

## 제2형 콜라겐 경구관용 유도 동물모델에서 수지상 세포의 Indoleamine 2,3-dioxygenase 의존성 관절염 항원 특이 T세포 증식반응 제어 연구

가톨릭대학교 의과대학 연구원 류마티스연구센터

박민정 · 민소연 · 박경수 · 조미라 · 조영규 · 민준기 · 윤종현 · 박성환  
김호연

### Immune Regulatory Function of Dendritic Cells Expressing Indoleamine 2,3-Dioxygenase in Orally Tolerance to Type II Collagen-induced Animal Model

Min Jung Park, So Youn Min, Kyoung Su Park, Mi La Cho, Young-Gyu Cho, Jun Ki Min, Chong Hyeon Yoon, Sung Hwan Park, Ho Youn Kim

*The Rheumatism Research Center, Catholic Research Institute of Medical Science, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea*

#### ABSTRACT

**Background:** Immune regulatory dendritic cells (DCs) play an important role in maintaining self-tolerance. Recent evidences demonstrate that DCs expressing indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), which is involved in tryptophan catabolism, play an important role in immunoregulation and tolerance and induce T cell apoptosis. This study was devised to examine the role of IDO in the oral tolerance induction in collagen-induced arthritis (CIA) mouse model. **Methods:** Beginning 2 weeks before immunization, CII was fed six times to DBA/1 mice and the effect on arthritis was assessed. In tolerized mice, CD11c<sup>+</sup> DCs were isolated and stimulated with CII, IFN- $\gamma$ , and LPS with or without IDO inhibitor, 1-methyl-DL-tryptophan (1-MT) and IDO expression by CD11c<sup>+</sup> DCs was analyzed using FACS and RT-PCR. The expression of IDO, MHC II, CD80, and CD86 by CD11c<sup>+</sup> DCs were examined using confocal microscopy. Regulatory effect of CD11c<sup>+</sup> DCs on Ag-specific T cell proliferative response to CII was examined by mixed lymphocyte reaction (MLR) with or without 1-MT. **Results:** The proportion of IDO-expressing CD11c<sup>+</sup> DCs was slightly higher in tolerized mice than in CIA mice and significantly increased after stimulation with CII, IFN- $\gamma$ , and LPS in an IDO-dependent manner. On confocal microscopic examination, the expression of IDO was higher and those of MHC II and CD86 were lower in CD11c<sup>+</sup> DCs from tolerized mice compared to those from CIA mice. On MLR, CD11c<sup>+</sup> DCs from tolerized mice inhibited T cell proliferative response to CII in an IDO-dependent manner. **Conclusion:** Enhanced IDO expression by CD11c<sup>+</sup> DCs from tolerized mice may contribute to the regulation of proliferative response of CII-reactive T cells and could be involved in the induction of oral tolerance to CII. (*Immune Network* 2005;5(4):221-231)

**Key Words:** IDO, dendritic cells, oral tolerance, collagen-induced arthritis, Ag-specific T cells

책임저자 : 김호연, 가톨릭의과대학 연구원 류마티스연구센터, ☎ 137-701, 서울시 서초구 반포동 505번지

Tel: 02-590-2702, Fax: 02-537-4673, E-mail: ho@catholic.ac.kr

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 우수연구센터육성사업의 지원(R11-2002-098-06003-0)으로 수행되었음.

이 논문은 2005년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(KRF-2005-E00003).

## 서 론

면역 관용(immune tolerance)이란 특정 항원에 대해 면역 반응이 일어나지 않거나 그 강도가 저하되어 있는 무반응 상태(unresponsiveness)를 의미한다. 특히 항원을 경구 투여하여 얻어진 면역관용을 경구 관용(oral tolerance)이라고 하며, 류마티스 관절염을 비롯한 여러 가지 자가 면역질환의 질병의 원인이 되는 자가 항원 단백질을 경구 투여하는 치료법을 임상에 적용하는 보고들이 나오고 있다(1,2). 경구로 반복 투여된 항원 단백질이 면역 억제제를 일으키는 기전은 완전하게 규명되지 못한 상태이나, 실험 동물을 모델로 한 연구 결과에 따르면 아마도 소화기를 둘러싼 점막 면역계에서 이들을 인지하는 T 림프구들이 Th2 또는 Th3 아형으로 분화된 뒤 혈관을 타고 병소로 이동하여 IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ 를 비롯한 염증 억제성 사이토카인들을 분비하기 때문일 것으로 추정되고 있다(3,4). 그러나 자가항원을 투여하는 방법과 시기, 그리고 투여량의 차이에 따라 상반된 결과가 얻어지기도 하므로 아직 그 명확한 기전은 알려져 있지 않다(5).

수지상 세포(dendritic cells)란 항원제시세포로서 T 세포의 항상성(homeostasis)을 조절하여 면역반응을 유도하기도 하고 관용을 유도하기도 한다(6). 최근 수지상 세포 중 일부는 특별한 면역 조절능을 가지고 있어서 Th1 반응 또는 Th2 반응을 조절하기도 하고, 면역 조절 T 세포를 유도하여 면역 관용을 일으킬 수도 있다고 알려졌다(7). 그러나 수지상 세포의 아형과 위치, 숙성도와 분자적 특성에 따라 일부는 T 세포의 증식을 억제하기도 하고, 일부는 오히려 T 세포 분화를 촉진시키는 데 관여한다는 등 보고자에 따라 상반된 결과가 보고되어서(5,8-12) 아직까지 면역관용 유도에서 수지상 세포가 어떤 역할을 가지는 지에 대해서는 명확한 기전이 알려져 있지 않다.

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)는 필수 아미노산인 tryptophan을 분해하는 효소로서 세포 내에 기생하는 진핵의 병원이나 종양 세포의 증식을 막아서 숙주 방어에 기여한다고 알려져 있다. 생체 내에서 IDO는 주로 태반, 림프절, 림프 조직 및 장내 점막 부위, 부고환, 안구 전방에서 발현된다(13-18). IDO는 면역반응 조절에 중요한 역할을 하는데, 임신한 쥐의 태반에 발현된 IDO는 태아의 이종항원에 대해 관용을 유도하여 모체의 면역시스템을 조절하는 역할을 하며, IDO의 특이적 억제제로 알려진 1-MT를 투입하면 임신한 쥐가 유산된다(19-21). IDO는 또한 구조적 적합항원이 일치하지 않는 이식된 동종 간에 대한 T 세포 면역 반응을 억제한다고 한다. IDO를 발현하는 세포로는 대식세포나 수지상 세포 등이 있으며 IDO를 표현하는 수지상 세포는 T 세포의 증식을 억제하여 면역 관용에 중요한 역할을 한다고 알려져 있

다(22-24). CD8 수지상 세포는 IDO 조절기능을 통해 T 세포를 매개로 한 면역반응 조절에 결정적인 역할을 한다고 보고되었다(25-27).

본 연구에서는 면역 관용 유도시 IDO가 수지상 세포의 면역 조절 작용에 미치는 영향을 조사하기 위해서 사람의 류마티스 관절염과 매우 유사한 양상을 나타낸다고 알려진 콜라겐 유도 관절염모델에서 제2형 콜라겐(type II collagen)을 경구 투여하여 경구 관용을 유도한 다음 마우스의 수지상 세포에서 IDO 발현을 조사하고, 항원 특이적 T 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

**DBA/1 마우스의 경구관용 유도.** DBA/1 마우스를 이틀에 한 번씩 2주간에 걸쳐 0.05 N 아세트산에 2 mg/ml로 녹인 bovine type II 콜라겐(유한 양행, 서울, 이하 CII)을 oral Zonde needle (Natsume, Japan)을 사용하여 100  $\mu$ g씩 투여하였다. 대조군인 관절염 유도군의 DBA/1 마우스에는 CII 대신 phosphate-buffered saline (PBS)를 2주간 6회 투여하였다.

**CIA의 유도과 관절염의 평가.** CII 또는 PBS의 경구 투여를 마친 DBA/1 마우스(n=6)에 complete Freund's adjuvant (CFA, Arthrogen-CIA, Redmond, WA)와 동량으로 섞어준 CII 100  $\mu$ g을 26 게이지 바늘로 꼬리에 주사한다. 이로부터 2주 후 100  $\mu$ g의 CII와 동량의 Incomplete Freund's adjuvant (IFA, DIFCO, Detroit, MI) 혼합액을 한 쪽 뒷다리에 주사하고, 첫 접종을 시작점으로 하여 실험의 내용을 알고 있지 않은 관찰자 세 명이 18일, 즉 2.5주째 되는 날로부터 매주 세 번씩 관절 염증의 위증도를 평가하여 11주까지 계속한다. 관절염 평가는 Rosolniec 등에 의한 평균 관절염 지수(mean arthritic index)에 기준하여 마우스당 2차 접종 때 CII/IFA를 투여한 다리를 제외한 나머지 세 다리에서 아래의 척도에 따라 매진 점수를 합하여 3으로 나눈 평균치를 얻고, 다시 각 마우스에서 3명의 관찰자가 얻은 수치를 합산하여 나눈 평균치를 사용한다.

0점: 부종이나 종창이 없다.

1점: 발 또는 발목관절에 국한된 경한 부종과 발적

2점: 발목관절에서 족근골(metatarsal)에 걸친 경한 부종과 발적

3점: 발목관절에서 족근골에 걸친 중등도의 부종과 발적

4점: 발목에서 다리 전체에 걸쳐 부종과 발적이 있는 경우

**관절 조직염색.** 1차 면역유도 주사 후 5주 후 마우스의 뒷다리를 제거하여 피부조직을 벗겨낸 후 피부조직을 벗겨낸 후 관절조직은 4% paraformaldehyde (Sigma, St,

Louis, MO)가 포함된 PBS (phosphate-buffered saline, Gibco, Gaithersburg, MD) 용액에 담그고 4°C에서 1일간 방치한다. 그 다음 조직을 10% EDTA가 포함된 증류수에 담그고 1개월 동안 탈회시킨 다음 파라핀으로 포매하였다. 절편의 두께는 7 μm로 하였고 이를 탈파라핀, 재함수 과정에 이어 헤마토실린과 에오신으로 염색하였다.

**IgG 항체의 아형 분석.** CII/CFA를 주사한 시점으로부터 5주 후에 각 군의 마우스의 혈액을 채취하여 mouse IgG1, IgG2a 농도를 ELISA방법으로 측정하였다(Bethyl Lab Co., Montgomery, TX). 항 CII IgG항체 측정 방법은 다음과 같다. CII를 40 μg/ml 농도로 0.05M Sodium carbonate coating buffer (pH 9.6)에 희석하여 96-well microtiter plate에 도포한 다음 4°C에서 18시간 방치하였다. 도포된 용액을 제거한 후 비특이적인 결합을 억제하기 위하여 1% bovine serum albumin (BSA, Amresco, Solon, Ohio)이 포함된 TBS (pH 8.0)를 200 μl씩 넣고 30분간 실온에서 반응시켰다. 항 CII IgG2a 측정을 위해서 1:1,000으로 희석하였으며, 항 CII IgG1 측정을 위해서는 1:20으로 희석하였다. 이때 희석용액은 1% BSA, 0.05% Tween20 (Amresco)이 포함된 TBS (pH 8.0)용액을 사용하였다. 다음으로 희석해 둔 혈청 샘플을 well당 50 μl씩 넣고 실온에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝나면 0.05% Tween 20 (Amresco)이 포함된 TBS (pH 8.0)용액으로 3번씩 세척한 뒤, TMB+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system (KPL, Gaithersburg, MD)으로 발색하였고, 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 동량으로 넣어 반응을 중지하였다. 이는 450 nm에서 흡광도로 읽었으며, 항체 측정 결과는 흡광도 자체로 표시하였다.

**T 세포 증식반응.** 1차 면역주사 5주차 후 비장을 적출하여 PBS (Gibco)용액으로 2회 세척 후 가위로 잘게 자르고, 이를 cell strainer (BD Falcon, Bedford, MA)를 통과시켰다. 4°C 1,300 rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하고 세포층을 10% 우태아 혈청이 포함된 RPMI1640 (Gibco)배지에 재부유시켰다. 다음으로 비장세포들 중에서, 적혈구는 2.06% Tris (pH 7.65), 0.83% NH<sub>4</sub>Cl이 1:9 (v/v)로 섞인 용액과 실온에서 30분간 방치하여 용혈시켜 제거하였다. 관절염 유도군의 비장 세포는 anti-CD4 microbead (Miltenyi biotec, Bergisch Galdbach, Germany)와 4°C에서 30분간 반응시킨 후 1% BSA, 2 mM EDTA (Amresco)가 포함된 PBS 용액(pH 7.4)으로 세척한 뒤, Column (Miltenyi biotec)을 통과시켜 CD4<sup>+</sup> T세포를 얻었다. 같은 방법으로 경구관용 유도군과 관절염 유도군의 비장세포에서 anti-CD11C microbead (Miltenyi biotec, Bergisch Galdbach, Germany)를 이용하여 수지상 세포를 분리하였다. 항원 제시 세포만을 얻기 위해서, T 세포는 mouse pan T cell isolation kit (Miltenyi biotec)과 4°C에서 30분간 반응시킨 뒤 앞서와 마찬가지로 컬럼을 통과시켜 제거하였다. 스스로 증식하지 못하게 하고

CD4<sup>+</sup> T 세포에 항원제시기능만 갖게 하기 위해 5,000 rad에서 방사선을 조사하였다.

앞서 얻은 관절염 유도군의 CD4<sup>+</sup> T세포와 항원제시 세포를 각각 1×10<sup>5</sup> cell/well로 넣고 경구관용 유도군과 대조군인 관절염 유도군의 non T cell이나 CD11c<sup>+</sup> 수지상 세포를 1×10<sup>4</sup> cell/well을 함께 넣는다. CII 40 μg/ml로 자극하여 3일간 공조 배양하였다. IDO의 억제제 (1-MT)는 200 μM로 자극제 사용 2시간 전에 처리하였다. 실험시 대조군으로 자극하지 않은 세포와 비교하였다. 배양 종료 18시간 전에 <sup>3</sup>H-thymidine (NEN, Boston, MA)을 well당 1.0 uCi씩 넣어 주었으며, 세포를 수집한 후 beta counter (Packard Instrument Co., Downers Grove, IL)로 동위원소 양을 측정하였다.

**RT-PCR.** 관절염군과 관용 유도군의 비장으로부터 single cell suspension을 만들어 6 well plate에 well당 1×10<sup>7</sup>을 넣어 CII (40 μg/ml), IFN-γ (10 ng/ml), LPS (100 ng/ml)로 자극하며 자극하지 않는 세포와 함께 24시간 동안 배양한 후 각기 다른 자극 조건에서 anti-CD11C microbead (Miltenyi biotec, Bergisch Galdbach, Germany)를 이용하여 수지상 세포를 분리하였다. 분리된 CD11c<sup>+</sup> 수지상 세포(1×10<sup>6</sup>)를 얻어 RNazolB™ (Tel. Test, Friendwood, TX)를 사용하여 세포를 녹인 뒤 mRNA를 추출하였고, 이를 cDNA로 합성하기 위하여, 0.5 μg random primer (Takar, Shiga, Japan)와 70°C에서 5분 반응시킨 뒤 4°C에서 급냉시킨 다음 10 mM dNTP mix (Invitrogen, Carlsbad, California) 1 ul, 역전사효소 M-MuLV (MBI Fermentas, MD) 1 unit, 5×M-MuLV 희석용액(MBI Fermentas) 0.5 μl를 가하고 전체를 nuclease free water (Promega, Madison, WI) 20 μl로 맞춘 뒤, 25°C에서 10분, 42°C에서 60분, 72°C에서 10분간 반응시켰다. 25 μl의 반응액 내에, cDNA 2 μl, 2.5 mM dNTP mix (Takara) 4 μl, 10×Taq buffer (SuperBIO) 0.3 μl, 10 pmol IDO primer 2 μl를 사용하였고, 사용된 primer 서열은 sense 5'-CACTGTACCA GTGCAGTAG-3', antisense 5'-CCATAATATGGTTGATG AACT-3'으로, IDO 증폭 조건은 94°C 30초, 55°C 1분 30초, 72°C에서 30초간 반응을 40 cycle 반복하는 것으로 하였다.

**유세포 분석.** 앞서 T 림프구의 증식 반응 측정에서 설명한 것과 동일한 방법으로 관절염 유도군과 관용 유도군의 비장으로부터 single cell suspension을 만든 후 24 well plate에 well당 1×10<sup>6</sup>개씩 넣어주고 40 μg/ml의 CII, IFN-γ (10 ng/ml), LPS (100 ng/ml)로 자극하며 자극하지 않는 세포와 함께 24시간 동안 배양한다. 배양 종료 후 4시간 동안 Golgi Stop (Pharmingen, San Diego CA)으로 고정된 후 fluorescein isothiocyanate (FITC)로 표지된 anti-CD11C 항체(Pharmingen, San Diego CA)로 4°C에서 30분간 염색한다. PBS로 2번 씻어준 후 cytoperm/cytofix (Pharmingen,

San Diego CA)에 재부양하여 20분간 놓아 둔 후 anti-IDO Ab를 붙이고, PE가 부착된 anti-mouse IgG 항체(Pharmin-gen, San Diego CA)로 세포질 내 합성된 IDO 표지하여 FACS Ventage 유세포 분석기(Becton Dickinson, San Jose CA)로 측정한다.

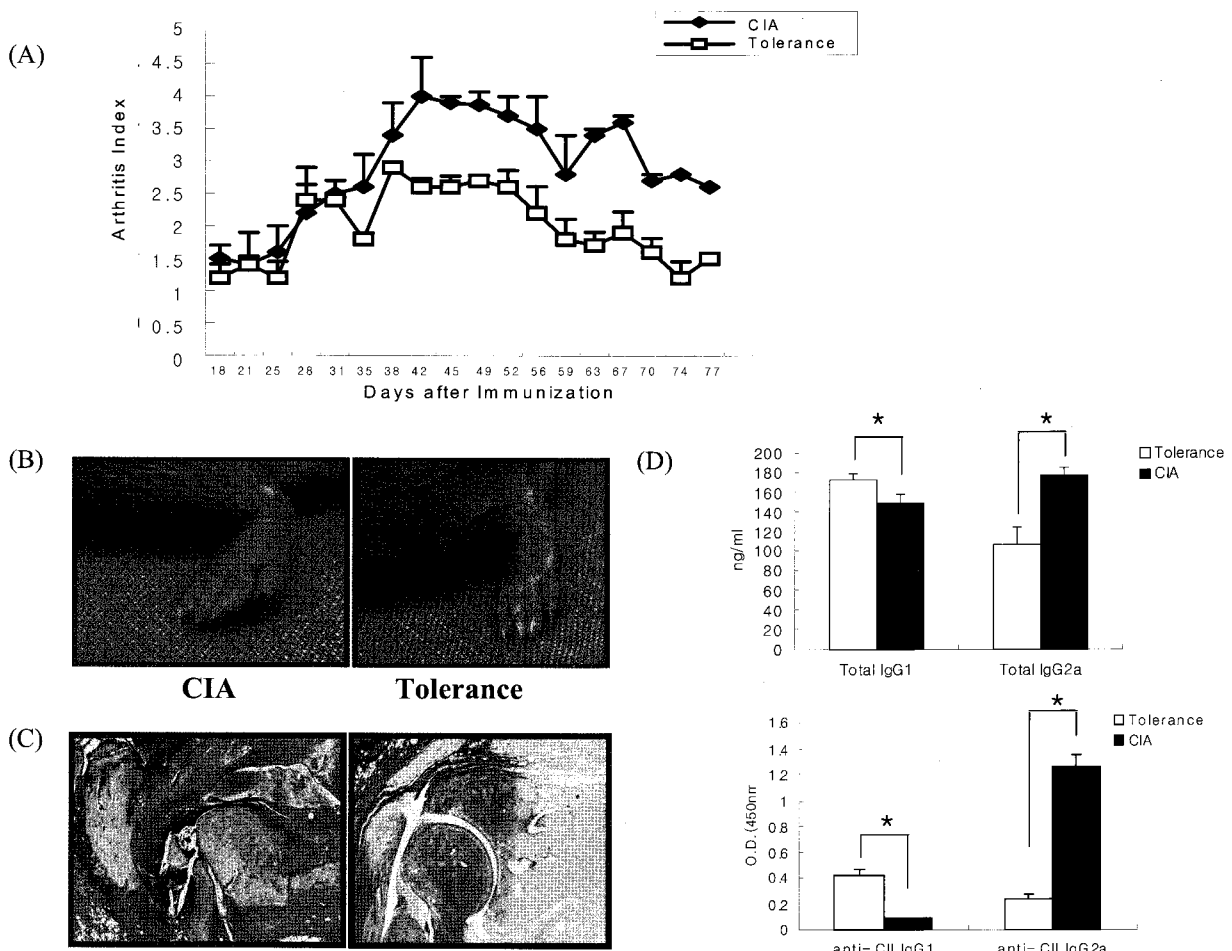
**공초점 주사 현미경.** 조직 염색방법으로는 유세포 분석 방법과 동일한 방법으로 염색하였으며, 세포는 슬라이드 위에 Shandon CytoSpin III cytocentrifuge (GMI, Ramsey, MN)를 이용하여 고정시키고 모든 면역 형광염색된 표본은 공초점 주사 현미경(FV300, Olympus, Japan)을 사용하여 관찰하였다. 레이저 광선의 흥분파장으로는 488

nm파장을 FITC용으로, 568 nm파장을 PE용으로 사용되었다.

**통계적 유의성의 검증.** 실험 결과는 평균±표준 오차로 표현하였으며 통계적 유의성은 SPSS 통계 프로그램 (version 11.5, Chicago, IL)을 사용하여 student's t-test를 실시하였고 P값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의하다고 분석하였다.

**결 과**

**CII 경구관용 유도를 통한 마우스의 관절 염증 억제 효과.** CII에 의한 경구관용이 관절염에 미치는 영향을



**Figure 1.** Suppression of arthritis development in tolerance group. (A) The mean arthritis indexes in tolerance group were significantly lower than those in CIA group throughout the examination period. (B) The severity of CIA was significantly lower in the tolerance mice five weeks after the first immunization. In CIA group, marked erythema and edema developed in observed paws (left). In contrast, only mild swelling was found in paws of tolerance group (right). (C) Hematoxylin and eosin-stained section of joint from CIA mice showed intense inflammatory infiltrates and severe bony destruction (left), whereas Tolerance mice had preserved joint histology with mild inflammatory infiltrate (right). (D) Serum level of IgG1 (left) and IgG2a (right) anti-CII antibody were measured by ELISA five weeks after first immunization. The serum level of IgG1 was significantly higher in Tolerance mice (□) than in CIA mice (■) (172±7 ng/ml vs. 149±8.5 ng/ml, P<0.05), whereas that of IgG2a was significantly lower in tolerance mice compared to CIA mice (108±17 ng/ml vs. 176±8.5 ng/ml, P<0.05). \*Data are represented as means±SD using ng/ml, as analyzed in five separate experiments (7 mice/group/experiment).

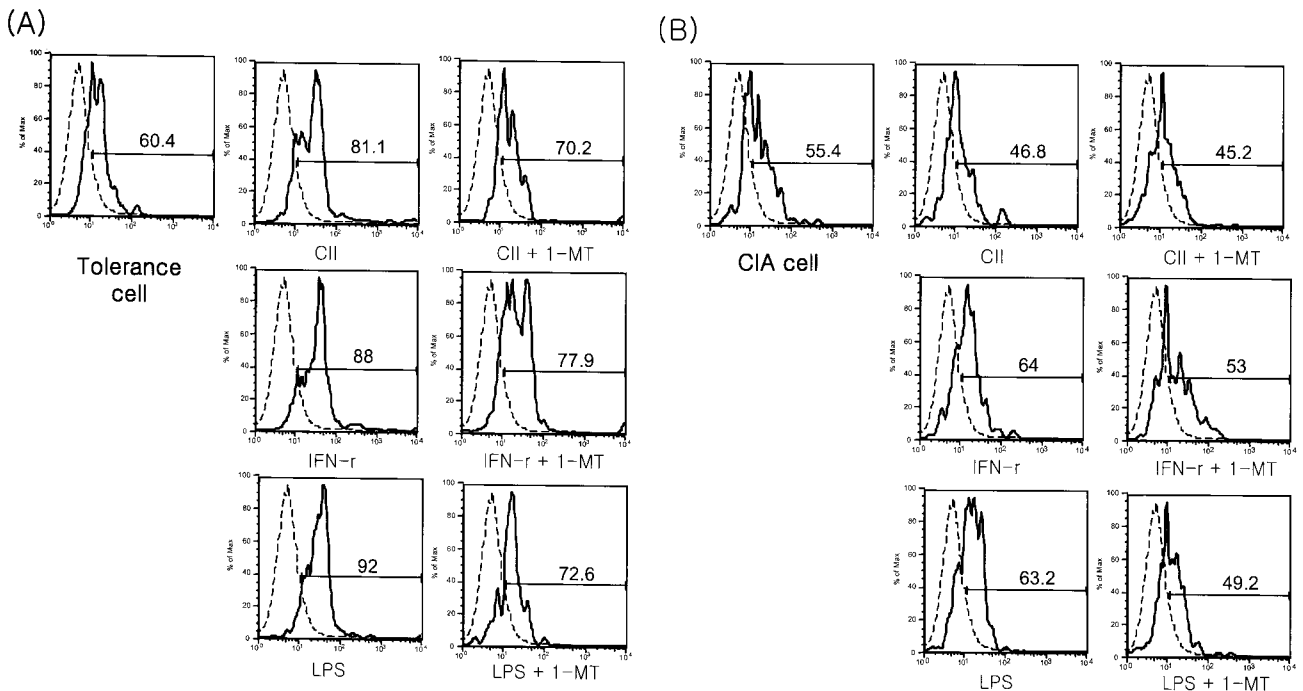
조사하기 위해 경구관용 유도군과 관절염 유도군의 관절염 지수를 관절염 유도 후 3주째 되는 시점부터 11주에 걸쳐 조사하였다(Fig. 1A).

CII를 발에 주사한 시점으로부터 4주째 되는 시점까지 관용 유도군과 관절염 유도군 모두에서 위증도가 낮았으나 관절염 유도의 경우, 이후 계속 관절염 지수가 증가하여 5주에서 8주에 이르는 시기에 최대치를 이루었으며(Fig. 1B), 9주째에 감소하기 시작하여 12주까지 비슷한 수준으로 유지되는 것이 관찰되었다. 관용 유도군 역시 5주 이후부터는 대조군과 마찬가지로 관절염이 약간 증가하는 경향을 보이거나 관절염 유도과 비교해 볼 때 전 반적으로 현저히 낮은 관절염 지수를 보였다(Fig. 1A, B). 다음은 CII의 경구 관용에 의한 관절염 억제력을 조직학적으로 조사하기 위해 관용유도군과 관절염 유도군의 관절을 헤마톡실린-에오신법으로 염색하였다(Fig. 1C). 관절염 유도군의 관절을 살펴본 결과 관절이 심하게 파괴되어 있거나 섬유화 현상이 일어났으며, 염증이 있는 부위에 백혈구와 호중구 등이 침윤되어 나타나는 반면, 관용 유도군의 경우 관절염 유도군에 비해 관절 파괴나 염증 부위의 백혈구나 호중구 침윤 등이 현저하게 적은

것이 관찰되었다.

마우스의 경우 IgG 항체의 여러 아형 중 IgG1은 염증을 억제하는 조절자의 역할을 하는 반면 IgG2a는 염증을 매개하는 인자로 작용한다고 알려져 있으며 DBA/1 마우스에서는 관절염을 유도할 경우 주로 Th1 반응을 일으키는 IgG2a가 특이적으로 증가되어 있다고 보고된 바 있다(28). 특히 관절염의 자가항원으로 알려진 CII에 대한 IgG 반응성은 관절염 질환의 정도와도 연관이 있다고 알려져 있다(29,30). 본 실험에서도 경구 관용이 유도된 실험 동물의 혈청 내 항 CII특이적 IgG1의 농도는 대조군인 관절염군에 비해 높게 나타난 반면(172±7 ng/ml vs 149±8.5 ng/ml, P<0.05) 항 CII특이적 IgG2a는 낮아져 있는 것이 관찰(108±17 ng/ml vs 176±8.5 ng/ml, P<0.05) 되었다(Fig. 1D).

**경구 관용 유도로 인한 관절염 동물 모델에서 비장 세포에서 IDO 발현 조사.** 이전 보고에 따르면 IDO는 사람의 조직 뿐만 아니라 대식세포와 수지상 세포에서 발현되며 IFN- $\gamma$ 나 다른 염증성 사이토카인에 의해 IDO의 발현이 증가된다고 알려져 있다(23,24,31). 본 연구에서는 경구 관용이 유도된 DBA/1 마우스에 말초면역기관



**Figure 2.** FACS analysis of intracellular IDO in splenic CD11c<sup>+</sup> DCs. Mononuclear cells obtained from spleen of tolerance (A) and CIA (B) mice were cultured in 24-well plates at a concentration of  $1 \times 10^6$ /well with CII (40  $\mu$ g/ml) or IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) or LPS (100 ng/ml) for 24 hours with or without pretreatment with IDO inhibitor, 1-MT. Cells were probed with FITC-labeled anti-CD11c and analyzed on FACS caliber flow cytometer. The histograms were gated on CD11c<sup>+</sup> DCs. The proportion of CD11c<sup>+</sup> IDO<sup>+</sup> DCs was slightly higher in tolerance mice than in CIA mice. After CII/IFN- $\gamma$ /LPS stimulation, the proportion of IDO<sup>+</sup> cells significantly increased in CD11c<sup>+</sup> DCs from tolerance mice (A) compared to those from CIA mice (B). The increase of the proportion of IDO<sup>+</sup> DCs was partly abrogated by pretreatment with 1-MT. Dotted histogram lines represent cells stained with isotype-matched control monoclonal antibodies. Data are from the representative FACS histogram of 3 independent experiments.

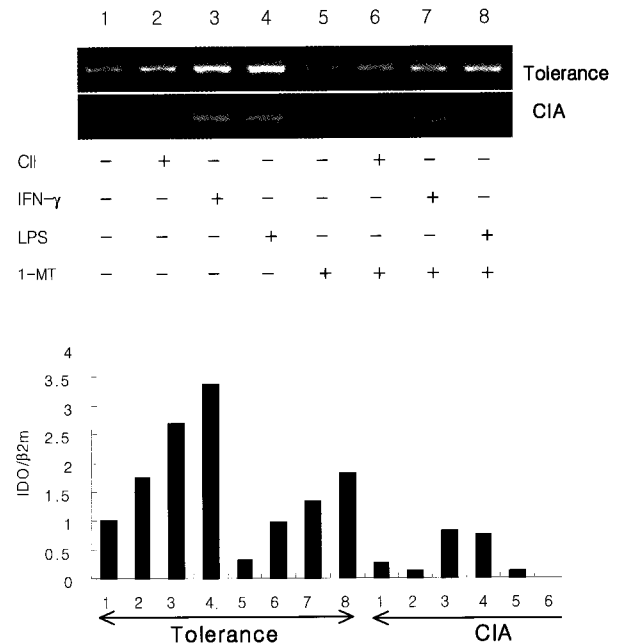
인 비장의 수지상 세포에서 발현하는 IDO의 변화를 보기 위해 anti-CD11c와 anti-IDO 단일항체로 이중 염색하여 유세포 분석으로 조사하여 보았다.

경구 관용군의 비장세포에서 발현하는 IDO는 대조군인 관절염 유도군, 정상군에 비해 IDO가 의미 있게 증가함을 확인할 수 있었다(결과 제시하지 않음). 다음은 유세포 분석을 통해 수지상 세포의 마커로 사용된 CD11c<sup>+</sup> DC 세포를 먼저 gating한 뒤 IDO의 발현을 히스토그램으로 나타내었다(Fig. 2). 그 결과 CD11c<sup>+</sup> 수지상 세포의 IDO 발현은 대조군으로 사용된 관절염 유도군에 비해 관용 유도군에서 약간 높은 발현양상을 보였으나(55.4% vs 60.4%), CII로 자극하면 그 두 군의 발현 양상의 차이가 뚜렷해짐을 관찰할 수 있었다(46.8% vs 81.1%)(Fig. 2). 또한 이전 보고와 같이 IDO의 양성 유도제인 IFN- $\gamma$ 나 LPS 자극 시에도 관절염 유도군에 비해 관용 유도군에서 IDO 발현이 증가되어 있는 것이 관찰되었다(IFN- $\gamma$ ; 64% vs 88%, LPS; 63.2% vs 92%). 사실 결과에 제시하지는 않았지만 대조군인 관절염 유도군에서도 IDO 발현 정도는 DBA/1 마우스 정상군에 비해 의미 있는 차이를 보였고, CII로 자극한 경우뿐만 아니라 IFN- $\gamma$ 나 LPS로 처리시에 발현이 더욱 증가되는 것을 관찰할 수 있었다.

Hwang 등에 의하면 미성숙한 monocyte-derived DC에서 IDO발현이 증가하였고 IDO 특이적인 억제제인 1-MT를 처리한 뒤 24시간 후에 LPS나 CD40L 자극하면 세포 내 IDO 발현은 현저하게 감소한다고 보고되었다(27). 본 연구에서도 경구 관용군과 대조군인 관절염 유도군의 수지상 세포에서 CII 자극에 의한 IDO 발현 효과가 1-MT에 의해 조절되는지 알아보기 위해, CII로 자극하기 전에 1-MT를 처리한 후 IDO의 발현을 유세포 분석으로 조사하였다. 그 결과 경구 관용 유도군에서 CII 자극 전 1-MT를 처리한 경우 CII만 자극한 경우에 비해 81.1%에서 70.2%으로 줄어든 반면 대조군인 관절염 유도군의 경우에는 46.8%에서 45.2%으로 감소되었다. IFN- $\gamma$ 나 LPS 역시 두 군 모두에서 IDO의 발현양상이 1-MT에 의해서 모두 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 2). **경구 관용 유도 여부에 따른 마우스 비장세포에서 IDO mRNA의 발현 양상 변화.** CII로 경구관용을 유도한 마우스의 비장 단핵구에서 IDO의 mRNA 발현 양상을 조사하기 위하여 RT-PCR법을 시행하였다. 이때 관용 유도군과 관절염 유도군의 비장 단핵구들은 *in vitro* 상에서 CII와 IFN- $\gamma$  또는 LPS로 자극하거나 또는 자극하지 않은 조건 하에서 24시간 동안 배양한 뒤 RNA를 추출하여 cDNA를 합성하였다. 자극하지 않은 경우, 관용 유도군과 대조군인 관절염 유도군의 비장세포 내의 IDO 발현에는 큰 차이가 없었으나, CII로 자극하면 관용 유도군에서 현저하게 IDO mRNA 레벨이 증가하였으며, IDO의 양성 유도제인 IFN- $\gamma$ 나 LPS를 처리하면 자극하

지 않은 경우와 다르게 두 군 모두에서 IDO 발현이 최대치로 증가되는 현상이 관찰되었다(결과 제시하지 않음). 다음은 두 군의 비장 단핵구에서 microbead system을 이용하여 CD11c<sup>+</sup> 수지상 세포를 분리한 다음 IDO mRNA의 변화를 조사한 결과 관절염 유도군에 비해 관용 유도군에서 약간 증가하였으며 CII로 자극 시에는 더욱 더 증가된 양상을 보였다. 이와 동시에 IFN- $\gamma$ 나 LPS로 자극 시 경구 관용 유도군의 수지상 세포에서 IDO 발현이 증가함을 알 수 있었다(Fig. 3). 이를 통해 마우스에서 경구관용이 유도되면 비장 세포뿐만 아니라 비장 세포에서 분리한 수지상 세포에서도 IDO 발현이 증가하고 경구관용의 특정항원으로 사용된 CII로 자극하면 IDO 발현은 현저하게 증가됨을 실험을 통해 확인할 수 있었다.

강직성 뇌 척수염 동물모델(experimental allergic encephalomyelitis, EAE), 다발성 경화증과 당뇨병 환자 등에서 IDO를 발현하거나 인위적으로 주입시키면 자가항원에 의한 질환의 심화도는 감소하고 생존율이 높아진다는 보고가 있었다(25,32). 특히나 강직성 뇌 척수염 동물모델의 수지상 세포에서 항원 특이적으로 증가된 IDO mRNA는 1-MT를 처리하면 특이적으로 감소하였다(25). 따라서 본 연구에서도 자가항원으로 알려진 CII에 의해

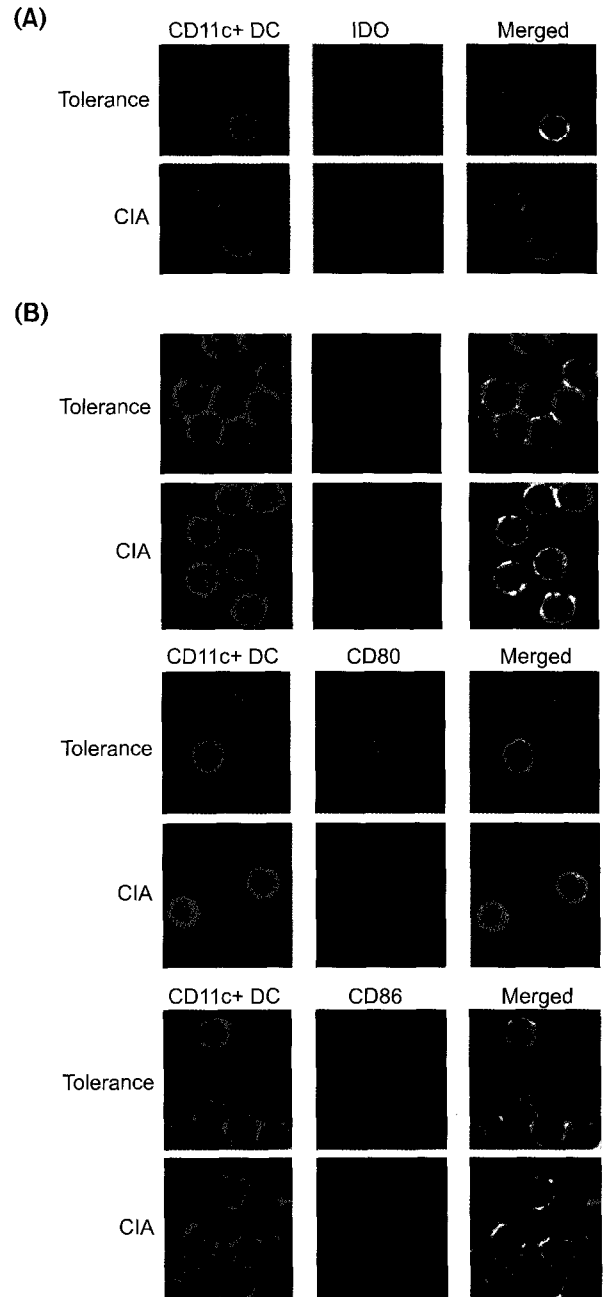


**Figure 3.** Expression of Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) mRNA in splenocytes. Mononuclear cells obtained from spleen of tolerance and CIA mice were cultured in 6 well plates at a concentration of  $1 \times 10^7$ /well with CII (40  $\mu$ g/ml) or IFN- $\gamma$  (10 ng/ml) or LPS (100 ng/ml) for 24 hours with or without pre-treatment with IDO inhibitor, 1-MT. After stimulation, CD11c<sup>+</sup> DCs were isolated using MACs. Then, RNA (2  $\mu$ g) was isolated and the expression of IDO mRNA was analyzed using RT-PCR.  $\beta$ 2 microglobulin ( $\beta$ 2M) was used as an internal control.

증가된 IDO mRNA 발현양상이 보고에서처럼 1-MT에 의해 변화하는지 조사하여 보았다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 관용 유도군과 대조군에서 CII로 자극한 CD11c<sup>+</sup> 수지상 세포에 1-MT를 처리하면 증가되었던 IDO mRNA가 1-MT에 의해 모두 감소됨을 알 수 있었다. IFN- $\gamma$ 나 LPS 자극 역시 1-MT에 의해 감소된 것으로 보아 경구관용 유도군과 대조군인 관절염 유도군의 CII, IFN- $\gamma$ 나 LPS에 의한 IDO mRNA 레벨은 모두 1-MT에 의해 감소됨을 확인할 수 있었다.

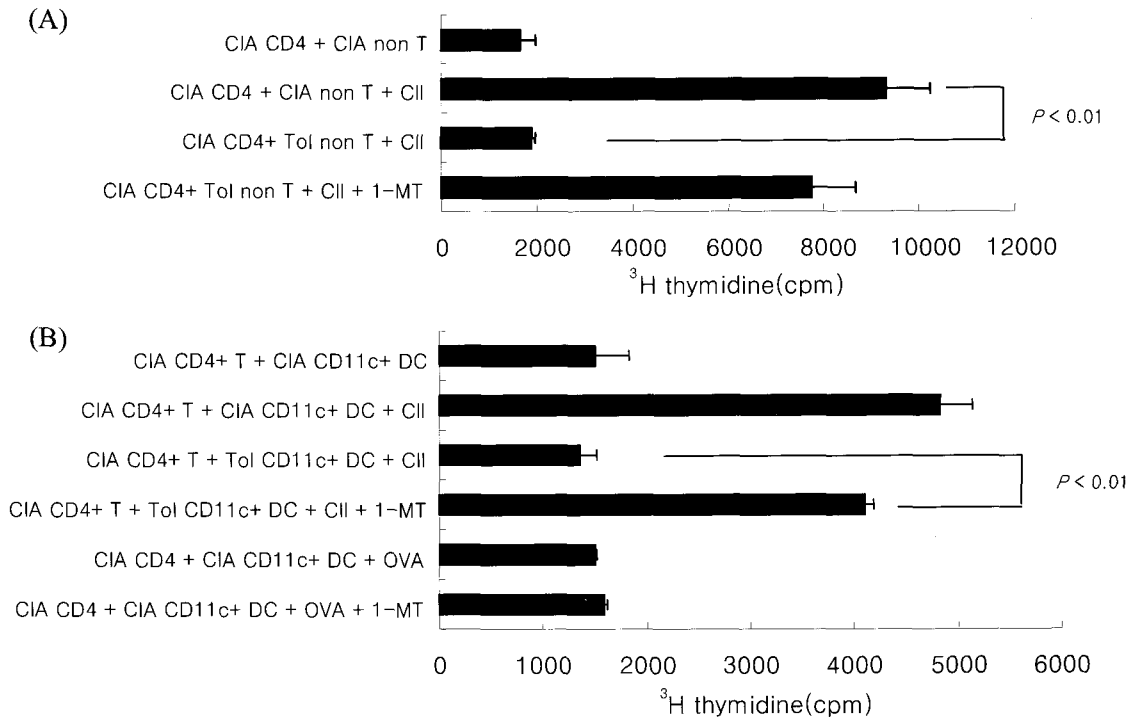
**관용이 유도된 마우스에서 IDO를 생산하는 수지상 세포의 특성 변화.** Human system에서 IDO를 발현하는 수지상 세포표면에 CD83<sup>+</sup>, CD80<sup>+</sup>, CD86<sup>HI</sup>, HLA-DR<sup>HI</sup>인 성숙한 상태라고 알려져 있다(33). 반면 Andrew 등에 의하면 미성숙 상태의 수지상 세포에서 IDO가 더 많이 발현한다는 논문도 보고된 바 있다(34). 그러나 아직까지 IDO를 발현하는 수지상 세포에 대한 특성을 비교해 볼 때 성숙도에 따라 IDO의 발현이 어떻게 다른지는 아직까지 정확하게 정의된 바가 없다. 본 실험에서도 IDO를 발현하는 수지상 세포가 어떤 특성을 가지는지 알아보기 위해 관절염 유도군과 관용 유도군의 비장세포를 anti-CD11c mAb와 anti-IDO mAb로 이중염색을 한 후 공초점 주사 현미경을 이용한 면역형광 염색법을 시행하여 수지상 세포의 IDO, MHC II 및 보조자극인자인 CD80, CD86 발현 정도를 살펴보았다. 그 결과 관용 유도군의 수지상 세포에서 발현하는 IDO 발현 정도는 앞서 결과와 마찬가지로 대조군인 관절염 유도군에 비해 높았으나(Fig. 4A), MHC II와 CD86는 관절염 유도군에 비해 낮게 발현되었다(Fig. 4B). 그러나 CD80 발현 정도는 두 군 모두 뚜렷한 양상의 차이를 관찰할 수 없었다(Fig. 4B). 이상에서 IDO는 미성숙 세포의 특징을 갖는 수지상 세포에서 발현됨을 확인할 수 있었다.

**관용이 유도된 마우스에서 IDO를 발현하는 수지상 세포가 CII에 특이적인 T 세포 증식반응에 미치는 변화.** Munn 등은 IDO를 발현하는 대식세포나 수지상 세포가 트립토판 결핍 기전을 통해 T 세포 증식반응을 억제하고, 이러한 억제효과는 IDO 특이적 억제제인 1-MT를 사용하면 역전된다고 보고하였다(24,33). 본 연구에서도 관용 유도군의 IDO를 발현하는 수지상 세포가 관절염의 자가항원인 CII에 특이적으로 반응하는 병인 T 세포에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 <sup>3</sup>H-thymidine을 이용한 증식반응을 조사하였다. 이를 위해 먼저 관절염 유도군 또는 관용 유도군의 비장세포 모두에서 microbead system을 이용하여 non T 세포와 CD4<sup>+</sup> T 세포를 분리하였다. 관절염 유도군에서 분리한 T 세포와 non T 세포를 공조 배양한 뒤 CII로 자극하여 증식반응을 관찰한 결과, CII로 자극하지 않은 경우에 비해 CII로 자극하면 관절염 유도군의 T 세포 증식반응은 현저히 증가하



**Figure 4.** Immunofluorescent confocal microscopic examination of the expression of IDO (A), MHC II, and costimulatory molecules (B) by splenic CD11c<sup>+</sup> DCs. Splenocytes were stained with FITC-labeled anti-CD 11c (green) and anti-IDO, anti-MHC II, anti-CD80, or anti-CD86 (red) and fixed before confocal microscopic examination. Isotype-control antibody staining was negative (not shown).

였다(9299 ± 930 cpm vs 1653 ± 322 cpm, p < 0.01). 이와는 반대로 관절염 유도군의 T 세포와 관용 유도군의 non T 세포를 공조 배양하면 CII 자극이 있어도 자극하지 않은 경우와 비교해 여전히 낮은 증식반응을 보였다(1906 ± 58 cpm vs 1653 ± 322 cpm). 여기에 IDO의 특이적 억제제



**Figure 5.** CD11c<sup>+</sup> DCs from CII-fed mice suppress CII-induced T cell proliferation via IDO-dependent manner. (A) Splenic CD4<sup>+</sup> T cells (1×10<sup>5</sup>/well) from CIA mice were cultured with splenic non T cells (1×10<sup>5</sup>/well) from CIA or tolerance mice in the presence or absence of CII (40 μg/ml) in 96 well, U-Bottomed plates for 3 days with or without pretreatment with 1-MT (200 uM). 1-MT was pretreated for 2 hr. Non T cells from tolerance mice suppressed CII-induced proliferation of CII-reactive CD4<sup>+</sup> T cells from CIA mice, which was partly abrogated by IDO inhibitor, 1-MT (76% inhibition). (B) CII-reactive splenic CD4<sup>+</sup> T cells (1×10<sup>5</sup>/well) from CIA mice and irradiated splenic non-T cells (1×10<sup>5</sup>/well) were culture with splenic CD11c<sup>+</sup> DCs (1×10<sup>4</sup>/well) from tolerance or CIA mice in the presence or absence of CII (40 μg/ml) in 96 well, U-Bottomed plates for 3 days with or without pretreatment with 1-MT (200 uM). 1-MT was pretreated for 2 hr. CD11c<sup>+</sup> DCs from tolerance mice suppressed CII-induced proliferation of CII-reactive CD4<sup>+</sup> T cells from CIA mice, which was partly abrogated by IDO inhibitor, 1-MT (75% inhibition). Data were presented as the mean cpm of triplicate cultures.

인 1-MT를 처리하면, CII에 대한 증식 억제반응이 회복 되는 것을 관찰할 수 있었다(1906 ± 58 cpm vs 7732 ± 937 cpm, p<0.01)(Fig. 5A).

다음은 비장세포로부터 CD11c<sup>+</sup> 수지상 세포를 분리한 뒤 CII에 대한 병인 T 세포의 증식반응을 관찰하였다. 그 결과 관절염 유도군의 T 세포와 CD11c<sup>+</sup> 수지상 세포에 CII를 처리한 경우보다 관용 유도군의 CD11c<sup>+</sup> 수지상 세포와 관절염 유도군의 T 세포에 CII를 처리하였을 때 앞서 비장세포 결과와 마찬가지로 낮은 증식반응이 확인되었다(1503 ± 328 cpm vs 687 ± 62 cpm, P<0.03) (Fig 5B). 여기에 다시 1-MT를 처리하면 관절염 유도군의 CD11c<sup>+</sup> 수지상 세포와 CD4<sup>+</sup> T세포에 CII로 자극한 조건과 유사한 정도로 회복되는 것이 관찰되었다(4823 ± 322 cpm vs 4105.5 ± 87 cpm). 그러나 CII 반응성에 대한 음성 대조군으로 ovalbumin (OVA)을 처리하면 CII에 대한 자극반응과 비교할 때 반응성이 낮았으며 여기에 1-MT를 처리하여도 별다른 차이를 발견할 수 없었다 (506 ± 15 cpm vs 595 ± 21 cpm).

## 고 찰

경구 관용이란 항원을 경구로 투여하면 이에 대한 면역 반응을 유도하는 현상으로 Nagler-Anderson 등이 제 2형 콜라겐을 경구 투여하여 관절염을 억제하였다는 논문이 발표된 이래 지금까지 이에 대한 많은 논문들이 발표되었다(1-4). 경구관용이 유도되는 과정에는 생체 내 여러 가지 면역 세포들과 이들이 분비하는 조절인자들이 관여할 것으로 생각한다. 경구 관용 유도에 관여하는 중요한 면역 세포로는 수지상 세포(dendritic cells)를 들 수 있으며, 성숙 상태나 주위 환경에 따라 관용 유도를 일으키기도 하고 면역반응을 일으킨다고 알려져 있다(33). 수지상 세포가 미성숙(immature) 또는 휴지기 상태인 경우 항원에 대해 관용현상이 나타나는 반면 성숙한 수지상 세포는 항원에 대한 T 세포의 면역 반응을 일으킨다고 알려져 있다(33).

최근 들어 주목을 받고 있는 면역 관용 유도에 관여하는 중요한 인자로 indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO)를



들 수 있다. IDO란 우리 몸에 필수 아미노산인 트립토판을 분해하는데 사용되는 효소로 주로 대식 세포와 수지상 세포에서 발현된다고 알려져 있고, IDO를 발현하는 세포는 T 세포의 증식반응을 억제하고, 생체 내에서는 면역반응을 줄여 면역관용이 일어난다는 보고가 있었다(23,24,35,36).

따라서 본 연구에서는 CII를 반복적으로 경구 투여하여 CII에 대한 면역 관용이 유도된 DBA/1 마우스에 관절염을 유발시킬 때 수지상 세포에서 IDO를 발현하는지 조사하고, 이로 인해 일어나는 면역기능의 변화를 조사하여 염증이 억제되는 기전을 알아보려고 하였다.

본 연구에서는 먼저 관절염 유도 후 비장세포에서 IDO의 변화 양상을 유세포 분석을 통해 관찰하였다. 그 결과 관절염 유도군이나 정상군에 비해 경구관용 유도군의 비장세포에서 IDO의 발현이 가장 높았고(결과 제시하지 않음) 비장 세포로부터 수지상 세포를 분리한 후 IDO의 변화를 유세포 분석기로 관찰한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 자극 전에는 관용 유도군에서 관절염 유도군에 비해 약간 증가하는 정도로 발현되는 것이 관찰되었으나 CII로 자극하면 관용 유도군에서 IDO 발현이 약 2배 가량 증가하였다(Fig. 2). 이전 보고에 따르면 CTLA4 면역 글로불린으로 ligation을 하지 않거나 IDO 유전자가 결핍된 마우스의 수지상 세포는 오히려 면역성을 가진다는 보고가 있었다(14,33). 본 연구에서는 이러한 면역 글로불린이나 유전자 과발현 시스템을 사용하지 않은 관절염 모델 시스템에서 CII 자극 시 IDO는 관절염 유도군에 비해 관용 유도군에서 현저하게 과발현됨을 확인할 수 있었으며 여기에 IDO의 억제제인 1-methyl-DL-tryptophan (1-MT)를 처리하면 현저하게 줄어드는 것이 관찰되었다(Fig. 2, 3). 이처럼 관절염 유도에 앞서 CII를 먹인 관용 유도 마우스의 수지상 세포에서 현저하게 IDO가 발현되는 이유로, 경구를 통하여 들어간 CII가 비장의 수지상 세포들로 하여금 IDO 발현을 촉진시킨 결과로 추정되며, 항원특이적으로 경구관용을 일으킨 관절염 동물에서 자가항원인 CII에 의해 IDO 발현이 가능함을 제시하였다고 생각한다.

IDO 발현을 transcription과 translation 수준에서 조사해 본 결과 관용 유도군의 비장세포에서 관절염 유도군의 비장세포에 비해 약간 증가하였으며, CII로 자극하면 IDO가 발현하였고, 또한 IDO 특이적 유도제인 IFN- $\gamma$ 나 LPS 자극 시에도 역시 실험적으로 의미 있는 증가를 보였다. 관절염 유도군의 IDO 발현 정도는 DBA/1 마우스 정상군에 비교해 자극하기 전이나 CII, IFN- $\gamma$ 나 LPS에서 모두 증가한 것으로 보아 관절염 동물모델에서 관절염증이 진행되더라도 IDO를 연속적으로 발현함으로써 염증을 제어하려는 하나의 의미로 해석해 볼 수 있겠다. 또한 IDO의 증가는 IDO의 특이적 억제제인 1-MT (1-

methyl-dl-tryptophan)를 전 처리한 뒤 자극하면 자극제에 의해 증가된 IDO가 감소하는 현상이 관찰되는 바 관용 유도군에서 IDO가 관용유도의 조절자임을 실험을 통해 확인할 수 있었다(Fig. 3, 4).

IDO를 발현하는 경구관용 유도군의 수지상 세포의 특성을 조사하기 위해 공초점 주사 현미경을 이용해 보조 자극인자와 MHC class molecule을 면역형광염색으로 염색해 본 결과 관절염 유도군에 비해 경구관용 유도군의 비장세포의 CD11c<sup>+</sup> 세포에서 IDO발현이 증가되었으며, 세포의 모양은 사람의 plasmacytoid DC의 모양과 유사하였고(결과 제시하지 않음) 세포 표면에 MHC II, CD86의 발현 정도는 관절염 유도군에 비해 낮은 것으로 조사되었다. 결과적으로 수지상 세포의 성숙도는 미성숙 상태(immature state)임을 관찰할 수 있었다. 그러나 또 다른 보조자극인자 중 CD80은 두 군 간의 별다른 차이를 보이지 않았다(Fig. 4).

경구 관용유도 모델에서 수지상 세포에서 IDO 발현을 조사하고 그것이 직접적으로 자가 항원 T 세포를 조절하거나 자가면역질환과 관련하여 어떤 직접적인 영향을 주는지에 대해서 아직 보고가 많지 않다(24,25,35-37). 그러나 본 연구를 통해 관용 유도군의 non T 세포, 특히나 수지상 세포에서 IDO를 발현한다는 사실과 간접적으로 IDO를 발현하는 수지상 세포가 관절염 유도군의 항원 특이적인 병인 T 세포 증식을 억제하는 데 관여한다는 사실을 아울러 확인할 수 있었다. 이는 경구 관용에 의한 염증 억제 과정에 IDO가 관여함을 시사하는 결과라고 추측해 볼 수 있겠다.

다시 말해 IDO를 발현하는 수지상 세포가 T 세포 증식반응을 억제한다는 기전으로 트립토판의 결핍이나 그 대사 산물에 관여한다는 가설을 뒷받침하는 연구가 보고된 바 있다(35,36).

이상의 내용을 요약하면 DBA/1 마우스에서 관절염을 유도하기에 앞서 그 원인 항원인 CII를 반복적으로 경구 투여하여 CII에 대한 면역 관용이 유도되면, 관용 유도군 비장세포와 수지상 세포에서 모두 IDO 발현이 증가하였다. IDO의 특이적 억제제인 1-MT를 사용하였을 때 증가된 IDO 발현이 억제되는 것으로 보아 IDO 기전을 통해 CII 특이적인 수지상 세포가 면역 관용에 관여함을 시사한다. 또한 IDO를 발현하는 수지상 세포의 특성을 조사해 본 결과 미성숙 상태(immature state)임을 알 수 있었고, 관용 유도군의 수지상 세포는 IDO에 의존적으로 CII 자극에 대한 관절염 유도군의 병인 T 세포의 증식반응을 감소시킬 수 있다는 사실을 아울러 확인하였다. 따라서 본 연구를 통해 경구 관용 유도군에 IDO의 발현은 궁극적으로 자가항원 특이적인 T 세포의 증식억제 반응을 유도함으로써 자가 면역질환의 면역 관용을 이해하는데 하나의 표적 물질로 작용할 수 있을 것으로 기

대해 본다.

## 참 고 문 헌

- Nagler-Anderson C, Bober LA, Robinson ME, Siskind GW, Thorbecke GJ: Suppression of type II collagen-induced arthritis by intragastric administration of soluble type II collagen. *Proc Natl Acad Sci USA* 83;7443-7446, 1986
- Garcia G, Komagata Y, Slavin AJ, Maron R, Weiner HL: Suppression of collagen-induced arthritis by oral or nasal administration of type II collagen. *J Autoimmun* 13;315-324, 1999
- Fishman-Lobell J, Friedman A, Weiner HL: Different kinetic patterns of cytokine gene expression in vivo in orally tolerant mice. *Eur J Immunol* 24;2720-2724, 1994
- Tsuji NM, Mizumachi K, Kurisaki J: Interleukin-10-secreting Peyer's patch cells are responsible for active suppression in low-dose oral tolerance. *Immunology* 103;458-464, 2001
- Friedman A, Weiner HL: Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci USA* 91;6688-6692, 1994
- Steinman RM, Nussenzweig MC: Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 99;351-358, 2002
- Wakkach A, Fournier N, Brun V, Breittmayer JP, Cottrez F, Groux H: Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo. *Immunity* 18;605-617, 2003
- Derry CJ, Harper N, Davies DH, Murphy JJ, Staines NA: Importance of dose of type II collagen in suppression of collagen-induced arthritis by nasal tolerance. *Arthritis Rheum* 44;1917-1927, 2001
- Daniels LK: Rapid in-office and in-vivo desensitization of an injection phobia utilizing hypnosis. *Am J Clin Hypn* 18;200-203, 1976
- Mowat AM, Parker LA, Beacock-Sharp H, Millington OR, Chirido F: Oral tolerance: overview and historical perspectives. *Ann N Y Acad Sci* 1029;1-8, 2004
- Dubois B, Goubier A, Joubert G, Kaiserlian D: Oral tolerance and regulation of mucosal immunity. *Cell Mol Life Sci* 62;1322-1332, 2005
- Kelsall BL, Leon F: Involvement of intestinal dendritic cells in oral tolerance, immunity to pathogens, and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* 206;132-148, 2005
- Yoshida R, Nukiwa T, Watanabe Y, Fujiwara M, Hirata F, Hayaishi O: Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase activity in the small intestine and the epididymis of mice. *Arch Biochem Biophys* 203;343-351, 1980
- Yoshida R, Urade Y, Nakata K, Watanabe Y, Hayaishi O: Specific induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by bacterial lipopolysaccharide in the mouse lung. *Arch Biochem Biophys* 212;629-637, 1981
- Malina HZ, Martin XD: Indoleamine 2,3-dioxygenase: antioxidant enzyme in the human eye. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 234;457-462, 1996
- Moffett JR, Espey MG, Namboodiri MA: Antibodies to quinolinic acid and the determination of its cellular distribution within the rat immune system. *Cell Tissue Res* 278;461-469, 1994
- Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ: Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med* 9;1269-1274, 2003
- Lee JR, Dalton RR, Messina JL, Sharma MD, Smith DM, Burgess RE, Mazzella F, Antonia SJ, Mellor AL, Munn DH: Pattern of recruitment of immunoregulatory antigen-presenting cells in malignant melanoma. *Lab Invest* 83;1457-1466, 2003
- Taylor MV, Feng GS: Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *Faseb J* 5;2516-2522, 1991
- Pfefferkorn ER: Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci USA* 81;908-912, 1984
- Gupta SL, Carlin JM, Pyati P, Dai W, Pfefferkorn ER, Murphy MJ Jr: Antiparasitic and antiproliferative effects of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme expression in human fibroblasts. *Infect Immun* 62;2277-2284, 1994
- Mellor AL, Munn DH: Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunol Today* 20;469-473, 1999
- Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL: Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* 189;1363-1372, 1999
- Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW, Young HA: Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol* 164;3596-3599, 2000
- Xiao BG, Liu X, Link H: Antigen-specific T cell functions are suppressed over the estrogen-dendritic cell-indoleamine 2,3-dioxygenase axis. *Steroids* 69;653-659, 2004
- Mellor AL, Sivakumar J, Chandler P, Smith K, Molina H, Mao D, Munn DH: Prevention of T cell-driven complement activation and inflammation by tryptophan catabolism during pregnancy. *Nat Immunol* 2;64-68, 2001
- Hwang SL, Chung NP, Chan JK, Lin CL: Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) is essential for dendritic cell activation and chemotactic responsiveness to chemokines. *Cell Res* 15;167-175, 2005
- Trentham DE, Townes AS, Kang AH: Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 146;857-868, 1977
- Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H, Shevach EM: CD4(+)CD25(+) regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor beta1 production and responsiveness. *J Exp Med* 196;237-246, 2002
- Hirofuji T, Kakimoto K, Hori H, Nagai Y, Saisho K, Sumiyoshi A, Koga T: Characterization of monoclonal antibody specific for human type II collagen: possible implication in collagen-induced arthritis. *Clin Exp Immunol* 62;159-166, 1985
- Bozza S, Fallarino F, Pitzurra L, Zelante T, Montagnoli C, Bellocchio S, Mosci P, Vacca C, Puccetti P, Romani L: A crucial role for tryptophan catabolism at the host/*Candida albicans* interface. *J Immunol* 174;2910-2918, 2005
- Alexander AM, Crawford M, Bertera S, Rudert WA, Takikawa O, Robbins PD, Trucco M: Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted NOD islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes. *Diabetes* 51;356-365, 2002
- Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaveri KG, Johnson TS, Keskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, Burgess R, Slingluff CL Jr, Mellor AL: Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 297;1867-1870, 2002
- Tan PH, Beutelspacher SC, Wang YH, McClure MO, Ritter MA, Lombardi G, George AJ: Immunolipoplexes: an efficient, nonviral alternative for transfection of human dendritic cells with potential for clinical vaccination. *Mol Ther* 11;790-800, 2005

35. Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P: Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol* 24; 242-248, 2003
  36. Mellor AL, Munn DH: Tryptophan catabolism and regulation of adaptive immunity. *J Immunol* 170;5809-5813, 2003
  37. Terness P, Chuang JJ, Bauer T, Jiga L, Opelz G: Regulation of human auto- and alloreactive T cells by indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)-producing dendritic cells: too much ado about IDO? *Blood* 105;2480-2486, 2005
-