



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

mregDC2를 통한 CD137신호의
면역조절

Immune regulation of CD137 signaling
through mregDC2

울산대학교 대학원

의과학과

김민지

mregDC2를 통한 CD137신호의
면역조절

지도교수 조홍래

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함

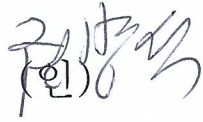


2022년 8월

울산대학교 대학원

의과학과

김민지

김민지의 이학석사 학위 논문을 인준함

심사위원	권병석	(인) 
심사위원	조홍래	(인) 
심사위원	이종수	(인) 

울산대학교 대학원

2022년 8월

국문 요약

CD137 신호는 강력한 T 세포 공동자극분자이지만, 질병 유도 모델에서 CD137 유전자 결핍 생쥐는 종종 면역이 과활성화되는 표현형을 가진다. 유사한 맥락으로 CD137 항체는 면역을 억제하여 자가면역질환과 염증성 질환을 효과적으로 치료한다. 본 연구에서는 CD137 신호에 의해 면역을 조절하는 수지상 세포를 동정하는 연구를 수행하였다. 먼저, DBA/2→BDF1 만성 이식편대숙주병 모델에서 생쥐의 비장에서 분리한 CD11b⁺ DC2 를 사용하여 scRNA seq(Single cell RNA sequencing: 단일세포 RNA 시퀀싱)을 수행하였다. DC2 는 11 개의 cluster 로 분류되었으며 그 중 cluster 5 가 mregDC2 (mature DCs enriched in immunoregulatory molecules: 면역조절분자가 풍부한 성숙한 DC) 로 확인되었다. cluster 0 에서 DC2A, DC2B 와 cluster 7 로 분기되며 mregDC2 는 cluster 7 로부터 분화된다. 의사시간 궤적 분석에 의하면 mregDC2 는 가장 성숙한 형태의 DC2 이며 면역활성분자와 면역억제분자를 동시에 가지고 있다. GVHD 모델에서 CD137 유전자 결핍 생쥐에서 mregDC2 와 Treg(regulatory T cell: 조절 T 세포)의 수가 감소하지만 CD137 항체를 주입한 생쥐에서는 이와 반대의 양상을 보여준다. 시험관에서 CD137 항체로 프라이밍된 DC2 는 이식편대숙주병을 억제할 능력을 가지고 있다. 이상의 결과는 CD137 신호는 mregDC2-Treg 세포 축을 통해 면역을 억제할 수 있음을 보여준다.

키워드: 자가면역질환, CD137, DC, cDC2

차 례

국문 요약.....	i
그림 차례.....	iii
서론.....	1
연구재료 및 방법.....	4
결과.....	8
1. Identification of DCs subsets involved in immunoregulation by receiving CD137 signal through scRNA seq.	
2. Treatment of 3E1 in cGVHD model induced immune tolerance.	
3. CD137 antibody treatment increase mregDC2 in cGVHD.	
4. Immune tolerance was induced when 3E1-priming DC2 was adaptive transfer to the cGVHD model.	
5. The inflammatory response was increased in GVHD-induced (BalxB6)F1 CD137 KO mice.	
6. aGVHD is induced in WT (BalxB6)F1 mice and CD137 KO B6 mice.	
고찰.....	23
참고 문헌.....	25
영문 요약.....	29

그림 차례

Figure 1.....	10-11
Figure 2.	13
Figure 3.	15
Figure 4.	17
Figure 5.	19
Figure 6.	22

서론

동종 조혈 모세포 이식은 골수 및 면역계의 다양한 악성 및 비 악성 질환에 점점 더 많이 사용되는 치료법이다 (1). 이 방법은 불치병을 가진 많은 환자들을 치료하지만 종종 심각한 면역학적 합병증, 특히 이식편대숙주병과 관련이 있다 (2). 또한 골수 이식 후 질병률과 사망률의 주요 원인으로 남아 있는 이식편대숙주병은 조혈모세포 이식에 포함된 성숙한 공여자 T 세포에 의해 매개된다. GVHD 를 모방하는 생쥐 모델에서 DBA/2 계통의 기증자 T 세포를 (C57BL/6 X DBA/2)F1 (BDF1) 생쥐에 주입하면 만성 이식편대숙주병이 유도되는 반면, 다른 부모인 C57BL/6 를 주입할 경우는 급성 이식편대숙주병이 유도된다 (3). 그 중 만성 이식편대숙주병모델은 많은 동종 조혈 모세포 이식 수혜자들에게 영향을 미쳐 수많은 장기 시스템의 기증 장애와 종종 심각한 면역 결핍 상태를 초래한다 (4-6).

CD137 은 T 세포에 대한 공동자극 분자로 기능한다. CD137 신호는 CD8+ T 세포에서 가장 광범위하게 연구되었다 (7). 공동자극 분자는 T 세포 반응을 결정하는데 중요한 역할을 한다 (8). 다양한 공동자극 분자 중에서, CD137 은 특히 암 면역요법에서 널리 연구되어 온 종양괴사인자 슈퍼패밀리(TNFSF: Tumor Necrosis Factor Super Family) 수용체 중 하나이다. T세포로의 CD137 신호전달은 제 1형 도움 T 세포(Th1) 및 세포 독성 T 세포(Tc1)를 통해 강력한 세포 면역 반응을 유도하여, 감염 동안 향상된 바이러스 제거를 유도하고 (9), 종양에서 악성 세포의 세포 매개 세포독성을 유도한다 (10,11,12,13). 활성화된 T 세포 상의 CD137 및 면역제시세포 상의 CD137L 의 상호작용은 상호작용하는 세포 유형 둘 다를 공동 자극하거나 활성화시키는 양방향 신호전달을 유도한다 (14). T 세포로의 CD137 신호전달은 클론확장, 분화 및 생존을 촉진하는 반면

(15), 면역 제시 세포로의 역 CD137L 신호 전달은 사이토카인 생산 증가와 항원 제시의 향상된 능력으로 세포 활성화 및 성숙을 유도한다 (16). CD137 과 CD137L 의 발현은 활성화에 의존적이고 일시적이다. 자가 면역 질환에서 면역관용이 깨지고 면역 체계가 과민반응을 일으키고 조절이 어려워진다. 자가반응성 T 세포 및 자가항체는 장기 손상을 초래하는 정상 조직을 표적으로 한다 (17,18).

DCs(Dendritic cells: 수지상세포)는 정상상태에서 미성숙하고, 낮은 MHCII(주조직 적합성 복합체 클래스 II; Major Histocompatibility Complex class II) 및 공동 자극 분자 표면 발현을 나타내는 전문적인 항원 제시 세포이다. 활성화 시 예를 들어, TLR(Toll-유사 수용체; Toll-Like Receptor)자극에 노출되면, DCs 는 공동자극분자를 성숙시키고 상향조절하여 적응면역을 촉진시킨다 (19). 또한, DCs 는 T 세포 내성을 유도하여, 자가 반응성 T 세포가 중심 흥선 내성을 벗어나거나 자가항원 또는 주변 항원을 만나 자가 면역을 유발하지 않도록 한다 (20,21). 이러한 관용성 DCs 는 여전히 T 세포에 항원을 제시하고, 억제 신호에 대한 공동자극의 나타내지만, 궁극적으로 T 세포 활성화 및 증식을 감소시킨다 (20,21). 말초 T 세포 내성에 대한 DC 의 영향을 뒷받침하는 동물에서 CD11c DC 의 제거는 Th1(T helper 1; 제 1 형 도움 T 세포) 또는 Th17(T helper 17; 제 17 형 도움 T 세포) 효과기 계통에 대한 향상된 활성화 및 분화를 나타내는 말초 조직에서 증가된 CD4 T 세포와 관련된 자발적 자가면역을 유발한다 (22). DC 는 항원 전달 및 공동자극 시 발생하는 iTregs(induced T regulatory cells; 유도된 T 조절 세포)의 확장을 통해 자가면역을 조절할 수 있다 (23,24,25). TGF- β , 인터루킨 10, 코르티코 스테로이드 또는 라파마이신을 포함한 다양한 항 염증 및 면역 억제제는 DC 의 성숙 또는 관용성 DC 를 유도한다 (26). cDC(conventional Dendritic cells; 보편적인 수지상세포)는 강력한 항원제시세포이며 두 가지 주요 하위집합으로 분류된다. cDC1 은 CD8+ T 세포로의 교차 자세를 통해 세포와 관련된

항원을 제시하고 제 1 형 면역 반응을 활성화 시키는데 효율적이다. 대조적으로 cDC2 는 MHCII 를 통한 CD4+ T 세포 반응을 활성화시키는데 더 초점이 맞춰져 있다. cDC 와 달리 pDC(plasmacytoid dendritic cells; 혈장 세포질 수지상세포)는 상대적으로 약한 항원제시세포이며 IFN-1(type 1 interferon, 제 1 형 인터페론)의 빠른 생산을 전문적으로 하는 것으로 알려져 있다 (27).

면역조절에 관여하는 면역 조절 분자가 풍부한 성숙한 DC 는 종양에서 처음 기술되었다 (28,29,30). 하지만 이러한 세포는 종양에서만 국한되지 않았고 (31), 성숙 및 면역 조절 능력과 관련된 마커를 특징으로 한다. 그리고 이러한 DC 는 mregDC(mature DCs enriched in immunoregulatory molecules: 면역조절분자가 풍부한 성숙한 DC) (30), LAMP3+ DC (32,33) 또는 cDC3 (29, 34)로 다양하게 지칭되었다. mregDC 라고 하는 이러한 DC 는 서로 다른 cDC 의 하위집합 (cDC1 및 cDC2)에서 파생되고, 성숙(예: CD40, CD83, CD86), 이동(예: CCR7, ICAM1) 및 종양조절(IL-12) 뿐만 아니라 내성/면역 억제(예: PD-L1, PD-L2, CD200)에 특이적인 특징을 가지고, IL-4 를 통해 유도되는 것으로 제안되었다 (28,29,30,34).

따라서 본 연구에서는 실험동물의 자가 면역 질환 모델에서 CD137 신호를 받아 면역 조절에 관여하는 DC 인 mregDC 를 확인하고자 하였다. 이를 확인하기 위해 CD137 이 결핍된 생쥐와 CD137 항체를 사용하여 면역 조절에서 DC 의 하위집합을 유세포 분석을 통해 확인하였고, 자가항체의 수준을 확인하여 질병의 징후를 확인하였다.

연구재료 및 방법

Mice

7-8주령의 Female C57BL/6, DBA/2, BDF1, Balb/c 마우스는 Orient Bio(Seoul, Korea)에서 구입하였다. C57BL/6 또는 (BalxB6)F1 background CD137KO^{-/-} 생쥐와 야생형 (BalxB6)F1 생쥐는 Specific Pathogen Free(SPF) 조건에서 유지되었으며, 실험 전 최소 1주일 동안 적응시켜 사용하였다. 본 연구는 울산대학교 동물실험 협의회 승인에 따라 수행되었다.

Reagents and Antibodies

FITC-, PE-, APC-, Percp-, APC/cy7-, PE/cy7- 결합 단일 클론 항체들은 BD Biosciences 그리고 eBioscience 사에서 구입하였다: CD11c, MHCII, CD11b, CD24, sirpa(CD172a), CCR7, CD24, ESAM, CD3, CD4, CD8, H2k^b, H2k^d, LAG3, CD44, PD-1, CXCR5, CD25, FoxP3, PD-L1, PD-L2, CD371, CD40, Fas, GL7, CD138, CD19, CD16/32(2.4G2) 단일 클론 항체와 3E1(항-CD137 작용제)는 본 실험실에서 제작되어 복수로부터 정제되었다.

Induction of GVHD

만성이식편대숙주병 유도 모델로는 2 가지 모델을 사용하였다. MHCII 가 H2k^d 타입인 Balb/c, DBA/2 와 H2k^b 타입인 C57BL/6 생쥐를 사용하였다. 공여자로는 Balb/c 또는 DBA/2 를 사용하였고, 수혜자로는 두 타입의 첫 세대인 (BalxB6)F1 과 BDF1 을 사용하였다. 공여자의 비장과 림프절을 으깨서 PBS 에 부유시켜 스트레이너(40 μ m BD Falcon)에 걸러 찌꺼기 없이 세포들만 남겨주었다. 그리고 RBC(Red Blood Cell; 적혈구) 용해 완충액 (삼차 증류수로 10x 완충액을 1x 로 희석시켜 사용하였다. Biolegend)을

사용하여 적혈구들을 깨주고 PBS 로 세척 후 재부유시켜 스트레이너에 한 번 더 걸러주었다. 그리고 수혜자 한 마리 당 8×10^7 개의 세포를 0.2ml 로 하여 혈관 내 주사 (intravascular injection)로 넣어주어 이식편대숙주병을 유도하였다.

Cell isolation and FACS

이식편대숙주병이 유도된 쥐를 경추탈골로 희생한 다음 비장만 꺼내어 비장을 잘게 잘라주었다. 잘게 잘린 비장을 1% BSA(Bovine Serum Albumin) 5mM EDTA(Ethylene-Diamine-Tetraacetic Acid) 완충액에 넣고, Collagenase IV (gibco) 1mg/ml, DNase I (sigma) 0.1mg/ml)을 넣어 비장 세포를 분리해주었다. FACS 표면 염색을 하는 경우 하나의 FACS 튜브에 2×10^6 개의 세포를 넣고 2.4G2 를 10 μ g넣고 blocking 을 하였다. FACS 염색 항체들을 넣어 염색해주었다. 세포 내 염색 (ex)IL-12)의 경우 세포를 배양 용기에서 LPS(Merck) 10 μ g/ml, GolgiPlug(BD Biosciences) 1 μ g/ μ l를 넣고 4 시간 배양해준 다음 세포를 FACS 튜브에 넣고 표면염색을 해주었다. 그 다음 4% paraformaldehyde(Biosesang)로 세포를 고정해주고, Permeabilization 완충액(삼차 증류수로 10x 완충액을 1x 로 희석시켜 사용하였다. Invitrogen)으로 세척하여 세포에 구멍을 내주고 세포 내 염색을 해주었다. FACS-canto system (BD Biosciences Pharmingen)을 사용하여 분석하였고, 데이터는 FlowJo 소프트웨어(version10)와 BD Diva 를 사용하여 분석하였다.

CD11b+ DCs Single Cell RNA seq

만성 이식편대숙주병이 유도된 생쥐의 비장에서 단일 세포를 분리하여 MACS 로 CD11c⁺ 세포를 풍부하게 만들어 주었다. 그 다음 CD11c, MHCII, CD11b 를 FACS 염색

항체로 표면염색을 하여 BD FACS Aria Fusion Cell Sorter 기계로 CD11b⁺ cDC(cDC2)를 분리하였다. 이 세포를 마크로젠(서울, 한국)에 맡겨 sc RNA seq 을 수행하였다.

Histology

이식편대숙주병을 유도한 생쥐에서 간과 대장을 분리하여 10% 포르말린과 파라핀에 고정시켰다. 조직학적 소견을 관찰하기 위하여 5 μ m 간격으로 조직 절편을 만들어서 H&E 염색을 하였다. 또한 섬유화와 병리학적 차이를 확인하기 위하여 한 명의 병리학과 전문의가 모든 폐 조직의 병리 소견을 분석하였다.

ELISA

생쥐의 정맥에서 채혈하고, 항-DNA IgG1 을 혈청에서 ELISA 로 확인했다. 플레이트(96-well)는 10 μ l/ml 농도의 100 μ l SSD(Salmon Sperm DNA, Sigma-Aldrich)와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 2% BSA 로 차단한 후 플레이트를 100 μ l씩 상온에서 2 시간동안 인큐베이션 하고 희석된 혈청 샘플들을 넣고 다시 상온에서 2 시간동안 인큐베이션 해주었다. 그런 다음 0.1% Tween 20 을 포함하는 PBS 로 3 회 세척하고 HRP-접합된 항-생쥐 IgG1 을 각 웰에 첨가하고 플레이트를 상온에서 2시간 동안 인큐베이션 하였다. 샘플을 동일한 용액으로 다시 세척하고 10-15분 동안 100 μ l의 3,5,3',5'-tetramethylbenzene substrate(Pierce)에서 발색하고, 1M H₃PO₄ 50 μ l를 첨가하여 발색을 멈추었다. 그럼 다음 플레이트를 SpectraMax iD3 을 사용하여 450nm 에서 판독했다

Co-Culture

수여자로 사용하는 생쥐(BDF1)에 이식편대숙주병을 유도하고 3E1 을 주고, 3 일 째에 비장에서 cell 을 분리하여 MACS 를 통하여 CD11c+ cell 을 분리한 다음 초고속 유세포 자동 분석/분리기(FACSAria™ Fusion/BD)를 가지고 CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺CD371⁺cell (cDC2B)를 분리하고, 공여자로 사용하는 생쥐(DBA/2)의 비장에서 MACS 를 통하여 CD4⁺ cell 을 분리한 다음 초고속 유세포 자동 분석/분리기(FACSAria™ Fusion/BD)를 가지고 CD4⁺CD62L⁺CD25⁻ cell(활성화되지 않은 야생형 T 세포)를 분리하였다. 그리고 96well 플레이트에 cDC2B:T 세포=1:5=6x10⁴:3x10⁵ 씩 배양해주었다.

Adoptive transfer

수여자로 사용하는 생쥐(BDF1)에 GVHD 를 유도하고 3E1 을 주고, 3 일 째에 비장에서 cell 을 분리하여 MACS 를 통하여 CD11c+ cell 을 분리한 다음 초고속 유세포 자동 분석/분리기(FACSAria™ Fusion/BD)를 가지고 CD11c⁺MHCII⁺CD11b⁺cell (cDC2)를 분리하고, 이식편대숙주병 유도할 때, 5x10⁵ 개씩 혈관 내 주사를 해주었다.

Statistics

본 연구의 data 는 GraphPad Prism 8(GraphPad Software)를 이용하여 분석 및 시각화 되었다. 모든 값은 평균 ± 표준오차로 나타내었다. 통계적 유의성은 one-way analysis of variance(ANOVA)검정을 사용하였다. 서로 다른 그룹 간의 통계적 유의성은 two-tailed t-test, one-way 또는 two-way ANOVA 를 이용하고 post-hoc Tukey 분석을 통해 검증하였다. 통계학적 유의 수준은 P-value 가 0.05 미만인 경우로 설정하였다.

결과

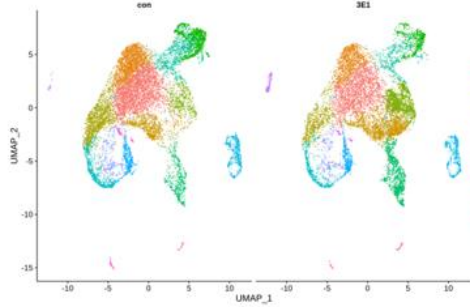
1. Identification of DCs subsets involved in immunoregulation by receiving CD137 signal through scRNA seq.

CD137 신호를 받아 Treg 세포를 증가시켜 면역 조절에 관여하는 DC 의 하위집합을 확인하기 위해 만성 이식편대숙주병 모델 생쥐에게 3E1 을 처리한 그룹과 대조군 그룹을 가지고 scRNA seq 을 진행하였다.

DBA/2 생쥐의 림프절과 비장에서 면역세포를 분리하여 BDF1 생쥐에게 i.v.(intravenous injection; 혈관내 주사)를 통해 주입해 주어 이식편대숙주병을 유도해주었다. 생쥐는 대조군 생쥐와 CD137 항체를 처리한 두 그룹으로 구성되었다. 질병 유도 5 일 후 비장에서 CD11c+MHCII+CD11b+ DC(cDC2 DC)를 분리하여 scRNA seq(single cell RNA sequencing; 단일 세포 RNA 시퀀싱)을 수행하였다. scRNA seq 데이터를 UMAP 에 의한 클러스터 결과를 나타내었다 (Fig 1A). 그리고 유전자의 발현을 확인하여 각각의 클러스터들이 추정되는 세포를 확인하였다. 총 16 개의 클러스터들 중 6 개를 제외한 10 개의 클러스터가 DC 의 하위집합으로 확인되었고(Fig 1A), 그 중 클러스터 5 를 mregDC2, 클러스터 7 을 mregDC2 전구체로 확인하였다 (Fig 1B). 의사시간 궤적분석을 통해 mregDC2 로의 분화 과정은 클러스터 13 인 DC 전구체에서 시작되어 10,8,3 을 거쳐 클러스터 0 로 가게 되고, 그 이후 mregDC2 의 전구체인 클러스터 7 을 지나 클러스터 5 인 mregDC2 로 분화된다는 것을 확인하였다 (Fig 1C). 클러스터 5 에서 유전자 발현들을 확인하여 mregDC2 에서 많이 나타나는 수용체-리간드 상호작용 (Fig 1D), 전사 인자 (Fig 1E), 효과기 분자 (Fig 1F) 들을 확인 하였고, 이를 바탕으로 CD137 신호가 면역억제 유전자와 Treg 을 유도하는 유전자를 어떤 과정을 거쳐 발현시키는 지를 추정해 보았다 (Fig 1G).

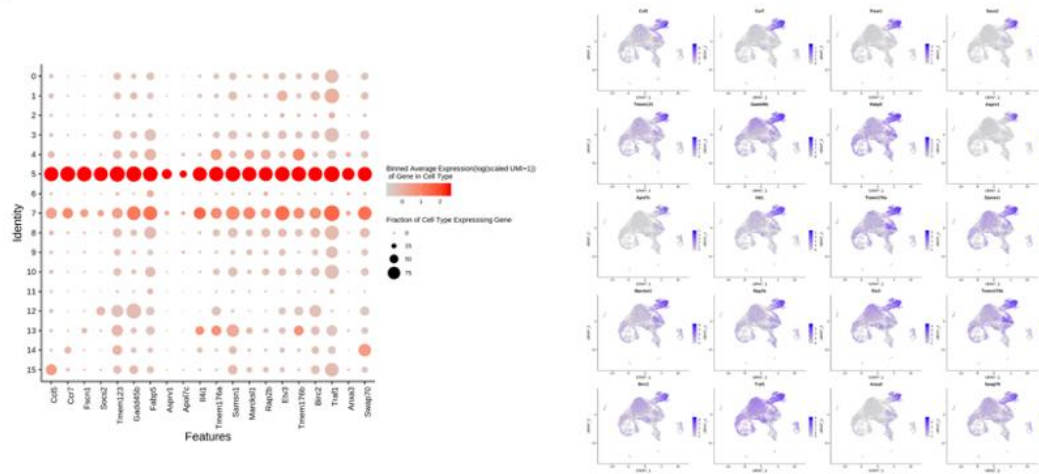
이러한 결과는 만성 이식편대숙주병을 유도한 모델의 비장에서 cDC2 를 scRNA seq 을 통해 각 클러스터들의 유전자 발현을 확인해보았을 때, 면역 조절에 관여할 것으로 추정되는 DC 의 하위집합을 확인할 수 있었다.

A

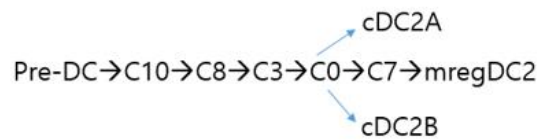
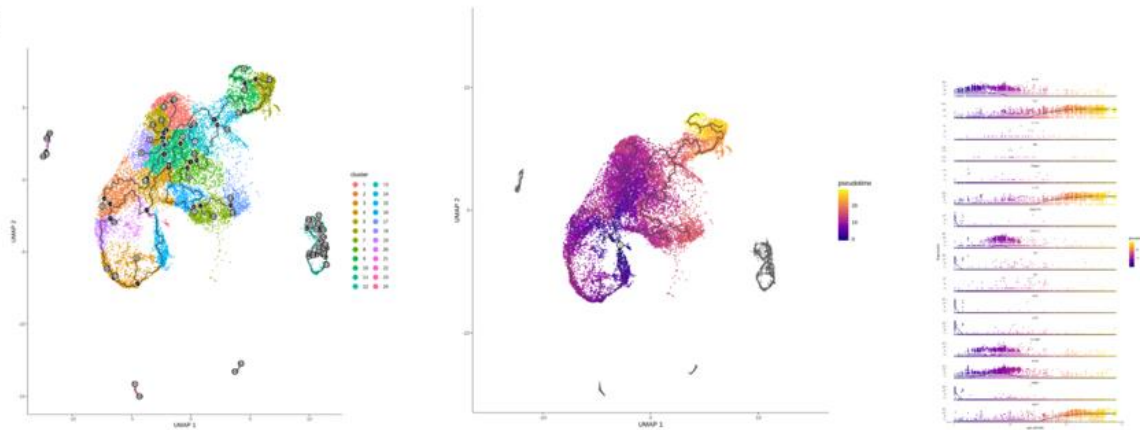


- Cluster 0: DC2
- Cluster 1: cDC2A
- Cluster 2: cDC2B
- Cluster 3: DC2
- Cluster 4: monocyte
- Cluster 5: mregDC**
- Cluster 6: red pulp macrophage**
- Cluster 7: inflammatory DC and a precursor of mregDC**
- Cluster 8: proliferative cDC2
- Cluster 9: cDC1
- Cluster 10: proliferative cDC2
- Cluster 11: cDC2
- Cluster 12: B cell
- Cluster 13: pre-DC (main territory) or pDC (islet)
- Cluster 14: marginal zone B cell
- Cluster 15: T cell

B



C



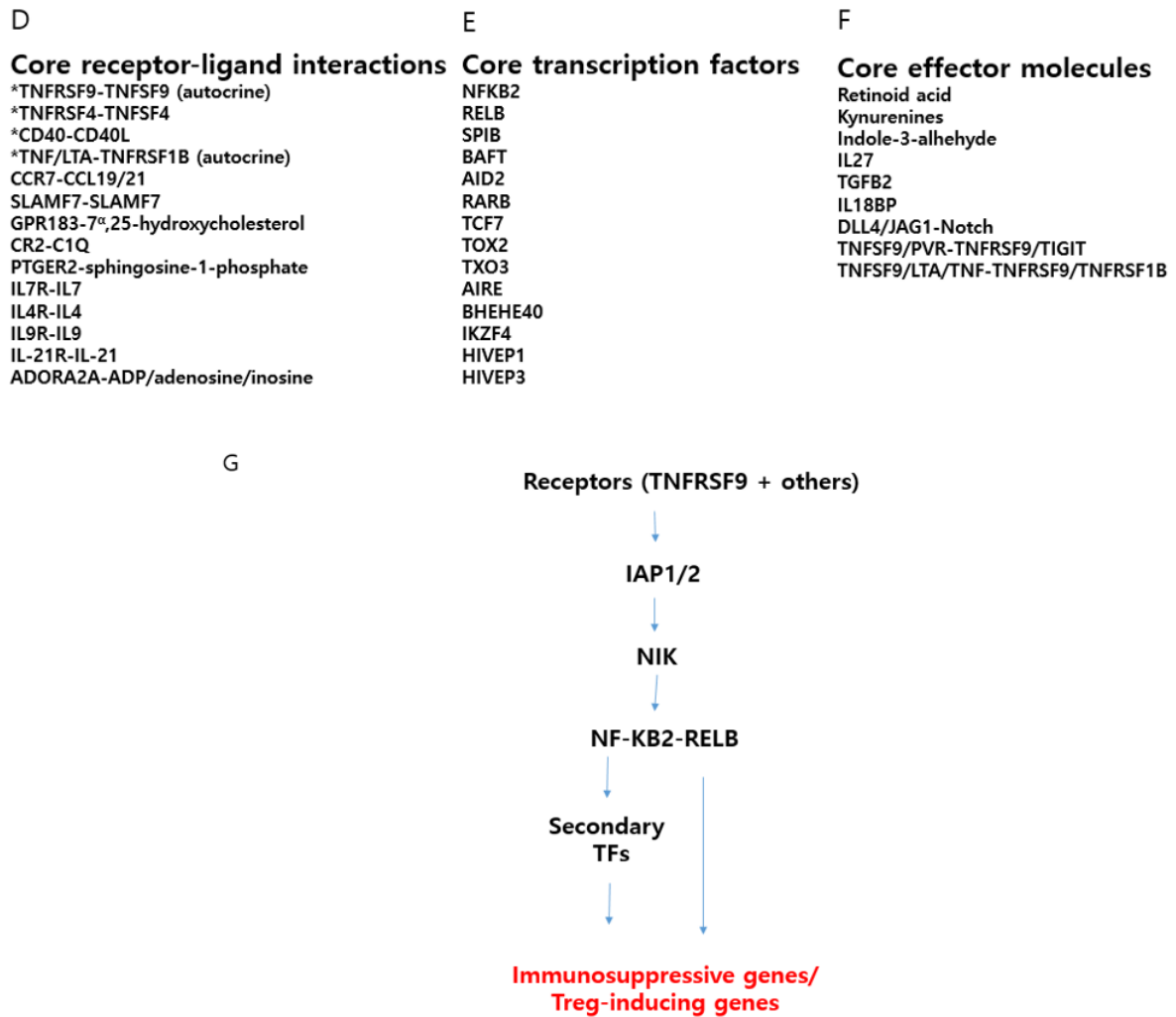


Fig 1. Identification of DCs subsets involved in immunoregulation by receiving CD137 signal through scRNA seq.

비장 DC2 의 UMAP 에 의한 cell clustering 분석결과. (A) cGVHD 유도 5 일 후에 CD11b+CD11c+ MHCII+ DC 를 sorting 한 후 scRNA seq 을 실시하여 UMAP 으로 나타내고, 각 클러스터들의 유전자 발현을 보고 세포를 추정. (B) 각 클러스터들의 유전자 발현을 보여준 그래프. (C) pseudotime trajectory 분석을 통해 mregDC2 의 분화 과정 확인 (D) mregDC(cluster5)에서 많이 발현하는 receptor-ligand 상호작용, (E) 전사 인자, (F) 효과기 분자. (G) CD137 신호가 면역 억제와 Treg 유도에 영향을 미치는 과정을 보여주는 그림.

2. Treatment of 3E1 in cGVHD model induces immune tolerance.

CD137 항체의 효과에 대한 또 다른 이슈는 CD137 항체가 면역관용을 유발하는 여부이며 이 점에 대한 연구도 아직 진행된 바가 없다. 이러한 면역관용에 관여할 것이라 추정되는 세포는 DC의 하위집합 중 하나로 다른 논문에서 mregDC로 명명되며 면역 조절에 관여한다. mregDC는 PD-L1^{hi}CD40⁺IL-12⁺ DC로 특징지어진다. 이 DC는 RNA seq 상으로 CCR7이 높게 발현된다.

질병 유도 3일 후 비장에서 CD137 항체는 투여 받은 생쥐의 mregDC2는 야생형 생쥐에 비해 유의미하게 증가하지만 mregDC1은 두 그룹 간에 차이가 없다 (Fig 2A, Fig 2B). 동시에 Treg 세포의 수도 증가한다 (Fig 2C). 이러한 Treg의 증가는 자가항체의 감소 효과와 이어졌다 (Fig 2D). 그러므로 mregDC→Treg 세포 축이 CD137 항체에 의한 면역관용 유발에 핵심적인 역할을 할 가능성이 높다. 3E1(CD137 항체)을 투여한 4주 후에 생쥐의 공여 T 세포의 존재를 조사하였을 때 다소 편차는 심하지만 3E1을 투여한 생쥐에서도 공여 T 세포 수는 대조군에 비해 감소되어 나타났다.(Fig 2E, Fig 2F).

이러한 결과는 숙주에서 증가된 공여 T 세포는 자가면역을 일으키지 않고 동종항원반응도 일으키지 않는 것을 의미하며 3E1 항체는 면역관용을 유발함을 의미한다.

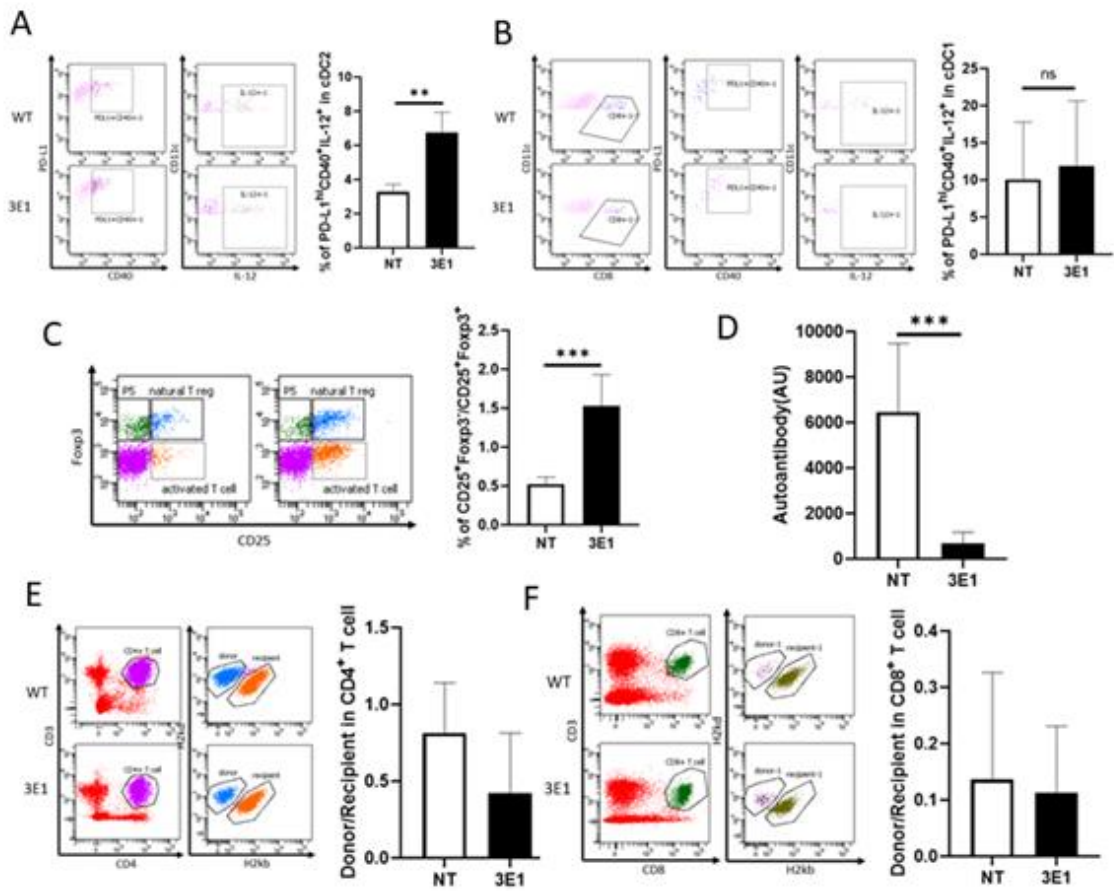


Fig 3. Treatment of 3E1 in cGVHD model induces immune tolerance.

CD137 항체는 비장 mregDC2 를 증가시키며 자가항체 생산을 감소시킴. (A-C) 질병 유도 3 일 후에 확인. (A) mregDC2 빈도수. (B) mregDC1 빈도수. (C) 활성화된 CD4+ T cell/Treg 비율. (D-F) 질병 유도 후 4 주후 확인. (D) 혈청 항-dsDNA 농도. (E) 공여/수혜 CD4+ T 세포 비율. (F) 공여/수혜 CD8+ T 세포 비율.

3. CD137 antibody treatment increases mregDC2 in cGVHD.

CD137 항체(3H3)가 만성 이식편대숙주병을 억제하는 것은 CD4⁺ T 세포를 AICD에 의해 제거되기 때문이라는 것이 이전의 논문에서 밝혀졌다. 만성 이식편대숙주병 모델에서 Tfh 세포(follicular T helper cell: T 여포 도움 세포)는 공여 CD4⁺ T 세포에서 유래되기 때문에 CD4⁺ T 세포가 제거되면 자가항체 생산이 저하된다.

이 실험에서는 전의 논문에서 사용한 CD137 항체인 3H3가 아니라 3E1(CD137 항체)를 사용하여 실험을 진행하였다. 3E1은 3H3에 비해 CD137 자극 강도가 약하며 CD137L 신호를 차단하는 효과가 있는 항체이다. DBA/2를 가지고 BDF1 모델에 유도하는 만성 이식편대숙주병 모델에 3E1을 주고 3일째에 비장에서 확인하였다. 3E1을 주었을 때, 공여 T 세포를 제거하는 능력과 자가항체 생산을 억제하는 능력은 3H3를 주었을 때와 유사하다 (Fig 3). 3E1을 주었을 때, 염증성 DC2B(CD371⁺ PD-L2⁺ DC2B)를 증가시킨다 (Fig 3A). DC2B를 활성화되지 않은 CD4⁺ T 세포와 공동 배양하여 DC2B가 T 세포에 미치는 영향을 확인하였다. 활성화된 염증성 DC2B는 공여 CD4⁺ T 세포를 활성화시키지만 Treg 세포 분화를 유도하지는 못한다 (Fig 3B).

이러한 결과는 3E1(CD137 항체)을 주면 활성화된 염증성 DC2B를 증가시키고, 이러한 DC2B는 CD4⁺ T 세포를 활성화시키지만 Treg 세포 분화를 유도하지는 못한다. 이러한 DC2B의 능력으로 보아 CD137 항체에 프라이밍된 DC2B는 공여 T 세포를 AICD에 의해 제거할 가능성이 높다.

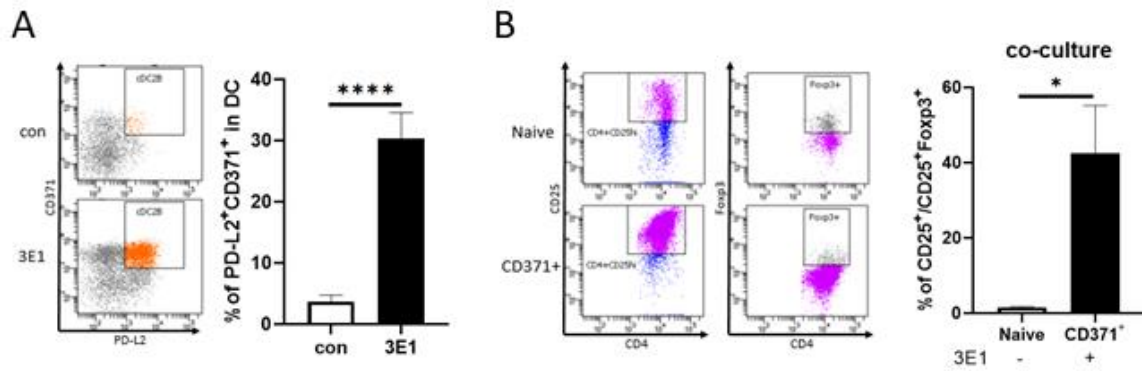


Fig 3. CD137 antibody treatment increases mregDC2 in cGVHD.

cGVHD 유도 3 일 후에 비장에서 확인. (A) DC2B(PD-L2⁺CD371⁺ DC) 빈도 수. (B) CD137 항체로 프라이밍된 숙주 (BDF1)의 DC2B 를 분리하여 DBA/2 CD4⁺ T 세포와 공동배양. 배양 3 일과 4 일 후에 활성화된 T/Treg ratio 를 분석함.

4. Immune tolerance was induced when 3E1-priming DC2 was adaptive transfer to the cGVHD model.

만성 이식편대숙주병을 유도하고 3E1 을 투여한 생쥐의 비장에서 FACS Aria 를 사용하여 DC2 를 분리하였다. 그리고 이 3E1 이 프라이밍된 DC2 를 만성 이식편대숙주병을 유도한 생쥐에서 입양 전달해주었다. 이 입양 전달 모델에서 3E1 이 프라이밍된 DC2 가 자가항체 반응을 억제할 능력을 가지는지 확인하였다.

만성 이식편대숙주병을 유도하였을 때, DC2 를 입양전달한 생쥐에서 자가항체 생산이 감소한다 (Fig 4A). 입양 전달한 생쥐의 비장에서 생성되는 Tfh 는 대부분 FoxP3 를 발현하는 Treg 세포였다 (Fig 4B). 그리고 자가항체 생산이 감소된 결과와 일치하게 입양 전달한 생쥐에서 GC B 세포와 플라즈마 B 세포가 감소되었다 (Fig 4C). 그리고 이전에 그림에서 3E1 을 주었을 때 Treg 세포가 증가된 것 일치한 결과로 입양 전달한 생쥐에서 또한 Treg 의 수가 증가되었다 (Fig 4D).

이러한 결과는 이전에 CD137 신호를 준 데이터와 유사한 양상을 나타낸다. 그래서 DC2 가 CD137 신호를 받아 면역관용에 관여한다는 사실을 확인할 수 있다. 그리고 향후 DC2 중에 mregDC2 가 이 현상을 매개하는 여부는 검증이 필요하지만 이 연구 결과는 3E1 을 tolDC2(tolerogenic DC2 : 관용성 제 2 형 수지상세포)를 매개로 면역관용을 유발하는 것으로 판단된다.

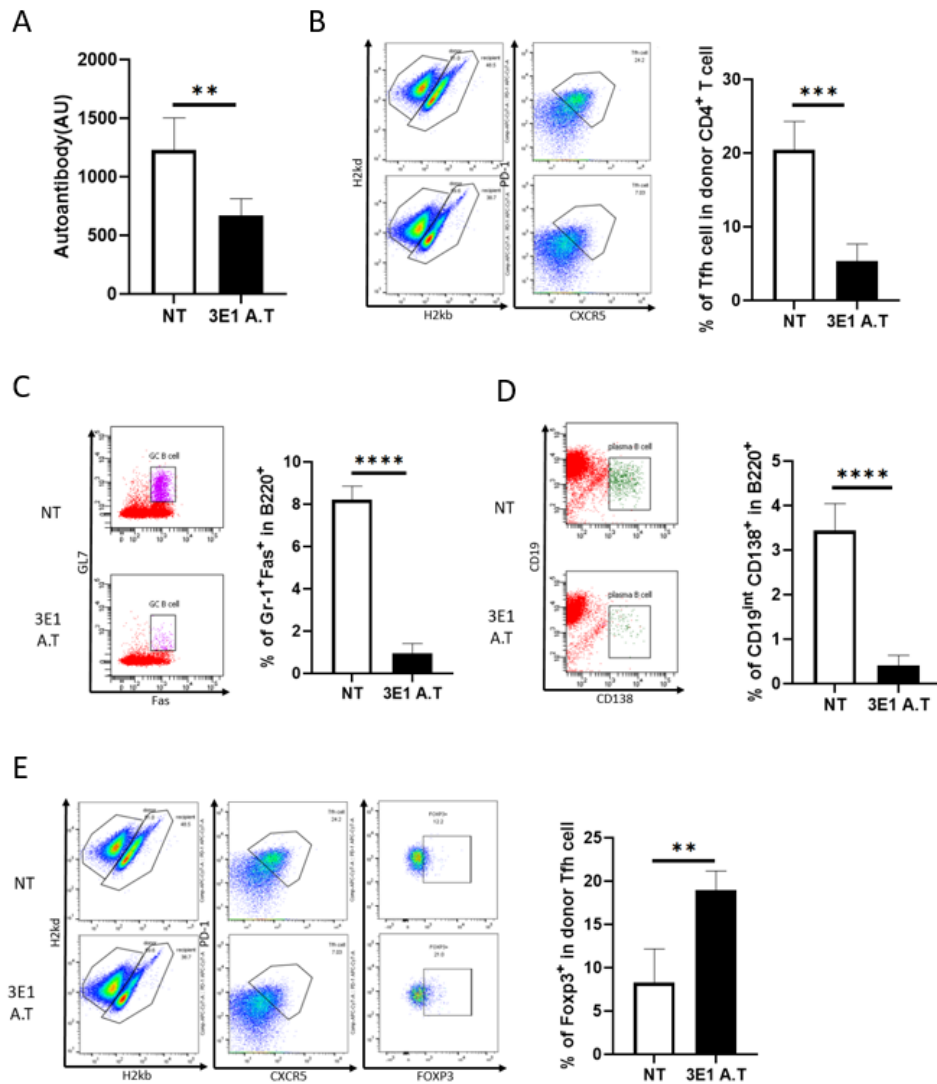


Fig 4. Immune tolerance was induced when 3E1-priming DC2 was adaptive transfer to the cGVHD model.

CD137 항체로 priming 된 DC2 는 자가항체 반응을 억제함. 질병 유도 3 일 후 CD137 항체를 투여한 cGVHD 생쥐의 비자에서 DC2 를 분리하여 cGVHD 유도 시 입양 전달함. 2 주 후 sampling. (A) 혈청 항-dsDNA IgG1 항체 수준. (B) Tfh 빈도수. (C) GC B 빈도수. (D) 플라즈마 B 세포 빈도수. (E) regulatory Tfh 빈도수.

5. The inflammatory response was increased in GVHD-induced (BalxB6)F1 CD137 KO mice.

이식편대숙주병 모델에 CD137 신호가 미치는 영향을 확인하기 위해 CD137 KO 생쥐를 사용하여 DC의 하위집합을 확인하였다. 유세포 분석을 통하여 DC 하위집합의 표지인자를 확인하였다. cDC의 마커인 CD11c⁺MHCII⁺로 게이트 해서 cDC1은 CD24⁺sirpa⁻, cDC2는 CD24^{int}sirpa⁺로 게이트 하고 염증성 DC2B는 CD371⁺, mregDC는 ESAM⁻CCR7⁺로 확인하였다.

이식편대숙주병 생쥐 모델로 수혜자는 C57BL/6와 Balb/c의 첫 세대인 (BalxB6)F1을 사용하였고, 공여자로 Balb/c를 사용하였다. CD137KO 생쥐의 비장에서 DC2B:mregDC2 비율은 야생형 생쥐가 1.76배 높다 (Fig 5B). 하지만 CD371+cDC1:mregDC1의 비율은 CD137KO와 야생형 생쥐에서 차이가 없다 (Fig 5A).

이러한 결과는 CD137이 주로 mregDC2에 발현되는 것과 관련이 있다. 즉, mregDC2 분화가 손상되면 염증성 DC2B가 조절 장애가 생겨 CD137KO 생쥐에서 염증반응이 증가함을 암시할 수 있다. 이러한 해석은 BM12→B6 급성 이식편대숙주병 모델에서 CD137 KO 생쥐에서 전신 염증이 증가한 것과 일치한다.

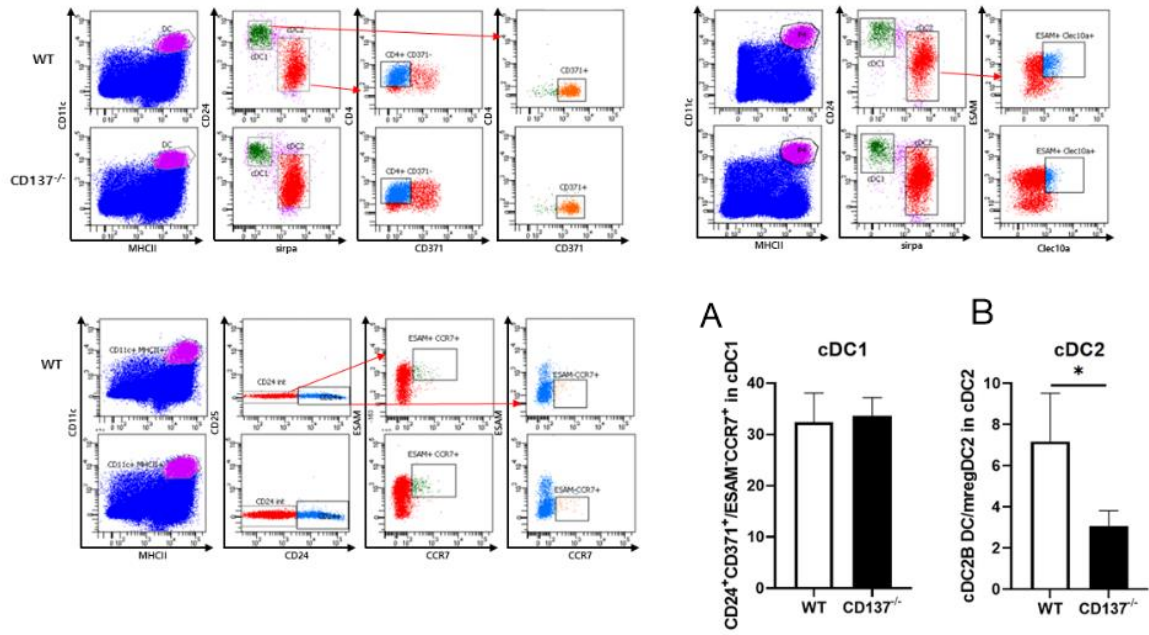


Fig 5. The inflammatory response was increased in GVHD-induced (BalxB6)F1 CD137 KO mice.

naive (Balb/c x B6)F1 WT 및 CD137 KO 생쥐의 비장에서 DC1, DC2 와 mregDC 를 분석 결과. (A) CD371⁺ DC1/mregDC1 과 (B) DC2B/mregDC2 ratio 가 제시됨

6. aGVHD is induced in WT (BalxB6)F1 mice and CD137KO B6 mice.

BM12 →CD137KO B6 만성 이식편대숙주병과 Balb/c (B/c) →(B/c x B6)F1 CD137KO 이식편대숙주병 모델을 사용하여 숙주의 DC 역할에 대해 연구를 수행하였다. 이전 결과에 따르면 BM12→CD137KO B6 이식편대숙주병 모델에서 숙주는 급성 이식편대숙주병인 전신 염증반응을 보이며 숙주 DC의 유전자 발현 조절장애에 기인한다. B/c→(B/c x B6)F1 CD137 KO 이식편대숙주병 모델은 아직 보고된 바가 없는 모델이다.

질병 유도 2 주 후에 야생형 생쥐는 대장염을 발병하지 않지만 심한 간염을 보여준다 (Fig 6A, Fig 6B). 반면, CD137KO 생쥐는 자가 항체를 생산하는 전형적인 급성 이식편대숙주병 양상을 보여준다 (Fig 6C). CD137KO 생쥐는 공여 T 세포가 비장에 거의 존재하지 않는다 (Fig 6E). 질병 유도 후 5 일에 CD137KO 생쥐의 비장에서 공여 T 세포가 야생형 생쥐에 비해 높은 비율로 존재하는 것을 고려하면 공여 T 세포는 CD137KO 생쥐의 비장에서 AICD(Activation-Induced Cell Death; 활성화에 유도된 세포사멸)에 의해 제거되는 것으로 추정된다 (Fig 6E). 이 모델에서 CD137 항체는 질병 유도 5 일에 이미 대부분의 공여 T 세포를 제거하였고, 비장에서 야생형 생쥐의 CD4⁺ T 세포는 높은 빈도로 활성화되어 있으며 대부분 공여 T 세포에서 유래된다 (Fig 6E). 활성화된 CD4⁺ T 세포 : Treg 세포 비율이 CD137KO 생쥐에 비해 야생형 생쥐에서 월등히 높다 (Fig 6D). 이 결과는 야생형 생쥐에서 급성 이식편대숙주병이 발생했음을 보여준다. 질병 유도 2 주 후에 비장의 DC를 분석하였을 때, 야생형 생쥐의 CD371⁺는 PD-L2를 높은 수준으로 발현하는 활성화된 DC이지만 CD137KO 생쥐의 CD371⁺ DC는 PD-L2가 발현되지 않는 활성화되지 않은 DC이다 (Fig 6G).

이러한 결과는 CD137KO 생쥐의 항원 제시 세포는 과도하게 공여 T 세포를 활성화시켜 AIDC 를 유도하고, 이 과정에서 공여 T 세포는 B 세포의 면역관용을 깨버린다는 것을 가설로 세울 수 있다. 이 가설을 DC 를 확인하여 야생형 생쥐의 활성화된 염증성 DC 가 공여 T 세포를 활성화시켜 급성 이식편대숙주병을 유도한다는 가설과 일치하는 것을 확인할 수 있다. 만약 이 가설이 사실이면 동종 항원 자극 강도는 CD137 항체 > MHC 하플로타입 불일치 > 작은 MHCII 불일치 순으로 판단된다. CD137 항체는 급성 이식편대숙주병과 만성 이식편대숙주병을 억제하고, 하플로타입이 불일치하는 면역 제시 세포는 급성 이식편대숙주병을 억제하지만 B 세포 면역 관용을 깨트리고, 마지막 경우에는 급성 이식편대숙주병이 발병한다.

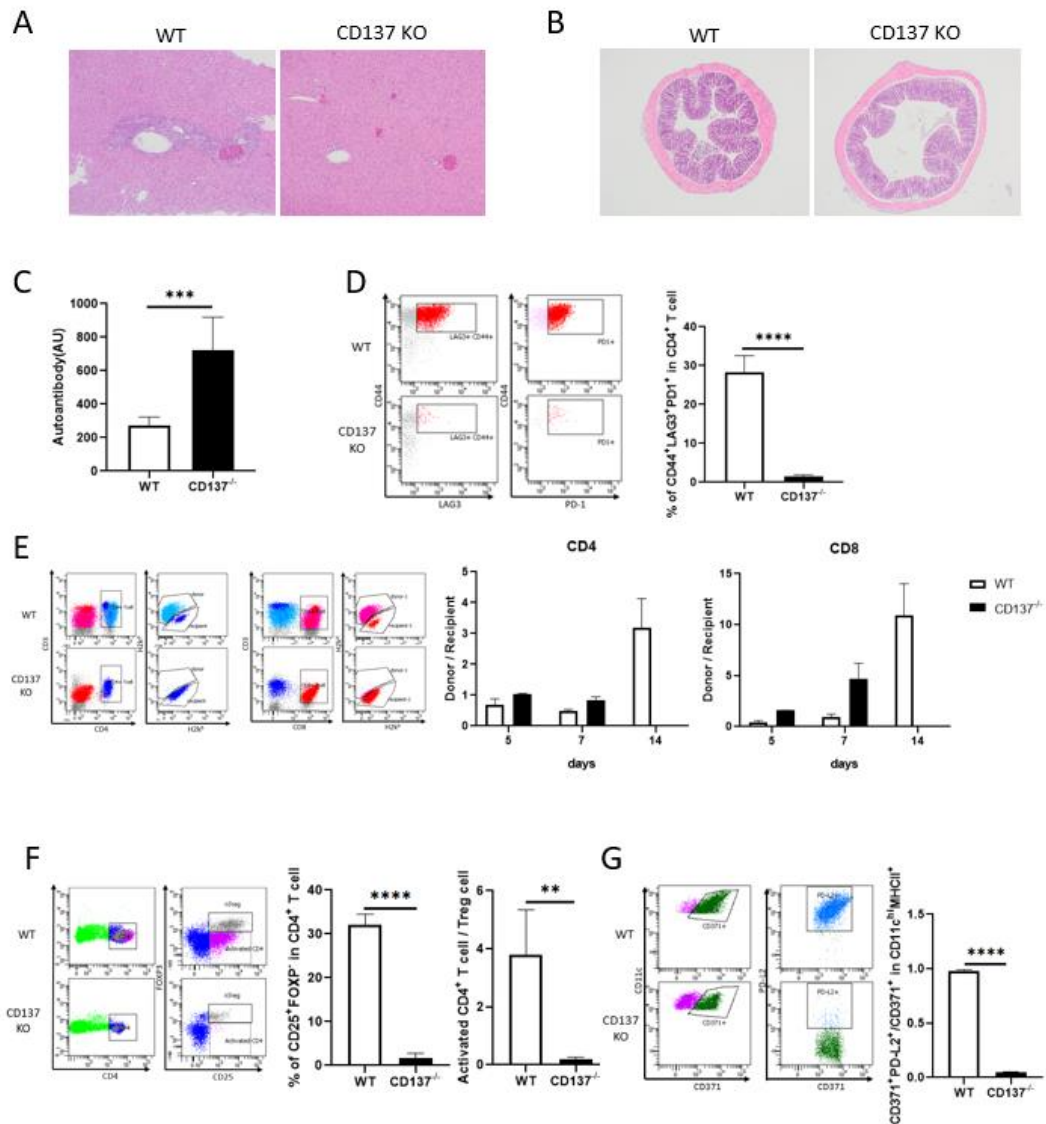


Fig 6. aGVHD is induced in WT (BalxB6)F1 mice and CD137KO B6 mice.

B/c->(B/c x B6)F1 WT 과 CD137 KO 생쥐에 GVHD 유도. 질병 유도 2 주 후 확인. (A, B) 간과 대장의 조직학 사진. (C) 혈중 anti-dsDNA IgG 농도. 의 BM12 splenocytes 를 B6 생쥐에 주입한 14 일 후 혈장에서 항-DNA IgG 양을 측정함. (D) 활성화된 T 세포 빈도수 (E) 5 일, 7 일, 2 주 donor T cell/recipient T cell ratio.. (F) activated T cell/Treg cell ratio. (G) activated DC2B/total DC2B ratio.

고찰

CD137신호는 T 세포에 대해 공동자극분자로 기능하고, 이러한 공동자극분자는 T 세포 반응을 결정하는데 중요한 역할을 한다 (8). T 세포로의 CD137 신호 전달은 제 1형 도움 T 세포 및 세포 독성 T 세포를 통해 강력한 세포 면역 반응을 유도한다 (9). 그리고 CD137과 OX40, TNFR2 및 GITR은 비유도 야생형 T 세포가 FoxP3+ T 조절 세포(Treg)으로 분화하는 것을 차단하는 것으로 나타났지만 이러한 수용체의 자극이 오히려 Treg의 증가를 유도하였다 (35) 그래서 면역이 과 활성화되어 자가 항체 증가, 수많은 장기 시스템의 기능장애와 심각한 면역 결핍상태를 나타내는 이식편대숙주병 (4-6)에 CD137 항체를 처리 하였을 때, 면역을 억제하여 자가면역질환과 염증성 질환을 효과적으로 치료한다는 것이 확인 되었다.

이 연구에서는 자가면역질환 모델이 CD137 항체를 처리하였을 때 일어나는 면역 억제에 핵심이 되는 DC를 단백질 수준과 유전자 수준으로 확인하였다.

먼저 이식편대숙주병을 유도한 생쥐에서 5일 째에 비장에서 cDC2를 분리하여 scRNAseq을 통해 유전자 수준들을 기준으로 클러스터들을 분류하였다. 이 중 면역조절에 관여할 DC들의 하위집합을 확인할 수 있었고, 그 중 의사시간 궤적 분석을 통해 mregDC2로의 분화 과정을 확인하였다. 그리고 클러스터들의 유전자 발현을 비교하여 mregDC2에게 영향을 미치는 수용체와 리간드의 상호작용, 전사인자 그리고 효과기 분자를 확인하여 CD137신호가 면역억제 유전자와 Treg분화 유전자를 발현시키는 기작을 예상할 수 있었다. 자가면역질환 모델로 사용된 이식편대숙주병 모델에 CD137 항체를 주었을 때, mregDC2의 수준이 DC1과 달리 유의미하게 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 면역 조절의 핵심 세포인 Treg의 수준도 증가되고, 자가항체의 수준은 감소되는 결과가

도출되었다. 이는 CD137 항체는 면역관용을 유발했음을 확인하였다. 그리고 CD137 신호는 먼저 염증 수준을 높이고 그 이후 면역 관용에 영향을 미치기 때문에 CD137 항체를 주었을 때, 염증성 cDC2 또한 증가 되어 나타났는데 이 세포를 분리하여 비유도 야생형 T 세포와 공동배양 하였을 때, T 세포를 Treg 세포로의 분화를 유도하는 것을 확인하였다. 이러한 결과가 CD137을 받은 cDC2의 효과인지 확인하기 위해 입양전달실험을 수행하였다. 그 결과 CD137 항체를 주었을 때와 같은 결과를 나타내는 것을 확인 하였고, 이는 CD137이 cDC2를 매개로 면역 관용을 유발한다는 것으로 판단되었다.

또한, 다른 생쥐 모델((B6xBal)F1)에서 CD137 결핍생쥐를 가지고 mregDC2와 염증성 cDC2B를 확인하였을 때, CD137 결핍된 생쥐에서 더 낮은 수준을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 mregDC2 분화가 손상되면 염증성 cDC2B가 조절 장애가 생겨 CD137이 결핍된 생쥐에서 염증반응이 증가함을 예상할 수 있다. 그리고 이 모델에서 자가면역질환의 중증도를 확인 하였을 때, CD137이 결핍된 생쥐에서 항원 제시 세포가 과도하게 공여 T 세포를 활성화 시켜 AICD를 유도하고 이 과정에서 공여 T 세포가 B 세포의 면역관용을 깨버린다는 것으로 판단되었다.

이러한 결과를 종합하여 봤을 때, DC가 cDC2B나 mregDC로 분화되는데 CD137이 필수적이고, 이러한 DC는 비유도 야생형 T 세포가 면역 조절에 관여하는 Treg으로 분화되는데 영향을 미친다. 그리고 CD137신호를 주었을 때, 자가면역질환 모델인 이식편대숙주병 모델에서 질병이 징후에 긍정적인 영향을 미쳤고, 이는 CD137 항체가 면역관용을 유발함으로써 일어났다. 그리고 이 CD137 신호를 받아 면역관용을 유발하는 세포는 cDC2인 것을 확인할 수 있었다. 따라서 본 연구는 자가면역질환에서 CD137신호를 받아 면역 관용을 유발하는 DC를 유세포 분석으로 확인하고, 그 세포의 유전자 발현까지 확인을 하였다. 그래서 자가면역질환의 치료에서 이 mregDC가 중요한 키워드가 될 수 있음을 확인하였다.

참고문헌

1. Armitage JO. Bone marrow transplantation. *N Engl J Med.* 1994;330:827-838.
2. Ferrara JL, Deeg HJ. Graft-versus-host-disease. *N Engl J Med.* 1991;324:667-674
3. Via, C. S., S. O. Sharrow, and G. M. Shearer. Role of cytotoxic T lymphocytes in the prevention of lupus-like disease occurring in a murine model of graft-vs-host disease. *J. Immunol.* 1987;139:1840-1849
4. Shulman HM, Sullivan KM, Weiden PL, et al. Chronic graft-versus-host syndrome in man. A long-term clinicopathologic study of 20 Seattle patients. *AM J Med* 1980;69:204-217
5. Sullivan KM, Agura E, Anasetti C, et al. Chronic graft-versus-host disease and other late complications of bone marrow transplantation. *Semin Hematol.* 1991;28:250-259
6. Lee SJ, Vogelsang G, Glowers ME. Chronic graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant.* 2003;9:215-233
7. Croft M. The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases. *Nat Rev Immunol* 2009;9:271-285
8. D.L. Mueller, M.K. Jenkins, R.H. Schwartz Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy *Annu. Rev. Immunol.*, 7 (1989), pp. 445-480
9. K.C. Wang, K.L. Chu, N.V. Batista, T.H. Watts Conserved and differential features of TNF superfamily ligand expression on APC subsets over the course of a chronic viral infection in mice. *Immunohorizons*, 2 (2018), pp. 407-417
10. S. Wang, L. Chen Immunobiology of cancer therapies targeting CD137 and B7-H1/PD-1 cosignal pathways *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 344 (2011), pp. 245-267
11. D.S. Vinay, B.S. Kwon 4-1BB (CD137), an inducible costimulatory receptor, as a specific target for cancer therapy. *BMB Rep.*, 47 (2014), pp. 122-129

12. C. Guillerey, K. Nakamura, A.C. Pichler, D. Barkauskas, S. Krumeich, K. Stannard, et al.
Chemotherapy followed by anti-CD137 mAb immunotherapy improves disease control in a mouse myeloma model *JCI Insight*, 5 (2019)
13. B. Dharmadhikari, M. Wu, N.S. Abdullah, S. Rajendran, N.D. Ishak, E. Nickles, et al.
CD137 and CD137L signals are main drivers of type 1, cell-mediated immune responses *OncoImmunology*, 5 (2016), p. e1113367
14. J. Langstein, J. Michel, J. Fritsche, M. Kreutz, R. Andreesen, H. Schwarz CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, induces monocyte activation via bidirectional signaling *J. Immunol.*, 160 (5) (1998), pp. 2488-2494
15. C. Takahashi, R.S. Mittler, A.T. Vella Cutting edge: 4-1BB is a bona fide CD8 T cell survival signal *J. Immunol.*, 162 (1999), pp. 5037-5040
16. Z. Shao, H. Schwarz CD137 ligand, a member of the tumor necrosis factor family, regulates immune responses via reverse signal transduction *J. Leukoc. Biol.*, 89 (1) (2011), pp. 21-29
17. C.C. Goodnow, J. Sprent, B. Fazekas de St Groth, C.G. Vinuesa Cellular and genetic mechanisms of self tolerance and autoimmunity *Nature*, 435 (7042) (2005), pp. 590-597
18. L. Wang, F.S. Wang, M.E. Gershwin Human autoimmune diseases: a comprehensive update *J. Intern. Med.*, 278 (4) (2015), pp. 369-395
19. P. Pierre, S.J. Turley, E. Gatti, M. Hull, J. Meltzer, A. Mirza, K. Inaba, R.M. Steinman, I. Mellman Developmental regulation of MHC class II transport in mouse dendritic cells *Nature*, 388 (1997), pp. 787-792
20. R.M. Steinman, M.C. Nussenzweig Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 99 (2002), pp. 351-358
21. Y. Xing, K.A. Hogquist T-cell tolerance: central and peripheral *Cold Spring Harb Perspect. Biol.*, 4 (2012), p. a006957
22. C. Ohnmacht, A. Pullner, S.B. King, I. Drexler, S. Meier, T. Brocker, D. Voehringer
Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity *J. Exp. Med.*, 206 (2009), pp. 549-559

23. K. Kretschmer, I. Apostolou, D. Hawiger, K. Khazaie, M.C. Nussenzweig, H. von Boehmer
Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen *Nat. Immunol.*, 6
(2005), pp. 1219-1227
24. S. Yamazaki, D. Dudziak, G.F. Heidkamp, C. Fiorese, A.J. Bonito, K. Inaba, M.C.
Nussenzweig, R.M. Steinman Inducing and expanding regulatory T cell populations by
foreign antigen *J. Immunol.*, 181 (2008), pp. 6923-6933
25. N. Yogeve, F. Frommer, D. Lukas, K. Kautz-Neu, K. Karram, D. Ielo, E. von Stebut, H.C.
Probst, M. van den Broek, D. Riethmacher, et al. Inducing and expanding regulatory T cell
populations by foreign antigen *Immunity*, 37 (2012), pp. 264-275
26. A.E. Morelli, A.W. Thomson Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant
tolerance *Nat. Rev. Immunol.*, 7 (2007), pp. 610-621
27. B. Reizis Plasmacytoid Dendritic Cells: Development, Regulation, and Function *Immunity*,
50 (2019), pp. 37-50
28. Y. Lavin, S. Kobayashi, A. Leader, E.-A. D. Amir, N. Elefant, C. Bigenwald, R. Remark, R.
Sweeney, C. D. Becker, J. H. Levine, K. Meinhof, A. Chow, S. Kim-Shulze, A. Wolf, C.
Medaglia, H. Li, J. A. Rytlewski, R. O. Emerson, A. Solovyov, B. D. Greenbaum, C.
Sanders, M. Vignali, M. B. Beasley, R. Flores, S. Gnjatic, D. Pe'er, A. Rahman, I. Amit, M.
Merad, Innate immune landscape in early lung adenocarcinoma by paired single-cell
analyses. *Cell* 169, 750–765.e17 (2017).
29. R. Zilionis, C. Engblom, C. Pfirschke, V. Savova, D. Zemmour, H. D. Saatcioglu, I.
Krishnan, G. Maroni, C. V. Meyerovitz, C. M. Kerwin, S. Choi, W. G. Richards, A. De
Rienzo, D. G. Tenen, R. Bueno, E. Levantini, M. J. Pittet, A. M. Klein, Single-cell
transcriptomics of human and mouse lung cancers reveals conserved myeloid populations
across individuals and species. *Immunity* 50, 1317–1334.e10 (2019).
30. B. Maier, A. M. Leader, S. T. Chen, N. Tung, C. Chang, J. LeBerichel, A. Chudnovskiy, S.
Maskey, L. Walker, J. P. Finnigan, M. E. Kirkling, B. Reizis, S. Ghosh, N. R. D'Amore, N.
Bhardwaj, C. V. Rothlin, A. Wolf, R. Flores, T. Marron, A. H. Rahman, E. Kenigsberg, B. D.

- Brown, M. Merad, A conserved dendritic-cell regulatory program limits antitumour immunity. *Nature* 580, 257–262 (2020).
31. S. Nakamizo, C.-A. Dutertre, A. Khalilnezhad, X. M. Zhang, S. Lim, J. Lum, G. Koh, C. Foong, P. J. A. Yong, K. J. Tan, R. Sato, K. Tomari, L. Yvan-Charvet, H. He, E. Guttman-Yassky, B. Malleret, R. Shibuya, M. Iwata, B. Janela, T. Goto, T. S. Lucinda, M. B. Y. Tang, C. Theng, V. Julia, F. Hacini-Rachinel, K. Kabashima, F. Ginhoux, Single-cell analysis of human skin identifies CD14⁺ type 3 dendritic cells co-producing IL1B and IL23A in psoriasis. *J. Exp. Med.* 218, e20202345 (2021).
32. Q. Zhang, Y. He, N. Luo, S. J. Patel, Y. Han, R. Gao, M. Modak, S. Carotta, C. Haslinger, D. Kind, G. W. Peet, G. Zhong, S. Lu, W. Zhu, Y. Mao, M. Xiao, M. Bergmann, X. Hu, S. P. Kerker, A. B. Vogt, S. Pflanz, K. Liu, J. Peng, X. Ren, Z. Zhang, Landscape and dynamics of single immune cells in hepatocellular carcinoma. *Cell* 179, 829–845.e20 (2019).
33. S. Cheng, Z. Li, R. Gao, B. Xing, Y. Gao, Y. Yang, S. Qin, L. Zhang, H. Ouyang, P. Du, L. Jiang, B. Zhang, Y. Yang, X. Wang, X. Ren, J.-X. Bei, X. Hu, Z. Bu, J. Ji, Z. Zhang, A pan-cancer single-cell transcriptional atlas of tumor infiltrating myeloid cells. *Cell* 184, 792–809.e23 (2021).
34. G. M. Gerhard, R. Bill, M. Messemaker, A. M. Klein, M. J. Pittet, Tumor-infiltrating dendritic cell states are conserved across solid human cancers. *J. Exp. Med.* 218, e20200264 (2021).
35. Ward-Kavanagh, L.K.; Lin, W.W.; Sedy, J.R.; Ware, C.F. The TNF Receptor Superfamily in Co-stimulating and Co-inhibitory Responses. *Immunity* **2016**, *44*, 1005–1019.

영문 요약

Although CD137 signaling is an efficient T cell costimulatory molecule, CD137 deficient mice often present a phenotype in which immunity is hyperactive in disease induction models. In the case of the anti-CD137 agonist antibody effectively treats autoimmune and inflammatory diseases through immunosuppression. In this study, the author conducted a study to identify dendritic cells that regulate immunity through CD137 signaling. Initially, scRNAseq was performed by isolation of CD11b+DC(cDC2) from mice spleen in chronic GVHD model (DBA/2 → BDF1). In the analysis, DC2 was categorized into 11 clusters, of which cluster 5 was identified as mregDC2, a mature DC2 enriched in immunoregulatory molecules. It branched from cluster 0 to cDC2A, cDC2B and cluster 7, and mregDC2 is differentiated from cluster7. According to pseudotime trajectory analysis, mregDC2 is the most mature form of cDC2, presenting both immunoactive and immunosuppressive molecules. In the GVHD model, the number of mregDC2 and Treg cells decreased in the CD137 deficient mice, but the opposite pattern was confirmed in the mice injected with the anti-CD137 antibody. In addition in vitro study showed that cDC2 primed with anti-CD137 antibody has the ability to inhibit GVHD. In summary, the results show that CD137 signaling can suppress immunity through the mregDC2-Treg cell axis.