

소아 크론병의 장 점막 조직에서 FOXP3+T세포와 TGF- β 1 발현에 관한 연구

이화여자대학교 의학전문대학원 소아과학교실, *병리학교실

길주현 · 오정은 · 서정완 · 조민선* · 조기영 · 유은선

FOXP3+T Cells and TGF- β 1 in Colonic Mucosa of Children with Crohn's Disease

Joo Hyun Gil, M.D., Jung Eun Oh, M.D., Jeong Wan Seo, M.D., Min-Sun Cho, M.D.*,
Ky Young Cho, M.D. and Eun Sun Yoo, M.D.

Departments of Pediatrics and *Pathology, Ewha Womans University School of Medicine, Seoul, Korea

Purpose: Forkhead box protein 3 (FOXP3)+T cells are the major regulatory T cells controlling all aspects of the immune response. Transforming growth factor- β (TGF- β) is a suppressive cytokine which mediates the suppressive action of FOXP3+T cells. The aim of this study was to investigate the role of FOXP3+T cells, TGF- β in colonic mucosa of children with Crohn's disease (CD).

Methods: Colonic mucosal biopsies were obtained from 10 children with CD (12~15 years of age) and 11 control (8~15 years of age). Frequencies of FOXP3+T, CD4+T cells and TGF- β 1 expression were examined in the lamina propria (LP) and lymphoid aggregates or follicles (LA/F) by immuno-histochemistry, and later evaluated by association with disease activity.

Results: In the LP of CD group, frequencies of FOXP3+T, CD4+T cells, proportion of FOXP3/CD4+T cells and TGF- β 1 expression significantly increased compared to the control. In the LA/F of CD group, frequency of FOXP3+T cells, proportion of FOXP3/CD4+T cells and TGF- β 1 expression significantly increased compared to the control ($p < 0.05$). CD4+T cells also increased compared to the control, but this finding was not significant. In the LP and LA/F of CD group, frequency of FOXP3+T cells exhibited positive correlation with CD4+T cells ($p < 0.05$). In the LP and LA/F of CD group, TGF- β 1 expression had positive correlation with CRP, Pediatric Crohn's Disease Activity Index, and negative correlation with hematocrit and albumin ($p < 0.05$).

Conclusion: Increased frequency of FOXP3+T cells and TGF- β 1 expression in colonic mucosa of CD can be interpreted as a compensatory increase towards achieving down-regulation of immune responses. (Korean J Pediatr Gastroenterol Nutr 2011; 14: 258~268)

Key Words: T-lymphocytes, Regulatory, Crohn's disease, FOXP3, CD4, Transforming growth factor beta, Child, Disease activity

접수 : 2011년 2월 27일, 수정 : 2011년 3월 15일, 승인 : 2011년 3월 17일

책임저자 : 서정완, 158-710, 서울시 양천구 목동 911-1, 이대목동병원 소아청소년과

Tel: 02-2650-5573, Fax: 02-2653-3718, E-mail: jwseo@ewha.ac.kr

본 연구는 이대목동병원의 IRB (Institutional review board) 위원회에 의해서 승인받았음(승인번호 ECT201- 23).

서 론

염증성 장질환은 장에 발생하는 원인불명의 만성 염증 질환이다. 염증성 장질환의 기전은 장내 균총에 대한 면역학적 조절의 이상으로, 장 점막에서 면역 반응을 하향 조절하는 세포의 수나 기능이 적절하지 못하기 때문에 발생한다^{1~4)}.

최근 조절 T세포(regulatory T cell)가 염증성 장질환의 병인으로서 활발하게 연구되고 있다. 조절 T세포는 비특이 항원에 대해서 염증을 발생시키는 효과기 T세포(effector T cell)의 반응을 억제하여 염증을 제한하는 중요한 역할을 한다^{3~5)}. 조절 T세포는 대부분 CD4+T세포군에 속해 있으며, 여기에는 forkhead box protein 3 (FOXP3)를 발현하는 CD4+CD25+T세포, TGF- β 를 발현하는 T helper 3 (Th3), IL-10을 발현하는 regulatory T cell 1 (Tr1)의 세 종류가 있다^{5~7)}.

특히 CD4+CD25+T세포는 대표적인 조절 T세포로, 염증성 장질환 환자의 말초혈과 장 점막에서 자가 CD4+T세포에 의해 생성되는 전염증성 사이토카인을 억제하는 것으로 보고되었다^{6,8~10)}. FOXP3는 이 세포의 분화와 활성을 조절하고, 억제 능력을 발달시키는 전사 인자이다^{4~6,9,11)}. 이것은 CD4+T세포에만 국한되어 발현되며, 이 중 소수는 CD25-T세포에서도 일시적으로 발현된다는 사실이 밝혀졌지만 대다수는 CD25+T세포이므로^{4,7)}, 아직까지 FOXP3는 CD4+CD25+T세포의 특징적인 표지자로서 널리 연구되고 있다^{8,9)}. FOXP3의 유전적 결함은 중증 자가면역질환인 IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome)를 일으키고, 소장과 대장의 염증성 침윤으로 인한 설사증상이 동반되므로, 장관의 항상성 유지에 있어서 FOXP3+T세포의 역할이 중요함을 알 수 있다¹⁰⁾.

TGF- β 는 FOXP3+T세포의 유도과 면역 억제능의 유지에 중요한 역할을 하는 조절 사이토카인이다^{12,13)}. CD4+CD25-T세포가 TGF- β 의 존재하에 억제능을 가진 FOXP3+T세포로 전환되며¹⁴⁾, FOXP3+T세포에서 면역억제 사이토카인인 TGF- β 를 발현하여 효과기 세포에 직접 접촉하여 세포주기를 정지시킴으로써 억제능을 발휘한다^{11,12,15~17)}. 또한, TGF- β 의 생성능이 제거된 쥐에서 염증성 장질환이 발생한 것으로 억제능이 입

증되었다^{13,18)}.

따라서, FOXP3+T세포의 수나 기능의 결함 또는 TGF- β 발현과 신호전달의 이상으로 인해 크론병과 같은 조절되지 않는 염증이 발생한다.

그러나 아직까지 국내, 외에서 소아 염증성 장질환 환자를 대상으로 한 조절 T세포에 관한 연구는 미미한 실정이다. 질병이 만성으로 경과할수록 병태생리에 관여하는 면역 반응도 변화하므로, 소아는 노화과정이나 환경 요소에 대한 영향을 배제할 수 있으며, 질병의 초기 상태에서 면역 기전을 연구하기에 좋은 대상이다¹⁹⁾.

이에, 본 연구에서는 소아 크론병 환자의 대장 점막 조직에서, 조절 T세포의 원천과 빈도를 알아보기 위하여 CD4+T세포, FOXP3+T세포를, 조절 사이토카인의 역할을 알아보기 위하여 기능과 구조에 있어서 차이가 없는 TGF- β 군 중 가장 풍부한 타입인 TGF- β 1을 표지자로 선정하여 관찰하였다. 그리고, 질병 활동성 척도인 소아 크론병 활동성 측정기준(Pediatric Crohn's Disease Activity Index, PCDAI)과 이의 구성요소 중 객관적 검사인 ESR, albumin, hematocrit (Hct)과 임상적 염증 지표로서 CRP와의 연관성을 분석하여, 크론병에서의 조절 T세포의 역할을 알아보려고 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2001년 2월에서 2010년 3월까지 발열, 체중 감소, 만성 복통, 혈변, 설사, 우하복부 종괴 등의 하부 위장관 증상을 주소로 이화여자대학교 목동병원 소아청소년과를 방문하여 진단 및 치료를 위하여 대장 내시경과 조직검사를 시행한 환자 중, 병원 방문 전에 스테로이드나 infliximab, aminosalicylate를 투여받았던 경우는 제외하였고, 조직이 보관되어 있는 크론병 10명, 대조군 11명을 후향적으로 연구하였다. 임상 증상과 방사선학적 검사, 대장 내시경 및 조직병리 진단 기준으로 10명이 크론병을 처음으로 진단받았다. 이들 중 남아는 7명, 여아는 3명이었고, 연령은 12세부터 15세까지 분포하였으며, 평균 연령은 13.2세였다. 말단 회장의 근위부는 소장조영술을 통해 질병의 침범 여부를 확인하였으며, 10명 중 6명은 대장뿐 아니라 소장에도 병변이 있었고, 모든 환자에서 공통적으로 병변이 있었던 대장

점막을 대상으로 하였다.

대조군은 대장 내시경을 통하여 정상 점막으로 확인되고 조직병리에서 염증이 없거나 거의 없는 경우로, 기능성 위장관 질환으로 진단되었다. 남아는 6명, 여아는 5명이었고, 연령은 8세부터 15세까지 분포하였고, 평균 연령은 12.2세였다. 크론병군과 대조군 간 연령의 유의한 차이는 없었다(Table 1).

2. 방법

1) 대장내시경: Midazolam 또는 valium, pethidine을 투여한 진정 상태에서 대장내시경(CF-230, CF-Q260AL; Olympus, Tokyo, Japan)을 시술하였다. 말단 회장까지 내시경을 삽입한 뒤 회수할 때에 말단 회장, 맹장, 상행 결장, 횡행결장, 구불결장, 직장의 각 구역에서 생검하였고, 크론병군에서는 육안상 심한 병변 부위에서 생검하였다.

2) 면역조직화학염색: 크론병군에서는 조직학적으로 심한 염증이 확인된 부위를, 대조군에서는 염증이 없거나 거의 없는 부위를 대상으로 하였다. 장 점막 조직을 10% 중성 포르말린에 24시간 고정한 후 파라핀으로 포매하여 두께 4~5 μ m의 절편으로 박절하고 poly-L-lysine이 부착된 슬라이드에 조직을 붙이고, xylene으로 파라핀을 제거한 후 에탄올에 세척하여 합수시켰다. 일차 항체로는 항 FOXP3 항체(mouse monoclonal antibody, dilution 1 : 100, 236A/E7; Abcam, Cambridge, UK)와 항 CD4 항체(mouse monoclonal antibody, dilu-

tion 1 : 60, 1F6; Novocastra, Newcastle, UK), 항 TGF- β 1 항체(rabbit polyclonal antibody, dilution 1 : 200, sc-146; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA)가 사용되었고, BondTM Polymer DAB Detection Kit (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)와 함께 Bond-X 자동 면역 염색 기계(Leica Microsystems)를 이용하여 면역 염색을 시행하였다. 항원성 노출을 위해 FOXP3와 TGF- β 1는 pH 6.0의 10 mM citrate buffer 용액에, CD4는 pH 9.0의 10 mM Tris/1 mM EDTA buffer 용액에 슬라이드를 넣고, 전자레인지에서 20분간 가열하였다. 조직 절편에 있는 내인성 과산화효소의 활성을 억제하기 위해 0.3% 과산화수소수에 10분간 처리 후 증류수로 세척하였고, 비특이 결합을 차단시키기 위해 차단 혈청을 이용하여 5분간 처리하였다. 그 다음, 일차 단클론 항체를 각각 검체 위에 떨어뜨려 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 이후 일차항체 증폭제를 20분 처리한 후 HRP (horseradish-peroxidase) polymer를 30분간 반응시켰고, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride로 5분간 발색반응을 시킨 후 PBS로 10분간 세척하였고, 대조염색은 Mayer's hematoxylin을 이용하였다.

3) 면역조직화학염색 결과 판정: 환자에 대한 사전 정보가 없는 상태에서 판독하였다. 항 CD4 항체는 세포질막이 갈색으로 염색된 경우, 항 FOXP3 항체는 핵이 갈색으로 염색된 경우, 항 TGF- β 1 항체는 세포질과 세포외기질이 갈색으로 염색된 경우를 양성으로 판독하였다.

림프구는 점막 고유층에 산재되어 있거나, 아니면 모여 있어서 림프구 밀집부 또는 림프 여포를 형성하고 있었다. 따라서 점막 고유층과 림프구 밀집부 또는 림프 여포의 두 곳으로 나누어 양성 세포 수를 판독하였다.

점막 고유층의 판독은 현미경 저배율 시야에서 상대적으로 림프구 침윤이 많은 세 곳을 선정한 후 배율을 높여 400배 고배율 시야에서 0.0625 mm² 면적당 CD4 양성 세포와 FOXP3 양성 세포 수를 세고, 세 곳의 평균치로 결과를 산정하였다. 림프구 밀집부 또는 림프 여포 부위의 판독은 최소 500개 이상의 림프구에서 CD4 및 FOXP3 양성 세포 수를 세어, 100개의 림프구당 각 항체에 양성인 세포 수를 구했다. 림프구 밀집부 또는 림프 여포가 관찰되지 않았던 환자군 중 2명과 대조군

Table 1. Demographic and Clinical Characteristics of Patients with Crohn's Disease and Control Subjects

	CD	Control
Number	10	11
Gender (male/female)	7/3	6/5
Age, years (mean, range)	13.2, 12~15	12.2, 8~15
Medication	None	None
ESR (mm/hr, mean \pm SD)	44.6 \pm 19.5*	4.4 \pm 3.1
Albumin (g/dL, mean \pm SD)	3.2 \pm 0.4*	4.7 \pm 0.2
Hct (% , mean \pm SD)	35.4 \pm 3.2	38.2 \pm 2.0
CRP (mg/dL, mean \pm SD)	7.3 \pm 2.7*	0.3 \pm 0.1
PCDAI (mean, range)	34, 22.5~45	-

* p <0.05. CD: Crohn's disease, ESR: erythrocyte sedimentation rate, Hct: hematocrit, CRP: C-reactive protein, PCDAI: pediatric Crohn's disease activity index.

의 1명은 제외하고 분석하였다(Fig. 1, 2).

TGF- β 1이 발현되는 정도에 대해서, 반정량적으로 평가하였다²⁰⁾. 400배 고배율 현미경 시야에서 0.0625

mm² 면적당 전혀 발현되지 않는 경우를 0점, 10% 미만으로 발현되는 경우를 1점, 10~50% 발현되는 경우를 2점, 50% 이상 발현되는 경우를 3점으로 판독하였다

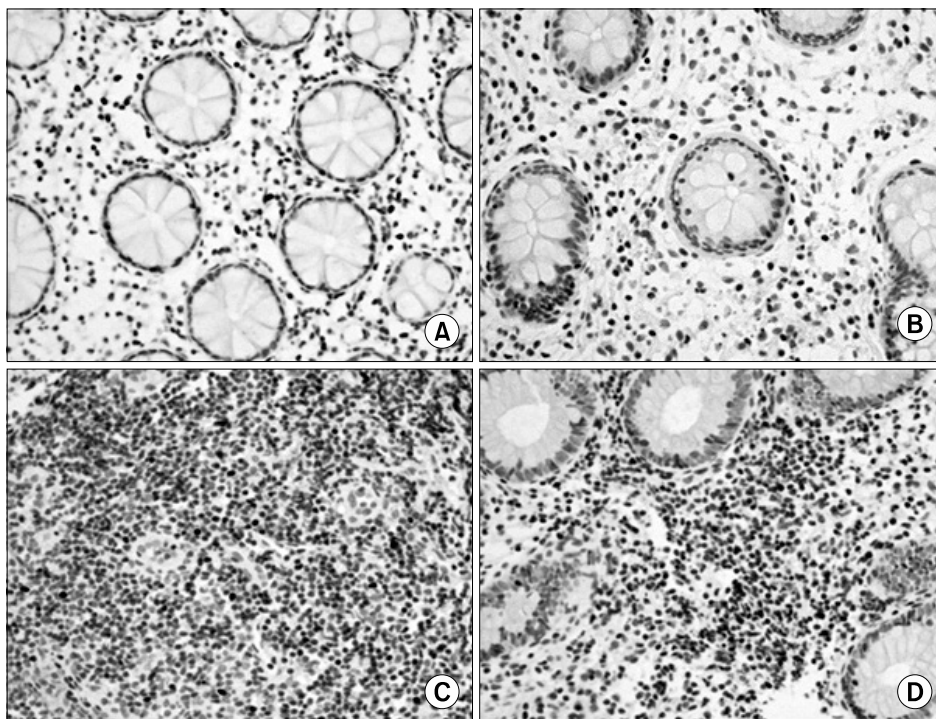


Fig. 1. Immunohistochemical staining of FOXP3 ($\times 400$). (A) In the lamina propria (LP) of Crohn's disease (CD) group. (B) In the LP of the control. (C) In the lymphoid aggregates or follicles (LA/F) of CD group. (D) In the LA/F of the control.

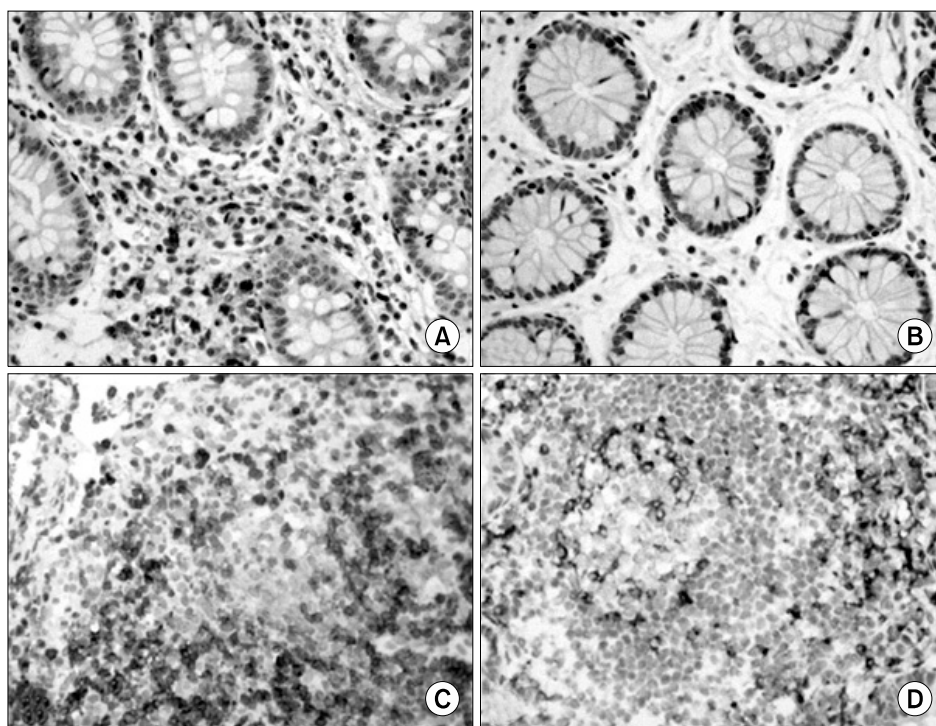


Fig. 2. Immunohistochemical staining of CD4 ($\times 400$). (A) In the LP of CD group. (B) In the LP of the control. (C) In the LA/F of CD group. (D) In the LA/F of the control.

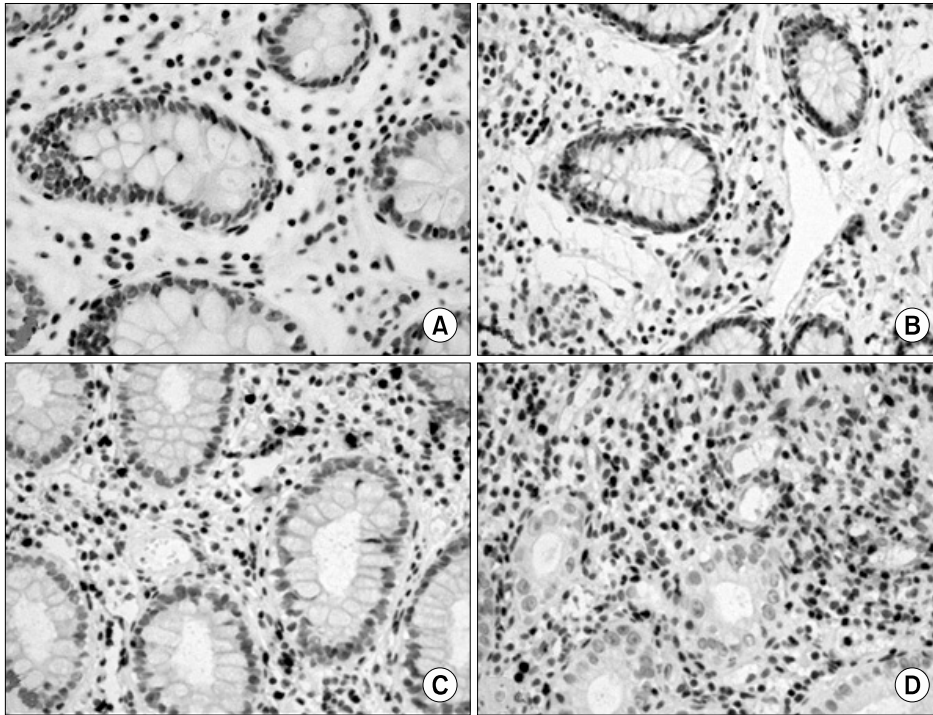


Fig. 3. Immunohistochemical staining of TGF- β 1 ($\times 400$). (A) Grade 0 in the control, (B) Grade 1, (C) Grade 2, (D) Grade 3 in CD group.

(Fig. 3).

4) 질병 활동성 판정과 혈액 검사: 크론병의 활동성은 PCDAI로 점수화하였다²¹⁾. 의무기록을 바탕으로 복통, 대변 습관, 일반적 전신 안녕감, 체중, 신장, 복부 종괴, 항문 주위 병변, 장외 소견, 그리고 조직 생검과 같은 시기에 시행한 혈액 검사 중 ESR, Hct, albumin, CRP를 후향적으로 조사하였다. PCDAI가 10점 이상인 경우 활동기로 판정하였다.

3. 통계 분석

자료의 통계적 분석은 SPSS (version. 18.0, Inc., Chicago, Illinois)를 이용하였다. 환자군과 대조군에서, 양성 염색된 세포수의 비교에는 Mann-Whitney U 검정을 이용하였으며, 사이토카인의 발현을 비교할 때에는 Fisher's exact 검정을 이용하였다. 측정치 간 연관성 분석에는 Spearman 순위 상관 분석을 이용하였다. p 값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 임상적 특징

크론병군에서 대조군에 비해 ESR, CRP가 유의하게 높았고, 혈청 albumin이 유의하게 낮았다($p < 0.05$, Table 1). Hct은 유의한 차이가 없었다(Table 1).

크론병군은 PCDAI 22.5점부터 45점까지 분포하였고, 평균 34점이었으며, 모두 활동기였다(Table 1).

2. FOXP3+T세포와 CD4+T세포의 빈도

점막 고유층에서 FOXP3+T세포는 크론병군 23.4 ± 10.9 개, 대조군 4.4 ± 1.6 개, CD4+T세포는 크론병군 60.1 ± 19.6 개, 대조군 25.0 ± 9.9 개로, 크론병군에서 유의하게 많았다($p < 0.05$, Fig. 4A, B). CD4+T세포에 대한 FOXP3+T세포의 비율은 크론병군 $42.0 \pm 20.4\%$, 대조군 $19.5 \pm 8.4\%$ 로 크론병군에서 유의하게 높았다($p < 0.05$, Fig. 4C).

림프구 밀집부 또는 림프 여포에서 FOXP3+T세포는 크론병군 7.0 ± 3.6 개, 대조군 2.9 ± 1.1 개로, 크론병군에서 유의하게 많았다($p < 0.05$, Fig. 5A). CD4+T세포는 크론

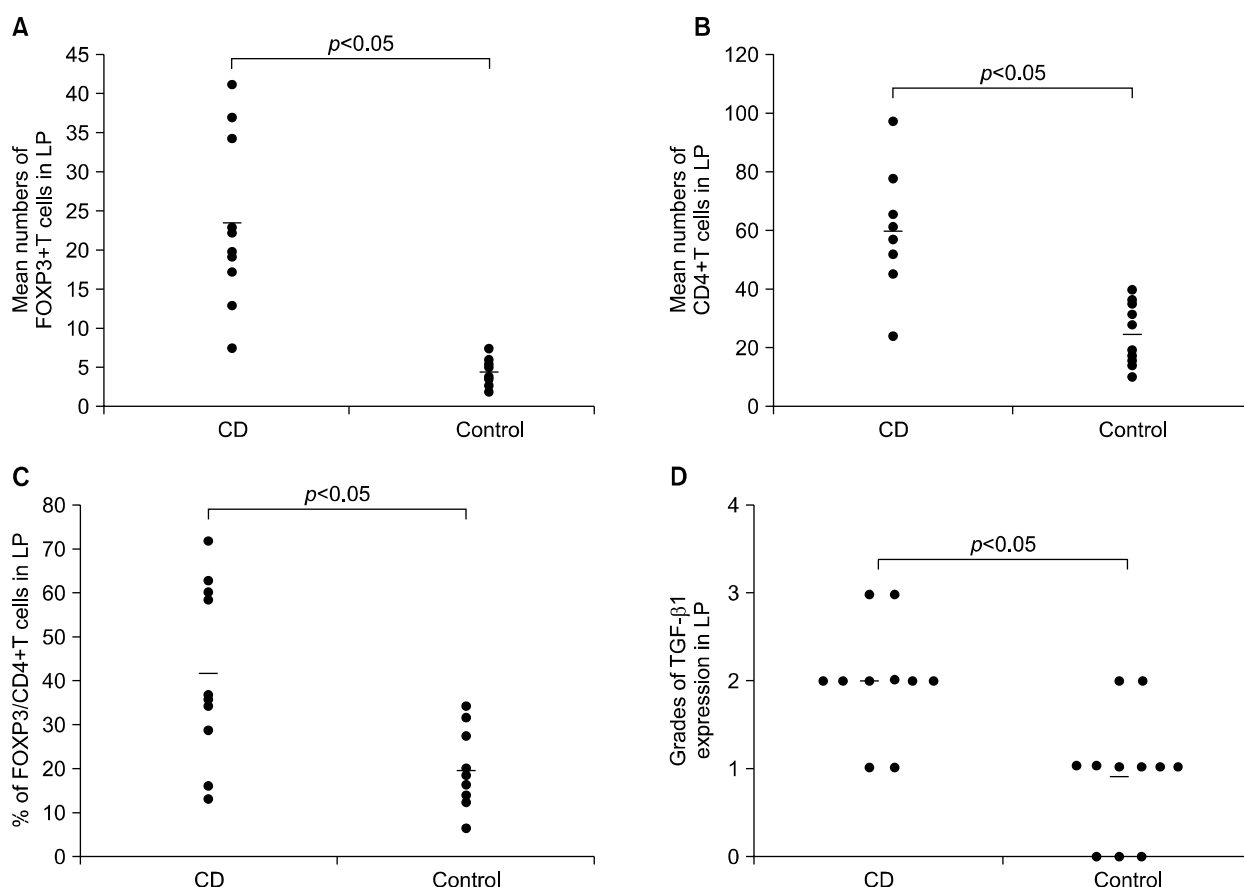


Fig. 4. The frequencies of FOXP3+T, CD4+T cells, and the proportion of FOXP3+T cells to CD4+T cells and TGF- β 1 expression were more increased in the lamina propria of Crohn's disease group ($n=10$) than the control ($n=11$). (A) FOXP3+T cells, (B) CD4+T cells, (C) FOXP3/CD4+T cells, (D) TGF- β 1 expression.

병군에서 대조군보다 많았으나, 유의하지는 않았다 ($p=0.051$, Fig. 5B). CD4+T세포에 대한 FOXP3+T세포의 비율은 크론병군 $63.1 \pm 27.4\%$, 대조군 $55.0 \pm 32.1\%$ 로 크론병군에서 유의하게 높았다 ($p < 0.05$, Fig. 5C).

3. TGF- β 1 발현 정도

점막 고유층과 림프구 밀집부 또는 림프 여포에서 TGF- β 1 사이토카인의 발현 정도를 점수화하여 비교하였다. 점막 고유층에서 크론병군 2.0 ± 0.7 점, 대조군 0.9 ± 0.7 점, 림프구 밀집부 또는 림프 여포에서 크론병군 2.4 ± 0.7 점, 대조군 1.1 ± 0.6 점으로 크론병군에서 유의하게 높았고, 고발현군(2~3점)과 저발현군(0~1점)으로 나누어 비교했을 때, 크론병군에서 대조군에 비해 유의하게 발현이 높았다 ($p < 0.05$, Fig. 4D, 5D).

4. FOXP3+T세포와 CD4+T세포의 빈도, TGF- β 1 발현 정도 간의 상관성

크론병군의 점막 고유층과 림프구 밀집부 또는 림프 여포에서, FOXP3+T세포와 CD4+T세포의 빈도 간에 유의한 양의 상관관계가 있었다($r=0.7$, $r=0.9$, $p < 0.05$, Table 2). 그 외에 FOXP3+T세포의 빈도와 TGF- β 1의 발현 정도간에 유의한 상관성은 없었다(Table 2).

5. 질병 활동성, 혈액 검사 지표와의 상관성

크론병군의 점막 고유층에서, TGF- β 1 발현과 albumin, Hct간에 유의한 음의 상관성($r=-0.6$, $r=-0.6$, $p < 0.05$)이 있었고, PCDAL, CRR와 유의한 양의 상관성이 있었으나($r=0.7$, $r=0.8$, $p < 0.05$), ESR과는 유의한 상관성은 없었다(Table 3).

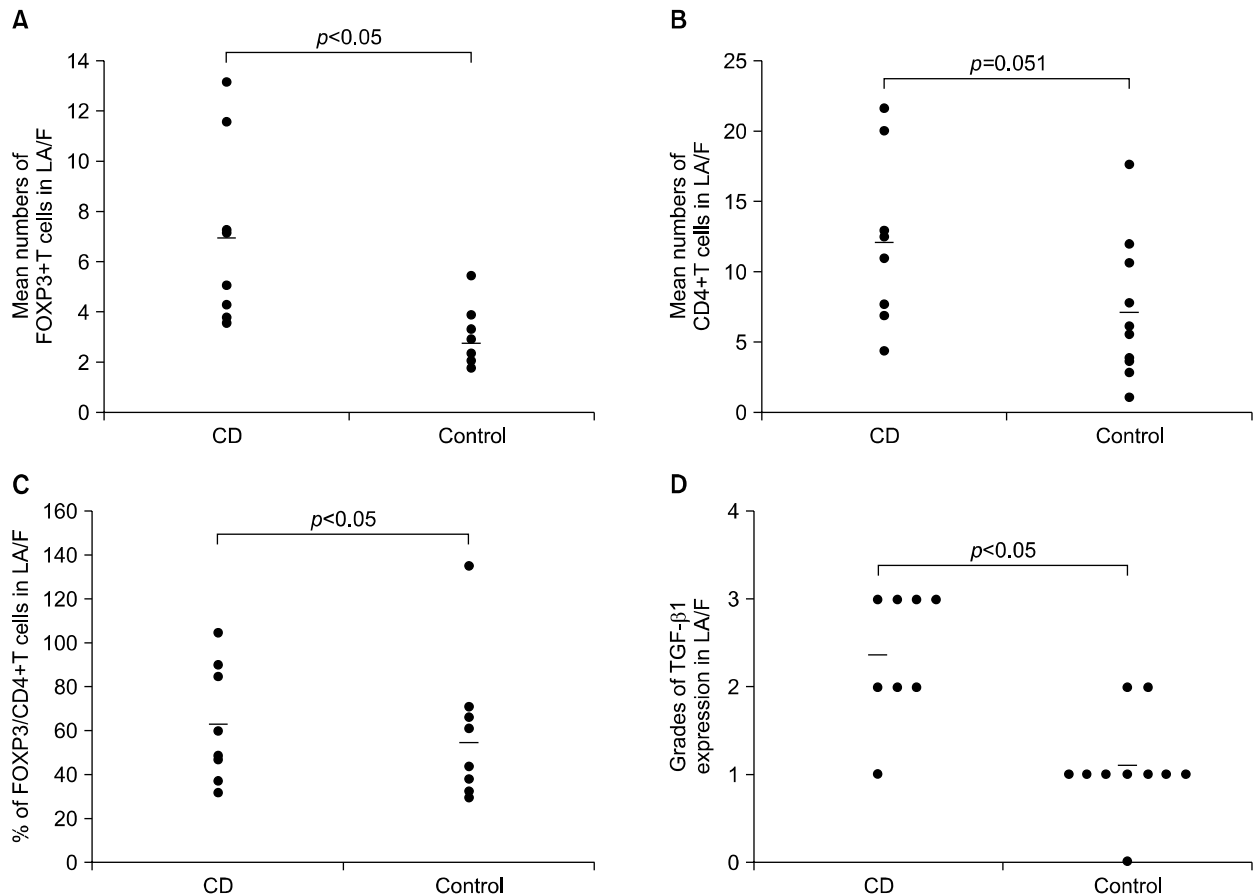


Fig. 5. The frequencies of FOXP3+T, CD4+T cells, and the proportion of FOXP3+T cells to CD4+T cells and TGF- β 1 expression were more increased in the lymphoid aggregates or follicles of Crohn's disease group (n=8) than the control (n=10). (A) FOXP3+T cells, (B) CD4+T cells, (C) FOXP3/CD4+T cells, (D) TGF- β 1 expression.

Table 2. Correlation of the Frequencies of FOXP3+T Cells with the Frequencies of CD4+T Cells, TGF- β 1 Expression in CD Group

	CD group
FOXP3+T cells versus TGF- β 1 expression in LP	$r=-0.5$
FOXP3+T cells versus TGF- β 1 expression in LA/F	$r=0.6$
FOXP3+T cells versus CD4+T cells in LP	$r=0.7^*$
FOXP3+T cells versus CD4+T cells in LA/F	$r=0.9^*$

* $p<0.05$. FOXP3: forkhead box protein 3, TGF- β 1: transforming growth factor- β 1, CD: Crohn's disease, LP: lamina propria, LA/F: lymphoid aggregates or lymphoid follicles.

림프구 밀집부 또는 림프 여포에서도 마찬가지로 TGF- β 1 발현과 albumin, Hct간에 유의한 음의 상관성이 있었고($r=-0.9$, $r=-0.8$, $p<0.05$), PCDAI, CRP와 유의한 양의 상관성이 있었으나($r=0.8$, $r=0.9$, $p<0.05$), ESR과는 유의한 상관성은 없었다(Table 3).

반면, FOXP3+T세포, CD4+T세포의 빈도와 albumin, Hct, ESR, CRP, PCDAI간에 유의한 상관성은 없었다(Table 3).

고 찰

본 연구에서 소아 크론병 환자의 장 점막에서 CD4+T세포, FOXP3+T세포의 절대적 빈도 및 CD4+T세포에 대한 FOXP3+T세포의 상대적 빈도와 TGF- β 1의 발현이 유의하게 증가되어 있었다. 이는 조절 T세포가 장 점막에서 활성화되어 있다는 점을 시사하며, 특히, TGF- β 1은 질병 활동성 지표인 PCDAI, albumin, Hct과 염증 지표인 CRP와 상관성이 있었다.

이러한 결과는 소아^{19,22)}뿐 아니라 성인을 대상으로 한 연구^{8,9,23)}와 일치한다. 최근, La Scaleia 등¹⁹⁾은 소아

Table 3. Correlation of the Frequencies of FOXP3+T, CD4+T Cells, Expression of TGF- β 1 with Disease Activity Parameters in CD Group

	ESR	Albumin	Hct	PCDAI	CRP
LP					
FOXP3+T cells	r=-0.5	r=0.3	r=0.2	r=-0.1	r=-0.5
CD4+T cells	r=-0.2	r=0.4	r=0.3	r=0.2	r=-0.1
TGF- β 1 expression	r=0.4	r=-0.6*	r=-0.6*	r=0.7*	r=0.8*
LA/F					
FOXP3+T cells	r=-0.3	r=-0.5	r=-0.3	r=0.1	r=0.4
CD4+T cells	r=-0.4	r=-0.2	r=-0.1	r=0.0	r=0.2
TGF- β 1 expression	r=0.1	r=-0.9*	r=-0.8*	r=0.8*	r=0.9*

* $p<0.05$. FOXP3: forkhead box protein 3, TGF- β 1: transforming growth factor- β 1, CD: Crohn's disease, LP: lamina propria, LA/F: lymphoid aggregates or follicles, Hct: hematocrit, PCDAI: pediatric Crohn's disease activity index.

크론병 환자의 대장 점막 고유층에서 CD4+T세포와 FOXP3+T세포의 빈도 및 mRNA 발현이 활동기에서 관해기 또는 대조군보다 유의하게 높았다고 보고하였다. 그 밖에 성인을 대상으로 했던 Maul 등⁸⁾은 크론병과 궤양성 대장염 환자의 대장 점막 고유층에서 FOXP3+T세포의 빈도와 mRNA 발현이 대조군보다 높았다고 보고하였고, Saruta 등⁹⁾도 이와 마찬가지로 크론병 환자의 장간막 림프절과 점막 고유층에서 FOXP3+T세포의 빈도가 대조군보다 높았고, 또한 관해기와 비교했을 때, 활동기에서 유의하게 높았다고 보고하였다. 이들은 말초혈에서도 FOXP3+T세포의 빈도와 mRNA 전사율을 조사하였는데, 대장 점막과는 반대로, 대조군에서 질환군보다 유의하게 높았고, 관해기에서 활동기보다 유의하게 높았다. 관해기 환자에서 말초혈의 조절 T세포가 확장된 것은, 장으로부터의 순환이 증가되어 있음을 반영하고, 반대로 활동기 장 점막에서 조절 T세포가 증가한 것은 이 세포들이 면역 조절을 위해서 염증이 있는 장에서 축적된 것으로 생각된다. 이러한 결과는 조절 T세포가 염증 부위에 집중하여 재분포함을 의미한다^{4,5,8,9,11,24,25)}.

하지만, 장 점막의 염증 부위에서 FOXP3+T세포가 증가되어있음에도 불구하고 염증이 지속되는 이유에 대해서는 확실히 밝혀지지 않았다. 성인의 경우, 궤설염과 같은 염증성 대조군과 염증성 장질환군을 비교하였을 때, 염증성 장질환군의 장 점막과 말초혈 모두에서, 궤설염보다 조절 T세포의 수가 유의하게 낮았다^{8,26)}. 이는 염증성 장질환 환자의 말초혈과 장 점막에 조절 T세포가 존재하지만 수적으로 위축되어 있으며, 장의

염증 부위로의 조절 T세포 순환이 상대적으로 불충분한 것으로 추정할 수 있다^{4,5,8,9,26)}. 더구나 염증성 장질환 환자의 말초혈과 장 점막에서 FOXP3+T세포를 추출하여 효과기 세포와 반응시켰을 때, 이 세포의 증식과 염증성 사이토카인 생성에 대해서 정상적인 억제능이 나타나므로, 질병 발생의 원인은 기능적 결함보다는 수적 결핍으로 설명된다^{6,8,9,27,28)}.

TGF- β 1의 발현도 FOXP3와 마찬가지로 크론병군에서 대조군에 비해 유의하게 증가되어 있었으며, Babyatsky 등²⁹⁾이 보고한 성인 크론병 장 점막에서 TGF- β mRNA 발현이 대조군보다 유의하게 높았다는 결과와 일치한다. TGF- β 와 FOXP3+T세포의 기능간의 관계는 복잡한데, 크론병의 장 점막에서 FOXP3+T세포와 TGF- β 1의 발현이 모두 증가한 것은, TGF- β 1이 FOXP3+T세포를 유도하고, 수와 기능을 유지한다는 점을 뒷받침 한다^{15,16,30)}. Saruta 등⁹⁾은 체외 실험을 통해서 장 점막의 FOXP3의 발현율이 TGF- β 의 첨가로 더욱 향상됨을 입증하였다.

이번 연구에서는 FOXP3+T세포의 빈도와 TGF- β 1의 발현이 모두 증가하였지만, 이 두 지표간에 유의한 상관성이 관찰되지 않았다. TGF- β 1 신호 전달 체계의 결함을 고려할 수 있겠고^{31,32)}, 또한 TGF- β 의 생성이 반드시 FOXP3+T세포를 매개로 하는 것은 아니며, 수지상 세포와 같은 항원 제시 세포에 의해서도 생성될 수 있으며, 반대로 FOXP3+T세포 모두가 Th3 세포는 아니기 때문에 추정할 수 있다^{15,25)}.

한편, FOXP3+T세포와 CD4+T세포는 유의한 양의 상관관계가 있었으며, Sitohy 등⁷⁾이 궤양성 대장염 환

자의 장 점막에서 GITR, CD25를 제외한 FOXP3+T세포와 CD4+T세포만이 빈도간의 유의한 양의 상관성을 가진다고 밝힌 것과 유사하다. 염증이 있는 장 점막의 CD4+T세포는 국소 면역 조절을 위해 활성화되어 조절 T세포로 분화되는 중요한 역할을 하는 것으로 생각되며, 크론병의 장 점막에서도 FOXP3+T세포는 CD4+T세포로부터 기원한다고 추정할 수 있다^{7,19,27,33}).

본 연구의 크론병군은 모두 PCDAI 10점 이상으로 활동기²¹)에 속하였기 때문에 관해기와 나누어 비교할 수 없었지만, 활동기내에서도 PCDAI와 CRP가 높을수록 장 점막의 TGF- β 1 발현이 유의하게 높아지고, albumin, Hct이 낮을수록 TGF- β 1 발현이 유의하게 높아짐을 알 수 있었다. Babyatsky 등²⁹)은 활동기 크론병 환자의 장 점막 TGF- β mRNA 발현이 비활동기에 비하여 유의하게 높았고, 질병의 활동성과 TGF- β 의 발현 간에 유의한 양의 상관관계가 있다고 밝혔다. Wang 등³⁴)은 궤양성 대장염 환자의 장 점막에서 조직학적 염증이 심할수록, 면역조직화학염색법으로 살펴본 TGF- β 의 발현이 높아졌다고 보고한 바 있다. PCDAI는 복통, 배변 습관, 생활 안녕감 등의 주관적 증상과 객관적 이학적 검사, 체중, 신장 및 ESR, Hct, albumin 수치를 종합하여 크론병의 중증도를 점수화한 것으로, 단독 혈액 검사 수치보다 질병 활동성을 나타내는 데 있어서 더 정확하며²¹), 이번 연구에서도 ESR과 TGF- β 1간의 유의한 연관성이 없었으나, PCDAI와 연관성이 있었던 점은 매우 의미 있는 것으로 생각된다. 여러 염증 지표들 중에서도 특히 CRP는 염증성 장질환의 조직학적, 임상적 질병 활동성과 유의한 연관성이 보고되어 왔으나, 아직까지 CRP를 포함한 ESR, albumin, IL-1, 6, 대변 alpha-1-antitrypsin 등의 단일 검사 지표들이 질병 활동성의 척도나 재발 예측인자로서의 역할은 논쟁의 여지가 있다^{9,21,35}). 한편, 크론병 환자의 장 점막에서, FOXP3+T세포의 빈도와 질병 활동성간의 유의한 양의 상관성을 보고한 연구들과^{6,8,9}) 달리, 본 연구에서는 통계적 유의성은 없었으므로, 더 많은 환자를 대상으로 한 연구가 필요하다.

이번 연구의 대상 부위는 장 점막으로, 여기에는 조절 T세포들이 함께 공존하고 있고, 항원 제시 세포가 다양하게 존재하기 때문에 상호 간의 유도과 성장을 위한 좋은 환경이다. 장관에서 항원은 장간막 림프절과

소장에서 유래된 수지상 세포, 대식세포 같은 항원 제시 세포를 통해 장 점막의 면역 체계에 접근하여, 효과기 세포뿐 아니라 조절 T세포와 사이토카인을 활성화시킨다^{4,5}). 장관 내 항원의 노출에 가장 근접한 위치인 점막 고유층은 조절 T세포를 분석하기에 좋은 대상이다¹¹). 점막 고유층 내에서도 특히, 림프구 밀집부는 조절 T세포가 만들어지는 주요한 장소이며, 여기에서 다른 T세포 및 수지상 세포와 밀접한 상호작용이 이루어지기 때문이다^{6,7,9}). 그러므로, 본 연구에서는 림프구 밀집부와 이 바깥의 점막 고유층 두 부위로 구분하여, 조절 T 세포를 분석하였다. 실제로, 이들은 T 림프구가 침윤해있는 부위에 분포하고 있었고, 점막 고유층과 림프구 밀집부 및 여포에서 두드러지게 존재하고 있었으며, 그 외 육아종에서도 관찰되었다.

결론적으로, 소아 크론병의 장 점막에서 염증 반응을 하향 조절하기 위해 조절 T세포와 조절 기능을 가진 사이토카인이 보상적으로 증가되어 있었음을 알 수 있었다. 아직까지 소아 크론병에서 조절 T세포의 역할에 대한 연구가 거의 없는 실정이며, 참고가 되었던 이전의 다른 연구들 역시 대부분 성인을 대상으로 한 결과였다. 하지만, 초기에 질병이 발현한 소아와 만성 경과를 거친 성인의 경우는 면역 병리 기전이 다를 수 있다. 따라서, 본 연구는 소아 크론병의 병인 규명과 치료에 기초 자료를 제공한다는 데 의의가 있다.

하지만, 본 연구의 제한점은 대상수가 적었고, 후향적 연구로 말초혈과 관해기 조직을 얻을 수 없었으므로 활동기와 관해기, 말초혈과 조직 상태를 비교할 수 없었던 점이다. 향후 더 많은 대상군에서, 장 점막뿐 아니라 말초혈에서의 동시 분석, 질병의 경과에 따라 활동기와 관해기 비교, 성인과 비교 분석, 조절 T세포의 빈도와 더불어 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응을 이용한 mRNA 발현 분석, TGF- β 신호전달 체계 분석 등 다양하게 접근하는 전향적 연구가 필요할 것으로 생각한다.

요 약

목 적: FOXP3+T세포는 염증을 일으키는 면역반응을 조절하는 대표적인 조절 T세포이다. 또한, TGF- β 는 조절 사이토카인으로서 CD4+T세포에서 FOXP3의 발

현을 유도하여 억제능을 생기게 한다. 본 연구에서는 소아 크론병 환자의 장 점막에서 CD4+T세포, FOXP3+T세포의 빈도와 TGF- β 1의 발현 정도를 분석하여 조절 T세포의 역할을 알아보려고 하였다.

방 법: 크론병을 처음 진단받은 10명의 환자군(12~15세)과 11명의 대조군(8~15세)의 대장 점막 고유층과 림프구 밀집부 또는 림프 여포에서, 면역조직화학염색을 통해 CD4+T세포, FOXP3+T세포의 빈도와 TGF- β 1의 발현 정도를 조사하였고, 질병 활동성 지표와의 연관성을 분석하였다.

결 과: 크론병군의 점막 고유층에서 FOXP3+T, CD4+T세포의 빈도, FOXP3/CD4+T세포의 비율과 TGF- β 1의 발현은 대조군에 비해 유의하게 더 높았다. 크론병군의 림프구 밀집부 또는 림프 여포에서도 FOXP3+T세포의 빈도, FOXP3/CD4+T세포의 비율과 TGF- β 1의 발현이 대조군에 비해 유의하게 더 높았고, CD4+T세포의 빈도는 더 높았으나, 통계적으로 유의하지는 않았다. 크론병군의 점막 고유층과 림프구 밀집부 또는 림프 여포에서 FOXP3+T세포와 CD4+T세포의 빈도간에 유의한 양의 상관성이 있었다. 그리고, TGF- β 1 발현과 CRP, PCDAI간에 유의한 양의 상관성이 있었고, albumin, Hct과 유의한 음의 상관성이 있었다.

결 론: 소아 크론병의 장 점막에서 염증 반응을 하향 조절하기 위해 FOXP3+T세포와 조절 기능을 가진 TGF- β 1 사이토카인이 보상적으로 증가되어 있었고, 특히 TGF- β 1은 질병 활동성과 유의한 상관성이 있었다.

참 고 문 헌

- 1) Baumgart DC, Carding SR. Inflammatory bowel disease: cause and immunology. *Lancet* 2007;369:1627-40.
- 2) Kim JM. Inflammatory bowel diseases and enteric microbiota. *Korean J Gastroenterol* 2010;55:4-18.
- 3) Kim J, Choe J. Introduction to autoimmune disease. *J Korean Med Assoc* 2009;52:638-44.
- 4) Boden EK, Snapper SB. Regulatory T cells in inflammatory bowel disease. *Curr Opin Gastroenterol* 2008;24:733-41.
- 5) Allez M, Mayer L. Regulatory T cells: peace keepers in the gut. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10:666-76.
- 6) Yu QT, Saruta M, Avanesyan A, Fleshner PR, Banham AH, Papadakis KA. Expression and functional characterization of FOXP3+ CD4+ regulatory T cells in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13:191-9.
- 7) Sitohy B, Hammarström S, Danielsson A, Hammarström ML. Basal lymphoid aggregates in ulcerative colitis colon: a site for regulatory T cell action. *Clin Exp Immunol* 2008;151:326-33.
- 8) Maul J, Loddenkemper C, Mundt P, Berg E, Giese T, Stallmach A, et al. Peripheral and intestinal regulatory CD4+ CD25 (high) T cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2005;128:1868-78.
- 9) Saruta M, Yu QT, Fleshner PR, Mantel PY, Schmidt-Weber CB, Banham AH, et al. Characterization of FOXP3+CD4+ regulatory T cells in Crohn's disease. *Clin Immunol* 2007;125:281-90.
- 10) Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27:20-1.
- 11) Shevach EM. Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression. *Immunity* 2009;30:636-45.
- 12) Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;198:1875-86.
- 13) Fahlén L, Read S, Gorelik L, Hurst SD, Coffman RL, Flavell RA, et al. T cells that cannot respond to TGF-beta escape control by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells. *J Exp Med* 2005;201:737-46.
- 14) Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J Exp Med* 2001;194:629-44.
- 15) Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Exp Med* 2005;201:1061-7.
- 16) Shevach EM, Davidson TS, Huter EN, Dipaolo RA, Andersson J. Role of TGF-beta in the induction of Foxp3 expression and T regulatory cell function. *J Clin Immunol* 2008;28:640-6.
- 17) Andersson J, Tran DQ, Pesu M, Davidson TS, Ramsey H, O'Shea JJ, et al. CD4+ FoxP3+ regulatory T cells confer infectious tolerance in a TGF-beta-dependent manner. *J Exp Med* 2008;205:1975-81.
- 18) Levéen P, Larsson J, Ehinger M, Cilio CM, Sundler M, Sjöstrand LJ, et al. Induced disruption of the transforming

- growth factor beta type II receptor gene in mice causes a lethal inflammatory disorder that is transplantable. *Blood* 2002;100:560-8.
- 19) La Scaleia R, Morrone S, Stoppacciaro A, Scarpino S, Antonelli M, Bianchi E, et al. Peripheral and intestinal CD4⁺ T cells with a regulatory phenotype in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;51:563-72.
- 20) Bedossa P, Poynard T, Mathurin P, Lemaigre G, Chaput JC. Transforming growth factor beta 1: in situ expression in the liver of patients with chronic hepatitis C treated with alpha interferon. *Gut* 1993;34:S146-7.
- 21) Hyams JS, Ferry GD, Mandel FS, Gryboski JD, Kibort PM, Kirschner BS, et al. Development and validation of a pediatric Crohn's disease activity index. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1991;12:439-47.
- 22) Ricciardelli I, Lindley KJ, Londei M, Quarantino S. Anti tumour necrosis-alpha therapy increases the number of FOXP3 regulatory T cells in children affected by Crohn's disease. *Immunology* 2008;125:178-83.
- 23) Sanchez-Munoz F, Dominguez-Lopez A, Yamamoto-Furusho JK. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2008;14:4280-8.
- 24) Uhlig HH, Coombes J, Mottet C, Izcue A, Thompson C, Fanger A, et al. Characterization of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ and IL-10-secreting CD4⁺CD25⁺ T cells during cure of colitis. *J Immunol* 2006;177:5852-60.
- 25) Guyot-Revol V, Innes JA, Hackforth S, Hinks T, Lalvani A. Regulatory T cells are expanded in blood and disease sites in patients with tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 2006;173:803-10.
- 26) Eastaff-Leung N, Mabarrack N, Barbour A, Cummins A, Barry S. Foxp3⁺ regulatory T cells, Th17 effector cells, and cytokine environment in inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol* 2010;30:80-9.
- 27) Makita S, Kanai T, Oshima S, Uraushihara K, Totsuka T, Sawada T, et al. CD4⁺CD25⁺ bright T cells in human intestinal lamina propria as regulatory cells. *J Immunol* 2004;173:3119-30.
- 28) Holmén N, Lundgren A, Lundin S, Bergin AM, Rudin A, Sjövall H, et al. Functional CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells are enriched in the colonic mucosa of patients with active ulcerative colitis and increase with disease activity. *Inflamm Bowel Dis* 2006;12:447-56.
- 29) Babyatsky MW, Rossiter G, Podolsky DK. Expression of transforming growth factors alpha and beta in colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1996;110:975-84.
- 30) Ikeda M, Takeshima F, Ohba K, Ohnita K, Isomoto H, Yamakawa M, et al. Flow cytometric analysis of expression of transforming growth factor-beta and glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor on CD4⁽⁺⁾ CD25⁽⁺⁾ T cells of patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 2006;51:178-84.
- 31) Monteleone G, Kumberova A, Croft NM, McKenzie C, Steer HW, MacDonald TT. Blocking Smad7 restores TGF-beta1 signaling in chronic inflammatory bowel disease. *J Clin Invest* 2001;108:601-9.
- 32) Duchmann R, Zeitz M. T regulatory cell suppression of colitis: the role of TGF-beta. *Gut* 2006;55:604-6.
- 33) Vorobjova T, Uibo O, Heilman K, Rågo T, Honkanen J, Vaarala O, et al. Increased FOXP3 expression in small-bowel mucosa of children with coeliac disease and type I diabetes mellitus. *Scand J Gastroenterol* 2009;44: 422-30.
- 34) Wang YF, Wei B, Ouyang Q. Expression with TGFbeta1 in the patients with ulcerative colitis. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2005;36:204-6.
- 35) Wiercińska-Drapała A, Flisiak R, Prokopowicz D. Effect of ulcerative colitis activity on plasma concentration of transforming growth factor beta1. *Cytokine* 2001;14: 343-6.