

## *In vitro* Expansion of Natural Regulatory T Lymphocytes Useful for Cell Therapy in Allotransplantation

Youn-Hee Park, Sun-Kyung Koo, Yu-Joung Lee, In-Yi Joe, Song-Cheol Kim,  
Duck-Jong Han and Dong-Gyun Lim\*

Department of Surgery, Ulsan University College of Medicine & Asan Medical Center,  
Asan Institute for Life Sciences, Seoul, Korea

Immunotherapy with regulatory T lymphocytes is considered to be an attractive new therapeutic modality to prevent allograft rejection. The success of this new therapy is critically dependent on the preparation of highly effective and enough number of regulatory T cells. Here, we tried to establish a proper strategy for the *ex vivo* expansion of regulatory T cells and evaluated their characteristics. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup>CD62L<sup>+</sup> T cells were isolated from the recipient mice and weekly stimulated with various stimuli in the presence of IL-2. The most efficient protocol for the expansion of regulatory T cells maintaining Foxp3 expression and regulatory activity was the three cycles stimulation with donor bone marrow-derived dendritic cells (BM-DCs) which yielded around 400 fold expansion of regulatory T cells. The *in vitro*-expanded regulatory T cells expressing lymph node homing receptors on their cell surface, were composed of polyclonal population, and did not acquire the ability to produce effector cytokines. Importantly, these expanded regulatory T cells induced a modest prolongation of skin allograft survival when combined with transient T cell depletion in recipient mice. These data indicate that our protocol could be used to obtain an effective population of natural regulatory T cells available for the regulatory T cell therapy to prevent allograft rejection.

**Key Words:** Regulatory T lymphocyte, Cell therapy, Allograft rejection, *Ex vivo* expansion

### 서 론

장기이식은 기존 장기의 기능이 떨어지거나 상실될 경우 이를 극복할 수 있는 가장 이상적인 치료법이다. 성공적인 장기이식을 위해서는 이식장기에 대한 숙주의 면역거부반응을 통제해야 한다. 현재 사이클로스포린 A 및 스테로이드와 같은 여러 면역억제제의 사용을 통해 급성 면역거부반응을 많은 부분 극복할 수 있게 되었다.

그러나 이들 면역억제제의 사용만으로는 만성 면역거부반응을 예방하기 어렵고 또한 면역억제제의 지속적인 사용으로 인한 여러 부작용이 장기이식 시 커다란 걸림돌로 작용하고 있다 (1). 따라서 장기이식분야의 최대 과제는 이식장기에 대한 숙주의 면역관용을 유도하는 것이다.

항원 특이적 면역관용이 유도될 수 있는 기전으로는 림프구 클론 제거, 무반응 (anergy) 그리고 조절 T 림프구 (regulatory T lymphocyte; Treg)에 의한 능동적 통제 등이 있다 (2). 이들 중 과거 여러 가지 면역억제제 처리 후 간헐적으로 관찰되던 이식항원에 특이한 면역관용상태가 특정 실험모델에 따라 T 세포의 아형인 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>low</sup>, Tr1, CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> Ts cell 등과 같은 Treg 또는 억제 T 림프구에 의해 매개된다는 사실이 확인되면서 (3~8), 이러한 Treg에 의한 면역반응의 능동적 통제가 이식면역관용의 유도 및 유지에 핵심적인

Received: June 9, 2009/ Revised: July 14, 2009

Accepted: July 20, 2009

\*Corresponding author: Dong-Gyun Lim, M.D., Ph.D. Department of Surgery, Ulsan University College of Medicine, 388-1 Pungnap-2-Dong, Songpa-Gu, Seoul 138-736, Korea.

Phone: +82-2-3010-4188, Fax: +82-2-3010-4182

e-mail: dglim@amc.seoul.kr

\*\*This work was supported by the Korea Research Foundation Grant funded by the Korean Government (MOEHRD) (KRF-2005-041-E00150).

요소로 부각되기 시작하였다.

Treg는 크게 자연 조절 T 림프구 (natural Treg; nTreg)와 유도성 조절 T 림프구 (adaptive 또는 inducible Treg; iTreg)로 나눌 수 있다 (9). 기존에  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  T 세포로 알려진 nTreg은 정상 개체의 말초  $CD4^+$  T 림프구 중 5~10%의 빈도로 존재하고, 흉선에서 아마도 자가 항원에 의해 선택/분화되며, 그 기전은 아직 명확히 파악되어 있지 않지만 항원제시세포 및 다른 T 림프구의 활성화를 강력히 억제하는 세포로 알려지고 있다 (10). 반면, 말초 naive T 세포가 특정 환경 하에 자가 또는 외부 항원의 자극을 받으면 면역억제효과를 나타내는 세포로 분화될 수 있는데 이를 iTreg로 부르며, IL-10을 분비하는 Tr1, TGF- $\beta$ 를 분비하는 Th3 및 말초에서 Foxp3 발현을 획득한 일부  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  T 세포 등이 여기에 해당한다 (9, 11). 입양전달 (adoptive transfer) 실험을 통해서 이식항원 특이적 면역관용의 유도 및 유지에 관여하는 것으로 반복 입증되고 있는  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  T 세포가 nTreg인지 아니면 iTreg인지는 명확하지 않다. 왜냐하면 말초기관에 상존하는 이식항원에 의해 지속적으로 자극될 수 있는 iTreg도 T 세포 활성화 표지인 CD25를 세포막에 표출할 수 있기 때문이다. 한편 nTreg 중 이식항원에 교차반응성을 지닌 세포들이 이식면역관용에 직접적으로 관여할 수도 있고, 혹은 nTreg이 naive T 세포로부터 iTreg로 분화하는데 필수적인 역할을 수행함으로써 간접적으로 관여할 수도 있다 (4). 이와 같이 이식면역관용과 밀접하게 관련된 Treg의 정확한 기전을 파악하기 위해서는 아직도 많은 연구가 필요하지만, Treg의 활용면에서 중요한 점은 항체 (anti-CD25)를 이용하여 면역억제효과가 이미 확고하게 입증되어 있는  $CD4^+CD25^+$  T 세포를 용이하게 분리할 수 있고 또한 체외에서 이들 세포를 분열 증식시킬 수 있으며 이렇게 증식된 세포에서 면역억제기능이 유지된다는 사실이다 (10). 따라서 현재 전 세계적으로 자가면역질환이나 이식거부반응의 예방에  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  T 세포를 이용하고자 하는 많은 노력이 경주되고 있다. 본 연구에서는 장기이식 시  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  T 세포를 이용한 새로운 이식거부반응 예방법을 확립하기 위한 첫 과정으로서 nTreg의 효율적 체외 증식법 및 증식세포의 특성에 관하여 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 마우스

수컷 C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>), BALB/c (H-2<sup>d</sup>), 및 BDF1 (C57BL/6  $\times$  DBA/2; H-2<sup>b/d</sup>) 마우스는 일본 SLC 사 (Shizuoka)로부터 구입하였다. 모든 마우스는 온도 및 습도가 적절히 조절되는 청결 조건에서 사육시켰으며 울산대학교 의과대학 동물실험위원회에서 승인한 동물실험계획서에 준하여 8~12주령 시기에 실험에 사용하였다.

### 림프구 분리

건강한 C57BL/6 마우스의 비장과 각종 말초 림프절을 채취하여 단일 세포부유액을 만들고 적혈구를 제거한 후, MACS  $CD4^+$  T-세포 분리세트 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)를 이용하여 음성 선택법으로  $CD4^+$  T-세포를 분리하였다.  $CD4^+$  T-세포를 FITC-anti- $CD4$ , PE-anti- $CD25$ , 및 PE-Cy5-anti- $CD62L$  (모두 BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) 항체로 염색한 다음 FACS Vantage (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA)를 이용하여  $CD4^+CD25^{hi}CD62L^+$  T-세포를 분리수집한 후 이를 nTreg로 실험에 사용하였다. 한편,  $CD4^+$  T-세포를 PE-anti- $CD25$  항체와 anti-PE 부착 자석구슬 (Miltenyi Biotec)에 차례로 반응시킨 후, 자기장세포분리법 (MACS)으로  $CD4^+CD25^-$  T-세포를 분리하여 이를 반응 T 림프구 (responder T cell)로 사용하였다. 동종항원자극세포는 BALB/c 또는 BDF1 마우스의 비장세포를 anti- $CD90$  부착 자석구슬과 반응시켜 이에 부착하는 T-세포를 제거하여 마련하였다.

골수 유래 수지상세포 (bone marrow-derived dendritic cell; BM-DC)

마우스의 대퇴골 (femur)과 경골 (tibia)로부터 얻은 골수세포를 20 ng/ml의 유전자 재조합 GM-CSF (PeproTech, Rocky Hill, NJ, USA)가 함유된 RPMI1640 배양배지 (10% 우태아혈청 포함) 10 ml에  $1 \times 10^7$  세포가 들어가도록 부유한 후, 배양접시에 넣고 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 3일 후, 배양용기 바닥에 부착되지 않은 세포를 제거하고 GM-CSF가 함유된 새로운 배지로 교환하였다. 배양 6일째, 바닥에 부착되지 않거나 또는 느슨히 부착된 세포를 회수하여 새로운 배양접시로 옮긴 후, GM-CSF가 함유된

새로운 배지를 첨가하여 2일간 추가 배양하였다. 배양 8일째, 비부착 세포를 회수하여 이를 BM-DC로 실험에 사용하였다.

#### Treg의 증식배양

분리한  $CD4^+CD25^{hi}CD62L^+$  T 세포를 방사선 조사 (25 Gy)시킨 공여자 T-세포 제거 비장세포 또는 BM-DC와 각각 1:4 및 1:1 비율로 섞어 500 U/ml의 유전자 재조합 인형 IL-2 (Chiron, Amsterdam, The Netherlands) 첨가 하에 RPMI1640 배양배지에서 배양하였다. 일부 nTreg는 공여자 항원제시세포 대신 anti-CD3/anti-CD28 부착 Dynabeads (DynaL Biotech, Oslo, Norway)를 하나의 세포당 2개의 구슬 비율로 섞어 IL-2 첨가 하에 배양하였다. 배양 3일 후, 배양상청액 절반을 IL-2가 첨가된 새로운 배지로 교환하면서 총 7일간 배양하였다. 이러한 1주 단위의 자극배양을 3회까지 반복 시행하였으며 각 자극배양 주기의 마지막 7일째 생존세포를 회수하여 실험에 사용하였다. 그리고 일부 자극배양의 경우 두 번째 자극배양 시부터 2 ng/ml의 인형 TGF- $\beta$ 1 (PeproTech)를 첨가하여 nTreg를 배양하였다.

#### 면역형광염색법 및 유세포 분석

자극배양으로 증식시킨 nTreg를 FITC-anti-CD4, PE-anti-CD25, 및 PE-Cy5.5-anti-CD62L 항체 (모두 BD Pharmingen)로 세포표면염색 후, APC-anti-mouse Foxp3 염색 세트 (e-Bioscience, San Diego, CA, USA)를 이용하여 제조사의 지시에 따라 세포내 Foxp3를 염색하였다. 특히 항체 (4B12) (e-Bioscience)를 이용한 CCR7 염색은 제조사의 지시에 따라 37°C에서 시행하였다. 증식시킨 nTreg의 세포질내 사이토카인 염색을 위해서는 우선 nTreg를 Brefeldin A (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) 첨가 하에 5 ng/ml PMA (Sigma-Aldrich, ST. Louis, MO, USA)와 500 ng/ml ionomycin (Sigma-Aldrich)으로 6시간 자극시킨 다음, FITC-anti-CD4로 표면염색시키고 Cytotfix/Cytoperm kit (BD Biosciences)를 이용하여 고정 및 침투시킨 후, PE-anti-IFN- $\gamma$  (XMC1.2), PE-anti-IL-4 (11b11), PE-anti-IL-17 (TC11-18H10.1), 혹은 PE-anti-IL-10 (JES5-16E3) (모두 BD Pharmingen)으로 반응시켜 세포질내 사이토카인을 염색하였다. nTreg의 TCR 레퍼토리를 알기 위해서는 일련의 마우스 TCR V $\beta$  사슬들을 인식하는 FITC-부착 항체 (Mouse V $\beta$  TCR Screening Panel; BD Pharmingen)로 염색하

였다. 염색된 세포는 CellQuest 프로그램이 설치된 FACS Calibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로 분석하였다.

#### 림프구혼합배양반응 (mixed lymphocyte reaction; MLR) 억제법

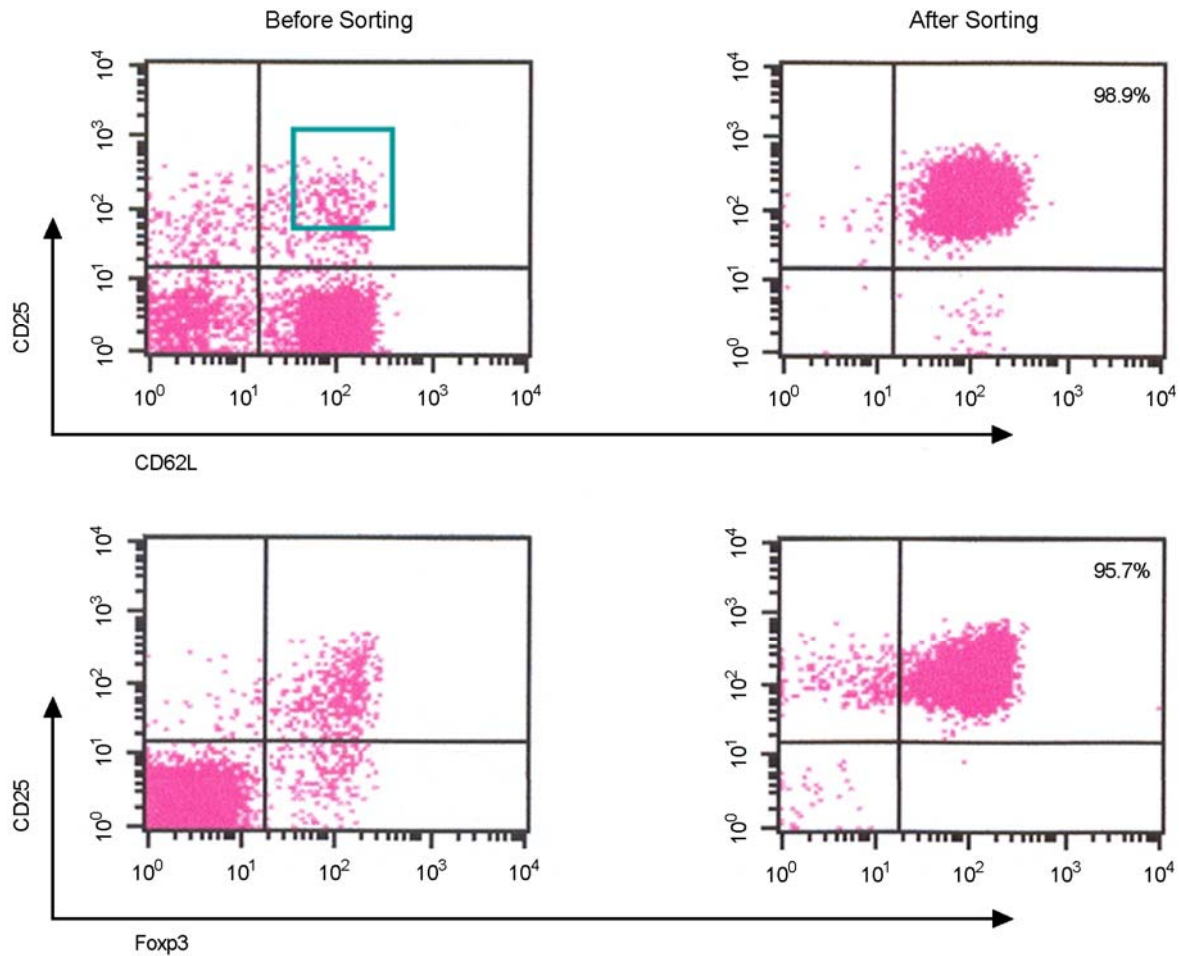
96-well round-bottom plate의 각 well당  $5 \times 10^4$ 개의 C57BL/6 마우스 유래  $CD4^+CD25^-$  T 세포와  $2 \times 10^5$ 개의 방사선으로 조사시킨 공여자 유래 T-세포 제거 비장세포를 넣고 혼합 배양시켰다. 여기에 계단 희석시킨 nTreg를 첨가하였다. 배양 4일째 well당 1  $\mu$ Ci의 [ $^3$ H]-thymidine (185 GBq/mmol, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)을 넣고 18시간 추가 배양시킨 다음, 세포수집기를 이용하여 세포를 여과지에 수집하였다. 세포내로 합병된 [ $^3$ H]-thymidine의 양은 TopCount NXT 베타 계수기 (PerkinElmer, Downers Grove, IL, USA)를 이용하여 측정하였다.

#### 정량적 실시간 중합효소연쇄반응 (quantitative real-time polymerase chain reaction; qRT-PCR)

체외에서 증식시킨 nTreg의 Foxp3 mRNA 발현량을 알아보기 위해, 우선 RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Germantown, MD, USA)을 이용하여 세포의 total RNA를 추출하고, High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. Foxp3 및 내부 참조 유전자로 *Hprt1*의 증폭을 위해 각각 TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression Assays (Applied Biosystems) ID (Mm00475162\_m1)와 ID (Mm00446968\_m1)을 사용하여 RT-PCR을 시행하였다. 모든 반응은 3중으로 시행했으며, Foxp3의 발현량은 *Hprt1*의 발현량을 기준으로 표준화시킨 후, 실험 조건에 따른 상대적 발현량으로 표시하였다.

#### 피부이식

체외에서 공여자 BM-DC로 3회 자극배양시켜 증식시킨 nTreg를 인산완충용액으로 3회 세척 후, 수혜자 마우스당  $1 \times 10^7$  세포를 꼬리정맥내로 주입하였다. 같은 날 공여자 마우스로부터 꼬리피부를 얻어 이의 조각을 전신 마취 하에 수혜자 마우스 등쪽에 이식하였다. 이식 2~3일 후, 동 수의 nTreg를 다시 한번 추가로 주입하였다. 일부 수혜자 마우스는 피부이식 2주 전에 각각 200  $\mu$ g의 depleting anti-CD4 (GK1.5)와 anti-CD8 (2.43) 항체 (모두



**Figure 1.** Isolation of nTreg cells.  $CD4^+$  T cells were isolated from spleen/LN cells of normal C57BL/6 mice using MACS  $CD4^+$  T cell isolation kit, and then they were stained with FITC- $CD4$ , PE- $CD25$ , and PE-Cy5- $CD62L$ .  $CD4^+CD25^{hi}CD62L^+$  T cells were purified by FACS sorting. The expression of Foxp3 was determined by intracellular staining with APC-anti-Foxp3 Ab.

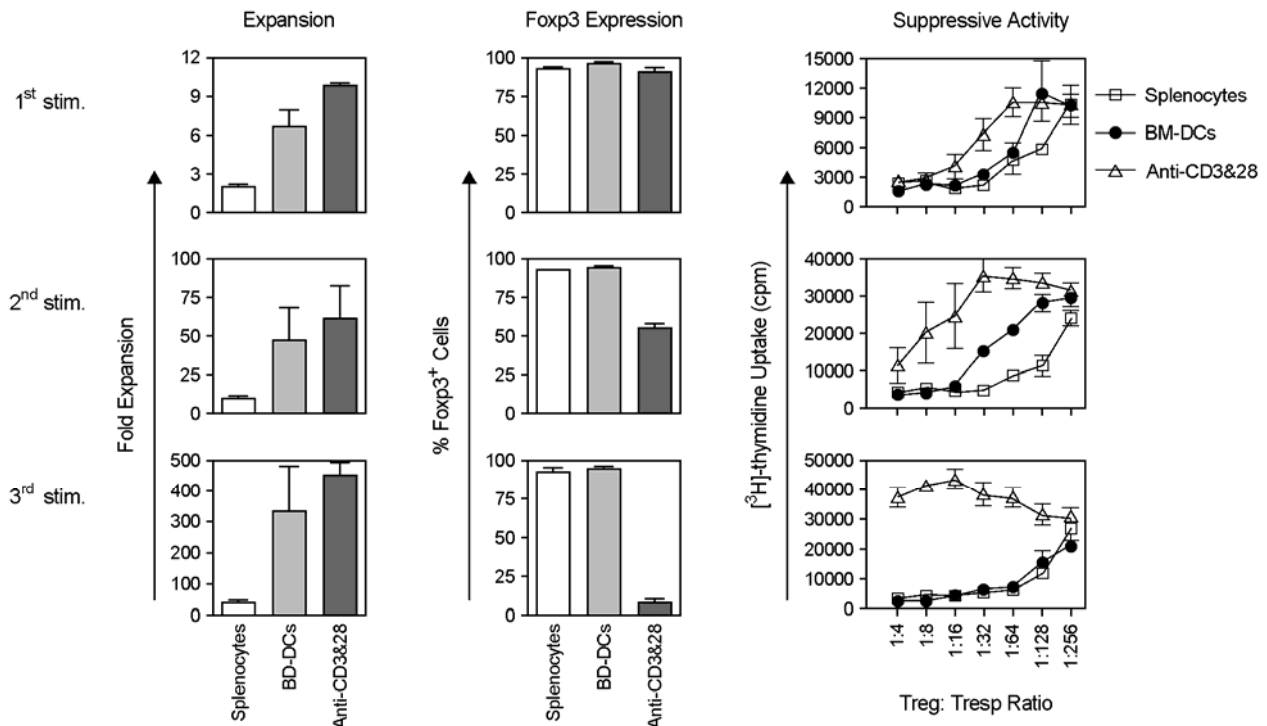
Bio X Cell, West Lebanon, NH, USA)를 복강내로 주입하여 체내 T 림프구를 일시적으로 제거시킨 후 피부이식을 시행하였다. 이식 7일 후 이식부위를 감싼 반창고를 제거한 다음 이식피부를 매일 눈으로 관찰하면서 통상적 판정 방법에 따라 (12, 13) 이식피부가 완전히 괴사되는 시점을 이식거부가 일어난 날로 판정하였다. 두 그룹간의 이식피부 생존기간의 차이는 GraphPad Prism (v4) 프로그램을 이용하여 log-rank 시험법으로 비교하였다.

## 결 과

자극의 형태에 따른 nTreg의 증식 양상

nTreg의 체외 증식을 위하여 우선, 비교적 순수한 nTreg를 분리하고자 하였다. 이를 위해 수혜자인 C57BL/6

마우스의 비장 및 림프절 세포로부터 자기장활성세포 분리법 (MACS)을 이용하여 음성 분리법으로  $CD4^+$  T 세포를 일차적으로 얻은 다음, 이들 세포를 형광항체로 염색 후 nTreg가 주로 포함되는 세포 분획으로 알려진  $CD4^+CD25^{hi}CD62L^+$  T 세포를 형광활성세포분류기로 분리수집하였다. 이렇게 분리한 세포 분획은 세포표면항원인 CD25 및 CD62L 발현도 측면에서 그 순수 분획율이 통상 98% 이상이었고, 세포내 Foxp3 발현율도 최저 90% 이상인 것으로 판명되어 비교적 순수한 nTreg를 증식배양 출발세포로 사용할 수 있었다 (Fig. 1). 다음은 nTreg의 증식에 적절한 자극의 종류 및 자극 횟수를 파악하기 위해 서로 다른 자극원을 사용하여 1주일 주기로 1~3회까지 반복 자극 후 회수되는 세포의 수, Foxp3 발현율, 그리고 시험관내 림프구혼합배양 억제력을 조사하였다. Fig.



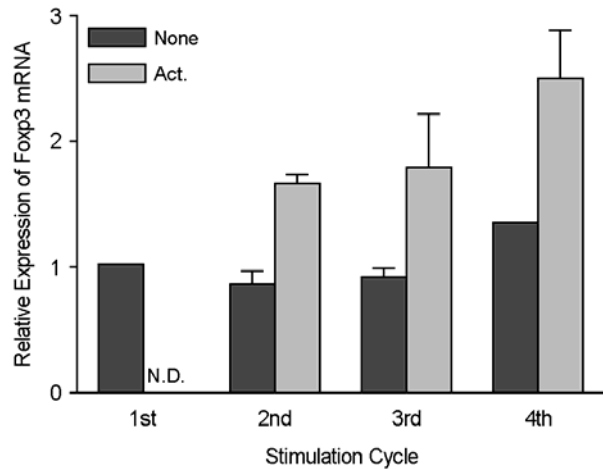
**Figure 2.** *Ex vivo* expansion of nTreg cells. Purified nTreg cells were weekly stimulated with allo-APCs or anti-CD3 & CD28-coated beads in the presence of 500 U/ml rIL-2. At the end of each stimulation cycles, viable cells were harvested and counted to calculate the expansion fold. The percentage of Foxp3-expressing cells was determined by intracellular staining with specific Ab. The suppressive activity of cultured nTreg cells was examined by their ability to inhibit the proliferation of responder T cells in MLR.

2에서 볼 수 있는 바와 같이 nTreg를 공여자 T-세포 제거 비장세포로 자극한 경우 3회 반복 자극을 가해 주더라도 20~30배 정도의 증식만 일어나지만, 공여자 BM-DC나 anti-CD3 & anti-CD28으로 자극 시에는 3회 자극 후 300 배 이상 증식될 수 있음을 알 수 있었다. 한편, 면역억제기능과 가장 밀접하게 연관된 인자로 알려진 Foxp3의 발현은 두 가지 공여자 유래 항원제시세포로 자극배양 시에는 3회 자극배양 후에도 증식된 세포의 90% 이상에서 그 발현이 잘 유지되는 반면, anti-CD3 및 anti-CD28로 자극배양 시 1회 자극배양 후에는 증식세포들에서 Foxp3의 발현이 유지되지만 2회 자극 이후로는 Foxp3의 발현이 급격히 감소하여 3회 자극 후에는 증식세포의 10% 미만에서만 Foxp3의 발현이 관찰되었다. TGF- $\beta$ 는 nTreg의 증식 및 Foxp3 발현 유지에 관여할 뿐만 아니라 naive T 림프구의 증식은 억제하고 Foxp3의 발현을 일부 유도하는 사이토카인으로 알려져 있다 (14). 그러나 nTreg를 anti-CD3 및 anti-CD28로 반복 자극배양 시 TGF- $\beta$ 를 첨가하더라도 증식세포에서의 Foxp3 발현을 저하를 근본적으로 막을 수는 없었다. Foxp3의 발현 양상

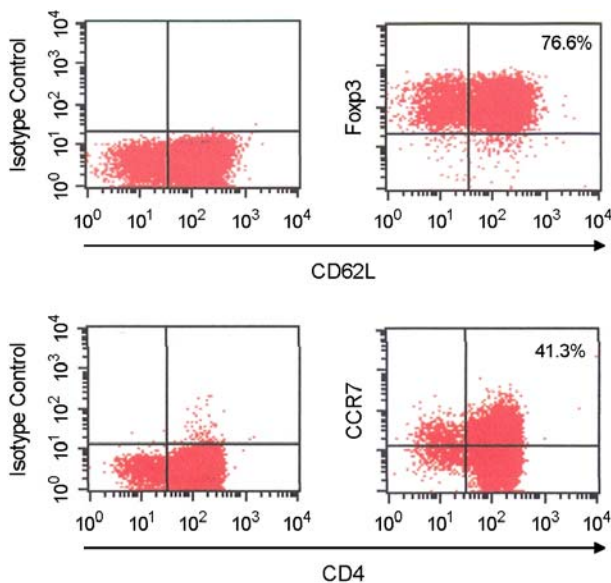
과 일치하게 공여자 항원제시세포로 자극배양하여 증식시킨 nTreg에서는 시험관내 면역억제활성 또한 잘 유지될 뿐만 아니라 자극 횟수가 증가함에 따라 면역억제활성도 약간씩 상승하는 양상을 보인 반면, anti-CD3와 anti-CD28으로 자극배양한 nTreg는 자극 횟수가 증가할수록 면역억제활성을 점점 상실하였다. 이상의 결과로부터 순수 분리한 nTreg를 공여자 BM-DC로 1주 간격으로 3회 자극배양시키면 면역억제활성을 유지하면서 많은 수의 세포를 확보할 수 있다는 사실을 알 수 있었다.

#### 체외에서 증식시킨 Treg의 특성

이전의 실험으로부터 nTreg를 동종 BM-DC로 반복 자극하면 Foxp3의 발현 및 면역억제활성이 잘 유지되면서 효율적 증식이 가능하다는 사실을 알 수 있었다. 다음 단계로 이들 증식세포의 특성을 보다 깊이 파악하고자 첫째, 정량적 방법인 RT-PCR을 이용하여 반복 자극 횟수에 따른 Foxp3의 mRNA 발현 정도를 관찰하였다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 nTreg를 동종 BM-DC로 4회까지 반복 자극하더라도 Foxp3 mRNA의 발현량은 저하되지

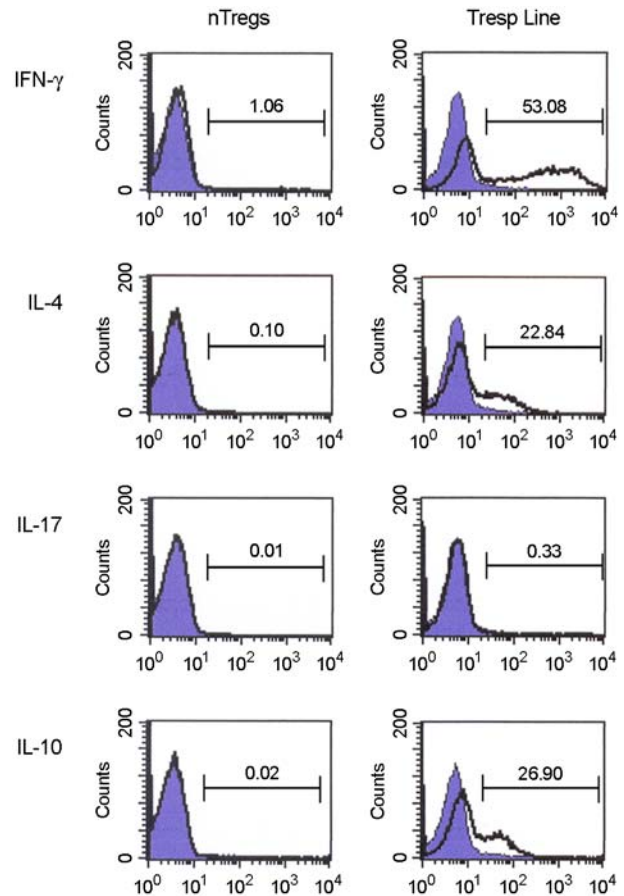


**Figure 3.** Expression level of Foxp3 mRNA after repeated *in vitro* stimulation. The amount of Foxp3 mRNA in nTreg cells at the end of each stimulation cycles (black bar; None) or one day after restimulation (gray bar; Act) with allogeneic BM-DCs was determined by real-time RT-PCR. Foxp3 levels are shown relative to that observed in nTregs at the end of first stimulation cycle. N.D. represents 'not determined'; the recovered cell number of Tregs was not enough to perform the experiment after first stimulation culture.



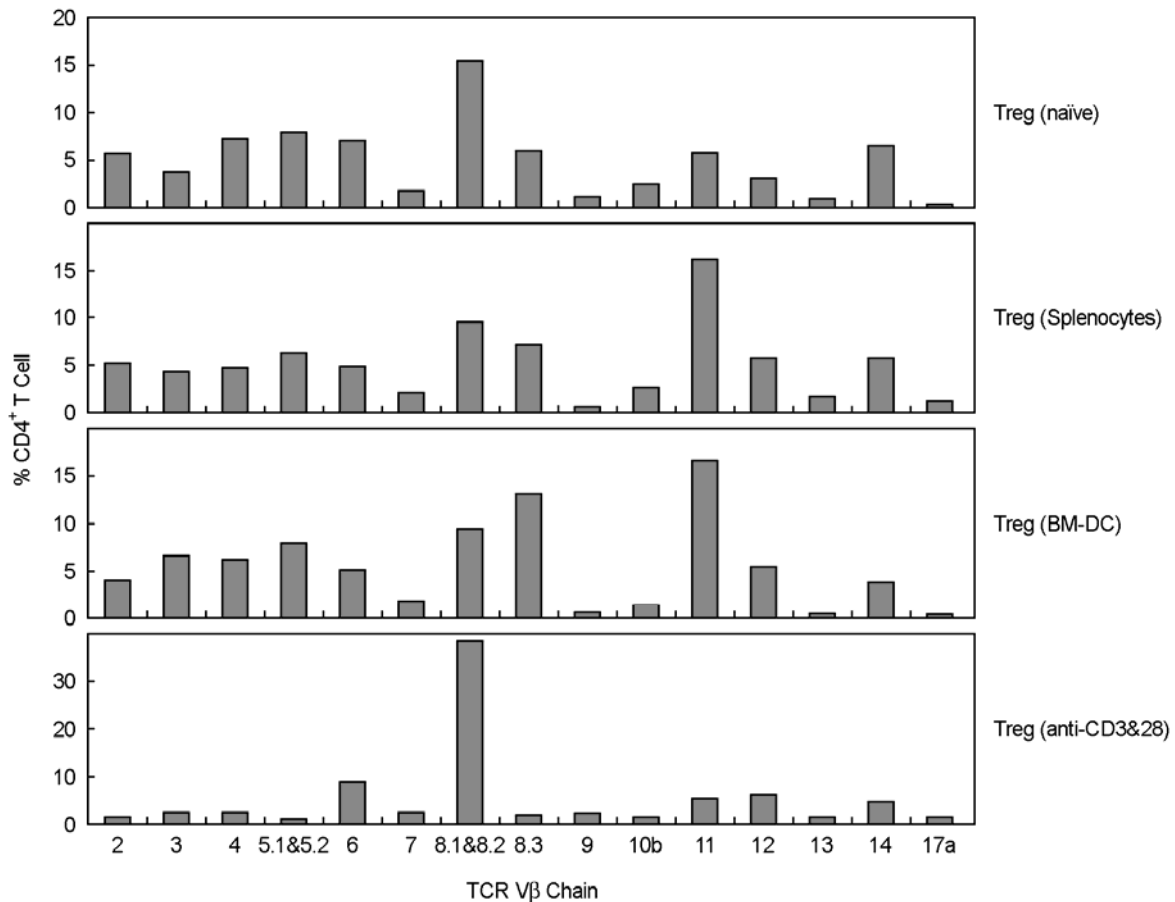
**Figure 4.** Expression of lymph node homing receptors in *in vitro*-expanded nTreg cells. *In vitro*-expanded nTreg cells by three cycles of stimulation with allogeneic BM-DCs were stained with specific and control antibodies. Percentage of CD62L and CCR7 positive cells is shown in each corresponding quadrant.

않았으며, TCR 자극 1일 후에는 그 발현량이 일시적으로 상승함을 알 수 있었다. 이러한 결과로부터 증식된 nTreg에서는 단백질 수준에서 뿐만 아니라 mRNA 수준에서도



**Figure 5.** The absence of effector cytokine secretion from *in vitro*-expanded nTreg cells. The cytokine secretion was examined by intracellular cytokine staining with each cytokine-specific antibodies after restimulation of cells with PMA and ionomycin. Tresp line was prepared from CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T cells after repeated stimulation with allogeneic BM-DCs using the same protocol as used in Treg cell expansion. Gray filled and black line histogram represent isotype control antibody and cytokine specific antibody-stained cells, respectively.

Foxp3의 발현이 잘 유지되고 있음을 확인하였다. 둘째, 생체내에서 말초 림프절내로 이동해 들어가는 데 중요한 세포표면물질로 알려진 CD62L 및 CCR7의 발현 여부를 관찰한 결과, 동종 BM-DC로 3회 반복 자극배양 후에도 증식된 nTreg의 3/4 이상에서 CD62L의 발현을 잘 유지하고 있었으며, 약 40%의 세포에서 CCR7을 발현하고 있었다 (Fig. 4). 셋째, 시험관내에서 대량 증식된 nTreg가 효력 사이토카인의 생성분비력을 획득하는지의 여부를 알아 보고자 하였다. 이를 위해 동종 BM-DC로 3회 반복 자극으로 증식시킨 nTreg를 PMA 및 ionomycin으로 재 자극 후 생성분비하는 여러 사이토카인을 세포내 사이토카인 형광염색법으로 관찰한 결과, 대조군으로 사용한 작



**Figure 6.** TCR Vβ chain usage of nTreg cells. Naïve or *in vitro*-expanded nTreg cells by three rounds of stimulation were stained with FITC-conjugated mAbs which recognize mouse Vβ chains. The percent of cells having specific TCR Vβ chain among total CD4<sup>+</sup> T cells was displayed. The stimuli used in each cycles of stimulation were shown in the right parenthesis of each graph.

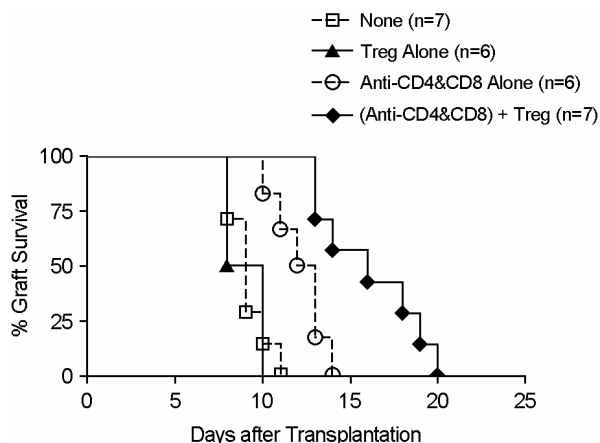
동 T 림프구 세포주와는 달리 이들 증식된 nTreg는 IL-4, IL-17 및 IFN-γ와 같은 어떠한 효력 사이토카인들도 생성하지 않으며, IL-10도 만들지 않음을 알 수 있었다 (Fig. 5). 마지막으로 nTreg의 체외 증식 시 특정 세포 클론의 선별적 증식이 일어나는지를 알아 보고자 nTreg를 여러 종류의 자극원을 이용하여 3회 반복 자극배양 후 증식된 세포를 대상으로 TCR Vβ 사슬 레퍼토리를 특이 항체를 이용한 형광염색법으로 관찰하였다. 동종항원제 시세포 (T-세포 제거 비장세포 또는 BM-DC)로 반복 자극배양 시 전체적으로 볼 때 특정 클론의 선별적 증식이 아니라 증식출발세포가 지닌 TCR Vβ 레퍼토리가 별 변화없이 잘 유지되고 있었으며 단지 TCR Vβ11을 이용하는 nTreg 세포 클론이 약간 증가하는 사실을 확인할 수 있었다. 이와는 반대로 anti-CD3 및 anti-CD28로 반복 자극시킨 nTreg 세포집단에서는 특정 클론, 특히 원래 우

세집단이었던 TCR Vβ8.1 혹은 8.2를 이용하는 클론이 증식세포의 대다수를 차지하고 있어 oligoclonal expansion이 일어났음을 알 수 있었다 (Fig. 6).

체외에서 증식시킨 nTreg의 동종피부이식 거부반응 억제 효과

동종 BM-DC의 반복 자극으로 체외에서 증식시킨 nTreg의 생체내 이식거부반응에 대한 억제효과를 마우스 동종피부이식실험을 통해 알아 보았다. C57BL/6 마우스의 nTreg를 BALB/c 마우스 유래 BM-DC로 3회 반복 자극시켜 증식시킨 nTreg를 새로운 정상 C57BL/6 마우스에 주입한 후 BALB/c 피부를 이식했을 때, 이식피부의 생존연장효과는 전혀 관찰되지 않았다 (중간생존기간 = 9일 대 대조군 9일). 한편 depleting anti-CD4 및 anti-CD8 항체를 수혜자 마우스의 복강내로 1회 주사하여 작동 T





**Figure 7.** The therapeutic effect of *in vitro*-expanded nTreg cells on skin allograft survival. *In vitro*-expanded nTreg cells ( $1 \times 10^7$ /mouse) were intravenously injected prior to engraftment of skin on the same day and one more time 2~3 days after skin grafting. In some recipient mice, endogenous T cells were transiently depleted by the administration of depleting anti-CD4 and anti-CD8 mAbs 14 days prior to receiving skin allograft. MHC fully mismatched skin grafting (BALB/c  $\rightarrow$  C57BL/6) was conducted in recipient mice without any manipulation (None), or with either adoptive transfer of nTreg or transient lymphodepletion alone, or together.

림프구를 일시적으로 감축시킨 후에 nTreg를 주입할 경우, 대조군인 T-림프구 감축만 처치한 수혜자 (중간생존기간 = 12.5일)에 비해 이식피부의 생존기간이 통계학적으로 의미있게 증가하였다 (중간생존기간 = 16일;  $p < 0.05$ , Fig. 7). 이러한 결과로부터 시험관내에서 증식시킨 nTreg는 생체내에서도 이식면역거부반응을 억제할 수 있는 활성을 나타낼 수 있음을 확인하였다.

## 고 찰

Treg를 이용한 세포치료법은 이식거부반응을 예방하는데 이용할 수 있는 새로운 효율적 치료 방안의 하나로 부각되고 있다. 이의 임상적 적용을 위해서는 가능하면 많은 수의 Treg, 특히 이식항원 특이적 Treg의 확보가 선행되어야 한다. 본 연구에서는 이식항원에 대한 면역억제활성을 유지하면서 많은 수의 Treg를 증식시킬 수 있는 체외 자극배양 조건을 탐색한 결과, 고농도의 rIL-2 첨가 하에 공여자 BM-DC를 자극원으로 사용하여 순수 분리한 마우스 nTreg를 1주일 간격으로 3회 자극배양하면 적어도 400배 이상의 Treg를 얻을 수 있으며, 이들 중 많은 부분의 세포들이 CD62L나 CCR7을 세포표면에 발현하고 있어 T 림프구의 감작반응이 일차적으로 일어나

는 말초 림프절로 이동해 들어갈 수 있고, 효력 사이토카인을 만들지 않으며, 또한 다클론성을 유지하여 다양한 이식항원에 잘 대응할 수 있는 가능성을 지니는 것으로 확인되었다. 또 다른 중요한 성장중의 하나는 이렇게 증식시킨 nTreg를 체내로 주입하면 실제로 이식거부반응을 어느 정도 억제하는 활성을 보인다는 점이다.

nTreg의 존재가 밝혀진 초기에는 이들 세포가 TCR 자극에 의해 증식하지 않는 무반응 (anergy) 표현형을 지니는 것으로 인식되었다 (15). 그러나 체내에서 항상성 림프구 증식과정이나 특정 항원 자극 하에 이들 세포도 분열 증식할 수 있다는 사실이 알려지기 시작하였고 (16, 17), 곧 이어 체외에서도 nTreg를 증식시킬 수 있는 방안들이 고안되었다. 즉, Bluestone 그룹과 Steinman 그룹은 각각 시험관내에서 고농도의 IL-2 첨가 하에 anti-CD3 & CD28 또는 CD86<sup>+</sup> 수지상세포로 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T 세포를 자극배양시키면 적게는 5배에서 많게는 200배까지 그 수를 증가시킬 수 있으며, 이들 세포는 자가면역질환 모델에서 면역억제활성을 유지한다고 보고하였다 (18, 19). 이러한 관찰을 토대로 현재 체외에서 nTreg를 증식시키는 데에는 두 가지 기법이 주로 사용되고 있다. 하나는 anti-CD3와 anti-CD28 항체를 이용하여 nTreg를 비특이적으로 증식시키는 방법으로 특히 이들 두 가지 항체를 작은 구슬상에 부착시켜 사용하면 nTreg의 증식효과가 매우 큰 것으로 알려져 있다 (18). 그러나 이러한 방식으로 증식된 nTreg는 항원 특이성이 없으며, 또한 다른 많은 연구자들이 발표한 바와 같이 1회 자극배양 후에는 Foxp3의 발현이 잘 유지되지만, 2~3회 반복 자극 시에는 본 연구에서 관찰된 것처럼 Foxp3의 발현율이 점차 저하되므로 최종 Foxp3 양성 nTreg의 수거에는 한계가 있다고 하겠다 (20). 두 번째 기법은 수지상세포를 이용하여 nTreg를 증식시키는 방법으로서 이식분야의 경우 공여자의 수지상세포를 이용하거나 수혜자 수지상세포에 공여자 주조직복합체 항원을 제시시켜 이용하는 방법이다. 동종장기이식의 동물실험 모델에서 항원 특이적 nTreg를 이용한 세포치료법이 항원 비특이적 nTreg를 이용한 세포치료 보다 더 큰 효과를 나타낸다고 알려져 있는데 (21), 이식항원이 제시된 수지상세포로 nTreg를 자극배양시키면 이식항원 특이적 nTreg를 선별적으로 증식시킬 수 있다는 장점이 있다. 또한 수지상세포를 이용한 증식 방법은 nTreg의 증식 유도효과가 우수하다는 점을 본 연구에서도 확인할 수 있었다. 최근에는 위의 두 가지 증



식기법을 혼합하여 사용하려는 시도가 보고되고 있다. 즉, 처음 자극배양 시에는 anti-CD3와 anti-CD28 부착 미세구슬을 이용하여 nTreg를 최대 증식시킨 다음 이식항원을 인식하는 세포를 선택적으로 재활성화시키기 위해 공여자 수지상세포를 이용하여 이차 자극배양시키는 방법이다 (22). 수지상세포 대신에 준비과정이 훨씬 수월한 공여자 T-세포 제거 비장세포를 자극원으로 이용하여 nTreg를 증식시키면 면역억제활성이 잘 유지된 nTreg를 얻을 수 있지만 그 증식 효율이 낮다는 단점이 있다. 따라서 이식에 사용할 nTreg의 마련에는 아직까지 공여자 BM-DC로 nTreg를 체외에서 반복 자극배양하는 것이 최상의 방법 중 하나라는 사실을 본 실험을 통해 재확인할 수 있었다.

체외에서 증식시킨 Treg를 이식면역거부반응의 억제를 위한 세포치료제로 사용하려면 이들 증식세포가 다음과 같은 몇 가지 전제 조건을 충족시켜야 한다. 첫째, 생체내로 주입한 nTreg가 작동 T 림프구의 감작 및 효력기능을 제어하도록 이식부위와 draining lymph node로 이동할 수 있어야 한다. 특정 항원의 자극으로 활성화된 CD4<sup>+</sup> Treg는 E 셀렉틴이나 P 셀렉틴, 그리고 여러 염증반응 화학주성물질에 대한 수용체를 발현하여 이식부위와 같은 염증부위의 조직에 잘 들어 갈 수 있다고 알려져 있다 (23). 또한 본 연구에서 증식시킨 nTreg는 림프절내로의 이동에 관여하는 세포표면물질로 알려진 CD62L나 CCR7을 발현하므로 생체내에서 필요한 부위로의 이동은 만족시킬 수 있을 것으로 추정된다. 둘째, 이들 nTreg가 생체내에 들어가 이식항원에 의해 반복적으로 재자극되더라도 면역억제활성을 안정적으로 나타낼 수 있어야 한다. nTreg의 면역억제활성과 밀접한 관계를 보이는 Foxp3의 발현으로 판단할 때 우리가 BM-DC를 자극원으로 사용하여 증식시킨 nTreg는 4회까지 재자극 시에도 Foxp3의 발현이 전혀 감소하지 않을 뿐만 아니라 재자극 직후에는 오히려 Foxp3 발현량이 증가하므로 이들 세포는 생체내에서도 면역억제활성을 유지할 가능성이 높다고 하겠다. 또한 이들 증식 nTreg는 PMA와 ionomycin으로 강력하게 재자극하더라도 작동 사이토카인들을 생성하지 않으므로 위의 가능성에 역행하지 않는다. 셋째, 효과적인 이식면역반응 특이적 면역억제효과를 나타내기 위해서는 이식항원 특이적 nTreg로 구성되어 있어야 한다. 비록 동종 BM-DC로 3회 반복 자극시킨 nTreg는 1회 및 2회 자극한 세포들에 비해 시험관내 혼합림프구

반응의 억제효과를 더 크게 나타내지만 이는 개개 세포의 면역억제활성의 상승에 기인할 수도 있기 때문에 3회 자극 후 얻은 세포집단에 이식항원 특이적 세포 클론이 더 많이 함유되어 있다고 단정할 수 없다. 또한 현재까지 이식항원에 반응하는 특정 소수 nTreg 세포 클론의 효과가 우수한지 아니면 다클론성 세포집단이 나은지에 관하여 철저하게 조사된 바가 없다. 본 연구자들이 수행한 예비실험에 따르면, BALB/c BM-DC로 자극하여 C57BL/6 nTreg를 증식시킬 때 그 선택적 증식이 반복적으로 확인된 TCR Vβ11 양성 세포가 음성 세포집단과 비교하여 생체내 면역거부반응 억제효과에서 별 다른 차이를 나타내지 않았다. 하지만 본 연구에서 얻은 다클론성 nTreg 세포집단이 소수 nTreg 세포 클론 집단보다 세포치료제로서 더 적합한지에 대해서는 추후 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

생체내에는 원래 많은 수의 동종 반응성 작동 T 림프구가 존재하는 것으로 알려져 있다. 즉, 전체 T 림프구 중 5~10%에 해당하는 T 림프구들이 동종 반응성을 보이며 주로 이들에 의해 이식 후 급성 면역거부반응이 유발된다 (24). 뿐만 아니라 CD8<sup>+</sup> T 림프구 및 기억/작동 CD4<sup>+</sup> T 림프구는 Treg의 면역억제활성에 대하여 어느 정도 저항성을 지니는 것으로 알려져 있다 (25). 따라서 nTreg 주입에 의한 효과적인 면역 통제가 일어나도록 유도하기 위해서는 이들 동종항원 반응성 T 림프구 수를 줄이든가 혹은 기억/작동 T 림프구의 감축 등과 병행하는 것이 유리할 것이다. 이러한 점은 본 연구에서도 잘 반영되고 있다. 수혜자 마우스에 체외 증식 nTreg의 단독 주입만으로는 생체내 동종이식피부에 대한 면역거부반응을 전혀 억제하지 못했다. 그러나 anti-CD4 및 anti-CD8 항체 투여로 수혜자 체내 T 림프구를 감축시킨 후 nTreg를 주입했을 경우 면역거부반응이 어느 정도 억제되는 것으로 나타났다. 따라서 본 연구에서 사용한 방법 보다 더욱 더 효율적인 동종항원 반응성 작동 T 림프구의 감축 또는 억제법과 병행하면 체외 증식 nTreg의 체내 주입법의 효과가 보다 더 뚜렷해 질 것으로 기대된다.

마지막으로 본 연구의 의미를 종합해 보면, 순수 분리한 nTreg를 고농도의 IL-2 첨가하에 공여자 수지상세포로 반복 자극배양하면 세포치료법에 이용할 수 있을 만큼 충분한 수 및 적합한 성상의 nTreg를 얻을 수 있고, 림프구 감축과 병행 처치하면 실제 동종이식피부의 생존

을 연장시킬 수 있음을 확인하였기에 앞으로 Treg를 이용한 성공적인 세포치료법 확립에 대한 발판을 마련했다고 사료된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Dantal J, Souillou JP. Immunosuppressive drugs and the risk of cancer after organ transplantation. *N Engl J Med* 2005; 352:1371-3.
- 2) Lechler RI, Garden OA, Turka LA. The complementary roles of deletion and regulation in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003;3:147-58.
- 3) Zhang ZX, Yang L, Young KJ, DuTemple B, Zhang L. Identification of a previously unknown antigen-specific regulatory T cell and its mechanism of suppression. *Nat Med* 2000;6:782-9.
- 4) Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med* 2001;193: 1311-8.
- 5) Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 2002;196:389-99.
- 6) Davies JD, O'Connor E, Hall D, Krah T, Trotter J, Sarvetnick N. CD4<sup>+</sup> CD45RB low-density cells from untreated mice prevent acute allograft rejection. *J Immunol* 1999;163:5353-7.
- 7) Hara M, Kingsley CI, Niimi M, Read S, Turvey SE, Bushell AR, Morris PJ, Powrie F, Wood KJ. IL-10 is required for regulatory T cells to mediate tolerance to alloantigens *in vivo*. *J Immunol* 2001;166:3789-96.
- 8) Ciubotariu R, Colovai AI, Pennesi G, Liu Z, Smith D, Berlocco P, Cortesini R, Suciu-Foca N. Specific suppression of human CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-cell responses to pig MHC antigens by CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 1998;161:5193-202.
- 9) Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003;3:253-7.
- 10) Shevach EM. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002;2:389-400.
- 11) Jonuleit H, Schmitt E. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol* 2003;171:6323-7.
- 12) Daley SR, Ma J, Adams E, Cobbold SP, Waldmann H. A key role for TGF- $\beta$  signaling to T cells in the long-term acceptance of allografts. *J Immunol* 2007;179:3648-54.
- 13) Carvalho-Gaspar M, Jones ND, Luo S, Martin L, Brook MO, Wood KJ. Location and time-dependent control of rejection by regulatory T cells culminates in a failure to generate memory T cells. *J Immunol* 2008;180:6640-8.
- 14) Wan YY, Flavell RA. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol Rev* 2006; 212:114-30.
- 15) Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol* 1998;10:1969-80.
- 16) Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of *ex vivo* activated and expanded CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002;99: 3493-9.
- 17) Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, Steinman RM. Direct expansion of functional CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J Exp Med* 2003;198:235-47.
- 18) Tang Q, Henriksen KJ, Bi M, Finger EB, Szot G, Ye J, Masteller EL, McDevitt H, Bonyhadi M, Bluestone JA. *In vitro*-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2004;199:1455-65.
- 19) Tarbell KV, Yamazaki S, Olson K, Toy P, Steinman RM. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes. *J Exp Med* 2004;199:1467-77.
- 20) Chai JG, Coe D, Chen D, Simpson E, Dyson J, Scott D. *In vitro* expansion improves *in vivo* regulation by CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Immunol* 2008;180:858-69.
- 21) Sanchez-Fueyo A, Sandner S, Habicht A, Mariat C, Kenny J, Degauque N, Zheng XX, Strom TB, Turka LA, Sayegh MH. Specificity of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cell function in alloimmunity. *J Immunol* 2006;176:329-34.
- 22) Peters JH, Hilbrands LB, Koenen HJ, Joosten I. *Ex vivo* generation of human alloantigen-specific regulatory T cells from CD4<sup>pos</sup>CD25<sup>high</sup> T cells for immunotherapy. *PLoS One* 2008;3:e2233.
- 23) Huehn J, Siegmund K, Lehmann JC, Siewert C, Haubold U, Feuerer M, Debes GF, Lauber J, Frey O, Przybylski GK, Niesner U, de la Rosa M, Schmidt CA, Brauer R, Buer J,

- Scheffold A, Hamann A. Developmental stage, phenotype, and migration distinguish naïve- and effector/memory-like CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *J Exp Med* 2004;199:303-13.
- 24) Suchin EJ, Langmuir PB, Palmer E, Sayegh MH, Wells AD, Turka LA. Quantifying the frequency of alloreactive T cells *in vivo*: new answers to an old question. *J Immunol* 2001; 166:973-81.
- 25) Shevach EM. Mechanisms of Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009;30:636-45.
-