

## 류마티스관절염 활액 대식세포에서 파골세포 분화 관련 유전자의 발현

지종대<sup>1</sup> · 김태환<sup>2</sup> · 이빛나라<sup>2</sup> · 최성재<sup>1</sup> · 이영호<sup>1</sup> · 송관규<sup>1</sup>

고려대학교 의과대학 류마티스내과학교실<sup>1</sup>, 한양대학교 의과대학 류마티스병원<sup>2</sup>

### Expression of Osteoclastogenesis-related Genes in Rheumatoid Arthritis Synovial Macrophages

Jong Dae Ji<sup>1</sup>, Tae-Hwan Kim<sup>2</sup>, Bitnara Lee<sup>2</sup>, Sung Jae Choi<sup>1</sup>, Young Ho Lee<sup>1</sup>, Gwan Gyu Song<sup>1</sup>

Department of Rheumatology, College of Medicine, Korea University<sup>1</sup>, The Hospital for Rheumatic Diseases,  
College of Medicine, Hanyang University<sup>2</sup>, Seoul, Korea

**Objective.** To examine the mechanism for the inhibited differentiation of osteoclasts in rheumatoid arthritis synovial CD14<sup>+</sup> osteoclast precursors, the different expressions of the osteoclastogenesis-related genes in rheumatoid arthritis (RA) synovial fluid CD14<sup>+</sup> osteoclast precursors were compared with those of normal peripheral blood (PB) CD14<sup>+</sup> osteoclast precursors.

**Methods.** The expression of osteoclastogenesis-related genes were examined using a gene expression oligonucleotide microarray. To validate the results of the microarray analysis, the mRNA expressions of osteoclastogenesis-related genes were measured by real-time PCR.

**Results.** Comparative analysis of the mRNA profiles showed

significantly different expression of osteoclastogenesis-related genes, such as MafB, Id3 and LILRB4, in the RA synovial CD14<sup>+</sup> osteoclast precursors, compared to that of normal PB CD14<sup>+</sup> osteoclast precursors.

**Conclusion.** The expression of the osteoclastogenesis-related genes in RA synovial CD14<sup>+</sup> osteoclast precursors is different from that of the normal PB CD14<sup>+</sup> osteoclast precursors. These results suggest that the different expression of osteoclastogenesis-related genes might be involved in the altered osteoclastogenesis in RA synovial osteoclast precursors.

**Key Words.** Rheumatoid arthritis, Synovial osteoclast precursors, Osteoclastogenesis

## 서 론

류마티스관절염은 전 인구의 1~2%의 유병률을 보이는 흔한 질환으로 30~50대의 여성에서 호발하며 만성 염증과 함께 동반된 연골 및 골 파괴로 심각한 장애를 야기한다. 류마티스관절염을 포함한 염증성 질환들은 골 주위 염증을 유발하는데 이 같은 골 주위의 염증은 골 흡수(resorption)와 골 용해(osteolysis)를 초래한다. 염증성 골용

해는 류마티스관절염, 치주염(periodontitis) 등 염증성 질환의 중요한 특징이며 심각한 장애의 원인이 된다(1-4). 염증성 골 파괴에서 가장 중요한 과정은 파골세포(osteoclast)의 생성인데 파골세포는 골수 세포나 혈액 내에 있는 단핵구 등의 골수성 전구세포(myeloid precursor)에서 생성된다. M-CSF는 골수성 전구세포에 작용하여 receptor activator of nuclear factor  $\kappa$  B (RANK) 수용체의 발현을 유도하고 세포사멸을 억제하며 RANK ligand는 RANK수용체에 결합하여 전구세포를 성숙한 파골세포로 분화시킨다. 또한 골수성 전구세포는 세포 표면에 면역수용체(immunoreceptor)인 TREM2, SIRP1  $\beta$ , PIR- $\alpha$ , OSCAR 등을 발현하는데 이들 수용체는 DAP12나 FcR  $\gamma$  등의 신호전달 물질과 결합하여 파골세포 분화에 중요한co-stimulatory signal을 제

<접수일 : 2010년 9월 17일, 수정일 : 2010년 10월 21일, 심사  
통과일 : 2010년 10월 21일>

통신저자 : 지 종 대

서울시 성북구 안암동 5가 126-1

고려대학교 의과대학 류마티스내과학교실

E-mail : jjdimesy@korea.ac.kr

공한다 (2). 따라서 골수성 전구세포에서 CSF-1R, RANK와 같은 사이토카인 수용체의 발현, TREM2, OSCAR과 같은 면역수용체의 발현 및 TRAF6, Tec, Btk 같은 세포 내 신호전달 물질의 발현의 변화는 파골세포의 분화 조절에서 있어 매우 중요하다. 류마티스관절염이나 치주염 같은 염증성 질환들에서는 섬유아세포(fibroblast)나 골아세포(osteoblast)에서 RANKL의 발현이 유도되고 침윤성 T 림프구나 B림프구에서도 RANKL이 현저히 만들어진다. 염증성 질환에서 증가된 RANKL은 TNF  $\alpha$ 나 IL-1  $\beta$ 와 같은 염증성 사이토카인과 함께 파골세포 분화를 유도하여 대규모의 골 파괴를 일으킨다.

일반적으로 염증 질환에서는 염증을 유도하는 TNF  $\alpha$ 나 IL-1  $\beta$ 와 같은 염증성 사이토카인의 발현이 증가함과 동시에 이를 억제하기 위하여 IL-10과 같은 항염증 사이토카인 등도 증가되는 조절 기전이 작동한다. 염증반응과 함께 염증억제 기전(homeostasis)이 같이 작동하는 것과 마찬가지로 염증성 골 파괴에서도 파골세포 분화 분화 유도과 분화 억제작용이 함께 나타난다. 류마티스관절염과 같은 만성 염증성 질환에서 골 손실의 정도는 파골세포에 의한 골 흡수와 그에 대한 억제 기전(feedback and homeostatic mechanism)사이의 균형에 의해 결정되며, 따라서 불충분한 feedback inhibition은 이들 질환에서 골 손실을 가져온다. 최근의 연구에서 본 연구자는 류마티스관절염에서 발현되는 항염증 사이토카인 중 하나인 IL-10이 정상인 말초혈액 파골 전구세포에서 TREM2 발현 및 Erk1/2의 활성화에 관여하여 파골세포 분화를 억제함을 보고하였으나 IL-10의 신호전달 과정에 중요한 signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)의 활성화가 정상인의 말초혈액 단핵구에 비해 류마티스관절염의 활액세포에서는 현저히 억제됨을 보여 류마티스관절염에서는 IL-10에 의한 억제 기전이 작동하지 않을 가능성을 제시하였다 (5,6).

파골세포 생성을 억제하는 조절 기전(negative regulation)에 대해서는 많은 연구가 되어 있지 않으며 기존의 대부분의 연구들은 주로 RANKL의 길항체인 osteoprotegerin (OPG)에 한정되어 있다. 그러나 최근 수년간 파골세포 분화 억제 기전에 대한 연구가 급격히 증가하고 있어 염증 질환에서 골 파괴의 억제 기전을 규명하고 새로운 치료 물질을 개발하는데 중요한 기초가 마련되고 있다. 면역계에서 작용하는 GM-CSF, interferon IFN  $\alpha/\beta$ , IFN  $\gamma$ , IL-4, IL-10과 같은 사이토카인들이 파골 전구세포(osteoclast precursor)나 파골세포에 직접 작용하여 파골세포 분화를 억제한다는 것이 알려졌고, leukocyte Ig-like receptor (LILR)B같은 수용체나 protein inhibitor of activated STAT3 (PIAS3), MafB, Src homology 2 domain-containing in-

ositol-5-phosphatase (SHIP), Src homology 2 domain-containing tyrosine phosphatase (SHP-1), inhibitors of differentiation/DNA binding (Ids)과 같은 세포 내 물질들이 파골세포 분화 억제에 작용함이 보고되었다 (7-16). 그러나 현재까지 연구된 파골세포 분화 억제 기전들이 실제로 류마티스관절염에서 어떻게 작동하는지에 대한 체계적인 연구는 미흡하며 따라서 류마티스관절염 환자의 세포나 조직을 대상으로 한 파골세포 분화 억제 연구는 류마티스관절염에서 염증성 골 파괴의 기전을 규명하고 새로운 치료제의 개발에 매우 중요한 기초를 제공할 것이다. 본 연구자들은 류마티스관절염 활액 내 파골 전구세포와 정상인의 말초혈액 내 파골 전구세포를 비교하여 류마티스관절염에서 작동하는 파골세포 분화 억제 기전을 규명하기 위한 연구를 시행하였는데 예상과는 달리 정상인의 말초혈액 내 파골 전구세포에 비해 류마티스관절염 활액 내 파골 전구세포로부터의 파골세포 분화가 억제되어 있음을 확인하였다(비출간 자료). 이는 염증 병소에서 작동하는 억제 기전에 의해 파골세포의 분화가 부분적으로 조절되었을 가능성을 보여주는 것이다. 하지만 류마티스관절염의 활막조직에서는 파골 전구세포의 절대적인 숫자가 현저히 증가되어 있어 염증 조직에서 파골세포 분화 억제 기전이 작동하더라도 억제 효과가 파골 전구세포의 절대적인 숫자 증가를 극복할 정도로 강력하지 않으면 골 파괴의 진행을 적절히 막을 수는 없을 것이다. 실제로 류마티스관절염 조직에서 파골 전구세포로 생각되는 단핵구/대식세포의 수와 류마티스관절염의 질환의 활성과는 밀접한 연관이 있고 (17), 관절염 동물 모델을 이용한 염증성 골 파괴 연구에서 bisphosphonate의 사용량이 일반적인 골다공증 치료 용량에 비해 현저히 많은 양이 필요함이 알려져 (18) 관절염에 동반된 골 파괴를 막기 위해서는 보다 강력한 파골세포 분화 억제가 필요하다 하겠다. 따라서 류마티스관절염에서 작동하는 파골세포 분화 억제 기전을 밝혀내고 그 기전을 강화시키는 방법을 발견한다면 류마티스관절염에서 발생한 골 파괴를 막는 효과적인 치료제의 개발의 기초를 제공할 것이다.

이에 본 연구자들은 류마티스관절염 환자의 활액 내 CD14 양성 파골 전구세포와 정상인 말초혈액 내의 CD14 양성 파골 전구세포에서의 파골세포 분화 관련 유전자의 발현을 비교하여 류마티스관절염에서 작동하는 파골세포 분화 억제 기전을 조사하였다.

## 대상 및 방법

### 세포의 분리

건강 자원자로부터 혈액을 채취 한 후 Ficoll (Invitrogen,

Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 단핵세포를 얻었다. 혈액에서 얻은 단핵세포로부터 anti-CD14 magnetic beads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)을 이용하여 CD14 양성 세포를 얻었다. 류마티스관절염 환자로부터 활액을 얻은 후 Ficoll (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 단핵 세포를 얻고 활액에서 얻은 단핵세포로부터 혈액세포에서 사용한 방법을 이용하여 CD14 양성 세포를 얻었다. 활액을 얻었던 류마티스관절염 환자들은 1987년 미국 류마티스학회가 제정한 류마티스관절염의 진단기준을 만족하였고 prednisolone, methotrexate, sulfasalazine, hydroxychloroquine, leflunomide 등의 항류마티스 제제를 사용하였으나 병의 활성이 조절되지 않은 환자의 활액을 대상으로 하였다. 이 연구의 계획은 한양대학교 류마티스 병원 임상시험심사위원회(institutional review board)의 승인을 얻어 시행하였고 혈액 및 활액을 채취한 건강 자원자 및 환자들로부터 연구에 대해 설명하고 동의서를 받았다.

#### 파골세포로의 분화

건강 자원자 말초혈액(10명)의 CD14 양성 세포를 10% FBS가 포함된  $\alpha$  MEM 배양액에서 M-CSF 20 ng/mL와 함께 2일간 배양한 후 M-CSF 20 ng/mL과 RANKL 40 ng/mL과 함께 6일간 배양하였다. 류마티스관절염 환자 활액(14명)의 CD14 양성 세포의 경우는 12일까지 배양기간을 연장 하였다. 첨가하는 사이토카인은 3일마다 바꾸어 주었다. 배양한 세포를 formalin으로 고정하고 Acid Phosphatase Leukocyte diagnostic kit (Sigma, San Diego, CA)를 이용하여 TRAP 염색을 하였다. 다핵(핵이 3개 이상인) TRAP양성인 파골세포의 수를 현미경 하에서 관찰하였다. 파골세포 분화의 차이는 Mann-Whitney test을 이용하여 분석하였고 통계적 유의 수준은 0.05를 기준으로 하였다.

#### 파골세포 분화 관련 유전자의 Expression profiling

2명의 건강 자원자의 말초혈액과 6명의 류마티스관절염 환자의 활액으로부터 분리된 CD14 양성 세포로부터 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA를 이용하여 mRNA microarray를 시행하였다. mRNA microarray는 Illumina HumanRef-8 v3 Expression BeadChip (Illumina, Inc., San Diego, CA)을 이용하여 시행하였고 분석은 Illumina BeadStudio v3.1.3 (Gene Expression Module v3.3.8)을 이용하여 시행하고 ArrayAssist<sup>®</sup> 5.5.1 (Stratagene, La Jolla, USA)와 R statistical language v. 2.4.1를 이용하여 통계처리 하였다. CD14 양성 세포에서의 파골세포 분화 관련 유전자의 발현 차이는 t-검정을 이용하여 분석하였고 통계적 유의 수준은 0.05를 기준으로 하였다. 이상의 mi-

croarray를 이용한 mRNA profiling 실험은 Macrogen (Seoul, Korea)에 의뢰하여 진행하였다.

#### Microarray 결과의 검증

MicroArray의 결과를 확인하기 위해 total RNA (5명의 건강 자원자의 말초혈액과 12명의 류마티스관절염 환자의 활액으로부터 분리된 CD14 양성 세포)로부터 a First Strand cDNA, Synthesis kit (Fermentas)를 이용하여 cDNA를 만들고 iQTM SYBR-GreenSupermix와 iCycler iQTM thermal cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)를 이용한 real-time PCR법으로 MafB, Id3와 LILRB4 등의 유전자 발현을 검사하였다. 검사한 유전자의 발현은 GAPDH의 발현과 비교하여 정량화하였다. 유전자 발현 차이는 Mann-Whitney test을 이용하여 분석하였고 통계적 유의 수준은 0.05를 기준으로 하였다.

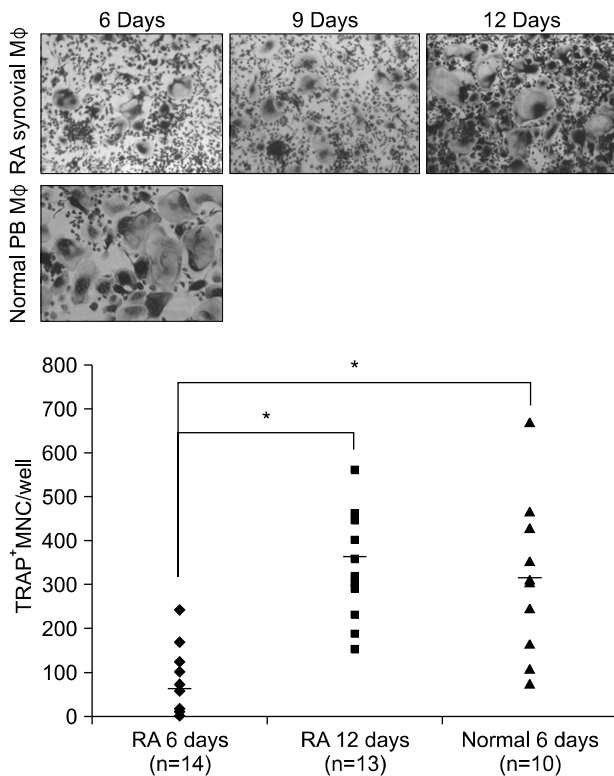
### 결 과

#### 류마티스관절염 환자의 활액 내 CD14 양성 파골 전구 세포에서 파골세포로의 분화 억제

기존의 연구에서 본 연구자들은 류마티스관절염 활액 내 파골 전구세포와 정상인의 말초혈액 내 파골 전구세포를 비교하여 류마티스관절염에서 작동하는 파골세포 분화 억제 기전 규명을 위한 연구를 시행하였는데 정상인의 말초혈액 내 파골 전구세포에 비해 류마티스관절염 활액 내 파골 전구세포로부터의 파골세포 분화가 억제되어 있음을 확인하였다(비출간 자료). 본 연구에서는 건강 자원자 말초혈액(10명)과 류마티스관절염 환자 활액(14명)의 CD14 양성 파골 전구세포를 이용하여 염증성 환경에 노출된 파골 전구세포에서 파골세포 분화 능력의 억제를 대상 검체 수를 늘려 재확인 하였다. 본 연구자들이 기존의 논문에서 확인한 바와 같이 RANKL과 M-CSF로 6일간 처리한 경우 정상 파골 전구세포에 비해 류마티스관절염 환자의 활액 파골 전구세포로부터의 파골세포 분화가 현저히 억제되었고 류마티스관절염 환자의 활액 파골 전구세포는 RANKL와 M-CSF를 12일간 처리해야 6일간 처리한 정상 파골 전구세포의 분화 정도와 유사한 소견을 보였다(그림 1).

#### 류마티스관절염 환자의 활액 내 CD14 양성 파골 전구 세포에서 파골세포 분화 관련 유전자의 발현

인간 말초혈액 내 파골 전구세포에 비해 류마티스관절염 환자의 활액 파골 전구세포에서 파골세포 분화가 억제되어 있어(그림 1) 그 기전을 규명하기 위하여 말초혈액 내 파골 전구세포와 류마티스관절염 환자의 활액 내 파골 전구세포에서 파골세포 분화 관련 유전자들의 발현을 mRNA microarray 방법을 이용하여 비교하였다. 파골세포



**Figure 1.** Healthy volunteer PB and RA synovial CD14<sup>+</sup> cells were cultured with M-CSF (20 ng/mL) for 2 days, and then with RANKL (40 ng/mL) and M-CSF (20 ng/mL) for an additional 6, 9 or 12 days. The cells were stained for TRAP expression. TRAP-positive multinucleated (>3 nuclei/cell) cells were counted as osteoclasts. \* $p < 0.05$  versus RA 6 days.

분화 관련 사이토카인 및 케모카인 유전자중 파골세포 분화를 촉진하는 것으로 알려져 있는 monocyte chemo-attractant protein-1 (MCP-1/CCL2), IL-32와 억제하는 macrophage migration inhibitory factor (MIF)가 류마티스관절염 환자의 활액 파골 전구세포에서 유의한 증가를 보였다(표 1). 파골세포 분화 관련 수용체 및 membrane factor 중에는 colony stimulating factor 1 receptor (CSF-1R), LILRB4, macrophage scavenger receptor 1 (MSR1), triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (TREM2) 등이 유의하게 증가되어 있었다(표 2). 파골세포 분화 관련 세포 내 인자들 중에는 B-cell CLL/lymphoma 2 (Bcl-2), MafB 등이 증가되어 있었고 SHIP가 감소되어 있었다(표 3). 이들 중 파골세포 분화를 억제하는 작용이 있는 유전자는 MIF, LILRB4, MafB, SHIP였고 따라서 류마티스관절염 환자의 활액 파골 전구세포의 분화를 억제할 기전으로 작용하였을 가능성이 있는 유전자는 증가된 MIF, LILRB4, MafB였다. 또한 통계적으로는 유의하지 않았지만( $p=0.06$ ) 파골세포 분화를 억제하는 것으로 알려진 Id3도 증가되어 있어 류마티스관절염에서의 파골세포 분화 억제에 관여하였을 가능성 있는 유

**Table 1.** Differentially expressed mRNAs in the RA synovial CD14<sup>+</sup> cells compared to that of the normal PB CD14<sup>+</sup> cells (Cytokines and chemokines involved in osteoclastogenesis)

Gene name	Osteoclast differentiation	Fold change	p-value
BMP2	Stimulation	ND	ND
CCL2 (MCP-1)*	Stimulation	8.5	0.02
CCL3 (MIP-1 $\alpha$ )	Stimulation	1.89	0.4
CCL4 (MIP-1 $\beta$ )	Stimulation	ND	ND
CX3CL1	Stimulation	ND	ND
CXCL10	Stimulation	2.98	0.29
CXCL11	Inhibition	ND	ND
CXCL12	Stimulation	2.98	0.29
GM-CSF	Inhibition/Stimulation	ND	ND
IFN $\alpha$	Inhibition	ND	ND
IFN $\beta$	Inhibition	ND	ND
IFN $\gamma$	Inhibition	ND	ND
IL-10	Inhibition	-1.13	0.68
IL-12A	Inhibition	ND	ND
IL-12B	Inhibition	ND	ND
IL-17A	Stimulation	ND	ND
IL-18	Inhibition	-1.13	0.74
IL-1 $\beta$	Inhibition/Stimulation	1.07	1
IL-27	Inhibition	-1.09	0.82
IL-32*	Stimulation	3.04	0.05
IL-4	Inhibition	ND	ND
IL-6	Stimulation	ND	ND
MIF*	Inhibition	2.34	0.04
TGF $\beta$	Inhibition/Stimulation	ND	ND
TNF $\alpha$	Stimulation	1.43	0.63
TNFSF11A (RANKL)	Stimulation	ND	ND

\* $p < 0.05$  versus Healthy volunteer PB, ND not detected

전자로 생각할 수 있다.

### Microarray 검사 결과에서 발현에 차이를 보인 파골세포 분화 관련 유전자의 검증

Microarray 검사에 사용되었던 검체를 포함하여 5명의 건강 자원자의 말초혈액과 12명의 류마티스관절염 환자의 활액으로부터 분리된 CD14 양성 세포로부터의 total RNA를 이용하여 microarray에서 유의한 차이를 보였던 유전자들을 real-time PCR검사로 확인하였다. Real-time PCR 검사에서도 MafB와 LILRB4는 유의하게 류마티스관절염에서 증가되었고(그림 2) MIF의 경우는 통계적으로 유의하지는 않았으나( $p=0.08$ ) 류마티스관절염에서 증가된 경향을 보였다(data not shown). 아울러 microarray에서는 유의하지 않았지만 증가되었던 Id3의 경우는 검체의 수가 늘어난 real-time PCR검사에서는 유의하게 류마티스관절염에서 발현이 증가되었다(그림 2).

**Table 2.** Differentially expressed mRNAs in the RA synovial CD14+ cells compared to that of the normal PB CD14+ cells (Receptors and membrane factors involved in osteoclastogenesis)

Gene name	Osteoclast differentiation	Fold change	p-value
ATP6v0d2	Positive	ND	ND
CSF1R*	Positive	1.77	0.01
FCER1G (FcR $\gamma$ )	Positive	-1.03	0.99
ITGAM (CD11b)	Positive	1.28	0.22
ITGB3 (CD61)	Positive	ND	ND
LILRB1	Negative	1.33	0.11
LILRB3	Negative	1.14	0.67
LILRB4*	Negative	2.87	0
MSR1 (SR-A)*	Positive	4.84	0
OSCAR	Positive	-1.21	0.71
Plexin-A1	Positive	2.16	0.13
TM7SF4 (DC STAMP)	Positive	ND	ND
TNFR11A (RANK)	Positive	ND	ND
TREM2*	Positive	1.59	0.04
TYROBP (DAP12)	Positive	-1.29	0.54

\*p&lt;0.05 versus Healthy volunteer PB, ND not detected

## 고찰

류마티스관절염 환자에서 염증성 골파괴는 심각한 기능 이상 및 장애를 일으키는 중요한 소견으로 류마티스관절염과 같은 염증성 질환에서 염증에 의한 골 흡수 및 골 용해는 주로 활성화된 파골세포에 의해 일어난다. 본 연구에서 연구자들은 류마티스관절염의 활액 내 파골 전구세포에서 파골세포 분화 관련 유전자들의 발현 양상을 관찰하여 류마티스관절염 병소에서 작동하는 파골세포 분화 조절 기전을 연구하고자 하였다. 류마티스관절염 환자의 활액 내 CD14양성 파골 전구세포의 유전자 발현의 비교를 위해 대조군으로 정상인 말초혈액 내의 CD14 양성 파골 전구세포를 사용하였는데 이는 류마티스관절염 환자의 활액 내 CD14 양성 파골 전구세포가 주로 말초혈액 내의 단핵구로부터 기원되었고 (19) 류마티스관절염 환자의 말초혈액 CD14 양성 파골 전구세포도 이미 일정량의 염증 물질에 노출되었기 때문에 염증에 노출되지 않은 정상인의 말초혈액 내 파골 전구세포를 대조군으로 하였다. 본 연구에서는 기존의 논문에서 본 연구자들이 발표하였던 바와 같이(비출간 자료) 정상인의 말초혈액 파골 전구세포에 비해 류마티스관절염 환자의 활액 파골 전구세포에서 파골세포 분화 능력이 현저히 억제되었음을 확인 하였다. 또한 파골세포 분화 관련 유전자의 발현 양상을 관찰하기 위해 시행한 microarray 검사에서 파골세포 분화 억제에 관여하는 MIF, LILRB4, MafB 등이 류마티스관절염 환자에서 유의하게 증가됨을 보았고 통계적으로는 유의하지는 않았지만 또 다른 파골세포 분화 억제 유전자인 Id3의 발현도 증

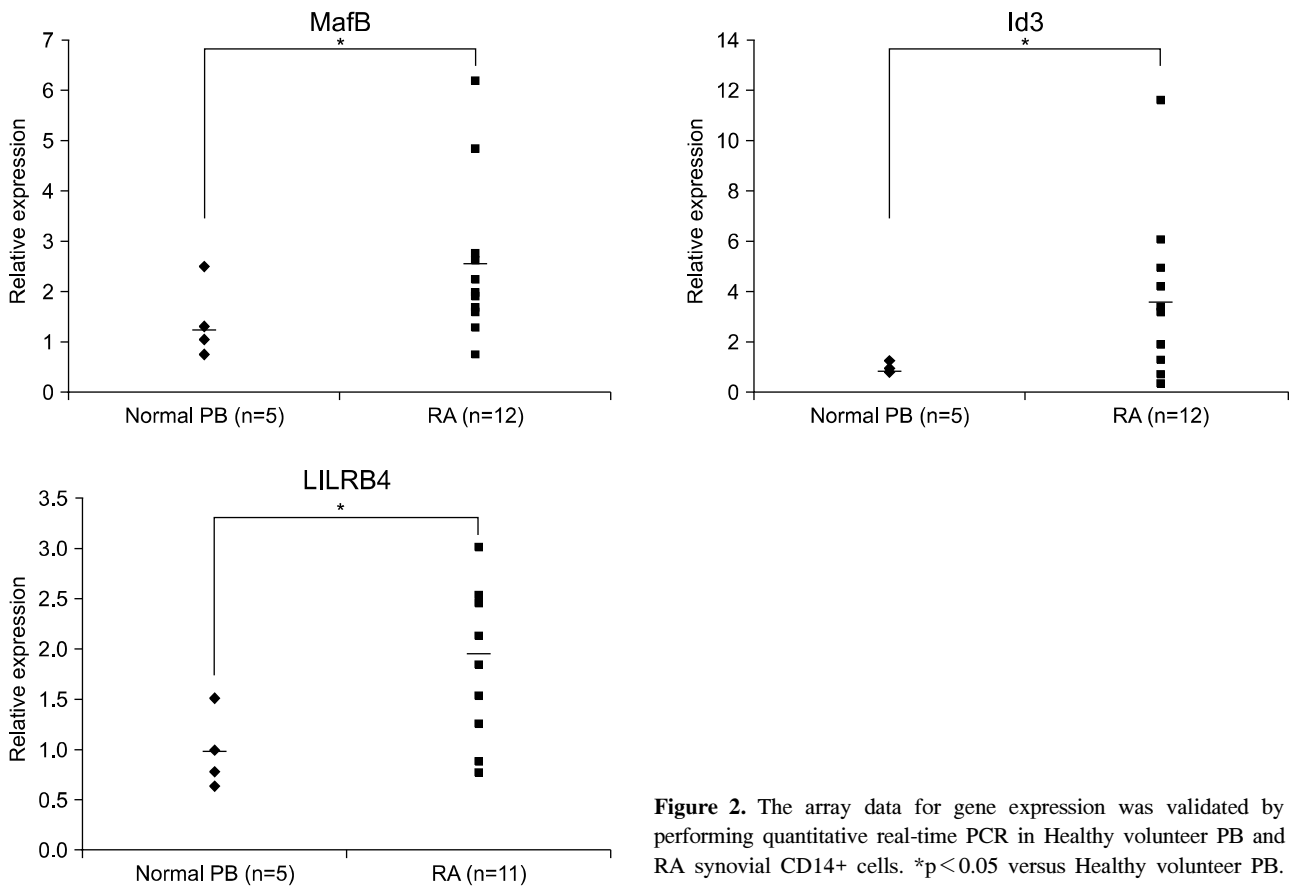
**Table 3.** Differentially expressed mRNAs in the RA synovial CD14+ cells compared to that of the normal PB CD14+ cells (Intracellular molecules involved in osteoclastogenesis)

Gene name	Osteoclast differentiation	Fold change	p-value
Bcl-2*	Positive	2.83	0.01
Btk	Positive	-1.37	0.36
C/EBP $\beta$	Negative	1.39	0.38
CaMKIV	Positive	ND	ND
c-Fos	Positive	-1.86	0.06
c-Jun	Positive	1.29	0.54
DYRK1A	Negative	ND	ND
FOSL1 (Fra-1)	Positive	ND	ND
Gab2	Positive	-1.29	0.24
Id1	Negative	ND	ND
Id2	Negative	1.34	0.56
Id3	Negative	2.59	0.06
IKBKB (IKK- $\beta$ )	Positive	ND	ND
MafB*	Negative	2.63	0.01
MITF	Positive	1.38	0.29
NFATc1	Positive	-1.01	1
NFKB1 (NF $\kappa$ B p50)	Positive	1.38	0.15
NFKB2 (NF $\kappa$ B p52)	Positive	-1.02	0.99
MAP3K14 (NIK)	Positive	-1.19	0.21
PIAS3	Negative	-1.08	0.39
PLC $\gamma$ 2	Positive	-1.13	0.09
PU.1	Positive	1.02	0.97
INPP5D (SHIP)*	Negative	-1.67	0.01
PTPN6 (SHP-1)	Negative	ND	ND
SOCS1	Positive	1.76	0.14
SOCS3	Positive	1.07	0.74
STAT1	Negative	1.49	0.49
Syk	Positive	1.08	0.8
MAP3K7 (TAK1)	Positive	1.18	0.36
Tec	Positive	1.08	0.22
TRAF6	Positive	1.06	0.54

\*p&lt;0.05 versus Healthy volunteer PB, ND not detected

가됨을 보았다. Microarray 결과를 확인하기 위해 검체수를 늘려 검사한 real-time PCR 결과에서도 류마티스관절염에서 MafB, LILRB4와 Id3가 유의하게 발현이 증가되어 있음을 보았고 통계적으로는 유의하지는 않았지만 MIF도 증가된 경향을 보여 이들 유전자가 류마티스관절염 환자의 활액 내 세포에서 관찰된 파골세포 분화 억제제의 기전으로 작동했을 가능성을 시사하였다.

Kim 등은 RANKL에 의해 MafB의 발현이 감소되고 MafB를 쥐 골수에 있는 파골 전구세포에 과발현 시킴으로써 파골세포 분화가 현저히 억제됨을 보아 MafB가 파골세포 분화 억제 물질로 작용함을 보고하였고 그 기전으로 파골세포 분화에 중요한 역할을 하는 c-Fos에 결합하여 NFATc1의 활성화를 억제함을 제시하였다 (8). 또한 Smink 등은 CCAAT/enhancer-binding protein beta (C/EBP  $\beta$ )의 long



**Figure 2.** The array data for gene expression was validated by performing quantitative real-time PCR in Healthy volunteer PB and RA synovial CD14+ cells. \* $p < 0.05$  versus Healthy volunteer PB.

transactivating (LAP\*, LAP) isoform에 의해 MafB의 발현이 증가되어 파골세포 분화가 억제됨을 확인하였고 파골세포 분화가 진행됨에 따라 C/EBP  $\beta$ 의 long transactivating isoforms의 발현이 없어짐을 보여 C/EBP  $\beta$ 가 MafB를 통해 파골세포 분화를 억제함을 보고하였다 (20). 또한 RANKL에 의한 파골세포 분화 유도가 All-trans- retinoic acid (ATRA)에 의해 억제되는데 그 기전으로 MafB의 발현 조절이 제시되었다 (21). 이상의 연구 결과들로 미루어 MafB가 파골세포 분화 억제에 중요한 역할을 할 것으로 생각되며 본 연구에서 관찰된 류마티스관절염 활액 파골 전구세포에서의 MafB의 발현 증가가 파골세포 분화 억제를 유도하였을 가능성을 시사한다 하겠다. 또한 Mori 등은 ITIM-harboring inhibitory receptor인 LILRB의 isoform들이 파골 전구세포의 세포 표면에 발현되고 RANKL과 M-CSF에 의한 파골세포 분화 과정에서도 지속적으로 인산화되고 SHP-1과 결합하며 각각의 LILRB의 isoform에 대한 단일클론 항체를 이용하여 LILRB를 자극한 경우 RANKL에 의해 유도되는 파골세포 분화가 현저히 억제됨을 보아 LILRB가 파골세포 분화 억제에 역할을 함이 제시되었고 (12) 본 연구자들의 연구에서는 LILRB isoform중 LILRB4가 유의하게 류마티스관절염 활액 파골 전구세포에서 증가됨을

보였다. MIF는 활성화된 T세포나 대식세포에서 만들어지는 물질로 RANKL에 의해 유도된 쥐의 파골세포 분화가 MIF에 의해 억제됨이 관찰되었고 MIF 유전자 결핍 쥐에서 파골세포 분화가 증가됨이 관찰되어 MIF가 파골세포 분화에 억제 물질로 작용함이 제시되었다 (22). 그러나 난소절제술로 유도된 골다공증 동물 모델 쥐에서 연구 결과를 보면 정상 쥐와 비교하여 MIF 유전자 결핍 쥐에서는 난소절제술에 의해 골다공증이 유도되지 않았고 MIF 유전자 결핍 쥐의 골조직에서 정상 쥐와 비교하여 난소절제술에 의한 파골세포 증가가 관찰되지 않아 난소절제술에 의한 골다공증 유도에서 MIF가 파골세포 분화를 촉진함이 제시되었다 (23). 이는 Jacquin 등의 연구 (22)와는 반대되는 결과로 MIF가 직접적으로는 파골세포의 분화를 억제하나 조골세포나 골조직의 기질세포(stromal cell)에 작용하여 간접적으로 파골세포의 분화를 촉진했을 가능성을 생각해 볼 수 있겠다. 따라서 MIF에 의한 파골세포 분화 조절을 밝히기 위해서는 인간 파골 전구세포를 이용한 직접적인 파골세포 분화 실험이 필요할 것으로 생각된다. Id1, Id2, Id3가 MafB와 유사하게 RANKL에 의해 파골세포 분화가 진행됨에 따라 발현이 감소함을 보이며 Id 유전자를 쥐의 골수 파골 전구세포에 과발현 시킬 경우 파골세포

분화가 현저히 억제됨을 보여 Id1, Id2, Id3가 파골 전구세포에 직접적으로 작용하여 분화억제 물질로 작용함을 보여주었다. 한편 Kurowska-Stolarska 등의 연구에서는 류마티스관절염 활막세포를 저산소 상태에 노출시켰을 경우 Id2의 발현이 증가되고 Id2를 과발현 시킨 류마티스관절염 활막세포와 쥐의 골수 파골 전구세포를 같이 배양한 경우 Id2 발현이 정상인 류마티스관절염 활막세포에 비해 현저히 파골세포 분화가 증가함을 보여 Id2가 간접적으로는 기질세포나 골아세포 등에 작용하여 파골세포 분화를 촉진함을 보였다 (24). 이는 기질세포나 조골세포 등에 작용하여 간접적으로는 파골세포 분화를 촉진하지만 파골 전구세포에 직접적으로 작용할 때는 파골세포 분화를 억제하는 toll-like receptor (TLR) ligand (25)나 IL-1 $\beta$  (비출간 자료)와 같은 염증성 물질의 파골세포 분화 조절과 유사한 소견이다.

## 결론

본 연구에서는 류마티스관절염 환자의 활액 내 CD14 양성 파골 전구세포에서 정상인 말초혈액 내의 CD14 양성 파골 전구세포에 비해 파골세포 분화가 억제되어 있고 그 기전으로 파골세포 분화 억제물질로 알려진 MafB, LILRB4, Id3, MIF 등의 발현 증가가 관여하였을 가능성을 제시하였다. 그러나 현재의 연구는 유전자 발현만을 보았다는 제한점을 가지고 있어 실제로 본 연구자들이 파골세포 분화 억제 기전으로 제시하였던 유전자들의 단백질에서도 발현이 증가됨을 확인할 예정이며 또한 유전자 조작 기법을 이용한 파골 전구세포에서 이들 유전자의 과발현이나 발현 억제 연구를 통해 이들 유전자의 세포 내 기능을 확인할 예정이다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지가족부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호 A084224).

## 참고문헌

- Han X, Kawai T, Taubman MA. Interference with immune-cell-mediated bone resorption in periodontal disease. *Periodontol* 2000 2007;45:76-94.
- Takayanagi H. Osteoimmunology: shared mechanisms and crosstalk between the immune and bone systems. *Nat Rev Immunol* 2007;7:292-304.
- Teitelbaum SL. Osteoclasts; culprits in inflammatory osteolysis. *Arthritis Res Ther* 2006;8:201.
- Walsh NC, Crotti TN, Goldring SR, Gravalles EM. Rheumatic diseases: the effects of inflammation on bone. *Immunol Rev* 2005;208:228-51.
- Ji JD, Tassulas I, Park-Min KH, Aydin A, Mecklenbrauker I, Tarakhovsky A, et al. Inhibition of interleukin 10 signaling after Fc receptor ligation and during rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 2003;197:1573-83.
- Park-Min KH, Ji JD, Antoniv T, Reid AC, Silver RB, Humphrey MB, et al. IL-10 suppresses calcium-mediated costimulation of receptor activator NF-kappa B signaling during human osteoclast differentiation by inhibiting TREM-2 expression. *J Immunol* 2009;183:2444-55.
- Aoki K, Didomenico E, Sims NA, Mukhopadhyay K, Neff L, Houghton A, et al. The tyrosine phosphatase SHP-1 is a negative regulator of osteoclastogenesis and osteoclast resorbing activity: increased resorption and osteopenia in me(v)/me(v) mutant mice. *Bone* 1999;25:261-7.
- Kim K, Kim JH, Lee J, Jin HM, Kook H, Kim KK, et al. MafB negatively regulates RANKL-mediated osteoclast differentiation. *Blood* 2007;109:3253-9.
- Kim K, Lee J, Kim JH, Jin HM, Zhou B, Lee SY, et al. Protein inhibitor of activated STAT 3 modulates osteoclastogenesis by down-regulation of NFATc1 and osteoclast-associated receptor. *J Immunol* 2007;178:5588-94.
- Lari R, Fleetwood AJ, Kitchener PD, Cook AD, Pavasovic D, Hertzog PJ, et al. Macrophage lineage phenotypes and osteoclastogenesis--complexity in the control by GM-CSF and TGF-beta. *Bone* 2007;40:323-36.
- Lee J, Kim K, Kim JH, Jin HM, Choi HK, Lee SH, et al. Id helix-loop-helix proteins negatively regulate TRANCE-mediated osteoclast differentiation. *Blood* 2006;107:2686-93.
- Mori Y, Tsuji S, Inui M, Sakamoto Y, Endo S, Ito Y, et al. Inhibitory immunoglobulin-like receptors LILRB and PIR-B negatively regulate osteoclast development. *J Immunol* 2008;181:4742-51.
- Takayanagi H, Kim S, Matsuo K, Suzuki H, Suzuki T, Sato K, et al. RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta. *Nature* 2002;416:744-9.
- Takayanagi H, Ogasawara K, Hida S, Chiba T, Murata S, Sato K, et al. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. *Nature* 2000;408:600-5.
- Takeshita S, Namba N, Zhao JJ, Jiang Y, Genant HK, Silva MJ, et al. SHIP-deficient mice are severely osteoporotic due to increased numbers of hyper-resorptive osteoclasts. *Nat Med* 2002;8:943-9.
- Wei S, Wang MW, Teitelbaum SL, Ross FP. Interleukin-4 reversibly inhibits osteoclastogenesis via inhibition of NF-kappa B and mitogen-activated protein kinase signaling. *J Biol Chem* 2002;277:6622-30.
- Haringman JJ, Gerlag DM, Zwinderman AH, Smeets TJ, Kraan MC, Baeten D, et al. Synovial tissue macrophages: a sensitive biomarker for response to treatment in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:834-8.
- Herrak P, Görtz B, Hayer S, Redlich K, Reiter E, Gasser J, et al. Zoledronic acid protects against local and systemic bone loss in tumor necrosis factor-mediated arth-

- ritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:2327-37.
19. Kinne RW, Stuhlmueller B, Burmester GR. Cells of the synovium in rheumatoid arthritis. Macrophages. *Arthritis Res Ther* 2007;9:224.
  20. Smink JJ, Bégay V, Schoenmaker T, Sterneek E, de Vries TJ, Leutz A. Transcription factor C/EBPbeta isoform ratio regulates osteoclastogenesis through MafB. *EMBO J* 2009;28:1769-81.
  21. Conaway HH, Persson E, Halén M, Granholm S, Svensson O, Pettersson U, et al. Retinoids inhibit differentiation of hematopoietic osteoclast progenitors. *FASEB J* 2009;23:3526-38.
  22. Jacquin C, Koczon-Jaremkó B, Aguila HL, Leng L, Bucala R, Kuchel GA, et al. Macrophage migration inhibitory factor inhibits osteoclastogenesis. *Bone* 2009;45:640-9.
  23. Oshima S, Onodera S, Amizuka N, Li M, Irie K, Watanabe S, et al. Macrophage migration inhibitory factor-deficient mice are resistant to ovariectomy-induced bone loss. *FEBS Lett* 2006;580:1251-6.
  24. Kurowska-Stolarska M, Distler JH, Jüngel A, Rudnicka W, Neumann E, Pap T, et al. Inhibitor of DNA binding/differentiation 2 induced by hypoxia promotes synovial fibroblast-dependent osteoclastogenesis. *Arthritis Rheum* 2009;60:3663-75.
  25. Ji JD, Park-Min KH, Shen Z, Fajardo RJ, Goldring SR, McHugh KP, et al. Inhibition of RANK expression and osteoclastogenesis by TLRs and IFN-gamma in human osteoclast precursors. *J Immunol* 2009;183:7223-33.