<원 저>

C57BL/6 마우스에서 Retroviral 벡터를 이용한 Foxp3 유전자의 도입에 의한 Foxp3 단백질 발현 양상

황인선¹ · 하단비¹ · 빙소진¹ · 전경익¹ · 안긴내² · 김대승¹ · 조진희¹ · 임재학¹ · 임신혁³ · 황규계¹ · 지영흔^{1,*}

¹제주대학교 수의과대학 수의학과, ²제주대학교 해양과학대학 해양생명과학과,

³광주과학기술원 생명과학부 면역조절연구실

(접수: 2011년 12월 9일, 수정: 2012년 9월 14일, 게재승인: 2012년 9월 19일)

The expression of Foxp3 protein by retroviral vector-mediated gene transfer of Foxp3 in C57BL/6 mice

Insun Hwang¹, Danbee Ha¹, So Jin Bing¹, Kyong-Leek Jeon¹, Ginnae Ahn², Dae Seung Kim¹, Jinhee Cho¹, Jaehak Lim¹, Sin-Hyeog Im³, Kyu-Kye Hwang¹, Youngheun Jee^{1,*}

¹College of Veterinary Medicine and Applied Radiological Institute, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

²Department of Marine Life Sciences, Jeju National University, Jeju 690-756, Korea

³School of Life Sciences and Immune Synapse Research Center, Gwangju Institute of Science and Technology (GIST), Gwangju 500-712, Korea

(Received: December 9, 2011; Revised: September 14, 2012; Accepted: September 19, 2012)

Abstract : The maintenance of peripheral immune tolerance and prevention of chronic inflammation and autoimmune disease require CD4⁺CD25⁺ T cells (regulatory T cells). The transcription factor Foxp3 is essential for the development of functional, regulatory T cells, which plays a prominent role in self-tolerance. Retroviral vectors can confer high level of gene transfer and transgene expression in a variety of cell types. Here we observed that following retroviral vector-mediated gene transfer of Foxp3, transductional Foxp3 expression was increased in the liver, lung, brain, heart, muscle, spinal cord, kidney and spleen. One day after vector administration, high levels of transgene and gene expression were observed in liver and lung. At 2 days after injection, transductional Foxp3 expression level was increased in brain, heart, muscle and spinal cord, but kidney and spleen exhibited a consistent low level. This finding was inconsistent with the increase in both CD4⁺CD25⁺ T cell and CD4⁺Foxp3⁺ T cell frequencies observed in peripheral immune cells by fluorescence-activated cell-sorting (FACS) analysis. Retroviral vector-mediated gene transfer of Foxp3 did not lead to increased numbers of CD4⁺CD25⁺ T cell and CD4⁺Foxp3⁺ T cell. These results demonstrate the level and duration of transductional Foxp3 gene expression in various tissues. A better understanding of Foxp3 regulation can be useful in dissecting the cause of regulatory T cells dysfunction in several autoimmune diseases and raise the possibility of enhancing suppressive functions of regulatory T cells for therapeutic purposes.

Keywords : Foxp3, regulatory T cells, retroviral vector, gene transfer

서 론

CD4⁺CD25⁺ T 세포(조절 T 세포, regulatory T cell)는 자가 항원이나 인체에 해롭지 않은 외래항원에 대해 면역반응을 억제하고, 자가 관용을 유지하는 역할을 한다 [21-23]. 그리고 조절 T 세포는 흉선으로부터 직접 유래한 자연 조절 T 세포(natural regulatory T cell)와 말초 기관에서 미감작

(Naïve) T 세포가 항원의 자극을 받아 유도되는 유도 조절 T 세포(inducible T cell)가 존재한다고 알려져 있다 [8, 24]. 조절 T 세포는 마우스와 사람의 말초 T 세포 중 약 5~10% 정도 비율로 존재하며, 표면에 높은 수준의 CD25 분자(IL-2 receptor α -chain)를 발현하고, 특히 forkhead box P3(Foxp3)라 불리는 전사 인자에 의해 활성화 되는 것으로 보고되었다 [2, 11, 20]. Foxp3는 조절 T 세포의 성장과 기

*Corresponding author

Tel: +82-64-754-3374, Fax: +82-64-756-3354

E-mail: yhjlee@jejunu.ac.kr

능에 관여하며, 미감작 T 세포를 조절 T 세포로 전환시키는 유도인자로 밝혀지면서 면역관용을 조절할 수 있을 것이라는 가능성이 제시되었다 [7, 26]. 그 중 Foxp3 유전자와 자가 면역성 질병의 조절에 관한 다양한 연구가 진행되어 Foxp3 유전자에 변이가 생겼거나 녹아웃된 마우스는 조절 T 세포가 생성되지 않아, 다발성 자가면역 질환의 한 종류인 IPEX 증후군(면역조절곤란(dyregulation), 다발성 내분비장애 증(polyendocrineopathy), 장질환(entripathy), X 연관 증후군(X-linked syndrome))이 발생한다는 보고들이 있다 [1, 4, 14, 27]. 또한 Foxp3 결핍 마우스(Foxp3-deficient mice)에 인위적인 조절 T 세포를 주입하면 자가 면역성 질병의 발달을 지연시킨다는 연구 결과도 있다 [6, 12, 15]. 이처럼 최근 자기 항원과 반응하는 자가면역 질환 동물 모델에서 Foxp3 단백을 통한 조절 T세포의 면역반응의 조절에 의한 새로운 치료학적 접근의 시도가 이루어지고 있다. 본 연구에서는 Retroviral 벡터(vector)를 이용하여 Foxp3 벡터(Foxp3-expressing vector)를 제조하고, 제조된 Foxp3 벡터의 C57BL/6 마우스 생체 내 도입에 의한 다양한 중요 장기에서 인위적으로 발현된 Foxp3 단백질 발현 양상을 관찰하였다. 이를 통해 다양한 장기에서의 인위적인 Foxp3 단백질 발현 유무와 그 발현의 정도를 확인하여 기관 특이적인(organ-specific) 자가면역성 질환에 대한 치료학적 접근의 기본적 정보를 제공하고, 면역성 질환에 대한 치료학적 가능성에 대해 연구해 보고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 5~6주령 암컷 14~15 g의 C57BL/6 마우스(오리엔트바이오, 한국)를 사용하였다. 실험동물은 표준적인 사육조건으로서, 온도는 $23 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도는 $50 \pm 5\%$ 로 유지하였으며, 마우스전용 고형 사료(NIH-07)와 음수는 자유급식하게 하였다. 본 연구를 위한 동물실험 계획서는 제주대학교 동물실험 윤리위원회의 승인을 받았으며, 모든 동물실험 및 관리는 제주대학교 동물실험 윤리위원회 윤리적 기준에 의거하여 시행되었다.

Foxp3 벡터(Foxp3-expressing vector) 제조 방법

pCDNA3.1-Foxp3와 pEGFP-N1 벡터에 각각 삽입되어 있는 Foxp3와 Green Fluorescent Protein(GFP)의 염기서열을 제한 효소가 들어가도록 프라이머(primer)를 디자인하여 flag-Foxp3와 GFP의 유전자를 중합효소연쇄반응(Polymerase Chain Reaction, PCR)을 하였다(Table 1). 본 실험에 사용된 pCDNA3.1-Foxp3 벡터는 광주과학기술원 임신헌 교수로부터 공여 받아 사용하였다. 각각의 PCR 산물을 QIAquick PCR Purification Kit(QIAGEN, USA)을 사용하여 정제한 후 제한효소를 사용하여 양쪽 말단을 절단하고 MinElute Cleanup Kit(QIAGEN)과 QIAquick Gel Extraction Kit(QIAGEN)을 사용하여 수거 및 정제를 하였다. 레트로바이러스 벡터(Retrovirus vector)인 pDONAI-2에 DNA Ligation kit(TAKARA Bio, Japan)을 사용하여 절단된 PCR 산물 삽입하여 pDONAI-2-Flag-Foxp3 벡터와 pDONAI-2-Flag-Foxp3-GFP 벡터 그리고 pDONAI-2-Flag-GFP 벡터를 제작하였다. 제작된 각각의 레트로바이러스 벡터를 레트로바이러스 입자로 만들기 위하여 Retrovirus Packaging Kit(TAKARA Bio)을 사용하여 co-transfection을 하였다. 293 cell에 recombinant retrovirus vector와 pGP vector 그리고 pE-ampho vector를 Calcium phosphate transfection method로 co-transfection을 하였다. co-transfection 후 7~11시간 동안 5% CO₂, 37°C로 배양한 후 새로운 배지로 교환해 주었다. Transfection 48시간 후 원심분리로 상층액을 수거하고 0.45 µm sterilized filter를 사용하여 필터 후에 -80°C에 보관하고 형질도입(transduction)에 사용하였다.

Foxp3 벡터의 투여 및 마우스 각종 장기 채취를 위한 부검

실험군은 정상 대조군, Foxp3 벡터 투여군으로 두 개의 군으로 구분하였으며, Foxp3 벡터 투여군은 Foxp3 벡터를 각 군당 4마리의 마우스에 200 µg/L를 둔부 근육에 1일과 7일에 총 2회 투여하였다. 그리고 투여 후 1일째(D1), 2일째(D2), 7일째(D7)에 마우스를 희생시켜 간, 폐, 뇌, 심장, 근육, 척수, 신장, 비장의 장기를 각각 채취하였다. Foxp3 벡터를 투여하지 않은 정상 대조군에는 동량의 phosphate-buffered saline(PBS)를 투여하였다.

Table 1. PCR primers design for Foxp3-expressing retrovirus particles using recombinant retrovirus packaging system

Primer name		primer
(Sac II)-flag-Foxp3-(Nhe I)	S	5' TATAATCCGCGGATGGACTAC 3'
	A-S	5' AAGCTAGCAGGGCAGGGATT 3'
(Nhe I)-GFP-(Sal I)	S	5' GTA ATA GCT AGC ATG GTG AGC 3'
	A-S	5' GTC GAC TTA CTT GTA CAG CTC 3'
(Sac II)-flag-Foxp3-(Sal I)	S	5' TTAAACCGCGGATGGACTAC 3'
	A-S	5' GTC GAC TCA AGG GCA GGG A 3'
(Sac II)-GFP-(Sal I)	S	5' CTT AAA ATG GTG AGC AAG GGC 3'
	A-S	5' GTCGACTTACTTGTACAGCTC 3'

Western blot analysis

마우스 생체 내의 인위적으로 발현된 Foxp3 단백 발현의 확인을 위하여 western blot analysis를 실시하였다. 벡터의 투여 후 1일째(D1), 2일째(D2) 및 7일째(D7) 각각 Foxp3 벡터 투여 마우스의 간, 폐, 뇌, 심장, 근육, 척수, 신장, 비장의 주요 장기를 적출한 다음, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mg/μL leupeptin, 2 mM sodium orthovanadate, 10 μg/mL aprotinin(Sigma-Aldrich, USA)을 함유한 용해액(lysis buffer)을 이용해 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질을 정량하여, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis를 이용하여 각 군별로 동일 양의 단백질을 전기영동 하였다(10% SDS-PAGE). 분리된 단백질은 니트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)에 100 V로 2시간 동안 전이(transfer) 시켰다. 그 후에 2% 탈지우유(skim milk)를 사용하여 1시간 동안 실온에서 반응시켜 비특이적 반응을 억제하였다. 1% 탈지우유에 희석한 Biotin anti-mouse/rat Foxp3(1 : 1,000; eBioscience, USA)를 1차 항체로 사용하여 실온에서 1시간 반응시키고, 2차 항체로는 avidin-biotin peroxidase conjugate(Vector, USA)로 45분간 실온에서 반응시켰으며, 단백질 밴드(Protein band)는 암실에서 WEST-ZOL(plus) Western Blot Detection System (iNtRON bio, USA)로 발현을 시켰다. 각각의 밴드의 밀도는 scanning laser densitometer(GS-700; Bio-Rad, USA)를 통해 얻었으며, ImageJ(National Institutes of Health, USA)를 이용하여 분석하였다.

Flow cytometry

Foxp3 벡터를 인위적으로 투여한 마우스 비장에서의 CD4⁺CD25⁺ T 세포와 Foxp3⁺를 발현하는 CD4⁺ T 세포의 수적 변화를 관찰하기 위해 유세포 분석(flow cytometry)을 수행하였다. 마우스의 비장을 적출하여 세포 여과기를 통해 단일 세포 부유액을 얻었다. 이렇게 얻은 세포는 ammonium chloride-potassium(ACK) 용액과 함께 10분간 실온에서 배양한 뒤, Dulbecco's phosphate-buffered saline(DPBS; Gibco BRL, UK)로 세정한 다음, 10% 소 태아 혈청(FBS; Gibco BRL)과 1% 항생제(100 U/mL penicillin-streptomycin; Gibco BRL)가 포함된 RPMI-1640 배지(Gibco BRL)에 부유시켰다. 마우스 당 1 × 10⁶개의 비장세포를 사용하였고, 비장세포 중 표면에 Fc receptor를 발현하는 세포들에 의한 비특이적 반응을 줄이기 위해 purified anti-mouse CD16/CD32 단클론 항체 5 μg/mL(BD PharMingen, USA)를 이용하여 4°C에서 15분간 반응시킨 후, 세포 표면 분자인 CD4 및 CD8에 대한 Fluorescein Isothiocyanate(FITC)-conjugated anti-mouse CD4(BD Biosciences, USA), Phycoerythrin(PE)-conjugated anti-mouse CD25(BD Biosciences) 항체를 각각 처리하여 4°C에서 15분간 반응하였다. 세포 내 발현 단백질인 Foxp3는 FITC-conjugated anti-mouse CD4(BD Biosciences) 항체 반응 후에 cytofix/cytoperm 용액으로 다시 4°C에서 20분간 반응하고, PE-labelled anti-mouse/rat Foxp3

Fig. 1. Foxp3-expressing retrovirus particles using recombinant retrovirus packaging system.

(eBioscience) 항체를 4°C에서 15분간 반응하였다. 항체 반응이 끝난 세포를 DPBS로 세척하고, 1% 파라포름알데하이드(paraformaldehyde) 500 μL에 고정하여, 유세포 분석기(FACSCalibur; Becton Dickinson, USA)로 분석하였다. 분석 프로그램으로는 CellQuest software(BD Biosciences)를 사용하였다.

통계 처리

각 실험은 2회 반복(각 군당 3마리, 총 n=6)하였으며 결과는 평균값 ± 표준오차로 나타내고, Student *t*-test를 이용하여 통계처리한 후 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

Foxp3 벡터(Foxp3-expressing vector) 제조 확인

제작된 pDONAI-2-Flag-Foxp3 벡터와 pDONAI-2-Foxp3-GFP 벡터 그리고 pDONAI-2-Flag-GFP 레트로바이러스 벡터를 제한효소를 사용하여 확인하고 바이러스 입자로 제작한 후에 바이러스의 역가를 측정한 결과 10^{6.3} infectious units/mL의 바이러스 입자를 얻을 수 있었다(Fig. 1).

인위적으로 발현된 Foxp3 단백질의 간, 폐, 뇌에서의 발현 양상

Foxp3 벡터의 투여 시에 시간적 경과에 따라 인위적 Foxp3 단백질의 각 장기에서 발현 유무와 발현의 정도의 차이를 확인하기 위해, Foxp3 벡터 투여 마우스에서 벡터 투여 후 1일째(D1), 2일째(D2) 및 7일째(D7)에 간, 폐, 뇌, 심장, 근육, 척수, 신장 및 비장을 분리하여 인위적으로 발현된 Foxp3 단백질 발현의 양상을 western blotting analysis를 통해 확인하였다. 그 결과 Foxp3의 단백질 밴드는 47 kD의 내재된 구성 성분인(constitutive) Foxp3와 72 kD의 인위적으로 발현된 Foxp3의 두 개의 밴드로 나타났다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 각 장기별로 발현되는 양상은 차이가 있어 인위적으로 발현된 Foxp3 단백질 발현은 Foxp3 벡터 투여 마우스의 간과 폐에서는 투여 후 1일째(D1)에 강하게 증가하였고

Fig. 2. The level of expressional Foxp3 (72kD), constitutive Foxp3 (47kD), GFP (25kD) and β -actin (43kD) in the liver, lung, brain of vehicle and D1, D2, D7 groups in normal C57BL/6 mice after transduction. (A) Liver, (C) lung and (E) brain tissue lysates were prepared and immunoblotted with anti-Foxp3, GFP and β -actin antibody. The level of expressional Foxp3 in (B) liver, (D) lung and (F) brain was normalized against β -actin and the ratio was plotted in the graph (arbitrary units). * $p < 0.05$, significantly different from normal mice by Student's *t*-test.

(Figs. 2A and C), 뇌에서는 2일째(D2)에서 증가하는 경향을 나타내었다(Fig. 2E). 간에서는 인위적 Foxp3의 발현이 가장 강한 1일째에 2일째에 비하여 1021.29배, 7일째에 비해 5.08배 증가된 발현을 보였으며(Fig. 2B), 폐에서는 발현이 가장 강한 1일째에 2일째에 비하여 4.36배, 7일째에 비해 19.51배 증가하였다(Fig. 2D). 그리고 뇌에서는 2일째에 인위적으로 발현된 Foxp3 단백질이 1일째에 비하여 1158.49배, 7일째에 19.51배 증가하였다(Fig. 2F). 즉, 간과 폐에서는 투여한 후 1일째(D1)에 인위적으로 투여한 Foxp3 벡터의 발현이 강하게 나타났으며, 2일째(D2)와 7일째(D7)에는 투여한 Foxp3 벡터의 발현은 거의 나타나지 않음을 관찰할 수 있었다. 그리고 뇌에서는 Foxp3 벡터의 발현은 투여 후 2일째(D2)에 가장 강하게 나타났으며, 7일째(D7)에는 발현이 사라

지는 경향을 나타내었다(Fig. 2). 이상의 결과로부터 간, 폐, 뇌에서는 인위적으로 발현된 Foxp3 단백질이 투여한 후 1일째(D1)와 2일째(D2)까지 단기간동안 발현되는 양상을 관찰할 수 있었다.

인위적으로 발현된 Foxp3 단백질의 심장, 근육, 척수, 신장, 비장에서의 발현 양상

간, 폐, 뇌에서 관찰된 인위적으로 발현된 Foxp3 단백질의 발현 양상과는 달리 심장, 근육, 척수, 신장, 비장에서는 Foxp3 벡터 투여 후 7일째(D7)까지 지속적으로 발현되는 양상이 관찰되었다(Fig. 3). 심장(Fig. 3A), 근육(Fig. 3C), 척수(Fig. 3E)에서는 투여 후 2일째(D2)에 인위적으로 발현된 Foxp3의 양이 증가하였다. 심장에서는 인위적 Foxp3의 발현

Fig. 3. The level of expressional Foxp3 (72kD), constitutive Foxp3 (47kD), GFP (25kD) and β -actin (43kD) in the heart, muscle, spinal cord of vehicle and D1, D2, D7 groups in normal C57BL/6 mice after transduction. (A) Heart, (C) muscle and (E) spinal cord tissue lysates were prepared and immunoblotted with anti-Foxp3, GFP and β -actin antibody. The level of expressional Foxp3 in (B) heart, (D) muscle and (F) spinal cord which normalized against β -actin was plotted in the graph (arbitrary units). * $p < 0.05$, significantly different from normal mice by Student's *t*-test.

이 가장 강한 2일째에 1일째에 비하여 10.23배, 7일째에 비해 1.65배 증가된 발현을 보였으며(Fig. 3B), 근육에서는 발현이 가장 강한 2일째에 1일째에 비하여 2.74배, 7일째에 비해 1.70배 증가하였다(Fig. 3D). 또한 척수에서는 2일째에 인위적으로 발현된 Foxp3 단백질이 1일째에 비하여 1.27배, 7일째에 1.52배 증가하였다(Fig. 3F). 즉, 심장, 근육, 척수에서는 투여 후 2일째(D2)에 인위적으로 투여한 Foxp3 벡터의 발현이 가장 강하게 나타났으며, 7일째(D7)에 투여한 Foxp3 벡터의 발현도 장기간 유지되는 경향을 나타내었다(Fig. 3).

그러나 Fig 4에서 보는 바와 같이 신장(Figs. 4A and B)과 비장(Figs. 4C and D)에서는 이들 장기에서 나타난 인위

적 Foxp3 단백질의 발현양상과는 달리 투여한 후 1일째(D1), 2일째(D2) 및 7일째(D7)에서 Foxp3 벡터의 발현이 지속적으로 약하게 유지되어, 인위적으로 발현된 Foxp3 단백질 발현의 양은 큰 변화가 없음을 확인할 수 있었다(Fig. 4). 이와 같이 각 장기에 따라 Foxp3 벡터의 투여에 의해 인위적으로 투여된 Foxp3 단백질의 발현은 현저히 다른 양상을 나타내었으며 이와 같은 장기별 발현양상의 특징에 따라 면역성 질환에 대한 치료학적 시도를 위해서는 투여 시기 및 치료를 대상으로 하는 장기를 구체적으로 고려되어야 할 것으로 생각된다.

Fig. 4. The level of expressional Foxp3 (72kD), constitutive Foxp3 (47kD), GFP (25kD) and β -actin (43kD) in the kidney and spleen of vehicle and D1, D2, D7 groups in normal C57BL/6 mice after transduction. (A) Kidney and (C) spleen tissue lysates were prepared and immunoblotted with anti-Foxp3, GFP and β -actin antibody. The level of expressional Foxp3 in (B) kidney and (D) spleen was normalized against β -actin and the quantitative graphical representation of band density was shown (arbitrary units).

Foxp3 벡터를 투여한 마우스의 비장에서 $CD4^+CD25^+$ T 세포의 수적 변화 확인

Foxp3 벡터를 투여한 마우스의 비장에서 분리된 $CD4^+CD25^+$ T 세포의 수적 변화를 측정하기 위하여 유세포 분석(flow cytometry)을 이용하였다. 벡터 투여 후 1일째(D1), 2일째(D2) 및 7일째(D7)인 각각의 다른 세 그룹의 Foxp3 벡터 투여군의 비장세포에서 $CD4^+$ T 세포와 조절 T 세포의 표지 마커인 CD25를 동시에 발현하는 세포($CD4^+CD25^+$ T 세포)의 수를 측정한 결과, 정상 대조군($5.2\% \pm 0.36$)과 Foxp3 벡터 투여 후 1일째(D1: $5.5\% \pm 0.14$), 2일째(D2: $5.3\% \pm 0.52$) 및 7일째(D7: $5.8\% \pm 0.58$)에서 $CD4^+CD25^+$ T 세포의 수적 변화는 예상대로 큰 차이가 없었다. 따라서 $CD4^+CD25^+$ T 세포의 성장과 발달에 관여하며, 미감작 T 세포를 $CD4^+CD25^+$ T 세포로 전환시키는 유도인자로 밝혀진 Foxp3 단백질 [5, 22]의 마우스 내로의 인위적인 유도는 Foxp3 벡터 투여군의 비장 세포에서 $CD4^+CD25^+$ T 세포의 수적 변화는 유도하지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 5A).

Foxp3 벡터를 투여한 마우스 비장에서 Foxp3⁺를 발현하는 $CD4^+$ T 세포 수적 변화 확인

Foxp3 벡터를 투여한 마우스의 비장에서 Foxp3⁺를 발현하는 $CD4^+$ T 세포의 수적 변화를 측정하기 위하여 유세포 분석(flow cytometry)을 이용하였다. 벡터 투여 후 1일째(D1), 2일째(D2) 및 7일째(D7)인 각각의 다른 세 그룹의 Foxp3 벡터 투여군의 마우스의 비장 세포에서 Foxp3⁺를 발현하는 $CD4^+$ T 세포의 수를 측정한 결과, 정상 대조군($3.2\% \pm 0.73$)과 Foxp3 벡터 투여 1일째(D1: $3.4\% \pm 0.20$), 2일째(D2: $4.3\% \pm 0.27$) 및 7일째(D7: $3.8\% \pm 0.18$)에서 Foxp3⁺를 발현하는 $CD4^+$ T 세포의 수 또한 큰 차이가 없었다. 따라서 Foxp3 단백질의 마우스 내로의 인위적인 유도는 Foxp3⁺를 발현하는 $CD4^+$ T 세포의 수적 변화는 유도하지 않음을 확인할 수 있었다(Fig. 5B).

고 찰

정상 마우스의 $CD4^+CD25^-$ T 세포(자가 반응성 T 세포)를 림프구가 없는 동종의 마우스로 이식(transplantation)하면,

Fig. 5. The splenocytes from vehicle and D1, D2, D7 groups in normal C57BL/6 mice were analyzed using flow cytometry for the expression of (A) CD4⁺CD25⁺ cells and (B) CD4⁺Foxp3⁺ cells. The dot plots are representative of two separate experiments (n = 6). On representative plots from individual mice, the numbers indicate percentage of cells expressing the specific markers among total lymphocytes.

마우스의 갑상샘, 대장 및 위장 등의 기관에서 자가면역성 질병이 유발되나, CD4⁺CD25⁺ T 세포(조절 T 세포)와 자가 반응성 T 세포를 함께 이식하면 마우스의 자가면역성 질병의 유발이 억제된다고 한다 [13, 19]. 이 연구에서 정상 마우스에는 자기 항원과 반응 할 수 있는 T 세포, 즉 자가반응성 T 세포들이 존재하고, 이 자가 반응성 T 세포들은 조절 T 세포에 의해 조절됨을 알 수 있다 [10, 13, 19]. 따라서 조절 T 세포의 면역 반응의 조절은 생체 내 자가 관용의 유지에 중요한 역할을 함을 알 수 있으며, 더 나아가 조절 T 세포의 생성과 기능에 관여하는 중요 전사 인자인 Foxp3의 생체 내 면역관용을 조절할 수 있는 가능성이 제시되어 최근에는 이와 관련하는 많은 연구가 진행되고 있다.

DNA 백신은 유전자 치료(gene therapy) 방법을 면역학적으로 이용한 것으로, 항원의 에피토프(epitope)에 대한 해당 유전자(gene)를 플라스미드 벡터(plasmid vector)에 도입하여 만들어진다. 여러 종류의 플라스미드 벡터를 이용한 유전자 도입 방법에 관해서는 많은 연구가 진행되고 있다 [9, 17, 18]. 그 중 쥐의 무릎 관절에 lentiviral 벡터를 이용하여 interleukin(IL)-1Ra 유전자를 synovial lining cells에 형질도입(transduction)시킨 연구에서, 인위적으로 도입된 IL-1Ra 유

전자는 면역능력이 있는(immunocompetent) 동물의 경우에 생체 내 20일간 지속되었으며, 면역력이 부족한(immunocompromised) 동물의 경우에도 최소 6주간 지속되는 결과를 나타내었다 [9]. 그리고 HIV(Human immunodeficiency virus)에 기초한 GFP 유전자 함유 lentiviral 벡터(HIV-based GFP-containing lentiviral vector)를 동물에 투여 후 4일째 마우스를 희생시켜 10개의 장기에서 GFP 이식 유전자(transgene)를 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR)으로 분석한 결과, 이식 유전자의 빈도가 골수에서 최대 37%, 간에서 59%, 비장에서 54%의 높은 빈도를 나타내었고, 그 외 뇌, 신장, 폐, 심장, 소장, 방광, 생식선에서는 검출되지 않았다 [17]. 이와 같이 인위적으로 도입된 이식 유전자는 다양한 주요 장기에서 그 발현 양상이 매우 상이하게 보고됨을 알 수 있었다. 본 연구에서는 Retroviral 벡터를 이용한 Foxp3 유전자를 마우스 내 인위적으로 여러 시기에 도입하여 마우스의 다양한 주요 장기에서 인위적으로 발현된 Foxp3 단백질의 발현 양상을 관찰하였다.

그 결과, Foxp3 벡터 투여 마우스의 간과 폐에서는 투여 후 1일째에 Foxp3 단백질 발현이 강하게 증가하였으며, 뇌, 심장, 근육 그리고 척수에서는 투여 후 2일째에 인위적으로

발현된 Foxp3 단백질이 증가함을 관찰할 수 있었다. 또한, 간, 폐, 뇌의 장기에서는 인위적으로 발현된 Foxp3 단백질이 1일째와 2일째에 단기간으로 발현된 반면, 심장, 근육, 척수, 신장, 비장의 장기에서는 Foxp3 벡터 투여 후 7일째까지 Foxp3의 발현은 장기간 유지됨을 관찰할 수 있었다. 특히 심장, 근육 및 척수에서는 장기간 강하게 발현이 유지됨을 확인할 수 있었다. 이와 같은 발현 양상은 장기 특이적으로 발생하는 자가면역성 질환(organ-specific immune disorder) 중 각각 중추신경계에 특이적으로 발생에서 자가면역성 심근염(autoimmune myocarditis)과 자가면역성 뇌척수염(autoimmune encephalomyelitis)에 대해 치료 효과를 보일 가능성을 제시하였다. 그러나 마우스의 말초면역기관인 비장 세포에서 CD4⁺CD25⁺ T 세포와 Foxp3⁺를 발현하는 CD4⁺ T 세포의 수적 변화를 관찰한 결과, Foxp3의 인위적인 유도는 Foxp3 벡터 투여군에서 CD4⁺CD25⁺ T 세포와 Foxp3⁺를 발현하는 CD4⁺ T 세포의 수적 변화는 유도하지 않음을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구에서는 조절 T 세포의 성장에 관여하며, 미감작 T 세포를 조절 T 세포로 전환시키는 유도 인자로 밝혀진 Foxp3 [7, 26]의 인위적으로 도입된 마우스 주요 장기에서 각각 다른 시기에 인위적으로 발현된 Foxp3 단백질의 발현의 증가를 확인할 수 있었고, 각 장기별 그 발현 양상은 매우 다를 수 있었다.

이와 더불어 본 연구에서 constitutive Foxp3의 발현은 심장, 신장, 근육, 척수 및 비장 조직에서 강하게 나타났으며 간, 폐 및 뇌 조직에서는 약한 발현을 보였다. Foxp3는 Treg 세포의 특이적인 marker로 알려져 [20], 면역 장기를 제외한 다른 장기에서의 발현 연구가 많이 이루어지지 않은 실정이나, 최근 몇몇 논문을 통해 흉선이나 유선조직의 상피 세포에서의 Foxp3 발현이 보고되었다 [3, 28]. 또한 림프구에 특이적으로 발현하는 recombination activating genes (RAGs)와 Foxp3를 double knock-out 시킨 마우스에서 폐, 유선 및 전립선 상피세포의 Foxp3 발현이 감소되었으나, 이에 반해 간, 신장, 심장 및 소장 조직에서는 Foxp3의 발현이 미약하며 double knock-out 시에도 발현이 영향을 받지 않는 것이 보고되었다 [5]. 본 연구 결과에서 일부 결과가 기존의 보고와는 일치하지 않는 부분이 있으나, 본 연구에서 사용된 정상 마우스는 RAG^{-/-} 마우스와 달리 혈액의 영향, 즉 림프구에 발현하는 Foxp3에 의한 total Foxp3 단백질의 증가에 영향을 받았을 가능성이 있는 것으로 사료된다. 또한 정상 마우스의 근육, 척수 및 뇌 조직에서의 constitutive Foxp3 대해서는 현재까지 보고가 없으나, 뇌 및 척수의 염증에 관한 연구에서 정상 C57BL/6 대조군이 염증세포의 침윤이 일어나지 않았음에도 불구하고 Foxp3의 발현을 보여 [16, 25], 이러한 중추신경계의 장기에서도 constitutive Foxp3의 발현이 일어남을 예측해 볼 수 있다.

이상의 결과로 정상 마우스 내 인위적인 Foxp3 단백질의 도입으로 C57BL/6 마우스의 주요 장기에서 인위적으로 발현된 Foxp3 단백질이 얼마나 발현, 지속되는지를 알 수 있었으며, 이를 바탕으로 인위적으로 발현된 Foxp3 단백질이 자가

항원이나 외래항원에 대해 다양한 장기에 따라 면역반응의 억제 양상을 보일 수 있음을 예측할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구를 통해 인위적인 Foxp3 유전자를 도입하여 마우스의 다양한 중요 장기에서 Foxp3의 과발현을 유도함으로써 장기 특이적으로 발생하는 자가면역성 질환(organ-specific immune disorder)에 치료 가능성을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 교육인적자원부 기초연구지원기초과학 재원으로 학술진흥재단 (KRF-2008-E00240)의 연구비 및 2012년 국토해양부의 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원(D10900612H41000110)을 받아 연구되었음.

참고문헌

1. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001, **27**, 20-21.
2. Bensing SJ, Bandeira A, Jordan MS, Caton AJ, Laufer TM. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *J Exp Med* 2001, **194**, 427-438.
3. Chang X, Gao JX, Jiang Q, Wen J, Seifers N, Su L, Godfrey VL, Zuo T, Zheng P, Liu Y. The Scurfy mutation of FoxP3 in the thymus stroma leads to defective thymopoiesis. *J Exp Med* 2005, **202**, 1141-1151.
4. Chatila TA, Blaese F, Ho N, Lederman HM, Voulgaropoulos C, Helms C, Bowcock AM. JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* 2000, **106**, R75-81.
5. Chen GY, Chen C, Wang L, Chang X, Zheng P, Liu Y. Cutting edge: Broad expression of the FoxP3 locus in epithelial cells: a caution against early interpretation of fatal inflammatory diseases following in vivo depletion of FoxP3-expressing cells. *J Immunol* 2008, **180**, 5163-5166.
6. Clark LB, Appleby MW, Brunkow ME, Wilkinson JE, Ziegler SF, Ramsdell F. Cellular and molecular characterization of the scurfy mouse mutant. *J Immunol* 1999, **162**, 2546-2554.
7. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003, **4**, 330-336.
8. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity* 2005, **22**, 329-341.
9. Gouze E, Pawliuk R, Pilapil C, Gouze JN, Fleet C, Palmer GD, Evans CH, Leboulch P, Ghivizzani SC. In vivo gene delivery to synovium by lentiviral vectors. *Mol Ther* 2002, **5**, 397-404.
10. Hori S, Hauray M, Coutinho A, Demengeot J. Specificity

- requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, **99**, 8213-8218.
11. **Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, Naji A, Caton AJ.** Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol* 2001, **2**, 301-306.
 12. **Kanangat S, Blair P, Reddy R, Daheshia M, Godfrey V, Rouse BT, Wilkinson E.** Disease in the scurfy (sf) mouse is associated with overexpression of cytokine genes. *Eur J Immunol* 1996, **26**, 161-165.
 13. **Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD.** Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2002, **169**, 4712-4716.
 14. **Lal G, Bromberg JS.** Epigenetic mechanisms of regulation of Foxp3 expression. *Blood* 2009, **114**, 3727-3735.
 15. **Lyon MF, Peters J, Glenister PH, Ball S, Wright E.** The scurfy mouse mutant has previously unrecognized hematological abnormalities and resembles Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990, **87**, 2433-2437.
 16. **Mann MK, Maresz K, Shriver LP, Tan Y, Dittel BN.** B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2007, **178**, 3447-3456.
 17. **Pan D, Gunther R, Duan W, Wendell S, Kaemmerer W, Kafri T, Verma IM, Whitley CB.** Biodistribution and toxicity studies of VSVG-pseudotyped lentiviral vector after intravenous administration in mice with the observation of in vivo transduction of bone marrow. *Mol Ther* 2002, **6**, 19-29.
 18. **Pardridge WM.** Drug and gene delivery to the brain: the vascular route. *Neuron* 2002, **36**, 555-558.
 19. **Reddy J, Illes Z, Zhang X, Encinas J, Pyrdol J, Nicholson L, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Kuchroo VK.** Myelin proteolipid protein-specific CD4+CD25+ regulatory cells mediate genetic resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, **101**, 15434-15439.
 20. **Sakaguchi S.** Policing the regulators. *Nat Immunol* 2001, **2**, 283-284.
 21. **Sakaguchi S.** Naturally arising Foxp3-expressing CD25+ CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol* 2005, **6**, 345-352.
 22. **Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z, Shimizu J, Takahashi T, Nomura T.** Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev* 2006, **212**, 8-27.
 23. **Shevach EM.** CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002, **2**, 389-400.
 24. **Vignali DA, Collison LW, Workman CJ.** How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 2008, **8**, 523-532.
 25. **Walline CC, Kanakasabai S, Bright JJ.** Dynamic interplay of T helpercell subsets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *World J Immunol* 2012, **2**, 1-13.
 26. **Wan YY, Flavell RA.** Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 2007, **445**, 766-770.
 27. **Zhan H, Sinclair J, Adams S, Cale CM, Murch S, Perroni L, Davies G, Amrolia P, Qasim W.** Immune reconstitution and recovery of FOXP3 (forkhead box P3)-expressing T cells after transplantation for IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked) syndrome. *Pediatrics* 2008, **121**, e998-1002.
 28. **Zuo T, Wang L, Morrison C, Chang X, Zhang H, Li W, Liu Y, Wang Y, Liu X, Chan MW, Liu JQ, Love R, Liu CG, Godfrey V, Shen R, Huang TH, Yang T, Park BK, Wang CY, Zheng P.** FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ ErbB2 oncogene. *Cell* 2007, **129**, 1275-1286.