

요추 추간판 탈출증에서의 AITR 과
AITRL 의 특성

연세대학교 대학원
의 학 과
박 문 수

요추 추간판 탈출증에서의 AITR 과
AITRL 의 특성

지도 교수 한 수 봉

이 논문을 박사 학위 논문으로 제출함

2005 년 12 월 일

연세대학교 대학원

의학과

박 문 수

박문수의 박사 학위논문을 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2005년 12월 일

감사의 글

이 논문을 완성하기 까지 세심한 배려와 격려로 지도하여 주신 한수봉 교수님께 무한한 감사를 드리며, 논문 심사 중 훌륭한 지적으로 방향을 잡아주신 이환모 교수님, 윤도흠 교수님, 문성환부교수님, 박병우 부교수님께 충심으로 감사 드립니다.

저자 씀

차 례

국문요약	1
I. 서 론	3
II. 연구 대상 및 방법	7
1. 연구 대상	7
2. 연구 방법	7
가. 세포의 분리 및 배양	8
나. 항체 및 시약	8
다. 유세포분석	9
라. 공초점 형광 현미경	10
마. 면역조직화학염색법	10
바. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction	11
사. Enzyme-linked immunosorbent assay ...	12

아. 통계처리	13
III. 결 과.....	14
IV. 고 찰.....	26
V. 결 론.....	30
참고문헌.....	31
영문요약	42

그림 차례

Figure 1. Expression of AITR and AITRL in the disc cells by the flow cytometric analysis	14
Figure 2. Expression of AITR and AITRL in the PBMC by the flow cytometric analysis	16
Figure 3. Expression of CD68 ⁺ dendritic cells including macrophages in the flow cytometric analysis.....	18
Figure 4. Expression of CD4 ⁺ CD25 ⁺ T cells in the flow cytometric analysis.....	20
Figure 5. AITR and AITRL in the patients with lumbar disc herniation expressed by	

confocal laser microscopy..... 21

Figure 6. AITR and AITRL in the patients with
lumbar disc herniation expressed by the
immunohistochemical staining..... 22

Figure 7. Representative RT-PCR derived from mRNA
of tissue cell and PBMC..... 23

표 차례

Table 1. Quantitative analysis of serum concentrations of soluble AITR (sAITR), soluble AITRL (sAITRL), IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α and IL-1 β between normal control groups and disc herniation groups.....	25
--	----

국문요약

요추 추간판 탈출증에서의 AITR 과 AITRL 의 특성

요추 추간판 탈출증은 정형외과 질환 중 가장 흔하며 요통 및 하지 방사통을 유발한다. 추간판 탈출증에서 병리 기전은 기계적인 압박, 염증 반응, 자가 면역 반응, apoptosis 등으로 보고된다. 자가 면역 반응의 발생 기전에서 중요한 역할을 하는 면역 조절 T 세포(regulatory T cell)에서 발견된 공동 자극 분자(costimulatory molecule)로서 세포 표면 수용체인 AITR(human, activation inducible tumor necrosis factor receptor[TNFR], GITR : murine, glucocorticoid induced TNFR)이 최근 주목 받고 있다. 동물 실험 결과에서 GITR에 신호를 보내는 항진성(agonistic) anti-GITR 단클론항체를 주입하면 면역 조절 T 세포의 기능이 저하되어 자가 면역 증상이 유발되었으며, 다량의 AITRL(AITR ligand)이 자가 면역 질환의 일종인 류마티스 관절염 환자의 관절 활막 세포에 발현되는 것이 관찰되었다. 따라서, AITR과 AITRL은 추간판 탈출증과 같은 자가 면역 질환의 병태 생리와 연관성이 있을 것으로 추정되나, 현재까지 요추 추간판 탈출증과 관련한 AITR과 AITRL의 발현 특성에 대한 연구는 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구는 요추 추간판

탈출증 환자의 추간판 조직과 혈액에서 AITR과 AITRL의 발현 특성을 조사하고자 하였다. 대상 환자를 요추 추간판 탈출증 환자군 (실험군, 20예)과 척추 골절 환자군 (대조군, 5예)으로 분류하여 비교하였다. 추간판 탈출증 환자의 추간판 조직 및 말초 혈액으로부터 분리된 세포에서의 AITR과 AITRL의 발현 특성을 유세포분석 (flow cytometric analysis), 공초점 형광 현미경(confocal laser fluorescent microscope), 면역조직화학염색법(immunohistochemistry), reverse transcriptase-polymerase chain reaction(RT-PCR), enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)을 이용하여 분석하였다. 유세포분석, 공초점 형광 현미경, 면역조직화학염색법으로 조사한 결과 실험군이 대조군보다 AITR과 AITRL의 발현이 증가하였다. AITRL의 mRNA는 실험군에서는 발현이 관찰되었으나, 대조군에서는 관찰이 되지 않았고 AITR의 mRNA는 실험군 및 대조군 모두에서 관찰이 되지 않았다. 혈청내 soluble AITR, soluble AITRL, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α 는 실험군이 대조군보다 높았으나, IL-1b 는 차이가 없었다. 요추 추간판 탈출증 환자의 추간판 조직과 혈액에서 AITR과 AITRL의 발현이 증가하였다.

핵심 되는 말 : 요추 추간판 탈출증, 공동 자극 분자

요추 추간관 탈출증에서의 AITR 과 AITRL 의 특성

<지도 교수 한수봉>

연세대학교 대학원 의학과

박 문 수

I. 서 론

요추 추간관 탈출증은 정형외과 질환 중 가장 흔하며 요통 및 하지 방사통을 유발한다.¹ 추간관 탈출증에서 통증의 발생 기전은 기계적인 압박, 염증 반응, 자가 면역 반응 등으로 보고되고 있다.² 염증 반응과 관련하여 대식세포(macrophage), 수지상세포(dendritic cell) 등 염증 세포의 추간관 조직내로의 침윤이 보고되었으며^{3,4} prostaglandin E₂, interleukin-1-alpha (IL-1 α), interleukin-8 (IL-8), tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), basic fibroblast growth factor (BFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) 등 다양한 염증성 사이토카인 (inflammatory cytokine)에 대하여 보고되었다.⁵⁻¹⁰ 현재 TNF- α 에 대한 monoclonal chimeric antibody를 이용한 recombinant biologic anti-TNF- α therapeutic을 시행하여 rat 동물

실험 및 추간관 탈출증 환자의 임상 실험에서 전기 생리적 호전과 통증 감소 효과까지 보고되고 있다.¹¹⁻¹⁴

요추 추간관 탈출증은 자가 면역 반응이 아닌 단순 염증 반응이라는 보고도 있으나,² 탈출한 수핵 (nucleus pulposus)은 인체내 이물질로 인식되어 자가 면역 반응을 유발한다고 보고되고 있으며 추간관 탈출증 환자의 추간관 조직과 혈청에서 다량의 immunoglobulin이 관찰되었다.¹⁵⁻²⁰ 자가 면역 반응에서 시발점은 항원 제시 세포(antigen presenting cell; 수지상세포, 대식세포 등)에 의해 항원이 포획된 후 T 세포에 항원을 제공하면서부터 시작되는데 T 세포 수용체 (T cell receptor)로의 신호 전달(signal transduction)을 통해 T 세포의 활성화 (activation)가 이루어진다. T 세포로의 항원 제시 세포에 의한 1차 신호 전달 외 T 세포 표면에 존재하는 다양한 부속 분자들 (accessory molecules)에 의한 2차적인 신호 전달이 T 세포를 활성화 시킴으로써 실제적인 면역반응이 이루어지게 되는데 이런 부속 분자를 공동 자극 분자 (costimulatory molecule)이라고 한다. 대다수 자가 면역 반응에서는 병원성 자가 항원 반응성 T 세포(pathogenic autoreactive T cell)가 병태 생리에 중요한 역할을 한다. 면역 조절 T 세포 (CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell)는 자가 항원 반응성 T 세포를 억제함으로써 자가 면역 반응을 조절하는 세포 집단으로 최근 면역 반응의 자가 항상성 (self-tolerance) 유지에 중요한 역할을 하는 것

으로 보고되고 있다.²¹⁻²³ 면역 조절 T 세포의 표면에 존재하는 공동 자극 분자는 면역 조절 T 세포의 활성화를 억제하는 역할을 한다고 보고된다.^{24,25} 즉, 면역 조절 T 세포의 표면에 존재하는 공동 자극 분자의 신호전달을 차단 (blocking)하면 면역 조절 T 세포의 기능이 활성화되어 병원성 자가 항원 반응성 T 세포의 기능이 억제됨으로써 자가 면역 반응을 치료할 수 있다.^{26,27}

최근 면역 조절 T 세포 표면에 발현되는 중요한 공동 자극 분자로 세포 표면 수용체인 AITR(human, activation inducible tumor necrosis factor receptor[TNFR], GITR : murine, glucocorticoid induced TNFR)에 대한 연구가 주목 받고 있다.^{28,29} GITR는 TNFR superfamily의 일종으로 면역 조절 T 세포에서 주로 발현되지만 다른 T 세포들 (CD25⁻CD4⁺ T, CD8⁺ T, B cell)이나 대식세포에서도 발현되는 것으로 알려져 있으며 T 세포 활성화시 발현이 더욱 증가된다.³⁰ Human AITR는 murine GITR과 아미노산 배열에서 55%의 identity를 가지며 사람의 임파절 (lymph node), 말초 혈액의 백혈구 (peripheral blood leukocyte)에서 관찰된다.³⁰ AITR Ligand (AITRL)는 TNF superfamily의 일종이며 AITR과 상호작용을 하는데 주로 혈관 내피 세포에서 관찰된다.³⁰ 따라서 AITR과 AITRL은 활성화된 T 세포와 혈관 내피 세포 사이의 상호 작용에 중요한 역할을 한다.³⁰ 동물 실험 결과에 의하면 GITR에 신호를 보내는

항진성(agonistic) anti-GITR 단클론항체를 주입하면 면역 조절 T 세포의 기능이 저하되어 자가 면역 증상이 유발되었으며^{24,29} AITRL의 과발현 (overexpression)이 자가 면역 질환의 일종인 류마티스 관절염 환자의 관절 활막 세포(fibroblast-like synoviocyte)에 발현되는 것이 관찰되었다 (unpublished data). 따라서 AITR과 AITRL은 추간판 탈출증과 같은 자가 면역 질환의 병태 생리와 연관성이 있을 것으로 추정되며, AITR과 AITRL의 상호 작용 차단을 통한 면역 조절이 이러한 질환을 치료할 수 있는 치료제를 개발하는데 좋은 단서를 제공할 가능성이 높을 것으로 기대된다. 그럼에도 불구하고 현재까지 요추 추간판 탈출증과 관련한 AITR과 AITRL의 발현특성이나 생물학적 기능, 면역 반응 조절 기전, 병태 생리 및 치료제로서의 가능성 등에 대한 연구는 거의 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구는 요추 추간판 탈출증 환자의 추간판 조직과 혈액에서 AITR과 AITRL의 발현 특성을 조사하고자 한다.

II. 연구 대상 및 방법

1. 연구 대상

요추 추간판 탈출증 환자군 (실험군, 20예)과 척추 골절 환자군 (대조군, 5예)으로 분류하여 비교하였다. 요통 및 하지 방사통을 가진 환자 중 자기 공명 영상 검사에서 추간판의 탈출이 확인되고 추간판 제거술 후 술 전 통증이 호전된 환자를 실험군으로 하였다. 실험군은 추간판의 변성 변화 유무와는 관련 없이 요추 추간판 섬유륜의 파열에 따른 수핵 탈출이 확인된 환자로 제한하였다. 평균연령은 38세(28-42세)이고, 남자 10명, 여자 10명이었다. 대조군은 흉요추 골절로 인하여 추간판 제거술 및 척추 전방 골유합술이 필요하고 자기 공명 영상 검사에서 추간판이 정상으로 확인된 환자로 제한하였다.¹⁷

2. 연구 방법

모든 환자에서 추간판 조직, 말초 혈액 등의 시료를 이용하여 AITR과 AITRL의 발현 특성을 조사하였다. 추간판 조직 및 말초 혈액으로부터 분리된 세포에서의 AITR과 AITRL의 발현 특성을 유세포분석 (flow cytometric analysis), 공초점 형광

현미경(confocal laser fluorescent microscope), 면역조직화학염색법(immunohistochemistry), reverse transcriptase-polymerase chain reaction [RT-PCR], enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)을 이용하여 분석하였다.

가. 세포의 분리 및 배양

수술시 얻어진 추간판 조직을 마쇄한 후 0.4% (w/v) collagenase type II와 0.25% (w/v) trypsinase를 처리하여 다양한 면역 세포 (infiltrated T 세포; 면역 조절 T 세포, B 세포, 대식세포, 수지상세포, 단핵구 등)와 조직 세포 (fibroblast cells, chondroblast cells 등)를 분리하였다. 분리된 추간판 세포들은 10% fetal bovine serum(FBS)와 항생제가 첨가된 RPMI-1640 배양액을 이용하여 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 말초 혈액에서 Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation 방법에 의해 단핵세포 (PBMC; peripheral blood mononuclear cell)를 분리하였다.

나. 항체 및 시약

AITR 항체(anti-AITR mAb; clone 621), AITRL 항체(anti-AITRL mAb: clone CE2)를 ImmunoMics Co.(Ulsan, Korea)로부터 구입하였으며 fluorescein-isothiocyanate (FITC)를

부착(conjugation) 시킨 후 유세포분석, 공초점 형광 현미경, 면역조직화학염색법, ELISA의 시약으로 사용하였다. CD4, CD8, CD19, CD 14, CD55, CD68에 대하여 phycoerythrin (PE)을 부착시킨 항체(monoclonal antibody : mouse IgG1)를 사용하였고 CD25에 대하여 Cy을 부착시킨 항체(monoclonal antibody : mouse IgG1)를 사용하였다(R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). T 세포 표면 표식자로는 CD4와 CD8을, B 세포 표면 표식자로는 CD19을, 단핵구 표면 표식자로는 CD14을, 수지상세포 표면 표식자로는 CD68을, fibroblast cell 표면 표식자로는 CD55을 사용하였다.

다. 유세포분석 (flow cytometric analysis)

추간관 세포에서의 AITR과 AITRL의 발현특성을 조사하기 위해 배양된 추간관 세포를 1× Trypsinase-EDTA로 분리한 후 2% BSA와 0.1% NaN₃ 가 포함된 1×phosphate buffered saline(PBS)으로 세척하였다. 이를 AITR 항체와 AITRL 항체로 염색한 다음 유세포분석기(FACSCalibur)를 이용하여 발현정도를 조사하였으며, 결과는 CellQuest software (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. AITRL의 과발현이 면역 조절 T 세포의 기능을 억제하기 때문에 T 세포뿐만

아니라 항원 제시 세포(수지상세포, 대식세포) 및 추간판 조직 세포와 같은 비항원 제시 세포에서의 AITR과 AITRL의 발현 특성을 분석하였다. 말초 혈액으로부터 분리된 세포에 대하여도 동일한 방법으로 발현정도를 조사하였다.

라. 공초점 형광 현미경

(confocal laser fluorescent microscope)

추간판 세포를 일주일간 단층 배양을 시행한 후 건조된 표본을 4° C에서 10분간 acetone에 고정한 다음 비특이 반응을 줄이기 위해 10% normal human serum과 4% BSA 용액으로 1시간 처리하였다. 이를 PBS로 세척한 후 1/100으로 희석된 FITC를 부착시킨 AITR 항체와 AITRL 항체로 실온에서 1시간 염색한 다음 PBS로 세척한 후 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany)을 사용하여 관찰하였다. 음성대조군으로 IgG isotype 염색을 실시하였다.

마. 면역조직화학염색법(immunohistochemistry)

추간판 조직의 조직 절편을 제작하고 세포 표면 표식자 및 AITR과 AITRL의 항체를 이용하여 면역 염색 후 조직에서의 AITR과 AITRL의 발현 특성을 조사하였다. 모든 추간판 조직은

Tissue-Tek OCT compound를 이용하여 dry ice-chilled isopentane에서 frozen tissue block으로 제작되었으며 80° C에 보관하면서 차후의 실험재료로 사용하였다. Cryostat를 이용하여 6 μ m 두께의 serial sections을 하였으며 SuperFrost Plus slide 위에 도말하여 실온에서 건조시켰다. 건조된 표본은 4° C에서 10분간 acetone에 고정한 다음 비특이 반응을 줄이기 위해 10% normal human serum과 4% BSA 용액으로 1시간 처리하였다. 이를 PBS로 세척한 후 1/100으로 희석된 FITC를 부착시킨 AITR 항체와 AITRL 항체로 실온에서 1시간 염색한 다음 PBS로 세척한 후 confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany)을 사용하여 관찰하였다. 또한 제작된 조직절편은 hemaxylin으로 counterstaining하여 Zeiss Axiophot photomicroscope으로 관찰하였다. 음성대조군으로 IgG isotype 염색을 실시하였다.

바. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction

(RT-PCR)

역전사 반응과 PCR은 RNeasy kit (Qiagen, Countaboeuf, France)을 사용하였다. 반응을 위해 주형 RNA, 0.2 μ M의 primer 을 사용하였다(AITRL: 5' -AAG CTG TGG CTC TTT TGC TC - 3' ; 5' -GAA TTG GGG ATT TGC CAG TA-3' ; β -actin:

5' - GGT CTC AAA CAT GAT CTG GG-3' ; 5' - GGG TCA
GAA GGA TTC CTA TG-3').

반응조건으로는 50 ° C에서 20분간 cDNA 합성을 하고 95 ° C에서
30초간 pre-denature 시켰고, PCR 증폭을 위해서는 95 ° C에서
0초간 denature 시켜서 56 ° C 에서 60초간 annealing, 72 ° C에서
60초 동안 수행하는 조건으로 40회 반복하였다. PCR 수행을 위해
GeneAmp PCR System 2400 기계를 사용하였고, RT-PCR 산물은
1% agarose gel에서 전기영동하여 확인하였다.

사. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

TNF superfamily 계열의 공동 자극 분자들은 수용성 isoform을
가지며 혈청을 통해 순환하게 되는데 주로 염증 반응과 관련되는
것으로 알려져 있다. 말초 혈액으로부터 혈청을 분리한 후 AITR과
AITRL의 soluble isoform인 sAITR과 sAITRL를 검출하기 위해
ELISA를 실시하였다. 검출을 위한 ELISA kit는 AITR 항체와
AITRL 항체의 서로 다른 2개의 clones, 즉 coating을 위한 AITR
항체와 AITRL 항체와 detection을 위해 biotin을 부착한 항체를
이용하여 ELISA kit를 제작하였다. ELISA 방법은 다음과 같다. 먼저
Nunc Maxisorb ELISA plate에 1 µg/ml의 AITR 항체와 AITRL
항체를 0.05M NaHCO₃ 완충액을 이용하여 4°C에서 overnight

coating 하였다. 이를 0.1% Tween 20이 첨가된 PBS로 3회 세척한 후 4% BSA 용액으로 37 °C에서 1시간 동안 blocking 하였으며, 이후 혈청을 0.1% Tween 20과 1% BSA가 첨가된 PBS를 이용하여 3배 희석한 다음 blocking된 plate에 넣어주었고 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 이후 0.1% Tween 20이 첨가된 PBS로 3회 세척한 후 biotinylated antibody를 넣고 실온에서 2시간 반응시킨 다음, 반응된 plates를 세척하였다. 끝으로 반응이 끝난 plate에 TMB peroxidase 기질용액(Endogen, BD Biosciences)을 넣어 실온에서 20분간 충분히 발색시킨 후 0.1N H₂SO₄ 용액으로 반응을 정지시켰으며 OD₄₅₀ nm 흡광도에서 발색농도를 측정하였다. 재조합 AITR 단백질(AITR-GST recombinant protein)과 재조합 AITRL 단백질(AITRL-GST recombinant protein)을 이용하여 농도값 계산을 위한 기준치(standard)로 사용하였다. 또한 혈청내 존재하는 염증성 사이토카인들을 동일한 방법으로 검출하였다.

아. 통계처리

통계학적 분석은 윈도우용 SPSS 통계분석 프로그램 10을 이용하여 시행하였다. 통계처리는 student *t*-test 를 이용하였고, $P < 0.05$ 시 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

III. 결 과

AITR 과 AITRL 의 발현은 추간판 조직에서 분리된 세포에 대하여 유세포분석을 시행한 결과 대조군보다 실험군에서 높았다(AITR : $12.15 \pm 5.16 \%$ versus $6.38 \pm 1.45 \%$, $P = 0.04$, AITRL : 39.43 ± 8.57 versus $18.51 \pm 6.01 \%$, $P = 0.01$)(Figure 1).

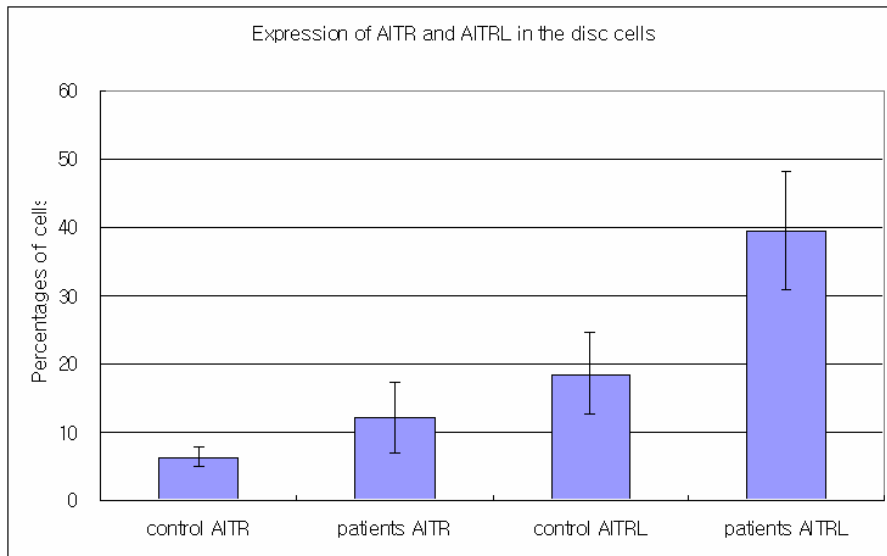


Figure 1. Expression of AITR and AITRL in the disc cells by the flow cytometric analysis. In the flow cytometric analysis the patients with lumbar disc herniation (patients) had significantly higher levels than did normal controls (control) expressed as percentages of cells from disc tissue.

말초 혈액으로부터 분리된 단핵 세포에 대하여 유세포분석을 시행한 결과에서도 AITR 과 AITRL 의 발현 정도는 대조군보다 실험군에서 높았다(AITR : resting state 10.36 ± 5.51 % versus 2.38 ± 1.37 %, $P=0.01$, stimulated state 27.79 ± 8.54 % versus 9.30 ± 3.40 %, $P = 0.01$, AITRL : resting state 23.15 ± 3.78 % versus 16.02 ± 4.45 %, $P = 0.01$, stimulated state 45.00 ± 10.75 % versus 24.36 ± 5.10 %, $P =0.01$)(Figure 2). 다른 세포 마커인 CD4, CD8, CD19, CD14, CD55 의 발현은 추간관 조직에서 분리된 세포와 말초 혈액으로부터 분리된 단핵 세포 모두에서 유세포분석상 실험군과 대조군간에 차이가 없었다(data not shown).

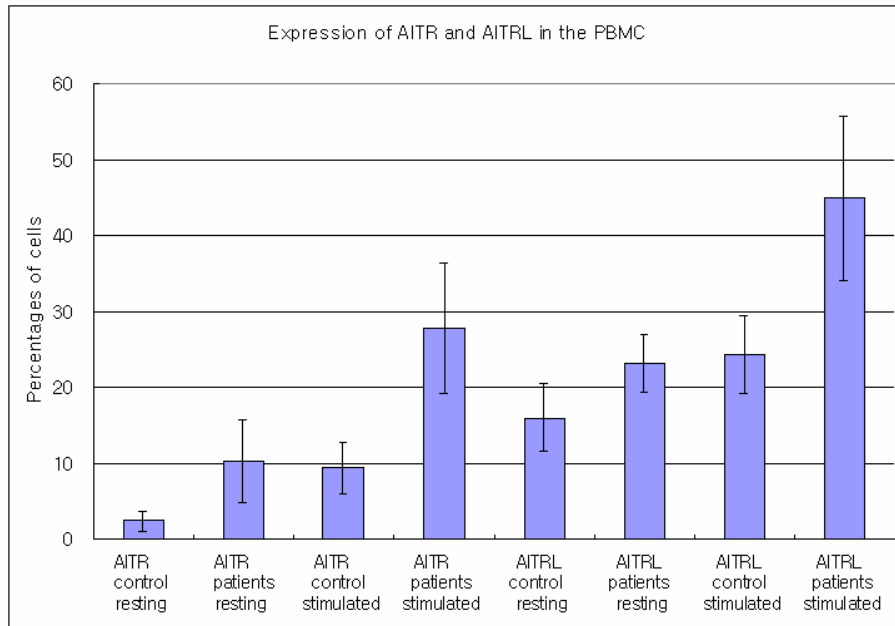


Figure 2. Expression of AITR and AITRL in the PBMC by the flow cytometric analysis. In the flow cytometric analysis of AITR and AITRL the patients with lumbar disc herniation (patients) had significantly higher levels than did normal controls (control) expressed as percentages of peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

수지상세포의 발현은 추간관 조직에서 분리된 세포에서 유세포분석을 시행한 결과 대조군보다 실험군에서 증가하였다(mean \pm standard deviation(SD), 12.11 ± 3.84 % versus 6.22 ± 1.18 %, $P = 0.02$) (Figure 3). 말초 혈액으로부터 분리된 단핵 세포에 대하여 유세포분석을 시행한 결과에서도 수지상세포의 발현은 대조군보다 실험군에서 증가하였다(resting state 8.21 ± 0.91 % versus 0.57 ± 0.45 %, $P = 0.001$, stimulated state 13.56 ± 1.79 % versus 0.64 ± 0.54 %, $P = 0.002$)(Figure 3).

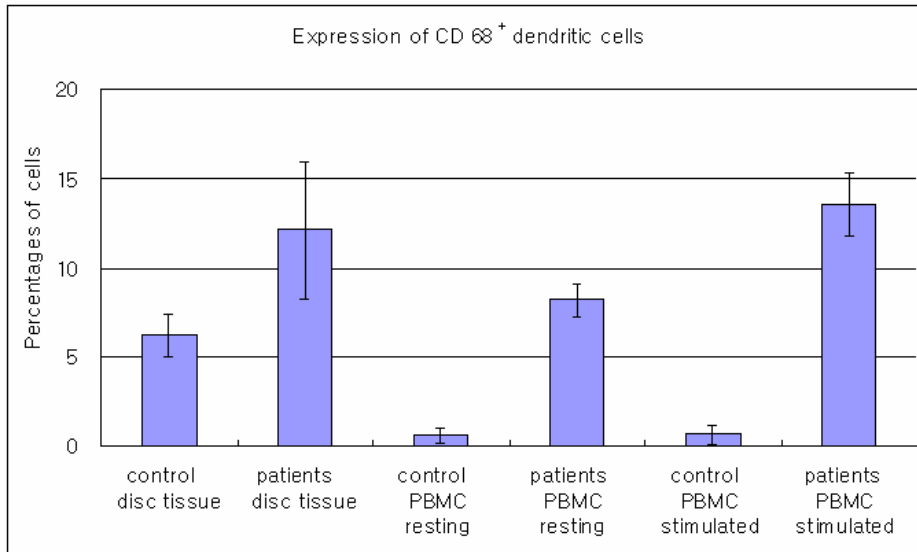


Figure 3. Expression of CD68⁺ dendritic cells including macrophages in the flow cytometric analysis. The patients with lumbar disc herniation (patients) had statistically higher levels of CD68⁺ dendritic cells including macrophages than did normal controls (control), when expressed as either percentages of cells from disc tissue or peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

면역 조절 T 세포의 발현은 추간판 조직에서 분리된 세포에 대하여 유세포분석으로 확인한 결과 대조군보다 실험군에서 낮았다(mean \pm SD, 0.07 ± 0.09 % versus 1.76 ± 0.06 %, $P = 0.01$) (Figure 4). 말초 혈액으로부터 분리된 단핵 세포에 대하여 유세포분석으로 확인한 결과에서도 면역 조절 T 세포의 발현은 대조군보다 실험군에서 낮았다(resting state 1.15 ± 0.02 % versus 4.01 ± 1.43 %, $P = 0.04$, stimulated state 7.51 ± 0.01 % versus 16.80 ± 4.29 %, $P = 0.03$)(Figure 4).

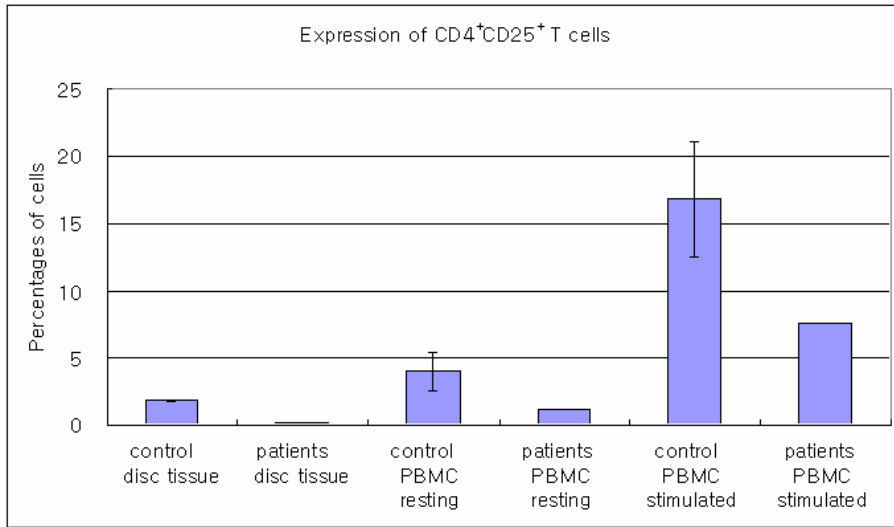


Figure 4. Expression of CD4⁺CD25⁺ T cells in the flow cytometric analysis. The patients with lumbar disc herniation (patients) had statistically lower levels of CD4⁺CD25⁺ T cells than did normal controls (control), when expressed as either percentages of cells from disc tissue or peripheral blood mononuclear cells (PBMC).

추간판 조직에서 분리 후 일주일간 배양된 세포에 대하여 공초점 형광현미경을 이용하여 AITR 과 AITRL 의 발현을 확인한 결과 실험군에서는 발현이 관찰되었으나, 대조군에서는 관찰이 되지 않았다(Figure 5).

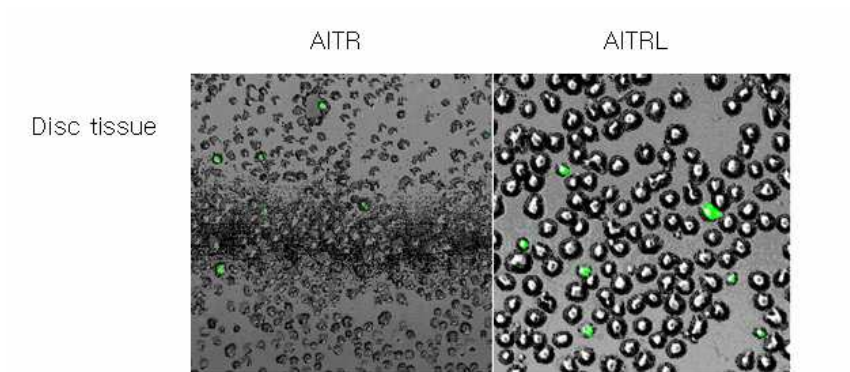


Figure 5. AITR and AITRL in the patients with lumbar disc herniation expressed by confocal laser microscopy. Many round-shaped cells expressing AITR and AITRL are seen. Confocal laser microscopic staining $\times 200$.

면역조직화학염색법을 실시하여 탈출 추간판조직에서 확인한 결과 실험군에서 분리한 추간판 조직에서 AITR 과 AITRL 이 과발현되는 것을 확인할 수 있었다. (Figure 6)

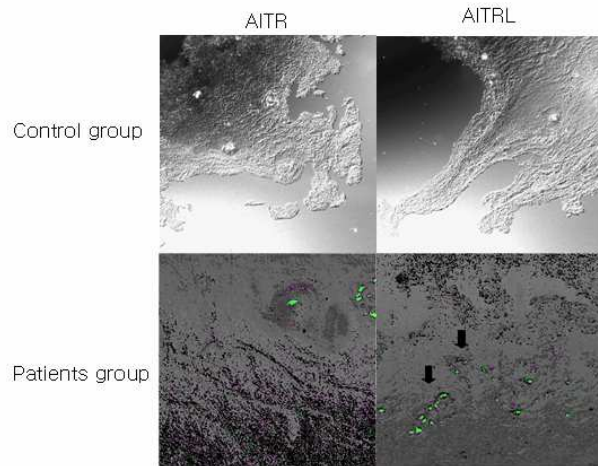


Figure 6. AITR and AITRL in the patients with lumbar disc herniation expressed by the immunohistochemical staining. AITR and AITRL in the disc tissue of the patients with spinal fracture managed with anterior discectomy as a control group of healthy individuals (control group) and the patients with lumbar disc herniation (patients group) were expressed. Many spindle-shaped cells expressing AITR and AITRL are seen inside disc tissue. Immunohistochemical staining $\times 200$.

RT-PCR 로 AITR 과 AITRL 의 mRNA 의 발현을 확인한 결과 AITRL 의 mRNA 는 실험군에서는 발현이 관찰되었으나, 대조군에서는 관찰이 되지 않았고 AITR 의 mRNA 는 실험군 및 대조군 모두에서 관찰이 되지 않았다(Figure 7).

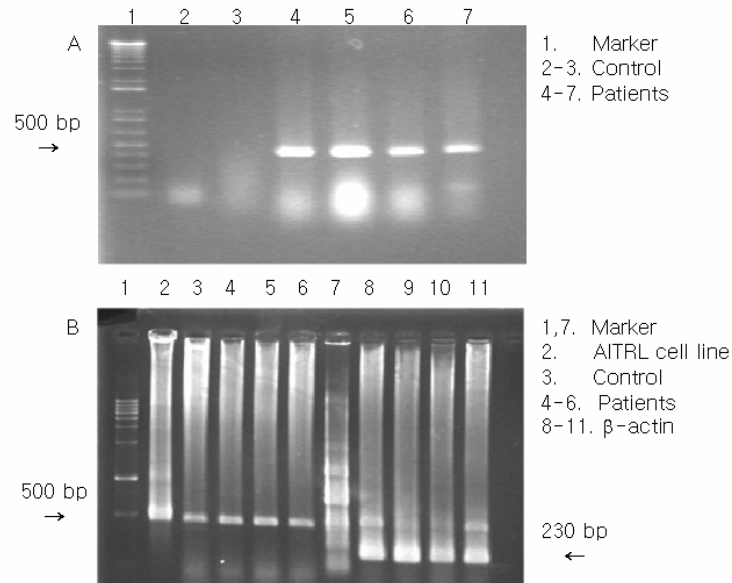


Figure 7. Representative RT-PCR derived from mRNA of tissue cell (A) and PBMC (B) following culture in control groups (control) and disc herniation groups(patients). RT-PCR for AITRL and β -actin was performed. The cDNA for β -actin was used as control. The PCR products of AITRL and β -actin were each 513 bp and 230 bp fragment.

말초 혈액으로부터 혈청을 분리한 후 ELISA를 실시한 결과 sAITR, sAITRL, IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α 는 실험군이 대조군보다 높은 것으로 관찰되었으나, IL-1b 는 통계학적 차이가 없었다(Table 1).

Table 1. Quantitative analysis of serum concentrations of soluble AITR (sAITR), soluble AITRL (sAITRL), IL-2, IL-6, IL-8, TNF- α and IL-1b between normal control groups (control) and disc herniation groups(patients).

	Control	Patients	P value
sAITR	10.53 \pm 8.16	35.22 \pm 16.56	0.008
sAITRL	46.29 \pm 21.49	500.97 \pm 272.73	0.009
IL-2	5.96 \pm 4.48	28.68 \pm 7.01	0.001
IL-6	8.61 \pm 3.41	29.72 \pm 9.35	0.005
IL-8	14.67 \pm 5.90	58.57 \pm 19.19	0.001
TNF- α	12.08 \pm 6.43	28.23 \pm 9.67	0.032
IL-1b	15.13 \pm 1.81	20.50 \pm 9.81	0.24

The values are mean \pm standard deviation (picogram/milliliter) unless otherwise noted. The p values were determined by independent-samples *t* test, level 5%.

IV. 고 찰

본 연구에서는 요추 추간판 탈출증 환자의 추간판 조직과 혈액에서 AITR과 AITRL의 발현 특성을 조사하고자 하였다.

추간판 탈출증에서 병리 기전은 기계적인 압박, 염증 반응, 자가 면역 반응, apoptosis 등으로 보고된다.^{2,31,32} 염증 반응과 관련하여 다양한 염증 세포가 추간판 조직으로 침윤된다고 보고되며^{3,4} 특히 수지상세포, 대식세포의 침윤이 급성 및 만성 탈출 추간판 조직에서 보고되었다.⁴ 반면 활성화된 T 세포와 B 세포는 급성 탈출 추간판 조직에서 각각 14%, 9%에서 관찰되나 만성 탈출 추간판 조직에서는 관찰되지 않는다고 보고된다.⁴ 면역조직화학염색에서는 침윤된 염증성 세포과 더불어 탈출한 추간판 조직 주위에 신생 혈관이 많은 육아조직이 관찰되며,^{6,10,33-35} 육아조직에서 관찰되는 fibroblast cell과 유사한 방추형 세포의 세포 표면 표식자는 CD68로 수지상세포 표면 표식자와 동일하다고 보고되었다.³ 본 연구에서 요추 추간판 탈출증 환자의 추간판 조직 및 말초 혈액 모두에서 CD68⁺ 수지상세포의 발현이 증가하였다.

탈출한 수핵은 인체내 이물질로 인식되어 자가 면역 반응을 유발한다고 보고된다.¹⁵⁻²⁰ 탈출된 추간판 조직에서 antigen-antibody complexes (Immunoglobulin G : IgG, Immunoglobulin M : IgM)이

관찰되며,^{16,17} 돌출된 탈출 추간판 조직보다 격리된 탈출 추간판 조직에서 immunoglobulin이 많이 관찰되었다.¹⁸ 탈출 추간판 조직 뿐만 아니라 추간판 탈출증 환자의 말초 혈액에서 수술전에는 IgG과 IgM이 증가하였다가 수술후에는 IgA과 IgM이 감소한다고 보고된다.^{19,20} 정상 성인의 추간판 조직은 혈관 분포가 없으므로 추간판 조직내의 세포는 추간판 주위의 혈관으로부터 영양분을 확산(diffusion)에 의하여 공급받는다.³⁶ 따라서, immunoglobulin은 확산에 의하여 추간판 조직에 이동하여 육아조직 및 신생혈관을 형성하며 자가면역반응을 유발하는 것으로 생각된다. 본 연구에서는 요추 추간판 탈출증 환자의 추간판 조직 및 말초 혈액 모두에서 AITR과 AITRL의 발현이 증가하였다.

대다수 자가 면역 반응에서는 병원성 자가 항원 반응성 T 세포가 자가 면역 반응을 유발한다. 면역 조절 T 세포는 자가 항원 반응성 T 세포를 억제함으로써 자가 면역 반응을 억제하여 면역 반응의 자가 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.^{21-23,37-39} 면역 조절 T 세포의 표면에 존재하는 공동 자극 분자는 면역 조절 T 세포의 활성화를 억제하는 역할을 한다고 보고된다.^{24,25} 따라서, 면역 조절 T 세포의 표면에 존재하는 공동 자극 분자의 신호전달을 차단하면 면역 조절 T 세포의 기능이 활성화되어 자가 항원 반응성 T 세포의 기능을 억제함으로써 자가 면역 반응을 치료할 수 있다.^{25-27,40-42}

반면에, 공동 자극 분자가 활성화되면 면역 조절 T 세포의 기능이 억제되어 자가 면역 반응을 유발할 수 있다. 본 연구에서 요추 추간판 탈출증 환자의 추간판 조직 및 말초 혈액 모두에서 면역 조절 T 세포의 발현이 감소하였다.

최근 면역 조절 T 세포 표면에 발현되는 중요한 공동 자극 분자로 세포 표면 수용체인 AITR(human, activation inducible tumor necrosis factor receptor(TNFR), GITR : murine, glucocorticoid induced TNFR)이 주목 받고 있다.^{28,29} Murine GITR는 TNFR superfamily의 일종으로 면역 조절 T 세포에서 주로 발현되지만 다른 T 세포들 (CD25⁻CD4⁺ T, CD8⁺ T, B 세포)이나 대식세포에서도 발현되는 것으로 알려져 있으며^{30,43} T 세포가 활성화되면 발현이 더욱 증가된다고 보고된다.³⁰ Human AITR는 인체의 임파절, 말초 혈액의 백혈구에서, AITRL는 주로 인체의 혈관 내피 세포에서 관찰되어 AITR과 AITRL은 활성화된 T 세포와 혈관 내피 세포 사이의 상호작용에 의한 신생혈관형성에 관여할 것으로 추론된다.³⁰

동물 또는 인체 실험에서 항진성 anti-GITR 단클론항체를 주입하면 면역 조절 T 세포의 기능이 저하되어 자가 면역 증상이 유발되며 이것은 autoimmune encephalomyelitis,²⁴ murine inflammatory bowel disease,²⁹ mice autoimmune diabetes,⁴⁴ non-infectious autoimmune uveitis⁴³ 등의 질환에서 증명되었다.

따라서 AITR과 AITRL은 추간판 탈출증과 같은 자가 면역 질환의 병태 생리와 연관성이 있을 것으로 추정되며 추간판 탈출증의 치료제를 개발하는데 좋은 단서를 제공할 가능성이 높으나, 현재까지 요추 추간판 탈출증과 관련한 AITR과 AITRL의 발현특성에 대한 보고는 없었다.

본 연구에서 요추 추간판 탈출증 환자의 AITR과 AITRL의 발현 특성을 최초로 보고하였으며 요추 추간판 탈출증의 병태 생리와 연관성이 있을 것으로 추정된다.

그러나, 상기 AITR과 AITRL의 발현이 요추 추간판 탈출증의 병태 생리의 근본 원인으로서는 의미가 있는 것인지 또는 결과물로서 발생한 것인지에 대한 병리적 인과 관계를 규명하지 못하였다. 따라서, 추후에 병리적 인과 관계를 구체적으로 규명하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

본 연구에서는 요추 추간판 탈출증 환자의 추간판 조직과 혈액에서 AITR과 AITRL의 발현 특성을 조사하고자 하였다. 추간판 조직 및 말초 혈액에 대한 유세포분석, 공초점 형광현미경, 면역조직화학염색법으로 조사한 결과 요추 추간판 탈출증 환자군이 대조군보다 AITR과 AITRL의 발현이 증가하였다. AITRL의 mRNA 는 요추 추간판 탈출증 환자에서는 발현이 관찰되었으나, 대조군에서는 관찰이 되지 않았고 sAITR, sAITRL도 요추 추간판 탈출증 환자가 대조군보다 증가되었다. 요추 추간판 탈출증 환자의 추간판 조직과 혈액에서 AITR과 AITRL의 발현이 증가하며 요추 추간판 탈출증의 병태 생리와 연관성이 있을 것으로 추정된다.

VI. 참고문헌

1. Deyo RA, Tsui-Wu YJ. Descriptive epidemiology of low-back pain and its related medical care in the United States. *Spine* 1987;12:264-268.
2. Kawaguchi S, Yamashita T, Yokogushi K, Murakami T, Ohwada O, Sato N. Immunophenotypic analysis of the inflammatory infiltrates in herniated intervertebral discs. *Spine* 2001;26:1209-1214.
3. Ito T, Yamada M, Ikuta F, Fukuda T, Hoshi SI, Kawaji Y, et al. Histologic evidence of absorption of sequestration-type herniated disc. *Spine* 1996;21:230-234.
4. Habtemariam A, Gronblad M, Virri J, Seitsalo S, Karaharju E. A comparative immunohistochemical study of inflammatory cells in acute-stage and chronic-stage disc herniations. *Spine* 1998;23:2159-2165.

5. Ahn SH, Cho YW, Ahn MW, Jang SH, Sohn YK, Kim HS. mRNA expression of cytokines and chemokines in herniated lumbar intervertebral discs. *Spine* 2002;27:911-917.
6. Doita M, Kanatani T, Harada T, Mizuno K. Immunohistologic study of the ruptured intervertebral disc of the lumbar spine. *Spine* 1996;21:235-241.
7. Haro H, Crawford HC, Fingleton B, Shinomiya K, Spengler DM, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor- α in a model of herniated disc resorption. *J Clin Invest* 2000;105:143-150.
8. Kato T, Haro H, Komori H, Shinomiya K. Sequential dynamics of inflammatory cytokine, angiogenesis inducing factor and matrix degrading enzymes during spontaneous resorption of the herniated disc. *J Orthop Res* 2004;22:895-900.
9. Kang JD, Georgescu HI, McIntyre-Larkin L, Stefanovic-Racic M, Evans CH. Herniated cervical intervertebral discs spontaneously

produce matrix metalloproteinases, nitric oxide, interleukin-6, and prostaglandin E2. *Spine* 1995;20:2373-2378.

10. Takahashi H. A mechanism for sciatic pain caused by lumbar disc herniation--involvement of inflammatory cytokines with sciatic pain. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1995;69:17-29.

11. Tobinick EL, Britschgi-Davoodifar S. Perispinal TNF-alpha inhibition for discogenic pain. *Swiss Med Wkly* 2003;133:170-177.

12. Onda A, Yabuki S, Kikuchi S. Effects of neutralizing antibodies to tumor necrosis factor-alpha on nucleus pulposus-induced abnormal nociresponses in rat dorsal horn neurons. *Spine* 2003;28:967-972.

13. Karppinen J, Korhonen T, Malmivaara A, Paimela L, Kyllonen E, Lindgren KA, et al. Tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody, infliximab, used to manage severe sciatica. *Spine* 2003;28:750-753.

14. Olmarker K, Nutu M, Storkson R. Changes in spontaneous

behavior in rats exposed to experimental disc herniation are blocked by selective TNF-alpha inhibition. Spine 2003;28:1635-1641.

15. Brisby H, Balague F, Schafer D, Sheikhzadeh A, Lekman A, Nordin M, et al. Glycosphingolipid antibodies in serum in patients with sciatica. Spine 2002;27:380-386.

16. Habtemariam A, Gronblad M, Virri J, Seitsalo S, Ruuskanen M, Karaharju E. Immunocytochemical localization of immunoglobulins in disc herniations. Spine 1996;21:1864-1869.

17. Satoh K, Konno S, Nishiyama K, Olmarker K, Kikuchi S. Presence and distribution of antigen-antibody complexes in the herniated nucleus pulposus. Spine 1999;24:1980-1984.

18. Slowinski J, Pieniazek J, Szydlik W, Mrowka R, Harabin-Slowinska M, Myrcik G, et al. The study of the role of intervertebral disc neovascularization and immune response in the pathogenesis of lumbar discopathy. Neurol Neurochir Pol

1998;32:341-350.

19. Spiliopoulou I, Korovertis P, Konstantinou D, Dimitracopoulos G. IgG and IgM concentration in the prolapsed human intervertebral disc and sciatica etiology. *Spine* 1994;19:1320-1323.

20. Yuceer N, Arasil E, Temiz C. Serum immunoglobulins in brain tumours and lumbar disc diseases. *Neuroreport* 2000;11:279-281.

21. Shevach EM, Piccirillo CA, Thornton AM, McHugh RS. Control of T cell activation by CD4+CD25+ suppressor T cells. *Novartis Found Symp* 2003;252:24-36.

22. Liu MF, Wang CR, Fung LL, Wu CR. Decreased CD4+CD25+ T cells in peripheral blood of patients with systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol* 2004;59:198-202.

23. Prakken BJ, Samodal R, Le TD, Giannoni F, Yung GP, Scavulli J, et al. Epitope-specific immunotherapy induces immune

deviation of proinflammatory T cells in rheumatoid arthritis.

Proc Natl Acad Sci U S A 2004;101:4228-4233.

24. Kohm AP, Williams JS, Miller SD. Cutting edge: ligation of the glucocorticoid-induced TNF receptor enhances autoreactive CD4+ T cell activation and experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol 2004;172:4686-4690.

25. Ehrenstein MR, Evans JG, Singh A, Moore S, Warnes G, Isenberg DA, et al. Compromised function of regulatory T cells in rheumatoid arthritis and reversal by anti-TNFalpha therapy. J Exp Med 2004;200:277-285.

26. Salazar-Fontana LI, Sanz E, Merida I, Zea A, Sanchez-Atrio A, Villa L, et al. Cell surface CD28 levels define four CD4+ T cell subsets: abnormal expression in rheumatoid arthritis. Clin Immunol 2001;99:253-265.

27. Liossis SN, Sfrikakis PP. Costimulation blockade in the treatment of rheumatic diseases. BioDrugs 2004;18:95-102.

28. Kwon B, Kim BS, Cho HR, Park JE, Kwon BS. Involvement of tumor necrosis factor receptor superfamily(TNFRSF) members in the pathogenesis of inflammatory diseases. *Exp Mol Med* 2003;35:8-16.
29. Uraushihara K, Kanai T, Ko K, Totsuka T, Makita S, Iiyama R, et al. Regulation of murine inflammatory bowel disease by CD25⁺ and CD25⁻ CD4⁺ glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 2003;171:708-716.
30. Kwon B, Yu KY, Ni J, Yu GL, Jang IK, Kim YJ, et al. Identification of a novel activation-inducible protein of the tumor necrosis factor receptor superfamily and its ligand. *J Biol Chem* 1999;274:6056-6061.
31. Park JB, Chang H, Kim KW. Expression of Fas ligand and apoptosis of disc cells in herniated lumbar disc tissue. *Spine* 2001;26:618-621.

32. Park JB, Kim KW, Han CW, Chang H. Expression of Fas receptor on disc cells in herniated lumbar disc tissue. *Spine* 2001;26:142-146.

33. Haro H, Kato T, Komori H, Osada M, Shinomiya K. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced angiogenesis in herniated disc resorption. *J Orthop Res* 2002;20:409-415.

34. Haro H, Shinomiya K, Komori H, Okawa A, Saito I, Miyasaka N, et al. Upregulated expression of chemokines in herniated nucleus pulposus resorption. *Spine* 1996;21:1647-1652.

35. Arai Y, Yasuma T, Shitoto K, Yamauchi Y, Suzuki F. Immunohistological study of intervertebral disc herniation of lumbar spine. *J Orthop Sci* 2000;5:229-231.

36. Parke WW. Applied anatomy of the spine. In: Herkowitz HN, Garfin SR, Balderston RA, Eismont FJ, Bell GR, Wiesel SW, editors. *The spine*, 4th ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B.Saunders Company; 1999. p. 49.

37. Morris GP, Chen L, Kong YC. CD137 signaling interferes with activation and function of CD4+CD25+ regulatory T cells in induced tolerance to experimental autoimmune thyroiditis. *Cell Immunol* 2003;226:20-29.
38. Herman AE, Freeman GJ, Mathis D, Benoist C. CD4+CD25+ T regulatory cells dependent on ICOS promote regulation of effector cells in the prediabetic lesion. *J Exp Med* 2004;199:1479-1489.
39. Mukherjee R, Chaturvedi P, Qin HY, Singh B. CD4+CD25+ regulatory T cells generated in response to insulin B:9-23 peptide prevent adoptive transfer of diabetes by diabetogenic T cells. *J Autoimmun* 2003;21:221-237.
40. Foell J, McCausland M, Burch J, Corriazzi N, Yan XJ, Suwyn C, et al. CD137-mediated T cell co-stimulation terminates existing autoimmune disease in SLE-prone NZB/NZW F1 mice. *Ann N Y Acad Sci* 2003;987:230-235.

41. Foell J, Strahotin S, O'Neil SP, McCausland MM, Suwyn C, Haber M, et al. CD137 costimulatory T cell receptor engagement reverses acute disease in lupus-prone NZB x NZW F1 mice. *J Clin Invest* 2003;111:1505-1518.

42. Foell JL, Diez-Mendiondo BI, Diez OH, Holzer U, Ruck P, Bapat AS, et al. Engagement of the CD137 (4-1BB) costimulatory molecule inhibits and reverses the autoimmune process in collagen-induced arthritis and establishes lasting disease resistance. *Immunology* 2004;113:89-98.

43. Li Z, Mahesh SP, Kim BJ, Buggage RR, Nussenblatt RB. Expression of glucocorticoid induced TNF receptor family related protein (GITR) on peripheral T cells from normal human donors and patients with non-infectious uveitis. *J Autoimmun* 2003;21:83-92.

44. Suri A, Shimizu J, Katz JD, Sakaguchi S, Unanue ER, Kanagawa O. Regulation of autoimmune diabetes by non-islet-specific T

cells - a role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. Eur
J Immunol 2004;34:447-454.

Abstract

The role of AITR and AITRL in the lumbar disc herniation

Moon Soo Park

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Soo Bong Hahn)

In the lumbar disc herniation the herniated nucleus pulposus may be recognized as a foreign-body by the immune system and this will lead to autoimmune reaction. It was demonstrated that antagonistic monoclonal antibodies specific for costimulatory molecules could be used as novel therapeutic agents to block autoimmune disease progression. Although human activation-inducible tumor necrosis factor receptor (AITR) and ligand for AITR (AITRL) might be considered important costimulatory molecules in the pathogenesis of autoimmune diseases, their examination in lumbar disc herniation remains unexplored. The purpose is to investigate whether AITR and AITRL might be

overexpressed in the lumbar disc herniation.

The study population consisted of 20 patients suffering from lumbar disc herniation. Five macroscopically normal discs were obtained from the patients with spinal fracture managed with anterior discectomy as a control group. Peripheral blood samples from the patients and control groups were collected during the same period of this study. The expression levels of AITR and AITRL were investigated by flow cytometric analysis, confocal laser scanning microscopy, immunohistochemistry and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Serum levels of soluble AITR and AITRL were measured by an enzyme-linked immunosorbent assay.

In the flow cytometric analysis of AITR and AITRL the patients with lumbar disc herniation had significant higher levels than did normal controls expressed as percentages of cells from disc tissues and PBMC. We found increased AITR and AITRL expression in confocal laser scanning microscopy, immunohistochemistry from the patients with lumbar disc herniation. We did not find increased AITRL expression in RT-PCR from the normal controls but found it from the patients with lumbar disc herniation. We

did not find increased AITR expression in RT-PCR from the normal controls and the patients with lumbar disc herniation. Soluble AITR, AITRL, IL-2, IL-6, IL-8 and TNF- α were elevated in the patients with lumbar disc herniations but there was no difference of IL-1b in the normal controls and the patients with lumbar disc herniation.

AITR and AITRL increased in the herniated disc tissue and peripheral blood of the patients with lumbar disc herniation, but decreased in healthy discs.

Key words: lumbar disc herniation, costimulatory molecule