

콜라겐으로 경구 관용을 유도한 관절염 동물 모델의 세포 특이적 면역 반응 조사

가톨릭대학교 의과학연구원 류마티스연구센터

민소연 · 황수연 · 이재선 · 김주영 · 이강은
김경운 · 김영훈 · 도주호 · 김호연

Studies on the Cellular Immune Response in Animal Model of Arthritis after the Induction of Oral Tolerance

So-Youn Min, Sue-Yun Hwang, Jae-sun Lee, Ju-Young Kim, Kang-Eun Lee, Kyung-Wun Kim, Young-Hun Kim, Ju-Ho Do and Ho-Youn Kim

Rheumatism Research Center, Catholic Research Institute of Medical Science, The Catholic University of Korea, Seoul, Korea

ABSTRACT

Oral administration of antigen has long been considered as a promising alternative for the treatment of chronic autoimmune diseases including rheumatoid arthritis (RA), and oral application of type II collagen (CII) has been proven to improve pathogenic symptoms in RA patients without problematic side effects. To further current understandings about the immune suppression mechanisms mediated by orally administered antigens, we examined the changes in IgG subtypes, T-cell proliferative response, and proportion of interleukin (IL)-10 producing Th subsets in a time course study of collagen induced arthritis (CIA) animal models. We found that joint inflammation in CIA mouse peaked at 5 weeks after first immunization with CII, which was significantly subdued in mice pre-treated by repeated oral administration of CII. Orally tolerized mice also showed increase in their serum level of IgG1, while the level of IgG2a was decreased. T-cell proliferation upon CII stimulation was also suppressed in lymph nodes of mice given oral administration of CII compared to non-tolerized controls. When cultured in vitro in the presence of CII, T-cells isolated from orally tolerized mice presented higher proportion of CD4⁺IL-10⁺ subsets compared to non-tolerized controls. Interestingly, such increase in IL-10 producing cells were obvious first in Peyer's patch, then by 5 weeks after immunization, in mesenteric lymph node and spleen instead. This result indicates that a particular subset of T-cells with immune suppressive functions might have migrated from the original contact site with CII to inflamed joints via peripheral blood after 5 weeks post immunization. (*Immune Network* 2003; 3(2):136-144)

Key Words: Oral tolerance, rheumatoid arthritis, type II collagen, interleukin-10 (IL-10), interferon-gamma (IFN- γ)

서론

경구 관용(oral tolerance)이란 특정 항원을 소화기를 통하여 반복적으로 주입하면 이후 동일한 항원에 노출되더라도 이에 대한 면역 반응이 일어나지 않거나 그 강도가 저하되는 현상을 일컫는 것으로, 이를 자가면역질환들의 치료에 응용하기 위한 연구들이 오래 전부터 진행되어 왔다(1). 류마티스 관절염(2,3)을 비롯한 다발성 경

책임저자 : 김호연, 가톨릭의과대학연구원 류마티스연구센터
☎ 137-701, 서울특별시 서초구 반포동 505번지
Tel: +82-2-590-2702, Fax: +82-2-537-4673
E-mail: ho@cmc.cuk.ac.kr

본 연구는 보건복지부 보건 의료 기술 연구 개발 사업(HMP-00-CH-08-0007)의 지원으로 수행되었음.

화증, 경피증, 제1형 당뇨병 및 홍채염과 같은 자가 면역 질환에서는 질병의 원인이 되는 자가 항원 단백질을 경구 투여하는 치료법을 임상에 적용하는 보고들이 나오고 있다(4). 경구로 반복 투여된 항원 단백질이 면역 억제제를 일으키는 기전은 완전하게 규명되지 못한 상태이나, 실험 동물을 모델로 한 연구 결과에 따르면 아마도 소화기를 둘러싼 점막 면역계에서 이들을 인지하는 T 림프구들이 Th2 또는 Th3 아형으로 분화된 뒤 혈관을 타고 병소로 이동하여 IL-4, IL-10, TGF- β 를 비롯한 염증 억제성 사이토카인들을 분비하기 때문일 것으로 추정되고 있다(5,6). 그러나 자가항원을 투여하는 방법과 시기, 그리고 투여량의 차이에 따라 상반된 결과가 얻어지기도 하므로 아직 그 명확한 기전은 알려져 있지 않다(7).

류마티스 관절염(rheumatoid arthritis, RA)의 병인은 아직까지 정확히 밝혀지지 않았으나 일부 관절 단백질, 그 중에서도 제2형 콜라겐(type II collagen, CII)이 자가 반응의 유발에 중요한 역할을 한다고 알려져 왔다. DBA/1 마우스나 같은 감수성 동물에 CII를 주사할 때 일어나는 다발성 관절염의 병리학적 소견은 류마티스 관절염과 매우 유사한 양상을 나타낸다(12,13).

류마티스 관절염의 치료법에 있어서도 주로 비특이적 염증 억제제인 부신피질 호르몬, 비스테로이드성 항염제(NSAID), TNF- α 차단 항체 등 광범위한 면역억제제들이 사용되어 왔으나 감염 또는 암의 발생과 같은 부작용으로 인하여 장기 투여에 어려움이 따른다(18-20). 이에 대한 대안으로 시도된 여러 생물학적 요법의 하나로 90년대부터 하버드 의대를 중심으로 CII의 반복적 경구 투여를 통한 관용 유도 치료법(2,3)이 시작되었다. 이 치료법은 별다른 부작용이 없다는 장점이 있으나 복용된 콜라겐이 위장관에서 빠르게 분해되어 효과적인 흡수가 어렵고 그 효과가 뚜렷하지 않다는 것이 단점이다. 이 경우 염증 억제성 사이토카인 등과 같이 경구 관용의 유도 과정에 관여하는 다른 면역 조절 물질들을 함께 투여하면 그 치료 효과를 증강시킬 수 있을 것으로 보이나 RA 환자는 물론 관절염의 동물 모델인 콜라겐 유발 관절염(collagen induced arthritis, CIA)에서도 관용 유도에 수반되는 면역 세포들의 기능 변화 및 이를 조절하는 인자들에 관한 정보는 그리 많이 알려져 있지 않다.

본 연구에서는 CII의 경구 투여가 관절 염증의 완화에 기여하는 과정에서 일어나는 면역 변화를 조사하기 위하여 관용이 유도된 DBA/1 마우스에서 CIA를 유발시킬 경우 관절염이 일어나는 빈도와 염증의 정도, CII를 인지하는 IgG 항체의 아형 변화, 그리고 이들의 림프절과 비장에서 추출한 세포에서 CII로 자극하였을 때 일어나는 세포 분열 및 사이토카인 생성 패턴의 변화를 관절염 유도 후 주기별로 관찰하여 그 결과를 조사하였다.

재료 및 방법

DBA/1 마우스의 경구관용 유도. DBA/1 마우스를 이틀에 한 번씩 2주간에 걸쳐 0.05 N 아세트산에 2 mg/ml로 녹인 bovine type II 콜라겐(유한 양행, 서울)을 oral Zonde needle (Natsume, Japan)을 사용하여 100 μ g씩(용액 50 μ l+150 μ l 아세트산) 투여하였다. 대조군으로 사용되는 DBA/1 마우스에는 CII 대신 phosphate-buffered saline (PBS)를 2주간 6회 투여하였다.

CIA의 유도와 관절염의 평가. CII 또는 PBS의 경구 투여를 마친 DBA/1 마우스(n=6)에 complete Freund's adjuvant (CFA)와 동량으로 섞어준 bCII 100 μ g (0.05N 아세트산에 2 mg/ml로 녹인 용액의 50 μ l)을 26 게이지 바늘로 꼬리에 주사한다. 이로부터 2주 후 200 μ g의 CII와 동량의 IFA (incomplete Freund's adjuvant) 혼합액을 한 쪽 뒷다리에 주사하고, 첫 번 접종을 시작점으로 하여 실험의 내용을 알고 있지 않은 관찰자 세 명이 18일, 즉 2.5주째 되는 날로부터 매주 세 번씩 관절 염증의 위증도를 평가하여 11주까지 계속한다. 관절염 평가는 Rosoliniec 등에 의한 평균 관절염 지수(mean arthritic index)(8)에 기준하여 마우스당 2차 접종 때 CII/IFA를 투여한 다리를 제외한 나머지 세 다리에서 아래의 척도에 따라 매긴 점수를 합하여 3으로 나눈 평균치를 얻고, 다시 각 마우스에서 3명의 관찰자가 얻은 수치를 합산하여 나눈 평균치를 사용한다.

0점: 부종이나 종창이 없다.

1점: 발 또는 발목관절에 국한된 경한 부종과 발적

2점: 발목관절에서 족근골(metatarsal)에 걸친 경한 부종과 발적

3점: 발목관절에서 족근골에 걸친 중등도의 부종과 발적

4점: 발목에서 다리 전체에 걸쳐 부종과 발적이 있는 경우

IgG 항체의 아형 분석. CII/CFA의 1차 접종 후 3주, 5주, 그리고 7주째에 마우스의 혈액을 채취하여 Bethyl Lab Co. (Montgomery, TX)의 mouse IgG1/IgG2a ELISA quantitation kit를 사용하여 IgG 항체의 아형을 조사하였다. **CII 자극에 대한 T 림프구의 증식반응 측정.** 각 림프절과 비장을 적출하여 인산 완충 용액(phosphate-buffered saline, PBS)로 2회 세척한 후 잘게 자르고 cell strainer로 거른다. 4°C 1,500 rpm에서 10분간 원심분리 후 상층액을 버리고 세포층을 RPMI 1640 배양액에 재부유시켜 1 \times 10⁵ cells/ml로 맞춘다. 96 well microtiter plate의 각 혈액 림프구와 비장을 각각 2 \times 10⁵개씩 넣고 40 μ g/ml 농도의 CII로 3일간 자극하며 배양한다. 이 때 대조군으로 동일한 양의 ovalbumin을 사용한다. 배양 종료 18시간 전에 ³H-thymidine (NEN, Boston MA)을 혈당 0.5 μ Ci씩 넣어 주었다가 세포를 수집한 후 beta counter (Packard

Instrument Co., Downers Grove, IL)로 동위원소 양을 측정한다. T 림프구 증식반응의 결과를 나타내는 자극지수 (stimulation index, S. I.)는 CII로 자극한 세포의 동위원소량을 ovalbumin으로 자극한 세포의 동위원소량으로 나눈 값이며, S. I. 값이 2 이상인 경우를 양성 증식반응 (positive proliferative response)으로 간주하였다.

유세포 분석을 통한 T 세포 아형 분석 및 IL-10과 IFN- γ 를 생성하는 림프구의 측정. 앞서 T 림프구의 증식반응 측정에서 설명한 것과 동일한 방법으로 각 장기로부터 single cell suspension을 만든 후 24 well plate에 혈당 1×10^6 개씩 넣어주고 40 ug/ml의 CII로 자극하며 자극하지 않는 세포와 함께 3일간 배양한다. 배양 종료 후 2시간 동안 Golgi Stop (Pharmingen, San Diego CA)으로 고정 한 후 fluorescein isothiocyanate (FITC)로 표지된 anti-CD4 항체(Pharmingen, San Diego CA)로 4°C에서 30분간 염색한다. PBS로 2번 씻어 준 후 cytoperm/cytofix (Pharmingen, San Diego CA)에 재부양하여 20분간 놓아 둔 후 phycoerythrin (PE)가 부착된 anti-IL-10 및 anti-IFN- γ 항체(Pharmingen, San Diego CA)로 세포질 내 합성된 사이토카인을 표지하고 FACS Ventage 유세포 분석기(Becton Dickinson, San Jose CA)로 측정한다. CD25를 발현하는 T 세포의 분석은 PE 또는 FITC로 표지된 anti-mouse CD25 항체(Pharmingen, San Diego CA)를 사용하여 CD4⁺ 세포의 분석과 마찬가지로 방법으로 시행하였다.

통계적 유의성의 검증. 실험 결과는 평균 표준 오차로 표현하였으며 통계적 유의성은 SPSS 통계 프로그램 (version 10.0)을 사용하여 student's t-test를 실시하였고

*P*값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의하다고 분석하였다.

결과

경구 관용을 통한 DBA/1 마우스의 관절염 유발 억제 효과. 100 μ g의 CII를 여섯 번 경구로 투여한 DBA/1 마우스와 동일한 용량의 용매를 준 대조군에서 관절염을 유발시키고 이후 11주에 걸쳐 평균 관절염 지수를 조사해 본 결과, CII/CFA의 1차 접종 후 4주째 되는 시점까지는 실험군과 대조군 모두에서 비교적 낮은 위증도가 관찰되었으며 두 군 사이에 별 다른 차이는 보이지 않았다 (Fig. 1). 대조군의 평균 관절염 지수는 이후 계속 증가하여 5주에서 6주에 이르는 시기에 최대치를 이루며, 7주째에 약간 감소한 뒤 11주까지 비슷한 수준으로 유지되

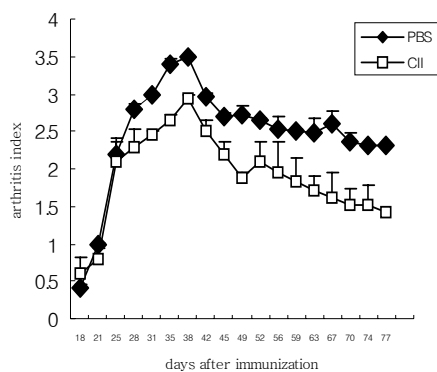


Figure 1. Suppression of arthritis in CIA mice which received oral administration of CII prior to the induction of arthritis. Mice that were given 6 consecutive administration of 100 μ g CII through oral route showed marked decrease in arthritis index compared to PBS-fed controls throughout the examination period (e.g. from 2 to 11 weeks after the first CII injection.) (Data represent average values of 5 individual mice each in experimental and control group.).

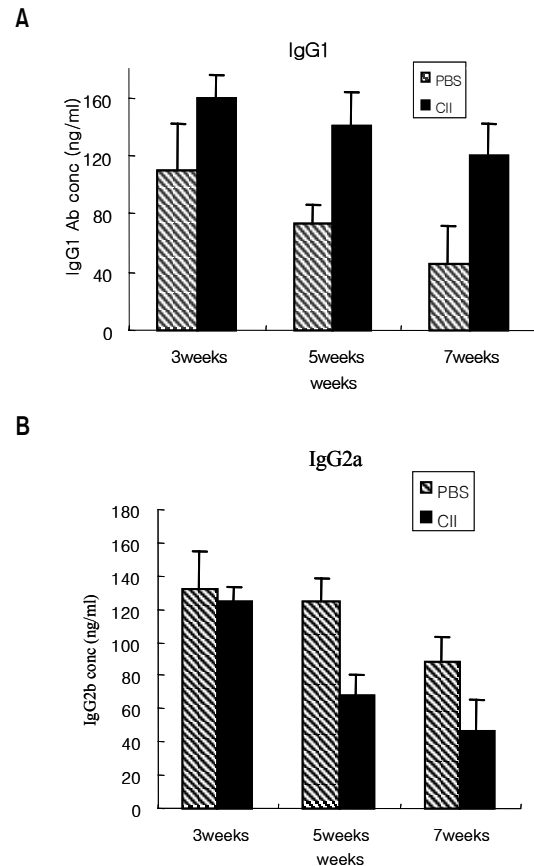


Figure 2. Differences in serum levels of IgG1 and IgG2a subtypes between orally tolerized mice and PBS-fed controls at 3, 5 and 7 weeks after the first CII injection. Mice undergone oral administration of CII showed higher serum level of IgG1 than that of PBS controls in all three time points examined, while the level of IgG2a was lower than PBS-fed controls. (A) Serum levels of IgG1 subtypes. (B) Serum levels of IgG2a subtypes (Data represent average values of 5 individual mice each in experimental and control group).

었다. 이 기간 동안 CII를 경구로 투여한 실험군은 대조군에 비해 현저하게 낮은 수치의 관절염 지수를 보였으며, 5~6주 때 최대치를 보인 후 7주 이후로도 11주째까지 점진적인 감소를 나타내었다. 전반적으로 CII를 경구로 투여한 실험군은 관찰 기간 동안 지속적으로 대조군과 비교하여 통계적으로 유의한 감소를 보였다.

경구 관용이 관절염 모델 마우스의 혈청 내 IgG 아형 변화에 미치는 영향. 마우스의 경우 IgG 항체의 여러 아형 중 IgG1은 염증을 억제하는 조절자의 역할을 하는 반면 IgG2a는 염증을 매개하는 인자로 작용한다고 알려져 있으며, DBA/1 마우스에서는 CIA를 유도할 경우 주로 Th1 반응을 일으키는 IgG2a가 특이적으로 감소되어 있다고 보고된 바 있다(9,14). 본 실험 결과에서도 경구 관용이 유도된 실험 동물의 혈청 내 이 두 가지 IgG 항체 아형의 상대적 농도가 서로 상반된 변화를 보이는 것이 관찰되었다. 즉 CII를 먹인 DBA/1 마우스에서 관절염을 유발시킬 경우 일어나는 혈청 내 IgG 아형의 농도 변화를 1차 접종 이후 3주, 5주, 그리고 7주째 되는 시점에서 각각 조사하였다(Fig. 2). CII를 경구로 투여한 실험군과 용매를 대신 먹인 대조군 마우스의 혈청을 50,000배에서 400,000배까지 단계적으로 희석한 뒤 각각 IgG1과 IgG2a를 선택적으로 인지하는 ELISA로 분석 해 본 결과, 관절염 유도에 앞서 CII를 경구로 투여한 동물의 IgG1 농도는 대조군보다 높게 나타난 반면($104.6 \text{ ng/ml} \pm 21$ vs. $76.3 \text{ ng/ml} \pm 15$, $P < 0.05$) IgG2a의 농도는 낮아져 있는 것(86.6 ± 17.5 vs. 114.7 ± 12.2 , $P < 0.05$)이 1차 접종 후 3주와 5주째 되는 시점에서 관찰되었다(Fig. 2 A, B). 특히 IgG2a의 경우는 1차 접종 후 5주째 되었을 때 경구 관용이 유도된 마우스에서 대조군의 50% 정도로 감소해 있는 것을 볼 수 있었다. 그러나 관절염 평가의 수치가 정

점을 지난 후인 11주째에 시행한 조사에서는 IgG 아형별 농도가 실험군과 대조군에서 별 차이가 없는 것으로 나타났다(data not shown).

경구 관용 유도로 인한 CIA 모델 마우스의 장간막 림프절 T 림프구 증식 반응의 억제효과. 다음으로는 반복적인 CII의 경구 투여로 이 항원 단백질에 대한 관용이 유도된 DBA/1 마우스에서 관절염을 유발시킬 경우 말초면역기관 중 혈액 림프절, 장간막 림프절(mesenteric lymph node, mLN), 비장세포들이 CII 자극에 의해 일어나는 증식 반응에 대해 조사하였다. 우선 혈액 림프절(drainage lymph node)로부터 추출한 세포들의 반응을 살펴 본 결과, 1차 접종 후 3주와 5주되는 시점에서 경구 관용이 유도된 동물의 림프절 세포가 대조군에 비하여 약 25% 정도 낮은 증식반응을 보이는 것으로 나타났으나(8.2 ± 2.3 vs. 6.2 ± 3.5 , $P < 0.05$) 7주 이후부터는 두 군 사이에 별 다른 차이를 볼 수 없었다(Fig. 3A). 장간막 림프절의 경우 CII를 경구로 투여한 마우스의 림프구들이 1차 접종 후 5주째 되었을 때 S. I. 값이 30 ± 2.5 에 달하는 강력한 증식반응을 보인 반면 대조군에서는 S. I. 값이 8을 넘지 않았다(Fig. 3B). 한편 경구관용을 일으킨 마우스의 비장에서 측정된 증식 반응은 5주 때 대조군보다 낮은 수치를 보이기는 하였으며 7주 후에는 5주와 비교해 각 군에서 50% 정도 감소하는 현상을 보였으며 두 군 간의 차이는 거의 나타나지 않았다(Fig. 3C).

관용이 유도된 마우스에서 IL-10을 생산하는 T 림프구의 분포 변화. CII의 반복적인 경구 투여가 DBA/1 마우스의 세포 분화에 미치는 영향, 특히 IL-10을 생산하는 억제성 세포의 $CD4^+$ T 림프구의 상대적 빈도를 어떻게 조절하는지를 알아보기 위하여 실험군과 대조군에서 각기 파이어 소절, 장간막 림프절, 그리고 비장을 적출한

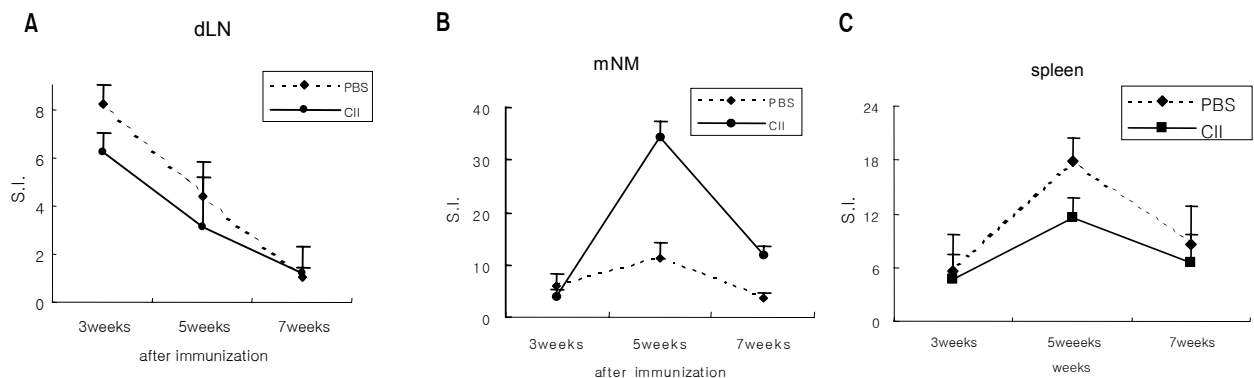


Figure 3. Time-course examination of T-cell proliferative response in lymph nodes and spleen upon CII stimulation. Peripheral blood mononuclear cells were isolated from lymph nodes and spleen of mice sacrificed at 3, 5 and 7 weeks after the first CII injection, and cultured for 72 hours in the presence of CII. Panels show changed in the stimulation index (S.I.) of T-cells isolated from; (A) draining lymph node; (B) mesenteric lymph node, (C) spleen (Data represent average values of 5 individual mice each in experimental and control group.).

뒤 각각의 세포를 분리하여 이 중 IL-10을 분비하는 세포의 빈도를 CD4와 세포질 내 IL-10에 대한 항체로 이중 염색한 뒤 유세포 분석기로 조사하였다. 이 때 CII에 특

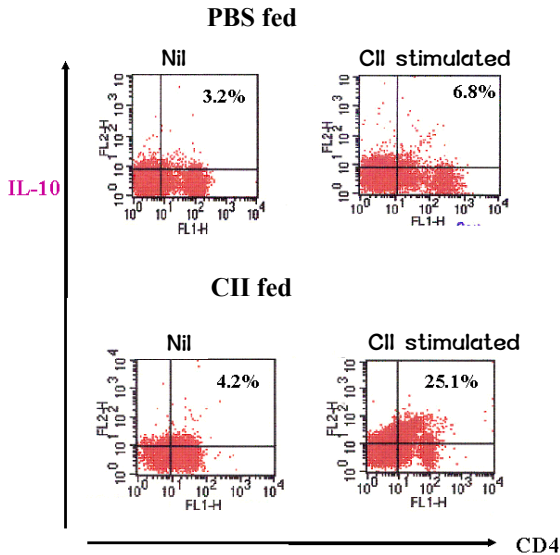


Figure 4. Changes in the proportion of IL-10 producing T-cells in Peyer's patch. While lymphocytes cultured without CII stimulation showed no difference in the proportion of IL-10 producing cells between CII-fed and PBS-fed groups, lymphocytes of tolerized mice cultured in the presence of CII showed a marked increase in IL-10 producing fraction compared to controls. Organs were extracted at 3 weeks from first injection of CII. Single cell suspensions combined from organs of 5 independent mice were used for each FACS analyses.

이적인 T 림프구들로부터의 반응을 알아보기 위하여 각 조직으로부터 분리한 세포들은 *in vitro*에서 CII로 자극하며 3일 동안 배양하여 얻은 단기 세포주(short-term cell line)를 분석하고 *ex vivo*에서 얻어진 결과와 비교하였다.

우선 1차 접종 유도 후 3주째 되는 시점에서 적출한 파이어 소절의 림프절 세포에서 CD4⁺ T 림프구에서 분비되는 IL-10의 변화를 살펴보면, CII로 자극하지 않은 경우는 관용이 유도된 실험군과 대조군에서 CD4⁺/IL-10⁺인 T 림프구의 숫자는 별 다른 차이가 없었으나 *in vitro*에서 3일간 CII로 자극하며 배양한 단기 세포주는 관용이 유도된 동물에서 IL-10을 생산하는 T 림프구의 수가 대조군에 비하여 6.8%에서 25.1%로 3 내지 4배 정도 증가한 것을 볼 수 있었다(Fig. 4). 한편 같은 시기에 장간막 림프절과 비장에서 분리한 T 림프구로부터 구축한 단기 세포주는 CII를 먹인 군과 용매를 먹인 대조군 사이에서 IL-10을 생성하는 세포의 숫자에 큰 차이가 없었다(data not shown).

관절염 유도 후 5주차 때 적출한 장간막 림프절과 비장의 T 림프구들 역시 *ex vivo*에서는 관용 유도 여부에 상관없이 CD4⁺/IL-10⁺인 세포들의 숫자가 비슷하게 나타난 반면 이들을 3일 동안 CII로 자극한 후에는 경구 관용이 유도된 마우스에서 IL-10을 생산하는 CD4⁺ T 림프구가 대조군과 비교할 때 장간막 림프절에서는 13.9% vs. 49.5%로, 그리고 비장에서는 22.3% vs. 41%로 2 내지 3배 가량 증가되어 있었다(Fig. 5A, B). 또 3주차 때 시행한 분석 결과와는 대조적으로 이 시기에는 혈액 림프절

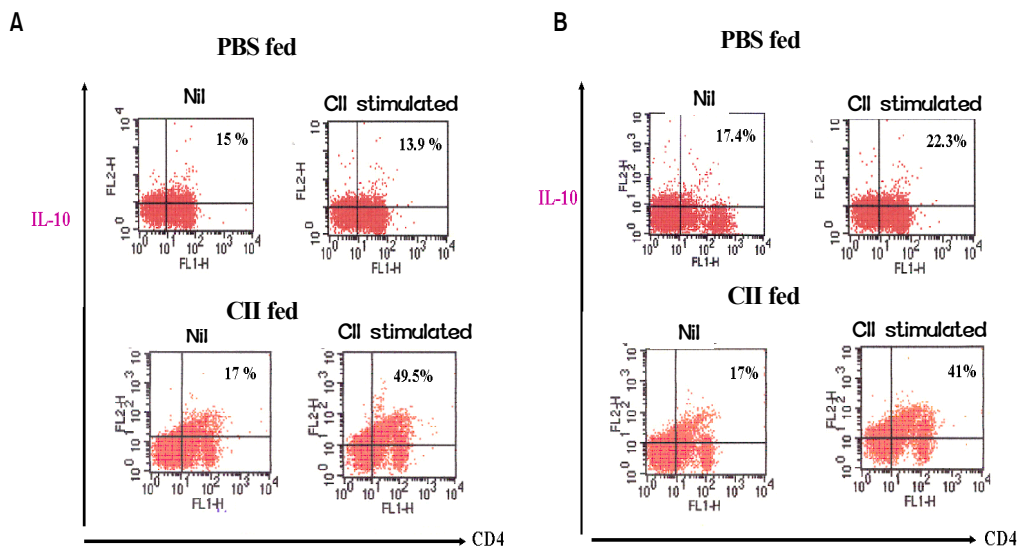


Figure 5. Proportion of IL-10 producing lymphocytes in the mesenteric lymph node and spleen. For both organs, lymphocytes isolated from mice tolerized by oral administration of CII showed significant increase in the proportion of IL-10 producing cells upon *in vitro* stimulation with CII. (A) mesenteric lymph node, (B) spleen (Organs were extracted at 5 weeks from first injection of CII/CFA. Single cell suspensions combined from organs of 5 independent mice were used for each FACS analyses.).

과 파이어 소절의 IL-10⁺을 분비하는 T 림프구 숫자가 CII를 먹인 군과 대조군 모두에서 비슷하게 나타났다 (data not shown).

관절염 유도 후 각각 7주와 11주째에 위와 동일한 방법으로 IL-10 생성량을 조사하여 보니 3일 동안 CII로 자극을 준 후에도 관용이 유도된 마우스와 대조군의 혈액 림프절과 파이어 소절, 장간막 림프절, 그리고 비장에서 분리한 T 림프구들 모두에서 별다른 차이점을 관찰할 수 없었다(data not shown).

관용이 유도된 마우스에서 CD4⁺ CD25⁺ T 림프구의 분포 변화. 다음으로는 관용 유도과정에서 IL-10의 주된 생성자로 지목되고 있는 CD25⁺인 조절 T 림프구(regulatory T lymphocyte)의 분포를 조사해 보았다(6,11) (Table I). 관용이 유도된 마우스와 용매를 대신 먹인 대조군에서 각기 1차 접종 유도 후 3주와 5주째에 장간막 림프절을 적출하여 그 T 림프구 내 CD4⁺/CD25⁺ 세포들

의 비율을 분석해 본 결과 3주차 때에는 두 군 사이에 별다른 차이를 보이지 않았으나 5주차 때 시행한 조사에서는 3.49% vs. 16.32%로 관용이 유도된 마우스의 장간막 내 CD4⁺/CD25⁺ 세포들이 차지하는 비율이 훨씬 높게 나타났다. 특히 이 증가는 전체 gating된 CD4⁺ 세포의 수가 비슷하게 유지된 상황에서 CD4⁺/CD25⁺ 세포

Table I. Proportion of CD4⁺ CD25⁺ T cells in the mesenteric lymph node of mouse tolerized by oral administration of CII

Percent (%)	3 wk		5 wk	
	Control	bCII	Control	bCII
CD25 ⁺ CD4 ⁺	2.83	4.99	3.49	16.32
CD25 ⁻ CD4 ⁺	60.55	59.00	66.03	47.78

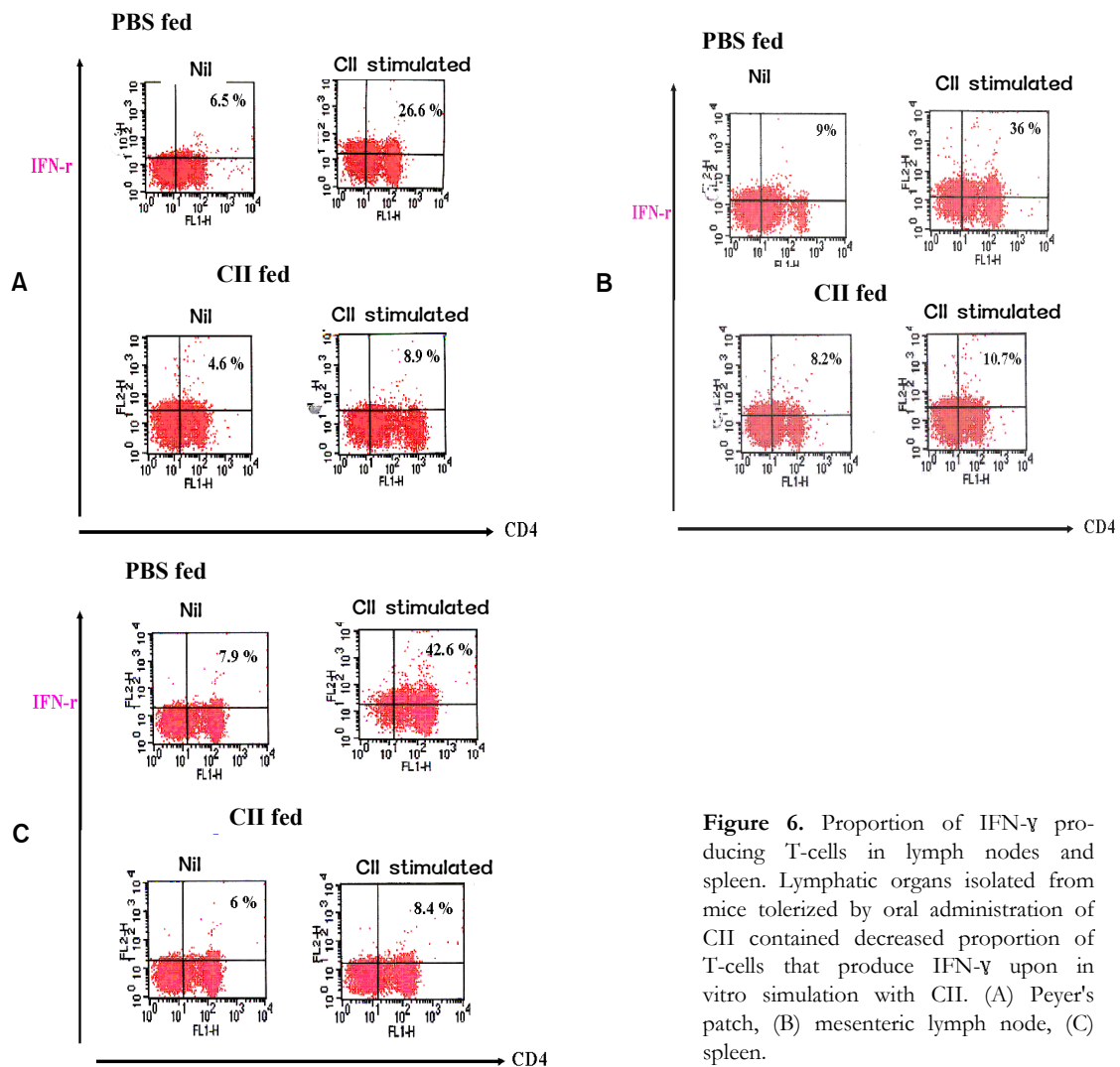


Figure 6. Proportion of IFN- γ producing T-cells in lymph nodes and spleen. Lymphatic organs isolated from mice tolerized by oral administration of CII contained decreased proportion of T-cells that produce IFN- γ upon in vitro simulation with CII. (A) Peyer's patch, (B) mesenteric lymph node, (C) spleen.

들의 상대적인 감소를 수반하고 있어 CD25를 발현하는 조절 T 림프구의 분화가 촉진되었음을 시사해 준다.

관용이 유도된 마우스에서 IFN- γ 를 생산하는 T 림프구의 분포 변화. CII의 반복적인 경구 투여가 IFN- γ 를 생산하는 염증성 세포의 상대적 빈도를 어떻게 조절하는지를 알아보기 위하여 실험군과 대조군에서 각기 파이어 소절, 장간막 림프절, 그리고 비장을 적출한 뒤 세포를 분리하여 조사하였다. 또한 IL-10의 경우와 마찬가지로 CII에 특이적인 T 림프구들의 반응을 알아보기 위하여 각 조직으로부터 분리한 세포들을 in vitro에서 CII로 자극하며 3일 동안 배양하여 단기 세포주(short-term cell line)을 제작하여 ex vivo에서 얻어진 결과와 비교하였다.

관절염 유도 후 3주째 되는 시점에서 적출한 파이어 소절의 경우, CII로 자극하지 않으면 관용이 유도된 실험군과 대조군에서 CD4⁺/IL-10⁺인 세포의 분포에 별다른 차이가 없었으나 in vitro에서 3일간 CII로 자극하며 배양한 단기 세포주는 관용이 유도된 동물에서 IFN- γ 를 생산하는 T 림프구의 수가 대조군에 비하여 26.6%에서 8.9%로 감소한 것을 볼 수 있었다(Fig. 6A). 한편 같은 시기에 장간막 림프절과 비장에서 분리한 단기 세포주에서 CII를 먹인 군과 용매를 먹인 대조군 사이에서 IFN- γ 를 생성하는 세포의 숫자에 큰 차이가 없었다(data not shown).

관절염 유도 후 5주차 때 적출한 장간막 림프절과 비장의 세포들 역시 ex vivo에서는 관용 유도 여부에 상관없이 CD4⁺/IFN- γ ⁺인 세포들의 숫자가 비슷하게 나타난 반면 이들을 3일 동안 CII로 자극한 후에는 경구 관용이 유도된 마우스에서 대조군과 비교할 때 장간막림프절에서는 36% vs. 10.7%로, 그리고 비장에서는 42.6% vs. 8.4%로 4 내지 5배 감소되어 있었다(Fig. 6. B, C). 또 3주차 때 시행한 분석 결과와는 대조적으로 이 시기에는 파이어 소절의 IFN- γ ⁺ T 림프구 숫자가 CII를 먹인 군과 대조군 모두에서 비슷하게 나타났다(data not shown).

관절염 유도 후 각각 7주와 11주째에 위와 동일한 방법으로 IFN- γ 를 생성하는 CD4⁺ 세포들을 조사하여 보니 3일 동안 CII로 자극을 준 후에도 관용이 유도된 마우스와 대조군의 파이어 소절, 장간막 림프절, 그리고 비장에서 분리한 세포들 모두에서 별다른 차이점을 관찰할 수 없었다(data not shown).

고 찰

자가 면역질환의 항원을 경구로 투여하여 이에 대한 관용을 유도하는 것은 특히 광범위 면역억제제의 장기 투약으로 인한 부작용이 우려되는 만성 질환의 치료에 적합한 방법이며 현재까지의 임상 적용에서 별다른 문제점이 발견되지 않았다는 점에서 전망이 밝은 치료

법이다. 경구로 복용한 항원 단백질은 소화기 내에서 신속하게 분해되어 그 면역 조절 효과가 오래 지속되지 않는다는 단점이 있지만, 본 연구팀에서는 류마티스 관절염의 주요 자가항원인 CII를 특수한 고분자 복합체로 싸서 투여하여 이를 현저하게 개선한 바 있다(10). 이와 병행하여 경구관용이 유도되는 과정에 관여하는 생체 내 면역 세포들의 기능과 이들이 분비하는 조절인자들을 적절히 이용한다면 염증 억제효과를 크게 증진시킬 수 있을 것으로 보여지나, 현재 경구관용의 기전을 분석하는 in vivo 연구들은 대부분 ovalbumin과 같이 실험 항원과 이를 인지하는 T 림프구의 클론을 transgene으로 과발현하는 동물 모델에서 진행되고 있으므로 실제로 임상적인 의미를 찾기는 어렵다(15).

본 연구에서는 CII를 반복적으로 경구 투여한 DBA/1 마우스에 CIA를 유발시킬 때 일어나는 면역기능의 변화를 조사하여 그 염증이 억제되는 기전을 알아보려 하였다. 이를 위하여 CIA 동물 모델에서 관절염이 진행되는 kinetics를 1차 접종을 한 시기로부터 11주까지 지속적으로 관찰한 결과, 3주째부터 관절의 염증이 관찰되기 시작하여 5~6주 사이에 평균 관절염 지수가 최고치를 보였으며 7주에는 약간 감소한 뒤 이 상태가 11주까지 유지되는 것으로 나타났다. 관절염 유도에 앞서 CII를 경구로 투여한 동물 역시 5~6주 때 관절지수가 가장 높았으나 관찰 기간 내내 대조군보다는 의미있게 낮은 수치를 보였으며, 7주차에 접어들면서부터는 점진적으로 염증이 해소되는 양상이 나타났다. 이 결과에 근거하여 1차 접종 후 3주, 5주, 그리고 7주가 되는 시점을 대상으로 그 혈청 내 IgG 항체의 아형과 각 림프절 및 비장의 T 림프구 증식반응, 그리고 경구관용의 중추적인 조절자로 알려진 IL-10과 IFN- γ 의 생성을 살펴 본 결과, 앞서 관찰된 관절염의 진행 양상과 시간적으로 병행하는 변화들이 관찰되었다.

우선 실험대상 동물의 IgG2a와 IgG1의 농도 변화를 살펴본 결과, CIA의 증세가 점차 악화되어가는 과정인 3주에서 5주까지의 기간 동안은 관용이 유도된 마우스가 대조군, 즉 일반적인 CIA 마우스에 비하여 IgG2a는 감소되어있는 반면 IgG1은 더 높은 것으로 나타나 있어 이러한 IgG 아형별 농도의 상대적 차이가 관용을 일으키는 기전에 관여하고 있음을 시사해 준다. 또 1차 접종 후 7주부터는 선행된 관용유도가 이 두 가지 Ig 아형의 농도에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 보아 CIA 마우스에서 IgG 2a가 관여하는 염증반응은 주로 병의 초기단계에서 작용할 것으로 짐작된다.

CIA 유도 후 각 림프절과 비장의 T 림프구들이 CII 자극에 대하여 보이는 증식반응의 양상도 관절염 유도에 앞서 CII를 경구로 투여한 마우스와 용매를 대신 먹인 대조군에서 흥미있는 차이를 보였다. 먼저 일반적인

CIA의 진행경로를 따르는 대조군의 경우, 1차로 꼬리에 접종한 CII/CFA를 인지한 T 림프구들이 가장 먼저 homing하는 장소인 혈액림프절에서 분리한 세포들은 3주차 때 가장 높은 증식 반응을 보인 뒤 이후 점차로 감소하는 양상을 보였으나 장간막 림프절에서는 이보다 조금 늦게 5주가 되는 시점에서 S. I. 값이 35에 달하는 최고치를 나타내었다. 이처럼 관절염 유도에 앞서 CII를 먹인 마우스의 경우는 5주차 때 적출한 장간막 림프절에서 현저한 증식 반응의 증가가 나타난 이유는 경구를 통하여 들어간 CII가 장간막 림프절의 T 세포들로 하여금 Th2와 Th3와 같은 면역 억제성 아형으로의 분화를 촉진시킨 결과로 추정된다(16,17). 한편 경구관용을 일으킨 마우스의 비장에서는 측정된 증식반응은 3주와 5주 때 대조군 보다 낮은 수치를 보이기는 하였으나 장간막 림프절에서 나타난 것과 같은 극적인 차이는 볼 수 없었다 (Fig. 3C).

Th2 아형의 세포들이 분비하는 대표적인 염증 억제성 사이토카인인 IL-10이 말초관용 유도과정에서 중요한 역할을 담당한다는 결과는 최근 많은 연구에서 보고된 바 있다(1,6). 본 연구에서는 관용이 유도된 마우스의 림프절들과 비장에서 분리한 세포로부터 T 림프구에서 분비하는 IL-10과 IFN- γ 의 생성을 조사해 본 결과 대조군과 비교해 보았을 때 림프 조직의 종류 및 그 적출 시기에 상관없이 두 군 사이에서 의미있는 차이를 볼 수 없었다. 그 이유는 아마도 인위적인 자극을 주지 않은 상태에서는 CII 특이적인 T 림프구의 숫자가 충분히 많지 않기 때문인 것으로 짐작되며, 현재까지 관용 유도의 기전을 분석하는 연구들이 특정 T 세포 수용체의 transgenic 동물 모델에 국한되어 있는 것은 바로 이러한 제약 때문이다. 본 연구에서는 이러한 과발현시스템을 사용하지 않은 관절염 모델에서 관용 유도가 미치는 영향을 조사하기 위하여 림프절과 비장에서 분리한 세포들을 *in vitro*에서 CII로 자극을 주며 3일간 배양하여 단기 세포주를 구축하였다. 이들을 분석해 본 결과 CII의 반복적 경구 투여로 관용을 일으킨 동물의 T 림프구 세포주들에서 IL-10을 생산하는 세포의 숫자는 증가된 반면 IFN- γ 를 생성하는 세포들의 숫자는 줄어든 것으로 나타났는데, 이 때 특히 흥미로운 것은 CII/CFA의 1차 접종 후 3주째 되는 시기에 파이어 소절에서 변화가 보인 반면 장간막 림프절과 비장에서는 차이가 없었고 5주차 때에는 이에 반대되는 양상을 보였으며, 7주 이후로는 어느 조직에서도 의미있는 변화가 관찰되지 않았다는 점이다. 이는 IL-10의 주요 생산자로 추정되는 Th2 또는 Th3 아형의 세포들이 초기에는 경구항원이 들어오는 길목에 있는 파이어 소절에 존재하다가 시간의 경과에 따라 장간막 림프절로 옮겨가며 또 혈관을 타고 관절 염증 부위로 이동해 가는 과정에서 비장에도 분포하게 되었음을 시사하는 결

과로, 경구 관용에 의한 염증 억제과정에 IL-10이 관여함을 간접적으로 보여주고 있다. 이 가설을 지지하는 또 다른 결과는 말초관용이 유도되는 과정에서 IL-10의 생성과 IFN- γ 의 생성을 억제하는 기능으로 그 역할이 주목되고 있는 CD25⁺ 조절 T 림프구(6,11)의 숫자가 5주째의 장간막 림프절에서 증가되어 있다는 사실이다. 현재 CII를 통한 경구 관용 유도과정이 CD25⁺ 인 조절 세포로부터 IL-10의 생성에 미치는 영향을 조사 중에 있다.

이상의 내용을 요약하면, DBA/1 마우스에서 CIA를 유도하기에 앞서 그 원인 항원인 CII를 반복적으로 경구 투여하면 이에 대한 관용이 유도되어 용매를 대신 투여한 대조군과 비교하였을 때 관절 염증이 감소되며 혈청 내 IgG1의 농도는 높아지는 반면 IgG2a의 농도는 감소하였다. 또 관절염 유도 후 5주 차 때에 최고치를 나타내는 T 림프구의 증식반응이 억제되었고, 각 림프절과 비장에서 IL-10을 생산하는 T 림프구의 숫자가 초기에는 파이어 소절에서, 그 이후로는 장간막 림프절과 비장에서 증가된 반면 IFN- γ 를 생성하는 세포는 줄어 들었음이 관찰되었다. 이러한 결과들은 류마티스 관절염의 동물 모델에서 CII의 경구투여를 통하여 얻어지는 관용의 기전에는 IgG1 항체의 증가 및 IgG2a 항체의 감소, 그리고 CII 특이적 T 림프구의 증식 억제와 이들 중 IL-10을 생성하는 억제성 아형을 가지는 세포들의 선택적 증가 및 IFN- γ 를 생성하는 염증성 세포를 억제하는 작용들이 기여하고 있음을 말해 준다.

참 고 문 헌

- Weiner HL, Friedman A, Miller A, Khoury SJ, al-Sabbagh A, Santos L, Sayegh M, Nussenblatt RB, Trentham DE, Hafler DA: Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu Rev Immunol* 12;809-837, 1994
- Trentham DE, Dynesius-Trentham RA, Orav EJ, Combitchi D, Lorenzo C, Sewell KL, Hafler DA, Weiner HL: Effect of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis. *Science* 261;1727-1730, 1993
- 홍연식, 김완옥, 이신석, 주영실, 민준기, 박성환, 이상현, 조철수, 김호연: 류마티스 관절염 환자에서 제2형 콜라겐의 치료효과. *대한류마티스학회지* 6;149-156, 1999
- Strobel S, Mowat AM: Immune responses to dietary antigens: Oral tolerance. *Immunol Today* 19;173-181, 1998
- Fisherman-Lobell J, Friedman A, Weiner HL: Different kinetic patterns of cytokine gene expression *in vivo* in orally tolerant mice. *Eur J Immunol* 24;2720-2724, 1994
- Tsuji NM, Mizumachi K, Kurisaki J: Interleukin-10 secreting Peyer's patch cells are responsible for active suppression in low-dose oral tolerance. *Immunology* 103;458-464, 2001
- Friedman A, Weiner HL: Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci USA* 91;6688-6692, 1994
- Coligan JE, Kruisbeek AM, Matquies DH, Shevach EM, Strober W: Collagen-induced arthritis. *Current Protocols in Immunology* vol 3;15.5.1-19, 1996
- Seetharaman R, Mora AL, Nabozny G, Boothby M, Chen

- J: Essential role of T cell NF-kappa B activation in collagen-induced arthritis. *J Immunol* 163;1577-1583, 1999
 10. Kim WU, Park JS, Ryoo JW, Kim J, Youn J, Kim SH, Min SY, Bae EY, Lee WK, Hwang SY, Park SH, Cho CS, Kim HY: Suppression of collagen induced arthritis by single administration of poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles entrapping CII: a novel therapeutic strategy for oral tolerance. *Arth Rheum* 46;1109-1120, 2002
 11. Piccirillo CA, Letterio JJ, Thornton AM, McHugh RS, Mamura M, Mizuhara H, Shevach EM: CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells can mediate suppressor function in the absence of transforming growth factor β 1 production and responsiveness. *J Exp Med* 196;237-245, 2002
 12. Trentham DE, Townes AS, Kang AH: Autoimmunity to type II collagen: An experimental model of arthritis. *J Exp Med* 146;857-868, 1997
 13. Stuart JM, Huffstutter EH, Townes AS, Kang AH: Incidence and specificity of antibodies to type I, II, III, IV, and V collagen in rheumatoid arthritis and other rheumatic disease as measured by 125I-radioimmunoassay. *ArthritisRheum* 26; 832-840, 1983
 14. Butler DM, Malfait AM, Maini RN, Brennan FM, Feldmann M. Anti-IL-12 and anti-TNF antibodies synergistically suppress the progression of murine collagen-induced arthritis. *Eur J Immunol* 29;2205-2212, 1999
 15. Gonnella PA, Chen Y, Inobe J, Komagata Y, Quartulli M, Weiner HL: In situ immune response in gut-associated lymphoid tissue (GALT) following oral antigen in TCR-transgenic mice. *J Immunol* 160;4708-4718, 1998
 16. Weiner HL: Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol Today* 19;335, 1997
 17. Shi HN, Grusby MJ, Nagler-Anderson C: Orally induced peripheral nonresponsiveness is maintained in the absence of functional Th1 or Th2 cells. *J Immunol* 162;5143-5148, 1999
 18. Taylor PC: Anti-TNFalpha therapy for rheumatoid arthritis: an update. *Intern Med* 42;15-20, 2003
 19. Okada Y, Okada N, Mizuguchi H, Hayakawa T, Mayumi T, Mizuno N: An investigation of adverse effects caused by the injection of high-dose TNF alpha-expressing adenovirus vector into established murine melanoma. *Gene Ther* 10; 700-705, 2003
 20. DeBisschop M: What are the risks of long-term NSAIDs and COX-2 inhibitors? *J Fam Pract* 52; 199-200, 2003
-