Hyper IgM Syndrome 환자에서 얻은 림프절 및 말초혈액 B세포의 특성

연세대학교 의과대학 소아과학교실, 병리학교실*, 미생물학교실†, 충남대학교 의과대학 미생물학교실‡

김동수 · 신경미 · 양우익* · 신전수† · 송창화‡ · 조은경‡

Characterization of B Cells of Lymph Nodes and Peripheral Blood in a Patient with Hyper IgM Syndrome

Dong Soo Kim, M.D., Kyuong Mi Shin, M.D., Woo Ick Yang, M.D.*, Jeon-Soo Shin, M.D.† Chang Hwa Song, M.D.‡ and Eun Kyeong Jo, M.D.‡

Department of Pediatrics, Pathology, and Microbiology†, Yonsei University College of Medicine, Seoul, and Department of Microbiology‡, College of Medicine, Chungnam National University, Daejon, Korea*

Purpose : Hyper IgM syndrome(HIGM) is characterized by severe recurrent bacterial infections with decreased serum levels of IgG, IgA, and IgE but elevated IgM levels. Recently, it has been classified into three groups; HIGM1, HIGM2 and a rare form of HIGM. HIGM1 is a X-linked form of HIGM and has now been identified as a T-cell deficiency in which mutations occur in the gene that encodes the CD40 ligand molecule. HIGM2 is an autosomal recessive form of HIGM. Molecular studies have shown that the mutation of HIGM2 is in the gene that encodes activation-induced cytidine deaminase(AID). Recently, another rare form of X-linked HIGM syndrome associated with hypohydrotic ectodermal dysplasia has been identified. We encountered a patient with a varient form of HIGM2. To clarify the cause of this form of HIGM, we evaluated the peripheral B cells of this patient.

Methods : The lymphocytes of the patient were prepared from peripheral blood. B cells were immortalized with the infection of EBV. Cell cycle analysis was done with the immortalized B cells of the patient. Peripheral mononuclear cells were stained with monoclonal anti-CD40L antibody. Total RNA was extracted from the peripheral mononuclear cells. After RT-PCR, direct sequencing for CD40L gene and HuAID gene were done. Immunostainings of a lymph node for CD3, CD23, CD40, Fas-L, bcl-2, BAX were done.

Results : The peripheral B cells of this patient showed normal expression of CD40L molecule and normal sequencing of CD40L gene, and also normal sequencing of AID gene. Interestingly, the peripheral B cells of this patient showed a decreased population of G2/mitosis phase in cell cycles which recovered to normal with the stimulation of IL-4.

Conclusion : We suspect that the cause of increased serum IgM in this patient may be from a decrease of G2/mitosis phase of the peripheral B cells, which may be from the decreased production or secretion of IL-4. Therefore, this may be a new form of HIGM. **(J Korean Pediatr Soc 2003;46: 128-136)**

Key Words : Hyper IgM Syndrome, CD40L, AID, Cell Cycle

서 론

Hyper IgM syndrome(HIGM)은 혈중에 IgM이 증가하여있으면서 다른 면역글로블린인 IgM, IgA, IgE는 정상이거나 또는 감소한 양상을 보이는 선천성 면역결핍 증후군으로 하나의 병이

본 연구는 2000년도 김명선 기념재단 연구비에 의하여 이루어졌음.
접수 : 2002년 9월 11일, 승인 : 2002년 11월 1일
책임저자 : 김동수, 연세대학교 의과대학 소아과학교실
Tel : 02)361-5524 Fax : 02)393-9118
E-mail : dskim6634@yumc.yonsei.yonsei.ac.kr

라기보다는 이러한 소견을 보이는 다양한 질병의 한 그룹으로 여겨지고 있다[1]. 현재 그 유전형은 상염색체성 열성, X-linked 형태 또는 후천적으로 다양한 양태를 보이고 있다[2-6], 일반적으로 X-linked 형태가 전형적인 것으로 알려져 있고 또 가장 잘 설명되고 있으며 증상으로는 어렸을 때부터 반복적인 감염이 있으면서 중성구 감소증과 기회감염이 증가하는 소견을 보인다. 그러나 이러한 임상적인 양상이나 검사소견을 가지고 다양한 형태의 HIGM을 구별하기란 매우 어렵다. 게다가 가족력을 가지고 X-linked hyper IgM syndrome을 구별하기란 어려운 것이 이러한 질환의 반수 이상의 경우에서 가족 중 새로운 돌연변이로 처음 나타나기 때문이다.

과거에는 X-linked hyper IgM syndrome을 B세포의 이상으로 여겨졌으나 최근 들어 이 질환의 원인이 B세포에 있다기보다는 T세포에서 발현되는 CD40 ligand(CD40L) 유전자의 돌연변이로 인하여 초래되는 것이라고 알려졌다[7-11]. CD40L은 처음에는 gp39라고도 하였는데 tumor necrosis factor와 nerve growth factor와 homology를 갖는 Type II transmembrane protein이다[12, 13]. CD40L는 활성화된 T세포의 표면에 발현되는 단백질로 그 기능은 특별히 B세포의 성장과 분화에 관여한다[14, 15]. 말하자면 B세포의 CD40과 결합하는데, CD40은 growth factor receptor들, 즉 CD27, CD30, Fas, TNF receptor, nerve growth factor receptor와 같은 family이며 이들은 homology를 보인다[16, 17]. 이러한 B세포 표면의 CD40이 CD40L와 결합을 하거나 또는 CD40L와 결합을 하거나 또는 CD40항체로 자극을 받는 경우 B세포는 활성화되기 시작하고 장단기 증식이 일어나며 apoptosis로부터 B세포를 보호하게 해주고 이어서 싸이토카인의 존재 하에 isotype switching이 일어나게 된다[18-21]. 그러므로 T세포 표면에 CD40L의 돌연변이는 B세포로 하여금 활성화되어 immunoglobulin isotype switching을 자극하지 못하므로 B세포는 주로 IgM만 분비하게 되어 본 질환이 발생하는 것으로 알려져 있다.

앞서 지적한 것과 마찬가지로 HIGM은 다양한 질병의 그룹이다. X-linked hyper IgM syndrome과는 다르게 다른 한 그룹은 T세포의 CD40L 표면이 정상이면서 상염색체성 열성으로 유전되는 경우가 있는데 이들은 T세포에 의한 B세포의 자극은 정상이지만 비정상적인 CD40 mediated B cell 활성화 과정으로 인하여 초래되는 것으로 알려져 있다[22]. 이들은 다시 세 경우로 나눌 수 있는데 PI3 kinase, NF-kB, AP-1과 같은 전사인자의 유발이 정상인 경우, PI3 kinase에는 문제가 있고 다른 두 전사인자는 정상인 경우, 그리고 세 가지에 모두 문제가 있는 경우로 나눌 수 있다고 하였다[23].

최근에 들어서 이러한 HIGM을 크게 세 부류로 나누는데[24] 먼저 기술한대로 CD40L 분자의 돌연변이로 초래되며 X-linked로 유전되는 형태를 HIGM1이라고 하고, 상염색체성 열성 형태로 유전되면서[25, 26] T세포 표면에 CD40L는 정상적으로 표현되며, B세포 표면에는 CD40가 정상적으로 표현되는 형태로 최근 activation-induced cytidine deaminase(AID) 유전자에 이상 때문에 오는 경우[27]를 HIGM2로 분류하고 있다. 다른 한 부류는 최근에 기술된 것으로 X-linked HIGM 증후군의 매우 드문 형태로서 발한 저하성 외배엽 이형성증(hypohydrotic ectodermal dysplasia)이 동반된 경우이다. 이 경우는 외배엽의 이형성으로 초래되는 머리카락, 치아, 및 땀샘이 없거나 드문 것이 특징이다[28]. 이 질환은 전사인자인 nuclear factor κB의 활성화에 관여하는 nuclear factor κB essential modulator를 coding 하는 유전자의 돌연변이 때문에 오는 것으로 알려져 있다.

연구자들은 HIGM2에 해당되는 것으로 생각되는 환자의 말초혈액 B림프구를 통해서 기존에 보고되어진 형태와 임상적으로는 비슷하지만, 기전 면에서는 다른 양상을 보이는 환자의 B 세포에 관한 연구를 실시하여 기존에 보고된 HIGM과의 차이점을 알아보기 위하여 본 연구를 시행하였다.

대상 및 방법

1. 환자의 병력

6세 남아가 만성적인 기침과 3일간의 고열을 주소로 응급실로 내원 하였다. 환아는 생후 1세경부터 지속적인 호흡기 감염을 주소로 인근 병원에서 치료받아왔으며 최근 한달 전부터는 기침이 급격하게 심해지면서 3일 전부터 고열이 발생하였다. 남자 동생을 포함한 가족에는 특별한 병력이 없었다. 입원당시 말초혈액에서 WBC 17,910(poly 84%, lympho 6%, Mono 8%) 혈소판 228,000/mL였다. ESR과 CRP는 각각 36 mm/hr와 10.0 mg/mL로 증가되어 있었고 IgG/A/M/E는 1,130/30/684/10 mg/mL로 IgG는 정상이지만 현저하게 IgM이 증가하였다. 말초 혈액 단핵구는 CD3세포가 80%, CD19세포가 15%였다. T세포의 기능을 보기 위하여 PHA와 Con A stimulation test를 시행한 결과 정상을 보였다. 환자는 폐렴의 진단 하에 45일간의 입원치료를 하고 퇴원하였다. 두 달 후 환아는 다시 양측 폐에 폐렴 및 농흉의 진단 하에 입원하였으며 이때 혈액과 농흉 삼출액에서 *H. influenzae* b가 배양되었다. 다시 시행한 IgG/A/M에서는 638/32/516 mg/dL로 여전히 IgM이 증가되어 있는 소견을 보였다. 7개월 후 환자는 다시 폐렴 및 우측 경부에 심한 림프절 병변을 주소로 입원하여 폐렴이 치료 된 후에 림프절 조직생검을 시행하고 퇴원하였다. 환자는 HIGM으로 진단을 받은 후 현재 매 4주 간격으로 지속적인 IVIG를 투여 받고 있으며, 전신상태는 양호하고 간간히 호흡기에 감염이 있지만 비교적 잘 지내고 있다.

1) 림프구 분리

헤파린 처리한 환아 및 정상아동의 말초혈액 5 mL를 RPMI 1640으로 2배 희석한 후 Lymphoprep(Nyegaard, Oslo, Norway)용액 3 mL 위에 중첩한 다음 2,000 rpm에서 20분간 density gradient법으로 원심분리하여 말초혈액 단핵세포를 분리하였다. 분리한 세포는 RPMI 1640(Sigma Co, St. Louis, MO,

USA)으로 2회 세척한 후 hemocytometer로 세포수를 세었다. 총 1×10^5 세포를 단클론항체로 염색한 후 flow cytometry를 이용하여 표면 표식자를 분석하였다.

2) B cell clone 형성

(1) Ebstein-Barr virus(EBV) 함유 배양 상청액의 준비

1×10^6/mL의 B95-8세포를 37℃, 5% CO_2 배양기에서 3일간 배양하면서 90% 이상의 생존률을 유지하였다. 이것을 4℃, 300×g에서 10분간 원심분리하여 EBV가 함유된 상청액을 취하여 0.45 μm filter로 여과한 후 -130℃에 저장해 놓았다. 이렇게 얻은 상청액에는 1 mL당 10^2-10^3 transforming unit를 함유하게 되었다.

(2) Immortalization을 하려는 target cells의 준비

환자 및 정상아동의 혈액을 PBS에 1:2로 희석하였다. Cornical tube(50 mL)에 12 mL의 희석된 혈액을 동량의 Ficoll-Hypaque 위에 조심스럽게 얹은 다음 실온에서 1,500×g로 8분간 원심분리한 후 buffy coat를 얻어서 50 mL cornical tube에 넣었다. 여기에 PBS를 가득 채우고 실온에서 15 분간 300×g로 원심분리 하였다. 여기서 상청액을 취하여 버린 후 세포를 다시 HBSS(Sigma Co, St. Louis, MO, USA)로 부유시킨 다음, 실온에서 300×g로 10분간 다시 원심분리하고 상청액을 취하여 버렸다. 이것을 반복하여 실시하고 2-5 mL의 complete RPMI-10(Sigma Co, St. Louis, MO, USA)에 다시 부유시키고 세포수를 세어보았다.

(3) B세포의 감염 및 감염된 B세포의 배양

환자 및 정상아동에서 얻은 10^7개의 단핵구를 2.5 mL의 complete RPMI-10에 부유시키고 (1)에서 얻은 EBV 함유 배양 상청액 2.5 mL을 첨가한 후 37℃ 수조에서 2시간 동안 방치하였다. 여기에 11 μg/mL의 cyclosporin A가 함유된 complete RPMI-10을 5 mL 첨가한 후, 10 mL의 세포부유액을 취하여 25 cm^2 tissue culture flask에 넣어 37℃, 5% CO_2 배양기에 3주간 배양하였다. 배양 3주 후에 세포를 잘 섞고 phase-contrast microscopy로 세포를 관찰하여 large, clear, 때때로 hairy하며 다양한 크기의 tight clumps를 형성하는 경향을 보이면 .EBV에 의하여 B세포가 immortalization된 것으로 생각하였다. 이렇게 형성된 clone을 가지고 CD5와 CD19로 이중염색을 하여 clone을 찾아 20% 우태아혈청이 함유된 RPMI-1640 배지에서 37℃, 5% CO_2 배양기에 세포를 유지하였다.

3) B cell의 염색

사용된 단세포군 항체는 Becton-Dickinson Monoclonal Center(San Jose, CA, USA)사의 제품으로 fluorescein(FITC)나 phycoerythrin(PE)이 conjugation된 anti-Leu-12(CD19), anti-Leu-3a(CD4), anti-Leu-2a(CD8), anti-kappa, 및 anti-lamda를 사용하였다. 배양된 세포액 100 μL에 100 μL의 FITC conjugated anti-Leu 1(CD5), PE conjugated anti-Leu12(CD19), FITC conjugated anti-Leu 3a(CD4), PE conjugated anti- Leu 2a(CD8) 단세포군 항체와 음성 대조군으로 PBS를 첨가하고 30분 동안 4℃ 암소에 방치하였다. 적혈구는 lysing reagent를 사용하여 용혈시키고 원심분리하여 상청액을 버렸다. 남아있는 세포를 2% 우혈청 알부민이 함유된 0.01 M PBS 3 mL를 넣고 부유액을 다시 만들었다. 이 용액을 원심분리하여 상청액을 버리고 남아있는 세포를 1% paraformaldehyde가 함유된 PBS용액 0.3 mL를 넣고 flow cytometer (FACStar, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

4) B세포의 IgM 또는 IgG 염색

클론이 형성된 환자의 B세포가 IgM 분비세포인지 또는 IgG 분비 세포인지 알아보기 위하여 배양된 세포를 cytospin으로 얻어서 slide에 부착하였다. 부착한 slide의 세포를 PBS로 3회 세척하였다. 공기에서 잘 말린 후 fluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated goat anti-human IgG 및 anti-human IgM으로 염색하였다. 여기서 conjugate는 1% 우혈청 알부민이 함유된 PBS로 1:50 희석하여 사용하였다. 이것을 다시 PBS로 잘 씻고 말린 후 5분간 Evan's blue로 배양하였다. 이것을 다시 PBS로 세척하여 말린 후 glycerin으로 mounting하여 Leiz Dialux 20 fluorescence microscope으로 관찰하였다.

5) 세포 주기 분석(Cell cycle analysis)

2)의 (3) 방법대로 준비한 세포를 PBS로 1,300 rpm에서 10분간 2회 세척한 후 100% ethanol을 2.5배 가하여 -80℃에서 30 분간 빠르게 고정하였다. 이후 원심분리하여 PBS로 2회 세척한 후 CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)을 이용하여 염색하였다. 방법을 간단히 설명하면, 용액 A(trypsin buffer)를 고정된 세포에 가하고 부드럽게 섞어준 후, 상온에서 10분간 방치하였다. 다음 용액 B(trypsin inhibitor 및 RNase buffer) 200 μL를 첨가하고 부드럽게 섞어준 후 상온에서 10분간 방치하였다. 여기에 차가운 용액 C(propidium iodide stain solution)를 200 μL 첨가하고 암실에서 10분간 4℃에 반응 시켰다. 반응이 끝난 샘플을 세포 여과용 체에 조심스럽게 여과하여 FACScalibur의 Cell Quest program을 이용하여 cell cycle을 분석하였다.

6) 환자의 말초혈액을 이용한 T세포의 CD40L의 immunophenotyping 및 gene sequencing

환자의 말초혈액에서 Ficoll-Hypaque gradient centrifugation을 통해 단핵구를 얻은 후 phobol 12-myristate 13-acetate (10 ng/mL)(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)와 ionomycin(400 ng/mL)(Calbiochem-Novabiochem Corp., La Jolla, CA)과 함께 8시간 배양하였다. T세포 표면에서 CD40L의 표현을 보기 위하여 anti-CD40L 단세포군 항체 5c8(mouse IgG2a, Biogen, Cambrigde, MA)을 사용하여 염색하였다. CD40L 유전자의 돌연변이를 조사하기 위하여 말초혈액에서 total RNA 및 genomic DNA를 추출하고 RT-PCR을 시행하였다. 이때 사용된 nucleotide sequence는 5′-GCCAGAAGATACCATTTCA-AC-3′(forward) 5′-CCGCTGTGCTGTATTATGAA-3′(back-

ward)였다. 반응조건은 93℃, 1분에서 30 cycle denaturation, 55℃, 1분에서 annealing, 72℃, 2분에서 extension을 시행한 후에 PCR 산물은 전기영동으로 분리하고 정제하고 direct sequencing을 실시하였다.

7) *HuAID* gene의 sequencing

Thermal Cycler 9700(Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA), primers, Taq High Fidelity(Roche Diagnostic, Mannheim, Germany)를 사용하여 다섯개의 *HuAID* exon을 증폭하였다. 이때 사용된 primers는 exon 1 : 5′-CATTAATTGAAGTGAGATTTTTCTGG-3′(forward) 5′-A GCATTTGTGTGGAAAACTCTGG-3′(reverse)(94℃에서 1 분간 1 cycle, 94℃에서 30초간, 54℃에서 1분간, 68℃에서 6분간 40 cycle), exon 2 : 5′-GAGTTTGAGG TACAAGTTGGACAC-3′(forward) 5′-ACAAGCTGATAATATTCTCCCCAT-3′(reverse)(94℃에서 1분간 1cycle, 94℃에서 30초간, 54℃에서 1분간, 72℃에서 1분간 40 cycle), exon 3, 4, 5 : 5′-TATCTCCTCTCTCCTAACACGCT-3′(forward) 5′-GATCTCTCATTAG GAG GTCC-3′(reverse)(94℃에서 1분간 1cycle, 94℃에서 30초간, 54℃에서 1분간, 72℃에서 6분간 40 cycle)였다. PCR 산물은 전기영동으로 분리하고 정제하고 dRhodamine dye terminator cycle sequencing kit(ABI prism, Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)로 sequence한 후 ABI prism 377 genetic analyzer(Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA)로 분석하였다.

8) 림프조직의 조직학적 소견 및 immunostaining 소견

포르말린 고정 파라핀 포매조직에서 대표적인 절편을 선택하여 4 ㎛ 두께로 박절한 후 건조, 탈파라핀, 함수과정을 거친 후 하원성을 회복하기 위하여 구연산완충액(pH 6.0)에 담가 압력 용기로 극초단파에서 20분간 끓인 후 labelled streptavidin biotin 방법(LSAB kit, Dako, Glostrup, Denmark)으로 면역염색을 시행하였고 발색제로는 3, 3-diaminobenzidine을 사용하였다. 일차항체로는 CD3(polyclonal, Dako 희석비율 1 : 50), L26(Dako, 희석비율 1 : 50), Fas(polyclonal, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, 희석비율 1 : 100), Fas-L(polyclonal, Santa Cruz, 희석비율 1 : 200), CD40(polyclonal, Santa Cruz, 희석비율 1 : 100), bcl-2(Dako 희석비율 1 : 50), bax(polyclonal, Dako 희석비율 1 : 200), CD23(Dako 희석비율 1 : 50)를 사용하였다.

결 과

1. 환자에서 얻은 림프절 소견

림프절은 냉동 절편 소견에서 Hodgkin's lymphoma가 의심될 정도의 심한 여포(germinal center)의 증식을 보이는 반응성 여포증식의 소견을 보였다. 증식된 여포는 크기와 모양이 다양하고, 다양한 크기의 림프구와 탐식조직구로 구성되어 있었으며 극성(polarity)이 존재하였다. 여포 주위의 외투층은 뚜렷하지 않았

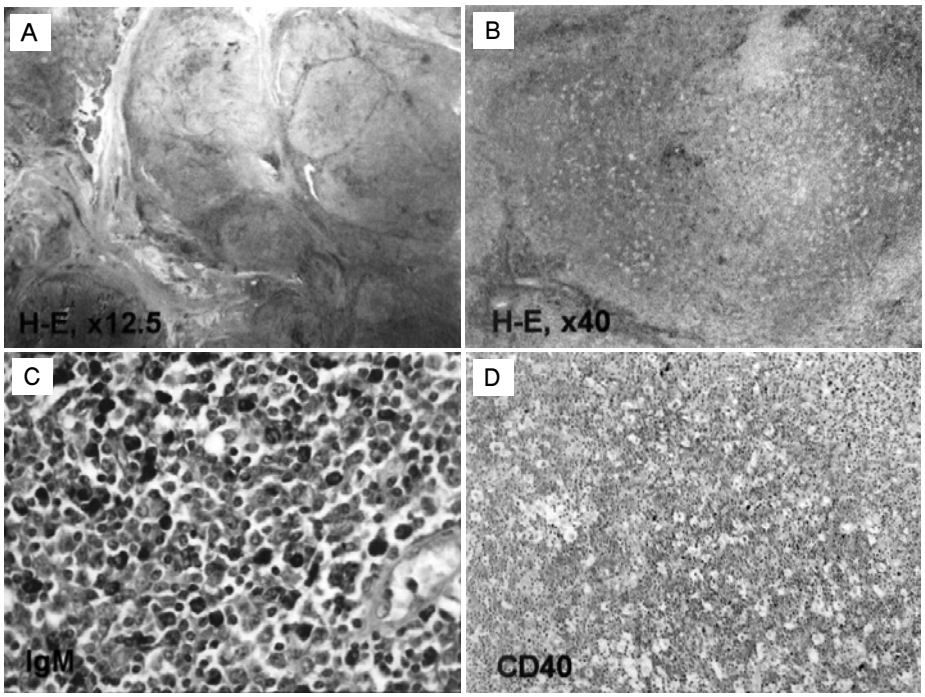

Fig. 1. Histology of a lymph node. Follicular hyperplasia of the lymph node(A) is apparent. The T-cell area in the follicle(B) can be seen. Plasma cells in the follicle are composed mainly of IgM producing cells(C). CD40 expression of the B cells is normal(D).

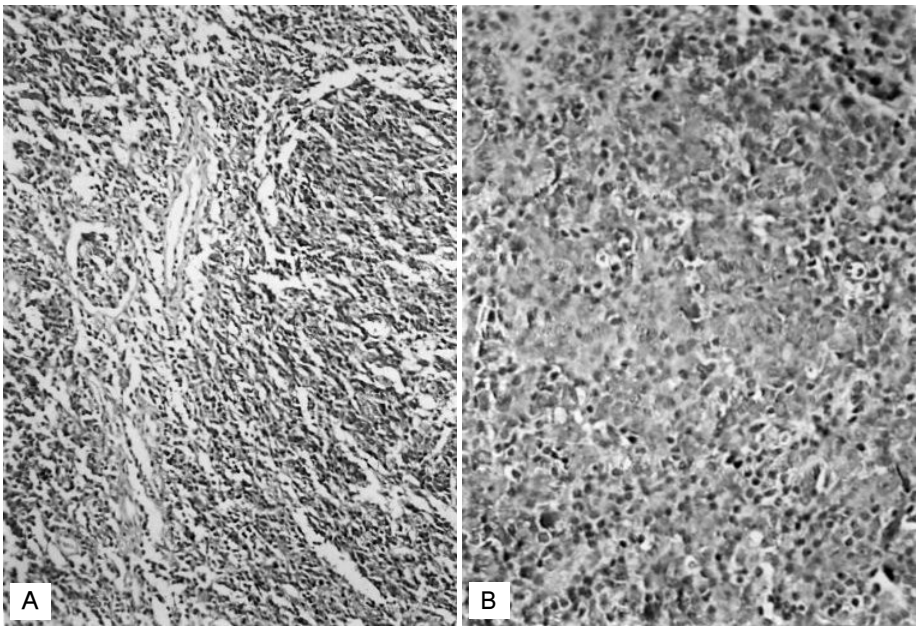

Fig. 2. Folliclular cells in lymph node expressed Fas(A, ×12.5) and BAX(B, ×40).

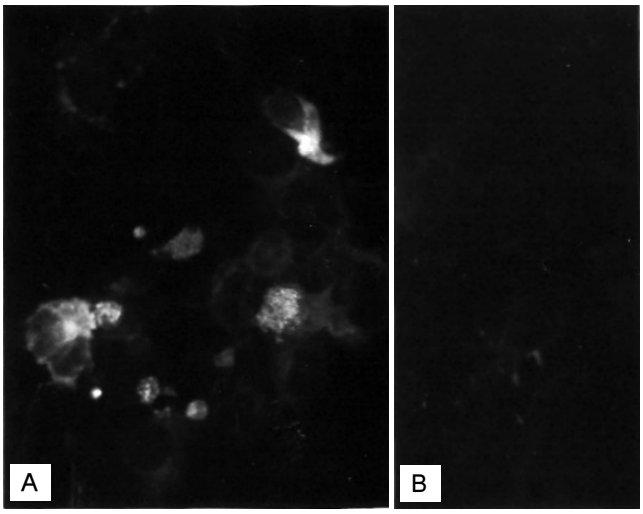

Fig. 3. Immunofluorescent staining of B cells immortalized with EB virus are mainly surface IgM bearing B cells(A : IgM, B : IgG).

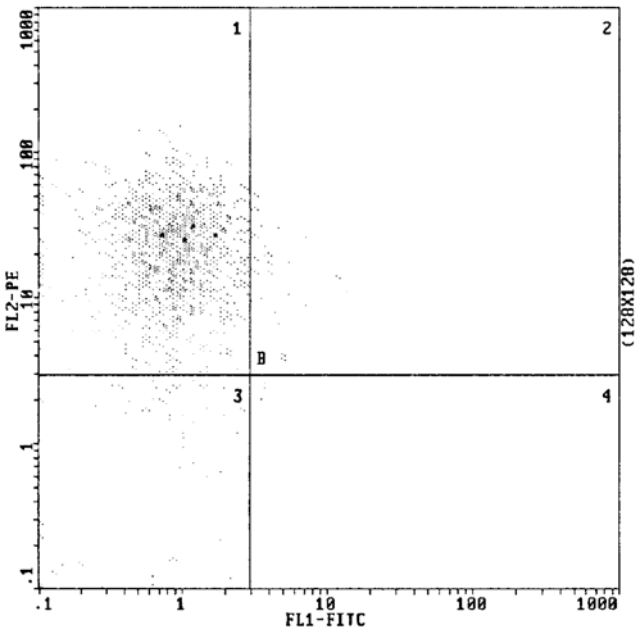

Fig. 4. Light chain seen here are mainly kappa chain(x : kappa, y : lamda).

으나 부위에 따라서는 단구양 B-세포의 증식이 여포 주위로 관찰되었다. 여포 사이에는 뚜렷한 T-세포 구역이 존재하였다. 여포와 단구양 증식은 B-세포 표시인자인 L26에 양성을 보였고 여포 사이의 T-구역은 CD3에 양성을 보였다. 수질에 존재하는 대부분의 형질세포는 IgM에 양성을 보였고 IgG에 양성을 보이는 형질세포는 소수 관찰되지 않았다. 물론 IgE 양성 B 세포도 발견할 수 없었다(Fig. 1). 또한 증식된 여포는 CD40, Fas, BAX에 양성반응을 보이고, bcl-2와 Fas-L에 음성반응을 보이고 여포 내에서는 CD23에 양성인 그물모양의 여포수지세포가 관찰되어 전형적인 반응성 여포의 면역 표현형을 보이며 apoptosis는 정상적으로 일어나는 것을 보였다(Fig. 2).

2. 환자의 말초혈액 B 림프구 소견

환자의 말초혈액 B 림프구를 EB virus로 immortalization을 시도한 결과, 얻어진 B세포는 IgM bearing B 세포(Fig. 3)이며 light chain은 kappa chain으로 되어 있는 것을 알 수가 있었다(Fig. 4). 이 세포의 특징으로는 전혀 세포가 증식하지 않는 상

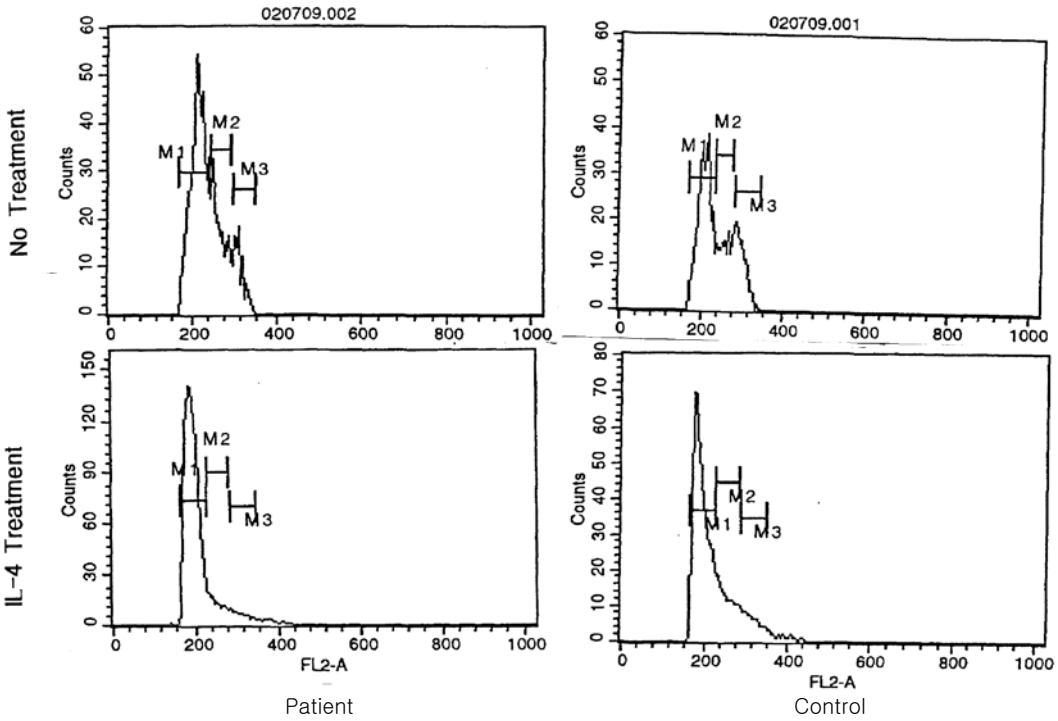

Fig. 5. Cell cycle analysis of B cells immortalized with EB virus. G2/mitosis phase(M3 in figure) of the patient's B cells are definitely decreased(8.5%) compared to that of control B cells(17.9%). After stimulation with IL-4, the cell cycle of the patient's B cells recovered to that of control B cells. counted cells : 1×105.

태에서 사멸해 가는 것을 확인할 수가 있었다. 이 세포를 이용하여 세포 주기를 분석한 결과 정상(17.9%)에 비하여 G2/mitosis phase(M3 in figure)가 현저하게 감소(8.5%)되어 있는 양상을 보여주고 있으며, IL-4로 자극한 경우에는 정상인에서 보여주는 양상으로 회복되는 양상을 볼 수 있었다(Fig. 5).

3. 환자의 말초혈액 단핵구의 CD40L의 immunophenotyping 및 gene sequencing

환자의 말초혈액 단핵구에서 CD40L의 표현은 정상이었고 CD40L 유전자에도 돌연변이는 발견할 수 없었다(data not shown).

4. *HuAID* gene의 sequencing

HuAID 유전자에도 돌연 변이를 발견할 수 없었다(data not shown).

고 찰

서론에서 기술한대로 최근에 들어서 HIGM을 크게 세 부류로 나누는데 CD40 ligand 분자의 돌연변이로 초래되며 X-linked로 유전되는 형태를 HIGM1이라고 하고, 상염색체성 열성 형태로 유전되면서[25, 26] T세포 표면에 CD40L는 정상적으로 표현되며, B세포 표면에는 CD40가 정상적으로 표현되는 형태[27]를 HIGM2로 분류하고 있다. HIGM1의 유전자적인 변이는 서론에 이미 기술한데로 CD40L의 돌연변이로 알려졌지만 HIGM2에 대하여는 아주 최근에 들어와서 activation-induced cytidine deaminase(AID) 유전자에 돌연변이로 인하여 초래된다는 것이 밝혀졌다[26].

임상적으로도 HIGM2는 HIGM1과는 달리 *P. carinii*에 의한 기회감염의 빈도가 적고 또 자가면역성혈액질환도 잘 발생하지 않는 것으로 알려져 있다[29, 30]. 또한 HIGM2의 특징은 림프양 증식과 선병증인데, HIGM1과 달리 림프 조직, 특히 편도선, 비장, 그리고 림프선 등의 현저한 비대를 보인다. 배중심이 없는 림프절이 특징적인 소견을 보이는 HIGM1과는 달리 HIGM2에서는 배중심이 매우 크고 고도로 증식하고 있는 B세포를 보이는 것이 특징이다[31]. 말초 B세포는 모두 sIgM과 sIgD를 표현하고 있으며, T림프구의 수와 항원에 의한 증식능력은 정상을 보인다. 이 경우에서 면역글로블린의 class switching에 이상 뿐만 아니라, CD19+CD27+B세포의 V-region에 memory B세포에서 특징적으로 관찰되는 체세포성 돌연변이가 관찰되지 않는다는 것이다.

AID 유전자의 돌연변이가 이러한 면역글로블린의 class switch와 체세포성 돌연변이에 관여하는 기능에 관하여는 아직 잘 알려져 있지는 않다. 그럼에도 불구하고, AID는 B세포의 terminal differentiation과 항체생산 과정에 있어서 중요한 몇몇

과정에 관여하고 있는 것으로 알려져 있다. 사실 AID 유전자 산물은 mRNA editing enzyme인 APOBEC-1과 같기 때문에, mRNA의 수정(modification) 자체가 B세포의 성숙과정 중 마지막 단계에서 중요한 역할을 할 수 있을 것으로 추측하고 있다[32]. 다른 한 부류는 최근에 기술된 것으로 X-linked HIGM 증후군의 매우 드문 형태로서 발한저하성 외배엽 이형성증(hypohydrotic ectodermal dysplasia)이 동반된 경우이다. 이 경우는 외배엽의 이형성으로 초래되는 머리카락, 치아, 및 땀샘이 없거나 드문 것이 특징이다[28]. 또한 HIGM1에서 볼 수 있는 것과 같은 기회감염의 병력이 없다. 이 질환은 전사 인자인 nuclear factor κB의 활성화에 관여하는 nuclear factor κB essential modulator를 coding하는 유전자의 돌연변이 때문에 오는 것으로 알려져 있다.

본 환자를 진단하는데 있어서 연구자들은 이미 알려져 있는 대로 먼저 HIGM1에 대한 조사를 하였다. CD40L와 CD40의 세포 표면에서의 발현을 조사하였는데 정상적인 발현을 보였으며, 발현 소견 뿐만 아니라 실제로 CD40L와 CD40의 sequence를 분석한 결과 돌연변이 부위는 전혀 발견할 수 없었다. 게다가 이 환자의 남동생은 전혀 정상이었기 때문에 X-linked HIGM인 HIGM1이 아닌 경우임을 확실히 할 수 있었다.

두번째로 환자에서 관찰된 조직 소견은 HIGM1에서는 림프절 내에 여포가 발달되어 있지 않는 소견과는 달리 HIGM2에서 보이는 특징적인 병리학적 소견을 볼 수 있었다. 이 소견과 함께 환자의 남동생이 전혀 면역학적으로 이상이 없는 추가적인 소견으로 보아 HIGM1이라기 보다는 HIGM2일 가능성이 많은 것과 일치하는 소견이었다. 그러나 AID유전자의 소견을 조사한 결과, 전혀 정상적인 소견을 보여서 이 경우도 진단에서 제외하였다.

세번째로, 저자들은 본 환자가 lymphoproliferatice syndrome (ALPS)[33]을 의심하였다. 연구자가 이 질환을 ALPS로 생각한 것은 첫째로 경부 림프절이 전혀 적어지지 않고 5년 이상 계속되고 있는 점, 두번째로는 말초 혈액배양세포의 배양속도가 느린 점으로 추정하기는 IgM bearing B 세포의 apoptosis 장애가 본 환자의 주요 면역병리 기전이 아닌가 생각되며 IgM bearing B 세포의 apoptosis 장애로 B세포에서는 IgM만 분비하고 다른 면역글로블린 분비는 비정상적인 소견을 보이기 때문에 환자와 같은 소견이 생긴 것이 아닌가 생각하게 되었다.

잘 알려져 있는 것처럼 B 세포의 특징은 CD40과 Fas receptor의 이중 표현이 특징인 세포이다. CD40의 기능은 기존에 알려져 있는 것처럼 B세포를 활성화시키기 시작하고 장단기 증식이 일어나게 하며 apoptosis로부터 B세포를 보호하게 해주고 이어서 싸이토카인의 존재하에 isotype switching이 일어나게 하는 역할을 한다[18-21]. 반대로 Fas 수용체와 결합함으로 인하여 FADD를 활성화시키고 이어서 caspase를 활성화 시킴으로 proteolysis, DNA fragmentation에 이어 세포 괴사를 일으키는 apoptosis에 관여하는 기능을 가지고 있다[33]. 결국 mature B cell에 있는 이와 같은 수용체는 이들의 상반된 기능의 역동학적인 균형을 통하여 B세포의 선별, 성숙, 항상성에 중요한 역할을 한다.

그러나 최근 들어서 CD40의 기능은 B세포에서의 기능과는 달리 오히려 apoptosis를 증가시키는 역할이 보고되기 시작하였다. CD40은 앞서도 지적한 것처럼 TNF receptor family에 속하는 데 이들에 속한 것은 TNF-R1, TNF-R2, Fas/APO-1, CD27, CD30, LT-βR, TRAIL receptor 1, 2, 3, 4 등이 있다[33]. 이들은 다시 크게 두 군으로 나눌 수 있는데 특히 CD40은 TNF-R-associated fator(TRAFs)라고 불리는 단백과 결합하며 CD40의 PXQXT motif와 결합하는 것으로 알려져 있다[34]. 특히 B세포에서와는 달리 간엽 세포와 상피 세포에 CD40을 transfection시켜 CD40의 기능을 조사한 보고를 보면 오히려 사멸신호를 전달하는 것으로 알려져 있다[35]. Grell 등[36]에 의하면 이러한 CD40에 의한 apoptosis의 증가는 세포내의 endogenous TNF 생성을 증가시키고 이어서 TNF-R1의 antotropic 또는 paratropic production을 증가시키고, 아울러 CD40는 TNF-R2의 자극과 상승적으로 작용하여 TNF-R1-induced cytotoxicity를 촉진시킨다고 하였다.

물론 B세포에서의 CD40의 역할은 항상 일정한 것이 아니어서 마우스를 이용한 연구에 의하면 약간의 다른 소견들이 관찰된다. Hirose의 보고[37]에 의하면 전신성 홍반성 낭창-prone (NZB×NZB)F1 마우스에서 자가 항체생성 B 세포를 보면 특히 어린 마우스에서 B세포는 Fas 표현이 거의 되지 않고 있다. 그러나 이들 세포를 Fas 표현이 상승되게 하기 위하여 CD40 단세포항체로 자극하였을 때 두 가지 세포로 나눌 수가 있다고 하였다.

하나는 Fas 표현이 증가되어 있으며 apoptosis가 증가된 세포와 반대로 Fas 표현이 감소되어 있으며 apoptosis가 감소된 세포였다. 그러나 나이가 들어 전신성 홍반성 루푸스가 생긴 마우스를 가지고 실험하였을 때는 모든 B세포가 Fas 표현이 감소되어 있으며 apoptosis가 감소된 세포였다고 하였다. 이러한 소견을 사람의 B세포에 그대로 적용할 수는 없지만 B세포 자체도 다양한 집단으로 되어있을 가능성을 암시하고 있다. 이러한 소견은 사람의 암세포에서도 관찰할 수가 있는데 Wang 등[38]에 의하면 CD40으로 활성화 시킨 림프종 세포는 CD95-mediated apoptosis에 매우 민감하다고 보고하였다. 또 Wallen-Ohman 등[39]에 의하면 promyelocytic cell line으로 연구한 결과는 CD40의 활성화는 anti-MHC I-induced apoptosis에 민감해 진다고 보고하였다. 결국 이들의 연구를 종합해 보면 CD40의 자극은 일반적으로 B세포의 apoptosis로부터 보호하는 역할을 가지고 있지만 어떠한 자가항체를 발현하는 B세포라든지 또는 악성종양세포로 전환된 경우에는 일반적인 B세포의 성질이 달라질 수 있다고 할 수 있다.

그러나 세번째로 생각한 질환에도 타당하지 않은 것이 전신의 림프절을 일으키는 증상으로는 앞서 지적한대로 ALPS가 대표적인 질환이지만 이 환자의 말초혈액 소견은 ALPS에서 관찰되

는 double negative T cell(CD3+CD4−CD8−)(data not shown)의 증가가 전혀 관찰되지 않는다는 점이다. 또한 환자의 림프절 조직으로 염색한 apoptosis에 관한 연구에 의하면 정상적인 소견을 관찰할 수 있었기 때문에 ALPS는 확실하게 진단에서 제외할 수 있었다.

최근 들어 B세포의 세포분열 주기와 면역글로블린의 class switching에 관계되는 연구가 있었다[40]. 연구자에 의하면 마우스에서 B세포를 분리하고 배양하면서 세포의 분열회수를 측정하였는데 배양 5일째가 되면서 8회 이상의 분열이 관찰되었고, 이러한 B세포의 분열이 거듭될수록 분비되는 면역글로블린은 IgM에서 IgG1과 IgE로 switching이 일어나는 것을 관찰할 수 있다고 하였다. 이러한 연구결과에 의하면 본 환자에서 항원의 자극에 의하여 주로 IgM만 분비하는 이유는 환자의 B세포가 어떤 이유에서인지 세포주기의 정지 때문에 생긴 것임을 알 수 있었다. 다시 말해서 환자의 B세포는 세포 주기가 원활하게 돌아가지 못하므로 인하여 IgM을 분비하는 B세포가 IgG를 분비하는 세포로 분화해 가지 못하기 때문에 발생하는 HIGM임을 알 수 있었다. 흥미 있는 사실은 이 세포에 IL-4를 투여하였을 때 정상인에서 보여주는 cell cycle양상을 보여주는데 그렇다면 이 환자의 면역학적인 결함은 아마도 IL-4의 분비 이상 때문에 초래된 질환이 아닌가 생각된다. 이 부분에 대하여는 환자에서 IL-4 유전자의 어떤 돌연변이가 있는지, 아니면 IL-4의 분비기전에 문제가 있는지를 더 조사해 보아야 할 것으로 생각된다.

결론적으로 이 환자는 임상적으로는 HIGM2에 해당하지만 AID 유전자의 돌연변이를 연구한 결과 기존에 연구된 돌연변이를 찾을 수가 없었기 때문에, HIGM 중에서도 또 다른 형태의 HIGM이 될 수 있는 첫 환자로 생각된다.

요 약

목 적 : Hyper IgM syndrome(HIGM)은 크게 세 부류로 나누는데, CD40L 분자의 돌연변이로 초래되며 X-linked로 유전되는 형태를 HIGM1이라고 하고, 상염색체성 열성 형태로 유전되면서 CD40L는 정상적으로 표현되는 형태로 activation-induced cytidine deaminase(AID) 유전자에 이상 때문에 오는 경우를 HIGM2로 분류하고 있다. 다른 한 부류는 X-linked HIGM 증후군의 매우 드문 한 형태로서 발한 저하성 외배엽 이형성증이 동반된 경우로, 이 질환은 전사인자인 nuclear factor κB의 활성화에 관여하는 nuclear factor κB essential modulator를 coding하는 유전자의 돌연변이 때문에 오는 것으로 알려져 있다. 연구자들은 HIGM2와 유사하지만 AID 유전자에 변이는 없는 새로운 형태의 HIGM 환자의 말초 B세포를 이용하여 병인을 조사하고자 본 연구를 시도하였다.

방 법 : 환자의 말초혈액 단핵구를 분리하고, EBV로 immortalization을 시켜 Cycle TEST PLUS DNA Reagent kit를 이용하여 cell cycle을 분석하였다. 환자의 말초혈액 T 세포에서 CD40L의 표현을 immunostaining으로 알아보고, RNA를 추출하여 RT-PCR을 하고 direct sequencing을 통하여 CD40L 유전자의 돌연변이 부위를 찾아보았다. 아울러 AID 유전자의 돌연변이를 찾기 위하여 같은 방법으로 sequencing하고 조사하였다. 환자의 림프절을 병리학적인 검사를 시행하고 CD3, CD23, CD40, Fas-L, bcl-2, BAX의 표현을 알아보기 위하여 immunostaining을 실시하였다.

결 과 : 림프절의 광학적 소견은 반응성 여포증식의 소견을 보였으며, 여포와 단구양 증식은 B-세포 표시인자인 L26에 양성을 보였고, 대부분의 형질세포는 IgM에 양성을 보였다. 여포는 CD40, Fas, BAX에 양성반응을 보이고, bcl-2와 Fas-L에 음성반응을 보였다. 말초혈액 B 림프구를 이용하여 cell cycle을 분석한 결과 정상(17.9%)에 비하여 G2/mitosis phase(M3 in figure)가 현저하게 감소(8.5%)되어 있는 양상을 보여주고 있으며, IL-4로 자극한 경우에는 정상인에서 보여주는 양상으로 회복되는 양상을 볼 수 있었다. 단핵수에서 CD40L의 표현은 정상이었고 CD40L 유전자에도 돌연변이는 발견할 수 없었으며, *HuAID* 유전자에도 돌연변이를 발견할 수 없었다.

결 론 : 환자의 말초혈액 B림프구를 통한 연구 결과, 기존에 보고 되어진 HIGM2 형태와 임상적으로는 비슷하지만, 정상적인 AID유전자를 보이고, G2/mitosis phase가 정상에 비하여 감소된, 새로운 형태의 HIGM이라고 여겨진다.

참 고 문 헌

1) Notarangelo LD, Duse M, Ugazio AG. Immunodeficiency with hyper-IgM(HIM). Immunodefic Rev 1992;3:101-21.
2) Rosen FS, Craging JM, Vawter G, Janeway CA. The dysgammaglobulinemias and X-linked thymic hypoplasia. Birth Defects 1968;4:67-70.
3) Ackerman BD. Dysgammaglobulinemia : report of a case with a family history of a congenital gamma globulin disorder. Pediatrics 1964;3:211-19.
4) Winfield DL, Cohen PL, Bradley L, Finkelman FD, Eisenberg RA, Wistar R, et al. IgM cryoprecipitation and anti-immunoglobulin activity in dysgammaglobulinemia type 1, Clin Immunol Immunopathol 1982;23:58-69.
5) Brahmi Z, Lazarus KH, Hodes ME, Baehner RL. Immunologic studies of three family members with the immunodeficiency with hyperIgM syndrome. J Clin Immunol 1983;3:127-34.
6) Sliepian IK, Schwartz SA, Weiss JJ, Roth SL, Mathews KP. Immunodeficiency with hyper-IgM after systemic lupus erythematosus. J Allergy Clin Immunol 1984;73:846-57.
7) Allen RC, Armitage RJ, Conley ME, Rosenblatt H, Jenkins NA, Copeland NG, et al. CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. Science 1993; 259:990-3.
8) Korthauer U, Graf D, Mages HW, Briere F, Padayachee M, Malcolm S, et al. Defective expression of T-cell CD40 ligand causes X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. Nature 1993;361:539-41.

9) DiSanto JP, Bonnefory JY, Gauhat JF, Fischer A, de Saint Basile G. CD40 ligand mutations in x-linked immunodeficiency with hyper IgM. Nature 1993;361:541-3.
10) Aruffo A, Farrington M, Hollenbaugh D, Li X, Milatovich A, Nonoyama S, et al. The CD40 ligand, gp39, is defective in activated T cells from patients with X-linked hyper-IgM Syndrome. Cell 1993;72:291-300.
11) Ramesh N, Fuleihan R, Ramesh V, Lederman S, Yellin MJ, Sharma S, et al. Deletions in the ligand for CD40 in x-linked immunoglobulin deficiency with normal or elevated IgM(HIGMX-1). Int Immunol 1993;5:769-73.
12) Armitage RJ, Fanslow WC, Strokbine L, Sato TA, Cliffor KN, Macduff BM, et al. Molecular and biological characterization of a murine ligand for CD40. Nature 1992;357:80-2.
13) HollenbaughD, Grosmaire LS, Kullas CD, Chlupny NJ, Braesch-Andersen S, Noelle RJ, et al. The human T cell antigen gp39 with B cell co-stimulatory activity. EMBO J 1992;11:4313-21.
14) Armitage RJ, Sato TA, Macduff BM, Clifford KN, Alpert AR, Smith CA, et al. Identification of a source of biologically active CD40 ligand. Eur J Immunol 1992;22:2071-6.
15) Lane P, Traunecker A, Hubele S, Inui S, Lanzavecchia A, Gray D. Activated human T cells express a ligand for the human B cell-associated antigen CD40 which participates in T cell-dependent activation of B lymphocytes. Eur J Immunol 1992;22:2573-8.
16) Stamenkovic I, Clark EA, Seed B. A B-lymphocyte activation molecule related to the nerve growth factor receptor and induced by cytokines in carcinomas. EMBO J 1989;8:1403-10.
17) Loenen WAM, Gravestein LA, Beumer S, Melief CJM, Hagemeijer A, Borst J. Genomic organization and chromosomal localization of the human CD27 gene. J Immunol 1992;149:3937-43
18) Clark EA. Ledbetter JA. Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. Proc Natl Acad Sci USA 1986;83:4494-8.
19) Liu YJ, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J, Maclennan ICM. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. Nature 1989;342:929-31.
20) Gruber MF, Bjorndahl JM, Nakamura SN, Fu SM. Anti-CD45 inhibition of human B cell proliferation depends on the nature of activation signals and the state of B cell activation. J Immunol 1989;142:4144-52.
21) Banchereau J, De Paoli P, Valle A, Garcia E, Rousset F. Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40. Science 1991;251:70-2
22) Durandy A, Hivroz C, Marzerolles F, Sciff C, Bernard F, Jouanguy E, et al. Abnormal CD40-mediated activation pathway in B lymphocytes from patients with hyper-IgM syndrome and normal CD40 ligand expression. J Immunol 1997;158:2576-84.
23) Bhushan A, Barnhart B, Shone S, Song C, Covey LR. A transcriptional defect underlies B lymphocyte dysfunction in a patient diagnosed with non-X-linked hyper-IgM syndrome. J Immunol 2000;164:2871-80.
24) Ballow M. Primary immunodeficiency disorders : Antibody deficiency. J Allergy Clin Immunol 2002;109:581-91.
25) Minegishi Y, Lavoie A, Cunningham-Rundles C, Bedard PM, Hebert J, Cote L, et al. Mutations in activation induced cytidine deaminase in patients with hyperIgM syndrome. Clin Immunol 2000;97:203-10.
26) Revy P, Muto T, Levy Y, Geissmann F, Plebani A, Sanal O, et al. Activation-induced cytidine deaminase(AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the hyper-IgM syndrome(HIGM2). Cell 2000;102:565-75.
27) Oliva A, Quinti I, Seala E, Fanales-Belasio E, Rainaldi L, Pierdominici M, et al. Immunodeficiency with hyper immunoglobulinemia M in two female patients is not associated with abnormalities of CD40 or CD40 ligand expression. J Allergy Clin Immunol 1995;96:403-10.
28) Jain A, Ma CA, Liu S, Brown M, Cohen J, Strober W. Specific missense mutations in NEMO result in hyper-IgM syndrome with hypohydrotic ectodermal dysplasia. Nat Immunol 2001;2:223-8.
29) Notarangelo Ld, Duse M, Ugazio AG. Immunodeficiency with hyperIgM(HIM). Immunodefic Rev 1992;3:101-22.
30) Levy J, Espanol-Boren T, Thomas C, Fischer A, Tovo P, Bordigoni P, et al. The clinical spectrum of X-linked hyper IgM syndrome. J Pediatr 1997;131:47-54.
31) Facchetti F, Appiani C, Salvi L, Levy J, Notarangelo LD. Immunohistologic analysis of ineffective CD40-CD40 ligand interaction in lymphoid tissues from patients with X-linked immunodeficiency with hyper-IgM. J Immunol 1995;154:6624-33.
32) Puck JM. A disease gene for autosomal hyper-IgM syndrome : more genes associated with more immunodeficiencies. Clin Immunol 2000;97:191-2.
33) Jackson Ce, Puck JM. Autoimmune lymphoproliferative syndrome, a disorder of apoptosis. Curr Opin Pediatr 1999;11:521-7.
34) Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB. Tumor necrosis factor receptor-associated factors(TRAFs)-a family of adaptor proteins that regulate life and death. Gene Dev 1998;12:2821-30.
35) Hess S, Engelmann H. A novel function of CD40 : induction of cell death in transformed cells. J Exp Med 1996;183:159-67.
36) Grell M, Zimmermann G, Gottfried E, Chen CM, Grunwald U, Huang DC, et al. Induction of cell death by tumor necrosis factor(TNF) receptor 2, CD40 and CD30 : a role for TNF-R1 activation by endogenous membrane-anchored TNF. EMBO J 1999;18:3034-43.
37) Hirose S. Break down of B cell-tolerance and its genetic control. Jpn J Clin Med 1997;55:1450-4.
38) Wang D, Freeman GJ, Levine H, Ritz J, Robertson MJ. Role of the CD40 and CD95(APO-1/Fas) antigens in the apoptosis of human B-cell malignancies. Br J Haematol 1997;97:409-17.
39) Wallen-Ohman M, Larrick JW, Carlsson R, Borrebaeck CA. Ligation of MHC class I induces apoptosis in human pre-B cell lines, in promyelocytic cell lines and CD40-stimulated mature B cells. Int Immunol 1997;9:599-606.
40) 장미영. B세포 분화에서 세포분열 주기와 class switching과의 관계. 충남대학교 대학원 의학과 소아과학 전공. 박사학위논문 2002년 8월.