



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

Del-1에 의한 항체 매개성 이식 거부 반응
조절

Regulation of Antibody-Mediated Rejection in Kidney
Transplantation by Del-1

울산대학교 대학원

의과학과

김희중

Del-1에 의한 항체 매개성 이식 거부 반응
조절

지도교수 최은영

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2024년 8월

울산대학교 대학원
의과학과
김희중

김희중의 이학석사학위 논문을 인준함

심사위원장 장 수 환 (인)

심사위원 강 민 지 (인)

심사위원 최 은 영 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2024년 8월

국문요약

고형 장기 이식에서 항체 매개성 거부 반응(Antibody-mediated rejection, ABMR)은 long-term allograft failure를 초래하는 가장 큰 요인이다. 현재 항체 매개성 거부 반응을 예방 및 치료하기 위해 면역억제제와 혈장 교환술 등의 치료를 시행하지만, ABMR의 재발 방지는 한계가 있다. 신장 이식 후 환자와 이식편 향상을 위해 ABMR의 예방 및 치료를 위한 새로운 표적인자 발굴이 절실한 상태이다. 따라서, 신장 이식 후 장기간 이식편 생존을 저해의 가장 큰 요인인 ABMR에 대한 다양한 기전 연구를 통해 새로운 치료 표적을 발굴하고 있다. 본 연구에서는 Donor-specific antibody(DSA) 매개 혈관 내피 세포 활성화 제어를 통해 ABMR을 개선할 수 있는지를 확인하였다.

연구결과, 건강한 정상인의 면역세포와 상업용 Anti-HLA class I 항체를 함께 배양하면 혈관 내피 세포의 활성화 marker가 증가하였다. 재조합 Del-1 단백질을 가한 경우 혈관 내피 세포에서 다양한 ABMR markers의 발현이 감소하였다. 신장 이식 환자의 시료들을 이용해 분석한 결과, ABMR 환자의 면역세포가 Non-ABMR 환자의 면역세포보다 혈관 내피 세포에 대한 부착능이 더 큰 것을 확인하였다. 이러한 ABMR 환자의 면역세포 부착능은 재조합 Del-1 단백질을 가한 경우 감소하였다. 또한 Del-1 단백질은 혈관 내피 세포의 glycocalyx를 감소시켰으며, 면역세포에서 유래한 perforin에 의한 혈관 내피 세포의 lysis를 감소시켰다. 이는 Del-1 단백질이 acute tissue injury를 완화시킬 수 있다는 것을 나타낸다. 신장 이식 환자의 serum에서 total IgG 및 Del-1 농도를 측정된 결과, 정상인 또는 Non-ABMR 환자에 비해, ABMR 환자의 serum에서 total IgG 및 Del-1 농도의 평균값이 증가한 것을 확인하였다. 이러한 결과들은 조직 이식에 의한 ABMR 가능성의 빠른 진단을 위한 marker 발굴 및 ABMR의 tissue injury 기전 규명을 위한 연구에 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

중심단어: 신장 이식, 항체 매개성 거부 반응, 혈관 내피 세포, Del-1

목 차

국문요약.....	i
목차.....	ii
표 및 그림 차례.....	iv
1. Introduction.....	1
2. Materials & Methods.....	4
2.1. 세포 및 세포 배양.....	4
2.2. PBMC 분리 및 동결 보존과 해동.....	4
2.3. 혈관 내피 세포 활성화와 Del-1 처리.....	5
2.4. Conventional RT-PCR와 실시간 정량 증합효소 연쇄반응(qRT-PCR)을 통 한 ABMR markers 발현량 비교.....	6
2.5. 세포 부착 분석법(Cell adhesion assay).....	9
2.6. 면역 세포 화학 분석(Immunocytochemistry).....	9
2.7. 효소 결합 면역 흡착 분석법(Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	10
2.8. 유효성 검사.....	10
3. Results.....	12
3.1. PBMC와 DSA-매개로 혈관 내피 세포 활성화 확인.....	12
3.2. DSA-매개로 활성화된 혈관 내피 세포에서 PBMC 부착 증가.....	12

3.3. DSA-매개에 의해 활성화된 혈관 내피 세포를 제어하기 위한 Del-1 단백질 적용 가능성 검사.....	13
3.4. Del-1이 혈관 내피 세포 활성화 markers 발현을 감소.....	13
3.5. Del-1이 활성화된 혈관 내피 세포에 대한 PBMC 부착을 감소.....	14
3.6. Del-1에 의한 acute tissue injury 감소.....	14
3.7. 신장 이식 환자의 serum 분석.....	16
3.8. Del-1이 신장 이식 환자의 PBMC와 DSA-매개로 증가된 혈관 내피 세포 활성화 markers 발현량을 감소.....	16
3.9. Del-1이 신장 이식 환자의 PBMC와 DSA-매개로 활성화된 혈관 내피 세포간의 부착을 감소.....	17
3.10. Del-1이 신장 이식 환자의 PBMC와 DSA-매개에 의한 acute tissue injury를 감소.....	18
4. Discussion.....	35
5. Reference.....	37
6. Abstract.....	41
7. 감사의 글.....	42

표 및 그림 차례

표 1. 본 연구에 사용된 primers 목록.....	8
표 2. 신장 이식 환자의 PBMC 유형별 수와 비율 정보.....	19
그림 1. 활성화된 혈관 내피 세포의 markers 확인.....	20
그림 2. DSA-매개로 활성화된 혈관 내피 세포에서 PBMC 부착 증가.....	21
그림 3. DSA-매개에 의해 활성화된 혈관 내피 세포에서 Del-1 분자의 발현량 변화.....	22
그림 4. Del-1에 의한 혈관 내피 세포 활성화 markers 발현량 변화.....	23
그림 5. 활성화된 혈관 내피 세포에서 Del-1에 의한 PBMC 부착 감소.....	25
그림 6. Del-1에 의한 acute tissue injury 변화.....	26
그림 7. 신장 이식 환자의 serum 분석.....	29
그림 8. 신장 이식 환자의 PBMC와 DSA-매개로 증가된 혈관 내피 세포 활성화 markers 발현량을 Del-1이 조절.....	30
그림 9. 신장 이식 환자의 PBMC와 DSA-매개로 활성화된 혈관 내피 세포에서 Del-1에 의한 PBMC 부착 변화.....	31
그림 10. 신장 이식 환자의 PBMC와 DSA-매개에 의한 acute tissue injury 를 Del-1이 조절.....	32

Introduction

고형 장기 이식은 말단 장기 기능 이상을 갖고 있는 환자에게서 최종적으로 치료할 수 있는 조건이 되었다. 새로운 수술 기술의 발달로 더 많은 고형 장기를 이식할 수 있게 되었으며 이러한 접근법으로 인해 고형 장기 이식은 빠르게 발전하였다.¹ 그러나 고형 장기 이식에서 항체 매개성 거부 반응은 만성 동종 이식 실패(Chronic allograft failure)를 유발하는 주 요인이 된다.^{2,4} 항체 매개성 거부 반응을 예방 또는 치료하기 위해 rituximab, bortezomib, cyclosporine 등의 면역 억제제와 혈장 교환술 같은 치료를 시행하지만, 항체 매개성 거부 반응에는 효과적이지 않고 한계가 있다.^{2,5-7} 그러므로 고형 장기 이식 후 환자와 이식편 생존율을 높이기 위해서는 항체 매개성 거부 반응을 예방 또는 치료에 활용하기 위한 biomarker나 표적인자 발굴이 필요하다.

고형 장기 이식에서 Donor Specific Antibody(DSA)는 이식된 장기의 내피 세포에 붙어있는 공여자 HLA-molecule에 특이적으로 생긴 항체로 DSA와 HLA-molecule이 만나면 항원-항체 반응이 생기면서 이식 거부 반응이 일어난다. DSA가 형성되어 sensitization된 환자는 초기 급성 항체 매개성 거부 반응을 유발하고 신규 기증자 특이적 항체(de novo DSA)는 후기 만성 항체 매개성 거부 반응과 관련이 있다.⁸ DSA 존재가 항체 매개성 거부 반응을 예측하는 biomarker로 사용하고 있으며 HLA class I인 HLA-A, B와 HLA class II인 HLA-DR, DQ를 확인하고 있다.⁹ MHC class I을 target으로 한 de novo DSA는 이식 후 더 빨리 발견되며 IgG1과 IgG3 subclass일 가능성이 높다. 이는 급성 항체 매개성 거부반응과 초기 이식편 손실과 관련이 있다.¹⁰ MHC class II를 target으로 한 de novo DSA는 나중에 나타나며 IgG2 또는 IgG4 subclass는 이식 초기에 발견될 수도 있지만 이식 후 시간이 지난 뒤에 발견이 될 수도 있다.¹⁰ 그렇기 때문에 MHC class I, II 둘 다 항체 매개성 거부 반응에서 중요한 marker이다. MHC class I 단백질 복합체를 암호화하는 유전자 그룹은 HLA class

I(A, B, C)이며, MHC class II 단백질 복합체를 암호화하는 유전자 그룹은 HLA class II(DRB1, DPB1, DQB1, DQA1)이다.

항체 매개성 거부반응(Antibody-mediated rejection, ABMR)은 신장 이식 거부 반응과 기능 손상의 주요 병인이다.^{11,12} ABMR에서 조직 손상은 주로 allograft endothelium의 antigenic target에 대한 alloantibodies에 의해 야기된 것으로, 이식 수혜자의 항체계(humoral system)와 이식된 조직 간에 일어난다.¹³⁻¹⁵ 이식 수혜자가 만들어낸 DSA는 모세혈관 내피 세포에 손상을 일으키며 주로 complement 활성화, Fc receptor에 의한 염증 세포(macrophages, NK cells)의 유입 또는 직접적인 내피 세포 활성화의 원인이 된다.^{8,16} 최근 신장 이식 초기에 혈관 내피 세포 활성화가 일어나는 것은 나쁜 예후와 연관되어 있다는 것으로 알려지고 있다.¹³ 따라서 혈관 내피 세포 활성화 marker로 알려진 adhesion molecules(E-selectin, P-selectin, VCAM-1, ICAM-1 등), cytokines(IL-1 β , TNF- α 등)의 발현 변화를 확인하여 혈관 내피 세포 활성을 예측할 수 있다. 또한, 이들 분자들을 활용하여 혈관 내피 세포 활성을 유도함으로써 신장 이식 거부 반응의 조건을 in vitro에서 mimic할 수 있다.^{17,18} 신장 이식 거부 반응 환자의 소변과 신장 생검에서 초기 DSA가 검출되지 않을 때 chemokine(CXCL9, CXCL10, CCL4등)은 검출되어 ABMR marker로 사용하기도 한다.^{19,20} 또한, 신장 생검에서 혈관 내피 세포의 glycocalyx 변화는 혈관 내피 세포의 기능과 상태를 보여주는데 신장 이식 거부 반응이 일어난 환자에게서 신장의 기능과 상태를 알 수 있는 지표로 사용되기도 한다.^{21,22} 이를 이용함으로써 이식 glomerulopathy를 예측할 수 있다.^{23,24}

항염증 단백질로 알려진 Developmental endothelial locus-1(Del-1)은 neutrophil의 LFA-1 integrin과 내피 세포의 ICAM-1 사이의 상호 작용을 조절하여 neutrophil 응집을 제한하는 내피 세포 분비 단백질로²⁵ 항체 매개성 신장 이식 거부 반응에서 Del-1 처리시 어떤 역할과 효과가 있는지 아직 알려진 바가 없다.

이에, 본 연구에서는 DSA에 의한 혈관 내피 세포 활성을 유도한 상태에서, 재조합 단백질 Del-1을 이용하여 항체 매개성 신장 이식 거부 반응을 개선할 수 있는지에 알아보았다.

Materials & Methods

2.1 세포 및 세포 배양

본 연구는 Primary Human Glomerular Microvascular Endothelial Cell(HGMEC) (cell systems, #ACBRI 128)를 구입하여 cell passages 6-10을 사용하였다. 배양액은 EGM -2 MV Microvascular Endothelial Cell Growth Medium-2 Bullet Kit(Lonza, #CC-3202)를 사용하였으며 0.2% gelatin(Sigma, #G1393)으로 2시간, 37 °C incubation 시켜 coating이 된 10cm² dish에 10ml media와 함께 2.2x10⁵cells를 5% CO₂, 37 °C incubator에서 배양하였다. 10cm² dish에서 배양중인 HGMEC의 Confluency가 90% 일 때 계대배양을 진행하였다. 계대배양은 배양액을 제거하고 37°C PBS로 wash후 1X TE buffer를 추가하여 1분, 5% CO₂, 37 °C incubator에서 10cm² dish에 붙어있는 HGMEC를 분리하였다. 이후 원심분리기(1000rpm, 5분)를 이용하여 상층액을 제거하고 cells count하여 2.2x10⁵cells을 새로운 media 10ml과 함께 계대 배양 하였다.

2.2 PBMC 분리 및 동결 보존과 해동

서울아산병원 진단검사의학과에 의뢰하여 volunteer로 참여하는 healthy donor의 혈액을 제공받았다. PBMC(Peripheral Blood Mononuclear Cell)를 분리하기 위해 혈액과 1X DPBS 1:1로 희석하고 희석한 혈액 1ml을 기준으로 33 μ l의 ACD solution(citrate-dextrose solution) (Sigma, #C3821)을 혼합하였다. 상온에서 30분 incubation후 Ficoll-Paque PLUS(Cytiva, #17144002)와 4:3의 비율로 잘 섞이지 않도록 50ml tube 안 Ficoll-Paque PLUS위에 흘려보낸 뒤 원심분리기(400g, 30분,

상온, ACC 3, DEC 0 break off)를 이용하였다. 그 후 PBMC층을 분리하여 2% FBS(in 1X DPBS)로 원심분리기(200g, 10분, 상온)를 이용하여 2번 wash한 뒤 cells을 count하였다.

분리된 PBMC를 동결시켜 보관하기 위해 원심분리기(400g, 10분, 상온)를 이용하여 pellet으로 만들고 5% DMSO(Dimethyl Sulfoxide) (Sigma, #317275)(in FBS)에 resuspension하였다. 이후 stock tube에 옮긴 뒤 Cryo-container 박스에 넣어 deep freezer에 overnight 시키고 LN2 tank에 보관하였다.

보관된 PBMC를 사용하기 위해 37°C water bath에 2분간 해동시킨 후 15ml tube에 옮겼다. RPMI 1640 medium with HEPES, L-glutamine (10% FBS)(Cytiva, #SH30255.01)를 해동시킨 PBMC가 들어있는 15ml tube에 넣어 원심분리기(400g, 10분, 상온)를 이용하였다. 이후 상층액을 제거하고 1X DPBS로 resuspension하여 cells을 count하였다.

2.3 혈관 내피 세포 활성화와 Del-1 처리

신장 이식 환자의 시료를 사용하기 전 예비 실험을 위해 DSA대신 Anti-HLA Class I Ctrl(Invitrogen, hla-c1) 항체를 사용하였고, 신장 이식 환자의 시료를 사용할 때는 환자의 serum 내 DSA가 있으므로 환자의 serum을 사용하였다. positive control로 Anti-HLA Class I Ctrl과 Recombinant Human TNF- α (Thermo Fisher Scientific, #PHC3015)를 같이 사용하였다. HGMEC를 0.2% gelatin으로 coating된 plate에 EMV2 media와 함께 seeding 후 26시간, 5% CO₂, 37 °C incubator에서 배양하였다. 그 후 활성화된 혈관 내피 세포 중 강한 positive control로 사용할 실험군에는 TNF- α (100ng/ml)를 넣어주었다. 추가로 22시간, 5% CO₂, 37 °C incubator에서 배양하면서 seeding 후 혈관 내피 세포 안정화 및 monolayer 형성을 위해

총 48시간에 도달하기 2시간 전에 Del-1(100 nM/5x10⁴cells)을 넣어 preincubation 하였다. HGMEC seeding 후 48시간이 되었을 때 PBMC(HGMEC 수의 3배)와 Anti-HLA Class I Ctrl(0.5µg/ml)²⁶ 또는 신장 이식 환자의 serum(DSA) 100µl²⁷을 넣은 후, HGMEC와 공배양(2시간, 5% CO₂, 37°C) 하였다. 그 후 HGMEC에 붙어 있지 않는 PBMC를 제거하기 위해 plate에 있는 media를 fresh EMV2 media로 교체한 후, 5% CO₂, 37°C incubator에서 추가적으로 14시간동안 공배양 하였다. 이후 세포들은 혈관 내피 활성 인자 발현, PBMC 부착 정도, acute tissue injury 분석에 사용하였다.

2.4 Conventional RT-PCR와 실시간 정량 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)을 통한 ABMR markers 발현량 비교

RNA를 얻기 위해 먼저 TRIzol Reagent(Invitrogen, #15596026) 250µl를 이용하여 12 well plate에 있는 각 세포들(HGMEC, DSA 또는 Anti-HLA Class I Ctrl 없이 PBMC와 공배양된 HGMEC, 활성화된 HGMEC, Del-1을 처리한 활성화된 HGMEC, TNF-α를 처리한 활성화된 HGMEC)을 용해시켜 tube에 옮겼다. Chloroform(Sigma, #C2432) 50µl를 가한 후, vortexing하여 원심분리(12000RCF, 4°C, 15분)하였다. 상층액 70µl를 취하여 isopropanol 70µl를 첨가하고 원심분리 (12000RCF, 10분, 4°C) 후 상층액을 제거한 뒤 75% 에탄올을 이용하여 세척하였다. 세척하고 남은 RNA pellet을 DEPC water에 용해하여 Nanodrop을 통해 RNA를 정량하였다. 정량된 RNA를 cDNA로 합성하기 위해 High capacity cDNA reverse transcription kit(Sigma, #4368813)을 사용하였고 구체적으로 1µg RNA, 10X RT buffer 2.0µl, 25X dNTP 0.8µl, 10X RT primer 2.0µl, Reverse transcriptase 1.0µl에 DEPC water로 20ul까지 채운 뒤 25°C에서 10분, 37°C에서 120분, 85°C에서 5분으로 reverse transcription PCR하여 cDNA를 합성하였다. PCR band를 확인하기 위

해 합성된 cDNA를 이용하여 Quick Taq HS dye mix(Toyobo, #DTM-101) 10 μ l, 각 primer forward, reverse 0.2 μ l, DW 8.6 μ l, cDNA 1 μ l를 넣고 PCR을 하였다. PCR 조건은 94°C에서 3분, 94°C에서 1분, 60°C에서 45초, 72°C에서 45초, 72°C에서 3분, 35 cycle이며 18s rRNA는 25 cycle로 하였다. PCR band는 1Kbp DNA ladder(Lugen Sci, #LGM-2201)와 agarose 2% gel을 이용하여 확인하였다.

실시간 정량 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)을 관측하기 위해 합성된 cDNA 1 μ l에 Light cycler 480 2X SYBR Green I Master(Roche, #04887352001) 10 μ l, 각 primer forward, reverse 0.1 μ l, DW 8.8 μ l를 넣어 PCR(Roche, LC480)을 하였다. PCR 조건은 preincubation 95°C에서 5분, amplification 95°C에서 20초, 60°C에서 10초, 72°C에서 30초, 45 cycle, melting curve 95°C에서 5초, 65°C에서 1분, cooling 40°C 하였다. 실험 결과는 18s rRNA로 normalization하였으며, 사용한 primer sequences는 아래 표와 같다.

Target Gene	Sense	Sequence (5'to 3')	Product Size (bp)
HLA-A	Forward	TAA TGT ATG GCT GCG ACG TGG	182
	Reverse	TCT CAA CTG CTC CGC CTC AT	
HLA-B	Forward	GGA CCA AAC TCA GGA CAC TGA	236
	Reverse	CTC CGA TGA CCA CAA CTG CTA	
HLA-C	Forward	TGG CTG TCC TGG TTG TCC TA	155
	Reverse	GGC TTT ACA AGT GAT GAG AGA CT	
HLA-DRB1	Forward	TCT ATA ACC AGG AGG AGT CCG T	202
	Reverse	TTA GGT TGG ACT CGC CGC T	
HLA-DPB1	Forward	GTC CAC CAA CCT GAT CCG TAA T	183
	Reverse	CCA GCT CCC GTC AAT GTC TTA	
HLA-DQB1	Forward	CTC CAC CAG CAG GGC TTC	218
	Reverse	TGC AGG AAG CAG AGT CAC AG	
HLA-DQA1	Forward	ACG TTG CCT CTT GTG GTG TAA	237
	Reverse	TAG CAG CGG TAG AGT TGT AGC	
CXCL 10	Forward	TGC CAT TCT GAT TTG CTG CCT	233
	Reverse	TGG CCT TCG ATT CTG GAT TCA	
CXCL 11	Forward	GTT CAA GGC TTC CCC ATG TTC	194
	Reverse	CTT GCT TGC TTC GAT TTG GGA	
CCL 2	Forward	TGC AAT CAA TGC CCC AGT CA	219
	Reverse	GTC TTC GGA GTT TGG GTT TGC	
CCL 4	Forward	AAG TCT GTG CTG ATC CCA GTG	294
	Reverse	GAG AAG GGA CAG GAA CTG CG	
E-selectin	Forward	TCT CAG CTC TCA CTT TGG TGC	236
	Reverse	TCC TAC CCA GAC CCA CAC ATT	
ICAM 1	Forward	CCA ACG TGA TTC TGA CGA AGC	227
	Reverse	CCG GGT CTG GTT CTT GTG TAT	
VCAM 1	Forward	GAG GGT CTA CCA GCT CCA GA	199
	Reverse	GAT CTC TAG GGA ATG CTT GAA CA	
hDel-1	Forward	CCT GTG AAA TAA GTG AAG C	268
	Reverse	GAG CTC GGT GAG TAG AGG	
18s rRNA	Forward	GTT CCG ACC ATA AAC GAT GCC	147
	Reverse	ATT GAC GGA AGG GCA CCA	

표 1. 본 연구에 사용된 primer 목록

2.5 세포 부착 분석법(Cell adhesion assay)

Cell adhesion assay를 진행하기 위해 0.2% gelatin으로 coating한 후, HGMEC를 seeding하였다. 혈관 내피 세포 활성화 De1-1 처리 방법은 동일하지만 PBMC를 해동한 후 곧바로 HGMEC와 공배양 하지 않고 BCECF, AM(Thermo Fisher Scientific, #B1150) solution 3 μ M, 20분, 37°C incubation시켜 염색하였다. 이후, DSA 또는 Anti-HLA Class I Ctrl(0.5 μ g/ml)과 함께 HGMEC에 첨가하여 2시간 공배양 하였다. 2시간 공배양 종료 후 HBSS를 사용하여 연속적으로 wash하면서 부착되지 않은 PBMC를 제거한 후 microplate reader로 480, 530nm에서의 흡광도를 측정하여 분석하였다. 부착된 PBMC의 percentage는 아래의 공식²⁸을 사용하였다.

$$\text{부착된 세포의 percentage(\%)} = (\text{wash후 부착되어 있는 세포의 형광 세기}) / (\text{wash하기 전 부착되어 있는 세포의 형광 세기}) \times 100\%$$

2.6 면역 세포 화학 분석(Immunocytochemistry)

24 well plate에 coverslip glass를 넣고 0.2% gelatin으로 coating하였다. Coating종료 후 HGMEC를 seeding하고 혈관 내피 세포 활성화 과정과 동일하게 진행하였다. 이후 2% PFA로 10분, 상온에서 고정시켰다. 0.5% Triton X-100(in PBS)를 10분, 상온에서 처리하여 permeabilization하였고 blocking solution(5% NGS, 1% BSA, 0.1% Triton X-100 in PBS)을 이용하여 1시간 상온에서 blocking하였다. 1차 항체는 Mouse anti-human VE-cadherin antibody(R&D systems, #MAB9381), Rabbit anti-human CD45 antibody(abcam, #ab40763) 사용하였으며 4°C에서 overnight 하였다. 2차 항체는 Alexa Fluor 647 goat anti-mouse IgG(H+L)(Invitrogen, #A21236), Glycocalyx, FITC Lectin from Triticum vulgaris (wheat) (Sigma, #L4895-2MG), Perforin Monoclonal

Antibody (dG9) conjugated Alexa Fluor 647(Thermo Fisher Scientific, #MHPERF21), Alexa Fluor 532 goat anti-rabbit IgG(H+L)(Invitrogen, #A11009), Alexa Fluor 488 goat anti mouse IgG(H+L)(Invitrogen, A11001)을 어두운 곳, 상온에서 1시간 incubation 하였다. 이후 DAPI(Invitrogen, #NL5995050)를 1분간 처리하여 염색한 후, fluoromount G(Electron microscopy science, #17984-25)를 이용하여 mounting하였다. 분석은 samples을 공초점 형광 현미경(LSM 710)으로 실행하였다.

2.7 효소 결합 면역 흡착 분석법(Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

서울 아산병원 진단검사의학과에서 Vacutainer에 healthy donor의 혈액을 제공 받았다. Clot이 형성되기 위해 상온에서 45분동안 보관하였다. 원심분리(1500g, 10분, 4°C)를 통해 serum인 상층액을 얻었다. 신장 이식 환자 16명의 serum은 이식 연구팀에게서 제공받았다. Healthy donor와 신장 이식 환자의 serum을 이용하여 serum내 soluble Del-1 농도와 total IgG 농도를 비교 분석하기 위해 효소 결합 면역 흡착 분석법을 적용하였다. Soluble Del-1 농도는 Human EDIL3 DuoSet ELISA kit(R&D systems, #DY6046-05)와 DuoSet Ancillary Reagent Kit 2(R&D systems, #DY008)을, total IgG 농도는 Human IgG Total ELISA kit(Invitrogen, #BMS2091)를 사용하여 분석하였다. 각 kit의 manual을 적용하여 실험을 진행하였으며 microplate reader를 이용하여 450nm 형광으로 분석하였다.

2.8 유효성 검사

유효성 검사를 진행한 실험은 최소 그룹당 n=3 이상이었다. 통계적 유효성은 t-test, One-way ANOVA 를 사용하였다. P 값이 0.05 미만인 경우에 만

유효한 것으로 간주하였다. (* ; $P < 0.05$, ** ; $P < 0.01$, *** ; $P < 0.005$, ns ; not significant)

Results

3.1 PBMC와 DSA-매개로 혈관 내피 세포 활성화 확인

DSA 대체 항체인 Anti-HLA class I 존재 하에, 혈관 내피 세포(HGMEC)와 PBMC를 공배양하면 혈관 내피 세포가 활성화되는 것을 확인하려고 하였다. cDNA를 얻어 혈관 내피 세포 유래 활성 인자들의 발현 변화를 2% agarose gel 로 전기영동 하였다(그림 1). HLA class I (A, B, C)은 Anti-HLA class I와 PBMC를 공배양 하였음에도 혈관 내피 활성 marker의 변화가 없었다. Chemokine(CXCL 10, CXCL 11, CCL 2, CCL 4), Adhesion molecule(E-selectin, ICAM1, VCAM1), HLA class II는 혈관 내피 세포 활성 marker가 증가하는 모습이 관측되었지만, CCL 2, ICAM1에서는 큰차이가 확인되지 않았다. VCAM1은 희미하게 Anti-HLA class I 과 PBMC를 공배양하여 활성화된 혈관 내피 세포에서 발현 하였지만 매우 적 게 관측되었다. 결과적으로 PBMC와 DSA 대체 항체인 Anti-HLA class I으로 공 배양시킴으로써 혈관 내피 세포의 활성 markers의 발현 변화를 확인하였다.

3.2 DSA-매개로 활성화된 혈관 내피 세포에서 PBMC 부착 증가

활성화된 혈관 내피 세포는 PBMC를 더 많이 부착하는 것으로 알려져 있다.^{29,30} 이를 바탕으로 DSA 또는 Anti-HLA class I을 PBMC와 함께 혈관 내피 세포와 공배양시켜 활성화를 유도하는 경우 PBMC의 부착성에 변화가 있는지 검사하였다. PBMC의 부착성은 BCECF, AM 이라는 형광물질로 labeling하여 세포 부착 분석법(cell adhesion assay)을 통해 분석하였다.

혈관 내피 세포와 PBMC 공배양 후, Anti-HLA class I이 투입된 실험군에서는 Anti-HLA class I이 투입되지 않은 실험군보다 더 많은 PBMC가 부착되는 것을

확인하였다(그림 2). 따라서 DSA-매개로 활성화된 혈관 내피 세포에서 더 많은 PBMC가 부착되고 이는 더 많은 염증 또는 이식 거부 반응과 관련한다는 것을 암시한다.

3.3 DSA-매개에 의해 활성화된 혈관 내피 세포를 제어하기 위한 Del-1 단백질 적용 가능성 검사

염증 또는 조직 손상시 혈관 내피 세포의 항염증 단백질 Del-1의 발현이 감소한다고 보고되었다.³¹ 이에, 이식 수혜자의 항체와 면역세포에 의한 혈관 내피 세포 활성화 이후, Del-1의 발현 변화가 있는지 실시간 정량 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)으로 알아보았다. HGMEC와 Anti-HLA class I이 첨가되지 않고 PBMC만 첨가된 HGMEC에서는 Del-1의 발현량에 큰 차이가 없었다. 그러나 Anti-HLA class I이 추가된 경우 Del-1의 발현량이 감소되는 경향을 확인하였다(그림 3). 이는 Anti-HLA class I에 의한 혈관 내피 세포의 PBMC 부착 증가가 Del-1의 발현을 조절할 수 있다는 것을 의미하며, Del-1이 DSA-매개 혈관 내피 세포 활성화 이전에 연관되어 있다는 것을 암시한다.

3.4 Del-1이 혈관 내피 세포 활성화 markers 발현을 감소

DSA 및 PBMC에 의한 혈관 내피 세포 활성화시 Del-1의 발현 감소를 확인하였기 때문에, Del-1 단백질을 가한 경우, 혈관 내피 세포 활성화에 변화가 있는지 알아보았다. Del-1은 PBMC와 Anti-HLA class I을 HGMEC와 공배양 하기 2시간 전에 preincubation을 하였고 Del-1이 첨가 되어있는 media를 교체하지 않은 상태에서 PBMC와 Anti-HLA class I를 첨가하고 2시간 더 incubation하였다. cDNA를 얻어 PCR band와 실시간 정량 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)으로 혈관 내피 세포 활성화 markers 발현량의 변화를 확인하였다. 2% agarose gel로 전기영

등을 내려 확인한 PCR band에선 chemokine인 CXCL10, CXCL11가 Del-1 처리 실험군에서 육안으로도 크게 감소한 것으로 관측되었다(그림 4-a). HLA class I은 모든 실험군에서 큰 차이가 관측되지 않았으며, HLA class II에서는 HLA-DRB1을 제외한 나머지와 adhesion molecule(E-selectin, ICAM1, VCAM1)에서 Del-1의 항염증 단백질 효과를 육안으로 확인하는 것이 쉽지 않았다(그림 4-a). 좀 더 정확한 발현량을 보기 위해 실시간 정량 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)을 진행하였다. HLA class I에서 HLA-A를 제외한 HLA-B, C은 Del-1이 처리된 실험군에서 발현량이 감소되었고 모든 HLA class II에서도 발현량이 감소되는 경향을 보였다 (그림 4-b). Chemokine에선 CXCL10, CXCL11, CCL4가 Del-1이 처리된 경우와 함께 adhesion molecule에서 VCAM1의 발현량이 감소된 것을 확인하였다(그림 4-b). 이러한 결과들은 Del-1이 혈관 내피 세포의 활성화 marker들 중 일부를 감소시킬 수 있다는 것을 나타낸다.

3.5 Del-1이 활성화된 혈관 내피 세포에 대한 PBMC 부착을 감소

Del-1이 일부 혈관 내피 세포 활성화 markers를 감소시키는 것을 확인하였기 때문에 Del-1에 따른 혈관 내피 세포와 PBMC의 부착 정도를 비교하였다. 활성화된 혈관 내피 세포에서 Del-1이 처리되었을 때, 첫번째 wash에서 BCECF, AM으로 labeling된 PBMC가 덜 부착되는 것을 확인하였다(그림 5). 따라서 Del-1이 혈관 내피 세포에 붙어 염증을 유도하는 PBMC의 부착을 감소시킬 수 있다는 것을 암시한다.

3.6 Del-1에 의한 acute tissue injury 감소

혈관 내피 세포에 대한 과도한 백혈구 부착은 혈관내피세포의 손상(acute tissue injury)을 유도한다. Glycocalyx는 혈관 내피 세포의 세포막을 둘러싼 당단백질과 당지질이며 지지대 역할을 하고 세포의 integrity를 유지한다. 이는

조직 손상에 의해 파괴될 수 있다.²¹ 형광이 달려 있는 항체를 이용하여 공초점 형광 현미경으로 확인하였다. 아무것도 처리 되지 않은 혈관 내피 세포인 negative control과 비교 했을 때 Anti-HLA class I + PBMC로 활성화된 혈관 내피 세포와 추가로 TNF- α 를 넣어 더 심하게 활성 시킨 실험군에서 glycoalyx(초록색)가 적절한 장벽 기능을 유지하는 VE-Cadherin(빨간색, 혈관 내피 세포들 사이에 발현하는 부착 단백질)까지 꼭 차 있지 않고 많이 분해되어 핵(DAPI, 파란색) 위주로만 남아 있었다. 이는 glycoalyx가 감소한 것을 나타낸다(그림 6-a). 반면 Del-1이 처리 된 경우에는 glycoalyx가 덜 감소하였고 negative control과 크게 차이가 나지 않은 정도인 것을 확인 할 수 있었다(그림 6-a). 이는 glycoalyx 형광 세기를 정량화한 그래프에서도 Del-1이 처리된 것과 처리되지 않은 실험군에서 glycoalyx의 양의 차이를 확인 할 수 있었다. 따라서 Del-1은 glycoalyx의 손상을 완화시키는 것을 확인하였다.

또 다른 acute tissue injury의 지표로써, perforin(cytotoxic t cell과 NK cell의 과립에서 발견되는 기공 형성 세포 용해 단백질³²)에 의한 혈관 내피 세포 lysis를 공초점 현미경으로 분석하였다. 기본적으로 perforin은 혈관 내피 세포에 존재하지 않고 PBMC에 존재 하는 것으로 알려져 있다.³³ CD45(노란색) 안에 perforin(빨간색)이 있는 것과 혈관 내피 세포가 활성화되어 CD45(노란색) 안에서 VE_Cadherin(초록색) 안으로 perforin(빨간색)이 많은 이동을 하는 것을 확인하기 위해 본 실험을 진행하였다. 또한 Del-1이 PBMC의 유입을 차단하면서 Del-1이 처리되어 있는 실험군에서는 perforin(빨간색)이 VE_Cadherin(초록색) 안으로 적게 들어갈 것으로 추정하였다. 실험 결과, Anti-HLA class I + PBMC군과 TNF-a가 처리된 실험군에서 PBMC가 많이 부착되어 있는 것을 확인하였으며, Del-1이 처리 되어 있는 실험군에선 더 적게 부착되어 있는 것을 관측하였고 perforin 또한 적게 포함되어있는 것을 확인하였다(그림 6-c). Perforin만 더 자세히 관측하기 위해 perforin 이미지만 모아서 확인한 결과(그림 6-d), perforin의 양이 Del-1이 처리된 혈관 내피 세포에서 전체적으로 더 적은 것을 확인 할 수 있었다(그림 6-d). 결과적으로

Del-1은 PBMC를 혈관 내피 세포에 덜 부착시켜 perforin의 이동을 어느정도 억제하는 것을 확인하였다.

3.7 신장 이식 환자의 serum 분석

패혈증에서 내피 세포의 glycocalyx가 분해되면 패혈증 환자 serum 내 Del-1이 증가한다고 알려져 있다.³¹ 따라서 두개의 신장 이식 환자 집단(Non-ABMR, ABMR)에서 각 8명의 serum 내 soluble Del-1의 농도 차이와 DSA 농도를 대략적으로 평가하기 위한 total IgG의 농도를 함께 비교하여, ABMR과 이들의 연관성을 확인하고자 하였다. 신장 이식 환자 중에는 Non-ABMR 환자보다 ABMR환자의 serum에서 soluble Del-1 농도의 평균값이 약간 높은 것으로 나왔지만 유의성은 없었다(그림 7-a). Total IgG의 농도 역시 Non-ABMR 환자보다 ABMR 환자의 serum에서 평균값이 더 높은 것으로 확인 되었지만 두 그룹간의 유의성은 확인 할 수 없었다(그림 7-b). 따라서 이번 시료 모음에서는 ABMR과 Non-ABMR 차이를 반영할 수 있는 지표로서의 serum 내 soluble Del-1의 농도 또는 total IgG 농도의 수준 차이를 관측할 수 없었다.

3.8 Del-1 이 신장 이식 환자의 PBMC 와 DSA-매개로 증가된 혈관 내피 세포 활성화 markers 발현량을 감소

앞선 실험에서 DSA 대체 항체인 Anti-HLA class I과 healthy donor의 PBMC에 의해 증가된 혈관 내피 세포 활성화 markers를 Del-1이 감소시킴을 확인하였다. 이를 토대로 신장 이식 환자의 시료를 이용해 증가된 혈관 내피 세포 활성화 markers를 Del-1이 감소시킬 수 있는지 확인하려고 하였다. 두 개의 신장 이식 환자 그룹(Non-ABMR, ABMR)에서 각 8명의 serum과 PBMC를 신·췌장 이식외과 연구실에서 제공받았다(표 2). 이 중 각 그룹에서 1명의 환자 시료를 임의로 지정하여 혈관 내피 세포를 in vitro 활성화 하였다. ABMR 환자의

PBMC와 serum을 이용하여 혈관 내피 세포를 활성화 하기 이전에, 혈관 내피 세포에 PBS 또는 Del-1으로 2시간 preincubation하였다. 이후 ABMR 환자의 PBMC와 serum을 공배양하였다. cDNA를 얻어 실시간 정량 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)으로 분석하였다. 혈관 내피 세포의 PBMC 부착이나 ABMR marker로 알려진 marker들을 중점적으로 관측하기 위해 Adhesion molecule 위주로 분석하였다. 그 결과, Adhesion molecule(E-selectin, ICAM1, VCAM1) 모두 Non-ABMR 환자보다 ABMR 환자에게서 발현량이 증가하였고 ABMR 환자에게 Del-1을 처리했을 때 모든 adhesion molecule에서 발현량이 감소하였다(그림 8). 따라서 Del-1이 혈관 내피 세포 활성 marker이자 ABMR marker를 감소시킬 수 있다는 것을 다시 확인하였다.

3.9 Del-1 이 신장 이식 환자의 PBMC 와 DSA-매개로 활성화된 혈관 내피 세포 간의 부착을 감소

신장 이식 환자(Non-ABMR, ABMR)의 임상시료(PBMC, serum)를 이용하여 항염증 단백질인 Del-1이 혈관 내피 세포에 대한 PBMC 부착 정도를 변화시키는지 알아보았다. 신장 이식 환자의 PBMC에 BCECF, AM으로 labeling하여 혈관 내피 세포층 위에 올려놓았다. 실험 결과, Non-ABMR 환자 또는 ABMR 환자의 PBMC를 이용하여 혈관 내피 세포에 부착하였을 때 1 wash 이후 Non-ABMR 환자 보다 ABMR 환자에게서 더 많은 PBMC가 혈관 내피 세포에 부착된 것을 확인하였으나 유의성은 없었다(그림9-a). ABMR 환자의 시료에서 Del-1을 처리하였을 때 PBMC가 혈관 내피 세포에 덜 부착되는 것을 확인하였으나 유의성은 없었다(그림 9-b). 이는 Del-1이 혈관 내피 세포에 대한 PBMC의 부착 매개성 염증을 줄일 수 있다는 것을 암시한다.

3.10 Del-1이 신장 이식 환자의 PBMC와 DSA-매개에 의한 acute tissue injury를 완화

신장 이식 환자(Non-ABMR, ABMR)의 시료를 통해 발생시킨 acute tissue injury와 Del-1을 처리 하였을 때 이를 완화 시킬 수 있는지 공초점 형광 현미경으로 분석하였다. Negative control과 비교 했을 때 Non-ABMR 환자는 glyocalyx(초록색)가 VE_Cadherin(빨간색) 안에 거의 짝 차 있으며 큰 차이가 없는 것을 확인하였다(그림 10-a). ABMR 환자는 CD45(노란색)를 갖고있는 PBMC가 혈관 내피 세포에 부착되어 있으며 관련 혈관 내피 세포에는 glyocalyx가 짝 차 있지 않고 분해되어 있는 모습을 관측할 수 있었다(그림 10-a). 반면 ABMR 환자 실험군에게 Del-1을 처리하였을 경우 glyocalyx의 손상이 완화되는 모습이 확인되었다(그림 10-a). glyocalyx 혈관 세기를 정량화한 그래프에서도 ABMR 환자 실험군에게 Del-1 처리시 처리되지 않은 실험군보다 glyocalyx의 형광 세기가 더 강한 것을 확인할 수 있었다(그림 10-b). 이는 Del-1이 항체 매개성 신장 이식 거부 반응에서의 glyocalyx 손상을 완화시키는 것을 확인하였다.

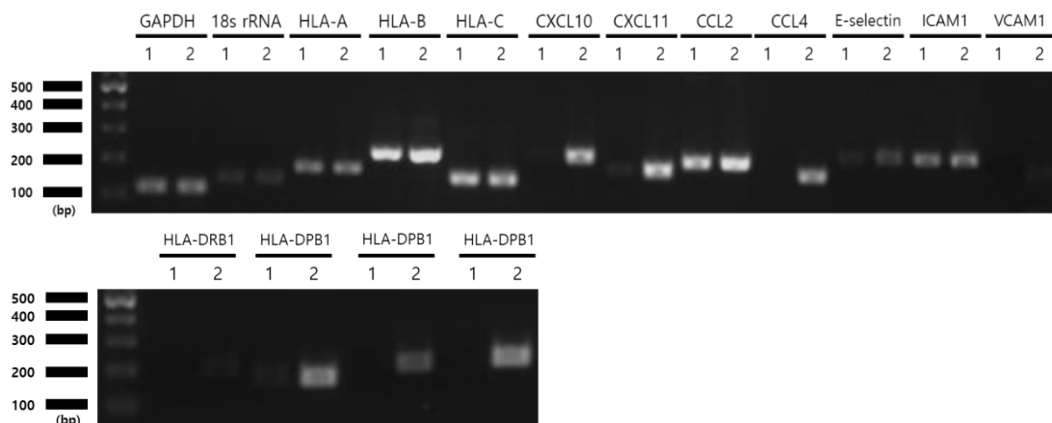
또 다른 acute tissue injury의 지표인 perforin에 의한 혈관 내피 세포 lysis를 공초점 현미경으로 분석하였다. Negative control과 Non-ABMR 환자 실험군에서 perforin(빨간색)은 잘 확인되지 않았다(그림 10-c). 그러나 ABMR 환자 실험군에서는 perforin이 VE_Cadherin(초록색)안으로 유입된 혈관 내피 세포를 확인 할 수 있었다(그림 10-C). Perforin만 더 자세히 관측하기 위해 perforin 이미지만 확인하였다(그림 10-d). perforin의 양이 Negative control과 Non-ABMR 실험군 보다 ABMR 실험군에서 조금 더 많은 것을 확인할 수 있었으며, ABMR 환자에게 Del-1 처리시 조금 더 감소하는 모습을 관측할 수 있었다(그림 10-d). 결과적으로 Del-1은 ABMR 환자에게서 PBMC가 혈관 내피 세포에 부착하는 것을 감소시켜 perforin의 이동을 어느정도 억제할 수 있는 것을 암시한다.

PBMC

ABMR	corelab	검체ID	등록일	등록번호	환자명	Bx	cell / vial (4등분)	lympho%	mono%	lympho+mono %
1	202118133		2021-03-30	17365363	신O순	ABMR	1.27E+06	80.3	11.8	92.1
2	202122684		2021-04-20	45211252	윤O익	ABMR	5.60E+06	60.3	20.1	80.4
3	202144490		2021-07-28	36400375	최O준	ABMR	5.69E+06	55.1	23.2	78.3
4	202146656		2021-08-09	53261140	오O희	ABMR	5.49E+06	58.8	27.2	86
5	202152851		2021-09-02	37503594	박O흠	ABMR	4.09E+06	49.4	46.8	96.2
6	202155621		2021-09-15	24136556	김O석	ABMR	1.19E+07	76.3	18.4	94.7
7	202158610		2021-10-06	21537864	조O기	ABMR	5.36E+06	57.8	24.8	82.6
8	202175801		2021-12-24	17743646	이O자	ABMR	4.39E+06	33	28.2	61.2

Non ABMR	corelab	검체ID	등록일	등록번호	환자명	Bx	cell / vial (4등분)	lympho%	mono%	lympho+mono %
1	202119652		2021-04-06	56982282	신O성	NOMOA	1.16E+07	83.5	10.9	94.4
2	202124192		2021-04-27	40458311	김O우	NOMOA	5.39E+06	54.6	22.9	77.5
3	202127269		2021-05-11	55076881	이O순	NOMOA	1.21E+07	69.3	27.5	96.8
4	202130932		2021-05-27	30722969	배O숙	NOMOA	3.41E+06	37.8	11.4	49.2
5	202144486		2021-07-28	53207742	최O윤	NOMOA	7.52E+06	75	10.9	85.9
6	202173490		2021-12-14	50852770	박O덕	NOMOA	3.63E+06	66.5	16	82.5
7	202173499		2021-12-14	36826023	박O미	NOMOA	6.06E+06	70.9	25.9	96.8
8	202162721		2021-10-26	36954865	김O중	NOMOA	7.60E+06	71.5	26.5	98

표 2. 신장 이식 환자의 PBMC 유형별 수와 비율 정보



1 : Negative control, 2 : HGMEC + Anti-HLA class I + PBMC

그림 1. 활성화된 혈관 내피 세포의 markers 확인

Anti-HLA class I과 PBMC를 혈관 내피 세포인 HGMEC(Primary Human Glomerular Microvascular Endothelial Cell)와 공배양하여 활성화시켰다.(그룹당 n=1) 활성화된 혈관 내피 세포 cDNA를 2% agarose gel 전기영동을 통해 markers를 확인하였다. 사용한 primer는 GAPDH, 18s rRNA, HLA class I(A, B, C), HLA class II(DRB1, DPB1, DQB1, DQA1), Chemokine(CXCL10, CXCL11, CCL2, CCL4), Adhesion molecule(E-selectin, ICAM1, VCAM1)이다.

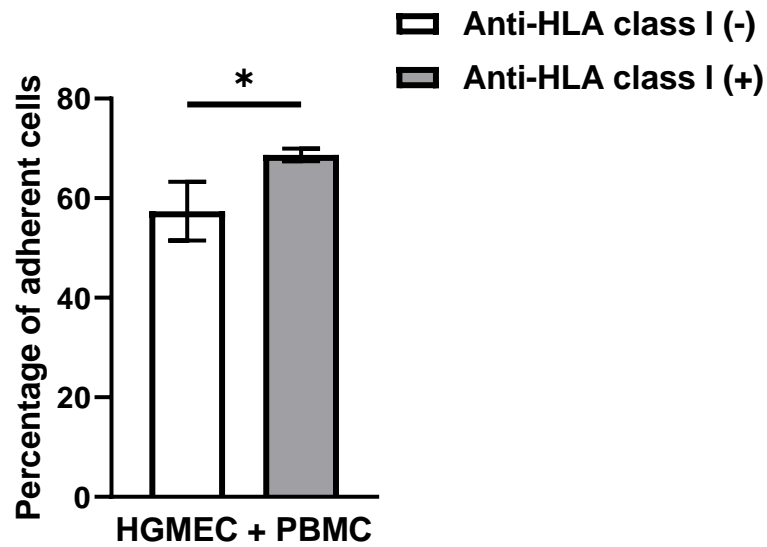


그림 2. DSA-매개로 활성화된 혈관 내피 세포에서 PBMC 부착 증가

세포 부착 분석법(Cell adhesion assay)을 이용하여 Anti-HLA class I(DSA 대체 항체)에 따른 PBMC 부착 능력을 비교하였다. PBMC를 BCECF, AM(3 μ M) 형광물질로 labeling하여 HGMEC와 공배양 시키고 microplate reader로 흡광도(480, 530nm)를 측정하였다. 데이터는 평균 \pm SD (그룹당 n=3)으로 표시되었다. (* ; P < 0.05 ; t-test)

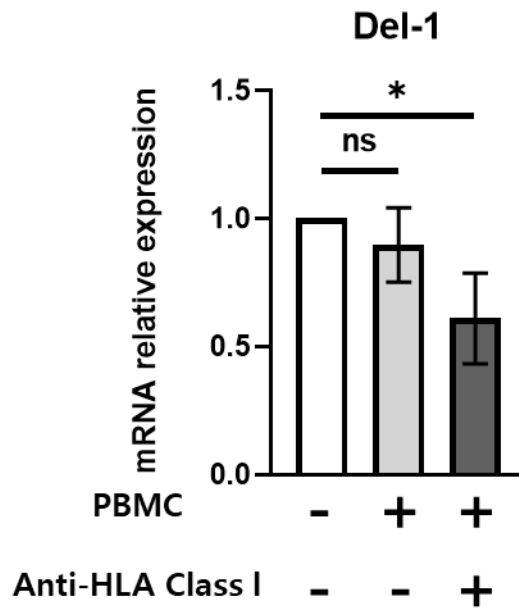
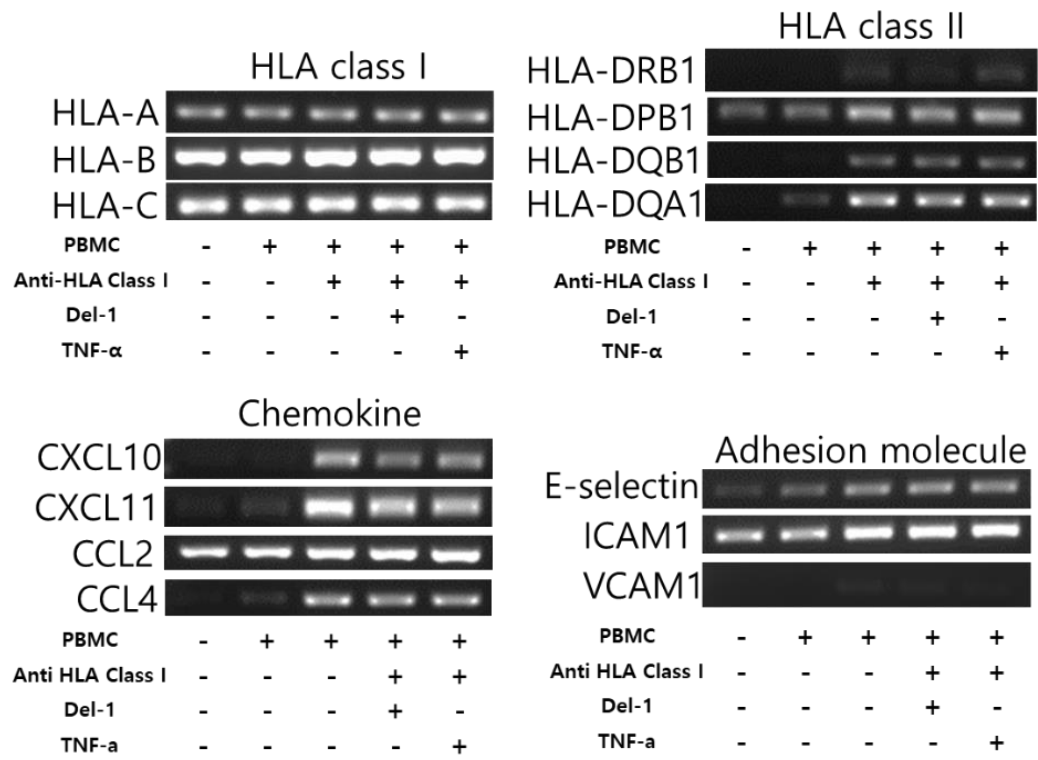


그림 3. DSA-매개에 의해 활성화된 혈관 내피 세포에서 Del-1 분자의 발현량 변화

Negative control(HGMEC), HGMEC + PBMC, HGMEC + PBMC + Anti-HLA class I을 각각 16시간, 5% CO₂, 37 °C incubator에서 배양 또는 공배양하여 RNA prep 후 cDNA를 합성하여 실시간 정량 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)으로 확인하였다. 데이터는 평균±SD (그룹당 n=3)으로 표시되었다. (* ; P < 0.05, ns ; not significant ; One-way ANOVA)

a



b

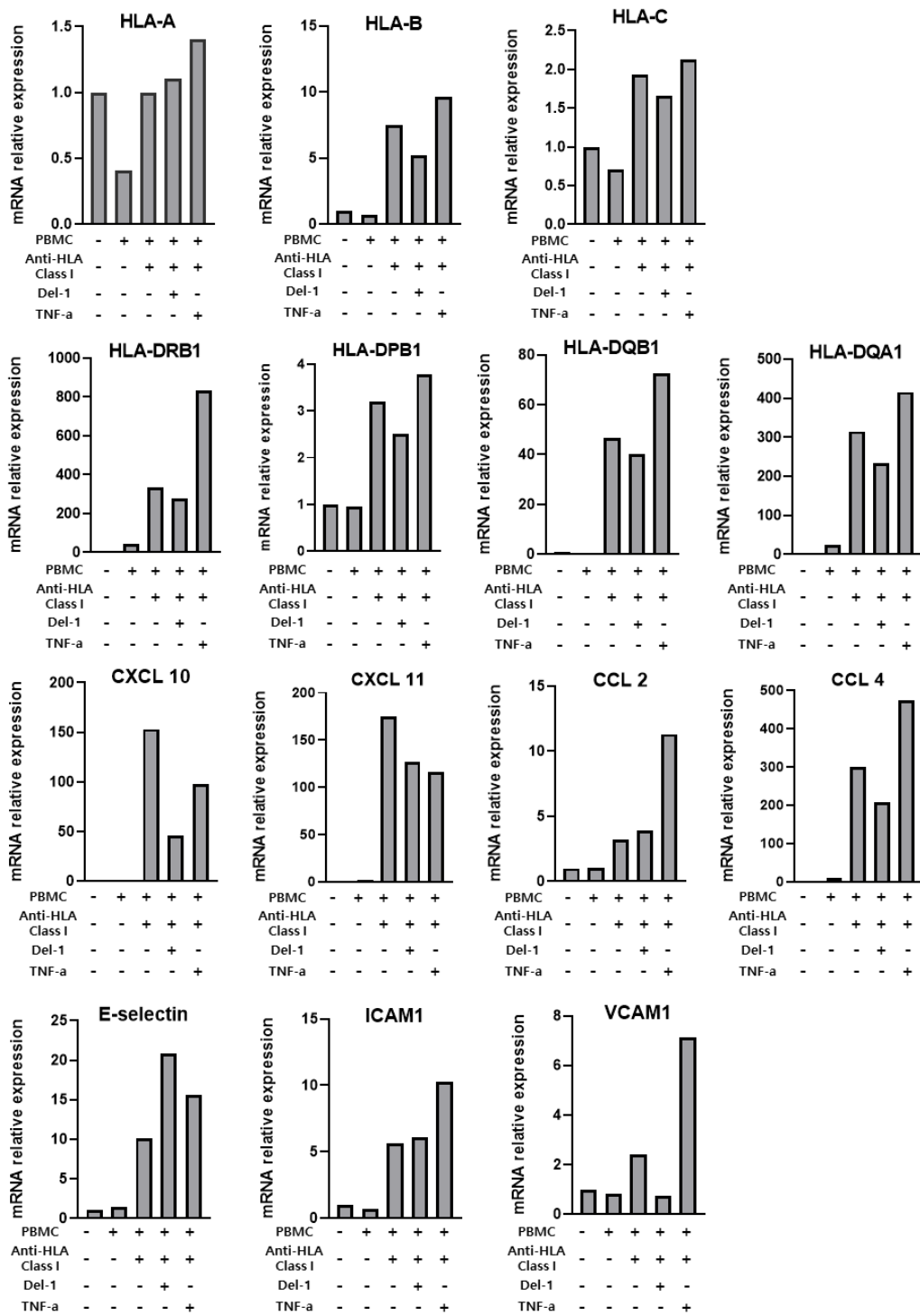
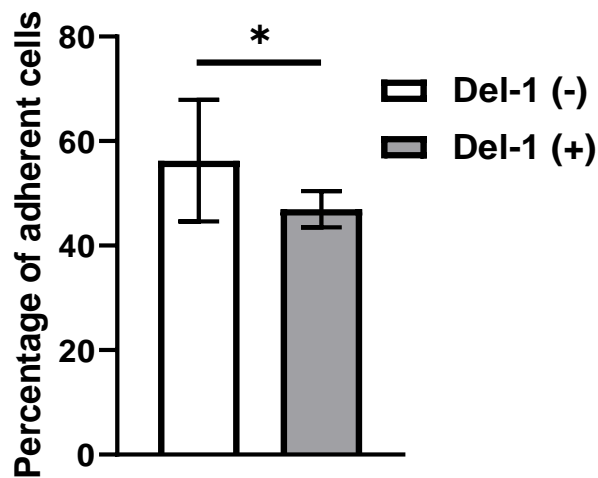


그림 4. Del-1에 의한 혈관 내피 세포 활성화 markers 발현량 변화

Del-1이 처리되었을 때 혈관 내피 세포 활성화 marker의 변화된 발현량을 비교하였다. (a)는 2% agarose gel에 각 실험군의 PCR product를 전기영동 후 4번 반복 실험을 통해 나온 PCR band 대표 이미지를 나타낸다. (b)는 각 실험군의 cDNA를 이용하여 실시간 정량 중합효소 연쇄반응(qRT-PCR)을 진행하였고 18s rRNA로 정량화한 결과를 나타낸다. (그룹당 n=1)

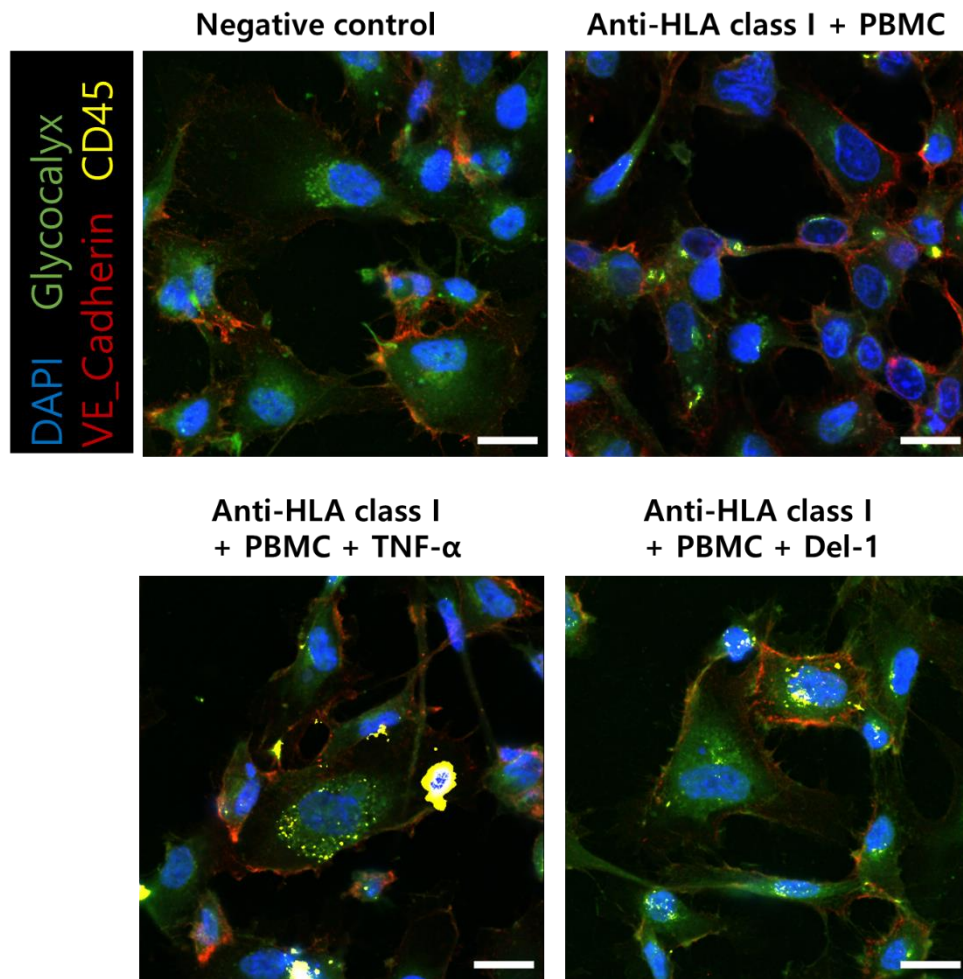


HGMEC + Anti-HLA Class I + PBMC

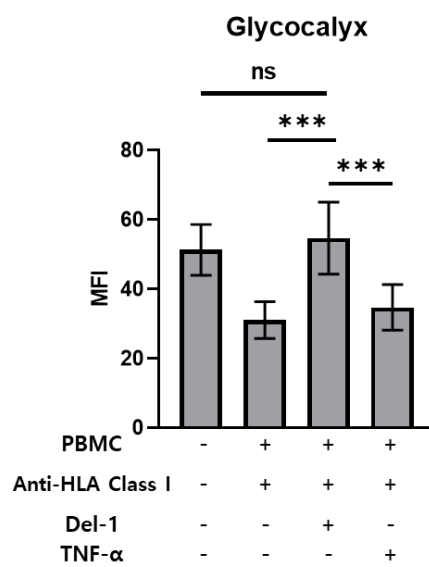
그림 5. 활성화된 혈관 내피 세포에서 Del-1에 의한 PBMC 부착 감소

세포 부착 분석법(cell adhesion assay)을 진행하여 Del-1에 따른 혈관 내피 세포에 PBMC 부착 정도를 확인하였다. PBMC와 Anti-HLA class I으로 혈관 내피 세포를 활성화 시키기전 Del-1으로 2시간 preincubation하였다. PBMC를 BCECF, AM(3 μ M) 형광물질로 labeling하여 HGMEC와 공배양 시키고 microplate reader로 흡광도(480, 530nm)를 측정하였다. 데이터는 평균 \pm SD (그룹당 n=3)으로 표시되었다. (* ; P < 0.05 ; t-test)

a



b



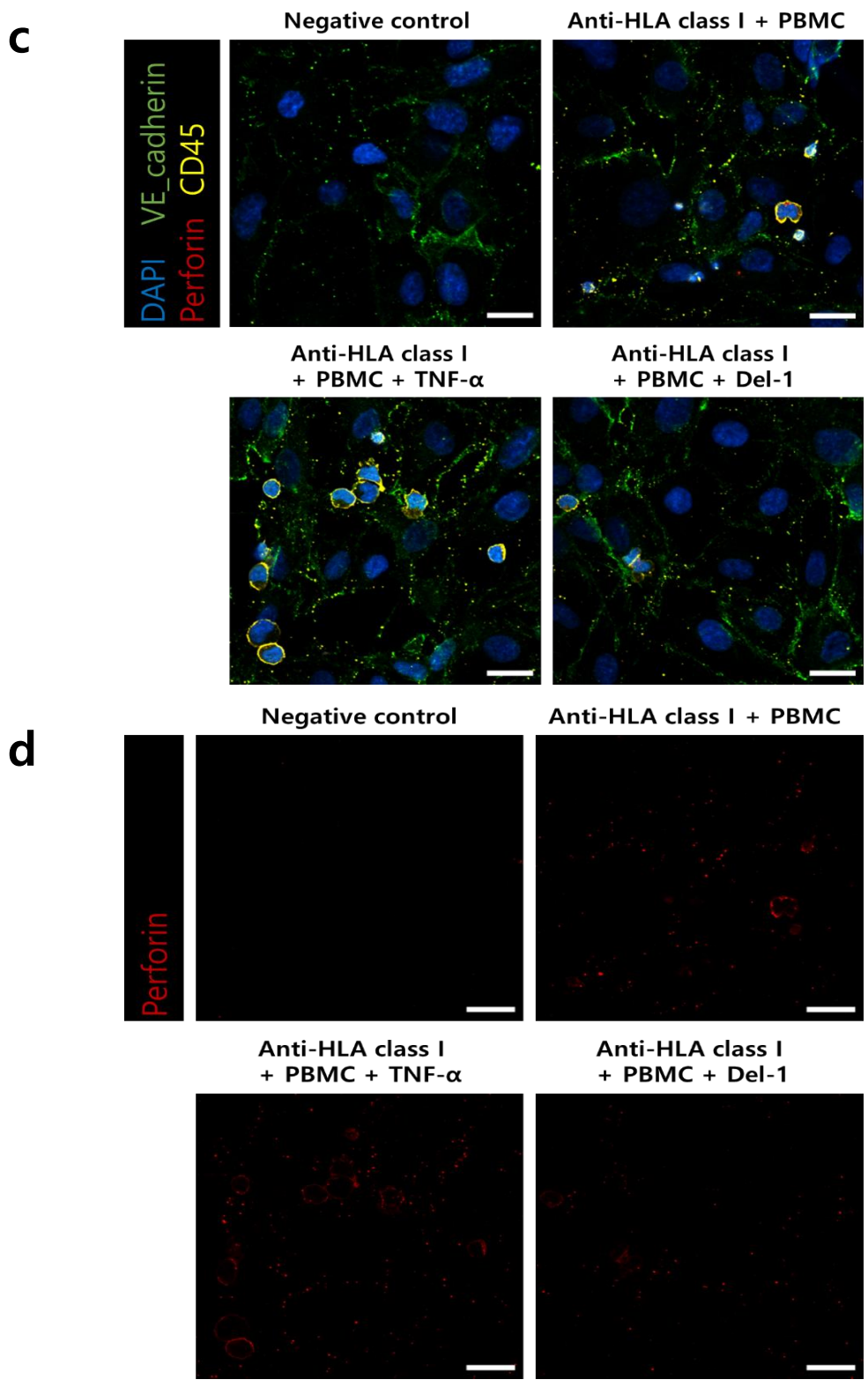


그림 6. Del-1에 의한 acute tissue injury 변화

Del-1 유무에 따른 혈관 내피 세포 내 glyocalyx 감소와 perforin으로 인한 혈관 내피 세포 lysis 또는 perforin 이동을 비교하려고 형광이 달린 항체를 이용하여 공초점 형광 현미경으로 확인하였다. (a)는 glyocalyx 감소를 확인하기 위한 이미지를 나타내며, 핵(DAPI), VE_cadherin(Alexa 647), glyocalyx(FITC), CD45(A532)를 각각 염색하였다. 해당 이미지는 merge 이미지이다. (b)는 (a)의 이미지를 중점으로 하여 glyocalyx 형광 세기를 정량화하였다. 각 그룹당 2개의 이미지에서 임의로 5곳을 설정하여 총 10곳에서의 형광 세기를 측정하였다. 관련 이미지는 이에 대한 대표 이미지를 나타낸다. (c)는 perforin으로 인한 혈관 내피 세포 lysis 또는 perforin 이동을 보기 위한 이미지이며 핵(DAPI), VE_cadherin(Alexa 488), perforin(Alexa 647), CD45(A532)를 각각 염색하였다. 관련 이미지는 merge 이미지이다. (d)는 (c)의 이미지에서 염색된 perforin만을 나타낸다. 모두 630배율이며 scale bar는 20 μ m이다. 데이터는 평균 \pm SD (그룹당 n=10)으로 표시되었다. (***) ; P < 0.005, ns ; not significant ; One-way ANOVA)

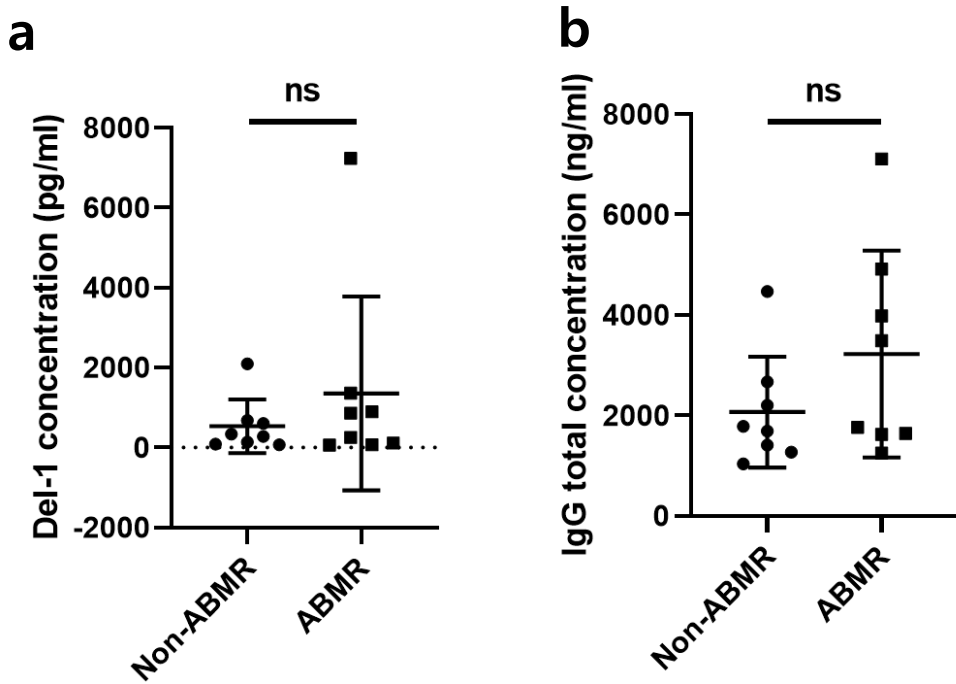


그림 7. 신장 이식 환자의 serum 분석

두개의 신장 이식 환자 그룹(Non-ABMR, ABMR)에서 각 8명의 serum을 신·췌장 이식외과 연구실에서 제공받았다. 실험은 microplate reader로 450nm 형광으로 분석하였다. (a)는 serum내 soluble Del-1 농도 측정 결과이며(그룹당 n=8, $R^2 = 0.9994$), (b)는 serum 내 total IgG 농도 측정 결과를 나타낸다. (그룹당 n=8, $R^2=0.9923$). 데이터는 평균±SD (그룹당 n=8)으로 표시되었다. (ns ; not significant ; t-test)

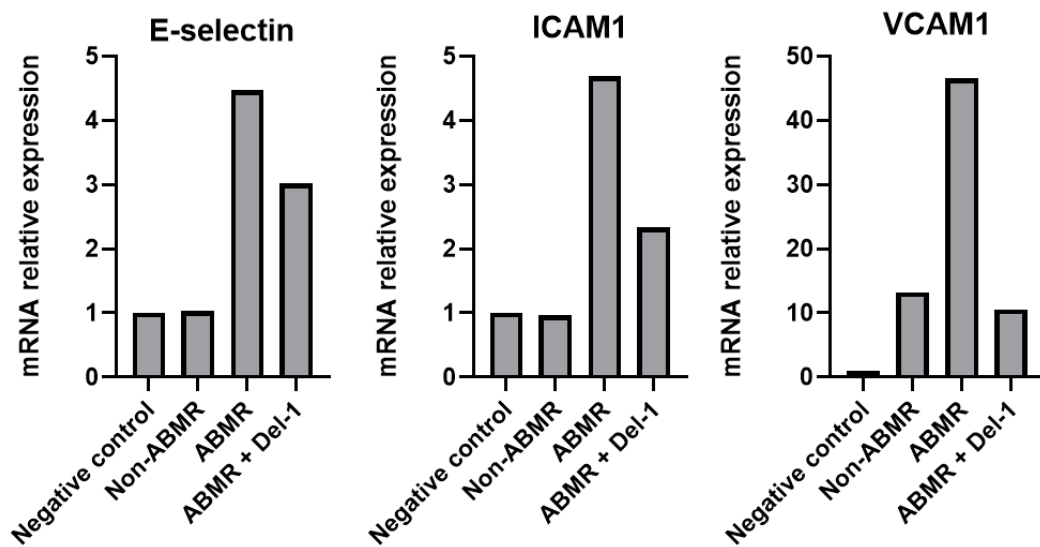


그림 8. 신장 이식 환자의 PBMC와 DSA-매개로 증가된 혈관 내피 세포 활성화 markers 발현량을 Del-1이 조절

두 개의 신장 이식 환자 그룹(Non-ABMR, ABMR)에서 adhesion molecule 발현량 비교와 ABMR 환자에게 Del-1이 처리되었을 때 adhesion molecule 발현량을 실시간 정량 증합효소 연쇄반응(qRT-PCR)으로 비교하였다. 해당 그래프는 18s rRNA로 normalization하여 정량분석하였다. (그룹당 n=1)

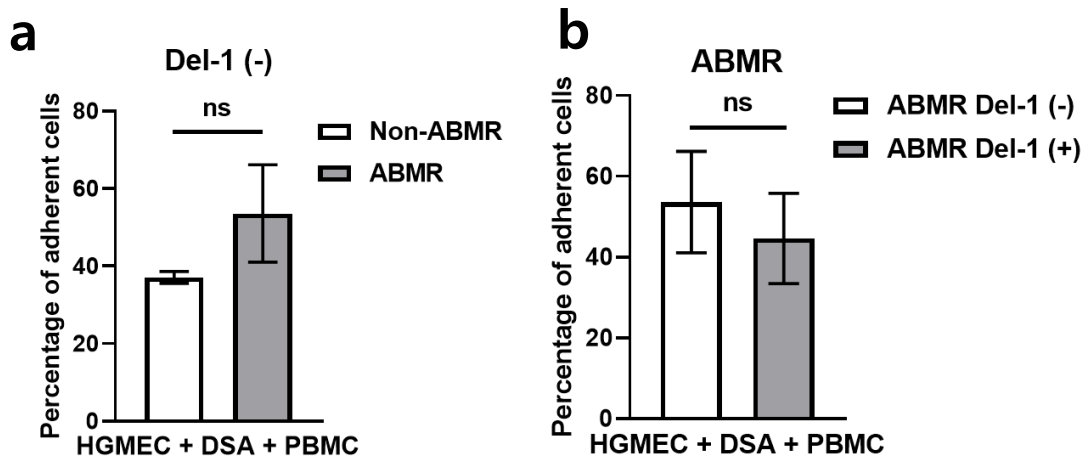
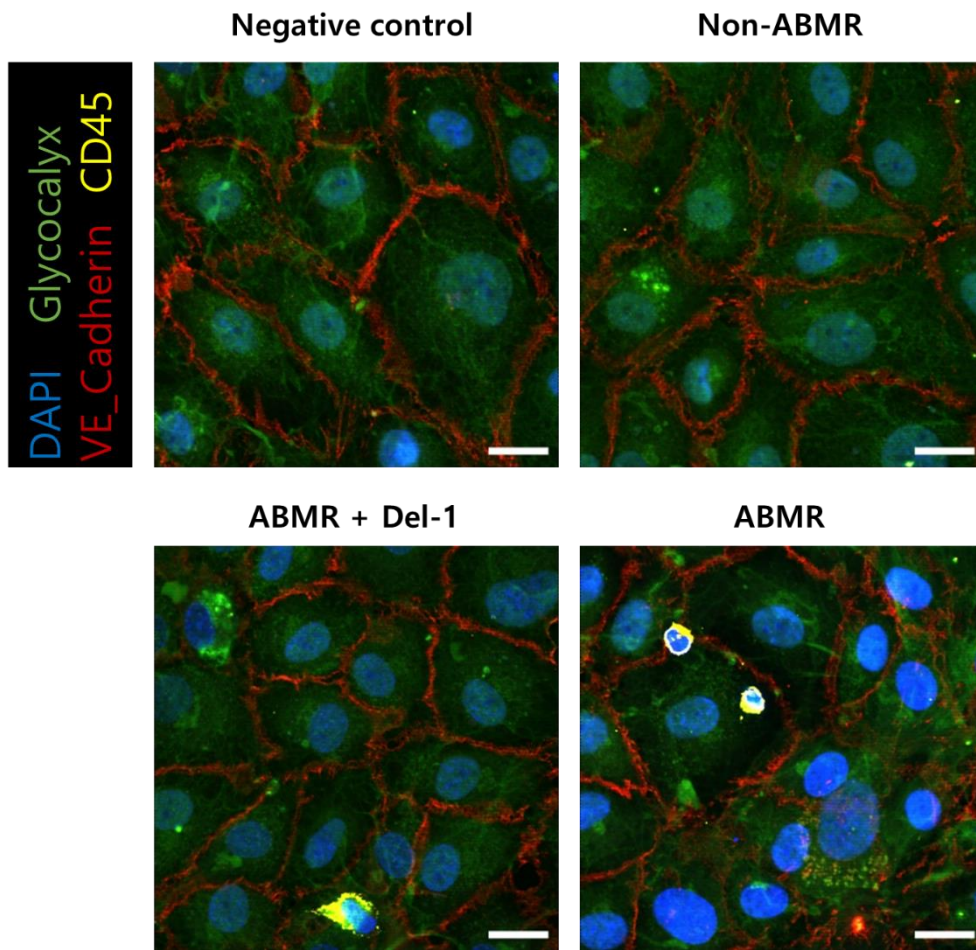


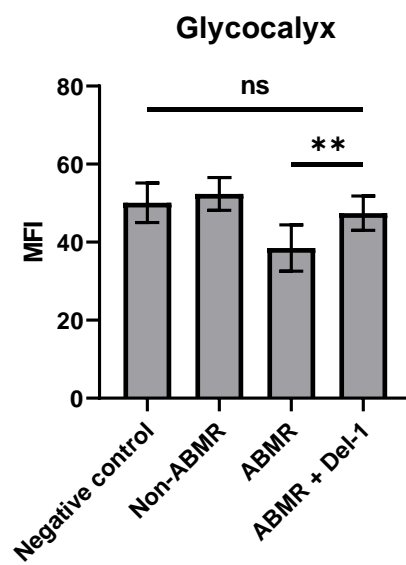
그림 9. 신장 이식 환자의 PBMC와 DSA-매개로 활성화된 혈관 내피 세포에서 Del-1에 의한 PBMC 부착 변화

세포 부착 분석법(cell adhesion assay)을 진행하여 Del-1에 따른 혈관 내피 세포에 신장 이식 환자들의 PBMC 부착 정도를 확인하였다. PBMC와 serum(DSA)으로 혈관 내피 세포를 활성화 시키기전 Del-1으로 2시간 preincubation하였다. PBMC를 BCECF, AM(3 μ M) 형광물질로 labeling하여 HGMEC와 공배양 시키고 microplate reader로 흡광도(480, 530nm)를 측정하였다. (a), (b)는 5번 반복하여 측정한 후 이에 대한 평균값을 나타낸다. (a)는 혈관 내피 세포에 Non-ABMR 환자와 ABMR 환자의 PBMC를 부착하여 비교한 결과를 나타낸다. (b)는 같은 ABMR 환자에게 Del-1을 처리했을 때에 PBMC 부착 정도를 비교한 결과이다. 데이터는 평균 \pm SD(그룹당 n=3)으로 표시되었다. (ns ; not significant ; t-test)

a



b



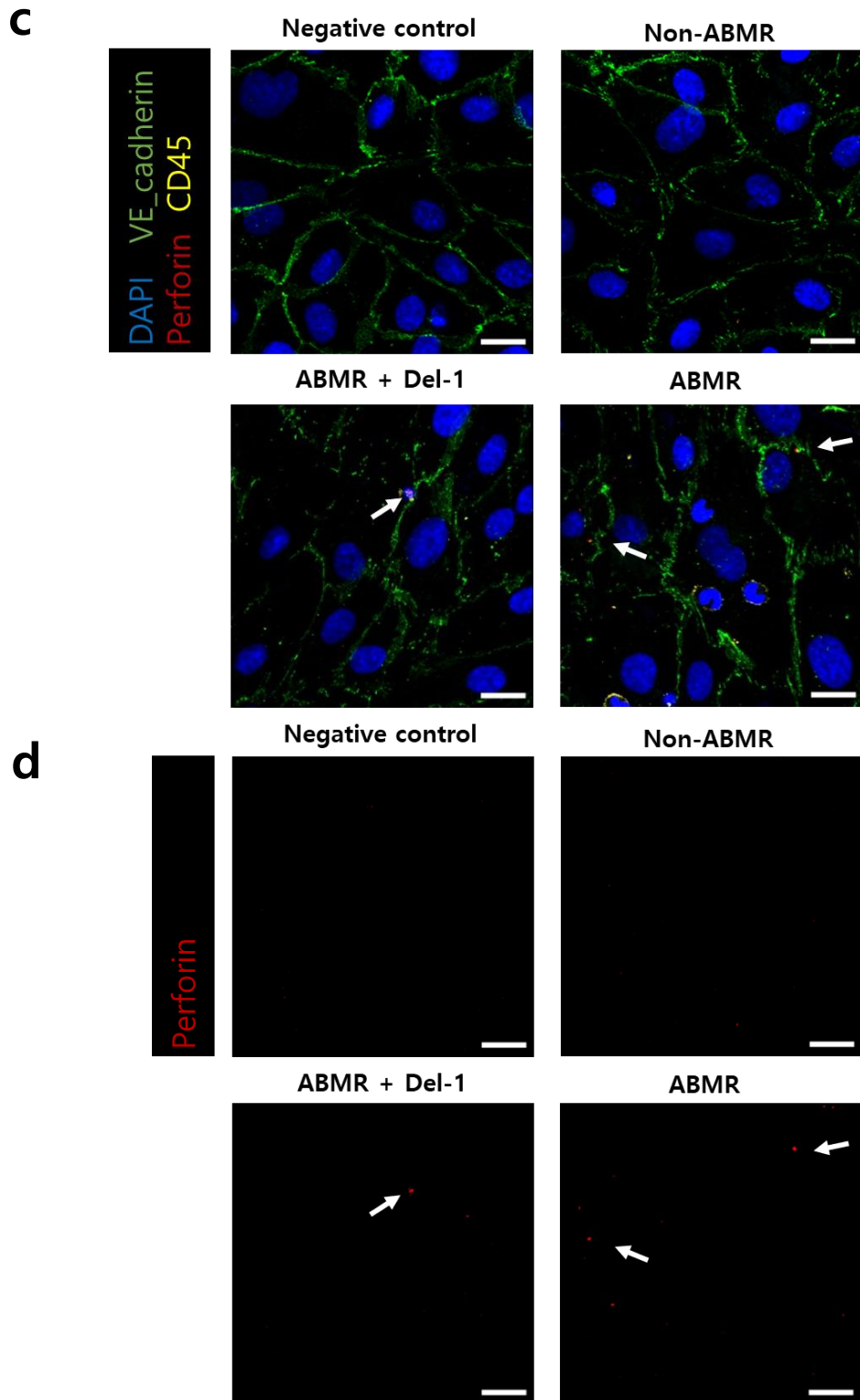


그림 10. 신장 이식 환자의 PBMC 와 DSA-매개에 의한 acute tissue injury 를 Del-1 이 조절

신장 이식 환자의 시료(PBMC, serum)를 이용하여 혈관 내피 세포 내 glyocalyx 감소와 perforin으로 인한 혈관 내피 세포 lysis 또는 이동과 De1-1에 따른 acute tissue injury 감소를 확인하였다. 형광이 달린 항체를 이용하여 공초점 형광 현미경을 사용하여 관측하였다. (a)는 glyocalyx 감소를 확인하기 위한 이미지이며 핵(DAPI), VE_cadherin(Alexa 647), glyocalyx(FITC), CD45(A532)를 각각 염색하였다. 관련 이미지는 merge 이미지이다. (b)는 (a)의 이미지를 중점으로 하여 glyocalyx 형광 세기를 정량화 하였다. 각 그룹당 2개의 이미지에서 임의로 5곳을 설정하여 총 10곳에서의 형광 세기를 측정하였다. 해당 이미지는 이에 대한 대표적인 이미지를 나타낸다. (c)는 perforin으로 인한 혈관 내피 세포 lysis 또는 perforin 이동을 보기 위한 이미지이며 핵(DAPI), VE_cadherin(Alexa 488), perforin(Alexa 647), CD45(A532)를 각각 염색하였다. 관련 이미지는 merge 이미지이다. 하얀색 화살표는 perforin을 의미한다. (d)는 (c)의 이미지에서 염색된 perforin만을 나타낸다. 하얀색 화살표는 perforin을 의미한다. 모두 630배율이며 scale bar는 20 μ m이다. 데이터는 평균 \pm SD (그룹당 n=10)으로 표시되었다. (** ; P < 0.01 ; One-way ANOVA)

Discussion

본 연구는 항체 매개성 신장 이식 거부 반응에서 항염증 단백질인 Del-1을 이용하여 ABMR을 개선 가능성을 검사하고자 하였다. Del-1이 DSA 매개 혈관 내피 세포 활성을 어느 정도 제어하여 PBMC가 혈관 내피 세포에 부착하는 것을 억제하였으며 glyocalyx 감소와 PBMC에서 perforin이 혈관 내피 세포로 이동을 감소시키는 것과 같은 acute tissue injury를 어느정도 예방 또는 개선하였다. 이는 향후 초기 이식 거부 반응에 관한 연구에 기여할 수 있을 것으로 추정된다. 이러한 결과는 신장 이식 거부 반응뿐만 아니라 PBMC가 관여하는 다른 장기 이식 거부 반응에서도 초기의 이식 거부 반응을 억제시킬 수 있는 물질이 될 수 있다는 것을 확인함에 따라, 이와 관련된 유사한 다른 연구에서도 본 연구의 결과가 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구를 진행하면서 신장 이식 환자의 임상 시료 또는 임상 시료를 사용하기 전 healthy donor의 PBMC를 이용한 혈관 내피 세포 활성화에서 몇몇 혈관 내피 세포 활성 marker들이 일관된 결과로 관측되지 않았다. 이러한 원인은 환자 또는 healthy donor마다 PBMC 유형별 비율이 다르고 serum 내 성분도 매우 차이가 있는 것으로 사료된다. 소수의 환자와 healthy donor에서는 Del-1을 처리했을 때 adhesion molecule과 chemokine 등이 제각각으로 증가하기도 하였으며, PBMC가 더 많이 부착되는 환자나 healthy donor도 있었다. 본 연구의 제한점은 제한된 수의 환자들 또는 healthy donor의 시료를 이용해 나온 결과이다.

Del-1은 발현 위치에 따라 숙주 염증 반응의 각 단계 즉 백혈구 모집에 대한 골수 생성부터 세포증식 및 염증 해결까지를 조절한다.²⁵ ABMR과 관련하여 기전 또는 원인 등을 아직 규명하지 못한 상태이므로 Del-1을 이용한 좀 더 많은 연구를 필요로 한다. Serum에서의 soluble Del-1과 total IgG는 ABMR 환자에서 Non-ABMR 환자 보다 농도가 약간 높은 경향성을 보였지만 유의성이

없었다. 이 또한 이식 환자의 serum내 성분이 variation하고 환자들을 Non-ABMR과 ABMR이라는 큰 분류 외에도 정확한 분석 결과를 얻기 위해서, 이식 이후의 시간 경과 또는 ABMR 환자의 severe 상태 등과 같은 새로운 분류 기준이 필요할 것으로 추정된다.

더 많은 이식 환자의 임상 시료와 신장 이식 전과 이식후 일정 시기별 임상 시료를 활용하여 다양한 반복 실험을 진행한다면 이식 환자들 serum내에 Del-1의 농도만으로 ABMR의 가능성을 빠르게 판단 할 수 있는 새로운 marker가 될 수도 있으며 ABMR로 인한 tissue injury에서도 효과를 기대할 수 있을 것으로 예상된다. 이는 향후 Del-1을 포함하는 진단 kit나 의약품 개발에 도움이 될 수 있는 가능성을 제공할 수 있을 것으로 추정된다.

Reference

1. Black, C. K., et al. (2018). Solid organ transplantation in the 21(st) century. *Ann Transl Med*, 6(20), 409.
2. McLaren, A. J., et al. (2000). Chronic allograft failure in human renal transplantation: a multivariate risk factor analysis. *Ann Surg*, 232(1), 98-103.
3. Einecke, G., et al. (2009). Antibody-mediated microcirculation injury is the major cause of late kidney transplant failure. *Am J Transplant*, 9(11), 2520-2531.
4. Sellares, J., et al. (2012). Understanding the causes of kidney transplant failure: the dominant role of antibody-mediated rejection and nonadherence. *Am J Transplant*, 12(2), 388-399.
5. Pineiro, G. J., et al. (2018). Rituximab, plasma exchange and immunoglobulins: an ineffective treatment for chronic active antibody-mediated rejection. *BMC Nephrol*, 19(1), 261.
6. Eskandary, F., et al. (2018). A Randomized Trial of Bortezomib in Late Antibody-Mediated Kidney Transplant Rejection. *J Am Soc Nephrol*, 29(2), 591-605.
7. Sandal, S., & Zand, M. S. (2015). Rational clinical trial design for antibody mediated renal allograft injury. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 20(4), 743-762.
8. Zhang, R. (2018). Donor-Specific Antibodies in Kidney Transplant Recipients. *Clin J Am Soc Nephrol*, 13(1), 182-192.
9. Opelz, G. (1997). Impact of HLA compatibility on survival of kidney transplants from unrelated live donors. *Transplantation*, 64(10), 1473-1475.
10. Nakamura, T., et al. (2019). The Role of Major Histocompatibility Complex in Organ Transplantation- Donor Specific Anti-Major Histocompatibility Complex Antibodies Analysis Goes to the Next Stage. *Int J Mol Sci*, 20(18).
11. Kojc, N., et al. (2018). Early Graft Loss after Kidney Transplantation: Endothelial Dysfunction of Renal Microvasculature. *Biomed Research International*, 2018.

12. Quaglia, M., et al. (2020). Recent Advances on Biomarkers of Early and Late Kidney Graft Dysfunction. *Int J Mol Sci*, 21(15).
13. Veceric-Haler, Z., et al. (2019). Severe Endothelial Injury of Deceased Donor Kidney Is Associated with Early Graft Failure. *Transplant International*, 32, 340-340.
14. El-Zoghby, Z. M., et al. (2009). Identifying specific causes of kidney allograft loss. *Am J Transplant*, 9(3), 527-535.
15. Kim, M., et al. (2014). Antibody-mediated rejection in kidney transplantation: a review of pathophysiology, diagnosis, and treatment options. *Pharmacotherapy*, 34(7), 733-744.
16. Garg, N., et al. (2017). Defining the phenotype of antibody-mediated rejection in kidney transplantation: Advances in diagnosis of antibody injury. *Transplant Rev (Orlando)*, 31(4), 257-267.
17. Zhang, J. (2022). Biomarkers of endothelial activation and dysfunction in cardiovascular diseases. *Rev Cardiovasc Med*, 23(2), 73.
18. Kloda, K., et al. (2013). The impact of ICAM1 and VCAM1 gene polymorphisms on chronic allograft nephropathy and transplanted kidney function. *Transplant Proc*, 45(6), 2244-2247.
19. Muhlbacher, J., et al. (2020). Non-invasive Chemokine Detection: Improved Prediction of Antibody-Mediated Rejection in Donor-Specific Antibody-Positive Renal Allograft Recipients. *Front Med (Lausanne)*, 7, 114.
20. Halloran, P. F., et al. (2022). Molecular diagnosis of ABMR with or without donor-specific antibody in kidney transplant biopsies: Differences in timing and intensity but similar mechanisms and outcomes. *Am J Transplant*, 22(8), 1976-1991.
21. Liew, H., Roberts, M. A., & McMahon, L. P. (2021). Markers of the Endothelial Glycocalyx Are Improved following Kidney Transplantation. *Kidney Blood Press Res*, 46(5), 581-587.

22. Delgadillo, L. F., et al. (2021). Changes in endothelial glycocalyx layer protective ability after inflammatory stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol*, 320(2), C216-C224.
23. Hara, S. (2017). Current pathological perspectives on chronic rejection in renal allografts. *Clin Exp Nephrol*, 21(6), 943-951.
24. Cornell, L. D. (2021). Histopathologic Features of Antibody Mediated Rejection: The Banff Classification and Beyond. *Front Immunol*, 12, 718122.
25. Shin, J., et al. (2013). Expression and function of the homeostatic molecule Del-1 in endothelial cells and the periodontal tissue. *Clin Dev Immunol*, 2013, 617809.
26. Congy-Jolivet, N., et al. (2013). Production and characterization of chimeric anti-HLA monoclonal antibodies targeting public epitopes as tools for standardizations of the anti-HLA antibody detection. *J Immunol Methods*, 390(1-2), 41-51.
27. Crespo, M., et al. (2021). Non-HLA Antibodies and Epitope Mismatches in Kidney Transplant Recipients With Histological Antibody-Mediated Rejection. *Front Immunol*, 12, 703457.
28. Strazza, M., et al. (2014). Static adhesion assay for the study of integrin activation in T lymphocytes. *J Vis Exp*(88).
29. Vanoni, G., Jandus, C., & Trabanelli, S. (2022). Static Adhesion Assay for Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *Bio Protoc*, 12(1), e4276.
30. Safuan, S., et al. (2012). A comparative study of adhesion of melanoma and breast cancer cells to blood and lymphatic endothelium. *Lymphat Res Biol*, 10(4), 173-181.
31. Kim, W. Y., et al. (2019). Serum developmental endothelial locus-1 is associated with severity of sepsis in animals and humans. *Sci Rep*, 9(1), 13005.
32. Osinska, I., Popko, K., & Demkow, U. (2014). Perforin: an important player in

immune response. *Cent Eur J Immunol*, 39(1), 109-115.

33. Choy, J. C. (2010). Granzymes and perforin in solid organ transplant rejection. *Cell Death Differ*, 17(4), 567-576.

Abstract

In solid organ transplantation, antibody-mediated rejection (ABMR) is the most significant factor contributing to long-term allograft failure. Currently, immunosuppressive therapy and plasma exchange are employed to prevent and treat ABMR, but their efficacy in preventing ABMR recurrence is limited. Therefore, there is an urgent need to identify novel therapeutic targets for the prevention and treatment of ABMR to improve patient and graft survival rates in kidney transplant recipients. The aim of this study is to investigate whether donor-specific antibodies (DSAs)-mediated activation of endothelial cells is controlled to attenuate ABMR. When immune cells obtained from healthy donors were cultured in the presence of commercially available anti-HLA class I antibodies, there was an increase in the activation markers of endothelial cells. However, the addition of recombinant Del-1 protein led to a reduction in the expression of various ABMR markers in endothelial cells. Analyzing samples from kidney transplant patients, immune cells from ABMR patients exhibited greater adhesion capability to endothelial cells compared to immune cells from non-ABMR patients. This adhesion capability in ABMR patients was reduced when recombinant Del-1 protein was added. Additionally, Del-1 protein decreased the glycocalyx of endothelial cells and reduced endothelial cell lysis caused by perforin originating from immune cells. This suggests that Del-1 protein has the potential to alleviate acute tissue injury. Measuring the concentrations of total IgG and Del-1 in the serum of kidney transplant patients, the average levels of total IgG and Del-1 were higher in the serum of ABMR patients compared to healthy donors or non-ABMR patients. These findings provide insights into the mechanisms of ABMR-caused tissue injury and help find markers for rapid ABMR diagnosis associated with tissue transplantation.

감사의 글

석사과정을 진행하면서 저의 석사 학위 논문에 도움을 주신 많은 분들께 감사드립니다.

먼저 최은영 지도교수님 감사드립니다. 교수님 덕분에 많은 실험들의 피드백과 좋은 조언들을 받게 되었습니다. 또한 본 논문을 심사해주신 장수환 교수님과 강민지 교수님께 감사드립니다. 교수님들께서 검토해주시고 심사해주신 덕분에 이 논문을 끝까지 마무리하여 작성할 수 있었습니다. 혈액 채취에 많은 도움을 주신 서울아산병원 진단검사의학과 황상현 교수님과 진단검사의학과 선생님들에게도 감사드립니다.

저에게 면역학의 즐거움을 처음 알려주신 중앙대학교 신차균 교수님께 감사드립니다. 신차균 교수님께서 알려주신 면역학으로 인해 제가 이 길을 선택할 수 있는 계기가 되었습니다. 제가 울산대학교 대학원에 입학하여 많은 수업과 연구 활동을 진행할 수 있었던 이유는 중앙대학교 학부때 김경동 교수님, 김우연 교수님, 박경순 교수님, 설우준 교수님, 손태일 교수님, 이재관 교수님, 이상준 교수님, 차창준 교수님, 함영태 교수님께서 가르쳐 주셨던 전공 지식들 덕분입니다. 교수님들 진심으로 감사 드립니다. 그 당시에는 이게 나중에 얼마나 도움이 될까 했었는데 정말 많은 도움이 되었습니다.

그리고, 옆에서 많은 얘기들을 나누고 함께 실험실에서 일했던 이상용 선생님, 김태환 선생님에게도 감사드립니다. 선생님들과 함께여서 대학원 생활이 즐거웠습니다. 마지막으로 제 옆에서 항상 응원해주고 지지해주신 부모님, 누나, 예린이에게도 깊은 감사를 드립니다.