

의학 석사학위 논문

형 B	염 환 스 리 이 바	X	이 질 1
현 발	상 정 가 포 세 간	원 항 이 특	
D CT	의 포 세	과 성 활	
에 췌	는 췌	행 형	

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

이 미 진

형 B 염 환 스 리 이 바 X 이 질 1
| 현 발 상 정 가 포 세 간 원 항 이 특
D C T 의 포 세 과 성 활
애 췌 는 췌 행 형

지도교수 박 선

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2005년 2월

아 주 대 학 교 대 학 원

의 학 과

이 미 진

이미진의 의학 석사학위 논문을 인준함.

심사위원장 신 호 준 인

심사위원 조 혜 성 인

심사위원 박 선 인

아 주 대 학 교 대 학 원

2004년 12월 22일

B형 간염 바이러스의 X 단백질이 발현되는 정상 간세포가 항원 특이 CD8⁺ T 세포의 활성화와 세포사에 미치는 영향

B형 간염 바이러스 (HBV)에 의한 감염증의 회복에는 감염된 세포를 제거할 수 있고 바이러스 복제를 억제할 수 있는 CD8⁺ T 세포 면역 반응이 중요하다고 알려져 있다. HBV 만성 감염에서 약한 CD8⁺ T 세포 면역 반응이 관찰되고 여기에는 HBV에 의한 면역 조절 기작이 기여할 가능성이 있다. 기존의 보고들에서 HBV의 단백질의 하나인 X 단백질이 CD8⁺ T 세포 면역 반응에 관여하는 분자의 발현을 조절하는 것으로 밝혀졌으므로 본 연구에서는 간세포 내 X 단백질 발현에 의해 CD8⁺ T 세포 면역 반응이 조절되는지 알아보려고 연구하였다. X 단백질을 발현할 수 있는 재조합 baculovirus를 생산하고, 이 바이러스를 감염 시킴으로써 일차 배양된 C57BL/6 (H-2^b) 수컷 마우스 간세포에서 X 단백질을 발현시켰다. 수컷에서 발현되는 H-Y 항원과 H-2K^b 복합체에 특이한 암컷 MHC인 CD8⁺ T 세포를 분리하여 간세포와 함께 배양한 후, CD8⁺ T 세포의 증식과 사이토카인 생산, 세포사를 분석하였다. 본 연구 결과, X 단백질을 발현하는 간세포와 함께 배양한 조건과 대조군 baculovirus를 감염시킨 간세포와 함께 배양한 조건간의 CD8⁺ T 세포의 증식양상은 차이를 보이지 않았다. 사이토카인 생산의 경우, X 단백질을 발현하는 간세포와 CD8⁺ T 세포를 함께 배양한 조건에서 대조군에 비해 IFN- γ 생산이 증가하는 경향을 보였다. 그러나 IL-10의

경우는 본 실험 조건에서 생산되지 않았다. CD8⁺ T 세포의 세포사가 일어난 빈도는 X 단백질을 발현하는 간세포와 함께 배양한 조건에서 대조군 baculovirus를 감염한 간세포와 함께 배양한 조건에 비해 약 5배, 정상 마우스 간세포와 함께 배양한 조건에 비해 약 2.5배임을 관찰하였다. X 단백질을 발현하는 일차 마우스 간세포와 미 자극 CD8⁺ T 세포를 함께 배양한 본 연구 체계에서는 X 단백질이 CD8⁺ T 세포의 증식에는 영향을 미치지 않지만 IFN- γ 의 분비와 세포사는 증가시킨다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 HBV가 감염 환자의 CD8⁺ T 세포의 면역 반응을 조절할 수 있다는 기존가설에 대한 증거로서 만성 감염환자에서 나타나는 세포 독성 T 세포의 기능저하를 유도하는데 기여할 것이다.

핵심되는 말: B형 간염 바이러스 (HBV), X 단백질 (HBx), CD8⁺ T 세포, 일차 배양 간세포, 세포 증식, 세포사, baculovirus, 사이토카인

차 례

국문요약	I
차례	iii
그림차례	v
I. 서론	1
A. B형 간염 바이러스 (Hepatitis B Virus)와 X 단백질	1
B. HBV에 대한 CD8 ⁺ T 세포 면역 반응	3
C. 면역 반응에서 간의 기능	4
D. 연구 목적	6
II. 재료 및 방법	7
A. 재조합 baculovirus 생산	7
B. Plaque assay를 이용한 baculovirus 역가 분석	8
C. 마우스와 세포	9
D. 유전자의 한시적 이입과 재조합 baculovirus의 감염	9
E. Western blotting	10
F. 마우스 간세포 배양 및 X 단백질 발현 baculovirus의 감염	11
G. MataHari RAG1 ^{-/-} 마우스에서 CD8 ⁺ T 세포의 분리	11
H. 일차 배양 간세포와 CD8 ⁺ T 세포의 배양	12
I. CD8 ⁺ T 세포의 증식 분석	13
J. 사이토카인 생산 분석	13
K. CD8 ⁺ T 세포의 세포사 분석	14

III. 결과	15
A. X 단백질을 발현하는 baculovirus 생산	15
B. X 단백질이 발현되는 일차 간세포가 미자극 CD8 ⁺ T 세포의 활성화에 미치는 영향	18
C. X 단백질이 발현되는 일차 간세포가 미자극 CD8 ⁺ T 세포의 세포사에 미치는 영향	21
IV. 고찰	25
V. 결론	30
참고문헌	31
영문요약	47

그림 차례

Fig.1. The morphology of <i>sf</i> 9 cells infected with baculovirus	16
Fig.2. Construction of the baculovirus transfer vector	17
Fig.3. The expression of HBx protein in mammalian cell lines	19
Fig.4. The proliferation assay of naive CD8 ⁺ T cells co-cultured with primary hepatocytes expressing HBx or not	20
Fig.5. IFN- γ and IL-10 production of naive CD8 ⁺ T cells co-cultured with primary hepatocytes expressing HBx or not	23
Fig.6. The TUNEL assay of naive CD8 ⁺ T cells co-cultured with primary hepatocytes expressing HBx or not	24

I. 서론

A. B형 간염 바이러스 (Hepatitis B Virus)와 X 단백질

Hepatitis B virus (HBV)는 전 세계적으로 350만 이상의 인구가 감염되어 있으며, 급성 감염과 전격성 감염, 만성 감염을 일으킨다. 특히, HBV는 우리나라를 비롯하여 중국, 아프리카에서 감염률이 높고 우리나라의 간암의 70%는 HBV의 감염에 기인한다 (Chisari 등, 1995).

HBV의 병인 정도는 사람의 연령에 따라 크게 차이가 난다. 성인의 HBV 감염은 불현성 감염이 일반적이며, 급성 감염된 성인의 대부분은 바이러스가 완전히 제거된다. 그러나 급성 감염의 5~10%는 만성 감염으로 진행되고 이중 일부는 또한 간경변증과 간암으로 발전한다. 한편, 태아의 HBV 감염은 모체를 통한 감염체의 전달이 가장 큰 원인이 된다. 태아의 경우, 성인과는 다르게 감염의 90% 이상이 만성 감염으로 쉽게 진행되고, 만성 감염의 경우 간경변증이나 간암으로 발전하는 경우가 대다수이다 (Chisari 등, 1995). 현재 HBV에 대한 백신이 이용되고 있음에도 세계적으로 해마다 수백만 명이 HBV 감염에 의해 사망하고 있다 (Chisari 등, 1995; William 등, 1997).

HBV는 지질외막으로 둘러싸인 캡시드 단백질 속에 3.2 kb 크기의 DNA를 가지고 있는 바이러스이다. 이 DNA는 네 개의 open reading frame (ORF)을 가지고 있는 부분적 이중 원형 DNA로 외막 단백질 (sAg), 캡시드 단백질 (core protein), 복제효소 (polymerase), X 단백질의 유전자로 채워져 있다 (William 등, 1997).

이 중 X 단백질은 154개의 아미노산으로 구성된 17 kDa 정도의 단백질분

자이며, 간암 발생과 바이러스의 복제, 면역반응에 관련되어 있어 주목을 끌고 있다. HBV의 분자생물학적 연구에 따르면, HBV 감염 세포내에서 X 단백질이 트랜스 작용인자 (transactivator)로써 바이러스나 세포 유전자의 발현을 조절하여 간암 형성에 관여한다고 보고 되었으며 (Wang 등, 1995; Shintani 등, 1999; Diao 등, 2001; Ahn 등, 2002; Terradillo 등, 2002), 복제와 관련된 X 단백질의 기능에 대해서는 몇 가지 보고된 결과들이 있으나, HBV 감염 환자에 대한 보고와 HBV의 동물 모델실험 방법이 서로 다른 결과를 보였다 (Fukuda 등, 1995; bouchard 등, 2001).

한편, 면역반응과 관련된 X 단백질의 기능에 대한 연구 결과에 따르면, X 단백질이 세포독성 T 세포의 활성을 주도하는 분자들을 직접적으로 조절한다는 보고들이 있었다. 즉, 주조직적합복합체 1집단 (major histocompatibility complex I; 이하 MHC class I로 표기함)의 발현이 HBV에 감염된 세포에서 정상 간세포보다 높은 원인이 HBV에 감염될 경우, 발현된 X 단백질이 MHC class I의 전사를 증가시켰기 때문이라는 보고가 있었다 (Zhou 등, 1990). 또한, 인간 간암 세포주에 HBx 유전자를 인위적으로 발현시켰을 때 사람의 백혈구 항원-DR (human leukocyte antigen-DR; 이하 HLA-DR로 표기함) RNA의 양이 증가했다는 실험으로 X 단백질에 의해 HLA-DR의 발현이 조절된다는 사실을 증명했다 (Hu 등, 1992). X 단백질이 T 세포 수용체 (T cell receptor; 이하 TCR로 표기함)와 항원-MHC I이 결합할 때 필요한 부착 분자 (adhesion molecule) 중 하나인 intercellular cell adhesion molecule I (이하 ICAM-1로 표기함)의 발현을 증가시킨다는 사실이 인간 간암 세포주를 이용한 실험을 통해 증명되었다 (Hu 등, 1992). 이와 같은 분자들은 세포독성 T 림프구 (cytotoxic T lymphocyte; 이하 CTL로 표기함)가 매개하는 면역 반응에 필요한 분자들으로써

이러한 분자들이 X 단백질에 의해 직접적으로 조절된다는 보고들은 X 단백질이 HBV 감염과 관련된 면역반응에서 중요한 역할을 하고 있다는 것을 증명한다.

X 단백질과 HBV 감염 세포에서 분비되는 사이토카인의 관계를 분석한 연구에 따르면, HBV 유전자를 지속적으로 발현하는 간암 세포주에서 전염증성 사이토카인 (proinflammatory cytokine)인 종양괴사인자 (tumor necrosis factor α ; TNF- α)와 IL-18의 유전자 전사가 촉진되고, 나아가 X 단백질을 발현하는 형질 전환 마우스 (transgenic mouse)의 간에서도 IL-18의 발현이 관찰되었다. 이와 관련하여 IL-18에 의해 유도되는 Fas 라이간드 (이하 FasL로 표기함)의 발현도 관찰되었다 (Shin 등, 1999; Lee 등, 2002). 이 보고들로 X 단백질이 Fas를 발현하고 있는 활성화된 T 세포의 세포사를 유도할 것과 HBV 감염의 면역 병인 기전에서 중요한 역할을 하리라 예상된다. 즉 X 단백질이 HBV에 감염된 간세포 표면의 FasL와 ICAM-1의 발현률을 높여서 간으로 CD8⁺ T 세포를 보다 끌어들이고, CD8⁺ T 세포의 증식과 세포사에 영향을 미칠 수 있다고 예상된다. 이에 본 실험에서는 X 단백질이 HBV 감염과 CD8⁺ T 세포와 관련된 면역반응에서 중요한 역할을 하고 있다는 사실에 주목하여 연구하고자 한다.

B. HBV에 대한 CD8⁺ T 세포 면역 반응

세포독성 T 림프구 (CTL)는 세포 관련 면역반응을 통하여 HBV에 감염된 세포를 죽이거나 바이러스 증식을 억제시켜 HBV 감염의 회복에 기여하는 세포이다 (Guidotti 등, 1999). B형 간염 환자의 CD8⁺ T 세포활성에 대한 연구에서 급성 B형 간염 환자는 HBV의 외막 단백질, 캡시드 단백질, 복제효소에 대하여 강한 CTL 반응이 관찰된 반면에 만성 간염 환자는 상대적으로 약한 CTL 반응

이 관찰되었다 (Nayersina 등, 1993 ; Rehermann 등, 1995). 그러나 성인의 만성 감염에서 관찰되는 약한 CTL 반응의 기전에 대한 이해는 HBV의 지속 감염을 이해하는데 필요함에도 아직 충분히 연구되어 있지 않다. 가능한 기전을 숙주 요인과 바이러스 요인으로 대별하여 생각해 볼 수 있는데, 숙주 요인으로는 비활동성 HBV 보유자와 활동성 HBV 감염 환자의 IL-10 promoter 유전자에는 차이가 있으며, 이로 인해 비활동성 보유자는 면역 억제 반응을 하는 IL-10의 생산이 낮을 것이라고 하였다 (Miyazoe 등, 2002). 한편, 바이러스 요인에 대해서는 캡시드 단백질이 Th2형으로 면역 반응을 유도함으로써 효과적인 CTL 반응을 억제할 것이라고 보고된 바 있다 (Milich 등, 1998).

C. 면역 반응에서 간의 기능

간은 활성화된 $CD8^+$ T 세포의 세포사에 관련된 장기로 알려져 있다. 펩타이드 주사 혹은 바이러스 감염에 의하여 생체 내에서 $CD8^+$ T 세포는 활성화되고 비장과 림프절에서 수가 급속히 증가하다가 3~5일 안에 항원에 노출되기 이전 상태로 수가 줄었으며, 활성화된 $CD8^+$ T 세포의 수가 비장과 림프절에서 감소되면 오히려 간에서는 그 수가 증가되기 시작하고, $CD8^+$ T 세포의 세포사가 증가되는 것으로 관찰되었다 (Huang 등, 1994; Belz 등, 1998). 한편, 간에서 활성화된 $CD8^+$ T 세포의 세포사가 일어나는지, 단순히 죽어가는 $CD8^+$ T 세포를 간이 제거하는 것인지 또는 두 가지 현상이 함께 일어나는지는 아직도 밝혀지지 않은 상태이나 현재로서는 두 가지 현상이 함께 일어나는 것으로 받아들여지고 있다 (Park 등, 2002).

흥미롭게도 간에서는 활성화된 $CD4^+$ T 세포보다 활성화된 $CD8^+$ T 세포의

제거가 일어나는데 그 원인에 대해서는 정확히 밝혀져 있지 않으나, 아마도 두 T 세포에서 발견되는 부착 분자의 차이가 요인인 것으로 생각되고 있다. 실제로 마우스를 이용한 실험에서 활성화된 CD8⁺ T 세포에서 상대적으로 많이 발견되는 lymphocyte function antigen-1 (LFA-1)과 간 구성 세포들의 ICAM-1간의 결합으로 활성화된 CD8⁺ T 세포의 축적이 일어남이 증명되었다 (Mehal 등, 1999).

한편, 간은 내피세포와 간세포 사이에 basement membrane이 없고, 내피세포에는 작은 구멍이 많이 있다. 그래서 간에 염증이 있거나 간에서 항원이 발견될 경우, T 세포가 내피세포의 세포질 구멍을 통해서 간세포와 만날 수 있다고 한다 (Park 등, 2002). 이와 같은 간의 구조적 특징을 보면, 간세포 자체가 T 세포의 활성화에 미치는 영향을 배제할 수 없다. 특히나 ICAM-1은 정상 상태의 간의 내피세포와 Kupffer 세포뿐만 아니라 간세포에서도 발견되고 염증 반응이 있는 간에서는 발현양이 증가한다고 보고되었다 (Park 등, 2002). 즉, 간에서 ICAM-1의 발현이 증가되면 CD8⁺ T 세포의 간 내 집결이 증진될 것으로 생각되는데, 이것은 앞에서 말한 HBV의 X 단백질이 간암 세포주의 ICAM-1의 발현을 증가시킨다는 실험 결과와 연관하여 주목할만한 사실이다 (Hu 등, 1992).

간 내 집결한 활성화 CD8⁺ T 세포의 세포사를 유도하는 기전에 대해서는 여러 의견들이 있다. 그 중에서 FasL와 관련된 세포사의 원인을 연구한 결과로는 Adenovirus에 감염된 마우스를 이용한 연구에서 바이러스에 특이한 CD8⁺ T 세포의 제거에 TNF- α 나 perforin보다 FasL가 필요하다는 보고가 있었다 (Liu 등, 2001). 한편으로는 마우스를 이용한 실험에서 Kupffer 세포에 항원이 제공되는 것이 세포사에 더 작용하고, 간에서 FasL를 발현하는 백혈구 계통의 세포가 CD8⁺ T 세포의 세포사에 관련된 주된 세포라고 하였으나 FasL을 발현하는 간세

포도 CD8⁺ T 세포의 세포사에 작용할 가능성도 남아있다 (Liu 등, 2001; Mehal 등, 2001). C형 바이러스와 관련된 사람의 간암 조직 표본에서 암세포와 암조직을 둘러싸고 있는 정상 간세포에서 FasL의 발현이 증가되어 있고, 동시에 그 주변에서 CD8⁺ T세포의 세포사가 관찰된 결과는 정상 간세포의 FasL 발현도 CD8⁺ T 세포의 세포사에 작용할 가능성을 간접적으로 보여주고 있다 (Fukazawa 등, 2001).

D. 연구 목적

본 연구에서는 X 단백질을 발현시킨 일차 간세포가 CD8⁺ T 세포의 활성화와 세포사에 영향을 미치는가를 조사하고자 한다. 앞서 기술한 바와 같이 X 단백질의 발현으로 간세포가 CD8⁺ T 세포의 면역반응에 영향을 미칠 가능성이 충분하다고 생각된다. 그러나 아직까지 이러한 점에 주목하여 보고된 연구가 없었다. 그 이유는 정상 간세포 배양이 어렵고 일차로 배양된 간세포로 유전자 도입이 어렵다는 것으로 생각된다. 본 연구에서는 baculovir시스템을 이용하여 일차 배양된 정상 간세포에 X 유전자 도입을 가능하게 하였고 (Hofmann, 1995), X 단백질을 발현하는 일차 배양된 간세포가 CD8⁺ T 세포의 증식과 사이토카인 생산, 세포사에 미치는 영향을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

A. 재조합 Baculovirus 생산

이미 확보하고 있는 pAcSG2-EGFP-OVA-HBx 벡터를 *Bam*HI과 *Not*I으로 잘라 EGFP 유전자 전체와 OVA, HBx 유전자의 일부를 제거하였다. 이 벡터에서 제거된 X 유전자는 pCMV-OVA-HBx 벡터를 partial cutting하여 분리한 451bp DNA가닥을 T4 DNA ligase (Biolabs, New England)로 연결하여 X 유전자가 삽입된 벡터, pAcSG2-CMV-HBx를 만들었다. 이 벡터에 대한 대조군으로 pAcSG2-EGFP-OVA를 *Bam*HI과 *Not*I으로 잘라 EGFP-OVA 유전자를 제거한 후 T4 DNA polymerase (Biolabs)로 blunt end를 만든 후, T4 DNA ligase (Biolabs)를 이용해 self ligation하여 X 유전자를 가지고 있지 않은 벡터, pAcSG2-CMV를 만들었다.

이와 같이 제작된 재조합 baculovirus transfer vector를 이용하여 재조합 baculovirus를 생산하고 수집할 때 사용한 세포주는 곤충세포주인 *Spodoptera frugiperda* 9 (*Sf* 9) 세포 (BD biosciences, Bedford, MA, U.S.A)이다. 먼저, *Sf* 9 세포를 60 mm dish에 2×10^6 수만큼 넣은 후 1 시간동안 27°C, CO₂가 없는 배양기에 정치시켰다. pAcSG2-CMV-HBx 또는 pAcSG2-CMV 3 μ g와 linearized lethal mutant baculovirus DNA 0.5 μ g (BD biosciences)을 혈청이 없는 TNM-FH 배지(BD biosciences) 1 ml에 넣고, liposome reagent (DMRIE-C Reagent, GibcoBRL, Gaithersburg, MD, U.S.A) 10 μ l가 들어있는 TNM-FH 배지 1 ml를 첨가하였다. 이를 실온에서 15분 정치한 다음, *Sf* 9 세포에 넣고, 27°C에서 5시간 배양한 후, fetal bovine serum (이하 FBS로 표기함, GibcoBRL)을

첨가하였다. 배양 4일째 배양액을 4°C, 2,500 rpm, 10 분간 원심 분리하여 세포 과편을 제거함으로써 재조합 baculovirus를 생산하였다. 일차로 생산된 바이러스를 *sf 9* 세포에 감염시킴으로서 바이러스를 증식시켰고 이를 이차로 생성된 바이러스로 명명하였다. 이차로 생성된 바이러스를 *sf 9* 세포에 감염시킴으로서 3차로 생성된 바이러스를 생산하고 이를 이용하여 4차로 생성된 바이러스를 대량 생산하여 실험에 사용하였다. *sf 9* 세포에 3차 감염을 시키고 4일정도 되면 대조군과 세포 형태를 비교하여 감염이 된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1).

수집된 Baculovirus 부유액을 6,000 xg (Jouan, Seoul, Korea)으로 4°C에서 16시간 원심분리한 후, 상층액을 제거하고 바이러스 pellet은 1% FBS가 포함된 PBS로 부유시켜 빛을 차단하여 4°C에 보관하였다.

B. Plaque assay를 이용한 baculovirus 역가 분석

바이러스 감염하기 1시간 전, 6 well plate에 *sf 9* 세포 (2×10^6)가 골고루 퍼지도록 넣은 후, 배양기에 정치시켰다. 고속 원심분리법으로 농축한 바이러스액을 희석하여 *sf 9* 세포가 들어있는 well에 각각 넣어주고 27°C에서 1 시간 정치한 후 배지를 제거하였다. 여기에 0.8 % agarose TNM-FH 배지 3 ml 씩 넣어 주고, 실온에서 20 분간 정치한 다음 27°C의 습한 배양기에서 약 6~10일 동안 배양하면서 플라크 형성을 조사하였다.

C. 마우스와 세포

본 실험에서는 6~8 주령된 수컷 C57BL/6 (H-2^b) 마우스 (Taconic, Suwon, Korea)를 이용하였다. MataHari TCR 형질전환 마우스 (TCR transgenic mouse)는 Dr. Matzinger (NIH)로부터 받았다. MataHari 마우스는 RAG^{-/-} 배경의 TCR 형질전환 마우스로서 수컷에서만 발현되는 단백질 H-Yp^b의 펩타이드와 MHC class I의 subtype H-2D^b 복합체에 특이한 TCR을 발현하는 CD8⁺ T 세포만을 생산한다.

Sf 9 세포는 10% FBS와 Gentamicine이 포함된 TNM-FH 배지로 27°C에서 배양하였다. COSM6 세포와 Huh7 세포는 10% FBS와 streptomycin, penicillin이 포함된 Dulbecco's modified eagle medium (DMEM, GibcoBRL) 배지로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 일차 간세포는 타입 I collagen (BD biosciences)이 코팅된 48 well plate에 insulin 과 dexamethasone, nicotinamide가 포함된 DMEM-F12 (GibcoBRL) 배지로 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

D. 유전자의 한시적 이입 (transient transfection)과 재조합 baculovirus의 감염

재조합 baculovirus transfer vector에 의한 X 유전자 발현이 포유동물 세포에서 이루어지는가 알아보고자 COSM6 세포에 유전자를 이입하였다. COSM6 세포 (4 × 10⁵ cells/60 mm dish)에 8 μg의 palsmid DNA를 liposome (Lipofectiamine2000 reagent, GibcoBRL)를 이용하여 유전자 이입을 실시하였다. 이 세포를 36 시간동안 37°C, CO₂ 배양기에서 배양하였다.

재조합 baculovirus 감염에 의하여 간세포주에서 X 단백질이 발현되는가

알아보고자 Huh7 세포를 이용하였다. 먼저 Huh7 세포 (4×10^5 cells/60 mm dish)를 넣고 16시간 배양한 후, MOI 1000의 baculovirus가 들어있는 배지로 교환하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에 정치시켰다. 한 시간 후, 배지 2 ml을 첨가하고 48시간동안 배양하였다.

E. Western blot ting

재조합 baculovirus transfer vector가 도입된 세포 혹은 재조합 baculovirus가 감염된 세포를 모아, 인산 완충 식염수 (phosphate buffered saline; 이하 PBS로 약함)로 씻은 후, 4°C, 5,000 rpm으로 5 분간 원심 분리한 세포침전에 RIPA buffer (1% NP-40, 1% DOC, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.4)을 넣고 4°C에서 20 분간 반응시켰다. 이를 4°C, 12,000 rpm으로 20 분간 원심 분리하여 얻은 상청액에 SDS-PAGE sample loading buffer를 첨가하고, 5분간 끓인 후 15% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (이하 SDS-PAGE로 약함) gel에 적하하여 70 V (voltage)로 전기영동하였다. 이 acrylamide gel의 단백질을 polyvinylidene fluoride (이하 PVDF로 약함, millipore Co., Bedford, MA, U.S.A.)막으로 260mA (Ampere)에서 2 시간 전기이동시킨 후 1: 2,000으로 희석한 HBx에 대한 토끼 혈청과 1 시간 동안 반응시켰다. 막을 세척한 후 Horseradish peroxidase (이하 HRP로 약함)가 결합된 anti-rabbit IgG 항체 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark)를 넣고 1시간동안 반응시켰다. 충분히 세척한 후 Enhanced chemical luminescence (이하 ECL로 약함, Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)로 X 단백질의 band를 확인하였다.

F. 마우스 간세포 배양 및 X 단백질 발현 baculovirus의 감염

C57BL/6 수컷 마우스에서 간의 portal vein에 EGTA (Sigma, Saint Louis, MO, U.A.S.)가 함유된 칼슘이온과 마그네슘이온이 없는 Hank's balanced salt solution (이하 HBSS로 칭함, GibcoBRL, Grand Island, NY, U.S.A)를 15분간 관류한 다음, EGTA가 들어가지 않은 HBSS와 collagenase (Sigma)가 함유된 HBSS를 각각 15 분간 관류한 후 간을 적출하였다. 세포 스크레이퍼와 세포 여과기를 이용하여 간세포를 분리하고 50 xg에서 2 분간 두 차례 원심 분리하여 림프구와 Kupffer cell, 내피세포를 제거하였다. 다음으로 percoll gradient (Sigma)를 이용하여 10 분간 4°C, 1,000 rpm에서 원심 분리하여 죽은 세포를 제거하였다. Collagen (type I, BD biosciences)이 코팅된 48 well plate의 각 well에 간세포 (2×10^4)를 넣고 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 밤새 정치하여 세포를 well의 바닥에 부착시킨 후 M.O.I 1,000의 비율로 준비된 재조합 baculovirus를 감염시켰다.

G. MataHari RAG1^{-/-} 마우스에서 CD8⁺ T 세포의 분리

암컷 MataHari 마우스의 비장과 림프절을 분리한 후 세포 분리망을 이용하여 단일 세포 부유액을 만들었다. Ficoll 액 (lympholyte-M, Cedarlane laboratories, hordy, Canada)을 이용하여 세포 부유액에서 림프구를 분리하였다. 수집한 림프구에서 CD8⁺ T 세포를 분리하기 위해서 magnetic cell separator, MACS 분리기 (MiltenyiBiotec GmbH, Sunnyvale, CA)를 이용하였다. 먼저 세포 수 1×10^7 당 superparamagnetic microbead가 결합된 단일클론 rat anti- CD8

(Ly-2) 항체 (MiltenyiBiotec GmbH) 10 μ l와 90 μ l 세척액 (0.5% BSA가 포함된 PBS, pH 7.4)을 넣고 4°C에서 15 분간 반응시켰다. 이후 세포를 세척액으로 2회 세척한 후, 다시 2 ml 세척액으로 부유하였다. 세포 부유액을 마그네틱 판 (Vrio MACS, Miltenyibiotec GmbH)에 부착된 separation column (MiltenyiBiotec GmbH)에 투과시켰다. 칼럼을 세척액으로 5번 세척한 후, 마그네틱 판에서 분리한 칼럼에 세척액을 통과시킴으로써 칼럼에 결합된 CD8⁺ T 세포를 수집하였다. 수집한 세포의 일부를 phycoerythrin (PE)가 결합된 단일클론 항체 anti-CD8 (PharMingen, San Diego, CA) (최종농도; 1:200)로 염색하였고 유세포 분석기 (FACS Vantage, Beckton Dickinson, U.S.A)를 이용하여 분석함으로써 CD8⁺ T 세포 분리 효율을 분석하였다.

H. 일차 배양 간세포와 CD8⁺ T 세포의 배양

Collagen이 코팅된 48 well plate의 각 well에 적출한 수컷 C57BL/6 마우스의 간세포 (2 x 10⁴)를 넣고 37°C, 5% CO₂조건에서 배양하였다. 16 시간 후, HBx를 발현하는 baculovirus와 대조군 baculovirus 각각 M.O.I 1,000으로 간세포를 감염시킨 후 24시간동안 배양하여 X 단백질이 발현되도록 하였다. 여기에 암컷 MataHari CD8⁺ T 세포 (2 x 10⁵)를 넣고 48시간동안 배양하였다. CD8⁺ T세포의 증식을 분석하고자 할 때에는 아래에 기술한 방법으로 CD8⁺ T 세포를 5-(6-)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (이하 CFSE로 표기함)로 표지한 후 간세포와 함께 배양하였다.

I. CD8⁺ T 세포의 증식 분석

CD8⁺ T 세포의 증식은 CFSE가 염색된 CD8⁺ T 세포의 형광 반감도를 분석함으로써 가능하다. MataHari CD8⁺ T 세포를 5×10^7 /ml가 되도록 PBS에 희석하고, 여기에 5 mM CFSE 농축액을 넣어 최종농도가 5 μ M가 되도록 하였다. 이를 37°C에서 10 분간 정치한 후 2% FBS가 포함된 DMEM 배지(GibcoBRL)로 세척한 후 배양에 이용하였다. CFSE로 표지된 CD8⁺ T 세포를 간세포와 함께 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후 CD8⁺ T 세포를 수집하고 phycoerythrin (PE)이 결합된 단일클론 항체 anti-CD8으로 염색하였다. CD8⁺ T 세포의 CFSE의 형광도의 변화를 유세포 분석기를 이용하여 분석하였다.

J. 사이토카인 생산 분석

위의 H항에서 기술한 방법으로 1차 간세포와 CD8⁺ T 세포를 48시간 함께 배양한 후 세포 배양액을 모아 Enzyme-linked immunosorbent assay를 실시하고자 INF- γ ELISA kit (Endogen, Inc., Boston, MA, U.S.A), IL-10 ELISA kit (Biosource, California, CA, U.S.A)을 이용하였다.

분석하려는 사이토카인에 특이적인 단일클론항체가 코팅된 96 well-plate에 배양액을 넣은 후 덮개를 덮고 37°C에서 1 시간 반응시켰다. 배양액을 제거하고 세척액으로 4 회 plate를 씻은 후, biotin이 결합된 단일클론 항체액을 각 well에 넣고 덮개를 덮은 후 한 시간동안 실온에서 반응시켰다. 한 시간 후 세척액으로 각 well을 씻은 후 streptavidin-peroxidase 반응액 (100 μ l/well)을 넣고 덮개를 덮은 후 30 분간 실온에서 반응시켰다. 다시 well을 씻은 후 100 μ l stabilized

Chromogen을 넣고 빛을 차단하여 실온에서 반응시켰다. 삼십 분 후 각 well에 100 μ l 정지액을 넣고 섞은 후 450 nm에서의 흡광도를 분석하였다.

K. CD8⁺ T 세포의 세포사 분석

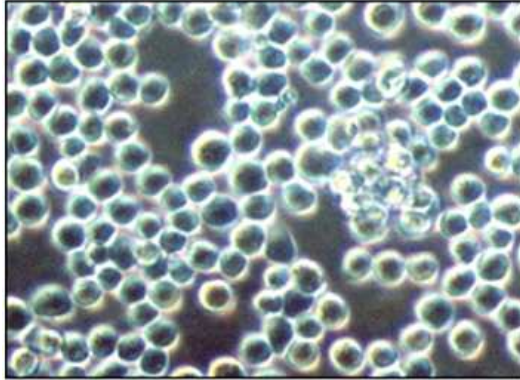
CD8⁺ T 세포의 세포사 분석은 일정 시간동안 간세포와 배양 후 수집한 T 세포를 Terminal deoxynucleotidyl transferase end-labeling 법 (이하 TUNEL로 표기함, *In Situ* Cell Death Detection Kit-Fluorescein, Roshe, Penzberg, Germany)를 이용함으로써 분석하였다. 먼저 CD8⁺ T 세포 (2×10^5)를 PE가 결합된 단일클론 anti-CD8과 anti-CD45 항체로 염색한 후, 100 μ l 2% paraformaldehyde를 넣고 실온에서 40분간 처리하여 고정시켰다. 그 후, PBS로 한번 세척한 다음 100 μ l 0.1% Triton-X를 포함하는 0.1% sodium citrate를 넣고 4°C에서 3 분간 반응시켰다. 세포를 다시 씻은 후 fluorescein isothiocyanate (이하 FITC로 표기함)가 결합된 dUTP와 Terminal deoxynucleotidyl transferase (이하 TdT로 표기함)를 1:9로 희석된 100 μ l 반응액을 넣고 빛을 차단한 채 37°C에서 1 시간동안 반응시켰다. 반응을 끝내고 두 번 세척한 후 2% paraformaldehyde로 부유하여 유세포 분석기로 분석하였다.

III. 결 과

A. X 단백질을 발현하는 baculovirus 생산

일차 배양 간세포에 효과적으로 감염이 되는 baculovirus를 이용하여 B형 간염 바이러스의 X 유전자를 도입한 재조합 baculovirus를 생산하였다. 재조합 baculovirus를 제작하기 위해서 먼저 baculovirus transfer vector를 제작하였다. Baculovirus 유전자는 88~160 kbp 정도로 크기 때문에 바이러스 전체 유전자를 조작하기가 어려우므로 재조합 baculovirus transfer vector를 생산한 후 이것을 lethal mutant baculovirus 유전자와 함께 *sf* 9 세포에 도입하여 transfer vector와 바이러스 DNA의 동일염기서열간의 recombination이 일어나도록 함으로서 재조합 baculovirus를 생산한다 (Stewart 등 1997). 본 실험에서 사용한 재조합 baculovirus transfer vector는 cytomegalovirus (이하 CMV로 표기함) promoter와 SV40의 poly A tail이 포함된 mammalian expression cassette가 포함되어 있으며, pAcSG2-CMV-HBx의 X 유전자는 CMV promoter의 조절을 받아 포유류 세포에서 발현될 수 있다 (Fig. 2.). 대조군으로 X 유전자를 포함하지 않은 pAcSG2-CMV 벡터를 제작하였다 (Fig. 2.). 제작한 baculovirus transfer 벡터의 유전자 발현을 단백질 단계에서 확인하기 위하여 COSM6 세포에 liposome을 이용하여 재조합 baculovirus transfer 벡터를 도입한 후 세포 용해액으로 Western blot 분석법을 수행하였다. 대장균에서 발현시켜 정제한 HBx와 동일한 크기의 약 17 kDa 정도의 band가 pAcSG2-CMV-HBx를 도입한 세포에서 나타난 반면에 pAcSG2-CMV를 도입한 대조군에서는 나타나지 않았다 (Fig. 3-A.).

A.



B.

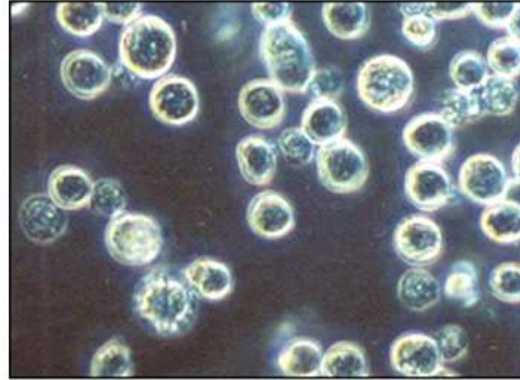


Fig. 1. The morphology of *Sf* 9 cells infected with baculovirus. *Sf* 9 cells were infected with baculovirus (B) at the multiplicity of infection (M.O.I) 1,000. After 4 days of culture, the morphology of *Sf* 9 cells was observed under a microscope of 100 magnifications. Uninfected *Sf* 9 cells (A).

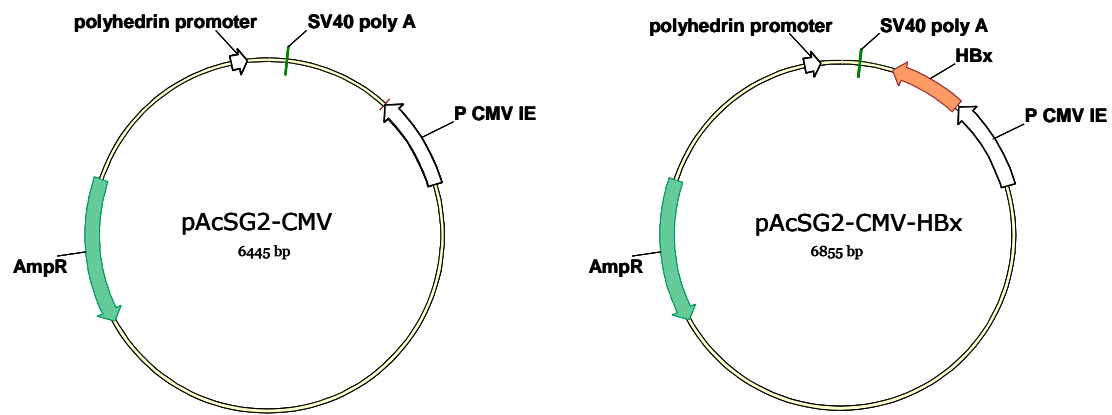


Fig. 2. Construction of the baculovirus transfer vector.

다음으로 X 단백질 발현 baculovirus transfer vector를 이용하여 재조합 baculovirus를 생산하였다. 생산된 바이러스 감염으로 인간 간암 세포주에서 X 유전자가 발현되는가를 Western blot 분석법으로 확인하였다 (Fig. 3-B). 대조군 baculovirus를 감염시킨 세포와 달리 X 단백질 발현 baculovirus를 감염시킨 세포에서 약 17 kDa의 band가 검출되었다.

B. X 단백질이 발현되는 일차 간세포가 미자극 (naive) CD8⁺ T 세포의 활성화에 미치는 영향

동종 정상 마우스 간세포는 실험관에서 동종 MHC class I 분자에 특이한 CD8⁺ T 세포의 증식을 유도한다고 보고되어 있으며 (Zhou 등, 1990), 간세포가 생체 내에서 미자극 CD8⁺ T 세포의 활성을 유도할 가능성이 배제되어 있지 않다. 먼저 X 단백질이 발현되는 간세포가 항원 특이 미자극 CD8⁺ T 세포의 증식에 미치는 영향을 조사하기 위하여 수컷 C57BL/6 (H-2^b) 마우스의 간세포를 분리하여 baculovirus를 감염시키고, 여기에 CFSE로 표지한 암컷 MataHari 마우스의 CD8⁺ T 세포를 넣고 함께 배양하였다. 암컷 MataHari 마우스의 CD8⁺ T 세포는 수컷의 단백질에서 유래된 펩타이드 (WMHHNMDLI, H-Yp^b)와 H-2D^b 복합체에 특이적인 TCR transgene을 발현한다. CD8⁺ T 세포를 일차 배양 간세포와 함께 배양한 결과, MataHari 마우스의 CD8⁺ T 세포의 증식이 유도되었으며, IL-2 (20 U/ml)가 첨가되었을 때 CD8⁺ T 세포의 증식이 더욱 활발하였다. 그러나 IL-2의 첨가와 상관없이 CD8⁺ T세포의 증식은 간세포의 X 단백질 발현의 영향을 받지 않았다 (Fig. 4).

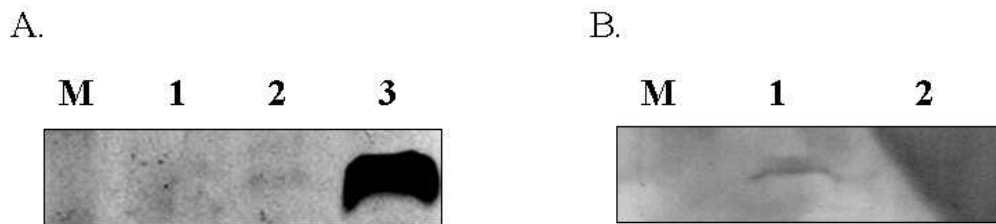


Fig. 3. The expression of HBx protein in mammalian cell lines. A; To confirm the expression of HBx of baculovirus transfer vector in mammalian cell , COSM6 cells were transfected transiently with pAcSG2-CMV (1), and pAcSG2-CMV-HBx (2) respectively, HBx purified from *E. coli*(3). B; To confirm the expression of HBx in mammalian cells infected with HBx of recombinant baculoviruses, Huh7 cells were infected with recombinant baculovirus expressing HBx protein (1) or not (2). Two days after infection, the cell lysate was analyzed by Western blot with rabbit anti-X- κ HL and HRP-conjugated anti-rabbit Ig Ab.

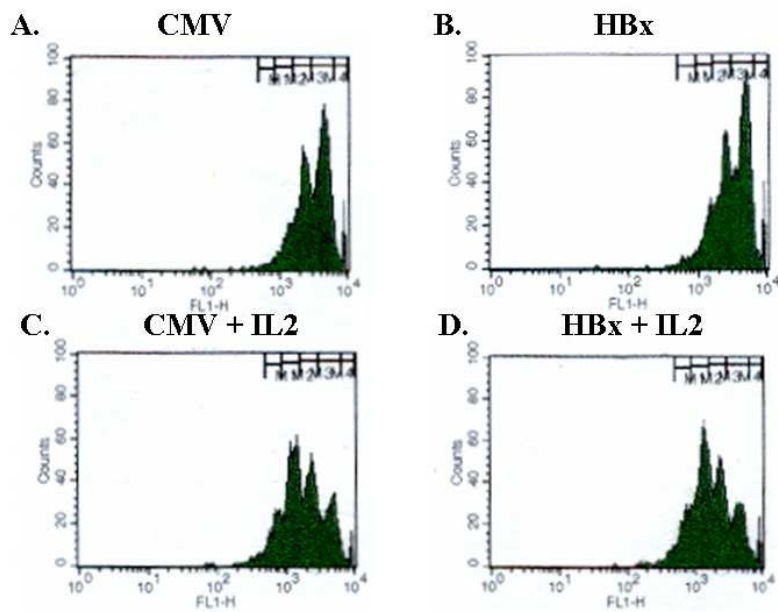


Fig. 4. The proliferation assay of naive CD8⁺ T cells co-cultured with primary hepatocytes expressing HBx or not. Primary hepatocytes were isolated and infected with baculovirus expressing HBx or not. After 24 h, purified female MataHari CD8⁺ T cells labeled with CFSE were co-cultured with primary hepatocytes (H-2^b). After 48 hours of co-culture, the cells were harvested and stained with PE-conjugated anti-CD8 Ab and anti-CD45 Ab and analyzed by a flow cytometry. Histogram gates were set on CD8⁺ and CD45⁺ cell populations. A; CD8⁺ T cells cultured with hepatocytes infected with control baculovirus, B; CD8⁺ T cells cultured with hepatocytes infected with baculovirus expressing HBx, C; CD8⁺ T cells cultured in the presence of IL-2 with hepatocytes infected with control baculovirus, D; CD8⁺ T cells cultured in the presence of IL-2 with hepatocytes infected with baculovirus expressing HBx.

CD8⁺ T 세포와 간세포를 함께 배양할 때 간 세포내 X 단백질의 발현이 IFN- γ 와 IL-10의 분비에 영향을 미치는가 알아보기 위하여 sandwich ELISA를 수행하였다. 간세포 또는 CD8⁺ T 세포를 단독으로 배양한 조건에서는 IFN- γ 가 생산되지 않았으나 간세포와 CD8⁺ T 세포를 함께 배양한 조건에서는 생산되었다. 그 양에 있어서 baculovirus를 감염시키지 않은 간세포와 CD8⁺ T 세포를 함께 배양한 조건보다 baculovirus를 감염시킨 조건에서 IFN- γ 가 적게 생산되었다. X 단백질을 발현하는 baculovirus를 감염시킨 간세포와 CD8⁺ T 세포를 함께 배양한 조건과 대조군 baculovirus를 감염시킨 간세포와 CD8⁺ T 세포를 함께 배양한 조건간의 IFN- γ 생산의 차이가 보였지만 이 결과가 통계적으로 유의한지 알기 위하여 실험을 반복수행할 예정이다 (Fig. 5). 반면에 본 실험조건에서는 IL-10의 생산이 관찰되지 않았다 (Fig. 5).

C. X 단백질이 발현되는 일차 간세포가 미자극 CD8⁺ T 세포의 세포사멸에 미치는 영향

일차 배양된 간세포에 의하여 활성화된 CD8⁺ T 세포의 세포사가 간세포의 X 단백질 발현에 의하여 영향을 받는지 알아보하고자 X 단백질을 발현하는 간세포와 함께 48 시간 배양한 MataHari CD8⁺ T 세포를 TUNEL 염색하여 유세포 분석을 수행하였다.

본 실험조건에서 CD8⁺ T세포가 활성화된 후 48 시간에서는 CD8⁺ T 세포의 5% 미만에서 세포사가 일어남이 관찰되었다. CD8⁺ T 세포의 세포사가 일어난 빈도는 X 단백질을 발현하는 간세포와 함께 배양한 조건에서 대조군 baculovirus를 감염한 간세포와 함께 배양한 조건에 비해 약 5배, 정상 마우스 간세포와 함께 배양한 조

건에 비해 약 2.5배임을 관찰하였다 (Fig. 6).

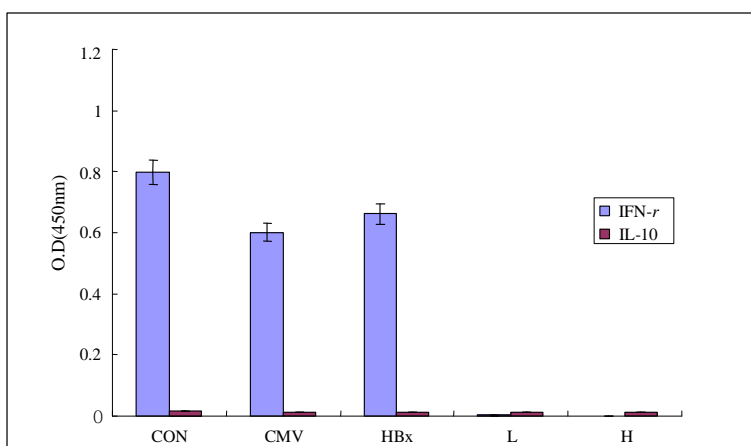


Fig. 5. IFN- γ and IL-10 production of naive CD8⁺ T cells co-cultured with primary hepatocytes expressing HBx or not. Purified female MataHari CD8⁺ T cells were co-cultured with primary hepatocytes. After 48 hr of co-culture, the supernatants were harvested and the production of IFN- γ and IL-10 were analyzed by sandwich ELISA. CON; CD8⁺ T cells cultured with uninfected-hepatocytes, CMV; CD8⁺ T cells cultured with hepatocytes infected with control baculovirus, HBx; CD8⁺ T cells cultured with hepatocytes infected with baculovirus expressing HBx, L; CD8⁺ T cells cultured alone, H; hepatocytes alone.

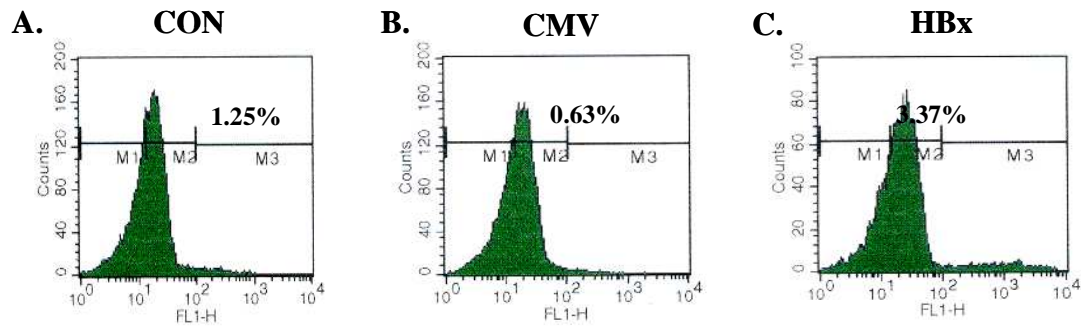


Fig. 6. The TUNEL assay of naive CD8⁺ T cells co-cultured with primary hepatocytes expressing HBx or not. The naive CD8⁺ T cells were co-cultured with hepatocytes infected with recombinant baculovirus expressing HBx or not. The CD8⁺ T cells were harvested, labeled and analyzed by FACS 48 hr after co-culture. TUNEL histograms of CD8⁺ T cells were gated on CD45.1⁺CD8⁺ cells. A; CD8⁺ T cells cultured with uninfected hepatocytes B; CD8⁺ T cells cultured with hepatocytes infected with control baculovirus. C; CD8⁺ T cells cultured with hepatocytes infected with baculovirus expressing HBx.

IV. 고찰

초기의 X 단백질의 기능에 대한 분자생물학적 연구로는 감염된 간세포의 간암 발생기작과 세포내 바이러스의 복제에 관련된 것이 많았다. 최근 들어 HBV의 감염에 대한 면역반응과 관련하여 X 단백질이 중요한 역할을 할 것으로 보고되고 있으나 간암 세포주를 이용한 연구가 대부분이며, 이러한 연구 또한 분자 생물학적 접근으로만 이루어지고 있을 뿐, HBV 감염에서 바이러스의 제거에 중요한 역할을 하는 CD8⁺ T 세포와 정상 간세포에서 X 단백질 발현의 상관관계에 대하여 구체적으로 보고된 바는 없다. 본 연구에서 X 단백질을 발현하는 간세포가 항원 특이적 CD8⁺ T 세포를 증식시킬 수 있으며, IFN- γ 의 생산을 유도하고, 항원 특이적 CD8⁺ T 세포의 세포사를 촉진시킨다는 사실을 확인하였다.

본 연구에서 일차 배양된 마우스의 정상 간세포에서 X 단백질을 발현하도록 한 후 이 세포가 CD8⁺ T 세포의 활성화와 세포사에 미치는 영향을 조사하였다. 이러한 실험체계는 간세포 친화성이 높고, 일차 배양된 사람 또는 마우스의 간세포에서도 높은 효율로 유전자를 도입하는 baculovirus 감염 시스템 (Hofmann, 1995)을 이용하여, 본 연구에서 처음으로 확립되었다. 이러한 실험 체계는 HBV 전체 유전자를 삽입한 baculovirus를 이용함으로써 HBV의 초기 감염의 *in vitro* 모델로 발전될 수 있을 것이다.

일반적으로 미자극 T 세포는 림프절과 비장에서 활성화되고 분화되며, 이렇게 성숙된 T 세포만이 혈관을 통해서 비림프 조직으로 이동할 수 있다고 받아들여지고 있다 (Mackay 등, 1990). 미자극 T 세포는 림프절 또는 비장에서 펩티드와 MHC 복합체를 발현하는 수상돌기세포 (dendritic cell)에 의해 활성화된다고 알려져 있다. 그러나 본 연구에서는 H-Y 항원을 발현하는 수컷 C57BL/6

(H-2^b) 마우스의 간세포와 H-Y 항원과 H-2D^b에 특이적인 암컷 MataHari의 CD8⁺ T 세포를 함께 배양한 결과, 미자극 CD8⁺ T 세포가 활성화되어 증식하고 IFN-*r*을 분비한다는 사실을 관찰하였다 (Fig. 4., 5.). 이 결과는 최근에 발표된 H-2K^b에 특이적인 미자극 Des-TCR 형질전환 마우스의 CD8⁺ T 세포를 간에서만 H-2K^b를 발현하는 형질전환 Met-K^b 마우스로 adoptive transfer 하였을 때 수 시간 안에 간으로 수집되고 간에서 활성화되었다는 Bertolino의 결과와도 부합되는 것이다 (Bertolino 등, 2001). 본 결과는 다른 비림프구 조직과 다르게 간 내부에서는 간의 림프구계열 세포들과 관계없이 간세포 자체만으로 미자극 CD8⁺ T 세포가 항원 특이적으로 활성화될 수 있음을 뒷받침한다.

현재까지 X 단백질이 세포독성 T 세포의 활성을 조절하는지에 대한 직접적인 연구는 없었다. 본 실험에서 X 단백질을 발현하는 간세포와 CD8⁺ T 세포를 함께 배양한 후 CFSE 염색법을 이용하여 세포 분열을 확인한 결과, 간세포에 의한 CD8⁺ T 세포 증식이 X 단백질 발현 여부에 의해 조절되지 않음을 관찰하였다 (Fig. 4.). 한편, CD8⁺ T 세포에서 분비되는 IFN-*r* 분비를 조사한 결과, X 단백질을 발현하는 baculovirus에 감염된 간세포와 CD8⁺ T 세포를 함께 배양했을 때 X 단백질을 발현하지 않는 baculovirus에 감염된 간세포와 CD8⁺ T 세포를 배양한 조건에 비해 그 분비량이 증가하는 경향을 보였으나 baculovirus에 감염되지 않은 간세포와 CD8⁺ T 세포를 배양한 조건에서보다는 IFN-*r*의 분비량이 적었다 (Fig. 5.). X 단백질에 의해 MHC class I 분자와 ICAM-1 분자의 발현이 증가한다는 보고가 있어 (Zou, 1990; Hu 1992) CD8⁺ T 세포의 활성이 증가할 가능성이 예상되었으나 본 연구 결과는 간에서 X 단백질의 발현은 CD8⁺ T 세포의 활성에는 영향을 미치지 않음을 보여준다.

IL-10은 사이토카인 2 집단 (Class 2 cytokine)의 대표 사이토카인으로 항

염증성 사이토카인이며, 보조 T 림프구 1 타입 (type 1 helper T cell; 이하 Th1 cell로 약함)의 면역 작용을 억제하는 것으로 보고되어 있다. 본 실험에서 ELISA 법으로 IL-10 분비량을 측정하였으나 어느 실험군에서도 IL-10의 분비를 확인할 수 없었다 (Fig. 5). 이 결과는 최근 OT-1 마우스를 이용하여 *in vitro* 상에서 항원을 제공하는 일차배양 간세포와 미자극 항원 특이적 CD8⁺ T 세포를 함께 배양했을 때 IL-10의 분비가 제공된 항원의 농도에 관계없이 분비량이 매우 낮았다는 보고와 부합하며 (Dikopoulos 등, 2004), 간세포 내 X 단백질의 발현이 IL-10의 생산을 유도하지 않음을 의미한다.

간은 활성화된 CD8⁺ T 세포의 세포사에 관련된 장기로 알려져 있다. 간의 구조적 특징으로 간 내로 유입된 CD8⁺ T 세포가 간세포와 직접 상호 작용할 수 있다는 연구 결과가 보고되었기 때문에 (Park 등, 2002), 본 연구는 HBV 감염과 관련하여 간세포가 CD8⁺ T 세포의 세포사를 유도하는지 밝히고자 X 단백질을 발현하는 간세포와 함께 배양한 CD8⁺ T 세포의 세포사 빈도를 분석하였다. 그 결과, CD8⁺ T 세포의 세포사 빈도의 수치가 낮기는 하지만 X 단백질을 발현하는 간세포가 대조군에 비해 2.5~5배 높은 빈도로 CD8⁺ T 세포의 세포사를 유도했다 (Fig. 6). 비록 본 실험에서 90% 이상의 간세포를 감염시킬 수 있는 M.O.I 10⁴의 baculovirus를 이용하였으나, 실제로 얼마나 많은 수의 간세포가 X 단백질을 발현하는지 관찰할 수 없었다. 왜냐하면 X 단백질의 발현양이 매우 낮고 반감기가 매우 짧기 때문에 각 세포수준에서 X 단백질의 발현을 보기 어려워 본 실험에서 재조합 baculovirus를 이용한 X 단백질 발현은 Western blot을 이용하여 확인하였기 때문이다. 따라서 X 단백질 발현에 의해 간세포가 CD8⁺ T 세포의 세포사를 유도하는 현상이 본 실험 결과에서 보인 결과보다 더욱 현저할 가능성이 남아있다.

X 단백질을 발현하는 간세포에 의한 CD8⁺ T 세포의 세포사 촉진기전으로 첫째, X 단백질에 의한 간세포의 FasL 발현 증가를 생각할 수 있다. 간에서 FasL을 발현하는 Kupffer 세포나 그밖에 백혈구 계통의 세포들뿐만 아니라 FasL을 발현하는 간세포가 CD8⁺ T 세포의 세포사에 작용할 가능성이 있다고 보고되었다 (Liu 등, 2001). 또한 FasL의 발현을 유도하는 IL-18의 발현이 X 단백질을 발현하는 형질전환 마우스의 간에서 관찰되었다 (Lee 등, 2002). 그러므로 X 단백질이 HBV에 감염된 간세포의 표면의 FasL의 발현을 유도하여 CD8⁺ T 세포의 세포사를 유도할 가능성이 있다.

둘째, TNF- α 에 의한 CD8⁺ T 세포의 세포사 유도기전을 생각할 수 있다. 최근 TNF- α 항체를 이용한 *in vivo* 실험 결과, TNF- α 가 간에서 CD8⁺ T 세포사를 촉진한다는 보고가 있었다 (Debbie 등, 2004). 이와 관련하여, X 단백질을 발현하는 간암 세포주에서 TNF- α 의 유전자 전사가 촉진된다고 보고되었다 (Shin 등, 1999). 즉, X 단백질을 발현하는 간세포에서 TNF- α 의 발현이 유도되어 CD8⁺ T 세포의 세포사가 촉진됨을 생각할 수 있다.

세 번째로 X 단백질에 의한 간세포 표면의 ICAM-1 발현 증가로 CD8⁺ T 세포의 세포사가 촉진될 수 있다. *In vitro* 상에서 일차 배양 간세포와 활성화된 T 세포를 함께 배양했을 때 T 세포의 세포사가 유도되었으나, 렉틴 (lectin)이 제거된 간세포와 함께 배양한 T 세포의 세포사는 유도되지 않았으며, ICAM-1 결핍 마우스의 간세포와 함께 배양한 경우에도 T 세포의 세포사가 유도되지 않았다고 보고되었으므로 (Qian 등, 2001) ICAM-1의 발현이 CD8⁺ T 세포사에 중요한 작용을 할 가능성이 있다. 한편, X 단백질을 발현하는 간세포주에서 ICAM-1 유전자 전사가 증가하였으므로 (Hu 등, 1992), ICAM-1이 본 실험에서 CD8⁺ T 세포의 세포사 촉진 기작이 될 수 있으리라 생각할 수 있다. 앞으로 X

단백질을 발현하는 간세포가 CD8⁺ T 세포의 세포사를 촉진시키는 기작에 대한 연구가 진행되어야 하겠다.

본 연구를 종합해 보면, X 단백질을 발현하는 간세포는 미자극 항원 특이적 CD8⁺ T 세포의 활성을 조절하지 않으나 세포사를 촉진할 수 있었다. X 단백질을 발현하는 간세포에 의한 CD8⁺ T 세포의 세포사 촉진은 HBV 감염에서 간내 항원 특이 CD8⁺ T 세포의 감소를 유도할 수 있으리라 생각되며 이것은 만성 간염 환자에서 세포독성 T 세포의 면역반응이 약하게 나타나는 현상과 연관될 것으로 생각한다. 그러므로 본 연구 결과는 HBV에 의한 만성 간염의 발생 기전과 간암 발생기전을 이해하는데 도움이 되며, HBV 감염증 치료에 도움을 될 것이다.

IV. 결 론

본 연구에서는 간세포 내 X 단백질의 발현이 CD8⁺ T 세포의 활성화와 세포 사멸에 미치는 영향을 연구하고자, 일차 배양된 간세포에서 X 단백질을 발현시켜, 미자극 CD8⁺ T 세포와 함께 배양하는 실험계를 확립하고 CD8⁺ 세포의 증식과 사이토카인 생산, 세포사 빈도를 조사하였다. 그 결과, X 단백질을 발현하는 간세포가 미자극 항원 특이적 CD8⁺ T 세포의 활성화에는 영향을 미치지 않지만, CD8⁺ T 세포의 세포사를 촉진하는 것을 관찰하였다. 이것은 X 단백질의 간 내 발현이 CD8⁺ T 세포 면역반응을 조절할 수 있다는 증거로서 HBV에 감염된 간세포가 항원 특이 CD8⁺ T 세포의 감소를 유도할 가능성을 제시한다.

V. 참고 문헌

1. Ahn JY, Jung EY, Kwun HJ, Lee CW, Sung YC, Jang KL : Dual effects of hepatitis B virus X protein on the regulation of cell-cycle control depending on the status of cellular p53. *J Gen Virol* 83:2765-2772, 2002
2. Belz G, Altman JD, Doherty PC: Characteristics of virus-specific CD8(+) T cells in the liver during the control and resolution phases of influenza pneumonia. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:13812-13817, 1998
3. Bertolino P, Bowen DG, McCaughan GW, De St. Grothe BF: antigen-specific primary activation of CD8 T cells within the liver. *J Immunol* 166:5430-5438, 2001
4. Bouchard MJ, Wang LH, Schneider RJ: Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. *Science* 294:2376-2378, 2001
5. Chisari FV: Hepatitis B virus immunopathogenesis. *Ann Rev Immunol* 13:29-60, 1995
6. Diao J, Khine AA, Sarangi F, Hsu E, Iorio C, Richardson CD: X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway. *J Biol Chem*

276:8328–8340, 2001

7. Dikopoulos N, Wegenka U, Kroger A, Hauser H, Schirmbeck R, Reimann J: Recently primed CD8⁺ T cells entering the liver induce hepatocytes to interact with naive CD8⁺ T cells in the mouse. *Hepatology* 39:1256–1266, 2004
8. Fukazawa K, Takahashi K, Furuta K, Tagaya T, Koji T, Kakumu S et al: Expression of fas/fas ligand(fasL) and its involvement in infiltrating lymphocytes in hepatocellular carcinoma(HCC). *J Gastroenterol* 36:681–688, 2001
9. Fukuda R, Nguyen XT, Ishimura N, Ishihara S, Chowdhury A, Kohge N et al: X gene and precore B e antigen: comparison between asymptomatic "healthy" carriers and patients with severe chronic active hepatitis. *J Infect Dis* 172:1191–1197, 1995
10. Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV: Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 284:825–829, 1999
11. Hofmann C, Sandig V, Jennings G, Rudolph M, Schlag P, Strauss M: Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:10099–10103, 1995

12. Hu KQ, Vierling JM, Siddiqui A: Trans-activation of HLA-DR gene by hepatitis B virus X gene product. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:7140-7144, 1990
13. Hu KQ, Yu CH, Vierling JM: Up-regulation of intercellular adhesion molecule 1 transcription by hepatitis B virus X protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11441-11445, 1992
14. Huang L, Soldevila G, Leeker M, Flavell R, Crispe IN: The liver eliminates T cells undergoing antigen-triggered apoptosis in vivo. *Immunity* 1:741-749, 1994
15. Lee M, Choi Y, Shin E, Kang H, Kim Y, Jeong S et al: Hepatitis B virus X protein induced expression of interleukin 18 (IL-18): a potential mechanism for liver injury caused by hepatitis B virus (HBV) infection. *J Hepatol* 37:380-386, 2002
16. Liu ZX, Govindarajan S, Okamoto S, Dennert G: Fas-mediated apoptosis causes elimination of virus-specific cytotoxic T cells in the virus-infected liver. *J Immunol* 166:3035-3041, 2001
17. Mackay CR, Marston WL, Dudler L: Naive and memory T cells show distinct pathways of lymphocyte recirculation. *J Exp Med* 171:801-817,

1990

18. Mehal WZ, Azzaroli F, Crispe IN: Antigen presentation by liver cells controls intrahepatic T cell trapping, whereas bone marrow-derived cells preferentially promote intrahepatic T cell apoptosis. *J Immunol* 167:667-673, 2001
19. Mehal WZ., Juedes AE, Crispe IN: Selective retention of activated CD8⁺ T cells by the normal liver. *J Immunol* 163:3202-3210, 1999
20. Milich DR, Chen MK, Hughes JL, Jones JE: The secreted hepatitis B precore antigen can modulate the immune response to the nucleocapsid: a mechanism for persistence. *J Immunol* 95:13812-13827, 1998
21. Miyazoe S, Hamasaki K, Nakata K, Kajiya Y, Kitajima K, Eguchi K et al: Influence of interleukin-10 gene promoter polymorphisms on disease progression in patients chronically infected with hepatitis B virus. *Am J Gastroenterol* 97:2086-2092, 2002
22. Nayersina R, Fowler P, Guilhot S, Missale G, Cerny A, Redeker AG et al.: HLA-A2 restricted cytotoxic T lymphocyte responses to multiple hepatitis B surface antigen epitopes during hepatitis B virus infection. *J Immunol* 150:4659-4671, 1993

23. Park S, Murray D, John B, Crispe IN: Biology and significance of T-cell apoptosis in the liver. *Immunol Cell Biol* 80:74-83, 2002
24. Rehermann B, Fowler P, Sidney J, Person J, Redeker A, Chrisari F.V et al: The cytotoxic T lymphocyte response to multiple hepatitis B virus polymerase epitopes during and after acute viral hepatitis. *J Exp Med* 181:1047-1058, 1995
25. Reifenberg K, Nusser P, Lohler J, Spindler G, Kuhn C, von Weizsacker F et al: Virus replication and virion export in X-deficient hepatitis B virus transgenic mice. *J Gen Virol* 83:991-996, 2001
26. Shin EC, Shin JS, Park JH, Kim H, Kim SJ: Expression of Fas ligand in human hepatoma cell lines: role of hepatitis-B virus X (HBX) in induction of Fas ligand. *Int J Cancer* 28:587-591, 1999
27. Shintani Y, yotsuyanagi H, Moriya K, Fujie H, Tsutsumi T, Koike K et al: Induction of apoptosis after switch-on of the hepatitis B virus X gene mediated by the Cre/loxP combination system. *J Gen Virol* 80:3257-3265, 1999
28. Stewart MD, Possee RD: Baculovirus as expression vectors. *Curr Opin Biotechnol* 8:569-572, 1997

29. Terradillos O, De La Coste A, Pollicino T, Neuveut C, Sitterlin D, Buendia MA...et al: The hepatitis B virus X protein abrogates Bcl-2-mediated protection against Fas-apoptosis in the liver. *Oncogene* 21:377-386, 2002
30. Wang XW, Gibson MK, Vermeulen W, Yeh H, Forrester K, Harris CC et al: Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene. *Cancer Res* 55:6012-6016, 1995
31. William M, Lee M.: Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med* 337:1733-1745, 1997
32. Zhou DX, Taraboulos A, Ou JH, Yen TS: Activation of class I major histocompatibility complex gene expression by hepatitis B virus. *J Virol* 64:4025-4028, 1990

-ABSTRACT-

**The Effect of Primary Hepatocyte Expressing HBx
on the Activation and Apoptosis of
Antigen-specific CD8⁺ T Cell**

Lee, Mi Jin

Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Assistant Professor Park Sun)

CD8⁺ T cells contribute to the control of Hepatitis B virus (HBV) infection by killing of infected cells or inhibiting viral replication inside cells. HBx, antigen of hepatitis B virus, plays an important role in the immunopathogenesis of HBV infection. Since HBx is able to upregulate cellular expression level, it is thought that HBx may modulate CD8⁺ T cell immune response. To test this hypothesis, proliferation, cytokine production and apoptosis of CD8⁺ T cells co-cultured with hepatocytes expressing HBx were analyzed. First, recombinant baculovirus containing mammalian gene expression cassette for X gene was generated. Then, female MataHari naive

CD8⁺ T cells were cultured with C57BL/6 mouse primary hepatocytes infected with baculovirus expressing HBx. At the end of co-culture, cell proliferation, cytokine production and apoptosis of CD8⁺ T cells were analyzed. As the results, the cell proliferation of naive CD8⁺ T cells co-cultured with primary hepatocytes expressing HBx was equivalent with naive CD8⁺ T cells co-cultured with normal hepatocytes. CD8⁺ T cells co-cultured with primary hepatocytes expressing HBx was shown a increase in the IFN-*r* production but this result made no sens. But apoptosis was increased in CD8⁺ T cells co-cultured with hepatocytes expressing HBx. In conclusion, this results suggest that primary hepatocytes infected HBV can modulate cytotoxic T lymphocytes immune response. This study will improve understanding of the mechanism how to chronic hepatitis and hepatocellular carcinoma develop and might provide a new sight of the treatment of HBV infection.

Key Words: Hepatitis B virus (HBV), X protein (HBx), CD8⁺ T cell, primary hepatocyte, cell proliferation, apoptosis, baculovirus, cytokine