Journal of Rheumatic Diseases
Vol. 20, No. 2, April 2013
http://dx.doi.org/10.4078/jrd.2013.20.2.94

□ Original Article □

류마티스관절염 동물모델에서 메토트렉세이트의 STAT3-TH17/STAT5-Treg Axis 조절을 통한 관절염의 치료효과

박은미[1,2] · 박미경[1,2] · 이동건[1,2] · 백승예[1,2] · 우정원[2] · 곽승기[1,2,3] · 조미라[1] · 박성환[1,2,3]

가톨릭대학교 의과학연구소 류마티스연구센터[1], 서울성모병원 면역질환 융합연구 사업단 자가면역연구소[2], 가톨릭대학교 의과대학 류마티스내과학교실[3]

Reciprocal Regulation of TH17 and Regulatory T Cells by Methotrexate and Its Therapeutic Effects in Collagen-induced Arthritis (CIA)

Eun-Mi Park[1,2], Mi-Kyung Park[1,2], Dong-Gun Lee[1,2], Seung-Ye Baek[1,2], Jung-Won Woo[2], Seung-Ki Kwok[1,2,3], Mi-La Cho[1], Sung-Hwan Park[1,2,3]

Rheumatism Research Center, Catholic Institutes of Medical Science[1], Immune Tolerance Research Center, Convergent Research Consortium for Immunologic Disease, Seoul St. Mary's Hospital[2], Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, The Catholic University of Korea College of Medicine[3], Seoul, Korea

Objective. **Methotrexate is the first-line drug in treatment of rheumatoid arthritis (RA) exhibiting higher efficacy and better tolerability than most other DMARDs. To have a better understanding of the anti-arthritic mechanism of methotrexate, we investigated the effect of methotrexate on suppressing the autoimmune inflammatory and destructive arthritis in collagen-induced arthritis (CIA) mice.**

Methods. **The effects of methotrexate on joint inflammation were assessed by clinical scoring and histologic analysis. Levels of cytokines and autoreactive antibodies were analyzed by immunohistochemistry and ELISA. The population of TH17 and Foxp3$^+$ regulatory T (Treg) cells and phosphorylation of their critical transcription activators, STAT3 and STAT5, were examined by fluorescence microscopy and flow cytometry, respectively.**

Results. **Treatment with methotrexate significantly alleviated joint inflammation and cartilage destruction in CIA. Serum levels of total immunoglobulins G, G1, G2a specific to type II collagen were also reduced considerably in methotrexate-treated mice. The drug inhibited the expression of proinflammatory cytokines such as IL-1β, TNF-α, IL-6 and IL-17 in arthritic joints ex vivo as well as by splenocytes in vitro. Moreover, methotrexate treatment resulted in reciprocal modulation of TH17 cells and Foxp3$^+$ regulatory T (Treg) cells in spleen tissues, in which TH17 cells were decreased and Treg cells in number were increased. Subsequent analysis of CD4$^+$T cells showed that phosphorylation of STAT3 was decreased whereas phosphorylation of STAT5 was increased in methotrexate-treated mice.**

Conclusion. **Methotrexate treatment effectively suppressed autoimmune arthritis and restored homeostasis of the immune system by reciprocal regulation of TH17 and Treg cells in a mouse model of collagen-induced arthritis.**

Key Words. **Methotrexate, Collagen-induced arthritis, Cytokines, TH17 cells, Regulatory T cells**

<Received : November 7, 2012, Revised (1st : November 19, 2012, 2nd : November 23, 2012), Accepted : November 24, 2012>

Corresponding to : Sung-Hwan Park, Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine, The Catholic University of Korea School of Medicine, Seoul St. Mary's Hospital, 505, Banpo-dong, Seocho-gu, Seoul 137-701, Korea.
E-mail : rapark@catholic.ac.kr

pISSN: 2093-940X, eISSN: 2233-4718
Copyright ⓒ 2013 by The Korean College of Rheumatology
This is a Free Access article, which permits unrestricted non-commerical use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

메토트렉세이트(methotrexate)는 류마티스관절염의 치료에 있어서 단독 혹은 다른 약제와의 복합치료제로서 가장 흔히 사용되는 항 류마티스 약물이다.

메토트렉세이트는 50년 전 항암제로 처음 사용되기 시작하였으며. 1980년대 들어 류마티스관절염뿐 아니라 다른 전신 류마티스 질환에 흔히 사용되는 약제로 엽산 유사체이다.

메토트렉세이트는 세포 내로 이동하여 polyglutamated되어 세포 내의 효소인 aminoimidazole carboximide ribonucleotide (AICAR), transformylase (ATIC), thymidylate synthetase (TYMS), dihydrofolate reductase (DHFR) 등의 작용을 억제하며, 그 결과 아데노신(adenosine)의 증가와 피리미딘(pyrimidine) 합성 감소, transmethylation 반응 억제를 나타내는 것으로 알려져 있다. 즉 DHFR의 억제와 엽산의존 효소의 억제를 통한 세포 내 퓨린(purine) 수치, 피리미딘 대사, DNA 합성에 영향을 미치는 것으로 알려져 왔으나 그 기전은 정확히 알려지지 않았다 (1).

동물모델 및 세포주를 이용한 연구에서 메토트렉세이트는 단핵구와 대식세포에서 염증을 유발하는 사이토카인인 인터루킨-12 (IL-12), 종양괴사인자(TNF)-알파, 인터루킨-6 (IL-6), 인터루킨-8 (IL-8)의 생성을 억제하며 항염증 작용 사이토카인인 인터루킨-10 (IL-10)의 생성을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 또한 메토트렉세이트는 류마티스관절염의 관절파괴의 중요한 인자로 알려진 프로스타글란딘(prostaglandin)과 루코트리엔(leukotriene)을 억제조절 하는 것으로 알려져 있으나, 메토트렉세이트의 류마티스관절염 질병제어와 관련된 작용기전은 충분히 밝혀지지 않았다 (2-4).

최근 인터루킨-17 (IL-17)을 생산하는 TH17 세포가 류마티스관절염의 병인에 주도적인 역할을 하며 특히 관절염증과 골 파괴를 직접 유도하는 것이 밝혀지면서 이들의 제어를 위해서 TH17 세포의 활성을 유도하는 IL-6 사이토카인을 억제하거나 forkhead box protein 3 (Foxp3)를 발현하는 면역조절 T 세포(regulatory T cells; Treg)의 증식과 활성을 유도하여 병인 T 세포의 제어 및 면역관용을 유도하는 것이 류마티스관절염의 치료에 중요한 것으로 알려지고 있다.

이러한 TH17 세포 또는 조절 T 세포의 동시 균형 조절은 핵심적인 사이토카인과 이에 상응하는 전사인자의 상호조절을 통해 나타나는 것으로 밝혀졌다.

TH17 세포의 분화 및 활성에 핵심전사인자로 알려진 STAT3는 직접적으로 IL-17의 로커스(locus)를 조절할 수 있고 TH17 분화와 관련된 많은 전사인자들의 발현에 필수적인 요소로써 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다 (5,6). TH17 세포 내에서 이러한 STAT3의 활성을 억제하면 TH17 세포는 제어되고 면역 조절 T 세포의 활성은 동시에 유도되는 이상적인 면역조절이 이루어졌다 (7).

면역조절 T 세포에서는 Foxp3와 STAT5가 주요 전사인자로 알려져 있으며 TH17 세포에서 STAT3 활성을 억제하면 동시에 STAT5 활성이 유도되는 기전이 밝혀지면서 STAT3와 STAT5와 상호조절이 매우 중요한 면역조절 기전으로 예측되고 있다. 따라서 면역질환 제어를 위해 연구자들은 이들 이상적 면역조절을 유도하기 위해 STAT3 제어 및 STAT5 유도 관련 유도체들에 대한 연구가 질병제어 전략으로 주목 받고 있다 (8-10).

메토트렉세이트가 류마티스관절염 대표적 치료제로 알려져 있으나 사이토카인 IL-17과 병인 TH17 세포에 미치는 영향에 대한 연구는 매우 제한적인 상황이다 (11). 저자들은 류마티스관절염 동물모델인 콜라겐 유도관절염 모델(type II collagen-induced arthritis; CIA)에서 메토트렉세이트 처치에 따른 관절염 치료 효과와 염증에 관여하는 사이토카인의 변화와 함께 메토트렉세이트의 TH17 세포에 미치는 영향을 조사하고, 조절 T세포에 미치는 영향을 조사하여 작용기전을 조사하고자 하였다.

대상 및 방법

제2형 콜라겐 유발 관절염 동물모델 확립과 메토트렉세이트 처리

분양받은 6～7주령의 수컷 DBA/1J 마우스(Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)는 2주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22.0±2°C, 1일 중 12시간은 200～300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. DBA/1J 마우스에 Complete Freund's Adjuvant (CFA; DIFCO, Detroit, MI)와 1 : 1 (v/v)비율로 섞은 Bovine Type II collagen (Chondrex Inc., Redmond, WA) 100 μg을 꼬리 부분에 피하로 주사하였다. 주사 후 일주일 후 phosphate buffered saline (PBS) 를 먹인 대조군과 메토트렉세이트(Sigma Aldrich, St. Louis, MO)를 투여한 실험군(1 mg/kg, 7.5 mg/kg)으로 나눈 후 일주일에 3회 각각 100 μL씩 복강 내 주사하였다. 동물실험에 사용된 메토트렉세이트의 농도는 이전 실험 논문을 토대로 결정하였다 (12).

관절염의 육안 관찰 및 측정

관절염 병변의 육안적 관찰은 참고 문헌에 근거하여 다음과 같은 스코어를 사용하여 실시하였다 (13). 0점: 부종이나 종창이 없음, 1점: 발 또는 발목관절에 국한된 경한 부종과 발적, 2점: 발목관절에서 족근골에 걸친 경한 부종과 발적, 3점: 발목관절에서 족근골에 걸친 중등도의 부종과 발적, 4점: 발목에서 다리전체에 걸쳐 부종과 발적이 있고 관절경직이 나타난 경우이다. 따라서, 관절염 병변의 최고 스코어는 마우스 한 마리 당 16이며, 꼬리에 주사한 시점으로부터 7주까지 일주일에 3회씩 실시하였고, 평가자료는 실험과 관계없는 3인이 작성하였다.

관절의 조직학적 변화

각 그룹의 마우스를 희생하여 관절 조직을 채취하여 10%

중성완충 포르말린에서 1일간 고정한 후 Calci-Clear Rapid (National Diagnostics, Atlanta, Georgia)으로 7시간 동안 탈회하였다. 일반적인 방법에 의하여 수세 후 Ethyl alcohol로 탈수하고 xylene으로 명화한 후 파라핀으로 포매 하였다. 포매 후 7 μm 두께로 절편 한 후 H-E (Hematoxylin-Eosin) 염색을 시행하였다.

면역조직화학염색

파라핀 포매 조직을 7 μm 두께로 자른 후 xylene으로 파라핀을 제거하고 Ethyl alcohol로 함수시킨 후, Digest-All 3 (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA) 처리 후 3% hydrogen peroxide를 15분간 처리하여 endogenous peroxidase를 제거하였다. 조직절편을 PBS로 15분간 세척 후 면역조직화학염색은 Vector Elite ABC kit (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA)를 사용하였다. 조직절편을 1.5% normal goat serum으로 30분간 반응한 다음 1차 항체인 rabbit anti-IL-17 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, CA), goat anti-TNF-α (Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-IL-6 (Abcam Inc., Cambridge, MA), rabbit anti-IL-1β (Santa Cruz Biotechnology) 또는 isotype control 항체(rabbit IgG, goat IgG)를 4°C에서 14～16시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 biotin이 결합한 2차 항체를 실온에서 40분 반응시킨 다음 ABC reagent를 실온에서 1시간 적용하였다. 3,3'-diaminobenzidine (Thermo Shandon Co., Pittsburgh)를 사용하여 발색반응을 보았고 hematoxylin으로 대조염색을 실시한 후 최종적으로 봉입을 시행하였다.

콜라겐 특이적인 IgG 및 IgG 아형 측정

콜라겐을 dilution buffer (Chondrex)에 희석한 후 96-well plate의 각 well에 4°C에서 12시간 반응하였다. 1% bovine serum albumin (Sigma)가 함유된 phosphate buffered saline (PBS)를 200 μL/well씩 넣고 1시간 상온에 둔 채 blocking하였다. 3회 washing 한 후 0.05% Tween이 함유된 PBS로 희석한 혈청(1 : 25,000)을 100 μL/well씩 넣고 4°C에서 12시간 반응하였다. 3회 washing 후 anti-mouse IgG1/IgG2a peroxidase conjugate (Bethyl Lab Co., Montgomery, TX, USA)를 1 : 40,000으로 희석한 후 30분간 상온에 두었다. 3회 washing 후 TMB substrate reagent 100 μL를 가한 후 30분이 지나서 1 M H_2SO_4 50 μL를 첨가하였다. Microplate reader (Molecular Devices, US)로 파장 450～570 nm에서 측정하였다.

공초점 현미경

OCT compound (Sakura Finetech USA, Torrance, CA)에 포매시킨 뒤 액체질소로 동결된 비장조직을 7 μm 두께의 연속적인 조직 절편을 Coated slide에 부착하였다. 조직절편은 공기 중에서 한 시간 건조시킨 후 4% paraformaldehyde solution (Sigma)에 넣어 실온에서 차가운 acetone으로 15분간 고정시킨 뒤 PBS로 15분간 씻어주었다. 불특정 결합을 억제하기 위해 10% normal goat serum을 넣고 상온에서 30분간 반응시켰다. Anti-CD4 PerCP 또는 FITC 항체(BD Pharmingen, San Diego, CA), anti-IL-17 FITC 항체(eBioscience, San Diego, CA)와 anti-Foxp3 PE (eBioscience), anti-CD25 APC, anti-STAT3 phospho Y705 항체(BD Pharmingen), anti-STAT3 phospho S727 항체(BD Pharmingen)와 anti-STAT phospho Y694 FITC 항체(BD Pharmingen)를 넣고 4°C에서 18시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBS로 30분간 씻어주었다. Cover-slip 위에 수용성 봉입제(Dako cytomation, Denmark)를 한 방울 떨어뜨린 뒤 조직 부위에 살포시 덮었다. 그리고 공초점 현미경(Zeiss, LSM 510 Meta, Germany)으로 관찰하였다.

세포 분리 및 자극

마우스의 비장을 적출하고 PBS 용액으로 세척 후 가위로 자르고 이를 Cell strainer (BD Falcon, Bedford, MA)에 통과시켰다. 4°C에서 1,300 rpm으로 5분간 원심분리 후 상층액을 제거한 비장 세포들 중에서, 적혈구는 적혈구 용액(2.06% Tris와 0.83% NH4Cl을 1 : 9로 섞음)과 실온에서 5분간 반응시킨 후 Cell strainer (BD Falcon, Bedford, MA)에 통과시켰다.

마우스 비장세포는 5% heat-treated 우태아 혈청(fetal bovine serum; FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY) 및 1% penicillin/streptomycin이 첨가된 RPMI (Gibco BRL)에 부유되어 1×10^5 cell/mL로 24 well culture plate (NUNC, Roskilde, Denmark)에 분주하고 anti-CD3 항체 1 μg/mL, anti-CD28 항체 2 μg/mL (BD Pharmingen), lipopolysaccharide (LPS, Sigma) 1 μg/mL와 메토트렉세이트 0.5, 1 μg/mL로 3일간 자극되었다.

사이토카인 측정

세포로부터 배양한 상층액을 모아 IL-10, IL-6를 sandwich ELISA를 이용하여 농도를 측정하였다. Sandwich ELISA용 96 well plate (NUNC)에 단클론성 anti-IL-6 항체, anti-IL-17 항체와 anti-TNF-α 항체(R&D, Minneapolis, MN, USA)를 각각 4 μg/mL로 100 μL/well씩 넣고 4°C에서 밤새 반응시킨 다음 차단용액(1% BSA/PBST)을 200 μL/well씩 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. Standard로는 재조합 IL-6, IL-17와 TNF-α (R&D)를 이용하여 각각 10,000 pg/mL～156.25 pg/mL 농도를 사용하였다. 표준시료와 함께 측정할 세포배양 상층액을 100 μL/well씩 넣고 실온에서 2시간 반응시켰다. 반응용기를 세척용액(0.05% Tween 20/PBS)으로 세척 후 biotinylated anti-IL-6 항체(R&D)를 200 ng/mL로, anti-IL-17 항체와 anti-TNF-α 항체(R&D)를 400 ng/mL로 희석하여 100 μL/well씩 넣어 실온에서 2시간 반응시킨 후 세척하였다. 마지막으로는 Extravidin-Alkaline phosphatase conjugate (Sigma)를 1 : 2,000으로 희석하여 100 μL/well씩 넣고 실온에서 2시간 반응시키고 세척 후 phosphate diso-

dium salt hexahydrate (PNPP, Fluka)/Diethanolamine 용액 (DEA, 97 Ml, NaN3 0.2 g, MgCl2H2O 0.1 g, 1차 증류수 800 mL)을 1 mg/mL 농도로 녹여 100 μL/well씩 넣어 30분 후 0.2 M NaOH로 반응을 멈추고 405 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

통계적 유의성의 검증

실험 결과는 평균±표준 오차로 나타냈으며, 통계적 유의성은 Student's t-test를 실시하였고 p값이 0.05 이하일 때 통계적으로 유의 하다고 분석하였다.

결 과

콜라겐 유발 관절염 동물모델에서 메토트렉세이트의 치료효과

메토트렉세이트의 관절염 치료효과를 평가하기 위해 제2형 콜라겐을 이용하여 콜라겐 유발 관절염 마우스를 확립하였다. 콜라겐 1차 주입 후 7일째 일주일에 3번 메토트렉세이트를 복강 투여한 치료군과 PBS만 투여한 대조군의 관절염 중증도를 평가하였다. 콜라겐 유발 관절염 모델은 1차

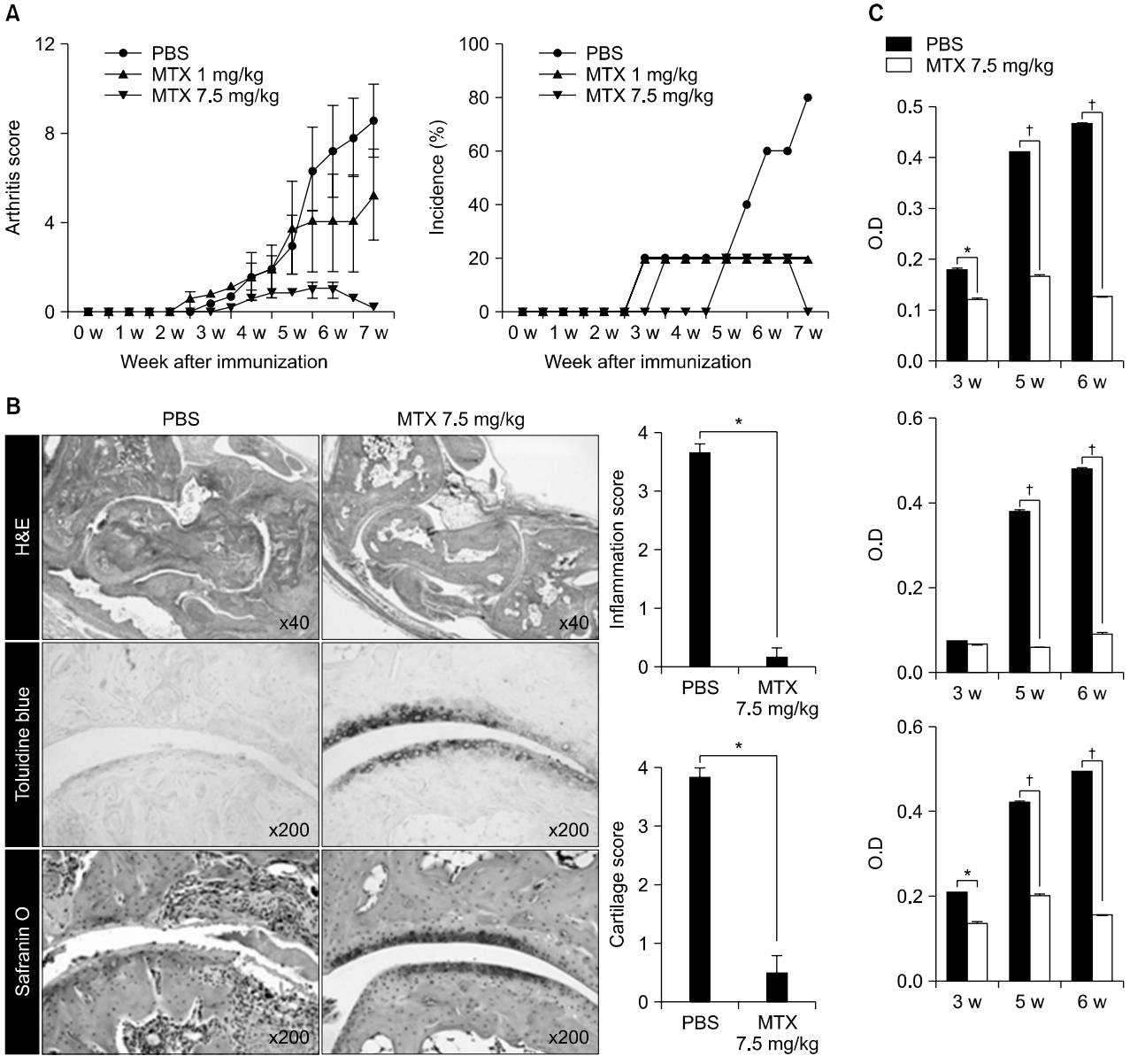

Figure 1. Suppression of arthritis development in MTX-treated CIA mice. Arthritis was induced by immunization with CII in Freund's complete adjuvant on day 0. On day 7, mice also received PBS or MTX (1 mg/kg or 7.5 mg/kg) three times per week for 7 weeks. (A) Severity of arthritis was determined as described in Materials and Methods. (B) Representative histological analysis of knee joints and paws was assessed by H & E, toluidine blue, and safranin o staining. Original magnification: ×40 and ×200 for H&E staining and ×200 for toluidine blue and safranin o staining. Values of histological scores of inflammation and cartilage damage were shown in the right panel. (C) Anti-collagen antibody levels in CIA mice. The levels of IgG anti-collagen antibodies were measured by ELISA. Values are expressed as the optical density (O.D.) *$p<0.01$, †$p<0.001$ compared to the vehicle control mice.

면역 후 약 3주부터 관절염이 발병하기 시작하였으며 메토트렉세이트 1 mg/kg 치료군에서 중증도는 비교적 낮은 상태를 유지하였다 이에 비해 메토트렉세이트 7.5 mg/kg 치료군에서는 치료기간 동안 지수가 지속적으로 낮은 상태를 유지하였다(Figure 1A).

치료적 효과가 가장 크게 나타난 메토트렉세이트 7.5 mg/kg 치료군의 관절 조직에서 조직학적 차이를 조사하기 위해 헤마톡실린-에오신법으로 염색하였으며, 연골파괴 정도를 확인하기 위하여 톨루이딘 블루와 사프라닌 O 염색을 시행하였다. 관절염 유도군의 관절은 파괴가 심하고, 염증 부위에 면역세포들이 침윤, 판누스(pannus) 형성이 나타난 반면, 메토트렉세이트 처리군은 관절염 유도군에 비해 관절 파괴, 염증 정도가 적고 면역세포들의 침윤, 연골파괴 및 뼈 침식이 현저히 적게 관찰되었다(Figure 1B).

게다가 메토트렉세이트를 주입한 동물모델의 경우에 혈청 중 콜라겐에 특이적인 Total IgG 항체뿐만 아니라 아형인 IgG1과 IgG2a의 함량이 대조군과 비교 시 처치군에서 유의적으로 감소하였다(Figure 1C).

메토트렉세이트 주입에 의한 콜라겐 유발 관절염 동물모델의 염증억제 효과

염증성 사이토카인인 IL-1β, TNF-α, IL-6와 IL-17는 자가면역관절염의 병인과 관련된 중요 인자들이다. 따라서 대조군과 치료군의 콜라겐 유발 관절염 마우스의 관절 조직에서 대표적인 염증성 사이토카인인 IL-1β, TNF-α, IL-6와 IL-17에 특이적인 항체를 이용하여 면역조직화학염색을 시행하였다. 관절염 유도군의 관절은 침윤된 세포 내 많은 양의 IL-1β, TNF-α, IL-6와 IL-17이 분포되어 있었으나 치료군의 관절 내에는 이러한 염증성 사이토카인의 발현이 관찰되지 않았다(Figure 2).

메토트렉세이트 주입에 의한 콜라겐 유발 관절염 모델V내 염증 TH17 세포 및 면역조절 T 세포의 조절효과

최근 염증성 자가면역질환의 치료 패러다임은 병인세포를 억제하는 동시에 조절세포의 분포 및 활성을 증가시켜 면역체계의 이상을 정상화하는 것에 초점이 맞춰지고 있다. 메토트렉세이트에 의한 치료효과 규명을 위해 처리군의 비장 내 존재하는 TH17 세포와 조절 T 세포의 분포를 조사하기 위해 면역형광염색을 시행하고 공초점 현미경으로 관찰, 분석하였다. 관절염 발병군의 비장조직상에는 많은 양의 CD4+IL-17+ 세포의 분포가 관찰된 반면 메토트렉세이트 치료군에서는 현저하게 감소되어 있었다(Figure 3).

메토트렉세이트에 의한 STAT3/STAT5 의존적인 TH17 세포 및 면역조절 T 세포의 변화

TH17 세포와 조절 T 세포의 분화는 각각 STAT3와 STAT5

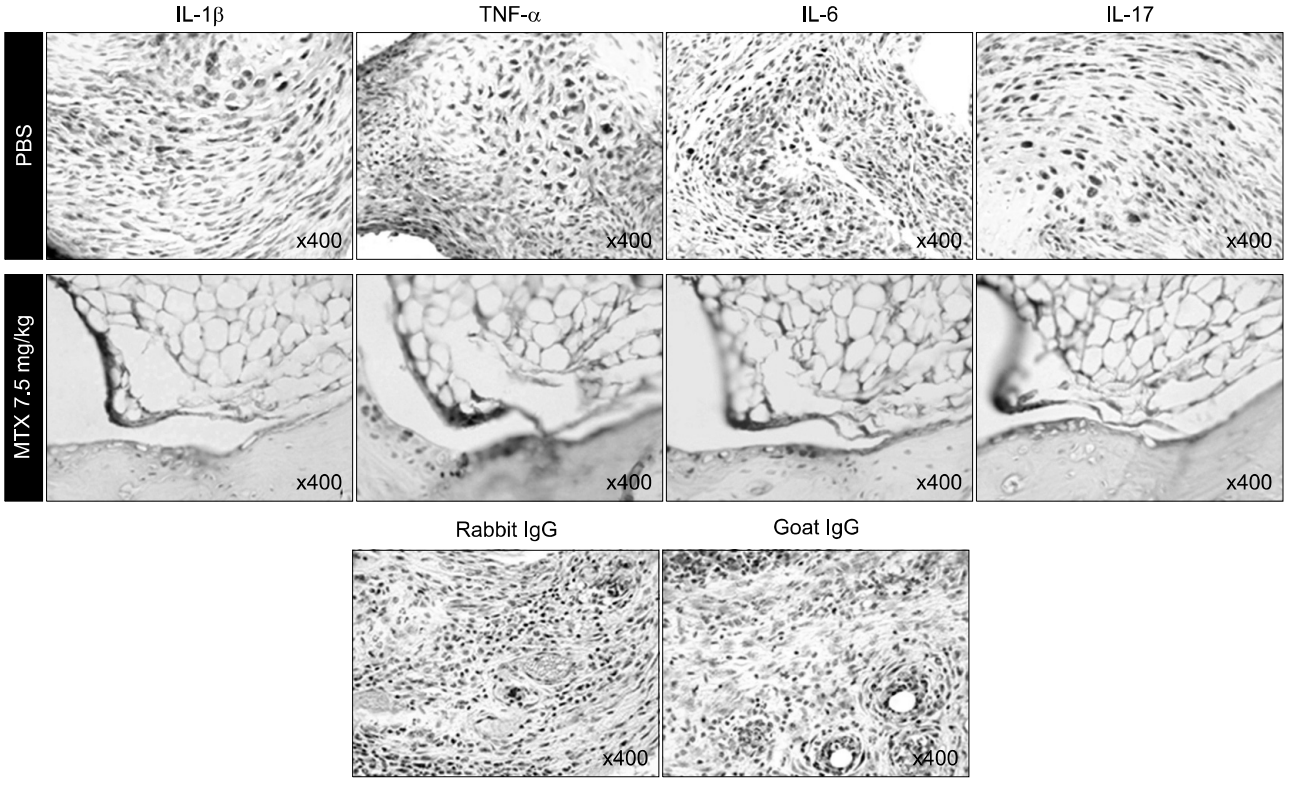

Figure 2. Immunohistologies of joints tissues from MTX treated CIA mice. Tissue sections from mice joints of each group were stained with anti-TNF-α, anti-IL-1β, anti-IL-6, anti-IL-17 antibodies or isotype antibodies, respectively. Cells stained with each antibody are shown in brown. Original magnification: ×400.

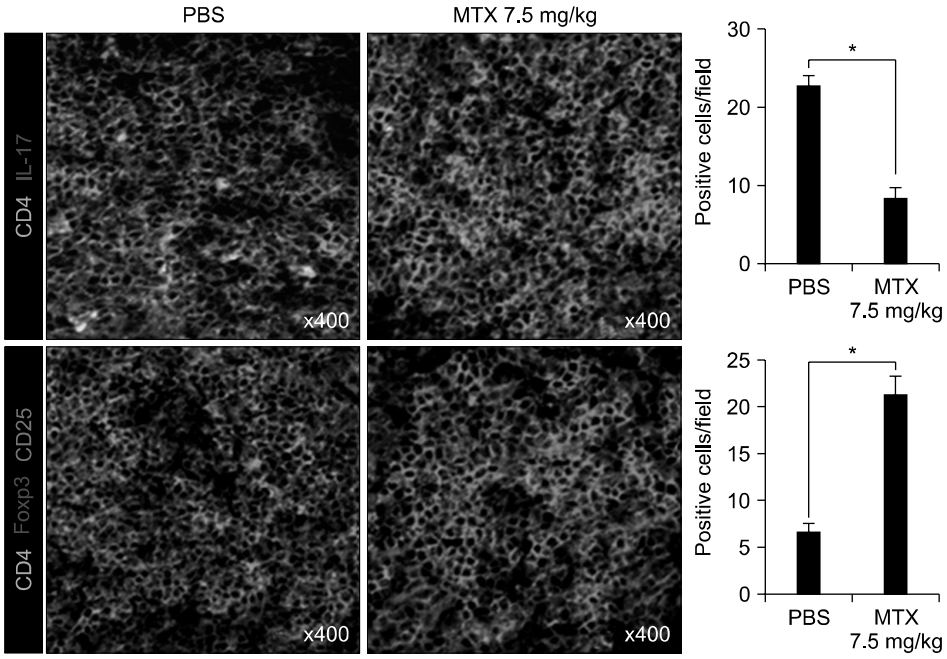

Figure 3. Reciprocal regulation of TH17 and Foxp3+ regulatory T cells in MTX-treated CIA mice. Spleen from vehicle and MTX-treated CIA mice were stained by anti-CD4 (green), anti-CD25 (blue), and anti-IL-17 (red, upper), anti-Foxp3 (red, lower) antibodies. Populations of $CD4^{+}CD25^{+}Foxp3^{+}$ T cells and $CD4^{+}IL\text{-}17^{+}$ T cells were analyzed using laser confocal microscopy. Original magnification: ×400. The graphs represent the number of positive cells. *$p < 0.05$ compared to the vehicle control mice.

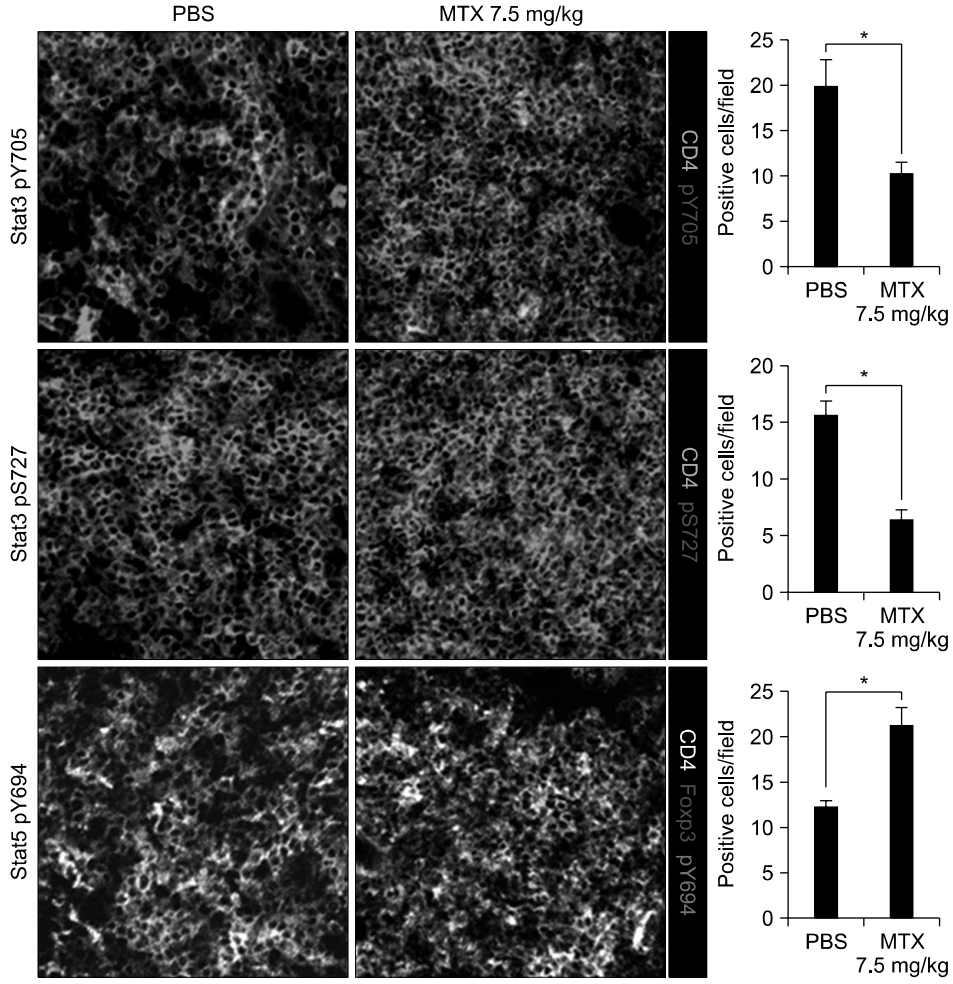

Figure 4. STATs-dependent regulation of TH17 and Foxp3+ regulatory T cells in MTX-treated CIA mice. Spleens from mice in each group were stained with antibodies against anti-CD4 (green, upper; white, lower), anti-Foxp3 (red), phospho-STAT3 (red) or phospho-STAT5 (blue). Original magnification: ×400. The graphs represent the number of positive cells. Data are expressed as the mean±SD. *$p < 0.05$ compared to the vehicle control mice.

에 의존적으로 조절된다. 메토트렉세이트 처리에 의한 TH17 세포의 증가 및 조절 T 세포의 감소가 이러한 주요 전사인자들의 발현과 연관성이 있는지 보고자 CD4+ T 세포 내 STAT3 또는 STAT5의 인산화 부위를 면역형광염색을 통해 조사하였다. TH17 세포 및 조절 T 세포의 분포와 동일한 양상으로 인산화된 STAT3 (Y705와 S727)는 관절염 발병군에서 증가하고, 반면 인산화된 STAT5 (Y694)는 메토트렉세이트 치료군에서 증가되어 있었다(Figure 4).

메토트렉세이트에 의한 염증성 사이토카인의 생성억제 효과

In vivo 상의 메토트렉세이트의 항염증 효과를 시험관내에서 확인하고자 정상마우스의 비장세포를 LPS 또는 CD3/CD28 자극하였을 때 메토트렉세이트에 의한 염증성 사이토카인 TNF-α, IL-6와 IL-17의 생성 억제 효과를 조사하였다. TNF-α, IL-6와 IL-17는 모두 LPS 또는 CD3/CD28 자극에 의해 증가되었으며 추가적인 메토트렉세이트의 처리는 증가된 TNF-α, IL-6와 IL-17의 생산을 억제하였다(Figure 5).

고 찰

본 연구결과 메토트렉세이트 투여가 대표적인 류마티스 관절염 동물모델인 콜라겐 유발 관절염 동물모델에서 대조군과 비교하여 관절염 지수 및 관절염 발병률을 낮추고 조직학적으로 연골 파괴, 염증 정도를 개선시키는 등의 치료효과가 있음을 보여주었다. 메토트렉세이트는 콜라겐 유발 관절염 마우스의 관절조직에서 류마티스관절염의 병인과 밀접한 관련이 있는 염증성 사이토카인인 IL-1β, TNF-α, IL-6와 IL-17의 발현을 억제하였다. 메토트렉세이트 투여는 콜라겐 유발 관절염 마우스의 비장 내 염증 TH17 세포를 감소시키고 조절 T 세포를 증가시켰으며 이는 각각 염증 TH17 세포와 조절 T 세포의 대표적인 전사인자인 STAT3와 STAT5 의존적임을 증명하였다. 또한 시험관내에서 메토트렉세이트 투여는 LPS혹은 anti-CD3/CD28로 자극된 정상마우스 비장의 염증성 사이토카인의

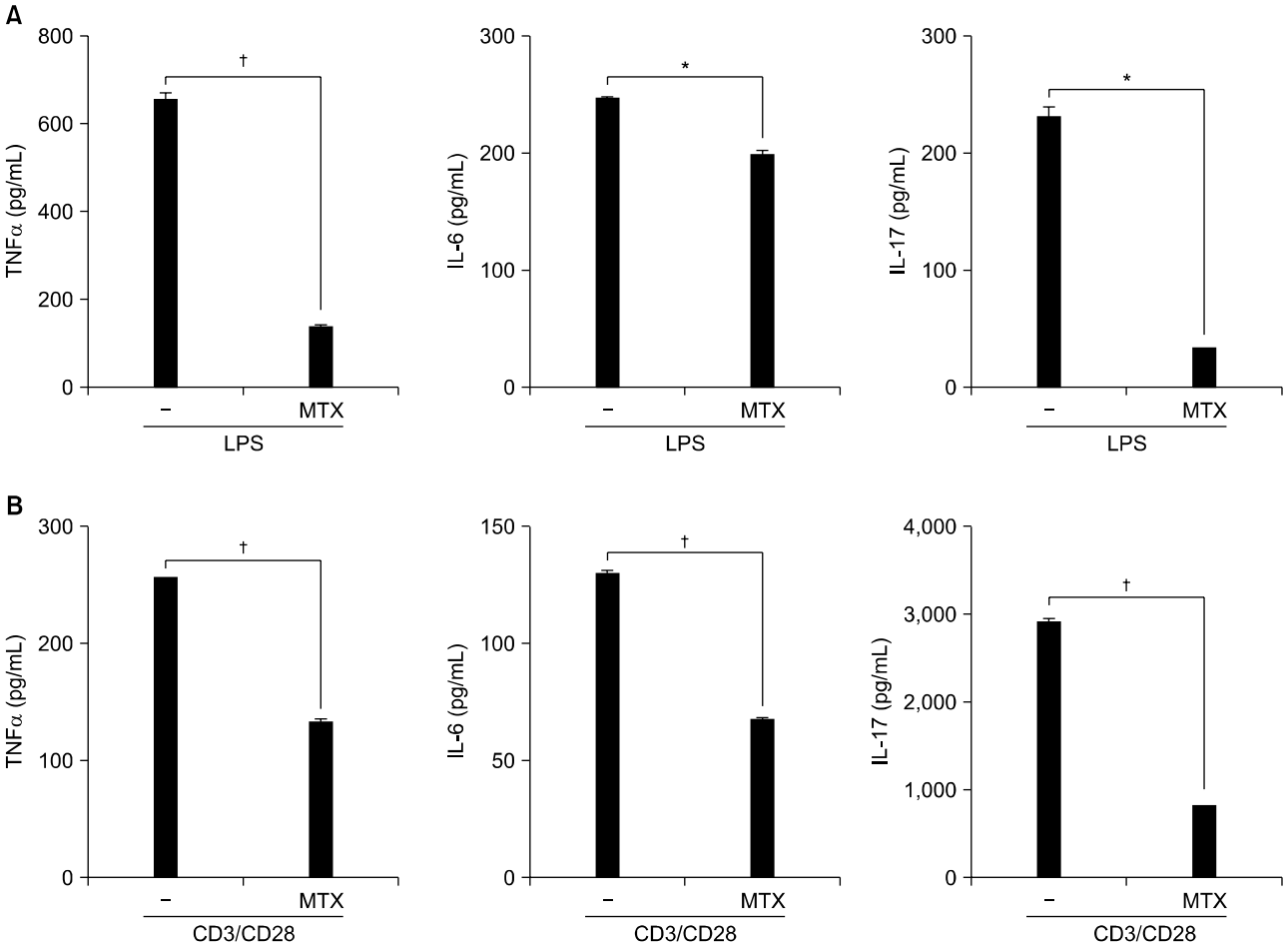

Figure 5. Suppressive effect of MTX on production of inflammatory cytokines. Splenocytes of DBA/1J mice were cultured with LPS (100 ng/mL) (A) or anti-CD3 (1 μg/mL)/CD28 (2 μg/mL) (B) in the presence or absence of MTX (0.5 μg/mL) for 24 hours in vitro. TNF-α, IL-6 and IL-17 in the cell supernatant was determined by ELISA. Data are expressed as the mean±SD. *$p<0.01$, $^{\dagger}p<0.001$ compared to the LPS or CD3/CD28-treated cells.

합성을 억제하였다.

류마티스관절염의 병인에 T세포, 그 중에서도 CD4+ T세포가 중요한 역할을 담당하고 있다는 것은 주지의 사실이다. CD4+ T 세포는 1986년 Mosmann 등이 CD4+ T세포가 상반된 기능을 가지는 TH1/TH2 세포로 분화한다는 사실을 밝힌 이후 (14), TH1/TH2 개념이 지속되어서 다양한 자가면역질환의 병인을 TH1/TH2 개념에서 해석하고자 하는 많은 시도가 2005년 TH17 세포가 규명될 때까지 지속되었다 (15,16). TH17 세포는 염증성 사이토카인인 IL-17 (IL-17A)의 합성을 특징으로 하며 다양한 사이토카인(IL-6, TGF-β, IL-23, IL-21, IL-1β)이 TH17 세포의 분화 및 증폭에 관련됨이 알려져 있다 (17,18). IL-17과 TH17 세포는 류마티스관절염, 기관지 천식, 염증성 장질환, 건선 등의 다양한 자가면역질환의 발병에 중요한 역할을 한다 (18-20). 특히 류마티스관절염의 경우 TH17 세포와 TH17 세포에서 분비하는 IL-17이 질환의 발병에 결정적인 역할을 하는 것으로 밝혀지면서 현재 IL-17 억제제가 류마티스관절염 환자들을 대상으로 임상실험 중이다.

TH17 세포와 대조적으로 면역조절 T 세포는 그 분화에 Foxp3라는 전사인자의 발현을 특징으로 하며 면역관용 및 조절에 결정적인 역할을 하는 CD4+ T 세포의 아형이다 (21,22). 그러므로, TH17 세포를 감소시키고 조절 T 세포를 증가시키는 물질이 류마티스관절염의 치료에 새로운 후보물질이 될 수 있을 것이다.

메토트렉세이트는 엽산 유사체로서 다양한 류마티스관절염 동물모델에서 치료효과가 입증되었고 류마티스관절염 환자들을 대상으로 한 randomized controlled trial에서 치료효과 및 골 파괴 억제효과가 증명되어 현재 가장 많이 사용되고 있는 항 류마티스 약제이다 (23). 최근 병인에 근거한 표적치료제인 항 TNF-α로 대표되는 생물학적 제제가 기존의 항 류마티스 약제보다 치료효과가 우수함이 입증되면서 류마티스관절염 치료의 패러다임에 큰 변화를 가지고 왔다. 그러나, 생물학적 제제들도 메토트렉세이트와 병용 시 치료효과 및 골파괴 억제효과가 증가함이 알려지면서 거의 모든 생물학적 제제들도 메토트렉세이트와의 병용요법이 추천되는 만큼 메토트렉세이트는 류마티스관절염 치료의 근간이 되는 약제라 할 수 있다. 그러나, 메토트렉세이트의 정확한 작용기전은 아직 밝혀지지 않았다.

메토트렉세이트가 류마티스관절염의 핵심 병인세포인 TH17 세포에 관한 연구는 거의 보고된 바 없다. Li 등이 류마티스관절염 환자의 말초혈액 단핵구를 대상으로 시험관내에서 메토트렉세이트 처리시 IL-17의 합성이 억제됨을 보고하였고 (11), 이는 메토트렉세이트를 투여한 류마티스관절염 동물모델의 비장에서 TH17 세포의 감소 및 비장세포에서 IL-17의 합성억제를 관찰한 본 연구결과와 일맥상통하는 결과라 할 수 있을 것이다.

메토트렉세이트가 조절 T 세포에 미치는 영향에 관한 연구도 거의 이루어진 바 없다. Oh 등은 정상인의 말초혈액에서 CD4+CD25+ 조절 T 세포를 분리하여 시험관내에서 메토트렉세이트를 처리 시 조절 T 세포의 기능에 영향이 없음을 보고하였다 (24). 한편 Kinoshita 등은 동물실험에서 엽산이 결핍된 식이섭취 시 Foxp3를 발현하는 조절세포가 유의하게 감소함을 보고하여 엽산이 조절 T 세포의 유지에 중요하고 주장하였다 (25). 이러한 결과들은 메토트렉세이트가 류마티스관절염 동물모델의 비장에서 조절세포의 수를 증가시키는 본 연구결과와 상반된다고 할 수 있을 것이다. 이러한 차이점에 관하여 아직 명확한 원인을 알 수 없으며 향후 추가적인 연구가 필요할 것이다. 본 연구에서 류마티스관절염 동물모델에서 TH17 세포를 감소시키고 조절 T 세포를 증가시킴을 보여주었고 이는 STAT3/STAT5의 발현변화와 관련 있음을 증명하였다. 그러나 이러한 메토트렉세이트의 TH17/Treg 조절효과가 메토트렉세이트가 직접적으로 STAT3, STAT5의 발현에 영향을 주는 것인지 아니면 메토트렉세이트의 항염증 효과에 의하여 TH17 세포의 분화에 영향을 주는 염증성 사이토카인의 발현을 억제함에 의한 2차적인 현상인지에 관하여는 추가연구가 필요하다고 하겠다.

결 론

본 연구를 통하여 메토트렉세이트에 의한 류마티스관절염 치료가 핵심 병인세포인 TH17 세포 및 조절 T 세포의 조절과 관련되어 있음을 보여 주었다. 이러한 연구는 자가면역관절염의 면역체계의 이해와 그 치료법을 연구하는데 중요한 초석이 될 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지가족부 선도형연구중심병원사업의 지원에 의하여 이루어진 것입니다(과제고유번호 A092258).

참고문헌

1. Firestein GS, Kelley WN. Kelley's textbook of rheumatology. In: Cannella AC, O'dell JR, eds. Methotrexate, leflunomide, sulfasalazine, hydroxychloroquine, and combination therapies. 8th ed. p. 883, Philadelphia, PA, Saunders Elsevier, 2009.
2. Link AA, Kino T, Worth JA, McGuire JL, Crane ML, Chrousos GP, et al. Ligand-activation of the adenosine A2a receptors inhibits IL-12 production by human monocytes. J Immunol 2000;164:436-42.
3. Haskó G, Szabó C, Németh ZH, Kvetan V, Pastores SM, Vizi ES. Adenosine receptor agonists differentially regulate IL-10, TNF-alpha, and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and in endotoxemic mice. J Immunol 1996;157:4634-40.
4. Mello SB, Barros DM, Silva AS, Laurindo IM, Novaes GS. Methotrexate as a preferential cyclooxygenase 2 inhibitor in whole blood of patients with rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford) 2000;39:533-6.
5. Chen Z, Laurence A, Kanno Y, Pacher-Zavisin M, Zhu

BM, Tato C, et al. Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103:8137-42.
6. Durant L, Watford WT, Ramos HL, Laurence A, Vahedi G, Wei L, et al. Diverse targets of the transcription factor STAT3 contribute to T cell pathogenicity and homeostasis. Immunity 2010;32:605-15.
7. Yang XP, Ghoreschi K, Steward-Tharp SM, Rodriguez-Canales J, Zhu J, Grainger JR, et al. Opposing regulation of the locus encoding IL-17 through direct, reciprocal actions of STAT3 and STAT5. Nat Immunol 2011;12: 247-54.
8. Zhou L, Lopes JE, Chong MM, Ivanov II, Min R, Victora GD, et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. Nature 2008;453:236-40.
9. Elias KM, Laurence A, Davidson TS, Stephens G, Kanno Y, Shevach EM, et al. Retinoic acid inhibits Th17 polarization and enhances FoxP3 expression through a Stat-3/ Stat-5 independent signaling pathway. Blood 2008;111: 1013-20.
10. Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, et al. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. Science 2007;317:256-60.
11. Li Y, Jiang L, Zhang S, Yin L, Ma L, He D, et al. Methotrexate attenuates the Th17/IL-17 levels in peripheral blood mononuclear cells from healthy individuals and RA patients. Rheumatol Int 2012;32:2415-22.
12. Fiehn C, Wunder A, Krienke S, Max R, Ho AD, Moehler T. Lack of evidence for inhibition of angiogenesis as a central mechanism of the antiarthritic effect of methotrexate. Rheumatol Int 2005;25:108-13.
13. Barnett ML, Kremer JM, St Clair EW, Clegg DO, Furst D, Weisman M, et al. Treatment of rheumatoid arthritis with oral type II collagen. Results of a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. Arthritis Rheum 1998; 41:290-7.
14. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. J Immunol 1986;136:2348-57.
15. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, et al. Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. Nat Immunol 2005;6: 1123-32.
16. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. Nat Immunol 2005;6:1133-41.
17. Dong C. Differentiation and function of pro-inflammatory Th17 cells. Microbes Infect 2009;11:584-8.
18. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, Fox DA. Th17 cells in human disease. Immunol Rev 2008;223:87-113.
19. Dong C. IL-23/IL-17 biology and therapeutic considerations. J Immunotoxicol 2008;5:43-6.
20. Iwakura Y, Nakae S, Saijo S, Ishigame H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. Immunol Rev 2008;226:57-79.
21. Sakaguchi S. Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. Annu Rev Immunol 2004;22:531-62.
22. Sakaguchi S, Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T. Regulatory T cells: how do they suppress immune responses? Int Immunol 2009;21:1105-11.
23. Kremer JM. Toward a better understanding of methotrexate. Arthritis Rheum 2004;50:1370-82.
24. Oh JS, Kim YG, Lee SG, So MW, Choi SW, Lee CK, et al. The effect of various disease-modifying anti-rheumatic drugs on the suppressive function of $CD4^{+}CD25^{+}$ regulatory T cells. Rheumatol Int 2013;33:381-8.
25. Kinoshita M, Kayama H, Kusu T, Yamaguchi T, Kunisawa J, Kiyono H, et al. Dietary folic acid promotes survival of Foxp3+ regulatory T cells in the colon. J Immunol 2012;189:2869-78.