

사람의 동종 조혈모세포이식에서 CD4⁺CD25⁺ T세포의 분포와 이식편대숙주병

한림대학교 의과대학 소아과학교실, 가톨릭대학교 의과대학 소아과학교실*

이대형 · 정낙균* · 정대철* · 조 빈* · 김학기*

= Abstract =

Distribution of CD4⁺CD25⁺ T cells and graft-versus-host disease in human hematopoietic stem cell transplantation

Dae Hyoung Lee, M.D., Nak Gyun Chung, M.D.*, Dae Chul Jeong, M.D.*, Bin Cho, M.D.* and Hack Ki Kim, M.D.*

Department of Pediatrics, College of Medicine, Hallym University, Seoul

Department of Pediatrics*, College of Medicine, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

Purpose : This study aimed to determine the frequencies of CD4⁺CD25⁺ T cells in donor graft and peripheral blood CD4⁺CD25⁺ T cells in recipients after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) and their association with graft-versus-host disease (GVHD).

Methods : Seventeen children who underwent HSCT were investigated. CD4⁺CD25⁺ T cells in samples from donor grafts and recipient peripheral blood were assessed by flow cytometry at 1 and 3 months after transplantation.

Results : CD4⁺CD25⁺ T cell frequencies in the grafts showed no significant difference between patients with and without acute GVHD (0.90% vs. 1.06% $P=0.62$). Absolute CD4⁺CD25⁺ T cell number in grafts were lower in patients with acute GVHD than in those without acute GVHD ($6.18 \times 10^5/\text{kg}$ vs. $25.85 \times 10^5/\text{kg}$, $P=0.09$). Patients without acute GVHD showed a significant decrease in peripheral blood CD4⁺CD25⁺ T cell percentage at 3 months compared to those at 1 month after HSCT (2.11% vs. 1.43% $P=0.028$). However, in patients with acute GVHD, CD4⁺CD25⁺ T cell percentage at 3 months was not different from the corresponding percentage at 1 month after HSCT (2.47% vs. 2.30% $P=0.5$).

Conclusion : The effect of frequencies of CD4⁺CD25⁺ T cells in donor grafts on acute GVHD after HSCT could not be identified, and the majority of peripheral blood CD4⁺CD25⁺ T cells in patients who underwent HSCT may be activated T cells related to acute GVHD rather than regulatory T cells. Further studies with additional markers for regulatory T cells are needed to validate our results. (*Korean J Pediatr* 2008 51:1336-1341)

Key Words : Regulatory T cell, Graft-versus-host Disease, Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation

서 론

동종 조혈모세포이식은 난치성 혈액종양질환의 완치에 중요한 치료 방법이다. 조혈모세포이식의 발전에도 불구하고 이식의 성패를 결정짓는 중요한 요소 중 하나는 이식편대숙주병(graft-versus-host disease, GVHD)이다. 급성 GVHD는 전처치에 의한 숙주세포의 활성화와 공여자 T 세포의 활성화에 이은 세포성 혹은

체액성 면역의 발동에 의하여 발생한다^{1,2}). 따라서 GVHD의 예방과 치료의 중요한 목표는 공여자 T 세포의 활성화를 차단하는 것이다²). 현재 GVHD의 예방과 치료에 쓰이는 많은 면역억제제들은 이러한 공여자 기원 T세포의 활성화와 증식을 억제한다. 이식편대숙주병 내 공여자 T세포를 제거하여 이식을 하는 방법은 GVHD는 감소되지만 거부반응 및 기회감염의 증가와 이식편대백혈병 효과의 감소를 초래한다^{3,4}). 따라서 GVHD의 조절을 위해 다른 방법들이 모색되고 있는데 CD4⁺CD25⁺ 조절 T세포(regulatory T cell, CD4⁺CD25⁺ Treg)의 역할에 대한 연구가 그 중 하나이다. CD4⁺CD25⁺ 조절 T세포는 동종항원에 반응하는 T세포와 항원전달세포의 면역반응을 조절하여 면역관용에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다^{5,6}). 쥐를 이용한 동종 조혈모세포 이식에서 공여자 기원의 CD4⁺CD25⁺ 조절 T세포가 이식 후 급성 GVHD의 발생을 억제한다고 하였다⁷⁻¹²). 사람의 조절 T세포를 분석하고 선별하기 위해

Received : 29 July 2008, Revised : 8 October 2008

Accepted : 3 November 2008

Address for correspondence : Bin Cho, MD.

Department of Pediatrics, St. Mary's Hospital, 62 Youido-dong, Youngdungpo-gu, Seoul 150-713, Korea

Tel : +82-2-3779-2237, Fax : +82-2-783-2589

Email : chobinkr@catholic.ac.kr

서는 무엇보다도 조절 T세포의 절대적 표지자(phenotype marker)를 찾는 것이 중요하다. 왜냐하면 조절 T세포의 표지자로 알려진 CD25, CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte antigen 4), GITR (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family-related gene) 등은 활성화된 T세포에서도 발현되기 때문이다⁶⁾. 사람의 동종 조혈모세포 이식이 동물 실험과 다른 이유 중 하나는 급성 GVHD의 예방과 치료에 cyclosporin A, FK-506, steroid 등의 면역억제제가 사용된다는 점이다. 면역억제제가 T세포의 분화와 증식을 억제한다고 알려져 있으나, 이식 후 면역억제에 의한 CD4⁺CD25⁺ T세포의 형성과 증식에 대해서는 알려진 바가 거의 없다.

본 연구에서는 사람의 동종 조혈모세포 이식에서 이식편 내 CD4⁺CD25⁺ T세포가 급성 GVHD 발생에 영향을 주는지 알아보고 이식한 환자의 말초혈액 내 CD4⁺CD25⁺ T세포가 급성 GVHD와 관련된 조절 T세포인지 활성화된 T세포인지 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상 및 검체 수집

2005년 9월부터 2006년 5월까지 혈액 질환으로 동종 조혈모세포이식을 시행 받은 소아 17명을 대상으로 하였다. 조혈모세포이식을 시행하는 당일에 이식편(골수, 말초혈, 제대혈)을 EDTA가 처리된 vacutainer tube에 5 mL를 수집하였고 이식 후 1개월과 3개월에 환자의 말초혈액을 같은 방법으로 수집하여 24시간 이내에 세포 분석을 하였다.

2. CD4⁺CD25⁺ T 세포의 유세포 분석(flow cytometry)

수집한 검체의 전혈 50 µL에 CD3, CD4, CD25에 대한 FITC-conjugated 또는 PE-conjugated monoclonal antibody (Becton Dickinson Pharmingen, San Jose, CA, USA)와 negative isotype control antibody를 10 µL씩 시험관에 당지 않도록 넣은

후 3초간 vortex 시켰다. 15분간 실온에서 빛을 차단하여 반응을 시킨 후 lysing solution (Becton Dickinson Pharmingen) 2 µL씩을 시험관에 넣었다. 다시 3초간 vortex 후 10분간 빛을 차단하여 반응을 시키고 3분간 저속으로 원심분리 하였다. 시험관 내 50 µL 정도의 침전물은 남기고 상층액은 버린 후, 모든 시험관에 500 µL의 인산완충용액을 넣은 후 잘 섞어 분석할 때까지 냉장보관에 보관하였다. 염색된 세포는 flow cytometer (FACSCalibur, BD Medical System, Mountain View, CA, USA), McIntosh PowerMac G3 personal computer (Apple Computer, Cupertino, CA, USA)와 Cell Quest software program (BD Medical System)을 이용하여 분석하였다. 검체의 유세포 분석은 large lymphocyte gate를 설정하여 CD4와 CD25를 표현하는 세포군의 분획을 구하였다(Fig. 1).

3. 급성 GVHD의 평가와 치료

조혈모세포이식 후에 발생한 급성 GVHD의 평가는 시애틀 기준(Seattle criteria)을 이용하였다¹³⁾. 급성 GVHD가 없었거나 1도(grade I)인 경우를 GVHD(-)군으로 2도(grade II-IV) 이상의 급성 GVHD가 발생한 군을 GVHD(+)군으로 각각 구분하였다. 급성 GVHD 예방에는 주로 cyclosporin A와 단기간 methotrexate를 사용하였고 급성 GVHD의 초기 치료에는 스테로이드를 사용하였다. 초기 치료에 호전이 없거나 진행되는 불응성 급성 GVHD의 치료에는 mycophenolate mofetil (MMF)과 같은 면역억제제를 추가하거나 cyclosporin A을 tacrolimus (FK-506)로 변경하였다.

4. 통계 분석

세포수 및 비율과 같은 연속형 변수의 비교 분석에는 Mann-Whitney U test와 Kruskal-Wallis test를 하였고 짝지은 두 군의 평균값 비교 분석에는 Wilcoxon signed rank test를 하였다. 모든 P값은 양측 검정으로 하였고 유의 수준은 P<0.05로 하였다.

결 과

1. 대상 환자의 특성과 급성 GVHD의 발생

대상 환자는 총 17명이었고 남아 12명, 여아 5명이었으며 이식 당시의 환자들의 중앙연령은 11세이었다(Table 1). 대상 질환으로는 중증재생불량빈혈 6명, 급성골수성백혈병 5명, 급성림프모구백혈병 4명, Fanconi빈혈 1명, 혈구포식 림프 조직구증 1명이었다. 공여자에 따른 이식 방법으로는 형제간이식 7명, 비혈연간이식 8명, 제대혈이식 2명 이었다. 사용된 조혈모세포원으로는 골수 8명, 말초혈 7명, 제대혈 2명 이었다. 골수, 말초혈, 제대혈의 전체 유핵세포수는 각각 2.3×10^8 /kg, 17.0×10^5 /kg, 0.725×10^5 /kg 이었고, CD34⁺세포수는 각각 4.75×10^6 /kg, 11.9×10^6 /kg, 0.710×10^6 /kg 이었다. 이식 후 100일 이내에 대상 환자 17명 중 6명에서 2도의 급성 GVHD가 발생하였고 1명에서 4도의 급성 GVHD가

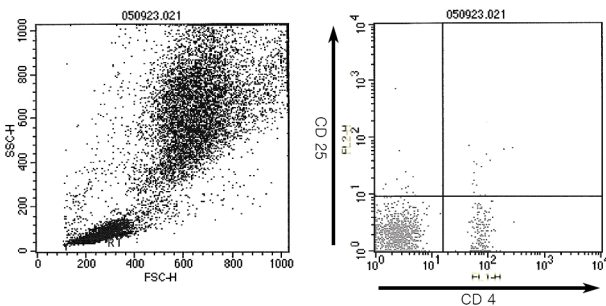


Fig. 1. Assessment of CD25 expression on graft or peripheral blood CD4⁺ T cells. Frequency of CD4⁺CD25⁺ dual positive cells in right upper quadrant was calculated as a percentage of positive cells in total lymphocyte gate.

Table 1. Patient Characteristics

Number of patients	17
Median age, yrs (range)	11 (1-16)
Male/Female	12/5
Disease	
SAA	6
AML	5
ALL	4
Fanconi anemia	1
HLH	1
Conditioning regimen	
Busulfan-based	6
TBI-based	6
Others	5
GVHD prophylaxis	
CSA	3
CSA+MTX	12
CSA+others	2
Donor type	
Familial donor	7
Unrelated donor	10
Stem cell source	
BM	8
PBSC	7
CB	2
Number of cells infused	
TNC, $\times 10^8/\text{kg}$	2.9 (0.5-23.5)
CD34 ⁺ , $\times 10^6/\text{kg}$	6.6 (0.7-16.6)
CD3 ⁺ , $\times 10^6/\text{kg}$	63.1 (14.6-1035.4)

Abbreviations : SAA, severe aplastic anemia; AML, acute myeloid leukemia; ALL, acute lymphoblastic leukemia; HLH, hemophagocytic lymphohistiocytosis; TBI, total body irradiation; GVHD, graft-versus-host disease; CSA, cyclosporin A; MTX, methotrexate; BM, bone marrow; PBSC, peripheral blood stem cell; CB, cord blood; TNC, total nucleated cell.

발생하였다.

2. 이식편 내 CD4⁺CD25⁺ T 세포의 분포

총17명 환자의 이식편 내 CD4⁺CD25⁺ T세포 분획의 중앙값은 0.90% (0.00%-3.23%), CD4⁺CD25⁺ T세포 절대수(absolute count)의 중앙값은 $7.7 \times 10^5/\text{kg}$ ($0.0 \times 10^5/\text{kg}$ - $397.3 \times 10^5/\text{kg}$)이었다. 골수, 말초혈, 체대혈에서 CD4⁺CD25⁺ T세포 분획의 중앙값은 각각 1.14%, 0.63%, 0.11%로 유의한 차이가 없었고($P=0.15$), CD4⁺CD25⁺ T세포 절대수의 중앙값은 각각 $7.24 \times 10^5/\text{kg}$, $52.0 \times 10^5/\text{kg}$ 와 $0.63 \times 10^5/\text{kg}$ 이었다.

3. 이식편 내 CD4⁺CD25⁺ T세포와 급성 GVHD

GVHD(+)군과 GVHD(-)군에서 이식편 내 CD4⁺CD25⁺ T세포 분획의 중앙값은 각각 0.90%, 1.06%이었고 두 값의 유의한 차이는 없었다($P=0.62$, Fig. 2A). GVHD(+)군과 GVHD(-)군에서 이식편 내 CD4⁺CD25⁺ T세포의 절대수는 각각 $6.18 \times 10^5/\text{kg}$ 와 $25.85 \times 10^5/\text{kg}$ 로 GVHD(-)군이 GVHD(+)군보다 많은 경향을

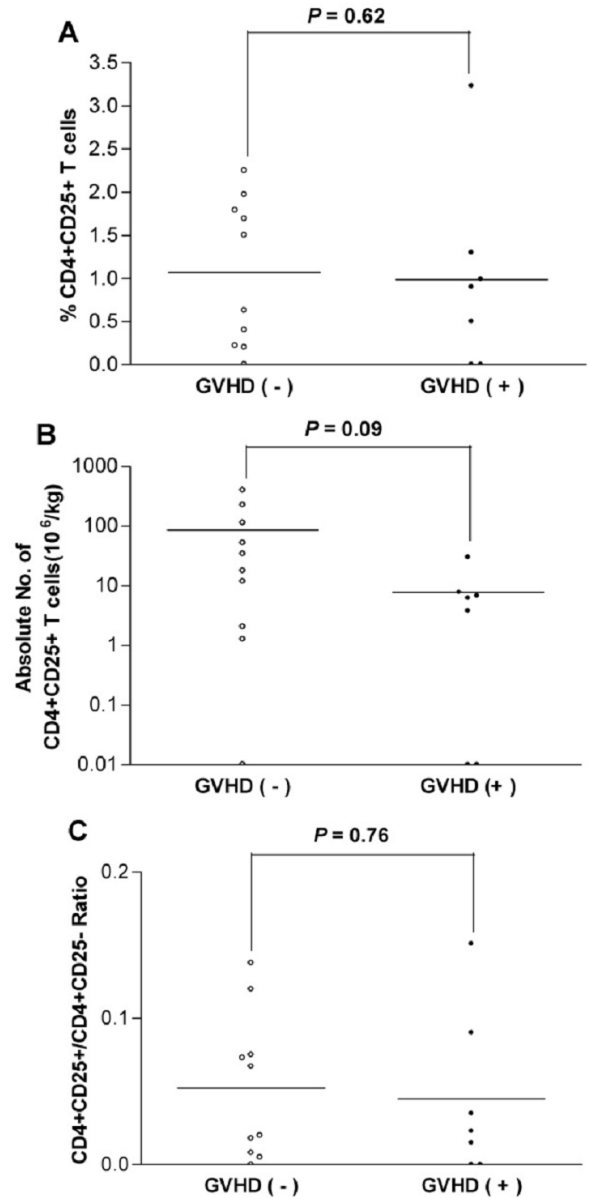


Fig. 2. Severity of acute GVHD and CD4⁺CD25⁺ T cells in donor grafts. (A) Percentage of CD4⁺CD25⁺ T cells in grafts did not show a significant difference between patients with acute GVHD and those without acute GVHD. (B) Absolute numbers of CD4⁺CD25⁺ T cells in grafts showed a lower trend in patients with acute GVHD compared to those without acute GVHD. (C) Ratios of CD4⁺CD25⁺ T cells to CD4⁺CD25⁻ T cells in grafts did not show a significant difference between patients with acute GVHD and those without acute GVHD.

보였으나 통계적 유의성은 없었다($P=0.09$, Fig. 2B). GVHD(+)군과 GVHD(-)군에서 이식편 내 CD4⁺CD25⁻ T 세포에 대한 CD4⁺CD25⁺ T 세포의 비율은 각각 0.023과 0.043으로 유의한 차이가 없었다($P=0.76$, Fig. 2C).

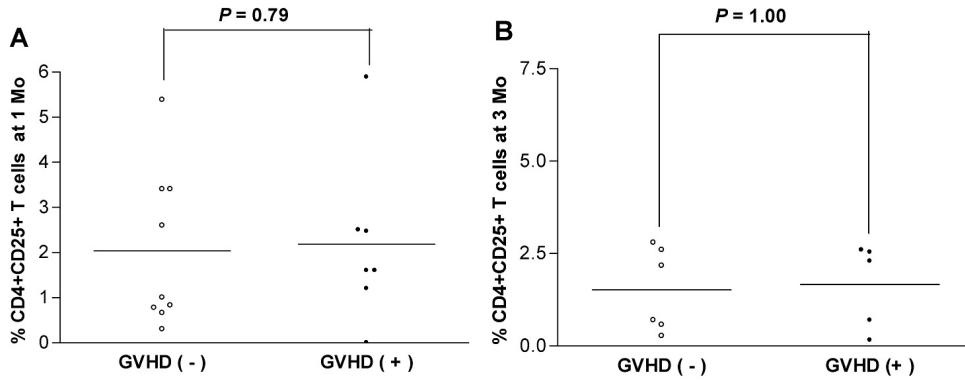


Fig. 3. Severity of GVHD and CD4⁺CD25⁺ T cells in peripheral blood after HSCT. (A) At 1 month after transplantation, the percentage of CD4⁺CD25⁺ T cells in peripheral blood did not show a significant difference between patients with acute GVHD and those without acute GVHD. (B) At 3 months after transplantation, the percentage of CD4⁺CD25⁺ T cells in peripheral blood did not show a significant difference between patients with acute GVHD and those without acute GVHD.

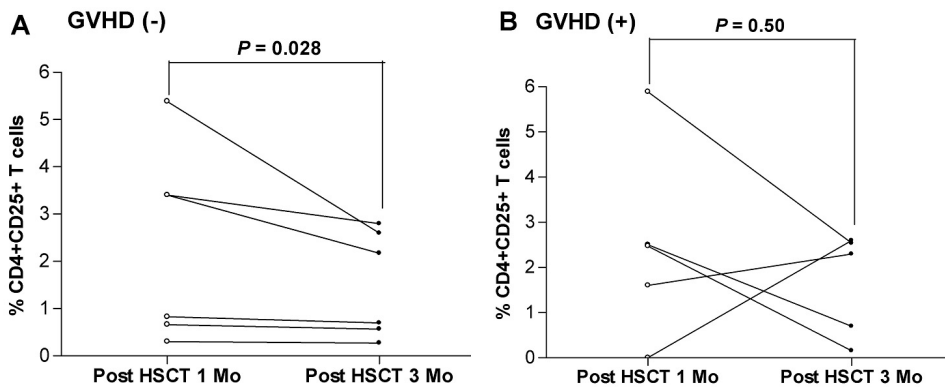


Fig. 4. Severity of GVHD and changes in CD4⁺CD25⁺ T cells in peripheral blood after HSCT. (A) In patients without acute GVHD, the percentage of peripheral blood CD4⁺CD25⁺ T cells at 3 months showed a significant reduction compared to the corresponding percentage at 1 month. (B) In patients with acute GVHD, the percentage of peripheral blood CD4⁺CD25⁺ T cells at 3 months showed no significant difference from the corresponding percentage at 1 month.

4. 이식 후 환자의 말초혈액 내 CD4⁺CD25⁺ T세포와 급성 GVHD

이식 후 전체 환자의 말초혈액 내 CD4⁺CD25⁺ T세포 분획의 중앙값은 1개월에 1.60% (0.00-5.89%), 3개월에 2.17% (0.16-2.80%)이었다. 이식 후 1개월에 말초혈액 내 CD4⁺CD25⁺ T세포 분획은 GVHD(+)^군 1.60%, GVHD(-)^군 1.00%로 유의한 차이는 없었다($P=0.79$, Fig. 3A). 이식 후 3개월에 말초혈액 내 CD4⁺CD25⁺ T세포 분획은 GVHD(+)^군 2.30%, GVHD(-)^군 1.43%로 역시 유의한 차이는 없었다($P=1.00$, Fig. 3B). GVHD(-)^군의 말초혈액 내 CD4⁺CD25⁺ T 세포 분획은 이식 후 1개월 2.11%, 3개월 1.43%로 유의하게 감소하였으나($P=0.028$, Fig. 4A), GVHD(+)^군의 말초혈액 내 CD4⁺CD25⁺ T 세포 분획은 이식 후 1개월과 3개월에 각각 2.47%와 2.30%로 유의한 차이가 없었다($P=0.50$, Fig. 4B).

고 찰

1995년 Sakakuchi 등⁵⁾은 CD25⁺ T세포가 자가항원과 동종항원에 대한 면역 관용을 유도하고 유지시키는데 중요한 역할을 한다고 보고하였다. 쥐의 동종 조혈모세포이식에서 CD4⁺CD25⁺ Treg세포가 GVHD의 발생을 조절하고 이식 거부반응에서도 중요한 역할을 하는 것이 알려져 있으나, 사람의 동종 조혈모세포이식에서 CD4⁺CD25⁺ Treg세포의 역할에 대해서는 알려진 것이 거의 없다^{6-12, 14)}. 사람의 CD4⁺CD25⁺ Treg세포는 말초혈액의 림프구 중 1-3%를 차지하고 있으며 절대적인 단독 표지자는 아직 알려져 있지 않다^{6, 15)}. 따라서 본 실험을 통하여 저자들은 사람의 동종 조혈모세포이식에서 공여자의 이식편과 이식 후 소아 환자의 말초혈액에서 CD4⁺CD25⁺ T세포를 유세포 분석을 통하여 정량화 하여 이식 후 급성 GVHD와 관계를 규명하고 CD4⁺CD25⁺ T

세포를 조절T세포로 볼 수 있는지 알아보려고 하였다.

본 실험의 결과에서 이식편 내 $CD4^+CD25^+$ T세포의 비율과 이식 후 환자의 급성 GVHD간 상관성을 볼 수는 없었다. 그러나, 급성 GVHD가 있었던 군이 급성 GVHD가 없었던 군보다 이식편 내 $CD4^+CD25^+$ T세포의 절대수는 적은 경향을 보였다. 한편, 쥐의 동종 조혈모세포이식에서는 이식편 내 $CD4^+CD25^+$ T세포에 대한 $CD4^+CD25^-$ T세포의 비율이 클수록 급성 GVHD 발생이 증가한다는 보고가 있다¹⁰⁾. 본 실험에서도 이식편 내 $CD4^+CD25^-$ T세포에 대한 $CD4^+CD25^+$ T세포의 비율과 급성 GVHD의 관련성을 확인해 보았으나 유의한 결과는 아니었다. 쥐를 이용한 동물 실험과 본 실험이 다른 결과를 보인 것은 주입된 세포 중 활성화된 공여자T세포나 자연살해세포(NK cell) 등 이식편에 포함된 세포 중 GVHD에 관여하는 세포의 영향을 완전히 배제시킬 수 없었기 때문이라고 생각한다. 또한, 사람의 동종 조혈모세포이식에서는 공여자(혈연, 비혈연), 구조적적합항원 일치도, 공여자와 환자의 성별과 나이, 전처치 종류, GVHD의 예방법, 거대세포바이러스 항체 유무, 환자의 유전적인 소인 등과 같은 많은 인자가 GVHD에 관여하기 때문에 동물 실험과 달리 균일한 대상을 통한 실험을 하기 어렵다는 문제점이 있으며 본 실험에서 대상군의 크기가 충분하지 않다는 제한점이 있어 보다 많은 대상을 통한 연구가 필요하다고 사료된다.

주목할 만한 결과는 급성 GVHD가 있었던 환자들은 이식 후 1개월과 3개월의 $CD4^+CD25^+$ T세포 분획에 유의한 변화가 없었으나, 급성 GVHD가 없었던 환자들의 $CD4^+CD25^+$ T세포 분획은 이식 후 시간이 경과에 따라 감소되었다. 이 결과는 말초혈액 내 $CD4^+CD25^+$ 조절T세포가 동종항원에 대한 면역관용을 유도하여 급성 GVHD를 감소시킨다는 사실과 상반된다. CD25는 IL-2 수용체의 α 사슬로서 조절 T세포뿐만 아니라 활성화된 T세포에서도 발현되고, 조절 T세포의 다른 표지자인 CTLA4, GITR 등도 활성화된 T세포에서 발현이 되기 때문에 조절 T세포의 분석에 표지자로 이용하는 경우에는 유의해서 해석하여야 한다⁶⁾. 아직까지 사람의 말초혈액에서 전체 $CD4^+CD25^+$ T세포 중 활성화된 T세포의 비율은 알려져 있지 않다. 따라서 여러 연구에서 인간의 조절 T세포를 분리하는데 CD25를 표현하는 기억 T세포나 활성화된 T세포가 혼동을 주게된다. Stanzani 등¹⁶⁾은 사람의 말초혈액 조혈모세포이식에서 이식편 내 $CD4^+CD25^+$ T세포수가 많을수록 오히려 GVHD 위험도가 높다고 하였으며 CD4와 CD25만으로 조절 T세포를 확인할 수 없었다고 보고하였다. 한편, Clark 등¹⁷⁾과 Sanchez 등¹⁸⁾은 GVHD가 있었던 환자의 말초혈액 내 $CD4^+CD25^+$ T세포수가 GVHD가 없었던 환자에 비하여 많거나 비슷하다고 보고하였다. 그러나, Zorn들²⁰⁾은 만성 GVHD가 있는 환자에서 GVHD가 없는 환자에 비하여 말초혈액 내 $CD4^+CD25^+$ T세포가 감소되었다는 상반된 보고를 하였다. 일반적으로 사람의 동종 조혈모세포이식 후 환자의 T세포가 면역학적으로 재구성되기까지는 보통 6-12개월이 걸리기 때문에 이식 후 환자의 초기 말초혈액 내 T세포수는 대부분 공여자로부터 기원한 이식편 내

T세포수의 영향을 받는다^{21, 22)}. 사람의 동종 조혈모세포 이식에서는 면역억제제를 사용하기 때문에 이식 후 초기3개월에는 조절 T세포수는 감소하지만 GVHD가 발생한 환자에서 활성화된 공여자 기원 T세포는 증식이 억제되지 않을 것으로 생각할 수 있다. 따라서 본 실험에서 유세포 분석으로 확인한 이식 후 환자의 말초혈액 내 $CD4^+CD25^+$ T세포는 조절 T세포 단독으로 구성된 것이 아니고 GVHD에 관여하는 공여자 기원의 활성화된 T세포를 상당수 포함하고 있을 것으로 생각한다. 이러한 이유로 본 실험에서 저자들은 이식 후 유세포 분석에 의한 환자의 말초혈액 내 $CD4^+CD25^+$ T세포를 GVHD의 조절에 관여하는 조절T세포보다 활성화된 T세포군을 반영한다고 생각할 수 있었다. 그러나, 우리 연구는 이식 환자의 말초혈액 $CD4^+CD25^+$ T세포 중 공여자 기원 분획에 대한 검증과 기능적으로 면역 억제능을 보이는 조절 T세포의 분리등에 대한 실험을 시행하지 못한 문제점이 있다. 이러한 제한점을 극복하기 위해서 최근 조절 T세포로 분화하는데 중요한 요소로 알려진 FOXP3를 이용하여 조절 T세포를 구분하고 이식 후 말초혈액의 T세포의 키메라(chimerism)분석이 필요하다고 생각한다¹⁹⁾.

본 실험의 결과로 저자들은 유세포 분석에 의한 이식편 내 $CD4^+CD25^+$ T세포의 분포와 이식 후 환자의 급성 GVHD의 관계에 대한 유의성은 검증할 수 없었으나, 보다 많은 대상을 통한 검증이 필요하다고 생각한다. 또한, 동종 조혈모세포이식을 시행 받은 환자에서 유세포 분석에 의한 말초 혈액 내 $CD4^+CD25^+$ T세포에는 조절 T세포보다 GVHD와 연관된 활성화된 T세포의 분획이 더 클 것으로 사료되나 추가적인 조절 T세포의 표지자를 이용한 검증이 필요할 것으로 사료된다.

요 약

목적 : 본 연구의 목적은 사람의 동종 조혈모세포이식에서 공여자의 이식편과 환자의 이식 후 말초혈액에서 $CD4^+CD25^+$ T세포 분획의 분포를 알아보고 급성 이식편대숙주병(GVHD)과 연관성을 알아보려고 하였다.

방법 : 동종 조혈모세포이식을 시행 받은 17명의 소아를 대상으로 하였다. 공여자의 이식편과 이식 받은 환자의 이식 후 말초혈액으로부터 얻은 검체를 유세포 분석(flow cytometry)하였다. 공여자의 이식편과 이식 후 1개월과 3개월에 환자의 말초혈액 내 $CD4^+CD25^+$ T 세포의 분획과 절대 세포수를 알아보았다.

결과 : 공여자의 이식편 내 $CD4^+CD25^+$ T 세포의 분획은 급성 GVHD 발생군과 비발생군에서 각각 0.90%, 1.06%이었으며 차이가 없었다($P=0.62$). 이식편 내 $CD4^+CD25^+$ T세포의 절대수는 급성 GVHD 발생군과 비발생군이 각각 $6.18 \times 10^5/kg$ 와 $25.85 \times 10^5/kg$ 으로 급성 GVHD 비발생군이 발생군보다 많은 경향을 보였으나 유의성은 없었다($P=0.09$). 급성 GVHD 비발생군의 말초혈액 $CD4^+CD25^+$ T 세포는 이식 후 1개월에 2.11%, 3개월에 1.43%로 유의하게 감소하였으나($P=0.028$), 급성 GVHD 발생군

의 말초혈액 내 CD4⁺CD25⁺ T 세포는 이식 후 1개월과 3개월에 각각 2.47%와 2.30%로 유의한 차이가 없었다($P=0.50$).

결론: 본 실험을 통하여 저자들은 공여자의 이식편 내 CD4⁺CD25⁺ T세포의 분포와 이식 후 환자의 급성 GVHD의 관계에 대한 유의성은 검증할 수 없었으며 이식 후 환자의 말초혈액 내 CD4⁺CD25⁺ T 세포에는 조절 T세포보다 GVHD와 연관된 활성화된 T세포의 분획이 더 클 것으로 사료되나 추가적인 조절 T세포의 표지자를 이용한 검증이 필요할 것으로 사료된다.

References

- Ferrara JL, Reddy P. Pathophysiology of graft-versus-host disease. *Semin Hematol* 2006;43:3-10.
- Teshima T, Ferrara JL. Pathogenesis and prevention of graft-versus-host disease. *Curr Opin Organ Transplant* 2001; 6:265-71.
- Martin PJ, Hansen JA, Buckner CD, Sanders JE, Deeg HJ, Stewart P, et al. Effects of in vitro depletion of T cells in HLA-identical allogeneic marrow grafts. *Blood* 1985;66:664-72.
- Horowitz MM, Gale RP, Sondel PM, Goldman JM, Kersey J, Kolb HJ, et al. Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood* 1990;75:555-62.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-64.
- Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immuno*. 2003;3:199-210.
- Trenado A, Charlotte F, Fisson S, Yagello M, Klatzmann D, Salomon BL, et al. Recipient-type specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest* 2003;112:1688-96.
- Jones SC, Murphy GF, Korngold R. Post-hematopoietic cell transplantation control of graft-versus-host disease by donor CD4⁺CD25⁺ T cells to allow an effective graft-versus-leukemia response. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003;9: 243-56.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, et al. Immunologic tolerance maintained by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001;182:18-32.
- Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 2002;196:389-99.
- Cohen JL, Trenado A, Vasey D, Klatzmann D, Salomon BL. CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells: new therapeutics for graft-versus-host disease. *J Exp Med* 2002;196:401-6.
- Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4⁺CD25⁺ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002;99: 3493-9.
- Glucksberg H, Storb R, Fefer A, Buckner CD, Neiman PE, Clift RA, et al. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HLA-matched sibling donors. *Transplantation* 1974;18:295-304.
- Hanash AM, Levy RB. Donor CD4⁺CD25⁺ T cells promote engraftment and tolerance following MHC-mismatched hematopoietic cell transplantation. *Blood* 2005;105:1828-36.
- Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4⁺CD25^{high} Regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001;167:1245-53.
- Stanzani M, Martins SL, Saliba RM, St John LS, Bryan S, Couriel D, et al. CD25 expression on donor CD4 or CD8 T cells is associated with an increased risk for graft-versus-host disease after HLA-identical stem cell transplantation in humans. *Blood* 2004;103:1140-6.
- Clark FJ, Gregg R, Piper K, Dunnion D, Freeman L, Griffiths M, et al. Chronic graft-versus-host disease is associated with increased numbers of peripheral blood CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells. *Blood* 2004;103:2410-6.
- Sanchez J, Casano J, Alvarez MA, Roman-Gomez J, Martin C, Martinez F, Gomez P, et al. Kinetic of regulatory CD25^{high} and activated CD134⁺(OX40) T lymphocytes during acute and chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Br J Haematol* 2004;126:697-703.
- Miura Y, Thoburn CJ, Bright EC, Phelps ML, Shin T, Matsui WH, et al. Association of Foxp3 regulatory gene expression with graft-versus-host disease. *Blood* 2004;104: 2187-93.
- Zorn E, Kim HT, Lee SJ, Floyd BH, Lista D, Arumugarajah S, et al. Reduced frequency of FOXP3⁺ CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2005;106:2903-11.
- Auletta JJ, Lazarus HM. Immune restoration following hematopoietic stem cell transplantation: an evolving target. *Bone Marrow Transplant* 2005;35:835-57.
- Storek J, Witherspoon RP. Immunological reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. In: Atkinson K, Champlin R, Ritz J, Fibbe WE, Ljungman P, Brenner MK. *Clinical bone marrow and blood stem cell transplantation*, 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2004:194-226.