

사람 태아 망막색소상피세포에서
FasL와 TRAIL의 발현과 이들에 의한
림프구의 세포자살

연세대학교 대학원

의 학 과

김 종 욱

사람 태아 망막색소상피세포에서
FasL와 TRAIL의 발현과 이들에 의한
림프구의 세포자살

지도 박주영 교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2002년 6월 일

연세대학교 대학원

의 학 과

김 종 욱

김종욱의 박사 학위논문을 인준함

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

심사위원 _____ 인

연세대학교 대학원

2002년 6월 일

감사의 말씀

여러 면에서 부족한 저의 논문이 나오기까지 연구여건도 제공해 주시고 격려와 지도를 아끼지 않으신 박주영 선생님과 김수기 선생님께 깊은 감사를 드립니다. 전공의를 시작할 때부터 지금까지 저를 이끌어 주시고 이번 논문에도 많은 관심과 지도를 아끼지 않으신 김순현 선생님께 감사를 드립니다. 바쁘신 중에도 꼼꼼히 살펴주신 등영건 선생님과 최인홍 선생님께도 깊은 감사의 마음을 표합니다.

미생물학교실의 원로로 저를 지켜봐 주시고 항상 격려를 아끼지 않으신 고춘명 선생님께 감사를 드립니다. 미생물학교실의 박현숙 선생님과 실험에 많은 도움을 주신 미생물학교실원들에게도 감사를 표합니다. 저에게 많은 편의는 물론 어려울 때마다 많은 힘이 되어준 저희 건양의대 안과학교실의 노경환, 정준균 선생님과 교실원들에게 감사를 드립니다. 항상 많은 관심을 보여주시고 언제나 마음 써 주시는 저의 보교인 원주의대 안과학교실의 이종혁 선생님께도 많은 감사를 표합니다. 라상훈 선생님께도 많은 감사를 드립니다. 언제나 저를 지켜봐 주시는 김안과병원의 김중우 선생님께도 저의 작은 성과를 빌어 다시 한번 감사를 표합니다. 실험진행에 많은 도움을 주신 임창교 선생님과 손창환 선생님께도 많은 감사를 드립니다.

지나고 보니 저의 작은 결과는 많은 분들의 보살핌과 도움이 아니었으면 어려웠을 거라고 생각합니다. 열거하지 못한 많은 분들께도 사의를 표하고 싶습니다.

오늘까지 저의 길이 되시고 저를 지켜 주신 주님께 깊은 감사의 기도를 드립니다. 저를 사랑으로 키워주시고 항상 사랑을 베풀어주시는 양가 부모님과 연구하고 실험할 때는 물론 휴식할 때도 함께 해주는 소중한 아내, 그리고 저희의 귀여운 아이들 민채, 석우와 함께 이 작은 기쁨을 나누고 싶습니다.

저 자 씀

차 례

그림 차례	iii
표 차례	iii
국문요약	1
I. 서 론	3
II. 재료 및 방법	7
1. 사람 태아 망막색소상피세포의 분리와 배양	7
2. 사이토카인을 이용한 사람 태아 망막색소상피세포의 자극	8
3. RNA 분리 및 cDNA 합성	8
4. 중합효소연쇄반응	9
5. 단백질 분리	12
6. Western blotting	12
7. T-림프구 세포주의 세포자살 측정	13
III. 결 과	14
1. 사람 태아 망막색소상피세포의 배양 및 FasL와 TRAIL의 발현	14
2. 사이토카인 자극에 의한 FasL와 Fas 수용체 발현	17
3. 사이토카인 자극에 의한 TRAIL 발현	19
4. 사람 태아 망막색소상피세포에서 TRAIL 수용체 발현	22

5. 사람 태아 망막색소상피세포에 의한 T-림프구 세포주의 FasL 매개 세포자살	22
6. 사람 태아 망막색소상피세포에 의한 T-림프구 세포주의 TRAIL 매개 세포자살	24
IV. 고 찰	27
V. 결 론	34
참고문헌	35
영문요약	40

표 목차

표 1. 중합효소연쇄반응 수행조건	10
표 2. 중합효소연쇄반응에 사용한 primer의 염기서열	11

그림 목차

그림 1. 사람 태아 망막색소상피세포의 배양과 염색	15
그림 2. 중합효소연쇄반응 산물의 염기서열 분석	16
그림 3. IFN- γ 자극에 의한 FasL 발현의 변화	18
그림 4. 사람 태아 망막색소상피세포에서 Fas 수용체의 발현	19
그림 5. 사이토카인 자극에 의한 TRAIL 발현의 변화	20
그림 6. IFN- γ 자극에 의한 TRAIL 발현의 변화	21
그림 7. 사람 태아 망막색소상피세포에서 TRAIL 수용체의 mRNA 발현	22
그림 8. 사람 태아 망막색소상피세포에 의한 MOLT-4 세포의 세포자살	23
그림 9. 사람 태아 망막색소상피세포에 의한 PEER 세포의 세포자살	25
그림 10. 사람 태아 망막색소상피세포수의 증가에 따른 PEER 세포의 세포자살	26

국문요약

사람 태아 망막색소상피세포에서 FasL와 TRAIL의 발현과 이들에 의한 림프구의 세포자살

Tumor necrosis factor (TNF) superfamily에 속하는 Fas ligand (FasL)는 침윤된 T-림프구의 세포자살을 유도함으로써 전안부의 면역관용에 기여하는 것으로 알려져 있으나 T-림프구의 세포자살 유도에 관한 기전은 명확하지 않다. TNF superfamily중 TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)는 여러 종류의 세포에서 세포자살을 유도하며 임신 중의 자궁에서 FasL와 함께 림프구의 증식을 억제한다. 본 연구에서는 사람 태아 망막색소상피세포에서 사이토카인에 의한 FasL와 TRAIL의 발현과 이들 분자에 의한 T-림프구의 세포자살 유도를 규명하고자 하였다.

사람 태아 망막색소상피세포를 분리, 순수배양하고, FasL와 TRAIL의 발현을 역전사중합효소연쇄반응과 Western blotting으로 확인하였다. 사람 태아 망막색소상피세포에서 발현되는 FasL와 TRAIL에 의한 T-림프구의 세포자살 유도를 측정하기 위해 MOLT-4 세포와 PEER 세포를 사람 태아 망막색소상피세포와 함께 배양한 후에 이들 세포의 세포자살을 Annexin-V 염색으로 확인하였다.

사람 태아 망막색소상피세포는 FasL와 TRAIL의 mRNA를 지속적으로 발현하고 있었으며, interferon- γ (IFN- γ) 또는 TNF- α 자극 후에는 그 발현이 증가하였다. Western blotting의 결과를 통하여 TRAIL 단백질

이 사람 태아 망막색소상피세포에서 지속적으로 발현되고 있을 뿐 아니라 IFN- γ 자극 후에 발현이 증가됨을 확인하였다. FasL에 의한 세포자살이 일어난다고 알려진 MOLT-4 세포를 사람 태아 망막색소상피세포와 함께 배양한 경우 세포자살의 정도는 대조군에 비해 큰 차이가 없었지만, TRAIL에 의한 세포자살이 일어난다고 알려진 PEER 세포를 사람 태아 망막색소상피세포와 함께 배양한 후에는 PEER 세포의 세포자살이 의미 있게 증가하였다.

이상의 결과를 통하여 본 연구자는 사람 태아 망막색소상피세포는 FasL와 TRAIL을 지속적으로 발현하고 있으며, 사람 태아 망막색소상피세포에 의한 T-림프구의 세포자살 유도과정은 FasL 보다는 TRAIL에 의한 경로로 이루어지고 있을 가능성을 제시한다.

핵심 되는 말: FasL, TRAIL, 망막색소상피세포, 림프구, 세포자살

사람 태아 망막색소상피세포에서 FasL와 TRAIL의 발현과 이들에 의한 림프구의 세포자살

〈지도 박 주 영 교수〉

연세대학교 대학원 의학과

김 종 욱

I. 서론

망막색소상피(retinal pigment epithelium)는 입방형의 세포로 한 층을 형성하여 망막의 광수용체층의 바깥쪽 면과 부루크막(Bruch's membrane)의 내층 사이에 위치한다¹. 망막색소상피층은 광수용체층의 바깥분절에서 떨어져 나온 조직과편(debris)을 탐식하고 분해하여 광수용체층을 지지하고 유지한다. 따라서 망막색소상피층의 손상은 광수용체층을 포함한 감각신경망막의 손상은 물론 최근 실명의 주요 원인으로 알려진 연령관련황반변성(age related macula degeneration)의 병인과도 연관된다². 망막색소상피세포의 노화는 연령관련황반변성의 발병과정에서 가장 중요한 요소이다^{2,3}. 리포푸신(lipofuscin)이 망막색소상피세포 내에 침착 되면 세포의 대사장애가 발생하고, 이는 세포의 자살과 그에 따르는 망막의 위축으로 발전한다. 이러한 결과들은 대부분의 대사기능을 망막색소상피층에 의존하는 광수용체층에 심각한 장애를 가져오게 된다. 또한 연령관련

황반변성 환자로부터 수술적으로 절제된 맥락막신생혈관막(choroidal neovascular membrane) 검체에서 망막색소상피층의 광범위한 세포자살(apoptosis)이 관찰되었다⁴. 이러한 이유로 연령관련황반변성을 포함한 몇 가지의 퇴행성 망막질환에 대한 치료로 망막색소상피세포의 이식이 주목을 받고 있다⁵⁻⁹. 사람 태아에서 얻은 망막색소상피세포를 혈액망막장벽이 건강하지 않은 삼출성 연령관련황반변성 환자들에게 이식한 연구에서는 이식 후 수개월 이내에 낭포황반부종(cystoid macula edema)이 이식편위의 망막에서 나타나고 이식편은 섬유성의 조직에 의해 피막화(encapsulation)되는 이식거부반응이 나타났다⁹⁻¹¹. 그러나 혈액망막장벽이 건강한 비삼출성 연령관련황반변성 환자군에서는 어떠한 형태의 거부반응도 보이지 않았다⁹. 각막이식의 경우 이식편이 거부반응으로부터 보호되는 면역관용을 보인다는 사실은 오래 전부터 알려져 왔다¹². 많은 연구자들에 의해 면역관용은 안구 내에 존재하는 여러 세포들에 의해 능동적으로 제공되는 면역억제환경 때문이라는 증거들이 밝혀졌다^{13,14}. 최근의 중요한 진전은 상당한 정도의 FasL가 각막의 상피와 내피, 홍채와 모양체 그리고 망막에서 발현될 뿐 아니라, 이들 FasL가 각막과 전방에 침윤된 활성화된 T-림프구의 세포자살을 유도하여 전안부의 면역관용을 유지한다는 사실이다^{15,16}.

이처럼 전안부에서 면역관용이 일어나는 기전은 많이 밝혀졌으나, 망막하강(subretinal space)에서 망막색소상피세포에 의한 면역억제의 기전에 대한 연구는 아직도 많이 부족하다. 위에서 언급한 바와 같이 망막하강에서 망막색소상피세포가 T-림프구의 세포자살을 유도하여 면역관용상태를 유지한다는 사실은 분명하지만 그 기전에 대해서는 아직도 논란이 많다¹⁷⁻²⁰. FasL, prostaglandin E₂ (PGE₂), transforming growth factor- β (TGF- β), interleukin-10 (IL-10) 그리고 tumor necrosis factor- α

(TNF- α)를 대상으로 한 많은 실험에서 이들 중의 어떤 분자도 망막색소상피세포가 T-림프구의 세포자살을 유도하는 과정에 절대적으로 기여한다는 결과는 나오지 않았다¹⁷⁻²⁰.

많은 연구자들은 각막과 전방에서 면역관용을 유지하는 과정에서 FasL가 매우 중요한 역할을 한다는 사실과, 정상적인 조건에서 망막색소상피세포의 FasL 발현은 미약하지만 연령관련황반변성 환자의 맥락막신생혈관막 밑에 위치한 망막색소상피층에서는 FasL의 발현이 증가되어 나타난다는 사실들로 미루어⁴ FasL가 망막하강에서도 면역관용의 유지에 중요한 역할을 할 것으로 생각하였다. 그러나 망막색소상피세포에서 FasL의 발현여부와 역할에 대해서는, 지금까지의 많은 연구에도 불구하고 아직까지도 명확한 결론이 없다. 망막색소상피세포에서 FasL의 발현 여부에 대해서는 조직에 대한 면역조직화학염색에서는 FasL가 발현된 반면²¹, 망막색소상피세포를 배양한 경우는 FasL mRNA와 단백질이 모두 발현되지 않았다¹⁸는 보고와, 세포표면에서 FasL가 발현되었다¹⁹는 상충된 보고들이 있어 아직까지도 망막색소상피세포가 FasL를 발현하는지의 여부는 분명하지 않다. 특히 배양된 망막색소상피세포에서 FasL가 발현되었다는 연구¹⁹의 경우, 항체의 선택이 적절치 않았음이 지적되었으며²² 재현성 여부에도 의문이 제기되는²³ 등 아직까지도 논란의 대상이 되고 있다. 망막색소상피세포의 T-림프구에 대한 세포독성에 대한 실험에서도 T-림프구의 세포자살은 FasL와 관계가 없다는 결과¹⁸와 망막색소상피세포와 T-림프구의 세포접촉을 통한 Fas-FasL 상호작용에 의한다는 결과^{19,21} 등 이견이 있다.

세포자살을 유도하는 또 다른 death ligand인 TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)는 TNF superfamily에 속하는 type II membrane protein으로 두 종류의 death receptor (DR4, DR5)와 두 종류의 decoy receptor(DcR1, DcR2)를 통해 death signal과 decoy

signal을 표적세포에 전달한다²⁴. TRAIL은 주로 형질 변형된 세포의 세포 자살을 유도하므로 이에 대한 연구는 종양의 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 기대되었다²⁵. 그러나 최근의 연구에서 TRAIL이 형질 변형된 세포뿐만 아니라 정상세포에서도 세포자살을 유도하고²⁶, 면역관용기관 중의 하나인 임신상태의 자궁 내에 위치한 모체-태아간 계면의 영양세포(trophoblast)에서 FasL와 TRAIL이 협력하여 모체 측의 면역세포들을 제거하고 자궁 내의 면역관용을 유지한다는 사실이 밝혀졌다^{27,28}. 이러한 연구 결과들은 눈에서도 TRAIL이 발현되어 면역관용유지에 일정한 역할을 할 수 있을 것이라는 가능성을 시사한다. 하지만 아직까지 눈에서 TRAIL의 발현에 대한 연구는 수정체상피세포에서 TRAIL의 두 종류의 수용체(DR5, DcR1)가 발현되지만 다른 수용체와 TRAIL은 발현되지 않는다는 결과²⁹ 뿐으로, 이의 기능적 의미나 안구 내의 각막, 망막 그리고 망막색소상피 등 다른 조직에서의 발현과 그 의미에 대한 연구는 전무하다. 이는 지금까지 TRAIL에 대한 연구가 주로 종양학분야에 초점이 맞추어졌기 때문으로 생각된다.

본 연구는 사람의 태아로부터 망막색소상피세포를 분리하여 일차배양을 한 후 망막색소상피세포 이식의 성공을 위한 중요한 요구조건인 망막하강의 면역관용유지에 대한 망막색소상피의 역할을 밝히고자 하였다. 이런 목적을 위하여 망막의 면역관용유지에 기여할 것으로 예상되는 FasL와 TRAIL이 망막색소상피세포에서 발현되는지, 또 사이토카인 자극에 의해 FasL와 TRAIL의 발현이 조절되는지를 연구하였다. 아울러 FasL와 TRAIL 분자들이 망막색소상피세포에 의한 T-림프구의 세포자살을 유도하는지에 대하여 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사람 태아 망막색소상피세포의 분리와 배양

치료 목적으로 임신이 중단된 18주에서 23주 사이의 태아의 안구를 적출한 다음 24시간 내에 무균조건에서 해부현미경을 이용하여 망막색소상피층을 분리하였다. 먼저 적출된 안구에서 공막 주위의 결합조직과 외안근을 깨끗이 박리하였다. 그 다음 안구를 각막윤부 주위의 거상연 부위에서 360도 절개 후 전안부 조직과 수정체를 제거하였다. 후안부 조직은 공막과 망막 그리고 망막색소상피층에 모두 한꺼번에 사사분면 이완절개를 가한 후 인산완충식염수(phosphate buffered saline: PBS)를 넣은 페트리 접시(petri dish)에서 나머지 조각을 하였다. 망막과 남아있는 유리체를 제거한 후 망막색소상피층을 분리하였다. 분리한 망막색소상피세포를 0.25%의 trypsin(Life Technologies, Grand Island, NY)이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies)에 넣고 5% CO₂가 함유된 37℃ 배양기에 1시간 동안 두었다. 1시간 후 15% 우태아혈청(Hyclone, Logan, UT)이 포함된 DMEM을 첨가한 후 1200 g로 10분간 원심분리 하였다. 상청액을 제거하고 세포침전물을 15% 우태아혈청과 glutamine (Life Technologies), HEPES (Life Technologies), 페니실린과 스트렙토마이신(Life Technologies)이 함유된 DMEM에 부유시킨 후에 24 well plate(Corning, Cambridge, MA)의 한 well에 넣고 5% CO₂가 함유된 37℃ 배양기에서 1주간 배양하였다. 1주 후에 trypsin을 처리하여 75cm² culture flask(Corning)로 계대 배양하였다. 배양액은 1주에 두 번씩 갈아주었고 1-2주에 한 번씩 계대 배양하였다.

세포의 순수성은 anti-pancytokeratin antibody (Sigma, St. Louis, MO)를 이용한 간접면역형광염색법으로 확인하였으며, 95%이상의 세포가 양성이었다. 본 연구에 사용한 세포들은 계대 배양세대 2대부터 6대까지의 세포들로서 실험결과에 있어서 배양세대간의 차이는 없었다. 실험에 사용된 MOLT-4와 PEER 세포는 사람 T 세포주이며 이들은 10%의 우태아 혈청이 함유된 RPMI (Life Technologies)에 배양하였다.

2. 사이토카인을 이용한 사람 태아 망막색소상피세포의 자극

배양된 사람 태아 망막색소상피세포를 trypan blue로 염색하여 90%이상의 세포가 살아있는 것을 확인하고 실험에 사용하였다. 세포에 0.25% trypsin(Sigma)을 처리하여 개개세포를 분리시킨 후 적절한 수의 세포를 6 well plate에 넣어주고 15% 우태아혈청이 함유된 DMEM에서 24-48 시간동안 배양하였다. 배양액을 제거한 후 interferon- γ (IFN- γ , Sigma), IL-1 β (R & D systems, Minneapolis, MN), TNF- α (Endogen, Woburn, MA)가 함유된 배양액을 첨가한 후 적절한 시간동안 자극하였다.

3. RNA 분리 및 cDNA 합성

전체 RNA는 Trizol 용액(Life Technologies)을 이용하여 분리하였다. 간략히 기술하면, 배양접시를 PBS로 세척하고 Trizol 용액을 넣어 세포를 깬 후 chloroform 추출과 isopropanol 침전과정을 거쳐서 RNA를 분리하였다. 분리된 RNA를 diethylpyrocarbonate로 처리한 증류수에 녹인 후 분광광도계를 이용하여 정량하였다. cDNA를 합성하기 위하여 1-2 μ g의

RNA와 완충용액, 500ng의 oligo-dT primer, 15U의 avian myeloblastosis virus 역전사효소(Promega, Madison, WI), 20U의 RNase inhibitor (Promega), 1mM의 dNTP, 5mM의 MgCl₂를 혼합하여 20 μ l의 반응액을 만들었다. 이 반응액을 42°C에서 30분간 반응시킨 후 95°C에서 5분간 두어 효소를 불활성화 시키고 5°C에서 10분간 두었다가 실험에 사용할 때까지 -70°C에 보관하였다.

4. 중합효소연쇄반응

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), FasL, TRAIL, Fas, TRAIL 수용체에 대한 primer를 사용하여 cDNA를 증폭하였다. 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction)을 수행하기 위하여 cDNA 2 μ l, 완충용액, 0.2mM dNTP, 1.25U Taq polymerase (Takara, Otsu, Shiga, Japan), primer, 2mM MgCl₂를 넣어서 50 μ l의 반응액을 만든 후 94°C에서 30초, 55-60°C사이의 annealing temperature에서 30초, 72°C에서 1분간 반응시켰다. 각 사이토카인의 구체적인 annealing temperature와 반응회수는 표1과 같다. 중합효소연쇄반응에 사용된 primer의 염기서열과 증폭산물의 크기는 표 2와 같다.

표 1. 중합효소연쇄반응 수행조건

사이토카인	Annealing temperature(°C)	Cycle number
GAPDH	60	25
FasL	59	35
Fas	59	30
TRAIL	55	29
DR4	59	29
DR5	59	29
DcR1	59	29
DcR2	59	29

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, TRAIL: TNF-related apoptosis inducing ligand, DR4: death receptor4, DR5: death receptor5, DcR1: decoy receptor1, DcR2: decoy receptor2.

표 2. 중합효소연쇄반응에 사용한 primer의 염기서열

사이토카인		Sequence	Size(bp)
GAPDH	Forward	ACCACAGTCCATGCATCAC	451
	Reverse	TCCACCACCCTGTTGCTGTA	
FasL	Forward	ATGTTTCAGCTCTTCCACCTACAGAAGGA	497
	Reverse	CAGAGAGAGCTCAGATACGTTGAC	
Fas	Forward	CGGAGGATTGCTCAACAAC	397
	Reverse	TTGGTATTCTGGGTCCG	
TRAIL	Forward	CCCAATGCGAGAGAGTATGA	360
	Reverse	GGAATAGATGTAGTAAAACCCT	
DR4	Forward	TTACACCAATGCTTCCAACAAT	680
	Reverse	AGGAGTCAAAGGGCACGATGTT	
DR5	Forward	GCCTCATGGACAATGAGATAAAGGTGGCT	502
	Reverse	CCAAATCTCAAAGTAGCACAAACGG	
DcR1	Forward	GATCCCCAAGACCCTAAAGTT	485
	Reverse	GGTTTCCACAGTGGCATTGGC	
DcR2	Forward	AGGGATGGTCAAGGTCAGTAAT	538
	Reverse	GATGTCAGCGGAGTCAGCGTC	

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, TRAIL: TNF-related apoptosis inducing ligand, DR4: death receptor4, DR5: death receptor5, DcR1: decoy receptor1, DcR2: decoy receptor2.

5. 단백질 분리

단백질 분리는 Dignam의 방법을 변형하여 시행하였다³⁰. 배양된 세포에 0.25% trypsin을 처리하여 떼어낸 후 100mm 배양접시에 24-48시간 동안 배양하였다. 배양액을 제거한 후 IFN- γ 가 포함된 배양액을 넣고 적절한 시간동안 배양하였다. 배양된 세포를 찬 PBS로 2회 세척한 후 scraper를 이용하여 세포를 긁어낸 후 원심분리 하였다.

상청액을 제거한 후 완충용액 A (10mM HEPES(pH7.9), 10mM KCl, 1mM DTT, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin)를 1 ml 넣고 잘 섞어준 뒤 30초간 원심분리 하였다. 상청액을 제거하고 0.1%의 NP-40이 함유된 완충용액 C (20mM HEPES(pH7.9), 0.4M KCl, 1mM DTT, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin)를 넣고 섞어준 후 얼음에 15분간 두었다가 잠깐 와동(vortexing)시킨 후 원심분리 하여 상청액을 얻어서 실험에 사용할 때까지 -70 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 정량은 Bradford 방법을 이용하였다³¹.

6. Western blotting

정량된 세포단백질 20 μ g을 12% SDS-polyacrylamide gel에서 전기영동 한 후 nitrocellulose membrane에 전이시켰다. 이 membrane을 5% 탈지분유와 0.1% Tween-20이 포함된 Tris 완충용액 (Tris-buffered saline with Tween-20: TBST)에 넣어 1시간 동안 blocking하였다. 3% 우혈청알부민이 함유된 TBST에 anti-TRAIL antibody (PharMingen, San Diego, CA)를 첨가하고 나서 membrane을 넣고 1시간 동안 흔들여 준 후 TBST로 3회 세척하였다. 1: 5000으로 희

석된 anti-mouse IgG antibody (Sigma) 용액에 membrane을 넣고 1시간 동안 반응시킨 후 TBST로 3회 세척하였다. ECL kit (Amersham, Little Chalfont, UK)를 사용하여 필름에 15분간 감광시켰다.

7. T-림프구 세포주의 세포자살 측정

배양된 망막색소상피세포를 60mm dish에 옮겨준 후 24시간 동안 배양하고 나서 배양액을 제거한 후 5×10^5 개의 MOLT-4 세포 혹은 PEER 세포를 넣어주었다. 24시간이 지난 후 MOLT-4나 PEER세포를 수거하여 Annexin-V (Clontech, Palo Alto, CA)와 propidium iodide로 염색한 후 flow cytometer를 이용하여 분석하였다. Annexin-V 염색의 음성대조군으로 망막색소상피세포와 coculture하지 않은 MOLT-4와 PEER 세포를 사용하였고, 양성대조군으로 actinomycin D로 처리된 MOLT-4와 PEER 세포를 사용하였다. 주효세포(Effector, E):표적세포(Target, T) 비(ratio)는 4:1, 10:1, 20:1 이었다. 망막색소상피세포를 IFN- γ 로 자극한 군의 경우에는, 망막색소상피세포에 IFN- γ 를 50ng/ml의 농도로 첨가한 후 18시간 후에 배양액을 제거하고 DMEM으로 3회 세척한 후 MOLT-4 또는 PEER 세포와 함께 배양하였다.

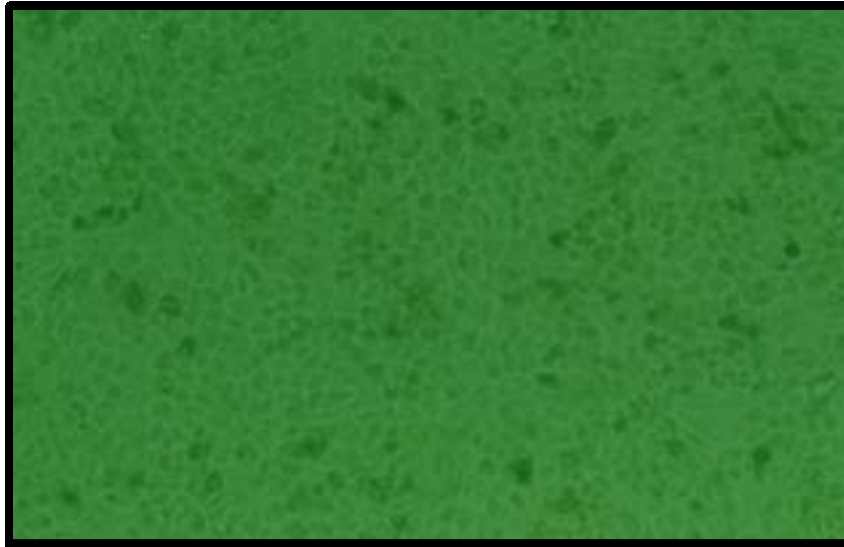
III. 결 과

1. 사람 태아 망막색소상피세포의 배양 및 FasL와 TRAIL의 발현

사람 태아로부터 분리한 망막색소상피세포를 배양하기 시작하고 1주일 이 지난 후부터 flask 바닥에 검은 색소들이 침착 된 것을 육안과 현미경 으로 관찰할 수 있었다. 세포는 바닥에 붙어 있었으며 위상차현미경 관찰 시에 대부분의 세포는 육각형 또는 방추형의 형태를 취하고 있었고(그림 1A), trypsin을 처리하였을 때 세포의 침전물은 검은색을 띄고 있었다. 세포를 anti-pancytokeratin antibody를 이용하여 염색하였을 때 95%이상의 세포에서 양성으로 나타났다(그림 1B).

배양된 세포로부터 RNA를 추출한 다음 FasL와 TRAIL에 대한 primer로 역전사증합효소연쇄반응을 시행하여 FasL와 TRAIL의 mRNA에 해당하는 증폭산물을 확인하였다. 이 증폭산물을 추출하여 염기서열을 분석한 결과 이들의 염기서열은 FasL와 TRAIL의 염기서열과 일치하였다 (그림 2).

A.



B.

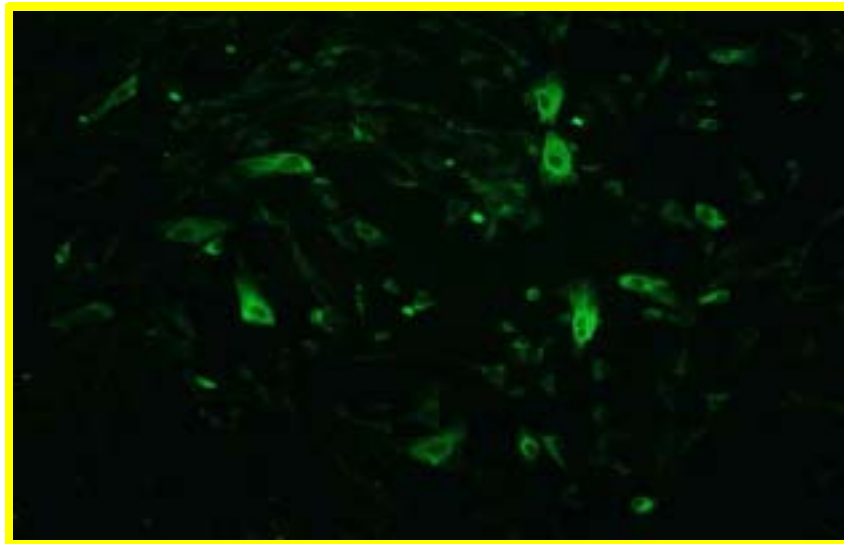


그림 1. 사람 태아 망막색소상피세포의 배양과 염색. A, 배양 후 1 주일 된 사람 태아 망막색소상피세포를 위상차현미경으로 관찰한 사진(x 100). B, 배양된 세포를 anti-pancytokeratin antibody를 이용하여 염색한 후 형광현미경으로 관찰한 사진(x 200).

A.

CGTTGGGCCCCGNGTCGCTGCTCCCGGCCGCCTGGCCGCGGGATATGTTTC
AGCTCTTCCACCTACAGAAGGAGCTGGCAGAACTCCGAGAGTCTACCAGC
CAGATGCACACAGCATCATCTTTGGAGAAGCAAATAGGCCACCCCAGTCC
ACCCCCTGAAAAAAGGAGCTGAGGAAAGTGGCCCATTTAACAGGCAAG
TCCAACCTCAAGGTCCATGCCTCTGGAATGGGAAGACACCTATGGAATTG
TCCTGCTTTCTGGAGTGAAGTATAAGAAGGGTGGCCTTGTGATCAATGA
AACTGGGCTGTACTTTGTATATTCCAAAGTATACTTCCGGGGTCAATCT
TGCAACAACCTGCCCCTGAGCCACAAGGTCTACATGAGGAACTCTAAGTA
TCCCAGGATCTGGTGATGATGGAGGGGAAGATGATGAGCTACTGCACT
ACTGGGCAGATGTGGGCCCCGAGCAGCTACCTGGGGGCAGTGTTCAATCT
TACCAGTGCTGATCATTTATATGTCAACGTATCTGAGCTCTCTCTGAAT
CACTAGTGCGGCCGCCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCAACGCGT
TGGATGCATAGCTTTGAGTATTCTATAGTGTACCTTAAATAGCTTGGC
GTAATCATGGTCATAGCTGTTTTCTGTGTGAAAATTGTTATTCCGCTC
ACAATTCCACACAACATACGNNCCCGGNAGCCNTAAAGTGTAAGCCTG
GGGGTGCCTAATGAAGTGACCTAACTCCATTTAATTGCGT

B.

CATTGGGCCCCGCGTCGCTGCTCCCGGCCGCCTGGCCGCGGGATGGAATAG
ATGTAGAAAACCCTTTTTTCATGGATGACCAGTTCACCATTCTCAAGTG
CAAGTTGCTCAGGAATGAATGCCCACTCCTTGATGATTTCCAGGAGTTT
ATTTTGCGGCCAGAGCCTTTTTCATTCTTGGAGTTTGGAGAAGACAATG
TGTTGCTTCTTCTCTGCTGCCAGTTATGTGAGCTGCTACTCTCTGAGG
ACCTCTTCTCTCACTAGGGGAGAAATATTTTGTTGCTTTTCTTGAAC
GTAGAAATGGTTTTCTCAGAGGTTCTCAAAATCATCTTTCTAACGAGCT
GATGGAGTTGCCACTTGACTTGCCAGCAGGGGCTGTTTCATACTCTCTCG
TCATTGGGAATCACTAGTGCGGCCGCCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAG
CTCCCAACGCGTTGGATGCATAGCTTGGAGTATTCTATAGTGTACCTAA
ATAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTTCTGTGTGAAAATTGTTA
TCCGCTCACAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAG
GCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTTGCGTTGCGC
TCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATG
AATCGGCCAACGCGCGGGGAGANGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTTCC
GCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCCT

그림 2. 중합효소연쇄반응 산물의 염기서열 분석. A, FasL, B, TRAIL.

2. 사이토카인 자극에 의한 FasL와 Fas 수용체 발현

IFN- γ 자극에 의한 FasL 발현양상의 변화를 알아보기 위해 IFN- γ 로 망막색소상피세포를 자극하였다. IFN- γ 를 0.01ng/ml부터 100ng/ml까지 용량별로 다르게 첨가한 후 망막색소상피세포를 배양한 결과 IFN- γ 의 용량이 증가함에 따라 FasL의 발현은 증가하였으며(그림 3A), 50ng/ml로 자극한 경우에는 자극 후 8시간째에 최고치를 보였다(그림 3B).

Fas 수용체의 발현을 역전사중합효소연쇄반응으로 관찰하였다. IFN- γ 나 TNF- α 로 자극한 경우에는 Fas 수용체의 발현이 증가되었다. IL-1 β 만으로 자극한 경우에는 Fas 수용체의 발현이 증가되지 않았지만, IFN- γ 를 전 처리한 후에 IL-1 β 로 자극한 경우에는 Fas 수용체의 발현이 증가되었다(그림 4).

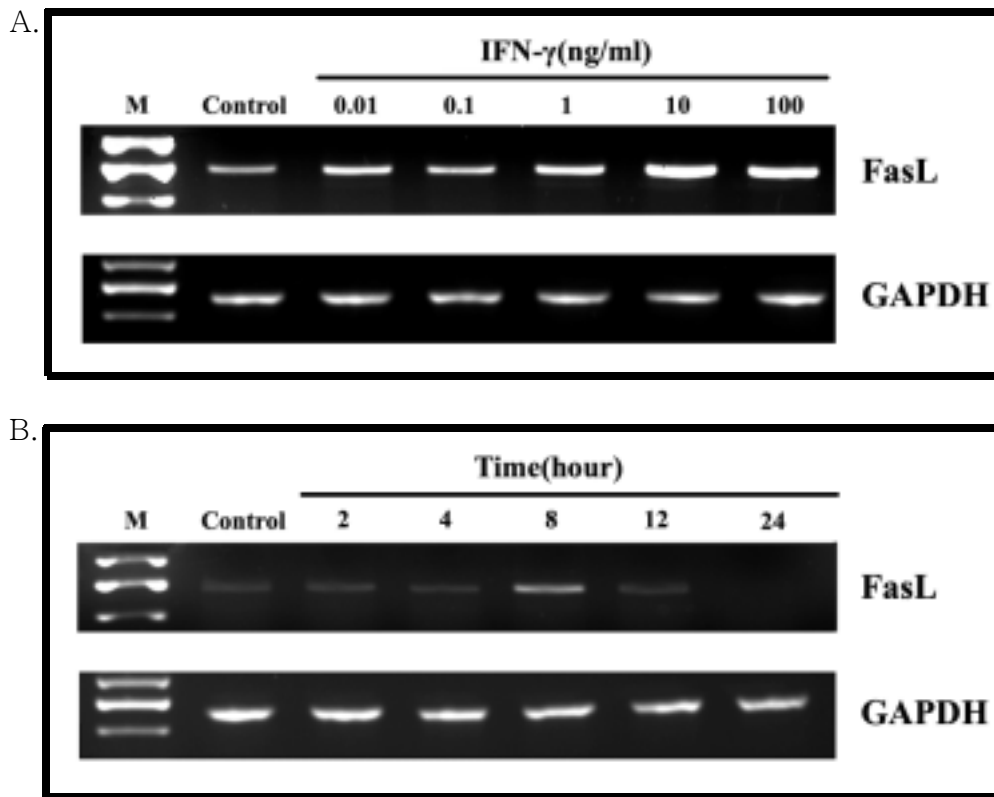


그림 3. IFN- γ 자극에 의한 FasL 발현의 변화. A, IFN- γ 를 0.01ng/ml, 0.1ng/ml, 1ng/ml, 10ng/ml, 100ng/ml의 용량으로 8시간 동안 자극한 후 FasL mRNA 발현. B, IFN- γ 50ng/ml으로 자극한 후 시간에 따른 FasL mRNA의 발현. M: size marker, Control: 대조군.

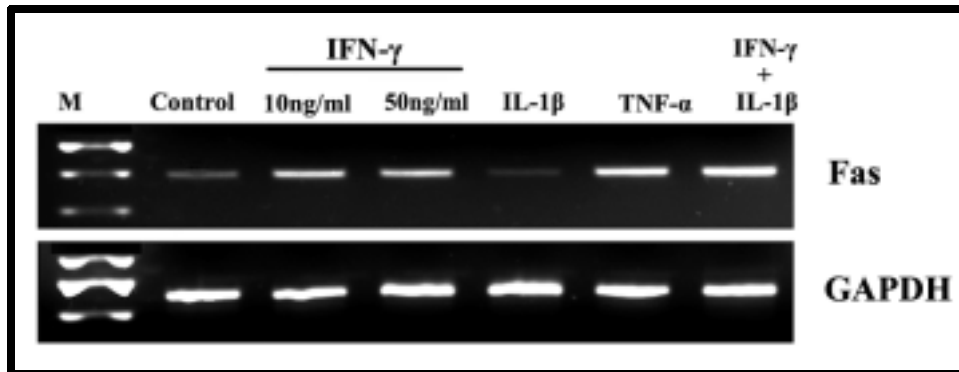


그림 4. 사람 태아 망막색소상피세포에서 Fas 수용체의 발현. M: size marker, Control: 대조군, IFN- γ : interferon- γ , IL-1 β : interleukin-1 β (10ng/ml), TNF- α : tumor necrosis factor- α 50ng/ml, IFN- γ +IL-1 β : IFN- γ 1ng/ml으로 16시간 동안 전 처리 후 IL-1 β 10ng/ml으로 자극. 각 사이토카인은 8시간 동안 자극.

3. 사이토카인 자극에 의한 TRAIL 발현

망막색소상피세포에서의 TRAIL의 발현이 사이토카인 자극에 의해 변화하는지 알아보기 위하여 망막색소상피세포를 여러 가지 사이토카인으로 자극한 후 TRAIL mRNA의 발현을 확인하였다. IL-1 β , IL-2로 자극하였을 때는 TRAIL의 발현에 변화가 없었으나 TNF- α 로 자극한 경우에는 발현이 약간 증가되었고, IFN- γ 로 자극하였을 때는 TRAIL의 발현이 매우 증가하였다(그림 5). IFN- γ 1ng/ml을 16시간 동안 전 처리한 후 IL-1 β , IL-2 그리고 TNF- α 로 자극한 경우에도 TRAIL의 발현은 증가되었다(그림 5).

IFN- γ 로 용량별로 자극한 결과 5ng/ml 부터 50ng/ml 까지 IFN- γ

의 용량이 증가함에 따라 TRAIL의 발현은 증가되었으며, 50ng/ml로 자극한 경우에는 3시간 후부터 증가하기 시작하여 24시간까지 지속되었다(그림 6). TRAIL의 발현은 Western blotting에서도 확인되었으며 역시 IFN- γ 자극에 의하여 발현이 증가되었고 이는 1ng/ml 부터 100ng/ml까지 IFN- γ 의 용량에 따라 증가하는 양상을 보였으며, 시간대별로는 48시간대에 가장 많은 증가를 보였다(그림 6).

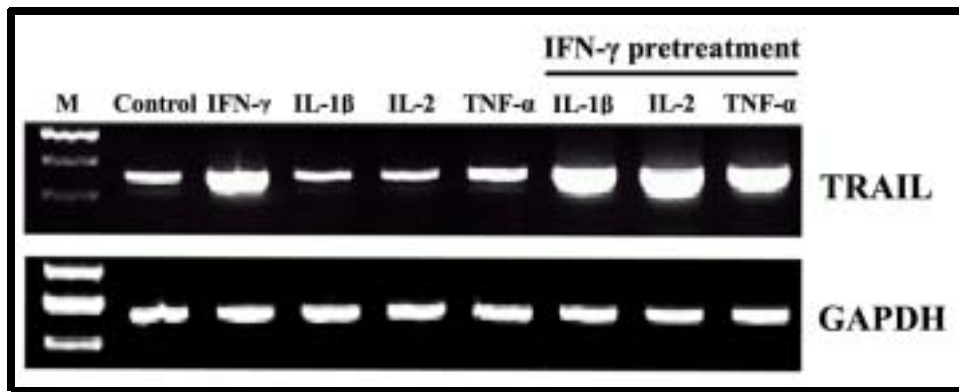


그림 5. 사이토카인 자극에 의한 TRAIL 발현의 변화. M: size marker, Control: 대조군, IFN- γ : interferon- γ 10ng/ml, IL-1 β : interleukin-1 β 10ng/ml, IL-2: interleukin-2 10ng/ml, TNF- α : tumor necrosis factor- α 50ng/ml, IFN- γ pretreatment: IFN- γ 1ng/ml으로 16시간 동안 전 처리 한 후 IL-1 β , IL-2, TNF- α 로 각각 자극. 각각의 사이토카인으로 8시간 동안 자극.

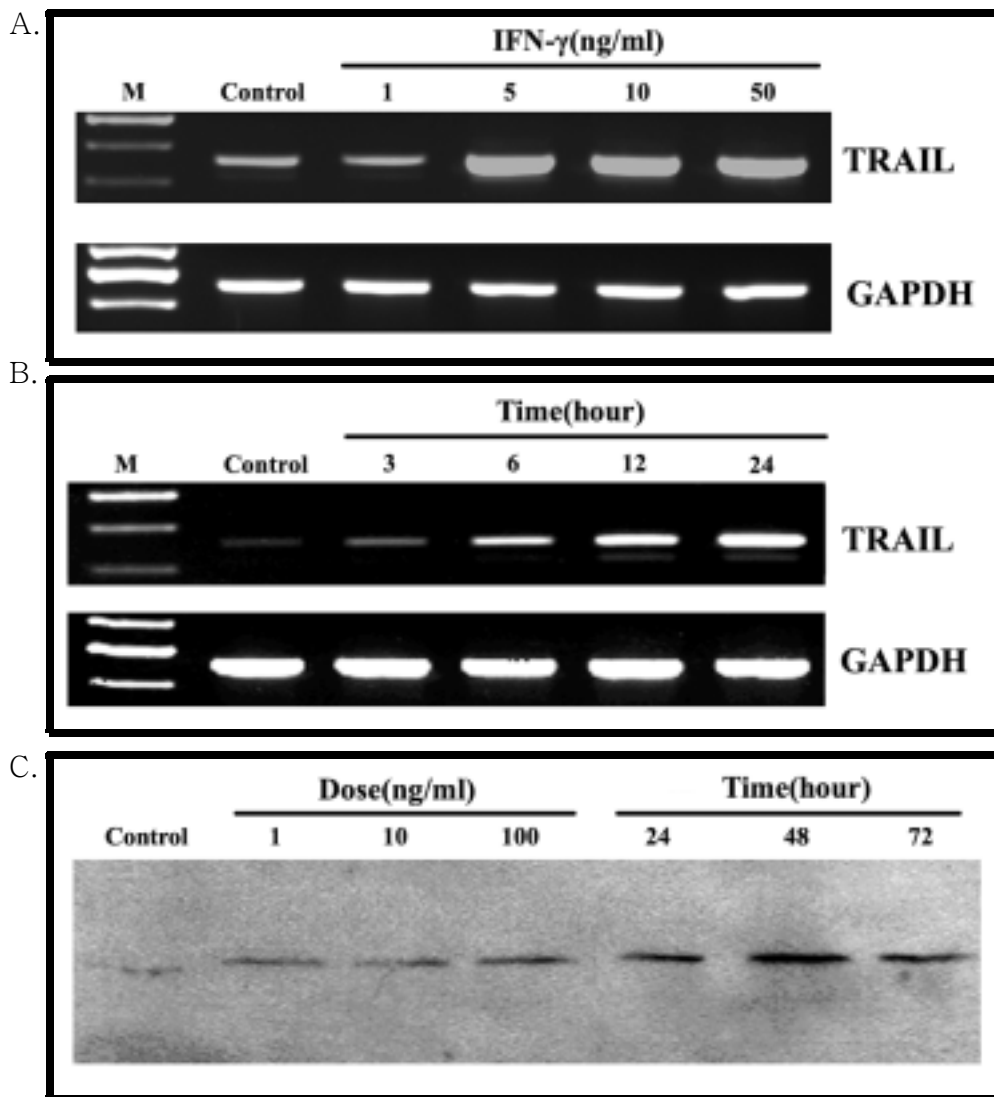


그림 6. IFN- γ 자극에 의한 TRAIL 발현의 변화. A, IFN- γ 를 용량별로 16시간 동안 자극 한 후의 TRAIL mRNA 발현. B, IFN- γ 50ng/ml으로 시간별로 자극 한 후의 TRAIL mRNA 발현. C, IFN- γ 로 자극한 후 세포단백질을 추출하여 Western blotting을 시행. M: size marker, Control: 대조군.

4. 사람 태아 망막색소상피세포에서 TRAIL 수용체 발현

망막색소상피세포에서 TRAIL 수용체가 발현되는지 역전사중합효소연쇄반응을 시행하여 확인하였다. 망막색소상피세포에서는 DR1, DR2, DcR1, DcR2가 모두 잘 발현되고 있었다(그림 7).

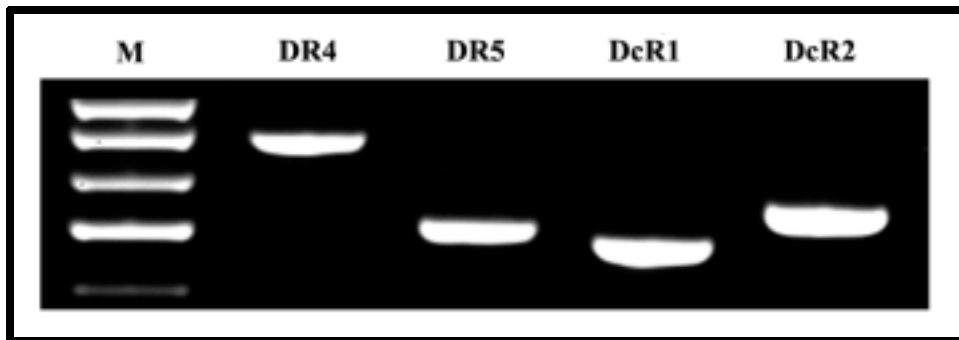


그림 7. 사람 태아 망막색소상피세포에서 TRAIL 수용체의 mRNA 발현. 각각의 TRAIL 수용체에 대한 primer를 이용하여 역전사중합효소연쇄반응을 시행. M: size marker, DR4: death receptor4, DR5: death receptor5, DcR1: decoy receptor1, DcR2: decoy receptor2.

5. 사람 태아 망막색소상피세포에 의한 T-림프구 세포주의 FasL 매개 세포자살

Fas-FasL 상호작용에 의한 경로로 세포자살이 잘 일어나는 MOLT-4 세포를 망막색소상피세포와 함께 24시간동안 배양한 후 Annexin-V에 대한 항체로 염색하여 MOLT-4 세포에서 세포자살을 관찰하였다. MOLT-4 세포만 배양한 경우에는 19.4%에서 Annexin-V 염색에 양성이었으나, MOLT-4 세포를 망막색소상피세포와 함께 배양한 경우

MOLT-4 세포의 세포자살은 22.0%로 큰 차이는 없었다(그림 8). IFN- γ 로 전 처리된 망막색소상피세포와 함께 배양한 MOLT-4세포의 경우도 세포자살은 23.9%로 대조군과 큰 차이는 없었다(그림 8)

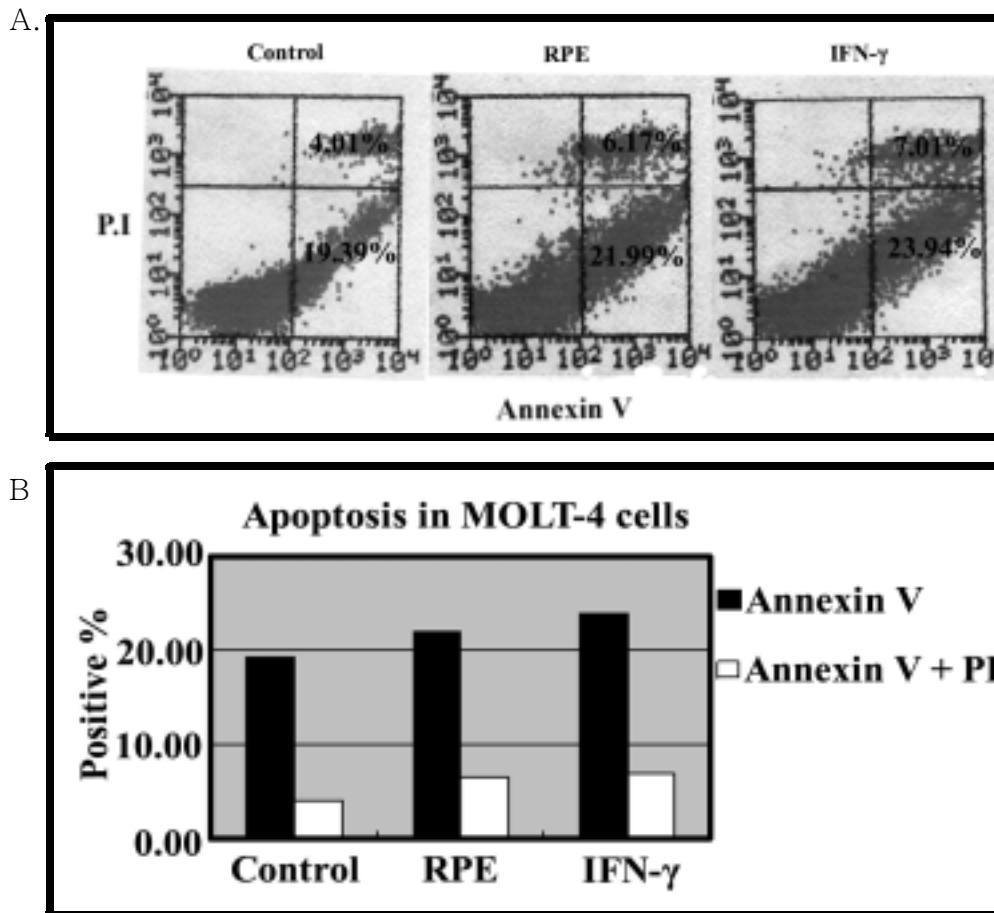


그림 8. 사람 태아 망막색소상피세포에 의한 MOLT-4 세포의 세포자살. A, Scattergram, B, 그래프. Control: MOLT-4 세포만 배양, RPE: 망막 색소상피세포와 함께 24시간동안 배양, IFN- γ : 망막색소상피세포를 IFN- γ 50ng/ml로 18시간 동안 자극 한 후 MOLT-4 세포와 함께 배양. 모든 군은 배양하고 24시간이 지난 후 MOLT-4 세포를 Annexin-V로 염색한 다음 flow cytometry를 시행.

6. 사람 태아 망막색소상피세포에 의한 T-림프구 세포주의 TRAIL 매개 세포자살

FasL보다는 TRAIL에 의한 경로로 세포자살이 일어나는 PEER 세포주를 망막색소상피세포와 함께 24시간 동안 배양한 후 Annexin-V에 대한 항체로 염색하여 세포자살을 확인하였다. PEER 세포만 배양한 대조군에서는 13.0%의 세포에서만 세포자살이 관찰된 반면, 망막색소상피세포와 함께 배양된 PEER 세포에서는 24.7%의 세포가 Annexin-V 양성을 보였다. IFN- γ 로 자극한 망막색소상피와 PEER 세포를 함께 배양한 경우에는 IFN- γ 로 자극하지 않은 경우에 비하여 44.4%로 세포자살이 증가하였다(그림 9).

망막색소상피세포의 수를 증가시키면서 배양하였을 때는 E:T ratio가 증가할수록 PEER 세포의 세포자살은 증가하였다. IFN- γ 로 자극한 망막색소상피세포의 경우에서도 E:T ratio가 증가할수록 세포자살은 증가되었다(그림 10).

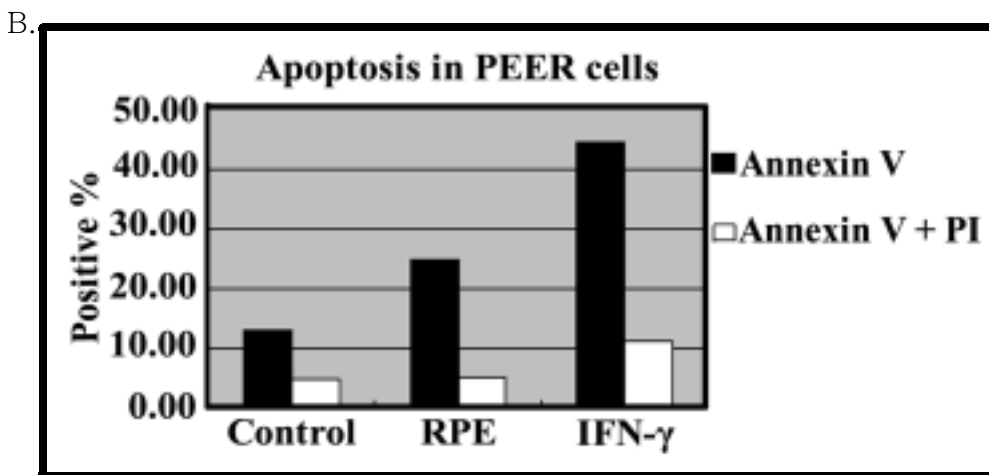
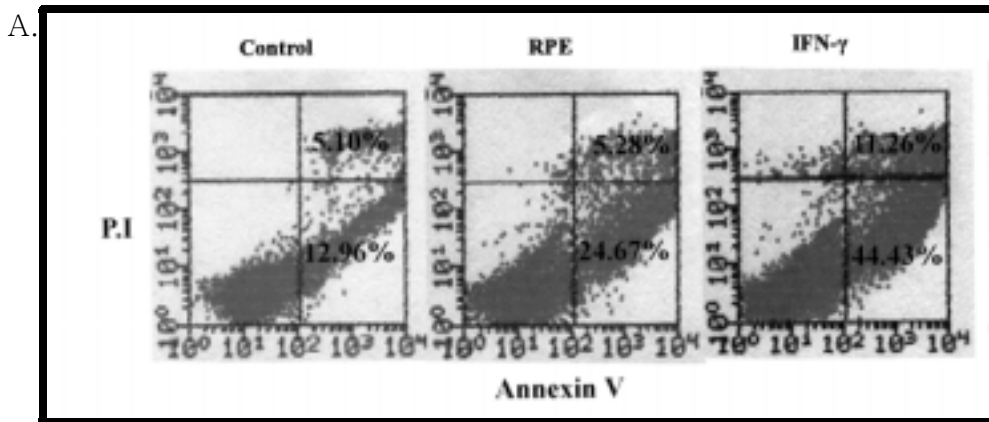


그림 9. 사람 태아 망막색소상피세포에 의한 PEER 세포의 세포자살. A, Scattergram, B, 그래프. Control: PEER 세포만 배양, RPE: 망막색소상피세포와 함께 24시간동안 배양, IFN- γ : 망막색소상피세포를 IFN- γ 50ng/ml로 18시간 동안 자극 한 후 PEER 세포와 함께 배양. 배양하고 24시간이 지난 후 PEER 세포를 Annexin-V로 염색한 다음 flow cytometry를 시행.

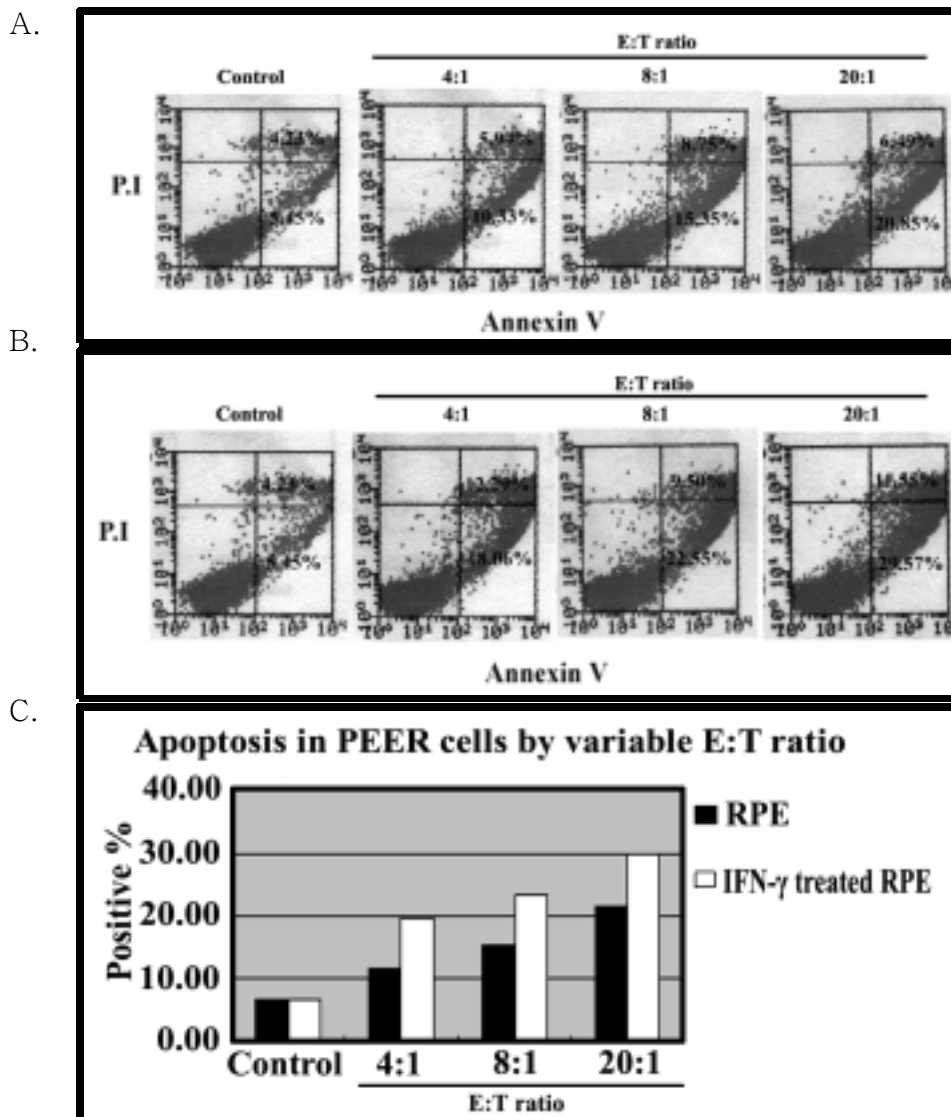


그림 10. 사람 태아 망막색소상피세포수의 증가에 따른 PEER 세포의 세포자살. A, 망막색소상피세포와 PEER 세포를 coculture한 후 측정된 Scattergram, B, IFN- γ 로 18시간 동안 자극한 망막색소상피세포와 PEER 세포를 coculture한 후 측정된 scattergram, C, A와 B를 함께 그래프로 표현. Control: PEER 세포만 배양. 배양하고 24시간이 지난 후 PEER 세포를 Annexin-V로 염색한 다음 flow cytometry를 시행.

IV. 고 찰

망막색소상피세포를 18주에서 23주 사이에 임신이 중단된 태아에게서 얻은 안구로부터 분리, 배양한 결과 1주 말부터 culture flask바닥에서 검은색의 침착이 육안으로 확인되었으며, 배양된 세포를 현미경으로 관찰했을 때는 육각형의 세포와 세포내의 검은 색소의 침착을 확인할 수 있었다(그림 1A). 검은 색소의 침착은 멜라닌 생성에 의한 현상인데 안구에서 멜라닌을 형성할 수 있는 조직은 포도막과 홍채-모양체 그리고 망막색소상피이다. 망막색소상피층 외의 조직은 박리과정 중에 모두 제거되었기 때문에 망막색소상피세포가 잘 배양되고 있음을 알 수 있었다. 세포의 순수성을 확인하기 위해 cytokeratin에 대한 항체로 면역형광염색을 하였다. 면역형광염색의 결과 95%이상의 세포가 양성으로 망막색소상피세포의 분리와 배양과정중의 다른 세포들의 오염가능성이 배제되었다.(그림 1B). Cytokeratin은 대부분의 상피세포에 특이성을 보이는 표지분자(marker)로 눈에서는 결막과 각막, 수정체의 상피와 망막색소상피에서 볼 수 있다. 하지만 결막과 각막 그리고 수정체의 상피는 망막색소상피세포의 분리과정 중 제거되었고, 박리과정 중 오염의 가능성이 있는 망막과 맥락막의 세포들은 cytokeratin으로 염색되지 않는다. 따라서 형태학적으로 육각형의 모양을 유지하고, 검은 색소가 침착되며, cytokeratin으로 염색이 잘 되는 것으로 순수한 망막색소상피세포가 분리되고 배양된 것을 확인할 수 있었다. 2대에서 6대의 세포를 실험에 사용하였으나 계대 배양을 하면서 관찰한 결과 6대까지의 세포는 진한 색소의 침착이 유지되었다.

배양한 사람 태아 망막색소상피세포에서는 FasL가 발현되었다. IFN- γ 로 자극하지 않은 무 자극 상태에서도 FasL는 발현되었고 이러한 FasL의 발현은 IFN- γ 로 자극한 경우 증가하였다. IFN- γ 로 자극한 경우에

는 자극 후 8시간째에 최고치에 도달하였고 10ng/ml의 IFN- γ 을 사용한 경우에 발현이 최고로 증가하는 양상을 보였다. FasL와 함께 Fas수용체의 발현도 관찰되었는데 이러한 Fas 수용체의 발현은 IFN- γ 나 TNF- α 로 자극 시에 증가되는 양상을 보여 주었고 IFN- γ 와 IL-1 β 를 함께 자극한 경우에는 그 발현이 더욱 증가하였다. 주목할 만한 사실은 MOLT-4 세포와 사람 태아 망막색소상피세포를 함께 배양하였더니 대조군에 비하여 세포자살이 유의하게 증가하지 않았음은 물론 IFN- γ 로 전 처리한 망막색소상피세포와 함께 배양한 MOLT-4 세포에서도 세포자살이 그다지 증가하지 않았다는 점이다. 이러한 결과는 망막하강에서 면역관용의 유지과정에 FasL외의 다른 기전이 관여한다는 점을 시사한다.

망막색소상피세포에서 Fas 수용체의 발현에 대한 기존의 연구결과는 무자극 상태에서 Fas 수용체의 발현이 확인되고 활성화소로 자극 후 Fas 수용체의 발현이 증가했다고 한다²¹. 본 연구에서는 연령관련황반변성의 발병과정에 관계하는 활성화소보다는 안구 내 염증반응이나 망막색소상피이식 후 거부반응과 관계가 깊은 IFN- γ , TNF- α 에 대한 연구를 진행하였다.

면역계의 세포들에서 FasL의 발현은 활성화과정중이나 그 후에 일어나고 그 발현의 조절은 세포의 활성화와 깊은 관계가 있다. 하지만 흥미로운 점은 안구에서 FasL를 발현하는 세포는 망막색소상피세포나 각막의 내피세포같이 출생 후 증식을 멈추는 세포들이라는 점이다³⁴. 이러한 세포들을 분리하여 배양하면, 세포는 증식하기 시작하고 대부분의 경우에 더 이상 FasL는 발현되지 않는다³⁴. 따라서 FasL의 발현은 세포의 노화와 함께 감소할 가능성이 있다. 본 연구에 사용한 세포는 태아의 안구에서 일차 배양한 것으로 이러한 세포들은 상대적으로 젊고, 분열 능력이 우수하다. 따라서 위와 같은 관점에서 보면 배양한 사람 태아 망막색소상피에서 FasL

mRNA의 발현은 자연스러운 현상일 수도 있다. 하지만 본 연구와 같이 사람 태아의 망막색소상피세포를 사용한 연구에서도 FasL가 발현되지 않았다는 결과¹⁷도 있어 결론을 내리기는 어렵다.

MOLT-4 세포주는 Fas 수용체는 발현하지만 DR4 (TRAIL receptor 1)는 발현하지 않아³² 주로 Fas-FasL 상호작용에 의한 세포자살이 일어난다. MOLT-4 세포주의 세포자살이 사람 태아 망막색소상피세포의 존재 유무에 따라 특이한 변화를 보이지 않았다는 결과는 망막색소상피세포에 의한 T-림프구의 세포자살과정은 FasL와 관계가 없다는 기존의 연구결과^{17,18,23}를 보다 구체적인 방법으로 확인한 것이다.

본 연구의 결과에서 나타난 IFN- γ 에 의한 Fas와 FasL의 발현증가나 IL-1 β 와 TNF- α 의 상승작용에 의한 Fas mRNA의 발현증가는 염증반응 시에 nuclear factor kappa B(NF- κ B)의 전사가 활성화되고 그에 따라 Fas의 발현이 증가되는 현상³⁵을 대변하는 것으로 생각된다. 생리적 조건에서 FasL나 Fas중 한가지의 발현이 증가되면 망막색소상피는 Fas-FasL 상호작용에 의해 세포자살이나 fracticide 될 수 있다²¹. 실제로 연령관련황반변성 환자의 맥락막신생혈관막 검체에서 관찰한 결과에 의하면 망막색소상피세포의 Fas수용체 발현정도와 망막색소상피세포의 세포자살은 비례한다⁴. 하지만 사람백혈병세포주인 Jurkat세포주와 망막색소상피세포 각각에게 재조합 FasL나 anti-Fas 항체를 처리한 실험에서 48시간 후에 Jurkat세포주에서는 80%의 세포에서 세포자살이 일어난 반면 망막색소상피세포는 20-40%에서만 세포자살이 일어났다³⁶는 결과처럼 생리적 조건에서 망막색소상피는 Fas-FasL의 상호작용에 의한 세포자살이 잘 일어나지 않는다. 망막색소상피세포의 Fas수용체의 신호전달에 의한 세포자살에 대한 저항성은 망막색소상피세포내의 억제물질에 의한 Fas 신호전달체계의 차단에 의한 것이다. 망막색소상피세포 내에는 매우 높은 정도

의 세포 내 Zn^{2+} 가 확인³⁷되었는데, Zn^{2+} 는 caspase3와 endonuclease의 강력한 억제물질이므로, 망막색소상피는 Fas-FasL 상호작용에 의한 세포 자살에는 저항성을 나타낼 가능성이 있다.

본 연구에서는 세포자살에 관련된 또 다른 분자인 TRAIL의 망막색소상피세포에서의 발현과 기능에 대한 연구를 진행하였다. TRAIL은 TNF superfamily의 일원으로 FasL와 매우 유사한 단백질구조를 갖고 있다³⁸⁻⁴⁰. TRAIL은 FasL와 함께 자극 후의 림프구 증식을 억제하는 것은 물론 세포 내 신호전달경로를 상당부분 공유하면서 림프구의 세포자살을 유도한다. 본 연구의 결과는 배양한 사람 태아 망막색소상피세포에서 TRAIL이 잘 발현되고 수용체 또한 4종류 모두 잘 발현되는 양상을 보였다. 아직까지 망막색소상피세포에서 TRAIL의 발현에 대한 보고는 없었기 때문에 본 연구에서는 발현된 TRAIL mRNA를 염기서열분석으로 확인하였고 염기서열분석에 의해 TRAIL의 mRNA임이 확인되었다. Western blotting으로 확인한 단백질수준의 발현도 IFN- γ 자극 전 후에 모두 확인 되었으며, IFN- γ 자극 후 24시간째에 최고치에 도달하였다.

사람 태아의 정상세포에서 TRAIL의 발현이 IL-1과 TNF- α 의 자극에 의해 증가되었다는 보고³²가 있었는데, 본 연구에서는 IFN- γ 는 물론 IFN- γ 전 처리 후에 투여한 IL-1 β 와 IL-2, 그리고 TNF- α 에 의해 TRAIL의 발현이 증가되었다. 이런 TRAIL의 발현은 FasL의 발현과 매우 유사하게 시간에 따른 변화는 물론 IFN- γ 의 용량에 따라서도 증가되는 소견을 보여 주었는데, 24시간까지도 발현이 증가되어 있었다. 또한 망막색소상피세포의 TRAIL 발현을 FasL의 발현과 비교했을 때 FasL에 비해 TRAIL의 발현이 mRNA수준에서 양적으로 많은 소견을 보여주었다.

TRAIL 수용체는 조직의 종류에 따라 발현되는 수용체의 종류가 다른 특징을 보이지만 망막색소상피세포에서는 두 종류의 decoy 수용체를 포함

하여 4종류의 수용체 모두 잘 발현되고 있었다. 이런 점은 망막색소상피세포 스스로가 T-림프구 표면에서 발현되는 TRAIL 단백질에 의한 세포자살이나 망막색소상피세포 간의 상호접촉에 의한 세포자살에는 저항성을 보일 수 있다는 가능성을 시사한다.

망막색소상피세포에 의한 T-림프구의 세포자살을 검증하기 위해 MOLT-4 세포주 뿐만 아니라 PEER 세포주를 실험에 사용하였다. PEER 세포는 Jurkat 세포와 마찬가지로 T-림프구 세포주로서 Jurkat 세포가 FasL와 TRAIL 각각에 의해 세포자살이 일어나는 것과는 달리 TRAIL에 의한 세포자살은 잘 일어나지만 FasL 자극에는 상당한 저항성을 보인다³³. 이런 이유로 TRAIL경로에 의한 T-림프구의 세포자살을 보다 분명히 밝히기 위해 PEER 세포를 망막색소상피세포와 함께 배양하였다.

배양한 결과 PEER 세포만 배양한 대조군에 비해 망막색소상피세포와 함께 배양한 실험군에서 PEER 세포의 세포자살이 flow cytometry 검사상 더욱 증가되었으며 이러한 결과는 망막색소상피세포를 IFN- γ 로 전 처리한 경우 더욱 두드러졌다. 망막색소상피세포와 PEER 세포의 비율을 바꾸어 가면서 배양했을 때는 E:T ratio가 증가할수록 PEER 세포의 세포자살은 더욱 증가되었다. 망막색소상피와 Jurkat 세포주를 가지고 행한 실험에서 망막색소상피를 IFN- γ 로 전 처리한 후 Jurkat 세포와 함께 배양한 경우 T-림프구의 세포자살이 증가되었다고 보고 되었는데^{17,18} 본 실험에서도 같은 결과를 얻었다. 이러한 결과로 미루어 TRAIL은 망막하강에서 T-림프구의 세포자살 과정에 기여한다고 생각한다. 망막하강에서 망막색소상피세포에 의한 T-림프구의 세포자살유도에 관한 실험에서 세포간의 접촉보다는 수용성인자에 의한 세포자살의 가능성이 제시되었는데^{17,18,20}, 망막색소상피세포에서 분비된 수용성 TRAIL에 의해 T-림프구의 세포자살이 일어났을 가능성도 배제할 수는 없다.

삼출성 연령관련황반변성환자에게 망막색소상피세포를 이식하는 경우 이식받는 부위는 망막색소상피층의 퇴행과 결손은 물론, 부류크막은 결손되어 있으며 맥락막의 모세혈관층은 위축되어있다². 이 경우 이식된 망막색소상피세포가 생존하기 어려울 뿐 아니라, 혈액-망막장벽이 결여되어 있기 때문에 면역관용이 나타나지 않는다. 따라서 건성 연령관련황반변성환자에 비해 거부반응의 빈도가 많고 빠르게 나타나는 특징⁹이 있어 면역억제는 필수적이다. 하지만 대부분의 연령관련황반변성환자들은 고령이고 동반된 내분비, 심혈관 질환이 많아서 면역억제 요법에 상당한 무리가 따른다. 따라서 각막이식 때처럼 이식한 조직의 표면에서 발현되는 FasL와 같은 세포독성인자에 의한 림프구의 세포자살유도에 의한 면역관용의 유지¹⁶가 이식 후 거부 반응을 줄일 수 있는 좋은 방법이라고 생각된다.

본 연구의 결과는 사람 태아 망막색소상피세포는 T-림프구의 세포자살을 유도하고, 이에 관여하는 분자로는 FasL보다는 TRAIL이 보다 중요하다는 점을 시사한다. 또한 TRAIL의 발현이 IFN- γ 나 TNF- α 에 의해 증가될 수 있다는 점을 보여주었다. 이러한 결과로 미루어 사람 태아 망막색소상피를 이식하기 전에 인위적으로 TRAIL의 발현을 증가시킨 후에 이식하는 방법도 유용할 것으로 생각된다.

본 연구에 사용된 세포는 사람 태아로부터 유래된 것이므로 연구결과에서 제시된 TRAIL 매개 T-림프구 세포독성은 태아 안구의 발생과정 중 면역계의 세포에 의한 안구세포의 손상을 막기 위한 일시적 현상일 가능성도 배제할 수는 없다. 그러나 연령관련황반변성의 병인에는 망막색소상피의 노화가 중요한 부분을 차지하고 있으며 따라서 연령관련황반변성을 치료하기 위해서는 가능한 젊은 망막색소상피를 이식하는 편이 전략적으로 유리하다. 그러므로 본 연구에서는 이식하기에 적합하다고 생각되는 사람 태아 망막색소상피세포를 이용하여 연구했으며 그 결과로 망막하강에서 망

막색소상피에 의한 T-림프구 세포자살유도과정에는 TRAIL경로가 관여한다는 증거를 제시하였다. 이러한 결과는 망막색소상피이식의 성공률을 높이기 위한 연구들의 이론적 토대가 될 수 있을 것이다.

V. 결 론

사람 태아 망막색소상피세포에서 발현되는 세포독성분자인 FasL와 TRAIL의 발현을 확인하기 위해 사람 태아 망막색소상피세포를 안구에서 분리 배양한 후에 RT-PCR, flow cytometry 그리고 Western blotting 으로 확인하였다. 아울러 이들 분자들에 의한 림프구의 세포자살유도의 기전을 확인하기 위해 MOLT-4와 PEER 세포주를 사람 태아 망막색소상피세포와 함께 배양한 후에 이들 세포주의 세포자살을 확인하여 다음의 결과를 얻었다.

1. 사람 태아 망막색소상피세포는 FasL과 Fas 수용체의 mRNA를 지속적으로 발현하고 있었다.
2. FasL mRNA 발현은 IFN- γ 자극 후에 증가되었다.
3. 사람 태아 망막색소상피세포는 TRAIL과 4종류의 TRAIL 수용체의 mRNA를 지속적으로 발현하고 있었다.
4. TRAIL의 발현은 IFN- γ 와 TNF- α 자극에 의해 증가되었다.
5. 사람 태아 망막색소상피세포에 의한 림프구의 세포자살유도는 FasL 경로보다는 TRAIL 경로에 의해 나타났다.
6. TRAIL 경로에 의한 림프구의 세포자살유도는 IFN- γ 자극 후에 더욱 강하게 나타났다.

이상의 결과를 통하여 본 연구자는 사람 태아 망막색소상피세포는 FasL와 TRAIL을 지속적으로 발현하고 있으며, 사람 태아 망막색소상피세포에 의한 T-림프구의 세포자살 유도과정은 FasL 보다는 TRAIL에 의한 경로로 이루어지고 있을 가능성을 제시한다.

참고문헌

1. Young RW, Bok D. Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol* 1969;42:392-403.
2. Young RW. Pathophysiology of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 1987;31:291-306.
3. Green WR, McDonnell PJ, Yeo JH. Pathologic features of senile macular degeneration. *Ophthalmology* 1985;92:615-27.
4. Hinton DR, He S, Lopez PF. Apoptosis in surgically excised choroidal neovascular membranes in age-related macular degeneration. *Arch Ophthalmol* 1998;116:203-9.
5. Zhang X, Bok D. Transplantation of retinal pigment epithelial cells and immune response in the subretinal space. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:1021-7.
6. Lopez R, Gouras P, Kjeldbye H, et al. Transplanted retinal pigment epithelium modifies the retinal degeneration in the RCS rat. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1989;30:586-8.
7. Li LX, Sheedlo HJ, Turner JE. Long-term rescue of photoreceptor cells in the retinas of RCS dystrophic rats by RPE transplants. *Prog Brain Res* 1990;82:179-85.
8. Lavail MM, Li L, Turner JE, Yasumura D. Retinal pigment epithelial cell transplantation in RCS rats: normal metabolism in rescued photoreceptors. *Exp Eye Res* 1992;55:555-62.
9. Algvere PV, Berglin L, Gouras P, Sheng Y, Kopp ED. Transplantation of RPE in age-related macular degeneration:

- observations in disciform lesions and dry RPE atrophy. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1997;235:149–58.
10. Algvere PV, Berglin L, Gouras P, Sheng Y. Transplantation of fetal retinal pigment epithelium in age-related macular degeneration with subfoveal neovascularization. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1994;232:707–16.
 11. Gouras P, Algvere P. Retinal cell transplantation in the macula: new techniques. Vision Res 1996;36:4121–5.
 12. Streilein JW. Unraveling immune privilege. Science 1995;270:1158–9.
 13. Hooper P, Bora NS, Kaplan HJ, Ferguson TA. Inhibition of lymphocyte proliferation by resident ocular cells. Curr Eye Res 1991;10:363–72.
 14. Ferguson TA, Waldrep JC, Kaplan HJ. The immune response and the eye. II. The nature of T suppressor cell induction in anterior chamber-associated immune deviation (ACAID). J Immunol 1987;139:352–7.
 15. Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. Science 1995;270:1189–92.
 16. Stuart PM, Griffith TS, Usui N, Pepose J, Yu X, Ferguson TA. CD95 ligand (FasL)-induced apoptosis is necessary for corneal allograft survival. J Clin Invest 1997;99:396–402.
 17. Farrokh-Siar L, Rezai K, Semnani R, et al. Human fetal retinal pigment epithelial cells induce apoptosis in the T- cell line Jurkat. Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1999;40:1503–3998.

18. Rezai KA, Semnani RT, Farrokh-Siar L, et al. Human fetal retinal pigment epithelial cells induce apoptosis in allogenic T-cells in a Fas ligand and PGE2 independent pathway. *Curr Eye Res* 1999;18:430-9.
19. Jorgensen A, Wiencke A, la Cour M, et al. Human retinal pigment epithelial cell-induced apoptosis in activated T cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998;39:1590-1599.
20. Farrokh-Siar L, Rezai KA, Palmer EM, Patel SC, Ernest JT, van Seventer GA. Human Fetal Retinal Pigment Epithelium-Induced Cell Cycle Arrest, Loss of Mitochondrial Membrane Potential and Apoptosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000;41:3991-3998.
21. Jiang S, Wu MW, Sternberg P, Jones DP. Fas mediates apoptosis and oxidant-induced cell death in cultured hRPE cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41:645-55.
22. Smith D, Sieg S, Kaplan D. Technical note: Aberrant detection of cell surface Fas ligand with anti-peptide antibodies. *J Immunol* 1998;160:4159-60.
23. Kaestel CG, Madsen HO, Prause JU, et al. Lack of FasL expression in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Exp Clin Immunogenet* 2001;18:34-41.
24. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305-8.
25. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-65.
26. Jo M, Kim TH, Seol DW, et al. Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related

- apoptosis-inducing ligand. *Nat Med* 2000;6:564-7.
27. Phillips TA, Ni J, Pan G, et al. TRAIL (Apo-2L) and TRAIL receptors in human placentas: implications for immune privilege. *J Immunol* 1999;162:6053-9.
 28. Jerzak M, Bischof P. Apoptosis in the first trimester human placenta: the role in maintaining immune privilege at the maternal-foetal interface and in the trophoblast remodelling. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2002;100:138-42.
 29. Jordan JF, Kociok N, Grisanti S, et al. Specific features of apoptosis in human lens epithelial cells induced by mitomycin C in vitro. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001;239:613-8.
 30. Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* 1983;11:1475-89.
 31. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-54.
 32. Choi C, Park JY, Lee J, et al. Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF-alpha, or IFN-gamma. *J Immunol* 1999;162:1889-95.
 33. Kayagaki N, Yamaguchi N, Nakayama M, et al. Involvement of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human CD4+ T cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol* 1999;162:2639-47.

34. Ferguson TA, Griffith TS. A vision of cell death: insights into immune privilege. *Immunol Rev* 1997;156:167–84.
35. Osborn L, Kunkel S, Nabel GJ. Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:2336–40.
36. Weis M, Schlegel J, Kass GE, et al. Cellular events in Fas/APO-1-mediated apoptosis in JURKAT T lymphocytes. *Exp Cell Res* 1995;219:699–708.
37. Ugarte M, Osborne NN. The localization of endogenous zinc and the in vitro effect of exogenous zinc on the GABA immunoreactivity and formation of reactive oxygen species in the retina. *GenPharmacol* 1998;30:297–303.
38. Wiley SR, Schooley K, Smolak PJ, et al. Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity* 1995;3:673–82.
39. Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A. Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem* 1996;271:12687–90.
40. Golstein P. Cell death: TRAIL and its receptors. *Curr Biol* 1997;7:R750–3.

Abstract

Human Fetal Retinal Pigment Epithelial Cells Express FasL and TRAIL Inducing Lymphocyte Apoptosis

Jongwook Kim

*Department of Medicine
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Joo Young Park)

Fas ligand (FasL), one of the apoptosis inducing members of the TNF (tumor necrosis factor) superfamily, and is believed to be a major contributor to ocular immune privilege. However, to date, the involvement of FasL on human fetal retinal pigment epithelial cell (HFRPE)—induced T cell apoptosis is not well defined. Recently, the TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) was identified as a member of the TNF superfamily, and found to induce apoptosis in a variety of cells. Moreover, FasL and TRAIL are known to cooperate in the mediation of lymphocyte apoptosis in the feto-maternal interface. In this study, we investigated FasL and TRAIL expression in HFRPE and investigated how HFRPE induces lymphocyte apoptosis.

Pure HFRPE cells were isolated and cultured, and the expressions of FasL and TRAIL were examined using RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) and Western blotting. The role of FasL and TRAIL in HFRPE induced lymphocyte apoptosis were assessed. MOLT-4 or PEER cell line was cocultured with HFRPE and the apoptosis fraction was assessed by flow cytometry after Annexin V staining.

Analysis by RT-PCR demonstrated that mRNAs encoding FasL and TRAIL were expressed constitutively on HFRPE, and that their expressions were increased when these cells were treated with IFN- γ (interferon- γ) or TNF- α . Western blotting demonstrated that TRAIL protein was expressed in HFRPE and that its expression was enhanced after IFN- γ treatment. After coculture with MOLT-4 or PEER cell lines, we detected many apoptotic fractions in the PEER cell line by flow cytometry, but not in the MOLT-4 cell line. Furthermore, the PEER cell line apoptosis increased when HFRPE was pretreated with IFN- γ .

We conclude that FasL and TRAIL molecules are constitutively expressed on HFRPE, and that TRAIL-mediated apoptosis is more effective than FasL-mediated apoptosis in HFRPE.

Key words: FasL, TRAIL, RPE, Lymphocyte, Apoptosis