인체 말초혈액 단핵세포 표면에서 Interleukin-15 수용체 Alpha Chain의 발현 양상 및 이에 대한 면역억제제의 영향

한림대학교 의과대학 내과학교실

채 동 완

서 론

T 림푸구 의존성 면역반응에 interleukin-2(IL-2)가 중심적인 역할을 함은 잘 알려져 있다. 그러나 IL-2의 유전자가 파괴된 IL-2 knock out mice도 정상적인 T 림푸구의 분화와 함께 T 림푸구 의존성 면역반응인 항 바이러스반응과 이식장기에 대한 거부반응을 효과적으로 나타내며 이는 다른 cytokine이 IL-2작용을 대신할 수 있음을 시사한다. 이런 점에서 최근 simian kidney epithelial cell line인 CV-1/EBNA와 human adult T cell leukemic cell line인 HuT-102의 배양 상층액에서 분리된 interleukin-15(IL-15)이 IL-2와 유사한 생화학적 작용을 지니고 있음은 주목할 필요가 있다. IL-15은 IL-2와 마찬가지로 T 림푸구, B 림푸구, NK세포의 증식 및 분화를 촉진하고 T 림푸구와 NK세포의 세포독성을 활성화시키며 T 림푸구에 대한 chemotactic effect를 나타낸다.

IL-15는 IL-2와 amino acid sequence상 homology는 없으나 IL-2와 유사한 3차원적 구조를 가지고 있으며 IL-2 수용체의 β와 γ chain을 공유한다. IL-2와 IL-15의 수용체 공유와 이에 따른 유사한 intracellular signal transduction system의 이용은 양 cytokine의 작용상의 유사점을 설명해준다.

그러나 IL-15은 IL-2 수용체 α chain(IL-2Rα)과 다른 IL-15에 특이한 α chain을 이용하며 이 α chain은 IL-15이 수용체에 접착하는데 매우 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으나 아직 IL-15 수용체 α chain(IL-15Rα)의 인체 말초혈액 단핵세포 표면에서의 발현양상 및 이에 대한 면역억제제의 영향에 대하여 알려져 있지 않다. 이에 연자들은 "tagged IL-15"을 합성하고 이를 이용하여 IL-15Rα의 인체 말초혈액 단핵세포 표면에서의 발현양상 및 이에 대한 면역억제제의 영향을 파악하고자 하였다.

FLAG-HMK-IL-15의 합성

본 연구 목적의 달성을 위하여 mature IL-15에 FLAG peptide 및 heart muscle kinase(HMK) target sequence가 tag된 FLAG-HMK-IL-15을 합성하였다. FLAG peptide에 specific하고 high affinity을 지닌 anti-FLAG Ab가 존재하고 HMK target sequence 에 ^{32}P를 incorporate할 수 있으므로 양 물질들은 tag된 단백질의 표식자로 이용될 수 있었다. 이를 위하여 mature IL-15을 encode하는 322 base pair cDNA fragment를 PHA-activated human PBMCs(peripheral blood mononuclear cells)의 cDNA template에서 PCR방법으로 얻은 후 여기에 FLAG 및 HMK sequence를 포함하고 있는 pAR(DRI)59/60 plasmid에 clone하여 BL-21 E Coli strain에서 express하였다. 박테리아에서 생성된 FLAG-HMK-IL-15 protein은 anti-FLAG Ab가 부착된 bead를 이용하여 affinity purification을 시행하였다. 생성된 단백질을 SDA-PAGE로 분리한 후 Coomassi blue staining, anti-FLAG Ab와 anti-IL-15 Ab를 이용한 Western blotting, ^{32}P을 이용한 autoradiography에서 약 15kDa의 band가 관찰되어 FLAG 및 HMK sequence peptide가 부착된 IL-15 protein이 합성되었음을 알수 있었다.

Cross-linking of axtivated PBMCs

PHA-activated PBMCs에 [^{32}P]-FLAG-HMK-IL-15을 반응시키고 chemical cross-linker인 di-succinimidyl suberate를 첨가한 후 detergent를 사용하여 얻은 protein을 SDA-PAGE에서 분리하여 시행한 autoradiography에서 75-80kDa의 single band를 관찰할 수 있었다. IL-15의 분자량이 14-15kDa임을 감안할 때 IL-15Rα의 분자량은 60-65kDa로 판단되었다.

또한 [^{32}P]-FLAG-HMK-IL-15 첨가 전 과량의 IL-15을 먼저 첨가하고 실행한 동일한 실험에서 radiolabelled 75-80kDa의 single band를 관찰할 수 없어 [^{32}P]-FLAG-HMK-IL-15 이 IL-15R α에 특이적으로 binding함을 알수 있었다.

Proliferation Assay Using FLAG-HMK-IL-15

FLAG-HMK-IL-15이 bioactivity를 파악하기 위하여 PHA-activated human PBMCs에 FLAG-HMK-IL-15를 첨가한 후 시행한 [^{3}H]-TdR incorporation assay에서 FLAG-HMK-IL-15가 PHA-activated human PBMCs의 증식을 자극함을 알수 있었다.

또한 murine pre-B cell인 BAF-BO3 cell을 이용한 proliferation assay에서 IL-2 수용체 β chain(IL-2Rβ)을 transfection시킨 cell은 FLAG-HMK-IL-15에 증식하는 반면 IL-2Rβ이 없는 cell은 FLAG-HMK-IL-15에 증식하지 않았다. 따라서 FLAG-HMK-IL-15은 biologically active한 성장인자이며 biological effect를 나타내려면 IL-2Rβ의 존재가 필요 함을 알 수 있었다.

PBMCs표면에서 IL-15Rα의 발현 양상

PBMCs 표면에서의 IL-15Rα 발현 양상을 파악하기 위하여 FLAG-HMK-IL-15을 flow cytometric analysis에 이용하였다. 즉 PBMCs에 FLAG-HMK-IL-15을 첨가한 후 biotin-conjugated anti-FLAG monoclonal Ab와 streptavidin-RED670과 차례로 반응시킨후 flow cytometric analysis를 시행하였다. resting PBMCs에서는 IL-15Rα이 발현되지 않은 반면 PHA-activated PBMCs는 FLAG-HMK-IL-15에 의한 염색이 관찰되었으며 이 염색은 과량의 IL-15에 의하여 억제되어 FLAG-HMK-IL-15을 이용한 flow cytometric analysis가 IL-15Rα 발현을 관찰 할 수 있는 특이적인 방법임을 알 수있었다.

또한 CD4-PE, CD8-PE을 이용한 double staining에서 activated CD4+, CD8+ cells에서도 IL-15Rα의 발현이 관찰되었다. PHA activation에 의한 IL-15Rα의 발현이 CD14+(monocyte/macrophage), CD16+(NK cells)에서도 관찰되었다.

IL-2Rα 및 IL-2Rβ의 IL-15 binding에 사용유무

FLAG-HMK-IL-15와 CD25-PE(anti-IL-2Rα)을 이용한 flow cytometer에서 IL-2Rα와 IL-15R α 모두가 발현된 세포와 함께 둘중 한가지만 발현된 세포들도 관찰되었다.

또한 FLAG-HMK-IL-15와 CD122-PE(anti-IL-2Rβ)을 이용한 flow cytometer에서 IL-15Rα 혹은 IL-2Rβ만 발현된 세포들이 관찰되었다. 따라서 IL-2Rα 및 β chain은 IL-15 binding에 사용되지 않음을 알수있었고 이는 IL-15Rα가 IL-15에 대하여 high affinity를 갖고 있다는 사실에 잘 부합되는 소견이었다.

IL-15Rα의 발현에 대한 면역억제제의 영향

Cyclosporin은 PHA activation에 의한 IL-15R α의 발현을 억제하지 못하였으며 rapamycin은 오히려 IL-15Rα의 발현을 증가시켰다. 이와 대조적으로 dexamethasone은 PHA activation에 의한 IL-15R α의 발현을 강력히 억제하였다. 또한 proliferation assay에서도 dexamethasone은 IL-2에 대한 PHA-activated PBMCs의 증식에 영향을 주지않은 반면 IL-15에 대한 PHA-activated PBMCs의 증식은 강력히 억제하였다.

REFERENCES

1) Giri JG, Ahdie M, Eisenman J, Shanebeck K, Grabstein K, Kumaki S, Namen A, Park LS, Cosman D, Anderson D: *Utilization of the β and γ chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15. EMBO Journal 13:2822-2830, 1994*

2) Grabstein KH, Eisenman J, Shanebeck K, Rauch C, Srinivasan S, Fung V, Beers C, Richardson J, Schoenborn MA, Ahdie M, Johnson L, Alderson MR, Watson JD, Anderson DM, Giri JG: *Cloning of T cell growth factor that interact with the β chain of the interleukin-2 receptor. Science 264:965-968, 1994*

3) Giri JG, Kumaki S, Ahdie M, Friend DJ, Loomis A, Shanebeck K, DuBose R, Cosman D, Park LS, Anderson DM: *Identification and cloninig of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the α chain of the IL-2 receptor. EMBO 14:3654-3663, 1995*

4) Chae DW, Nosaka Y, Strom TB, Maslinski W: *The distribuiton of IL-15 α chains on human PBMCs and the effect of immunosuppressive drugs on receptor expression. J Immunology Oct, 1996(in press)*