

인간 각막세포에서 국소 면역억제 인자 Indoleamine 2,3-dioxygenase의 발현

류양환 · 김재찬

중앙대학교 의과대학 안과학교실

목적 : 인간 각막세포에서 indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)의 발현 양상을 확인하고 이의 국소 면역억제 인자로써의 기능을 평가해 보고자 하였다.

대상과 방법 : 초대배양된 인간 각막세포에서 IDO의 발현 양상을 RT-PCR과 Western blot을 통해 확인하였다. IDO의 발현과 면역억제와의 관련성을 알아보기 위하여 인간 각막세포 조정배지에서 면역세포를 배양한 후 세포의 증식을 MTT assay를 통해 확인하였으며 IFN- γ 처리에 의한 IDO의 면역세포 사멸유도 효과를 ELISA 방법을 통해 확인하였다.

결과 : 세 종류의 인간 각막세포(각막 상피세포, 간질세포, 내피세포) 중 각막 간질세포에서 IDO의 mRNA 및 단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 각막 간질세포 조정배지에서 배양한 면역세포는 그 증식이 감소하는 양상을 나타내었으며 IFN- γ 처리에 따라 농도의존적으로 IDO의 면역세포 사멸유도 효과가 증가됨을 확인할 수 있었다.

결론 : 인간 각막 간질세포는 IDO의 발현에 의해 면역관용이 증가될 것으로 생각되며 이후 이를 이용하여 각막 이식 수술시 면역거부 반응을 감소시킬 수 있는 국소면역억제 인자로서의 적용 가능성이 기대된다.

〈한안지 48(8):1126-1133, 2007〉

각막조직은 다른 신체 조직과는 달리 면역특혜로 인해 면역거부반응이 적은 것으로 알려져 있어 일반적으로 각막이식은 매우 성공적일 것으로 기대되고 있다. 하지만 임상적 견해에서 보면 각막이식의 성공률이 기대만큼 높은 것은 아니다. 각막이식이 필요한 환자의 경우 대부분 각막 질환을 가지고 있는데, 이와 같은 경우 각막조직의 면역특혜가 파괴되고 면역거부반응이 유발되어 결국에는 각막이식이 실패하게 되는 경우도 있다. 이와 같은 일련의 거부반응 억제를 위해 calcineurin 억제인자인 cyclosporin이나 FK506과 같은 면역억제제가 주로 사용되고 있으나 전신적인 면

역억제를 유도하는 이와 같은 약제들은 감염과 같은 부작용의 동반을 피할 수 없게 된다. 따라서 전신적 부작용을 최소화하면서 국소적으로 작용할 수 있는 면역억제의 필요성이 제기되고 있다.

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)는 hemering을 포함하고 있는 단쇄형태의 효소로써 L-tryptophan의 pyrrole-ring 구조에 작용하여 N-formylkynurenine의 생성을 촉진하고 이는 급격하게 분해되어 kynurenine으로 전환된다.¹ IDO의 강력한 유도물질로써는 IFN- γ 가 섬유아세포와² 대식세포,³ 가지세포⁴ 및 많은 종류의 암세포주에서⁵ 작용하는 것으로 보고되었으며, 그 외에도 lipopolysaccharide (LPS),⁶ IFN- α 와 - β 가⁷ 보고되고 있다.

IDO의 면역학적 기능은 임신된 모체의 태반에서 높은 발현 양상이 확인되어 태아를 이중 단백질로 인식하여 면역학적으로 공격하는 것을 방지하는 인자로 작용함이 확인되었으며,⁸ 인간의 대식세포에서 IDO가 tryptophan 대사를 통해 T 세포의 증식을 억제함이 보고된 바 있다.⁹ 또한 IDO에 의한 T 세포의 활성 억제는 국소조직에서 tryptophan의 이용도가 IDO에 의해 제한되기 때문임이 밝혀졌으며,¹⁰ 인간의 가지세포에서도 IDO의 발현 양상이 확인되어 역시 T 세포의

〈접수일 : 2006년 3월 31일, 심사통과일 : 2007년 5월 15일〉

통신저자 : 김 재 찬

서울시 용산구 한강로3가 65-207
중앙대학교 용산병원 안과
Tel: 02-748-9838, Fax: 02-792-5076
E-mail: JCK50ey@kornet.net

* 본 논문의 요지는 2005년 대한안과학회 제93회 춘계학술대회에서 포스터로 발표되었음.

* 본 논문은 2005년 중앙대학교 학술연구비(일반연구비) 지원에 의해 수행됨.

증식을 억제함이 확인된 바 있다.⁴ 이와 같은 일련의 보고들은 IDO에 의해 조성되는 tryptophan 고갈 환경이 T 세포의 증식을 억제할 수 있음을 의미하고 있다. 뿐만 아니라 최근에는 면역세포 뿐 아니라 피부 섬유아 세포에도 IDO의 발현이 확인되었으며 역시 동일하게 면역세포에 증식 및 사멸을 조절함이 보고되었다.¹¹

그 외에 종양학 분야에서는 종양세포가 자체 면역체계의 공격으로부터 자신을 보호하고자 하는 기전중 하나로 IDO의 발현이 보고되어 많은 연구가 진행되었다. Uyttenhove et al¹²은 생쥐의 비만세포종에서 IDO의 발현을 유도하면 자체 면역체계에 의한 공격을 피할 수 있으며 따라서 종양세포가 자신 주위의 보호적인 면역체계를 형성할 수 있음을 보고하였다. 이와 같은 보고는 체외 세포배양에서 IDO를 발현하는 종양세포들이 면역세포의 공격을 받지 않고,¹³ 또한 IDO의 길항자인 1-methyltryptophan이 종양의 과증식을 억제한다는 보고와 일치하는 결과였다.¹⁴

이와 같은 면역학 또는 종양학 분야에서는 IDO에 대한 다양한 연구가 이루어진 바 있으며 의학적 이용까지 시도되고 있으나 안과학적으로는 IDO에 대한 연구가 거의 진행되지 않고 있는 것이 사실이다. 따라서 본 연구에서는 인간 각막세포에서 IDO의 발현 양상을 확인하고 이의 국소 면역억제 인자로써의 기능적 유용성을 평가해 보고자 하였다.

대상과 방법

1. 인간 각막세포의 분리 및 배양

본 연구에 사용된 인간 각막은 헬싱키 선언에서 정한 규칙에 준하여 확보하였다. 세 가지 종류의 각막세포(각막 상피세포, 간질세포, 내피세포)는 공여된 인간 각막조직으로부터 기 보고된 방법에 준하여 분리하였다.¹⁵ 각막조직을 세 층(상피층, 간질층, 내피층)으로 구분하여 절개하였으며 2 mm²의 크기로 세절한 후 각 세포층이 바닥을 향하도록 각각 부착하고 약 1주일 후 조직으로부터 자라나온 세포들을 회수하여 실험에 이용하였다.

분리된 각막 상피세포(primary human corneal epithelial cells; PHCEp)와 간질세포(primary human corneal fibroblasts; PHCF)의 배양은 0.06 M CaCl₂와 human corneal growth supplements (HCGS; Cascade Biologics Inc., USA)가 포함된 Epilife (Cascade Biologics Inc., USA) 및 10% FBS (WelGENE Biopharmaceuticals, Korea)와 1%의 항생제(WelGENE Biopharmaceuticals, Korea)가 포함된 DMEM (WelGENE Biopharmaceuticals,

Korea)에서 각각 배양하였다. 각막 내피세포(primary human corneal endothelial cells; PHCEn)의 배양에는 5 ng/ml EGF (Sigma Chemicals, USA), 20 ng/ml NGF (R&D Systems, USA), 20 µg/ml ascorbic acid (Sigma Chemicals, USA), 0.005% insect lipid (Sigma Chemicals, USA), 0.2 µg/ml CaCl₂, 0.02% chondroitin sulfate (Sigma Chemicals, USA), 1% RPMI 1640 vitamin mixture (Sigma Chemicals, USA), 8% FBS, 1% 항생제가 포함된 Opti-MEM (Gibco BRL, USA)을 이용하였다. 모든 세포들은 5% CO₂를 함유한 37℃의 세포배양기에서 배양하였으며, 3~4일 간격으로 계대배양을 하되 3계대가 넘지 않는 세포만을 실험에 이용하였다.

2. 인간 면역세포의 배양

인간 T 세포주인 Jurkat cell과 단핵세포주인 THP-1은 한국세포주은행으로부터 구입하여 사용하였다. 두 세포주 모두 10% FBS와 1% 항생제가 포함된 RPMI1640 배양액에서 배양하였으며 3~4일 간격으로 계대배양을 실시하였다.

3. RT-PCR

Messenger RNA의 발현을 확인하기 위해 Trizol reagent (Sigma Chemicals, USA)를 이용하여 total RNA를 추출하였다. cDNA 합성은 250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂, 50 mM DTT, 1 mM dNTP, RNase 20 U가 포함되어 있는 총 부피 20 µl의 AccuPower™ RT premix (Bioneer, Korea)를 사용하였다. RT premix에 total RNA 2 µg과 0.3 µg의 random primer를 첨가한 후 3차 증류수를 사용하여 최종부피를 20 µl로 조정하였다. 57℃에서 10분간 RNA 변성을 실시하였으며, 42℃에서 60분간 역전사 반응을 유도하였고, RTase의 불활성화를 위하여 94℃에서 5분간 반응시켜 cDNA를 합성하였다. cDNA 합성 후 RNA 분리 및 cDNA의 균일한 합성을 알아보기 위하여 GAPDH를 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR은 10 mM Tris-HCl (pH 9.0), 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1U DNA polymerase, 1 mM dNTP가 포함되어 있는 AccuPower™ PCR premix (Bioneer, Korea)에 10 pM의 primer와 5 µl의 cDNA를 넣은 후 3차 증류수를 이용하여 총 부피를 20 µl가 되도록 조정하여 실시하였으며, GeneAmp

PCR System 2400 (Perkin Elmer, USA)를 사용하여 증폭하였다. IDO 유전자의 증폭에 사용된 primer의 염기서열은 sense 5'-GGC AAA GGT CAT GGA GAT GT-3', antisense 5'-CAG GAC GTC AAA GCA CTG AA-3' (GeneBank accession No. BC027882)이며 증폭조건은 변성 94℃에서 1분, annealing 60℃에서 1분, 합성 72℃에서 1분간 진행하여 총 40 cycle을 반복하였다. RT-PCR 생산물은 2% agarose gel에서 확인하였다.

4. Western Blot Analysis

각막세포로부터 PRO-PREPTM Protein Extraction Solution (Intron Biotechnology, USA)을 이용하여 총 단백질을 분리하였다. 총 단백질(10 µg/시료)은 95℃에서 5분간 가열하였으며 12.5% sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 실시하였다. 분자량에 따라 분리된 단백질들은 nitrocellulose membrane으로 electrotransfer하였다. Membrane은 1× TBST (50 mM NaCl, 20 mM Tris, 0.05% Tween 20)에 녹인 5% skim milk로 1시간 동안 상온에서 blocking 하였다. 이후 1:200으로 희석된 goat anti-human IDO 단일클론 항체(Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA)에서 4℃에서 16시간 동안 반응을 유도하였으며 horse radish peroxidase (HRP)-conjugated rabbit anti-goat IgG (Santa Cruz Biotechnology, Inc., USA)에서 상온에서 2시간 동안 반응을 유도하였다. Peroxidase의 활성은 ECLTM Western Blotting Detection Reagent (Amersham Bioscience, USA)을 이용하여 X-ray 필름에 감광 후 관찰하였다.

5. IFN-γ 처리 및 각막세포 조정배지 준비

인간 각막세포가 부착된 후 1 ng/ml IFN-γ (R&D Systems, USA)를 처리하였으며 이후 24시간 동안 배양하여 IDO의 발현을 유도하였다. 또한 IDO의 길항제인 1-methyl tryptophan (1-MT; Sigma Chemicals, USA)을 추가적으로 처리하여 IDO의 기능을 봉쇄하였다. 이후 배양 상층액을 회수한 후 원심분리를 실시하여 부유된 세포를 제거함으로써 각막세포 조정배지를 준비하였다.

6. MTT assay

세포의 증식 변화를 측정하기 위하여 3-(4,5-

dimethylthiazol-2-yl)-2,5,-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma Chemicals, USA)을 사용하였다. THP-1 또는 Jurkat 세포를 96-well plate에 0.4×10^4 cells/100 µl 배양액/well (Falcon Co., USA)의 농도로 접종한 후 24시간 동안 배양하여 부착을 유도하였다. 부착된 세포는 준비된 각막세포 조정배지로 배양액을 각각 교환하였으며 또한 IDO의 길항제인 1-MT를 추가적으로 처리하여 IDO의 기능을 봉쇄하였다. 배양중인 세포는 MTT working solution (2 mg/ml)을 2시간 동안 처리하였다. 이후 배양액을 모두 제거하고 150 µl dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma Chemicals, USA)를 가하여 formazan을 용해시킴으로써 발색을 유도하였다. 발색반응은 ELISA plate reader를 이용하여 595 nm에서 측정하였다.

7. ELISA

Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche, Germany)를 이용하여 면역세포의 사멸 정도를 측정하였다. 1-MT가 포함되거나 또는 포함되지 않은 각막세포 조정배지에서 24시간 동안 배양된 면역세포를 회수하여 lysis buffer를 가하였다. 상온에서 30분간 정치시킨 후 200×g에서 10분간 원심분리를 실시하였다. 12 µl의 상층액을 streptavidin이 피복된 multi-well plate에 가한 후, 80 µl immuno-reagent를 첨가하였다. 반응은 상온에서 2시간 동안 유도하였으며 incubation buffer로 3회 세정하였다. ABTS solution (100 µl/well)을 가한 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 ABTS solution의 흡광도를 blank로 하여 값을 환산하였다.

8. 통계 분석

통계처리는 Statistical Analysis System (SAS, 1995) 통계 프로그램을 이용하였으며, 그룹간 비교는 one-way ANOVA 방법에 의한 Duncan 검정을 이용하여 실시하였다.

결 과

1. 인간 각막세포에서 IDO의 발현

초대배양된 인간각막세포에서 IDO의 발현양상을 RT-PCR 및 Western blot을 통하여 확인하였다. 세 종류의 인간 각막세포 중 PHCEn에서는 IDO의

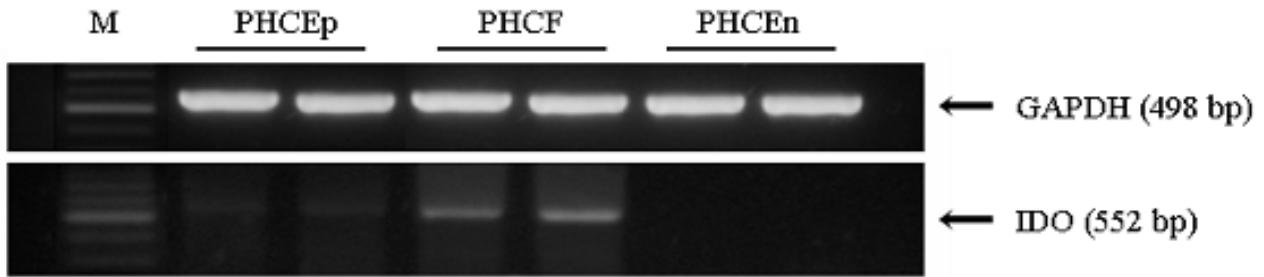


Figure 1. Expression of IDO in human corneal cells. RT-PCR was performed to identify the expression of IDO in primary cultured human corneal cells. Among three different types of human corneal cells, PHCEn did not express IDO. IDO expression was observed in PHCEp and PHCF. PHCF showed significantly higher expression.

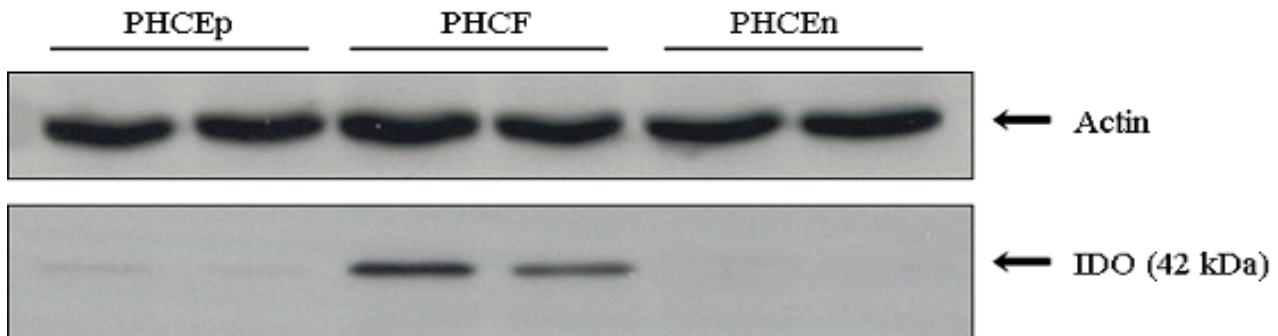


Figure 2. Expression of IDO in human corneal cells. Western blotting performed to identify the expression of IDO in primary cultured human corneal cells. Among three different types of human corneal cells, PHCEn did not express IDO. PHCF showed significantly higher IDO expression, and PHCEp also showed IDO expression.

mRNA 및 단백질의 발현을 확인할 수 없었다(Fig. 1, 2). 그러나 PHCEp와 PHCF에서 IDO의 발현을 확인할 수 있었으며 특히 PHCF의 경우에는 유의적으로 높은 발현 양상을 나타내었다(Fig. 1, 2).

2. 인간 각막세포 조정 배지에 의한 면역세포의 증식

인간 각막세포에서 발현되는 IDO가 면역세포의 증식에 미치는 영향을 확인하기 위하여 THP-1과 Jurkat 세포를 인간 각막세포 조정 배지에서 배양한 후 MTT assay를 통해 증식의 변화 양상을 관찰하였다. 조정 배지의 배지 조성에 따른 실험적 오차를 보정하기 위하여 인간 각막세포의 배양 배지(defined medium)를 대조군으로 각각 사용하였으며 IDO에 의한 기능 여부를 정확하게 알아보기 위하여 IDO의 길항제인 1-MT를 추가적으로 처리한 조정배지를 분석에 사용하였다. 실험 결과 단백질세포인 THP-1은 대조군에 비해 각막세포 조정 배지에 의한 증식의 변화 양상을 나타내지 않았다(Fig. 3A). 그러나, T 세포인 Jurkat 세포의 경우에는 각막세포 배양 배지를 처리한 경우 약간의 증식 감소를 나타내었으며, 이를 기준으로 각막세

포 조정 배지의 효과를 확인했을 때 PHCF 조정 배지에서만 유의적인 증식의 감소 양상을 확인할 수 있었다(Fig. 3B). 1-MT를 처리한 Jurkat 세포의 증식은 각막세포 배양 배지에서 배양한 경우와 유사한 정도의 증식을 나타내었다.

3. IFN- γ 농도 의존적인 IDO의 apoptosis 유도능

IFN- γ 처리에 따른 IDO의 발현 변화가 apoptosis에 미치는 영향이 IFN- γ 에 농도 의존적으로 나타나는지 여부를 확인하기 위하여 다양한 농도의 IFN- γ 를 처리한 각막 간질세포 조정배지에서 면역세포를 배양한 후 이들의 apoptosis를 확인하였다. THP-1은 IFN- γ 의 처리 농도 변화에 아무런 영향을 받지 않았으나, Jurkat 세포의 경우에는 1.0~5.0 ng/ml IFN- γ 를 처리한 각막 간질세포 조정배지에서 apoptosis의 증가 양상을 나타내었다(Fig. 4). 또한 1-MT가 추가적으로 처리된 각막 간질세포 조정배지에서 배양된 면역세포에서는 apoptosis의 증가가 나타나지 않았으나 5.0 ng/ml IFN- γ 가 처리된 조정배지에서는 약간의 증가 양상이 관찰되었다.

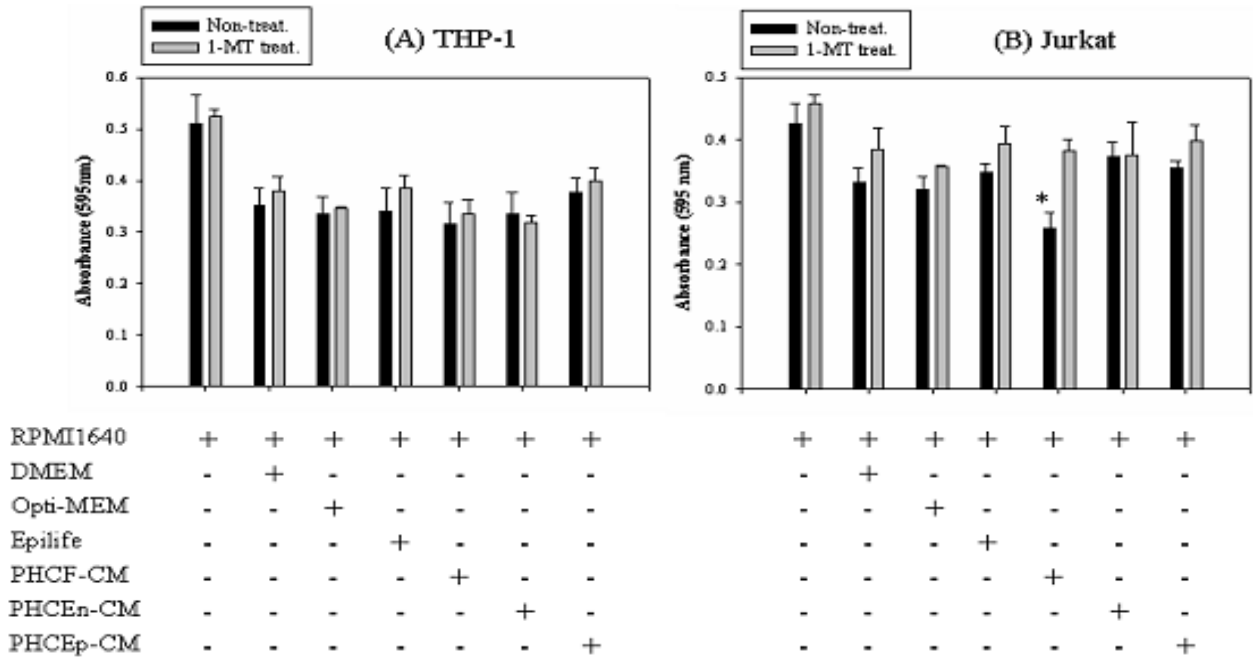


Figure 3. Proliferation of immune cells cultured in human corneal cells conditioned medium. In order to investigate the effects of IDO expressed by human corneal cells on the proliferation of immune cells, an MTT cell proliferation assay was performed. Human immune cells, THP-1 and Jurkat cells, were cultured in three different types of human corneal cells conditioned medium. To remove the effects of the medium, immune cells were cultured in human corneal cell-defined medium. (A) Although the human monocytes, THP-1, showed decreased proliferation compared with the control (cultured in RPMI1640), there were no effects of the conditioned medium. (B) Human T-lymphocytes (Jurkat cells) cultured in defined medium for human corneal cells showed slightly decreased proliferation. PHCEn-conditioned medium did not show any effects on proliferation of the Jurkat cells. However, PHCF and PHCEp-conditioned medium showed decreased proliferation of Jurkat cells (* $P > 0.05$). Data represent the mean(SD of three separate experiments.

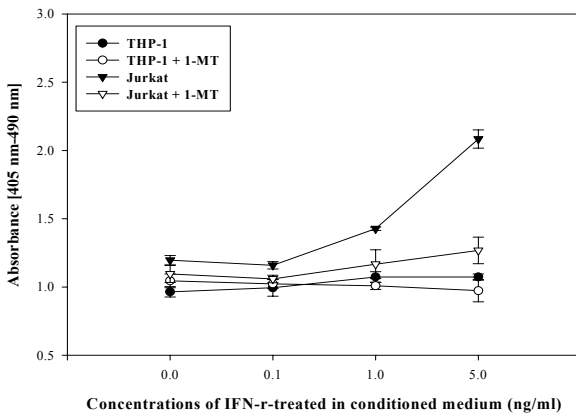


Figure 4. Apoptosis of immune cells cultured in IFN- γ -treated PHCF-conditioned medium. Immune cells were cultured in IFN- γ -treated PHCF-conditioned medium for 24 hrs, and cellular apoptosis was measured by ELISA. The THP-1 culture was not affected by IFN- γ treatment. However, Jurkat cells showed increased apoptosis in 1.0 and 5.0 ng/ml IFN- γ -treated conditioned medium. IDO neutralizer, 1-MT, treatment showed recovered apoptosis.

고 찰

일반적으로 각막이식이 각막조직의 면역특혜라는 특수성으로 인해 매우 성공적일 것으로 기대되는 것과는 달리 각막질환에 의해 면역특혜는 파괴될 수 있으며, 때문에 임상적으로 각막이식 후 거부반응이 나타나고 있다. 따라서 면역거부의 억제를 위해 전신적 부작용 없이 국소적 면역특혜를 유지할 수 있는 면역억제 기법의 필요성이 대두되고 있다.

본 연구에서 국소적 면역억제의 가능성을 제기한 IDO는 heme-ring을 포함하고 있는 단쇄형태의 효소로써, 다양한 종양세포주,⁵ 태반,⁸ 대식세포,⁹ 가지세포에서⁴ 그 발현이 확인된 바 있다. 각막세포의 RT-PCR 및 Western blot 결과 IDO의 발현이 PHCEp와 PHCF에서 나타남을 확인하였으며, 특히 PHCF에서는 유의적으로 강한 발현이 나타남을 관찰하였다(Fig. 1, 2). 최근 설치류의 각막 내피세포에서 IDO의 발현이 나타남이 보고된 바 있으나,¹⁶ 본 연구의 결과는 그와 달리 각막 내피세포에서는 그 발현을 확인할 수 없

었다. 이는 종 특이적 발현의 차이로 생각해 볼 수 있으며, 이와 같은 결과는 각막이식시 각막 간질층에서의 면역거부 반응이 다른 층에 비해 비교적 적게 나타나는 임상적 관찰과도 동일한 결과를 보이고 있다. IDO의 국소적 발현이 tryptophan의 국소적 고갈 환경을 조성함으로써 T 세포의 증식을 억제한다는 기존의 보고를 통해 볼 때 PHCF에서의 IDO 발현 양상은 각막 간질층에서 IDO발현에 의한 국소적 tryptophan 고갈 환경이 조성될 수 있는 것임을 의미하는 것으로 생각된다.

이를 바탕으로 PHCEp와 PHCF에서 발현되는 IDO에 의해 면역세포의 증식이 영향을 받을 수 있는지 여부를 각막세포 조정배지를 통해 확인한 결과, 단핵세포인 THP-1에서는 조정배지에 의한 증식의 변화가 나타나지 않았으나 T 세포인 Jurkat 세포는 PHCF 조정배지에 의해 증식이 유의적으로 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

최근 tryptophan 고갈 환경의 조성은 Fas 기질의 발현 유도를 통해 T 세포의 증식을 억제함이 보고되었다.¹⁷ 또한 tryptophan 대사산물인 3-hydroxyanthranilic acid가 U937 세포의 사멸을 유도함이 보고된 바 있다.¹⁸ 이와 같은 일련의 보고는 IDO에 의한 면역세포의 억제가 IDO에 의해 중재되는 면역관용의 주요한 인자중 하나로 작용할 수 있는 것임을 의미하는 것이다. 따라서 인간 각막세포에서 발현되는 IDO는 면역학적 활성을 가지고 있으며 T 세포의 증식 억제를 통해 면역억제 효과를 나타내는 물질 중 하나로 작용할 수 있음을 확인할 수 있었다.

IDO 발현에 따른 T 세포의 증식 억제의 원인이 무엇인지 그리고 IDO의 강력한 유도 물질로 알려져 있는 IFN- γ 처리에 따른 IDO의 발현 변화가 면역세포의 apoptosis에 미치는 영향이 IFN- γ 에 농도 의존적으로 나타나는지 여부를 확인하기 위하여 다양한 농도의 IFN- γ 를 처리한 각막 간질세포 조정배지에서 면역세포를 배양한 후 이들의 세포사멸사를 확인하였다. THP-1은 IFN- γ 의 처리 농도 변화에 아무런 영향을 받지 않았으나, Jurkat 세포의 경우에는 1.0-5.0 ng/ml IFN- γ 를 처리한 각막 간질세포 조정배지에서 세포사멸이 증가하는 양상을 나타내었다(Fig. 4). 또한 1-MT가 추가적으로 처리된 각막세포 조정배지에서 배양된 면역세포에서는 세포사멸의 증가가 나타나지 않았으나 5.0 ng/ml IFN- γ 가 처리된 조정배지에서는 약간의 증가 양상이 관찰되었다. 이와 같은 결과는 IFN- γ 의 처리가 농도 의존적으로 IDO의 발현과 면역학적 활성의 증가에 영향을 미칠 수 있음을 의미하는 것과 동시에 IDO 발현에 의해 나타나는 T 세포의 증식 억제는 세포

주기의 고정이나 세포고사에 의한 것이 아닌 세포사멸사에 의한 사멸 때문임을 의미하는 것이다.

결론적으로 PHCF 및 PHCEp에서 발현되는 IDO는 단핵세포에는 영향을 미치지 않으나 T 세포의 사멸에 영향을 미칠 수 있음이 확인되었으며, 그 활성은 IFN- γ 에 의해 농도 의존적으로 나타남을 알 수 있었다. 따라서 본 연구 결과는 IDO의 발현을 이용한 국소 면역거부의 기전을 밝히고 IFN- γ 의 IDO발현 유도 기능을 제시함으로써 향후 이를 이용하여 각막 이식수술시 면역거부 반응을 감소시킬 수 있는 국소면역억제 인자로서의 적용 가능성을 기대할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

- 1) Higuchi K, Hayaishi O. Enzymic formation of D-kynurenine from D-tryptophan. Arch Biochem Biophys 1967;120:397-403.
- 2) Dai W, Gupta SL. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase gene expression in human fibroblasts by interferon- γ . Upstream control region discriminates between interferon- γ and interferon- α . J Biol Chem 1990;265:19871-7.
- 3) Carlin JM, Borden EC, Sondel PM, et al. Interferon-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes. J Leukoc Biol 1989;45:29-34.
- 4) Hwu P, Du MX, Lapointe R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. J Immunol 2000;164:3596-9.
- 5) Taylor MW, Feng GS. Relationship between interferon- γ , indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. FASEB J 1991;5:2516-22.
- 6) Yoshida R, Hayaishi O. Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharide. Proc Natl Acad Sci U S A 1978;75:3998-4000.
- 7) Bianchi M, Bertini R, Ghezzi P. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon in mice: A study with different recombinant interferons and various cytokines. Biochem Biophys Res Commun 1988;152:237-42.
- 8) Munn DH, Zhou M, Attwood JT, et al. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. Science 1998;281:1191-3.
- 9) Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, et al. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. J Exp Med 1999;189:1363-72.
- 10) Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? Immunol Today 1999;20:469-73.
- 11) Li Y, Tredget EE, Kilani RT, et al. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in dermal fibroblasts functions as a local immunosuppressive factor. J Invest Dermatol 2004;122:953-64.
- 12) Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, et al. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. Nat Med 2003;9:

- 1269-74.
- 13) Mellor AL, Keskin DB, Johnson T, et al. Cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase inhibit T cell responses. *J Immunol* 2002;168:3771-6.
- 14) Friberg M, Jennings R, Alsarraj M, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase contributes to tumor cell evasion of T cell-mediated rejection. *Int J Cancer* 2002;101:151-5.
- 15) Koizumi N, Fullwood NJ, Bairaktaris G, et al. Cultivation of corneal epithelial cells on intact and denuded human amniotic membrane. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:2506-13.
- 16) Larkin DFP, Beutelspacher SC, George AJT. Expression and function of indoleamine 2,3-dioxygenase in murine cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci (ARVO E-Abstract)* 2005;46:3587.
- 17) Lee GK, Park HJ, Macleod M, et al. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* 2002;107:452-60.
- 18) Morita T, Saito K, Takemura M, et al. 3-hydroxyanthranilic acid, an L-tryptophan metabolite, induces apoptosis in monocyte-derived cells stimulated by interferon-gamma. *Ann Clin Biochem* 2001;38:242-51.

=ABSTRACT=

Expression of Local Immunosuppressive Factor, Indoleamine 2,3-dioxygenase, in Human Corneal Cells

Yang Hwan Ryu, M.S., Jae Chan Kim, M.D., Ph.D.

Department of Ophthalmology, College of Medicine, Chung-Ang University, Seoul, Korea

Purpose: To identify the localization of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) in human corneal cells and to evaluate its ability to act as a local immunosuppressive factor.

Methods: The expression profile of IDO was obtained with RT-PCR and Western blot of in a primary culture of human corneal cells (fibroblasts, epithelial cells and endothelial cells). In order to investigate the immunosuppressive function of IDO, immune cells were cultured in a human corneal cell-conditioned medium, and their proliferation was identified by the MTT assay. Moreover, apoptotic effects of IDO in immune cells treated with IFN- γ were also investigated with apoptosis ELISA.

Results: Among the three different types of human corneal cells analyzed, mRNA and protein expression of IDO was observed only in human corneal fibroblasts. Immune cells cultured in a human corneal fibroblast-conditioned medium showed inhibited proliferation. Moreover, IFN- γ -induced expression of IDO significantly enhanced apoptotic ability in a dose-dependant manner.

Conclusions: Our results suggest that human corneal fibroblasts are relatively immuno-resistant and that expression of IDO may be one of the factors involved in the immune tolerance observed in corneal grafts.

J Korean Ophthalmol Soc 48(8):1126-1133, 2007

Key Words: Indoleamine 2,3-dioxygenase, Corneal fibroblasts, Immune privilege

Address reprint requests to **Jae Chan Kim, M.D.**

Department of Ophthalmology Chung-ang University Yongsan Hospital
#65-207 Hangangro 3-ga, Yongsan-gu, Seoul 140-757, Korea
Tel: 82-2-748-9838, Fax: 82-2-792-6295, E-mail: jck50ey@kornet.net