

류마티스관절염 환자의 활액 세포에서 IL-17과 IL-1 β 에 의한 IL-23p19의 발현 증가

조미라¹ · 허유정¹ · 오혜좌¹ · 강창민¹ · 이선영¹ · 홍연식^{2*} · 김호연¹

¹가톨릭대학교 의과대학 류마티스 연구센터, ²가톨릭대학교 의과대학 성모자애병원 류마티스내과

IL-23 P19 Expression Induced by IL-17 and IL-1 β in Rheumatoid Arthritis Synovial Mononuclear Cells

Mi-La Cho¹, Yu-Jung Heo¹, Hye-Jwa Oh¹, Chang-Min Kang¹, Seon-Yeong Lee¹, Yeon-Sik Hong^{2*}, Ho-Youn Kim¹

¹Rheumatism Research Center (RhRC), Catholic University, ²Department of Internal Medicine, Our Lady of Mercy Hospital, Catholic University College of Medicine, Seoul, Korea

Interleukin-23 (IL-23) is a novel pro-inflammatory cytokine which has been implicated to play a pathogenic role in rheumatoid arthritis (RA). This study was undertaken to investigate the IL-23 inductive activity of the proinflammatory cytokine IL-17, IL-1 β and tumor necrosis factor (TNF- α) in RA synovial fluid mononuclear cells (SFMC). Expression of IL-23p19, IL-17, IL-1 β and TNF- α in joint was examined by immunohistochemistry (IHC) of patients with RA and osteoarthritis (OA). The effects of IL-17 and IL-1 β on expression of IL-23p19 in human SFMC from RA patients were determined by reverse transcriptase chain reaction (RT-PCR) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). IL-23p19 was expressed in the RA fibroblast like synoviocyte (FLS), but not from OA FLS. Similar to the protein expression, IL-23p19 mRNA could be detected by RT-PCR in RA SFMC. IL-17 and IL-1 β could induce RA SFMC to produce the IL-23p19. The effects of IL-17 were much stronger than IL-1 β or TNF- α . These responses were observed in a dose-responsive manner. In addition, IL-17 or IL-1 β neutralizing antibody down-regulated the expression of IL-23p19 induced by LPS in RA-SFMC. Our results demonstrate that IL-23p19 is overexpressed in RA synovium and IL-17 and IL-1 β appears to upregulate the expression of IL-23p19 in RA-SFMC. [Immune Network 2008;8(1):29-37]

서 론

류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis; RA)은 만성 염증과 관절 파괴를 동반하는 질환으로, 주로 관절 활막내 세포들이 T세포, B세포, 대식세포, 수지상 세포 등과 함께 활성화 되어 관절 조직 내로 침윤이 일어 난다(1,2). 이때, 염증성 사이토카인의 증가에 의한 질병 활성화가 매우 중요한 원인으로 알려지고 있으며, 대표적 염증성 사이토카인으로서는 지금까지 IL-1 β 와 TNF- γ 가 주목 받아왔다(3). 하지만, 최근 새로운 세포군으로 알려진 T helper 17 (Th17)에서 분비되는 IL-17이 자가면역질환에서 중요하다는 보고가 계속되면서, IL-17이나 IL-23와 같은 사이토카인이 자가면역 관절염에서 새로운 치료 표적 사이토카인으로 주목을 받게 되었다(4-6).

염증성 사이토카인인 IL-17, IL-1 β , TNF- α 는 섬유모세포, 내피세포 및 상피세포에 작용하여 다양한 생물학적 반응에 영향을 주며, 주로 염증반응 및 조혈작용을 한다. 류마티스 관절염에서 IL-17은 활막의 Th17 림프구에서 생성되어 활막세포, 단핵구, 대식세포 및 연골세포 등에 작용하여 다양한 사이토카인을 유리시켜 관절의 염증 및 파괴에 주요한 역할을 한다. 이들의 발현은 대부분 IL-17A, F로 활성화된 기억 CD4+나 CD8+세포에서 생산이 되며(7), 미경험 T세포에 IFN- γ 와 IL-4를 차단하고, IL-6와 IL-21을 주어 배양하면 Th17로 분화하고, IL-23가 증가된다(8-10). 그 중, IL-23는 항원 제시세포로부터 생산되고, Th17세포의 생존과 확장에 관여 하며, IL-17의 발현을 증가시켜 관절염 발병과 활성화에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다(10,11). 또한, IL-23의 수용체 리간드의 상호 작용은 Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3)를 활성화하여 IL-17A와 IL-17F의 생성을 촉진한다(12). IL-17A는 이형이량체 단백질로서 IL-17의 구성원에 속한다. IL-17F는 IL-17A와 비슷한 기능을 가지고 있고, 수용체와 조절인자를 공유하고 있다(13).

IL-23는 IL-12와 p40를 공유하며, IL-12는 내재적 세포 매개

*책임저자. Tel: 032-510-5796; Fax: 032-510-5683; E-mail: rhcow1@yahoo.co.kr

이 논문은 2006년도 가톨릭대학교 성의장학 학술연구비 지원에 의한 것임.

Keywords: Rheumatoid arthritis, Synovial fluid mononuclear cells, IL-23p19, IL-17, IL-1 β

면역반응과 Th1의 발달에 필수적인 요소로써(14,15), p35와 p40의 두 가지 아형을 가지고 있는 이형이량체(heterodimeric)이다(16,17). IL-12는 T 세포나 자연 사해 세포에 의한 IFN- γ 생성의 강력한 유도자로서 작용하며(18), IL-12에 의해 생성된 IFN- γ 는 GM-CSF와 함께 항원제시세포에 작용하여 IL-12생성을 촉진하는 양성 피드백 매카니즘으로 작용한다(19-21). IL-23는 IL-12p40 KO 마우스에 있어서 감소되는 면역 반응의 정도가 p35 KO 마우스에서 보다 심하게 나타나기 때문에(22-24), p40과 결합하여 면역 반응을 유도하는 또 다른 사이토카인 아형이 존재 할 것이라는 가정하에 탐색되었다(25). 즉, IL-23는 IL-12p35 아형에 속해있는 IL-6 helical 사이토카인 구성원과 유사한 서열을 검색한 결과 발견된 p19가 IL-12의 p40 아형과 이형이량체를 구성함으로써 기능을 할 수 있음이 확인되었다(26). 이 두 사이토카인의 구조적인 공통점은 p40를 공유하는 사이토카인이라는 점과 이와 이형이량체의 형태를 구성하는 아형인 p35, p19 모두 IL-6 구성원으로써 Conserved region을 가지고 있다는 점이다(27). 이와 같이, IL-23는 IL-12와 같은 그룹에 속하지만, IL-12와는 다르게 Th17의 분화를 촉진 시켜 IL-17의 발현을 증가시켜 관절염 발병과 활성화에 중요한 역할을 하고 있다(28,29).

IL-23는 기억 T 세포를 활성화 시켜 IL-17의 생성을 유도한다. IL-23는 주로 활성화된 수지상 세포와 대식세포에서 생산이 되지만, IL-23의 병인적 기능에 대해서는 잘 알려지지 않았다(10,11). IL-17은 주로 CD4+CD45RA+ 기억 T세포에서 생성이 되며, RA 환자의 활막조직과 활액 내에서 발현됨이 알려져 있다(31). IL-17은 단핵세포나 대식세포로부터 분비되는 IL-1 β 와 TNF- α 와 같은 염증성 사이토카인에 의해 발현이 유도된다(32,33). 최근 보고에 따르면, IL-23역시 IL-17의 생성을 유도하며, 확장과 분화에도 관여한다고 밝혀졌다(10,11). IL-23의 발현도 IL-1 β 나 TNF- α 와 같은 사이토카인 자극을 통해서 수지상세포나 대식세포에서 생성되는 것이 알려졌다(22). 최근 자가면역질환을 연구하는 그룹들에서 IL-17을 분비하는 Th17 세포가 질환발생과 활성화에 매우 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 Th17세포에 대한 연구의 진행이 매우 활발하며 이들 세포를 직접 활성화 시키는 것으로 밝혀진 IL-23까지 관심이 집중되고 있다. 이러한 이유로 이들 두 사이토카인의 상호작용에 대한 연구는 매우 중요하게 여겨진다. 이전 우리 연구 결과에서 활막 세포에서, IL-17에 의해 IL-23이 증가됨을 보고한바 있다(34).

본 연구에서는, 류마티스 관절염 환자의 활액내 세포에서 Th17 세포에서 분비되는 IL-17과 염증성 사이토카인에 의해서 IL-23 p19이 생성되는지 조사하였다.

대상 및 방법

대상

본 연구는 강남성모병원 류마티스 연구센터에서 1997년에 개정

된 미국 류마티스 학회(American College of Rheumatology, ACR)의 RA 분류 기준을 4가지 이상 만족시키는 38명의 RA 환자를 대상으로 진행되었다. 대상자의 성별은 여성이 30명 이상이며, 평균나이는 56 ± 2 세이다. 본 연구는 가톨릭중앙의료원 임상연구관리 규정을 준수하여 실험하였다.

시약

LPS (SIGMA, USA), recombinant human IL-17 (1~10 ng/ml (R&D, USA)), recombinant human IL-1 β (1~10 ng/ml)과 recombinant human TNF- α (1~10 ng/ml (Endogen, USA))를 사용하였다. 중성화 항체로는 anti IL-17 10 ug/ml (R&D, USA), anti IL-1 β (R&D, USA)와 anti TNF- α (R&D, USA)를 사용하였다.

조직 염색

4% 파라포름알데하이드에 고정된 각 활막(류마티스 관절염 환자, 골관절염환자) 조직을 통상의 방법대로 파라핀에 포매한 후 절편기를 이용하여 7 um절편을 만들어 슬라이드에 붙인 후 헤마톡실린과 에오진(hematoxylin-eosin) 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 사이토카인의 발현의 측정은 면역조직화학염색방법으로 ABC (Vector laboratories, Burlingame, CA, USA) kit를 사용하여 염색하였으며, 슬라이드에 부착된 절편을 자일렌과 에탄올로 탈파라핀과 함수를 시킨 후 3% H₂O₂로 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 IL-1b, IL-17, IL-23p19, TNF- α (R&D systems, 1 : 100)을 다음날(16~18 h)까지 반응시켰다. Primary Ab 반응 후 결합이 안된 항체를 PBS로 수세하고 바이오틴이 결합된 이차 항체와 과산화효소가 결합된 streptavidin반응을 시킨 후 DAB으로 발색시킨다. Mayer's 헤마톡실린으로 대조염색한 후 수세하고 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

SFMC 분리

관절염 환자의 활액 세포(Synovial fluid mononuclear cells, SFMC)를 분리하기 위해서 관절내 활액(Synovial fluid)을 heparin으로 처리한 주사기를 이용하여 채취한 후 단핵구세포를 Ficoll-Paque TM (Amersham Biosciences, SWEDEN)를 이용하여 centrifuge gradient법으로 분리하였다. 실험에 사용된 세포들은 56°C에서 1시간 동안 불활성화된 10% 우 태아 혈청, Penicillin (100 U/ml) Streptomycin (100 g/ml)이 포함된 세포 배양액(RPMI 1,640, Gibco BRL, USA)을 첨가와 1 : 1로 섞어 Ficoll과 배양액으로 희석한 활액을 1 : 4의 비율로 Ficoll 층이 흐트러지지 않게 50 ml tube에 천천히 떠운 다음 혈액을 2,000 rpm, 30분간 원심분리 하였다. Buffy coat 층만을 따서 새 tube에 담은 후 PBS로 세척하고 세포 수를 계산한 다음 활액 단핵세

포를 사용하였으며, non T 세포의 사용은 CD3+ T 세포를 MACs bead를 이용해서 분리 하여 제거한 후 사용하였다. 세포를 anti-human CD3+ Micro bead (Miltenty biotec, Bergisch Gladbach, Germany)와 4°C, 15분간 반응 시킨 후, 1% BSA, 2 mM EDTA (Amresco Ohio USA)가 포함된 PBS-용액(pH7.4)으로 세척하고 Column (Miltenty biotec)을 통과시켜 양성 분획으로 CD3+ T세포를 분리하였다.

사이토카인 측정

Sandwich ELISA용 96 Well plate (NUNC, Denmark)에 capture monoclonal IL-23p19 antibody (Ab) (R&D, SA), 4 ug/ml로 50 ul/ml씩 넣고, 4°C에 밤새 반응시킨 다음 차단용액(1% Bovine serum albumin (BSA)/0.05% Tween 20이 함유된 Phosphate buffered saline (PBST))을 200 ul/well씩 넣고 실온에서 2시간 반응시킨다. 샘플과 recombinant human IL-23p19 (R&D, USA)을 10000~15 pg/ml 이용하여 실온에서 2시간 반응시켰다. Well을 세척용액(0.05% PBST)으로 4번 세척하고 Biotinylated goat-anti-human IL-12p40 monoclonal Ab (R&D, USA)를 300 ng/ml로 50 ul/well씩 넣어 실온에서 2시간 반응시킨 후 4번 세척 하였다. 마지막으로는 ExtraAvidin-Alkaline Phosphatase conjugate (SIGMA, USA)를 1 : 2000으로 희석하여 50 ul/well씩 넣고 실온에서 2시간 반응시키고 세척 후 PNPP (Fluka, Phosphate Disodium Salt Hexahydrate)/DEA 용액을 1 mg/ml 농도로 녹여 50 ul/well씩 넣어 20~30분 후 0.2 N NaOH로 반응을 멈추고 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

RNA 분리와 IL-23p19 역 전사 중합효소반응

관절염 환자의 활액 단핵세포 1×10^6 개의 세포를 세포 배양액 1 ml에 넣어 24 well plate (costar, Cambridge, MA)에 부유한 후 LPS 자극 또는 자극 없이 12시간 동안 37°C 배양기에서 배양하였다. 위와 같이 처리한 세포로부터 총 RNA를 RNAzol BTM (TEL TEST, Friendswood, TX)를 이용하여 추출하였다. 추출한 총 RNA를 주형으로 cDNA를 합성하기 위하여 0.5 ug random ninemer (TakaRA, Shiga, JAPAN)와 70°C에서 5분 반응시킨 뒤 4°C에서 급냉 시킨 다음 10 mM dNTP mix (Invitrogen, Carlsbad, California) 1 ul, 역 전사 효소 M-MuLV (MBI Fermentas, Hanover, MD) 1unit, 5X M-MuLV 희석용액(MBI Fermentas) 4 ul, RNase Inhibitor (MBI Fermentas) 0.5 ul를 가하고 전체를 nuclease free water (Promeg, Madison, WI) 20 ul로 맞춘 뒤, 25°C 10분, 42°C에서 60분, 72°C에서 10분간 반응시켰다. 이렇게 생성된 cDNA 산물을 이용하여 중합효소 연쇄 반응을 시행하였다. 본 실험에서 사용한 GAPDH, IL23p19의 시 발체는 모두 Genotec Co (Seoul, Korea)에서 구입하였다. 염기 서열은 (5'→3'): IL-23p19 sense GCA GAT TCC AAG CCT CAG TC, IL-23p19 anti sense TTC AAC ATA TGC AGG TCC CA and glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) sense

CGA TGC TGG GCG TGA C, GAPDH anti sense CGT TCA GCT CAG GGA TGA CC를 사용하여, 94°C에서 30초, GAPDH 55°C/IL-23p19 60°C에서 1분, 55°C에서 25회 시행하였다. PCR를 위한 반응 화합물은 총 25 ul가 되도록 하였고, 용액의 조성은 2.5 ul의 10Xreaction buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3: 15 mM MgCl₂: 50 mM KCl; Takara, Shiga, Japan), 0.5 mM의 dNTP (Takara, Shiga, Japan)을 사용하였다. 증폭을 위해 Dual-bay Thermal cycler system (M Research)를 사용하였다. 음성 대조군으로 추출한 cDNA 대신 증류수를 사용하여 시행한 PCR반응에서 PCR 산물이 관찰되지 않도록 하여 PCR 오염이 없음을 확인하였다. PCR이 끝난 후의 반응물은 1.5% agarose gel에서 전기영동 하여 확인했다.

통계적 유의성의 검증

실험 결과는 평균표준오차로 표현하였으며 통계적 유의성은 SPSS 통계 프로그램(version 11.5, Chicago, IC)을 사용하여 student's t-test를 실시하였고 P값이 0.05이하 일 때 통계적으로 유의 하다고 분석하였다.

결 과

류마티스관절염 환자의 활막세포에서의 염증성사이토카인 IL-23, IL-17, IL-1 β , TNF α 발현 조사

류마티스관절염 환자와 골관절염 환자의 활막 조직에서, 관절 활막내 면역세포의 침윤과 IL-23, IL-17, IL-1 β , TNF- α 의 발현 양상을 헤마톡실린/에오진, 조직 면역화학염색을 통하여 확인 하였다. 그 결과, 류마티스관절염 활막조직내에 면역세포가 의미 있게 증가되어 있으며 IL-23p19, IL-17, IL-1 β , TNF- α 이 골관절염에서는 거의 발현 되지 않았으며, 류마티스관절염에서 이들 사이토카인 발현이 의미있게 증가되어 있음을 확인했다 (Fig. 1).

말초혈액 단핵세포(PBMC)와 활액 단핵세포(SFMC)에서 IL-23p19 발현 조사

관절염 환자의 말초혈액과 활액에서 단핵세포를 분리하여 IL-23p19의 발현을 비교하였다. 세포들을 분리 한 후, 순수 배양액에서 세포 배양후 세포내 IL-23p19의 mRNA 발현을 RT-PCR로 조사하였으며 이때 말초혈액 단핵세포에 비하여 활액 단핵세포에서 IL-23p19의 mRNA 발현이 통계적으로 유의하게 증가되었다(Fig. 2A). 배양한 세포 배양액에서 IL-23 생성을 Sandwich ELISA로 조사하였고 이때 IL-23 생성양도 말초혈액 단핵세포에 비하여 활액 단핵세포에서 IL-23p19의 생성이 통계적으로 유의하게 증가되었다(Fig. 2B).

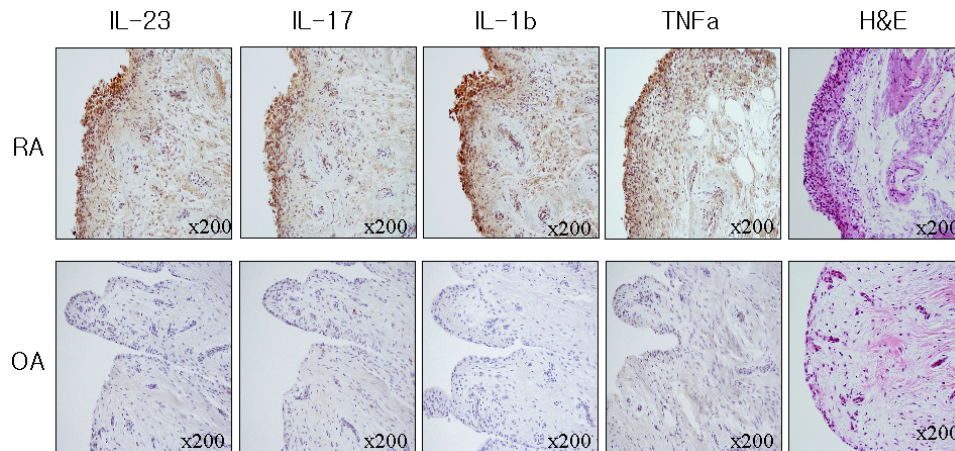


Figure 1. The expression of IL-23, IL-17, IL-1 β and TNF α in RA and OA synovium. Expression levels of IL-23, IL-17, IL-1 β and TNF α in synovium were obtained from RA and OA patients. Expression level of SDF-1 and MIF were detected by immunohistochemical stain. Hematoxylin and eosin-stained section 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.

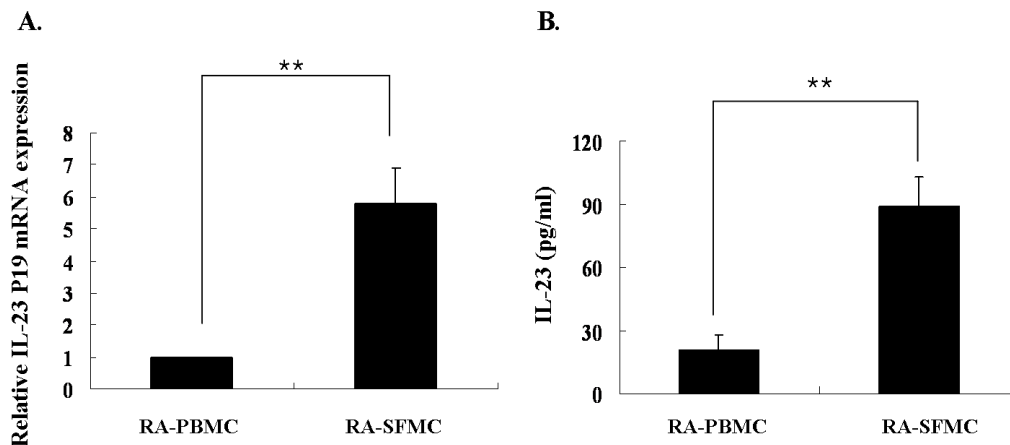


Figure 2. The expression of IL-23 in RA PBMC and SFMC. (A) RA PBMC or SFMC were cultured for 16 hours. Total RNAs were extracted and analyzed by RT-PCR using specific primers for human IL-23p19 cDNA sequences. beta-actin mRNA was used as an internal control. Values represent the means and SEM of 4 experiments. ** $p < 0.01$ compared with the expression of IL-23p19 of the RA-PBMC. (B) The RA PBMC or SFMC were cultured for 48 hours, then, the concentrations of IL-23 in the conditioned media were measured by sandwich ELISA. Values represent the means and SEM of 4 experiments. ** $p < 0.01$ compared with the production of IL-23p19 of the RA-PBMC.

활액 세포 내에서 IL-17과 IL-1 β 에 의한 IL-23p19의 발현 유도 조사

활액 단핵 세포를 분리하여, 세포에 IL-17 (1, 10 ng/ml), IL-1 β (1, 10 ng/ml), TNF- α (1, 10 ng/ml)로 자극하여 이들이 IL-23p19의 발현에 어떠한 영향을 주는지 비교 조사하였다. IL-1 β , TNF- α 와 IL-17에 의해 IL-23p19의 발현이 증가되었으

며, 그 발현은 사이토카인 용량에 의존적으로 IL-23 발현이 증가되었다. 이때 TNF α 보다는 IL-17과 IL-1 β 가 10 ng/ml의 용량으로 자극되었을 때 IL-23p19의 발현이 유의하게 증가되었다(Fig. 3A). IL-17, IL-1 β , TNF- α 이들 사이토카인을 조합하여 자극해 본 결과, IL-23p19의 증가는 IL-17 단독에서보다 IL-1 β 를 함께 자극해주면 IL-1 β 와 TNF- α 를 동시에 넣어준 조건과 함께

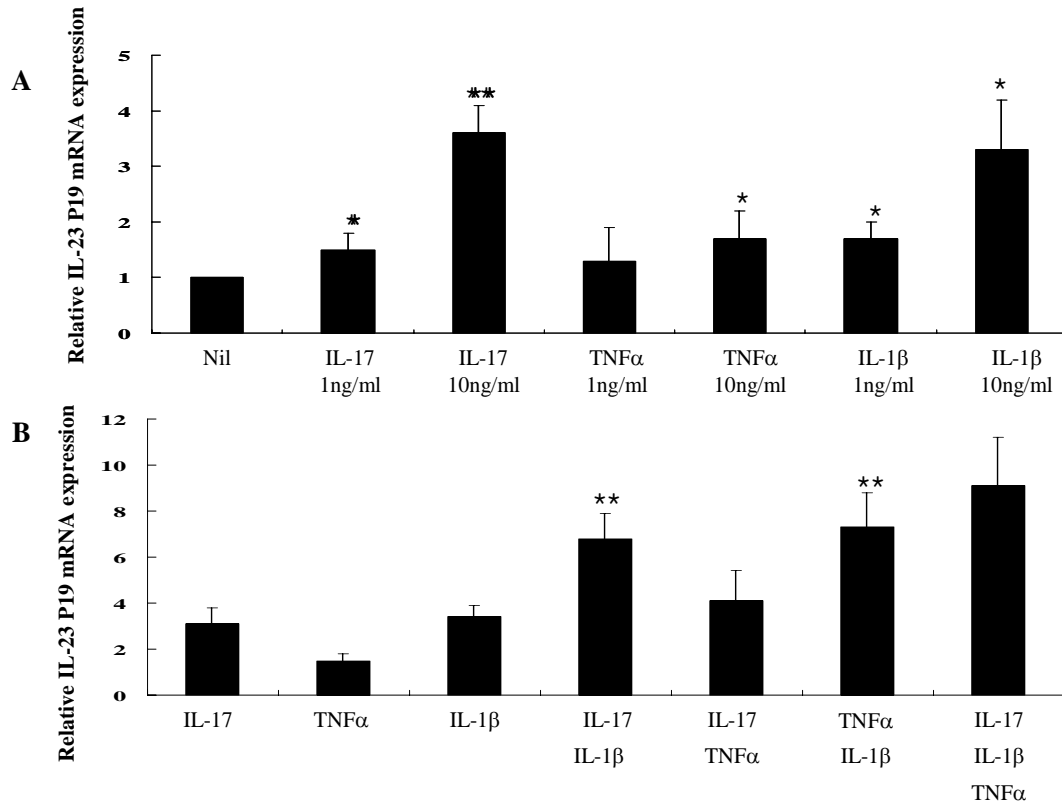


Figure 3. The Effects of IL-17 and IL-1 β on the expression of IL-23p19 mRNA in RA-SFMC. RA-SFMC were cultured in the presence of recombinant human IL-17 (1 ~ 10 ng/ml), IL-1 β (1 ~ 10 ng/ml), or/and TNF α (1 ~ 10 ng/ml) for 16 hours. Total RNAs were extracted and analyzed by RT-PCR using specific primers for human IL-23p19 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 IL-23p19 of the un-stimulated cells (A). ** p <0.01 compared with the production of IL-23p19 of the IL-17 stimulated SFMC (B).

통계적으로 유의하게 IL-23p19 발현이 증가하였다. 하지만 IL-17과 TNF- α 를 조합은 IL-1 β 와 조합 만큼 IL-23p19 발현을 증가시키지 못했다. IL-17, IL-1 β , TNF- α 를 동시에 자극했을 때 2개의 조합을 통해서 증가되었던 IL-23p19의 발현양보다 높게 증가시키지는 못하는 것으로 조사되었다(Fig. 3B).

활액 세포에서 비자기 T세포(non T cell)를 분리하여 IL-23p19 발현 유도 조사

IL-23는 비자기 T 세포와 같은 항원제시세포에서 주로 발현, 분비되는 사이토카인이다. 활막 세포로부터 beed를 이용하여 CD3 T세포를 분리하여 제거한후 비자기 T세포만 획득하여 이들 세포에 IL-17 (1, 10 ng/ml), IL-1 β (1, 10 ng/ml)와 TNF- α (1, 10 ng/ml)를 자극하여 IL-23p19의 발현을 조사하였다. 이러한 비자기 세포 배양에서도 앞서 보였었던 전체 활막 단핵세포에서 보여준 결과(Fig. 3A, B)와 동일하게 IL-17과 IL-1 β 의해 IL-23p19의 발현이 의미있게 증가되었고(Fig. 4A) IL-17과 IL-

1 β 을 동시에 자극했을 때 IL-23p19의 발현이 의미있게 증가됨을 조사하였다(Fig. 4B).

활막 단핵세포에서 IL-17, IL-1 β , TNF- α 이들 사이토카인을 차단하였을 때, IL-23p19의 발현 조사

류마티스관절염 환자 활액 단핵세포를 LPS로 자극하여 세포 활성을 유도한 후, IL-17, IL-1 β , TNF- α 이들의 중화항체를 사+용하여 이들의 신호전달을 차단했을 때 IL-23p19발현과 생성이 조절되는지 조사하였다. 흥미롭게도 LPS 자극을 통해 IL-23p19발현이 활성화된 활액 단핵세포들은 IL-17과 IL-1 β 를 차단하였을 때, IL-23p19의 발현이 통계적으로 유의하게 감소되었으며, 이들 두 개의 사이토카인을 동시에 차단하면 IL-23p19의 발현이 통계적으로 유의하게 더욱 감소됨을 조사하였다(Fig. 5A). 세포 배양액 내에서도 역시 IL-17과 IL-1 β 의 차단에 의해 IL-23p19 분비가 됨을 조사하였다(Fig. 5B).

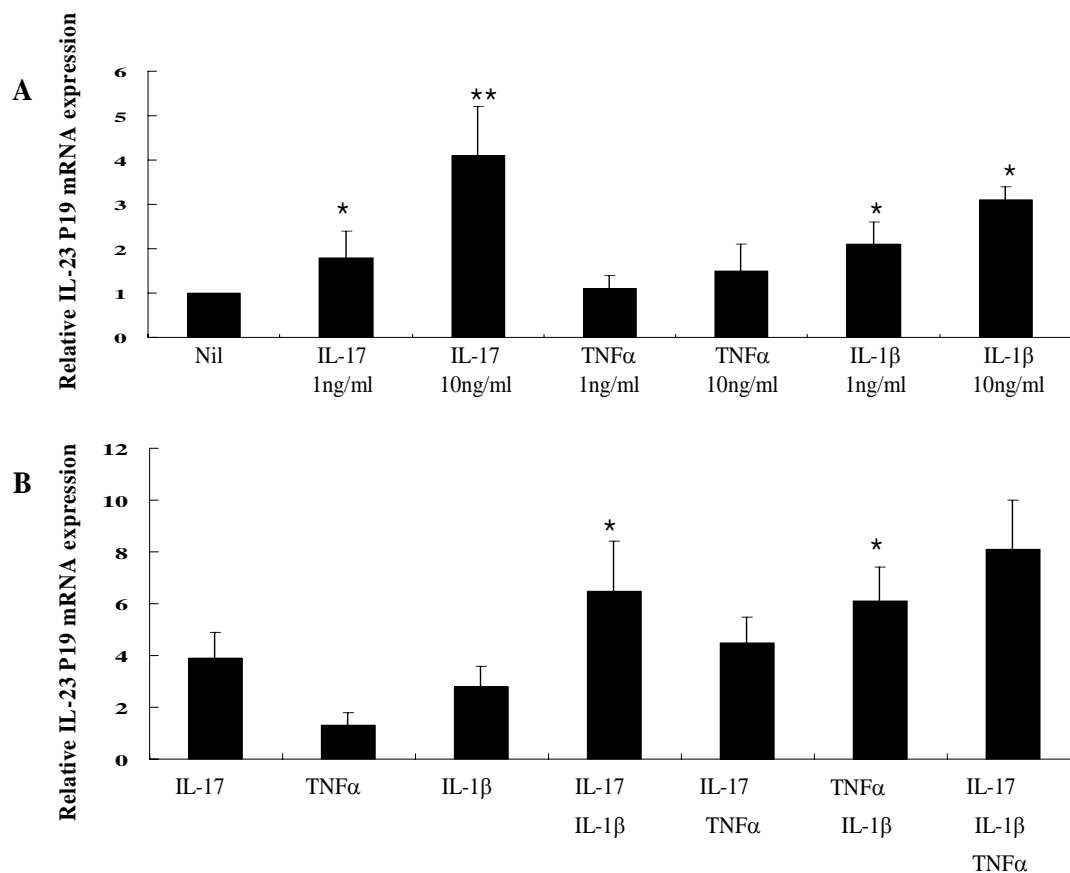


Figure 4. The Effects of IL-17 and IL-1 β on the expression of IL-23p19 mRNA in RA-SFMC non T cells. RA-SFMC non T cells were cultured in the presence of recombinant human IL-17 (1~10 ng/ml), IL- β (1~10 ng/ml), or/and TNF α (1~10 ng/ml) for 16 hours. Total RNAs were extracted and analyzed by RT-PCR using specific primers for human IL-23p19 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 IL-23p19 of the un-stimulated cells (A). ** p <0.01 compared with the production of IL-23p19 of the IL-17 stimulated SFMC (B).

고 찰

IL-12는 IL-12계열의 대표적 사이토카인으로, 미경험 T 세포로부터 IFN- γ 의 생성을 유도하여, Th1세포의 분화와 활성을 유도하는 것으로 알려졌다(14,15). IL-23는 IL-12와 p40 아형을 공유하는 염증성 사이토카인으로 발견되었다. 특히, 류마티스 관절염과 같은 자가면역질환에서 IL-12 보다 IL-23가 병인적 역할로 주목 받고 있는데, 실제로 IL-23가 결핍되면, 류마티스 관절염 모델(Collagen-induced arthritis: CIA)에서 염증과 관절의 파괴가 감소 되었고 질환발달이 억제되는 것으로 조사되었다(30).

본 연구에서는 류마티스관절염 환자의 관절 활막조직에서 염증성 사이토카인인 IL-23, IL-17, IL-1 β , TNF- α 가 퇴행성관절염 보다 증가되어 있음을 확인하였다. 퇴행성 관절염은 류마티스관절염과는 달리 관절에서 환경과 노화에 의해서 연골이 손상되어 발생하는 비 염증성 질환이다(35). 비 염증성 질환이기 때문에 이러한 염증성 사이토카인의 발현이 류마티스관절염에 비해 적은것으로 생각된다. 류마티스관절염 환자의 활막세포에서 IL-23p19의 발현이 말초 혈액 세포 보다 통계적으로 유의하게 증가되었으며, IL-23 단백질 생성 도 활막세포 배양액에서 현저하게 높았다. 류마티스관절염 환자의 활막조직과 활막세포에서 모두 IL-23 발현과 생성이 의미있게 증가됨을 조사하였다. 이러한 염증성 사이토카인 IL-23p19이 환자의 혈액보다 활막 즉 병인 조직과 관련된 부위의 체액에서 증가되어 있는 것은 질환 병인 반응에 관여하는 것을 간접적으로 확인 하는 결과이다. 이러한 사이토카인은 Th17 세포 즉 병인 활성 메모리 T세포의 증식을 유도 할 수 있다.

본 연구에서 IL-23가 IL-1 β 와 TNF- α 같은 염증성 사이토카인과 함께 작용하여 IL-23p19의 발현을 증가시킨다는 것을 확인하였다. IL-17과 IL-1 β 의 조합은 IL-23p19의 발현을 IL-17 단독 자극보다 2배 이상 증가시켰다. IL-17과 TNF- α 의 조합은 IL-23p19의 발현을 IL-17 단독 자극보다 1.5배 이상 증가시켰다. IL-1 β 와 TNF- α 의 조합은 IL-23p19의 발현을 IL-1 β 단독 자극보다 1.5배 이상 증가시켰다. IL-17, IL-1 β , TNF- α 의 조합은 IL-23p19의 발현을 IL-17 단독 자극보다 4배 이상 증가시켰다. 이러한 결과는 IL-17, IL-1 β , TNF- α 가 IL-23p19의 발현을 증가시키는 데에 각각의 역할을 하고 있으며, IL-17과 IL-1 β 의 조합은 IL-23p19의 발현을 가장 많이 증가시킨다는 것을 시사한다.

본 연구에서 IL-23가 IL-1 β 와 TNF- α 같은 염증성 사이토카인과 함께 작용하여 IL-23p19의 발현을 증가시킨다는 것을 확인하였다.

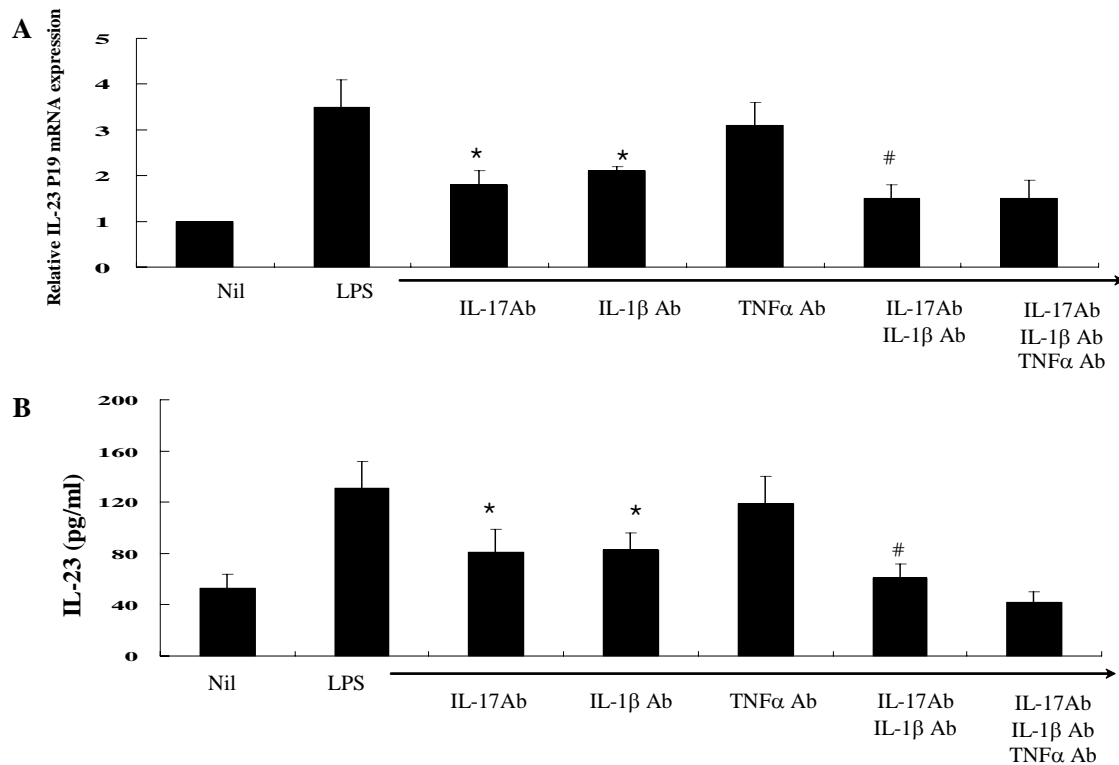


Figure 5. The Effect of IL-17 neutralizing antibody on the LPS induced IL-23 expression and production in RA-SFMC. (A) RA SFMC were cultured with LPS in the presence and absence of IL-17 neutralizing antibody, IL-1 β neutralizing antibody or/and TNF α neutralizing antibody for 16hours. Total RNAs were extracted and analyzed by RT-PCR using specific primers for human IL-23p19 cDNA sequences. beta-actin mRNA was used as an internal control. Values represent the means and SEM of 4 experiments. * $p < 0.05$ compared with the expression of IL-23p19 of the RA-PBMC stimulated with LPS. # $p < 0.05$ compared with the expression of IL-23p19 of the RA-PBMC stimulated with LPS plus IL-17 neutralizing antibody. (B) RA SFMC were cultured with LPS in the presence and absence of IL-17 neutralizing antibody, IL-1 β neutralizing antibody or/and TNF α neutralizing antibody for 48 hours, then, the concentrations of IL-23 in the conditioned media were measured by sandwich ELISA. Values represent the means and SEM of 4 experiments. * $p < 0.05$ compared with the expression of IL-23p19 of the RA-SFMC stimulated with LPS. # $p < 0.05$ compared with the expression of IL-23p19 of the RA-SFMC stimulated with LPS plus IL-17 neutralizing antibody.

인을 통해서 환자의 활액내 세포에서 발현이 증가되는 것을 조사하였고, 흥미롭게도 IL-17에 의해서 IL-23p19의 생성이 현저하게 증가됨을 세포와 세포배양액에서 조사하였다. 이때 IL-17 용량 의존적으로 IL-23 p19 발현이 증가 유도되었고 IL-1 β 와 동시에 자극하면 단독 자극에 비하여 통계적으로 유의하게 IL-23p19발현을 유도하였다. 하지만 TNF- α 는 IL-17과 함께 자극시 이러한 효과는 관찰되지 않았다. 이러한 결과로 Th17 세포가 분화 할 때, IL-23가 필요한 것처럼 IL-23의 발현과 생성에도 Th17세포가 발현하는 IL-17이 작용을 하는것으로 조사되었고 이러한 결과를 통해 IL-23와 IL-17을 세포들에서 상호 양성 피드백 역할을 하는것으로 생각된다. 또한, 대표적 염증성사이토카인인 IL-1 β 역시 IL-17과 IL-23 모두 유도할 수 있고 특히 IL-23 생성에는 IL-17과 동시에 상승 작용을 유도하는 것을 조사하였다. 이러한 IL-17에 의한 IL-23p19의 증가를 T세포를 제외한 비

자기 T세포에서 조사해 본 결과 활액 단핵세포 실험과 유사한 결과를 확인하였다. IL-17이 직접적으로 비자기 세포를 자극하여 IL-23p19의 발현을 유도하는 것과 IL-1 β 와 함께 동시에 자극하면 IL-23p19 발현이 더욱 활성화 되는 것을 조사하였다. 류마티스관절염 환자의 활액세포를 활성화 시키기 위해 LPS로 자극하여 IL-23발현과 생성을 증가 시킨 조건에서 IL-17, IL-1 β , TNF- α 이들사이토카인의 분비를 억제하는 중화항체를 사용하여 세포에 처리하여 IL-23 발현과 생성을 조사하였고 이때 IL-17을 차단하는 항체를 처리하면 활액세포에서 증가되어 있던 IL-23의 발현과 생성이 억제 되었다. 이때 IL-1 β 중화항체와 동시에 세포에 처리하면 IL-23의 발현은 더욱 유의하게 억제되었다.

TNF- α 중화항체 단독과 IL-17과 IL-1 β 중화항체 조합에 TNF- α 중화항체를 추가로 처리하였을 때, IL-23p19의 생성과

발현은 변화가 없었다. 이러한 결과로 TNF- α 는 IL-23p19의 생성은 증가시키지만 IL-17과 함께 동시 상승작용에는 영향을 미치지 않는 것으로 보여진다.

이와 같은 결과들로 볼 때 류마티스관절염환자의 관절내 활액 세포에서 IL-23p19는 IL-17에 의해 유도되며, IL-1 β 와 IL-17는 서로 상호 상승작용이 있어서 IL-23p19의 발현과 생성을 더욱 활성화 시킨다. 이러한 결과로 류마티스관절염 환자의 관절 활액 세포에서 사이토카인 상호작용으로 인해 세포의 활성화와 염증매개 반응이 더욱 가속화 되는 것을 규명하였다. 이들 사이토카인의 체외 기전을 연구하여 류마티스관절염과 같은 자가면역질환의 치료표적 물질 연구에 도움이 될것으로 기대된다.

참고문헌

1. Goldring SR: Pathogenesis of bone and cartilage destruction in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 42;11-16, 2003
2. Harris ED, Jr: Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 322;1277-1289, 1990
3. Miossec P: An update on the cytokine network in rheumatoid arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 16;218-222, 2004
4. Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, Miossec P: Human interleukin-17: a T cell-derived proinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. *Arthritis Rheum* 42;963-970, 1999
5. Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, Tanaka S, Kodama T, Akira S, Iwakura Y, Cua DJ, Takayanagi H: Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med* 203;2673-2682, 2006
6. Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL: Interleukin-23 promotes a distinct CD4T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278;1910-1914, 2003
7. Miossec P: Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. *Arthritis Rheum* 48;594-601, 2003
8. Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK: Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441;235-238, 2006
9. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, Hatton RD, Wahl SM, Schoeb TR, Weaver CT: Transforming growth factor-beta induces development of the T (H)17 lineage. *Nature* 441;231-234, 2006
10. Fantini MC, Rizzo A, Fina D, Caruso R, Becker C, Neurath MF, Macdonald TT, Pallone F, Monteleone G: IL-21 regulates experimental colitis by modulating the balance between T (reg) and Th17 cells. *Eur J Immunol* 37;3155-3163, 2007
11. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM: T (H)-17 differentiation: of mice and men. *Nat Immunol* 8;903-905, 2007
12. Kim KW, Cho ML, Park MK, Yoon CH, Park SH, Lee SH, Kim HY: Increased interleukin-17 production via a phosphoinositide 3-kinase/Akt and nuclear factor kappaB-dependent pathway in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 7;139-148, 2005
13. Starnes T, Robertson MJ, Sledge G, Kelich S, Nakshatri H, Broxmeyer HE, Hromas R: Cutting edge: IL-17F, a novel cytokine selectively expressed in activated T cells and monocytes, regulates angiogenesis and endothelial cell cytokine production. *J Immunol* 167;4137-4140, 2001
14. Brombacher F, Kastelein RA, Alber G: Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends Immunol* 24;207-212, 2003
15. Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA: Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13;715-725, 2000
16. Kim W, Min S, Cho M, Youn J, Min J, Lee S, Park S, Cho C, Kim H: The role of IL-12 in inflammatory activity of patients with rheumatoid arthritis (RA). *Clin Exp Immunol* 119;175-181, 2000
17. Wiekowski MT, Leach MW, Evans EW, Sullivan L, Chen SC, Vassileva G, Bazan JF, Gorman DM, Kastelein RA, Narula S, Lira SA: Ubiquitous transgenic expression of the IL-23 subunit P19 induces multiorgan inflammation, runting, infertility, and premature death. *J Immunol* 166;7563-7570, 2001
18. Frucht DM: IL-23: a cytokine that acts on memory T cells. *Sci STKE* 114;PE1, 2002
19. Belladonna ML, Renauld JC, Bianchi R, Vacca C, Fallarino F, Orabona C, Fioretti MC, Grohmann U, Puccetti P: IL-23 and IL-12 have overlapping, but distinct, effects on murine dendritic cells. *J Immunol* 168;5448-5454, 2002
20. Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, To W, Wagner J, O'Farrell AM, McClanahan T, Zurawski S, Hannum C, Gorman D, Rennick DM, Kastelein RA, de Waal Malefyt R, Moore KW: A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta2 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol* 168;5699-5708, 2002
21. Broberg EK, Setälä N, Erälinna JP, Salmi AA, Røytä M, Hukkanen V: Herpes simplex virus type 1 infection induces upregulation of interleukin-23 (p19) mRNA expression in trigeminal ganglia of BALB/c mice. *J Interferon Cytokine Res* 22;641-651, 2002
22. Zhang Z, Andoh A, Yasui H, Inatomi O, Hata K, Tsujikawa T, Kitoh K, Takayanagi A, Shimizu N, Fujiyama Y: Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha upregulate interleukin-23 subunit p19 gene expression in human colonic subepithelial myofibroblasts. *Int J Mol Med* 15;79-83, 2005
23. Sheibanie AF, Tadmori I, Jing H, Vassiliou E, Ganea D: Prostaglandin E2 induces IL-23 production in bone marrow-derived dendritic cells. *FASEB J* 18;1318-1320, 2004
24. Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD: Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cy-

- tokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421;744-748, 2003
25. Trinchieri G: Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 3;133-146, 2003
26. Lee E, Trepicchio WL, Oestreicher JL, Pittman D, Wang F, Chamian F, Dhodapkar M, Krueger JG: Increased expression of interleukin 23 p19 and p40 in lesional skin of patients with psoriasis vulgaris. *J Exp Med* 199;125-130, 2004
27. Ohshima S, Saeki Y, Mima T, Sasai M, Nishioka K, Nomura S, Kopf M, Katada Y, Tanaka T, Suemura M, Kishimoto T: Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 95;8222-8226, 1998
28. Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ: IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201;233-240, 2005
29. Hue S, Ahern P, Buonocore S, Kullberg MC, Cua DJ, McKenzie BS, Powrie F, Maloy KJ: Interleukin-23 drives innate and T cell-mediated intestinal inflammation. *J Exp Med* 203; 2473-2483, 2006
30. Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, Joyce-Shaikh B, Stumhofer JS, McClanahan T, Blumenschein W, Churakovsa T, Low J, Presta L, Hunter CA, Kastelein RA, Cua DJ: Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 116;1317-1326, 2006
31. Hoy MD, O'Donnell JL, Hart DN: Dual CD45RA, CD45RO positive T-lymphocytes within rheumatoid arthritic joints. *Pathology* 25;167-173, 1993
32. Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, Jolicoeur FC, He Y, Zhang M, Mineau F, Pelletier JP: IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* 160;3513-3521, 1998
33. Chabaud M, Page G, Miossec P: Enhancing effect of IL-1, IL-17, and TNF-alpha on macrophage inflammatory protein-3alpha production in rheumatoid arthritis: regulation by soluble receptors and Th2 cytokines. *J Immunol* 167;6015-6020, 2001
34. Kim HR, Cho ML, Kim KW, Juhn JY, Hwang SY, Yoon CH, Park SH, Lee SH, Kim HY: Up-regulation of IL-23p19 expression in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts by IL-17 through PI3-kinase-, NF-kappaB- and p38 MAPK-dependent signalling pathways. *Rheumatology* 46;57-64, 2007
35. Felson DT, Naimark A, Anderson J, Kazis L, Castelli W, Meenan RF: The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham osteoarthritis study. *Arthritis Rheum* 30;914-918, 1987