

사이토카인 리포터생쥐 시스템을 이용한 소수 인터루킨-12 p40 발현 면역세포의 확인

기미아, 김정은, 임우석, 윤지희¹, 홍석만

세종대학교 생명과학대학 생명공학과,

¹한양대학교 의과대학 해부·세포생물학 교실

간추림 : 인터루킨(IL)-12는 p35와 p40 단백질로 구성된 사이토카인으로, 선천면역과 적응면역을 서로 연결시켜주는 매우 중요한 면역학적 기능을 한다. p35 유전자는 지속적으로 발현되지만, p40 유전자의 발현은 외부자극에 의해 유도되는 점에 착안하여, 최근 IL-12 p40 유전자를 발현하는 세포를 형광 발현으로 동정할 수 있는 형광리포터 생쥐 모델이 만들어졌다. 본 연구에서는 형광리포터 시스템을 이용하여 생체 내에 매우 적은 수로 존재하는 미세아교세포와 B 세포 소수 집단의 IL-12 p40 발현을 확인하고자 하였다.

먼저, IL-12 p40 형광리포터생쥐의 지라로부터 유래한 가지돌기세포와 복강으로부터 분리한 큰포식세포를 Toll-유사수용체(Toll-like receptor, TLR) 리간드로 자극한 후 IL-12 p40 발현 정도를 황색 형광단백질(yellow fluorescence protein, YFP) 발현으로 조사하였다. 그리고 뇌에 분포하는 큰포식세포의 한 종류인 미세아교세포를 신생 생쥐로부터 분리 증폭하여 IL-12 p40 발현을 조사하였다. 또한 지라의 B 세포에서 IL-12 발현이 유도되는지를 조사하였다.

지라 유래 가지돌기세포와 복강 유래 큰포식세포에서 IL-12 p40 형광리포터생쥐 시스템의 유용성을 확인하였다. 그리고 분리 증폭한 미세아교세포의 일부 세포가 TLR 리간드인 CpG oligodeoxynucleotides, lipopolysaccharide, peptidoglycan 그리고 polyinosinic-polycytidylic acid의 자극에 대해 IL-12 p40이 발현되는 것을 YFP 형광단백질 발현으로 확인할 수 있었다. 마지막으로 B 세포의 경우, B 세포의 소수 집단이 CpG 자극에 특이적으로 IL-12 p40을 발현하는 것을 확인하였다.

종합하면, 본 연구결과는 IL-12 p40 형광리포터생쥐 시스템을 통하여 뇌에 존재하는 미세아교세포의 일부와 소수의 B 세포집단에서 적절한 TLR 자극 시 IL-12 p40 유전자가 발현됨을 보였다. 이상의 결과는 IL-12 p40 형광리포터생쥐 시스템은 최근 새로이 발견되고 있는 소수 선천면역세포들을 효과적으로 동정하는 데 유용함을 제시한다.

(2008년 11월 7일 접수, 2009년 2월 6일 게재승인)

찾아보기 낱말 : 형광리포터생쥐 시스템, 인터루킨-12, Toll-유사수용체, 미세아교세포

서 론

인터루킨(Interleukin, IL)-12은 p35와 p40로 구성

된 이종이합체 사이토카인으로, 가지돌기세포(dendritic cell, DC), 큰포식세포 등에서 분비되며 선천면역세포의 하나인 자연살해(natural killer) 세포를 활성화시켜 인터페론(interferon, IFN)- γ 의 분비를 촉진시킬 뿐 아니라 적응면역세포의 일원인 naive한 CD4⁺ T 세포를 IFN- γ 분비성의 Th1 세포로 분화시키는 데 중요한 역할을 한다(Stern 등 1996). IL-12

*본 논문은 학술진흥재단 젊은과학자연구활동지원(KRF-2003-205-E00032, 홍석만)의 지원으로 수행되었음.

교신저자 : 홍석만(세종대학교 생명과학대학 생명공학과)

전자우편 : shong@sejong.ac.kr

의 발현 유도는 선천면역수용체의 하나인 Toll-유사 수용체(Toll-Like Receptor, TLR)를 통한 신호전달에 의해 이루어질 수 있다. TLR는 대표적인 선천면역수용체의 하나로 적응면역반응을 유도하고 조절하는 데 중요한 영향을 미친다. 이들은 병원균에 보존되어 있는 특이적 분자패턴(pathogen-associated molecular patterns, PAMPs)을 인지하는 병원균인지수용체로서 포유동물에서 11개 이상 밝혀졌으며 각기 다른 PAMP를 인지한다(Akira와 Takeda 2004). TLR에 의해 인지되는 리간드는 다음과 같다. TLR2에 의해 인지되는 peptidoglycan (PGN)(Takeuchi 등 1999), TLR3에 의해 인지되는 polyinosinic-polycytidylic acid (poly I : C) (Alexopoulou 등 2001), TLR4에 의해 인지되는 lipopolysaccharide (LPS) (Poltorak 등 1998), TLR9에 의해 인지되는 CpG oligodeoxynucleotides (CpG) (Ilvesaro 등 2008) 등이 있다. TLR의 발현은 선천면역세포뿐만 아니라 B, T 세포와 같은 적응면역세포에서도 보고되고 있으나 그 역할에 대한 연구는 미흡하다(Pasare와 Medzhitov 2005). 특히, B 세포에서의 TLR 자극에 따른 면역학적 역할은 명확하지 않다.

DC는 가장 효과적인 항원제공세포로서, 지속적으로 보조자극분자와 다량의 MHC class II 분자를 발현하고 있다. 또 다른 항원제공세포인 큰포식세포는 식균작용 또는 수용체를 통해 항원을 분해, 제거할 수 있으며, 식균작용 후에 보조자극분자와 MHC class II를 발현하여 T 세포에 항원을 제시하는 능력을 가지고 있다. DC와 큰포식세포는 선천면역세포들로 염증반응과 관련된 여러 사이토카인을 분비하는데 그 중에서도 IL-12의 발현은 이미 보고된 사실이다(Koch 등 1996, Skeen 등 1996). 큰포식세포는 신체 각 조직들에 광범위하게 분포되어 있으며 위치하는 조직에 따라 명칭이 다르다. 큰포식세포의 한 부류인 미세아교세포는 뇌에 존재하는 큰포식세포로서, 신경발생 기간 동안 잔여물을 제거하는 등의 식균작용과 항원제공세포로서의 역할을 담당하고 있다(Aloisi 등 1998). 또한 중추신경계의 염증반응에서 중요한 역할을 한다고 보고되었으며 여러 TLR를 통한 자극에 의해 IL-12의 분비가 유도된다

고 보고되었다(Gonzalez-Scarano와 Baltuch 1999, Olson과 Miller 2004). B 세포는 일반적으로 체액성 면역반응에 중요한 역할을 하는 적응면역세포로 알려져 있지만 세포 표면 면역글로불린을 통하여 항원을 세포 내로 유입하여 T 세포에 항원을 제시할 수 있는 항원제공세포로서의 기능도 가진다. 최근 B 세포는 다른 항원제공세포와 같이 여러 TLR을 발현하고 있어 PAMP 자극에 의해 활성화될 수 있다고 보고되었다(Barr 등 2007).

형광리포터생쥐를 이용하여 IL-4, IFN- γ , IL-12, forkhead box P3 (Foxp3)와 같은 중요 면역활성 단백질 발현 세포에 대한 연구가 많이 이루어지고 있다(Grogan 등 2001, Bettelli 등 2006, Reinhardt 등 2006). 형광리포터생쥐의 사용은 특정 단백질을 생산하는 세포가 비록 매우 적게 존재하더라도 형광 단백질의 발현으로 인해 표지된 세포를 유세포분석 방법으로 용이하게 동정할 수 있게 한다. 또한 형광리포터 시스템은 특정단백질을 생산하는 세포의 형질 연구와 in vivo 연구에도 사용될 수 있는 장점을 가지고 있다. 본 연구에서는 IL-12 p40 형광리포터생쥐 시스템이 IL-12 p40을 생산하는 세포의 동정에 유용한지 조사하기 위하여 DC, 큰포식세포, 미세아교세포, B 세포에서의 IL-12 생산을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물

C57BL/6 (B6) 생쥐는 Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME)에서 구입하였다. IL-12 p40 형광리포터생쥐(Reinhardt 등 2006)는 B6 생쥐와 6번의 역교배를 진행하였으며, heterozygous한 생쥐를 서로 교배시켜 homozygous한 knockin 생쥐를 얻었다. 실험에는 6~12주령의 homozygous 리포터생쥐를 이산화탄소 가스를 이용하여 희생시킨 후 사용하였다. 동물은 세종대학교 동물사육실에서 유지하였으며, 방사선 멸균사료와 멸균한 물을 자유롭게 섭취시켰고, 12시간 명암 조건을 유지하였다.

2. 사용배지 및 반응물

미세아교세포를 제외한 모든 세포배양에서 RPMI 1640 (Gibco, BRL)에 10% FBS (JBI, Daegu, Korea), 10 mM HEPES buffer (WelGENE, Daegu, Korea), 2 mM L-glutamine (WelGENE, Daegu, Korea), 100 units/mL penicillin-streptomycin (WelGENE, Daegu, Korea), 5 mM 2-mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 첨가한 배지를 사용하였다. IL-12 p40 발현을 관찰하기 위하여 4가지 TLR 리간드를 세포 배양에 사용하였다. TLR2 리간드인 PGN, TLR3 리간드인 Poly I:C, TLR4 리간드인 LPS, TLR9 리간드인 CpG, PGN, Poly I:C, LPS는 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구매하였으며, CpG와 GpC는 Geno Tech (Daejeon, Korea)으로부터 구입하였다. CpG는 세 가지 A-, B-, C-type을 합성하여 사용하였고 염기서열은 다음과 같다. 5'-GGGGGACGATCG TCGGGGG-3' (A-type CpG 2216), 5'-TCCATGAC GTTCCTGACGTT-3' (B-type CpG 1826), 5'-TCGT CGTTTTCGGCGCGCGCCG-3' (C-type CpG 2395). 그리고 별도의 언급이 없는 경우 B-type의 CpG를 실험에 사용하였다. CpG motif가 역전된 GpC (5'-TCCATGAGCTTCTGAGCTT-3')는 B-type CpG의 대조군으로 사용하였다. 각각의 리간드 사용 농도는 CpG와 GpC의 경우 5 µg/mL, LPS는 1 µg/mL, Poly I:C는 100 µg/mL, PGN은 100 µg/mL였다.

3. 지라 가지돌기세포의 준비

IL-12 p40 형광리포터생쥐의 지라를 적출하고, frosted microscope slide (Fisher, St. Louis, MO, USA)를 사용하여 single cell suspension으로 만든 다음, ACK lysis buffer (0.15 M NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 2 mM EDTA)를 사용하여 적혈구를 제거하였다. PBS buffer로 세척한 후 anti-CD11c magnetic beads (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany)와 혼합 후, column을 통과시켜 CD11c⁺ DC만을 취하였다. 이들 세포의 사이토카인 분비능력을 측정하고자 B-type CpG 1826 (5 µg/mL)로 자극시켜 YFP 형광단백질이 발현되는지를 유세포분석기로 조사하였다.

4. 큰포식세포의 분리

증류수에 녹인 4% thioglycollate (Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액 2 mL을 IL-12 p40 형광리포터생쥐의 복강에 주입하였다. 5일 뒤에 복강으로부터 세포를 획득한 후 부착성이 있는 큰포식세포를 분리하기 위해서 이들 세포를 24 well plate에 3시간 동안 37°C에서 세포가 부착할 수 있도록 배양하였다. 부착되지 않은 세포는 4,500 mg/L D-glucose, 4 mM L-glutamine, 110 mg/L sodium pyruvate, 3,700 mg/L sodium bicarbonate를 포함하는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; WelGENE, Daegu, Korea) 배지를 이용하여 제거하고, 부착된 큰포식세포에 IFN-γ (100 U/mL)를 첨가하여 세포를 활성화 준비 단계로 유도하였다. 이들 세포를 LPS (1 µg/mL)로 자극시켜 사이토카인 분비를 유도하였다.

5. 미세아교세포의 분리

생후 2~3일 정도된 IL-12 p40 형광리포터생쥐의 뇌로부터 일차 미세아교세포를 예전 보고에 따라 분리 증폭하였다 (Lotz 등 2005). 간단히 설명하면, 뇌의 겔질 부분을 분리하여 DMEM (4,500 mg/L D-glucose, 4 mM L-glutamine, 110 mg/L sodium pyruvate, 3,700 mg/L sodium bicarbonate 포함; WelGENE, Daegu, Korea) 배지에 10% FBS (JBI, Daegu, Korea)가 첨가된 배양액으로 세포 현탁액을 만들어 75-cm² flask에 깔아준 후 37°C, 5% CO₂ 조건에서 14일간 배양하였다. 부착하지 않은 세포들을 제거하기 위하여 배양 3일째에 새 10% FBS DMEM으로 한번 교체해 주었다. 배양 시작 후 14일째에 배양 flask를 손바닥으로 강하게 두드리 물리적 충격을 주어 flask에 강력하게 붙어서 자라는 별아교세포 (astrocyte)로부터 미세아교세포를 분리하였다. 이렇게 분리한 세포는 98% 이상이 anti-CD11b와 anti-F4/80 단클론항체로 염색되었다.

6. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

IL-12 p40 단백질을 동정하기 위하여 standard sandwich ELISA 방법을 사용하였다. 세포를 TLR 리

간드와 함께 16시간 동안 배양한 후 그 상층액을 걷어 IL-12 p40 단백질 발현을 ELISA (R & D systems, Minneapolis, MN, USA) 방법으로 측정하였다.

7. 유세포분석 및 항체염색

Phycoerythrin (PE)가 결합된 anti-CD11c, anti-CD11b 단클론항체, Tricolor (TC)가 결합된 anti-CD19, anti-CD11b 단클론항체, Allophycocyanin (APC)가 결합된 anti-F4/80 단클론항체를 이용하여 세포를 염색하였다. 항체로 염색한 세포의 획득은 CellQuest software와 FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하였고 분석은 FlowJo (Tree Star, Ashland, OR, USA)를 이용하였다. 비특이적인 항체가 Fc 수용체 (CD16/32) 발현세포에 비특이적으로 결합하는 것을 막기 위하여 항체염색 전에 세포에 anti-CD16/32 항체로 (4°C, 15 min) 처리해 주었고, 이후에 항체로 염색(4°C, 45~50분)한 후, FACS wash buffer (1% FBS을 함유한 PBS)로 3번 세척하고 1% paraformaldehyde로 고정시켰다. 본 연구에 사용된 anti-CD11c, anti-CD11b, anti-CD19, anti-CD11b, anti-F4/80, anti-CD16/32 단클론항체는 BD Pharmingen (San Jose, CA, USA)에서 구입하였다.

결 과

1. DC와 큰포식세포의 TLR 자극에 따른 IL-12 p40의 발현

IL-12를 생산하는 면역세포는 면역반응을 조절하는 데 있어 매우 중요한 역할을 담당하고 있지만, 생체 내에 적은 수로 존재하는 경우에는 IL-12를 발현하는 세포를 동정하는 데 있어 어려운 점이 많다. 최근 IL-12를 구성하는 구성원인 p40 유전자 마지막 exon 뒤에 internal ribosomal entry site (IRES)로 연결된 YFP 유전자를 결합시킨 생쥐 모델이 확립되었다. 이 생쥐 모델에서 YFP 형광단백질의 발현 분석을 통하여 IL-12 p40 유전자 발현 여부를 조사

하는 것이 유효한지를 살펴보았다. 우선, IL-12를 가장 활발히 분비한다고 알려진 DC를 IL-12 p40 형광 리포터생쥐로부터 분리하여 확인하였다. 지라의 DC를 분리하기 위하여 지라세포에 DC 표면 분자 CD11c에 특이적인 MACS bead를 이용하였다. 이를 통하여 획득한 CD11c⁺ 세포에 CpG (5 µg/mL)으로 16시간 자극을 준 후, anti-CD11c 단클론항체를 사용하여 DC에서의 YFP 발현을 조사하였다. 분석결과 대조군에 비해 CpG 자극을 받은 실험군에서 YFP 발현이 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1A). 다음으로, IL-12 p40 형광리포터생쥐의 복강으로부터 분리한 큰포식세포가 IL-12를 분비하는지 조사하였다. 생쥐의 복강에 4% thioglycollate를 주입하고, 약 5일 후에 복강 내 큰포식세포를 분리하였다. 분리한 큰포식세포에 IFN-γ (100 U/mL)를 처리하여 초기 활성 상태를 유도한 후 LPS (1 µg/mL)로 16시간 동안 자극을 주었다. 그리고 큰포식세포를 탐지할 수 있는 anti-CD11b 항체로 염색하여 분석한 결과, 자극을 받지 않은 큰포식세포보다 LPS 자극을 받은 큰포식세포에서 YFP 발현이 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1B). 다음으로, 리포터생쥐로부터 분리한 DC와 큰포식세포에서의 YFP 발현이 실제 IL-12 p40의 단백질 발현을 충실히 반영하는지 시험하였다. 이를 위하여 CpG로 자극된 CD11c⁺ DC와 LPS로 자극된 복강 큰포식세포의 배양상층액을 걷어 IL-12 p40 단백질의 발현을 ELISA 방법을 이용하여 측정하였다. 대조군과 비교한 결과, IL-12 p40 단백질의 발현 증가를 확인할 수 있었다 (Fig. 1C). 따라서, TLR 리간드 자극에 반응하여 IL-12 p40 단백질을 발현하는 면역세포를 IL-12 p40 형광리포터 시스템을 이용하여 유세포분석 방법으로 용이하게 분석할 수 있음을 알 수 있었다.

2. 미세아교세포의 TLR 자극에 따른 IL-12 p40의 발현

큰포식세포는 세포표면에 발현되는 CD11b 분자와 F4/80 분자에 특이적인 항체를 이용하여 탐지할 수 있으며, 뇌에 존재하는 큰포식세포인 미세아교세포 역시 CD11b 분자와 F4/80 분자가 다량 발현되어

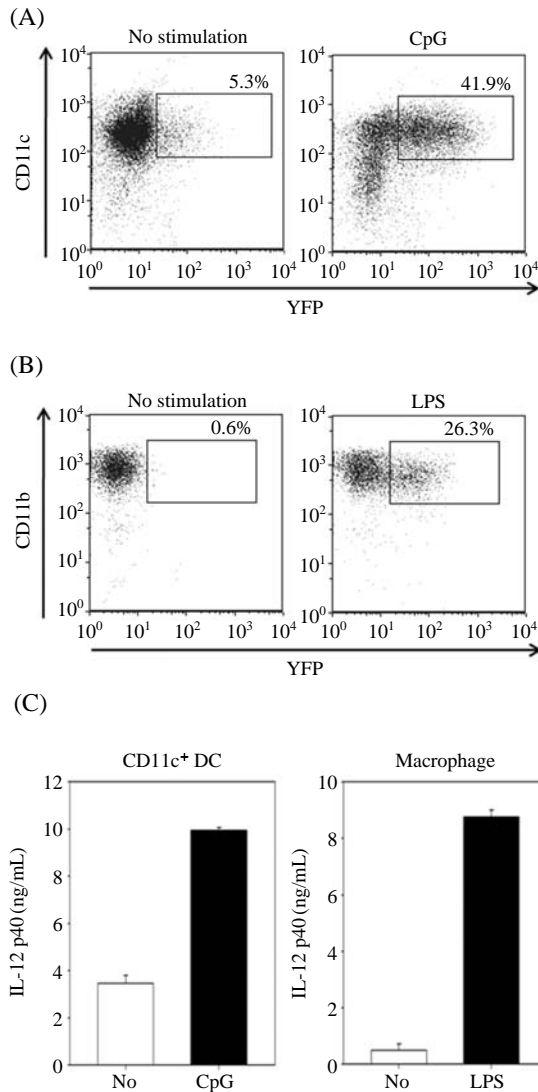


Fig. 1. Dendritic cells and macrophages produce IL-12 p40 upon TLR stimulation. (A) Dendritic cells were enriched from the spleen by using CD11c MACS beads. Splenic DCs were stimulated with vehicle or CpG (5 µg/mL). (B) Macrophages were isolated from peritoneal cavities from mice previously injected with 4% thioglycollate broth. Peritoneal macrophages were stimulated with TLR4 ligand LPS. IL-12 p40 expression was analyzed by flow cytometry for YFP intensity. (C) Supernatants from CpG-stimulated CD11c⁺ DCs and LPS-stimulated peritoneal macrophages were harvested and subsequently the amount of IL-12 p40 was determined by ELISA assay. The bar chart represents the mean value ± SEM (n=2).

있어 항체염색으로 별아교세포와 구별이 가능하다. 미세아교세포는 TLR2, TLR4, TLR9을 발현하고 있으며 그에 상응하는 TLR 리간드를 처리하면 IL-12 p40을 생산한다고 알려져 있다 (Lodge와 Sriram 1996, Dalpke 등 2002, Esen과 Kielian 2005). 따라서, IL-12 p40 형광리포터생쥐 시스템을 이용하여 미세아교세포의 IL-12 발현을 YFP 발현으로 확인하고자 하였다. 이를 위하여 생후 약 2~3일된 리포터생쥐에서 대뇌결질을 분리한 후, 미세아교세포를 획득하고자 14일간 배양하였다. 미세아교세포는 배양 용기에 단단히 부착된 별아교세포 위에 약하게 붙어 자라기 때문에 (Fig. 2A) 물리적 충격을 가하면 별아교세포로부터 쉽게 분리가 된다. 배양 14일째에 별아교세포로부터 분리된 미세아교세포는 98% 이상이 큰포식세포 표지 분자를 발현하는 것으로 미루어 분리 과정에서 별아교세포의 오염이 거의 되지 않았음을 알 수 있었다 (Fig. 2A). 미세아교세포에 CpG (5 µg/mL), LPS (1 µg/mL), PGN (100 µg/mL)을 24시간 동안 처리한 후, anti-CD11b 항체로 염색하여 CD11b⁺ 세포집단에서 IL-12 사이토카인을 생산하는 세포를 YFP에 대한 히스토그램으로 나타내었다 (Fig. 2A). CD11b⁺ 미세아교세포는 이전 보고와 같이 CpG, LPS, PGN의 자극에 따라 IL-12 p40을 분비한다는 것을 리포터생쥐 시스템을 통해 확인할 수 있었다 (Fig. 2B). 미세아교세포는 TLR3을 통하여 이중나선 RNA를 인지하는 것으로 알려져 있기 때문에 (Town 등 2006), double stranded RNA 분자의 유사체인 TLR3 리간드인 poly I:C (100 µg/mL)를 24시간 동안 처리한 후 anti-CD11b 항체로 염색하여 YFP의 발현을 조사하였다. 실험 결과, 미세아교세포가 poly I:C 자극에 의해 IL-12을 생산한다는 것을 리포터생쥐 시스템을 통해 확인할 수 있었다 (Fig. 2C).

3. IL-12 p40을 발현하는 소수 B 세포집단의 확인

전문 항원제공세포에는 DC, 큰포식세포 그리고 B 세포가 있다. 이 가운데 IL-12 p40은 DC와 큰포식세포에서 주로 발현되는 것으로 알려져 있는 반면,

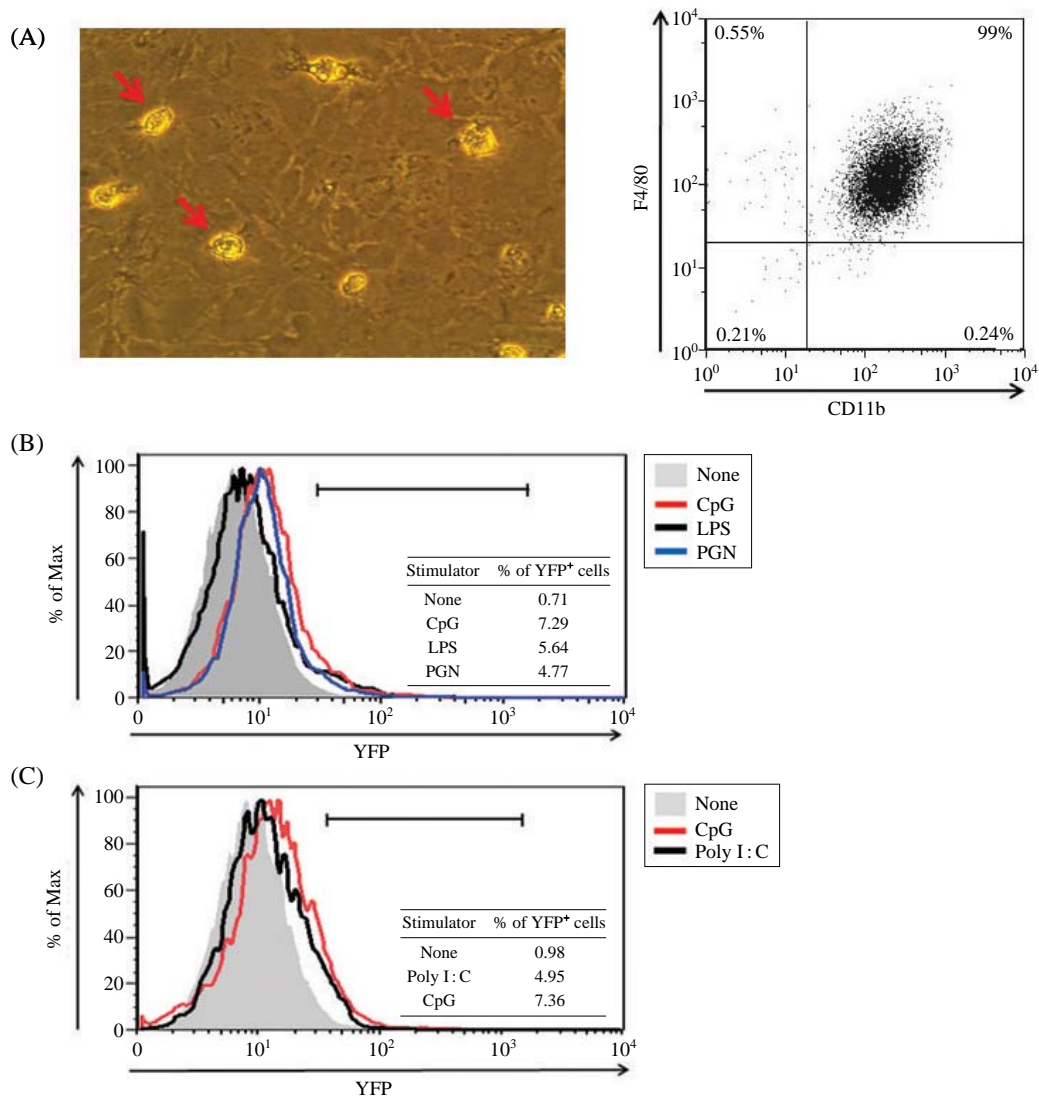


Fig. 2. Microglial cells can produce IL-12 p40 when stimulated with TLR ligands. Cerebral cortex were isolated from newborn mice. The cells were suspended in DMEM containing 10% fetal bovine serum and then were cultured for 14 days to obtain microglial cells. After that, microglial cells were enriched by detaching from astrocytes strongly adherent to the culture plate. (A) The arrows in photograph of Fig. 2A indicate microglial cells. More than 98% of these isolated cells express both CD11b and F4/80, which are markers specific for macrophages. (B and C) After isolation of microglial cells, subsequently microglial cells were stimulated with CpG (5 μ g/mL), LPS (1 μ g/mL), or poly I:C (100 μ g/mL) and then IL-12 p40 production were analyzed by flow cytometry.

B 세포에서의 발현은 거의 보고되어 있지 않다. 실제로 IL-12는 초기에 Epstein-Barr 바이러스-형질전환된 B 세포에 발현되는 자연살해 세포 활성 인자

로 알려졌지만, 많은 연구에서 B 세포에 의한 IL-12 분비를 확인하지 못하고 있는 실정이다. 최근 B 세포에서의 IL-12 발현이 TLR9 리간드인 CpG 자극에

의해 유도된다고 보고되었다(Hemmi 등 2000). 따라서 IL-12 p40 형광리포터 시스템을 통하여 IL-12를 생산하는 B 세포의 존재 여부를 확인할 수 있는지 실험하였다. IL-12 p40 형광리포터생쥐의 지라세포를 분리하고 B 세포 특이분자인 B220에 대한 단클론항체에 magnetic bead가 결합된 B 세포 분리 MACS를 통하여 B220⁺ 세포를 분리하였다. 분리한 B 세포에 LPS (1 µg), Type-B CpG (5 µg), poly I:C (100 µg), GpC (5 µg)를 16시간 동안 처리한 후 DC 표지를 위한 anti-CD11c 단클론항체와 B 세포 표지를 위한 anti-CD19 단클론 항체를 사용하여 염색하였다. B220⁺ 세포에는 B 세포뿐만 아니라 IL-12를 분비하는 것으로 알려진 plasmacytoid 가지돌기세포(pDC)를 포함하므로, B 세포에서의 IL-12 발현만을 측정하기 위해 CD11c⁻이고 CD19⁺한 세포집단에서의 YFP 발현 수준을 비교하였다. CD11c⁻CD19⁺ B 세포의 일부 집단이 LPS와 poly I:C가 아닌 CpG에 의해 IL-12 p40을 발현하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). 세 가지 종류의 CpG 가운데, A type의 CpG는 pDC로 하여금 높은 수준의 IFN- α 분비를 유도하고, B type의 CpG는 B 세포와 자연살해 세포의 활성화를 유도하고, C type의 CpG는 A type과 B type의 면역학적 효능을 모두 가지고 있는 것으로 알려져 있다(Vollmer 등 2004). 따라서, 어떤 타입의 CpG에 의해서 B 세포의 IL-12 p40 발현이 유도되는지 조사하기 위하여 각각의 CpG를 B 세포에 처리해본 결과, 정도의 차이는 있지만, Type-A, Type-B 그리고 Type-C의 CpG 모두 B 세포의 IL-12 p40 발현을 유도하는 것으로 확인되었다(Fig. 3B).

고 찰

본 논문에서는 IL-12 p40 형광리포터생쥐 시스템이 IL-12 p40을 발현하는 DC와 큰포식세포를 동정하는데 유용하며, 실제로 뇌에 존재하는 큰포식세포의 일종인 미세아교세포의 일부 집단이 여러 TLR 리간드의 자극에 의해 IL-12 p40을 발현한다는 것을 보였다. 또한 B 세포의 소수 집단이 IL-12를 분

비할 수 있으며 TLR9 리간드인 CpG에 매우 특이적으로 반응한다는 것을 알 수 있었다.

미세아교세포는 뇌에 존재하는 큰포식세포로 IL-12뿐만 아니라 IL-23을 분비한다고 최근 보고되었다(Li 등 2003). 자가면역질환의 하나인 자가면역 뇌척수염 실험모델(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)은 Th1-매개성 질병으로 알려져 왔고, 새롭게 발견된 사이토카인인 IL-17을 분비하는 세포에 의해서도 EAE가 조절된다고 최근 보고되었다(Aranami와 Yamamura 2008). Th1 세포는 IL-12에 의해 분화가 조절되는 반면에, Th17 세포는 IL-12의 p40과 p19로 이루어진 IL-23에 의해 분화가 조절된다. 따라서 IL-12와 IL-23의 공통 분모인 p40을 분비하는 미세아교세포의 면역학적 역할을 규명하는 것은 매우 흥미로운 것이다. 형광리포터생쥐 시스템을 이용하면 p40을 발현하는 미세아교세포의 소수 집단을 순수 분리하여 연구하는 것이 가능하리라 생각한다.

본 연구에서는 또한 B 세포의 일부 집단이 Type-B CpG에 의한 자극에 특이적으로 IL-12 p40을 발현한다는 사실을 확인하였고 CpG의 다른 형태인 Type-A 또는 Type-C CpG에 의해서도 IL-12 p40의 발현이 유도되는 것을 알 수 있었다(Fig. 3). 최근 보고에 따르면 IL-12를 생산하는 B 세포가 Th2 반응에 의해 매개되는 염증성 장질환의 면역반응에 기여한다는 보고가 있다(Sugimoto 등 2007). 하지만 일반 생쥐에서 IL-12를 생산하는 B 세포의 동정은 그 수가 상당히 적어 어려움이 많고 더군다나 이들 세포의 순수 분리는 거의 불가능하다. 하지만, 리포터생쥐 시스템을 이용하면, 비록 그 수가 적더라도 IL-12 p40을 생산하는 B 세포의 동정 및 분리가 가능하여 이들 세포의 특성을 파악하는 데 유용할 것으로 기대한다.

면역학의 발전과 더불어 예전에는 알려지지 않았던 새로운 종류의 세포들이 하나 둘씩 밝혀지고 있다. 최근 가지돌기세포의 성격과 자연살해세포의 중간 성격을 가지고 있는 자연살해 가지돌기세포(natural killer dendritic cell)가 보고되었는데, 이 세포는 IL-12를 생산하는 세포로 항암면역반응과 같은 Th1

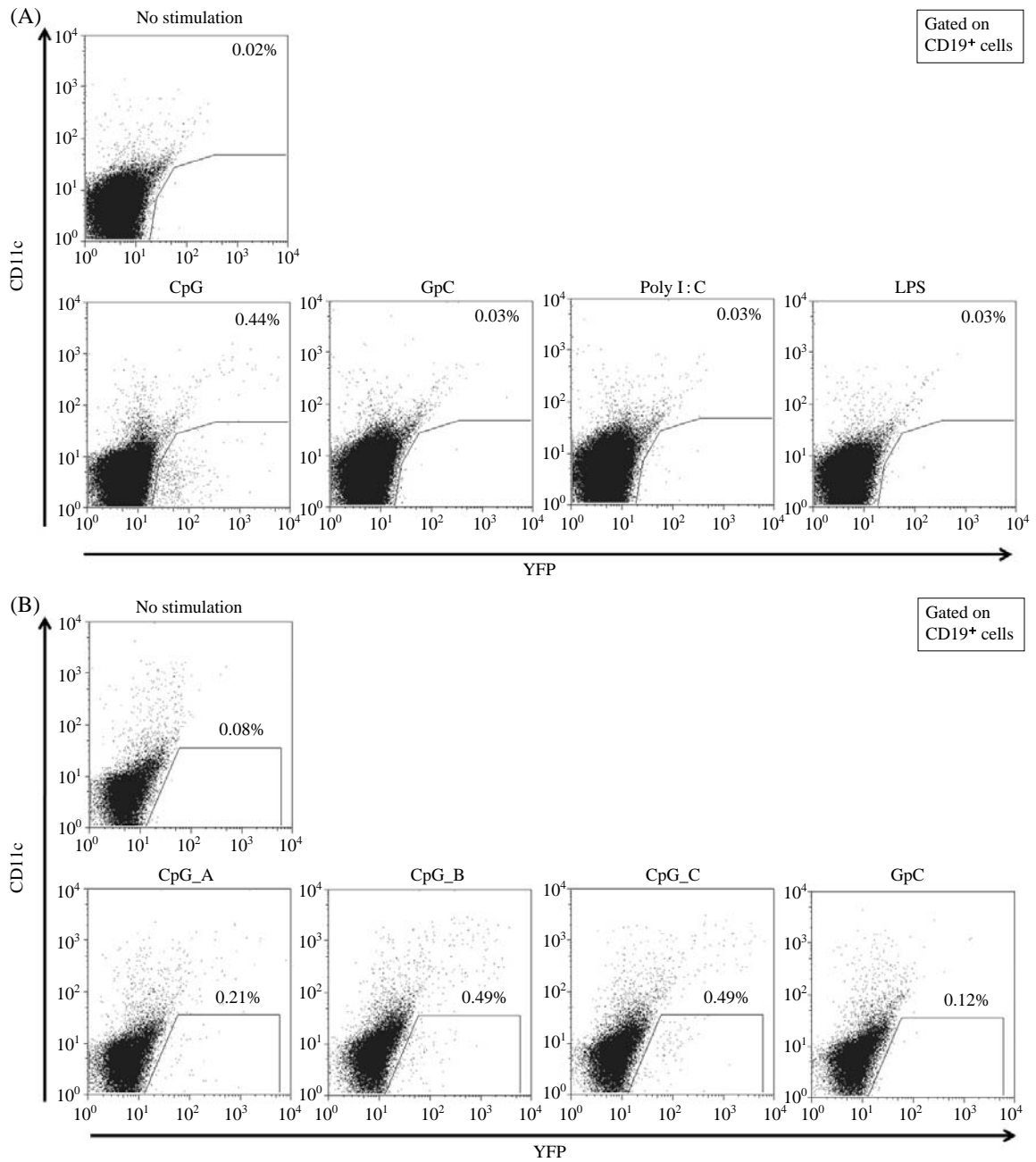


Fig. 3. A subpopulation of B cells can produce IL-12 p40 upon stimulation with CpG. B cells were isolated from the spleen by using B220 MACS beads. (A) Purified B220⁺ splenic B cells were stimulated with different TLR ligands including CpG, poly I:C, or LPS. After sixteen hours of stimulation, these B cells were stained with anti-CD19 and anti-CD11c mAbs. IL-12 production was examined on CD19⁺CD11c⁻ gated B cells by flow cytometry. (B) Stimulatory effect of three different types of CpGs on IL-12 production by B cells was examined. Purified B cells were stimulated with different types of CpGs including A-, B-, and C-type CpG for 16 hr. Again, IL-12 production was examined on CD19⁺CD11c⁻ gated B cells by flow cytometry.

type 면역반응에서 그 면역학적 기능의 중요성이 강조되고 있다(Chan과 Housseau 2008). 이러한 자연 살해 가지돌기세포도 그 수가 매우 적어 생체 내 검출에 어려움이 있는데, 본 연구에서 사용한 형광 리포터 시스템을 이용하면 이들 세포의 특성 연구가 훨씬 용이해질 것이다.

종합하면, IL-12 p40 형광리포터생쥐의 이용은 ELISA에 의해 IL-12 p40 분비를 동정하는 방법과는 다르게 매우 적은 수로 존재하는 IL-12 p40 생산 면역세포일지라도 살아있는 형태로 분리해낼 수 있고 실제로 in vitro뿐만 아니라 in vivo에서의 IL-12 p40의 발현변화를 검출하는 데 있어서도 매우 유용할 것이다. 더 나아가 IL-12 p40을 발현하는 활성화된 세포의 유전자 발현 양상 등과 같은 특성을 연구하는 데 훌륭한 방법이 될 것으로 기대한다.

참 고 문 헌

- Akira S, Takeda K : Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 4: 499-511, 2004.
- Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA : Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732-738, 2001.
- Aloisi F, Ria F, Penna G, Adorini L : Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. *J Immunol* 160: 4671-4680, 1998.
- Aranami T, Yamamura T : Th17 Cells and autoimmune encephalomyelitis (EAE/MS). *Allergol Int* 57: 115-120, 2008.
- Barr TA, Brown S, Ryan G, Zhao J, Gray D : TLR-mediated stimulation of APC : Distinct cytokine responses of B cells and dendritic cells. *Eur J Immunol* 37: 3040-3053, 2007.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK : Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441: 235-238, 2006.
- Chan CW, Housseau F : The 'kiss of death' by dendritic cells to cancer cells. *Cell Death Differ* 15: 58-69, 2008.
- Dalpe AH, Schafer MK, Frey M, Zimmermann S, Tebbe J, Weihe E, Heeg K : Immunostimulatory CpG-DNA activates murine microglia. *J Immunol* 168: 4854-4863, 2002.
- Esen N, Kielian T : Recognition of Staphylococcus aureus-derived peptidoglycan (PGN) but not intact bacteria is mediated by CD14 in microglia. *J Neuroimmunol* 170: 93-104, 2005.
- Gonzalez-Scarano F, Baltuch G : Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 22: 219-240, 1999.
- Grogan JL, Mohrs M, Harmon B, Lacy DA, Sedat JW, Locksley RM : Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity* 14: 205-215, 2001.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S : A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 408: 740-745, 2000.
- Iivesaro JM, Merrell MA, Li L, Wakchoure S, Graves D, Brooks S, Rahko E, Jukkola-Vuorinen A, Vuopala KS, Harris KW, Selander KS : Toll-like receptor 9 mediates CpG oligonucleotide-induced cellular invasion. *Mol Cancer Res* 6: 1534-1543, 2008.
- Koch F, Stanzl U, Jennewein P, Janke K, Heuffer C, Kampgen E, Romani N, Schuler G : High level IL-12 production by murine dendritic cells : upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J Exp Med* 184: 741-746, 1996.
- Li J, Gran B, Zhang GX, Ventura ES, Siglienti I, Rostami A, Kamoun M : Differential expression and regulation of IL-23 and IL-12 subunits and receptors in adult mouse microglia. *J Neurol Sci* 215: 95-103, 2003.
- Lodge PA, Sriram S : Regulation of microglial activation by TGF-beta, IL-10, and CSF-1. *J Leukoc Biol* 60: 502-508, 1996.
- Lotz M, Ebert S, Esselmann H, Iliev AI, Prinz M, Wiazewicz N, Wiltfang J, Gerber J, Nau R : Amyloid beta peptide 1-40 enhances the action of Toll-like receptor-2 and -4 agonists but antagonizes Toll-like receptor-9-induced inflammation in primary mouse microglial cell cultures. *J Neurochem* 94: 289-298, 2005.
- Olson JK, Miller SD : Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *J Immunol* 173: 3916-3924, 2004.
- Pasare C, Medzhitov R : Control of B-cell responses by Toll-like receptors. *Nature* 438: 364-368, 2005.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X,

- Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B : Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice : mutations in Tlr4 gene. *Science* 282: 2085-2088, 1998.
- Reinhardt RL, Hong S, Kang SJ, Wang ZE, Locksley RM : Visualization of IL-12/23p40 in vivo reveals immunostimulatory dendritic cell migrants that promote Th1 differentiation. *J Immunol* 177: 1618-1627, 2006.
- Skeen MJ, Miller MA, Shinnick TM, Ziegler HK : Regulation of murine macrophage IL-12 production. Activation of macrophages in vivo, restimulation in vitro, and modulation by other cytokines. *J Immunol* 156: 1196-1206, 1996.
- Stern AS, Magram J, Presky DH : Interleukin-12 an integral cytokine in the immune response. *Life Sci* 58: 639-654, 1996.
- Sugimoto K, Ogawa A, Shimomura Y, Nagahama K, Mizoguchi A, Bhan AK : Inducible IL-12-producing B cells regulate Th2-mediated intestinal inflammation. *Gastroenterology* 133: 124-136, 2007.
- 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.
- Town T, Jeng D, Alexopoulou L, Tan J, Flavell RA : Microglia recognize double-stranded RNA via TLR3. *J Immunol* 176: 3804-3812, 2006.
- Vollmer J, Weeratna R, Payette P, Jurk M, Schetter C, Laucht M, Wader T, Tluk S, Liu M, Davis HL, Krieg AM : Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *Eur J Immunol* 34: 251-262, 2004.

Abstract

IL-12 p40-Expressing Immune Cells Revealed by Cytokine Reporter Mouse System

Mia Gi, Jungeun Kim, Wooseok Im, Jeehee Youn¹, Seokmann Hong

Department of Bioscience and Biotechnology, College of Life Science, Sejong University,

¹Department of Anatomy and Cell Biology, College of Medicine, Hanyang University

Interleukin-12 (IL-12), consisting of p35 and p40, plays important roles in linking innate and adaptive immunity. While p35 is constitutively expressed, IL-12 p40 gene expression is induced upon activation by Toll-like receptor ligands. Recently, with gene targeting technology, the cytokine IL-12 p40 reporter mouse has been developed to express the p40 gene linked via a viral IRES element with yellow fluorescence protein (YFP) fluorescent reporter. We investigated whether this novel system would be useful to reveal IL-12 p40-producing immune cells.

We first investigated whether macrophages and dendritic cells from these mice faithfully reported p40 induction. Next, we tested if microglial cells, macrophages in the brain, could induce IL-12 p40. Finally we tested whether B cells could produce IL-12 p40 because there were very few reports for IL-12 production by B cells.

Our results confirmed that macrophages and dendritic cells are main producer of IL-12 p40. Then, we found that microglial cells could produce IL-12 p40 upon stimulation with various TLR ligands. Finally we found that a subset of B cells could produce IL-12 p40 in TLR9-dependent manner.

Taken all together, our system will be a valuable tool to identify the type of immune cells that produce IL-12 p40.

Key words : Fluorescent reporter mouse system, Interleukin-12, Toll-like receptor, Microglia