

류마티스관절염 환자의 활액에서 형광 리포터 생쥐 시스템을 이용한 인터루킨-12/인터루킨-23 p40 생성 유도물질의 발굴

김정은, 조미라¹, 홍석만, 김원규², 윤지희²

세종대학교 공과대학 생명공학과

¹가톨릭대학교 의과대학 연구원 류마티스연구센터

²한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실

간추림 : 류마티스관절염은 주로 가동관절에 만성적 염증 소견을 보이는 자가면역질환으로 그 발병기전이 잘 알려져 있지 않다. 본 연구에서는 류마티스관절염에 걸린 관절조직에서 활성화된 병적 신호전달체계를 규명하기 위한 노력의 일환으로, 류마티스관절염 또는 골관절염 환자의 무릎 관절에서 분리한 활액 속에 포함된 물질이 전염 증성 사이토카인인 인터루킨(IL)-12와 IL-23 생성을 유도할 수 있는지를 조사하였다.

IL-12/IL-23 p40 형광 리포터 생쥐의 복강에서 분리한 대식세포를 활액으로 자극한 후, CD11b⁺ 세포 중에서 노란형광을 띤 세포를 유세포분석기로 분석하여 IL-12/IL-23 p40의 생성을 유도하는 물질이 포함된 활액을 스크리닝하였다. 이들 유도물질이 관절조직 속의 활막세포에서 Toll-like receptors (TLRs)를 통하여 신호를 보내 이 사이토카인의 생성을 유도할 가능성을 조사하기 위하여, 활막조직에서 분리한 활막세포에서 TLR-2와 TLR-4의 발현 양상을 RT-PCR 방법으로 조사하였다.

10명의 류마티스관절염 환자 중 한명의 활액이 양성반응을 보였으며, 10명의 골관절염 환자의 활액은 모두 음성반응을 보였다. 류마티스관절염 환자의 활막세포는 TLR-2와 TLR-4를 모두 발현하고 있었고, LPS 자극에 의하여 TLR-2의 발현은 감소하고 TLR-4의 발현은 증가하는 변화를 보였다.

그러므로 본 연구결과는 류마티스관절염 환자의 일부는 관절조직에서 전염증물질로 알려진 IL-12와 IL-23의 생성되어 염증반응을 일으키며 이 과정을 TLR-2와 TLR-4가 매개할 가능성이 있음을 제시한다.

찾아보기 낱말 : 류마티스관절염, 활액, 인터루킨-12, 인터루킨-23, Toll-like receptor

서 론

류마티스관절염은 그 병적 증상이 주로 가동관절(diarthrodial joint)에 대칭적으로 나타나는 전신성 만성 염증 질환이며 자가면역성을 띤다(Youn 2005). 류마티스관절염은 전 세계 인구의 약 1%에 일어나

지만 장기간 진단과 치료가 어려운 난치병이어서 심각한 사회적 경제적 문제를 일으키는 요인이 되고 있음에도 불구하고 그 발병기전에 대하여서는 잘 알려져있지 않다. 일반적으로, 류마티스관절염은 이 질환에 민감한 유전적 성향을 가진 사람이 류마티스관절염의 병인에 관련된 항원에 노출됨에 의하여 발병되는 것으로 가정되며, 자가관용(self tolerance) 파괴에서부터 관절 부전의 임상적 소견에 이르기까지 면역계를 구성하는 다양한 구성 성분 간의 부적절한 상호작용의 산물로 생각되어진다(Blass 등 1999). 일차적으로 말초(periphery)에 형성된 T,

*본 논문은 학술진흥재단의 선도연구자 지원사업(E00108, 윤지희)과 한국과학재단의 특정기초연구과제(R01200500010-10702006, 홍석만)의 지원 하에 수행되었음.
교신저자: 윤지희(한양대학교 의과대학 해부·세포생물학교실)
전자우편: jhyoun@hanyang.ac.kr

B 림프구 repertoire에서 자가 항원 특이 림프구가 증식되고 활성화되어 전신적 적응 자가면역성 (adaptive autoimmunity)이 발생하는 단계가 진행되며 이 단계에서는 임상적 병변이 관찰되지 않는다. 이어, 관절조직에 국한된 염증성 관절염이 시작되는 임상적 단계가 전개된다. 이 단계에서 처음에는 염증세포의 침윤, 활막염 (synovitis), 활막의 증식 (hyperplasia)에 의한 pannus 형성, 새 혈관 형성 등이 발달하며 이런 상태가 만성적으로 지속되면서 관절 연골과 뼈의 파괴가 시작되고 결국 관절부전상태에 까지 이르게 된다. 이런 현상은 림프구, 섬유모세포, 백혈구 계통의 세포를 포함한 여러 다양한 세포들과 그들의 산물인 용해성 또는 막 부착성 효과물질들이 합작으로 만들어낸 결과일 것이다. 이런 일련의 병적 상태가 유도되는데 시발점이 되며 또한 중추적인 역할을 하는 작동자는 CD4⁺ T 세포라 할 수 있다.

CD4⁺ T 세포 아형 중에서 류마티스관절염 발병 이전에 관여하리라 제시된 세포로는 제1형 도움 T (type1 helper T, Th1) 세포와 인터루킨 (interleukin, IL)-17을 분비하는 T 세포 (Th_{IL-17})를 들 수 있다. Th1/Th2 패러다임에 의하면, Th1 세포는 IFN- γ 를 생성하고 대식세포 활성을 촉진하여 세포면역반응을 일으키는 반면 Th2 세포의 발생을 억제하는 기능을 가진 세포이다. 여러 동물모델 실험을 통하여 Th1 세포의 기능이 류마티스관절염 뿐 아니라 제1형 당뇨병, 다발성 경화증 (multiple sclerosis) 등과 같은 기관 특이적 (organ-specific) 자가면역질환의 발병에서 첫 염증반응을 매개하는 것으로 잘 알려져 있다 (McIntyre 등 1996, Malfait 등 1998, O'Garra와 Arai 2000). 이런 Th1 세포의 발생에 결정적인 역할을 하는 물질 중에 IL-12가 있다. IL-12는 주로 대식세포, 수지상세포 (dendritic cells) 등에 의하여 생성되는 사이토카인으로, p35와 p40이라는 두 가지 단량체가 결합된 이형복합체로 되어 있다.

IL-23는 IL-12와 p40를 공유하는 사이토카인으로 기관 특이적 자가면역질환의 발병과 밀접한 관련이 있다. IL-23 p19 결핍 생쥐에서 experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)와 콜라겐 유도 관절염이 잘 일어나지 않음은 이 사이토카인이 자가면

역질환 발병 이전에 중요한 역할을 함을 시사한다 (Cua 등 2003, Murphy 등 2003). IL-23는 EAE와 관절염 모두에 병적 요인으로 작용하는 IL-17을 생성하는 세포인 Th_{IL-17} 발생에도 관여하는 것으로 알려져 있다 (Aggarwal 등 2003). 그러므로 IL-23/IL-17으로 구성된 병적 사이토카인 신호전달체계는 자가면역질환 발병에 결정적이다. 이런 맥락에서 IL-12, IL-23가 어떻게 생성되는지를 파악하는 것은 류마티스관절염 발병기전을 이해하는데 중요한 단서를 제공할 것이다. 주로 대식세포와 수지상세포에서 생성되는 이 물질들이 어떤 물질에 의하여 어떤 경로로 생성되는지가 연구대상이다. 이들 세포 표면에 발현하며 병적 신호를 세포 내 전달하는 주요한 세포표면 수용체로 Toll-like receptors (TLRs)를 들 수 있다.

포유류의 TLR은 초파리에 존재하는 Toll과 유사한 구조를 갖고 있는 type I transmembrane 단백질이다 (Akira와 Takeda 2004). TLRs는 병원균의 구성 성분에 특이적으로 결합할 수 있는 pattern recognition receptor의 일종으로 포유류에서 TLR1-11까지 11가지가 알려져 있다. TLR은 주로 대식세포 및 수지상세포와 같은 항원제시세포에 발현되어 병원균을 인식하는 일차 방어에 있어서 뿐만 아니라, T 세포 활성화를 통하여 적응면역반응을 조절하는데 중요한 역할을 담당하리라 생각된다 (Schnare 등 2001). 세포내에서 TLR에 결합하는 adapter 단백질인 MyD88은 TLR의 Toll/IL-1R motif에 결합하고 한편 death domain을 통해 IL-1R-associated kinase (IRAK)에 결합한다. 활성화된 IRAK은 TRAF6와 결합하여 결국 NF- κ B나 MAPK 경로를 활성화한다. TLR4 리간드로는 lipopolysaccharide (LPS)와 bacterial glycolipid와 같은 pathogen-associated molecular pattern (PAMP) 뿐 아니라 taxol, heat shock protein (HSP)60, HSP 70 등과 같은 다양한 형태의 물질들이 알려졌다 (Takeuchi 등 1999, Ohashi 등 2000, Asea 등 2002). 특히 자가면역 질환과 연관이 있는 HSP에 대한 반응성은 TLR 신호가 자가면역 반응 유발에 관여하리라 가정을 가능케 한다. 또한, 이들 리간드의 다양성은 더 많은 리간드가 존재 가능함을 시사한다.

본 논문에서는 류마티스관절염 환자의 관절조직에 생긴 활액에 병적 역할을 담당하는 IL-12와 IL-23의 발현을 유도하는 물질이 들어있는지를 알아보고자 하였다. 본 연구를 위하여 특별히 IL-12/IL-23 p40 리포터 생쥐모델 (Im 등 2005, Reinhardt 등 2006)을 활용하였다. 이 생쥐 시스템은 p40가 발현되는 상황에서 형광단백질도 동시에 같이 발현되기 때문에, 이 생쥐의 세포에 형광을 띠게 하는 물질이 함유된 활액을 보다 용이하게 검출함에 의하여 류마티스관절염 기전의 일부 회로를 밝힐 수 있었다.

재료 및 방법

1. IL-12/IL-23 p40-YFP 리포터 생쥐

6~12주령의 IL-12/23 p40 knockin 생쥐 (yet40) (Im 등 2005)를 실험에 이용하였으며, 세종대학교 동물사육실에서 유지하였다. 방사선 멸균사료와 autoclave한 물을 자유롭게 섭취시켰고 12시간 명암 조건을 유지하였다.

2. 대식세포 수확 및 자극

류마티스관절염 환자 활액 속에 IL-12/IL-23 p40 발현을 유도하는 물질이 함유되어 있는지를 조사하기 위하여 yet40 생쥐의 복강으로부터 분리한 대식세포를 사용하였다 (Trinchieri 2003). American College of Rheumatology 규정에 합당한 10명의 류마티스관절염 환자와 대조군으로 10명의 골관절염 환자로부터 치료과정 중 제거된 활액을 얻어 1,500 rpm으로 원심분리하여 세포 및 조직 찌꺼기를 가라앉히고 그 상층액을 얻어 PBS에 1:50으로 희석하여 대식세포 배양에 사용하였다. 복강 내 대식세포를 얻기 위하여, 멸균된 증류수에 녹인 4% thioglycollate (Sigma) 2 mL을 yet40 생쥐의 복강에 주입하고 약 3~5일이 지난 후, 복수를 주사기로 빼 내었다. 복수를 낮은 속도로 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 분리한 복강세포로부터 부착성 대식세포를 선별해 내기 위하여 세포를 24-well plate에서 3시간 동안 배양한 후, 부착 되지 않은 세포는 배지로 세

척하여 제거하였다. plate에 부착된 대식세포는 recombinant IFN- γ (100 U/mL)를 첨가하여 초기 활성을 유도하였다. 이렇게 준비된 세포에 1 μ g/mL LPS (Sigma) 또는 환자의 활액을 첨가하여 약 16시간 자극한 후 IL-12/IL-23 p40 발현을 대변하는 노란 형광을 띠는 세포를 유세포분석기 (flow cytometer)를 이용하여 분석하였다.

3. 유세포 분석 (flow cytometry)

자극이 끝난 대식세포를 수확하여 1 \times 10⁶ 세포 당 1 μ g의 anti-CD11b-phycoerythrin (PE) 항체 (BD Pharmingen)로 4°C에서 45분간 염색한 후 1% FBS와 0.1% NaN₃를 함유한 PBS로 세척하고 1% paraformaldehyde로 고정하였다. 고정된 세포를 FACS^{Calibur} (Becton Dickinson)를 이용하여 분석하였다.

4. 활막세포에서 TLRs 발현 조사

류마티스관절염환자의 관절조직에서 얻어 확립한 활막세포주 (Youn 등 2005)를 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 units/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 2 mM L-glutamine, 50 μ M 2-mercaptoethanol, 0.1 mM non-essential amino acid (Life Technologies)가 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 배양기 내에서 배양하였다. 세포에 5 μ g/mL LPS를 첨가하여 12시간 배양한 후 Trozol (Invitrogen)로 세포를 분해하고 균질화 한 후에 회사에서 제시하는 방법에 의하여 총 RNA를 순수분리 하였다. 반응버퍼에 2 μ g의 RNA, 5 μ g/mL random hexamer, 1 mM dNTP, 0.8 unit/mL avian myeloblastosis virus reverse transcriptase XL, 0.48 unit RNase inhibitor (Takara)를 넣고, 멸균 3차 증류수로 전체 부피를 25 μ L로 맞추었다. 42°C에 1시간 반응시켜 cDNA를 만들었다. 만들어진 cDNA 0.16 μ g을 주형으로 이용하여 1 μ M primer와 0.25 mM dNTP, PCR buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂), 0.06 unit Taq DNA polymerase (Takara)를 넣고 멸균 3차 증류수로 전체부피를 25 μ L로 맞추었다. 94°C 30초, 55°C 45초, 72°C 45초로 32 cycle을 반응시키고 72°C에서

7분간 더 반응시켰다. 증폭된 PCR 산물을 ethidium bromide가 포함된 1% agarose gel에 전기영동하고 자외선을 조사하여 사진을 찍었다. PCR에 사용된 primer 염기서열은 다음과 같다: TLR-2 sense, 5'

GCC AAA GTC TTG ATT GAT TGG 3'; TLR-2 anti-sense, 5' TTG AAG TTC TCC AGC TCC TG 3'; TLR-4 sense, 5' TGG ATA CGT TTC CTT ATA AG 3'; TLR-4 anti-sense, 5' GAA ATG GAG GCA CCC

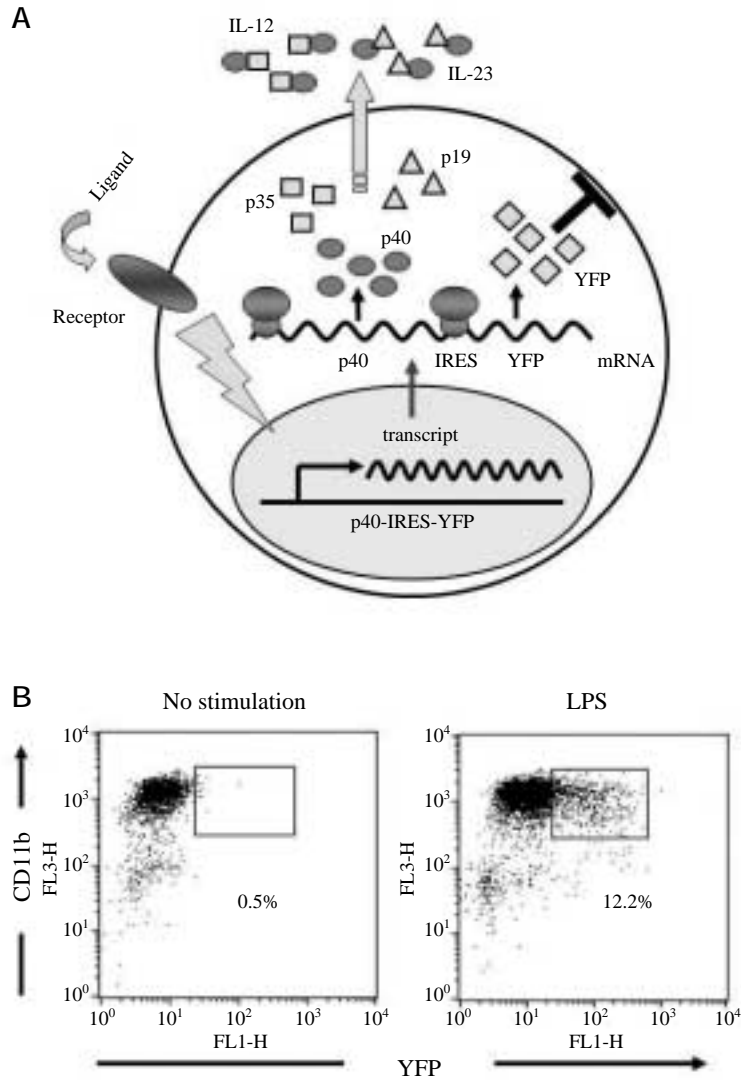


Fig. 1. The cytokine reporter system. A, Diagram for the IL-12/IL-23 p40-YFP knockin reporter system. When cells are stimulated with appropriate ligands for receptors, such as LPS, IL-12/IL-23 p40 gene begins to express. Since IL-12/IL-23 p40 gene is linked to YFP gene via IRES, IL-12/IL-23 p40 proteins are secreted extracellularly while YFPs are produced at the same time but remain in the cytosol, consequently marking cells yellow. B, Peritoneal macrophages in vivo elicited by injection with thioglycollate were isolated from IL-12/IL-23 p40 reporter mice and stimulated with 1 μ g/mL LPS. Cells were stained with anti-CD11b-PE and analyzed by FACS. Values are the percentage of YFP⁺ cells among CD11b⁺ cells.

CTT C 3'; GAPDH sense, 5' CGA TGC TGG GCG TGA GTA C 3'; GAPDH anti-sense, 5' CGT TCA GCT CAG GGA TGA CC 3'.

결 과

1. IL-12/IL-23 p40 리포터 생쥐를 이용한

IL-12/IL-23 발현의 유세포분석 시스템 확립

IL-12/IL-23을 생산하는 세포는 면역학에서 중요한 위치를 차지하고 있지만, 이 사이토카인을 생산하는 세포를 생체 내에서 측정하는 방법은 한정되어 있었다. 하지만 최근에 IL-12/IL-23을 구성하는 단백질인 p40을 발현하는 세포는 자동적으로 형광을 띄도록 고안된 생쥐 모델이 확립되었다(Reinhardt 등 2006). 이 IL-12/IL-23 p40 knockin 생쥐 모델은 genome 상에서 p40 유전자의 8번째 exon과 노란형 광단백질 (yellow fluorescence protein, YFP) 유전자가 internal ribosomal entry site (IRES)를 사이에 두고 연결되어 있고 그 뒤에 정지 codon이 연결된 형태를 갖는다. 그러므로 대식세포나 수지상세포가 적당한 자극을 받아서 IL-12/IL-23 p40 유전자가 발현되는 상태가 되면 YFP 유전자도 동시에 같이 전사 (transcription)되고 번역 (translation)되어 결국 p40과 YFP 단백질이 생성된다. 이 중 p40 단백질은 p35, p19와 결합하여 각각 IL-12, IL-23 사이토카인이 되어 세포 밖으로 분비되는 반면 YFP 단백질은 세포질에 머물러 결과적으로 세포가 488 nm 파장의 빛을 받으면 노란 형광을 띄게 된다. 이러한 원리에 의하여 IL-12/IL-23 p40을 발현하는 세포를 유세포 분석 방법으로 용이하게 관찰이 가능하게 되었다 (Fig. 1A).

이 생쥐 모델에서 YFP 발현을 분석함에 의하여 IL-12/IL-23 p40 유전자 발현 유무를 조사하는 것이 유효한지를 살펴보았다. 복강 내에 모여든 활성화된 대식세포를 취합한 후 TLR-4 agonist인 LPS로 자극을 주어 대식세포에서 IL-12/IL-23 p40의 발현을 유도하였다. 복강에서 분리하여 배양한 세포의 대부분은 대식세포 특이 표지인 CD11b를 발현하였

으며 이 세포들은 자극이 없는 상태에서는 YFP를 발현하지 않았으나 LPS 자극에 의하여 YFP의 발현이 현저히 증가하였다 (Fig. 1B). 그러므로 YFP 발현에 대한 유세포 분석은 p40 발현을 충실히 대변해 준다고 할 수 있다.

2. 류마티스관절염 환자의 활액에서 IL-12/IL-23 p40 발현 유도 탐색

동물모델 실험을 통하여 류마티스관절염 발병기 전에 IL-12와 IL-23가 관여할 가능성이 제시되어 왔으나, 이런 가설이 사람 질환에도 적용되는지에 대한 연구는 미흡하였다. 이런 의문에 답을 구하고자 p40 리포터 생쥐의 대식세포를 이용하여 류마티스관절염 환자의 활액에 IL-12/IL-23 p40 발현을 유도하는 전염증성 물질이 함유되어 있는지를 알아보았다. 대조군으로는 골관절염 환자의 활액을 사용하였다. yet40 생쥐로부터 분리한 대식세포를 배양한 후, 류마티스관절염 환자와 골관절염 환자 각각 10명으로부터 채취한 활액의 1 : 50 희석물을 세포에 처리하였다. LPS 자극은 YFP 발현 세포의 비율을 약 20배 증가시켰다. 10명의 류마티스관절염 환자 중 한명의 환자에서 자극을 주지 않은 세포에 비해 3배 이상 YFP 발현 세포의 비율이 증가하였다 (Fig. 2). 하지만 10명의 골관절염환자 활액은 모두 YFP 발현 유도 면에서 음성대조군에 준하는 수준으로 음성반응을 보였다 (Table 1). 그러므로 일부 류마티스관절염 환자의 활액에는 대식세포에서 IL-12/IL-23 p40의 발현을 유도하는 물질이 함유되어 있으리라 추정된다. 이들 물질은 대식세포 표면에 분포하는 TLR과 같은 수용체를 통하여 그 신호를 세포 내로 전달할 것이다. LPS는 대표적인 TLR-4 agonist 이므로 환자활액이 LPS endotoxin으로 오염되었을 경우에도 양성 반응이 나올 수 있다. 이런 가능성을 배제하기 위하여 Limulus 반응으로 활액 내 endotoxin 량을 측정하였는데, 그 양이 모든 환자 샘플에서 비슷한 수준으로 endotoxin이 제거된 증류수와 유사한 수준이었다 (데이터 생략). 그러므로 양성반응을 보인 활액에서 양성반응 원인 물질이 LPS는 아닌 것으로 추정되었다.

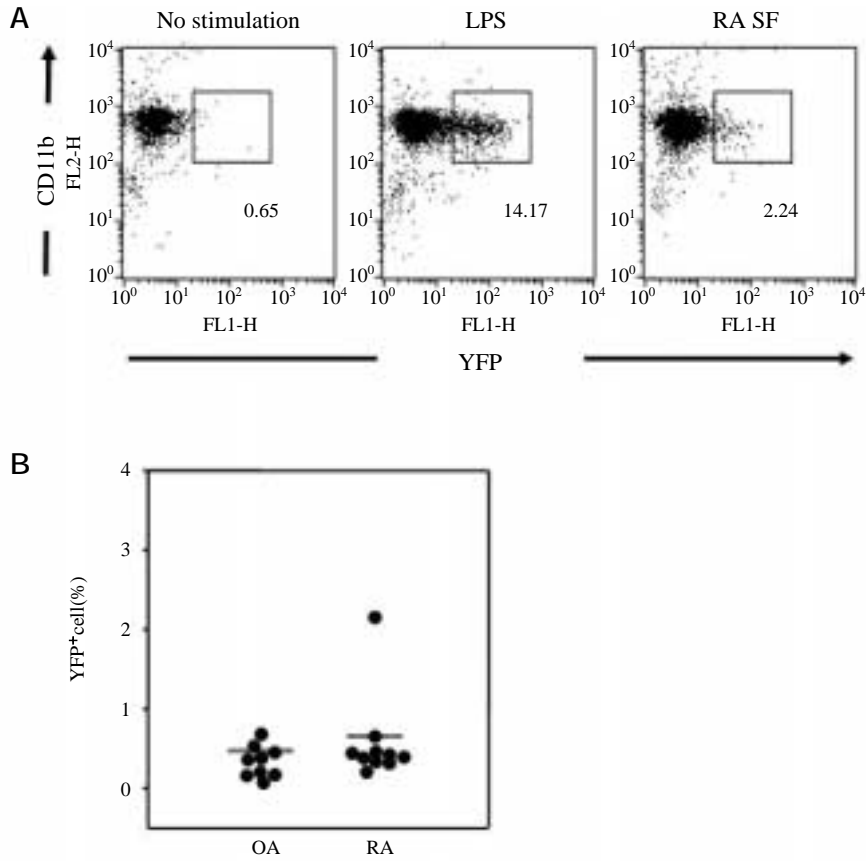


Fig. 2. Responses of synovial fluid-treated macrophages. Peritoneal macrophages were stimulated with either LPS or synovial fluid (SF) from patients with rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) and analyzed by flow cytometry. A, Representative figures showing the profile of CD11b⁺/YFP⁺ cells. Values are the percentage of YFP⁺ cells among CD11b⁺ cells. B, Percentages of YFP⁺ cells in response to stimulation with synovial fluids from RA and OA patients. Bars represent the mean of each group.

3. 류마티스관절염 환자의 활막세포에서 TLR-2, TLR-4 발현 양상

활액에 함유되어 있는 IL-12/IL-23 유도물질이 관절조직에 존재하는 세포에 작용하여 병적신호를 창출하기 위하여서는 관절조직 세포 표면에 그 유도물질에 대한 수용체가 필히 발현되어 있어야 한다. 활막을 구성하는 바탕 세포는 크게 대식세포 유래 활막세포와 섬유모세포 유래 활막세포로 되어있으며, 이 중 후자는 세포주로 배양 및 유지가 가능하여 in vitro 실험에서 주로 활용되는 세포원인데, 활

막염을 유발하는데 중요하게 작용하는 주요 효과세포로 알려져 있다. 이 세포에 IL-12/IL-23 p40 유도물질의 신호를 매개할 수 있는 수용체의 발현 양상을 알아보기 위하여 TLR-2와 TLR-4의 발현 양상을 RT-PCR로 조사하였다. 류마티스관절염 환자의 활막세포는 특별한 자극이 없는 상태에서도 TLR-2와 TLR-4 전사체를 발현하였다. LPS로 자극을 준 경우 TLR-2 발현량은 현저히 감소하였고 TLR-4 발현량은 약간 증가하는 추세를 보였다(Fig. 3). 그러므로 활막세포는 활액속에 들어있는 TLR-2 또는 TLR-4 agonists에 반응하여 여러 병적 신호전달 경로를 활

Table 1. Percentages of YFP+ cells within CD11b+ cells¹

Sample #	RA SF	OA SF
1	0.39	0.45
2	0.65	0.16
3	0.46	0.53
4	0.33	0.07
5	0.38	0.38
6	0.31	0.20
7	2.24*	0.36
8	0.44	0.38
9	0.20	0.68
10	0.42	0.17
Mean (SEM)	0.57 (0.18)	0.34 (0.06)

¹Peritoneal macrophages were stimulated with either LPS or synovial fluid (SF) from patients with rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA) and analyzed by flow cytometry. Values are the percentage of YFP+ cells among CD11b+ cells. The percentages of YFP+ cells without stimulation and upon LPS stimulation were 0.65% and 14.17%, respectively.

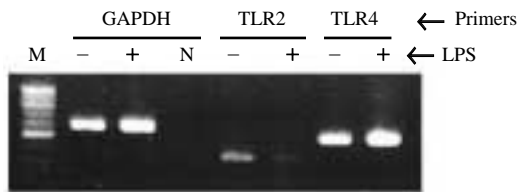


Fig. 3. The levels of TLR-2 and -4 transcripts in rheumatoid synovial cells. A synovial cell line originally derived from the synovium of a rheumatoid arthritis patient was cultured in the presence (+) or absence (-) of LPS overnight and assayed by RT-PCR. M, DNA size marker; N, the PCR reaction performed without cDNA template.

성화할 수 있는 가능성이 있음을 알 수 있다.

고 찰

본 논문에서는 류마티스관절염 환자의 활액에서 IL-12/IL-23 p40 발현 유도물질이 함유되어 있는지와 활막세포에 그 신호를 받아들일 수 있는 수용체가 발현하는지를 조사하여, 관절조직에서 일어나는 일련의 병적 신호 회로를 제시하고자 하였다. 대조군인 퇴행성질환인 골관절염 환자에서와는 달리, 10명의 류마티스관절염 환자 중 한명에서 활액에 IL-

12/IL-23 p40 발현 유도물질이 함유되어 있었다. 또한 활막염을 일으키는데 주된 작동 (effector) 세포로 작용하는 섬유모세포 유래성 활막세포에서 TLR-2와 -4가 발현하고 있고, agonist인 LPS 자극에 의하여 발현 양에 변동이 생기는 것을 관찰하였다. 이상의 결과는 류마티스관절염 발병 경로 및 기전이 다양하지만 그 중에서도 일부 환자에서 활액 속에 함유된 물질이 활막세포의 TLR을 자극하여 그 신호를 세포 내로 전달하여 결국 IL-12, IL-23과 같은 전염증성 사이토카인의 발현을 증가시킴에 의하여 병적 상태를 증폭시킴을 추정케 한다.

본 연구 결과는 IL-12/IL-23 p40 발현 유도물질은 TLR에 결합하는 리간드일 가능성이 높음을 제시한다. 기존에 잘 알려진 TLR 리간드는 주로 미생물에서 유래한 외래성 물질로 lipoteichoic acid, LPS, 세균 DNA의 CpG motif, 바이러스 RNA 등이 있다. 최근에 외래성 물질이 아닌 숙주 자체의 물질인 fibronectin, HSP, hyaluronic acid, 숙주의 RNA 등이 TLR agonist로 밝혀졌다 (Smiley 등 2001, Termeer 등 2002). 특히 최근에 small HSP 중에 α A crystallin, HSP22 등이 수지상세포의 TLR-4에 결합하여 수지상세포의 성숙과 사이토카인 생성을 유도하며, 이중 HSP22는 류마티스관절염 환자의 활막조직에 많이 발현하고 있음이 알려졌다 (Roelofs 등 2006). 그러므로 미생물 감염이나 외래성 물질에 의해서가 아니라, 생리적 스트레스에 의하여 생성이 유도된 이런 물질들이 결국 자가면역질환을 일으키는 병인이 될 수 있다고 보여진다. 본 연구결과에서 발굴한 류마티스관절염환자의 활액 내에 있는 IL-12/IL-23 p40 발현 유도물질이 무엇인지는 더 연구해야 할 과제로 남아 있다. Limulus 테스트 결과, 이 물질이 적어도 LPS 같은 endotoxin은 아니었으므로, 생체 내 Gram 양성 세균 감염이나 또는 실험 중의 오염일 가능성은 배제되었다.

본 연구에서 사용한 yet40 생쥐는 IL-12와 IL-23에 공통적인 구성성분인 p40의 발현을 노란형광단백질 발현 조사로 분석하는 시스템이다. 수년 전부터 IL-12와 IL-23은 모두 전염증성 사이토카인으로 기관 특이적 자가면역질환의 발병기전에 관여하리라 생각되어져 왔다. 그러나 최근에 이런 견해에 대

하여 반대되는 연구결과들이 보고된 바 있다. 예를 들면, 콜라겐 유도 관절염 모델에서 IL-12에 의하여 발생이 유도된 interferon- γ 가 결핍인 경우 관절염 위증도가 더 심해졌다(Vermeire 등 1997). 또한 같은 모델에서 IL-23 p19 결핍이 질환을 감소시키는 결과를 얻는 보고가 있는가 하면 반대로 IL-23 p19 결핍 생쥐에서 TNBS 유도 대장염이 더 활발하다는 보고도 있다(Becker 등 2006). TLR 자극에 의하여 생성된 IL-23은 IL-12의 생성을 억제한다는 보고는 IL-23과 IL-12 간의 길항적 상호조절 경로를 제시하는 예라 할 수 있다. 이런 맥락에서 보면 IL-12와 IL-23이 자가면역적 관절염 발병에 비슷한 역할을 하기보다는 상호 견제적이고 상반된 역할을 할 가능성도 있다. 그렇다면 p40의 발현을 통하여 전염증성 신호 경로를 파악하는 것보다는 IL-12와 IL-23 각각을 독자적으로 관찰할 수 있는 시스템이 필요할 것이다.

종합하면, 본 논문은 일부 류마티스관절염 환자에 특이적인 활액 성분이 활막조직 구성 세포를 자극하여 IL-12와 IL-23과 같은 사이토카인을 생성케 하고 이것이 다시 염증반응 과정을 조절하는 활막 조직 내의 일종의 신호전달 회로를 제시하고 있다. 본 실험에서 사용한 yet40 생쥐 시스템은 이런 활액 성분을 스크리닝하는데 유용하며, 이런 시스템을 활용하여 전염증 물질의 발굴 및 신호전달 회로의 차단 등을 이룰 수 있으리라 생각된다.

참 고 문 헌

- Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL : Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278: 1910-1914, 2003.
- Akira S, Takeda K : Toll-like receptor signaling. *Nature Rev Immunol* 4: 499-511, 2004.
- Asea A, Rehli M, Kabingu E, Boch JA, Bare O, Auron PE, Stevenson MA, Calderwood SK : Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70. *J Biol Chem* 277: 15028-15034, 2002.
- Becker C, Dornhoff H, Neufert C, Fantini MC, Wirtz S, Huebner S, Nikolaev A, Lehr HA, Murphy AJ, Valenzuela DM, Yancopoulos GD, Galle PR, Karow M, Neurath MF : Cutting Edge: IL-23 cross-regulates IL-12 production in T cell-dependent experimental colitis. *J Immunol* 177: 2760-2764, 2006.
- Blass S, Engel JM, Burmester GR : The immunologic homunculus in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 42: 2499-506, 1999.
- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD : Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421: 744-748, 2003.
- Im W, Kim H, Yun D, Seo SY, Park SH, Locksley RM, Hong S : Cytokine reporter mouse system for screening novel IL12p40-inducing compounds. *Mol Cells* 20: 288-296, 2005.
- Malfait AM, Butler DM, Presky DH, Maini RN, Brennan FM, Feldmann M : Blockade of IL-12 during the induction of collagen-induced arthritis (CIA) markedly attenuates the severity of the arthritis. *Clin Exp Immunol* 111: 377-83, 1998.
- McIntyre KW, Shuster DJ, Gillooly KM : Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in interleukin-12-deficient mice. *Eur J Immunol* 26: 2933-2938, 1996.
- Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ : Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 198: 1951-1957, 2003.
- O'Garra A, Arai N : The molecular basis of T helper 1 and helper 2 cell differentiation. *Trends Cell Biol* 10: 542-550, 2000.
- Ohashi K, Burkart V, Flohé S, Kolb H : Heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex. *J Immunol* 164: 558-561, 2000.
- Reinhardt L, Hong S, Kang S, Wang Z, Locksley RM : Visualization of IL-12/23 p40 in vivo reveals immunostimulatory dendritic cell migrants that promote Th1 differentiation. *J Immunol* 177: 1618-1627, 2006.
- Roelofs MF, Boelens WC, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, Geurts J, Wunderink LU, Schreurs BW, van den Berg WB, Radstake TR : Identification of small heat shock protein

- B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 176: 7021-7027, 2006.
- Schnare M, Barton GM, Holt AC, Takeda K, Akira S, Medzhitov R : Toll-like receptors control activation of adaptive immune responses. *Nature Immunol* 2: 947-950, 2001.
- Smiley ST, King JA, Hancock WW : Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4. *J Immunol* 167: 2887-2894, 2001.
- Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, Sanjo H, Takada H, Ogawa T, Takeda K, Akira S : Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of Gram-negative and Gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity* 11: 443-451, 1999.
- Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, Miyake K, Freudenberg M, Galanos C, Simon JC : Oligosaccharides of hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 195: 99-111, 2002.
- Trinchieri G : Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3: 133-146, 2003.
- Vermeire K, Heremans H, Vandeputte M, Huang S, Billiau A, Matthys P : Accelerated collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *J Immunol* 158: 5507-5513, 1997.
- Youn J : Lessons for the pathogenesis of rheumatoid arthritis acquired from experimental animal models. *Hanyang Med Rev* 25: 53-66, 2005.
- Youn J, Cho ML, Kim YJ, Yun HS, Park SH, Jin CZ, Paik DJ, Kim HY : New cyclooxygenase-2 inhibitor DFU regulates vascular endothelial growth factor expression in rheumatoid synoviocytes. *Immunol Lett* 96: 219-224, 2005.

K C I

Abstract

Screening of Interleukin-12/interleukin-23 p40 Inducers in Rheumatoid Synovial Fluids by Fluorescence Reporter Mouse System

Jungeun Kim, Mi-La Cho¹, Seokmann Hong, Won-Kyu Kim², Jeehee Youn²

Department of Bioscience and Biotechnology, Sejong University

¹*The Rheumatism Research Center, Catholic Research Institutes of Medical Sciences,
Catholic University of Korea*

²*Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University*

Although rheumatoid arthritis has been known to be a common autoimmune disease characterized by chronic inflammation mainly evident in diarthrodial joints, its pathogenesis remains to be clarified. In the present study, to investigate the pathogenic signaling system taken place in the rheumatoid joints, we assessed whether synovial fluid obtained from patients with rheumatoid arthritis contains inducers for proinflammatory cytokines such as interleukin (IL)-12 and IL-23.

Peritoneal macrophages isolated from IL-12/IL-23 p40-YFP reporter mice were stimulated with synovial fluid, followed by flow cytometry to screen CD11b⁺ and YFP-expressing cells, reflective of IL-12/IL-23 p40-producing macrophages. The expression levels of Toll-like receptor (TLR)-2 and -4, which have a potential to mediate IL-12/IL-23 p40 induction, were determined in synovial cells obtained from a patient with rheumatoid arthritis by RT-PCR analyses.

One out of 10 synovial fluid from rheumatoid arthritis patients induced IL-12/IL-23 p40 expression, while all of 10 synovial fluid from osteoarthritis patients did not. Synoviocytes constitutively expressed Toll-like receptor (TLR)-2 and -4 which are candidate receptors for IL-12/IL-23 inducers. Upon LPS stimulation, the levels of TLR-2 and -4 were downregulated and upregulated, respectively.

Taken together, these results suggest that some patients with rheumatoid arthritis elicit synovitis through TLR-2- and -4-mediated induction of proinflammatory cytokines IL-12 and IL-23.

Key words : Synovial fluid, Rheumatoid arthritis, IL-12, IL-23, TLR