

신약 개발 연구개발사업
(Research Program for New Drug Target Discovery)

마우스 개체에서 CD99 기능 분석을
통한 이식대숙주질환 조절기술 개발

(Development of GVHD control method via
CD99 functional analysis in mouse system)

서울대학교 의과대학

교육과학기술부

신약 개발 연구개발사업
(Research Program for New Drug Target Discovery)

마우스 개체에서 CD99 기능 분석을
통한 이식대숙주질환 조절기술 개발

(Development of GVHD control method via
CD99 functional analysis in mouse system)

서울대학교 의과대학

교육과학기술부

편집순서 2 제출문

제 출 문

장관 귀하
이 보고서를 " 미래기반기술개발사업 "과제(세부과제 "신약타겟 validation 연구")의 보고서로 제출합니다.

2010. 8.

주관연구기관명 :서울대학교 의과대학

주관연구책임자 :최 은 영

연 구 원 :

" :

" :

협동연구기관명 :

협동연구책임자 :

보고서 요약서

| | | | | | |
|--|---------------------|---|-------------------------------|-------------|--|
| 과제고유번호 | 2007-03619 | 해 당 단 계 연구 기 간 | 2007.7.16.~ 2010.7.15 | 단 계 구 분 | 3/3 |
| 연구사업명 | 중사업명 | 미래기반기술개발사업 | | | |
| | 세부사업명 | 신약타겟 validation 연구 | | | |
| 연구과제명 | 대과제명 | | | | |
| | 세부과제명 | 마우스 개체에서 CD99 기능 분석을 통한 이식대숙주질환 조절기술 개발 | | | |
| 연구책임자 | 최은영 | 해당단계 참여 연구원수 | 총 : 6명 내부 : 1명 외부 : 5명 | 해당단계 연구비 | 정부:6000천 원 기업 : 천원 계: 6000천원 |
| | | 총연구기간 참여 연구원수 | 총 : 10명 내부 : 1명 외부 : 9명 | 총연구비 | 정부:212,000 천원 기업 : 천원 계:212,000 천원 |
| 연구기관명 및 소속부서명 | 서울대학교 의과대학 의과 학과 | | 참여기업명 | | |
| 국제공동연구 | 상대국명 : | | 상대국연구기관명 : | | |
| 위탁연구 | 연구기관명 : | | 연구책임자 : | | |
| 요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내) | | | | 보고서면수 | 67 |
| <p>조혈모 세포 이식 성공을 위하여 반드시 이루어야할 GVHD의 조절을 위하여는 타겟 장기로의 세포 이동 조절 및 물질 수송에 관한 기술 개발을 필요로 하며, CD99 분자기 세포 이동과 관련이 있다는 기존의 연구 보고들에 기반하여,</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) GVHD 발병 중 선천 면역 세포 및 T 세포등에 발현되는 CD99 단백질의 발현 역동성 확인 2) CD99 단백질 자체의 생화학적 특성 분석 3) CD99 단백질과 상호작용할 후보 물질로서 CD99L2 단백질군의 기능 분석 및 상호작용이 미치는 세포 기능에 대한 영향 평가를 통한 CD99 단백질의 세포내 기능 확인 4) CD99 적중 마우스를 GVHD 모델 적용하여 CD99 단백질이 GVHD 발병기전에 미치는 영향 평가의 연구 목표를 두었음. <p>결과 1. B6 → BALB.B 의 GVHD 모델에서 CD99 단백질의 발현 역동성 확인</p> <ol style="list-style-type: none"> 1) CD99 단백질의 세포 표면으로의 발현은 세포 활성화에 따라 조절됨. 2) GVHD 발병중 활성화되는 T 세포와 염증관련 선천 면역 세포인 granulocyte에서 시간 경과 | | | | | |

에 따라 CD99 발현이 늘며 CD99 양성 세포들의 타겟 장기 내 축적이 일어남
 3) 세포 활성화에 따라 세포 표면으로의 발현은 증가하나, 비활성화된 세포에서도 CD99 단백질의 발현이 내재되어 있음. 즉, CD99 단백질의 세포막으로의 발현이 세포 활성화에 따라 조절됨을 시사함.

결과 2. CD99 단백질의 생화학적 분자생물학적 특성 연구

- 1) CD99 단백질은 세포막외부위 (extracellular domain)을 매개로 homo-dimer를 형성하며, 이 homodimer는 주로 세포내에 머물고 있음.
- 2) CD99 단백질은 CD99L2 단백질 (CD99L2_S & CD99L2_L) 과 hetero-dimer (CD99-CD99L2_S & CD99-CD99L2_L)를 형성함.
- 3) CD99L2 단백질끼리는 homodimer 또는 heterodimer를 형성하지 못함.
- 4) O-glycosylation mutant CD99 단백질들은 homo-dimer를 형성할 수 있음.
- 5) CD99 단백질과 CD99 glycosylation mutant 들은 dimer (CD99-CD99T45A, CD99-CD99T50A, CD99-CD99T45AT50A)를 형성할 수 있음
- 6) Glycosylation mutant들은 CD99L2 단백질과 dimer를 형성하지 않음.
- 7) CD99-CD99 homo-dimer 및 CD99-CD99L2_S, CD99-CD99L2_L hetero-dimer 는 golgi 및 membrane 에 위치함.
- 8) CD99-CD99L2 hetero-dimer 형성에 의하여 세포간 유착 (cell adhesion) 이 증가함.
- 9) CD99L2 단백질은 CD99가 있을 때에만 세포막으로 나갈 수 있음
- 10) CD99 단백질이 homodimer나 CD99L2 단백질과 heterodimer를 형성할 때 CD99L2 단백질과 경쟁하지 않음을 two-color BiFC를 통해 확인.
- 11) CD99-CD99L2 heterodimer와 CD99 단백질은 Trimer를 형성하지 않음을 확인.
- 12) CD99-CD99 homodimer와 CD99-CD99L2 heterodimer는 세포 내에서 서로 다른 위치에 존재함.

결과 3. CD99 적중 마우스를 이용한 연구

- 1) CD99 유전자 적중 마우스의 말초 혈액 분석 결과, 림프구에서 CD99L2 단백질의 발현이 없음을 확인
- 2) H-2K (MHC class I), I-A (MHC class II) 의 발현 정도에는 차이가 거의 없음을 확인.
- 3) CD99 적중 마우스의 흉선의 CD8 T 세포의 분획이 정상보다 낮음
- 4) CD99 적중 마우스에 면역반응을 유도하였을 때 초기 반응에서만 약간의 차이를 보임을 확인하였으며 CD99 적중 마우스를 donor로 하여 GVHD를 유도하였을 때도 초기 반응에서는 더 나은 양상을 보이며 이때 장기로 침윤된 세포의 수에서 차이가 있음을 확인하였음.

연구 결과의 의의

- 1) 본 연구에서 밝힌 CD99 분자의 생화학 분자생물학적 특성을 바탕으로 면역반응과 이식편대숙주질환에서의 CD99의 기능을 알아낼 수 있는 토대를 만들었음.
- 2) 면역 반응과 이식편대숙주질환 조절에 있어 CD99 뿐만 아니라 CD99L2가 면역세포 활성화 후 세포이동 조절 타겟으로의 가능성을 가짐

| | | |
|------------------|----|--|
| 색인어 (각 5개 이상) | 한글 | CD99, CD99L2, 상호작용, 세포 부착, 이식편대숙주질환 |
| | 영어 | CD99, CD99L2, Interaction, Cell adhesion, GVHD |

요 약 문

I. 제 목

마우스 개체에서 CD99 기능분석을 통한 이식편대숙주질환 조절 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

마우스를 이용한 부조직적합 불일치성 이식에 의한 이식편대숙주질환 (GVHD) 모델에서, 세포이동관 관련된 CD99 의 역할을 확인, CD99 단백질의 분자적 수준에서의 특성 및 기능을 분석하고, CD99 적중 마우스를 이용한 기능 검증으로 GVHD 조절 신약개발 물질의 타겟으로서의 CD99 생체 기능 확인하고자 하였음.

GVHD의 조절을 위하여는 타겟 장기로의 세포 이동 조절 및 물질 수송에 관한 기술 개발을 필요로 하며, CD99 분자기 세포 이동과 관련이 있다는 기존의 연구 보고들에 기반하여,

- 1) GVHD 발병 중 선천 면역 세포 및 T 세포등에 발현되는 CD99 단백질의 발현 역동성 확인
- 2) CD99 단백질 자체의 생화학적 특성 분석
- 3) CD99 단백질과 상호작용할 후보 물질로서 CD99L2 단백질군의 기능 분석 및 상호작용이 미치는 세포 기능에 대한 영향 평가를 통한 CD99 단백질의 세포내 기능 확인
- 4) CD99 적중 마우스를 GVHD 모델 적용하여 CD99 단백질이 GVHD 발병기 전에 미치는 영향 평가의 연구 목표를 두었음.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. B6 -> BALB.B 의 GVHD 모델에서 CD99 단백질의 발현 역동성 확인
 - 1) B6-> BALB.B 모델에서 선천성 면역세포에서 CD99 단백질 발현확인
 - 2) 세포 표면에서의 CD99 단백질의 발현과 세포내의 CD99 단백질 발현

의 차이 비교

2. CD99 단백질의 생화학적 분자생물학적 특성 연구
 - 1) CD99 단백질의 생화학적 분자생물학적 특성 연구
 - 2) CD99와 상호작용하는 단백질로서 CD99L2 단백질군의 역할 확인
 - 3) CD99 단백질과 CD99L2 단백질과의 상호작용이 세포 유착에 미치는 영향 확인
 - 4) CD99 단백질이 물질수송에 갖는 역할 확인
3. CD99 적중 마우스를 이용한 연구
 - 1) CD99 적중 마우스의 phenotyping
 - 2) CD99 적중 마우스에서 면역 반응 유도과 적중 마우스를 이용한 GVHD 유도 연구

IV. 연구개발결과

1. B6 → BALB.B 의 GVHD 모델에서 CD99 단백질의 발현 역동성 확인
 - 1) CD99 단백질의 세포 표면으로의 발현은 세포 활성화에 따라 조절됨.
 - 2) GVHD 발병중 활성화되는 T 세포와 염증관련 선천 면역 세포인 granulocyte에서 시간 경과에 따라 CD99 발현이 늘며 CD99 양성 세포들의 타겟 장기 내 축적이 일어남
 - 3) 세포 활성화에 따라 세포 표면으로의 발현은 증가하나, 비활성화된 세포에서도 CD99 단백질의 발현이 내재되어 있음. 즉, CD99 단백질의 세포막으로의 발현이 세포 활성화에 따라 조절됨을 시사함.
2. CD99 단백질의 생화학적 분자생물학적 특성 연구
 - 1) CD99 단백질은 세포막외부위 (extracellular domain)을 매개로 homo-dimer를 형성하며, 이 homodimer는 주로 세포내에 머물고 있음.
 - 2) CD99 단백질은 CD99L2 단백질군 (CD99L_{2s} & CD99L_{2L}) 과 hetero-dimer (CD99-CD99L_{2s} & CD99-CD99L_{2L})를 형성함.
 - 3) CD99L2 단백질끼리는 homodimer 또는 heterodimer를 형성하지 못함.
 - 4) O-glycosylation mutant CD99 단백질들은 homo-dimer를 형성할 수 있음.
 - 5) CD99 단백질과 CD99 glycosylation mutant 들은 dimer (CD99-CD99T45A, CD99-CD99T50A, CD99-CD99T45AT50A)를 형성할 수 있음
 - 6) Glycosylation mutant들은 CD99L2 단백질군과 dimer를 형성하지 않음.
 - 7) CD99-CD99 homo-dimer 및 CD99-CD99L_{2s}, CD99-CD99L_{2L} hetero-dimer는 golgi 및 membrane 에 위치함.
 - 8) CD99-CD99L2 hetero-dimer 형성에 의하여 세포간 유착 (cell adhesion) 이 증가함.
 - 9) CD99L2 단백질군은 CD99가 있을 때에만 세포막으로 나갈 수 있음

- 10) CD99 단백질이 homodimer나 CD99L2 단백질과 heterodimer를 형성할 때 CD99L2 단백질과 경쟁하지 않음을 two-color BiFC를 통해 확인.
- 11) CD99-CD99L2 heterodimer와 CD99 단백질은 Trimer를 형성하지 않음을 확인.
- 12) CD99-CD99 homodimer와 CD99-CD99L2 heterodimer는 세포 내에서 서로 다른 위치에 존재함.

3. CD99 적중 마우스를 이용한 연구

- 1) CD99 유전자 적중 마우스의 말초 혈액 분석 결과, 림프구에서 CD99L2 단백질의 발현이 없음을 확인
- 2) H2-K^b, I-A^b의 발현 정도에는 차이가 거의 없음을 확인.
- 3) CD99 적중 마우스의 흉선의 CD8 T 세포의 분획이 정상보다 낮음
- 4) CD99 적중 마우스에 면역반응을 유도하였을 때 초기 반응에서만 약간의 차이를 보임을 확인하였으며 CD99 적중 마우스를 donor로 하여 GVHD를 유도하였을 때도 초기 반응에서는 더 나은 양상을 보임을 확인하였음.

V. 연구개발결과의 활용계획

- 1) 본 연구에서 밝힌 CD99 분자의 생화학 분자생물학적 특성을 바탕으로 면역반응과 이식편대숙주질환에서의 CD99의 기능을 알아낼 수 있는 토대를 만들었음.
- 2) 면역 반응과 이식편대숙주질환 조절에 있어 CD99 뿐만 아니라 CD99L2가 면역세포 활성화 후 세포이동 조절 타겟으로의 가능성을 가짐.

S U M M A R Y

I. Purpose

- 1) Analysis on the kinetics of CD99 expression on innate immune cells and T cells during the development of GVHD
- 2) Biochemical and molecular biological characterization of CD99
- 3) Study on the interaction of CD99 with CD99L2 proteins and the effects of the interaction on CD99 function.
- 4) Application of CD99 deficient mouse for GVHD induction to analyze the effect of CD99 in GVHD pathogenesis.

II. Contents

Analysis on the kinetics of CD99 expression during GVHD pathogenesis

- 1) Surface expression of CD99 is regulated by activation of cell
- 2) In GVHD, surface expression of CD99 on granulocytes was increased and CD99 positive cells were accumulated in target organs.
- 3) While the surface expression of CD99 is increased on activated cells, the CD99 is also present inside of the cells before the activation. That is, the transport of CD99 to cell surface is regulated by cell activation.

Biochemical and molecular characterization of CD99

- 1) CD99 molecules form homodimer through its extracellular domain and this dimer stays in cytosol mainly.
- 2) CD99 molecule forms heterodimer with two isoforms of CD99L2 (CD99L2_S & CD99L2_L)
- 3) CD99L2 molecules cannot form homo- or heterodimer
- 4) O-glycosylation mutant of CD99 can form homo-dimer
- 5) Wild type CD99 and glycosylation mutants of CD99 form dimer.
- 6) Glycosylation mutants do not form dimer with CD99L2

- 7) CD99-CD99 homo-dimer and CD99-CD99L2_S CD99-CD99L2_L hetero-dimer are localized in golgi and cell membrane
- 8) Cell adhesion is increased when CD99 forms dimer with CD99L2
- 9) CD99 helps CD99L2 to move to cell membrane
- 10) There is no competition between CD99 and CD99L2 when they form homo- or hetero-dimer which was confirmed by two-color BiFC
- 11) CD99-CD99L2 heterodimer and CD99 do not form trimer.
- 12) CD99-CD99 homodimer and CD99-CD99L2 heterodimer exist on different part of cell which was analyzed by confocal microscopy.

Study with CD99 KO mouse

- 1) CD99L2 is not expressed on the surface of lymphocytes from CD99 KO mouse
- 2) Expression levels of H-2K and I-A molecules are not affected by the lack of CD99 expression
- 3) Development of T cells in CD99 KO mice : low percentage of CD8 T cell population in thymus of CD99 KO mice.
- 4) In early time of CD99 KO cell-induced GVHD model, there was quick recovery in weight change.

III. Expected Contribution

- 1) Broadening knowledge on the biochemical and molecular characteristics of CD99 which is well known proteins related to leukocytes migration across endothelial lining
- 2) Enhanced chance for targeting CD99 function for controlling cell migration
- 3) Increased possibility of defining CD99 function as well as CD99L2 in vivo and the role of the molecule in pathogenesis of GVHD
- 4) Establishment of disease model for screening new drugs related to cell migration or GVHD

C O N T E N T S

(영 문 목 차)

Chapter 1. Purpose of Research

Chapter 2. The Present States of Research Field

Chapter 3. Results

Chapter 4. Accomplishment and Expected Contribution

Chapter 5. Application

Chapter 6. Information from Abroad

Chapter 7. Reference

목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
- 제 5 장 연구개발결과의 활용계획
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
- 제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구 개발 배경과 그 필요성

가. 연구개발의 과학기술적 중요성

- 백혈병 등의 악성혈액질환과 그 외 비악성혈액질환의 치료를 목적으로, 골수은행을 통하여 제공받은 비혈연 공여자의 조혈모세포 이식 후에는, 부조직적합항원 불일치에 의해 면역반응이 유도되어 이식편대숙주질환이 (Graft-versus-Host Disease: GVHD) 발병된다.
- 그러나 이 면역반응은 이식편대 종양효과 (Graft-versus-Tumor: GVT)를 동반하며, 종양제거 효율을 높이고 백혈병의 재발을 억제하는 장점을 갖는다. 그러므로, GVT 효과는 유지하면서 GVHD를 제어할 수 있는 치료제 개발이 필요하다.
- GVHD 발병 후반기에 폐, 간, 피부 조직 등에 염증 세포의 침투가 일어나며, 이때 침투된 선천성면역세포 (innate immune cell)에 의한 조직파괴가 유발된다.
- 따라서, 염증성 장기로 활성화된 선천성면역세포의 이동을 선택적으로 블로킹하는 방안으로 CD99 항원의 기능 분석과 이를 통한 GVHD 조절 기술을 확립하고 GVHD 조절을 위한 신약개발의 타겟을 위한 시스템이 필요하다.

1) 이식편대숙주 질환

- 이식편대숙주 질환 (Graft-versus-Host Disease: GVHD)은 조혈모세포 (Bone Marrow Stem Cell) 이식 후 발생하는 면역질환으로, 이식된 BM 내에 존재하는 성숙 면역세포가 숙주를 인지하여 공격함으로써 발생한다.
- 조혈모세포이식은 백혈병, 림프종, 다발성골수종과 같은 여러 악성 혈액질환과 재생불량성 빈혈, 선천성면역결핍 등의 비악성 혈액질환의 치료를 위하여 시행되고 있으며, 최근에는 일부 고형암 환자에서도 조혈모세포 이식술의 치료효과가 밝혀지고 있다. 특히 동종조혈모세포이식은 자가이식과는 달리 이식편대종양효과 (Graft-versus-Tumor effect: GVT effect) 가 있어 악성질환의 재발을 효과적으로 예방할 수 있다.
- 조혈모세포이식에 사용되는 조혈모세포가 타인으로부터 유래되는 동종조혈모세포이식 (allogeneic stem cell transplantation)은 HLA 유전자 일치 공여자를 가족내에서 찾을 확률이 1/4 에 불과하기에 대부분의 환자들은 골수은행을 통하여 타인 공여자를 찾아서 행해진다.
- 비혈연이식에서는 환자와 공여자 사이의 면역학적 장벽이 높아지며, 이식 후 생착 부전이나 이식편대 숙주질환의 발생이 형제간 이식보다 더 많아지게 된다.
- 그러나 백혈병 세포를 제거하는 이식편대 종양효과는 비혈연 이식이 상대적으로 더 우수하여 백혈병의 재발이 형제간 이식에 비하여 적은 장점이 있다. 따라서 조혈모 세포이식

의 성공률을 높이기 위하여는 이식후 합병증의 발생을 줄이는 것이 필수적이다.

- 합병증인 이식편대숙주질환의 예방을 위한 사이클로스포린 (cyclosporine) 이나 FK506 과 같은 면역억제제의 사용, 이식후 바이러스 감염 예방을 위한 항바이러스제와 면역글로불린의 투여, 장내 세균박멸을 통하여 체재 감염을 줄이기 위한 항생제의 투여 등이 이식 후 합병증의 예방 방법들이나, 그러나 이와 같은 방법들은 제공받은 조혈모세포로부터 면역계가 재건되기까지의 기간동안 환자의 면역결핍을 유도하며, GVT 효과를 상쇄시킨다.
- 따라서, GVT 효과는 유지하면서, GVHD 효과만 선택적으로 조절할 수 있는 방안이 필요하다.

2) GVHD 발병 기전 및 조절

- GVHD 발병기전은 항암화학요법 및 방사선 치료에 의한 조직의 파괴에 의해 시작되는데, 수지상세포 및 B 세포가 조직 파괴에 의해 떨어져나온 항원들 및 분비되는 염증성 cytokine 에 노출됨으로써 항원제공기능이 활성화된다.
- 항원제공에 의해 동종세포 (allogeneic cell)을 인지하는 T 세포가 활성화되어 증식한후 target 조직으로 이동한다.
- 이동한 T 세포들이 조직 파괴를 유도하고, 파괴된 조직에 의해 다시 T 세포가 활성화되는 사이클이 반복된다.
- GVHD 발병을 완화하기위한 조치로 T 세포의 활성화에 필요한 costimulatory 분자들인 CD28/B7 신호 전달을 억제하기 위하여 CTLA-Ig를 이용하거나, ICOS 활성을 낮추고 PD-1 활성을 유도하기위한 노력들이 시도되고 있다. 이들의 결과, GVHD에서 T 세포활성은 각각의 costimulatory 분자들 역할의 합에 의해 결정되므로 각 분자 조절의 다양한 조합이 필요하다는 결론을 얻었다.
- GVHD를 조절하기위한 시도로 CD4+CD25+ Treg 세포를 이용하기도 한다. CD4+CD25+Treg 세포를 BMT 시에 동시에 넣어줄 경우 상당수의 경우에서 GVHD 발병이 경감되는 효과를 발견하였다.
- 그러나 아직 CD4+CD25+ T 세포의 순수 분리 및 증폭을 위한 전략이 세워지지 않았다.

3) GVHD 와 세포의 이동 및 CD99 관련성

- 소화관, 간, 피부등의 GVHD target 장기의 조직 특이적 파괴는 동종세포 (allogeneic cell)를 인지하는 T 세포의 이동력 (migrating capacity) 와 관련 있을 것으로 간주된다 (Ferrara et al. N ㅁ히 J Med 324: 667, 1991; Hill et al. Blood 95: 2754, 2000).
- 동종 세포 이식 후 일어나는 T 세포의 조직 침투를 Bioluminescence immugaing (BLI) 기법을 이용하여 확인하면, 공여자 유래의 CD4 T 세포가 림프절 및 비장, payer's patch 등의 2차 면역 조직기관에서 활성화 및 증식이 있을 후 CD8 T 세포의 증식이 왕성히 일어나는 것이 관찰되었다. 이후 CD8 T 세포의 장, 간, 피부로의 이동이 일어난다.(Nguye et al. Blood 109: 2649, 2007)

- 공여자와 수여자사이에 주조직적합 항원 (MHC) 는 일치하나 부조직적합항원 (minor histocompatibility antigen) 이 불일치하는 GVHD 모델에서 시간차를 두고서 세포의 이동을 확인한 결과 CD4 T 세포의 활성화, CD8 T 세포의 활성화 후 순차적으로 granulocytes, monocytes, neutrophil 등의 선천면역 (innate immune) 세포의 증식이 일어나는 것이 확인되었다 (Choi et al. Blood 100:4259, 2002)
- 마지막, GVHD target 장기의 조직화학적 검사에 의하면, neutrophil 및 granulocytes의 조직 침윤이 심각하고 이들에 의한 조직 파괴가 일어난다는 것을 추측할 수 있다.
- 따라서, 면역세포의 2차 면역 조직에서의 활성화 후 선천 면역 세포의 염증 조직으로의 이동을 선택적으로 조절할 수 있다면, 이는 GVHD를 경감하면서 전체적인 면역 기능은 유지할 수 있는 방법이라 할 수 있겠다.
- 백혈구의 endothelial cell을 관통하는 세포 이동 (transendothelial migration) 은 염증반응에 있어서 매우 중요한 요소중하나이며, 이 현상의 분자적 조절에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. CD31 (PECAM) 은 단핵구 (monocytes) 및 neutrophil transmigration 의 주요한 중개자중의 하나이며 CD99 은 단핵구의 transmigration 에 있어서 2차 중개자로 알려졌다. (Petri et al. FEBS J 273: 4399, 2006)
- 인간 CD99 에 대한 연구는 주로 세포수준에서 항체를 이용한 세포 신호 전달을 통해서 이루어졌으며, 이런 연구결과 CD99 이 neutrophil 의 diapedesis 역할 을 가지고 있으며, 항체를 통해 기능이 저하되면, neutrophil 이 endothelial cell junction에서 멈추어있는 결과가 있다 (Oliva et al. J Immuno 178: 1136, 2007).
- 마우스 CD99에 대한 연구에서는 염증성 피부조직에 T 세포의 이동이 관련있다는 보고가 있다 (Bixel et al. Blood 104: 3205, 2004)
- 그러나 GVHD 조절 단백질 혹은 세포 이동 조절 단백질로서의 신약타겟 가능성에도 불구하고, CD99 의 단백질 자체의 세포신호 전달 및 분자적 수준에서의 생화학적 특성 및 마우스 CD99 단백질을 이용한 생체 수준의 연구들이 진행되지 않았다.
- 따라서, CD99 단백질의 생화학 분자적 특성 연구와, 마우스 개체 수준에서의 연구를 통하여, CD99 의 생체내 기능 평가 및 GVHD 조절로의 연구 진행이 필수적이라 할 수 있다.

나. 현기술상태의 취약성

- CD99 분자의 생체내 기능연구는 현재까지 이루어진 바 없고, 주로 실험관내 결과에 의존해왔다.
- GVHD 모델은 면역세포의 활성화 및 세포의 이동, 조직으로의 침윤 등을 동시에 관찰할 수 있는 시스템이다. 이 GVHD 모델에서 CD99 분자의 역할 분석을 통하여 면역세포의 활성화 및 transmigration을 조절할 수 있는 target 으로의 개발이 기대된다
- CD99 의 생화학적 분자적 성격이 규명되지 않았다.

- GVHD 조절은 주로 면역억제제 투여, 항생제 투여등 GVT를 유지하며 GVHD 만 조절할 수 있는 치료기술 개발이 시급하다.
- CD99 분자의 역할은 CD99 적중 마우스 (Knock out mouse)를 이용하여 확인할 수 있으며, 이 적중 마우스에서 GVHD를 유도함으로써, CD99의 GVHD 타겟으로의 적정성을 확인할 수 있다.

2. 연구 목표와 연구 범위

<마우스 개체를 이용한 GVHD 모델에서 CD99의 발현 분석>

- Minor H antigen 불일치성 동종 이식 후 면역 반응에서 T 세포 활성화 및 선천 면역 세포 활성화에 따른 CD99 항원의 발현 확인
- GVHD 발병중 CD99 항원의 T 세포, 선천 면역 세포에서 발현 역동성 확인 및 T 세포 이동과 CD99 항원발현의 상관관계 확인

<CD99 단백질의 분자생물 생화학적 분석>

- CD99 분자의 생화학적 분자생물학적 성격 확인
- CD99/CD99L2 분자군의 상호 작용성 확인
- CD99 분자의 mutant 제작 및 기능적 영향 확인
- CD99 분자의 특성에 의한 세포간 상호작용 영향 확인

<CD99 KO 마우스에서 GVHD 확인>

- CD99 KO 마우스의 phenotyping
- CD99 KO 마우스에서의 면역 반응 확인
- CD99 KO 마우스를 공여자로 이용한 GVHD 모델 연구

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 기술개발 현황

1) 현재 연구개발하는 기술의 수준

기술발전주기(technology life cycle)-연구개발단계, 개념정립단계, 기업화 단계, 기술의 안정화 단계- 중에서 개념정립 단계에 해당됨.

2) 국내,외 기술개발 현황

가. CD99의 역할 규명

- CD99 분자의 생체 내 기능연구는 현재까지 이루어진 바 없고, 주로 시험관내 결과에 의존해왔다.
- CD99의 생화학적 분자적 성격이 규명되지 않았다.
- CD99가 세포 이동에 관계된다는 사실이 보고되어왔으나, 주로 항체를 통한 블로킹 연구에 한정되었다.
- CD99 항체로 이 단백을 블로킹했을 때 neutrophil과 monocytes의 transendothelial migration이 저해된다는 보고가 있으나 이 또한 생체 내 연구가 아니며 그 매커니즘이 밝혀지진 않은 상태이다. 따라서 neutrophil 이외의 면역세포에서의 CD99의 역할과 그 매커니즘을 밝혀야할 필요가 있다.

나. GVHD의 조절

- 조혈모세포이식은 백혈병, 림프종, 다발성골수종과 같은 여러 악성 혈액질환과 재생불량성 빈혈, 선천성면역결핍등의 비악성 혈액질환의 치료를 위하여 시행되고 있으며, 최근에는 일부 고형암 환자에서도 조혈모세포 이식술의 치료효과가 밝혀지고 있다. 특히 동종 조혈모세포이식은 자가이식과는 달리 이식편대종양효과 (Graft-versus-Tumor effect: GVT effect) 가 있어 악성질환의 재발을 효과적으로 예방할 수 있다.
- 조혈모세포이식에 사용되는 조혈모세포가 타인으로부터 유래되는 동종조혈모세포이식 (allogeneic stem cell transplnatation)은 HLA 유전자 일치 공여자를 가족내에서 찾을 확률이 1/4 에 불과하기에 대부분의 환자들은 골수은행을 통하여 타인 공여자를 찾아서 행해진다.
- 비혈연이식에서는 환자와 공여자 사이의 면역학적 장벽이 높아지며, 이식 후 생착 부전이나 이식편대 숙주질환의 발생이 형제간 이식보다 더 많아지게 된다.
- 그러나 백혈병 세포를 제거하는 이식편대 종양효과는 비혈연 이식이 상대적으로 더 우수하여 백혈병의 재발이 형제간 이식에 비하여 적은 장점이 있다. 따라서 조혈모 세포이식의 성공률을 높이기 위해서는 이식 후 합병증의 발생을 줄이는 것이 필수적이다.

- 합병증인 이식편대숙주질환의 예방을 위한 사이클로스포린 (cyclosporine) 이나 FK506 과 같은 면역억제제의 사용, 이식후 바이러스 감염 예방을 위한 항바이러스제와 면역글로블린의 투여, 장내 세균박멸을 통하여 체재 감염을 줄이기 위한 항생제의 투여 등이 이식 후 합병증의 예방 방법들이나, 그러나 이와 같은 방법들은 제공받은 조혈모세포로부터 면역계가 재건되기까지의 기간 동안 환자의 면역결핍을 유도하며, GVT 효과를 상쇄시킨다.
- 따라서, GVT 효과는 유지하면서, GVHD 효과만 선택적으로 조절할 수 있는 방안이 필요하다. 이에 대해 세포 이동의 조절이 효과적인 방안이 될 수 있음이 제시되었고 GVHD 의 조절과 target organ으로의 세포 이동에 관한 기술 개발을 필요로 한다.

2. 연구결과의 현 위치

- 국내,외에서 CD99 관련 연구에 있어서, 본 연구실을 포함하여, 프랑스의 니스-포피아 대학의 Dr. Bernard 그룹, 독일 막스프랑크 연구소의 Dr. Vestweber 그룹, 미국 코넬대학의 Dr. Muller 그룹 등이 선도 그룹이나, 본 연구에서 얻은 결과들로 인하여 본 연구 그룹은 선도 그룹에서도 더 앞으로 나가는 계기를 마련하였다.
- 본 연구를 통하여 CD99 상호작용을 하는 CD99L2의 역할에 대하여, 그 동안 알려져 있지 않았다 기능을 밝혔으며, CD99 단백질을 GVHD 연관지어 연구하고 있는 그룹이 없으며, CD99 적중 마우스 를 보유하여 그 기능 연구를 하고 있는 유일한 연구 기관으로 선도적 위치를 견지하고 있다.
- CD99 적중 마우스 (Knock out mouse)를 이용하여 CD99 분자의 역할 분석을 하였고 이를 통하여 면역세포의 활성화 및 transmigration을 조절할 수 있는 target으로의 개발 가능성을 높였다.
- GVHD 모델은 면역세포의 활성화 및 세포의 이동, 조직으로의 침윤 등을 동시에 관찰할 수 있는 시스템이다. CD99 적중 마우스를 이용하여 GVHD를 유도함으로써 CD99의 GVHD 타겟으로의 적정성을 확인할 수 있는 모델을 정립하였다

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

1. 연구 범위 및 연구수행 방법

| 구분 | 연구 범위 | 연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법) | 구체적인 내용 |
|-------|---|---|--|
| 1차 년도 | 세포 이식 후 면역 반응에서 T 세포 활성에 및 CD99 단백질 발현 분석 | B6 숙주에 minor H Ag 불일치성 세포인 BALB.B strain 유래 비장세포의 복강내 면역 후 면역반응 유무 확인 | 암컷 B6 마우스에 BALB.B 마우스로부터 얻은 비장세포 2 x 10 ⁷ cells/200 ul를 복강내 주사 후 7일 혹은 10일째 마우스의 말초 혈액에서 항원 특이적 CD8 T 세포 반응이 있는지 H60-tetramer /항-CD8 항체로 염색 FACS analysis |
| | | 동종 이식반응 (allo-response)을 보이는 B6 숙주에서 시간 경과에 따라 비장세포를 분리 CD4, CD8 T 세포, granulocyte, macrophage 세포의 분획 확인 및 CD99 발현 확인 | BALB.B 비장세포 면역 후 B6 마우스로부터 시간 별로 마우스를 희생하여 비장세포를 분리, 항-CD4/항-CD8/항-CD99, 혹은 항-Gr-1/항-MAC-1/항-CD99 항체의 조합으로 세포 염색 후 FACS 분석. 각 항-CD44/항-CD4/항-CD8 조합의 염색은 면역 반응 추이를 확인하기 위하여 포함 |
| | | 활성화된 CD4, CD8, granulocyte, macrophage를 증폭하기 위한 mixed lymphocyte culture (MLC) 및 MLC 세포들의 각 세포들의 활성화 후 CD99 발현 확인 | 면역반응 중인 B6 숙주로부터 비장세포를 분리하여 (2.5 x 10 ⁶ /ml), 방사선처리를 받은 BALB.B 비장세포 (3.5 x 10 ⁶ /ml) 와 섞어 시험관내에서 7일 이상 배양함 (mixed lymphocyte culture: MLC). 이는, 숙주 유래의 면역 세포들이 재 활성화되어 2차 면역 반응과 같은 효과를 보이면서, 활성화된 세포들을 증폭해서 관찰할 수 있는 장점이 있음. MLC 배양 7일째 세포들을 항-CD4/항-CD8/항-CD99, 혹은 항-Gr-1/ |

| | | |
|--|--|---|
| | | 항-Mac-1/항-CD99 항체의 조합으로 세포 염색 후 FACS 분석. 각 항-CD44/항-CD4/항-CD8 조합의 염색은 면역 반응 추이를 확인하기 위하여 포함 |
| | 면역 반응 중 혹은 naive 숙주의 면역세포들의 세포내 함유하는 CD99 측정을 위한 세포질내 염색 및 면역 형광 (intracytoplasmic staining) | 면역반응 중 혹은 naive B6 마우스의 비장세포를 채취하여, 항-CD8, 항-CD4, 항-Gr-1, 항-Mac-1 항체들로 세포표면 항원에 대한 염색을 수행한 후 세포고정 및 saponin 처리로 세포막에 구멍을 낸 후 항-CD99 항체로 염색하여 유세포 측정 |
| GVHD 발병 중 CD99 항원의 T 세포내 발현 역동성 확인 및 T 세포, neutrophil 이 동과 CD99 항원 발현의 상관관계 확인 | BALB.B strain 의 숙주에서 GVHD 유도 | 수컷 BALB.B strain 숙주를 900 cGy 방사선 처리 후 4시간째에 암컷 B6 공여자 유래의 조혈모 세포 (bone marrow stem cell: 5×10^6) 와 비장세포 (2×10^7)을 섞어 혈관내 (intravenous) 주사함으로써 minor H Ag 불일치성 조혈모 세포 이식 실시 |
| | BALB.B strain 의 숙주에서 GVHD 발병 확인 | 수컷 BALB.B 숙주에 암컷 B6 공여자 조혈모 세포 이식 (allogeneic) 그룹과, 이에 대한 대비군으로 암컷 B6 숙주에 암컷 B6 공여자 조혈모 세포 이식 (syngeneic) 그룹에서 생존율 확인 및 기간별 body weight 체크. 그룹당 10 마리 이상 포함시킴 |
| | BALB. B strain 의 숙주에서 GVHD 발병중 비장 및 간에서 T 세포군, granulocyte 세포군들의 분획 확인 | B6 조혈모 세포 이식 후 BALB.B 숙주로부터 해당 시간별 희생 후, 비장과 타겟장기인 간을 적출. 비장과 간에 침윤한 림프구 분리. 비장세포와 간에 침윤한 면역 세포들에서 CD4, CD8 T 세포 및 granulocyte 의 분획 및 CD99 발현 확인을 위한 FACS analysis. |

| | | | |
|--|------------------------|--|---|
| | | <p>CD99-VC 단백질 혹은 CD99-VN 단백질 발현을 위한 벡터 클로닝</p> | <p>CD99 단백질과 GPF 단백질의 C-terminal half 에 해당하는 VC 단백질의 융합 단백을 만들기 위하여, CD99 leader peptide 와 extracellular domain 코딩 서열 사이에 PCR을 이용하여 Myc tag을 연결하고, CD99 두전자의 C 말단과 VC와 이을 수 있도록 stop codon을 제거한 PCR product를 생산. 이 PCR product를 VC 발현 벡터에 클로닝. 같은 방법으로 myc tag-CD99를 VN 벡터에 클로닝한 후, mammalian expression vector 로 재 클로닝. N-terminal half VN 단백질과도 같은 방법으로 CD99-VN 벡터 클로닝.</p> |
| | <p>CD99 단백질의 특성 규명</p> | <p>CD99-VC 단백질 및 CD99-VN 단백질의 발현 확인</p> | <p>CD99-VC 융합 단백질과 CD99-VN 융합 단백질의 발현 확인을 위하여 293 T 세포에 transfection 후 cell lysate를 항-Myc 항체로 면역 블로팅하여 확인</p> |
| | | <p>CD99 단백질의 homo-dimer 형성 확인</p> | <p>CD99-VC 벡터와 CD99-VN 벡터를 COS-7 세포에 cotransfection 한 후 형광 현미경으로 관찰, 녹색 형광의 발광을 측정. cotransfection 한 COS-7 세포를 항-CD99 항체로 세포 표면의 CD99 항원 측정을 위해 염색 및 FACS analysis</p> |
| | | <p>CD99-mutant VC 단백질 발현 및 CD99 단백질의 CD99-VN 과의 homo-dimer 형성여부 확인</p> | <p>CD99 의 extracellular, transmembrane, cytosolic domain을 행당하는 인간 CD4 domain 으로 치환한 mutant-VC 벡터를 클로닝한 후 각각의 VC 벡터와 CD99-VN 벡터를 COS-7 세포에 cotransfection 한 후 green fluorescence 측정을 위한 형광</p> |

| | | | |
|-------|-------------------------------|--|---|
| | | | 현미경 관찰과 FACS analysis |
| | CD99 적중 마우스 생산 | CD99 적중 마우스 생산을 위한 교배 시작 및 progeny 생산 | CD99 유전자가 적중된 ES cell 을 확보한 후 blastocyst injection 과 chimera 생산. chimera를 B6 마우스와 교배하여 F1 마우스 얻음. F1 중 적중 allele을 갖는 마우스를 스크리닝 후 선택하여 F2 generation 생산. |
| 2차 년도 | CD99 단백질과 CD99L2 단백질의 상호작용 확인 | CD99L2 _S -VN (VC) 단백질과 CD99L2 _L -VN (VC) 단백질 발현을 위한 벡터 클로닝 | CD99L2 _S 와 CD99L2 _L 단백질을 Venous 단백질의 N-terminal half 에 해당하는 VN 단백질 혹은 C-terminal half에 해당하는 VC 와의 hybrid 단백질을 만들기 위하여, VN vector 에 클로닝하는 유전자는 myc tag을 VC vector 에 클로닝하는 유전자는 Flag tag을 연결한 후 stop codon을 제거한 PCR product를 생산한 후 pGME-T vector 에 넣어 sequenc를 확인하였음. 이후 VN 혹은 VC 벡터에 클로닝한 후 mammalian expression vector 에 삽차 클로닝하였음. |
| | | CD99L2 _S -VN (VC) 단백질과 CD99L2 _L -VN (VC) 단백질 발현 확인 | CD99L2 _S 와 CD99L2 _L 유전자의 VN vector에 클로닝 시 myc tag을 사용하였으며, VC vector 에 클로닝시 flag tag을 사용하였으며, 293 T 세포에 transfection 후 cell lysate를 항-Myc 항체 혹은 항-Flag 항체로 면역블로팅하여 확인 |
| | | CD99-CD99L2 단백질군의 dimer 형성 확인을 위한 BiFC analysis | CD99-VN 벡터와 CD99L2 _S -VC 혹은 CD99L2 _L -VC을 COS-7 세포에 cotransfection 한 후 형광의 발광을 confocal microscope 를 측정하였음. 또한 co-transfection 한 세포에서의 형광 발광 정도를 FACS analysis를 통하여 확인 |
| | | CD99의 homo-dimer 혹은 CD99L2 단백질군의 hetero-dimer 형성에 대한 competitive Two-BiFC | CD99의 homo-dimer 와 CD99L2 단백질군의 hetero-dimer 가 혼재할 수 있는지 확인하기 위하여, CD99 유전 |

| | | | |
|---|---|----------|--|
| | | analysis | <p>자를 VN 혹은 CC vector 에 클로닝하고, CD99L2 단백질의 유전자들을 CrN vector 에 클로닝하여 VN-CC 의 경우 YFP 형광을 VN-CrN 의 경우 CFP 형광을 발광하도록 하였음</p> <p>CD99-VN, CD99-CC, CD99L2_s-CrN 또는 CD99-VN, CD99-CC, CD99L2_L-CrN 의 세 종류 vector 를 co-transfection 한 후 COS7 세포에서 발광되는 CFP (VN-CrN) 형광과 YFP (VN-CC) 형광을 측정하였음</p> |
| CD99L2 단백질의 dimer 형성 유무 확인 | CD99L2 _s -CD99L2 _s homodimer 형성 확인을 위한 BiFC analysis | | CD99L2 _s -VN과 CD99L2 _s -VC을 COS-7 cell 에 cotransfection 한 후 형광 발광을 confocal microscopy 와 FACs analysis를 통하여 확인 |
| | CD99L2 _L -CD99L2 _L 의 homodimer 형성 확인을 위한 BiFC analysis | | CD99L2 _L -VN과 CD99L2 _L -VC을 COS-7 cell 에 cotransfection 한 후 형광 발광을 confocal microscopy 와 FACs analysis를 통하여 확인 |
| | CD99L2 _s -CD99L2 _L 의 hetero-dimer 형성 확인을 위한 BiFC analysis | | CD99L2 _L -VN과 CD99L2 _L -VC을 COS-7 cell 에 cotransfection 한 후 형광 발광을 confocal microscopy 와 FACs analysis를 통하여 확인 |
| CD99 단백질의 glycosylation mutant 발현을 위한 mutagenesis | | | CD99 단백질의 extracellular domain 45번과 50 번 amino acid의 Thr을 Ala 로 치환시킨 CD99 T45A, CD99T50A, CD99 T45A50A 의 세 종류의 mutant 를 PCR을 이용하여 제작, 각 mutant를 VN 벡터와 VC 벡터에 클로닝하였음 |
| | CD99 glycosylation mutant 들의 homodimer 형성 유무를 확인하기 위한 BiFC analysis | | CD99 T45A - CD99 T45A, CD99 T50A - CD99 T50A, CD99T45A50A-CD99T45A50A 의 homodimer 형성 확인을 위한 VN 혹은 VC 벡터를 cotransfection 한 후 형광 발광을 FACs analysis를 통하여 확인 |
| 영향 | CD99 glycosylation mutant | | 각 CD99 glycosylation mutant |

| | | | |
|-------|-------------------------------|---|---|
| | | 와 CD99 혹은 CD99L2 단백질과의 dimer 형성 유무를 확인하기 위한 BiFC analysis | 들과 CD99, CD99L2s, CD99L2L의 상호작용 확인을 위한 VN, VC 벡터 cotransfection 후 형광 발광을 FACS analysis 로 확인 |
| | Dimer 의 세포내 위치 확인 | Dimer 의 세포내 위치 확인 | Golgi (BODIPY dye), membrane marker (Dil tracer)를 이용하여, BiFC 형광 발광의 위치를 confocal microscopy 로 확인 |
| | CD99 적중 마우스의 생산 및 phenotyping | CD99 적중 (homozygote) 마우스의 생산 및 phenotyping | CD99 KO heterozygote 끼리의 교배를 통하여, CD99 KO homozygote를 얻었으며, 말초혈액 림프구의 FACS analysis 로 CD3, B세포, 단핵구등의 분획 확인 |
| | | CD99 적중 마우스에 면역반응 유도 | CD99 KO 마우스에 H60 congenic 비장세포를 면역한 후 day 10일째 말초혈액으로부터 림프구를 분리하여 H60 특이적 CD8 T 세포 반응이 유도되었는지 FACS analysis 로 확인 |
| 3차 년도 | CD99 단백질과 CD99L2 단백질의 상호작용 확인 | CD99-VN 단백질과 CD99L2-VC 단백질의 동시 발현을 위한 viral vector 클로닝 | CD99 단백질과 CD99L2 단백질이 dimer를 형성할 때 BiFC 발현이 되도록 construct를 클로닝하고 이것으로 형질도입된 세포주를 확립할 수 있도록 viral vector에 클로닝함. |
| | | CD99 단백질과 CD99L2를 동시에 또는 따로 발현하는 세포주의 확립 | 마우스 T 세포 계열의 EL4 세포와 사람 epithelial cell 계열의 HEK 293 세포에서 CD99 또는 CD99L2가 발현하도록 transfection 후 neomycin으로 선택적 배양함. |
| | | CD99 단백질과 CD99L2 단백질의 발현 세포 간 adhesion assay | CD99 또는 CD99L2 단백을 내는 HEK 293 세포를 배양하고 여기에 CD99 또는 CD99L2 단백을 발현하는 EL4 세포주를 함께 배양 후 두 세포간의 부착 정도를 trypan-blue counting이나 FACS analysis를 통해 확인함. |
| | CD99 단백질과 | CD99-CD99 homodimer와 CD99-CD99L2 heterodimer | homodimer를 형성할 때와 heterodimer를 형성할 때 서로 다른 형광을 띠도록 BiFC |

| | | | |
|--|--|--|---|
| | | 형성의 competition assay | molecule과 fusion construct 제작함. COS7 세포에 cotransfection 후 confocal을 이용하여 intensity 측정 후 competition 여부를 측정함. |
| CD99L2 단백질의 homo-, heterodimer 형성의 kinetics 확인 | | CD99 단백질과 CD99L2 단백질들의 trimer 형성의 확인 | CD99 단백질의 움직임과 BiFC로 관찰되는 CD99-CD99L2 heterodimer의 움직임을 동시에 관찰하기 위해 CD99-mkate construct를 클로닝함. HEK 293 세포에 transfection 한 후 confocal을 이용하여 BiFC와 mKate의 co-localize를 관찰함. |
| | | CD99 단백질과 CD99L2 단백질들의 dimer 형성시 위치 차이가 확인 | 형광 단백질과 fusion된 CD99와 CD99L2 construct를 HEK 293 세포에 transfection 한 후 17시간, 48시간 후 confocal을 이용하여 형광의 위치 차이를 확인함. |
| | | CD99 적중(homozygote) 마우스의 phenotyping | CD99 적중마우스의 말초혈액, 비장, 흉선 세포의 림프구를 FACS analysis로 T 세포, B 세포, 단핵구 등의 분획 확인함. |
| CD99 적중 마우스의 phenotyping | | CD99 적중 마우스에 면역반응 유도 | CD99 적중 마우스에 H60 congenic 비장 세포를 1차 면역한 후 42일 후 2차 면역함. 면역 후 말초혈액으로부터 림프구를 분리하여 H60 특이적 CD8 T 세포 반응이 유도되었는지 FACS analysis로 확인함. |
| | | CD99 적중 마우스를 donor로 한 GVHD유도 | CD99 적중 마우스의 골수와 비장세포를 분리하여 다른 종의 마우스에 이식하고 체중변화와 생존율을 확인함. |

2. 연구 수행 내용 및 결과

1) 1차년도 연구 결과

| 목 표 | 내 용 |
|--|--|
| Minor H antigen 불일치성 동종 이식 후 면역 반응에서 T 세포 활성화 및 선천 면역 세포 활성화에 따른 CD99 항원의 발현 확인 | 동종이식 면역 반응을 보이는 생체에서 T 세포 및 선천 면역 세포인 granulocyte 및 macrophage 에서 CD99의 발현 확인함. MLC로 모든 세포군을 시험관내 재활성화시키면, 활성화된 모든 세포군에서 CD99 단백질의 세포 표면으로의 발현을 확인하였다. CD99 발현이 낮은 naive 세포군에서도 활성화된 세포군과 마찬가지로, 세포질내에는 CD99 단백질이 내재되고 있음 확인함. |
| GVHD 발병중 CD99 항원의 T 세포, 선천 면역 세포 neutrophil 에서 발현 역동성 확인 및 T 세포 이동과 CD99 항원발현의 상관관계 확인 | GVHD 발병중 CD4, CD8 T 세포 및 granulocyte의 비장과 타겟 장기인 간에서의 침윤 역동성을 확인하여, 활성화된 CD99 양성 세포의 타겟 장기 내 증가 확인. GVHD 가 발병되어 염증 반응으로 진행되는 시간 경과에 따라 granulocyte 침윤이 후반기에 진행되고 CD99를 발현하는 granulocyte의 백분위율의 증가 확인함. 효과자 중의 하나인 CD8 T 세포에서도 점차 CD99 발현세포의 비중이 높아감을 확인하였다. 즉, CD99 단백을 표현하는 세포의 타겟 장기에서의 축적은 확인함. |
| CD99 단백질의 특성 규명 | CD99 단백질의 homo-dimer 가 형성됨을 확인하였다. CD99 의 homo-dimer 형성은 extracellular domain을 매개로함을 확인하였다. CD99의 transmembrane 이나 cytoplamic domain 이 치환된 경우에는 CD99 단백질과 homo-dimer 형성을 통하여 형광 발광을 하나, 형광 발광이 세포막에서도 관찰됨을 확인함. |
| CD99 적중 마우스 (Knock out mouse)의 heterozygote 교배를 통해 CD99 KO 마우스 생산 | F1 끼리의 intercross를 통하여 F2 generation 확보. |

<Result 1.> 이식 후 면역반응을 보이는 숙주의 생체내에서, CD99 단백을 발현하는 면역 세포들의 역동성 확인

- C57BL/6 (B6) 마우스 숙주에 구조적 적합항원 일차-부구조적합항원 불일치성

(MHC-matched but minor histocompatibility antigen-mismatched) 세포 (BALB/B strain 유래 splenocytes) 면역 후, B6 숙주에서 일어나는 allo-response 반응을 확인하기 위하여, 이식 후 시간 경과별로 혈액을 채취하여 CD8 T 세포에서 H60 tetramer 에 binding 하는 세포를 유세포 측정으로 확인하였다. 또한 면역 후 특정 시간별로 비장세포를 채취하여, CD4 T 세포, CD8 T 세포, 선천 면역세포들의 분포와 이들에서의 CD99 발현을 유세포 측정법으로 확인하였다.

- 결과, 면역전 naive 마우스에서 확인된 CD4, CD8 T 세포에서의 CD99 발현과 비교하여 면역 후 day 14에서 CD99를 발현하는 CD4, CD8 T 세포 늘어난 것을 확인할 수 있으며, T 세포 면역 반응이 휴지기에 들어선 day 35 에는 다시 CD99를 발현하는 CD4, CD8 T 세포가 줄어든 것을 확인하였다 (그림 1).
 - Granulocytes, macrophage 등의 선천 면역세포들의 경우, 반응의 후기에 증가하며, CD99 발현을 보이는 세포의 분획이 증가함을 확인하였다 (그림 2).
 - 이 결과들은, 면역 반응 초, 중반에 CD4, CD8 T 세포들의 활성이 일어나고, 이후 선천면역세포들의 활성이 증가하며, 활성화된 세포들은 CD99을 세포 표면에 발현한다는 것을 시사한다. 그러나 전체 생체 내 면역 반응에 가담하는 면역 세포들의 분획이 크지 않아, 각 면역세포들의 활성화에 따른 CD99의 발현 변화가 크게 부각되지 못했다고 판단하였다.
- * * 이 결과의 의미 : CD99 발현이 세포 활성에 따라 역동적이다.

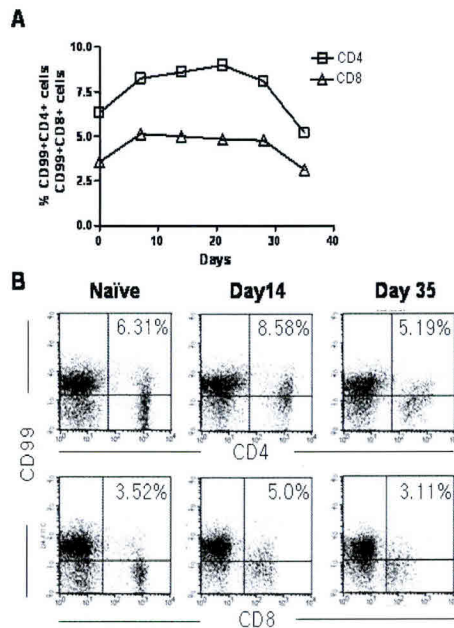


그림 1. B6 숙주에 BALB.B 세포 이식 후 면역반응시 CD4 T 세포, CD8 T 세포에서 CD99 단백질 발현 조사.

(A) B6 마우스에 2×10^7 BALB.B 세포 면역 후, 비장세포내 CD99 발현하는 CD4 T 세포 혹은 CD8 T 세포의 분획 역동성 그래프

(B) 면역전 naive B6 마우스와, 면역후 14일, 35일째 숙주 마우스에서 비장세포의 항-CD4 항체, 항-CD8 항체, 항-CD99 항체로 염색 후 유세포 측정된 결과.

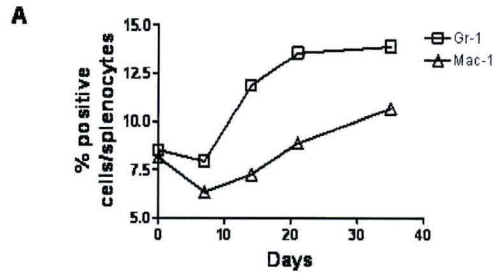
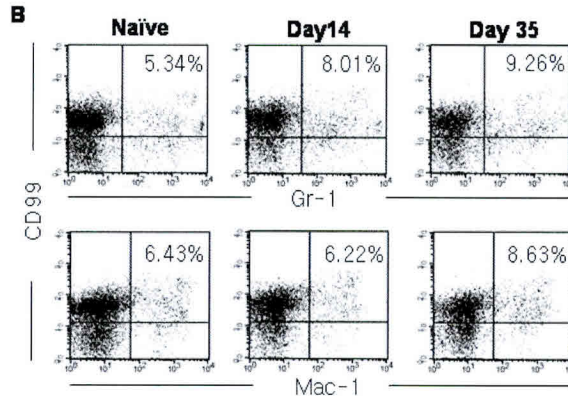


그림 2. B6 숙주에 BALB.B 세포 이식 후 Granulocyte와 macrophage 에서 CD99 단백질 발현조사.

(A) B6 숙주에 BALB.B 세포 면역 후 시간 경과에 따른 granulocyte 와 macrophage 의 비장세포 내 분획을 나타내는 그래프



(B) 면역 후 14일, 35일에 숙주로부터 채취한 비장세포를 항-Gr-1 항체 (granulocyte), 항-Mac 1 항체 (macrophage), 항-CD99 항체로 세포 표면 염색 후 유세포 측정 결과

<Result 2> 생체 면역반응중인 면역세포들의 시험관내 재자극시, 2차 활성화된 세포들에서 CD99 단백질의 발현 확인

- 생체내 면역 반응에 가담하는 면역세포들이 전체 면역 세포에서 차지하는 비율이 크지 않은 이유로 활성화된 세포들을 극대화하여 관찰하고 CD99의 발현 여부를 확인하고자, 세포 이식 후 T 세포 및 granulocyte 수도 어느 정도 증가한 day 21째 비장세포를 채취하여, mixed lymphocyte culture (MLC)를 수행하였다.
 - 이 배양기간 동안에 숙주 유래 비장세포에서 CD4, CD8 T 세포들과 granulocyte, macrophage 등의 면역세포들이 BALB.B 세포 재자극에 의해 2차 활성화된 상태로 되었음을 CD44 등의 활성 마커 단백질의 upregulation으로 확인하였다.
 - MLC 후 각 세포군에서 CD99의 발현을 유세포측정으로 확인한 결과, 활성화된 후 모든 세포군에서 CD99 분자가 세포표면에 발현됨을 확인하였다 (그림 3)
 - 즉, 활성화된 각 면역 세포들이 CD99 단백을 세포 표면에 발현하는 생체내 현상을 시험관내에서 확대 재현한 것이다 .
- ** 결과의 의미 :** 활성화된 T 세포 뿐 아니라, 활성화된 granulocyte, macrophage 등도 CD99 단백을 세포 표면에 발현한다

<Result 3> CD99 단백질의 세포표면으로의 발현 조절 가능성

- 생체 내 면역 반응에 가담하는 각 면역 세포군에서 세포 표면으로의 CD99 발현과 CD99 단백질의 전체 양에 대한 상대적 비율을 확인하기 위하여, CD99 단백질에 대한 intracytoplasmic staining을 실시하였다

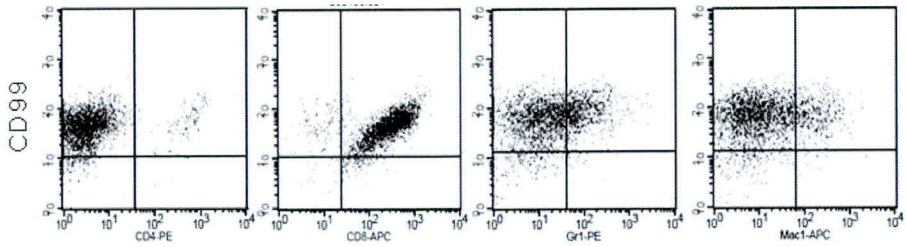


그림 3. B6 숙주에 BALB.B 세포 이식후 21일째 얻은 비장세포의 mixed lymphocyte culture (MLC) 후 7일째 얻은 각 면역세포군에서 CD99의 발현조사.

- 결과, CD99 단백질의 전체 양은 세포 표면의 발현 차이와 관계없이 항상 일정한 양으로 존재함을 확인하였다. 즉, 세포 표면에서 측정되는 CD99의 발현이 가장 적은 상태인 naive CD4, CD8 T 세포 granulocyte, macrophage 에서도 CD99를 내재하고 있으며, CD99의 세포 표면으로의 발현이 높은 활성화된 day 14 에서도 모든 세포가 CD99를 내포하고 있음을 확인하였다 (그림 4).

**** 이 결과의 의의 :** CD99 단백질의 세포 표면으로의 세포질내 이동이 세포 활성화에 의해 조절되고 있음을 알 수 있었다. 이는, 활성화된 세포들이 세포표면으로 CD99 단백질의 표현함으로써 endothelial cell 이 표현하는 CD99 단백질과의 homophilic interaction이 가능해지고, 이 CD99-CD99 매개의 림프구와 내피세포와의 상호작용은 세포가 내피세포막 (endothelial lining)을 교차통과 (transvasation) 하여 염증 장기로 이동할 수 있을 거라는 일종의 세포이동 시나리오를 제공하는 결과이다.

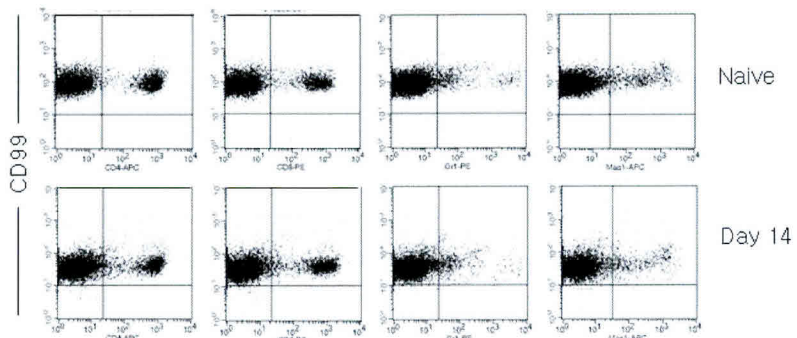


그림4. CD99 단백질의 세포내 총량을 확인하기 위한 Intracytoplasmic staining 결과. B6 숙주에 BALB.B 세포를 면역한 후 14일째 비장세포를 채취하여, naive 숙주에서 채취한 비장세포와 함께 각 세포군에서 CD99 단백질의 존재를 유세포 측정으로 확인.

**** 따라서, 세포 이동의 저해를 위한 타겟 분자로서 CD99 단백질의 중요성 및 CD99와 결합하는 단백질의 확인과 CD99 단백질의 생화학적 분자생물학적 특성 파악의 중요성을 제기하는 결과라 할 수 있다.**

<Result 4> GVHD 발병 중인 숙주의 생체내 면역 반응 시 CD99 단백질의 발현 확인

- GVHD 모델을 BALB.B 마우스를 숙주로 조혈모 세포와 성숙 T 세포의 공여자를 암컷 B6 마우스로 하여 얻는 minor H antigen-mismatched BMT 시스템으로 확립하였다. 임상에서는 HLA banking center를 통하여 점차적으로 MHC-일치성 비혈연 공여자에 의한 조혈모세포 이식의 case 가 늘고 있으며, 이 모델은 임상에서의 조혈모 세포 이식을 모방하면서, 강력한 GVHD를 유발하는 시스템을 재확인하였다. (그림 5).
- 조혈모 세포와 비장세포 이식 후 day7, day10, day20 일째 마우스를 희생하여, 제 2차 면역기관인 비장과 GVHD 타겟 장기인 간을 추출하고, 이에 침윤한 림프구들을 순수 분리한 후 각 세포 분획 및 CD99 발현 확인을 위한 유세포측정을 하였다.
- 결과, CD4 T 세포의 경우 비장세포내에서 분획이 일정한 반면, 효과자인 CD8

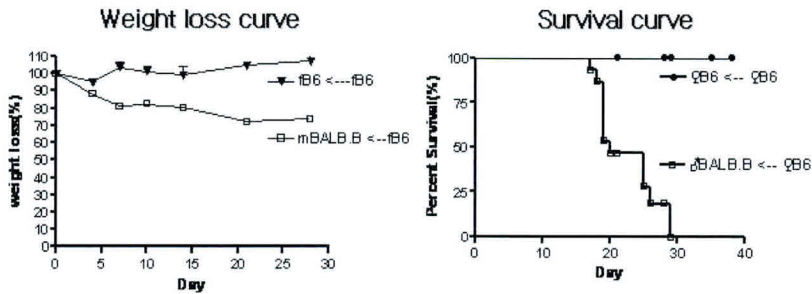


그림5. BALB.B 숙주에서 GVHD 발병. B6 BM 세포와 비장세포를 방사선 처리 후 숙주 BALB.B 에게 이식한 후, 숙주의 체중 변화와 생존율 결과, B6 숙주는 syngeneic 비교군.

T 세포의 경우 day 10에서 정점을 보이고, granulocyte 의 경우, 이후 점차적으로 증가하였다. 이는 시간 경과에 따라 염증성 반응이 진행되고 있음을 보여주는 것이다. 타겟 장기인 간에서 보면, day 10일부터 이미 granulocyte가 정점에 이르며, 간에 침윤한 세포의 대부분을 차지함을 알 수 있다 (그림 6)

- 특히, 시간 경과별로 각 세포군들에서 CD99 단백질의 발현하는 세포가 증가함을 확인할 수 있었다.
- GVHD 반응의 효과자 (effector) 세포인 CD8 T 세포에서 점차적으로 CD99 발현이 증가하는 세포의 백분율이 타겟 장기인 간과 비장에서 증가하였으며, 염증 반응에 관련된 granulocyte에서도 CD99 발현이 양성인 세포의 백분율이 반응 후반에 들어서 타겟 장기에서 급속히 증가함을 확인하였다.
- 이 결과는 세포이식 후 일어나는 allo-response 와 약간 다르게, GVHD 는 끊임 없이 항원을 만나는 조건이므로, T 세포의 활성이 지속되고 있음을 시사하고 있으며, 시간 경과에 따라 granulocyte에서 CD99 발현세포의 증가는 granulocyte의 활성이 계속해서 이루어지고 있음을 시사하는 결과이다.

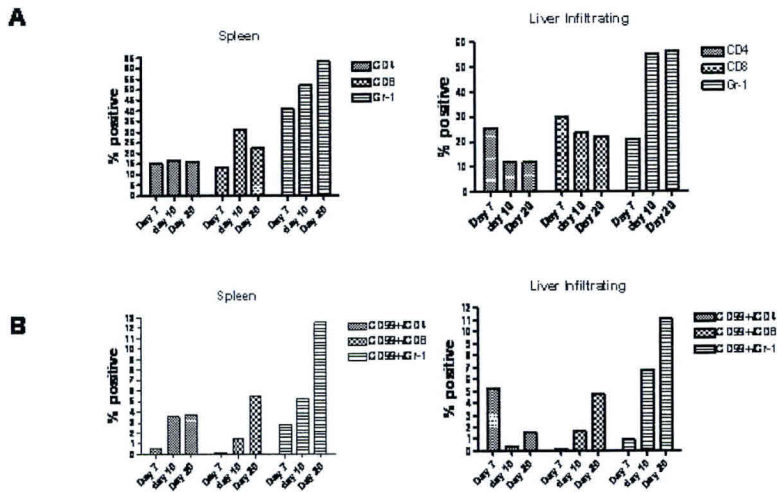


그림 6. GVHD 발병중인 BALB.B 숙주의 비장과 간에서 시간별 각 면역세포군의 분획과 CD99 발현 세포군들의 분획. (A) B6 조혈모 세포 이식 후 7일, 10일, 20일째 비장과 간을 채취한 후 면역 세포들을 분리하여, FACS analysis 후 각 면역세포군의 백분위를 그래프. (B) 시간별 CD99를 발현하는 면역세포군들의 백분위를 그래프.

- 그동안 비장이 제 2차 면역 기관인 동시에 타겟 장기로 작용한다는 보고를 뒷받침하는 결과라할 수 있다. 정확한 T 세포 및 선천 면역 세포인 granulocyte의 타겟 장기와 면역 기관과의 차별을 위해서는 림프절을 포함해야 할 것이라는 것을 시사하기도 한다.

**** 결과의 의의 :** GVHD 발병중 활성화되는 T 세포와 염증관련 선천 면역 세포인 granulocyte에서 시간 경과에 따라 CD99 발현이 늘며 CD99 양성 세포들의 타겟 장기에서의 축적이 일어난다.

<Result 5> CD99 단백질의 homo-dimer 형성

- CD99 단백질은 지난 수년 동안 homophilic binding 에 대한 가능성이 제시되어왔으나, 이에 대한 실험적 증거가 이루어지지 못했다.
- CD99 단백질의 세포 표면 발현과 관련 없이 CD99 단백질의 총량이 같다는 것은 세포질내 많은 양의 CD99 단백질이 저장되고 있음을 시사하였다. 이에 따라, CD99 단백질이 세포내에서 homophilic binding 하는 형태로 저장되었고 있다가, 세포 활성화에 따라 새로운 단백질의 합성보다는 기존의 CD99 단백질이 세포막으로 이동할 거라는 가설을 세웠다.
- CD99 단백질의 세포내 homotypic binding 여부를 확인하기 위하여 CD99-VN 벡터와 CD99-VC 벡터를 제작하여 COS-7 세포에 co-transfection을 한 후 유세포 측정과 형광현미경을 통하여 CD99 단백질끼리 interaction을 하여 VN-VC 가 근접하여 형광을 발광하는 정도를 측정하였다 (그림 7).

- 결과, CD99 단백질의 homo-dimer 가 형성됨을 확인하였다. 그러나, CD99 단백질의 결합에 의해 형성된 형광이 주로 perinuclear vesicular region에 한정되어 있으며, 세포 표면에서는 형광이 관찰되지 않았다
- ** 이 결과의 의의 : CD99-단백끼리의 homodimer 가 주로 세포질 내에서 형성되고 있으며, 이 homo-dimer 형태로는 세포막으로 이동되지 않을 것임을 시사한다.

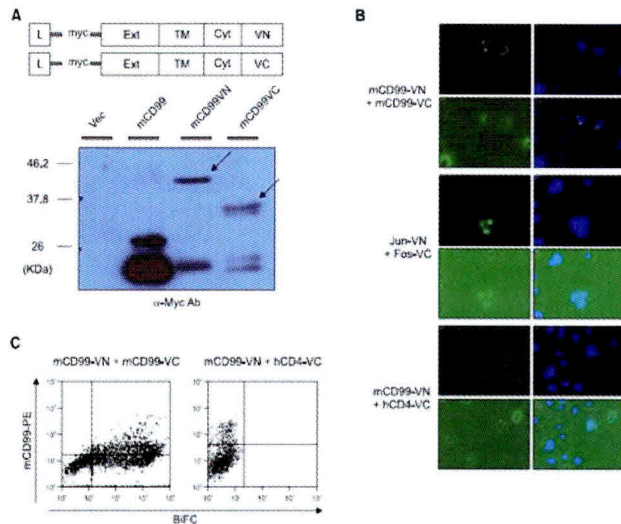


그림7. CD99 단백질의 homo-dimer 형성 확인. (A) CD99 단백질의 N-terminal 에 myc tag를 붙인 후 VN 혹은 VC 벡터에 클로닝 후 293 T 세포에 transfection 하여 단백질이 만들어짐을 면역 블로팅으로 확인. (B) CD99-VN 벡터와 CD99-VC 벡터를 COS-7 세포에 cotransfection 한 후 green fluorescence의 발광을 형광 현미경으로 확인 (C) CD99-VN 벡터와 CD99-VC 벡터를 COS-7 세포에 cotransfection 한 후 GFP 발광과 세포 표면으로의 CD99 단백질 발현을 유세포분석

<Result 6> CD99 단백질의 homo-dimer 형성은 세포막외부위 (extracellular domain)을 매개로 함

- CD99 단백질의 homo-dimer 형성이 어느 부위를 매개로 이루어지는지를 확인하기 위하여 세포막외부위 (extracellular domain), 막관통부위 (transmembrane domain), 혹은 세포질내부위 (cytoplasmic domain)를 각각 인간 CD4의 해당 domain 으로 치환한 후 VC 벡터에 제작, CD99-VN 벡터와 cotransfection 후 형광현미경을 통하여 형광 발광을 관찰하였다 (그림 8).
- 결과, CD99 extracellular domain 이 인간 CD4 의 extracellular domain 으로 치환될 경우 형광 발광이 이루어지지 않음이 관찰되어, CD99 의 homo-dimer 형성은 extracellular domain을 매개로함을 확인하였다.
- 또한, CD99의 transmembrane 이나 cytoplasmic domain 이 치환된 경우에는 CD99 단백질과 homo-dimer 형성을 통하여 형광 발광을 하나, 형광 발광이 세포막에서도 관찰되는 결과를 얻었다.
- 즉, extracellular domain을 통해서 CD99-dimer 가 형성되어도, transmembrane 이나 cytosolic domain 이 치환되는 경우에는 세포막으로 dimer 형태로 분포되는

것을 보여주는 결과이다.

**** 이 결과의 의미 :** CD99 단백질의 homo-dimer 형성은 extracellular domain을 통해서 이루어지나, 세포내에서의 retention 혹은 세포막으로의 이동 조절은 transmembrane domain과 cytosolic domain 을 통해서 이루어질 가능성을 제시한다. 즉, CD99 단백질의 homo-dimer 형성 후 세포내 머물다가, 세포 활성화 이후 다른 단백질과의 상호작용이 transmembrane-cytosolic domain을 통해 이루어지면서, 세포내로의 retention에서 벗어나 세포막으로 이동할 가능성을 제시하는 결과이다.

- 이결과는 CD99 단백질의 생화학적 분자생물학자 특성을 규명하면서, 동시에 이 단백질이 세포표면으로의 다른 단백질의 이동에도 역할을 담당할 수 있음을 시사하며, 세포내 물질 수송 조절에 대한 타겟으로도 이용될 가능성을 제시한다고 할 수

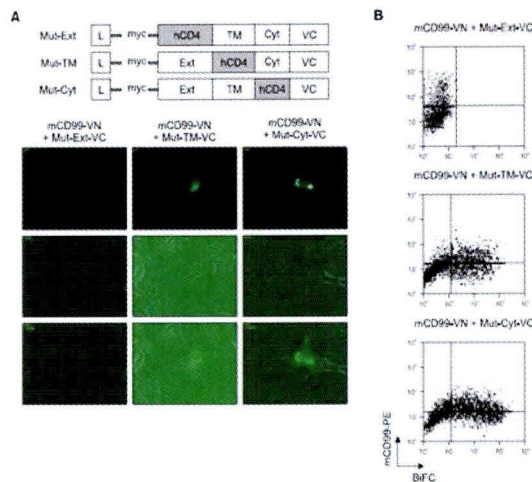


그림8. CD99 단백질의 세포막외부위 (extracellular domain) 매개의 homo-dimer 형성 확인. (A) CD99 단백질의 extracellular, transmembrane, cytoplasmic domain 을 각각 인간 CD4 의 해당 domain 으로 치환시킨 mutant 제작 후 VC 벡터에 클로닝, CD99-VN 벡터와 COS-7 세포에 cotransfection 후 형광 현미경 관찰. (B) CD99 mutant-VC 벡터들과 CD99-VN 벡터를 유 COS-7 세포에 cotransfection 한 후 GFP 발광과 세포 표면으로의 CD99 단백질 발현을 유 세포측정

있다.

<Result 7> CD99 적중 마우스 (Knock out mouse)의 ES cell 확립 후 CD99 KO 마우스 생산을 위한 heterozygote 확보

- CD99 targeted allele을 갖는 ES 세포 확립 후 blastocyst injection 후 Chimeric progeny를 얻은 후 B6 마우스와 교배하여 F1 generation을 얻었다.
- F1 끼리의 intercross를 통하여 F2 generation 까지 얻었으나, 아직 homozygote 의 KO 마우스가 확보되지 않았다 (그림 9).

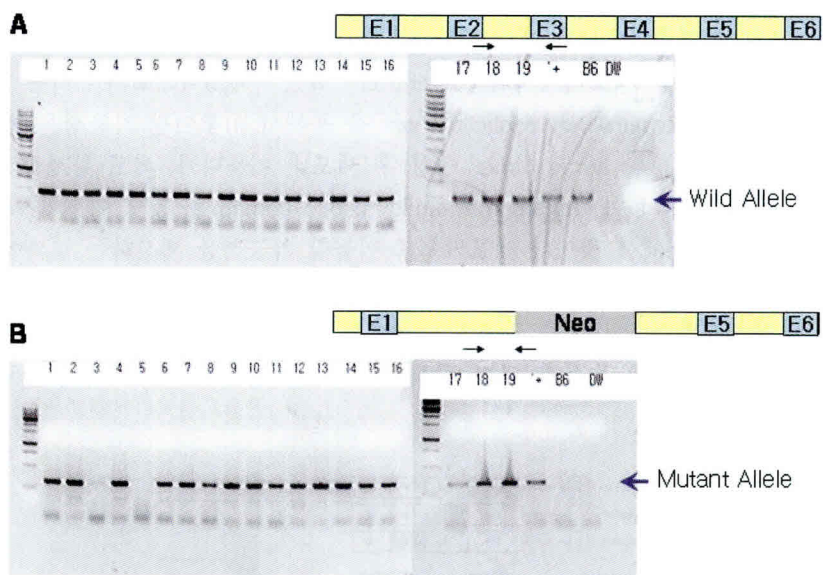


그림 9. CD99 KO 마우스 생산을 위한 교배에서 F2 generation screening 결과, (A) F2 generation 의 마우스들에서 endogenous exon 2와 exon 3에 해당하는 primer 로 PCR 한 결과, (B) KO allele 확인을 위한 PCR 결과

2) 2차년도 연구 결과

| 연구 내용 | 연구 결과 |
|---|---|
| CD99L2 _S -VN (VC) 단백질과 CD99L2 _L -VN (VC) 단백질 발현을 위한 벡터 클로닝 및 단백질 발현 확인 | D99-VN, CD99L2 _S -VN/VC, CD99L2 _L -VN/VC 단백질들의 발현 확인 |
| CD99-CD99L2 단백질군의 dimer 형성 확인을 위한 BiFC analysis | CD99 단백질은 CD99L2 단백질군 (CD99L2 _S & CD99L2 _L)과 hetero-dimer (CD99-CD99L2 _S & CD99-CD99L2 _L)를 형성함. |
| CD99의 homo-dimer 혹은 CD99L2 단백질군과의 hetero-dimer 형성에 대한 competitive Two-BiFC analysis | CD99 단백질의 homo-dimer와 CD99L2 단백질군과의 hetero-dimer가 세포내 혼재함을 확인. |
| CD99L2 _S -CD99L2 _S homodimer 및 CD99L2 _L -CD99L2 _L 의 homodimer 형성 확인을 위한 BiFC analysis | CD99L2 단백질군은 homo-dimer를 형성하지 못함. |
| CD99L2 _S -CD99L2 _L 의 hetero-dimer 형성 확인을 위한 BiFC analysis | CD99L2 단백질들끼리 hetero-dimer도 형성하지 못함. |
| CD99 단백질의 glycosylation mutant 발현을 위한 mutagenesis | CD99T45A, CD99T50A, CD99T45AT50A의 glycosylation mutant들을 제작하고 VN 혹은 VC의 hybrid 단백질의 발현을 확인. |
| CD99 glycosylation mutant들의 homodimer 형성 유무를 확인하기 위한 BiFC analysis | O-glycosylation mutant CD99 단백질들은 homo-dimer를 형성할 수 있음을 확인. (CD99T45A homo-dimer, CD99T50A homo-dimer, CD99T45AT50A homo-dimer) |
| CD99 glycosylation mutant와 CD99 혹은 CD99L2 단백질군과의 dimer 형성 유무를 확인하기 위한 BiFC analysis | CD99 단백질과 CD99 glycosylation mutant들은 dimer (CD99-CD99T45A, CD99-CD99T50A, CD99-CD99T45AT50A)를 형성할 수 있으며 Glycosylation mutant들은 CD99L2 단백질군과 dimer를 형성하지 않음을 확인함. |

<Result 1> CD99-VN, CD99L2_S-VN/VC, CD99L2_L-VN/VC 단백질들의 발현 확인

- BiFC analysis를 수행하기 위한 기반으로, CD99-VN, CD99L2_S-VN/VC와 CD99L2_L-VN/VC를 클로닝하였으며, 각각을 293 T 세포에 transfection 한 후 각 분자에 tag으로 사용한 myc-epitope과 flag epitope에 대한 항체를 이용하여 면역 블로팅을 수행한 결과, 각 단백질들이 정상적으로 만들어짐을 확인하였다 (그림1).

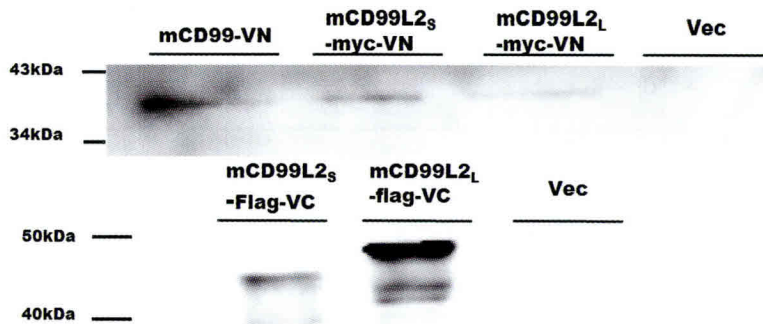


그림 1. CD99-VN, CD99L2_s-VN/VC, CD99L2_L-VN/VC 단백질들의 발현 확인을 위한 면역 블로팅.

<Result 2> CD99 단백질은 CD99L2 단백질군 (CD99L2_s & CD99L2_L) 과 dimer를 형성한다

- CD99 분자 자체가 extracellular domain을 통하여 homo-dimer를 형성함이 1차년도 연구 결과 밝혀진 후 (Choi et al, 2007), CD99 분자의 paralog 인 CD99L2 단백질군인 CD99L2_s (short form) 과 CD99L2_L 단백질이 CD99 분자와 dimer를 형성하는지 확인하고자, 각각 venous 형광단백의 N half 와 C half hybrid 단백을 만들도록 CD99-VN 벡터와 CD99L2_s-VC 혹은 CD99L2_L-VC 벡터를 293 T 세포에 co-transfection 하여, 48~72 hr 후에 형광 발광을 유세포 측정으로 확인하였다.
- 결과, CD99-CD99 의 homo-dimer 뿐 아니라, CD99 단백질은 CD99L2군 단백질들과 hetero-dimer를 형성할 수 있음을 확인하였다 (그림2).
- 또한 FRET(Foester Resonance Energy Transfer) assay를 이용하여 이를 확인하였다. (그림3) CD99-YFP 벡터와 CD99L2-CFP 벡터를 293 세포에 co-transfection 하여, 형광 현미경으로 FRET 현상을 관측하였다. positive control로 CD99-CFP를 co-transfection한 세포를 관찰하였고, negative control로서 CD99L2와 CFP fusion protein을 만들 때 두 단백질 사이의 길이를 달리한 vector를 사용하였다. (그림4)
- 결과, homodimer뿐만 아니라, heterodimer의 경우에도 FRET 현상이 일어남을 확인할 수 있었다.

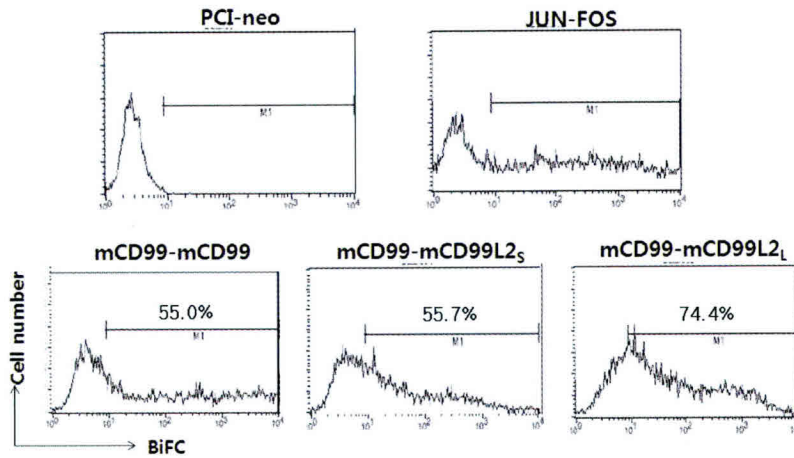


그림 2. mouse CD99 단백질과 CD99L2군 단백질과의 Dimer 형성 확인을 위한 BiFC analysis

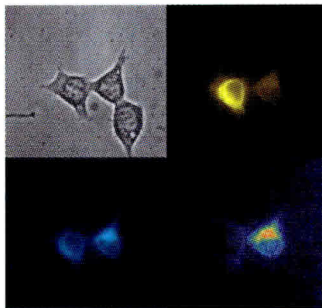


그림 3. homodimer 형성 시 FRET 현상 관찰
 CD99-YFP(상위우측)
 CD99-CFP(하위좌측)
 FRET 현상(하위우측)

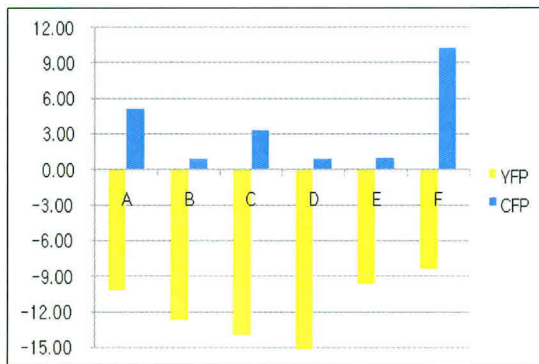


그림 4. heterodimer 형성시 FRET 현상이 일어남

- A: CD99-CD99L2S
- B: CD99-CD99L2S (neg. cont. of A)
- C: CD99-CD99L2L
- D: CD99-CD99L2L (neg. cont. of C)
- E: CD99-C99 (neg. cont. of exp.)
- F: CD99-CD99 (pos. cont. of exp.)

<Result 3> CD99L2 단백질들은 homo-dimer를 형성하지 못하며, CD99L2 단백질들끼리 hetero-dimer도 형성하지 않는다

- CD99L2 단백질 사이의 상호작용을 확인하기 위하여, CD99L2_S-CD99L2_S 와 CD99L2_L-CD99L2_L 의 homodimer 형성 및 CD99L2_S-CD99L2_L 의 hetero-dimer 형성 확인 여부를 확인하기 위하여, CD99L2_S-VN 과 CD99L2_S-VC, CD99L2_L-VN 과

CD99L_{2L}-VC, 또는 CD99L_{2S}-VN 과 CD99L_{2L}-VC를 293 T 세포에 cotransfection 한 후 48 hr~72 hr 에 형광 발광을 유세포 측정으로 확인하였다.

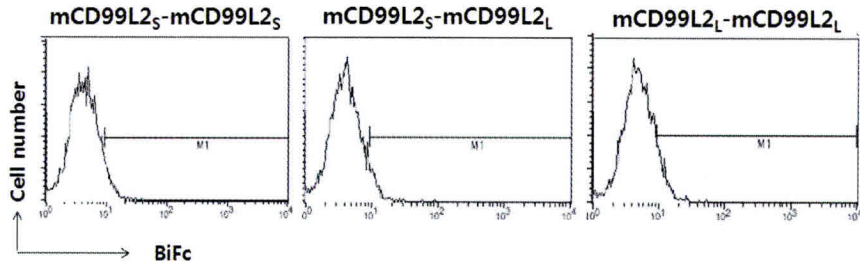


그림 5. CD99L2군 단백질 사이의 homo-dimer 혹은 hetero-dimer 형성 확인을 위한 BiFc analysis

- 결과, CD99L2 단백질들 사이에 상호작용이 일어나지 않음을 확인하였다 (그림 5). 즉, CD99L2 단백질들이 CD99 과는 dimer를 형성하나, CD99L2 단백질들 사이에는 dimer를 형성하지 않음을 보여주는 결과이다.

<Result 4> CD99-CD99 homo-dimer 및 CD99-CD99L_{2S}, CD99-CD99L_{2L} hetero-dimer 는 golgi 및 membrane 에 위치한다

- CD99-CD99 homo-dimer 및 CD99-CD99L_{2S}, CD99-CD99L_{2L} hetero-dimer의 세포내 위치를 확인하기 위하여, confocal microscopy analysis를 수행하였다.
- 또한 세포내 위치를 확인하기 위하여, 핵 (DAPI), Golgi (BODIPY dye), membrane (Dil) staining 도 병행하여 confocal microscopy를 수행하였다.

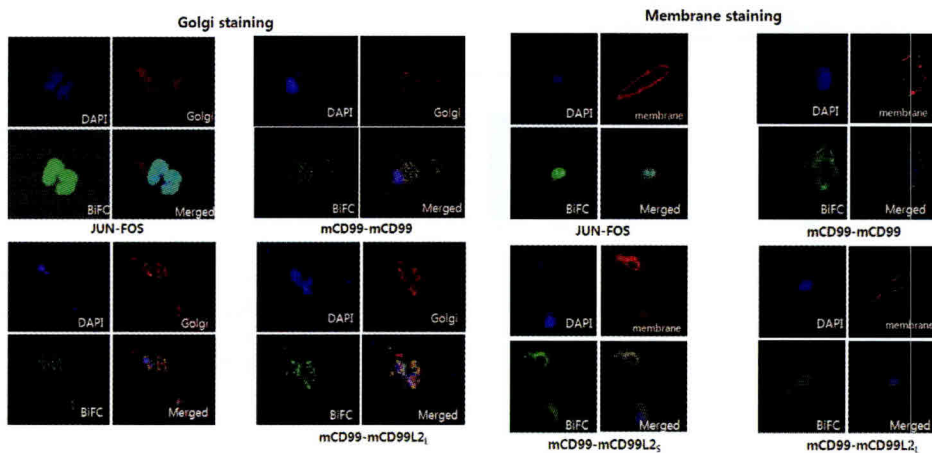


그림 6. BiFc 와 Golgi, membrane staining 후 confocal microscopy

- 결과, CD99-CD99 homo-dimer, 및 CD99-CD99L_{2S}, CD99-CD99L_{2L} hetero-dimer 가 Golgi 및 membrane 에 위치한다는 것을 확인하였다 (그림 6) .
- 또한 FACS analysis에서 확인한 바와 마찬가지로, CD99L_{2S}-CD99L_{2S},

CD99L2_L-CD99L2_L 의 homodimer 및 CD99L2_L-CD99L2_S의 hetero-dimer 형성에 의한 발광을 confocal microcopy 에서도 확인할 수 없었다 (그림 7).

- 이러한 결과를 종합하면, CD99-CD99 의 homo-dimer 및 CD99-CD99L2_S, CD99-CD99L2_L hetero-dimer 가 형성되어 Golgi 뿐 아니라, membrane 까지 dimer 형태로 존재하고 있으나, CD99L2 단백질들은 스스로 dimer를 형성하지 못한다는 것을 알 수 있었다.
- 이는 CD99가 CD99 혹은 CD99L2 단백질과의 상호작용에 있어서, 어떠한 차이로 dimer 형성에 있어서 파트너를 바꿀지 혹은 세 분자간의 trimer를 형성할 지에 대한 의문을 던지는 결과이며, 또한 각 dimer 형성에 있어서, 영향을 미치는 인자에 대한 의문을 던지는 결과이다.

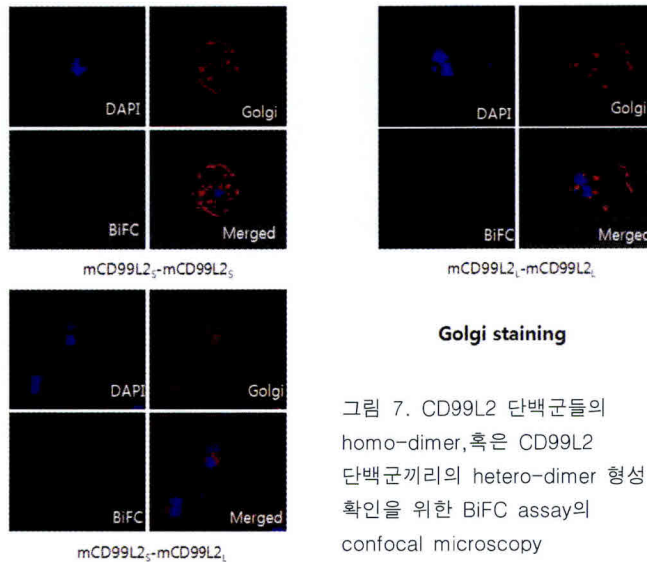


그림 7. CD99L2 단백질들의 homo-dimer, 혹은 CD99L2 단백질끼리의 hetero-dimer 형성을 위한 BiFC assay의 confocal microscopy

<Result 5> CD99 단백질의 homo-dimer 와 CD99L2 단백질과의 hetero-dimer 가 세포내 혼재한다

- CD99 단백질사이의 homo-dimer 와 CD99-CD99L2_S 혹은 CD99-CD99L2_L 의 hetero-dimer 가 형성될 수 있는 가능성 중에서 어느 것이 더 우세한지를 확인하기 위한 competition analysis를 수행하였다.
- 이를 위하여 CD99-유전자를 VN 벡터와 CC 벡터에 클로닝하고, CD99CD99L2_S 혹은 CD99L2_L를 CrN (cerulean의 N-half) 벡터에 클로닝하여, VN-CC 에 의해서는 YFP 형광이 VN-CrN 에 의해서는 CFP 형광이 나오는 시스템 만들어, COS-7 세포에 three-gene cotransfection을 수행하였다.
- CD99-CD99 의 homo-dimer 와 CD99-CD99L2_S 혹은 CD99-CD99L2_L 의 hetero-dimer 가 혼재할 수 있는지 확인하기 위한 two-BiFC analysis 결과, CD99-CD99 homo-dimer 에 의해 형성되는 YFP 형광과 CD99-CD99L2 단백질사이의 hetero-dimer 에 의해 형성되는 CFP 이 혼재함을 확인하였다 (그림8)

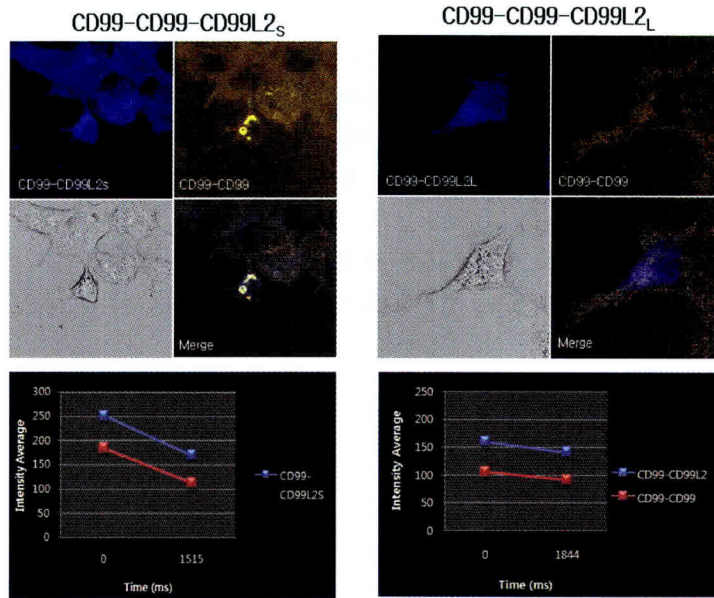


그림 8. CD99 homo-dimer, CD99-CD99L2 단백질과의 hetero-dimer형성의 competitive Two-BiFC

- 둘 사이의 competition 에 대한 결과에 의하면, CD99-CD99L2단백군 사이의 hetero-dimer 들이 약간 우세하였으며, YFP-CFP 가 co-localize 되는 부분도 있으나, 세포내 분포가 서로 다른 부분도 있음을 확인하였다.
- 이는 CD99 homo-dimer 와 CD99L2 단백질과의 hetero-dimer 뿐 아니라, CD99-CD99-CD99L2 단백질사이의 three-molecular complex 도 가능하다는 것을 시사하며, 또한 각 dimer 의 기능이 다를 수도 있음을 시사하는 결과이다.

<Result 6> O-glycosylation mutant CD99 단백질은 homo-dimer를 형성할 수 있다

- CD99 단백질의 amino acid 45 번째 Threonin residue 와 50 번째 Threonin residue 가 O-glycosylation site 이며, 이를 alanine 으로 치환할 경우 glycosylation 이 저해됨이 보고되었다 (Wang et al, 2008). 이 보고는 CD99 단백질의 glycosylation 이 CD99 혹은 CD99L2 단백질과의 상호작용에 어떠한 영향을 미칠 것인가에 대한 의문을 제기하였다.
- CD99 단백질의 glycosylation 이 CD99의 상호작용에 미치는 영향을 확인하기 위하여, CD99T45A, CD99T50A, CD55T 45A50A 의 세 종류 mutant를 제작하였으며, 이들에 myc-tag 혹은 flag-tag를 붙인 후 VN 벡터 혹은 VC 벡터에 클로닝하여, 각 mutant 들이 발현되는지 확인하기 위하여 면역블로팅을 실시하였다.
- VN 벡터에 클로닝할 유전자에는 myc tag이, VC 벡터에 클로닝할 유전자는 flag tag 이 있으므로, myc epitope, flag epitope 에 대한 항체를 이용한 면역 블로팅에서 해당 단백질이 발현되고 있음을 확인하였다 (그림9).
- CD99T45A, CD99T50A, CD99T45A50A 각 단백질이 homodimer를 형성할 수 있는지 확

인하기 위하여, 각 해당 VN, VC 벡터들을 293T 세포에 cotransfection을 실시한 후 형광 발광을 유세포측정하였다.

- 결과, CD99의 glycosylation mutant 들이 homo-dimer를 형성할 수 있음을 확인하였다 (그림 10).
- 이는 CD99의 extracellular domain 에 있는 O-glycosylation 이 CD99 의 homo-dimer 형성에 영향을 주지 않을 가능성을 보여주는 결과이다.

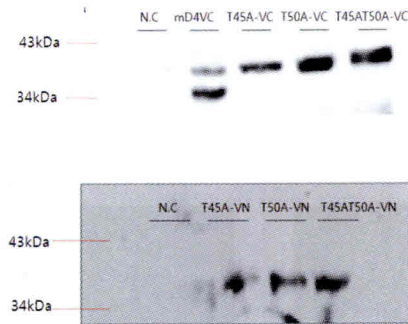


그림 9. CD99 glycosylation mutant 단백질 확인을 위한 면역블로팅

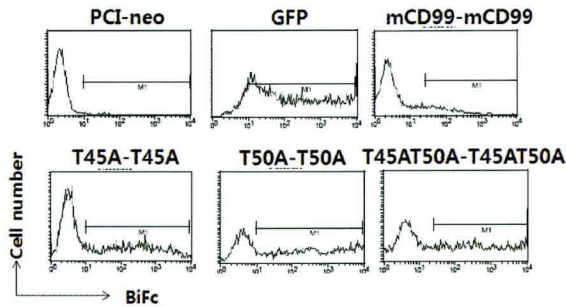


그림 10. CD99 glycosylation mutant 들의 homo-dimer 형성 확인을 위한 BiFC assay의 FACS 결과

<Result 7> CD99 단백질과 CD99 glycosylation mutant 들은 dimer를 형성할 수 있다

- CD99의 O-glycosylation mutant 들이 서로 homo-dimer를 형성할 수 있다는 결과를 바탕으로 CD99 단백질과 CD99 glycosylation mutant 들이 dimer를 형성할 수 있는지 확인하고자 BiFC 실험을 수행하였다.
- 결과, CD99-CD99T45A, CD99-CD99T50A, CD99-CD99T45AT50A 사이의 dimer가 형성될 수 있음을 유세포 측정을 확인하였으며 (그림 11), confocal microscopy 로 확인할 수 있었다 (그림 12).
- Dimer의 분포는 Golgi, membrane 에 분포함을 확인할 수 있었다.

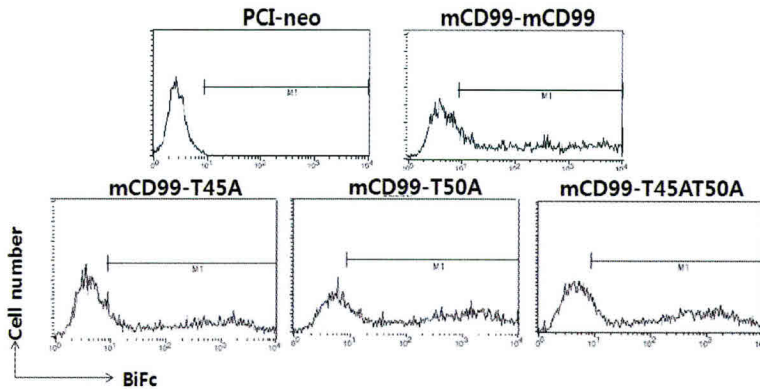


그림 11. CD99와 CD99 glycosylation mutant Dimer 형성

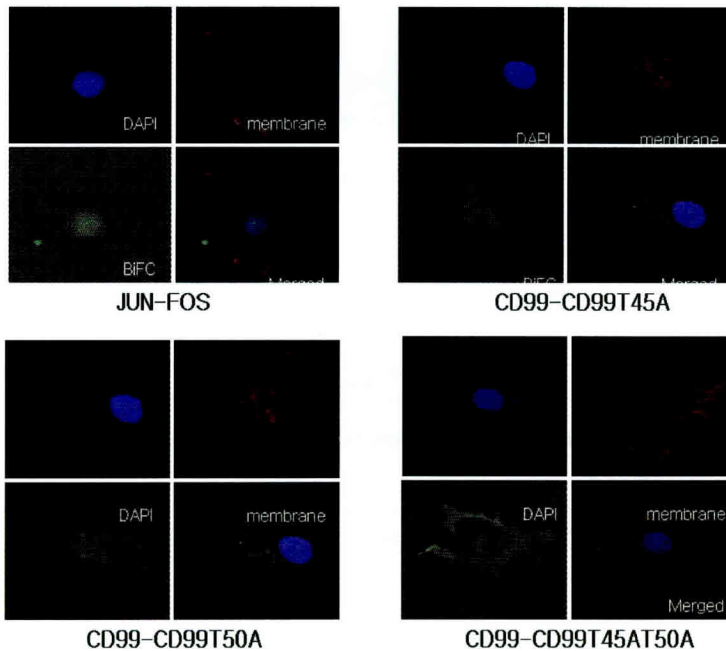


그림 12. CD99-CD99 glycosylation mutant 사이의 dimer 형성

<Result 8> Glycosylation mutant CD99 와 CD99L2 단백질은 dimer를 형성할 수 없다

- CD99 단백질의 homodimer 형성에 glycosylation 이 영향을 주지 않는 결과는, 과연 CD99 과 CD99L2 단백질과의 dimer 형성에 glycosylation 이 영향을 미칠 수 있을지에 대한 의문을 제기하였다.
- 이를 확인하기 위하여, CD99T45A, CD99T50A, CD99T45AT50A와 CD99L2S, CD99L2L 단백질 사이의 dimer 형성 가능성을 확인하기 위하여 BiFC assay를 수행하였다.
- 결과, CD99의 glycosylation mutant 들은 CD99L2S 혹은 CD99L2L 단백질과 dimer를 형성할 수 없음이 확인되었다 (그림 13).

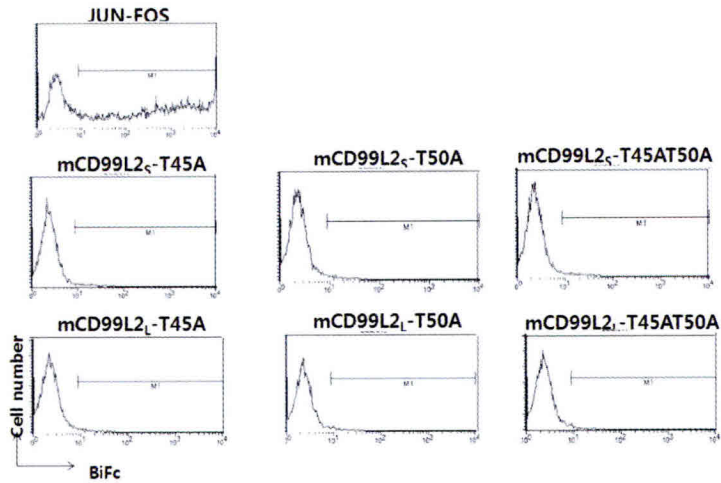


그림 13. CD99L2 단백질과 CD99 glycosylatin mutant 들이 dimer를 형성할 수 없음을 보여주는 BiFC 결과

- 이 CD99 과 CD99L2 단백질과의 상호작용에 있어서 CD99 의 glycosylation 이 중요하게 작용하고 있음을 시사하는 결과이다.

<Result 9> CD99 유전자의 적중 마우스의 말초 혈액 분석결과, T 세포의 분획이 정상에 비하여 약간 낮은 편이다

- CD99 유전자 적중 마우스를 생산하게 되었으며, 이들의 말초 혈액 림프구를 분리하여 CD3 T 세포, CD4 CD8 T 세포 분획, B 세포 분획, Granulocyte, macrophage 분획을 확인하는 FACS analysis를 수행하였다.

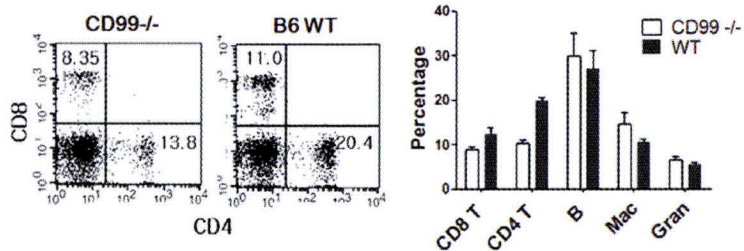


그림 14. CD99 KO 마우스와 B6 정상 마우스의 말초 혈액에서 림프구의 분획 비교

- 결과, CD99 KO 마우스에서 T 세포, B 세포, macrophage, granulocyte 등의 분화는 제대로 일어나, 전체적인 분획에 있어서, CD4 T 세포 및 CD8 T 세포의 분획의 저하가 관찰되었다 (그림 14). 그러나, n 수를 10 이상으로 늘려 통계적 유의성을 확인해야 확실할 것으로 판단된다.

<Result 10> CD99 적중 마우스에서 항원 특이적 CD8 T 세포 반응의 저하가 관찰되었다

D4 KO mouse: anti-H60 specific Response (DAY 10)

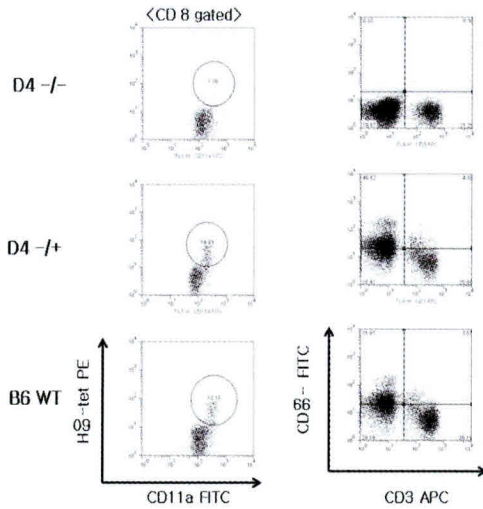


그림 15. CD99 KO 마우스, heterozygote 마우스, B6 정상마우스에 H60 congenic male 비장세포 면역 후 10일 째 말초혈액에서 H60 특이적 CD8 T 세포 측정 및 CD3 T 세포에서 CD99 발현 확인

- CD99 유전자 적중 마우스에서 CD8 T 세포 반응 정도를 확인하기 위하여, CD99 KO homozygote, CD99 KO heterozygote, 혹은 B6 wild type 유전형의 암컷 마우스에 H60 congenic male 세포를 면역하여 H60 특이적 CD8 T 세포 반응을 유도하였으며, 면역 후 day 10 일 정도에 H60 특이적 CD8 T 세포 빈도를 측정하였으며, T 세포에서의 CD99 level을 확인하였다 (그림 15).
- 결과, CD99KO 마우스에서는 H60 특이적 CD8 T 세포 반응이 유도되지 않았으며, 정상 마우스나 heterozygote 에서의 CD3 T 세포에서 CD99 발현이 증가한 반면, CD99 KO 마우스에서는 CD99 발현이 측정되지 않았다. 따라서 이는 CD99 KO 마우스가 제대로 생산 되었음을 확인하며, CD99유전자 적중이 T 세포 반응에 영향을 줄 수 있음을 시사하는 결과라 할 수 있다.

3) 3차년도 연구 결과

| 연구 내용 | 연구 결과 |
|---|--|
| CD99 단백질과 CD99L2s/L 단백질 발현하는 세포의 adhesion assay | CD99 단백질과 CD99L2 단백질을 발현하는 세포주에서 세포의 adhesion 증가 확인 |
| CD99L2 단백질의 이동성과 CD99와의 관련성 확인을 위한 confocal microscopy와 FACS analysis | CD99L2 단백질은 CD99가 존재해야만 세포막으로 나갈 수 있음을 확인함. |
| CD99와 CD99L2s/L 군의 상호작용 위치 확인 | CD99 단백질과 CD99L2 단백질 사이의 상호작용은 CD99의 cytoplasmic domain을 매개로 한다. |
| CD99-CD99 homodimer와 CD99-CD99L2 heterodimer의 dimer 형성 kinetics 확인을 위한 two-color BiFC analysis와 confocal microscopy | CD99 단백질이 homodimer나 CD99L2 단백질과 heterodimer를 형성할 때 CD99L2 단백질과 경쟁하지 않음을 two-color BiFC를 통해 확인했으며, CD99-CD99L2 heterodimer와 CD99 단백질은 Trimer를 형성하지 않음을 확인함. |
| CD99-CD99 homodimer와 CD99-CD99L2 heterodimer의 위치 차이 확인 | CD99-CD99 homodimer와 CD99-CD99L2 heterodimer는 세포 내에서 서로 다른 위치에 존재함을 확인함. |
| CD99 적중 마우스의 phenotyping | CD99 유전자의 적중 마우스의 말초 혈액분석 결과 T 세포 분획에서의 감소와 림프구 분획별 H2-K, I-A의 차이가 거의 없음을 확인함 |
| CD99 적중 마우스에서의 T 세포의 발달 확인 | CD99 적중 마우스의 흉선의 CD8 T 세포의 분획이 정상보다 낮음을 확인함 |
| CD99 적중 마우스의 면역반응유도와 CD99를 donor로 한 GVHD 유도 | CD99 적중 마우스에 면역반응을 유도하였을 때 초기 반응에서 약간의 차이를 보임을 확인하였으며 CD99 적중 마우스를 donor로 하여 GVHD를 유도하였을 때도 초기 반응에서는 더 나은 양상을 보임을 확인함 또한 CD99 적중 마우스 세포는 GVHD유도 시 장기로의 침윤이 정상 마우스 세포보다 적게 나타나는 것을 확인함 |

<Result 1> CD99 단백질과 CD99L2 단백질은 세포 표면에서 세포의 adhesion을 증가시킨다.

- CD99 단백질과 CD99L2 단백질이 세포에서 발현되었을 때 세포의 adhesion에 여

양을 미칠 수 있는지 알아보기 위하여 adhesion assay를 수행하였다.(그림1)

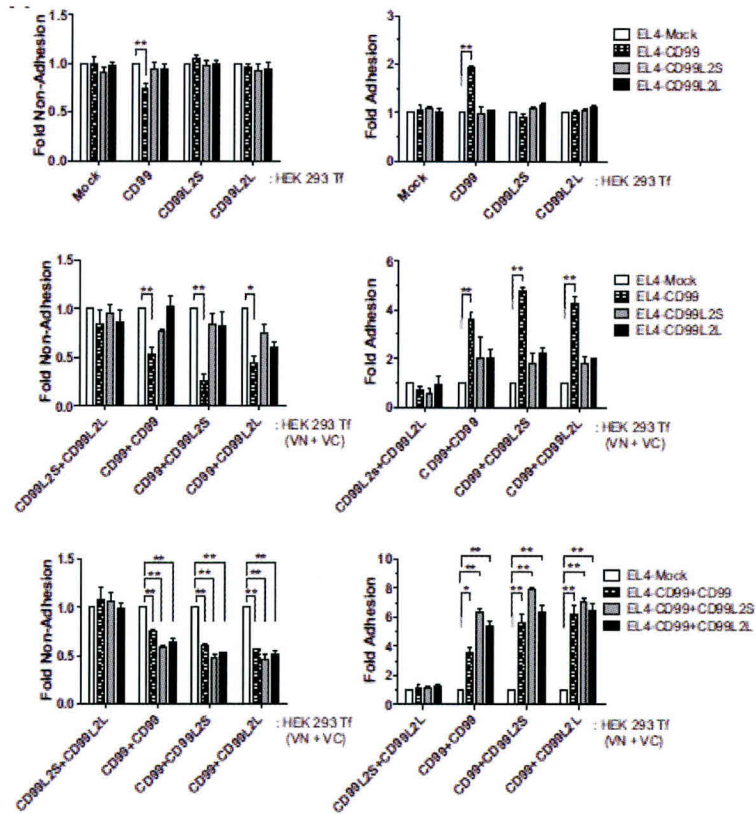


그림 1. CD99 단백질과 CD99L2 단백을 발현하는 세포 주를 이용한 adhesion assay

- CD99 또는 CD99L2s/L를 포함한 vector를 HEK 293 세포나 EL4 세포에 transfection 후 neomycin으로 선택 배양하여 지속적으로 단백을 발현하는 세포 주를 확립하고 각 세포주를 함께 배양한 뒤 HEK 293 세포에 붙어있는 EL4 세포의 수를 FACS analysis를 통해 확인하였다.
- Adhesion assay를 1) CD99 혹은 CD99L2 를 발현하는 EL4 세포주와 CD99 혹은 CD99L2 를 발현하는 HEK293 세포를 이용하여 수행한 결과, CD99를 발현하는 EL4 세포주와 CD99를 발현하는 HEK293 세포주에서만 adhesion 이 일어남을 확인하였다. 즉, EL4에서 발현하는 CD99 와 HEK293 세포에서 발현하는 CD99 사이의 homophilic adhesion 이 일어난 것이다.
- 2) HEK293 세포를 CD99-CD99 혹은 CD99-CD99L2를 발현하는 세포로 바꾼 후, CD99 혹은 CD99L2 를 발현하는 EL4 와 adhesion assay 를 수행한 결과, CD99-CD99L2 를 발현하는 HEK293 세포와 CD99를 발현하는 EL4 세포사이의 adhesion 이 CD99-CD99를 발현하는 HEK293 세포와의 adhesion 보다 더 높게 일어남을 확인 하였다. 즉, CD99-CD99L2 hetero-dimer 발현에 의해 adhesion 이

더 높다는 것을 의미한다.

- EL4 세포에 CD99-CD99 혹은 CD99-CD99L2 dimer 를 발현하도록 한 후 adhesion assay 를 수행한 결과, EHK293 세포, EL4 세포 둘다에서 CD99-CD99L2 를 발현할 때 adhesion 이 가장 높은 것을 확인하였다.
- 결과, CD99-CD99 homo-dimer 와 CD99-CD99L2 hetero-dimer 에 의해 세포간 homophilic interaction 에 의한 세포 유착이 일어남을 확인하였다.

<Result 2> CD99L2 단백질은 CD99가 있을 때 세포막으로 나갈 수 있다.

- 세포 간 adhesion assay의 결과를 토대로, CD99에 의해 CD99L2가 세포막으로 이동하는 지 확인하기 위해 CD99-YFP와 CD99L2s/L-Cerulean 을 각각 single transfection 한 후, 혹은 co-transfection 한 후, 각 단백질의 위치 확인을 위하여 confocal microscopy를 수행, 두 그룹을 비교하였다.

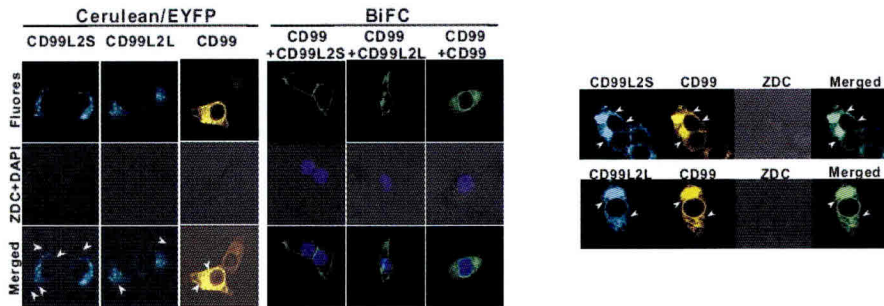


그림 2. CD99-EYFP, CD99L2s/L-Cerulean 을 single transfection 한 후 48 시간째에 confocal microscopy, 수행하여, BiFC complex 와의 위치 비교 (좌)와 CD99-EYFP, CD99L2s/L-Cerulean의 co-transfection 한 후 48시간째에 confocal microscopy 를 수행한 결과 (우).

- 결과, CD99없이 CD99L2 단백질이 홀로 발현될 때는 세포막으로의 이동이 저해된 것으로 확인하였다.(그림 2, 좌)으며, CD99와 CD99L2 를 동시에 발현시켜야만, CD99L2 단백질이 세포막에 존재함을 확인하였다 (그림2, 우).
- CD99L2 단백질의 세포막으로의 이동에 CD99이 중요함을 밝혀냈다.
- confocal microscopy 결과를 확인하기 위하여, transfection 후 FACS analysis 를 수행하였다. 즉, Myc-CD99와 HA-CD99L2s/L을 single transfection 한 경우와 co-transfection 한 경우로 나누어 transfection 후 48시간째에 FACS analysis를 수행하였다.
- 결과, CD99가 co-transfection 되었을 경우에만 HA가 세포 표면에서 발현되는 것을 확인할 수 있었다.(그림 3)
- 따라서 CD99 단백질의 존재가 CD99L2 단백질군의 세포막 발현에 중요함을 확인하였다.

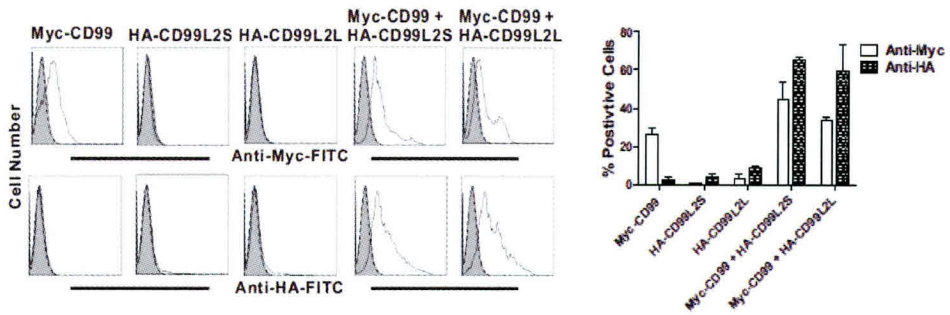


그림 3. CD99L2 단백질의 세포막으로의 움직임 확인을 위한 FACS analysis

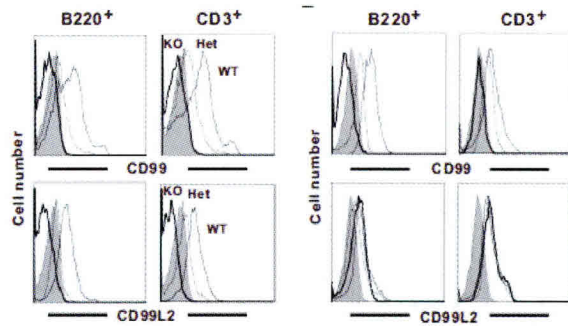


그림 4. CD99 적중 마우스에서의 CD99L2의 표면 및 세포 내 발현 확인을 위한 FACS analysis

- 이러한 사실을 바탕으로 CD99 적중 마우스의 세포에서는 CD99L2가 표면에 발현되지 않을 거라는 가설을 세우고, 이를 확인하기 위하여 CD99 적중 마우스의 말초 혈액에서 림프구의 CD99L2 단백질의 표면 발현을 FACS analysis를 수행했다.(그림 4)
- 결과, 예상한 바와 같이 CD99 적중마우스의 경우 heterozyote나 B6 정상마우스와 달리 CD99L2 단백질이 세포 표면에서 발현되지 않음을 확인하였다. 반면, 세포 내에서는 CD99L2가 CD99와 상관없이 발현되고 있음을 볼 수 있었다.
- 종합하면, CD99L2 단백질은 혼자 있을 때는 세포막으로 이동하지 못하지만 CD99 단백질이 함께 있을 경우, heterodimer를 형성하여 세포막으로 이동할 수 있음을 의미한다. 또한 이는 CD99L2 단백질은 CD99 단백질과 heterodimer를 형성하여 세포막에서 세포의 adhesion에 관계된 역할을 하고 있음을 의미하는 결과이다.

<Result 3> CD99 단백질과 CD99L2 단백질간의 상호작용은 CD99 단백질질의 cytoplasmic domain 을 매개로한다.

- CD99 단백질과 CD99L2 단백질사이의 상호작용 위치를 확인하기 위하여 CD99의 extracellular domain, transmembrane domain, cytoplasmic domain 을 각각

human CD4 의 해당 domain 으로 치환시킨 mutant 를 제작하여, CD99L2 단백질군과 BiFC analysis 를 수행하였다.

- 결과, CD99의 cytoplasmic domain 을 인체 CD4 domain으로 치환시킨 CytoMut CD99 과는 CD99L2 단백질들이 BiFC complex 를 형성하지 않음을 확인하였다. (그림 5)

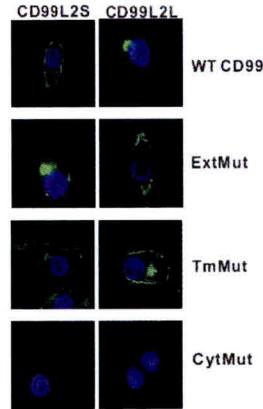


그림 5. CD99 mutant 들과 CD99L2s/L 단백질의 BiFC analysis 결과

<Result 4> CD99 단백질이 CD99 단백질과 homodimer나 heterodimer를 형성할 때 CD99L2 단백질과 경쟁하지 않는다.

- CD99 단백질끼리 homodimer를 형성하고 CD99 단백질과 CD99L2 단백질이 heterodimer를 형성함이 2차년도 연구결과에서 밝혀진 후, CD99-CD99L2 heterodimer와 CD99-CD99 homodimer가 형성될 때 세포 전반에 걸쳐 분자적인 경쟁이 있는지 확인하고자 하였다.
- two color-BiFC를 수행하기 위한 기반으로 CD99-CN, CD99-CC, CD99L2s-VN 과 CD99L2L-VN을 클로닝하였다. 이들을 HEK 293 세포에 co-transfection 한 뒤 세포 전체에서 나오는 형광의 intensity를 측정하였고 이를 바탕으로 competition 여부를 측정한 결과 두 dimer 형성 시 경쟁관계에 있지 않음을 확인하였다.(그림6)

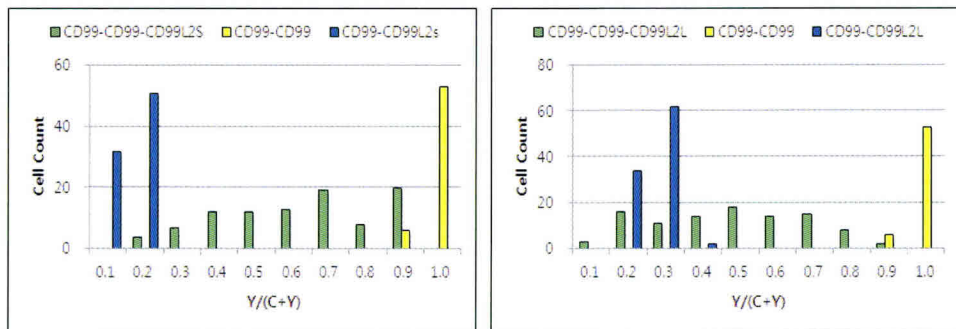


그림 6. CD99-CD99 homodimer와 CD99-CD99L2 heterodimer 형성의 경쟁을 확인하기 위한 competition assay

<Result 5> CD99-CD99L2 heterodimer와 CD99 단백질은 Trimer를 형성하지 않는다.

- Heterodimer 형성 시 CD99 분자가 하나 더 결합한 trimer를 형성하는지 확인하기 위해 CD99-VN과 CD99L2_{s/L}-VC, CD99-mkate를 HEK 293 세포에 co-transfection 후 confocal study를 수행하였다.
- 결과, 세포의 소기관(ER이나 Golgi 등)에서는 co-localize하는 것으로 보이나 세포의 membrane에서는 VN/VC BiFC complex 와 CD99-mkate 가 정확히 co-localize 하는 것은 아님을 확인하였다. 즉, membrane에서 trimer를 형성하지 않음을 확인하였다.(그림7)

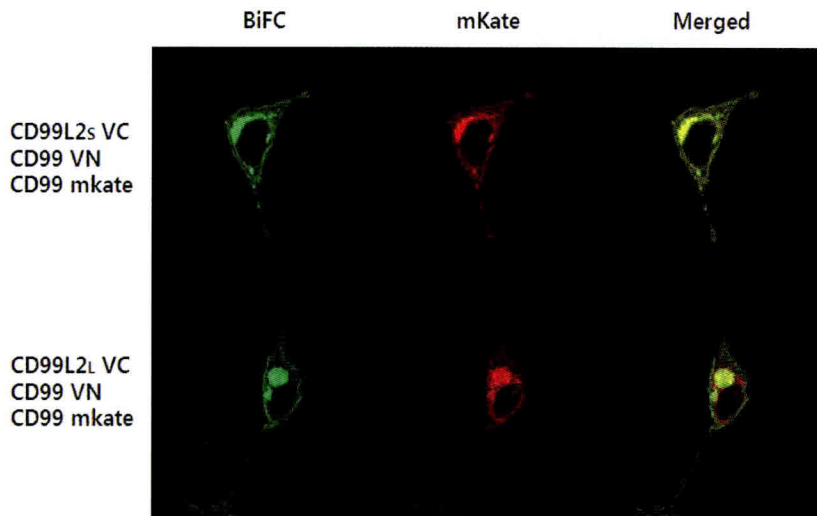


그림 7. CD99와 CD99-CD99L2 heterodimer가 trimer 형성 확인을 위한 confocal assay

<Result 6> CD99-CD99 homodimer와 CD99-CD99L2 heterodimer는 서로 다른 위치에 존재한다.

- CD99-CD99 homodimer와 CD99-CD99L2 heterodimer가 한 세포 내에서 동시에 형성될 때 위치의 차이가 있는지 확인하기 위하여 confocal microscopy analysis를 수행하였다. (그림 8)
- 결과, CD99-CD99 homodimer는 membrane에서 바로 밑 부위에 존재하며 CD99-CD99L2 heterodimer는 좀 더 바깥쪽인 membrane에 존재하는 것을 확인하였다.

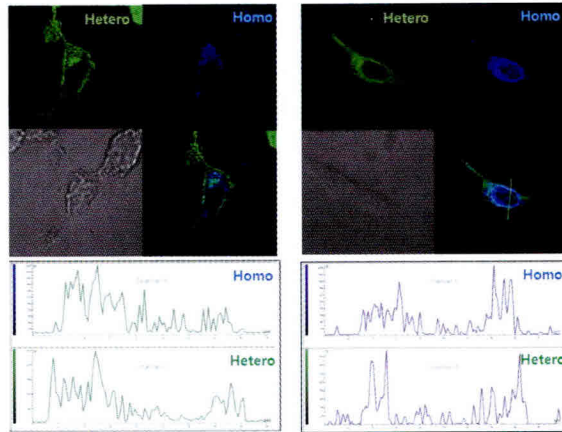


그림 8. CD99끼리의 homodimer와 CD99L2와의 heterodimer 형성을 관찰하는 two-color BiFC assay의 confocal microscopy

<Result 7> CD99 유전자의 적중 마우스의 말초 혈액의 림프구 분획 분석 결과

- CD99 유전자 적중 마우스의 phenotyping을 위해서 말초혈액에서 림프구를 분리하여 FACS analysis를 수행하였다. (그림9)
- 4, 8, 12, 16 주령의 CD99 KO (D4 KO) mouse와 CD99 heterozygote(두 allele 중 하나만 knock out 됨) mouse를 비교하였다.
- 결과, CD4 T 세포는 CD99 적중 마우스에서 주령에 따라 Hetero-마우스보다 증가된 양상을 보였고 CD8 T 세포는 반대로 감소된 양상을 보였다. 또한 Granulocytes(Gr-1+), Macrophages(CD11b+)는 적중마우스에서 조금 감소된 경향을 보였다. 그러나, B6 WT mouse와의 비교가 필요한 점과 n 수를 10 이상으로 늘려 통계적 유의성을 확인해야 확실할 것으로 판단된다.

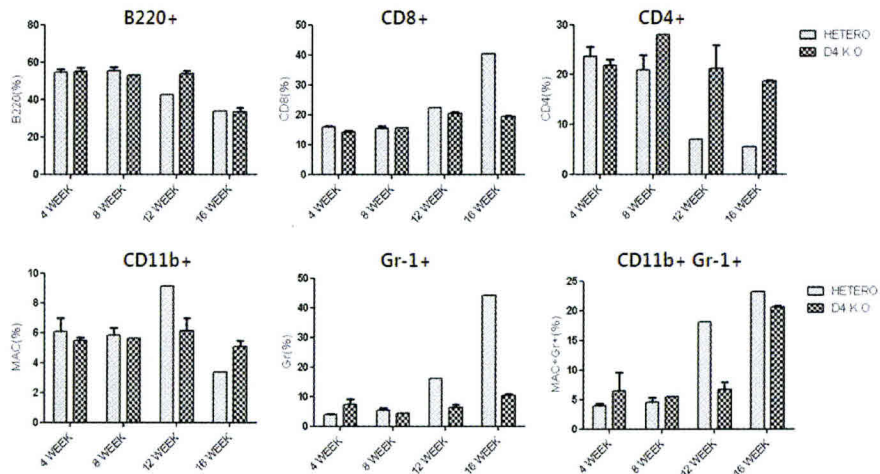


그림 9. CD99 적중 마우스와 heterozygote 마우스의 말초혈액에서 림프구의 분획비교

<Result 8> CD99 적중 마우스와 정상마우스의 말초 혈액에서 H2-K, I-A의 차이는 거의 없다.

- CD99 단백질이 MHC class I, II의 표면 발현의 차이를 유도하는지 확인하기 위하여 CD99 KO, Heterzygote, B6 정상 마우스의 말초 혈액의 림프구를 분획화하여 마우스 MHC class I, II 인 H2-K와 I-A에 대한 FACS analysis를 수행하였다. (그림 10)
- B 세포 분획과 T 세포 분획으로 나누어 분획 별 MHC class I, II의 발현 변화(세포 분획의 크기변화)를 관찰하였고 표면에서의 발현 빈도의 상대적 값을 측정하였다.
- 결과, H2-K는 세포 분획의 크기변화나 표면 발현의 빈도에서 차이가 없었다. I-A는 분획의 크기나 발현빈도 면에서 CD99 적중 마우스가 정상보다 증가된 경향은 보였으나 통계적으로 유의미한 정도의 차이는 보이지 않았다.

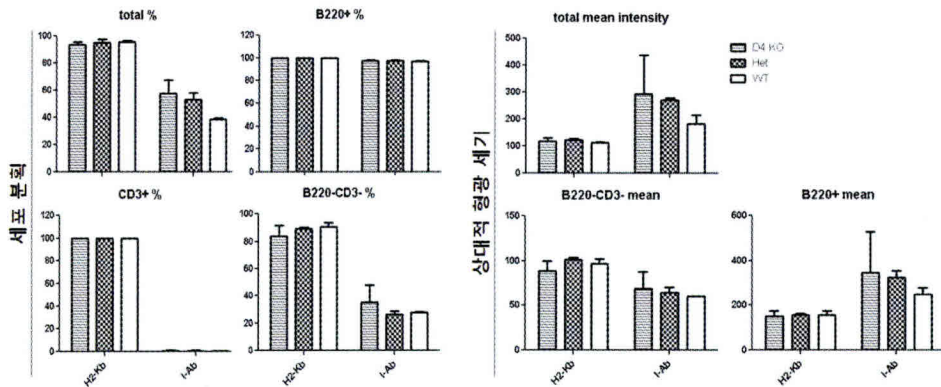


그림 10. CD99 KO, Heterzygote, B6 정상 마우스의 말초 혈액 림프구의 MHC class I, II의 표면 발현 양상 비교

<Result 9> CD99 적중 마우스의 T 세포 발달 시 CD8 T 세포의 분획이 정상보다 낮다

- CD99 적중 마우스에서 T 세포 발달에서의 영향을 알아보기 위해 CD99 KO, heterozygote, B6 정상 마우스의 흉선 세포에 대해 FACS analysis를 수행하였다.(그림 11)

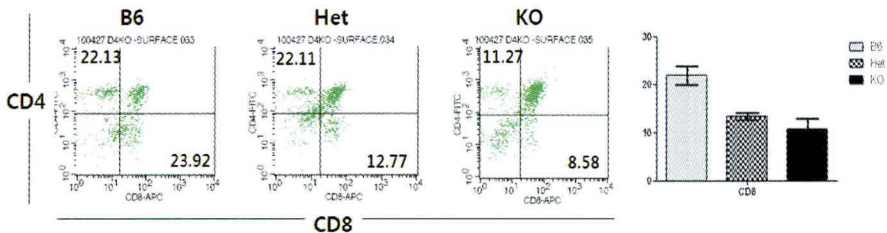


그림 11. CD99 KO, heterozygote, B6 정상 마우스의 흉선세포 분획 비교

- 결과, CD99 적중 마우스의 경우 정상 마우스 보다 CD8 T 세포의 분획이 감소된 것을 확인하였다. 그러나 n 수를 10 이상으로 늘려 통계적으로 유의미한지 확인해 볼 필요가 있다.

<Result 10> CD99 적중 마우스에 면역반응을 유도하였을 때 초기 반응에서 약간의 차이를 보인다

- CD99 적중 마우스에서 CD8 T 세포의 반응 정도를 확인하기 위하여, CD99 KO, heterozygote, B6 정상 마우스에 H60 congenic 마우스의 비장세포를 면역하여 H60 특이적 CD8 T 세포 반응을 유도하였으며 1차 면역 42일 후 2차 면역반응을 유도하였다. 각 면역 후 H60 특이적 CD8 T 세포 빈도를 측정하였다.(그림 12)
- 결과, 1차 면역 후 반응에서 CD99 KO 마우스에서 H60 특이적 CD8 T 세포의 반응이 적게 유도된 듯 보였으나 2차 면역 후 측정된 결과에서는 큰 차이를 보이지 않았다.

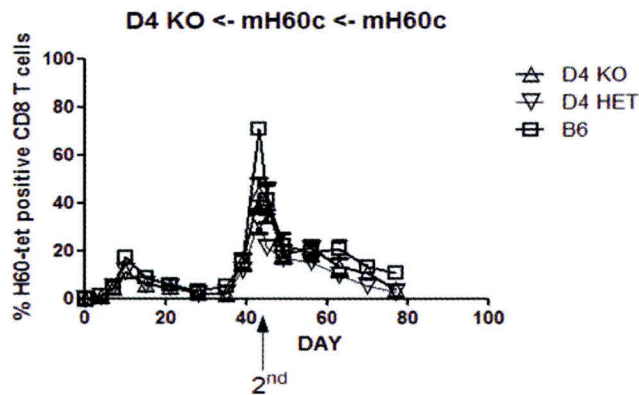


그림 12 CD99 KO, heterozygote, B6 정상 마우스에서 H60 congenic male 비장세포를 1차, 2차 면역했을 때 H60 특이적 CD8 T 세포 측정

<Result 11> CD99 적중 마우스를 donor로 하여 GVHD를 유도하였을 때 초기 반응에서는 더 나은 양상을 보인다

- CD99 적중 암컷 마우스의 조혈모세포와 비장세포를 방사선 조사된 Balb.b 암컷 마우스에 이식한 후 GVHD 유도를 체중 변화와 생존율로 확인하였다(그림 13).
- 결과, BMT 후 21일까지 CD99 적중 마우스가 donor로 사용된 경우에서 체중 감소로부터의 회복이 더 좋았고 생존율에서도 더 나은 양상을 보였으나 28일 이후 생존율에서 급격한 감소를 보였다.
- 이는 CD99가 GVHD의 유도에서 초기에 영향을 줄 수 있음을 시사하는 바이다.

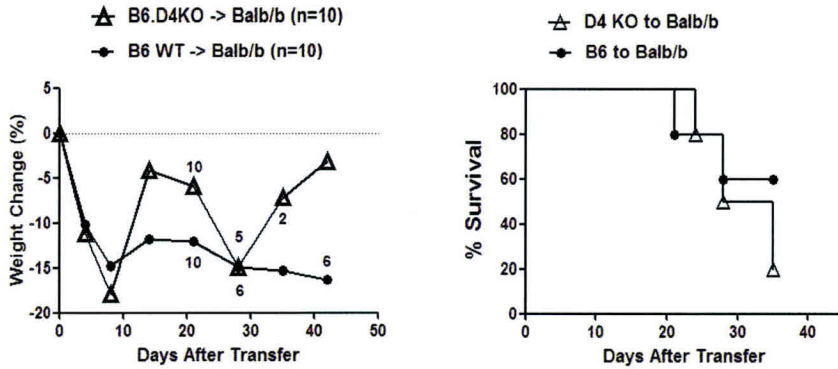


그림 13 CD99 적중 마우스를 donor로 사용한 GVHD 유도

<Result 12> CD99 적중 마우스를 donor로 이용하여 GVHD를 유도할 경우 면역 세포의 장기 침윤 능력이 감소한다

- CD99 적중 마우스와 정상마우스를 이용하여 Balb.b 마우스에 GVHD를 유도하고 Balb.b 마우스의 장기에 침윤된 donor 면역세포의 수를 확인하였다.(그림 14)
- 결과, 비장, 간, 폐, 림프선에서 GVHD 유도 후 초기 시점인 4일, 7일에 CD99 적중 마우스의 세포가 정상 마우스 유래의 세포보다 적게 침윤되어있음을 확인하였다. 또한 면역세포 분획별로 그 수를 비교하였을 때 Gr-1+ 세포, Mac-1+ 세포, CD4+, CD8+ T 세포의 침윤이 적게 나타남을 확인하였다.(그림 15)
- 이는 <Result 11>에서 보이는 결과-GVHD 초기 반응에서의 빠른 회복 속도-의 이유를 설명하는 것으로, 반응 초기 CD99를 타겟으로 하여 장기 침윤을 막는다면 GVHD를 경감시킬 수 있음을 시사하는 결과이다.

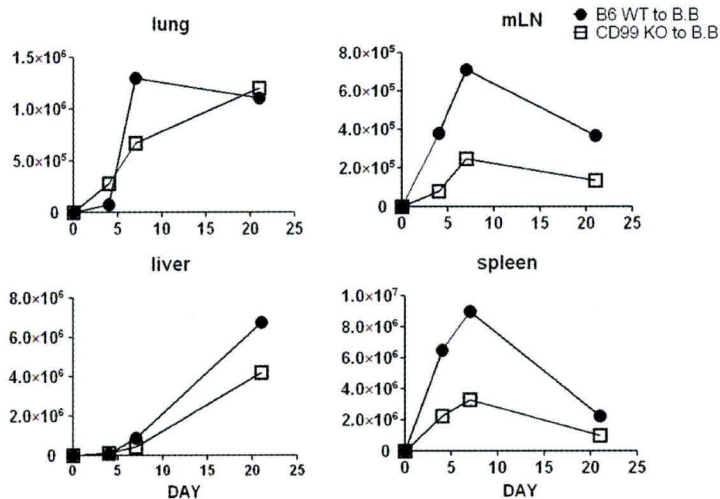


그림 14. CD99 적중 마우스를 donor로 유도한 GVHD에서 장기별로 침윤된 면역세포의 수

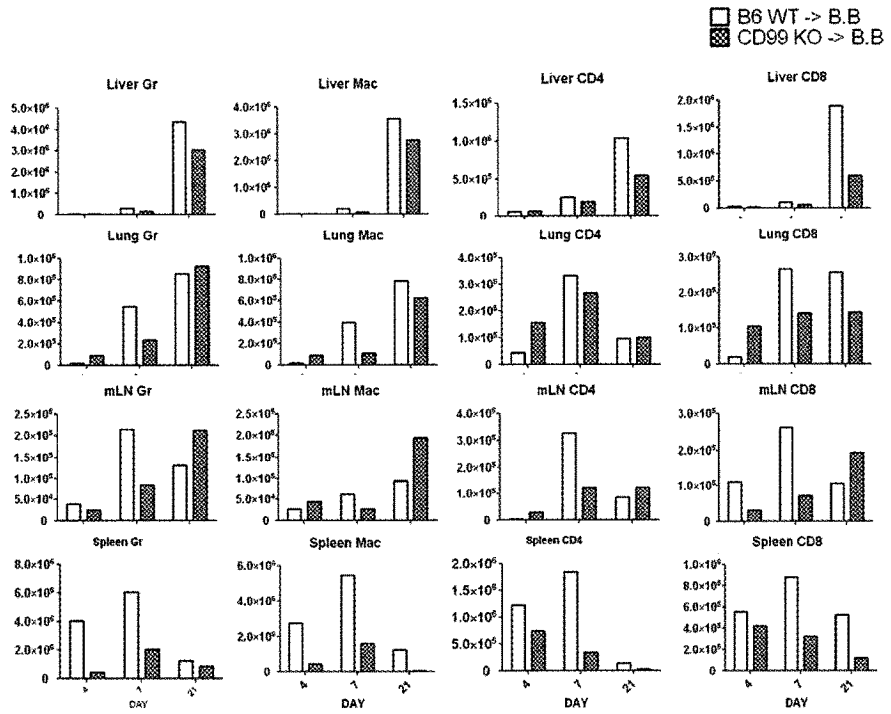


그림 15. CD99 적중 마우스를 donor로 유도한 GVHD에서 장기별로 침윤된 면역 세포의 분획별 수

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구목표 및 평가의 착안점

| 구분 | 년도 | 세부연구목표 | 가중치 | 평가의 착안점 및 척도 |
|------|------|---|------|---|
| 1차년도 | 2007 | Minor H antigen 불일치성 이식 후 1차 및 2차 면역 반응에서 T 세포 활성화에 따른 CD99 항원의 발현 역동성 확인 | 30 % | 면역 1차 반응 및 2차 반응에서 T 세포 활성화에 따른 CD99 발현의 확인하였는가? |
| | | GVHD 발병중 CD99 항원의 T 세포내 발현 역동성 확인 및 T 세포 이동과 CD99 항원발현의 상관관계확인 | 30 % | GVHD 발병중 CD99 항원 발현 면역세포의 활성화 및 세포 이동이 확인되었는가? |
| | | GVHD 발병중 CD99 항원의 monocyte, neutrophil에서 발현 역동성 확인 및 neutrophil 이동과 CD99 항원의 발현과 상관성 확인 | 30 % | GVHD 발병중 선천 면역성세포에서 CD99 항원의 발현이 확인되었는가? |
| | | CD99 적중 마우스 (Knock out mouse)의 heterozygote 교배를 통해 CD99 KO 마우스 생산 | 10 % | 적중마우스가 생산되는가? |
| 2차년도 | 2008 | CD99 분자가 CD99L2 단백질과 상호작용 유무 확인 | 30 % | CD99의 단백질과 CD99L2 단백질의 dimer 형성 확인을 위한 세포내 연구가 진행되었는가? |
| | | CD99 분자군 (CD99L _s & CD99L _L) 이 homodimer 혹은 heterodimer 형성 확인. | 20 % | CD99L _s -CD99L _s 혹은 CD99L _L -CD99L _L 의 homodimer 가 형성되는지, 혹은 CD99L _s -CD99L _L 상호의 heterodimer 가 형성되는지 확인하였는가? |
| | | CD99 분자의 glycosylation mutant 제 | 30 % | CD99 분자의 glycosylation mutation 이 CD99의 homodimer, |

| | | | | |
|------|------|--|------|---|
| | | 작 및 분자간의 상호작용에 미치는 영향 확인 | | 및 CD99L2 와의 dimer 형성에 영향을 주는지 확인되었는가? |
| | | CD99 분자와 상호작용하는 새로운 타겟 발굴을 위한 기초마련 | 5 % | CD99 단백질과 상호작용을 할 타겟 분자 발굴을 위한 조처를 취하였는가? |
| | | CD99 유전자 적중 마우스 생산 | 15 % | CD99 유전자 적중 마우스가 생산되어 phenotyping 되었는가? |
| 3차년도 | 2009 | CD99와 CD99L2 의 상호관계 확인 | 20 % | CD99 homo-dimer 와 CD99-CD99L2 heterodimer 가 homophilic interaction 에 관여하는지 in vitro assay를 수행하였는가? |
| | | CD99 - CD99 homo-dimer 및 CD99-hetero-dimer 의 세포내 형성기작 이해 | 20 % | CD99 의 homo-dimer 및 hetero-dimer 가 만들어지는 T 세포 라인을 확립하였는가? 각 dimer 형성과 T 세포 활성화의 관련성을 확인하였는가? |
| | | CD99 유전자의 생체내 기능 분석을 위한 GVHD 유도 | 60 % | CD99 KO 마우스의 phenotyping 을 하였는가? CD99 KO 마우스에 면역 반응을 유도하여 CD8 T 세포의 일차 및 메모리 반응의 kinetics를 확인하였는가? CD99KO 마우스의 조혈모세포와 비장세포를 이용하여 GVHD를 유도하여 발병을 확인하였는가? |

2. 연구개발 목표의 달성도 및 관련분야의 기술발전예의 기여도

1) 연구개발 목표의 달성도

| 목 표 | 달성도 % | 내용 |
|--|-------|---|
| Minor H antigen 불일치성 동종 이식 후 면역 반응에서 T 세포 활성화 및 선천 면역 세포 활성화에 따른 CD99 항원의 발현 확인 | 100 % | 동종이식 면역 반응을 보이는 생체에서 T 세포 및 선천 면역 세포인 granulocyte 및 macrophage 에서 CD99의 발현을 확인하였으며, MLC로 모든 세포군을 시험관내 재활성화시키면, 활성화된 모든 세포군에서 CD99 단백질의 세포 표면으로의 발현을 확인하였다. CD99 발현이 낮은 naive 세포군에서도 활성화된 세포군과 마찬가지로, 세포질내에는 CD99 단백질이 내재되고 있음을 확인하였다. |
| GVHD 발병중 CD99 항원의 T 세포, 선천 면역 세포 neutrophil 에서 발현 역동성 확인 및 T 세포 이동과 CD99 항원발현의 상관관계 확인 | 80% | GVHD 발병중 CD4, CD8 T 세포 및 granulocyte의 비장과 타겟 장기인 간에서의 침윤 역동성을 확인하여, 활성화된 CD99 양성 세포의 타겟 장기내 증가를 확인하였다. GVHD가 발병되어 염증 반응으로 진행되는 시간 경과에 따라 granulocyte 침윤이 후반기에 진행되고 CD99를 발현하는 granulocyte의 백분율이 증가하였다. 효과자 중의 하나인 CD8 T 세포에서도 점차 CD99 발현세포의 비중이 높아감을 확인하였다. 즉, CD99 단백을 표현하는 세포의 타겟 장기에서의 축적은 확인하였다. 그러나, 이는 세포 이동의 간접적인 데이터이고, 직접적인 증거로는 생체 이미지 촬영이 있어야 한다는 것을 배웠다. 따라서 직접적인 상관관계를 규명하지 못했으므로 80% 달성이라 판단한다. |
| CD99 단백질의 특성 규명 | 100% | CD99 단백질끼리의 homo-dimer 가 형성됨을 확인하였다. CD99 의 homo-dimer 형성은 extracellular domain을 매개로함을 확인하였다. CD99의 transmembrane 이나 cytoplasmic domain 이 치환된 경우에는 CD99 단백질과 homo-dimer 형성을 통하여 형광 발광을 하나, 형광 발광이 세포막에서도 관찰되는 결과를 얻었다 |
| CD99 단백질과 CD99L2 단백질과의 상호작용 확인 | 100% | CD99 단백질과 CD99L2 단백질 사이에 hetero-dimer 가 형성될 수 있음을 BiFC를 통한 FACS analysis 와 confocal microscopy 로 확인하였음. 또한, CD99 homo-dimer 와 CD99-CD99L2 hetero-dimer 형성이 동시에 일어날 수 있는지 확인하는 competition assay (YFP-CFP two |

| | | |
|--|------|---|
| | | BiFC assay) 를 통하여, 두가지 dimer form이 형성될 수 있음도 추가로 확인하였음. |
| CD99L2 단백질의 homo-dimer 형성 확인 | 100% | CD99 단백질과 달리 CD99L2 단백질은 자체적인 homo-dimer를 형성하지 않을 뿐 아니라, CD99L2 단백질 사이에 hetero-dimer 도 형성하지 않음을 확인하였음. |
| CD99 glycosylation mutation 이 CD99 의 homodimer 및 CD99L2 군과의 상호작용에 미치는 영향 확인. 형성에 미치는 영향 확인 | 100% | CD99 단백질의 homodimer 형성에 있어서, glycosylation 이 중요하지 않으나, glycosylation mutant 가 CD99L2 단백질과는 dimer 형성을 하지 않음을 확인하였음. |
| CD99 단백질과 상호작용하는 타겟 단백질 발굴을 위한 기초 마련 | 80% | 인체 CD99 단백질과 p230 단백질에 대한 상호작용이 보고됨 (Bremond et al., Blood 2009)에 따라 마우스 p230 유전자의 클로닝을 하였으며, CD99 의 transmembrane 에 binding 하는 새로운 단백질을 찾기 위한 cDNA library 제작을 중단하였음. |
| CD99 적중 마우스의 생산 | 100% | CD99 유전자가 적중된 마우스를 생산하여, 이들의 말초혈액 분석으로 CD4 T 세포분할이 적고, Macrophage 분할이 높은 결과를 얻었으며, T 세포 활성이 제대로 일어나지 않음을 확인하였음. |
| CD99 단백질과 CD99L2 단백질과의 상호작용 확인 | 100% | CD99의 homodimer 및 heterodimer가 homophillic 또는 heterophillic interaction을 통해 세포 간 adhesion에 관여함을 확인하였음. 또한 CD99L2 단백질은 CD99에 의해 세포막으로 이동이 가능함을 밝혀냄. |
| CD99 - CD99 homodimer 및 CD99-heterodimer의 세포 내 형성기작 이해 | 100% | CD99 단백질이 CD99 또는 CD99L2 단백질과 dimer를 형성함에 있어 경쟁적인 관계에 있지 않음을 competition assay로 확인하였음. 또한, CD99-CD99L2 hetero dimer와 CD99가 trimer를 형성하지 않으며 각 dimer의 세포 내 위치가 다를음을 confocal study로 확인하였음. |
| CD99 유전자의 생체 내 기능 분석을 위한 GVHD 유도 | 100% | CD99 적중 마우스의 조혈모 세포와 비장 세포를 Balb.b 마우스에 이식하여 GVHD를 유도하였을 때, CD99 KO 세포가 이식되었을 때 이식 초기에 체중의 회복이나 생존율이 더 좋음을 확인하였음. |

2) 기술 발전에의 기여도

- CD99의 homodimer 뿐만 아니라 heterodimer의 형성기작과 이들 dimer에 의한 세포 부착성에 대한 역할을 밝혔다. 이는 세포 이동성에 관한 새로운 타겟을 제시하며 이를 이용한 면역 반응 조절 기술 개발의 발달을 가져올 것으로 기대한다.
- CD99 적중 마우스를 이용한 면역반응 유도과 GVHD 유발 모델을 확립하여 CD99의 생체 내 역할에 대한 연구를 가능하게 하였다. 이는 시험관 내 실험에서 한 단계 도약하여 생체 내에서의 직접적인 CD99의 역할을 알 수 있고 따라서 CD99를 타겟으로 한 신약 개발의 발달에 기여할 것으로 본다.

(1) 연구개발의 최종목표

마우스를 이용한 부조직적합 불일치성 이식에 의한 이식편대숙주질환 (GVHD) 모델에서, 세포이동과 관련된 CD99 의 역할 및 분자적 기능 분석 및 CD99 적중 마우스를 이용한 기능 검증으로 GVHD 조절 신약개발 물질의 타겟으로서의 CD99 생체 기능 확인 및 스크리닝 시스템 확립

(2) 연차별 연구개발 목표 및 내용

| 구분 | 연구개발 목표 | 연구개발 내용 및 범위 |
|------|------------------------------------|--|
| 1차년도 | 마우스 개체를 이용한 GVHD 모델에서 CD99 의 발현 분석 | Minor H antigen 불일치성 이식 후 1차 및 2차 면역 반응에서 T 세포 활성화에 따른 CD99 항원의 발현 역동성 확인 GVHD 발병중 CD99 항원의 T 세포내 발현 역동성 확인 및 T 세포 이동과 CD99 항원발현의 상관관계확인 GVHD 발병중 CD99 항원의 monocyte, neutrophil에서 발현 역동성 확인 및 neutrophil 이동과 CD99 항원의 발현과 상관성 확인 (모델 정립) |
| | CD99 KO 마우스 생산을 위한 교배 | CD99 적중 마우스 (Knock out mouse) 생산을 위한 heterozygote 교배 시작 (모델 정립) |
| 2차년도 | CD99 분자의 기능적 분석 | CD99 분자의 생화학적 분자생물학적 성격 확인 CD99 분자군의 상호 작용성 확인 CD99 분자의 mutant 제작 및 기능적 영향을 CD8 T 세포 클론에서 확인 및 세포이동에 미치는 영향 분석 (성질 분석) |

| | | |
|------|-----------------------|--|
| | CD99 유전자 적중 마우스 대량 생산 | CD99 적중 마우스 대량 생산 (모델 정립) |
| 3차년도 | CD99 KO 마우스에서 GVHD 확인 | CD99 적중 마우스를 공여자로 이용한 GVHD 모델에서, CD99 발현이 없는 조혈계 세포에 의한 GVHD 영향 평가(기능 분석) GVHD 조절에 필요한 신약 스크리닝에 적합한 마우스 시스템 확립 (모델 정립) |

(3) 계획대비 달성도(선정시 제시된 연구목표)

| 번호 | 세부연구목표 | 달성내용 | 달성도(%) |
|----|---|---|--------|
| 1 | Minor H antigen 불일치성 이식 후 1차 및 2차 면역 반응에서 T 세포 활성화에 따른 CD99 항원의 발현 역동성 확인 | 동종이식 면역 반응을 보이는 생체에서 T 세포 및 선천 면역 세포인 granulocyte 및 macrophage 에서 CD99의 발현을 확인하였으며, MLC 로 모든 세포군을 시험관내 재활성화 시키면, 활성화된 모든 세포군에서 CD99 단백질의 세포 표면으로의 발현을 확인하였다. CD99 발현이 낮은 naive 세포군에서도 활성화된 세포군과 마찬가지로, 세포질내에는 CD99 단백질이 내재되고 있음을 확인하였다. | 100 % |
| 2 | GVHD 발병중 CD99 항원의 T 세포내 발현 역동성 확인 및 T 세포 이동과 CD99 항원발현의 상관관계 확인 | GVHD 발병중 CD4, CD8 T 세포 및 granulocyte의 비장과 타겟 장기인 간에서의 침윤 역동성을 확인하여, 활성화된 CD99 양성 세포의 타겟 장기내 증가를 확인하였다. GVHD 가 발병되어 염증 반응으로 진행되는 시간 경과에 따라 granulocyte 침윤이 후반기에 진행되고 CD99를 발현하는 granulocyte의 백분율이 증가하였다. 효과자 중의 하나인 CD8 T 세포에서도 점차 CD99 발현세포의 비중이 높아감을 확인하였다. 즉, CD99 단백을 표현하는 세포의 타겟 장기에서의 축적은 확인하였다. 그러나, 이는 세포 이동의 간접적인 데이터이고, 직접적인 증거로는 생체 이미지 촬영이 | 80% |

| | | | |
|---|---|--|------|
| | | 있어야한다는 것을 배웠다. 따라서 직접적인 상관관계를 규명하지 못했으므로 80% 달성이라 판단한다. | |
| 3 | GVHD 발병중 CD99 항원의 monocyte, neutrophil에서 발현 역동성 확인 및 neutrophil 이동과 CD99 항원의 발현과 상관성 확인 | CD99 단백질의 homo-dimer 가 형성됨을 확인하였다. CD99 의 homo-dimer 형성은 extracellular domain을 매개로함을 확인하였다. CD99의 transmembrane 이나 cytoplamic domain 이 치환된 경우에는 CD99 단백질과 homo-dimer 형성을 통하여 형광 발광을 하나, 형광 발광이 세포막에서도 관찰되는 결과를 얻었다 | 100% |
| 4 | CD99 적중 마우스 (Knock out mouse)의 heterozygote 교배를 통해 CD99 KO 마우스 생산 | F1 끼리의 intercross를 통하여 F2 generation 까지를 얻었다. | 100% |
| 5 | CD99 분자의 생화학적 분자생물학적 성격 확인 | CD99 단백질과 CD99L2 단백질 사이에 hetero-dimer 가 형성될 수 있음을 BiFC를 통한 FACS analysis 와 confocal microscopy 로 확인하였음. 또한, CD99 homo-dimer 와 CD99-CD99L2 hetero-dimer 형성이 동시에 일어날 수 있는지 확인하는 competition assay (YFP-CFP two BiFC assay) 를 통하여, 두가지 dimer form이 형성될 수 있음도 추가로 확인하였음. | 100% |
| 6 | CD99 분자군의 상호 작용성 확인 | CD99 단백질과 달리 CD99L2 단백질은 자체적인 homo-dimer를 형성하지 않을 뿐 아니라, CD99L2 단백질 사이에 hetero-dimer 도 형성하지 않음을 확인하였음. | 100% |
| 7 | CD99 분자의 mutant 제작 및 기능적 영향을 CD8 T 세포 클론에서 확인 및 세포이동에 미치는 영향 분석 | CD99 단백질의 homodimer 형성에 있어서, glycosylation 이 중요하지 않으나, glycosylation mutant 가 CD99L2 단백질과는 dimer 형성을 하지 않음을 확인하였음. | 100% |
| 8 | CD99 적중 마우스 대량 생 | CD99 적중 마우스를 대량 생산하였으 | 100 |

| | | | |
|----|--|---|------|
| | 산 후 T 세포 생성 확인 | 며 T 세포의 생성이 이뤄지기는 하지만 말초혈액에서의 T 세포 분할이 정상보다 적고 T 세포 활성이 제대로 일어나지 않음을 확인하였음. | |
| 9 | CD99 적중 마우스를 공여자로 이용한 GVHD 모델에서, CD99 발현이 없는 조혈계 세포에 의한 GVHD 영향 평가 | CD99 적중 마우스를 공여자로 이용하여 GVHD를 유발하였으며 B6 정상 마우스 보다 초기 체중회복이 빠른 것을 확인 하였다. | 100% |
| 10 | GVHD 조절에 필요한 신약 스크리닝에 적합한 마우스 시스템 확립 | CD99 적중 마우스와 정상 마우스를 공여자로 이용한 GVHD 모델에서 비 교에서의 초기 체중 회복 차이는 초반 GVHD 조절 연구의 타겟으로 이용할 가치가 있음을 시사한다. | 80% |

(4) 위 연구목표(총연구기간)에서 중요도 순으로 4-5개 목표 추출 및 가중치 부여

| 번호 | 세부연구목표 | 가중치 |
|----|---|--------|
| 1 | CD99 분자의 생화학적 분자생물학적 성격 확인 | 50% |
| 2 | CD99 분자의 mutant 제작 및 기능적 영향을 CD8 T 세포 클론에서 확인 및 세포이동에 미치는 영향 분석 | 20% |
| 3 | Minor H antigen 불일치성 이식 후 1차 및 2차 면역 반응에서 T 세포 활성화에 따른 CD99 항원의 발현 역동성 확인 | 10% |
| 4 | CD99 적중 마우스를 공여자로 이용한 GVHD 모델에서, CD99 발현이 없는 조혈계 세포에 의한 GVHD 영향 평가 | 10% |
| 5 | CD99 적중 마우스 대량 생산 후 T 세포 생성 확인 | 10% |
| 계 | | 총 100% |

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 추가 연구의 필요성

- 본 연구에서는, CD99의 분자적 특성을 규명하였다. CD99는 그 자체로 homodimer를 형성하여 세포막에 존재하여 세포 부착과 이동에 기능함으로써 세포이동 조절 타겟으로서의 가치가 높음을 확인하였다.
- 이와 함께 CD99의 paralog로 알려진 CD99L2 분자의 특성을 규명하였다. CD99L2의 두 개의 isoform인 CD99L2s와 CD99L2L 모두 CD99와 함께 dimer를 형성한다. 또한 CD99에 의해 세포막으로 이동이 가능한 특성을 지니며 이렇게 형성된 heterodimer는 세포 부착성에 관여하고 있음을 밝혔다.
- 따라서 CD99L2가 세포 이동에 있어 CD99와 함께 기능하고 있을 수 있다는 가능성이 제기 되었고 이는 CD99L2가 면역반응과 GVHD 조절에 있어 CD99와 동시에 새로운 신약 타겟이 될 수 있음을 의미하기에 이를 밝히기 위한 연구가 필요하다.
- 또한, CD99-CD99의 homodimer와 CD99-CD99L2 heterodimer의 세포 내 위치차이는 두 dimer가 서로 다른 역할을 할 수 있는 가능성을 제기하는 사실이며 이에 따라 homodimer와 heterodimer의 역할 규명이 필요하다.
- CD99 적중 마우스를 이용한 염증 반응과 GVHD 모델에서 공통적으로 초기 반응의 변화를 관찰할 수 있었다. 즉, 이차 면역반응보다는 일차 면역반응에서 CD8 T 세포의 활성화에서의 차이가 컸고, CD99 적중 마우스 세포가 공여자인 GVHD 모델에서도 초기 체중 회복에 있어서 더 나은 양상을 보였다.
- GVHD 발병 시 각 장기별로 침윤된 세포의 수와 분획을 비교 분석한 결과 발병 초기에 CD99 적중 마우스를 이용한 모델에서 장기로 침윤된 면역세포의 수가 정상마우스를 이용한 모델에서보다 적은 것을 확인할 수 있었다.
- 이는 CD99의 생체 내 기능에 있어서 세포 이동 초기에 관여하고 있을 가능성을 의미하며 염증반응이나 GVHD 반응 초기에서 기능한다면 조절 타겟으로서의 가치를 더 높이게 된다.
- 따라서 CD99 적중 마우스를 이용한 CD99의 생체 내 역할 규명에 있어 면역반응과 GVHD 반응이 일어나는 시기를 구분하여 초기에 초점을 맞추고 기능을 연구할 필요가 있다.

2. 타 연구에의 응용

1) 활용분야 및 활용방안

- GVHD 조절기술은 조혈모 세포이식술의 확대에 이어지고 있을 수 있다.

- CD99를 타깃으로하는 항체 치료제, 혹은 세포치료제의 개발로 확대될 수 있다.
- GVHD 의 조절은 조혈모세포 이식 성공 및 암치료율의 제고로 확대될 것으로 기대된다.

2) 기대 효과

가. 기술적 측면

- 염증성 장기로의 활성화된 면역세포 및 선천성면역세포의 이동을 선택적으로 블로킹하는 방안은, 그동안 면역세포 활성화를 차단하는데 주요 약물이 개발된 것에 비추어 새로운 약물의 장을 여는 것이다.
- CD99 항원의 기능 분석과 세포 이동 차단 기술은 GVHD 뿐 아니라, 다른 염증성 질환 및 자가 면역질환 치료제 개발에 응용성을 갖는다.
- CD99를 타깃으로 하는 항체 치료제 개발로의 응용될 수 있다.

나. 경제·산업적 측면

- 이식편대숙주질환의 예방을 위한 전신성 면역 억제제 투여 및 항생제 사용을 대체할 수 있는 치료법 및 치료제 개발이 될 것이다.
- GVHD 조절은 개인마다의 맞춤형 치료에 해당하므로, 수입이 불가능한 시장을 독점이 가능할 수 있다.
- CD99를 타깃으로하는 항체 치료제의 개발이 이루어지면, 새로운 치료항체 상품화로 연결될 수 있다.
- 환자의 건강한 삶을 유지하면서, 장기 치료로 인한 치료비 절감 효과를 기대함.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. CD99 분자에 대한 연구

- 마우스 CD99 뿐 아니라 human CD99 단백질도 extracellular domain을 매개로 한 homodimer 가 형성됨이 보고되었다 (Lee et al., J. Microbiol Biotechnol. 18:472, 2008).
- 마우스 CD99 분자의 당화 (glycosylation)는 O-linked glycosylation이며, 이에 extracellular domain에 존재하는 아미노서열 45번째의 Threonin 기와 50 번째의 Threonin 기에 glycosylation 이 이루어지며, CD99 의 리간드 중의 하나로 밝혀진 PILR (paired Ig-like receptor) 와 상호작용에 있어서 CD99 의 glycosylation 이 중요함이 밝혀졌다 (Wang et al., J. Immunol 180: 1686, 2008).
- 마우스 CD99 분자와 PILR 과의 상호작용에 있어서, 불활성화 리간드인 PILRa 와의 상호작용이 활성화 리간드인 PILRb 와의 상호작용보다 친화력이 높으며, T45A 변이체, T50A 변이체 각각이 PILR a 와 반응할 수 있는 반면, PILFb 와는 T45A 변이체가 반응할지 못함이 보고되었다 (Tabata et al., J. Biol. Chem. 283: 8893, 2008). 이 결과는 CD99 단백질의 당화와 각 리간드 반응이 유연하고 리간드마다 각기 반응한다는 것을 제시한다.
- 따라서, CD99 homodimer 형성에 O-linked glycosylation 이 어떠한 영향을 줄 수 있는가에 대한 해답의 필요성이 제기되었다.
- 인간 CD99 단백질과 마찬가지로, 마우스 CD99 단백질에 대한 항체 처리가 transendothelial crossing을 방해함이 보고되었음 (Dufour et. al., Cell Commun. & Adhes. 2008).
- 인간 CD99 단백질이 HLA class I 단백질의 세포표면으로의 이동에 중요한 역할을 담당함이 보고되었다. CD99의 발현이 저하된 Jourkat T 세포에서 HLA-class I 단백질의 발현이 저하되며, CD99 단백질과 HLA class I 단백질이 CD99 단백질의 transmembrane domain 매개의 상호작용을 하고 있으며, CD99 단백질인 trans-golgi 와 cytosol 사이에 cycling을 하는 p230 단백질과 상호작용하고 있음이 보고되었음 (Bremond, et. al, Blood 2009).
- 인간 CD99 단백질이 인간 백혈구 세포가 돼지 유래의 endothelium의 crossing 에 관련되었음이 보고되었음 (Schneider, JK, et. al. Transplantation 2009).

2 CD99L 분자에 대한 연구

- CD99 단백질의 paralog 인 CD99L2가 2003 년 클로닝 되었으며, 두개의 isoform 이 발표되었음 (Suh et al., Gene 307: 63, 2003). 이후 최근 마우스와 인간 CD99L2 유전자의 클로닝과 그 기능이 homophilic interaction을 통한

leukocyte 의 endothelial line을 통과하는 transmigration 후 염증 부위로의 이동과 밀접한 관련이 있음이 보고되었다 (Schenkel et al., Cell Communication and Adhesion, 13: 220, 2007). 이 결과는 CD99L2 단백질의 생화학적 특성과 CD99 단백질의 생화학적 특성 및 분자 간 상호작용에 대한 연구 필요성을 다시 한 번 제기한 것이라 하겠다.

- CD99와 CD99L2 단백질에 대한 항체 처리로 인해 neutrophil의 transendothelial migration이 방해되고 이때 CD99와 CD99L2가 같은 위치에서 작용하고 있음이 보고되었음. (Bixel et. al., Blood. 2010)

3. CD99 분자와 마우스 질병 모델에 대한 연구

- 대동맥 (large artery) 의 만성염증 중의 하나인 죽상경화증 (Atherosclerosis) 는 백혈구가 혈관벽으로 recruit 되어 경화성 병변 (Atherosclerotic plaque) 형성됨으로써 발병되는 질환이다. CD99 단백질이 leukocyte와 내피세포의 상호작용에 관련되어 extravasation 에 작용한다는 사실에 기초하여, 마우스 CD99 단백질에 대한 vaccination을 시도한 결과 lipoprotein receptor 결핍 마우스에서 atherogenesis 가 저해됨이 보고되었다 (Wanrooij, Cardiovasc Res. 2008). 이 결과는 CD99 단백질을 세포 이동에 대한 타깃으로 이용한 질환 적용의 첫 모델이라 할 수 있다.

4. 세포이동과 이식편대 숙주질환의 관련성 연구

- 급성 이식편대 숙주 질환은 공여자 T 세포가 숙주의 위장관, 간, 피부등의 타겟 기관을 공격함으로써 발생되는데, 이때 특정 이차 면역기관로의 T 세포 진입을 방해하거나, 특정 이차 면역장기의 제거로는 급성 이식편대 숙주질환을 예방할 수 없으며, 대신 모든 이차 면역장기로의 진입을 방해하거나, 혹은 모든 이차 면역기관을 제거하는 경우에 발병이 저해됨이 보고되었다 (Beilhack. Blood. 2008).
- 이 결과는 모든 T 세포의 특정 면역기관에 대한 진입을 방해하는 것은 오히려 공여된 조혈모세포의 정착에 방해가 될 수 있는 위험을 내재하고 있으므로, 활성화된 T 세포의 선별적인 타겟 장기로의 이동을 방해하는 것이 질환 예방에 더 효과적일 수 있음을 시사한다.
- 따라서, 이 보고는 활성화 후 발현되는 CD99 단백질의 기능 조절 혹은 vaccination 이 급성 이식 편대 숙주 질환의 예방에 더 효과적일 수 있다는 타겟 장기로의 이동과 CD99 단백질의 상관관계에 대한 본 연구 목표를 지지하는 보고라 할 수 있다.

제 7 장 참고문헌

Beilhack A, Schulz S, Baker J, Beilhack GF, Nishimura R, Baker EM, Landan G, Herman EI, Butcher EC, Contag CH, Negrin RS. (2008) Prevention of acute graft-versus-host disease by blocking T-cell entry to secondary lymphoid organs. *Blood* 111(5):2919-28.

Bixel MG, Li H, Petri B, Khandoga AG, Khandoga A, Zarbock A, Wolburg-Buchholz K, Wolburg H, Sorokin L, Zeuschner D, Maerz S, Butz S, Krombach F, Vestweber D.(2010) CD99 and CD99L2 act at the same site as, but independently of, PECAM-1 during leukocyte diapedesis. *Blood*. (ahead of print)

Brémond A, Meynet O, Mahiddine K, Coito S, Tichet M, Scotlandi K, Breittmayer JP, Gounon P, Gleeson PA, Bernard A, Bernard G. (2008) Regulation of HLA class I surface expression requires CD99 and p230/golgin-245 interaction..*Blood*. 113(2):347-57.

Choi G, Lee SW, Jung KC, Choi EY. (2007) Detection of homodimer formation of CD99 through extracellular domain using bimolecular fluorescence complementation analysis. *Exp Mol Med*. 39(6):746-55.

Dufour EM, Deroche A, Bae Y, Muller WA.(2008) CD99 is essential for leukocyte diapedesis in vivo. *Cell Commun Adhes*. 15(4):351-63.

Ferrara JL, Deeg HJ. (1991) Graft-versus-host disease. *N Engl J Med*. 324(10):667-74.

Hill GR, Ferrara JL. (2000) The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 95(9):2754-9.

Lee MK, Kim HS, Kim SS, Cho MH, Lee IS. (2008) Analysis of the dimerization of human CD99 using bimolecular fluorescence complementation technique. *J Microbiol Biotechnol*. 18(3):472-6.

Lou O, Alcaide P, Luscinskas FW, Muller WA. (2007) CD99 is a key mediator of the transendothelial migration of neutrophils. *J Immunol*. 178(2):1136-43.

Schneider MK, Ghielmetti M, Rhyner DM, Antsiferova MA, Seebach JD. (2009) Human leukocyte transmigration across Gal α (1,3)Gal-negative porcine endothelium is regulated

by human CD18 and CD99. *Transplantation*. 87(4):491-9.

Schenkel AR, Dufour EM, Chew TW, Sorg E, Muller WA.(2007) The murine CD99-related molecule CD99-like 2 (CD99L2) is an adhesion molecule involved in the inflammatory response. *Cell Commun Adhes.* 14(5):227-37.

Suh YH, Shin YK, Kook MC, Oh KI, Park WS, Kim SH, Lee IS, Park HJ, Huh TL, Park SH. (2003) Cloning, genomic organization, alternative transcripts and expression analysis of CD99L2, a novel paralog of human CD99, and identification of evolutionary conserved motifs. *Gene* 307:63-76.

Tabata S, Kuroki K, Wang J, Kajikawa M, Shiratori I, Kohda D, Arase H, Maenaka K. (2008) Biophysical characterization of O-glycosylated CD99 recognition by paired Ig-like type 2 receptors. *J Biol Chem.* 283(14):8893-901.

Wang J, Shiratori I, Satoh T, Lanier LL, Arase H. (2008) An essential role of sialylated O-linked sugar chains in the recognition of mouse CD99 by paired Ig-like type 2 receptor (PILR). *J Immunol.* 180(3):1686-93.

van Wanrooij EJ, de Vos P, Bixel MG, Vestweber D, van Berkel TJ, Kuiper J. (2008) Vaccination against CD99 inhibits atherogenesis in low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Cardiovasc Res.* 78(3):590-6.

주 의

1. 이 보고서는 교육과학기술부에서 시행한 신약개발연구사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 교육과학기술부에서 시행한 사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.