

한국인에서 Chemokine 수용체 (CCR5) promoter 유전자 다형성과 B형간염 바이러스 감염 후 임상 경과와의 상관성

연세대학교 의과대학 내과학교실¹, 미생물학교실², 소화기병 연구소³,
Brain Korea 21 의과학 사업단⁴, (주) GeneMatrix 중앙연구소⁵

3,4. 1,3. 1. 2. 1,3. 5. 5
5. 5. 1,3,4

Abstract

Association between CCR5 Promoter Polymorphisms and Hepatitis B Virus Infection

Hye-Young Chang^{3,4}, Sang Hoon Ahn^{1,3}, Do Young Kim¹, Jeon-Soo Shin², Yong-Soo Kim^{1,3},
Sun Pyo Hong⁵, Hyun Jae Chung⁵, Soo-Ok Kim⁵, Wang Don Yoo⁵, and Kwang-Hyub Han^{1,3,4}

*Dept. of Internal Medicine¹, Dept. of Microbiology², Institute of Gastroenterology³,
Brain Korea 21 Project for Medical Science⁴, Yonsei University College of Medicine, GeneMatrix Inc.⁵ Seoul, Korea*

Background/Aims: Immunogenetic factors may play a role in determining the susceptibility of an individual to viral infection. CCR5 promoter polymorphisms are known to be associated with HIV infection. However, there has been no report on the association between CCR5 promoter polymorphism and HBV infection. Therefore, we investigated the relationship between the CCR5 promoter polymorphism and HBV infection. **Methods:** A total of 377 patients were classified into two groups according to their HBV infection status: ① the spontaneous clearance group (SC); HBsAg (-), anti-HBc (+), anti-HBs (+) ② the chronic HBsAg (+) carrier group (CC); HBsAg (+), anti-HBc (+), anti-HBs (-). CCR5 polymorphisms were detected by employing matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)-based SNP scoring assay, termed Restriction Fragment Mass Polymorphism (RFMP), which exploits the differences in molecular masses between the common allele and rare allele bases of interest. **Results:** We found that the genotype frequencies of CCR5 A59029G significantly differed between the SC group (n=138) and CC group (n=239) ($P<0.05$). The CCR5 59029A allelic genotype was associated with an increased risks of chronic infection rather than spontaneous clearance ($P=0.002$), and the presence of the CCR5 59029G allele was significantly associated with the spontaneous clearance of HBV ($P=0.001$). Strong linkage disequilibrium between the CCR5-59029 and the CCR5-59353 polymorphic variants was identified. None of the 377 subjects had the CCR5-32 bp deletion mutation. **Conclusions:** The CCR5 promoter polymorphisms at position 59029 might play a role in the clearance of HBV infection. This primary experimental evidence needs further studies to clarify the clinical usefulness of CCR5 promoter polymorphisms as a target for the screening or treatment of HBV infection. (**Korean J Hepatol 2005;11:116-124**)

Key Words: Chemokine receptor 5, Hepatitis B virus, Genetic polymorphism

◇ 접수 2004년 10월 22일; 수정본 접수 2005년 3월 3일; 승인 2005년 3월 29일

◇ Abbreviations: CC, chronic HBsAg(+) carrier group; CCR5, CC chemokine receptor 5; HBV, hepatitis B virus; HIV, human immunodeficiency virus; IL-10, Interlukin-10; MALDI-TOF MS, Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry; MHC, major histocompatibility complex; MIP-1a, monocyte inflammatory protein 1a; MIP-1β, monocyte inflammatory protein 1β; ORF, open reading frame; PCR, polymerase chain reaction; RANTES, regulated upon activation, normal T cells expressed and secreted; RFMP, restriction fragment mass polymorphism; SC, spontaneous clearance group; SNP, single nucleotide polymorphism; TNF-α, tumor necrosis factor α; UE, Unexposed group

◇ 책임저자 : 한광협, 서울시 서대문구 신촌동 134번지 연세대학교 의과대학 내과학교실 (우) 120-752
Phone: 02) 2228-1949; Fax: 02) 312-7833; E-mail: gihankhys@yumc.yonsei.ac.kr

※ 본 연구는 보건복지부에서 시행한 2004년도 보건의료기술 연구개발사업의 지원(03-PJ10-PG13-GD01-0002)과 일부는 암정복추진 연구개발사업(0320250-2) 및 연세대학교 학술연구비(6-2004-0024)의 지원으로 이루어진 것임.

B형간염 바이러스(HBV)는 급만성 간염뿐만 아니라 간경변증과 간암 등의 만성 간질환을 유발하는 비세포병변성(non-cytopathic) DNA 바이러스로 전세계 인구의 약 5%가 감염되어 있으며 우리나라에는 5-8%의 유병률을 보고하고 있다.^{1,2} HBV의 감염 후 임상 경과는 다양하여 바이러스의 효과적인 제거가 일어날 수도 있고, 만성화나 전격성 간염으로의 이행이 일어날 수도 있다. 이것은 바이러스 인자뿐만 아니라 숙주의 면역반응이 중요하게 작용하기 때문이다.³⁻⁵

HBV의 제거에는 CD8⁺ T 림프구의 역할이 중요하며 특히 사이토카인(cytokine)의 합성 및 분비는 바이러스에 감염된 간세포의 사멸화 등을 통해서 바이러스 증식 억제를 조절하고 숙주의 전반적 면역반응을 조절하는 데 중요한 역할을 한다.⁶⁻¹¹ 이들 림프구가 면역반응을 수행하기 위해서는 감염 부위로의 적절한 이동이 필요하며, 이 세포들의 이동은 감염 부위에서 합성, 분비되는 다양한 케모카인(chemokine)과 이를 인지하는 림프구에 발현하는 케모카인 수용체(chemokine receptor)에 의해서 결정된다고 알려져 있다.¹² 케모카인은 크기가 약 8-10 kD인 구조적으로 상동적인 사이토카인의 대집단을 구성하며, 염증 부위로 백혈구의 이동 및 방향성 운동(chemotaxis)을 자극하는 능력을 갖고 있다. 화학적 구조에 따라 C-C와 C-X-C family로 나뉘는데, C-X-C 집단은 주로 조직세포와 거핵세포(megakaryocyte) 그리고 활성화된 단핵구에 의해 생성되며 급성 염증반응의 매개자로서의 역할을 하며 인터루킨-8(IL-8)과 특이적으로 결합하여 활성화된다. C-C 집단은 주로 활성화된 T 림프구에 의해 분비되고 T 림프구, 단핵구, 호산구, 호염구 등에 작용한다. 케모카인은 이를 인지하는 림프구 표면에 발현되는 chemokine 수용체와 결합하여 바이러스 감염 시 Th1과 Th2 세포의 면역반응을 조절하게 된다.¹³

케모카인 수용체 중 하나인 CCR5 (CC chemokine receptor 5)는 바이러스 감염 후 생성되

는 케모카인인 RANTES (regulated upon activation, normal T cells expressed and secreted)나 MIP-1 α (monocyte inflammatory protein 1 α), MIP-1 β (monocyte inflammatory protein 1 β)에 의해 매개된다. 특히 CCR5는 T 림프구, 대식세포, 단핵구 등의 표면에 발현하여 면역반응을 조절하며 사람 면역결핍 바이러스(Human Immunodeficiency Virus, HIV) 감염 시에는 공조수용체(coreceptor)의 역할을 통해 바이러스의 세포 내 진입과 병인에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.¹⁴ CCR5 promoter 부위에서 발생하는 유전적 다형성 중 하나인 CCR5의 32 염기쌍 결손(이하 CCR5- Δ 32)의 동형접합체(homozygote)는 세포표면에 CCR5의 발현을 감소시킴으로써 HIV 감염에 저항성을 가지고 있고, 이형접합체(heterozygote)의 경우도 병의 진행이 늦어진다는 보고가 있었다.¹⁵ 또한 CCR5 promoter-59029의 위치에 A에서 G로의 전환이 생기는 경우 HIV에 대하여 방어적 역할을 하며, 이 부위와 CCR5 promoter-59353 부위와 연관 불균형(linkage disequilibrium)의 관계가 있다는 것이 보고된 바 있어, CCR5 gene은 HIV 감염과 관련한 중요한 후보 유전자로 인지되고 있다.¹⁶

HIV 감염 이외에도, 최근 Woitas 등¹⁷은 만성 C형간염 환자들에서 CCR5- Δ 32의 빈도가 증가될수록 병의 예후가 좋지 않음을 보고하였다. 이와 반대로 Hellier 등¹⁸은 이 결손 변이가 C형간염 바이러스 감염 시 문맥 부위의 염증을 감소시킨다고 보고하여 전자와 상반된 견해를 보였다. 또한 인터페론과 리바비린 병합요법의 치료반응과 CCR5의 다형성과의 연관성에 대한 몇몇 보고들이 있었다.¹⁹⁻²¹ 이와 같이 HIV, HCV 감염에서 CCR5 promoter 유전자 다형성의 역할을 밝히려는 연구가 활발히 이루어지고 있으며, 그 밖에 샤가스병, 천식, 류마티스 관절염, 당뇨병성 신증 등 다양한 면역질환에서도 그 연관성이 보고되고 있다.²²⁻²⁵ 그러나 아직까지 HBV 감염과의 연관성은 보고된 바 없어, 본 연구에서는 HBV 감염 후 자연 회복 여부에 따라 CCR5 promoter 부위의 Δ 32과 59029, 59353 부위에

서 유전적 다형성을 조사하여 연관성을 찾고 임상적 의의를 규명하고자 하였다.

1.

2001년 1월부터 2003년 6월까지 연세대학교 의과대학 세브란스병원을 내원한 총 377명을 대상으로 하였다. 환자의 혈액은 원심분리 후 -20°C 에서 보관하였고, 혈액 채취 당시의 생화학적 검사(AST, ALT, bilirubin, albumin, creatinine, prothrombin time), 혈청학적 검사(HBsAg, anti-HBs, HBeAg, anti-HBe) 및 바이러스학적 검사(HBV-DNA 정량)를 시행하여 자연 치유군과 만성 HBV 보유자군으로 분류하였다. 과거에 또는 현재 B형간염에 이환되었다가 자연 치유된 군[SC; Spontaneously cleared group, HBsAg(-), anti-HBc(+) and anti-HBs(+)]은 138명이며, 만성 HBV 보유자군[CC; Chronic carrier group, HBsAg(+), anti-HBc(+), anti-HBs(-)]은 239명으로, 표면항원(HBsAg)이 6개월 이상 양성이었고, 미국간학회 기준에 따라 임상 진단을 비활동성 보유자, 만성 간염, 간경변증으로 구분하였으며,^{26,27} anti-HCV 또는 anti-HIV 양성인 환자와 다른 만성 간질환이 동반되어 있는 환자는 연구 대상에서 제외하였다.

2.

1) CCR5- Δ 32 변이의 결정

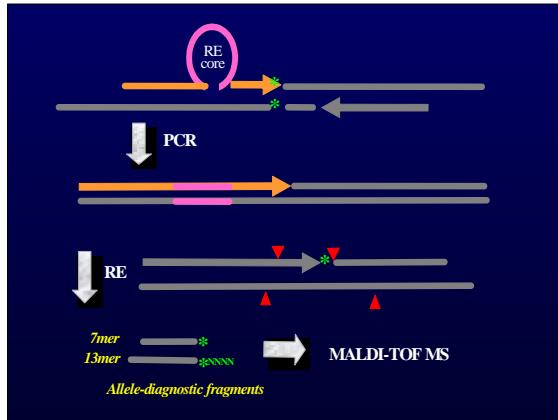
CCR5- Δ 32 변이를 조사하기 위하여 QIAamp DNA Blood Minikit (QIAGEN, Inc. Mildred, Germany)를 이용하여 전혈 200 μl 로부터 genomic DNA를 얻은 후, DNA 추출물에 10x EX-Taq polymerase buffer (Takara Shuzo Co., Otsu, Shiga, Japan) 2.5 μl , 2.5 mM deoxyribonucleotidetriphosphate 2.5 μl , EX-Taq

polymerase (5 units, Takara Shuzo Co.) 0.1 μl 를 섞고, sense primers (5'-TGTTTGCCTCTCTCCCAG-3')와 antisense primers (5'-CACAGCCTGTGCCTCTT-3')를 각각 20 pmol/ μl 씩 넣었다. PCR은 94°C 1분, 55°C 1분, 72°C 1분으로 총 35 cycles을 시행하였다. PCR 산물은 3.0% Nusieve (3:1) agarose gel에서 전기영동시킨 후 UV하에서 변이를 관찰하였다. CCR5- Δ 32 변이가 있을 경우 201 bp의 PCR 산물이 생기며 변이가 없을 경우는 233 bp의 산물이 생기게 된다.

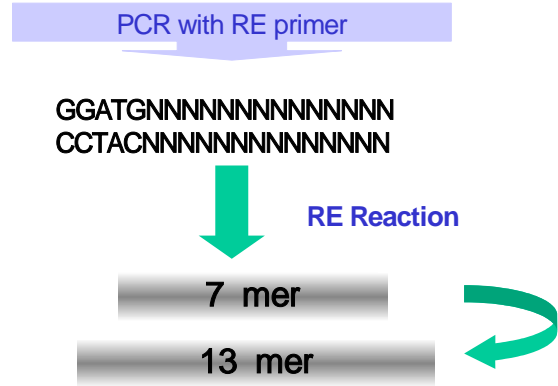
2) CCR5 유전자 다형성 결정

본 연구에서 SNP (single nucleotide polymorphism)를 수행하기 위하여 자동화 MALDI-TOF 질량 분석 기술을 응용한 제한효소분절 질량 다형성(Restriction Fragment Mass Polymorphism) 방법을 이용하였다. 특정 제한효소(Type IIS: 인지 부위와 절단 부위가 다른 제한효소)의 인지 부위(RE core)를 포함하며 변이 염기나 변이 부위의 윗부분에 결합하는 특수 시발체를 이용(표 2)하여 PCR 반응을 한 후, 해당 제한효소로 증폭 산물(PCR product)을 절단하게 되면, 변이 부위를 포함하는 7mer와 13mer의 올리고머가 형성된다. 이 두 가지의 올리고머는 CCR5 유전자의 유전적 변이에 따라 특정 질량을 가지게 되는데 이 두 분자의 질량을 MALDI-TOF 질량분석기에서 측정함으로써 변이를 파악할 수 있다.

DNA 추출물을 얻은 후, 20 mM HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 0.2 mM의 dNTP, 각각의 10 pmol/ μl 의 primer에 50 ng의 DNA를 넣고 Taq polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA)를 넣은 후 PCR하였다. PCR product는 제한효소 절단반응을 위하여 *FokI*을 넣고 37°C 에서 2시간 동안 반응시킨 후, 다시 *BstF5I*를 넣어 2시간 동안 45°C 에서 반응시켜, 잘려진 절편의 질량을 MALDI-TOF 질량분석기에서 측정하였다(그림 1).



A. RFMP Genotyping strategy



B. Assay strategy

Figure 1. PCR was done with primers designed to introduce a type IIS restriction endonuclease recognition sequence (FokI=BstF5I) ahead of the polymorphism site. The enzymatic cleavage of the products leads to excision of two oligonucleotide fragments (7mer and 13mer) containing the variation site, and then masses of the resulting oligonucleotide fragments were examined by MALDI-TOF MS (A). Differences are seen as the presence, absence, or mass change of peaks corresponding to fragments affected by existence of polymorphism that have base substitution at the site of variation. The respective sequences of forward and reverse primers used in the PCR for genotyping of CCR5 gene (B).

3.

CCR5 유전자 다형성의 빈도에 대한 통계적 분석을 위하여 SPSS version 11.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA) 통계 프로그램을 이용한 Student's *t* test, Chi-square test 또는 logistic regression test를 시행하였다. 통계적 유의 수준은 $P < 0.05$ 로 하였다.

1.

총 377명의 대상자 중 남자가 265명, 여자가 112명으로, 이들의 평균 연령은 44.3 ± 13.3 세였다. SC는 138명으로 평균 연령은 45.3 ± 14.6 세이고, 남자와 여자는 각각 89명, 49명이었다. CC는 239명이었고, 평균 연령은 43.2 ± 12.1 세이며, 남자와 여자는 각각 176명, 63명이었다. SC와 CC 간의 평균 연령과 성비의 차이는 없었다(표 1).

Table 1. Characteristics of Subjects

Group	N	Male/Female	Age (mean±SD)
SC	138	89/ 49	45.3±14.6*
CC	239	176/ 63	43.2±12.1
Total	377	265/112	44.3±13.3

Chi-square test.

* $P > 0.05$, between SC and CC.

SC (Spontaneously cleared group), CC (Chronic carrier group).

2. HBV CCR5-59029

CCR5 promoter 59029에 G/G 유전형을 갖는 경우가 SC에서는 55명(39.9%), CC에서는 54명(22.6%)으로 나타났으며, 두 군 간의 G/G 유전형의 빈도에서 통계적 유의성이 관찰되었다($P < 0.05$; 표 3). 이와 반대로, CC에서 A/A 유전형이 99명(41.4%)을 나타내어, SC의 29명(21.0%)에 비해 유의하게 많이 나타났다($P < 0.05$; 표 3).

Table 2. Sequences of Amplifying Primers for CCR5 Promoter Polymorphisms

Loci	Amplicon size	PCR Primer
CCR5-Δ32	98/66*	For: TTCATTACACCTGCAGCTCTCATTTGGATGTCCATACA Rev: AGGACCAGCCCCAAGATGACTATC
CCR5-59029	80	For: AGGGGGATCCTGGACTTCACATTGGATG ACCCTGTG Rev: TTGGGGTGGGATAGGGGATAC
CCR5-59353	70	For: ATAAGCTAGAGAATAGATCTCGGATGGGTCTGAA Rev: CAAAATAATCCAGTGAGAAAAGC

*66 indicates amplicon size of 32 bp deletion.

Table 3. Genotype Distribution of CCR5-59029 in the Spontaneously cleared group and Chronic carrier group

CCR5 -59029	SC (n=138)	CC (n=239)	P-value
G/G	55 (39.9%)	54 (22.6%)	<0.05*
G/A	54 (39.1%)	86 (36.0%)	
A/A	29 (21.0%)	99 (41.4%)	

The differences in genotype frequency for the CCR5 promoter was examined for significance using the Chi-square test. *P<0.05, between SC and CC.

SC (Spontaneously cleared group), CC (Chronic carrier group).

또한 G/G 유전형이나 G/A 유전형과 같이 G allele를 가진 G보유군(G carrier) 역시 SC에서 많이 나타나 통계적 유의성을 보였다(P=0.001, OR=1.64-4.31; 표 4). 이와 반대로, CC에서는 A allele를 가진 A보유군(A carrier)이 통계적 유의성을 보였다(P=0.02, OR=1.08-2.73; 표 4).

3. CCR5-59029 CCR5-59353 (Linkage disequilibrium)

CCR5 promoter 59029와 59353부위 간의 반수 체형(haplotype)을 조사하였다. 그 결과 모든 환자에서 CCR5-59029A/A homozygote는 CCR5-

Table 4. The Association of CCR5-59029 Polymorphism with Clearance of HBV infection

CCR5 -59029	SC (n=138)	CC (n=239)	G carrier dominant OR (95% CI)	P value	A carrier dominant OR (95% CI)	P value
G carrier	109 (79.0)	140 (58.6)	2.66 (1.64-4.31)	0.001	1.72 (1.08-2.73)	0.02
A/A	29 (21.0)	99 (41.4)				
A carrier	83 (60.1)	185 (77.4)				
G/G	55 (39.9)	54 (22.6)				

Logistic regression models were used for calculating the odds ratios (95% confidential intervals) and corresponding P-values.

G carrier has G/G or G/A genotype and A carrier has G/A or A/A genotype.

SC (Spontaneously cleared group), CC (Chronic carrier group).

59353C/C homozygote를 가졌으며, 이와 유사하게 CCR5-59029A/G heterozygote는 CCR5-59353 부위에서도 역시 C/T heterozygote로 나타났다. 또한 CCR5-59029G/G homozygote를 가진 모든 환자에서는 CCR5-59353T/T homozygote를 나타내었다. 본 연구에서는 CCR5-59029A allele은 CCR5-59353C allele과, CCR5-59029G allele은 CCR5-59353T allele과 강한 linkage disequilibrium의 관계가 있음을 확인하였다(그림 2).

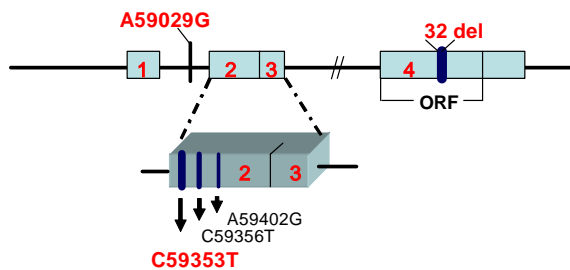


Figure 2. Schematic representation of the CCR5 gene drawn to scale. Location of polymorphic sites in the CCR5 gene on chromosome 3p21. The four exons are represented as boxes. Exon 4 contains the open reading frame (ORF).

5. CCR5-Δ32

CCR5-Δ32를 조사하기 위하여, 우선적으로 변이의 유무에 따라 염기 크기가 다르게 나타나는 PCR 산물을 agarose gel에 전기영동하여 관찰하였으나, 건강대조군과 질환군을 포함한 총 377명에서 CCR5의 32 염기쌍 결손은 관찰되지 않았고, MALDI-TOF MS를 다시 시행하여 CCR5의 32 염기쌍 결손이 없음을 재확인하였다.

HBV 감염 후 나타날 수 있는 임상 양상은 다양하여, 자연 회복에서부터 만성간염, 간경변증 및 간세포암종으로 까지 진행할 수 있다. 숙주의 면역반응은 이러한 질병의 자연 경과에 밀접한 연관이 있으며, 세포성 면역반응과 체액성 면역반응이 모두 관여한다.²⁸ 최근 들어 HBV 감염과 바이러스

와 숙주 요인과의 연관성을 밝히는 연구들이 활발히 이루어지고 있는데, 숙주의 MHC (Major Histocompatibility Complex)의 유전자형 중 HLA-DRB1*1302와 cytokine의 일종인 Tumor necrosis factor α (TNF-α)와 Interleukin-10 (IL-10)의 유전적 다형성이 HBV 감염 후 임상 경과에 영향을 미친다는 보고가 있다.^{3,29,30} 또한 Transforming Growth Factor-β1 (TGF-β1)의 유전적 다형성과 간경변증 및 간세포암종과의 연관성에 대한 보고가 있다.³¹ CCR5의 유전적 다형성은 HIV 감염 후 질환의 진행성과 관계있다고 보고되었고,^{14-16,32} 최근에는 HCV 감염과의 관련성이 연구되고 있다.¹⁷⁻²¹ 하지만 HBV 감염과의 연관성은 아직 보고된 바 없다.

본 연구에서는 HBV 감염과의 연관성을 알아보기 위해 우선적으로 CCR5-Δ32를 조사하여 보았으나, 자연 치유군(SC) 및 만성 보유자군(CC)에서도 변이를 발견할 수 없었다. CCR5-Δ32는 실제 Caucasian의 경우 10-15%의 heterozygote가 발견되며, 1% 정도의 homozygote가 발견된다는 보고가 있다.³³⁻³⁵ HIV에 감염된 한국인을 대상으로 CCR5-Δ32를 조사한 보고에 의하면,³⁶ 총 472명 중 heterozygote 및 homozygote 32 bp 소멸이 있는 경우는 단 한 경우도 발견되지 않았다. 본 연구에서도 대상으로 한 총 377명의 환자에서 PCR 산물의 길이를 조사한 결과 CCR5-Δ32이 발견되지 않았고, RFMP 방법을 추가적으로 시행하여 이를 확인하였다. CCR5-Δ32는 지역적, 인종적 차이를 반영하며, 흥미롭게도 한국인에서는 매우 드문 것으로 생각된다.

CCR5-59029의 경우, G/G 유전형이 자연 치유군(SC)에서 만성 보유자군(CC)에 비하여 유의하게 높게 나타났으며, A/A 유전형의 경우는 만성 보유자군(CC)에서 유의하는 결과를 나타내었다($P < 0.05$; 표 3). 이것으로 보아, 이 부위의 특정 유전형이 질환의 경과에 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. HBV의 감염 후, CCR5 유전적 다형성과의 연관성을 좀더 자세히 알아보기 위하여, 자연 회복군(SC)과 만성 보유자군(CC)의 CCR5 유전적 다형

성을 allele 보유군으로 비교하여 보았다. 그 결과, G/G 유전형이나 G/A 유전형과 같이 G allele를 가진 G 보유군(G carrier)은 만성 보유자군(CC)에 비하여 자연 치유군(SC)에서 빈번히 관찰되어 통계적 유의성을 나타내었다. 이것은 G allele를 가지고 있는 대상이 HBV 감염 후, 자연 치유될 수 있음을 시사하여 준다($P=0.001$; 표 4). 이와 대조적으로 HBV 만성 보유자군(CC)에서는 A allele이 통계적으로 의미 있게 높게 관찰이 되어 A allele가 질환의 만성화와 관계가 있음을 알 수 있었다($P=0.02$; 표 4). 과거에 HIV를 대상으로 한 McDermott 등에 의하면 CCR5 promoter 59029 부위는 유전자의 전사 활성화(transcription activity)에 중요한 역할을 하는 부위로서, *in vitro* 실험을 통하여 CCR5-59029의 A allele가 높은 유전자 발현을 한다고 보고하였다.¹⁶ 즉 G allele가 있는 경우가 A allele일 때보다 CD4⁺ T 세포의 표면에 CCR5 수용체를 발현하는 능력이 낮아서, HIV에 감염에 대해 좀더 방어적인 역할을 한다는 결론이었으나, HBV 감염 시에는, HIV처럼 CCR5가 바이러스의 세포 내 침입을 도와주는 공조수용체로 작용하지 않으며, HBV가 감염된 *in vivo* 상에서는 어떠한 유전형이 CCR5 유전자 발현을 촉진시키는지 알 수 없다. 따라서 HBV 감염 환자를 대상으로 CCR5 유전형과 유전자 발현과의 관계를 조사하는 추후의 연구가 필요할 것으로 생각된다.

CCR5 promoter 59029 부위의 유전형은 HBV 감염 후 Th1/Th2 면역반응의 균형에 영향을 주어 HBV 제거에 영향을 줄 것으로 생각되어진다. 실제로 바이러스의 감염 후, 숙주 내 면역반응 중 Th1과 Th2 반응의 균형은 중요하다.^{13,37} Th1 림프구는 IL2, INF- γ , TNF 등의 사이토카인을 발현하여 바이러스의 증식을 억제할 뿐만 아니라 CXCR3, CCR5 등의 chemokine 수용체를 발현하여 감염 조직 내에서 발현하는 chemokine과 결합하게 된다. 즉 감염 조직에서 국소적으로 발현하는 chemokine에 반응을 보이는 수용체를 지닌 림프구만이 감염 조직 내로 이동하여 유지되며 항바이러스 작용을 나타낼 수 있다. Th2 세포는 IL-4, IL-5,

IL-10 등을 분비하여 Th1의 기능을 억제시켜 지속적인 염증반응으로부터 숙주를 보호하고 항체 매개 면역반응을 유도하지만 감염 초기 보다 이른 시점에 유도되면 만성 질환의 발생과 관련이 있다.³⁸ 따라서 이들 T 림프 간의 상호 견제 작용으로 면역반응이 조절되며, 이들의 균형이 바이러스의 조절 및 만성 염증에 있어 중요한 요인으로 보고되고 있다.³⁹ CCR5 promoter 59029 부위는 전사 활성화에 중요한 부위로 인지되고 있으므로,^{16,40} 이 부위의 유전형에 따라 유전자 발현이 달라지게 되고, 결국 감염 조직에서 Th1과 Th2 pathway의 균형에 영향을 주어 바이러스를 제거하여 자연 치유 상태가거나, 그렇지 않은 경우 만성화로 접어들 것으로 추정된다.

뿐만 아니라 HBV 감염 시 염증 부위에서 chemokine인 RANTES, MIP-1 α 와 MIP-1 β 의 생산이 증가되면서 CCR5를 발현하는 Th1 세포들의 움직임이 시작되고 CCR5가 림프구 표면에서 발현되는 양은 간 내에서의 면역 세포들의 유형과 양 그리고 HBV로 인한 염증반응 정도를 결정하므로³² 이와 같이 바이러스를 제거하기 위한 숙주의 면역 인자들의 복합적인 반응이 초기에 바이러스를 제거하거나 감염된 바이러스를 제거하지 못하고 만성화로 접어들어 질환의 악화에 영향을 준다고 생각된다.

과거에 CCR5 유전자의 여러 부위를 표적으로 하여 유전적 다형성을 찾아 HIV 및 HCV 감염과의 연관성을 밝히고자 하는 연구들이 있으나,^{15,18} 바이러스에 감염된 환자에서 CCR5 유전적 다형성이 어떠한 기전으로 면역반응을 유도하는지는 아직까지 명확히 규명되지 못하고 있다. 이것은 바이러스 감염 후의 chemokine의 유전형과 연관된 면역 기전을 밝히는 것이 쉬운 일이 아님을 보여 준다. 본 연구에서는 HBV 감염 후 CCR5의 유전자형과 HBV 제거와 연관이 있음을 밝혔지만, 이를 토대로 각기 다른 유전형이 어떠한 기전의 면역반응을 일으키는지에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각한다.

본 연구에서는 CCR5- Δ 32와 CCR5-59029 이외

에도 CCR5-59353 부위의 변이도 관찰되었다. 이전에 McDermott 등¹⁶은 HIV 감염 환자에서 CCR5-59029G homozygote는 CCR5-59353T와, CCR5-59029A homozygote는 CCR5-59353C, 역시 CCR5-59029G/A heterozygote는 CCR5-59353T/C와 강한 연관 불균형을 보고하였고 본 연구에서도 같은 결과를 나타내어 이를 확인할 수 있었으나, CCR5-59029와 CCR5-59353의 유전적 다형성 가운데 어떤 것이 더 우성으로 작용하는 인자인지는 알 수 없었다.

결론적으로 CCR5-59029의 G allele이 HBV 감염 후 바이러스의 제거와 관련이 있고, 반면 A allele는 질환의 진행성과 관련이 있음을 본 연구를 통하여 알 수 있었다. 흥미롭게도 한국인에서 CCR5-59029와 CCR5-59353 간에 강한 연관 불균형이 있음과 CCR5-Δ32가 나타나지 않는다는 것을 알 수 있었고 이의 임상적 의의에 대한 추가적 연구가 필요하다고 생각된다.

: 숙주의 면역 유전적 요인은 바이러스 감염과 관련하여 중요한 역할을 한다. CCR5 promoter의 유전적 다형성은 HIV 감염 후 질환의 진행성과 연관이 있다. 그러나 아직까지 HBV 감염과의 연관성은 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 CCR5 promoter의 유전자 다형성과 HBV 감염과의 관계를 조사하였다. : 총 377명의 환자를 대상으로 하였으며 이들을 자연 치유군[HBsAg (-), anti-HBc (+), anti-HBs (+)]과 만성 HBV 보유자군[HBsAg (+), anti-HBc (+), anti-HBs (-)]으로 분류하였고, MALDI-TOF를 이용한 RFMP법을 시행하여 유전적 다형성을 조사하였다. : CCR5 promoter A59029G의 유전자형 빈도가 자연 치유군과 만성 HBV 보유군에서 유의한 차이를 나타냈다($P<0.05$). CCR5 59029 A allele는 만성 바이러스 보유군에서 높게 나타났으며($P=0.002$), G allele는 자연 회복군에서 통계적으로 의미 있게 높은 빈도를 보여 주었다($P=0.001$). 모든 환자에서

CCR5-59029 유전적 다형성은 CCR5-59353 부위와 강한 연관 불균형의 관계를 보였으며, CCR5-Δ32는 발견되지 않았다. : CCR5 promoter 59029의 유전적 다형성은 HBV의 제거와 관계가 있으며, 면역학적 기전과 설명을 위해서는 좀더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

색인단어: 케모카인 수용체 5, B형간염 바이러스, 유전적 다형성

1. Han KH, Oh SH, Chon CY, et al. Hepatitis B virus genome and genomic expression (antigens) in the liver tissue of the patients with chronic hepatitis B. *Korean J Gastroenterol* 1994;26:289-297.
2. Kim DG, Lee NS, Yoo WH, Anh DS, Yang DH, Cho BH. Cell-mediated immune response to hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) after hepatitis B virus infection. *Korean J Int Med* 1996;51:25-37.
3. Ahn SH, Han KH, Park JY, et al. Association between hepatitis B virus infection and HLA-DR type in Korea. *Hepatology* 2000;31:1371-1373.
4. Han KH, Kim KH, Chang HY. Immunogenetics of hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(suppl 3): S329-S332.
5. Hill AV. The immunogenetics of human infectious diseases. *Annu Rev immunol* 1998;16:593-617.
6. Chisari FV, Ferrari C. Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Ann Rev Immunol* 1995;13:29-60.
7. Chisari FV. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest* 1997;99:1472-1477.
8. Penna A, Chisari FV, Bertolotti A, et al. Cytotoxic T lymphocyte recognize an HLA-A2 restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Exp Med* 1991;174:1565-1570.
9. Nayarsina R, Fowler P, Guilhot S, et al. HLA-A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *J Immunol* 1993;150:4659-4671.
10. Rehmann B, Fowler P, Sidney J, et al. The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Exp Med* 1995;181:1047-1058.
11. Moriyama T, Guilhot S, Klopchin K, et al. Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Science* 1990;248:361-364.
12. Altman JD, Moss PA, Goulder PJ, et al. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 1996; 274:94-96.
13. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. The role of

- chemokine receptors in primary, effector, and memory immune responses. *Annu Rev Immunol* 2000;18:593-620.
14. Berger EA, Murphy PM, Farber JM. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism and disease. *Annu Rev Immunol* 1999;17:657-700.
 15. Huang Y, Paxton WA, Wolinsky SM, et al. The role of a mutant CCR5 allele in HIV-1 transmission and disease progression. *Nat Med* 1996;2:1240-1243.
 16. McDermott DH, Zimmerman PA, Guignard F, Kleeberger CA, Leitman SF, Murphy PM. CCR5 promoter polymorphism and HIV-1 disease progression. *Lancet* 1998;352:866-870.
 17. Woitas RP, Ahlensteil G, Iwan A, et al. Frequency of the HIV-Protective CC Chemokine receptor5-Δ32/Δ32 genotype is increased in hepatitis C. *Gastroenterology* 2002;122:1721-1728.
 18. Hellier S, Frodsham AJ, Henning BJ, et al. Association of genetic variants of the chemokine receptor CCR5 and its ligands, RANTES and MCP-2, with outcome of HCV infection. *Hepatology* 2003;38:1468-1476.
 19. Glas J, Torok HP, Simperl C, et al. The Δ32 mutation of the chemokine-receptor 5 gene neither is correlated with chronic hepatitis C nor does it predict response to therapy with interferon-α and ribavirin. *Clin Immunol* 2003;108:46-50.
 20. Ahlensteil G, Berg T, Woitas RP, et al. Effects of the CCR5-Δ32 mutation on antiviral treatment in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 2003;39:245-252.
 21. Promrat K, McDermott DH, Gonzalez CM, et al. Associations of chemokine system polymorphisms with clinical outcomes and treatment responses of chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 2003;124:352-360.
 22. Calzada JE, Nieto A, Beraun Y, Martin J. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens* 2001;58:154-158.
 23. Hall IP, Wheatley A, Christie G, McDougall C, Hubbard R, Helms PJ. Association of CCR5 delta32 with reduced risk of asthma. *Lancet* 1999;354:1264-1265.
 24. Garred P, Madsen HO, Petersen J, et al. CC chemokine receptor 5 polymorphism in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1998;25:1462-1465.
 25. Nakajima K, Tanaka Y, Nomiyama T, et al. RANTES promoter genotype is associated with diabetic nephropathy in type 2 diabetic subjects. *Diabetes Care* 2003;26:892-899.
 26. Lok AS, McMahon BJ. Practice guideline committee, AASLD. Chronic hepatitis B. *Hepatology* 2001;34:1225-1241.
 27. Lee JM, Ahn SH, Chang HY, et al. Reappraisal of HBV genotypes and clinical significance in Koreans using MALDI-TOF mass spectrometry. *Korean J Hepatol* 2004;10:260-270.
 28. Reherrmann B. Immune responses in hepatitis B virus infection. *Semin Liver Dis* 2003;23:21-37.
 29. Kim YJ, Lee HS, Yoon JH, et al. Association of TNF-α promoter polymorphisms with the clearance of hepatitis B virus infection. *Hum Mol Genet* 2003;12:2541-2546.
 30. Cheong JY, Hwang IL, Hong SH, et al. Association between chronic hepatitis B virus infection and genetic polymorphism of interleukin-10 and tumor necrosis factor-α. *Korean J Hepatol* 2003;9:S55.
 31. Kim YJ, Lee HS, Im JP, et al. Association of transforming growth factor-β1 gene polymorphisms with a hepatocellular carcinoma risk in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Exp Mol Med* 2003;35:196-202.
 32. Shieh B, Liao YE, Hsieh PS, Yan YP, Wang ST, Li C. Influence of nucleotide polymorphisms in the CCR2 gene and the CCR5 promoter on the expression of cell surface CCR5 and CXCR4. *Int Immunol* 2000;12:1311-1318.
 33. Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu YT, Clegg JB. Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion. *Nat Genet* 1997;16:100-103.
 34. Magierowska M, Lepage V, Boubnova L, et al. Distribution of the CCR5 gene 32 base pair deletion and SDF1-3'A variant in healthy individuals from different populations. *Immunogenetics* 1998;48:417-419.
 35. Leboutte AP, de Carvalho MW, Simoes AL. Absence of the delta CCR5 mutation in indigenous populations of the Brazilian Amazon. *Hum Genet* 1999;105:442-443.
 36. Oh MD, Kim SS, Kim EY, et al. The frequency of mutation in CCR5 gene among Koreans. *Int J STD AIDS* 2000;11:266-267.
 37. D'Ambrosio D, Iellem A, Colantonio L, Clissi B, Pardi R, Sinigaglia F. Localization of Th-cell subsets in inflammation: differential thresholds for extravasation of Th1 and Th2 cells. *Immunol Today* 2000;21:183-186.
 38. Mosmann TR, Sad S. The expanding universe of T cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today* 1996;17:138-146.
 39. Bertolotti A, D'Elios MM, Boni C, et al. Different cytokine profiles of intraphepatic T cells in chronic hepatitis B and hepatitis C virus infections. *Gastroenterology* 1997;112:193-199.
 40. Shieh B, Liao YE, Hsieh PS, Yan YP, Wang ST, Li C. Influence of nucleotide polymorphisms in the CCR2 gene and the CCR5 promoter on the expression of cell surface CCR5 and CXCR4. *Int Immunol* 2000;12:1311-1318.