大 韓 微 細 手 術 學 會 誌
Vol. 21, No. 1, May, 2012

단기간 면역억제제와 수지상 세포주의 전처치를 이용한 복합조직 동종이식

서울대학교 의과대학 성형외과학교실

은석찬 · 백롱민

— Abstract —

Rat Hindlimb Allotransplantation with Short-term Immune Suppressants and Dendritic Cell Pretreatment

Seok Chan Eun, M.D., Rong Min Baek, M.D.

Department of Plastic and Reconstructive Surgery, Seoul National University College of Medicine , Korea

Prevention of acute rejection in composite tissue allotransplantation without continuous immunosuppression lacks reports in worldwide literature. Recently dendritic cells (DC) gained considerble attention as antigen presenting cells that are also capable of immunologic tolerance induction. This study assesses the effect of alloantigen-pulsed dendritic cells in induction of survival in a rat hindlimb allograft. We performed hindlimb allotransplantation between donor Sprague-Dawley and recipient Fischer344 rats. Recipient derived dendritic cells were harvested from rat whole blood and cultured with anti-inflammatory cytokine IL-10. Then donor-specific alloantigen pulsed dendritic cells were reinjected into subcutaneous tissue before limb transplantation. Groups: I) untreated (n=6), II) DC injected (n=6), III) Immunosuppressant (FK-506, 2 mg/Kg) injected (n=6), IV) DC and immunouppressant injected (n=6). Graft appearance challenges were assessed postoperatively. Observation of graft appearance, H-E staning, immunohistochemical (IHC) study, and confocal immunofluoreiscece were performed postoperatively. Donor antigen pulsed host dendritic cell combined with short-term immunosuppression showed minimal mononuclear cell infiltration, regulator T cell presence, and could prolong limb allograft survival.

Key Words: Allotransplantation, Dendritic Cell, Hindlimb

복합조직의 동종이식에서 지속적인 면역억제제의 투입 없이 거부반응을 예방하는 일은 매우 중요하다. 최근에 수지상 세포(dendritic cell)는 항원제공세포로서, 또한 면역 관용을 유발할 수 있는 세포로서 많은 주목을 받고

※통신저자: 은 석 찬
경기도 성남시 분당구 구미로 173길 82
서울대학교 의과대학 성형외과학교실
Tel: 031-787-7223, Fax: 031-787-4055, E-mail: sceun@snubh.org
* Acknowledgements: 이 논문은 분당서울대학교병원 일반연구자 지원사업(11-2009-001)의 연구비로 진행된 것임.

있다. 본 연구는 항염증성 시토카인 IL-10을 처리하고 동종항원에 감작시킨 비성숙 수지상 세포가 쥐의 다리이식 모델에서 생존률에 미치는 영향을 평가하고자 하였다. 동종이식 수술시 Sprague-Dawley를 공여자로, F344를 수여자로 사용하였다. F344 쥐의 혈액으로부터 단핵세포층을 뽑고 비성숙 수지상세포로 분화시킨 후에 IL-10을 첨가하여 관용성 수지상 세포로의 분화를 유도하였다. 공여자 에서 뽑은 단핵구층과 24시간 동안 동시배양을 통해 감작시킨 수지상 세포를 피하주입시키고 다음날 이식수술을 진행하였다. 실험은 각 6마리씩 4개의 군으로 나누어 진행하였고, 제 1군은 아무 처치도 시행하지 않은 군, 제 2군은 이식 하루 전에 동종항원에 감작된 수지상세포만을 주입한 군, 제 3군은 이식 후 면역억제제를 2주간 투여한 군, 제 4군은 이식 하루 전에 수지상세포를 주입하고, 면역억제제를 2주간 투여한 군으로 분류하였다. 수술 후에 이식된 다리의 경과 관찰, 면역 조직화학 검사, 조절 T 림프구에 대한 FACS검사 등을 실시하였다. 술 후 일주일째 조직관찰을 시행한 결과 제 4군의 피부와 근육조직 내에서 면역반응세포의 저하 및 FoxP3 양성 조절 T림프구가 존재함을 나타내었다. 따라서 본 실험을 통해 IL-10을 처리하여 만든 관용성 수지상세포가 조직내에서 T 림프구의 저반응성과 조절 T세포의 생성을 유도함으로써 결과적으로 동종이식편의 생존을 증가시키는데 도움이 된다는 것을 알 수 있었다.

서 론

최근 여러 가지 면역억제제의 개발과 새로운 수술 기술의 발전으로 복합조직 이식술이 점점 진화되어 가고 발전을 거듭하고 있다. 그러나 비특이적이며 지속적인 면역억제요법은 감염, 악성종양 등 많은 부작용을 야기하며 이식외과 의사들에게 만만치 않은 도전으로 지금도 다가오고 있다. 특히 피부조직은 다른 장기이식과는 달리 거부반응이 매우 강하여 임상적 이용이 아주 제한되어 있는 실정이다[1].

수지상세포(dendritic cell)는 대표적인 항원전달세포(antigen presenting cell)로서 면역반응의 초기 단계에서 항원을 T세포에 전달한다는 측면에서 중요한 의미를 지니고 있는데 같은 항원을 전달하더라도 반응하는 T세포의 활성화를 유발하기도 하고 또는 관용을 유도하기도 한다. 지금까지 알려진 인간의 면역 체계에서 가장 강력한 항원전달세포는 수지상세포로서 체외 및 체내에서 특이항원으로 자극 후 원시 T 보조림프구 활성화 및 세포독성 T림프구를 증식시켜 항원을 이용한 면역치료에서 항원감작의 효과적인 매개체로 알려져 있다[2,3]. 지금까지는 이러한 수지상 세포를 이용하는데 제한점이 많았으나 최근 수적으로 증가시킬 수 있는 배양기술의 발전, 수지상세포를 이용한 자연발생적인 T 림프구의 증식 및 이식 장기의 면역관용에 조절 림프구의 역할이 있을 것으로 받아들여지고 있다는 점에서 이를 이용한 항원에 대한 면역 반응을 증가시키고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다[4-6]. 본 연구의 목적은 동종 이식의 세포전처치의 한 방법으로 항원에 감작된 수지상세포를 주입후 이식편의 면역세포의 침윤정도 및 성상의 변화를 조직학적으로 확인하고 그 병리학적 의의를 분석하는데 있다.

재료 및 방법

1. 수지상세포의 배양 및 감작

수여자인 F344계의 쥐에서 8 ml의 혈액을 채취하여 DMEM과 1:1 비율로 섞은 다음 3 ml ficoll이 들어 있는 튜브에 1:2의 비율로 서로 섞이지 않게끔 넣어 1500 rpm으로 20℃에서 30분간 원심분리 하였다. 단핵구를 적혈구, 다핵구 및 혈소판의 오염을 최소화 하면서 중간층에서 buffy coat 부분을 획득한 후 1800 rpm으로 20℃에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 제거하고 DMEM을 2 ml 넣고 1200 rpm으로 20℃에서 10분간 원심 분리하였고 같은 방법으로 800 rpm으로 20℃에서 10분간 원심 분리하였다. 상층 액을 제거하고 원심 분리하여 가라앉은 세포를 10% 우태혈청과 DMEM을 혼합한 배양액에 수지상 세포로의 분화유도를 위하여 GM-CSF(200 ng/ml) and IL-4(20 ng/ml)를 첨가하였고, IL-10(40 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN)를 처리하여 관용성 미성숙 수지상 세포(tolerogenic immature dendritic cell)로의 분화를 유도하였다(Fig. 1). 공여자인Sprague-Dawley계의 쥐의 꼬리에서 혈액 2 ml를 채취하여 단핵구 세포층을 일주일간 배양한 후 수지상 세포와의 감작을 위해24시간 동안 공동배양하였다. 공여자 세포와 감작된 1-1.5×10^6 정도의 수지상 세포를 피하에 주입시키고(1-1.5×10^6) 다음날 이식수술을 진행하였다.

2. 동물실험

동종다리이식 수술시 Sprague-Dawley를 공여자로, F344를 수여자로 사용하였다. 평균 9주령의 수컷만을 선별하여 사용하였으며 사료 및 생활 조건을 동일하게 하였

고 IACUC (Institutional Animal Care and Use Committee)의 지침을 준수하였다. 실험은 각 군당 6마리씩 4개의 군으로 나누어 진행하였고, 제 1군은 아무 처치도 시행하지 않은 군, 제 2군은 이식 하루 전에 동종항원에 감작된 수지상세포만을 주입한 군, 제 3군은 이식 후 면역억제제를 2주간 투여한 군, 제 4군은 이식 하루 전에 수지상세포를 주입하고, 면역억제제를 2주간 투여한 군으로 분류하였다. 실험은 전신마취하에 진행되었고 21-gauge needle을 이용하여 골고정한 후 좌골신경, 대퇴동정맥, 대퇴신경에 대하여 현미경을 이용하여 미세문합술을 시행하였고 이어서 내외측 근육 봉합, 피부 봉합 순으로 마무리지었다(Fig. 2).

이식 후 이식 부위를 매일 육안으로 관찰하여 거부반응 유무를 판정하였고 이식편의 생착기간 산정은 표피탈락, 궤양, 가피화 및 괴사 등이 전체면적의 50%가 되는 때를 거부반응에 의한 탈락의 시기로 판정하였다(Fig. 3). 술후 일주일째 염증세포의 침윤정도를 알아보기 위해H&E staning, CD3, CD4, CD8, CD25에 대한 immunohistochemistry, 조절 T 세포에 대한 Confocal microscopy 검사를 실시하였다. Mann-Whitney test를 통해서 그룹간 통계적 검정을 실시하였고, $p<0.05$ 이하를 통계적으로 의미있는 수준으로 보았다.

결 과

다리이식 실험 후 그룹들간의 평균생착기간을 살펴 본 결과 1군(4.7일), 2군(5.3일), 3군(26.3일), 4군(46.7일)로 나타나 수지상 세포와 단기간의 면역억제제를 주입한 그룹에서 이식편이 가장 오래 생존함을 알 수 있었다 ($p<0.05$)(Table 1).

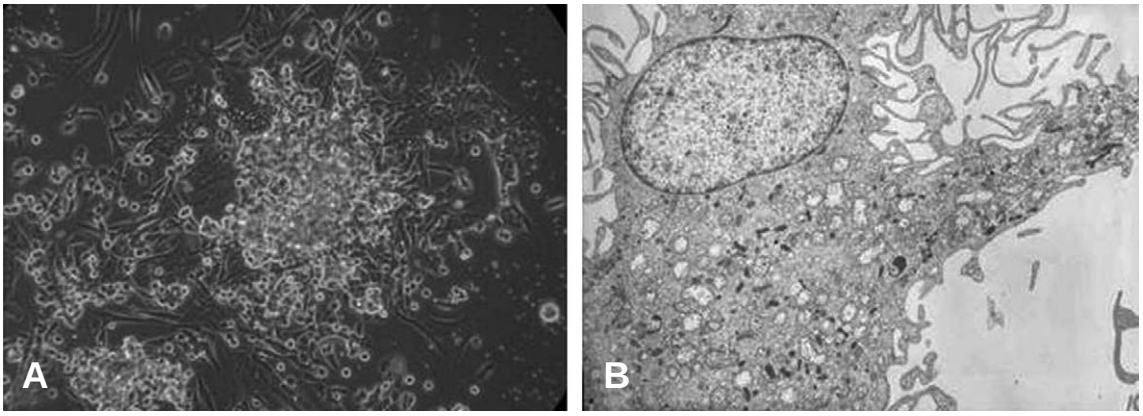

Fig. 1. Cultured recipient immature dendritic cells of LM(×200) and EM(×4000) finding **(A & B)**. This demonstrated outsurface long dendrite with intracellular prominent nucleus, numerous vesicles and mitochondria.

Fig. 2. Intraoperative findings of hindlimb allotransplantation. **(A)** Inhalation anesthenia, **(B)** Bone fixation and sciatic nerve repair **(C)** femoral artery, vein and nerve repair, **(D)** Postoperative finding of intramedullary nailing by 21-gauze needle.

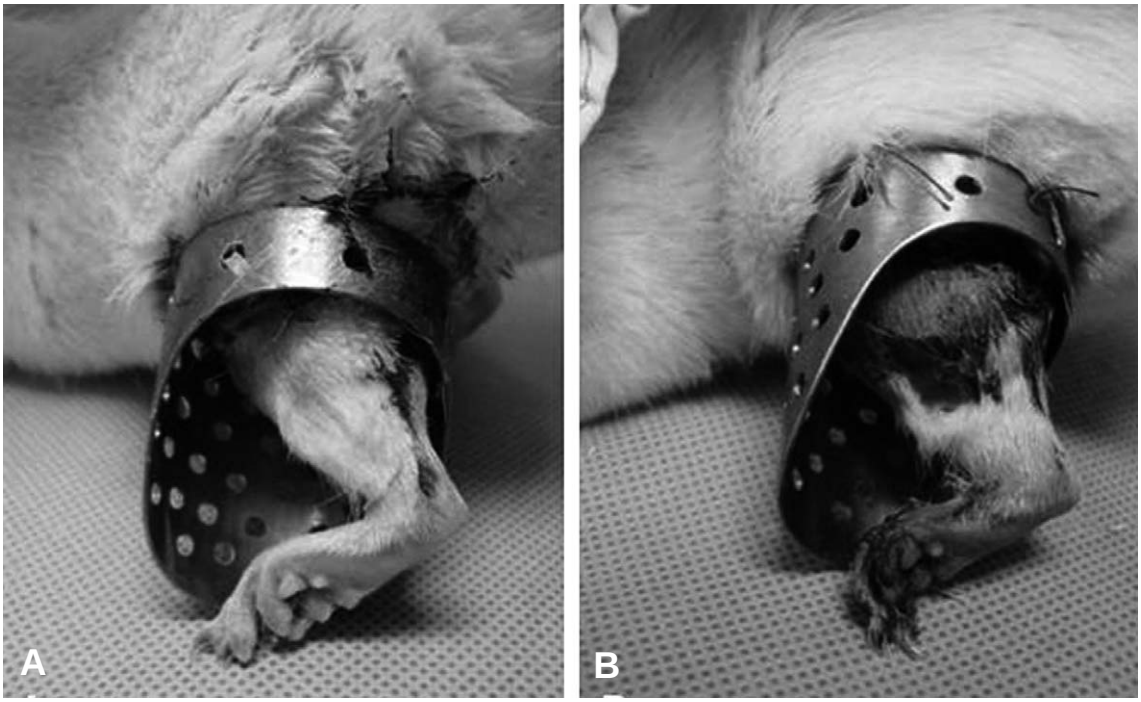

Fig. 3. Evaluation of endpoints for the clinical allograft rejection. **(A)** Immediate finding after transplantation, **(B)** One week after transplantation that shows rejection responses.

Table 1. Hindlimb survival data after allotransplantation

Group	Survival (days)	Mean
I	4, 5, 5, 4, 5, 5	4.7
II	5, 4, 5, 5, 7, 6	5.3
III	23, 27, 33, 24, 26, 25	26.3
IV	42, 37, 55, 46, 51, 49	46.7*

*exact Mann-Whitney test($p<0.05$)

술 후 일주일째 조직관찰을 시행한 결과 피부와 근육의 H&E 염색에서 제 1, 2, 3군에서 단핵구 세포의 침윤이 관찰되면서 중등도의 염증반응을 보이는 반면에 제 4군에서 거부반응 초기의 단계임을 알 수 있었다(Fig. 4). 면역조직화학 염색소견에서도 CD3, CD4, CD8등 효과 T 세포(effector T cell)의 침윤이 제 1, 2, 3군에 비해 제 4군에서 적고 조절 T세포의 인자인 CD25는 증가된 걸로 나타났다(Fig. 5). Confocal 현미경 검사에서는 조직내에 FoxP3 양성 조절 T세포가 적은양이지만 주변 2차 림프절로부터 조직으로 이동하여 거부반응 억제에 기여하고 있음을 알 수 있었다(Fig. 6).

고 찰

복합조직 동종이식이란 같은 종(species) 다른 계통(strain)으로부터 채취한 팔, 다리, 얼굴 등의 복합조직 또는 외장기를 이식하는 것을 말한다[7]. 이러한 복합조직은 피부를 포함하고 있기 때문에 면역반응이 강하게 일어나는 특징이 있으며 이를 억제하기 위해서 강한 면역억제제의 사용을 필요로 한다. 최근에 새로이 개발되고 본 실험에 사용된 FK-506은 대표적인 calcineurin inhibitor로 streptomyces tsukubansis의 발효즙에서 추출하였으며 Cs A와 마찬가지로 T 림프구에 특이성을 가져 IL-2 수용체와 IL-2, interferon, IL-3를 포함한 lymphokine의 분비를 억제하는 것으로 알려져 있다[6,7]. 그러나 면역억제제는 신장독성, 감염, 종양발생 가능성 등 많은 문제를 야기할 수 있기 때문에 이를 극복하기 위한 많은 전략을 필요로 한다[6,8].

최근 항원전달 능력이 대식세포보다 100배나 강한 수지상세포가 T림프구 면역반응의 내성 혹은 활성을 조절하는 것으로 알려져 있어 면역질환 치료 등 방면에서 연구대상으로 주목받고 있다. 수지상 세포의 이러한 능력은 과거에서부터 잘 알려져 왔으나 배양하기 어려웠기 때문에 면역치료에 이용하는 연구가 활발하게 진행되지 못했다. 그러나 말초혈액 단핵세포로부터 배양한 수지상세포가 조혈모세포에서 배양한 것과 기능적으로 차이가 없음이 보고되면서 다량의 수지상 세포를 말초혈액으로부터 쉽게 배양할 수 있게 되었고 따라서 면역치료법에 이용하려는 연구가 활성화 되었다[9-11]. 많은 실험연구에 있어서 세포주입시기를 7~10일 전으로 기술하고 있으나 최근

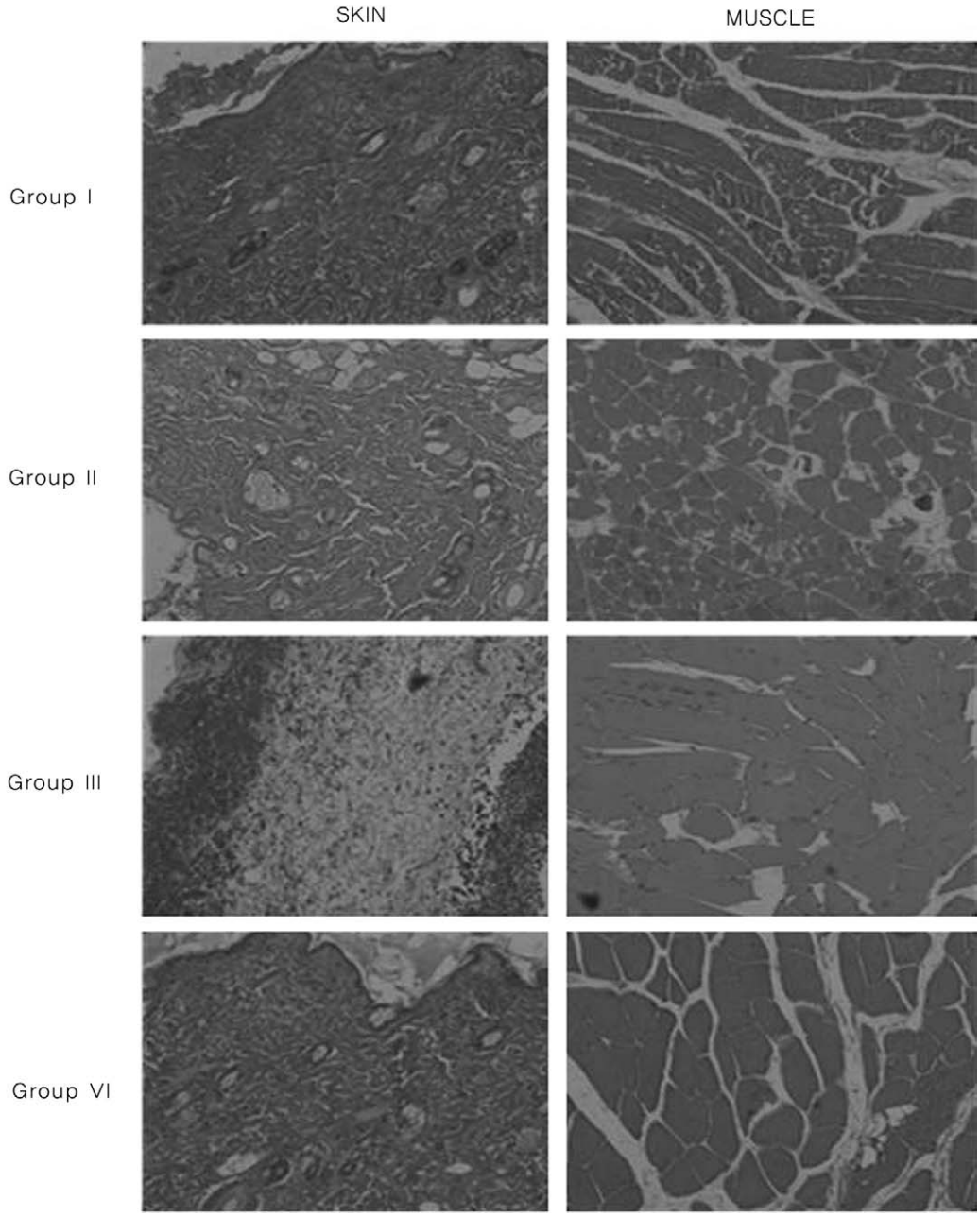

Fig. 4. Histopathological analysis of allo-skin and muscle sections. H&E staining performed on the allo-skin and muscle biopsy samples obtained from the group I & II animals at 1 wk after transplantation revealed severe signs of skin rejection accompanied by necrosis. Group III treated with tacrolimus exhibited delayed signs of rejection in the allo-skin and mild signs of rejection in the muscle. Group IV received combined treatment with donor alloantigen-pulsed recipient BL-DCs and tacrolimus exhibited no signs of rejection and minimal mononuclear cell infiltration in the donor skin or muscle($\times$ 200).

연구결과를 보면 수지상 세포가 림프절에 머무는 반감기가 1.5일 정도로 매우 짧은 것으로 나타나 감작을 시킨 후 빠른 시간내에 이식수술을 진행하는 것이 도움이 됨을 짐작할 수 있다[12-14]. 수지상 세포를 주입하는 최상의 방법은 아직 결정되지 않았으나 정맥을 통한 주입은 대부분이 폐, 간이나 비장, 골수 등으로 분산되어 정작 필요한 림프절에는 도달하지 못하는 것으로 조사되었다. 반면에 피하나 진피층으로 주사된 세포는 림프절의 T세포구역에서 확인됨으로서 주입방법이 수지상세포의 분포에 지대한 영향을 미침을 알 수 있다[15,16].

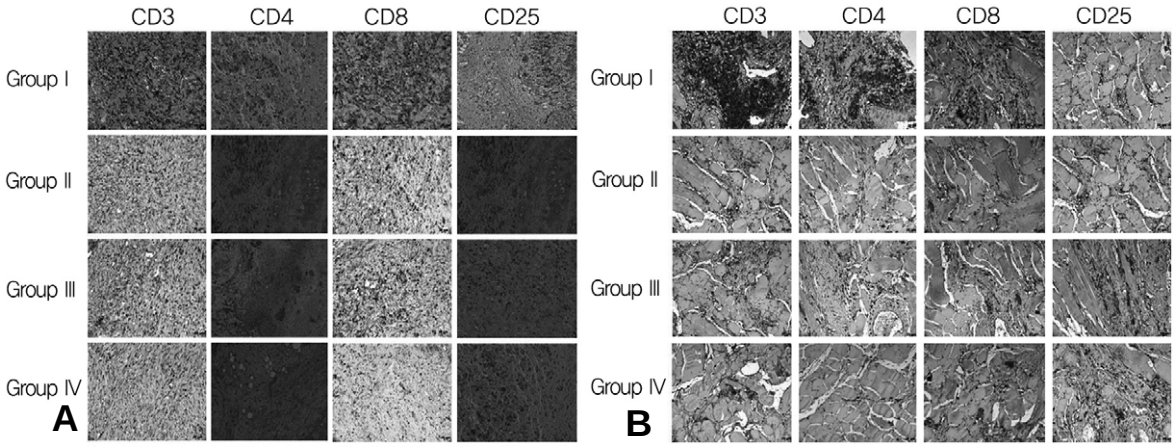

Fig. 5. IHC staining of the CD3, CD4, CD8 and CD25 in donor allo-muscle biopsy tissues. The allo-skin **(A)** and muscle **(B)** revealed an reduced infiltration of T effector cells in group IV compared to other groups.

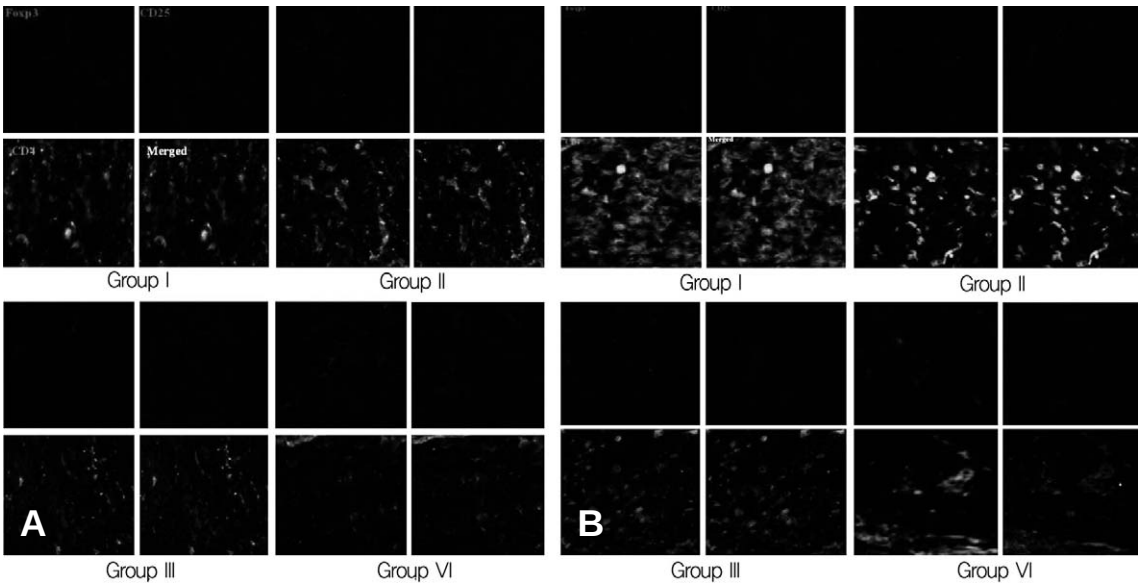

Fig. 6. Confocal microscopy showed FoxP3 cells were only positively stained in the group IV skin **(A)** and muscle **(B)** tissues although small in number (red). CD25 cells were slightly stained in the group III (blue). CD4 was highly expressed in all the groups (green).

수지상 세포는 체내에 주입된 후 초기일수록 가장 미성숙한 상태를 유지할 수 있으며 주입 후 주변 2차 림프절로 이동하는 과정에서 성숙화 과정을 거치게 되고 CD80. 83, 86 등과 같은 동시 자극자가 발현하게 된다. 그러나 동종의 항원과 감작과정을 거친 수지상세포는 동시자극자의 발현이 없는 미성숙 상태에서 T세포에 미약한 자극반응을 보이게 됨에 따라 결과적으로 T세포가 불완전한 활성화 반응을 나타내게 된다. 이식 후 나타나는 거부반응은 세포독성 T세포가 이식부위로 이동하여 표적을 공격하는 일련의 면역반응의 결과물이라고 할 수 있으며 우리 몸이 생존하기 위해서 기본적으로 갖추고 있어야 할 보호기전이다. 이 때 불완전하게 활성화된 T세포들과 조직으로 침윤된 조절 T세포(Treg)의 작용에 의해 거부반응이 차단되고 관용상태가 만들어 질 수 있다. 이러한 일련의 면역관용반응이 정착되기 전까지 초기이식단계에는 일시적이나마 면역억제제가 필수적이라고 할 수 있으며 사용시기와 용량에 대해 명확한 가이드라인이 설정되어 있지는 않으나 면역관용 유도 전략과 결합하여 저용량 사용 또는 이후 중단이 가능할 걸로 생각된다.

결론적으로 이상의 실험결과를 종합해 보면 공여항원에 특이적으로 감작된 수지상세포는 T세포의 저반응성을 유도하여 결과적으로 거부반응을 억제하고 이식편의 생착을

오래 지속시킴을 알 수 있었다.

REFERENCES

1) Siemionow M, Aleksandra K. Tolerance and Future Directions for Composite Tissue Allograft Transplants: Part II. Plast Reconstr Surg. 2009; 123: 7.
2) Swearingen B, Ravindra K, Hong X, et al. Science of composite tissue allotransplantation. Transplant. 2008; 86: 627.
3) Iain S. Eileen M, Rita R. et al. Composite tissue allotransplantation: a review of relevant immunological issues for plastic surgeons. J Plast Reconstr Aesth Surg. 2008; 61: 481.
4) Linda C, Allan D, Margaret M. Composite Tissue Allotransplantation: Classification of Clinical Acute Skin Rejection. Transplant. 2005; 80: 1676.
5) Bohdan P, Jesus A, Alexander J. et al. The Skin Allograft Revisited: A Potentially Permanent Wound Coverage Option in the Critically Ill Patient. Plast Reconstr Surg. 2009; 123: 1755.
6) Andrew LWP, Yaremchuk M. Relative Antigenicity of Components of a Vascularized Limb Allograft. Plast Reconstr Surg. 1991; 87: 401.
7) Baek RM, Eun SC, Heo CY. Experimental facial transplantation surgery. J Craniofac Surg. 2010; 21: 648.
8) Mario G, Kia M. et al. Daily Topical Tacrolimus Therapy Prevents Skin Rejection in a Rodent Hind Limb Allograft Model. Plast Reconstr Surg. 2009; 123 (Suppl.): 17.
9) Tan C, Yaremchuk M. Vascularized Muscle Allografts and the Role of Cyclosporine. Plast Reconstr Surg 1991; 87: 412.
10) Roelen D, Schuurhuis D, Boogaardt D, et al. Prolongation of skin graft survival by modulation of the alloimmune response with alternatively activated dendritic cells. Transplant. 2003; 76: 1608.
11) Garrovillo M, Ali A, Depaz HA, et al. Induction of transplant tolerance with immunodominant allopeptide-pulsed host lymphoid and myeloid dendritic cells. Am J Transplant. 2001; 1: 129.
12) Sacks J, Kuo Y, Taieb A, et al. Prolongation of composite tissue allograft survival by immature recipient dendritic cells pulsed with donor antigen and transient low-dose immunosuppression. Plast Reconstr Surg. 2008; 121: 37.
13) Kamath AT. The development, maturation, and turnover rate of mouse spleen dendritic cell populations. J Immunol. 2000; 165: 6762.
14) Calne R. Prope tolerance: the future of organ transplantation from the laboratory to the clinic. Int Immunopharmacol. 2005; 5: 163.
15) Eggert A, Schreurs M, Boerman O, et al. Biodistribution and vaccine efficiency of murine dendritic cells are dependent on the route of administration. Cancer Res. 1999; 59: 3340.
16) Jerzy W. Kupiec W, Jonathan M. et al. Migration patterns of dendritic cells in the mouse. J Exp Med .1988; 167: 632.
17) Morse M, Coleman R, Akabani G, et al. Migration of human dendritic cells after injection in patients with metastatic malignancies. Cancer Res. 1999; 59: 56.
18) Matesic D, Lehmann PV, Heeger PS. High-resolution characterization of cytokine producing alloreactivity in na?ve and allograft primed mice. Transplant. 1998; 7: 906.
19) Mungara AK, Brown DL, Bishop DK. Anti-CD40L monoclonal antibody treatment induces long-term, tissue specific, immunologic hyporesponsiveness to peripheral nerve allografts. J Reconstr Microsurg. 2008; 24: 189.
20) Haruhiko Y, Takashi N, Kyoko N. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD251CD41 regulatory T cells. Inter Immunol. 2004; 16: 1643.
21) Masanori N, Nozomu S, Yoshifumi I. Operational tolerance induced by pretreatment with donor dendritic cells under blockade of CD40 pathway Transplantaion. 2001; 72: 1556.