

알레르기 환자에서 TLR9 Ligand인
CpG-ODN 자극에 의한
IFN- α 분비와 TLR9 발현

연세대학교 대학원

의 학 과

한 만 용

**알레르기 환자에서 TLR9 Ligand인 CpG-ODN
자극에 의한 IFN- α 분비와 TLR9 발현**

지도교수 김 규 언

이 논문을 석 사 학위논문으로 제출함

2008 년 12 월

연세대학교 대학원

의 학 과

한 만 용

한 만 용의 석사 학위논문을
인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2008 년 12 월

감사의 글

오랜 대학원 생활을 통하여 많은 공부를 하게 되었습니다. 많은 분들의 따뜻한 관심과 애정 어린 질책 속에 또 다시 한층 성숙해 질 수 있었습니다.

먼저, 연구와 강의로 바쁘신 가운데도 논문이 완성되기까지 인도해 주시고 연구 방향에 대하여 넓은 안목으로 키워주시고 지도해주신 김규언, 최인홍, 황성규 세분의 교수님께 진심으로 감사 드립니다.

지금까지 변함없는 믿음과 사랑으로 저를 응원해주신 사랑하는 부모님과 나의 아내, 두 아들에게 감사의 마음을 전합니다. 저를 지켜 봐주셨던 모든 분들께 부끄럽지 않은 모습으로 최선을 다하겠습니다.

저자 씀

<차례>

국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	5
1. 연구 대상자 선정	5
2. 말초혈액단핵세포 채취와 배양	6
3. PBMC내 수지상세포 분포	6
4. TLR ligand 자극	7
5. 사이토카인 분석	8
6. Real-time RT PCR	8
7. 정량적 역전사 분석	9
8. 통계	9
III. 결과	11
1. 연구대상군의 특징	11
2. CD123 분포 분석	11
3. TLR9 mRNA 표현	12
4. IFN- α 분비	13
IV. 고찰	15
V. 결론	18
참고문헌	19
영문요약	21

그림 차례

Fig. 1. Flow cytometric analysis for plasmacytoid dendrite cells	7
Fig. 2. Interferon- α secretion in PBMCs with stimulation of CpG-ODN 2216	8
Fig. 3. Percentage of plasmacytoid dendritic cells in PBMC from allergic patients	12
Fig. 4. TLR9 expression in PBMCs from allergic patients	13
Fig. 5. Secretion of interferon- α in PBMCs from allergic patients	14

표 차례

Table 1. Clinical characteristics	11
---	----

<국문요약>

**알레르기 환자에서 TLR9 Ligand인 CpG-ODN 자극에 의한
IFN- α 분비와 TLR9 발현**

목적 ; 알레르기 환자는 형질세포양 수지상세포의 기능이 떨어져 Th2 편향된 면역반응이 유도된다는 것을 확인하고자 한다.

대상 ; 연구 동의서를 제출한 19 명의 알레르기 성인환자와 17 명의 건강한 성인을 대상으로 하였다. 알레르기라 함은 과거력상 기관지 천식 또는 알레르기 비염을 의사에게 진단받고, 5 종의 피부시험검사 상에서 한 종류 이상 양성을 보이며, 비강유발검사에서 양성인 환자로 정하였다. 건강한 성인은 이러한 모든 사항에 음성일 때로 하였다.

방법 : 말초혈액단핵세포를 채취하여 Lineage Cocktail (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56)음성, HLA-DR 양성이면서 CD123 양성을 유세포 분석기로 분석하였다. 말초혈액단핵세포에 TLR9 작용제(agonists)인 CpG ODN 2216 과 음성 대조를 위해 ODN 2206 으로 자극한 후 24 시간 상청액을 추출하여 IFN- α 를 측정하였다. 또한 real-time RT PCR 을 시행하여 TLR9 mRNA 정량분석을 시행하였다.

결과 ; 형질세포양 수지상세포의 분포는 말초혈액단핵세포에서 알레르기 환자는 평균 $0.1 \pm 0.04\%$ 대조군에서는 평균 $0.25 \pm 0.23\%$ 이었다. TLR9

mRNA 상대적인 양을 나타내는 $\Delta\Delta Ct$ 는 알레르기 환자에서 1.29 ± 0.41 이었고 대조군은 1.25 ± 0.23 이었다. TLR9 리간드인 CpG-ODN 2216 자극에 따른 IFN- α 의 분비능은 알레르기 환자에서 911 ± 829 pg/mL 이었고 대조군에서 $1,095 \pm 888$ pg/mL 이었다. 이 세 결과에서 통계적인 차이는 발견할 수 없었다.

결론 ; TLR9 을 통한 신호전달이 알레르기 환자의 면역반응을 대표하지 않는 것으로 보이며, 이는 수지상 세포를 분리하여 확인할 필요가 있다.

핵심되는 말 : 알레르기, toll like 수용체 9, 형질세포양 수지상세포, 인터페론-알파

알레르기 환자에서 TLR9 Ligand인 CpG-ODN 자극에 의한

IFN- α 분비와 TLR9 발현

<지도교수 김 규 언>

연세대학교 대학원 의학과

한 만 용

I. 서론

알레르기가 T helper 2 (Th2) 반응에 의해 유도된다는 사실이 알려진 후 Th1/Th2 조절 기전 중 무엇이 Th2 분화를 유도하는가에 대한 의문점은 항상 있어왔다. 초기에는 IL-4와 같은 미세환경을 조절하는 사이토카인의 되먹임 기전에 의한 것이라 설명되었으나¹ 1990년대 말부터 이런 미세환경을 조절하는 변수로서 조절 T세포(Treg ; regulatory T cell)와 수지상세포(DC ; Dendritic cell)가 주목을 받게 되었다. 과거 5년간 이러한 복잡한 면역반응에 대한 이해의 폭이 상당히 넓어졌다.

병원체나 알레르겐과 같은 다양한 외부 자극이 체내에 들어오면 1차적으로 내재면역반응(innate immune reaction)이 일어난다. 모든 개체에 존재하는 이 내재면역반응은 과립구, 대식세포와 수지상세포가 관장하며

병원체와 싸우는데 있어 미리 기억할 필요없이 바로 동원될 수 있기 때문에 초기 병원체의 공격에 대한 방어작용과 더불어 적응면역계에 병원체 침입을 알리는 신호전달작용을 하게 된다. 내재면역반응에서 적응면역계로의 신호전달 과정은 식물을 비롯한 모든 생명체가 갖고있는 고전적인 신호전달 경로인 Toll 경로로 이루어지며, 이와 비슷한 역할을 하는 Toll like receptors (TLRs)가 마우스와 인간에서 확인되었다².

TLR 중에서 골수계 수지상세포(mDC ; myeloid dendritic cell)에 존재하는 TLR4는 naive T세포를 Th1으로 분화되도록 유도하고, 이와달리 형질세포양 수지상세포(pDC ; plasmacytoid dendritic cell)는 Th2로 분화유도시킨 연구는 많이 알려져 있다³. 이중 TLR9은 IFN- α 를 분비하여 TLR4와 더불어 천식 유병률과의 관련성이 가장 많이 제기된 수용체임에도 아직 연구된 것이 한정되어 있다⁴.

본 연구는 pDC에 발현되어 있는 TLR9를 자극하였을 때 정상인과 달리 알레르기 환자에서 Th1 사이토카인 IFN- α 의 분비 결함이 있음을 확인하고자 하는 것이다. 이를통해 최근 알레르기 증가의 원인이 미생물이나 내독소의 자극의 결핍에 의한 것임을 지지하고자 함을 목적으로 한다.

II. 재료 및 방법

1. 연구 대상자 선정

연구 동의서를 제출한 20세에서 40세의 성인 36명을 대상으로 연구를 진행하였다. 모든 연구대상군은 피부단자시험을 시행하였다. 알레르겐은 *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der f), *Dermatophagoides farinae* (Der f), Cat, Dog과 Cockroach (Allergopharma, Hamburg, Germany) 5종을 시행하였다. 매 검사경우마다 양성 대조액으로 히스타민 1 mg/mL를 사용하였고 음성 대조액으로 생리식염수를 사용하였으며, 알레르겐 팽진의 크기가 3 mm 이상일 때를 양성으로 판정하였다. 비강 유발검사는 피부시험검사에서 양성인 대상군에서 시행하였다. 알레르겐 추출액(single-dose pump spray, Allergopharma, Germany)을 사용하여 대조용액인 생리식염수와 15분의 간격을 두고 양쪽 비강에 0.04 - 0.05 ml 분무하였다. 알레르겐 분무 후 15분간 발생한 재채기 횟수(0-2= 0점, 3-4=1점, 5회 이상=3점), 소양증(코, 구개, 귀 각각 1점씩), 콧물(0-3점), 코막힘(1-3점), 안와증상(1점)을 점수화하고 5점 이상인 경우 양성으로 판정하였다.

문진에서 의사에 의해 기관지 천식이나 알레르기 비염 진단받은 과거력이 있으면서 피부시험검사에서 한 종류 이상 알레르겐에 양성소견을 보이고 그 알레르겐 비강유발검사에서도 양성소견을 보일 때 알레르기 환자로 정의하고 연구군으로 하였다. 대조군은 건강한 성인으로 과거력에서 특이 소견이 없고 5종류로 시행한 알레르기 피부시험에 음성인 경우로 하였다. 두 군 모두 최근 한 달 이내에 급성 질환력이나 알레르기 이외의 만성 질환이 없었으며, 본 연구는 의학연구

윤리심의위원회를 통과한 후 서면으로 동의서를 받은 후 검체를 얻었다.

2. 말초혈액단핵세포 채취와 배양

채취한 혈액을 24시간 내에 Ficoll-paque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)로 말초혈액단핵세포(peripheral blood mononuclear cell, PBMC)를 분리하였다. 이를 간단히 기술하면, 전혈을 Phosphate buffered saline (Gibco, Cergy Pontoises, France)로 1:1로 희석시킨 후 같은 용량의 Ficoll을 이용하여 900 g 25분간 20도에서 원심분리하였다. 혈소판을 제거하기 위하여 PBS를 넣고 300 g 15분간 원심분리한 후 이를 1회 반복하였다. 이후 분리한 PBMC를 -180도 질소탱크에 보관하였다. 이후 저장된 PBMC를 녹인 후에 연구를 진행하였다.

3. PBMC내 수지상세포 분포

형질세포양 수지상세포 분포를 확인하기 위해 CD123을 확인하였고, 이는 상업회사(BD Biosciences Pharmingen, San Diego, Ca, USA)에서 제공하는 프로토콜에 따라 세포분포를 확인하였다. 이를 짧게 기술하면, 채취한 1×10^5 PBMC에 Lin 1 FITC, CD123 PE, HLA-DR PerCP, CD11c APC를 넣고 20분간 배양한 후 fixation buffer로 고정시킨 후 유세포분석기(Becton Dickinson, Mountain View, NJ, USA)를 통해 분석하였다. 각각 isotype의 대조군을 만들었다^{5,6}(Fig. 1).

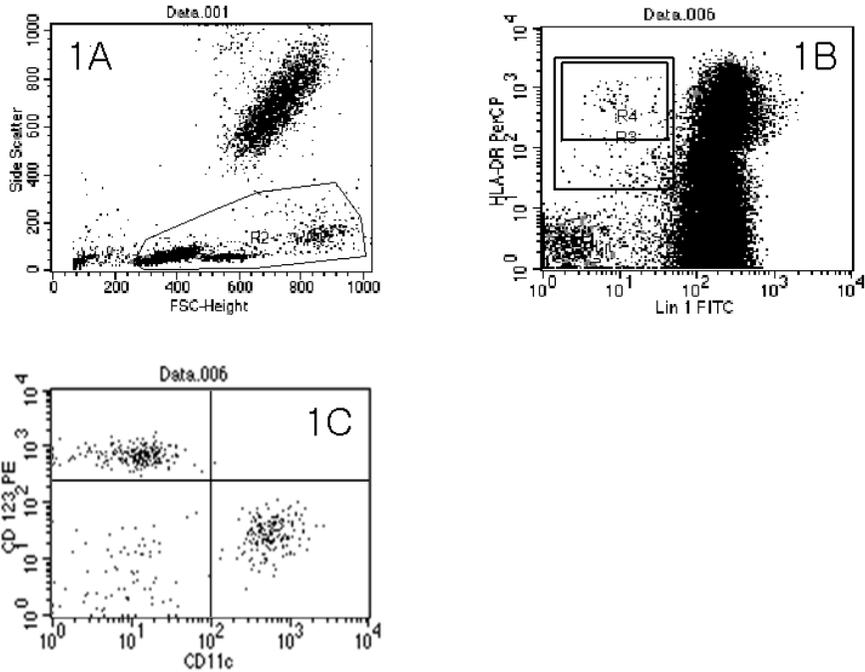


Fig. 1. Flow cytometric analysis for plasmacytoid dendrite cells. A, lymphocyte gate of R2. B, Lineage negative, HLA-DR positive gate of R4. C, Plasmacytoid dendritic cells are gated base on CD123+ population. A and B representative case was shown.

4. TLR 리간드 자극

TLR9 리간드인 ODN 2216 (5'-ggG GGA CGA TCG TCg ggg gg-3')와 이의 non-CpG variant인 ODN 2206 (5'-ggG GGA GCA TGC TGg ggg gc-3') {대문자는 phophodieters, 소문자는 nuclease-resistant phosphothioates} (Bioneer, Seoul, Korea)을 구입하였다.

먼저 CpG - ODN 2206으로 자극하는 것을 음성대조액으로, NF- κ B 자극제인 Phytohemagglutinin 2 μ g/ml 자극을 양성 대조액으로 사용하였다. 각 well 당 2×10^5 PBMC를 넣고 이에 TLR9 리간드로 자극을

준 후 37°C 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 모든 자극은 duplicate로 하였다. 각 자극 농도는 CpG-ODN 2216은 0.5, 5, 50, 100 µg/ml로 titration 하였고, 이후 50 µg/ml 농도에서 두 군간의 분비능을 확인하였다(Fig. 2).

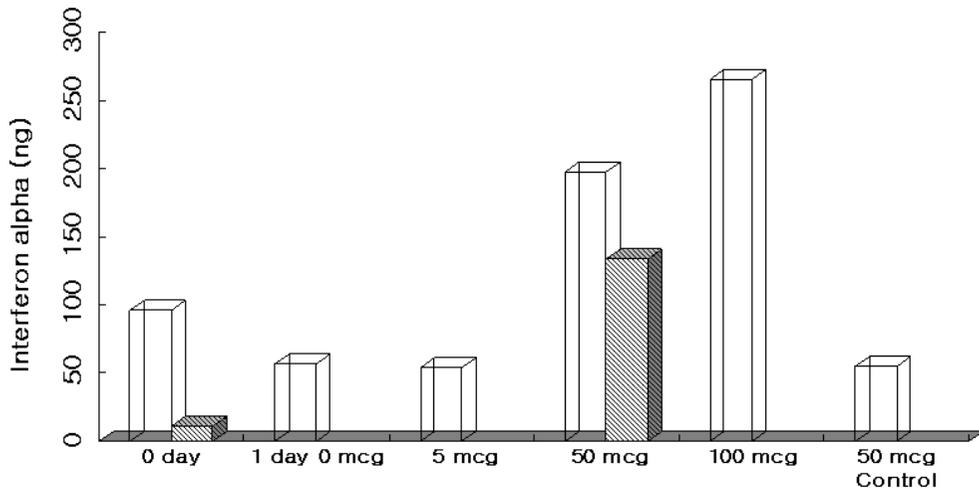


Fig. 2. Interferon- α secretion in PBMCs with stimulation of CpG-ODN 2216. PBMCs were stimulated by CPG-ODN 2216 for 24 hrs. Interferon- α in culture supernatants was analysed by ELISA.

5. 사이토카인 분석

24시간동안 배양한 상청액을 -20도 냉장고에 보관하였다가 ELISA kit (R &D System, Minneapolis, MN, USA)를 활용하여 IFN- α 분석을 한다. 검사 kit의 민감도는 10 pg/mL 이었다

6. Real-time RT PCR

Total RNA를 3 - 10 X 10⁵ PBMC에서 Qiagen Rneasy Mini 키트를 사용하여 추출하였다. 이후 cDNA을 Qiagen QuantiTect Reverse Transcription 키트를 사용하여 상업회사에서 제시한 프로토콜에 따라 만들었다. Real-time RT PCT을 위해 TLR9 특이 primer와 FAM-labeled probe를 구입하였다. Forward primer는 5'-GGACCTCTGGTACTGCTTCCA-3' 이며, Reverse primer는 5'-AAGCTCGTTGTACACCCAGTCT-3' 이며, probe는 5'-FAM-CTGCAGGTGCTAGACCTGTCCCGC-TAMRA-3' 로 하였다. Internal 대조 유전자로는 hypoxanthin phosphoribosyltransferase (HPRT)의 forward primer 5'-CGGCCGGCTCCGTTA-3' 으로, reverse primer 5'-TTAGGTATGCAAATAAATCAAGGTCAT-3' 으로, probe는 5'-FAM-CCGCAGCCCTGGCGTCGT-TAMRA-3' 로 하여 표준화를 하였다.

7. 정량적 역전사 분석

증폭시킨 후 같은 역치의 서로 다른 실험결과에서 Ct 값을 유도하여 분석하였다. 즉, 각 샘플에서 평균 Ct 값을 대응하는 Ct 값으로 ΔCt ($Ct_{\text{experimental gene}} - Ct_{\text{control gene}}$) 계산해 내었다. TLR9 리간드인 CpG-ODN 2216 자극에 대한 반응과 non-CpG variant인 ODN 2206 자극의 반응도의 유전자 발현의 차이를 알아보기 위해서 각 자극제의 차이값을 $\Delta\Delta Ct$ 로 계산해내었는데 이는 두 군간의 mRNA 정도를 비율로 보여준 것이다.

8. 통계

결과치의 통계처리는 SPSS 10.0 version 을 이용하였고 대상군의

특성비교 중 성별은 Fisher's exact test를 시행하였고, 대상군의 나이와 같은 평균치의 비교값인 CD 123분포, IFN- α 분비량과 TLR9 mRNA 상대적인 양은 Mann-Whitney 검정을 시행하였다. *P* 값이 5% 이하를 유의 수준으로 검증하였다.

III. 결과

1. 연구 대상군의 특징

기관지 천식, 알레르기 비염을 비롯한 알레르기 질환력과 5 종류의 알레르기 피부시험, 비강유발 검사에서 양성소견을 보인 연구 대상군의 평균 연령은 31 ± 3.4 (남/녀 = 9/10) 이었다. 문진에서 알레르기력이 없으면서 피부시험 검사에서 음성 소견을 보인 대조군의 평균 연령은 28 ± 3.5 (남/녀 = 9/8) 이었다. 두 군간의 통계적인 성별, 연령별 차이는 보이지 않았다(Table 1).

Table 1. Clinical characteristics

	Control (n=17)	Allergy (n=19)	P value
Age	28 ± 3.5	31 ± 3.4	N.S.
Sex (Male)	9	9	N.S.
Skin test (Positive)	0	19	0.000
Nasal provocation test	0	19	0.000

N.S, not significant; Skin test, any positive results from skin prick test of five allergen; Nasal provocation test, five point above in challenge test.

2. CD123 분포 분석

형질세포양 수지상세포는 CD123로 염색하여 두 군간의 비교하였다. 대조군에서 평균 $0.25 \pm 0.23\%$ 확인되었고 연구군에서는 $0.1 \pm 0.04\%$ 였다. 두 군간의 통계학적인 차이는 확인할 수 없었다(Fig. 3).

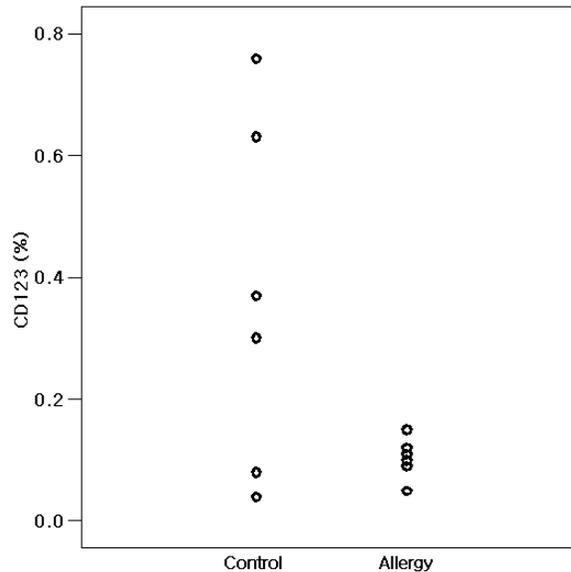


Fig. 3. Percentage of plasmacytoid dendritic cells in PBMC from allergic patients. After preparation of PBMCs that are negative for lineage cocktail (CD3+, CD14+, CD16+, CD19+, CD20+, CD56+), cell were stained with HLA-DR positive and CD123 marker of pDC. Control group (n = 6) and patient group (n = 6) were analysed.

3. TLR9 mRNA 표현

PBMC에서 TLR9의 mRNA 정량적인 분석에서 대조군과 연구군의 차이를 확인할 수 없었다. 대조군과 연구군의 PBMC에 TLR9 리간드인 CpG-ODN 2216을, 음성 자극제로 CpG - ODN 2206을 투여한 후 1시간, 4시간, 12시간과 24시간 mRNA 양을 분석한 예비연구에서 24시간이 가장 큰 차이를 보여서 24시간 mRNA를 비교하였다. CpG-ODN 2206으로 자극한 평균 ΔCt 값은 -1.9 ± 0.53 이었고 TLR9 리간드로 자극한 후의 ΔCt 값은 -2.26 ± 0.49 였다(Fig. 4A). 이해보아 음성 대조액과 비교하여 CpG-

ODN 2216의 자극에 대해서 TLR9 mRNA 표현이 증가된 것을 확인할 수 있었으나(ΔCt) 알레르기 환자의 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 값은 1.29 ± 0.41 과 대조군에서는 1.25 ± 0.23 으로 두 군간의 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 값은 통계적인 차이를 확인할 수 없었다(Fig. 4B).

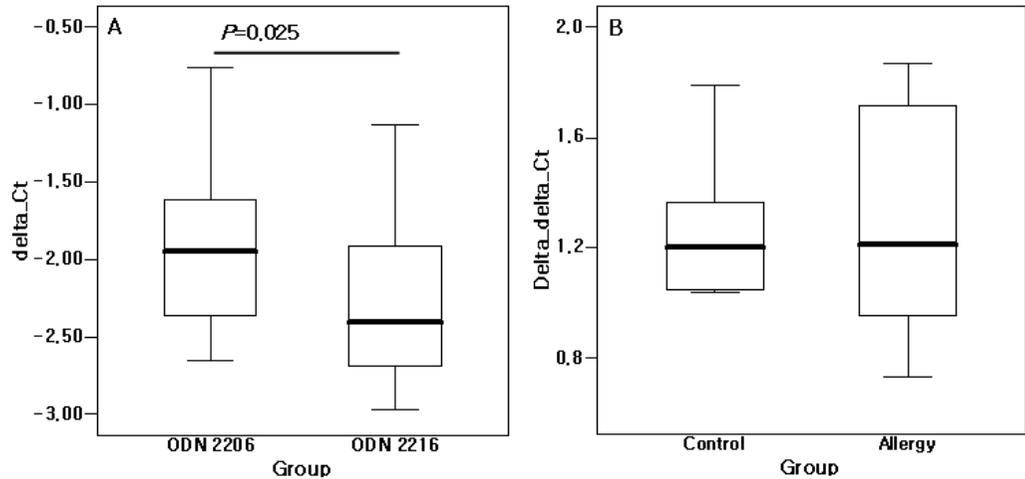


Fig. 4. TLR9 expression in PBMCs from allergic patients. Specific TLR9 mRNA amounts of stimulated with ODN 2206 in mononuclear cells from control (n = 12) and allergic patients (n = 12) were analysed by real time PCR. Each value represents mean \pm SD.

4. IFN- α 분비능

TLR9 ligand인 CpG-ODN 2216 50 ug/ml 농도로 PBMC를 자극 24시간 후 IFN- α 를 측정하였다. 대조군에서 CpG-ODN 2206과 TLR9 ligand 자극에서는 유의할 만한 분비능의 차이가 있었고 이는 연구군에서도 동일하였다. 그러나 대조군과 알레르기 환자를 비교하였을 때 대조군에서는 $1,095 \pm 888$ pg/mL의 분비가 있었고 알레르기 환자에서는

911 ± 829 pg/mL로 통계적인 차이를 확인할 수 없었다(Fig. 5).

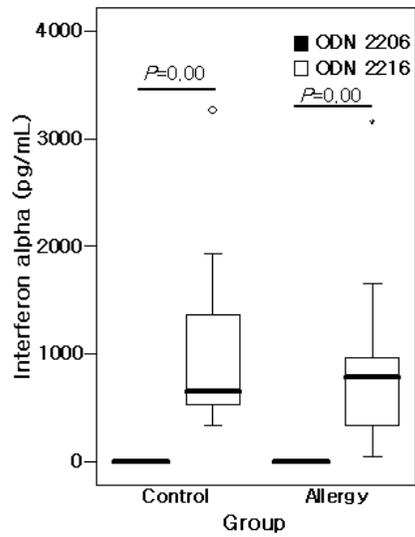


Fig. 5. Secretion of interferon- α in PBMCs from allergic patients. PBMCs were stimulated by CPG-ODN 2216 (TLR ligand) or CPG-ODN 2206 (negative control). After 24 hrs, Supernatant were harvested and analysed by ELISA. Allergic patients (n = 19) and control group (n = 17) were analysed.

IV. 고찰

최근 정상인과 알레르기 환자들에서 TLR 자극에 의한 반응에 차이가 많다는 보고가 늘고 있다. 가장 대표적인 것으로는 LPS에 대한 TLR4의 반응이다. 1980년대 후반까지 LPS 를 인식하는 수용체가 무엇인지 알려지지 않다가 Lipopolysaccharid binding protein (LBP)와 CD14 의 존재가 알려지고 이후 1990년대 TLR 가 알려지면서 새로운 사실들이 드러나기 시작하였다. 또한 세포내 신호전달 과정도 많은 부분이 알려졌다⁷. LPS는 TLR4로 인식되어 MyD88 의존형 기전과 MyD88 비의존형 기전으로 신호전달되며, 이에 관계되는 신호전달 물질로는 IRAK4, TRAF6, TAK1과 IRF5 등이 있으며 이러한 신호전달 물질을 통해 최종적으로 NF- κ B을 활성화시켜 IL-12가 분비된다⁸. 이러한 과정을 통해 LPS는 최종적으로 IL-12를 분비하게 된다. 알레르기 환자에서는 이러한 과정 중 어느 부분이 억제되거나 활성화되어 정상인과 달리 IL-12나 IL-10의 분비가 적은 것으로 알려져 있다⁹. 한 연구자¹⁰는 고전적으로 TLR4를 통해서 신호전달하는 것으로 알려진 LPS로 자극을 주었을 때 알레르기 환자는 IL-12과 IL-10의 분비가 정상 성인에 비해 감소한 것을 보고하였다. 이러한 차이점이 TLR4의 다형성에 기인한다는 보고도 있다¹¹.

알레르기 환자와 정상인에서 외부 항원을 받아들이는 통로인 TLR4의 차이점을 확대한다면, TLR4 만이 아니라 다른 TLR 또한 알레르기 기전에 관여할 것으로 추정할 수 있다. 형질세포양 수지상세포에 존재하는 TLR9을 통해 IFN- α 의 분비 신호전달은 TLR4와 마찬가지로 MyD88을

통하는 것으로 알려져 있다. 이러한 공통된 신호전달 과정은 TLR4의 문제가 TLR9의 결함과 동일하거나 비슷할 수도 있음을 암시한다.

본 연구에서는 알레르기 환자에서 형질세포양 수지상세포에서 분비되는 IFN- α 의 분비능이 정상인보다 떨어져 있을 것이라 가정하였고 그것은 TLR9의 mRNA 전사 양이나 pDC의 분포 숫자에 기인할 것이라 추정하고 연구를 진행하였다.

이와 관련되어 본 연구에서는 알레르기 환자와 대조군을 비교하였을 때 IFN- α 의 분비에 차이가 없었다. 이러한 차이는 건강한 성인에서 IgE 차이에 따른 TLR9 자극과 반응에 차이가 없고 TLR9 다형성에서도 의미있는 차이를 발견하지 못한 기존의 보고¹²와 일치되는 소견이다. 앞서의 연구 결과들은 건강한 성인을 대상으로 특정한 알레르겐에 반응이 생긴 군을 연구군으로 하였기에 본 연구결과와 다를 수 있을 것이라 예측하였지만 동일한 결과를 얻었다.

이러한 차이는 근본적으로 알레르기 질환이 Th2에 의한 단순한 도식도에 의한 것이 아님을 나타내는 자료일 수 있다. 아토피피부염을 앓고 있는 환자의 형질세포양 수지상세포에는 많은 Fc ϵ RI가 있고 Fc ϵ RI를 활성화시킨 수지상세포에서 IL-12 분비를 유도할 수 있다는 보고¹³는 이를 대변하는 듯 하다. 또한 알레르기 질환에서 TLR4과 달리 TLR9은 질병 경과에 크게 영향을 주지 않는 면역 기전일 수도 있다. 그러나 최근에 본 연구와 비슷한 연구 디자인으로 다른 연구결과를 보고된 결과가 있다¹⁴. 이 보고에 따르면 알레르기 환자와 대조군에서 형질세포양 수지상세포의 분포와 TLR9 분비도 차이가 없었고 이는 본

연구결과와 일치한다. 그러나 이들은 IFN- α 분비가 알레르기 환자에서 대조군에 비해 떨어져 있음을 확인하였다. 이러한 차이는 본 연구가 PBMC에 직접 CpG-ODN을 자극 주었지만 이들은 형질세포양 수지상세포를 분리하였기에 IFN- α 의 분비가 특정 세포에서만 확인할 수 있도록 한 차이점에 기인한 것으로 여겨진다. 비록 IFN- α 분비의 많은 부분이 pDC에서 분비되지만¹⁵ 자극을 받았을 때의 차이점이 완전히 이해된 것이 아니기에 이러한 결과가 차이가 나지 않았나 싶다.

결론적으로, 알레르기 환자는 근본적으로 외부항원을 받아들일 때 TLR9를 통해서 얻어지는 Th1 반응이 억제되어 알레르겐에 의한 Th2 반응이 유도 될 것이라고 추론하였다. 그러나 TLR9 자극에 대한 정상인과 알레르기 환자의 반응 차이점이 IFN- α 에서 확인하지 못하였고 pDC의 분포 TLR9 mRNA 정량분석에서도 차이점을 확인하지 못하였다. 이는 TLR9이 알레르기 반응에서 중요한 역할을 수행하지 않는 것일 수도 있지만 pDC 자체를 자극하지 않은 PBMC 만으로의 연구 결과이기에 제한된 결과만을 얻었다고 할 수 있다.

V. 결론

알레르기 환자의 말초혈액단핵세포에서 형질세포양 수지상세포의 분포, TLR9 mRNA 정량과 IFN- α 분비가 차이가 없었다. 이로부터 알레르기 면역반응이 TLR9을 통한 신호전달로 대표하지 않는 것으로 보이며, 수지상 세포를 분리하여 이를 확인하는 연구가 필요하다.

참고문헌

1. Umetsu DT, DeKruyff RH. TH1 and TH2 CD4+ cells in human allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 100:1-6.
2. Cook DN, Pisetsky DS, Schwartz DA. Toll-like receptors in the pathogenesis of human disease. *Nat Immunol* 2004; 5:975-9.
3. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; 283:1183-6.
4. Lazarus R, Klimecki WT, Raby BA, Vercelli D, Palmer LJ, Kwiatkowski DJ, et al. Single-nucleotide polymorphisms in the Toll-like receptor 9 gene (TLR9): frequencies, pairwise linkage disequilibrium, and haplotypes in three U.S. ethnic groups and exploratory case-control disease association studies. *Genomics* 2003; 81:85-91.
5. Kim HY, Han MY, Seo JY, Jo HJ, Kim NK, Oh DY, et al. IL-12 production in lipopolysaccharide and dermatophagoides pteronyssinus copulsed monocyte derived dendritic cell. *J Asthma Allergy Clin Immuno (Korea)* 2006; 26:1-6.
6. Deering RP, Orange JS. Development of a Clinical Assay To Evaluate Toll-Like Receptor Function. *Clin Vac Immunol* 2006; 13:68-76.
7. Triantafilou M, Triantafilou K. The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J Endotoxin Res* 2005; 11:5-11.
8. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptor function and signaling. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117:979-87.
9. Yang IA, Fong KM, Holgate ST, Holloway JW. The role of Toll-like receptors and related receptors of the innate immune system in asthma. *Curr*

- Opin Allergy Clin Immunol 2006; 6:23-8.
10. Reider N, Reider D, Ebner S, Holzmann S, Herold M, Fritsch P, et al. Dendritic cells contribute to the development of atopy by an insufficiency in IL-12 production. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109:89-95.
 11. Fageras Bottcher M, Hmani-Aifa M, Lindstrom A, Jenmalm MC, Mai XM, Nilsson L, et al. A TLR4 polymorphism is associated with asthma and reduced lipopolysaccharide-induced interleukin-12(p70) responses in Swedish children. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:561-7.
 12. Berghofer B, Frommer T, Konig IR, Ziegler A, Chakraborty T, Bein G, et al. Common human Toll-like receptor 9 polymorphisms and haplotypes: association with atopy and functional relevance. *Clin Exp Allergy* 2005; 35:1147-54.
 13. Novak N, Allam JP, Hagemann T, Jenneck C, Laffer S, Valenta R, et al. Characterization of FcepsilonRI-bearing CD123 blood dendritic cell antigen-2 plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114:364-70.
 14. Tversky JR, Le TV, Bieneman AP, Chichester KL, Hamilton RG, Schroeder JT. Human blood dendritic cells from allergic subjects have impaired capacity to produce interferon-alpha via Toll-like receptor 9. *Clin Exp Allergy* 2008; 38:781-8.
 15. Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S. Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 years of convergent history. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008; 19:3-19.

Abstract

Toll-like receptor 9 expression and interferon- α secretion upon
CpG-ODN stimulation in allergic subjects

Man Yong Han

Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Kyu-Earn Kim)

Objectives: The aim of the study was to determine whether the failure of plasmacytoid dendritic cell (pDC) to responds to antigen induces Th2 immune deviation.

Subjects: In this study, 19 allergic subjects and 17 healthy volunteers were subjected to skin and nasal provocation tests. Allergy was defined as reporting ever having had asthma or allergic rhinitis, confirmed by a physician and a positive skin-prick test to mites, cats, dogs or cockroaches, and a positive nasal provocation test using sensitized allergen.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected from subjects and analyzed for the Lineage Cocktail (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) (-), HLA-DR (+), and CD123 (+) using flow cytometry [fluorescence-activated cell sorting (FACS)]. In addition, we analyzed Toll-like receptor 9 mRNA by reverse-transcriptase polymerase chain reaction. Moreover, the ability of PBMCs to produce IFN- α following stimulation with the TLR9 ligand CpG-ODN 2216 was evaluated in the subjects.

Results: FACS analyses of CD123 (+) revealed a nearly similar distribution for the classical pDC markers in patients ($0.1 \pm 0.04\%$) and in controls ($0.25 \pm 0.23\%$). The mRNA levels of TLR9 on PBMCs were not different in allergic patients (1.29 ± 0.41) and in controls (1.25 ± 0.23). Similarly, IFN- α production in PBMCs exposed to stimuli of the TLR9 ligand CpG-ODN 2216 was not significantly different between patients (911 ± 829 pg/mL) and controls ($1,095 \pm 888$ pg/mL).

Conclusion: These results suggest that TLR9-dependent immune responses in human pDCs are not associated with allergic status.

Key Words : allergy, toll-like receptor 9, plasmacytoid dendritic cell, interferon-alpha.