

# 마우스 동종 조혈모세포 이식모델에서 Cyclosporin A, FK506, 3-Deazaadenosine 등의 약제가 급성 이식편대 숙주병과 생존에 미치는 영향

가톨릭대학교 의과대학 <sup>1</sup>내과학교실, <sup>2</sup>소아과학교실, <sup>3</sup>치료방사선과학교실

진종률<sup>1</sup> · 정대철<sup>2</sup> · 엄현석<sup>1</sup> · 정낙균<sup>2</sup> · 박수정<sup>1</sup> · 최병옥<sup>3</sup> · 민우성<sup>1</sup> · 김학기<sup>2</sup>  
김춘추<sup>1</sup> · 한치화<sup>1</sup>

## Effects of Cyclosporin A, FK506, and 3-Deazaadenosine on Acute Graft-versus-host Disease and Survival in Allogeneic Murine Hematopoietic Stem Cell Transplantation

Jong Youl Jin<sup>1</sup>, Dae Chul Jeong<sup>2</sup>, Hyeon Seok Eom<sup>1</sup>, Nak Gyun Chung<sup>2</sup>, Soo Jeong Park<sup>1</sup>, Byung Ock Choi<sup>3</sup>, Woo Sung Min<sup>1</sup>, Hack Ki Kim<sup>2</sup>, Chun Choo Kim<sup>1</sup> and Chi Wha Han<sup>1</sup>

*Departments of <sup>1</sup>Internal Medicine, <sup>2</sup>Pediatrics, and <sup>3</sup>Therapeutic Radiology, Catholic Hematopoietic Stem Cell Transplantation Center, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea*

### ABSTRACT

**Background:** We investigated the effect of donor marrow T cell depletion, administration of FK506, cyclosporin A (CSA), and 3-deazaadenosine (DZA) on graft versus host disease (GVHD) after allogeneic murine hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). **Methods:** We used 4 to 6 week old Balb/c (H-2<sup>d</sup>, recipient), and C3H/He (H-2<sup>k</sup>, donor) mice. Total body irradiated recipients received  $1 \times 10^7$  bone marrow cells (BM) and  $0.5 \times 10^7$  splenocytes of donor under FK506 (36 mg/kg/day), CSA (5 mg/kg/day, 20 mg/kg/day), and DZA (45 mg/kg/day), which were injected intraperitoneally from day 1 to day 14 daily and then three times a week for another 2 weeks. To prevent the GVHD, irradiated Balb/c mice were transplanted with  $1 \times 10^7$  rotor-off (R/O) cells of donor BM. The severity of GVHD was assessed daily by clinical scoring method. **Results:** All experimental groups were well grafted after HSCT. Mice in experimental group showed higher GVHD score and more rapid progression of GVHD than the mice with R/O cells (R/O group) ( $p < 0.01$ ). There were relatively low GVHD scores and slow progressions in FK506 and low dose CSA groups than high dose CSA group ( $p < 0.01$ ). The survival was better in FK506 group than low dose CSA group. All mice treated with CSA died within 12 days after HSCT. The GVHD score in DZA group was low and slow in comparison with control group ( $p < 0.05$ ), but severity and progression were similar with low dose CSA group ( $p = 0.11$ ). All mice without immunosuppressive treatment died within 8 days, but all survived in R/O group ( $p < 0.01$ ). Survival in low dose CSA group was longer than in control group ( $p < 0.05$ ), but in high dose CSA group, survival was similar to control group. The survival benefit in DZA group was similar with low dose CSA group. FK506 group has the best survival benefit than other groups ( $p < 0.01$ ), comparable with R/O group ( $p = 0.18$ ), although probability of survival was 60%. **Conclusion:** We developed lethal GVHD model after

책임저자 : 정대철, 성모자애병원 소아과, ☎ 403-720, 인천시 부평구 부평6동 665  
Tel: 032-510-5687, Fax: 032-503-9724  
E-mail: dcjeong@olmh.cuk.ac.kr

이 논문은 0199-3532234 성가병원 임상의학연구비, 건일제약(주)와 한국파마시아(주)의 연구비 지원으로 이루어진 것임.

allogeneic murine HSCT. In this model, immunosuppressive agents showed survival benefits in prevention of GVHD. DZA showed similar survival benefits to low dose CSA. We propose that DZA can be used as a new immunosuppressive agent to prevent GVHD after allogeneic HSCT. (*Immune Network* 2003;3(2):150-155)

**Key Words:** 3-Deazaadenosine, graft versus host disease, allogeneic murine hematopoietic stem cell transplantation

## 서 론

동종 조혈모세포 이식은 난치성 혈액질환, 고형종양, 대사이상, 일부의 면역질환 등의 치료에 획기적인 발달을 가져왔다(1). 그러나, 동종 조혈모세포 이식 후 이식편과 숙주 사이에서 발생하는 이식편대 숙주병(graft versus host disease, GVHD)에는 아직도 해결해야 될 많은 문제점이 남아 있다(2). GVHD는 공여자와 수혜자 사이의 주조직적합복합체(major histocompatibility complex, MHC)가 불일치하게 되면 매우 현저하게 일어난다(3). GVHD는 여러 장기에 현저한 염증 반응을 초래하여 치명적인 장기의 손상을 일으킨다(2,3). GVHD의 면역학적 기전으로는 이식편의 림프구와 단구(monocytes)가 숙주의 동종항원을 인지하여 활성화되면서 일어나는 것으로 알려져 있다. 이 과정에서 IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , 그리고 IL-1 $\beta$  등 여러 종류의 싸이토카인이 과다하게 분비되는 것으로 보고되고 있다(3,4).

GVHD를 예방하고 치료하기 위한 목적으로 여러 가지 면역억제제가 사용되고 있다. 면역억제제들은 동물과 사람의 장기이식이나 동종 조혈모세포 이식 후 상당기간 투여함으로써 거부반응을 억제하고 이식편의 생착을 도와주며 조혈모세포 이식 후 일어나는 급성 GVHD를 예방한다(5,6). 이 중에서 현재 세계적으로 가장 널리 사용되는 cyclosporin A (CSA)와 FK506는 T 림프구의 세포 내 immunophilin인 cyclophilin과 FK-binding protein에 각각 결합한 다음 calcineurin과 결합함으로써 세포질형의 NF-AT (NF-ATc)의 활성화를 차단하여 T 림프구의 분화 및 증식에 관여하는 IL-2의 발현을 억제한다(7). 따라서 T 세포의 분화 및 증식 또는 조직 손상에 관여하는 싸이토카인을 억제함으로써 현저한 GVHD를 조절할 수 있는 것으로 알려져 있다. 또한, 단구에서 분비되는 싸이토카인인 TNF- $\alpha$ 에 대한 면역반응을 억제하기 위해서 항TNF- $\alpha$  항체나 TNF- $\alpha$ 에 길항작용을 하는 pentoxifyllin을 이용하여 심각한 GVHD를 억제하려는 시도도 보고되고 있다(8,9).

3-Deazaadenosine (DZA)는 S-adenosylhomocysteine hydrolase를 억제하여 NF- $\kappa$ B의 전사를 억제함으로써 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 발현을 선택적으로 감소시킨다(10-12). 또한, p65 (Rel-A)의 인산화를 방해하여 NF- $\kappa$ B의 전사도를 억제하는데 이는 homocysteine이 첨가되면 그 효능이 배가된다

고 한다(13). 이외에도 DZA의 생물학적 효과로는 항염증 작용, 면역억제 효과, 싸이토카인의 발현 억제, 백혈병 세포의 아포토시스(apoptosis) 유도 등이 알려져 있다(14-17).

저자들은 MHC가 불일치하여 치명적인 GVHD를 보이도록 계획된 동종 조혈모세포 이식 마우스 모델[C3H/He (H-2<sup>k</sup>)  $\rightarrow$  BALB/c (H-2<sup>d</sup>)]에서 DZA가 GVHD에 미치는 영향을 알아보고, 동시에 다른 면역억제제인 CSA나 FK506와 비교하여 GVHD와 생존에 미치는 효과를 연구하였다.

## 재료 및 방법

**마우스.** 4 내지 6주 된 암컷 BALB/c (H-2<sup>d</sup>)와 C3H/He (H-2<sup>k</sup>) 마우스(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)를 specific pathogen free (SPF) 조건하에서 항생제가 첨가된 멸균수와  $\gamma$ -선이 조사된 멸균 고형식으로 사육하였으며 마우스들은 실험 전 최소 1주간 적응시켜 사용하였다.

**골수세포와 비장세포의 분리.** 저자들의 실험에서는 골수세포와 비장세포를 조혈모세포로 사용하였다. 공여 마우스로 C3H/He 마우스를 경추 탈골법으로 죽사시켜 양쪽 비골과 대퇴골로부터 RPMI 1640 배양액을 사용하여 골수를 채취한 다음 골 파편 등의 불순물들을 제거하고 동일한 배양액으로 2차례 세척하였다. 동일한 방법으로 희생시킨 마우스의 비장을 적출하여 조직 mesh 등을 이용하여 단일 세포 부유액을 만들었다. 골수와 비장세포들의 활성은 trypan blue염색법으로 확인하였다.

**골수세포에서 Rotor off (R/O) 세포분획의 분리.** 골수세포를 역류 원심성 세포분리 방법(counterflow centrifugal elutriation, CCE)으로 분리하면 R/O세포 분획에는 T 세포가 적은 대신 조혈모세포들이 농축되어 있기 때문에 동종 골수이식 후 급성 GVHD의 예방과 골수의 생착을 촉진한다(18). CCE의 방법을 간단히 기술하면 다음과 같다. JE 5.0 rotor와 5.0 ml 표준 chamber가 장착된 J6MI CCE (Beckman Instrument, Palo Alto, CA)를 이용하였다. 소독된 line 전체를 CCE용 배양액[0.9% NaCl, 0.3 mM EDTA, 1% D-glucose, 0.5% fetal bovine serum]으로 미리 채워놓은 다음, 원심분리기의 온도를 20°C에 맞추고, rotor를 3,000 rpm으로 회전시킨 상태에서 준비된 골수 세포 부유액(2~3  $\times 10^7$ /mL)을 주입한 후에 CCE용 배양액의 단계별 주입속도와 각 세포 분획의 수집되는

양을 컴퓨터와 전자저울(Mettler Instrument, Greifensee, Switzerland)로 조절하여 원하는 세포 분획들을 얻었다. 본 실험에서는 골수세포를 17 ml/min의 배양액 속도에서 주입하여 150 ml을 얻었고 이후에 25 ml/min, 28 ml/min에서 각각 200 ml의 세포분획을 얻었으며 마지막으로 rotor를 정지시켜서 원하는 R/O 분획을 얻었다.

**마우스 동종 조혈모세포 이식.** BALB/c 마우스를 선형 가속기(Clinac®, 6MeV, Varion, CA)로 875 cGy의 전신 방사선 조사를 하였다. 전신 방사선 조사 후 4시간 이내에 미리 준비해 놓은 C3H/He 마우스의 골수와 비장세포를 꼬리 정맥을 통하여 주입하였다. 예비 실험결과 875 cGy의 방사선 조사 용량은 급성 GVHD를 일으키기에 충분하였으며 골수를 이식하지 않으면 방사선 조사 후 13일 이내에 모두 사망하였다.

치명적인 급성 GVHD를 일으키는 실험군(이하 GVHD군)에는  $1 \times 10^7$ 의 골수 세포와  $0.5 \times 10^7$ 의 비장세포를 함께 주입하였고 GVHD를 완벽하게 예방하기 위한 실험군으로는  $1 \times 10^7$ 의 R/O분획 세포들만 주입하였다(이하 R/O군).

**면역억제제의 주사.** CSA는 저용량 5 mg/kg/day, 고용량 20 mg/kg/day의 서로 다른 용량으로, FK506는 36 mg/kg/day, DZA는 45 mg/kg/day의 용량으로 조혈모세포 이식 1일전부터 이식 후 14일까지 매일 복강 내로 주사하였고, 이후 2주 동안은 격일로 1주일에 3회씩 투여하였다. 면역억제제들의 혈중 농도를 가능한 일정하게 유지하기 위하여 약제들을 각각 멸균된 0.2% carboxymethyl cellulose (CMC, Sigma Co., St. Louis, MO, USA)와 혼합하였으며, 마리당 1회에 0.3 ml씩 면역억제제들과 같이 주사하였다. 대조군들에는 동일한 양의 0.2% CMC 용액을 주사하였다. 모든 실험은 면역억제제의 용량과 종류에 따라 각각 5마리씩 이식하여 경과를 관찰하였다.

**급성 GVHD의 평가.** 조혈모세포 이식 후 GVHD의 평가는 Cooke 등이 제안한 임상점수제(clinical scoring system)를 이용하였다(19). 이는 체중, 털의 상태, 자세, 활동 정도 그리고 발이나 꼬리 부위의 피부변화를 관찰하여 각각의 항목을 0, 1, 2점으로 부여한 다음 이들의 합계를 표시하는 방법이다. 저자들은 객관성을 높이기 위하여 각 항목을 최소 2인이 동시에 관찰하여 점수를 부여하였다.

급성 GVHD의 정도는 총점이 4점 미만이면 경도(mild), 4점 이상 6점까지는 중등도(moderate), 7점 이상 10점까지는 중증(severe)으로 정하였다.

**통계 분석.** 통계분석에는 개인용 컴퓨터의 SPSS 프로그램(version 10.0)을 사용하였다. 마우스들의 생존은 log-rank test를 이용한 Kaplan-Meier방법으로 생존 분석을 시행하였고 급성 GVHD의 심각도는 ANOVA와 Bonferoni multiple test를 이용하여 분석하였다. 또한, 급성 GVHD의 정도는 반복 측정자료의 분산 분석 통계방법을 사용

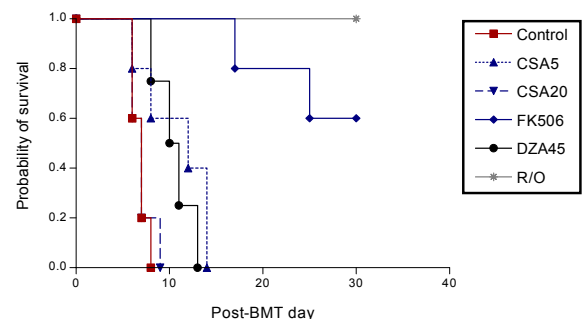
하였다.

**결 과**

**동종 조혈모세포 이식 마우스의 생존분석.** C3H/He의 골수와 비장세포를 이식 받은 실험군(GVHD군)은 이식 제8일에 높은 GVHD점수를 보이며 모두 사망하였으나(6~8일, 중앙값: 7일), 공여자 마우스의 골수에서 역류 원심성 세포분리로 T세포를 제거한 R/O세포를 이식 받은 대조군(R/O군)은 이식 후 관찰기간 동안 모두 생존하였다(Fig. 1). R/O군이 면역억제제를 투여 받지 않은 GVHD군에 비하여 유의하게 장기간 생존하였다( $p < 0.01$ ).

3-Deazaadenosine (DZA)투여군은 면역억제제를 투여 하지 않은 GVHD 실험군이나 고용량 cyclosporin (CSA) 투여군(6~8일, 중앙값: 7일)에 비하여 생존기간이 의미 있게 길었다(8~13일, 중앙값: 11일,  $p < 0.05$ ). 또한, 저용량 CSA 투여군은 면역억제제를 투여하지 않은 실험군에 비하여 장기간 생존하였으며(6~14일, 중앙값: 12일,  $p < 0.05$ ), DZA군과 거의 유사한 생존을 보였다( $p = 0.39$ ). 그러나, R/O분획을 이식한 대조군 및 FK506군에 비해서는 현저하게 저조한 생존율을 보였다( $p < 0.01$ ) (Fig. 1).

저자들의 동종 마우스 조혈모세포 이식 후 유사한 면역억제 기전을 가지고 있는 CSA과 FK506를 투여한 경



**Figure 1.** Comparison of survival curve among Balb/c mice received C3H/He bone marrow and spleen cells according to the treatment of various immunosuppressive agents. All mice of lethal GVHD model without immunosuppressive treatment died within 8 days after HSCT (■), but mice received with rotor off (R/O) cells (\*) survived up to post-HSCT 33 day ( $p < 0.01$ ). Among lethal GVHD models treated with immunosuppressive agents, mice treated with FK506 (◆) survived longer than other groups ( $p < 0.01$ ), even though the survival was about 60%. In CSA treated group, survival was longer in low dose group (▲) than high dose group (▼) ( $p < 0.05$ ). In high dose group, survival rates showed similar with lethal GVHD model without immunosuppressive treatment ( $p = 0.66$ ). The DZA treated mice (●) survived longer than lethal GVHD model without immunosuppressive treatment and high dose CSA treated group ( $p < 0.05$ ), but all mice died within post-HSCT 12 day. The survival rate in DZA group was similar with low dose CSA treated group ( $p = 0.11$ ).

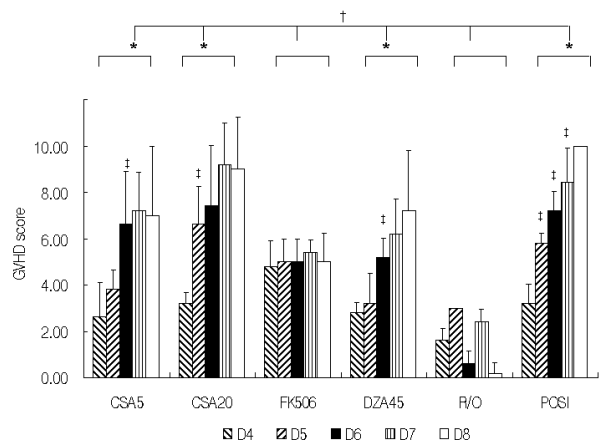
우에 FK506 투여군이 CSA의 투여용량에 관계없이 장기간 생존하였다( $p < 0.01$ ). 즉, FK506군은 이식 후 30일째에 60%의 생존을 보였지만, R/O 군과 비교하였을 때 생존기간에 차이가 없었다( $p = 0.18$ )(Fig. 1). CSA의 용량에 따른 생존율을 비교하였을 때는 저용량 CSA 투여군에서는 이식 제14일까지 모두 생존하였으나 고용량 CSA 군에서는 이식 제8일에 모두 사망하여 저용량의 CSA를 투여한 경우가 고용량의 CSA를 투여한 경우보다 오래 생존하는 경향을 보였다( $p < 0.05$ ). 비록 저용량 CSA 투여군이 FK506 투여군보다 생존율이 낮았으나 면역억제제를 투여하지 않은 GVHD 실험군에 비하여 의미있게 생존기간이 연장되었다( $p < 0.05$ )(Fig. 1). 그러나 고용량 CSA를 투여한 군의 생존율은 면역억제제를 투여하지 않은 GVHD 실험군과 유사한 생존율을 보였다( $p = 0.66$ )(Fig. 1).

동종 조혈모세포 이식을 받은 모든 마우스가 사망한 후 시행한 광학 현미경적 골수 조직 검사결과 모든 예에서 이식 생착이 일어났음을 알 수 있었고 20~70% (중앙값: 40%)의 골수 조혈세포 충실도를 관찰할 수 있었다. 면역억제제 투여 후 GVHD의 심각도(severity)와 진행속도. 면역억제제 투여 후 관찰되는 GVHD의 정도와 경과를 Fig. 2에 기술하였다.

GVHD 임상점수의 변화는 면역억제제를 투여하지 않은 GVHD 실험군에서는 이식 제4일부터 급속히 증가하여 이식 제8일에는 10점의 점수를 나타내면서 모두 사망하였다( $p < 0.01$ ). 반면, R/O세포를 이식 받은 마우스(R/O 군)는 이식 제4일과 제5일 GVHD점수가 약간 증가하였으나 GVHD정도는 중등도 이하로서 시간이 지남에 따라 감소하는 소견을 보였고( $p < 0.05$ ), 면역억제제를 투여하지 않은 GVHD 실험군에 비하여 현저히 낮은 점수를 나타내었다( $p < 0.01$ ). R/O군과 FK506 투여군을 제외한 모든 GVHD 실험군(면역억제제를 투여하지 않은 GVHD 실험군, 저용량 및 고용량 CSA 투여군, DZA 투여군)에서 이식 제4일부터 진행되는 GVHD점수는 중등도 이상의 GVHD점수를 보이면서 모두 급속하게 진행이 되었고( $p < 0.05$ ) 7일 이후에는 R/O군과 FK506군을 제외한 모든 실험군에서 중증의 GVHD점수를 보여 심각도에 있어 차이를 관찰할 수 없었다( $p = 0.37$ ).

DZA를 투여한 군은 면역억제제를 투여하지 않은 GVHD 실험군과 고용량 CSA 투여군에 비하여 유의하게 GVHD 진행속도와 임상점수가 낮았으나( $p < 0.01$ ), 저용량의 CSA를 투여군과 유사한 정도의 심각도와 진행속도를 확인할 수 있었다( $p = 1.00$ )(Fig. 2).

CSA의 투여용량에 따른 GVHD의 정도는 고용량 투여군이 저용량 투여군에 비하여 이식 제4일부터 8일까지 모두 유의하게 높은 임상점수를 보여 심각도가 높은 것으로 관찰되었으나( $p < 0.01$ ) 진행 속도는 유사하였다



**Figure 2.** Progression and severity of GVHD patterns in transplanted mice treated with immunosuppressive agents. The severity of GVHD was increased according to post-HSCT day (\*,  $p < 0.01$ ) except FK506 and R/O group. In each group, GVHD scores on post-HSCT 5 or 6 day were higher than other day (\*,  $p < 0.01$ ). The progression and severity of GVHD in FK506 and R/O group were significantly less than other groups (\*,  $p < 0.01$ ). Abbreviation; CSA5: cyclosporin 5 mg/kg/day, CSA20: cyclosporin 20 mg/kg/day, FK506: FK506 35 mg/kg/day, DZA45: 3-deazaadenosine 45 mg/kg/day, R/O: mice transplanted with rotor off cells, POSI: control.

( $p = 0.155$ ). 고용량의 CSA를 투여한 군의 GVHD는 면역억제제를 투여하지 않은 GVHD 실험군과 심각도와 진행속도가 유사하였다( $p = 0.342$ ).

저자들의 실험에서는 특이하게도 CSA와 작용기전이 유사함에도 불구하고 FK506 투여군에서 이식 초기인 제4일에서만 GVHD가 중등도로 나타나 다른 실험군에 비하여 GVHD가 현저한 경향을 보였으나 이후부터는 면역억제제를 투여하지 않은 GVHD 실험군이나 CSA와 DZA를 투여한 군보다 현저하게 낮은 GVHD 임상점수를 보였으며 더 이상 진행되는 소견도 관찰되지 않았다( $p = 1.00$ ).

## 고찰

이식편대숙주병(graft versus host disease, GVHD)은 동종 조혈모세포 이식 후 발생하는 면역질환의 한가지로서 조혈모세포 이식 후 사망률이나 유병률과 밀접한 연관 관계를 가지고 있다(1-3). GVHD는 이식편에 존재하는 T 세포가 숙주의 동종 항원을 인지하여 활성화되면서 분화하고 증식하여 일어나는 질환으로 알려져 있다(3). 이 과정에는 IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ 를 비롯한 많은 사이토카인이 관여한다(4). CSA와 FK506은 T 세포가 활성화되면서 발현되는 여러 사이토카인의 생성을 억제하는 비골수 독성의 면역억제제로 임상에서 널리 사용되고 있다(1,5,7). 이들은 생체 내에서 숙주의 동종항원에 반

응하여 증식하는 T 세포의 기능을 저하시킴으로써 치명적인 GVHD의 발생을 억제하는 것으로 알려져 있다(5-7).

저자들이 사용한 마우스 조혈모세포 이식 모델 중 급성 GVHD 모델[C3He/H (H-2<sup>k</sup>) → Balb/c (H-2<sup>d</sup>)]은 공여마우스와 숙주마우스 사이의 구조적합항원인 H-2가 완전히 일치하지 않는 경우로서 본 실험 이전에 실시한 사전 실험에서는 이식 제8일 이전에 모두 사망하였다. 마우스 조혈모세포 이식 모델 중 알려진 급성 GVHD 모델로는 Blazar 등이 이용하였던 마우스 GVHD 모델[C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>) → B10.BR(H-2<sup>k</sup>)]이 있는데 이는 H-2가 불일치하여 이식 후 20~40일에 사망하였고(20), Sykes 등이 사용하였던 모델[A/J (H-2a) → C57BL/10 (H-2b)]에서는 평균 이식 제8일만에 이식 마우스가 급성 GVHD로 사망하였는데(21), 이는 구조적합복합체(major histocompatibility, MHC)과 부구조적합항원(minor histocompatibility)가 모두 일치하지 않는 경우로서 저자들의 모델과 유사한 GVHD의 모델이라고 생각된다. 또한, 물리적 방법인 역류 원심성 세포 분리법으로 골수에서 T 세포를 제거하고 이식한 경우는 연구기간 동안 경도의 GVHD를 보이면서 생존하여 T 세포가 GVHD 기전에 관여한다는 사실을 재차 확인할 수 있었다. 저자들이 역류 원심성 세포 분리법으로 얻은 R/O세포를 이식한 마우스 모델 (R/O군)은 관찰 기간 동안 경도의 GVHD만 보이면서 장기간 생존한 모델로서 이전 연구에서 이식 제 90일까지 생존하였고 이때 실시한 골수 검사상 100%의 키메리즘을 확인할 수 있었다(18).

급성 GVHD의 발생과정은 3단계로 이해된다. 우선, 전처치나 감염 등에 의해 유리된 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  등이 표적이 되는 조직들의 MHC와 부착분자의 발현을 증가시킨다(3). 이렇게 되면, 이식편의 T 세포가 숙주의 MHC 항원을 인지하여 활성화되어 IL-2와 IFN- $\gamma$ 를 분비한다(4). 활성화된 T 세포들은 MHC 항원의 발현이 뚜렷한 장, 간, 피부 및 폐로 이동하며 이 곳에서 항원을 다시 만나 다양한 효과를 나타낸다(3,4). 다음 단계로서 분비된 IL-2가 이식편의 단핵구들을 활성화시켜 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  등을 분비하도록 하여 MHC의 발현을 더욱 증가시켜 세포매개성 세포독성이 잘 일어나게 함으로서 급성 GVHD의 치명적인 병리 및 임상소견을 나타나게 한다(22,23). TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$  등의 발현을 억제하거나 이들의 작용을 억제하는 사이토카인들을 사용하여 GVHD를 억제하고자 하는 시도로 항TNF- $\alpha$ 항체나 TNF의 생성을 억제하는 pentoxifyllin을 투여하는 방법이 시도되었으나 아직 그 결과는 만족스럽지 못하다(8,9).

3-Deazaadenosine (DZA)은 S-adenosylhomocysteine hydrolase를 강력하게 억제하여 마우스 대식세포에서 세균의 lipopolysaccharide 유발성 TNF- $\alpha$ 와 IL-1 $\beta$ 의 전사를 억제한다(12). 또한, DZA는 p65 (Rel-A)의 인산화를 방해하여

NF- $\kappa$ B의 전사능을 억제하며 이는 homocysteine을 첨가함으로써 더 증가시킬 수 있다(13). 한편, Nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B)는 전사 인자(transcriptional factor)로서 염증, 면역반응, 세포증식, 종양발생 그리고 아포토시스에 중요한 역할을 한다(24). 따라서 DZA의 생물학적 효과는 HIV의 증식억제, 면역조절기능, 항염증 효과, 림프구 매개성 세포 용해의 억제, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 를 포함한 사이토카인 발현의 억제, 세포의 부착분자(adhesion molecule)의 발현 억제, 그리고 사람과 마우스 백혈병 세포들에서 아포토시스 유도 등에 관여하는 것으로 연구되고 있다(12,14, 15-17).

본 연구에서 사용한 DZA의 용량은 항바이러스 효과를 보이는 용량과 동일한 용량으로써 급성 GVHD의 예방이 가능하여 면역억제제로 사용 가능성이 있는지 또한 증상의 발현을 완화시킬 수 있는지를 확인하고자 하였다(14). 본 연구에서 면역억제제를 투여하지 않은 GVHD 실험군과 비교해서 DZA를 투여한 경우 생존기간이 연장되고, GVHD의 진행속도가 의미있게 조절되는 결과를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 저용량의 CSA를 투여한 경우와 유사한 정도의 생존율과 GVHD 양상을 보임으로써 면역억제제로 사용될 수 있는 가능성이 있음을 알 수 있었다. DZA가 치명적인 급성 GVHD 억제 효과를 보이는 것은 전술한 바와 같이 세포 내에서 NF- $\kappa$ B의 기능을 억제하여 사이토카인의 발현 억제, 세포의 부착분자 발현의 억제 등이 관여한 결과 T 세포의 활성이 억제되어 나타나는 것으로 추정된다. 그러나, DZA군이 T 세포 제거골수이식을 시행한 R/O군에 비하여 심각한 GVHD의 진행을 보이면서 이식 제13일에는 모두 사망하는 결과는 DZA도 CSA 등의 면역억제제와 같이 T세포가 활성화된 다음 생성되는 다양한 사이토카인의 발현을 적절하게 조절하지 못하는 것을 시사하는 것으로 보인다.

CSA와 FK506는 calcineurin의 작용을 억제함으로써 T 세포의 활성화와 관련된 IL-2의 생성을 억제하여 강력한 면역억제제의 역할을 한다. 저자들도 Blazar 등이 급성 GVHD를 경감시키면서 생존기간을 연장시키기 위해 사용한 FK506의 용량으로 저자들이 사용한 급성 GVHD 모델에서 유사한 급성 GVHD 경감효과를 확인하였다(20). 즉, 실험에 사용한 FK506은 다른 면역억제제인 CSA에 비하여 경한 GVHD를 보이고 진행을 억제하여 의미있게 생존율을 증가시키는 것을 확인하였다. 그러나 이식 초기에는 중등도의 GVHD를 보였다. 이러한 현상은 아마도 FK506이 초기의 GVHD를 억제하는 능력이 효과적이지 않은 것으로 생각되며 이식 제8일 이후에는 더 이상의 GVHD소견 없이 장기간 생존하는 것으로 볼 때 본 연구에서 시행된 FK506의 용량이 마우스 동종 조혈모세포 이식에서 적용될 수 있는 용량이라고 생각된다. 그러

나 초기 GVHD를 억제할 수 있는 방법이 개발되어야 할 것으로 생각된다. FK506는 다른 면역억제제보다 GVHD에 대하여 보다 효과적으로 면역조절을 일으킬 수 있으며 CSA에 비하여 분자량으로 비교해 볼 때 이론적으로 10~100배 강력할 가능성이 있다고 한다(25).

본 연구에서는 CSA를 저용량으로 투여한 군에서 면역억제제를 투여하지 않은 GVHD 실험군에 비하여 GVHD의 심각도와 진행속도가 의미있게 억제되었으나 이식 제14일에 모두 GVHD와 관련하여 사망하였다. 또한, 고용량의 CSA를 투여한 경우에는 면역억제제를 투여하지 않은 GVHD 실험군과 유사한 임상경과를 보이면서 사망하였다. 이러한 연구의 결과가 나온 이유는 정확히 알 수 없으나 저자들의 GVHD 모델에서는 저용량의 CSA가 고용량의 CSA보다 유용한 것으로 보인다.

본 연구의 결과, 저자들의 GVHD모델에서는 CSA보다 저분자량의 FK506가 GVHD에 대하여 보다 효과적인 면역억제능을 가지고 있음을 관찰하였다. 고용량의 CSA보다 저용량의 CSA이 동종 조혈모세포 이식 후 생존에 보다 좋은 결과를 보였다. 또한, 새로운 면역억제 물질인 DZA가 MHC가 불일치하는 마우스 동종 조혈모세포 이식에서 나타나는 치명적인 GVHD를 조절할 수 있는 새로운 면역억제제로서 사용될 수 있을 것으로 생각한다.

#### 감사의 글

본 연구를 위해 많은 도움을 주신 성모자애병원 임상 의학연구소 이희철, 염미영 연구원에게 감사드립니다.

#### 참 고 문 헌

1. Storb R: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation-yesterday, today, and tomorrow. *Exp Hematol* 31;1-10, 2003
2. Tabbara IA, Zimmerman K, Morgan C, Nahleh Z: Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: complications and results. *Arch Intern Med* 162;1558-1566, 2002
3. Goker H, Haznedaroglu IC, Chao NJ: Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management. *Exp Hematol* 29; 259-277, 2001
4. Ferrara JLM: Cellular and cytokine effectors of acute graft versus host disease. *Int J Hematol* 76(suppl 1);195-198, 2002
5. Basara N, Kiehl MG, Fauser AA: New therapeutic modalities in the treatment of graft-versus-host disease. *Crit Rev Oncol Hematol* 38;129-138, 2001
6. Arai S, Vogelsang GB: Management of graft-versus-host disease. *Blood Rev* 14;190-204, 2000
7. Rovira P, Mascarell L, Truffa-Bachi P: The impact of immunosuppressive drugs on the analysis of T cell activation. *Curr Med Chem* 7;673-692, 2000
8. Tsimberidou A, Giles FJ: TNF- $\alpha$  targeted therapeutic approaches in patients with hematologic malignancies. *Expert Rev Anticancer Ther* 2;277-286, 2002
9. Stockschrader M, Kalhs P, Peters S, Zeller W, Kruger W, Kabisch H, Lechner K, Zander A: Intravenous pentoxifylline failed to prevent transplant-related toxicities in allogeneic bone marrow transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 12;357-362, 1993
10. Kim IK, Aksamit RR, Cantoni GL: Mechanism of the cyto-

static activity of 3-deazaaristeromycin, an inhibitor of adenosylhomocysteine hydrolase. *J Biol Chem* 257;14726-14729, 1982

11. Backlund Jr PS, Carotti D, Cantoni GL: Effects of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors 3-deazaadenosine and 3-deazaaristeromycin on RNA methylation and synthesis. *Eur J Biochem* 160;245-251, 1986
12. Jeong SY, Lee JH, Kim HS, Hong SH, Cheong CH, Kim IK: 3-deazaadenosine analogues inhibit the production of tumour necrosis factor- $\alpha$  in RAW264.7 cells stimulated with lipopolysaccharide. *Immunology* 89;558-562, 1996
13. Jeong SY, Ahn SG, Lee JH, Kim HS, Kim JW, Rhim H, Jeong SW, Kim IK: 3-deazaadenosine, a S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, has dual effects on NF-kappaB regulation. Inhibition of NF-kappaB transcriptional activity and promotion of IkappaBalpha degradation. *J Biol Chem* 274;18981-18988, 1999
14. Flexner CW, Hildreth JE, Kuncl RW, Drachman DB: 3-deaza-adenosine and inhibition of HIV. *Lancet* 339;438, 1992
15. Jurgensen CH, Huber BE, Zimmerman TP, Wolberg G: 3-deazaadenosine inhibits leukocyte adhesion and ICAM-1 biosynthesis in tumor necrosis factor-stimulated human endothelial cells. *J Immunol* 144;653-661, 1990
16. Medzihradsky JL, Zimmerman TP, Wolberg G, Elion GB: Immunosuppressive effects of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitor, 3-deazaadenosine. *J Immunopharmacol* 4;29-41, 1982
17. Kim IK, Li CC, Young HA, Lee JH, Kim HS, Pardhasaradhi K, Garcia GE, Chiang PK: Apoptosis of L1210 leukemia cells induced by 3-Deazaadenosine analogs: differential expression of c-myc, NF-Kappa B and molecular events. *J Biomed Sci* 483-90, 1997
18. Jeong DC, Han CW, Jin JY, Kim DS, Choi IB, Kim WI, Kim HK, Kim CC, Lee BC, Imamura M, Noga SJ: Effectiveness of rotor off fraction in allogeneic murine bone marrow transplantation with complete disparity of major histocompatibility. *Exp Hematol* 27;1219-1225, 1999
19. Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, Brewer J, Delmonte J Jr, Crawford JM, Ferrara JL: An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. *Blood* 88;3230-3239, 1996
20. Blazar BR, Taylor PA, Fitzsimmons WE, Vallera DA: FK506 inhibits graft-versus-host disease and bone marrow graft rejection in murine recipients of MHC disparate donor grafts by interfering with mature peripheral T cell expansion post-transplantation. *J Immunol* 153;1836-1846, 1994
21. Sykes M, Szot GL, Nguyen PL, Pearson DA: Interleukin-12 inhibits murine graft-versus-host disease. *Blood* 86;2429-2438, 1995
22. Jasinski M, Wieckiewicz J, Ruggiero I, Pituch-Noworolska A, Zembala M: Isotype-specific regulation of MHC class II gene expression in human monocytes by exogenous and endogenous tumor necrosis factor. *J Clin Immunol* 15;185-193, 1995
23. Piguet PF, Grau GE, Allet B, Vassalli P: Tumor necrosis factor/cachectin is an effector of skin and gut lesions of the acute phase of graft-vs.-host disease. *J Exp Med* 166;1280-1289, 1987
24. Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M: The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *Cell* 91;243-252, 1997
25. Thomson AW: Interspecies comparison of the immunosuppressive efficacy and safety of FK 506. *Transplant Proc* 22;100-105, 1990