

패혈증에서 PD-L1 (Programmed Cell Death-ligand 1)의 발현 증가 기전

서울대학교 의과대학 내과학교실 및 폐연구소

이상민

Induction Mechanism of PD-L1 (Programmed Cell Death-ligand 1) in Sepsis

Sang-Min Lee, M.D.

Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine and Lung Institute, Medical Research Center, Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea

PD-L1 is expressed in a variety of antigen-presenting cells and provides T cell tolerance via ligation with its receptor PD-1 and B7-1 on T cells. Stimulation with lipopolysaccharide (LPS) can increase the level of PD-L1 expression in B cells and macrophages, which suggests that this molecule plays a role in the immunosuppression observed in severe sepsis. The aim of this study was to identify which of the downstream pathways of TLR4 are involved in the up-regulation of PD-L1 by LPS in macrophages. Flow cytometry was used to examine the expression of PD-L1 in RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS. The following chemical inhibitors were used to evaluate the role of each pathway: LY294002 for PI3K/Akt, SB202190 for p38 MAPK, and U0126 for MEK. LPS induced the expression of PD-L1 in a time- and dose-dependent manner. Transfection of siRNA for TLR4 suppressed the induction of PD-L1. Pretreatment with LY294002 and SB202190 decreased the level of PD-L1 expression but U0126 did not. Overall, the PI3K/Akt and p38 MAPK pathways are involved in the up-regulation of PD-L1 expression in RAW 264.7 macrophages stimulated with LPS. (*Tuberc Respir Dis* 2008;65:343-350)

Key Words: PD-L1, LPS, Sepsis, Macrophage

서 론

패혈증은 중환자 사망원인의 1위를 달리고 있는 질환으로 미국 통계에 의하면 매년 750,000명 이상의 환자가 발생하며 그 중 210,000명 이상이 사망하고 있다¹. 최근 대중 요법이 발달하고 있지만 패혈증의 이환율과 사망률은 감소 추세를 보이지 못하고 있는 실정으로, 보다 근본적인 치료법의 개발이 시급해진 상황이다.

그 동안 많은 연구자들은 패혈증이 세균 내독소와 같은 외부 물질에 의해 유발된 염증 반응이 각종 사이토카인의 연쇄반응에 의하여 증폭됨으로써 진행된다는 사실을 발견하고, 이러한 염증 반응의 악순환의 고리를 끊는 치료법 개발에 몰두하게 되었다. 이에 염증 반응을 차단하기 위

하여 steroid², antiendotoxin antibody, tumor necrosis factor (TNF) antagonists, interleukin-1-receptor antagonist 등 여러 약제에 대한 임상 시험이 진행되었지만, 안타깝게도 그 효과가 입증된 약제는 거의 없는 상황이고, 오히려 사망률을 증가시킨다는 결과도 보고되고 있는 실정이다.

패혈증은 조절되지 않는 염증 반응의 증폭에 의하여 발생한다는 것이 초기의 개념이었고, 기존의 치료법도 염증 반응을 억제하고자 하는데 초점을 맞추어 개발이 되었다. 그러나, 위에서 살펴본 바와 같이 이러한 치료법들이 효과가 없음이 입증되어 패혈증에 대한 새로운 접근 방법이 필요하게 되었다.

1996년도에 Bone³은 CARS (compensatory anti-inflammatory response syndrome)라는 개념을 제안하여 기존의 개념과는 달리 염증 반응 및 면역 반응의 억제도 패혈증의 병태 생리를 이해하는데 중요함을 주창하였다. 실제로 패혈증 환자에서 delayed hypersensitivity가 감소되어 있고, 병원 감염에 취약하다는 보고들이 있어, 이들 환자에서 면역 반응이 억제되어있음을 시사하고 있다. 이를

Address for correspondence: Sang-Min Lee, M.D.

Division of Pulmonary and Critical Care Medicine, Department of Internal Medicine, Seoul National University College of Medicine, 101, Daehangno, Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea
Phone: 82-2-2072-0833, Fax: 82-2-762-9662
E-mail: sangmin2@snu.ac.kr

바탕으로 패혈증 발생 기전에 대한 개념이 변화되었는데, 초기에는 염증 반응 물질의 과도한 생성이 일어나지만, 패혈증이 진행할수록 염증 반응 및 면역 반응이 억제되는 상황으로 전이되어 간다는 것이다⁴. 이로써, 패혈증에서 면역 반응이 억제되는 기전에 대한 관심이 높아지고 이에 대한 연구가 진행되어지게 되었다.

한편 면역 반응에 중요한 역할을 담당하고 있는 T lymphocyte가 증식하고 분화하는데 있어 APC (antigen presenting cell)에서 제공되는 여러 가지 신호전달이 중요하다고 알려져 있으며 이러한 신호전달에 각종 costimulator가 중요한 역할을 담당하고 있다. APC 표면에 발현되는 단백질 중 PD-L1 (programmed death receptor ligand 1)은 B7 family에 속하는 표면 단백질로서 B7-H1이라고도 불린다. PD-L1은 기존의 B7-1이나 B7-2 등의 다른 B7 family와는 달리 T lymphocyte 표면의 CD28이나 CTLA-4 등과 결합을 하지 않고, PD-1 (programmed death receptor 1)이라는 특정 receptor와 결합을 한다고 알려져 있다. PD-L1과 PD-1이 결합함으로써 T-cell receptor (TCR)을 통한 신호전달체계를 억제하여 T lymphocyte의 증식이나 사이토카인 분비력을 억제한다고 보고되고 있다⁵.

이러한 PD-L1은 T lymphocyte, B lymphocyte, macrophage 및 dendritic cell 표면에 발현되며 LPS를 포함한 몇몇 자극에 의하여 발현이 유도된다. 또한 심장의 내피 세포, 췌장의 베타 세포, 근육의 glial cell 등에서도 발현됨이 발견되어 림프계 기관뿐만 아니라 비림프계 기관의 면역 조절 기전에도 관여함이 시사되고 있다^{6,8}.

최근 PD-L1은 macrophage와 B cell에서는 LPS 자극에 의하여 발현이 증가한다는 보고가 있어, 패혈증 모델에서 LPS에 의해 PD-L1발현이 증가된다면 PD-L1과 PD-1의 상호 작용이 패혈증에서 나타나는 면역 반응 억제의 한 기전일 가능성을 고려해 볼 수 있다. 그렇지만, 이제까지의 PD-1/PD-L1 관련 연구는 주로 자가 면역 질환이나 종양 분야에 집중되어있는 경향을 보이고 있고, 패혈증에서의 면역 억제 반응과 PD-1/PD-L1이 관여하는지, 관여한다면 어떤 기전에 의하여 발현이 조절되는지에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 현실이다.

본 연구에서는 mouse macrophage cell line을 이용하여 LPS 자극에 의하여 PD-L1 발현이 증가하는지를 확인하고, 발현 증가에 어떤 기전이 관여하는지를 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 세포주

본 연구에는 mouse macrophage cell line인 RAW 264.7을 사용하였다. RAW 264.7 세포주는 10% FBS (fetal bovine serum), 페니실린 30 mg/ml, 스트렙토마이신 50 mg/ml이 첨가된 RPMI-1640 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

2. Western 분석법

Whole lysis buffer (0.1% Nonidet P-40, 5 mM EDTA, 50 mM Tris (pH 7.5~8.0), 250 mM NaCl, 50 mM β-mercaptoethanol)를 이용하여 총세포 단백을 추출하였다. 30 g의 세포 단백을 10% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동시켰다. 4시간 동안 400 mA의 일정한 전류로 단백질을 nitrocellulose membrane으로 transfer 시키고, 이 membrane을 blocking solution (5% skim milk in 1 X PBS/Tween 20)으로 1시간동안 block 시킨 후 anti-PD-L1 항체, anti-TLR4 항체, 혹은 anti-actin 항체를 1 : 1,000으로 첨가하여 12시간 동안 반응시켰다. 세척 후 이차 항체를 1 : 2,000으로 첨가하여 반응시킨 후 면역 신호의 검출은 ECL Western blotting detection system을 이용하였다.

3. Flow cytometry

세포 표면의 PD-L1 발현 증가를 확인하기 위하여 Flow cytometry 기법을 이용하였다. RAW 264.7 세포에 LPS를 필요한 시간 동안 처리한 후 PE conjugated anti-mouse B7-H1 (CD274, B7H1, PD-L1)를 넣고 4°C에서 30분간 배양하였다. Cytometry analyzer는 Epics XL (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)를 이용하였고, mean fluorescence intensity (MFI)를 측정하여 비교하였다.

4. MTT assay

3-(4,5-dimethyl thiazole-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 96 well plate에 well 당 1×10⁴개의 세포를 분주하고 4~5시간 뒤 약물을 처리하여 정해진 시간 동안 배양하였다. 배양된 세포에 5 mg/ml의 MTT 용액 (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 15 μl 첨가하고, CO₂ incubator에 37°C에서 5시간동안 배양하였다. 배양액을 제거한 후 50 μl의 DMSO를 첨가하여 녹이고 분광광도계를 이용하여 590 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 각각 4개 well의

성적을 분석하였다.

5. Chemical inhibitor 처리

각 signaling pathway를 blocking 하기 위해서 chemical inhibitor를 처리하였다. PI3K/Akt pathway를 억제하기 위해서 LY294002 50 μ M을, ERK/MEK pathway를 억제하기 위해서 U0126 10 μ M을, 그리고 p38 MAPK pathway를 억제하기 위해서 SB202190 10 μ M을 전처리하였다. 각각의 chemical inhibitor는 2시간 동안 처리되었다.

결 과

1. PD-L1 is up-regulated by LPS in time-dependent & concentration-dependent manner in mouse macrophage cell line

RAW 264.7 세포주에서 LPS 자극에 의하여 PD-L1의 발현이 증가하는지 평가하기 위하여 LPS 1.0 μ g/ml의 농도로 24시간 동안 전처리 후 RAW 264.7 세포주 표면의 PD-L1 발현 정도를 flow cytometry를 통해 분석하였다. Control군에서도 PD-L1 발현이 관찰되어 macrophage에서의 constitutional expression을 반영하고 있었고, LPS 자극 후에 PD-L1 발현이 증가함을 알 수 있었다. Control군에서 mean fluorescence intensity (MFI)가 30.16이고, LPS 처리군에서 MFI가 133.27로 통계적으로 유의하게 ($p=0.001$) LPS 처리한 경우 PD-L1 발현이 증가함을 관찰할 수 있었다(Figure 1). LPS 자극에 의한 PD-L1 발현의 증가는 LPS 처리 후 시간이 증가함에 따라 time-dependent manner로 나타남을 알 수 있었고, LPS 처리 농도를 변화시켰을 때도 농도에 비례하여 dose-dependent manner로 PD-L1 발현의 증가가 관찰되었다(Figure 2).

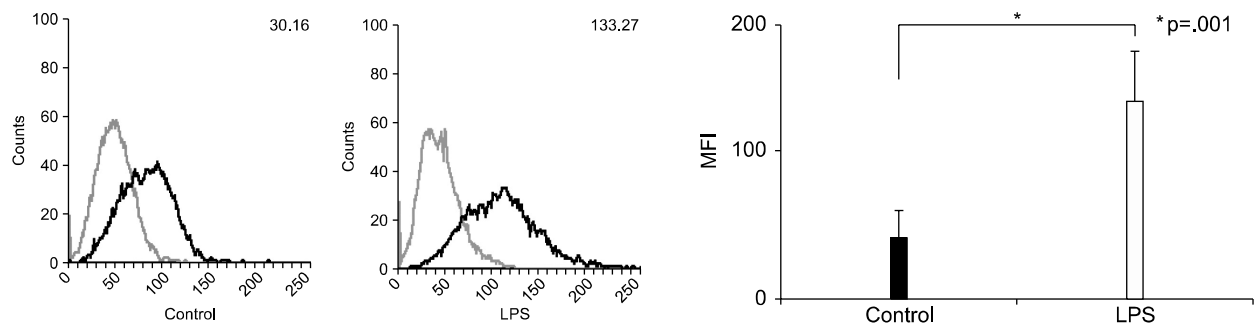


Figure 1. PD-L1 is up-regulated by LPS in mouse macrophage cell line. RAW 264.7 cells were treated with LPS (1.0 μ g/ml) for 24 hrs. Surface expressions of PD-L1 were measured by flow cytometry and expressed via MFI (mean fluorescence intensity). Number: mean fluorescence intensity (MFI). Gray: isotype control, Black: PD-L1.

2. Blocking of TLR4 with siRNA suppress LPS-induced PD-L1 expression

LPS 자극에 의한 PD-L1 발현의 증가가 toll-like receptor 4 (TLR4)를 통해서 일어나는지 알아보기 위하여 small interfering RNA (siRNA) method를 이용하여 실험을 진행하였다. RAW 264.7 세포주에 TLR4에 대한 siRNA를 transfection하였을 때 control siRNA를 transfection하였을 때보다 TLR 발현이 효과적으로 감소하는 것을 western blot을 통하여 확인하였다(Figure 3A). Control siRNA를 transfection한 뒤 LPS 자극 후의 MFI를 100%로 하였을 때, TLR4 siRNA를 transfection한 후의 MFI가 감소됨을 flow cytometry를 통하여 확인할 수 있었다(Figure 3B). 이를 통해 LPS 자극에 의한 PD-L1 발현의 증가는 TLR4를 통하여 이루어짐을 추정할 수 있었다.

3. PI3K/Akt pathway is involved in up-regulation of PD-L1 by LPS

다음으로 TLR4의 downstream pathway 중 하나인 PI3K/Akt pathway가 LPS 자극에 의한 PD-L1 발현의 증가에 관여하는지 알기 위하여 PI3K/Akt pathway에 대한 chemical inhibitor인 LY294002를 전처리한 뒤 실험을 진행하였다. LY294002 전처리 시 RAW 264.7 세포주에서 PD-L1의 constitutional expression에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었으나, LPS 자극 후의 PD-L1 발현의 증가는 LY294002 전처리 시 감소함을 확인할 수 있었다(Figure 4). MTT assay로 cell viability를 평가하였을 때 vehicle control과 차이가 없어 이러한 효과는 cell death에 의한 것은 아님을 알 수 있었다. 이러한 결과를 통해 LPS 자극 후의 PD-L1 발현의 증가에는 PI3K/Akt pathway가 관여

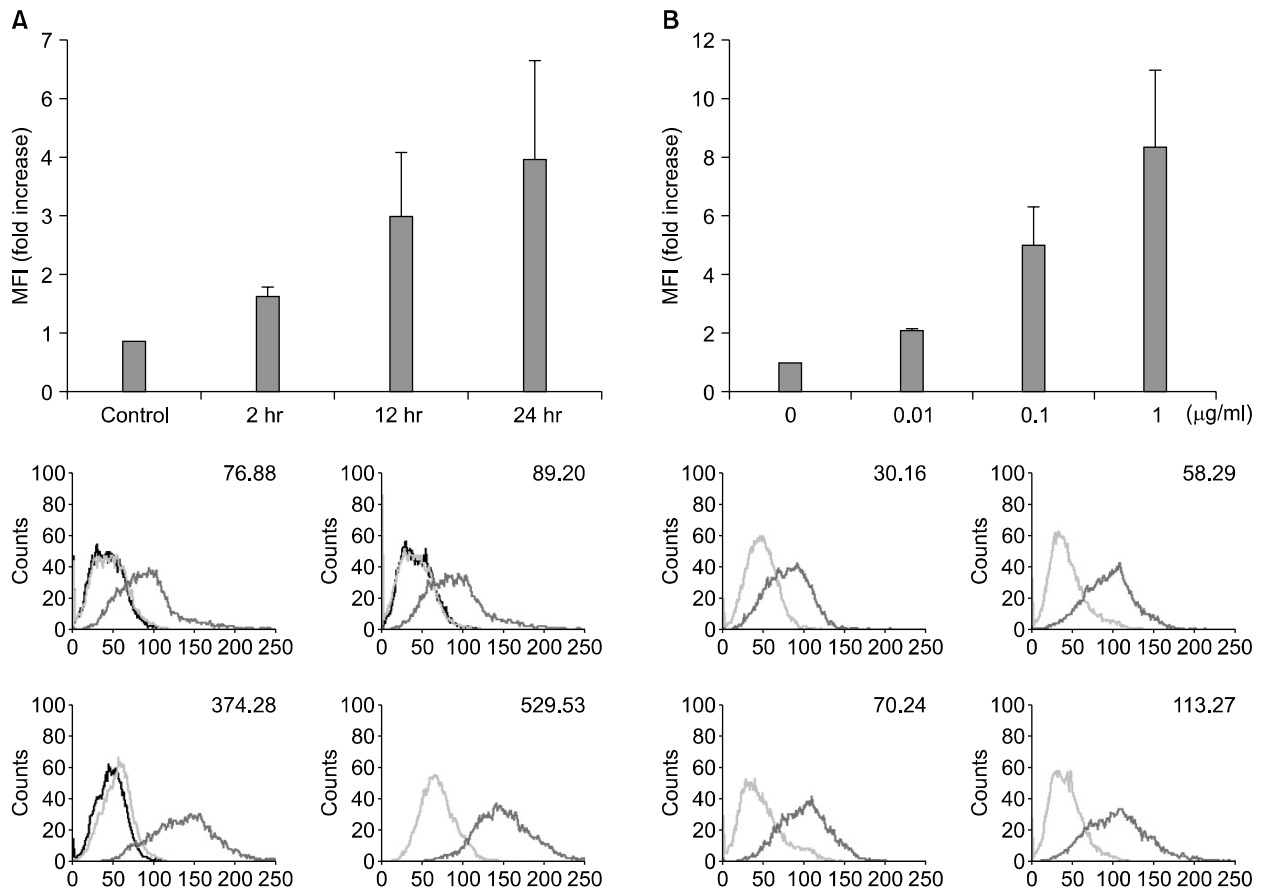


Figure 2. PD-L1 is up-regulated by LPS in time-dependent & concentration-dependent manner. RAW 264.7 cells were treated with LPS (1.0 µg/ml) for the indicated times (A) and with the indicated concentrations of LPS for 24 hrs (B). Surface expressions of PD-L1 were measured by flow cytometry and expressed via MFI.

함을 추정할 수 있었다.

4. MEK/ERK pathway has no role in up-regulation of PD-L1 by LPS

다음으로 TLR4의 downstream pathway 중 하나인 MEK/ERK pathway가 LPS 자극에 의한 PD-L1 발현의 증가에 관여하는지 알기 위하여 MEK/ERK pathway에 대한 chemical inhibitor인 U0126를 전처리한 뒤 실험을 진행하였다. U0126 전처리 시 PD-L1의 constitutional expression에는 차이가 없었으나, PI3K/Akt pathway의 경우와는 다르게 LPS 자극 후 오히려 MFI가 증가해 PD-L1 발현이 다소 늘어남을 확인할 수 있었다(Figure 5). 이는 반복 실험을 통해서도 확인할 수 있어 MEK/ERK pathway는 LPS 자극 후의 PD-L1 발현 증가에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

5. p38 MAPK pathway is involved in up-regulation of PD-L1 by LPS

마지막으로 TLR4의 downstream pathway 중 하나인 p38 MAPK pathway가 LPS 자극에 의한 PD-L1 발현의 증가에 관여하는지 알기 위하여 p38 MAPK pathway에 대한 chemical inhibitor인 SB202190를 전처리한 뒤 LPS 자극 후의 PD-L1 발현을 평가하였다. 앞에 실험에서의 같이 SB202190 전처리는 PD-L1의 constitutional expression에는 영향을 미치지 않았으나, LPS 자극 후의 PD-L1 증가 정도는 MFI로 평가하였을 때 줄어듦을 알 수 있었다(Figure 6). 이를 통해 p38 MAPK pathway는 LPS 자극 후의 PD-L1 발현 증가에 관여함을 확인할 수 있었다.

고 찰

PD-L1은 inhibitory function을 가지는 costimulatory

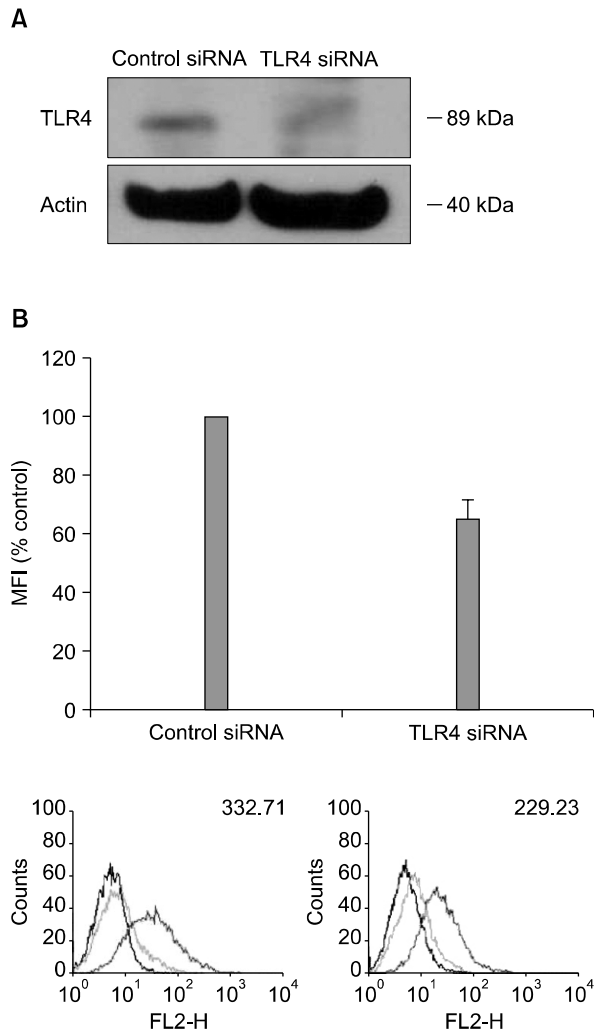


Figure 3. Blocking of TLR4 with siRNA suppress LPS-induced PD-L1 expression. RAW 264.7 cells were transfected with control siRNA and siRNA for TLR4. The levels of TLR4 in cellular extracts were detected by Western blot analysis (A). After cells were treated with LPS (1.0 μ g/ml) for 24 hrs, surface expressions of PD-L1 were measured by flow cytometry and expressed via MFI (B).

molecule의 하나로 알려져 있다⁹. Naive T cell은 MHC와 TCR의 작용과 함께, costimulatory molecule의 작용에 의하여 activated T cell이 된다. 이 때 chronic infection이나 persistent antigen stimulation과 같은 상황에서, APC에서 발현되는 PD-L1은 T세포에 있는 inhibitory costimulatory molecule인 PD-1과 상호작용하여 inhibitory signal을 만들고, T cell은 exhausted T cell로 변하게 되어 immune tolerance를 일으키게 된다. PD-1이 T lymphocyte에 대한 negative stimulatory function을 갖는다는 사실은 PD-1

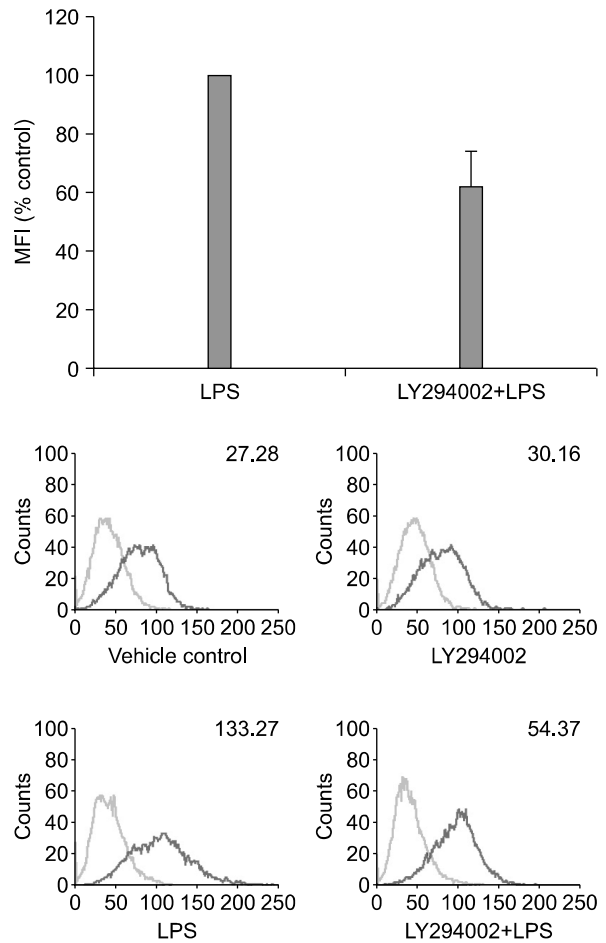


Figure 4. PI3K/Akt pathway is involved in up-regulation of PD-L1 by LPS. RAW 264.7 cells were pretreated with LY294002 (50 μ M) for 2 hrs and then stimulated with LPS for 24 hrs. Surface expressions of PD-L1 were measured by flow cytometry and expressed via MFI. Cell viability by MTT assay: >90% of vehicle control.

knockout mice에서 자연적으로 자가면역질환이 발생한다는 실험 결과에서 밝혀지기 시작했다^{10,11}. 이러한 PD-1-PD-L1 interaction은 HBV, HCV, HIV, H. pylori와 같은 만성 감염과 종양 면역에서 immune tolerance를 일으키는 기전의 하나로 잘 알려져 있다⁹.

한편 PD-1의 ligand로 알려진 PD-L1에 관해서는 몇몇 질병 model에서 immune tolerance 기전에 관여함이 알려지고 있다.

우선 NOD (non-obese diabetes) mice의 췌장 베타 세포에서 PD-L1 발현이 증가되어 있으며, PD-1 knockout NOD mice에서 제1형 당뇨병이 더 잘 발생한다는 사실이 보고되었다¹². 또한, 대표적인 immune tolerance 현상인

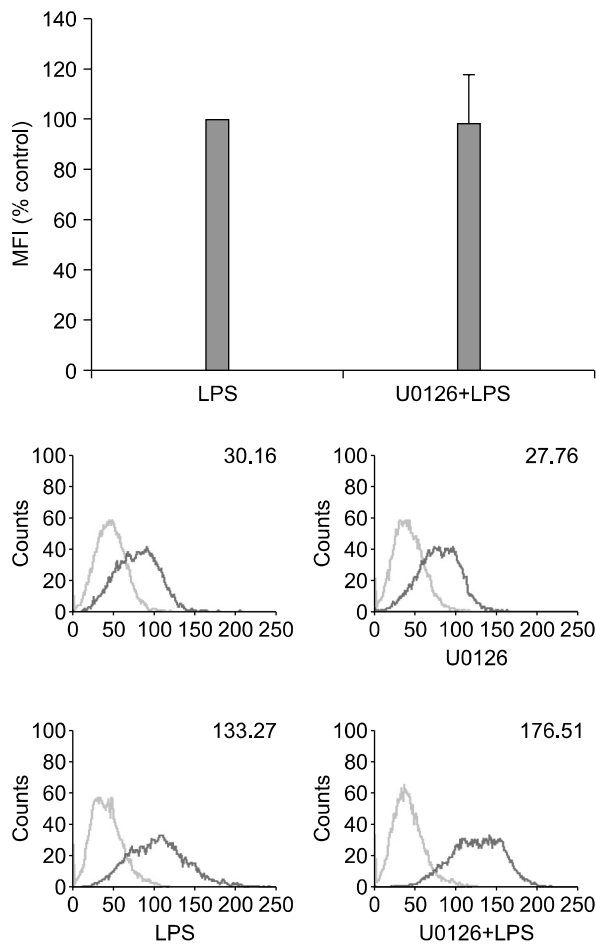


Figure 5. MEK/ERK pathway has no role in up-regulation of PD-L1 by LPS. RAW 264.7 cells were pretreated with U0126 (10 μ M) for 2 hrs and then stimulated with LPS for 24 hrs. Surface expressions of PD-L1 were measured by flow cytometry and expressed via MFI. Cell viability by MTT assay: >90% of vehicle control.

임신과 관련된 연구 결과도 발표되었다. Guleria 등¹³은 murine abortion model을 이용하여 태반 세포에 PD-L1 발현이 증가되어 있으며, PD-L1을 억제하는 blocking Ab를 처리하였을 때 유산(abortion)이 늘어남을 밝혀 임신에서의 immune tolerance에도 PD-1/PD-L1이 관여함을 보여주고 있다.

이외에 PD-L1에 대한 연구는 악성 종양 분야에서도 진행되고 있는데, Thompson 등¹⁴은 신장암 환자를 대상으로 한 연구를 통해 tumor cell 및 lymphocyte에서 PD-L1 발현이 증가되어 있는 환자가 더 빨리 사망에 이른다는 사실을 밝혔다. 또한, 식도암 환자에서도 PD-L1 발현이 증가된 환자의 예후가 더 나쁘다는 보고도 있어 tumor

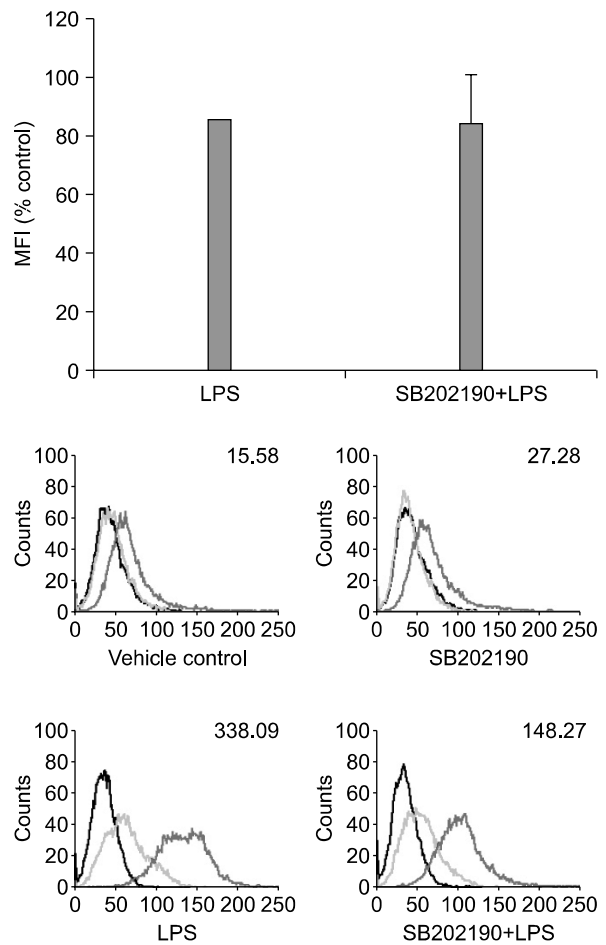


Figure 6. p38 MAPK pathway is involved in up-regulation of PD-L1 by LPS. RAW 264.7 cells were pretreated with SB202190 (10 μ M) for 2 hrs and then stimulated with LPS for 24 hrs. Surface expressions of PD-L1 were measured by flow cytometry and expressed via MFI. Cell viability by MTT assay: >90% of vehicle control.

cell이 면역체계를 피해서 증식하는 기전에도 PD-L1 발현이 중요함을 시사하고 있다¹⁵.

PD-L1은 Activated macrophages 및 B lymphocytes, dendritic cells, activated T cells 등 여러 APC에서 발현되며, 특히 IFN- γ stimulation은 endothelial cell이나 tumor cell 같은 non-lymphoid tissue에서도 PD-L1의 발현을 증가시키는 것이 잘 알려져 있다. LPS stimulation에 의해서는 non-lymphoid tissue에서 발현이 증가된 경우는 없었고 dendritic cell에서도 LPS자극이 PD-L1의 발현을 증가시키지 않는다. 그러나 macrophage에서는 LPS에 의하여 발현이 증가한다는 몇몇 보고가 알려져 있다.

Yamazaki 등¹⁶은 PD-L1이 macrophage와 B cell에서

LPS 자극에 의하여 발현이 증가한다는 발표를 하였으며, 이후 mouse peritoneal macrophage에서 LPS 자극에 의해 PD-L1의 발현이 증가하는 것이 TLR4의 downstream effect라는 것을 주장한 실험 결과가 보고되기도 하였다¹⁷. 따라서 PD-L1과 PD-1의 상호 작용이 패혈증에서 나타나는 immune suppression의 한 기전일 가능성을 유추해 볼 수 있다. 그러나 실제 macrophage에서 LPS 자극 시에 PD-L1의 발현이 증가하는 것에 TLR4의 어떤 downstream pathway에 의한 것인지는 알려져 있지 않아 본 연구를 진행하였다.

패혈증에 대한 개념이 바뀌어, 면역 억제 반응이 패혈증 후기에는 더 중요하다는 사실이 밝혀지게 되었고, PD-L1이 이런 면역 억제 반응에 관여할 수 있음을 보여주었고, PD-L1이 패혈증이 지속되는 현상을 이해하는데 중요한 열쇠가 될 수 있음을 시사하고 있다. 패혈증에서 LPS로 시작된 염증 신호 전달 체계는 TLR4를 거쳐서 이하 downstream pathway에 전달이 된다. 이러한 downstream pathway에는 PI3K/Akt, ERK, p38 MAPK 등 여러 신호 경로가 관여함이 알려져 있고¹⁸, 이러한 신호 경로 사이에는 서로 crosstalk이 일어난다는 보고도 있는 실정이다. 이에 본 연구에서는 PI3K/Akt, ERK 및 p38 MAPK 경로가 LPS 자극에 의한 PD-L1 증가에 관여하는지에 초점을 맞추어 연구를 시행하였다.

PI3K/Akt 경로가 PD-L1 증가에 직접적으로 관여하는지에 대한 연구 결과는 많지 않은 실정이다. Dermal fibroblast cell을 이용하여 IFN-gamma를 처리한 경우 PD-L1 발현의 증가를 관찰하였다는 보고가 있었고¹⁹, 이때 PI3K의 일시적인 인산화가 관찰되어서 이러한 PI3K/Akt pathway의 활성화가 PD-L1 발현 증가에 관여할 가능성을 시사하였다. 그렇지만, 실제 PI3K pathway를 block하는 방법 등을 이용하여 직접적으로 PI3K/Akt pathway가 관여하는지를 입증하지는 않았다. 본 연구에서는 PI3K/Akt pathway의 chemical inhibitor를 전처리하였을 때 LPS에 의한 PD-L1 발현 증가가 억제됨을 보여, PI3K/Akt pathway가 직접적으로 관여함을 보여주었다.

한편 기존에 ERK 경로와 PD-L1과의 연관성에 대한 연구들은 주로 PD-L1을 억제하였을 때 나타나는 현상 중의 하나로서 ERK pathway에 변화가 나타난다는데 초점이 맞추어져 있었고^{20,21}, 반대로 ERK pathway에 의해 PD-L1 발현이 어떤 영향을 받는지에 대한 연구 결과는 거의 없는 실정이다. 본 연구에서는 ERK pathway에 대한 chemical inhibitor인 U0126을 처리한 뒤 PD-L1 expression을 평가

하여, ERK pathway는 LPS에 의한 PD-L1 발현 증가에 직접적인 영향을 미치지 않는 것을 보여주었다. 그렇지만, p38 MAPK에 대해서는 chemical inhibitor인 SB202190 전처리에 의하여 LPS에 의한 PD-L1 발현 증가가 억제됨을 보여, PI3K/Akt pathway와 마찬가지로 p38 MAPK pathway가 직접적으로 관여할 수 있음을 밝혔다.

결론적으로 mouse macrophage cell line을 이용하여 LPS 자극시 세포 표면의 PD-L1 발현 증가가 일어나고, 이러한 기전에는 TLR4가 관여하며 downstream pathway 중 PI3K/Akt 경로 및 p38 MAPK 경로가 관여함을 확인할 수 있었다.

참 고 문 헌

1. Angus DC, Linde-Zwirble WT, Lidicker J, Clermont G, Carcillo J, Pinsky MR. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-10.
2. Bone RC, Fisher CJ Jr, Clemmer TP, Slotman GJ, Metz CA, Balk RA. A controlled clinical trial of high-dose methylprednisolone in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 1987;317:653-8.
3. Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med* 1996;24:1125-8.
4. Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003;348:138-50.
5. Okazaki T, Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol* 2006;27:195-201.
6. Iwai Y, Terawaki S, Ikegawa M, Okazaki T, Honjo T. PD-1 inhibits antiviral immunity at the effector phase in the liver. *J Exp Med* 2003;198:39-50.
7. Liang SC, Latchman YE, Buhlmann JE, Tomczak MF, Horwitz BH, Freeman GJ, et al. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur J Immunol* 2003;33:2706-16.
8. Wiendl H, Mitsdoerffer M, Schneider D, Chen L, Lochmuller H, Melms A, et al. Human muscle cells express a B7-related molecule, B7-H1, with strong negative immune regulatory potential: a novel mechanism of counterbalancing the immune attack in idiopathic inflammatory myopathies. *FASEB J* 2003;17:1892-4.
9. Sharpe AH, Wherry EJ, Ahmed R, Freeman GJ. The function of programmed cell death 1 and its ligands in regulating autoimmunity and infection. *Nat Immunol* 2007;8:239-45.
10. Nishimura H, Minato N, Nakano T, Honjo T. Immunological studies on PD-1 deficient mice: implication of

- PD-1 as a negative regulator for B cell responses. *Int Immunol* 1998;10:1563-72.
11. Nishimura H, Nose M, Hiai H, Minato N, Honjo T. Development of lupus-like autoimmune diseases by disruption of the PD-1 gene encoding an ITIM motif-carrying immunoreceptor. *Immunity* 1999;11:141-51.
 12. Ansari MJ, Salama AD, Chitnis T, Smith RN, Yagita H, Akiba H, et al. The programmed death-1 (PD-1) pathway regulates autoimmune diabetes in nonobese diabetic (NOD) mice. *J Exp Med* 2003;198:63-9.
 13. Guleria I, Khosroshahi A, Ansari MJ, Habicht A, Azuma M, Yagita H, et al. A critical role for the programmed death ligand 1 in fetomaternal tolerance. *J Exp Med* 2005;202:231-7.
 14. Thompson RH, Gillett MD, Cheville JC, Lohse CM, Dong H, Webster WS, et al. Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients: indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101:17174-9.
 15. Ohigashi Y, Sho M, Yamada Y, Tsurui Y, Hamada K, Ikeda N, et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2005;11:2947-53.
 16. Yamazaki T, Akiba H, Iwai H, Matsuda H, Aoki M, Tanno Y, et al. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J Immunol* 2002;169:5538-45.
 17. Loke P, Allison JP. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:5336-41.
 18. Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet* 2005;365:63-78.
 19. Lee SK, Seo SH, Kim BS, Kim CD, Lee JH, Kang JS, et al. IFN-gamma regulates the expression of B7-H1 in dermal fibroblast cells. *J Dermatol Sci* 2005;40:95-103.
 20. Keir ME, Latchman YE, Freeman GJ, Sharpe AH. Programmed death-1 (PD-1):PD-ligand 1 interactions inhibit TCR-mediated positive selection of thymocytes. *J Immunol* 2005;175:7372-9.
 21. Saunders PA, Hendrycks VR, Lidinsky WA, Woods ML. PD-L2:PD-1 involvement in T cell proliferation, cytokine production, and integrin-mediated adhesion. *Eur J Immunol* 2005;35:3561-9.