolls MR, Coulombe M, Gill RG: The basis of immunogenicity of endocrine allografts. *Crit Rev Immunol* 21; 87-101, 2001
11. Gasser DL, Silvers WK: Genetics and Immunology of sex-linked antigens. *Adv. Immunol* 15;215, 1972
12. Hurme M, Hetherington CM, Chandler PR, Simpson E: Cytotoxic T-cell responses to H-Y: mapping of the Ir genes. *J Exp Med* 147;758-767, 1978
13. Simpson E, Roopenian D: Minor histocompatibility antigens. *Curr Opin immunol* 9;655-661, 1997
14. Ohno S: The original function of MHC antigens as the general plasma membrane anchorage site of organogenesis-direction proteins. *Immunol Rev* 33;59, 1977
15. Simpson E, Gordon RD: Responsiveness to H-Y antigen, Ir gene complementation and target cell specificity. *Immunological Rev* 35;59, 1977
16. Hurme M, Chandler PR, Hetherington CM, Simpson E: Cytotoxic T-cell responses to H-Y: correlation with the rejection of syngeneic male skin grafts. *J Exp Med* 147;768-775, 1978
17. Gordon RD, Simpson E, Samelson LE: In vitro cell-mediated immune responses to the male specific(H-Y) antigen in mice. *J Exp Med* 142;1108-1120, 1975
18. Bailey DW: Allelic forms of a gene controlling the female immune response to the male antigen in mice. *Transplantation* 11;426-428, 1971
19. Gordon RD, Simpson E: Immune-response gene control of cytotoxic T-cell responses to H-Y. *Transplant Proc* 9;885-888, 1977
20. Simpson E, Scott D, Chandler P: THE MALE-SPECIFIC HISTOCOMPATIBILITY ANTIGEN, H-Y: A History of Transplantation, immune Response Genes, Sex determination and Expression Cloning. *Annu Rev Immunol* 15;39-61, 1997
21. Gasser DL, Silvers WK: Genetics and immunology of sex-linked antigens. *Adv Immunol* 15;215-247, 1972
22. Simpson E: The role of H-Y as a minor transplantation antigen. *Immunol Today* 3;97-106, 1982
23. Simpson E: H-Y and sex reversal: minireview. *Cell* 44; 813-814, 1986
24. Zinkernagel RM, Doherty PC: Restriction of in vitro mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semi-allogenic system. *Nature* 248;701-702, 1974
25. Roopenian D, Choi YE, Brown A: The immunogenomics of minor histocompatibility antigens. *Immunol Rev* 190;86-94, 2002
26. Lacy PE, Kostianovsky M: Method for the isolation of intact islets of Langerhans from the rat pancreas. *Diabetes* 16; 35-39, 1967
27. Naji A, Frangipane L, Barker CF, Silvers WK: Survival of H-Y-incompatible endocrine grafts in mice and rats. *Transplantation* 31;145-147, 1981
28. Gray DW, Sutton R, McShane P, Peters M, Morris PJ: Exocrine contamination impairs implantation of pancreatic islets transplanted beneath the kidney capsule. *J Surg Res* 45;432-442, 1988
29. Hiller WF, Klempnauer J, Steiniger B: Contribution of nonendocrine tissue to the immunogenicity of endocrine pancreatic transplants. *Transplant Proc* 22;2331, 1990
30. Qin S, Cobbold SP, Pope H, Elliott J, Kioussis D, Davies J, Waldmann H: 'Infectious' transplantation tolerance. *Science* 259;974-977, 1993
31. Onodera K, Lehmann M, Akalin E, Volk HD, Sayegh MH, Kupiec-Weglinski JW: Induction of 'infectious' tolerance to MHC-incompatible cardiac allografts in CD4 monoclonal antibody-treated sensitized rat recipients. *J Immunol* 157; 1944-1950, 1996