

## 기관지천식에서 Interferon-Gamma 치료의 효과

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실, \*한국과학기술원 유전공학연구소

김관형, 김석찬, 김영균, 권순석, 김치홍, 문화식, 송정섭, 박성학, \*이충은, \*변광호

= Abstract =

### Efficacy of Interferon-Gamma Treatment in Bronchial Asthma

Kwan Hyoung Kim, M.D., Seok Chan Kim, M.D., Young Kyoon Kim, M.D.,  
Soon Seog Kwon, M.D., Chi Hong Kim, M.D., Hwa Sik Moon, M.D., Jung Sup Song, M.D.,  
and Sung Hak Park, M.D. \*Choong Eon Lee, Ph.D. and \*Kwang Ho Byun, M.D.

Department of Internal Medicine, Catholic University Medical College, Seoul, Korea

\*Genetic Engineering Research Institute, KIST, Taejeon, Korea

**Background :** There have been many *in vitro* evidences that interleukin-4(IL-4) might be the most important cytokine inducing IgE synthesis from B-cells, and interferon-gamma(IFN- $\gamma$ ) might be a main cytokine antagonizing IL-4-mediated IgE synthesis. Recently some reports demonstrated that IFN- $\gamma$  might be used as a new therapeutic modality in some allergic diseases with high serum IgE level, such as atopic dermatitis or bronchial asthma. To evaluate the *in vivo* effect of IFN- $\gamma$  in bronchial asthma we tried a clinical study.

**Methods :** Fifty bronchial asthmatics(serum IgE level over 200 IU/ml) who did not respond to inhaled or systemic corticosteroid treatment, and 17 healthy nonsmoking volunteers were included in this study. The CD 23 expressions of peripheral B-cells, the IL-4 activities of peripheral T-cells, the serum soluble CD23(sCD23) levels, and the superoxide anion( $O_2^-$ ) generations by peripheral PMN were compared between bronchial asthmatics and normal subjects. The IL-4 activities of peripheral T-cells were analyzed by T-cell supernatant (T-sup)-induced CD23 expression from tonsil B-cells. In bronchial asthmatics the serum IgE levels and histamine  $PC_{20}$  in addition to the above parameters were also compared before and after IFN- $\gamma$  treatment. IFN- $\gamma$  was administered subcutaneously with a weekly dose of 30,000 IU per kilogram of body weight for 4 weeks.

**Results :**

The  $O_2^-$  generations by peripheral PMNs in bronchial asthmatics were higher than normal subjects( $8.23 \pm 0.94$  vs  $5.00 \pm 0.68$  nmol/ $1 \times 10^6$  cells,  $P < 0.05$ ), and significantly decreased after IFN- $\gamma$  treatment compared to initial values( $3.69 \pm 0.88$  vs  $8.61 \pm 1.53$  nmol/ $1 \times 10^6$  cells,  $P < 0.05$ ).

CD23 expression of peripheral B-cells in bronchial asthmatics was higher than normal subjects( $47.47 \pm 2.96\%$  vs  $31.62 \pm 1.92\%$ ,  $P < 0.05$ ), but showed no significant change after IFN- $\gamma$  treatment.

The serum sCD23 levels in bronchial asthmatics were slightly higher than normal subjects( $191.04 \pm 23.3$  U/ml vs  $162.85 \pm 4.85$  U/ml), and 11(64.7%) of 17 patients showed a decreasing pattern in their serum sCD23 levels after IFN- $\gamma$  treatment. However the means of serum sCD23 levels were not different before and after IFN- $\gamma$  treatment.

The IL-4 activities of peripheral T-cells in bronchial asthmatics were slightly higher than normal subjects( $22.48 \pm 6.81\%$  vs  $18.90 \pm 2.43\%$ ), and slightly increased after IFN- $\gamma$  treatment( $27.90 \pm 2.56\%$ ).

Nine(60%) of 15 patients showed a decreasing pattern in their serum IgE levels after IFN- $\gamma$  treatment. And the levels of serum IgE were significantly decreased after IFN- $\gamma$  treatment compared to initial values ( $658.67 \pm 120.84$  IU/ml vs  $1394.32 \pm 314.42$  IU/ml,  $P < 0.05$ ).

Ten(83.3%) of 12 patients showed an improving pattern in bronchial hyperresponsiveness after IFN- $\gamma$  treatment, and the means of histamine PC<sub>20</sub> were significantly increased after IFN- $\gamma$  treatment compared to initial values ( $1.22 \pm 0.29$ mg/ml vs  $0.69 \pm 0.17$ mg/ml,  $P < 0.05$ ).

**Conclusion :** Our results suggest that IFN- $\gamma$  may be useful as well as safety in the treatment of bronchial asthmatics with high serum IgE level, and that *in vivo* effects of IFN- $\gamma$  may be different from its *in vitro* effects on the regulations of IgE synthesis or the respiratory burst of PMN.

**Key words :** Interferon-gamma, Asthma, IgE, Superoxide

## 서 론

기관지천식은 다양한 병인과 복잡한 병태생리의 일종의 염증성 질환으로서, 현재도 기관지천식의 병인을 보다 명확히 규명하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 기관지천식에서의 염증반응은, 비만세포, 호산구, 호중구, 폐포대식세포, 기관지상피세포, 섬유아세포등으로부터 분비되는 다양한 염증매개물질들 및 면역조절물질들의 복잡한 기전에 의한 상호작용으로 야기되는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 최근 각 세포들의 기능을 상호 조절하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려진 cytokine들에 관한 연구가 발전되면서 기관지천식에서도 이에 대한 연구가 진행되고 있는데, 그중에서 기관지천식의 병태생리에 가장 많은 영향을 미치는 IgE의 합성 및 조절에 관련된 cytokine들에 대한 연구들이 특히 관심의 대상이 되고 있다. 현재까지 알려진 바로는 B-상충액으로부터 IgE의 합성 및 분비에

관여하는 cytokine으로서 가장 중요한 역할을 하는 것은 interleukin-4(IL-4)로 알려져 있으며, interferon-gamma(IFN- $\gamma$ )는 이러한 IL-4의 작용을 길항하는 것으로 알려져 있다<sup>2)</sup>. 이에 대해서는 최근 국내에서도 한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소에서 IgE가 높은 기관지천식 환자와 신중후군 환자를 대상으로 연구한 결과를 보고한 바 있다. 이를 근거로 하여 최근에는 IFN- $\gamma$ 를 아토피 피부염등 IgE가 높은 알레르기성 질환의 치료에 이용하고자 하는 임상적 시도가 이루어지고 있는데<sup>3)</sup>, 아직 기관지천식에 대한 임상적 시도는 별로 보고되어 있지 않다. 한편 IFN- $\gamma$ 는 *in vitro*에서 말초혈액 다형핵구나 단핵세포에 의한 독성산화물 생성을 증가시킨다는 보고도 있지만<sup>4,5)</sup>, 실제 임상에서 IFN- $\gamma$  치료를 시행하였을 때 나타날 임상적 반응에 대해서는 잘 알려져 있지 않다. 이에 저자들은 IL-4 매개성 IgE 생성에 대한 IFN- $\gamma$ 의 길항작용에 근거를 두고, IgE가 높은 기관지천식 환자

들을 대상으로 IFN- $\gamma$  치료를 한 후, *in vitro* 에서 증명된 바와 같이 IFN- $\gamma$ 가 *in vivo* 에서도 IL-4 매개성 IgE 생성을 억제하는지 여부와 그 결과 궁극적인 임상적 치료효과를 나타내는지에 대해 관찰하는 한편, 다형핵구의 독성산화물 생성능에 미치는 영향은 *in vitro* 의 경우와 어떻게 다른지에 대해서도 관찰하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 연구대상

기관지천식으로 2년 이상의 치료를 받은 병력이 있는 18세에서 65세 사이의 환자들로서, 혈청 IgE가 200 IU/ml 이상이며, 경구용과 흡입용 스테로이드제의 용량의 합이 prednisolone으로 환산하여 하루에 10mg 이상을 유지하는 중에도 반복적인 천식증상의 악화를 보였던 환자들중 시험용량의 IFN- $\gamma$  투여에 심한 전신부작용을 나타냈던 5명을 제외한 50명(남자 32명; 평균연령  $48.1 \pm 13.4$ 세, 여자 18명; 평균연령  $42.5 \pm 16.3$ 세)을 대상으로 하였다. 기관지천식외의 다른 호흡기질환, 심혈관계 질환, 간장질환, 신장질환 및 악성종양등이 있거나, 4주 이내에 급성 호흡기 감염증이 있었던 환자들은 제외하였다. 정상대조군은 건강한 비흡연자 17명(남자 11명; 평균연령  $28.6 \pm 3.7$ 세, 여자 6명; 평균연령  $26.0 \pm 5.1$ 세)으로 하였다. 모든 대상인들에게는 미리 본 임상연구의 취지를 충분히 설명하고, 소정양식의 임상연구 참여 동의서를 배부하여 이에 서명하게 하였다.

### 2. 연구방법

우선 각 대상인들을 임의로 선별하여 말초혈액 다형핵구의  $O_2^-$  생성능, 말초혈액 단핵세포(mononuclear cell)내 CD23+ B-상층액의 발현도, 혈청내 soluble form CD23(sCD23)의 농도, T-상층액의 IL-4 activity를 측정하였다. 그후 기관지천식 환자들에게

는 3일 동안 각각 10,000 IU, 50,000 IU, 100,000 IU의 IFN- $\gamma$ 를 시험 투여하여 고열 및 근육통 등의 전신부작용을 관찰한 후, 부작용이 나타나지 않았던 환자들에 한해서 체중당 30,000IU의 IFN- $\gamma$  (릭키사 제품)을 4주간 매일 피하 주사하였다. 4주간의 IFN- $\gamma$  치료가 완료된 환자들을 임의로 선정하여 상기 실험들중 한가지 이상을 반복하여 치료전후를 비교하였으며, 임상적으로는 IFN- $\gamma$  치료전후로 혈청 IgE 농도 및 히스타민에 대한 비특이성 기관지 과민반응을 측정하여 비교 관찰하였다. IFN- $\gamma$  치료중 흡입용 혹은 경구용 기관지확장제를 제외한 항알레르기 혹은 항염작용을 지닌 약제들의 사용은 금지시켰다.

### 3. 실험방법

#### 1) 실험재료 및 사용기기

RPMI 1640 media는 GIBCO에서, FBS는 Hyclone에서, Histopaque, superoxide dismutase (SOD), phorbol myristate acetate(PMA), phytohemmaglutinin(PHA), cytochrome c 및 formyl-methionyl-leucine-phenylalanine(fMLP)은 Sigma에서, anti-Leu16-FITC 및 anti-Leu20-PE는 Becton/Dickinson에서, EIA standard IgE는 일본의 MBL에서, alkaline phosphatase-conjugated anti-human IgE는 Cappel에서 각각 구입하여 사용하였으며, monoclonal 3-5-14 anti-Fc $\epsilon$ RII는 일본 Osaka대학의 Dr. Kishimoto로부터 기증받아 사용하였다. Fluorescence activated cells canner(FAC-scan)은 Becton/Dickinson사 제품을, ELISA autoreader는 Dynatech사 제품을 각각 사용하였다.

#### 2) 말초혈액으로부터 단핵세포 및 다형핵구 분리

Böyum<sup>6)</sup>의 방법대로 heparin 처리된 30cc의 말초정맥혈로부터 Ficoll-Hypaque(비중 = 1.077) density gradient separation을 이용하여 분리하였다. 최종적으로 얻어진 단핵세포와 다형 핵구는 HBSS로 현탁

액(suspension)을 만들었으며, trypan blue로 염색하여 각 세포들의 생존도(viability)를 관찰하였다. 본 연구에 사용된 각 세포들의 생존도는 모두 95% 이상이었다.

### 3) CD23 발현을 위한 B-상층액의 분리

사람의 편도(tonsil)조직을 갈아서 분리한 단핵세포를 sheep-RBC rosetting을 2회 행하여 T-상층액을 제거한 후, adherent cell을 plate에 부착시켜 제거함으로써 순수한 B-상층액을 얻었다. 얻어진 B-상층액의 순도는 anti-Leu16 및 anti-Leu4로 염색하여 분석하였는데 95% 이상의 순도를 보였다.

### 4) 다형핵구의 $O_2^-$ 생성능 측정

#### ① 방법 1(modified Absolom's method)<sup>7)</sup>

위에서 분리한 다형핵구 현탁액으로 두개의 Effendorf tube에 각각  $1 \times 10^6$  cell이 되도록 분주하고, 그중 한 tube에는  $10 \mu\text{g/ml}$ 의 SOD를 첨가하여 blank로 사용하였다. 그다음 각 tube(blank tube 포함)를  $37^\circ\text{C}$  수액조에서 2분간 배양시킨 후, 각 tube에  $1.0\text{mg/ml}$ 의 cytochrome C를 첨가하고, 이어서 blank tube들을 제외한 나머지 tube에는  $10^{-5}$  M PMA를, 각 blank tube에는 PMA대신 HBSS를 첨가하여, 다시  $37^\circ\text{C}$  수액조에서 20분간 배양하였다. 다음에는 각 tube들을 얼음에 3분간 방치하여 반응을 중단시키고,  $4^\circ\text{C}$ 에서 6500rpm으로 5분간 원심분리하여, 각 tube의 상층액을 차례로 1ml cuvette에 옮겨 담은 후, spectrophotometer로 550nm에서의 흡광도를 측정하였다. 다형핵구의  $O_2^-$  생성능은 각 test sample의 흡광도에서 blank의 흡광도를 뺀 후, cytochrome c의 extinction coefficient 21.2을 곱하여  $\text{nmol}/1 \times 10^6$  cells로 표시하였다. 각 결과는 중복실험의 평균값으로 나타내었다.

#### ② 방법 2(modified Sedgwick's method)<sup>8)</sup>

96-well microtiter plate에 well당  $1 \times 10^5$ 수의 다형핵구를 분주하여, blank well에는  $20 \mu\text{g/ml}$ 의 SOD를 첨가하고, 다형핵구의  $O_2^-$  자연유리능을 관

찰하기 위한 well에는 HBSS를, 나머지 test well에는 다형핵구 활성화제인 PMA( $1.0 \mu\text{g/ml}$ ) 또는 fMLP( $10^{-5}$  M)를 각각 첨가한 후, 각 well에  $100 \mu\text{M}$  cytochrome c를 첨가하여, 즉시 ELISA autoreader를 이용하여 550nm에서의 흡광도를 측정하고, 다시 5%  $\text{CO}_2/\text{air}$  incubator,  $37^\circ\text{C}$ 에서 배양하면서, 10, 20, 30, 60분에 각각 흡광도를 측정하였다. 다형핵구의  $O_2^-$  생성능은 각 test well의 흡광도와 blank well의 흡광도 차이( $A_{550}$ )로 표시하였다. 각 결과는 중복실험의 평균값으로 나타내었다.

### 5) CD23+ B-상층액 발현도 측정

CD23+ B-상층액의 발현도는 말초혈액 단핵세포 혹은 편도조직으로부터 분리한 B-상층액들을 pan B marker인 anti Leu16-FITC와 CD23 marker인 anti Leu20-PE로 이중염색하여 FACScan으로 측정하였고, CD23 positivity는 total B-cell중에서 CD23+ B-cell의 백분율로 계산하였다.

### 6) 혈청 sCD23 농도의 측정

96-well microtiter plate에 monoclonal 3-15-14 anti CD23을 coating antibody로 부착시켜  $4^\circ\text{C}$ 에서 overnight incubation 시킨 후, 각 혈청 sample을 2배 또는 5배로 희석하여 첨가하여 상온에서 2시간 반응시켰다. 이어서 secondary antibody인 alkaline phosphatase conjugated monoclonal MHM6 antibody(anti-CD23)을 넣어 binding시킨 후, substrate인 o-p-nitrophenyl로 반응시켜서, 410nm와 450nm에서 ELISA autoreader로 흡광도를 측정하였다.

### 7) 혈청 IgE 농도의 측정

sCD23 농도 측정시와 같은 ELISA 방법으로 측정하였으며, coating antibody로는 1 : 100으로 희석한 monoclonal anti-human IgE(HP 6029)를 사용하였으며, second antibody로는 alkaline phosphatase-conjugated anti-human IgE를 사용하였다.

#### 8) T-상층액의 IL-4 activity 측정

10% FBS가 배합된 RPMI 1640배지에 말초혈액 단핵세포( $2 \times 10^6/\text{ml}$ )를 분주하고, T-상층액 mitogen인 PHA( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ )와 PMA( $10 \text{ ng}/\text{ml}$ )를 첨가하여 5%  $\text{CO}_2/\text{air}$  incubator에서  $37^\circ\text{C}$ 로 48~72시간 배양한 후, 이를 원심분리하여 T-상층액 상층액(T-sup)을 얻었다. 이때 T-상층액 mitogen 첨가없이 단핵세포만을 배양한 후 원심분리하여 얻은 상층액을 대조 상층액(Control-sup)으로 하였다. 각 상층액 내의 IL-4 activity는 CD23 expression assay를 이용하여 간접적으로 측정하였는데, 간단히 요약하면 사람의 편도조직으로부터 분리한 B-상층액에 Control-sup 또는 T-sup을 각각 작용시켰을때 유도되는 CD23+ B-상층액의 발현도를 FACScan을 이용하여 측정하였다.

9) 히스타민에 대한 비특이적 기관지과민반응의 측정 표준화된 히스타민 기관지유발시험(Chai's method)으로 측정하였으며, FEV<sub>1</sub>이 기저치에 비해 20% 감소되는 히스타민 흡입농도(histamine PC<sub>20</sub>)를 semi-log paper상에서 구하였다.

#### 4. 결과분석 및 통계

우선 IFN- $\gamma$  치료전에 정상인과 기관지천식 환자간의 항목별 차이를 unpaired Student's *t* test로 검정하였고, 기관지천식 환자들에서는 IFN- $\gamma$  치료후에 항목별로 추적검사가 된 환자 들만을 각각 따로 모아 치료전후의 변화를 paired Student's *t* test로 검정하였다. IFN- $\gamma$  치료에 따른 임상효과는 혈청 IgE 농도 및 histamine PC<sub>20</sub>에 대한 추적검사가 시행되었던 환자들만을 대상으로 분석하였으며, 각각의 경우 IFN- $\gamma$  치료후 혈청 IgE 농도가 감소되는 환자 및 histamine PC<sub>20</sub>가 증가되는 환자의 비율을 관찰하였다. 각각의 경우 통계적 유의성은 *P* 값 0.05 이하로 하였다.

#### 결 과

##### 1. 다형핵구의 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성능

- 1) 기관지천식 환자의 다형핵구는 정상인의 다형핵구에 비해 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성능이 유의하게 높았다 ( $8.23 \pm 0.94$  vs  $5.00 \pm 0.68 \text{ nmol}/1 \times 10^6 \text{ cells}$ ,  $P < 0.05$ , Fig. 1).
- 2) IFN- $\gamma$  치료후 추적이 가능했던 기관지천식 환자들을 대상으로, IFN- $\gamma$  치료에 따른 다형핵구의 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성능을 변화를 관찰해본 결과, 치료후에 다형핵구의 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성능이 현저하게 감소함을 알 수 있었다 ( $8.61 \pm 1.53$  vs  $3.69 \pm 0.88 \text{ nmol}/1 \times 10^6 \text{ cells}$ ,  $P < 0.05$ , Fig. 2).
- 3) 다형핵구 배양시간에 따라 자연적인 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성능 및 PMA 혹은 fMLP 자극에 의한 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성능을 관찰하였을 때에도, 배양시간 및 다형핵구 자극제의 종류와는 상관없이 IFN- $\gamma$  치료후가 치료전에 비해 다형핵구의 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성능이 감소하는 경향을 보여주었다 (Fig. 3).

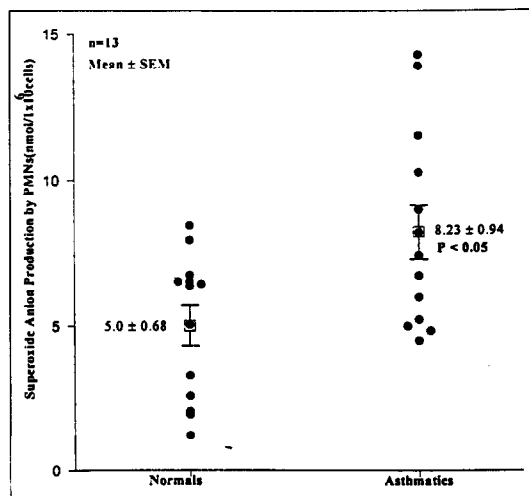


Fig. 1. Comparison of superoxide anion production by peripheral PMNs between normal and bronchial asthmatics

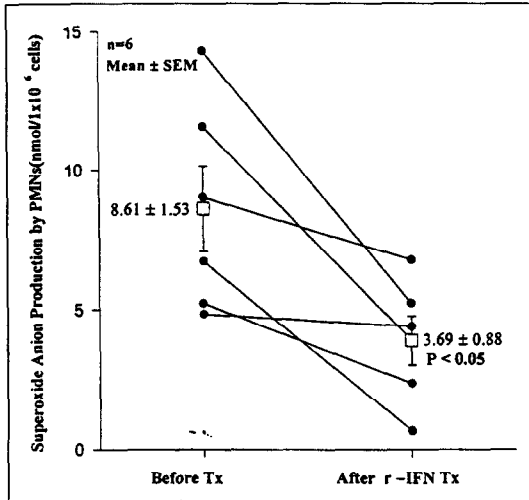


Fig. 2. Changes of superoxide anion productions by peripheral PMNs after r-IFN treatment in bronchial asthmatics

## 2. CD23+ B-상층액의 발현도

IFN- $\gamma$  치료전의 기관지천식 환자의 말초혈액내 CD 23+ B-상층액의 발현도는  $47.47 \pm 2.96\%$ 로서 정상인의  $31.62 \pm 1.92\%$ 보다 현저히 높았다( $P < 0.05$ , Fig. 4). 그러나 IFN- $\gamma$  치료후 추적 검사가 가능하였던 15명의 환자들을 대상으로 치료전후의 변화를 관찰해본 결과 의미있는 변화를 나타내지는 않았다(Fig. 5).

## 3. 혈청내 sCD23 농도

IFN- $\gamma$  치료전의 기관지천식 환자의 혈청내 sCD23 농도는  $191.04 \pm 23.3\text{U/ml}$ 로서 정상인의  $162.85 \pm 4.85\text{U/ml}$ 에 비해 다소 높은 경향을 보였다(Fig. 6). 이중 IFN- $\gamma$  치료후 추적검사가 가능하였던 17명의 환자들을 대상으로 분석해본 결과, 11명(64.7%)에서 IFN- $\gamma$  치료후에 혈청 sCD23 농도가 감소되었으며, 평균적으로는 IFN- $\gamma$  치료전에  $152.86 \pm 18.04\text{U}$

/ml였던 것이 치료후에  $140.95 \pm 16.90\text{U/ml}$ 로서 통계적으로 유의하지는 않았으나 다소 감소되는 경향을 나타냈다(Fig. 7).

## 4. T-상층액의 IL-4 activity

기관지천식 환자나 정상인 모두에서 Control-sup보다는 T-sup이 편도조직에서 분리한 B-상층액의 CD 23 발현도를 현저히 증가시켰는데, 이로서 T-상층액의 IL-4 activity를 간접적으로 확인할 수 있었다. 이러한 T-sup의 IL-4 activity는 정상인에 비해 기관지천식 환자에서 다소 높은 경향을 보였는데( $18.90 \pm 2.43$  vs  $22.48 \pm 6.81\%$ , Fig. 8), IFN- $\gamma$  치료후 기대와는 달리  $27.90 \pm 2.56\%$ 로 오히려 증가되는 경향을 보였다(Fig. 9).

## 5. 혈청 IgE 농도

IFN- $\gamma$  치료후 혈청 IgE 농도의 추적검사가 시행되었던 환자는 모두 15명이었는데, 이중 9명(60%)에서 IFN- $\gamma$  치료후 혈청 IgE 농도가 감소하였으며, 통계적으로도 IFN- $\gamma$  치료전에  $1394.32 \pm 314.42\text{IU/ml}$ 였던 것이 IFN- $\gamma$  치료후에  $658.67 \pm 120.84\text{IU/ml}$ 로 유의하게 감소되었다( $P < 0.05$ , Fig. 10).

## 6. 히스타민에 대한 비특이적 기관지과민반응

IFN- $\gamma$  치료에 따른 기관지과민반응의 변화는 모두 12명의 환자에서 관찰되었는데, 이중 10명(83.3%)에서 IFN- $\gamma$  치료후 histamine PC<sub>20</sub> 수치가 증가되었으며, 통계적으로도 IFN- $\gamma$  치료 전에  $0.69 \pm 0.17\text{mg/ml}$ 였던 것이 IFN- $\gamma$  치료후에  $1.22 \pm 0.29\text{mg/ml}$ 로 유의하게 증가되는 소견을 보여주었다( $P < 0.05$ , Fig. 11).

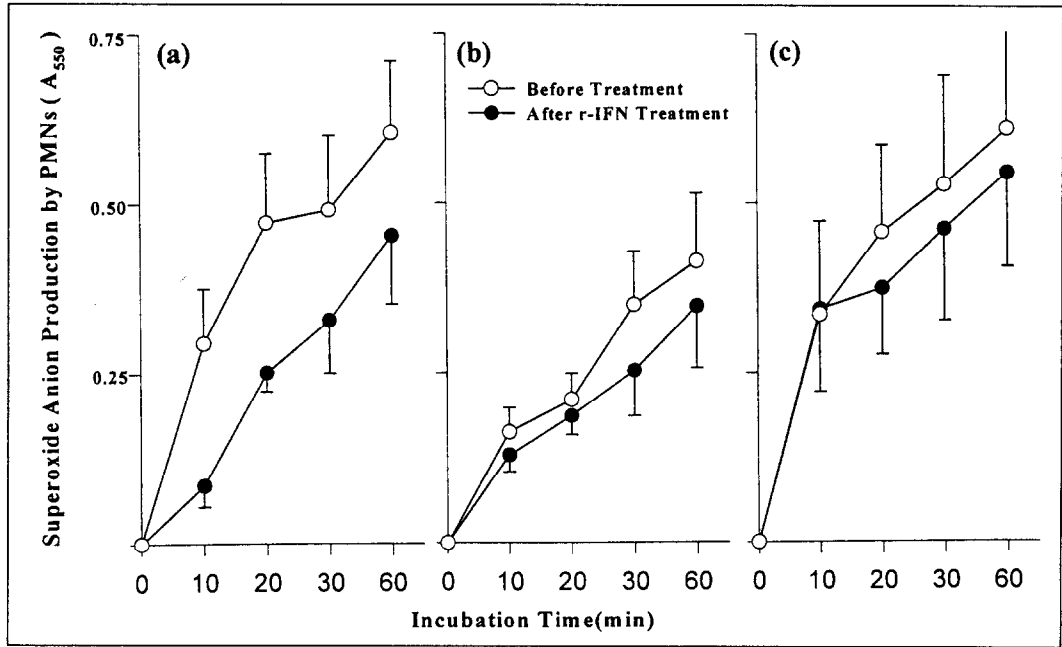


Fig. 3. Superoxide anion production by peripheral PMNs before and after r-IFN treatment in bronchial asthmatics ; spontaneous(a), 1.0mg/ml PMA-induced(b), and  $1 \times 10^{-5}$  M fMLP induced release(c)

## 고 찰

기관지천식의 병인 및 병태생리는 매우 복잡하여 아직 치료에 결정적인 역할을 할만한 기전이 정확히 밝혀지지 않고 있는 실정이다. 그럼에도 불구하고 IgE 매개성 염증반응은 기관지천식 특히 알레르기성 기관지천식의 병인에 가장 중요한 기전으로 현재까지 인정되고 있다. 최근 세포들 상호간의 작용을 조절하는 cytokine에 관한 관심이 집중되면서, 기관지천식을 포함한 여러 알레르기성 질환에서는 주로 IgE 합성 및 조절에 관여하는 cytokine에 관한 연구들이 많이 보고되고 있다. 현재까지는 Th2 cell로부터 분비되는 IL-4 및 IL-6가 주로 B-cell로부터 IgE 생성을 유도하는 것으로 알려져 있으며, Th1 cell에서 분비되는 IFN- $\gamma$ 는 IL-4의 작용을 길항하여 IgE 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>2,9)</sup>. 이에 대한 근거로는

IgE가 높은 알레르기성 기관지천식 환자의 T-cell clone들은 정상인의 T-cell clone에 비해 IL-4 생성 능력이 증가되어 있는 반면, IFN- $\gamma$  생성능은 감소되어 있다는 보고와, 이들의 기관지점막내에 IL-4 mRNA를 발현하는 세포수와 IFN- $\gamma$  mRNA를 발현하는 세포수사이에는 서로 역상관관계를 나타낸다는 보고 등을 들 수 있다<sup>10~12)</sup>. 또한 알레르기성 기관지천식 환자의 말초혈액 및 기관지폐포세척액내에는 CD4+ IL-2R+ T-cell 및 IL-4와 IL-5 농도가 증가되어 있으며, 이러한 T-상충액의 활성화는 CD23+ B-cell수와 밀접한 상관관계를 보이는 것으로 알려져 있다<sup>13)</sup>. 본 연구에서도 기관지천식 환자는 혈중 CD23+ B-cell의 발현도가 정상인에 비해 현저히 높았을 뿐 아니라(Fig. 4), sCD23 농도 또한 높은 경향을 보였으며(Fig. 6), T-상충액의 IL-4 activity도 정상인의 T-상충액에 비해 높은 경향을 보였다(Fig. 8). 그러

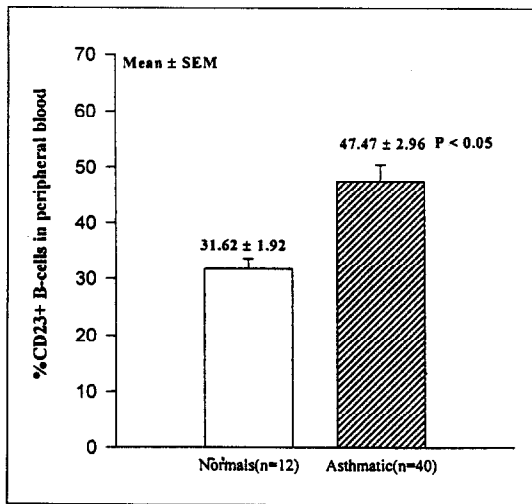


Fig. 4. Comparison of % CD23+ B-cells in peripheral blood between normals and asthmatics

나 혈중 IgE 농도, CD23+ B-상층액의 발현도 및 sCD23 농도사이에 어떤 상관관계를 찾을 수는 없었다(Data not shown). 이는 혈중 IgE 농도에 반응하는 세포들의 CD23 발현이 기관지천식 환자들에서는 매우 불안정함을 시사하는 소견으로 생각된다.

이러한 연구 결과들을 토대로 하여 최근에는 IFN- $\gamma$ 를 IgE가 높은 알레르기 질환의 치료에 이용하고자 하는 임상적 시도가 이루어지고 있다. 한 보고에 의하면 IgE가 높은 아토피성 피부염 환자들에게 IFN- $\gamma$  치료를 시도한 결과, 실제 혈중 IgE 농도는 그다지 감소하지 않았음에도 불구하고 임상증상은 현저히 호전을 보였는데 그 정확한 기전에 대해서는 알수가 없다고 하였다<sup>3)</sup>. 이에 대한 간접적인 설명으로서 알레르기성 기관지천식 및 알레르기성 비염 환자들의 T-sup은 정상인에 비해 현저히 높은 IgE-inducing activity를 나타내지만, 아토피성 피부염 환자들의 T-sup은 정상인과 차이를 보이지 않는다는 *in vitro* 실험보고를 들 수 있는데, 이 보고에 의하면 대상 환자들중 37%에서는 T-sup에 의한 IgE-inducing activity가 anti-IL-4 antibody에 의해 억제되지 않

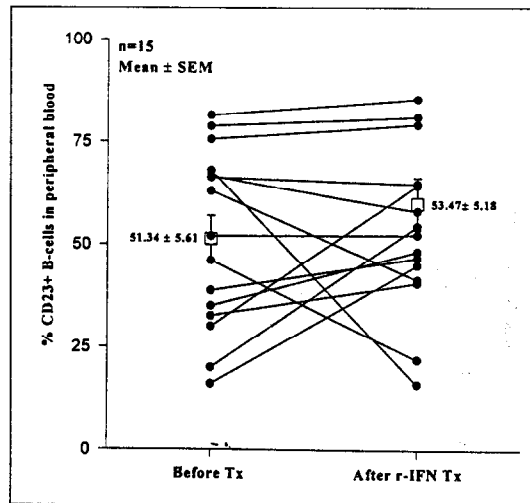


Fig. 5. Changes of % CD23+ B-cells in peripheral blood after r-IFN treatment in bronchial asthmatics

았다<sup>14)</sup>. 이는 T-sup의 IgE-inducing activity가 알레르기성 질환의 종류 및 환자에 따라 다를 수 있으며, IgE 합성 및 조절에 IL-4의 영향을 받지않는 다른 기전이 있을 수도 있음을 시사하는 소견이라 생각된다. 그러나 이들의 연구결과에서도 *in vitro*에서 측정된 말초 혈액 단핵세포의 IgE 생성능은 IFN- $\gamma$  치료후 현저히 감소됨이 증명되었다.

한편 IFN- $\gamma$ 은 IL-4 매개성 IgE 생성을 억제하는 작용도 나타내지만, *in vitro*에서 말초혈액 다형핵구 및 단핵세포에 의한 독성산화물 생성을 증가시킬뿐 아니라<sup>4,5)</sup> Leukotriene C4(LTC4) 분비를 증가시키고<sup>15)</sup>,  $\beta$ -adrenoceptor 기능을 억제하는 작용도 있는 것으로 보고되어 있다<sup>16)</sup>. 또한 기관지천식 환자의 혈중 및 기관지폐포세척액내에는 IFN- $\gamma$ 의 농도가 정상인에 비해 증가되어 있고<sup>17)</sup>, 천식증상의 호전에 따라 혈중 IFN- $\gamma$ 의 농도가 감소한다는 보고등도 있으며<sup>18)</sup>, 부신피질 호르몬 내성 천식환자의 말초혈액 단핵세포는 감수성 환자의 단핵세포와는 달리 IFN- $\gamma$  분비가 dexamethasone에 의해 억제되지 않는다는 보고도 있다<sup>19)</sup>. 이러한 사실들은 모두 IFN- $\gamma$ 가 오히려 기



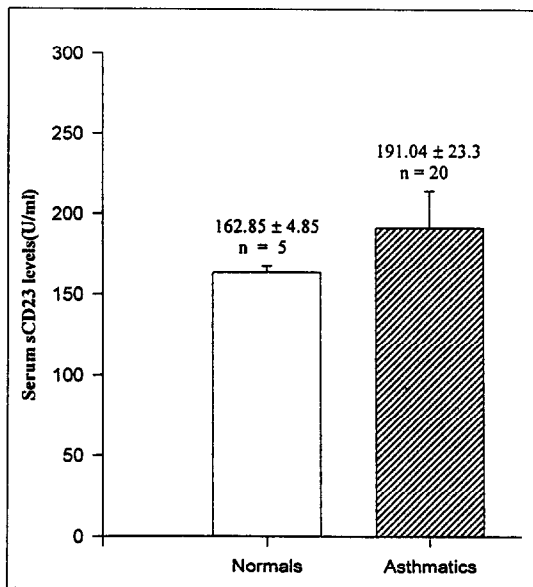


Fig. 6. Comparison of serum sCD23 level between normals and bronchial asthmatics

관지천식의 병인에 관여할 가능성을 시사하는 소견으로 생각된다. 따라서 IFN- $\gamma$ 를 기관지천식의 치료에 사용하는데에는 많은 문제점이 있으며, 실제 임상에서 IFN- $\gamma$  치료가 궁극적으로 어떤 결과를 초래할 것인지에 대해서는 예측하기가 힘들다. 이와 같은 이유에서 인지 실제로 IFN- $\gamma$ 를 기관지천식의 치료에 사용한 임상보고는 별로 없었으며, 최근 Scholz 등<sup>20)</sup>이 30명의 기관지천식 환자들을 대상으로 IFN- $\gamma$  치료를 하여, IFN- $\gamma$  치료후 알레르기 피부반응은 현저히 호전되었지만 알레르겐 유발성 기관지수축은 호전되지 않았음을 보고한 것이 고작이었다. 따라서 본 임상연구는 보다 많은 기관지천식 환자들을 대상으로 IFN- $\gamma$  치료를 하여, 임상적 지표뿐만 아니라 실제 *in vivo*에서 일어난 면역학적 반응의 변화 및 IFN- $\gamma$  치료의 문제점으로 제기되었던 다형핵구의 독성산화물 생성에 미친 영향등에 대해서도 함께 관찰하였다는 점에서 그 의미가 있다고 볼수 있다.

본 임상연구 결과 종래의 보고들과는 다소 달리, IFN- $\gamma$  치료후 60%의 환자에서 혈중 IgE 농도가 감

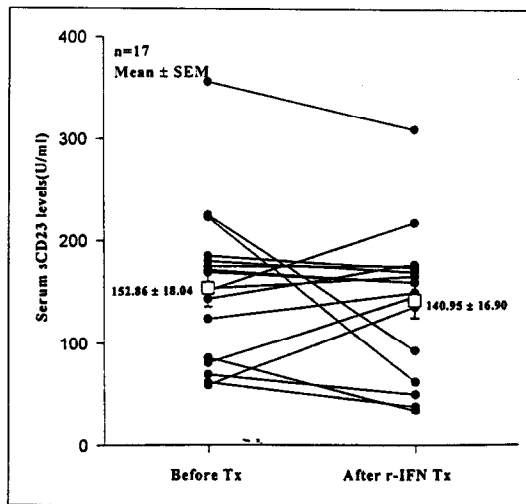


Fig. 7. Change of serum sCD23 levels after r-IFN treatment in bronchial asthmatics

소되었으며(Fig. 10), 비특이성 기관지 과민반응의 지표인 histamine PC<sub>20</sub> 또한 83.3%에서 증가되었다(Fig. 11). 또한 염려하였던 다형핵구에 의한 과산화 음이온 생성도 *in vitro* 실험과는 달리 달리 IFN- $\gamma$  치료후 오히려 감소되는 소견을 보여(Fig. 2, 3), 기관지천식에서 IFN- $\gamma$  치료가 비교적 안전하다는 근거를 제시하였다. IFN- $\gamma$ 가 *in vivo*에서 말초혈액 다형핵구에 어떤 영향을 미쳐 과산화 음이온 생성능을 감소시켰는지에 대해서는 좀더 규명할 필요가 있겠지만, IFN- $\gamma$ 가 다형핵구로부터 IL-8 분비를 억제한다는 최근 보고<sup>21)</sup>를 감안할때, 다른세포들로부터 분비되는 IL-8 역시 억제함으로써 결과적으로 다형핵구의 활성화를 억제하였을 가능성과 IFN- $\gamma$ 의 항알레르기 작용으로 전반적인 염증반응이 저하됨으로 인해 다형핵구 기능 또한 억제되었을 가능성등을 생각할 수 있을 것이다. 본 연구에서 또 한가지 의문이 되었던 것은 IFN- $\gamma$  치료후 혈중 IgE는 현저히 감소하였음에도 불구하고(Fig. 10), 혈중 CD23+ B-상층액 발현도 및 sCD23 농도와 T-상층액의 IL-4 activity에는 큰 변화가 없었다는 점이다(Fig. 5, 7, 9). 이 결과에 대한 정확한 이유는 아직 알 수 없으나, 어떤 보고에 의

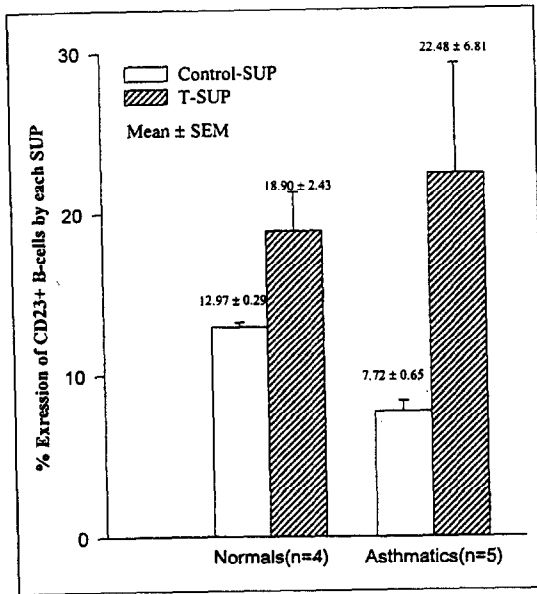


Fig. 8. Comparison of IL-4 activity in control-SUP and T-SUP between normals and asthmatics (analyzed by CD23 expression from tonsil B-cells)

Control-SUP : culture supernatants of peripheral mononuclear cells stimulated without stimulation

T-SUP : culture supernatants of peripheral mononuclear cells stimulated with 5 ug/ml PHA and 10ng/ml PMA

하면 IgE가 높은 아토피 환자들을 대상으로 plasma-pheresis를 통하여 혈중 IgE를 제거한후, 시간별로 IgE 및 IL-4의 혈중농도 변화를 측정해본 결과, IgE의 혈중농도는 3~5일에 걸쳐 지속적으로 증가되어 치료전의 농도로 회복되는데 반해, IL-4의 혈중농도는 일정하게 낮은 농도만으로 유지되는 것이 관찰되었다<sup>20)</sup>. 또 다른 보고에 의하면 아토피 환자들에서 증가되는 말초혈액 B-상층액의 CD23 발현에는 T-상층액과의 세포간 상호작용이 필수적으로 작용하며, 이로부터 sCD23가 분비되는 것은 T-상층액과는 무관한 독립적인 체액성 기전에 의해 조절받는 것으로 생

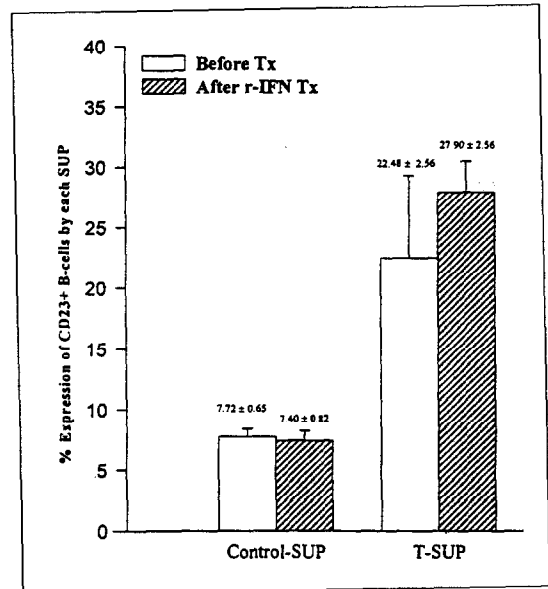


Fig. 9. Change of IL-4 activities in control-SUP and T-SUP after r-IFN treatment in bronchial asthmatics (n=5) (analyzed by CD23 expression from tonsil B-cells).

각된다고 하였다<sup>23~24)</sup>. 따라서 *in vivo*에서는 IgE 합성 및 조절에 IL-4가 관여하는 정도가 *in vitro*에서 만큼 결정적이지 아닐 수도 있다는 가능성을 생각할 수 있겠고, 또한 본 연구 결과 혈중 단핵세포의 CD23+ B-상층액의 발현, sCD23 농도 및 IgE 농도 사이에 상호관련성이 없었던 사실과 IFN- $\gamma$  치료후 다형핵구에 의한 과산화 음이온 생성능이 현저하게 감소되었던 사실등으로 미루어보아, IFN- $\gamma$ 가 IL-4 매개성 IgE 생성과는 무관한, 즉 IL-10 매개성 IgE 생성 등에 영향을 주었을 가능성도 배제할수 없을 것으로 생각된다.

이상의 연구결과 IFN- $\gamma$ 는 IgE가 높은 기관지천식 환자들의 치료에 효과가 있을 것으로 생각되며, *in vivo*에서의 IgE 합성 및 조절기전과 이에 대한 IFN- $\gamma$ 의 역할을 보다 명확하게 규명하기 위한 연구가 필요하리라 생각되는 바이다.

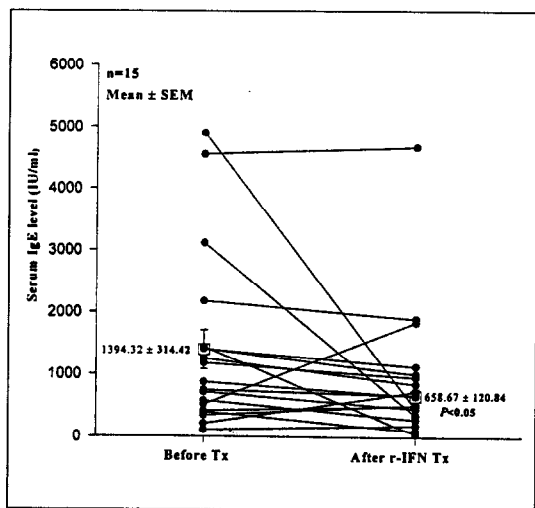


Fig. 10. Changes of serum IgE levels after r-IFN treatment in bronchial asthmatics

## 요 약

### 연구배경 :

기관지천식의 병태생리중 IgE의 합성 및 조절에 IL-4가 중요한 역할을 하며, IFN- $\gamma$ 는 이러한 IL-4의 작용을 길항하는 것으로 알려져 있다. 이를 근거로 최근에 IFN- $\gamma$ 를 아토피 피부염등 IgE가 높은 알레르기성 질환의 치료에 이용하고자 하는 임상적 시도가 있는데, 아직 기관지천식에 대한 임상적 시도는 별로 보고되어 있지 않다. 그러나 IFN- $\gamma$ 는 *in vitro* 에서 말초혈액 다형핵구나 단핵세포에 의한 독성산화물 생성을 증가시킨다는 보고도 있어, 실제 임상에서 IFN- $\gamma$  치료의 임상적 효과는 확실하지 않다. 이에 저자들은 IL-4 매개성 IgE 생성에 대한 IFN- $\gamma$ 의 길항작용에 기초하여, IgE가 정상범위보다 높은 기관지천식 환자들에서 *in vitro* 에서와 같이 *in vivo* 에서도 IFN- $\gamma$ 가 IgE 생성을 억제하는지 여부와, 그 결과로 임상적 치료효과를 나타내는지에 대해 관찰하는 한편, 다형핵구의 독성산화물 생성능에 미치는 영향은 *in vitro* 의 경우와 어떻게 다른지에 대해서 관찰하였다.

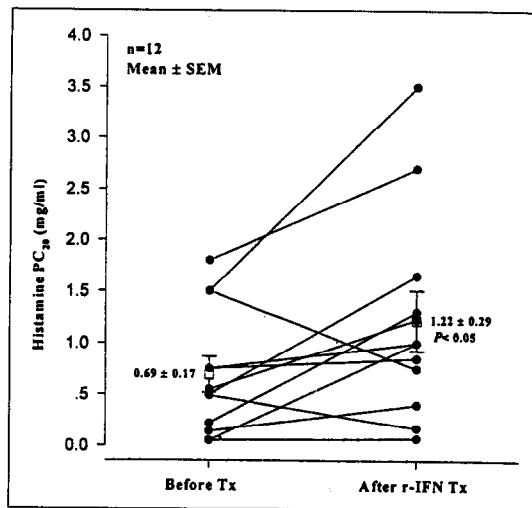


Fig. 11. Changes of histamine PC<sub>20</sub> after r-IFN treatment in bronchial asthmatics

### 대상 및 방법 :

IgE가 200IU/ml 이상이고 정기적인 부신피질호르몬 치료에 반응을 보이지 않는 기관지천식 환자 50명과 정상인 17명을 대상으로, 혈중 CD23+ B-상층액 발현도, sCD23 농도, T-상층액의 IL-4 activity, 말초혈액 다형핵구에 의한 과산화 음이온 생성능등을 측정한 후, 환자군과 정상군간의 차이를 비교하고, 환자군에 대해서는 상기 검사외에 혈중 IgE 농도 및 histamine PC<sub>20</sub>등을 함께 측정하여 IFN- $\gamma$  치료전후의 변화를 관찰하였다. IFN- $\gamma$  치료는 체중당 30,000IU를 매일 4주간 피하주사하였다.

### 결 과 :

#### 다형핵구의 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성능

환자군의 다형핵구는 정상군의 다형핵구에 비해 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성능이 높았다(P<0.05).

IFN- $\gamma$  치료후 추적이 가능했던 환자들에서는 IFN- $\gamma$  치료후에 다형핵구의 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성능이 현저하게 감소하였다(P<0.05).

다형핵구 배양시간에 따라 자연적인 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성능 및 PMA 혹은 fMLP 자극에 의한 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성능을

관찰하였을 때에도, 배양시간 및 자극제의 종류와 무관하게 IFN- $\gamma$  치료후가 치료전에 비해  $O_2^-$  생성능이 감소하는 경향을 보였다.

IFN- $\gamma$  치료전의 환자군의 말초혈액내 CD23+ B-상충액의 발현도는 정상군에 비해 현저히 높았으나 ( $P < 0.05$ ), 치료후 추적검사가 가능하였던 15명의 환자들에서 치료전후에 의미있는 변화를 나타내지는 않았다.

IFN- $\gamma$  치료전의 환자군의 혈청내 sCD23 농도는 정상군에 비해 다소 높은 경향을 보였으며, 이중 치료후 추적검사가 가능하였던 17명의 환자들중 11명(64.7%)에서 치료후에 혈청 sCD23 농도가 감소되었다.

T-상충액의 IL-4 activity는 정상군에 비해 환자군에서 다소 높은 경향을 보였는데, IFN- $\gamma$  치료후에는 큰 변화를 보이지 않았다.

IFN- $\gamma$  치료후 혈청 IgE 농도의 추적검사가 시행되었던 환자 15명 중 9명(60%)에서 치료후 혈청 IgE 농도가 유의하게 감소되었다( $P < 0.05$ ).

IFN- $\gamma$  치료에 따른 기관지과민반응의 변화는 모두 12명의 환자에서 관찰되었는데, 이중 10명(83.3%)에서 IFN- $\gamma$  치료후 histamine PC<sub>20</sub>가 유의하게 호전되는 소견을 보여주었다( $P < 0.05$ ).

#### 결 론 :

이상의 연구결과 IFN- $\gamma$ 는 IgE가 높은 기관지천식 환자의 치료에 유용할 것으로 추측되며, *in vivo*에서의 IgE 합성 및 조절기전과 이에 대한 IFN- $\gamma$ 의 역할을 보다 명확하게 규명하기 위한 노력이 필요할 것으로 생각된다.

#### 감사의 글

Monoclonal 3-5-14 anti-Fc $\epsilon$ R2를 기증하여 본 연구에서 sCD23측정에 도움을 주신 일본 Osaka 대학의 Dr. Kishimoto와 환자들에게 사용한 IFN- $\gamma$ 를 지원해주신 주식회사 럭키에 감사를 드린다.

#### 참 고 문 헌

1. Krishna MT, Chauhan AJ, Holgate ST : Molecular mediators of asthma : current insights. Hospital Practice (Office Edition) 31(10) : 115, 1996
2. Erb KJ, Le Gros G : The role of Th2 type CD4+ T cells and Th2 type CD8+ T cells in asthma. Immunol Cell Biol 74(2) : 206, 1996
3. Boguniewicz M, Jaffe HS, Izu A, Sullivan MJ, York D, Geha RS, Leung DY : Recombinant gamma interferon in treatment of patients with atopic dermatitis and elevated IgE levels. Am J Med 88 : 365, 1990
4. Saito H, Hayakawa T, Yui Y, Shida T : Effect of human interferon on different functions of human neutrophils and eosinophils. Int Archs Allergy Appl Immunol 82 : 133, 1987
5. Kemmerich B, Rossing TH, Pennington JE : Comparative oxidative microbicidal activity of human blood monocytes and alveolar macrophages and activation by recombinant gamma interferon. Am Rev Respir Dis 136 : 226, 1987
6. B yum A : Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J Clin Lab Invest 21(Suppl 97) : 77, 1968
7. Absolom DR : Basic methods for the study of phagocytosis. In Method in Enzymology edited by Colowick SP and Kaplan NO, Vol 132, p151, Orlando Florida, Academic Press Inc., 1986
8. Sedgwick JB, Vrtis RF, Gourley MF, Busse WW : Stimulus-dependent differences in superoxide anion generation by normal human eosinophils and neutrophils. J Allergy Clin Immunol 81 : 876, 1988
9. Yasuhide U, Katsushi T, Keiji K, Seizi K, Hans DO : Effect of Interleukin-10 on Anti-CD40-

- and Interleukin-4-Induced Immunoglobulin E Production by Human Lymphocytes. *Int Arch Allergy Immunol* 1110 : 225, 1996
10. Lin KL, Hsieh KH, Huang JH, Wang SY : Major histocompatibility complex (MHC) class II restriction, lymphokine production, and IgE regulation of house dust mite-specific T-cell clones. *J Clin Immunol* 12 : 271, 1992
  11. Bentley AM, Meng Q, Robinson DS, Hamid Q, Kay AB, Durham SR : Increases in activated T lymphocytes, eosinophils, and cytokine mRNA expression for interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in bronchial biopsies after allergen inhalation challenge in atopic asthmatics. *Am J Respir Cell Mol Biol* 8 : 35, 1993
  12. Robinson DS, Hamid Q, Ying S, Tsicopoulos A, Barkans J, Bentley AM, Corrigan C, Durham SR, Kay AB : Predominant TH2-like bronchoalveolar T-lymphocyte population in atopic asthma. *N Engl J Med* 326 : 298, 1992
  13. Walker C, Bode E, Boer L, Hansel TT, Blaser K, Virchow JC Jr : Allergic and nonallergic asthmatics have distinct patterns of T-cell activation and cytokine production in peripheral blood and bronchoalveolar lavage. *Am Rev Respir Dis* 146 : 109, 1992
  14. Zhang X, Polla B, Hauser C, Zubler RH : T cells from atopic individuals produce IgE-inducing activity incompletely blocked by anti-interleukin-4 antibody. *Eur J Immunol* 22 : 829, 1992
  15. Saito H, Hayakawa T, Mita H, Yui YS, Shida T : Augmentation of leukotriene C4 production by gamma interferon in leukocytes challenged with an allergen. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 87 : 286, 1988
  16. Van Oosterhout AJ, Stam WB, Vanderschueren RG, Nijkamp FP : Effects of cytokines on beta-adrenoceptor function of human peripheral blood mononuclear cells and guinea pig trachea. *J Allergy Clin Immunol* 90 : 340, 1992
  17. Cembrzynska-Nowak M, Szklarz E, Inglot AD, Teodorczyk-Injeyan JA : Elevated release of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by bronchoalveolar leukocytes from patients with bronchial asthma. *Am Rev Respir Dis* 147 : 291, 1993
  18. Corrigan CJ, Kay AB : CD4 T-lymphocyte activation in acute severe asthma. Relationship to disease severity and atopic status. *Am Rev Respir Dis* 141 : 970, 1990
  19. Corrigan CJ, Brown PH, Barnes NC, Tsai JJ, Frew AJ, Kay AB : Glucocorticoid resistance in chronic asthma. Peripheral blood T lymphocyte activation and comparison of the T lymphocyte inhibitory effects of glucocorticoids and cyclosporin A. *Am Rev Respir Dis* 144 : 1026, 1991
  20. Scholz D, Brandt-Hofflin K, Hahn HL : Effect of recombinant gamma interferon on allergic skin reaction and bronchoconstriction (Abstract). *Pneumologie* 44(Suppl 1) : 431, 1990
  21. Cassatella MA, Guasparri I, Ceska M, Bazzoni F, Rossi F : Interferon-gamma inhibits interleukin-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. *Immunology* 78 : 177, 1993
  22. Lebedin YS, Raudla LA, Chuchalin AG : Serum levels of interleukin 4, interleukin 6 and interferon-gamma following in vivo isotype-specific activation of IgE synthesis in humans. *Int Arch*

- Allergy Appl Immunol **96** : 92, 1991
23. Pene J : Regulatory role of cytokines and CD23 in the human IgE antibody synthesis. Int Arch Allergy Appl Immunol **90**(Suppl 1) : 32, 1989
24. Kicza K, Fischer A, Pfeil T, Bujanowski-Weber J, König W : Cell-cell interactions for CD23 expression and soluble CD23 release from peripheral lymphocytes of atopic donors. Immunology **68** : 532, 1989
-