

## 조기진통 임신부의 말초혈액 내 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T림프구 분포 및 Foxp3의 발현

울산대학교 의과대학 서울아산병원 산부인과학교실, 아산생명과학연구소\*

마진영 · 원혜성 · 김용만 · 정복경\* · 심재윤 · 이필량 · 김 암

### Proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Regulatory T Lymphocytes and Expression of Their Foxp3 in Preterm Labor

Jin-Young Ma, M.D., Hye-Sung Won, M.D., Yong Man Kim, M.D., Bok Kyoung Jung, M.S.\*,  
Jae-Yoon Shim, M.D., Pil Ryang Lee, M.D., Ahm Kim, M.D.

Department of Obstetrics and Gynecology, University of Ulsan, College of Medicine, Asan Medical Center,  
\*Asan Institute for life Sciences, Seoul, Korea

**Objective:** During pregnancy the immune system retains the ability to respond to foreign antigen tolerance mechanism ensure that inappropriate responses against self-antigen are prevented. Recently, the studies on the pathogenesis of preterm birth related on immunological changes of maternity and fetus has been reported, which focused on how fetus maintains immune tolerance from the uterus. The cells that produce cytokines blocking activation or functions of T lymphocyte inhibit part of the immune responses. These inhibiting cells are called regulatory T cells (Treg). It has been reported studies on T lymphocyte inhibiting immune responses, yet in the present not many studies on the alteration of pregnancy are preformed. This study investigated that proved the immunological roles of regulatory T cells for preterm birth.

**Methods:** Blood samples were collected from 15 healthy women, 15 normal pregnancy and 16 preterm labor women at department of Obstetrics and Gynecology, Asan Medical Center, Seoul, Korea, from March 2006 to September 2006, were enrolled in study group. Information regarding patient and obstetrical history was recorded. The populations of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Tregs, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3 Tregs and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3 Tregs as a percentage of total CD4<sup>+</sup>cells were evaluated by flow cytometric analysis. We measured the proportion of Treg cell that co-express CD25 and Foxp3 in the peripheral blood lymphocytes from preterm labor and normal pregnancy women.

**Results:** In preterm labor, normal pregnant women and nonpregnant healthy women, the proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Tregs was 0.18% (SD 0.12), 0.11% (SD 0.07), and 0.37% (SD 0.14) of the total CD4<sup>+</sup>cells respectively. The proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Tregs were significantly lower in preterm labor group and normal pregnant group when compared with nonpregnant women. But there was no significant difference in proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Tregs, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3 Tregs and CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3 Tregs comparing with nonpregnant women.

**Conclusion:** Our data didn't indicate that regulatory T cells are required for the maternal immune system to tolerate the fetal allograft. But the presence of Treg cells in the peripheral blood suggests that these cells are important in protecting the fetus from allo-active immune responses at the maternal-fetal interface. Also, further study may offer the important key for the prevention of preterm birth and the establishment of treatment methods to increase of regulatory T cells inducing alteration of cytokine related to preterm birth.

**Key words:** CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory lymphocyte, Transcription Foxp3, Preterm labor

접수일 : 2007. 5. 7.

주관책임자 : 원혜성

E-mail: hswon@amc.seoul.kr

\* 본 연구는 아산생명과학연구소에서 연구비를 지원받았습니다.

## 서 론

조산에 의해 출생한 조산아들은 영아사망의 절반을 차지할 뿐만 아니라 생존아에서도 신경계 발달 장애, 호흡기계 이상 등의 이환율이 증가하는 것으로 알려져 있어<sup>1</sup> 조산을 유발하는 원인에 관한 연구의 임상적 필요성 및 중요성은 매우 절실한 형편이다. 하지만 조산의 원인은 아직까지 정확히 밝혀져 있지 않은 실정으로 임신 중 면역학적 변화에 관한 연구는 태아가 어떻게 임신부에서 면역관용 (immune tolerance)을 유지하는가에 연관을 지어, 모체 및 태아의 면역학적 변화와 관련된 조산의 발생기전에 대한 연구가 이루어지고 있다.<sup>2</sup> 즉 모체에게 태아는 부체로부터 유전물질이 전달된 일종의 유사 동족체 (semiallogeneic)로 인지되어 면역학적 거부반응이 일어나야 하지만, 오히려 임신 초기에 태아조직을 흡수, 침투, 착상시켜 태아에 대한 면역관용이 일어난다.<sup>3</sup> 최근에는 조절 T 세포 (regulatory T cells)가 면역관용에 중요한 역할을 할 것으로 제시되고 있으며,<sup>4</sup> 특히  $CD4^+CD25^+$ 조절 T림프구는 동종이나 자가 항원에 대한 강력한 면역 억제능을 나타내어 자가면역, 종양면역 및 이식 후 면역관용과 연관되어 있다.<sup>5</sup> 이들은 흉선에서 성숙되어 총  $CD4^+$ 조절 T 림프구의 약 5-10% 비율로 말초혈액에서 발견된다.<sup>6</sup>  $CD4^+$ 조절 T 림프구는 항원에 대해 T 세포 수용체 (T cell receptor, TCR)를 표현하여 특정 class II MHC (major histocompatibility complex, MHC) 분자와 결합하거나 항원제시세포 (antigen presenting cell, APC)의 자극을 받으면 활성화된다.<sup>7</sup> 이후 TGF- $\beta$ , IL-10 등의 면역억제 사이토카인을 분비하거나, 직접 T 림프구의 활성화를 억제하여 면역조절 기능을 하게 된다.<sup>5</sup> Foxp3은 전사인자 (transcription factor)로서 조절 T림프구의 성장에 관여하며,<sup>8</sup> 미경험 T림프구를  $CD4^+CD25^+$ 조절 T림프구 표현형으로 전환시키는 유도인자로 밝혀지면서 면역관용을 조절할 수 있는 가능성이 제시되었다.<sup>8</sup> 면역관용에 핵심으로 조절 T 림프구에 대한 연구가 이루어지고 있지만 임신 중의 변화에 관한 연구는 미미한 실정이다. 따라서 본 연구는 조기진통의 발생기전으로 조절 T 림프구의 역할을 알아보고자 조기진통 또는 조기양막

파수에 의해 조산아를 분만한 임신부 16명과 이와 비슷한 주수의 정상 임신부 15명, 정상 성인 여성 15명을 대상으로  $CD4^+CD25^+$ 조절 T 림프구의 분포양상 및 이의 표지자인 Foxp3의 발현 정도의 차이를 확인하였다. 이러한 차이는 조기진통과 관련된 사이토카인의 변화와 관련하여 임신 유지 및 나아가 조산의 한 원인으로 면역학적 역할에 대한 객관적인 토대를 제공할 수 있을 것으로 보인다.

## 연구 대상 및 방법

### 1. 연구 대상

2006년 3월부터 2006년 9월까지 조기진통 또는 조기 양막파수에 의해 조산아를 분만한 임신부 16명과 이와 비슷한 주수의 정상 임신부 15명, 정상 비임신 여성 15명을 대상으로 하였다. 다태임신, 태아 기형, 내과적 문제가 있는 임신부는 제외하였다. 임신부 및 신생아에 대한 정보 및 과거력, 임신 중 특이사항, 분만기록은 의무기록을 참고하였다. 조산군의 경우 분만이 임박하여 입원한 시점에서, 유사 주수의 정상 임신군은 외래 내원시에, 그리고 자발적으로 연구에 참여한 정상 여성 15명의 말초혈액을 heparin tube에 약 10 cc 채취하여 냉장보관 후 24시간 이내에 바로 실험에 사용하였다.

### 2. 연구 방법

#### 1) 림프구의 표현형(phenotype) 분석

##### 가. 림프구 세포(lymphocyte) 분리

채취한 혈액과 Histopaque을 1:1로 하여 섞은 후 원심 분리 (20℃, 30분, 2000 rpm, No break)하여 위에서 아래로 혈장, 단핵, 림프구 세포, 적혈구의 층으로 분리시켰다. pasteur pipet을 이용하여 단핵세포층을 10% FBS-RPMI 1640 10 ml를 담아 둔 새로운 시험관으로 옮긴 다음 원심 분리 (15℃, 5분, 1500 rpm)하였다. 10% FBS-RPMI 1640 배양액으로 다시 세척한 후 10% FBS-RPMI 1640 배양액으로 부유하고 세포수를 계산하였다.

### 나. 림프구의 세포 표식자(extracellular phenotyping of lymphocyte) 분석

림프구를  $1 \times 10^6$  cells로 준비하고 FACS (fluorescence activated cell sorter)용 시험관에 PBS buffer를 3 ml씩 넣은 후 계산된 세포 수대로 각각의 시험관에 넣은 다음 원심 분리 ( $15^\circ\text{C}$ , 5분, 1500 rpm)하고 상층액은 제거하였다. 세포 표식자 분석을 위해 Fluorescein isothiocyanate (FITC) 또는 Phycocerythrin (PE)에 결합된 단일 클론 항체를 이용하였다. 단일클론 항체들은 항 CD4 항체, 항 CD25 항체 (Serotec, Oxford, UK), 항 Foxp3 (eBioscience, san Diego, CA) 이고, 대조군은 항 IGF-1 FITC, IGF-1 PE를 사용하였다. 70  $\mu\text{l}$ 의 PBS buffer를 넣고 부유한 다음 5  $\mu\text{l}$ 의 단세포군 항체를 각 IGF-1 FITC/PE, 항 CD4 항체, 항 CD4 항체/항 CD25 항체, 항 CD25 항체/항 Foxp3 항체 세포군에 맞게 섞은 후  $4^\circ\text{C}$ , 30분간 배양하고 FACS buffer (PBS, 0.02%  $\text{NaN}_3$ , FBS)로 2회 세척하였다. 표식자 분석은 FACSort flow cytometry (Becton Dickinson Immunocytometry System BIDS, USA)로 분석하였다.

다. 말초혈액에서  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  조절 T림프구의 분리 LD column에 버퍼용액을 넣고 시료를 첨가하여  $\text{CD4}$ 에 대한 음성 선택 (negative selection)을 시행한 후 anti-PE-bead를 첨가하여  $4^\circ\text{C}$ 에서 15분간 암실에서 배양하고 MS column으로  $\text{CD25}^+$  세포 양성선택 (positive selection)하여  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  조절 T림프구를 얻었다.

$\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  조절 T 림프구 분획은 전체  $\text{CD4}^+$ 림프구 중의 비율로 표시하였다.  $\text{CD25}$  발현 정도에 따라 log 값 10을  $\text{CD25}^+10^2$  이상 -  $10^4$  미만을  $\text{CD25}^+$ ,  $10^4$  이상을  $\text{CD25}^{\text{high}}$ 로 분류하였다.  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  조절 T 림프구와  $\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$  조절 T 림프구 중 Foxp3에 양성 선택된 세포만 분류하여 그 분포를 비교하였다.

### 3) 통계 분석

SPSS version 11.0을 이용하여 자료를 비교 분석하였다. 모든 측정치는 평균 $\pm$ 표준편차로 표시하였다. 각 군 간의 비교 및 유의성 검정은 ANOVA (Analysis of variance)를 이용하여 분석하였으며, 두 군간의  $p$ 값이 0.05 미만인 경우에 통계적으로 유의한 것으로 판정하였다.

**Table 1.** Characteristics of preterm labor, normal pregnancy and non-pregnant groups

	Non-pregnancy	Normal pregnancy	Preterm labor
Patients number	15	15	16
Mean age (yr)	29.66 $\pm$ 0.76 (29-31)	32.00 $\pm$ 3.24 (29-37)	31.93 $\pm$ 3.65 (28-41)
GA at diagnosis (wks)		29.12 $\pm$ 6.96 (23.4-35.5)	31.39 $\pm$ 3.68 (26-36.4)
GA at delivery (wks)		37.49 $\pm$ 1.69 (32.2-39.1)	30.79 $\pm$ 4.09 (23.3-36.4)
Birth weight (gram)		2843 $\pm$ 431 (2115-3593)	1527 $\pm$ 651 (370-2326)
Apgar score <7 at 1 min		1/15 (6.6%)	6/16 (37.5%)

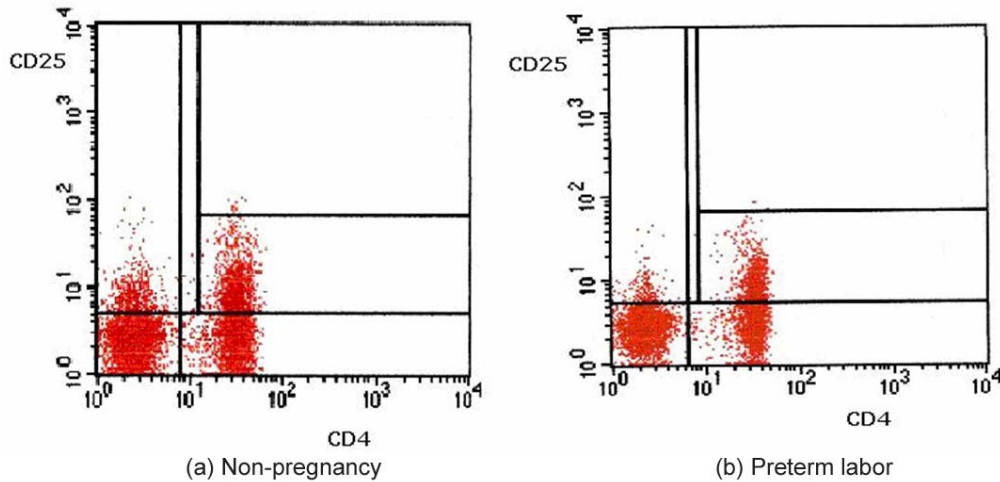
Dimension = mean $\pm$ Standard deviation (range)

GA: Gestational age, yr: year, wks: weeks.

**Table 2.** Comparison of CD25 and Foxp3 expression in  $\text{CD4}^+$  regulatory T lymphocyte among the groups

	Mean(%) $\pm$ SD			P value
	Non-pregnancy	Normal pregnancy	Preterm labor	
$\text{CD4}^+\text{CD25}^+$	12.43 $\pm$ 2.28	10.39 $\pm$ 4.18	9.98 $\pm$ 5.28	>0.05
$\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}$	0.37 $\pm$ 0.14	0.11 $\pm$ 0.07	0.18 $\pm$ 0.12	<0.01
$\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{Foxp3}^+$	3.88 $\pm$ 1.70	3.31 $\pm$ 1.44	3.03 $\pm$ 0.86	>0.05
$\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{Foxp3}^+$	75.29 $\pm$ 4.90	74.95 $\pm$ 9.72	75.22 $\pm$ 9.61	>0.05

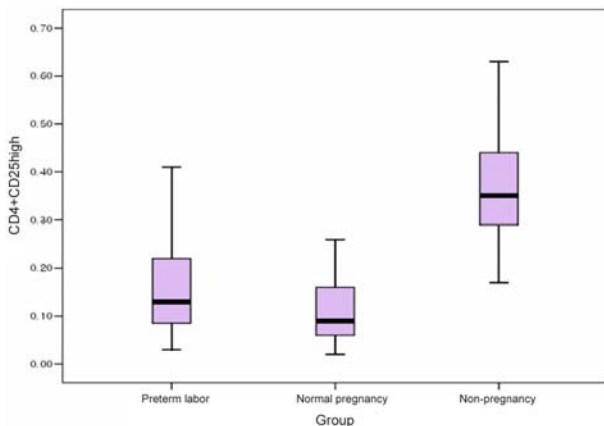
SD: Standard Deviation.



**Fig. 1.** Characterization of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes in peripheral blood from preterm labor and non-pregnancy groups (a–b). The expression of CD4 and CD25 in peripheral blood lymphocytes from one nonpregnant woman and one preterm labor woman.

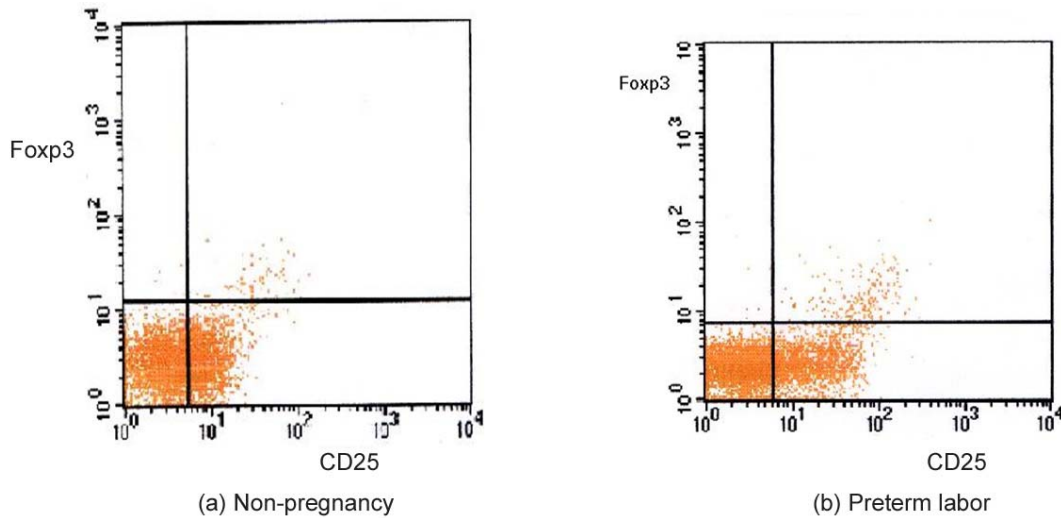
## 결 과

조기진통 임신부와 정상 임신부 그리고 정상 여성의 말초혈액 내 조절 T 림프구 분포 및 CD4<sup>+</sup> 조절 T 림프구 중 CD25 발현하고 있는 정도를 비교하였다 (Table 2, Fig. 1). 정상 여성의 평균 발현율은 12.43±2.28%이었고, 조기진통 임신부의 평균 발현율은 9.98±5.28% ( $p=0.276$ ),



**Fig. 2.** Frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T lymphocytes in the peripheral lymphocytes. The proportion of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> Tregs was significantly lower in preterm labor group and normal pregnant group when compared with nonpregnant women.

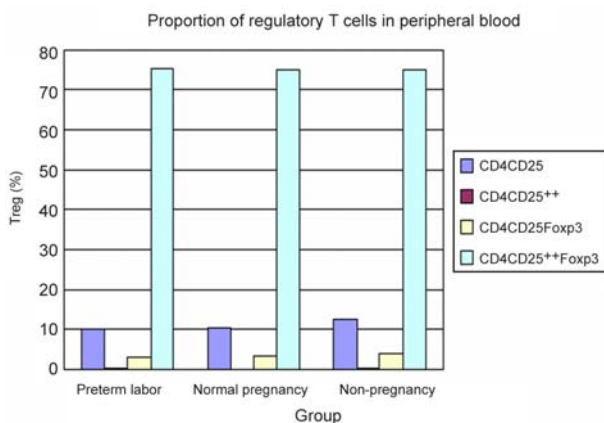
정상 임신부의 평균 발현율은 10.39±4.18% ( $p=0.384$ )로 각 군 간에서 통계적으로 유의한 차이는 보이지 않았다. 그러나 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> 조절 T 림프구의 발현 정도를 정상 여성과 비교하였을 때, 정상 여성의 평균 발현율은 0.37±0.14%이었고, 조기진통 임신부의 평균 발현율은 0.18±0.12% ( $p=0.001$ ), 정상 임신부의 평균 발현율은 0.11±0.07% ( $p=0.001$ )로 조산 여부와 관계없이 임신한 상태에서 비 임신 여성에서보다 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> 조절 T 림프구의 발현 정도가 유의하게 낮게 나타났다 ( $p<0.05$ ) (Fig. 2). 이러한 조절 T 림프구들이 자연 획득된 림프구임을 확인하기 위해 Foxp3 발현 정도를 확인하였다 (Fig. 3). 조산 임신부와 정상 임신부 그리고 정상 여성의 말초혈액 내 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 림프구 중 Foxp3를 발현하고 있는 정도를 비교한 결과 정상 여성의 평균 발현율은 3.88±1.70%이었고, 조산 임신부의 평균 발현율은 3.31±1.44% ( $p=0.505$ ), 정상 임신부의 평균 발현율은 3.03±0.86% ( $p=0.252$ )로 임신 상태에서 비 임신상태에서보다 낮은 농도를 유지하고 있었으나 통계적 유의성은 없었다. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>Foxp3 발현율은 정상 여성의 평균 발현율은 75.29±4.90%이었고, 조산 임신부의 평균 발현율은 74.95±9.72% ( $p=0.986$ ), 정상 임신부의 평균 발현율은 75.22±9.61% ( $p=0.994$ )로 각 군 사이의 유의



**Fig. 3.** Characterization of  $CD4^+CD25^+Foxp3$  regulatory T lymphocytes and  $CD4^+CD25^{high}Foxp3$  regulatory T lymphocytes in peripheral blood from preterm labor and non-pregnancy groups (a-b). The expression of Foxp3 and CD25 in peripheral blood lymphocytes from one nonpregnant woman and one preterm labor woman.

성은 없었다. 또한 조기진통군과 정상 임신군에서의  $CD4^+CD25^+$ 조절 T 림프구,  $CD4^+CD25^{high}$  조절 T 림프구  $CD4^+CD25^+Foxp3$ 조절 T 림프구와  $CD4^+CD25^{high}Foxp3$  조절 림프구의 발현 정도는 모두 차이를 보이지 않았다 (Fig. 4).

## 고 찰



**Fig. 4.** Frequency of  $CD4^+CD25^+Foxp3$  regulatory T lymphocytes in the peripheral lymphocytes. There was no significant difference in proportion of  $CD4^+CD25^+$  Tregs,  $CD4^+CD25^+Foxp3$  Tregs and  $CD4CD25^{high}Foxp3$  Tregs comparing with non-pregnant women.

조산의 원인은 아직까지 정확히 밝혀져 있지 않은 상태로 이로 인한 신생아 이환율 및 사망률로 인해 조산을 유발하는 원인에 관한 연구의 임상적 필요성 및 중요성은 이미 임상의의 관심 대상이다. 일부 모성 및 태아의 면역학적 변화와 관련된 조산의 발생기전에 대한 연구들이 관심을 받고 있는 가운데,<sup>9</sup> 임신 중 면역학적 변화에 관한 연구는 임신부의 면역 체계 측면에서 태아를 유사동종체로 인지하지 않고 오히려 태아에 대한 모체 면역관용이 일어나서 태아의 착상 및 성장을 돕게 되는 점에 주목하고 있다.<sup>10</sup> 태아와 임신부 사이에 면역반응이 일어나는 주요 장소를 모성-태아 접촉면 (maternal-fetal interface)라 부르는데 임신부의 탈락막 (decidua)과 태반이 인접한 곳을 지칭한다.<sup>11</sup> 태반 및 양막은 면역학적 측면에서 보면 태아와 임신부 면역체계 간의 장벽 역할을 수행하므로 임신 중 면역반응은 태아와 임신부 간에 일어나는 것이 아니라 태반과 임신부 간에 일어나는 것으로 간주할 수 있다.<sup>4</sup>

한편 사람의 면역계통은 광범위한 병원균의 침입에 대하여 적극적으로 반응하되 자신의 몸을 이루는 물질에 대하여 반응성을 갖지 않도록 발달되어 있다.<sup>12</sup> 이런 자가관용 (self tolerance)은 가슴샘에서 T 세포 발달에서부터 시작된다. 자가관용 기전으로 가슴샘에서 자가항

원에 대한 반응성이 있는 T 클론은 제거될 뿐 아니라 말초관용에 중요한 임무를 수행하는 조절 T 림프구 (Treg)의 발생이 프로그램 되어있다.<sup>12</sup> 면역조절 T 림프구는 크게 자연조절 T 림프구 (natural Treg)와 입양조절 T 림프구 (adoptive Treg)로 나눌 수 있다.<sup>13</sup> 자연조절 T 림프구인 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 림프구는 이 세포가 흉선에서 새로이 만들어 질 때부터 면역억제기능을 부여 받고 나오며, 정상 개체의 말초 CD4<sup>+</sup> 조절 T 림프구 중 5~10%의 빈도로 존재한다.<sup>6</sup> 아직까지 이 세포의 면역억제 기전은 파악되어 있지 않지만, Foxp3라는 유전자 발현제어 인자가 이 세포의 분화와 활성화에 중요한 역할을 수행한다는 사실이 최근에 밝혀졌다.<sup>14</sup> 반면, 말초 원시 T 림프구 (naïve T lymphocyte)가 특정 환경 하에 자가 또는 외부 항원의 자극을 받으면 면역억제효과를 나타내는 세포로 분화될 수 있는데 이를 입양 또는 유도(inducible)조절 T 림프구로 부르며, IL-10을 분비하는 Tr1, TGF-β를 분비하는 Th3a 및 CD8Ts 등이 여기에 해당한다.<sup>15</sup> 이식항원 특이적 면역관용의 유도 및 유지에 주로 관여하는 면역 조절세포가 자연조절 T 림프구인지 아니면 입양조절 T 림프구인지는 명확하지 않지만 두 부류의 조절 T 림프구 모두 일정한 역할을 담당하는 것으로 관찰된 바 있다.<sup>15</sup> 최근 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 림프구 중 CD25를 더 강하게 표현하는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> 조절 T 림프구가 소개되고 있다.<sup>16</sup> 이들은 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 림프구와 달리 사이토카인에 의존하지 않고 면역조절을 하며, IL-2 수용체를 더욱 많이 표현하여 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 림프구를 활성화시킨다고 알려져 있다.<sup>16</sup> 하지만, 이러한 차이만으로 CD25<sup>+</sup> 조절 T 림프구와 CD25<sup>high</sup> 조절 T 림프구의 기능을 명확히 구분할 수는 없을 것으로 보이나, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> 조절 T 림프구가 다양한 항원에 대해 좀 더 신속한 면역반응을 일으킬 것으로 추정하고 있다.<sup>16</sup> 이와 같이 면역조절 T 림프구의 성상에 대한 자세한 규명을 위해서는 아직도 많은 연구가 필요하지만, 이들 세포의 활용면에서 중요한 점은 면역억제효과가 이미 확고하게 입증되어 있는 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 림프구를 항체 (anti-152, anti-CD4, anti-CD25)를 이용하여 용이하게 분리할 수 있다는 사실이다. 뿐만 아니라 이들 자연조절 T림프

구를 면역억제기능을 유지한 채 체외에서 분열 증식시킬 수 있는 기법과<sup>17</sup> 최근에는 Foxp3의 세포 표식자를 분리하는 방법이 알려지고 있어 조절 T 림프구와 관련된 이식,<sup>18</sup> 종양,<sup>19</sup> 감염면역반응<sup>20</sup>에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 조절 T 림프구의 작용 기전은 아직 밝혀지지 않은 부분이 많지만 이들은 다른 T cell과 마찬가지로 항원에 대해 αβ T-cell receptor (TCR)를 가지며, 이들이 특정 class II MHC molecule에 결합하거나, 항원제시세포의 CD80, CD86 같은 B7 molecule의 자극을 받는 경우 활성화된다.<sup>7</sup> 활성화가 되면 Th1, Th2, 세포독성 림프구의 강력한 면역억제 사이토카인인 transforming growth factor (TGF)-β, IL-10을 생산함으로써, 억제 물질인 cytotoxic T lymphocyte associated antigen-4 protein (CTLA-4)를 통해서, 또는 직접 T 림프구의 활성화를 억제함으로써 면역 억제-조절 능력을 갖게 되는 것으로 정리된다.<sup>5</sup>

전술한 바와 같이 많은 연구들에도 불구하고 조산의 병인에 대한 확실한 규명이 어려운 가운데, 최근에는 임신의 모성-태아 면역관용에 대한 연구가 조산을 비롯한 유산 및 임신중독증 등의 발생기전에 관여할 것이라는 가설이 제시되고 있으나 국내는 물론 국외에서도 산과 영역에서의 조절 T 림프구와 연관된 연구 시도는 미미한 실정이다. Varuna 등에 의하면 임신한 여성은 조절 T 림프구가 자궁에서의 면역반응을 억제하기 때문에 그들의 태아를 외부 항체로 인식하는 거부반응을 일으키지 않는다고 하였다.<sup>4</sup> 실험적으로 조절 T 림프구의 수를 감소시킨 쥐에서 태아가 거부되는 것을 보여주어 이를 응용하여 조절 T 림프구를 증가시킴으로써 미성숙 태아의 유산, 조산 그리고 전자간증 등을 예방할 수 있을 것으로 보고 있으며, 또한 면역질환과 이식에 따른 거부 반응의 새로운 치료법을 이끌 수 있는 계기가 될 것이라고 발표하였다.<sup>4</sup> 인간을 대상으로 한 연구는 극히 드물지만, 일반적으로 정상 임신 제 2, 3분기에 비 임신상태보다 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 조절 T 림프구의 수가 증가되어 있고, 분만이 임박한 상황에서는 그 수가 감소되어 임신유지 및 모체-태아 면역관용에 관여할 것으로 알려져 있다.<sup>21</sup> 그러나 일부 연구에서는 말초 혈액에서는 임신과 비 임신 사이의 조절 림프구 분포의 차이는 없다고 하여 아직까지

일치된 의견은 없다고 하겠다.<sup>22</sup> 정상 임신과 자연유산에서의 조절 T 림프구에 대한 연구에 의하면 정상 임신군에 비해 자연 유산군에서 혈액과 탈락막에서  $CD4^+$   $CD25^{high}$  조절 T 림프구의 분포가 감소되어 있었고, 초기 임신의 모체 혈액과 탈락막 조직에서 분리한  $CD4^+$   $CD25^+$  조절 T 림프구가 세포와 세포 사이의 직접적인 접촉으로 T 림프구의 활성을 억제한다고 하였다.<sup>23</sup> 이는 임신부의 혈액뿐만 아니라 탈락막에서의  $CD4^+$   $CD25^{high}$  조절 T 림프구가 임신유지를 위해 모체 면역관용을 매개하는 역할을 할 것으로 추정하고 있다.<sup>23</sup> 본 연구결과 정상 여성과 비교하였을 때 조기진통 임신부와 정상 임신부군에서  $CD4^+$   $CD25^{high}$  조절 T 림프구의 비율이 통계적으로 유의하게 낮은 결과를 보였지만,  $CD4^+$   $CD25^+$  조절 T 림프구와  $CD4^+$   $CD25^+$  Foxp3 조절 T 림프구,  $CD4^+$   $CD25^{high}$  Foxp3 조절 T 림프구의 비율은 세 군간의 차이가 없었다. 하지만 기존 연구와 달리 Foxp3항체를 이용하여 조절 T 림프구 중의 분포를 확인한 결과,  $CD4$  림프구 중에  $CD4^+$   $CD25^+$  Foxp3 조절 T 림프구와  $CD4^+$   $CD25^{high}$  Foxp3 조절 T 림프구가 검출되었다는 것은 이러한 조절 T 림프구가 비특이적인 항원이 아닌 모체의 면역관용을 위해 자연적으로 유도되었음을 의미하고, 정상 여성에서도 다른 기능을 위해 조절 T 림프구가 존재한다면 정상적으로 Foxp3가 검출될 것으로 유추된다. 조기진통군과 정상 임신부군간에 조절 T 림프구의 분포에 유의한 차이를 발견할 수 없었던 것은 조산의 발생에 조절 T 림프구 이외의 다른 면역학적 요인 또는 유전적 요인이 관여할 것으로 추정되며,<sup>24</sup> 조산의 발생과 같은 광범위한 분야에 대한 포괄적인 연구가 지속적으로 이루어져야 할 것이라 생각된다. 그 일례로 최근의 많은 연구에 의하면 조기분만 진통은 감염세균에 대한 반응으로 미생물에서 유래된 어떤 물질이 거식세포 (macrophage)와 단핵세포 (monocyte)를 활성화시키고 이러한 과정에서 발생된 생성물인 IL-1, IL-6, 혈소판 활성화인자 (platelet activating factor), tumor necrosis factor (TNF) 등이 프로스타글란딘의 생성을 촉진시킬 것이라는 가설이 지배적이다.<sup>25</sup> 여러 가지 생물학적 과정에서 다른 사이토카인의 억제제로서 작용하는 TGF- $\beta$ 는 양막세포에서 사이토카인에

대한 프로스타글란딘의 생성을 억제하였으며, 토끼의 양막강 내에 IL-1와 TNF의 주사에 의해 유발된 조기진통이 TGF에 의해 억제된다는 사실은 조기진통의 억제에 대한 TGF- $\beta$ 의 가능성을 시사해 주었다.<sup>26</sup>

본 연구를 통해 조기진통 및 조산에서의 조절 T 림프구의 역할은 확실하게 규명하지는 못하였다. 그러나 임신유지를 위해 모체의 전신적 면역반응뿐만 아니라 국소 면역반응이 관여한다는 것을 감안한다면 탈락막에서의  $CD4^+$   $CD25^+$  조절 T 림프구에 대한 연구가 병행되어야 할 것으로 보인다. 최근에는 이전의 연구결과와 달리 임신부의 말초혈액에서의 조절 T 림프구 분포가 비 임신상태와 다르지 않고, 탈락막에서만  $CD4^+$   $CD25^+$  조절 T 림프구 특히  $CD4^+$   $CD25^{high}$  조절 T 림프구가 유의하게 증가되어 있어<sup>22</sup> 모체-태아 접촉면에서의 국소적 면역억제 작용이 임신유지에 더 많은 역할을 할 것이라는 가설도 제시되고 있다.<sup>22,27</sup> 본 연구는  $CD4^+$   $CD25^+$  조절 T 림프구의 강력한 발현인자인 Foxp3를 기존의 방법과는 달리 항체를 이용하여 분리하여  $CD4^+$   $CD25^+$  조절 T 림프구 중에서도 Foxp3만을 발현하는 조절 T 림프구를 선택 분리할 수 있었으며, 이는 임신과 조산에서 발현된 조절 T 림프구가 자연적으로 발생한 것임을 입증할 수 있었다는데 의의가 있다고 할 수 있다. 즉 Foxp3항체를 사용하여 다양한 항원에 의해 무작위로 유도된 T 림프구가 아닌 임신 중의 면역관용을 위해 고유하게 발생된 자연 조절 T 림프구임을 비교적 손쉽게 증명할 수 있게 되었다. 이러한 조절 T 림프구와 임신과의 연관성은 단지 조산뿐만 아니라 다른 고위험 임신과 합병된 산과질 환들의 병인규명과 새로운 치료법 개발에도 기여할 것이다. 또한 최근 임신부의 고령화 등으로 인해 증가하고 있는 조산의 병인 규명과 치료 및 예방에 본 연구가 기초 자료를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

## 참고문헌

1. 신종철. 조기진통 처치의 최신지견. 대한산부학회지 2006; 49: 1403-11.
2. Sacks G, Sargent I, Redman C. An innate view of human pregnancy. Immunol Today 1999; 20: 114-8.

3. Gaunt G, Ramin K. Immunological tolerance of the human fetus. *Am J Perinatol* 2001; 18: 299-312.
4. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Regulatory T cells mediate maternal tolerance to the fetus. *Nat Immunol* 2004; 5: 266-71.
5. Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med* 2001; 193: 1285-94.
6. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001; 182: 18-32.
7. Kingsley CI, Karim M, Bushell AR, Wood KJ. CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J Immunol* 2002; 168: 1080-6.
8. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057-61.
9. Zencclusen AC, GerlofK, Zencclusen ML, Ritschel S, Zambon Bertoja A, Fest S, Hontsu S, Ueha S, Matsushima K, Leber J, Volk HD. Regulatory T cells induce a privileged tolerant micro-environment at the fetal-maternal interface. *Eur J Immunol* 2006; 36: 82-94.
10. Billington WD. The immunological problem of pregnancy: 50 years with the hope of progress. A tribute to Peter Medawar. *J Reprod Immunol* 2003; 60: 1-11.
11. Aluvihare VR, Kallikourdis M, Betz AG. Tolerance, suppression and the fetal allograft. *J Mol Med* 2005; 83: 88-96.
12. Le NT, Chao N. Regulating regulatory T cells. *Bone Marrow Transplant* 2007; 39: 1-9.
13. Hauben E, Roncarolo MG. Human CD4<sup>+</sup> regulatory T cells and activation-induced tolerance. *Microbes Infect* 2005; 7: 1023-32.
14. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330-6.
15. Bacchetta R, Sartirana C, Levings MK, Bordignon C, Narula S, Roncarolo MG. Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines. *Eur J Immunol* 2002; 32: 2237-45.
16. Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2001; 167: 1245-53.
17. Cervera A, Lillo R, Garcia-Sanchez F, Madero L, Madero R, Vicario JL. Flow cytometric assessment of hematopoietic cell subsets in cryopreserved preterm and term cord blood, influence of obstetrical parameters, and availability for transplantation. *Am J Hematol* 2006; 81: 397-410.
18. Wood KJ, Sakaguchi S. Regulatory T cells in transplantation tolerance. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 199-210.
19. Gallimore A, Sakaguchi S. Regulation of tumour immunity by CD25<sup>+</sup> T cells. *Immunology* 2002; 107: 5-9.
20. Thompson C, Powrie F. Regulatory T cells. *Curr Opin Pharmacol* 2004; 4: 408-14.
21. Somerset DA, Zheng Y, Kilby MD, Sansom DM, Drayson MT. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T-cell subset. *Immunology* 2004; 112: 38-43.
22. Tilburgs T, Roelen DL, van der Mast BJ, van Schip JJ, Kleijburg C, de Groot-Swings GM, Kanhai HH, Claas FH, Scherjon SA. Differential distribution of CD4(+)CD25(bright) and CD8(+)CD28(-) T-cells in decidua and maternal blood during human pregnancy. *Placenta* 2006; 27 Suppl A: S47-53.
23. Sasaki Y, Sakai M, Miyazaki S, Higuma S, Shiozaki A, Saito S. Decidual and peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 347-53.
24. Menon R, Merialdi M, Betran AP, Dolan S, Jiang L, Fortunato SJ, Williams S. Analysis of association between maternal tumor necrosis factor- $\alpha$  promoter polymorphism (-308), tumor necrosis factor concentration, and preterm birth. *Am J Obstet Gynecol* 2006; 195: 1240-8.
25. Bry K, Hallman M, Lappalainen U. Cytokines released by granulocytes and mononuclear cells stimulate amnion cell prostaglandin E2 production. *Prostaglandins* 1994; 48: 389-99.
26. Bry K, Lappalainen U, Hallman M. Interleukin-1 binding and prostaglandin E2 synthesis by amnion cells in culture: regulation by tumor necrosis factor- $\alpha$ , transforming growth factor- $\beta$ , and interleukin-1 receptor antagonist. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1181: 31-6.
27. Heikkinen J, Mottonen M, Alanen A, Lassila O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin Exp Immunol* 2004; 136: 373-8.



---

「국문초록」

**목적:** 최근 모성 및 태아의 면역학적 변화와 관련된 조산의 발생기전에 대한 연구들이 이루어지고 있는데, 이러한 임신 중 면역학적 변화에 관한 연구는 태아가 어떻게 임신부에서 면역관용 (immune tolerance)를 유지하는가에 초점을 맞추고 있다. 일부의 면역반응들은 T 림프구의 활성화나 기능을 막는 사이토카인들을 생산하는 세포들에 의해 조절된다. 최근 이러한 면역반응을 조절하는 조절 T 림프구에 대한 연구가 이루어지고 있지만 임신 중의 변화에 관한 연구는 미미한 실정이다. 본 연구는 조기진통과 정상임신, 그리고 정상여성에서의 조절 T 림프구의 분포를 알아보고자 하였다.

**연구 방법:** 이를 위해 조기진통 또는 조기양막파수에 의해 조산아를 분만한 임신부 16명과 이와 비슷한 임신주수 15명의 정상 임신부 그리고 정상 성인 여성 15명을 대상으로 조절 T 림프구 중  $CD4^+CD25^+$  조절 T 림프구와 이들의 발현유전자인 Foxp3를 flow cytometric 방법으로 그 분포양상 및 특징을 비교하였다.

**결과:** 조기진통 임신부와 정상 임신부군, 그리고 정상 여성에서 총  $CD4^+$  T 림프구 중  $CD4^+CD25^{high}$  T 림프구의 분포는 각각 0.18% (SD 0.12), 0.11% (SD 0.07), 0.37% (SD 0.14)이었다. 정상 여성과 비교하였을 때 조기진통 임신부와 정상 임신부군에서  $CD4^+CD25^{high}$  조절 T 림프구의 비율이 통계적으로 유의하게 낮은 결과를 보였다. 그러나  $CD4^+CD25^+$  조절 T 림프구와  $CD4^+CD25^+Foxp3$  조절 T 림프구 그리고  $CD4^+CD25^{high}Foxp3$  조절 T 림프구의 비율은 세 군간의 통계적 차이가 없었다.

**결론:** 본 연구는 조절 T 림프구의 특이항체를 이용하여 임신 중의 조절 T 림프구의 분포를 알아보았다. 조기진통 및 조산에서의 조절 T 림프구의 역할을 확실하게 규명하지는 못하였으나, 임신 유지를 위해 모체의 전신적 면역반응 뿐만 아니라 태반에서의  $CD4^+CD25^+$  조절 T 림프구에 대한 연구가 더 필요할 것으로 보이며 이를 통해 국소 면역반응 및 다른 면역반응과의 관계에 대해 좀 더 진보된 결과를 얻을 수 있을 것으로 보인다.

**중심 단어:** 조절 T 림프구, Foxp3, 조기진통, 면역관용

---