

Huh7.5 간암 세포주의 HCV 항원제시에 의한 HCV 특이 T 림프구의 활성화에 관한 연구

조효선

덕성여자대학교 약학대학 약학과

The Activation of HCV-specific CD8 T Cells by HCV Peptide Pulsed Huh7.5 Cells

Hyosun Cho

Department of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Republic of Korea

(Received November 15, 2011 / Accepted December 10, 2011)

T cells play a key role in viral infection. However, in patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection, HCV-specific T cells are dysfunctional and impaired in the liver, which is the primary site for HCV replication. There are multiple potential mechanisms for HCV-specific T cell dysfunction including induction of immune inhibitory pathways (program death-1; PD-1, cytotoxic t lymphocyte associated antigen-4; CTLA-4) and immune tolerance induced specific for the liver. However, the interaction between hepatocytes and HCV-specific CD8 T cells has not clearly established. In this study, we confirmed huh (human hepatoma) 7.5 cells expressing HLA (human leukocyte antigen) A2 presented antigen to activate HCV-specific CD8 T cells in HLA A2-restricted manner and expression of PD-L (program death ligand) 1 on huh7.5 cells reduced HCV-specific CD8 T cell activation, suggesting an immune modulatory activity. Loss of HCV-specific tetramer responses following antigenic stimulation correlated with increased caspase-3 activity. In addition, PD-L1 on huh7.5 cells rescued HCV-specific CD8 T cells from apoptosis. Our results suggest that the interaction between PD-L1 and PD-1 can recover the function of HCV-specific CD8 T cells in the liver, which could be applied in therapy of HCV chronic infection.

Keywords: hepatitis C virus (HCV), HCV-specific T cells, hepatoma cell line 7.5 (huh7.5), PD-L1

C형 간염 바이러스(hepatitis C virus, HCV)는 지놈길이 9.6 kb의 RNA바이러스로 인체에 감염시 간세포 표면에 발현 되는 CD81, SR-B1, claudin-1, occludin 등의 수용체를 통해 만성 간염 및 간경화와 간암을 일으키는 것으로 알려져 있다(12). 항 HCV치료제로는 인테페론(interferon)- α , 리바비린(ribavirin) 등이 알려져 있으나 바이러스의 strain마다 치료효과가 다양하며 항 HCV백신은 아직 개발되지 않았다(15).

T 림프구는 바이러스에 감염된 세포 사멸이나 항바이러스 항체를 생성하는 데 중요한 역할을 한다. 그러나 C형 간염이 만성적으로 진행된 환자의 혈액에는 HCV특이적 T 림프구가 거의 존재하지 않으며 있다 하더라도 그 기능이 결핍되어 있는 것으로 알려져 있다. 이러한 HCV 특이 T 림프구의 기능 결핍은 바이러스가 복제되는 장소인 간(liver)에서 더욱 심각

하며, T 림프구 기능결핍의 기전에는 여러 가설이 있으나 대표적으로 PD-1 (program death-1), CTLA-4 (cytotoxic t lymphocyte associated antigen-4), FoxP3+, IL10+Tr1 등의 면역억제 물질 유도 그리고 간 특이적 면역내성(immune tolerance) 유도 등이 보고되었다(6, 13, 19).

일반적으로 T 림프구 활성화의 신호체계는 T 림프구 표면 수용체(T cell receptor; TCR)와 펩타이드 주조직 적합성 복합체(peptide/MHC)의 상호작용으로 첫번째 신호, 그리고 CD28, 촉진자극신호(costimulatory signal)를 매개로 하는 두번째 신호로 구성된다. 두번째 신호체계를 구성하는 CD28은 T 림프구 활성을 촉진하는 반면 PD-1과 CTLA-4는 T 림프구 활성을 억제한다(16).

PD-L1과 PD-L2는 PD-1의 리간드(ligand)로 PD-L2의 경우, 간을 포함한 비면역기관에서는 거의 발현되지 않으나 PD-L1은 수지상세포, 대식세포, T 림프구 등 면역, 비면역기관에서 광범위하게 발현된다. 특히 PD-L1은 간의 다양한 세

* For correspondence. E-mail: hyosun1102@gmail.com; Tel.: +82-2-901-8678; Fax: +82-2-901-8386

포들(liver sinusoidal endothelial cells, Kupffer cells, hepatocytes)에 의하여 발현되며 T 림프구의 항바이러스작용을 조절하는 것으로 알려져 있다(4, 5, 7).

만성 C형 간염 환자들의 혈액에서 분리되는 HCV 특이 CD8 T 림프구 기능(증식, IFN- γ /TNF- α 분비)이 결핍되어 있을수록 PD-1이 높게 발현되고 있음이 밝혀졌으며, HCV의 복제가 직접 일어나는 간에서 분리되는 HCV 특이 CD8 T 림프구의 기능결핍은 혈액에서 분리되는 T 림프구에 비해 훨씬 더 심화되어 있으며 PD-1발현도 더 높게 나타나는 것으로 알려져 있다(14). HCV의 표적세포인 간세포에 대한 연구는 오랜 기간 동안 많은 문제점으로 인해 어려움을 겪어왔다. 첫째, 인체 내 간세포를 직접 분리하여 실험적으로 배양하는 것이 거의 불가능하며, 둘째, RNA형 바이러스인 HCV에 대한 복제 시스템(replication system)을 확립하지 못했기 때문이었다(10). 하지만 최근 간세포에서 분화된 간암세포주(human hepatoma cells; huh cell line)를 간세포 모델로 도입하여 HCV 복제 시스템을 실험적으로 구축함으로써 간암 세포주(human hepatoma 7.5 cells)와 HCV 특이 T 림프구와의 상호작용에 대한 연구가 가능하게 되었다(2). 따라서 본 연구에서는 간암세포주가 HCV항원을 표면에 발현, 항원제시세포로의 가능성을 확인함과 동시에 HCV 특이 T 림프구를 활성화 할 수 있는지, 그리고 간암세포주의 표면에 PD-L1을 발현시 HCV 특이 T 림프구의 활성화에 어떠한 영향이 있는지 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

세포주(cell line) 및 lentiviral 벡터

Huh7.5 hepatoma cell line 인체 간암 세포주는 Charles M. Rice 박사(The Rockefeller University)로부터 제공 받아 10% fetal bovine serum을 함유한 DMEM을 사용하여 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다(11). HLA A2와 PD-L1을 발현하는 lentiviral 벡터는 James Riley 박사(The University of Pennsylvania)로부터 제공 받았다(18).

대상환자 선별 및 HCV특이 T 림프구 분리

필라델피아 보훈병원(Philadelphia Veterans Affairs Medical Center)과 펜실베이니아 대학병원(Hospital of the University of Pennsylvania)에서 과거 HCV감염이 있었으나 자연적으로 회복한 환자(HCV-seropositive but RNA-negative patients)들이 모집되었다. 이들 중 HLA A2 양성으로 혈액 중 HCV NS3 항원결정기(epitope)에 반응하는 HCV 특이 CD8 T 림프구의 양이 많은 대상이 선별되었으며, 환자로부터의 샘플 채취는 필라델피아 보훈병원 IRB (institutional review boards)에 의해 승인된 프로토콜에 따라 이루어졌다.

HCV NS3 펩타이드(peptide) 및 HLA A2 tetramers

T 림프구 활성을 일으키기 위한 HLA A2+형 펩타이드와, HCV 특이 CD8 T 림프구를 정량적으로 확인하기 위한 tetramer [HCV NS3 1406 (KLVALGINAV)]는 실험실에서 자체 합성

하였다(13, 14).

유세포 분광기(flow cytometry) 사용 및 형광 항체(fluorescent antibodies)

분석하고자 하는 간암세포주(huh7.5)와 환자의 혈액에서 분리된 T 림프구를 각각의 형광항체로 염색하여 형광세기의 정도를 FACS Canto (Becton Dickinson, USA)로 측정하고 FlowJo (Tree Star Inc, USA)를 이용하여 데이터를 분석하였다. 모든 형광항체(monoclonal antibodies; FITC anti-HLA A2, PE-cy7 anti-PD-L1, APC anti-NS31406 tetramer)는 BD Bioscience (USA)로부터, Capsase-3 Detection Kit은 QIAGEN (USA)으로부터 구입하였다.

T 림프구 단기세포배양에서 HCV 특이성 IFN- γ , TNF- α 생성 측정 및 분석

HLA A2 +/- 간암세포주(huh7.5)의 PD-L1발현 여부를 유세포분광기(flow cytometry)로 확인후 HCV NS3 1406 peptide 과 함께 배양하였다. 24시간 후, 세포주를 PBS (phosphate buffered saline)로 세 번이상 세척하여 peptide의 잔유물을 완전히 제거한 다음 HLA A2+ C형 간염 회복 환자로부터 분리한 T 림프구와 세포내 단백질 분비과정을 억제하는brefeldin A을 넣어 혼합배양하였다(13, 14). 6시간 후, T 림프구에서 생성, brefeldin A에 의해 세포내 축적된 IFN- γ 와 TNF- α 를 유세포 분광기(flow cytometry)를 이용한 intracellular cytokine staining으로 측정 분석했다.

결과

간암세포주(huh7.5)에서의 안정적인 HLA A2, PD-L1의 발현 확립

간암세포주(huh7.5 cells)는 일반적으로 HLA A11형으로 알려져 있다. 따라서, HLA A2형 환자로부터의 분리된 HCV 특이 T 림프구에 대한 반응이 미미할 것으로 판단하여 본 연구에서는 lentiviral 벡터를 이용하여 간암세포주에 HLA A2의 발현을 유도하였다. 그림1A은 HLA A2발현을 유도하는 lentivirus의 도입후 간암세포주의 HLA A2 발현이 월등히 증가하였음을 보여준다. 마찬가지로 PD-L1도 lentiviral 벡터를 이용하여 간암세포주 표면에 발현시켰다(그림 1B). 또한 HLA A2와 PD-L1의 지속적인 높은 발현 정도는 각각의 발현에 영향없이 반영구적인 상태임을 확인하였다.

간암세포주(huh7.5)에 의한 HCV 특이 CD8 T 림프구의 활성화와 PD-L1 발현이 미치는 영향

HCV peptide를 받아들인 항원제시세포(antigen presenting cells), 즉 간암세포주(huh7.5)가 HCV에 특이적으로 반응하는 T 림프구를 활성화 시켜 IFN- γ 와 TNF- α 를 생성할 수 있는지 살펴보기 위해 간암세포주(huh7.5 cells)에 HCV NS3 1406 peptide를 가하여 24시간 동안 배양 후 PBS로 펩타이드의 잔유물을 완전히 제거, C형 간염 회복 환자 혈액에서 분리된

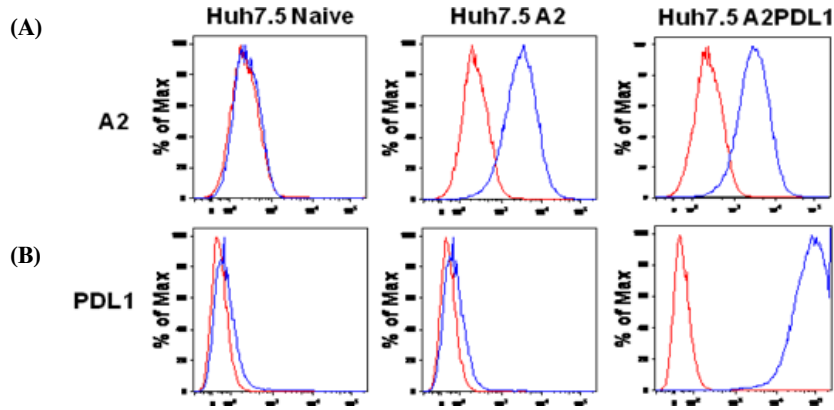


Fig. 1. Stable expression of HLA A2+ or PD-L1 in huh7.5 cells after transduction using lentiviral vector. Human hepatoma cells (huh7.5) are infected with lentiviral vector expressing HLA A2 or PD-L1 (program death ligand 1). The expression of HLA A2+ (A, middle, blue) or PD-L1 (B, right, blue) on huh7.5 cells are measured by Flow cytometry among three different cell lines (huh7.5, HLA A2+ huh7.5, HLA A2+ PD-L1 huh7.5) made in this experiments.

HCV 특이 T 림프구, 그리고 brefeldin A을 넣어 6시간 동안 혼합배양 후 세포 내 축적되는 IFN- γ 와 TNF- α 를 측정하였다. Fig. 2A에서 보는 바와 같이 HLA A2 발현없이(Naïve huh7.5) HCV peptide의 항원제시도 받지 못한 경우(왼쪽 위), IFN- γ (0.12%)와 TNF- α (0.95%) 모두 생성이 미미함을 알 수 있다. 하지만 HLA A2+ 간암세포주에 의해 HCV peptide 항원제시를 받은 T 림프구의 경우(오른쪽 아래) IFN- γ 와 TNF- α 의 발현정도(IFN- γ : 3.27%, TNF- α : 12.86%)가 항원제시를 받지 않은 경우(왼쪽 아래; IFN- γ : 0.27%, TNF- α : 3.39%)에 비해 훨씬 높음을 알 수 있다. 흥미롭게도 간암세포주가 표면에 PD-L1을 발현하고 있는 경우(Fig. 2B, 오른쪽 아래)에는 IFN- γ (1.05%)와 TNF- α (4.15%) 모두 크게 감소됨을 볼 수 있다. 일반적으로 brefeldin A의 처리시간은 1-6시간으로 다양하나 본 실험

에서는 6시간 처리하였으며 brefeldin A의 세포독성에 대한 영향은 없음을 실험군과 대조군의 비교로 확인하였다.

간암세포주(huh7.5)에 의한 HCV 특이 CD8 tetramer 반응

간암세포주(huh7.5)에 HCV NS3 1406 peptide를 가하여 24시간 동안 배양시킨 후 PBS로 펩타이드의 잔유물을 완전히 제거한 후 HLA A2+ 환자의 혈액에서 분리된 T 림프구를 넣어 혼합 배양하였다. Fig. 3A는 간암세포주(huh7.5) 없이 HCV 특이 T 림프구를 단독 배양한 경우로 T 림프구와 섞여있는 소량의 B림프구 또는 단구세포(monocyte)가 항원제시세포로 작용하여 4개의 분자로 구성된 HCV NS3 tetramer에 특이적으로 반응하는 T 림프구의 발현을 볼 수 있다. Fig. 3B에서는 간암세포주(huh7.5)와 HCV 특이 T 림프구를 혼합 배양한 경

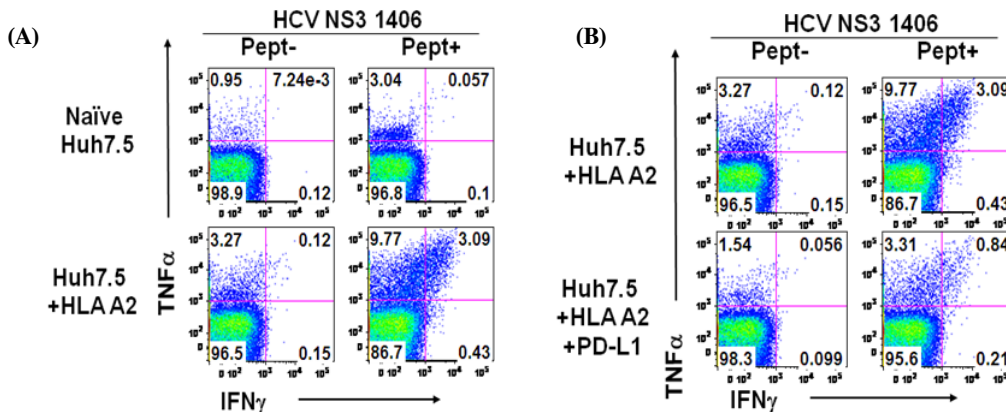


Fig. 2. HCV-specific T cell IFN- γ and TNF- α expression upon antigenic stimulation by huh7.5 cells. (A) HLA A2- or HLA A2+ huh7.5 cells are stimulated with HCV NS3 1406 peptide. Peripheral lymphocytes from HLA A2+ subjects (recovered HCV patients) are added in presence of BFA (brefeldin A) and subsequently cocultured for 6h. The expression of IFN- γ and TNF- α are measured by intracellular cytokine staining using flow cytometry. (B) HLA A2+ huh7.5 cells with or without PD-L1 expression are pulsed with HCV NS3 1406 peptide. Peripheral lymphocytes from HLA A2+ subjects are added and the expression of IFN- γ and TNF- α are measured in the same way.

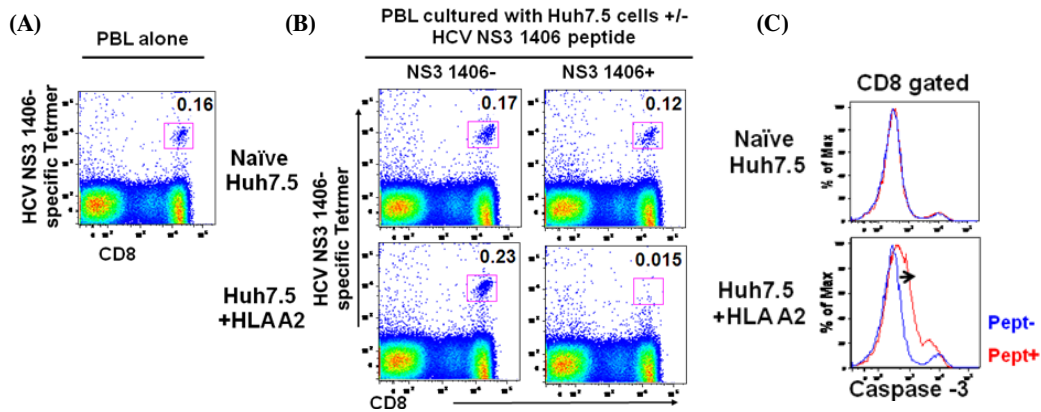


Fig. 3. Loss of specific CD8 T cell tetramer response in co-culture with HLA A2+ huh7.5 cells pulsed with cognate peptide and correlation with increased caspase-3 activity. Huh7.5 cells are stimulated with HCV NS3 1406 peptide for 24 h. Peripheral lymphocytes from HLA A2+ subjects (recovered HCV patients) are added (B) or cultured alone (A) and HLA A2/peptide tetramer responses are measured after 6 h by flow cytometry to detect CD8 T cells specific for HLA A2-restricted HCV NS3 epitope. Caspase-3 activity (C) is also measured by flow cytometry (pept+/-; with or without peptide).

우로 HLA A2를 발현하지 않는 간암세포주는 예상한 바와 같이 HCV peptide 항원제시와 유무와 상관없이 비슷한 빈도의 tetramer반응(NS3 1406-: 0.17%, NS3 1406+: 0.12%)을 보이고 있는 반면, HLA A2+ 간암세포주(huh7.5)에 의해 HCV peptide 항원제시를 받은 T 림프구의 경우 HCV tetramer 반응을 보이는 빈도가 훨씬 감소함을 볼 수 있다(NS3 1406-: 0.23%, NS3 1406+: 0.015%). 이는 이미 환자 체내에서 HCV 감염으로 인한 항원제시에 의해 활성화 되었던 T 림프구가 간암세포주(huh7.5)에 의한 재차 항원제시를 받음으로써 과도한 활성화에 의해 자기살해(apoptosis)의 과정을 겪고 있을 수도 있다고 예상하였다. 따라서 T 림프구의 자기살해(apoptosis) 경로 중 중요한 인자로 작용하는 caspase 3의 활성화 정도를 함께

측정하였다. 그림 3C에서 보는 바와 같이 HCV tetramer반응이 감소함과 동시에 caspase 3의 활성이 증가됨을 알 수 있다. 흥미롭게도 PD-L1을 발현하고 있는 간암세포주(huh7.5)에 의해 HCV peptide 항원제시를 받은 경우 caspase 3의 활성이 감소하였다(그림 4).

고찰

C형 간염을 연구하기 위한 동물 또는 세포주 모델의 개발은 지난 수십 년 동안의 과제였다. 유일한 동물모델로 침팬지가 있지만 여러 복잡한 이유로 연구모델로서의 접근이 쉽지 않다(3). 이러한 연구환경은 C형 간염 바이러스에 대한 분자적 규명뿐만 아니라 인체 감염시 일어나는 병리학적, 면역학적 현상에 대한 고찰을 더디게 했다. 더욱이, HCV의 일차적인 표적세포가 간세포임에도 불구하고 인체의 간에서 분리된 간세포를 배양, 또는 간암세포주에 환자로부터 분리된 HCV를 가하여 감염을 유도하는 것은 거의 불가능하였다(10). 그럼에도 불구하고 최근 몇년간 HCV연구는 큰 전환점을 맞게 되었다. HCV 복제가 가능한 간암세포주(human hepatic huh-7 cell line)의 발견이었다. 이들 중 특히 huh 7.5 line은 IFN발현과 밀접하게 관련있는 RIG-I 부위에 결함(point mutation)을 유도하여 세포배양액에 훨씬 높은 HCV 복제율을 유지할 수 있게 되었다(2, 11). 따라서 본 연구에서는 만성 C형 간염의 표적세포인 간세포의 항원제시(antigen presentation) 가능성을 인체 간암세포주(huh7.5 cells)와 C형 간염 회복환자에서 분리된 HCV특이 T 림프구를 이용하여 살펴보았다. 첫번째로, HCV NS3 1406 peptide를 간암세포주(huh7.5)에 항원으로 가하고 일정한 시간이 지난 뒤 간암세포주(huh7.5)의 항원제시로 HCV 특이 T 림프구가 활성화 되는 것을 IFN- γ 와 TNF- α 의 생성으로 확인하였다. 이와 같은 결과는 HCV replicons를 가한 huh7 또는 huh7.5 cells이 HCV 특이 T 림프구를 자극

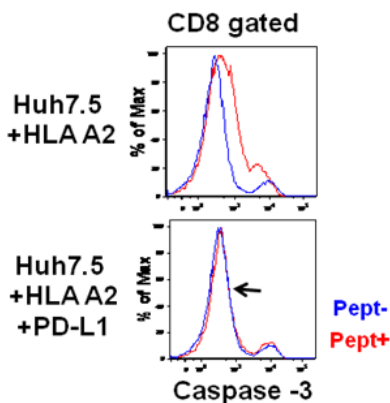


Fig. 4. Reduction in CD8 T cell apoptosis in presence of PD-L1 on huh7.5 cells. HLA A2+ huh7.5 cells with or without PD-L1 expression are stimulated with HCV NS3 1406 peptide. Peripheral lymphocytes from HLA A2+ subjects (recovered HCV patients) are added and caspase-3 activity is measured after 6 h by flow cytometry (pept+/-; with or without peptide).

하여 IFN- γ 를 생성시킨다는 최근 몇몇 연구그룹에서 발표한 내용과 일치한다(9, 17). 즉, 간세포(hepatocytes)가 효과적인 항원제시세포(effective antigen presenting cells)가 될 수 있음을 시사한다.

PD-1은 면역내성(immune tolerance)과 조절에서 중요한 역할을 하는 억제보조수용체(inhibitory co-stimulatory receptor)로 PD-1과 PD-L1의 반응은 면역반응을 억제하는 방향으로 작용한다. 급만성 바이러스 감염에서 항원특이성 CD8 T 림프구의 기능결핍과 PD-1의 지속적 발현은 깊은 상관관계를 보여왔다(5, 6). HCV 감염에서 CD8 T 림프구의 역할과 HCV 복제의 인체 표적장기가 간세포임을 고려할 때 항바이러스 CD8 T 림프구에서의 PD-1:PD-L1 발현은 C형 간염회복에서 중요한 의미를 가진다.

만성 C형 간염 환자에서 분리되는 HCV 특이 CD8 T 림프구는 기능적으로 결핍되어 IFN- γ , TNF- α 와 같은 항바이러스 싸이토카인을 제대로 분비하지 못하는 반면 두드러진 PD-1의 발현으로 T 림프구의 기능억제와 PD-1의 밀접한 관계가 있음이 보고되었다(13). 본 연구에서도 간암세포주 표면에 PD-L1을 발현시켜 T 림프구와 반응시킨 경우 T 림프구에서 생성되는 IFN- γ 와 TNF- α 가 현저히 줄어듦을 관찰하였다. 즉, PD-1과 PD-L1의 반응이 면역조절인자(immune modulatory activity)로 작용하고 있음을 시사한다.

본 연구에서는 HCV 특이성 T 림프구의 활성을 측정할 수 있는 또 다른 방법인 HCV 특이성 tetramer 반응을 살펴보았다. Tetramer 반응이란 특정 항원 펩타이드를 4개의 분자(tetramer)로 구성하여 형광물질을 부착한 후 T 림프구와 반응시켜 특정항원을 인식하여 결합하는 특이 T 림프구를 유세포분광기로 정량적으로 측정하는 것이다. 일반적으로 T 림프구의 활성이 강할수록 tetramer 반응 또한 강하게 나타나나 peptide로 전 처리된 HLA A2 간암세포주(huh7.5)와 혼합 배양한 T 림프구의 경우 반복된 항원제시로 인하여 T 림프구 활성고갈 상태가 되어 HCV 특이 tetramer 반응이 감소하였다. 또한, tetramer 반응의 감소와 T 림프구 자기사멸(apoptosis)의 표지인 caspase-3활성이 밀접한 상관관계가 있음을 밝혔다. 이러한 결과는 최근 몇몇 연구에서 제시된 간세포가 CD8 T 림프구의 사멸을 매개할 수 있다는 보고와 일치한다(1, 8, 20). 즉, 간세포를 CD8 T 림프구에 대한 항원전달세포로 사용했을 때 간세포에 의해 활성화된 CD8 T 림프구는 증식, 효과적인 살해기능(Cytotoxic activity)을 획득하지만 72시간 안에 사멸한다는 내용이다. 이러한 CD8 T 림프구의 사멸을 IL-2나 다른 기관의 면역세포와의 혼합배양으로 막을 수 있는 것으로 볼 때 간세포가 직접적으로 CD8 T 림프구를 사멸시키기 보다는 어떤 환경적인 인자들이 관련되어 있음을 시사한다. 흥미롭게도 본 연구에서는 이러한 T 림프구의 사멸이 간암세포주의 표면에 PD-L1을 유도함으로써 구제될 수 있음을 확인하였다. 만성 C형 간염시 간에서 관찰되는 HCV 특이 T 림프구는 높은 PD-1의 발현과 더불어 나타나는 기능고갈로 대부분 간세포를 침입한 HCV를 방어하지 못한 채 대량의 자기사멸 과정을 겪게 된다. 하지만 PD-L1을 임상면역요법으로 도입하

여 T 림프구의 기능을 회복하고 또한 자기사멸을 억제할 수 있다면 만성 C형 간염 회복에 획기적인 계기를 마련할 수 있을 것이다. 다음단계의 연구는 HCV 복제시스템이 구축된 간암세포주(huh7.5)를 이용하여 실질적인 바이러스의 감염에 의한 T 림프구의 활성여부를 확인하는 것이 될 것이다.

적요

인체의 바이러스 감염 방어기전에서 T 림프구는 중요한 역할을 한다. 하지만, 만성 C형 간염 바이러스의 일차적 복제장소인 간염 환자의 간에서 분리된 HCV 특이 T 림프구는 심각한 기능결핍을 보인다. 이러한 T 림프구 기능결핍의 이유로는 PD-1, CTLA-4 등 면역억제 물질의 발현, 또는 간에서 특이적으로 유도되는 면역내성(immune tolerance)이 있으나, 간세포(hepatocytes)와 HCV 특이 T 림프구의 상호작용에 대해서는 명확하게 확립되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 HLA (human leukocyte antigen) A2+ 간암세포주(human hepatoma cell line; huh7.5)가 항원제시(antigen presentation)를 통해 효과적으로 HCV 특이 T 림프구를 활성화시키며 간암세포주(huh7.5) 표면의 PD-L (program death ligand) 1 발현은 T 림프구의 활성을 감소시켜 면역조절의 가능성이 있음을 시사하였다. 또한, HCV 특이 tetramer 반응은 T 림프구의 과도한 활성으로 자기사멸(apoptosis)의 경로에 있음을 caspase 3 활성으로 확인하였고, 역시 PD-L1의 발현이 T 림프구를 자기사멸(apoptosis)로부터 구제하여 caspase 3 활성이 감소하는 것을 확인하였다. 이는 PD-L1과 간성(liver) T 림프구 표면의 PD-1 결합이 T 림프구의 자기사멸을 막고, 또한 그 기능을 회복시켜 만성 C형 간염 치료에 응용될 수 있음을 시사한다.

감사의 말

간암세포주 huh7.5를 제공해 주신 Charles M. Rice 박사(The Rockefeller University, USA) 및 HLA A2, PD-L1을 발현하는 lentiviral 벡터를 제공해 주신 James L. Riley 박사(University of Pennsylvania)께 감사드립니다. 또한 HCV peptide와 tetramer를 제공해 주시고 전반적인 연구계획에 도움을 주신 Kyong-Mi Chang (University of Pennsylvania)께도 감사의 말씀을 전한다.

참고문헌

- Bertolino, P., G.W. McCaughan, and D.G. Bowen. 2002. Role of primary intrahepatic T-cell activation in the 'liver tolerance effect'. *Immunol. Cell. Biol.* 80, 84-92.
- Binder, M., G. Kochs, R. Bartenschlager, and V. Lohmann. 2007. Hepatitis C virus escape from the interferon regulatory factor 3 pathway by a passive and active evasion strategy. *Hepatology* 46, 1365-1374.
- Chayama, K., C.N. Hayes, N. Hiraga, H. Abe, M. Tsuge, and M. Imamura. 2011. Animal model for study of human hepatitis viruses. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26, 13-18.

4. Freeman, G.J., A.J. Long, and Y. Iwai. 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J. Exp. Med.* 192, 1027-1034.
5. Freeman, G.J., E.J. Wherry, R. Ahmed, and A.H. Sharpe. 2006. Reinvigorating exhausted HIV-specific T cells via PD-1-PD-1 ligand blockade. *J. Exp. Med.* 203, 2223-2227.
6. Golden-Mason, L., B. Palmer, J. Klarquist, J.A. Mengshol, and N. Castelblanco. 2007. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8+ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J. Virol.* 81, 9249-9258.
7. Greenwald, R.J., G.J. Freeman, and A.H. Sharpe. 2005. The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 515-548.
8. Holz, L.E., A. Warren, D.G. Le Couteur, D.G. Bowen, and P. Bertolino. 2010. CD8+ T cell tolerance following antigen recognition on hepatocytes. *J. Autoimmun.* 34, 15-22.
9. Jo, J., U. Aichele, N. Kersting, R. Klein, P. Aichele, E. Bisse, A.K. Sewell, H.E. Blum, R. Bartenschlager, V. Lohmann, and R. Thimme. 2009. Analysis of CD8+ T-cell-mediated inhibition of hepatitis C virus replication using a novel immunological model. *Gastroenterology* 136, 1391-1401.
10. Jo, J., V. Lohmann, R. Bartenschlager, and R. Thimme. 2011. Experimental models to study the immunobiology of hepatitis C virus. *J. Gen. Virol.* 92, 477-493.
11. Keril, J.B., A.J. McKeating, and M.C. Rice, 2002. Highly permissive cell lines for subgenomic and genomic hepatitis C virus RNA replication. *J. Virol.* 76, 13001-13014.
12. Lauer, G.M. and B.D. Walker. 2001. Hepatitis C virus infection. *New Engl. J. Med.* 345, 41-52.
13. Nakamoto, N., D.E. Kaplan, J. Coleclough, Y. Li, M.E. Valiga, and K.M. Chang. 2008. Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology* 134, 1927-1937.
14. Nakamoto, N., H. Cho, A. Shaked, K. Olthoff, M.E. Valiga, M. Kaminski, E. Gostick, D.A. Price, G.J. Freeman, E.J. Wherry, and K.M. Chang. 2009. Synergistic reversal of intrahepatic HCV-specific CD8 T cell exhaustion by combined PD-1/CTLA-4 blockade. *PLoS Pathog.* 5, e1000313.
15. Pagliaro, L., A. Craxi, C. Cammaa, F. Tine, V. di Marco, L. Iacono, and P. Almasio. 1994. Interferon-alpha for chronic hepatitis C: an analysis of pretreatment clinical predictors of response. *Hepatology* 19, 820-828.
16. Salomon, B. and J.A. Bluestone. 2001. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu. Rev. Immunol.* 19, 225-252.
17. Uebelhoer, L., J.H. Han, B. Callendret, G. Mateu, N.H. Shoukry, H.L. Hanson, C.M. Rice, C.M. Walker, and A. Grakoui. 2008. Stable cytotoxic T cell escape mutation in hepatitis C virus is linked to maintenance of viral fitness. *PLoS Pathog.* 4, e1000143.
18. Varela-Rohena, A., C. Carpenito, E.E. Perez, M. Richardson, R.V. Parry, M. Milone, J. Scholler, X. Hao, A. Mexas, R.G. Carroll, C.H. June, and J.L. Riley. 2008. Genetic engineering of T cells for adoptive immunotherapy. *Immunol. Res.* 42, 166-181.
19. Wherry, E.J. and R. Ahmed. 2004. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J. Virol.* 8, 5535-5545.
20. Willberg, C., E. Barnes, and P. Klenerman. 2003. HCV immunology-death and the maiden T cell. *Cell. Death Differ.* 10, S39-47.