

실험적 자가면역 포도막염 마우스 모델에서 Nod양 수용체 전사체의 안내 발현 양상 분석

Transcriptional Analysis of Nod-Like Receptors in a Mouse Model of Experimental Autoimmune Uveitis

김형민¹ · 김태완² · 정현정³ · 류진숙³ · 김미금^{1,3} · 위원량^{1,3} · 오주연^{1,3}

Hyeong Min Kim, MD¹, Tae Wan Kim, MD, PhD², Hyun Jeong Jeong³, Jin Suk Ryu³,
Mee Kum Kim, MD, PhD^{1,3}, Won Ryang Wee, MD, PhD^{1,3}, Joo Youn Oh, MD, PhD^{1,3}

서울대학교 의과대학 서울대학교병원 안과학교실¹, 서울특별시 보라매병원 안과², 서울대학교병원 의생명연구원 인공안구센터 안면역각막재생연구실³

Department of Ophthalmology, Seoul National University Hospital, Seoul National University College of Medicine¹, Seoul, Korea

Department of Ophthalmology, Seoul Metropolitan Government Seoul National University Boramae Medical Center², Seoul, Korea

Laboratory of Ocular Regenerative Medicine and Immunology, Seoul Artificial Eye Center, Seoul National University Hospital Biomedical Research Institute³, Seoul, Korea

Purpose: To evaluate the transcription pattern of Nod-like receptors (NLRs), the intracellular sensors, to detect danger signals in murine eyes with experimental autoimmune uveitis (EAU).

Methods: EAU was induced in B6 (C57BL/6) mice by subcutaneous injection of human interphotoreceptor retinoid binding protein and intraperitoneal injection of pertussis toxin. At 1, 2, and 3 weeks post-immunization, the eyeballs were extracted and subjected to histological and molecular assays using real-time reverse transcription polymerase chain reaction.

Results: The levels of nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pysin domain 1 (NLRP1), NLRP3, nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 1 (NOD1), and NOD2 transcripts were increased at 2 weeks and gradually reduced thereafter. Notably, NLRP3 showed the highest expression in the eyes with EAU. Similarly, the transcript level of pro-inflammatory cytokine, interleukin-1 β , increased and reached a peak at 2 weeks post-immunization. The retinal structure was severely damaged by inflammation at 3 weeks post-immunization.

Conclusions: Among NLRs, NLRP3 may induce inflammation in eyes after EAU immunization.

J Korean Ophthalmol Soc 2015;56(1):99-103

Key Words: Experimental autoimmune uveitis, NLRP3, Nod-like receptors

포도막염은 안과 외래에서 흔히 보는 질환으로 전체 실

명원인의 약 10% 정도를 차지한다고 알려졌다.¹ 포도막염을 일으키는 원인에는 결핵, 헤르페스, 매독, 톡소플라스마와 같은 감염성 원인부터 사르코이드증, 당뇨, 베체트병, 척추관절병증 등 전신적인 염증 질환이 있으며, 내인성 포도막염은 대개 발생기전이 확실히 밝혀지지는 않았으나 자가면역기전에 의한 것으로 생각되고 있다. 따라서 자가면역 포도막염의 일차적인 치료로 스테로이드 제제가 사용되고 있으나 이러한 면역억제제는 비특이적으로 면역반응을 억제하므로 장기간 투여 시 전신적인 부작용을 초래할 수 있

■ Received: 2014. 5. 16. ■ Revised: 2014. 8. 11.

■ Accepted: 2014. 12. 10.

■ Address reprint requests to **Joo Youn Oh, MD, PhD**
Department of Ophthalmology, Seoul National University Hospital, #101 Daehak-ro, Jongno-gu, Seoul 110-744, Korea
Tel: 82-2-2072-0836, Fax: 82-2-741-3187
E-mail: jooyounoh77@gmail.com

* This work was supported by the SNUH research fund (04-2012-0360).

© 2015 The Korean Ophthalmological Society

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

다. 따라서 내인성 포도막염에서 자가면역 반응을 조절할 수 있는 여러 방법들이 모색되고 있는데, 성공적인 치료법 개발을 위해서는 포도막염의 발병기전에 대한 분자유전학적인 이해가 선행되어야 한다.²

그중에 Nod양 수용체(NOD-like receptor, NLR)는 최근 세포내 병원체를 감지하는 체계로 발견되었는데, toll-like receptor (TLR) 단백질과 구조적으로, 기능적으로 유사하며 선천성 면역 반응에 관여하는 것으로 알려졌다.³ 또한 Nod 양 수용체는 Interleukin (IL)-1 β 와 같은 염증성 사이토카인을 세포 밖으로 분비하여 내인성 위험 신호에 대해 염증반응을 유발하는 역할을 하는 것으로 알려졌다.⁴ 하지만 자가 면역질환에서 이들 수용체의 발현 양상과 그 역할에 대해

서는 알려진 바가 없다.

이에 본 연구에서는 인간의 내인성 포도막염 모델인 실험적 자가면역 포도막염 마우스 모델에서 Nod양 수용체 전사체의 시간에 따른 안구내 발현을 알아보려고 하였다.

대상과 방법

실험적 자가면역 포도막염의 유발

6주령된 무병원(pathogen-free) B6 mouse (C57BL/6J) (Orient Bio Inc., Seongnam, Korea) 마우스를 실험에 사용하였다. 실험동물의 사육은 서울대학교병원 임상의학연구소 전임상실험실의 무균 동물실(SPF free)을 이용하였고 실

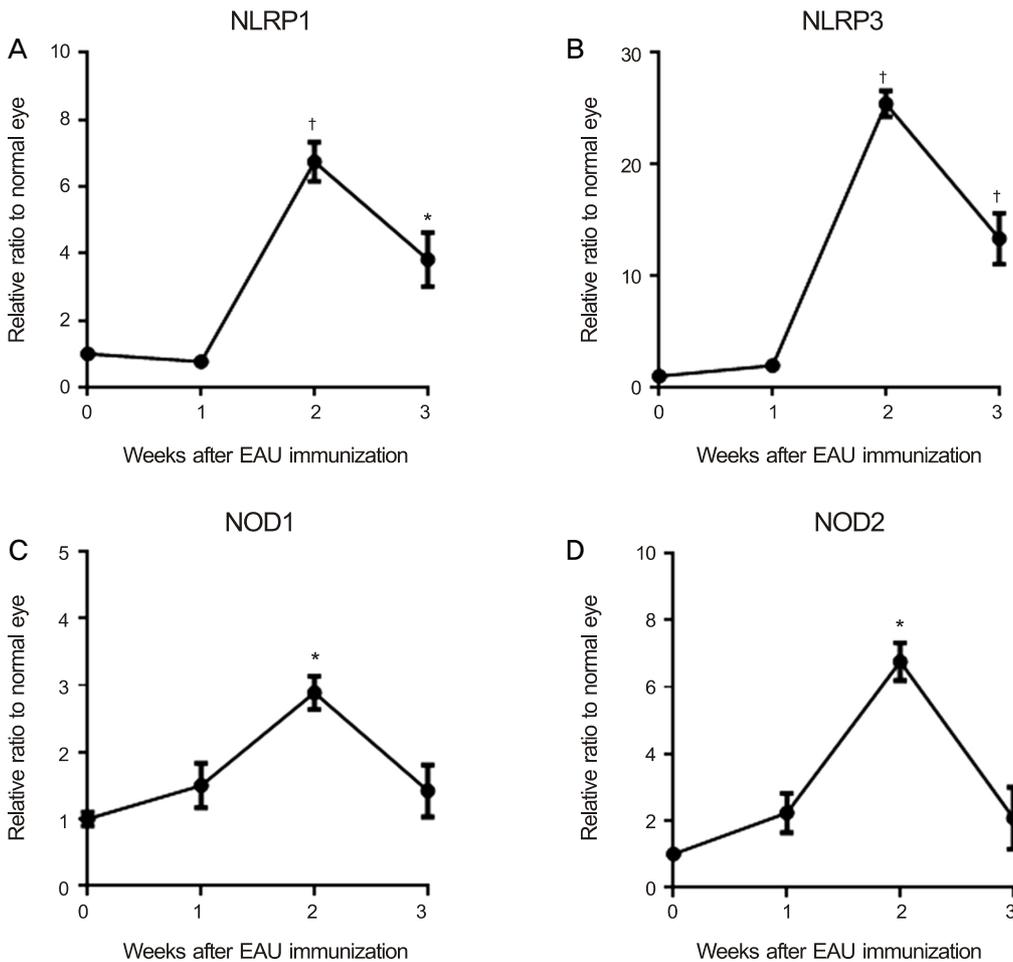


Figure 1. Assay for Nod-like receptors in the eyes after experimental autoimmune uveitis (EAU) immunization. Real-time RT-PCR analysis showed that the levels of NLRP1, NLRP3, NOD1, and NOD2 transcripts increased in the eyes after EAU immunization with a peak at the post-immunization 2 weeks, and gradually decreased until 3 weeks. (A) Time course of NLRP1 expression in the eye. (B) Time course of NLRP3 expression in the eye. (C) Time course of NOD1 expression in the eye. (D) Time course of NOD2 expression in the eye. Data are presented in mean \pm SEM. N = 5 in each group. RT-PCR = reverse transcription polymerase chain reaction; NLRP = nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain; NOD = nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein; SEM = standard error of the mean. ^{*} $p < 0.01$; [†] $p < 0.001$.

험 프로토콜은 서울대학교병원 임상의학연구소 전임상실험실의 동물실험윤리위원회의 허가를 받았다.

실험적 자가면역 포도막염을 유발하기 위해 250 µg의 사람 광수용체 간 레티노이드 결합 단백질(human IRBP) 펩타이드 1-20, GPTHFLFQPSLVLDMAKVLLD (20 mg/mL; Peptron, Daejeon, Korea)를 마우스 발바닥에 피하내주입하였다. Human IRBP는 *Mycobacterium tuberculosis* (2.5 mg/mL; BD Difco™, Franklin Lakes, NJ)가 포함된 complete Freund's adjuvant (Sigma, Saint Louis, MO)에 emulsion된 것을 사용

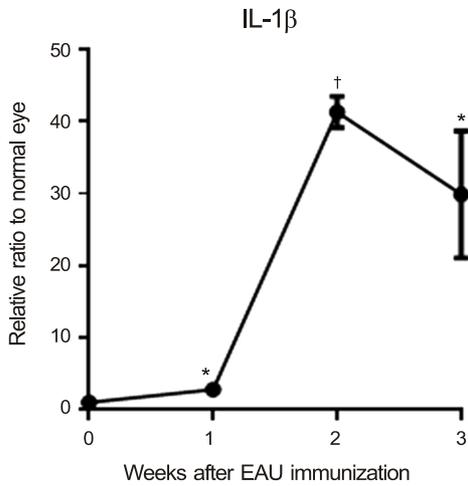


Figure 2. Assay for the pro-inflammatory cytokine interleukin (IL)-1β in the eyes after experimental autoimmune uveitis (EAU) immunization. Real-time RT-PCR analysis showed that the level of IL-1β transcript were gradually increased and reached at peak at the post-immunization 2 weeks after EAU immunization. Data are presented in mean ± SEM. N = 5 in each group. RT-PCR = reverse transcription polymerase chain reaction; SEM = standard error of the mean. * $p < 0.05$; † $p < 0.001$.

하였다. 동시에 0.7 µg의 백일해 독소(Pertussis toxin; 300 µL, Sigma)를 복강내에 주입하였다.⁵

조직학적 분석

포도막염 유발 후 1, 2, 3주째에 쥐를 안락사하여 안구를 적출한 후 10% 포르말데히드와 파라핀으로 고정을 하였다. 4 µm 두께의 냉동절편을 만들고 hematoxylin과 eosin으로 염색을 시행하였다.

실시간 역전사 연쇄중합반응

포도막염 유발 후 1, 2, 3주째에 적출한 안구를 RNA isolation reagent (RNA Bee, Tel-Test Inc., Friendswood, TX)로 용해하였고 sonicator (Ultrasonic Processor, Cole Parmer Instruments, Vernon Hills, IL)로 균질화하였다. RNA는 RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA)를 이용하여 추출하였고 역전사효소 (SuperScript III, Invitrogen, Carlsbad, CA)로 이중가닥 cDNA를 합성하였다. 실시간 역전사 연쇄중합반응은 TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Carlsbad, CA)를 이용하여 시행하였으며, 18s rRNA probe (TaqMan Gene Expression Assays ID, Hs03003631_g1)를 이용하여 유전자발현 기준점을 동일하게 하였다. 사용한 PCR probe set는 모두 Taqman Gene Expression Assay kit를 Applied Biosystems에서 구입하였다.

통계분석

SPSS software version 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL)을 이용하여 통계 분석을 시행하였다. Student's *t* 방법을 이용하여 유의한 차이가 있는지 분석하였으며, 통계적 유의성은 p -value<0.05로 정의하였다.

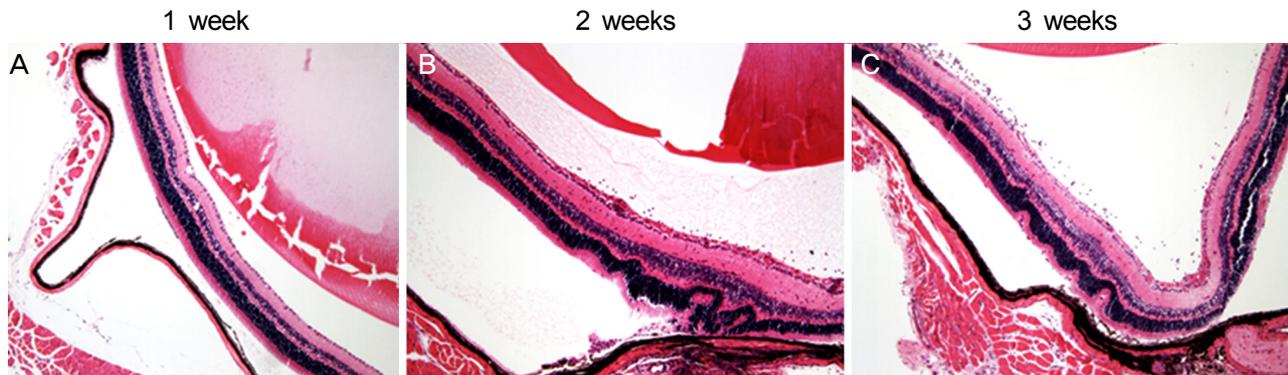


Figure 3. Histological findings of the eye. Hematoxylin-eosin staining of the eye showed that the retinal structure including the photoreceptor layer was severely disorganized with massive infiltration of inflammatory cells in the vitreous cavity and in the retina of BSS-treated experimental autoimmune uveitis mice on day 21 (Original magnification x100, Hematoxylin-eosin staining). (A) Hematoxylin-eosin staining of the eye at one week after EAU induction. (B) Hematoxylin-eosin staining of the eye at two weeks after EAU induction. (C) Hematoxylin-eosin staining of the eye at three weeks after EAU induction. BSS = balanced salt solution.

결 과

자가면역 포도막염 유발 후 안구 내에서 Nod양 수용체인 NLRP (nucleotide-binding oligomerization domain, Leucine rich Repeat and Pyrin domain)1, NLRP3, NOD (nucleotide-binding oligomerization domain)1, NOD2의 전사체의 양이 증가하기 시작하여 2주째에 최대치를 보인 후 3주째에는 감소하였다(Fig. 1). 이 중 NLRP3 전사체의 양이 가장 많았다. 또한, 염증성 사이토카인인 IL-1 β 의 전사체의 발현도 포도막염 유발 후 2주째에 가장 높아서 Nod양 수용체와 비슷한 발현 양상을 보였다(Fig. 2).

하지만 자가면역 포도막염 유발 후 망막의 구조적 파괴는 3주째에 가장 심하게 관찰되었다(Fig. 2). 포도막염 유발 후 1주째에는 정상과 다른없는 망막의 구조를 보였지만 2주째에는 망막 광수용체층의 파괴가 일부분에서 관찰되기 시작하였다. 3주째에는 유리체강내 염증세포가 침착하고 망막층의 부종이 일어났으며 특히 망막 광수용체층의 뒤를림을 동반한 파괴가 심하게 관찰되었다(Fig. 3).

고 찰

포도막염은 안구의 중간층을 이루고 있는 포도막에 발생하는 염증성 질환으로 미국에서 100,000명당 115명의 환자가 있으며, 특히 만성 포도막염의 경우 적절한 치료가 이루어지지 않으면 인접한 안구조직 즉 공막, 각막, 망막 조직에 비가역적인 손상을 일으켜 전체 실명의 약 10%, 전체 실명 원인의 빈도 중 4위를 차지하는 질환이다.^{6,7}

포도막염의 치료는 부신피질호르몬과 면역 억제제인데 적어도 2-3년 이상의 장기 치료가 필요해 눈과 신체 다른 부위의 심각한 부작용을 초래하여 치료를 지속하지 못하는 경우가 종종 발생하며 스테로이드에 반응을 안하는 포도막염도 있다.⁸ 따라서 안전하고 효과가 지속되는 새로운 약물의 개발이 요구되고 있는 상황이다. 염증성 질환에 대해 새로운 치료법을 개발하기 위해서는 염증성 질환의 발병기전에 대한 분자유전학적 새로운 이해가 필요하다.

최근 급성 감염성 염증질환뿐 아니라 파킨슨씨병, 알츠하이머병, 심근경색, 비만, 당뇨, 뇌졸중 등 만성 염증성 질환에서도 중요한 발병원인으로 염증조절복합체인 인플라마솜의 역할이 새로이 대두되고 있다. 염증조절복합체는 카스파제-1 (caspase-1)을 활성화시켜 IL-1 β 를 성숙시키고 분비하게 하여 염증반응을 유도한다. 염증조절복합체에는 NOD양 수용체로 세포내 신호를 감지하는 수용체와 caspase recruitment domain (CARD) 복합체를 유도하는 어댑터 단백질(adaptor protein)이 속해 있다.⁹

본 연구에서는 실험적 자가면역 포도막염에서 염증조절 복합체인 NOD양 수용체 중 기존연구에서 여러 염증성 질환 및 자가면역질환에 관여하는 것으로 알려진 NLRP1, NLRP3, NOD1, NOD2의 4가지를 선정하여 분석하였다. 이 중 NOD1은 caspase recruitment domain 4 유전자(CARD4), NOD2는 CARD15 유전자에서 발현되는 것으로 알려졌으며, CARD15 유전자의 변이로 인한 NOD2의 선천성 면역 체계 발현으로 크론병이 발병하는 것으로 유명하다.¹⁰ NOD2 변이로 나타나는 Blau syndrome 또한 유명한데 다발 장기의 염증을 일으키며 피부염, 관절염과 함께 눈에서는 포도막염을 일으키는 것으로도 알려졌다. NLRP1, NLRP3은 이들 단백질이 활성화되어 선천성 면역 체계 이상으로 제2형 당뇨병과 같은 대사성 질환이나 암, 류마티스관절염 및 자가면역질환을 일으킨다는 연구들이 많다.^{11,12}

본 연구에서 유발된 자가면역 포도막염에서는 위의 4가지 NOD양 수용체의 안구내 발현이 대표적인 염증성 사이토카인인 IL-1 β 의 발현 양상과 비슷하게 2주째에 가장 최고점을 찍었으며 그 이후로 점진적으로 감소하는 양상을 보였다. 특히 NLRP3가 가장 많이 발현됨을 알 수 있었다. NLRP3 염증조절복합체는 선천성 면역 체계에 관여하여 여러 자가면역 질환과 관련이 있음이 알려졌지만,^{13,14} 안구내 질환에서의 작용은 알려진 바가 없다.

본 연구는 NOD양 수용체가 자가면역 포도막염의 안내에서 유의하게 증가하고 이 중 NLRP3의 발현이 가장 특징적으로 높음을 확인하였다. 앞으로 실제로 안구내 염증성 질환에서 NLRP3를 비롯한 NOD양 수용체의 역할을 규명하기 위한 후속 연구가 필요하겠다.

REFERENCES

- 1) Chang JH, Wakefield D. Uveitis: a global perspective. *Ocul Immunol Inflamm* 2002;10:263-79.
- 2) Caspi RR. A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest* 2010;120:3073-83.
- 3) Martinon F, Tschopp J. NLRs join TLRs as innate sensors of pathogens. *Trends Immunol* 2005;26:447-54.
- 4) Ogura Y, Sutterwala FS, Flavell RA. The inflammasome: first line of the immune response to cell stress. *Cell* 2006;126:659-62.
- 5) Caspi RR. Experimental autoimmune uveoretinitis in the rat and mouse. *Curr Protoc Immunol* 2003;Chapter 15:Unit 15.6.
- 6) Gritz DC, Wong IG. Incidence and prevalence of uveitis in Northern California; the Northern California Epidemiology of Uveitis Study. *Ophthalmology* 2004;111:491-500; discussion 500.
- 7) LeHoang P. The gold standard of noninfectious uveitis: corticosteroids. *Dev Ophthalmol* 2012;51:7-28.
- 8) Willermain F, Rosenbaum JT, Bodaghi B, et al. Interplay between innate and adaptive immunity in the development of non-infectious uveitis. *Prog Retin Eye Res* 2012;31:182-94.
- 9) Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians

- of the body. *Annu Rev Immunol* 2009;27:229-65.
- 10) Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nat Rev Immunol* 2006;6:9-20.
- 11) Vandanmagsar B, Youm YH, Ravussin A, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Med* 2011;17:179-88.
- 12) Rosenzweig HL, Planck SR, Rosenbaum JT. NLRs in immune privileged sites. *Curr Opin Pharmacol* 2011;11:423-8.
- 13) Franchi L, Warner N, Viani K, Nuñez G. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev* 2009;227:106-28.
- 14) Chen M, Wang H, Chen W, Meng G. Regulation of adaptive immunity by the NLRP3 inflammasome. *Int Immunopharmacol* 2011;11:549-54.

= 국문초록 =

실험적 자가면역 포도막염 마우스 모델에서 Nod양 수용체 전사체의 안내 발현 양상 분석

목적: 내인성 포도막염의 실험 모델인 실험적 자가면역 포도막염 마우스 모델의 눈에서 세포내 위험신호를 감지하는 역할을 하는 Nod양 수용체 전사체의 시간에 따른 발현을 알아보고자 하였다.

대상과 방법: 마우스에 사람 광수용체간 레티노이드 결합 단백질(human IRBP)의 피하내 주입 및 백일해 독소(Pertussis toxin)의 복강내 주입을 하여 실험적 자가면역 포도막염을 유발하고, 유발 후 1, 2, 3주째 눈을 적출하여 실시간 역전사 연쇄중합반응(real time RT-PCR)으로 분자유전학적인 분석을 시행하였고, 헤마톡실린-에오진 염색으로 조직학적 분석을 시행하였다.

결과: 자가면역 유발 후 2주째에 Nod양 수용체인 NLRP1, NLRP3, NOD1, NOD2의 전사체 발현이 가장 증가하였고, 그 뒤로 점진적으로 감소하였다. 이 중 NLRP3의 발현이 가장 높았다. 염증성 사이토카인인 Interleukin-1 β 의 발현도 포도막염 유발 후 2주째에 가장 높았다. 망막의 구조적 파괴는 포도막염 유발 후 3주째에 가장 심하게 관찰되었다.

결론: Nod양 수용체 중 NLRP3가 실험적 자가면역 포도막염에서 위험신호를 감지하여 염증 반응을 시작하는 데 중요한 역할을 할 가능성이 있다.

〈대한안과학회지 2015;56(1):99-103〉
