

류마티스관절염 활막세포에서 NF- κ B 신호전달을 통한 MIF의 SDF-1 생성 유도

¹가톨릭대학교 의과대학 류마티스연구센터, ²건국대학교 의과대학 내과학교실

조미라¹ · 박미경¹ · 김경운¹ · 오혜좌¹ · 이선영¹ · 박진실¹ · 허유정¹ · 주지현¹
민준기¹ · 이상현² · 박성환¹ · 김호연¹

Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) Induced Stromal Cell-derived Factor 1 (SDF-1) Production Via Nuclear Factor KappaB (NF- κ B) Signaling in Rheumatoid Arthritis Fibroblast Like Synoviocytes (RA-FLS)

Mi-La Cho¹, Mi-Kyung Park¹, Kyoung-Woon Kim¹, Hye-Jwa Oh¹, Seon-Yeong Lee¹, Jin-Sil Park¹, Yu-Jung Heo¹, Ji-Hyeon Ju¹, Jun-Ki Min¹, Sang-Heon Lee², Sung-Hwan Park¹ and Ho-Youn Kim¹

¹Rheumatism Research Center (RhRC), The Catholic University of Korea, ²Division of Rheumatology, Department of Medicine, School of Medicine, Konkuk University, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: Stromal cell-derived factor (SDF)-1 is a potent chemoattractant for activated T cells into the inflamed Rheumatoid arthritis (RA) synovium. To determine the effect of macrophage migration inhibitory factor (MIF) on the production of SDF-1 in the inflamed RA synovium. **Methods:** The expression of SDF-1 and MIF in RA and Osteoarthritis (OA) synovium was examined by immunohistochemical staining. The SDF-1 was quantified by RT-PCR and ELISA after RA fibroblast like synoviocyte (FLS) were treated with MIF in the presence and absence of inhibitors of intracellular signal molecules. The synovial fluid (SF) and serum levels of MIF and SDF-1 in RA, OA and healthy control were measured by ELISA. **Results:** Expression of SDF-1 and MIF in synovium was higher in RA patients than in OA patients. The production of SDF-1 was enhanced in RA FLS by MIF stimulation. Such effect of MIF was blocked by the inhibitors of NF- κ B. Concentrations of SDF-1 in the serum and SF were higher in RA patients than in OA patients and healthy control. SDF-1 and MIF was overexpressed in RA FLS, and MIF could up-regulate the production of SDF-1 in RA FLS via NF- κ B-mediated pathways. **Conclusion:** These results suggest that an inhibition of interaction between MIF from T cells and SDF-1 of FLS may provide a new therapeutic approach in the treatment of RA. (*Immune Network* 2007;7(1):39-47)

Key Words: SDF-1, MIF, rheumatoid arthritis, FLS, NF- κ B

서론

류마티스 관절염(rheumatoid arthritis, RA)은 관절의 파괴와 관절 활막 부위의 염증을 특징으로 하는 전신성 염증 자가 면역 질환이다. 비록 류마티스 관절염의 병인은 밝혀지지 않았지만 다양한 염증 세포와 사이토카인, 케모카인들과의 복잡하고 정밀한 네트워크가 병인에 중요한 역할을 하는것으로 알려져 있다. 류마티스 관절염의

책임저자 : 김호연, 가톨릭대학교 의과대학 류마티스연구센터
☎ 120-752, 서울시 서초구 반포동 505번지
Tel: 02-590-2533, Fax: 02-02-599-4287
E-mail: iammila@catholic.ac.kr

이 논문은 2006년 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2006-331-E00107).

활막내 활막세포는 증식할 뿐만 아니라 T 세포와 monocyte의 침착(infiltration)을 특징으로 하고 활막의 sublining 부위는 mature memory 타입의 T 세포가 침착되어 있다.

활막 부위로의 T 세포, B 세포와 monocytes/macrophages의 이동은 골수 기질세포(bone marrow stromal cells), 활막세포, macrophages, 내피세포(endothelial cells)에 의해 생산되는 SDF-1, IL-8과 같은 케모카인들에 의해 촉진된다. SDF-1의 농도는 류마티스 관절염 환자의 혈장(plasma), 활막액(synovial fluids, SF), 활막조직(synovial tissue)내에 증가되어 있고(2,3) 류마티스 관절염 활막 조직내 SDF-1이 과발현되어 있다(4,5).

SDF-1은 $CD4^+$ 기억 T 세포의 recruitment와 accumulation을 촉진하고 활막으로 monocyte migration을 촉진한다(6). SDF-1은 MMP-3와 MMP-9을 통해 각각 연골세포(chondrocytes)와 골과괴세포(osteoclasts)를 활성화시키고 내피세포의 heparin sulfate 분자상의 immobilization을 통한 신생혈관형성에 의해 관절 파괴를 촉진한다(5). 또한 SDF-1을 억제시키면 collagen-induced arthritis (CIA)의 발병이 억제되고(7) SDF-1 수용체인 CXCR4의 억제는 CIA의 발병과 임상적 severity를 감소시킨다(8).

SDF-1은 일반적으로 주로 케모카인을 자극하고 그로 인해 다른 분자를 유도하고 자극할 수 있으므로 류마티스관절염 병인 내 염증반응, 신생혈관형성과 관절 파괴에 중요한 역할을 한다. 하지만 SDF-1의 유도과 조절 메커니즘에 대한 규명은 아직 미흡한 상황이다. 저산소증(hypoxia)은 활막세포내 SDF-1 mRNA의 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있다(9).

MIF (macrophage migration inhibitory factor)는 활성화된 T 세포에서 분비되어 macrophage의 이동을 억제하고 세포내 기생체나 종양 세포를 사멸하는 능력을 향상시키는 물질로 처음 알려졌다(10-12). 최근의 연구에서는 macrophage, 내피세포(endothelial cell), 섬유아 세포(fibroblast) 등에서도 분비되어(13-15) 종양 발생과 같은 세포 성장, T 세포 활성화와 혈관 신생에도 관여하며 여러 가지 염증이나 면역 반응에 중요한 역할을 한다고 알려졌다(16,17). 특히 TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8을 포함하는 염증 유발성 사이토카인의 합성을 유발하고 glucocorticoid에 의한 사이토카인 생산 억제를 길항하는 특수한 기능을 가진다(18). 이러한 MIF의 발현 증가가 건선, 사구체신염, 이식 거부, 유육종증, 천식을 포함하는 여러 가지 면역 및 염증성 질환에서 보고되어 왔다(19).

류마티스 질환에서의 MIF에 대한 연구를 살펴보면, 류마티스 관절염에서는 환자의 염증성 활막 조직에서 높은 MIF의 발현이 확인되었고(20), 활막의 MIF 발현 정도와 질병 활성도와의 연관성을 증명하여 류마티스 관절염에 항 MIF 치료의 가능성을 보여주었다(21). 또한 MIF는 류마티스 관절염의 활막세포의 증식반응을 직접

적으로 유도하는 것으로 보고되었고(22) 연소성 류마티스 관절염 환자의 혈청과 활액에서 MIF가 증가되는 것으로 확인되었다(24). 전신성 경화증 혈청 및 피부 조직에서 MIF의 발현이 증가하며 이러한 증가는 전신성 경화증 병인에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다(23).

이러한 사실을 바탕으로 본 실험에서는 T 세포에서 유래한 MIF와 관절 활막세포와의 상호작용이 활막 세포에서 SDF-1의 생산에 영향을 주는지 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

환자. 가톨릭대학교 강남성모병원 류마티스센터에서 1987년에 개정된 미국 류마티스 학회(American College of Rheumatology, ACR)의 분류 기준에 만족하는 류마티스 관절염 환자 20명을 대상으로 하였다(25). 대조군으로는 골관절염 환자와 최근 건강검진에서 정상으로 판명된 지원자중 성별과 나이가 맞춰진 20명을 대상으로 하였다. 본 연구는 강남성모병원 임상연구관리 규정과 헬싱키 선언을 준수하여 시행하였다. 활막 조직은 무릎 관절 교체술을 한 류마티스 관절염 환자로부터 분리하였다.

시약. Recombinant MIF는 R&D systems (Minneapolis, MN, USA)에서 구매하였다. Pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), curcumin과 parthenolide는 Sigma Chemical Co (St. Louis, MA)로부터 구매하고 JNK inhibitor, SP600125는 Calbiochem (Schwalbach, Germany)으로부터 구매하였다.

면역조직화학염색법. 4% 파라포름알데하이드에 고정된 각 활막(류마티스 관절염 환자, 골관절염 환자)조직을 통상의 방법대로 파라핀에 포매한 후 절편기를 이용하여 7 μ m절편을 만들어 슬라이드에 붙인 후 헤마톡실린과 에오신(hematoxylin-eosin) 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 사이토카인의 발현의 측정은 면역조직화학 염색방법으로 ABC (Vector laborites, Burlingame, CA, USA) kit를 사용하여 염색하였으며, 슬라이드에 부착된 절편을 자일렌과 에탄올로 탈파라핀과 함수를 시킨 후 3% H_2O_2 로 내인성 과산화효소를 차단시키고, 인산화 완충액(phosphate buffered saline, PBS)으로 수세한다. 비특이적인 반응을 차단할 목적으로 anti-mouse serum을 30분 반응시킨 후 primary Ab를 4°C에서 MIF (R&D Systems, 1 : 50), SDF-1 (R&D Systems, 1 : 50)을 다음날(16~18 h)까지 반응시켰다. Primary Ab 반응 후 결합이 안 된 항체를 PBS로 수세하고 바이오틴이 결합된 이차 항체와 과산화효소가 결합된 streptavidin반응을 시킨 후 DAB으로 발색시킨다. Mayer's 헤마톡실린으로 대조염색한 후 수세하고 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

활막세포의 분리. 활막 세포는 관절 치환술을 하는 류마티스 관절염과 골 관절염 환자로부터 얻은 활막 조직을 효소를 이용한 분해를 통해 분리하였다. 조직은 2~3 mm 조각으로 잘게 자른 후 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL, Carlsbad, CA) 배양액에 4 mg/ml의 농도의 type I collagenase (Worthington Biochemical, Freehold, NJ)와 함께 37°C water bath에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 조직은 500 g에서 원심분리하였고 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco), L-glutamine 2 mM, penicillin 100 units/ml과 streptomycin 100 ug/ml이 들어있는 DMEM 배양액으로 희석 후 75 cm² 플라스크에 담아 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 하룻밤을 보내고 다음날 붙지 않은 조직은 제거하고 붙은 세포만 20% DMEM 배양액에서 배양하였다. 배양액은 주 3일마다 교환해 주었고 계대 배양은 면적의 90% 이상으로 세포가 차지했을 때 1 : 3으로 희석하여 늘려 주었다. 모든 실험의 활막세포는 passage 5~7를 사용하였고 세포 확인은 phycoerythrin (PE)-conjugated anti-CD14 (PharMingen, San Diego, CA), fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated anti-CD3 또는 anti-Thy-1 (CD90) monoclonal antibodies (PharMingen)를 이용한 유세포 분석을 시행하였다.

활막세포는 passage 4에 모든 세포는 95% 이상 CD90⁺을 발현하였고 CD14⁺는 3.5%, CD3⁺는 1% 미만이었다. **SDF-1과 MIF 측정.** 혈청 MIF와 SDF-1의 농도와 배양액 상층액에 있는 SDF-1 농도는 sandwich ELISA로 측정하였다. Sandwich ELISA용 96 well plate (NUNC, Denmark)에 단클론성 SDF-1 항체(R&D Systems, Minneapolis, MN) 2 ug/ml로 50 ul/well씩 넣고 4°C에 밤새 반응시킨 다음 차단용액(1% BSA/PBST)을 200 ul/well씩 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. 표준시료로는 재조합 human SDF-1 (R&D Systems)를 이용하여 5 ng/ml~7.8 pg/ml 농도를 사용하였다. 표준시료와 함께 측정할 혈청 및 세포 배양 상층액을 50 ul/well씩 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. 반응용기를 세척용액(0.05% Tween20/ Phosphate-Buffered Saline)으로 4번 세척하고 Biotinylated goat-anti-human SDF-1 antibody (R&D Systems)를 200 ng/ml로 희석하여 50 ul/well씩 넣어 실온에서 2시간 반응시킨 후 세척용액으로 4번 세척하였다. 마지막으로 Extravidin-alkaline phosphatase conjugate (Sigma)를 1 : 2000으로 희석하여 50 ul/well씩 넣고 실온에서 2시간 반응시키고 세척 후 PNPP (Fluka, Phosphate Disodium Salt Hexahydrate)/DEA 용액 (Diethanolamine 97 ml, NaN₃ 0.2 g, MgCl₂·6H₂O 0.1 g, 1차 증류수 800 ml)을 1 mg/ml 농도로 녹여 50 ul/well씩 넣어 30분 후 0.2 M NaOH로 반응을 멈추고 405 nm파장에서 흡광도를 측정하였다.

RNA 분리와 SDF-1의 reverse transcription-polymerase

chain reaction (RT-PCR). 다양한 신호 억제제(JNK inhibitor, curcumin, SP600125, PDTC or parthenolide)를 처리하거나 하지 않은 조건에서 MIF의 다양한 농도와 함께 배양한 활막세포를 배양하였다. 배양 후, 세포로부터 총 RNA를 RNazolBTM (Tel.Test, Friendwood, TX)를 이용하여 추출하였다. 추출한 총 RNA를 주형으로 complementary DNA (cDNA)를 합성하기 위하여 2 ug의 RNA에 0.5 ug random primer (Takara, Shiga, Japan)와 70°C에서 5분 반응시킨 뒤 4°C에서 급냉시켰다. 다음 10 mM dNTP mix (Invitrogen, Carlsbad, CA) 1 ul, 역전사효소 M-MuLV (MBI Fermentas, Hanover, MD) 1 unit, 5× M-MuLV 희석용액(MBI Fermentas) 4 ul, RNase Inhibitor (MBI Fermentas) 0.5 ul를 가하고 전체를 nuclease free water (Promega, Madison, WI) 20 ul로 맞춘 뒤, 25°C에서 10분, 42°C에서 60분, 72°C에서 10분간 반응시켰다. 생성된 cDNA 산물을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 즉, 25 ul의 반응액 내에, cDNA 1 ul, 2.5 mM dNTP mix (Takara) 2 ul, 10× Taq buffer (iNtRON Biotech, Seoul, Korea) 2.5 ul, Taq 0.5 ul (iNtRON), 10 pmol DNMT-1 primer 2 ul를 사용하였고, 증폭을 위해 Dual-bay thermal cycler system (MJ Research)를 사용하였다. 사용된 primer 서열은 β -actin sense 5'-GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG-3', antisense 5'-TGT GTT GGC GTA CAG GTC TTT G-3', SDF-1 sense 5'- ATG AAC GCC AAG GTC GTG GTC-3', SDF-1 antisense 5'-TGG CTG TTG TGC TTA CTT GTT T -3'으로, β -actin은 조건은 변성 단계에서 94°C 30초, annealing 단계에서 60°C 30초, 신장 단계에서 72°C 30초간 반응을 25회 반복하였으며 DNMT-1 증폭 조건은 변성 단계에서 94°C 30초, annealing 단계에서 56°C 1분, 신장 단계에서 72°C 1분간 반응을 25회 반복하였다. 음성 대조군으로 추출한 cDNA 대신 증류수를 사용하여 시행한 PCR 반응에서 PCR 산물이 관찰되지 않도록 하여 PCR 오염이 없음을 확인하였다.

통계학적 처리. 실험 결과는 평균(±)표준오차로 표현하였으며, SPSS 통계 프로그램(version 10.0)을 사용하였다. 통계 분석은 정상인과 환자군의 평균비교는 Mann-Whitney U test와 Wilcoxon signed rank test를 이용하였다. p값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의하다고 분석하였다.

결 과

류마티스 관절염 환자의 활막 조직에서의 MIF와 SDF-1의 과발현. 류마티스 관절염 환자와 환자 대조군으로써 골관절염 환자의 활막 조직에서 MIF와 SDF-1의 발현 양상을 조사하였다. 헤마톡실린과 에오진으로 염색하였을 때 골관절염 환자보다 류마티스 관절염 환자에서 면역세포들의 침착의 정도가 높았으며 그러한 세포에서의 MIF (RA 59±11/100 cell, OA 6±2/100 cell)와 SDF-1

(RA $47 \pm 5/100$ cell, OA $7 \pm 3/100$ cell) 발현 양상도 류마티스 관절염 환자에서 모두 높게 발현하였다(Fig. 1). 류마티스 관절염 환자의 활막 세포에서 MIF에 의한 SDF-1 생산량의 증가. 우리의 이전 연구에서 T세포 유래 사이토카인으로 알려진 IL-17에 의해서 류마티스 관절염 환자의 활막 세포에서 SDF-1의 생산이 발생됨을 보고하였다(26). 본 연구에서는 T세포에서 분비되는 또 다른 사이토카인인 MIF에 의해 활막 세포에서 SDF-1의 생성이 조절되는지를 단백질 수준과 mRNA 수준에서 조사하였다.

류마티스 관절염 환자의 활막 세포에 MIF를 농도별로 처리하였을 때 농도 의존적으로 SDF-1의 생산량이 증가하였다. MIF 5 ng/ml (Nil: 151 ± 27 pg/ml, MIF 5 ng/ml: 269 ± 26 pg/ml)의 자극부터 의미 있게 증가하여 10 ng/ml (371 ± 39 pg/ml)의 농도에서 SDF-1 최고 생산치를 보였다. 이러한 MIF 자극을 통한 SDF-1의 생산은 이전 연구

에서 보고한 IL-17 10 ng/ml (401 ± 55 pg/ml)에 의해서 생산되는 양보다는 적게 나타났지만 IFN- γ 10 ng/ml (217 ± 39 pg/ml)를 처리한 조건보다는 생산량이 높았다(Fig. 2). 이러한 SDF-1의 생산은 mRNA 수준에서도 동일한 양상을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

류마티스 관절염 환자의 활막 세포내 NF- κ B 신호 전달을 통한 MIF에 의한 SDF-1 생산. 류마티스 관절염 환자의 활막 세포내 MIF에 의한 SDF-1의 생산에 관여하는 신호 전달 체계를 알아보기로 JNK (Jun N-terminal kinase), NF- κ B와 AP-1 (activating protein-1)의 억제제를 사용하여 SDF-1의 생산량의 변화를 단백질 수준과 mRNA 수준에서 조사하였다.

활막 세포에 curcumin (AP-1 inhibitor), SP600125 (JNK inhibitor)을 단독 처리하였을 경우 SDF-1 생산량은 변화가 없었으나(curcumin: 145 ± 21 pg/ml, SP600125: 141 ± 25) PDTC (NF- κ B inhibitor)와 parthelotide (NF- κ B inhi-

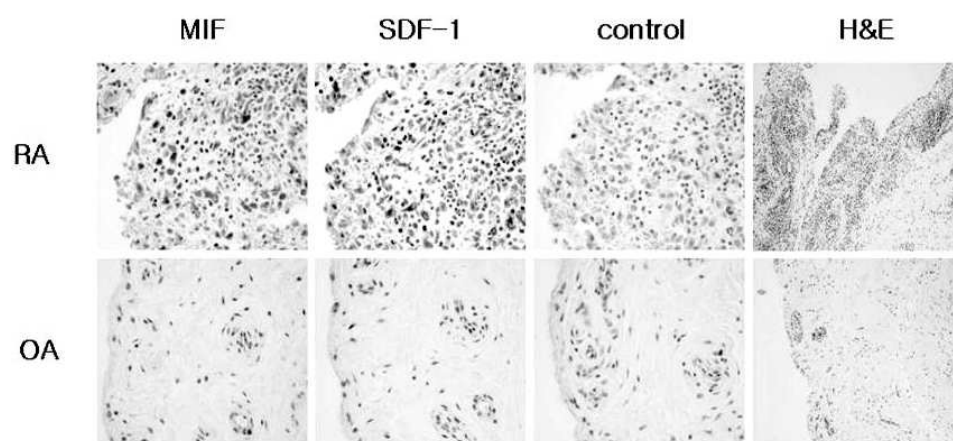


Figure 1. The expression of SDF-1 and MIF in RA and OA synovium. Expression levels of SDF-1 and MIF in synovium was obtained from RA and OA patients. Expression level of SDF-1 and MIF were detected by immunocytochemical staining. Hematoxylin and eosin-stained section of RA and OA synovium showed intense inflammatory infiltrates. The data represent the results of a typical experiment conducted at least three times with similar.

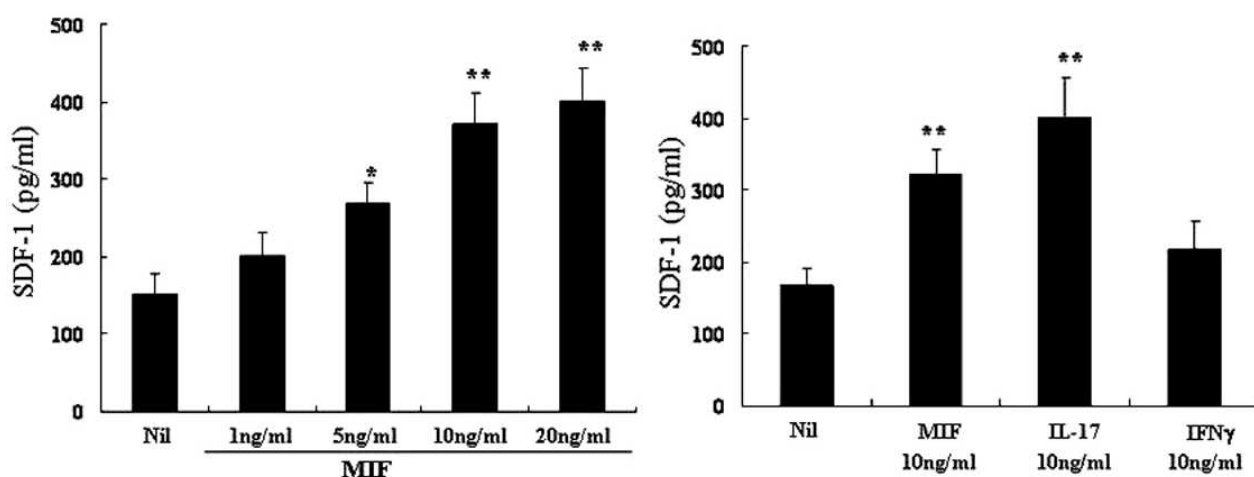


Figure 2. Dose-dependent effects of MIF on the production of SDF-1 in RA synovial fibroblasts. The RA synovial fibroblasts were treated with 1~20 ng/ml of recombinant MIF for 48 hours, then, the concentrations of SDF-1 in the conditioned media were measured by sandwich ELISA. Values represent the means and SEM of 4 experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with the production of SDF-1 of the un-stimulated cells.

bitor)를 단독 처리하였을 때 SDF-1 생산량이 의미있게 감소하였다(PDTC: 86 ± 11 pg/ml, partheloridae: 80 ± 17 pg/ml). MIF에 의해 증가된 SDF-1의 생산량(351 ± 41 pg/ml) 또한 curcumin (301 ± 29 pg/ml)과 SP600125 (331 ± 13 pg/ml) 처리시에는 변화가 없었지만 PDTC (195 ± 23 pg/ml)와 partheloridae (211 ± 25 pg/ml) 처리군에서는 MIF

에 의해 생성된 SDF-1의 생산을 의미 있게 감소시켰다 (Fig. 4).

mRNA 수준에서도 동일하게 MIF에 의해 증가된 SDF-1은 curcumin과 SP600125 처리군에서는 변화가 없었고 PDTC와 partheloridae 처리군에서만 증가되었던 SDF-1을 의미 있게 감소시키는 것으로 확인되었다. 단백질 생성

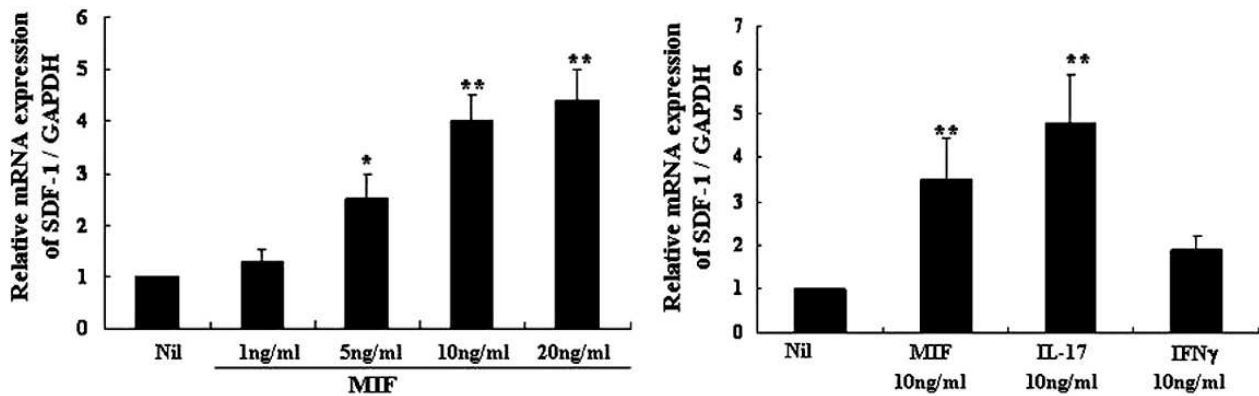


Figure 3. Dose-dependent effects of MIF on the expression of SDF-1 mRNA in RA synovial fibroblasts. RA synovial fibroblasts were cultured in the presence of recombinant human MIF (1~20 ng/ml) for 16 h. Total RNAs were extracted and analyzed by RT-PCR using specific primers for human SDF-1 cDNA sequences. beta-actin mRNA was used as an internal control. Values represent the means and SEM of 4 experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with the production of SDF-1 of the un-stimulated cells.

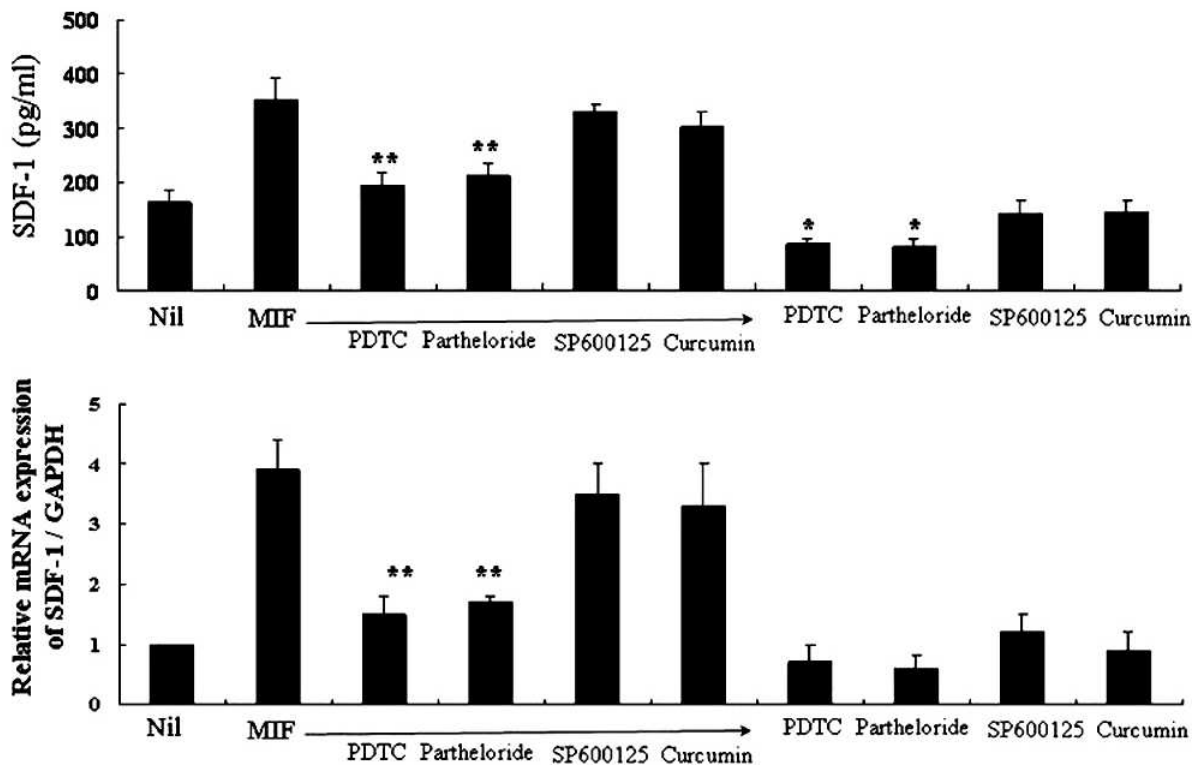


Figure 4. Effects of protein kinase inhibitors on SDF-1 production and SDF-1 mRNA by MIF stimulation. RA synovial fibroblasts were pre-treated with curcumin ($10 \mu\text{M}$), SP600125 ($1 \mu\text{M}$), pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC; $100 \mu\text{M}$) and partheloridae ($10 \mu\text{M}$) in combination of MIF (10 ng/ml). Culture supernatant was assayed for SDF-1 using ELISA and RT-PCR. Values represent the means and SEM of 4 experiments. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ compared with the production of SDF-1 of the un-stimulated cells.

시와는 다르게 mRNA 수준에서는 curcumin, SP600125, PDTC와 parthelotide 단독 처리군에서 SDF-1 생성의 변화는 없었다(Fig. 4).

류마티스 관절염 환자의 혈청과 활액 내 MIF와 SDF-1의 증가. 류마티스 관절염 환자와 대조군으로써 골관절염 환자와 정상인의 혈청과 활액 내 존재하는 MIF와 SDF-1의 양을 조사하였다.

혈청 내 MIF와 SDF-1의 양은 정상인(MIF: 159 ± 55 pg/ml, SDF-1: 193 ± 66 pg/ml)에 비해 류마티스 환자(MIF: 1014 ± 315 pg/ml, SDF-1: 775 ± 138 pg/ml)와 골관절염 환자에서(MIF: 635 ± 214 pg/ml, SDF-1: 506 ± 101 pg/ml) 증가되어 있었고, 류마티스 관절염 환자는 정상인과 골관절염 군에 비해 유의하게 증가하였다. 활액의 경우 MIF와 SDF-1의 양은 골관절염 환자(MIF: 1568 ± 536 pg/ml, SDF-1: 705 ± 236 pg/ml) 비해 류마티스 관절염 환자에서(MIF: 5514 ± 1024 pg/ml, SDF-1: 1201 ± 460 pg/ml) 유의하게 증가하는 것으로 확인되었다(Fig. 5).

고찰

지금까지 많은 연구 보고를 살펴보면 류마티스 관절염과 같은 자가면역질환의 병인으로 T 세포에 의한 이상 면역반응이 매우 주요한 것으로 알려져 있다(27-29). 류마티스 관절염에서 보여지는 관절 활막 부위의 염증과 이상면역반응은 활막조직 쪽으로 많은 T 세포를 비롯한

macrophage, monocyte와 같은 면역 세포들이 침착(infiltration) 되어 있어 이들 면역 세포들과 활막 세포와의 상호작용을 통해 발생하는 것으로 알려져 있다.

SDF-1은 CXCR4에 결합하는 CXC 케모카인이다. SDF-1-CXCR4의 상호작용은 HIV 감염(30), 암(31), 자가면역형 당뇨병(autoimmune diabetes)(32), 류마티스 관절염과 같은 많은 질환에서 중요한 역할을 한다. 류마티스 관절염에서 SDF-1의 생성이 병의 발병과 활성화에 중요한 것으로 알려져 있으나, 아직까지 SDF-1의 조절 기전에 대한 연구는 밝혀져야 할 부분이 더 많다. Anti-CD40 자극은 류마티스 관절염 활막세포내 SDF-1의 생성을 증가시키고(33), 저산소증은 류마티스 관절염 활막세포내 SDF-1을 유도한다(34). 류마티스관절염 활막세포와는 다르게 피부(dermal)와 치은(gingival)의 섬유아 세포에서 IL-1 β 와 TNF- α 는 SDF-1의 발현과 생성을 의미 있게 감소시키는 것으로 보고되었다(35).

SDF-1은 다른 케모카인들과는 달리 정상조직에서도 발현되는 것이 확인되었다(36). 이러한 점 때문인지 지금까지 SDF-1의 연구는 자가면역질환을 포함한 질환연구에서 주목받지 못했으나 최근 질환 활성화와 연관이 있는 것으로 확인되면서 류마티스관절염 새로운 치료표적 케모카인으로 주목받고 있다.

본 연구에서는 활막조직내에서 T세포와 활막세포와 상호작용을 통해 SDF-1 생성이 활성화되는 이전 연구를

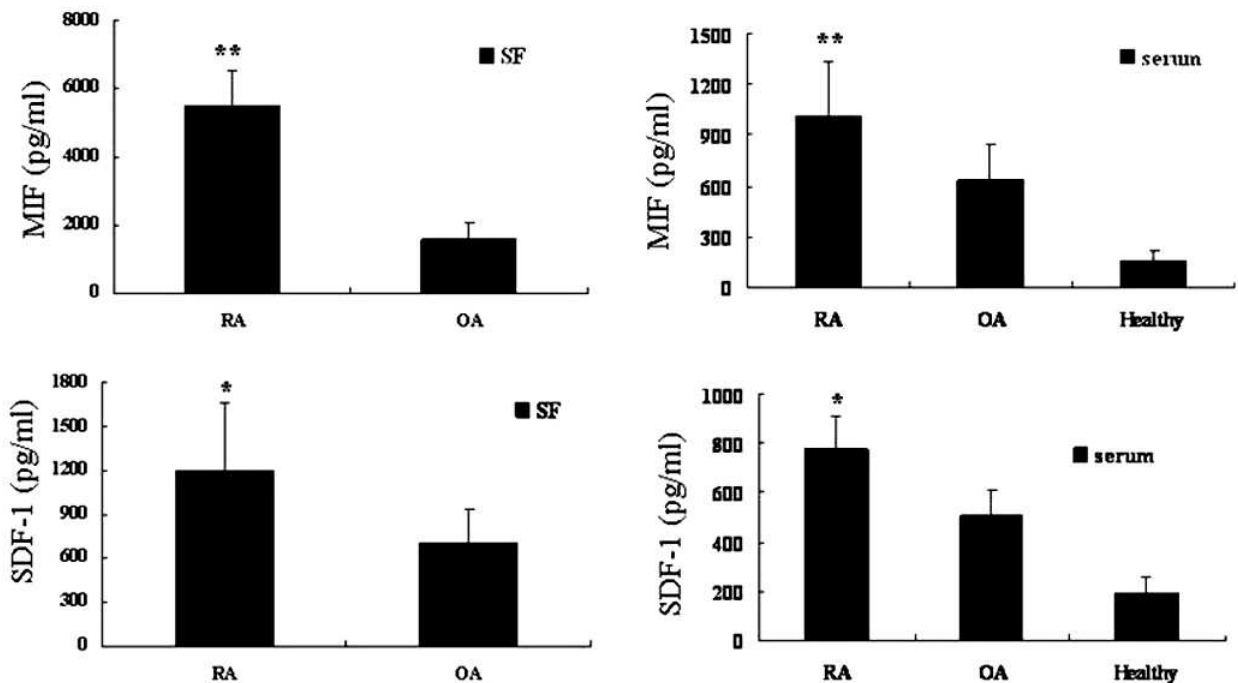


Figure 5. Synovial fluid (SF) or serum concentration of MIF and SDF-1 in rheumatoid arthritis (RA), osteoarthritis (OA) patients and healthy control (HC). Both serum and SF levels of MIF and SDF-1 were determined by ELISA. Values represent the means and SEM of 4 experiments. *p < 0.05 and **p < 0.01 compared with the concentration of MIF and SDF-1 of osteoarthritis (OA) patients or healthy control (HC).

바탕으로 MIF라는 T세포에서 많이 생성되는 사이토카인을 활막세포에 처리하여 활막세포에서 SDF-1의 생성과 기전을 조사하였다.

MIF는 활성화된 T 세포에서 분비되는 사이토카인으로 현재는 macrophage, monocyte를 비롯한 여러 면역세포에서도 분비됨이 보고되었다(13-15). 또한 MIF는 류마티스 관절염의 염증 반응 진행과정에서 중요한 역할을 한다. 특히 TNF- α , IL-6, IL-8을 포함하는 염증 유발성 사이토카인의 합성을 촉진시키는 것으로 알려져 있다(18-20).

본 연구에서는 기존의 보고와 마찬가지로 MIF가 류마티스 관절염 환자의 혈청, 활액과 활막 조직의 면역 세포에서 과발현되는 것을 확인하였고 SDF-1도 유사하게 높게 발현 되는 것을 단백질과 mRNA 수준에서 확인하였다. 배양된 류마티스 관절염 환자의 활막세포는 MIF의 농도의존적으로 SDF-1의 생성을 유도하였다. 이러한 결과는 T 세포로부터의 분비되는 MIF와 활막 세포로 분비되는 SDF-1을 통한 T 세포와 활막세포의 상호작용으로 인해 류마티스 관절염 병인에 기여할 것으로 생각된다. 구체적으로 활막 세포로부터 나온 SDF-1에 의해 염증 활막 조직으로 T 세포가 이동하여 MIF를 생산하고 이러한 MIF는 활막세포를 자극하여 SDF-1생성을 촉진시키는 것으로 생각된다. 활막세포와 T세포에서 지금까지 알려진 IL-17와 SDF-1뿐만이 아니라 MIF와 SDF-1 또한 상호작용함을 확인하였다.

류마티스 관절염 내 염증 활막조직의 또 다른 중요한 특징은 신생 혈관의 형성이다. 이는 연골과 뼈의 파괴 과정에 있어서 중요한 역할을 하며, 종양과 염증성 질환에서 주요한 신생혈관 형성 매개자로 알려진 혈관 내피 세포 성장인자(vascular endothelial growth, VEGF)는 류마티스관절염 활액과 혈액에서 증가되어 있을뿐 아니라 활막조직에서 발현되며 활막세포에서 생성되는 것으로 알려져 있다.

이전 보고에 따르면 류마티스 환자의 다양한 질환 활성도와 혈청내 VEGF의 수준이 순상관관계(positive correlation)를 보였다(37). TGF- β 는 류마티스 관절염의 활막세포에서 VEGF 생성을 유도한다(38). MIF와 VEGF의 상관관계와 MIF에 의한 VEGF의 생성은 아교모세포종(glioblastomas), 교종(glial tumor), 간세포암(hepatocellular carcinoma), 식도편평상피암(esophageal squamous cell carcinoma)을 포함하는 여러 질환에서 보고되었다(39-42).

SDF-1도 혈관 신생에 관여하는 케모카인으로 활막 조직으로 T 세포와 B 세포를 끌어당기며(4), 선택적인 케모카인 수용체 길항제(antagonist)인 Tannic acid로 처리 시 SDF-1과 CXCR4의 상호작용으로 인한 chemotatic 효과와 신혈관 형성을 억제한다(43).

이번 연구에서 증명된 류마티스 관절염 환자의 활막

세포내 MIF에 의한 SDF-1의 과발현은 염증 반응과 활막 세포 주변의 신생 혈관을 촉진하여 류마티스 관절염을 더욱 가속화하고 증대시킬 것으로 추측할 수 있다.

SDF-1에 의한 CXCR4 활성 신호전달 기전은 잘 알려져 있으나(44) SDF-1 생성에 관여하는 신호전달 체계에 대한 보고는 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 NF- κ B와 AP-1 억제제를 이용하여 MIF에 의해 유도되는 SDF-1 생성에 NF- κ B 신호 전달 체계가 관여됨을 확인하였다.

결론적으로 류마티스 관절염의 활막세포에서 SDF-1이 과잉 생성되며 MIF가 NF- κ B 신호 전달을 통해 SDF-1의 발현을 조절할 수 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 T 세포로부터 분비되는 MIF와 활막세포로부터 분비되는 SDF-1의 상호작용을 차단하여 류마티스 관절염 환자의 치료에 응용될 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- Hoy MD, O'Donnell JL, Hart DN: Dual CD45RA, CD45RO positive T-lymphocytes within rheumatoid arthritic joints. *Pathology* 25;167-173, 1993
- Mittal GA, Joshi VR, Deshpande A: Stromal cell-derived factor-1 alpha in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 42;915-916, 2003
- Kanbe K, Takagishi K, Chen Q: Stimulation of matrix metalloproteinase 3 release from human chondrocytes by the interaction of stromal cell-derived factor 1 and CXCR4 chemokine receptor 4. *Arthritis Rheum* 46;130-137, 2002
- Grassi F, Cristino S, Toneguzzi S, Piacentini A, Facchini A, Lisignoli G: CXCL12 chemokine up-regulates bone resorption and MMP-9 release by human osteoclasts: CXCL12 levels are increased in synovial and bone tissue of rheumatoid arthritis patients. *J Cell Physiol* 199;244-251, 2004
- Pablos JL, Santiago B, Galindo M, Torres C, Brehmer MT, Blanco FJ, Garcia-Lazaro FJ: Synovial cell-derived CXCL12 is displayed on endothelium and induces angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 170;2147-2152, 2003
- Blades MC, Ingegnoli F, Wheller SK, Manzo A, Wahid S, Panayi GS, Perretti M, Pitzalis C: Stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) induces monocyte migration into human synovium transplanted onto SCID Mice. *Arthritis Rheum* 46;824-836, 2002
- De Klerck B, Geboes L, Hatse S, Kelchtermans H, Meyvis Y, Vermeire K, Bridger G, Billiau A, Schols D, Matthys P: Pro-inflammatory properties of stromal cell-derived factor-1 (CXCL12) in collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 7;R1208-R1220, 2005
- Tamamura H, Fujisawa M, Hiramatsu K, Mizumoto M, Nakashima H, Yamamoto N, Otake A, Fujii N: Identification of a CXCR4 antagonist, a T140 analog, as an anti-rheumatoid arthritis agent. *FEBS Lett* 569;99-104, 2004
- Hitchon C, Wong K, Ma G, Reed J, Lyttle D, El-Gabalawy H: Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 46;2587-2597, 2002
- David JR: Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Pathology* 56;72-77, 1966
- Nathan CF, Karnovsky ML, David JR: Alterations of macrophage functions by mediator from lymphocytes. *J Exp Med* 133;1356-1376, 1971

12. Bloom BR, Bennet B: Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed hypersensitivity. *Science* 153;80-82, 1966
13. Shimizu T, Ohkawara A, Nishihira J, Sakamoto W: Identification of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human skin and its immunohistochemical localization. *FEBS Lett* 381;199-202, 1996
14. Matsuda A, Tagawa Y, Matsuda H, Nishihira J: Identification and immunohistochemical localization of macrophage migration inhibitory factor in human cornea. *FEBS Lett* 385;225-228, 1996
15. Onodera S, Suzuki K, Matsuno T, Kaneda K, Kuriyama T, Nishihira J: Identification of macrophage migration inhibitory factor in murine neonatal calvariae and osteoblasts. *Immunology* 89;430-435, 1996
16. Bacher M, Metz CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, Gerns D, Donnelly T, Bucala R: An essential regulatory role for macrophage migration inhibitor factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93;7849-7854, 1996
17. Lolis E: Glucocorticoid counter regulation: macrophage migration inhibitory factor as a target for drug discovery. *Curr Opin Pharmacol* 1;662-668, 2001
18. Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R: MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 377;68-71, 1995
19. Morand EF, Bucala R, Leech M: Macrophage migration inhibitory factor: an emerging therapeutic target in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 48;291-299, 2003
20. Leech M, Metz C, Hall P, Hutchinson P, Gianis K, Smith M, Weedon H, Holdsworth SR, Bucala R, Morand EF: Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum* 42;1601-1608, 1999
21. Morand EF, Leech M, Weedon H, Metz C, Bucala R, Smith MD: Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: clinical correlations. *Rheumatology* 41;558-562, 2002
22. Lacey D, Sampey A, Mitchell R, Bucala R, Santos L, Leech M, Morand E: Control of fibroblast-like synoviocyte proliferation by macrophage migration inhibitory factor. *Arthritis Rheum* 48;103-109, 2003
23. Selvi E, Tripodi SA, Catenaccio M, Lorenzini S, Chindamo D, Manganelli S, Romaqnoli R, Letta F, Paulesu L, Miracco C, Cintonino M, Marcolongo R: Expression of macrophage migration inhibitory factor in diffuse systemic sclerosis. *Ann Rheum Dis* 62;460-464, 2003
24. Meazza C, Travaglini P, Pignatti P, Magni-Manzoni S, Ravelli A, Martini A, De Benedetti F: Macrophage migration inhibitory factor in patients with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 46;232-237, 2002
25. Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Linanq MH, Luthra HS: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31;315-324, 1988
26. Kim KW, Cho ML, Kim HR, Ju JH, Park MK, Oh HJ, Kim JS, Park SH, Lee SH, Kim HY: Up-regulation of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) production in rheumatoid synovial fibroblasts through interactions with T lymphocytes: Role of interleukin-17 and CD40L-CD40 interaction. *Arthritis Rheum* 56;1076-1086, 2007
27. Goronzy JJ, Weyand CM: Thymic function and peripheral T-cell homeostasis in rheumatoid arthritis. *Trends Immunol* 22;251-255, 2001
28. Weyand CM, Goronzy JJ: T-cell responses in rheumatoid arthritis: systemic abnormalities-local disease. *Curr Opin Rheumatol* 11;210-217, 1999
29. Aarvak T, Narvig JB: Cell-cell interactions in synovitis: antigen presenting cells and T cell interaction in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 3;13-317, 2001
30. Mbemba E, Benjouad A, Saffar L, Gattegno L: Glycans and proteoglycans are involved in the interactions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein and of SDF-1 α with membrane ligands of CD4(+) CXCR4(+) cells. *Virology* 265;354-364, 1999
31. Burger JA, Kipps TJ: CXCR4: A key receptor in the cross talk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 107;1761-1767, 2006
32. Dubois-Laforgue D, Hendel H, Caillat-Zucman S, Zagury JF, Winkler C, Boitard C, Timsit J: A common stromal cell-derived factor-1 chemokine gene variant is associated with the early onset of type 1 diabetes. *Diabetes* 50;1211-1213, 2001
33. Nanki T, Hayashida K, El-Gabalawy HS, Suson S, Shi K, Girschick HJ, Yavuz S, Lipsky PE: Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* 165;6590-6598, 2000
34. Hitchon C, Wong K, Ma G, Reed J, Lyttle D, El-Gabalawy H: Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 46;2587-2597, 2002
35. Fedyk ER, Jones D, Critchley HO, Phipps RP, Blieden TM, Springer TA: Expression of stromal-derived factor-1 is decreased by IL-1 and TNF and in dermal wound healing. *J Immunol* 166;5749-5754, 2001
36. Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, Honjo T: Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 28;495-500, 1995
37. Lee SS, Joo YS, Kim WU, Min DJ, Min JK, Park SH, Cho CS, Kim HY: Vascular endothelial growth factor levels in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 19;321-324, 2001
38. Cho ML, Cho CS, Min SY, Kim SH, Lee SS, Kim WU, Min DJ, Min JK, Youn J, Hwang SY, Park SH, Kim HY: Cyclosporine inhibition of vascular endothelial growth factor production in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 46;1202-1209, 2002
39. Munaut C, Boniver J, Foidart JM, Deprez M: Macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in human glioblastomas correlates with vascular endothelial growth factor (VEGF) expression. *Neuropathol Appl Neurobiol* 28;452-460, 2002
40. Radstake TR, Sweep FC, Welsing P, Franke B, Vermeulen SH, Geurts-Moespot A, Calandra T, Donn R, van Riel PL: Correlation of rheumatoid arthritis severity with the genetic functional variants and circulating levels of macrophage migration inhibitory factor. *Arthritis Rheum* 52;3020-3029, 2005
41. Ren Y, Law S, Huang X, Lee PY, Bacher M, Srivastava G, Wonq J: Macrophage migration inhibitory factor stimulates angiogenic factor expression and correlates with differentiation and lymph node status in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg* 242;55-63, 2005
42. Ren Y, Tsui HT, Poon RT, Nq IO, Li Z, Chen Y, Jiang G, Lau C, Yu WC, Bacher M, Fan ST: Macrophage migration inhibitory factor: roles in regulating tumor cell migration and expression of angiogenic factors in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 107;22-29, 2003
43. Chen X, Beutler JA, McCloud TG, Loehfelm A, Yang L, Dong HF, Chertov OY, Salcedo R, Oppenheim JJ, Howard

OM: Tannic Acid Is an Inhibitor of CXCL12 (SDF- α)/CXCR4 with Antiangiogenic Activity. Clin Cancer Res 9;3115-3123, 2003

44. Kucia M, Jankowski K, Reca R, Wysoczynski M, Bandura L,

Allendorf DJ, Zhang J, Ratajczak J, Ratajczak MZ: CXCR4-SDF-1 signalling, locomotion, chemotaxis and adhesion. J Mol Histol 35;233-245, 2004
