

제 출 문

미래창조과학부 장관 귀하

이 보고서를 "만성 바이러스 감염의 치료타겟으로서 TIM-3, LAG-3, IL-10의 검증"과제의 보고서로 제출합니다.

2013년 10월 18일

주관연구기관명: 한국과학기술원

주관연구책임자: 신의철

연구원: 이진오, 이지원, 김지혜, 유희태, 오인수

협동연구기관명:

협동연구책임자:

보고서 요약서

과제고유번호	2010-0030075	해당 단계 연구 기간	2010.12.15~2013.10.31	단계 구분	1단계/ 총 1단계
연구사업명	중사업명	바이오의료기술개발사업			
	세부사업명	신약타겟발굴검증사업			
연구과제명	대과제명				
	세부과제명	만성 바이러스 감염의 치료타겟으로서 TIM-3, LAG-3, IL-10의 검증			
연구책임자	신의철	해당단계 참여 연구원수	총: 9명 내부: 9명 외부: 0명	해당단계 연구비	정부: 270000천원 기업: 0천원 계: 270000천원
		총연구기간 참여 연구원수	총: 9명 내부: 9명 외부: 0명	총연구비	정부: 270000천원 기업: 0천원 계: 270000천원
연구기관명 및 소속부서명	한국과학기술원 의과학대학원			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내로 작성합니다)				보고서 면수: 39	
<p>만성 바이러스성 간염 환자의 T세포 subset에서 T세포 억제분자 발현특성을 규명하고 항-바이러스제 치료 중의 발현 변화도 조사함. C형간염바이러스, B형간염바이러스, 인간면역결핍바이러스 등 각종 바이러스에 만성감염되어 있는 환자의 PBMC를 바이러스 항원 peptide mix로 자극 주면서 항체로 T세포 억제분자를 차단하고 세포배양액을 수집하여 IFN-γ와 TNF-α의 농도를 측정하는 T cell restoration assay를 시행한 결과, 각 바이러스 질환마다 다른 종류의 수용체가 조절타겟으로 이용될 수 있음을 규명함. 이러한 연구를 통해 TIM-3, LAG-3, IL-10 중 가장 좋은 조절타겟을 찾고 in vivo에 적용 가능한 blocker를 확보하는 것이 당초 목표였으나, 실험결과 CD27-CD70을 조절하는 것이 항-바이러스 반응(특히 NK세포)을 더욱 잘 조절할 수 있다는 사실을 알게 됨. 이에 따라 CD27을 자극할 수 있는 제조함 soluble CD70 단백질을 제조/생산하였음. 이로써 soluble CD70을 치료용 단백질 후보로 확보하였고, 이의 효과를 C형간염바이러스 시스템에서 검증하였고, 인간화 마우스를 이용하여 soluble CD70을 평가함</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한글	만성 바이러스 감염, C형간염바이러스, T세포, TIM-3, LAG-3, IL-10			
	영어	chronic viral infection, hepatitis C virus, T cells, TIM-3, LAG-3, IL-10			

요약문

I. 제 목

만성 바이러스 감염의 치료타겟으로서 TIM-3, LAG-3, IL-10의 검증

II. 연구개발의 목적 및 필요성

C형간염바이러스, B형간염바이러스, 인간면역결핍바이러스 등에 의한 만성 지속성 바이러스 감염 치료 용으로 사용될 수 있는 T/NK세포 활성조절 바이오신약 개발을 위해, 만성 바이러스 감염의 치료타겟으로서 TIM-3, LAG-3, IL-10의 blocking 효과(또는 CD27-CD70 자극 효과)를 검증하고, 최종적으로 동물모델에서 in vivo 효능을 검증

III. 연구개발의 내용 및 범위

만성 바이러스 감염에서 TIM-3, LAG-3, IL-10R의 발현 특성 규명

TIM-3, LAG-3, IL-10의 T세포 억제 기전 규명

TIM-3, LAG-3, IL-10 blocking 효과 평가 시스템 확립

만성 바이러스 감염질환별 TIM-3, LAG-3, IL-10 blocking의 in vitro 효과 평가

임상지표로서 TIM-3, LAG-3, IL-10 blocking 평가의 의의 발굴

In vivo에 적용 가능한 blocker 확보

인간화 마우스를 이용한 in vivo 효능 평가

IV. 연구개발결과

만성 바이러스성 간염 환자의 T세포 subset에서 T세포 억제분자 발현특성을 규명하고 항-바이러스제 치료 중의 발현 변화도 조사함. C형간염바이러스, B형간염바이러스, 인간면역결핍바이러스 등 각종 바이러스에 만성감염되어 있는 환자의 PBMC를 바이러스 항원 peptide mix로 자극 주면서 항체로 T세포 억제분자를 차단하고 세포배양액을 수집하여 IFN- γ 와 TNF- α 의 농도를 측정하는 T cell restoration assay를 시행한 결과, 각 바이러스 질환마다 다른 종류의 수용체가 조절타겟으로 이용될 수 있음을 규명함. 이러한 연구를 통해 TIM-3, LAG-3, IL-10 중 가장 좋은 조절타겟을 찾고 in vivo에 적용 가능한 blocker를 확보하는 것이 당초 목표였으나, 실험결과 CD27-CD70을 조절하는 것이 항-바이러스 반응(특히 NK세포)을 더욱 잘 조절할 수 있다는 사실을 알게 됨. 이에 따라 CD27을 자극할 수 있는 재조합 soluble CD70 단백질을 제조/생산하였음. 이로써 soluble CD70을 치료용 단백질 후보로 확보하였고, 이의 효과를 C형간염바이러스 시스템에서 검증하였고, 인간화 마우스를 이용하여 soluble CD70을 평가함

V. 연구개발결과의 활용계획

본 연구에서 확보한 soluble CD70을 활용하여 항바이러스 바이오신약 개발에 후보물질로 이용함

SUMMARY

(영문요약문)

In the present study, we examined expression pattern of T-cell inhibitory molecules in patients with chronic viral hepatitis before and after antiviral treatment. In addition, we stimulated peripheral blood lymphocytes from patients infected by hepatitis B virus, hepatitis C virus or human immunodeficiency virus with viral antigen peptide mixes in combination with blocking antibodies against T-cell inhibitory molecules. Then, supernatants were collected and the concentration of IFN- γ and TNF- α was evaluated in T cell restoration assay. As a result, different types of t-cell inhibitory molecules were responsible for T-cell exhaustion in each viral disease. Initially, we wanted to identify the best drug candidate among TIM-3, LAG-3 and IL-10, however, we found that CD27-CD70 was the best drug candidate for antiviral activity. Therefore, we developed recombinant form of soluble CD70 as a candidate material. Finally, we validated antiviral activity of soluble CD70 in the in vitro infection model of hepatitis C virus and evaluated its effect in a humanized mouse model system.

CONTENTS

(영문목차)

Chapter 1. Introduction	07
Chapter 2. Status of the Research in the Field	10
Chapter 3. Results	12
Chapter 4. Achievement of the Goals	26
Chapter 5. Plan	27
Chapter 6. Acquired Information	28
Chapter 7. References	32

목 차

제1장 연구개발과제의 개요	07
제2장 국내외 기술개발 현황	10
제3장 연구개발수행 내용 및 결과	12
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	26
제5장 연구개발결과의 활용계획	27
제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	28
제7장 참고문헌	32

제1장 연구개발과제의 개요

제1절 만성 바이러스 감염질환 현황

1. 만성 바이러스 감염질환 현황

- 가. 전세계적으로 만성 지속성 바이러스 감염(chronic persistent viral infection)은 공중 보건학적 위협이 되고 있다. 현재 전세계에서 약 1억 7천만 명이 C형간염바이러스(hepatitis C virus: HCV)에, 약 3억 5천만 명이 B형간염바이러스(hepatitis B virus: HBV)에, 그리고 약 4천만 명이 인간면역결핍 바이러스(human immunodeficiency virus: HIV)에 감염되어 있다.
- 나. HBV의 경우, 효과적인 예방백신이 개발되어 있으나 이미 감염되어 있는 환자는 간경변증과 간암 발생에 취약한 상태로서 적극적인 의료 대책이 필요하고, HCV의 경우, 아직까지 예방백신이 개발되지 않은 상태로 새로운 감염을 효과적으로 제어하지 못하는 실정이다.
- 다. HCV나 HBV에 만성감염되면 만성간염의 시기를 거쳐 간경변증이나 간암으로 사망할 확률이 증가한다. 그리고, HIV 만성감염은 치료하지 않으면 결국 후천성면역결핍증후군(AIDS)이 발생하여 각종 기회감염이 발생하여 사망한다. 즉, 만성 바이러스 감염은 환자의 morbidity와 mortality를 증가시켜 의학 및 보건학적 문제뿐만 아니라 사회적 문제를 야기한다.

2. 우리나라 현황

- 가. 한국은 간질환으로 인한 사망률이 OECD 국가 중 1위이다. WHO의 조사에 의하면, 전세계적으로 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 있다.
- 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 있고, 2004년도 요양급여 비용자료를 검토하면, 우리나라에서 간질환으로 인한 요양급여지출 총액은 약 3550억원이며 실인원수 약 166만명이다.
- 다. 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 나타났다. 여기에 간질환에서 비롯된 간암까지 고려한다면 그 비용은 더욱 늘어날 것으로 예상된다.
- 라. 이러한 원인은 HBV 또는 HCV 감염으로 인한 바이러스성 간염으로 우리나라에서는 전 인구 중 6-7%가 HBV에 감염되어 있고, 40세 이상 인구의 약 1.3%가 HCV에 감염되어 있다. 우리나라에서 간경변증과 간암의 약 70-80%는 B형 또는 C형간염과 관련이 있는 것으로 알려져 있다.

제2절 만성 바이러스 감염질환 치료제 현황

1. 현행 치료법의 문제점

- 가. 현재 HCV에 의한 만성간염의 표준치료법은 페그인터페론과 리바비린의 병합요법으로 확립되어 있으나, 장기간(48주) 치료를 해야 하며 발열, 골수억제, 우울증 등의 심각한 부작용을 동반한다. 그리고, 전반적으로는 50-80%의 치료 성공률을 보이고 있으나, 한국이나 다른 선진국에 가장 많은 genotype 1 HCV의 경우에는 50%의 환자만이 치료되고 50%는 치료에 실패하는 실정이다.
- 나. 한편, HBV에 의한 만성간염의 경우, 항바이러스제 개발이 활발히 이루어져 현재 라미부딘, 아데포비어, 엔테카비어, 텔비부딘, 테노포비어 등의 항바이러스제가 FDA의 공인을 받았고 한국에서도 클레부딘이 개발된 바 있다. 하지만, 바이러스 감염의 완치에는 아직까지 한계가 많아 한번 치료를 시작하면 거의 평생 장기치료를 해야 하며 내성바이러스가 출현하는 문제가 있다. 항바이러스 치료 후에도 바이러스 감염이 완치되지 않는 문제는 HIV 감염에서도 동일하여, 여러 약제를 병합하여 사용하는 HAART(highly active antiretroviral therapy) 요법은 효과는 좋으나 평생 치료의 부담이 있다.
- 다. 이처럼 만성 바이러스 감염질환의 경우, 질병의 완치에는 아직까지 한계를 보여 거의 평생 요구되는 장기적인 치료와 이에 따른 경제적 부담을 야기하고 있는 실정이다. 이는 항바이러스 치료에 대한 내성바이러스 균주 출현과 환자 개개인에 따른 숙주 요인(host factor)들이 얽혀 있기 때문이다.

2. 만성 바이러스 감염 치료제 개발의 중요성

- 가. 한국은 HBV 및 HCV가 주요 원인인 만성 간질환이 만연하여 간질환으로 인한 사망률이 OECD 국가 중 1위이다. 한국보건사회연구원이 발표한 자료에 따르면 간질환의 사회 및 경제적 비용이 약 2조 6201억원으로 압도적으로 높은 것으로 나타났다(2003년 5월 보건복지포럼).
- 나. 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 있다.

3. 만성 바이러스 감염질환에서 T세포 억제분자의 중요성

- 가. HBV나 HCV 감염이 만성감염으로 지속되는 것은 이들 바이러스에 반응하는 T세포의 기능저하 때문으로 여겨진다.
- 나. 활발한 연구에도 불구하고, 몇 년 전까지만 해도 왜 HBV나 HCV 감염 때 T세포의 기능이 저하되는지 그 이유를 밝히지 못했다.
- 다. 2006년에, 마우스의 LCMV 만성감염에서는 바이러스-특이 CD8 T세포 표면에 T세포

억제분자가 과발현되어 있고, 이 억제분자들 때문에 T세포의 기능이 저하된다는 것이 밝혀졌다. (그림 1; Shin EC & Rehermann B. Nature Medicine 2006. 12:276)

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 받게 되었다.

마. B형 및 C형간염에서도 바이러스-특이 CD8 T세포 표면에 T세포 억제분자가 과발현되어 있다고 보고되고 있다. 하지만 아직 다양한 B형 및 C형간염 환자군에서 T세포 억제분자의 임상적 의의는 체계적으로 연구된 바 없었다.

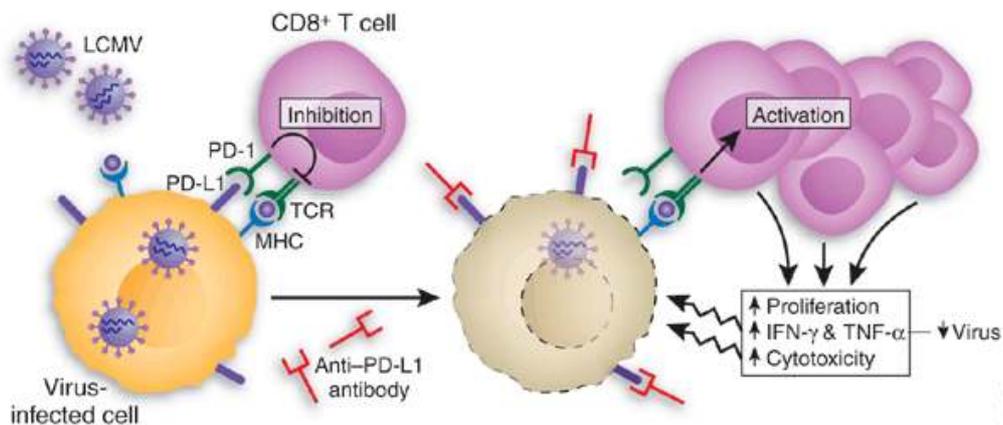


그림 1. 바이러스 만성감염시에 CD8 T세포 표면에 PD-1이라는 T세포 억제 분자가 과발현되어 T세포의 기능을 억제하며, 그 기능을 항체로 차단하였을 때 T세포의 항-바이러스 기능이 회복되어 바이러스 역가가 감소함

제2장 국내외 기술개발 현황

제1절 국내 현황

1. 분자바이러스학 기초연구

가. HCV 및 HBV에 대한 분자바이러스학 기초연구는 세계 수준에 근접하고 있다. 최근 국내의 분자바이러스학 연구자들의 지속적인 연구로 인해 분자바이러스학 기초연구는 세계 수준에 근접하고 있다. HCV의 경우 포항공대 장승기 교수, 한림대 황순봉 교수, 고려대 안병운 교수, 연세대 오종원 교수 등이, HBV의 경우 연세대 류왕식 교수, 건국대 김균환 교수, 한국생명공학연구원 이영익 박사 등이 꾸준히 연구하고 있다. 다만, HIV의 경우 국내 유병률이 낮은 관계로 분자바이러스학 기초연구를 활발히 진행하는 연구자는 없다.

2. 면역학적 접근

가. HCV 및 HBV에 대한 바이러스 면역학적 접근은 제한적으로 수행되고 있다. 국내에서 HCV 및 HBV에 대한 분자바이러스학적 연구는 활발히 수행되는 반면, 바이러스 면역학적 연구는 몇몇 연구팀에서만 제한적으로 수행되고 있다. 포항공대 성영철 교수, 카이스트의 본 연구자 등이 수행하고 있다. 포항공대 성영철 교수 연구팀은 만성 B형간염 치료용 백신을 개발하여 임상시험을 수행 중에 있다. 이는 향후 항바이러스제 치료와 병합되어 사용되어질 것으로 기대된다. 한편 사람의 만성 바이러스 감염은 아니지만, 마우스에서 만성 지속성 감염을 일으키는 LCMV를 이용한 바이러스 면역학 연구가 최근 연세대 하상준 교수에 의해 활발히 수행되기 시작하였다.

3. 항바이러스 신약 개발

가. 국내에서 글로벌 수준의 항바이러스 신약이 개발된 바는 없다. 그 동안 국내에서 개발된 항바이러스 신약으로서 가장 성공적이었던 것은 부광약품의 클레부딘 (상품명: 레보비르)이었다. 그러나, 안타깝게도 근육병증 등의 부작용 문제 때문에 글로벌 수준으로 성장하지는 못하였다. 이외에도 한국화학연구원 손종찬 박사 연구팀이 HIV 치료제를 개발하여 미국 길리어드사에 기술이전을 한 바 있고, 이문페드는 인터페론의 한계점을 극복할 수 있는 VSF를 개발하여 임상시험을 추진하고 있다.

제2절 국외 현황

1. 면역학적 치료제 연구

가. HCV, HBV, HIV 등에 의한 만성 지속성 바이러스 감염에서는 항바이러스 기능을 제대로 하지 못하는 dysfunctional T세포가 특징적으로 관찰된다. 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 밝혀졌다(Nature 439:682-687, 2006). 이 연구는 만성 바이러스 감염에서 T세포 억제분자의 중요성을 밝히는데 그치지 않고 T세포 억제분자가 바이오신약 개발의 타겟으로 이용될 수 있음을 보여 준 연구였다. 즉, PD-1과 같은 T세포 억제분자의 기능을 차단하는 항체나 수용성 수용체(soluble receptor)를 항바이러스 바이오신약으로 개발할 수 있는 가능성을 제시하게 되었다(그림 2).

나. 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 vitro*에서 PD-1의 기능을 차단하면 T세포의 기능이 회복됨이 증명되었다. 이러한 원리에 따라, HIV의 원숭이 모델인 SIV 감염 원숭이에서 anti-PD-1 항체를 이용하여 PD-1의 기능을 *in vivo*에서 차단하였더니 SIV의 역가가 감소하였다는 연구가 발표되었다(Nature 458:206-210, 2009).

다. 그러나, 최근에 시행된 만성 C형간염 침팬지 *in vivo* 실험에서는 anti-PD-1 항체가 T세포의 기능을 회복시키지 못하였고 HCV 바이러스 역가를 감소시키지 못하였다(personal communication with Dr. Christopher Walker, Ohio State University). 이러한 연구결과는 같은 만성 바이러스 감염이라 하더라도 마우스와 사람은 다를 수 있다는 것으로서, PD-1과 같은 T세포 억제분자들을 마우스 모델에서 찾는 것보다는 직접 만성 바이러스 감염 환자의 T세포에서 발굴해야 한다는 사실을 알 수 있다. 이와 같은 생각으로 많은 연구자들이 항바이러스 바이오신약 타겟으로 이용 가능한 T세포 억제분자들을 스크리닝하고 있다.

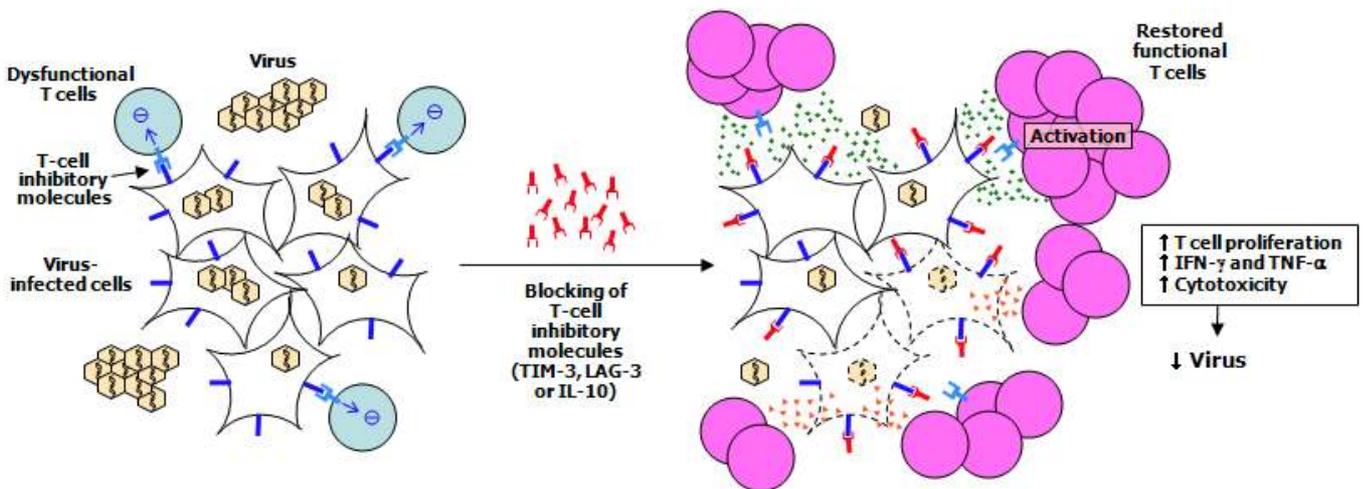


그림 2. 만성 바이러스 감염시에는 제 기능을 하지 못하는 dysfunctional T세포에 T세포 억제분자(T-cell inhibitory molecules)가 과발현되어 있음. 이 기능을 blocker로 차단하면 T세포 증식, IFN- γ 및 TNF- α 분비, 세포독성 등의 T세포 기능이 회복되면서 바이러스 역가는 감소함. 따라서, T세포 억제분자를 바이오신약 타겟으로 설정하고 있음

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 T세포 억제분자 발현 연구

1. T세포 억제분자의 발현 특성 규명

가. 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 조사하였다. T세포 억제분자로 PD-1, IL-10R, Tim-3, LAG-3 등을 조사하고, 대조군 T세포로서 MHC class I tetramer 음성인 CD8 T세포군을 이용하였다. 아래 그림은 T세포 억제분자 중 PD-1의 예로써 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 발현하였다 (그림 3)

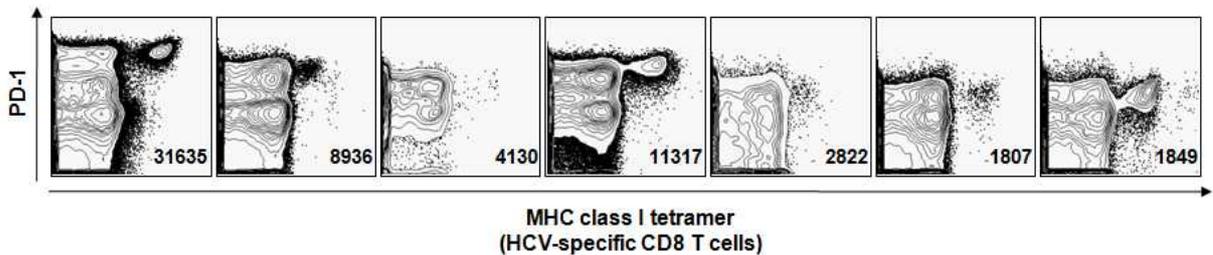


그림 3. 7명의 만성 C형간염 환자 PBMC를 MHC class I tetramer와 anti-PD-1 항체로 형광염색하고 multicolor flow cytometry를 수행한 결과, 모든 만성 C형간염 환자의 HCV-특이 T세포가 PD-1을 매우 강하게 발현함.

나. 한편, T세포 억제분자 간의 발현 패턴을 분석한 결과 PD-1을 발현하는 세포들은 Tim-3나 CTLA-4를 발현하는 세포들과는 다른 세포임을 밝혔다. 즉, PD-1과 다른 T세포 억제분자를 동시에 발현하는 T세포는 거의 검출되지 않았다. (그림 4 및 5)

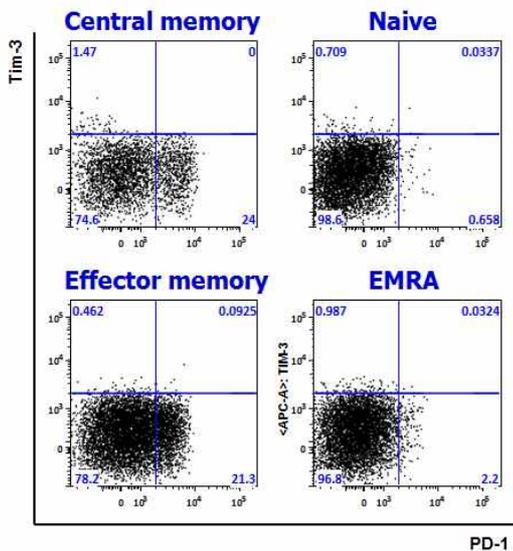


그림 4. CD45RA 및 CCR7 발현 양상을 기준으로 하여 CD8 T세포를 Naive, central memory, effector memory, EMRA로 구분하여 gating한 후, PD-1과 Tim-3의 발현 양상을 분석한 결과. PD-1은 central memory 및 effector memory에서 발현하고, Tim-3는 central memory에서 발현함. 하지만 PD-1과 Tim-3를 동시에 발현하는 세포는 관찰되지 않음

다. CD45RA 및 CCR7 발현 양상을 기준으로 하여 CD8 T세포를 Naive (CD45RA+CCR7+), central memory (CD45RA+CCR7-), effector memory (CD45RA-CCR7-), EMRA (CD45RA+CCR7-)로 구분하여 gating한 후, PD-1과 Tim-3의 발현 양상을 분석한 결과, PD-1은 central memory 및 effector memory에서 발현하고, Tim-3는 central memory에서 발현하였다. 하지만 PD-1과 Tim-3를 동시에 발현하는 세포는 관찰되지 않았다 (그림 4). 이러한 발현 패턴은 PD-1과 CTLA-4의 발현 관계에서도 동일하게 관찰되었다. (그림 5)

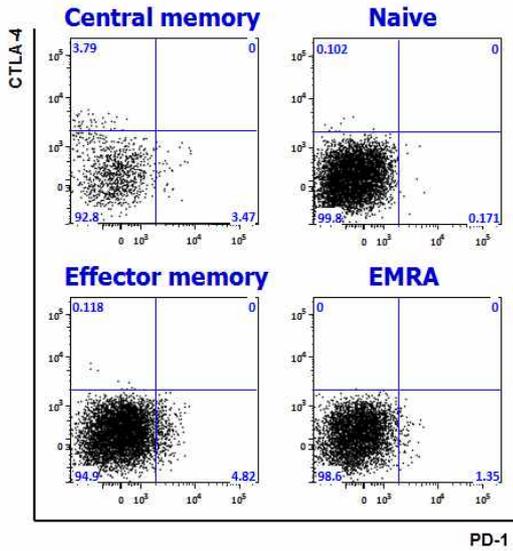
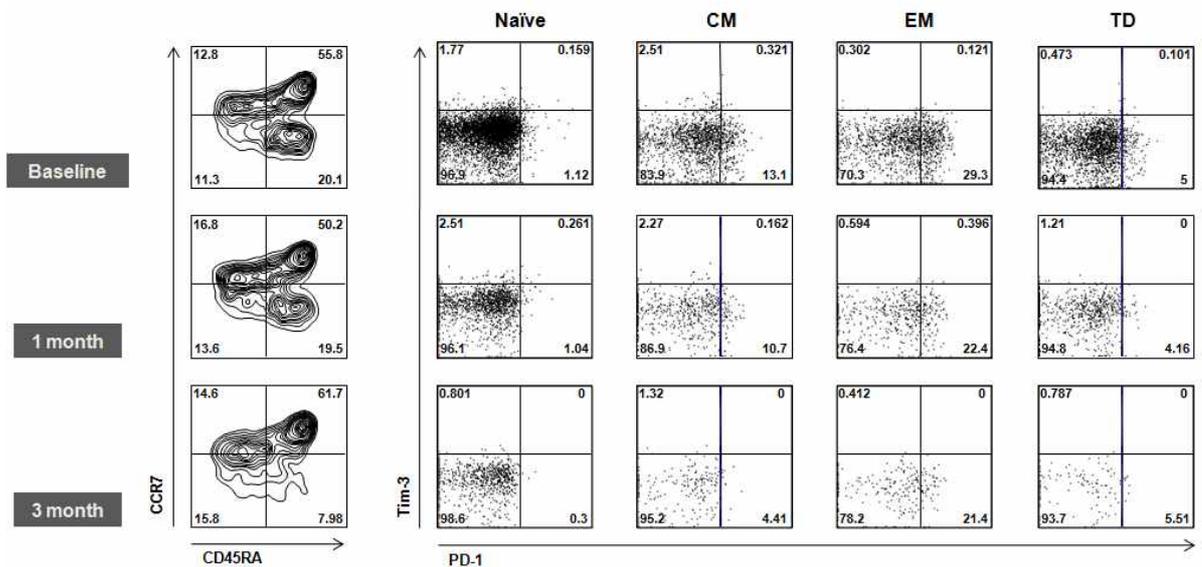


그림 5. CD45RA 및 CCR7 발현 양상을 기준으로 하여 CD8 T세포를 Naive, central memory, effector memory, EMRA로 구분하여 gating한 후, PD-1과 CTLA-4의 발현 양상을 분석한 결과. PD-1은 central memory 및 effector memory에서 발현하고, CTLA-4는 central memory에서 발현함. 하지만 PD-1과 CTLA-4를 동시에 발현하는 세포는 관찰되지 않음

라. 항바이러스제 치료를 받는 만성 B형간염 환자의 말초혈액 림프구에서 치료 전후에 있어 CD8 T세포 억제분자의 발현 특성을 조사한 결과 치료 전에 비해 치료 후에는 CD8 T세포 억제분자의 발현이 감소하는 것을 관찰하였다. (그림 6 위 패널)

마. 이러한 변화는 PD-1에서 두드러졌으며 특히 memory CD8 T세포에서 두드러지게 관찰되었다. 이는 바이러스 항원량의 감소와 더불어 T세포 억제분자의 발현이 감소됨을 증명한 결과로 향후 치료 타겟으로서 T세포 억제분자의 가치를 보여주는 data로서, 유사한 결과가 CD4 T세포에서도 관찰되었다. (그림 6 아래 패널)



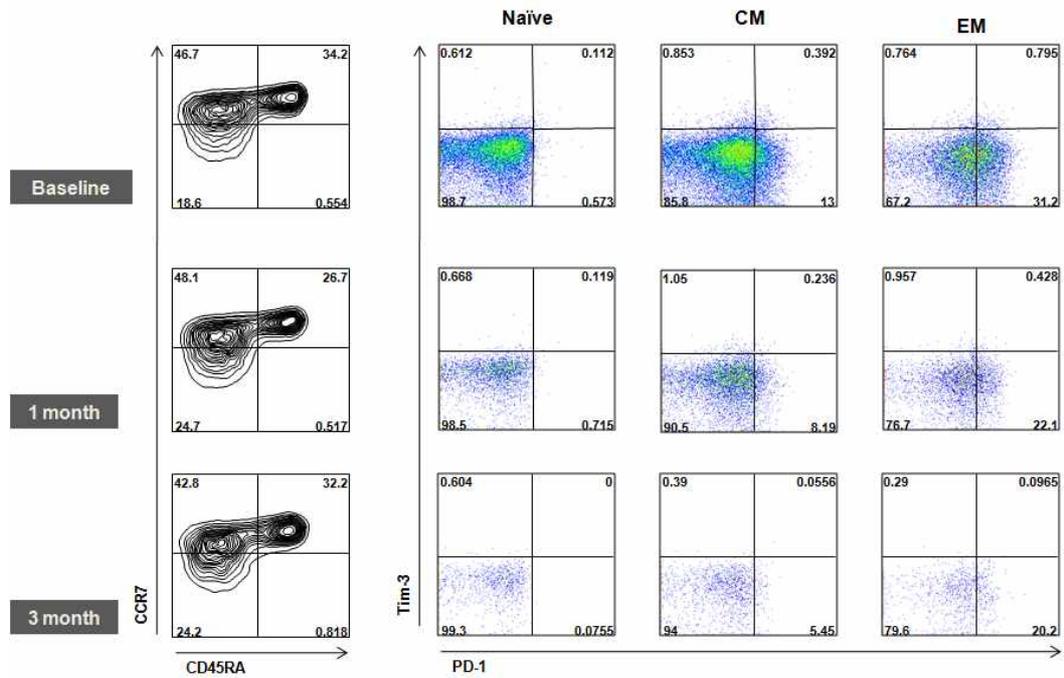


그림 6. 만성 B형간염 환자를 entecavir로 치료하기 전(baseline)과 치료 1개월 째, 3개월 째에 T세포의 naive, central memory, effector memory, EMRA group에서 PD-1과 Tim-3의 발현을 조사한 결과. 위는 CD8 아래는 CD4 T세포 결과를 나타냄.

제2절 T세포 억제기전 규명

1. T세포 억제기전 규명

가. MHC class I tetramer로 항원-특이 CD8 T세포를 검출한 후 PD-1과 IFN- γ intracellular cytokine staining을 함께 시행/분석하면, PD-1^{dim} T세포가 PD-1⁻ T세포보다 IFN- γ 분비를 더 많이함을 알 수 있었다 (그림 7). 이는 매우 새로운 연구결과로 PD-1의 발현량에 따라 PD-1^{dim} T세포와 PD-1^{bright} T세포는 다르게 조절될 가능성을 제시한다. 이의 구체적인 의미를 향후 연구에서 규명해야 한다.

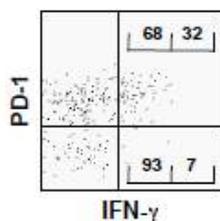


그림 7. MHC class I tetramer로 항원-특이 CD8 T세포를 검출한 후 PD-1과 IFN- γ intracellular cytokine staining을 함께 시행/분석한 결과. PD-1^{dim} T세포가 PD-1⁻ T세포보다 IFN- γ 분비를 더 많이함

나. 한편 Tim-3 기능 차단 효과의 평가를 다각적으로 평가한 결과, 다기능 T세포 (polyfunctional T cell)의 기능이 회복됨을 관찰하였다. 최근, 항바이러스 T세포 면역 반응 연구에서 각광을 받는 것이 IFN- γ , IL-2, TNF- α 를 한꺼번에 분비하는 다기능 T세포이다. 이를 측정하기 위해 intracellular cytokine staining을 이용한 multicolor

flow cytometry 분석을 시행하였다. 그림 8은 intracellular cytokine staining을 이용하여 다기능 T세포 (polyfunctional T cell) 측정을 시행한 예이다. 환자의 림프구에서 anti-Tim-3로 T세포 기능회복을 시도한 경우로 두 환자 (patient #06과 patient #09) 모두에서 anti-Tim-3을 안 준 경우(왼쪽)에 비해 anti-Tim-3을 준 경우(오른쪽)에 IFN- γ , IL-2, TNF- α 3가지 사이토카인을 다 분비하는 세포의 비율(붉은색)과 2가지 사이토카인을 분비하는 세포의 비율(파란색)이 현저히 증가하였다. 즉, polyfunctional T세포의 비율이 현저히 증가한 것이다.

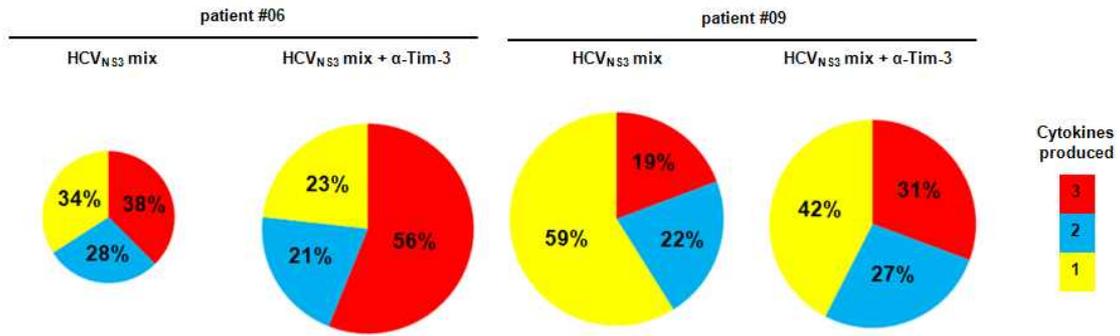


그림 8. Tim-3의 기능을 항체로 차단한 결과, polyfunctional T세포의 비율이 현저히 증가함. 두 환자 (patient #06과 patient #09) 모두에서 anti-Tim-3을 안 준 경우(왼쪽)에 비해 anti-Tim-3을 준 경우(오른쪽)에 IFN- γ , IL-2, TNF- α 3가지 사이토카인을 다 분비하는 세포의 비율(붉은색)과 2가지 사이토카인을 분비하는 세포의 비율(파란색)이 증가함

다. 한편, IL-10의 경우, 그 기능 차단에 의해 T세포 기능뿐만 아니라 NK세포 기능도 향진됨을 밝혔다. 이는 애초에 기대하지 않았던 연구결과로 NK세포 기능의 향진에 의한 항-바이러스 작용도 부수적으로 고려할 수 있게 되었다. (그림 9)

라. T세포 기능회복 후보물질의 하나로 soluble IL10Ra-Fc를 제조하여 다양한 효과를 in vitro에서 관찰한 결과 본 연구팀이 제조한 soluble IL10Ra-Fc는 T세포뿐만 아니라 NK세포의 활성화도 증강시킴을 밝혔다. (그림 9). 따라서, soluble IL10Ra-Fc는 NK세포의 항-바이러스 기능도 증강시키는 부수적인 치료효과가 있을 것으로 기대되었다.

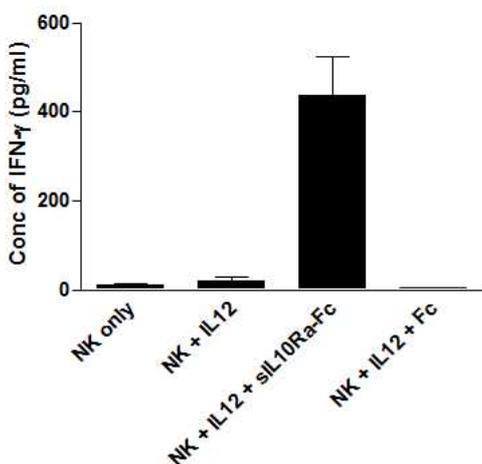


그림 9. 사람 NK세포를 분리한 후, IL-12로 자극을 주어 IFN- γ 생성을 유도하면서, soluble IL10Ra-Fc를 같이 처리하면 IFN- γ 의 생성이 유의하게 증가함. 이는 soluble IL10Ra-Fc가 NK세포의 항-바이러스 기능을 증강시키는 효과도 있음을 나타냄

제3절 평가시스템 확립

1. T세포 억제-차단 시험법 확립

가. 바이러스성 간염 환자의 PBMC를 HCV NS3 peptide mix로 자극 주면서 anti-PD-1, anti-IL-10, anti-TIM-3 등의 항체로 T세포 억제분자를 차단하고 3일 후 세포배양액을 수집하여 IFN- γ 와 TNF- α 의 농도를 측정하였다. 이 결과의 조합으로 각 환자의 T세포 억제 상태를 평가하였다. PBMC의 개수, peptide mix의 농도, 배양시간 등의 인자들을 바꾸어 주면서 가장 효과가 극명하게 나타나는 조건을 잡아 'T세포 억제-차단 시험법'을 확립하였다. 'T세포 억제-차단 시험법'의 대략적인 개요는 그림 10 및 그림 11과 같다.

▪ T Cell Restoration Assay (TCRA)

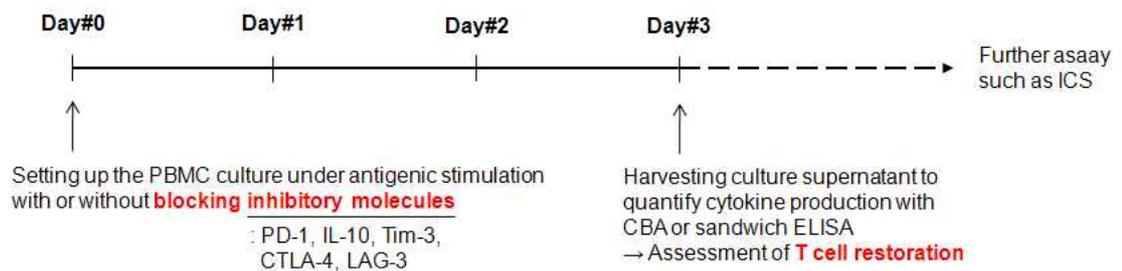


그림 10. 'T세포 억제-차단 시험법'의 대략적인 개요 및 스케줄

T Cell Restoration Assay (TCRA)

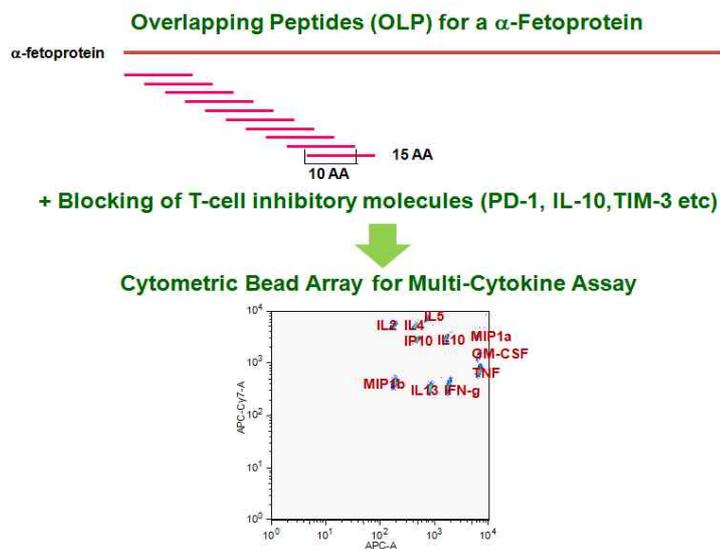


그림 11. 'T세포 억제-차단 시험법'의 대략적인 개요

나. 구체적으로, 각 3×10^5 개의 만성 C형간염 환자 PBMC를 10% FBS/RPMI-1640 배지에 부유시킨 뒤, 항원으로 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도의 HCV NS3 중복펩타이드 혼합액을 첨가하고 각각의 T세포 억제인자 (PD-1, IL-10, TIM-3, CTLA-4, LAG-3) 중화항체를 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의

농도로 첨가한 뒤, 37°C, CO₂ 항온배양기에서 72시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 세포배양액을 채취한 뒤, cytometric bead array (CBA)로 세포배양액 속 IFN- γ , TNF- α , GM-CSF 사이토카인의 양을 측정하여 T세포의 기능 회복을 평가하였다.

다. 그 결과, anti-PD1 항체의 T세포 기능회복 효과는 다수의 환자에서 일관되게 나타난 반면, anti-Tim3와 anti-IL10은 환자 간에 매우 다른 반응을 나타냈다 (그림 12). 이는 T세포 억제분자의 역할과 기능에 따라 환자들을 여러 군으로 분류할 수 있음을 시사한다. 이러한 예비실험 결과는 *in vitro*에서 T세포 억제분자들의 기능을 항체로 차단하였을 때, T세포의 기능을 회복시킬 수 있으며, 그 반응은 각 환자들마다 다양하게 나타난다는 사실을 처음으로 밝힌 것으로서, 이는 본 과제 의 핵심 중 하나인 'T세포 기능회복 검사법'의 기초가 되는 현상이다.

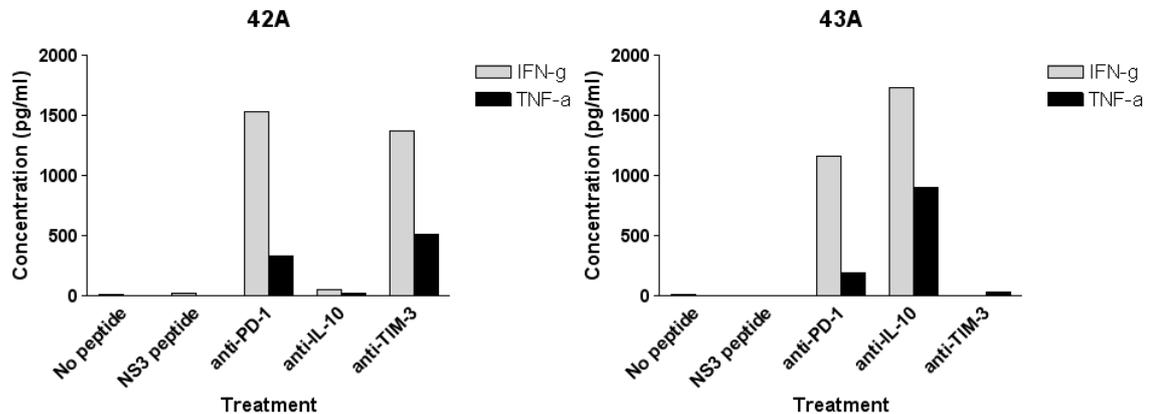


그림 12. 만성 C형간염 환자 2명의 PBMC를 HCV NS3 peptide mix로 자극 주면서 anti-PD1, anti-IL10, anti-Tim3 등의 항체로 T세포 억제분자를 차단하고 3일 후 세포배양액을 수집하여 IFN- γ 와 TNF- α 의 농도를 측정된 결과, 42A 및 43A 두 환자 모두에서 anti-PD1은 사이토카인을 분비하는 T세포 기능을 회복시킴. 반면 anti-IL10은 43A 환자에서만, 그리고 anti-Tim3는 42A 환자에서만 T세포 기능을 회복시킴. 이는 환자별로 주로 작동하는 T세포 억제분자가 서로 다를 것임을 시사하는 결과임

다. 이러한 실험을 총 21명의 HCV 만성감염자로 확장하여 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 관찰하였다. (그림 13)

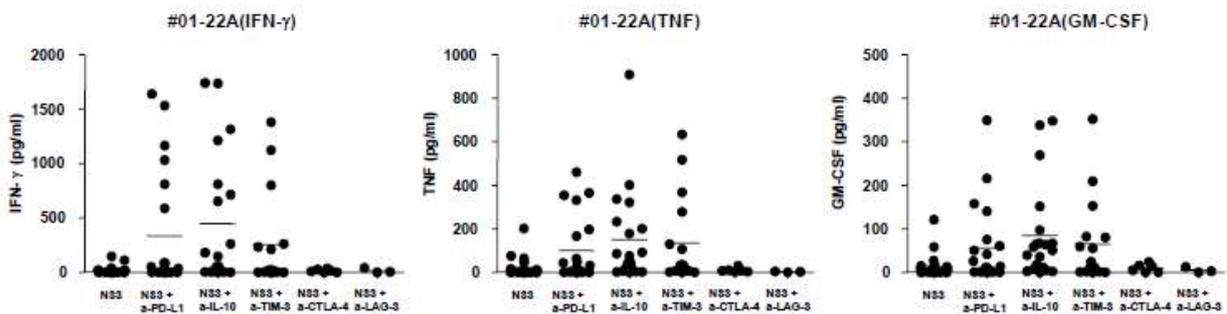


그림 13. 소모성 T세포 조절인자의 차단에 따른 T세포의 기능회복. 각 3X10⁵개의 환자 (n=21) PBMC를 10% FBS/RPMI-1640 배지에 부유시킨 뒤, 항원으로 1 μ g/ml의 농도의 HCV NS3 중복펩타이드 혼합액을 첨가하고 각각의 T세포 억제인자 (PD-1, IL-10,

TIM-3, CTLA-4, LAG-3) 중화항체를 5 μ g/ml의 농도로 첨가한 뒤, 37 $^{\circ}$ C, CO₂ 항온배양기에서 72시간 동안 배양하였음. 배양이 끝나면 세포배양액을 채취한 뒤, cytometric bead array (CBA)로 세포배양액 속 IFN- γ , TNF- α , GM-CSF 사이토카인의 양을 측정하여 T세포의 기능 회복을 평가하였음. 왼쪽 그림은 IFN- γ , 가운데 그림은 TNF- α , 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.

마. 이러한 기능회복은 IFN- γ , TNF- α , 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 나타내었다. 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 있을 것으로 기대된다.

바. 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 14)

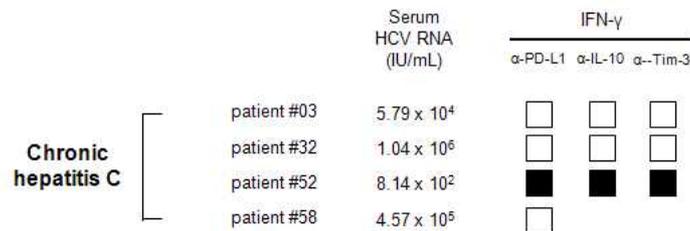


그림 14. 소모성 T세포 조절인자의 차단에 따른 T세포 기능회복과 HCV viral load와의 관계. 4명의 HCV 만성감염자에서 상기기술한 T세포 기능 회복 평가를 시행하고 그 결과를 하얀 박스 (□, 기능회복이 없는 경우)나 검은 박스 (■, 기능회복이 나타난 경우)로 나타내고, 이를 각 환자의 HCV viral load와 함께 나타냄. 4명의 환자 중, HCV viral load가 1,000 IU/ml 이하인 경우(환자번호 52)에서만 기능 회복이 관찰되고, 10,000 IU/ml 이상인 경우에는 관찰되지 않음

사. 또 다른 종류의 환자군에서 T세포 억제-차단 시험을 시행하였다. 이 환자군은 만성 신부전 때문에 혈액투석을 지속적으로 받는 환자들로 HCV 감염 고위험군에 속하는 환자군이였다. 이들에게서 바이러스학적, 혈청학적 결과와 세포면역반응을 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 실험하였다. 각 환자들에서 T세포 억제-차단 시험을 시행한 결과, 각 환자들마다 매우 다양한 패턴의 T세포 기능회복 패턴을 나타내었다 (그림 15). 이로써, 각 환자별로 주로 작동하는 T세포 억제수용체를 판별하는 것이 매우 중요함을 알 수 있었다.

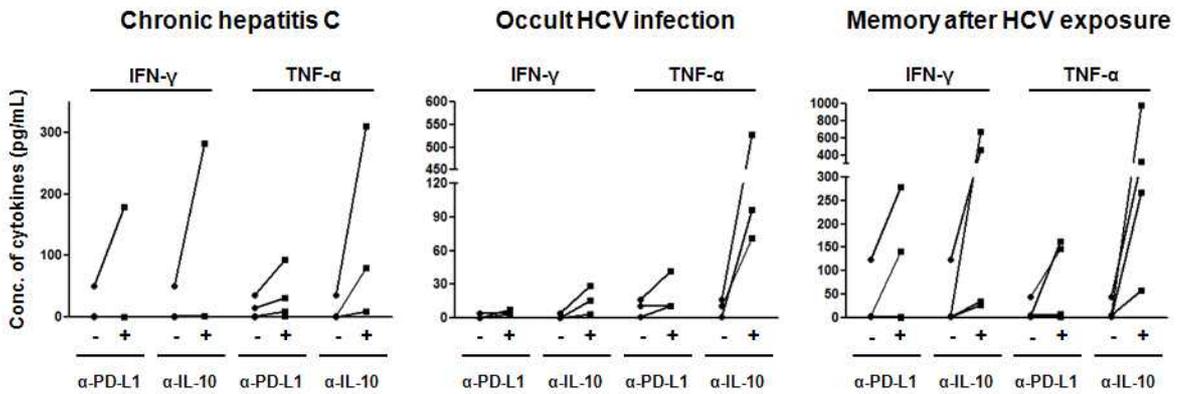


그림 15. 만성 C형간염(chronic hepatitis C), 잠복성 HCV 감염 (occult HCV infection), HCV 노출 후 기억 T세포반응 보유군(memory after HCV exposure)의 PBMC를 이용하여 T세포 억제-차단 시험을 시행한 결과. anti-PD-L1이나 anti-IL-10 항체를 이용하여 T세포 억제인자를 차단하였을 때, IFN- γ 나 TNF- α 생성이 증가함을 나타냄. 그리고 반응은 각 환자마다 다양한 패턴으로 나타남.

아. 한편, 유사한 *in vitro* 예비실험을 HIV감염환자에서 시행한 결과, HCV감염환자와는 다소 상이한 결과를 나타내었다. 애초에 HCV만성 감염 환자의 T세포에서 5가지의 조절타켓 (PD-1, IL-10, TIM-3, CTLA-4, LAG-3) 후보를 발굴하였지만, 실제 blocking 실험에서는 PD-1, IL-10, TIM-3의 blocking만이 T세포를 성공적으로 회복시킨 반면 HIV감염자에서는 이에 더하여 LAG-3의 blocking도 T세포 회복을 유도하였다. 이는 각기 다른 바이러스 질환마다 적용해야 할 T세포 억제분자가 서로 다를 수 있음을 나타내는 data이다. (그림 16)

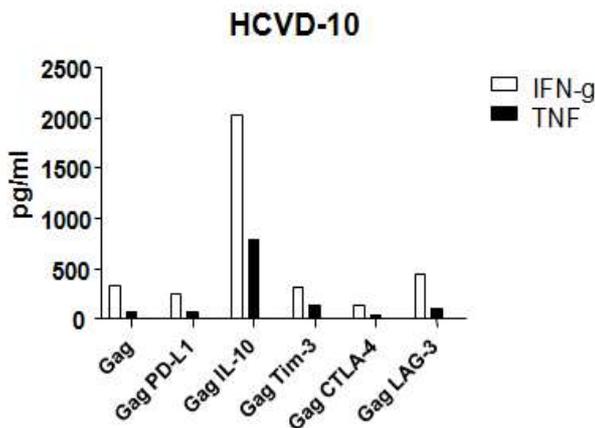


그림 16. HIV감염자에서의 dysfunctional한 T세포 조절인자의 차단에 따른 T세포 기능회복의 일례. HIV감염 환자의 PBMC를 gag peptide mix로 자극을 주면서 anti-PD-L1, anti-IL-10, anti-Tim-3, anti-CTLA-4, anti-LAG-3등의 항체로 T세포 억제분자를 차단하고 3일 후 세포배양액을 수집하여 IFN- γ 와 TNF- α 의 농도를 측정한 결과, 본 환자에서는 LAG-3를 block하였을 때 사이토카인을 분비하는 T세포의 기능을 회복시킴.

제4절 치료용 단백질 후보물질 확보

1. T/NK 세포 활성화 물질로서 soluble CD70 발굴

가. 본 과제에의 궁극적인 목표는 C형간염바이러스, B형간염바이러스, 인간면역결핍바이러스 등에 의한 만성 지속성 바이러스 감염 치료용으로 사용될 수 있는 T세포/NK세포 활성화조절 바이오신약 개발이다.

나. 이러한 목표 하에 1-2차년도에는 주로 TIM-3, LAG-3, IL-10 등의 수용체를 조절타겟으로 삼아 그 blocking 효과를 바이러스-특이 T세포나 NK세포의 측면에서 규명하였다. 다. 그 결과, 위에서 언급한 'T세포 억제-차단 시험'을 통해 TIM-3, LAG-3, IL-10 등의 수용체를 blocking 하면 바이러스-특이 T세포의 활성이 증가함은 관찰하였으나 그 효과는 모든 환자에서 일관되게 나타나지 않았다. 이에 따라 새로운 조절타겟을 검색하였고 그 결과 CD27-CD70을 새로운 조절타겟으로 발굴하였다.

라. CD27은 120KDa type I transmembrane glycoprotein으로 T cell의 대부분과 일부 B cell, NK cell에서 발현하고 있다. CD27은 T cell에서 잘 알려진 costimulatory 분자이다. CD27의 리간드는 CD70으로서 type II transmembrane protein이고 T cells, B cells, dendritic cells에서 주로 발현된다. T cells과 B cells에서는 Ag receptor signaling에 의해 발현이 유도되고, activated DCs에서 발현이 증가된다. 따라서, CD70-CD27 결합은 DC에 의한 T cell activation에 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다. CD27은 NK cells에서도 발현하고 있으며, 그 발현 양상이 CD56과 유사성이 있어 CD27+ subset과 CD27- subset으로 구분하고, 기능적으로도 다르다. CD27+ subset은 주로 사이토카인 분비 기능을 보이고, CD27- subset은 cytotoxicity 기능을 나타낸다. (그림 17)

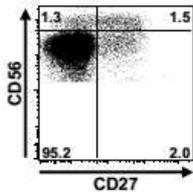


그림 17. NK세포에서 CD27과 CD56의 발현 양상

2. NK 세포 활성화 물질로서 soluble CD70 검증

가. 본 연구팀은 CD70을 soluble form으로 제작하여 CD27+ subset NK cells을 특이적으로 활성화 시킨다면 cytotoxicity에 대한 영향은 최소로 하면서 IFN-g와 같은 cytokine 분비를 증강시킴으로서 host damage를 줄이면서 바이러스의 증식을 억제할 수 있을 것으로 예상하였다. 이에 따라, soluble CD70을 Fc-융합 재조합단백 형태로 제작하여 CD27+ NK cells의 activator로 작용할 수 있는지 살펴보았다. 그 결과, CD27을 통한 CD27+ NK cells의 활성화는 IFN-g 분비를 촉진하고, cytotoxicity에는 영향을 주지 않았다. 또한 분비된 IFN-g는 HCV의 증식을 억제하였다.

나. 주요 연구결과를 요약하면, 본 연구팀이 제조한 soluble CD70은 NK세포에 잘 결합하며 그 결합 양상은 NK세포에서의 CD27 발현 양상과 유사하였다. 그리고 NK세포에 대한 soluble CD70의 결합은 soluble CD27의 존재하에 억제되어, soluble CD70이 NK세포에서 발현하는 CD27에 선택적으로 결합함을 알 수 있었다. (그림 18)

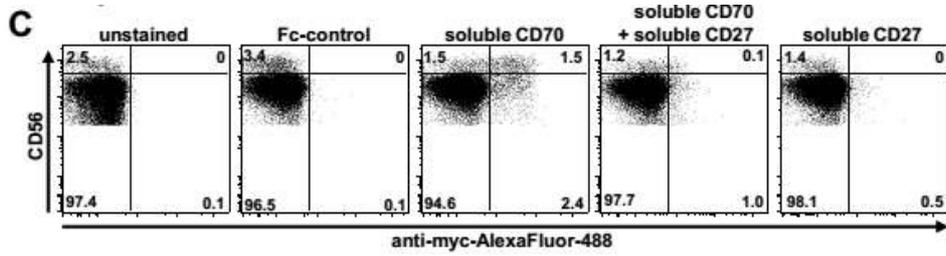


그림 18. NK세포에 대한 soluble CD70 결합능. NK세포에 soluble CD70을 결합시키고 형광으로 염색을 하면 그 양상은 NK세포에서의 CD27 발현 양상과 매우 유사하게 나타나며, 이러한 결합은 soluble CD27의 존재하에 사라짐. 이는 soluble CD70이 NK세포에서 발현하는 CD27에 선택적으로 결합함을 시사함.

다. Soluble CD70은 IL-12에 의해 분비되는 IFN-g의 양을 크게 향상시켰으며, 이 효과는 용량-반응 관계를 나타내었고 IFN-g의 mRNA 양도 증가시켰다. 그리고 이러한 효과는 anti-CD70 Ab이나 soluble CD27에 의해 상쇄되어 이러한 반응이 soluble CD70과 CD27의 결합에 의한 것임을 다시 확인하였다. 하지만, NK cells에 soluble CD70 단독으로 처리했을 때는 IFN-g의 분비를 유도하지 못했다. Soluble CD70은 IL-12 이외에도 poly(I:C)에 의한 IFN-g 분비를 증강시켰으나, CD16을 통한 자극에 의한 IFN-g 분비에는 영향을 주지 못했다. (그림 19)

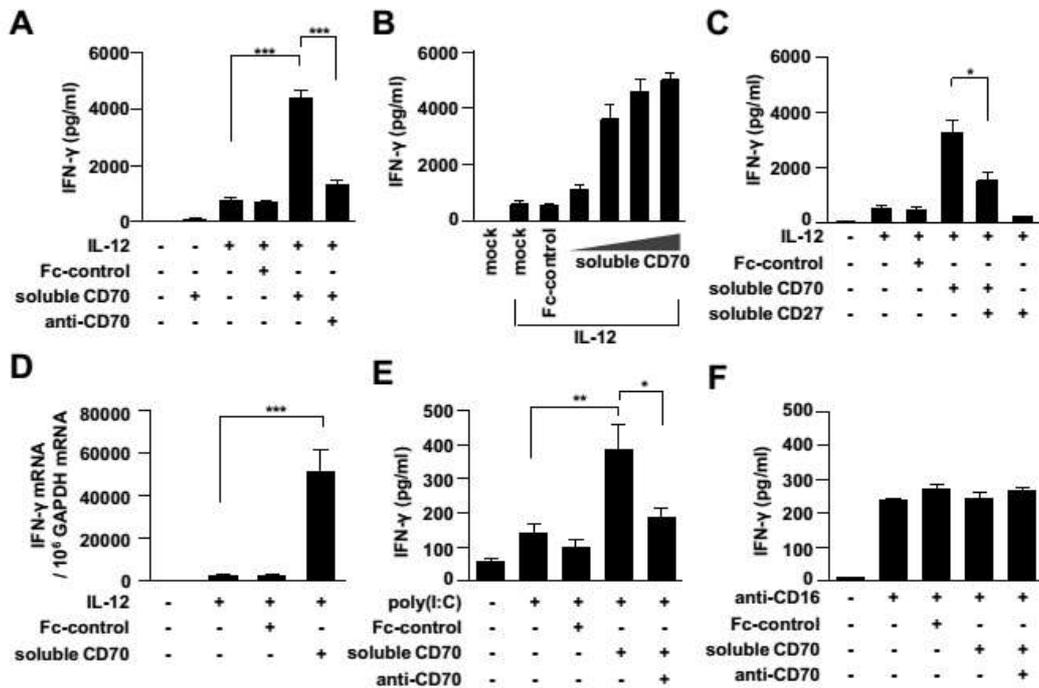


그림 19. Soluble CD70이 NK세포의 IFN-g 분비에 미치는 영향

라. Soluble CD70이 NK세포의 IFN-g 분비에 미치는 영향을 intracellular cytokine staining으로 조사하였다. 그 결과, soluble CD70은 IL-12의 존재하에 CD56bright NK

세포에서만 IFN-g의 생성을 증가시켰다. 하지만 세포독성의 마커인 CD107a는 증가시키지 않았다. (그림 20)

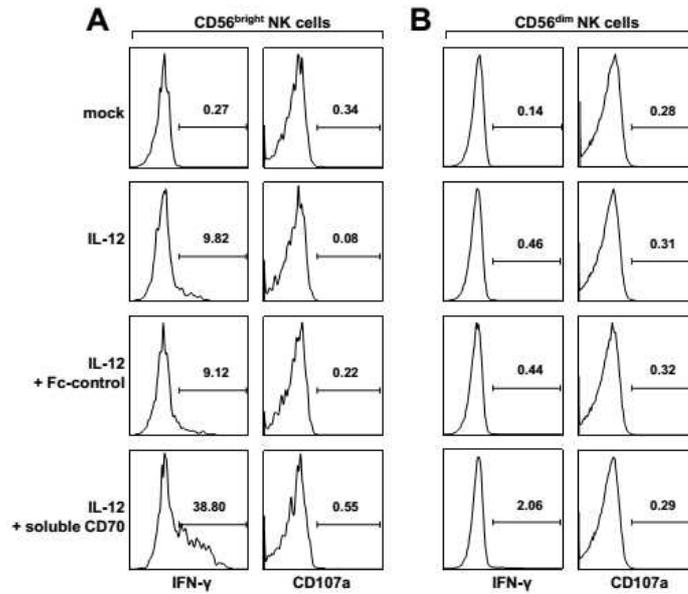


그림 20. Soluble CD70이 NK세포의 IFN-g 분비에 미치는 영향을 평가한 intracellular cytokine staining

마. 다음으로, soluble CD70이 NK cell의 cytotoxicity를 증가시키는지 확인해보았다. K562 세포를 target cell로 사용한 경우, IL-12를 단독으로 처리했을 때, 약 20%의 cytotoxicity의 증가가 있었지만, soluble CD70에 의한 추가 cytotoxicity는 관찰되지 않았다. (그림 21) 또한, 간암세포주인 Huh-7.5 cell을 이용한 실험에서는 IL-12 처리에 의해 cytotoxicity가 아주 크게 증가하지만, 여기서도 soluble CD70에 의한 추가 cytotoxicity는 관찰되지 않았다. (그림 21) 이 결과로, soluble CD70을 통한 CD27 자극은 NK cell의 cytotoxic activity를 유도하지 않는 것을 알 수 있었다.

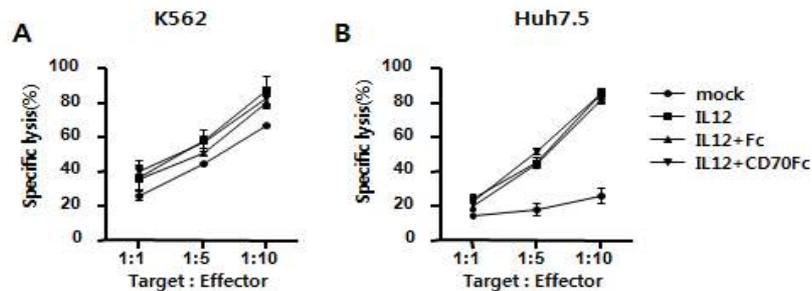


그림 21. Soluble CD70이 NK세포의 cytotoxicity에 미치는 영향

바. 한편, soluble CD70이 NK cell의 세포증식을 증가시키는지 확인해보았다. IL-15를 단독으로 처리했을 때, CD56^{bright} NK세포에서는 약 90% 그리고 CD56^{dim} NK세포에서는 약 70%의 세포가 증식을 했는데, soluble CD70에 의한 추가적인 세포증식은 관찰되지 않았다. (그림 22) 이 결과로, soluble CD70을 통한 CD27 자극은 NK cell의 세포증식을 유도하지 않는 것을 알 수 있었다.

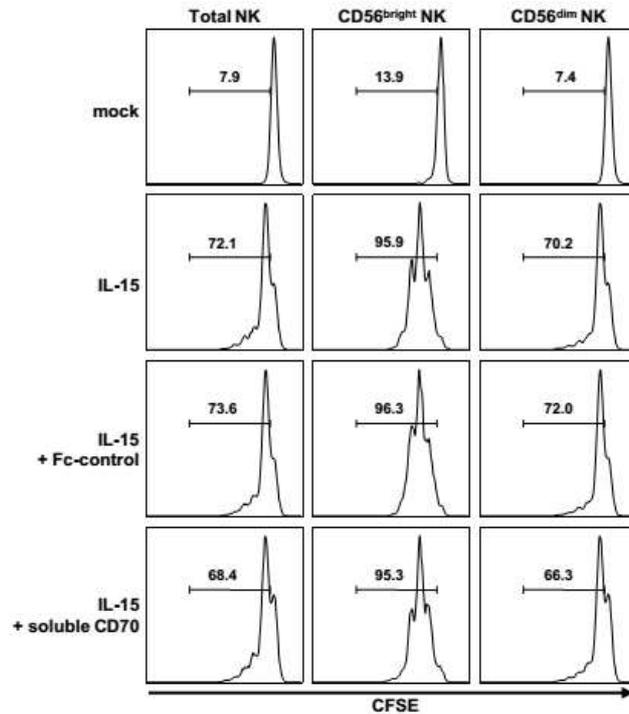


그림 22. Soluble CD70이 NK세포의 세포증식에 미치는 영향

3. Soluble CD70의 항바이러스 활성 검증

가. NK cells로부터 분비된 IFN-g는 다른 면역세포를 활성화시키기도 하지만, 직접적으로 viral replication을 억제하는 역할도 수행한다. 따라서 soluble CD70을 이용한 IFN-g 분비 촉진은 virus를 억제하는 좋은 수단이 될 수 있다. 더군다나 cytotoxicity의 증강 효과가 없기 때문에 host damage 없이 항바이러스 효과를 나타낼 것으로 기대되었다. 따라서, HCV in-vitro replication 시스템을 이용하여 soluble CD70의 항바이러스 효과를 살펴보았다.

나. JFH-1 HCV를 Huh-7.5에 감염시키고, 이를 IL-12와 soluble CD70으로 처리한 NK cell과 co-culture했을 때, IL-12만을 처리한 NK cell군에 비하여 유의하게 HCV의 titer가 감소함을 관찰하였다. 또한, anti-CD70 blocking antibody를 처리한 군에서는 viral titer 감소가 나타나지 않았다 (그림 23A). 따라서, soluble CD70에 의한 특이적인 viral clearance 증가가 있음을 알 수 있었다. 이러한 viral clearance는 soluble CD70을 처리한 군에서 분비되는 IFN-g의 양과 비례관계를 보였으며 (그림 23D), IFN-g를 다양한 농도로 직접 처리한 비교군과 비교했을 때, 그 양에 비례하여 virus replication이 억제됨을 관찰하였다 (그림 23C).

다. NK cell이 분비한 IFN-g의 viral replication 억제 효과를 직접적으로 확인하기 위하여, anti-IFN-g blocking antibody와 anti-IFN-a/b blocking antibody를 이용하여 실험하였다. 그 결과, HCV replication 억제효과는 anti-IFN-g blocking antibody에 의해 특이적으로 저해됨을 관찰하였다 (그림 23B). Co-culture supernatant를 이용하여 NK cell에 의한 HCV-infected Huh-7.5 cells의 killing을 살펴본 결과, IL-12를 처리한 군에서는 cytotoxicity가 증가하였지만, soluble CD70에 의한 추가적인 cytotoxicity의 증

가는 관찰되지 않았다 (그림 23E). 따라서, soluble CD70으로 활성화된 NK cell은 viral replication을 효과적으로 억제하였다. 또한, 이 viral replication 억제는 활성화된 NK cell에서 분비된 IFN-g의 증가에 의한 것이며, NK cell cytotoxicity에 의한 것이 아님을 알 수 있었다.

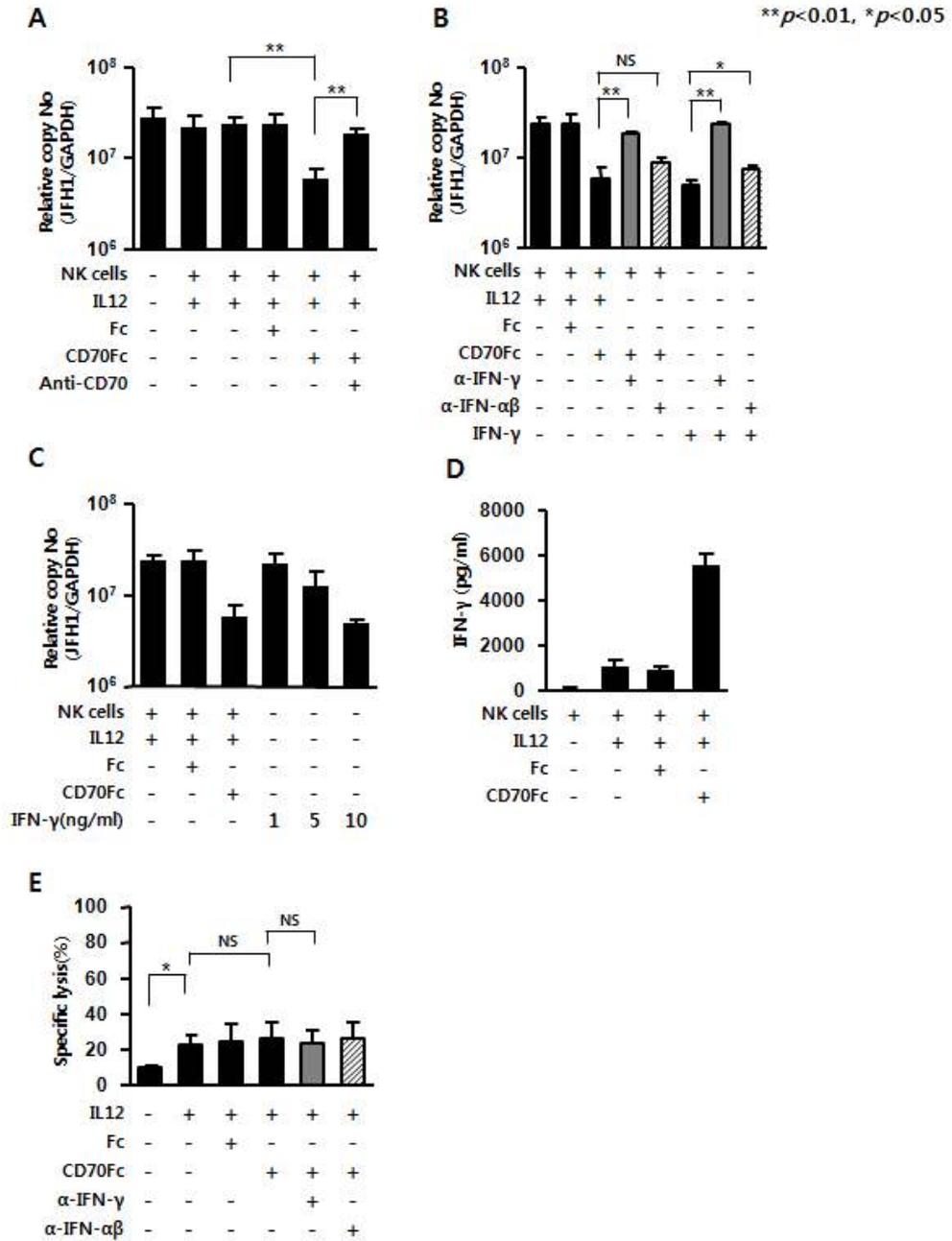


그림 23. Soluble CD70이 HCV 감염세포에 미치는 영향.

Soluble CD70은 NK세포의 cytotoxicity는 증가시키지 않으면서, IFN-g 분비를 통한 항-HCV 효과를 선택적으로 증가시켜 HCV 증식을 억제함

라. 상기 연구를 통해, TIM-3, LAG-3, IL-10의 blocking보다 CD27-CD70을 조절하는 것이 항-바이러스 반응(특히 NK세포)을 더욱 잘 조절할 수 있다는 사실을 알게 되었다. 이에 따라 CD27을 자극할 수 있는 재조합 soluble CD70 단백질을 치료용 단백질 후보로 확보하였다.

4. Soluble CD70의 in vivo 평가

가. Soluble CD70의 활성을 in vivo에서 평가하기 위해 인간화 마우스(humanized mouse)를 이용하여 평가실험을 하였다. 이를 위해 인간화 마우스에 IL-12 20 ng을 단독 또는 soluble CD70 20 ug과 병합하여 복강내로 주사하고 24시간 후에 혈청 내의 IFN-g 농도를 ELISA로 측정하였다. 그 결과, IL-12 단독 투여 군에 비해 IL-12 + soluble CD70 병합 투여군에서 혈청 IFN-g의 농도가 더 높게 나타났다. (그림 24) 이는 soluble CD70의 in vitro 실험결과와 유사한 결과이다.

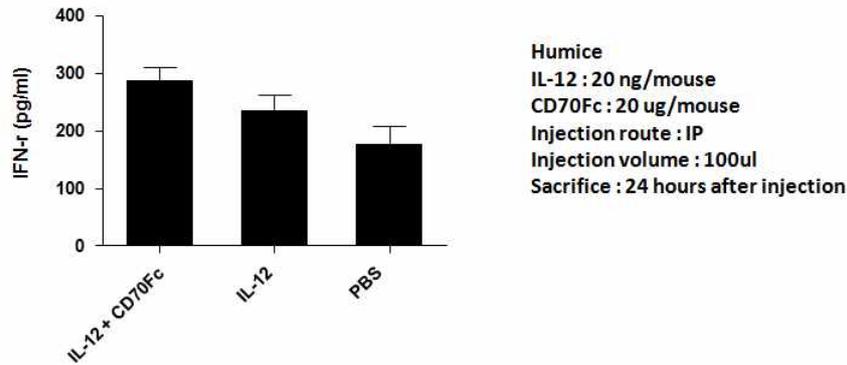


그림 24. 인간화 마우스에서 soluble CD70의 투여가 혈청 IFN-g 농도에 미치는 영향

나. 한편 동일 실험을 통하여 얻어진 비장세포에서 total NK세포와 CD56bright NK세포를 gating하고 다양한 세포표면 및 세포내부 단백질 마커들의 발현을 조사한 결과, IL-12 단독 투여 군에 비해 IL-12 + soluble CD70 병합 투여군에서 유의한 변화는 관찰할 수 없었다. (그림 25) 이러한 결과는 soluble CD70의 in vitro 실험결과와 유사한 결과이다.

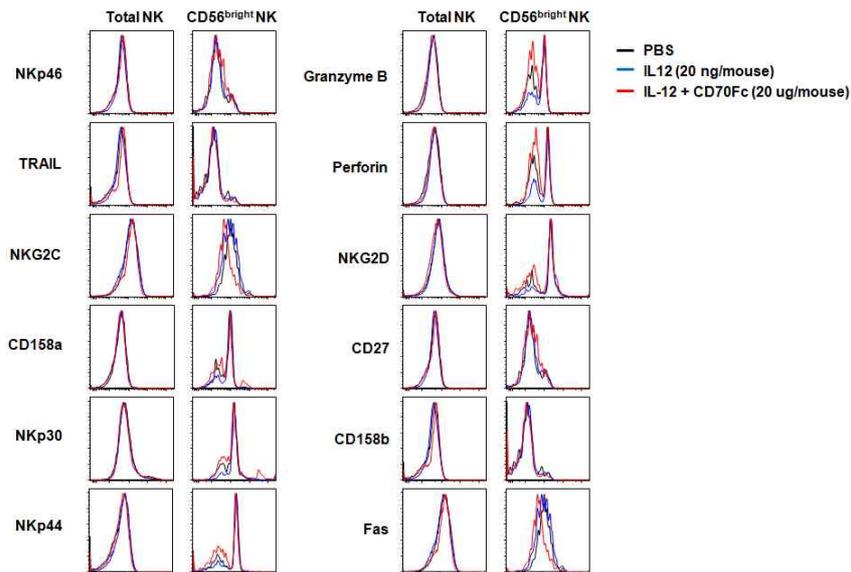


그림 25. 인간화 마우스에서 soluble CD70의 투여가 세포표면 및 세포내부 단백질 마커들의 발현에 미치는 영향

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 목표달성도 및 기여도

1. 연도별 연구목표, 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도

- 가. 만성 바이러스 감염에서 TIM-3, LAG-3, IL-10R의 발현 특성 규명: 100%
- 나. TIM-3, LAG-3, IL-10의 T세포 억제 기전 규명: 100%
- 다. TIM-3, LAG-3, IL-10 blocking 효과 평가 시스템 확립: 100%
- 라. 바이러스 감염질환별 TIM-3, LAG-3, IL-10 blocking의 in vitro 효과 평가: 100%
- 마. 임상지표로서 TIM-3, LAG-3, IL-10 blocking 평가의 의의 발굴: 100%
- 바. In vivo에 적용 가능한 blocker 확보: 100% (soluble CD70)
- 사. 만성 C형간염 침팬지 T세포를 이용한 in vitro 효능 평가
최근 연구에 사용이 금지된 침팬지 대신 인간화 마우스를 이용하여 평가
- 아. 만성 C형간염 침팬지를 이용한 in vivo 효능 평가
최근 연구에 사용이 금지된 침팬지 대신 인간화 마우스를 이용하여 평가

2. 관련 분야의 기술발전예의 기여도

- 가. 미국, 유럽, 일본에서는 과거부터 세포면역학의 기초연구 및 응용연구가 활발했던 반면, 한국에서는 세포면역학 연구가 활성화되지 않았다. 본 연구과제의 성공적으로 수행으로 확립된 세포면역학 연구기술과 기법들이 한국 세포면역학 기초연구의 활성화에 일조할 것으로 기대된다.
- 나. 또한, 본 연구과제는 세포면역학 기초연구를 임상응용으로 확대하는 중개연구의 특성을 지니고 있어, 이러한 연구의 좋은 역할 모델로 발전시킬 수 있다. 그리고, 본 연구를 통하여 만성 바이러스 감염에서 T/NK세포의 특성을 규명하여 사람 T/NK세포 조절 기전에 대한 새로운 이해 기반을 마련하였고, 본 연구를 통하여 발굴된 지식/기술은 만성 바이러스 감염뿐만 아니라 각종 종양질환의 기반 지식/기술 발전을 촉진할 것으로 기대된다.

제5장 연구개발결과의 활용계획

제1절 신약개발 활용 가능성

1. 바이오신약 가능성

가. 본 과제에서 후보물질로 확보한 soluble CD70에 대해서는 논문뿐만 아니라 특허를 출원해 놓은 상태이다. 이를 활용하면 NK세포의 활성화를 유도하여 만성 바이러스 감염 치료용 바이오신약을 개발할 수 있을 것이다. 일단은 HCV 치료목적으로 개발 하지만, 이는 매우 용이하게 HBV 및 HIV 감염으로 적응증을 확대할 수 있을 것이다. 현재 산업화의 가능성을 두고 국내 여러 제약회사들과 의논 중이다.

2. 보건의료 측면의 의의

가. 현재 전세계에서 약 1억 7천만 명이 HCV에, 약 3억 5천만 명이 HBV에, 그리고 약 4천만 명이 HIV에 감염되어 있는 현실을 고려할 때, 본 연구결과는 공중보건학적으로 매우 큰 의미가 있을 것으로 기대된다. 특히 한국에서의 높은 간질환 사망률이 HBV 및 HCV 만성감염 및 이에 따른 간경화 및 간암에 기인함을 고려할 때, 그 사회적 기여도는 매우 클 것으로 기대된다. 구체적으로, 한국보건사회연구원이 발표한 자료에 따르면 간질환의 사회 및 경제적 비용이 약 2조 6201억원으로 압도적으로 높은 것으로 나타났다(2003년 5월 보건복지포럼).

나. 현재 항바이러스 치료제의 세계시장 규모는 2005년 17,493백만 달러로 2015년에는 70,769백만 달러 규모로 성장할 것으로 예상된다(BT 기술동향 보고서 121권, 국가생명공학 정책연구센터). 이중 약 50%를 HBV 및 HCV 등의 간염바이러스 치료제가 차지하고 있다. 그리고, 시장규모는 지속적으로 증가하고 있기 때문에, 본 연구과제가 궁극적으로 바이오신약 개발로 이어진다면 상당한 경제적 부가가치를 창출할 것으로 기대된다.

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제1절 최근 연구 동향

1. 바이러스 감염에서 PD-1의 역할

- 가. PD-1은 T세포 표면에 발현하는 억제 수용체 중 하나임. PD-1에게는 두 종류의 리간드가 있는데 B7 family에 속하는 PD-L1, PD-L2가 리간드임
- 나. 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
- 다. 만성 바이러스 감염의 바이러스-특이 T세포에서 PD-1의 역할은 만성 LCMV 감염 마우스 모델에서 처음으로 확인되었음(1). 만성 LCMV 감염에서처럼, 만성 HCV 감염에서 바이러스-특이 CD8 T세포에서 PD-1이 과발현되어 있었으며, HCV-특이 PD-1high T세포는 기능이 저하되어 있었음(2-4). 게다가 PD-1/PD-L1의 상호작용을 차단했을 때 분열증식능력, 세포용해능, 및 사이토카인(IFN- γ TNF- α) 생성과 같은 T세포 기능이 회복되었음(2-4)
- 라. PD-1high 기능장애 T세포는 기억 T세포의 전구 상태에서 발현되는 CD127 발현이 낮았으며, T세포 노화 마커인 CD57의 발현이 높았음 (2,4). PD-1highCD127low HCV-특이 CD8 T세포는 자주 세포사(apoptosis)에 빠졌음(5)
- 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(6). 게다가 PD-1/PD-L1의 차단은 말초혈액에서 얻은 HCV-특이 CD8 T세포의 기능을 회복시켰지만, 간에서 얻은 CD8 T세포는 그렇게 하지 못했음(6). 체내의 서로 다른 구획에 위치하는 바이러스-특이 CD8 T세포들의 차이는 향후에 연구해 볼 필요가 있음
- 바. HCV 급성 감염기에 PD-1의 역할 역시 연구되어짐. 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(7,8). 한편, 적어도 한 연구이상에서는 급성 HCV 감염 시 PD-1의 과발현이 HCV 감염 결과와 관계없다는 결론을 내렸음(9)
- 사. 급성 C형 간염의 칩팬지 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(10)
- 아. 만성 HCV감염에서 HCV-특이 CD8 T세포의 PD-1 레벨은 T세포 에피토프의 회피 돌연변이(escaping mutation)이 발생하게 되면 감소함(7). 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

차. 아주 최근에 실험 백신을 투여하고, HCV를 감염시킨 침팬지에서 PD-1 발현을 측정
한 연구가 있었음. 이 연구에서 HCV에 감염된 침팬지의 HCV-특이 CD8 T세포의 표
현형이 분석되었고, 이는 adenovirus/DNA HCV NS3-NS5 백신 연구에서 일부 결과
가 나와있음(11)

차. 대조군에 비해 백신을 투여한 침팬지의 HCV-특이 CD8 T세포는 PD-1을 적게 발현
하였으며 IFN- γ 의 분비능이 더 높았음. 이 결과와 일치하게, 간 내 PD-1, PD-L1의
mRNA 레벨 역시 대조군에 비해 백신을 맞은 침팬지에서 유의하게 낮았음. 이 연구
결과에 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

2. 바이러스 감염에서 CTLA-4의 역할

가. CTLA-4는 구조적으로 중요한 T세포 보조자극(costimulatory) 분자인 CD28과 상동적
임(homologous). 그리고 CTLA-4의 발현은 활성화 T세포에서 증가되어 있음(12)

나. 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 활
성화 신호를 저해함

다. 만성 LCMV 감염 마우스 모델에서 CTLA-4를 차단했을 때 T세포 기능이 회복되지
는 않았지만(1), 최근 연구에서 만성 HCV 감염에서 CTLA-4의 역할이 중요하다는 결
과를 보임(6,13)

라. 만성 C형 간염 환자의 간조직에서 분리한 HCV-특이 CD8 T세포는 PD-1 뿐만 아니
라 CTLA-4까지 과발현하고 있었음. PD-1과 CTLA-4의 동시 발현(co-expression)은 간
에 침윤되어 있는 림프구에서는 관찰되었으나, 말초혈액의 림프구에서는 관찰되지 않
았음(13). 이는 체내에서 구획에 따른 바이러스-특이 CD8 T세포의 표현형에 차이가
있음을 의미함

마. PD-1+CTLA-4+ HCV-특이 T세포는 심각한 기능장애가 있었음(6). PD-1+CTLA-4+
HCV-특이 T세포는 PD-1과 CTLA-4 경로를 동시에 차단하였을 때에만 기능이 회복
되었고, 각각의 경로를 차단했을 때에는 그러지 못하였음(13) HCV-특이 CD8 T 세포
의 기능을 회복시켜 치료에 이용하는 전략으로서 여러 종류의 억제 수용체를 동시에
차단하는 것이 필요함

3. 바이러스 감염에서 TIM-3의 역할

가. Tim-3은 원래 Th1 CD4 T세포의 특수한 표지로서 발견되었음(14). Tim-3와 그 리간
드인 galectin-9 사이의 상호작용은 Th1 세포의 세포사를 촉진하고 Th1 세포의 반응
을 종결시킴

나. 만성 바이러스 감염 시 Tim-3의 역할은 처음에 HIV 감염에서 확인되었음(15). HIV
에 감염된 환자들에서 Tim-3+ CD8 T세포가 증가되었고 T세포가 발현하는 Tim-3 수
준이 바이러스 역가(viral titer)와는 양의 상관관계를, CD4 T세포 수와는 반대의 관계
를 나타냄(15)

- 다. Tim-3를 과발현하는 HIV-특이 CD8 T세포는 기능적으로 장애를 나타냈으며 Tim-3의 차단은 HIV-특이 CD8 T세포의 기능을 회복시킴(15). 이후, Tim-3의 기능은 만성 HCV 감염에서도 연구되었음(16). Tim-3가 기능이 저하된 HCV-특이 CD8 T세포에서 과발현되었고, Tim3+ CD8 T세포는 표현형이 CD127^{low}CD57^{high}로서 만성 HCV 감염시 PD-1+ CD8 T세포의 표현형과 동일하였음(2,4)
- 라. Tim3+PD-1+ HCV-특이 CD8 T세포는 우선적으로 말초혈액보다 간 내부에 더 많았음. 중요하게, Tim-3의 차단은 증식과 INF- γ 생산의 증가로 뒷받침되는 HCV-특이 CD8 T세포의 기능적인 회복으로 이어짐
- 마. Tim-3의 역할은 또한 HCV/HIV 동시 감염에서도 연구되었음. HCV 감염만 있는 경우에 비하여 HCV/HIV가 동시감염된 경우에 Tim3+PD-1++ HCV-특이 CD8 T세포가 더 많았고 Tim-3/PD-1 동시 발현이 간 손상과 상관관계가 있었음(17). Tim-3 또는 PD-1 차단, 둘 중 하나 만으로도 Tim3+PD-1+ HCV-특이 CD8 T세포의 기능을 충분히 회복시킬 수 있다는 것이 확인됨. 흥미롭게도 Tim3+PD-1+ 표현형은 HCV-특이 CD8 T세포에서 HIV-특이 CD8 T세포 보다 많았으며, 이는 서로 다른 바이러스-특이 T세포에서의 서로 다른 장애(impairment)를 의미함

4. 바이러스 감염에서 다른 억제성 수용체의 역할

- 가. 만성 바이러스 감염시 T세포의 기능을 하향조절(downregulation)할 수 있는 가능성이 있는 또 다른 분자들을 발견하기 위해서 microarray와 gene expression profiling 이 LCMV 감염 설치류 모델에서 수행됨(18)
- 나. 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 알려졌다(19)
- 다. 가장 최근에, T세포의 PD-1, 2B4, CD160, KLRG1, LAG-3 그리고 CTLA-4의 동시발현이 만성 HCV 감염에서 연구되었음(20). 다수의 억제성 수용체들의 동시발현이 HCV-특이 CD8 T세포에서 관찰되었고 이는 낮은 수준의 CD127 발현과 관련 있었음

5. 관련연구에 대한 향후 전망

- 가. 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
- 나. 최근의 한 연구에서 SIV에 감염된 macaque들의 생체 내(in vivo)에서 anti-PD-1 antibody가 나타내는 차단 효과를 평가했음(22). PD-1의 차단은 면역 반응을 증진시켰으며 바이러스 역가를 상당히 감소시켰고 감염된 숙주들의 생존은 연장되었음(22)
- 다. 그러나 생체 내에서의 억제성 수용체 차단을 실제 치료에 적용하기 위해서는 몇 가지 발생가능한 부작용들을 고려해야 함. 한 연구에서 PD-L1-/- 마우스의 만성 LCMV 감염은 심한 면역병리학적 손상 때문에 치명적이라는 것을 밝혔으며(1), 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 감염으로 이어질 수 있음(23)

라. 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

마. 한편, 최근에는 글로벌 제약회사들에 의해 PD-1 blocker (anti-PD-1 Ab 또는 anti-PD-L1 Ab)의 악성종양질환에 대한 임상 I상 시험이 완료되었다는 보고가 있었고, 보고에 따르면 부작용이 없으면서도 좋은 효과를 나타내었다 (New Eng J Med, 2012). 하지만 아직까지 바이러스 질환에의 응용은 되지 않고 있다.

바. 그리고 최근에는 항-바이러스 특이 T세포나 NK세포의 항-바이러스 활성을 향상시키기 위해 T세포 억제분자들의 blocking뿐만 아니라, co-stimulatory 수용체들을 agonist를 이용하여 자극하는 방안도 고려되는 상황이다.

제7장 참고문헌

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) 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+ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J Virol* 81;9249-9258, 2007
- 5) 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+ 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
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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
- 9) Kasprowitz 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+ and CD4+ T cells during acute HCV infection, irrespective of clinical

- outcome. *J Virol* 82;3154-3160, 2008
- 10) 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 JL, 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
 - 11) 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
 - 12) 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
 - 13) 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.
 - 14) Meyers JH, Sabatos CA, Chakravarti S, Kuchroo VK: The TIM gene family regulates autoimmune and allergic diseases. *Trends Mol Med* 11;362-369, 2005
 - 15) Jones RB, Ndhlovu LC, Barbour JD, Sheth PM, Jha AR, Long BR, Wong JC, Satkunarajah M, Schweneker M, Chapman JM, Gyenes G, Vali B, Hyrcza 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
 - 16) 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
 - 17) 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
 - 18) 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

- 19) 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
- 20) 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
- 21) Chang DY, Shin EC: Immune-based therapy for chronic hepatitis C. *J Leukoc Biol* 86;33-39, 2009
- 22) 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
- 23) 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 미래창조과학부에서 시행한 바이오의료기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 미래창조과학부에서 시행한 바이오의료기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표하거나 공개하여서는 아니 됩니다.

연구개발결과 활용계획서

1. 연구성과 및 활용 현황

사업명	신약타겟발굴·검증사업	연구책임자	신의철	주관기관	한국과학기술원
과제번호	2010-0030075	과제명	만성 바이러스 감염의 치료타겟으로서 TIM-3, LAG-3, IL-10의 검증		

과학기술/학술적 연구성과(단위 : 건)													
전문학술지 논문게재				초청 강연 실적	학술대회 논문발표		지식재산권				수상 실적	출판실적	
국내논문		국외논문			국내	국제	출원		등록			저역서	보고서
SCI	비SCI	SCI	비SCI				국내	국외	국내	국외			
1	1	5	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

인력양성 및 연구시설(단위 : 명,건)							
학위배출		국내외 연수지원				산학강좌	연구기자재
박사	석사	장기		단기			
		국내	국외	국내	국외		
0	0	0	0	0	0	0	0

국제협력(단위 :명,건)						
과학자교류		국제협력기반			학술회의개최	
국내과학자 해외파견	외국과학자 국내유치	MOU체결	국제공동연구	국제사업참여	국내	국제
0	0	0	0	0	0	0

산업지원 및 연구성과 활용(단위 : 건)							
기술확산				연구성과활용(사업화 및 후속연구과제 등)			
기술실시계약	기술이전	기술지도	기술평가	후속연구추진	사업화추진중	사업화완료	기타목적활용
0	0	0	0	0	0	0	0

전문화술지 논문게재 성과정보

과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci 여부	impact Factor	국제공동 연구논문	기여도
2010-00 30075	201208	Colorimetric Focus-Forming Assay with Automated Focus Counting by Image Analysis for Quantification of Infectious Hepatitis C Virions	K a n g , Wonseok; S h i n , Eui-Cheol	SCI	PLOS ONE	7(8)	국외	SCI등재	4.092	아니오	30
2010-00 30075	201209	Hepatitis C virus infection enhances TNF α -induced cell death via suppression of NF- κ B	Park J; Kang W; Ryu SW; Kim WI; C h a n g DY; Lee DH; Park DY; Choi YH; Choi K; Shin EC	직접입 력	Hepatology	56(3)	국외	SCI등재	11.665	아니오	50
2010-00 30075	201307	Programmed death-1 (PD-1)-dependent functional impairment of CD4+ T cells in recurrent genital papilloma	C h a n g DY; Song SH; You S; Lee J; Kim J; Racanelli V; Son H; Shin EC	직접입 력	Clinical and experimental medicine	13(4)	국외	SCI등재	2	예	30
2010-00 30075	201307	Immunosenescent CD8+ T cells and C-X-C chemokine receptor type 3 chemokines are increased in human hypertension	Youn JC; Yu HT; Lim BJ; Koh MJ; Lee J; C h a n g DY; Choi YS; Lee SH; Kang SM; Jang Y	직접입 력	Hypertension	62(1)	국외	SCI등재	6.207	아니오	30
2010-00 30075	201309	CD27 engagement by a soluble CD70 protein enhances non-cytolytic antiviral activity of CD56bright natural killer cells by IFN- γ secretion	Young-So on Jang; Wonseok K a n g ; Dong-Yeo p Chang; Pil Soo S u n g ; Bum-Cha n Park; Seok Ho	직접입 력	Clinical Immunology	150(1)	국외	SCI등재	4.046	아니오	50

			Y o o ; Y o u n g Woo Park; Eui-Cheol Shin								
--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

전문학술지 논문게재 성과정보

과제번호	게재연월	논문제목	총저자명	출처	학술지명	권(호)	학술지구분	sci 여부	impact Factor	국제공동 연구논문	기여도
2010-0030075	201111	Clinical Implications of Chemokines in Acute and Chronic Hepatitis C Virus Infection	K a n g , Wonseok; S h i n , Eui-Cheol ;	직접입력	Y O N S E I MEDICAL JOURNAL	52(6)	국내	SCI등재	1.02	아니오	50
2010-0030075	201302	Ribavirin Does Not Impair the Suppressive Activity of Foxp3(+)CD4(+)CD25(+) Regulatory T Cells	Lee J; Choi YS; Shin EC	직접입력	I m m u n e Network	13(1)	국내	SCI미등재		아니오	100

학술대회 논문발표 성과정보

과제번호	발표년월	학술대회명	저자	논문제목	학술대회구분	개최국
2010-0030075	201109	18th international symposium on HCV and related viruses	Shin EC, Park SH, Nascimbeni M, Major M, Feinstone SM, Rice CM, Rehermann B	The percentage of hepatitis C virus-specific CD127+ memory T cells in the acute phase T cell response predicts the outcome of HCV infection	국제학술대회	미국

2. 연구개발결과 활용 계획 (해당항목에 “○” 표시)

기술이전	기업화	후속연구 추진	타 사업 활용	그 밖의 목적 활용	연구결과 활용 중단
		○			

가. 당해연도 활용계획 (6하 원칙에 따라 구체적으로 작성)

본 연구를 통하여 유전자재조합 형태의 soluble CD70 단백질을 항바이러스 바이오신약 후보물질로 확보하고 in vitro 실험에서 항-HCV 활성을 검증하였지만, 향후 그 이상의 연구 개발 여부는 연구비 수주 여부에 달려 있음

나. 활용방법

본 연구를 통하여 유전자재조합 형태의 soluble CD70 단백질을 항바이러스 바이오신약 후보물질로 확보하고 in vitro 실험에서 항-HCV 활성을 검증하였지만, 향후 그 이상의 연구 개발 여부는 연구비 수주 여부에 달려 있음

다. 차년도 이후 활용계획 (6하 원칙에 따라 구체적으로 작성)

본 연구를 통하여 유전자재조합 형태의 soluble CD70 단백질을 항바이러스 바이오신약 후보물질로 확보하고 in vitro 실험에서 항-HCV 활성을 검증하였지만, 향후 그 이상의 연구 개발 여부는 연구비 수주 여부에 달려 있음

3. 기대효과

1. 바이오신약 가능성

가. 본 과제에서 후보물질로 확보한 soluble CD70에 대해서는 논문뿐만 아니라 특허를 출원해 놓은 상태이다. 이를 활용하면 NK세포의 활성화를 유도하여 만성 바이러스 감염 치료용 바이오신약을 개발할 수 있을 것이다. 일단은 HCV 치료목적으로 개발 하지만, 이는 매우 용이하게 HBV 및 HIV 감염으로 적응증을 확대할 수 있을 것이다. 현재 산업화의 가능성을 두고 국내 여러 제약회사들과 의논 중이다.

2. 보건의료 측면의 의의

가. 현재 전세계에서 약 1억 7천만 명이 HCV에, 약 3억 5천만 명이 HBV에, 그리고 약 4천만 명이 HIV에 감염되어 있는 현실을 고려할 때, 본 연구결과는 공중보건학적으로 매우 큰 의미가 있을 것으로 기대된다. 특히 한국에서의 높은 간질환 사망률이 HBV 및 HCV 만성감염 및 이에 따른 간경화 및 간암에 기인함을 고려할 때, 그 사회적 기여도는 매우 클 것으로 기대된다. 구체적으로, 한국보건사회연구원이 발표한 자료에 따르면 간질환의 사회 및 경제적 비용이 약 2조 6201억원으로 압도적으로 높은 것으로 나타났다(2003년 5월 보건복지포럼).

나. 현재 항바이러스 치료제의 세계시장 규모는 2005년 17,493백만 달러로 2015년에는 70769백만 달러 규모로 성장할 것으로 예상된다(BT 기술동향 보고서 121권, 국가생명공학 정책연구센터). 이중 약 50%를 HBV 및 HCV 등의 간염바이러스 치료제가 차지

하고 있다. 그리고, 시장규모는 지속적으로 증가하고 있기 때문에, 본 연구과제가 궁극적으로 바이오신약 개발로 이어진다면 상당한 경제적 부가가치를 창출할 것으로 기대된다.

4. 문제점 및 건의사항

※ 연구성과의 제고를 위한 제도·규정 및 연구관리 등의 개선점