대 한 류 마 티 스 학 회 지
Vol. 17, No. 1, March, 2010
DOI:10.4078/jkra.2010.17.1.36

□ 원 저 □

류마티스관절염 활막세포에서 IL-17과 TLR 상호전달을 통한 RANKL과 IL-6 생성 조절

건국대학교 의학전문대학원 류마티스내과, 의생명과학연구원 의학면역센터[1],
가톨릭대학교 류마티스연구센터[2]

김경운[1] · 이상헌[1] · 조미라[2] · 오혜좌[2] · 우윤주[2] · 김석형[1] · 김해림[1]

= Abstract =

IL-17 and Toll-like Receptor 2 or Toll-like Receptor 4 Combined Engagement Upregulates RANKL and IL-6 in Human Rheumatoid Synovial Fibroblasts

Kyoung-Woon Kim[1], Sang-Heon Lee[1], Mi-La Cho[2], Hye-Joa Oh[2], Yun-Ju Woo[2], Suk-Hyung Kim[1], Hae-Rim Kim[1]

Division of Rheumatology Konkuk University School of Medicine, Medical Immunology Center, Institute of Biomedical Science and Technology[1], The Catholic University of Korea, Rheumatism Research Center[2], Seoul, Korea

Objective: The aim of this study was to clarify whether stimulation of recombinant IL-17, TLR2 and TLR4 by their specific ligands induces the production of RANKL and IL-6 in the fibroblast-like synoviocytes (FLSs) from RA patients.

Methods: FLSs were isolated from RA synovial tissues and they were stimulated with the IL-17, TLR2 ligand bacterial peptidoglycan (PGN) and TLR4 ligand lipopolysaccharide (LPS). The RANKL levels were assessed by RT-PCR and western blotting. The expressions of IL-17, TLR2, TLR4, RANKL and IL-6 in the RA synovium were quantified by immunohistochemistry and these values were compared with the values obtained in the osteoarthritis synovium. The increased IL-6 production in the culture supernatants of the RA FLSs was quantified by sandwich ELISA.

Results: The mRNA and protein levels of RANKL and IL-6 increased in the RA FLSs stimulated with PGN, LPS and IL-17, or PGN plus IL-17 or LPS plus IL-17. The expressions

＜접수일 : 2010년 2월 12일, 수정일 : 2010년 2월 18일, 심사통과일 : 2010년 2월 19일＞

※통신저자 : 이 상 헌
서울시 광진구 구의로 265
건국대학교병원 류마티스내과
Tel : 02) 2030-7541, Fax : 02) 2030-7747, E-mail : shlee@kuh.ac.kr

이 논문은 2007년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임(한국학술진흥재단-2007-355-C00028).

of IL-17, TLR2, TLR4, RANKL and IL-6 were much higher in the RA synovium than those in the osteoarthritis (OA) synovium.

Conclusion: We observed synergistic effects of TLR-2, TLR-4 and IL-17 upon the induction of RANKL. In conclusion, our data supports the previous evidence of an important role of TLR-2, TLR-4 and IL-17 in the pathogenesis of RA.

Key Words: Toll-like receptor, IL-17, RANKL, IL-6, RA FLS

서 론

류마티스관절염(Rheumatoid arthritis)은 관절내 대식세포 및 T 세포 등 염증세포의 침윤 및 활막의 이상증식(hyperplasia)을 특징으로 하며, 분비되는 염증성 사이토카인들이 관절 파괴에 중요한 인자로 작용한다고 알려져 있다 (1).

대표적 염증성 사이토카인으로는 지금까지 interleukin (IL)-1β와 tumor necrosis factor (TNF)-α가 주목을 받아왔다 (2). 하지만 최근 새로운 세포군으로 알려진 T helper 17 (Th17)에서 분비되는 IL-17이 자가면역질환에서 중요하다는 보고가 계속되면서, IL- 17이나 IL-23와 같은 사이토카인이 자가면역 관절염에서 새로운 치료 표적 사이토카인으로 주목을 받게 되었다 (3-5).

류마티스관절염에서 IL-17은 Th17 림프구에서 생성되어 활막세포, 단핵구, 대식세포 및 연골세포 등에 작용하여 다양한 사이토카인을 유리시켜 관절의 염증 및 파괴에 주요한 역할을 한다. 이들의 발현은 대부분 IL-17A, F로 활성화된 기억 CD4+나 CD8+ 세포에서 생산이 되며 (6), 미경험 T 세포에 IFN-γ와 IL-4를 차단하고, IL-6와 IL-21을 주어 배양하면 Th17로 분화하고, IL-23R가 증가된다 (7-9).

최근까지 연구에 의해 IL-17은 RANKL receptor를 통한 골흡수세포(osteoclast)를 활성화시켜 관절조직을 파괴 시키는데 관여하는 사이토카인으로 알려져 있다 (10). 또한 활막세포에서는 IL-6와 leukemia inhibitory factor (LIF) 생성을 유도하고 연골세포에서는 prostaglandin E2 (PGE2)와 nitric oxide (NO)의 생성을 유도하며 수지상 세포에서는 세포의 분화와 활성을 촉진시킬 수 있는 다양한 기능이 있는 물질로 알려져 있다 (11-13). IL-17은 골관절염 환자와 비교했을 때 류마티스관절염 환자의 윤활액과 혈액에서 더 많이 생성이 되는 것이 보고된바 있으며 (14), 관절염 동물모델에서 핵심적인 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다 (15).

Toll-like receptor (TLR)는 류마티스관절염의 병인에 관련된 중요한 인자 중 한가지로 생체 내로 침입한 미생물의 pathogen-associated molecular pattern (PAMP)과 결합하여 항원제시세포를 활성화하여 염증 사이토카인 및 케모카인을 생성하는 유전자를 활성화시키고 T 림프구를 활성화시켜 선천면역 및 적응면역에 주요한 역할을 한다고 알려져 있다 (16). 류마티스관절염 환자 활막 섬유모세포 및 대식세포에서 TLR-2가 발현되며, 배양된 류마티스관절염 활막 섬유모세포에서 IL-1과 TLR-2 리간드에 의하여 TLR-2 발현이 증가된다고 알려져 있다 (17).

또 하나의 중요한 인자인 receptor activator for nuclear Factor κB Ligand (RANKL)은 세포막에 위치한 TNF과의 하나로 파골세포의 전구체에 존재하는 receptor activatior of NF-κB (RANK)에 결합하여 파골세포의 형성 및 활성을 증가시킨다. 이러한 RANKL의 골 흡수활성은 osteoprotegerin (OPG)에 의해 조절되는데 이는 용해 가능한 TNF 수용체의 하나로 RANKL와 결합하여 RANKL-RANK간의 상호작용을 방해하는 유인수용체(decoy receptor)의 역할을 하므로 파골세포의 형성이 억제 된다 (18,19). 특히 최근에는 파골세포의 형성 및 생존, 골 흡수 기능은 RANKL 및 OPG의 절대량의 증감보다는 RANKL과 OPG의 비율에 의해 결정되는 것으로 밝혀졌다 (20-23).

류마티스관절염 환자의 윤활액 및 혈청에서 IL-6의 수치가 증가되어 있고 류마티스관절염에서의 만성 활막염의 정도와 윤활액 내 IL-6의 농도가 비례하며(32) 혈청 내 IL-6의 농도와 C-reactive protein (CRP), Ritchie articular index, 조조 강직의 시간이 서로 연관되어 있어 IL-6도 류마티스관절염의 병태생리에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

RANK 수용체는 파골세포는 물론이며 나아가 암세포주, 류마티스 관절염에서도 발현되고 있으며, 실제로 RANK 수용체를 자극하는 파골세포 자극인자인 RANKL을 류마티스관절염 환자의 활막세포에서 조사하는 것은 관절염 병인 연구의 핵심이라고 할 수 있다. 현재까지 활막세포의 RANKL 발현에 있어서 TLR와 IL-17의 공조자극에 대한 연구가 미비한 실정이다.

이에 본 논문에서는 류마티스관절염 환자 활막세포에서 IL-17과 TLR 자극을 통한 RANKL과 IL-6발현을 알아보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

건국대학교병원에 내원하여 진단된 류마티스 관절염 환자 8명을 대상으로 하였다. 대상자의 성별은 여성이 6명, 남성이 2명이며, 나이는 62±3세였다.

2. 시약

사용한 자극제로는 peptidoglycan (PGN) (SIGMA, USA) 1, 5, 25 ug/ml, lipopolysaccharide (LPS) (SIGMA, USA) 1, 10 ng/ml를 사용하였고 사이토카인으로는 IL-17 1, 5, 25 ng/ml (R&D, USA)을 사용하였다.

3. 활막세포 분리와 배양

류마티스관절염 환자의 인공관절 치환술을 통해 얻은 조직으로부터 활막세포를 분리하였다. 활막 조직을 2～3 mm의 조각으로 잘게 부순 후 5% CO_2와 37°C의 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 넣고 제1형 collagenase (Worthington Biochemial, Freehold, NJ) 4 mg/ml를 가하여 4시간 동안 처리하였다. 분리된 세포를 원심분리(1,200 rpm, 10분)하여 10% FCS, 2 mM glutamine, penicillin (100 unit/ml), streptomycin (100 μg/ml)를 가한 DMEM에 재부유시켜 75-cm_2 플라스크에 분주하였다. 하루가 지난 후 배양기에 부착되어 있는 세포만을 10% FBS를 가한 DMEM에서 5% CO_2와 37°C의 조건에서 배양하고 배양액은 매 3일마다 교환하였다. 플라스크 바닥의 90～95%가 활막세포로 충만되면 신선한 배양액으로 1 : 3 희석하여 계대 배양하였다. 실험에는 4～8 계대의 활막세포를 사용하였다. 배양된 세포가 활막세포임을 확인하기 위해 항CD14 PE 항체, 항CD3 FITC 항체, 항Thy-1 (CD90) FITC 항체(BD Pharmingen)를 이용하여 유세포 분석을 시행하였다.

4. RNA 분리와 B-actin & RANKL의 역전사 효소-PCR

추출한 총 RNA를 주형으로 cDNA를 만들었으며 Diethyl Pyrocarbonate (DEPC) 증류수에 용해되어 있는 2 ug의 RNA에 Oligo (dT) (Invitrogen, USA) 1 μl와 10 mM dNTP mixture (TakaRa, JAPAN) 1 μl를 가하고 65°C의 수조에 5분간 방치한 후 바로 얼음에 담가 급냉시켰다. 4 μl의 5× first strand (TakaRa, JAPAN), 2 μl 0.1 M DTT (TakaRa, JAPAN), 1 μl Ribonuclease Inhibitor (TakaRa, JAPAN)와 혼합하고 총 반응액이 20 μl가 되도록 증류수를 가하였다. 37°C로 2분간 반응시킨 후 1 μl M-MLV Reverse Transcriptase[99] (TakaRa, JAPAN)를 더하고 37°C 50분, 70°C 15분 반응시켜 cDNA를 얻었다. 이렇게 생성된 cDNA 산물을 이용하여 중합효소 연쇄반응을 시행하였다.

본 실험에 사용한 RANKL, beta-actin의 시발체는 모두 Genotec Co (Korea)에서 구입하였고 염기 서열은 RANKL (sense; ACC AGC ATC AAA ATC CCA AG, antisense; CCC CAA AGT ATG TTG CAT CC), Beta-actin(sense; GGA CTT CGA GCA AGA GAT GG, antisense; TGT GTT GGC GTA CAG GTC TTT G)을 사용하였다.

PCR 과정 중 각각 서로 다른 양으로 역전사된 cDNA와 PCR cycle 수를 변경하면서 PCR을 시행하여 대수적으로 증가하는 cDNA 양과 PCR cycle 수를 결정하였다. PCR을 위한 반응 화합물은 총 25 μl가 되도록 하였고 용액의 조성은 2.5 μl의 10×reaction buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.3; 15 mM $MgCl_2$; 50 mM KCl; TakaRa, JAPAN), 0.5 mM의 dNTP (TakaRa, JAPAN), 최종 각각 1 M의 두가지 시발체, 1.25 unit의 Taq DNA polymerase (TakaRa, JAPAN)를 함유한 용액 내에 1 μl의 역전사된 cDNA를 첨가한 후 시행하였다. 증폭을 위해 Takara PCR Thermal Cycler (TakaRa, JAPAN)를 사용하였다. 변성을 위해서 94°C에서 1분간, annealing은 beta-actin에서 60℃에서 1분,

RANKL에서도 59°C에서 1분간, 신장을 위해서 72°C에서 1분간의 과정을 beta-actin에서는 25회, RANKL에서는 30회씩 반복하였다. 음성 대조군으로 추출한 cDNA 대신 증류수를 사용하여 시행한 PCR 반응에서 beta-actin PCR 산물이 관찰되지 않도록 하여 PCR 오염이 없음을 확인하였다.

5. RANKL의 단백질 발현조사(Western blot)

전기영동은 12% SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel)을 사용하였고 전기영동시 한 lane에 가하는 시료는 세포 수 5×10^5으로부터 추출된 양이 되게 조절하였다. 전기영동 후 젤은 nitrocellulose 흡착지(Amersham Pharmacia Biotech, Germany)를 사용하여 4°C, 100 volt, 150 mA로 2시간 동안 단백을 이동시켰다. 전기영동을 끝낸 후 흡착지를 분리해 내어 차단용액(5% fat free skim milk in Tris-Buffered Saline)에 담가 실온에서 1시간 반응시켰다. 차단용액을 버리고 세척용액(0.01% Tween20/Tris-Buffered Saline)으로 차단용액을 세척하였다. 흡착지를 꺼내어 1 : 1,000으로 희석한 항 RANKL 항체(Santa Cruz Laboratory, USA) 또는 항 beta-actin 항체(SIGMA, USA)로 4°C, 밤새 반응시키고 흡착지를 꺼내어 세척용액으로 3회 세척하였다. 항체 희석액으로 HRP (horseradish peroxidase)가 부착된 goat anti-rabbit IgG (PIERCE, USA)로 1 : 1,000으로 희석한 후 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 흡착지를 꺼내어 세척용액으로 4번 세척하고 Supersignal west Pico Chemiluminescent Substrate (PIERCE, USA)의 용액 1, 2를 1 : 1로 섞어서 흡착지에 반응시키고 X-ray film (AGFA, Belgium)에 노출시켜 항체 결합 신호를 확인하였다.

6. 사이토카인 IL-6 측정

Sandwich ELISA용 96 well plate (NUNC, Denmark)에 capture monoclonal IL-6 Ab (R&D, USA) 4 ug/ml을 plate에 50 ul/well씩 넣고 4°C, 밤새 반응시킨 다음 차단용액 (1%BSA/PBST)을 200 ul/well씩 넣고 실온에서 2시간 반응시킨다. standard로는 recombinant human IL-6 (R&D, USA)을 이용하여 10 ng/ml～15.6 pg/ml 농도를 사용하였다. Standard와 함께 측정할 세포 배양 상층액을 50 ul/well씩 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. Well을 세척용액(0.05% Tween20/phosphate-buffered saline, PBS)으로 4번 세척하고 biotinylated goat-anti-human IL-6 Ab (R&D, USA)를 100 ng/ml로 희석하여 50 ul/well씩 넣어 실온에서 2시간 반응시킨 후 세척용액으로 4번 세척하였다. 마지막으로는 ExtraAvidin-Alkaline Phosphatase conjugate (SIGMA, USA)를 1 : 2,000으로 희석하여 50 ul/well씩 넣고 실온에서 2시간 반응시키고 세척 후 PNPP (Fluka, Phosphate Disodium Salt Hexahydrate)/DEA 용액(Diethanolamine 97 ml, NaN_3 0.2 g, $MgCl_26H_2O$ 0.1 g, 1차 증류수 800 ml)을 1 mg/ml 농도로 녹여 50 ul/well씩 넣어 20～30분 후 0.2 N NaOH로 반응을 멈추고 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

7. 면역조직염색화학법

4% 파라포름알데하이드에 고정된 각 활막(류마티스관절염 환자, 골관절염 환자) 조직을 통상의 방법대로 파라핀에 포매한 후 절편기를 이용하여 7 um 절편을 만들어 슬라이드에 붙인 후 헤마톡실린과 에오진(hematoxylin-eosin) 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 사이토카인의 발현의 측정은 면역조직화학염색방법으로 ABC (Vector laborites, Burlingame, CA, USA) kit를 사용하여 염색하였으며, 슬라이드에 부착된 절편을 자일렌과 에탄올로 탈파라핀과 함수를 시킨 후 3% H_2O_2로 내인성 과산화효소를 차단시키고, PBS으로 수세한다. 비 특이적인 반응을 차단할 목적으로 anti mouse serum을 30분 반응시킨 후 primary Ab를 4°C에서 IL-6, IL-17 (R&D systems, 1 : 100), TLR- 2, TLR-4, RANKL (Santa cruz, 1 : 100)을 다음날(16 h)까지 반응시켰다. Primary Ab 반응 후 결합이 안된 항체를 PBS로 수세하고 바이오틴이 결합된 이차 항체와 과산화효소가 결합된 streptavidin 반응을 시킨 후 DAB으로 발색시킨다. Mayer's 헤마톡실린으로 대조염색한 후 수세하고 봉입하여 광학현미경을 관찰하였다.

8. 통계적 유의성의 검증

실험 결과는 평균과 표준오차로 표현하였으며 통계적 유의성은 SPSS 통계 프로그램(version 10.0)을 사용하여 student's *t*-test를 실시하였고 p값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의하다고 분석하였다.

결 과

1. 류마티스관절염 활막세포에서 IL-17과 TLR 리간드 자극을 통한 RANKL mRNA 발현 변화

류마티스관절염 환자의 활막세포에서 IL-17이나 TLR 리간드 자극에 의한 RANKL의 생성을 비교해 보고자 PGN, LPS, IL-17로 자극하여 RANKL mRNA 발현을 RT-PCR법으로 조사하였다. TLR-2, TLR-4 자극인자로 알려진 PGN과 LPS를 단독으로 자극 했을 때, PGN의 5 ug/ml 자극에서 자극하지 않은 군과 비교하여 RANKL의 mRNA생성 비율이 가장 증가하였다(7.2±0.8 vs 1, $p<0.01$). IL-17의 자극 농도로는 1, 5, 25 ng/ml을 사용하였고 그 결과 농도 의존적으로 RANKL의 mRNA 발현이 증가하는 것으로 조사되었다(1.7±0.5, 2.5±0.4, 8.7±1.3 vs 1)(그림 1A). 이때 IL-17과 비교해 PGN과 IL-17을 함께 자극한 조건에서 더 증가하였으며(7.7±1.2 vs 3.4±0.4, $p<0.05$), PGN과 IL-17을 함께 자극한 조건과 비교해 PGN, LPS, IL-17 세가지를 함께 자극한 조건에서 더 유의하게 증가하였다(12.4±2.6 vs 7.7± 1.2, $p<0.05$)(그림 1B).

2. 류마티스관절염 활막세포에서 IL-17과 TLR 리간드 자극을 통한 RANKL 단백질 발현 변화

류마티스관절염 환자의 활막세포에서 IL-17이나 TLR 리간드 자극에 의한 RANKL 단백질 발현을 western blot법으로 조사하였다. PGN, LPS, IL-17 단독으로 다양한 자극농도로 자극하였을 때 자극하지 않은 군과 비교하여 RANKL의 단백질 발현이 농도 의존적으로 증가하였다(그림 2A). 이때 IL-17 단독과 비교

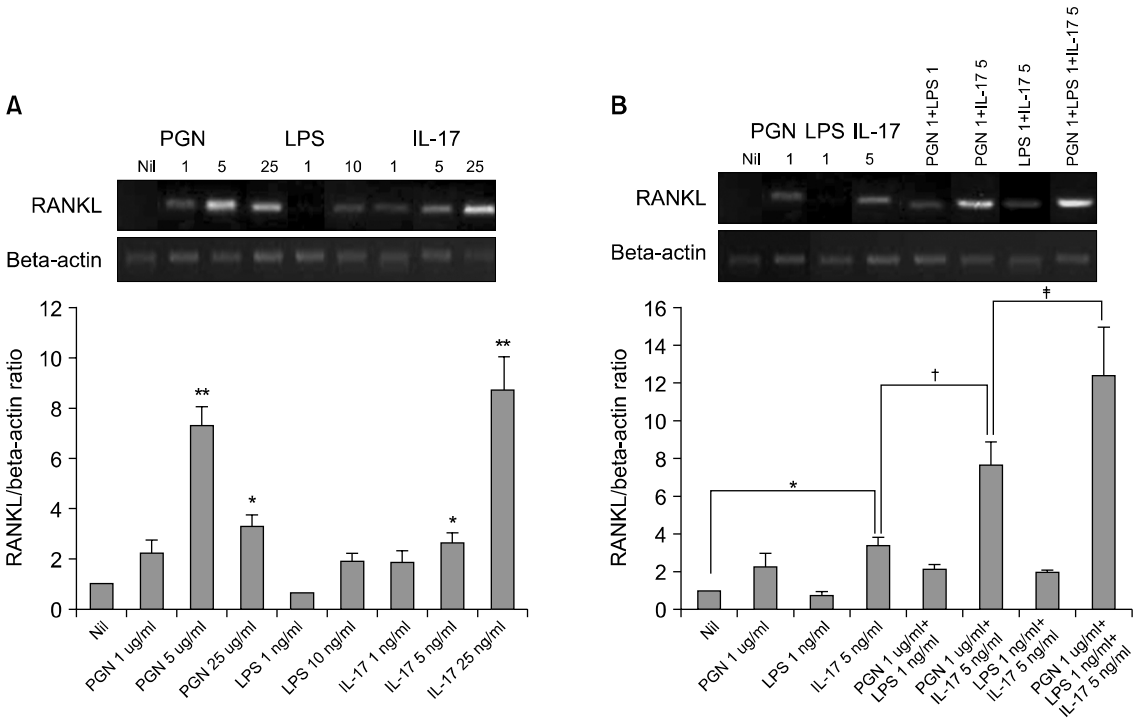

Fig. 1. RANKL mRNA expression by the RA-FLSs after stimulation with IL-17, PGN and LPS (A) The RANKL mRNA expression induced by IL-17, PGN and LPS. The FLSs were cultured with IL-17 (1, 5, 25 ng/ml), PGN (1, 5, 25 ng/ml) and LPS (1, 10 ng/ml) for 72 h. The expression of RANKL mRNA was evaluated by RT-PCR. The optical density was normalized to the band for beta-actin. (B) The RANKL mRNA expression induced by IL-17, PGN, LPS, IL-17 plus PGN, IL-17 plus LPS, PGN plus LPS, and IL-17 plus PGN plus LPS. The expression of RANKL mRNA was evaluated by RT-PCR. *$p<0.05$, **$p<0.01$ compared with Nil, $^{\dagger}p<0.05$ compared with IL-17 5 ng/ml, $^{\ddagger}p<0.05$ compared with PGN 1 ug/ml +IL-17 5 ng/ml.

해 PGN과 IL-17을 함께 자극한 조건에서 통계적으로 의미있게 더 증가하였으며(10.7±1.2 vs 2.9±0.1, $p<0.05$), PGN과 IL-17을 함께 자극한 조건과 비교해 PGN, LPS, IL-17 세가지를 함께 자극한 조건에서 더 유의하게 증가하였다(16.8±0.8 vs 10.7±1.2, $p<0.05$) (그림 2B).

3. 류마티스관절염 활막세포에서 IL-17과 TLR 리간드를 통한 IL-6 생성능 변화

IL-6는 autoreactive T 세포를 활성화시키고 류마티스 인자의 생성을 촉진하며 CRP, fibrinogen 등 acute phase reactant의 생성을 유도하고 VEGF의 생성을 증가시키며 albumin의 생성은 억제한다. 최근 논문 결과에 따르면 IL-6는 T 세포의 증식과 세포독성 T 세포로의 분화도 촉진하며 파골 세포분화를 촉진하여 류마티스 관절염의 관절 손상에 주요한 역할을 한다고 알려져 있다 (25,26) 본 연구에서는 류마티스관절염 환자 활막세포에 IL-17이나 TLR 리간드로 72시간 자극후 세포 배양액에서 sandwich ELISA법으로 IL-6 단백질 생성능을 조사하였다.

PGN과 LPS를 단독으로 자극 했을 때 PGN의 자극농도로는 5 ug/ml을 사용하였을 때 자극하지 않은 군과 비교하여 IL-6의 생성이 가장 증가하였다(1,480±189 vs 93±7, $p<0.01$). IL-17의 자극 농도로는 1, 5, 25 ng/ml을 사용하였고 자극하지 않은 군과 비교하여 농도 의존적으로 IL-6의 생성이 증가하였다(125±2, 271±55, 1,082±81 vs 93±7)(그림 3A). 반면, 류마티스관절염 활막세포에 LPS 단독에 의한 IL-6 생성 증

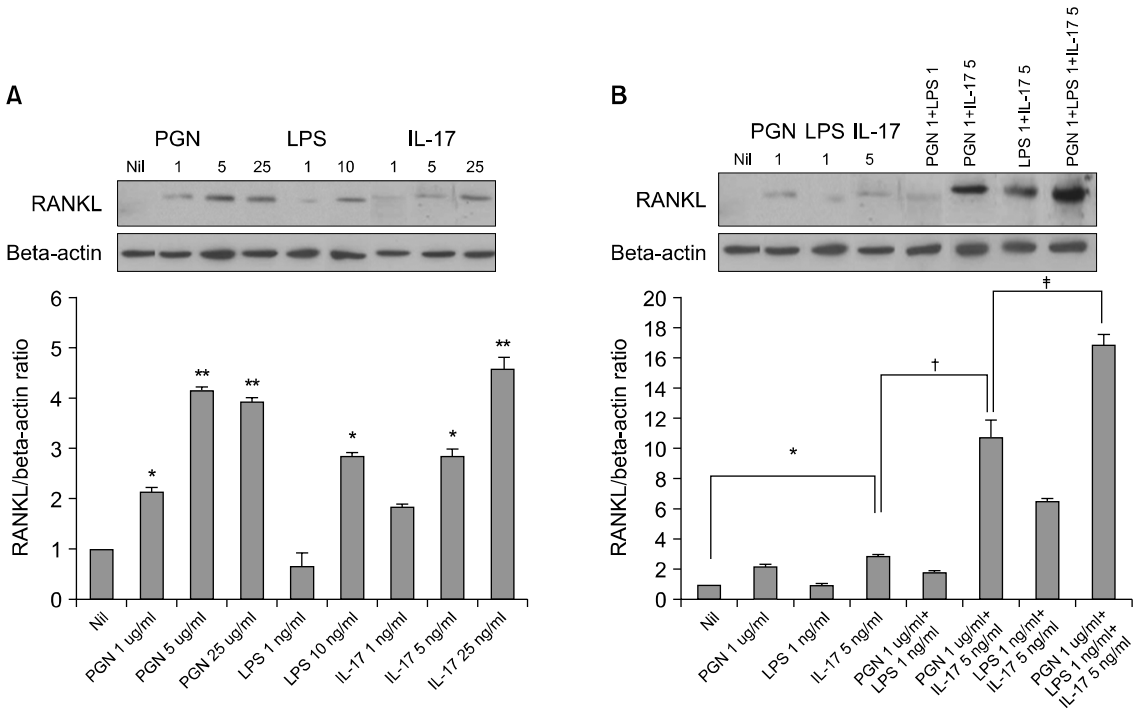

Fig. 2. The RANKL protein expression in the RA-FLSs increased significantly after treatment with IL-17, PGN and LPS (A) The RA-FLSs were cultured with or without IL-17 (1, 5, 25 ng/ml), PGN (1, 5, 25 ng/ml) or LPS (1, 10 ng/ml) for 72 h. The RANKL protein expression was measured in the cell lysates by western blot analysis using goat polyclonal anti-RANKL antibody. (B) The RANKL protein expression induced by IL-17, PGN, LPS, IL-17 plus PGN, IL-17 plus LPS, PGN plus LPS, and IL-17 plus PGN plus LPS. The results are expressed as the ratio of the densitometric intensity of the RANKL product to that of the beta-actin product. The results are presented as the mean±S.E.M., n=3. *$p<0.05$, **$p<0.01$ compared with Nil, $^{\dagger}p<0.05$ compared with IL-17 5 ng/ml, $^{\ddagger}p<0.05$ compared with PGN 1 ug/ml +IL-17 5 ng/ml.

가에는 별 변화가 없었다. 이때 IL-17과 비교해 PGN과 IL-17을 함께 자극한 조건에서 IL-6가 더 증가하였으며(1,071±80 vs 271±55, $p<0.05$), PGN과 IL-17을 함께 자극한 조건과 비교해 PGN, LPS, IL-17 세 가지를 함께 자극한 조건에서 IL-6생성이 더 유의하게 증가하였다(1,492±12 vs 1071±80, $p<0.05$) (그림 3B).

4. 류마티스관절염 활막조직에서 IL-17, TLR-2, TLR-4, RANKL, IL-6 발현 변화

류마티스관절염 환자의 활막조직에서 IL-17, TLR-2, TLR-4, RANKL, IL-6 발현의 차이를 대조군인 골관절염 환자의 활막조직과 비교하기 위하여 면역조직 염색화학법으로 조사하였다. 류마티스관절염 환

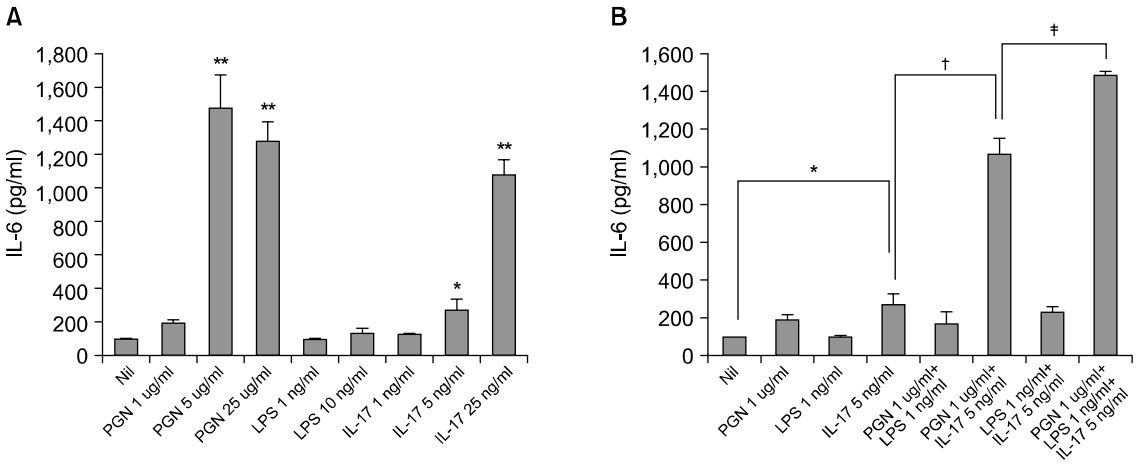

Fig. 3. Quantitation of the IL-6 production by IL-17, PGN and LPS in the RA-FLSs. (A) The FLSs were cultured with IL-17 (1, 5, 25 ng/ml), PGN (1, 5, 25 ng/ml) or LPS (1, 10 ng/ml) for 72 h, and the IL-6 concentrations in the culture supernatants were determined by enzyme-linked immunosorbent assay. (B) The IL-6 production induced by IL-17, PGN, LPS, IL-17 plus PGN, IL-17 plus LPS, PGN plus LPS, and IL-17 plus PGN plus LPS. Values are the mean and SEM of triplicate cultures. *$p<0.05$, **$p<0.01$ compared with Nil, $^{\dagger}p<0.05$ compared with IL-17 5 ng/ml, $^{\ddagger}p<0.05$ compared with PGN 1 ug/ml +IL-17 5 ng/ml.

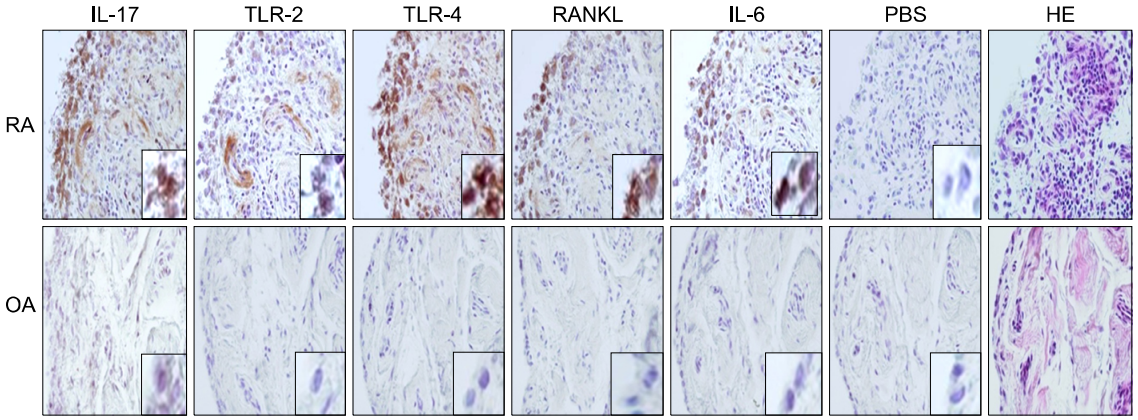

Fig. 4. The expressions of IL-17, TLR-2, TLR-4, RANKL and IL-6 was significantly greater in the RA synovium than those in the OA synovium. Immunohistochemical detection of IL-17, TLR-2, TLR-4, RANKL and IL-6 in the synovium of patients with RA and OA. All the tissues were counterstained with hematoxylin (original magnification, ×400).

자의 활막조직에서 골관절염 환자 활막조직과 비교하여 IL-17, TLR-2, TLR-4, RANKL, IL-6의 발현이 활막의 표면층에서 더 증가되어 있었다(그림 4).

고 찰

TLR는 바이러스와 박테리아에서 생성되는 LPS와 같은 microbial molecules을 인식하여 침입한 항원에 대하여 효과적인 T 세포 반응을 일으키는데 작용한다. 이러한 TLR의 이상적인 신호전달은 결국 자가면역 질환의 발병에 관여한다.

류마티스관절염 섬유모세포에서 TLR-2 활성은 IL-6, tissue destructive metalloproteinase 및 adhesion molecule 발현과 (27) 케모카인 생성을 증가시킨다 (28). 또한 류마티스관절염 환자의 말초혈액에 TLR-2의 발현이 증가된 $CD16^+$ 대식세포의 수가 증가하며, 이 세포들은 TLR-2 작용제(agonist)에 의하여 TNF-α, IL-1, IL-6 및 IL-8 생성을 증가시키며, 활막의 표면층(lining layer)에 존재하는 것이 보고되어 TLR 활성이 관절염 발생과 연관됨이 확인되었으나, 명확한 작용은 밝혀진 것이 없다.

IL-17은 Th17 세포에서 생성되는 사이토카인으로 다발성 경화증 등의 자가면역 질환의 병인에 중요한 역할을 하며, IL-17은 관절의 염증과 뼈 및 연골의 파괴를 증가시키며, 항IL-17 항체를 이용한 IL-17의 차단은 관절염증 및 파괴를 억제한다고 알려져 있다 (29,30). 최근 연구중 관절염 마우스 모델에서 IL- 17에 의해 TLR-2, TLR-4, TLR-9 발현이 증가된다고 보고되어 (15), IL-17 자극에 의해 TLR 발현이 증가됨으로써 관절의 염증과 관절파괴가 더 심화될 수 있다.

류마티스관절염 환자에서 RANKL은 그 수용체인 RANK에 결합함으로써 파골세포를 분화시킨다는 *in vitro*와 *in vivo*에서 확인한 실험적 증거로부터 RANKL-RANK 결합을 억제하는 방법은 효과적인 뼈 질환 치료제가 될 수 있다는 타당성이 확보되었다.

본 연구에서는 류마티스관절염 환자의 활막세포에서 사이토카인 비의존성 경로(cytokine independent pathway)로 선천성 면역(innate immunity)과 관련된 TLR와 염증성 사이토카인 IL-17이 활막세포내 파골세포분화에 중요한 RANKL 발현에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 본 연구진은 TLR-2와 TLR-4가 류마티스관절염 환자의 활막세포에서 발현이 증가되어 있음을 밝힌바 있으며 그 리간드 자극에 의해 RANKL 발현이 증가함을 확인하였다 (31).

본 연구의 결과에서 PGN, LPS, IL-17 각 단독으로 자극하였을 때 보다 PGN, IL-17함께 자극한 조건과 PGN, LPS, IL-17 세가지를 함께 자극한 조건들에서 RANKL 발현이 더 유의하게 증가함을 확인하였다.

IL-6에 대한 생물학적 역할에 대한 연구들로는 단구, 대식구, T 및 B 림프구와 기타 일부 세포에서 생성되는 26kDa의 사이토카인으로서 면역작용, 감염 및 염증반응 등에서 다양한 기능을 가지며 간(肝)세포를 자극하여 피브리노겐과 같은 혈장단백의 생성을 유도하여 간접적으로 염증반응에 관여한다고 알려져 있다. IL-6의 수용체는 IL-6Rα와 gp130로 구성되어 있으며 IL-6Rα는 IL-6와 직접 결합하여 IL-6-IL-6Rα 이형이합체(heterodimer)를 만들고 gp130와 결합하여 세포내 신호전달이 일어난다. 최근까지도 다양한 세포에서 IL-6의 역할은 많이 조사되고 있다. 본 논문에서도 PGN, LPS, IL-17 각 조건들의 단독에 의해 IL-6생성 증가뿐 아니라 PGN+IL-17 함께 자극한 조건과 PGN, LPS, IL-17 세 가지를 함께 자극한 조건들에서 IL-6 생성이 더 유의하게 증가함을 확인하였다.

IL-17은 관절염 동물모델에서 TLR-2, TLR-4, TLR-9 발현을 증가시키며 (15), 관절염 환자의 활막세포에서 IL-6와 IL-8을 증가시킨다 (33). IL-6는 골아세포에서 RANKL을 증가시키고 파골세포 분화를 촉진시킨다 (34). 본 연구에서 IL-17과 TLR를 함께 자극하였을 때 IL-17이 TLR발현을 증가시킬 수 있으므로 TLR 신호전달이 증폭되어 RANKL 발현을 더욱 증가시켰을 것으로 생각된다. 또한 IL- 17과 TLR를 함께 자극하였을 때 파골세포 분화를 촉진할 수 있는 IL-6 생성도 증가되었으므로 IL-17과 TLR를 함께 자극하면 단독보다 파골세포 분화를 증가시켜 결국 관절파괴를 더 악화시킬수 있을 것이다.

결 론

TLR-2, TLR-4와 IL-17의 조합효과는 류마티스관절염 환자의 활막 조직에서 다른 염증성 인자들의 발현을 유도하고 골조직 파괴 등을 유발하여 병의 진

행을 더욱 촉진시키는 것으로 생각되므로 TLR 리간드와 IL-17을 통한 RANKL과 IL-6 생성을 파악하고 그 기전을 억제할 수 있는 방안을 모색한다면 뼈 파괴의 핵심인자인 파골세포를 조절할 수 있으므로 관절염 치료에 중요한 기반 지식을 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

참고문헌

1) Lacey D, Sampey A, Mitchell R, Bucala R, Santos L, Leech M, et al. Control of fibroblast-like synoviocyte proliferation by macrophage migration inhibitory factor. Arthritis Rheum 2003;48:103-9.
2) Miossec P. An update on the cytokine network in rheumatoid arthritis. Curr Opin Rheumatol 2004;16; 218-22.
3) Chabaud M, Durand JM, Buchs N, Fossiez F, Page G, Frappart L, et al. Human interleukin-17: a T cell-derivedproinflammatory cytokine produced by the rheumatoid synovium. Arthritis Rheum 1999;42:963-70.
4) Sato K, Suematsu A, Okamoto K, Yamaguchi A, Morishita Y, Kadono Y, et al. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. J Exp Med 2006;203: 2673-82.
5) Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. J Biol Chem 2003;278:1910-4.
6) Miossec P. Interleukin-17 in rheumatoid arthritis: if T cells were to contribute to inflammation and destruction through synergy. Arthritis Rheum 2003;48: 594-601.
7) Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 andregulatory T cells. Nature 2006;441:235-8.
8) Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T (H)17 lineage. Nature 2006;441:231-4.
9) Fantini MC, Rizzo A, Fina D, Caruso R, Becker C, Neurath MF, et al. IL-21 regulates experimental colitis by modulating the balance between T (reg) and Th17 cells. Eur J Immunol 2007;37:3155-63.
10) Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, et al. Protein expression and functional difference of modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. Biophys Res Commun 2000;275:768-75.
11) LeGrand A, Fermor B, Fink C, Pisetsky DS, Weinberg JB, Vail TP, et al. Interleukin-1, tumor necrosis factor a, and Interleukin-17 synergistically up-regulate nitric oxide and prostaglandin E2 production in explants of human osteoarthritic knee menisci. Arthritis Rheum 2001;44:2078-83.
12) Attur MG, Patel RN, Abramson SB, Amin AR. Interleukin-17 up-regulation of nitric oxide production in human osteoarthritis cartilage. Arthritis Rheum 1997; 40:1050-3.
13) Cai L, Yin JP, Starovasnik MA, Hogue DA, Hillan KJ, Mort JS, et al. Pathways by which interleukin 17 induces articular cartilage breakdown in vitro and in vivo. Cytokine 2001;16:10-21.
14) Kotake S, Udagawa N, Takahashi N, Matsuzaki K, Itoh K, Ishiyama S, et al. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. J Clin Invest 1999; 103:1345-52.
15) Lee JH, Cho ML, Kim JI, Moon YM, Oh HJ, Kim GT, et al. Interleukin 17 (IL-17) Increases the Expression of Toll-like Receptor-2, 4, and 9 by Increasing IL-1β and IL-6 Production in Autoimmune Arthritis. J Rheumatol 2009;36:684-92.
16) Brentano F, Kyburz D, Schorr O, Gay R, Gay S. The role of Toll-like receptor signalling in the pathogenesis of arthritis. Cell Immunol 2005;203:90-6.
17) Seibl R, Birchler T, Loeliger S, Hossle JP, Gay RE, Saurenmann T, et al. Expression and regulation of Toll-like receptor 2 in rheumatoid arthritis synovium. Am J Pathol 2003;162:1221-7.
18) Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis:correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. Ann Rheum Dis 1993;52:232-4.
19) Nishimoto N, Kishimoto T. Inhibition of IL-6 for the treatment of inflammatory diseases. Curr Opin Pharmacol 2004;4:386-91.
20) Tamura T, Udagawa N, Takahashi N, Miyaura C, Tanaka S, Yamada Y, et al. Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin-6. Proc Natl Acad Sci 1993;90:11924-8.
21) Chole RA. Cellular and subcellular events of bone resorption in human and experimental cholesteatoma: The role of osteoclasts. Ann Otol Rhinol Laryngol

1984;94:76-95.
22) Kong YY, Yoshida H, Sarosi I, Tan HL, Timms E, Capparelli C, et al. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lympocyte development and lymph-node organogenesis. Nature 1999;397:315-23.
23) Takahashi N, Udagawa N, Suda T. A new member of tumor necrosis factor ligand family, ODF/OPGL/TRANCE/RANKL, regulates osteoclast differentiation and function. Biochem Biophys Res Commun 1999;256:449-55.
24) Haynes DR, Crotti TN, Potter AE, Loric M, Atkins DW, Findlay DM. The osteoclastogenic molecules RANKL and RANK are associated with periprosthetic osteolysis. J Bone Joint Surg (Br) 2001;83:902-11.
25) Kudo O, Sabokbar A, Pocock A, Itonaga I, Fujikawa Y, Athanasou NA. Interleukin-6 and interleukin-11 support human osteoclast formation by a RANKL independent mechanism. Bone 2003;32:1-7.
26) Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA. Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. Ann Rheum Dis 1993;52:232-4.
27) McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: acomplicated picture of autoimmunity. Nat Immunol 2007;8:913-9.
28) Toh ML, Miossec P. The role of T cells in rheumatoid arthritis: new subsets and new targets. Curr Opin Rheumatol 2007;19:284-8.
29) 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.
30) 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.
31) Kim KW, Cho ML, Lee SH, Oh HJ, Kang CM, Ju JH, et al. Human rheumatoid synovial fibroblasts promote osteoclastogenic activity by activating RANKL via TLR-2 and TLR-4 activation. Immunol Lett 2007;110:54-64.
32) Sack U, Kinne RW, Marx T, Heppt P, Bender S, Emmrich F. Interleukin-6 in synovial fluid is closely associated with chronic synovitis in rheumatoid arthritis. Rheumatol Int 1993;13:45-51.
33) Hwang SY, Kim JY, Kim KW, Park MK, Moon YM, Kim WU, et al. IL-17 induces production of IL-6 and IL-8 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts via NF-κB- and PI3-kinase/Akt-dependent pathways. Arthritis Res Ther 2004;6:R120-8.
34) Kurihara N, Bertolini D, Suda T, Akiyama Y, Roodman GD. IL-6 stimulates osteoclast-like multinucleated cell formation in long term human marrow cultures by inducing IL-1 release. The Journal of Immunology 1990;144:4226-30.