

# 자연 경과에 따른 만성 B형 간염의 간조직 내 FoxP3 양성 조절 T세포의 침윤 양상: 간 침생검 조직을 이용한 면역 조직 화학적 연구

배지윤 · 김형경 · 강하나 · 정하린  
송동은 · 성순희 · 구혜수 · 한운섭  
이정경<sup>1</sup> · 김태현<sup>2</sup> · 정규원<sup>3</sup> · 조민선

이화여자대학교 의학전문대학원 병리학교실  
<sup>1</sup>영상의학과학교실 및 <sup>2</sup>내과학교실  
<sup>3</sup>가톨릭의대부속 인천성모병원 내과학교실

접 수 : 2009년 8월 4일  
게재승인 : 2009년 10월 26일

책임저자 : 조민선  
우 158-710 서울시 양천구 목동 911-1  
이화여자대학교 의학전문대학원  
병리학교실  
전화: 02-2650-5822  
Fax: 02-2650-2879  
E-mail: mcho1124@ewha.ac.kr

## Frequency of Intrahepatic FoxP3+ Regulatory T cells during the Natural Course of Chronic Hepatitis B: An Immunohistochemical Study Using Needle-Biopsied Liver Tissue

Ji Yoon Bae · Hyung Kyung Kim · Hanna Kang · Ha Rin Cheong  
Dong Eun Song · Sun Hee Sung · Heasoo Koo · Woon Sup Han  
Jeong Kyong Lee<sup>1</sup> · Tae-Hun Kim<sup>2</sup> · Kyu Won Chung<sup>3</sup> · Min-Sun Cho

Departments of Pathology, <sup>1</sup>Radiology, and <sup>2</sup>Internal Medicine, Ewha Womans University School of Medicine, Seoul; <sup>3</sup>Department of Internal Medicine, St. Mary's Hospital, The Catholic University of Korea College of Medicine, Incheon, Korea

**Background :** Regulatory T cells (Tregs) may contribute to the immunological hyporesponsiveness against hepatitis B virus (HBV), and this can result in chronic infection. Tregs suppress the T cell responses directed against HBV and they protect hepatocytes by down-regulating the immune responses that cause liver damage, but the role of Tregs has not been well characterized. **Methods :** Fifty four patients were selected and classified into three groups (12 were in the immune-tolerance phase, 35 were in the immune-clearance phase and 7 were in the asymptomatic virus carrier phase). We examined the frequency of CD3+, CD4+ & CD8+ T cells and forkhead box P3 (FoxP3)+ Tregs in the needle-biopsied liver tissue by performing immunohistochemistry. **Results :** The FoxP3+ Tregs were mainly located at the portal tracts. In the immune-clearance phase, the frequency of FoxP3+ Tregs was significantly increased compared to that of the immune-tolerance group and the asymptomatic carrier group. Increased FoxP3+ T cells were observed in the patients with a higher histologic inflammatory index. No correlation was observed among the numbers of FoxP3+ Tregs, the serum alanine aminotransferase level, detection of HBeAg and the HBV-DNA viral load. **Conclusions :** FoxP3+ Tregs may play important roles in suppressing the immune response to HBV and the complete elimination of HBV.

**Key Words :** Hepatitis B, chronic; T-lymphocytes, regulatory; FoxP3

만성 B형 간염은 간경화와 간세포암종의 중요한 발병 요인이다. B형 간염 바이러스(hepatitis B virus, HBV)는 대부분의 환자에게 있어 급성 간염의 형태로 체액성 및 세포성 면역반응에 의해 완전히 제거되지만, 약 5-10%의 환자에게는 인체 내에 지속적으로 남아 만성 간염을 유발한다.<sup>1</sup> 이는 바이러스에 대한 면역반응이 충분히 일어나지 못해 일어나는 현상인데, 이러한 바이러스가 면역반응을 회피하는 기전으로는 여러 가지가 알려져 있다. 특히 음성 선택(negative selection)을 통한 클론 삭제(clonal deletion), 말초 관용 유도, 바이러스의 돌연변이, 항원 제시과정의 결함 그리고 사이토카인 분비의 부조화 등이 잘 알려져 있으며,<sup>2</sup> 최근에는 조절 T세포(regulatory T cells, Tregs)

에 의한 면역반응 억제가 주목을 받고 있다.

조절 T세포는 자가 항원 및 외부 항원에 대한 면역반응을 억제함으로써 자가 관용(self-tolerance)의 유지 및 여러 미생물에 대한 정상 면역반응을 억제하는 역할을 하는 T세포다. 이 조절 T세포는 미생물 감염에 대해 두 가지의 매우 다른 역할을 하는데, 첫째는 면역반응을 억제하여 미생물의 완전 제거를 방해함으로써 감염을 지속시키는 것이며, 둘째는 감염이 일어난 조직 내에서 면역반응, 즉 염증 반응을 억제하여 조직 손상을 최소화시키는 이로운 역할이다.<sup>3-7</sup> 단순 포진 바이러스,<sup>8</sup> 인간 면역결핍 바이러스,<sup>7</sup> C형 간염 바이러스<sup>9,10</sup> 등 여러 감염성 질환에서 조절 T세포의 이러한 양면적 역할이 증명되고 있다.

최근 조절 T세포의 연구에 다양한 종류의 세포 표면 및 세포 내 항원이 이용되고 있으며, 보다 특이적인 항원을 찾고자 하는 연구가 진행 중이다. CD25 (interleukin-2 수용체의 알파 쇠)는 조절 T세포 연구에 처음으로 이용된 대표적인 표지자로 조절 T세포에 의해 강하게 발현되는 특징을 가지고 있다.<sup>11</sup> 그러나 항원 자극을 받는 림프구는 모두 어느 정도 CD25를 발현하기 때문에<sup>12</sup> 면역조직화학염색 등의 방법을 이용해 조직 내 침윤한 림프구를 제자리(*in situ*)에서 연구할 때 그 발현 정도의 차이로 조절 T세포를 구분하는 데는 어려움이 있다. 그 외에도 cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4)<sup>13</sup>, glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor family related protein (GITR)<sup>14</sup> 등이 있다. 또한 최근에는 forkhead/winged helix family에 속하며 조절 T세포의 발달과 분화에 필수 역할을 하는 전사인자인 forkhead family transcription factor 3 (forkhead box P3, FoxP3)가 새로 밝혀져 조절 T세포의 분석에 활발히 이용되고 있다.<sup>15,16</sup>

한편 조절 T세포가 HBV의 만성화에 미치는 역할을 알아보기 위해 급만성 B형 간염에서 조절 T세포 양의 차이점을 파악하는 연구가 진행되고 있는데, 연구자 간에 서로 다른 결과를 얻고 있다. 즉 Franzese 등<sup>17</sup>은 완치된 급성 B형 간염 환자와 만성 B형 간염 환자 간의 말초 혈액 순환 CD4+CD25+ Tregs의 빈도를 비교했을 때 서로 차이가 없으므로 CD4+CD25+ Tregs가 HBV의 만성화와 관련이 없다고 주장하였다.

그러나 다른 연구자들은 급성 B형 간염 환자군 및 급성 B형 간염으로부터 회복한 사람군과 만성 B형 간염 환자군을 비교했을 때 말초 혈액의 순환 CD4+CD25+ Tregs의 수가 만성 B형 간염 환자에서 높았으므로, HBV 감염의 만성화와 조절 T세포가 연관되어 있다고 하였다.<sup>18-20</sup>

만성 B형 간염은 자연 경과에 따라 면역 관용기(immune tolerance), 면역 제거기(immune clearance), 무증상 보유자(asymptomatic carrier) 등의 단계로 나눌 수 있다. 이들은 각 단계별로 HBV의 복제 활성도 및 간 조직의 염증 정도가 다르며 따라서 조절 T세포의 침윤 정도도 다를 수 있다. 그러나 만성 B형 간염에서 자연 경과별로 조절 T세포의 간 조직 내 침윤 정도의 차이를 비교한 연구는 많지 않다. 이제까지의 연구는 대부분 만성 B형 간염 환자군을 경과별로 구분하지 않았으며, 또한 간 내 침윤 조절 T세포가 아니라 말초 혈액의 조절 T세포를 대상으로 한 연구였다. 이들은 만성 간염을 만성 활동성 간염과 무증상 보유자 혹은 면역 관용기 정도로 나누었으며, 말초 혈액의 조절 T세포 빈도를 비교하였을 때 이들 군 간에 통계적으로 유의한 차이가 없다고 보고하였다.<sup>17,19,20</sup> 그러나 최근 면역 염색을 이용하여 간 조직 내 침윤한 CD4+CD25+ Tregs의 빈도를 살펴본 연구에 따르면, 면역 제거기, 면역 관용기, 정상 대조군의 순으로 CD4+CD25+ Tregs 수가 많았다고 보고한 바 있다.<sup>21</sup>

따라서 본 연구는 만성 B형 간염의 자연 경과별, 즉 면역 관용기, 면역 제거기, 무증상 보유자 간의 간 내 조절 T세포의 침

윤 빈도가 차이가 있는지를 비교 분석하고자 하였다. 이에 병리 진단을 목적으로 얻은 파라핀 포매 간 생검 조직을 이용하였으며, 조절 T세포에 대한 표지자로서 FoxP3을 이용, 면역조직화학염색을 시행하였다.

## 재료 및 방법

1997년 1월부터 2008년 12월까지 대학병원 병리과에서 조직 검사를 통해 만성 B형 간염으로 진단된 54예를 대상으로 하였다. 그 중 환자의 임상 기록을 검토하여 중복 감염이나 혼합 감염, 즉 인간 면역결핍 바이러스나 A형, C형, D형 및 E형 간염 바이러스에 동시에 감염된 경우, 다른 질환이 동반된 경우 그리고 항바이러스제를 간 조직 생검 6개월 전에 투여 받은 과거력이 있는 경우 등은 제외하였다. 또한 검사실 소견에서 조직 생검 당시의 혈청 간 효소 수치(alanine aminotransferase [ALT]), HBeAg, anti-HBe, HBV-DNA의 양 등을 조사하였고, 각각의 결과에 비추어 3단계로 자연 경과를 나누었다.<sup>22</sup> 즉 면역 관용기는 ALT≤45 IU/L, HBeAg 양성, anti-HBe 음성, HBV-DNA 양>10<sup>5</sup> copies/mL로 정하였고, 면역제거기는 ALT>45 IU/L, HBeAg 양성 또는 음성, anti-HBe 양성 또는 음성, HBV-DNA 양>10<sup>4</sup> copies/mL로 정하였다. 그리고 무증상 보유자는 ALT≤45 IU/L, HBeAg 음성, anti-HBe 양성, HBV-DNA 양<10<sup>4</sup> copies/mL로 하였다. 한편 hematoxylin and eosin 염색, Masson's trichrome 염색, reticulin 염색 슬라이드를 관찰하여 조직학적 염증 활성도를 평가, 간 문맥역(문맥과 문맥 주변부)과 간 소엽의 염증 활성도를 대한병리학회 소화기 병리연구회에서 정한 기준(간 문맥역 활성도[0-4], 간 소엽 활성도[0-4])에 따라 점수를 매겼다.<sup>23</sup> 그런 다음 각 영역의 염증 활성도의 합을 구하였고, 합이 0-2점인 경우를 경한 염증, 3-5점인 경우를 중등도 염증 그리고 6-8점인 경우를 심한 염증이 있다고 구분하였다. 그리고 혈청 HBV-DNA의 양이 10<sup>7</sup> copies/mL 이상일 경우 바이러스 증식이 높았다는 보고가 있어<sup>24</sup> 이 기준으로 높은 군과 낮은 군, 두 군으로 나누었다.

한편 진단에 이용한 생검 조직의 파라핀 포매 표본에 대해서는 CD3 (clone LN10, Leica microsystems, Weltzar, Germany), CD4 (clone 4B12, Leica microsystems), CD8 (clone 4B11, Leica microsystems) 및 FoxP3 (clone 236A/E7, Abcam, Cambridge, UK)에 대한 단클론 항체를 이용하여 면역 염색을 시행하였다. 이때 파라핀 블록을 4 μm 두께로 잘라 슬라이드에 붙인 후 항온기에서 60°C로 한 시간 동안 건조하였으며, 항원성 회복을 위해 적절한 완충액 속에 슬라이드를 담가 극 초단파로 20분간 가열한 후 실온에서 식혔다. 또한 CD3, CD8 및 FoxP3 염색을 위해서 citrate (pH 6.0) 완충액을 사용하였고, CD4 염색을 위해서는 Tris-EDTA (pH 9.0) 완충액을 사용하였다. 이후 Bond polymer detection system (Leica

microsystems)과 함께 Bond-X 자동 면역 염색 기계를 이용하여 면역 염색을 시행하였다. 이 과정은 내인성 과산화 효소 활성을 억제하기 위한 30분간의 0.3% 과산화수소수 용액 처리 과정과 희석한 각각의 일차 항체 CD3 (1:400), CD4 (1:60), CD8 (1:80) 및 FoxP3 (1:100)으로 실온에서 30분간 처리하는 과정 그리고 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride로 발색 및 Mayer's hematoxylin으로 대조 염색하는 과정을 포함한다. CD4의 경우에는 항원성 소실을 방지하기 위해 과산화수소수 용액으로 처리하는 과정을 제외시켰다. 그 결과 CD3, CD4, CD8은 림프구의 세포막을 따라 염색되었으며 FoxP3는 핵에 염색되었다. 면역 염색 결과는 정량적으로 판독하였는데, 염색한 슬라이드를 두 명의 병리사가 400배 고배율 시야에서 접안렌즈 눈금자를 이용해 0.0625 mm<sup>2</sup>당 양상으로 염색되는 림프구의 수를 세었다. 이때 간 문맥역과 간 소엽을 구분, 3개 시야를 세어 각각의 평균을 구하였다. 통계 처리는 SPSS ver. 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 프로그램을 이용하였고, 각 그룹 간 CD3, CD4, CD8, FoxP3 양성 T세포 수의 비교는 one way ANOVA, 각 그룹에서 독립 변수에 따른 상관성은 independent-samples T test, 조직학적 염증 활성도, ALT, HBV-DNA의 양에 따른 양적 관계는 spearman correlation analysis로 검정하였으며, p값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

### 만성 B형 간염 환자군의 임상소견

B형 간염 환자 표본의 54예 중 46명(85%)이 남자였는데, 검

**Table 1.** Clinical characteristics of the patients at the time of liver biopsies

Patients (n = 54)	Immune-tolerance (n = 12)	Immune-clearance (n = 35)	Asymptomatic carrier (n = 7)
Age (yr) <sup>a</sup>	20 (11-35)	32 (18-59)	19 (18-20)
Sex (M/F)	10/2	29/6	7/0
ALT (IU/L) <sup>a</sup>	27.6 (13-44)	403.5 (47-2,288)	35.2 (24-45)
HBsAg positive	12	35	7
Anti-HBs positive	0	0	0
HBV DNA (copies/mL) <sup>a</sup>	4.05 × 10 <sup>8</sup> (3.1 × 10 <sup>5</sup> - 5.6 × 10 <sup>9</sup> )	2.84 × 10 <sup>8</sup> (0-3.4 × 10 <sup>9</sup> )	0
HBeAg positive	12	29	0
Anti-HBe positive	0	28	7
HI index <sup>a</sup>	1.8 (0-3)	4.1 (1-8)	1.4 (0-3)

<sup>a</sup>Mean values (range).

M, male; F, female; ALT, alanine aminotransferase; HBV, hepatitis B virus; HI index, histologic inflammatory index.

사 당시 연령은 11세에서 59세(평균 연령 27.5세)였다. 이를 각 생화학적 및 바이러스 지표 및 조직 소견에 따라 3단계의 자연 경과 즉 면역 관용기 12예, 면역 제거기 35예, 무증상 보유자 7예로 분류하였다. 이때 조직학적 염증 활성도는 면역 관용기는 1.8점(0-3점), 무증상 보유자는 1.4점(0-3점), 면역제거기는 4.1점(1-8점)으로 면역 제거기가 가장 높게 나타났다. 나머지 각 경과별, 임상적 특징은 Table 1과 같다.

### 만성 B형 간염의 각 자연 경과에 따른 간 내 림프구 중 CD3+ T세포, CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 침윤 정도

간 조직에 침윤한 CD3+ T세포, CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 수를 만성 B형 간염의 각 자연 경과에 따라 비교하였다. (Table 2, Fig. 1). 이들 T세포는 주로 간 문맥역에 침윤해 있었고 소엽은 문맥역에 비해 침윤 빈도가 현저히 낮았다. 침윤한 CD3+ T세포, CD4+ T세포 및 CD8+ T세포 수는 간 문맥역 및 소엽 모두에서 면역 제거기, 무증상 보유자, 면역 관용기의 순으로 감소하였으며 이것은 통계적으로 유의하였다(p=0.000). 한편 면역 제거기에서 CD3+ T세포, CD4+ T세포 및 CD8+ T세포의 침윤 수는 간 문맥역에서 227.09±67.07, 84.88±34.33, 86.47±29.82, 소엽에서 45.22±16.25, 17.42±8.85, 19.80±8.08으로 가장 높았고, 그 다음 무증상 보유자로 간 문맥역에서 111.24±76.11, 33.24±23.90, 41.77±29.95, 소엽에서 23.37±14.54, 7.34±3.28, 11.01±4.51였다. 마지막으로 면역 관용기에서는 간 문맥역에서 91.14±88.86, 31.98±29.53, 39.18±41.00, 소엽에서 14.38±9.74, 6.16±2.70, 6.27±3.80로 침윤 세포 수가 가장 적었다.

### 만성 B형 간염의 각 자연 경과에 따른 FoxP3+ Treg의 침윤 정도

FoxP3+ Tregs도 주로 간 문맥역에 침윤하여 있었다. 간 문맥역에서 침윤한 FoxP3+ Tregs의 절대 수, CD3+ T세포에 대한 FoxP3+ Tregs의 비율(FoxP3+/CD3+), CD4+ T세포에

**Table 2.** Comparison of the numbers of intrahepatic T cells in each clinical phase

	Immune-tolerance <sup>a</sup>	Immune-clearance <sup>a</sup>	Asymptomatic carrier <sup>a</sup>
CD3+ PT	91.14 ± 88.86	227.09 ± 67.07	111.24 ± 76.11
L	14.38 ± 9.74	45.22 ± 16.25	23.37 ± 4.54
CD4+ PT	31.98 ± 29.53	84.88 ± 34.33	33.24 ± 23.90
L	6.16 ± 2.70	17.42 ± 8.85	7.34 ± 3.28
CD8+ PT	39.18 ± 41.00	86.47 ± 29.82	41.77 ± 29.95
L	6.27 ± 3.80	19.80 ± 8.08	11.01 ± 4.51

<sup>a</sup>Numbers of positive cells/hpf, mean ± SD.

PT, portal tract and periportal area; L, lobule.

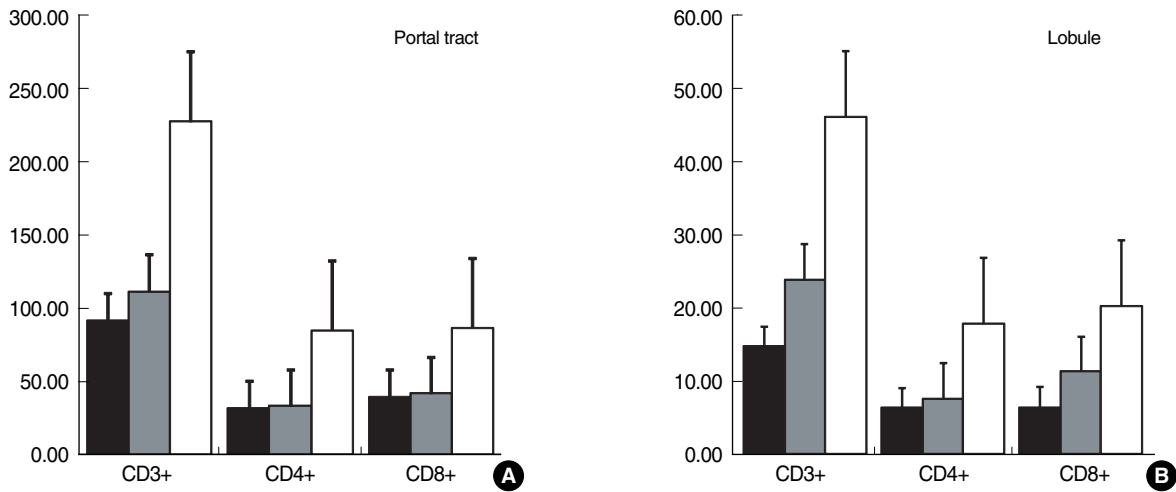


Fig. 1. Comparison of the numbers of intrahepatic CD3+, CD4+, and CD8+ T cells of the portal tract and the lobules in each clinical phase (■, immune-tolerance; ▒, asymptomatic carrier; □, immune-clearance). In both the portal tract (A) and lobules (B), the immune-clearance phase shows greater T-cell infiltration than the immune-tolerance group and the asymptomatic carrier group.

Table 3. Comparison of the frequency of intrahepatic FoxP3+ Tregs in each clinical phase

		Immune-tolerance <sup>a</sup>	Asymptomatic carrier <sup>a</sup>	Immune-clearance <sup>a</sup>
No. of FoxP3+ Tregs	PT	4.23 ± 5.94	5.71 ± 5.92	22.31 ± 15.27
	L	0.77 ± 0.66	1.33 ± 0.99	3.77 ± 2.34
FoxP3+/CD3+ (%)	PT	5.01 ± 3.85	5.11 ± 2.74	9.29 ± 5.19
	L	6.81 ± 7.95	6.73 ± 4.88	8.40 ± 4.70
FoxP3+/CD4+ (%)	PT	10.98 ± 6.63	16.08 ± 5.13	25.72 ± 13.70
	L	12.69 ± 8.54	24.44 ± 27.27	20.21 ± 10.04

<sup>a</sup>Mean ± SD.

FoxP3, forkhead box P3; Tregs, regulatory T cells; PT, portal tract and periportal area; L, lobule.

Table 4. Correlation of the FoxP3+ Tregs of the portal tract and the histologic inflammatory index

		No. of FoxP3+ Tregs <sup>a</sup>	FoxP3+/CD3+ (%) <sup>a</sup>	FoxP3+/CD4+ (%) <sup>a</sup>
HI index	0-2 (n = 24)	5.82 ± 6.49	5.32 ± 3.58	15.29 ± 10.26
	3-5 (n = 21)	22.06 ± 14.00	9.13 ± 5.37	24.45 ± 13.69
	6-8 (n = 9)	29.84 ± 17.50	11.32 ± 4.73	29.36 ± 12.98
p-value		0.000	0.002	0.006

<sup>a</sup>Mean ± SD.

FoxP3, forkhead box P3; Tregs, regulatory T cells; HI index, histologic inflammatory index.

대한 FoxP3+ Tregs의 비율(FoxP3+/CD4+)은 모두 면역 제거기(22.31±15.27, 9.29±5.19%, 25.72±13.70%), 무증상 보유자(5.71±5.92, 5.11±2.74%, 16.08±5.13%), 면역 관용기(4.23±5.94, 5.01±3.85%, 10.98±6.63%) 순으로 면역 제거기에 가장 많았고, 이는 통계적으로 유의하였다(p=0.000, p=0.002, p=0.006). 이들 수치를 각 군별로 비교해 보면 면역 제거기는 조절 T세포의 침윤 정도가 가장 낮았던 면역 관용기에 비해 세 수치 모두에서 통계적으로 유의한 침윤 증가를 보여주었다(p=0.000, p=0.023, p=0.001). 그러나 면역 제거기와 무증상 보유자 간에는 FoxP3+/CD3+ 및 FoxP3+/CD4+ 수치에서 통계적으로

유의한 차이를 보여주지 않았다(p=0.096, p=0.126). 그리고 면역 관용기와 무증상 보유자 사이에는 통계적 의미가 없었다(p=0.969, p=0.999, p=0.634)(Table 3, Figs. 2, 3).

한편 간 소엽의 경우, 침윤한 FoxP3+ Tregs의 절대 수는 면역 제거기(3.77±2.34), 무증상 보유자(1.33±0.99), 면역 관용기(0.77±0.66)의 순으로 면역 제거기에서 가장 많았는데, 이는 통계적으로 유의성이 있었다(p=0.000). 또한 FoxP3+/CD3+ 및 FoxP3+/CD4+는 면역 제거기에서 8.40±4.70%, 20.21±10.04%, 무증상 보유자에서 5.11±2.74%, 24.44±27.27%, 면역 관용기에서 5.01±3.85%, 12.69±8.54%로 나타나 면역 제거기에

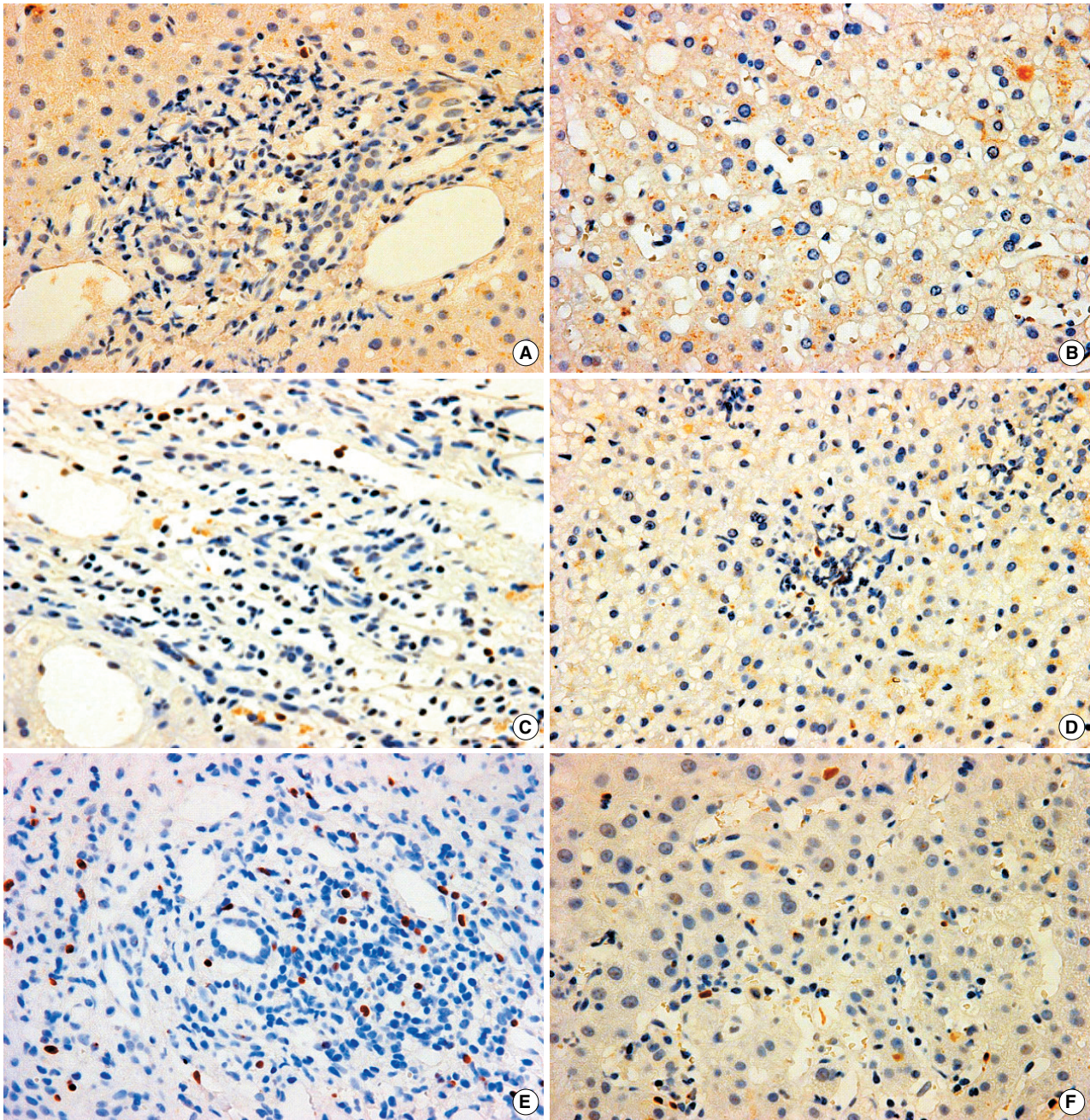


Fig. 2. Immunohistochemical staining for forkhead box P3 (FoxP3) in the liver tissue of a patient with chronic B viral hepatitis. Representative tissue sections are selected. FoxP3+ regulatory T cells (Tregs) are more infiltrated at the portal tracts (A, C, E) than at the lobules (B, D, F). The greater number of FoxP3+ Tregs shows in the immune-clearance phase (E, F) rather than in the immune-tolerance phase (A, B) and the asymptomatic carrier phase (C, D).

서 가장 높았으나, 통계적 의미는 없었다( $p=0.601$ ,  $p=0.079$ ).

#### FoxP3+ Treg의 침윤 정도와 조직학적 염증 활성화도 및 임상적 지표와의 비교

간 문맥역의 FoxP3+ Tregs 침윤 정도와 조직학적 염증 활

성도 및 여러 임상지표(HBV-DNA의 양, HBeAg 양성 여부, ALT)와의 상관관계를 알아보았다. 특히 간 문맥역의 FoxP3+ Tregs의 침윤 정도가 각 경과별로 통계적으로 유의한 차이를 보여주었으므로 이를 비교하였다. 조직학적 염증 활성화도와 세 군, 즉 경한 염증군(24명), 중등도 염증군(21명), 고도 염증군(9명)으로 나누고 각 군의 평균을 비교하였을 때 FoxP3+ Tregs의

고찰

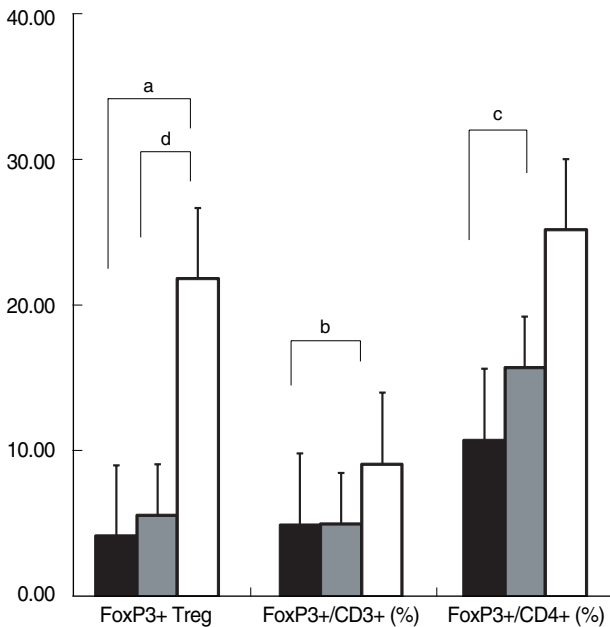


Fig. 3. Comparison of the numbers and percentages of intrahepatic forkhead box P3 (FoxP3)+ regulatory T cells (Tregs) in each clinical phase (■, immune-tolerance; ▣, asymptomatic carrier; □, immune-clearance) at the portal tract. The numbers of FoxP3+ Tregs and the ratio of FoxP3+/CD3+ and FoxP3+/CD4+ cells are higher in the immune-clearance phase than that of the immune-tolerance phase (\*p = 0.000, \*p = 0.023, \*p = 0.001), and the number of FoxP3+ Tregs is also higher in the immune-clearance phase than that in the asymptomatic carrier phase (\*p = 0.009).

절대 수, FoxP3+/CD3+, FoxP3+/CD4+ 모두 염증이 심할수록 증가하였는데, 이는 통계적으로도 유의하였다(Table 4). 또한 세 군으로 나누지 않고 전체 점수 범위인 0점에서 8점까지의 연속선 상에서 비교하였을 때에도 서로 통계적으로 유의한 상관관계가 있었다(Fig. 4).

한편, 면역 관용기의 경우 통상적으로 HBV DNA의 양이 높으므로 제외하고 면역 제거기와 무증상 보유자군에서 HBV-DNA의 양과 FoxP3+ Tregs의 침윤 정도를 비교하였다. 그 결과 10<sup>7</sup> copies/mL보다 낮은 군(24명)과 높은 군(18명)의 간 문맥역의 FoxP3+ Tregs의 수는 14.69±10.86, 26.01±18.33로서 HBV-DNA의 양이 높은 군에서 더 많았으며 이는 통계적 의미가 있었다(p=0.028).

그러나 FoxP3+/CD3+와 FoxP3+/CD4+는 각각 HBV-DNA가 낮은 군(7.38±3.62%, 21.66±11.13%), HBV-DNA가 높은 군(10.21±6.33%, 27.39±15.13%)으로 HBV-DNA의 양이 높은 군에서 침윤이 증가하는 경향을 보였으나, 이는 통계적 의미는 없었다(p=0.102, p=0.165). 결론적으로 HBeAg 양성 유무 및 혈청 ALT 수치와 FoxP3+ Treg의 절대 수, FoxP3+/CD3+ Tregs 및 FoxP3+/CD4+ Tregs 사이에는 상관관계를 보이지 않았다.

본 연구에서는 만성 B형 간염의 자연 경과 중 면역 관용기, 면역 제거기, 무증상 보유자에서 간 내 FoxP3+ Tregs의 침윤 빈도를 비교하였고, 면역 제거기에서 면역 관용기나 무증상 보유자에 비해 FoxP3+ Tregs가 유의하게 많이 침윤되어 있었다. 또한 간 조직의 염증 활성도가 높을수록 FoxP3+ Tregs의 침윤 빈도가 증가하였다. 혈청 HBV-DNA의 양과 간 내 FoxP3+ Tregs의 침윤 빈도의 상관성을 보았을 때, HBV-DNA의 양이 10<sup>7</sup> copies/mL 이상으로 많은 경우 FoxP3+ Tregs의 침윤이 증가하는 경향을 보였다. 다른 임상 지표(혈청 ALT 수치 및 HBeAg 양성 유무)와 FoxP3+ Tregs의 침윤 정도는 통계적으로 유의한 상관관계를 찾을 수 없었다.

급만성 B형 간염에서 조절 T세포에 대한 연구는 주로 말초 혈액을 이용하여 이루어지고 있는데, HBV 감염과 면역반응이 직접 일어나는 장소인 간에서 조절 T세포의 역할을 알아보는 것은 실제 면역반응을 반영한다는 점에서 더욱 중요하다. 간 조직에서 면역조직화학염색을 통해 간 내 림프구 중 FoxP3+ Tregs의 비율을 비교 측정한 연구는 많지 않은데,<sup>16,22</sup> 이들 연구를 보면 FoxP3+ Tregs는 대부분 간 문맥역에 위치하고 있었다. 본 연구에서도 간 문맥역과 소엽을 구분하여 측정해 보았을 때 간 문맥역이 소엽에 비해 FoxP3+ Tregs의 침윤이 더 많았다.

Yang 등<sup>19</sup>은 만성 활동성 B형 간염 환자군과 무증상 보유자군에서 FoxP3+ Tregs의 수를 각각 4.2±3.0/hpf와 1.1±1.5/hpf로 측정하였고, 급성 B형 간염이나 비알코올성 지방간염에서는 발견할 수 없었다고 보고하였다. 또한 Xu 등<sup>25</sup>은 간 문맥역에서 FoxP3+ Tregs의 수와 FoxP3+/CD4+ 비는 각각 심한 만성 활동성 B형 간염: 32.4±13.5/hpf, 35%, 만성 활동성 간염: 10.0±8.6/hpf, 19%, 정상대조군: 0.6±0.5/hpf, 5%였으며, 만성 B형 간염을 가진 두 군이 정상 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 FoxP3+ Tregs가 많았다고 보고하였다.

본 연구의 문맥역에서는 면역 제거기(22.31±15.27, 25.72±13.70%), 무증상 보유자(5.71±5.92, 16.08±5.13%) 그리고 면역 관용기(4.23±5.94, 10.98±6.63%)로 나타났고 대상군 및 분류 방법이 달라서 연구결과를 직접 그대로 비교할 수는 없지만, 연구자의 결과와 큰 차이를 보이지 않았다.

만성 간염에서는 자연 경과에 따라 간 조직 내의 염증 활성도가 다양하게 변한다. 즉 조절 T세포가 바이러스의 제거는 방해하지만 다른 한편으로는 염증을 억제시키는 역할도 하기 때문인데, 이에 많은 연구자들이 간염 염증 활성도와 FoxP3+ Tregs의 침윤 정도를 비교하였다. Stoop 등<sup>26</sup>은 간 조직 염증 활성도를 평가하는 등급 체계의 하나인 METAVIR 점수 체계에 의한 염증 활성도와 간 내 조절 T세포의 빈도 차가 없었다고 보고하였다. 그리고 여러 만성 B형 간염을 대상으로 한 연구에서도 만성 활동성 간염과 면역 관용기 혹은 무증상 제거기 간에 말초혈액 내 순환 조절 T세포의 빈도의 차이를 발견하지 못했는데, 이것

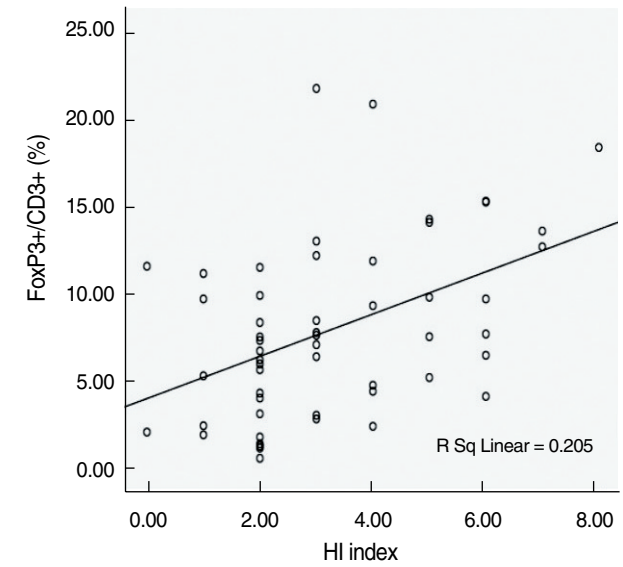
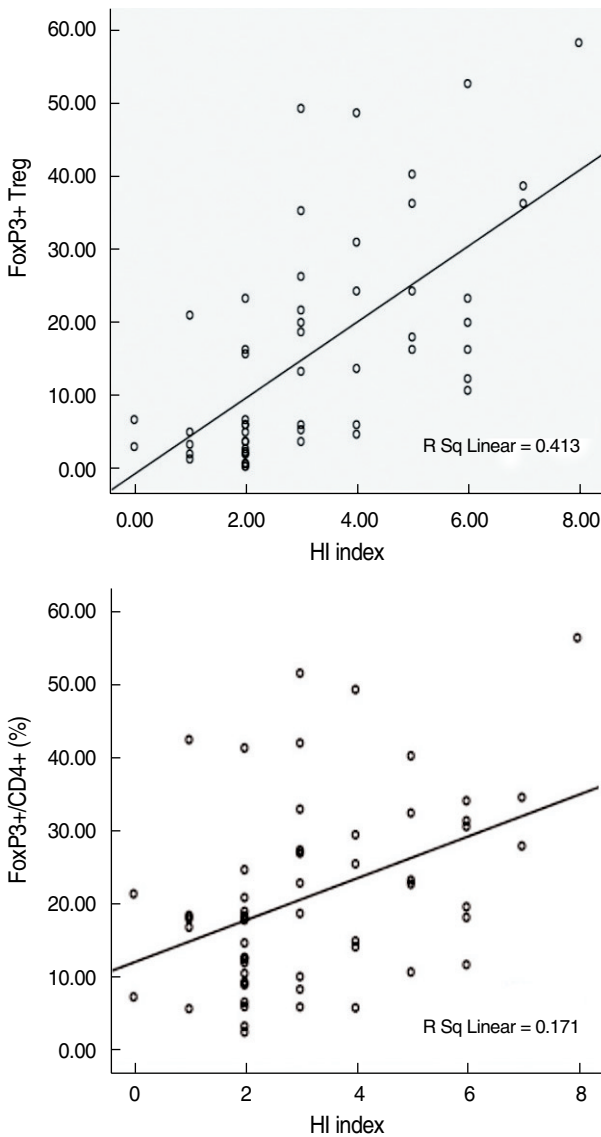


Fig. 4. Correlation of the intrahepatic forkhead box P3 (FoxP3)+ regulatory T cells (Tregs) infiltration of the portal tract and the histologic inflammatory index (histologic inflammatory [HI] index). A positive correlation is noted between the HI index and the numbers of FoxP3+ Tregs (A), FoxP3+/CD3+ (%) (B), and FoxP3+/CD4+ (%) (C), respectively (p = 0.000, r = 0.413 [A], p = 0.001, r = 0.205 [B], p = 0.002, r = 0.171 [C]).

은 간접적으로 염증 정도와 상관관계가 없다는 것을 시사한다.<sup>17,19,20</sup> 그러나 Xu 등<sup>25</sup>은 FoxP3+ Tregs 침윤이 만성 활동성 간염보다 심한 만성 활동성 B형 간염에서 더 많았다고 보고한 바 있다.

본 연구에서는 만성 B형 간염의 자연 경과 중 면역 제거기, 즉 조직학적으로 염증 활성도가 높은 시기의 조절 T세포의 침윤 정도가 염증 활성도가 낮은 면역 관용기나 무증상 보유자에 비해 통계적으로 의미 있게 높았다. 또한 대한병리학회의 군 신검용 간 생검 판독기준에 따라 염증 활성도를 점수화하여 비교해 보았을 때에도 점수가 높을수록, 즉 염증이 심할수록 FoxP3+ Tregs의 침윤이 많았으며 이는 통계적으로도 의미가 있었다.

만성 B형 간염환자에게 있어 조절 T세포가 증가하는 원인으로는 3가지 정도를 생각해 볼 수 있다. 첫째 체내에 존재하는 HBV-DNA다. 연구자에 따라 HBV-DNA의 양이 많을수록 조

절 T세포의 빈도가 높다는 보고도 있고<sup>19,20,25-27</sup> 그렇지 않다는 보고도 있다.<sup>17,18,21</sup> 그러나 오랜 기간 동안 높은 농도의 항원이 반복해서 자극하면 조절 T세포의 형성이 유도되기도 하는데,<sup>28</sup> Stoop 등<sup>29</sup>은 항바이러스제로 치료하여 HBV-DNA의 양이 줄어들면 말초 혈액 내 조절 T세포의 수도 점차 감소한다고 한 바, HBV-DNA에 의해 조절 T세포가 유도될 가능성이 있다.

본 연구에서는 HBV-DNA의 양은 많으나 다른 면역학적인 기전에 의해 HBV에 대한 면역반응이 없는 면역 관용기를 제외하고, 면역 제거기와 무증상 보유자를 대상으로 HBV-DNA와 FoxP3+ Tregs 간의 상관관계를 살펴보았을 때, 비록 통계학인 의미는 없었지만 HBV-DNA의 양이 많은 경우 FoxP3+ Tregs의 침윤이 증가하는 경향을 볼 수 있었다.

여러 연구에서 연구자들 간 결과 차이가 나는 것은 대상 환자군이 다르고, 조절 T세포를 검출하는 데 사용한 표지자가 다르

기 때문일 수 있다. 본 연구의 경우 남자 환자가 85.2%를 차지하였는데, 이는 우리나라의 특성상 군 복무와 연관된 조직 검사가 많기 때문에 이것이 결과에 영향을 미쳤을 수도 있을 것이다.

둘째, transforming growth factor (TGF)-beta의 역할이다. 만성 B형 간염환자의 혈청 및 간 조직에서 TGF-beta의 양이 높게 측정되는데, 이렇게 만성 간염 환자의 조절 T세포가 증가하는 기전으로 TGF-beta에 의해 말초에서 Treg로의 전환이 유도될 것이라는 가설이 제시되었다.<sup>19</sup> 셋째, 환자군의 나이이다. 나이가 들수록 말초 혈액 내 순환 CD4+CD25+ Tregs가 증가한다는 연구가 있으나,<sup>30</sup> Xu 등<sup>25</sup>은 나이와 조절 T세포의 빈도와는 상관관계가 없다고 하였다.

결론적으로 만성 B형 간염의 자연 경과 중 면역 제거기에서 면역 관용기나 무증상 보유자에 비해 FoxP3+ Tregs가 많이 침윤되어 있었고, 간 조직의 염증이 심할수록 FoxP3+ Tregs의 침윤 빈도가 증가하였다. 또 혈액 내 HBV-DNA의 양이 많은 경우 FoxP3+ Tregs의 침윤이 증가하는 경향을 보였다. 따라서 HBV의 만성화 내지 불완전한 제거로 인한 지속 감염에 조절 T세포가 관련되어 있음을 추측할 수 있다. 그러나 후향적 연구이기 때문에 환자군을 동일한 목적과 일정한 시기에 검사실 검사를 행하고 조직을 채취하지 못하여 결과에 오류가 발생했을 가능성도 있다. 또한 간 조직과 함께 말초 혈액에서 순환 조절 T세포를 분석 비교했다면 더 좋은 결과를 얻을 수 있었으리라고 본다. 이러한 만성 B형 간염에서 조절 T세포에 대한 연구를 통해 향후 조절 T세포를 선택적으로 억제하는 치료 방법을 개발함으로써 여러 가지 지속 감염을 유발하는 감염원을 치료하는데 도움이 되리라고 본다.

## REFERENCES

- Han CJ, Lee CH, Cho SW, *et al.* Natural course of hepatitis B. In: The Korean Society of Gastroenterology, ed. The series of the Korean Society of Gastroenterology: hepatitis. 2nd ed. Seoul: Goonja Publishing Co., 2005; 41-58.
- Jung MC, Pape GR. Immunology of hepatitis B infection. *Lancet Infect Dis* 2002; 2: 43-50.
- Belkaid Y, Rouse BT. Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol* 2005; 6: 353-60.
- Billerbeck E, Bottler T, Thimme R. Regulatory T cells in viral hepatitis. *World J Gastroenterol* 2007; 13: 4858-64.
- Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 875-88.
- Rouse BT, Sarangi PP, Suvas S. Regulatory T cells in virus infections. *Immunol Rev* 2006; 212: 272-86.
- Li S, Gowans EJ, Choungnet C, Plebanski M, Dittmer U. Natural regulatory T cells and persistent viral infection. *J Virol* 2008; 82: 21-30.
- Suvas S, Kumaraguru U, Pack CD, Lee S, Rouse BT. CD4+CD25+ T cells regulate virus-specific primary and memory CD8+ T cell responses. *J Exp Med* 2003; 198: 889-901.
- Boettler T, Spangenberg HC, Neumann-Haefelin C, *et al.* T cells with a CD4+CD25+ regulatory phenotype suppress in vitro proliferation of virus-specific CD8+ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 2005; 79: 7860-7.
- Li S, Jones KL, Woollard DJ, *et al.* Defining target antigens for CD25+ FOXP3+ IFN-gamma- regulatory T cells in chronic hepatitis C virus infection. *Immunol Cell Biol* 2007; 85: 197-204.
- Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25): breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995; 155: 1151-64.
- Nelson BH, Willerford DM. Biology of the interleukin-2 receptor. *Adv Immunol* 1998; 70: 1-81.
- Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, *et al.* Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000; 192: 303-10.
- McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, *et al.* CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity* 2002; 16: 311-23.
- Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4: 330-6.
- Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003; 299: 1057-61.
- Franzese O, Kennedy PT, Gehring AJ, *et al.* Modulation of the CD8+-T-cell response by CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with hepatitis B virus infection. *J Virol* 2005; 79: 3322-8.
- Stoop JN, van der Molen RG, Baan CC, *et al.* Regulatory T cells contribute to the impaired immune response in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2005; 41: 771-8.
- Yang G, Liu A, Xie Q, *et al.* Association of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells with chronic activity and viral clearance in patients with hepatitis B. *Int Immunol* 2007; 19: 133-40.
- Peng G, Li S, Wu W, Sun Z, Chen Y, Chen Z. Circulating CD4+CD25+ regulatory T cells correlate with chronic hepatitis B infection. *Immunology* 2008; 123: 57-65.
- Yang YY, Lang ZW, Lan MD, *et al.* Expression of intrahepatic CD4+ CD25+ regulatory T cells in patients with chronic hepatitis B. *Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi* 2008; 22:



- 296-8.
22. Yim HJ, Lok AS. Natural history of chronic hepatitis B virus infection: what we knew in 1981 and what we know in 2005. *Hepatology* 2006; 43(2 Suppl 1): S173-81.
23. Park YN, Kim HG, Chon CY, *et al.* Histological grading and staging of chronic hepatitis standardized guideline proposed by the Korean Study Group for the Pathology of Digestive Diseases. *Korean J Pathol* 1999; 33: 337-46.
24. Webster GJ, Reignat S, Brown D, *et al.* Longitudinal analysis of CD8+ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy. *J Virol* 2004; 78: 5707-19.
25. Xu D, Fu J, Jin L, *et al.* Circulating and liver resident CD4+CD25+ regulatory T cells actively influence the antiviral immune response and disease progression in patients with hepatitis B. *J Immunol* 2006; 177: 739-47.
26. Stoop JN, Claassen MA, Woltman AM, *et al.* Intrahepatic regulatory T cells are phenotypically distinct from their peripheral counterparts in chronic HBV patients. *Clin Immunol* 2008; 129: 419-27.
27. Barboza L, Salmen S, Goncalves L, *et al.* Antigen-induced regulatory T cells in HBV chronically infected patients. *Virology* 2007; 368: 41-9.
28. Taams LS, Vukmanovic-Stejić M, Smith J, *et al.* Antigen-specific T cell suppression by human CD4+CD25+ regulatory T cells. *Eur J Immunol* 2002; 32: 1621-30.
29. Stoop JN, van der Molen RG, Kuipers EJ, Kusters JG, Janssen HL. Inhibition of viral replication reduces regulatory T cells and enhances the antiviral immune response in chronic hepatitis B. *Virology* 2007; 361: 141-8.
30. Gregg R, Smith CM, Clark FJ, *et al.* The number of human peripheral blood CD4+ CD25 high regulatory T cells increases with age. *Clin Exp Immunol* 2005; 140: 540-6.