

자연살세포 억제와 저용량 방사선 골수 조사 방법으로 유도된 혼합 키메라의 동종 체도 이식거부반응 억제 효과

가톨릭대학교 의과대학 내분비대사내과 교실, 가톨릭 의정부 혈액종양내과, 서울대학교 의과대학 미생물학 교실

박헌석·조석구·박정규·홍옥기·김지원·김보령·윤건호

The effects of mixed chimerism conducted by natural killer cell depletion
with non myeloablation on islet allograft rejection

Heon-Seok Park, Seok-Goo Cho¹, Chung-Gyu Park², Oak Kee Hong,
Ji-Won Kim, Bo-Ryung Kim, Kun-Ho Yoon

*Division of Endocrinology and Metabolism, Division of Hemato-Oncology¹, Department of Internal Medicine,
The Catholic University of Korea Department of Microbiology and Immunology,
Tumor Immunity Medical Research Center, Transplantation Research Institute,
Seoul National University College of Medicine², Seoul, Korea*

- Abstract -

Background: Because of the shortage of human pancreas and immunorejection, very small fraction of patients with type 1 diabetes can be treated with islet transplantation. The immune tolerance induction for overcoming the immune rejection of transplanted islets could be conducted by hematopoietic mixed chimerisms with various invasive methods. The purpose of this study is to investigate the effect of mixed chimerisms conducted by newly developed minimally invasive methods on islet allografts rejection in streptozotocin induced diabetic mice.

Methods: Recipient, Balb/c (H-2K^d) mice were injected intraperitoneally with anti-asialoGM1 antibody at one day before bone marrow transplantation. There were received total body irradiation at a dose of 500 cGy and followed by tail vein injection of the 2×10^7 T-cell depleted bone marrow cells from C57BL/6 (H-2K^b). Mixed chimerism mice were determined by gDNA PCR of lymphocyte MHC class I gene (H-2K) on 21st day. Streptozotocin induced diabetic mixed chimera mice were received islet transplantation from bone marrow donors. Grafts, spleen and peripheral blood were obtained from the mixed chimera mice, and there were used by Immunohistochemical staining, flow cytometric analysis and gDNA PCR on 21st day.

Results: The blood glucose levels of streptozotocin induced diabetic mice were normalized by transplantation of bone marrow donor islets and maintained during 30 days. After removal of first islet allografts, hyperglycemia was re-established. We could re-confirmed donor specific tolerance of transplanted islets by second transplantation of bone marrow donor islets. Normoglycemia was maintained during 21 days after second islet transplantation. Furthermore islet grafts from MHC-mismatched third party mice were immediately rejected. Flow cytometric analysis results suggest that the mixed chimerism mice were maintain during the whole study period.

Conclusion: The mixed chimerism model conducted by newly developed and minimally invasive method effectively prevents the islet allografts rejection in STZ-induced mixed chimerism

mice (J Kor Diabetes Assoc 30:54~63, 2006).

Key words: Insulin, Islet, Transplantation, Mixed chimera, Type 1 diabete

서 론

자가 면역 기전에 의한 베타세포 파괴로 인슐린의 분비가 저하되어 유발된 제1형 당뇨병은 적절한 혈당 조절이 어려워 결국 당뇨병성 만성 합병증이 발생함으로 심각한 질환으로 발전된다^{1,2)}. 따라서 완치할 수 있는 치료법의 개발이 필요하며, 췌장 혹은, 췌도 이식이 임상에 소개되고 있다. 그러나 공여자 췌장의 심각한 부족과 면역거부반응 등의 장애로 보편적인 치료 방법으로 자리 잡지 못하고 있다. 장기의 이식이 성공적이라도 지속적인 면역억제제의 사용은 이후, 수혜자에게 여러 가지 요인으로 부작용을 유발하게 된다³⁾. 이러한 문제의 근본적인 해결책으로 면역반응 극복에 영구적으로 안정적이며, 효율적이고, 안전한 방법들의 개발이 필요한 상황이다⁴⁾. 그중 공여자의 골수를 수혜자에게 이식함으로써, 수혜자가 공여자의 조직적합항원에 대한 내성을 가지게 하는 키메라 방법이 주목 받고 있다.

최근 골수 이식을 이용해 혼합 키메라를 유도하여 면역 내성을 유도하는 방법으로 면역거부반응을 극복할 수 있는 새로운 치료법들이 다양하게 연구되고 있다. 혼합 키메라는 완전 키메라가 가지고 있는 부작용인 이식편대숙주병 (graft versus host disease, GvHD)이 최소화된다는 점에서 주목받고 있다^{5,6)}. 혼합 키메라가 유도되면 골수 공여자의 장기 이식 후 대부분 성공적인 면역 내성을 유도하는 것으로 보고되고 있다⁶⁻⁸⁾. 그러나 혼합 키메라 (혹은 완전 키메라) 유도를 위한 방사선 조사 및 면역억제제 사용에 의한 면역기능의 심각한 억제 및 장기 손상 등의 부작용과, 고비용의 부담이 있다. 따라서 골수의 기능 억제와, 이식 비용을 최소화하면서도 혼합 키메라를 성공적으로 유도할 수 있는 새로운 방법의 혼합 키메라 유도법이 개발된다면 이식학 분야에 커다란 발전을 이룰 수 있을 것으로 기대되고 있다. 새로운 방법 중 수혜자의 자연살세포의 작용을 억제하여 이식하는 방법이 있다. 이러한 방법이 고안된 배경은 몇몇의 연구들에서 골수의 안정적인 이식에서 수혜자의 자연살세포의 중요성이 보고 되고 있기 때문이다⁹⁾. 또한 자연살세포는 이식된 조직적합항원 부적합 세포에 가장 먼저 이식 후 거부반응을 유발하는 것으로 보고 되고 있다^{10,11)}.

본 실험에서는 저 용량의 방사선을 단 한 차례 조사하고, 수혜자의 자연살세포 억제제를 처리한 후에, 항 Thy-1.2를

이용하여 T-세포를 제거한 공여자의 골수를 이식하였다¹²⁾. 이러한 방법을 통해서, 자연살세포의 억제에 의해 이식된 골수가 생착 되어 혼합 키메라가 성공적으로 유도되어있는가를 확인하였다. 또한 성공적으로 유도된 혼합 키메라 Balb/c 생쥐에 당뇨병을 유발시킨 후 골수 공여자의 췌도를 이식하여 면역관용이 발생하는 가를 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 실험군과 대조군

혼합 키메라를 만들기 위해서 공여자는 조직적합항원 유전자 H-2K^b인 C57BL/6 (Orient, Seoul, S. Korea) 생쥐를 사용하였고, 수혜자는 H-2K^d 인 Balb/c (Orient) 생쥐를 이용하였다. 췌도를 제공하는 생쥐는 골수 공여자인 C57BL/6와, 골수를 제공하지 않은 제3종으로 H-2K^k 인 C3H/H (Orient) 생쥐를 실험 대조군으로 이용하였다.

혼합 키메라 Balb/c의 대조군은 면역거부반응 내성을 비교하기 위해 wild Balb/c를 두어 골수 공여자인 C57BL/6의 췌도를 각각 이식하여 군마다의 내성 유무를 비교하였다. 비교 방법은 고혈당으로 유도한 후, C57BL/6의 췌도 이식 후 혈당 변화와, 이식된 췌도의 인슐린 염색 유무로 평가하였다. 골수 공여자인 C57BL/6 췌도의 선택적인 면역거부반응 내성을 비교하기 위하여 골수 비공여자인 C3H/H의 췌도를 혼합 키메라 Balb/c에 이식하여 면역거부반응을 비교하였다. 비교 방법은 이식 한 후 C57BL/6의 췌도와 동일한 시기에 수거하여 인슐린 염색을 실행하여 비교하였다.

2. 실험 방법

혼합 키메라 Balb/c의 유도는 그림 1-A 와 같이 골수 이식 전날에 anti-asialoGM1 (Wako Chemicals, Osaka, Japan) 40 μ L를 D-PBS (Gibco, N.Y, USA) 200 μ L에 섞어서 주입하여 수혜자의 자연살세포를 억제한 후 다음 날에 전신방사선 조사를 한 후 골수 이식을 수행하였다. 골수 이식 후 혼합 키메라 유도를 확인한 후 췌도 이식 6일 전에 Streptozotocin (STZ, Sigma & Aldich, St. Louis, USA)을 주사하여 혼합 키메라 Balb/c의 혈당이 300 mg/dL 이상 오른 것을 확인하고, 최소 3일간 지속된 다음, 골수 공여자의 췌도 이식을 시행하였다. 골수 공여자의 췌도를 이식 후 30

일이 지난 뒤 이식 부위를 제거한 후 다시 혈당이 오르는 것을 확인하여 골수 공여자의 체도가 면역거부 반응에 내성을 가졌다는 것을 1차 확인 한 후, 동일한 방법으로 2차 이식을 하여 골수 공여자의 조직적합항원에 대한 내성을 재 확인 하였다. 그리고 2차 이식 시에 골수를 제공하지 않은 제3종의 체도를 2차 이식 부위의 반대편 신장 막하에 동일한 날에 이식하여 이후 최종적으로 2차 이식 부위를 수거할 때에 같이 수거하여 면역염색법으로 체도의 면역거부 반응에 대해 대조 확인하였다 (Fig. 1-B).

Wild Balb/c 역시 STZ를 이용하여 당뇨병을 유도한 후 골수 공여자의 체도를 동일한 방법으로 이식하여 이식 후 면역거부 반응에 대해서 대조하였다. 단 2차 이식은 수행하지 않았다.

3. 혼합 키메라 Balb/c 유도

골수 이식 하루 전에 40 μ L의 anti-asialoGM1을 수혜자인 Balb/c (H-2k^d)에게 주사하였다. 골수 이식 당일 Balb/c

에 방사선을 500 cGy 세기로 전신방사선에 한차례 노출시켰다. 골수 공여자인 C57BL/6 (H-2K^b)의 대퇴골과 경골에서 골수를 뽑은 후 100 μ m 나일론 체 (Becton Dickinson, NJ, USA)에 통과시켰다. 걸러진 세포들을 1000 rpm에 10 분간 원심분리를 하였다. 상층액을 제거하고 Dulbecco's PBS (D-PBS, Gibco)를 첨부하여 1500 rpm에서 3분간 원심분리를 하는 방법으로 두 차례 세척을 하였다.

C57BL/6에서 채취된 골수에서 T-세포들을 제거하기 위하여 mini magnetic cell sorting (Miltenyi biotec, CA, USA)을 이용하였다. 자성을 가진 micro bead conjugated anti Thy-1.2 항체 (Miltenyi biotec)를 채취된 골수 1x10⁷/ μ L 당 10 μ L를 넣었다. 항체를 넣은 후 15분간 4 $^{\circ}$ C에서 배양한 후, mini MACS column 에 통과시켰다. 통과되어 나온 골수는 D-PBS를 이용하여 세척 한 후 이식에 이용하였다. 방사선 조사 10~30분 후 T-세포가 제거된 2x10⁷ 개의 C57BL/6의 골수를 250 μ L D-PBS 에 섞어 꼬리의 정맥에 한 차례 주입하였다 (Fig. 1-A). 혼합 키메라 발생은 꼬리에

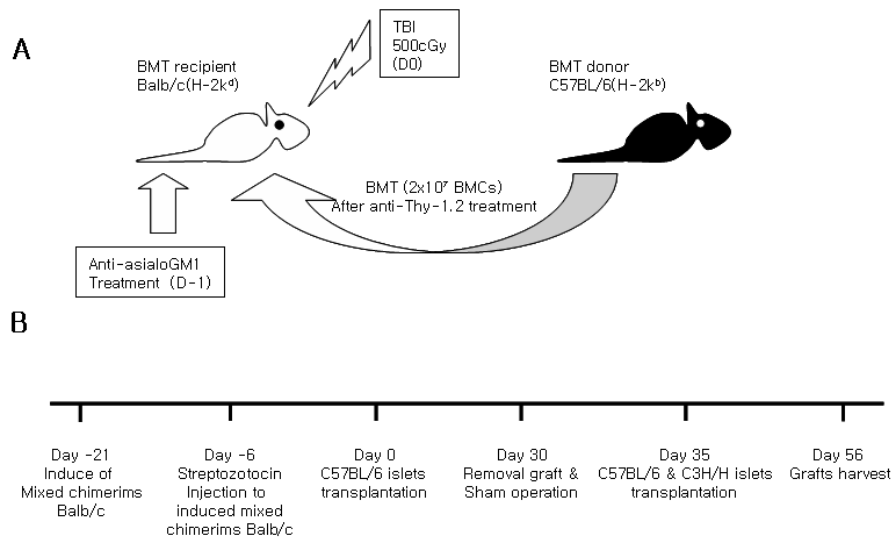


Fig. 1. Schematic of experimental design. (A) Method of mixed chimerism mice induction. -1 day. Anti-asialoGM1 was injected to Balb/c. Total body irradiated and 2x10⁷ Bone marrow cells were transplanted to the Balb/c on 0 day. (B) Islet transplantation schedule in STZ induced type 1 DM mixed chimerism mice. On 21 days before islets transplantation to induced mixed chimerism in Balb/c. On 6day before transplantation, type 1 diabetes was induced by STZ injection. On day 0, 1st B6 islets transplantation to the mixed chimerism mice. Graft removal or sham op was done on 30th day. On the 35th day, the second islet transplantation was performed, at the same time third party islets were co-transplanted on the other side of the same kidney. Finally, on the 56th day and the 65th day, all grafts, spleen, peripheral blood and pancreas were harvested.

TBI: Total body irradiation
 BMCs: Bone marrow cells
 BMT: Bone marrow transplantation
 STZ: Streptozotocin
 DM: Diabetes mellitus

서 채취한 말초 혈액을 이용한 지놈 DNA 중합효소 연쇄반응을 통해 확인하였다.

4. 혼합 키메라 유도 확인

이식된 골수가 제대로 정착하여 정상적으로 세포 분열하여 혈액 세포들을 방출하는지 확인하기 위해 혼합 키메라 Balb/c 의 꼬리 정맥에서 200 μ L의 말초혈액을 추출하였다. 지놈 DNA를 추출하기 위하여 Mini blood QIAamp (QIAGEN, CA, USA)을 사용하였다. 중합효소 연쇄반응을 수행하기 위하여 조직적합항원 Class I 유전자인 H-2K gene 의 primer인 forward: 5'-cgactgtagaaccttagctg-3' 와 reverse: 5'-tggagvtgtctcctttag-3'을 사용하였다. Perfect PreMix (Takara Biomedicals, Otsu, Japan)를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 수행하였고, 2 % agarose gel에서 전기영동 하여 C57BL/6과 Balb/c 간의 염기서열 크기 차이를 이용하여 확인하였다.

5. 생쥐 체도 분리

7주령의 C57BL/6의 수컷들을 1:4 로 혼합한 림폰 (Bayer, Leverkusen, German)과 케타민 (유한양행, S. Korea)을 주사용 식염수 (대한약품, Kyeoki, S. Korea)로 1:1로 희석하여 마취하고 Media 199 (M199, Gibco) 1 ml 당 collagenase P (Roche, Basel, Switzerland) 1 mg을 용해시킨 용액 2 ml를 체장에 연결되는 담관을 통해 주입하여 37 °C 수조에서 60 rpm 으로 25분간 흔들며 진탕하여 소화시켰다. 10% bovine serum (Gibco)을 섞은 M199로 세 번 세척을 한 후 500 μ m의 구멍크기를 가진 체 (Sigma-Aldrich)로 여과하여 일정 크기 이상의 체장 조각은 제거하였다. 체도의 순도를 높이기 위하여 Histopaque 1077 (Sigma-Aldrich)로 밀도차를 이용한 분리방법으로 체도를 분리하였다. 분리한 체도들을 M199 (+ 10% bovine serum)로 세척하여 체도 수를 확인한 후에 10 % Fetal Bovine Serum (JBI, Taegu, S. Korea)을 섞은 Low glucose D-MEM (Gibco)으로 옮겨서 37 °C 5 % CO₂ 배양기에서 약 1시간 배양 한 후 이식에 이용하였다.

6. 체도 이식 및 이식편 제거와 수거

STZ를 주사하여 혼합 키메라 Balb/c의 혈당이 ≥ 300 mg/dL 로 오른 후 3일 후에 이식을 시행하였다. 분리한 C57BL/6 의 체도를 CO₂ 배양기에서 1시간 배양한 후 100~250 μ m 크기들을 수거하여 500개씩을 각각 PE-50 tube (Becton Dickinson)에 넣은 후 신장 피막하에 이식하였다. 이식을 위하여 Hamilton syringe를 이용하여 균일한 압력으로 체도가 오른쪽 신장막하에 외부로 분출되지 않도록 하면서 이식하였다. 이식 후 열봉합기를 이용하여 이식을 위해 절개한 부분을 열로 봉합하였다.

이식 후 30일 날에 이식된 C57BL/6 의 체도 부위를 수거하기 위하여 이식된 혼합 키메라 Balb/c를 마취한 후, 이식 부위를 열봉합기를 이용하여 열로 제거하였다. 열로 제거한 이유는 이후에 진행되어질 2차 이식 부위는 직접 신장을 채취할 것이므로, 이러한 처리 후 1차 이식이 되어진 신장이 남아서 2차 이식 부위가 있는 신장을 채취한 후에도 생존하도록 하여, 혈당변화를 관찰하기 위한 것이다. 또한 열처리를 직접 이식 부위에 하지 않고 주변에만 열처리를 하는 허위 수술을 하는 군을 분리하여, 이식된 체도에 의해 혈당이 유지되었는지를 알아보았다. 이후 최종 수거를 할 때는 같이 수거하여 염색을 통하여 제대로 제거가 되어, 이후 실험 결과에 미치는 영향을 확인하였다.

이식 부위를 제거한 5일 후 C57BL/6 와 C3H/H 의 분리된 체도를 처음 C57BL/6 체도를 제거한 군과, 허위 수술한 군 모두의 왼쪽 신장막의 각기 다른 위치에 이식하였다. 2차 이식 후 17일 째와 24일째에 처음 이식된 C57BL/6 체도를 제거한 군과, 허위 수술한 군 모두에서 이식된 C57BL/6, C3H/H 의 이식 부위를 수거하였다. 또한 허위 수술된 군의 처음 이식된 C57BL/6 의 체도 1차 이식 후 55일 째에 수거하였다 (Fig. 1-B).

7. 혈당측정 및 복강 내 당부하 검사

혈당의 측정은 꼬리를 조금 자른 후 나오는 혈액을 이용하여 혈당측정기 (Roche)로 오전 9~10시에 확인하였다. 측정은 격일과 3일 간격으로 수행하였다. 복강 내 당부하 검사는 이식편을 제거하기 2일 전에 수행하였다. 25% 포도당을 (대한약품) 2 g/kg 용량으로 복강 내에 주입한 후 30분, 60분, 90분 120분에 혈당을 측정하였다.

8. 유세포 분석법

비장은 막자를 이용하여 잘게 부수어 100 μ m 나일론 체를 통과시킨 후 RBC lysis buffer를 처리한 후 사용하였다. RBC lysis buffer 처리를 한 후 비장세포들을 1% FBS를 첨가한 Hank's balanced salt solution (HBSS, JBI)에 항체를 첨부하여 염색을 하였다. 혼합 키메라 비율은 조직적합항원 class I 항원과 결합하는 바이오틴이 결합된 항 H-2K^b을 스트렙토아비딘 APC (Becton Dickison)로 결합한 것과, FITC conjugated anti H-2K^d (Becton Dickison)로 염색하여 골수의 수혜자와 공여자의 비율을 측정하였다. 혼합 키메라 Balb/c에서 공여자의 T-세포, B-세포 비율은 스트렙토아비딘 APC conjugated H-2K^b에 반응하는 세포들을 각각 PE conjugated anti-CD4, PE conjugated anti-CD8a, PE conjugated anti-CD45R/B220 (Becton Dickison)로 이중 염색하여 측정하였다.

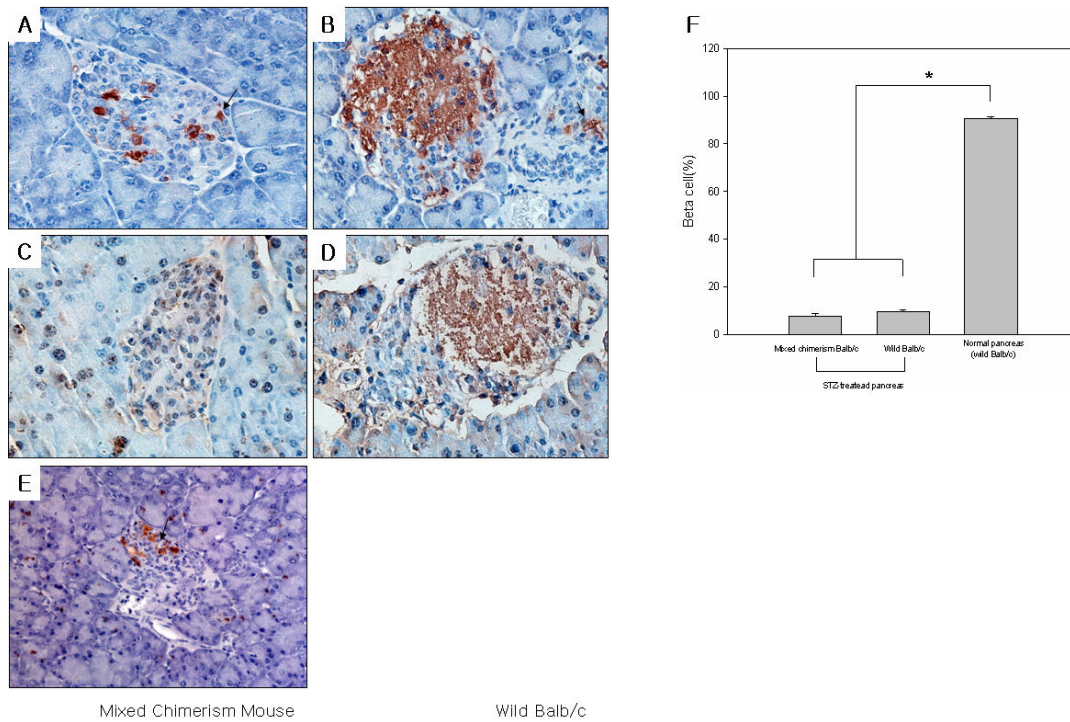


Fig 2. Pancreatic damage after streptozotocin treatment. Insulin immunohistochemical staining (Arrow) in wild Balb/c (B) and mixed chimerism Balb/c (A) pancreatic islet on 1 day before islet transplantation. BrdU immunohistochemical staining in wild Balb/c (D) and mixed chimerism Balb/c (C). pancreatic islet on 6th day after STZ treatment. Insulin immunohistochemical staining in Mixed chimerism Balb/c (E). on 65th day after islet transplanted of bone marrow cell donor. Beta cell percentage in islets of wild Balb/c and mixed chimerism Balb/c on -1 day (F). (Original magnification x400, * $P \leq 0.001$)

9. 면역조직염색 법

췌장과 이식된 췌도를 10% 포르말린 (Sigma-Aldrich)으로 고정한 후 파라핀으로 포매하였다. 인슐린은 1:100 비율로 Guinea pig anti-insulin (Zymed, CA, USA), CD4 (+) T-세포는 mouse anti-CD4 (Becton & Dickinson)를 일차 항체로 사용하였다. 세포분열을 보기 위해 anti mouse anti-BrdU (Neomarkers, CA, USA)을 이용하였다. Vectastin ABC kit (Vector laboratories, CA, USA)을 사용하여 비 특이적 반응 억제와, 스트렙토아비딘-바이오티린 결합을 유도 한 후, Diamin- obenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma-Aldrich)로 발색하였다.

10. 베타세포 비율 측정

조직 내 베타세포의 상대적 비율은 현미경하에서 200배율 렌즈를 통하여 비디오 화면으로 투시한 다음 point count 법으로 측정하였다¹³⁾.

11. 통계적 검증

각 실험 결과는 평균 \pm 표준편차 (standard error)로 표시하였고, 각 군 간의 비교는 독립 표본 *t-test*로 유의 성을 확인하였으며, *p*값은 0.05 이하를 유의수준으로 하였다.

결 과

1. 말초 혈액의 지놈 DNA 중합효소 연쇄반응을 통한 혼합 키메라 유도 확인

혼합 키메라 Balb/c의 말초혈액에서 추출한 지놈 DNA 중합효소 연쇄반응 결과에서는 C57BL/6의 유전자 (H-2K^b) 만이 나타났다 (Fig. 3).

2. STZ 에 의한 베타세포 손상 및 당뇨병 발생 확인

STZ를 투여한 후 1일째부터 혈당은 급격히 상승하였다. 그 후 300mg/dL 이상을 3일 이상 유지되는 것을 관찰하였다. STZ 투여 3일 후 췌장 베타세포의 양상은 정상 Balb/c, 혼합 키메라 Balb/c 모두 인슐린 염색되는 세포가 거의 발견되지 않았다 (Fig. 2-A, 2-B). Fig. 2-B에서 염색된 부분은 베타세포가 죽은 후의 잔류물로 보이며, 핵의 수가 확연히 줄어들어있다는 것을 알 수 있다. Point count를 사용하여 베타세포의 비율을 확인 한 결과, 정상 췌장에서의 베타세포의 비율에 비해 현저히 떨어졌으며, mixed chimerism Balb/c 와 wild Balb/c 간의 유의한 차이는 없었다 (2-F). BrdU 염색을 하여 췌장 베타세포의 재생하는 것은 큰 차이

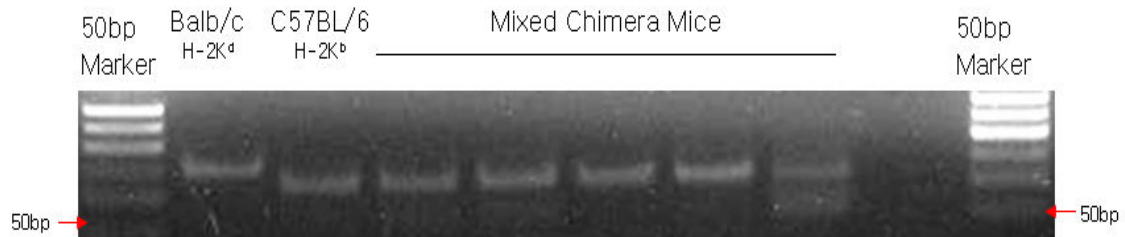


Fig. 3. Induced mixed chimeras Balb/c confirmed by genomic DNA PCR in peripheral blood.

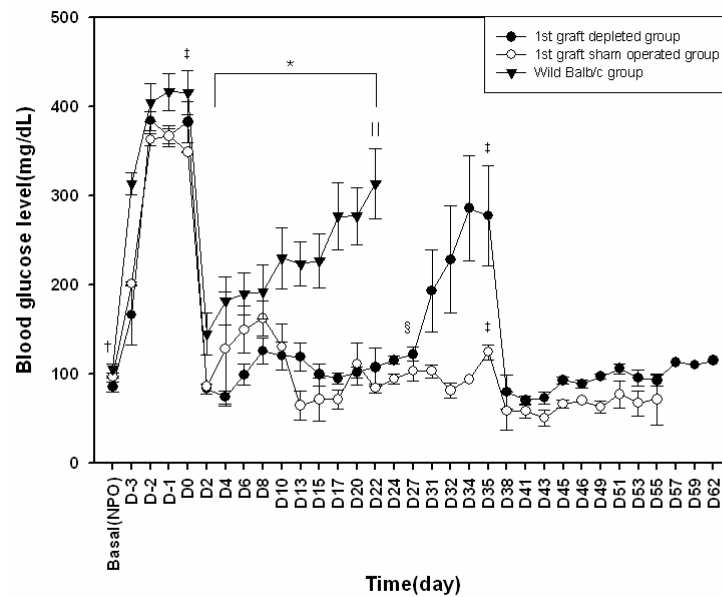


Fig. 4. Blood glucose levels were measured after islet transplantation. Islets of bone marrow cell donor were transplanted to STZ- induced diabetic mixed chimeras Balb/c. Islet of bone marrow cell donor and third party were re-transplanted after depleted(30th day) of the first graft (●- 1st graft depleted group n=4, ○- 1st graft did not deplete group n=2). Islets of bone marrow cell donor were transplanted to wild Balb/c mice (▼- n=14).

* $P \leq 0.001$ (●- vs ▼- & ○- vs ▼-)

+ Streptozotocin injection (300mg/Kg)

‡ Islet transplantation

§ IP-GTT (●- & ○-)

|| End point of death (▼-)

점이 나타나지 않았다 (Fig. 2-C, 2-D).

이식 후 65일 후의 혼합 키메라 Balb/c의 췌장을 수거하여 인슐린 염색을 한 결과에서 역시 베타세포의 수는 현저히 감소되어 있는 것을 관찰할 수 있어 (Fig. 2-E), 췌도 이식 후 혈당이 내려간 후 지속적으로 혈당조절 능력을 가지는 것은 오직 이식된 췌도에 의한 것임을 예측할 수 있다.

3. 혈당 변화

혼합 키메라 Balb/c는 골수의 공여자인 C57BL/6 췌도의 1차 이식 후 오랜 기간 혈당이 정상으로 유지되었으며, 1차

이식 부위를 제거하자마자 다시 혈당이 오르는 것을 확인할 수 있었다 (n=4). 2차로 췌도를 이식 하였을 때에도 1차 이식과 동일하게 혈당이 정상화 되었다 (Fig 4). 정상 Balb/c 에서 C57BL/6 췌도는 이식 후 10일째부터 다시 고혈당이 유발되기 시작하여, 이식 후 17일째에는 혈당이 300 mg/dL 이상으로 올라갔다.

4. 면역조직염색법을 통한 골수 공여자, 제3종 췌도 이식 부위의 상태 비교.

이식되어진 췌도에 의해서만 혈당이 조절이 되는 것을

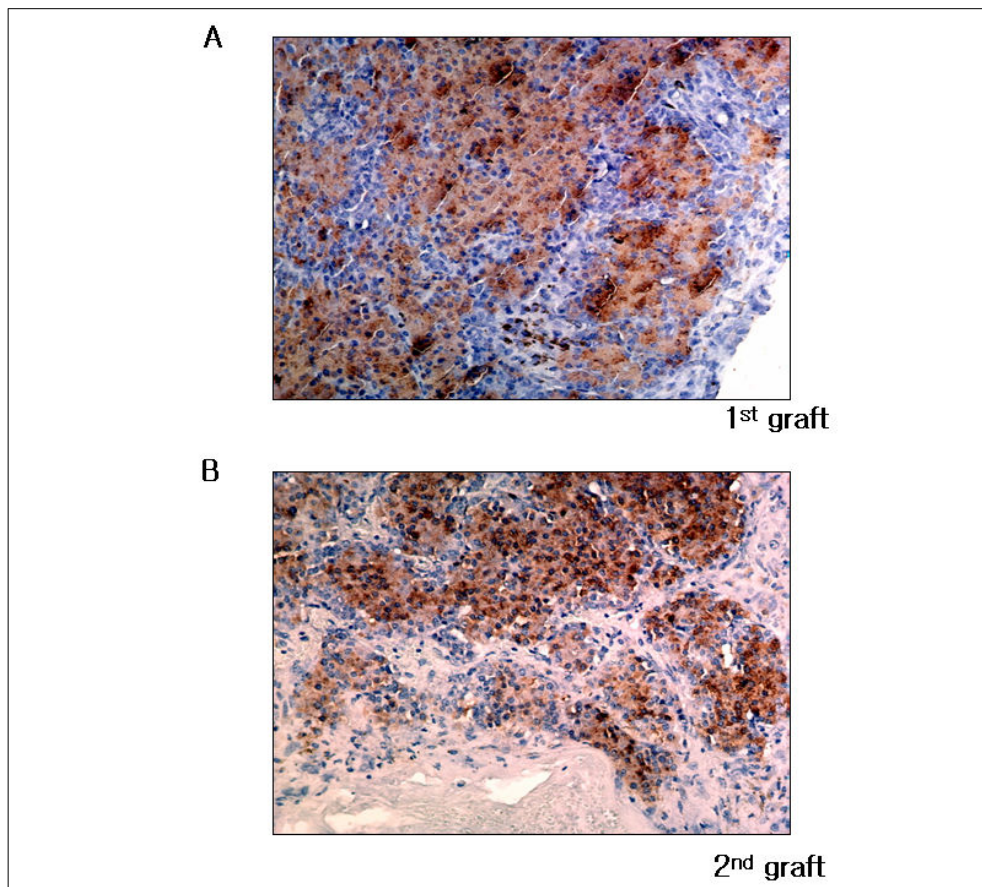


Fig 5. Insulin immunohistochemical staining in islet graft. (A) Islet of bone marrow cell donor in the graft was stained with insulin immunohistochemical staining at 56th day. (B) Second islet 1st graft depleted group were stained with insulin immunohistochemical staining at 26 days after 2nd islet transplantation. (Original magnification x 400)

확인하기 위하여 수행되어진, 1차 이식을 한 후 열봉합기를 이용하여 제거한 실험군의 1차 이식 부위는 신장막조차 노출되어 있었으며, 인슐린 염색은 되지 않았다.

두 번 이식된 골수 공여자의 체도는 이식 후 58일째 제거하지 않은 1차 이식 부위와, 2차 이식 부위를 모두 수거하여 인슐린 염색을 하였을 때 인슐린 염색은 체장에서 인슐린 염색 한 것과 동일하게 잘 되었으며, 세포의 상태 매우 양호하였다 (Fig. 5). 혼합 키메라 Balb/c 에 이식된 제3 종 체도는 관찰되지 않았다.

5. 유세포 분석법을 이용한 혼합 키메라 비율 확인.

2차 이식 후 체도를 수거하면서 비장을 같이 채취하여 유세포 분석방법을 이용하여 골수 공여자의 전체 비율과, T-세포, B-세포의 비율을 각기 측정하였다 (Fig. 6). 골수 공여자의 임파구 비율은 94.12%, 52.57%, 90.71%의 비율로 나타났으며, 이 중에서 CD4+ T-세포의 비율은 7.90%, 3.40%, 10.84%이며, CD8+ T-세포는 8.82%, 2.80%, 2.97% 비율이었다. 반면 B-세포는 58.07%, 33.56%, 64.30%로 T-

세포 보다 매우 높은 비율로 측정되었다.

고 찰

제1형 당뇨병의 근본적인 치료는 지속적으로 체내에 인슐린이 분비되어 혈당이 조절되는 것을 의미하는 것으로, 체장 혹은 체도를 이식함으로써 충족된다. 하지만 조직적합항원이 다름으로 인하여 다양한 면역기전작용에 의해 이식된 세포, 조직, 장기들은 이식거부반응으로 소실되어지게 된다. 따라서 면역억제제, 조직적합항원이 맞는 장기 이식을 필요로 한다. 이식 후 면역거부반응을 억제하기 위하여 면역억제제를 투여하여야 하는데, 몇몇 면역억제제에서 오히려 체도 베타세포에 악영향을 주는 부작용이 발생된다^{14,15}. 그로 인해 면역억제제를 이용하지 않으면서도 조직적합항원 부적합 체장, 체도를 이식할 수 있는 방법으로 키메라법이 제시되었다¹⁶. 키메라는 공여자의 세포로 완전히 바뀐 완전 키메라, 수혜자와 공유하는 혼합 키메라로 구분된다.

혼합 키메라는 완전 키메라가 골수 공여자의 조직적합항

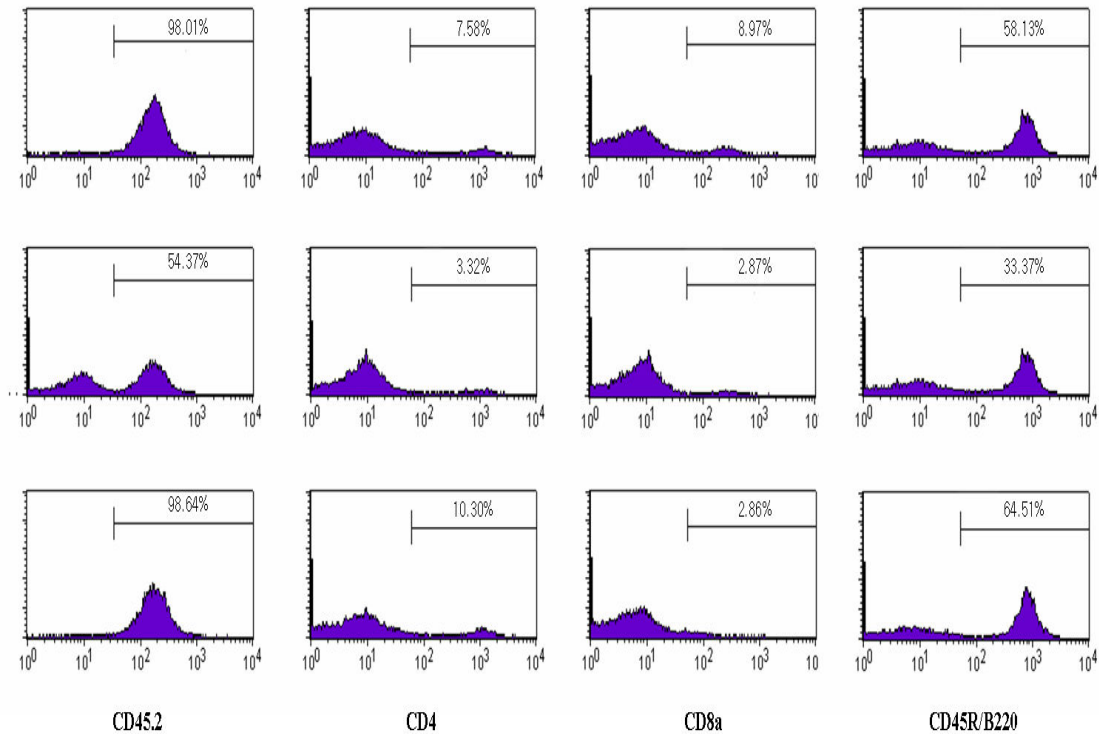


Fig 6. The diagram of flowcytometric analysis in mixed chimerism Balb/c. Splenocytes were stained with C57BL/6 marker CD45.2 on mixed chimerism mice. Histogram of C57BL/6 origin lymphocyte (CD4, CD8a, CD45R/B220; B-cell) has been shown from the CD45.2 positive region.

원에 대해서만 내성을 가지고 있는 것에 비해, 공여자, 수혜자의 모두에 대한 조직적합항원 내성을 가지게 됨으로써 공여자의 장기가 이식 되었을 때 면역 내성이 유도됨은 물론, 수혜자에서의 이식편대숙주병 (GvHD; 발진, 염증 등)이 감소되는 장점을 가지고 있다. 이러한 이유는 혼합 키메라는 골수 완전 제거 방법을 쓰는 것에 반해 완전 혼합 키메라는 계획적인 골수 비완전 제거 방법을 사용하기 때문이다¹⁷⁾. 혼합 키메라 유도를 위해 현재까지 다양한 방법들이 소개되고 있으며, 대부분은 골수에 일정량의 방사선 조사 및 항 T-세포 혹은 자연살세포 항체를 이용하여 이식되어질 공여자의 골수 생착을 유도하는 방법들이 있다. 이중 자연살세포는 골수 이식 후 초기에 먼저 작용하는 것으로 알려졌으며, 이 후의 자연살세포에 유도되어진 항원특이반응이 활성화되어 T-cell 에게도 정보를 전달하여 본격적인 이식되어진 골수 세포에 대한 면역작용이 발생되어지는 것으로 알려지고 있다^{9,11)}. 그렇기 때문에 골수 이식을 위해서는 초기의 자연살세포 억제와 중요하다고 보이며, 이렇게 유도되어진 면역관용은 1주일간 지속되어지며, 이 후에는 자연살세포가 정상적인 수치로 돌아옴을 확인할 수 있다¹²⁾.

본 연구에서는 골수의 T-세포를 억제하는 방법이 아닌 자연살세포를 억제함으로써 혼합 키메라를 유도하였고, 이

러한 방법에 의해 생성된 혼합 키메라 Balb/c에서 골수 공여자의 체도를 이식하였을 때 안정적인 생착이 되어 유지되는지를 살펴보았다. 우선적으로 체도를 이식 한 후 면역거부반응의 유무를 알기 위하여, 체도이식에 의해 혈당이 정상화되는지를 살펴보기 위해 STZ 로 제1형 당뇨병모델을 사용하였다. STZ는 베타세포에 특이적으로 일산화질소 (NO) 자극을 유발시킴으로써 세포사멸을 발생시키게 된다. 이와 같은 STZ 작용을 이용하여 제1형 당뇨병을 발생시킨 후 혼합 키메라와 정상 쥐들의 체도 손상의 차이를 확인하였다. 혼합 키메라의 발생 유도 확인은 지놈 DNA 중합효소 연쇄반응을 이용하였다. 결과에서는 Balb/c 의 유전자인 H-2K^d 는 보이지 않으며, 단지 공여자인 C57BL/6 의 유전자인 H-2K^b 만이 강하게 나타남을 확인하였다. 그러나 공여자 전체 세포의 높은 비율에 비해 T-세포의 비율은 이 후에 시행된 유세포 분석법에서 매우 낮음을 확인 하였다. 반면 B-세포의 비율은 공여자의 것이 많음을 알 수 있었다. 골수 공여자에서 유래된 B-세포의 높은 비율과, 실험에서 관찰하지 않은 다른 혈액구성 세포 (예: 과립구, 자연살세포 등)들 대부분은 골수 공여자 유래성임을 예상할 수 있다. 적은 비율의 공여자 유래성 T-세포와, 수혜자 유래성 T-세포들은 공여자와 수혜자의 골수에서 분화되어진 항원제시체

포에 의해 공여자, 수혜자에 조직에 대한 면역관용을 얻은 것으로 보여진다.

혼합 키메라 Balb/c의 췌장을 인슐린 면역조직염색 하였을 때, 이식 1일 전과, 이식 후 65일 사이의 베타세포는 동일하게 낮은 비율이 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 두 차례에 걸친 이식에서 혼합 키메라 Balb/c는 모두 정상적인 혈당을 유지하였으며, 모두 최종 수거를 하기 전까지 생존하는 것을 확인하였다. 그리고 또한 이식된 1차 췌도를 제거하였을 때에는 혈당이 다시 급속히 증가하는 것을 보여, 혈당의 정상화는 이식 췌도에 의한 것임을 확인할 수 있었다. 또한 그림을 제시하지 않았지만 첫 번째 췌도 이식 후 29일째에 복강 내 당부하 검사를 한 결과에서 혼합 키메라 Balb/c에서는 정상 내당능 상태를 나타냈다. 반면 정상 Balb/c에 이식한 경우에는 그와 반대로 이식 후 정상 혈당을 오랜 기간 지속시키지 못하였으며, 이식 후 9일째부터 혈당은 다시 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이것은 이식된 췌도는 정상 Balb/c에서는 면역반응에 의해 손상되었음을 의미한다. 혼합 키메라 Balb/c의 최종 수거를 통해서 얻어진 췌도 1차, 2차 이식편에서 면역조직염색법을 통해서 인슐린 분비를 확인할 수 있었으며, 대부분의 췌도의 상태는 건강했고 또한, CD4+ T 세포의 염색은 나타나지 않음을 확인 하였으며, 이것은 췌도 이식 후에 면역거부 반응이 없었거나 미약했다는 것임을 확인할 수 있다.

유세포 분석법은 비장을 이용하였다. 전체적으로 C57BL/6 (CD45.2 H-2K^b)의 비율이 높은 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 결과는 췌도 이식 전의 말초 혈액을 통해서 확인한 지놈 DNA 중합효소 연쇄반응과 비슷한 결과를 보여주고 있다. 이러한 결과는 선행 실험과¹²⁾ 동일하다. 결과적으로 혼합 키메라 Balb/c는 최종 수거를 할 때까지 혼합 키메라를 유지하였으며, 이러한 영향으로 이식된 골수 공여자의 췌도는 안정적으로 인슐린 분비를 할 수 있게 된 것임을 알 수 있다.

결론적으로 자연살세포를 억제하고, 저 용량의 전신방사선 조사 (500cGy), 공여자의 골수에 항 T-세포 항체를 처리한 후 이식하는 비교적 간단한 방법으로 유도된 혼합 키메라 Balb/c는 안정적으로 골수 공여자의 췌도에 대하여 자가 조직으로 인식하여 거부반응이 소실되어 STZ를 이용하여 유도된 제1형 당뇨병이 치유됨을 알 수 있다.

자연살세포 억제를 이용하여 골수를 이식한 후 혼합 키메라를 유도함으로써 골수 제공자의 장기에 대한 면역 관용을 가지게 한 이 실험 방법은 조직면역적합 항원이 다른 사람끼리의 췌도를 포함한 거의 모든 장기이식에 기여할 수 있을 것이다. 그리고 자연살세포의 면역작용 기전에 대한 정확하게 알려진 바가 없음으로, 수혜자의 자연살세포 억제 후 감염, 암유발 등에 대한 주의가 필요할 것으로 보인다. 본 연구 중에서는 감염과, 암 발생이 관찰되지 않았다.

요 약

연구배경: 제1형 당뇨병의 치료 방법 중에서 혼합 키메라 유도 방법은 일반적으로 공여자의 골수를 방사선이나 약물로 골수세포를 제거한 수혜자에게 직접 정맥에 주사하는 방식으로 유도한다. 그리고 골수의 생착을 위한 보조자극 차단항체를 보편적으로 사용한다. 본 연구에서는 수혜자의 독성을 줄이고, 수혜자의 자연살세포만을 억제하는 방법으로 혼합 키메라를 유도하고, 여기에 공여자의 췌도를 이식하여 면역거부 반응을 관찰하였다.

방법: Anti-asialoGM1로 자연살세포를 억제한 Balb/c에 500cGy로 전신방사선 조사 후, C57BL/6의 골수를 anti-CD90 (Thy-1.2) 항체로 처리한 후에 꼬리 정맥에 마리당 2×10^7 세포를 주사하였다. 지놈 DNA 중합효소 연쇄반응을 이용하여 유도된 혼합 키메라 Balb/c의 성공적인 혼합 키메라 유도 확인을 하였다. 그 후에 Streptozotocin (STZ) 으로 당뇨병을 유발 시킨 후 골수 공여자의 췌도를 신장막부위에 100-250 μ m 크기로 500개를 이식하였다. 이식 3주 후 이식 부위를 제거하고, 혈당이 상승되는 것을 확인 한 후, 골수 공여자 및 제3종 쥐의 췌도를 각각 500개씩 이식하였다. 2차 이식 3주 후 모든 이식 부위와, 췌장, 혈액, 비장을 수거하여 지놈 DNA 중합효소 연쇄반응, 면역조직염색법 및 유세포 분석법을 하였다.

결과: STZ에 의해 상승한 혈당은 C57BL/6 췌도를 이식한 후 곧 정상치화 되었으며, 30일간 지속됨을 확인하였다. 그리고 췌도 이식 부위 제거 후에 다시 고혈당으로 되는 것을 관찰하였다. 두 번째의 이식에서도 똑같이 혈당이 정상으로 돌아오는 것을 확인하였다. 면역조직염색법으로 각 이식 부위를 염색하였을 때 골수 공여자의 췌도 이식편에서 인슐린이 강하게 염색되는 것을 확인하였으며, 제3종의 이식편은 면역거부 반응에 의해 소실되어 나타나지 않았다. 마지막 이식 부위를 적출할 때에 혼합 키메라의 유도 후 지속여부를 비장과, 혈액을 유세포 분석법으로 분석한 결과, 혼합 키메라가 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

결론: 수혜자의 면역체계등에 대한 나쁜 영향을 최소화 하고, 골수의 자연살세포 억제를 이용한 새로운 방법으로 유도된 혼합 키메라는 STZ로 당뇨병을 유도한 후에 골수 공여자의 췌도를 이식하였을 때 정상적인 혈당을 유지되는 것을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 바이오 디스커버리 복제기술기반 사업에 형질전환 돼지 췌도를 이용한 당뇨병 치료 기술 개발 연구 과제 지원으로 이루어졌음.

참 고 문 헌

1. Atkinson MA, Maclaren NK: *The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. N Engl J Med.* 331:1428-36, 1994
2. Patricia MG, George SE: *Pathogenesis, prediction and trials for the prevention of insulin-dependent (type 1) diabetes mellitus. Advanced Drug Delivery Reviews* 35:143-56, 1999
3. Stratta R: *Late acute rejection after pancreas transplantation. Transplantation Proceedings* 30:646, 2000
4. Nakhleh R E, Gruessner RWG: *Ischemia due to vascular rejection causes islet loss after pancreas transplantation. Transplantation Proceedings* 30:539-40, 1998
5. Spiros D, Gaetano CC, George WB III, Rolando GM, Joshua M: *Donor bone marrow transplantation chimerism and tolerance. Transplant Immunology* 13:105-15, 2004
6. Hans JK, Georg L: *Tolerance and chimerism. Transplantation* 75: 26s-31, 2003
7. Li H, Inverardi L, Damaris RM, Antonello P, Camillo R: *Nonlethal conditioning for the induction of allogeneic chimerism and tolerance to islet allografts. Transplantation* 75:966-70, 2003
8. Zhiguang G, Tao W, Hakan S, Yisheng P, Neal H, Hannes K, David E R Sutherland, Bruce R Blazar, Bernhard J, Hering: *A substantial level of donor hematopoietic chimerism is required to protect donor-specific islet grafts in diabetic nod mice. Transplantation* 75:909-15, 2003
9. William J M, Vinay K, Michael B: *Acute rejection of murine bone marrow allografts by natural killer cells and T cells -differences in kinetic and target antigen recognized. J Exp MED* 166:1499-509, 1987
10. Pierre T, Dan LL, John WW, WG Alvord, Craig WR: *Anti-asialo GM1 antiserum treatment of lethally irradiated recipients before bone marrow transplantation: Evidence that recipient natural killer depletion enhances survival, engraftment, and hematopoietic recovery. Blood* 76:1419-30, 1990
11. William JM, Crystal Y. K, Arati R, Michael B, Dan LL: *Immunobiology of natural killer cells and bone marrow transplantation: Merging of basic and preclinical studies. Immunological Reviews* 181: 279-89, 2001
12. Cho SG, Yukinobu S, Yasushi S, Yukoh N, Kiyoko I, Kaoru U, Satoshi T, Kenzaburo T, Arinobu T, Shigetaka A: *Anti-NK cell treatment induces stable mixed chimerism in MHC-mismatched, T cell-depleted, nonmyeloablative bone marrow transplantation. Experimental Hematology* 32:1246-54, 2004
13. Weibel ER: *Stereologic methods. In practical methods for biologic morphometry. London, Academic Press, 1:101-61* 1978
14. Drachenberg CB, Klassen DK, Weir. MR, Wiland. A, Fink. JC, Bartlett ST, Cangro CB, Blahut S, Papadimitriou JC: *Islet cell damage associated with tacrolimus and cyclosporine: Morphological features in pancreas allograft biopsies and clinical correlation. Transplantation* 68:396-402, 1999
15. Guo, Zhiguang, Chong ASF, Shen. J, Foster P, Sankary HN, McChesney L, Mital D, Jensik SC, Gebel H, Williams JW: *In vivo effects of leflunomide on normal pancreatic islet and syngeneic islet graft function. Transplantation* 63:716-21, 1997
16. Paul SR, Catharine MC, Megan S, Hiroshi I, Juanita S, Robert BC: *Tolerance, mixed chimerism, and chronic transplant arteriopathy The Journal of Immunology* 167: 5731-40, 2001
17. Sykes M: *Mixed chimerism and transplant tolerance. Immunity* 14:417-24, 2001