

IL-15에 의한 류마티스관절염 환자 활막 섬유모세포에서의 SDF-1 유도

부산대학교 의학전문대학원 내과학교실¹, 가톨릭대학교 류마티스연구센터²

박영은¹ · 김성일¹ · 박성후¹ · 백승훈¹ · 오혜좌² · 허양미² · 조미라²

= Abstract =

IL-15 Induced an Increased SDF-1 Expression in the Synovial Fibroblasts of Patients with Rheumatoid Arthritis

Young-Eun Park¹, Sung-Il Kim¹, Seong-Hu Park¹, Seung-Hoon Baek¹,
Hye-Jwa Oh², Yang-Mi Heo², Mi-La Cho²

*Department of Internal Medicine, School of Medicine, Pusan National University,
Busan¹, The Rheumatism Research Center, Catholic Research Institute of Medical Science,
The Catholic University of Korea, Seoul², Korea*

Objective: Interleukin-15 (IL-15) recruits and activates synovial T cells, and IL-15 plays an important role in amplifying and perpetuating inflammation in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) is a potent chemoattractant for memory T cells in the inflamed RA synovium. This study investigated the effect of IL-15 on SDF-1 production in RA fibroblast-like synoviocytes (FLS).

Methods: The expressions of IL-15 and SDF-1 were determined from the synovium of patients with RA and osteoarthritis (OA) by performing immunohistochemistry. The expressions of SDF-1 was measured from the RA FLS that were cultured with IL-15 and IL-17 by real-time RT-PCR and ELISA. The SDF-1 expression was also measured, via ELISA, from the RA FLS stimulated by IL-15 together with the inhibitors of such intracellular signal molecules as phosphatidylinositol 3-kinase (PI 3-kinase, LY294002), STAT3 (AG490), MAP Kinase (PD98059), NF- κ B (parthenolide) and activator protein 1 (AP-1, curcumin).

Results: IL-15 and SDF-1 were mainly expressed in the RA synovium compared to that of the OA synovium. IL-15 increased the SDF-1 expressions and it, and had an additive effect with

<접수일 : 2010년 5월 7일, 수정일 : 2010년 5월 31일, 심사통과일 : 2010년 6월 2일>

※통신저자 : 김 성 일

부산시 서구 아미동1가

부산대학교 의학전문대학원 내과학교실

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

IL-17 on the SDF-1 expressions in the cultured RA FLS. The IL-15 induced increase of the SDF-1 expression in the cultured RA FLS was blocked by the inhibitors of PI 3-kinase, NF- κ B and AP-1.

Conclusion: The SDF-1 expression was increased in the RA synovium and it was up-regulated by IL-15 in the RA FLS through the PI 3-kinase, NF- κ B, and AP-1 pathways. These results imply that the IL-15 induced increase of the SDF-1 expressions may be involved in the immunopathogenesis of RA.

Key Words: IL-15, Stromal cell-derived factor-1, IL-17, Fibroblast-like synoviocytes, Rheumatoid arthritis

서 론

류마티스관절염(rheumatoid arthritis, RA)은 관절 활막의 지속적인 염증으로 연골 및 골을 포함한 관절 조직의 파괴가 발생하는 전신성 만성 염증성 자가면역 질환으로, 명확한 병인은 밝혀져 있지 않으나, 선천면역 세포(항원인지 세포), 후천면역세포(T 및 B 림프구) 및 활막섬유모세포(fibroblast-like synovocyte, FLS) 등의 활성화와 이들 세포에서 유리되는 사이토카인 및 케모카인들을 포함한 염증 매개물질들이 병인에 중요한 역할을 한다 (1).

Stromal cell-derived factor 1 (SDF-1; CXCL12)은 T 및 B 림프구, 단핵세포/대식세포들을 염증성 활막 내로 이동하도록 촉진하는 케모카인이다. SDF-1은 RA 환자의 골수 기질세포, FLS, 대식세포 및 혈관 내막세포에서 생성되며, RA 환자의 혈액, 활액 및 활막에서 발현이 증가된다 (2-5). SDF-1은 CD4⁺ T 세포의 이동 및 축적과 단핵세포의 활막 내 이동을 촉진하고, 혈관생성 유도 및 연골세포와 파골세포를 활성화시켜 관절파괴를 악화시킨다 (2,6). SDF-1 및 SDF-1 수용체인 CXCR4의 억제제들은 collagen-induced arthritis (CIA)에서 관절염 발생 빈도 및 중증도를 감소시킨다 (7,8).

IL-15는 RA의 병인에 중요한 염증성 사이토카인으로, RA 환자의 활액 및 활막에서 발현이 증가되고, 주로 대식세포, FLS 및 혈관 내막세포에서 발현된다 (9-11). IL-15는 대식세포와 memory T 세포의 상호 접촉에 의해 T 림프구를 염증반응 부위로 이동시키고 증식시킨다 (9). IL-15에 의하여 T 림프구에서 생성이 증가된 tumor necrosis factor (TNF), in-

terferon (INF)- γ 및 interleukin (IL)-17은 FLS에서 IL-15, IL-8 및 IL-6의 생성을 자극하여 염증을 악화시킨다 (12,13). CIA에서 IL-15의 기능 차단 시 관절염 발생 및 TNF, IL-1 β , IL-6 및 IL-17 생성이 감소하고, RA 환자에게 IL-15에 대한 항체 투여는 질병 활성을 감소시킨다 (14-16). 이러한 결과들은 IL-15가 RA에서 염증반응을 지속시키고 확장시키는데 중요한 역할을 함을 암시하며, 치료 전략의 표적 사이토카인으로서의 가능성을 시사한다.

저자들은 RA 환자의 활막에서 IL-15가 SDF-1의 발현에 미치는 영향에 대하여 조사하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

미국 류마티스학회(American College of Rheumatology)의 RA의 진단 기준에 부합되는 환자 중 무릎관절 치환술을 받는 4명(평균 연령은 51 \pm 11세)에서 활막 조직을 채취하였고, 대조군은 성별, 연령이 일치하는 골관절염(osteoarthritis, OA) 환자 4명에서 활막 조직을 채취하였다. 본 연구는 임상연구 윤리위원회로부터 승인 받았으며, 모든 환자로 부터 동의서를 획득하였다.

2. 시약

Recombinant human IL-15, IL-17, IL-1 β , anti-IL-15 antibody (Ab) 및 anti-SDF-1 Ab는 R&D System (Minneapolis, MN)으로부터 구입하였다.

3. 면역조직화학염색

파라포름알데하이드(4%)에 고정된 RA 및 OA 활

막을 파라핀에 포매한 후 절편기를 이용하여 $7\mu\text{m}$ 절편을 만들어 슬라이드에 부착하였다. 면역조직화 염색은 ABC (Vector laborites, Burlingame, CA, USA) kit를 사용하여 염색하였으며, 슬라이드에 부착된 절편을 자일렌과 에탄올로 탈파라핀과 함수를 시킨 후 3% H_2O_2 로 내인성과산화효소를 차단시키고, 인산화 완충액(phosphate buffered saline, PBS)으로 수세한다. 비 특이적인 반응을 차단할 목적으로 anti-mouse serum을 30분 반응시킨 후 일차 항체인 recombinant human anti-IL-15 Ab와 anti-SDF-1 Ab (R&D systems, 1 : 100)를 4°C 에서 다음날(16시간)까지 반응시켰다. 일차 항체 반응 후 결합이 안 된 항체를 PBS로 수세하고 바이오틴이 결합된 이차 항체와 과산화효소가 결합된 streptavidin반응을 시킨 후 DAB으로 발색시켰다. Mayer's 해마톡실린 대조염색 한 후 수세하고 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다. 음의 대조 조직(negative control tissue)은 isotype control antibody (Mouse IgG1 : R&D Systems, Minneapolis, MN)를 사용하였다.

4. 활막 섬유모세포(fibroblast-like synoviocyte, FLS)의 분리 및 자극

FLS는 RA 및 OA 환자의 활막에서 효소를 이용하여 분리하였으며, 조직은 2~3 mm 조각으로 잘게 자른 후 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 type I collagenase (Worthington, Freehold, NJ)와 함께 37°C , 5% CO_2 에서 4시간 동안 반응시켰다. 분리된 세포를 500 g에서 원심분리 하여 10% fetal calf serum (FCS), 2 mM L-glutamine, penicillin (100 units/mL), streptomycin ($100\mu\text{g/mL}$)를 가한 DMEM에 재부유시켜 75 cm^2 플라크스에 분주하였다. 하루가 지난 후 배양기에 부착되어 있는 세포만을 10% FBS를 가한 DMEM에 넣어 5% CO_2 와 37°C 의 조건에서 배양하고 배양액은 매 3일마다 교환하였다. 플라스크 바닥의 90~95%가 FLS로 증만되면 신선한 배양액으로 1 : 3 희석하여 계대 배양하였다. 실험에는 4~8 계대의 FLS를 사용하였다. 배양된 세포가 FLS임을 확인하기 위해 항 CD14 PE 항체(PharMingen, San Diego, CA), 항 CD3 FITC 항체 또는 항 Thy-1 (CD90) 항체(PharMingen)를 이용하여 유세포 분석을 시행하였다. 세포를 카운트하여 5×10^4 cells/well을 1

mL의 serum free DMEM/insulin-transferrin-selenium A (Life Technologies, Gaithersburg, MD) 배양액에 섞어 24-well plate에 분주 하여 준다. 다양한 농도의 IL-15 및 IL-17을 각각 혹은 함께 자극하거나, 신호 전달 억제 물질들(LY294002, AG490, PD98059, parthenolide, 그리고 curcumin)을 처리 후 IL-15 (10 ng/mL)로 자극하였다.

5. SDF-1의 단백질 발현 측정(ELISA)

FLS 자극 후 48시간째에 세포 배양 상층액을 모아 SDF-1 정량을 위한 ELISA를 시행하였다. Sandwich ELISA용 96 well plate (Nunc, Roskilde, Denmark)에 human anti-SDF-1 Ab (4 ug/mL ; R&D Systems)에 넣고 4°C , 밤새 반응시킨 후, 차단 용액(1% bovine serum albumin (BSA)/0.05% Tween200)이 함유된 phosphate buffered saline (PBS)를 첨가하여 실온에서 2 시간 반응시켰다. Biotinylated SDF-1 polyclonal antibody (400 ng/mL ; R&D Systems), streptavidin-alkaline phosphate (1 : 2,000, Sigma)와 avidin-peroxidase ($50\mu\text{L}$, 1 : 2,000), 501 tetramethylbenzidine substrate solution (Kirkegaard & Perry, Guildford, UK)을 차례대로 각 well에 첨가하여 반응시켰다.

6. SDF-1 mRNA 측정(real-time RT-PCR)

FLS를 다양한 농도의 IL-15로 자극 후 16시간째에 세포의 mRNA를 RNAzol B (Biotechx, Houston, TX)를 이용하여 추출하였다. 총 $2\mu\text{g}$ 의 추출된 mRNA를 Superscript reverse transcription system (Takara, Shiga, Japan), 42°C 에서 역 전사 시켰다. SYBR Green I (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany)를 이용하여 real-time PCR을 시행하였다. Real-time PCR 전용 capillary tube를 사용하여 LightCycler FastStart DNA mastermix (SYBR Green I) $2\mu\text{L}$, 각각의 primer $0.5\mu\text{M}$, MgCl_2 4 mM, 그리고 template DNA $2\mu\text{L}$ 를 포함하여 총 $20\mu\text{L}$ 가 되도록 하였다. SDF-1과 GAPDH 시발체의 염기 서열은 다음과 같았다; SDF-1 (5'-ATG-AAC-GCC-AAG-GTC-GTG-GTC-3' (sense), 5'-TGG-CTG-TTG-TGC-TTA-CTT-GTT-T-3' (antisense)), GAPDH (5'-CGA-TGC-TGG-GCG-TGAGTA-C-3' (sense), 5'-CGT-TCA-GCT-CAG-GGA-TGACC-3' (antisense)). SDF-1과 GAPDH에서, 변성을 위해 94°C 에서 30초, annealing은 56°C 에서 1분,

신장을 위해 72°C에서 1분의 과정을 30회 반복하였다. 형광커브는 LightCycler software v. 3.0에서 분석하였다.

7. MTT assay

96 well plate에 1×10^3 /mL의 농도로 세포를 배양하여, ITSA가 포함된 serum free DMEM 배양액으로 starvation한다. LY294002, AG490, PD98059, parthenolide 혹은 curcumin을 처리 후 IL-15는 10 ng/mL의 농도로 처리하였으며, 48시간 동안 37°C, 5% 배양기에서 배양 하였다. 여기에 MTT 용액(Thiazolyl blue, 2.5 mg/mL, indeiodinized H₂O) 10 μ L를 혼합하여 4시간 동안 반응시킨 후 5분간 원심 분리하고, 0.04 M HCl 100 μ L를 첨가하여 5분 동안 실온에 방치하였다가 ELISA 판독기로 595 nm로 측정하였다.

8. 통계적 유의성의 검증

결과는 평균과 표준오차로 표현하였고 통계적 유의성은 SPSS 통계 프로그램(version 10.0)을 사용하여 Mann-Whitney U test나 Wilcoxon's signed rank test를 실시하였고 p값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의하다고 분석하였다.

결 과

1. RA 활막 조직에서 IL-15 및 SDF-1의 발현 증가

RA 환자의 활막 조직에서 IL-15과 SDF-1의 발현이 대조군(골관절염 환자 활막 조직)에 비하여 증가되어 있음을 면역조직화학염색법을 통해서 관찰하였다. SDF-1과 IL-15은 모두 류마티스관절염 환자 활막에서 과발현 되어 있었다(그림 1).

2. RA (FLS)에서 IL-15에 의한 SDF-1 발현 증가

RA 환자 FLS에서 IL-15에 의한 SDF-1 발현이 조절되는지 알아보하고자, FLS 1×10^5 cell/mL 로 배양된 세포에 IL-15을 0.1, 1, 10, 50 ng/mL의 농도로 처리하여 12시간의 세포와 48시간 세포배양액에서 각각 SDF-1의 mRNA와 단백질 발현량을 real-time PCR과 ELISA 방법으로 평가하였다. 그 결과 IL-15 농도 의존적으로 SDF-1의 mRNA (그림 2A)와 단백질 발현량(그림 2B)이 FLS에서 증가되는 것을 관찰하였다(*p<0.05 compared to nil, [†]p<0.01 compared to nil).

IL-15과 IL-17을 함께 자극하였을 때 SDF-1의 단백질 발현에 부가적인 효과(additive effect)가 관찰되었다(*p<0.01 compared to nil, [†]p<0.05 compared to

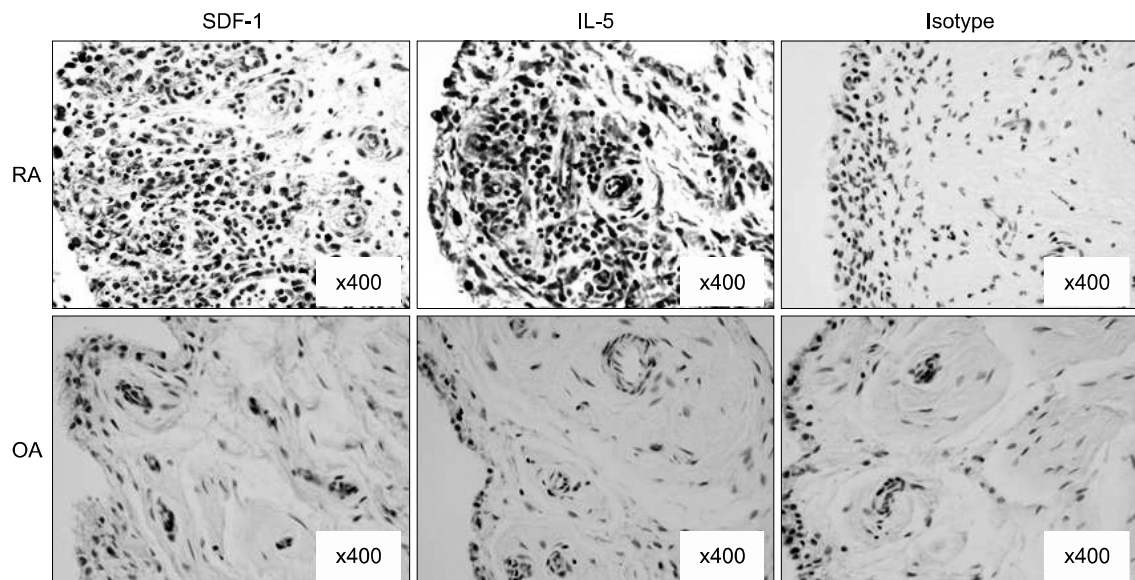


Fig. 1. Immunohistochemical staining for stromal-cell derived factor-1 (SDF-1) and interleukin-15 (IL-15) on the synovium of patients with rheumatoid arthritis (RA) and osteoarthritis (OA). IL-15 and SDF-1 were significantly more expressed in the RA synovium compared to that of the OA synovium (original magnification, $\times 400$).

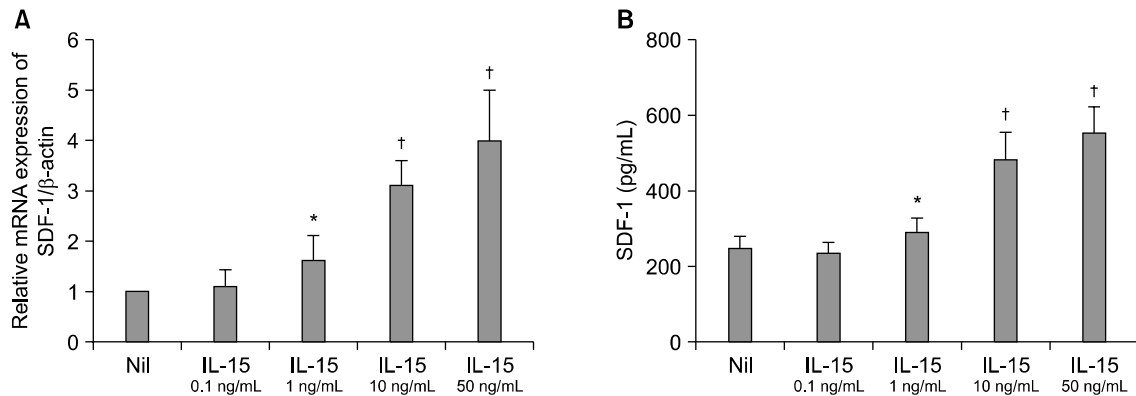


Fig. 2. The expressions of SDF-1 from the RA synovial fibroblasts stimulated with various concentrations of IL-15 (0, 0.1, 1, 10 and 50 ng/mL) were determined by real-time RT-PCR (A) and ELISA (B). IL-15 increased the SDF-1 expression in a dose-dependent manner. * $p < 0.05$ compared to nil, † $p < 0.01$ compared to nil.

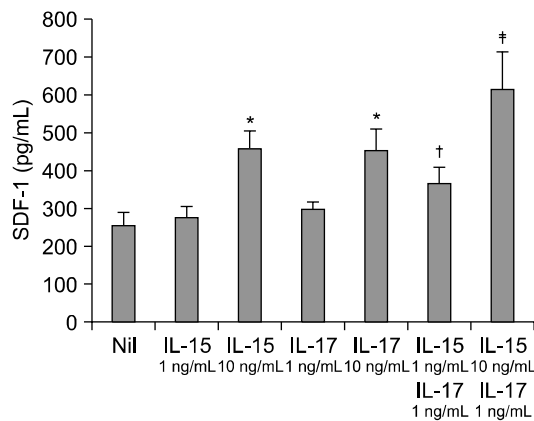


Fig. 3. The productions of SDF-1 from the RA FLS stimulated with IL-15 and IL-17 were determined by ELISA. IL-15 and IL-17 up-regulated SDF-1 production. IL-17 had an additive effect with IL-15 on the SDF-1 production. * $p < 0.01$ compared to nil, † $p < 0.05$ compared to IL-15 1 ng/mL, ‡ $p < 0.01$ compared to IL-15 10 ng/mL.

IL-15 1 ng/mL, ‡ $p < 0.01$ compared to IL-15 10 ng/mL) (그림 3).

3. RA FLS에서 IL-15에 의한 SDF-1 발현 증가 관련 세포 내 신호전달

RA 환자 FLS에서 IL-15에 의한 SDF-1 발현에 관여하는 신호전달 경로를 조사하기 위하여 세포에 IL-15와 신호전달 물질의 억제제(LY294002; PI3Kinase

inhibitor, AG490; JAK2-STAT3 inhibitor, PD98059; MAPK inhibitor, parthenolide; NF- κ B inhibitor, curcumin; AP-1 inhibitor)를 처리하였다. 이 때 PI3-kinase 억제제(LY294002), NF- κ B 억제제(parthenolide) 및 AP-1 억제제(curcumin)는 IL-15에 의한 활막섬유모세포의 SDF-1 단백질 발현을 유의하게 억제하였으나, STAT3 억제제(AG490) 및 MAPK 억제제(PD98059)는 SDF-1 단백질 발현에 영향이 없었다(* $p < 0.05$ compared to IL-15 10 ng/mL, † $p < 0.01$ compared to IL-15 10 ng/mL) (그림 4A). 억제제에 의한 세포독성 효과가 없음은 MTT assay로 확인하였다(그림 4B).

고 찰

저자들은 IL-15와 SDF-1 발현이 OA에 비하여 RA 활막의 lining layer에서 주로 발현되고, IL-15는 RA FLS에서 SDF-1의 mRNA 및 단백질 발현을 농도의존적으로 증가시키며, IL-15와 IL-17은 SDF-1 발현에 부가적인 효과가 있음을 확인하였다. 또한, IL-15에 의한 FLS의 SDF-1 발현 증가는 PI3-kinase, NF- κ B 및 AP-1 경로에 의함을 확인하였다.

SDF-1은 CXC 케모카인으로, 단독 수용체인 CXCR4와 결합하여 세포의 이동 및 정체에 중요한 역할을 한다 (17). SDF-1과 CXCR4의 결합은 인간면역결핍 바이러스(HIV), 암, 제1형 당뇨병 및 RA 등의 다양한 질병 병인에 관여한다 (18-20). RA에서 SDF-1은 T 림프구의 활막 내 이동 및 혈관 주위의 침윤을

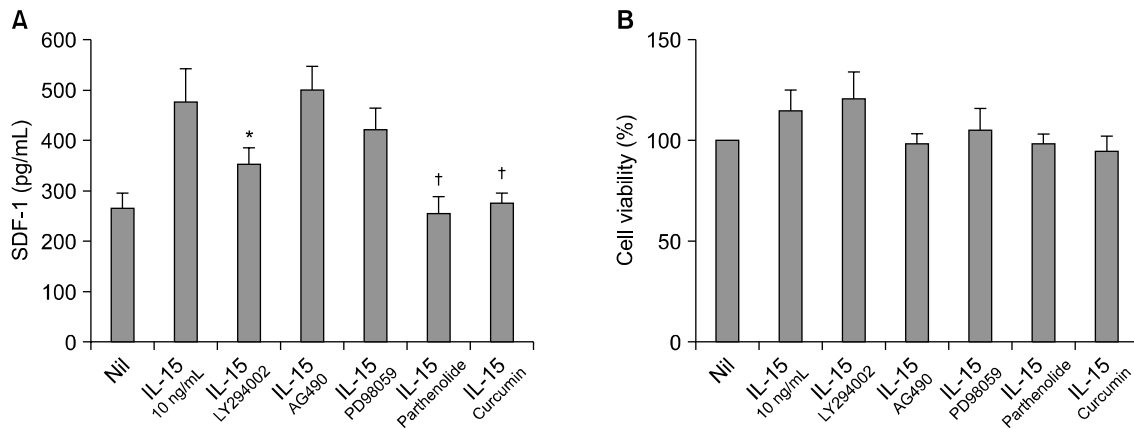


Fig. 4. (A) The IL-15 induced increase of SDF-1 was blocked by the inhibitors of PI3-kinase, NF- κ B and AP-1. RA FLS that were, pre-treated with the inhibitors of PI3-kinase (LY294002), STAT3 (AG490), MAPK (PD98059), NF- κ B (parthenolide) and AP-1 (curcumin), were cultured with IL-15; the production of SDF-1 was determined by ELISA. Up-regulation of SDF-1 by IL-15 was blocked by the inhibitors of PI3-kinase, NF- κ B and AP-1. (B) MTT assay was done to confirm that the inhibitors did not have cell toxicity. This assay showed that there was no difference in cell viability after all the stimulations and/or inhibitions. * $p < 0.05$ compared to IL-15 10 ng/mL, † $p < 0.01$ compared to IL-15 10 ng/mL.

촉진하고, T 림프구의 활성화에 의한 자가사멸(apoptosis)을 억제하여 활막 내 T 림프구를 축적시킨다 (6). 또한 활막 내 B 림프구를 축적하여 ectopic germinal center 형성을 촉진하고 FLS 활성화, 신생혈관생성 자극, 연골세포와 파골세포의 matrix metalloproteinase-3 (MMP-3)와 MMP-9의 분비를 자극하여 연골 기질 파괴 및 골 흡수 증가를 야기하여 RA의 병인에서 중요한 작용을 한다 (2). RA에서 SDF-1의 발현을 조절하는 기전에 대한 연구는 적는데, 항 CD40 항체, 저산소증(hypoxia), TGF- β 및 IL-17은 RA FLS에서 SDF-1 발현을 증가시키고, IL-1 β 와 TNF- α 는 RA FLS에서의 SDF-1 발현에 영향이 없지만 피부와 구강 내 섬유모세포의 SDF-1 발현을 감소시킨다 (6,21,22).

IL-15는 RA에서 염증 지속에 중요한 역할을 한다. IL-15는 활막 내로 T 림프구 이동 및 활성을 촉진시키고, 활성화된 T 림프구는 대식세포와 접촉하여 TNF- α 의 분비를 유도함으로써 염증 반응을 증폭, 지속시킨다 (9). 또한 IL-15는 TNF와는 독립적으로 auto-reactive CD4⁺CD28⁻T cell에서 자연 살상세포(natural killer cell, NK cell) 수용체인 NKG2Ddml 발현을 유도하여 RA의 self-perpetuating inflammation에 관여하므로, IL-15가 항 TNF 제제와는 무관하게 memory T 세포의 확장과 유지를 지속시킨다 (23).

RA 활막에서 IL-15 발현이 항 TNF 제제에 의하여 감소하지 않으므로 항 TNF제제에 반응이 불충분한 환자에서 IL-15의 기능 차단은 RA의 새로운 치료법이 될 수 있음을 시사하였다 (24).

염증성 활막 내의 CD4⁺T 세포 축적은 RA의 중요한 병인 중 하나이다. Toshihiro 등은 활막 CD4⁺ memory T 세포에서 발현된 CXCR4와 활막 세포에서 발현된 SDF-1의 상호작용이 CD4⁺T 세포의 이동에 중심적인 역할을 하며, IL-15가 T 림프구의 CXCR4의 발현을 증가시킨을 보고하였다 (6). 저자들은 IL-15가 RA FLS에서 SDF-1의 mRNA 및 단백질 발현을 농도 의존적으로 증가시키며, IL-15와 IL-17은 SDF-1 발현에 부가적인 효과가 있음을 확인하였다. 이러한 결과들은 IL-15가 T 림프구의 CXCR4 및 FLS의 SDF-1를 증가시켜 활막 내 T 림프구의 축적에 관여함을 암시한다. 활막의 활성화된 T 림프구와 대식세포 및 단핵세포와의 상호 작용에 의하여 증가된 TNF, IFN- γ 및 IL-17은 FLS를 자극하여 IL-15를 포함하는 염증성 사이토카인 및 매개 물질의 생성을 증가시킨다. 활막에서 증가된 IL-17과 IL-15는 FLS에서 SDF-1의 생성을 증가시켜 T 림프구의 활막 내 이동 및 활성화를 더욱 촉진하고, 혈관생성, 연골 파괴 및 골 흡수를 야기하여 관절 파괴가 지속적으로

진행 됨을 암시한다.

Kim 등은 RA FLS에서 IL-17이 SDF-1의 발현을 증가시키고, 이를 매개하는 세포 내 신호 전달 과정으로 NF- κ B, PI 3-kinase 그리고 AP-1과 연관됨을 보고하였다 (22). IL-15 receptor를 통한 IL-15의 세포 내 신호 전달과정으로는 NF- κ B, JAK1, JAK3, STAT3, STAT5 그리고 MAPK 등 여러 신호 전달 물질을 매개하는 것으로 알려져 있고, 본 연구에서는 RA FLS에서 IL-15가 NF- κ B, PI 3-kinase 및 AP-1과 연관하여 SDF-1의 발현을 증가시킴을 확인하였다 (25,26).

결 론

본 연구는 SDF-1과 IL-15가 RA 활막에서 발현이 증가하고, IL-15가 RA FLS에서 SDF-1의 발현을 증가시키며, IL-15에 의한 SDF-1의 증가는 PI-3 kinase, NF- κ B 및 AP-1의 신호 전달 과정을 통함을 확인하였다. 이러한 결과들은 IL-15에 의한 FLS의 SDF-1 증가가 RA의 염증 지속과 관절 파괴에 주요한 역할을 하며, IL-15 기능 차단을 이용한 치료법 개발에 새로운 근거가 될 것으로 생각된다.

참고문헌

- 1) Müller-Ladner U, Pap T, Gay RE, Neidhart M, Gay S. Mechanisms of disease: the molecular and cellular basis of joint destruction in rheumatoid arthritis. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2005;1:102-10
- 2) Mittal GA, Joshi VR, Deshpande A. Stromal cell-derived factor-1 alpha in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)* 2003;42:915-6.
- 3) Kanbe K, Takagishi K, Chen Q. Stimulation of matrix metalloproteinase 3 release from human chondrocytes by the interaction of stromal cell-derived factor 1 and CXC chemokine receptor 4. *Arthritis Rheum* 2002; 46:130-7.
- 4) Grassi F, Cristino S, Toneguzzi S, Piacentini A, Facchini A, Lisignoli G. CXCL12 chemokine up-regulates bone resorption and MMP-9 release by human osteoclasts: CXCL12 levels are increased in synovial and bone tissue of rheumatoid arthritis patients. *J Cell Physiol* 2004;199:244-51.
- 5) Pablos JL, Santiago B, Galindo M, Torres C, Brehmer MT, Blanco FJ, et al. Synovocyte-derived CXCL12

is displayed on endothelium and induces angiogenesis in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2003;170:2147-52.

- 6) Nanki T, Hayashida K, El-Gabalawy HS, Suson S, Shi K, Girschick HJ, et al. Stromal cell-derived factor-1-CXC chemokine receptor 4 interactions play a central role in CD4+ T cell accumulation in rheumatoid arthritis synovium. *J Immunol* 2000;165: 6590-8.
- 7) De Klerck B, Geboes L, Hatse S, Kelchtermans H, Meyvis Y, Vermeire K, et al. Pro-inflammatory properties of stromal cell-derived factor-1 (CXCL12) in collagen-induced arthritis. *Arthritis Res Ther* 2005; 7:R1208-20.
- 8) Tamamura H, Fujisawa M, Hiramatsu K, Mizumoto M, Nakashima H, Yamamoto N, et al. Identification of a CXCR4 antagonist, a T140 analog, as an anti-rheumatoid arthritis agent. *FEBS Lett* 2004;569: 99-104.
- 9) McInnes IB, al-Mughales J, Field M, Leung BP, Huang FP, Dixon R, et al. The role of interleukin-15 in T-cell migration and activation in rheumatoid arthritis. *Nat Med* 1996;2:175-82.
- 10) Turkow EW, van der Heijden IM, Breedveld FC, Smeets TJ, Daha MR, Kluin PM, et al. Increased expression of IL-15 in the synovium of patients with rheumatoid arthritis compared with patients with Yersinia-induced arthritis and osteoarthritis. *J Pathol* 1997;181:444-50.
- 11) Oppenheimer-Marks N, Brezinschek RI, Mohamadzadeh M, Vita R, Lipsky PE. Interleukin 15 is produced by endothelial cells and increases the transendothelial migration of T cells in vitro and in the SCID mouse-human rheumatoid arthritis model in vivo. *J Clin Invest* 1998;101:1261-72.
- 12) Miranda-Carús ME, Balsa A, Benito-Miguel M, Pérez de Ayala C, Martín-Mola E. IL-15 and the initiation of cell contact-dependent synovial fibroblast-T lymphocyte cross-talk in rheumatoid arthritis: effect of methotrexate. *J Immunol* 2004;173:1463-76.
- 13) Cho ML, Yoon CH, Hwang SY, Park MK, Min SY, Lee SH, et al. Effector function of type II collagen-stimulated T cells from rheumatoid arthritis patients: cross-talk between T cells and synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2004;50:776-84.
- 14) Ruchatz H, Leung BP, Wei XQ, McInnes IB, Liew FY. Soluble IL-15 receptor alpha-chain administration prevents murine collagen-induced arthritis: a role for IL-15 in development of antigen-induced immuno-

- pathology. *J Immunol* 1998;160:5654-60.
- 15) Ferrari-Lacraz S, Zanelli E, Neuberger M, Donskoy E, Kim YS, Zheng XX, et al. Targeting IL-15 receptor-bearing cells with an antagonist mutant IL-15/Fc protein prevents disease development and progression in murine collagen-induced arthritis. *J Immunol* 2004; 173:5818-26.
- 16) Baslund B, Tvede N, Danneskiold-Samsøe B, Larsson P, Panayi G, Petersen J, et al. Targeting interleukin-15 in patients with rheumatoid arthritis: a proof-of-concept study. *Arthritis Rheum* 2005;52:2686-92.
- 17) Murdoch C. CXCR4: chemokine receptor extraordinaire. *Immunol Rev* 2000;177:175-84.
- 18) Mbemba E, Benjouad A, Saffar L, Gattegno L. Glycans and proteoglycans are involved in the interactions of human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein and of SDF-1 α with membrane ligands of CD4⁺ CXCR4⁺ cells. *Virology* 1999;265:354-64.
- 19) Burger JA, Kipps TJ. CXCR4: a key receptor in the cross talk between tumor cells and their microenvironment. *Blood* 2006;107:1761-7.
- 20) Dubois-Laforge D, Hendel H, Caillat-Zucman S, Zagury JF, Winkler C, Boitard C, et al. A common stromal cell-derived factor-1 chemokine gene variant is associated with the early onset of type 1 diabetes. *Diabetes* 2001;50:1211-3.
- 21) Hitchon C, Wong K, Ma G, Reed J, Lyttle D, El-Gabalawy H. Hypoxia-induced production of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) and vascular endothelial growth factor by synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2002;46:2587-97.
- 22) Kim KW, Cho ML, Kim HR, Ju JH, Park MK, Oh HJ, et al. Up-regulation of stromal cell-derived factor 1 (CXCL12) production in rheumatoid synovial fibroblasts through interactions with T lymphocytes: role of interleukin-17 and CD40L-CD40 interaction. *Arthritis Rheum* 2007;56:1076-86.
- 23) Groh V, Bruhl A, El-Gabalawy H, Nelson JL, Spies T. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100: 9452-57.
- 24) Ernestam S, af Klint E, Catrina AI, Sundberg E, Engström M, Klareskog L, et al. Synovial expression of IL-15 in rheumatoid arthritis is not influenced by blockade of tumour necrosis factor. *Arthritis Res Ther* 2006;8:R18.
- 25) Giri JG, Kumaki S, Ahdieh M, Friend DJ, Loomis A, Shanebeck K, et al. Identification and cloning of a novel IL-15 binding protein that is structurally related to the α chain of the IL-2 receptor. *EMBO J* 1995;14:3654-63.
- 26) Waldmann T, Tagaya Y, Bamford R. Interleukin-2, interleukin-15, and their receptors. *Int Rev Immunol* 1998;16:205-26.