Tuberculosis and Respiratory Diseases 결핵 및 호흡기질환, Vol. 47, No. 3, Sep, 1999

□원 저□

난치성 결핵 환자의 단핵구에서 IFN-γ 활성화 효과 및 IFN-γ 수용체의 숫적 변화에 대한 연구

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 의학연구원 폐연구소, 원자력병원 내과*

이재철*, 유철규, 이춘택, 김영환, 한성구, 심영수

= Abstract =

The Priming Effect of IFN-γ and Numbers of IFN-γ Receptors in Patients with Chronic Refractory Tuberculosis

Jae Cheol Lee, M.D.*, Chul-Gyu Yoo, M.D., Choon-Taek Lee, M.D., Young Whan Kim, M.D., Sung Koo Han, M.D., Young-Soo Shim, M.D.

Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine and Lung Institute, SNUMRC, Korea Cancer Center Hospital, Seoul, Korea*

Background : IFN-γ plays an important role in host response to intracellular organisms such as mycobacterium. Human infection with mycobacterium leads to a wide variety of outcomes, ranging from asymptomatic infection to widespread and rapidly fatal disease. Recent reports suggest that alteration of the function of IFN-γ caused by a defective IFN-γ receptor gene can explain different host response to mycobacterium. In this study, we investigated the role of IFN-γ in the development of chronic refractory tuberculosis.

Methods : The LPS-induced TNF-α production with or without IFN-γ priming was compared by using monocytes taken from recently diagnosed tuberculosis, chronic refractory tuberculosis patients and controls. And the IFN-γ receptor was measured by indirect fluorescent antibody technique to know whether change in the priming effect of IFN-γ is related to IFN-γ receptor deficiency or not.

Results : The ratio of TNF-α produced in response to stimulation with INF-γ and LPS to LPS alone was 13.5 ±7.6 in controls, 10.8±6.4 in recently diagnosed tuberculosis patients and 6.7±3.9 in chronic refractory tuberculosis patients. The priming effect of IFN-γ significantly decreased in chronic refractory tuberculosis patients

Address for correspondence :
Young Whan Kim, M.D.
Department of Internal Medicine, Seoul National University Hospital,
28 Yonggon-Dong, Chongno-Gu, Seoul 110-744, Korea
Phone : 02-760-2856 Fax : 02-762-9662 E-mail : ywkim@snu.ac.kr

compared with that in controls($p=0.002$). However, IFN-γ receptor deficiency was detected in one of chronic refractory tuberculosis patients.

Conclusion : The decrease of the priming effect of IFN-γ may play an important role in the development of chronic refractory tuberculosis, and in some patients, this may be related to the IFN-γ receptor deficiency. (Tuberculosis and Respiratory Diseases 1999, 47 : 304-310)

Key words : Chronic refractory tuberculosis, IFN-γ, IFN-γ receptor.

서 론

우리 나라의 결핵은 1960년대부터 시행된 국가 결핵 관리 사업과 경제 성장, 효과적인 약제의 등장에 힘입어 많이 감소하였으나 1995년 실태조사에 따르면 아직 추정 결핵 환자수가 42만 명으로 전체 인구의 1.0 %에 달하고[1] 단일 호흡기 질환으로는 가장 많은 사망 원인이다. 또 전염성이 높은 도말 양성 환자가 젊은 연령인 20대를 포함, 매년 15,000명 가량 발생하고 있어 아직도 우리 나라의 결핵 문제가 안심할 상태가 아니라는 사실을 입증하고 있다[2]. 현재 결핵은 다제 병합 요법, 특히 INH, RFP을 축으로 한 치료가 이루어지면서 효과적으로 치료가 되고 있지만 대부분의 치료가 외래 중심으로 전환된 이후 긴 치료기간 동안 불규칙한 약물 복용과 부적절한 처방 등으로 약제 내성균이 증가하고 이들 내성균에 의한 일차 감염이 늘어나고 있다. 한편으로는 약제 내성균에 의한 일차 감염이 아니면서 적절한 처방과 충분한 기간 동안 잘 투약했음에도 불구하고 치료가 되지 않는 난치성 결핵 환자가 있어 이들의 치료가 임상적인 문제가 되고 있다. 사람에서 결핵의 발병과 치료에 있어 유전적인 요소가 관여하리라는 생각은 쌍둥이를 대상으로 한 연구[3]나 전염병으로서의 결핵이 만연되었을 때 인종간의 감수성에 차이가 있었다는 보고[4] 등에서 시사된 바 있다. 실험쥐에서 M. bovis에 대한 저항력은 Bcg라는 우성 상염색체 유전자에 의해 결정된다는 사실[5] 또한 이를 뒷받침한다고 할 수 있다. 최근 비결핵 항산균에 반복적으로 감염되는 4명의 어린이에 대한 보고에서 모두 유전적으로 연관되어 있었고 알려진 면역 결함은 없었다. 이들 중 3명이 결국 사망하였고 이들에 대한 유전자 연구에 따르면 IFN-γ 수용체 1에 대한 유전자에 점 돌연변이가 생겨 수용체가 형성되지 못한 것이 중요한 병인으로 작용했을 것으로 판단되었다[6,7]. IFN-γ가 세포 내에서 번식하는 병원균에 대한 숙주의 반응에 있어 중요한 역할을 하고 있다는 사실[8]은 이미 밝혀져 있어 이러한 IFN-γ에 대한 숙주의 반응에 변화를 가져오는 유전적 변이가 결핵의 발병이나 치유에 영향을 끼치고 난치성 결핵으로의 이행에 있어 중요한 역할을 할 가능성이 있다고 하겠다. 이에 저자들은 적절한 항결핵요법에도 불구하고 잘 치유되지 않는 난치성 결핵 환자의 단핵구에서 IFN-γ에 대한 반응이 정상 대조군과 차이가 있는지, 그러한 차이가 IFN-γ 수용체의 숫적 변화와 관련 있는지를 알아보고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

서울대학병원에서 폐결핵으로 진단 받은 36명의 환자와 21명의 정상 대조군을 대상으로 하였는데 환자군은 최근 1개월 이내 결핵으로 진단받아 치료를 시작한 군($n=21$), 적절한 치료에도 불구하고 계속 결핵이 조절되지 않거나 최근 5년 내에 3번 이상 재발되어 현재 치료를 받고 있는 난치성 결핵군($n=15$)으로 나누었다. IFN-γ 수용체에 대한 연구는 최근 결핵으로 진단받은 군에서 12명, 난치성 결핵군 9명, 정상 대조군 13명에서 각각 시행되었다.

2. 방 법

1) IFN-γ 활성화 효과

대상 환자와 대조군에서 헤파린으로 처리된 주사기로 정맥혈을 15ml 채취한 후 1:1의 비율로 생리식염수와 섞어서 Ficoll-Hypaque(Sigma Diagnostics, St. Louis, U.S.A.)에 조심스럽게 중첩시킨 후 1500rpm으로 30분간 원심 분리한 후 Pasteur pipette을 이용하여 단핵세포층을 분리하여 SM과 penicillin이 첨가되어있는 RPMI 1640으로 세척하였다. 이중 일부를 취해 0.2% Trypan blue로 염색하여 hemocytometer로 단핵구의 농도를 계산하고 단핵구 부유액의 세포농도가 3×10^6/ml이 되도록 RPMI 1640으로 희석하였다. 96well 플라스틱 배양접시에 IFN-γ로 전처치한 후 lipopolysaccharide(LPS)로 자극할 경우[IFN-γ+LPS], LPS만으로 자극할 경우[LPS], 아무런 자극을 하지 않을 경우[basal]로 분리하여 200 μℓ 씩 점적하고 36℃, 5% CO2 incubator에서 2시간 배양하여 단핵구를 배양접시에 부착시켰다. 상층액과 비흡착세포들을 제거하고 RPMI 1640으로 3번 세척한 후 현미경으로 부착된 단핵세포를 확인하였다. IFN-γ+LPS의 경우 IFN-γ (Promega, U.S.A.;2 μg/ml)로 전처치한 2시간 후 LPS(Escherichia coli O55:B5, Sigma Diagnostics;1 μg/ml)를 넣고 12시간 동안 자극하였다. LPS 경우에는 LPS(1 μg/ml)를 넣고 12시간 동안 자극하였다. 이상의 자극이 끝나면 아무런 자극을 하지 않은 경우를 포함하여 세가지 경우 모두에서 상층액을 분리하여 -20℃에 보관하였고 충분한 검체가 모였을때 ELISA kit를 이용하여 TNF-α의 농도를 측정하였다. IFN-γ 활성화 효과를 알아보기 위해 LPS만으로 자극한 경우와 IFN-γ 전처치 후 LPS로 자극한 경우에 생성된 TNF-α의 비를 구하여 비교하였고 Student's t-test로 통계적 유의성을 검정하였다.

2) IFN-γ 수용체 연구

말초 혈액 림프구를 분리하여 V-well 플라스틱 접시에 대조 항체군과 IFN-γ 수용체 항체군으로 나누어 2×10^5의 세포를 넣고 1500rpm으로 7분간 원심 분리하였다. 상층액을 버리고 대조 항체군에는 4 μg의 isotype 항체, IFN-γ 수용체 항체군에는 4 μg 의 IFN-γ 수용체 1 항체(Genzyme, Cambridge, Mass.)를 넣고 부유시킨 후 45분간 얼음에 두었다. 이후 fluorescein isothiocyanate를 붙인 goat anti-mouse IgG antibody(Dako, Teddington, U.K.)를 넣고 FACS를 이용하여 Mean fluorescence를 측정하였다.

결 과

1. IFN-γ 활성화 효과

최근 결핵으로 진단받은 군, 난치성 결핵 환자군, 정상 대조군 모두에서 TNF-α 생성은 아무런 자극을 하지 않았던 경우나 LPS만으로 자극한 경우보다 IFN-γ 전처치 후 LPS로 자극한 경우에 유의하게 증가되었다(Table 1). IFN-γ 전처치 후 LPS로 자극한

Table 1. TNF-α production in response to LPS with or without IFN-γ pretreatment.

Subjects	TNF-α (pg/ml/3×10^6 cells;12hr)			Ratio of TNF-α by (LPS+IFN-γ)/LPS
	basal	LPS	LPS+IFN-γ	
Control	50±51	1225±1068	13675±16250	13.5±7.6
Recently diagnosed tuberculosis	152±329	3130±3291	24099±20481	10.8±6.4(p=0.24)
Chronic refractory tuberculosis	202±411	2588±3716	12265±13350	6.7±3.9(p=0.002)

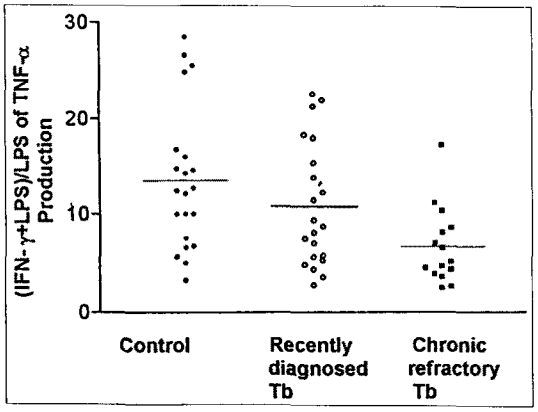

Fig. 1. The ratio of TNF-α produced in response to LPS stimulation with or without INF-γ pretreatment. The ratio of TNF-α in response to stimulation with IFN-γ and LPS to LPS alone was lower in patients with chronic refractory tuberculosis ($p<0.05$).

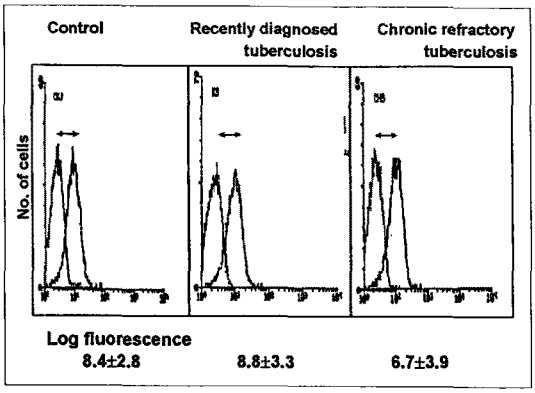

Fig. 2. Levels of expression of IFN-γ receptor. Level of expression of IFN-γ receptor on peripheral blood lymphocytes was normal in all patients except one. The left curves indicate the background fluorescence obtained with isotypic control antibody.

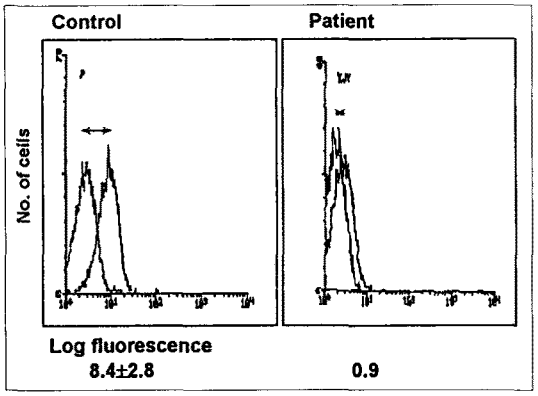

Fig. 3. A case of IFN-γ receptor deficiency: Levels of expression of IFN-γ receptor. There was little expression of IFN-γ receptor on peripheral blood lymphocytes of the patient.

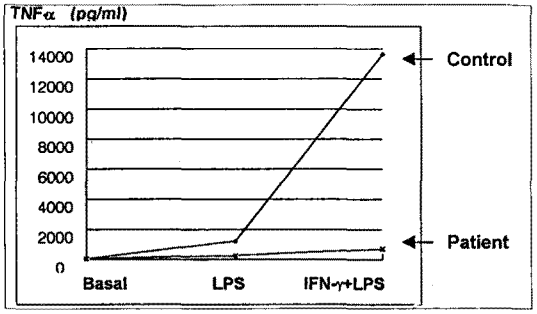

Fig. 4. A case of IFN-γ receptor deficiency: TNF-α production in response to LPS with or without IFN-γ pretreatment. The priming effect of IFN-γ markedly decreased in one patient with chronic refractory tuberculosis who showed decreased expression of IFN-γ receptor.

한 경우에 생성된 TNF-α의 농도의 절대값은 세 군에서 통계적으로 유의한 차이가 없었으나 IFN-γ 전처치가 TNF-α 생성에 기여한 부분에 대한 평가를 위해 LPS만으로 자극한 경우와 IFN-γ 전처치 후 LPS로 자극한 경우에 생성된 TNF-α의 비를 구하여 보았을 때 난치성 결핵 환자군에서 나머지 두 군에 비해 유의하게 떨어져 있음을 알 수 있었다(Fig. 1).

2. IFN-γ 수용체 연구

IFN-γ 수용체에 대한 mean fluorescence는 세 군에서 차이가 없었으나(Fig. 2) 난치성 결핵 환자군에 속했던 한 환자에서 mean fluorescence가 많이 떨어

져 있어 IFN-γ 수용체가 감소되어 있는 것으로 확인되었고(Fig. 3) 이 환자의 경우 IFN-γ 활성화 효과 역시 상당히 저하되어 있음을 알 수 있었다(Fig. 4).

고 찰

결핵은 감염 후 아무런 임상적인 증상을 일으키지 않고 저절로 치유되는 경우에서 급속히 전신에 퍼져 치명적이 되는 경우까지 다양한 형태로 나타날 수 있는데 이는 결국 결핵균에 대한 숙주의 면역 반응에 따라 달라진다고 할 수 있다. 결핵에 대한 면역 반응은 T-림프구와 단핵식세포를 주축으로 하는 세포성 면역반응이 주를 이루는데[9,10] 대식세포에 의해 제시된 결핵균항원과 면역감응 T-림프구가 접촉하면서 림프구가 활성화되고 IFN-γ와 같은 cytokine이 분비되며 이들이 다시 단핵구를 활성화시켜 항원 발현이 증강되고 IL-1, TNF-α, nitric oxide, reactive oxygen intermediate등의 생성이 증가되어 항균효과를 나타내는 것으로 알려져 있다[11]. 단핵구를 LPS로 자극했을 때 생성되는 TNF-α는 IFN-γ로 전처치 했을 때 증가하는데 이에 대한 정확한 기전은 잘 알려져 있지 않으나 IFN-γ의 기능을 알아보는 지표로 많이 이용되고 있다. IFN-γ는 세포 표면에 존재하는 수용체를 통해 효과를 나타내는데 이 수용체는 적혈구를 제외한 모든 세포에 존재하며[12,13] 수용체에 대한 유전자는 6번 염색체에 30kb 정도의 크기로 있는 것이 확인되었다[14]. 수용체는 IFN-γ가 붙는 수용체 1과 transmembrane accessory factor인 수용체 2로 구성되어 있는데 정상적인 역할을 하는데는 이 구성 성분 모두가 필요하다[15]. 결핵에서 IFN-γ는 최근 쥐에서 IFN-γ나 IFN-γ 수용체 유전자를 제거하여 결국 IFN-γ의 기능을 차단시킨 실험적 모델들이 만들어지면서 그 중요성이 밝혀지고 있는데 IFN-γ 유전자를 파괴한 gko mice나 IFN-γ 수용체 유전자를 제거한 IFN-γ $R^{0/0}$ mice에 결핵균을 감염시켰을 때 대조군에 비해 조직괴사가 심하게 일어나면서 급속한 경과를 밟아 조기에 사망한 결과들이 보고되었다[16,17]. IFN-γ 수용체 1 유전자에 이상이 생겨 비결핵 항산균에 반복적인 감염이 생겼던 환자들의 경우에는 염기서열 분석을 통해 IFN-γ 수용체 1 유전자의 395번 핵산 위치에 C가 A로 바뀌는 점 돌연변이가 생겨 IFN-γ 수용체 1의 transmembrane domain과 intracellular domain이 생기지 않음으로써 IFN-γ가 제대로 기능하지 못하게 됨이 밝혀진바 있다[7]. 1996년에도 BCG 예방접종후 전신에 BCG 감염이 퍼진 소아의 증례가 보고되었는데 이 환아 역시 알려진 면역 부전은 없었고 결국 IFN-γ 수용체 염색체의 변이가 문제가 되었던 것으로 알려졌다[18]. 본 연구에서 수용체 의 숫적 감소가 확인되었던 환자는 33세 여자환자로 1996년 1월 폐결핵으로 진단받았고 적절한 항결핵요법을 시행하였음에도 결핵이 결국 조절되지 않고 1년 반에 걸쳐 흉막, 심막, 복막등에 퍼졌고 1997년 9월 우측 편마비가 생겼는데 뇌에 감염성 종괴가 발견되어 이 병변이 결핵인지 검사하는 도중 사망하였다. 이 환자의 경우 IFN-γ 활성화 효과 또한 상당히 감소되어 있어 IFN-γ 수용체의 숫적 감소가 결핵에 대한 적절한 반응을 못하게된 중요한 병인일 것으로 추정되었다. 최근 IFN-γ 수용체 감소의 정도가 다른 임상 양상을 나타낼 수 있음이 알려졌는데 1997년 BCG 접종 후 감염이 생긴 환아에서 부분적인 수용체 감소가 발견되었고 이들의 경우 IFN-γ에 대한 반응이 감소되어 있었으나 치료엔 잘 반응하였으며 IFN-r 수용체 1 유전자의 missense mutation이 원인인 것으로 밝혀졌다[19]. 이러한 결과들을 볼 때 일부 결핵 환자에 있어 IFN-γ 수용체 1 유전자의 변이가 다양하게 존재하며 그에 따른 수용체의 숫적 감소가 다르게 나타나고 결핵에 대한 면역 반응이 또한 달라져서 비교적 치료가 잘되는 경우에서 결국 사망에 이르는 경우까지 다양한 임상양상을 띄게되는 것으로 판단된다. 한편 본 연구에서는 IFN-γ 수용체의 숫적 감소가 확인된 1명을 제외한 다른 난치성 결핵 환자들에서는 IFN-γ의 활성화 효과는 정상 대조군이나 새로 진단된 결핵 환자들에 비해 유의하게 감소되어 있으나 수용체 1의 숫적 감소가 발견되지 않아 이들에게는 측정할 수 있는 IFN-

γ 수용체 1의 숫적 감소 외에 다른 기전을 통해 IFN-γ에 대한 반응이 감소되는 것으로 생각된다. 이는 IFN-γ 수용체 1의 기능적 결함이나 수용체 2 혹은 postreceptor mechanism등을 통해 이루어질 가능성이 있으며 추가적인 연구가 필요한 부분이라 할 수 있다. 본 연구를 통하여 IFN-γ의 활성화 효과가 난치성 결핵 환자들에서 감소되어 있고 이것이 일부 환자에서는 IFN-γ 수용체의 숫적 감소와 관련이 있음을 확인하였다. 앞으로 IFN-γ 수용체의 숫적 감소이외에도 IFN-γ에 대한 숙주의 반응을 저하시킬 수 있는 여러 가능성과 난치성 결핵에서의 역할, 이를 토대로 한 유전자 요법의 개발 등에 대한 추가적인 연구가 필요하다고 하겠다.

요 약

연구배경 :

결핵에 대한 면역 반응은 T-림프구와 단핵 식세포를 주축으로 하는 세포성 면역 반응이 주를 이루는데 여기에 IFN-γ와 TNF-α등의 cytokine이 관여하고 있다. IFN-γ는 주로 T-림프구에서 분비되어 활성화된 단핵구에서의 TNF-α생성을 증가시키는 기전을 통해 결핵균 증식을 억제하고 치유에 이르는 과정을 매개하는 것으로 알려져 있다. 효과적인 화학요법에도 불구하고 난치성 결핵으로 이행하는 기전에 IFN-γ가 관여하는지 규명하고자 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법 :

정상 대조군과 최근 결핵으로 진단받아 치료를 시작한 환자, 난치성 결핵 환자에서 혈액을 채취하여 단핵구를 분리하고 아무런 자극을 하지 않은 경우, 12시간 LPS(1 μg/ml)만으로 자극을 한 경우, IFN-γ (2 μg/ml)로 2시간 전처치한 후 12시간 LPS 자극한 경우로 나누어 TNF-α의 농도를 측정, IFN-γ 활성화 효과에 변화가 있는지를 살펴보았고 IFN-γ 수용체 항체를 이용, IFN-γ 활성화 효과의 변화가 IFN-γ 수용체의 숫적 변화와 관련이 있는지를 확인하였다.

결 과 :

IFN-γ활성화 효과를 알아보기 위해 LPS만으로 자극한 경우와 IFN-γ 전처치 후 LPS로 자극한 경우에 생성된 TNF-α의 비를 구하여 보았을 때 정상 대조군 13.5±7.6, 최근 결핵환자로 진단받은 군 10.8±6.4, 난치성 결핵 환자군 6.7±3.9의 결과를 보였다. 난치성 결핵환자군의 경우 정상대조군에 비해 IFN-γ의 활성화 효과가 통계적으로 유의하게 감소되어 있음을 알 수 있었다(p=0.002). IFN-γ 수용체 수의 감소는 대상 환자 중 난치성 결핵 환자 1명에서 관찰되었다.

결 론 :

난치성 결핵으로의 이행에 있어 단핵구에서의 IFN-γ 활성화 효과의 감소가 중요한 역할을 할 것으로 생각되며 IFN-γ 활성화 효과의 감소는 일부 환자의 경우, IFN-γ 수용체의 감소와 관련되어 생기는 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. 보건복지부-대한결핵협회. 제7차 전국 결핵실태조사결과보고. 1995.
2. 홍영표. 우리나라 결핵-어제, 오늘, 내일. 결핵 및 호흡기질환 1997;44:1-10.
3. Stead WW. Genetics and resistance to tuberculosis. Could resistance be enhanced by genetic engineering? Ann Intern Med 1992;116:937-41.
4. Comstock GW. Tuberculosis in twins: A re-analysis of the Prophit study. Am Rev Respir Dis 1978;117:621-4.
5. Denis M, Forget A, Pelletier M, Turcotte R, Skamene E. Control of the Bcg gene for early resistance in mice to infections with BCG substrains and atypical mycobacteria. Clin Exp Immunol 1986;63:517-25.
6. Levin M, Newport MJ, D'Souza S, Kalabalikis P, Brown IN, Lenicker HM, et al. Familial dissemi-

nated atypical mycobacterial infection in childhood:a human mycobacterial susceptibility gene? Lancet 1995;345:79-83.

7. Newport MH, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williamson R, et al. A mutation in the interferon-γ receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. N Engl J Med 1996;335:1941-49.
8. Schreiber RD, Celada A. Molecular characterization of interferon gamma as a macrophage activating factor. Lymphokines 1985;11:87-118.
9. North RJ. Importance of thymus-derived lymphocytes in cell-mediated immunity to infection. Cell Immunol 1973;7:166-76.
10. Orme IM, Collins FM. Protection against M. tuberculosis infection by adoptive immunotherapy. J Exp Med 1983;158:74-83.
11. Orme IM, Roberts AD, Griffin JP, Abrams JS. Cytokine secretion by CD4 T lymphocytes acquired in response to Mycobacterium tuberculosis infection. J immunol 1993;151:518-25.
12. Celada A, Allen R, Esparza I, Gray PW, Schreiber RD. Demonstration and partial characterization of the interferon-gamma receptor on human mononuclear phagocytes. J Clin Invest 1985;76:2196-205.
13. Valente G, Ozmen L, Novelli F, Geuna M, Palestro G, Forni G, et al. Distribution of interferon-γ receptor in human tissues. Eur J Immunol 1992;22:2403-12.
14. Merlin G, Van der Leede BJ., Auguet M. Dembic Z. The human interferon gamma receptor gene. J. Interferon Res. 1989;9:89(Abstr.)
15. Soh J, Donnelly RJ, Kotenko S, Mariano TM, Cook JR, Wang N, et al. Identification and sequence of an accessory factor required for activation of the human interferon receptor. Cell 1994;76:793-802.
16. Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferon-γ in resistance to Mycobacterium tuberculosis infection. J Exp Med 1993;178:2249-54.
17. Kamijo R, Le J, Shapiro D, Havell EA, Huang S, Aguet M, et al. Mice that lack the interferon-gamma receptor have profoundly altered response to infection with Bacillus Calmette-Guerin and subsequent challenge with lipopolysaccharide. J Exp Med 1993;178:1435-40.
18. Jouanguy E, Altare F, Lamhamedi S, Revy P, Emile JF, Newport M, et al. Interferon-r receptor deficiency in an infant with fatal BCG infection. N Eng J Med 1996;26:1956-61.
19. Jouanguy E, Lamhamedi S, Altare F, Fondaneche MC, Tuerlinckx D, Blanche S, et al. Partial interferon-gamma receptor 1 deficiency in a child with tuberculoid bacillus Calmette-Guerlin infection and a sibling with clinical tuberculosis. J Clin Invest 1997;100:2658-64.