

편집순서 1

(뒷면)

(앞면)

<div data-bbox="260 1160 469 1272" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin: 10px auto; width: fit-content;">                 주 의 (편집순서 8)             </div> <div data-bbox="245 1435 491 1467" style="margin-top: 100px;">                 (15 포인트 고딕계열)             </div> <div data-bbox="344 1491 392 1570" style="text-align: center; margin-top: 10px;">                 ↑ 6cm ↓             </div>	2008-2005337  C형간염바이러스 만성감염에서 소모성 T세포 조절타겟 발굴 교육과학기술부  ↑ 3cm ↓	보안과제( ), 일반과제( O )      2008-2005337 <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">                     5cm ↓                 </div> 신약타겟발굴검증사업 (18 포인트 고딕계열) (Research Program for New Drug Target Discovery)  C형간염바이러스 만성감염에서 소모성 T세포 조절타겟 발굴 (17 포인트 고딕계열) (Identification of regulatory target for exhausted T cell in chronic hepatitis C virus infection)  (15 포인트 명조계열)  한국과학기술원 (17 포인트 명조계열)  <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">                     ↑ 9cm ↓                 </div> 교 육 과 학 기 술 부 (17포인트 명조계열)  <div style="text-align: center; margin-top: 10px;">                     ↑ 4cm ↓                 </div>
--	--	---

편집순서 2 제출문

제 출 문

교육과학기술부 장관 귀하

이 보고서를 "신약타겟발굴검증사업에 관한 연구"과제(세부과제 "C형간염바이러스 만성감염에서 소모성 T세포 조절타겟 발굴에 관한 연구")의 보고서로 제출합니다.

20 11 . 9 .5

주관연구기관명 : 한국과학기술원

주관연구책임자 : 신 의 철

연구원 : 장 동 엽

연구원 : 최 윤 석

연구원 : 유 수 성

연구원 : 이 진 오

협동연구기관명 :

협동연구책임자 :

보고서 요약서

과제고유번호	2008- 2005337	해당단계 연구기간	2008.10.01 2011.07.15	단계구분	(해당단계)/ (총 단계)
연구사업명	중사업명	미래기반기술개발사업			
	세부사업명	신약타겟발굴검증사업			
연구과제명	대과제명	대과제가 있을 경우에는 기재			
	세부과제명	C형간염바이러스 만성감염에서 소모성 T세포 조절 타겟 발굴			
연구책임자	신의철	해당단계 참여 연구원수	총 : 5명 내부 : 5명 외부 : 명	해당단계 연구비	정부:206000천원 기업 : 천원 계: 206000천원
		총연구기간 참여 연구원수	총 : 15명 내부 : 15명 외부 : 명	총연구비	정부:206000천원 기업 : 천원 계: 206000천원
연구기관명 및 소속부서명	한국과학기술원 의과학대학원		참여기업명		
국제공동연구 위탁연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)				보고서면수	49
<p>본 연구에서는 다양한 C형간염 환자의 말초혈액림프구를 이용하여,</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 각 환자에게 적합한 MHC class I tetramer/pentamer를 제작하고</li> <li>2) Tetramer/pentamer 염색을 시행하여 HCV-특이 CD8 T세포를 분리하고</li> <li>3) 분리된 HCV-특이 CD8 T세포를 이용하여 real-time PCR array를 시행하여 소모성 T세포 관련인자인자를 스크리닝하고</li> <li>4) 스크리닝을 통하여 발굴된 인자를 FACS 분석을 이용하여 확인하고</li> <li>5) 발굴된 인자의 기능을 차단하면 소모성 T세포를 기능성 T세포로 전환시킬 수 있는지 여부를 테스트하였음</li> </ol>					
색인어 (각 5개 이상)	한글	C형간염바이러스, 만성 C형간염, 소모성 T세포, 기능성 T세포, 조절인자			
	영어	hepatitis C virus, chronic hepatitis C, exhausted T cell, functional T cell, regulatory factor			

## 요 약 문

### I. 제 목

C형간염바이러스 만성감염에서 소모성 T세포 조절타겟 발굴

### II. 연구개발의 목적 및 필요성

1) C형간염바이러스(HCV) 만성/지속성 감염에서는 제 기능을 하지 못하는 "소모성 T세포 (exhausted T cell)"가 특징적으로 나타나며, 이는 HCV 만성감염의 원인으로 여겨지고 있음

2) 본 연구에서는 HCV 만성감염에서 관찰되는 소모성 T세포의 결정 인자 및 조절인자를 발굴하여 신약개발의 타겟으로 삼고자 함

### III. 연구개발의 내용 및 범위

본 연구에서는 다양한 C형간염 환자의 말초혈액림프구를 이용하여,

- 1) 각 환자에게 적합한 MHC class I tetramer/pentamer를 제작하고
- 2) Tetramer/pentamer 염색을 시행하여 HCV-특이 CD8 T세포를 분리하고
- 3) 분리된 HCV-특이 CD8 T세포를 이용하여 real-time PCR array를 시행하여 소모성 T세포 관련인자/인자를 스크리닝하고
- 4) 스크리닝을 통하여 발굴된 인자를 FACS 분석을 이용하여 확인하고
- 5) 발굴된 인자의 기능을 차단하면 소모성 T세포를 기능성 T세포로 전환시킬 수 있는지 여부를 테스트하였음

#### IV. 연구개발결과

- 1) 각 HCV 환자에서 HCV 펩타이드 매트릭스법과 IFN- $\gamma$  ELISpot을 이용하여 HCV T세포항원을 결정하였음
- 2) 환자 맞춤형 MHC class I tetramer 주문 제작하여 HCV-특이 T세포를 검출하였음
- 3) MHC class I tetramer 및 Cytokine secretion assay를 이용하여 HCV-특이 CD8 T세포를 분리하였음
- 4) Microarray를 이용하여 소모성 T세포 조절인자를 스크리닝하였음. 그 결과, PD-1, IL-10, TIM-3, CTLA-4, LAG-3 등이 조절타겟 후보로 확인되었음
- 5) HCV-특이 T세포에서 PD-1, TIM-3, CTLA-4 등의 조절타겟이 발현됨을 FACS 분석으로 확인하였음
- 6) 차단항체 또는 수용성수용체를 이용하여 조절타겟의 기능을 차단하고 소모성 T세포의 기능 회복을 평가한 결과, PD-1, IL-10, TIM-3가 향후 신약타겟으로서 가능성이 있음을 알게 되었음

#### V. 연구개발결과의 활용계획

- 1) 본 연구를 통하여 HCV 만성감염에서 나타나는 소모성 T세포 결정인자 및 조절타겟을 발굴하게 되어, 만성C형간염에 대한 신약개발의 타겟으로 바로 이용가능하게 되었음
- 2) PD-1, IL-10, TIM-3를 타겟한 차단항체 또는 수용성수용체를 신약후보로 개발하려 함

S U M M A R Y

(영 문 요 약 문)

In chronic persistent hepatitis C virus (HCV) infection, dysfunctional exhausted T cells are observed, and they are considered as a cause of chronic infection of HCV. In the present study, we identified regulating factor(s)/determining factor(s) of the exhausted T cells in chronic HCV infection as a target for new anti-HCV drug development.

We studied the following points by using the peripheral blood lymphocytes of patients with acute/chronic hepatitis C and spontaneously recovered patients.

- 1) Acquisition of tailor-made MHC class I tetramers for HCV patients
- 2) Isolation of HCV-specific T cells by using MHC class I tetramers
- 3) Screening of regulating factor(s)/determining factor(s) of the exhausted T cells by microarray
- 4) Confirmation of the identified factor(s) by FACS analysis
- 5) Test of blocking antibody or soluble receptor for the identified factors for functional restoration of exhausted T cells.

We can utilize the identified regulating factor(s)/determining factor(s) of the exhausted T cells for the development of new anti-HCV drugs.

C O N T E N T S

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction	09
Chapter 2. Status of the Research in the Field	13
Chapter 3. Results	15
Chapter 4. Achievement of the Goals	27
Chapter 5. Plan	31
Chapter 6. Acquired Information	33
Chapter 7. References	37

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	09
제 2 장 국내외 기술개발 현황	13
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	15
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	27
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	31
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	33
제 7 장 참고문헌	37

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 1절 만성 바이러스성 간염 실태

1. 전세계적으로 만성 바이러스성 간염은 공중보건학적 위협이 되고 있음. 현재 전세계에서 약 1억 7천만 명이 C형간염바이러스(hepatitis C virus: HCV)에, 약 3억 5천만 명이 B형간염바이러스(hepatitis B virus: HBV)에 감염되어 있음
2. HCV나 HBV에 만성감염되면 만성간염의 시기를 거쳐 간경변증이나 간암으로 사망할 확률이 증가함. 즉, 만성 바이러스성 간염은 환자의 morbidity와 mortality를 증가시켜 의학 및 보건학적 문제뿐만 아니라 사회적 문제를 야기함
3. 한국에서 만성 바이러스성 간염 실태
  - 가. WHO의 조사에 의하면, 만성 간질환으로 인해 연간 140만 명이 사망하고 있고, 미국에서는 전체 사망 원인의 9위를 차지하고 있음. 우리나라는 간질환으로 인한 사망률이 OECD 국가 중 1위라는 불명예를 지켜오고 있음
  - 나. 2002년 통계청 발표에 의하면 우리나라의 간질환은 국민전체의 5대 사망원인 (뇌혈관질환, 심장질환, 교통사고, 암, 만성 간질환) 중 하나로, 활발한 사회 활동이 요구되는 40대, 50대 남성에서 만성 간질환이 사망원인 2위를 차지하고 있음
  - 다. 2004년도 요양급여 비용자료를 검토하면, 우리나라에서 간질환으로 인한 요양급여지출 총액은 약 3550억원이며 실인원수 약 166만명임
  - 라. 한국보건사회연구원이 '5대 사망 질병의 사회, 경제적 비용 추계: 2001년' 이란 주제로 '보건복지포럼'에 발표(2003년 5월)한 자료에 따르면, 간질환의 사회, 경제적 비용이 약 2조 6201억원으로 암 다음으로 높은 것으로 나타났음. 여기에 간질환에서 비롯된 간암까지 고려한다면 그 비용은 더욱 늘어날 것으로 예상됨
4. 현재 만성 바이러스성 간염의 문제점
  - 가. HBV의 경우, 효과적인 예방백신이 개발되어 있으나 이미 감염되어 있는 환자는 간경변증과 간암 발생에 취약한 상태로써 적극적인 의료 대책이 필요함
  - 나. HCV의 경우, 아직까지 예방백신이 개발되지 않은 상태로 새로운 감염을 효과적으로 제어하지 못하는 실정임

## 2절 C형간염 바이러스 및 면역반응 특성

1. C형간염 바이러스(HCV)는 Flaviviridae 과(family)의 Hepacivirus 속(genus)에 속하는 양의 방향(positive-sense) 단일 가닥(single-stranded) RNA 바이러스로서, 전 세계에서 1억 7천만 명의 사람들이 이 바이러스에 감염되어 있음(1)
2. 약 10-60%의 환자가 급성 감염에서 저절로 회복되지만(2), 나머지 환자에서는 만성 지속성 감염으로 이행되어 간경화나 간세포성 간암이 발생하게 됨(3)
3. 환자 연구(4-6)와 유일한 HCV 감염의 동물 모델인 침팬지 연구(7,8)에서 밝혀진 바로는 HCV 감염의 자연 회복(spontaneous resolution)은 지속되는 왕성한 바이러스-특이 T세포 반응과 관련되어 있음. 반면에 만성 HCV 감염으로의 진행은 바이러스-특이 T세포의 짧고 약한 반응과 관련됨(4-8)
4. 불충분한 분열증식, 세포용해능, 및 사이토카인 생성능력과 같은, HCV-특이 T세포의 여러 기능장애는 일반적으로 HCV 감염의 만성 단계에서 관찰됨(9,10)
5. 세포성 면역 반응의 저하는 T세포 에피토프(T-cell epitope)의 돌연변이(11-13), T세포의 편향된 분화(14), 조절 T세포의 억제 기능(15) 때문임
6. 인간에서는 B형간염바이러스(HBV), 인간면역결핍 바이러스(HIV)에 의한 감염과 마우스에서는 림프구성 맥락수막염바이러스(lymphatic chorio-meningitis virus; LCMV) 감염과 같은 다른 만성 지속성 바이러스 감염에서도 기능 장애가 있는 T세포가 관찰됨(16)
7. 최근 T세포 기능장애의 새로운 기전이 마우스 모델의 만성 LCMV 감염 모델에서 밝혀졌음(17)
  - 가. 마우스에서 기능장애가 있는 LCMV-특이 CD8 T세포에서 PD-1이 과 발현되어 있었음(17)
  - 나. 생체 내에서 PD-1과 그 리간드(ligand)인 PD-L1의 상호작용을 차단하였더니, LCMV-특이 CD8 T세포가 기능을 회복하였으며 바이러스 역가(viral titer)가 감소하였음(17)
  - 다. 이 발견은 인간 만성 바이러스 감염에서 T세포 조절에 대한 PD-1의 역할에 대한 광범위한 연구로 이어졌음(16)
  - 라. 더욱 최근에, CTLA-4, TIM-3와 같은 다른 억제 수용체도 연구되었으며, 이 수용체들이 만성 바이러스 감염에서 T세포 기능 장애를 조장한다는 사실이 밝혀졌음

### 3절 만성 C형간염에서 T세포 억제분자의 중요성

#### 1. 만성 C형간염의 치료 동향

- 가. 만성 HCV 감염의 치료는 페그인터페론과 리바비린의 병합요법에 의존하고 있으나, 장기간 치료를 해야 하며 발열, 골수억제, 우울증 등의 심각한 부작용을 동반함
- 나. 전반적으로는 50-80%의 치료 성공률을 보이나, 우리나라나 다른 선진국에 가장 많은 1형 유전자형 HCV의 경우에는 50%의 환자만이 치료되고 50%는 치료에 실패함
- 다. 어떤 환자가 치료에 성공하고 실패할 것인지 정확히 예측하지 못하여 비효율적인 치료를 시행하고 있는 실정임
- 라. 치료 전이나 치료 초기에 HCV 환자의 최종 치료결과를 예측할 수 있는 예후인자 개발이 필요함
- 마. 항바이러스 치료제의 세계시장 규모는 2005년 17,493백만 달러로 2015년에는 70769백만 달러 규모로 성장할 것으로 예상된다(BT 기술동향 보고서 121권, 국가생명공학정책연구센터). 이중 약 50%를 HBV 및 HCV 등의 간염바이러스 치료제가 차지하고 있다. 현재 사용되는 항바이러스제는 인터페론 제제를 제외하고는 모두 바이러스에 직접 작용하는 화합물(small chemical) 제제로서 근본적으로 내성바이러스의 문제에 직면해 있음

#### 2. 만성 C형간염에서 T세포 억제분자의 중요성

- 가. HCV 감염이 만성감염으로 지속되는 것은 이들 바이러스에 반응하는 T세포의 기능저하 때문으로 여겨짐
- 나. 활발한 연구에도 불구하고, 몇 년 전까지만 해도 왜 HCV 감염 때 T세포의 기능이 저하되는지 그 이유를 밝히지 못 했음
- 다. 2006년에, 마우스의 LCMV 만성감염에서는 바이러스-특이 CD8 T세포 표면에 T세포 억제분자가 과발현되어 있고, 이 억제분자들 때문에 T세포의 기능이 저하된다는 것이 밝혀짐
- 라. 더욱 흥미있는 것은, 차단항체(blocking antibody)를 이용하여 T세포 억제분자의 기능을 차단하면 T세포의 항-바이러스 기능이 회복되어 바이러스 역가가 감소한다는 사실임. 이에 따라 T세포 억제분자가 항-바이러스 치료의 새로운 치료타겟으로 각광을 받음
- 마. C형간염에서도 바이러스-특이 CD8 T세포 표면에 T세포 억제분자가 과발현되어 있다고 보고되고 있음. 하지만 아직 다양한 C형간염 환자군에서 T세포 억제분자의 임상적 의의는 체계적으로 연구된 바 없음
- 바. 또한, T세포 억제분자의 발현이 C형간염의 치료반응과 밀접한 관련이 있다고 보고되기 시작함. 이는 치료반응 예후인자로서 T세포 억제분자의 효용성 여부를 평가해야 함을 시사함

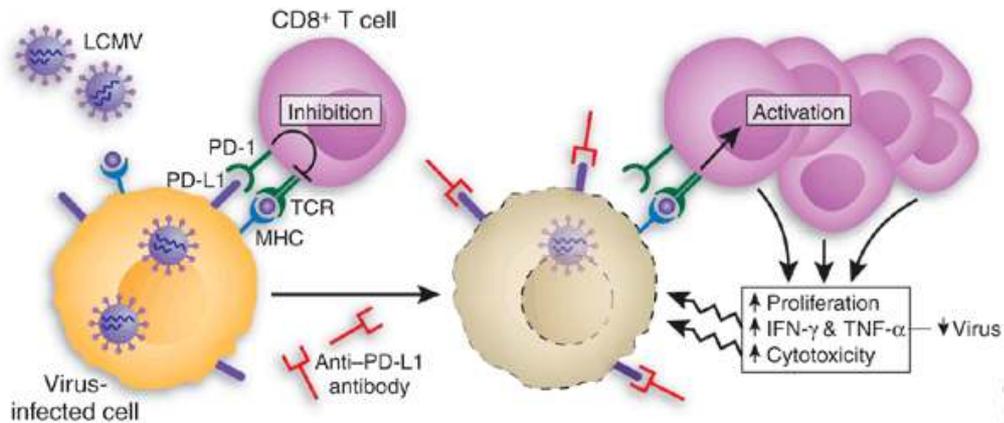


그림 1. 바이러스 만성감염시에 CD8 T세포 표면에 PD-1이라는 T세포 억제분자가 과발현되어 T세포의 기능을 억제하며, 그 기능을 항체로 차단하면 T세포의 항-바이러스 기능이 회복되어 바이러스 역가가 감소함

### 3. 만성 C형간염에서 세포면역학적 예후인자 개발의 중요성

- 가. 현재까지는 주로 바이러스의 돌연변이, 유전자형 또는 바이러스 역가와 같은 바이러스 인자들이 C형간염의 임상지표나 치료반응 예후인자로 이용되고 있음
- 나. 최근 환자 개개인의 유전자의 중요성이 부각되면서 SNP와 같은 숙주 인자들에 대한 연구가 많이 진행되고 있으나 아직은 숙주의 유전학적 인자 연구에 국한되어 있음
- 다. HCV 만성감염이 바이러스-특이 T세포 기능저하 때문임을 고려하면 T세포의 기능을 반영하는 세포면역학적 임상지표나 예후인자가 매우 중요할 것으로 생각됨. 하지만 아직까지 좋은 세포면역학적 임상지표나 예후인자는 개발된 바 없음
- 라. 최근 C형간염에서 T세포 억제분자들의 중요성이 밝혀지고 있으므로 T세포 억제분자의 성질을 이용한 면역학적 임상지표나 예후인자는 매우 유용할 것으로 기대됨

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 1절 HCV 관련 국내 기술개발 현황

1. HCV에 대한 분자바이러스학 기초연구는 세계 수준에 근접하고 있음.다
  - 가. 최근 국내의 분자바이러스학 연구자들의 지속적인 연구로 인해 분자바이러스학 기초연구는 세계 수준에 근접하고 있음
  - 나. HCV의 경우 포항공대, 한림대, 고려대, 연세대 등의 연구진이 기초연구를 활발히 진행하고 있음
2. HCV에 대한 바이러스 면역학적 접근은 제한적으로 수행되고 있음
  - 가. 국내에서 HCV에 대한 분자바이러스학적 연구는 활발히 수행되는 반면, 바이러스 면역학적 연구는 몇몇 연구팀에서만 제한적으로 수행되고 있음. 포항공대 및 카이스트의 연구진 등이 수행하고 있음
  - 나. 한편 사람의 만성 바이러스 감염은 아니지만, 마우스에서 만성 지속성 감염을 일으키는 LCMV를 이용한 바이러스 면역학 연구가 최근 연세대 연구진에 의해 활발히 수행되기 시작함
3. 국내에서 글로벌 수준의 항바이러스 신약이 개발된 바는 없음
  - 가. 그 동안 국내에서 개발된 항바이러스 신약으로서 가장 성공적이었던 것은 부광약품의 클레부딘 (상품명: 레보비르)이었음. 그러나, 안타깝게도 근육병증 등의 부작용 문제 때문에 글로벌 수준으로 성장하지는 못하였음. 이외에도 한국화학연구원 연구팀이 HIV 치료제를 개발하여 미국 길리어드사에 기술이전을 한 바 있고, 이문메드는 인터페론의 한계점을 극복할 수 있는 VSF를 개발하여 임상시험을 추진하고 있음

### 2절 HCV 관련 국외 기술개발 현황

1. HCV, HBV, HIV 등에 의한 만성 지속성 바이러스 감염에서는 항바이러스 기능을 제대로 하지 못하는 dysfunctional T세포가 특징적으로 관찰됨
  - 가. 이러한 사실은 이전부터 알려져 왔으나, 2006년에 Emory University의 Rafi Ahmed 박사팀의 연구에 의해 PD-1이라는 T세포 억제분자가 dysfunctional T세포에 과발현되어 있고 blocking Ab를 이용해 PD-1의 기능을 차단하면 T세포의 기능이 회복되면서 바이러스의 역가가 감소한다는 사실이 처음으로 밝혀짐
  - 나. 이 연구는 만성 바이러스 감염에서 T세포 억제분자의 중요성을 밝히는데 그치지 않고 T세포 억제분자가 바이오신약 개발의 타겟으로 이용될 수 있음을 보여 준 연구였음. 즉, PD-1과 같은 T세포 억제분자의 기능을 차단하는 항체나 수용성 수용체(soluble receptor)를 항바이러스 바이오신약으로 개발할 수 있는 가능성을 제시하게 되었음
  - 다. 2006년도의 상기 연구는 마우스의 LCMV 만성감염 모델에서 이루어진

것이었지만, 그 후 HIV, HCV, HBV 등의 만성감염 환자의 말초혈액 림프구를 이용한 in vitro 연구에서도 PD-1이 dysfunctional T세포에 과발현되어 있고 blocking Ab를 이용해 in vitro에서 PD-1의 기능을 차단하면 T세포의 기능이 회복됨이 증명되었음

- 라. 이러한 원리에 따라, HIV의 원숭이 모델인 SIV 감염 원숭이에서 anti-PD-1 항체를 이용하여 PD-1의 기능을 in vivo에서 차단하였더니 SIV의 역가가 감소하였다는 연구가 발표되었음
2. 하지만, 최근에 시행된 만성 C형간염 침팬지 in vivo 실험에서는 anti-PD-1 항체가 T세포의 기능을 회복시키지 못하였고 HCV 바이러스 역가를 감소시키지 못하였음(personal communication with Dr. Christopher Walker, Ohio State University)
3. 이러한 연구결과는 같은 만성 바이러스 감염이라 하더라도 마우스와 사람은 다를 수 있으므로, PD-1과 같은 T세포 억제분자들을 마우스에서 찾는 것보다는 직접 만성 바이러스 감염 환자의 T세포에서 발굴해야 한다는 사실을 알 수 있음. 이와 같은 생각으로 많은 연구자들이 항바이러스 바이오신약 타겟으로 이용 가능한 T세포 억제분자들을 스크리닝하고 있음
4. 만성 바이러스 감염에서 T세포 기능저하가 주요 원인이라는 것이 규명되면서 T세포의 활성을 조절하여 만성 바이러스 감염을 치료하려는 시도들이 활발해지고 있음. 이러한 연구들에 있어 한 가지 중요한 점은 누가 가장 좋은 치료용 조절타겟을 발굴하느냐 하는가에 있음
5. 일단 좋은 조절타겟이 발굴되면 인간화 차단항체나 수용성 수용체(soluble receptor)를 이용하여 새로운 치료제를 개발하는 것은 비교적 용이한 일로 여겨지고 있음
6. 따라서 앞으로의 경쟁은 “누가 T세포의 가장 좋은 조절타겟을 발견하는가?”하는 질문으로 압축된다고 여겨지고 있음

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1절 C형간염 환자에서 T세포항원 결정

1. 다양한 C형간염 환자들에서 각 환자 맞춤형 T세포항원을 펩타이드 매트릭스법으로 결정함
2. C형간염바이러스 펩타이드 매트릭스 구성
  - 가. HCV의 전체 단백체에 대한 T세포반응을 측정하기 위해, HCV 전체 단백질(3000 아미노산)에 해당하는 600개의 중복 펩타이드 시리즈를 고안하여 구입함
  - 나. 각각의 중복 펩타이드는 15 아미노산으로 구성되며, 이웃한 펩타이드와 10 아미노산이 중복되게 고안함
  - 다. 600개의 중복 펩타이드를 매트릭스법에 의거하여 배열을 하고, 이에 따른 49개(A부터 Y까지, 그리고 AA부터 XX까지)의 펩타이드 혼합물을 제조함 (그림 1)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X
AA	1	26	51	76	101	126	151	176	201	226	251	276	301	326	351	376	401	426	451	476	501	526	551	576
BB	2	27	52	77	102	127	152	177	202	227	252	277	302	327	352	377	402	427	452	477	502	527	552	577
CC	3	28	53	78	103	128	153	178	203	228	253	278	303	328	353	378	403	428	453	478	503	528	553	578
DD	4	29	54	79	104	129	154	179	204	229	254	279	304	329	354	379	404	429	454	479	504	529	554	579
EE	5	30	55	80	105	130	155	180	205	230	255	280	305	330	355	380	405	430	455	480	505	530	555	580
FF	6	31	56	81	106	131	156	181	206	231	256	281	306	331	356	381	406	431	456	481	506	531	556	581
GG	7	32	57	82	107	132	157	182	207	232	257	282	307	332	357	382	407	432	457	482	507	532	557	582
HH	8	33	58	83	108	133	158	183	208	233	258	283	308	333	358	383	408	433	458	483	508	533	558	583
II	9	34	59	84	109	134	159	184	209	234	259	284	309	334	359	384	409	434	459	484	509	534	559	584
JJ	10	35	60	85	110	135	160	185	210	235	260	285	310	335	360	385	410	435	460	485	510	535	560	585
KK	11	36	61	86	111	136	161	186	211	236	261	286	311	336	361	386	411	436	461	486	511	536	561	586
LL	12	37	62	87	112	137	162	187	212	237	262	287	312	337	362	387	412	437	462	487	512	537	562	587
MM	13	38	63	88	113	138	163	188	213	238	263	288	313	338	363	388	413	438	463	488	513	538	563	588
NN	14	39	64	89	114	139	164	189	214	239	264	289	314	339	364	389	414	439	464	489	514	539	564	589
OO	15	40	65	90	115	140	165	190	215	240	265	290	315	340	365	390	415	440	465	490	515	540	565	590
PP	16	41	66	91	116	141	166	191	216	241	266	291	316	341	366	391	416	441	466	491	516	541	566	591
QQ	17	42	67	92	117	142	167	192	217	242	267	292	317	342	367	392	417	442	467	492	517	542	567	592
RR	18	43	68	93	118	143	168	193	218	243	268	293	318	343	368	393	418	443	468	493	518	543	568	593
SS	19	44	69	94	119	144	169	194	219	244	269	294	319	344	369	394	419	444	469	494	519	544	569	594
TT	20	45	70	95	120	145	170	195	220	245	270	295	320	345	370	395	420	445	470	495	520	545	570	595
UU	21	46	71	96	121	146	171	196	221	246	271	296	321	346	371	396	421	446	471	496	521	546	571	596
VV	22	47	72	97	122	147	172	197	222	247	272	297	322	347	372	397	422	447	472	497	522	547	572	597
WW	23	48	73	98	123	148	173	198	223	248	273	298	323	348	373	398	423	448	473	498	523	548	573	598
XX	24	49	74	99	124	149	174	199	224	249	274	299	324	349	374	399	424	449	474	499	524	549	574	599
YY	25	50	75	100	125	150	175	200	225	250	275	300	325	350	375	400	425	450	475	500	525	550	575	600

그림 1. 600개의 중복 펩타이드를 이용한 HCV 펩타이드 매트릭스 구성

- 라. 각각의 중복 펩타이드는 적어도 2개의 펩타이드 혼합물에 포함되게 디자인함
  - 마. 이러한 매트릭스법에 의해, 49개의 펩타이드 혼합물에 의한 실험을 시행하여, 600개의 펩타이드 중 어느 것이 특정 환자에서 T세포항원으로 작용하는지 쉽게 식별 하였음
3. 각 환자에서 T세포항원 결정
    - 가. HCV에 만성감염된 환자 또는 침팬지(침팬지 샘플은 미국 NIH와의 공동연구로 확보)로부터 PBMC를 분리한 후, HCV 펩타이드 매트릭스를 이용한 IFN- $\gamma$  ELISpot assay를 시행함
    - 나. 이 결과 HCV에 감염된 각 환자나 침팬지에서 HCV T세포항원을 결정함(그림 2,그림 3)

- 다. 15명의 HCV 환자로부터 전 HCV 프로테옴에 걸친 스크리닝을 통해 적어도 각 환자당 1개 이상의 T세포항원을 발굴함
- 라. 침팬지의 경우, 유사한 실험을 5마리의 침팬지(3마리는 HCV 만성감염에 이환되고, 2마리는 HCV로부터 자연회복됨)에서 시행하여 각 침팬지마다 적어도 1개 이상의 T세포항원을 발굴함

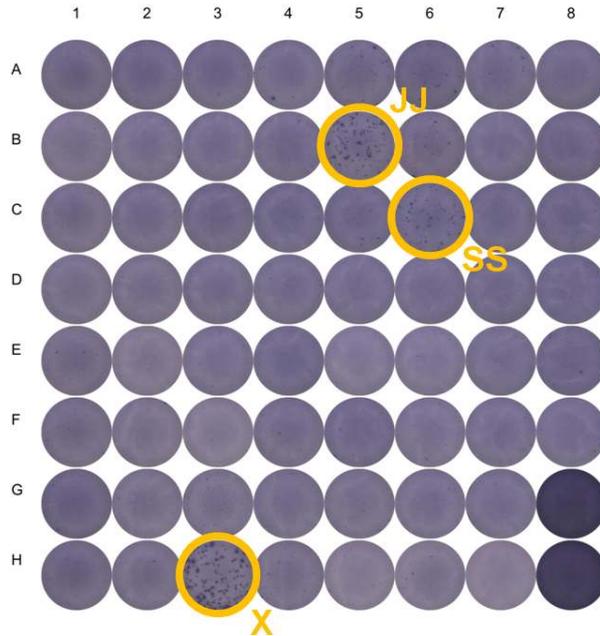


그림 2. HCV에 만성감염된 환자의 PBMC에서 HCV 펩타이드 매트릭스를 이용하여 IFN- $\gamma$  ELISpot assay를 시행함. 그 결과 펩타이드 믹스 X, JJ, SS에서 강한 양성반응을 보임

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X
AA	1	26	51	76	101	126	151	176	201	226	251	276	301	326	351	376	401	426	451	476	501	526	551	576
BB	2	27	52	77	102	127	152	177	202	227	252	277	302	327	352	377	402	427	452	477	502	527	552	577
CC	3	28	53	78	103	128	153	178	203	228	253	278	303	328	353	378	403	428	453	478	503	528	553	578
DD	4	29	54	79	104	129	154	179	204	229	254	279	304	329	354	379	404	429	454	479	504	529	554	579
EE	5	30	55	80	105	130	155	180	205	230	255	280	305	330	355	380	405	430	455	480	505	530	555	580
FF	6	31	56	81	106	131	156	181	206	231	256	281	306	331	356	381	406	431	456	481	506	531	556	581
GG	7	32	57	82	107	132	157	182	207	232	257	282	307	332	357	382	407	432	457	482	507	532	557	582
HH	8	33	58	83	108	133	158	183	208	233	258	283	308	333	358	383	408	433	458	483	508	533	558	583
II	9	34	59	84	109	134	159	184	209	234	259	284	309	334	359	384	409	434	459	484	509	534	559	584
JJ	10	35	60	85	110	135	160	185	210	235	260	285	310	335	360	385	410	435	460	485	510	535	560	585
KK	11	36	61	86	111	136	161	186	211	236	261	286	311	336	361	386	411	436	461	486	511	536	561	586
LL	12	37	62	87	112	137	162	187	212	237	262	287	312	337	362	387	412	437	462	487	512	537	562	587
MM	13	38	63	88	113	138	163	188	213	238	263	288	313	338	363	388	413	438	463	488	513	538	563	588
NN	14	39	64	89	114	139	164	189	214	239	264	289	314	339	364	389	414	439	464	489	514	539	564	589
OO	15	40	65	90	115	140	165	190	215	240	265	290	315	340	365	390	415	440	465	490	515	540	565	590
PP	16	41	66	91	116	141	166	191	216	241	266	291	316	341	366	391	416	441	466	491	516	541	566	591
QQ	17	42	67	92	117	142	167	192	217	242	267	292	317	342	367	392	417	442	467	492	517	542	567	592
RR	18	43	68	93	118	143	168	193	218	243	268	293	318	343	368	393	418	443	468	493	518	543	568	593
SS	19	44	69	94	119	144	169	194	219	244	269	294	319	344	369	394	419	444	469	494	519	544	569	594
TT	20	45	70	95	120	145	170	195	220	245	270	295	320	345	370	395	420	445	470	495	520	545	570	595
UU	21	46	71	96	121	146	171	196	221	246	271	296	321	346	371	396	421	446	471	496	521	546	571	596
VV	22	47	72	97	122	147	172	197	222	247	272	297	322	347	372	397	422	447	472	497	522	547	572	597
WW	23	48	73	98	123	148	173	198	223	248	273	298	323	348	373	398	423	448	473	498	523	548	573	598
XX	24	49	74	99	124	149	174	199	224	249	274	299	324	349	374	399	424	449	474	499	524	549	574	599
YY	25	50	75	100	125	150	175	200	225	250	275	300	325	350	375	400	425	450	475	500	525	550	575	600

그림 3. HCV에 만성감염된 환자의 PBMC에서 HCV 펩타이드 매트릭스를 이용하여 IFN- $\gamma$  ELISpot assay를 시행한 결과 그림 2처럼 펩타이드 믹스 X, JJ, SS에서 강한 양성반응을 보여 펩타이드 585 및 594가 T세포항원임을 결정하였음

## 2절 T세포 기능을 측정하기 위한 민감한 기술 확립

1. 본 연구에서는 HCV-특이 T세포의 기능을 체계적이고 민감하게 측정할 수 있는 방법을 이용하여야 하였음
2. 많은 환자들의 혈액샘플을 효과적으로 검사할 목적으로 IFN- $\gamma$  ELISPOT 기법을 확립함
3. 이외에도 T세포의 기능을 여러 기능요인으로 분석하여 체계적으로 파악할 필요성이 존재하여, 여러 개의 사이토카인 생성을 한 번에 측정할 목적으로 multi-cytokine cytometric bead array 법을 확립함. 이를 이용하여 약 12가지의 주요 사이토카인 발현을 한번에 민감하게 측정할 수 있었음

## 3절 환자 맞춤형 MHC class I tetramer 제조 및 이용

1. 각 환자나 침팬지에서 식별한 HCV T세포항원과 이의 MHC class I 제한성 정보를 이용하여 이에 대한 맞춤형 MHC class I tetramer를 제조하였음
2. 미국 NIH tetramer core facility (침팬지의 경우) 및 Proimmune (환자의 경우)에 환자 맞춤형 MHC class I tetramer를 주문 제작하였음
3. 확보한 MHC class I tetramer이 성공적으로 작동함을 검증하였음 (그림 4)

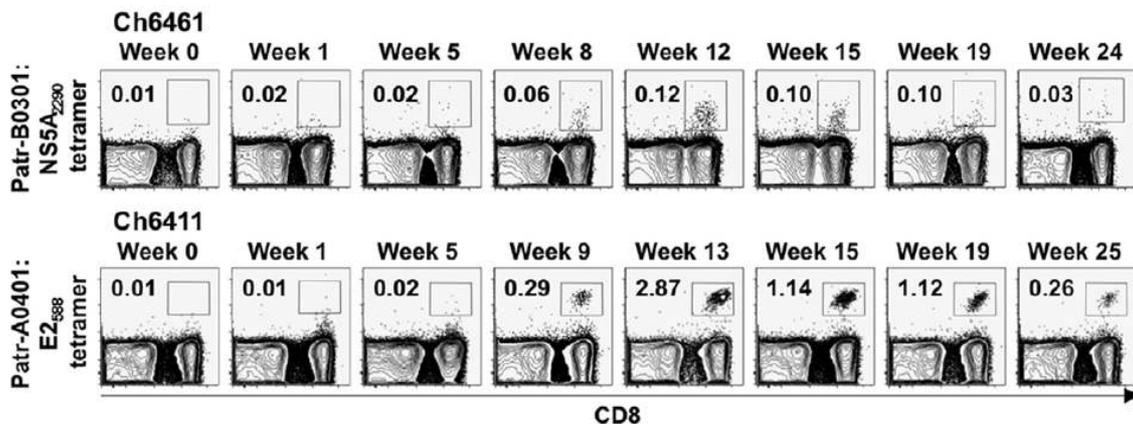


그림 4. HCV에 감염된 후 자연회복된 침팬지(Ch6461)나 HCV에 만성감염된 침팬지(Ch6411)의 PBMC에서 각 침팬지 맞춤형 MHC class I tetramer를 이용하여 HCV-특이 CD8 T세포를 검출한 결과. HCV-특이 CD8 T세포가 8-9주가 되어야 검출됨을 알 수 있음. 이러한 과정으로 MHC class I tetramer를 검증하였음

#### 4절 HCV-특이 CD8 T세포 분리

1. 각 환자에서 HCV-특이 CD8 T세포를 살아있는 채로 분리하기 위해서 두 가지 방법을 사용하여 비교하였음
  - 가. PE-conjugated MHC class I tetramer 염색을 시행한 후, anti-PE microbead (Miltenyi, Germany)를 이용하여 magnetic separation을 시행하여 분리함
  - 나. PBMC에 각 환자에서 결정되었던 T세포항원 펩타이드 자극을 주고 Miltenyi 사의 IFN- $\gamma$  secretion assay kit을 이용하여 IFN- $\gamma$  사이토카인을 분비하는 CD8 T세포를 살아있는 채로 염색하고, 이를 magnetic separation으로 분리, 이때 그 순도가 90% 이상인 경우만을 다음 과정에 사용하였음

#### 2. 바이러스-특이 CD8 T세포 분리 결과

- 가. PE-conjugated MHC class I tetramer 염색을 시행한 후, anti-PE microbead (Miltenyi, Germany)를 이용하여 magnetic separation을 시행하여 분리한 결과, 대부분의 경우에 있어 순도 90% 이상의 바이러스-특이 CD8 T세포를 살아있는 채로 분리하였음. 그림 5는 대표적인 결과로, 분리 전에는 0.5%의 세포가 바이러스-특이 CD8 T세포였는데 magnetic separation을 1회 시행한 경우 48.3%, 2회 시행한 경우에는 순도가 92.1%까지 증가하여 성공적인 분리의 예를 보여줌

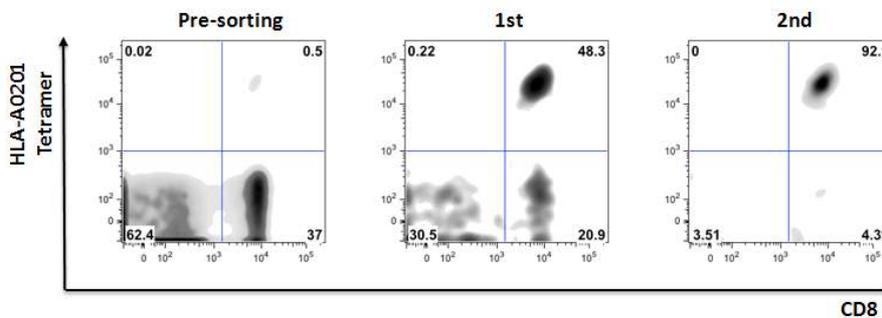


그림 5. MHC class I tetramer를 이용한 바이러스-특이 CD8 T세포 분리의 예. PBMC를 PE-conjugated MHC class I tetramer로 염색한 후, anti-PE microbead를 이용하여 magnetic separation을 시행하여 분리한 결과, 분리 전에는 0.5%의 세포가 바이러스-특이 CD8 T세포였는데 (왼쪽) magnetic separation을 1회 시행한 경우 48.3% (가운데), 2회 시행한 경우에는 순도가 92.1%까지 증가 (오른쪽)하였음

- 나. 다른 방법으로서, 각 환자에서 결정되었던 T세포항원 펩타이드 자극을 주고 Miltenyi 사의 IFN- $\gamma$  secretion assay kit을 이용하여 IFN- $\gamma$  사이토카인을 분비하는 CD8 T세포를 살아있는 채로 염색하고, 이를

magnetic separation으로 분리하였음. 그 결과 대부분의 경우에 있어 순도 80% 이상의 바이러스-특이 CD8 T세포를 살아있는 채로 분리하였음. 그림 6은 대표적인 결과로, 분리 전에는 11.1%의 세포가 항원펩타이드-특이적으로 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 세포였으나 분리후에는 81.8%의 순도로 분리되었음. 하지만, 분리후에도 남은 PBMC에 아직 7.8%의 항원펩타이드-특이 IFN- $\gamma$  분비세포가 남아 있음을 나타냄.

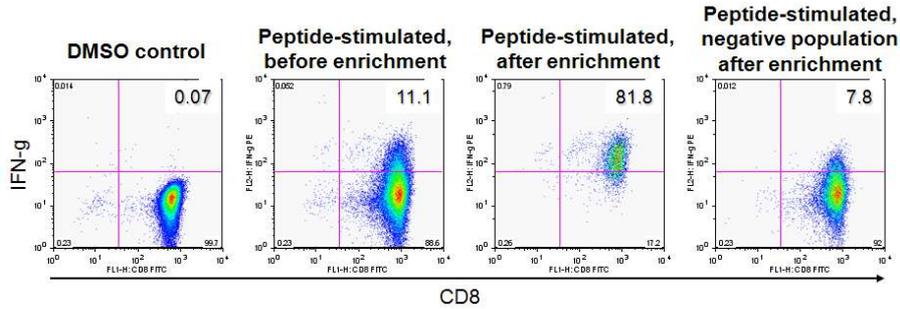


그림 6. IFN- $\gamma$  secretion assay kit을 이용한 바이러스-특이 CD8 T세포 분리의 예. PBMC에 T세포항원 펩타이드 자극을 주고 Miltenyi사의 IFN- $\gamma$  secretion assay kit을 이용하여 IFN- $\gamma$  사이토카인을 분비하는 CD8 T세포를 살아있는 채로 염색하고, 이를 magnetic separation으로 분리한 결과, 분리 전에는 11.1%의 세포가 항원펩타이드-특이적으로 IFN- $\gamma$ 를 분비하는 세포였으나 (왼쪽에서 2번째) 분리후에는 81.8%의 순도로 분리되었음 (왼쪽에서 3번째). 하지만, 분리후에도 남은 PBMC에 아직 7.8%의 항원펩타이드-특이 IFN- $\gamma$  분비세포가 남아 있음을 나타냄 (오른쪽)

다. 결과적으로, 분리된 세포의 순도 (purity) 및 효율 (yield)에 있어서 MHC class I tetramer를 이용한 1번째 방법이 IFN- $\gamma$  secretion assay kit을 이용한 2번째 방법보다 우월하였음. 이를 확인한 후에는 모든 실험에서 MHC class I tetramer를 이용한 분리를 시행하였고, 순도가 90% 이상인 경우만을 다음 단계의 실험에 사용하였음

## 5절 소모성 T세포 조절타겟 스크리닝

1. 분리된 HCV-특이 CD8 T세포로부터 total RNA를 분리하고 RNA 증폭과정을 거친 후, 이를 재료로 microarray를 시행하여 소모성 T세포 결정인자 및 조절타겟을 스크리닝하였음
2. 대조군으로는 HCV 감염 후 자연회복자의 HCV-특이 T세포나, CMV-, EBV- 또는 flu-MHC class I tetramer를 이용하여 이들 바이러스-특이 CD8 T세포를 분리하여 사용함

3. 분리한 세포를 아무 in vitro 자극 없이 비교하거나, 또는 anti-CD3 항체로 자극을 준 후 유전자 발현을 microarray (30K)로 비교함 (그림 7)
- 가. 그림 7A는 전반적인 유전자 발현 clustering pattern을 보여 줌
- 나. 그림 7B는 자극을 주지 않은 세포군들을 비교한 전체 유전자 결과이며, 그림 7C는 anti-CD3 항체로 자극을 준 세포군들을 비교한 전체 유전자 결과임. anti-CD3 항체로 자극을 준 경우에 두 세포군의 유전자 발현 차이는 더욱 커짐

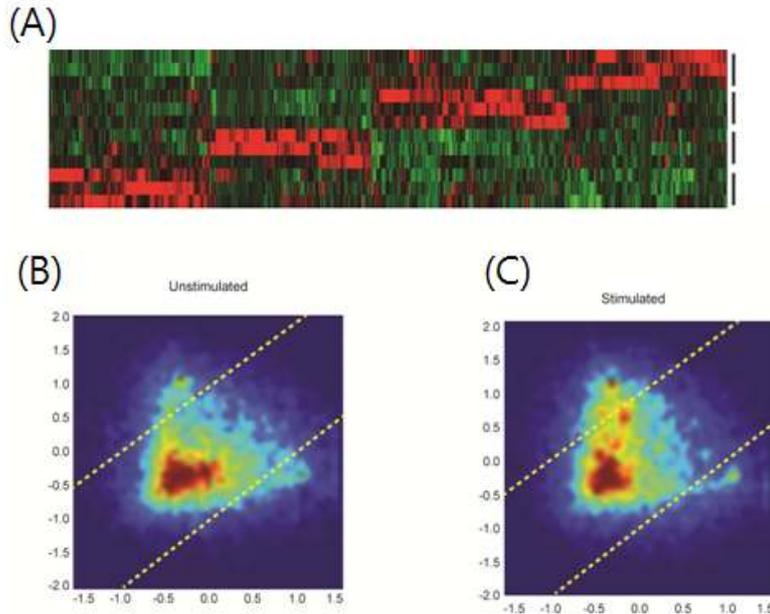


그림 7. 바이러스-특이 CD8 T세포들을 분리하고 total RNA를 분리하여 microarray (30K)를 시행하여 HCV에 특이적인 T세포에서 특징적으로 발현하는 유전자 발굴을 시도함. A는 전반적인 유전자 발현 clustering pattern을 나타내며, B는 자극을 주지 않은 세포군들을 비교한 전체 유전자 결과, C는 anti-CD3 자극을 주고 비교한 전체 유전자 결과임

- 다. 그림 8은 costimulatory molecule 및 cytotoxicity molecule, senescence marker들만으로 두 세포군을 비교한 data로서, 몇몇 차별 발현되는 유전자가 있음을 나타냄

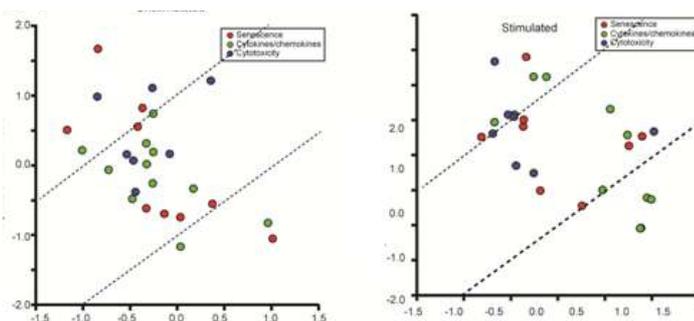


그림 8. Costimulatory molecule, cytotoxicity molecule, senescence marker들만으로 비교한 data. 왼쪽은 자극을 안 주고 비교한 결과, 오른쪽 그림은 anti-CD3 자극을 주고 비교한 결과

4. 그 결과, HCV 만성감염자의 바이러스-특이 CD8 T세포에서는 PD-1, IL-10, TIM-3, CTLA-4, LAG-3 등 총 5가지 유전자의 과발현이 관찰되었음
5. 이 결과를 바탕으로 PD-1, IL-10, TIM-3, CTLA-4, LAG-3 등 5가지 단백질을 HCV 만성감염에서 나타나는 소모성 T세포의 조절인자 후보로 여기고 다음 단계의 실험을 수행함

## 6절 조절타겟 FACS 분석

1. 만성 C형간염 환자의 PBMC에서 MHC class I tetramer와 T세포 억제분자에 대한 형광 항체를 이용하여 염색하고 multicolor flow cytometer로 분석하여 바이러스-특이 CD8 T세포에서의 T세포 억제분자 발현 특성을 조사함
2. T세포 억제분자로 PD-1, IL-10R, Tim-3, LAG-3 등을 조사하고, 대조군 T세포로서 MHC class I tetramer 음성인 CD8 T세포군을 이용함
3. 만성 C형간염 환자들의 PBMC에서 MHC class I tetramer를 이용하여 HCV-특이 T세포를 검출하고, PD-1의 발현을 multicolor flow cytometry로 분석한 결과, 대부분 만성 C형간염 환자의 HCV-특이 T세포가 PD-1을 매우 강하게 발현하였음 (그림 9)

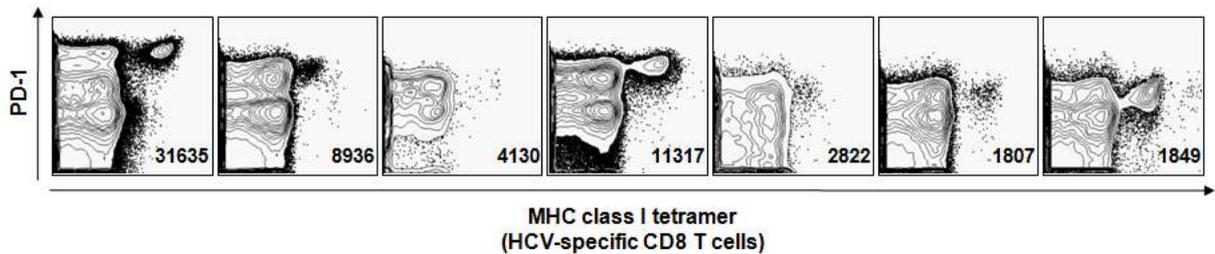


그림 9. 7명의 만성 C형간염 환자 PBMC를 MHC class I tetramer와 anti-PD-1 항체로 형광염색하고 multicolor flow cytometry를 수행한 결과, 모든 만성 C형간염 환자의 HCV-특이 T세포가 PD-1을 매우 강하게 발현함

4. 한편, T세포 억제분자 간의 발현 패턴을 분석한 결과 PD-1을 발현하는 세포들은 Tim-3나 CTLA-4를 발현하는 세포들과는 다른 세포임을 밝힘. 즉, PD-1과 다른 T세포 억제분자를 동시에 발현하는 T세포는 거의 검출되지 않음 (그림 10 및 11)

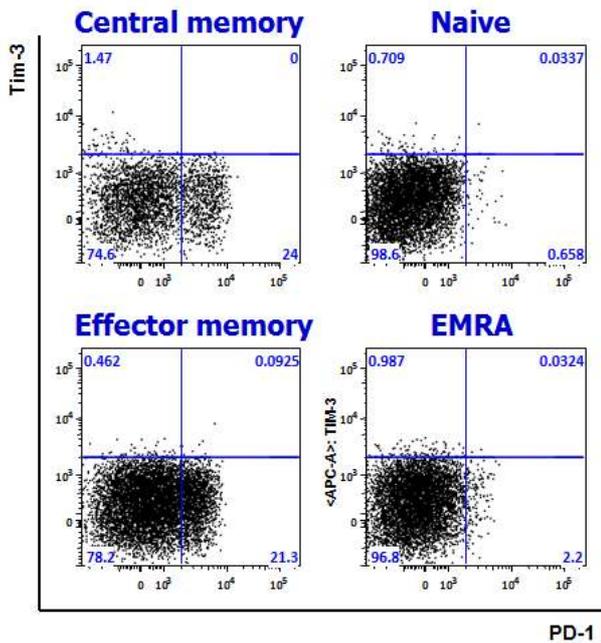


그림 10. CD45RA 및 CCR7 발현 양상을 기준으로 하여 CD8 T세포를 Naive, central memory, effector memory, EMRA로 구분하여 gating한 후, PD-1과 Tim-3의 발현 양상을 분석한 결과. PD-1은 central memory 및 effector memory에서 발현하고, Tim-3는 central memory에서 발현함. 하지만 PD-1과 Tim-3를 동시에 발현하는 세포는 관찰되지 않음

가. CD45RA 및 CCR7 발현 양상을 기준으로 하여 CD8 T세포를 Naive (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>+</sup>), central memory (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>), effector memory (CD45RA<sup>-</sup>CCR7<sup>-</sup>), EMRA (CD45RA<sup>+</sup>CCR7<sup>-</sup>)로 구분하여 gating한 후, PD-1과 Tim-3의 발현 양상을 분석한 결과. PD-1은 central memory 및 effector memory에서 발현하고, Tim-3는 central memory에서 발현함. 하지만 PD-1과 Tim-3를 동시에 발현하는 세포는 관찰되지 않음 (그림 10)

나. 이러한 발현 패턴은 PD-1과 CTLA-4의 발현 관계에서도 동일하게 관찰됨 (그림 11)

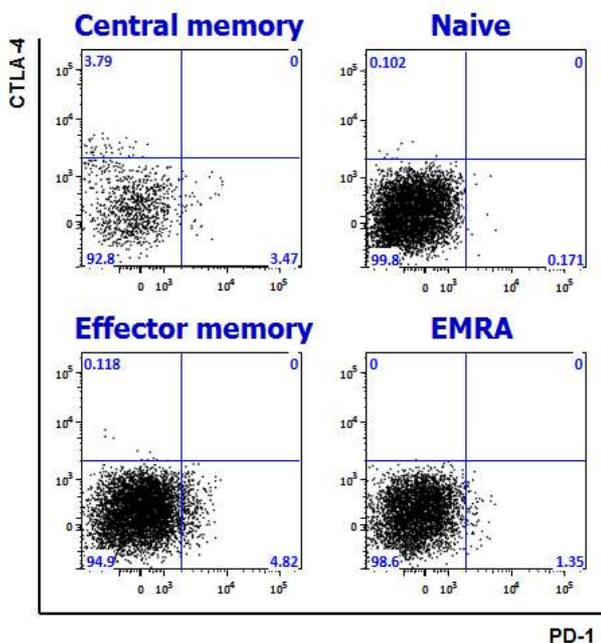


그림 11. CD45RA 및 CCR7 발현 양상을 기준으로 하여 CD8 T세포를 Naive, central memory, effector memory, EMRA로 구분하여 gating한 후, PD-1과 CTLA-4의 발현 양상을 분석한 결과. PD-1은 central memory 및 effector memory에서 발현하고, CTLA-4는 central memory에서 발현함. 하지만 PD-1과 CTLA-4를 동시에 발현하는 세포는 관찰되지 않음

5. 한편, MHC class I tetramer로 항원-특이 CD8 T세포를 검출한 후 PD-1과 CD38의 발현을 함께 분석한 결과, 환자를 크게 2 군으로 나눌 수 있었음. 첫 번째 군은 대부분의 항원-특이 CD8 T세포가 PD-1과 CD38을 동시에 발현하였고 (PD-1<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>), 두 번째 군에서는 PD-1<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>와 PD-1<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>가 각각 절반을 차지하였음 (그림 12). 아직 PD-1<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup> T세포와 PD-1<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup> T세포의 기능적 의미는 불분명함. 이는 향후 연구에서 반드시 규명되어야 함

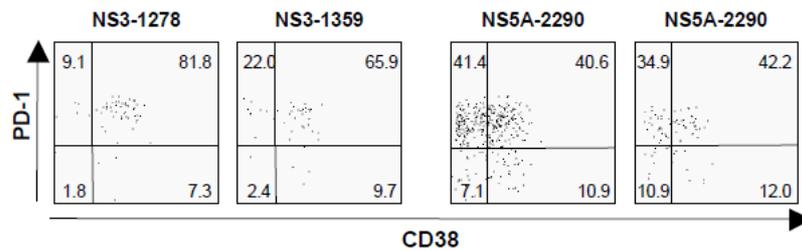


그림 12. 항원-특이 CD8 T세포를 MHC class I tetramer로 표지한 후 FACS gating을 하고, PD1 및 CD38의 발현 관계를 분석함. 왼쪽 두 명의 환자는 대부분의 항원-특이 CD8 T세포가 PD1과 CD38을 동시에 발현하는 반면 (PD1<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>), 오른쪽 두 명의 환자에서는 PD1<sup>+</sup>CD38<sup>-</sup>와 PD1<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>가 각각 절반을 차지함

6. 두 종류의 환자군을 모두 포함하여 PD-1의 발현량과 CD38의 발현량의 연관성을 분석하면 유의한 상관관계가 나옴. 이의 기능적 의미도 아직 불분명하여 향후 연구에서 반드시 규명되어야 함 (그림 13)

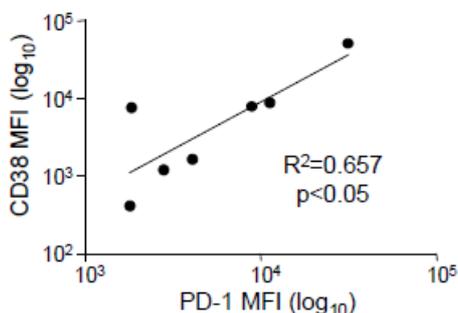


그림 13. 7명의 환자에서 항원-특이 CD8 T세포를 MHC class I tetramer로 표지한 후 FACS gating을 하고, PD-1 및 CD38의 발현량을 평균형광값으로 측정하고 PD-1 및 CD38 발현량의 관계를 회귀분석함. PD-1 및 CD38 발현량 사이에는 유의한 상관관계가 있음

7. 한편, MHC class I tetramer로 항원-특이 CD8 T세포를 검출한 후 PD-1과 IFN- $\gamma$  intracellular cytokine staining을 함께 시행/분석하면, PD-1<sup>dim</sup> T세포가 PD-1<sup>-</sup> T세포보다 IFN- $\gamma$  분비를 더 많이함을 알 수 있었음 (그림 14). 이는 매우 새로운 연구결과로 PD-1의 발현량에 따라 PD-1<sup>dim</sup> T세포와 PD-1<sup>bright</sup> T세포는 다르게 조절될 가능성을 제시함. 이의 구체적인 의미를

향후 연구에서 규명해야 함

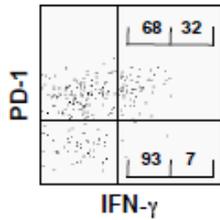


그림 14. MHC class I tetramer로 항원-특이 CD8 T세포를 검출한 후 PD-1과 IFN- $\gamma$  intracellular cytokine staining을 함께 시행/분석한 결과. PD-1<sup>dim</sup> T세포가 PD-1<sup>-</sup> T세포보다 IFN- $\gamma$  분비를 더 많이함

## 7절 조절타겟 차단에 따른 효과 확인

1. 발굴된 조절타겟 차단에 따른 효과를 확인하기 위해, 각  $3 \times 10^5$ 개의 환자 PBMC를 10% FBS/RPMI-1640 배지에 부유시킨 뒤, 항원으로  $1 \mu\text{g/ml}$ 의 농도의 HCV NS3 중복펩타이드 혼합액을 첨가하고 각각의 T세포 억제인자 (PD-1, IL-10, TIM-3, CTLA-4, LAG-3) 중화항체를  $5 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가한 뒤,  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  항온배양기에서 72시간 동안 배양하였음. 배양이 끝나면 세포배양액을 채취한 뒤, cytometric bead array (CBA)로 세포배양액 속 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF 사이토카인의 양을 측정하여 T세포의 기능 회복을 평가하였음
2. 이를 총 21명의 HCV 만성감염자에서 시행한 결과, 5가지의 후보 조절타겟 (PD-1, IL-10, TIM-3, CTLA-4, LAG-3) 중 PD-1, IL-10, TIM-3의 차단에 의해 바이러스-특이 T세포의 기능이 회복됨을 관찰함 (그림 15)

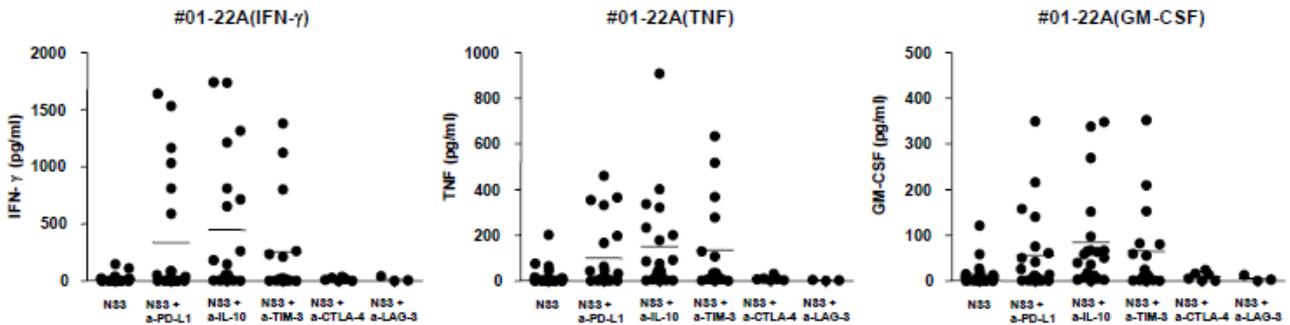


그림 15. 소모성 T세포 조절인자의 차단에 따른 T세포의 기능회복. 각  $3 \times 10^5$ 개의 환자 ( $n=21$ ) PBMC를 10% FBS/RPMI-1640 배지에 부유시킨 뒤, 항원으로  $1 \mu\text{g/ml}$ 의 농도의 HCV NS3 중복펩타이드 혼합액을 첨가하고 각각의 T세포 억제인자 (PD-1, IL-10, TIM-3, CTLA-4, LAG-3) 중화항체를  $5 \mu\text{g/ml}$ 의 농도로 첨가한 뒤,  $37^\circ\text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  항온배양기에서 72시간 동안 배양하였음. 배양이 끝나면 세포배양액을 채취한 뒤, cytometric bead array (CBA)로 세포배양액 속 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF 사이토카인의 양을 측정하여 T세포의 기능 회복을 평가하였음. 왼쪽 그림은 IFN- $\gamma$ , 가운데 그림은 TNF- $\alpha$ , 오른쪽 그림은

GM-CSF 결과를 나타내며, 각 그림에서는 왼쪽부터 각각 1) NS3 peptide mix only, 2) NS3 mix & anti-PD-L1, 3) NS3 mix & anti-IL-10, 4) NS3 mix & anti-TIM-3, 5) NS3 mix & anti-CTLA-4, 6) NS3 mix & anti-LAG-3를 첨가하여 얻은 결과를 나타냄.

- 이러한 기능회복은 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF 등 multi-cytokine 반응으로 나타남. 기능회복 효과가 모든 환자에서 관찰되지는 않았지만, 약 50%의 환자에서 적어도 한 가지 molecule 차단에는 반응을 보여 신약타겟으로서의 가능성을 나타냄
- 한편, 본 연구과정 중 확립한 상기 실험법은, 향후 PD-1, IL-10, TIM-3 등을 타겟으로 한 치료방법이 개발되었을 때 치료반응의 예후를 진단하는 예후진단키트로 개발될 수 있음
- HCV viral load를 측정할 수 있었던 4명의 환자에서 기능 회복 결과를 HCV viral load와 연관지어 분석한 예비실험 결과, 기능 회복의 정도는 HCV viral titer가 1,000 IU/ml보다 낮을때만 관찰되는 것으로 보여, 발굴된 조절타겟의 차단 효과는 바이러스 항원량과 밀접한 관련이 있는 것으로 나타났다(그림 16)

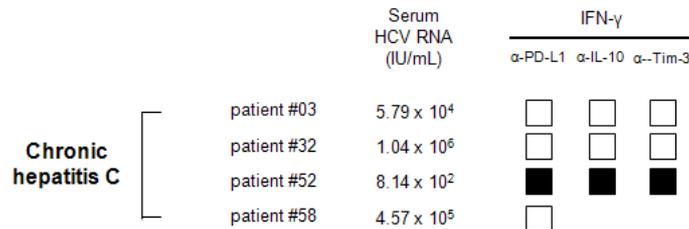


그림 16. 소모성 T세포 조절인자의 차단에 따른 T세포 기능회복과 HCV viral load와의 관계. 4명의 HCV 만성감염자에서 상기기술한 T세포 기능 회복 평가를 시행하고 그 결과를 하얀 박스 (□, 기능회복이 없는 경우)나 검은 박스 (■, 기능회복이 나타난 경우)로 나타내고, 이를 각 환자의 HCV viral load와 함께 나타냄. 4명의 환자 중, HCV viral load가 1,000 IU/ml 이하인 경우(환자번호 52)에서만 기능 회복이 관찰되고, 10,000 IU/ml 이상인 경우에는 관찰되지 않음

- 또 다른 종류의 환자군에서 T세포 억제-차단 시험을 시행함. 이 환자군은 만성신부전 때문에 혈액투석을 지속적으로 받는 환자들로 HCV 감염 고위험군에 속하는 환자군임. 이들에게서 바이러스학적, 혈청학적 결과와 세포면역 반응을 토대로 전형적인 만성 C형간염(chronic hepatitis C), 잠복성 HCV 감염(occult HCV infection), HCV 노출 후 기억 T세포반응 보유군(memory after HCV exposure)으로 나누어 실험함
- 각 환자들에서 T세포 억제-차단 시험을 시행한 결과, 각 환자들마다 매우

다양한 패턴의 T세포 기능회복 패턴을 나타냄 (그림 17). 이로써, 각 환자 별로 주로 작동하는 T세포 억제수용체를 판별하는 것이 매우 중요함을 알 수 있었음

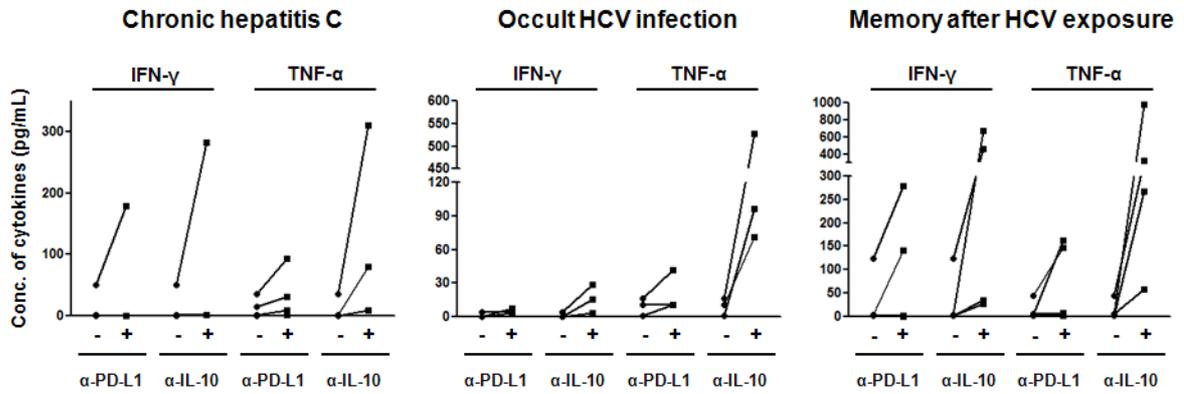


그림 17. 만성 C형간염(chronic hepatitis C), 잠복성 HCV 감염 (occult HCV infection), HCV 노출 후 기억 T세포반응 보유군(memory after HCV exposure)의 PBMC를 이용하여 T세포 억제-차단 시험을 시행한 결과. anti-PD-L1이나 anti-IL-10 항체를 이용하여 T세포 억제인자를 차단하였을 때, IFN- $\gamma$ 나 TNF- $\alpha$  생성이 증가함을 나타냄. 그리고 반응은 각 환자마다 다양한 패턴으로 나타남

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1절 최종목표 달성도

1. 본 연구개발의 최종목표는 HCV 만성감염의 원인이 되는 소모성 T세포 (exhausted T cell)의 결정인자 및 조절인자를 발굴하여 신약개발의 타겟으로 삼고자 함이었고, 궁극적으로는 소모성 T세포의 기능을 최소한 100% 이상 증강시킬 수 있는 조절타겟 발굴이 목표였음
2. 본 연구과제의 성공적인 수행으로 상기 최종목표를 모두 달성하였음

### 2절 연도별 연구목표 달성도

1. 본 연구개발의 연도별 목표는 다음과 같고 이를 모두 100% 달성하였음

연구범위	연구수행방법	구체적인 결과 내용
연구재료제조 (1차년도)	각 환자에서 HCV T세포항원 결정	각 HCV 환자에서 HCV 펩타이드 매트릭스법과 IFN-g ELISpot을 이용하여 HCV T세포항원을 결정함
연구재료제조 (1차년도)	각 환자 맞춤형 MHC class I tetramer 제조	환자 맞춤형 MHC class I tetramer 주문 제작함(NIH 또는 Proimmune)
타겟스크리닝 (2차년도)	HCV-특이 CD8 T세포 분리	MHC class I tetramer 및 Cytokine secretion assay를 이용하여 HCV-특이 CD8 T세포를 분리함
타겟스크리닝 (2차년도)	소모성 T세포 조절인자 스크리닝	Microarray를 이용하여 소모성 T세포 조절인자를 스크리닝함
조절타겟 적합여부결정 (3차년도)	조절타겟을 FACS 분석으로 확인	세포표면분자, 세포내단백, 사이토카인 등의 발굴된 조절타겟을 FACS 분석으로 확인함
조절타겟 적합여부결정 (3차년도)	조절타겟 차단에 따른 효과 확인	차단항체 또는 수용성수용체를 이용하여 조절타겟의 기능을 차단하고 소모성 T세포의 기능 회복을 평가함

### 3절 관련분야 기술발전 기여도

#### 1. 국내 세포면역학 활성화 기여

- 가. 미국, 유럽, 일본에서는 과거부터 세포면역학의 기초연구 및 응용연구가 활발했음. 반면, 우리나라에서는 세포면역학 연구가 활성화되지 않았음
- 나. 본 연구성과를 통하여 확립된 세포면역학 연구기술과 기법들이 우리나라의 세포면역학 기초연구의 활성화에 일조할 것으로 기대됨
- 다. 본 연구과제는 세포면역학 기초연구를 임상응용으로 확대하는 중개연구의 특성을 지니고 있어, 이러한 연구의 좋은 역할 모델로 삼을 수 있음

#### 2. 사람 T세포 조절 기전에 대한 새로운 이해 기반 마련

- 가. 본 연구를 통하여 HCV 만성감염에서 T세포의 특성을 규명하여 사람 T세포 조절 기전에 대한 새로운 이해 기반을 마련함
- 나. 본 연구를 통하여 발굴된 지식/기술은 간염바이러스뿐만 아니라 HIV나 결핵 및 중앙질환의 기반 지식/기술 발전을 촉진할 것으로 기대됨

<첨부>

(1) 연구개발의 최종목표

HCV 만성감염의 원인이 되는 소모성 T세포(exhausted T cell)의 결정인자 및 조절인자를 발굴하여 신약개발의 타겟으로 삼고자 함.

소모성 T세포의 기능을 최소한 100% 이상 증강시킬 수 있는 조절타겟 발굴이 목표

(2) 연차별 연구개발 목표 및 내용

구분	연구개발 목표	연구개발 내용 및 범위
1차년도	환자맞춤형 MHC class I tetramer 제조	각 환자에서 HCV T세포항원 결정 각 환자 맞춤형 MHC class I tetramer 제조
2차년도	소모성 T세포 조절타겟 스크리닝	HCV-특이 CD8 T세포 분리 소모성 T세포 조절인자 스크리닝
3차년도	조절타겟 차단효과 확인	조절타겟을 FACS 분석으로 확인 조절타겟 차단에 따른 효과 확인

(3) 계획대비 달성도(선정시 제시된 연구목표)

번호	세부연구목표	달성내용	달성도(%)
1	각 환자에서 HCV T세포항원 결정	각 HCV 환자에서 HCV 펩타이드 매트릭스법과 IFN- $\gamma$ ELISpot을 이용하여 HCV T세포항원을 결정함	100%
2	각 환자 맞춤형 MHC class I tetramer 제조	환자 맞춤형 MHC class I tetramer 주문 제작함 (NIH 또는 Proimmune)	100%
3	HCV-특이 CD8 T세포 분리	MHC class I tetramer 및 Cytokine secretion assay를 이용하여 HCV-특이 CD8 T세포를 분리함	100%
4	소모성 T세포 조절인자 스크리닝	Microarray 분석을 이용하여 소모성 T세포 조절인자를 스크리닝함	100%
5	조절타겟을 FACS 분석으로 확인	세포표면분자, 세포내단백, 사이토카인 등의 발굴된 조절타겟을 FACS 분석으로 확인함	100%
6	조절타겟 차단에 따른 효과 확인	차단항체 또는 수용성수용체를 이용하여 조절타겟의 기능을 차단하고 소모성 T세포의 기능 회복을 평가함	100%

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

번호	세부연구목표	가중치
1	조절타겟 차단에 따른 효과 확인	40%
2	소모성 T세포 조절인자 스크리닝	30%
3	조절타겟을 FACS 분석으로 확인	10%
4	각 환자에서 HCV T세포항원 결정	10%
5	각 환자 맞춤형 MHC class I tetramer 제조	10%
계		총 100%

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 1절 신약개발에 활용

1. 본 과제에서 조절타겟으로 발굴한 PD-1, IL-10, TIM-3의 blocking을 이용한 만성 바이러스 감염 치료용 바이오신약을 개발할 수 있음
  - 가. 본 연구의 연구주제인 T세포 억제분자는 최근 새로운 치료타겟으로 각광을 받고 있음
  - 나. 특히, anti-PD-1 항체가 T세포의 항-바이러스 기능을 회복시켜 바이러스 역가를 감소시킴이 마우스 실험에서 증명된 이후 이러한 연구가 활발히 진행되고 있음
  - 다. 최근에는 HIV의 모델인 원숭이 SIV 감염에서 anti-PD-1 항체가 바이러스 역가를 감소시킴이 보고되었음
  - 라. 따라서 본 연구에서 새로운 T세포 억제분자를 발굴하게 되면 이는 바이러스성 감염의 새로운 치료타겟으로 이용할 수 있음. 이 경우 개발하는 치료제는 수용성 수용체나 차단 항체의 형태가 될 것으로 기대됨
2. 향후 칩앤지를 이용한 in vivo 효능 평가를 시행함으로써, 전임상 및 임상시험에 진입할 바이오신약 후보물질을 확보할 수 있음
3. 일단은 HCV 치료목적으로 개발하지만, 이는 매우 용이하게 HBV 및 HIV 감염으로 적응증을 확대할 수 있을 것으로 기대됨
4. 한편, 본 과제를 통해 개발되는 바이오신약 후보물질은 악성종양 질환의 치료 목적으로도 사용될 수 있을 것임. 최근 PD-1과 같은 T세포 억제분자가 악성종양 환자의 T세포에도 과발현되어 있고, 이를 차단하면 T세포의 기능이 회복되어 항종양 활성이 증가한다는 보고가 있어 이와 유사한 현상이 TIM-3, IL-10에서도 일어날 것으로 기대됨
5. 일단, PD-1, IL-10, TIM-3 등의 조절타겟 후보 중 한 가지를 최적의 후보로 결정하고 산업화를 추진해야 함. 현재 국내의 제넥신(주)에서는 TIM-3의 T세포 조절 기능에 관심을 보여 제넥신(주)의 hybrid-Fc 기술을 이용한 TIM-3-Fc 제조에 관심을 보이고 있음. 한편, 본 과제의 결과에 따라 제넥신(주)이 PD-1-Fc나 IL-10R-Fc 형태로 T세포 활성 조절 바이오신약을 산업화할 것으로 기대됨
6. 이외에도, 현재 공동연구를 수행하고 있는 에이앤알테라페틱스(주)와의 협력을 통하여 PD-1, IL-10, TIM-3 등을 타겟하는 인간화 항체나 수용성 수용체를 바이오신약 후보물질로 개발 중임

## 2절 C형간염 예후인자 검사법 개발

1. 본 연구를 통하여 확립된 T세포 억제-차단 시험 방법이 임상적 의의를 가지는 것으로 판명되면 이는 새로운 검사법의 개발로 이어짐
2. T세포 억제-차단 시험 방법이 임상적 의의를 가진다면 이를 특허 출원하고 kit 형태로 개발하여 상품화할 수 있음
3. 특히, 최근 타 감염질환(결핵)에서 T세포의 반응을 평가하는 임상진단 kit들이 상용화되고 있는 실정(예, TBspot, Quantiferon 등)을 고려하면, T세포 억제-차단 시험 방법은 이와 유사한 형태의 kit 형태로 개발될 것으로 기대됨
4. PD-1 등의 T세포 억제분자의 과발현은 HBV 및 HCV 감염뿐만 아니라 HIV 감염이나 결핵 및 종양질환에서도 관찰되는 현상임. 따라서 향후 T세포 억제-차단 시험 방법은 HIV 감염이나 결핵 및 종양질환에서도 응용될 가능성이 높음
5. 현재 이러한 T세포 억제-차단 시험 방법에 대해 특허 출원 준비 중임

## 3절 사회적, 경제적 의의

1. 현재 전세계에서 약 1억 7천만 명이 HCV에 감염되어 있는 현실을 고려할 때, 본 연구결과는 공중보건학적으로 매우 큰 의미가 있을 것으로 기대됨. 특히 한국에서의 높은 간질환 사망률이 HBV 및 HCV 만성감염 및 이에 따른 간경화 및 간암에 기인함을 고려할 때, 그 사회적 기여도는 매우 클 것으로 기대됨. 구체적으로, 한국보건사회연구원이 발표한 자료에 따르면 간질환의 사회 및 경제적 비용이 약 2조 6201억원으로 암 다음으로 높은 것으로 나타남(2003년 5월 보건복지포럼)
2. 현재 항바이러스 치료제의 세계시장 규모는 2005년 17,493백만 달러로 2015년에는 70769백만 달러 규모로 성장할 것으로 예상됨(BT 기술동향 보고서 121권, 국가생명공학 정책연구센터). 이중 약 50%를 HBV 및 HCV 등의 간염바이러스 치료제가 차지하고 있음. 그리고, 시장규모는 지속적으로 증가하고 있기 때문에, 본 연구과제가 궁극적으로 바이오신약 개발로 이어진다면 최소한 연간 수백억 달러 이상의 경제적 부가가치를 창출할 것으로 기대됨

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1절 HCV 감염에서 PD-1의 역할

1. PD-1은 T세포 표면에 발현하는 억제 수용체 중 하나임. PD-1에게는 두 종류의 리간드가 있는데 B7 family에 속하는 PD-L1, PD-L2가 리간드임  
가. PD-1은 리간드에 결합하면, SH2 모티프를 포함한 인산가수분해효소(phosphatase)인 SHP-1, SHP-2를 immunoreceptor-tyrosin-based switch motif (ITSM)으로 소환하여 T세포의 억제 신호를 개시함. 소환된 인산가수분해효소는 T세포 수용체(TCR)에 의해 매개되는 활성화 신호를 차단함
2. 만성 바이러스 감염의 바이러스-특이 T세포에서 PD-1의 역할은 만성 LCMV 감염 마우스 모델에서 처음으로 확인되었음(17).  
가. 만성 LCMV 감염에서처럼, 만성 HCV감염에서 바이러스-특이 CD8 T세포에서 PD-1이 과발현되어 있었으며, HCV-특이 PD-1<sup>high</sup> T세포는 기능이 저하되어 있었음(18-20)  
나. 게다가 PD-1/PD-L1의 상호작용을 차단했을 때 분열증식능력, 세포용해능, 및 사이토카인(IFN- $\gamma$  TNF- $\alpha$ ) 생성과 같은 T세포 기능이 회복되었음(18-20)  
다. PD-1<sup>high</sup> 기능장애 T세포는 기억 T세포의 전구 상태에서 발현되는 CD127 발현이 낮았으며, T세포 노화 마커인 CD57의 발현이 높았음(18,20)  
라. PD-1<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> HCV-특이 CD8 T세포는 자주 세포사(apoptosis)에 빠졌음(21)  
마. 간 내의 HCV-특이 CD8 T세포가 말초혈액에서 발견되는 경우보다 PD-1이 과발현되어 있는 것으로 볼 때, PD-1 발현은 체내 CD8 T세포의 위치에 의해 영향을 받는 것으로 생각됨(22)  
바. 게다가 PD-1/PD-L1의 차단은 말초혈액에서 얻은 HCV-특이 CD8 T세포의 기능을 회복시켰지만, 간에서 얻은 CD8 T세포는 그렇게 하지 못했음(22). 체내의 서로 다른 구획에 위치하는 바이러스-특이 CD8 T세포들의 차이는 향후에 연구해볼 필요가 있음
3. HCV 급성 감염기에 PD-1의 역할 역시 연구되어짐  
가. 특히, PD-1 발현과 급성 HCV 감염결과와의 관계에 초점이 맞추어져 있음. 최근 연구들에서, 급성 HCV감염이 만성으로 진행되는 경우에서 급성기에 관찰되는 HCV-특이 CD8 T세포에 PD-1이 과발현되어 있었고, HCV가 성공적으로 회복된 경우에는 PD-1 발현이 적었음(23, 24)  
나. 한편, 적어도 한 연구이상에서는 급성 HCV 감염 시 PD-1의 과발현이 HCV 감염 결과와 관계없다는 결론을 내렸음(25)

- 다. 급성 C형 간염의 침팬지 모델에서, 간 내의 PD-1 발현 정도를 간생검을 통한 real-time PCR로 정량한 결과, 높은 PD-1 mRNA 레벨이 만성 HCV 감염과 연관이 있다는 것을 밝혔음(26)
  - 라. 만성 HCV감염에서 HCV-특이 CD8 T세포의 PD-1 레벨은 T세포 에피토프의 회피 돌연변이(escaping mutation)이 발생하게 되면 감소함(23). 이는 HCV-특이 CD8 T세포의 PD-1의 과발현이 T세포 수용체(TCR)의 지속적인 자극을 통해서 유지되며, 이는 만성 지속성 바이러스 감염에서 PD-1의 과발현이 통상적으로 관찰되는 이유를 설명할 수 있음
4. 실험 백신을 투여한 경우의 PD-1
- 가. 아주 최근에 실험 백신을 투여하고, HCV를 감염시킨 침팬지에서 PD-1 발현을 측정 한 연구가 있었음
  - 나. 이 연구에서 HCV에 감염된 침팬지의 HCV-특이 CD8 T세포의 표현형이 분석되었고, 이는 adenovirus/DNA HCV NS3-NS5 백신 연구에서 일부 결과가 나와있음(27)
  - 다. 대조군에 비해 백신을 투여한 침팬지의 HCV-특이 CD8 T세포는 PD-1을 적게 발현하였으며 IFN- $\gamma$ 의 분비능이 더 높았음. 이 결과와 일치하게, 간 내 PD-1, PD-L1의 mRNA 레벨 역시 대조군에 비해 백신을 맞은 침팬지에서 유의하게 낮았음
  - 라. 이 연구결과에 따르면 PD-1과 PD-L1의 낮은 발현이 백신에 의한 급성 HCV 감염의 소멸의 특징적인 소견이며, 백신에 의한 HCV의 제거에서 PD-1/PD-L1 경로의 감약이 HCV-특이 CD8 T세포와 항바이러스 기능 증진에 기여했을 수 있음

## 2절 HCV 감염에서 CTLA-4의 역할

1. CTLA-4는 구조적으로 중요한 T세포 보조자극(costimulatory) 분자인 CD28과 상동적임(homologous). 그리고 CTLA-4의 발현은 활성화 T세포에서 증가되어 있음(28)
2. CTLA-4는 다양한 기전을 통해 T-세포 억제 기능을 수행함. CTLA-4는 CD80과 CD86과 결합하여 CD28과 B7 분자의 상호작용을 경쟁적으로 저해함. 게다가, CTLA-4는 SHP-2와 같은 인산가수분해효소(phosphatase)를 소환하여 TCR에 의한 활성화 신호를 저해함
3. 만성 LCMV 감염 마우스 모델에서 CTLA-4를 차단했을 때 T세포 기능이 회복되지는 않았지만(17), 최근 연구에서 만성 HCV 감염에서 CTLA-4의 역할이 중요하다는 결과를 보임(22,29)
4. 만성 C형 간염 환자의 간조직에서 분리한 HCV-특이 CD8 T세포는 PD-1뿐만 아니라 CTLA-4까지 과발현하고 있었음
5. PD-1과 CTLA-4의 동시 발현(co-expression)은 간에 침윤되어 있는 림프구

에서는 관찰되었으나, 말초혈액의 림프구에서는 관찰되지 않았음(29). 이는 체내에서 구획에 따른 바이러스-특이 CD8 T세포의 표현형에 차이가 있음을 의미함

6. PD-1<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> HCV-특이 T세포는 심각한 기능장애가 있었음(22). PD-1<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> HCV-특이 T세포는 PD-1과 CTLA-4 경로를 동시에 차단하였을 때에만 기능이 회복되었고, 각각의 경로를 차단했을 때에는 그러지 못하였음(29)
7. HCV-특이 CD8 T세포의 기능을 회복시켜 치료에 이용하는 전략으로서 여러 종류의 억제 수용체를 동시에 차단하는 것이 필요함

### 3절 HCV 감염에서 TIM-3의 역할

1. Tim-3은 원래 Th1 CD4 T세포의 특수한 표지로서 발견되었음(30). Tim-3와 그 리간드인 galectin-9 사이의 상호작용은 Th1 세포의 세포사를 촉진하고 Th1 세포의 반응을 종결시킴
2. 만성 바이러스 감염 시 Tim-3의 역할은 처음에 HIV 감염에서 확인되었음(31). HIV에 감염된 환자들에서 Tim-3<sup>+</sup> CD8 T세포가 증가되었고 T세포가 발현하는 Tim-3 수준이 바이러스 역가(viral titer)와는 양의 상관관계를, CD4 T세포 수와는 반대의 관계를 나타냄(31)
3. Tim-3를 과발현하는 HIV-특이 CD8 T세포는 기능적으로 장애를 나타냈으며 Tim-3의 차단은 HIV-특이 CD8 T세포의 기능을 회복시킴(31)
4. 이후, Tim-3의 기능은 만성 HCV 감염에서도 연구되었음(32). Tim-3가 기능이 저하된 HCV-특이 CD8 T세포에서 과발현되었고, Tim3<sup>+</sup> CD8 T세포는 표현형이 CD127<sup>low</sup>CD57<sup>high</sup>로서 만성 HCV 감염시 PD-1<sup>+</sup> CD8 T세포의 표현형과 동일하였음(18,20)
5. Tim3<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> HCV-특이 CD8 T세포는 우선적으로 말초혈액보다 간 내부에 더 많았음. 중요하게, Tim-3의 차단은 증식과 INF- $\gamma$  생산의 증가로 뒷받침되는 HCV-특이 CD8 T세포의 기능적인 회복으로 이어짐
6. Tim-3의 역할은 또한 HCV/HIV 동시 감염에서도 연구되었음. HCV 감염만 있는 경우에 비하여 HCV/HIV가 동시감염된 경우에 Tim3<sup>+</sup>PD-1<sup>++</sup> HCV-특이 CD8 T세포가 더 많았고 Tim-3/PD-1 동시 발현이 간 손상과 상관관계가 있었음(33). Tim-3 또는 PD-1 차단, 둘 중 하나 만으로도 Tim3<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> HCV-특이 CD8 T세포의 기능을 충분히 회복시킬 수 있다는 것이 확인됨. 흥미롭게도 Tim3<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup> 표현형은 HCV-특이 CD8 T세포에서 HIV-특이 CD8 T세포 보다 많았으며, 이는 서로 다른 바이러스-특이 T세포에서의 서로 다른 장애(impairment)를 의미함

#### 4절 HCV 감염에서 다른 억제성 수용체의 역할

1. 만성 바이러스 감염시 T세포의 기능을 하향조절(downregulation)할 수 있는 가능성이 있는 또 다른 분자들을 발견하기 위해서 microarray와 gene expression profiling이 LCMV 감염 설치류 모델에서 수행됨(34)
2. PD-1, LAG-3, 2B4, CD160, CTLA-4, PIR-B 그리고 GP49B 같은 몇 가지 후보 분자들이 확인됨. 그리고 이후의 연구에서 억제성 분자들의 복잡한 발현 양상들이 밝혀졌고 다수의 억제성 분자들의 동시발현이 감염의 중증도와 관련이 있음이 알려졌음(35)
3. 가장 최근에, T세포의 PD-1, 2B4, CD160, KLRG1, LAG-3 그리고 CTLA-4의 동시발현이 만성 HCV 감염에서 연구되었음(36). 다수의 억제성 수용체들의 동시발현이 HCV-특이 CD8 T세포에서 관찰되었고 이는 낮은 수준의 CD127 발현과 관련 있었음

#### 5절 관련연구에 대한 향후 전망

1. 만성 LCMV 감염에서 PD-1이 T세포 기능장애와 관련 있는 억제성 수용체로 밝혀진 이래로, 바이러스-특이 CD8 T세포의 억제성 수용체들이 나타내는 다양한 기능이 HCV, HBV 및 HIV 감염과 같은 인간의 만성 바이러스 감염에서 폭넓게 연구되어 왔음. 체외에서 억제성 수용체의 차단(blocking)이 바이러스 특이 T세포 기능을 회복시켰으므로, 억제수용체의 차단은 만성 바이러스 감염의 획기적인 치료법이라 생각됨
2. 최근의 한 연구에서 SIV에 감염된 macaque들의 생체 내(in vivo)에서 anti-PD-1 antibody가 나타내는 차단 효과를 평가했음(38). PD-1의 차단은 면역 반응을 증진시켰으며 바이러스 역가를 상당히 감소시켰고 감염된 숙주들의 생존은 연장되었음(38)
3. 그러나 생체 내에서의 억제성 수용체 차단을 실제 치료에 적용하기 위해서는 몇 가지 발생가능한 부작용들을 고려해야 함. 한 연구에서 PD-L1<sup>-/-</sup> 마우스의 만성 LCMV 감염은 심한 면역병리학적 손상 때문에 치명적이라는 것을 밝혔으며(17), 이는 PD-1/PD-L1이 바이러스 감염으로 유발되는 치명적인 면역병리적 손상을 막는 데에 중요하다는 것을 의미함. 특별히, HCV에 감염된 경우 T세포 반응을 통해 간 손상이 일어나는 것으로 알려져 있으므로 T세포가 매개하는 간 손상은 억제성 수용체들을 차단함으로써 더 악화될 수 있으며 이는 치명적인 간염으로 이어질 수 있음(39)
4. 이미 언급한 것과 같이, 몇몇의 환자들은 급성 HCV 감염으로부터 회복하고 억제성 수용체들을 낮은 수준으로 발현하지만, 나머지 환자에서는 억제성 수용체들이 과다발현되고, T세포의 기능이 점진적으로 소실되어가는 만성 단계로 들어서게 됨. 따라서 급성 HCV 감염 초기의 억제성 분자들의 차단이 만성 단계로의 이행을 막을 수 있을 것이라는 가능성을 고려해야 함

## 제 7 장 참고문헌

1. Shepard CW, Finelli L, Alter MJ: Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infect Dis* 5:558-567, 2005
2. Kamal SM: Acute hepatitis C: a systematic review. *Am J Gastroenterol* 103:1283-1297, 2008
3. Alter HJ, Seeff LB: Recovery, persistence, and sequelae in hepatitis C virus infection: a perspective on long-term outcome. *Semin Liver Dis* 20:17-35, 2000
4. Diepolder HM, Zachoval R, Hoffmann RM, Wierenga EA, Santantonio T, Jung MC, Eichenlaub D, Pape GR: Possible mechanism involving T-lymphocyte response to non-structural protein 3 in viral clearance in acute hepatitis C virus infection. *Lancet* 346:1006-1007, 1995
5. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenwend P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD: Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 191:1499-1512, 2000
6. Thimme R, Oldach D, Chang KM, Steiger C, Ray SC, Chisari FV: Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 194:1395-1406, 2001
7. Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P, Walker CM: Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 10:439-449, 1999
8. Thimme R, Bukh J, Spangenberg HC, Wieland S, Pemberton J, Steiger C, Govindarajan S, Purcell RH, Chisari FV: Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:15661-15668, 2002
9. Rehermann B, Nascimbeni M: Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat Rev Immunol* 5:215-229, 2005
10. Dustin LB, Rice CM: Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu Rev Immunol* 25:71-99, 2007
11. Erickson AL, Kimura Y, Igarashi S, Eichelberger J, Houghton M, Sidney J, McKinney D, Sette A, Hughes AL, Walker CM: The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 15:883-895, 2001
12. Chang KM, Rehermann B, McHutchison JG, Pasquinelli C, Southwood S, Sette A, Chisari FV: Immunological significance of cytotoxic T lymphocyte epitope variants in patients chronically infected by the

- hepatitis C virus. *J Clin Invest* 100:2376–2385, 1997
13. Weiner A, Erickson AL, Kansopon J, Crawford K, Muchmore E, Hughes AL, Houghton M, Walker CM: Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:2755–2759, 1995
  14. Appay V, Dunbar PR, Callan M, Klenerman P, Gillespie GM, Papagno L, Ogg GS, King A, Lechner F, Spina CA, Little S, Havlir DV, Richman DD, Gruener N, Pape G, Waters A, Easterbrook P, Salio M, Cerundolo V, McMichael AJ, Rowland-Jones SL: Memory CD8<sup>+</sup> T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 8:379–385, 2002
  15. Sugimoto K, Ikeda F, Stadanlick J, Nunes FA, Alter HJ, Chang KM: Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated *ex vivo* in persistent HCV infection. *Hepatology* 38:1437–1448, 2003
  16. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ: The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 8:239–245, 2007
  17. Barber DL, Wherry EJ, Masopust D, Zhu B, Allison JP, Sharpe AH, Freeman GJ, Ahmed R: Restoring function in exhausted CD8 T cells during chronic viral infection. *Nature* 439:682–687, 2006
  18. Radziewicz H, Ibegbu CC, Fernandez ML, Workowski KA, Obideen K, Wehbi M, Hanson HL, Steinberg JP, Masopust D, Wherry EJ, Altman JD, Rouse BT, Freeman GJ, Ahmed R, Grakoui A: Liver-infiltrating lymphocytes in chronic human hepatitis C virus infection display an exhausted phenotype with high levels of PD-1 and low levels of CD127 expression. *J Virol* 81:2545–2553, 2007
  19. Penna A, Pilli M, Zerbini A, Orlandini A, Mezzadri S, Sacchelli L, Missale G, Ferrari C: Dysfunction and functional restoration of HCV-specific CD8 responses in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology* 45:588–601, 2007
  20. Golden-Mason L, Palmer B, Klarquist J, Mengshol JA, Castelblanco N, Rosen HR: Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8<sup>+</sup> T cells associated with reversible immune dysfunction. *J Virol* 81:9249–9258, 2007
  21. Radziewicz H, Ibegbu CC, Hon H, Osborn MK, Obideen K, Wehbi M, Freeman GJ, Lennox JL, Workowski KA, Hanson HL, Grakoui A:

- Impaired hepatitis C virus (HCV)-specific effector CD8<sup>+</sup> T cells undergo massive apoptosis in the peripheral blood during acute HCV infection and in the liver during the chronic phase of infection. *J Virol* 82:9808-9822, 2008
22. Nakamoto N, Kaplan DE, Coleclough J, Li Y, Valiga ME, Kaminski M, Shaked A, Olthoff K, Gostick E, Price DA, Freeman GJ, Wherry EJ, Chang KM: Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology* 134:1927-1937, 2008
  23. Rutebemberwa A, Ray SC, Astemborski J, Levine J, Liu L, Dowd KA, Clute S, Wang C, Korman A, Sette A, Sidney J, Pardoll DM, Cox AL: High-programmed death-1 levels on hepatitis C virus-specific T cells during acute infection are associated with viral persistence and require preservation of cognate antigen during chronic infection. *J Immunol* 181:8215-8225, 2008
  24. Urbani S, Amadei B, Tola D, Massari M, Schivazappa S, Missale G, Ferrari C: PD-1 expression in acute hepatitis C virus (HCV) infection is associated with HCV-specific CD8 exhaustion. *J Virol* 80:11398-11403, 2006
  25. Kasprowicz V, Schulze Zur Wiesch J, Kuntzen T, Nolan BE, Longworth S, Berical A, Blum J, McMahon C, Reyor LL, Elias N, Kwok WW, McGovern BG, Freeman G, Chung RT, Klenerman P, Lewis-Ximenez L, Walker BD, Allen TM, Kim AY, Lauer GM: High level of PD-1 expression on hepatitis C virus (HCV)-specific CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T cells during acute HCV infection, irrespective of clinical outcome. *J Virol* 82:3154-3160, 2008
  26. Rollier CS, Paranhos-Baccala G, Verschoor EJ, Verstrepen BE, Drexhage JA, Fagrouch Z, Berland JL, Komurian-Pradel F, Duverger B, Himoudi N, Staib C, Meyr M, Whelan M, Whelan JA, Adams VC, Larrea E, Riezu JJ, Lasarte JJ, Bartosch B, Cosset FL, Spaan WJ, Diepolder HM, Pape GR, Sutter G, Inchauspe G, Heeney JL: Vaccine-induced early control of hepatitis C virus infection in chimpanzees fails to impact on hepatic PD-1 and chronicity. *Hepatology* 45:602-613, 2007
  27. Folgori A, Capone S, Ruggeri L, Meola A, Sporeno E, Ercole BB, Pezzanera M, Tafi R, Arcuri M, Fattori E, Lahm A, Luzzago A, Vitelli A, Colloca S, Cortese R, Nicosia A: A T-cell HCV vaccine eliciting

- effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nat Med* 12:190–197, 2006
28. Chambers CA, Kuhns MS, Egen JG, Allison JP: CTLA-4-mediated inhibition in regulation of T cell responses: mechanisms and manipulation in tumor immunotherapy. *Annu Rev Immunol* 19:565–594, 2001
  29. Nakamoto N, Cho H, Shaked A, Olthoff K, Valiga ME, Kaminski M, Gostick E, Price DA, Freeman GJ, Wherry EJ, Chang KM: Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog* 5:e1000313, 2009.
  30. Meyers JH, Sabatos CA, Chakravarti S, Kuchroo VK: The TIM gene family regulates autoimmune and allergic diseases. *Trends Mol Med* 11:362–369, 2005
  31. Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, Sheth PM, Jha AR, Long BR, Wong JC, Satkunarajah M, Schwenker M, Chapman JM, Gyenes G, Vali B, Hycza MD, Yue FY, Kovacs C, Sassi A, Loutfy M, Halpenny R, Persad D, Spotts G, Hecht FM, Chun TW, McCune JM, Kaul R, Rini JM, Nixon DF, Ostrowski MA: Tim-3 expression defines a novel population of dysfunctional T cells with highly elevated frequencies in progressive HIV-1 infection. *J Exp Med* 205:2763–2779, 2008
  32. Golden-Mason L, Palmer BE, Kassam N, Townshend-Bulson L, Livingston S, McMahon BJ, Castelblanco N, Kuchroo V, Gretch DR, Rosen HR: Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD4+ and CD8+ T cells. *J Virol* 83:9122–9130, 2009
  33. Vali B, Jones RB, Sakhdari A, Sheth PM, Clayton K, Yue FY, Gyenes G, Wong D, Klein MB, Saeed S, Benko E, Kovacs C, Kaul R, Ostrowski MA: HCV-specific T cells in HCV/HIV co-infection show elevated frequencies of dual Tim-3/PD-1 expression that correlate with liver disease progression. *Eur J Immunol* 40:1–13, 2010
  34. Wherry EJ, Ha SJ, Kaech SM, Haining WN, Sarkar S, Kalia V, Subramaniam S, Blattman JN, Barber DL, Ahmed R: Molecular signature of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection. *Immunity* 27:670–84, 2007
  35. Blackburn SD, Shin H, Haining WN, Zou T, Workman CJ, Polley A, Betts MR, Freeman GJ, Vignali DA, Wherry EJ: Coregulation of CD8+ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol* 10:29–37, 2009

36. Bengsch B, Seigel B, Ruhl M, Timm J, Kuntz M, Blum HE, Pircher H, Thimme R: Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD8+ T cells is linked to antigen recognition and T cell differentiation. *PLoS Pathog* 6:e1000947, 2010
37. Chang DY, Shin EC: Immune-based therapy for chronic hepatitis C. *J Leukoc Biol* 86:33-39, 2009
38. Velu V, Titanji K, Zhu B, Husain S, Pladevega A, Lai L, Vanderford T H, Chennareddi L, Silvestri G, Freeman GJ, Ahmed R, Amara RR: Enhancing SIV-specific immunity in vivo by PD-1 blockade. *Nature* 458:206-210, 2009
39. Shin EC, Rehermann B: Taking the brake off T cells in chronic viral infection. *Nat Med* 12:276-277, 2006

주 의

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