

Network Analysis을 이용한 류마티스관절염 활액 대식세포에서 유전자 발현 연구

지종대¹ · 김태환² · 이빛나라² · 최성재¹ · 이영호¹ · 송관규¹

고려대학교 의과대학 류마티스내과학교실¹, 한양대학교 의과대학 류마티스병원²

Study of the Gene Expressions in Rheumatoid Arthritis Synovial Macrophages Using Network Analysis

Jong Dae Ji¹, Tae-Hwan Kim², Bitnara Lee², Sung Jae Choi¹, Young Ho Lee¹, Gwan Gyu Song¹

Department of Rheumatology, College of Medicine, Korea University University¹, The Hospital for Rheumatic Diseases, College of Medicine, Hanyang University², Seoul, Korea

Objective. We wanted to investigate the mechanisms that could account for the pathogenesis of rheumatoid arthritis, so we examined the different expressions of the genes in rheumatoid arthritis (RA) synovial fluid macrophages as compared with that of normal peripheral blood (PB) monocyte-derived macrophages using microarray and bioinformatic analysis.

Methods. We examined the expression of genes by using a gene expression oligonucleotide microarray. The differences of the gene expressions between the RA synovial macrophages and the normal PB monocytes-derived macrophages were analyzed using bioinformatic tools, including cytoscape and its plugin.

Results. In this study, we found that 899 genes (464 genes up-regulated and 435 genes down-regulated) were differentially expressed between the two groups. Among the 899

genes, 552 genes were included for gene ontology analysis and network analysis. Based on biological process ontology, they were categorised mainly into immune response processes, responses to stimulus and signaling and regulation of biological processes. In addition to the genes related with STAT1 and AP-1 signaling, we found that the genes involved in the antigen processing and the cell cycle are abundantly expressed in RA synovial macrophages, suggesting that these genes may play an important role in the pathogenesis of RA.

Conclusion. Our study suggest that this approach using integration of the gene expression profile with the protein interaction data may help to find several important pathogenic mechanisms in RA.

Key Words. Rheumatoid arthritis, Synovial macrophages, Microarray, Bioinformatics

서 론

류마티스관절염은 손, 발의 작은 관절을 일차적으로 침범하는 전신성 염증질환으로 만성 염증과 함께 동반된 연

골 및 골 파괴로 심각한 장애를 일으키는 질환이다. 현재 까지 류마티스관절염의 병인을 밝히기 위한 많은 연구가 진행되어 T 림프구, B 림프구, 단핵구/대식세포, 섬유아세포, 파골세포 등 다양한 세포와 사이토카인, 케모카인 등 의 다양한 염증물질들이 관여함이 밝혀졌다 (1). 특히 최근에는 microarray 기법을 이용한 다양한 유전자 발현 프로파일링(gene expression profiling) 연구가 류마티스관절염 활막 조직이나 말초혈액 세포에서 진행되어 류마티스관절염 병인에 관여하는 중요한 유전자들이 밝혀지고 있다 (2-5). 류마티스관절염에서 전사 프로파일링(transcription profil-

<접수일 : 2011년 1월 3일, 수정일 : 2011년 1월 19일, 심사통과일 : 2011년 1월 20일>

통신지자 : 지 종 대

서울시 성북구 안암동 5가 126-1

고려대학교 의과대학 류마티스내과학교실

E-mail : jjdjmesy@korea.ac.kr

ing)의 연구는 류마티스관절염의 병인에 관여하는 특징적 유전자발현의 발견 뿐 아니라 발현에 차이를 보이는 유전자 조합에 따라 류마티스관절염을 여러군으로 세분화하여 항 TNF제제나 anakinra와 같은 특정 항류마티스제제에 대한 치료반응을 예측하는 지표로도 활용될 가능성이 최근의 연구들에 의해 제시되었다 (2,5-7). 그러나 면역계는 다양한 면역세포와 그 세포들에서 생성되는 사이토카인, 케모카인 등의 염증 물질들에 의해 매우 복잡하게 조절되기 때문에 류마티스관절염에 작동하는 병태 생리학적 이상은 단지 독립적인 유전자들의 발현변화만으로는 설명하기가 힘들다. 최근 류마티스관절염 등과 같이 복잡한 요인들이 작동하는 질환의 병인 연구에서 다양한 omics기법을 이용하여 단백질 및 유전자 발현의 차이를 분석하고 이들 유전자들이 유기적으로 작동하는 생물학적 네트워크(biological network)를 밝혀내고 질환의 병인에 중요한 역할을 하는 공통된 생리학적 기능을 가지는 유전자들의 군(regulatory module)을 밝혀냄으로써 질환의 병인을 규명하려는 연구들이 진행되고 있다 (8,9).

다양한 유전자 및 단백질의 발현 profile정보와 단백질-단백질 상호작용(protein-protein interaction), 단백질-DNA 상호작용(protein-DNA interaction) 등의 세포 network 정보(cell network information)를 통합 분석함으로써 각각의 질환에서 관찰되는 특징적 병태생리학적 기전을 찾으려는 연구가 있다. 이 같은 network 정보와 expression profile의 통합 분석을 목적으로 cytoscape을 비롯한 다양한 software들이 개발되었다 (10). Cytoscape는 분자상호작용 네트워크(molecular interaction network)를 보기 쉽게 표현하고 이 같은 네트워크와 gene expression profile을 통합 분석할 수 있도록 하는 생물정보학 소프트웨어(open source bioinformatic software)이다 (11). Cytoscape는 *jActiveModule*ssk *Bi-NGO*같은 plugin 소프트웨어를 인터넷에서 내려 받아 실행시킴으로써 gene ontology (GO) enrichment analysis를 하거나 조절모듈(regulatory module)을 찾는데 사용될 수 있다 (8,10).

본 연구자들은 microarray를 이용하여 류마티스관절염 환자의 활액 대식세포와 정상인의 말초혈액 단핵구에서 분화된 대식세포에서 유전자 발현을 관찰하고 그 병태생리학적 의의를 찾기 위해 cytoscape와 그 plugin을 이용하여 생물정보학적 분석(bioinformatic analysis)를 시행하였다.

대상 및 방법

세포의 분리

건강 자원자로부터 혈액을 채취한 후 Ficoll (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 말초 혈액 단핵세포를 얻고 이 세포로부터 anti-CD14 magnetic beads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)을 이용하여 단핵구를 얻었다. 10% 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)이 포함된 RPMI 1,640 배양액에서 단핵구를 M-CSF 20 ng/mL로 처리한 후

2일간 배양하여 대식세포로 분화 시켰다. 류마티스관절염 환자로부터 활액을 얻은 후 anti-CD14 magnetic beads (Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA)을 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 류마티스병원 임상시험심사위원회(institutional review board)의 승인을 얻어 시행하였고 혈액 및 활액을 채취한 건강 자원자 및 환자들로부터 연구에 대해 설명하고 동의서를 받았다.

류마티스관절염 환자의 활액 대식세포 및 건강 자원자의 말초 혈액 단핵구-유래 대식세포의 Gene expression profiling

류마티스관절염 환자의 활액 내 대식세포에서의 유전자 발현을 비교하기 위해 대조군으로 정상인 말초혈액에서 분리된 단핵구를 M-CSF로 처리하여 분화시킨 대식세포를 사용하였는데 이는 류마티스관절염 활액에 존재하는 CD14+세포가 대식세포로 생각되고 기존의 연구들에서 류마티스 관절염 활액 대식세포의 대조군으로 정상인 말초혈액의 단핵구-유래 대식세포를 사용하였기 때문에 본 연구에서도 말초혈액 단핵구를 분화시킨 대식세포를 대조군으로 사용하였다 (12,13). 2명의 건강 자원자의 말초 혈액으로부터 분리된 단핵구에서 분화된 대식세포와 6명의 류마티스관절염 환자의 활액으로부터 분리된 대식세포로부터 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 이용, 분석은 Illumina BeadStudio v3.1.3 (Gene Expression Module v3.3.8)을 이용, ArrayAssist[®] 5.5.1 (Stratagene, La Jolla, USA)와 R statistical language v. 2.4.1를 이용하여 통계처리 하였다. 각 세포들간의 유전자의 발현 차이는 one-way analysis of variance (ANOVA)을 이용하여 분석하였고 통계적 유의 수준은 0.05를 기준으로 하였다. 이상의 microarray를 이용한 mRNA profiling 실험은 Macrogen (Seoul, Korea)에 의뢰하여 진행하였다.

Microarray 결과의 검증

MicroArray의 결과를 확인하기 위해 total RNA (3명의 건강 자원자의 말초 혈액과 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 유전자 발현을 재확인하였다. 검사한 유전자의 발현은 GAPDH의 발현과 비교하여 정량화하였다. 유전자 발현 차이는 *Student's t-test*를 이용하여 분석하였고 통계적 유의 수준은 0.05를 기준으로 하였다.

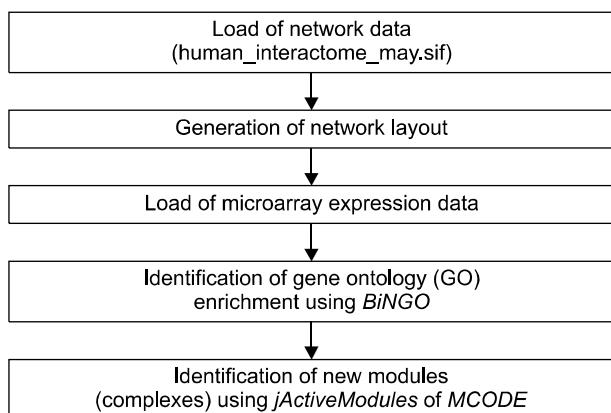


Figure 1. Overview of the bioinformatic analysis using cytoscape.

생물 정보학적 분석

Cytoscape를 이용한 생물 정보학적 분석은 2007년 Cline 등에 의해 보고되었던 논문의 방법을 이용하였다(그림 1). 간단히 살펴보면 Cytoscape에 불러온(import한) 네트워크 정보(network data)는 www.cytoscape.org에서 내려 받은 Human_Interactome_May.sif을 이용하였다. Human_Interactome_May.sif 파일은 yeast two-hybrid (Y2H) system과 co-affinity purification assay를 이용하여 찾아낸 protein-protein interaction과 문헌 검색을 통해 찾아낸 literature-curated interaction (LCI)을 이용한 세편의 논문에 보고된 data set들에 더하여 (14-16) IntAct molecular interaction database (IntAct), Database of Interacting Proteins (DIP), Biomolecular Interaction Network Database (BIND), Human Protein Reference Database (HPRD)에 보고된 interaction들을 통합하여 만든 인간 interaction network data로 10,203개의 gene (node)와 61,262개의 interaction (edge)으로 구성되어 있다. Cytoscape의 layout algorithms을 이용하여 network layout을 생성한 후 microarray를 이용하여 만든 gene expression data를 불러왔다(import). Cytoscape plugin인 *jActiveModules*과 *MCODE*를 이용하여 류마티스관절염 환액 대식세포에서 특징적으로 작동하는 유전자들의 module (complex)들을 찾고 또 다른 plugin인 *BiNGO*를 이용하여 gene ontology

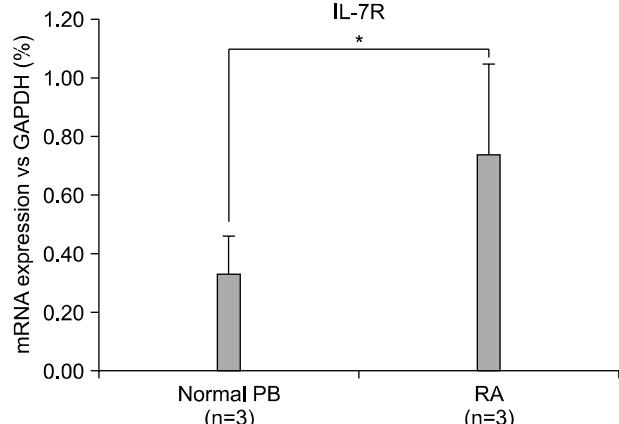
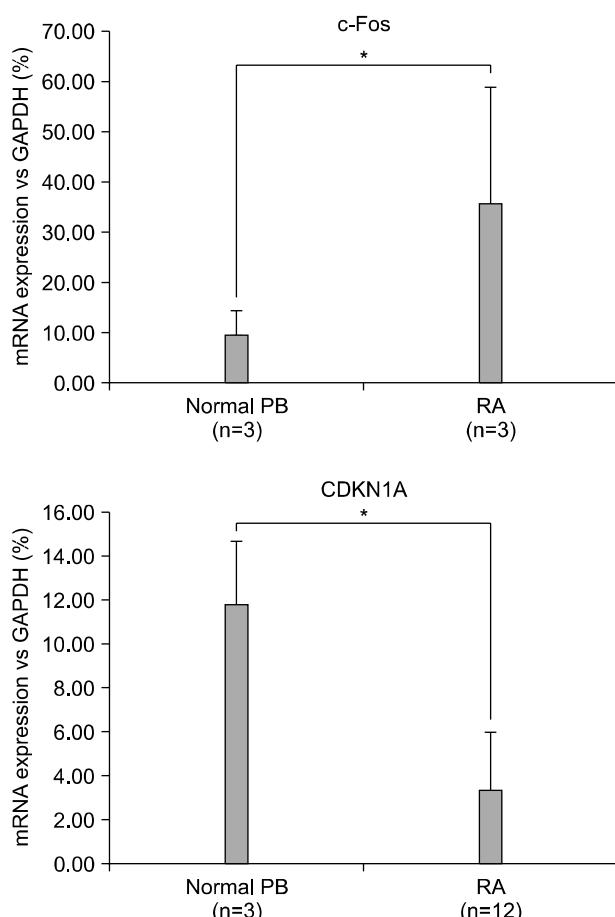


Figure 2. The array data for the gene expressions was validated by performing quantitative real-time PCR in the healthy volunteer PB monocyte-derive macrophages and the RA synovial macrophages * $p < 0.05$ versus the healthy volunteer PB monocyte-derive macrophages.

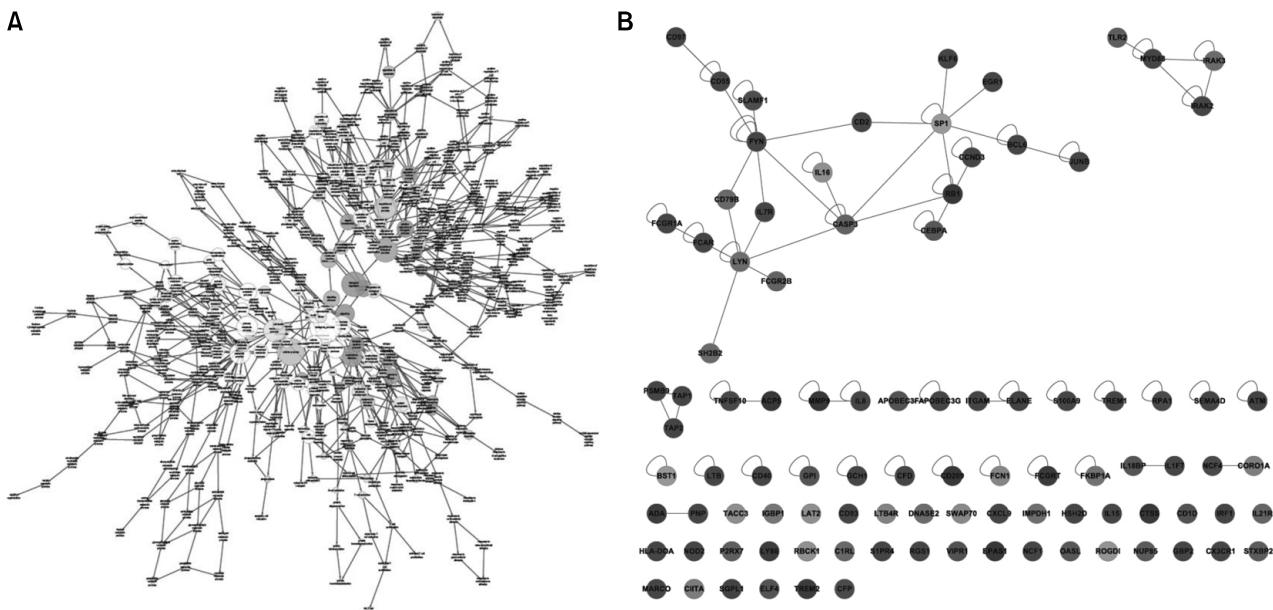


Figure 3. (A) Map of the biological processes associated with RA synovial macrophages. Darker nodes mean the more significant ontology terms. The size is proportional to the number of genes included in that ontology term. (B) Network of the genes included in the immune system processes (GO: 2376). A blue node means down-regulation of genes and a red node means up-regulation of genes in the RA synovial macrophages.

enrichment를 찾았다 (10). Protocol에 따라 *jActiveModules*의 경우는 score 3이상을 의미 있는 module로 간주하였고 *MCODE*에서는 score 2 이상, 적어도 node가 4개 이상을 의미 있는 complex로 간주하였다.

결 과

류마티스관절염 환자의 활액 대식세포 및 건강 자원자의 말초 혈액 단핵구-유래 대식세포에서 유전자의 발현 비교
류마티스관절염 환자의 활액 대식세포의 병태생리학적 역할을 규명하기 위하여 말초 혈액 내 단핵구로부터 분화된 대식세포와 류마티스관절염 환자의 활액 내 대식세포에서 유전자들의 발현을 mRNA microarray 방법을 이용하여 검사하여 비교하였다. microarray 분석결과를 보면 건강한 자원자의 단핵구에서 분화된 대식세포와 비교하였을 때 류마티스관절염 활액 대식세포에서는 899개의 유전자가 통계적으로 유의한 발현의 차이를 보였고 그 중 464개 유전자의 발현이 증가되었고 435개 유전자의 발현이 감소되어 있었다.

Microarray 검사 결과에서 발현에 차이를 보인 파골세포 분화 관련 유전자의 검증

Microarray 검사에 사용되었던 검체를 포함하여 2명의 건강 자원자의 말초 혈액과 12명의 류마티스관절염 환자의 활액으로부터 분리된 CD14 양성 세포로부터의 total RNA를 이용하여 microarray에서 유의한 차이를 보였던 유전자들을 real-time PCR 검사법으로 확인하였다. real-time PCR

검사에서도 microarray 결과와 같이 c-Fos와 IL-7R는 유의하게 류마티스관절염에서 증가되었으나 CDKN1A의 경우는 microarray 결과와는 반대로 류마티스관절염에서 현저히 낮았다(그림 2).

류마티스관절염 활액 대식세포와 말초 혈액 내 단핵구-유래 대식세포에서 microarray방법으로 확인된 유전자발현 차이에 대한 생물정보학적 분석

Microarray결과에서 보인 류마티스관절염 환자의 활액 대식세포와 건강 자원자의 단핵구-유래 대식세포에서 유전자 발현의 차이의 생물학적 의의를 규명하기 위해 cytoscape와 그 plugin을 이용하여 gene ontology analysis등의 생물정보학적 분석을 시행하였다. 류마티스관절염 환자의 활액 대식세포와 건강 자원자의 단핵구-유래 대식세포에서 발현의 차이를 보였던 899개의 유전자 중 본 연구에 사용된 네트워크 자료에서 상호작용이 보고된 522개의 유전자(node)를 대상으로 분석을 진행하였다. 이들 552개의 유전자(node)는 437개의 상호작용(edge)이 있었고 325개의 유전자가 증가되어 있었고 227개의 유전자가 감소되어 있었다.

본 연구자는 류마티스관절염 환자의 활액 대식세포에서 유의하게 차이를 보이는 유전자들의 생물학적 기능 및 유전자 발현의 변화가 류마티스관절염의 병태생리에 미치는 여향을 파악하기 위해 cytoscape의 plugin 프로그램인 BiNGO를 이용하여 gene ontology enrichment 분석을 시행하였다. Biological process GO annotation을 가지는 인간 유

Table 1. The gene ontology analysis (biological process) of the differentially expressed genes in RA synovial macrophages using the BiNGO plugin (The top ten GO terms were statistically significant)

Biological process	GO No.	Array data frequency n/501 (%)	Expected frequency n/14,306 (%)	p-value
Immune system processes	2376	96/501 (19.1)	948/14,306 (6.6)	2.41E-18
Regulation of immune system processes	2682	47/501 (9.3)	424/14,306 (2.9)	2.35E-09
Immune responses	6955	54/501 (10.7)	619/14,306 (4.3)	1.80E-07
Regulation of immune responses	50776	30/501 (5.9)	235/14,306 (1.6)	2.72E-07
Response to stimulus	50896	197/501 (39.3)	3,633/14,306 (25.3)	2.35E-09
Response to stress	6950	115/501 (22.9)	1,773/14,306 (12.3)	1.40E-08
Defense responses	6952	55/501 (10.9)	620/14,306 (4.3)	7.40E-08
Signaling	23052	172/501 (34.3)	3,131/14,306 (21.8)	2.78E-08
Regulation of biological processes				
Positive regulation of biological processes	48518	133/501 (26.5)	2,208/14,306 (15.4)	2.78E-08
Regulation of responses to stimulus	48583	50/501 (9.9)	524/14,306 (3.6)	4.78E-08

Table 2. The gene ontology analysis (molecular function) of the differentially expressed genes in RA synovial macrophages using the BiNGO plugin (The top ten GO terms were statistically significant)

Molecular function	GO No.	Array data frequency n/501 (%)	Expected frequency n/14,306 (%)	p-value
Binding	5488	474/501 (89.9)	12,368/14,306 (80.0)	1.17E-07
Protein binding	5515	381/501 (72.2)	8,123/14,306 (52.5)	3.70E-18
Protein dimerization activity	46983	52/501 (9.8)	578/14,306 (3.7)	7.02E-08
Protein homodimerization activity	42803	30/501 (5.6)	377/14,306 (2.4)	2.83E-03
Cytoskeletal protein binding				
Actin binding				
Actin filament binding	51015	9/501 (1.7)	47/14,306 (0.3)	3.07E-03
Ion binding				
Cation binding				
Metal ion binding				
Magnesium ion binding	287	18/501 (3.4)	159/14,306 (1.0)	1.86E-03
Antigen binding	3823	10/501 (1.8)	59/14,306 (0.3)	3.07E-03
Lipid binding	8289	31/501 (5.8)	411/14,306 (2.6)	3.22E-03
Catalytic activity				
Lyase activity				
Carbon-carbon lyase activity				
Aldehyde-lyase activity	16832	4/501 (0.7)	6/14,306 (0.0)	2.85E-03
Transferase activity				
Transferase activity, transferring phosphorus-containing groups				
Kinase activity	16301	46/501 (8.7)	741/14,306 (4.7)	5.78E-03

전자의 수는 14,306개였고 류마티스관절염 환자의 활액 대식세포에서 유의하게 차이를 보이는 유전자들 중 GO annotation을 가지고 있어 분석에 포함된 유전자는 501개였다. GO enrichment 분석의 결과를 보면 생물학적 과정(biological process) ontology의 경우는 274개 GO term에서 의미 있는 차이를 보였고 분자 기능 ontology는 38개, 세포 조성 ontology는 49개의 GO term에서 의미 있는 차이를 보였다(그림 3A). 각각의 세부 ontology에서 유의한 차이를 보였던 GO term을 보면 생물학적 과정의 범주에서는 면역 반응 과정, 자극에 대한 반응, 생물학적 과정의 조절 등에서 유전자 발현의 차이를 보였고 분자 기능에서는 결합이나

촉매 활동에서 세포 조성은 세포 부분 범주 중 세포 내 부분, cell leading edge, 세포 내, 세포 표면 등의 subcategory에서 차이를 보였다(표 1, 2). 류마티스관절염의 병인과 관련하여 분자 기능의 category 중 면역계 과정에 속한 유전자들을 보면 *Toll-like receptor 2 (TLR2)*, *Myeloid differentiation primary response gene 88 (MYD88)*, *Interleukin-1 receptor-associated kinase 2 (IRAK2)*, *IRAK3* 등의 유전자 발현이 류마티스관절염 환자의 활액 대식세포에서 현저히 증가되어 있어 TLR 신호전달과정이 류마티스관절염의 병인에 중요한 역할을 할 것으로 생각할 수 있었고 *LYN*, *FYN* 등의 Src family kinases와 *FCAR*, *FCGRIA*, *FCGR2B* 등의 Fc γ 수용

체 유전자들이 유의하게 증가되어 있었다(그림 3B). microarray를 이용한 기존의 류마티스 관절염의 병인연구들에서 (5,12,17) STAT1 관련 유전자들의 발현이 증가된 것과 마찬

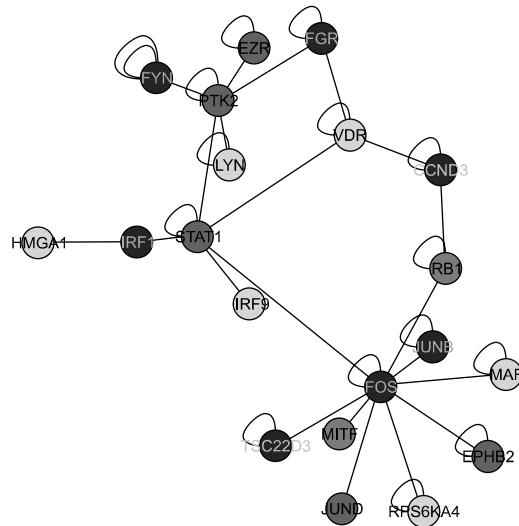


Figure 4. Different expressions of the STAT1-related genes in the RA synovial macrophages. A blue node means down-regulation of genes and a red node means up-regulation of genes in the RA synovial macrophages.

가지로 본 연구에서도 STAT1이 증가되어 있었고 STAT1과 interaction을 가지는 IRF1, IRF9의 발현도 증가되어 있었으며 FOS, JUNB, JUND등의 유전자가 STAT1과 상호작용(interaction)을 보였다(그림 4).

단백질-단백질 상호작용 네트워크에서 연결이 밀집된 부분은 함께 기능하는 단백질 복합체를 의미한다. 연결이 밀집된 부분을 찾기 위해 cytoscape plugin인 MCODE를 이용하였다. MCODE에서는 score 2 이상, 적어도 node가 4개 이상을 의미 있는 complex로 간주하는데 이 기준에 합당한 complex는 발견되지 않았다. 그러나 score 2에 근접한 두 개의 complex를 찾았는데 하나는 PSME1, PSMB8, RPL34, UBA52, RPL17, PSME2, PSMB9 등 7개의 node로 구성된 complex과 다른 하나는 CCND2, RB1, CDKN1A, CCND3, CDK6, CEBPA 등 6개의 node로 구성된 complex였다(그림 5A). 또한 jActiveModules을 이용하여 본 연구에서 사용한 네트워크에서 기능 모듈을 찾으려 했으나 score 3 이상의 module은 발견할 수 없었다. 그러나 3에 근접한 score를 보이는 module로 FOS와 STAT1이 중심이 되어 구성된 module을 찾을 수 있었다(그림 5B).

고 찰

류마티스관절염은 임상양상이 환자에 따라 다양하고 치

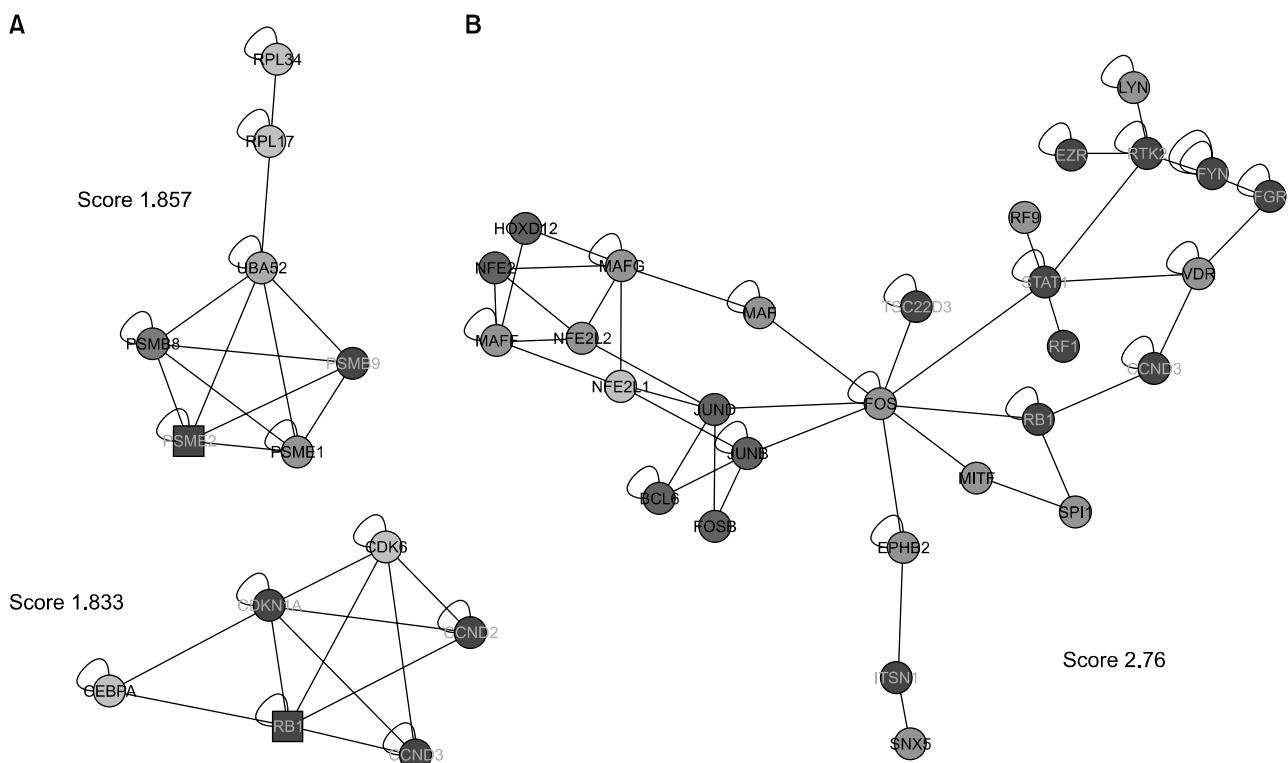


Figure 5. (A) Detection of densely connected regions in the network of genes differentially expressed in the RA synovial macrophages and the PB monocyte-derived macrophages from healthy volunteer using MCODE. A square node is a seed node. (B) Identification of the functional modules as highly connected regions with similar responses using jActiveModules. A blue node means down-regulation of genes and a red node means up-regulation of genes in the RA synovial macrophages.

료에 대한 반응의 정도도 매우 다르다. 그 동안의 많은 연구에도 불구하고 류마티스관절염의 원인은 현재까지 명확히 알려져 있지 않으며 작동하는 병태 생리학적 기전이 매우 복잡하고 다양해서 독립적인 개개의 유전자나 단백질 발현 변화에 대한 연구만으로는 정확한 병인을 파악하고 질환의 원인을 찾아내기가 힘들 것으로 생각된다. 최근 microarray 등과 같은 분자 생물학적 방법의 진보의 결과로 류마티스 관절염에서 작동하는 유전자 발현이나 단백질 발현이상을 소수의 유전자에 대한 연구가 아닌 전체 유전자 발현의 이상을 파악하고 생물 정보학적 기법으로 분석하려는 시도가 이루어지고 있다. 본 연구에서는 microarray 기법을 이용하여 류마티스관절염 환자의 활액 대식세포와 정상인의 말초혈액 단핵구에서 분화된 대식세포에서 나타나는 유전자 발현의 차이를 관찰하고 생물정보학적 기법을 이용하여 류마티스관절염의 병인에 중요한 역할을 할 것으로 예상되는 단백질들의 네트워크를 밝혀내고자 하였다. 본 연구에서는 899개의 유전자가 통계적으로 유의한 발현의 차이를 보였고 그 중 464개 유전자의 발현이 증가되었고 435개 유전자의 발현이 감소되었으며 이들 유전자 중 본 연구에 사용된 network data에서 interaction이 보고된 522개의 유전자(node)를 대상으로 생물정보학적 분석을 시행하였다.

본 연구의 gene ontology enrichment 분석 결과를 보면 생물학적 과정 ontology의 경우 면역 반응 과정, 자극에 대한 반응, 신호전달, 생물학적 과정의 조절 등에서 유전자 발현의 차이를 보였다. 면역 반응 과정 GO subcategory에 속한 단백질들 중 interleukin-1 receptor/TLR 신호전달에 관여하는 *TLR2*, *MYD88*, *IRAK2*, *IRAK3* 등의 유전자 발현이 증가되어 있었고 네트워크상에서 SP1과 TLR2사이의 단백질-단백질 상호작용은 관찰되지 않았지만 인간 단핵구/대식세포에서 TLR2의 주 전사인자로 작용하는 (18) SP1의 발현이 증가됨이 관찰되어 interleukin-1 receptor/ TLR 신호전달 과정에 관여하는 유전자들이 류마티스관절염의 병태생리에 중요한 역할을 함을 시사하며 이는 TLR 신호전달 과정이 류마티스관절염에 중요한 역할을 한다는 기존의 연구들의 주장을 뒷받침하는 결과이다. 기존의 연구 결과를 보면 High Mobility Group Box chromosomal protein 1 (HMGB-1)이 류마티스관절염 환자의 활액에서 증가되어 있고 TLR2 ligand로 작용하며 본연구에서와 같이 정상인의 말초혈액 단핵구-유래 대식세포에 비해 TLR2의 발현이 증가되어 있음이 보고되었다 (13,19,20). 또한 기존의 연구 결과와 유사하게 *STAT1*, *IRF1*, *IRF9* 등 STAT1 관련 유전자들의 발현이 류마티스관절염 환자의 활액 대식세포에서 증가되어 있었다. 또한 *FOS*, *JUNB*, *JUND* 등 AP-1 관련 유전자들도 증가되어 있어 AP-1 신호전달계가 류마티스관절염의 병인에 역할을 할 것임을 시사하였다. 본 연구에서는 *STAT1*관련 유전자와 AP-1관련 유전자들이 류마티스관절염 환자의 활액 대식세포에서 증가되어 있고 네트워크상

에서 단백질-단백질 상호작용이 관찰되므로 이는 STAT1과 AP-1이 상호작용에 의해 단백질 복합체(complex)를 이루어 류마티스관절염 병인에 관여하는 중요한 유전자의 발현을 유도할 가능성을 시사한다 하겠다. 실제로 기존의 연구결과를 보면 인간 폐 상피세포에서 IFN γ 에 의한 nitric oxide synthase-2 (*NOS2*)의 발현유도가 c-Fos/STAT1 복합체가 *NOS2*의 γ -activated site (GAS)에 결합하여 일어남이 보고되었다 (21).

저자들은 MCODE plugin을 이용하여 본 연구에서 사용된 네트워크에서 단백질들 사이의 연결이 밀집된 부분을 찾으려 하였는데 이 부분은 서로 연관된 단백질들이 함께 기능하는 복합체를 의미한다. 본 연구의 네트워크 모델에서는 의미 있는 complex로 간주되는 score 2 이상이고 node가 4개 이상인 complex는 관찰하지 못하였으나 2에 근접한 score를 보이는 complex를 관찰할 수 있었다. 이를 중 score 1.857인 complex를 구성하는 유전자로 *PSME1* (PA28 α), *PSME2* (PA28 β), *PSMB8* (immunoproteasome β 5i), *PSMB9* (immunoproteasome β 1i) 등 proteasome subunit과 ubiquitination에 관여하는 *UBA52*의 발현이 증가하였고 ribosomal protein의 유전자인 *RPL34*와 *RPL17*의 발현은 감소함을 보였다. 이 complex에서 특히 흥미로운 것은 *PSME1*, *PSME2*, *PSMB8*, *PSMB9*는 IFN γ 에 의해 유도되는 유전자로 class I MHC peptides의 생성에 관여하여 항원 제시에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (22,23). 따라서 본 연구의 결과로 미루어 류마티스관절염 활액 대식세포에서 항원 제시 관련 유전자들 발현의 변화가 류마티스관절염 병인에 관여하였을 가능성을 시사한다. 또한 score 1.833인 complex는 발현이 증가된 *CDKN1A*, *CDK6*, *CCND2*, *CCND3*의 유전자와 발현이 억제된 *RBI*, *CEBPA*로 구성되어 있다. 이전의 섬유아세포를 이용한 여러 연구에서 *CDKN1A* (p21^{CIP1})는 세포주기의 진행을 억제하고 c-Jun의 활성을 감소시켜 IL-6, IL-8, type I IL-1R, MCP-1 등 염증성 물질의 발현을 억제하여 동물 모델에서 관절염을 억제하는 효과가 있음이 알려졌다 (24,25). 그러나 serum transfer-induced arthritis 모델에서는 p21^{CIP1}이 단핵구의 발달 및 분화를 조절하여 염증성 관절염의 발생에 중요한 역할을 함이 보고되어 세포의 종류에 따라 p21^{CIP1}이 세포주기의 조절에 서로 다른 효과를 나타냄을 시사하였다 (26). 최근의 연구들에서 *RANKL*나 *TNF α* 에 의한 파골세포분화 유도에 있어 p21^{CIP1}이 세포주기 억제를 통해 관여함이 보고되어 류마티스관절염의 염증성 골파괴에 있어 p21^{CIP1}의 발현 변화가 영향을 줄 가능성을 생각할 수 있다 (27,28). 본 연구는 대식세포를 사용한 연구로 p21^{CIP1}의 발현이 microarray 와 real-time PCR 실험에서 반대되는 결과를 보여 이 결과로 p21^{CIP1}의 발현에 대한 결론은 낼 수 없고 보다 많은 대상을 연구 후에 판단할 수 있을 것이다. 그러나 본 연구에서 MCODE를 이용한 분석은 유전자 발현의 증감은 고려하지 않으므로 p21^{CIP1}의 의미 있는 발현 증가나 감소가 단핵구/

대식세포에 영향을 미쳐 관절염 병태 생리에 영향을 미쳤을 가능성을 생각할 수 있으며 아울러 *CDK6*, *CCND2*, *CCND3*과 같은 세포 증식을 촉진하는 유전자들이 증가되어 있고 *RBI*같은 세포 증식을 억제하는 유전자들이 감소됨을 보여 이 유전자들의 변화에 의해 활막 대식세포의 증식이 촉진 되었을 가능성을 생각할 수 있으며 실제로 여러 연구에서 류마티스 관절염 환자의 활액 대식세포에서 세포 사멸이 감소되어 있다는 보고가 있어 이들 유전자들이 관여하였을 가능성을 시사한다 (29,30). 또한 류마티스관절염 활막 섬유아세포를 이용한 연구에서 cyclin-D-CDK4/6 complex가 MMP-3의 발현을 증가시키고 RB에 의해 MMP-3와 MCP-1의 생성이 감소됨을 보였다 (31). 이는 *CDKN1A*, *CDK6*, *CCND2*, *CCND3*, *RBI* 등의 유전자발현의 변화가 세포증식이나 사멸에 대한 효과 외에도 염증 물질의 발현을 조절하여 류마티스관절염의 병태 생리에 관여하였을 가능성을 시사한다. 본 연구자들은 *jActiveModules*를 이용하여 연구에 사용된 네트워크에서 functional module을 찾으려 했는데 했으나 score 3 이상의 의미 있는 module은 발견할 수 없었다. 그러나 3에 근접한 score를 보이고 *FOS*, *FOSB*, *JUNB*, *JUND* 등 AP-1 전사인자를 구성하는 유전자와 *STAT1*, *IRF1*, *IRF9*과 같은 발현이 증가된 유전자들로 이루어진 module을 찾을 수 있었다. 이는 류마티스관절염의 병인에 있어 AP-1, *STAT1*이 중요한 역할을 할 것임을 시사하는 소견으로 기존의 연구들의 결과와 유사한 소견이다.

결 론

본 연구자들은 류마티스관절염 활액 대식세포에서 정상인 말초혈액 단핵구-유래 대식세포에 비해 immune response process에 관여하는 유전자들의 발현이 현저히 증가되었음을 확인하였고 cytoscape와 그 plugin인 *MCODE*, *jActiveModules*를 이용한 생물정보학적 분석에서 proteasomal degradation과 항원 제시에 관여하는 유전자들의 complex와 세포 증식 및 분화에 관여하는 유전자들의 complex를 찾을 수 있었고 AP-1 전사인자를 구성하는 *FOS*, *FOSB*, *JUNB*, *JUND* 등의 유전자들과 *STAT1* 신호전달 관련 유전자들의 발현이 증가되어 있음을 확인하여 이들 유전자들이 류마티스관절염의 병태생리에 중요한 역할을 할 가능성을 발견하였다.

감사의 글

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

참고문헌

1. Firestein GS. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature* 2003;423:356-61.
2. Teixeira VH, Olaso R, Martin-Magniette ML, Lasbleiz S, Jacq L, Oliveira CR, et al. Transcriptome analysis describing new immunity and defense genes in peripheral blood mononuclear cells of rheumatoid arthritis patients. *PLoS One* 2009;4:e6803.
3. Toonen EJ, Barrera P, Radstake TR, van Riel PL, Scheffer H, Franke B, et al. Gene expression profiling in rheumatoid arthritis: current concepts and future directions. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1663-9.
4. van der Pouw Kraan TC, Wijbrandts CA, van Baarsen LG, Voskuyl AE, Rustenburg F, Baggen JM, et al. Rheumatoid arthritis subtypes identified by genomic profiling of peripheral blood cells: assignment of a type I interferon signature in a subpopulation of patients. *Ann Rheum Dis* 2007;66:1008-14.
5. van Baarsen LG, Bos CL, van der Pouw Kraan TC, Verweij CL. Transcription profiling of rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 2009;11:207.
6. Bansard C, Lequerré T, Derambure C, Vittecoq O, Hiron M, Daragon A, et al. Gene profiling predicts rheumatoid arthritis responsiveness to IL-1Ra (anakinra). *Rheumatology (Oxford)* 2011;50:283-92.
7. Lindberg J, Wijbrandts CA, van Baarsen LG, Nader G, Klareskog L, Catrina A, et al. The gene expression profile in the synovium as a predictor of the clinical response to infliximab treatment in rheumatoid arthritis. *PLoS One* 2010;5:e11310.
8. Diez D, Wheelock AM, Goto S, Haeggström JZ, Paulsson-Berne G, Hansson GK, et al. The use of network analyses for elucidating mechanisms in cardiovascular disease. *Mol Biosyst* 2010;6:289-304.
9. Segal E, Shapira M, Regev A, Pe'er D, Botstein D, Koller D, et al. Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data. *Nat Genet* 2003;34:166-76.
10. Cline MS, Smoot M, Cerami E, Kuchinsky A, Landys N, Workman C, et al. Integration of biological networks and gene expression data using Cytoscape. *Nat Protoc* 2007;2:2366-82.
11. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 2003;13:2498-504.
12. Antoniv TT, Ivashkiv LB. Dysregulation of interleukin-10-dependent gene expression in rheumatoid arthritis synovial macrophages. *Arthritis Rheum* 2006;54: 2711-21.
13. Huang Q, Ma Y, Adebayo A, Pope RM. Increased macrophage activation mediated through toll-like receptors in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:2192-201.
14. Ramani AK, Bunescu RC, Mooney RJ, Marcotte EM. Consolidating the set of known human protein-protein interactions in preparation for large-scale mapping of the human interactome. *Genome Biol* 2005;6:R40.
15. Rual JF, Venkatesan K, Hao T, Hirozane-Kishikawa T, Dricot A, Li N, et al. Towards a proteome-scale map of the human protein-protein interaction network. *Nature*

2005;437:1173-8.

- 16. Stelzl U, Worm U, Lalowski M, Haenig C, Brembeck FH, Goehler H, et al. A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* 2005;122:957-68.
- 17. van der Pouw Kraan TC, van Gaalen FA, Kasperkowitz PV, Verbeet NL, Smeets TJ, Kraan MC, et al. Rheumatoid arthritis is a heterogeneous disease: evidence for differences in the activation of the STAT-1 pathway between rheumatoid tissues. *Arthritis Rheum* 2003;48:2132-45.
- 18. Haehnel V, Schwarzfischer L, Fenton MJ, Rehli M. Transcriptional regulation of the human toll-like receptor 2 gene in monocytes and macrophages. *J Immunol* 2002;168:5629-37.
- 19. Park JS, Svetkauskaitė D, He Q, Kim JY, Strassheim D, Ishizaka A, et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem* 2004;279:7370-7.
- 20. Taniguchi N, Kawahara K, Yone K, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Goto M, et al. High mobility group box chromosomal protein 1 plays a role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis as a novel cytokine. *Arthritis Rheum* 2003;48:971-81.
- 21. Xu W, Comhair SA, Zheng S, Chu SC, Marks-Konczalik J, Moss J, et al. STAT-1 and c-Fos interaction in nitric oxide synthase-2 gene activation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2003;285:L137-48.
- 22. Rivett AJ, Bose S, Brooks P, Broadfoot KI. Regulation of proteasome complexes by gamma-interferon and phosphorylation. *Biochimie* 2001;83:363-6.
- 23. Tanaka K. Role of proteasomes modified by interferon-gamma in antigen processing. *J Leukoc Biol* 1994; 56:571-5.
- 24. Nonomura Y, Kohsaka H, Nagasaka K, Miyasaka N. Gene transfer of a cell cycle modulator exerts anti-inflammatory effects in the treatment of arthritis. *J Immunol* 2003;171:4913-9.
- 25. Perlman H, Bradley K, Liu H, Cole S, Shamiyah E, Smith RC, et al. IL-6 and matrix metalloproteinase-1 are regulated by the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in synovial fibroblasts. *J Immunol* 2003;170:838-45.
- 26. Scatizzi JC, Hutcheson J, Bickel E, Woods JM, Klosowska K, Moore TL, et al. p21Cip1 is required for the development of monocytes and their response to serum transfer-induced arthritis. *Am J Pathol* 2006; 168:1531-41.
- 27. Kwak HB, Jin HM, Ha H, Kang MJ, Lee SB, Kim HH, et al. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of human peripheral blood mononuclear cells into osteoclasts through the induction of p21(WAF1/Cip1). *Biochem Biophys Res Commun* 2005;330:1080-6.
- 28. Sankar U, Patel K, Rosol TJ, Ostrowski MC. RANKL coordinates cell cycle withdrawal and differentiation in osteoclasts through the cyclin-dependent kinase inhibitors p27KIP1 and p21CIP1. *J Bone Miner Res* 2004; 19:1339-48.
- 29. Perlman H, Pagliari LJ, Liu H, Koch AE, Haines GK 3rd, Pope RM. Rheumatoid arthritis synovial macrophages express the Fas-associated death domain-like interleukin-1beta-converting enzyme-inhibitory protein and are refractory to Fas-mediated apoptosis. *Arthritis Rheum* 2001;44:21-30.
- 30. Liu H, Huang Q, Shi B, Eksarko P, Temkin V, Pope RM. Regulation of Mcl-1 expression in rheumatoid arthritis synovial macrophages. *Arthritis Rheum* 2006;54: 3174-81.
- 31. Nonomura Y, Nagasaka K, Hagiwara H, Sekine C, Nanki T, Tamamori-Adachi M, et al. Direct modulation of rheumatoid inflammatory mediator expression in retinoblastoma protein-dependent and -independent pathways by cyclin-dependent kinase 4/6. *Arthritis Rheum* 2006; 54:2074-83.