



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](#)

의학석사 학위논문

한국인 재생불량성빈혈과 *FoxP3*
유전자 다형성의 연관성

2016년 2월

서울대학교 대학원
의학과 검사의학 전공
인 지 원

한국인 재생불량성빈혈과 *FoxP3* 유전자 다형성의 연관성

지도 교수 송은영

이 논문을 의학석사 학위논문으로 제출함

2015년 11월

서울대학교 대학원

의학과 검사의학 전공

인 지 원

인지원의 의학석사 학위논문을 인준함

2015년 12월

위 원 장 _____

부위원장 _____

위 원 _____

Association of aplastic anemia and *FoxP3* gene polymorphisms in Koreans

by Ji Won In, M.D.

(Directed by Eun Young Song, M.D., Ph.D.)

A thesis submitted to the Department of Medicine in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Master of Science in Medicine (Laboratory Medicine) at Seoul National University College of Medicine

December, 2015

Approved by Thesis Committee:

Professor _____, Chairman

Professor _____, Vice Chairman

Professor _____

국문초록

서론: 재생불량성빈혈은 말초 혈액의 혈구 감소와 골수 부전을 특징으로 하는 질환으로 후천성 재생불량성빈혈의 발병 기전에 면역학적 요인이 관여함이 알려졌다. 재생불량성빈혈에서 림프구 기능의 이상으로 활성화된 T 세포가 정상 조혈 기능을 억제한다는 연구 결과가 보고되었으며, 재생불량성빈혈 환자에서 자가반응성 T 세포를 억제하는 조절 T 세포의 감소가 관찰되었다. FoxP3 (forkhead box P3)는 조절 T 세포의 발달과 기능에 가장 중요한 역할을 하는 전사인자로 *FoxP3* 유전자의 다형성과 여러 자가면역질환과의 연관성이 보고되었으나 아직까지 재생불량성 빈혈에서는 분석이 이루어진 바 없어, 본 연구에서는 한국인 재생불량성빈혈 환자에서 *FoxP3* 다형성과의 연관성을 분석하고자 하였다.

방법: 1997년~2012년에 서울대병원에서 골수검사를 통해 재생불량성빈혈로 진단 받은 94명의 환자와 정상대조군 195명을 대상으로 *FoxP3* 유전자 다형성(rs5902434 del/ATT, rs3761548 C/A, rs3761549 C/T, rs2232365 A/G)을 중합효소연쇄반응-직접염기서열 검사법으로 분석하였다. 환자군과 정상대조군 간의 유전자형 또는 대립유전자형의 빈도 차이를 분석하였고, 재생불량성빈혈 환자에서 면역억제치료를 받은 경우 치료에 대한 반응군(responders)과 비반응군(non-responders) 간에 유전자형 또는 대립유전자형의 빈도 차이를 분석하였다. 통계 분석은 카이제곱 검정과 Fisher의 정확한 검정을 이용하였고 통계적 유의성은 $P <$

0.05로 판정하였다.

결과: *FoxP3* 다형성의 유전자형 분석에서 대조군과 환자군 간에 유의한 차이를 보이지 않았으나, 대립유전자 분석에서 rs3761548 C 대립유전자 빈도가 환자군에서 대조군에 비해 유의하게 높았다(87.4% vs 79.7%, $P = 0.047$). 면역억제제 치료에 대한 반응을 분석하였을 때, rs3761549 C 대립유전자 빈도가 비반응군에서 반응군에 비해 유의하게 높았으며(89.6% vs 66.7%, $P = 0.036$), 여자환자에서 비반응군에서 반응군에 비해 rs3761549 C/C 유전자형의 빈도가 유의하게 높았다(84.2% vs 16.7%, $P = 0.006$).

결론: 한국인 재생불량성빈혈 환자에서 *FoxP3* rs3761548 다형성이 연관을 보였으며 면역억제치료에 대한 반응과 *FoxP3* rs3761549 다형성이 연관되어 있었다. 본 연구를 통해 *FoxP3* 유전자 다형성이 한국인에서 재생불량성빈혈의 질병 감수성 및 면역억제치료에 대한 반응과 연관이 있음을 확인하였고, 이는 향후 재생불량성빈혈의 발병기전 및 치료 방향을 정하는데 기초자료로 활용될 수 있을 것이다.

주요어: 재생불량성빈혈, 조절 T 세포, FoxP3, 유전자 다형성, 면역억제치료

학 번: 2014-21148

목 차

국문초록	i
목차	iii
표 목록	v
서론	1
연구 재료 및 방법	4
1. 연구대상	4
2. 검체 수집 및 DNA 추출	5
3. <i>FoxP3</i> 유전자 다형성 검사	6
4. HLA-DR 저해상도 수준의 DNA 형별 검사	7
5. 통계분석	7
결과	9
1. 환자군의 임상적 특성	9
2. <i>FoxP3</i> 유전자 다형성과 재생불량성빈혈의 연관성	10

3. 재생불량성빈혈 환자에서 <i>FoxP3</i> 유전자 다형성과 면역억제제 치료 반응	10
4. <i>FoxP3</i> 유전자 다형성과 면역억제제 치료 반응의 HLA- DR15 형별에 따른 층화 분석	11
고찰	18
결론	22
참고문헌	23
초록 (영문)	28

표 목록

Table 1	13
Table 2	14
Table 3	15
Table 4	16
Table 5	17

서 론

재생불량성빈혈은 범혈구감소증과 골수세포충실도의 감소를 특징으로 하는 골수 부전 질환으로 서양에서는 연간 인구 백만명 당 2 명의 발생 빈도를 보이나 동양에서는 2-3 배 호발하는 것으로 알려져 있다[1]. 국내 호발 연령은 젊은 층(15-30 세)과 60 세 이상이며 남녀 간의 차이는 없다[2]. 재생불량성빈혈의 원인은 크게 선천성과 후천성으로 나눌 수 있으며, 선천성 재생불량성빈혈은 판코니빈혈, Shwachman-Diamond 증후군과 같은 질환에 동반되어 나타나며 후천성 재생불량성빈혈의 원인으로는 화학물질과 약제, 바이러스 등이 알려져 있으나 대부분은 원인이 밝혀지지 않는 특발성이다. 이후 연구에서 재생불량성빈혈의 발병에 면역학적 인자가 중요한 요인임이 알려졌는데[3], 재생불량성빈혈의 치료에 면역억제제가 좋은 임상적 반응을 보이는 것이 이를 뒷받침하는 중요한 증거라고 할 수 있다[4]. 실험 연구 결과로는 우선 재생불량성빈혈 환자의 골수에서 림프구를 제거하였을 때 세포 배양에서 조혈모세포 군집수의 증가가 관찰되었고 정상인 골수와 재생불량성빈혈 환자의 림프구를 함께 배양할 경우 정상 골수 조혈 기능의 저하가 보고되었다[5]. 또한 재생불량성빈혈 환자에서

interferon- γ (IFN- γ)와 tumor necrosis factor- α (TNF- α)같은 사이토카인을 생산하는 T 세포의 증가가 관찰되었고[6, 7], 조력 T 세포(helper T cell)의 아형인 CD3+/CD4+/IL17-producing Th17 세포의 증가 소견이 관찰되었다[8]. 한편, 재생불량성빈혈 환자에서 조력 T 세포의 또 다른 아형인 CD4+/CD25+/FoxP3+ 조절 T 세포의 이상 소견이 관찰되었다. 조절 T 세포는 자가면역 관용(self tolerance)과 면역학적 항상성(immune homeostasis) 유지에 가장 중요한 역할을 하는 세포로, 특히 자가반응성 T 세포를 억제하는 기능을 통해 면역 반응을 조절한다[9]. 재생불량성빈혈 환자에서는 이러한 조절 T 세포의 수적 감소 및 *CXCR4* mRNA 발현 감소로 인한 골수로의 세포 이동능 저하, 면역 반응 억제 능력 저하 소견이 보고된 바 있다[10, 11]. FoxP3 는 이러한 조절 T 세포의 발달과 기능에 핵심적인 역할을 하는데[12], *FoxP3* 유전자는 X 염색체의 단완(Xp11.23)에 위치하며, *FoxP3* 유전자 다형성이 자가면역성 갑상선 질환[13], 전신성 홍반성 낭창[14], 전신성 경화증[15] 등의 여러 자가면역질환 및 알레르기 질환[16], 임신기 태아-모체의 거부반응[17], 동종이식거부반응[18] 등에 대한 유전적 감수성과 관련이 있음이 보고 되었다. 그러나 아직까지 재생불량성빈혈 환자를 대상으로 *FoxP3* 유전자 다형성에 대한 분석이 이루어진 바가 없다.

또한, 재생불량성빈혈 환자에서 면역억제치료에 대한 반응과 연관된 유전적 소인으로 HLA-DR15 [19, 20], IFN gamma, TGF beta 유전자 다형성 [21, 22] 등이 보고된 바 있다. 이에 본 연구에서는 재생불량성빈혈 환자군과 정상대조군을 대상으로 *FoxP3* 유전자 다형성 (rs5902434 del/ATT, rs3761548 C/A, rs3761549 C/T, rs2232365 A/G) 분석을 시행하고 질병 감수성 및 면역억제치료에 대한 반응과의 연관성을 알아보려고 하였다.

연구 재료 및 방법

1. 연구대상

환자군은 서울대학교병원에서 1997년부터 2012년 사이에 골수검사를 시행하여 재생불량성빈혈로 진단되어 HLA 형별 검사가 의뢰된 환자 중 잔여 검체 수집이 가능한 94명을 대상으로 하였다. 대조군은 이전 연구[23]에서 사용된 정상 한국인 DNA 검체 195건을 대상으로 하였다.

재생불량성빈혈은 진단 시 검사 결과에 따라 비중증(non-severe aplastic anemia)과 중증(severe aplastic anemia)으로 구분하였다. 중증 재생불량성빈혈의 기준은 말초혈액검사에서 절대호중구수(absolute neutrophil count) $0.5 \times 10^9/L$ 미만, 혈소판수(platelet count) $20 \times 10^9/L$ 미만, 그리고 교정 망상 적혈구수(corrected reticulocyte count) 1% 미만의 세 가지 지표 중 두 가지 이상을 만족하면서 골수세포충실도(cellularity)가 25% 미만인 경우로 하였으며, 그 외의 경우를 비중증으로 분류하였다[24].

치료 방법은 oxymetholone 단독 치료, 면역억제제 치료, 조혈모세포이식, 그 외 치료를 받지 않았거나 추적 관찰이 불가능했던 군으로 나누어 구분하였다. 면역억제제 치료를 받은 환자들은 약제에 따라 ATG

(anti-thymocyte globulin) 또는 ALG (anti-lymphocyte globulin) 단독 치료를 받은 환자, ATG 또는 ALG와 함께 CsA (cyclosporin A)를 이용한 복합면역억제요법을 받은 환자, 그리고 CsA 단독 치료를 받은 환자로 구분하였고, 이 중 면역억제제 치료를 받고 치료 6개월 후 시점에서 반응을 평가할 수 있는 환자를 대상으로 면역억제제 치료에 대한 반응을 평가하였다. 완전 반응군(complete responders)은 수혈 없이 말초혈액검사에서 혈색소 10 g/dL 이상, 절대호중구수 $1.0 \times 10^9/L$ 이상, 그리고 혈소판수 $100 \times 10^9/L$ 이상을 만족하는 경우로 하였고, 부분 반응군(partial responders)은 이전 수혈이 필요하던 환자가 적혈구 수혈이 필요 없게 되거나 또는 절대 호중구수가 기저값에서 $0.5 \times 10^9/L$ 이상 개선되거나 혈소판수가 $30 \times 10^9/L$ 이상 개선된 경우로 하였다. 비반응군(non-responders)은 부분 반응에 도달하지 못한 경우로 분류하였다[24, 25].

2. 검체 수집 및 DNA 추출

환자의 말초혈액에서 LaboPass Genomic DNA Extraction Kit (COSMO, Seoul, Korea) 또는 QuickGene DNA whole blood kit

(Fujifilm, Tokyo, Japan)를 이용해 추출하여 -80°C 에 보관 중인 94개의 DNA 검체를 분석에 사용하였다.

3. *FoxP3* 유전자 다형성 검사

FoxP3 유전자 다형성 검사는(rs5902434 del/ATT, rs3761548 C/A, rs3761549 C/T, rs2232365 A/G) PCR-sequencing 방법을 이용하여 기존 방법을 일부 변형하여 시행하였다[16, 26] (Table 1). PCR 반응액은 40 ng DNA, 각 0.2 μM forward와 reverse primer, 0.8 μL 10 mM dNTP, 1.0 U Taq DNA polymerase (Roche applied science, Basel, Switzerland), 그리고 제조사에서 제공된 reaction buffer 4 μL 를 합하여 40 μL 를 사용하였다. 95°C 에서 5분간 반응시킨 후, 95°C 에서 30초 denaturation, 각 annealing temperature에서 30초 annealing, 그리고 72°C 에서 30초 extension 과정을 30회 반복하고 마지막에 72°C 에서 5분간 반응시켰다. Sequencing PCR은 정제된 1 μL PCR 산물, 1 μL forward 또는 reverse primer (F1, R2, F3, F4), 4 μL BigDye Terminator Ready Reaction Mix (Life technologies, Grand Island, NY, USA), 그리고 멸균증류수를 더하여 최종 반응액을 10 μL 로 하였다. 반응 조건은 96°C 10초, 50°C 5초, 그리고 60°C 4분을 주기로 30주기를 실시하였다. Sequencing PCR 후 얻어진 반응물에 2 μL NaOAc/EDTA와

25 μL 무수에탄올을 첨가하여 2000g에서 30분간 원심분리하고 상층액을 제거 한 후, 50 μL 80% 에탄올을 더하여 2000g에서 5분간 원심분리 과정을 2회 반복하였다. Hi-Di formamide 15 μL 를 넣어 잘 섞고 95°C에서 4분간 heating 후 ABI 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용해 분석하였다. 염기서열 결과는 Sequencher 소프트웨어(Gene Codes, Ann Arbor, MI, USA)를 이용하여 분석을 실시하였다.

4. HLA-DR 저해상도 수준의 DNA 형별 검사

총 94건의 DNA 검체에 대해 Dynal RELI sequence specific oligonucleotide (SSO) HLA Test kit (Dynal Biotech, Wirral, U.K.) 또는 WAKFlow HLA typing kit (Wakunaga, Hiroshima, Japan)를 이용하여 저해상도의 HLA-DR 형별 검사를 시행하였다. 검사 과정은 제조사의 지침에 따라 실시하였다.

5. 통계분석

재생불량성빈혈 환자군과 정상대조군에서 관찰된 유전자형의 빈도는 Hardy-Weinberg equilibrium으로 분포의 적합성을 확인하였고, 직접계

수법으로 환자군과 대조군의 *FoxP3* 유전자 다형성의 유전자형 및 대립 유전자 빈도를 구하여 비교 분석하였다. 또한 환자군 중 면역억제치료 반응 평가가 가능한 환자들을 대상으로 반응군(완전 반응군과 부분 반응군)과 비반응군으로 나누어 두 군간에 차이를 보이는 *FoxP3* 유전자 형별을 확인하였다. *FoxP3* 유전자가 X 염색체에 위치하므로, 유전자형 빈도 분석은 성별에 따라 나누어 분석하였고, 대립유전자형은 남녀 합하여 분석을 시행하였다. 통계분석은 chi-square test 혹은 Fisher's exact test를 이용하였고 유의수준은 0.05로 정하였다. 통계적 유의성을 나타내는 *FoxP3* 유전자 형별에 대해서는 odds ratio (OR)와 95% 신뢰구간 (confidence interval, CI)을 구하였다. 통계분석은 SPSS for Windows version 22.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 이용하여 시행하였다.

결 과

1. 환자군의 임상적 특성

환자군의 임상적 특성을 Table 2에 요약하였다. 94명의 환자 중 남자는 45명(47.9%), 여자 49명(52.1%)으로 진단 시 연령의 중앙값(median age)은 22세였다. 비중증 환자는 19명이었고 중증 환자는 75명이었다. 치료방법에 따른 분포를 보면 oxymetholone 단독 치료를 받은 환자 5명(비중증 3명, 중증 2명), 면역억제제 치료 환자 44명(비중증 9명, 중증 35명), 조혈모세포이식을 받은 환자 20명(비중증 2명, 중증 18명)이었으며 치료를 받지 않았거나 추적 관찰이 불가능했던 환자가 25명이었다. 비중증 환자군과 중증 환자군 사이에서 치료 방법의 차이는 보이지 않았다. 면역억제제 치료를 받은 44명의 환자를 다시 약제에 따라 구분하면 ATG 또는 ALG 단독 치료를 받은 환자가 4명, ATG 또는 ALG와 함께 CsA를 이용한 복합면역억제요법을 받은 환자가 34명, 그리고 CsA 단독 치료를 받은 환자가 6명이었다. 면역억제제 치료 방법 역시 비중증 환자군과 중증 환자군 간에 유의한 차이를 보이지 않았다.

정상대조군의 성별 분포는 남자 95명(48.7%), 여자 100명(51.3%)이었다.

2. *FoxP3* 유전자 다형성과 재생불량성빈혈의 연관성

환자군과 정상대조군에서 *FoxP3* 각 유전자형의 빈도는 모두 Hardy-Weinberg equilibrium 분포를 따랐다. *FoxP3* 유전자 다형성의 분포를 Table 3에 요약하였다. *FoxP3* 다형성의 유전자형은 각 성별에서 환자군과 대조군 간에 유의한 차이를 보이지 않았다. 대립유전자 분석에서 rs3761548 C 대립유전자의 빈도가 환자군에서 대조군에 비해 높았다(87.4% vs 79.7%, $P = 0.047$, OR = 1.8, 95% CI 1.0 - 3.1). 나머지 부위의 다형성 분석에서 환자군과 대조군 간의 통계적으로 유의한 대립유전자 빈도 차이는 관찰되지 않았다.

3. 재생불량성빈혈 환자에서 *FoxP3* 유전자 다형성과 면역억제제 치료 반응

면역억제제 치료를 받은 44명의 환자를 비반응군과 반응군으로 나누어 *FoxP3* 유전자 다형성 분석을 시행하였다(Table 4). 유전자형 분석에서 여자 환자의 경우 rs3761549에서 비반응군과 반응군 간에 유의한 차이를 보였고($P = 0.002$), 이를 다시 각 유전자형별로 분석하였을 때, rs3761549 C/C 형의 빈도가 비반응군에서 반응군에 비해 유의하게 높았다(84.2% vs 16.7%, $P = 0.006$, OR = 26.7, 95% CI 2.2 - 317.1).

남자 환자의 경우 비반응군과 반응군 간의 유전자형 분포에 차이를 보이지 않았다. 대립유전자 빈도 분석에서 rs3761549 C 대립유전자의 빈도가 면역억제제 치료에 대한 비반응군에서 반응군에 비해 유의하게 높았다(89.6% vs 66.7%, $P = 0.036$, OR = 4.3, 95% CI 1.2 - 15.7) (Table 5).

4. *FoxP3* 유전자 다형성과 면역억제제 치료 반응의 HLA-DR15 형별에 따른 층화 분석

총 94 명의 환자 중 면역억제제 치료를 받은 44 명 환자의 HLA-DR15 유무에 따른 층화 분석을 시행하였다. HLA-DR15 양성인 환자가 20 명(45.5%), 음성인 환자가 24 명(54.5%)이었고, 면역억제제 치료 반응군에서 HLA-DR15 형별의 빈도가 비반응군에 비해 유의하게 높았다(66.7% vs 34.5%, $P = 0.042$, OR = 0.3, 95% CI 0.1 - 1.0). 면역억제제 치료 환자군을 HLA-DR15 유무에 따라 나누어 *FoxP3* rs3761549 에 대한 분석을 시행한 결과 HLA-DR15 양성인 군에서는 비반응군과 반응군 간의 rs3761549 C 대립유전자 빈도 차이가 관찰되지 않았으나, HLA-DR15 음성인 군에서 비반응군의 rs3761549

C 대립유전자 빈도가 반응군에 비해 높게 나타났다(93.8% vs 62.5%, $P = 0.046$, OR = 9.0, 95% CI 1.2 - 68.1).

Table 1. Primers used in the genotyping by PCR-sequencing

Polymorphisms	Primer		Length (bps)	AT (°C)
rs5902434 (del/ATT)	F1	5'-CTGCTCTCCCCTACCAGATG-3'	196	56
	R1	5'-CCCTGCCCATGCATTAAGTA-3'		
rs3761548 (C/A)	F2	5'-TTGTCTACTCCACGCCTCTCC-3'	373	60
	R2	5'-TGCCTCCATCATCACCACG-3'		
rs3761549 (C/T)	F3	5'-GTCCTCTCCACAACCCAAGA-3'	250	60
	R3	5'-CAGATTTTTCCGCCATTGAC-3'		
rs2232365 (A/G)	F4	5'-GAGGGCTTTCAAGGTGAGGA-3'	371	60
	R4	5'-GGGAGTTGGATTGGGTGCA-3'		

F, forward primer; R, reverse primer; AT, annealing temperature

Table 2. Clinical characteristics of aplastic anemia patients (n=94)

Characteristics	Patients (%)
Sex (male:female)	45:49
Age (median)	22
Severity (NSAA:SAA)	19:75
Treatment	
Oxymetholone alone	5 (5.3)
Immunosuppressive therapy	
ATG/ALG alone	4 (4.3)
ATG/ALG+CsA	34 (36.2)
CsA alone	6 (6.4)
HSCT	20 (21.3)
No treatment or F/U loss	25 (26.6)

NSAA, non-severe aplastic anemia; SAA, severe aplastic anemia; ATG, anti-thymocyte globulin; ALG, anti-lymphocyte globulin; CsA, cyclosporin A; HSCT, hematopoietic stem cell transplantation

Table 3. Genotype and allele frequencies of *Foxp3* polymorphisms in aplastic anemia patients (n=94) and controls (n=195)

Polymorphisms		Patients (%)	Controls (%)	<i>P</i> value	Odds ratio
rs5902434					
Genotype (F)	del/del	18 (36.7)	34 (34.0)	0.288	
	del/ATT	25 (51.0)	43 (43.0)		
	ATT/ATT	6 (12.2)	23 (23.0)		
Genotype (M)	del	32 (71.1)	65 (68.4)	0.747	
	ATT	13 (28.9)	30 (31.6)		
Alleles	del	65.0	59.7	0.279	
	ATT	35.0	40.3		
rs3761548					
Genotype (F)	C/C	35 (71.4)	60 (60.0)	0.308	
	C/A	13 (26.5)	34 (34.0)		
	A/A	1 (2.0)	6 (6.0)		
Genotype (M)	C	42 (93.3)	81 (85.3)	0.172	
	A	3 (6.7)	14 (14.7)		
Alleles	C	87.4	79.7	0.047	1.8 (1.0 - 3.1)
	A	12.6	20.3		
rs3761549					
Genotype (F)	C/C	31 (63.3)	62 (62.0)	0.966	
	C/T	16 (32.7)	33 (33.0)		
	T/T	2 (4.1)	5 (5.0)		
Genotype (M)	C	35 (77.8)	79 (83.2)	0.445	
	T	10 (22.2)	16 (16.8)		
Alleles	C	79.0	80.0	0.811	
	T	21.0	20.0		
rs2232365					
Genotype (F)	A/A	18 (36.7)	34 (34.0)	0.288	
	A/G	25 (51.0)	43 (43.0)		
	G/G	6 (12.2)	23 (23.0)		
Genotype (M)	A	32 (71.1)	65 (68.4)	0.747	
	G	13 (28.9)	30 (61.3)		
Alleles	A	65.0	59.7	0.279	
	G	35.0	40.3		

F, female; M, male

Table 4. Comparison of genotype frequencies for *FoxP3* polymorphisms between non-responder (n=29) and responder (n=15) in aplastic anemia patients

Polymorphisms		Non-responder (%)	Responder (%)	<i>P</i> value
rs5902434				
F	del/del	7 (36.8)	1 (16.7)	0.643
	del/ATT	10 (52.6)	4 (66.7)	
	ATT/ATT	2 (10.5)	1 (16.7)	
M	del	8 (80.0)	6 (66.7)	0.628
	ATT	2 (20.0)	3 (33.3)	
rs3761548				
F	C/C	11 (57.9)	5 (83.3)	0.507
	C/A	7 (36.8)	1 (16.7)	
	A/A	1 (5.3)	0 (0.0)	
M	C	9 (90.0)	8 (88.9)	1.000
	A	1 (10.0)	1 (11.1)	
rs3761549				
F	C/C	16 (84.2)	1 (16.7)	0.002 (0.006*)
	C/T	2 (10.5)	5 (83.3)	
	T/T	1 (5.3)	0 (0.0)	
M	C	9 (90.0)	7 (77.8)	0.528
	T	1 (10.0)	2 (22.2)	
rs2232365				
F	A/A	8 (42.1)	0 (0.0)	0.155
	A/G	9 (47.4)	5 (83.3)	
	G/G	2 (10.5)	1 (16.7)	
M	A	8 (80.0)	6 (66.7)	0.628
	G	2 (20.0)	3 (33.3)	

F, female; M, male

*C/C vs C/T+T/T (84.2% vs 16.7%, *P* = 0.006, OR = 26.7, 95% CI 2.2 - 317.1)

Table 5. Comparison of allele frequencies for *FoxP3* polymorphisms between non-responder (n=29) and responder (n=15) in aplastic anemia patients

Polymorphisms	Non-responder (%)	Responder (%)	<i>P</i> value	Odds ratio
rs5902434				
del	66.7	57.1	0.449	
ATT	33.3	42.9		
rs3761548				
C	79.2	90.5	0.321	
A	20.8	9.5		
rs3761549				
C	89.6	66.7	0.036	4.3 (1.2 - 15.7)
T	10.4	33.3		
rs2232365				
A	68.7	52.4	0.193	
G	31.3	47.6		

고 찰

1995년 일본의 Sakaguchi 등[27]에 의해 표현형이 밝혀진 조절 T 세포는 자가 항원에 특이적인 T 세포를 능동적으로 억제하여 자가 항원에 대한 관용을 유지하는 중요한 세포로 IL-2 receptor 의 α -chain (CD25)을 발현하며 전체 CD4+ T 세포 중 약 5-10%를 차지하고 있다[28]. 이러한 조절 T 세포의 기능은 FoxP3 단백을 통해 이루어지는데 *FoxP3* 유전자는 돌연변이 마우스에서 CD4+ T 림프구의 과잉 증식 및 활성 소견 관찰과[29] immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked (IPEX) syndrome 환자의 원인 유전자로 처음 알려졌으며[30], Fontenot 등에 의해 이 유전자가 조절 T 세포의 발달과 기능에 필수적인 역할을 함이 보고 되었다[31]. 조절 T 세포 표면의 높은 FoxP3 발현은 조절 T 세포의 자가면역 억제 기능을 유지하게 해주며 FoxP3는 다른 전사인자들과의 상호작용을 통해 조절 T 세포에서의 전사 촉진 및 억제 양쪽에 관련된 기능을 한다[32]. 초기 연구에서는 FoxP3가 전사 억제 인자로 작용하는 것으로 알려졌으나[33] 이후 여러 연구에서 NFAT, RUNX1, 또는 ROR- γ t 등과의 상호작용을 통한 전사 활성화 인자로서의 역할이 보고 되었다[34-36]. 이러한 FoxP3 발현이

조절 T 세포의 기능과 연관되어 있으므로[37] 본 연구에서는 *FoxP3* 유전자의 기능적 다형성을 유발할 것으로 생각되는 promoter 부위의 유전자 다형성과 재생불량성빈혈의 연관성에 대해 분석하였다.

총 94명의 환자를 분석하였을 때 rs3761548에서 C 대립유전자 형질의 빈도가 환자군에서 대조군에 비해 유의하게 높았다 ($P = 0.047$). *FoxP3* rs3761548 다형성과 자가면역질환의 연관성에 대한 보고는 다양한 결과를 보이고 있다. Gao 등(2009)의 보고에 의하면[38] 건선 환자에서 rs3761548 C/A+A/A 유전자형이 대조군에 비해 높았으며, 재발성 자연 유산 환자 발생에 rs3761548 A/A 유전자형의 연관성이 보고되었다[17]. 백반증 환자의 경우 인도인 환자에서 rs3761548 C/C 유전자형이 질병 예방 효과가 있음이 관찰되었고[39], 중국인 환자 연구에서는 rs3761548 C/A+A/A 유전자형과 A 대립유전자 빈도가 환자군에서 유의하게 높았음이 보고된 바 있다[40].

헝가리인 알레르기성 비염 환자에서는 rs3761548 A/A 유전자형이 질병 예방 효과가 있음이 보고 되었고[41], 대만인 루푸스 환자에서는 환자군과 대조군 간의 빈도 차이는 보이지 않았으나 환자군 내에서 rs3761548 A 대립유전자 형질이 있을 경우 더 낮은 anti-dsDNA 수치를 보이는 것이 확인되었다[14]. 본 연구에서는 유전자형에 따른 환자군과 대조군 간의 차이는 관찰되지 않았으나 환자군에서 rs3761548 C 대

립유전자 빈도가 더 높게 나타나 재생불량성빈혈 환자의 발병에 *FoxP3* 유전자 다형성이 관여할 가능성이 있는 것으로 생각되나, 이는 좀 더 많은 수의 환자군을 대상으로 확인이 필요할 것으로 생각된다.

재생불량성빈혈 환자에서 *FoxP3* 발현의 영향으로 조절 T 세포의 감소를 보이는 것은 rs3761548 다형성과 더불어 복합적인 원인이 존재할 것으로 생각된다. 재생불량성빈혈 환자에서는 *FoxP3*뿐만 아니라 T세포의 활성화와 관련된 전사인자인 NFAT1이 감소된 것으로 보고 되었는데 NFAT1 단백 발현이 억제 되면 *FoxP3* 단백질 발현도 함께 감소하는 것이 관찰된 바 있어[10, 34] 추후 NFAT1 등을 포함한 다른 유전자에 대한 연구도 추가적으로 시행할 필요가 있을 것이다.

면역억제제 치료를 받은 재생불량성빈혈 환자에서 치료반응에 대한 차이와 rs3761549 유전자형이 유의한 연관성을 보였는데 여자 환자의 경우 rs3761549 C/C 유전자형이 면역억제제 치료에 불량한 반응을 보이는 위험 요인으로 관찰되었다($P = 0.006$). 남자 환자에서는 비반응군에서 C 대립유전자의 빈도가 높은 경향은 보였으나 통계적 유의성은 도달하지 못하였다(90.0% vs 77.8%, $P = 0.528$). Inoue 등(2010)의 연구에서 중증 하시모토 갑상선염과 rs3761549 C/C 유전자형의 연관성이 보고된 바 있고[42], 반대로 브라질 여성에서 자궁내막증 관련 불임 환자의 경우 rs3761549 T/T 유전자형이 유의한 연관성을 보였다[43]. 본

연구의 대립유전자 형별 분석에서는 비반응군에서 반응군에 비해 rs3761549 C 대립유전자의 빈도가 유의하게 높았고($P = 0.036$) 면역억제치료에 반응하지 않을 위험이 약 4배 더 높은 것으로 관찰되었다.

HLA-DR15는 재생불량성빈혈에서 면역억제치료의 양호한 반응과 연관성이 있다고 알려진 대표적인 유전적 소인이다[44]. 본 연구에서도 면역억제치료 반응군에서 HLA-DR15의 빈도가 비반응군에 비해 유의하게 높았다($P = 0.042$). 본 연구에서 재생불량성빈혈 환자에서 면역억제치료와 유의한 연관성을 보인 *FoxP3* rs3761549 다형성 분석을 시행하였을 때, HLA-DR15 음성인 군에서 비반응군의 rs3761549 C 대립유전자 빈도가 반응군에 비해 높게 나타나($P = 0.046$) rs3761549 C 대립유전자가 HLA-DR15가 음성인 환자군에서 면역억제제 치료에 대한 불량한 반응과 연관이 있음을 확인할 수 있었다.

결 론

한국인 재생불량성빈혈 환자에서 *FoxP3* rs3761548 C 대립유전자빈도가 정상대조군에 비해 유의하게 높았다(87.4% vs 79.7%, $P = 0.047$). 면역억제치료를 받은 환자 중 비반응군에서 여자 환자의 경우 *FoxP3* rs3761549 C/C 유전자형의 빈도가 반응군에 비해 유의하게 높았으며(84.2% vs 16.7%, $P = 0.006$), rs3761549 C 대립유전자 빈도가 면역억제제 치료 반응군에서 비반응군에 비해 유의하게 높았다(89.6% vs 66.7%, $P = 0.036$). 본 연구를 통해 *FoxP3* 유전자 다형성이 한국인 재생불량성빈혈의 질병 감수성 및 면역억제치료에 대한 반응과 연관이 있음을 확인하였다. 이는 재생불량성빈혈 환자에서 발병 기전과 치료방향 결정을 위한 기초자료로서 사용될 수 있을 것이다.

참 고 문 헌

1. Montane E, Ibanez L, Vidal X, Ballarin E, Puig R, Garcia N, et al. Epidemiology of aplastic anemia: a prospective multicenter study. *Haematologica* 2008;93:518-23.
2. 대한혈액학회. 혈액학. 2판 ed. 서울: 범문교육케이션, 2011.
3. Young NS, Calado RT, Scheinberg P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood* 2006;108:2509-19.
4. Dezern AE and Brodsky RA. Clinical management of aplastic anemia. *Expert Rev Hematol* 2011;4:221-30.
5. Kagan W, Ascensao J, Pahwa R, Hansen J, Goldstein G, Valera E, et al. Aplastic anemia: presence in human bone marrow of cells that suppress myelopoiesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:2890-4.
6. Dufour C, Corcione A, Svahn J, Haupt R, Battilana N, Pistoia V. Interferon gamma and tumour necrosis factor alpha are overexpressed in bone marrow T lymphocytes from paediatric patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol* 2001;115:1023-31.
7. Sloan E, Kim S, Maciejewski JP, Tisdale J, Follmann D, Young NS. Intracellular interferon-gamma in circulating and marrow T cells detected by flow cytometry and the response to immunosuppressive therapy in patients with aplastic anemia. *Blood* 2002;100:1185-91.
8. de Latour RP, Visconte V, Takaku T, Wu C, Erie AJ, Sarcon AK, et al. Th17 immune responses contribute to the pathophysiology of aplastic anemia. *Blood* 2010;116:4175-84.
9. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol* 2010;10:490-500.

10. Solomou EE, Rezvani K, Mielke S, Malide D, Keyvanfar K, Visconte V, et al. Deficient CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ T regulatory cells in acquired aplastic anemia. *Blood* 2007;110:1603-6.
11. Shi J, Ge M, Lu S, Li X, Shao Y, Huang J, et al. Intrinsic impairment of CD4⁽⁺⁾CD25⁽⁺⁾ regulatory T cells in acquired aplastic anemia. *Blood* 2012;120:1624-32.
12. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-61.
13. Ban Y, Tozaki T, Tobe T, Ban Y, Jacobson EM, Concepcion ES, et al. The regulatory T cell gene FOXP3 and genetic susceptibility to thyroid autoimmunity: an association analysis in Caucasian and Japanese cohorts. *J Autoimmun* 2007;28:201-7.
14. Lin YC, Lee JH, Wu AS, Tsai CY, Yu HH, Wang LC, et al. Association of single-nucleotide polymorphisms in FOXP3 gene with systemic lupus erythematosus susceptibility: a case-control study. *Lupus* 2011;20:137-43.
15. D'Amico F, Skarmoutsou E, Marchini M, Malaponte G, Caronni M, Scorza R, et al. Genetic polymorphisms of FOXP3 in Italian patients with systemic sclerosis. *Immunol Lett* 2013;152:109-13.
16. Zhang L, Zhang Y, Desrosiers M, Wang C, Zhao Y, Han D. Genetic association study of FOXP3 polymorphisms in allergic rhinitis in a Chinese population. *Hum Immunol* 2009;70:930-4.
17. Wu Z, You Z, Zhang C, Li Z, Su X, Zhang X, et al. Association between functional polymorphisms of Foxp3 gene and the occurrence of unexplained recurrent spontaneous abortion in a Chinese Han population. *Clin Dev Immunol* 2012;2012:896458.
18. Qiu XY, Jiao Z, Zhang M, Chen JP, Shi XJ, Zhong MK. Genetic association of FOXP3 gene polymorphisms with allograft rejection in renal transplant patients. *Nephrology (Carlton)* 2012;17:423-30.

19. Sugimori C, Yamazaki H, Feng X, Mochizuki K, Kondo Y, Takami A, et al. Roles of DRB1 *1501 and DRB1 *1502 in the pathogenesis of aplastic anemia. *Exp Hematol* 2007;35:13-20.
20. Nakao S, Takamatsu H, Chuhjo T, Ueda M, Shiobara S, Matsuda T, et al. Identification of a specific HLA classII haplotype strongly associated with susceptibility to cyclosporin dependent aplastic anemia. *Blood* 1994;84:4257-61.
21. Gidvani V, Ramkissoon S, Sloand EM, Young NS. Cytokine gene polymorphisms in acquired bone marrow failure. *Am J Hematol* 2007;82:721-4.
22. Lee YG, Kim I, Kim JH, Bae JY, Kwon JH, Shin DY, et al. Impact of cytokine gene polymorphisms on risk and treatment outcomes of aplastic anemia. *Ann Hematol* 2011;90:515-21.
23. Song EY, Park MH, Kang SJ, Park HJ, Kim BC, Tokunaga K, et al. HLA class II allele and haplotype frequencies in Koreans based on 107 families. *Tissue Antigens* 2002;59:475-86.
24. Kim I, Yoon SS, Park S, Kim BK, Kim NK. The treatment of severe aplastic anemia: outcomes of bone marrow transplantation and immunosuppressive therapy in a single institution of Korea. *J Korean Med Sci* 2003;18:365-71.
25. Scheinberg P, Wu CO, Nunez O, Scheinberg P, Boss C, Sloand EM, et al. Treatment of severe aplastic anemia with a combination of horse antithymocyte globulin and cyclosporine, with or without sirolimus: a prospective randomized study. *Haematologica* 2009;94:348-54.
26. Chen X, Gan T, Liao Z, Chen S, Xiao J. Foxp3 (-/ATT) polymorphism contributes to the susceptibility of preeclampsia. *PLoS One* 2013;8:e59696.
27. 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.
28. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, et al. Immunologic tolerance maintained by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev* 2001;182:18-32.
 29. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet* 2001;27:68-73.
 30. Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, et al. The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nat Genet* 2001;27:20-1.
 31. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-6.
 32. Vent-Schmidt J, Han JM, MacDonald KG, Levings MK. The role of FOXP3 in regulating immune responses. *Int Rev Immunol* 2014;33:110-28.
 33. Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* 2001;276:37672-9.
 34. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, et al. FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell* 2006;126:375-87.
 35. Ono M, Yaguchi H, Ohkura N, Kitabayashi I, Nagamura Y, Nomura T, et al. Foxp3 controls regulatory T-cell function by interacting with AML1/Runx1. *Nature* 2007;446:685-9.
 36. Ramsdell F and Ziegler SF. FOXP3 and scurfy: how it all began. *Nat Rev*

- Immunol 2014;14:343-9.
37. Wan YY and Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 2007;445:766-70.
 38. Gao L, Li K, Li F, Li H, Liu L, Wang L, et al. Polymorphisms in the FOXP3 gene in Han Chinese psoriasis patients. *J Dermatol Sci* 2010;57:51-6.
 39. Jahan P, Cheruvu R, Tippisetty S, Komaravalli PL, Valluri V, Ishaq M. Association of FOXP3 (rs3761548) promoter polymorphism with nondermatomal vitiligo: A study from India. *J Am Acad Dermatol* 2013;69:262-6.
 40. Song P, Wang XW, Li HX, Li K, Liu L, Wei C, et al. Association between FOXP3 polymorphisms and vitiligo in a Han Chinese population. *Br J Dermatol* 2013;169:571-8.
 41. Fodor E, Garaczi E, Polyanka H, Koreck A, Kemeny L, Szell M. The rs3761548 polymorphism of FOXP3 is a protective genetic factor against allergic rhinitis in the Hungarian female population. *Hum Immunol* 2011;72:926-9.
 42. Inoue N, Watanabe M, Morita M, Tomizawa R, Akamizu T, Tatsumi K, et al. Association of functional polymorphisms related to the transcriptional level of FOXP3 with prognosis of autoimmune thyroid diseases. *Clin Exp Immunol* 2010;162:402-6.
 43. Andre GM, Barbosa CP, Teles JS, Vilarino FL, Christofolini DM, Bianco B. Analysis of FOXP3 polymorphisms in infertile women with and without endometriosis. *Fertil Steril* 2011;95:2223-7.
 44. Song EY, Kang HJ, Shin HY, Ahn HS, Kim I, Yoon SS, et al. Association of human leukocyte antigen class II alleles with response to immunosuppressive therapy in Korean aplastic anemia patients. *Hum Immunol* 2010;71:88-92.

Abstract

Association of aplastic anemia and *FoxP3* gene polymorphisms in Koreans

Ji Won In

Laboratory Medicine, Department of Medicine

The Graduate School

Seoul National University

Introduction: Aplastic anemia (AA) is characterized by pancytopenia and bone marrow failure, and most acquired AA is an immune-mediated disorder. Activated marrow lymphocytes of AA patients suppressed the normal bone marrow in vitro and regulatory T cells suppressing auto-reactive T cells were decreased in AA patients. FoxP3 (forkhead box P3) is a major regulator for the development and function of regulatory T cells. Polymorphism in *FoxP3* was shown to be associated with various autoimmune diseases, however, has not yet been studied in aplastic anemia. In this study, we examined the association of *FoxP3* polymorphisms with AA patients in Koreans.

Methods: The study population consisted of 94 patients diagnosed by bone marrow examination in Seoul National University Hospital during 1997-2012 and 195 healthy controls. *FoxP3* polymorphisms (rs5902434 del/ATT, rs3761548 C/A, rs3761549 C/T, rs2232365 A/G) were analyzed by PCR-sequencing method. We analyzed differences of genotype and allele frequencies between patients and controls. We compared differences of genotype and allele frequencies between responder and non-responder in patients treated with immunosuppressive therapy (IST). For the statistical analysis, the chi-square test and Fisher's exact test were used and $P < 0.05$ was regarded as statistically significant.

Results: There was no significant difference in the genotype frequencies of *FoxP3* polymorphisms between patients and controls. As regards the allele frequencies, rs3761548 C allele was significantly higher in AA patients than in controls (87.4% vs 79.7%, $P = 0.047$). In patients treated with IST, rs3761549 C allele was significantly higher in non-responder patients than in responders (89.6% vs 66.7%, $P = 0.036$) and female rs3761549 C/C genotype carriers were associated with greater risk for non-response to IST (84.2% vs 16.7%, $P = 0.006$).

Conclusions: Polymorphisms in rs3761548 and rs3761549 of *FoxP3* in our population were associated with disease susceptibility and response for IST, respectively. This study suggests an association between *FoxP3* polymorphisms and AA in Korean patients and will be helpful in further understanding the genetic basis of disease susceptibility and response to IST in AA patients.

Keywords: Aplastic anemia, regulatory T cell, FoxP3, single nucleotide polymorphism, immunosuppressive therapy

Student number: 2014 – 21148