

인간 CD4⁺ T 임파구의 활성도와 증식에 대한 노화의 영향

예일대학교 의과대학 류마티스내과학교실¹, 한림대학교 의과대학 영상의학교실²,
차의과학대학교 부속 구미차병원 정형외과³

홍명선^{1,2} · 단진명^{1,3} · 이원우¹ · 강인수¹

= Abstract =

Alterations in the Kinetics of CD4⁺ T Cell Responses with Aging

Myung Sun Hong^{1,2}, Jin Myung Dan^{1,3}, Won-Woo Lee¹, Insoo Kang¹

Section of Rheumatology, School of Medicine, Yale University, New Haven, Connecticut, USA¹,
Department of Radiology, School of Medicine, Hallym University, Chuncheon²,
Department of Orthopedics, CHA Gumi Medical Center, CHA University, Gumi³, Korea

Objective: Alterations in the immune system occur with aging, and these contribute to an increased risk of infection and malignancy. The age-associated changes in T cell immunity range from single cell function to the maintenance of cell populations. We investigated the kinetics of CD4⁺ T cell activation and proliferation in young and elderly subjects after stimulating their peripheral blood mononuclear cells with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (Abs).

Methods: The expressions of the activation markers CD69, CD40L and CD25 on the CD4⁺ T cells from young (n=14) and elderly (n=19) were analyzed at 6, 24 and 48 hours (hrs) of T cell receptor (TCR) stimulation by using flow cytometry. In the same individuals, the CD4⁺ T cell proliferation was determined at 48 and 96 hrs of TCR stimulation by using the CFSE dilution method.

Results: The elderly had decreased CD69 and CD40L expressions on the CD4⁺ T cells at 6 hrs of stimulation, as compared to that of the young patients. The elderly also had a decreased CD25 expression on the CD4⁺ T cells at 24 hrs of stimulation. However, the two groups had similar levels of the CD25, CD69 and CD40L expressions at 48 hrs of stimulation. The elderly had decreased CD4⁺ T cell proliferation at 96 hrs of stimulation, as compared to that of the

<접수일 : 2009년 9월 21일, 수정일 : 2009년 10월 13일, 심사통과일 : 2009년 10월 14일>

※통신저자 : Insoo Kang, M.D., Section of Rheumatology, P. O. Box 208031, 300 Cedar Street, TAC Room 541C,
New Haven, CT 06520, USA

Section of Rheumatology, School of Medicine, Yale University

Tel : 1-203-785-2453, Fax : 1-203-785-7053, E-mail : insoo.kang@yale.edu

This work was supported in part by grants from the Hartford Foundation (I.K.), the American College of Rheumatology (I.K.), the Arthritis Foundation (I.K.) and the Lupus Foundation of America (I.K.).

young, although both groups had similar levels of CD4⁺ T cell proliferation at 48 hrs of stimulation.

Conclusion: Our findings suggest that the elderly have altered kinetics of CD4⁺ T cell activation and proliferation in response to anti-CD3 and -CD28 Ab stimulation, and that such an altered response is governed by the duration of stimulation.

Key Words: Aging, CD4⁺ T cells, Activation, Proliferation

서 론

노화가 진행되면서 면역계 기능과 효율은 현저히 저하되어 노인이 되면 감염성 질환, 암, 그리고 자가 면역질환 등의 질병에 대한 감수성이 크게 증가된다 (1-4). 면역기능의 저하는 면역계를 구성하는 요소들, 즉 조혈 줄기세포계, 선천성 면역계(innate immunity), 후천성 면역계(adaptive immunity) 등의 양적인 변화 뿐 아니라 기능상의 변화에서도 유래한다 (4,5). 특히 나이가 들면서 뚜렷이 나타나는 후천성 면역계의 기능 결함이 노인에게 증가하는 이환율과 사망율의 주된 원인으로 보고되었다 (6). 새로운 naïve T세포를 혈액내로 공급하는 주된 기관인 흉선은 출생과 동시에 퇴축이 시작되고 청년기 동안에 가속화되며, 40대 이후에는 새로운 T세포를 말초혈액 내로 공급 할 능력이 현저하게 저하 된다 (3,7). 흉선이 퇴축된 40대 이후에도 성인은 수십년간을 기준에 만들어진 T세포 면역계를 이용하여 외부의 공격에 대한 정상적인 면역반응을 유지하게 된다 (8). 이 과정에서 T 세포는 대규모 세포증식을 통해서 memory 또는 effector T세포로 분화되고 (9), 외부 항원자극과 관계 없이 체내의 T세포 수를 일정 수준으로 유지하기 위한 항상성 세포증식(homeostatic proliferation)이 일어난다 (8,10). 이러한 이유들로 인하여 T세포는 분열 스트레스(replicative stress)에 가장 많이 노출되어 있는 면역세포중 하나이며 노화에 따른 변화가 가장 뚜렷하게 나타나기 때문에 이에 대한 연구가 널리 진행되어 오고 있다 (8,11).

나이가 들면서 나타나는 T세포 아형(subset) 분포와 기능상의 변화가 사람과 마우스 연구에서 보고되었다 (2,12). 예를 들어 65세 이상 노인의 말초혈액 내 CD8⁺ T세포는 젊은 성인보다 naïve 세포 빈도가 급격히 감소하고 effector memory T세포가 크게 증가

한다 (11,13). 이와 비교할 때 CD4⁺ T세포의 경우, 노인에서는 central memory T세포 빈도가 증가하는 데 비하여, naïve 그리고 effector memory T세포의 빈도는 감소한다 (14). 이러한 T세포 아형들의 분포 변화는 나이가 들면서 비교적 명확하게 관찰되는데 반하여, 단위 세포 수준에서 T세포 기능의 평가 척도가 되는 T세포의 자극 정도나 자극 후에 일어나는 T세포 증식(proliferation)의 정도는 연구간에 상반된 결과가 보고되었다. Phytohemagglutinin (PHA)이나 Phorbol myristate acetate (PMA) 그리고 ionomycin을 사용하여 4시간 동안 자극된 CD4⁺와 CD8⁺ T세포에서 활성 표지자인 CD69의 발현 정도가 젊은 성인에 비해 노인에게서는 감소되었다. 이에 비하여 다른 활성 표지자(activation marker) 중의 하나인 CD25는 자극 방법과 관계 없이 자극 48시간 후 비슷한 정도의 발현이 보고되었다 (2,15-17). 흥미로운 점은 anti-CD3 항체로 6시간 동안 자극한 노인의 T세포의 경우 CD40L의 발현 정도가 젊은 성인에 비교해 낮았으나, 동일연구에서 PMA와 ionomycin으로 자극한 경우에는 두 연령군간의 CD40L 발현정도에 있어 차이가 없었다 (18). 이러한 연구 결과들은 T세포의 자극 방법과 자극 지속시간이 두 연령군의 T세포 자극에 영향을 주고 있음을 시사한다.

노화가 진행되면서 분열촉진물질(mitogen)에 대한 T세포 증식 능력이 줄어든다는 보고가 있으나 다른 연구에서는 그러한 차이가 없음이 보고되었다 (17, 19-21). 이는 각각의 실험에서 서로 다른 세기(strength)의 T세포 자극이 주어졌기 때문일 가능성성이 있다. 비교적 저농도의 anti-CD3 항체를 사용하여 T세포를 자극한 경우 노인과 젊은 성인의 T세포증식 능력에서 차이를 관찰할 수 없었다. 그러나 고농도의 anti-CD3 항체나 강력한 분열촉진물질인 PHA 혹은 PMA 그리고 ionomycin을 자극물질로 사용한 연구에선 그와 반대되는 결과가 보고되었다 (17,19-22). 이러한

연구 결과는 T세포를 자극하는 자극원의 세기나 시간이 노인과 젊은 성인간의 T세포 분열 정도를 결정해주는 중요한 요인이 될 수 있음을 시사해준다. 그러나 이러한 개념을 동일 실험상에서 비교한 연구는 현재까지 보고되고 있지 않다.

본 연구에서는 노인과 젊은 성인에서 분리한 말초 혈액 단핵세포중 T세포 수용체(T cell receptor; TCR)에 anti-CD3 항체와 anti-CD28 항체를 처리하여 서로 다른 기간동안 자극한 후 CD4⁺ 세포 활성도과 증식 정도를 평가하였다.

대상 및 방법

1. 대상

건강한 성인을 대상으로 하였으며 면역억제제를 복용하고 있거나 면역계에 영향을 줄만한 질환들(암, 자가면역질환, 그리고 당뇨병)을 과거에 경험한 적이 있는 피험자들은 본 연구에서 제외하였다. 33명이 본 실험에 참가하였으며, 대상자는 65세 이상의 노인군(19명)과 40세 이하의 젊은 성인군(14명)으로 구분하였다. 두 연령군 간의 성별 분포는 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았으며($p=0.830$, chi-square test), 두 연령군의 자원자들 평균 나이는 각각 71.4 ± 4.13 세 그리고 34.4 ± 3.64 세였다. 피험자에게 연구 목적과 연구 참여 중 발생할 수 있는 일에 대해 충분히 설명한 후 피험자로부터 서면 동의서를 받고 말초혈액을 헤파린이 처리된 시험관(BD Vacutainer; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ)을 이용해 채혈하였다. 본 연구는 예일 대학 IRB 및 the Veterans Administration New England Health Care System West Haven Campus에 의하여 승인되었다.

2. 세포분리 및 자극

말초혈액 단핵세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMC)는 Ficoll-PaqueTM를(Pharmacia, Piscataway, NJ) 이용한 gradient centrifugation 방법에 의해 분리되었다. 분리된 말초혈액 단핵세포를 PBS로 세척하고 10%의 우테아 혈청, L-glutamine, Penicillin (50 U/mL), streptomycin (50 μ g/mL)이 포함된 세포 배양액(RPMI 1,640, Gibco BRL, USA)을 사용하여 세포 농도가 1×10^6 cells/mL에 맞도록 재부유하였다. 말초

혈액 단핵세포는 10 μ g/mL의 anti-CD3 항체(BD Pharmingen, San Jose, CA)와 1 μ g/mL의 anti-CD28 항체(BD Pharmingen)가 부착된 48 well 세포배양용 plate(Falcon; Beckon Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ)에서 자극하였고, 음성 대조군을 위해 PBS가 처리된 48 well 세포 배양용 plate에서 실험하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양되었다.

3. 자극된 CD4⁺ T세포 활성 표지자 측정

CD4⁺ T세포 표면상 활성 표지자들의 발현 양상을 분석하기 위하여 자극 후 6, 24, 48시간에 수거한 세포와 anti-CD4, CD69, CD40L, CD25 항체(all from BD Pharmingen)를 4°C 암시아에서 30분간 반응한 후, FACS buffer (0.05% sodium azide, 0.5% BSA/PBS)를 이용하여 세척하고 2% paraformaldehyde를 사용하여 고정하였다. 염색된 세포는 유세포 분석기(FACS Calibur; BD Biosciences Immunocytometry Systems, San Jose, CA)를 이용하여 분석했으며, Flow Jo software (Treestar, Ashland, OR)를 이용하여 결과를 처리하였다. 각 시료에서 CD4⁺ T세포 표면상 활성 표지자들의 발현정도는 median fluorescent intensity (MFI)를 사용하여 표시하였으며 실험군과 대조군에서의 MFI 간 차이를 Δ MFI로 계산하였다.

4. 자극 후 CD4⁺ T세포 증식

노인과 젊은 성인으로부터 분리된 말초혈액 단핵세포를 기준 연구에 따라 carboxyfluorescein succinimidyle ester (CFSE; Molecular Probes, Eugene, OR)를 이용하여 처리하였다 (23). CFSE가 표지된 세포는 세척 후 세포 배양액을 사용하여 1×10^6 cells/mL 농도로 재부유한 후, 10 μ g/mL의 anti-CD3 항체와 1 μ g/mL의 anti-CD28 항체가 부착된 48 well 배양용 plate에 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48 또는 96시간 동안 자극하였다. 음성 대조군은 PBS가 처리된 48 well plate에서 배양되었다. 정해진 시간에 수거된 세포는 anti-CD4 항체로 염색하고 CD4⁺ 세포내 CFSE 희석정도를 유세포 분석기로 측정하여 세포증식이 일어난 세포 빈도와 증식횟수를 조사하였다.

5. 통계 분석

결과는 평균 \pm 표준오차로 나타내고, 두 연령군에서

측정 인자들의 차이는 Mann-Whitney test를 이용하였다. 통계 분석은 SPSS 12.1프로그램(SPSS, Chicago,

IL)을 사용하여 수행하였다. $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의하다고 판단하였다.

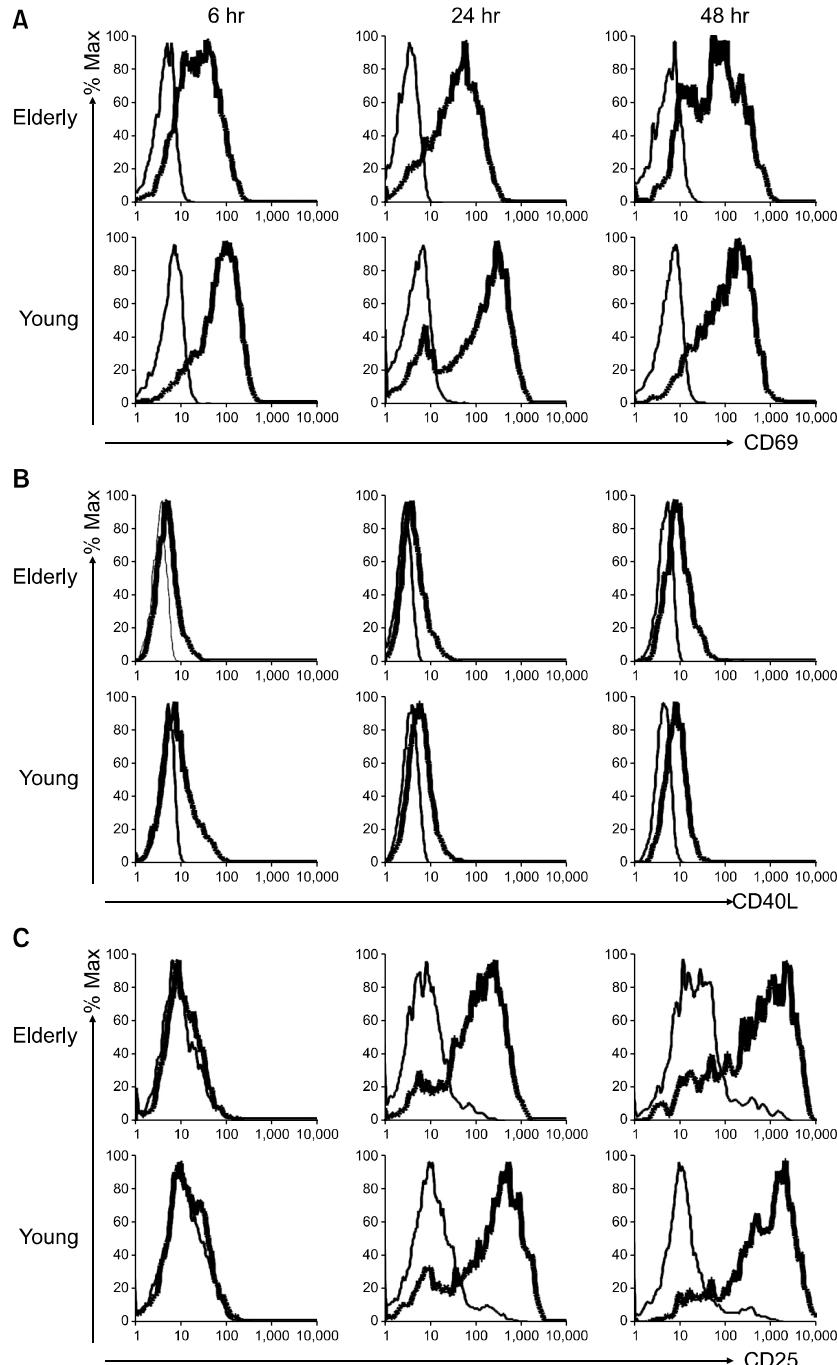


Fig. 1. The expressions of CD 69, CD40L and CD25 by the $CD4^+$ T cells in response to anti-CD3 and -CD28 antibody (Ab) stimulation. Peripheral blood mononuclear cells from a young individual and an elderly individual were stimulated for 6, 24 and 48 hours (hr) with PBS (thin line) or anti-CD3 Abs (bold line) at $10 \mu\text{g/mL}$ in the presence of anti-CD28 Abs ($1 \mu\text{g/mL}$). The stimulated cells were stained with anti-CD4, -CD69 (A), -CD40L (B) or -CD25 (C) Abs. The cells were washed and then analyzed on a flow cytometer. The cells were gated on the $CD4^+$ population.

결 과

1. Anti-CD3와 anti-CD28 항체로 자극한 CD4⁺ T 세포에서 CD69, CD40L, CD25 발현

두 연령대에서 CD69 발현 정도는 자극 후 24시간에서 가장 높게 관찰되었다. CD40L은 젊은 성인의 CD4⁺ T세포에서 자극 6시간에 가장 높게 발현되는 데 비하여, 노인군에서는 자극 48시간에 가장 높았다. CD25의 발현은 젊은 성인군에서 자극 24시간

후에 최고점에 도달하였으나 노인군에서는 48시간 후에 최고점에 도달하였다(그림 1, 2).

T세포 수용체 자극 후 CD4⁺ T세포의 표면에 발현되는 CD69는 자극 6시간 후 젊은 성인군에서 유의하게 증가하였다(그림 2A, mean $\Delta MFI \pm SEM$; 180.0 \pm 17.4 vs. 113.0 \pm 14.8, $p=0.008$). 이러한 경향은 자극 24시간에도 유지되었지만 그 차이는 통계학적으로 유의하지 않았다(그림 2A, mean $\Delta MFI \pm SEM$; 293.6 \pm 16.2 vs. 244.5 \pm 27.8, $p=0.137$). CD69는 자극 초기 24시간 동안 급격히 증가하였으며 그 이후 발현이 점

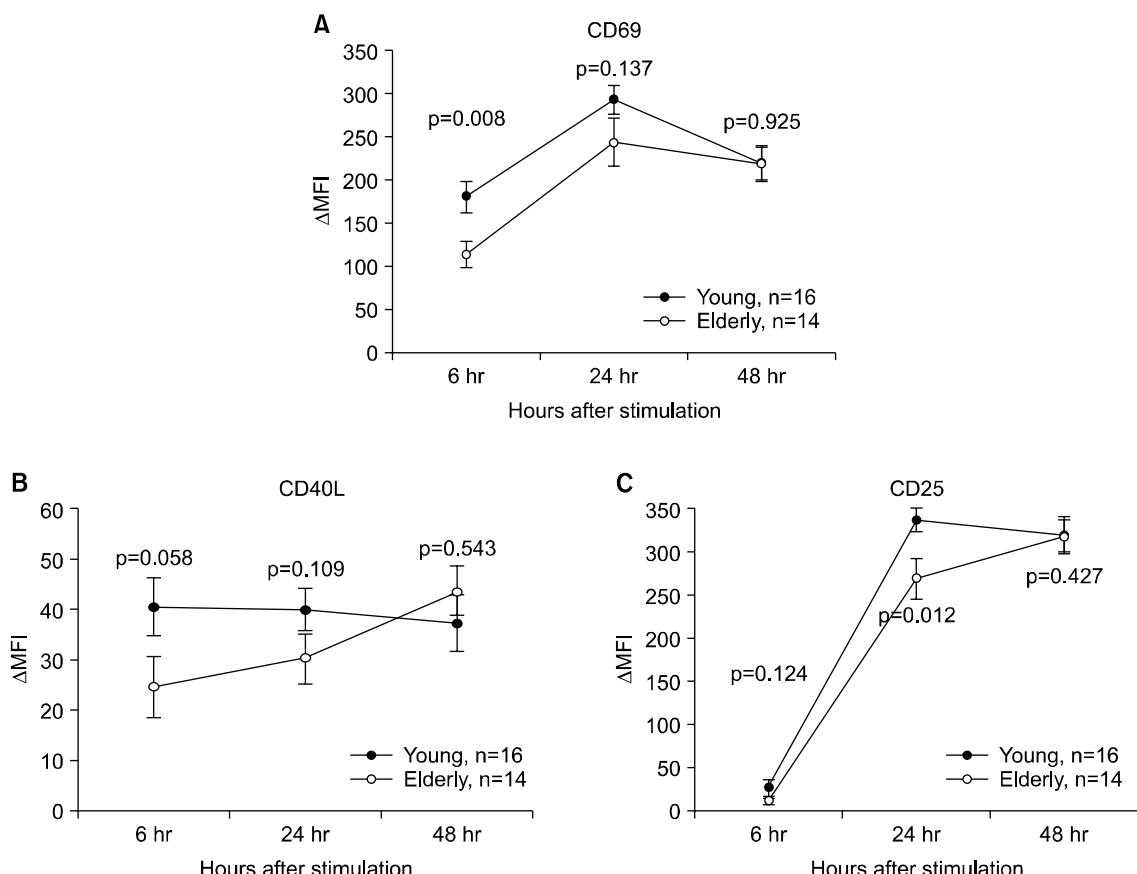


Fig. 2. Kinetics of the activation markers' expressions on the CD4⁺ T cells in young and elderly people. Peripheral blood mononuclear cells from 14 young people and 19 elderly people were stimulated for 6, 24 and 48 hours (hr) with PBS or anti-CD3 Abs at 10 μ g/mL in the presence of anti-CD28 Abs (1 μ g/mL). The stimulated cells were stained with anti-CD4, -CD69 (A), -CD40L (B) or -CD25 (C) Abs. The cells were washed and analyzed on a flow cytometer. The cells were gated on the CD4⁺ population. The differences in median fluorescent intensity (ΔMFI) between the samples stimulated with PBS and anti-CD3 Abs were obtained. The symbols and the error bars indicate the mean ΔMFI and the S.E.M., respectively. The values on the Y-axis indicate the ΔMFI . The p-values were obtained by the Mann-Whitney U test.

차 감소하는 양상을 보여주었다. 이러한 이유로 자극 48시간 후 두 연령군에서 CD69 발현 정도의 차이가 더는 관찰되지 않았다(그림 2A, mean $\Delta MFI \pm SEM$; 221.1 ± 20.6 vs. 218.6 ± 19.1 , $p=0.925$). CD40L 발현의 경우 자극 6시간 후 두 연령군 간의 가장 큰 차이가 나타났다(그림 2B, mean $\Delta MFI \pm SEM$; 40.6 ± 5.8 vs. 24.8 ± 6.0 , $p=0.058$). 젊은 성인의 말초혈액 내 $CD4^+$ T세포에서는 자극 6시간 후에 CD40L 발현이 이미 최고점에 도달하였고, 그 이후 자극 48시간까지 큰 변화 없이 유지되는데 비하여, 노인군의 CD40L 발현은 자극 후 48시간까지 계속 증가하여 자극 48시간 후에는(그림 2B, mean $\Delta MFI \pm SEM$; 37.4 ± 5.6 vs. 43.8 ± 4.9 , $p=0.543$) 젊은 성인과 비슷한 발현 정도를 보여주었다. T세포 수용체 자극 후 $CD4^+$ T세포에서 발현되는 CD25는 자극 24시간 후 젊은 성인군에서 노인군에 비해서 통계적으로 유의하게 증가하였다(그림 2C, mean $\Delta MFI \pm SEM$; 337.4 ± 13.8 vs. 269.8 ± 23.4 , $p=0.012$). 자극 48시간에서 CD25의 발현 정도는 젊은 성인군에서 감소되는 경향을 보였으나 노인군에서는 계속적으로 증가하여 두 연령군 간에 차이를 관찰 할 수 없었다(그림 2C, mean $\Delta MFI \pm SEM$; 321.4 ± 37.0 vs. 318.2 ± 26.8 , $p=0.427$).

2. Anti-CD3와 anti-CD28 항체에 의해 자극 된 $CD4^+$ T세포 분열

CD40L이나 CD25와 같은 활성 표지자는 T세포의 면역학적 반응을 증가하는 중요한 역할을 하기 때문에 이러한 표지자들의 발현 양상 차이는 T세포 기능 변화와 직접적으로 연결 될 수 있다 (24,25). 다음 실험은 이러한 T세포 기능 중 세포증식 능력이 노화와 어떤 관련이 있는지 확인하기 위한 단계로 두 연령군에서 분리한 말초혈액 단핵세포 중 T세포 수용체를 anti-CD3와 anti-CD28항체를 사용하여 서로 다른 시간 동안(48, 96시간) 자극하였다(그림 3, representative histogram). CFSE 분석 결과, 자극 후 48시간동안 세포분열을 한 $CD4^+$ T세포 빈도는 노인군($n=7$)과 젊은 성인군($n=7$)에서 차이가 없었다(그림 4A, mean $\pm SEM$; $11.9 \pm 3.9\%$ vs. $9.7 \pm 3.2\%$, $p=0.482$). 그러나 자극 96시간이 경과한 후 anti-CD3로 자극한 노인($n=16$)의 $CD4^+$ T세포에서 세포분열에 들어간 빈도수가 젊은 성인($n=14$)에 비하여 통계적으로 유의하

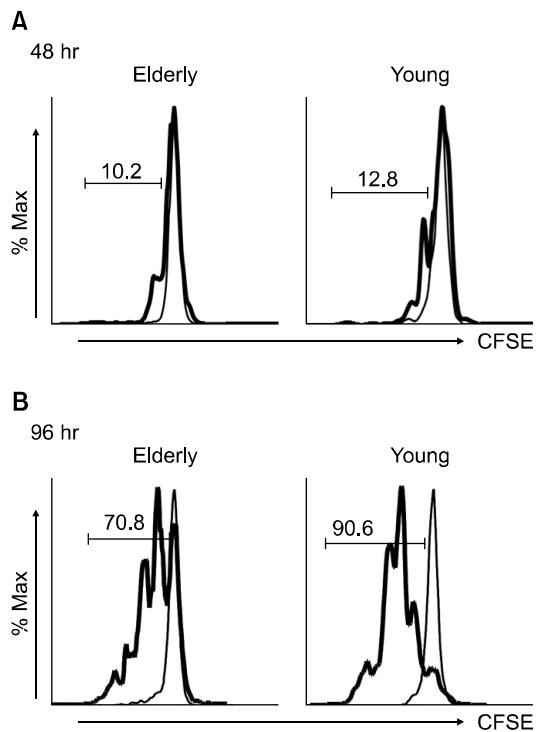


Fig. 3. The proliferation of $CD4^+$ T cells in response to anti-CD3 and -CD28 antibody (Ab) stimulation as measured by carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE) staining. The peripheral blood mononuclear cells from a young individual and an elderly individual were stained with CFSE. The cells were then stimulated for 48 (A) and 96 (B) hours (hr) with PBS (thin line) or anti-CD3 Abs (bold line) at $10 \mu g/mL$ in the presence of anti-CD28 Abs ($1 \mu g/mL$). The stimulated cells were stained with anti-CD4 Abs, washed and analyzed on a flow cytometer. The cells were gated on the $CD4^+$ population. The numbers on the histograms indicate the percentage of proliferated cells in the samples stimulated with anti-CD3 Abs.

게 감소하였음을 확인할 수 있었다(그림 4A, mean $\pm SEM$; $74.6 \pm 2.9\%$ vs. $64.0 \pm 4.1\%$, $p=0.031$). 또한 두 연령군에서 자극 48시간 후 $CD4^+$ T세포 분열 횟수는 차이를 보이지 않았으나(결과를 제시하지 않음) 자극 96시간 후 노인군에서는 세포분열 횟수가 감소된 경향을 보여주었다(그림 4B, mean division number $\pm SEM$; 3.4 ± 0.2 vs. 2.8 ± 0.2 , $p=0.124$).

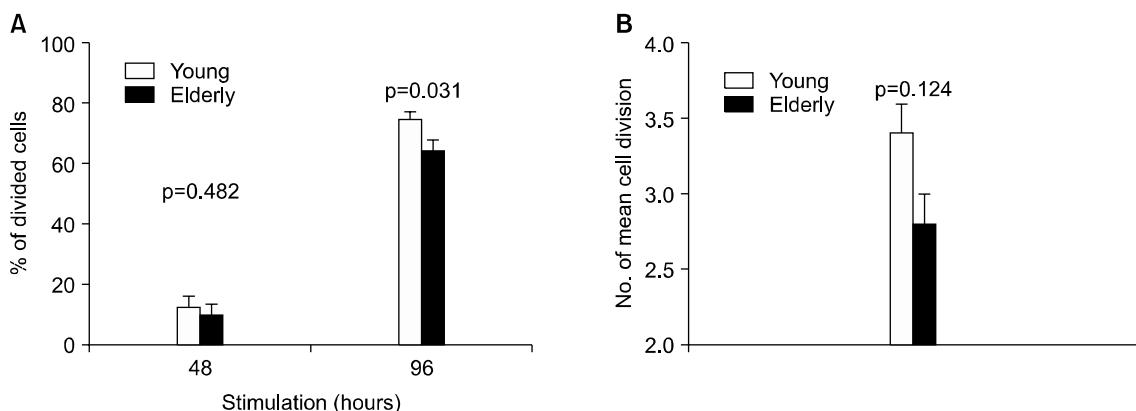


Fig. 4. Difference in the proliferation of $CD4^+$ T cells in response to anti-CD3 and -CD28 Ab stimulation between the young and the elderly. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from young and elderly people were stained with CFSE. The cells were then stimulated for 48 or 96 hours (hr) with PBS or anti-CD3 Abs at 10 μ g/mL in the presence of anti-CD28 Abs (1 μ g/mL). The stimulated cells were stained with anti-CD4 Abs. The cells were washed and analyzed on a flow cytometer. The data for 48 hr were from 7 young and 7 elderly individuals (A). The data for 96 hr were from 14 young and 16 elderly individuals (A and B). The columns and the error bars indicate the mean percent of proliferating $CD4^+$ T cells and the S.E.M (A) or the number of mean divisions and S.E.M (B). The p-values were obtained by the Mann-Whitney U test.

고 칠

T세포가 자극을 받으면 세포 내에서는 일련의 생화학적 신호전달계가 시작되면서 특정 유전자의 전사와 세포분열이 시작된다. 이 과정에서 세포의 생물학적 반응을 중개하는 데 중요한 역할을 하는 단백질들이 일정한 진행 양상에 따라 T세포에서 순차적으로 발현된다 (26). 그 중 세포표면에 발현되는 CD69, CD40L, CD25 등은 T세포의 자극 여부를 판단할 수 있는 표시자들로 면역학 연구에서 널리 사용되고 있다 (27-30). 본 연구는 노인과 젊은 성인에게서 분리한 말초혈액 내 T세포의 T세포 수용체를 anti-CD3와 anti-CD28항체로 자극한 후 $CD4^+$ T세포의 활성도와 세포증식 양상을 비교하였다. 자극 후 $CD4^+$ T세포에서 CD69, CD40L, CD25 발현의 진행 양상은 두 연령군에서 차이를 보였다. 자극 초기 단계(6시간) 노인의 $CD4^+$ T세포에서 측정된 활성 표지자의 발현 정도는 젊은 성인에 비하여 저하되어 있었으나, 자극 후반부(48시간)에는 두 연령군에서의 차이가 더 이상 없었다. 자극 초기 단계의 노인에게서 나타나는 CD69, CD40L의 낮은 발현정도는 PHA

나 PMA 그리고 ionmycin 혹은 anti-CD3 항체로 T세포를 자극한 이전 결과와 비슷한 양상을 보여주었다 (17,18). 하지만 이러한 자극 초기 단계의 연령군 간 차이는 자극 지속 기간이 길어지면서 점차 적어졌으며 자극 48시간 후에는 두 연령군의 차이가 없었다. 어떠한 기전에 의해서 노인과 젊은 성인간 자극표시자의 발현양상 차이가 나타나게 되는지 아직 밝혀지지 않았으며 이에 대한 연구가 필요하다. 노인에게 나타나는 변화된 $CD4^+$ T세포 활성 진행 양상은 나이가 들어감에 따라 나타나는 $CD4^+$ T세포 자체의 내재적인 결함(intrinsic defect)이나 $CD4^+$ T세포 아형의 빈도상 변화, 혹은 앞에 언급한 두 가지 원인이 복합되어 일어난 부차적인 결과 때문일 수 있다. 노화 마우스 모델에서 분리한 naïve 그리고 memory $CD4^+$ T세포의 T세포 수용체를 자극했을 때 immunological synapse (IS) 형성에 결함이 관찰되고 이러한 결함이 자극 초기단계에서 T세포 활성을 저하시키는 현상과 관련이 있다는 보고가 있다 (31-33). 이는 노화에 따른 $CD4^+$ T세포의 내재적인 결함이 본 연구가 제시한 결과를 설명할 수 있는 가능성이 있다. $CD4^+$ T세포는 세포 표면에 발현하는 CD45RA와 림프절 귀소 케모카인 수용체인 CCR7의 존재 여부에

따라 서로 다른 면역학적 기능을 나타내는 3개의 아세포군; naïve ($CD45RA^+CCR7^+$), central memory ($CD45RA^-CCR7^+$), 그리고 effector memory ($CD45RA^-CCR7^-$)로 각각 구분된다 (34). Anti-CD3 항체로 T세포 수용체를 자극하면 central memory $CD4^+$ T세포에서 가장 높은 정도의 CD40L이 발현된다 (34). 흥미로운 점은 젊은 성인과 비교할 때, 노인의 말초혈액 내에서는 effector memory $CD4^+$ T세포 빈도가 감소되며 central memory $CD4^+$ T세포의 빈도는 증가됨이 보고되었다 (14). 따라서 노인의 경우, 저하된 활성 능력으로 대표되는 $CD4^+$ T세포의 내재적 결함을 상대적으로 활성정도가 증가된 central memory $CD4^+$ T세포의 빈도가 증가됨으로서 보상할 가능성도 있다.

본 연구에서 노인의 $CD4^+$ T세포에 비교적 고농도 ($10 \mu\text{g/mL}$)의 anti-CD3 항체 자극을 96시간동안 처리한 경우 $CD4^+$ T세포 증식 능력이 감소됨이 관찰되었다. 이러한 소견은 PHA 혹은 PMA 그리고 ionomycin과 같은 비교적 강력한 T세포 자극원이 사용되었을 경우 $CD4^+$ T세포 증식 능력이 나이가 들어감에 따라 감소된다는 이전 연구 결과와 일치된다 (17,20,21). 그러나 같은 농도($10 \mu\text{g/mL}$)의 anti-CD3 항체를 이용한 T세포 수용체를 짧은 시간(48시간) 동안 자극한 경우에는 두 연령군에 차이는 없었다. 비교적 낮은 농도의 anti-CD3 항체($2.5 \sim 100 \text{ ng/mL}$)를 사용해서 자극한 경우 노인의 T세포 증식 능력은 젊은 성인과 유사하다는 보고가 있다 (19,22). 이러한 결과들을 종합할 때 T세포가 비교적 약한 자극을 받을 경우, 노인의 $CD4^+$ T세포 증식 능력은 젊은 성인과 차이가 없으나 자극이 강하고 시간이 길어질수록 노인의 $CD4^+$ T세포는 젊은 성인에서 비해 세포 증식 능력이 저하됨을 보여준다. 본 연구에서 나타난 결과를 설명할 수 있는 가능한 기전 중 하나는 $CD4^+$ T세포가 보유하고 있는 최대분열능력 (maximum proliferation capacity)이 나이가 들어감에 따라 낮아지며 이러한 원인 중에 하나가 나이가 들어감에 따라 짧아지는 telomere 길이의 차이에 기인한다는 것이다 (35,36).

본 연구의 결과는 몇 가지 중요한 점을 제시한다. 첫째, 자극의 지속 시간을 달리했을 때 $CD4^+$ T세포 반응이 노인과 젊은 성인에서 다르다는 본 연구 결

과에 의하면 $CD4^+$ T세포 기능에 대한 나이의 영향을 연구할 때는 자극의 지속시간과 자극 농도에 결정되는 자극의 세기(strength)를 고려해서 설계하고 해석해야 한다는 점이다. 둘째, 노화와 연관되어 나타나는 $CD4^+$ T세포의 변화된 활성 진행 양상의 임상적 중요성이다. 낮은 정도의 자극이 예상되는 만성감염 질환의 경우, 노인의 $CD4^+$ T세포 활성을 짧은 성인만큼 증가되어 충분한 면역 반응을 나타낼 수 있으나 급성감염의 초기 단계의 경우 짧은 성인만큼 충분히 나타나지 않아 면역기능에 결함이 나타날 가능성이 있다. 비교적 short-term T세포 면역 반응 중 하나인 지연형 과민반응(delayed type skin hypersensitivity: DTH)이 노인에게 감소되어 있다는 보고가 이를 뒷받침해준다 (12).

본 연구로 노인의 말초혈액 $CD4^+$ T세포에 대한 anti-CD3와 anti-CD28 항체 자극은 $CD4^+$ T세포 활성과 세포 증식에서 있어 짧은 성인의 반응과는 서로 다른 진행양상을 보여주고 있음을 알 수 있었고, 두 연령군에서의 이러한 차이는 T세포 자극의 기간과 관련되어 있음을 보여주었다. 이는 나이에 따른 $CD4^+$ T세포 반응의 변화에 대한 상반된 기존 결과들에 대해 가능한 설명을 제시해주고 있으며, 노인에게 나타나는 변화된 T세포 반응을 조사할 경우 여러가지 서로 다른 자극 하에서 T세포의 반응을 측정한 후 종합적으로 결과를 분석해야 한다는 점에서 본 연구의 의의를 찾을 수 있다.

결 론

노인의 $CD4^+$ T세포는 anti-CD3와 anti-CD28 항체에 의한 T세포 수용체 자극에 대해 짧은 성인에 비하여 저하된 $CD4^+$ T세포 활성도 및 감소된 $CD4^+$ T세포 증식이 관찰되었다. 두 연령군에서의 차이는 T세포 자극 기간과 관련이 있음을 확인하였다. 향후 이러한 차이의 원인을 일으키는 기전을 밝히는 것은 면역계의 노화를 이해하고 그 치료법을 연구하는데 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

참고문헌

- 1) Linton PJ, Dorshkind K. Age-related changes in lym-

- phocyte development and function. *Nat Immunol* 2004;5:133-9.
- 2) Miller RA. Aging and Immune Function. In: Paul WE, ed. *Fundamental Immunology*. 4th ed. p. 947-966, Philadelphia, Lippincott-Raven, 1999.
 - 3) Naylor K, Li G, Vallejo AN, Lee WW, Koetz K, Bryl E, et al. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J Immunol* 2005;174:7446-52.
 - 4) Nikolic-Zugich J. T cell aging: naive but not young. *J Exp Med* 2005;201:837-40.
 - 5) Solana R, Pawelec G, Tarazona R. Aging and innate immunity. *Immunity* 2006;24:491-4.
 - 6) Castle SC. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. *Clin Infect Dis* 2000;31:578-85.
 - 7) Haynes BF, Markert ML, Sempowski GD, Patel DD, Hale LP. The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow transplantation, and HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* 2000;18:529-60.
 - 8) Goronzy JJ, Weyand CM. T cell development and receptor diversity during aging. *Curr Opin Immunol* 2005;17:468-75.
 - 9) Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol* 2002;2:251-62.
 - 10) Jameson SC. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat Rev Immunol* 2002;2:547-56.
 - 11) Goronzy JJ, Lee WW, Weyand CM. Aging and T-cell diversity. *Exp Gerontol* 2007;42:400-6.
 - 12) Yung RL. Changes in immune function with age. *Rheum Dis Clin North Am* 2000;26:455-73.
 - 13) Czesnikiewicz-Guzik M, Lee WW, Cui D, Hiruma Y, Lamar DL, Yang ZZ, et al. T cell subset-specific susceptibility to aging. *Clin Immunol* 2008;127:107-18.
 - 14) Kang I, Hong MS, Nolasco H, Park SH, Dan JM, Choi JY, et al. Age-associated change in the frequency of memory CD4+ T cells impairs long term CD4+ T cell responses to influenza vaccine. *J Immunol* 2004;173:673-81.
 - 15) Ginn-Pease ME, Whisler RL. Alterations in the expression of interleukin-2R subunits by activated T cells from elderly humans are uncoupled from aberrancies in G1/S progression. *J Interferon Cytokine Res* 2001;21:515-21.
 - 16) Pawelec G, Adibzadeh M, Solana R, Beckman I. The T cell in the ageing individual. *Mech Ageing Dev* 1997;93:35-45.
 - 17) Schindowski K, Frohlich L, Maurer K, Muller WE, Eckert A. Age-related impairment of human T lymphocytes' activation: specific differences between CD4(+) and CD8(+) subsets. *Mech Ageing Dev* 2002;123:375-90.
 - 18) Fernandez-Gutierrez B, Jover JA, De Miguel S, Hernandez-Garcia C, Vidan MT, Ribera JM, et al. Early lymphocyte activation in elderly humans: impaired T and T-dependent B cell responses. *Exp Gerontol* 1999;34:217-29.
 - 19) Beckman I, Dimopoulos K, Xu XN, Bradley J, Henschke P, Ahern M. T cell activation in the elderly: evidence for specific deficiencies in T cell/accessory cell interactions. *Mech Ageing Dev* 1990;51:265-76.
 - 20) Douziech N, Seres I, Larbi A, Szikszay E, Roy PM, Arcand M, et al. Modulation of human lymphocyte proliferative response with aging. *Exp Gerontol* 2002;37:369-87.
 - 21) Tortorella C, Pisconti A, Piazzolla G, Antonaci S. APC-dependent impairment of T cell proliferation in aging: role of CD28- and IL-12/IL-15-mediated signaling. *Mech Ageing Dev* 2002;123:1389-402.
 - 22) Sansoni P, Fagnoni F, Vescovini R, Mazzola M, Brianti V, Bologna G, et al. T lymphocyte proliferative capability to defined stimuli and costimulatory CD28 pathway is not impaired in healthy centenarians. *Mech Ageing Dev* 1997;96:127-36.
 - 23) Glimm H, Eaves CJ. Direct evidence for multiple self-renewal divisions of human in vivo repopulating hematopoietic cells in short-term culture. *Blood* 1999;94:2161-8.
 - 24) Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, Briere F, Galizzi JP, van Kooten C, et al. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* 1994;12:881-922.
 - 25) Smith KA. The interleukin 2 receptor. *Annu Rev Cell Biol* 1989;5:397-425.
 - 26) Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol* 2009;27:591-619.
 - 27) Frents M, Arbach O, Kirchhoff D, Moewes B, Worm M, Rothe M, et al. Direct access to CD4+ T cells specific for defined antigens according to CD154 expression. *Nat Med* 2005;11:1118-24.
 - 28) Kahi S, Cozon GJ, Greenland T, Wallon M, Gay-Andrieu F, Peyron F. A rapid flow cytometric method to explore cellular immunity against *Toxoplasma gondii* in humans. *Clin Diagn Lab Immunol* 1998;5:745-8.
 - 29) Maino VC, Suni MA, Ruitenberg JJ. Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation. *Cytometry* 1995;20:127-33.
 - 30) Michalek J, Collins RH, Durrani HP, Vaclavkova P,

- Ruff LE, Douek DC, et al. Definitive separation of graft-versus-leukemia- and graft-versus-host-specific CD4+ T cells by virtue of their receptor beta loci sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100: 1180-4.
- 31) Eisenbraun MD, Tamir A, Miller RA. Altered composition of the immunological synapse in an anergic, age-dependent memory T cell subset. *J Immunol* 2000;164:6105-12.
- 32) Garcia GG, Miller RA. Single-cell analyses reveal two defects in peptide-specific activation of naive T cells from aged mice. *J Immunol* 2001;166:3151-7.
- 33) Tamir A, Eisenbraun MD, Garcia GG, Miller RA. Age-dependent alterations in the assembly of signal transduction complexes at the site of T cell/APC interaction. *J Immunol* 2000;165:1243-51.
- 34) Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999;401:708-12.
- 35) Slagboom PE, Droog S, Boomsma DI. Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *Am J Hum Genet* 1994;55:876-82.
- 36) Weng NP, Hathcock KS, Hodes RJ. Regulation of telomere length and telomerase in T and B cells: a mechanism for maintaining replicative potential. *Immunity* 1998;9:151-7.