

류마티스관절염의 실험 동물 모델: 방법과 활용

김 현 옥 · 이 상 일

경상대학교 의학전문대학원 내과학교실, 건강과학연구원

Experimental Animal Models for Rheumatoid Arthritis: Methods and Applications

Hyun-Ok Kim, Sang-Il Lee

Department of Internal Medicine, Institute of Health Sciences,
Gyeongsang National University School of Medicine, Jinju, Korea

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic inflammatory disorder characterized by synovitis and joint damage. The etiology of RA is multi-factorial including various genetic and environmental factors, and the pathogenesis is complex involving lymphocyte infiltration, synovial cell proliferation, pannus formation, and cartilage and bone destruction. Various animal models have been used to study potential etiopathogenetic mechanisms in RA. They are also extensively used to test new potential therapeutic agents. Despite some limitations, those animal models have significantly progressed our understanding of the basic mechanisms and have contributed to several current major advances in the treatment of RA. These models include

the induced arthritis models such as collagen-induced arthritis (CIA), antibody-induced arthritis, the genetically manipulated or spontaneous arthritis models, and humanized mouse models. The choice regarding the proper model should be performed carefully, taking into account the biology of the animal model and the therapeutic target under evaluation in order to make better predictions of efficacy in human RA. Thus, in this review, we describe important mouse models of RA, focusing on the underlying mechanisms, methods, advantages and limitations, and usefulness.

Key Words. Rheumatoid arthritis, Animal model

서 론

류마티스관절염은 약 1~1.5%의 유병율을 나타내는 자가면역질환이자 만성적인 염증성 질환이다 (1,2). 최근 류마티스관절염의 진단 및 치료분야에 많은 발전이 이루어 졌는데, 항 cyclic citrullinated peptide (CCP) 항체가 포함되면서 약 30년 만에 류마티스관절염의 진단기준이 개정되고 (3), 종양괴사인자(이하 TNF) 억제제를 포함한 다양한 생물학적 제제는 류마티스관절염의 치료성적을 획기적

으로 개선시켰다 (4). 이러한 진단과 치료의 발전은 환자를 대상으로 하는 여러 임상시험 이외에도 면역학 및 류마티스 연구분야의 다양한 기초실험들의 성과에 기반한 것이라 생각된다. 활막섬유세포(synovial fibroblast), 제1형 및 17형 보조 T세포, B세포, 대식세포, 파골세포, 혈관내피세포 등 다양한 세포들의 복잡한 상호작용의 결과로 발생하는 류마티스관절염의 발병기전을 제대로 이해하기 위해서는 동물실험이 필수적이며, 특히 인체를 대상으로 하는 임

<Received : August 11, 2012, Accepted : August 16, 2012>

Corresponding to : Sang-Il Lee, Department of Internal Medicine, Institute of Health Sciences, Gyeongsang National University School of Medicine, 90, Chilam-dong, Jinju 660-987, Korea. E-mail : goldgu@gnu.ac.kr

pISSN: 2093-940X, eISSN: 2233-4718

Copyright © 2012 by The Korean College of Rheumatology

This is a Free Access article, which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

상시험 이전에 새로운 약제의 효과와 부작용을 규명하기 위한 중개연구의 과정에서 동물실험의 중요성은 최근 더욱 강조되고 있다 (2,5). 류마티스관절염의 동물모델은 매우 다양한데, 일반적으로 콜라겐 유도성 관절염 모델, 유전자 변형 자연발생 관절염 모델, 항체 유도성 관절염 모델, 인간화 모델인 severe combined immunodeficiency (SCID)-HuRAG 마우스 등으로 구분할 수 있다. 류마티스관절염의 발병기전을 올바르게 파악하고 작용기전이 서로 다른 약제의 치료효과를 제대로 규명하기 위해서는 다양한 동물모델의 특징과 차이점을 구분해서 이해하고 있어야 한다. 이에 본 논고에서는 여러 가지 류마티스관절염의 실험동물 모델들의 발병기전, 제작 방법, 장단점 및 효용을 주로 마우스 모델을 중심으로 알아보고자 한다.

콜라겐 유도성 관절염 모델

DBA/1 마우스 콜라겐 유도성 관절염 모델(Collagen-induced arthritis in DBA/1 mice, CIA)

1977년에 Trentham 등에 의해 처음으로 확립된 콜라겐 유도성 관절염(이하 CIA)은 현재 가장 많이 사용되는 류마티스관절염의 대표적인 동물모델이다 (6). 류마티스관절염 환자의 혈청에서 콜라겐에 대한 항체가 발견되고, 관절에 존재하는 제2형 콜라겐이 자가항원으로 작용할 수 있다는 점에서 착안되어 고안된 모델로써 처음에는 rat에서 관절 염을 유도하였지만 현재는 마우스에서 유도되는 CIA가 주로 사용되고 있다 (6-8). 류마티스관절염이 shared epitope (SE)로 대표되는 특정 human leukocyte antigen (HLA)분자를 가진 사람에게서 더욱 잘 발생하는 것과 유사하게 CIA 역시 특정한 제2형 major histocompatibility complex (MHC) 분자와 관련이 있어서 H-2^a, H-2^r 등이 발현된 마우스들이 주로 CIA에 감수성을 나타내기 때문에 원칙적으로 DBA/1 (H-2^a) 마우스가 CIA의 제작에 사용되고 있다 (8-10). 악화와 완화를 반복하면서 점차적으로 진행하는 사람의 류마티스관절염과는 다르게 질병의 진행양상이 지속적인 악화·소견을 나타내는 점, 류마티스인자가 검출되지 않는 점 등

일부 양상의 차이가 있기는 하지만 CIA는 임상적인 소견이 류마티스관절염과 전반적으로 유사하며, 제2형 MHC와의 연관성, 선천면역 및 특이적인 T, B세포반응에 의한 적응면역을 반영하는 발병기전, 활막세포의 증식과 림프구의 침윤 및 파누스(pannus) 형성 등의 병리소견 역시 사람의 류마티스관절염과 전반적으로 유사하다 (11).

CIA를 제작하기 위해서는 6주령 이상의 수컷 DBA/1 마우스를 구입하여 1주 이상의 적응기를 보낸 뒤 보통 7~9주령 사이의 마우스를 대상으로 CIA를 유도한다 (12,13). 콜라겐 가루를 0.1N acetic acid에 녹이거나 혹은 이미 액체 형태로 판매되는 2 mg/mL 농도의 Bovine 제2형 콜라겐 용액을 동일한 농도의 complete Freund's adjuvant (CFA, 유화제와 mineral oil의 혼합물을 건조시킨 mycobacteria에 확산시켜 만든 용액)와 1:1의 비율로 혼합하며, 이 혼합액을 물위에 한 방울 떨어뜨렸을 때 천천히 풀어지면서 가라앉을 정도 까지 충분히 혼합한다. 혼합액 0.1 mL (제2형 콜라겐 100 µg)을 꼬리의 기저부 혹은 기저부에서 1.5~3 cm 아래쪽의 피내를 통해 천천히 주입한다. 이때 혼합액의 농도나 투여량이 증가하거나 꼬리의 보다 아래쪽에 주사할 경우 관절염이 심하게 발생하므로 투여량과 투여부위를 일관성 있게 유지하는 것이 중요하다. 일차 주사를 시행한 후 2~3 주 후에 2차 주사를 시행하는데, 1차 시기와 동일하게 꼬리를 이용하여 CFA대신 incomplete Freund's adjuvant (IFA)과 혼합하여 동량의 콜라겐을 주사하는 방법, 한쪽 발바닥에 주사하는 방법, adjuvant 대신 saline에 콜라겐을 혼합하여 복강내로 투여하는 방법, 1차시기와 똑같이 CFA에 혼합된 콜라겐을 꼬리로 투여하는 방법 등이 있다. 각각 장단점이 있으나 꼬리를 이용하고 IFA에 혼합된 콜라겐을 투여하는 방법이 일반적으로 가장 많이 사용된다 (12,13). 2차 접종 이후 약 3~7일 후부터 관절염 증상이 나타나며 계속 악화되면서 진행하는 양상을 보인다. 개체간에 관절염의 발생 정도를 유사하게 만들거나 더욱 심한 관절염을 얻고자 하는 경우에는 2차 주사 후 1주일째 5~50 µg의 lipopolysaccharide (LPS)를 추가로 투여하기도 한다 (12,14). 2차 주사

Table 1. Possible cause and solution of the problems that might be observed during CIA experiment

Problem	Possible cause	Solution
Low incidence/ Denature CII		Keep the collagen under -20°C, do not store at 4°C for more than 1 week, and consider storing the collagen in small aliquots
No arthritis		Collagen should be a clear solution, cloudy collagen suggests that it has cross-linked and precipitated, or that it may be contaminated and should be discarded
Poor emulsion		Increase the speed for the mixing apparatus (homogenizer, dual-hub syringe, etc.)
Inadequate concentration of CFA		Keep the reagents cold and the mixing vessel on ice during emulsification
Subcutaneous injection		Check that IFA get used by mistake for 1 st injection
Aged or immature mice		Increase the concentration of CFA
		Make CFA is vortexed sufficiently to resuspend it before use
		Make sure to keep the injection shallow to maintain intradermal site
		Avoid injections that go deep into the tail tissue
		Mice at 8~12 weeks of age are optimum for starting experiments

이후에 1주일에 2~3회의 빈도로 각 발마다 0~4점(총 0~16점)의 임상점수, 발목 두께의 변화, 발생률 등을 측정하며 방사선학적, 조직학적 검사 및 면역염색, 염증성 사이토카인 등의 측정을 병행하여 평가한다. B세포 관련 평가를 위해서는 혈액 내에서 제2형 콜라겐에 관한 항체를 측정하고 T세포 관련 평가를 위해서는 림프절 및 비장은 이용하여 T세포 증식 및 Th1, Th17 경로 관련 사이토카인을 측정한다 (15). CIA를 이용하여 신뢰성 있는 실험을 진행하기 위해서는 충분한 관절염이 개체간에 일정하게 유도되는 것이 중요한데, 기존에 알려진 CIA를 유도하는 과정에서 나타날 수 있는 문제점 및 해결방안과 본 저자들이 경험한 바를 함께 Table 1에 정리하였다 (13).

C57BL/6 마우스 콜라겐 유도성 관절염 모델(CIA in C57BL/6 mice, CIA-B6)

C57BL/6 (B6) 마우스는 MHC분자 중 H-2^b를 발현하기 때문에 bovine 제2형 콜라겐을 이용하는 일반적인 CIA 유도 방법으로는 관절염이 거의 발생하지 않는다. 그러나 현재 대부분의 유전자변형 마우스는 B6 계통이므로 특정 유전자가 질환의 발병에 어떤 역할을 하는지를 규명하기 위해서는 B6 마우스를 이용한 동물실험이 매우 중요하다. 여러 연구진들에 의해서 B6 마우스의 H-2^b분자에 의해 인지되는 chicken 제2형 콜라겐을 이용하여 CIA-B6를 유도하는 시도들이 몇 가지 발표되었는데 관절염의 발현빈도와 발현양상의 일관성이 떨어지는 단점이 있었다 (16-19). 이후 2008년 Inglis 등이 비교적 잘 정립된 실험방법(protocol)을 발표하였는데, 일반적인 실험방법은 DBA1의 CIA와 유사하지만 첫째 10~14주령의 상대적으로 고령의 B6마우스를 이용하는 점, 둘째 chicken 제2형 콜라겐을 이용하는 점, 셋째 고농도인 4 mg/mL의 콜라겐 용액 및 CFA를 이용하는 것이 DBA1을 이용한 CIA와의 주된 차이점이다 (20). 그러나, DBA/1 마우스의 CIA가 약 80~100%의 유병율 및 개체당 최대 16점의 심한 관절염을 보이는 반면, CIA-B6는 약 50~80%의 유병율 및 개체당 평균 4~6점의 약한 관절염을 보인다. 이러한 특징으로 CIA-B6는 특정 유전자가 결손 되거나 증폭되었을 경우 관절염이 더욱 악화되는 결과를 나타내는 실험에 좀더 적합하기도 하다 (20). DBA1의 CIA와 유사하게 2차 주사 후 1주일 후에 LPS를 추가로 투여하면 개체 간에 차이가 적고 좀 더 심한 관절염을 유도할 수 있다.

유전자 변형 자연발생 관절염 모델

K/BxN TCR transgenic mouse model

1996년에 Kouskoff 등은 제2형 MHC 분자 가운데 H-2^{g7}과 연관되어 발현하는 bovine pancreas ribonuclease의 42~56 번 peptide를 인식하는 T세포를 양성 선택하기 위해 KRN T cell receptor transgenic (KRN-TCR TG)마우스를 이용하여 실험을 하던 중, KRN-TCR TG 마우스를 우연히

Non-obese diabetes (NOD) 마우스와 교배하였더니 F1 자손 (off-spring)에서 사람의 류마티스관절염과 유사한 형태의 관절염이 발생하는 것을 발견하게 되었다 (21). 결국 이러한 마우스는 B6계열의 KRN TCR와 NOD마우스의 교배를 통해서 자연발생적으로 만들어지므로 K/BxN spontaneous arthritis로 명명되었고, 발병기전은 KRN TCR가 리보핵산 분해효소(ribonuclease)뿐만 아니라 또한 glucose 6 phosphate isomerase (GPI)도 특이적으로 인식해서 B세포에 의해 생성되는 anti-GPI 항체가 관절염의 발생에 핵심적인 역할을 하는데, 이때 보체계 중에서 alternative pathway인 C5의 역할과 비만세포(mast cell), 중성구, 대식세포, 자연 살해세포(natural killer cell)에 발현된 Fc γ 수용체의 역할이 중요하게 관여한다 (11,21,22). 조직학적으로도 관절에서 백혈구 침윤, 활막세포의 증식, 파누스 형성, 활막염, 뼈와 연골의 파괴 등이 관찰되며 면역학적으로 B세포의 다yclonal 활성, 고감마글로불린혈증, 자가항체의 형성 등이 관찰되어 류마티스관절염과 유사한 소견을 보이나 류마티스 인자는 나타나지 않는다 (11). 64%의 류마티스관절염 환자에서 혈청과 활액에서 soluble GPI 와 anti-GPI 항체의 증가가 관찰된다는 보고도 있어 K/BxN 마우스 모델은 사람의 류마티스관절염의 연구에도 중요하다 (23). 한편 GPI는 대부분의 조직에서 광범위하게 발현되는데 anti-GPI에 의한 임상증상이 주로 관절에 국한되어서 나타나는 이유에 대해서는 아직까지 명확히 밝혀지지 않았지만 연골의 proteoglycans에 GPI가 더 잘 결합하며, 관절내에서 보체계가 상대적으로 더 활성화가 잘 되는 특성 등으로 일부분 설명되고 있다 (24). K/BxN spontaneous arthritis는 KRN TCR와 NOD마우스의 교배를 통해서 태어난 새끼에서 생후 약 4주경을 전후해서 저절로 관절염이 발생하며 약 8주경에 염증소견이 가장 심해지면서 거의 100%에서 관절염을 나타내며 이후로 관절염이 계속 진행하면서 관절강직이 더욱 심해지는 질병경과를 나타낸다 (25).

TNF Transgenic (TTG) 마우스 모델

1991년 Keffer 등은 TNF를 억제하는 역할을 하는 TNF 3' untranslated region이 없는 변형된 인간 TNF 이식유전자 (transgene)를 마우스에 유도해서 TNF가 과발현되는 모델을 만들었는데 관절에서 류마티스관절염과 유사한 활막의 비후, 관절강의 염증세포의 침윤, 파누스 형성과 연골과 뼈의 파괴가 관찰되었다 (26). 이 모형을 통해 TNF가 관절염의 발병에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있었고 또한 항TNF항체의 치료의 유용성을 동물모델에서 증명할 수 있었다 (2). 현재도 TTG 모델은 특히 TNF에 의해 유도되는 관절염의 발병기전을 확인하고 TNF와 연관된 다양한 치료제의 효과를 확인하는데 유용하게 활용되고 있다 (27). 일반적으로 8~10주째부터 증상 발현이 시작되어 거의 100%에서 관절염이 발생한다.

Interleukin-1 transgenic (IL-1 TG) 마우스와 IL-1 receptor antagonist deficient (IL-1 Ra^{-/-}) 마우스

1990년대 TTG arthritis 모델을 통한 연구의 과정에서 IL-1이 TNF의 하부기전을 조절하는데 있어 중요한 사이토카인임이 밝혀졌으며 특히 연골의 미란과정에 IL-1이 핵심적으로 관여하는 것을 알게 되었다 (2,27). 이후 IL-1 α 를 과발현하는 경우 혈청에서 IL-1의 농도가 높게 측정되고 4주 뒤에 심한 다발성 관절염이 유발되며 조직학적으로는 활막 증식, 파누스 형성 및 연골의 파괴가 관찰되는 만성 관절염이 나타나는 것이 확인되었다 (27,28). 한편, IL-1의 작용을 억제하는 내재적인 IL-1 길항제인 IL-1Ra를 제거해서 자연발생적으로 관절염이 발생하는 IL-1Ra^{-/-} 모델이 제작되었는데, 이 모델은 BALB/c 마우스에서 IL-1Ra 결핍을 유발시키면 8주 뒤에 증상이 발생하여 12주 후에 가장 심하게 발생하는 관절염이 거의 100%에서 발생하게 된다 (29). 조직학적인 소견은 활막 및 관절주변 조직에 심한 염증이 관찰 되며 육아조직의 침윤과 관절의 미란이 관찰되는 특징이 있다 (27,29).

항체 유도성 관절염 모델

Collagen antibody induced arthritis (CAIA)

항체 유도성 관절염 모델은 특정 항체를 투여하여 수동 면역(passive immunity), 보체계의 역할과 비만세포, 중성구, 대식세포 등에 발현된 Fc γ 수용체의 역할과 이에 따른 염증성 사이토카인의 작용 및 염증세포의 침윤에 의해 관절염이 발생하게 되는 모델이다 (30-32). CIA 및 유전자 변형 자연발생 관절염 모델이 실험을 위해서 최소 6~8주가 소요되는 반면, 항체 유도성 관절염 모델은 실험기간이 2주 이내로 비교적 짧아서 항염증 효과를 가지는 약물의 효과를 신속하게 평가할 수 있는 장점이 있다. 그리고 CIA가 비교적 DBA1이라는 특정 마우스 종에서만 발생하는 반면, 항체 유도성 관절염 모델은 Balb/c, DBA, B6 등의 여러 종의 마우스에서 관절염을 유도할 수 있어서 특정 유전자가 관절염에 미치는 영향을 유전자 과발현 혹은 유전자 결핍 마우스를 이용하여 실험을 진행할 수 있다 (12, 30). 그러나 류마티스관절염에 중요한 역할을 하는 적응면역, 특히 T세포의 역할을 반영하지 못하는 단점이 있다. CAIA는 4개의 clone으로부터 유래된 단클론항체의 복합 액인 mAb cocktail을 구입하여 6~8주의 수컷 마우스에 투여하는데 일반적으로 Balb/c, DBA/1 마우스는 4 mg을 투여하고 B6 마우스의 경우는 8 mg을 투여한다 (12,30). 마우스에서 유도되는 관절염이 일관성을 유지하고 조금 더 심한 증상을 유발하기 위해서 LPS를 추가로 투여하며, 이러한 mAb-LPS-induced arthritis의 경우 LPS를 투여한 후 24~48시간 이내에 100%에서 관절염이 발생하고 5~7일경에 최고조에 이르렀다가 점차 관절염이 감소하는 양상을 나타낸다 (12,30).

K/BxN serum transfer arthritis

K/BxN serum transfer arthritis는 K/BxN spontaneous arthritic 마우스에서 채취된 혈청을 투여하여 관절염을 유발하는데 CAIA와 유사하게 실험기간이 2주 이내로 비교적 짧고 여러 종의 마우스에서 관절염을 유도할 수 있는 장점이 있는 반면 T세포의 역할을 반영하지 못하는 단점이 있다 (33,34). 일반적으로 8주 이상 된 K/BxN spontaneous arthritic 마우스에서 채취된 혈청 150 μ L를 6주령 이상의 마우스에 각각 day 0, day 2에 2회 복강 내로 투여하여 관절염을 유발하면 최초 혈청 투여일 이후 2~3일 뒤에 관절염이 발생하고 약 8~10일째에 최고조에 이르렀다가 점차 관절염이 감소하는 양상을 나타낸다 (25). CAIA와 유사하게 2일에 한번 씩 임상점수와 발목두께의 변화를 측정하면서 10~14일까지 실험을 진행한다. 특정 유전자가 결핍되거나 과발현된 유전자변형 마우스에서 관절염이 악화될 것으로 예상되는 경우에는 50~75 μ L의 저용량의 혈청을 투여하여 대조군에서 관절염을 상대적으로 약하게 유발하여 평가를 하게 된다 (25,35). 서로 다른 K/BxN spontaneous arthritic 마우스, 혹은 서로 다른 시기에 채취된 혈청에 의해서 관절염의 발생 정도가 다르게 나타날 수 있기 때문에 일관성 있는 실험을 위해서는 여러 마리의 K/BxN spontaneous arthritic 마우스에서 충분한 혈청을 채취하여 혼합한 뒤 분주하여 사용하여야 한다.

SCID-HuRAG 마우스 모델

기존의 여러 가지 마우스모델이 새로운 약물의 효과를 평가하거나 류마티스관절염의 발병기전을 이해하는데 많은 기여를 하였으나, 사람의 류마티스관절염에서 가장 많이 사용되는 약제인 메소트렉세이트는 CIA에서 분명한 치료효과를 보이지 못하였고 반면 비스테로이드성 소염진통제는 CIA를 거의 완전하게 억제하는 등 여전히 인간과 마우스의 차이에 따른 연구결과의 상이함이 존재한다 (8, 10). 이러한 한계를 극복하기 위해서 인간의 세포나 면역체계를 마우스에 이식한 후에 질환을 유도하여 평가하는 인간화 마우스가 특히 전임상 중개연구의 유용한 동물모델로 최근 활발히 사용되고 있는 추세다 (36). 류마티스관절염 연구를 위해 이용할 수 있는 인간화 마우스 모델은 크게 두 종류가 있다. 첫 번째는 류마티스관절염의 발생과 관련 있는 HLA-DR β 1 allele의 발현을 인위적으로 증가시킨 마우스이고, 두 번째는 면역결핍 마우스에 사람의 면역시스템을 이식하여 제작하는 마우스이다 (37). 1992년 Barry와 Haynes는 선천 및 획득면역이 결핍되어 동종 혹은 이종이식편에 대한 거부반응을 나타내지 않는 SCID 마우스에 류마티스관절염 환자의 활막세포 혹은 활막조직을 연골과 함께 이식한 SCID-HuRAG 마우스 모델을 제작하여 실험에 사용한 뒤, 류마티스관절염 환자의 병태생리를 주로 활막세포의 역할을 중심으로 규명하기 위해 이 모델을 이용하고 있다 (38). SCID-HuRAG 마우스 모델은 채취

된 신선한 활막조직을 바로 이식해야 하는 어려움이 있고 T세포, B세포 등 면역세포의 역할을 반영하지 못하는 단점이 있는데, 2002년 Davis 등은 SCID-HuRAg 마우스 모델에 사람의 T세포를 이식하였을 때 활막조직 이식편으로 T세포가 이동하여 사이토카인 등의 생성을 통해 질병의 경과에 영향을 미치는 것을 확인하였다 (39). 그러나 활막이식편으로의 T세포 침윤정도 및 활막이식편의 파괴에 미치는 영향이 크지는 않았는데 이는 기존에 이용되던 NOD-SCID 마우스에 마우스의 선천면역계가 남아있어 인간말초혈액 단핵구(PBMC)의 생착 효율성(engraftment efficacy)이 낮기 때문인 것으로 알려져 있다. 최근 기존의 NOD-SCID 마우스에서 인터루킨 2 수용체의 감마 사슬을 결손시켜 인간 PBMC를 이식 한 경우 매우 안정적이고 높은 생착 효율성을 나타내는 새로운 면역결핍 마우스인 NOD/Lt-scid IL2r γ null (NSG) 마우스가 몇몇 연구에서 사용되기 시작하였다 (40). 이러한 NSG 마우스에 사람의 PBMC를 혈관주사를 통해 이식한 뒤 류마티스관절염 환자의 활막세포/연골 복합체를 피하에 이식하는 새로운 마우스 모델을 제작할 경우 좀더 인간의 류마티스관절염에 가까운 마우스 모델이 될 수 있을 것으로 기대된다.

기타 모델

Rat에서 adjuvant 유도성 관절염 모델(Adjuvant induced arthritis model in rat)

Adjuvant induced arthritis (AIA) 모델은 최초의 관절염 모델로서 rat나 guinea pig에 complete Freund's adjuvant를 주사를 하면 auto-intolerance가 발생하는 것에 착안하여 1956년 Carl Pearson 등이 처음으로 발표하였다 (41). AIA rat 모델에서는 암컷 Sprague-Dawley rat으로 관절염을 유도하는데, CFA나 IFA를 bovine 제2형 콜라겐과 1:1의 비율로 혼합한 유상액(emulsion) 1 mL를 rat의 등쪽의 피내로 1차 접종을 시행하고 추가 접종은 1차 접종 21일 뒤에 콜라겐을 복강내로 주입한다. 급성 혹은 만성 관절염이 약 76%에서 동반되지만 만성적인 관절염은 약 46%정도에서만 발생한다 (42). 대부분 adjuvant 주사 이후 약 10일 뒤에 다발성 관절염이 발생하는데 골 흡수(bone resorption)와 골막골의 증식(periosteal bone proliferation)이 잘 나타나고 T세포 및 중성구와 연관성은 보이지만 보체 및 B세포의 역할과

는 연관이 없으며, 또한 약 1개월 후에는 소실되는 급성의 전신의 염증반응 및 관절 증상은 류마티스관절염의 기준에 부합되지 않는 단점이 있다 (1).

Citrullinated peptide induced arthritis

Citrulline을 함유한 단백질에 대한 자가 항체가 류마티스 관절염 환자에서 거의 100%에 가까운 특이도를 보이고 있으며, 이러한 자가 항체는 류마티스관절염의 발생기전에 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다 (43). 이러한 항-CCP 항체가 류마티스관절염에서 진단의 조기 검사 방법으로 확인된 이후 citrullinated peptide를 이용하여 관절염을 유도하기 위한 많은 시도가 있었다. Vossenaar 등은 streptococcal cell wall 유도 관절염 모델과 CIA 마우스 모델의 활막에서 peptidyl arginine deiminase (PAD)효소에 대한 messenger RNA (mRNA)의 발현을 조사한 결과 PAD4 mRNA가 활막 조직에 염증 반응이 발생하는 동안 다형 중성구에 의해 쉽게 전사와 번역이 되는 것을 확인하였다 (44). 또한 Hill 등에 의해 Human RA-associated SE (DR-4)를 가지는 DR4-IE transgenic mice에서 citrullinated 섬유소원(fibrinogen)을 접종한 결과 관절내에서 활막섬유세포와 유사한 세포가 증식이 되고 citrullinated 단백질이 일시적으로 관찰되면서 증상이 진행하는 관절염이 발생하였다 (45). 이러한 마우스 모델은 류마티스관절염의 발생기전에서 SE에 제한된 T세포와 B세포의 citrullinated 항원에 대한 반응을 연구하는데 중요한 모델로 제시되었으며 이후 citrullinated peptide를 이용하여 관절염을 유도하는 모델을 이용한 많은 연구들이 기존의 CIA 모델이 가지는 한계를 극복할 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

류마티스관절염의 동물모델은 질환의 원인 및 병태생리를 규명하고, 임상시험 이전 단계에서 새로운 약제의 효과와 부작용을 규명하기 위해서 매우 중요하게 사용된다. 주로 사용되는 동물모델에는 콜라겐 유도성 관절염 모델, 유전자 변형 자연발생 관절염 모델, 항체 유도성 관절염 모델, 인간화 모델등이 있다. 다양한 동물모델의 특징과 차이점 및 실험동물 모델들의 발생기전, 제작 방법, 장단점 및 효용을 구분해서 잘 이해하고 실험의 목적에 따라서 적

Table 2. A comparison of various mouse models for RA

No	Mouse model	Pathogenesis	Incidence of arthritis (%)	Duration of experiment	Reference
1	CIA in DBA/1 mice	Innate & adaptive	80~100	≥6~8 weeks	12,13
2	CIA in C57BL/6 mice	Innate & adaptive	50~80	≥6~8 weeks	20
3	K/BxN spontaneous arthritis	Anti-GPI & B cell	100	6~8 weeks	25,30
4	TNF transgenic mice	TNF overexpression	100	>12~17 weeks	27
5	IL-1 Ra $^{-}$ mice	IL-1 Ra deficiency	100	12~16 weeks	29
6	CAIA	Innate & passive	100	10~14 days	12
7	K/BxN serum transfer arthritis	Innate & passive	100	10~14 days	25,30

절한 동물 모델을 선택해서 사용해야 한다(Table 2). 더불어서, 기존 동물모델의 한계를 극복하고 사람의 류마티스 관절염의 특성을 더욱 가깝게 반영하는 발전된 동물모델의 개발 역시 지속적으로 요구된다.

참고문헌

1. Hegen M, Keith JC Jr, Collins M, Nickerson-Nutter CL. Utility of animal models for identification of potential therapeutics for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008;67:1505-15.
2. Kollias G, Papadaki P, Apparailly F, Vervoordeldonk MJ, Holmdahl R, Baumans V, et al. Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment. *Ann Rheum Dis* 2011;70:1357-62.
3. van der Linden MP, Knevel R, Huizinga TW, van der Helm-van Mil AH. Classification of rheumatoid arthritis: comparison of the 1987 American College of Rheumatology criteria and the 2010 American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism criteria. *Arthritis Rheum* 2011;63:37-42.
4. de Punder YM, Fransen J, Kievit W, Houtman PM, Visser H, van de Laar MA, et al. The prevalence of clinical remission in RA patients treated with anti-TNF: results from the Dutch Rheumatoid Arthritis Monitoring (DREAM) registry. *Rheumatology (Oxford)* 2012;51:1610-7.
5. van den Berg WB. Lessons from animal models of arthritis over the past decade. *Arthritis Res Ther* 2009;11:250.
6. Trentham DE, Townes AS, Kang AH. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis. *J Exp Med* 1977;146:857-68.
7. Shultz LD, Ishikawa F, Greiner DL. Humanized mice in translational biomedical research. *Nat Rev Immunol* 2007;7:118-30.
8. Brand DD, Kang AH, Rosloniec EF. Immunopathogenesis of collagen arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 2003;25:3-18.
9. Wooley PH, Luthra HS, Stuart JM, David CS. Type II collagen-induced arthritis in mice. I. Major histocompatibility complex (I region) linkage and antibody correlates. *J Exp Med* 1981;154:688-700.
10. Inglis JJ, Criado G, Medghalchi M, Andrews M, Sandison A, Feldmann M, et al. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is associated with a robust and sustained T-cell response to type II collagen. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R113.
11. Youn J. Lessons for the pathogenesis of rheumatoid arthritis acquired from experimental animal models. *Hanyang Med Rev* 2005;25:53-66.
12. Protocol for the Successful Induction of Collagen-Induced Arthritis (CIA) and Collagen Antibody-Induced Arthritis (CAIA) in Mice. Reagents & Consulting for Inflammatory Research, Redmond, chondrex, 2009.
13. Brand DD, Latham KA, Rosloniec EF. Collagen-induced arthritis. *Nat Protoc* 2007;2:1269-75.
14. Hah YS, Lee YR, Jun JS, Lim HS, Kim HO, Jeong YG, et al. A20 suppresses inflammatory responses and bone destruction in human fibroblast-like synoviocytes and in mice with collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62:2313-21.
15. Lamacchia C, Palmer G, Seemayer CA, Talabot-Ayer D, Gabay C. Enhanced Th1 and Th17 responses and arthritis severity in mice with a deficiency of myeloid cell-specific interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Rheum* 2010;62:452-62.
16. Campbell IK, Hamilton JA, Wicks IP. Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2000;30:1568-75.
17. Boross P, van Lent PL, Martin-Ramirez J, van der Kaa J, Mulder MH, Claassens JW, et al. Destructive arthritis in the absence of both Fc γ RI and Fc γ RIII. *J Immunol* 2008;180:5083-91.
18. Busso N, Karababa M, Nobile M, Rolaz A, Van Gool F, Galli M, et al. Pharmacological inhibition of nicotinamide phosphoribosyltransferase/visfatin enzymatic activity identifies a new inflammatory pathway linked to NAD. *PLoS One* 2008;3:e2267.
19. Geboes L, Dumoutier L, Kelchtermans H, Schurgers E, Mitera T, Renaud JC, et al. Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice. *Arthritis Rheum* 2009;60:390-5.
20. Inglis JJ, Simelyte E, McCann FE, Criado G, Williams RO. Protocol for the induction of arthritis in C57BL/6 mice. *Nat Protoc* 2008;3:612-8.
21. Kouskoff V, Korganow AS, Duchatelle V, Degott C, Benoist C, Mathis D. Organ-specific disease provoked by systemic autoimmunity. *Cell* 1996;87:811-22.
22. Korganow AS, Ji H, Mangialao S, Duchatelle V, Pelanda R, Martin T, et al. From systemic T cell self-reactivity to organ-specific autoimmune disease via immunoglobulins. *Immunity* 1999;10:451-61.
23. Schaller M, Burton DR, Ditzel HJ. Autoantibodies to GPI in rheumatoid arthritis: linkage between an animal model and human disease. *Nat Immunol* 2001;2:746-53.
24. Maccioni M, Zeder-Lutz G, Huang H, Ebel C, Gerber P, Hergueux J, et al. Arthritogenic monoclonal antibodies from K/BxN mice. *J Exp Med* 2002;195:1071-7.
25. Monach P, Hattori K, Huang H, Hyatt E, Morse J, Nguyen L, et al. The K/BxN mouse model of inflammatory arthritis: theory and practice. *Methods Mol Med* 2007;136:269-82.
26. Keffer J, Probert L, Cazlaris H, Georgopoulos S, Kaslaris E, Kioussis D, et al. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO J* 1991;10:4025-31.
27. van den Berg WB. Lessons from animal models of arthritis over the past decade. *Arthritis Res Ther* 2009;11:250.
28. Niki Y, Yamada H, Seki S, Kikuchi T, Takaishi H, Toyama Y, et al. Macrophage- and neutrophil-dominant arthritis in human IL-1 alpha transgenic mice. *J Clin Invest* 2001;107:1127-35.
29. Horai R, Saijo S, Tanioka H, Nakae S, Sudo K, Okahara A, et al. Development of chronic inflammatory arthropathy

- resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med* 2000;191:313-20.
30. Andrew P. Cope. *Arthritis Research: Volume 2: Methods and Protocols (Methods in Molecular Medicine)*. p. 215-23, Totowa, New Jersey, Human press, 2007.
31. Holmdahl R, Rubin K, Klareskog L, Larsson E, Wigzell H. Characterization of the antibody response in mice with type II collagen-induced arthritis, using monoclonal anti-type II collagen antibodies. *Arthritis Rheum* 1986; 29:400-10.
32. Nandakumar KS, Svensson L, Holmdahl R. Collagen type II-specific monoclonal antibody-induced arthritis in mice: description of the disease and the influence of age, sex, and genes. *Am J Pathol* 2003;163:1827-37.
33. Jacobs JP, Pettit AR, Shinohara ML, Jansson M, Cantor H, Gravallese EM, et al. Lack of requirement of osteopontin for inflammation, bone erosion, and cartilage damage in the K/BxN model of autoantibody-mediated arthritis. *Arthritis Rheum* 2004;50:2685-94.
34. Kyburz D, Corr M. The KRN mouse model of inflammatory arthritis. *Springer Semin Immunopathol* 2003;25:79-90.
35. Lee SI, Boyle DL, Berdeja A, Firestein GS. Regulation of inflammatory arthritis by the upstream kinase mitogen activated protein kinase kinase 7 in the c-Jun N-Terminal kinase pathway. *Arthritis Res Ther* 2012;14:R38.
36. Gregersen JW, Holmes S, Fugger L. Humanized animal models for autoimmune diseases. *Tissue Antigens* 2004; 63:383-94.
37. Taneja V, Behrens M, Mangalam A, Griffiths MM, Luthra HS, David CS. New humanized HLA-DR4-transgenic mice that mimic the sex bias of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:69-78.
38. Barry TS, Haynes BF. In vivo models of human lymphopoiesis and autoimmunity in severe combined immune deficient mice. *J Clin Immunol* 1992;12:311-24.
39. Davis LS, Sackler M, Brezinschek RI, Lightfoot E, Bailey JL, Oppenheimer-Marks N, et al. Inflammation, immune reactivity, and angiogenesis in a severe combined immunodeficiency model of rheumatoid arthritis. *Am J Pathol* 2002;160:357-67.
40. Pearson T, Greiner DL, Shultz LD. Creation of "humanized" mice to study human immunity. *Curr Protoc Immunol* 2008;Chapter 15:Unit 15.21.
41. Whitehouse MW. Adjuvant arthritis 50 years on: The impact of the 1956 article by C. M. Pearson, 'Development of arthritis, periarthritis and periostitis in rats given adjuvants'. *Inflamm Res* 2007;56:133-8.
42. Holmdahl R, Lorentzen JC, Lu S, Olofsson P, Wester L, Holmberg J, et al. Arthritis induced in rats with non-immunogenic adjuvants as models for rheumatoid arthritis. *Immunol Rev* 2001;184:184-202.
43. Lundberg K, Nijenhuis S, Vossenaar ER, Palmblad K, van Venrooij WJ, Klareskog L, et al. Citrullinated proteins have increased immunogenicity and arthritogenicity and their presence in arthritic joints correlates with disease severity. *Arthritis Res Ther* 2005;7:R458-67.
44. Vossenaar ER, Nijenhuis S, Helsen MM, van der Heijden A, Senshu T, van den Berg WB, et al. Citrullination of synovial proteins in murine models of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48:2489-500.
45. Hill JA, Bell DA, Brintnell W, Yue D, Wehrli B, Jevnikar AM, et al. Arthritis induced by posttranslationally modified (citrullinated) fibrinogen in DR4-IE transgenic mice. *J Exp Med* 2008;205:967-79.