대한소화기학회지 1999;34:609 - 618

# HLA DR 양성 및 음성 Lamina Propria-like T세포 아군의 표현형 특징과 CD2 및 CD3 매개 신호전달

연세대학교 의과대학 내과학교실 및 소화기병연구소, Cedars-Sinai Inflammatory Bowel disease Center*

김원호 · 김현수 · 이충렬 · 문영명 · 강진경 · 박인서 · Stephan R. Targan*

# Phenotypic Characteristics and CD2- and CD3-mediated Signal Transduction in HLA DR Positive and Negative Subsets of Lamina Propria-like T-cells

**Won Ho Kim,** M.D., **Hyun Soo Kim,** M.D., **Chung Ryul Lee,** M.D.,
**Young Myung Moon,** M.D., **Jin Kyung Kang,** M.D.,
**In Suh Park,** M.D. and **Stephan R. Targan,** M.D.*

*Department of Internal Medicine, Institute of Gastroenterology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea; Inflammatory Bowel Disease Center, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, U.S.A.**

**Background/Aims:** Peripheral blood T-cells co-cultured with Daudi (a irradiated B-cell line) and interleukin (IL)-2 attain a CD2 dominant cytokine secretion pattern and show tyrosine phosphorylation profile identical to freshly isolated lamina propria (LP) T-cells. Since the phenotypic characteristics and signal transduction pathway of these LP-like T-cells are largely unknown yet, we have explored the expression pattern of T-cell markers and CD2 ligation-induced tyrosine phosphorylation profile of LP-like T-cells and their HLA DR+ and DR- subsets. **Methods:** The LP-like T-cells were sorted into DR+ and DR- subsets by magnetic sorting. Surface markers were measured by flow cytometry Tyrosine phosphorylation profile was investigated by Western blot. **Results:** The LP-like T-cells consisted of two distinct populations: approximately 55% of the cells express both HLA DR and IL-2R (DR+ LP-like T-cells) and the remainder express neither HLA DR nor IL-2R (DR- LP-like T-cells). Approximately 80% of DR+ LP-like T-cells were memory cells expressing CD45RO and 2/3 of them were activated T-cells expressing CD69, CD71 and CD30. In contrast, 50% of DR- LP-like T-cells expressed CD45RO and only 10-20% of them expressed activation markers. Tyrosine phosphorylation of p72 protein after CD2 ligation was identified only in DR- LP-like T-cells **Conclusions:** The LP-like T-cells consist of two distinct subpopulation in terms of phenotype and tyrosine phosphorylation pattern according to CD2 ligation. **(Kor J Gastroenterol 1999;34:609 - 618)**

**Key Words:** Lamina propria T-cells, LP-like T-cells, Phenotype, CD2, Tyrosine phosphorylation

접수: 1999년 6월 2일, 승인: 1999년 8월 9일
연락처: 김원호, 120-752, 서울특별시 서대문구 신촌동 134, 연세대학교 의과대학 내과학교실
Tel: (02) 361-5410, Fax: (02) 393-6884, E-mail: kimwonho@yumc.yonsei.ac.kr
※ 본 논문은 1997년도 연세대학교 의과대학 교수연구비의 보조로 이루어졌음.

## 서 론

사람에서 소화관 점막은 펼치면 약 400 m2나 되는 넓이로 음식물의 소화와 흡수뿐만 아니라 여러 가지의 외부 자극으로부터 생체를 보호하는 역할도 수행한다.[1,2] 점액, tight junction, 연동운동 등의 물리적인 비특이 방어와 lysozyme, lactoferrin, amylase와 담즙산 등의 화학적인 비특이 방어 이외에도 면역학적인 방어기전이 생체를 외부 자극으로부터 보호하는 데 있어서 매우 중요하다. 면역학적인 방어기전으로는 secretory IgA (sIgA)가 핵심적인 역할을 수행하는데, sIgA의 하루 생산량은 체중 1 kg당 40 mg으로 체내 IgG 총 생산량보다 많다. 뿐만 아니라 사람에서 면역글로부린을 생산하는 세포의 약 80%는 점막고유층(lamina propria; LP)에 존재하고 전신의 림프구 중 약 10%가 gut-associated lymphoid tissue (GALT)에 존재하는 등 점막 면역계가 전신의 면역계에서 차지하는 비중이 매우 높음에도 불구하고 아직까지 그 중요성이 충분히 인정되지 않고 있다.[3] 점막 면역계는 다양한 항원에 항상 노출되고 있지만 대부분의 해롭지 않은 항원에 대해서는 면역반응을 일으키지 않는 면역 관용(immune tolerance)을 보이고 일부 해로운 항원에 대해서만 선택적(selective) 반응을 일으킨다는 특징이 있으며, 매우 효율적(effective)이고 국소 반응만 일으키며(localized) 잘 조절된다는(controlled) 사실 또한 전신 면역계의 면역반응과는 다른 점이다.[4,5]

점막 면역계는 Peyer's patch (PP)로 대표되고 면역세포가 항원에 노출되어 IgA를 생산할 수 있도록 감작(commit)되는 유도부(inductive site)와 lamina propria (LP)로 대표되고 형질세포와 세포독성 T세포 등 주효세포로 완전 분화하여 sIgA 분비 또는 T세포 반응을 일으키는 주효부(effector site)로 나눌 수 있다.[1] 활성화된 T세포는 세포독성 또는 사이토카인 분비의 두 가지 작용을 통하여 면역반응을 매개하는데, 대부분의 상피 내(intraepithelial) αβ T세포 수용체(T-cell receptor, TCR) 양성 CD8+ T세포는 세포독성 효과를 나타내는 반면 LP의 CD4+ T세포는 사이토카인을 분비하여 B세포의 분화와 증식에 따른 면역글로부린, 특히 IgA의 합성을 조절하고 다른 주효세포의 이동과 활성화를 통제한다. LP림프구(LP lymphocyte; LPL)의 40-90%는 T세포로서 T세포/B세포의 구성 비율은 말초혈액과 유사하고 약 10%는 대식세포이다.[6] 그러나 LP는 T세포-의존 B세포 분화가 일어나는 곳이므로 LP의 T세포는 말초혈액 T세포에 비하여 보조세포(Leu3+, Leu8-)가 많다. 또한 LP의 T세포는 말초혈액 T세포에 비하여 대부분이 활성화된 기억세포(CD45RO+)로서 표면에 interleukin-2 receptor a chain (IL-2Ra), transferrin 수용체, 4F2 및 MHC class II 분자 등 여러 가지 활성화 표지자의 발현이 증가되어 있다. LP T세포의 이러한 활성화는 항원과 마이토젠에 항상 노출되어 있기 때문인데 활성화 정도가 어느 정도 이상은 되지 않도록 항상 조절되고 있다(controlled inflammation).[7] LP T세포는 다른 T세포와 표현형이 다를 뿐만 아니라 기능적으로도 다른 점이 많다. 즉, 항원이나 마이토젠 또는 CD3 ligation 등으로 자극할 경우 잘 증식하지 않고 IL-2 첨가 또는 CD2 ligation시 강한 증식 반응을 보이는 반면 IL-4에는 잘 반응하지 않으며 자극을 받았을 때 생산하는 사이토카인의 종류도 다르다.[7] 그러나 LP T세포의 유래는 어떤지, LP T세포의 활성화가 어떻게 통제되는지, LP T세포에서 CD2를 통한 반응의 중요성은 무엇인지 등 밝혀야 할 과제는 아직까지 매우 많다.

T세포는 여러 경로로 활성화되는데,[8-11] 항원에 의하여 자극되면 TCR/CD3 복합체를 통한 신호가 inositol phospholipid (InsP) 경로와 protein tyrosine kinase (PTK) 경로를 거쳐 전달되게 된다. TCR을 통한 신호 이외에도 T세포 표면에 발현되어 있는 CD2, CD28, CD27, CD40L 등을 통한 보조 자극이 CD3 경로를 통한 신호에 영향을 미칠 뿐만 아니라 항원 비의존성 T세포 활성화를 일으키기도 한다.[12,13] 예를 들면 말초혈액 T세포에서 leukocyte function antigen-3 (LFA-3, CD58)와 결합하는 CD2를 통한 신호가 InsP와 PTK를 활성화시킨다.[14-18] 그러나 LP T세포에서의 신호전달경로에 대한 연구는 매우 드물다. LP T세포에서 CD3 ligation시 소량의 inositol triphosphate (IP3)가 유리되는 반면 CD2 ligation시에는 IP3 유리가 확실하게 증가한다.[19] 또한 LP T세포

에서 CD3 ligation시에는 보이지 않는 인산화 tyrosine (p72)이 CD2 ligation시 관찰된 것은 CD2 ligation에 의한 세포생물학적 반응을 뒷받침하는 소견이다.[20]

LP T세포에 대한 형태적 및 기능적인 연구가 아직 미흡한 것은 정상 사람의 LP T세포를 구하기가 쉽지 않다는 점에도 기인한다. 그러나 최근 말초혈액 T세포에 B세포주인 Daudi 및 IL-2를 첨가하여 배양하여 얻은 T세포는 CD3를 통한 자극에 비하여 CD2를 통한 자극에 더 잘 반응하고 CD28 co-ligation시 CD2 ligation에 의한 반응이 증폭된다는 사실이 발표되었는데, LP T세포를 연구하기 위한 모델로 사용될 수 있으므로 LP-like T세포라 불린다.[20] 본 연구에서는 LP-like T세포의 표현형 특징과 CD2 및 CD3 ligation시 tyrosine phosphorylation profile을 알아봄으로써 LP T세포의 특성에 대한 연구에 일조하고자 하였다.

## 연구 방법

### 1. 세포 배양 및 LP-like T세포 생산

헤파린 처리한 플라스틱 주사기로 건강한 성인의 정맥혈을 채취하여 1:1 비율의 Ficoll-hypaque (1.077 g/mL; Pharmacia Fine Chemicals)에 의한 비중변화 도원침법(density gradient centrifugation; 500 g, 30 분)으로 단핵구를 분리하였다.[21] 분리한 단핵구를 Hank's balanced salt solution (HBSS)으로 세척한 다음 RPMI 1640 (Irvine Scientific, Santa Ana, CA)에 5% 우태아혈청(Fetal calf serum; Irvine Scientific)을 첨가한 완전배지에 부유시켜 Petri dish에 넣고 37℃, 5% $CO_2$하에서 1시간 이상 배양하여 플라스틱에 부착하는 대식구를 제거하였다. 세포부유액을 원심분리하고 완전배지를 첨가하여 $100\times10^6$/mL으로 부유시킨 다음 나일론 울 column에 넣고 37℃, 5% $CO_2$ 하에서 1시간 이상 배양하여 나일론 울에 부착하는 B세포를 제거하여[22] T세포를 분리하였다. 분리한 T세포의 순도를 유세포분석(flow cytometry)으로 확인하여 95% 이상이 CD3+이면 실험에 사용하였다.

완전배지에 T세포를 $10^6$/mL이 되도록 부유시킨 다음 3,000 rad의 방사선을 조사한 $2\times10^5$/mL의 Daudi와 10 U/mL의 recombinant human interleukin-2 (rhIL-2; R&D Systems, Minneapolis, MN)를 첨가하고 5일간 37℃, 5% $CO_2$하에서 배양하여 LP-like T세포를 얻었다.[20] 이어 섞여 있는 Daudi를 배제하기 위하여 magnetic sorting으로 CD19+ 세포를 제거하였다.

### 2. Magnetic cell sorting을 이용한 DR+ 및 DR- LP-like T세포의 분리

Magnetic cell sorting을 위해서 LP-like T세포를 완전배지에 $10^7$/mL이 되도록 부유시킨 다음 0.25 μg/$10^6$ 세포의 항 HLA-DR 단클론항체(L243)를 넣고 4℃에서 30분간 반응시켰다. 세포를 세척한 후 염소 항마우스 면역글로부린 G (goat anti-mouse IgG) microbead (Miltenyi Biotec Inc., Sunnyvale, CA)를 $10^7$세포 당 20 μL 첨가하고 4℃에서 15분간 반응시켰다. 다시 세척한 후 MACS (Miltenyi Biotec Inc.)로 sorting을 시행하였다.[23] 순수 분리된 LP-like T세포는 유세포분석으로 확인하여 CD19+ 또는 CD20+ 세포가 1% 이하임을 확인하였다.

### 3. Flow cytometry를 이용한 LP-like T세포의 표현형 측정

이중 염색을 위하여 $2\times10^5$개의 세포를 12×75 mm 시험관에서 2% FCS와 0.1% sodium azide를 포함하는 phosphate buffered saline (PBS-FCS) 100 μL에 부유시킨 다음 첫 번째 단클론항체를 넣고 4℃에서 20분간 반응시켰다. 세포를 세척하고 FITC가 부착된 1:200으로 희석한 염소의 항마우스 면역글로부린 G를 100 μL 첨가한 후 20분간 반응시켰다. 세포를 PBS-FCS로 3회 세척하고 100 μg/mL의 mouse IgG를 포함하는 PBS-FCS 100 μL에 부유시킨 다음 PE가 부착된 두 번째 단클론항체를 첨가하고 다시 20분간 반응시켰다. 대조 세포는 PE 또는 FITC가 부착된 마우스 면역글로부린과 반응시켰다. 염색된 세포는 PBS-FCS로 세척하고 1% paraformaldehyde가 포함된 PBS에 부유하여 고정시켰다. Becton-Dickinson사의 FACScan으로 형광을 측정하였고 LYSIS II 프로그램으로 분석하였다.[24] 이 때 LP-like T세포 중 기억세포의 비율을 알아보기 위하여는

CD45RO 및 CD45RA 발현을 측정하였고, 활성화 표지자로는 CD69와 CD71 (transferrin receptor) 및 CD30 발현을 측정하였다.[25-27]

4. Phosphotyrosine에 대한 Western blot

얼음 위에서 5×106/mL의 T세포 부유액에 1:50으로 희석한 항CD2 항체(T11) 10 μL 또는 항CD3 항체(OKT 2 mg/mL) 10 mL를 가하였다. 37℃로 2분간 가온한 다음 10 μg/mL 항마우스 면역글로부린을 가하고 2분간 반응시켰다. 4℃에서 4,500 rpm으로 5분간 원심분리하여 상층액을 제거하고 세포침사에 2.5 mM EDTA, 2% sodium dodesyl sulfate (SDS), 20% 2-mercaptopurine (2-ME), 10% glycerol, 0.1 M Tris (pH 6.8) 및 bromophenol blue로 구성된 시료완충액(sample buffer) 50 mL를 넣고 5분간 끓인 후 4℃, 8,000 rpm에서 원심분리하여 세포용해물을 얻었다. 세포용해물을 SDS PAGE한 다음 BioBlot membrane (Costar)에 전기적으로 전이(transfer)시키고 Tris-buffered saline Tween (TBST)에 희석한 5% non-fat milk로 차단(blocking)한 후 일차항체(mouse anti-human phosphotyrosine antibody, Upstate Bio-technology)를 가하고 4℃에서 밤새 반응시켰다. TBS-T로 3회 세척하고 10,000배 희석한 이차항체(horse radish peroxidase conjugated sheep anti-mouse Ig, Amersham Life Science)와 실온에서 1시간 반응시킨 후 enhanced chemiluminescence (ECL, Amersham)를 시행하였다.

## 결 과

LP-like T세포의 표현형 특징을 알아보기 위하여 항HLA DR 항체 및 항IL-2R 항체로 염색하여 유세포분석을 시행하였다. LP-like T세포는 HLA DR과 IL-2R 양자를 발현하는 세포와 모두 발현하지 않는 세포의 두 아군으로 뚜렷이 구분되어(Fig. 1), LP-like T세포 중 HLA DR과 IL-2R를 동시에 발현하는 세포를 DR+ LP-like T세포, 모두 발현하지 않는 세포를 DR-LP-like T세포라 명명하였다. HLA DR과 IL-2R 양성인 DR+ LP-like T세포는 유세포분석시 forward scatter로 본 세포의 크기가 DR- LP- like T세포에 비하여 컸으며 두 아군 모두 CD2와 CD3를 동시에 발현하는 T세포였다.

DR+ 및 DR- LP-like T세포에서 기억세포 표지자 및 활성화 표지자 발현 정도를 이색도 유세포분석(two color flowcytometry)으로 알아본 결과 DR+ LP-like T세포의 약 80%는 CD45RO를 발현하는 기억세포였고, 2/3는 CD69, CD71 및 CD30 등의 활성화 표지자를 발현하는 반면, DR- LP-like T세포는 반수만이 기억세포였고, 10-20%만이 활성화 표지자를 발현하고 있었다(Fig. 2).

Sorting하지 않은 LP-like T세포 전체와 분리한 DR+ 및 DR- LP-like T세포의 CD2 및 CD3 ligation시 protein tyrosine phosphorylation profile을 Western blot으로 알아보았다. Sorting하지 않은 LP-like T세포 전체를 항CD2 및 항CD3 항체 또는 superantigen인 staphylococcal enterotoxin B (SEB)로 자극하고 10분 후 항 phosphotyrosine 항체로 immunoblot한 결과 SEB로 자극하여 CD3를 통한 신호를 전달하거

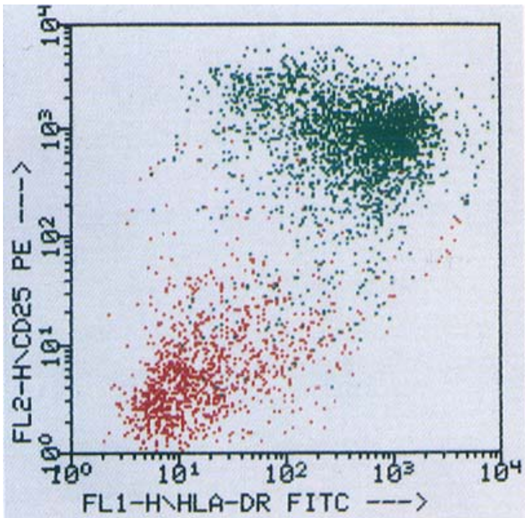


**Fig. 1.** Phenotypic characteristics of LP-like T-cells. LP-like T-cells were stained with FITC-conjugated anti-HLA DR and PE-conjugated anti-IL-2R monoclonal antibodies then analyzed by two color flow cytometry after gating with cell size. LP-like T-cells consisted of two distinct populations; approximately 55% of cells expressing both HLA DR as well as IL-2R (DR+ LP-like T-cells) and the remainder expressing neither HLA DR nor IL-2R (DR-LP-like T-cells).

나 CD3를 직접 ligation한 경우에는 나타나지 않는 72 kDa의 단백질 tyrosine 인산화가 CD2를 ligation 할 때 나타남을 관찰할 수 있었다(Fig. 3). LP-like T 세포를 DR+ 및 DR- LP-like T세포로 분리한 후

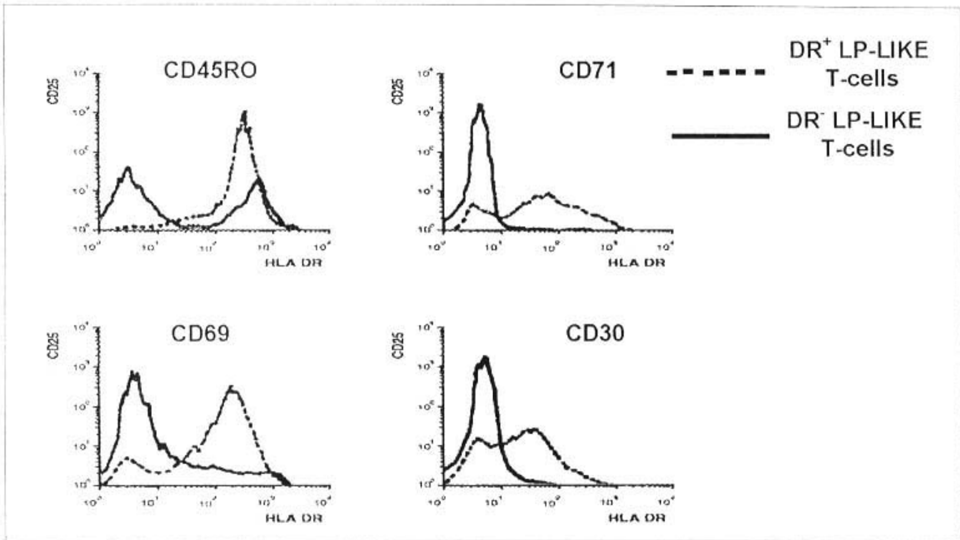


**Fig. 2.** Phenotypic characteristics of DR+ and DR- subsets of LP-like T-cells. DR+ and DR- subsets of LP-like T-cells were magnetically sorted and their expression of CD45RO, CD69, CD71 and CD30 were analyzed by two color flow cytometry. Approximately 80% of DR+ LP-like T-cells were memory cells expressing CD45RO and 2/3 were activated T-cells expressing CD69, CD71 and CD30. In contrast, 50% of DR- LP-like T-cells expressed CD45RO and only 10-20% expressed T-cell activation markers.

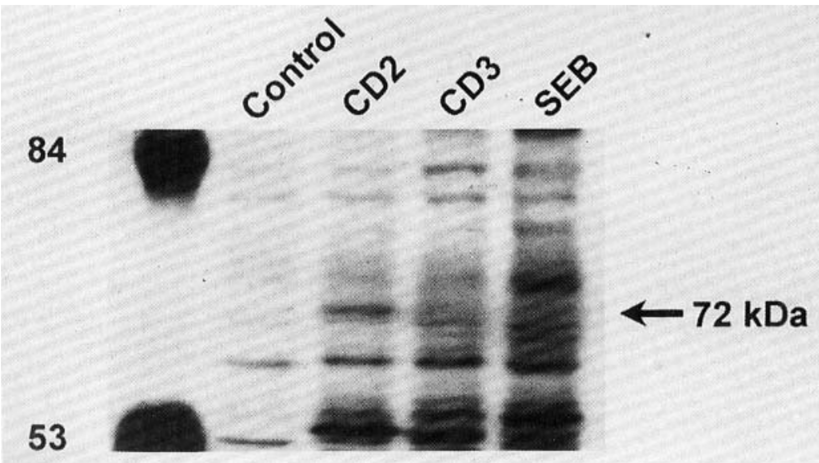


**Fig. 3.** CD2 or CD3 ligation-mediated tyrosine phosphorylation profile of LP-like T-cells. LP-like T-cells were stimulated with CD2 or CD3 ligation and staphylococcal enterotoxin B (SEB) then immunoblot was performed using anti-phosphotyrosine antibody. Immunoblotting revealed inducible 72 kDa protein (p72) phosphorylation during CD2, but not CD3, ligation indicating that postreceptor pathways in LP-like T-cells may be adapted specifically to facilitate CD2-mediated cytokine secretion.

Western blot해 본 결과, CD2 ligation에 의한 p72 단백질 인산화가 DR+ LP-like T세포에서는 거의 나타나지 않는 반면 DR- LP-like T세포에서는 매우 강하게 나타남을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

## 고 찰

점막 면역계의 T세포는 말초혈액 T세포에 비하여 대부분이 활성화된 기억세포(CD45RO+)로서 표면에 여러 가지 활성화 분자의 발현이 증가되어 있으며 항원이나 마이토젠 또는 CD3 ligation 등으로 자극할 경우 잘 증식하지 않고 IL-2 첨가 또는 CD2 ligation시 강한 증식반응을 보이는 반면 IL-4에 대해서는 잘 반응하지 않으며 자극을 받았을 때 생산하는 사이토카인의 종류도 다르다는 차이가 있다.[4,7,28,29] 최근 말초혈액 T세포에 B세포주인 Daudi 및 IL-2를 첨가하여 배양하여 얻은 LP-like T세포가 CD3를 통한 자극에 비하여 CD2를 통한 자극에 더 잘 반응하고 CD28 co-ligation시 CD2 ligation에 의한 반응이 증폭되며 LP T세포와 동일한 tyrosine phosphorylation profile을 보인다는 사실이 알려져 LP T세포를 연구하기 위한 모델로 사용될 수 있음이 보고되었다.[20,28] 그러나 아직까지 이 모델이 일반적으로 받아들여지고 있지는 않는데 형태적 및 기능적인 특성에 대한 연구가 충분하게 이루어져 있지 않기 때문이다. 본 연구의 결과 LP-like T세포는 CD2와 CD3를 발현하는 T세포로서 HLA DR과 IL-2R를 동시에 발현하는 DR+ LP-like T세포와 HLA DR과 IL-2R 모두를 발현하지 않는 DR- LP-like T세포의 두 아군을 구성되어 있었다. DR+ 및 DR- LP-like T세포에서 기억세포 표지자 및 활성화 표지자 발현 정도를 알아 본 결과 DR+ LP-like T세포의 약 80%는 CD45RO를 발현하는 기억세포였고, 2/3는 CD69, CD71 등의 활성화 표지자와 CD28, CD30 등의 보조 자극인자를 발현하는 반면, DR- LP-like T세포는 반수만이 기억세포였고, 10-20%만이 활성화 표지자를 발현하고 있었다. 전체적인 LP-like T세포의 기억세포 비율 및 활성화 표지자 발현 등의 표현형은 기존에 보고되어 있는 LP T세포와 유사하여 LP-like T세포가 LP T세포의 형태 및 기능을 연구하기 위한 모델로 적합하다고 판단하였다.

CD2는 T세포와 자연살해 세포의 표면에 발현되는 당단백질 항원으로 분자량이 50-55 kDa이며 원형질막의 안과 밖에 걸쳐 있다.[30,31] CD2의 기능은 아직까지 확실하게 밝혀져 있지 않으나 T세포 표면의 CD2 분자가 면양 적혈구와 결합하여 rosette를 형성하므로 CD2에 대한 단클론항체가 사용되기 이전에는 이 특성을 이용하여 T세포를 다른 세포와 구

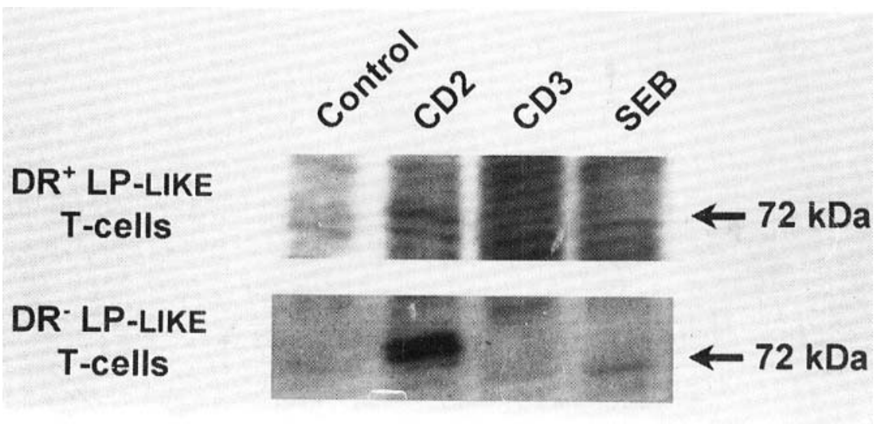


**Fig. 4.** Tyrosine phosphorylation profile of DR+ and DR- subsets of LP-like T-cells. DR+ and DR- subsets of LP-like T-cells were magnetically sorted and their phosphorylation profile were analyzed by immunoblotting. CD2 ligation-mediated tyrosine phosphorylation of p72 was observed in DR- LP-like T-cells but not in DR+ LP-like T-cells.

분하는 데 이용되어 왔다. 최근 CD2는 ligand인 CD58 (LFA-3)과 함께 T세포의 항원 인식에 관여하거나 TCR/CD3 복합체를 통한 신호에 대한 보조적인 신호를 전달함으로써 T세포의 기능을 조절하고, T세포가 표적세포 또는 항원전달세포와 결합하는 데 필요하며, 때로는 T세포를 직접적으로 활성화시키거나 반대로 면역 관용을 일으키기도 할 뿐 아니라,[13,34] 활성화된 T세포에서 세포의 사멸(apoptosis)을 유발하기도 한다는 것이 알려졌다.[32]

CD2를 통한 신호는 TCR/CD3 복합체를 통한 신호와 동일한 생화학적 경로를 통하여 전달된다고 알려져 왔다.[15,33] CD2 분자의 세포 내 영역(domain)에는 protein tyrosine kinase (PTK)의 src-homology 3 (SH3) domain과 결합하는 proline이 풍부한 부분이 있어 CD2를 통한 신호가 PTK 단계반응을 활성화시킨다.[31] 그러나 최근 Jurkat 세포에서 CD2 자극시에는 CD3 자극에 의한 단백질 인산화 단계 반응의 초기에 중요한 역할을 하는 T세포 특이 PTK인 ZAP-70를 우회하는 신호가 보고되었으며,[34] ξ-chain 특이 immune receptor tyrosine-based activation (ITAM) motif가 결실된 T세포에서도 CD2 매개 신호가 세포 내로 전달된다는 사실이 알려졌다.[35] 뿐만 아니라 사람의 말초혈액 단핵구에서 CD3와는 달리 CD2에 의하여 cAMP-response element binding protein (CREB)의 인산화가 일어난다는 사실로 보아 CD2를 통한 신호는 CD3를 통한 신호와는 동일하지 않다는 것이 일반적인 생각이다.[36] CD2 자극과 CD3 자극에 따른 신호전달경로가 동일하지 않음과 같은 맥락으로 이들 표면항원을 자극할 때 세포의 반응 또한 동일하지 않다.[37]

LP T세포를 대상으로 한 연구에 따르면 CD3 ligation시 소량의 inositol triphosphate (IP3)가 유리되는 반면 CD2 ligation시에는 IP3 유리가 확실하게 증가하며,[19] CD2 ligation에 의한 72 kDa 단백질의 tyrosine 인산화는 CD2 ligation에 의한 세포생물학적 반응을 뒷받침하는 소견이다.[20] 본 연구에서는 LP-like T세포를 연구 모델로 이용하여 CD2 및 CD3 ligation시 protein tyrosine phosphorylation profile을 Western blot으로 알아보았다. LP-like T세포에서 SEB로 자극하여 CD3를 통한 신호를 전달하거나 CD3를 직접 ligation한 경우에는 나타나지 않는 72 kDa의 단백질 tyrosine 인산화가 CD2를 ligation할 때 나타났으며, LP-like T세포의 아군 중 DR+ LP-like T세포에서는 CD2 ligation에 의하여 p72 단백질이 인산화되지 않는 반면 DR- LP-like T세포에서는 강하게 인산화되어 세포 표현형의 차이에 따른 세포 내 신호전달경로의 차이가 있음을 알 수 있었다.

LP T세포가 말초혈액 T세포와 다른 가장 중요한 기능적인 차이는 CD2를 통한 자극에 대한 반응이 CD3를 통한 자극에 대한 반응보다 크다는 것이다.[20,29] LP T세포의 연구 모델인 LP-like T세포의 아군 중 DR+ LP-like T세포와 DR- LP-like T세포에서 CD2와 CD3 ligation시 tyrosine phosphorylation profile이 다르다는 것을 밝힌 본 연구의 결과는 세포의 표현형에 따른 세포생물학적인 반응의 차이와 세포 내 신호전달경로의 차이에 대한 연구의 서막이며 LP T세포의 신호전달경로에 대한 연구의 시금석이 되리라 생각한다. 앞으로 CD2 ligation시 특징적으로 tyrosine이 인산화되는 p72를 분리하여 분자구조를 밝힌 다음 이를 통한 신호전달경로를 알아봄으로써 점막 면역계 T세포의 기능적인 특성을 규명하는 연구가 계속되기를 기대한다.

## 요 약

목적: 최근 말초혈액 T세포에 B세포주인 Daudi 및 IL-2를 첨가하여 배양하여 얻은 T세포(LP-like T세포)는 CD3를 통한 자극에 비하여 CD2를 통한 자극에 더 잘 반응하고 CD28 co-ligation시 CD2 ligation에 의한 반응이 증폭되며 CD2 ligation시의 tyrosine phosphorylation profile이 LP T세포와 동일하므로, LP T세포를 연구하기 위한 모델로 이용 가능함이 보고되었다. 본 연구에서는 LP-like T세포 중 DR+ 및 DR- LP-like T세포의 표현형 특징을 알아보고 CD2 및 CD3 ligation시 tyrosine phosphorylation profile을 알아봄으로써 LP T세포의 특성에 대한 연구에 일조하고자 하였다. 대상 및 방법: LP-like T세포 중 DR+ 및 DR- LP-like T세포는 magnetic cell sorting으로 분리하였다. 세포의 표현형은 유세포분

석으로 측정하였으며 tyrosine phosphorylatin은 Western blot으로 평가하였다. 결과: LP-like T세포는 HLA DR과 IL-2R을 동시에 발현하는 세포와 모두 발현하지 않는 세포의 두 아군으로 뚜렷이 구분되었으며, 두 아군 모두 CD2와 CD3를 동시에 발현하는 T세포였다. DR+ LP-like T세포의 약 80%는 CD45RO를 발현하는 기억세포였고, 2/3는 CD69, CD71 및 CD30 등의 활성화 표지자를 발현하는 반면, DR- LP-like T세포는 반수만이 기억세포였고 10-20%만이 활성화 표지자를 발현하고 있었다. 분리하지 않은 LP-like T세포 전체를 이용한 Western blot에서 CD3 ligation시에는 나타나지 않는 72 kDa의 단백질 tyrosine 인산화가 CD2 ligation시 나타났으며, LP- like T세포를 DR+ 및 DR- LP-like T세포로 분리한 후 Western blot해 본 결과, CD2 ligation에 의한 p72 단백질 인산화가 DR+ LP-like T세포에서는 거의 나타나지 않는 반면 DR- LP-like T세포에서는 강하게 나타남을 관찰할 수 있었다. 결론: LP-like T세포는 표현형 및 CD2 ligation에 따른 tyrosine phosphorylation profile이 상이한 두 아군으로 구성되어 있음을 알 수 있었다.

색인단어: 점막고유층 T세포, LP-like T세포, 표현형, CD2, Tyrosine phosphorylation

## 참 고 문 헌


1. Brandtzaeg P. Overview of the mucosal immune system. Curr Top Microbiol Immunol 1989;146: 13-25.
2. Brandtzaeg P. Basic mechanisms of mucosal immunity: a major adaptive defense system. Immunologist 1995;3:89-96.
3. Brandtzaeg P, Nilssen DE, Rognum TO, Thrane PS Ontogeny of the mucosal immune system and IgA deficiency. Gastroenterol Clin North Am 1991;20: 397-439.
4. Brandtzaeg P, Farstad IN, Haraldsen G, Jahnsen FL Cellular and molecular mechanisms for induction of mucosal immunity. Develop Biol Stand 1998;92: 93-108.
5. Brandtzaeg P. Homing of mucosal immune cells: a possible connection between intestinal and articular inflammation. Aliment Pharmacol Therap 1997;11: 24-39.
6. Beagley KW, Elson CO. Cells and cytokines in mucosal immunity and inflammation. Gastroenterol Clin North Am 1992;21:347-366.
7. James SP. Mucosal T-cell function. Gastroenterol Clin North Am 1991;20:597-612.
8. Klausner RD, Lippincort-Schwartz J, Bonifacino JS T-cell antigen receptor: insights into organelle biology. Ann Rev Cell Biol 1990;6:403-431.
9. Patel MD, Samelson LE, Klausner RD. Multiple kinases and signal transduction. Phosphorylation of the T-cell antigen receptor complex. J Biol Chem 1987;262:5831-5838.
10. Weiss A, Imboden JB. Cell surface molecules and early events involved in human T-lymphocyte activation. Adv Immunol 1987;41:1-38.
11. Nel AE, Hanekom C, Hultin L. Protein kinase C plays a role in the induction of tyrosine phosphorylation of lymphoid microtubule-associated protein 2 kinase: evidence for a CD3-associated cascade tha includes p56lck and that is defective in HPB-ALL. Immunol 1991;147:1933-1939.
12. Meuer SC, Hussey RE, Fabbi M, et al. An alternative pathway of T-cell activation: a functional role for the 50 kd T11 sheep erythrocyte receptor protein Cell 1984;36:897-906.
13. Geppert TD, Davis LS, Gur H, Wacholtz MC Lipsky PE. Accessory cell signals involved in T-cel activation. Immunol Res 1990;117:5-66.
14. Pantaleo G, Olive D, Poggi A, Kozumbo WJ Moretta L, Morreta A. Transmembrane signaling via the T11-dependent pathway of human T-cell activation. Evidence for the involvement of 1,2-diacylglycerol and inositol phosphates. Eur J Immunol 1987 17:55-60.
15. Monostori E, Desai M, Brown MH, Cantrell DA Crumpton MJ. Activation of human T-lymphocytes via the CD2 antigen results in tyrosine phosphorylation of T-cell antigen receptor -chains. J Immuno

1990;144:1010-1014.
16. Samelson LE, Fletcher MC, Ledbetter JA, June CH. Activation of tyrosine phosphorylation in human T-cell via the CD2 pathway. Regulation by the CD45 tyrosine phosphatase. J Immunol 1990;145: 2448-2454.
17. Nel AE, Ledbetter JA, Williams K, et al. Activation of MAP-2 kinase activity by the CD2 receptor in Jurkat T-cells can be reversed by CD45 phosphatase Immunology 1991;73:129-133.
18. Bockenstedt LK, Goldsmith MA, Dustin M, Olive D, Springer TA, Weiss A. The CD2 ligand LFA-3 activates T-cells but depends on the expression and function of the antigen receptor. J Immunol 1988 141:1904-1911.
19. Qiao L, Schrmann M, Betzler M, Meuer SC. Activation and signaling status of human lamina propria T-lymphocytes. Gastroenterology 1991;101:1529-1536.
20. Targan SR, Deem RL, Liu M, Wang S, Nel A Definition of lamina propria T cell responsive state Enhanced cytokine responsiveness of T cells stimulated through the CD2 pathway. J Immuno 1995;154:664-675.
21. 김원호, 함기백, 강진경 등. 위암환자에서 수술 전 Polyadenylic-Polyuridylic acid 투여가 말초혈액과 영역림프절 단핵구의 NK 및 LAK 활성도에 미치는 영향. 대한소화기병학회지 1992;24:224-241.
22. Julius MH, Simpson E, Herzenberg LA. A rapid method for the isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. Eur J Immunol 1973;3 645-649.
23. Miltenyi SW, Mller W, Weichel W, Radbruch A High gradient magnetic cell separation with MACS Cytometry 1990;11:231-238.
24. Kim DY, Kim WH, Kang JK, Park IS, Kwon OH The mechanism of antiproliferative effect of desferrioxamine on human hepatoma cell lines. Yonse Med J 1994;35:62-71.
25. Drkop H, Latza U, Hummel M, Eitelbach F, Seed B Stein H. Molecular cloning and expression of a new member of the nerve growth factor family that i characteristic for Hodgkin's disease. Cell 1992;68: 421-427.
26. Ellis TM, Simms PE, Slivnick DJ, Jck H-M, Fishe RI. CD30 is a signal-transducing molecule tha defines a subset of human activated CD45RO+ T cells. J Immunol 1993;151:2380-2389.
27. Alzona M, Jck H-M, Fisher RI, Ellis TM. CD30 defines a subset of activated human T cells tha produce IFN-g and IL-5 and exhibit enhanced B cel helper activity. J Immunol 1994;153:2861-2867.
28. Gonsky R, Deem RL, Hughes CC, Targan SR Activation of the CD2 pathway in lamina propria T cells up-regulates functionally active AP-1 binding to the IL-2 promotor, resulting in messenger RNA transcription and IL-2 secretion. J Immunol 1998 160:4914-4922.
29. Borivant M, Fuss I, Fiocchi JS, Strong SA, Strobe W. Hypoproliferative human lamina propria T cells retain the capacity to secrete lymphokines when stimulated via CD2/CD28 pathways. Proc Asso Am Phys 1996;108:55-67.
30. Davis SJ, van der Merwe PA. The structure and ligand interactios of CD2: implications for T-cel function. Immunol Today 1996;17:177-187.
31. Lin H, Hutchcroft JE, Andoniou CE, Kamoun M Band H, Bierer BE. Association of p59 (fyn) with the T lymphocyte costimulatory receptor CD2 Binding of the Fyn Src homology (SH) 3 domain i regulated by the Fyn SH2 domain. J Biol Chem 1998;273:19914-19921.
32. Dumont C, Deas O, Mollereau B, et al. Poten apoptotic signaling and subsequent unresponsiveness induced by a single CD2 (BTI-322) in activated human peripheral T cells. J Immunol 1998;160 3797-3804.
33. Von Bonin A, Ehrlich S, Fleischer B. The transmembrane region of CD2-associated signal-transducing proteins is crucial for the outcome of CD2 mediated T-cell activation. Immunology 1998;93: 376-382.
34. Hubert P, Lang V, Debre P, Bismuth G. Tyrosine phosphorylation and recruitment of ZAP-70 to the

CD3-TCR complex are defective after CD2 stimulation. J Immunol 1996;157:4322-4332.
35. Steeg C, von Bonin A, Mittrucker HW, Malissen B Fleischer B. CD2-mediated signaling in T cells lacking the zeta-chain-specific immune receptor tyrosine-based activation (ITAM) motif. Eur J Immunol 1997;27:2233-2238.
36. Guyot DJ, Newbound GC, Lairmore MD. Co-stimulation of human peripheral blood mononuclear cells with IL-2 and anti-CD3 monoclonal antibodies induces phosphorylation of CREB. Immunol Lett 1998;61:45-52.
37. Dilloo D, Dirksen U, Schneider M, Zessack N Butties B, Levitt L. Differential production of interleukin-3 in human T lymphocytes following either CD3 or CD2 receptor activation. Exp Hemato 1996;24:537-543.