

경구관용이 유도된 관절염 모델에서 CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포 상의 Indoleamine 2,3-Dioxygenase 발현 증가

가톨릭대학교 의과학연구원 류마티스연구센터

김영주 · 김호연 · 박민정 · 민소연 · 박현실 · 조미라

= Abstract =

Increased Indoleamine 2,3-Dioxygenase Expressing CD11c⁺CD11b⁺ Dendritic cells in Oral Tolerance to Type II Collagen

Young Joo Kim, Ho-Youn Kim, Min Jung Park, So-Youn Min, Hyun-Sil Park, Mi-La Cho

*The Rheumatism Research Center, Catholic Research Institute of Medical Science,
The Catholic University of Korea, Seoul, Korea*

Objective: Indoleamine 2, 3-dioxygenase (IDO), an immuno suppression enzyme, is one of the initial and rate-limiting enzymes involved in the catabolism of the essential amino acid tryptophan. IDO inhibits T cell proliferation, induces T cell apoptosis, and plays a fundamental role in autoimmunity and allergy. We investigated which subtype of dendritic cells (DCs) is involved in IDO expression and the generation of regulatory T cells during the induction of oral tolerance in type II collagen-induced arthritis (CIA).

Methods: Type II Collagen was fed to DBA/1J mice before immunization. Changes in DC subtypes and induction of regulatory T cell in orally tolerized CIA mice were analyzed. Whether the effect of DC subtype was modulated by the IDO expression, was determined by flow cytometry (FACs) and confocal microscopy.

Results: IDO expression of CD11c⁺ DCs was higher in orally tolerized CIA mice than in non-tolerized CIA mice. CD11b⁺ DCs of the CD11c⁺DCs, subtype was higher in the induction of in IDO expression. Our data suggest that these IDO expressing DCs of oral tolerized mice suppressed type II collagen-specific T cell proliferation and favored the differentiation of naïve CD4⁺ T cells into regulatory T cells. Especially, CD11c⁺CD11b⁺ DCs expressed IDO, which

< 접수일 : 2008년 11월 13일, 심사통과일 : 2008년 11월 29일 >

※통신저자 : 김 호 연

서울시 서초구 반포동 505번지

가톨릭대학교 의과학연구원 류마티스연구센터

Tel : 02) 590-2963, Fax : 02) 599-4287, E-mail : ho0919@catholic.ac.kr

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 우수연구센터 육성사업 및 내과연구 재단의 지원으로 수행되었음(R11-2002-098-05003-0).

is known to be associated with regulatory T cell induction.

Conclusion: We observed that oral tolerance induced the increase in IDO-expressing CD11c⁺CD11b⁺ DCs, which appeared to induce regulatory T cells. IDO-expressing CD11c⁺CD11b⁺ DCs are involved in oral tolerance, which may provide a new therapeutic approach for the treatment of rheumatoid arthritis.

Key Words: CD11c⁺CD11b⁺ dendritic cells, Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), Oral tolerance, Regulatory T cell, Autoimmune arthritis

서 론

경구관용이란 소화기를 통하여 체내로 들어 온 항원에 대한 면역 반응이 억제되는 현상을 일컫는다. 류마티스관절염의 경우 제2형 콜라겐을 경구 투여하면 관절의 염증이 완화되는 치료 효과를 얻을 수 있다 (1,2). 그러나 아직 경구 유도 기전이 확실하게 밝혀져 있지 않다 (3). 현재 경구관용기전 연구에서 키누레닌 대사 경로(Kynurenine metabolic pathway)를 통한 트립토판 이화작용에 관련하여 주목하고 있다. 이런 경로를 통해 트립토판을 분해하는 효소인 indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO)는 트립토판 경로 기전에 의한 부산물인 키누레닌을 생성하여 T세포 증식이 억제되고 세포사멸을 유도하여 면역관용을 매개하는 것으로 알려져 있다 (4-6). 이런 경로를 통해 트립토판을 분해하는 효소인 IDO는 면역계를 포함하는 많은 세포에서 발견되고 있다. 이전 보고에 따르면 IDO의 발현을 억제시키면 태아에 대해 거부반응을 일으키는데 (7), 이것은 트립토판의 분해과정이 면역관용 유지에 있어 필수적이라는 것을 시사한다.

수지상세포(dendritic cells, DCs)는 가장 강력한 항원 전달세포로써 그들의 위치, 성숙도, 활성 상태, 아형에 따라 일부는 T세포 활성화인으로 작용하고 일부는 말초 T세포 반응을 유도한다 (8-13). 수지상세포에서 발현된 IDO는 T세포의 증식과 생존에 영향을 미친다. 사람과 마우스의 수지상세포에서 발현되는 IDO는 조절성 표현형을 갖는 T세포의 분화를 유도한다 (5,14,15). 우리는 이전 보고에서 경구관용이 유도된 마우스의 파이어 소절 내 CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포는 IL-10의 분비를 증가시키고, 조절성 T세포의 분화를 유도할 뿐만 아니라 CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포를 관절염 유도 마우스에 입양 전이하였을

때 관절염을 현저히 억제함을 관찰한 바 있다 (16). 마우스의 CD8 α ⁺ 수지상세포에서 발현되는 IDO가 종양항원에 대한 지연성 과민반응(DTH)을 억제한다고 보고되었다 (17). 또한 Mellor 등은 CpG oligonucleotide를 생체 내로 주입하였을 때, 비장세포내 CD19⁺ 수지상세포에서 IDO 발현이 유도되고 IDO에 의존적인 면역 조절 기능을 갖는다고 보고하였다 (18). Puccetti 등은 IDO를 발현하는 plasmacytoid 수지상세포가 염증과 반응을 조절하는 중요한 역할을 한다고 보고하였다 (19). 그러나 경구관용이 유도된 관절염 마우스 모델에서 특정 수지상세포가 이러한 IDO를 발현하는지 조사가 필요하며, 이러한 IDO를 발현하는 특정 수지상세포가 효과 T세포와 면역조절 T세포를 조절하는지에 대한 연구가 필요하다. 면역관용의 기전을 규명하는데 있어서, IDO에 의해 T세포 증식을 억제시키는 트립토판 기전을 이용하여, 본 연구에서는 제2형 콜라겐으로 경구관용을 유도한 관절염 모델 마우스의 CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포에서 IDO 발현이 증가되었고 또한 그것은 type II collagen (CII)에 특이적인 효과 T세포증식 반응을 억제함과 동시에 면역 조절 T세포의 생성을 유도하는데 관여함으로써 면역관용을 매개하는데 중요한 역할을 수행하고 있음을 관찰하였다. 이러한 결과를 통해 관절염의 치료모델인 경구관용모델에서 경구면역관용 기전규명에 접근할 것을 기대한다.

대상 및 방법

1. DBA/1J 마우스의 경구관용 유도

7주령의 DBA/1J 마우스(SLC Inc. Shizoka, Japan)에 2주간 이틀에 한 번씩 0.05 N 아세트산에 4 mg/ml로 녹인 bovine CII를 100 μ g/100 μ l씩 경구투여하였다. 대조군으로 사용되는 DBA/1J 마우스에는

phosphate- buffered saline (PBS; Gibco, Gaithersburg, MD)를 투여하였다.

2. 관절염 유도과 관절염의 평가

경구 투여를 마친 후, type II collagen-induced arthritis (CIA) 유도는 CII 100 g을 Complete Freund's Adjuvant (CFA; Arthrogen-CIA, Redmond, WA) 와 1 : 1 (w/v) 비율로 혼합하여 꼬리에 피하주사 하였다. 2주후에 CII 100 g을 Adjuvant incomplete Freund (IFA; DIFCO, Detroit, Michigan) 와 1 : 1 (v/v)비율로 혼합하여 뒷다리 족근골(metatarsal)에 피하주사하였다. 관절염의 평가는 Rosolniec 등에 의한 평균 관절염지수(mean arthritic index) (20)에 기준하여, 꼬리에 주사한 시점으로부터 8주까지 일주일에 3회씩 실시하였고, 평가자료는 실험과 관계없는 3인이 작성하였다. 마우스마다 주사한 뒷다리를 제외한 나머지 세 개의 다리에서 다음과 같은 척도에 준한 점수를 합한 평균치를 얻고, 또다시 세 명의 평가자의 점수를 합하여 평균점수를 얻었다.

- 0점: 부종이나 종창이 없다.
- 1점: 발 또는 발목관절에 국한된 경한 부종과 발적
- 2점: 발목관절에서 족근골에 걸친 경한 부종과 발적
- 3점: 발목관절에서 족근골에 걸친 중등도의 부종과 발적
- 4점: 발목에서 다리전체에 걸쳐 부종과 발적이 있고 관절경적이 나타난 경우

3. 관절 조직 염색

2차 면역유도주사를 하지 않은 뒷다리를 제거하여 피부조직을 벗겨냈다. 관절조직은 4% paraformaldehyde가 포함된 PBS 용액에 담그고 4°C에서 1일간 방치하였다. 그 다음, 조직을 10% ethylenediamine-tetraacetic acid (EDTA; Amresco, Solon, Ohio)가 포함된 증류수에 담그고 1개월동안 탈회시킨 다음 파라핀으로 포매하였다. 절편의 두께는 7 μ m로 하였고 이를 탈파라핀, 재함수 과정에 이어 헤마토실린과 에오신으로 염색하였다.

4. T세포 증식반응

CIA 유도 5주째에 비장을 적출하였다, 적출한 비장

은 PBS 용액으로 2회 세척 후 가위로 잘게 자르고, 이를 Cell strainer (BD Falcon, Bedford, MA)에 통과시켰다. 4°C에서 1,300 rpm으로 5분간 원심분리 후 상층액을 제거한 비장 세포들 중에서, 적혈구는 적혈구용해 용액(2.06% Tris와 0.83% NH_4Cl 이 1 : 9로 섞임)과 실온에서 20분간 반응시킨 후 제거하였다. 제거 후 세포층을 10% 우태아혈청이 포함된 RPMI1640 (Gibco) 배지에 재부유시켰다. T세포를 분리하기 위해 anti mouse CD4 microbead (Miltenyi biotec, Bergisch Gladbach, Germany)와 4°C에서 15 분간 반응시킨 후 1% BSA, 2 mM EDTA (Amresco) 가 포함된 PBS 용액(pH7.4)으로 세척하였다. 그것을 column (Miltenyi biotec)에 통과시켜 CD4^+ T세포를 얻었다. 항원제시 세포만을 얻기위해서, T세포는 Mouse pan T cell isolation kit (Miltenyi biotec)와 4°C에서 15분간 반응시킨 뒤 앞에서와 같은 방법으로 column에 통과시킨 후 T세포를 제거하였다. 항원제시세포는 스스로 증식하지 못하게 하고 CD4^+ T세포에 항원제시기능만 갖게 하기 위해 5,000 rad 에서 방사선 조사 하였다. 위와 같은 방법으로 경구관용 유도군과 관절염 유도군의 비장세포에서 anti CD11c microbead (Miltenyi biotec)를 이용하여 수지상세포를 분리하였다. $\text{CD11c}^+ \text{CD11b}^+$ 수지상세포를 분리하기 위해 앞에서 분리한 수지상세포에 anti-CD11c FITC 항체(Pharmingen, San Diego, CA)와 anti-CD11b PerCP 항체(Pharmingen)를 넣고 4°C에서 15 분간 반응시키고 PBS로 씻어 준 다음 FACs Ventage (Becton Dickinson, San Diego, CA)로 분리하였다. 앞서 얻은 CD4^+ T세포와 항원제시세포를 각각 1×10^5 cell/well씩 넣고 경구관용 유도군과 대조군인 관절염 유도군의 CD11c^+ 또는 $\text{CD11c}^+ \text{CD11b}^+$ 수지상세포를 1×10^4 cell/well씩 넣은 후 CII 40 μ g/ml으로 자극하여 3일간 공조배양하였다. 그리고 IDO의 억제제인 1-methyl tryptophan (1-MT, Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) 200 μ M를 자극제 사용하기 2시간 전에 처리하였다. 배양종료 18시간 전에 ^3H -thymidine (NEN, Boston, MA)을 well당 1.0 Ci씩 넣어 주었다. 배양이 끝난 세포를 수집한 후 Beta counter (Packard Instrument Co., Downers Grove, IL)로 동위원소 양을 측정하였다.

5. 유세포 분석

앞서 T세포의 증식 반응 측정에서 설명한 것과 동일한 방법으로 관절염 유도군과 경구관용 유도군의 비장으로부터 single cell suspension을 만든 후 24 well plate에 well당 1×10^6 씩 넣어주고 40 μ g/ml CII로 자극한 것과 자극하지 않는 세포를 24시간 동안 배양하였다. 1-MT는 200 μ M씩 자극제를 사용하기 2시간 전에 처리하였다. 배양 종료 후 4시간 동안 Golgi Stop (Pharmingen)으로 고정시킨 뒤 anti-CD11c FITC 항체(Pharmingen), anti CD11b PerCP 항체(Pharmingen)를 넣고 4°C에서 20분간 반응시켰다. PBS로 두 번 씻어 준 후 Cytoperm/cytofix (pharmingen)를 부양하여 4°C에서 20분간 배양한 후에 permeabilization solution (Pharmingen)으로 씻어주었다. Anti IDO 항체를 넣고 4°C에서 30분간 반응시킨 다음 PBS로 씻어 주었다. 세포질 내 합성된 IDO를 표지시키기 위해 anti-rabbit IgG PE 항체(Pharmingen)를 넣고 4°C에서 30분간 반응시킨 후 PBS로 씻어주었다. 유세포분석

기(FACS Calibur; Becton Dickinson, San Diego, CA)로 측정하였다.

6. 공초점 현미경

손상되지 않은 비장 조직을 OCT compound (Sakura Finetech USA.)에 포매 시킨 뒤 액체질소로 동결하여 Cryostat (Lecia, Germany)을 이용하여 6~7 μ m 두께의 연속적인 조직 절편을 Coated slide에 부착하였다. 이것을 공기 중에서 30분간 건조시킨 후 4% paraformaldehyde solution (Sigma)에 넣어 실온에서 15분간 고정시킨 뒤 pH7.4 PBS로 15분간 씻어주었다. 불특정 결합을 억제하기 위해 10% normal goat serum을 넣고 상온에서 30분간 반응시켰다. Anti-CD11c APC 항체(Pharmingen), anti-CD11b FITC 항체(Pharmingen)와 anti-IDO 항체를 넣고 4°C에서 18시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 anti-rabbit IgG Cy3항체(Pharmingen)를 넣고 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 pH7.4 PBS로 30분간 씻어주었다. Cover-slip 위에 수용성 봉입제(Dako cytomation,

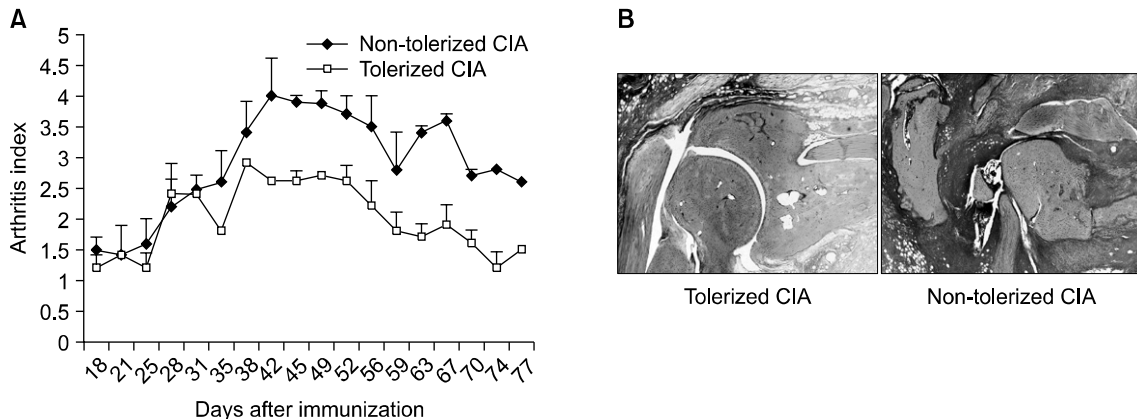


Fig. 1. Suppression of arthritis development in tolerized CIA mice. (A) Severity of arthritis was recorded as the mean arthritic index on a 0 to 4 scale according to the following criteria: 0=no edema or swelling, 1=slight edema and erythema limited to the foot or ankle, 2=slight edema and erythema from the ankle to the tarsal bone, 3=moderate edema and erythema from the ankle to the tarsal bone, and 4=edema and erythema from the ankle to the entire leg. The sum of the values from three legs, excluding the hind leg into which CII-incomplete Freund's adjuvant was injected, were determined and divided by three to obtain an average. The final value represents the average recorded by three independent observers. The arthritis index was significantly lower in the orally tolerized CIA mice group than those in the non-tolerized CIA mice group throughout the experiment period. (B) Section of joint from tolerized CIA mice and non-tolerized CIA mice were stained by hematoxylin and eosin. Tolerized CIA mice had preserved joint histology with mild inflammatory infiltrate (left), whereas non-tolerized CIA mice had intense inflammatory infiltrates and severe bony destruction (right).

Denmark)를 한 방울 떨어뜨린 뒤 조직 부위에 살포시 덮었다. 그리고 공초점 현미경(Zeiss, LSM 510 Meta, Germany)으로 관찰하였다.

7. 통계적 유의성의 검증

실험 결과는 평균±표준 오차로 나타냈으며, 통계적 유의성은 Student's t-test를 실시하였고 p 값이 0.05이하일 때 통계적으로 유의하다고 분석하였다.

결 과

1. CII 경구관용 유도를 통한 마우스의 관절 염증 억제 효과

DBA/1J 마우스에 관절염 유도 전 CII로 경구투여한 경구관용 유도군과 대조군인 관절염 유도군의 관절염 수치를 조사하기 위해 관절염 지수를 관절염 유도 후 2주째 되는 시점부터 11주에 걸쳐 조사하였다(그림 1A).

CII를 발에 주사한 시점으로부터 4주째까지 경구관용 유도군과 관절염 유도군 모두에서 위증도가 낮았다. 그 이후 관절염 지수가 증가하여 7주에서 10주 시기에 가장 큰 증가를 보이며, 14주째부터 감소하기 시작하여 15주에 두 군의 관절염 지수가 비슷한 수준으로 유지되는 것이 관찰되었다. 경구관용

유도군 역시 5주부터는 대조군과 마찬가지로 관절염이 증가하는 경향을 보였으나 관절염 유도군에 비해 전반적으로 낮은 관절염 지수를 보였다(그림 1A). CII로 인한 경구관용이 관절염 억제 효과를 조직학적으로 조사하기 위해 경구관용 유도군과 관절염 유도군의 관절을 헤마톡실린-에오신법으로 염색하였다(그림 1B). 관절염 유도군의 관절은 파괴가 심하고, 염증 부위에 면역세포들이 침윤되어 나타난 반면, 경구관용 유도군은 관절염 유도군에 비해 관절 파괴, 염증정도가 적고 면역세포들의 침윤이 현저하게 관찰되었다(그림 1B).

2. 경구 관용 유도군에서 수지상세포의 증가

수지상세포는 가장 강력한 항원제시세포로 T세포의 항상성을 조절함으로써 면역반응을 유도하거나 관용을 유도한다 (8). 우리의 이전 보고에서 수지상세포가 경구관용 유도에 중요한 역할을 한다고 보고한 바 있다 (15,21). 본 실험에서도 경구관용 유도군과 관절염 유도군의 비장세포에서 수지상세포의 비율을 유세포 분석을 통해 조사하였다. 경구관용 유도군과 대조군인 관절염 유도군으로부터 분리한 비장세포에서 $CD11c^{+}$ 수지상세포는 관절염유도군에 비해 경구관용 유도군에서 더 증가 되어있었다($4.87\pm1.08\%$ vs $7.66\pm0.65\%$, $p<0.05$) (그림 2A). $CD11c^{+}CD11b^{+}$ 수지상세포 빈도 역시 관절염 유도군에 비해 경구관

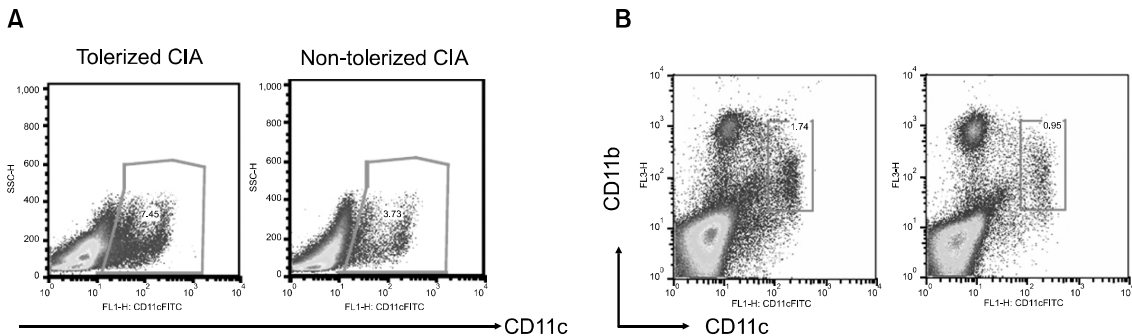


Fig. 2. FACS analysis of DCs in splenocytes. (A) splenocytes from tolerized CIA mice and non-tolerized CIA mice were stained with anti-mouse CD11c (FITC conjugated), anti-mouse CD11b (PerCP conjugated) antibodies and were analyzed on FACS. The proportion of $CD11c^{+}$ DCs in spleen was slightly higher in tolerized CIA mice than in non-tolerized CIA mice. (B) The proportion of $CD11c^{+}CD11b^{+}$ DCs in spleen was slightly higher in tolerized CIA mice than in non-tolerized CIA mice.

용 유도군에서 증가 되어 있었다($0.85 \pm 0.075\%$ vs $2.16 \pm 0.365\%$, $p < 0.05$) (그림 2B).

3. 경구 관용 유도군에서 수지상세포에 의한 CII에 특이적인 T세포 증식반응 억제

경구관용이 유도된 마우스의 수지상세포가 CII에 특이적인 T세포 증식 반응을 조절할 수 있는지 조사하기 위해, 관절염 유도군의 비장세포에서 분리한 CD4⁺ T세포와 경구 관용 유도군과 관절염 유도군에서 분리한 수지상세포를 각각 3일간 공조배양하였다. 경구관용 유도군의 CD11c⁺ 수지상세포는 관절염 유도군의 수지상세포와 달리 CII에 특이적인 T세포 증식 반응을 억제하였다($2,248 \pm 74$ cpm vs $4,811 \pm 388$ cpm, $p < 0.05$) (그림 3A). IDO 억제제인 1-MT를 처리했을때, 억제 되었던 CII에 대한 T세포 증식 반응이 회복되는 것을 관찰할 수 있었다($2,248 \pm 74$ cpm vs $4,601 \pm 472$ cpm, $p < 0.05$) (그림 3). 또한, 경구관용 유도군의 CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포가 대조군인 관절염 유도군 보다 CII에 특이적인 T세포의 증식 반응을 현저히 억제시키는 것을 관찰하였다 ($2,089 \pm 58$ cpm vs $5,004 \pm 104$ cpm, $p < 0.05$) (그림 3B).

4. 경구 관용 유도군의 수지상세포에 의한 면역조절 T세포 분화 유도

수지상세포가 면역조절 T세포를 분화 증식시킬 수 있는지 조사하기 위해, 경구관용 유도군에서 분리한 CD4⁺ T세포와 경구관용 유도군 또는 관절염 유도군의 수지상세포를 3일간 공조배양하였다. 경구 관용 유도군에서 비장세포의 CD11c⁺ 수지상세포와 CII를 함께 자극했을 때 의미있게 CD4⁺CD25⁺ T세포로 분화되었고($10.98 \pm 2.27\%$ vs $6.28 \pm 0.88\%$, $p < 0.05$), 이러한 증가는 IDO 억제제인 1-MT에 의해 현저히 감소되었다($10.98 \pm 2.27\%$ vs $6.25 \pm 0.85\%$, $P < 0.05$) (그림 4A). 이는 CD11c⁺ 수지상세포에서 발현된 IDO에 의해 CD4⁺CD25⁺ T세포가 유도되었음을 알 수 있다. 또한 CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포와 CII를 함께 자극했을때, 관절염 유도군에 비해 경구관용 유도군의 수지상세포와 공조배양에서 CD4⁺CD25⁺ T세포 생성이 의미있게 증가되었다($18 \pm 4.52\%$ vs $4.8 \pm 0.87\%$, $p < 0.05$) (그림 4B). 그러므로 CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포는 CD11c⁺ 수지상세포보다 더 강력하게 면역조절 T세포를 분화 시킬 수 있는 면역관용 항원제시 세포임을 알 수 있었다.

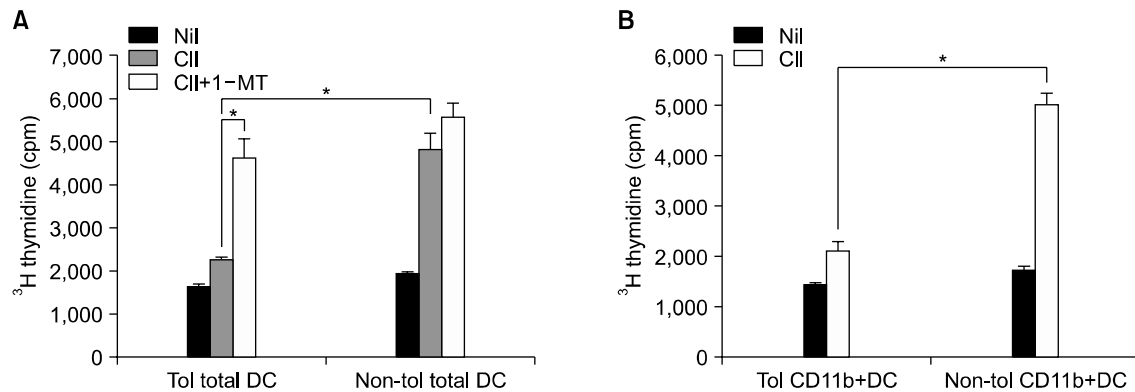


Fig. 3. CD11c⁺ DCs from tolerized CIA mice suppress CII-induced T cell proliferation. (A) Splenic CD4⁺ T cells from non-tolerized CIA mice were cultured with splenic CD11c⁺ DCs from non-tolerized CIA mice or tolerized CIA mice in the presence or absence of CII (40 ug/ml) with or without pretreatment with IDO inhibitor, 1-MT. CD11c⁺DCs from tolerized CIA mice suppressed CII-induced proliferation of CII-reactive CD4⁺ T cells, which was partly abrogated by 1-MT. Values are the mean±standard deviation from three independent experiments. * $p < 0.05$. (B) Splenic CD4⁺T cells from non - tolerized CIA mice were cultured with CD11c⁺CD11b⁺ DCs from non-tolerized CIA or tolerized CIA mice in the presence or absence of CII (40 ug/ml). CD11b⁺ DC from tolerized CIA mice suppressed CII-induced proliferation of CII-reactive CD4⁺ T cells. Values are the mean±standard deviation from three independent experiments. * $p < 0.05$.

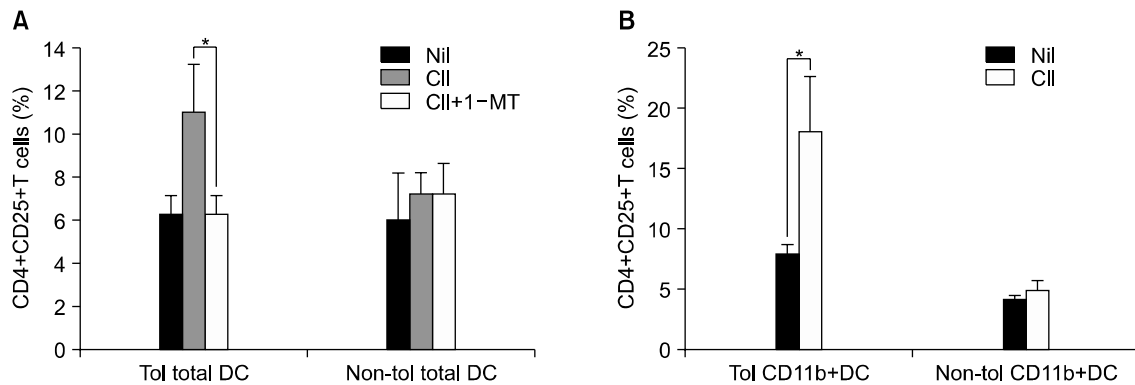


Fig. 4. Antigen-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell induction by DCs. (A) For regulatory T-cell induction, isolated CD4⁺ T cells from spleen of tolerized CIA mice were cultured with CD11c⁺ DCs from spleen of tolerized and non-tolerized CIA mice in the absence or presence of CII (40 μ g/ml) with or without IDO inhibitor, 1-MT for 3 days. The proportion of CD4⁺CD25⁺ T cells was determined using FACS. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells of CD11c⁺ DCs in tolerized CIA mice increased, which was partly abrogated by 1-MT. Values are the mean \pm standard deviation from three independent experiments. *P<0.05. (B) CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell expression in the same method as (A). The numbers were represented CD4⁺CD25⁺ cell percentage by CD11c⁺ and CD11b⁺ cells. CD4⁺CD25⁺ T cells were expanded to CD11c⁺ CD11b⁺ DCs of spleen from tolerized CIA mice in the presence of CII antigen stimulation. Values are the mean \pm standard deviation from three independent experiments. *p<0.05.

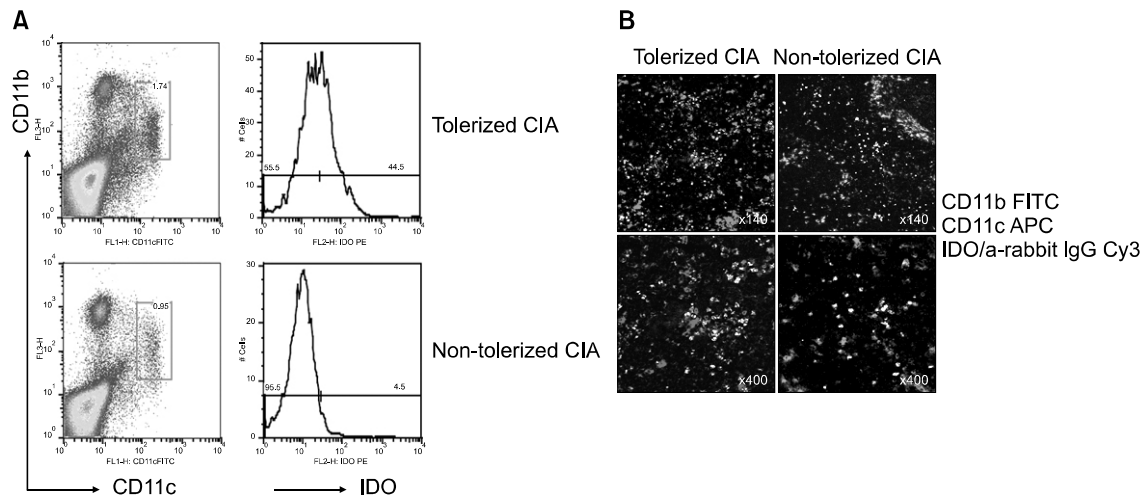


Fig. 5. Expression of IDO on CD11c⁺CD11b⁺ DCs. (A) To experiment expression of IDO in DCs of tolerized CIA mice and non-tolerized CIA mice, splenocytes from tolerized and non-tolerized CIA mice were stained with anti mouse CD11c (FITC conjugated), anti mouse CD11b (PerCP conjugated) and IDO (PE conjugated) antibodies and were analyzed on FACS. IDO expression of CD11c⁺CD11b⁺ DCs of tolerized CIA mice increased. (B) Cryo sections of spleen from tolerized CIA mice and non-tolerized CIA mice were stained by anti mouse CD11c (APC conjugated), anti mouse CD11b (FITC conjugated) and IDO (Cy3 conjugated) antibodies. We analyzed it on confocal microscopy. Merged CD11c⁺ CD11b⁺ IDO⁺ cells increased in tolerized CIA mice.

5. 경구 관용 유도군의 비장세포내 수지상세포에서의 IDO 발현 조사

이전 보고에 의하면 IDO는 사람의 조직뿐 아니라 수지상세포와 대식세포에서 발현되며, IFN- γ 나 다른 염증성 사이토카인에 의해 IDO 발현이 증가된다고 알려져 있다 (22-24). 본 연구에서는 경구관용 유도군의 말초면역기관인 비장 내 수지상세포에서의 IDO 발현을 관찰하기 위해 유세포 분석법을 시행하여 조사하였다. 경구관용 유도군의 비장 내 CD11c⁺ CD11b⁺ 수지상세포는 대조군인 관절염 유도군에 비해 IDO의 발현은 의미 있게 증가하였다(42.4 \pm 5.52% vs 4.3 \pm 0.187%, $p < 0.05$) (그림 5A). CD11c⁺CD8 α ⁺ 수지상세포 아형과 비교했을 때도 CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포에서 IDO의 발현이 의미있게 증가하였다(결과 제시하지 않음). IDO를 발현하는 수지상세포를 조직학적으로 조사하기 위해 경구관용 유도군과 관절염 유도군의 비장 조직을 냉동절편한 후 anti-CD11c APC항체, anti-CD11b FITC항체와 anti-IDO Cy3항체로 면역 형광 염색법을 시행하였다. 이것을 공초점 현미경으로 관찰하였다. 관절염 유도군보다 경구관용 유도군에서 파란색으로 표지된 CD11c⁺ 수지상세포와 초록색으로 표지된 CD11b⁺ 수지상세포가 더 많이 관찰되었다. 또한 초록색과 빨간색이 섞여 노란색으로 표지된 CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포가 더 많이 관찰되었을 뿐만 아니라 붉은 주황색으로 표지된 CD11c⁺CD11b⁺IDO⁺ 세포가 증가되어 있음을 관찰하였다(그림 5B). 위의 결과를 통해 경구관용을 유도한 마우스의 비장 조직에서 IDO를 발현하는 CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포가 증가되는 것을 관찰하였다.

고 찰

경구관용이란 특정 항원을 반복적으로 경구로 투여할 경우 항원에 특이적인 면역 반응이 억제되어 질병 관해를 일으키는 현상을 말한다. 실험동물모델에서 다발성 경화증 (25,26), 제1형 당뇨병 (27), 특발성 홍채염 (28) 등의 치료에 있어 항원의 경구 투여가 효과적이라고 보고되었다. 류마티스관절염에서도 CIA에 제2형 콜라겐을 반복적으로 경구투여하면

관절염이 호전된다는 보고가 있어 (29) CII의 경구투여가 류마티스관절염의 치료에 적용될 수 있음이 시사되었다. 그러나 경구관용이 유도되는 과정에서 항원의 농도나 정확한 기전은 명확하게 밝혀지지 않았다. 경구관용을 유도하는데 중요한 면역세포로써 수지상세포가 대표적으로 알려져 있으며, 세포의 성숙도나 그들의 아형과 주위 환경에 따라 면역관용을 유도하거나 면역반응을 일으킬 수 있다 (16,30). IDO는 필수 아미노산 트립토판을 키누레닌으로 분해하는 효소로 주로 수지상세포, 대식세포, B세포 에서 발현되고 T세포의 증식반응을 억제하고 세포 사멸을 유도하며 생체 내 면역반응을 줄임으로써 면역관용이 일어난다고 알려져 있다 (15,23,31,32).

본 연구에서는 경구관용 유도군과 대조군인 관절염 유도군의 비장세포에서 수지상세포의 비율을 조사하고, 그들의면역기능 조사와 IDO를 특이적으로 발현하는 수지상세포의 아형을 조사하였다. 그 결과, 관절염 유도군에 비해 경구 관용 유도군의 비장 내 CD11c⁺ 수지상세포와 CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포 아형이 증가하였다(그림 2). 그러나 CD11c⁺CD8 α ⁺ 수지상세포는 CD11c⁺와 차이가 없었다(결과 제시하지 않음). 이러한 결과는 우리의 이전 실험에서 이어 조절 내 CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포가 경구관용 유도군에서 증가한 것과 유사한 결과임을 관찰하였다 (16). 또한 experimental autoimmune encephalomyelitis 모델에 자가항원을 정맥주사하여 관용을 유도한 실험 결과에서도 관용을 유도한 마우스의 척수와 비장세포에서 전체 수지상세포의 수 뿐만 아니라 CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포의 수가 증가되었다는 보고가 있다 (33). 경구관용이 유도된 마우스에서 수지상세포의 증가는 면역 관용을 유도하는데 있어 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

경구관용 유도군에서 증가된 수지상세포가 T세포에 미치는 영향을 조사한 결과, 관절염 유도군 보다 경구 관용 유도군의 CD11c⁺ 수지상세포에서 CII에 특이적인 T세포의 증식반응이 의미있게 감소되었고, 면역 조절 CD4⁺CD25⁺ T세포의 분화가 현저하게 증가한 것을 관찰하였다(그림 3A, 4A). 하지만 IDO의 억제제인 1-MT를 전 처리하면 CII에 대한 T세포 증식 반응이 회복될 뿐 아니라 면역조절 CD4⁺CD25⁺ T세포가 감소되는 것을 관찰 할 수 있었다. 이러한

결과를 통해 IDO를 발현하는 수지상세포가 CII에 특이적인 병인 T세포의 증식 반응을 억제하고, 면역 조절 T세포를 유도하는데 관여함을 알 수 있다. 또한 경구관용 유도군의 CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포에 의해서도 T세포 증식 반응이 감소되었고, 조절성 T세포의 분화가 증가되었다. 특히 CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포는 CD11c⁺ 수지상세포 보다 더 의미있게 면역 조절성 CD4⁺CD25⁺ T세포의 분화를 유도시키는 것으로 관찰되었다(그림 3B, 4B). 면역조절 T세포는 자가관용을 유지하는데 중요한 뿐 아니라 알레르기 및 만성 염증 질환 및 자가면역질환을 치료하는데 중요한 역할을 한다. 최근 사람과 마우스에서 IDO를 발현하는 plasmacytoid 수지상세포에 의해 면역 조절 T세포가 분화 및 증식을 유도된다고 보고 되었다(34,35). 또한 이전 보고에서 우리는 경구관용 유도군의 파이어 소절 내 IDO를 발현하는 CD11c⁺ 수지상세포에 의해 CD4⁺CD25⁻ T세포를 CD4⁺CD25⁺ T세포 즉 면역조절 T세포로 분화시키는 것을 확인한 바 있다 (21). 이러한 결과를 토대로 CD11c+CD11b+ 수지상세포에 의한 면역조절 T세포의 증가에 있어 IDO가 관여할 것이라고 추측할 수 있다. CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포에서도 IDO의 발현을 조사한 결과, 관절염 유도군보다 경구 관용 유도군의 CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포에서 IDO의 발현이 증가하였다(그림 5A, B). 이는 CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포 내 IDO의 발현이 경구 관용의 유도에 있어 중요한 조절자임을 알 수 있다.

결 론

CII에 대한 면역관용을 유도한 마우스의 비장에서 증가된 CD11c⁺ 수지상세포와 CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포가 CII 특이적인 T세포 반응을 억제하고 면역 조절(CD4⁺CD25⁺) T세포의 분화를 유도하였다. CD11c⁺ 수지상세포의 경우, IDO의 억제제인 1-MT에 의해 T세포 반응이 회복되고 조절 T세포가 감소되는 것으로 보아 이러한 과정에 IDO가 관여함을 시사한다. 또한 경구관용군의 비장세포 내 CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포에서 IDO 발현이 증가되는 것으로 보아, CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포에 의한 면역조절 효과는 IDO에 의존적인 기전을 통하여 면역관용

을 유도하는데 중요할 것으로 생각된다. 우리의 이전 결과에서 보여준 경구관용 유도군의 파이어 소절 내에서 IDO를 발현하는 수지상세포의 증가와 비장세포에서 IDO를 발현하는 특이적인 병인 T세포의 증가는 국소적인 면역 관용뿐만 아니라 전신성 면역 관용을 유도 유지하는데 큰 역할을 하게된다.

결론적으로 경구 관용 유도군에서 증가된 CD11c⁺CD11b⁺ 수지상세포에 의한 면역 관용 유도는 IDO 발현을 증가시켜 항원에 특이적인 병인 T세포를 조절함으로써 자가면역 질환의 면역 관용 기전을 해석하는데 중요한 표적세포와 분자가 될 것으로 기대한다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 우수연구센터 육성사업 및 내과연구 재단의 지원으로 수행되었습니다. (R11-2002-098-05003-0)

참고문헌

- 1) Nagler-Anderson C, Bober LA, Robinson ME, Siskind GW, Thorbecke GJ. Suppression of type II collagen-induced arthritis by intragastric administration of soluble type II collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83:7443-6.
- 2) Garcia G, Komagata Y, Slavin AJ, Maron R, Weiner HL. Suppression of collagen-induced arthritis by oral or nasal administration of type II collagen. *J Autoimmun* 1999;13:315-24.
- 3) Friedman A, Weiner HL. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91:6688-92.
- 4) Mellor AL, Munn D, Chandler P, Keskin D, Johnson T, Marshall B, et al. Tryptophan catabolism and T cell responses. *Adv Exp Med Biol* 2003;527:27-35.
- 5) Mellor AL, Munn DH. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat Rev Immunol* 2004;4:762-4.
- 6) Stone TW, Darlington LG. Endogenous kynurenines as targets for drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:609-20.
- 7) Taylor MW, Feng GS. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and

- tryptophan catabolism. *Faseb J* 1991;5:2516-22.
- 8) Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:351-8.
- 9) Derry CJ, Harper N, Davies DH, Murphy JJ, Staines NA. Importance of dose of type II collagen in suppression of collagen-induced arthritis by nasal tolerance. *Arthritis Rheum* 2001;44:1917-27.
- 10) Daniels LK: Rapid in-office and in-vivo desensitization of an injection phobia utilizing hypnosis. *Am J Clin Hypn* 1976;18:200-3.
- 11) Mowat AM, Parker LA, Beacock-Sharp H, Millington OR, Chirido F. Oral tolerance: overview and historical perspectives. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1029:1-8.
- 12) Dubois B, Goubier A, Joubert G, Kaiserlian D. Oral tolerance and regulation of mucosal immunity. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1322-32.
- 13) Kelsall BL, Leon F. Involvement of intestinal dendritic cells in oral tolerance, immunity to pathogens, and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev* 2005;206:132-48.
- 14) Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB, et al. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science*. 2002; 297:1867-70.
- 15) Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol* 2003;24:242-8.
- 16) Min SY, Park KS, Cho ML, Kang JW, Cho YG, Hwang SY, et al. Antigen-induced, tolerogenic CD11c⁺, CD11b⁺ dendritic cells are abundant in Peyer's patches during the induction of oral tolerance to type II collagen and suppress experimental collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2006;54: 887-98.
- 17) Grohmann U, Fallarino F, Silla S, Bianchi R, Belladonna ML, Vacca C, et al. CD40 ligation ablates the tolerogenic potential of lymphoid dendritic cells. *J Immunol* 2006;166:277.
- 18) Mellor AL, Baban B, Chandler PR, Manlapat A, Kahler DJ, Munn DH. Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19⁺ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN type 1 signaling. *J Immunol* 2005;175:5601-5.
- 19) Fallarino F, Gizzi S, Mosci P, Grohmann U, Puccetti P. Tryptophan catabolism in IDO⁺ plasmacytoid dendritic cells. *Curr Drug Metab* 2007;8:209-16.
- 20) Barnett ML, Kremer JM, St Clair EW, Clegg DO, Furst D, Weisman M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with oral type II collagen. Results of a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum* 1998;41:290-7.
- 21) Park MJ, Min SY, Park KS, Cho YG, Cho ML, Jung YO, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase- expressing dendritic cells are involved in the generation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in Peyer's patches in an orally tolerized, collagen- induced arthritis mouse model. *Arthritis Res Ther* 2008;10:11R.
- 22) Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunol Today* 1999;20:469-73.
- 23) Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med* 1999;189:1363-72.
- 24) Bozza S, Fallarino F, Pitzurra L, Zelante T, Montagnoli C, Bellocchio S, et al. A crucial role for tryptophan catabolism at the host/*Candida albicans* interface. *J Immunol* 2005;174:2910-8.
- 25) Khoury SJ, Hancock WW, Weiner HL. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor β , interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med* 1992;176:1355-64.
- 26) Weiner HL, Mackin GA, Matusi M, Orav EJ, Khoury SJ, Dawson DM, et al. Double blind pilot trial of oral tolerance with myelin antigen in multiple sclerosis. *Science* 1993;259:1321-4.
- 27) Zhang ZJ, Davidson L, Eisenbarth G, Weiner HL. Suppression of diabetes in non-obese diabetic mice by oral administration of porcine insulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:10252-6.
- 28) Nussenblatt RB, Capsi R, Mahdi R, Cahn CC, Roberge F, Lider O, et al. Inhibition of S-antigen induced experimental autoimmune uveoretinitis by oral induction of tolerance with S-antigen. *J Immunol* 1990;144:1689-94.
- 29) Thompson HSG, Harper N, Bevan DJ, Staines NA. Gastric administration of type II collagen delays the onset and severity of collagen-induced arthritis in rats. *Clin Exp Immunol* 1986;6:581-6.
- 30) Mayer L, Shao L. Therapeutic potential of oral tolerance. *Nat Rev Immunol* 2004;4:407-19.
- 31) Hwu P, Du MX, Lapointe R, Do M, Taylor MW,

- Young HA. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol* 2000;164:3596-9.
- 32) Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and regulation of adaptive immunity. *J Immunol* 2003; 170:5809-13.
- 33) Li H, Zhang GX, Chen Y, Xu H, Fitzgerald DC, Zhao Z, et al. CD11c+CD11b+ dendritic cells play an important role in intravenous tolerance and the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2008;18:2483-93.
- 34) Chem W, Liang X, Perterson AJ, Muun DH, Blazar BR. The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol* 2008;181:5396-404.
- 35) Sharma MD, Baban B, Chandler P, Hou DY, Singh N, Yagita H, et al. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Clin Invest* 2007;117:2570-82.
-