

신장이식 분야의 세포 면역치료

서울대학교병원 장기이식센터¹, 서울대학교 의과대학 장기이식연구소²전희중¹ · 양재석^{1,2}

Cell Therapy in Kidney Transplantation

Hee Jung Jeon, M.D.¹ and Jaeseok Yang, M.D.^{1,2}Transplantation Center, Seoul National University Hospital¹, Transplantation Research Institute,
Seoul National University College of Medicine², Seoul, Korea

Current immunosuppressants have nonspecific immunosuppressive effects, and are not helpful for tolerance induction. Consequently, transplant patients cannot discontinue using them, and their nonspecific immunosuppressive effects result in many side effects, including infection and malignancy. However, most of cellular immunotherapy can have donor antigen-specific immunosuppressive effects. Therefore, cell therapy could be an alternative or adjunctive to nonspecific immunosuppressants. Polyclonal or antigen-specific Foxp3+ regulatory T cells have been actively tried for prevention of acute rejection, treatment of chronic rejection, or tolerance induction in clinical trials. Regulatory macrophages are also under clinical trials for kidney transplant patients. IL-10-secreting type 1 regulatory T cells and donor- or recipient-derived tolerogenic dendritic cells will also be used for immunoregulation in clinical trials of kidney transplantation. These cells have antigen-specific immunoregulatory effects. Mesenchymal stromal cells (MSCs) have good proliferative capacity and immunosuppressive actions independently of major histocompatibility complex; therefore, even third-party MSCs can be stored and used for many patients. Cell therapy using various immunoregulatory cells is now promising for not only reducing side effects of nonspecific immunosuppressants but also induction of immune tolerance, and is expected to contribute to better outcomes in transplant patients.

Key Words: Cell therapy, Kidney transplantation**중심 단어:** 세포 면역치료, 신장이식

서론

장기이식에 대한 이론과 기술이 점차 발전함에 따라, 장

기의 기능이 이식에 의해 빠르게 회복되고 이로써 환자들은 활동적인 일상 생활로의 복귀가 가능해졌다. 그러나, 인간의 면역 시스템은 동종 조직에 대하여 강하게 반응하며, 만약 이러한 면역 시스템이 면역억제제에 의해 억제되지 않을 경우 이식 후 수 일 혹은 수 주 내에 이식된 장기는 거부반응에 의하여 기능을 잃게 될 것이다. 하지만, 현재의 비특이적인 강력한 면역억제요법은 전체 면역 시스템을 손상시키기 때문에 독성, 감염, 악성 종양의 발생과 같은 많은 부작용을 일으킬 수 있다는 근본적인 문제점이 있다. 또한, 이런 비특이적인 면역억제제는 면역관용 유도를 이룰 수 없기 때문에, 부작용으로 인해 약제 복용을 소홀

Received August 20, 2014

Revised August 29, 2014

Accepted August 29, 2014

Corresponding author: Jaeseok YangTransplantation Center, Seoul National University Hospital, 101,
Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea

Tel: 82-2-2072-4128, Fax: 82-2-2072-4129

E-mail: jcyjs@dreamwiz.com

A portion of this work was presented at 15th symposium of Kidney Society of Transplant Nephrologists on June 28, 2014.

히 할 경우 만성거부반응이 발생하여 이식의 장기적인 성적을 저하시키는 중요한 원인이 되고 있다.

따라서 이런 비특이적인 면역억제제 치료의 한계점에 대한 대안으로 세포 면역치료(cell-based immunotherapy, cell therapy)가 제시되고 있다. 세포치료는 대부분 항원특이적으로 작용하여 비특이적인 면역억제제로 인한 부작용을 예방할 수 있고, 비특이적인 면역억제제의 용량 감량을 가능하게 하여 간접적으로도 부작용을 줄일 수 있다. 또한 세포치료는 면역관용 유도에 기여하기 때문에 다른 면역 조절제와 병용치료를 통해 면역관용 유도 시도에도 도움이 될 수 있기에 향후 그 역할이 기대된다. 현재, Foxp3+ 조절 T 세포(Foxp3+ regulatory T cells, Tregs)와 중간엽줄기세포(Mesenchymal stromal cells, MSCs) 등의 세포치료 임상시험이 미국, 영국, 독일, 프랑스, 네덜란드, 벨기에, 이탈리아, 러시아, 중국과 인도의 신장이식 환자를 대상으로 진행되고 있고, 독일에서는 조절 대식세포(Regulatory macrophage, Mregs)의 임상시험이 진행되고 있으며 향후 세포 면역치료는 보다 광범위하게 적용될 예정이다(1).

이에 본 저자들은 신장이식 분야에서 이루어지는 여러 세포 면역치료의 현황에 대해 살펴 보고자 한다. 그러나, 별도의 한 큰 분야인 면역 관용을 유도하기 위한 골수 혹은 말초 조혈모세포이식은 본 논문에서는 다루지 않고자 한다. 그 결과, 본 논문에서는 Foxp3+ 조절 T 세포(Foxp3+ regulatory T cells, Tregs), IL-10+ 1형 조절 T 세포(IL-10+ T regulatory type 1 (Tr1) cells), 관용유도 수지상 세포(Tolerogenic dendritic cells, DCregs), 조절 대식세포(Regulatory macrophage, Mregs), 및 중간엽줄기세포(Mesenchymal stromal cells, MSCs) 등을 다루고자 한다.

본 론

1. ONE 연구

ONE 연구(*The ONE Study*)는 유럽 연합의 연구비 지원을 받는 대규모 협력 연구과제로서, 공통 프로토콜을 활용하여 고형 장기이식 분야에서 세포 면역치료를 평가하기 위한 통합된 연구인데, 독일, 프랑스, 이탈리아, 영국, 미국의 연구진들이 참여하고 있다(www.onestudy.org)(2). 이 연구들의 목표는 장기 이식 환자의 면역억제제에 대한 평생의 의존도를 줄이는 것을 목적으로 새롭게 개발된 세포 면역치료법을 발전시키고 평가하는 데 있다. 원칙적으로 장기 이식에 있어 세포 면역치료의 배경이 되는 가설은, 이식 수술 시점 근처에 일정량의 조절 면역 세포(regulatory immune cells)를 환자에게 투여함으로써 이식된 장기

에 대한 거부 반응을 예방하는 일정 수준의 지속되는 면역 조절력을 유도하는 데 있다. 현재의 면역억제 치료는 거부 반응을 일으키는 면역 세포를 고갈시키거나 이러한 세포들의 면역 반응에 필요한 신호전달체계를 차단함으로써 면역 기능을 억제시키는 것이고, 이러한 형태의 기능적 억제 치료법은 전반적인 면역 시스템의 억제를 야기하게 된다. 반면에, 세포 면역치료는 면역 시스템에 기능적 세포 구성요소를 추가함으로써 면역 균형을 면역 조절 쪽으로 촉진하고 확립하여 이식 장기의 생존을 향상시키는 치료법이다(2). ONE 연구(*The ONE Study*) 컨소시엄은 특정 T 세포[T 조절 세포(Treg)와 T 조절 1형 세포(Tr1 세포)], 수지상 세포(dendritic cell), 그리고 대식세포 등으로 이루어진 각각의 다른 종류의 조절 세포 면역치료의 가능성과 잠재력을 평가하고 있다. 이 연구의 일차적인 목적은 이러한 세포 면역치료들을 통일된 시험 프로토콜을 이용하여 비교 평가하는데 있으며, 통일된 시험 프로토콜을 위해 다음과 같은 기준을 제시하였다. 우선 대조군에서는 basixilimab으로 유도 치료를 하고, prednisolone은 점차 줄여서 이식 후 15주에 중지하며, tacrolimus는 이식 후 37주 이후로 3~6 ng/mL의 농도를 유지하고, mycophenolate mofetil은 15일 이후로 1.5 g/day의 용량으로 투여한다. 실험군에서는 basixilimab 유도 치료 대신 세포 치료로 대체하고, prednisolone과 tacrolimus는 대조군과 같으며, mycophenolate mofetil은 이식 후 1년 이내에 끊는 것을 원칙으로 한다. 이와 같이 동일 프로토콜을 이용한 개별 세포치료 연구들을 수행함으로써, 서로 다른 세포 치료를 비교 분석할 수 있게 된다. 현재 유럽과 미국에서 다수의 대조군 연구와 세포면역치료 연구가 시작되어 진행 중으로 향후 보다 확대될 전망이다.

2. Foxp3+ 조절 T 세포(Foxp3+ regulatory T cells, Tregs)

다양한 종류의 T 세포가 이식 면역 관용에 관여된다는 것이 알려져 있으며, 그 중에 대표적인 것이 전사인자(transcription factor) FOXP3를 표현하는 CD4⁺CD25⁺ 조절 T 세포(regulatory T cells, Tregs)이다.

1) 임상시험

인간을 대상으로 한 Tregs 세포치료의 임상시험이 현재까지 4개가 발표되었고, 3개는 이식편대 숙주 질환(Graft versus Host Disease, GvHD)에서, 1개는 제1형 당뇨병에서 시행되었다(3-6). 발표된 4개의 임상시험 모두 Tregs 치료의 유효성과 안정성이 우수하다는 것을 보여 주었다. 또한 거대세포바이러스(cytomegalovirus) 감염과 같은 기회감

염성 질환에 대한 면역력에 장애가 되지 않았고, 독감 예방접종에 대한 항체 생성에 정상적인 반응을 보여주었다. 분리된 FOXP3⁺ Tregs의 순도(purity)가 31%에서 97%에 걸쳐 있었고, 반복적인 체외 자극을 통하여 순수 분리되는 Tregs의 비율이 증가되었다.

비이식 환자들을 대상으로 한 Treg 세포치료의 이와 같은 임상시험에 기반하여 신장이식 환자들을 대상으로도 임상시험이 진행되고 있다. 현재 www.clinicaltrials.org에 등록되어 진행되고 있는 Tregs 세포 면역치료의 임상시험 5개를 요약하면 다음과 같다. 첫 번째, 러시아에서 소아 신장이식 환자를 대상으로 거부 반응을 예방하기 위해 Tregs를 투여하는 임상시험이 진행 중이다. 체외에서 증식시킨 다중클론성(polyclonal) 자가 Tregs를 2×10^8 의 용량으로 30일째와 180일째 피하로 주사하여 치료할 예정이다. 두 번째, 독일에서는 tacrolimus와 mycophenolate로 치료하는 생체 제공자 신장이식 환자를 대상으로 제공자 특이 관용을 유도할 수 있는지를 평가하고자, 다중클론성(polyclonal) 자가 Tregs와 이식 수용 유도세포(Transplant-Acceptance inducing cells, TAIC)로 치료하여 이식 신 생존율과 면역억제제 감량 혹은 회피가 가능한지를 평가하고 있다. 세 번째, 영국의 ONE 연구에서는 신장이식 후 5일째 $1 \sim 10 \times 10^6/\text{kg}$ 의 다중클론성(polyclonal) 자가 Tregs를 정맥으로 투여하는 임상시험을 진행하고 있다. 이식 환자들은 prednisolone, mycophenolate mofetil, tacrolimus도 함께 복용하고 있다. 네 번째, 미국의 Massachusetts General Hospital에서도 신장이식 환자를 대상으로 Tregs를 이식 후 7일째 투여하는 임상시험을 진행하고 있다. 수용자의 말초 혈액 단핵세포에서 Tregs를 분리하여 제공자의 말초 혈액 단핵세포와 belatacept로 자극시켜 항원특이적 Tregs를 증식시킨 다음 다시 수용자에게 투여하며, 이식 후 60주 이내에 기존의 면역억제제를 줄일 수 있는지를 평가할 예정이다. 마지막으로, 미국의 University of California, San Francisco (UCSF)에서는 신장 이식 생검에서 발견된 무증상 염증에 대한 Tregs 치료를 평가하기 위해, 체외에서 증식시킨 다중클론성(polyclonal) 자가 Tregs를 320×10^6 의 용량으로 1회 주입하여 신장이식의 후기 합병증을 평가하고, 제공자 B세포와 anti-CD40L 자극을 이용한 항원 특이적 Tregs 치료도 시행할 예정이다.

2) Tregs 치료의 장단점

Tregs이 세포 면역치료에 이용될 수 있는 장점 중의 하나는 Tregs에 의해 매개되는 면역 반응은 매우 항원 특이적이라는 점이다. 현재의 면역억제제 중 어떤 것도 중앙

항원과 미생물 병원체에 대한 면역 반응을 변화시키지 않고 이식 항원에 대한 면역 반응을 억제하는 약물은 없다. 왜냐하면 현재의 면역억제제는 칼슘 신호(cyclosporine A, FK506)나 퓨린(purine) 생합성(mycophenolate) 같은 면역 반응의 공통적인 경로를 억제하기 때문이다. 뿐만 아니라, 항흉선세포 면역글로불린(antithymocyte globulin, ATG), Campath-1, anti-CD20와 같은 약제들은 대규모 및 비특이적으로 면역 세포를 제거한다. 반면에, T 세포는 서로 다른 항원들 사이에서 아주 작은 차이를 구별해 낼 수 있는 능력을 갖고 있기 때문에 동종항원에 대한 면역반응에 특이적으로 작용할 수 있다. 자가면역 당뇨병과 자가면역 췌장염의 마우스 모델에서, islet 항원 특이적인 Tregs를 사용하여 islet 세포가 효과적으로 보호되는 것이 관찰된 바 있다(7). 이식 모델에서는 공여 장기에 특이적인 Tregs에 의해 면역 관용이 유지되는 반면, Tregs과 관련이 없는 이식 장기는 거부 반응이 일어났다(8). 또한 이식 마우스 모델을 이용한 또 다른 연구에서는, Tregs 치료가 거부반응을 방지할 뿐만 아니라 감염성 관용(infectious tolerance) 과정을 거쳐 더 광범위한 특이성을 갖는 새로운 Tregs를 유도한다는 것을 알게 되었다(9). 그러므로, Tregs 치료는 잠재적으로 면역적으로 공격의 대상이었던 이식 장기를 면역관용적인 장기로 바꾸어 장기간의 생존율을 기대해 볼 수 있게 한다.

Tregs이 세포 면역치료에 이용될 때 두 번째 장점은, Tregs이 매우 다재다능하여 다양한 종류의 면역 세포의 반응을 모두 조절할 수 있다는 점이다. 즉 Tregs은 CD4⁺ T 세포, CD8⁺ T 세포, 자연살해세포[natural killer (NK) cells], 자연살해 T 세포(NKT cells), B 세포, 다양한 항원제시세포(antigen-presenting cells) 등을 포함하여 여러 선천 면역 및 후천 면역 반응을 조절할 수 있다(10). 또한, Tregs은 미세환경에 따라 다양한 조절 기전을 갖고 있다는 장점이 있다. 면역학적 휴지기(quiescent state)에는 림프계 조직에서 CD4⁺ T 세포의 5~10%를 차지하는 Tregs이 CTLA-4를 통하여 보조 자극 수용체인 CD80/CD86의 발현을 감소시키고, IL-2와 같은 사이토카인들을 소모함으로써 원치 않는 면역 활성화가 일어나는 것을 방지하고 있다(11,12). 반면 면역학적 활성화기(active state)에는 Tregs은 염증 반응이 일어나는 곳에서 증식하고 축적되게 되는데, 주로 면역 반응의 후기에 일어나게 되고, 면역억제 사이토카인인 IL-10, IL-35, TGF- β , ATPases, granzyme B, IL-9-매개성 비만 세포 등을 이용하여 정상적인 면역 항상성이 회복되게 한다(13,14).

그러나, Tregs의 수가 염증과 이식 장기 거부반응에서

증가하게 되지만, 이식 장기 손상을 예방하기에는 반응이 충분하지 않고 또한 반응 시간이 너무 늦는다는 단점도 있다. 따라서, 효과적인 Tregs 치료를 위해서는, 손상 반응이 일어나기 전에 면역 균형을 맞출 수 있는 충분한 용량의 Tregs 세포가 투여되어야 한다는 것이 전제되어야 한다.

3) Tregs 치료 용량

이식 장기의 거부반응을 효과적으로 억제할 수 있는 Tregs의 용량을 산출하는 실험에서, 림프구가 결여된 숙주에 효과기(effector) T 세포와 Tregs 혼합물을 입양전달(adoptive transfer) 하는 마우스 모델에서는 적어도 2개의 효과기 T 세포 당 1개의 Tregs, 때로는 1개의 효과기 T 세포 당 5개의 Tregs가 거부 반응을 예방하는 데 필요하였다(15,16). 또 다른 마우스 실험에서도 이식 장기 안에 30%의 Tregs가 거부 반응을 예방할 수 있다는 것이 관찰되었다(17). 따라서, 평균적으로 성인 체내에 166×10^9 의 CD4⁺ T 세포가 존재한다고 추정할 때, 면역반응을 효과적으로 억제하기 위해서는 53×10^9 의 Tregs가 필요하게 된다. 그러나, ATG와 같이 90%의 T 세포를 고갈시키는 치료와 함께 Tregs 치료가 병합된다면, 그 보다 10배 적은 5×10^9 의 Tregs도 충분할 것으로 예상된다(18). 한편, 마우스와 인간이 비장에 가지고 있는 림프구 수는 약 1000배 차이가 있는 것을 감안할 때, 이전 실험에서 30×10^6 의 다중클론성(polyclonal) Tregs 치료를 통해 마우스 모델에서 이식 장기 생존율이 증가하였기 때문에, 인간에서 거부 반응을 예방할 수 있는 다중클론성(polyclonal) Tregs 치료의 효과적인 용량은 30×10^9 으로 산술적으로 계산할 수 있다(10). 성인 체내의 총 Tregs의 수는 13×10^9 으로 추정되지만, 실제 치료에 사용될 수 있는 자가 세포의 공급원일 될 혈액에서 순환하고 있는 Tregs의 수는 0.25×10^9 에 불과하다. 따라서 효과적인 치료를 위해서는 Tregs의 수를 대폭으로 증가시킬 수 있는 체외 세포 증식(*ex vivo* expansion)이 필수적이다.

Tregs 세포 면역치료를 연구하는 이식 마우스 모델에서 일정하게 보여지는 결과 중 하나는, 관용을 얻은 숙주에서 얻은 동종항원을 경험한 Tregs가 동종항원을 경험하지 않은(naive) 숙주에서 얻어진 Tregs와 비교하여 더 효과적이라는 점이며, 이러한 향상된 효능은 동종항원에 반응하는 Tregs의 비율이 증가하기 때문이다(19,20). 동종항원 반응 T 세포에는 2가지 종류가 있다. “직접(direct)” 동종항원 반응 T 세포는 기증자 세포에 표현된 동종항원을 인식하는 반면에, “간접(indirect)” 동종항원 반응 T 세포는 숙주의 항원제시세포에 의해 가공되어 표현된 동종항원을 인

식한다. 흥미롭게도, 동종이식 관용은 일차적으로 간접 반응을 통해 이루어지며, 관용을 유도하는 많은 프로토콜도 간접 특이성을 가진 Tregs를 유도하였다. 간접 Tregs만으로도 거부 반응에 대하여 일정 정도의 보호 효과를 갖긴 하지만 직접 Tregs의 작용에 비교하여 그 효능은 제한적이다(21). Lee 등은 80%의 반응성 T 세포를 제거하는 치료와 병합한다면, 직접 동종항원 반응 Tregs 치료로 체외 동종이식의 생존율이 증가함을 발견하였다. 다중클론성(polyclonal) Tregs 또한 이식 장기의 장기 생존율을 유도하였지만, 같은 효과를 얻기 위해서 동종특이(allospecific) Tregs와 비교하여 5배 많은 수의 세포가 필요하였다(10). 종합해 보면, 제한된 수의 Tregs와 최소한의 면역억제제를 사용하여 이식 장기의 생존율을 증가시키고자 할 때, 직접과 간접 동종항원 반응 Tregs의 병합 요법이 최선으로 판단된다. 적절한 전처치 치료와 함께 충분한 수의 세포가 제공된다면, 직접과 다중클론성(polyclonal) Tregs 둘 다 이식 장기의 장기 생존을 유도할 수 있을 것이다.

4) Tregs 분리 및 증식 유도

Tregs 증식의 첫 번째 단계는 Tregs를 분리하는 것이다. 자기 활성화 세포 분리법(magnetic activated cell sorting, MACS)이 Tregs 분리를 위해 제안되었으나(22), 이 프로토콜을 사용한 방법은 기존의 효과기 T 세포를 완전히 분리하지 못하고 섞여서 나온다는 단점이 있다. 이는 CD4⁺ 세포에 발현된 CD25가 Tregs에만 국한되지 않아, CD25 발현을 기초로 한 분리법으로는 Tregs와 non-Tregs를 명쾌하게 분리할 수 없기 때문이다. 하지만 CD127의 추가적인 도입으로 CD4⁺CD25⁺CD127^{low}의 표현형을 기초로 하여 FACS를 이용한 sorting으로 고도로 순리 분리된 Tregs를 얻을 수 있게 되었으며(23), 이러한 방법을 사용하여 혈액 100 mL에서 평균 1×10^6 의 Tregs를 분리할 수 있게 되었다.

두 번째 단계로 다중클론성(polyclonal) Tregs 증식이 필요한데, Tregs는 anti-CD3와 anti-CD28으로 코팅된 beads에 IL-2를 보충함으로써 쉽게 증식시킬 수 있다(24). 하지만 CD4⁺ T 세포와 CD8⁺ T 세포가 Tregs보다 더 증식이 잘 되기 때문에, 증식시키기 전 세포를 고도로 순수하게 분리하는 것이 매우 중요하다. 그러나 MACS를 이용한 Tregs 분리는 종종 CD25⁺FOXP3⁻ 세포에 의해 오염이 되기 때문에 문제가 될 수 있다. Rapamycin을 추가함으로써 세포 배양의 순수성을 향상시킬 수 있는데, 이는 rapamycin이 기존의 효과기 T 세포의 증식은 억제시키는 반면에 Tregs 증식에는 영향을 덜 미치기 때문이다. 동종항원 특이 반응성 Tregs는 수지상 세포, B 세포, 그리고 미분화 말

초 혈액 단핵세포와 같은 기증자 항원제시세포를 사용하여 증식시킬 수 있다. Putnam 등은 CD40L 활성화 동종 B 세포를 사용하는 방법을 개발하여 동종항원 반응성 Tregs의 증식을 선택적으로 자극하는 데 성공하였다(25). 일차적으로 증식시킨 후 생산율을 높이기 위해 이 세포들은 다시 anti-CD3와 anti-CD28으로 코팅된 beads로 비특이적으로 자극시켰다. 이러한 방식으로 그들은 16일 안에 200에서 4,000배로 Tregs를 증식시킬 수 있었다. 이러한 세포는 동종항원에 대한 고도의 반응성이 있었으며, Tregs 특이적 탈메틸화 영역(Treg-specific demethylation region, TSDR)을 탈메틸화시켰다. 신장이식과 간이식에서 이 프로토콜을 사용하여 제조된 Tregs를 적용하는 임상 시험은 2014년에 시작할 예정이다.

5) 기존 면역억제제들의 Tregs에 대한 영향

현재 사용되고 있는 다양한 비특이적인 면역억제제들의 일부는 Tregs의 증식이나 면역조절 작용에 도움이 되나, 다른 일부는 방해가 된다. 그러므로, 보조적인 면역억제제의 선택은 Tregs 치료의 효능에 중요한 영향을 미칠 수 있다. 핵수용체에 결합하여 AP1과 NF- κ B 및 염증유도 싸이토카인의 발현을 억제하는 역할을 하는 스테로이드는 염증반응을 줄임으로써 Tregs의 작용을 도와줄 가능성이 있는 반면, 칼슘 신호전달통로를 차단하는 calcineurin 억제제는 Tregs의 기능과 생존에 해로운 영향을 주는 것으로 알려져 있다. Rapamycin은 mammalian target of rapamycin (mTOR)을 차단함으로써 단백질 합성 및 증식을 억제시키는 약제로 다른 면역세포에 비해 Tregs에 대한 영향은 적어 오히려 Tregs의 비율은 증가하게 된다. 퓨린(purine) 생합성을 억제하여 T 세포와 B 세포의 증식을 막

는 것으로 알려진 mycophenolate mofetil은 Tregs에 대한 영향에 있어 비교적 중립적이다. 또한 anti-CD25는 CD25를 발현하는 모든 세포를 고갈시켜 Tregs도 소실시키는 반면, T 세포, 자연살해세포(NK cells), B 세포를 고갈시키는 ATG는 상대적으로 Tregs에 대한 영향이 적어 Tregs의 비율이 오히려 증가하게 된다. CTLA4-Ig은 CD80/CD86을 차단하여 CD28에 대한 보조 자극 및 T 세포의 증식을 억제하는 약제로, 포화 용량 이하로 사용할 경우 비교적 Tregs에 대한 영향은 적으며, LFA-1과 ICAM-1 간의 상호작용을 차단시켜 T 세포 증식과 백혈구 트래피킹(trafficking)을 억제하는 anti-LFA-1은 오히려 순환하는 Tregs의 비율을 매우 증가시킨다고 알려져 있다. CD40를 통한 항원제시세포의 활성화는 Tregs 매개성 억제를 상쇄시키기 때문에, anti-CD40L은 Tregs의 기능을 향상시킬 수 있으며, FOXP3의 분해를 촉진하여 Tregs를 불안정하게 하는 histone deacetylases를 억제하는 약제는 Tregs의 항상성을 향상시킬 수 있다. 또한, IL-2를 투여함으로써 Tregs를 효과적으로 증식시킬 수 있으나, CD8⁺ T 세포와 자연살해세포(NK cells)도 함께 증식할 수 있기 때문에, anti-IL2를 함께 투여하여 Tregs에 선택적으로 IL-2가 작용하게 하는 방법도 연구가 이루어지고 있다(Table 1)(10).

3. IL-10+ 1형 조절 T 세포[IL-10+ T regulatory type 1 (Tr1) cells]

말초 1형 조절 T (Tr1) 세포는 동종항원에 특이적인 억제 기능을 가지고 있으며, 동종 조혈모세포 이식 후 키메라(chimeric) 환자에서 보이는 면역 관용 상태와 연관이 있는 세포이다. 몇몇 전임상 연구에서 Tr1 세포가 이식 면역관용을 유도하고 유지하는데 있어 매우 중요한 역할을

Table 1. Impact of immunosuppressants on regulatory T cells

Drugs	Impact on Tregs
Corticosteroid	May support Tregs by reducing inflammation
Calcineurin inhibitors	Detrimental to Tregs' function and survival
Rapamycin	Spare Tregs, thus increases proportion of Tregs
Mycophenolate mofetil	Likely neutral
Antithymocyte globulin	Deletes Tregs less efficiently, thus increase relative proportion of Tregs
Anti-CD25	Deletes Tregs
CTLA4-Ig	Spares Tregs when used at subsaturating dose
Anti-LFA-1	Dramatically increases circulating Tregs proportion
Anti-CD40L	Increases Tregs
Histone deacetylase inhibitors	Improve homeostasis of Tregs
IL-2 or IL-2 complex	Increases Tregs

Abbreviation: Tregs, regulatory T cells; CTLA4-Ig, Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 immunoglobulin fusion protein; LFA-1, lymphocyte function-associated antigen-1; IL-2, Interleukin-2.

한다는 것을 보여주었다(26-28). Tr1 세포는 고유의 싸이토카인(IL-10⁺IL-4⁺IL-17⁺)을 생성하며, CD49b와 LAG-3를 함께 발현하는 특징을 가진 것으로 알려져 있다(29). Tr1 세포는 고농도의 IL-10을 분비하고 골수양(myeloid) 세포를 사멸시킴으로써 면역 반응을 조절한다(30). 동종 항원 특이적인 Tr1 세포는 IL-10의 존재 하에 *in vitro*에서 유도될 수 있다(31). 즉, IL-10의 존재 하에 동종항원에 의하여 T 세포가 활성화되면 항원 특이성 저반응성이 유도되는데, 이를 가리켜 T 세포 아네르기(anergy)라고 부르며, 이렇게 IL-10으로 유도된 아네르기(anergized) T 세포 중에는 Tr1 세포를 포함하고 있다(32). 조혈모세포이식 마우스 모델에서 이러한 IL-10 아네르기(anergized) T 세포를 주입하였을 때 GvHD가 예방되는 것을 발견하였으며(33), 이는 동종 조혈모세포이식 임상시험에 심한 GvHD 발생 없는 면역 재건을 위해 IL-10 아네르기(anergized) 제공자 T 세포(IL-10-DLI)를 사용할 수 있게 되는 이론적 배경이 되었다.

실제로 ALT-TEN이라고 불리는 임상시험에서, T 세포를 고갈시킨 후 일배체 적합 조혈모세포이식(haplo-HSCT)을 시행 받은 12명의 고위험/진행성 병기의 혈액암 환자를 대상으로 IL-10-DLI 세포 면역치료를 시행하였다. 제공자로부터 분리한 말초 혈액 단핵세포를 CD3가 고갈된 환자 말초 혈액 단핵세포로 IL-10과 함께 10일 동안 자극시키는 혼합 림프구 반응(mixed lymphocyte reaction)을 통해 IL-10-DLI를 생산하였고, 조혈모세포이식 후 적어도 한 달 이후에 $1 \sim 3 \times 10^5$ 의 용량으로 환자에게 투여되었다. 치료를 시행한 12명의 중 4명의 환자에서 긍정적인 결과가 나타났다. 즉, 이 환자들은 제공자 완전 키메라즘(chimerism)과 면역재건 및 장기간의 완전 관해 상태를 얻을 수 있었으나, GvHD는 증가하지 않았다. 또한 이 4명의 환자에서 얻은 세포가 면역관용과 관련된 생체 표지자들을 발현한다는 것과 Tr1 세포가 풍부하게 존재하지만 CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg의 빈도는 변하지 않는다는 것 또한 확인하였다(34). 이 연구는 Tr1 세포 면역치료가 고형 장기 이식 영역에서도 보조 치료로 사용될 수 있다는 가능성을 제시하고 있으며, 실제로 ONE 연구에서 신장 이식환자를 대상으로 하는 연구를 계획하고 있다.

4. 관용유도 수지상 세포(Tolerogenic dendritic cells, DCregs)

1) 수지상 세포(DCregs) 치료의 원리 및 종류

수지상 세포는 본질적으로 항원 특이성 면역 반응을 하는 세포이며, 이식 장기에 대한 면역 반응을 특이적으로

조절할 수 있다는 점에서 세포 면역치료의 대상 세포로 관심을 받아왔다(35). 장기 이식에 있어, 수지상 세포는 면역과 관용의 균형을 결정하는 중요한 역할을 한다. 전문적인 항원제시세포(antigen-presenting cells)로서, 수지상 세포는 이식 장기의 항원을 처리하여 수용자 T 세포에 제시하는 능력을 갖고 있으며, 수지상 세포의 성숙 상태에 따라 거부 반응을 유도하는 면역원성 수지상 세포(immunogenic dendritic cells) 또는 이식 장기 면역관용을 유도하는 관용유도 수지상 세포(tolerogenic dendritic cells, DCregs)가 될 수 있다(36). DCregs를 동종이식 관용을 촉진하는데 사용하는 치료적 시도는 동물 모델에서 널리 연구된 바 있으며(37), 면역 관용을 유도하는데 있어 크게 두 가지 전략이 사용될 수 있다. 그 첫 번째는 제공자 수지상 세포 혹은 동종항원으로 자극된 수용자 수지상 세포를 이식 전에 투여하는 것이며, 두 번째는 자극 받지 않은 수용자 DCregs를 이식 수술 근처에 투여하는 것이다.

첫 번째 전략으로, 제공자 유래 DCregs를 보조자극 차단, 면역억제, 림프구 제거치료 등의 보조치료와 함께 미숙, 반성숙, 성숙 저항성, 선택적 활성화 혹은 유전자 변형 등 다양한 형태의 충분히 활성화되지 않은 형태로 수지상 세포를 주입하여 이식 장기의 생존율을 연장하였다는 여러 보고가 있었다(37). 예를 들어 Divito 등은 이식 7일 전에 제공자 미성숙 골수 유래 세포를 정맥으로 투여하여 마우스 심장 동종이식의 생존율이 유의하여 증가하였으며, 보조자극 차단과 병합한다면 생존율이 더욱 향상된다는 결과를 보여 준 바 있다(38). 체내에서 제공자 DCregs이 이식 면역관용을 유도하는 기전은 아직 명확하지 않으나, 제공자 항원을 직접적(direct)으로 제시하게 하여 공여 조직에 반응하는 T 세포를 아네르기(anergy)로 유도하거나 조절 T 세포(Tregs)의 증식을 유도하는 것으로 생각되고 있다. 하지만, Divito 등은 시행한 연구에서 제공자 DCregs은 정맥 내로 주입되자마자 빠르게 소멸되어 비장 내의 수용자 수지상 세포에 의해 재처리 과정을 거친다는 것을 보여 주었다(38). 이는 제공자 DCregs이 이식 장기 생존율을 향상시키는데 있어 항원제시세포(antigen-presenting cells)가 아닌 단지 항원을 전달하는 세포로서 기능을 할 가능성을 제시해 준다.

한편, 제공자 동종항원으로 자극된 수용자 수지상 세포(DCregs) 또한 이식 면역관용을 유도하는 데 사용되었으며, 마우스 심장이식 모델에서 이식 장기의 생존율이 증가함을 보여 준 바 있다(39). 수지상 세포의 특이 항원에 결합하는 항체(antigen-conjugated antibodies)에 동종항원을 결합하여 주사할 경우, 수용자 체내의 휴지기 수지상 세포

에 동종항원을 전달하는 역할을 할 가능성이 있다.

그러나, 이와 같은 방법으로 DCregs을 이용하는 세포 면역치료는 이식 장기의 면역관용을 유도하는 유망한 치료이지만, 몇 가지 단점이 존재한다. 이 치료에는 이식 수술 수일 전에 기증자로부터 세포를 추출하여 전처치하는 과정이 필요한데, 갑자기 이루어지는 뇌사자 신장이식에서는 사용될 수 없으며, 이식 전에 기증자 동종항원에 노출됨으로써 수용자가 제공자에 대하여 감작(sensitization)이 될 잠재적인 위험성도 존재한다.

두 번째 전략으로, 자극 받지 않은 수용자 DCregs을 투여하는 연구 역시 수행된 바 있다. 제공자 수지상 세포 혹은 동종항원으로 자극된 수용자 수지상 세포는 이식 일주일 전에 투여되는데 비해, 자극 받지 않은 수용자 DCregs은 이식일 근처에 투여될 수 있다. 즉, 이식 1일 전과 이식 당일에 정맥으로 투여된 자가 DCregs [저용량의 GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor)를 투여하여 생성된 골수 유래 세포(bone-marrow-derived cells)]이 마우스 심장이식 모델에서 거부반응을 유의하게 지연시켰음이 보고되었다. 또한 저용량의 면역억제 치료와 함께 자가 수지상 세포 치료를 병합하는 경우 90% 이상의 수용자에서 이식장기 관용까지 얻을 수 있었다(40). 자극 받지 않은 자가 수지상 세포가 기증자 특이 이식 면역관용을 유도하는 기전은 여러 연구에서 제시되고 있다. 첫째로 정맥 내로 투여된 DCregs은 빠르게 비장 내로 이동하여 기증자 동종항원을 포획하여 처리하고 있음이 보고되었다. 두 번째로 DCregs이 EBI3 사이토카인 연쇄를 통하여 CD4⁺CD8⁺ T 세포에서 면역조절 작용이 있는 interferon (IFN)- γ 의 생산을 촉진하는 것으로 알려져 있다(41). 셋째로, T 세포 증식을 억제하는데 필요한 HO-1이 발현된다는 점 또한 DCregs의 면역관용 유도를 설명하는 기전 중의 하나다(42).

2) 수지상 세포(DCregs) 생산 및 임상 경험

세포 배양 기술이 발전함에 힘 입어 임상적으로 사용 가능한 인간 수지상 세포를 생산해내는 것이 기술적으로 가능해졌다. 마우스의 DCregs은 보통 골수에서 얻어야 함에 비해, 인간에서 가장 접근 가능한 수지상 세포 전구체의 공급처는 혈액에 순환하는 단구이다. 단구 유래 수지상 세포(Monocyte-derived dendritic cells, MoDC)는 GM-CSF, IL-4와 함께 보통 6일 정도 짧은 시간을 배양하면 얻을 수 있다. DCregs은 미숙/반성숙 표현형을 가지며, 항염증성 사이토카인을 분비하고, 낮은 T 세포 자극 기능과 *in vitro*에서 Tregs을 유도하고 증식시킬 수 있다는 일반적인 특징

을 갖고 있다. 또한 최근 연구에 의하면 rapamycin, 비타민 D3, dexamethasone이 임상적으로 DCregs의 분화에 영향을 준다는 것을 보고되었고(43), 인간 단핵구를 IL-4 없이 저용량의 GM-CSF와 함께 배양하면 억제 기능을 갖는 수지상 세포의 분화를 촉진할 수 있다는 것도 발표되었다(44). 배양 시작부터 IL-10과 함께 배양을 시키면, 새로운 형태의 DCregs이 생성되는데 이를 dendritic cell-10으로 부르며, 이것은 *in vitro*에서 type 1 Tregs의 분화를 효과적으로 촉진한다고 알려져 있다(45). DCregs 치료의 또 다른 중요한 기준은 성숙화에 대한 저항성이다. 왜냐하면, 수지상 세포 치료의 가장 큰 위험성 중의 하나가 이식 환자에게 투여된 이후에 생체 내에서 성숙화가 일어나는 것이며, 이것은 수지상 세포의 관용유도 특성을 잃고 오히려 관용보다는 동종면역 반응이 활성화될 수 있기 때문이다. 안정적으로 관용유도 특성을 갖은 성숙 저항성 MoDC는 관용 유도제인 dexamethasone, 비타민 D3, cGMP grade TLR4 agonist (monophosphoryl lipid A)에 노출시켜 얻을 수 있음이 보고되었다(46).

한편, 기존의 비특이적인 면역억제제가 수지상 세포에도 다양한 영향을 미칠 수 있는데, 공통자극 경로 차단제(costimulatory pathway blocker)나 rapamycin은 수지상 세포의 작용에 도움이 되지만, calcineurin 차단제는 수지상 세포의 동종항원 처리를 방해하고, T 세포 제거제는 수지상 세포도 일부 제거함으로써 수지상 세포 치료에 방해가 될 수 있다(36).

DCregs을 임상적으로 이용한 세포 면역치료는 자가면역질환에 이미 적용되고 있다. 첫 번째 시행된 1상 임상시험은 피츠버그 대학(the University of Pittsburgh)에서 제1형 당뇨병 환자에게 자가 MoDC를 투여한 연구이며, 이것을 투여 받은 환자에서 심각한 부작용이나 독성이 나타나지 않았다(47). 오히려 흥미롭게도 수지상 세포 치료를 통해 조절 B 세포군을 함유한 것으로 알려진 B220⁺CD11c⁻ B 세포의 빈도가 올라감이 관찰되었다. 또한 류마티스 관절염 환자를 대상으로 하는 두 개의 1상 임상시험이 시작되었으며, 하나는 시트룰린 펩티드(citrullinated peptides)로 처리된 NFkB 차단 변형 수지상 세포를 투여하는 연구가 호주에서 시행되고 있고, 다른 하나는 비타민 D3와 dexamethasone으로 처리한 자가 수지상 세포를 투여하는 연구가 영국에서 진행되고 있다(48). 향후 이를 토대로 신장이식 환자를 대상으로 한 수지상 세포 치료가 ONE 연구를 통해 이루어질 예정이다.

5. 조절 대식세포(Regulatory macrophage, Mregs)

말초혈액 단핵구로부터 유도제나 배양조건에 따라 다양한 종류의 면역조절 세포를 얻을 수 있다. 이 세포들에는 면역관용 유도성 수지상 세포, DC-10 세포, rapamycin-조건화 수지상 세포(rapamycin-conditioned dendritic cells), 골수양-유래 억제세포(myeloid-derived suppressor cells, MDSC), 중간엽줄기세포-조건화 단구(mesenchymal stromal cell-conditioned monocytes) 및 조절 대식세포(regulatory macrophage) 등이 있다.

조절 대식세포(regulatory macrophage, Mregs)는 최근 세포 면역치료에 이용할 수 있는 후보 세포 중의 하나로 주목받고 있는 세포이다. Mregs는 간단하고 확실하게 얻을 수 있고, 최종 단계로 분화된 세포이며, 강력하게 T 세포를 억제할 수 있다는 점에서 면역관용을 유도하는데 있어 임상적으로 유용하게 사용될 수 있는 장점을 갖고 있다(49). 인간 Mregs는 형태학적으로 억제 대식세포(suppressor macrophage)의 균일한 집단이며, lipopolysaccharide에 의한 활성화에 비교적 불응성을 가진다. 말초 혈액 단핵구로부터 Mregs를 제조하는 방법이 개발되었으며, 이러한 과정을 통해 보통 $2 \sim 8 \times 10^8$ 의 Mregs를 생산해 낼 수 있다. 이는 kg 당 $2.5 \sim 7.5 \times 10^6$ 개의 세포 수가 요구되는 대부분의 이식 환자 치료에도 충분히 사용될 수 있는 양이 된다.

최근의 한 연구에서 두 명의 생체 기증자 신장이식 환자가 이와 같은 용량의 Mregs로 치료 받았다(50). 이 임상 시험에서는 기증자 말초 혈액 단핵세포를 추출하여 M-CSF (macrophage colony stimulating factor)와 human AB serum과 함께 6일 동안 배양하고, 이후 25 ng/mL의 재조합 human IFN- γ 로 1일 동안 자극시켜 Mregs를 제작하였다. 이렇게 제조된 Mregs는 신장이식 수술 6~7일 전에 환자에게 주입되었다. 결과적으로, 이식 후 3년째에 두 환자 모두 최소 용량의 tacrolimus 단일요법으로 면역억제제를 줄여서 투약 받으면서 안정적인 신기능을 유지하고 있음이 확인되었다. 또한 흥미롭게도 두 환자 모두 시간이 지남에 따라 말초 혈액에서 발현되는 유전 표지자가 면역관용과 관련된 특성으로 바뀌게 되었다. 현재 독일에서 생체 기증자 신장이식이 예정된 환자를 대상으로, kg 당 $2.5 \sim 7.5 \times 10^6$ 개의 기증자 Mregs를 신장 이식수술 6~7일 전에 정맥으로 투여하여 평가하는 ONE 연구 Mregs 임상시험이 진행되고 있다. 이 연구에서 신장이식 환자는 Mregs를 투여 받는 것 이외에도 prednisolone, mycophenolate mofetil 및 tacrolimus를 기반으로 하는 면역억제제들을 같이 복용하고 있다.

6. 중간엽줄기세포(Mesenchymal stromal cells, MSCs)

1) 중간엽줄기세포(MSCs)의 면역 조절 작용

이식 장기에 대한 거부반응 및 면역관용이 발생하는 기전에 대한 이해가 향상되면서, 효과기 T 세포가 대부분의 이식 장기의 거부반응에 필수불가결하며, 이에 반해 Tregs는 장기간의 이식 생존을 위한 면역관용에 매우 중요한 역할을 함이 알려지게 되었다. 하지만 최근 선천 면역세포 또한 이식 장기에 대한 환자의 면역 반응에 깊게 관여되며, T 세포의 반응을 개시하고 촉진시킬 수 있음이 대두되고 있다(51). 그러므로 성공적으로 관용을 유도하려면 선천 면역과 적응 면역을 포함한 다양한 기전을 대상으로 해야 하며, 이러한 측면에서 면역 시스템의 광범위한 기전을 강력하게 조절할 수 있는 중간엽줄기세포(mesenchymal stromal cells, MSCs)가 각광을 받고 있다(52). MSCs는 지방세포, 골세포, 연골세포 등으로 분화할 수 있는 잠재력을 가진 다분화능 전구세포이다.

전구세포로서의 특징 이외에도 MSCs는 효과기 T 세포의 증식과 활성화 및 기능을 억제하는 기능을 한다는 것이 초기 연구에서 증명되었다(53,54). MSCs가 후천 면역에서 갖는 이러한 억제 작용은 major histocompatibility complex (MHC)에 의해 제한적이지 않으며, naïve T 세포와 효과기/기억 $CD4^+$ 혹은 $CD8^+$ T 세포 모두를 대상으로 억제 작용이 나타나는 것으로 알려져 있다. 또한 MSCs는 Tregs의 발현을 유도하고, $CD4^+$ T 세포를 조절 기능을 가진 표현형으로 유도하는 기능을 하며, $CD34^+$ 전구세포가 수지상 세포로 분화하여 Th1 반응을 유도하지 못하게 차단하는 역할을 한다. TGF β , PGE2, NO, IL-10, IDO, HLA-G-5 등의 물질이 MSCs가 T 세포 기능을 억제하게 하는 매개체로 제시되고 있으며, MSCs는 IL-6, M-CSF, PGE2, IL-10을 사용하여 항원제시세포의 성숙화를 억제하게 된다(55). 선천 면역에서, MSCs는 성장 조절 종양유전자 케모카인(growth-regulated-oncogene chemokines)의 분비를 통해 단구-유래 수지상 세포(monocyte-derived dendritic cells)가 MDSC와 유사한 표현형을 갖게끔 유도하는 역할을 한다(56). MSCs로 자극된 단구는 고농도의 IL-10을 분비하게 되고, 이는 케모카인(chemokines) CCL18의 분비를 통하여 Tregs 생산을 촉진하게 되며, 또한 $CD8^+$ T 세포를 세포독성이 없는 표현형으로 바꾸게 한다(57). MSCs와 대식세포 사이의 상호 작용에 관여하는 용해성 물질(soluble mediator)로 제시되는 것으로 tumor necrosis factor-stimulated gene 6 protein (TSG-6)이 있으며, 이는 항원제시세포가 관용 유도적으로 변화되도록 촉진하는 역할을 한다.

한편, MSCs에 대한 주요 관심이 면역억제/항염증 특성

에 초점이 맞춰져 있음에도 불구하고, 어떠한 특정 조건에서는 MSCs가 이식 면역관용 유도에 장애가 되는 염증 반응을 촉진하는 특성을 갖는다는 증거가 제시되고 있다. MSCs에 표현되어 TLR4와 결합하는 리간드(ligands)는 *in vitro*에서 세포 염증반응을 촉진하는 특징을 가지며, 이는 난소암 마우스 모델에서 MSCs가 종양 성장과 전이를 억제하는 능력을 갖게 하였다. 반면에, TLR3 ligands는 MSCs에 항염증 반응을 유도하여 종양 성장과 전이를 유발하게 하는 작용을 하였다(58). 또한 마우스 신장이식 모델에서, 염증성 환경이 MSCs를 염증성 표현형으로 바꾸어 오히려 이식 신장 기능에 부정적인 영향을 미칠 수 있음이 보고되었다(59). 마우스 모델에서 이식 수술 이후에 MSCs를 투여하였을 때, 신장 조직에서의 수술 후의 염증성 환경에 대한 반응으로 주로 이식 장기 안에 MSCs가 자리잡았으며, 이는 IL-6와 TNF- α 를 유도하여 과립구(granulocyte)의 침윤과 C3 침착을 촉진하게 함으로써 결국은 급성 이식 장기 기능부전으로 이르게 하였다. 따라서, MSCs 치료에서는 치료 당시의 면역학적 환경을 고려하여 치료 방법을 결정하는 것이 필요하다.

한편, 기존의 비특이적 면역억제제가 MSCs와 서로 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 즉, MSCs는 calcineurin 억제제나 mTOR 억제제의 면역조절 작용을 방해하고, 반대로 calcineurin 억제제, mTOR 억제제, mycophenolate mofetil과 ATG는 MSCs의 작용을 방해할 수 있음이 발표되었다(60).

2) 중간엽줄기세포(MSCs) 치료를 위한 기준

MSCs를 임상적으로 사용하기 위해서는 이 세포군을 정확히 정의할 수 있어야 하는데, 이를 위해 국제 세포치료학회(the International Society for Cellular Therapy, ISCT)에서 MSCs를 면역학적으로 정의하는 기준을 다음과 같이 제안하였다. 첫 번째, 조직 배양 플라스크(flask)를 사용하여 표준 배양 조건을 유지하는 경우 MSCs는 반드시 플라스틱 부착성(plastic-adherent)이어야 한다. 두 번째, 유세포분석법(flow cytometry)에 의하여 측정하였을 때 95% 이상의 MSCs 집단은 반드시 CD105, CD73 및 CD90을 표현해야 한다. 이와 반대로, MSCs는 2% 이하의 양성 확률로 CD45, CD34, CD14 혹은 CD11b, CD79a 혹은 CD19, 그리고 HLA class II는 표현하지 않아야 한다. 세 번째로, 표준 *in vitro* 분화 조건에서 MSCs는 조골세포(osteoblasts), 지방세포(adipocytes) 및 연골모세포(chondroblasts)로 분화할 수 있어야 하므로, 이와 같은 *in vitro* 세포 배양은 특정 염색에 의해 입증 가능해야 한다(61).

또한, ISCT에서 제안한 MSCs의 면역학적 특성 평가 기준을 정리해 보면 다음과 같다. 첫째, 100 IU/mL (10 ng/mL)의 IFN- γ 와 15 ng/mL의 TNF- α 를 첨가하여 40시간 동안 배양하면 활성화된 MSCs를 얻을 수 있다. 둘째, MSCs를 인간에게 투여되는 시기뿐만 아니라 보관(banking) 직전에도 증식된 세포 생성물을 면역표현형적(immunophenotypic)으로 분석하는 것이 바람직하다. 셋째, 정제된 반응세포(purified responders)를 사용하여 MSCs의 억제 효능을 평가하는 것이 필요하다. 간접 음성 선택(indirect negative selection)을 통해 95% 이상의 고도로 정제된 세포를 얻을 수 있으며, 측정 가능한 효과를 얻기 위한 일반적으로 적합한 비율은 MSCs와 T 세포의 비율이 1:5~10이다. 하지만 MSCs가 B 세포 혹은 자연살해세포(NK cells)와 함께 배양된다면 1:1 혹은 1:5의 비율이 더 선호될 것이다. 넷째, *in vitro* 허가 분석(licensing assay)의 일환으로 시행되는 IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) 반응 평가는 반드시 고려되어야 한다. 면역억제의 분자 경로 측면에서, 인간과 마우스 MSCs는 mTOR 통로를 주로 이용한다는 점에서 상대적으로 비슷하지만, 인간 MSCs는 주로 IDO를 사용하기를 선호하고, 마우스 MSCs는 면역억제에 있어 선택적으로 iNOS (inducible nitric oxide synthase)를 사용한다는 차이점이 있다. 다섯째, 이종이식 동물 모델에 기반하여 도출된 결론은 임상 시험을 수행하는데 있어 매우 주의하여 적용되어야 한다. 여섯째, 환자한테 MSCs를 투여한 이후, 림프구 변화와 MSC에 대한 면역을 전향적으로 감시하는 것이 필요하다(62).

3) 중간엽줄기세포(MSCs) 임상시험 현황

MSCs는 전구세포로서 활발한 증식능이 있기 때문에 세포치료에 용이하다. 한편, MHC에 의존적이지 아니기 때문에 항원 비특이적으로 작용할 수 있다는 점에서 다른 세포 치료보다 약점이 되지만, 제3자로부터 만든 MSC를 냉동하여 상품화하는 방법으로 보다 손쉽게 임상적으로 적용할 수 있다는 점에서 오히려 장점이 되기도 한다. MSCs가 이식 면역관용을 유도한다는 고형 장기이식의 실험적 모델의 결과를 기반으로 하여, MSCs를 이용한 세포 면역치료를 신장이식 환자에서 적용하는 임상 시험이 현재 진행되고 있으며, 첫 번째 1상 임상시험 연구 결과들이 발표된 바 있다(Table 2).

Vanikar 등은 생체 기증자 신장이식을 받는 100명의 환자에서 기증자에 대한 저반응성을 유도할 목적으로 기증자 특이 지방조직유래 MSCs (adipose tissue-MSCs, AT-MSC)를 사용한 비무작위 임상시험을 첫 번째로 발표하였

Table 2. Clinical application of mesenchymal stromal cells for living donor kidney transplantation

Author	Patient number (MSCs vs. control)	FU (month)	Type of MSCs	Time & route of MSC infusion	Immunosuppression	Efficacy	Safety
Vanikar AV (65), Gujarat, India	606 vs. 310 (not randomized)	48	Donor, AT	D3, IV	DST/HST/TBI/RT X/ATG/CyP/IV IG/CS/CNI/ MMF (AZA)	IS minimization (CNI withdrawal after 6 months), reduced AR	None
Peng Y (66), Gu- angzhou, China	6 vs. 6 (randomized)	12	Donor, BM, $2 \sim 5 \times 10^6$	D0 (IA), D30 (IV)	CyP/CS/CNI/MMF	Reduced maintenance CNI dose	None
Kim SJ (67), Seoul, Korea	7	12	Donor, BM, $1 \times 10^6/\text{kg}$	D0, IO	ATG/CS/CNI/MMF	Increased Tregs and IL- 10, <i>in vitro</i> donor-spe- cific hyporesponsiveness	3/6 AR
Perico N (68), Italy	2	12	Auto, BM, $2.0 \times 10^6/\text{kg}$	D7, IV (D-1, IV)	ATG/anti-CD25, CS/CsA/MMF	Treg inhibition of me- mory T cells, <i>in vitro</i> donor- hyporesponsiveness	Cr ↑ In 1~2 week
Tan J (69), Fuzhou, China	102 vs. 51 (randomized)	12	Auto, BM, $1.2 \times 10^6/\text{kg}$	D0 & D14, IV	CS/CNI/MMF MSC1: standard CNI MSC2: low CNI Anti-CD25: standard	Reduced maintenance CNI dose, early graft fun- ction (1 month eGFR), reduced AR (6 mon- ths), reduced infection	None
Reinders ME (70), Netherlands	6 (Treatment for AR/IFTA)	5	Auto, BM, $1 \sim 2 \times 10^6/\text{kg}$	6 months, IV	ATG/CS/CNI/MMF, MSC: 2 doses with 1 week apart	Reduced tubulitis, and IF/ TA, <i>in vitro</i> donor- hyporesponsiveness	BKV, CMV

Abbreviations: aCD20, anti-CD20 antibody (Rituximab); aCD25, anti-CD25 antibody (Basiliximab); AE, adverse event; AT, adipose tissue; AZA, azathioprine; BM, bone marrow; CNI, calcineurin inhibitor(s); CyP, cyclophosphamide; DST, donor specific leukocyte transfusion; FU, follow-up; HSC, hematopoietic stem cells; IA, intraarterial; IF/TA, interstitial fibrosis/tubular atrophy; IO, intraosseous; IL, interleukin; IP, intraportal; IS, immunosuppression; IV, intravenous; LDKT, living donor kidney transplant; MMF, mycophenolate mofetil; MSC, mesenchymal stromal (stem) cell; RATG, rabbit anti-thymoglobulin.

다(63). 환자에게는 기증자 특이 백혈구 수혈(donor-specific leukocyte transfusion), anti-CD20 항체(Rituximab), ATG, 기증자 골수 조혈모세포, 전신 방사선조사, methyl-prednisone, calcineurin 억제제, prednisone, azathioprine 등의 면역억제제를 사용하고, AT-MSC를 투여하였다. 반면 100명의 대조군에서는 같은 면역억제제를 사용하되 AT-MSC는 투여 받지 않았다. 결과적으로 18개월의 추적 관찰 기간 중에 AT-MSC를 투여 받은 군에서 향상된 이식 생존율을 보여 주었고, 대조군보다 더 적은 용량의 면역억제제를 사용함에도 지속적인 조혈 키메라즘(chimerism) 수준을 유지할 수 있음을 보여 주었다. 계속해서 생체 기증자 신장이식 환자를 대상으로 4년의 관찰기간을 갖는 비무작위 임상시험에서 비슷한 연구 결과를 보여 주었으며, 이 시험에서는 기존의 3제 면역억제제를 투여 받는 310명의 대조군과 기증자 특이 AT-MSC를 투여 받는 606명의 환자를 비교한 바 있다(64).

Peng 등은 생체 기증자 신장이식을 받는 환자에서 기증

자 골수유래 MSCs의 안정성과 효능을 평가하는 무작위 임상시험을 수행하였다. 모든 환자들은 cyclophosphamide와 steroid 유도 요법 및 mycophenolate와 prednisone의 유지 면역억제제를 복용하였으며, tacrolimus는 대조군에서는 기준 용량($0.07 \sim 0.08 \text{ mg/kg/day}$; $n=6$)을 투여 받은 반면에, 실험군에서는 저용량($0.04 \sim 0.05 \text{ mg/kg/day}$; $n=6$)을 투여 받았다. 실험군에서 5×10^6 의 기증자 골수유래 MSCs가 재관류 시에 이식 신동맥에 주입되었고, 1달 후에 $\text{kg당 } 2 \times 10^6$ 의 MSCs가 경정맥으로 투여되었다. 결과적으로 이식 후 1년의 관찰 기간 동안 실험군에서 안정적인 이식 신장기능을 유지하였고, CD27⁺ 말초 기억 B 세포(peripheral memory B cells)가 증가하는 것을 보여 주었다(65).

Lee 등은 7명의 HLA 불일치 생체 기증자 신장이식 환자를 대상으로 기증자 골수유래 MSCs를 평가하였다. 이 환자들은 ATG 및 calcineurin 억제제, mycophenolate와 steroid를 기반으로 하는 기존의 면역억제제를 투여 받았으며, $\text{kg당 } 1 \times 10^6$ 개의 기증자 골수유래 MSCs를 신장이식

수술 당일에 골수 안(환자의 오른쪽 장골 내)으로 주입 받았다. 결과적으로, 키메리즘(chimerism)이 발견되지 않았음에도 불구하고, 기증자 특이 림프구 및 유사분열촉진제에 의한 T 세포 증식이 감소되는 것이 2명의 환자에게서 관찰되었으며, 또한 기증자 특이 림프구 혹은 T 세포 증식과 Treg-priming 반응이 몇몇 환자에게서 발견되었다. 하지만 3명의 환자는 생검에서 증명된 급성 세포성 거부반응을 경험하였으나, 스테로이드 충격요법(steroid pulse therapy)로 잘 조절되었다(66).

Perico 등은 사전 연구에서 2명의 생체 기증자 신장이식 환자를 대상으로 하였으며, 환자들은 자가 골수유래 MSCs를 이식 후 7일째 경정맥으로 투여 받았다. 환자들은 basiliximab과 저용량의 ATG를 유도요법으로 투여 받았고, cyclosporin과 mycophenolate mofetil로 유지 면역억제 치료를 하였다. 그 결과 점차 Tregs의 비율이 높아지는 것이 관찰되었고, 또한 기억 CD8⁺ T 세포 증식이 억제될 뿐만 아니라 기증 장기에 대한 CD8⁺ T 세포의 활성화도 줄어들었다. 하지만 세포가 주입된 며칠 후 두 환자에서 모두 혈청 creatinine이 경도로 상승되었으며, 이에 이식 신장 조직검사를 시행하였다. 조직검사에서는 국소적으로 과립구의 침윤과 보체 C3의 침착이 관찰되었으나 거부 반응의 증거는 없었다(67).

이후에 Tan 등은 159명의 신장이식 환자를 대상으로 비교적 규모가 큰 전향적 무작위배정 임상시험 연구를 수행하였다. 혈연간 생체 제공자 신장이식 환자를 대상으로 하였고, MSCs를 주입하는 세포 면역치료를 basiliximab 유도요법(대조군)을 대신하여 시행하여 이와 비교하였다. MSCs는 골수 흡인을 통해 얻어진 60~80 mL의 혈액을 처리하여 제조하였고, kg당 $1 \sim 2 \times 10^6$ 의 용량으로 이식 신장 재관류 시점 및 이식 후 14일째에 환자에게 주입되었다. 이 때 calcineurin 억제제는 기준 용량 혹은 저용량으로 환자군을 나누어 투여하였고, 대조군에서는 기준 용량으로 투여하였다. 결과적으로 MSCs 치료는 basiliximab 유도요법과 비교하여 이식 후 6개월 시점에 급성 세포성 거부반응이 더 적게 나타났으며, 또한 1년의 추적관찰 기간 동안 MSCs로 치료받은 군에서 대조군과 비교하여 기회 감염의 위험성도 유의하게 더 적었고, 신 기능 또한 더 향상된 결과를 보여주었다(68).

Reinders 등은 자가 골수유래 MSCs를 사용하여 급성 세포성 거부반응과 간질성 섬유화 및 세뇨관 위축(interstitial fibrosis and tubular atrophy, IF/TA)이 나타난 6명의 환자를 치료할 목적으로 투여하였다. 이 환자들은 HLA 완전 불일치 생체 제공자 신장이식 환자였으며, basiliximab,

calcineurin 억제제, mycophenolate mofetil, prednisone으로 면역억제제를 투여 받았고, 항바이러스 예방요법 약제 또한 3개월 동안 투여 받았다. 이식 후 6개월째 프로토콜 조직검사에서 급성 세포성 거부반응 혹은 IF/TA가 증가한 환자에게 경정맥으로 kg당 10^6 개의 골수유래 MSCs를 1주간격으로 2차례 투여하였고, 다른 면역억제제는 바꾸지 않았다. 결과적으로, 거부반응이 있던 2명의 환자는 MSCs 치료 이후에 시행한 조직검사에서 IF/TA 없이 세뇨관염(tubulitis)이 사라졌음을 확인할 수 있었다. 하지만, BK 바이러스 신병증 1예가 MSCs를 주입한 21주 이후에 발생하였고, 거대세포 바이러스(CMV) 감염이 MSCs 주입 2주 후에 발생했다는 부작용의 문제점이 있었지만 두 경우 모두 면역억제제 감량 없이 해결되었다(69).

이외에도, 현재 고형 장기에서 MSCs의 효과를 평가하는 다수의 임상시험이 ClinicalTrials.gov에 등록되어 진행되고 있다. 중국에서는 신장이식 환자를 대상으로 유도요법을 대체하거나 혹은 chronic allograft nephropathy를 치료할 목적으로 MSCs를 투여하는 연구를 진행할 예정이며, 이탈리아, 호주, 벨기에, 미국 등의 나라에서도 신장이식, 폐이식, 간이식 환자들을 대상으로 MSCs가 면역관용에 미치는 영향을 평가하는 임상시험이 수행될 예정이다(70).

결론

비특이적인 면역억제제의 장기치료로 인해 감염과 악성종양 등 여러 부작용이 생기고 면역관용 유도도 불가능하며, 약제를 잘 복용하지 않을 경우 만성거부반응으로 장기 성적이 저하되는 등 여러 문제점들이 대두되고 있다. 이에 대한 대안으로 항원특이적인 면역조절 작용이 있는 여러 세포치료들은 비특이적인 면역억제제 감량이나 면역관용 유도에 기여함으로써 면역억제 부작용을 줄일 수 있고, 나아가 장기이식의 장기 성적 향상에도 기여할 수 있을 것으로 기대된다. 현재 동종항원 특이적인 억제능을 보이는 Foxp3⁺ Tregs 세포 치료와, 세포 생산이 쉬우면서도 MHC와 관계 없이 사용할 수 있어 대량생산과 산업화에 장점이 있는 MSCs 치료가 가장 활발히 임상시험 중이며, 그 외에도 IL-10⁺ Tr1 세포, DCregs, Mregs 치료 등이 시도되고 있는데, 향후 세포치료의 종류와 그 영역이 점점 확대될 전망이다.

REFERENCES

- 1) The U.S. National Institutes of Health. ClinicalTrials.gov [Internet]. Bethesda, MD: U.S. National Library of Medicine; 1993 [cited 2014 May 13]. Available from: www.clinicaltrials.gov/.
- 2) Geissler EK. The ONE Study compares cell therapy products in organ transplantation: introduction to a review series on suppressive monocyte-derived cells. *Transplant Res* 2012;1:11.
- 3) Trzonkowski P, Bieniaszewska M, Juścińska J, Dobyszek A, Krzystyniak A, Marek N, et al. First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clin Immunol* 2009;133:22-6.
- 4) Brunstein CG, Miller JS, Cao Q, McKenna DH, Hippen KL, Curtsinger J, et al. Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood* 2011;117:1061-70.
- 5) Di Ianni M1, Falzetti F, Carotti A, Terenzi A, Castellino F, Bonifacio E, et al. Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* 2011;117:3921-8.
- 6) Marek-Trzonkowska N, Mysliwiec M, Dobyszek A, Grabowska M, Techmanska I, Juscinska J, et al. Administration of CD4+CD25highCD127- regulatory T cells preserves beta-cell function in type 1 diabetes in children. *Diabetes Care* 2012;35:1817-20.
- 7) Meagher C, Tang Q, Fife BT, Bour-Jordan H, Wu J, Pardoux C, et al. Spontaneous development of a pancreatic exocrine disease in CD28-deficient NOD mice. *J Immunol* 2008;180:7793-803.
- 8) Joffre O1, Santolaria T, Calise D, Al Saati T, Hudrisier D, Romagnoli P, et al. Prevention of acute and chronic allograft rejection with CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T lymphocytes. *Nat Med* 2008;14:88-92.
- 9) Waldmann H. Tolerance can be infectious. *Nat Immunol* 2008;9:1001-3.
- 10) Tang Q, Bluestone JA. Regulatory T-cell therapy in transplantation: moving to the clinic. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a015552.
- 11) Muthukumar T, Dadhania D, Ding R, Snopkowski C, Naqvi R, Lee JB, et al. Messenger RNA for FOXP3 in the urine of renal-allograft recipients. *N Engl J Med* 2005;353:2342-51.
- 12) Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nat Immunol* 2007;8:1353-62.
- 13) Tang Q, Bluestone JA. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. *Nat Immunol* 2008;9:239-44.
- 14) Yamaguchi T, Wing JB, Sakaguchi S. Two modes of immune suppression by Foxp3(+) regulatory T cells under inflammatory or non-inflammatory conditions. *Semin Immunol* 2011;23:424-30.
- 15) Golshayan D, Jiang S, Tsang J, Garin MI, Mottet C, Lechler RI. In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood* 2007;109:827-35.
- 16) Nishimura E, Sakihama T, Setoguchi R, Tanaka K, Sakaguchi S. Induction of antigen-specific immunologic tolerance by in vivo and in vitro antigen-specific expansion of naturally arising Foxp3+CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004;16:1189-201.
- 17) Fan Z, Spencer JA, Lu Y, Pitsillides CM, Singh G, Kim P, et al. In vivo tracking of 'color-coded' effector, natural and induced regulatory T cells in the allograft response. *Nat Med* 2010;16:718-22.
- 18) Tang Q, Lee K. Regulatory T-cell therapy for transplantation: how many cells do we need? *Curr Opin Organ Transplant* 2012;17:349-54.
- 19) Francis RS, Feng G, Tha-In T, Lyons IS, Wood KJ, Bushell A. Induction of transplantation tolerance converts potential effector T cells into graft-protective regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2011;41:726-38.
- 20) Verginis P, McLaughlin KA, Wucherpfennig KW, von Boehmer H, Apostolou I. Induction of antigen-specific regulatory T cells in wild-type mice: visualization and targets of suppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:3479-84.
- 21) Tsang JY, Tanriver Y, Jiang S, Leung E, Ratnasothy K, Lombardi G, et al. Indefinite mouse heart allograft survival in recipient treated with CD4(+)CD25(+) regulatory T cells with indirect allospecificity and short term immunosuppression. *Transpl Immunol* 2009;21:203-9.
- 22) Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Albrecht J, Doser K, Pisheska B, et al. Isolation of CD4+CD25+ regulatory T cells for clinical trials. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006;12:267-74.
- 23) Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 2006;203:1701-11.
- 24) Hoffmann P, Eder R, Kunz-Schughart LA, Andreesen R, Edinger M. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4(+)CD25high regulatory T cells. *Blood* 2004;104:895-903.
- 25) Putnam AL, Safinia N, Medvec A, Laszkowska M, Wray M,

- Mintz MA, et al. Clinical grade manufacturing of human alloantigen-reactive regulatory T cells for use in transplantation. *Am J Transplant* 2013;13:3010-20.
- 26) Battaglia M, Stabilini A, Draghici E, Gregori S, Mocchetti C, Bonifacio E, et al. Rapamycin and interleukin-10 treatment induces T regulatory type 1 cells that mediate antigen-specific transplantation tolerance. *Diabetes* 2006;55:40-9.
- 27) Serafini G, Andreani M, Testi M, Battarra M, Bontadini A, Biral E, et al. Type 1 regulatory T cells are associated with persistent split erythroid/lymphoid chimerism after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for thalassemia. *Haematologica* 2009;94:1415-26.
- 28) Gagliani N, Jofra T, Stabilini A, Valle A, Atkinson M, Roncarolo MG, et al. Antigen-specific dependence of Tr1-cell therapy in preclinical models of islet transplant. *Diabetes* 2010;59:433-9.
- 29) Gagliani N, Magnani CF, Huber S, Gianolini ME, Pala M, Licona-Limon P, et al. Coexpression of CD49b and LAG-3 identifies human and mouse T regulatory type 1 cells. *Nat Med* 2013;19:739-46.
- 30) Magnani CF, Alberigo G, Bacchetta R, Serafini G, Andreani M, Roncarolo MG, et al. Killing of myeloid APCs via HLA class I, CD2 and CD226 defines a novel mechanism of suppression by human Tr1 cells. *Eur J Immunol* 2011;41:1652-62.
- 31) Groux H, Bigler M, de Vries JE, Roncarolo MG. Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *J Exp Med* 1996;184:19-29.
- 32) Schwartz RH. T cell anergy. *Annu Rev Immunol* 2003;21:305-34.
- 33) Zeller JC, Panoskaltsis-Mortari A, Murphy WJ, Ruscetti FW, Narula S, Roncarolo MG, et al. Induction of CD4+ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF-beta. *J Immunol* 1999;163:3684-91.
- 34) Bacchetta R, Lucarelli B, Sartirana C, Gregori S, Lupo Stanghellini MT, Miqueu P, et al. Immunological outcome in haploidentical-HSC transplanted patients treated with IL-10-anergized donor T cells. *Front Immunol* 2014;5:16.
- 35) Ezzelarab M, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and their role in transplantation. *Semin Immunol* 2011;23:252-63.
- 36) Bériou G, Moreau A, Cuturi MC. Tolerogenic dendritic cells: applications for solid organ transplantation. *Curr Opin Organ Transplant* 2012;17:42-7.
- 37) Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* 2007;7:610-21.
- 38) Divito SJ, Wang Z, Shufesky WJ, Liu Q, Tkacheva OA, Montecalvo A, et al. Endogenous dendritic cells mediate the effects of intravenously injected therapeutic immunosuppressive dendritic cells in transplantation. *Blood* 2010;116:2694-705.
- 39) Taner T, Hackstein H, Wang Z, Morelli AE, Thomson AW. Rapamycin-treated, alloantigen-pulsed host dendritic cells induce ag-specific T cell regulation and prolong graft survival. *Am J Transplant* 2005;5:228-36.
- 40) Bériou G, Pêche H, Guillonnet C, Merieau E, Cuturi MC. Donor-specific allograft tolerance by administration of recipient-derived immature dendritic cells and suboptimal immunosuppression. *Transplantation* 2005;79:969-72.
- 41) Hill M, Thebault P, Segovia M, Louvet C, Bériou G, Tilly G, et al. Cell therapy with autologous tolerogenic dendritic cells induces allograft tolerance through interferon-gamma and epstein-barr virus-induced gene 3. *Am J Transplant* 2011;11:2036-45.
- 42) Moreau A, Hill M, Thébault P, Deschamps JY, Chiffolleau E, Chauveau C, et al. Tolerogenic dendritic cells actively inhibit T cells through heme oxygenase-1 in rodents and in nonhuman primates. *FASEB J* 2009;23:3070-7.
- 43) Naranjo-Gómez M, Raïch-Regué D, Oñate C, Grau-López L, Ramo-Tello C, Pujol-Borrell R, et al. Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells. *J Transl Med* 2011;9:89.
- 44) Chitta S, Santambrogio L, Stern LJ. GM-CSF in the absence of other cytokines sustains human dendritic cell precursors with T cell regulatory activity and capacity to differentiate into functional dendritic cells. *Immunol Lett* 2008;116:41-54.
- 45) Gregori S, Tomasoni D, Pacciani V, Scirpoli M, Battaglia M, Magnani CF, et al. Differentiation of type 1 T regulatory cells (Tr1) by tolerogenic DC-10 requires the IL-10-dependent ILT4/HLA-G pathway. *Blood* 2010;116:935-44.
- 46) Harry RA, Anderson AE, Isaacs JD, Hilkins CM. Generation and characterisation of therapeutic tolerogenic dendritic cells for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2010;69:2042-50.
- 47) Giannoukakis N, Phillips B, Finegold D, Harnaha J, Trucco M. Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care* 2011;34:2026-32.
- 48) Hilkins CM, Isaacs JD, Thomson AW. Development of dendritic cell-based immunotherapy for autoimmunity. *Int Rev Immunol* 2010;29:156-83.
- 49) Hutchinson JA, Riquelme P, Geissler EK. Human regulatory macrophages as a cell-based medicinal product. *Curr Opin Organ Transplant* 2012;17:48-54.
- 50) Hutchinson JA, Riquelme P, Sawitzki B, Tomiuk S, Miqueu

- P, Zuhayra M, et al. Cutting Edge: Immunological consequences and trafficking of human regulatory macrophages administered to renal transplant recipients. *J Immunol* 2011;187:2072-8.
- 51) Murphy SP, Porrett PM, Turka IA. Innate immunity in transplant tolerance and rejection. *Immunol Rev* 2011;241:39-48.
- 52) Casiraghi F, Remuzzi G, Perico N. Mesenchymal stromal cells to promote kidney transplantation tolerance. *Curr Opin Organ Transplant* 2014;19:47-53.
- 53) Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002;30:42-8.
- 54) Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, et al. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 2002;99:3838-43.
- 55) English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunol Cell Biol* 2013;91:19-26.
- 56) Chen HW, Chen HY, Wang LT, Wang FH, Fang LW, Lai HY, et al. Mesenchymal stem cells tune the development of monocyte-derived dendritic cells toward a myeloid-derived suppressive phenotype through growth-regulated oncogene chemokines. *J Immunol* 2013;190:5065-77.
- 57) Melief SM, Schrama E, Brugman MH, Tiemessen MM, Hoogduijn MJ, Fibbe WE, et al. Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells* 2013;31:1980-91.
- 58) Waterman RS, Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 2010;5:e10088.
- 59) Casiraghi F, Azzollini N, Todeschini M, Cavinato RA, Cassis P, Solini S, et al. Localization of mesenchymal stromal cells dictates their immune or proinflammatory effects in kidney transplantation. *Am J Transplant* 2012;12:2373-83.
- 60) Hoogduijn MJ, Crop MJ, Korevaar SS, Peeters AM, Eijken M, Maat LP, et al. Susceptibility of human mesenchymal stem cells to tacrolimus, mycophenolic acid, and rapamycin. *Transplantation* 2008;86:1283-91.
- 61) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006;8:315-7.
- 62) Krampera M, Galipeau J, Shi Y, Tarte K, Sensebe L; MSC Committee of the International Society for Cellular Therapy (ISCT). Immunological characterization of multipotent mesenchymal stromal cells--The International Society for Cellular Therapy (ISCT) working proposal. *Cytotherapy* 2013;15:1054-61.
- 63) Vanikar AV, Trivedi HL, Feroze A, Kanodia KV, Dave SD, Shah PR. Effect of co-transplantation of mesenchymal stem cells and hematopoietic stem cells as compared to hematopoietic stem cell transplantation alone in renal transplantation to achieve donor hypo-responsiveness. *Int Urol Nephrol* 2011;43:225-32.
- 64) Vanikar AV, Trivedi HL. Stem cell transplantation in living donor renal transplantation for minimization of immunosuppression. *Transplantation* 2012;94:845-50.
- 65) Peng Y, Ke M, Xu L, Liu L, Chen X, Xia W, et al. Donor-derived mesenchymal stem cells combined with low-dose tacrolimus prevent acute rejection after renal transplantation: a clinical pilot study. *Transplantation* 2013;95:161-8.
- 66) Lee H, Park JB, Lee S, Baek S, Kim H, Kim SJ. Intra-osseous injection of donor mesenchymal stem cell (MSC) into the bone marrow in living donor kidney transplantation; a pilot study. *J Transl Med* 2013;11:96.
- 67) Perico N, Casiraghi F, Inrona M, Gotti E, Todeschini M, Cavinato RA, et al. Autologous mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: a pilot study of safety and clinical feasibility. *Clin J Am Soc Nephrol* 2011;6:412-22.
- 68) Tan J, Wu W, Xu X, Liao L, Zheng F, Messinger S, et al. Induction therapy with autologous mesenchymal stem cells in living-related kidney transplants: a randomized controlled trial. *JAMA* 2012;307:1169-77.
- 69) Reinders ME, de Fijter JW, Roelofs H, Bajema IM, de Vries DK, Schaapherder AF, et al. Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of allograft rejection after renal transplantation: results of a phase I study. *Stem Cells Transl Med* 2013;2:107-11.
- 70) Pileggi A, Xu X, Tan J, Ricordi C. Mesenchymal stromal (stem) cells to improve solid organ transplant outcome: lessons from the initial clinical trials. *Curr Opin Organ Transplant* 2013;18:672-81.