

결핵균에 감염된 숙주 면역세포의 저산소 조건 배양 시 발현되는 유전자군 발굴 및 기능분석

충남대학교 의과대학 미생물학교실¹, 건양대학교 의과대학 미생물학교실², 호흡기 내과³
이지숙^{1,2,*} · 오재희^{1,*} · 손지웅³ · 송창화¹ · 김화중¹ · 박정규¹ · 백태현² · 조은경¹

Identification and Functional analysis of Gene Expression in *Mycobacterium tuberculosis*-infected Human Monocytic Cells Under Hypoxic Conditions

Ji-Sook Lee^{1,2,*}, Jae-Hee Oh^{1,*}, Ji Woong Son³, Chang-Hwa Song¹, Hwa-Jung Kim¹,
Jung-Kyu Park¹, Tae-Hyun Paik² and Eun-Kyeong Jo¹

¹Department of Microbiology, College of Medicine, Chungnam National University, Daejeon 301-747;

²Department of Microbiology, and ³Internal Medicine, College of Medicine,
Konyang University, Daejeon 302-718, Korea

Received : March 28, 2007

Accepted : May 5, 2007

Mycobacterium tuberculosis-induced granulomatous lesions, particularly those undergoing central caseation, are known as hypoxic. To analyze the host genes associated with hypoxic conditions from cells infected with *M. tuberculosis*, we performed GeneChip analyses on mRNA from *M. tuberculosis* H37Rv-treated human monocytic THP-1 cells cultured in oxygen-depleted status for 18 h. The expression of 99 genes was altered, including those involved in intracellular signaling, energy production, and protein metabolism, as revealed by stringent microarray data analysis. Most notably, mRNA expression of chemokine macrophage inflammatory protein 3alpha/CC chemokine ligand 20 (CCL20) was significantly up-regulated in *M. tuberculosis*-infected cells under hypoxic conditions. We further analyzed the CCL20 expression in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and monocyte derived macrophages (MDMs) from healthy controls and TB patients. A comparative analysis has revealed that the mRNA and protein expression of CCL20 were prominently up-regulated in PBMCs, and MDMs from TB patients, compared with healthy controls. Collectively, these data show that the gene expression of CCL20 was up-regulated in *M. tuberculosis* H37Rv-infected human monocytic THP-1 cells cultured in hypoxic conditions. In addition, the production of CCL20 is substantially increased in cells from TB patients than in healthy controls, suggesting an important role of CCL20 in the immunopathogenesis during TB infection.

Key Words: *Mycobacterium tuberculosis*, Hypoxic, CCL20, 30-kDa antigen

*These two authors equally contributed to this work

*교신저자: 조은경. 301-747, 대전광역시 중구 문화1동 6번지, 충남대학교 의과대학 미생물학교실
Phone: +82-42-580-8243, Fax: +82-42-585-3686, e-mail: hayoungj@cnu.ac.kr

**이 논문은 2005년도 충남대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었음.

서 론

결핵을 유발하는 병원체인 *Mycobacterium tuberculosis*는 일차적으로 호흡기를 통해 전염된다. 대부분의 기관 (organ) 들이 결핵균에 감염될 수 있지만 결핵은 일반적으로 폐에서 유발된다. 통계적으로 매년 약 200만 명의 사람들이 결핵에 의해 사망하고 800만 명 정도의 새로운 감염자가 발생하는 것으로 알려져 있다 (10).

결핵균에 감염된 사람들 중에서 단지 5~10%만이 결핵으로 발병을 한다고 알려져 있다. 나머지 90%는 PPD (purified protein derivative) 접종을 통한 투베르쿨린 (tuberculin) 피부 반응 검사 등에 양성반응을 나타내지만 임상적인 질병의 증상이 나타나지 않는다. 이러한 임상적 잠복기는 균을 탐식한 대식세포와 T 림프구의 지속적인 면역반응에 의해 육아종 (granuloma)을 형성하여 결핵균이 스스로 휴지기에 돌입한 상태를 말한다 (12). 결핵균에 잠복감염된 숙주는 일차적으로 육아종을 형성하여 결핵균의 성장을 제한하고 다른 장소로의 전염을 막는다. 육아종은 결핵균에 감염된 조직 주변으로 CD4+와 CD8+ T 림프구와 같은 작동세포 (effector cell)와 대식세포 등의 면역세포들이 모여들어 생성되는 조직의 염증성 병변이다 (13,28). 일반적으로 육아종 내 환경은 산소가 거의 없고 높은 농도의 이산화탄소를 포함하여 결핵균이 산소와 접촉할 수 있는 확률이 적은 것으로 알려져 있을 뿐 아니라 육아종을 형성한 면역세포들이 항균물질을 방출하여 결핵균이 생존하기 어렵다. 이렇게 생존이 어려운 환경에 처한 결핵균은 정지기 (stationary phase)에 들어가게 되고 non-replicating persistent (NRP) 상태가 된다 (30). 이와 같이 결핵균이 숙주에 감염되어 이를 처리하려는 면역반응이 일어났을 때 스스로 무활동 상태로 들어간 것을 두고 결핵균의 휴지기 또는 잠복감염 (latent or dormant state)이라고 한다. 휴지기 상태의 결핵균은 병을 전염시키지 않으며 건강에 위협을 주지 않는다. 그러나 만약 숙주의 면역반응체계가 불균형을 이루게 되면 잠복감염되어 있던 결핵균이 재활성화된다. 재활성화된 결핵균은 복제되고 성장하여 숙주의 폐 조직에 손상을 주게 되고 결핵을 재발시킨다 (13). 따라서 대식세포 내에서 결핵균이 생존하기 위해 필요한 내성 능력을 갖는데 관련하는 현상을 연구하는 것이 잠복 결핵 치료 연구에 필수적이다.

현재까지 결핵균의 휴지기 상태에 대한 연구는 많이 진행되어 왔으나, 저자들이 조사한 바에 의하면 육아종 환경과 유사한 저산소 분압 조건에서 숙주세포가 발현하는 유전자 혹은 단백질에 대한 연구는 거의 보고되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 저산소 분압 조건에서 숙주세포가 발현하는

단백질을 발굴하고 그 기능을 규명하고자 하였다. 정상적인 산소 분압 조건과 저산소 분압 조건에서 결핵균 감염 18시간 후 숙주세포로부터 mRNA를 분리하여 cDNA microarray 분석을 시행하였다. 그 결과 저산소 분압 조건에서 유의하게 증가 혹은 감소되는 각각 57종과 38종의 유전자군을 확인하였다. 특히 저산소 분압 조건에서 chemokine (CC-motif) ligand 20 (CCL20; macrophage inflammatory protein-3 α , MIP-3 α)/CCR6가 유의하게 증가됨을 알 수 있었다.

따라서 본 논문에서는 결핵에서 CCL20의 역할을 비교 분석하기 위해 건강인 및 폐결핵 환자 말초혈액 단핵구 (PBMC; peripheral blood mononuclear cell) 및 단핵구 유래 대식세포 (MDM; monocyte derived macrophage)를 대상으로 CCL20의 생성 발현을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

1. 결핵균의 준비 및 결핵균 30-kDa 항원의 분리정제

감염 실험에 이용할 표준 균주인 *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294)는 송 등 (27)의 방법에 따라 준비하였다. Sauton 합성 배지에서 37°C, 6주 내지 8주 동안 표면 배양하여 상온에서 5,000 rpm으로 30분간 원심 분리한 후 각각의 균체를 수집하고 수집한 균체는 10% Middlebrook oleic acid albumin dextrose catalase (OADC; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)가 첨가된 7H9 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 액체 배지로 부유시킨 후 글리세롤을 최종 30% (v/v) 되도록 가하여 1.5 ml tube에 각각 1.0 ml씩 분주하여 -70°C에서 보관하였다. 실험에 사용할 때는 보관된 각 균액 0.5 ml를 7H9 액체 배지에 접종하여 10일 내지 14일 동안 37°C에서 배양하여 정지기에 도달한 균체를 상온에서 5,000 rpm으로 30분간 원심 분리하고 PBS로 약 10⁷/ml의 농도로 조정하여 현탁시켰다. 균체 덩어리들은 vortex mixer로 5분간 과격하게 혼합 처리하여 부유 상태로 만들어 주었고, 여전히 남아있는 균의 미세 덩어리는 균액을 10분간 방치하여 생긴 상층액을 25-gauge 주사기로 10회 이상 통과시키어서 단일세균 부유액으로 만들어 사용하였다.

결핵균 30-kDa 항원의 분리 및 정제는 이 등의 보고 (21)와 동일한 방법으로 수행하였으며 최종적으로 단백질의 농도는 bovine serum albumin을 표준으로 하여 BCA Protein Assay Kit (Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA)로 측정하였다.

2. 사람 대식세포주 THP-1 세포의 준비 및 결핵균의 감염

사람 대식세포주인 THP-1 (ATCC TIB-202) 세포를 열처리

한 10% 우태아 혈청 (fetal bovine serum; Hyclone, Logan, UT, USA)과 1% 항균제 (100 U/ml penicillin G, 100 U/ml streptomycin sulfate, 0.25 g/ml amphotericin B)가 함유된 RPMI 1640 배양액을 이용하여 37°C로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 계대 배양하였다. 적당량의 세포가 준비된 후 5×10⁵/ml씩 48-well plate (Nunc Roskilde, Denmark)에 0.5 ml 분주하고 4 nM PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate; Sigma, St. Louis, Mo, USA)로 48시간 동안 처리하여 부착을 유도하였다. 부착된 세포는 무혈청, 무항생제 배양액으로 교환하여 24시간 동안 방치한 후 결핵균 *M. tuberculosis* H37Rv와 *M. tuberculosis* H37Ra를 MOI 1이 되도록 감염시키고, 37°C로 유지되는 5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 감염시켰다. 감염 직후 미리 37°C에서 보관중인 RPMI 배지로 2회 세척한 다음, 200 µg/ml의 amikacin (Sigma)이 첨가된 신선한 10%의 human AB⁺ serum (Sigma)의 RPMI 배지로 2시간 동안 처리하여 세포 외의 결핵균들을 사멸하였다. 이 후 20 µg/ml의 amikacin이 들어있는 10% human AB⁺ serum의 RPMI 배지에서 18시간 동안 세포를 각각 정상 산소 분압 (20% O₂)과 저산소 분압 (2% O₂) 조건에서 배양하였다. 저산소 분압 조건은 CO₂ 배양기 (water jacketed incubator; Forma Scientific, Marietta, OH, USA)를 이용하여 질소가스로 산소 분압을 조절하여 배양하였다.

3. cDNA microarray 분석

결핵균이 감염된 THP-1 세포를 정상 산소 분압 및 저산소 분압 조건에서 각각 18시간 동안 배양시키고, 각 조건에서 cDNA microarray 분석을 실시하였다.

1) THP-1 세포주에서 RNA의 추출

각 조건의 THP-1 세포주에서 RNeasy kit (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 total RNA를 추출하였고, 260 nm와 280 nm의 absorbance에서 RNA의 정성 및 정량을 실시하였다.

2) cDNA probe 준비와 microarray hybridization

DNA chip은 지노믹트리 사 (GenomicTree, Inc., Daejeon, Korea)의 Human cDNA 17k를 사용하였다. 먼저 total RNA 10 µg은 Cy3 또는 Cy5-dUTP (NEN Life Sciences, Inc., Boston, MA, USA)를 이용하여 42°C에서 2시간 역전사시켰다. 저산소 분압 조건에서 배양된 THP-1 세포의 RNA에 대하여 Cy5-dUTP를 이용하여 형광 labeling된 cDNA를 제조하였고, 정상 산소 분압 조건에서 배양된 THP-1 세포의 RNA에 대하여 Cy3-dUTP를 labeling하였다. 각각의 cDNA는 hybridization solution으로 부유시킨 후 17,448개의 유전자들이 삽어진 microarray에 42°C에서 12 내지 16시간 hybridization시켰다. microarray에 결합하지 않은 cDNA는 세척과정으로 제거하

였고, 결합한 probe를 분석하여 유전자 발현의 정도를 비교하였다.

3) Array 데이터 분석

Hybridization image는 GenePix Pro 6.0 (Axon Instruments, Union City, CA, USA)을 이용하여 분석하였다. 각 spot의 평균형광강도 (average fluorescence intensity)가 계산되었고, local background는 제외되었다. 모든 정보의 표준화와 유전자 발현의 분석은 GeneSpring 7.3 (Agilent Technology, Santa Clara, CA, USA)프로그램을 사용하여 수행되었고, microarray 과정에서 systematic variation을 보정하기 위하여 intensity-dependent normalization (LOWESS; locally weighted scatterplot smoothing)을 시행하였다. 유전자의 functional annotation은 Gene OntologyTM Consortium (<http://www.geneontology.org/index.shtml>)에 따라 실시되었다.

4. 실험대상

초치료 결핵군 (16명)은 건양대학병원과 충남대학병원에 내원하여 도말검사 및 배양검사 결과가 양성으로 판정되어 폐결핵으로 확진된 환자로 항결핵제 치료 후 1개월 이내의 환자이고, 난치 결핵군 (7명)은 국립목포결핵병원에 입원하여 2년 이상 항결핵 치료를 받는 환자로 구성하였다.

5. 말초혈액 단핵구의 분리 및 단핵구 유래 대식세포의 분화

Heparin (25,000 IU, 중외제약, Korea)으로 전 처리한 주사기로 정맥혈을 채혈하여 동량의 Ficoll-Paque Plus (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) 위에 조심스럽게 중첩한 후 상온에서 2,000 rpm으로 20분간 원심 분리하여 백혈구층 (buffy coat)을 수집하였다. 이 후 PBS로 세척하고 최종적으로 완전 배양액 (complete RPMI)으로 1×10⁶/ml의 농도로 부유하여 말초혈액 단핵구를 준비하였다. 단핵구 유래 대식세포는 2×10⁶/ml의 말초혈액 단핵구를 37°C에서 1시간 동안 부착시켜서 부착된 세포만을 모아 0.2 ng/ml GM-CSF (granulocyte/macrophage-colony stimulating factor; R&D Systems, Minneapolis, MI, USA)로 5일간 배양시켜서 사용하였다. 상기 분리한 말초혈액 단핵구와 단핵구 유래 대식세포에 결핵균 30-kDa 항원을 자극한 후 6시간에 세포를 수집하여 total RNA를 분리하였고, 18시간에 상층액을 수집하여 -70°C에서 보관 후 CCL20 사이토카인 측정에 사용하였다. 세포 자극의 양성 대조군으로 LPS (Sigma)를 사용하였다.

6. 역전사-중합효소 연쇄반응 (RT-PCR)에 의한 cathepsin D 및 CCL20 mRNA의 발현

결핵균을 감염시키어 정상 산소 분압과 저산소 분압에서

Table 1. Down-regulated genes in THP-1 cells infected with *M. tuberculosis* H37Rv under hypoxic conditions

Genbank accession no.	Symbol	Name of gene	Fold change ^a
1. Binding			
R43015	SF3A3	Splicing factor 3a, subunit 3, 60kDa	2.14
AA047478	CORO1A	Coronin, actin binding protein, 1A	2.57
AA281733	EIF1AX	Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-linked	2.30
AA460286	GNG10	Guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 10	2.10
AA133577	SNRPG	Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide G	2.57
W72693	HNRPAB	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	2.92
AA454585	SFRS2	Splicing factor, arginine/serine-rich 2	2.31
AA453749	HDGF	Hepatoma-derived growth factor	2.82
AA464731	S100A11	S100 calcium binding protein A11 (calgizzarin)	2.02
AA598526	HIF1A	Hypoxia-inducible factor 1, alpha subunit	3.41
AW075424	SFRS3	Splicing factor, arginine/serine-rich 3	2.60
AA086471	S100A8	S100 calcium binding protein A8 (calgranulin A)	5.78
AW087572	CALM2	Calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta)	2.65
2. Catalytic activity			
T72398	TDO2	Tryptophan 2,3-dioxygenase	3.58
AW028938	PPM1B	Protein phosphatase 1B (formerly 2C)	4.23
H65395	PSME2	Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 2 (PA28 beta)	2.38
AA863149	PSMA7	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 7	2.01
T71606	HMOX1	Heme oxygenase (decycling) 1	2.17
AI375353	SGK	Serum/glucocorticoid regulated kinase	2.21
N20475	CTSD	Cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)	7.23
AI361530	ACSL1	Acyl-CoA synthetase long-chain family member 1	2.55
AA708298	ATP5B	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex	2.54
AA160913	PDE9A	Phosphodiesterase 9A	2.39
AI828190	PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor	2.15
AW087572	CALM2	Calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta)	2.65
AW078798	UBB	Ubiquitin B	2.38
3. Chaperone activity			
AA448396	HSPE1	Heat shock 10 kDa protein 1 (chaperonin 10)	2.40
AW075457	CCT3	Chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma)	2.70
AW004895	HSPD1	Heat shock 60 kDa protein 1 (chaperonin)	3.40
4. Defense immunity protein activity			
AA865464	LY6E	Lymphocyte antigen 6 complex, locus E	2.35
H29485	SSB	Sjogren syndrome antigen B (autoantigen La)	2.13
AI362062	NOVA1	Neuro-oncological ventral antigen 1	2.06
AA775355	XRCC5	X-ray repair complementing defective repair in CHO cells 5	2.26
AW075443	G22P1	Thyroid autoantigen 70 kDa (Ku antigen)	2.25

^a The indicated values represent the ratio of normoxic/hypoxic signals. A mean ratio ≥ 2.0 refers to a decrease in hypoxic relative to normoxic expression.

Table 1. Down-regulated genes in THP-1 cells infected with *M. tuberculosis* H37Rv under hypoxic conditions

Genbank accession no.	Symbol	Name of gene	Fold change ^a
5. Signal transducer activity			
AW058480	LBR	Lamin B receptor	2.47
AA133212	NCOA4	Nuclear receptor coactivator 4	2.21
AI828190	PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor	2.15
6. Transporter activity			
H85355	ATP2A	ATPase, Ca ⁺⁺ transporting, cardiac muscle, slow twitch 2	2.26
AI815076	2SLC7A7	Solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter)	2.17
R52654	CYCS	Cytochrome c, somatic	2.99
AA598759	PGD	Phosphogluconate dehydrogenase	2.27
AI969670	LDHB	Lactate dehydrogenase B	2.68
AA708298	ATP5B	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex	2.54
AA865265	CYCS	Cytochrome c, somatic	2.47
AA463492	CYBB	Cytochrome b-245, beta polypeptide	2.07
7. Others			
AA608568	CCNA2	Cyclin A2	2.65
H99170	CALR	Calreticulin	2.70
AA699697	TNF	Tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	2.02
AA644088	CTSC	Cathepsin C	2.00
AA406020	G1P2	Interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-15K)	2.13
AA600177	CALR	Calreticulin	2.08
AA489087	KPNA2	Karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)	3.82
W73874	CTSL	Cathepsin L	2.70
AW087897	OK/SW-cl.56	Beta 5-tubulin	2.22
AW071125	PRDX1	Peroxiredoxin 1	3.39
W73144	LCPI	Lymphocyte cytosolic protein 1 (L-plastin)	2.42
N90109	NCL	Nucleolin	4.84

배양된 THP-1 세포 ('재료 및 방법' 2항)와 결핵균 항원 30-kDa 항원을 자극한 말초혈액 단핵구 ('재료 및 방법' 5항)로부터 total RNA를 추출하였다. Total RNA의 추출은 RNeasy kit (Qiagen)를 이용하였으며 역전사 반응에 의하여 cDNA를 만들고 PCR에 의하여 DNA를 증폭하였다. cDNA는 분리해 낸 total RNA와 oligo-dT를 AccuPower RT Premix (Bioneer, Daejeon, Korea)에 첨가한 뒤 총 반응액이 50 µl가 되도록 nuclease free water를 가한 후 42°C에서 1시간 반응시켜 얻었다. 이렇게 얻어진 cDNA 중 2 µl를 취하여 각각 cathepsin D, CCL20 및 GAPDH cDNA에 특이적인 oligonucleotide primer들 (cathepsin D, caa cag cga caa gtc cag c와 ctg aat cag cgg cac ggc; CCL20, atg tgc tgt acc aag agt ttg와 tta cat gtt ctt gac ttt ttt act gag gag; GAPDH, cat ctt cca gga ggc aga와 ctg ctt cac cac ctt ctt

gat)을 이용하여 PCR을 시행하였다. PCR 산물은 ethidium bromide를 첨가한 1.2% agarose gel에서 전기영동을 실시하여 DNA band의 위치를 확인하였다. Standard marker는 Invitrogen (Carlsbad, CA, U.S.A.)에서 제조한 100 bp DNA ladder를 사용하였다.

7. ELISA를 이용한 CCL20 사이토카인 측정

결핵균 30-kDa 항원으로 자극한 후 18시간 동안 배양된 말초혈액 단핵구와 단핵구 유래 대식세포 배양액의 상층액을 원심 분리하여 얻은 다음 CCL20 ELISA set (R&D Systems)를 이용하여 상층액 속의 사이토카인을 측정하였다.

Table 2. Up-regulated genes in THP-1 cells infected with *M. tuberculosis* H37Rv under hypoxic conditions

Genbank accession no.	Symbol	Name of gene	Fold change ^a
1. Binding			
AA936135	Gemin7	Gem (nuclear organelle) associated protein 7	2.40
AA278764	ZNF406	Zinc finger protein 406	3.24
AI800882	NRL	Neural retina leucine zipper	2.41
AA457153	ZNF282	Zinc finger protein 282	2.09
2. Catalytic activity			
AA644211	PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2	6.93
AA459292	CKS1B	CDC28 protein kinase regulatory subunit 1B	2.74
AI961583	MAPK10	Mitogen-activated protein kinase 10	2.15
AA496013	NEK4	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 4	2.05
R61229	GATM	Glycine amidinotransferase	3.57
AA427725	CPZ	Carboxypeptidase Z	2.10
AA481562	DARS	Aspartyl-tRNA synthetase	2.07
AA457671	P4HA1	Procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase	4.35
AA630620	PIK3R4	Phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 4, p150	2.59
AA457700	SCD	Stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	3.34
AA279533	HMGCS1	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	3.61
AA461478	RNGTT	RNA guanylyltransferase and 5'-phosphatase	2.04
AA866043	CBS	Cystathionine-beta-synthase	2.01
N63567	PDK3	Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 3	2.00
AI335255	NEK6	NIMA (never in mitosis gene a)-related kinase 6	2.05
3. Cell adhesion molecule			
AA922832	ICAM3	Intercellular adhesion molecule 3	2.13
4. Signal transducer activity			
AA453774	RGS16	Regulator of G-protein signalling 16	4.95
T62636	CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	3.06
AA017544	RGS1	Regulator of G-protein signalling 1	5.08
AI380755	PVR	Poliovirus receptor	2.08
5. Transcription regulator activity			
AI418194	SOX21; SOX25LD	Homo sapiens cDNA clone IMAGE: 2105121 3', mRNA sequence	2.25
6. Transporter activity			
AA453467	LDHC	Lactate dehydrogenase C	2.22
AA157955	SC4MOL	Sterol-C4-methyl oxidase-like	2.40
AI160757	KCNJ10C	Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 10	2.73

^a The indicated values represent the ratio of hypoxic/normoxic signals. A mean ratio ≥ 2.0 refers to an increase in hypoxic relative to normoxic expression.

Table 2. Up-regulated genes in THP-1 cells infected with *M. tuberculosis* H37Rv under hypoxic conditions

Genbank accession no.	Symbol	Name of gene	Fold change ^a
7. Others			
AI285199	CL20	Chemokine (C-C motif) ligand 20	5.54
AA857944	CSPG2	Chondroitin sulfate proteoglycan 2 (versican)	7.76
AA450123	ENO2	Enolase 2 (gamma, neuronal)	4.90
AI951114	ALDOC	Aldolase C, fructose-bisphosphate	4.43
AI656802	OLFM1	Olfactomedin 1	2.12
AA872001	ANXA6	Annexin A6	2.21
AA620859	SSPN	Sarcospan (Kras oncogene-associated gene)	2.01
AI362949	SYN2	Synapsin II	2.36
AI056417	MSLN	Mesothelin	2.12
AI015641	SDC1	Syndecan 1	2.27

결 과

1. 저산소 조건에서 결핵균에 감염된 대식세포주의 유전자 발현

결핵균이 감염된 granulomatous lesion에서 대식세포의 환경과 유사한 저산소 조건을 조성하여 *M. tuberculosis* H37Rv에 감염된 THP-1 대식세포를 배양하고 mRNA를 분리하였다. 정상 산소 조건 및 저산소 조건에서 각각 발현되는 유전자는 cDNA microarray를 통하여 분석하였다. 그 결과 저산소 조건에서 배양된 결핵균 감염 THP-1 세포에서 57종의 유전자의 발현은 억제되었고, 38종의 유전자의 발현은 증가하였다 (Table 1과 Table 2).

발현이 감소된 유전자는 크게 기능별로 결합 (binding), 촉매활성 (catalytic activity), chaperone 활성, 방어면역에 관련된 단백질활성 (defense immunity protein activity), 신호변환활성 (signal transducer activity), 전달체활성 (transporter activity) 및 미분류 (unclassified) 등으로 분류되었다. 흥미롭게도 일종의 단백질 분해효소인 cathepsin D (lysosomal aspartyl protease)는 정상 산소 조건에서 배양되었을 때에 비해 저산소 조건에서 7.23배 감소하여 가장 크게 발현이 감소한 유전자로 나타났다 (Table 1).

발현이 증가된 유전자는 기능별로 결합 (binding), 촉매활성 (catalytic activity), 세포부착 (cell adhesion molecule), 신호변환활성 (signal transducer activity), 전사조절활성 (transcription regulator activity), 전달체활성 (transporter activity) 및 미분류 (unclassified) 등으로 분류되었다. 이들 중에서 면역학적으로 의미 있는 단백질로 추정되는 CCL20 케모카인과 그의

상응하는 수용체인 CXCR4의 유전자는 각각 5.54배와 3.06배 발현이 증가하였다. 이들 단백질의 결핵발병과 관련된 기능과 역할은 아직까지 보고된 바 없다.

Table 1과 2에 나타난 유전자들은 그 기능이 완전히 알려지지 않았지만, 이들 유전자의 일부는 휴지기 상태의 결핵균에 대한 숙주의 방어면역 혹은 면역병리기전에 깊은 상관관계가 있을 것으로 생각된다.

2. THP-1 세포에서 산소 조건에 따른 cathepsin D 및 CCL20의 mRNA 발현

DNA microarray 결과 Table 1과 2에서 보는 바와 같이 결핵균 감염 시 저산소 조건 배양에 의한 대식세포 유래 cathepsin D의 발현은 7.23배 감소되었는데 반해, CCL20의 발현은 5.54배로 매우 크게 증가되었다. 이와 유사한 결과는 저산소 조건의 단핵세포에서 정상 산소 조건보다 CCL-20 발현이 7.4배 증가되어 새로운 저산소 유도가능 유전자 (hypoxia-inducible gene)로 지목되었다는 Bosco 등의 보고와 일치하는 부분이다 (2). 따라서 대식세포에서의 산소 조건에 따른 결핵균 유도 cathepsin D와 CCL20의 mRNA 발현여부를 조사하였다. 병원성 결핵균 (*M. tuberculosis* H37Rv)과 비병원성 결핵균 (*M. tuberculosis* H37Ra)을 THP-1 세포에 각각 감염시키고, 정상 산소 조건과 저산소 조건에서 18시간 배양하였다. 그리고 병원성 결핵균과 비병원성 결핵균 감염에 의한 cathepsin D와 CCL20 mRNA의 발현 정도를 RT-PCR을 통하여 확인하였다. 대식세포에 의한 포식작용 (phagocytosis)의 대조군으로 bead를 사용하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 cathepsin D mRNA는 결핵균 감염과 무관하게 모든 조건에서 발현되었고, 저산소 조건에서의 발현도 정상적인 산소

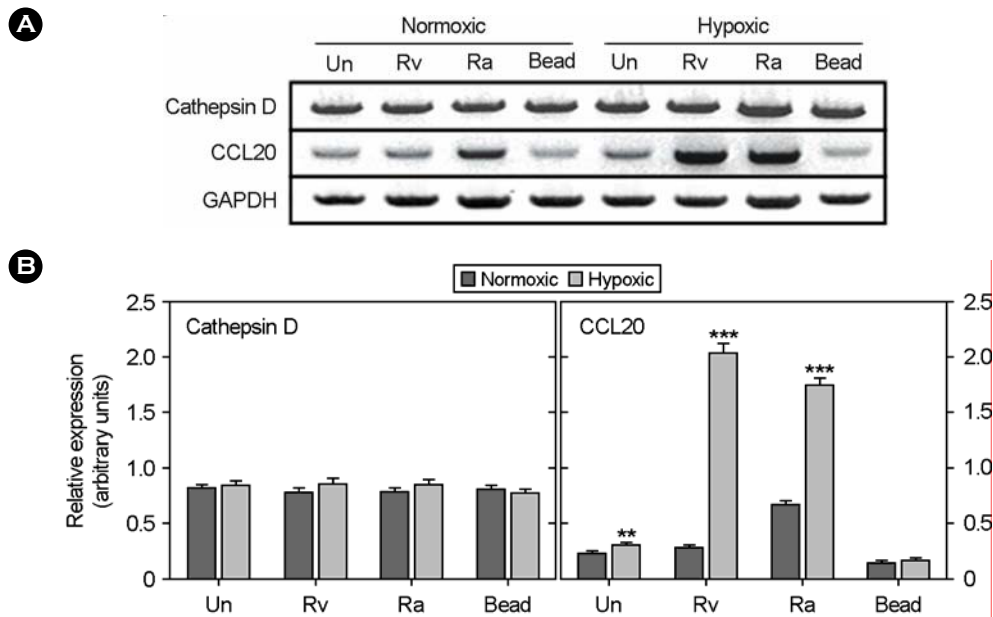


Figure 1. Comparative analysis of human cathepsin D and CCL20 mRNA expression in *M. tuberculosis*-infected THP-1 cells under normoxic and hypoxic conditions. **(A)** RT-PCR analysis was used to determine the differential expression of cathepsin D and CCL20 genes in THP-1 cells cultured under normoxic and hypoxic conditions. normoxic, aerobically incubated (20% O₂); Hypoxic, incubated in hypoxic conditions (2% O₂); Un, unstimulated. Rv, *M. tuberculosis* H37Rv-infected; Ra, *M. tuberculosis* H37Ra-infected. **(B)** Values are ratios of band density to band density of GAPDH mRNA at each condition and are mean \pm SEM. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

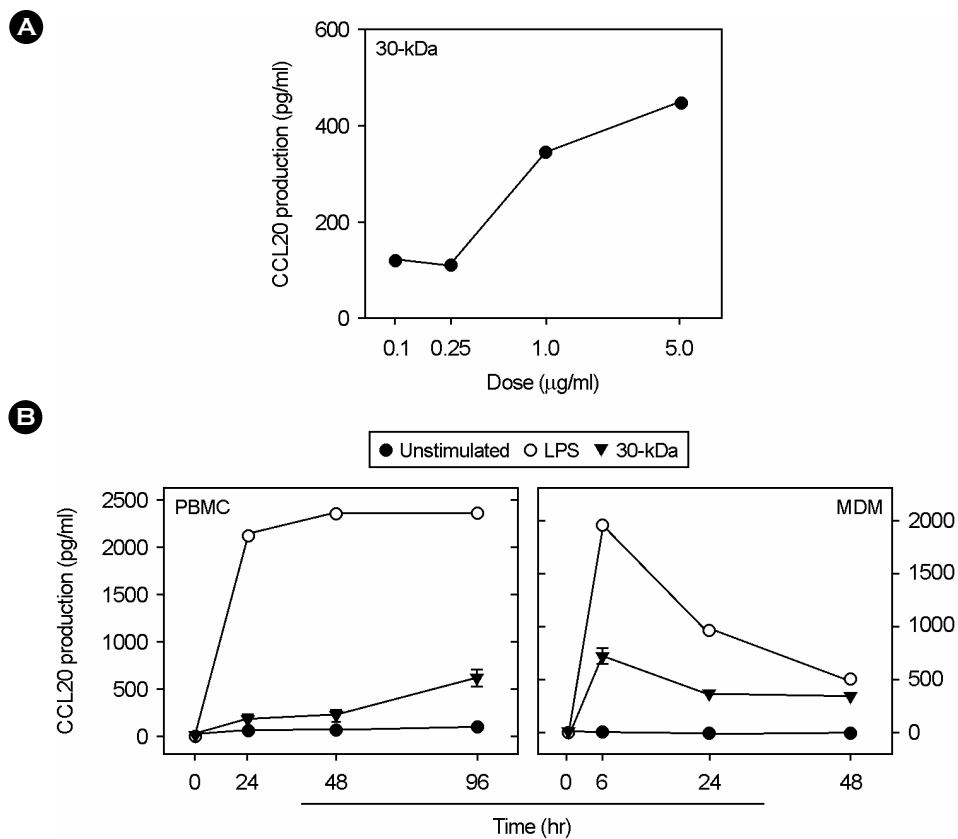


Figure 2. Kinetics of CCL20 induction in response to 30-kDa Ag. PBMCs and MDMs were incubated with different doses of 30-kDa Ag **(A)** and different time point **(B)**. Supernatants were harvested after the times indicated and CCL20 levels were measured by ELISA.

분압 조건과 매우 유사하였다. 반면 CCL20 mRNA는 저산소 조건에서 결핵균 감염에 의해 매우 강하게 발현이 유도되었다. 또한 병원성 결핵균 감염이 비병원성 결핵균 감염에 비해 높은 CCL20의 발현을 나타냄을 알 수 있었다. 포식작용의 양성 대조인 bead 처리에 의해서는 CCL20의 발현이 무처리 대조군에 비해 증가되지 않았으며, 산소 분압에 의해서도 발현이 조절되지 않았다.

3. 건강인 및 결핵 환자의 말초혈액 단핵구와 단핵구 유래 대식세포에서 CCL20 발현의 비교

Fig. 1의 결과로부터 저산소 조건에서 결핵균 감염에 의해 대식세포주로부터 CCL20 mRNA가 강하게 발현됨을 확인하였다. 따라서 결핵 환자와 건강인의 말초혈액 단핵구를 분리 후 결핵균의 대표적 분비 항원인 30-kDa 항원에 의한 CCL20의 유도능을 RT-PCR과 ELISA를 통하여 비교하였다. 먼저 30-kDa 항원농도별 혹은 시간별 CCL20 단백질 발현을 분석하여 적절한 시간과 항원농도를 결정하였다 (Fig. 2). 건강인 혈액으로부터 말초혈액 단핵구를 분리하고, 세포부착 방법을 이용하여 단핵구 유래 대식세포로 분화시킨 다음 30-

kDa 항원을 농도별로 처리 후 CCL20 생성능을 살펴보았다. 그 결과 말초혈액 단핵구의 경우 30-kDa 항원농도 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 부터 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 농도 의존적 (dose-dependent)인 경향으로 CCL20 생성이 높게 유도되었고, 단핵구 유래 대식세포의 경우 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 30-kDa 항원농도에서 CCL20 유도능이 가장 높았다 (Fig. 2, 단핵구 유래 대식세포의 결과는 그림으로 표시하지 않음). 따라서 앞으로 진행되는 실험의 30-kDa 항원의 농도는 말초혈액 단핵구는 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 으로, 단핵구 유래 대식세포는 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 사용하였다. 이 후 시간별 CCL20 유도능을 관찰한 결과, 말초혈액 단핵구에서 48시간부터 96시간까지 지속적으로 증가되는 양상의 CCL20을 나타내었고, 단핵구 유래 대식세포에서는 항원 자극 6시간에 가장 상승된 양상의 CCL20의 생성능을 보였다 (Fig. 2B).

본 연구에서는 건강인 및 결핵 환자, 즉 초치료 환자 (1개월 미만의 항결핵 치료군) 및 난치 환자 (2년 이상 항결핵 치료군)의 말초혈액 단핵구를 분리하여 30-kDa 항원으로 6시간 동안 자극 배양 후 총 mRNA를 분리하여 RT-PCR을 수행하였다. 그 결과 Fig. 3A에서 보는 바와 같이 건강인 대조군에 비해 초치료 결핵 환자군의 말초혈액 단핵구 유래

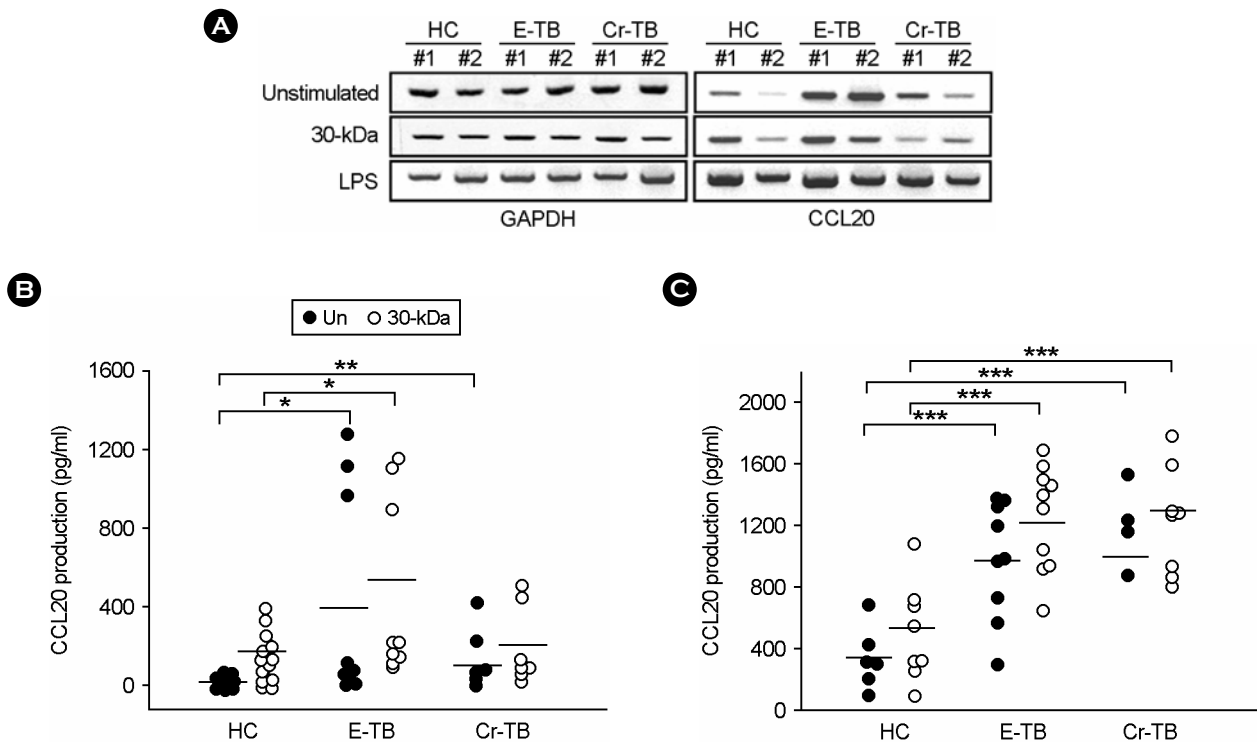


Figure 3. CCL20 expressions in PBMCs and MDMs from healthy controls (HC) and TB patients (E-TB and Cr-TB) in response to 30-kDa Ag. (A) The 30-kDa Ag was added to PBMCs at 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for 6 hr. RT-PCR analysis was done to determine the comparative expression of CCL20 mRNA from PBMCs from HCs and TB patients. PBMCs (B) and MDMs (C) from HCs and TB patients were stimulated by 30-kDa Ag. After 18-hr stimulation, the supernatants were harvested and CCL20 protein levels were measured by ELISA. Closed circle, unstimulated; open circle, stimulated with the 30-kDa Ag. E-TB, early diagnosed pulmonary tuberculosis patients; Cr-TB, chronic tuberculosis patients. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$

CCL20의 발현이 무자극 조건과 30-kDa 항원 처리 조건에서 모두 증가되었다. 특히 초치료군은 난치 환자군에 비해 30-kDa 항원에 의해 유도되는 CCL20의 발현이 더욱 유의하게 증가되어 있었다. 한편 CCL20의 양성 대조군으로 LPS를 처리하였을 때 건강인과 환자의 mRNA 발현 간에는 유의한 차이를 나타내지 않았다. Fig. 3의 (B)와 (C)에서는 말초혈액 단핵구와 단핵구 유래 대식세포에서의 각 그룹간의 30-kDa 항원에 의한 CCL20 단백질의 유도능을 ELISA를 통하여 분석하였다. Fig. 3B에서 보는 바와 같이 초치료 결핵 환자의 말초혈액 단핵구의 CCL20 생성은 무자극 조건과 30-kDa 항원 자극 조건 모두 건강인에 비해 유의하게 증가되었던 반면, 난치 결핵 환자에서의 30-kDa 항원 자극에 의한 CCL20의 유도능은 건강인보다 약간 높으나 유의하지 않은 양상으로 나타났다. 한편 CCL20의 주요 분비세포인 단핵구 유래 대식세포에서의 CCL20 유도능은 무자극 조건과 30-kDa 항원 자극 조건 모두 초치료 결핵 환자에서 매우 유의하게 높았고, 이러한 유의한 차이는 난치 결핵 환자에서도 동일하였다 (Fig. 3C).

고 찰

결핵균은 산소를 생존의 필수 조건으로 삼는 호기성 세균이므로 결핵은 산소의 공급이 원활한 폐, 특히 상엽폐 (upper lobe)로부터 주로 발생하는 폐결핵이 다수를 차지한다. 폐에서 결핵균 감염이 만성화 (chronic phase) 단계가 되면 대식세포 무리들 (cluster of macrophage)을 중심으로 육아종이 형성되고, 대식세포에게 산소를 공급하는 혈관은 약해지거나 완전히 없어진다. 따라서 육아종 조직은 저산소 (hypoxic) 또는 무산소 (anoxic) 상태에 빠지게 되고, 조직 내 대식세포 (macrophage)들은 서서히 저산소 상태에 적응하게 된다 (4,19).

본 연구에서는 이러한 육아종 내의 환경과 유사한 저산소 조건을 조성하여 숙주 면역세포가 발현하는 유전자군을 발굴하고 이의 기능을 밝히고자 하였다. 기존에 연구되어 있던 대식세포 내에서 결핵균이 생존할 수 있는 환경을 예상하여 정상적인 산소 조건과 저산소 조건에서 결핵균 감염 18시간 후 THP-1 세포주로부터 mRNA를 분리하여 cDNA microarray 분석을 의뢰하였다. 그 결과 저산소 분압 조건에서 유의하게 증가 혹은 감소되는 유전자군을 확인하였고, 아직까지 결핵의 면역병리와 관련해서 전혀 보고된 바가 없는 CCL20의 발현이 저산소 조건에서 유의하게 증가되었음을 확인하였다. 반면, 저산소 조건에서 유의하게 감소된 것으로 확인된 cathepsin D의 발현은 RT-PCR 분석 시 microarray 결과를 재현하지 못하였다. 이는 서로 다르게 조절되는 유전자를 규명

하는데 있어서 DNA microarray 기법이 매우 효율적이지만 그 결과는 반드시 개별 유전자 발현의 정량적 분석을 통해 반복되어야 함을 시사한다.

본 연구에서 저산소 조건에서 배양된 결핵균 감염 THP-1 세포에서 차등 발현된 유전자 중 57종의 유전자는 억제되었고, 38종의 유전자는 증가하였다. 동일한 cDNA array를 통해서 Burke 등은 사람 단핵구 유래 대식세포로부터 저산소증으로 유도되는 유전자를 조사한 결과, vascular endothelial growth factor (VEGF), glucose transporter 1 (GLUT-1), MMP-7, neuromedin B receptor 및 ID2 (inhibitor of DNA-binding 2 protein)가 상향 조절되는 유전자로 보고하였다 (3). 또한 Volpe 등에 의하면 microarray를 이용하여 결핵균 감염 7일째 사람 대식세포에서 IL (interleukin)-1 beta, IL-8, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 alpha, growth-related oncogene (GRO)-beta, epithelial cell-derived neutrophil-activating peptide (ENA)-78, 대식세포 유래 케모카인, 그리고 matrix metalloproteinase (MMP)-7 유전자들이 감염되지 않은 대식세포보다 상향 조절되었고, 반면 macrophage colony-stimulating factor (MCSF)-receptor와 CD4 유전자는 하향 조절되는 유전자로 보고하였다. 그리고 결핵균이 대식세포 내에서 생존하고, 강렬한 사이토카인 환경에서 버티는데 기여하는 5종의 유전자들도 밝혀진 바 sigma factors (sigA, sigE, sigG), alpha-crystallin (acr) 그리고 superoxide dismutase C (sodC)가 이러한 메커니즘에 관여하였다 (29). 이와 같이 결핵균 감염과 저산소증 등 각각의 환경에서 대식세포 혹은 결핵균에 의해 차등 발현되는 유전자는 보고된 바 있으나, 두 환경을 접목시킨 결핵균 감염 시 저산소 조건에서 상향 조절되는 대식세포의 유전자에 대한 보고는 본 연구가 처음이다.

대식세포와 면역 작동세포에서 생산된 활성 질소 중간물질 (reactive nitrogen intermediates)과 활성 산소 중간물질 (reactive oxygen intermediates), 그리고 interferon (IFN)- γ 혹은 tumor necrosis factor (TNF)- α 와 같은 염증성 사이토카인은 육아종 내에서 결핵균이 생존 혹은 사멸되는데 필요한 요인으로 생각되어지고 있다 (6,12,14). 결핵균 감염 후 휴지기 상태 동안 IFN- γ 와 TNF- α 유전자가 결핍된 마우스 실험에서 결핵이 빠르게 재발하였고, 활성 질소 중간물질 혹은 활성 산소 중간물질을 생산하는 유전자가 결핍된 마우스에서도 결핵균 감염 초기에 균의 생존률이 증가되고, 균의 급격한 성장으로 육아종 부위의 조직 손상이 증가됨이 관찰되었다 (1,7). 이와 같이 육아종 병변 부위에서 결핵균이 숙주세포와 공존하며 긴 시간의 휴지기 상태로 동면 및 재활성화될 수 있는 기전에 대해서 많은 연구가 이루어지고 있다. Demissie 등에 따르면 결핵균 감염을 장시간 제어할 수 있는 기전으로, 결핵균 잠복감염 건강인은 Th1 반응은 강하게 유도하는

한편, Th2 반응은 억제시키는 것으로 보고한 바 있다 (8).

CCL20의 생물학적 기능에 대한 기존의 보고들에 의하면 CCL19, CCL20, CCL21, CXCL12와 이들 케모카인의 수용체를 간암 병변 및 주변 조직에서 조사한 결과, CCL20만이 의미 있게 상승되었고 (24), 피부건선 (psoriasis) 환자와 만성 비부비동염 (chronic rhinosinusitis) 환자에서도 CCL20와 그의 수용체인 CCR6가 상승 조절되는 것으로 보고되었다 (16, 20). 또한 CCL20는 IL-1, TNF- α , IL-17 및 LPS와 같은 전염 증성 자극에 의해 상승 조절된다. 여기에 관여하는 기전으로 IL-17에 의한 janus kinase (JAK)에 독립적이고, MAPK/ERK kinase (MEK)/nuclear factor (NF)- κ B에 의존적인 신호전달이 관여하는 것으로 밝혀졌다 (18,26). 본 연구에서 치료요 결핵 환자들의 말초혈액 단핵구의 TNF- α 발현 역시 CCL20 경향처럼 결핵균 30-kDa 항원에 의해 유의하게 증가되었는데 (결과는 제시하지 않음), 이는 본 연구진이 기존에 보고한 내용과 일치한다 (21,22). 한편 CCL20는 기능에 따라 liver and activation-regulated chemokine (LARC) 혹은 exodus-1으로도 알려져 있고 (9), 항균활성을 가진 CC 케모카인으로 보고된 바 있다 (32). 이와 같이 CCL20의 기능과 역할들 중에 아직까지 결핵과 연관되어 보고된 적은 없으며 본 연구는 결핵균에 의해 감염된 대식세포가 저산소 분압 조건에서 배양되었을 때 CCL20 유전자 발현이 매우 유의하게 증가됨을 최초로 보고하고 있다.

결핵균의 휴지기 상태 유지는 결핵균 생존에 유해한 환경에서 살아 남기 위한 방법으로 잘 알려져 있다 (11,17). 낮은 산소 분압은 결핵균의 휴지기를 유도하며, 결핵균이 휴지기 형태를 유지하게 되면 저산소 상태에 적응하며 오랜 기간 동안 생존하게 되는데, 이러한 휴지기 상태는 결핵균이 잠복 감염 상태로 숙주세포 내에 생존하게 되는 요인이 된다 (23, 30,31). 따라서 본 연구에서 결핵균에 의해 감염된 대식세포가 저산소 환경에 노출되었을 때 발현이 증가된 CCL20에 대한 일차적 기능 연구는 결핵의 잠복감염모델에서 CCL20의 발현 증가를 확인되는 것이 가장 선행되어야 한다. 그러나 현재까지 인체 결핵의 잠복감염을 완벽하게 재현할 수 있는 동물모델은 없는 실정이다. 인체 잠복감염은 건강인 튜베르쿨린 양성자로 나타날 수 있으나 전 국민이 생후 4주에 BCG 접종을 받고 있는 우리나라의 경우 진단적 의의는 거의 없다고 생각된다. 본 연구에서도 건강인 튜베르쿨린 양성자와 음성자에 대하여 CCL20의 발현을 비교 분석하였으나 유의한 차이가 발견되지 않았다 (결과는 제시하지 않음). 따라서, 본 연구에서는 저산소 조건과 유사한 결핵 육아종 병변을 갖는 활동성 폐결핵 환자와 건강인의 말초혈액 단핵구 및 단핵세포를 대상으로 CCL20의 발현을 비교 분석하였으며 결핵 환자의 말초혈액 단핵구에서 CCL20 유전자 발현이

증가된 결과는 CCL20와 결핵 면역병리 간의 밀접한 연관성을 시사한다.

한편 CCL20의 수용체인 CCR6는 림프 조직과 기억 T세포 (memory T cell), B세포 및 수지상세포에서 발현되며 (15, 25), CCL20는 CCR6와 상호작용하는 유일한 케모카인이다. CCR6는 점액 조직에서 수지상세포 localization과 림프구 항상성을 매개하는 중요한 역할을 하는 수용체이다 (5). 향후 결핵 환자의 기억세포에서 CCR6의 발현이 상승 조절되는지 조사할 필요가 있을 것으로 사료된다.

이상의 연구결과를 종합해 볼 때, 결핵균을 사람 대식세포주에 감염시킨 후 정상 산소 및 저산소 조건에서 배양 시 숙주세포에서 다양한 유전자군이 억제되거나 증가됨을 알 수 있었다. 그 중 CCL20의 유전자 발현이 저산소 조건에서 유의하게 증가됨을 확인하였다. CCL20의 발현을 건강인 및 결핵 환자의 말초혈액 단핵구에서 결핵 항원 자극 전과 후에 비교하였고, 그 결과 건강인에 비해 결핵환자에서 CCL20의 발현이 매우 유의하게 증가됨을 알 수 있었다. 그러나 CCL20의 발현은 육아종 환경에서 결핵균에 대한 숙주 방어 면역 혹은 면역병리와 깊은 연관이 있을 것으로 생각되므로 향후 결핵 육아종 병변 부위에서 CCL20의 발현에 대한 보다 면밀한 연구가 요청된다.

참 고 문 헌

- 1) Adams LB, Dinauer MC, Morgenstern DE, Krahenbuhl JL: Comparison of the roles of reactive oxygen and nitrogen intermediates in the host response to *Mycobacterium tuberculosis* using transgenic mice. *Tuber Lung Dis* **78**: 237-246, 1997.
- 2) Bosco MC, Puppo M, Santangelo C, Anfosso L, Pfeffer U, Fardin P, Battaglia F, Varesio L: Hypoxia modifies the transcriptome of primary human monocytes: modulation of novel immune-related genes and identification of CC-chemokine ligand 20 as a new hypoxia-inducible gene. *J Immunol* **177**: 1941-1955, 2006.
- 3) Burke B, Giannoudis A, Corke KP, Gill D, Wells M, Ziegler-Heitbrock L, Lewis CE: Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *Am J Pathol* **163**: 1233-1243, 2003.
- 4) Cazin M, Paluszczak D, Bianchi A, Cazin JC, Aerts C, Voisin C: Effects of anaerobiosis upon morphology and energy metabolism of alveolar macrophages cultured in gas phase. *Eur Respir J* **3**: 1015-1022, 1990.

- 5) Cook DN, Prosser DM, Forster R, Zhang J, Kuklin NA, Abbondanzo SJ, Niu XD, Chen SC, Manfra DJ, Wiekowski MT, Sullivan LM, Smith SR, Greenberg HB, Narula SK, Lipp M, Lira SA: CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue. *Immunity* **12**: 495-503, 2000.
- 6) Cooper AM, Dalton DK, Stewart TA, Griffin JP, Russell DG, Orme IM: Disseminated tuberculosis in interferon gamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* **178**: 2243-2247, 1993.
- 7) Cooper AM, Segal BH, Frank AA, Holland SM, Orme IM: Transient loss of resistance to pulmonary tuberculosis in p47(phox^{-/-}) mice. *Infect Immun* **68**: 1231-1234, 2000.
- 8) Demissie A, Abebe M, Aseffa A, Rook G, Fletcher H, Zumla A, Weldingh K, Brock I, Andersen P, Doherty TM: VACSEL Study Group: Healthy individuals that control a latent infection with *Mycobacterium tuberculosis* express high levels of Th1 cytokines and the IL-4 antagonist IL-4 delta2. *J Immunol* **172**: 6938-6943, 2004.
- 9) Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait-Yahia S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C: Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* **188**: 373-386, 1998.
- 10) Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Ravigione MC: Consensus statement. Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. WHO Global Surveillance and Monitoring Project. *JAMA* **282**: 677-686, 1999.
- 11) Fenton MJ, Vermeulen MW: Immunopathology of tuberculosis: roles of macrophages and monocytes. *Infect Immun* **64**: 683-690, 1996.
- 12) Flynn JL, Chan J: Immunology of tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **19**: 93-129, 2001.
- 13) Flynn JL, Chan J: Tuberculosis: latency and reactivation. *Infect Immun* **69**: 4195-4201, 2001.
- 14) Flynn JL, Chan J, Triebold KJ, Dalton DK, Stewart TA, Bloom BR: An essential role for interferon gamma in resistance to *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Exp Med* **178**: 2249-2254, 1993.
- 15) Greaves DR, Wang W, Dairaghi DJ, Dieu MC, Saint-Vis B, Franz-Bacon K, Rossi D, Caux C, McClanahan T, Gordon S, Zlotnik A, Schall TJ: CCR6, a CC chemokine receptor that interacts with macrophage inflammatory protein 3alpha and is highly expressed in human dendritic cells. *J Exp Med* **186**: 837-844, 1997.
- 16) Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, Massacrier C, Pin JJ, Oldham E, Catron D, Buchanan ME, Muller A, deWaal Malefyt R, Deng G, Orozco R, Ruzicka T, Lehmann P, Lebecque S, Caux C, Zlotnik A: Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol* **164**: 6621-6632, 2000.
- 17) Honer zu Bentrup K, Russell DG: Mycobacterial persistence: adaptation to a changing environment. *Trends Microbiol* **9**: 597-605, 2001.
- 18) Kao CY, Huang F, Chen Y, Thai P, Wachi S, Kim C, Tam L, Wu R: Up-regulation of CC chemokine ligand 20 expression in human airway epithelium by IL-17 through a JAK-independent but MEK/NF-kappaB-dependent signaling pathway. *J Immunol* **175**: 6676-6685, 2005.
- 19) Kawaguchi T, Veech RL, Uyeda K: Regulation of energy metabolism in macrophages during hypoxia. Roles of fructose 2,6-bisphosphate and ribose 1,5-bisphosphate. *J Biol Chem* **276**: 28554-28561, 2001.
- 20) Lee JH, Kang HJ, Woo JS, Chae SW, Lee SH, Hwang SJ, Lee HM: Up-regulation of chemokine ligand 20 in chronic rhinosinusitis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **132**: 537-541, 2006.
- 21) Lee JS, Son JW, Jung SB, Kwon YM, Yang CS, Oh JH, Song CH, Kim HJ, Park JK, Paik TH, Jo EK: *Ex vivo* responses for interferon-gamma and proinflammatory cytokine secretion to low-molecular-weight antigen MTB12 of *Mycobacterium tuberculosis* during human tuberculosis. *Scand J Immunol* **64**: 145-154, 2006.
- 22) Lee JS, Song CH, Lim JH, Kim HJ, Park JK, Paik TH, Kim CH, Kong SJ, Shon MH, Jung SS, Jo EK: The production of tumour necrosis factor-alpha is decreased in peripheral blood mononuclear cells from multidrug-resistant tuberculosis patients following stimulation with the 30-kDa antigen of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Exp Immunol* **132**: 443-449, 2003.
- 23) Parrish NM, Dick JD, Bishai WR: Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol* **6**: 107-112, 1998.
- 24) Rubie C, Frick VO, Wagner M, Rau B, Weber C, Kruse B, Kempf K, Tilton B, Konig J, Schilling M: Enhanced expression and clinical significance of CC-chemokine MIP-3

- alpha in hepatocellular carcinoma. *Scand J Immunol* **63**: 468-477, 2006.
- 25) **Schutyser E, Struyf S, Van Damme J**: The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev* **14**: 409-426, 2003.
- 26) **Sugita S, Kohno T, Yamamoto K, Imaizumi Y, Nakajima H, Ishimaru T, Matsuyama T**: Induction of macrophage-inflammatory protein-3 alpha gene expression by TNF- α dependent NF-kappa B activation. *J Immunol* **168**: 5621-5628, 2002.
- 27) **Song CH, Lee JS, Lee SH, Lim K, Kim HJ, Park JK, Paik TH, Jo EK**: Role of mitogen-activated protein kinase pathways in the production of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-10, and monocyte chemotactic protein-1 by *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv-infected human monocytes. *J Clin Immunol* **23**: 194-201, 2003.
- 28) **Ulrichs T, Kaufmann SH**: New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J Pathol* **208**: 261-269, 2006.
- 29) **Volpe E, Cappelli G, Grassi M, Martino A, Serafino A, Colizzi V, Sanarico N, Mariani F**: Gene expression profiling of human macrophages at late time of infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology* **118**: 449-460, 2006.
- 30) **Wayne LG, Hayes LG**: An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect Immun* **64**: 2062-2069, 1996.
- 31) **Werngren J, Hoffner SE**: Drug-susceptible *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype does not develop mutation-conferred resistance to rifampin at an elevated rate. *J Clin Microbiol* **41**: 1520-1524, 2003.
- 32) **Yang D, Chen Q, Hoover DM, Staley P, Tucker KD, Lubkowski J, Oppenheim JJ**: Many chemokines including CCL20/ MIP-3 alpha display antimicrobial activity. *J Leukoc Biol* **74**: 448-455, 2003.
-