

제2형 콜라겐으로 경구관용을 유도한 관절염 모델 마우스의 비장림프구내의 보조자극인자 및 STAT/SOCS 신호전달 인자의 발현 양상조사

가톨릭대학교 의과대학 연구원 류마티스 연구센터(RhRC)

이강은 · 황수연 · 민소연 · 김호연

Expression of Co-stimulatory Molecules and STAT/SOCS Signaling Factors in the Splenocytes of Mice Tolerized against Arthritis by Oral Administration of Type II Collagen

Kang-Eun Lee, Sue-Yun Hwang, So-Youn Min and Ho-Youn Kim

Rheumatism Research Center (RhRC), The Catholic University of Korea, Seoul 137-701, Korea

ABSTRACT

Oral administration of antigen has long been used in the induction of immune tolerance in various animal models of autoimmune diseases including rheumatoid arthritis (RA). Alleviation of arthritogenic symptoms has been reported from RA patients who received oral administration of type II collagen (CII) without side effects, however its rather inconsistent therapeutic efficacy and variation among patients calls for more detailed investigation on the mechanism of oral tolerance to be settled as regular treatment for RA. In an attempt to understand the immunogenic processes underpinning tolerance induction by orally administered CII, we analyzed changes in the expression of costimulatory molecules and STAT/SOCS signaling messengers in the mouse model of collagen induced arthritis (CIA). We found that in the spleen of CIA mice, that has been undergone repeated oral feeding of CII prior to the induction of arthritis, showed increased proportion of CTLA4 expressing lymphocytes than in the spleen of PBS fed control. On the other hand, cells expressing CD28 or ICOS were decreased in the spleen of tolerized mice. Tolerance induction by oral CII administration also enhanced the expression of STAT6 in both RNA and protein level, while not affecting the expression of STAT3. The expression of SOCS3, which has been known to transmit STAT-mediated signals from Th2 type cytokines, remained unchanged in the spleen of tolerized mice. Interestingly transcript of SOCS1, which has been associated with Th1 related pathways, was only visible in the spleen of tolerized but not of control mice, suggesting that as in the case of IL-6 signaling, it may exert a feed back inhibition toward the Th1 type stimulation. (*Immune Network* 2003;3(3):248-254)

Key Words: Oral tolerance, rheumatoid arthritis, type II collagen, co-stimulatory molecules, STAT, SOCS

서론

류마티스 관절염(rheumatoid arthritis, RA)은 제2형 콜라겐(type II collagen, CII)을 포함한 연골 단백질을 인지하

는 항체 및 T 림프구들이 활막 조직 내로 침투하여 염증을 일으키는 질환이다. 그 치료에 주로 사용되는 비특이적 염증 억제제 또는 광범위 면역억제제들의 부작용을 피하기 위한 대안으로 시도된 여러 생물학적 치료법 중 1990년대 하버드 의대를 중심으로 개발된 CII의 반복적 경구 투여를 통한 관용 유도는 특정 항원을 소화기를 통하여 반복적으로 주입하면 이후 동일한 항원에 노출되더라도 그 항원에 대한 병적인 면역반응이 감소하면서 질병이 억제되는 현상을 이용한 것이다(1). 이 경구 관용

책임저자 : 김호연, 가톨릭대학교 류마티스 연구센터(RhRC)
☎ 37-701, 서울시 서초구 반포동 505번지
가톨릭 의과대학 연구원 5017호
Tel: 02-590-2509, Fax: 02-599-4287
E-mail: ho@cmc.cuk.ac.kr

요법은 현재 류마티스 관절염(2,3)을 비롯하여 다발성 경화증, 경피증, 제1형 당뇨병 및 홍채염과 같은 자가 면역질환에서도 임상에 적용되는 보고들이 나오고 있으나(4), 아직 그 기전이 정확히 알려져 있지 않아 이에 대한 보다 체계적인 연구가 요구된다. 또한 연구팀에 따라 경구 관용으로 얻어진 치료 효과의 정도가 많은 차이를 보이고 있어, 향후 경구 관용을 보다 체계적으로 류마티스 관절염의 치료에 응용하기 위해서는 이 과정에 관여하는 면역세포 및 조절인자들에 관한 좀 더 체계적인 연구가 필요하다.

실험동물을 모델로 한 연구 결과에 따르면 경구로 반복 투여된 항원 단백질이 면역 억제를 일으키는 원리는 아마도 소화기를 둘러싼 점막 면역계에서 이들을 인지하는 T 림프구들이 면역 억제를 유도시키는 아형으로 분화된 뒤 혈관을 타고 병소로 이동하여 IL-4, IL-10, TGF- β 를 비롯한 염증 억제성 사이토카인들을 분비하기 때문일 것으로 추정된다(5,6). 이 중에서 IL-2 수용체의 α -chain인 CD25를 발현하며 기억세포의 특성을 보유한 조절 T 세포 (Tr)의 역할이 주목을 받고 있는데(7), 이 Tr 세포들은 adaptive transfer를 통하여 그 능동적 면역 억제 기능이 확인되었으며(8) 또 이들이 결여된 실험동물에서 복합적인 자가면역질환들이 발생한다는 것이 보고되었다. 그러나 여기서 인용한 결과들은 대부분 ovalbumin을 인지하는 T 세포 수용체를 과발현 하는 형질전환 마우스에서 같은 단백질을 경구관용 유도에 사용한 실험으로부터 얻어진 것들로, 형질전환 동물이 아닌 일반 마우스의 경구 관용 유도 기전에 기여하는 림프구들의 특성은 아직 구체적으로 조사된 바가 없다.

본 연구에서는 제2형 콜라겐을 주사하여 관절 염증을 유발시킨 DBA/1J 마우스의 관절염 모델(collagen induced arthritis, CIA)에서 콜라겐의 경구 투여를 통한 관용 유도의 기전을 조사하였다. 이 경우 관찰되는 염증 완화 효과 기전을 체계적으로 규명하기 위한 선행 연구결과, 본 연구팀은 장간막 림프절에서 CD4+CD25+ 조절 T 세포 유도 및 이들로부터의 IL-10 분비 증가현상과(9) 이 과정에 관여하는 수지상세포의 역할(manuscript in preparation)에 대하여 이미 보고한 바 있다. 이 논문에서는 Tr들의 특성 중에 억제성 보조자극인자인 CTLA4의 발현이 증가되어 있는 현상이 포함된다는 사실에 주목하여 경구 관용을 유도 후 CIA 마우스의 림프구에서 각종 보조자극인자의 발현 양상을 조사하였다. 또한 관용이 유도된 마우스의 림프절에서 면역 억제성을 가지는 T 세포들이 유도되는 기전을 알아보고자 하는 연구의 일환으로 각종 사이토카인으로 부터의 자극을 세포 내부로 전달하는 역할을 담당하고 있는 STAT과 SOCS 신호 전달인자들의 발현도 조사해 보았다.

재료 및 방법

DBA/1J 마우스의 경구관용 유도. 6~8주령의 DBA/1J 마우스(Shizuoka, Japan)를 이들에 한번씩 2주간에 걸쳐 0.05N 아세트산에 2 μ g/ml로 녹인 bovine 콜라겐(bCII)을 oral Zonde needle (Natsume, Japan)을 사용하여 100 μ g씩 (용액 50 μ l+150 μ l 아세트산) 투여하였다. 대조군으로 사용되는 DBA/1J 마우스에는 200 μ l의 용매를 대신 투여하였다.

CIA의 유도와 관절염의 평가. CII 또는 PBS의 경구 투여를 마친 DBA/1J 마우스에 complete Freund's adjuvant (CFA)와 동량으로 섞어준 bCII 100 μ g (0.05 N 아세트산에 2 mg/ml로 녹인 용액의 50 μ l)을 26 게이지 바늘로 꼬리에 주사한다. 이로부터 2주 후 200 μ g의 CII와 동량의 Incomplete Freund's adjuvant (IFA) 혼합액을 한 쪽 뒷다리에 주사하고, 첫 번 접종을 시작점으로 하여 실험의 내용을 알고 있지 않은 관찰자 세 명이 18일, 즉 2.5 주째 되는 날로부터 매주 한 번씩 관절 염증의 위중도를 평가하여 11주까지 계속한다. 관절염 평가는 Rosolniec 등에 의한 평균관절지수(mean arthritic index) (10)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

유세포분석을 통한 T 세포 아형 분석 및 IL-10과 IFN- γ 를 생성하는 림프구의 측정. 마우스의 비장으로부터 single cell suspension을 만든 후 24 well plate에 well 당 1×10^6 개씩 넣어주고 200 μ g/ml의 CII로 자극 또는 자극하지 않으며 24시간 배양한다. 배양 종료 후 1시간 동안 Golgi Stop (Pharmingen, San Diego CA)으로 고정된 후 fluorescein isothiocyanate (FITC)로 표지된 표면 항체(anti CD4; Pharmingen, San Diego CA, anti CD25: Pharmingen, San Diego CA)로 4°C에서 30분 염색한다. PBS로 2번 씻어 준 후 cytoperm/cytofix (Pharmingen, San Diego CA)에 재부양하여 20분간 놓아 둔 후 phycoerythrin (PE)가 부착된 anti CD28, anti CTLA4, 또는 anti ICOS (Pharmingen, San Diego CA) 항체들로 표지하고, FACS Vantage 유세포 분석기(Becton Dickinson, San Jose CA)로 측정하였다.

RT-PCR 분석. Single cell suspension으로 준비한 마우스의 비장 세포(1.0×10^7)를 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 의 CII로 자극하거나 또는 자극하지 않으면서 6시간 동안 배양한 후, Trizol (Invitrogen, Calsbed CA, USA)을 사용하여 RNA를 추출하였다. 이들의 농도로 정량한 뒤 2 mg을 random nanomer와 MMLV (Invitrogen) 역전사효소를 사용하여 cDNA를 합성하고, 이 cDNA의 1/10을 각 보조자극인자 또는 신호전달 물질 및 internal control로 사용하기 위한 $\beta 2$ microglobulin에 특이적인 primer들로 25~35 cycle 증폭하였다. 사용된 primer들의 염기서열은 $\beta 2\text{M}$: forward 5'-GTC TTT CTG GTG CTT GTC TC-3', reverse 5'-AAC TCT GCA GTA TGT AT-3', CD28: forward 5'-CTC TGG AAT CTG CAC GTC AA-3', reverse 5'-GCT GGT AAG GCT TTC GAG TG-3' CTLA-4: forward 5'-GGG TGT TTC ATG TGC TGT TG-3', reverse 5'-GGA ATG AGG CAT TTC CTT GA-3', STAT3: forward 5'-ACC AAC ATC CTG GTG TCT CC-3', reverse 5'-CAT GTC AAA CGT GAG CGA CT-3', STAT6: forward 5'-CTT CAA CGA CAA CAG CCT CA-3', reverse 5'-CTG GCT CAT TGA GGA GAA GG-3' SOCS1: forward 5'-CTT AAC CCG GTA CTC CGT GA-3', reverse 5'-GAG GTC TCC AGC CAG AAG TG-3', SOCS3: forward 5'-CCT TTG ACA AGC GGA CTC TC-3', reverse 5'-GCC AGC ATA AAA ACC CTT CA-3'와 같다.

Western Blot. 앞서와 동일하게 준비한 비장 세포를 CII로 자극하거나 또는 자극하지 않으면서 배양한 후 lysis buffer (0.5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, 0.25% Triton X-100, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10 mM β -glycerphosphate, 10 mM NaF, $300 \mu\text{M}$ Na_3VO_4 , 1 mM benzamidine, $2 \mu\text{M}$ PMSF, aprotinin at $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, leupeptin at $1 \mu\text{g}/\text{ml}$, pepstatin at $1 \mu\text{g}/\text{ml}$, 1 mM DTT)에서 micropipette으로 pipetting 하여 세포막을 파괴한 뒤 14,000 rpm에서 15분 동안 원심 분리하여 상층액을 분리하였다. 이를 Bradford assay로 정량한 뒤 12% SDS-PAGE에서 lane당 $20 \mu\text{g}$ 씩 전개시키고 nitrocellulose membrane에 전이시켰다. 이 membrane을 5% skim milk/TBS에 넣고 실온에서 2시간 blocking 한 후 1차 항체(Anti-Stat6, R&D, 1:2,000)와 역시 실온에서 2시간 반응시켰다. 그 후 이를 0.1% Tween 20을 함유한 TBS로 세 번 세척한 뒤 2차 항체와 실온에서 1시간 반응시키고, 앞서와 마찬가지로 세척한 뒤 ECL detection system (Amersham Pharmacia, UK)을 사용하여 발색한 뒤 Meducal X-Ray film Blue (AGFA, Belgium)에 30분 노출시켰다.

결 과

경구관용이 유도된 마우스의 관절 염증 억제 효과. DBA/1J 마우스의 발과 꼬리에 CII를 주사하여 인위적으

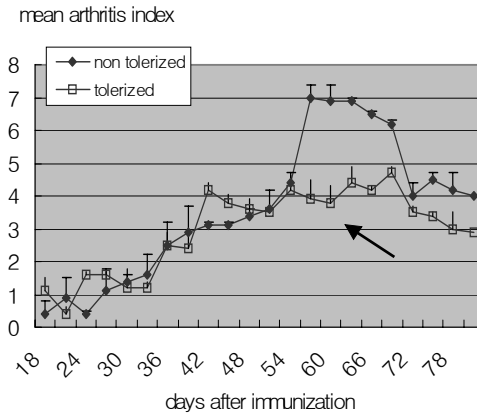


Figure 1. Reduction of arthritis index in mice tolerized by oral administration of CII. Mice that were given repeated oral CII feeding prior to the induction of arthritis showed decreased arthritis index compared to that of non-tolerized controls that were given PBS instead of CII. The peak point of arthritis was observed around 7 weeks (e. g. days 60-66) after the primary injection of CII for CIA induction (arrow).



Figure 2. Alleviation of foot and ankle inflammation in tolerized mice. Mice tolerized by oral CII (right) showed significant alleviation of edema and redness in the foot and ankle joint compared to non-tolerized controls (left).

로 관절염을 유발시키기 전 6회에 걸쳐 CII의 경구 투여로 관용을 유도한 군(CII, □)과 PBS를 동일한 횟수로 투여한 대조군(PBS, ◆)의 관절염 지수를 각 군당 5마리의 동물에서 관절염 유도 후 3주째 되는 시점부터 11주까지 관찰한 결과, 전 기간에 걸쳐 관용 유도군은 관절의 염증 증상이 나타나기 시작한 이후부터 대조군에 비하여 현저한 관절염지수의 감소를 보였다(Fig. 1). 이 때 관절염 유도 후 7주째 되는 시점에서 염증의 정도가 최고치를 나타낸 것으로 보아(화살표), 이보다 앞선 시기에 대장 마우스의 면역계에서 가장 활발한 세포 반응들이 일어날 것으로 간주하고 향후의 실험에 사용할 시료들은 5주째 되는 시점에서 채취하였다. 관용이 유도된 마우스들은 관절염지수 이외에 실제 육안으로 관찰된 발과 발목의 부기 및 염증면에서도 대조군과 현저한 차이를 보였다(Fig. 2).

경구 관용 유도 여부에 따른 마우스 비장 림프구에서의 보조자극인자 mRNA의 발현 양상 변화. CII로 경구 관용을 유도한 마우스의 비장 단핵구에서 각종 보조자극인자들의 발현 양상을 조사하기 위하여 RT-PCR 분석을 시행하였다. 이 때 관용 유도군과 대조군의 비장 단핵구들은 *in vitro*에서 각각 CII로 자극하거나 또는 자극하지 않은 조건하에서 6시간 동안 배양한 뒤 그 RNA를 추출하였다. 이들을 각 보조자극인자를 특이적으로 인지하는 primer들을 사용하여 RT-PCR한 결과, 관용이 유도된 마우스에서의 CTLA4 발현 증가가 가장 현저한 변화로 나타났다(Fig. 3). CD28의 경우는 관용 유도군과 대조군 사이에서 별다른 차이를 관찰할 수 없었으며, ICOS의 경우는 관용이 유도된 마우스의 비장에서 그 발현이 다소 감소되어 있는 것으로 나타났다.

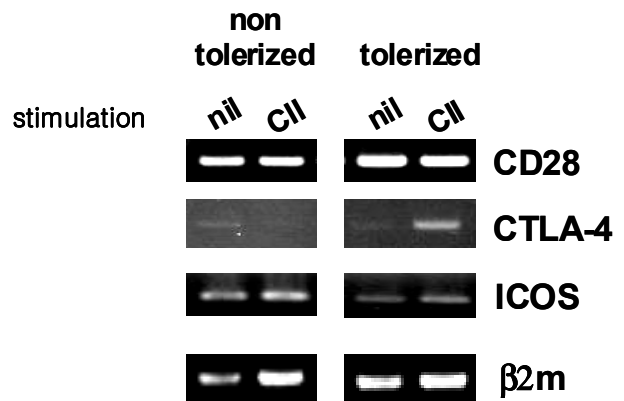


Figure 3. mRNA expression of co-stimulatory molecules in splenocytes. Expression of costimulatory molecules CD28, CTLA4 and ICOS was analyzed by RT-PCR analysis. Spleen lymphocytes were isolated from tolerized and non-tolerized mice and cultured *in vitro* with (CII) or without (nil) CII stimulation. $\beta 2$ microglobulin ($\beta 2$ M) was used as an internal control.

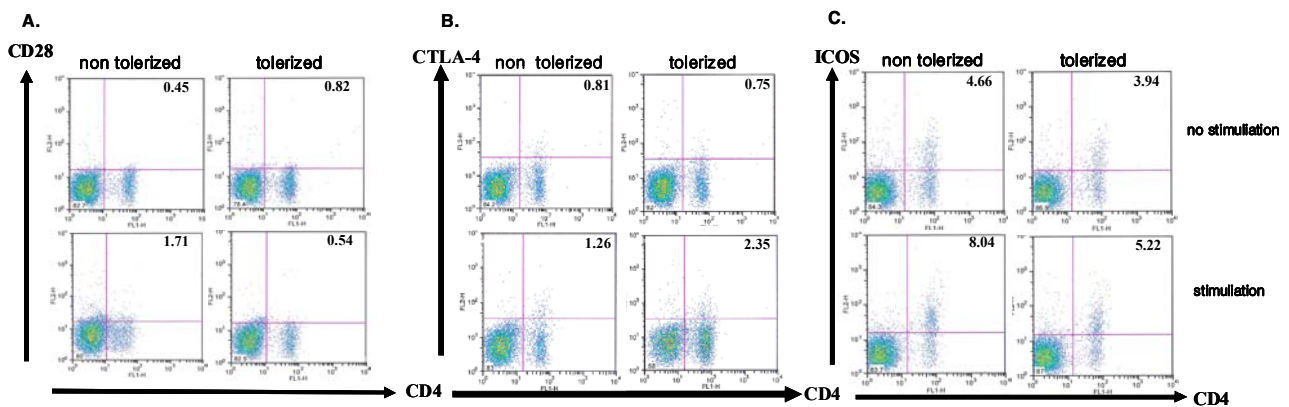


Figure 4. Expression of co-stimulatory molecules in the CD4⁺ portion of splenocytes. Proportion of cells expressing CD28 (A), CTLA4 (B) and ICOS (C) was compared between spleen lymphocytes of tolerized and non-tolerized controls that were cultured *in vitro* for 2 days in the presence (CII) and absence (nil) of CII stimulation, and analyzed by dual FACS staining of CD4⁺ and each co-stimulatory molecules.

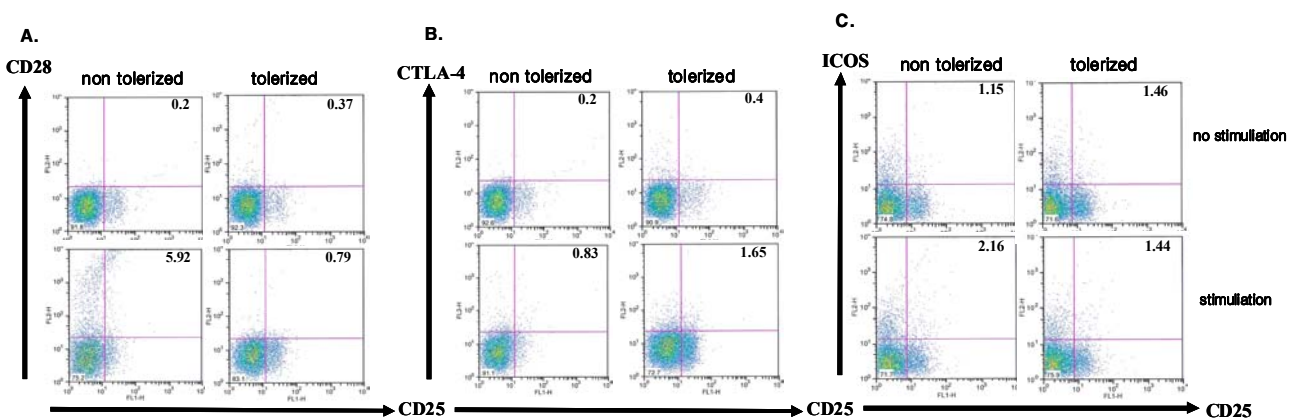


Figure 5. Expression of co-stimulatory molecules in the CD25⁺ portion of splenocytes. Proportion of cells expressing CD28 (A), CTLA4 (B) and ICOS (C) was compared between spleen lymphocytes of tolerized and non-tolerized controls that were cultured *in vitro* for 2 days in the presence (CII) and absence (nil) of CII stimulation, and analyzed by dual FACS staining of CD25⁺ and each co-stimulatory molecules.

경구 관용을 유도한 관절염 모델 마우스의 비장에서 관찰되는 CTLA4 발현의 증가와 CD28 발현의 감소. 앞의 RT-PCT 조사에서 CTLA4의 mRNA가 관용유도군에서 증가된 것으로 나타난 결과를 확인하기 위하여 마우스의 비장 단핵구들을 앞서와 동일한 자극 조건에서 24시간 배양한 뒤 유세포 분석을 통하여 CD4⁺ 또는 CD25⁺ 세포들의 CD28과 CTLA4 발현 양상을 조사하였다. 그 결과 관용이 유도된 마우스의 CD4⁺ 세포 중에는 CTLA4를 발현하는 세포들이 증가되어 있는 반면 대조군의 CD28을 발현하는 세포들의 분포에는 커다란 변화가 없는 것으로 나타났으며, 마찬가지로 방법으로 ICOS의 발현을 조사한 결과는 RT-PCR에서 관찰된 양상과 일치하여, CD4⁺ 세포에서는 관용 유도군보다 대조군, 즉 일반적인 CIA 마우스에서 이를 발현하는 세포들의 숫자가 세 배 정도 더 많은 것으로 나타났다(Fig. 4). 이 보조자극인자들의 발현을 CD25⁺ 세포를 대상으로 조사한 경우에도 비슷한 양상을 보였다(Fig. 5)

경구 관용 유도에 따른 STAT6 발현의 증가. 본 연구에서는 CII의 경구 투여에 따른 관절염 억제현상의 기전을 알아보기 위한 연구의 일환으로 T 림프구를 비롯한 면역세포들이 사이토카인을 비롯한 자극제들로부터 받는 신호를 내부로 전달해 주는 역할을 담당하는 STAT (signal transducer and activator of transcription) 인자들의 발현을 비장 림프구에서 조사해 보았다(11). STAT6와 STAT3의 mRNA 발현을 관용 유도군과 대조군의 비장에서 추출한 뒤 in vitro에서 CII로 자극을 주며 배양한 림프구들에서 조사해 본 결과, STAT3의 경우는 CII로 자극한 세포에서 증가된 양상을 보이나 관용 유도군과 대조군 사이의 차이는 없었다(Fig. 6). 한편 STAT6의 mRNA는 CII로 자극을 한 조건에서 관용 유도군 쪽이 대조군에 비하여 증가된 발현을 보이는 것으로 나타났다. 이 현상을 확인하기 위하여 동일한 방법으로 준비한

비장 세포들을 western blot으로 조사한 결과, STAT6의 단백질은 관용이 유도된 마우스에서만 관찰할 수 있었으며, mRNA의 결과와 같이 CII로 자극한 경우 약간의 증가를 나타내었다(Fig. 7). 또한 단백질인산화에 의한 STAT6의 활성화 양상에도 변화가 있는지를 알아보기 위하여 그 phosphorylated epitope을 인지하는 항체를 사용한 western blot도 시행하였는데, 밴드의 강도가 너무 약하여 정확하게는 알 수 없으나 역시 관용 유도군 쪽에서만 관찰되는 양상을 보였다(data not shown). STAT3 단백질의 양은 관용유도군과 대조군 사이에 차이가 없었다(Fig. 7).

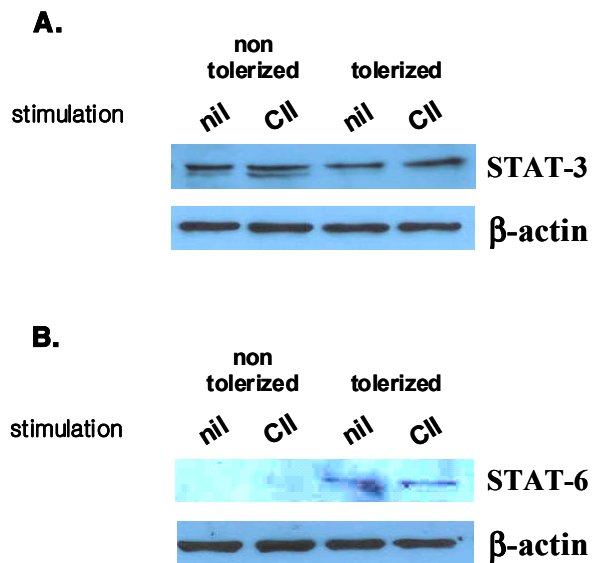


Figure 7. Expression of STAT3 and STAT6 protein in splenocytes. Protein expression of STAT3 and STAT6 was analyzed by western blot analysis of spleen cell extracts prepared from tolerized and non-tolerized mice after in vitro stimulation. Mouse β-actin was used as an internal control.

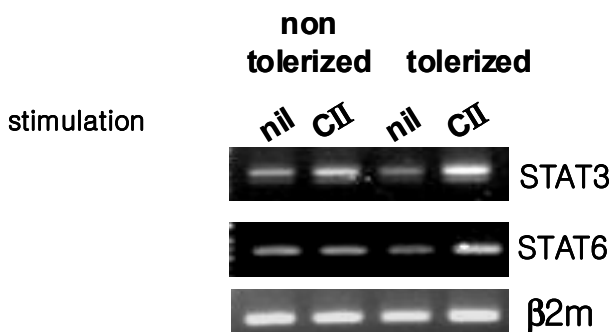


Figure 6. mRNA expression of STAT3 and STAT6 in splenocytes. The amount of STAT3 and STAT6 transcript was assessed by RT-PCR analysis of spleen lymphocytes isolated from tolerized and non-tolerized control and cultured in vitro for 6 hrs with (CII) and without (nil) CII stimulation. β2 microglobulin (β2 M) was used as an internal control.

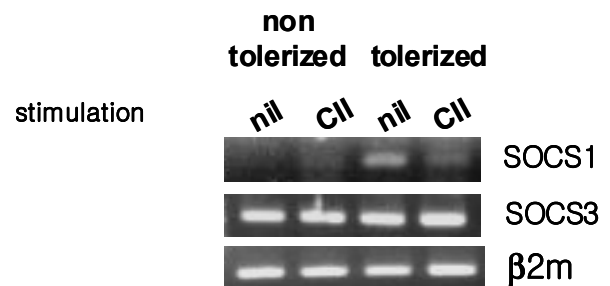


Figure 8. mRNA expression of SOCS1 and SOCS3 in splenocytes. The amount of SOCS1 and SOCS3 transcript was assessed by RT-PCR analysis of spleen lymphocytes isolated from tolerized and non-tolerized control and cultured in vitro for 6 hrs with (CII) and without (nil) CII stimulation. β2 microglobulin (β2 M) was used as an internal control.

경구 관용 유도 여부에 따른 마우스의 비장 세포 내 SOCS1과 SOCS3 발현 양상 비교. 최근의 보고에 의하면 IL-6로 자극한 세포에서 STAT3가 매개하여 전달한 자극은 일련의 염증성 반응을 유발하는 동시에 SOCS1의 활성화를 통하여 이들을 차단하는 작용을 동시에 수행하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 이 SOCS1의 mRNA 발현 변화를 마우스의 비장 세포에서 조사해 본 결과, 흥미롭게도 관용이 유도된 마우스에서만 RT-PCR 밴드가 관찰되었다 (Fig. 8). 이와 동시에 일련의 SOCS family 중 가장 Th2 반응과 밀접한 연관이 있는 것으로 보고되어지고 있는 SOCS3 (12)의 mRNA 발현도 함께 조사하였으나 이 경우는 모든 조건에서 전반적으로 SOCS1보다 강한 밴드로 나타난 반면 관용 유도군과 대조군 또는 *in vitro* CII 자극 여부에 따른 차이는 관찰되지 않았다.

고찰

류마티스 관절염은 면역기능의 조절실패로 인해 관절을 포함한 근 골격계가 파괴되는 만성 질환으로, 지속적인 인구의 증가와 고령화에 따라 유병률이 계속 증가함에 따라 사회 및 경제에 미치는 영향이 점차 커지고 있다. 그러나 대표적 다인성 질환(multifactorial disease)인 류마티스성 관절염의 특성상 환자들 중에는 현재 임상적으로 사용되는 염증 또는 면역 억제제에 잘 반응하지 않는 사람도 상당수 있으며, 특히 그 광범위/비특이적 면역 억제 효과로 인한 정상적인 생체방어기능의 약화로 기회 감염이나 악성종양 등 여러 가지 합병증이 증가하는 부작용 또한 만만치 않다. 이에 반하여 1990년대 초 하버드 의대에서 처음 실시된 이래 현재까지 별다른 부작용이 보고된 바 없으며 특히 일반적인 관절염의 치료 약제에 잘 반응하지 않는 환자들에게서 치료 효과를 거두고 있는 CII의 경구 관용은 매우 좋은 대체 치료법이라고 사료되나, 단지 아직까지 경구 관용의 작용 기전이 명확하게 밝혀져 있지 못한 관계로 보다 체계적인 치료를 시행할 수 없었다.

본 연구에서는 관절염의 동물 모델인 CIA마우스를 사용하여, CII를 통한 경구 관용 유도가 그 비장 세포의 보조자극인자 및 STAT/SOCS 신호전달 물질들의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 우선 T 세포 활성화에 관여하는 대표적인 보조자극인자인 CD28의 발현에는 큰 변화가 없는 반면 이와 반대로 T 세포에 의한 면역 반응을 억제시키는 CTLA4는 증가되어 있는 것으로 나타났다는데, 이는 억제성 보조자극인자들이 마우스의 말초 림프절에서 관용유도 기전에 관여할 가능성을 나타내 주는 것이다. 또한 ICOS의 경우는 일차적으로는 T 세포의 활성을 촉진시키는 역할을 하지만 그 궁극적인 작용은 말초관용을 증진시킨다는 보고가 있어 CII로 관용

이 유도된 마우스에서의 발현 양상이 주목되었는데, 실험 결과 이 물질은 관용 유도 후 발현이 줄어드는 것으로 나타났다. 이는 ICOS의 차단이 CIA마우스 모델의 관절 염증을 완화시키는 효과가 있다는 최신 보고(13)를 지지하는 결과로, 즉 ICOS는 관절 염증 유발과정에서 주로 T 세포의 활성화를 촉진시키는 역할을 담당할 가능성이 높음을 보여주고 있다. 향후 이처럼 관용 유도 후 발현상에 변화가 나타난 보조자극인자들이 작용하는 경로를 차단 또는 보완하는 물질을 고전적인 관용 유도 protocol에 첨가함으로써 한 차원 높은 치료 효과를 도모할 수 있을 것으로 생각된다.

세포 내에서 CTLA4를 통한 신호전달에 참여하는 매개인자들은 아직 잘 알려져 있지 않으나, 조직이식과정에서의 말초 관용 유도를 연구한 실험들로부터 STAT6가 이 과정에 관여할 가능성이 시사된 바 있다(14,15). 이는 STAT6가 주로 IL-4와 IL-10의 자극을 전달하는 역할을 통하여 IL-12의 주된 연락책으로 활동하는 STAT4와 길항 작용을 하면서 조직 내 Th1/Th2 반응 사이의 균형을 조절하는 기능을 담당하고 있음을 감안할 때 매우 흥미로운 결과이다. 실제로 STAT6가 관용이 유도된 마우스의 말초 림프절 세포들에서 CTLA4를 통하여 들어오는 자극의 전달에 관여하는지를 살펴보기 위하여 이 경로를 선택적으로 차단 한 뒤 STAT6의 발현 증가에 미치는 영향을 살펴보면 매우 흥미로운 것으로 생각되나, 현재 마우스의 CTLA4를 blocking하는 항체가 배포되고 있지 않은 관계로 조사해 볼 수 없는 점이 안타깝다. 일반적으로 CTLA4를 방해하는 것으로 인식되어 있는 soluble form, 즉 CTLA4-Ig의 fusion 단백질은 사실상 반대편 세포 표면에 표지된 CTLA4와 CD28이 공유하는 리간드들을 block하는 역할을 하는 것으로, 세포당 분자 수가 월등히 많은 CD28의 작용을 주로 방해하게 된다.

1990년대 후반에 들어와서 염증성 및 염증 억제성 반응에 관여하는 STAT 단백질들의 하부 표적 물질이면서 동시에 이들이 유도하는 세포 내 기전들을 feed-back으로 방해하는 역할을 수행하는 것으로 알려지면서 주목을 받게 된 SOCS family member들 중 SOCS1과 SOCS3는 각기 Th1과 Th2 타입의 세포들에서 선택적으로 발현된다(16). 이 중 IL-10이나 TGF- β 를 비롯한 염증 억제성 사이토카인에 의한 자극의 전달에는 주로 SOCS3가 관여한다는 연구 결과가 많이 보고되어 이를 관절염의 치료에 응용할 수 있는 가능성도 시사되고 있고(12,17), 반면 SOCS1은 주로 Th2 반응을 방해하는 작용을 한다고 알려져 있었다(18,19). 그러나 최근 IL-6를 통한 자극의 전달 과정에서 STAT3-SOCS1으로 이어지는 신호전달이 Th1 반응을 억제하는 효과를 가져오며, 이 되먹임 조절이 차단될 경우 관절염이 생긴다는 보고도 나온 바 있어(11), 본 연구에서는 이 두 물질의 발현을 관용이 유도된 마우스의

비장에서 살펴 보았다. 그 결과 흥미롭게도 SOCS3의 mRNA는 변화가 없는 반면 SOCS1의 mRNA가 관용 유도군에서 증가되어 있는 것으로 나타났다. 이는 일반적으로 IL-6에 의한 염증성 반응의 되먹임조절 도구로 이용되는 STAT3-SOCS1 pathway가 관용 유도의 과정에도 사용되었을 가능성을 나타내 준다고 하겠다. 이 때 과연 어떤 종류의 사이토카인이 증가에 관여했는지는 아직 알 수 없으나, 경구관용 유도 과정에서 중심적 작용을 하고 있는 IL-10과 TGF- β 의 역할이 주목되며, 앞으로의 연구에서 이 방면으로의 탐색을 계속 진행할 계획이다.

참 고 문 헌

- Weiner HL, Freidman A, Miller S, et al: 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-Tretham RA, Orav EJ, et al: Effect of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis. *Science* 259;1321-1324, 1993
- 홍연식, 김완욱, 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, Freidman A, Weiner HL: Different kinetic patterns of cytokine gene expression in vivo in orally tolerant mice. *Eur J Immunol* 24;2720-2724, 1994
- Noriko M, Mizumachi K, Kurisaki J-I: Interleukin-10 secreting Peyer's patch cells are responsible for active suppression in low-dose oral tolerance. *Immunology* 103;458-464, 2001
- Zhang X, Izikson L, Liu L, Weiner HL: Activation of CD25+ CD4+ regulatory T-cells by oral antigen administration. *J Immunol* 167;4245-4253, 2001
- Noriko M, Mizumachi K, Kurisaki J-I: Interleukin-10 secreting Peyer's patch cells are responsible for active suppression in low-dose oral tolerance. *Immunology* 103;458-464, 2001
- Min SY, Hwang SY, Lee JS, Kim JY, Lee KE, Kim KU, Kim YH, Do JH, Kim HY: Studies on the cellular immune response in animal model of arthritis after the induction of oral tolerance. *Immune Network* 3;136-144, 2003-09-04
- Coligan JE, Kruisbeek AM, Matquies DH, Shevach EM, Strober W. (Ed.): *Current Protocols in Immunology*. Vol.2, p.15-5-11. John Wiley & Sons, New York NY (1996)
- Ernst M, Ingelse M, Warning P, Campbell IK, Bao S, Caly FJ, Alexander WS, Wicks IP, Tarlinton DM, Novak U, Heath JK, Dunn AR: Defective gp130-mediated STAT signaling results in defenerative joint disease, gastrointestinal ulceration, and failure of uterine implantation. *J Exp Med* 194; 189-203, 2001
- Berlato C, Cassatella MA, Kinjo I, Gatto L, Yoshimura A, Bazzoni F: Involvement of SOCS3 as a mediator of the inhibitory effect of IL-10 on lipopolysaccharide-induced macrophage activation. *J Immunol* 168;6404-6411, 2002
- Iwai H, Kozono Y, Hirose S, Akiba H, Yagita H, Okumura K, Kohsaka H, Miyasaka N, Azuma M: Amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of inducible costimulator-B7 homologous protein costimulation. *J Immunol* 169;4332-4339, 2002
- Zhou P, Szot GL, Guo Z, Kim O, He G, Wang J, Grusby MJ, Newell KA, Thistlethwaite JR, Bluestone JA, Alegre ML: Role of STAT4 and STAT6 signaling in allograft rejection and CTLA4-Ig-mediated tolerance. *J Immunol* 165;5580-5587, 2000
- Zhou P, Szot G, Guo Z, Kim O, He G, Wang J, Grusby M, Newell KA, Thistlethwaite J, Bluestone J, Aletre M: Role of STAT6 signaling in the induction and long-term maintenance of tolerance mediated by CTLA4-Ig. *Transplant Proceed* 33;214-216, 2001
- Egwaugu CE, Yu CR, Zhang M, Mahdi RM, Kim S, Gery I: Suppressors of cytokine signaling protein are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: Implications for Th cell lineage commitment and maintenance. *J Immunol* 168;3181-3187, 2002
- Shouda T, Yoshida T, Hanada T, Wakioka T, Oishi M, Miyoshi K, Komiya S, Kosai KI, Hanakawa Y, Hashimoto K, Nagata K, Yoshimura A: Induction of the cytokine signal regulator SOCS3/CIS3 as a therapeutic strategy for treating inflammatory arthritis. *J Clin Invest* 108;1781-1788, 2001
- Losman JA, Chen XP, Hilton D, Rothman P: SOCS1 is a potent inhibitor of IL-4 signal transduction. *J Immunol* 162;3770-3774, 1999
- Ding Y, Chen D, Tarfalvi A, Su R, Qin L, Bromberg: SOCS1 inhibit IL-10-mediated immune responses. *J Immunol* 170; 1383-1391, 2003