

***Mycobacterium tuberculosis* Derived Epitope Peptide Specific CD8+ T Cell Responses in Tuberculous Pleurisy**

Jang-Eun Cho¹, Young Sam Kim², Moo Suk Park², Kyung Wha Lee³, Eunhee Lee⁴, Sang-Nae Cho^{4,†} and Sungae Cho^{4,†}

¹Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Yonsei University, Wonju, Korea.

²Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea.

³Hallym Institution for Genome Application, Hallym University Sacred Heart Hospital, Gyeonggi-do, Korea.

⁴Deptment of Microbiology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea

Cell-mediated immune response (CMI) is a major immune protective mechanism against tuberculosis (TB) infection. Among several components involved in CMI, recent studies suggest that CD8+ T cells are important in controlling TB infection. In our previous report, we defined four *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) derived epitope peptides specific for HLA-A*0201-restricted CD8+ T cells. These four peptides are PstA₁₇₅₋₈₃, ThyA₃₀₋₃₈, RpoB₁₂₇₋₁₃₅ and 85B₁₅₋₂₃. In this study, these epitope peptides specific CD8+ T cell responses in tuberculous pleurisy were investigated using *ex vivo* IFN- γ elispot assay and intracellular IFN- γ staining method. As a result, we observed these epitope peptide specific CD8+ T cell responses are induced in all three patients with tuberculous pleurisy suggesting that CD8+ T cells are involved in protective immune mechanism against MTB infection in tuberculous pleurisy. However, the CMI to mitogens and MTB antigens from pleural fluids of patients with tuberculous pleurisy does not seem to correlate with that from peripheral blood, although the sample size is too small to make any conclusion. In sum, the MHC I restricted CD8+ T cell responses seem to be induced efficiently in the pleural fluids, at the site of TB infection, in which the CMI is actively induced. In addition, these experiments suggest that MHC I restricted CD8+ T cell mediated immune responses are also involved in protective mechanism against MTB infection in extra-pulmonary TB.

Key Words: CD8+ T cells, Tuberculosis (TB), *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), Tuberculous pleurisy, Pleural fluid mononuclear cells (PFMC), Cell mediated immune response (CMI)

서 론

결핵균에 대한 인체의 보호 면역기전은 여러 가지 면역반응을 동반하는데, 그 중에서도 세포매개 면역반응 (cell-mediated immunity)이 크게 중요한 위치를 차지한다고 알려져 왔다. 결핵균은 인체에 감염시 대부분 세포 내에서 증식하는 병원균 (intracellular pathogens)인데, Th1 type의 cytokine의 분비가 주요한 보호면역반응을 일으키는데, 이때 분비된 cytokine은 대식세포를 활성화시켜

reactive nitrogen intermediate (RNI), nitric oxide (NO), O₂⁻ 등을 분비하여 세포 내에서 자라는 결핵균을 죽이게 된다 (Chan et al., 1992; Macmicking et al., 1997). 특히 CD4+ T 세포 (type 1)와 CD8+ T 세포에 의한 IFN- γ 의 분비가 보호 면역반응에서 가장 중요한 요소의 하나임이 많은 마우스를 이용한 실험결과에서 증명되었다 (Flynn et al., 1993; Newport et al., 1996).

최근에는 MHC class I 분자에 의해 제공되는 항원결정기를 인지하는 CD8+ T 세포 또한 IFN- γ 의 분비와 독성기전에 의해서 결핵균에 감염된 대식세포와 그 안의 결핵균들을 죽일 수 있다는 것이 보고된 바 있다 (Stenger et al., 1998). CD8+ T 세포는 항원전달세포의 표면에 있는 MHC class I 분자에 의해서 제공되는 항원결정기를 인지하고 이로 인해 활성화된다. 이 때 MHC class I 분자에 제한적으로 항원을 전달해주는데 관여하는 단백질 (TAP)에 돌연변이가 일어나면 결핵균 감염에 대한 면역반응이

*논문 접수: 2007년 11월 5일

수정재접수: 2007년 12월 3일

†교신저자: 조상래, (우) 120-752 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 미생물학교실

Tel: 02-2228-1819, e-mail: raycho@yonsei.ac.kr

교신저자: 조성애, (우) 136-791 서울특별시 성북구 하월곡동 39-1, 한국파스퇴르연구소, Biology of Intracellular pathgen Group

Tel: 02-2228-2547, e-mail: scho@ip-korea.org

Table 1. Demography of the study subjects participated in this study

Patients	Age (Sex)	Group	Cavity	HLA-A type
P1	17 (M)	Tuberculous pleurisy	-	A*0201/A*0207
P2	80 (F)	Tuberculous pleurisy	-	A*0201/A*1101
P3	55 (F)	Tuberculous pleurisy	-	A*0201/A*2602

The HLA-A typing of each blood donor was performed by DNA sequencing analysis of PFMC. Three subjects expressing HLA-A*0201 subtype were selected for this study. HLA-A typing was performed by DNA sequencing of $\alpha 1$ & $\alpha 2$ domains in HLA-A gene

현저히 감소하는 것이 마우스 모델에서 보고된 바 있다 (Behar et al., 1999). 마우스 모델에서 CD8+ T 세포나 β_2 -microglobulin 등의 유전자에 삭제 돌연변이 (deletion mutation)가 일어나면, 정상인 마우스보다 결핵균의 감염이 현저히 증가하는 것이 관찰되었다 (Flynn et al., 1992; Rui et al., 1996). 또한 잠복 감염된 사람들에게서 결핵균에 특정한 CD8+ T 세포들이 많이 존재하고, 결핵잠복 감염의 마우스 모델에서 CD8+ T 세포들을 제거하면 재감염이 일어난다고 보고되었다 (van et al., 2000). 또한 잠복 감염이 되어 있는 환자의 육아종 (granuloma)에는 결핵균에 특이적인 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포들이 모여 있어서 면역반응을 조절한다고 보고되었다 (Tully et al., 2005). 그러므로 결핵균에 존재하는 단백질 중에 CD4+ T 세포와 CD8+ T 세포의 세포매개 면역반응을 유도할 수 있는 항원의 동정은 결핵균에 대한 면역반응의 연구와 백신을 개발하는 단계에 있어서 매우 중요하다.

본 연구에서는 결핵균에 인한 질병 가운데 약 5% 정도를 차지하는 결핵성 흉막염 환자를 대상으로 실험을 진행하였다. 결핵성 흉막염 환자에서 흉수 (pleural fluid)의 유출은 대개 삼출성으로 세포분포를 보면 백혈구가 증가되고 림프구가 50% 이상을 차지한다. 결핵성 흉막염 환자에서 비결핵 흉막염 환자보다 흉수에서 adenosine deaminase (ADA)의 활성이 현저히 높다는 보고가 있고 (Piras et al., 1978), 따라서 흉수의 ADA의 측정이 결핵성 흉막염의 감별진단에 유용하다고 보고되었다 (Pettersson et al., 1984; Strankinga et al., 1987). 또한 결핵성 흉막염의 방어가전에 세포매개 면역반응이 중요하고 특히 CD4+ T 세포의 중요성은 많이 알려져 있지만, CD8+ T 세포의 역할은 아직 많이 밝혀져 있지 않고 있다. 본 연구에서는 사람의 HLA-A*0201 분자에 의해 제시되는 펩티드를 인지하는 CD8+ T 세포에 특정한 4개의 결핵균 항원결정기 (PstA₁₇₅₋₈₃, ThyA₃₀₋₃₈, RpoB₁₂₇₋₁₃₅, 85B₁₅₋₂₃)를 이용하여 (Cho et al., 2000), HLA-A*0201 분자를 표현하는 결핵성 흉막염 환자의 흉막삼출액 (pleural effusion)에서 분리한 흉수단핵구 (pleural fluid mononuclear cell)에서 결핵에 대

Table 2. Peptide sequences tested in this study

Peptide name	Source of peptide Site	Amino acid sequence
PstA ₁₇₅₋₈₃	Phosphate transport permease protein A-1	SLYFGGICV
ThyA ₃₀₋₃₈	Thymidylate synthase	RLPLVLPVAV
RpoB ₁₂₇₋₁₃₅	RNA polymerase- β subunit	MTYAAPLEV
85B ₁₅₋₂₃	Antigen 85B	LMIGTAAAV
Flu ₅₈₋₆₆	Influenza virus matrix protein	GILGFVFTL

한 CD8+ T 세포의 보호면역반응을 연구해 보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 연구대상

HLA-A*0201 분자를 보유하고 있는 3명의 결핵성 흉막염 환자를 연구대상으로 하였다 (Table 1). 결핵 환자들은 연세의료원 세브란스병원의 호흡기내과에서 진단을 받은 환자들이었고, 공동 (cavity)은 모두 보이지 않았다. 전혈과 흉막삼출액은 모두 치료 전에 채취되었다. 본 연구는 연세대학교 의과대학의 임상연구 심의위원회의 승인을 받고 또한 환자의 동의서를 받고 진행되었다.

2. HLA-A type 분석

개체의 HLA-A type은 PCR-SBT (PCR sequence based typing method) 방법으로 확인하였다. 각 개체의 흉막삼출액에서 분리된 흉수단핵구에서 DNA를 추출하였으며, HLA-A 유전자좌-특이 PCR primer set와 중합 효소를 이용하여 HLA-A 유전자의 다형적 부위 (exon 2와 exon 3)를 증폭하고 BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, DA, USA)와 DNA 자동염기서열 측정기 (ABI3100)를 이용하여 HLA-A 유전자 염기서열을 확인하고 type을 분석하였다. 분석된 개체 중에서, HLA-A*0201 subtype을 가진 개체들을 선별하였다.

3. 펩티드 합성

본 연구에서 사용된 펩티드의 이름과 특성, 아미노산 서열은 Table 2에 요약되어 있으며, 고려대학교에 부속되어 있는 기초과학지원 연구소에서 각각 합성되었다. Influenza virus matrix protein에 존재하는 항원결정기 (Flu₅₈₋₆₆)가 control로 사용되었다 (Bednarek et al., 1991).

4. 흉수단핵구 (Pleural Fluid mononuclear cell) 준비

HLA-A*0201 subtype을 표현하는 개체들의 흉수단핵구를 Ficoll-Paque (Amersham, Sweden) density gradient centrifugation 방법을 사용하여 분리하였고 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma, USA)과 RPMI 1640 (Gibco, USA) 배지로 씻어주었다.

5. Cytokine 측정을 위한 전혈과 흉수단핵구 준비

흉막삼출액을 채취한 날과 동일한 날에 헤파린이 포함된 tube에 개체의 전혈을 채혈하였고 전혈 2 ml을 18 ml의 RPMI 1640 배지로 희석하였다. 희석된 전혈 180 μ l을 96 well plate의 각각 well에 분주하고 3개의 well씩 mitogen (미토젠)인 phyto-hemagglutinin (10 μ g/ml) (PHA, Sigma, USA) 또는 concanavalin A (5 μ g/ml) (ConA, Sigma, USA), 결핵균 항원인 purified protein derivatives (10 μ g/ml) (PPD, Statens Seruminstitut, Denmark) 또는 culture filtrate proteins (10 μ g/ml) (CFP) 20 μ l를 첨가하여 5일간 배양하였다. 5일 후에 상층액을 모아서 -70°C에 보관하였다. 또한 전혈에서 분리되는 IFN- γ 와 비교하기 위해 분리된 1×10^5 개의 흉수단핵구를 96 well plate에 분주하여 위와 동일한 농도의 미토젠과 항원으로 자극시키고 5일 후에 상층액을 모았다.

6. IFN- γ enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법

전혈과 흉수단핵구에서 IFN- γ 생성능을 IFN- γ cytokine ELISA 방법으로 측정하였다 (BD-Pharmingen, USA). IFN- γ ELISA 과정은 제조회사의 사용 설명서를 따랐다. IFN- γ cytokine 생성량은 3개의 well을 평균으로 계산하고, 항원을 넣지 않은 well에서 측정된 값을 빼주었다.

7. Ex-vivo IFN- γ enzyme-linked immune-spot (ELISPOT) 방법

개체에서 흉수단핵구를 분리하고 CD4+ conjugated mag-

net beads (Dynal biotech, USA)를 사용하여 CD4+ T 세포들을 제거하였다. Assay plate는 anti-IFN- γ (BD-Pharmingen, USA) 항체로 하루 동안 코팅하였다. 다음날 CD4+ T 세포가 제거된 흉수단핵구를 펩티드, anti-CD28 mAb (1 μ g/ml, BD-Pharmingen, USA), IL-2 (10 units/ml, R&D systems, USA)를 96 well elispot assay plate (Millipore, France)에 넣고 이를 동안 배양하였다. 그 다음, biotinylated anti-IFN- γ mAb (BD-Pharmingen, USA)를 넣고 2시간 동안 반응시키고, streptavidine-alkaline phosphatase (BD-Pharmingen, USA) 접합체를 첨가하여 30분 동안 반응시켰다. Chromogenic 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) peroxide 기질 (Sigma, USA)을 넣고 반응을 지속시킨 다음, IFN- γ 를 분비하는 각각의 세포들은 색깔이 있는 점으로 보이게 되는데, automated elispot assay plate reader 기계 (AID, Germany)를 사용하여 그 수를 측정하였다.

8. 단기 세포주 (short term cell line) 생성

HLA-A*0201 subtype을 표현하는 결핵성 흉막염 환자에서 분리된 흉수단핵구 3×10^6 의 세포들을 각각의 50 μ g/ml의 펩티드로 90분 동안 반응시킨 후 씻어냈다. 펩티드로 자극 받은 세포를 10% 자가혈청과 재조합 IL-7 (10 ng/ml)을 포함하는 1 ml RPMI 1640 배지에서 배양하였고, 5일 후에 재조합 IL-2를 10 units/ml의 농도로 첨가하고 다시 5일을 더 배양하였다.

9. 세포표면 표지분자와 세포 내 IFN- γ 의 면역형광염색

각각의 펩티드로 적재된 autologous EBV 세포주로 10일 배양된 단기 세포주를 2시간 동안 자극시켰다. 계속해서 1 μ g/ml brefeldin A (Sigma)를 10시간 동안 가했다. 단기 세포주를 FACS 완충액 (0.5% BSA와 0.02% sodium azide가 들어있는 PBS)에서 FITC에 접합된 anti-CD8 mAb와 PerCP에 접합된 anti-CD3 mAb와 같이 4°C에서 30분 동안 배양하였다. 표지된 세포들을 FACS 완충액으로 씻은 다음, 고정용액으로 15분 동안 실온에서 고정하였다. 다시 세포들을 씻은 다음, Perm/Wash (BD-Pharmingen, USA) 용액을 가하고, PE가 접합된 IFN- γ 항체로 15분 동안 실온에서 반응시켰다. 마지막으로 1% paraformaldehyde로 고정하고, 유세포 분석기 (FACS caliber, Becton Dickinson, USA)를 사용하여 분석하였다.

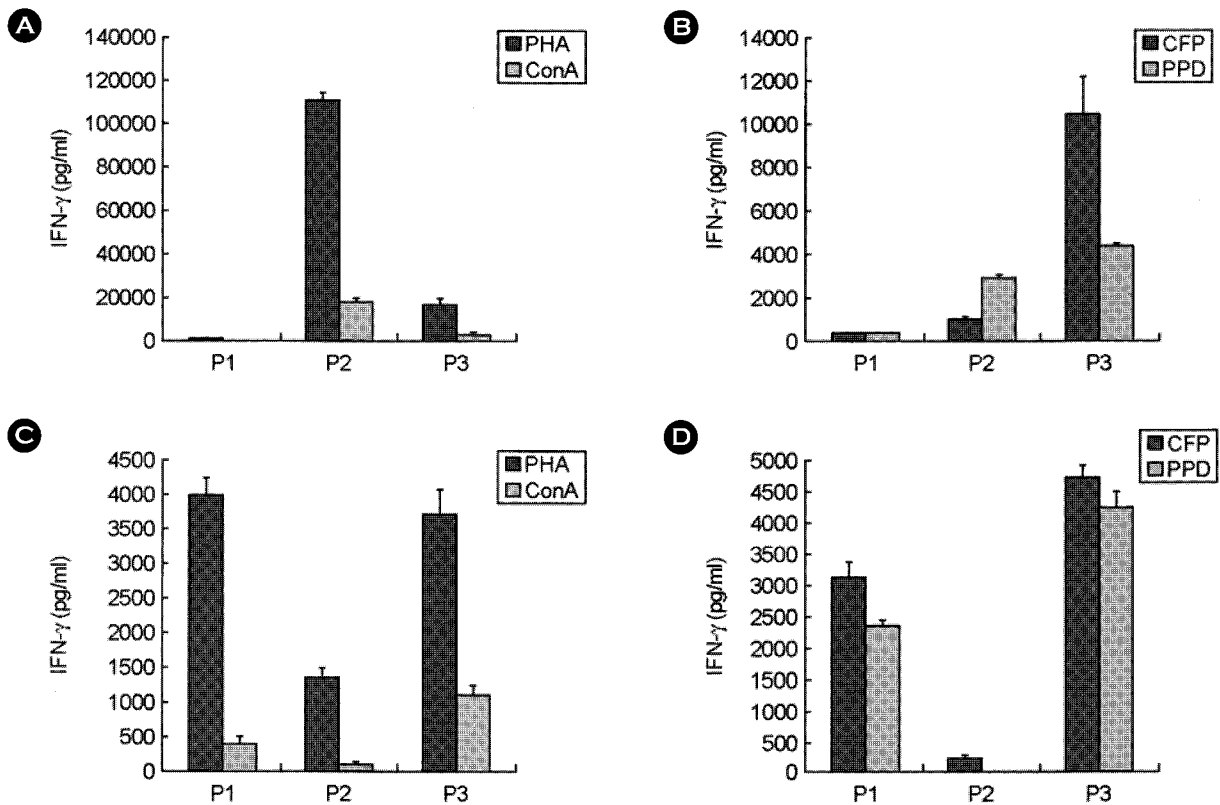


Fig. 1. IFN- γ responses to mitogens and MTB antigens in pleural fluid mononuclear cells (PFMC) or whole blood cultures from tuberculous pleurisy patients. Whole blood cultures (A, B) or PFMC (C, D) from three tuberculous pleurisy patients were stimulated with mitogens (PHA 10 μ g/ml or ConA 5 μ g/ml) or MTB antigens (PPD 10 μ g/ml or CFP 10 μ g/ml) for 5 days. Subsequently, the supernatants were collected and assayed for the determination of the amount of IFN- γ released.

결 과

1. 결핵성 흉막염 환자의 말초혈액과 흉수단핵구에서 유도되는 IFN- γ 분비능

HLA-A*0201 subtype을 표현하는 결핵성 흉막염 환자에서 얻은 전혈과 흉막삼출액에서 분리한 흉수단핵구를 미토겐인 PHA 또는 ConA, 또는 결핵항원인 PPD 또는 CFP로 자극을 주고 5일 후에 상층액을 모아서 유도된 IFN- γ 양을 IFN- γ ELISA 방법으로 측정하여 세포매개 면역반응 정도를 측정하였다 (Fig. 1). P1 환자에게는 결핵항원과 미토겐에 대한 반응이 모두 저하되어 있는 것으로 나타났으므로 일반적인 세포매개 면역반응이 말초혈액에서 모두 저하되어 있는 것으로 추정되고, P2에서는 미토겐에 대한 반응은 매우 높았고, 결핵항원에 대한 반응도 유도되어 있었다. P3에서는 미토겐에 대한 반응과 결핵항원에 대한 반응이 모두 높게 유도되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 이 같은 말초혈액에서의 IFN- γ 분비능은 병변 주변인 흉막삼출액에서의와 다르게 나타났는데,

P1에서는 결핵균 항원과 미토겐에 대한 세포매개 면역반응이 효율적으로 유도되는 것을 관찰할 수 있었고, P2에서는 많이 저하되어 있는 것으로 나타났다. P3에서는 결핵균 항원과 미토겐에 대한 IFN- γ 분비능이 강하게 유도되는 것을 관찰할 수 있었다. 결핵성 흉막염 환자에서 결핵항원과 미토겐의 자극에 대해 유도된 IFN- γ 분비능은 말초혈액과 흉막삼출액에서 세 명 모두 다르게 양상이 나타났으므로, 흉막염 결핵 환자에서 말초혈액과 흉막삼출액에서의 IFN- γ 분비능에 직접 상관관계는 없다고 사료되나 결론을 내리기에 더 많은 환자수가 필요하다고 사료된다.

2. 결핵성 흉막염 환자의 흉수단핵구에서 결핵균 펩티드 항원결정기에 특정하게 IFN- γ 를 분비하는 CD8+ T 세포수의 정량 분석

Ex vivo IFN- γ elispot assay를 이용하여서 결핵균 펩티드 (PstA1₇₅₋₈₃, ThyA₃₀₋₃₈, RpoB₁₂₇₋₁₃₅, 85B₁₅₋₂₃) 자극에 특정하게 IFN- γ 를 분비할 수 있는 CD8+ T 세포의 수를 HLA-A*0201을 표현하는 결핵성 흉막염 환자의 흉막삼출액에

서 흉수단핵구를 분리하여 측정하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 각각의 펩티드에 특정하게 IFN- γ 를 분비하는 CD8+ T 세포가 5×10^5 PFMC 당 약 5~10개 이내로 존재한다는 것을 알 수 있었다. 따라서 결핵균에서 유래한 항원결정기에 특정한 CD8+ T 세포의 IFN- γ 면역반응이 세 명의 환자에게서 유도되는 것을 관찰할 수 있었는데,

특히 ThyA₃₀₋₃₈에 대한 면역반응은 세 명 모두에게서 유도되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 P1과 P2에서 PHA에 반응을 나타낸 CD8+ T 세포 수는 매우 많아서 정량 분석을 할 수 없었고, Fig. 2에서 그래프의 최대한도인 50개로 표시하였음을 밝혀 둔다. P3에서는 PHA에 반응하는 CD8+ T 세포의 수가 5×10^5 PFMC 당 28개 정도로

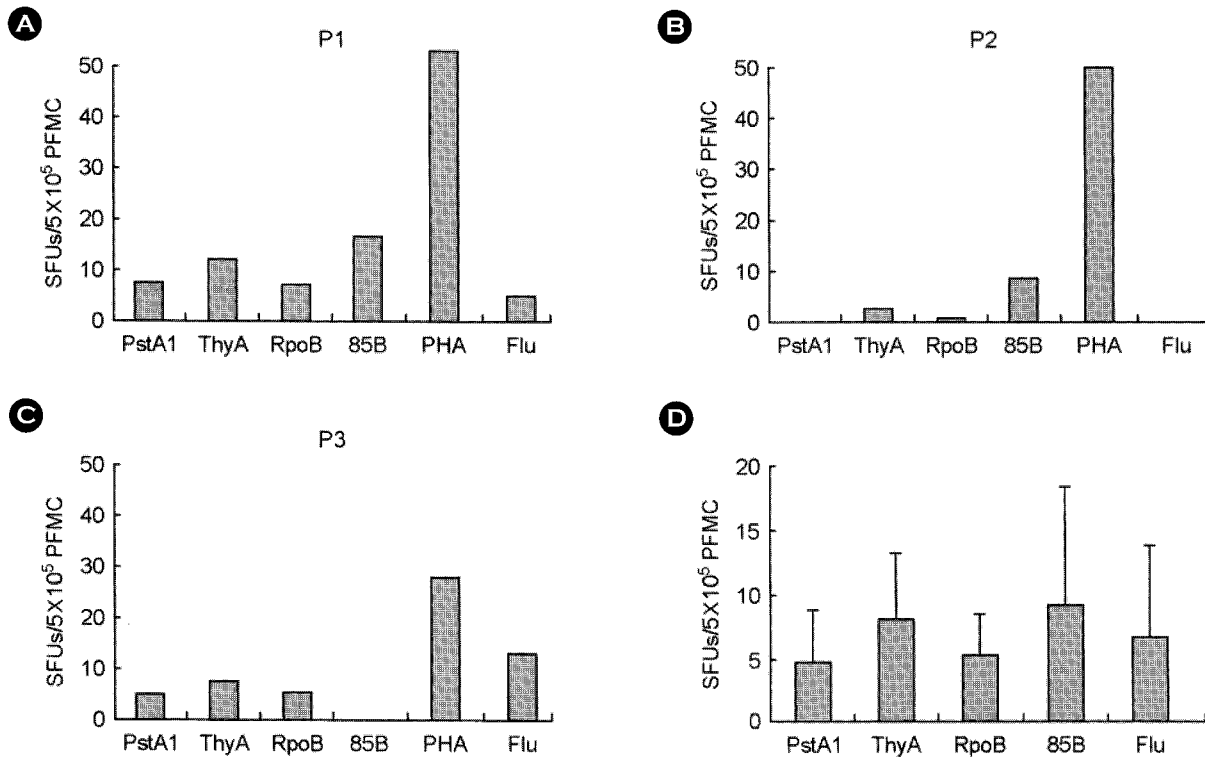


Fig. 2. CD8+ T cell mediated immune responses to MTB specific epitope peptides in TB pleurisy patients using *ex-vivo* IFN- γ elispot assay. Enumeration of peptide-specific CD8+ effector T cells in pleural fluid mononuclear cells (PFMC) from three HLA-A*0201 patients (A-C) with tuberculous pleurisy was performed using *ex-vivo* IFN- γ elispot assay. The mean levels (\pm SD) from three patients are represented in the graph (D). A total of 5×10^5 PFMC (CD4+ T cell depleted PFMC) were stimulated for 48 hrs with each peptide for the detection of each single cell producing IFN- γ . Results are expressed as a mean number of SFCs (spot forming cells) per 5×10^5 PFMC. The frequencies of the SFCs were calculated as number of spots per 5×10^5 PFMC after subtracting the number of spots in unstimulated PFMC.

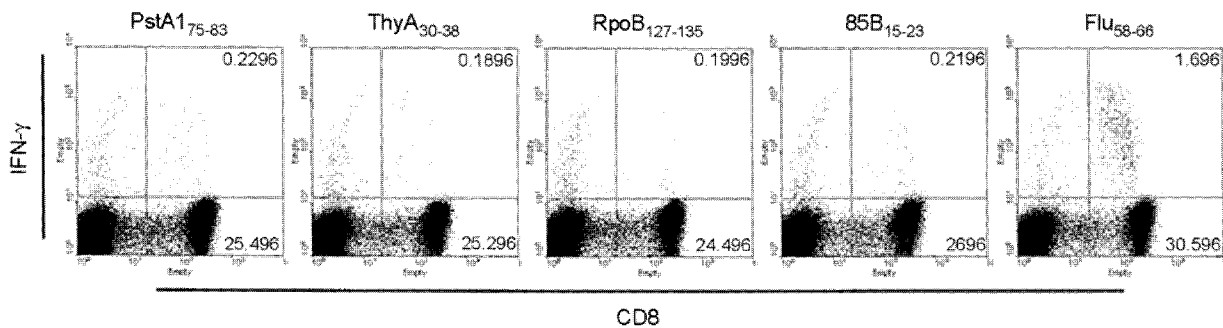


Fig. 3. IFN- γ intracellular staining of STCL (short term cell lines) generated from PFMC of a TB pleurisy patient expressing HLA-A*0201 subtype. The STCL from each tuberculous pleurisy patient was generated by the stimulation with each peptide (PstA1₇₅₋₈₃, ThyA₃₀₋₃₈, 85B₁₅₋₂₃, RpoB₁₂₇₋₁₃₅ and Flu₅₈₋₆₆) for 10 days. Subsequently, the STCL was re-stimulated with autologous EBV line pulsed with each peptide to perform intracellular IFN- γ staining. After overnight incubation, STCL was treated with brefeldin A and stained with IFN- γ , CD3+ and CD8+ specific monoclonal antibodies labeled with PE, PerCP and FITC, respectively. The frequencies of the peptide specific IFN- γ secreting CD8+ T cell population were measured from the CD3-gated lymphocyte population. A representative data from P3 is shown.

측정되었는데, P3의 경우 Fig. 1C에서 보여지는 바와 같이 흉수단핵구에서 측정된 PHA의 자극에 의해 분비된 IFN- γ 는 대부분 CD4+ T세포에서 분비된 것으로 사료된다.

3. 결핵균의 항원결정기에 특정하게 IFN- γ 를 분비하는 CD8+ T 세포주의 생성

결핵성 흉막염 환자에서 유도되는 각각의 항원결정기에 특정한 CD8+ T 세포들을 항원결정기 펩티드로 자극시켰을 때, 활성화되어서 증식할 수 있는지를 연구하였다. 각 개체의 흉막삼출액에서 분리한 흉수단핵세포를 각각의 항원결정기로 10일 동안 자극을 주었을 때 단기세포주 (short term cell line)가 생성되는 것을 관찰할 수 있었고, 이렇게 증식된 CD8+ T 세포들은 각각의 항원결정기에 특정하게 IFN- γ 를 분비하는 것을 세포 내 IFN- γ 형광염색방법을 통하여 3명의 HLA-A*0201를 표현하는 결핵성 흉막염 환자에서 모두 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

고 찰

결핵균은 인체에 감염시 세포 내에서 번식하기 때문에 세포매개 면역반응이 주요한 보호면역작용을 한다고 알려져 있으며, 또한 다양한 종류의 면역세포들이 세포매개 면역반응에 관여할 수 있다고 알려져 왔는데, 감염시기에 따라서 또한 결핵균의 항원의 종류와 숙주의 건강상태에 따라서 보호면역반응을 일으키는 면역세포들이 다르다고 할 수 있다. 감염초기에는 결핵균들이 대식세포나 수상 돌기세포의 탐식포 안에서만 증식한다고 알려져 왔으나, 최근에 보고된 바에 의하면 감염 후 4~7일 후에는 세포질로 나와서 오히려 결핵균의 증식을 더 원활히 하며 숙주세포의 자멸을 유도한다고 발표되었다. 그 동안은 탐식포안의 결핵균의 항원이 MHC I 제한 CD8+ T 세포들에게 항원을 제시할 수 있는 기전이 알려지지 않고 있었으나, 최근에는 여러 연구결과들이 세포질로 나온 결핵균의 항원은 MHC I 제한 항원처리과정과 제시과정을 통해서 CD8+ T 세포를 활성화시키게 된다는 사실을 증명하고 있다 (van der Wel et al., 2007).

결핵성 흉막염 (tuberculosis pleurisy)은 폐외결핵에 의한 질병으로써 결핵에 대한 보호면역반응이 효과적으로 일어나서 스스로 완쾌가 되는 경우가 있는 것으로 보고되고 있으며, 또한 결핵균 자체도 흉막삼출액 (pleural effusion)에서 발견되지 않는 경우가 많다고 알려져 있다.

또한 결핵자체가 체내의 다른 부위로 옮겨 가지 않고 병변 주위에만 국한되어 있다. IFN- γ 의 양이 흉막삼출액에는 혈액보다 매우 증가되어 있으며, 또한 많은 CD4+ T 세포들이 집중되어 있다고 알려져 왔다. CD8+ T 세포에 의한 보호면역반응은 결핵성 흉막염에서 잘 알려지지 않고 있는데, 본 연구에서는 세포매개 면역반응이 효율적으로 일어나고 있는 흉막삼출액에서, 결핵균의 단백질에서 동정된 4개의 항원결정기에 특정한 CD8+ T 세포의 빈도를 IFN- γ elispot assay와 세포 내 형광염색방법으로 분석하여 면역반응에서의 역할을 연구해 보고자 하였다.

결과에서 보여지는 바와 같이 결핵균에서 유래한 네 개의 결핵균 항원결정기에 특정한 CD8+ T 세포의 IFN- γ 면역반응은 세 명의 환자에서 유도되는 것을 관찰할 수 있었는데, 특히 ThyA₃₀₋₃₈ 펩티드에 대한 면역반응이 세 명 모두에게서 유도되는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 결핵균의 Rv2715 단백질의 Rv₁₆₃₋₁₇₁ 펩티드에서도 ThyA₃₀₋₃₈ 펩티드와 동일한 아미노산 배열이 존재하는데 BCG 예방접종을 받은 건강인에게서 보호면역반응을 효율적으로 유도하고 있으므로, 백신개발에 매우 유용한 펩티드 후보물질로써 사료된다 (Cho et al., 2005). 흉수단핵구에는 이미 T세포들이 활성화되어 있어서, 전혈에서 보다 펩티드 자극에 대하여 IFN- γ 를 분비할 수 있는 세포 수가 적다고 감안할 때, Fig. 2D에서 보여지는 바와 같이 5×10^5 PFMC 당 평균 약 5~10개 정도의 각각의 항원결정기에 특정한 CD8+ T 세포가 존재한다는 사실은 흉막삼출액에 존재하는 CD8+ T 세포의 역할의 중요성을 제시한다고 사료된다. 또한 P1과 P3의 흉막삼출액에서 결핵항원에 대한 IFN- γ 분비능이 P2보다 높게 나타났고, *ex vivo* IFN- γ elispot assay에서도 비슷한 경향이 관찰되었는데, 더 많은 환자 sample을 분석하면 그 상관관계를 파악할 수 있다고 사료된다.

결핵성 흉막염 환자에서 말초혈액과 흉막삼출액에서 결핵항원과 미토겐의 자극에 대해 분비된 IFN- γ 분비능은 세 명 모두 다르게 나타났다. 병변주위로 세포매개 면역반응을 일으키는 면역세포들이 모여들게 될 때 말초혈액에는 결핵항원에 반응하는 면역세포들이 감소할 것으로 사료되었으나, P3에서는 말초혈액과 흉막삼출액 모두에 결핵항원에 대한 IFN- γ 분비능이 모두 효율적으로 유도되는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 결핵성 흉막염 환자에서 말초혈액과 흉막삼출액에서의 IFN- γ 분비능이 직접 상관관계는 없다고 사료되나 결론을 내리기에는 더 많은 환자 sample 수가 필요하다. 그리고, 말초혈액에

서의 분리한 백혈구에서 *ex vivo* IFN- γ elispot assay를 수행하여서 PFMC에서 나온 결과와 비교하는 것이 바람직하나 환자에게서 assay에 필요한 양의 혈액을 분리할 수가 없었다.

또한 본 연구결과는 면역반응이 효율적으로 이루어진다고 알려진 결핵성 흉막염 환자의 흉막삼출액에서도 균체항원 (somatic antigen)에 특정한 CD8+ T 세포의 면역반응이 결핵에 대한 보호면역반응을 일으키는데 관여한다는 사실을 제시한다. 그 동안은 결핵균에 존재하는 분비항원 (secreted antigen)에만 면역성에 관한 연구가 치중되어온 데 반하여 이러한 결과는 결핵균의 병인기전이나 면역반응에 관한 연구 또는 백신개발을 위한 항원의 선택이나 동정이 분비항원 (secreted antigen)과 균체항원 모두에 대하여 이루어져야 한다는 것을 제시한다고 하겠다.

감사의 글

본 연구는 2002년도 한국과학재단 연구비 (R04-2002-000-00189-0)와 보건 복지부 보건의료기술연구개발사업 (A010381)의 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사 드립니다.

REFERENCES

Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, et al. HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J Exp Med*. 2000. 192: 63-75.

Barnes PF, Mistry SD, Cooper CL, Pirmez C, Rea TH, Modlin RL. Compartmentalization of a CD4+ T lymphocyte subpopulation in tuberculous pleuritis. *J Immunol*. 1989. 142: 1114-1119.

Barnes PF, Lu S, Abrams JS, Wang E, Yamamura M, Modlin RL. Cytokine production at the site of disease in human tuberculosis. *Infect Immune*. 1993. 61: 3482-3489.

Bednarek MA, Sauma SY, Gammon MC, et al. The minimum peptide epitope from the influenza virus matrix protein. Extra and intracellular loading of HLA-A2. *J Immunol*. 1991. 147: 4047-4055.

Behar SM, Dascher CC, Grusby MJ, Wang CR, Brenner MB. Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *J Exp Med*. 1999. 189: 1973-1980.

Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. Killing of virulent

Mycobacterium tuberculosis by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages *J Exp Med*. 1992. 175: 1111-1122.

Cho JE, Cho SN, Lee KW, Park SK, Cho SM. Tuberculosis somatic antigen specific CD8+ T cell responses in BCG-vaccinated subjects. *Tuberculosis and Respiratory Diseases* 2005. 59: 272-278.

Cho S, Mehra V, Thoma-Uszynski S, et al. Antimicrobial activity of MHC class I-restricted CD8+ T cells in human tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000. 97: 12210-12215.

Flynn JL, Goldstein MM, Triebold KJ, Koller B, Bloom BR. Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992. 89: 12013-12017.

Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR. An essential role for interferin-gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med*. 1993. 178: 2243-2247.

Hodsdon WS, Luzze H, Hurst TJ, et al. HIV-1-related pleural tuberculosis: elevated production of IFN-gamma, but failure of immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Aids*. 2001. 15: 467-475.

Hohn H, Kortsik C, Nilges K, et al. Human leucocyte antigen-A2 restricted and *Mycobacterium tuberculosis* 19-kDa antigen-specific CD8+ T-cell responses are oligoclonal and exhibit a T-cell cytotoxic type 2 response cytokine-secretion pattern. *Immunology* 2001. 104: 278-288.

Klein MR, McAdam KP. CD8+ T lymphocytes against *Mycobacterium tuberculosis*. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 1999. 47: 313-320.

Lalvani A, Brookes R, Hambleton S, Britton WJ, Hill AV, McMichael AJ. Rapid effector function in CD8+ memory T cells. *J Exp Med*. 1997. 186: 859-865.

Lalvani A, Brookes R, Wilkinson RJ, et al. Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci. U S A*. 1998. 95: 270-275.

MacMicking JD, North RJ, Lacourse R, Mudgett JS, Shah KS, Nathan CF. Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis *Proc Natl Acad Sci. U S A*. 1997. 94: 5243-5248.

Mazzaccaro RJ, Stenger S, Rock KL, et al. Cytotoxic T lymphocytes in resistance to tuberculosis. *Adv Exp Med Biol*. 1998. 452: 85-101.

Muller I, Cobbold SP, Waldmann H, Kaufmann SH. Impaired

- resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection after selective in vivo depletion of L3T4+ and Lyt-2+ T cells. *Infect Immun*. 1987. 55: 2037-2041.
- Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, Williams R, Levin M. A mutation in the interferon-gamma receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N Engl J Med* 1996. 335: 1941-1949.
- Okamoto M, Kawabe T, Iwasaki Y, Hara T, Hashimoto N, Imaizumi K, et al. Evaluation of interferon-gamma, interferon-gamma-inducing cytokines and interferon-gamma-inducible chemokines in tuberculous pleural effusions. *J Lab Clin Med*. 2005. 145: 88-93.
- Petterson T, Ojala K, Weber TH. Adenosine deaminase in the diagnosis of pleural effusions. *Acta Med Scand*. 1984. 215: 299-304.
- Piras MA, Gakis C, Budroni M, Andreoni G. Adenosine deaminase activity in pleural effusions: an aid to differential diagnosis. *Br Med J*. 1978. 2: 1751-1752.
- Rui Song, Clifford V. Harding Role of proteasomes. Transporter for Antigen presentation (TAP), and β 2-microglobulin in the processing of bacterial or particulate antigen via an alternative class I MHC processing pathway *J. Immunol*. 1996. 156: 4182-4190.
- Selin LK, Lin MY, Kraemer KA, et al. Attrition of T cell memory: selective loss of LCMV epitope-specific memory CD8 T cells following infections with heterologous viruses. *Immunity* 1999. 11: 733-742.
- Strankinga WF, Nauta JJ, Straub JP, Stam J. Adenosine deaminase activity in tuberculous pleural effusions: a diagnostic test. *Tubercle* 1987. 68: 137-140.
- Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 1998. 282: 121-125.
- Tully G, Kortsik C, Hohn H, et al. Highly focused T cell responses in latent human pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol*. 2005. 174: 2174-2184.
- van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, Brenner M, Peters P. *M. tuberculosis* and *M. leprae* Translocate from the Phagolysosome to the Cytosol in Myeloid Cells. *Cell* 2007. 129: 1287-1298.
- van Pinxteren LA, Cassidy JP, Smedegaard BH, Agger EM, Andersen P. Control of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection is dependent on CD8 T cells. *Eur J Immunol*. 2000. 30: 3689-3698.
- Wilkinson RJ, Zhu X, Wilkinson KA, et al. 38000 MW antigen-specific major histocompatibility complex class I restricted interferon-gamma-secreting CD8+ T cells in healthy contacts of tuberculosis. *Immunology* 1998. 95: 585-590.