

## 특발성 염증성 근육병증 환자에서 IL-17 발현의 증가

부산대학교 의과대학 내과학교실, 신경과학교실\*, 의학 연구소\*\*, 부산성모병원 내과\*\*\*

백승훈\*\*\* · 이준희 · 김근태 · 이정욱 · 조미라 · 김주인\*\* · 이선희 · 김대성\* · 김성일

= Abstract =

### Increased Interleukin-17 Expression in Patients with Idiopathic Inflammatory Myopathies

Seung-Hoon Baek\*\*\*, Jun-Hee Lee, Geun-Tae Kim, Joung-Wook Lee, Mi-Ra Cho,  
Ju-In Kim\*\*, Sun-Hee Lee, Dae-Seong Kim\*, Sung-Il Kim

*Departments of Internal Medicine, Neurology\*, Research Institute\*\*, College of Medicine,  
Pusan National University, Department of Internal Medicine,  
Busan St. Mary's Medical Center\*\*\*, Busan, Korea*

**Objective:** Idiopathic inflammatory myopathies (IIMs) are systemic autoimmune diseases characterized by infiltration of T lymphocytes, monocytes, and macrophages in muscle tissues. Interleukin-17 (IL-17), a Th17 cytokine, has potent pro-inflammatory actions and plays a role in autoimmune diseases. We investigated the expression of IL-17 in muscle tissues of patients with IIMs.

**Methods:** We measured the IL-17 mRNA level of muscle tissues from 14 patients with IIMs (9 patients with dermatomyositis and 5 patients with polymyositis) by real-time RT-PCR and compared with controls. We also performed an immunohistochemical stain to detect IL-17 expression.

**Results:** The expressions of IL-17 were significantly enhanced in IIMs than controls. In immunohistochemistry, IL-17 was expressed in perimysial, endomysial and perivascular infiltrating inflammatory cells.

**Conclusion:** These results suggest that IL-17 plays a role in the immunopathogenesis of IIMs.

**Key Words:** Interleukin-17, Idiopathic inflammatory myopathies, Dermatomyositis, Polymyositis

< 접수일 : 2008년 1월 3일, 심사통과일 : 2008년 3월 27일 >

※통신저자 : 김 성 일

부산시 서구 아미동 1가 10번지

부산대학교병원 류마티스내과

Tel : 051) 240-7928, Fax : 051) 241-7580, E-mail : ksimd@pusan.ac.kr

본 연구는 2006년 부산대학교병원 임상연구비 지원으로 이루어졌음.

## 서 론

특발성 염증성 근육병증(idiopathic inflammatory myopathies, IIMs)은 주로 근육 조직에 염증세포가 침윤되어 근육의 만성 염증을 일으키며, 근육 조직 외에 폐, 심장, 관절 및 혈관 등에도 만성 염증을 일으키는 전신성 만성 염증 질환으로, 임상적, 면역병리학적, 인구학적 기준에 의하여 다발근육염(polymyositis, PM), 피부근육염(dermatomyositis, DM) 및 봉입체 근육염(inclusion body myositis, IBM)으로 분류된다 (1).

DM은 피부 및 근육 조직의 미세혈관에 보체가 침착되고 활성화되어 허혈(ischemia)을 유발하는 보체매개성 미세혈관병증(complement-mediated microangiopathy)이며, PM 및 IBM은 MHC class I의 발현이 증가된 근육조직에 CD8 림프구가 침윤되어 근육 조직의 염증과 괴사를 야기하는 T 림프구 매개성 염증질환이다 (1,2).

시토카인은 면역세포 및 염증세포의 염증 반응을 유발하고 매개하는 주요한 분자(molecule)로 염증성 자가면역 질환의 병인에 주요한 역할을 한다. 다양한 염증성 시토카인들이 정상 근육섬유에서 MHC class I의 발현을 증가시키고, IIMs 환자의 혈액 및 근육조직에서 발현이 증가됨이 보고되며, 이 중 interleukin-1 (IL-1) 및 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )는 IIMs에서 가장 널리 연구되어 치료 목표 시토카인으로 인식되고 있다 (3).

활성화된 Th17 세포에서 생성되는 IL-17은 다발성 경화증 등의 자가면역 질환의 병인에 중요한 역할을 하며, 류마티스 관절염 동물모델에서 관절의 염증과 파괴에 중요한 역할을 한다 (4,5). IL-17은 정상 근육 모세포(myoblast)에서 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-6의 생성과 HLA class I의 발현을 증가시키며, IIMs 환자의 근육 조직에서 면역조직화학 염색으로 IL-17이 발현됨이 보고되었다 (6,7). 그러나, 최근 IIMs 환자의 근육 조직에서 시행한 면역분석법(immunoassay)에서는 IL-17의 발현이 정상인에 비하여 증가되지 않음이 보고되었다 (8).

저자들은 IIMs으로 진단된 환자의 근육 조직에서 IL-17의 발현을 조사하고 IL-17의 발현과 임상양상과

의 관계를 알아보고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 1. 대상

1998년부터 2005년까지 부산대학교 병원 류마티스 내과를 방문하여 Bohan 및 Peter가 제안한 진단기준 (9,10)을 만족하는 PM 및 DM 환자 14명을 대상으로 하였으며, 실험에 사용된 근육조직은 진단을 위하여 근육 생검 시 채취한 조직 중 일부를 액체질소에 냉동시켜  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 저장한 후 사용하였다. 임상적으로 근염이 의심되어 근 생검을 시행하였으나 병리 소견 및 임상 경과 상 특이 소견이 없었던 3명의 근육 조직을 대조군으로 하였다. 모든 환자 및 대조군에서 근 생검 조직을 이용한 연구에 동의하는 서명을 받았으며, 부산대학교병원 임상시험위원회의 승인을 받아서 본 연구를 진행하였다.

### 2. 근육 조직에서의 IL-17의 발현

저장된 근육조직으로부터 TRIzol 용액(Invitrogen, CA, USA)을 이용하여 총 RNA를 추출하였다.  $1\mu\text{g}$ 의 RNA가 들어있는 각각의 solution들을  $65^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 가열한 후 reverse transcriptase가 포함된 mixture를 첨가하여,  $25^{\circ}\text{C}$ 에서 10분,  $42^{\circ}\text{C}$ 에서 60분,  $99^{\circ}\text{C}$ 에서 5분,  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 반응시킴으로써 cDNA를 얻었다. 위 반응은 First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-PCR [AMV] (Roche, Mannheim, Germany)를 사용하였다.

Real-time PCR은 Roche Diagnostics LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)를 사용하여 수행하였다. Microcapillary tube에 LightCycler-DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostics), cDNA template,  $\beta$ -actin 및 IL-17 각각의 시발체와  $25\mu\text{M}$   $\text{MgCl}_2$ 를 최종 부피가  $20\mu\text{l}$ 가 되게 섞은 후  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 Pre denaturation시킨 다음  $95^{\circ}\text{C}$ 에서 10초,  $60^{\circ}\text{C}$ 에서 5초,  $72^{\circ}\text{C}$ 에서 10초 동안 50회 증폭시켰다. IL-17의 시발체는 Bioneer (Korea)에서 구입하였다. 염기서열은  $\beta$ -actin (sense 5'-AACACCCAG CCATGTACG-3', anti-sense 5'-ATGTCACGCACGATTTCCC-3'), IL-17 (sense 5'-AGAGATATCCCTCT GTGATC-3', anti-sense 5'-TACCCCAAAGTTATCTCAGG-3')이었다. 각각의 시료는 Roche Dia-

gnostics LightCycler 소프트웨어의 결과에 따라 대조군과 실험군 사이의 mRNA양을 정량하였다. 즉, 각 유전자의 Threshold cycle ( $C_T$ )값을 준시료의 검량선에 적용하여 각 유전자의 증폭산물의 양을 얻었고, 여기에  $\beta$ -actin의 정량결과를 적용하여 보정값을 얻었다. 이 결과를 바탕으로 대조군을 1로 하여 각각의 PCR 증폭산물들을 상대 정량하였다.

### 3. 면역조직화학염색

동결조직을 OCT compound에 얼려 6  $\mu$ m 두께로 잘라 충분히 건조시킨 다음 면역조직화학염색을 하기 위해  $-20^{\circ}\text{C}$  아세톤에서 20분간 고정한 후 공기 중에 2시간 동안 건조시켰다. 조직절편을 PBS로 5분간 세척 후 0.3% hydrogen peroxide 용액에서 20분간 처리하였다. 면역조직화학염색은 Vector Elite ABC kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA)를 사용하였다. 조직절편을 1.5% normal goat serum으로 30분간 protein blocking한 다음 1차 항체인 IL-17 (sc-7927)와  $4^{\circ}\text{C}$ 에서 14~16시간 동안 반응시켰다. 1차 항체는 Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA에서 구입하였다. 반응이 끝난 후 biotin이 결합한 2차 항체를 실온에서 30분 반응시킨 다음 ABC reagent를 실온에

서 30분간 적용하였다. 각 단계별 세척은 0.05% Tween 20이 함유된 PBS를 사용하였다. 3,3'-diaminobenzidine (Sigma, STLouis, MO, USA)를 사용하여 발색반응을 보았고 hematoxylin으로 대조염색을 실시한 후 최종적으로 봉입을 시행하였다.

### 4. 통계학적 분석

실험 결과는 평균 $\pm$ 표준오차로 표현하였다. 각 실험군 간 비교는 SPSS 통계 프로그램을 이용하여 변수에 따라 분석하였으며, p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 판정하였다.

## 결 과

### 1. 대상 환자의 임상적 특성

대상 환자는 총 14명(PM 5명, DM 9명)이었으며, 남자 및 여자가 각 7명, 연령은  $43.6\pm 13.7$ 세이며, 질환의 이환기간은  $3.2\pm 3.1$ 개월이었고, 항 Jo-1 항체는 3명(23%)에서 양성이었다(표 1).

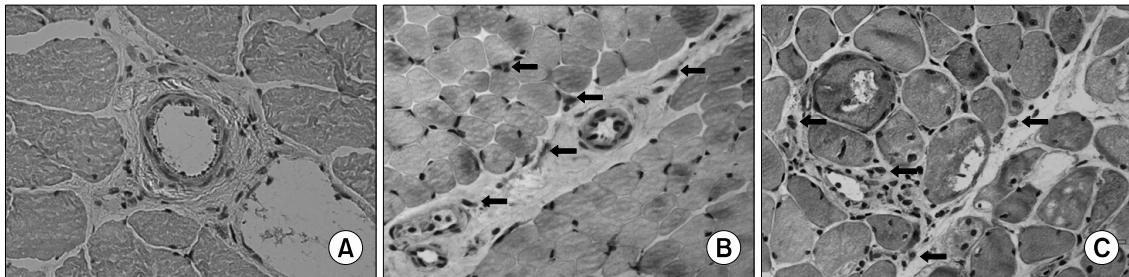
### 2. IL-17 mRNA 발현

IIMs 환자의 근육조직에서 IL-17의 발현은 대조군

**Table 1.** Demographic, clinical, and laboratory characteristics in 14 patients with idiopathic inflammatory myopathies

Patient/Sex	Age	Diagnosis	Disease duration (months)	CK, units/L	Anti-Jo-1 Antibody	Relative levels of IL-17 compared to controls
1/F	66	DM	1	3,969	negative	39.3
2/M	36	DM	3	2,815	positive	67.6
3/M	42	DM	2	1,163	negative	18.4
4/M	40	DM	12	70	negative	26.9
5/M	58	DM	1	3,006	negative	8.8
6/M	42	DM	2	>6,000	negative	18.7
7/M	56	DM	1	3,034	negative	62.2
8/F	36	DM	6	>6,000	negative	100.0
9/F	19	DM	3	668	not checked	122.0
10/F	51	PM	2	>6,000	negative	75.4
11/M	25	PM	3	32	negative	21.8
12/F	62	PM	1	2,207	positive	139.0
13/F	34	PM	7	2,743	positive	218.0
14/F	43	PM	1	1,820	negative	10.5
			43.6 $\pm$ 13.7	3.2 $\pm$ 3.1	2,823 $\pm$ 2,072	66.3 $\pm$ 60.6

CK: creatinine kinase (normal <160 units/liter), DM: dermatomyositis, PM: polymyositis



**Fig. 1.** Immunohistochemistry of IL-17 in muscle tissues from patients with IIMs (B, C) and control (A). In DM (B) and PM (C), IL-17 was expressed in perimysial, endomysial and perivascular infiltrating inflammatory cells (arrow). Muscle tissue from control was negative (A). Magnification,  $\times 200$ . IIMs: idiopathic inflammatory myopathies, DM: dermatomyositis, PM: polymyositis.

에 비하여  $66.3 \pm 60.6$  (최소 8.8~최대 218)로 유의하게 증가하였다. IL-17의 발현은 DM과 PM 환자군 두 군 간에 유의한 차이가 없었으며(DM  $51.6 \pm 39.4$ , PM  $92.9 \pm 86.3$ ), 환자의 연령, 질병이환기간, 근 효소치 및 항 Jo-1 항체의 양성 유무와 유의한 연관성은 없었다.

### 3. 면역조직화학염색

대조군의 근조직에서는 IL-17의 발현이 관찰되지 않았으나, IIMs에서 IL-17은 근육다발막(perimysium)과 근육섬유막(endomysium) 주위 및 혈관주위(perivascular)에 침윤된 염증세포에서 발현되었다(그림 1).

## 고 찰

IIMs는 임상양상 및 병인에서의 면역학적인 차이와 인구학적 차이에 따라 DM, PM 및 IBM 분류된다. DM은 피부 및 근육의 미세혈관에 보체가 침착 활성화되어 근섬유막(endomysium)의 모세혈관의 파괴에 의한 근육 허혈이 발생하는 보체매개성 미세혈관병증(complement-mediated microangiopathy)이며, PM 및 IBM은 활성화된 CD8<sup>+</sup> cytotoxic T 림프구가 MHC class I을 과다 발현한 근육섬유에 침윤하여 근육섬유의 괴사를 야기하는 T 림프구 매개성 자가면역 질환으로 인식된다 (1).

시토카인은 세포내 신호전달 분자(intracellular signalling molecules)로서 다양한 세포의 기능을 영향을 미치는 강력한 매개물질로 염증성 반응을 조절한다. 최근 IIMs에서 많은 종류의 시토카인에 대한 연구보

고들은 시토카인이 IIMs에서 주요한 역할을 함을 암시한다 (3). 특히 IL-1, TNF- $\alpha$  및 interferons (IFNs) 등은 근육세포에서 MHC class I 발현을 유발하여 IIMs의 병인에 주요한 역할을 함이 보고되어 치료 목표 시토카인으로 인식된다 (3).

IL-17은 Th17 세포에서 생성되는 시토카인으로 다발성 경화증 등의 자가면역 질환의 병인에 중요한 역할을 하며, 류마티스 관절염 동물 모델인 collagen-induced arthritis에서 IL-17은 관절의 염증과 뼈 및 연골의 파괴를 증가시키며, 항 IL-17 항체를 이용한 IL-17의 차단은 관절염증 및 파괴를 억제한다 (4,5). Chevrel 등은 IL-17이 정상 근육모세포에서 IL-6의 생성 증가와 IL-1 $\beta$ 에 의한 IL-6 생성 효과를 상승시키고, HLA class I의 발현을 유도하며, 면역조직화학염색 상 IL-17이 정상인 근육조직에서는 발현되지 않으나 5명의 DM 및 4명의 PM 환자 중 각 2명의 근육조직에서 IL-17이 근육다발막(perimysium)의 염증세포 침윤지역에서 발현됨을 처음 보고하였으며, Page 등은 6명의 DM 및 6명의 PM 환자 중 각 3명의 근육조직 면역조직화학 염색에서 IL-17이 발현됨을 보고하였다 (6,7). 그러나, 위의 두 보고들은 대상 환자 50%의 근육조직에서 IL-17 단백질이 검출되지 않아 IL-17이 IIMs 환자의 근육조직에서 발현됨을 확인하였지만 IL-17 발현을 명확히 정량화하지 못했다. Baird 등은 multiplex immunoassay 방법으로 18명의 IIMs 환자의 근육조직에서 IL-17을 측정하였으나 IL-17이 전혀 검출되지 않는 결과를 보고하였다 (8). 이러한 상반된 결과는 각 연구에서의 환자 근육 조직의 차이 및 IL-17의 단백질생성을 측정하는 검사 방

법의 차이 등에 기인하는 것으로 생각된다. 본 연구는 14명의 IIMs 환자에서 IL-17의 mRNA 발현이 대조군에 비하여 현저히 증가됨을 확인하였고, 증가된 IL-17 발현이 임상양상과는 연관이 없음을 확인하였다. 또한, 본 연구는 IIMs 환자의 근육 조직에서 IL-17의 발현을 정량적으로 측정한 첫 보고인 것으로 추측된다.

Chevrel 등은 IIMs 환자의 근육조직에서 IL-17이 근육다발막의 염증세포 침윤이 많은 지역에서 발현됨을 보고하였고, Page 등은 이중 면역조직화학 염색 방법으로 근육조직에 침윤된 CD4+ T 림프구가 IL-17 및 IFN- $\gamma$ 를 발현함을 확인하였다 (6,7). 본 연구에서도 IL-17은 근육 다발막의 염증세포 침윤지역에서 발현됨을 확인하였으나 발현되는 세포를 이중 면역조직화학 염색으로 확인하지는 못했다.

결론적으로 본 연구는 IIMs 환자의 근육조직에서 IL-17 mRNA의 발현이 유의하게 증가되며 면역조직화학 염색 상 근육섬유다발막의 침윤세포에서 IL-17이 발현됨을 확인함으로써 IIMs의 면역학적 병인에 IL-17이 역할을 할 것임을 추측할 수 있었다.

## 결 론

저자들은 IIMs 환자의 근육 조직에서 IL-17 mRNA의 발현이 유의하게 증가되었으며, IL-17이 근육다발막의 침윤된 염증세포에서 발현됨을 확인하였다. 이러한 결과는 IL-17이 IIMs의 발병기전에 관여함을 암시한다.

## 참고문헌

- 1) Briani C, Doria A, Sarzi-Puttini P, Dalakas MC. Update on idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmunity* 2006;39:161-70.
- 2) Wiendl H, Hofffeld R, Kieseier BC. Immunobiology of muscle: advances in understanding an immunological microenvironment. *Trend Immunol* 2005;26: 373-80.
- 3) Salomonsson S, Lundberg I. Cytokines in idiopathic inflammatory myopathies. *Autoimmunity* 2006;39: 177-90.
- 4) McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 2007;8:913-9.
- 5) Toh ML, Miossec P. The role of T cells in rheumatoid arthritis: new subsets and new targets. *Curr Opin Rheumatol* 2007;19:284-8.
- 6) Chevrel G, Page G, Granet C, Streichenberger N, Varennes A, Miossec P. Interleukin-17 increases the effects of IL-1 beta on muscle cells: arguments for the role of T cells in the pathogenesis of myositis. *J Neuroimmunol* 2003;137:125-33.
- 7) Page G, Chevrel G, Miossec P. Anatomic localization of immature and mature dendritic cell subsets in dermatomyositis and polymyositis. *Arthritis Rheum* 2004;50:199-208.
- 8) Baird GS, Montine TJ. Multiplex immunoassay analysis of cytokines in idiopathic inflammatory myopathy. *Arch Pathol Lab Med* 2008;132:232-8.
- 9) Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (first of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:403-7.
- 10) Bohan A, Peter JB. Polymyositis and dermatomyositis (second of two parts). *N Engl J Med* 1975;292:403-7.