

폐이식 거부반응 기전의 연구에서 Differential Display Revers Transcription PCR

계명대학교 의과대학 임상병리학교실

전 호 진

서 론

과거 20~30년 전만 해도 폐 혹은 심폐이식은 불가능한 것으로 여겨졌는데, 이식 장기의 급성거부반응을 억제할 수 없었던 것이 가장 큰 이유였다. 최근 들어서 거부반응의 면역학적인 기전이 연구되고 면역억제제가 개발되어 거부반응을 효과적으로 억제됨에 따라 각종 폐질환자에 대한 성공적인 폐이식이 가능하게 되었다¹⁾.

폐, 심장 및 간 등의 비교적 크기가 큰 실질장기의 이식은, MHC 혹은 HLA 항원의 일치도에 큰 영향을 받는 흘수 및 신장이식의 경우와는 달리, 소위 'center effect'가 중요한 것²⁾으로 알려져 있다. 그러나 Semik 등³⁾은 폐이식 환자의 장기생존률에 영향을 미치는 요소로서 거부반응을 들고 있어서, 이를 조기에 발견하여 효과적으로 예방, 치료하기 위한 방법이 강구되어야 하겠다. 앞에서 언급이 된 바와 같이 폐이식의 거부반응에 대한 임상양상 및 병리학적인 양상에 대해서는 많은 연구^{3~12)}가 있었으나, 분자생물학적인 관점에서의 연구는 미미한 실정이다¹³⁾. 특히 폐색성 세기관지염(obstructive bronchiolitis)의 양상을 보이는 만성거부반응은 다세포 과정(multiple cellular process)에 의한 것으로서, 여러 가지 이유로 인한 연구의 제약 때문에 거부반응과 관련된 분자생물학적 인자에 대해서는 거의 알려진 바 없다.

거부반응에 대한 분자생물학적인 연구는 여러가지 단계 혹은 방법이 있겠으나, 유전자발현의 조절이 대부분 전사(transcription)단계에서 이루어지므로 mRNA에 대한 분석이 거부반응의 유전자조절 기전을 연구하는 중요한 도구로 생각된다. 그러나 Northern blot등의 고전적인 mRNA 분석방법으로는

몇몇 알고 있는 유전자에 대한 제한적인 연구만이 가능하며, 경우에 따라서는 대상이 되는 유전자의 염기서열을 밝혀야만 한다. 그러므로 그 유전적인 기전이 거의 조사되지 않은 폐이식 거부반응의 경우에는 보다 효과적인 mRNA 분석방법이 모색되어야한다. Liang 등¹⁴⁾은 역전사 중합효소연쇄반응(RT-PCR)을 이용함으로써 각각의 eukaryotic세포에서 상이하게 발현되는 모든 mRNA를 분리 동정할 수 있는 새로운 기법(differential display reverse transcription PCR, 이하 DDRT-PCR)을 개발하였다. 이에 저자는 폐이식 거부반응의 기전을 밝히기 위한 DDRT-PCR의 연구방법론을 논하고자 하며, 기타 장기이식 거부반응 연구를 위한 활용성과 임상적인 기대효과를 살펴보고자 한다.

폐이식거부반응의 면역학적 기전

폐이식의 동종이식거부반응(allograft rejection)의 면역학적기전은 Fig. 1과 같다¹⁵⁾. 이식장기의 동종항원(alloantigen)은 다른 이질항원(foreign antigen)과 마찬가지로 대식세포에 탐식되어 면역반응을 개시한다. 대식세포는 interleukin-1(IL-1)을 분비하며, 동종항원을 감작하여 HLA class II 특이의 비활성(resting) T세포에 제시한다^{16,17)}. 감작항원, HLA class II 항원 및 IL-1의 복합적인 자극에 의해 비활성 T세포가 활성화되어 interleukin-2(IL-2)를 분비하며, 세포 표면에 새로 합성된 IL-2 수용체가 노출된다^{18~20)}. IL-2가 수용체에 결합함으로써 RNA 및 단백 합성 과정 등의 세포내 일련의 과정을 거쳐 전환 T세포의 클론성 증식이 일어나며 비활성 임파구가 활성화 임파구로 분화된다. 이러한 면역학적인 일련의 과정은 동종항원 특이의 활성화 T세포(특히 suppressor/cytotoxic 세포)의 분화(gene-

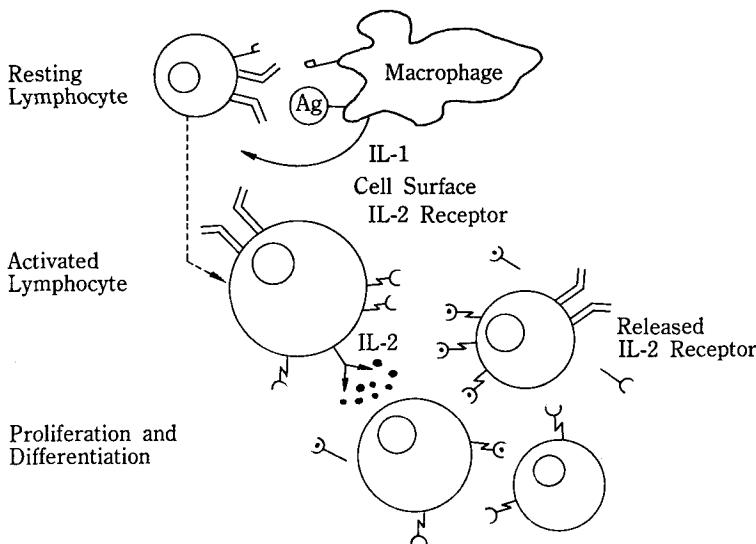


Fig 1. Model of T cell activation resulting in allograft rejection

ration) 과정으로서, 결과적으로 이 세포가 조직에 침윤하여 이식장기를 파괴하게 된다²¹⁻²³⁾

페이식거부반응의 진단

페이식거부반응의 진단은 ‘페이식거부반응의 임상적 양성’ 편에서 언급되었으므로 자세한 설명은 생략하기로 하겠다. 다만 급성거부반응의 임상적 진단과 병리학적 진단에 대해서 약술하면 다음과 같다. 급성거부반응은 임상적으로 볼 때 감염병과의 감별진단이 중요하며 면역억제제를 투여했을 때 증상의 호전이 보이면 진단이 가능하다. 병리학적 진단은 개흉폐 생검, 폐 침생검, 경기판지폐 생검, 기관지경검사 및 기관지폐포세척검사 등을 실시하여, 세포수와 세포감별검사, CD4/CD8 세포비, DNA 양, 장기제공자 특이 T세포 반응성 및 IL-2 수용체 능도검사 등²⁴⁻²⁸⁾이 있으나 임상적 의의에 대해서는 아직 확실하지 않다.

만성 거부반응의 면역학적 기전은 만성거부반응의 한 형태인 폐색성 세기관지염에서 보이는 기도점막하 림프구의 침윤이 면역억제제를 강화시키면 사라지는 것으로 보아 역시 동종이식 거부반응의 형태로 추측되나²⁹⁾ 확실히 알려진 바는 없다.

새로운 방법에 의한 이식거부반응기전 연구의 필요성

면역억제제가 개발되어 거부반응을 효과적으로 억제할 수 있게 됨으로써, 폐, 심장 및 간 등의 비고적 크기가 큰 실질장기의 이식은 이식술의 의과적 숙련도가 성공여부를 결정하는 요소²⁾로 알려져 있다. 그러나 이러한 실질장기이식 환자의 장기생존률에 영향을 주는 요소가 거부반응 특히 만성 거부반응임은 부인할 수 없다. 페이식거부반응의 임상양상은 환자마다 매우 다양하며 감염병과 감별진단이 어려운 경우가 많기 때문에 현재로서는 이를 조기에 발견하여 효과적으로 예방, 치료하기 위한 확실한 방법은 없다. 특히 페이식 만성거부반응은 심이식 만성거부반응과 같이 다세포 과정에 의한 것으로서 문자생물학적 혹은 유전자 표지자에 대해 거의 알려져 있지 않다. 이는 인간을 대상으로 페이식 만성거부반응을 연구하는 것이 아래와 같은 이유로 많은 제약이 따르기 때문이다¹³⁾. 1) 분석에 필요한 조직을 얻기가 힘든다. 2) 만성이식거부반응의 진행정도에 따라, 공존하는 다른 질환에 의해, 이식한 후부터 채취 시점의 기간에 따라 임상검체의 양상이 이질적이다. 2) 거부반응으로 사망한 환자의 부검 당시에 얻은 조직은 죽은 조직이다. 3) 개흉 폐생검을 제외하면 많은 양의 조직을 얻기가 힘든다. 4) 작은

부위에 제한적으로 발생한 폐색성 세기관지염은 이식후 국소적인 인자에 의해 조절되기 때문에 전신적 인자로서 이를 평가하는 것은 부적절하다. 5) 유전자발현의 조절이 대부분 전사 단계에서 이루어지므로 mRNA에 대한 분석이 거부반응의 유전자조절 기전을 연구하는 중요한 도구로 생각되나 Northern blot등의 고전적인 mRNA 분석방법으로는 제한적인 연구만이 가능하다.

이상에서와 같이 폐이식 거부반응의 기전을 보다 효과적으로 연구하기 위해서는 적은 양의 조직으로도 mRNA 분석할 수 있는 새로운 방법이 모색되어야 하겠고, 이를 통해 폐이식거부반응을 정확하게 조기에 예측할 수 있는 분자생물학적 인자를 밝혀 면역억제제를 보다 효율적으로 사용할 수 있어야 하겠다.

DDRT-PCR

인간을 포함한 고등생물은 약 10만개의 유전자가 존재하는 것으로 알려져 있으며 각 세포는 이 중 약 15%에 달하는 유전자가 mRNA로서 표현된다. 어느 종류의 유전자가 표현되는가 하는 선택은 발달과 분화, 호메오스타시스, 외부자극에 대한 반응, 세포주기 조절, 노화 및 programmed cell death 등의 생명현상에 의해서 조절된다. 정상적인 발달과정에서와 같이 이식거부반응 혹은 암화 과정 등의 병적 현상도 이러한 유전자의 표현 양상이 변화되었기 때문이다. 따라서 거부반응이 일어난 조직에 대해 거부반응이 일어나지 않은 조직과 mRNA의 변화 양상을 비교해보면 거부반응과 직접적인 연관이 있는 유전자를 찾아낼 수 있을 것이다. mRNA 비교분석법으로는 subtractive hybridization과 2-dimensional(2-D) 전기영동에 의한 mRNA 지문분석법 등을 들 수 있겠으나 많은 양의 임상검체를 필요로 하고 기술적으로 매우 어렵기 때문에 폐이식거부반응 기전의 연구방법으로는 적당하지 않다³⁰⁾. 따라서 Liang 등¹⁴⁾에 의한 DDRT-PCR은 적은 양의 검체로 mRNA 비교분석이 가능한 새로운 기법이므로 폐이식을 포함한 장기이식의 거부반응 기전을 연구하는데 매우 효과적인 방법으로 사료된다. DDRT-PCR은 경우에 따라(운이 좋으면) 전혀 새로운 유전자(novel gene)를 발견할 가능성이 있으므로 혹자는 이를 ‘유전자사냥’(gene hunting)으로 표현하기도 한다.

DDRT-PCR은 Liang 등¹⁴⁾에 의해 최초로 시도되어 Utans 등¹³⁾에 의해 발전되었으며, 그 분석의 개요를 소개하면 Fig. 2와 같다^{13,14,30-33)}. 먼저 조직에서 분리된 총 RNA를 poly(A) tail과 결합하는 시발체로서 역전사하여 cDNA를 합성한 다음 mRNA 상에 존재하는 다수의 불특정(arbitrarily) 시발체로서 PCR을 실시하면 특정 세포군에서 표현되는 모든 mRNA를 증폭할 수 있다. 이를 두가지 이상의 세포군에서 동시에 시행하여 비교분석하면 표현이 증가(up-regulated) 혹은 감소되는(down-regulated) mRNA를 알 수 있다. 거부반응과 관련된 유전자가 분리되면 이를 cDNA 클론닝하여 염기서열 분석하고 cDNA library와 비교하여 유전자를 동정한다. 이렇게 동정된 유전자에 대해 cDNA 탐침(probe)을 제조하여 거부반응을 찾아내는 표지자로 이용한다.

현재까지 폐이식 거부반응의 연구에 DDRT-PCR 기법을 응용된 연구는 없었으나 Utans 등¹³⁾은 심이식 만성거부반응 기전을 연구하는 쥐 심장 이종이식(heterotrophic rat cardiac transplantation 모델)로서 DDRT-PCR을 이용하였다. 쥐 심장 이종이식 모델은 만성 심이식 거부반응의 세포침윤기전을 설명하는데 유용성이 높은 모델로 알려져 있다. 연구결과를 요약하면, 동종이식은 각각 Lewis rat를 이식 공여자로 F344 rat를 이식 수용자로 하여 만성이식거부반응을 유도하였으며, 동계(syngeneic) 이식은 공여자와 수용자를 모두 Lewis rat로 하였다. 각각의 조직을 생검하고 DDRT-PCR을 실시하여 표현되는 mRNA를 비교한 결과 12종의 상이하게 표현되는 cDNA bands를 발견하였다. 이를 다시 클로닝하고 cDNA 탐침을 제작하여 조사한 결과 최종적으로 5종의 동종이식 거부반응에 특이한 mRNA가 조사되었다. 이중 3종은 이미 알려진 유전자였으나 이제까지의 연구결과로는 만성거부반응과 관련이 없는 것으로 생각되었던 galactosidase/N-acetylgalactosamine(세포표면수용체), 혼 P1 유전자(효모복제단백유전자와 유사유전자) 및 유사 ubiquitin 유전자였으며, 2종의 유전자는 전혀 새로운 유전자(novel gene)였다. 이상의 결과로서 DDRT-PCR은 심이식거부반응과 관련된 모든 유전자를 찾아낼 수 있으므로, 과거 연구되지 않았거나 잘못 해석되었던 거부반응의 기전에 대해 정확한 설명이 가능할 것으로 생각된다. 그러므로 지금까지 그 분자생물학적 실체가 알려져 있지 않았던 폐이식거부반응기전의 연구에도 DDRT-PCR이 좋은 실험도구가 될 수 있을 것으로

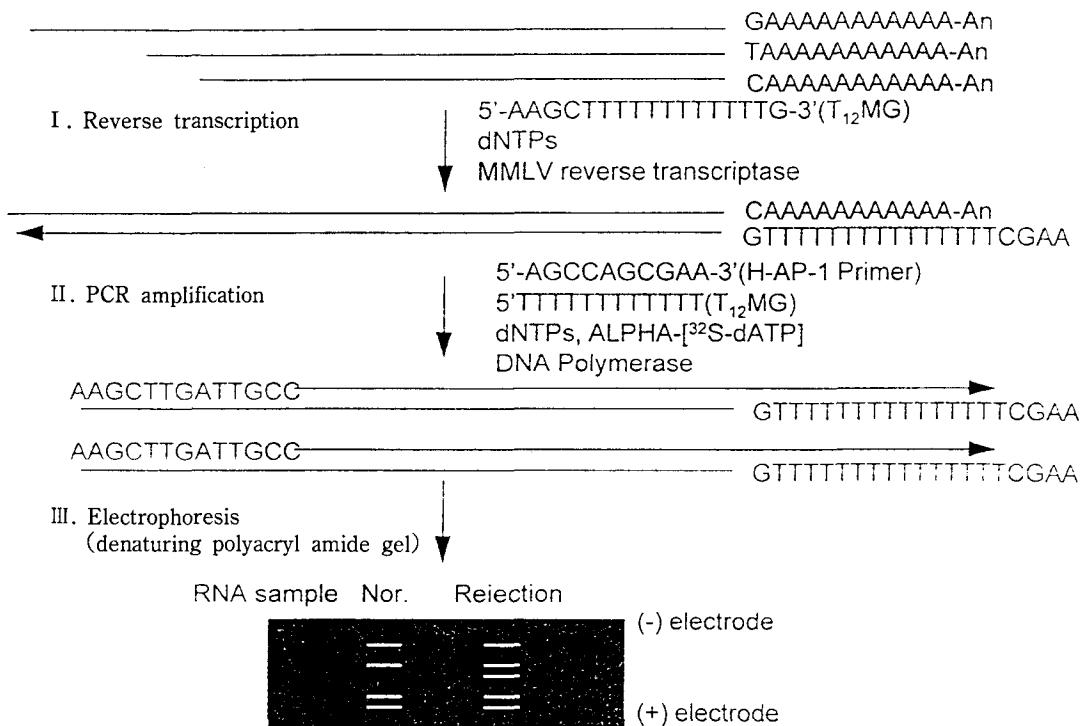


Fig. 2. Schematic Representation of DDRT-PCR.

기대된다. 저자는 DDRT-PCR 법으로 동물실험을 이용하여 폐이식 거부반응과 관련된 유전자를 밝혀낼 계획인데 성견을 폐이식에 이용하여 거부반응을 유도한 다음 이를 거부반응이 일어나지 않은 성견의 폐조직 혹은 이식전의 공여자 폐조직간의 mRNA 표현의 차이를 비교하고자 한다. 나아가서 폐이식 거부반응시 면역억제제의 효과 판정에 특이성이 있는 유전자를 발견하게 된다면 이를 면역억제요법의 적정성을 판단하고 거부반응의 조기예방을 위한 표지자로 이용하고자 한다.

DDRT-PCR의 활용분야

DDRT-PCR은 두가지 이상의 세포군간의 mRNA 표현의 차이를 비교분석하는 방법으로서 PCR을 이용하기 때문에 적은 양의 검체로서도 효과적으로 검사할 수 있다. 최근에 DDRT-PCR은 주로 유방암 등의 암의 발생과 진화(carcinogenesis)와 관련된 돌연변이 유전자의 연구에 이용되고 있다³²⁾. 또한 이 방법은 염증반응 혹은 면역방어기전과 같이 정상

유전자의 표현양상이 변화되는 경우에도 효과적인 연구 수단이 된다(Table 1). 따라서 저자는 심, 폐, 간, 끌수 및 신장 등의 장기이식의 거부반응의 기전을 밝히는데 DDRT-PCR이 광범위하게 활용될 수 있을 것으로 기대한다. 이와 같이 여러 장기의 이식거부

Table 1. Application of DDRT-PCR

- Identification of unknown genes involving in transplantation rejection-Acute rejection vs Chronic rejection
 - Renal transplantation
 - Lung transplantation
 - Bone marrow transplantation
 - Heart transplantation
- Identification of unknown genes involving in epileptogenesis
- Identification of mutant factor VIII gene in hemophilia A
- Identification of regulatory genes involving in degradation of prosthetic joint

반응의 연구에 DDRT-PCR을 이용한다면 1) 여러 장기의 이식거부반응에 공통적으로 작용하는 유전자, 2) 각 장기이식에 특이하게 작용하는 유전자, 3)

다양한 면역억제제가 공통적으로 효과를 미치는 유전자, 4) 특정 면역억제제가 작용하는 유전자 등을 발견해낼 수 있을 것이다. 이렇게 함으로써 이식 거부반응의 조기 발견을 위한 유전자 표지자(genetic marker)를 밝혀낼 수 있을 것이며, 보다 효과적으로 면역억제제를 사용할 수 있는 방법이 모색될 것이다. 또한 각 장기이식에 따라 혹은 개인에 따라 거부반응의 정도 및 양상이 상이할 것이므로 이와 직접적인 관계가 있는 유전자 표지자를 이용하면 면역억제제를 장기이식별로 혹은 개인별로 적절히 선택할 수 있을 것이다.

결 론

폐이식 환자의 장기생존률에 영향을 미치는 요소로서 거부반응 특히 만성 거부반응을 들고 있으나, 이에 대한 분자생물학적 기전에 대해서 거의 알려져 있지 않다. 폐이식 거부반응의 분자생물학적 기전을 알기 위해서는 먼저 관련 유전자를 조사하여야 하는데, mRNA 발현의 차이를 조사하는 새로운 방법인 differential display reverse transcription polymerase chain reaction (DDRT-PCR)이 매우 효과적인 방법으로 사료된다. 따라서 이를 현재 동산의료원 폐이식연구팀이 실시하고 있는 폐이식 개실험에 이용하여 폐이식거부반응의 기전을 연구하는 모델로 삼고자 하며, 이를 통해 폐이식 거부반응을 조기에 측할 수 있는 유전자와 면역억제제에 특이한 반응을 보이는 유전자를 규명하고자 한다. 나아가서 이 유전자를 표지자로 하여 효과적인 면역억제요법을 실시하기 위한 방법을 모색하여 이식거부반응을 예방 혹은 감소시킴으로써 폐이식환자의 장기생존률을 높일 수 있는 발판으로 삼고자 한다.

참 고 문 헌

- Burke CM, Glanville AR, Theodore J, Robin ED: Lung immunogenicity, rejection and obliterative bronchiolitis. *Chest* 1987(3); 92: 547-549.
- Zmijewsky CM: HLA: The Major Histocompatibility Complex(Applications). in McClatchey (ed): *Clinical Laboratory Medicine*, ed 1. Baltimore, Williams & Wilkins, 1994, pp 801-812.
- Semik M, Schnabel R, Bruske T, Lange V, Wottge H, Morgenrol K, Toomes H: Ultrastructural studies of acute rejection following single lung transplantation in the rat: Histological and immunohistological findings. *Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 42(5): 290-297.
- de Blic J, Peuchmaur M, Carnot F, Danel C, Derueyne M, Reynaud P, Scheinmann P, Brousse N: Rejection in lung transplantation: immunohistochemical study of transbronchial biopsies. *Transplantation*. 1992; 54(4): 639-644.
- Best NG, Trull AK, Tan KK, Hue KL, Spiegel Ihattler DJ, Gore SM, Wallwork J: Blood cyclosporin concentrations and the short-term risk of lung rejection following heart-lung transplantation. *Br J Clin Pharmacol* 1992; 34(6): 513-520.
- Yagyu K, Furuse A: Analysis of mononuclear cell subpopulations in bronchoalveolar lavage fluid in acute rejection after lung transplantation in rats. *Kyobu Geka* 1992; 45(12): 1,063-1,066.
- Arai H, Yuda T, Goodgold HM, Martin TW, Swartz MT, Pennington DG: Asymmetric intramyocardial lymphocytic accumulation during acute rejection in rat: Heart and heart-lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 1992; 11(5): 763-772.
- Okada M, Senoo Y, Teramoto S: Difference of rejection between heart and heart-lung transplantation in rats: flowcytometric analysis of graft infiltrating lymphocyte subsets. *Acta Med Okayama* 1992; 46(1): 37-44.
- Saitoh Y, Fujisawa T, Ogawa T, Urabe N, Yamaguchi V, Kimizuka G: Morphological rejection phases and cytotoxic activity in peripheral blood lymphocytes in canine lung allo-transplantation. *Jpn J Surg* 1990; 20(2): 205-211.
- Yagyu K, Steinhoff G, Schafers HJ, Dammenhayn T, Haverich A, Borst HG: Comparison of mononuclear cell subpopulations in bronchoalveolar lavage fluid in acute rejection after lung transplantation and Mycoplasma infection in rats. *J Heart Transplant* 1990; 9(5): 516-525.
- Saito R, Kondo T, Fujimura S, Handa M, Tchinoze T, Shiraishi Y: Detection of peripheral blood and bronchoalveolar lavage fluid lymphocytes in rat lung transplantation for early diagnosis of rejection. *Tohoku J Exp Med* 1990; 160(3): 231-249.
- Billingham ME: Pathology and etiology of chronic rejection of the heart. *Clin Transplant*

- 1994; 8(3): 289-292.
13. Utans U, Liang P, Wyner LR, Karnovsky MJ, Russell ME: Chronic cardiac rejection: Identification of five upregulated genes in transplanted hearts by differential mRNA display. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91(14): 6,463-6,467.
14. Liang P, Averboukh L, Keyomarsi K, Sager R, Pardee AB: Differential display and cloning of messenger RNAs from human breast cancer versus mammary epithelial cells. *Cancer Res* 1992; 52(24): 6,966-6,968.
15. Lawrence EC: Diagnosis and management of lung allograft rejection. *Clin Chest Med* 1990; 11(2): 269-278.
16. Mizel SB, Ben-Zvi A: Studies on the role of lymphocyte activating factor (interleukin 1) in antigen-induced lymph node lymphocyte proliferation. *Cell Immunol* 1980; 54(2): 382-389.
17. Rosenwasser LJ, Dinarello CA, Rosenthal AS: Adherent cell function in murine T-lymphocyte antigen recognition: IV. Enhancement of murine T-cell antigen. Recognition by human leukocytic pyrogen. *J Exp Med* 1979; 150(3): 709-714.
18. Leonard WJ, Depper JM, Robb RJ, et al: Characterization of the human receptor for T-cell growth factor. *Proc Natl Acad USA* 1983; 80(22): 6947-6961.
19. Uchiyama T, Broder TA, Waldman TA: A monoclonal antibody (ant-Tac) reactive with activated and functionally mature human T-cells. *J Immunol* 1981; 126(4): 1,393-1,397.
20. Smith KA: T-cell growth factor. *Immunol Rev* 1980; 51(1): 337-357.
21. Depper JM, Leonard C, Grogula C, et al: Interleukin-2 (IL-2) augments transcription of the IL-2 receptor gene. *Proc Natl Acad USA* 1985; 82(12): 4,230-4,234.
22. Robb RJ, Munck A, Smith KA: T-cell growth factor receptors: Quantitations, specificity, and biological relevance. *J Exp Med* 1981; 154: 1,455-1,474.
23. Smith KA, Cantress DA: Interleukin-2 regulates its own receptors. *Proc Natl Acad USA* 1985; 82(3): 864-868.
24. Hruban RH, Beschorner WE, Baumgartner, et al: Diagnosis of lung allograft rejection by bronchial intraepithelial Leu-7 positive T lymphocytes. *J Thorac Cardiovas Surg* 1988; 96(6): 939 -946.
25. Maurer JR, Gough E, Chamberlain DW, et al: Sequential bronchoalveolar lavage studies from patients undergoing double lung and heart-lung transplant. *Transplant Proc* 1989; 21: 2,585 -2,587.
26. Williams TJ, Cochrane DMG, Patterson, et al: Lymphocyte DNA content does not predict acute rejection in lung transplant recipients. *Am Rev Respir Dis* 1990; 141: A683.
27. Zeevi A, Rabinovich H, Paradis I, et al: Lymphocyte activation in bronchoalveolar lavages from heart-lung transplant recipients. *Transplant Proc* 1988; 20(2): 189-192.
28. Lawrence EC, Holland VA, Young JB, et al: Dynamic changes in soluble interleukin-2 receptor levels following lung or heart-lung transplantation *Am Rev Respir Dis* 1989; 140(3): 789-796.
29. Theodore J, Starnes VA, Lewiston NJ: Obliterative bronchiolitis. *Clin Chest Med* 1990; 11(2): 309-321.
30. Liang P, Pardee AB: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992; 257(14): 967-971.
31. Liang P, Averboukh L, Pardee A: Distribution and cloning of eukaryotic mRNAs by means of differential display: Refinements and optimization. *Nucleic Acid Res* 1993; 21(14): 3,269-3,275.
32. Mok SC, Wong KK, Chan RDW, Lau CC, Taso SW, Knapp RC, Berkowitz RS: Molecular cloning of differentially expressed genes in human epithelial ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 1994; 52 (2): 247-252.
33. Bauer D, Muller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe P, Strauss M: Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique(DDRT-PCR). *Nucleic Acid Res* 1993 21(18) 4,272-4,280.