

그레이브스병에서 공동자극분자인 4-1BB와 4-1BBL의 역할 연구

울산대학교 의과대학 내과학교실, 울산대학교병원 생의과학연구소¹

김은숙 · 정효원¹ · 남궁일성 · 우순주 · 최정일¹ · 김영일

Expression of 4-1BB and 4-1BBL in Graves' Disease

Eun Sook Kim, Hyo Won Jung¹, Il Sung Nam-Goong, Soon Joo Woo, Jung Il Choi¹, Young Il Kim

Department of Internal Medicine, Ulsan University Hospital, College of Medicine; and
Biomedical Research Center, Ulsan University Hospital¹

ABSTRACT

Background: 4-1BB mediated costimulatory signal is a recently identified immunotherapeutic strategy for treating autoimmune diseases without depressing the immune response. In this study, we investigated the expression of 4-1BB and 4-1BBL on the peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and we assessed whether the serum levels of soluble (s) 4-1BB and s4-1BBL in the patients with Graves' disease (GD) and compared them with normal subjects.

Methods: Expression of 4-1BB and 4-1BBL on PBMC of GD patients was determined by flow cytometry. The concentrations of s4-1BB and s4-1BBL were assessed in the sera of GD patients by performing ELISA.

Results: 4-1BB was constitutively expressed on naive CD4⁺ and CD8⁺ T cells of the GD patients and this was increased by stimulation. 4-1BBL was also expressed on the antigen-presenting cells such as CD19⁺ B cells, monocytes and dendritic cells in GD patients. The serum levels of s4-1BB and s4-1BBL were significantly higher in GD patients than those in controls, and these levels were significantly correlated with the serum levels of thyroid-binding inhibitory immunoglobulin and free T4.

Conclusion: These results indicate that effector T cells of GD patients can be activated through the 4-1BB-mediated costimulatory signal. Elevated s4-1BB and s4-1BBL levels in the sera of GD patients may affect modulation of the clinical course in GD patients. (J Kor Soc Endocrinol 21:116~124, 2006)

Key Words: Costimulatory molecule, Graves' disease, 4-1BB, 4-1BBL

서 론

정상적인 면역반응의 항상성은 자가항원에 반응하는 자가 반응성 T 세포를 제거함으로써 이루어지는데, 이러한 조절기전이 실패할 경우 자가면역 질환이 발병하게 된다[1]. 그레이브스병은 갑상선 여포세포막의 갑상선자극호르몬

(thyroid stimulating hormone, TSH) 수용체에 대한 자가항체가 생겨 TSH와 같은 양상으로 수용체 결합 후 갑상선을 자극하여 갑상선 여포 세포의 증식과 갑상선호르몬의 과잉 생산을 일으키는, 자가항원에 대한 항상성 조절기전 실패에 의한 갑상선 특이 자가면역 질환이라 할 수 있다[2~4]. 하지만 아직 어떠한 기전으로 자가항원이 인지되어 이에 대한 자가항체가 생성되는지는 분명하지 않다.

사람의 면역조절은 면역반응과정에 필요한 여러 단계의 신

접수일자: 2005 년 7월 5일

통과일자: 2005 년 11월 7일

책임저자: 김영일, 울산대학교 의과대학 내과학교실

* 이 논문은 2004년도 울산대학교의 연구비에 의하여 연구되었음.

호전달을 통해 이루어지지만 일단 항원제시세포에 의해 항원이 포획된 후 T 세포 수용체에 제공되면서 시작된다. 이 후 T 세포 표면에 존재하는 다양한 공동자극분자들(costimulatory molecules)에 의한 이차적인 신호전달이 이루어짐으로써 T 세포 활성화가 이루어지게 된다[5]. 공동자극분자들에 의한 신호전달은 세포분열, 세포생존 및 사이토카인 분비와 같은 세포의 실질적인 기능을 유발시키는데 매우 중요한 역할을 하며, 만약 이 경로가 차단될 경우 T 세포는 무반응(anergy) 상태에 빠지거나 제거과정에 접어들어 곧 사멸됨으로써 정상적인 면역반응을 유발하지 못하게 된다. 대표적인 공동자극분자로 CD28, inducible T-cell costimulator 및 종양괴사인자(tumor necrosis factor, TNF) 계열의 여러 분자들이 있으며, 특히 OX40-OX40 리간드(ligand, L), 4-1BB (CD137)/ 4-1BBL (CD137L), CD27, CD70, CD30-CD30L 및 herpesvirus entry mediator 등이 중요한 T 세포 조절자로 알려져 있다[6,7].

4-1BB는 종양괴사인자 수용체 계열의 유도성 T 세포 공동자극분자로서 B 세포, 대식세포 및 수지상 세포와 같은 전문적인 항원제시세포에서 주로 발현되는 4-1BBL와의 상호작용을 통해 T 세포 활성화와 기억을 유도함으로써 면역반응을 조절한다[8]. 4-1BB의 경우 collagen-induced arthritis, experimental autoimmune encephalomyelitis와 같은 동물질환 모델에서 anti-4-1BB 항체 처리가 자가 반응성 T 세포의 기능을 억제시킴으로써 자가면역 질환 치료에 효과적인 것으로 보고되고 있으며, 4-1BB를 통한 신호전달을 효과적으로 이용하는 새로운 면역치료방법이 최근 적극적으로 개발되고 있는 추세이다[9-12].

본 연구에서는 그레이브스병 환자를 대상으로 말초혈액에서 4-1BB와 4-1BBL의 발현특성을 조사하고 그레이브스병의 병태생리에서의 역할을 규명하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 대상

2004년 4월부터 12월까지 울산대학교병원에 내원하여 처음 그레이브스병으로 진단받은 환자 20명을 대상으로 하였고 건강한 정상인 20명을 대조군으로 하였다. 그레이브스병의 진단은 갑상선중독증의 증상과 갑상선 호르몬 검사,

TSH 수용체 항체(TSH binding inhibitor immunoglobulin, TBII), 갑상선글로불린과 갑상선과산화효소에 대한 자가항체 검사 그리고 갑상선 스캔 검사 등을 통하여 진단하였고, 내원당시 항갑상선제를 복용하고 있거나 재발된 경우는 제외하였다. 환자들의 임상적 특성은 Table 1에 나타내었다.

그레이브스병 환자와 정상 대조군의 말초혈액은 본원 윤리위원회 규정에 따라 환자 동의 후 heparinized vacutainer (BD Pharmingen, Mountain View, CA, USA)에 10 mL씩 수집하였으며 혈청은 분리 후 즉시 냉동(-70℃) 보관하였다.

2. 세포 분리와 배양

수집된 각 그룹의 말초혈액으로부터 Ficoll-Hypaque 용액(Pharmacia, Uppsala, Sweden)을 이용한 밀도구배 원심분리법에 의해 단핵세포를 분리하였다. 분리된 단핵세포는 1×phosphate-buffered saline (PBS)로 2번 세척한 다음 1×10⁶ PBMC/mL씩 10% fetal bovine serum (FBS)과 항생제가 첨가된 RPMI 1640 배지와 함께 24-well 배양접시에 분주하여 CO₂ 세포배양기(37℃, 5%)에 24시간 배양하였다. 세포의 활성화를 위해 anti-CD3 mAb (OKT3; 1 µg/mL)와 lipopolysaccharide (LPS; 5 µg/mL)를 함께 처리하였다.

단핵구를 분리하기 위해 단핵세포를 2시간 배양한 후 배양접시 바닥에 붙어 있는 세포들을 수거하였으며, 96.9% CD14⁺ 단핵구가 분리되었다. 또한 분리된 단핵구의 일부를 GM-CSF (100 U/mL)와 IL-4 (1,000 U/mL)를 2일 간격으로 3번 처리한 후, TNF-α (500 U/mL)를 1회 처리하여 수지상세포로 분화시켰다. 완전히 분화된 수지상세포의 순도는 98.9% CD11c⁺로 나타났다.

3. 유세포 분석(Flow cytometry)

그레이브스병 환자와 정상인의 말초혈액으로부터 분리한 단핵세포에서 4-1BB, 4-1BBL의 발현특성을 조사하기 위해 유세포 분석을 실시하였다. 먼저 단핵세포(1×10⁶ cells/mL) 활성화를 위해 OKT3 1 µg/mL와 LPS 5 µg/mL를 처리하여 24시간 배양한 다음, 각 세포를 수거하고 BSA (2%)와 NaN₃ (0.1%)가 첨가된 1×PBS (washing buffer)를 이용하여 2번 세척하였다. 이를 FITC-labelled anti-4-1BB mAb 또는 anti-4-1BBL mAb와 PE-labelled CD4 mAb, CD8

Table 1. Clinical characteristics of each study group

	Age (years)	Gender	TBII (%)	free T4 (ng/dL)	TSH (µU/mL)	TPOAb (IU/mL)	TgAb (IU/mL)
Reference Value	N	F M	0-15.0	0.89-1.81	0.35-5.50	0-25	0-40
Graves' Disease	20	36 ± 11 16 4	40.9 ± 17.3*	6.43 ± 2.39*	0.01 ± 0.00*	466 ± 358*	304 ± 683
Control	20	42 ± 8 20 0	3.8 ± 2.1	1.4 ± 1.06	0.58 ± 0.68	12 ± 11.3	2.6 ± 3.4

TBII, thyroid binding inhibitory immunoglobulin; TgAb, antibodies to thyroglobulin; TPOAb, antibodies to thyroid peroxidase.

* P < 0.05 vs. control.

mAb (T cell markers) 또는 CD19 mAb (B cell marker)로 4°C에서 30분간 이중 염색하였다. 염색된 세포를 washing buffer로 3번 세척하여 염색되지 않은 항체를 제거한 다음, T 세포에서의 4-1BB와 4-1BBL의 발현을 SSC/FSC gate의 lymphocytes population에서 관찰하였으며, 결과는 Cell Quest software (BD Biosciences)를 이용하여 분석하였다.

4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

혈청으로부터 soluble (s) 4-1BB와 s4-1BBL를 검출하기 위해 ELISA를 실시하였다. 먼저 ELISA microtiter plates (Nunc Maxisorb ELISA plate)를 1 µg/mL anti-4-1BB mAb (AB 4815, Immunomics, Co. Ulsan, Korea) 또는 anti-4-1BBL mAb (AB 5G11; Immunomics)가 들어있는 0.05M NaHCO₃ 용액으로 4°C에서 overnight coating하였다. 이를 0.1% Tween 20이 첨가된 washing buffer로 3회 세척한 후 비특이 반응을 줄이기 위해 4% BSA 용액으로 실온에서 1시간 동안 blocking 하였다. 혈청은 washing buffer를 이용하여 2배로 희석한 다음 blocking이 끝난 plate에 100 µL씩 3회 반복하여 넣은 후 4°C에서 overnight 하였다. 이를 다시 3회 세척한 후 detecting anti-4-1BB mAb 또는 anti-4-1BBL mAb가 들어있는 1% BSA-1×PBS를 넣어 실온에서 2시간 반응시켰다. Plate를 3회 세척한 다음, 1% BSA-1×PBS를 이용하여 1/5000배로 희석된 HRP-straptavidin 용액을 넣고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이를 다시 3회 세척하고 TMB peroxidase substrate (Endogen, BD Bioscience)을 넣어 15분간 기질반응 시킨 다음, 0.1 N H₂SO₄ 용액으로 반응을 정지시켰다. 반응 결과는 OD_{450 nm} 흡광도에서 발색농도를 측정하였으며, 양성대조군으로 1 µg/mL의 purified human recombinant 4-1BB-Fc 또는 4-1BBL-Fc (PeproTech, Inc. Rocky Hill, NJ)를 이용하여 농도값(pg/mL)을 환산하였다. 제조된 ELISA kit의 검출한계는 4-1BB와 4-1BBL 모두 20 pg/mL이었다.

5. 임상진단

TBII (%), free T4 (ng/dL) 및 TSH (µU/mL)의 혈청 농도는 시판되는 ADVIA Centaur kits (Bayer, USA)를 이용하였으며, TPOAb (antibody to thyroid peroxidase) (IU/mL)와 TgAb (antibody to thyroglobulin) (IU/mL)의 역가는 IMMULITE 2000 kit (DPC, LA, US)를 이용하여 positive agglutination 정도를 측정하였다.

6. 통계처리

단핵세포에서의 4-1BB와 4-1BBL의 발현을 및 혈청 내 s4-1BB와 s4-1BBL의 농도측정에 대한 모든 실험은 3회 이상 반복 실험하였으며, 통계적인 방법은 SPSS 프로그램 (SPSS inc, Chicago, IL)의 one-way ANOVA를 통해 유의성을 검정하였고, $P < 0.05$ 시 유의한 차이가 있는 것으로 인정하였다. 또한 s4-1BB와 s4-1BBL의 상호 연관성 및 갑상선기능 검사와의 연관성을 linear regression test를 이용하여 분석하였다.

결 과

1. 4-1BB와 4-1BBL의 발현 특성

4-1BB의 발현은 대조군의 경우, anti-CD3 mAb (OKT3)에 의해 활성화된 단핵세포에서만 관찰된 반면(mean ± SD; 14.50 ± 5.71%), 그레이브스병 환자군은 비활성 단핵세포에서 발현이 관찰될 뿐 아니라(3.61 ± 3.18%; $P < 0.01$), 활성화 후 발현율이 대조군에 비해 더욱 증가(20.56 ± 8.26%)하였다(Fig. 1A; $P < 0.01$). 또 4-1BB는 그레이브스병 환자군과 대조군 모두 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포에서만 제한적으로 발현되었다(Fig. 2).

4-1BBL의 발현은 대조군의 경우는 비활성 단핵세포에서 낮은 비율로 발현되었으며(3.20 ± 1.91%) 활성화 후 증가되었다(11.59 ± 6.19%). 그레이브스병 환자군은 대조군에 비

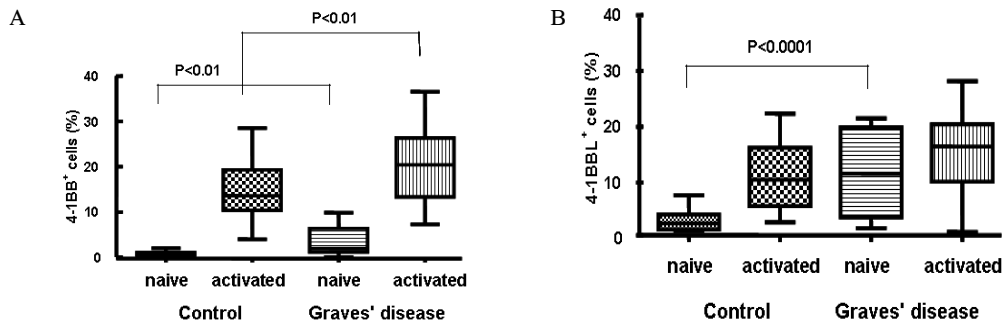


Fig. 1. Expression levels of 4-1BB and 4-1BBL on PBMC of the patients with Graves' disease (GD). Naïve PBMC were activated with 1 µg/mL of anti-CD3 mAb and 5 µg/mL of LPS for 24 hr. Expression levels of 4-1BB (A) and 4-1BBL (B) on PBMC of patients with GD were analyzed by flow cytometry compared with control group.

해 비활성 단핵세포에서 높은 발현율($11.66 \pm 6.66\%$; $P < 0.0001$)을 나타내었으며 활성화 후 발현율이 증가하였다($15.56 \pm 8.64\%$)(Fig. 1B). 4-1BBL의 발현은 CD19⁺ B 세포, 단핵구 및 수지상 세포와 같은 항원제시세포에서 주로 관찰되었으며, 대조군에 비해(Fig. 2A, 2B), 그레이브스병

환자군이 높게 발현되었다(Fig. 2C, 2D).

2. 수용성 4-1BB와 4-1BBL

s4-1BB는 대조군($164.11 \pm 72.04\%$)에 비해 그레이브스병 환자군에서 현저히 높게($838.00 \pm 1086.86\%$; $P < 0.05$)

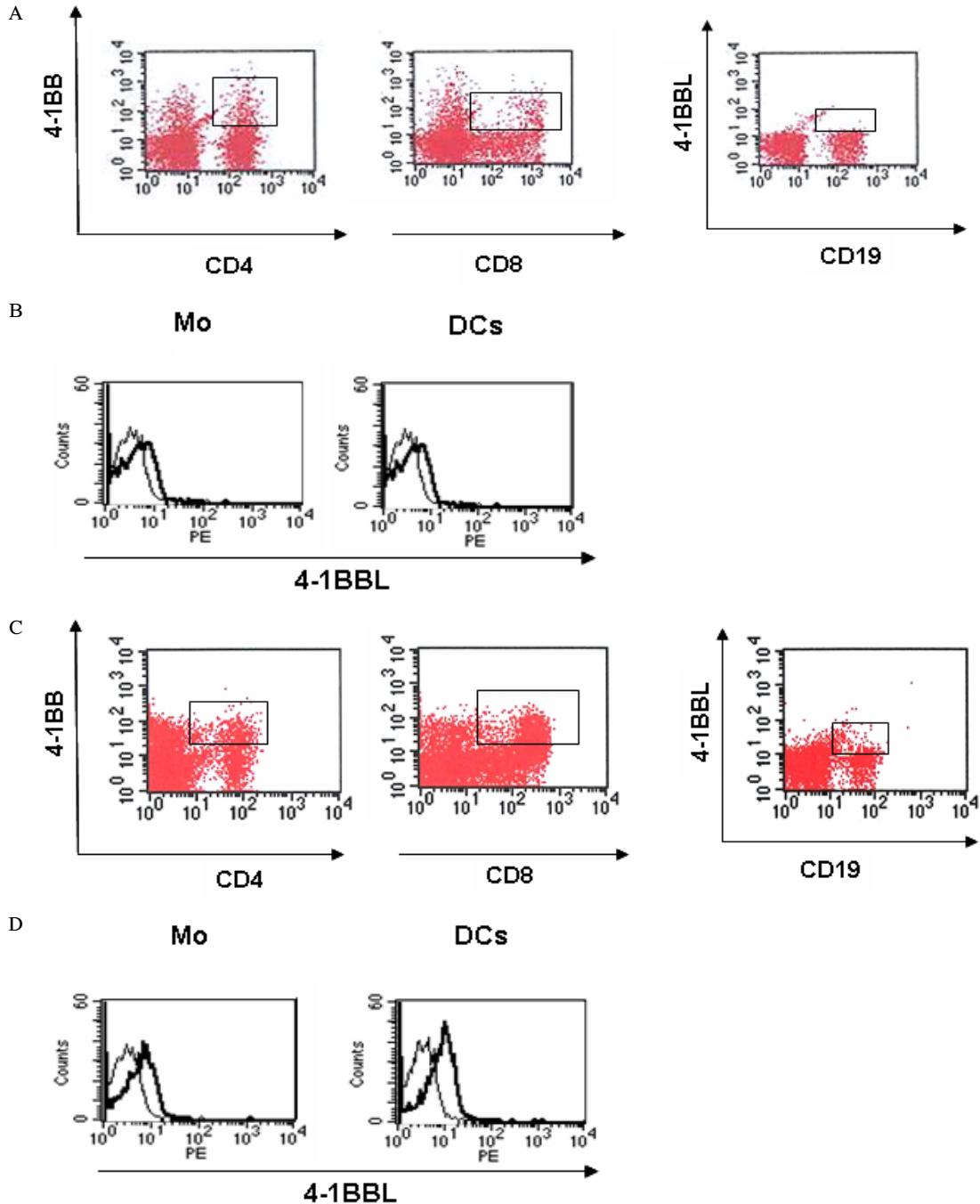


Fig. 2. Expression patterns of 4-1BB and 4-1BBL on PBMC of the patients with Graves' disease. A and C, PE conjugated CD4⁺/CD8⁺ T cells with FITC conjugated 4-1BB/4-1BBL fluorescence dot plots in the lymphocytes population of PBMC with healthy subject (A) and GD patient (C) by two-color cytometry. Square box presents double-positive cell population. B and D, 4-1BBL expression on primary monocytes (Mo) and monocyte-derived dendritic cells (DCs) of healthy subject (B) and GD patient (D) by single-color flow cytometric histogram. The thick lines represent 4-1BBL⁺ cells and the thin lines represent isotype-matched mAb as a control.

검출되었으며, s4-1BBL 역시 s4-1BB와 유사하게 대조군 ($37.61 \pm 42.20\%$)에 비해 그레이브스병 환자군의 혈청에서 매우 높게($1006.80 \pm 1312.21\%$; $P < 0.01$) 검출되었다(Fig. 3). 또한 동일한 그레이브스병 환자의 혈청 내에 존재하는 s4-1BB와 s4-1BBL의 농도는 서로 양의 상관관계를 나타내었다(Fig. 4).

3. 수용성 4-1BB와 갑상선기능 검사와의 상관관계

그레이브스병 환자의 혈청 s4-1BB의 농도는 TBII ($P < 0.01$; $r^2 = 0.425$) 및 free T4 농도($P < 0.05$; $r^2 = 0.254$)와 유의한 양의 상관관계를 보였으며 TSH, TPOAb, TgAb 등의 농도와는 상관관계가 없었다(Fig. 5A, 5B). 혈청 s4-1BBL의 농도 역시 s4-1BB의 경우와 유사하게 TBII ($P < 0.001$; $r^2 = 0.317$) 및 free T4 농도($P < 0.01$; $r^2 = 0.459$)와 양의 상관관계를 보였다(Fig. 5C, 5D).

고 찰

항원이 인체 외부로부터 침입하면 인체의 면역계는 이에 즉시 반응하여 염증반응을 일으키는 비특이적인 반응을 유발하게 되며, 이후 적응면역반응으로 이어져 외부항원에 대한 특이적인 반응이 시작된다. 즉 항원제시세포가 항원을 탐식하여 이를 다른 면역세포인 T 세포에 제시하게 되는데,

항원을 제시 받은 T 세포 중 그 항원에 특이적인 T 세포 수용체를 가진 T 세포만이 활성화된다. 이 과정에서 민감성과 특이성을 동시에 갖추지 않으면 면역기능 저하에 의한 감염이 증가하거나, 비특이적인 T 세포 반응에 의해 자가항원에 대한 면역반응을 일으켜 면역질환을 유발하게 된다[1]. T 세포 활성화에는 T 세포 표면 수용체를 통한 항원제시세포로부터의 항원 인식에 의한 1차 신호 전달과 더불어 공동자극 분자들의 공동자극신호에 의한 2차 신호전달이 필요하다[4,6]. 그레이브스병을 포함하여 전신성홍반성낭창이나 류마티스 관절염과 같은 자가면역 질환의 경우 자가반응성 T 세포에서의 cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) 과 발현이 질환의 병태생리와 밀접하게 관련이 있는 것으로 알려져 있다[13~15].

그레이브스병은 자가면역 질환으로 알려져 있고 갑상선 기능항진증의 가장 흔한 원인이다. 그레이브스병은 TSH 수용체 항체가 갑상선 여포세포의 수용체와 결합하여 TSH와 동일한 기능을 발휘함으로써 증상을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 항원특이성 T 세포 기능에 유전적 결함(HLA-DR3)이 생기는 비정상적인 체액성 면역반응 또한 그레이브스병을 유발하는 병인으로 알려져 있다[2~4].

그레이브스병에서 자가항원의 제시는 B 세포 또는 수지상 세포와 같은 전문적인 항원제시세포 및 갑상선 여포세포와 같은 비전문적인 항원제시세포에 의해 이루어진다[3]. 이런

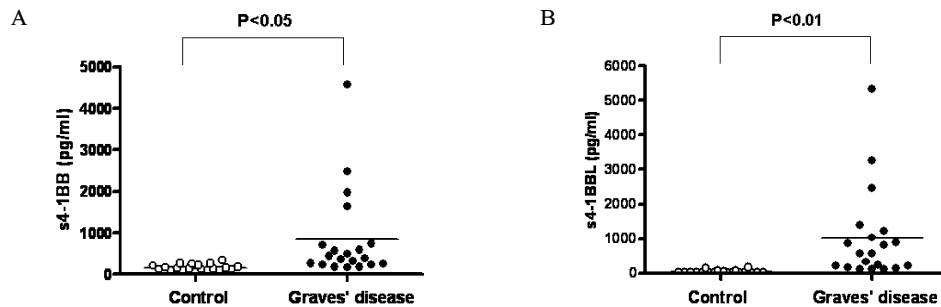


Fig. 3. Serum levels of s4-1BB and s4-1BBL in the patients with Graves' disease. s4-1BB (A) and s4-1BBL (B) were assessed in sera of the patients with Graves' disease by ELISA and compared with normal subjects as a control.

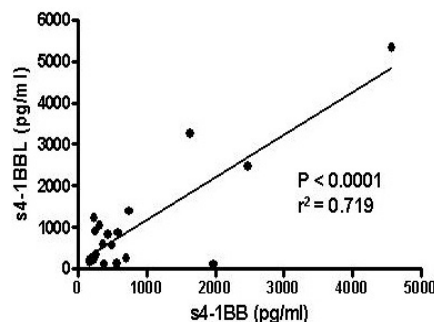


Fig. 4. Correlation between s4-1BB and s4-1BBL levels in sera of the patients with Graves' disease. The concentrations of s4-1BB and s4-1BBL were measured in sera of the same patients by ELISA.

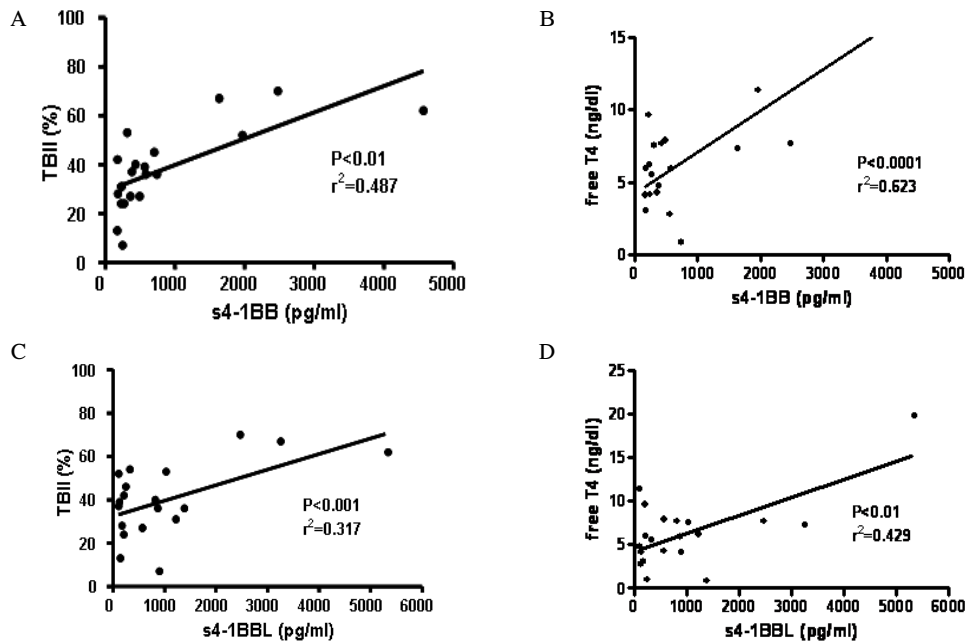


Fig. 5. Correlation between s4-1BB/s4-1BBL and clinical parameters of the patients with Graves' disease (GD). A, Correlation between s4-1BB and TBII (%) levels in sera of the patients with GD. B, Correlation between s4-1BB and free T4 (ng/mL) levels in sera of GD patients. C, Correlation between s4-1BBL and TBII levels in sera of GD patients. D, Correlation between s4-1BBL and free T4 levels in sera of GD patients.

항원제시세포들은 major histocompatibility complex (MHC) class II, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), CTLA-4, CD40 등과 같은 분자들을 과도하게 발현하고 있으며, ICAM-1 또는 CTLA-4의 발현을 차단할 경우 T 세포의 사멸 또는 무반응을 야기함으로써 자가면역 반응을 약화시킬 수 있다고 한다[3,4]. 그레이브스안구병증의 경우 안구 후방 조직 내로의 effector T 세포 침입이 이루어지는데 이는 혈관성 내피세포 및 결합조직세포에서의 ICAM-1, VCAM-1, CD44 등의 발현과 이를 통한 TNF- α , IFN- γ 의 생성에 의한 것으로 이런 공동자극분자들의 발현이 T 세포 활성화에 매우 중요한 역할을 하여 자가항원의 인식을 용이하게 함으로써 병이 유발되는 것으로 알려져 있다[2]. 그레이브스병의 경우에도 활성화된 독성 T 세포에서의 CD30의 발현, IgG3를 분비하는 세포 또는 CD4⁺ T 세포에서의 CD154 및 CD40 등 공동자극분자들의 과발현이 T 세포와 갑상선 여포 세포 간의 상호작용을 용이하게 함으로써 질환 유발에 기여하는 것으로 보고 있다[16,17]. 즉 자가 반응성 T 세포에서의 공동자극분자들의 발현특성이 그레이브스병과 같이 기관 특이적 자가면역 질환의 발병생태와 더욱 연관성이 있다는 것이다[4].

그레이브스병을 대상으로 4-1BB와 4-1BBL 공동자극분자들의 발현특성을 조사한 결과, 그레이브스병 환자의 말초혈액으로부터 분리한 단핵세포 표면에서의 4-1BB와 4-1BBL의 발현은 정상인에 비해 높게 발현되었으며, naïve T 세포

에서도 높은 발현율을 나타내었다. 4-1BB는 주로 CD4⁺ T 세포 및 CD8⁺ T 세포에만 발현되는 반면, 4-1BBL는 B 세포, 단핵구 및 수지상 세포와 같은 항원제시세포에서 주로 발현되었다. 4-1BB와 4-1BBL의 상호작용은 T 세포 활성화 및 생존에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는데[9,10], 최근 전신성홍반성낭창이나 류마티스 관절염과 같은 자가면역 질환의 경우 4-1BB-매개 신호전달을 조절함으로써 자가항체 생성을 억제하거나, 자가 반응성 CD4⁺ T 세포의 무반응 및 사멸을 유도하여 치료에 도움이 되는 것으로 보고되었다[9,11]. 본 연구에서는 그레이브스병에서 4-1BB와 4-1BBL가 다량 발현됨으로써 자가반응성 T 세포가 4-1BB 매개 신호전달에 의해 충분히 활성화될 수 있음을 알 수 있었으며, 이는 4-1BB 매개 신호전달 체계의 조절이 그레이브스병 치료에 이용될 수 있음을 의미한다.

종양괴사인자 수용체 계열의 공동자극분자들(TNFR1, TNFR2, TNFR3, CD27, CD30, CD40, CD95) 및 리간드들은 mRNA splicing이나 proteolytic cleavage 등의 기전에 의해 수용성 분자들로 분비되며 autocrine/paracrine loop를 통해 순환되고, 특히 종양세포 성장을 유도함으로써 많은 기관 및 질병 진행에 영향을 준다[18]. s4-1BB와 s4-1BBL의 경우 류마티스 관절염, 베타세포병, 다발성 경화증 및 골수이형성 증후군 등의 환자 혈청 내 다량 존재하는 것으로 밝혀졌으며 이들의 농도가 병의 심화 정도와 연관성이 있는 것으로 알려져 있다[19~24]. 본 연구에서도 그레이브스병 환

자의 혈청으로부터 s4-1BB 및 s4-1BBL의 농도 및 임상증상과의 연관성을 조사한 결과, 정상인에 비해 현저히 높은 농도의 s4-1BB와 s4-1BBL가 그레이브스병 환자의 혈청에 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 동일 환자의 혈청 내 존재하는 s4-1BB와 s4-1BBL의 농도는 서로 유의한 연관성을 보였다. 그러나 세포 표면에서 발현되는 4-1BB 및 4-1BBL의 발현양과는 서로 비례적인 연관성을 나타내지는 않았다(data not shown). 이는 s4-1BB와 s4-1BBL가 반드시 세포 표면에서 발현되는 4-1BB와 4-1BBL로부터 proteolytic cleavage 이전에 의해서 유래되는 것은 아니며, mRNA splicing과 같은 유전자 수준에서의 서로 다른 조절이 있다는 것을 암시한다. Michel 등에 의하면 s4-1BB는 mRNA splicing에 의해 만들어진다고 하였으며[20], Salih 등은 s4-1BBL의 경우 세포 표면에 발현된 4-1BBL로부터 matrix metalloproteinase (MMP)에 의해 잘려질 수 있다고 하였다[21].

Yamada-Okabe 등에 따르면, 갑상선호르몬 수용체를 발현하고 있는 Hela 세포(HeLaTR)에서 T3 처리에 의해 4-1BB 및 TRAF1, PSG7, fmfc 등의 유전자 발현이 현저히 증가하였다고 하였으며, 특히 4-1BB 발현의 증가는 T-세포매개의 면역반응을 유도할 뿐 아니라, 갑상선호르몬 수용체 발현과 연관된 T3에 의한 신호전달 경로를 매개할 수 있는 것으로 보고하였다[25]. 또한 Seko 등은 Takayasu's arteritis 환자의 대동맥 조직에서의 4-1BBL, Fas 및 MHC class I chain (MIC)-related A (MICA) 발현 증가와 4-1BB, FasL 및 NKG2D receptor를 발현하는 T 세포들의 침착을 확인하였으며, 이들 각 분자들의 상호작용은 세포사멸과 염증성 사이토카인 분비에 의한 만성 염증 유발을 통해 혈관손상에 기여한다고 하였다[26]. 한편 Salih 등[22]은 세포 표면에서의 4-1BBL 발현량의 변화가 세포-세포 간 상호작용을 조절하는데 중요한 역할을 하며, 특히 s4-1BBL 분비는 PMA, anti-IgM, anti-CD40 등의 외부 자극에 의해 현저히 증가되어 백혈병 환자의 T 세포를 통한 공동자극 신호에 영향을 미치게 되어 질병부위에 존재하는 T 세포의 급격한 사멸을 유도함으로써 질병 발달에 기여한다고 하였다. 또한 류마티스 관절염 환자의 경우 혈청 내 고농도의 s4-1BB가 존재하며 rheumatoid factor (RF) 농도와 유의한 연관성이 있고 sCD95 증가와 함께 관절조직 내 염증반응을 가속화시킴으로써 병의 진행에 기여하는 것으로 보고되었다[23,24].

본 연구에서는 그레이브스병 환자의 경우 정상인에 비해 높은 4-1BB 및 4-1BBL의 발현 및 혈청 내 다량의 s4-1BB 및 s4-1BBL가 존재하며 이는 특히 TBII 및 free T4 농도와 유의한 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 따라서 그레이브스병 환자의 경우 4-1BB 및 4-1BBL 발현의 과도한 증가가 자가 반응성 T 세포와 같은 항원 특이적 T 세포의 활성화에 기여하게 되며, 갑상선 여포 세포와 같은 질병 연관 세포들과의 상호작용을 용이하게 함으로써 자가면역질환과 같은

비정상적인 면역반응을 유발시킬 수 있는 것으로 보인다. 또한 혈청 내 다량 존재하는 s4-1BB 및 s4-1BBL는 염증성 사이토카인 분비를 자극함으로써 기관 특이적 자가면역질환의 진행에 기여하는 것으로 생각된다. 그러나 과도한 4-1BB-4-1BBL 매개의 신호전달이 어떻게 그레이브스병의 병태생리와 연관되는지에 대해서는 앞으로 지속적인 연구가 진행되어야 할 것이며, 이런 4-1BB 매개 신호전달의 조절을 이용하여 그레이브스병 치료에 유용한 방법이 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

연구배경: 4-1BB와 4-1BBL는 T 세포와 항원제시세포에서 발현되는 종양괴사인자 계열의 공동자극분자로서 T 세포 활성화와 생존에 중요한 역할을 한다. 본 연구에서는 그레이브스병에서 4-1BB와 4-1BBL의 발현특성을 조사하고 그 역할을 알아보고자 하였다.

방법: 그레이브스병 환자와 정상인의 말초혈액로부터 단핵세포와 혈청을 분리한 다음 유세포 분석법과 ELISA 방법을 이용하여 4-1BB와 4-1BBL의 발현특성 및 임상증상과의 연관성을 비교하였다.

결과: 정상인의 경우 4-1BB 발현은 활성화된 T 세포에서만 관찰되는 반면 그레이브스병 환자는 naive T 세포 및 활성화된 T 세포 모두에서 발현이 관찰되었으며 활성화 후 발현율이 더욱 증가하였다. 4-1BBL는 정상인과 그레이브스병 환자 모두 B 세포, 단핵구 및 수지상 세포와 같은 항원제시세포에서 주로 발현되었으며 활성화 후 발현율이 다소 증가하였다. 4-1BBL 발현율 역시 그레이브스병에서 높게 나타났다. 혈청 내 s4-1BB와 s4-1BBL 농도를 조사한 결과 그레이브스병 환자가 정상인에 비해 현저히 높게 측정되었으며, 이들의 농도는 TBII 및 유리 T4 농도와 서로 유의한 상관관계를 보였다.

결론: 그레이브스병 환자의 effector T 세포는 4-1BB 매개 신호전달을 통해 충분히 활성화될 수 있으며, 혈청 내 존재하는 고농도의 s4-1BB 및 4-1BBL는 그레이브스병 진행에 기여할 것으로 추정된다.

참 고 문 헌

1. Mathis D, Benoist C: *Back to central tolerance. Immunity* 20:509-516, 2004
2. Heufelder AE: *Pathogenesis of ophthalmopathy in autoimmune thyroid disease. Rev Endocr Metab Disord* 1:87-95, 2000
3. Weetman AP: *Autoimmune thyroid disease: propagation and progression. Eur J Endocrinol* 148:1-9, 2003

4. Salmaso C, Olive D, Pesce G, Bagnasco M: *Costimulatory molecules and autoimmune thyroid diseases. Autoimmunity* 35:159-167, 2002
5. Croft M: *Costimulation of T cells by OX40, 4-1BB, and CD27. Cytokine Growth Factor Rev* 14:265-273, 2003
6. Bodmer JL, Schneider P, Tschopp J: *The molecular architecture of the TNF superfamily. Trends Biochem Sci* 27:19-26, 2002
7. Kwon B, Yu KY, Ni J, Yu GL, Jang IK, Kim YJ, Xing L, Liu D, Wang SX, Kwon BS: *Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand. J Biol Chem* 274:6056-6061, 1999
8. Mittler RS, Bailey TS, Klussman K, Trailsmith MD, Hoffmann MK: *Anti-4-1BB monoclonal antibodies abrogate T cell-dependent humoral immune responses in vivo through the induction of helper T cell anergy. J Exp Med* 190:1535-1540, 1999
9. Mittler RS, Foell J, McCausland M, Strahotin S, Niu L, Bapat L, Hewes LB: *Anti-CD137 antibodies in the treatment of autoimmune disease and cancer. Immunol Res* 29:197-208, 2004
10. Foell J, Strahotin S, O'Neil SP, McCausland MM, Suwyn C, Haber M, Chander PN, Bapat AS, Yan XJ, Chiorazzi M, Hoffmann MK, Mittler RS: *CD137 costimulatory T cell receptor engagement reverses acute disease in lupus-prone NZB x NZW F1 mice. J Clin Invest* 111:1505-1518, 2003
11. Sun Y, Lin X, Chen HM, Wu Q, Subudhi SK, Chen L, Fu XY: *Administration of agonistic anti-4-1BB monoclonal antibody leads to the amelioration of experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol* 168:1457-1465, 2002
12. Seo SK, Choi JH, Kim YH, Kang WJ, Park HY, Suh JH, Choi BK, Vinay DS, Kwon BS: *4-1BB-mediated immunotherapy of rheumatoid arthritis. Nat Med* 10:1088-1094, 2004
13. Chistiakov DA, Turakulov RI: *CTLA-4 and its role in autoimmune thyroid disease. J Mol Endocrinol* 31:21-36, 2003
14. Anand A, Dean GS, Quereshi K, Isenberg DA, Lydyard PM: *Characterization of CD3+CD4-CD8- (double negative) T cells in patients with systemic lupus erythematosus: activation markers. Lupus* 11:493-500, 2002
15. Brunner-Weinzierl MC, Hoff H, Burmester GR: *Multiple functions for CD28 and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 during different phases of T cell responses: implications for arthritis and autoimmune diseases. Arthritis Res Ther* 6:45-54, 2004
16. Nakamoto Y, Niki M, Watanabe M, Iwatani Y: *Increase in immunoglobulin G3-secreting cells in intractable Graves' disease. Thyroid* 13:325-331, 2003
17. Watanabe M, Yamamoto N, Matsuzuka F, Miyauchi A, Iwatani Y: *Decrease of CD154 intensity on peripheral CD4+ T cells in autoimmune thyroid disease. Clin Exp Immunol* 136:555-558, 2004
18. Metkar SS, Naresh KN, Manna PP, Srinivas V, Advani SH, Nadkarni JJ: *Circulating levels of TNF alpha and TNF receptor superfamily members in lymphoid neoplasia. Am J Hematol* 65:105-110, 2000
19. Setareh M, Schwarz H, Lotz M: *A mRNA variant encoding a soluble form of 4-1BB, a member of the murine NGF/TNF receptor family. Gene* 164:311-315, 1995
20. Michel J, Schwarz H: *Expression of soluble CD137 correlates with activation-induced cell death of lymphocytes. Cytokine* 12:742-746, 2000
21. Salih HR, Schmetzer HM, Burke C, Starling GC, Dunn R, Pelka-Fleischer R, Nuessler V, Kiener PA: *Soluble CD137 (4-1BB) ligand is released following leukocyte activation and is found in sera of patients with hematological malignancies. J Immunol* 167:4059-4066, 2001
22. Salih HR, Nuessler V, Denzlinger C, Starling GC, Kiener PA, Schmetzer HM: *Serum levels of CD137 ligand and CD178 are prognostic factors for progression of myelodysplastic syndrome. Leuk Lymphoma* 45:301-308, 2004
23. Michel J, Langstein J, Hofstadter F, Schwarz H: *A soluble form of CD137 (ILA/4-1BB), a member of the TNF receptor family, is released by activated lymphocytes and is detectable in sera of patients with rheumatoid arthritis. Eur J Immunol* 28:290-295, 1998
24. Jung HW, Choi SW, Choi JI, BS Kwon BS: *Serum concentrations of soluble 4-1BB and 4-1BB ligand correlated with the disease severity in rheumatoid arthritis. Exp Mol Med* 36:13-22, 2004
25. Yamada-Okabe T, Satoh Y, Yamada-Okabe H: *Thyroid hormone induces the expression of 4-1BB and activation of caspases in a thyroid hormone receptor*

- dependent manner. *Eur J Biochem* 270:3064-3073, 2003
26. Seko Y, Sugishita K, Sato O, Takagi A, Tada Y, Matsuo H, Yagita H, Okumura K, Nagai R: Expression of costimulatory molecules (4-1BBL and Fas) and major histocompatibility class I chain-related A (MICA) in aortic tissue with Takayasu's arteritis. *J Vasc Res* 41:84-90, 2004