

류마티스 활막세포에서 Plexin A1의 발현과 기능

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실 류마티스내과

윤형주 · 김현숙 · 박승기 · 조철수 · 김완욱

= Abstract =

Expression and Function of Plexin A1 in Rheumatoid Synoviocytes

Hyung-Ju Yoon, M.S., Hyun-Sook Kim, M.D., Seung-Ki Kwok, M.D.,
Chul-Soo Cho, M.D., Wan-Uk Kim, M.D.

*Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine,
The Catholic University of Korea College of Medicine, Seoul, Korea*

Objective: To investigate the expression and function of plexin A1, a transmembrane protein involving cell survival and cell-to cell interaction, in the rheumatoid synoviocytes.

Methods: Immunohistochemical staining using anti-plexin A1 antibody was performed in the synovium of rheumatoid arthritis (RA) patients. The plexin A1 expression in cultured fibroblast-like synoviocytes (FLS) was also examined by Western blot analysis and immunocytochemistry. Cell viability was determined by CCK-8 assay. Deficiency of plexin A1 was established by the method of short interfering RNA (siRNA). The productions of interleukin-6 (IL-6) and monocytes chemotactic protein-1 (MCP-1) were measured in culture supernatants by ELISA.

Results: Plexin A1 was highly expressed in the lining layer of synovium and cultured FLS of RA patients. In RA FLS, basal expression of plexin A1 was higher than osteoarthritis FLS. On immunocytochemical staining, plexin A1 was co-expressed with neuropilin-1 in RA FLS. Semaphorin 3A (10 to 200 ng/mL), a specific ligand for neuropilin-1/plexin A1 complex, did not affect viability of RA FLS. The down regulation of plexin A1 mRNA by siRNA did not cause cell death, either. Co-culture of FLS with RA T cells, isolated from peripheral blood or synovial fluid, caused an increase in the productions of IL-6 and MCP-1 from FLS, but which were blocked by down-regulating plexin A1 transcripts using siRNA method.

< 접수일 : 2007년 2월 28일, 심사통과일 : 2007년 3월 19일 >

※통신저자 : 김 완 욱

수원시 팔달구 지동 93번지

성빈센트병원 류마티스내과

Tel : 031) 249-8168, Fax : 031) 253-8898, E-mail : wan725@catholic.ac.kr

본 연구는 과학재단 특정기초연구(No. R01-2006-000-11359-0)로부터 연구비 지원을 받아 이루어짐.

Conclusion: These data suggest that enhanced expression of plexin A1 in RA FLS may elicit over-production of IL-6 and MCP-1, and thereby contribute to perpetuation of chronic inflammation in RA.

Key Words: Plexin A1, Rheumatoid synoviocytes, IL-6

서 론

류마티스관절염(rheumatoid arthritis, RA)의 병리는 윤활막세포의 활성화 및 증양과 유사한 윤활막의 팽창 및 신생혈관형성(neovascularization)을 특징으로 한다 (1). 특히 윤활막을 구성하는 주된 세포 중 하나인 섬유모세포-유사 윤활막세포(fibroblast-like synoviocytes, FLS)는 RA 관절 안에서 만성 염증반응을 유지하고 증폭하는 데 핵심적인 역할을 수행한다 (2). FLS는 구조적복합체-II (major histologic complex, MHC class II), 혈관세포유착분자(vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1)와 같은 활성화 단백질을 강하게 발현하며 이를 통해 침윤된 T세포와 서로 상호작용하면서 효과적으로 항원을 전달할 수 있다 (1,2). 또한 FLS는 윤활막조직에서 인터루킨-6 (IL-6)와 인터루킨-15 (IL-15)와 같은 염증성 시토카인과 기질단백분해효소(matrix metalloproteinase)를 생성하는 주된 세포 중 하나이다. 이들은 주변에 침윤된 다른 면역세포와 상호접촉 혹은 시토카인 생성을 통해 정보를 교환하며 서로를 자극하고 활성화함으로써 염증반응의 악순환의 고리를 형성하는 데 핵심적인 역할을 수행한다 (1,2).

혈관내피성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)는 혈관내피세포의 이동, 분열, 증식을 촉진시키는 인자로서 신생혈관형성을 유발한다(3,4). 특히 VEGF₁₆₅ 아형은 RA에서 발현이 증가되어 있으며 발병초기부터 질병의 악화와 진전에 관여한다. 예를 들어 신생혈관은 윤활막염(synovitis) 부위에 영양분과 산소를 공급해 주어 만성 염증반응을 지속시킨다 (5,6). 저자들은 최근 연구에서 배양된 RA FLS에서 VEGF₁₆₅가 그 수용체 중 하나인 뉴로필린-1(neuropilin-1, NP-1)에 결합할 경우 세포사멸을 억제함으로써 윤활막의 비정상적인 성장에 기여함을 규명한 바 있다 (7). NP-1은 VEGF₁₆₅, 세마포린3A

(semaphorin 3A, Sema 3A), 태반성장인자-2 (placental growth factor-2) 등과 같은 여러 가지 종류의 리간드(ligand)와 결합할 수 있는 허브(hub) 수용체로 알려져 있다 (8). NP-1의 리간드 중 하나인 Sema 3A는 VEGF₁₆₅와 길항적, 경쟁적으로 작용하며 (9), Sema 3A가 NP-1에 결합할 경우 plexin A1이라는 막통과성(transmembrane) 단백질을 활성화되면서 세포내부로 신호가 전달된다 (10).

NP-1과 plexin A1은 세포막에서 복합체를 형성하고 있으며 (10), 이들의 발현은 세포의 성장 및 신생혈관 형성에 필수적이다 (8,10). 이외에도 NP-1/plexin-1 복합체는 생체 안에서 다양한 면역학적 역할을 수행한다 (11-13). 예를 들어 NP-1은 T세포와 가지세포(dendritic cells)에 표현되어 있으면서 동형친화성 상호결합(homophilic interaction)을 통해 서로를 활성화시킨다 (11). 가지세포에 표현되어 있는 plexin-1은 보조자극인자(co-stimulatory molecule)로 작용하여 T세포를 증식, 활성화시킬 수 있다 (12). T세포 표면에 있는 Sema 6D는 가지세포의 plexin A1과 결합할 경우 IL-12의 생성을 촉진시키며, Sema 6D가 골골세포의 plexin A1과 결합할 경우 이 세포의 분화와 골파괴가 일어난다 (13). 기존의 발표를 종합하여 볼 때 NP-1/plexin A1이 RA 윤활막세포의 증식 혹은 세포 간 상호작용에 관여하여 만성 염증반응에 기여할 수 있을 것이라고 추측해 볼 수 있다. 그러나 아직까지 RA와 같은 만성 염증성 질환에서 plexin A1의 발현과 기능에 관해서는 알려진 바가 없다. 이에 저자들은 RA 병변 부위인 윤활막과 배양된 FLS에서 plexin A1의 발현과 그 면역학적인 역할을 조사해 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 섬유모세포-유사 윤활막세포의 분리 및 배양

무릎관절 전치환술을 받은 RA 혹은 골관절염(oste-

oarthritis, OA) 환자로부터 얻은 활막조직으로부터 FLS를 분리하였다 (7). 조직을 2 mm 조각으로 잘게 자른 후 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco, Carlsbad, CA)에서 1형 콜라겐 분해효소를 첨가하여 37°C (5% CO₂ atmosphere)에서 4시간 동안 처리하였다. 분리된 세포는 DMEM (supplemented with 10% fetal calf serum [FCS], 2 mm glutamine, penicillin and streptomycin)에서 재부유시킨 후, 세포 여과기(cell strainer) (Falcon, FranklinLakes, NJ)로 거르고 75 cm² 플라스크에 부착시켰다. 12시간 배양한 후 비부착세포를 제거하고 부착세포만을 DMEM (supplemented with 10% FCS)에서 배양하였다. 계대 배양을 거듭하여 계대 3에서 7 사이의 FLS를 본 실험을 위해 사용하였다.

2. 윤활액과 말초 혈액 내 T세포의 분리

무릎 관절염이 생긴 RA 환자에서 관절천자를 하여 윤활액을 얻었으며, 채취된 윤활액은 즉시 인산염완충식염수(phosphate buffered saline, PBS)를 이용하여 1 : 5로 희석하였고 세포여과기에 통과시켰다 (14). RA 환자로부터 채취한 말초혈액은 PBS를 이용하여 1 : 1로 희석하였다. 혈액 혹은 말초혈액으로부터 분리한 단핵구는 Ficoll-Hypaque (SG 1077)상의 비중 차이를 이용하여 원심분리하였다. Ficoll 층 위의 부유세포를 수집하여 완전 배지(complete medium, consisting of RPMI-1640 supplemented with 10% FCS, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin and 2 mm L-glutamate)로 희석하여 원심분리 후 Human pan T cell isolation kit II (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)을 이용하여 T세포를 분리하였다.

3. Plexin-1의 면역조직화학염색

RA와 OA 환자로부터 얻은 윤활막조직을 포르말린으로 고정한 후 파라핀으로 포매(embedding)하여 5 µm 두께로 잘라서 면역조직화학염색을 시행하였다. 절편은 슬라이드 글라스에 파라핀을 녹여 부착시켰고 xylene으로 탈파라핀화 한 후 에탄올로 탈수하였다. 조직 내 내인성 과산화효소(endogenous peroxidase)는 3% H₂O₂를 이용하여 억제시켰으며 초단파(microwave)를 조사하여 항원을 노출시켰다. 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 조직을 1.5% 말 혈청

으로 60분 동안 반응시켰고 이후 1 : 100으로 희석한 염소 항-plexin A1 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)를 4°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 세척 후 조직을 biotin이 표지된 항-염소 IgG (Vector Laboratories, Inc. Burlingame, CA)와 30분간 반응시켰다. 마지막으로 peroxidase가 부착된 streptavidin (DAKO, Glostrup, Denmark)을 첨가하여 실온에서 30분간 반응시키고 3, 3'-diamino-benzidine으로 발색하였으며 Mayer hematoxyline으로 대조염색을 하였다. 음의 대조 조직(negative control tissue)은 일차항체 대신 희석 용액 혹은 isotype control antibody (IgG1; R&D Systems, Minneapolis, MN)를 사용하였고 그 외에는 모두 같은 방법으로 염색하였다.

4. Plexin A1의 면역세포화학염색(immunocytochemistry)

RA 환자로부터 배양된 FLS (1×10³ cells)를 8-chamber 슬라이드 글라스에 24시간 동안 배양시킨 후 PBS로 세척하였다. 2% paraformaldehyde로 고정시킨 후 소혈청알부민(bovine serum albumin)으로 비특이적인 결합을 차단하였다. 이후 염소 항-plexin A1항체(Santa Cruz Biotechnology) 혹은 생쥐 항-NP-1 항체(Santa Cruz Biotechnology)를 반응시켰다. 조직을 각각 Cy3 결합 항-염소항체(conjugate anti-goat antibody) (Sigma, St. Louis, MO)와 Alexa488 결합 항-생쥐항체(conjugate anti-mouse antibody) (Millipore, Billerica, MA)를 첨가하여 반응시킨 후 ProLong[®] Gold antifade reagent with DAPI (Invitrogen, San Diego, CA)로 표본제작하였고 형광현미경으로 관찰하였다.

5. Plexin A1의 Western blot 검사

배양된 FLS (3×10⁵ cells)를 세포용해액(0.5% Triton X-100, 300 mm NaCl, 50 mm Tris HCl, pH 7.6, containing 1 mm phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 µg/mL aprotinin, and 1 µg/mL leupeptin)에 넣고 4°C에서 30분 동안 용해시켰다. 원심분리 후 얻은 상층액 내 단백질 양을 Bradford assay (Biorad, Hercules, CA)로 측정하였다. 동량의 단백질(50 µg)을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis로 분리한 다음 니트로셀룰로즈막(nitrocellulose membrane)에 이동시켰다. 5% 무지방분유(non-fat dry milk)를 첨가

한 트리스완충식염수(Tris-buffered saline, TBS)에 4°C에서 12시간 동안 차단한 다음 5% 무지방분유, 0.05% Tween 20이 첨가된 TBS에서 토끼 항-plexin A1 항체(1 : 100) (Abcam Inc., Cambridge, MA)와 2시간 동안 반응시켰다. 이후 과산화효소가 부착된 항-생쥐 IgG (Santa Cruz Biotechnology, 1 : 3,000)와 반응시킨 후 화학발광(chemiluminescence) (ECL; GE Healthcare, Piscataway, NJ)방법으로 plexin A1의 존재를 확인하였고 그 발현 정도를 β -actin에 대한 상대값으로 표현하였다.

6. Plexin A1 mRNA의 역전사 증합효소 연쇄반응

RNAzolB (Biotex Laboratories, San Antonio, TX, USA)를 이용하여 배양된 FLS로부터 전체 RNA를 얻었다. 추출한 2 μ g의 RNA를 주형으로 RevertAid™-MULV 역전사효소(MBI Fermentas, Hanover, MD), random hexamer (TaKaRa, Shiga, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 2 μ L의 cDNA로 증합효소 연쇄반응을 시행하였으며 primer 염기서열은 다음과 같다: plexin A1 5'-ACTACCGGACATATGCCATGC-3' and 5'-CTCCTTGGCCTGGGTGACCG-3' (631 bp); GAPDH, 5'-CGATGCTGGGCGTGAG-TC-3' and 5'-CGT-TCAGCTCAGGGATGACC-3' (498 bp). 증폭된 증합효소 연쇄반응 산물은 1.5% 우무겔(agarose gel)에서 전기영동하였다.

7. Cell Counting Kit-8 (CKK-8) assay를 통한 FLS의 생존 능력의 측정

DMEM 배양액에서 24시간 배양된 FLS (2 \times 10³/well)를 96 well plate에 부착시켰다. 48시간 후 Insulin-Transferrin-Selenium-A (ITSA; Life Technologies, Gaithersburg, MD)가 포함된 DMEM 배양액에 Sema 3A (10~200 ng/mL)를 처리하였다. 24시간 후 CKK-8 용액(Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan)을 첨가(10 μ L/100 μ L)하고 4시간 후에 450 nm에서 흡광도를 측정하여 생존 능력의 변화를 평가하였다.

8. FLS에 plexin A1 전사유전자에 대한 short interfering RNA (siRNA)의 전달과 도입

24 well plate에서 RA FLS를 10% FCS가 포함된 DMEM에서 1 \times 10⁴/well의 농도로 부착시킨 다음 FCS

와 항생제가 없는 DMEM으로 배지를 바꾸어 주었다. SiRNA-lipofectAMINE reagent 복합체를 형성하기 위하여 serum-free OptiMEM을 넣은 상태에서 1 μ L의 lipofectAMINE reagent (Invitrogen)와 plexin A1 siRNA (10 pmol)을 혼합하였다. 사용된 plexin siRNA는 Santa Cruz Biotechnology에서 제공된 것으로 plexin A1 전사체를 knockdown시키기 위해 고안된 3가지 종류의 20~25개 길이를 가진 뉴클레오티드 혼합물이다. Plexin A1의 음의 대조(negative control)로는 scrambled sequence를 가진 control siRNA (Santa Cruz Biotechnology)를 사용하였다. Plexin A1 siRNA 혼합물을 제조사에서 제시한 방법에 따라 희석한 후 각 well에 첨가하고 plate를 전후로 부드럽게 흔들어서 FLS와 혼합하였다. FLS에 lipofectamine에 의한 siRNA 전달이 충분히 이루어지는 시점인 4시간 후에 배양액을 10% FCS이 포함된 DMEM으로 바꾸어주었고 37°C에서 24시간 동안 추가로 배양하였다. 세척 후 plexin A1가 전달된 FLS를 T세포와의 공동배양을 위해 사용하였다. 동일한 조건에서 siRNA를 전달하지 않은 FLS 혹은 control siRNA를 전달한 FLS를 음의 대조를 위해 사용하였다.

9. T세포와 FLS의 공동배양(co-culture)

공동배양을 위해 10% FCS이 포함된 DMEM 배양액에 부유시킨 FLS (1 \times 10⁴/well)를 24 well plate에 분주한 후 24시간 동안 5% CO₂, 37°C에서 배양하여 단층을 형성시켰다. 세척 후 RA 환자의 활액 혹은 말초혈액으로부터 분리한 T세포(3 \times 10⁵/well)를 첨가한 후 37°C에서 24시간 동안 공동배양하였다. 배양 상층액을 수집하여 향후 시토카인의 농도를 측정할 때까지 -20°C에서 보관하였다.

10. IL-6와 단핵구화학주성단백-1 (monocytes chemotactic protein-1, MCP-1)에 대한 효소면역측정법

배양 상층액 내 IL-6와 MCP-1의 농도를 이전에 보고된 방법과 같이 효소면역측정법으로 측정하였다. 표준 시토카인 항원으로는 재조합 인형 IL-6 (R & D Systems)와 MCP-1 (R & D Systems)을 사용하였다.

11. 통계

결과는 평균±표준편차로 표시하였다. 평균값의 비교는 paired or unpaired sample T-test를 이용하였고 p 값이 0.05 이하인 경우 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 류마티스 윤활막조직에서 plexin A1의 발현

RA 관절조직에서 plexin A1의 분포와 위치를 알아보기 위하여, 3명의 RA 환자와 2명의 OA 환자의 윤활막에서 plexin A1에 특이적 항체를 이용한 면역조직화학염색법을 시행하였다. 그 결과 plexin A1 단백질이 RA 환자의 윤활막조직 절편에서 모두 발현되어 있었다(그림 1A-E). Plexin A1 양성반응은 주로 윤활막의 표피세포층(lining layer)에 강하게 나타났으며 이외에도 침윤된 백혈구, 혈관내피세포 등에서도 발견되었다. 이러한 결과는 plexin A1이 윤활막조직

을 구성하고 있는 다양한 세포에 광범위하게 분포하고 있음을 보여준다. OA 윤활막조직 역시 plexin A1을 발현하고 있었으며 주로 표피세포층에 집중되어 있었다(그림 1F-H). 이미 알려진 바와 같이 OA조직은 RA조직에 비해 혈관내피세포의 밀도와 염증세포의 침윤이 적었으며 이에 따라 plexin A1 양성 세포의 빈도도 낮았다.

2. 배양된 류마티스 윤활막세포에서 plexin A1의 발현

윤활막의 표피세포층은 FLS와 대식세포유사 윤활막세포(macrophage-like synoviocyte)로 이루어져 있다. 저자들은 plexin A1 양성세포가 윤활막의 표피세포층에 강하게 나타난다는 결과에 근거하여, 윤활막조직으로부터 분리한 FLS에서 plexin A1의 발현을 조사하고자 하였다. 그림 2A에서 보는 바와 같이 배양된 RA와 OA FLS 모두에서 plexin A1 mRNA의 발현이 확인되었다. Western blot 검사를 이용해 RA FLS (n=7)와 OA FLS (n=7) 간의 plexin A1 단백질

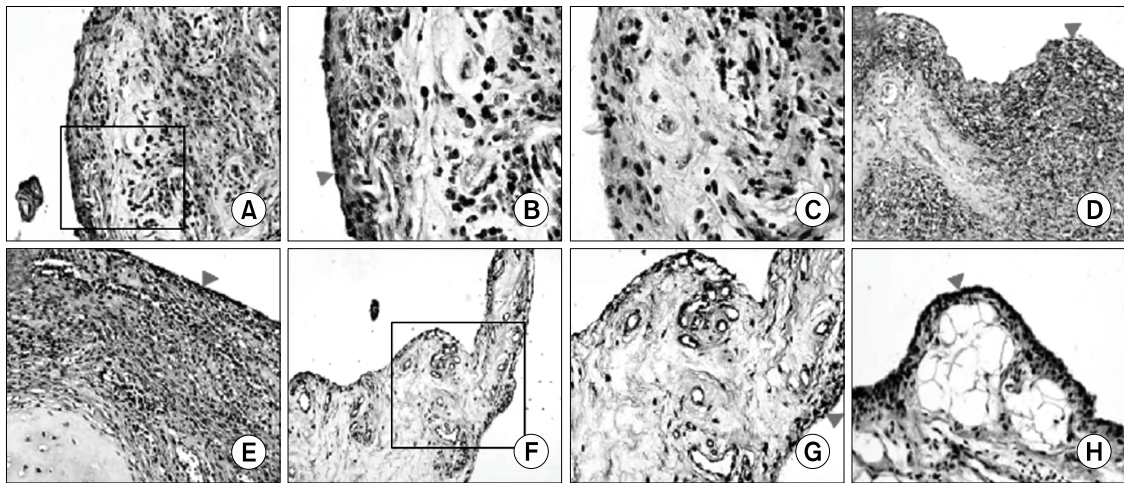


Fig. 1. Expression of plexin A1 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA). Tissue sections from the synovium of patients with RA and OA were stained with the anti-plexin A1 antibody. (A~E) The plexin A1 immunoreactivity in the synovium obtained from 3 different patients with RA. A: magnification $\times 200$, B and C: magnification $\times 400$, D and E: magnification $\times 100$. Rectangular area in Fig. 1A is magnified to Fig. 1B. Cells stained with anti-plexin A1 antibodies are shown in brown. Intense staining in the synovium was observed in the lining layer (arrowheads), endothelial surface of the synovial vessels and some infiltrating leukocytes. By contrast, isotype control antibody did not stain the RA synovium (Fig. 1C). (F~H) Plexin A1 expression in the synovium of two OA patients. F: magnification $\times 100$, G and H: magnification $\times 200$. Fig. 1G is the magnified image of the rectangular area in Fig. 1F.

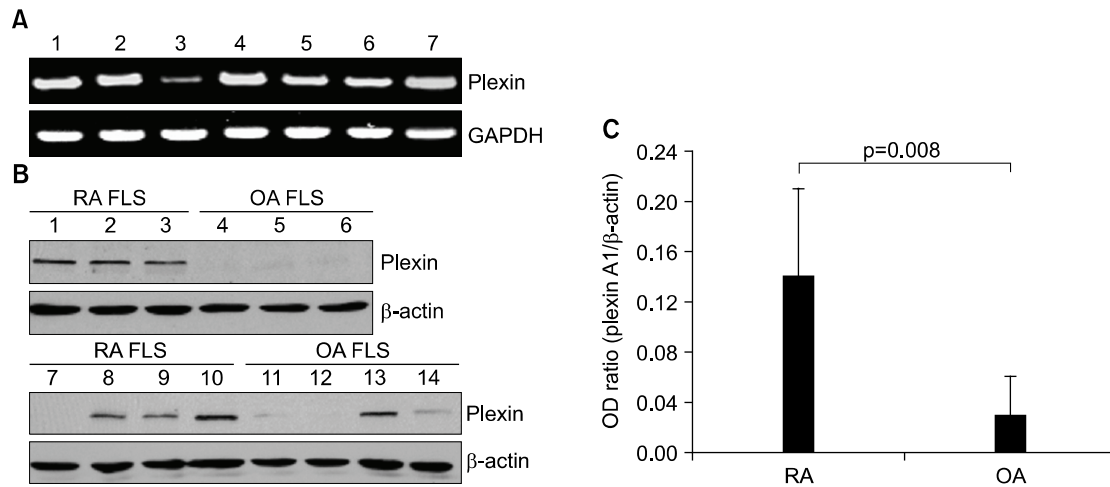


Fig. 2. Plexin A1 expression in the cultured synoviocytes. (A) Plexin A1 mRNA expression in fibroblast-like synoviocytes (FLS). The mRNA was extracted from cultured FLS and other cell types; lane 1 and 2: FLS of two rheumatoid arthritis (RA) patients, lane 3 and 4: FLS of two osteoarthritis (OA) patients, lane 5: Jurkat cells, lane 6: human umbilical vein endothelial cells, lane 7: Detroit 551 skin fibroblasts. Plexin A1 mRNA expressions were determined by reverse transcription PCR, using GAPDH as a reference gene. Representative results of more than 3 experiments are shown. All experiments yielded similar results. (B) Basal expression levels of the plexin A1 protein in RA FLS (lane 1 to 3, lane 7 to 10) and OA FLS (lane 4 to 6, lane 11 to 14), as determined by Western blot analysis using the anti-plexin A1 antibody. The housekeeping gene, β -actin, was used as the control. Data represent the results from one of three similar experiments. (C) Comparison of the optical density ratio [plexin A1/ β -actin] between RA FLS (n=7) and OA FLS (n=7), which was determined by Western blot analysis.

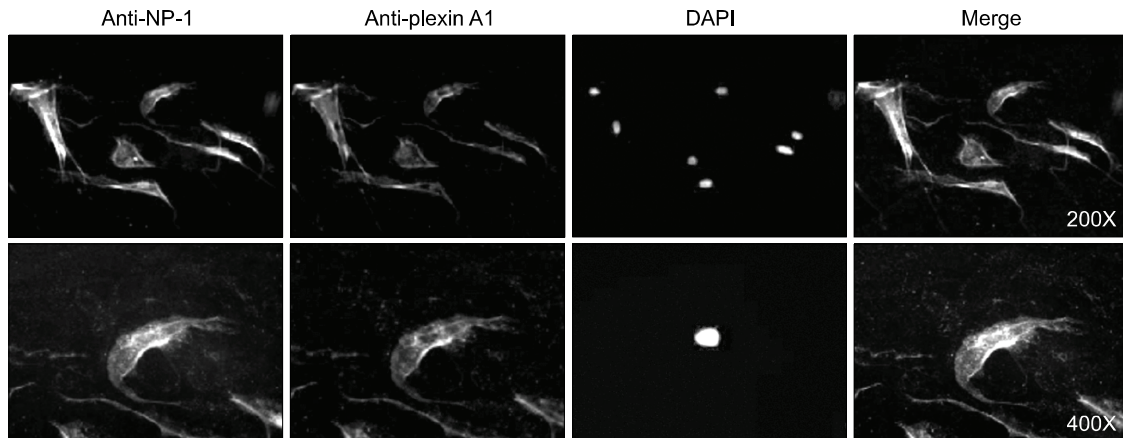


Fig. 3. Coexpression of neuropilin-1 and plexin A1 in rheumatoid synoviocytes. Immunocytochemical staining of fibroblast-like synoviocytes showed the neuropilin (NP-1) protein as green fluorescence (A488), and plexin A1 protein as red fluorescence (Cy3). Coexpression of NP-1 and plexin A1 is shown as yellow color that merged staining. Original magnifications: $\times 200$ (upper panel); $\times 400$ (lower panel).

의 기저발현(basal expression) 정도를 비교한 결과, RA FLS가 OA FLS보다 4배 이상 높은 양의 plexin A1을 발현하고 있었다(흡광도 비율[plexin A1/ β -actin]: 0.14 ± 0.07 대 0.03 ± 0.03 , $p=0.008$) (그림 2).

신경세포에서 plexin 1은 NP-1과 안정된 복합체를 이루고 있다 (10). NP-1의 리간드 중 하나인 Sema 3A는 NP-1 단독 수용체에 비해 NP-1/plexin 1 복합 수용체에 보다 강한 친화력을 가지고 결합한다 (10). 저자들은 FLS의 주된 VEGF₁₆₅ 수용체가 NP-1이라는 결과에 근거하여 NP-1/plexin A1 복합체의 분포양상을 면역세포화학염색법으로 조사하였다. 그림 3에서

보는 바와 같이 거의 모든 세포에서 항plexin-1 항체에 염색된 FLS는 항NP-1항체에도 동시에 염색되었다. 이러한 결과는 RA FLS가 NP-1뿐 아니라 plexin-1을 동시에 표현하고 있음을 의미한다.

3. 윤활막세포에서 plexin A1의 발현과 세포 생존 능력과의 관계

혈관내피세포에서 Sema 3A는 NP-1과 결합하여 세포 이동과 증식을 억제하고 사멸을 유도하는 반면 NP-1의 또 다른 리간드인 VEGF₁₆₅는 이러한 작용을 차단한다 (9). 또한 Sema 3A는 신장의 족세포(podo-

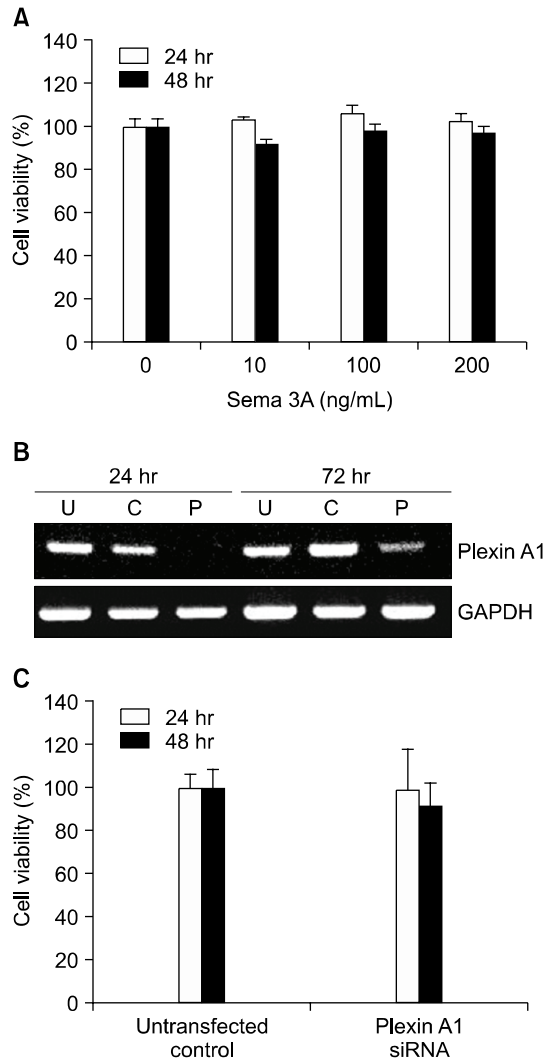


Fig. 4. No effect of plexin A1 and its ligand, semaphorin 3A, on viability of RA FLS. (A) Sema 3A, ranging from 0 to 200 ng/mL, did not affect cell viability of RA FLS, which was assessed by cell counting kit-8 (CCK-8) assay. (B) Downregulation of plexin A1 mRNA by short interfering RNA (siRNA). Plexin A1 knockdown cells were established via transfection of the plexin A1 siRNA into the primary fibroblast-like synoviocytes (FLS) using lipofectAMINE reagent, as described in Materials and Methods. The mRNA expression level for plexin A1 was determined by reverse transcription PCR in untransfected FLS (U), cells transfected with control siRNA (C), and cells transfected with siRNA (P). Plexin A1 expression was completely abolished 24 hours after the transfection. Data are representative of three independent experiments yielding similar results. (C) No effect of plexin A1 knockdown on FLS survival. RA FLS were culture with DMEM supplemented with 5% FCS after the siRNA transfection. The cell viability was determined by CCK-8 assay 24 hours or 48 hours after the transfection of plexin A1 siRNA. Data are the mean \pm SD of three independent experiments.

cyte)에서 농도의존적으로 세포의 사멸을 유도한다 (15). 저자들은 RA에서 plexin A1의 기능을 조사하기 위해 배양된 FLS에서 Sema 3A와 그 수용체인 NP-1/plexin-1이 세포사멸에 어떤 영향을 주는지를 조사하였다. 그림 4A에서 보는 바와 같이 10~200 ng/mL 농도의 Sema 3A를 처리한 후 24시간과 48시간 후에 FLS 생존능을 CCK-8 assay로 측정한 결과 처리하지 않은 대조군과 비교하여 생존능의 차이를 보이지 않았다. 또한 siRNA를 이용해 FLS내 plexin mRNA를 knockdown시켰을 경우에도(그림 4B), 세포 생존능의 변화는 관찰되지 않았다(그림 4C). 이러한 결과는 혈관내피세포나 골활의 족세포와는 달리 plexin A1이 FLS의 생존 혹은 사멸현상에 관여하지 않음을 시사한다.

4. Plexin A1은 T세포와 FLS의 상호작용에 의한 IL-6 생성에 관여한다.

가지세포와 T세포를 공동배양할 경우 가지세포 표면의 plexin-1이 보조자극인자로 작용하여 T림프구가 증식, 활성화되고 IL-12의 생성이 촉진된다 (12,

13). 한편 RA FLS와 T세포를 공동배양할 경우 T세포는 효과기세포로서 FLS에 작용하여 IL-6, MCP-1, 기질단백분해 효소의 생성이 증가된다 (16,17). 이러한 기존의 보고들을 토대로 저자들은 plexin A1이 T세포와 FLS 간의 상호작용에 관여하여 IL-6와 MCP-1의 생성을 증가시킬 수 있는지 조사하였다. 그림 5A에서 보는 바와 같이 RA 말초혈액에서 T세포를 분리하여 FLS와 공동배양 할 경우 FLS로부터의 IL-6의 생성이 2배 이상 증가하였다. 그러나 동일한 조건에서 FLS에 plexin A1에 대한 siRNA를 전달할 경우 T세포 자극에 의한 IL-6의 증가가 거의 일어나지 않았다. T세포와 FLS의 공동배양에 의한 MCP-1 생성의 증가 역시 유사한 경향을 보였다(결과제시 없음). 한편 RA 환자의 윤활액 내 단핵구에서 T세포를 분리하여 FLS와 혼합할 경우 IL-6의 생성이 5배 이상 증가하였으나 plexin siRNA를 FLS에 전달할 경우 말초혈액과는 달리 단지 부분적으로만 IL-6의 증가가 둔화되었다(감소율: 43.3%, 그림 5B). 이러한 결과는 RA FLS가 plexin A1을 매개로 하여 혈액 혹은 활액 내 T세포와 상호작용하고 이를 통해 IL-6와 MCP-1

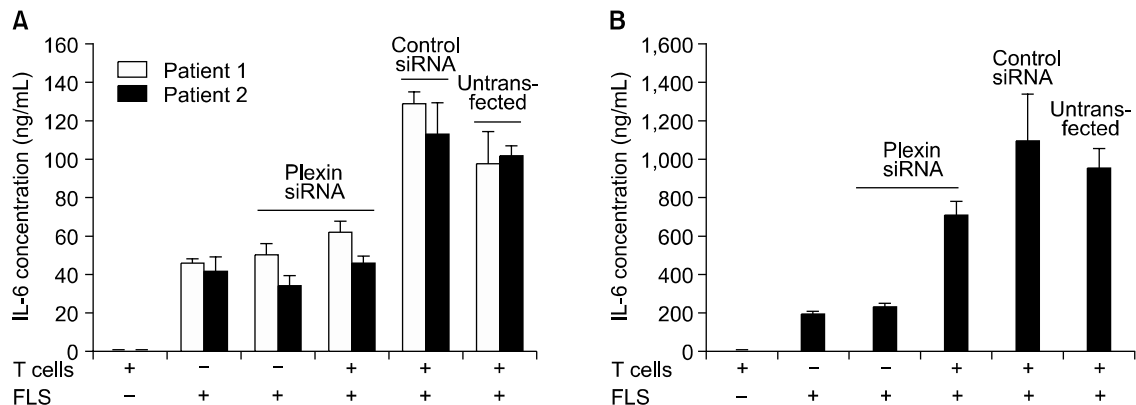


Fig. 5. Downregulation of plexin A1 results in a decrease in IL-6 production from FLS stimulated with T cells. (A) Complete reversal of IL-6 production from FLS stimulated with peripheral T cells by plexin A1 knockdown. The plexin A1 transcripts were downregulated by transfecting plexin A1 siRNA into RA FLS. Control siRNA with scrambled sequence, which has limited homology to all known sequences in the human, was used as a negative control. After 24 hours of transfection with plexin A1 or control siRNA, RA FLS (1×10^4 /well) were cocultured with T cells (3×10^5 /well) from peripheral blood of RA patients in DMEM supplemented with 1% FCS. IL-6 production in the culture supernatant was determined by ELISA. (B) Partial reversal of IL-6 production from FLS stimulated with synovial T cells by plexin A1 knockdown. Transfected or untransfected RA FLS (1×10^4 /well) were stimulated with T cells (3×10^5 /well) isolated from synovial fluid mononuclear cells of RA patients. Data are the representative of two independent experiments in triplicate.

의 생성이 증가되었음을 시사한다.

고 찰

Semaphorin 수용체인 plexin은 rho family GTPase 활성을 지니며 (18,19), 생체 내에서 신경 축삭세포의 유도, 기관발생, 혈관형성, 종양발생, 면역반응의 조절 등과 같은 다양한 기능을 수행한다 (8). 포유류에서 plexin은 A1, A2, A3, A4 B1, B2, B3, C1, D1 등의 9개의 아형을 가진다 (19). 이 중 plexin A1은 195 kDa의 막투과성 단백질로서 정상인 태아시절부터 성체에 이르기까지 폭넓게 발현되며 신경축삭세포의 유도 및 심혈관계 형성에 작용한다 (19,20). 본 연구에서 저자들은 처음으로 plexin A1의 발현이 OA 윤활막 조직에 비해 RA 윤활막 조직에서 높았으며 특히 포피세포층에서 두드러짐을 발견하였다. 또한 plexin A1은 OA FLS에 비해 RA FLS에서 그 발현이 증가되어 있었으며, T세포와 FLS의 상호작용에 의한 IL-6와 MCP-1 생성의 증가에 관여하였다. 이러한 결과들은 RA에서 plexin A1이 FLS로부터 전염증성 시토카인의 생성을 유도하여 염증반응을 유지, 증폭시키는 데 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.

Plexin A1은 NP-1과 복합체를 이룰 경우에만 Sema 3A와 결합할 수 있으며, plexin A1 독립적으로는 Sema 3A와 결합하지 못한다 (10). 본 연구에서 RA FLS는 NP-1과 plexin A1을 동시에 표현하고 있었으나 Sema 3A 처리 시 FLS의 생존에 거의 변화가 없었다. 게다가 Sema 3A는 RA윤활막 조직에서 거의 발견되지 않는다고 보고되었다 (21,22). 그러므로 plexin A1의 리간드로서 Sema 3A가 RA병인에 관여할 가능성은 낮다고 판단된다. Wong 등은 T세포를 항원으로 자극할 때 가지세포의 plexin A1이 보조자극인자로서 중요한 기능을 한다고 하였다 (12). Takegahara 등은 Sema 6D가 T세포에 강하게 표현되어 있으며 NP-1과 독립적으로 plexin A1에 직접 결합할 수 있는 리간드로 작용할 가능성을 제시하였다 (13). 이상의 보고를 종합하여 볼 때 RA T세포 표면의 Sema 6D가 FLS 표면의 plexin A1과 결합하여 IL-6와 MCP-1 생성을 유도했을 것으로 추론해 볼 수 있다. 향후 이에 관한 추가적인 연구가 필요하겠다.

RA는 T세포 매개성 자가면역질환이다 (23). 항원에 의해 자극된 T세포는 IL-17 등의 시토카인 분비를 통해 병인에 직접 관여하며 주변의 단핵구와 B세포를 자극하여 염증반응을 유지 또는 증폭시킨다 (23). 이외에도 휴지기 T세포는 RA에서 FLS와 상호작용하여 IL-6, MCP-1, prostaglandin, 기질단백분해효소 등의 생성을 유도하는 효과기 세포로서 기능한다 (16,23). FLS에 대한 T세포의 이러한 효과기 기능은 이종 혹은 동종 T세포 간에 차이를 보이지 않았다 (16). 그러나 아직까지 휴지기 T세포와 FLS 간 상호작용을 매개하는 세포표면 단백질이 무엇인지는 분명하지 않다. 활성화된 T세포 역시 FLS를 강하게 자극하는데, 예를 들어 2형 콜라겐으로 자극시킨 T세포를 FLS와 공동배양할 경우 MCP-1, IL-8 등의 케모카인 생성이 증가된다 (17). 이 조건에 항CD40 차단항체를 처리하면 케모카인 생성이 50% 이상 감소하는데, 이는 휴지기 T세포와는 달리 활성화된 T세포에서는 CD40와 CD40L 상호작용이 효과기 기능을 부분적으로 매개함을 시사한다 (17). 본 연구에서 RA말초 말초혈액 T세포에 의해 자극된 FLS로부터 생성되는 IL-6의 증가가 plexin A1의 억제에 의해 거의 완전히 차단되었으나, 윤활액 T세포의 효과기 기능은 plexin A1 siRNA에 의해 단지 부분적으로만 차단되었다. 항원에 의해 자극된 활성화된 T세포가 말초 혈액에서보다 윤활액에 집중되어 있음을 고려할 때, 본 연구 결과는 휴지기 T세포일수록 FLS에 대한 효과기 기능이 plexin A1에 전적으로 의존하는데 비해 활성화된 T세포의 경우 plexin A1에 부분적으로 의존함을 시사한다. 현재 RA T세포에서 Sema 6D를 포함하여 plexin A1의 리간드의 분포와 특성에 관한 연구가 진행 중이다.

결 론

면역세포의 생존과 세포 간 상호작용을 매개하는 단백질 중 하나인 plexin A1이 RA에 발병기전에 관련될 것이라는 가정하에 RA FLS에서 plexin A1의 분포와 역할을 조사하였다. OA 윤활막 조직에 비해 RA 윤활막 조직에서 plexin A1의 발현이 높았으며 포피세포층, 침윤된 백혈구, 혈관내피세포 등에 광범위하게 분포하고 있었다. Plexin A1의 발현은 배양된

RA FLS에서 증가되어 있었으며 NP-1의 발현분포와 일치하였다. Plexin A1은 FLS의 생존에는 영향을 주지 않았으나, T세포와 FLS 간의 상호작용에 의한 IL-6의 생성을 유도하는 데 결정적인 역할을 하였다. 이러한 결과들은 plexin A1이 RA FLS로부터 전염증성 시토카인의 생성을 유도하여 관절 내 염증반응을 유지, 증폭시키는 데 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.

REFERENCES

- 1) Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996;85:307-10.
- 2) Firestein GS. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* 1996;39:1781-90.
- 3) Koch A. Angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:951-62.
- 4) Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hypermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-39.
- 5) Firestein GS. Starving the synovium: angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest* 1999;103:3-4.
- 6) Lee SS, Joo YS, Kim WU, Min DJ, Min JK, Park SH, et al. Vascular endothelial growth factor levels in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2001;19:321-4.
- 7) Kim WU, Kang SS, Yoo SA, Hong KH, Bae DG, Lee MS, et al. Interaction of vascular endothelial growth factor₁₆₅ with neuropilin-1 protects rheumatoid synoviocytes from apoptotic death by regulating Bcl-2 expression and Bax translocation. *J Immunol* 2006;177:5727-35.
- 8) Kikutani H, Kumanogoh A. Semaphorins in interactions between T cells and antigen-presenting cells. *Nat Rev Immunol* 2003;3:159-67.
- 9) Narazaki M, Tosato G. Ligand-induced internalization selects use of common receptor neuropilin-1 by VEGF₁₆₅ and semaphorin3A. *Blood* 2006;107:3892-901.
- 10) Takahashi T, Fournier A, Nakamura F, Wang LH, Murakami Y, Kalb RG, et al. Plexin-neuropilin-1 complexes form functional semaphorin-3A receptors. *Cell* 1999;99:59-69.
- 11) Tordjman R, Lepelletier Y, Lemarchandel V, Cambot M, Gaulard P, Hermine O, et al. A neuronal receptor, neuropilin-1, is essential for the initiation of the primary immune response. *Nat Immunol* 2002;3:477-82.
- 12) Wong AW, Brickey WJ, Taxman DJ, van Deventer HW, Reed W, Gao JX, et al. CITA-regulated plexin-A1 affects T-cell-dendritic cell interactions. *Nat Immunol* 2003;4:891-8.
- 13) Takegahara N, Takamatsu H, Toyofuku T, Tsujimura T, Okuno T, Yukawa K, et al. Plexin-A1 and its interaction with DAP12 in immune responses and bone homeostasis. *Nature Cell Biology* 2006;8:615-22.
- 14) Yoo SA, Bae DG, Ryoo JW, Kim HR, Park GS, Cho CS, et al. Arginine-rich anti-vascular endothelial growth factor (anti-VEGF) hexapeptide inhibits collagen-induced arthritis and VEGF-stimulated productions of TNF-alpha and IL-6 by human monocytes. *J Immunol* 2005;174:5846-55.
- 15) Guan F, Villegas G, Teichman J, Mundel P, Tufro A. Autocrine class 3 semaphorin system regulates slit diaphragm proteins and podocyte survival. *Kidney Int* 2006;69:1564-9.
- 16) Yamamura Y, Gupta R, Morita Y, He X, Pai R, Endres J, et al. Effector function of resting T cells: activation of synovial fibroblasts. *J Immunol* 2001;166:2270-5.
- 17) Min DJ, Cho ML, Lee SH, Min SY, Kim WU, Min JK, et al. Augmented production of chemokines by the interaction of type II collagen-reactive T cells with rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2004;50:1146-55.
- 18) Eun SY, O'Connor BP, Wong AW, van Deventer HW, Taxman DJ, Reed W, et al. Cutting edge: rho activation and actin polarization are dependent on plexin-A1 in dendritic cells. *J Immunol* 2006;177:4271-5.
- 19) Negishi M, Oinuma I, Katoh H. Plexins: axon guidance and signal transduction. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1363-71.
- 20) Kruger RP, Aurandt J, Guan KL. Semaphorins command cells to move. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:789-800.
- 21) Miller LE, Weidler C, Falk W, Angele P, Schaumburger J, Scholmerich J, et al. Increased prevalence of semaphorin 3C, a repellent of sympathetic nerve fibers, in the synovial tissue of patients with rheu-

- matoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:1156-63.
- 22) Mangasser-Stephan K, Dooley S, Welter C, Mutschler W, Hanselmann RG. Identification of human semaphorin E gene expression in rheumatoid synovial cells by mRNA differential display. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;234:153-6.
- 23) Lundy SK, Sarkar S, Tesmer LA, Fox DA. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. T lymphocytes. *Arthritis Res Ther* 2007;9:202.
-