

콜라겐 유도 관절염에서 콜라겐 항원 특이 V β 3+CD4+ T 세포의 선택적 증식

가톨릭대학교 의과대학 연구원 류마티스연구센터

이재선 · 조미라 · 이정은 · 민소연 · 윤중현 · 김완욱 · 민준기 · 박성환 · 김호연

Selective Expansion of TCR V β 3+CD4+ T Cells in Collagen-induced Arthritis in DBA/1 Mice

Jae Seon Lee, Mi La Cho, Jung Eun Lee, So Youn Min, Chong Hyeon Yoon, Wan Uk Kim, Jun Ki Min, Sung Hwan Park and Ho Youn Kim

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

ABSTRACT

Background: Collagen-induced arthritis (CIA) in mice is animal model of autoimmune disease known as rheumatic arthritis in human. We investigated CII-specific CD4+ T cell receptor usage in CIA mice. **Methods:** In CIA model, draining lymph node (dLN) CD4+ T cells and splenocytes at 3rd, 5th, 8th week, we investigated CII-specific T cell proliferation, production of IL-17, IFN- γ , TNF- α , IL-4 and IL-10. And we also performed anti-CII IgG Ab measurements in serum level, TCRV β usage and T cell clonality with RT-PCR-SSCP analysis. Also, we performed proliferative response against CII when CII-specific T cell subset is deleted. **Results:** CIA mice showed more increase in the serum level of anti-CII IgG than normal mice after induction of arthritis. And the level of anti-CII IgG2a in CIA mice was increased after 3rd week after primary immunization, while anti-CII IgG1 was decreased. Draining LN CD4+T cells have proliferated against CII stimulation at 3rd week after 1st immunization. CD4+T cells derived from dLN of CIA mice produced proinflammatory cytokine IFN- γ , IL-17 etc. Draining LN CD4 T cells of CIA presented higher proportion of CD4+V β 3+subsets compared to those of normal mice at 3rd week after 1st immunization, and they were increased in proportion by CII stimulation. Draining LN CD4+ T cells without TCRV β 3+/V β 8.1/8.2+/V β 10b+cells were not responsive against CII stimulation. But, CII-reactive response of TCRV β 3-/V β 8.1/8.2-/V β 10b- T cells was recovered when V β 3+ T cells were added in culture. **Conclusion:** Our results indicate that CD4+V β 3+ T cells are selectively expanded in dLN of CIA mice, and their recovery upon CII re-stimulation in vitro, as well as the production Th1-type cytokines, may play pivotal role in CIA pathogenesis. (*Immune Network* 2005;5(2):78-88)

Key Words: TCRV β 3, antigen-specific T cell, type II collagen, collagen-induced arthritis

서 론

류마티스 관절염이란 자가면역 질환으로, 병인에 있어

책임저자 : 김호연, 가톨릭의과대학 연구원 류마티스연구센터

☎ 137-701, 서울시 서초구 반포동 505번지

Tel: 02-590-2964, Fax: 02-599-4287

E-mail: Ho@cmc.cuk.ac.kr

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터연구(R11-2002-098-01001-0) 지원으로 수행되었음.

서 제 2형 콜라겐(type II collagen; CII)에 대한 면역반응이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(1). 동물모델에서 역시 콜라겐 유도 관절염(collagen-induced arthritis; CIA)를 유발하였을 때 DBA/1J와 같은 감수성 쥐에서 다발성 관절염을 유발시킬 수 있으며(2), 이때 그 병리학적 소견이나 임상양상이 류마티스 관절염과 유사함을 관찰할 수 있다. 대표적으로 T 세포 증식반응 시 Th1 사이토카인인 IFN- γ , TNF- α 등이 증가하며, Th2 사이토카인인

IL-10 등이 상대적으로 낮게 존재한다(3). 또한, B 세포에 의해 항 콜라젠 IgG2a 항체가 증가되어 면역반응을 약화시킨다(4). 특히 CII나 aggrecan, cartilage glycoprotein gp39 등을 인지하는 T 세포의 성장과 T 세포 수용체 구조 분석을 통하여 질병의 병인을 이해하고 그 기전을 연구하는데 중요한 단서를 제공해 줄 수 있다.

관절 연골의 주된 구성성분인 CII를 인지하는 T 세포의 활성이 류마티스 관절염의 발병과 밀접한 상관관계가 있다는 사실은 기존의 여러 연구를 통하여 이미 잘 알려져 있는데, 본 연구진의 이전 연구결과에서는 류마티스 관절염 환자에서 CII에 반응하는 T 세포가 활성화되는 현상을 연구하고, 이 연구의 연장선으로 CII 특이 T 세포를 만드는 이들의 cytokine 분비양상과 특성을 T 세포 수용체 분석을 통하여 관찰한 바 있다. 간략하게, 류마티스 관절염 환자 T 세포 항원수용기와 CII항원의 결합부위를 구조적으로 규명하고자 *in vitro* 상에서 CII 특이 T 세포주를 형성하여 RT-PCR-SSCP 방법을 이용하여 분석해보니 환자 8명에서 절반가량이 공통된 V β 14 CDR3 밴드를 가지고 있음을 관찰하였다. 이 결과는 류마티스 관절염에서 CII를 인식하는 공통된 T 세포 수용체의 특정 아형이 선택적으로 증폭되고 있음을 의미한다(5).

위와 같은 실험이 관절염 동물모델에서도 진행되어 왔는데, 관절부위 염증반응에 중추적인 역할을 하는 것이 CD4+T 세포이며 이는 CD4+T 세포를 결여시킨 쥐는 관절염이 잘 발생하지 않는다는 결과를 통해 알 수 있다(6). 또한 항원 특이적 CD4+T 세포 수용체의 구조적 특징 또한 잘 알려져 있으나(7), 실제로 이들 CD4+T 세포의 활성화가 초기 병인에 어떻게 작용하는지에 대해서는 밝혀진 바가 없다.

CD4+T 세포의 CII에 특이적인 면역반응은 항원제시 세포가 나타내는 MHC II 분자와 항원의 epitope을 동시에 인지하면서 시작된다. T 세포 수용체 중 β 사슬의 다양성은 많은 종류의 항원-MHC 복합체를 인식하고 이에 반응하는 T 세포 집단의 증식능력을 위해서 중요하다. 그리고 이에 CDR3 부위가 밀접하게 관련하므로 CIA 모델에서도 CII에 특이적인 T 세포 수용체의 CDR3 부위를 밝히는데 집중적인 연구가 진행되고 있는데, 이전에 CII를 특이적으로 인식하는 T 세포 수용체를 발현하는 세포 집단을 가지지 않은 마우스는 CIA 진행이 나타나지 않으며, CII에 반응하는 T 세포 수용체를 가지는 마우스는 관절염이 더 심하게 일어나는 현상이 확인된 바 있다(7-9). 구체적으로, 1993년 Osman 등은 CIA를 유도한 DBA/1LacJ 마우스에 항 TCR V β 8.1/8.2 항체를 반복투여하면서 CIA 증상의 억제 효과를 보았고(10), 1994년 Ortman 등은 T 세포 수용체 V β 5, 8, 9, 11, 12, 13 집단이 결핍되어 CIA유도가 가능해진 BUB/BnJ 마우스에서 CII

특이적 염증반응에 주된 역할을 하는 것은 V β 10a+T 세포라고 보고하였다(11). 그러나 CII 특이적 T 세포 수용체와 관련해 진행되어왔던 연구가 거의 일반 T 세포를 대상으로 실험된 것이기 때문에 CIA 유도와 진행에 중추적 역할을 하는 CD4+T 세포를 대상으로 하는 T 세포 수용체의 연구가 필요하다.

류마티스 관절염 환자의 말초혈액이나 관절 활액에서 선택적으로 증폭되어 있는 항원 특이 T 세포에 관한 연구는 지난 20여년간 꾸준히 이루어져 왔으나 항원 특이 T 세포 수용체에 관한 연구는 최근에 와서야 비로소 이론적 뒷받침이 정립되고 있다. 그러나 주로 Southern Blotting이나 RT-PCR에 의존하는 기존의 방법으로 T 세포 수용체 구조 분석을 할 경우 각 실험자마다 상반되는 결과가 얻어진 관계로 의미 있고 일관성 있는 결론을 추출해 내기에 많은 어려움이 있었다.

이에 본 연구에서는 CIA를 유도한 마우스에서 면역반응이 활발하게 일어나는 혈액림프절과 비장을 대상으로, CII에 특이적인 반응을 나타내는 CD4+T 세포의 수용체를 조사하고, 선택적으로 활성화 되어있는 T 세포들의 cytokine 분비 양상 및 그 수용체의 분자적 구조를 살펴보고자 하였다. 이런 연구결과는 항원 특이 T 세포의 기능을 이해하고 이를 선택적으로 차단시키는 방법을 통하여 류마티스 관절염 치료를 위한 면역제어요법 개발에 매우 유용한 정보를 줄 것으로 생각된다.

재료 및 방법

CIA유도와 관절염 평가. 수컷 DBA/1J 마우스(SLC, Inc., Shizoka, Japan)를 분양받아 8~12주령인 시기에 사육하였다. Bovine type II collagen (유한양행, 서울, 이하 CII)을 4 μ g/ml의 농도로 0.1 N acetic acid에 녹인 후 0.05 M Tris, 0.2 M NaCl 완충액(pH 7.4)에 투석하여 사용하였다. CIA 유도는 CII 100 μ g을 Complete Freund's Adjuvant (CFA; Arthrogen-CIA, Redmond, WA) 와 1 : 1 (w/v) 비율로 혼합하여 꼬리에 피하주사한 뒤 2주후에 CII 100 μ g을 Adjuvant incomplete Freund (IFA; DIFCO, Detroit, Michigan)와 1 : 1 (v/v) 비율로 혼합하여 뒷다리 족근골(metatarsal)에 피하주사하였다(Fig. 1A). 관절염의 평가는 Rosoliniec 등에 의한 평균 관절염지수(mean arthritic index)(12)에 기준하여, 꼬리에 주사한 시점으로부터 8주까지 일주일에 3번씩 실시하였고, 평가자료는 실험과 관계없는 3인이 작성하였다. 마우스마다 주사한 뒷다리를 제외한 나머지 세 개의 다리에서 다음과 같은 척도에 준한 점수를 합하여 평균치를 얻고, 또다시 세 명의 평가자의 점수를 합하여 평균점수를 얻었다.

- 0점: 부종이나 종창이 없다.
- 1점: 발 또는 발목관절에 국한된 경한 부종과 발적
- 2점: 발목관절에서 족근골(metatarsal)에 걸친 경한

부종과 발적

· 3점: 발목관절에서 족근골(metatarsal)에 걸친 중등도의 부종과 발적

· 4점: 발목에서 다리전체에 걸쳐 부종과 발적이 있고 관절경직이 나타난 경우

관절 조직 염색. 2차 면역유도주사를 하지 않은 뒷다리를 제거하여 피부조직을 벗겨낸 후 관절조직은 4% paraformaldehyde (Sigma, St. Louis, MO)가 포함된 PBS (phosphate-buffered saline; Gibco, Gaithersburg, MD) 용액에 담고 4°C에서 1일간 방치한다. 그 다음, 조직을 10% EDTA가 포함된 증류수에 담고 1개월 동안 탈회시킨 다음 파라핀으로 포매하였다. 절편의 두께는 7 μ m로 하였고 이를 탈파라핀, 재합수 과정에 이어 헤마토실린과에 오신으로 염색하였다.

IgG 항체의 아형 분석. CII+CFA를 주사한 시점으로부터 3주 후, 5주 후, 8주 후에 각각의 마우스의 혈청을 채취하여 mouse IgG1, IgG2a 농도를 ELISA 방법으로 측정하였다(Bethyl Lab Co., Montgomery, TX). 항 CII IgG 항체 측정 방법은 다음과 같다. CII를 4 μ g/ml 농도로 0.05 M Sodium carbonate coating buffer (pH 9.6)에 희석하여 96-well microtiter plate에 도포한 다음 4°C에서 18시간 방치하였다. 도포된 용액을 제거한 후 비특이적인 결합을 억제하기 위하여 1% bovine serum albumin (BSA; Amresco, Solon, Ohio)이 포함된 TBS (pH 8.0)를 200 μ l씩 넣고 30 분간 실온에서 반응시켰다. 항 CII IgG2a 측정을 위해서 검체를 1 : 1,000으로 희석하였으며, 항 CII IgG1 측정을 위해서는 1 : 20으로 희석하였으며, 이때 희석 용액은 1% BSA, 0.05% Tween 20 (Amresco)이 포함된 TBS (pH 8.0) 용액을 사용하였다. 다음으로, 희석해 둔 혈청 샘플을 well당 50 μ l씩 넣고 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝나면 0.05% Tween 20 (Amresco)이 포함된 TBS 용액(pH 8.0)으로 3번씩 세척한 뒤, detection 항체/HRP conjugate (Bethyl lab)를 각각 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 마찬가지로 3번 세척한 뒤, TMB+H₂O₂ system (KPL, Gaithersburg, MD)으로 발색하였고, 1 N H₂SO₄를 같은 양으로 넣어 반응을 중지하였다. 이는 450 nm에서 흡광도로 읽었으며, 항체 측정 결과는 흡광도 자체로 표시하였다.

T 세포 증식반응. CIA 유도 후 3주, 5주, 8주 째에 혈액 림프절과 비장을 적출하여 PBS (Gibco) 용액으로 2회 세척 후 가위로 잘게 자르고, 이를 cell strainer (BD Falcon, Bedford, MA)를 통과시켰다. 4°C 1,300 rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하고 세포층을 10% 우태아혈청이 포함된 RPMI1640 (Gibco) 배지에 재부유시켰다. 혈액 림프절 세포는 anti-mouse CD4 microbead (Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach, Germany)와 4°C에서 30분간 반응시킨 후 1% BSA, 2 mM EDTA (Amresco)가 포함된 PBS

용액(pH 7.4)으로 세척한 뒤, Column (Miltenyi biotec)을 통과시켜 CD4+T 세포를 얻었다. 다음으로 비장 세포들 중에서, 적혈구는 2.06% Tris (pH 7.65), 0.83% NH₄Cl이 1 : 9 (v/v)로 섞인 용액과 실온에서 20분간 방치하여 용혈시켜 제거하였다. 항원제시세포만을 얻기 위해서, T 세포는 mouse pan T cell isolation kit (Miltenyi biotec)과 4°C에서 30분간 반응시킨 뒤 앞서와 마찬가지로 컬럼을 통과시켜 제거하였다. 스스로 증식하지 못하게 하고 CD4+T 세포에 항원제시기능만 갖게 하기 위해 5000 rad 에서 방사선 조사하였다.

앞서 얻은 CD4+T 세포와 항원제시세포를 각각 1 \times 10⁵ cell/well로 함께 넣고 CII 40 μ g/ml로 자극하여 3 일간 co-culture하였다. 실험시 대조군으로 자극하지 않은 세포와 비교하였다. 그리고, 양성 증식반응 대조군으로는 phytohemagglutinin (Sigma, 이하 PHA)을 사용하였다. 배양종료 18시간 전에 ³H-thymidine (NEN, Boston, MA)을 well당 1.0 μ Ci씩 넣어 주었으며, 세포를 수집한 후 beta counter (Packard Instrument Co., Downers Grove, IL)로 동위원소 양을 측정하였다. T 세포 증식반응을 나타내는 자극지수(Stimulation Index, S.I.)는 CII로 자극한 세포의 동위원소량을 자극하지 않은 세포의 동위원소량으로 나눈 값이며, S.I. 값이 2 이상인 경우를 양성 증식반응으로 간주하였다.

ELISA를 통한 사이토카인 측정. CII자극 후 48시간째 상등액을 수집하여 이에 존재하는 IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 (R&D system, Minneapolis, MN)을 ELISA로 측정하였다. IL-17은 IL-17 DuoSet, ELISA Development system (R&D system)을 사용하였다. 측정방법은 제조사의 추천을 따랐다.

유세포분석을 통한 T 세포 수용체 아형 분석. 마우스에서 CIA를 유도한지 3주, 5주, 8주차에 혈액 림프절세포를 반응 T 세포, 비장세포를 항원제시세포로 각각 사용하여 CII 40 μ g/ml로 자극하고, 자극하지 않는 조건도 똑같이 3일간 배양하였다. 다음으로, Peridinin Chlorophyll Protein (PerCP)으로 표지된 anti-CD4항체(BD Pharmingen, San Diego, CA)와 fluorescein isothiocyanate (FITC)가 표지된 V β 항체(mouse TCR Screening Panel, BD Pharmingen)를 동시에 넣고 4°C에서 30분간 염색한 다음, FACS Calibur (BD, San Diego, CA)로 분석하였다(13). 이때 분석프로그램은 Flow jo (Version 4.5, Treestar, Ashland, OR)를 사용하였다. 림프구 그룹은 전체세포를 forward/ side scatter 특징에 따라 나눈 그룹 중에 선별하여 읽었다.

RT-PCR-SSCP를 통한 T 세포 수용체 조사. CIA 유도 5주 째에 적출한 비장에서 CD4+T 세포를 얻어 RNAzolB™ (Tel.Test, Friendswood, TX)로 세포 1 \times 10⁶ 당 1 ml로 녹인 뒤 mRNA를 추출하였고, 이를 cDNA로 합성하

기 위하여, 0.5μg random nonamer (Takara, Shiga, Japan) 와 70°C에서 5분 반응시킨 뒤 4°C에서 급냉시킨 다음 10 mM dNTP mix (Invitrogen, Carlsbad, California) 1μl, 역전

사효소 M-MuLV (MBI Fermentas, Hanover, MD) 1 unit, 5 X M-MuLV 희석용액(MBI Fermentas) 4μl, RNase Inhibitor (MBI Fermentas) 0.5μl을 가하고 전체를 nuclease free water (Promega, Madison, WI) 20μl로 맞춘 뒤, 25°C에서 10분, 42°C에서 60 분, 72°C에서 10분간 반응시켰다. 20μl의 반응액 내에, cDNA 2μl, 2.5 mM dNTP mix (Takara) 2μl, 10×Taq buffer (SuperBIO, 수원) 2μl, Super Taq polymerase (SuperBIO) 0.2μl, 10 pmol Cβ 공통 primer 2μl, 20가지 알려진 Vβ primer 2μl를 사용하여 각 T 세포 수용체의 CDR3 부위를 증폭하였다. 사용된 primer 서열은 Table I에 따로 표시하였다. Vβ-Cβ 증폭 조건은 94°C에서 1분, 56°C에서 1분 30초, 72°C에서 1분 30 초간 반응을 36 cycle 반복하는 것으로 하였다. 증폭산물을 94°C에서 denaturation시킨 후 4%의 polyacrylamide에 10% glycerol이 들어있는 젤에서 전기영동하였다. 이후 젤상의 밴드들을 nylon membrane (Amersham bioscience, Piscataway, NJ)에 흡착시키고 해당 DNA 절편을 바이오 틴이 붙은 internal TCR Cβ probe (5'-GAGGATCTGAG AAATGTGACTCCAC-3')로 라벨하고 Phototope star-detection kit (New England Biotechnology, Beverly, MA)로 발색시켜 X선 필름(Agfa, Mortsel, Belgium)에 감광시켜 이동 패턴을 분석하였다(5,14).

항원 특이 T 세포 수용체를 가지는 T 세포 분리와 증식반응 조사. CIA유도 후 3 주차 마우스의 혈액림프절에서 분리한 CD4+T 세포에서 FITC로 표지된 anti mouse TCR Vβ3, 8.1/8.2, 10b 항체로 염색하여 양성집단

Table I. TCR Vβ and Cβ primer set

Name	Sequence
Vβ 1	5'-TTC GAA ATG AGA CCG TGC CG;
Vβ 2	5'-AGA GGT CAA ATC TCT TCC CG;
Vβ 3	5'-CIT CAG CAA ATA GAC ATG AG;
Vβ 4	5'-TGG ACA ATC AGA CIG CCT CA;
Vβ 5.1	5'-GAG ATA AAG GAA ACC TGC CG;
Vβ 5.2	5'-GAG CAA AGG ATT CCT ACC C;
Vβ 6	5'-CGA CAG GAT TCA GGG AAA GG;
Vβ 7	5'-ATA CAG GGT CTC ACG GAA GA;
Vβ 8.1	5'-CAT ATG TCG CTG ACA GCA CG;
Vβ 8.2	5'-CAT ATG GTG CTG GCA GCA CT;
Vβ 8.3	5'-CAT ATG GTG CTG GCA ACC TT;
Vβ 9	5'-ACA GGG AAG CTG ACA CTT TT;
Vβ 10	5'-AAT CAA GTC TGT AGA GCC GG;
Vβ 11	5'-GGA GTC CCT GAC TTA CTT TC;
Vβ 12	5'-AAG ATG GTG GGG CTT TCA AG;
Vβ 13	5'-TCT ATA ACA GTT GCC CTC GG;
Vβ 14	5'-CCT CCA GCA ACT CTT CTA CT;
Vβ 15	5'-CGC CTG AAA AGG CAT TTG AA;
Vβ 16	5'-CAG ACG TGG AGT TTC TGG T;
Vβ 17	5'-ACA GAC TTG GTC AAG AAG AG;
Cβ	5'-GGC TCA AAC AAG GAG ACC TTG.

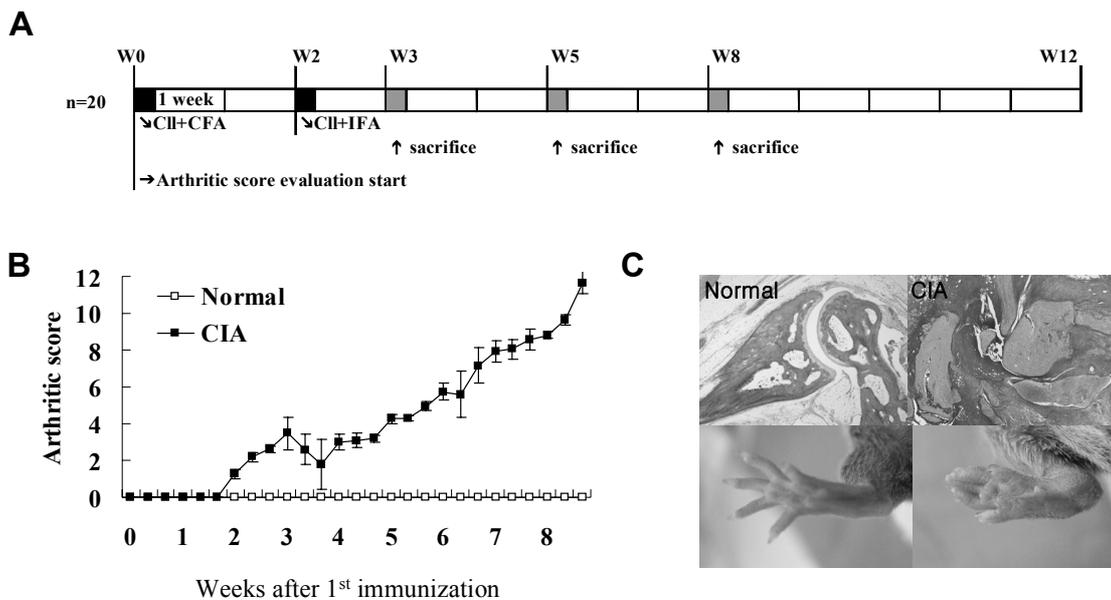


Figure 1. Development of CIA in DBA/1J mouse. (A) DBA/1J mice was immunized with type II collagen in adjuvant. (B) Results are expressed as the sum of arthritic severity of three paws except boosted paw. (C) Hematoxylin and eosin stain CIA, Collagen-induced arthritis

과 음성집단으로 나눈다음, FACS Sorter (BD)로 각각의 집단을 수집하였고, CII 40µg/ml로 자극하여 앞서 기술한대로 증식반응을 실험하였다.

통계적 유의성의 검증. 실험 결과는 평균 표준 오차로 나타냈으며 통계적 유의성은 SPSS 통계 프로그램(version 11.5, Chicago, IL)으로 student's t-test를 실시하였고 p 값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의하다고 분석하였다.

결 과

CII를 이용한 관절염 유도. Fig. 1A는 관절염 유도 방법과 장기적출 시기를 나타낸 모식도이다. DBA/1J 마우스에서 2차 면역반응유도 직후부터 관절염의 발생이 시작되었고 1차 면역반응유도 후 8~9주째의 시기에 관절염 지수가 최대인 12점에 달했다(Fig. 1B). 정상군과 CIA군의 관절을 1차 면역반응유도 이후 3주, 5주, 8주 후의 시기에 수집, 파라핀 조직절편으로 제작하여 헤마토실린-에오신 염색을 해본 결과, 8주차에는 정상군에 비해 CIA군에서의 조직과괴정도가 심했고, 염증세포의 침윤정도가 높았으며(Fig. 1C), CIA 유도 후 3주에서 8주로 갈수록 염증도나 조직과괴정도는 의미 있게 증가하였다 (data not shown).

혈청 내 항 CII 특이적 IgG항체 아형. 마우스의 경우 IgG1항체는 염증억제반응을 조장하는 반면에 IgG2a항체는 염증매개반응을 유도하는 것으로 알려져 있다(16). 본 연구에서는 CIA 유도 후 3주, 5주, 8주 후의 시기에 각 마우스에서 혈청을 채취하여 혈청 내에 존재하는 IgG항체 아형 분포를 조사하고, 그 중에 CII에 특이적인 IgG항체 아형의 분포도 조사하였다. CIA 유도 군에서 1차 면역유도주사 이후 3주차에 수집된 혈청에서 총 IgG1과 IgG2a는 모두 증가되어 있었다(IgG1, 111.7±23.7 ng/ml vs. 유도 전: 4.78±1.2 pg/ml, p<0.05; IgG2a, 37.1±6.9 ng/ml vs. 유도 전: 0.36±0.1 pg/ml). 특히 IgG1 항체 분포는 CIA 유도 후 5주에서 8주로 갈수록 시간의존적으로 감소하였다(5주차, 93.12±30.3 pg/ml vs. 8주차: 27.2±12.8 pg/ml, p<0.05). IgG2a 항체 분포는 IgG1 항체 분포 양상과는 반대로 오히려 증가하였다(CIA 5주차: 40.34±21.6 pg/ml vs. 8주차: 198.74±10.7 pg/ml, p<0.05)(Fig. 2A). 다음으로는, CII 특이적인 항 CII IgG2a 항체를 측정하였다. 시간이 지날수록 CII 특이적인 IgG2a 항체는 계속해서 증가하였다(3주차: 0.387±0.130 units vs. 5주차: 0.632±0.392 units vs. 8주차: 1.175±0.075 units, p<0.05). 그러나 CII 특이적인 IgG 1의 경우, 정상군과 CIA 질환

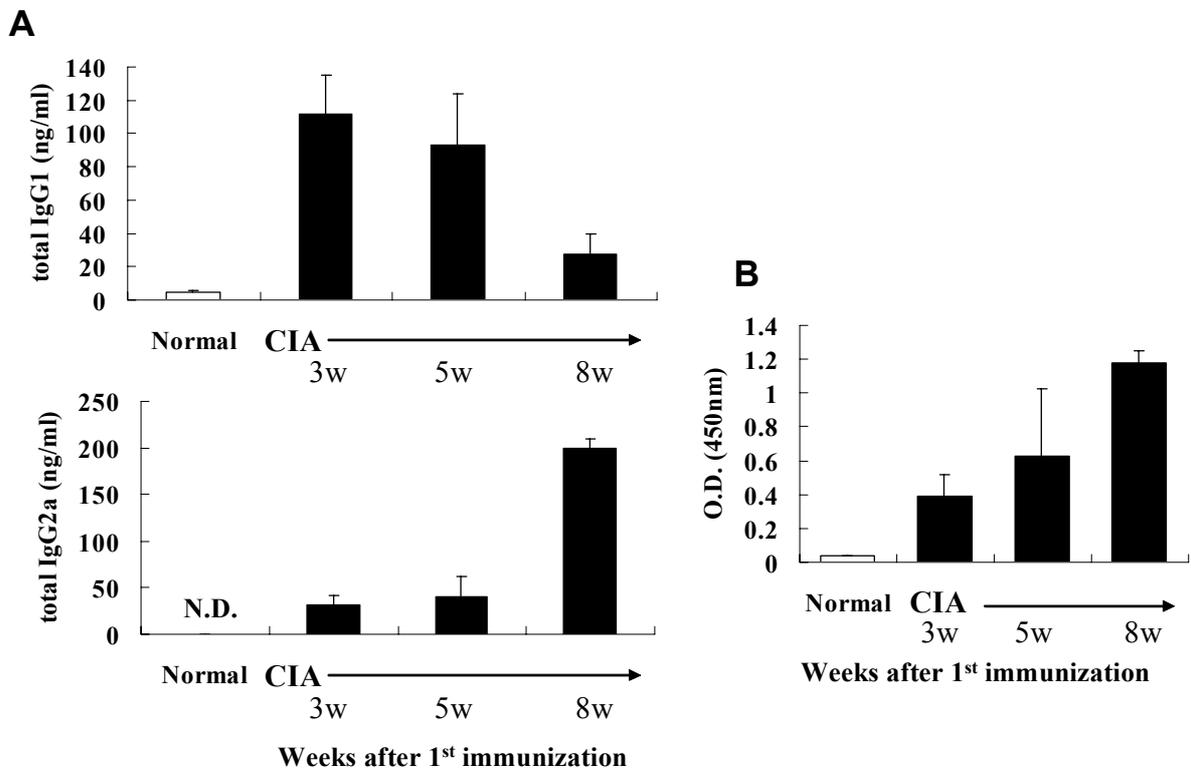


Figure 2. Humoral responses followed induction of CIA. Each mouse serum were collected at 3rd, 5th, 8th week after 1st immunization and diluted 1 : 50,000 for total IgG1 and IgG2a (A), 1 : 1,000 for anti-CII IgG2a (B). For measurements of anti-CII IgG1 and IgG2a Ab, immunoplate was coated with CII 4µg/ml. Anti-CII IgG1 Ab was not detectable in all group (data not shown). DATA represent the mean value of normal mice (n=3) serum or CIA mice (n=9) serum. N.D. means “Not Detectable”.

모델 군 모두에서 거의 검출되지 않았다(data not shown). **CIA 모델에서 CII에 특이적인 증식반응 관찰.** CIA 유도와 진행에 있어서 CD4+T 세포의 증식반응이 CIA 진행에 따라 어떻게 달라지는지 조사하였다. 1차 면역유도 주사 이후 3주, 5주, 8주째의 시기에 각 마우스의 혈액 림프절(drainig lymph node)에서 CD4+T 세포를 분리하였고, 비장(spleen)에서는 CD3 음성 세포를 얻어 항원제시세포로 사용하였다. CIA 유도 마우스는 정상군에 비해 CII에 대한 증식반응이 전반적으로 증가되어 있었고(정

상군: 1.6±0.01), 특히 초기 단계에서 대조군에 비해 S.I. 값이 8 배나 높은 것을 확인할 수 있었다(3주차, 8.4±3.0 vs. 정상군: 1.6±0.01, p<0.05; 5주차, 3.1±0.4; 8주차, 4.2±0.4), (Fig. 3). 이 실험에서 양성증식반응 대조군으로 사용된 PHA에 의한 S.I.값은 두 군간의 차이는 거의 나타나지 않았다(data not shown).

CII 반응성을 가지는 세포군에서 염증성 사이토카인 생성 조사. 다음으로, CIA 유도 후 초기단계인 3 주차 시기에 CII에 특이적인 CD4+T 세포가 어떠한 사이토카인을 생성하는지 조사하였다. 역시 CD4+T 세포는 혈액림프절(dLN)에서, 항원제시세포는 비장(spleen)에서 분리하여 48시간 동안 CII40µg/ml로 자극한 뒤, 상등액을 얻어 각 사이토카인에 관한 ELISA를 시행하였다. 먼저 활성화된 T 세포에서 분비되는 것으로 알려진 염증성 사이토카인인 IL-17의 경우, CII 자극에 의해서 36배 가량 증가하였고(521.7±33.0 pg/ml vs. 자극하지 않은 군: 19.8±0.9 pg/ml, p<0.05), 염증성 사이토카인인 IFN-γ의 경우 CII 자극에 의해서 4배가량 증가하였고(2239.0±1104.8 pg/ml vs. 자극하지 않은 군: 667.7±154.5 pg/ml, p<0.05), TNF-α도 자극하지 않은 것에 비해 2배 이상 증가하는 것을 확인하였다(74.0±77.4 pg/ml vs. 자극하지 않은 군: 9.2±7.6 pg/ml, p<0.05). 그리고 염증 억제성 사이토카인인 IL-4의 경우 3 배가량 증가하였으며(81.8±19.6 pg/ml vs. 자극하지 않은 군: 36.9±15.9 pg/ml, p<0.05), IL-10의 생성은 약간 증가되는 것으로 나타났으나 통계적 유의성은 없었다(Fig. 4).

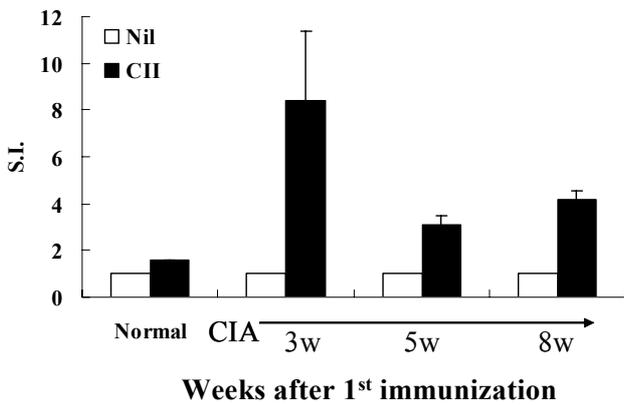


Figure 3. CII-reactive T cell proliferative response followed induction of CIA. T cell proliferative responses of dLN CD4+ T cells from CIA or normals. Cells were stimulated CII 40µg/ml for 3 days in 96 well U bottom plate. S.I. (Stimulation index) = cpm value of stimulated cell/cpm value of unstimulated cell.

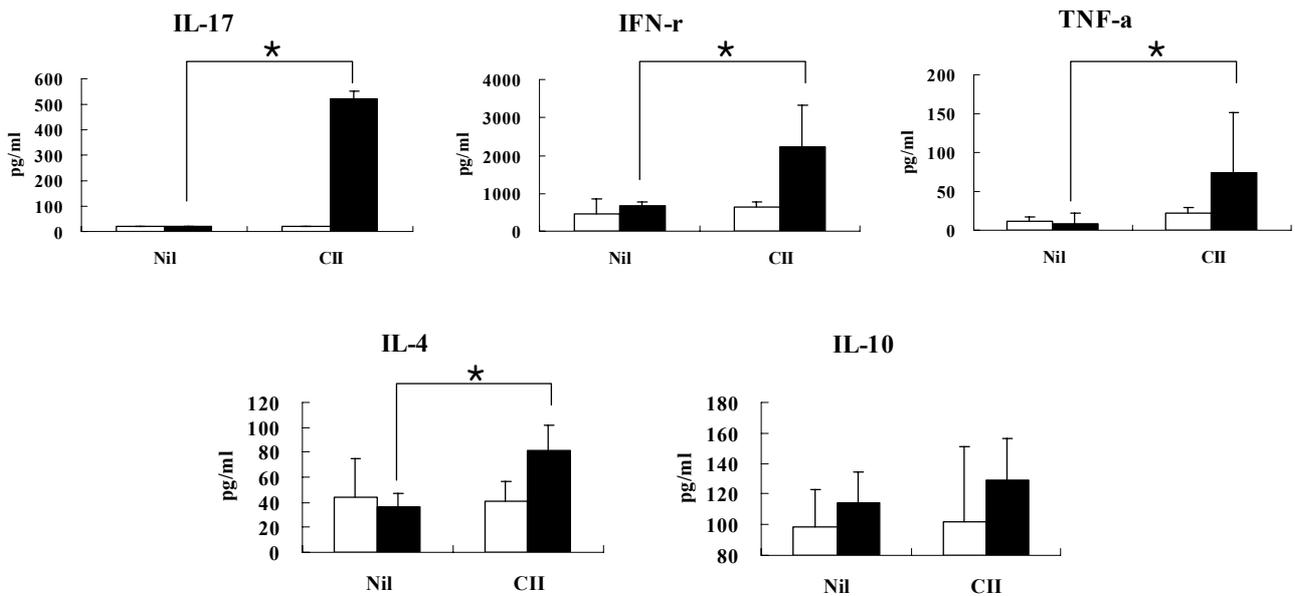


Figure 4. CII-stimulated CD4+ T cells produced proinflammatory cytokine IL-17, IFN-γ. Draining lymph node was removed at 3rd week after 1st immunization. And CD4+ T cells of dLN were isolated using CD4 microbead. CD3-cells from each mice spleen were γ-irradiated at 5,000 rad and used it as antigen-presenting cells. Cells were stimulated CII 40µg/ml for 2 days. These cytokine were measured by ELISA. □: Normal, ■: CIA; *p<0.05.

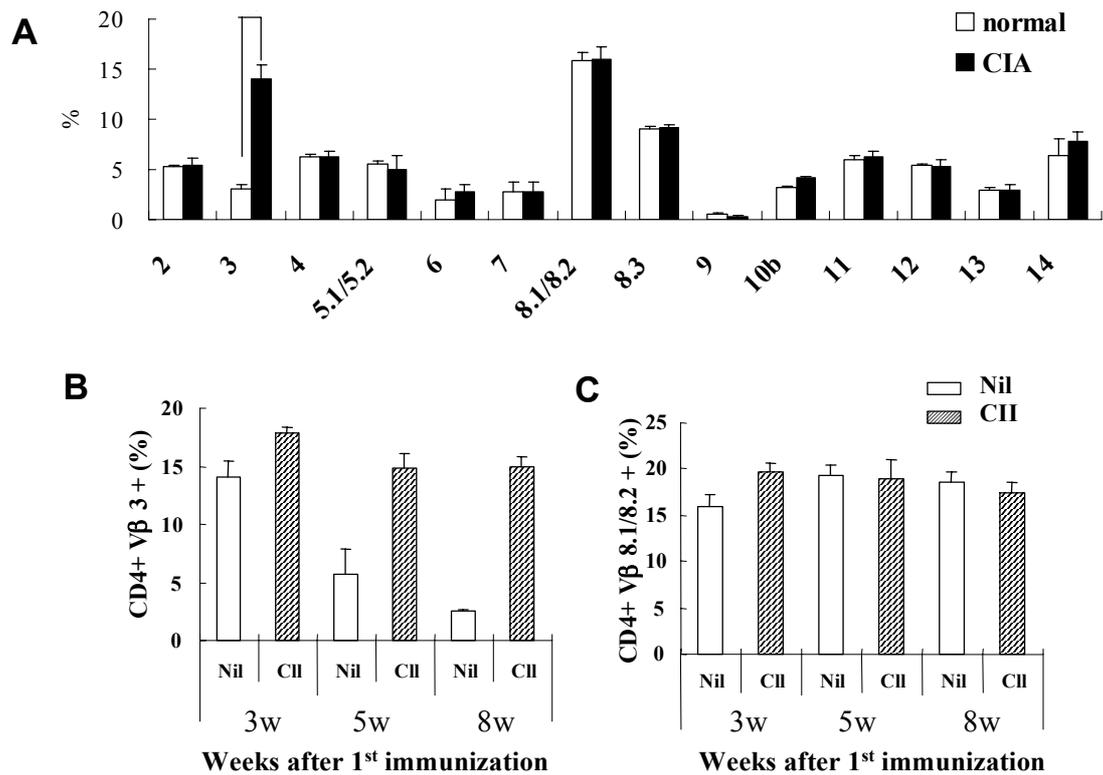


Figure 5. CD4+ T cell receptor screening in CIA model. (A) Draining lymph node was removed from normal mice or CIA mice at 3rd week after 1st immunization. After cells were cultured without stimuli for 3 days in vitro, we investigated T cell receptor repertoires using flowcytometry analysis. Cultured cells were double-stained with PerCP-conjugated anti-mouse CD4 Abs and FITC-conjugated anti-mouse TCR Vβ Abs. (B) Comparisons of Vβ3+CD4+ T cell portion between nonstimuli and CII 40μg/ml stimulation in CIA (C) Comparisons of Vβ8.1/8.2+CD4+ T cell portion between nonstimuli and CII 40μg/ml stimulation. *p<0.05.

CIA 모델에서 유세포분석기를 이용한 CII에 특이적인 CD4+T 세포 수용체 아형 조사. 이전의 연구결과에서, 류마티스 관절염 환자에서 선택적으로 증식되어 있는 TCR Vβ14+T 세포에 관하여 언급한 바 있다. 이와 같은 현상을 동물모델에서도 확인하기 위하여, 먼저 CIA유도후 3주째 적출한 혈액림프절에서 얻은 CD4+T 세포의 TCR (T cell receptor) 발현을 자극하지 않은 상태에서 조사하였다. 그 결과, 정상 마우스에서보다 의미 있게 TCRVβ3+T 세포가 관찰되었다(Fig. 5A). 정상 마우스의 Vβ3+T 세포는 3.1%였지만, CIA군에서 14.0% 증가되어 있었다. 이전에 보고되었던 CII에 특이적인 T 세포 수용체인(17) Vβ6+T 세포가 정상군에서나 CIA군에서 모두 2% 내외로 차이가 없었으며, Vβ8.1/8.2+T 세포 역시 정상군에서 15.8%, CIA군에서 15.9%로 나타나 거의 차이가 없음을 알 수 있었다. 다음으로는 CIA진행이 3 주에서 8 주로 진행될수록 위에서 언급한 수용체를 가진 세포의 비율이 어떻게 달라지는지 조사하였다. Vβ3+T 세포는 14.9%, 5.6%, 2.6%로 감소하지만, 5주와 8주차 실험에서 이들은 CII 자극에 의해 전체의 약 20%로 다시 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 5B). Vβ6+T 세

포의 경우 3% 내외로 자극 전에 비해 약간 증가하였으나 통계적인 유의성은 없었다. Vβ8.1/8.2+T 세포의 경우 전체 T 세포 수용체의 20%를 차지하고 있으나, CII 자극여부에 의한 증감에 있어서는 의미를 찾을 수 없었다(Fig. 5C). Vβ10b+T 세포의 경우, 자극하지 않은 상태에서 3주에서 8주로 갈수록 4.2%, 2.8%, 3.3%로 낮은 레벨로 존재하는 경향을 보이지만, CII 자극에 의해 각각 6.7%, 3.8%, 4.4%로 소폭 증가하는 것으로 나타났다. 여기에서 시간에 따른 의미를 찾기 어려우나 3주차의 시기에는 CII 자극에 의해 약간 증가하는 것으로 확인되었다 (data not shown).

CIA 모델에서 RT-PCR-SSCP를 이용한 CII 특이적인 CD4+ T 세포수용체 Vβ 유전자 발현 패턴. CII 항원 자극에 대하여 높은 증식반응을 보인 T 세포의 수용체를 분석 조사하기 위하여 배양된 세포들로부터 추출한 mRNA를 역전사하여 cDNA를 만들어내고 이로부터 2개의 Vβ primer를 이용하여 CDR3 부위를 포함한 항원결합장소를 PCR로 증폭시키고 SSCP 젤 상에 전기영동하여 각각의 Vβ 부위가 단일 가닥의 DNA 형태로 특정위

치에 배열되도록 하였다. 이전의 결과에서도 3주차 혈액 림프절에서 세포성 면역 반응이 5주차가 되면 비장에서 나타나는 사실을 보고한 바 있었다(18). 따라서, 5주차 비장에서 얻은 CD4+T 세포들은 CII로 자극하지 않거나 자극한 후 TCR Vβ1~20까지 RT-PCR-SSCP를 수

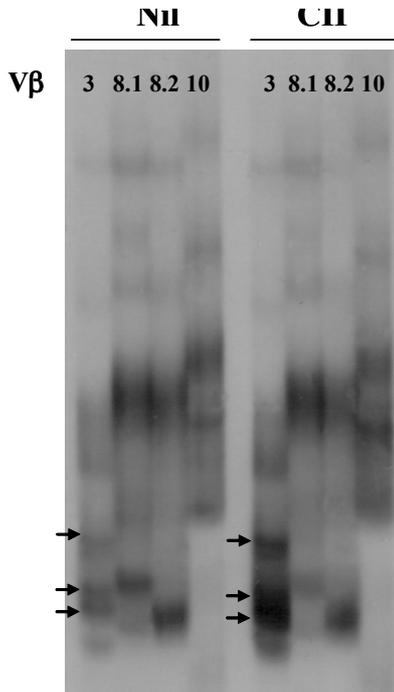


Figure 6. Pattern of TCR Vβ chain usage in CIA spleen CD4+ T cells during in vitro culture with CII. Spleen was removed at 5th week after 1st immunization and isolated with CD4 microbead. CD4+ T cells were stimulated with CII 40μg/ml for 3 days. RT-PCR products spanning the CDR3 region of 4 Vβ (Vβ3, 8.1, 8.2, 10b) genes were analysed using SSCP method. Arrows indicate that TCRVβ3 derived from CII stimulated CD4+ T cells express stronger pattern.

행한 결과(data not shown), 유세포분석상에서 의미가 있었던 TCRVβ3, Vβ8.1, Vβ8.2, Vβ10b 중 Vβ3 - Cβ 밴드가 CII 자극에 의해서 밴드패턴들이 짙고 뚜렷해 보임을 확인 할 수 있었다(Fig. 6).

CII 특이 CD4+T 세포군에서 나타나는 Vβ3+CD4 T 세포의 항원 특이 증식반응 조사. 앞서 살펴본 바와 같이 CII에 특이적인 수용체들에 대하여 TCRVβ3와 Vβ 8.1/8.2, Vβ10b을 언급하였다. 이번 실험에서는 이러한 세포들이 결여된 T 세포군에서 CII에 대한 증식반응이 어떻게 일어나는지 조사하였다. CIA유도 후 3주차에 마찬가지로 혈액림프절과 비장을 적출하여 각각 CD4+T 세포와 항원제시세포를 얻었다. CD4+T 세포의 경우 FITC conjugated anti mouse TCR Vβ3, 8.1/8.2, 10b 항체를 붙여 FACS sorter를 이용, 양성집단과 음성집단으로 분류하였다. 이어서 각 그룹을 5×10⁴개의 세포로 96 well에 넣고, 항원제시세포를 1×10⁵개 넣어 공조배양하면서 CII 자극여부에 따른 증식반응을 살펴본 결과, 양성집단에서는 CII에 대한 S.I.값이 2.2±0.7로 나타났지만(Fig. 7A), 음성집단에서는 CII에 대한 증식반응이 없는 것을 확인하였다(S.I.: 0.9±0.6). 그렇지만 CII와 동시에 TCRVβ3+T cell을 음성집단에 첨가하면 증식반응이 양성집단과 비슷하게 CII에 대한 증식반응이 일어나는 것을 하는 것을 확인할 수 있었다(2.1±0.7)(Fig. 7B). 그러나 이 같은 효과는 TCRVβ8.1/8.2+ 이거나 Vβ10b+ T 세포를 추가하였을 때는 나타나지 않았다(data not shown).

고 찰

CIA는 류마티스 관절염의 동물모델로 말초계 관절활막에 심각한 염증을 초래하며 병인에 있어서 항원반응 T 세포가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 이번 연구에서도, CIA를 유도하면서 1 차 면역반응을 유도한 시점

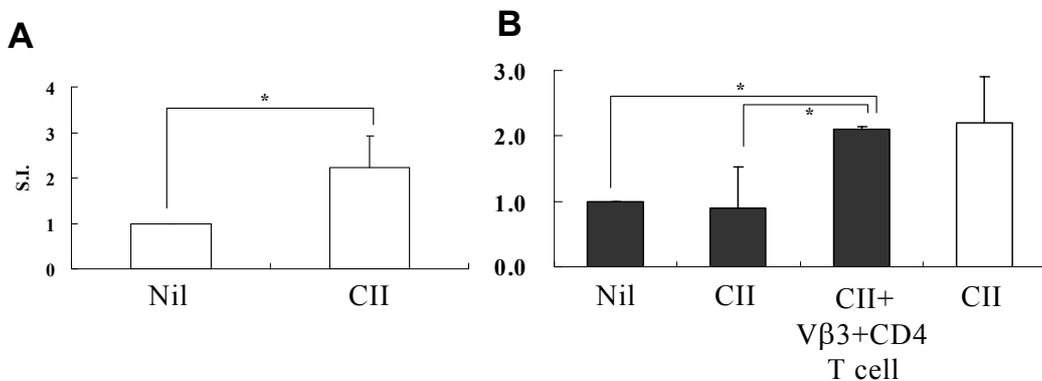


Figure 7. Vβ3+ T cells are essential for CII-specific proliferation in CIA. Among total CD4+ T cells, Vβ3+ or Vβ 8.1/8.2+ or Vβ10+ T cell was removed using FACS sorter. (A) Vβ3+ / Vβ8.1/8.2+ / Vβ10+ T cells proliferated against CII stimulation. (B) Vβ3- / Vβ8.1/8.2- / Vβ10- had inhibited proliferation when stimulated with CII. But, they were increased when Vβ3+ T cells were added. □: Vβ3+ / Vβ8.1/8.2+ / Vβ10+ group, ■: Vβ3- / Vβ8.1/8.2- / Vβ10- group; *p < 0.05.

을 시작으로 3주 후에 혈액림프절에서 CII항원에 특이적으로 반응하는 T세포의 증식반응이 유도되며, B 세포 활성화를 통한 면역글로블린 또한 증가되는 것을 확인하였다. 다음으로 5주 이후에 발생하는 면역세포들의 국소 부위 침윤으로 인한 관절염의 진행이 일어나고 이러한 관절염의 심화도는 8~9 주차까지도 지속되었다. 이러한 관절염 질환모델은 T 세포와 항원전달수지상세포 등의 활성이 특징적으로 나타나며 이런 활성은 특정항원 매개반응으로 더욱 뚜렷이 관찰할 수 있다. 관절염의 증상 중 발의 동통이나 붓기가 나타내는 임상적 증상은 12 주까지도 계속적으로 지속되는 것을 관찰 할 수 있으나, 세포성면역반응으로, 항원특이 T 세포 증식반응이나 항 CII 특이적인 IgG2a 항체 생성의 경우 12 주차에 이르면 다소 감소되는 경향을 관찰할 수 있었다(data not shown).

또 다른 관절염 실험모델로 면역촉진제(adjuvant)로만 관절염을 일으키는 adjuvant-induced arthritis (AIA) 질환 모델이 알려져 있다(19). 이 질환모델에서도 CII항원에 대한 T세포증식반응이 나타나는 것으로 알려져 있으나 우리가 확인할 결과 그러한 세포증식 면역반응은 정상 대조군에 비하여 다소 증가되지만 CIA질환모델과는 현격하게 차이가 나타나는 것을 관찰 할 수 있었다. 혈청내 total IgG 항체의 경우 3주에서 8주로 갈수록 IgG1 항체는 감소하고 IgG2a항체는 일시적으로 증가해 CIA 질환 모델과 비슷한 변화도를 관찰하였으나, 이들 군에서 CII에 의한 T 세포 증식반응은 CIA질환모델과 비교하여 매우 낮게 반응하는 것으로 확인되었고 total IgG 중에서 CII에 대한 특이 IgG의 항체의 경우 거의 검출되지 않는 것을 확인하였다. 따라서 류마티스질환 실험모델로 CIA와 AIA 질환모델은 항원 CII에 대한 면역반응 차이가 크게 나타나는 것을 확인할 수 있다.

CIA 질환모델에서 T 세포 증식반응의 특징을 살펴보면, CIA 3주차 군에서 *in vitro* 자극이 없는 상태에서의 T세포 증식반응은 정상대조군에 비해 오히려 2배가량 떨어지는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 관절염 질환이 진행되는 초기단계에서 질환의 활성유도를 억제하려는 자가면역방어로서 염증억제반응이 나타나는 것으로 생각될 수 있다. 이러한 현상은 관절 병변 부위에 면역세포가 침윤되는 시기 즉, 5주차에서는 3주차 T세포 증식반응에 비하여 9배가량 증가는 현상으로 이어지는데, 이는 CIA 질환모델에서 이미 염증의 위중도가 심한 5주차에 도달하게 되면 방어기작으로 작동하던 염증 억제반응이 약화되면서 병인 CD4+ T 세포의 자가증식반응이 크게 증가되는 것을 의미한다. 따라서 5주차에서 T 세포 자가증식반응은 CII 항원에 대한 특이적 증식반응이 관찰되기는 하지만 자극이 없는 상태에서도 T 세포의 자가증식반응이 활발하게 일어나는 관계로, 보다 의미 있는 항원 특이적 T 세포 증식과 활성반응을 관찰하기 위해서

는 질환유발 후 3주차에서 항원에 대한 반응성을 조사하고 T세포 증식반응을 조사하는 것이 매우 중요할 것으로 생각된다. 또한 질환유도 후 8주차가 지나면 CD4+ T 세포의 자연자가증식은 5주차에서의 증식유도반응보다는 25%가량 줄어들었으며 CII항원에 대한 증식반응은 5주차의 결과에 비해 다소 증가되는 것을 확인할 수 있었고, 이는 질환의 진행으로 인하여 기억 세포의 생성이 증가되는 것으로 해석할 수 있을 것이다.

CIA질환모델에서 CII 항원에 대한 반응성으로 3 주차 림프절 CD4+T 세포의 사이토카인 생성능을 비교하였다. CII의 자극으로 인해 IL-17, IFN- γ , TNF- α 가 증가되는 현상을 확인하였다. 특히 IL-17의 경우, 활성화된 CD4+CD45RO+ 기억 T 세포에서 발현되어 지질세포(stromal cell)를 자극함으로써 T 세포로 인해 유도되는 염증반응에서 중추적인 역할을 수행한다. 류마티스 관절염 환자의 활막에서도 많이 증가되어 있는데, 특히 관절부위 RANKL (receptor activator of NF- κ B ligand)의 발현을 유도하여 뼈를 파괴하는데 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 이러한 IL-17을 중화(neutralization)시켜, CIA 임상증상을 호전시킨 연구결과가 있다(20). IL-4 역시 3배 가량 증가하는 것을 확인하였다. 이는 CIA 진행 초기에 B 세포의 활성을 도와 IgG항체 분비가 증가한 현상과 관련지을 수 있다. 이에 반해 IL-10의 분비는 CII 자극에 의해 약간 증가하지만 전체적인 Th1 반응과 Th2반응의 불균형을 회복시키지는 못하였다. 그러므로 *in vivo* 상의 세포성 면역반응이 일어나는 CIA 진행의 초기에 염증억제작용의 실패한 것은 자가항원인 CII에 대한 염증반응의 악화를 초래하고, 8~9주차의 시기까지 관절염의 악화가 진행되는 것으로 보인다.

CIA질환모델에서 CII 항원에 반응하는 T 세포군이 가지는 항원특이 T 세포수용체를 조사하는 것은 항원에 대한 특이 반응성을 가지는 T 세포가 CIA질환을 유도/유지하는 결정적 역할자로 알려져 있는 이러한 상황에서 무엇보다도 선행되어야 할 연구의 목표이다. 따라서 그동안 많은 관절염 질환 연구 그룹에서 연구결과를 보고하였으나 아직까지 보다 정확한 연구결과 보고는 미비한 수준이다. CII에 대한 특이 증식반응을 가지는 T 세포군이 가지는 T 세포 수용체를 조사해본 결과, V β 3를 가지는 T 세포군이 가장 많은 것으로 확인되었다. V β 3와 함께 질환군에서 정상대조군보다 다소 증가되는 것으로 확인된 T 세포 수용체군으로 V β 8.1/8.2+, V β 10b+이 관찰되었다. 이 두 가지 세포군은 이전의 보고에서 CII에 특이적이라고 보고된 바 있다(13,15). 이러한 T 세포 수용체를 가지는 T 세포가 질환군에서 항원에 대한 반응성을 특이적으로 유도하는 세포군인지 조사하기 위하여 3주차의 혈액림프절 CD4+ T 세포를 대상으로 기능연구 실험을 진행하였다. V β 3+ T 세포와 V β 8.1/

8.2+ T 세포, V β 10b+ T 세포를 제거한 T 세포의 경우 질환군에서 확보한 T 세포임에도 항원에 대한 증식반응이 일어나지 않는 것을 확인할 수 있었다. 이때 다시 V β 3+ T 세포를 넣어주면 CII항원에 대한 증식반응이 다시 활발하게 나타나는 것을 관찰할 수 있어 항원에 대한 반응성을 가지는 T 세포군에서 특이 수용체를 가지는 세포군의 조절은 질환의 병인반응을 조절하는데 중요한 방법으로 활용될 수 있을 것으로 생각된다. V β 8.1/8.2+ T 세포의 경우 CII 자극에 의해 의미 있는 증가를 나타내지는 않았으나 이들이 전체 림프절 CD4+ T세포의 20%나 차지하고 있기 때문에 T 세포 증식반응을 일으키는데 있어 중요한 자리를 차지하는 것으로 생각된다. 그런데 V β 3-/V β 8.1/8.2-/V β 10- T 세포군에서는 CII 자극과 함께 V β 3+/V β 8.1/8.2+/V β 10+ T 세포를 추가해준 경우 CII에 대한 증식반응은 회복되지 않았으나(data not shown), 언급했듯이 CII 자극과 함께 V β 3+ T 세포를 추가해 준 경우에는 T 세포 증식반응이 다시 증가되는 것을 관찰할 수 있어 V β 3+ T 세포가 CII에 대한 세포 증식반응과 관련 염증반응을 유발하는 주요 T 세포 수용체군임을 확인할 수 있었다.

이전에 본 연구실에서 CII로 경구관용을 유도한 DBA/1J 마우스에서 세포성 면역반응이 CIA 진행 시기에 따라 파이어소절에서 림프절로, 이어서 비장으로 점차 이동해 가면서 나타난다는 사실을 보고한 적이 있었는데 (18), 이러한 이전 연구결과를 바탕으로 본 연구에서는 3주차에 혈액림프절에서의 V β 3+ T 세포 5주차의 비장에서 CII에 특이적인 세포가 역시 V β 3+ T 세포로 나타날지 의문지었다. 따라서 CIA유도 후 5주차의 비장에서 CD4+ T 세포를 분리한 뒤, CII 자극여부에 따라 V β 3 발현이 증가하는지 알아보았는데, 흥미롭게도 RT-PCR-SSCP상에서 V β 3~C β 밴드가 CII 자극에 의해 증가하는 것을 확인하였다. 그러나 V β 8.1/8.2나 V β 10의 발현은 자극여부와는 상관없이 없었다.

또한, 이에 대한 연구의 연장으로, 현재 TCRV β 3+CD4+ T 세포가 CII의 자극에 대해 어떠한 cytokine을 분비하는지 조사중에 있다. 그리고, 이러한 V β 3를 가지는 T 세포군이 CII항원에 대한 세포증식반응과 활성을 유도하며 질환유발을 위해 결정적인 역할을 수행하는지 질환모델군 생체내로 세포를 주입하여 변화를 관찰해보고자 한다. 이러한 연구의 진행이 계속 이루어진다면 특정세포군의 제어를 통하여 질환의 치료적 효과를 거둘 수 있을 것으로 생각되며 새로운 세포조절이나 치료법으로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 내용을 요약해 볼 때, DBA/1J 마우스는 CIA 유도 시 3주에서 8주차에 걸쳐 관절염이 악화되고 이에 CII에 특이적인 CD4+ T 세포의 이상증식과 B 세포의 활성으로 인한 항 CII IgG2a항체 증가로 인해 전신적인

염증반응을 일으키며, 계속해서 증식하는 CD4+ T 세포가 분비하는 여러 가지 염증성 사이토카인으로 인해 면역반응이 악순환한다. 반응의 초기에 주로 관여하는 것은 CD4+TCRV β 3+ T 세포이며, 이러한 세포군이 CII항원에 대한 특이적 면역반응을 이끄는 T세포군임을 간접적으로 확인한 연구의 결과이다. 이러한 연구결과를 기반으로 특정 항원반응 세포군의 수용체를 제어하는 억제성 펩타이드를 제작한다면 관절염증상의 완화를 이끌 수 있는 치료적 효과를 볼 수 있을 것으로 전망된다.

참 고 문 헌

1. 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. *Arthritis Rheum* 26;832-840, 1983
2. Trentham DE, Townes AS, Kang AH: Autoimmunity to type II collagen: An experimental model of arthritis. *J Exp Med* 146;857-868, 1997
3. Myers LK, Rosloniec EF, Cremer MA, Kang AH: Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. *Life Sci* 61;1861-1878, 1997
4. Holmdahl R., Andersson M, Goldschmidt TJ, Gustaffson K, Jansson L, Mo JA: Type-II collagen autoimmunity in animals and provocations leading to arthritis. *Immunol Rev* 118; 193-232, 1990
5. Kim SH, Cho ML, Yun JH, Park SH, Cho CS, Hwang SY, Kim HY: Generation and maintenance of type II collagen-specific T-cell line expressing conserved TCR- CDR3 motifs among patients with rheumatoid arthritis. *Immune Network* 1;61-69, 2001
6. Ranges GE, Sriram S, Cooper SM: Prevention of type II collagen-induced arthritis by in vivo treatment with anti-L3T4. *J Exp Med* 162;1105-1193, 1985
7. Anderson GD, Banerjee S, Luthra HS, David CS: Role of Mls-1 locus and clonal depletion of T cells in susceptibility to collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol* 147;1189-1193, 1991
8. Haqqi TM, Qu XM, Anthony D, Ma J, Sy MS: Immunization with T cell receptor V β chain peptides deletes pathogenic T cells and prevents the induction of collagen-induced arthritis in mice. *J Clin Invest* 97;2849-2858, 1996
9. Mori L, Loetscher H, Kakimoto K, Bluethmann H, Steinmetz M: Expression of a transgenic T cell receptor β -chain enhances collagen-induced arthritis. *J Exp Med* 176;381-388, 1992
10. Osman GE, Toda M, Kanagawa O, Hood LE: Characterization of the T cell receptor repertoire causing collagen arthritis in mice. *J Exp Med* 177;387-395, 1993
11. Ortman RA, Holderbaum D, Qu XM, Banerjee S, Haqqi TM: BUB/B α J (H-2^b) is a TCR deletion mutant mouse strain (TCR V β^a , KJ16) that is susceptible to type II collagen-induced arthritis. *J Immunol* 152;4175-4182, 1994
12. Coligan JE, Krusbeck AM, Matquies DH, Shevach EM, Strober W: Collagen-induced arthritis. *Current protocols in immunology* vol 3;15.5.1-19, 1996
13. Goldschmidt TJ, Jansson L, Holmdahl R: In vivo elimination of T cells expression specific T-cell receptor V beta chains in mice susceptible to collagen-induced arthritis. *Immunology* 69;508-514, 1990
14. Kato T, Ideda Y, Zong ZP, Sasakawa H, Kurokawa M, Ma-

- suko K, Igarashi R, Mizushima Y, Nishioka K, Yamamoto K: Characterization of T cell receptor β chains of accumulating T cells in skin allografts in mice. *Transplantation* 62; 266-272, 1996
15. Doncarli A, Ghiocchia G, Stasiuk LM, Herbage D, Boutillon MM, Fournier C, Abehsira-Amar O: A recurrent V α 17/V β 10 TCR-expressing T cell clone is involved in the pathogenicity of collagen-induced arthritis in DBA/1 mice. *Eur J Immunol* 29;3636-3642, 1999
 16. Mukherjee P, Wu B, Mayton L, Kim SH, Robbins PD, Wooley PH: TNF receptor gene therapy results in suppression of IgG2a anticollagen antibody in collagen-induced arthritis. *Ann Rheum Dis* 62;707-714, 2003
 17. Chu CQ, Song Z, Mayton L, Wu B, Wooley PH: IFN- γ deficient C57BL/6 (H-2b) mice develop collagen-induced arthritis with predominant usage of T cell receptor V β 6 and V β 8 in arthritic joints. *Ann Rheum Dis* 62;983-990, 2003
 18. Min SY, Hwang SY, Lee JS, Kim JY, Lee KE, Kim KW, 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
 19. Lucy FD, Jonathan RS, Daniel SM: A discrete adjuvant-induced monoarthritis in the rat: effect of adjuvant dose. *Journal of Neuroscience* 49;5-10, 1993
 20. Lubberts E, Koenders MI, Oppers-Walgreen B, van den Bersselaar L, Coenen-de Roo CJJ, Joosten LAB, van den Berg W: Treatment with a neutralizing anti-murine Interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. *Arthritis Rheum* 50;650-659, 2004
-