

기관지천식의 마우스모델에서 CPG-oligodeoxynucleotides의 기도의 만성염증 및 기도재구성에 대한 영향

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실, ¹성빈센트병원 임상의학연구소

송소향, 김치홍, 한동화¹, 김승준, 문화식, 송정섭, 박성학

Effects of CPG-oligodeoxynucleotides in Chronic Inflammation and Remodeling of Airway in a Murine Model of Bronchial Asthma

So Hyang Song, M.D., Chi Hong Kim, M.D., Dong Hwa Han¹, Seung Joon Kim, M.D., Hwa Sik Moon, M.D., Jeong Sup Song, M.D., Sung Hak Park, M.D.

Department of Internal Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea, ¹Research Institute of Medical Science, St. Vincent Hospital, Suwon, Korea

Background : Airway remodeling of the asthmatic airway, the result of persistent inflammation in the bronchial wall, is associated with irreversible airway obstruction and the severity of asthma. Previous reports had represented that administering CpG-oligodeoxynucleotides (CpG-ODN) before sensitization or challenge by allergens inhibits the development of eosinophilic airway inflammation in a murine model of asthma, but the effects of CpG-ODNs on chronic inflammation and airway remodeling had not been characterized. To investigate the influence of CpG-ODNs on chronic inflammation and remodeling of the airway, we performed studies using a murine model of chronic allergen-induced asthma.

Methods : Balb/C mice were sensitized to ovalbumin(OVA) and subsequently exposed to nebulized OVA by means of inhalation twice weekly for 7 weeks. CpG-ODNs(30 µg) was administered intraperitoneally at sensitization. After final inhalation, mice were evaluated for airway hyperresponsiveness, chronic airway inflammation and remodeling.

Results : The mice exposed to chronic and recurrent airway challenge with OVA had persistent airway hyperresponsiveness, chronic inflammation and airway remodeling. Mice treated with CpG-ODNs exhibited decreased bronchial hyperresponsiveness, OVA-specific IgE, chronic inflammation and evidence of airway remodeling, including goblet cell hyperplasia and subepithelial fibrosis.

Conclusion : CpG-ODNs was thought to prevent chronic inflammation and remodeling changes in a murine model of chronic asthma. (*Tuberc Respir Dis* 2004; 57:543-552)

Key words : CpG-oligodeoxynucleotides, airway remodeling, murine model of asthma

서론

기관지천식은 다양한 유발인자에 대한 기관지 과민성, 기도의 만성염증 및 가역적 기도폐쇄를 특징으로 한다. 그러나 기관지천식에서 기도수축은 완전히 가역적이지만은 않아서, 천식 유발기간 및 중

증도에 따라 비가역적인 기도폐쇄로 진행할 수도 있다. 이는 기관지의 만성 염증의 결과인 기도재구성 때문이며, 기도재구성이 일어나면 상피세포의 탈락, 기저막 두께의 비후, 기저막하부의 섬유화, 배상세포 과형성 및 이형성, 기도평활근 및 점액선의 증식 등의 병리학적인 소견을 보이고¹⁻⁴. 기도의 신전성(distensibility)이 소실되고, 항원에 대한 노출을 제거하여도 기도과민성이 지속되는 등의 기능적인 변화가 생긴다⁵. 그러므로, 기도재구성은 천식환자에서 기도과민성의 정도 및 천식 발작의 빈도 등의 천식의 중증도를 반영하는 중요한 조직학적 변화이다⁶.

기관지천식의 최근 치료지침은 항염증치료를 강조하고 있다. 스테로이드가 아직도 제일 중요한 치료제이며, 류코트리엔 길항제는 십여년전부터 임상에서

본 연구는 2003년 성빈센트병원 임상의학연구소 연구비 지원에 의해 이루어졌음.

Address for correspondence : **Chi Hong Kim, M.D.**

Department of Internal Medicine, St. Vincent's Hospital, The Catholic University of Korea
93 Chi-dong, Paldal-ku, Suwon, 442-723, Korea
Phone : 031-249-7361 Fax : 031-253-8898

E-mail : chihongk@yahoo.co.kr

Received : Jun. 30. 2004

Accepted : Oct. 12. 2004

새로운 치료제로 사용되고 있으나 환자의 삼분의 일에서만 현저한 효과를 보이고 있다. 그러나, 이런 치료제들이 천식환자의 기도재구성을 억제할 수 있는지는 명확히 알려지지 않았다. 베타2 항진제의 장기간 투여도 기도재구성을 억제하지 못하는 것으로 알려져 있고⁷, 스테로이드는 오히려 콜라겐의 합성을 증가시킬 수 있다는 보고도 있다⁸. 그리고, 만성 지속성 천식환자에서 몇 년간의 스테로이드 치료에도 불구하고 기도과민성이 정상화되는 천식환자는 드물다. 그래서, 면역치료가 기도과민성을 막을 수 있는지, 기도재구성을 막을 수 있는지에 대한 관심이 높아지고 있다.

면역요법 중에서 기존의 탈감작요법은 몇몇 알레르겐에 의한 아토피성 기관지 천식환자에게만 제한적으로 시행되며, 아나필락시스와 같은 심각한 부작용이 있을 수 있다는 문제점이 있어서, 새로운 면역치료법 등이 개발되고 있다. 특히, 알레르기 염증에서 핵심적인 역할을 담당하는 T 세포의 기능 이상을 조절하고자 하는 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 기존의 BCG면역요법, DNA 및 peptide 면역요법, oligodeoxynucleotides 치료 등 특이적인 치료법이 개발되고 있다⁹. 이 중에서 면역증강성 CpG-oligodeoxynucleotides (CpG-ODN)는 CpG motifs를 포함하는 합성 올리고뉴클레오티드로서 동물천식모델에 투여할 경우 T_H형의 면역반응이 항진되고, T_H2형 반응은 억제되어 천식의 특징적인 기도과민성이나 호산구성 염증 등이 호전되는 것으로 알려져 있다¹⁰⁻¹². 즉, CpG-ODNs은 T_H면역반응을 유도하여, 알레르기 천식에서의 T_H1/T_H2 불균형을 조절할 수 있는 DNA vaccine으로서, 항원에 의한 급성 염증반응을 효과적으로 억제할 수 있다는 보고가 있다. 만성천식 모델에서 만성 기관지 염증 및 기도재구성에 대한 CpG-ODNs의 영향에 대한 연구보고는 많지 않다.

본 연구에서는 만성천식환자에서 CpG-ODN의 투여가 만성염증 및 기도재구성을 억제할 수 있는지 알아보기 위해서, 항원에 반복적인 폭로 후에 기도재구성이 일어난 만성 천식 마우스모델을 사용하여 CpG-ODNs의 기도재구성에 대한 영향을 알아보려 하였다.

대상 및 방법

1. 실험동물 및 만성천식 마우스모델

6주된 암컷 BALB/c 마우스를 연구 제1일과 14일 항원 ovalbumin(grade V; Sigma, St. Louis, MO) 100 µg과 면역보강제 aluminum hydroxide(Aldrich, Milwaukee, WI) 500 µg을 복강내 주사하여 감작시켰고, 21일째부터 7주동안 1주당 2회씩, 30분동안 1% ovalbumin 용액으로 30분간 연무기(nebulizer)로 흡입시켜 만성기관지천식을 유발한 후, 다음과 같이 군별로 마우스를 나누었다. 1군(대조군)은 ovalbumin대신 동량의 PBS를 제1일 및 14일에 복강내 주사하였고, 연무기로 PBS를 흡입시켰다. 2군(OVA군)은 ovalbumin 100 µg을 제1일 및 14일에 복강내 주사하였고, 7주간 1% ovalbumin을 흡입시켰다. 3군(CpG-ODN군)은 제1일 및 14일에 ovalbumin 100 µg을 복강내에 주사시에 CpG-ODN 30 µg을 같이 주사하였고 7주간 1% ovalbumin을 흡입시켰다. 마지막 ovalbumin 흡입후 24시간 내에 기도저항을 측정하였고, 희생시킨후 기관지폐포세척술을 시행하고 병리 조직학적 연구를 위해 폐조직을 처리하였다(Fig. 1).

2. CpG-ODN의 합성 및 투여

CpG-ODN은 2-CpG motifs(TCCATGACGGTT-CCTGACGTT)를 Bionner사에 의뢰하여 합성하였고,

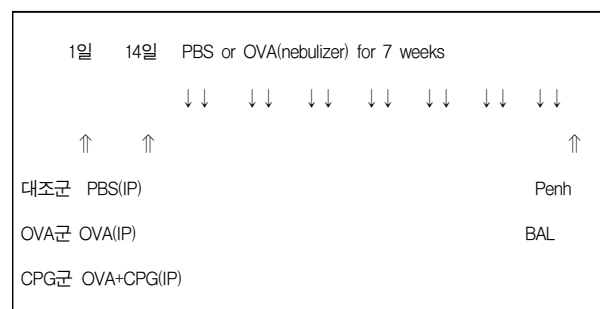


Figure 1. Schematic representation of systemic sensitization and provocation protocol in each group of mouse asthma model.

IP: intraperitoneal injection

OVA: ovalbumin

CpG: CpG-oligodeoxynucleotide

3군(CpG-ODN군)에서 ovalbumin 감작시에 CpG-ODN 30 µg을 같이 복강내 주사하였다.

3. 기도과민성의 측정

기도과민성은 methacholine 유발성 기도수축으로 측정하였다. 각 군별로 마지막 ovalbumin 흡입 24시간 후 기도저항측정기(Almedicus, An Yang, Korea)를 이용해 기도과민성(기도저항, Penh)을 측정하였다. 마우스를 체적기록상자(plethysmography box)에 넣어서 pressure transducer를 사용하여 tidal volume, respiratory rate, enhanced pause(Penh, 기도저항) 등을 측정하였다. 기도과민성 여부를 보기 위해 메타콜린을 이용하였는데, 0 mg/ml, 12.5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml을 농도를 증량하여 3분씩 연무기로 흡입시킨 후 각 3분간 기도저항을 측정하였다.

4. 기관지폐포세척

각 군별로 기도저항을 측정한 후 희생시켜 바로 개흉하였다. 좌측 기관지는 실로 묶고 22게이지 주사바늘을 기관에 삽입하고 우측 폐에서 BAL을 시행하였는데, 0.4 ml의 PBS를 주입하고 흡인하기를 3회 반복하여 모았다. 기관지 폐포세척액을 4°C, 2000 rpm에서 7분간 원심분리 하였고, 상층액은 -70°C에 보관하였다. 세포침전물은 hemocytometer로 총세포수를 세고, 일부는 cytocentrifuge하여 slide를 만든 후 Diff-Quik으로 염색하고 100 배시야에서 최소한 300개의 세포를 세어 폐포대식세포, 호산구, 림프구, 호중구를 감별 계산하였다.

5. 혈청 총 IgE 및 OVA specific IgE의 측정

각 군에서 채취한 혈청으로 총 IgE 및 OVA specific IgE(Pharmigen, San Diego, CA)를 ELISA로 측정하였다. OVA specific IgE 측정시 biotinylated rat-anti-mouse IgE를 detection antibody로 사용하였다. ovalbumin의 농도를 100 µg/mL로 희석하여 96-well plate에 well당 100 µl씩 분주하였으며 이에 결합하는 특이항체를 405 nm에서 측정하였다.

6. 조직학적 관찰

BAL을 시행하지 않은 폐를 떼어내어 즉시 4% paraformaldehyde에 고정시킨후 조직절편을 만들었다. paraffin block을 만들어 H-E염색을 하였고, 배상세포 염색을 위해 periodic acid-Schiff(PAS 염색) 염색을 하였고 배상세포의 증식 정도는 기저막 둘레의 길이 100 µm에서 PAS 양성인 세포의 수를 세어서 비교하였다. 기저막 둘레의 길이를 기준으로 크기가 유사하고 비교적 원형모양을 띄는 기관지 3개에서 배상세포의 수를 세어서, 기저막 둘레의 길이 100 µm당 배상세포수의 평균을 계산하였다.

기관지하부의 섬유화 정도를 보기 위해 Masson's trichrome 염색을 시행하여 기저막하부에 섬유화로 염색되는 부위의 면적을 측정하였다. 모든 기관지는 기저막 둘레의 길이를 기준으로 크기가 유사하고 비교적 원형모양을 띄는 3개를 정해 평균값을 계산하였으며, 기저막 둘레의 길이 100 µm당 섬유화염색부위의 면적을 계산하였고, 모든 측정은 computerized image analyzer 프로그램을 이용하였다.

7. 통 계

모든 변수는 평균±표준오차로 나타났다. 각 변수간의 통계적 검정은 SPSS 프로그램을 이용하였으며, 각 군 간의 평균 비교는 independent sample T-test로 하였다.

결 과

1. 기관지 폐포세척액의 염증세포

기관지폐포세척액내 전체세포수는 대조군($15.5 \pm 4.9 \times 10^4/\text{ml}$)과 비교해서 OVA군($32.3 \pm 15.2 \times 10^4/\text{ml}$) 및 CpG-ODN군($24.8 \pm 16.9 \times 10^4/\text{ml}$)이 통계적으로 유의하게 높았다($P < 0.01$). 대식세포는 대조군($13.8 \pm 4.6 \times 10^4/\text{ml}$)과 비교해서 OVA군($18.4 \pm 10.8 \times 10^4/\text{ml}$) 및 CpG-ODN군($19.6 \pm 14.0 \times 10^4/\text{ml}$)이 통계적으로 유의하게 높았으며($P < 0.01$), 호산구는 대조군($0.0 \pm 0.0 \times$

Table 1. Total cell count and differential cell count in bronchoalveolar lavage fluid

	Control	OVA	CpG-ODN
Total cells	15.5 ± 4.9	32.3 ± 15.2*	24.8 ± 16.9*
Macrophages	13.8 ± 4.6	18.4 ± 10.8*	19.6 ± 14.0*
Eosinophils	0.0 ± 0.0	9.7 ± 5.8*†	0.9 ± 0.8*
Lymphocytes	0.8 ± 0.4	1.5 ± 0.9*	1.8 ± 1.2*
Neutrophils	0.8 ± 0.5	3.5 ± 3.0*	2.5 ± 2.2*

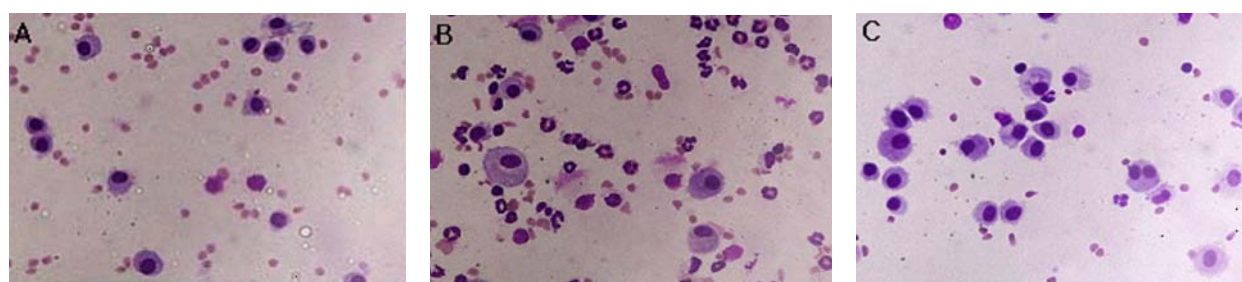
Unit: cells in BALF(10^4 /ml)* $P < 0.01$ significant difference vs control.† $P < 0.01$ significant difference between OVA group and CpG-ODN group.

Figure 2. Microphotographs of Diff-Quik stain of bronchoalveolar lavage cells in each group of mouse asthma model($\times 100$). (A) control group, (B) OVA group and (C) CpG-ODN group. Compared with control group, OVA group showed increased inflammatory cells including eosinophils, lymphocytes and neutrophils. Compared with OVA group, CpG-ODN group showed decreased eosinophils.

10^4 /ml)과 비교해서 OVA군($9.7 \pm 5.8 \times 10^4$ /ml)은 통계적으로 유의하게 증가되었고($P < 0.01$), CpG-ODN군($0.9 \pm 0.8 \times 10^4$ /ml)은 OVA군($9.7 \pm 5.8 \times 10^4$ /ml)에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였다($P < 0.01$). 림프구는 대조군($0.8 \pm 0.4 \times 10^4$ /ml)과 비교해서 OVA군($1.5 \pm 0.9 \times 10^4$ /ml) 및 CpG-ODN군($1.8 \pm 1.3 \times 10^4$ /ml)이 통계적으로 유의하게 높았으며($P < 0.01$), 호중구도 대조군($0.8 \pm 0.5 \times 10^4$ /ml)과 비교해서 OVA군($3.5 \pm 3.0 \times 10^4$ /ml) 및 CpG-ODN군($2.5 \pm 2.2 \times 10^4$ /ml)이 통계적으로 유의하게 높았다($P < 0.01$). 기관지폐포 세척액의 호산구는 대조군에 비해 OVA군에서 유의하게 증가하였고, CpG-ODN 치료군에서 유의하게 감소하였다(Table 1, Fig. 2).

2. 기도과민성

기도과민성은 대조군에 비해서 OVA군에서 유의하게 증가되었고($P < 0.01$), CpG-ODN군은 대조군에 비해 유의하게 증가하였으나($P < 0.01$), OVA군에 비해서 유의하게 감소하였다($P < 0.01$). OVA군은 대조군에 비해 모든 농도에서 기도과민성(Penh)이 유의하게

증가하였고($P < 0.01$), CpG-ODN군도 대조군에 비해 100 mg/ml의 농도를 제외하고 다른 농도에서 기도과민성(Penh)이 유의하게 증가하였다($P < 0.01$). OVA군에 비해 CpG-ODN 치료군은 기도과민성(Penh)이 50 mg/ml를 제외한 농도에서 모두 유의하게 감소한 소견

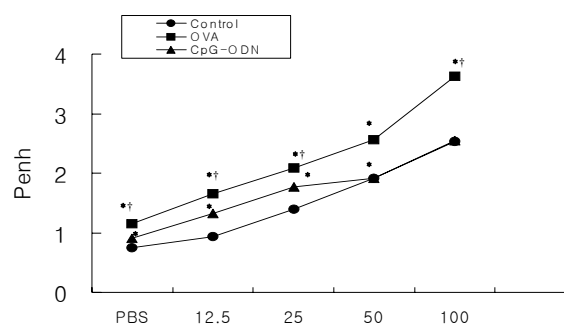


Figure 3. Airway hyperresponsiveness to methacholine in each group of asthma. CpG-ODN prevent non-specific airway hyperresponsiveness. Repeated inhalation of OVA in sensitized mice leads to induction of significant bronchial hyperresponsiveness, which is significantly reduced in mice treated with CpG-ODNs at the time of sensitization. * $P < 0.01$ significant difference vs control group. † $P < 0.01$ significant difference between OVA group and CpG-ODN group.

을 보였다($P < 0.01$). 50 mg/ml에서도 유의하지는 않았으나 OVA군에 비해 CpG-ODN군의 기도과민성(Penh)이 감소된 소견을 보였다(Fig.3).

3. 혈청 총 IgE

혈청 총 IgE는 대조군($0.23 \pm 0.18 \mu\text{g/ml}$)에 비해서 OVA군($1.16 \pm 0.39 \mu\text{g/ml}$)이 통계적으로 유의하게 높았다($P < 0.01$). OVA군에 비해 CpG-ODN($0.21 \pm 0.11 \mu\text{g/ml}$) 치료군은 혈청 총 IgE가 유의하게($P < 0.01$) 감소한 소견을 보였다(Fig. 4 A).

4. 혈청 OVA specific IgE

OVA specific IgE는 OVA군(1.7 ± 0.6 OD units)은

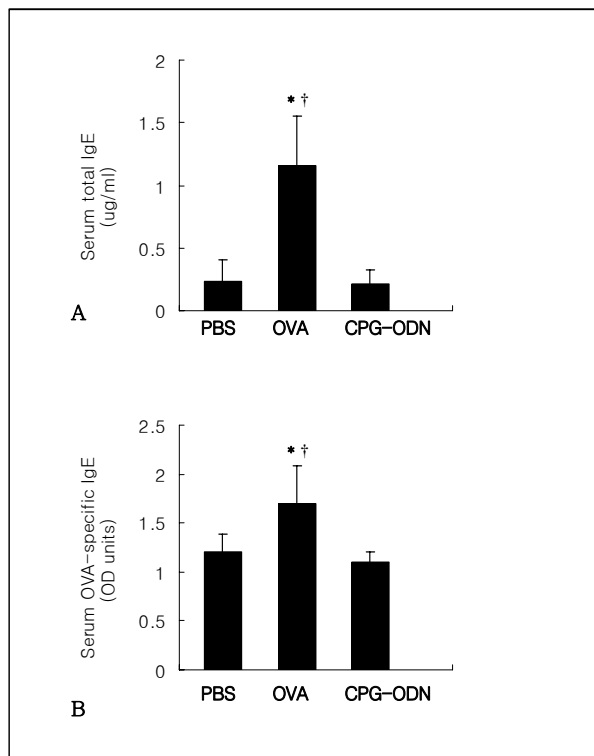


Figure 4. Changes of serum total IgE and OVA-specific IgE in each group do murine asthma group. Repeated inhalation of OVA in sensitized mice leads to induction of significant serum total IgE (A) and OVA specific IgE (B), all of which are significantly reduced in mice treated with CpG-ODNs at the time sensitization. * $P < 0.01$ significant difference vs control group. † $P < 0.01$ significant difference between OVA group and CpG-ODN group.

대조군(1.2 ± 0.4 OD units)에 비해 유의하게 높았고 ($P < 0.01$), CpG-ODN 치료군(1.1 ± 0.5 OD units)은 OVA 군에 비해 유의하게($P < 0.01$) 감소된 소견을 보였다(Fig. 4 B).

5. 배상세포의 증식정도

폐조직을 PAS 염색한 후 측정된 기관지 기저막의 둘레의 길이는 대조군, OVA군, CpG-ODN군이 각각 1.08 ± 0.36 mm, 1.02 ± 0.26 mm, 1.09 ± 0.39 mm로 각 군간의 차이는 없었다($P > 0.05$). 배상세포의 증식 정도는 대조군($1.10 \pm 0.53/100 \mu\text{m}$ of basement membrane)에 비해 OVA군($15.56 \pm 7.88/100 \mu\text{m}$ of basement membrane)이 유의하게 증가되었고($P < 0.01$), CpG-ODN군 ($2.64 \pm 4.68/100 \mu\text{m}$ of basement membrane)은 유의하게 감소된($P < 0.01$) 소견을 보였다(Fig. 5, Fig. 6).

6. 기저막 하부의 섬유화 정도

폐조직의 Masson's trichrome 염색에서 원형의 기관지 기저막의 둘레의 길이를 측정하였고, 기저막 하부에 섬유화로 염색되는 부위의 면적을 측정하였는데, 기저막 둘레의 길이 100 μm 당 평균 기저막 하부

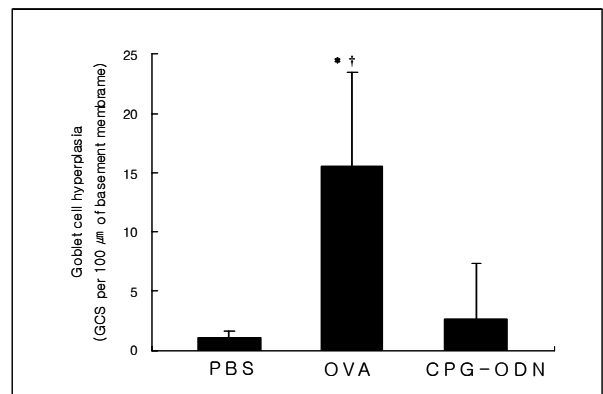


Figure 5. Changes of Goblet cell hyperplasia in each group of murine asthma model. Repeated inhalation of OVA in sensitized mice leads to induction of significant Goblet cell hyperplasia, which is significantly reduced in mice treated with CpG-ODNs at the time sensitization. * $P < 0.01$ significant difference vs control. † $P < 0.01$ significant difference vs CPG-ODN.

섬유화 면적은 대조군($1040 \pm 642 \mu\text{m}^2/100 \mu\text{m}$ of basement membrane)에 비해 OVA군($2291 \pm 802 \mu\text{m}^2/100 \mu\text{m}$ of basement membrane)이 유의하게 증가되었고($P<0.01$), CpG-ODN군($1162 \pm 589 \mu\text{m}^2/100 \mu\text{m}$ of basement membrane)은 OVA군에 비해 유의하게 증가된($P<0.01$) 소견을 보였다(Fig. 6, Fig. 7).

고 찰

본 연구에서 만성천식 마우스모델에서 ovalbumin 감작시에 CpG-ODN을 투여하였더니 기관지폐포세척액에서 호산구 등의 염증세포들이 감소하였으며, 기도과민성도 감소하였고, 혈청 IgE 및 OVA specific

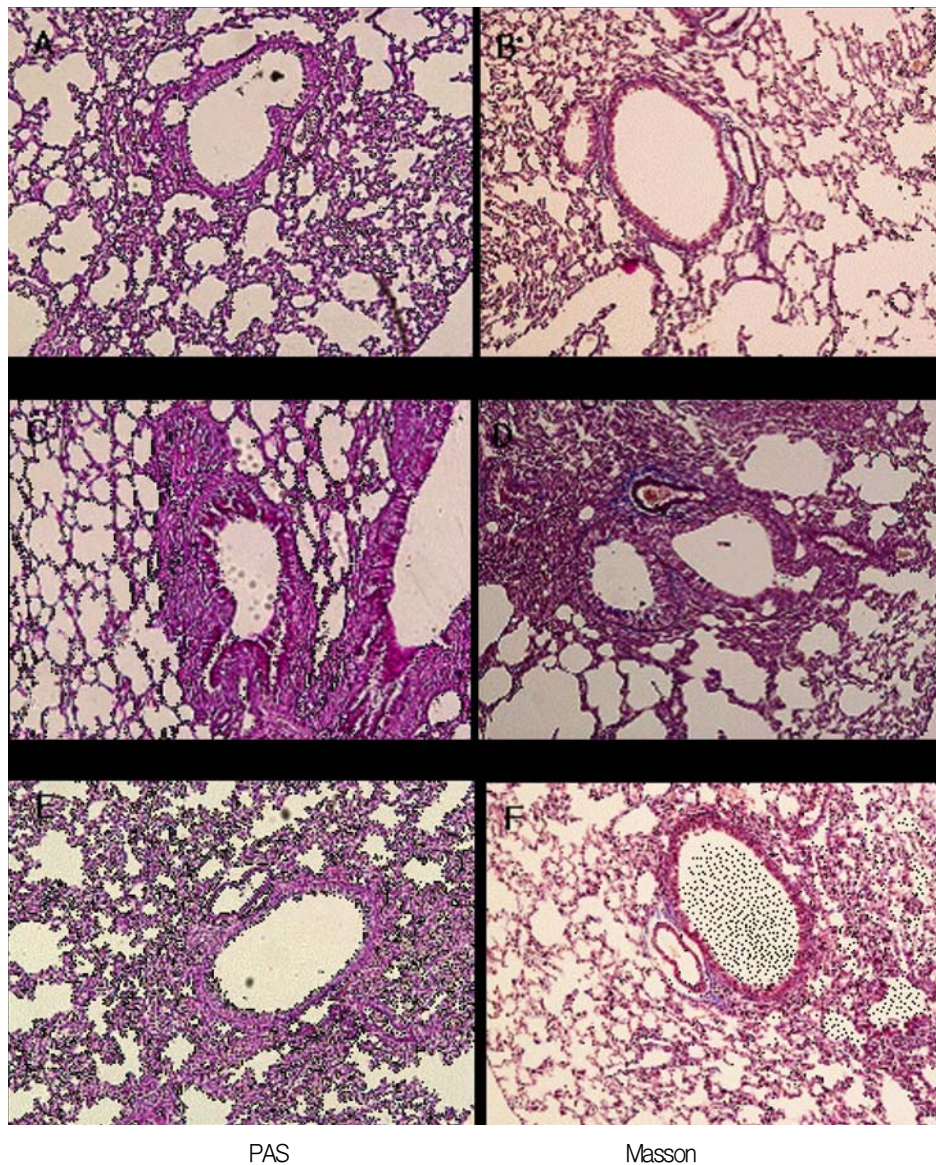


Figure 6. CpG-ODN prevent peribronchial inflammation, mouse asthma model. Compared with control group(A, B), OVA group showed significant chronic peribronchial inflammation and goblet cell hyperplasia(C, D). Compared with CpG-ODNs at the time of sensitization showed

PAS: PAS staining (x100)

MT: Masson Trichrome staining(x100)

goblet cell hyperplasia and subepithelial fibrosis in a group showed significant chronic peribronchial inflammation and goblet cell hyperplasia. Compared with OVA group, CpG-ODN group(E, F) which treated

significantly decreased peribronchial infiltration, goblet cell

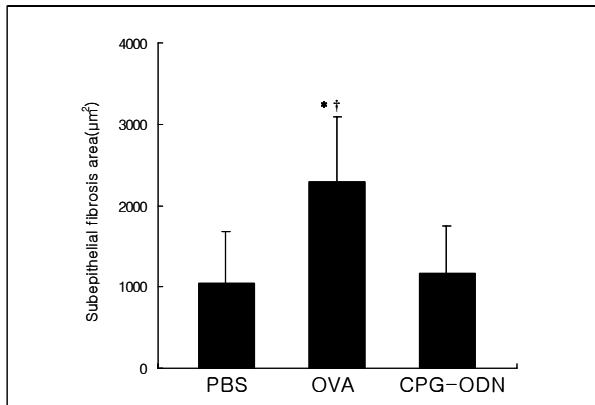


Figure 7. Changes of subepithelial fibrosis area in each group of murine asthma model. Repeated inhalation of OVA in sensitized mice leads to induction of significant subepithelial fibrosis, which are significantly reduced in mice treated with CpG-ODNs at the time sensitization. * $P < 0.01$ significant difference vs control. † $P < 0.01$ significant difference vs CpG-ODN.

IgE도 유의하게 감소하였다. 또한 CpG-ODN의 투여로 배상세포의 증식이 억제되었고 기저막하부의 섬유화도 억제되었다. 이와 같이 CpG-ODN은 급성 천식의 염증지표들을 억제시켰을 뿐만 아니라, 기저막 하부의 섬유화나 배상세포의 증식 등 만성천식의 기도재구성도 억제시킬 수 있음을 확인하였다.

기도재구성은 기저막 하부의 섬유화, 배상세포 과형성 및 이형성, 기도평활근 및 점액선의 증식 등의 병리학적인 소견을 나타낸다. Telmelkovski 등¹³에 의하면 만성천식 마우스모델에서 항원 자극 후 4-6주후에 기저막하부의 섬유화가 나타나기 시작한다고 하였다. 본 연구에서 ovalbumin 감작 후에 7주 동안 ovalbumin을 흡입시켰을 때 대조군에 비해 기저막하부의 섬유화가 진행된 소견을 보였다. CpG-ODN을 투여시에 기저막하 섬유화가 감소되었고 기도과민성의 감소와 관련이 있었다. 또한 만성 천식에서는 상피세포의 변화도 나타나는데, 배상세포의 증식은 점액의 과형성과 관련이 있다. 급성천식모델에서 CpG-ODN이 배상세포의 증식을 억제한다는 보고들이 있으며^{14,15}, 본 연구에서도 CpG-ODN 투여시에 현저히 배상세포의 증식이 억제되었다.

본 연구에서 CpG-ODN을 투여한 후 7주동안 항원을 흡입시켰으므로, CpG-ODN의 기도의 구조적인 변화 및 만성 기관지과민성에 대한 효과가 최소 7주 이

상 지속되었음을 의미하며, 이는 CpG-ODN이 기도호산구 증가 및 T_H cytokine들에 대한 지속적인 억제 효과가 있음을 보고했던 연구¹⁶와 일치되는 소견이다.

CpG-ODN이 천식 마우스모델에서 급성염증을 억제시킬 수 있다는 보고는 많이 있었지만^{14,17-19}, CpG-ODN이 만성천식 마우스모델에서 기도 재구성을 억제할 수 있다는 보고는 별로 많지 않으며, 본 연구에서 CpG-ODN은 만성 염증 및 기도재구성을 억제하는데 효과가 있음을 확인하였다.

천식에서 기도수축은 비가역적일 수 있고, 기도재구성과 같은 구조적인 변화와 관련이 깊다. 이런 구조적인 변화는 천식의 중증도와 관련이 깊다. 이런 구조적 변화를 예방할 수 있다면 비가역적인 기도 수축을 감소시킬 수 있을 것이다. 즉, 기관지천식의 병리단계 초기에 기도재구성을 억제할 수 있는 치료전략이 있다면 천식 치료의 수준이 한 단계 높아질 것으로 생각된다. 하지만 현재까지의 치료방법으로는 기도재구성을 완전히 예방할 수는 없다.

CpG-ODN은 CpG-motifs를 포함하는 합성 oligodeoxynucleotides로서 항원, 병원성 바이러스, 종양 등에 대해서 세포성 및 체액성 면역반응을 유발하는 DNA 서열이며, 이들 DNA 서열의 면역 자극효과의 대부분은 메틸화되지 않은 cytosine과 guanine이 포함된 핵산 서열(unmethylated CpG dinucleotide sequences), 즉 CpG-motifs로부터 기인하는 것으로 알려져 있다. 비메틸화된 CpG-motifs는 세균의 DNA에서 흔하고, 포유류의 DNA에는 없는 염기서열로 강한 T_H 형 면역반응을 일으키는 것으로 알려져 있고¹⁹⁻²³, 동물천식 모델에 투여할 경우 T_H 형의 면역반응이 항진되고, T_H 형 반응은 억제되는 것으로 알려져 있다. CpG-ODN이 T_H 형의 면역반응을 유도하는 기전은 대식세포나 수지상 세포에서 IL-12와 IL-18을 활성화시키고 분비시키며^{24,25}, 이들 cytokine들은 natural killer cell이나 T 림프구에 의한 IFN γ 생산을 촉진시킨다²⁶. 또한, CpG-ODN은 미숙한 dendritic cell을 antigen-presenting cell로 성숙시켜 T 림프구를 활성화시키며, B cell을 증식시켜²⁷ IgG2a나 IgA 등을 생산한다²⁸. IL-12는 T 림프구를 T_H effector cell로 성숙시켜서 호산구의 동원을 억제하고, IgE를 감소시키며, IFN γ

는 폐의 호산구성 염증을 억제한다. IgE는 mast cell이나 basophils의 표면에 cross-link하여 중요한 염증 매개 물질들을 분비하여 알레르기 염증반응에 관여한다. CpG-ODN은 B cell에 의한 IgE의 생산을 억제할 수 있다고 보고 되어 있다²⁹. 본 연구에서도 만성천식 마우스모델에서 CpG-ODN 투여군은 혈청 IgE 및 OVA specific IgE가 감소된 소견을 보였다.

CpG-ODN 투여 후 CpG-ODN에 대한 부적절한 면역반응 또는 과도한 면역반응에 따른 부작용이 발생할 수 있다. 가능한 부작용으로 투여장소에 발생할 수 있는 염증반응, TNF- α 등의 생성에 의한 폐혈증³⁰, 비장비대³¹, 자가면역질환의 발생³² 등이 우려되고 있으나, 현재까지 CpG-ODN 단독투여시 anaphylaxis나 자가면역질환이 발생한 보고는 없었으며, 기관지천식 치료에 사용되는 용량으로는 큰 부작용 없이 안전하게 사용될 수 있으리라 기대된다. 그러므로 cytokine 치료 등 다른 치료에 비해 안전성, 비용 및 장기지속력 등 모든 분야에서 우월한 치료법이 될 수 있을 것으로 전망된다.

만성 천식마우스모델에서 ovalbumin 감작시에 CpG-ODN을 투여하였더니 기도과민성, 만성기도염증 및 기도재구성이 억제되었음을 확인하였으므로, 향후 기관지천식에서 CpG-ODN은 임상에서 효과가 기대되는 면역조절요법이며, CpG-ODN의 부작용을 줄이는 방법의 개발과 임상연구가 필요하다고 생각된다.

요 약

연구배경 :

급성천식 동물모델에 투여할 경우 특징적인 기도과민성이나 호산구성 염증 등이 호전되는 것으로 알려져 있으나, 만성천식 모델에서 기도의 만성염증 및 기도재구성을 억제할 수 있다는 연구는 많지 않다. CpG-ODN이 기도의 만성염증 및 기도재구성을 예방할 수 있는 지 알기위하여, 만성천식 마우스모델에서 CpG-ODN의 기도의 만성염증 및 기도재구성에 대한 영향을 연구하고자 하였다.

방 법 :

BALB/C 마우스를 ovalbumin으로 감작시킨 뒤 7주

간 만성적인 자극을 주어 만성 천식모델을 만들고, CpG-ODN은 감작시에 복강내에 주사하였다. 7주후 기도저항(기도과민성)의 측정, 혈청 IgE의 측정, 기관지 폐포세척액에서 염증세포분획을 검사하였고, 폐조직검사로 염증세포의 침윤 및 기저막하부의 섬유화의 정도를 관찰하였고, OVA군과 CpG-ODN군과 비교하였다.

결 과 :

1) 기관지폐포세척액내 호산구는 CpG-ODN군은 OVA군에 비해 통계적으로 유의하게 감소하였다(0.9 ± 0.8 ; $9.7 \pm 5.8 \times 10^4/\text{ml}$, $P < 0.01$).

2) 기도과민성은 CpG-ODN군은 OVA군에 비해서 기도과민성(Penh)이 50 mg/ml를 제외한 농도에서 모두 유의하게 감소한 소견을 보였다($P < 0.01$).

3) 혈청 총 IgE는 CpG-ODN군이 OVA군에 비해 감소한 소견을 보였고(0.21 ± 0.11 ; $1.16 \pm 0.39 \mu\text{g/ml}$, $P < 0.01$), 혈청 OVA specific IgE도 CpG-ODN군이 OVA군에 비해 감소한 소견을 보였다(1.1 ± 0.5 ; $1.7 \pm 0.6 \text{ OD units}$, $P < 0.01$).

4) 배상세포의 증식정도는 CpG-ODN군은 OVA군에 감소된($P < 0.01$) 소견을 보였다.

5) 기저막하부의 섬유화의 정도는 CpG-ODN군이 OVA군에 비해서 유의하게 감소된($P < 0.01$) 소견을 보였다.

결 론 :

CpG-ODN은 기도의 급성염증 및 기도과민성을 억제할 뿐만 아니라 만성천식 마우스모델에서 기도의 만성염증 및 기도재구성을 억제시킴을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구에 많은 도움을 주신 성빈센트병원 임상의학연구소 한동화 선생님께 깊은 감사를 드립니다.

참 고 문 헌

1. Roche WR, Beasley R, Williams JH, Holgate ST. Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. Lancet 1989;1:520-4.

2. Aikawa T, Shimura S, Sasaki H, Ebina M, Takishima T. Marked goblet cell hyperplasia with mucus accumulation in the airways of patients who died of severe acute asthma attack. *Chest* 1992;101: 916-21.
3. Bousquet J, Chanez P, Lacoste JY, White R, Vic P, Godard P, et al. Asthma: a disease remodeling the airways. *Allergy* 1992;47:3-11.
4. Redington AE, Howarth PH. Airway wall remodeling in asthma. *Thorax* 1997;52:310-2.
5. Wilson JW, Li X, Pain MC. The lack of distensibility of asthmatic airways. *Am Rev Respir Dis* 1993;148: 806-9.
6. Boulet LP, Laviolette M, Turcotte H, Cartier A, Dugas M, Malo JL, et al. Bronchial subepithelial fibrosis correlates with airway responsiveness to methacholine. *Chest* 1997;112:45-52.
7. Jeffery PK, Goldfrey RW, Adelroth E, Nelson F, Rogers A, Johansson SA. Effects of treatment on airway inflammation and thickening of basement membrane reticular collagen in asthma. A quantitative light and electron microscopic study. *Am Rev Respir Dis* 1992;145:890-9.
8. Warshamana GS, Martinez S, Lasky JA, Corti M, Brody AR. Dexamethasone activates expression of the PDGF- α receptor and induces lung fibroblast proliferation. *Am J Physiol* 1998;274:499-507.
9. Wohlleben G, Erb KJ. Atopic disorders: a vaccine around the corner? *Trends Immunol* 2001;22:618-26.
10. Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 1997;186:1623-31.
11. Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga TR, Lemish JE, Weinstock JV, Thorne PS, et al. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* 1998;160: 2555-9.
12. Tanaka H, Masuda T, Tokunaga S, Komai M, Nagao K, Takahashi Y, et al. The effect of allergen-induced airway inflammation on airway remodelling in a murine model of allergic asthma. *Inflamm Res* 2001; 50:616-24.
13. Temelkovski J, Hogan SP, Shepherd DP, Foster PS, Kumar RK. An improved murine model of asthma: selective airway inflammation, epithelial lesions and increased methacholine responsiveness following chronic exposure to aerosolised allergen. *Thorax* 1998;53:849-56.
14. Santeliz JV, Van Nest G, Traquina P, Larsen E, Wills-Karp M. A λ -linked CpG oligodeoxynucleotides reverse established airway hyperresponsiveness in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109(3):455-62.
15. Serebrisky D, Teper AA, Huang CK, Lee SY, Zhang TF, Schofield BH, et al. CpG oligodeoxynucleotides can reverse Th2-associated allergic airway responses and alter the B7.1/B7.2 expression in a murine model of asthma. *J Immunol* 2000;165:5906-12.
16. Sur S, Wild JS, Choudhury BK, Sur N, Alam R, Klinman DM. Long term prevention of allergic lung inflammation in a mouse model of asthma by CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 1999;162: 6284-93.
17. Metzger WJ, Nye JW. Oligonucleotide therapy of allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104 (2 pt 1):260-6.
18. Kline JN, Krieg AM, Waldschmidt TJ, Ballas ZK, Jain V, Businga TR. CpG oligodeoxynucleotides do not require TH1 cytokines to prevent eosinophilic airway inflammation in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 1999;104(6):1258-64.
19. Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga TR, Lemish JE, Weinstock JV, Thorne PS, et al. Modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol* 1998; 160: 2555-9.
20. Tokunaga T, Yamamoto T, Yamamoto S. How BCG led to the discovery of immunostimulatory DNA. *Jpn J Infect Dis* 1999;52:1-11.
21. Sun S, Zhang X, Tough DF, Sprent J. Type I interferon-mediated stimulation of T cells by CpG DNA. *J Exp Med* 1998;188:2335-42.
22. Bohle B, Jahn-Schmid B, Maurer D, Kraft D, Ebner C. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce IL-12, IL-18 and INF- γ production in cells from allergic individuals and inhibit IgE synthesis in vitro. *Eur J Immunol* 1999;29:2344-53.
23. Broide D, Schwarze J, Tighe H, Gifford T, Nguyen MD, Malek S, et al. Immunostimulatory DNA sequences inhibit IL-5, eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness in mice. *J Immunol* 1998;161(12):7054-62.
24. Sparwasser T, Koch ES, Vabulas RM, Heeg K, Lipford GB, Ellwart JW, et al. Bacterial DNA and immunostimulatory CpG oligonucleotides trigger maturation and activation of murine dendritic cells. *Eur J Immunol* 1998;28:2045-54.
25. Hartmann G, Weiner GJ, Krieg AM. CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:9305-10.
26. Yamamoto S, Kuramoto E, Shimada S, Tokunaga T. In vitro augmentation of natural killer cell activity and production of interferon- α/β and- γ

- with deoxyribonucleic acid fraction from *Mycobacterium bovis* BCG. *Jpn J Cancer Res* 1988;79:866-73.
27. Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, et al. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature* 1995;374:546-9.
28. Chu RS, Targoni OS, Krieg AM, Lehmann PV, Harding CV. CpG oligodeoxynucleotides act as adjuvants that switch on T helper 1 (Th1) immunity. *J Exp Med* 1997;186:1623-31.
29. Peng Z, Wang H, Mao X, HayGlass KT, Simons FE. CpG oligodeoxynucleotide vaccination suppresses IgE induction but may fail to down-regulate ongoing IgE responses in mice. *Int Immunol* 2001;13:3-11.
30. Sparwasser T, Lipford G, Miethke T, Borscherz K, Hacker H, Heegk, et al. Bacterial DNA causes septic shock. *Nature* 1997;386:336-7.
31. Sparwasser T, Hultner L, Koch ES, Luz A, Lipford GB, Wagner H. Immunostimulatory CpG-oligodeoxynucleotides cause extramedullary murine hemopoiesis. *J Immunol* 1999;162:2368-74.
32. Tsunoda I, Tolley ND, Theil DJ, Whitton JL, Kobayashi H, Fujinami RS. Exacerbation of viral and autoimmune animal models for multiple sclerosis by bacterial DNA. *Brain Pathol* 1999;9:481-93.
-