

영유아기 아토피 환아에서 말초혈액 T 림프구에서 Interleukin-4 유전자의 DNA 메틸화 변화

한양대학교 의과대학 소아과학교실, 울산대학교 의과대학 병리학교실*

오재원 · 염명걸 · 김창렬 · 설인준 · 신수아 · 이하백 · 장세진*

DNA Methylation Change of IL-4 Gene from T Cell in Allergic Children

Jae Won Oh, M.D., Myung Gul Yum, M.D., Chang Ryul Kim, M.D., In-Joon Seol, M.D.
Su A Shin, M.D., Ha Baik Lee, M.D. and Se Jin Jang, M.D.*

Department of Pediatrics, College of Medicine, Hanyang University,
Department of Pathology*, Asan Medical Center,
University of Ulsan, College of Medicine, Seoul, Korea

Purpose : An understanding of the immunological process is required if primary prevention of atopic diseases is to be developed in early childhood. But, it is too hard to distinguish atopy from nonatopy under the age of two clinically, because the expression of phenotype and cytokines is vague in early childhood. We evaluated DNA methylation changes at Th2 interleukin-4 gene in peripheral blood from atopic children.

Methods : We selected 15 allergic children(mild : eight, moderate to severe : seven) and seven normal controls by using family allergy scores and clinical histories. We measured Total IgE and *Der f II* specific IgE levels and cultured peripheral blood mononuclear cells with *Der f II* stimulation and extracted DNA from *Der f II* specific T cells. We examined the change of CpG methylation in DNA from atopic and nonatopic children.

Results : In T cells from normal children, IL-4 DNA were predominantly methylated; otherwise, CpG demethylation occurred in *Der f II* specific T cells from allergic children.

Conclusion : IL-4 DNA methylation changes occurred in T genes from allergic children and DNA methylation assay in early childhood. (Korean J Pediatr 2005;48:634-639)

Key Words : Methylation, Allergy, Child, T cell

서 론

영유아기 사이토카인 생성은 성인에서의 사이토카인의 생성기전과 차이가 있다는 증거가 제시되고 있어 영아에서 성인에 이르기까지 면역체계가 점차적으로 성숙되고 있음을 시사하고 있다^{1,2)}. 이중에서도 알레르기과 많은 연관이 있는 것으로 알려져 있는 사이토카인으로 Th2 림프구에서 분비되어 B림프구의 성숙과 면역글로불린E의 생성에 밀접한 관계가 있는 interleukin

(IL)-4와 호산구 분비, 분화, 그리고 성숙에 밀접한 연관이 있는 IL-5 등을 대표적으로 들 수 있다^{3,4)}. 지금까지의 신생아기 사이토카인에 대한 연구 결과에 따르면 자극된 림프구에서의 IL-4, interferon- γ , granulocyte monocyte-colony stimulating factor(GM-CSF)의 생성은 성인에 비해 감소되어 있는 반면 IL-2, IL-6, TNF- α (tumor necrosis factor- α) 등은 성인과 비슷하게 분비하는 것으로 알려져 있다. 이러한 배경으로 신생아기나 영유아기에서 혈중이나 다른 체액에서 사이토카인이나 다른 매개체의 분비에 의해 아토피성 유무를 예견하는 것은 어렵다^{1,5)}.

세포의 유전자 발현양상을 결정하는 한 기전으로 DNA 메틸화(methylation)에 대한 연구가 최근 활발해지고 있다. 세포가 분화하여 한 표현형으로 정착되는 과정에서 특정 유전자의 발현 조절부위의 메틸화에 의한 발현억제와 탈메틸화(demethylation)에 의한 발현이 중요한 기전이 된다는 것이 발견된 이후 면역계

본 연구는 2002 대한소아과학회 삼아학술상 연구비의 보조로 이루어졌음.

접수 : 2004년 12월 30일, 승인 : 2005년 3월 10일

책임저자 : 오재원, 한양의대 구리병원 소아과

Correspondence : Jae Won Oh, M.D.

Tel : 031)560-2254 Fax : 031)552-9493

E-mail : jaewonoh@hanyang.ac.kr

에서도 최근 이에 대해 많은 연구가 보고되고 있다⁶⁻⁸⁾.

신생아기나 영유아기 precursor T 림프구(naive T cell)는 IL-4를 생성하는 Th2 림프구와 IFN- γ 를 생성하는 Th1 림프구로 분화된다. 이 분화 과정은 IFN- γ , IL-4, IL-5, 그리고 IL-13 유전자 부위의 DNase I hypersensitivity의 변화(long range changes)와 탈메틸화에 의해 수행되는 것으로 알려져 있다⁹⁾.

유전자 배열에서 CpG 섬(island)의 cytosine 메틸화는 chromatin 구조의 변형을 초래하여 그 부위 유전자의 전사를 억제하는 역할을 하고, 여성의 X 염색체 불활성화의 기전이 되며, 포유류 발생과정에서 조직 특이 유전자(tissue-specific genes)의 발현 양상을 확립하는데 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁰⁾. T 림프구의 분화과정에서 naive CD4 T cell은 IL-4 유전자와 IL-13 유전자 사이와 IL-4 유전자의 coding 부위는 과메틸화(hypermethylation) 되며 Th2 분화과정 중에 이 부위가 탈메틸화된다. 반면 conserved noncoding sequence(CNS-2)를 함유한 3'-DNase I-hypersensitive(DH) region(site V)은 계속 보존된 상태를 유지하며 반대되는 현상을 보이는데 naive T 림프구 상태에서는 저메틸화(hypomethylation)를 보이다가 Th1 분화과정 중에는 과메틸화를 나타낸다. 최근 naive CD4 T 세포가 Th1세포와 Th2세포로 분화해 가는 과정의 이상과 이들 세포가 분비하는 사이토카인이 영유아기 알레르기 발현과 관련이 있다는 보고가 되고 있다¹¹⁾. 이에 본 연구에서는 혈중 T림프구에서 IL-4 유전자의 메틸화 상태를 조사하여 영유아기에서 아토피환자와 정상 환자에서 IL-4 메틸화가 차이가 있는 지를 알아보고자 정상 영유아 혈중 T림프구와 알레르기 환자에서의 IL-4

유전자 CpG 섬의 메틸화를 비교하였다.

대상 및 방법

1. 대 상

한양대학교 구리병원 소아알레르기클리닉을 내원한 3세 미만 소아에 대해 소아의 병력과 가족력을 조사하여 Table 1과 기술한 바와 같이 family allergy score(FAS)^{12, 13)}와 집먼지 진드기 (*Dermatophagoides farinae*) 알레르기가 증명된 개인력을 기준으로 알레르기질환을 갖고 있는 환자 중 알레르기 고위험군(FAS 6점 이상) 7명과 알레르기 저위험군(FAS 6점 미만) 8명, 그리고 정상 대조군 7명을 대상으로 분류하였다(Table 2). 대상 소아에서 멸균된 방법으로 헤파린 튜브(1,000 U)에 혈액을 7 mL를 채취하였다. 이를 *Dermatophagoides farinae*의 알레르겐의 일종인 *Der f II*에 대한 특이 IgE 항체 검사와 총 IgE치 검사 위해 3 mL와 DNA 추출을 위해 4 mL을 분리 보관하였다.

2. 총 IgE 치와 *Der f II* 특이 IgE 검사

채취된 혈액 각각 1 mL 혈청을 분리하여 총 IgE치는 IgE PRIST kit(Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden)를 이용하였으며 *Der f II* 특이 IgE 검사는 UniCAP system(Pharmacia Diagnostics AB, Uppsala, Sweden)을 이용하여 측정하였다.

3. 말초혈액 단핵구 분리

말초혈액의 단핵구(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 분리하기 위해 50 mL 원심분리관에 헤파린이 섞인 전혈 15 mL을 넣고 2 mM L-glutamine, 100 IU/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin이 혼합된 RPMI-1640을 동량을 섞고 난 후 ficoll-hypaque 10 mL를 그 위에 각 층이 섞이지 않게 천천히 첨가하였다. 그 후 원심분리관을 25 $^{\circ}$ C, 1,500 rpm의 속도로 30분간 원심분리하여 침전된 단핵구가 포함된 buffy coat를 분리하여 RPMI-1640으로 3회 세척하여 정제된 말초혈액의 단핵구를 보관하였다.

Table 1. Family Allergy Score(FAS) System

	Obious*	Score	Probable†	Score
Father	(+, -)	3	(+, -)	2
Mother	(+, -)	3	(+, -)	2
Siblings	(+, -)	3	(+, -)	2
Grandparents	(+, -)	2	(+, -)	1
Uncle or aunt	(+, -)	2	(+, -)	1

* express history to be diagnosed allergy by medical doctor
 † express history to have suspicious allergic symptoms without any diagnosis for allergic diseases

Table 2. Characteristics of Subjects

	High risk allergics	Low risk allergics	Normal controls
Number	7	8	7
Age(month)	23.3 \pm 14.7	20.8 \pm 18.4	18.7 \pm 15.7
<i>D.f</i> (+) specific IgE	22.5 \pm 12.3	16.7 \pm 14.2	0
Family allergy score	8.6 \pm 6.3	4.5 \pm 3.4	0
Total eosinophil(/mm ³)	693.5 \pm 349.2*	324.4 \pm 371.8	238.4 \pm 321.3
Total IgE(IU/mL)	169.4 \pm 134.1*	121.8 \pm 112.8*	21.3 \pm 18.7

D.f(+) grade: *Dermatophagoides farinae* specific IgE level by UniCap assay
 *P<0.05

4. *Der f* II 특이 T세포 배양

Petri 배양판에 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 goat anti-mouse IgG(Fc specific) in Tris-HCl(pH9.5)를 넣어 3시간 동안 coating한 후 생리식염수로 3회 세척한 후 세포수 2×10^6 개당 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-CD3 단클론 항체와 10% FBS with streptomycin and gentamycin을 세포 1×10^6 당 1 mL, PMA(phorbol 12-myristate, 13-acetate; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 10 ng/mL, Ca inophore A23187(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 500 ng/mL, *Der f* II 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 혼합하여 분리한 1×10^6 의 말초혈액 단핵구와 함께 37°C, 5% CO₂ 배양기에 48시간 배양하였다. 그 후 15,000 rpm, 10분간 원심분리한 후 배양액을 수집한 후 rIL-2(1 nM)을 추가하여 상기에 기술된 같은 조건의 완전배양액을 mL 당 세포수가 1×10^6 개 초과되지 않도록 하여 7-9일간 배양을 하였다. 그 후 제 2차 자극을 위하여 세포를 2회 세척하고 완전히 rIL-2 잔여물을 제거하기 위해 45분간 37°C 배양기에 9시간을 배양한 후 1차 자극과 같은 조건의 항 CD3 단클론 항체, *Der f* II 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 넣어 37°C 배양기에 9시간을 배양한 후 15,000 rpm, 10분간 원심분리 후 부유액과 *Der f* II 특이 T세포를 4°C에 분리 보관하였다.

5. DNA extraction

배양된 말초혈액 단핵구(200 μL , 2×10^6)를 각 15 mL 원심분리관에 넣고 1,500 \times g, 25°C에서 10분간 원심분리한 후 부유액은 흡인하고 1% PBS 1 mL로 pellet을 세척하고, Effendorf tube로 옮긴 후 1,500 \times g, 25°C에서 10분간 원심분리 하였다. RNAzol(0.2 mL RNAzol/ 10^8 cells)을 첨가하여 5분간 얼음 속에 4°C보관한 후 200 μL chlorform을 넣고, 1분간 혼합한 후 5분 동안 정확히 얼음 속에서 4°C보관한 후 13,500 \times g, 0°C에서 20분간 원심분리한 후 부유액을 버리고, 동량의 isoprophenol을 혼합하여 흔든 후 30분 이상 -70°C 냉동고에 보관한 뒤 15,000 rpm, 0°C에서 15분간 원심분리한 후 다시 부유액은 버리고, 75% Ethanol 1 mL를 첨가하여 4°C, 15,000 rpm 15분간 원심분리를 반복한 후 부유액을 버리고 10 μL diethylpyrocarbonate-treated distilled water(DEPC-H₂O)로 재세척한 후 -70°C에 냉동보관 하였다. RNA를 사용하기 전에 순도를 측정하기 위해 OD 측정하였다. 파장 길이 260/280비가 1.5-2.0이 되도록 교정하여 그 RNA를 이용하며, 순도를 확인하기 위해 1% gel로 전기영동법(100 voltage, 40분)을 시행하였다. 2 μL 의 RNA aliquot에 2.5 U/ μL cloned moloney murine leukemia virus reverse transcriptase(M-MLV reverse transcriptase; Gibco BRL), 각 각의 1 mM dNTPs, 1 U/ μL RNase inhibitor, 2.5 μL oligo(dT) 16, 1 μL 10 \times PCR buffer(500 mM), 4 μL MgCl₂(5 mM)로서 전체량이 20 μL 가 되게 만든 다음 thermocycler를 이용하여 42°C 15분, 99°C 10분, 5분 정지를 1 cycle로 30회를 시행한 후 cDNA는 사용할 때까지 -20°C에서 냉동보관

하였다.

6. IL-4 유전자 두 번째 intron의 CpG 섬에 대한 메틸화 분석

정상 소아와 알레르기 환아로부터 분리한 림프구에서 추출한 DNA를 sodium bisulfite로 처리하여 메틸화 여부를 메틸화 특이 PCR(methylation specific PCR) 방법으로 검사하였다. IL-4 유전자의 두 번째 intron의 CpG 섬에 대한 메틸화 분석을 위해 두 쌍의 methylation specific oligonucleotide primer를 제작하였고 그 염기서열은 Table 3과 같다. 메틸화된 DNA와 메틸화 되지 않은 DNA에 대한 대조군으로 사람의 5번 염색체의 IL-4 유전자의 두 번째 인트론 부위(Gene Bank Accession NT_007072)의 CpG 섬을 포함한 부분의 DNA를 PCR로 증폭한 후 PCR 산물의 일부를 *SssI* 효소 처리로 CpG 부위를 메틸화 시킨 후 메틸화 시킨 PCR 산물(M)과 메틸화 시키지 않은 PCR 산물(U)을 Sodium bisulfite로 처리(sodium bisulfite modification)하여 사용하였다. Sodium bisulfite 처리과정은 다음과 같았다. DNA(2 μg)를 50 mL PBS에 섞은 후 2 M NaOH 5.5 mL을 추가하여 37°C에 10분간 denaturation 시킨 후 10 mM hydroquinone 30 mL을 넣고 3 M sodium bisulfite 520 mL을 섞은 후 50°C에서 16시간 배양하였다. Wizard miniprep column(Promega A7280, Palo alto, CA)을 이용하여 DNA를 정제한 후 70°C의 증류수 50 mL를 넣어 회수하고 3 M NaOH 5.5 mL을 넣고 DNA 재침전(reprecipitation)을 한 후 증류수 20 μL 에서 용해하였다. Methylated sequence specific(M) primer와 unmethylated sequence(U) specific primer를 사용하여 multiplex PCR을 시행하여 IL-4 유전자의 두 번째 intron에 위치한 CpG 섬의 두 부위의 methylation specific PCR 신호강도를 측정하여 정상아와 알레르기 환아의 메틸화를 비교하였다.

결 과

1. 연구 대상의 특성

알레르기 질환에 대한 고위험군(FAS 6점 이상) 7명과 저위험군(FAS 6점 미만) 8명, 그리고 정상 대조군 7명을 대상으로 분류하여 이들의 총 호산구치와 혈청 IgE치를 비교하였다(Table

Table 3. Methylation Specific PCR Primers for Analysis of IL-4 Gene Methylation Status

	Sequence(5' to 3')	Product size
IL4-MF1	ttataggtatttgttattacgcttc	118
IL4-MR1	aaccgaacaacaacgaatcagc	
IL4-UF1	attataggtatttgttattatgttt	130
IL4-UR1	cacttataaaacccaacaaacaaca	
IL4-MF2	gtttcgttttgcgtttgcgttgc	205
IL4-MR2	acactcacgaataaccctcg	
IL4-UF2	gttttgttttgtttgtgtgtgt	203
IL4-UR2	cactcacaataaccctca	

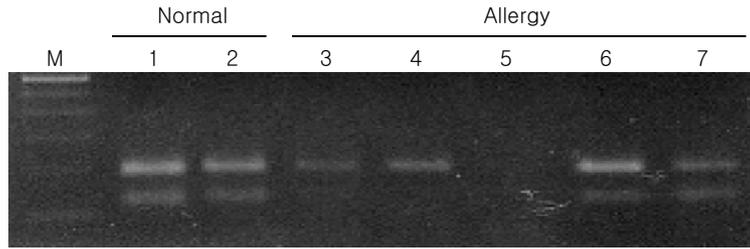


Fig. 1. DNA methylation change of IL-4 gene from T cell in peripheral blood. IL-4 DNA were predominantly methylated in T cells from normal children(1, 2), otherwise, CpG demethylation occurred in *Der f* II specific T cell from allergic children(moderate to severe; 3, 4, 5, mild; 6, 7). M means the fragment size marker.

2). 고위험군이 저위험군과 정상 대조군에 비해 총 호산구치가 유의하게 높았으며(고위험군 : $693.5 \pm 349.2/\text{mm}^3$, 저위험군 : $324.4 \pm 371.8/\text{mm}^3$, 정상 대조군 $238.4 \pm 321.3/\text{mm}^3$, $P < 0.05$), 혈청 총 IgE치는 고위험군이 정상 대조군에 비해 의미 있게 높았다(고위험군 : 169.4 ± 134.1 IU/mL, 저위험군 : 121.8 ± 112.6 IU/mL, 정상 대조군 : 21.3 ± 18.7 IU/mL, $P < 0.05$).

2. IL-4 유전자의 CpG 섬에 대한 메틸화 분석

정상 대조군에 비해 알레르기 환아군에서 IL-4 유전자의 두 번째 인트론에 위치한 CpG 섬의 두 부위 모두에서 메틸화 특이 PCR 신호강도가 약하게 나타나는 반면 정상 대조군에서는 118 bp PCR 산물과 205 bp PCR 산물이 모두 강하게 나타나서 메틸화 된 것으로 보이며(Fig. 1에서 1, 2번), 알레르기 환아 중에서 고위험군 알레르기 환아에서는 한 부위(4명; Fig. 1에서 3, 4 번), 두 부위 모두(3명; Fig. 1에서 5번)에서 탈메틸화가 일어났으며 저위험군 알레르기 환아에서는 두 부위 모두(Fig. 1에서 6, 7번)에서 메틸화가 일어난 것으로 확인되었다.

고 찰

본 연구에서는 영유아기에 알레르기 질환이 유전자 배열을 통하여 표현되는 지를 알아보려고 하였다. 연구 대상군의 말초혈액에서 Th2 림프구 interleukin-4 유전자의 DNA 메틸화 변화를 알아보려고 기존 알레르기가 있는 환아군을 고위험군과 저위험군으로 분류하고 정상 대조군과 함께 대상으로 연구를 실시하였다. 그 결과 고위험군 알레르기 소아에서 IL-4 유전자의 두 번째 인트론에 위치한 CpG 섬의 두 부위 모두에서 메틸화 특이 PCR 신호강도(118 bp PCR 산물과 205 bp PCR 산물)가 약하게 나타났다. 이러한 현상은 저위험군 알레르기에서는 두 부위 또는 한 부위에서 탈메틸화가 일어나고 있는데 이는 탈메틸화 현상이 알레르기가 심한 환자일수록 더 잘 진행된다는 것을 시사하고 있다.

면역체계가 완전히 성립되지 않은 2세 미만의 소아에서는 임상적으로 확실한 증상이 있거나 알레르기 가족력이 있는 경우를 제외하고 실제적으로 아토피 유무를 판별하는 것은 성인에 비해

여러 제한점이 있다. 특히 이 시기에는 혈청 IgE치 등이 성인치에 도달되어 있지 않아 알레르겐 피부시험이나 알레르겐 혈청 검사만으로 아토피 유무를 판정하기 어렵다. 본 연구에서는 연구의 대상이 2세 미만의 소아이기 때문에 혈청학적인 검사만을 분류 기준으로 하지 않고 대상군의 가족력과 알레르기 개인병력을 중심으로 혈청학적 검사를 참고로 중증도를 분류하였다. 이러한 이유로 인하여 처음 천명이 들리는 영유아의 경우 세기관지염과 영아 천식을 감별하는 것은 어렵고 아토피피부염인 경우 알레르기인 것인지 아니면 다른 원인에 의한 것인지를 감별하기가 어렵기 때문에 이를 구별하기 위하여 여러 방법을 통하여 이를 증명하고자 하였으나 아직 확실하게 밝혀진 방법이 없어 출생하였을 때를 전후하여 사이토카인 등 매개체를 이용하여 아토피를 감별하고자 시도된 적 있으나 이런 경우 실험실적인 방법으로 naive T 세포를 미리 자극하여 인위적으로 Th세포를 만들어 나타나는 사이토카인을 측정하였던 것으로서 임상적으로 대상군이 어떠한 알레르겐에 특이 반응을 일으키는 지를 구별할 수가 없어 실질적으로 임상에 적용하기는 어렵다^{14, 15}. 따라서 영유아에서 아토피 유무 판별을 위하여 새로운 접근방법이 필요한 실정이다.

본 연구에서는 아토피와 관련된 Th2세포의 분화과정에서 일어나는 유전자의 epigenetic pattern의 변화를 이용하여 영유아에서 아토피 유무 판별을 할 수 있는지를 메틸화 특이 PCR 방법으로 검사하였다. 그 결과 아토피 소아군에서 IL-4 유전자의 탈메틸화가 정상 대조군의 DNA에 비해 높게 나타났다.

IL-4와 IL-13은 주로 Th2세포에서 생성되는 알레르기 염증 반응에 있어 중요한 역할을 하는 사이토카인으로 잘 알려져 있어 naive T세포가 Th1이나 Th2세포로 분화를 결정짓는데 중요한 사이토카인이 되며 B세포에서 면역글로불린 E로 전환하는데 중요한 역할을 하여 결과적으로 비만세포에서의 면역글로불린 E에 대한 수용성이 증가되어 비만세포의 활성도를 증가시키는데 주된 역할을 담당하게 된다¹⁶. Th2 전사 요인(transcription factor)으로 GATA-3와 c-Maf가 있는데 일반적으로 c-Maf에 의하여 IL-4 발현이 활성화되고 GATA-3에 의해 IL-4, IL-13의 발현을 조절하는 것으로 알려져 있다^{17, 18}.

쥐에서 IL-4, IL-13의 locus는 인간의 locus와 유사한데 이중

인간과 쥐 사이의 전환되는 염색배열이 401-bp noncoding sequence로 converted noncoding sequence-1(CNS-1)이라고 한다. 이 배열은 IL-4와 IL-13 사이에 위치하게 되고, IL-4와 IL-13의 조절자(coordinate regulator)인데, 이 부분에 Th2 특이 DNase I hypersensitive sites(DHS)가 출현하면서 Th2세포로 분화된다. 한편 이 DHS는 naive T세포나 Th1세포에서는 나타나지 않는다^{19, 20}.

최근 연구에 의하면 IL-4 유전자와 IL-13 유전자 사이의 CpG 섬과 IL-4 유전자 두 번째 인트론의 CpG 섬의 메틸화양상은 naive T세포나 Th1세포에서는 메틸화된 상태인 반면, Th2세포로 분화하는 과정에서는 탈메틸화가 일어난다고 보고하였다¹¹. 탈메틸화는 특히 DHS 주위에서 일어나며 이 부위는 Th2 특이 전사 요소인 GATA-3 결합부위와 일치하는 것으로 밝혀짐으로서 CpG 메틸화가 naive T세포내 이들 유전자 발현을 억제하는데 중요한 역할을 한다는 것을 시사하고 있다.

CpG 섬의 DNA 메틸화는 히스톤 단백질의 탈아세틸화를 유도하게 되며 결과적으로 염색질의 구조를 조밀하게 영킨 상태로 변화시켜 전사인자의 접근을 방해한다. 이러한 CpG 메틸화 형태 변화는 B림프구의 분화 동안의 β chain 재배열, TCR- β chain 재배열, 그리고 CD8+ T세포 분화동안 IL-3, IFN- γ 전사 등 면역체계의 여러 변화와 밀접한 관련성이 있다^{10, 21, 22}.

따라서 면역세포의 사이토카인 유전자의 메틸화 양상을 분석한다면 아토피나 천식 같은 면역이상을 초래하는 질환의 진단에 이용할 가능성이 있다. 본 연구에서 7명의 정상대조군의 T 세포에서는 IL-4 유전자의 메틸화가 일어나 있는 것으로 보이며 알레르기 환아에서는 고위험군과 저위험군 모두 정도의 차이는 있으나 메틸화의 소실이 관찰되어 향후 더 많은 알레르기 환자를 대상으로 구체적인 연구가 이루어진다면 영유아기에서 아토피 유무를 예견할 수 있는 새로운 방법으로 사용될 수 있는 가능성을 제시하였다.

요 약

목적 : 2세 미만의 소아에서는 임상적으로 확실한 증상이 있거나 알레르기 가족력이 있는 것을 제외하고는 실제적으로 아토피 유무를 판별하는 것은 성인에 비해 제한점이 많다. 본 연구에서는 영유아기에 알레르기 질환과 관련된 사이토카인이 유전자 배열에서 발현하는 지를 말초혈액의 Th2 림프구에서 interleukin-4 유전자의 DNA 탈메틸화를 통하여 알아보고자 하였다.

방법 : 대상은 한양대학교 구리병원 소아알레르기클리닉을 내원한 3세 미만 소아에 대해 소아의 병력과 가족력을 조사하여 family allergy score와 개인력을 기준으로 알레르기질환에 대한 고위험군 7명, 저위험군 8명, 정상 대조군 7명이었다. 이들 모두에서 총 IgE치와 *Der f II* 특이 IgE를 측정하였고 이들의 말초혈액에서 T세포를 *Der f II*로 자극하여 배양한 후 DNA 추출을 하여 IL-4 유전자 두 번째 인트론의 CpG 섬에 대한 메틸화 분

석을 실시하였다.

결과 : 정상군에 비해 알레르기 환아군에서 IL4 유전자의 두 번째 인트론에 위치한 CpG 섬의 두 부위 모두에서 메틸화 특이 PCR 신호강도가 약하게 나타나는 반면 정상아에서는 118 bp PCR 산물과 205 bp PCR 산물이 모두 강하게 나타나서 메틸화된 것으로 보이며, 저위험군 알레르기 환아에서 최소한 한 부위에서 탈메틸화가 일어났으며 고위험군 알레르기 환아에서는 두 부위 모두에서 탈메틸화가 일어났다.

결론 : 정상 대조군의 T 세포에서는 IL-4 유전자의 메틸화가 일어나고 알레르기 환아에서 고위험군과 저위험군 모두 정도의 차이는 있으나 메틸화의 소실이 관찰되었다. 이를 이용하여 향후 영유아기에서 아토피 유무를 판별할 수 있는 가능성을 제시하였으나 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

References

- 1) Hagendorens MM, Van Bever HP, Schuerwegh AJ, De Clerck LS, Bridts CH, Stevens WJ. Determination of T-cell subpopulations and intracellular cytokine production(interleukin-2, interleukin-4, and interferon- γ) by cord blood T-lymphocytes of neonates from atopic and non-atopic parents. *Pediatr Allergy Immunol* 2000;11:12-9.
- 2) Host A. Development of atopy in childhood. *Allergy* 1997; 52:695-7.
- 3) Ricci M, Rossi O, Bertoni M, Matucci S. The importance of Th2-like cells in the pathogenesis of airway allergic inflammation. *Clin Exp Allergy* 1993;23:360-9.
- 4) Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138-46.
- 5) Kopp MV, Zehle C, Pichler J, Szepefalusi Z, Moseler M, Deichmann K, et al. Allergen-specific T cell reactivity in cord blood: the influence of maternal cytokine production. *Clin Exp Allergy* 2001;31:1536-43.
- 6) Kass SU, Pruss D, Wolffe AP. How does DNA methylation repress transcription? *Trends Genet* 1997;13:444-9.
- 7) Bird JJ, Brown DR, Mullen AC, Moskowitz NH, Mahowald MA, Sider JR, et al. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 1998;9:229-37.
- 8) Li E. The mojo of methylation. *Nat Genet* 199;23:5-6.
- 9) Bullens DMA, Rafiq K, Kasran A, van Gool SW, Ceuppens JL. Naive human T cells can be a source of IL-4 during primary immune responses. *Clin Exp Immunol* 1999;118: 384-91.
- 10) Bhattacharya SK, Ramchandani S, Cervoni N, Szyf M. A mammalian protein with specific demethylase activity for mCpG DNA. *Nature* 1999;397:579-69.
- 11) Santangelo S, Cousins DJ, Winkelmann NEE, Staynov DZ. DNA methylation changes at human Th2 cytokine genes coincide with DNase I hypersensitive site formation during CD4+ T cell differentiation. *J Immunol* 2002;169:1893-903.
- 12) Hide DW, Arshad SH, Twisleton R, Stevens M. Cord serum IgE: an insensitive method for prediction of atopy. *Clin Exp Allergy* 1991;21:739-45.

- 13) Kjellman NIM, Croner S. cord blood IgE determination for allergy prediction—a follow-up to seven years of age in 1,651 children. *Ann Allergy* 1984;53:167-74.
- 14) Kondo N, Kobayashi Y, Shinoda S. Cord blood lymphocyte responses to food antigens for the prediction of allergic disorders. *Arch Dis Child* 1992;67:1003-7.
- 15) Yabuhara A, Macaubas C, Prescott SL, Venaille TJ, Holt BJ, Habre W, et al. Th2-polarized immunological memory to inhalant allergens in atopics is established during infancy and early childhood. *Clin Exp Allergy* 1997;27:1261-9.
- 16) Maggi E, Parronchi P, Manetti P. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones. *J Immunol* 1992;148:2142-7.
- 17) Rengarajan J, Szabo SJ, Glimcher LH. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol Today* 2000;21:479-83.
- 18) Grogan JL, Locksley RM. T helper cell differentiation: on again, off again. *Curr Opin Immunol* 2002;14:366-72.
- 19) Guo L, Hu-Li J, Zhu J, Watson CJ, Difilippantonio MJ, Pannetier C, et al. In Th2 cells the IL4 gene has a series of accessibility states associated with distinctive probabilities of IL-4 production. *PNAS* 2002;99:10623-8.
- 20) Lee DU, Agarwal S, Rao A. The lineage commitment and efficient IL-4 production involves extended demethylation of the IL-4 gene. *Immunity* 2002;16:649-60.
- 21) Cedar H, Verdine GL. The amazing demethylase. *Nature* 1999;397:568-9.
- 22) Danbara M, Kameyama K, Higashihara M, Takagaki Y. DNA methylation dominates transcriptional silencing of Pax5 in terminally differentiated B cell lines. *Mol Immunol* 2001;38:1161-6.