

Respiratory syncytial virus (RSV) 재감염에 의한  
기도과민성과 기도염증에 대한  
Cytosine-phosphate-Guanine Oligodeoxynucleotides  
(CpG ODNs)의 효과

연세대학교 대학원

의 학 과

장 광 천

Respiratory syncytial virus (RSV) 재감염에 의한  
기도과민성과 기도염증에 대한  
Cytosine-phosphate-Guanine Oligodeoxynucleotides  
(CpG ODNs)의 효과

지도교수 김 규 언

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2008년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

장 광 천

# 장광천의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

심사위원 \_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2008 년 6 월

## 감사의 글

이 논문이 나오기까지 많은 연구방법과 지식을 가르쳐 주신 김규언 교수님과 박중원 교수님께 진심으로 감사의 마음을 전합니다. 이 논문에 대해 변함없는 관심을 보이시고 자문을 아끼지 않으신 이봉기 교수님과 김혜영 교수님 그리고 이경원 교수님께 머리 숙여 감사 드립니다. 실험과정에서 도움을 주신 이용원 강사님과 손정호 선생님, 고시환 선생님 그리고 알레르기 연구소 연구원분들에게도 감사드립니다.

저를 키워주신 부모님과 격려와 후원을 아끼지 않으신 숙부님, 항상 관심을 가져준 형님과 동생, 옆에서 힘이 되어준 아내 그리고 귀여운 딸 혜정과 아들 석원, 모두 감사하며 사랑의 마음을 전하고 싶습니다.

논문이 완성되는 것을 보지 못하시고 세상을 떠나신 부모님께 이 논문을 바칩니다.

저자 씀

# 차 례

국문 요약 .....	1
I. 서론 .....	3
II. 재료 및 방법 .....	5
1. 동물 및 RSV 감염 .....	5
2. 기도 과민성 측정 .....	6
3. 기관지 폐포 세척액 및 병리소견 .....	7
4. Cytokine 발현 및 RSV 특이 IgG2a 측정 .....	7
5. 통계 .....	7
III. 결과 .....	8
1. 기도 과민성 .....	8
2. 기관지 폐포 세척액내의 세포 소견 .....	9
3. PAS 양성 세포수의 비교 및 조직학적 소견 .....	11
4. 기관지 폐포 세척액내의 IL-13 비교 .....	13
5. 기관지 폐포 세척액내의 IL-5 비교 .....	14
6. 기관지 폐포 세척액내의 IFN- $\gamma$ 비교 .....	15
7. 혈청에서의 RSV 특이 IgG2a 비교 .....	16
IV. 고찰 .....	17
V. 결론 .....	20
참고문헌 .....	21
영문 요약 .....	25

## 그림 차례

FIG.1. Schematic of study protocol and exposure groups .....	5
FIG.2. Measurement of airway hyperresponsiveness .....	6
FIG.3. Airway hyperresponsiveness .....	8
FIG.4. Bronchoalveolar lavage(BAL) fluid cell count .....	10
FIG.5. Quantitative analysis of PAS-positive cells in the central airways. ....	11
FIG.6. Lung histologic features in RSV re-infected mice. ....	12
FIG.7. Levels of IL-13 in the BAL fluid of RSV re-infected mice. .....	13
FIG.8. Levels of IL-5 in the BAL fluid of RSV re-infected mice. .....	14
FIG.9. Levels of IFN- $\gamma$ in the BAL fluid of RSV re-infected mice. .....	15
FIG.10. IgG2a in the sera of RSV re-infected mice. ....	16

## 국문요약

# Respiratory syncytial virus (RSV) 재감염에 의한 기도과민성과 기도염증에 대한 Cytosine-phosphate-Guanine Oligodeoxynucleotides (CpG ODNs)의 효과

Respiratory syncytial virus(RSV)는 세기관지염과 폐렴을 일으키는 원인체이며 이 RSV에 의한 세기관지염은 영유아가 병원에 입원하게 되는 가장 흔한 원인 중 하나이다. 특히 영아기에 RSV감염으로 심한 세기관지염을 앓게 되면 이후에 반복적인 천명성 질환과 소아기의 천식으로 이행할 위험이 매우 높은 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 BALB/c마우스 모델을 사용하여 영아기에 유발되는 RSV의 영아기 감염과 재감염에 의한 기도과민성과 기도염증반응을 연구하고 CpG ODNs을 이용하여 이를 예방하고 치료하는 방법을 개발하고자 하였다.

생후 3일된 BALB/c마우스에, human RSV A2 균주(catalogue no. VR 1302)를  $10^6$  pfu씩 비강내 투여방법으로 감염시키고 3가지 군으로 나누었다: Sham군, RSV/CpG ODNs투여군 및 RSV/Control ODNs 투여군. CpG ODNs(5'-TGACTGTGAACGTTCCGAGATGA-3'; GenoTech, 대전)과 Control ODNs(5'-TGACTGTGAAGGTTGGAGATGA-3'; GenoTech, 대전)의 투여는 RSV를 감염시킨후 2일 뒤에 각각 비강내로 2  $\mu$ g씩 투여하였다. 5주 뒤 다시 RSV를 재감염시킨뒤 4일 후 기도과민성과 싸이토카인을 측정하고 병리학적검사를 시행하였다.

RSV/CpG ODNs투여군의 메타콜린 기도과민성이 RSV/Control ODNs투여군에 비하여 낮게 측정되었다. RSV/CpG ODNs투여군의 호산구수가 RSV/Control ODNs투여군에 비하여 적었다. RSV/CpG ODNs투여군의 IL-13과 IL-5가 RSV/Control ODNs투여군에 비하여 낮게 측정되었으나 IFN- $\gamma$ 와 IgG2a는 높게 측정되었다. RSV/CpG ODNs투여군의 기도상피세포의 배상세포 과형성(goblet cell hyperplasia)이 RSV/Control ODNs투여군에 비하여 적었다.

마우스 모델에서 RSV 재감염은 기도과민성과 호산구성 염증반응을 유도하고

배상세포 과형성(goblet cell hyperplasia)을 유도하며, CpG ODNs의 조기 투여는 RSV 재감염에 의한 기도과민성의 증가, 기도 염증반응, 폐포세척액내의 IL-13과 IL-5증가 및 기도상피세포에서 배상세포 과형성(goblet cell hyperplasia)을 막는 데 효과가 있음을 알 수 있었다.

---

핵심되는말 : respiratory syncytial virus(RSV), Cytosine-phosphate-Guanine Oligodeoxynucleotides (CpG ODNs), 기도과민성, 배상세포 과형성 (goblet cell hyperplasia)



Respiratory syncytial virus (RSV) 재감염에 의한 기도과민성과  
기도염증에 대한 Cytosine-phosphate-Guanine  
Oligodeoxynucleotides (CpG ODNs)의 효과

<지도교수 김 규 언>

연세대학교 대학원 의학과

장 광 천

## I. 서론

Respiratory syncytial virus(RSV)는 paramyxoviridae family에 속하는 RNA 바이러스이며, 크게 A와 B 균주 구분되고, A 균주가 일반적으로 우점종이다. RSV는 세기관지염과 폐렴을 일으키며, RSV에 의한 세기관지염은 영유아가 병원에 입원하게 되는 가장 흔한 원인 중 하나이다<sup>1)</sup>. 특히 영아기에 RSV감염으로 세기관지염을 앓게 되면 이후의 반복적인 천명성 질환과 소아기의 천식으로 이행할 위험이 매우 높은 것으로 알려져 있다. RSV 유행시기에 급성 세기관지염은 아토피를 가진 경우에 더 잘 발생하며, RSV 세기관지염을 앓은 후 혈청 IgE가 증가한다는 보고가 있었다<sup>2,3)</sup>. Sigurs 등의 보고에 의하면, 병원에 입원한 중증의 RSV 환자 47명을 7.5세까지 경과 관찰한 결과, 천식 현증의 유병률이 23%인 반면에 대조군은 2%에 불과하였다<sup>2)</sup>. RSV감염과 천식의 발병이 연관되어 있다는 연구들이 많았지만 아직 명확한 기전이 밝혀져 있지 않다. 여러 연구자들은 RSV감염이 알레르기 염증반응과 알레르겐에 대한 감작빈도를 높여서 천식을 유발한다고 보고하고 있으나, 다른 연구자들은 유전적으로 아토피 배경이 있거나 기관지 과민반응이 있는 환자군이 RSV에 감염될 때 천식과 유사한 임상증상이 유발되고 천명음이 들리며, RSV감염이 천식을 악화시키는 요인이라고 보고하였다<sup>4,5)</sup>.

RSV는 인체에서 다양한 면역반응을 유발할 수 있으며, 이는 다른 호흡기 바이러스와 큰 차이점이다. RSV 감염에 의해 획득된 면역력에는 양면성이 있다. 한쪽

에서는 감염에서 회복을 촉진하고 부분적인 예방 효과도 기대할 수 있지만 반대로 면역반응으로 인해 병변이 유도될 수 있다<sup>6-8)</sup>. Kim등의 보고에 의하면 RSV에 감염된 일부 환자의 기관지 폐포 세척액에서 호산구가 증가하고, RSV 특이 IgE가 검출되며, 환자의 증상도 천식과 같은 천명음이 청진되는 등 Th2 면역반응이 관여한다고 보고하였다<sup>9)</sup>. 마우스 동물실험에서도 감염 조건에 따라 Th1 면역반응 이외에도 Th2 알레르기 면역반응이 유발될 수 있다는 보고가 있었다. RSV는 10개의 단백질로 구성되어 있으며 각 단백질이 일으키는 면역반응에 차이가 있다. 이 중 F protein은 Th1 면역반응을 유도하며, G protein은 Th2 사이토카인인 IL-5, IL-13 등의 생산을 유도하는 것으로 알려져 있다. 마우스 동물실험에서도 G protein이나 formaline inactivated RSV로 먼저 감작시킨 후 RSV로 감염시키면 호산구성 염증반응이 유발되며, Th2 사이토카인이 증가하였다<sup>10-12)</sup>. 지금까지의 연구 결과에 의하면 IL-4와 IL-5, 특히 IL-13이 RSV에 의한 알레르기 염증반응과 기도 상피세포의 배상세포 과형성(goblet cell hyperplasia)을 유발시키는데 관여하는 것으로 알려져 있고, IFN- $\gamma$ 는 알레르기 염증반응을 억제한다는 보고가 있다<sup>13-17)</sup>. 이러한 현상으로 인해 RSV백신 개발에 어려움을 겪고 있다. 1960년대 말에 처음으로 formaline inactivated RSV 백신이 개발되어 임상시험을 실시하였으나, 오히려 접종받은 소아중 RSV 감염에 의해서 80%내외가 입원하였고, 일부 환자는 이로 인해 사망하였으며, 부검소견을 보면 폐에 호산구 침윤이 현저하였다<sup>18)</sup>.

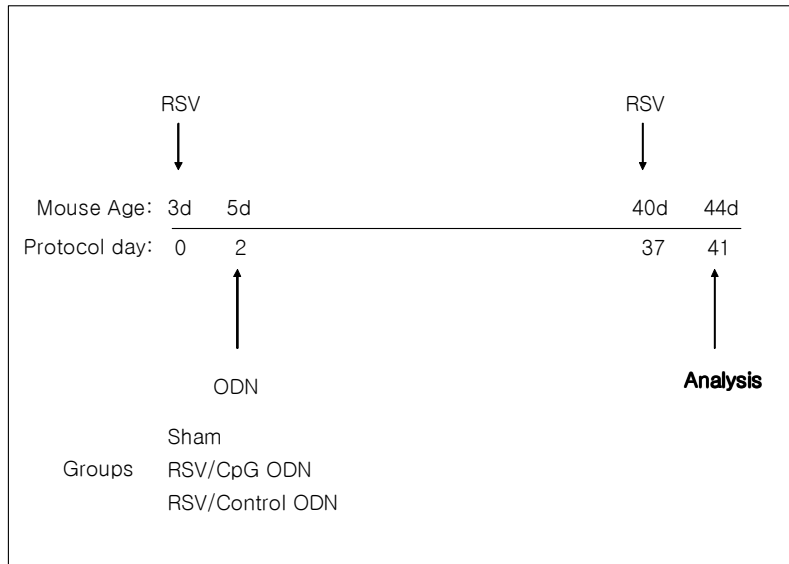
최근에는 기관지 천식에 대한 예방접종 및 치료에 DNA를 이용하려는 연구들로서, 알레르겐을 코드화하는 plasmid DNA의 적용, DNA 백신, 그리고 Cytosine-phosphate-Guanine OligodeoxynucleotidesCpG (ODNs)등이 시도되고 있다<sup>19)</sup>.

이에 본 연구자는 RSV마우스 모델에서 RSV 재감염에 의한 기도과민성과 기도 염증반응을 연구하고 CpG ODNs을 이용하여 이를 예방하고 치료하는 방법을 개발하고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 동물 및 RSV 감염

마우스는 생후 3일된 BALB/c를 사용하였고 specific pathogen free 상태에서 사육하였다. RSV는 human RSV A2 균주(catalogue no. VR 1302)를 사용하였다. RSV 는 HEp-2 cell( Eagle's minimum essential medium (Gibco) supplemented with 2% FBS)에 배양시켰으며, HEp-2 monolayer에 RSV를 inoculation시킨뒤 주기적으로 관찰하여 80%이상의 세포가 떨어져 뜰때 harvest하였다. 세포현탁액을 18°C에서 2000g로 15분간 원심분리하고, 바이러스가 포함된 pellet을 다시 신선한 배지(10 mmol/L PBS containing 15% sucrose)를 추가한뒤 -70°C 냉장고에 즉시 얼려 보관하였다. 바이러스 역가는 microplaque immunoperoxidase method에 따라 정량화 하였다.

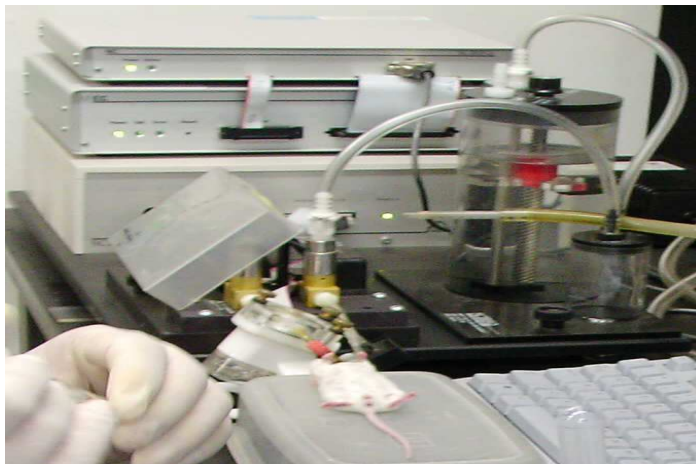


**FIG.1.** Schematic of study protocol and exposure groups. Neonatal mice (3 days of age) were infected with RSV ( $1 \times 10^6$  pfu) and re-infected 5 weeks after primary infection.

생후 3일된 BALB/c마우스에, 10  $\mu$ l의 RSV( $1 \times 10^6$  pfu) 균주 용액을 마우스 비강을 통해 감염시키고 3가지 군으로 나누었다: Sham군, RSV/CpG ODNs투여군 및 RSV/Control ODNs 투여군. RSV 초기 감염 2일뒤에 CpG ODNs은 5'-TGACTGTGAACGTTTCGAGATGA-3' (GenoTech, 대전)과 Control ODNs은 5'-TGACTGTGAAGGTTGGAGATGA-3'(GenoTech, 대전)을 비강내로 2  $\mu$ g씩 1회 투여하였다. 처음 감염 후 5주 뒤 다시 동량의 RSV로 재감염시킨 후 4일 뒤에 기도과민성을 측정하였고, 희생시킨후 기관지 폐포세척술을 시행하고 병리 조직학적 연구를 위해 폐조직을 처리하였다(Fig. 1).

## 2. 기도 과민성 측정

RSV 감염후 기도 과민성은 methacholine을 3.1 mg/ml에서 50 mg/ml 까지 nebulizer (Omron, Bannockburn, USA)로 단계적으로 두배씩 증가하여 흡입시킨 후 기도 저항의 변화를 forced oscillometer법 (Flexivent system; SCRIBUE, Quebec, Canada)으로 측정함으로써 판정하였다. 기도저항은 마우스를 pentobarbital(100 mg/kg)로 마취한 다음 tracheostomy를 시행하고 18 Gauge관을 통해 ventilator로 인공호흡 (Tidal breathing - 25.0 mL/kg, 호흡수 - 120 회/min)을 시킨 상태에서 측정하였다(Fig 2).



**FIG . 2.** Measurement of airway hyperresponsiveness by Flexivent system (SCRIBUE, Quebec, Canada) after tracheostomy under pentobarbital anesthesia.

### 3. 기관지 폐포 세척액 및 병리소견

기관지 폐포 세척액(BAL fluid)은 Hank's Balanced Saline 용액 1 ml를 관류시켜 채취하였고, 채취한 세척액은 원심분리하였다. 상층액은 싸이토카인 농도측정에 이용하고 세포 침전물은 cytospin으로 원심도말 한 다음 Diff-Quick (IMEB Inc., California, USA)으로 염색하여 100배시야에서 최소한 300개의 세포를 세어 폐포대식세포, 호산구, 림프구, 호중구를 감별 계산하였다. 폐조직은 10% formaline으로 고정된 다음 paraffin block을 만들고, H & E 및 PAS 염색을 실시하였다.

### 4. 싸이토카인 발현 및 RSV 특이 IgG2a 측정

BAL fluid 내의 IFN- $\gamma$ , IL-13, 및 IL-5의 변화량은 R&D systems (TECHNE Corporation, Menneapolis, USA)에서 구매한 시약으로 ELISA법에 의해 측정하였다. 마우스 혈청내 IgG2a는 RSV를 2  $\mu$ L/mL로 피막한 후, ELISA plate에 시험혈청을 각각의 well에 100  $\mu$ L씩 4°C에서 24시간 반응시킨 뒤, horseradish peroxidase(HRP) conjugated monoclonal rat anti-mouse IgG2a(SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) 100  $\mu$ L를 상온에서 1.5시간 반응시켰다. substrate(p-nitrophenylphosphate, 1 mg/mL in diethanolamine buffer, pH 9.8)로 발색 반응을 하였고, microplate reader(Molecular Devices, CA, USA)로 흡광도 450 nm(OD 450)에서 측정하였다. 모든 시험 측정은 ELISA에서 두 개의 well에 중복 측정하였으며 통계처리를 위해 평균치를 산출하였다. 싸이토카인의 농도가 낮은 경우 폐조직을 균질화한 검체를 이용하여 측정하였다.

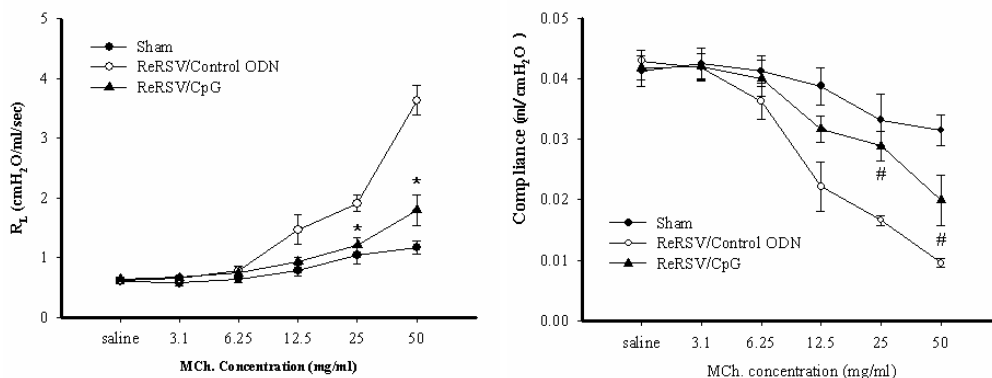
### 5. 통계

모든 변수는 평균 $\pm$ 표준오차로 표시하였다. 각 변수간 통계검정은 SPSS 통계 프로그램으로 분석하였고, 95% 이상의 유의 수준을 인정하였다.

### III. 결과

#### 1. 기도 과민성

기도과민성은 메타콜린농도가 25(mg/ml) 일때 Sham군은  $1.0425 \pm 0.1474$  (cmH<sub>2</sub>O/ml/sec)이었고, RSV/Control ODNs투여군은  $1.9100 \pm 0.1372$  (cmH<sub>2</sub>O/ml/sec)이었으며, RSV/CpG ODNs투여군은  $1.2080 \pm 0.1337$  (cmH<sub>2</sub>O/ml/sec)이었다. 메타콜린농도가 50(mg/ml) 일때 기도과민성은 Sham군이  $1.1725 \pm 0.1089$ (cmH<sub>2</sub>O/ml/sec)이었고, RSV/Control ODNs투여군이  $3.6360 \pm 0.2475$  (cmH<sub>2</sub>O/ml/sec)이었으며, RSV/CpG ODNs투여군이  $1.7940 \pm 0.2541$ (cmH<sub>2</sub>O/ml/sec)이었다. Sham군에 비해서 RSV 재감염군에서 메타콜린에 대한 기도과민성이 통계적으로 의미있게( $p < 0.01$ ) 증가하였으며, RSV/CpG ODNs투여군에서 메타콜린에 대한 기도과민성이 RSV/Control ODNs투여군에 비하여 낮게 측정되었다(Fig. 3.).

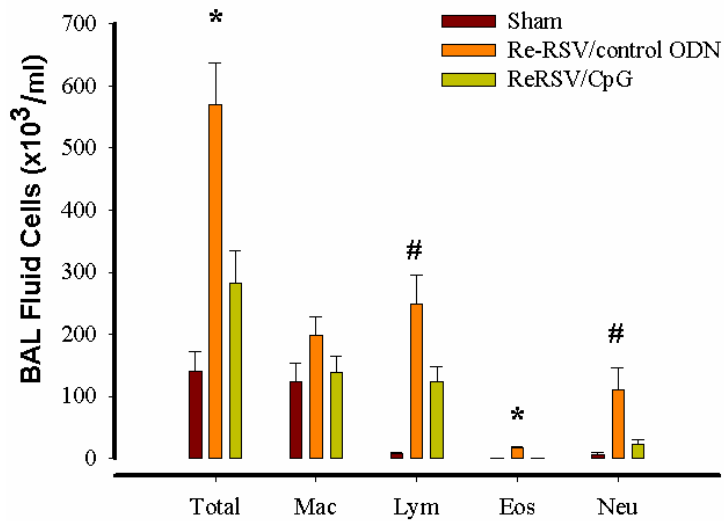


**FIG.3.** Airway hyperresponsiveness developed after RSV re-infection and is not affected by administration of CpG. Results were expressed as changes in airway resistance (Fig 1, A) and dynamic compliance (Fig 1, B). (\*  $p < 0.01$  compared with the sham group, #  $p < 0.05$  compared with the CpG-treated group.)

폐 순응도(compliance)는 메타콜린 농도가 25(mg/ml) 일때 Sham군은  $0.0332 \pm 0.0043$ (mL/cmH<sub>2</sub>O)이었고, RSV/Control ODNs투여군은  $0.0166 \pm 0.0009$ (mL/cmH<sub>2</sub>O)이었으며, RSV/CpG ODNs투여군은  $0.02895 \pm 0.0025$ (mL/cmH<sub>2</sub>O)이었다. 메타콜린 농도가 50(mg/ml) 일때 폐순응도 Sham군이  $0.0315 \pm 0.0025$ (mL/cmH<sub>2</sub>O)이었고, RSV/Control ODNs투여군이  $0.0095 \pm 0.0008$ (mL/cmH<sub>2</sub>O)이었으며, RSV/CpG ODNs투여군이  $0.0199 \pm 0.0041$ (mL/cmH<sub>2</sub>O)이었다. RSV/CpG ODNs투여군이 RSV/Control ODNs투여군에 비하여 폐순응도가 통계적으로 의미있게( $p < 0.05$ ) 높게 측정되었다(Fig. 3).

## 2. 기관지 폐포 세척액내의 세포 소견

RSV 재감염된 군에서의 림프구, 호산구, 호중구가 증가하였으며, 기관지 폐포 세척액내 전체 세포수는 sham군( $140.0 \pm 32.9 \times 10^3$ /ml)이나 RSV/CpG ODNs투여군( $283.3 \pm 50.6 \times 10^3$ /ml)에 비하여 RSV/Control ODNs투여군( $570.0 \pm 66.4 \times 10^3$ /ml)이 통계적으로 유의하게 높았다( $p < 0.01$ ). 대식세포는 RSV/Control ODNs투여군( $99.2 \pm 28.4 \times 10^3$ /ml)이 sham군( $123.0 \pm 29.8 \times 10^3$ /ml)이나 RSV/CpG ODNs투여군( $138.5 \pm 27.1 \times 10^3$ /ml)에 비하여 높았으나 통계적으로 의미는 없었다. 림프구는 sham군( $7.5 \pm 1.8 \times 10^3$ /ml)이나 RSV/CpG ODNs투여군( $123.7 \pm 24.6 \times 10^3$ /ml)에 비하여 RSV/Control ODNs투여군( $248.1 \pm 46.4 \times 10^3$ /ml)이 통계적으로 유의하게 높았다( $p < 0.05$ ). 호산구는 sham군( $0.237 \pm 0.15 \times 10^3$ /ml)이나 RSV/CpG ODNs투여군( $0.483 \pm 0.306 \times 10^3$ /ml)에 비하여 RSV/Control ODNs투여군( $16.4 \pm 3.66 \times 10^3$ /ml)이 통계적으로 유의하게( $p < 0.01$ ) 높았으며, 호중구도 sham군( $6.8 \pm 3.3 \times 10^3$ /ml)이나 RSV/CpG ODNs투여군( $23.0 \pm 7.54 \times 10^3$ /ml)에 비하여 RSV/Control ODNs투여군( $109.8 \pm 36.4 \times 10^3$ /ml)이 통계적으로 유의하게( $p < 0.05$ ) 높았다(Fig. 4).

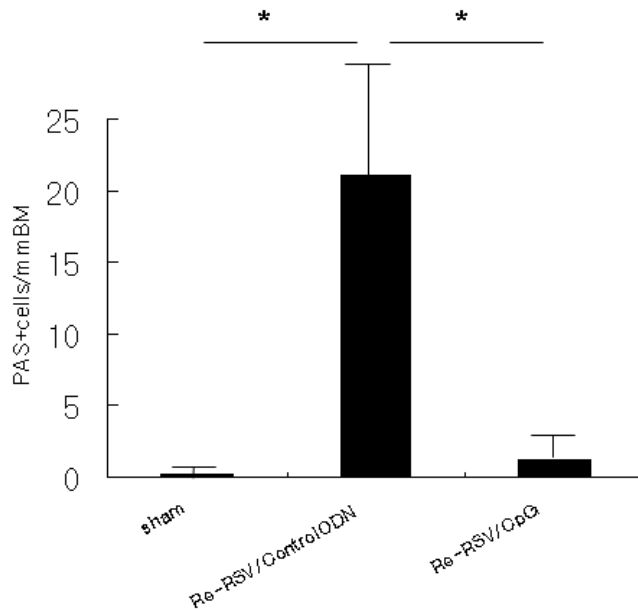


**FIG. 4.** Bronchoalveolar lavage(BAL) fluid inflammatory cell counts. The results are from the same mice shown in Fig 1. There were differences in BAL fluid lymphocyte, neutrophil and eosinophil counts between the RSV/CpG and the RSV/control ODN group. (\*  $p < 0.01$ , #  $p < 0.05$ )



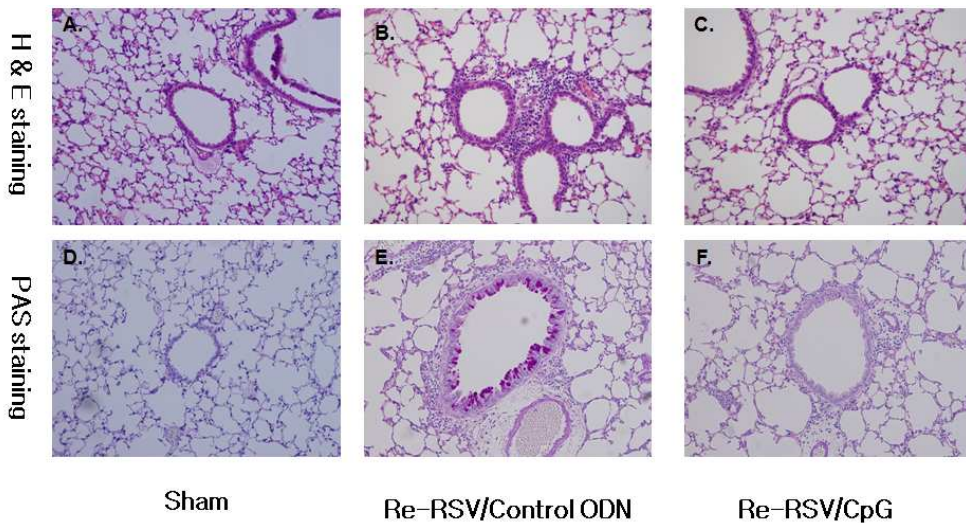
### 3. PAS 양성 세포수의 비교 및 조직학적 소견

기도 상피세포의 PAS 양성 세포수는 sham군( $0.48 \pm 0.92/\text{mmBM}$ )이나 RSV/CpG ODNs투여군( $1.45 \pm 1.52/\text{mmBM}$ )에 비하여 RSV/Control ODNs투여군( $21.75 \pm 8.27/\text{mmBM}$ )이 통계적으로 유의하게( $p < 0.01$ ) 높았다(Fig. 5).



**FIG. 5.** Quantitative analysis of PAS-positive cells in the central airways. RSV reinfection causes peribronchial and perivascular inflammation and goblet cell hyperplasia. After CpG administration, bronchial goblet cell hyperplasia was markedly decreased. Data are from the same mice shown in Fig 1. Results are expressed as the number of PAS-positive cells per millimeter of epithelial basement membrane. (\*  $p < 0.01$ )

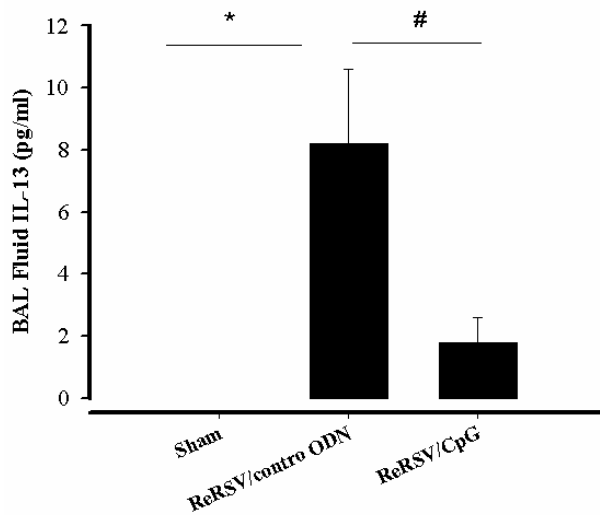
조직학적 소견을 보면 sham군과 RSV/Control ODNs투여군을 비교해 보았을 때 RSV 감염이 기도염증과 기도 주변의 혈관을 따라 염증반응을 유발함을 관찰할 수 있었고, RSV/CpG ODNs투여군에서는 RSV/Control ODNs투여군에 비해 기도염증과 기도주변 혈관의 염증반응 및 배상세포 과형성(goblet cell hyperplasia)이 억제됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 6).



**FIG. 6.** Lung histologic features in RSV re-infected mice. Lung tissues were stained with H&E and periodic acid-Schiff (PAS). RSV causes peribronchial and perivascular inflammation and goblet cell hyperplasia (E). After CpG administration, bronchial goblet cell hyperplasia was markedly decreased (C and F). Data are from the same mice shown in Fig 1.

#### 4. 기관지 폐포 세척액내의 IL-13 비교

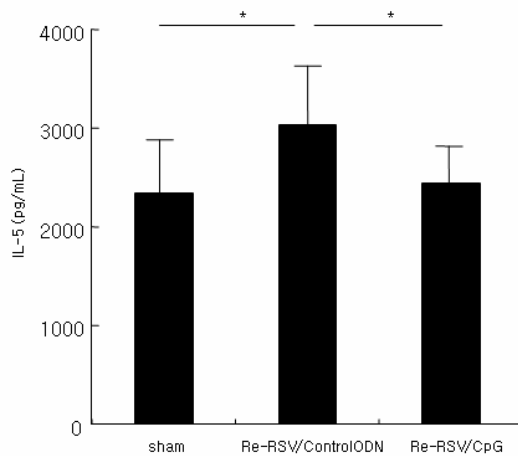
기관지 폐포 세척액내의 IL-13은 RSV/Control ODNs투여군( $8.2 \pm 2.4$  pg/ml)이 sham군( $0.0 \pm 0.0$  pg/ml)에 비하여 통계적으로 유의하게 ( $p < 0.01$ ) 높았고, RSV/CpG ODNs투여군( $1.8 \pm 0.8$  pg/ml)에 비해서도 통계적으로 유의하게 ( $p < 0.05$ ) 높았다(Fig. 7).



**FIG. 7.** Levels of IL-13 in the bronchoalveolar lavage fluid of RSV re-infected mice. Results are from the same mice shown in Fig 1. (\*  $p < 0.01$ , #  $p < 0.05$ )

### 5. 기관지 폐포 세척액내의 IL-5 비교

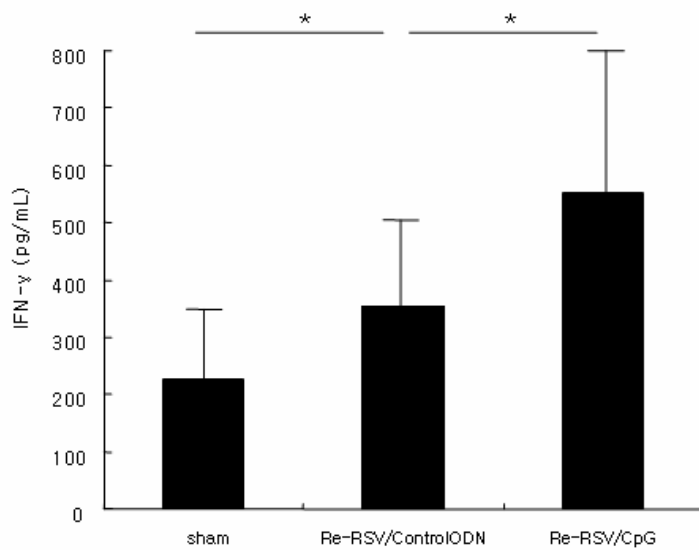
기관지 폐포 세척액내의 IL-5는 RSV/Control ODNs투여군(3251.0±610.7 pg/ml)이 sham군(2344.0±652.7 pg/ml)이나 RSV/CpG ODNs투여군(2432.0±326.4 pg/ml)에 비하여 통계적으로 유의하게( $p < 0.05$ ) 높았다(Fig. 8).



**FIG. 8.** Levels of IL-5 in the bronchoalveolar lavage fluid of RSV re-infected mice. (\*  $p < 0.05$ )

## 6. 기관지 폐포 세척액내의 IFN- $\gamma$ 비교

기관지 폐포 세척액내의 IFN- $\gamma$ 는 RSV/Control ODNs투여군( $355.0 \pm 149.4$  pg/ml)이 sham군( $225.0 \pm 162.7$  pg/ml)에 비하여 통계적으로 유의하게( $p < 0.05$ ) 높았으며, RSV/CpG ODNs투여군( $550.0 \pm 168.8$  pg/ml)에 비하여 통계적으로 유의하게( $p < 0.05$ ) 낮게 측정되었다(Fig. 9).



**FIG. 9.** Levels of IFN- $\gamma$  in the bronchoalveolar lavage fluid of RSV re-infected mice. (\*  $p < 0.05$ )

## 7. 혈청에서의 RSV 특이 IgG2a 비교

혈청에서의 RSV 특이 IgG2a는 RSV/CpG ODNs투여군( $6.24 \pm 1.88$ )이 sham군 ( $3.09 \pm 0.36$ )이나 RSV/Control ODNs투여군( $3.44 \pm 0.46$ )에 비하여 통계적으로 유의하게( $p < 0.05$ ) 높았다(Fig. 10).

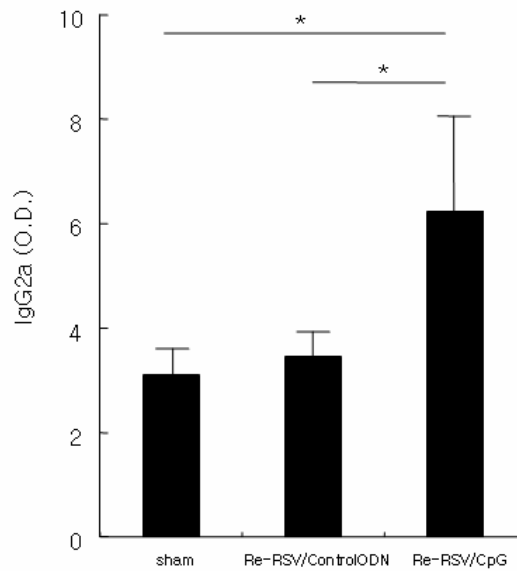


FIG.10. IgG2a in the sera of RSV re-infected mice. (\*  $p < 0.05$ )

#### IV. 고찰

RSV는 다른 호흡기 바이러스와 달리 감염에 의해 생기는 면역력이 불완전하여 1~2년 후에 동일한 strain의 RSV에 여러 번 재감염되는 경우를 흔히 볼 수 있으며, 효과적인 백신이 개발되지 않고 있다<sup>20)</sup>. RSV에 감염된 후에도 오랫동안 기도에 남아있어 만성적으로 기도 염증을 일으킬 가능성이 제시되고 있다<sup>21)</sup>. 마우스 감염모델에서 RSV에 의해 유도되는 CD8+ 세포는 다른 호흡기 바이러스에 의해 유도되는 CD8+ 세포에 비해 IFN- $\gamma$ , 항원자극에 의한 증식력 등 여러 기능이 떨어지는 것으로 보고된 바 있으며, 이러한 사실은 왜 RSV가 재감염이 잘되고 오랜 기간 기도에 잠복해 있을 수 있음을 부분적으로 설명하고 있다<sup>22-25)</sup>.

RSV 감염시 대표적인 Th1 사이토카인인 IFN- $\gamma$ 가 현저히 올라가고 CD8+ T 세포침윤이 증가한다<sup>25)</sup>. 그러나 RSV가 알레르기 염증반응을 유발할 수 있음은 RSV 재감염모델에서 알 수 있다. 생후 3주 이후에 처음 RSV에 감염된 경우에는 RSV 재감염시 기도과민반응이 억제되지만, 생후 1주내에 RSV에 감염되었다가 6주에 재감염되었을 때 Th2 면역반응이 유도된다고 하였다<sup>13)</sup>. 본 연구에서도 RSV/control CpG ODN군에서는 생후 1주 이내에 RSV에 감염되었다가 6주에 재감염되었을 때 Th2 면역반응이 유도되어 호산구성 염증반응과 더불어 강한 기도과민반응, 그리고 기관지상피세포에서의 배상세포 과형성(goblet cell hyperplasia)이 현저하게 증가됨을 관찰할 수 있었으며, RSV/CpG ODN군에서는 호산구성 염증반응과 기도과민성 및 goblet cell hyperplasia가 억제됨을 관찰할 수 있었다. Kim 등의 보고에 의하면 RSV에 감염된 일부 환자의 기관지 폐포 세척액에서 호산구가 증가함을 알 수 있었고, RSV 특이 IgE가 검출되며, 환자의 증상도 천식과 같은 천명음이 청진되어 Th2 면역반응이 관여한다고 보고하였다<sup>9)</sup>. 본 연구에서도 RSV/control CpG ODN군에서 기관지 폐포 세척액에서 호산구가 증가함을 알 수 있었고 기도과민성이 증가함을 관찰할 수 있었다.

RSV는 10개의 단백질로 구성되어 있으며 각 단백질이 일으키는 면역반응에 차이가 있다<sup>1)</sup>. 이 중 F protein은 Th1 면역반응을 유도하며, G protein은 Th2 사이토카인인 IL-5, IL-13등을 생산하는 것으로 알려져 있다<sup>10-12)</sup>. 지금까지의 연구결과

에 의하면 IL-4, IL-5와 특히 IL-13이 RSV에 의한 알레르기 염증반응을 유발시키는데 관여하는 것으로 알려져 있으며, IFN- $\gamma$ 는 알레르기 염증반응을 억제한다는 보고가 있다<sup>13-17</sup>. RSV 1차 감염과 재감염에 대한 다른 보고에서는 RSV 1차 감염 시에는 Th1 면역반응이 Th2 면역반응에 비해 우세하며 이로 인해 B세포에서 항바이러스 작용의 IgA와 IgG가 생성되어 RSV가 감소하여 치유단계로 넘어간다고 설명하고, RSV 재감염시에는 Th2 면역반응이 Th1 면역반응에 비해 우세하여 IL-4, IL-5, IL-13과 histamine, prostaglandin이 증가하고 호산구가 증가하여 기도에서 호산구성 염증반응이 일어나서 급성세기관지염 증세와 호흡기 천명이 일어난다고 설명하고 있다<sup>26</sup>.

DNA를 adjuvant로 한 연구는 1937년 Freund등에 의해 처음 시작되었고<sup>27</sup>, 최근에는 DNA 백신이 안전하면서도 세포성 면역반응을 유도하고 조절할 수 있다는 사실이 보고되면서 새로운 치료법으로 연구되고 있다<sup>19</sup>. 이러한 DNA 백신의 면역활성은 백신백터에 존재하는 DNA 염기서열인 CpG motif (5'-purine-purine-CG-pyrimidine-pyrimidine-3')에 의해 더욱 강화 되는데 투여 후 수지상 세포와 같은 항원제시세포에서 MHC class II 분자와 CD80 및 CD86의 costimulatory molecule의 발현이 증가되고, 4시간내에 IL-6, IL-12 등을 분비함으로써 Th2 사이토카인인 IL-4, IL-5, IL-13에 의한 염증 반응을 억제하고, NK 세포를 활성화시키며 T세포를 Th1면역반응쪽으로 활성화시킨다. 또한 cytotoxic T 세포 생성과 Th1 사이토카인인 IFN- $\gamma$ 의 분비가 증가되며 B 세포에서는 IgE의 생성이 감소하고 IgM과 IgG2a의 생산이 증가하여 광범위하게 염증반응과 면역 반응 조절에 영향을 준다고 하였다<sup>28</sup>. 본 연구에서도 RSV/CpG ODNs투여군의 IL-13와 IL-5가 RSV/Control ODNs 투여군에 비하여 낮게 측정되었으나, Th1 면역반응에 관여하는 IFN- $\gamma$ 는 RSV/CpG ODNs 투여군이 RSV/Control ODNs 투여군에 비하여 높게 측정되었고 RSV/CpG ODNs 투여군의 IgG2a가 RSV/Control ODNs투여군에 비하여 높게 측정되었다. 또한 RSV/CpG ODNs투여군의 호산구수와 기도과민성이 RSV/Control ODNs 투여군에 비하여 낮게 측정되었으며 이는 CpG ODNs 투여로 Th2 면역을 억제되고 Th1 면역반응이 유도되어 알레르기염증반응과 기도과민성에 영향을 주었을 것



으로 추정된다.

Kline 등의 연구에서는 천식 마우스 모델에서 CpG ODN의 투여는 IFN- $\gamma$ 와 IL-12가 모두 없거나 두가지 중 하나가 없는 경우에서도 기도의 호산구와 기관지 과민반응성이 감소될 수 있다는 것을 알게 되었고, 이들 cytokine이 없는 상태에서는 CpG ODN의 농도가 더욱 많이 필요하다는 것을 보고하였다<sup>29)</sup>. 본 연구에서는 결과를 보이지는 않았지만 CpG ODN의 농도를 0.5  $\mu$ g, 1  $\mu$ g, 2  $\mu$ g 4  $\mu$ g, 10  $\mu$ g으로 투여하여 보았으나 차이를 보이지 않았고 다른 연구에서와 같이 고용량의 투여는 생후 1주 이내에 비강내로 많은 양을 투여해야 하는 어려움 때문에 시행하지 못하였다. 따라서 앞으로 IFN- $\gamma$  knock out mouse를 통한 실험과 고용량 투여에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

CpG ODN의 투여경로와 시기에 따라 염증반응에 영향을 줄 수 있으며, 본 연구에서는 RSV초기 감염후 2일후에 CpG ODN/Control ODN을 비강내로 투여하는 방법을 사용하였다. Broide등이 연구한 실험에서 기관지 폐포 세척액내의 호산구수는 항원 유발전 복강내로 CpG ODN을 투여했을때가 가장 많이 억제되었고 CpG ODN과 항원 유발을 동시에 했을 때는 비강내 투여나 복강내 투여가 비슷한 결과를 보인다고 보고하였다<sup>30)</sup>. 전신적 투여에 비하여 국소적 투여의 경우 전신적인 독성 작용을 줄일 수 있지만 원하는 효과가 감소될 수 있는 단점이 있을 수 있다. CpG ODN 백신 접종은 다른 동물 실험에서 높은 효율성과 특이성, 안정성이 증명되고 있으며, 본 연구를 통해 RSV의 재감염에 의한 기도 염증반응과 기도과민성을 예방할 수 있는 방법으로 CpG ODN이 효과가 있음을 관찰할 수 있었다.

## V. 결론

마우스 모델에서 RSV 재감염은 기도과민성과 기도염증반응을 유도하며 배상세포 과형성(goblet cell hyperplasia)을 유도한다. CpG ODNs의 조기 투여는 폐포세척액내의 IFN- $\gamma$ 와 혈청내의 RSV 특이 IgG2a가 증가하여, RSV 재감염에 의한 기도과민성의 증가, 기도염증반응, 폐포세척액내의 IL-13, IL-5증가 및 기도 상피세포에서 배상세포 과형성(goblet cell hyperplasia)을 막는데 효과가 있었다. 이러한 사실은 RSV 중증 감염 환자에서 CpG ODNs이 새로운 치료법으로 사용될 가능성을 제시하고 있다.

## 참고문헌

1. Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med.* 2001;344:1917-28.
2. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;161:501-7.
3. Schauer U, Hoffjan S, Bittscheidt J, Köchling A, Hemmis S, Bongartz S, et al. RSV bronchiolitis and risk of wheeze and allergic sensitization in the first year of life. *Eur Respir J* 2002;20:1277-83.
4. Schwarze J, Hamelmann E, Bradley KL, Takeda K, Gelfand EW. Respiratory syncytial virus infection results in airway hyperresponsiveness and enhanced airway sensitization to allergen. *J Clin Invest* 1997;100:226-33.
5. Singh AM, Moore PE, Gern JE, Lemanske RF Jr, Hartert TV. Bronchiolitis to asthma: a review and call for studies of gene-virus interactions in asthma causation. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007;175(2):108-19.
6. Schwarze J, Makela MJ, Cieslewicz G, Kakhama A, Lahn M, Ikemura T, Joetham A, Gelfand EW. Transfer of the enhancing effect of respiratory syncytial virus infection on subsequent allergic airway sensitization by T lymphocytes. *J Immunol* 199;163:5729-34.
7. Schwarze J, Cieslewicz G, Joetham A, Ikemura T, Hamelmann E, Gelfand EW. CD8 T cells are essential in the development of respiratory syncytial virus-induced lung eosinophilia and airway hyperresponsiveness. *J Immunol* 1999;162:4207-11.
8. Anderson LJ, Heilman CA. Protective and disease-enhancing immune responses to respiratory syncytial virus. *J Infect Dis.* 1995;171(1):1-7.
9. Kim CK, Kim SW, Park CS, Kim BI, Kang H, Koh YY. Bronchoalveolar lavage cytokine profiles in acute asthma and acute bronchiolitis. *J Allergy*

Clin immunol 2003;112:64-71.

10. Openshaw PJM, Clarke SL, Record FM. Pulmonary eosinophilic response to respiratory syncytial virus infection in mice sensitized to the major surface protein G. *Int Immunol* 1992;4:493-500.

11. Alwan WH, Kozłowska WJ, Openshaw PJ. Distinct types of lung disease caused by functional subsets of antiviral T cells. *J Exp Med*. 1994;179(1):81-9.

12. Johnson TR, Parker RA, Johnson JE, Graham BS. IL-13 is sufficient for respiratory syncytial virus G glycoprotein-induced eosinophilia after respiratory syncytial virus challenge. *J Immunol*. 2003;170(4):2037-45.

13. Park JW, Taube C, Yan ES, Joetham A, Balhorn A, Takeda K, Miyahara N, Dakhama A, Donaldson DD, Gelfand EW. Respiratory syncytial virus-induced airway hyperresponsiveness is independent of IL-13 compared with that induced by allergen. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:1078-87.

14. Schwarze J, Cieslewicz G, Joetham A, Ikemura T, M?el?MJ, Dakhama A, et al. Critical roles for interleukin-4 and interleukin-5 during respiratory syncytial virus infection in the development of airway hyperresponsiveness after airway sensitization. *Am J Respir Crit Care Med* 2000;162:380-6.

15. Schwarze J, Cieslewicz G, Hamelmann E, Joetham A, Schultz LD, Lamers MC, et al. IL-5 and eosinophils are essential for the development of airway hyperresponsiveness following acute respiratory syncytial virus infection. *J Immunol* 1999;162:2997-3004.

16. Castilow EM, Olson MR, Meyerholz DK, Varga SM. Differential role of gamma interferon in inhibiting pulmonary eosinophilia and exacerbating systemic disease in fusion protein-immunized mice undergoing challenge infection with respiratory syncytial virus. *J Virol*. 2008;82(5):2196-207.

17. Johnson TR, Mertz SE, Gitiban N, Hammond S, Legallo R, Durbin RK, Durbin JE. Role for innate IFNs in determining respiratory syncytial virus

immunopathology. *J Immunol.* 2005;174(11):7234-41.

18. Waris ME, Tsou C, Erdman DD, Zaki SR, Anderson LJ. Respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice previously immunized with formalin-inactivated virus induces enhanced pulmonary inflammatory response with a predominant Th2-like cytokine pattern. *J Virol* 1996;70:2852-60.

19. Wohlleben G, Erb KJ. Atopic disorders: a vaccine around the corner? *Trends Immunol.* 2001;22(11):618-26.

20. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet.* 1999;354(9178):541-5.

21. Henderson FW, Collier AM, Clyde WA Jr, Denny FW. Respiratory-syncytial-virus infections, reinfections and immunity. A prospective, longitudinal study in young children. *N Engl J Med.* 1979;300(10):530-4.

22. Chang J, Braciale TJ. Respiratory syncytial virus infection suppresses lung CD8+T cell effector activity and peripheral CD8+T cell memory in the respiratory tract. *Nature Med* 2002;8:54-60.

23. Sheldock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science* 2003;300:337-9.

24. Ku CC, Murakami M, Sakamoto A, Kappler J, Marrack P. Control of homeostasis of CD8+memory T cells by opposing cytokines. *Science* 2000;288:675-8.

25. Ostler T, Davidson W, Ehl S. Virus clearance and immunopathology by CD8+T cells during infection with respiratory syncytial virus are mediated by IFN-gamma. *Eur J Immunol* 2002;32:2117-23.

26. Becker Y. Respiratory syncytial virus(RSV)-induced allergy may be controlled by IL-4 and CX3C fractalkine antagonists and CpG ODN as adjuvant: hypothesis and implications for treatment. *Virus Genes.*

2006;33(2):253-64.

27. Freund J, Casals J, Hosmer EP. Sensitization and antibody formation after injection of tubercule bacilli and paraffin oil. *Proc Soc Exp Biol Med* 1937;37:509-13.

28. Park Y, Lee SW, Sung YC: CpG DNA inhibits dendritic cell apoptosis by upregulating cellular inhibitor of apoptosis proteins through the phosphatidylinositide-3'-OH kinase pathway. *J Immunol* 2002;168:5-8.

29. Kline JN, Krieg AM, Waldschmidt TJ, Ballas ZK, Jain V, Businga TR. CpG oligodeoxynucleotides do not require TH1 cytokines to prevent eosinophilic airway inflammation in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 1999 ;104(6):1258-64.

30. Broide D, Raz E. DNA-Based immunization for asthma. *Int Arch Allergy Immunol.* 1999;118(2-4):453-6.

31. Peng SL, Szabo SJ, Glimcher LH. T-bet regulates IgG class switching and pathogenic autoantibody production. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(8):5545-50.

## Abstract

Effect of Cytosine-phosphate-Guanine Oligodeoxynucleotides (CpG ODNs) on the airway hyperresponsiveness and inflammation of repeated Respiratory syncytial virus(RSV) infection mouse model

Gwang Cheon Jang

*Department of Medicine  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Kyu Earn Kim)

Severe RSV infection in neonate has been reported as a risk factor for development of allergic asthma or early transient wheezing. RSV can induce re-infection by same strain, and re-infection after early RSV infection at neonate can induce eosinophilic inflammation and aggravate airway hyperresponsiveness (AHR) in BALB/C mouse model. We evaluate whether CpG administration at initial RSV infection can prevent the aggravation of AHR and eosinophilic inflammation by re-infection. RSV ( $10^6$  pfu) was infected BALB/C mouse by intranasal administration at age of 3 day and 6 week, respectively. Phosphorothioate CpG (1826s; 2 mcg/mouse) was also administered intranasally after initial RSV infection and post-infection day 2. Repeated RSV infection induced methacholine AHR, eosinophilic inflammation, goblet cell hyperplasia. CpG administration at initial RSV infection attenuated MCh AHR, eosinophilic inflammation and IL-13, IL-5, and IFN- $\gamma$  level in BAL fluid, and goblet cell hyperplasia of respiratory epithelium by repeated RSV infection compared to control ODN. These findings suggest the possibility that CpG can be used for prevention of airway pathology induced by RSV re-infection.

---

**Key Words** : respiratory syncytial virus(RSV), Cytosine-phosphate-Guanine Oligodeoxynucleotides(CpG ODNs), airway hyperresponsiveness, goblet cell hyperplasia