

## THP-1 세포주의 대식세포 분화과정에서 DICAM에 의한 제 1형 인터페론 시스템의 억제

김보연<sup>1</sup> · 박 인<sup>1</sup> · 정연관<sup>2</sup> · 한민수<sup>2</sup> · 김건우<sup>1,2</sup> · 한승우<sup>1,2</sup>

대구파티마병원 류마티스내과<sup>1</sup>, 대구파티마병원 의학연구소<sup>2</sup>

### DICAM-mediated Inhibition of Type 1 Interferon System during Macrophage Differentiation of THP-1 Cells

Bo Yeon Kim<sup>1</sup>, In Park<sup>1</sup>, Youn Kwan Jung<sup>2</sup>, Min Su Han<sup>2</sup>, Gun Woo Kim<sup>1,2</sup>, Seung Woo Han<sup>1,2</sup>

Department of Internal Medicine, Daegu Fatima Hospital<sup>1</sup>,  
Laboratory for Arthritis and Bone Biology, Fatima Research Institute<sup>2</sup>, Daegu, Korea

**Objective.** We have previously shown that DICAM inhibits LPS-mediated macrophage differentiation. However, less is known about the exact action mechanisms of DICAM on the macrophage function and differentiation.

**Methods.** To induce differentiation into a resting M0 macrophage, THP-1 cells were cultured with 100 nM PMA for 24 h, and then rested for 3 days. THP-1 cells were infected with 50 moi of control LacZ- or DICAM-containing adenovirus. The RNA expression profile associated with DICAM during THP-1 differentiation was analyzed with a microarray chip and in silico analysis with Ingenuity Pathway Analysis (IPA) program.

**Results.** A disease and function analysis of the microarray data in DICAM-overexpressed THP-1 cells revealed a suppression in the expression of multiple genes involved in the response of myeloid cells and phagocytes, and an increase of genes associated with apoptosis of fibroblast cell-line, and viral infection and replication. The canonical pathway anal-

ysis also showed the most prominent changes of signaling pathways that involve inflammation responses. An upstream regulator analysis identifying molecules upstream of the genes that potentially explain the observed expression changes revealed that IRF7 and the genes in type 1 interferon system, such as IFNA2 and IFNAR, was significantly attenuated by DICAM. A mechanistic network analysis confirmed a direct causal association between IRF7 and type 1 interferon system. A real-time RT-PCR analysis validating the microarray data verified the significant suppression of IRFs, IFNA2, and IFNB1.

**Conclusion.** These results suggest that DICAM can be a critical regulator of type 1 interferon system, which is an essential mediator in the process of intracellular infection and systemic lupus erythematosus.

**Key Words.** DICAM, Interferon, Interferon regulatory factor, Macrophage, THP-1

## 서 론

대식세포는 탐식작용 및 사이토카인 분비를 통해 선천면

역뿐만 아니라 적응면역 과정의 주요 작용세포로 작용한다 (1). 뿐만 아니라 대식세포는 조직 재형성(tissue remodel-

<Received : March 31, 2014, Revised : May 4, 2014, Accepted : May 15, 2014>

Corresponding to : Seung Woo Han, Department of Internal Medicine, Daegu Fatima Hospital, 99, Ayang-ro, Dong-gu, Daegu, 701-724, Korea. E-mail: kief73@gmail.com

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

Copyright © 2014 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.

ing) 이나 대사기능의 조절 등에도 관여하여 인체의 항상성을 유지하는데도 작용한다 (2). 대식세포는 단핵구에서 분화되며 분화 환경에 따라 다양한 표현형을 가지는데, 크게 고전적 대식세포 분화인 M1 대식세포와 대체적 대식세포 분화인 M2 대식세포로 대별된다 (1,2). 이러한 명명은 Th1 세포 사이토카인인 인터페론- $\gamma$ 에 의해 M1 대식세포로 분화되고, Th2 사이토카인인 인터루킨-4, -13에 의해 M2 대식세포로 분화하는데 근거한다 (3). M1 대식세포는 IL-12<sup>high</sup>, IL-23<sup>high</sup>, IL-10<sup>low</sup>의 표현형을 가지며 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6와 같은 염증성 사이토카인 분비, 반응성 산소기(reactive oxygen)와 산화질소와 같은 질소 중간물(nitrogen intermediates)의 생산, Th1 반응의 촉진을 통해 염증 반응에 관여한다 (1). 반면 M2 대식세포는 IL-4와 IL-13에 의해 분화되어 Th2 면역반응과 알러지에 관여하는 M2a, 면역 복합체와 Toll양 수용체/인터루킨-1 수용체 리간드에 의해 분화되어 Th2 면역반응과 면역조절 반응에 주로 관여하는 M2b, 그리고 IL-10에 의해 분화되어 면역 조절과 조직 리모델링에 관여하는 M2c, 그리고 종양세포에 의해 유도되는 M2d TAM (tumor associated macrophages)의 이질적인 대식세포군을 통칭하여 사용된다 (4). 이러한 M2 대식세포는 IL-12<sup>low</sup>, IL-23<sup>low</sup>의 표현형을 공유하며, 스캐빈저(scavenger) 수용체와 만노스(mannose), 갈락토스(galactose) 수용체를 많이 발현하고, arginase의 발현을 통해 오르니틴(ornithine)과 폴리아민(polyamine) 생성이 증가된 알기닌 대사의 양상을 보인다 (5-7).

대식세포의 분화에는 염증 환경에서 증가되는 사이토카인이나 케모카인 등의 염증매개환경이 중요하게 관여한다 (1). 인터페론 패밀리는 대표적 염증성 사이토카인 군으로 제1형 인터페론인 인터페론- $\alpha$ , - $\beta$ 와 2형 인터페론인 인터페론- $\gamma$ , 그리고 3형인 인터페론- $\lambda$ 의 세가지 군으로 구성된다 (8). 인터페론 패밀리는 대식세포 분화, 특히 M1 분화에서 중요한 역할을 가진다 (9). Th1 세포의 주요 사이토카인인 인터페론- $\gamma$ 는 JAK/STAT1 신호를 통해 직접적으로 M1 대식세포 분화를 유도한다 (10). 뿐만 아니라 인터페론- $\gamma$ 는 TLR 리간드, TNF- $\alpha$  그리고 제1형 인터페론에 의한 대식세포의 반응을 증가시키는 감작(priming) 기능을 가진다 (11). 제1형 인터페론의 하나인 인터페론- $\beta$ 는 자가분비성(autocrine)으로 작용하여 인터페론- $\gamma$ 와 유사하게 M1 대식세포로의 분화를 유도한다 (12). 또한 제1형 인터페론은 제1형과 2형 인터페론 수용체의 발현을 통해 인터페론- $\gamma$  신호를 증가시키는 양성 되먹임 기전을 가진다 (13). 이러한 증거들은 대식세포 분화에서 인터페론 시스템이 핵심적 조절인자로 작용함을 의미하며, 현재까지의 연구는 Th1 사이토카인인 인터페론- $\gamma$ 에 집중되어 왔다 (1,2).

인터페론- $\alpha$ , - $\beta$ 로 구성되는 제 1형 인터페론 시스템은 바이러스나 결핵과 같은 세포 내 감염에 중요하게 작용한다. 이 과정에서 Toll양 수용체(Toll-like receptor; TLR)3, TLR7, RIG-I-유사 수용체(RIG-I-like receptor; RLR)가 패턴인지 수용체로 작용하며, 이들은 미토콘드리아-연관 연결분자(ada-

ptor molecule)인 미토콘드리아 항바이러스 신호단백(Mitochondrial antiviral-signaling protein; MAVS)과 상호작용하며 하부의 TBK1이나 IKK- $\epsilon$ 와 같은 키나아제를 통해 interferon regulatory factor (IRF)-3, -7, 그리고 NF- $\kappa$ B를 통해 1형 인터페론의 생산을 매개한다(Figure 3). 제 1형 인터페론 시스템의 생물학적인 중요성에도 불구하고 이를 조절하는 단백질이나 기전에 대한 연구는 아직 드문 실정이다.

DICAM (Dual Immunoglobulin domain containing Cell Adhesion Molecule)은 인간연골세포주인 HCS-2/8 세포의 cDNA 라이브러리 분석을 통해 발견한 새로운 부착단백으로, 면역글로불린 슈퍼페밀리의 CTX (cortex thymocyte marker in Xenopus) 그룹에 속한다 (14). 구조적으로 DICAM 단백질은 제 1형 막단백질로 N 말단에 신호 펩타이드와 두 개의 가변형 면역글로불린 유사 도메인과 하나의 막 통과 부분과 비교적 짧은 세포내 부분으로 구성된다 (15). DICAM의 작용에 대한 연구에서 인테그린  $\beta$ 3의 억제제를 통해 파골세포의 분화와 혈관신생을 감소시키는 작용을 확인하였다 (16,17). 파골세포 분화 연구 과정에서 단핵구에 DICAM을 과발현 시키면 M-CSF에 의한 대식세포로의 분화가 억제됨을 확인하였으며, 단핵구 세포주인 RAW264.7 세포의 LPS 자극에 의한 분화가 DICAM에 의해 감소됨을 보고하였다 (17,18). 특히 이 과정에서 M-CSF와 LPS에 의한 JNK MAP kinase 활성 감소와 칼슘신호전달에 중요한 ITAM 관련 수용체인 Trem2, Pira1, Oscar의 발현의 감소가 관여함을 확인하였다 (18). 그러나 이러한 결과는 DICAM에 의한 대식세포 분화 억제기전의 일부에 불과하며, 전반적인 DICAM의 작용기전에 대한 시스템적인 접근을 통한 분석은 아직 이루어진바 없다. 본 연구진은 단핵구 세포주인 THP-1 세포에 DICAM을 과발현시킨 후 대식세포로 분화시키며 유전자 발현 전반의 변화를 cDNA 마이크로어레이 기법으로 분석하였다. 이를 통해 DICAM이 대식세포 분화 과정에서 제 1형 인터페론 시스템을 억제함을 확인하였다.

## 대상 및 방법

### THP-1 세포의 대식세포 분화 및 DICAM 과발현

인간 단핵구 세포주인 THP-1 세포는 경북대학교 김인산 교수팀에서 공급받았으며, RPMI 1640 (Corning<sup>TM</sup>, MA)을 바탕으로 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS), 100  $\mu$ g/mL 스트렙토마이신, 100 U/mL 페니실린, 그리고 0.05  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol을 첨가한 배지에서, 37°C, 5% 이산화탄소 조건에서 배양하였다. THP-1 세포주는 단핵구와 대식세포의 중간단계의 세포로, 대식세포로 분화시키기 위해 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)를 처리하는 방법을 따랐다 (19). 간단히 기술하면, THP-1 단핵구세포주에 100 nM의 PMA (Sigma, SL)와 함께 50 moi의 Ad-DICAM과 Ad-LacZ를 배지에 첨가하여 하루 동안 배양하였다. 다음날 배지를 교체한 후 PMA가 들어있지 않은 10% RPMI 1640 배지에 2일에 한 번씩 배지를 교체하며 배양하였다.

### 마이크로어레이 분석

PMA와 함께 DICAM 또는 LacZ가 포함된 아데노바이러스를 하루 동안 처리한 후, 3일간 배양하여 THP-1세포의 전체 RNA를 Trizol 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA)을 이용하여 분리하였다. NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific TM, USA)와 Agilent사의 Bioanalyzer 2100을 이용하여 흡광도 A260/A280 비율이 1.8~2.1을 만족하고, RNA Integrity Number가 9.0 이상인 전체 RNA 200 ng을 cDNA 합성에 사용하였다. RNA로부터 cDNA의 합성, cDNA로부터 cRNA의 합성 및 cRNA로부터 단일 가닥의 cDNA를 합성하는 과정은 SuperScript II reverse transcriptase와 T7-(N)6 primer, Random primer를 포함하는 WT expression kit (Ambion)를 사용하여 수행하였다. 바이오틴으로 표지된 단일 가닥의 cDNA는 GeneChip® WT Terminal Labeling Kit (Affymetrix)로 37°C에서 60분간 효소처리하여 fragmentation을 실시한 후 Affymetrix GeneChip® Mouse Gene 1.0 ST array에 주입하여 혼성화 과정을 시행하였다. Affymetrix GeneChip® 스캐너 3000 (Affymetrix) 7G를 이용하여 각각의 칩으로부터 영상을 스캔한 뒤 Affymetrix Expression Console software (Ver 1.3)로 유전자 발현 수준에 대한 신호의 강도를 계산하였다. 마이크로어레이의 농도차이는 Avadis Prophetic 3.3 version software (Strand Genomics)를 이용해서 정상화 및 그룹화되었고, 2 fold change method K-means cluster를 이용하여 clustering 하였다. 마이크로어레이 데이터의 분석은 Ingenuity System 사의 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 프로그램(www.ingenuity.com)을 이용하였다.

### 실시간 중합효소연쇄반응(real-time RT-PCR) 분석

마이크로어레이 결과의 검증을 위해 실시간 중합효소연쇄반응(real-time PCR)을 이용하여 IRFs와 IFNA1, IFNA2,

IFNB1, IFNG의 RNA 발현을 확인하였다. THP-1 세포주에 Ad-DICAM과 Ad-LacZ 감염 후 4일 동안 배양한 후에 Trizol 시약을 이용하여 세포를 수확하였다. ELIPS Biotech Reverse Transcription prime kit (Daejeon, Korea)을 이용하여 2 µg의 전체 RNA를 20 µL의 반응용량의 cDNA로 역전사하였다. 실시간 중합효소연쇄반응을 위한 반응액의 조성은 1:20으로 희석한 cDNA 시료 4.0 µL, QuantiFast SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) 5.0 µL, 전방 및 후방 시발체(primer)를 각 0.2 µL (200 nM/L)씩, 그리고 핵산효소(nuclease)가 포함되지 않은 물을 0.6 µL 첨가하여 최종 부피를 10 µL 되게한 후 ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Life Technologies™, CA)을 이용하여 수행하였다. 분석에 이용된 시발체의 서열은 다음과 같다; IFNA1: Forward: GCC TCG CCC TTT GCT TTA CT, Reverse: CTG TGG GTC TCA GGG AGA TCA, IFNA2: Forward: GCT TGG GAT GAG ACC CTC CTA, Reverse: CCC ACC CCC TGT ATC ACA C, IFNB1: Forward: ATG ACC AAC AAG TGT CTC CTC C, Reverse: GGA ATC CAA GCA AGT TGT AGC TC, IFNG: Forward: TCG GTA ACT GAC TTG AAT GTC CA, Reverse: TCG CTT CCC TGT TTT AGC TGC. 실시간 중합효소연쇄반응 결과에 대한 통계 분석은 Mann-Whitney U로 비교 검정하였고,  $p < 0.05$ 를 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 정의하였다. 통계 처리는 PASW statistics version 18.0 (SPSS, Chicago, IL) 소프트웨어를 이용하였다.

## 결 과

### DICAM과발현에 의한 THP-1 세포주 유전자 발현의 변화

단핵구의 대식세포 분화에서 DICAM 과발현에 의한 유전자 발현의 차이를 확인하기 위해 인간단핵구 세포주인 THP-1 세포에 100 nM의 PMA를 처리하고, DICAM 유전자

**Table 1.** The 8 mostly affected category of disease and biologic functions by DICAM overexpression in THP-1 cells that was analyzed with Downstream Effects Analysis using IPA

| Category                               | Disease or functions annotation             | p-value* | Predicted activation state | Activation z-score <sup>†</sup> | #Molecules <sup>‡</sup> |
|----------------------------------------|---------------------------------------------|----------|----------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Cell-To-Cell Signaling and Interaction | Response of myeloid cells                   | 2.84E-05 | Decreased                  | -3.049                          | 25                      |
| Inflammatory Response                  | Response of phagocytes                      | 6.18E-06 | Decreased                  | -2.990                          | 28                      |
| Cell-To-Cell Signaling and Interaction | Response of phagocytes                      | 6.18E-06 | Decreased                  | -2.990                          | 28                      |
| Lipid Metabolism                       | Biosynthesis of polyunsaturated fatty acids | 1.30E-08 | Decreased                  | -2.951                          | 35                      |
| Cell Death and Survival                | Apoptosis of fibroblast cell lines          | 7.84E-06 | Increased                  | 3.126                           | 40                      |
| Infectious Disease                     | Viral Infection                             | 1.12E-09 | Increased                  | 3.095                           | 168                     |
| Infectious Disease                     | Replication of RNA virus                    | 1.33E-07 | Increased                  | 3.056                           | 62                      |
| Infectious Disease                     | Replication of virus                        | 3.98E-08 | Increased                  | 2.769                           | 68                      |

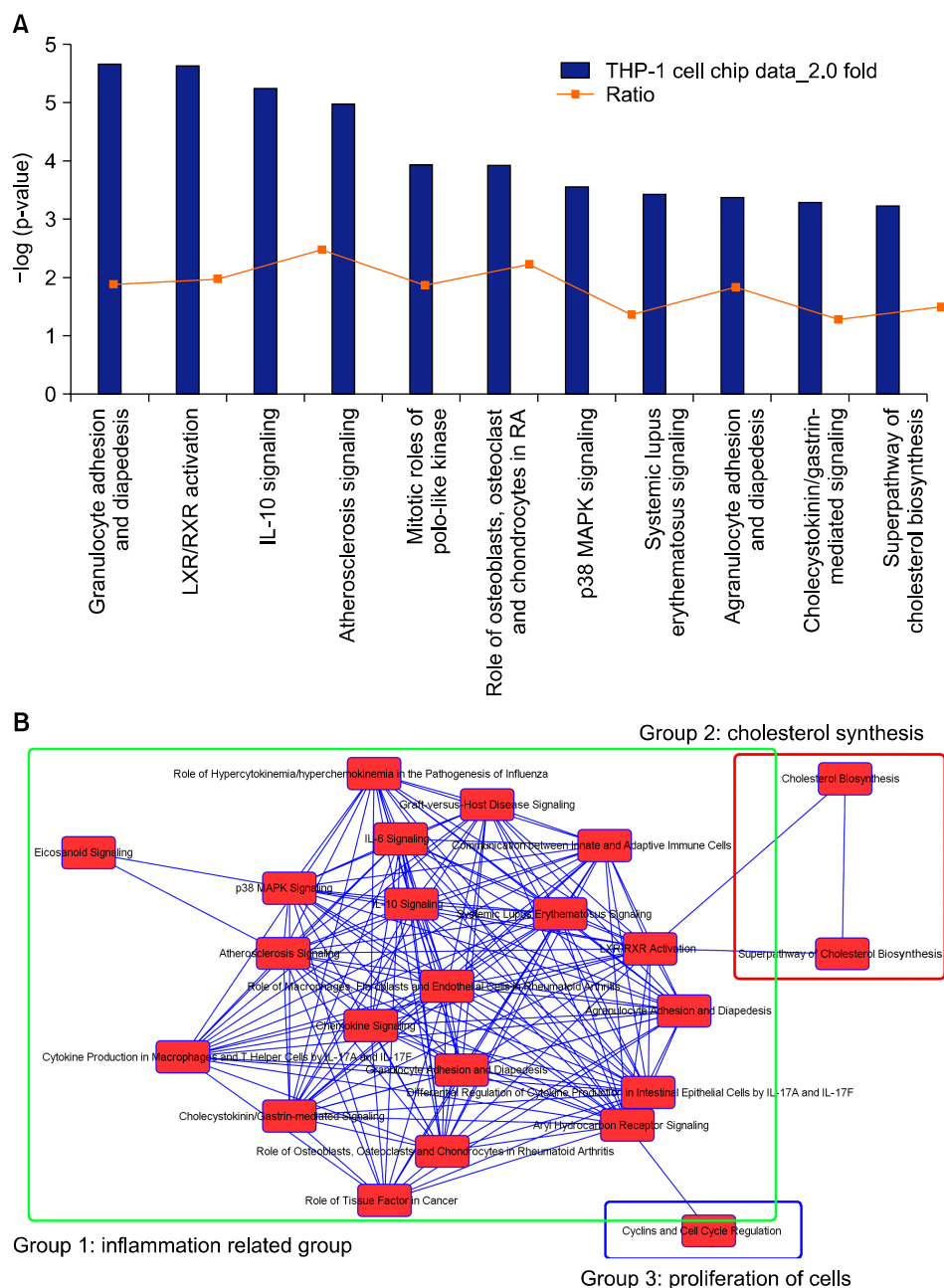
\*The p-value was calculated with the Fischer's exact test, and reflects the likelihood that the association between a set of genes in dataset and a related biological function is significant. <sup>†</sup>A positive or negative z-score value indicates that a function is predicted to be increased or decreased in THP-1 cells by DICAM overexpression. <sup>‡</sup>Number of RNAs differentially expressed in the disease and functions category.

와 대조군인 LacZ가 삽입된 아데노바이러스를 50 moi로 하루 동안 감염시켰다. 이후 PMA가 포함되지 않은 배지로 교체한 후 3일간 배양 한 후 전체 RNA를 추출하여 마이크로어레이 분석을 시행하였다. DICAM이 과발현된 THP-1 세포에서 대조군인 LacZ 과발현 세포와 비교하여 RNA의 발현이 2배 이상 증가된 유전자는 719개였으며, 2배 이상 감소된 유전자는 489개였다.

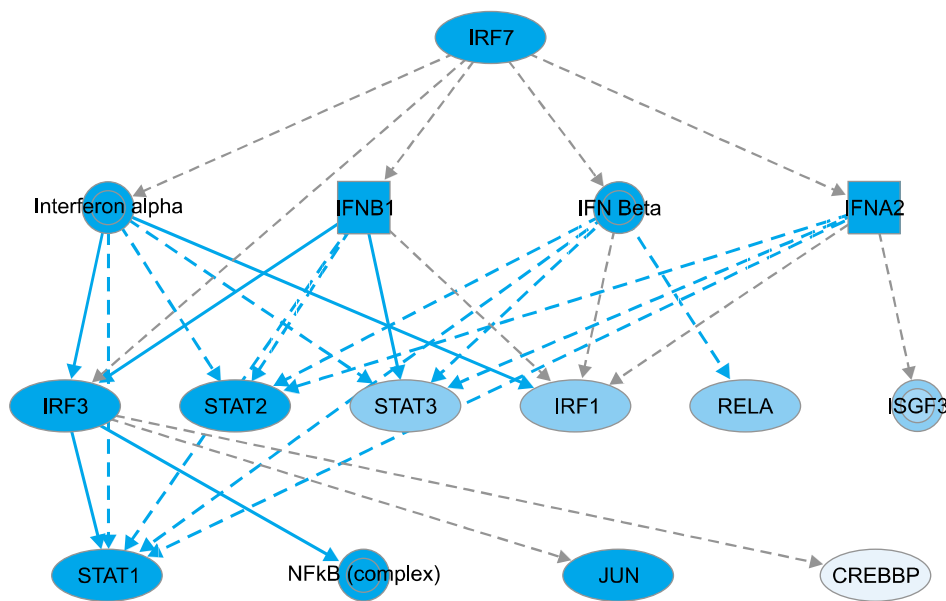
Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 프로그램을 이용하여 유전자 발현 변화에 따른 생물학적 변화 및 질병과의 연관성 (disease and function analysis; Downstream effect analysis)을 분석하였다. Table 1에 정리된 바와 같이 DICAM 과발현에 의해 골수양 세포(myeloid cell)의 반응(activated z-score  $-3.049$ ,  $p$

$<0.001$ )과 탐식세포 반응(z-score  $-2.990$ ,  $p<0.001$ )이 전반적으로 유의한 감소된 조건을 보였으며, 고도불포화 지방산 (polyunsaturated fatty acid)의 생합성(z-score  $-2.951$ ,  $p<0.001$ )도 유의하게 감소되었다. 반면 섬유모세포(fibroblast) 세포주의 세포자멸사(z-score  $3.126$ ,  $p<0.001$ )와 바이러스 감염(z-score  $3.095$ ,  $p<0.001$ )에 관계된 유전자들은 증가된 조건을 보였다. 그리고 RNA 바이러스 및 전체 바이러스 증식에 관계된 유전자들도 증가된 패턴을 보였다. 이러한 결과는 THP-1 단핵구 세포주에 DICAM이 과발현 될 경우 중성구와 대식세포를 포함하는 골수양세포의 작용 및 탐식이 감소되며, 바이러스 감염이 증가되는 양상으로 유전자 발현이 변화됨을 의미한다.

또한 신호전달계 분석(canonical pathway analysis)에서도



**Figure 1.** Top hits for canonical pathways of differentially expressed proteins by DICAM and their overlap connections. (A) The most highly represented canonical pathways of genes differentially expressed during the macrophage differentiation of THP-1 cells. The columns represent the  $-\log$  of the p-value calculated based on Fisher's exact test. The dot points represents the ratio of the number of genes in a given pathway that meet cut off criteria and total number of genes that make up that pathway. (B) The network of canonical pathways highlights the relationships between pathways and classify the functional domains.



**Figure 2.** IRF7-associated mechanistic networks of upstream regulators. IRF7, mostly suppressed by DICAM overexpression, is postulated to affect the expression of type I interferon and their downstream signaling molecules such as IRFs, STAT1/2/3 and RelA (p65). The set of total 15 regulators in mechanistic network has a connection with 187 dataset genes (not shown) among which 40 genes directly connect to IRF7. The blue color indicates a more confident predicted inhibition and the pale blue indicates a less confident predicted inhibition.

**Table 2.** The 12 mostly activated and inhibited upstream regulators by DICAM overexpression in THP-1 cells predicted by the Upstream Regulator Analysis in IPA

| Upstream regulator | Fold change | Molecule type                   | Predicted activation state | Activation z-score* | p-value of overlap <sup>†</sup> |
|--------------------|-------------|---------------------------------|----------------------------|---------------------|---------------------------------|
| IRF7               | -38.745     | Transcription regulator         | Inhibited                  | -5.247              | 2.70E-18                        |
| IFNA2              |             | Cytokine                        | Inhibited                  | -4.914              | 1.18E-15                        |
| Ifnar              |             | Group                           | Inhibited                  | -4.636              | 1.58E-18                        |
| Tretinoin          |             | Chemical - endogenous mammalian | Inhibited                  | -4.599              | 2.01E-19                        |
| IFNL1              |             | Cytokine                        | Inhibited                  | -4.463              | 4.80E-16                        |
| Lipopolysaccharide |             | Chemical drug                   | Inhibited                  | -4.345              | 4.02E-45                        |
| MYC                | 2.052       | Transcription regulator         | Activated                  | 5.330               | 4.19E-14                        |
| TRIM24             |             | Transcription regulator         | Activated                  | 4.208               | 7.73E-15                        |
| E2F1               |             | Transcription regulator         | Activated                  | 4.060               | 6.09E-13                        |
| INSIG1             | -6.816      | Other                           | Activated                  | 3.957               | 3.90E-13                        |
| TBX2               |             | Transcription regulator         | Activated                  | 3.900               | 4.44E-10                        |
| IL1RN              | -5.747      | Cytokine                        | Activated                  | 3.816               | 1.99E-11                        |

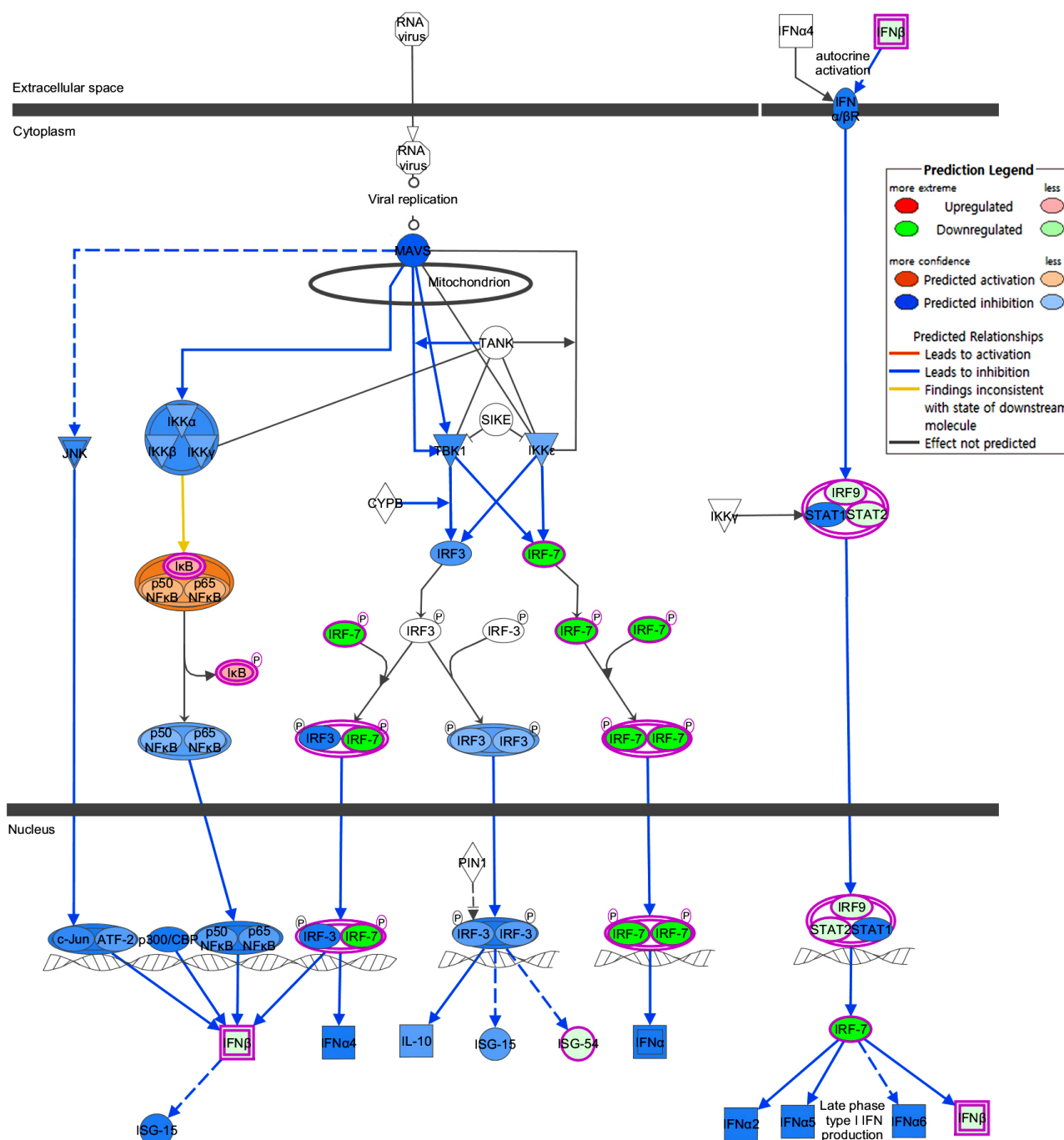
IRF7: interferon regulatory factor7, IFNA2: interferon alpha-2, Ifnar: interferon- $\alpha/\beta$  receptor, IFNL1: interferon lambda1, MYC: v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog, TRIM24: Tripartite Motif Containing 24, E2F1: E2F transcription factor 1, INSIG1: insulin induced gene 1, TBX2: T-box transcription factor2, IL1RN: interleukin-1 receptor antagonist. \*Based on a model that assigns random regulation directions for predicted upstream regulators ( $|z| > 2$ ).  $Z > 2$  predicts activation of the upstream regulator.  $Z < -2$  predicts inhibition of the upstream regulator. <sup>†</sup>The p-value of overlap was used to rank the significance associated for each Upstream Regulator. The p-value indicates the significance of the overlap between the genes targeted by the upstream regulator in the IPKB database and the experimental dataset.

골수양세포(granulocyte, agranulocyte)의 부착과 유주(diapedesis), IL-10 신호, p38 MAP kinase 신호와 같이 염증반응에 관련된 유전자의 변화를 보였고, 염증 반응이 중요한 죽상동맥경화증(atherosclerosis), 류마티스관절염, 전신홍반루푸스와 같은 질환에 관여하는 유전자 역시 유의한 차이를 보였다. 그리고 콜레스테롤 생합성에 관여된 신호전

달도 영향을 받았다(Figure 1A). 이러한 신호들을 상호 연관에 바탕하여 범주화 하였을때, 염증반응과 관계된 신호가 대부분을 차지하였고, 콜레스테롤 합성, 세포 증식에 관련된 Cyclin 발현이 DICAM에 의해 영향 받음을 확인할 수 있었다(Figure 1B).

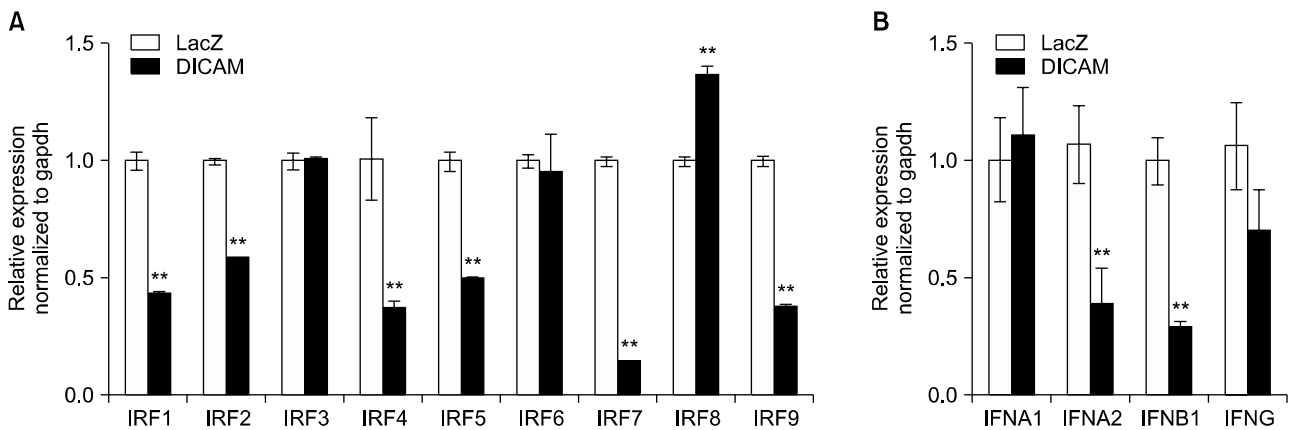
DICAM에 의해 조절되는 주요 상부 신호를 확인하기 위해 IPA 프로그램에서 Upstream Regulator Analysis를 시행하였다. Table 2에 정리된 바와 같이, DICAM을 과발현 시킨 경우 인터페론 신호와 관련된 interferon regulatory factor 7 (IRF7), Interferon- $\alpha$  2 (IFNA2), interferon (alpha, beta and omega) receptor (IFNAR), interferon, lambda 1 (IFNL1)이 가

장 많이 감소된 소견을 보였다. 그리고 비타민A의 카복시산 형태인 retinolin 처리에 관련된 신호 및 폐혈증과 관련된 lipopolysaccharide 하부 신호 역시 감소된 양상을 보였다. 증가된 신호전달계로는 전사인자인 MYC, Tripartite motif-containing 24 (TRIM24), E2F transcription factor 1 (E2F1), T-box transcription factor2 (TBX2)의 하부 신호와 관련된 유전자와, 콜레스테롤 합성에 관련된 Insulin in-



**Figure 3.** The predicted DICAM-mediated inhibition of IRF canonical pathway. The canonical pathway of IRF activation by cytosolic pattern recognition receptor is analyzed in silico using Molecule Activity Predictor analysis of IPA.





**Figure 4.** DICAM-mediated inhibition of IRFs and type I interferon system. The microarray data is validated with real-time RT-PCR analysis. In the presence of PMA 100 nM, THP-1 cells infected with adenovirus encoding DICAM or LacZ for 24 h, and then left unstimulated for 3 days. Real-time RT-PCR analysis of (A) IRFs mRNA and (B) type I interferon (IFNA1, IFNA2 and IFNB1) and type 2 interferon (IFNG).

duced gene 1 (INSIG1)과 interleukin-1 receptor antagonist (IL-1RA=IL1RN) 하부 유전자도 증가되었다(Table 2).

Upstream Regulator Analysis에서 DICAM에 의한 인터페론 관련 상부 신호의 억제에 근거하여, 가장 유의하게 감소된 IRF7과 관계된 상부 조절인자들의 연관 네트워크를 Mechanistic Networks 분석을 통해 확인하였다. IRF7의 감소는 제 1형 인터페론인 interferon- $\alpha$ , interferon- $\beta$  신호의 감소와 연관되었고, 이들의 하부인 IRF1, IRF3, STAT2, STAT3 및 canonical NF- $\kappa$ B 신호에 중요한 RELA (p65) 신호의 감소와 연관성을 보였다. 이들 하부에 NF $\kappa$ B 및 JUN 전사인자 신호도 감소됨을 확인하였으며, CREB-binding protein (CREBBP) 신호 역시 감소되는 것으로 예측되었다(Figure 2).

이상의 결과에 근거하여 IRF7 및 type I 인터페론 시스템이 중요하게 관여하는 세포질내 패턴인지수용체 신호전달의 변화를 IPA 프로그램의 Molecular Activity Predictor를 이용하여 확인하였다. DICAM의 과발현에 의해 IRF7의 유의한 감소 및 IRF3의 감소가 예측되었으며, I $\kappa$ B의 증가로 인한 canonical NF $\kappa$ B 신호의 억제가 예측되었다. 이들에 의한 초기 제 1형 인터페론의 생성 감소뿐 아니라, 후기 제 1형 인터페론의 억제도 예측되어, 전반적인 제 1형 인터페론 시스템의 억제가 예측되었다(Figure 3).

#### 대식세포 분화 과정에서 DICAM에 의한 인터페론 조절인자 및 인터페론의 발현 조절

마이크로어레이 분석 결과를 확인하기 위해 THP-1 세포주에 PMA를 처리하여 대식세포로 분화시키면서 DICAM을 아데노바이러스로 과발현하여 인터페론 조절인자 및 인터페론의 발현을 실시간중합효소연쇄반응을 통해 확인하였다. PMA 처리 후 4일째 RNA의 발현 변화를 확인하였을 때, DICAM 과발현시 인터페론 조절인자 패밀리 가운데

IRF1, IRF2, IRF4, IRF5, IRF7, IRF9의 발현이 유의하게 감소되었다. 인터페론의 발현을 확인하였을 때, 제 1형 인터페론인 인터페론- $\alpha$  2 (IFNA2)와 인터페론- $\beta$  1 (IFNB1)의 RNA 발현이 DICAM에 의해 유의하게 감소되었다. 반면 2형 인터페론인 인터페론- $\gamma$  (IFNG)의 발현은 유의한 차이를 보이지 않았다(Figure 4).

#### 고찰

본 연구에서 DICAM이 과발현된 THP-1 단핵구 세포주의 유전자 발현 패턴의 질병 기능 연관분석(disease and function analysis)에서 DICAM에 의해 골수양 세포(myeloid cell) 반응과 탐식세포 반응(response of phagocytes)이 유의하게 감소되고, 섬유모세포주의 세포자멸사나 바이러스 반응은 증가된 소견을 보였다. 신호전달계 분석(canonical pathway analysis)에서도 전반적으로 염증반응에 관계된 신호전달계의 변화가 현저하였다. 이를 매개하는 상부조절인자를 확인하기 위한 분석에서 IRF7과 관계된 제1형 인터페론 신호가 현저하게 감소된 소견을 확인할 수 있었고, 실시간중합효소 연쇄반응에서 재현할 수 있었다.

THP-1 세포에 DICAM을 과발현 시키고 대식세포로 분화시키는 조건에서, 상부조절인자(upstream regulator) 가운데 IRF7이 가장 현저하게 억제된 양상을 보였다. IRF7은 Ebstein-Barr 바이러스에 감염된 B 세포에서 EBNA1 유전자의 억제자로 처음 발견되었다 (20). 이후 연구에서 IRF3와 함께 제 1형 인터페론인 인터페론- $\alpha$ /- $\beta$ 의 발현을 조절하고, RANTES와 같은 케모카인의 분비를 증가시키는 것으로 알려졌다 (21-24). Lu 등은 U937 및 HL60과 같은 전단핵구(promonocyte) 세포주에서 PMA에 의한 대식세포 분화 과정에서 IRF7이 증가되고, IRF7 돌연변이 유전자를 도입할 경우 대식세포로의 분화 및 탐식능이 감소되고, IRF7을 과발현시키는 것만으로 단핵구의 대식세포로의

분화를 유도함을 밝혔다 (25). 최근 연구에 의하면 IRF7의 상부에 FOXO3가 억제인자로 존재하며, AKT 신호가 FOXO3의 활성도를 조절하는 것으로 보고되었다 (26). AKT 신호는 FOXO3의 인산화를 통한 유비퀴틴화를 증가시켜, 프로테아좀에서 FOXO3의 분해를 증가시키는 기전으로 FOXO3에 억제적으로 작용한다 (27,28). 본연구진은 선행 연구에서 DICAM을 과발현 시킬 경우 과골세포 및 혈관내피세포에서 AKT 신호전달이 공통적으로 억제된 것을 확인하였다 (16,17). DICAM에 의한 AKT 신호의 억제가 FOXO3를 증가시키고 핵으로 이동한 FOXO3가 IRF7의 억제자(repressor)로 작용하여 단핵구의 대식세포로의 분화가 억제될 가능성이 있으며, 추가적인 신호전달계에 관한 연구를 요한다.

단핵구는 대식세포로 분화하는 과정에서 M1이나 M2 대식세포의 표현형을 가지게 편향되게 분화된다 (1,2). 본 연구에서처럼 단핵구에 PMA를 처리한 후 일정시간 동안 PMA 없이 배양하여 대식세포로 분화시키는 방법이 단핵구 세포주의 대식세포로의 분화에 가장 많이 사용되며, 이 경우 만노스 수용체인 CD206과 스케빈저 수용체인 CD204를 많이 발현하는 M2 표현형을 가지는 대식세포로 분화하는 것으로 알려져 있다 (29). 이전 연구에서 저자들은 DICAM이 인테그린  $\beta 3$  신호의 억제 및 전체 인테그린  $\beta 3$  발현량의 감소를 통하여 과골세포의 분화 및 혈관신생에 억제적으로 작용함을 보고하였다 (16,17). 최근 연구에 의하면 인테그린  $\beta 3$ 가 결손된 생쥐의 골수에서 추출한 단핵구를 M-CSF 포함 배지에서 배양할 경우 대조군에 비해 TGF- $\beta$ 를 많이 생산하는 M2 표현형을 가지는 대식세포로 분화되는 양상을 보였다 (30). 이러한 결과는 DICAM에 의해 단핵구의 인테그린  $\beta 3$ 가 억제될 경우 M2 대식세포로 분화할 가능성을 시사한다. 또한 이러한 DICAM의 작용이 제 1형 인터페론의 감소에 의한 작용인가를 확인하는 추가적인 연구가 필요하다.

본 연구에서 DICAM은 단핵구/대식세포에서 제 1형 인터페론 관련 신호를 현저하게 억제하였다. 1형 인터페론은 거의 모든 세포에서 발현되며, 주로 세포질에서 DNA나 dsRNA에 반응하는 패턴인지 수용체의 활성화에 의해 생성된다 (31). 그리고 인터페론- $\beta$ 와 인터페론- $\alpha 4$ 에 의한 후기 제 1형 인터페론 생성을 통해 증폭되는 양성되먹임 기전을 가진다 (22,32). 제 1형 인터페론은 거의 모든 바이러스 감염 상황에서 초기에 효과적인 적응면역이 발생되기 이전에 세포내 바이러스 증식을 억제하는데 중요하게 작용하며, 특히 C형 간염이나 사람면역결핍 바이러스(HIV), 인플루엔자 감염과 같은 RNA바이러스 질환의 방어에 중요하게 작용한다 (31). 바이러스뿐만 아니라 제 1형 인터페론 시스템은 *Listeria*, *Mycobacteria*, *Brucella*, *Chlamydia*와 같은 세포내 감염되는 세균의 방어에도 중요하다 (31). 그리고 대표적인 자가면역질환인 전신홍반루푸스에도 제 1형 인터페론이 중요한 병리 작용을 가지는 것으로 알려져

있다. 루푸스 환자에서 1형 인터페론은 주로 말초수지상 세포에서 생산되며 (33), 활성 루푸스 환자의 말초혈액단핵구에서 제 1형 인터페론에 의해 유도되는 유전자군이 증가된 소견을 보였다 (34-36). 그리고 루푸스 동물모델인 NZB/NZW 생쥐에 인터페론- $\alpha$ 를 과발현하는 아데노바이러스를 주사할 경우 항dsDNA 항체가 유도되며, 사구체신염이 유도되었다 (37). 루푸스 환자의 말초단핵구에 자기 DNA나 RNA와 결합한 자가항체를 처리할 경우 Fc 수용체에 결합한 후 세포안으로 탐식되어 TLR7이나 TLR9을 통해 제 1형 인터페론의 생산을 증가시켰다 (33). DICAM에 의해 1형 인터페론의 조절 작용을 고려할 때 이상의 결과는 바이러스 및 결핵과 같은 세포내 세균감염뿐 아니라, 루푸스와 같은 자가면역질환에서 유전적으로 발현되는 DICAM의 양에 따라 1형 인터페론의 생산이 조절될 수 있고, 질병의 중증도나 예후를 예측할 수 있는 표지자로 사용될 수 있을 가능성을 시사한다. 그러나 본 연구는 아데노바이러스를 이용하여 세포내에서 발현될 수 없을 정도의 많은 DICAM단백을 인위적으로 과발현시켜 얻은 결과로 향후 knock down 실험을 통한 결과의 재현을 확인할 필요가 있다.

## 결론

DICAM은 junctional adhesion molecule (JAM) 패밀리와 유사한 세포부착분자로, 선행연구에서 LPS에 의한 대식세포로의 분화를 억제하는 바를 보고하였으나 기전에 대한 연구는 부족하였다. 마이크로어레이 결과를 IPA 프로그램으로 분석하였을 때, DICAM이 과발현된 THP-1 단핵구 세포주는 PMA에 의한 대식세포 분화 과정에서 골수양 세포반응과 탐식세포 반응이 유의하게 감소되었다. 신호전달계 분석에서도 전반적으로 염증반응에 관계된 신호전달계의 변화가 현저하였다. 이를 매개하는 상부조절인자를 확인하기 위한 분석에서 IRF7과 제 1형 인터페론 신호가 현저하게 감소된 양상을 확인할 수 있었고, 실시간 중합효소연쇄반응 분석에서 확인할 수 있었다. 이는 DICAM이 대식세포의 분화 양상을 결정하는데 관여하며, 제 1형 인터페론이 중요하게 작용하는 바이러스 감염이나 전신홍반루푸스와 같은 질환에서 중요한 조절인자로 작용할 가능성을 시사한다.

## 감사의 글

이 논문은 2011년도 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구입니다(과제번호: 2011-0007402).

## References

- Wynn TA, Chawla A, Pollard JW. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 2013;496:445-55.



2. Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 2010;32:593-604.
3. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:958-69.
4. Sica A, Schioppa T, Mantovani A, Allavena P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006;42:717-27.
5. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003;3:23-35.
6. Stein M, Keshav S, Harris N, Gordon S. Interleukin 4 potentially enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 1992;176:287-92.
7. Munder M, Eichmann K, Modolell M. Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4<sup>+</sup> T cells correlates with Th1/Th2 phenotype. *J Immunol* 1998;160:5347-54.
8. de Weerd NA, Nguyen T. The interferons and their receptors--distribution and regulation. *Immunol Cell Biol* 2012;90:483-91.
9. Hu X, Chakravarty SD, Ivashkiv LB. Regulation of interferon and Toll-like receptor signaling during macrophage activation by opposing feedforward and feedback inhibition mechanisms. *Immunol Rev* 2008;226:41-56.
10. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* 2011;11:750-61.
11. Hu X, Herrero C, Li WP, Antoniv TT, Falck-Pedersen E, Koch AE, et al. Sensitization of IFN-gamma Jak-STAT signaling during macrophage activation. *Nat Immunol* 2002;3:859-66.
12. Toshchakov V, Jones BW, Perera PY, Thomas K, Cody MJ, Zhang S, et al. TLR4, but not TLR2, mediates IFN-beta-induced STAT1alpha/beta-dependent gene expression in macrophages. *Nat Immunol* 2002;3:392-8.
13. Takaoka A, Mitani Y, Suemori H, Sato M, Yokochi T, Noguchi S, et al. Cross talk between interferon-gamma and -alpha/beta signaling components in caveolar membrane domains. *Science* 2000;288:2357-60.
14. Jung YK, Jeong JH, Ryoo HM, Kim HN, Kim YJ, Park EK, et al. Gene expression profile of human chondrocyte HCS-2/8 cell line by EST sequencing analysis. *Gene* 2004;330:85-92.
15. Jung YK, Jin JS, Jeong JH, Kim HN, Park NR, Choi JY. DICAM, a novel dual immunoglobulin domain containing cell adhesion molecule interacts with alphavbeta3 integrin. *J Cell Physiol* 2008;216:603-14.
16. Han SW, Jung YK, Lee EJ, Park HR, Kim GW, Jeong JH, et al. DICAM inhibits angiogenesis via suppression of AKT and p38 MAP kinase signalling. *Cardiovasc Res* 2013;98:73-82.
17. Jung YK, Han SW, Kim GW, Jeong JH, Kim HJ, Choi JY. DICAM inhibits osteoclast differentiation through attenuation of the integrin  $\alpha V \beta 3$  pathway. *J Bone Miner Res* 2012;27:2024-34.
18. Jung YK, Park HR, Lee EJ, Jeong DH, Kim GW, Choi JY, et al. DICAM Inhibits Activation of Macrophage by Lipopolysaccharide. *J Rheum Dis* 2012;19:196-205.
19. Stossi F, Madak-Erdogan Z, Katzenellenbogen BS. Macrophage-elicited loss of estrogen receptor- $\alpha$  in breast cancer cells via involvement of MAPK and c-Jun at the ESR1 genomic locus. *Oncogene* 2012;31:1825-34.
20. Zhang L, Pagano JS. IRF-7, a new interferon regulatory factor associated with Epstein-Barr virus latency. *Mol Cell Biol* 1997;17:5748-57.
21. Schindler U, Hoey T, McKnight SL. Differentiation of T-helper lymphocytes: selective regulation by members of the STAT family of transcription factors. *Genes Cells* 1996;1:507-15.
22. Marié I, Durbin JE, Levy DE. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J* 1998;17:6660-9.
23. Sato M, Suemori H, Hata N, Asagiri M, Ogasawara K, Nakao K, et al. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN-alpha/beta gene induction. *Immunity* 2000;13:539-48.
24. Génin P, Algarté M, Roof P, Lin R, Hiscott J. Regulation of RANTES chemokine gene expression requires cooperativity between NF-kappa B and IFN-regulatory factor transcription factors. *J Immunol* 2000;164:5352-61.
25. Lu R, Pitha PM. Monocyte differentiation to macrophage requires interferon regulatory factor 7. *J Biol Chem* 2001;276:45491-6.
26. Litvak V, Ratushny AV, Lampano AE, Schmitz F, Huang AC, Raman A, et al. A FOXO3-IRF7 gene regulatory circuit limits inflammatory sequelae of antiviral responses. *Nature* 2012;490:421-5.
27. Weidinger C, Krause K, Mueller K, Klagge A, Fuhrer D. FOXO3 is inhibited by oncogenic PI3K/Akt signaling but can be reactivated by the NSAID sulindac sulfide. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:E1361-71.
28. Yalcin S, Marinkovic D, Mungamuri SK, Zhang X, Tong W, Sellers R, et al. ROS-mediated amplification of AKT/mTOR signalling pathway leads to myeloproliferative syndrome in Foxo3(-/-) mice. *EMBO J* 2010;29:4118-31.
29. Tjiu JW, Chen JS, Shun CT, Lin SJ, Liao YH, Chu CY, et al. Tumor-associated macrophage-induced invasion and angiogenesis of human basal cell carcinoma cells by cyclooxygenase-2 induction. *J Invest Dermatol* 2009;129:1016-25.
30. Zhang L, Dong Y, Dong Y, Cheng J, Du J. Role of integrin- $\beta 3$  protein in macrophage polarization and regeneration of injured muscle. *J Biol Chem* 2012;287:6177-86.
31. Trinchieri G. Type I interferon: friend or foe? *J Exp Med* 2010;207:2053-63.
32. Tailor P, Tamura T, Kong HJ, Kubota T, Kubota M, Borghi P, et al. The feedback phase of type I interferon

- induction in dendritic cells requires interferon regulatory factor 8. *Immunity* 2007;27:228-39.
33. Rönnblom L, Alm GV, Eloranta ML. Type I interferon and lupus. *Curr Opin Rheumatol* 2009;21:471-7.
34. Banchereau J, Pascual V. Type I interferon in systemic lupus erythematosus and other autoimmune diseases. *Immunity* 2006;25:383-92.
35. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Ortmann WA, Espe KJ, et al. Interferon-inducible gene expression signature in peripheral blood cells of patients with severe lupus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:2610-5.
36. Bennett L, Palucka AK, Arce E, Cantrell V, Borvak J, Banchereau J, et al. Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. *J Exp Med* 2003;197:711-23.
37. Mathian A, Weinberg A, Gallegos M, Banchereau J, Koutouzov S. IFN-alpha induces early lethal lupus in pre-autoimmune (New Zealand Black x New Zealand White) F1 but not in BALB/c mice. *J Immunol* 2005;174:2499-506.