



Nephrosis의 발생에서 IL-4 및 CD23의 역할에 관한 연구

Studies on the Role of IL-4 and CD23 in the
Pathogenesis of Nephrosis

1991. 3

한국과학기술연구원
부설 유전공학연구소

제 출 문

한국과학기술연구원

부설 유전공학연구소장 귀하

본 보고서를 " Nephrosis의 발생에서 IL-4 및 CD23의 역할에 관한 연구 " 사업의 최종보고서로 제출합니다.

1991. 3.

연구책임자 : 이충은 (면역학실)

책임연구원 : 변광호 (면역학실)

연 구 원 : 윤석란 (면역학실)

김수연 (면역학실)

요 약 문

I. 제목

Nephrosis의 발생에서 IL-4 및 CD23의 역할에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

Nephrosis (Idiopathic Nephrotic Syndrome : 신증후군)은 atopic 피부염 또는 기관지 천식과 같은 allergy가 있는 소아에 잘 나타나며 높은 혈청 IgE level을 수반하는 경우가 많은 질환으로서 발생기전은 확실히 알려지지 않았으나 여러가지 lymphokine에 의하여 사구체 혈관벽의 투과성이 증가되어 중증 단백뇨가 나타나는 질환이다. 치료제로서는 nonspecific한 immunosuppressant인 steroid가 주로 사용되고 있으나 재발의 빈도가 높으며 steroid에 의한 많은 부작용들이 문제되고 있다. 근래에는 cyclosporine A 또는 cyclophosphamide의 사용이 시도되고 있으나 치료에 큰 효과를 거두지 못하고 있으므로 nephrosis의 발생기전의 연구를 통한 보다 specific하고 효과적인 치료법의 개발이 크게 요구되고 있다. 최근에 IL-4가 atopy나 allergy성 또는 hypersensitivity질환의 주 조절 lymphokine으로 밝혀지고 있으므로 nephrosis에서 IL-4의 작용을 연구하는 것은 이 질환의 발생기전의 연구로서 필요하며 또한 IL-4의 작용조절을 통한 nephrosis의 면역치료법의 개발 가능성을 타진한다는 데에 그 의의가 크다고 본다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. FACS를 이용한 CD23 분석방법 및 CD23 측정에 의한 IL-4 assay 방법을 수립하였다.
2. 1) Nephrotic syndrome patient의 serum과 PBL에서 IL-4, IgE, CD23의 level을 정상인의 경우와 비교 조사하였다.
2) N.S. patient의 PBL이 IL-4를 생성할 수 있는 capacity를 protein과 mRNA level에서 조사하여 정상인의 경우와 비교하였다.
3. 1) N.S. PBL의 배양시 IL-4가 CD23의 발현과 IgE 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 2) IFN-r 가 IL-4에 의해 유도된 CD23의 발현과 IgE 생성 효과에 미치는 영향을 조사하였다.
4. Steroid therapy 후 remission 환자에서 IL-4, IgE, CD23의 level을 조사하여 acute했을때와 비교 연구하였다.
5. IL-4의 작용과 CD23 발현 억제를 통한 IFN-r 의 임상적 적용 가능성에 대한 고찰.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발 결과

- 가. Double-antibody labelling을 이용한 FACScan에 의한 B-cell (Leu-16: Pan B marker)상의 CD23분자 (Leu20:Fc₂RII)의 발현도 측정법을 수립하였고 이를 사용한 새로운 IL-4 assay 방법을 확립하였다.

- 나. Nephrosis 환자의 fresh PBL에서 B-cell상의 CD23분자의 발현도와 serum IgE 및 serum IL-4의 농도가 정상인의 경우보다 현저히 증가되어 있음을 발견하였다.
- 다. Nephrosis 환자의 T-cell을 mitogen으로 자극하였을시 생성되는 IL-4가 정상인의 경우보다 유의하게 높음을 mRNA level과 protein activity level에서 각각 확인하였다.
- 라. IL-4는 nephrotic B-cell상의 CD23 발현을 in vitro culture에서 효과적으로 유도하였으며 IFN- γ 는 IL-4에 의한 CD23의 증가를 선별적으로 억제하였다.
- 마. IFN- γ 의 CD23 발현조절을 통한 IL-4 작용의 억제효과에 대하여 정상인의 B-cell과 nephrotic B-cell이 서로 유사한 반응도를 보였다.
- 바. 기존치료법(steroid)으로 remission을 보이는 환자들에서 B-cell상의 CD23 발현도가 대체로 감소하는 양상이 관찰되었다.
- 사. 결론적으로 nephrosis는 IL-4의 이상적인 과다분비에 의한 CD23 분자(Fc $_{\epsilon}$ RII) 증가된 발현 및 이로부터 유래되는 IgE의 과다생성등과 연관되어지는 질환으로 보여지며 IFN- γ 의 IL-4 작용억제효과를 이용한 치료법의 개발이 주시된다. 이는 IFN- γ 의 임상적 적용 가능성에 대한 고찰 및 nephrotic 환자들에의 직접적인 임상실험을 통해 가능하다.

2. 활용에 대한 건의

Nephrosis의 발생기전에서 IL-4 작용의 관여 여부와 CD23 (Fc $_{\epsilon}$ RII) 발현의 이 질환에 흔히 수반되는 높은 IgE 생성에 대한

기여도를 밝혀 nephrosis 의 pathogenesis 기전의 규명이 가능하리라고 본다. 또한 이러한 기초적 연구를 바탕으로 nephrosis 질환의 보다 specific한 새로운 면역치료제 개발에의 기초를 마련할 수 있을 것이다.

Summary

Idiopathic nephrotic syndrome (INS), accompanied by massive loss of protein through glomerular membrane, is often referred to be associated with immune dysfunction. The elevated serum IgE levels and atopic symptoms have been frequently observed in these patients. We investigated the role of interleukin-4 (IL-4) in the pathogenesis of INS through the regulation of CD23 (low affinity IgE receptor), by B-cells. Substantially higher levels of both membrane CD23 expression and soluble CD23 production were observed on freshly isolated nephrotic B-cells and in sera, respectively, than normals, as analyzed by fluorescence activated cell scanner (FACScan) using double-antibody staining with anti-Leu 16 (pan B marker)-FITC and anti-Leu 20 (CD23)-PE. Sera from these patients also demonstrated an increased IL-4 activity as compared with those from normal subjects. The ability of nephrotic T-cells to produce IL-4 was indeed greater than normal T-cells (up to 9 fold), as assessed by tonsillar B-cell proliferation with anti- μ and CD23 expression. In addition, nephrotic T-cells expressed higher levels of IL-4 mRNA than normals upon mitogen stimulation, whereas mRNA patterns of IFN- γ , a cytokine which antagonizes IL-4 activities to inhibit CD23 and IgE production, were similar in both groups. The responsiveness of nephrotic B-cells to exogenously added IL-4 (5-200u/ml) was similar to that of normal counterparts. As in the case of normal cells, IFN- γ (100-10,000u/ml)

effectively inhibited the IL-4 -induced CD23 expression by nephrotic B-cells (up to 80% inhibition). It was noteworthy that nephrotic patients clinically responding to routine steroid therapy displayed generally a decrease in CD23 expression. These results suggest that INS is a T-cell disorder involving abnormal production of IL-4 and that regulation of CD23 by IL-4 may play a role in the pathogenesis of INS.

CONTENTS

I. Introduction	13
II. Materials and Methods.	14
1. Materials and Apparatus	14
A. Cell culture	14
B. Analysis of CD23 and sCD23	14
C. Measurement of serum IgE	14
D. Bioassay of IL-4	14
E. Analysis of mRNA levels of IL-4/IFN- γ	15
2. Experimental Methods	15
A. Isolation and culture of mononuclear Cells	15
B. Analysis of mCD23 by FACScan	15
C. Measurement of sCD23 by ELISA	16
D. Measurement of serum IgE by ELISA	16
E. IL-4 bioassay	16
(1) B-cell proliferation assay	16
(2) CD23 expression assay	17
F. Analysis of IL-4/IFN- γ mRNA levels by Northern blot	17
III. Results an Discussion	18
1. Establishment of IL-4 bioassay based on CD23 expression on B-cells using FACScan analysis.	18
2. Levels of serum IgE in nephrotic and normal subjects.	18

3. Analysis of mCD23 and sCD23 in nephrotic vs. normal subjects.	18
4. Analysis of IL-4 activities in sera of nephrotic vs. normals.	22
5. Production of IL-4 by T-cells of nephrotic vs. normal subjects.	27
6. mRNA expression levels by T-cells of nephrotic vs. normals.	27
7. Responsivnes of B-cells to IL-4 in nephrosis and normals.	30
8. Effect of IFN- γ on the IL-4 induced CD23 expression by nephrotic and normal B cells.	30
9. Changes of mCD23 levels upon remission of nephrotic syndrome.	34
10. Combined effect of steroid and IFN-r on the IL-4 induced CD23 expression.	37
IV. Conclusions and Remarks	40
V. References	41

목 차

제 1장 서론	13
제 2장 실험재료 및 방법	14
제 1절 실험재료 및 사용기기	14
1. 세포배양	14
2. CD23의 분석	14
3. IgE의 측정	14
4. IL-4의 bioassay	14
5. IL-4 및 IFN- γ mRNA의 분석	15
제 2절 실험방법	15
1. 단핵세포의 분리 및 배양	15
2. FACScan을 이용한 mCD23의 측정	15
3. serum내 sCD23의 측정	16
4. ELISA에 의한 IgE의 측정	16
5. IL-4의 bioassay	16
(1) B 세포 증식 assay	16
(2) CD23 발현 assay	17
6. Northern blot에 의한 IL-4/IFN-r mRNA 분석	17
제 3절 실험결과 및 고찰	18
1. FACS를 이용한 CD23 분석방법 및 CD23 측정에 의한 IL-4 분석 방법의 수립	18

2. 정상인과 신증후군 환자에서 serum IgE의 측정	18
3. 정상인 및 신증후군 환자에서 B 세포상의 mCD23과 serum내의 sCD23의 비교분석	18
4. 정상인과 신증후군 환자에서 serum 내의 IL-4 activity의 비교분석	22
5. T 세포에 의한 IL-4 생산의 비교분석	27
6. T 세포에 의한 IL-4/IFN- γ mRNA 발현도의 비교분석	27
7. IL-4에 대한 정상인과 신증후군 환자 B 세포의 반응도 조사	30
8. IL-4에 의한 CD23 발현유도에 미치는 IFN- γ 의 효과	30
9. 신증후군 질환의 회복기에서 B 세포상의 CD23 level의 변화	34
10. Steroid와 IFN- γ 의 병용투여가 CD23 발현에 미치는 영향	37
 제 4장 결론 및 건의사항	 40
 참 고 문 헌	 41

제 1 장 서론

미세변화 신증후군은 주로 소아에서 발생하며 atopy성 피부염과 같은 allergy 질환과 관련되어 많이 발생한다. 발생기전은 확실히 알려지고 있지 않지만 lymphocyte에서 분비되는 여러 lymphokine 에 의해 사구체 혈관벽의 투과성이 증가되어 중증 단백뇨가 나타나는것으로 알려져 있다. 최근의 보고에 의하면 interleukin-4 (IL-4)가 allergy 질환의 주 조절 lymphokine 으로 알려져 있는바 신증후군의 발생과 진전 및 회복과정에서 IL-4의 작용을 연구하는 것은 이 질환의 발병기전을 규명하는데 있어서 중요하다고 할 수 있다. 특히 interferon-r (IFN-r)가 IL-4로부터 유도된 IgE 및 IgE receptor인 CD23의 발현을 억제한다는 보고에 의거할 때 IFN-r 를 이용한 신증후군의 새로운 면역치료제의 개발을 모색해 보는 연구로서도 큰 의의가 있다고 하겠다.

따라서 본 연구는 신증후군의 발병기전에서 IL-4의 작용의 관여 여부를 밝히는 것과 특히 IL-4가 CD23의 발현 조절을 통해 이러한 환자들의 혈중 IgE 생성과 IgE 반응조절에 미치는 영향도 및 이 질환의 발생 및 진전에 미치는 기여도와 상관관계를 조사해 보고자 하였다. 또한 이러한 연구결과들을 바탕으로하여 현재까지 확실한 치료법이 수립되어 있지않은 신증후군의 새롭고 보다 specific한 면역치료법의 개발에의 기초를 마련하고자 하였다.

제 2 장 실험 재료 및 방법

제 1절. 실험재료 및 사용기기

1. 세포배양

RPMI 1640 media, L-glutamine, HBSS는 GIBCO에서 FBS는 Hyclone에서 그리고 Histopaque 및 antibiotics와 amphotericin-B는 Sigma에서 각각 구입하여 사용하였다.

2. Fc_εRII (CD23)의 분석

Membrane Fc_εRII의 분석에 사용되는 fluorescence activated cell scanner (FACScan)과 anti Leu16-FITC 및 anti Leu20-PE는 Becton/Dickinson 제품을 사용하였고 soluble Fc_εRII의 ELISA에 사용되는 antibody는 monoclonal 3-5-14 anti Fc_εRII(Dr. Kishimoto, Japan)를 사용하였다.

3. IgE의 측정

Serum내의 IgE level의 ELISA 측정을 위한 standard IgE는 일본의 MBL에서 그리고 alkaline-phosphatase conjugated IgE는 Cappel에서 각각 구입하여 사용하였으며 ELISA Reader는 Dynatech (MR 700)제품을 사용하였다.

4. IL-4의 bioassay

B-cell proliferation assay에 쓰이는 anti-IgM은 Biorad 에서, [H] thymidine (25 Ci/m mol)은 Amersham에서 그리고 standard human IL-4는 Genzyme에서 구입하였다. PHA, PMA, Ionomycine 등은 Sigma 제품을 사용하였다. 또한 cell harvester는 Norway의 Skatron것을

그리고 β -scintillation counter 는Packard 의 Tri-card CA 2000을 사용하였다.

5. IL-4 및 IFN-r mRNA 의 분석

IL-4 및 IFN-r mRNA 분석을 위한 Northern blot 에 소용되는 nylon membrane은 NEN의 Gene-Screen plus를 [32 P]-dCTP (S.A. 2500 Ci/mol)는 Amersham 제품을 그리고 labelled [32 P]-cDNA의 분리에는 Worthington mini-spin column을 사용하였다.

제 2절. 실험방법.

1. 단핵세포 (mononuclear cell) 및 B세포의 분리

신증후군 환자 및 정상인의 혈액으로 부터 Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (D=1.077)을 사용하여 단핵세포를 분리하였다. 또한 Tonsil을 teasing한 후 분리한 MNC를 sheep-RBC rosetting을 2번 행하여 T-cell을 제거한 후 adherent cell 을 plate에 부착시켜 제거함으로써 순수한 B세포를 얻었다. 이때 B세포의 순도는 anti Leu16 및 anti Leu4의 staining으로 분석한 바 95% 이상이었다.

2. 단핵세포 및 B세포의 배양

RPMI에 10% FBS와 0.2% β ME가 배합된 배지에서 1.5×10^6 cell에 IL-4(20-200u/ml), IFN-r(100-10,000u/ml) 또는 mitogen (PHA $5 \mu\text{g/ml}$ + PMA 10ng/ml) 을 주고 48-72시간동안 37°C , CO_2 incubator에서 배양하였다.

3. Membrane CD23의 측정

Fresh B-cell상의 CD23 또는 IL-4 및 IFN-r를 투여한 후 배양한 B-cell상의 CD23을 pan B marker인 anti Leu16-FITC 와 anti Leu20 (CD23)-PE로 double staining 한 뒤 Fluorescence activated cell scanner로 측정하여

$$\text{CD23 positivity} = \frac{\text{CD23 positive B cell}}{\text{total B cell}} \times 100 \text{으로 계산하였다.}$$

4. Soluble CD23의 측정

환자 또는 정상인의 serum 내의 soluble CD23은 96-well plate에서 monoclonal 3-15-14 anti CD23을 coating antibody로 4°C에서 o/n incubation 시킨 후 serum sample을 각각 2 x 또는 5 x dilution 하여 가하고 상온에서 2h 반응시켰다. 이어서 second antibody로서 alkaline phosphatase conjugated monoclonal MHM6 Ab (anti CD23)을 넣어 binding 시킨 후 substrate로서 p-nitrophenyl를 가하여 반응시켜 410nm 와 450nm에서 ELISA reader로 O.D.를 측정하였다.

5. Serum IgE의 측정

환자 또는 정상인의 serum 내 IgE의 level을 ELISA로 측정함에 있어서 (4)항과 같은 방법을 쓰되 coating 항체로서 monoclonal anti human IgE HP 6029를 1:100으로 희석하여 사용하고 EIA standard IgE는 일본의 MBL에서 그리고 alkaline-phosphatase conjugated anti-human IgE는 Cappel에서 구입한 것을 사용하였다.

6. B-cell proliferation assay

환자나 정상인의 serum 내 또는 T-cell culture supernatant (T-Sup) 의 IL-4 activity를 측정하는 방법으로서 anti IgM constimulation을 이용한 B-cell proliferation assay를 사용하였다. 즉 순수분리한 B-cell (1×10^5 cell/well)에 standard IL-4 (2 to 200u/ml), diluted serum (1 to 10%) 또는 T-Sup (5 to 20%)를 immuno bead rabbit anti-IgM ($5 \mu\text{g/ml}$)과 함께 주고 48시간 배양한 후 [^3H] thymidine (25 Ci/m mol.)을 $1 \mu \text{ Ci/well}$ 씩 가한 후 16시간동안 pulse한 뒤 cell을 harvest하여 DWA로 incorporation 된 thymidine의 양을 β -scintillation counter로 측정하였다.

7. IL-4 및 IFN-r mRNA의 분석

환자 또는 정상인의 MNC (3×10^7)에 mitogen으로 PMA 40ng/ml과 Ionomycine 400ng/ml을 주고 4시간 자극한 후 4M Guanidinium isothiocyanate로 lysis 시킨후 5M CsCl cushion에 loading하여 ultracentrifugation (40,000 r.p.m. 24h)으로 total RNA pellet을 분리하였다. 이렇게 얻은 total cytoplasmic RNA 5-10 μg 을 1% agarose-formaldehyde gel에 electrophoresis 시킨후 Gene-screen plus nylon membrane에 transfer 시키고 ^{32}P -labelled된 IL-4 cDNA 및 IFN-r cDNA를 probe로 사용하여 hybridization을 행하였다. Hybridization은 50% formamide를 포함한 buffer를 써서 42°C 에서 행하였고 autoradiography는 Kodak X-omat RP film을 사용하여 1-10 day 동안 노출 시킨후 현상하였다.

제 3 장 실험결과 및 고찰

1. FACS를 이용한 CD23 분석방법 및 CD23 측정에 의한 IL-4 assay 방법의 수립

B-cell상의 CD23 발현도를 IL-4 activity의 index로 삼는 assay 방법을 수립하였다. 이 assay system은 B cell의 proliferation에 의한 IL-4 assay 방법에 비하여 보다 IL-4 specific하며 또한 FACScan에 의한 고감도 (high-sensitivity)의 정량분석을 가능케한다(Fig 1, Fig 2). 특히 culture-supernatant나 sera 같은 heterogeneous 한 test sample을 대상으로한 IL-4 activity의 측정에 있어서 B-cell proliferation assay 방법보다 훨씬 유효한 방법으로 나타났다.

2. 정상인과 신증후군 환자에서 serum 내의 IgE level의 측정

정상인(n=8)과 신증후군(n=8) 환자를 대상으로한 serum 내의 IgE level을 측정한 결과 신증후군 환자에서 IgE level이 유의하게 높음을 관찰하였다(Fig 3). 이는 신증후군이 특히 소아에서 allergy성 질환을 수반하거나 높은 serum IgE level을 수반하는 경우가 많다는 보고들과 일치하는 결과이며 이들 환자들을 대상으로한 nephrosis에서의 IL-4와 IgE 및 IgE receptor의 역할규명이 의의있는 연구가 됨을 시사하는 중요한 기초자료라 할 수 있다.

3. 정상인과 신증후군 환자의 fresh B cell상의 CD23(mCD23) 및 serum 내 soluble CD23 (sCD23) level의 분석

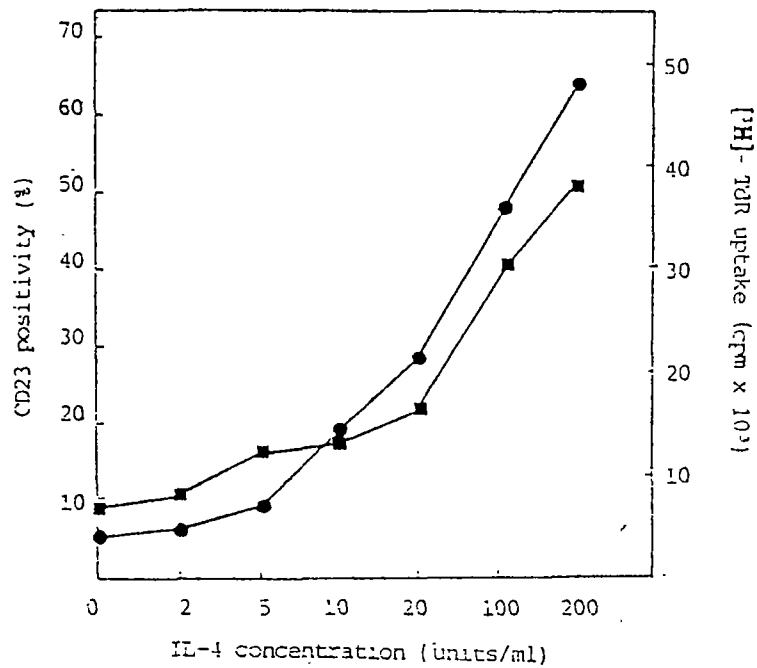


Fig 1. Effect of IL-4 on B-cell proliferation (■—■) and CD23 expression (●—●).

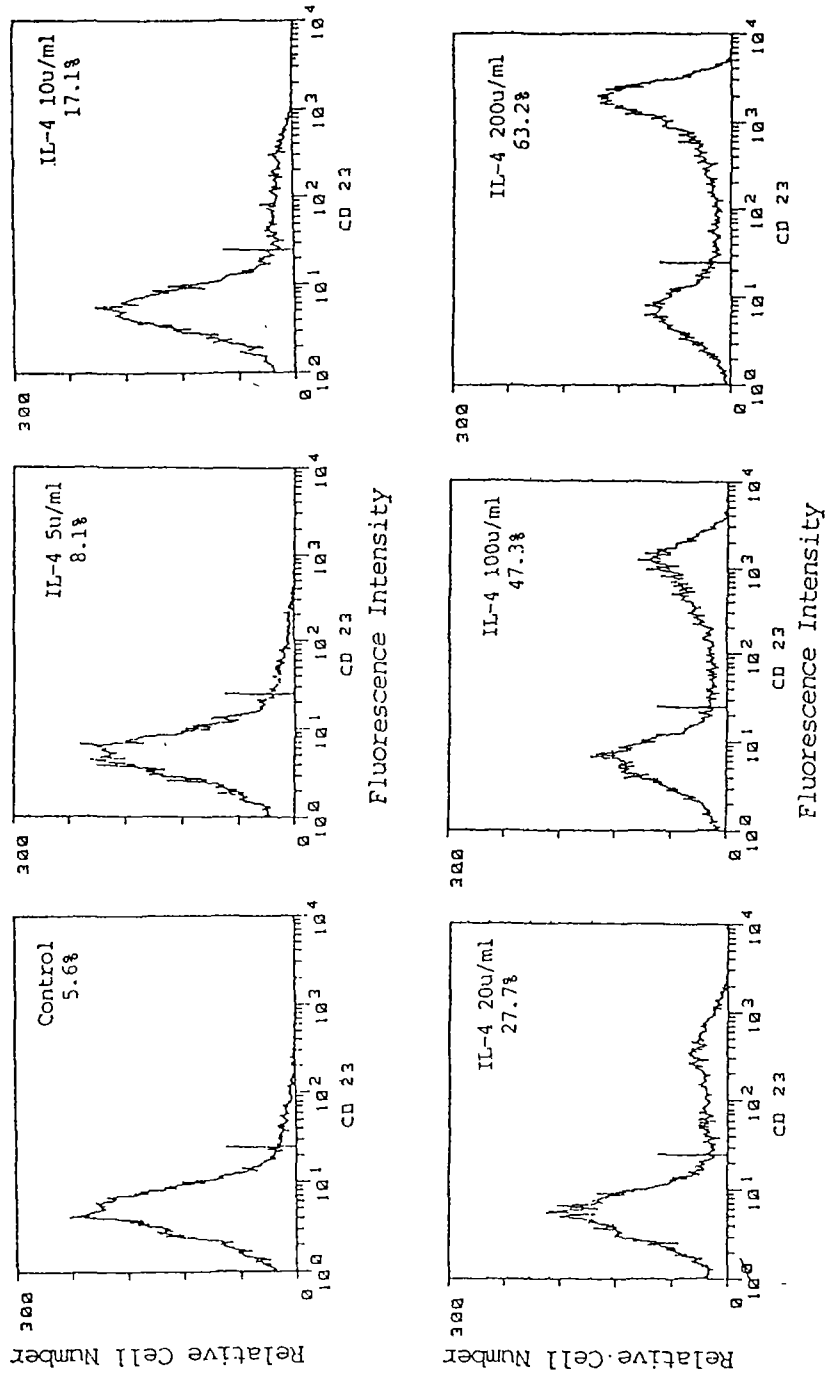


Fig 2. Analysis of membrane CD23 expression on B-cells by FACScan.

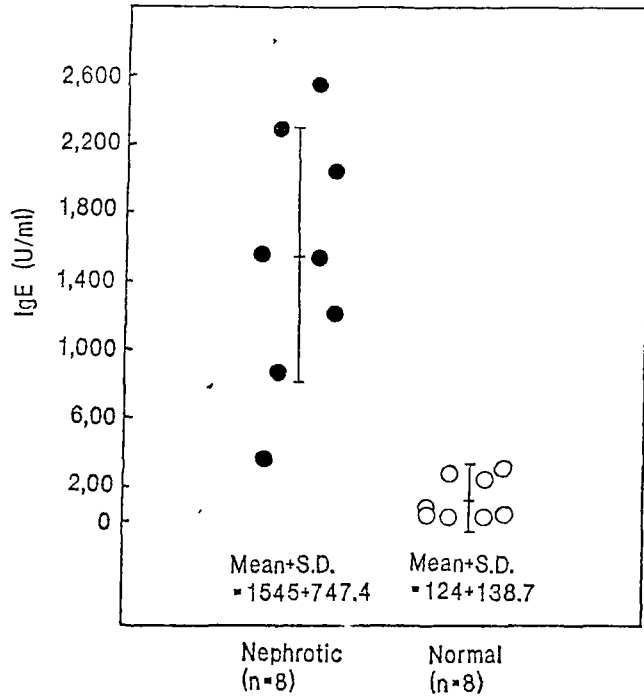


Fig 3. Levels of serum IgE in nephrotic vs. normal subjects

정상인 (n=12)과 신증후군 환자 (n=20)의 fresh PBL에서 B cell상의 CD23 발현도를 anti Leu16-FITC와 anti Leu20-PE의 double staining으로 FACScan에 의한 분석법을 사용하여 측정된 결과 신증후군 환자에서의 membrane CD23 (mCD23)의 발현도가 정상인보다 현저하게 증가되어 있음을 관찰하였다(Fig 4). FACScan contour graph로 나타낸 CD23 expression 양상은 Fig 4-a로서 panel 2가 CD23 positive B cell group(control 17% vs. nephrotic 48%)의 population에 해당한다.

또한 serum 내의 soluble form CD23을 ELISA로 측정된 결과 soluble CD23 level 역시 신증후군 환자 group(n=12)에서 유의하게 높음을 볼 수 있었다(Fig 5).

이렇게 증가된 IgE, mCD23, 그리고 sCD23의 양상은 이들 환자에서 정상인보다 serum 내 IL-4 activity가 높다는 것을 간접적으로 나타낸다 하겠다.

4. Serum 내 IL-4 activity의 측정

Serum중의 IL-4 activity는 serum이 tonsil B cell에 작용하여 유도하는 CD23의 발현도를 FACScan을 사용하여 분석함으로써 측정하였다. 그 결과 Fig 6에 나타난 바와 같이 optimal serum concentration 1.2-2.5%에서 신증후군 환자의 serum이 정상인보다 높은 IL-4 activity를 보였다.

B-cell proliferation에 의한 IL-4 activity의 측정은 serum 중에 존재하는 여러종류의 substance가 B-cell의 증식에 주는 non-specific한 effect로 말미암아 정량적인 분석이 불가능했다.

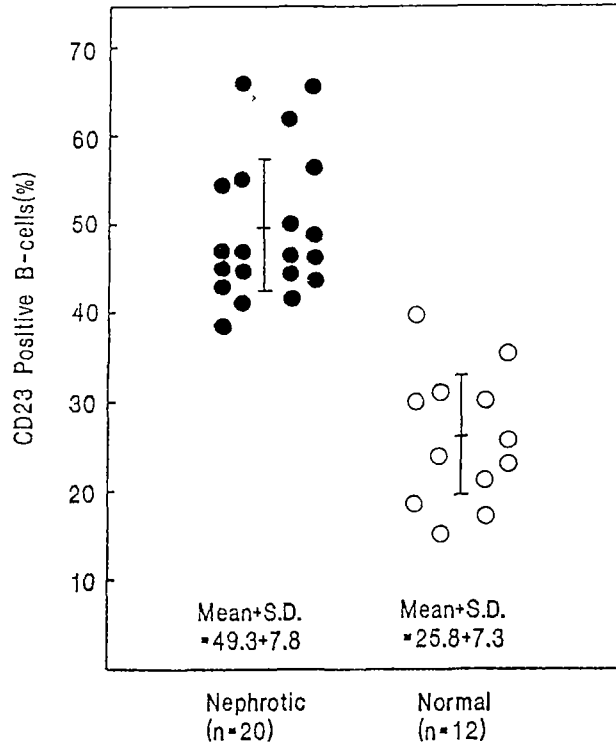
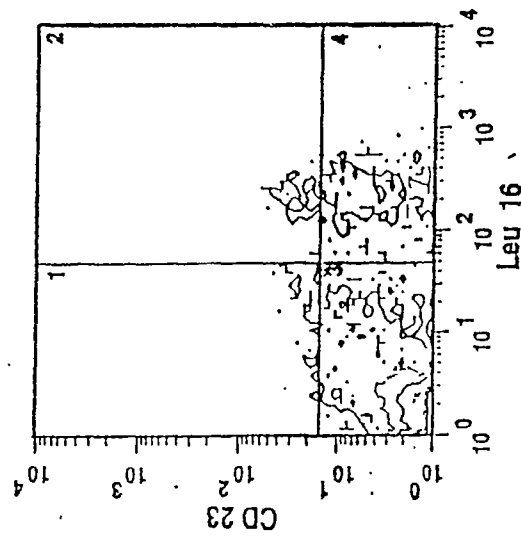


Fig 4. Levels of mCD23 on fresh B cells from PBL of nephrotic vs. normal subjects.

CONTROL PBL

17%



NEPHROTIC PBL

48%

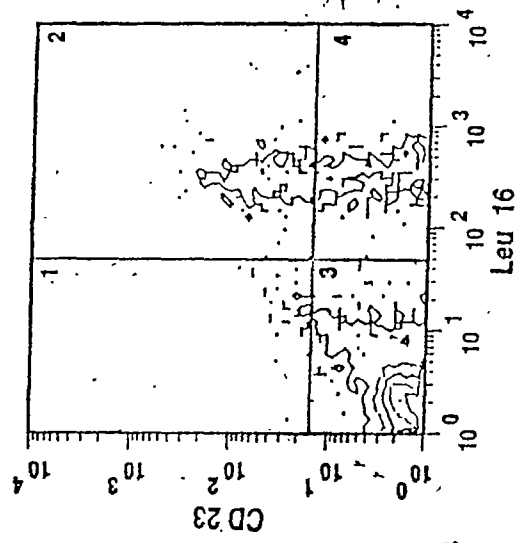


Fig 4-a. FACSscan analysis of CD23 positive B-cells.

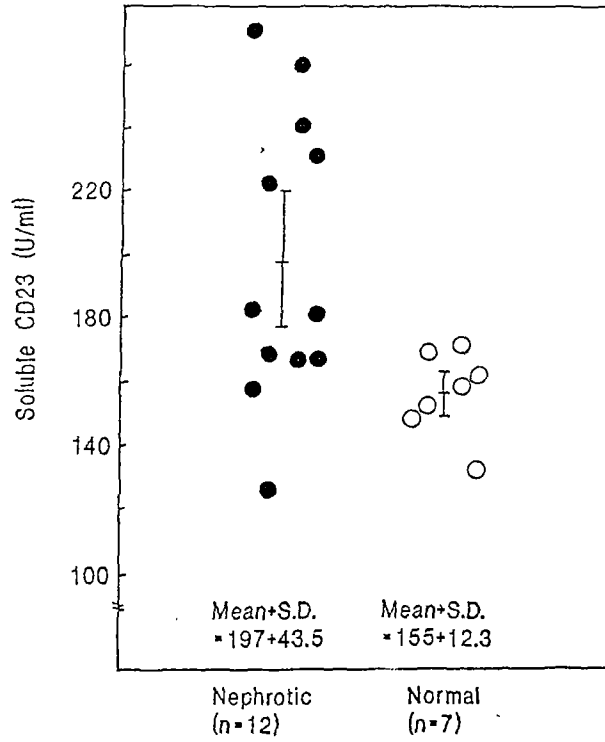


Fig 5. Levels of soluble CD23 in sera

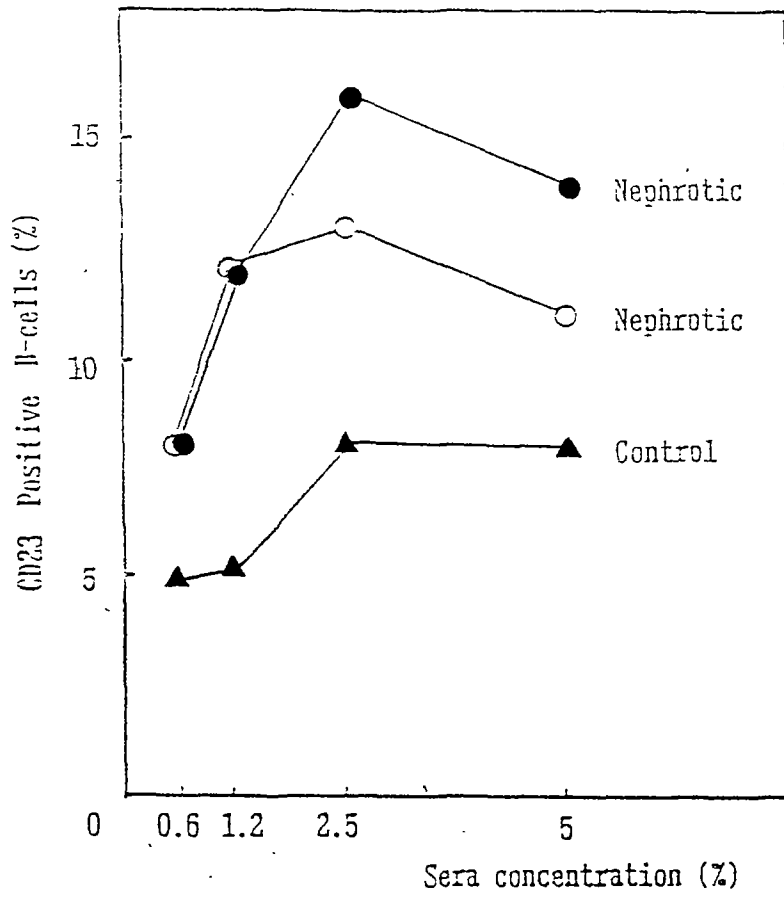


Fig 6. Effect of nephrotic vs. normal sera on CD23 expression on tosillar B cells.

5. 정상인 및 신증후군 환자의 T-cell로 부터의 IL-4 production의 측정

신증후군 환자 serum 중의 높은 IL-4 activity가 이 환자들의 T cell에서 생산되는 IL-4의 과다분비에 의한 것인지를 알아보기 위하여 신증후군 환자의 T cell이 IL-4를 생성, 분비하는 capacity를 조사하였다.

즉 PBL을 T cell mitogen인 PHA (5 μ g/ml)와 PMA(10ng/ml)로 48시간 자극하여 얻은 culture-supernatant (T-sup) 내의 IL-4의 activity를 B cell proliferation assay와 CD23 expression assay로 tonsil B cell을 target cell로 하여 조사하였다.

그 결과 B - cell proliferation activity (Table 1)과 CD23 expression activity(Fig 7)의 경우 모두에 있어서 신증후군 환자의 T-sup이 정상인의 T-sup보다 현저하게 높은 효과를 보임을 확인하였다.

6. 정상인 및 신증후군 환자 T-cell에 의한 IL-4/IFN-r mRNA 발현의 분석

신증후군 환자 T-cell culture supernatant에 나타나는 IL-4 protein의 activity가 nephrotic T-cell이 보유하고 있는 IL-4 mRNA expression capacity와 일치하는가를 조사하여 T-cell의 IL-4 production을 molecular level에서 확인하여 보았다. 그 결과 mitogen (PMA 40ng/ml + Ionophore 400ng/ml)으로 자극한 nephrotic T-cell은 control T-cell보다 유의하게 높은 level의 IL-4 mRNA (0.65Kb)의 expression을 유도할 수 있음을 보였다(Fig 8-a, Fig

Table 1.

Effect of PBL-Sup from Nephrotic Patients Vs Normals on Tonsillar B-cell Proliferation*

Treatment	[³ H] Thymidine Uptake** (cpm)		
Control	2012		
IL-4 20u/ml	8429		
IL-4 100u/ml	18435		
Normal PBL-Sup(20%)	w/o Mitogen	w/ Mitogen	Fold Increase
#1	9405	30189	3.2
#2	9963	27716	2.8
Nephrotic PBL-Sup(20%)			
#1	7306	79733	10.9
#2	9689	82711	8.5
#3	11895	82620	6.9
#4	9153	82637	9.0
#5	9989	57665	5.8

*. Proliferation assay was performed with anti Ig-M costimulation.

** Indicated as mean of triplicate culture from 2 independent experiments.
S.D. \leq \pm 10% of the mean

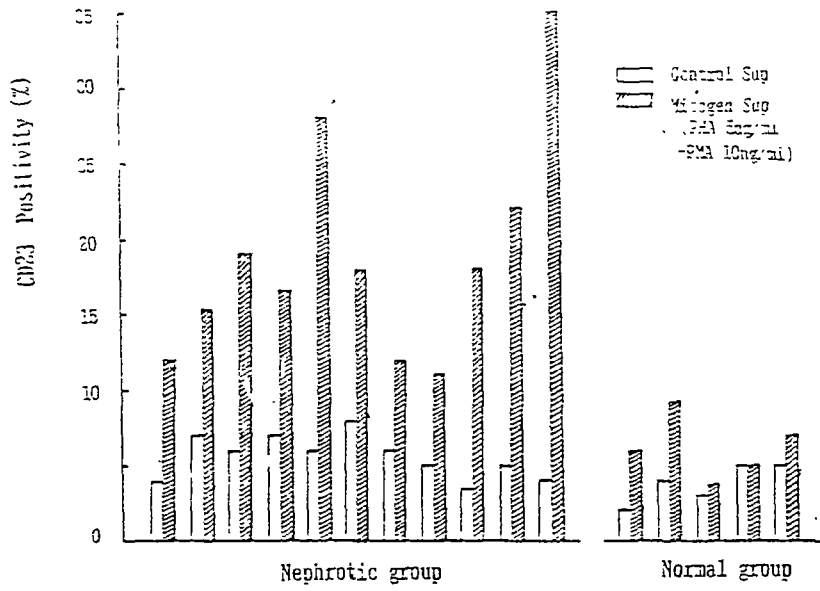


Fig 7. Effect of nephrotic patient PBL sup. on CD23 expression as compared to normal.

9-a). 또한 IL-4의 대표적인 antagonist로서 IFN-r의 작용, 특히 IgE 및 IgE receptor (CD23) 발현을 억제시키는 기능이 보고되어 있는바 신증후군 환자에서 IL-4의 internal regulator로서 IFN-r level의 변화가능성도 조사하기 위하여 IFN-r mRNA expression도 분석하였다.

그러나 IL-4 mRNA의 경우와는 달리 IFN-r mRNA level은 정상인과 신증후군 환자의 경우 큰 차이가 없는 것으로 나타났다(Fig 8-b, Fig 9-b). 이것으로서 신증후군환자의 serum 내의 증가된 IL-4 activity는 이환자들의 T-cell에서 IL-4가 over-expression 됨으로써 비롯되는 것으로 보여진다.

7. IL-4에 대한 B-cell의 반응도 조사

T-cell에서 생산.분비된 IL-4 action의 target 세포는 B-cell이므로 신증후군 환자 B-cell상의 CD23이나 serum 내 soluble CD23 또는 IgE의 증가가 B cell의 IL-4에 대한 반응성의 증가에 의한 현상인지를 조사하였다. 즉 환자 또는 정상인의 PBMC에 IL-4를 48-72시간동안 투여한뒤 배양하여 IL-4 농도변화에 따른 B세포상의 CD23 발현도의 변화를 측정하였다. 그 결과 환자 및 정상인의 B cell이 IL-4의 농도에 의존적으로 CD23 분자를 발현시켰는데 환자와 정상인 group에서의 반응도는 서로 유사한 것으로 나타났다(Fig 10)

8. 정상인 및 신증후군 환자의 B세포에서 IL-4에 의한 CD23 발현유도에 미치는 IFN-r의 효과

IFN-r는 T-cell에서 분비되는 cytokine으로서 최근의 보고들에

Northern Blot Analysis

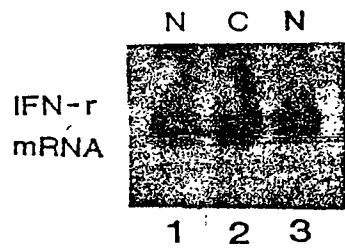
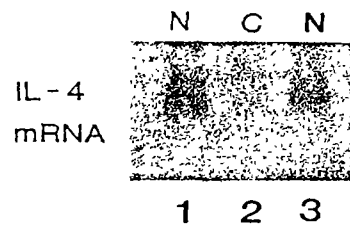


Fig 8. Northern blot analysis of IL-4/IFN- γ mRNA expression by nephrotic vs. normal PBMC.

Northern Blot Analysis

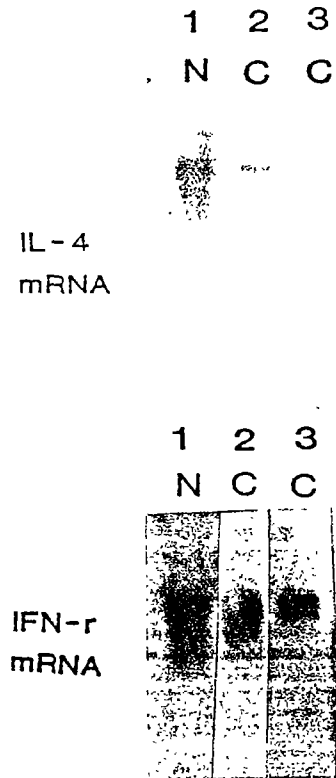


Fig 9. Northern blot analysis of IL-4/IFN- γ mRNA expression by nephrotic vs. normal PBMC.

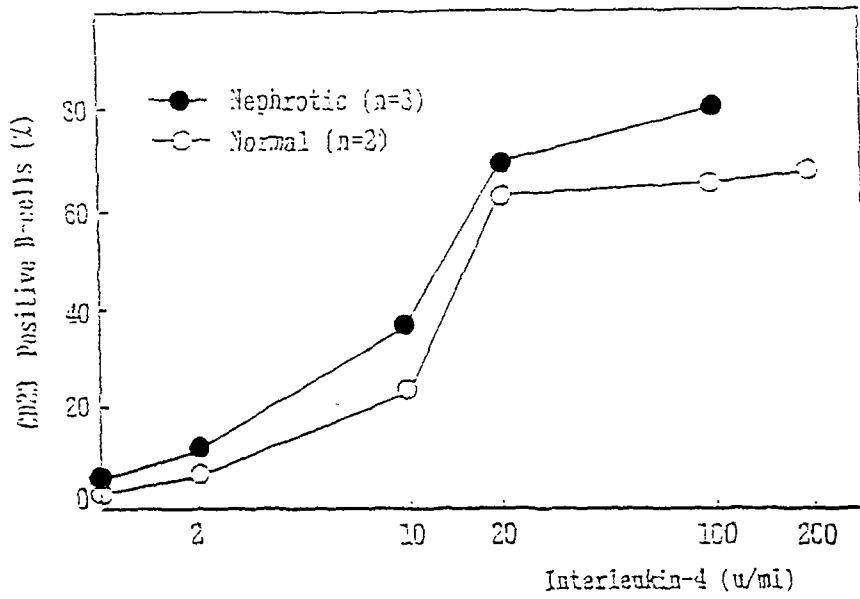


Fig10. IL-4 effect on CD23 expression on B-cells of nephrotic vs. normal subjects.

의하면 IFN-r가 IL-4의 여러 biological activity들을 억제한다고 알려져 있다. 특히 B세포에 작용하여 IL-4에 의한 IgE의 생성 및 IgE receptor (CD23) 발현을 억제하며 IL-4에 의해 유도된 MHC Class II의 발현을 감소시킨다. 따라서 본 연구에서는 신증후군 환자의 B세포상의 CD23의 발현이 IFN-r에 의해 어떻게 조절될 수 있는가를 알아보았다.

환자 및 정상인의 PBL에 IL-4와 IFN-r를 각각 또는 혼합하여 처리하고 48-72시간 배양한후 B세포상의 CD23 발현도를 측정한 결과 IFN-r는 환자 및 정상인의 경우 모두 IL-4에 의한 CD23발현을 효과적으로 억제하였으며 그 억제효과는 IFN-r의 농도에 의존적(dose-dependent)하게 나타났다(Fig 11). 이 결과는 신증후군 환자의 B세포가 정상인의 B세포와 유사하게 IFN-r에 의해 CD23 발현의 조절을 받을 수 있음을 나타낸다.

9. 신증후군 질환의 회복기에서 B세포상의 CD23 level의 변화

실제로 steroid treatment로서 therapy를 받고 있는 환자을 대상으로 PBL B-cell 상의 CD23 발현도 및 IgE의 level을 측정하여 환자의 증상변화와 CD23 발현도의 변화에 상관관계가 있는가를 조사하였다. Nephrotic 증상의 호전(e.g. 단백뇨의 감소)과 함께 clinical remission을 보이는 환자들 (n=11)중 대다수(n=9)는 B세포상의 CD23 level이 단백뇨가 심했던 acute stage에 비하여 대체로 감소하는 현상을 보였다(Fig 12). 반대로 CD23 level이 증가했던 2 case 중 1 case는 호전 후 곧이어 relapse 한 경우로서 이 결과들은 CD23 level과 신증후군의 발병 및 진전, 그리고

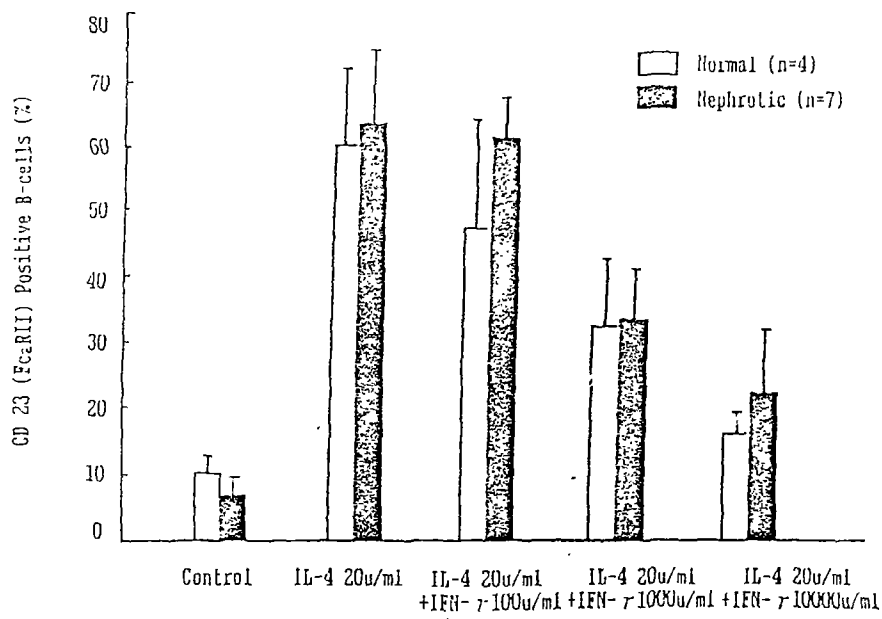


Fig11. Inhibitory effect of IFN- γ on the IL-4 induced CD23 expression by nephrotic and normal B-cells.

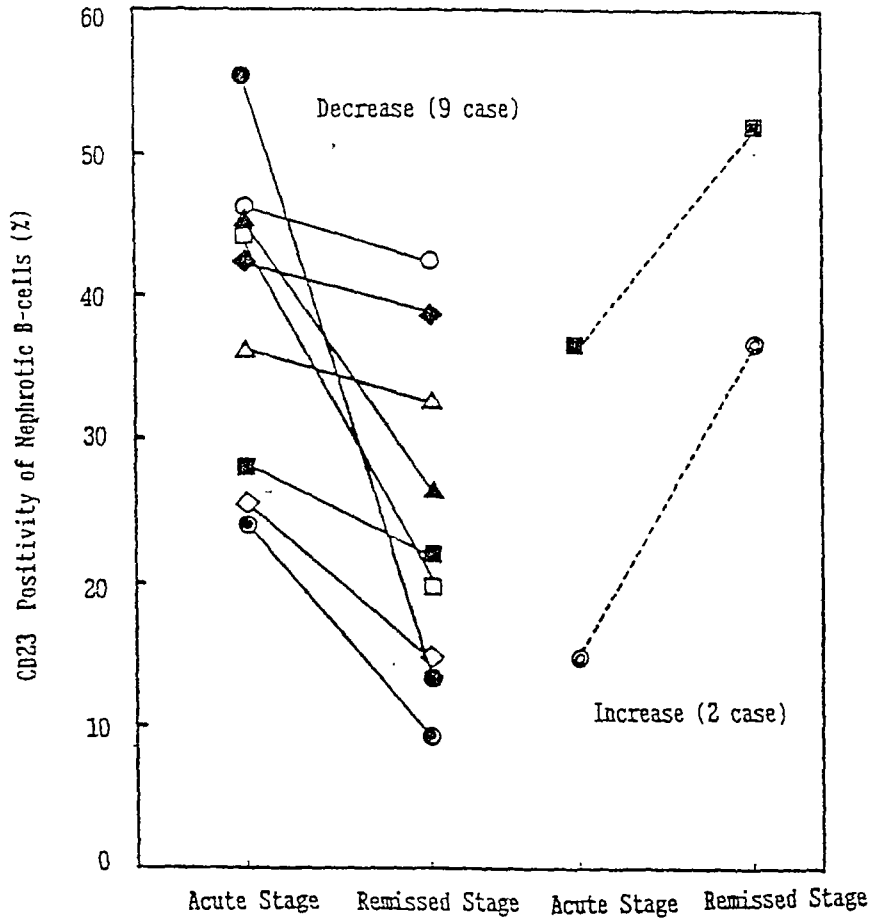


Fig12. Changes of mCD23 levels upon remission of nephrosis by steroid treatment.

회복과정에 상당한 상호관련성이 있음을 시사하고 있다.

10. Steroid 와 IFN-r의 병용투여가 CD23의 발현조절에 미치는 영향.

현존하는 신증후군 치료제인 steroid (hydrocortisone) 는 immunosuppressant로서 in vitro 에서 IL-4 에 의해 유도되는 CD23의 발현을 억제시키는 현상을 보였다 (Fig 13). 이에 반하여 IFN-r는 IL-4의 specific 억제제로서 알려져 있으므로 steroid 와 IFN-r의 병용투여가 IL-4에 의해 유도 되는 CD23 발현에 미치는 효과를 조사하여 보았다. Fig 14에서 보듯이 IFN-r 는 steroid 와 synergistic 하게 작용하여 CD23 의 발현을 효과적으로 억제 시키는 양상을 나타냈으며 이러한 in vitro data 들은 신증후군에서 steroid 와 IFN-r 의 병용치료의 효능성을 긍정적으로 시사한다.

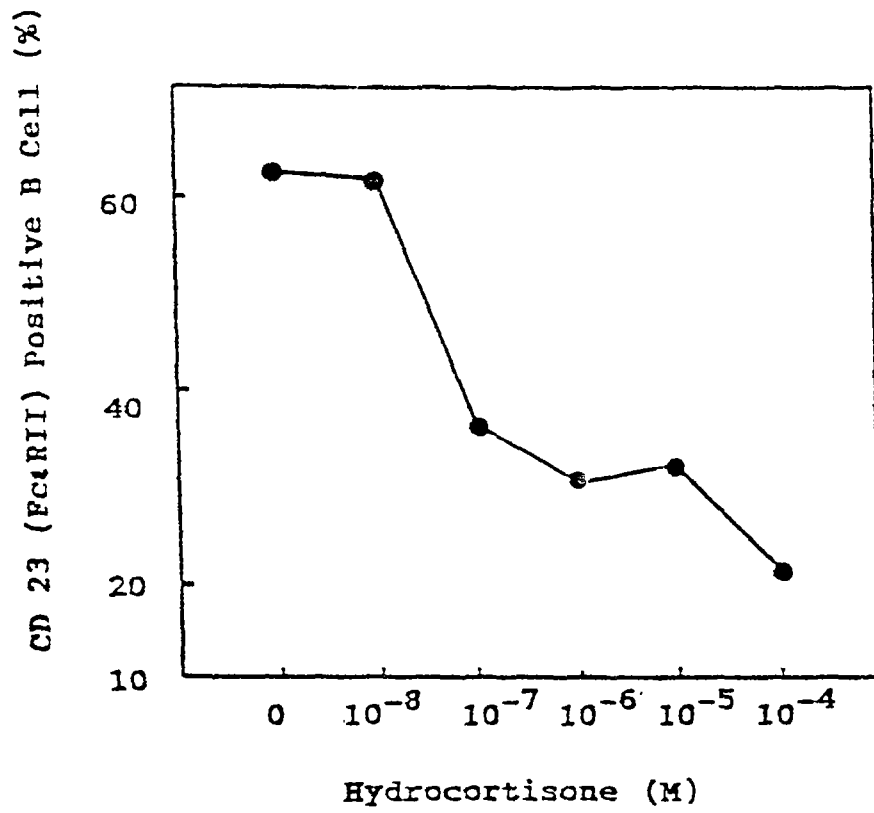


Fig13. Inhibitory effect of hydrocortisone on the IL-4 induced CD23 expression .

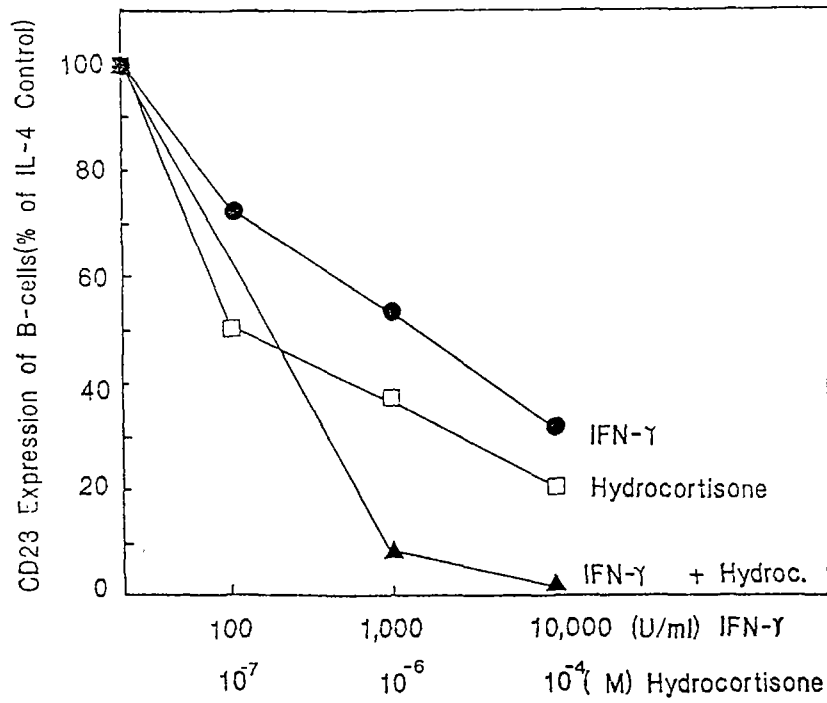


Fig14. Combined effect of IFN- γ and hydrocortisone on the IL-4 induced CD23 expression.

제 4 장 결론 및 건의사항

이상의 결과들을 종합해 볼 때 allergy 증상과 관련되어 나타나는 특발성 신증후군은 높은 혈청 IgE, B 세포상의 IgE receptor (mCD23) 및 soluble IgE receptor (sCD23) 의 증가를 수반하는데 이는 이들 환자 혈청내의 증가된 IL-4 activity 에 기인하는것으로 보여진다. 즉 환자 T 세포가 정상인에 비하여 hyperactivation 될 수 있는 potential이 높아 T 세포를 자극하는 인자에 민감하게 반응하여 정상인 보다 현저하게 높은 IL-4 mRNA level 의 발현 및 다량의 IL-4 protein 을 분비함으로써 일어나는 현상으로 볼 수 있겠다.

또한 이 환자들의 B 세포는 IL-4에 대하여 정상인과 유사한 반응성을 갖고 있으며 IFN-r 에 의해 CD23 발현의 조절이 가능한 것으로 나타났다. 특히 임상적으로 증상의 호전을 보이는 회복기 환자들에서 CD23의 level이 감소하는 양상이 나타남은 IL-4에 의한 CD23 발현 및 이와 수반된 IgE의 반응성등이 이 질환의 발병기전과 유의한 상관관계가 있음을 나타내고 있다. 또한 IFN-r와 steroid 의 병용투여가 CD23 발현의 억제에 매우 효과적임을 고려할때 많은 부작용을 수반하는 steroid에만 의존하는 기존의 치료법에서 벗어나 IFN-r 와의 병용 치료법을 구상해 보는 것이 보다 선별적인 신증후군의 새로운 면역 치료법으로서 그 효과가 주시되는 바이다.

References

1. Thomson PD, Barratt TN, Stokes CR, Turner MW: HLA antigens and atopic features in steroid responsive nephrotic syndrome in childhood. *Lancet* 2:765-768, 1976
2. Beale MG, Nish GS, Bertovich MJ, Macdsermott RP: Immunoglobulin synthesis by peripheralblood mononuclear cells in minimal change nephrotic syndrome. *Kid Int.* 23:380-386, 1983
3. Tornizawa S, Sakai X: Immunoglobulin E production by lymphocytes of children with idiopathic nephrotic syndrome. (abstract) *Pediatric Nephrol.* 1:c24, 1978
4. Suemura M, Yodol J, Hirashima M, Ishzaka K: Regulatory role of IgE- binding factors from rat T lymphocytes; Mechanism of enhancement of IgE response by IgE potentiating factor. *J. Immunol* 125:148-154, 1980
5. Reeves Wg, Carmeron JS, Johansson SGO, Ogg CS, Peters DK, Weller RO: Seasonal nephrotic syndrome: Description and Immunologic findings. *Clin. Allergy* 5:121-137, 1982
6. Howard M, Farrar J, Hilfike M, et al: Identification of a T-cell derived B-cell growth factor distinct from interleukin-2. *J. Exp. Med.* 155:914-923, 1982
7. Rabin Em, Ohara J, Paul WE: B-cell stimulatory factor (BSF)-1 activates resting B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*

82:2935-2938, 1985

8. Defrance T, Aubry JP, Rousset F, et al.: Human recombinant interleukin 4 induces Fc γ 2 receptor (CD23) on normal human B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 165:1459-1467, 1987
9. Kikutani H, Inui S, Sato R, et al.: Molecular structure of human lymphocyte receptor for immunoglobulin E. *Cell* 47:657-665, 1986
10. Snapper CM, Flnklman FD, Paul WE. : Regulation of IgG and IgE production by Interleukin 4. *Immunol. Rev.* 102:29-56, 1988
11. Spits H, Yssel H, Pallard X, et al. : IL-4 inhibits IL-2 mediated induction of human lymphokine-activated killer cells, but not the generation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in mixed lymphocyte cultures. *J. Immunol.* 141:29-36, 1988