

H2-M3의 세포 표면 발현이 NK 세포의 활성화에 미치는 영향 분석

이상열 · 전태훈*[#]

경원대학교 자연과학대학 생명과학과, *고려대학교 생명과학대학
(Received February 27, 2009; Revised March 17, 2009; Accepted May 11, 2009)

The Cell Surface Expression of H2-M3 Does Not Directly Effect on the Killing Activity of NK Cell

Sang Yeol Lee and Taehoon Chun*[#]

Department of Life Science, College of Natural Sciences, Kyungwon University, 461-701, Korea
*College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, 136-701, Korea

Abstract — H2-M3 (M3) is a unique antigen presenting molecule which provides *N*-formylated peptide to certain type of T cells. Previous observation indicated that NK cell activity is significantly diminished during listerial infection in H2-M3^{-/-} mice. To explore the possibility that M3 expression directly effect on NK cell activity, we measured NK cell activity with or without stimulation of *N*-formylated peptide on antigen presenting cells. Results indicated that the expression of M3 is not directly influence on NK cell activity. Further study will be focused on the indirect effect of M3 on regulating NK cell activity.

Keywords □ antigen presenting molecule, H-2M3 (M3), Major histocompatibility complex molecule, NK cell, *N*-formylated peptide

주요조직 적합성 항원(MHC; major histocompatibility complex)은 구조와 기능에 따라 두 가지로 나뉜다. 그 중 class Ia는 8개에서 11개로 구성되어진 peptide 항원을 세포독성 T 림프구에 전달해주며, class Ib는 기존의 peptide 항원이 아닌 각 각의 독특한 항원을 인식하여 각기 특이적인 T 림프구에 전달 해 준다.¹⁾ H2-M3(M3)는 주요조직 적합성 항원 class Ib로 분류되며 생쥐(mouse)에서 그 기능이 발견되어진 매우 독특한 항원인식물질이다. M3의 경우 항원인식부위가 *N*-formylated peptide에 매우 높은 특이성을 가지고 있으며, 이러한 항원에 대한 반응성은 어떠한 항원 인식 물질도 흉내 내지 못하는 것이다.²⁾ 생체 내에서 *N*-formylated peptide는 미토콘드리아나 세균의 단백질에서 발견되며, 따라서 항원인식물질로서 M3의 기능은 세균의 감염시 세균 특이적 항원을 T 림프구에 전달해주는 것으로 생각되어진다.³⁾

M3의 발현은 주요항원인식세포(professional antigen presenting cell)인 수지상세포(dendritic cell), 대식세포(macrophage), 미성숙(immature) B 림프구의 표면에 선택적으로 발현되는 것으로 알려졌으며, 따라서 발현 양상은 MHC class II 물질과 유

사한 것으로 알려져 있다.⁴⁾ M3가 항원을 전달해 주는 T 림프구는 주로 세포독성 T 림프구(cytotoxic T lymphocyte)로 알려져 있으며, 지금까지 알려진 M3에 결합하는 항원은 mitochondria에서 파생된 항원과 감염성 세균에서 파생된 항원으로 나뉜다.⁵⁾ 그 중 감염성 세균에서 파생된 항원은 리스테리아와 결핵균에서 발견되었다.^{6,7)}

M3에 결합하는 외부 항원인 리스테리아와 결핵균에서 파생된 항원을 인식하는 T 림프구는 실제로 리스테리아와 결핵균 감염시 이러한 병원성 세균을 죽일 수 있고, 대표적인 Th1 type 싸이토카인인 IFN- γ 를 방출할 수 있다. M3에 의해 항원을 인식하고 그에 따라 활성화 일어나는 세포독성 T 림프구의 중요성에 대해서는 리스테리아 감염 모델에서 자세히 연구되었다. 흥미로운 것은 리스테리아 감염시 MHC class Ia 물질이 결합된 생쥐에서는 리스테리아에 대한 저항성이 정상 생쥐와 비교하여 전혀 저하 되지 않는다는 것이다. 이러한 원인으로 아마도 리스테리아 감염시 M3에 의해 활성화 일어나는 세포독성 T 림프구의 역할이 중요하기 때문일 것으로 생각되어진다.⁸⁾ 또한 리스테리아 감염시 M3에 의해 활성화 일어나는 세포독성 T 림프구는 MHC class Ia 물질에 의해 활성화 일어나는 세포독성 T 림프구보다 먼저 활성화 일어나는 것으로 알려졌다.⁹⁾

M3의 항원인식과 이에 따른 세포독성 T 림프구의 활성화 리

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-3290-3069 (팩스) 02-3290-3507
(E-mail) tchun@korea.ac.kr

스테리아 감염시에 중요한 역할을 한다는 결정적인 증거는 M3 결핍 생쥐를 이용한 리스테리아 감염 모델에서 입증 되었다.¹⁰⁾ 리스테리아 감염시 M3 결핍 생쥐는 리스테리아에 상당한 감수성을 나타내는 것으로 보여졌고, 이러한 결과는 M3에 의해 활성이 일어나는 세포독성 T 림프구가 결핍되어 전체적인 세포독성 T 림프구의 활성화에 영향을 끼치기 때문이라고 알려졌다.¹⁰⁾ 더욱이 리스테리아 감염시 M3 결핍 생쥐는 NK 세포의 활성도 떨어지는 것으로 알려졌다.¹⁰⁾

NK 세포의 활성화는 활성화증진 신호와 활성화감소 신호의 두 가지 신호체계에 의해 조절된다. 활성화증진 신호와 활성화감소 신호가 동시에 NK 세포에 전달되면 NK 세포는 활성이 일어나지 않지만 활성화증진 신호만이 NK 세포에 전달되면 NK 세포는 활성이 일어나 target 세포의 세포사멸을 유발한다.¹¹⁾ 지금까지 발견된 NK 세포의 활성화감소 신호를 전달하는 물질 중 생쥐의 Qa-1과 인간의 HLA(human leukocyte antigen)-E는 MHC class Ib로 구분된다.^{12,13)} 그러나 다른 MHC class Ib 물질이 NK 세포의 활성화감소 신호를 전달하는가에 대해서는 알려진 바 없다. 앞에서 언급했듯이 리스테리아 감염시 M3 결핍 생쥐는 NK 세포의 활성도가 떨어지는 것으로 알려져 있으며, 이러한 원인을 규명하기 위해 본 연구에서는 M3의 발현과 NK 세포에 활성의 연관성에 대해 알아보았다.

실험방법

실험재료

정제된 항 M3 항체(mAb 130 clone)⁴⁾와 LemA(fMIGWII)⁶⁾ and TB4(fMFLIDV)⁷⁾ peptide는 Chung-Ru Wang 박사(Northwestern University, USA)가 제공 하였다. 각각의 항체 isotype control과 secondary antibody는 BD Pharmingen(USA)에서 구입하였다. 이외 언급하지 않은 모든 시약은 Sigma(USA)에서 구입하였다.

세포배양

생쥐 lymphoma 세포주인 YAC-1과 생쥐 macrophage 세포주인 P388D1은 ATCC(USA)에서 분양 받아 실험에 사용하였다. P388D1 세포주는 10% fetal bovine serum(FBS, Hyclone, USA)을 함유한 DMEM(Invitrogen, USA) 배지에서 37°C, 5% CO₂ 분압조건으로 배양하였다.

NK 세포 확립

Lymphokine activated killer cell(LAK) 세포는 C57BL/6(B6) 비장세포를 10% fetal bovine serum(FBS, Hyclone, USA)와 500 Unit/ml의 재조합 생쥐 IL-2(BDPharmingen, USA)를 함유한 DMEM 배지에서 5일간 세포 배양하여 얻었다.¹⁴⁾ 배양된 NK

세포는 T세포를 인식하는 항체(anti-TCR β)와 NK세포 표면인자를 인식하는 항체(anti-NK1.1)로 염색하여 유세포 분석기(flow cytometry)에서 분석하였다. 그 후, NK 세포를 B6 생쥐 NK세포 표면인자를 인식하는 항체가 붙어 있는 microbead(Miltenyi Biotech, Germany)를 사용하여 분리 하고 세포독성측정(cytotoxicity assay)에 effector로 사용하였다. 또한 poly(I:C) activated killer cell을 얻기 위해 B6 생쥐에 200 μ g의 poly(I:C)(Sigma, USA)를 복강 내 주사하고 20시간 후에 비장에서 세포를 분리하였다. 그 후 DMEM 배지에서 1시간 배양 후, nonadherent cell을 effector로 사용하였다.¹⁵⁾ 이 때, T세포를 인식하는 항체(anti-TCR β)와 NK세포 표면인자를 인식하는 항체(anti-NK1.1)로 염색하여 유세포 분석기(flow cytometry)에서 분석하였다.

세포독성 측정

세포독성측정은 lactase dehydrogenase(LDH) 방출을 이용한 non-radioactive cytotoxicity assay(Promega, USA)를 사용하여 측정하였다. 우선 effector와 target cell을 count하여 ratio를 정하였다. 그 후 U bottom 96 well plate에 target cell(1×10^4 cells)과 ratio를 정한 effector(LAK와 poly(I:C) activated killer cell)를 넣고 4시간 동안 37°C, 5% CO₂ 분압조건으로 배양하였다. 이 때 total volume은 200 μ l로 하였다. 그 후, 상층액 50 μ l를 LDH substrate와 반응 시켜서 absorbance 490 nm에서 상대적인 세포독성을 측정하였다.

유세포 분석기(flow cytometry) 분석

YAC-1 세포주와 P388D1 세포주를 유세포 분석기로 분석하기 위해 PBS로 3번 세척하였다. 그 후, 세포를 2% fetal bovine serum을 함유한 PBS 50 μ l에 현탁 한 후, 4°C에서 anti-M3 항체에 30분간 방치하였다. 그 후 세포와 항체가 들어있는 반응액을 PBS로 3번 세척하였고 secondary antibody인 항 FITC-conjugated hamster-IgG를 동일한 조건에서 반응 시켰다. Flow cytometry 분석은 FACSCalibur(BD Pharmingen, USA)를 이용하였고 PBS 400 μ l에 세포를 현탁하여 M3의 세포 표면 발현을 측정하였다.

실험결과 및 고찰

NK 세포 확립 및 기능 고찰

본 연구는 MHC class Ib 물질 중의 하나인 M3의 발현이 NK 세포 활성화에 직접적으로 영향을 미치는 가에 대한 고찰이다. 우선 NK 세포를 확립하기 위해 LAK와 poly(I:C) activated killer cell 두 종류의 NK 세포를 확립하였다. NK 세포를 확립하는 방법은 지금까지 여러 가지 방법이 개발 되었는데, 본 연구에서 사용되어진 방법은 고전적인 방법인 생쥐 비장세포에 다량의 IL-2

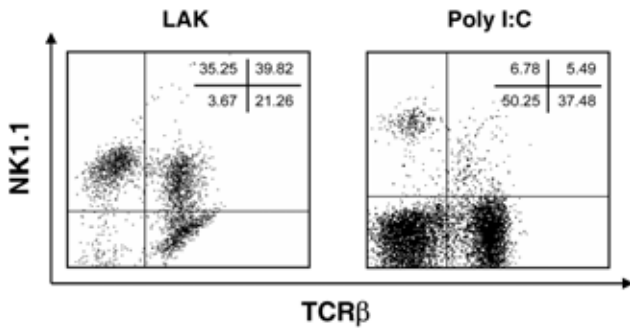


Fig. 1 – Establishment of LAK and poly I : C activated killer cells. Generated LAK and poly I : C activated killer cells were stained with antibody against TCR β chain and NK1.1. Numbers indicate percentages of cells in the corresponding quadrant. The results are representative of three separate experiments.

(500 unit/ml)를 처리하는 방법¹⁴)과 생쥐의 복강 내 poly(I : C) (200 μ g/mouse)를 주사하는 방법을 사용하였다.¹⁵) 따라서 한 가지 방법에서 과생된 NK 세포 보다 좀 더 다양한 조건에서 과생된 NK 세포를 사용하여 M3가 NK 세포 활성화에 미치는 영향을 평가하였다.

고전적인 NK 세포 확립 방법인 생쥐 비장세포에 다량의 IL-2 (500 unit/ml)를 처리하는 방법에 의해 만들어진 LAK는 두 가지 표현형으로 나뉜다. 즉 NK1.1⁺TCR⁺처럼 T 세포 수용체(T cell receptor)를 가진 LAK와 일반적인 NK 세포의 표현형을 가진 NK1.1⁺TCR⁻의 두 가지 표현형으로 나뉜다.¹⁶) 실험 결과 Fig. 1에서 보이는 것 같이 NK1.1⁺TCR⁻ 세포형과 NK1.1⁺TCR⁺세포형이 거의 1 : 1로 과생 되는데, NK1.1⁺TCR⁺세포형의 경우 대부분 CD8⁺CD4⁻ 세포형을 가지며, 이 때 CD8⁺세포형은 CD8 $\alpha\beta$ heterodimer를 발현한다.¹⁶) Poly(I : C)의 경우 toll like receptor-3(TLR-3)의 리간드로서 강력한 Th1 반응을 유발한다.¹⁷) 또한 1990년대부터 Poly(I : C)를 생쥐에 주사하여 NK 세포의 활성을 높이고 있다.¹⁵) Poly(I : C)를 생쥐에 주사하여 얻어진 비장세포의 NK 세포와 T 림프구의 분포도는 Fig. 1에서 보이는 것 같이, Poly(I : C)를 주사하기 전 생쥐의 NK 세포와 T 림프구의 분포도와 비교해 별다른 차이가 없으며, Poly(I : C)에 의해 자극 받은 nonadherent cell은 세포독성을 나타내는 것으로 알려졌다.¹⁷)

이러한 두 가지 NK 세포들을 확립한 후 각 각의 NK 세포의 활성을 고찰하기 위해 세포독성 실험을 YAC-1 세포주와 P388D1 세포주로 나누어 실행하였다. YAC-1 세포주는 생쥐 lymphoma 세포주로 NK 세포들의 세포독성 실험에 가장 널리 사용되는 세포주이며, P388D1은 생쥐 대식세포주로서 대식세포는 주요항원 인식세포로 M3를 발현할 수 있는 세포이다. LAK의 경우 세포독성 실험에 NK세포 표면인자(NK1.1⁺)를 인식하는 항체가 붙어 있는 microbead를 사용하여 분리 하여, 두 가지 세포형(NK1.1⁺TCR⁻ 세포형과 NK1.1⁺TCR⁺세포형)을 모두 사용하였

다. Poly(I : C)에 의해 활성화 한 NK 세포는 nonadherent cell을 effector로 사용하였다.¹⁷) Fig. 2A, B에서 보는 것 같이 두 가지 NK 세포들은 YAC-1 세포주와 P388D1 세포주 모두에게 세포독성을 나타내었으며, YAC-1 세포주를 P388D1 세포주보다 더 효과적으로 살해하였다. 또한 LAK의 경우 percent specific lysis가 거의 80~90%를 보였는데 반해, Poly(I : C)에 의해 활성화 한 NK 세포의 경우 percent specific lysis가 60%를 보였다. 따라서 LAK가 Poly(I : C)에 의해 활성화 한 NK 세포보다 세포독성에 대한 활성이 높았는데, 이러한 이유는 LAK의 경우 NK세포 표면인자만을 발현하는 세포를 effector로 사용했기 때문일 것이다.

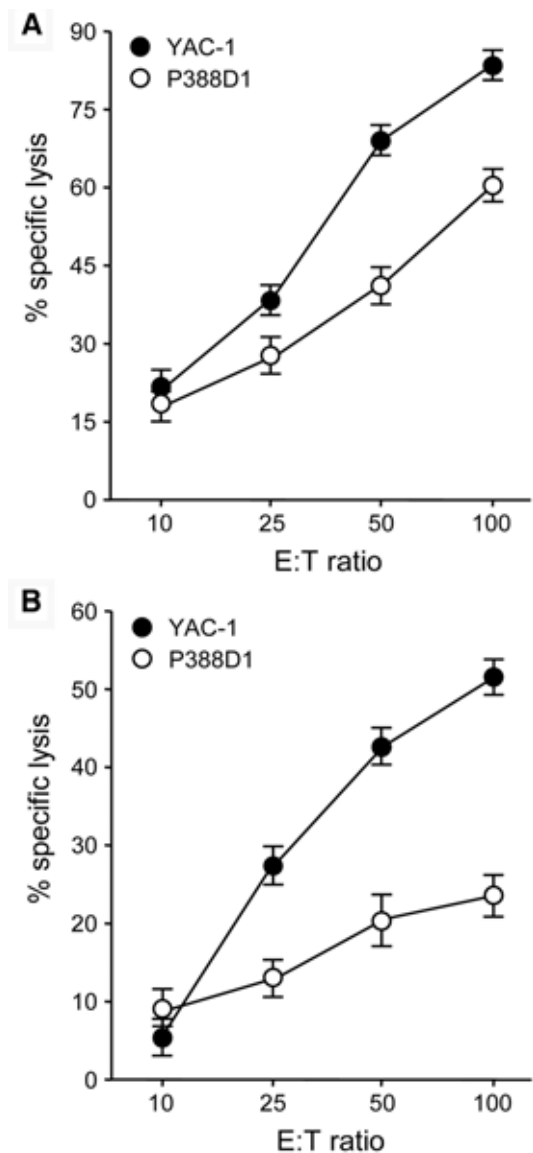


Fig. 2 – The function of LAK and poly I : C activated killer cells. Percent specific lysis of target cells (YAC-1 and P388D1) were measured to access the function of LAK (A) and poly I : C activated killer cells (B). Three independent experiments were done and results are shown as mean \pm SE.

M3 발현이 NK 세포 활성화에 미치는 영향 고찰

생체 내 면역 반응에서 NK 세포는 두 가지 중요한 역할을 한다. 첫째로, 감염 초기에 병원성 미생물에 대한 생체 내 저항성을 나타내며, 둘째로 암세포를 죽이는 역할을 한다. 따라서 최근에는 NK 세포의 활성 조절을 이용한 면역 요법들이 활발히 연구되어지고 있다. 최근에는 몇몇 MHC class Ib 물질, 특히 생쥐의 Qa-1과 인간의 HLA(human leukocyte antigen)-E가 NK 세포의 활성감소 신호를 전달하는 물질들이 밝혀졌다.^{12,13)} 그러나 아직 M3와 NK 세포의 활성화에 대한 연구는 이루어진 바 없다. Fig. 2에서 보는 것 같이 LAK와 poly(I:C) activated killer cell은 target 세포들인 YAC-1 세포주와 P388D1 세포주를 효과적으로 살해 할 수 있다. 따라서, 두 가지 세포주에서 우선 M3의 항원인 *N*-formylated peptide를 처리 한 후 M3의 세포표면 발현을 유도 한 후, M3의 발현 유무가 이들 NK 세포들의 세포독성 활성화에 미치는 영향에 대해서 알아보았다.

실험에 사용되어진 *N*-formylated peptide는 LemA와 TB4 peptide로 LemA peptide는 listeria에서 파생된 항원으로 M3에 가장 높은 affinity를 가진 항원이다.⁶⁾ Fig. 3에서 보는 것과 같이 LemA를 처리 하였을 시에는 M3의 세포 표면 발현을 유발한다. 또한 TB4 peptide는 결핵균에서 파생된 항원으로 LemA보다는

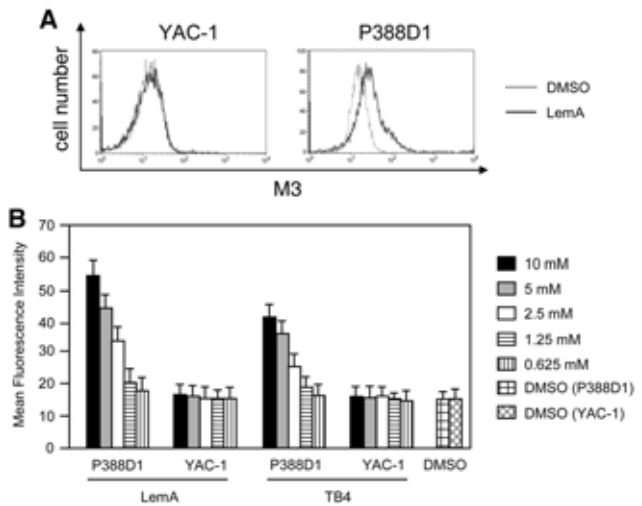


Fig. 3 – Induction of M3 on the cell surface by *N*-formylated peptides. (A) YAC-1 and P388D1 cells were incubated with LemA (fMIGWII) and TB4 (fMFLIDV) peptides at a concentration of 10 mM overnight. Then, Flow cytometric analysis was assessed the induction of M3 on the cell surface. The results are representative of three separate experiments. (B) YAC-1 and P388D1 cells were incubated with LemA and TB4 peptides with varying concentrations of M3-binding peptides. The range of concentrations and the corresponding hatchmarks are shown. Bars represent mean fluorescence intensity after staining with anti-M3 antibody as described. Three independent experiments were done and results are shown as mean±SE.

M3에 대한 affinity가 높진 않지만, TB4 peptide 역시 M3의 세포 표면 발현을 유발한다(Fig. 3).⁷⁾ 흥미로운 점은 LemA나 TB4 peptide가 YAC-1 세포주에서는 M3의 세포 표면 발현을 못 시킨다는 것이다(Fig. 3). 지금까지 알려진 M3의 세포 표면 발현은 주요항원인식세포들인 수지상세포, 대식세포, 미성숙 B 림프구들에서만 관찰 되었다. 따라서 본 연구에서는 처음으로 YAC-1 세포주에 high affinity *N*-formylated peptide를 제공해도 M3의 발현이 거의 유도가 안 된다는 점을 처음으로 밝혔다. 그 반면

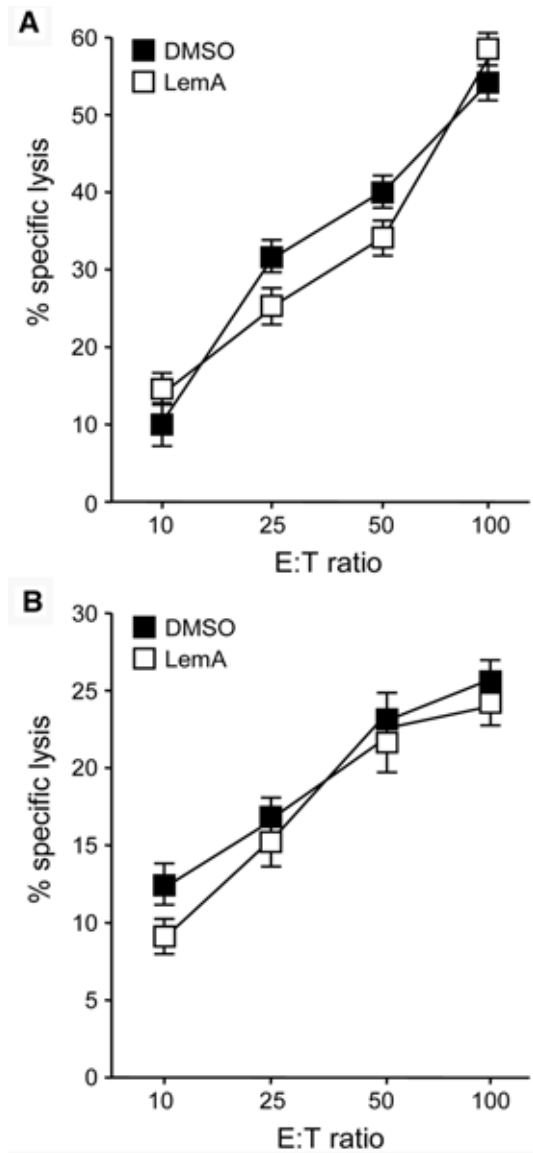


Fig. 4 – The induction of M3 on cell surface of target cell does not influence cytotoxic activity of NK cells. P388D1 cells were incubated with LemA peptide (10 mM) or negative control (0.1% DMSO) for overnight. Percent specific lysis of target cells (DMSO and LemA) were measured to access the cytotoxic activity of LAK (A) and poly I : C activated killer cells (B). Three independent experiments were done and results are shown as mean±SE.

대식세포주인 P338D1에서는 Fig. 3B에서 보는 것 같이 농도의 존적으로 M3의 세포표면 발현이 유도 되었다(Fig. 3).

그 후, P338D1에 high affinity *N*-formylated peptide인 LemA를 처리하고, LAK와 poly(I:C) activated killer cell의 세포독성 효능을 측정하였다. 이 때 음성대조구로는 0.1% DMSO를 사용하였다(Fig. 4). 실험 결과 그림 4에서 보는 것 같이 DMSO를 처리한 세포와 LemA를 처리한 세포주의 세포독성 효능은 별다른 차이가 없음이 나타났다. 결국 M3의 발현은 NK 세포의 활성화에 직접적으로 영향을 끼치지 않는 것으로 사료된다.¹⁰⁾ 이러한 결과로 미루어 볼 때, M3 유전자 적중 생쥐의 리스테리아 감염 시 NK 세포의 활성이 감소하는 것은 T 림프구의 활성이 줄어들어 보이는 간접적인 결과로 생각 된다. 앞으로는 M3 유전자 적중 생쥐의 리스테리아 감염 시, NK 세포의 활성을 조절할 수 있는 Th1 type 주요 cytokine인 IFN- γ 또는 IL-12의 발현 수준을 살펴 볼 예정이다.

결 론

본 연구에서는 *N*-formylated peptide를 세포독성 T 림프구에 전달해 주는 M3의 발현이 NK 세포의 활성화에 어떤 영향을 주는가에 대해 고찰하였다. 그 결과 M3의 발현은 NK 세포의 활성화에 직접적으로 영향을 끼치지 않는 것으로 사료된다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, M3 유전자 적중 생쥐의 리스테리아 감염 시 NK 세포의 활성이 감소하는 것은 간접적인 결과로 생각 된다. 앞으로는 M3 유전자 적중 생쥐의 리스테리아 감염 시, NK 세포의 활성을 조절할 수 있는 Th1 type 주요 cytokine인 IFN- γ 또는 IL-12의 발현 수준을 살펴 볼 예정이다.

감사의 말씀

이 논문은 2006년도 한국학술진흥재단의 지원에 의해서 연구되었음에 감사를 드립니다(KRF-2006-311-E00282).

참고문헌

- 1) Rodgers, J. R. and Cook, R. G. : MHC class Ib molecules bridge innate and acquired immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 459 (2005).
- 2) Lindahl, K. F., Byers, D. E., Dabhi, V. M., Hovik, R., Jones, E. P., Smith, G. P., Wang, C. R., Xiao, H. and Yoshino, M. : H2-M3, a full-service class Ib histocompatibility antigen. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 851 (1997).
- 3) Busch, D. H., Kerksiek, K. and Pamer, E. G. : Processing of *Listeria monocytogenes* antigens and the *in vivo* T-cell response to bacterial infection. *Immunol. Rev.* **172**, 163 (1999).
- 4) Chiu, N. M., Chun, T., Fay, M., Mandal, M. and Wang, C. R. : The majority of H2-M3 is retained intracellularly in a peptide-receptive state and traffics to the cell surface in the presence of *N*-formylated peptides. *J. Exp. Med.* **190**, 423 (1999).
- 5) Colmone, A. and Wang, C. R. : H2-M3-restricted T cell response to infection. *Microbes Infect.* **8**, 2277 (2006).
- 6) Lenz, L. L., Dere, B. and Bevan, M. J. : Identification of an H2-M3-restricted *Listeria* epitope: implications for antigen presentation by M3. *Immunity* **5**, 63 (1996).
- 7) Chun, T., Serbina, N. V., Nolt, D., Wang, B., Chiu, N. M., Flynn, J. L. and Wang, C. R. : Induction of M3-restricted cytotoxic T lymphocyte responses by *N*-formylated peptides derived from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Exp. Med.* **193**, 1213 (2001).
- 8) Seaman, M. S., Wang, C. R. and Forman, J. : MHC class Ib-restricted CTL provide protection against primary and secondary *Listeria monocytogenes* infection. *J. Immunol.* **165**, 5192 (2000).
- 9) Kerksiek, K. M., Busch, D. H., Pilip, I. M., Allen, S. E. and Pamer, E. G. : H2-M3-restricted T cells in bacterial infection: rapid primary but diminished memory responses. *J. Exp. Med.* **190**, 195 (1999).
- 10) Xu, H., Chun, T., Choi, H. J., Wang, B. and Wang, C. R. : Impaired response to *Listeria* in H2-M3-deficient mice reveals a nonredundant role of MHC class Ib-specific T cells in host defense. *J. Exp. Med.* **203**, 449 (2006).
- 11) Biassoni, R. : Natural killer cell receptors. *Adv. Exp. Med. Biol.* **640**, 35 (2008).
- 12) Lu, L., Werneck, M. B. and Cantor, H. : The immunoregulatory effects of Qa-1. *Immunol. Rev.* **212**, 51 (2006).
- 13) Sullivan, L. C., Clements, C. S., Rossjohn, J. and Brooks, A. G. : The major histocompatibility complex class Ib molecule HLA-E at the interface between innate and adaptive immunity. *Tissue Antigens.* **72**, 415 (2008).
- 14) Yu, Y. Y., George, T., Dorfman, J. R., Roland, J., Kumar, V. and Bennett, M. : The role of Ly49A and 5E6 (Ly49C) molecules in hybrid resistance mediated by murine natural killer cells against normal T cell blasts. *Immunity* **4**, 67 (1996).
- 15) Sugiyama, T., Hoshino, K., Saito, M., Yano, T., Sasaki, I., Yamazaki, C., Akira, S. and Kaisho, T. : Immunoadjuvant effects of polyadenylic:polyuridylic acids through TLR3 and TLR7. *Int. Immunol.* **20**, 1 (2008).
- 16) Raulet, D. H., Vance, R. E. and McMahon, C. W. : Regulation of the natural killer cell receptor repertoire. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 291 (2001).
- 17) Chiang, E. Y., Henson, M. and Stroynowski, I. : The nonclassical major histocompatibility complex molecule Qa-2 protects tumor cells from NK cell- and lymphokine-activated killer cell-mediated cytolysis. *J. Immunol.* **168**, 2200 (2002).