

말초혈액자연살해세포가 증가된 반복유산 환자의 탈락막자연살해세포의 발현

린산부인과¹, 관동대학교 의과대학 제일병원 산부인과학교실², 진단병리과³, 임상병리과⁴,
인제대학교 의과대학 상계백병원 산부인과학교실⁵

연명진¹ · 양광문^{2*} · 박찬우² · 송인옥² · 강인수² · 홍성린³ · 조동희⁴ · 조용균⁵

Expression of Decidual Natural Killer (NK) Cells in Women of Recurrent Abortion with Increased Peripheral NK Cells

Myeong Jin Yeon¹, Kwang Moon Yang^{2*}, Chan Woo Park², In Ok Song², Inn Soo Kang²,
Sung Ran Hong³, Dong Hee Cho⁴, Yong Kyocho⁵

¹Lin Women's Hospital, ²Department of Obstetrics and Gynecology, ³Department of Pathology,

⁴Department of Clinical Pathology, Cheil General Hospital & Women's Healthcare Center,
Kwangdong University, College of Medicine, Seoul, Korea, ⁵Department of Obstetrics and Gynecology,
Inje University, Sanggye Paik Hospital, Seoul, Korea

Objective: The purpose of this study was to quantify decidual CD56⁺ and CD16⁺ NK cell subtype population and to evaluate the correlation between decidual NK cell expression and peripheral CD56⁺ NK cell expression in women with a history of recurrent abortion and increased peripheral NK cells.

Methods: Twenty-nine women with recurrent abortion and elevated peripheral CD56⁺ NK cell percentage who had chromosomally normal conceptus were included in this study. Thirty-two women with recurrent abortion who had chromosomally abnormal conceptus were used as controls. Distribution of CD56⁺ and CD16⁺ NK cells in decidual tissues including implantation sites was examined by immunohistochemical staining. The degree of immunohistochemical staining was interpreted by score and percentage.

Results: There was a significant difference in decidual CD56⁺ NK cell score (43.6±24.5 vs. 23.9±16.3 $P=0.001$) and CD56⁺ NK cell percentage (42.1±11.7 vs. 33.9±15.8 $P=0.027$) between increased peripheral NK cell group and control group. However, there was no statistically significant difference in decidual CD16⁺ NK cell score (18.7±9.5 vs. 13.2±39.4 $P=0.108$) and CD16⁺ NK cell percentage (24.7±5.9 vs. 23.4±11.7 $P=0.599$). There was no significant correlation between decidual NK cell score and peripheral NK cell percentage in increase peripheral NK cell group (peripheral CD56⁺ NK cell percentage vs. decidual CD56⁺ NK cell score, $r=-0.016$, $P=0.932$, peripheral CD16⁺ NK cell percentage vs. decidual CD16⁺ NK cell score, $r=0.008$, $P=0.968$).

Conclusion: This study shows that CD56⁺ decidual NK cells are increased in decidua of women exhibiting a history of recurrent abortion with increased CD56⁺ peripheral NK cell. There was no significant correlation between decidual and peripheral NK cell increment in increase peripheral NK cell group. This study suggests the possibility that decidual NK cells may play an important role in the immune mechanism of recurrent abortion. [Korean. J. Reprod. Med. 2008; 35(2): 119-129.]

Key Words: Decidual natural killer cell, CD56⁺/CD16⁺ NK cell, Recurrent abortion

반복유산은 전체 임신부의 약 1%에서 경험한다

고 보고되며,¹ 그 원인으로는 유전적 요인, 해부학적 요인, 내분비학적 요인, 면역학적 요인, 원인 불명 등이 있다. 최근에는 반복유산의 면역학적 원인 중 동종면역 거부반응의 중요성이 점차 증가되고

주관책임자: 양광문, 우) 100-380 서울특별시 중구 북정동 1-19,
관동대학교 의과대학 제일병원 산부인과학교실
Tel: (02) 2000-7545, Fax: (02) 2000-7790
e-mail: ykm2955@yahoo.co.kr

있다. 또한 태아 염색체 이상 없이 유산을 경험한 여성에서 말초혈액자연살해세포 (peripheral blood natural killer cell, NK cell)가 증가되어 있으며, 임신 전에 말초혈액자연살해세포가 증가되어 있는 경우 반복유산 환자에서 다음 임신 시에도 유산이 될 가능성이 높다는 Aoki 등²의 연구 발표 이후, 동종면역 거부반응의 원인 기전으로 말초혈액자연살해세포의 활성화 및 수적 증가에 대한 여러 연구들이 시행되어 왔다.³⁻⁵

자궁자연살해세포 (uterine natural killer cells)은 태반이 형성되는 동안 탈락막 (decidua)에서 우선적으로 발현되는 모체의 면역세포이다. 이는 임신하지 않은 여성의 자궁내막에서도 발현되는데, 난소 호르몬의 조절을 받아서 그 수와 비율이 생리주기 동안에 변화한다. 자궁자연살해세포는 배란 전의 증식기 동안에는 드물게 나타나고, 배란 후의 중기 황체기에 증가하여 후기 분비기에는 최대가 된다.⁶ 생리 시작 전에 자궁자연살해세포는 세포고사 (apoptosis)와 유사한 변화를 보이게 되나, 임신이 되면 탈락막에 지속적으로 존재하게 되고, 특히 기저 탈락막 (decidua basalis)에 밀집된다.⁶ 임신 초기에 자궁자연살해세포는 탈락막 전체 림프구 분포의 약 70%를 담당한다. 탈락막에 자연살해세포가 존재하는 것은 임신 초기에만 관찰되는 특징으로 약 임신 20주 이후에는 감소하고, 임신말기의 탈락막에서는 관찰할 수 없다.⁷

착상 시기와 초기 태반 형성시기에 자궁에서 발현되는 독립적인 림프구가 존재한다는 것이 흥미롭긴 하지만, 자궁자연살해세포의 기능에 대해서 아직까지 완전히 알려져 있지 않다. 자궁자연살해세포는 혈관 성장인자들 (angiogenic growth factors)을 분비하여 혈관의 기능을 조절하며, 이로써 생리주기에 따른 자궁 점막의 성장과 분화, 탈락과 재생을 조절한다고 보고되었다.⁷ Loke와 King 등⁸은 자궁자연살해세포가 착상과정과 이후 태반의 성장과 발달에 중요한 역할을 할 것이라고 제시하였다.

몇몇의 저자들은 말초혈액과 자궁의 자연살해세포가 비슷하리라는 가정하에 반복유산 환자에서

말초혈액자연살해세포의 수와 활동성을 비교하려는 시도들을 하였다.^{5,7,9,10} 그러나 자궁자연살해세포는 표현형으로나 기능적으로 말초혈액에 존재하는 자연살해세포와는 다르며, 별개 림프구의 한 종류로 간주된다. 말초혈액자연살해세포는 주로 CD56^{dim}CD16⁺ NK cell로 구성되며, 자궁자연살해세포는 주로 CD56^{bright}CD16⁻ 자연살해세포로 구성된다.^{6,11,12} 또한 CD56^{dim}CD16⁺ 자연살해세포와 반대로, CD56^{bright}CD16⁻ 자연살해세포는 사이토카인을 많이 분비하며, 세포 용해능 (cytolytic ability)은 낮다. 따라서 사이토카인 생성이 이 세포의 또 다른 기능이라고 할 수 있으며, 반복유산에서 이 자궁자연살해세포들의 분포가 달라지는 것이 그 기전에 영향을 줄 수 있으리라 생각된다.

임신 전과 임신 중의 자궁내막은 변화가 많기 때문에 반복유산 환자에서 임신 전의 자궁내막에서보다 임신 초기 자궁내막에서의 자연살해세포의 분포와 그 작용에 대해 연구해야 할 필요성들이 제기되어 왔지만, 이전에 반복유산 환자를 대상으로 이루어진 연구는 없었다. 본 연구에서는 반복유산 환자에서 계류유산된 조직을 이용하여 임신 초기의 자궁 탈락막자연살해세포의 분포를 살펴보고자 하였다. 즉, 본 연구는 반복유산의 원인 중 면역학적 기전에 관한 연구로서, 말초혈액자연살해세포가 증가되어 있는 반복유산 환자와 염색체 이상으로 인해 반복유산된 환자에서 자궁자연살해세포의 양적 증가 양상을 비교하고, 그 증가 양상이 말초혈액자연살해세포의 증가 양상과 연관이 있는지를 연구해 보고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

2003년 1월 1일부터 2006년 12월 31일까지 관동의대 제일병원 습관성유산 클리닉을 방문한 여성 중 임신 20주 이전에 2번 이상의 반복유산을 경험한 유산 환자를 대상으로 하였다. 즉, 임신 전에 유산의 원인을 조사하는 기본검사인 자궁난관조영술,

복강경 및 자궁경검사, 자궁경부 균 배양검사, 부부 염색체검사, 자가항체검사 (anticardiolipin antibody, antinuclear antibody, antimicrosome antibody, antithyroglobulin antibody, lupus anticoagulant), 배란 7일 후 황체호르몬검사, 자궁내막검사 등을 시행하여 염색체 이상, 자궁의 해부학적 이상, 내분비 이상, 감염에 의한 반복유산인 경우는 제외하였다. 위 환자 중 임신 6~9주 사이 다시 계류유산이 되어 자궁경부확장배출술과 배아 염색체검사를 시행하였던 환자 가운데 배아 염색체검사서 정상이고 말초혈액에서 자연살해세포 중 CD56⁺ 자연살해세포가 차지하는 백분율을 측정하여 정상 범위인 12%에 비해 15% 이상 증가된 환자들 29명을 선택하였다. 대조군으로는 반복유산 환자 가운데 배아 염색체검사서 비정상적으로 나온 32명을 선택하였다. 이 환자들 이 계류유산되어 자궁경부확장배출술을 시행한 검체에서 착상부위를 포함한 자궁 탈락막조직을 확인하고, 용모 (chorionic villi)만 있거나 착상부위가 없는 탈락막조직만 있는 경우는 제외하였다. 이 연구는 제일병원의 연구 윤리 위원회의 심의를 거쳐 수행되었다.

2. 말초혈액자연살해세포 아형검사 (Peripheral NK cell subtype 검사)

각각의 환자로부터 말초혈액 10 ml를 채취한 후 F-H gradient solution 2000 μ l를 이용하여 림프구나 큰 단핵세포를 세척, 분리하였다. CD16⁺ 및 CD56⁺ 자연살해세포에 간접 형광염색하여 유세포분석기 (FACscan Becton-Dickinson Co, mautainview, USA)를 사용하여 분석하였다. 항체는 CD16-FITC/CD56-PE를 사용하였다. 간접 형광염색법에서는 모두 FITC-IgG1/PE-IgG2를 음성 대조물질로 사용하였다. 즉, sodium heparin 진공시험관에 채취한 전혈 50 μ l에 형광색소가 부착된 해당 세포의 항체 20 μ l를 가하고 잘 혼합한 후 실온 암소에서 15분간 반응시켰다. 적혈구 용혈용액 2 ml를 넣고 소용돌이 반응 (vortex)을 시키고 실온 암소에서 10분간 반응시켰다. 5분간 원심분리하여 상층액은 버리고 PBS

로 1회 세척한 후 1% paraformaldehyde 용액을 넣어 잘 섞어준 후 분석에 사용하였다. 결과 분석은 LYSISTM II soft program을 이용하였으며 백분율을 구하였다.

3. 탈락막자연살해세포의 아형검사 (Decidual NK cell subtype test)

1) 탈락막자연살해세포의 면역조직화학염색 (Immunohistochemical staining)

(1) 조직 선택

계류유산된 연구대상에서 자궁경부확장배출술로 얻은 조직을 formalin으로 고정 후 paraffin으로 포매한 (embed) 검체를 대상으로, hematoxylin-eosin으로 염색하여 착상부위 (implantation site)의 탈락막을 확인하였다.

(2) 면역조직화학염색

자동화된 면역염색기 (Vision BioSystems Ltd., Australia)를 이용하여 strepavidin-biotin complex 방법으로 하였다. 일차 항체로는 1:200으로 희석한 mouse monoclonal antibody인 CD56 항체 (NovocastraTM, Vision BioSystems Ltd.)와 1:150으로 희석한 mouse monoclonal antibody인 CD16 항체 (NovocastraTM, Vision BioSystems Ltd.)를 이용하였다. 대표적인 조직절편 (representative tissue section)을 선택한 후 5 μ m 두께로 잘라 xylene으로 탈파라핀화 (deparaffinization)를 하고 graded alcohol로 rehydration을 했다. 10 mM citrate buffer (pH 6.0)에서 17분간 고압멸균 (autoclave)하여 항원을 추출하고, slide를 Bond-X autoimmunostainer (Vision BioSystems Ltd.)에 넣어 Bond Polymer detection system with counterstain (Vision BioSystems Ltd.)을 이용하여 면역염색을 시행하였다. 각각의 CD56, CD16 일차 항체들은 한 시간 동안 반응시켰다.

2) 면역조직화학염색의 판독

Hematoxylin-eosin 염색을 통하여 세포괴사가 일어난 부분은 제외하였고, 세포가 잘 보존된 부분만을 선별하여 판독하였다. 저배율 (40배와 100배)에서 전반적으로 염색된 밀도의 정도를 세 단계로

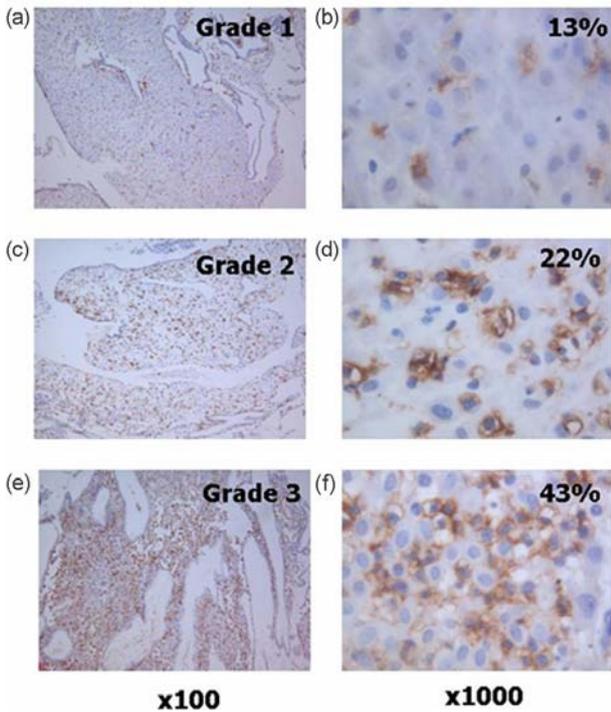


Figure 1. Immunohistochemical staining for CD56⁺ and CD16⁺ cells in deciduas.

Representative sections of immunohistochemical staining for CD56⁺ cells in deciduas showing the evaluation of grade and percentage of positive cells. Grades were evaluated by the staining density with three different levels under the low magnification (×100). Then, score was calculated by multiplying grade by positively stained cells count. Percentage of positively stained cells (brown color) were calculated by dividing with total decidual cells counted under the higher magnification (×1000). The same criteria was applied for CD16⁺ cells. Positively stained cells are seen in brown color. (a) grade 1 (×100), (b) grade 1 (×1000), (c) grade 2 (×100), (d) grade 2 (×1000), (e) grade 3 (×100), and (f) grade 3 (×1000).

평가하여 Figure 1의 (a), (c), (e)에서 대표적으로 나타낸 것처럼 등급 (grade) 1, 2, 3으로 평가하였고, 전체 슬라이드 중 면역염색된 세포의 분포를 가장 대표적으로 나타내고 있는 부위를 확인하고, 1000배 시야에서 사진을 찍어 각각 CD56과 CD16로 면역염색된 자연살해세포의 수 (count)를 세었다. 그 후 등급과 수의 값 (grade와 count)을 곱하여 임의의 score로 사용하였다 (Figure 1). 또한 면역염색 판독의 다른 방법으로 전체 슬라이드 중 면역염색된 세포의 분포를 가장 대표적으로 나타내고 있는 부위를 1000배 시야에서 확인하여 전체 간질세포의 수와, CD56 혹은 CD16에 양성을 보이는 세포의 수의 백분율 (percentage)을 구하여 비교하였다 (Figure 1).

3) 통계학적 분석

연구 결과는 SPSS version 12.0 통계 패키지 (Windows, Microsoft, WA, U.S.A)를 사용하여 통계학적으로 분석하였다. 두 군 간의 비교는 Student's t-test를 이용하였고 상관관계에는 Pearson's correlation test를 이용하였다. *P* < 0.05인 경우 통계적으로 유의하다고 정의하였다.

결 과

1. 대상 환자의 특성

배아 염색체는 정상이나 말초혈액자연살해세포가 증가되어 있는 29명의 반복유산 환자, 배아

Table 1. Characteristics of patients with elevated peripheral NK cell group and abnormal chromosome group

	Abnormal chromosome group (n=32)	Elevated pNK cell* group (n=29)	Significance
Age (years)	30.3±4.6	30.5±3.5	NS [¶]
Gravida	3.3±0.4	3.4±0.8	NS
No. of SAB [†]	2.4 (2~6)	2.6 (2~4)	NS
Primary RSA [‡] (%)	74.9	77.8	NS
Secondary RSA (%)	25.1	22.2	NS

* pNK cell: peripheral natural killer cell.

[¶] NS: not significant.

[†] SAB: spontaneous abortion. Values are mean ± SE.

[‡] RSA: recurrent abortion. *P* < 0.05 means significant.

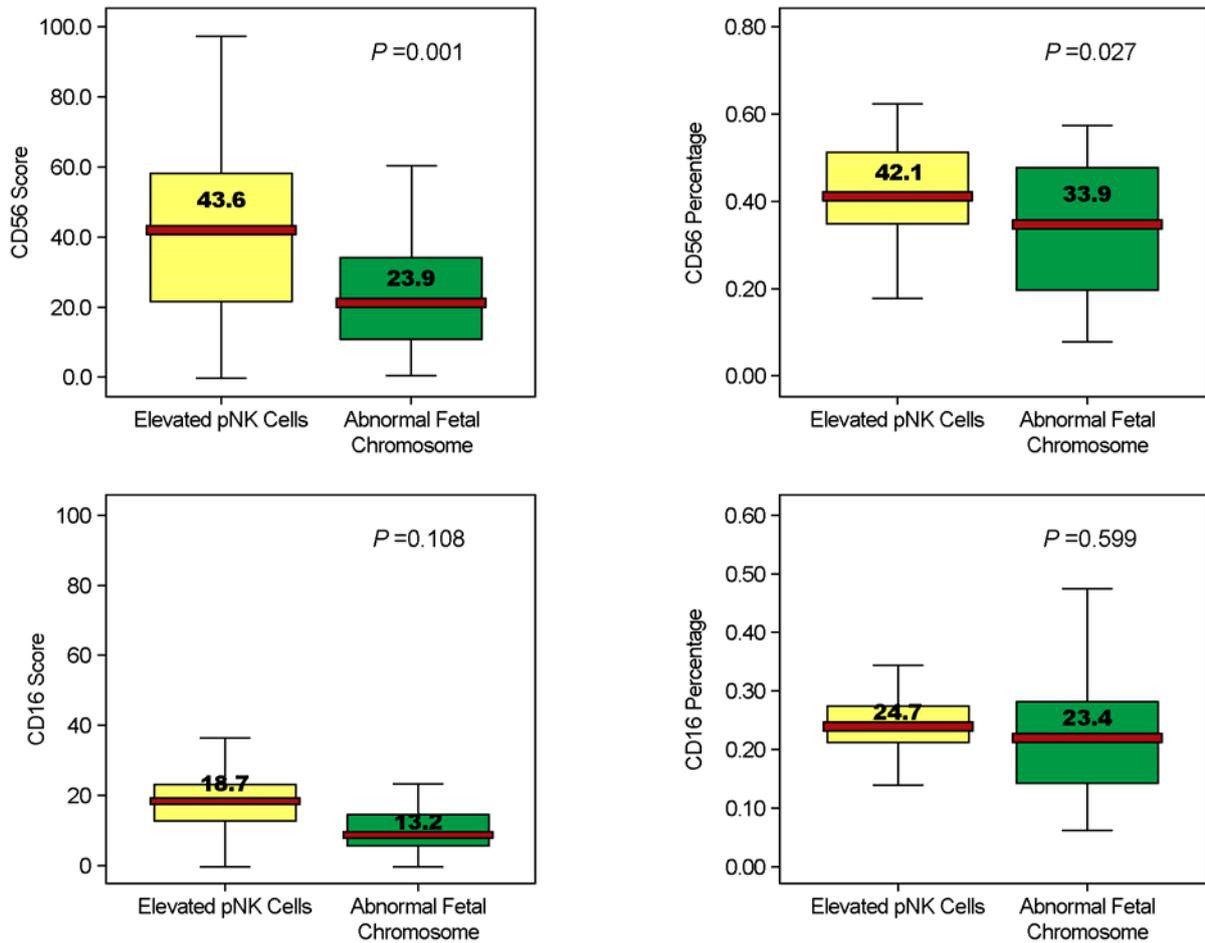


Figure 2. Score and percentage of decidual CD56⁺ and CD16⁺ NK cells in each group. Score was calculated by multiplying grade by positively stained cells count. Percentage of positively stained cells were calculated by dividing with total decidual cells counted under the higher magnification (×1000).

염색체 이상이 있었던 32명의 반복유산 환자군 사이에 평균 연령, 임신력, 자연유산의 평균 횟수, 1차성과 2차성 습관성유산의 빈도 등에서 차이가 없었다 (Table 1).

2. 탈락막조직에서의 면역염색

배아 염색체는 정상이나 말초혈액자연살해세포가 증가되어 있는 반복유산 환자군에서 탈락막조직 CD56⁺ 자연살해세포 score (43.6±24.5 vs. 23.9±16.3 P=0.001)와 CD56⁺ 자연살해세포 percentage (42.1±11.7 vs. 33.9±15.8 P=0.027)는 유의한 차이가 있었다. 그러나 탈락막조직 CD16⁺ 자연살해세포 score (18.7±9.5 vs. 13.2±39.4 P=0.108)와 CD16⁺

자연살해세포 percentage (24.7±5.9 vs. 23.4±11.7 P=0.599)는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다 (Figure 2).

3. 말초혈액자연살해세포와 탈락막자연살해세포의 상관관계

두 군에서 탈락막자연살해세포의 증가 정도는 임신부의 연령, 이전 유산 횟수와 상관관계가 없었다. 또한 말초혈액 CD56⁺ or CD16⁺ 자연살해세포가 증가되어 있는 반복유산 환자에서 탈락막자연살해세포의 score와 말초혈액자연살해세포의 백분율간에 직접적인 상관관계는 없었다 (Table 2).

Table 2. Correlation between decidual and peripheral NK cells in elevated peripheral NK cell group

	Decidual CD56 ⁺ cell score	Decidual CD56 ⁺ cell percentage	Decidual CD16 ⁺ cell score	Decidual CD16 ⁺ cell percentage
Peripheral CD56 ⁺ cell percentage	r = - 0.016 P = 0.932	r = 0.008 P = 0.964		
Peripheral CD16 ⁺ cell percentage			r = 0.008 P = 0.968	r = 0.120 P = 0.550

r: Pearson's correlation coefficient.

P <0.05 means significant.

고찰

반복유산의 원인은 크게 태아로 인한 원인과 모체로 인한 원인으로 나뉘며, 태아 측 원인으로는 태아 염색체가 비정상적인 경우가 있고, 모체 측 원인으로는 자궁내막이나 태반 발달에 영향을 주는 요인인 응고 장애, 자가 면역 질환, 내분비 장애, 자궁내막의 손상 등이 있다.^{13,14} 그러나 반복유산의 원인 중 약 50%는 여전히 원인을 알 수 없고, 이 중 많은 부분이 면역학적 원인에 기인하리라고 생각된다.

임신은 모체가 태아의 세포를 이질적인 존재 (foreign body)가 아닌 자신으로 인식하는 유일한 과정이다. 그러나 정상 임신 시 태아가 모체의 면역체계로부터 보호되는 기전이 충분히 알려져 있지 않다. 최근의 여러 연구들에 의하면 임신 시 모체에서 T 림프구 수보다 월등히 많은 자궁의 자연살해세포가 탈락막조직에 나타나는 것을 보고하였고, 자궁자연살해세포가 영양막 (trophoblast)의 침투와 분화의 정도를 조절하는 데 관여한다는 보고도 있었다.^{15,16} 태아의 융모의 세포영양막세포 (Fetal extra-villous cytotrophoblast cells)는 classical MHC I과 II, HLA-A, HLA-B는 발현하지 않고, non-classical HLA-G와 E를 발현하며 HLA-C를 낮은 정도로 발현한다.^{17,18} 다른 HLA 유전자들과는 달리 HLA-G는 nucleotide sequence에서 다형성 (polymorphism)이 거의 완전히 결여되어 있으므로 인간에게서 HLA-G 단백질은 변화되지 않는다.¹⁹ 이와 같이 단형성 (monomorphic)인 HLA-G의 발현이 모체의 면역체

계가 영양막을 이질적인 존재로 인식하지 않게 되는 기전이라고 생각된다. 만약 반대로 영양막에서 MHC I이 전혀 발현되지 않는다면 모체가 영양막을 비자기 (nonself)로 인식하여, 영양막이 자연살해세포에 의한 공격에 노출될 수도 있다. 이와 같이 모체의 일부인 탈락막내에 특수한 면역학적 체계가 존재한다는 증거들이 있으며, 이들이 정상 임신의 과정에서 중요한 역할을 하리라고 보고하였다.^{20,21} 이러한 면역체계가 제대로 작동되지 않는 것이 반복유산의 원인의 한 부분을 차지하리라는 가설들이 제시되었고, 여러 연구들이 진행되어 왔다.

본 연구에서는 반복유산 환자 가운데 배아 염색체는 정상이나 말초혈액자연살해세포가 증가되어 있는 군에서, 배아 염색체 이상이 있었던 군과 비교하여 탈락막조직 CD56⁺ 자연살해세포의 발현 정도가 유의하게 증가되어 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이는 면역학적 요인이 작용하리라고 생각되는 반복유산 환자에서 탈락막조직 CD56⁺ 자연살해세포가 유산의 기전에서 중요한 역할을 하리라는 가설을 뒷받침해준다.

그러나 말초혈액자연살해세포의 발현 정도와 탈락막자연살해세포의 발현 정도 사이에 직접적인 상관관계를 찾을 수는 없었다. 지금까지 발표된 말초혈액자연살해세포의 기능과 탈락막자연살해세포의 기능의 연관성에 대한 기존의 연구에 따르면, 말초혈액자연살해세포의 10% 이하는 표면 항원^{6,22}과 싸이토카인의 분비,^{8,23} 활동성 정도²⁴가 탈락막자연살해세포와 유사하다. 또한 말초혈액 CD56⁺ 자연살해세포는 골수에서 기원하며, IL-15에 의해 활성화된다. 아직까지 자궁에서 자궁자연살해세포

가 동원되고 지속되는데 필요한 특정한 신호가 무엇인지는 정확히 알려져 있지 않다. 첫째, 자궁자연살해세포는 말초혈액에서부터 자궁내막으로 가게 된다고 생각된다.²⁵ 둘째, 자궁자연살해세포에 Ki67이 존재하며, 이는 자궁자연살해세포가 단핵구나 수지상세포 (dendritic cell) 같은 다양한 간질세포의 분포에 영향을 받아 자궁내에서 증식한다는 것을 제시한다. 셋째, 자궁내막의 CD56⁺ 자연살해세포가 유지되는 데에는 IL-12, IL-18 같은 다양한 사이토카인의 영향을 받는다.²⁶ 이렇듯 탈락막자연살해세포는 단순히 이동 (trafficking) 뿐만 아니라, 자궁내 증식 등의 여러 기전에 의해 그 분포 정도가 결정되므로 말초혈액자연살해세포와 직접적인 선형의 상관관계를 보이지 않을 수 있으리라 생각된다. 또한 원인 불명의 반복유산 여성을 정상 대조군과 비교하였을 때 말초혈액 CD56⁺ 자연살해세포에서 CD69 발현이 증가되었다는 연구를 미루어 생각해 볼 때, 이는 자연살해세포의 절대적인 수의 차이에 세포의 활동성의 차이, 즉 기능의 차이를 반영하지 않기에 나온 결과일 것이라고도 생각된다.

임신 13주 이내의 반복유산의 원인을 연구할 때에 태아의 염색체 이상으로 인한 경우를 제외하고 그 외의 원인에 대하여 연구하는데 있어 가장 좋은 것은 반복유산 환자에게서 임신 초기의 태반조직을 얻는 것이나, 이는 윤리적인 문제로 인해 불가능하다. 따라서 반복유산의 원인을 연구하는데 있어서 면역학적인 역할을 하는 세포나 분자들을 연구하는 대체적인 접근들이 적용되어 왔다. 그러한 연구를 위한 검체로는 대표적으로 말초혈액^{27,28}이나 임신 전의 자궁내막,^{12,29} 유산된 태반조직^{30,31}이 있다.

먼저 반복유산 환자에서 말초혈액자연살해세포를 이용한 일부 연구들에서는, 임신 전이나 임신 중의 건강한 가임 여성 혹은 임신부에 비하여 반복유산 환자에서 말초혈액에서 CD56⁺ cell의 수가 증가되어 있다는 것을 보고하였다.²³ 또한 이로써 반복유산 환자에서 다음 임신 결과를 예측할 수 있다는 연구들도 있다.^{32,33} 그러나 여기에 반하는

연구 결과들도 있어 논란이 있다.

다음으로 쥐를 이용하여 자궁내막에서 자연살해세포를 비교한 연구에서는, 반복유산이 있는 경우 임신이 아닌 생리주기 중 황체기 중기와 후기의 자궁내막에서 CD56⁺ 자연살해세포가 증가한 것을 보고하였고, 자궁자연살해세포가 임신으로 유발되고 지속되는 자궁의 변화에 기여하는 핵심요인이라는 것을 제시하였다.³⁴ Quenby 등⁹과 Clifford 등³⁵은 반복유산 환자들에게서 임신이 아닌 생리주기 중에 자궁내막의 CD56⁺ 자연살해세포의 수가 증가되는 것을 보고하였으며, 자궁자연살해세포가 반복유산의 병인에 관여하리라고 주장하였다. 또한 Quenby 등⁹은 반복유산 환자들 중 다음 임신에서 유산된 경우, 임신되기 이전의 중기 황체기의 자궁내막에서 CD56⁺ 자연살해세포가 증가되어 있는 것을 보고하였다. 그러나 Michimita 등³⁶은 반복유산의 과거력이 있는 환자에서 임신 전 생리주기의 착상기 부근 시기에 자궁내막 생검을 하여 면역세포의 분포를 확인한 바로는 다음 임신의 결과를 예측하는 데 이를 사용할 수 없다고 결론을 내렸다. 이와 같이 임신 전 자궁내막에서 발현되는 CD56⁺ 자연살해세포의 정도를 반복유산 환자의 다음 임신에 대한 예측지표로 적용하는 데에는 아직까지 논란이 있다.

이상의 연구들에서 보듯이 반복유산 환자에서 임신 전 생리주기에서 자궁내막 생검을 통하여 자궁자연살해세포를 측정하거나 말초혈액에서 자연살해세포나 사이토카인 등을 측정한 연구들에서는 한계점들이 있다. 임신과 비임신 경우, 자궁내막에서의 자궁자연살해세포의 분포가 유사한지는 알려져 있지 않으며, 착상된 배아의 존재로 인하여 자궁자연살해세포의 수와 기능이 변할 수도 있다는 가능성이 존재한다. 또한 말초혈액에서 자연살해세포의 분포를 보는 것은 임신 중 자궁에서의 자연살해세포의 분포나 활동성을 직접적으로 반영해 주는지 확인하기가 어렵다. 이상적으로는 반복유산 환자의 임신 중의 자궁내막을 얻어서 자연살해세포의 분포를 보아야 하겠지만, 윤리적인 문제

로 인해 불가능하다. 따라서 몇몇의 이전 연구에서와 같이 본 연구에서는 반복유산 환자들의 계류유산된 조직을 통하여서 탈락막에서의 자연살해세포의 표현형을 확인하였다.

임신 초기의 탈락막에서 자연살해세포를 직접적으로 확인한다는 점에서 계류유산된 태반조직으로 연구하는 것은 좋은 방법이지만 이에도 제한점이 따른다. 면역체계의 구성에 대한 연구를 할 때에는 관찰되는 변화들이 유산으로 인한 세포괴사나 염증반응으로 인한 변화인지 확인하기가 어렵다. 본 연구에서는 먼저 H&E 염색을 통하여 조직에서 세포괴사가 일어난 부위는 배제하고 탈락막이 잘 보존되어 있는 착상부위만을 선택하여 가능한 변화에 대한 영향을 줄이고자 하였다. 이런 제한점에도 불구하고 반복유산 환자의 유산된 태반조직에서 단면적으로나마 직접 면역세포를 확인해 본다는 점에서 본 연구는 의미가 있는 연구라고 생각한다.

Stern 등³⁷은 반복유산된 경우 수태물의 50% 이상이 비정상적인 핵형을 가진다고 보고하였고, Yamada 등³⁸은 태아 염색체가 정상이었던 반복유산 환자에서만 말초혈액에서 CD56⁺ 자연살해세포의 수와 활동성이 증가된 것을 보고하였다. 또한 Yamamoto 등¹⁰은 계류유산된 환자에서 태아조직의 염색체검사를 확인하여 정상인 경우와 비정상인 경우를 비교한 연구에서 양쪽 군에서 말초혈액 CD56⁺ 자연살해세포의 정도에는 차이가 없었다고 보고하였다. 태아 염색체의 정상 여부가 CD56⁺ 자연살해세포의 정도와 연관성이 있을 가능성에 대해 의견들이 제시되었고, 이후의 반복유산에 대한 연구에서는 태아 염색체에 대한 확인이 필요함을 제시하였다. 따라서 본 연구에서는 모체 측 면역요인이 관여하리라고 생각되는 태아 염색체는 정상이고 말초혈액자연살해세포가 증가되어 있는 군과, 반복유산의 원인이 모체 측 원인보다는 태아 측 원인으로 볼 수 있는 태아 염색체가 비정상인 경우를 대조군으로 하여 연구를 수행하였다. 윤리적인 제약이 없어서 대조군을 반복유산이 아닌 정상적인

임신을 대상으로 계획적인 유산 (elective abortion) 을 시행한 군으로 하였다면 좀 더 나은 비교가 될 수 있었으리라고 생각된다.

탈락막의 CD56⁺ 자연살해세포의 분포에서 연구 대상군과 대조군 사이에 겹쳐지는 부분이 있다는 것은 주목할 만한 부분이다. 본 연구에서 태아 염색체 이상을 보인 반복유산 환자군에서는 반복유산의 원인이 염색체 이상으로 인한 유전적인 요인에 의한 것으로 생각하고 말초혈액에서 자연살해세포를 측정하지는 않았다. 하지만, 태아 염색체 이상을 보였던 군에서도 면역학적인 요인이 함께 작용하였을 가능성이 있고 이로 인해 탈락막에서 CD56⁺ 자연살해세포의 발현이 증가된 부분이 있을 수 있다고 생각된다. 이는 반복유산 자체가 매우 다양한 요인들에 의해 영향을 받으며 모든 경우를 한 가지의 병인만으로 설명될 수 없다는 점을 제시하여 준다.

이전에 자연유산과 선택적 유산 (elective abortion) 조직 사이에서 탈락막조직의 자연살해세포의 세포살해능 (cytolytic activity)을 비교한 연구가 있기는 하지만, 반복유산 환자를 대상으로 탈락막조직이나 자궁내막자연살해세포의 기능이나 활동성을 비교한 연구들은 거의 없었다. 본 연구는 단순히 탈락막조직에서 자연살해세포의 분포를 확인하고 비교하는 연구이지만, 유산의 기전에서 이러한 세포들의 역할을 이해하는데 있어서 기반이 될 수 있으리라고 생각한다.

이상과 같은 연구 결과로 모체의 면역학적 기전이 관여되어 있으리라고 예상되는 말초혈액자연살해세포가 증가되어 있는 반복유산 환자에서 태아의 염색체 이상이 원인으로 반복유산된 환자군에 비해 계류유산된 탈락막의 CD56⁺ 자연살해세포의 분포가 증가되어 있다는 것을 보여주었다. 그러나 말초혈액자연살해세포의 증가 정도와 탈락막자연살해세포의 증가 정도 사이에 직접적인 상관관계는 없었다. 이는 탈락막자연살해세포가 증가되어 있는 것이 반복유산의 면역학적 기전에서 중요한 역할을 할 것이라는 가능성을 제시하여 준다. 향후

반복유산에 연구에 있어서 면역세포들의 분포를 넘어 활동성 지표들 (activation markers)을 비롯하여 세포살해능 (cytolysis)과 분비능 (secretory activity) 같은 기능성 지표들 (functional parameters)에 대한 연구들이 이루어져서 반복유산의 면역학적 요인에 대한 활발한 연구들이 이루어지길 기대한다.

참 고 문 헌

1. Regan L. Recurrent miscarriage. *Brit Med J* 1991; 302: 543-4.
2. Aoki K, Kajiura S, Matsumoto Y, Ogasawara M, Okada S, Yagami Y, et al. Preconceptional natural-killer-cell activity as a predictor of miscarriage. *Lancet* 1995; 345: 1340-2.
3. Kwak JY, Beaman KD, Gilman-Sachs A, Ruiz JE, Schewitz D, Beer AE. Upregulated expression of CD56+, Cd56+/CD56-, and CD19+ cells in peripheral blood lymphocytes in pregnant women with recurrent pregnancy losses. *Am J Reprod Immunol* 1995; 34: 93-9.
4. Higuchi K, Aoki K, Kimbara T, Hosoi N, Yamamoto T, Okada H. Suppression of natural killer cell activity by monocytes following immunotherapy for recurrent spontaneous aborters. *Am J Reprod Immunol* 1995; 33: 221-7.
5. Yamada H, Morikawa M, Kato EH, Shimada S, Kobashi G, Minakami H, et al. Preconceptional natural killer cell activity and percentage as predictors of biochemical pregnancy and spontaneous abortion with normal chromosome karyotype. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50: 351-4.
6. King A, Burrows T, Verma S, Hiby S, Loke YW. Human uterine leukocytes. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 480-5.
7. Trundle A, Moffett A. Human uterine leukocytes and pregnancy. *Tissue Antigens* 2004; 63: 1-12.
8. Loke YW, King A. Human implantation: cell biology and immunology. Cambridge: Cambridge University Press; 1995; 256-61.
9. Quenby S, Bates M, Doig T, Brewster J, Lewis-Jones DI, Johnson PM, et al. Pre-implantation endometrial leukocytes in women with recurrent miscarriage. *Hum Reprod* 1999; 14: 2386-91.
10. Yamamoto T, Takahashi Y, Kase N, Mori H. Role of decidual natural killer (NK) cells in patients with missed abortion: differences between cases with normal and abnormal chromosome. *Clin Exp Immunol* 1999; 116: 449-52.
11. Koopman LA, Kopcow HD, Rybalov B, Boyson JE, Orange JS, Schatz F, et al. Human decidual natural killer cells are a unique NK cell subset with immunomodulatory potential. *J Exp Med* 2003; 198: 1201-12.
12. Dosiou C, Giudice LC. Natural killer cells in pregnancy and recurrent pregnancy loss: endocrine and immunologic perspectives. *Endocr Rev* 2005; 26: 44-62.
13. Aplin J. Maternal influences on placental development. *Semin Cell Dev Biol* 2000; 11: 115-25.
14. Li TC, Makris M, Tomsu M, Tuckerman EM, Laird SM. Recurrent miscarriage, aetiology, management and prognosis. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 463-81.
15. Biassoni R, Bottino C, Millo R, Moretta L, Moretta A. Natural killer cell-mediated recognition of human pregnancy. *Cancer Biol* 1999; 9: 13-8.
16. King A, Loke YW. On the nature and function of human uterine granular lymphocytes. *Immunol Today* 1991; 12: 432-5.
17. King A, Boocock C, Sharkey A, Gardner L, Beratta A, Siccardi AG, et al. Evidence for the expression of HLA-C class I mRNA and protein by first trimester trophoblast. *J Immunol* 1996; 156: 2068-76.
18. Le Bouteiller P. HLA-G in the human placenta; expression and potential functions. *Biochem Soc Trans* 2000; 28: 208-12.
19. Bainbridge DRJ, Ellis SA, Sargent IL. The short forms of HLA-G are unlikely to play a role in pregnancy because they are not expressed at the cell surface. *J Reprod Immunol* 2000; 47: 1-16.
20. Emmer PM, Steegers EAP, Kerstens HMJ, Bulten J, Nelen WL, Boer K, et al. Altered phenotype of HLA-G expressing trophoblast and decidual natural killer cells in pathological pregnancies. *Hum Reprod* 2002; 17: 1072-80.
21. Hunt JS, Petroff MG, Morale P, Sedlmayr P, Geraghty DE, Ober C. HLA-G in reproduction: studies on the maternal-fetal interface. *Hum Immunol* 2000; 61: 1113-7.
22. Searle RF, Jones RK, Bulmer JN. Phenotypic analysis and proliferative responses of human endometrial granulated lymphocytes during the menstrual cycle. *Biol Reprod* 1999; 60: 871-8.
23. Jokhi PP, King A, Loke YW. Cytokine production and cytokine receptor expression by cells of the human first trimester placental-uterine interface. *Cytokine* 1997; 9: 126-7.
24. Ferry BL, Starkey PM, Sargent IL, Watt GM, Jackson M,

- Redman CW. Cell populations in the human early pregnancy decidua: natural killer activity and response to interleukin-2 of CD56-positive large granular lymphocytes. *Immunology* 1990; 70: 446-52.
25. Heuval MJ, Chantakru S, Xuemei X, Evans SS, Tekpetey F, Mote PA, et al. Trafficking of circulating pro-NK cells to the decidualizing uterus: regulatory mechanisms in the mouse and human. *Immunol Invest* 2005; 34: 273-93.
 26. Ledee-Bataille N, Bonnet-Chea K, Hosny G, Dubanchet S, Frydman R, Chaouat G. Role of the endometrial tripod interleukin -18 -15 and -12 in inadequate uterine receptivity in patients with a history of repeated in vitro fertilization embryo transfer failure. *Fertil Steril* 2005; 3: 598-606.
 27. Hill JA, Polgar K, Anderson DJ. T-helper 1-type immunity to trophoblast in women with recurrent spontaneous abortion. *JAMA* 1995; 273: 1933-6.
 28. Raghupathy R, Makhseed M, Azizieh F, Omu A, Gupta M, Farhat R. Cytokine production by maternal lymphocytes during normal pregnancy and in unexplained recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2000; 15: 713-8.
 29. Von Wolff M, Thaler CJ, Strowitzki T, Broome J, Stolz W, Tabibzadeh S. Regulated expression of cytokines in human endometrium throughout the menstrual cycle; dysregulation in habitual abortion. *Mol Hum Reprod* 2000; 6: 627-34.
 30. Piccinni M, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nature Med* 1998; 4: 1020-3.
 31. Vassiliadou N, Bulmer JN. Characterization of endometrial T lymphocyte subpopulations in spontaneous early loss. *Hum Reprod* 1998; 13: 44-7.
 32. Coulam CB, Goodman C, Roussev RG, Thomason EJ, Beaman KD. Systemic CD56+ cells can predict pregnancy outcome. *Am J Reprod Immunol* 1995; 33: 40-6.
 33. Emmer PM, Nelen WL, Steegers EA, Hendriks JC, Veerhoek M, Joosten I. Peripheral natural killer cytotoxicity and CD56+ CD16+ cells increase during early pregnancy in women with a history of recurrent spontaneous abortion. *Hum Reprod* 2000; 15: 1163-9.
 34. Croy BA, He H, Esadeg S, Wei Q, McCartney D, Zhang J, et al. Uterine natural killer cells: insights into their cellular and molecular biology from mouse modeling. *Reproduction* 2003; 126: 149-60.
 35. Clifford K, Flanagan AM, Regan L. Endometrial CD56+ natural killer cells in women with recurrent miscarriage: a histomorphometric study. *Hum Reprod* 1999; 14: 2727-30.
 36. Michimita T, Ogasawara MS, Tsuda H, Suzumori K, Aoki K, Sakai M, et al. Distributions of endometrial NK cells, B cells, T cells, and T2/Tc2 cells fail to predict pregnancy outcome following recurrent abortion. *Am J Reprod Immunol* 2002; 47: 196-202.
 37. Stern JJ, Dorfmann AD, Gutierrez-Najar AJ, Cerrillo M, Coulam CB. Frequency of abnormal karyotypes among abortuses from women with and without a history of recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril* 1996; 65: 250-3.
 38. Yamada H, Kato HE, Kobashi G, Ebina Y, Shimada S, Morikawa M, et al. High NK cell activity in early pregnancy correlates with subsequent abortion with normal chromosomes in women with recurrent abortion. *Am J Reprod Immunol* 2001; 46: 132-6.

= 국문초록 =

목적: 말초혈액 CD56⁺ 자연살해세포 (natural killer cell)이 증가되어 있는 반복유산 환자들의 탈락막 CD56⁺/CD16⁺ 자연살해세포의 분포를 확인하고 말초혈액자연살해세포의 발현양상과 상관관계가 있는지 확인해 보고자 한다.

연구방법: 반복유산 환자 중 계류유산이 되어 자궁경부확장배출술과 배아 염색체검사를 시행하였던 환자 가운데 배아 염색체검사가 정상이고 말초혈액에서 자연살해세포 중 CD56⁺ 자연살해세포가 증가된 환자들 29명을 대상으로 연구하였으며, 대조군으로는 배아 염색체검사가 비정상인 32명을 선택하였다. 이 환자들의 검체에서 착상부위를 포함한 자궁 탈락막세포를 확인하여 면역조직화학염색을 통해 CD56⁺와 CD16⁺ 자연살해세포의 분포를 확인하였다. 면역조직화학염색은 score와 백분율을 구하여 평가하였다.

결과: 연구군과 대조군의 탈락막조직 CD56⁺ 자연살해세포 score (43.6 ± 24.5 vs. 23.9 ± 16.3 $P = 0.001$)와 CD56⁺ NK cell percentage (42.1 ± 11.7 vs. 33.9 ± 15.8 $P = 0.027$)는 유의한 차이가 있었다. 그러나 탈락막조직 CD16⁺ NK cell score (18.7 ± 9.5 vs. 13.2 ± 39.4 $P = 0.108$)와 CD16⁺ 자연살해세포 percentage (24.7 ± 5.9 vs. 23.4 ± 11.7 $P = 0.599$)는 통계학적으로 유의한 차이가 없었다. 말초혈액자연살해세포가 증가되어 있는 환자군에서 탈락막자연살해세포의 score와 말초혈액자연살해세포의 백분율간에 직접적인 상관관계는 없었다 (peripheral CD56⁺ NK cell percentage vs. decidual CD56⁺ NK cell score, $r = -0.016$, $P = 0.932$, peripheral CD16⁺ NK cell percentage vs. decidual CD16⁺ NK cell score, $r = 0.008$, $P = 0.968$).

결론: 본 연구에서는 말초혈액 CD56⁺ 자연살해세포가 증가되어 있는 반복유산 환자의 계류유산된 조직에서 탈락막 CD56⁺ 자연살해세포가 증가되어 있다는 것을 보여 주었다. 또한 탈락막자연살해세포와 말초혈액자연살해세포의 증가 양상에서는 직접적인 상관관계는 없었다. 이는 탈락막자연살해세포가 반복유산의 면역학적인 기전에서 중요한 역할을 할 것이라는 가능성을 제시하여 준다.

중심단어: 탈락막자연살해세포, CD56⁺/CD16⁺ 자연살해세포, 반복유산