

Histone H1이 마우스에서
콜라겐 유도성 관절염에 미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학사업단

양 재 호

Histone H1이 마우스에서
콜라겐 유도성 관절염에 미치는 영향

지도교수 김 동 수

이 논문을 박사 학위 논문으로 제출함

2002년 12월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

양 재 호

양재호의 박사학위를 인준함

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

심사위원_____인

연세대학교 대학원

2002년 12월 일

감사의 글

이 논문을 완성하기까지 시종일관 모든 면에서 지도해 주시고 조언과 격려로 도움을 주신 김동수 교수님께 진심으로 감사를 드립니다. 바쁘신 가운데도 자문을 해주신 피부과학교실 방동식 교수님, 내과학교실 이수곤 교수님, 정형외과학교실 신규호 교수님과 김현우 교수님께도 깊은 감사를 드립니다. 기초 및 임상실험에 대한 얕은 지식과 어리석은 제자임에도 불구하고 연구의 시작부터 끝까지 따뜻한 가르침과 준엄한 질책을 아끼지 않으시며 저를 이끌어 주신 교수님께 다시 한번 감사드립니다.

끝으로 저를 사랑으로 이해해 주셨고 항상 희생을 아끼지 않으시고 지켜 봐 주신 부모님, 가족 친지분들께 말로 표현할 수 없는 고마움을 전하며, 옆에서 힘이 되어준 사랑하는 아내에게 감사하고, 사랑하는 아들 정운과 딸 예운에게는 저의 박사학위 수여가 목표를 세우고 노력하며 삶을 성취해 나가는 하나의 동기가 되었으면 좋겠습니다.

저자 씀

차 례

그림 차례	iii
표 차례	iv
국문요약	1
I. 서론	3
II. 재료 및 방법	8
1. 실험동물	8
2. CIA의 유발	8
3. 실험군	8
4. 관절염발생을 및 관절염 지수 평가	9
5. 면역반응 평가	9
가. 항 collagen 항체치	9
나. 비장 단핵세포 자극 지수	10
다. 비장세포 단핵구 및 혈청에서의 tumor necrosis factor(TNF)- α 와 interleukin(IL)-10 치의 측정	11
6. 조직염색	12
7. U937 cell line을 이용한 실험	12
가. 배양세포의 상청액에서 TNF- α 및 IL-10의 측정	13
나. 배양세포에서 TNF- α 및 IL-10 mRNA expression	13
(1) 총 RNA분리	13
(2) First strand cDNA 합성	13
(3) TNF α 및 IL-10 primer를 이용한 PCR	14

8. 통계	14
III. 결과	16
1. 관절염의 육안 및 현미경적 소견	16
2. 관절염의 발생율	18
3. 관절염의 중등도	19
4. 항 collagen 항체	24
5. 비장 단핵세포 자극지수	24
6. 배양된 비장세포 상청액 내의 TNF- α 및 IL-10치	25
7. 혈청 TNF- α 및 IL-10치	26
8. 장기조직소견	26
9. 배양된 U937세포 상청액의 TNF- α 및 IL-10치	28
10. U937세포의 TNF- α 및 IL-10 mRNA 발현	29
IV. 고찰	30
V. 결론	40
참고문헌	41
영문요약	51

그림 차례

- Fig. 1. Erythematous swelling of the forefeet of a DBA/1 mouse 5 weeks after primary immunization with chicken type II collagen (upper) and normal forefeet (below). 16
- Fig. 2. Histologic findings of the joints. Joint from the control group mice showed the destruction of articular cartilage, bony erosion and the infiltration of inflammatory cells (left). Mice treated with histone H1 showed almost normal joint histology. Each sections were obtained 10 weeks after the primary immunization (right). (x200) 17
- Fig. 3. Clinical incidence of collagen induced arthritis. Suppression of collagen induced arthritis by histone H1(H1) and dexamethasone(Dexa) was shown ($p < 0.05$). 19
- Fig. 4. Effect of histone H1 on collagen induced arthritis. The score of collagen induced arthritis differed significantly($p < 0.05$) between the control(CTR) group mice and experimental group (dexamethasone(Dexa) or histone H1(H1). 20
- Fig. 5. Effect of different kinds of histones on collagen induced arthritis. Different kinds of histones showed the similar suppressive effect on collagen induced arthritis (H1; histone H1A, H2A; histone

H2A, BuII; Burforin II, Dexa; dexamethasone, CTR;control). 21

Fig. 6. Effect of delivery routes of histone H1 on collagen induced arthritis. Intravenous injection (IV) of histone H1 showed the most effective suppression of collagen induced arthritis compared to subcutaneous(SQ) injection and intraperitoneal(IP) injection. 22

Fig 7. Effect of doses of histone H1 on collagen induced arthritis. Dose dependent effect of histone H1 on the suppression of collagen induced arthritis was not observed. 23

Fig. 8. Production of IL-10 from the splenocytes treated with histone H1(H1) and dexamethasone(DEX). Splenocytes of the mice treated with histone H1 and dexamethasone showed an increased production of IL-10 compared to those of control(CTL) mice. 25

Fig. 9. Histologies of lung(A), kidney(B), spleen(C), and liver(D) from a mouse treated with 20 mg/kg of histone H1. Lung, kidney and spleen showed normal histology. Focal necrotic islands were observed in liver tissue(white arrows). (x200) 27

Fig. 10. Production of IL-10 from U937 cells cultured with different concentrations of histone H1. With increased concentrations of

histone H1, IL-10 productions from U937 cells increased by dose dependent manner. 28

Fig. 11. Effect of histone H1 treatment on mRNA expression for IL-10 in U937 cells. With increased concentrations of histone H1, expression of mRNA for IL-10 also increased. 29

표 차례

Table 1. The level of anti-collagen antibodies in each experimental groups.	24
Table 2. The stimulation indices of splenic mononuclear cells to chicken type II collagen in each experimental groups.	24

국문요약

Histone H1이 마우스에서 콜라겐 유도성 관절염에 미치는 영향

최근까지 histones의 기능은 주로 DNA의 안정화와 chromatin의 condensation과 관계되어 있는 것으로 알려져 왔다. 그러나 histone의 핵산 내에서의 이러한 기능 이외에도 핵산 이외의 장소와 세포 외에서의 역할들이 밝혀지기 시작하면서 많은 연구가 진행되고 있다. 이러한 기능들에는 첫째로, 자가면역질환에서 histone에 대한 항체가 증가한다고 보고되어 자가면역질환과 관련이 있음이 보고되었다. 두 번째로, histone은 rat에서 corticosterone과 같은 홀몬의 생산을 자극하는 것으로 알려져 있으며, 인슐린과 같은 기능이 있음이 밝혀져 있고, 성장홀몬, prolactin, thyrotropin, gonadotropin과 같은 다양한 홀몬의 분비에 관여하는 것으로 알려져 있다. 세 번째로 histone은 in vitro와 동물 모델에서 백혈병 세포의 성장을 억제할 뿐만 아니라 세포 사멸에도 관계가 있는 등 항암의 기능도 있음이 알려져 있다. 네 번째로 histone H1은 sea urchin sperm flagella의 axonemal microtubule의 안정화에 관계되는 것으로 알려져 있다. 이 중에서 histone이 microtubule assembly 기능은 마치 taxol이 가지고 있는 기능과 유사하기 때문에 taxol처럼 류마티스 관절염의 치료에 적용될 수 있음을 시사하고 있다. 이번 연구는 histone이 류마티스 관절염의 동물모델에서 치료효과를 보이는 지를 알아보고, 치료 효과의 기전에 관하여 조사해 보고자 본 연구를 시도하였다.

방법은 DBA/1 mouse에 chicken type II collagen을 피내주사하여 collagen induced arthritis(CIA)를 일으키고 histone H1을 복강내로 투여하며 치료 효과를 판정하였다. 또 다양한 histone을 투여하며 치료효과를 판정하였고 아울러 피내, 정주, 복강내로 투여하여 투여 방법에 따른 CIA의 치료 효과를 판정하였다. 면역 반응을 평가하기 위하여 혈중의 항 collagen 항체치를 ELISA 방법으로 측정하였고, 세포 면역 반응의 평가를 위해 비장 단핵세포의 collagen 항원에 대한 자극 지수를 측정하였다. 아울러 비장세포 단핵구 및 혈청에서의 tumor necrosis

factor(TNF)- α 와 interleukin(IL)-10 치의 측정을 ELISA 방법으로 측정하였으며, 마우스의 다리 및 장기(간, 콩팥, 비장)를 Hematoxylin-Eosin으로 염색하여 현미경으로 관찰하였다. 또, U937 cell line을 이용하여 histone으로 처리하면서 배양세포의 상청액에서 TNF- α 및 IL-10을 ELISA 방법으로 측정하였으며, 배양세포에서 총 RNA를 분리하여 TNF- α 및 IL-10 mRNA expression을 관찰하였다.

결과는 histone H1은 기대했던대로 마우스에서 CIA의 발생을 억제하는 효과를 관찰할 수 있었고 이러한 histone의 CIA발현 억제 효과는 histone의 종류에 관계없이 효과가 있었다. 또 histone의 이러한 CIA발현 억제 효과는 다른 경로에 비하여 정맥으로 투여한 경우가 가장 우수하였다. Histone의 투여 용량은 마우스에서 CIA를 억제하는데 큰 차이를 보이지 않지만 20 mg/kg를 투여하는 경우는 간세포를 손상시키는 것을 관찰할 수 있었다. Histone을 투여한 경우 마우스의 혈청 내 collagen에 대한 항체가는 대조군에 비하여 감소되는 것을 관찰 할 수 있었으나 비장단핵세포자극지수는 차이가 없었다. 흥미있는 것은 histone을 투여한 마우스의 비장세포단핵구에서 대조군에 비하여 IL-10의 분비가 현저하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었으며 이와 같은 소견은 histone으로 자극된 U937세포에서도 IL-10의 분비가 증가하는 것이 관찰되었는데 histone의 용량을 높일수록 IL-10의 분비도 증가되는 소견을 관찰할 수 있었다. 그러나 histone을 투여한 마우스의 비장세포단핵구에서와 histone으로 자극된 U937세포에서는 histone의 양이 증가되어도 TNF- α 의 분비에는 차이가 없었다.

이와 같은 결과를 종합해 볼 때 histone은 마우스에서 CIA의 발생을 억제하는 작용이 있으며 그 기전으로는 아마도 histone이 항염증성 싸이토카인인 IL-10의 분비를 증가시키기 때문으로 생각되었다.

핵심되는 말: collagen induced arthritis, histone, IL-10, TNF- α , U937

Histone H1이 마우스에서 콜라겐 유도성 관절염에 미치는 영향

< 지도 김 동 수 교수 >

연세대학교 대학원 의과학사업단

양 재 호

I. 서 론

류마티스 관절염은 만성적인 염증성 질환으로 관절을 싸고 있는 활막 내로 단핵구가 침윤되면서 점차적으로 진행되어 광범위한 관절의 침식 및 파괴가 일어나는 질환이다. 류마티스 관절염은 다른 자가 면역성 질환과 마찬가지로 주로 중년층의 여자들에게 많이 초래되며, 증상으로는 주로 관절의 부종, 통증, 운동장애 등을 호소하게 된다. 현재까지 류마티스 관절염에 관한 다양한 연구가 진행되어 왔으며 병리학적인 소견으로는 관절을 싸고 있는 활막에 면역학적인 공격인자들로 인하여서 염증이 초래되는 것으로 알려져 있다¹.

현재 류마티스관절염의 치료제로는 크게 다섯으로 분류할 수 있다. 첫째로는 NSAID(non-steroidal anti-inflammatory drugs), 둘째로는 steroid, 세 번째로는 DMARDs (disease modifying anti-rheumatic drugs), 네 번째로는 면역억제제, 다섯 번째로는 실험적인 방법 등이 있다. 이 중에서 가장 대표적으로 사용되는 약물은 NSAID인데 현재 NSAID계통에서 사용되는 약제로는 salicylate, piroxicam, nebumetone, indomethacin, sulindac,

naproxen, diflunisal, diclofenac, phenylbutazone, ibuprofen, flubiprofen, etodolac, tolmetin, ketoprofen, meclofenamate, fenoprofen 등이 있으며 비교적 좋은 효과를 보이고 있어서 가장 광범위하게 사용되고 있으나 위장장애, 신장피질괴사 등의 부작용은 아직도 해결되어야 할 문제로 남아 있다. 스테로이드는 전신증상이 심하거나 눈에 홍채염이 동반된 경우는 반드시 사용하도록 되어 있고 경우에 따라서 단기간 고용량을 사용하거나 관절내 투여가 시도되고 있다. DMARDs는 gold, hydroxychloroquine, D-penicillamine, sulfasalazine, methotrexate 등이 있으며 이 중에서 특히 methotrexate는 근자에 들어 NSAID로 조절되지 않는 경우 효과적인 약물로 각광을 받고 있으나 골수억제, 간기능손상 등의 부작용과 나아가서 발암의 가능성을 아직 배제하지 못하고 있는 실정이다. 그외 면역억제제로는 azathioprine, cyclophosphamide, cyclosporine 등이 있는데 이 중에서 근자에 들어 cyclosporine을 투여하는 경우가 늘고 있다. 그러나 이 약물은 methotrexate와 같은 부작용이 있는가하면 그외에도 infertility, hemorrhagic cystitis 등의 부작용이 있어서 쉽게 처방하기는 어려운 부분이 있는 실정에 있다².

최근에는 관절염 진행에 있어서 중요하다고 인식되는 싸이토카인 예를 들어 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 interleukin-1(IL-1)을 억제함으로써 관절염의 치료효과를 나타내는 약제들이 개발되어 미국의 FDA 승인을 거쳐 실제로 임상에 이용되는 약제들도 있는데 이 중에는 TNF- α 의 길항제로는 infliximab(Remicade[®])과 etanercept(Enbrel[®])가 있고 IL-1의 길항제로는 anakinra(Kineret[®])가 있다³. Infliximab은 chimeric mouse/human anti-TNF α monoclonal antibody로 TNF α 와 결합하여 작용을 나타낸다⁴. 그런가 하면 etanercept는 수용성 p75 TNF α 수용체 융합단백으로서 TNF α 와 결합하여 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다⁵. IL-1의 길항제는

anakinra는 recombinant human IL-1 receptor 대항제로 IL-1 수용체에 강력하게 결합하여 IL-1이 결합하는 것을 억제하는 작용을 가지고 있다³.

이처럼 매우 다양한 약제들이 기존에 개발되어 사용되고 있는데 이러한 약제들은 이미 류마티스 관절염이 발현된 환자에서 치료목적으로 사용되고 있는 약제들이지 예방을 위하여 사용되고 있는 약제들은 아니다. 물론 기존의 약물들이 류마티스 관절염을 치료하는 약제가 아니다. 아직까지 류마티스 관절염의 치료제는 없다. 단지 류마티스 관절염의 자연경과를 modify 하고 염증을 가라 앉힘으로서 환자들로 하여금 일상생활에 적응할 수 있게 하는 것이다. 이러한 관점에서 볼 때 앞으로 개발되어야 할 약물은 항염 작용 뿐만 아니라 이러한 류마티스 관절염의 자연경과를 변형시켜 자연경과를 단축하고 그 만큼 류마티스관절염으로 인한 관절의 기형을 예방할 수 있는 약제들이어야 한다.

이러한 이유로 근자에 들어서 다양한 약제의 개발이 시도되고 있는 실정인데, galectin-1이라고 해서 β -galactoside-binding protein⁶, pyrimidine de novo biosynthesis를 억제하는 합성물질인 KF20444 (6,7-dihydro-10-fluoro-3-(2-fluorophenyl)-5H-benzo[6,7]cyclohepta[1,2-b]-quinoline-8-carboxylic acid)⁷, methotrexate와 유사체인 10-ethyl-10-deazaaminopterin의 thiophene 유사체⁸ 등이 마우스에서 유발한 관절염에 효과가 좋은 것이 밝혀지면서 치료제의 가능성을 보이고 있다. 또 류마티스 관절 내에서 볼 수 있는 면역기전을 조절하여 치료해 보고자하는 시도로 T cell-specific NF- κ B inhibitor인 SP100030⁹, CC chemokine receptor antagonist인 MetRANTES¹⁰, 단세포균 항체로는 anti-Fas 항체(RK-8)¹¹ 및 IL-2 receptor 항체(DACLIZUMAB)¹²와 같은 것이 있으며, 특히 최근 들어 각광을 받고있는 유전자 치료로는 IL-1R antagonist(HuIL-Ra)유전자¹³, cyclin-dependent kinase inhibitor 유전자¹⁴,

extracellular superoxide dismutase (EC-SOD) 유전자¹⁵, tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) 유전자¹⁶, IL-10 유전자 등을 이용한 유전자 치료¹⁷⁻¹⁹가 그 예이다. 이들도 모두 마우스에서 유도된 관절염의 치료에 효과가 있음이 보고되면서 치료제 내지는 치료 방법으로 가능성이 대두되고 있는 실정이다.

이러한 것들 이외에도 식물에서 추출한 물질을 이용하여 류마티스 관절염을 치료해 보고자하는 시도가 계속되고 있는데 녹차 추출물 중에 함유된 polyphen fraction²⁰, 오가피에서 추출한 수용성 추출물 및 지용성 추출물을 정제한 diterpenoid²¹⁻²³, 인진쑥에서 추출한 flavonoid²⁴, 주목에서 추출한 taxol²⁵과 같은 것들이 마우스에서의 관절염 치료에 효과가 있음이 보고되어 있어서 마찬가지로 치료제로서의 가능성이 대두되고 있다.

이 중에서 taxol은 이미 유방암과 같은 암에서 항암제로 사용되고 있으며 그 작용기전은 tubulin polymerization을 유도하여 상당히 안정된 비기능성 microtubule 형성을 유도하는 기능을 가지고 있다. 이러한 기능 이외에 G2/M기를 억제하는 작용을 통해서 활막 세포의 증식을 저해하는 작용이 있다. 이러한 작용은 활막 세포의 apoptosis를 유도해서 일으키는 것이 밝혀졌다. 아울러 이 기능은 류마티스 관절염 환자에서 pannus형성을 억제할 수 있기 때문에 taxol이 류마티스 관절염에 실제적으로 사용될 수 있음이 시사되었다^{25, 26}.

Histone H1은 34kDa의 단백질로, 그 주된 기능은 DNA를 chromatin 내로 folding해 넣는 역할을 하는 것으로 알려져 왔다. 최근들어서 histone은 이러한 chromatin에서의 기능 이외에 다양한 홀몬과 같은 기능들이 밝혀지기 시작하였다²⁷. 말하자면 histone H3와 histone H4는 배양된 rat의 지방세포에 인슐린과 같은 기능이 있음이 밝혀져 있고²⁸, 골수회복과 관계되는 14-amino acid osteogenic peptide는 histone H4의 C terminus와 구

조가 같음이 밝혀져 있다²⁹. 그 외에도 homeostatic thymus hormone의 두 가지 중요한 구성요소가 histoneH2A와 histoneH2B임이 발견되었다³⁰. 또한 histone은 성장호르몬, prolactin, thyrotropin, gonadotropin과 같은 다양한 호르몬의 분비에 관여한다는 보고가 있다³¹⁻³³. 더욱이 homeostatic thymic hormone은 rat에서 corticosterone분비에 관여한다는 것이 알려졌다. 아울러 histone은 microtubule assembly 기능이 있음이 밝혀졌는데³⁴, 이와 같은 작용은 마치 taxol이 가지고 있는 기능과 유사한 작용이기 때문에 이론적으로 taxol처럼 류마티스 관절염의 치료에 적용될 수 있음을 시사하고 있다. 연구자는 이러한 점에 착안을 하여 histone이 실제로 류마티스 관절염의 동물 모델인 collagen induced arthritis를 억제하고 치료하는 효과를 가지고 있는지 알아보기 위하여 본 연구를 시도하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

DBA/1 mouse는 5 주령의 암컷을 일본 Charles Liver에서 수입하여 2주간 본교 실험동물 사육실에서 적응하도록 한 후 7 주령(20-25g)부터 실험에 사용하였다.

2. CIA의 유발

분리 정량된 chicken type II collagen (Sigma, St. Louis, MO, USA)을 0.01N 아세트산에 녹여 2 mg/mL의 농도가 되도록 한 후 4°C에서 18시간 정도 저어준 다음 동량의 Freund's adjuvant(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 섞어 emulsion으로 만들었다. 이를 100 μ L씩 마우스 꼬리의 기저 부근에 피내주사하고 처음 주사한 지 3주 후 동일한 방법으로 추가로 주사하였다.

3. 실험군

실험동물은 크게 3개 군으로 나누었다. 1군은 collagen을 접종하여 관절염을 유발시키면서 histone H1(Boehringer Mannheim GmbH, Germany)을 1주에 2회 복강 내로 투여하며(1 mg/kg), 2군은 collagen을 투여하면서 동시에 dexamethasone (1 mg/kg)을 복강 내로 주 2회 투여하며, 제 3군은 collagen을 투여하여 관절염을 유발시키면서 아무런 처치를 하지 않았다.

두 번째 실험은 histone H1, histone H2A(Boehringer Mannheim GmbH, Germany), burforin II(Boehringer Mannheim GmbH, Germany)를 같은 용법과 같은 용량으로 투여하면서 관절염의 변화를 관찰하였다. 세 번째 실험은 투여 방법을 달리하여 투여하면서 관절염의 변화를 관찰하였는데 피내, 정주, 복강 내로 투여하였다. 정주는 꼬리정맥에 주사하였다. 네 번째 실험은 histone H1A의 용량을 달리하면서 투여하였는데 0.1 mg/kg, 1 mg/kg, 10 mg/kg, 20 mg/kg를 복강 내로 투여하면서 관절염의 변화를 관찰하여 보았다.

4. 관절염발생률 및 관절염 지수 평가

주 2회 육안으로 발의 발적과 부종 및 기형의 발생 유무를 관찰하여 각 시기별 관절염 발생률을 조사하였다. 또한 CIA score는 일반적인 육안검사에 의하여 결정하였다. 즉 발적이나 부종 등 관절염의 증거가 없을 때는 0 점, score 1은 한 두 개의 발가락에 종창을 동반한 홍조를 띄거나, 최소한의 종창이 유발된 상태, score 2는 확실한 홍조를 띄거나 국부적 상지종창, 그리고 이러한 것이 여러 발가락에서 관찰되는 경우이며, score 3는 무릎까지의 상당한 부종과 종창이 관찰되며 자유로이 발을 이용하지 못하는 상태로 하였다. 각각의 발에서 나타나는 score는 네 발을 각각 평가한 후 합산하여 최대 12점이 되도록 하였고, 실험자의 bias를 줄이기 위하여 최소 3인의 입회 하에 의견의 일치를 얻어 점수화 하였다.

5. 면역반응 평가

가. 항 collagen 항체치

실험 10주 짜에 심장 천자로 혈액을 채취하여 혈청을 분리하였다. 측정 시까지 검체는 영하 70 °C에서 보관하였으며 실험 직전에 해동하여 항 collagen 항체를 ELISA 방법으로 측정하였다. 실험 방법을 간단하게 요약 하면, 96 well polystyrene microplate (Nunc, Denmark)의 각 well에 0.1 M PBS(phosphate buffered saline)에 녹인 chicken type II collagen(10 µg/mL)을 가하여 4°C에서 16시간 동안 방치한 후 PBS-0.05 % Tween 20 으로 well을 4회 세척하였다. 비특이적 결합의 방지를 위해 각 well에 PBS-0.5 % ovalbumine을 가하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 다시 PBS-0.05 % Tween 20으로 4회 세척하였다. 마우스의 혈청은 PBS로 1:100 희석하여 각 well 에 넣고 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 PBS-0.05 % Tween 20으로 4회 세척하였다. 그 후 각 well에 peroxidase-conjugated anti-mouse IgG, A, M을 넣어 2시간 동안 반응시킨 후 5-aminosalicylic acid를 넣은 후 450 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 각 검체의 항 collagen 항체치 측정은 2차례 시행하여 평균값을 얻었다. 예비실험에서 심한 관절염 증세를 보인 DBA/1 마우스 5마리의 혼합혈청의 값을 100 unit로 정하고 흡광도와 unit 간에는 직선형의 상관관계를 확인하였으며 이때 정상 마우스에서는 항 collagen항체가 검출되는지 확인하였다.

나. 비장 단핵세포 자극 지수

세포 면역 반응의 평가를 위해 비장 단핵세포의 collagen 항원에 대한 자극 지수를 측정하였다. 방법을 요약하면, 실험 10주째 동물을 희생한 후 비장을 무균적으로 적출하여 주변의 조직을 제거한 후 PBS로 수 차례 세척하였다. 비장 조직을 잘게 잘라 Hank's balanced salt solution(HBSS,

containing 10 nM HEPES, pH 7.4)에 넣어 세포를 부드럽게 분리시킨 후 무균 거즈에 걸러 응괴를 제거하였다. 걸러진 세포 부유액은 원심분리 하여 상청액을 제거한 후 0.015 M Tris/0.14 M NH₄Cl(pH 7.4)으로 처리 하여 적혈구를 제거하고 다시 HBSS로 3회 세척하였다. 처리된 세포는 RPMI 1640-10 % fetal calf serum media에 부유 시켜 2x10⁶ cell/mL 농도로 만든 후 멸균된 well plate에 각 well당 100 μ L 씩 넣었다. 각 well에 collagen 용액(25 μ g/mL) 100 μ L를 넣은 후 5 % CO₂ 배양기에서 37 °C를 유지하며 96시간 동안 배양하였다. 배양 종료 4시간 전에 0.5 μ Ci (³H)-thymidine를 가한 후 cell harvester를 사용하여 glass fiber filter 위에 harvest하였다. 배양 후 베타측정기로 세포 내에 결합된 (³H)-thymidine을 측정하여 자극 지수(stimulation index, SI)를 다음과 같이 계산하였다.

$$SI = \frac{\text{mean CPM of } (^3\text{H}) \text{ TdR in collagen stimulated culture}}{\text{mean CPM of } (^3\text{H})\text{TdR in unstimulated culture}}$$

다. 비장세포 단핵구 및 혈청에서의 tumor necrosis factor(TNF)- α 와 interleukin(IL)-10 치의 측정

위와 같은 방법으로 얻은 비장세포 단핵구를 배양하면서 10 μ g/mL의 Concanavalin A로 자극하면서 자극 전, 자극 후 24시간 및 72시간에 상청액을 분리하여 싸이토카인의 측정 시까지 검체를 영하 70 °C에서 보관하며 실험 직전에 해동하여 상청액내 TNF- α 및 IL-10 치를 R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA)의 mouse TNF- α 또는 IL-10 ELISA kit로 manufacturer manual의 방법에 따라 측정하였다. 실험 방법을 간단하게 요약하면, mouse TNF- α 또는 IL-10 항체가 도포된 96 well polystyrene

microplate의 각 well에 표준농도의 mouse TNF- α 또는 IL-10을 넣고 동시에 마우스혈청을 넣었다. 이 plate를 2시간동안 실온에 방치한 후 PBS-0.05 % Tween 20으로 well을 4회 세척하였다. 여기에 다시 HRP-conjugated anti mouse mouse TNF- α 또는 IL-10을 가하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 다시 PBS-0.05% Tween 20으로 4회 세척하였다. 여기에 다시 substrate chromogen solution을 넣고 실온에서 10분간 반응시킨 후 1 M H₂SO₄를 넣어 반응을 중지시킨 후 450 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 여기서 얻은 흡광도를 가지고 TNF- α 또는 IL-10 표준 농도 곡선에 대입하여 혈청내의 TNF- α 및 IL-10 농도를 측정하였다.

혈청에서의 같은 싸이토카인의 측정은 마우스의 희생 시에 얻은 혈청을 영하 70 °C에 보관하였다가 위와 같은 방법으로 측정하였다.

6. 조직염색

마우스를 희생시킬 때 각 군의 다리 및 장기(간, 콩팥, 비장)를 잘라 formalin으로 고정시킨 후 탈회작용을 거쳐서 Hematoxylin-Eosin으로 염색하여 현미경으로 관찰하였다.

7. U937 cell line을 이용한 실험

U937 cell line을 이용하여 세 군으로 나누어 실험하였다. 첫 번째 군은 아무런 자극이 없는 경우, 두 번째 군은 IFN- γ (R & D systems Inc., Minneapolis, MN, USA)로 세포를 자극한 군, 세 번째는 IFN- γ 로 자극하면서 histone H1으로 처리한 군으로 나누었다.

U937세포를 24 well plate에 배양하였는데 세포수는 2×10^5 /mL로 하

였으며 배지는 RPMI-1640에 10mM HEPES, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 streptomycin, 10 % (v/v) fetal calf serum을 섞어서 배양하였다. INF- γ 는 100 U/mL이 되게 하여 세포를 자극하였고 histone H1A는 각각 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 자극하였다. 세포는 5% CO₂ 배양기에 37 °C에 4일간 배양하였다.

가. 배양세포의 상청액에서 TNF- α 및 IL-10의 측정

위와 같은 방법으로 배양한 후 상청액을 떠서 ELISA kit를 이용하여 TNF- α 및 IL-10 치를 측정하였다. 측정방법은 앞에서 기술한대로 하였다.

나. 배양세포에서 TNF- α 및 IL-10 mRNA expression

(1) 총 RNA분리

위와 같은 방법으로 상청액을 취하고 남은 세포를 가지고 RNeasy minikit(Qiagen Co., Hilden, Germany)를 이용하여 총 RNA를 분리하였다. RNA 농도는 260 nm의 파장에서 UV-1601PC 분광광도계를 이용하여 측정하였다.

(2) First strand cDNA 합성

분리한 총 RNA 2 μg 으로부터 1st strand cDNA synthesis kit for RT-PCR(AMV)(Boehringer Mannheim Co., Indianapolis, IN, USA)과 GeneAmp PCR system 9600(Perkin Elmer Corp., Branchburg, NJ, USA)을 이용하여 cDNA를 제조하였다. First strand cDNA의 생성 여부를 알기 위해 생성된 반응 산물 10 μl , Taq polymerase (Takara Shuzo Co., Shiga,

Japan) 0.5 U와 human beta actin primers(sense primer : 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'; antisenseprimer : 5'-CTCCTTAATGT CACGCACGATTTC-3')를 20 pmole씩 혼합하여 PCR을 시행하였다. PCR은 GeneAmp PCR system 9600을 이용하여 94 °C에서 30초, 60 °C에서 30초, 72 °C에서 30 초를 23회 시행하고 72 °C에서 10분간 반응시켰다. PCR 산물 10 μ l를 1.5 % agarose gel에서 전기 영동한 후 밴드의 유무를 확인하였다.

(3) TNF α 및 IL-10 primer를 이용한 PCR

TNF- α 및 IL-10 primer로서 각각 human TNF- α primer set for RT-PCR(Stratagene, LaJolla, LA, USA)과 human IL-10 primer set을 이용하여, 94 °C에서 5분, 60 °C에서 5분간 반응시킨 후, 72 °C에서 1분 30초, 94 °C에서 45초, 60 °C에서 45초를 35회 시행하고 72 °C에서 10분간 반응하였다. 양성 대조군으로 10⁵개의 herpes simplex virus를 HDMEC에 처리한 후 함께 시행하였다. PCR 산물 10 μ L를 1.5% agarose gel에서 전기 영동한 후 밴드 유무를 관찰하였다. 이때 사용한 TNF- α 의 primer set는 5' - A G C A C A G A A A G C A T G A T C C C G - 3' 과 5'-CAGAGCAATGACTCCCAAAGT-3'이었고, IL-10의 primer set는 5' - A A C C A A G A C C C A G A C A T C A A G G C G - 3' 과 5'-CAGAGCCCCAGATCCGATTTTGG -3' 이었다.

8. 통계

시기에 따른 각 군의 관절염 발생률은 Fisher's exact test 검증법으로, 관절염 지수는 chi square test 검증법으로 비교하였다. 항 collagen 항체

및 비장 단핵세포의 자극 지수, 그리고 TNF- α 와 IL-10 치는 chi square test 검증법으로 비교 분석하였다. 모든 통계적 검정에서 유의기준은 p 값이 0.05 이하일 때로 하였다.

III. 결 과

1. 관절염의 육안 및 현미경적 소견



Fig. 1. Erythematous swelling of the forefeet of a DBA/1 mouse 5 weeks after the primary immunization with chicken type II collagen (upper) and normal forefeet (below).

마우스에 발에서 관찰되는 발적과 부종을 동반하는 관절염의 육안적 소견은 Fig. 1과 같았다. 마우스를 실험 10주 째에 희생시키고 얻은 관절염의 조직학적 소견은 염증의 소견을 뚜렷하게 보이면서 골의 파괴를 관찰할 수 있었다(Fig. 2).

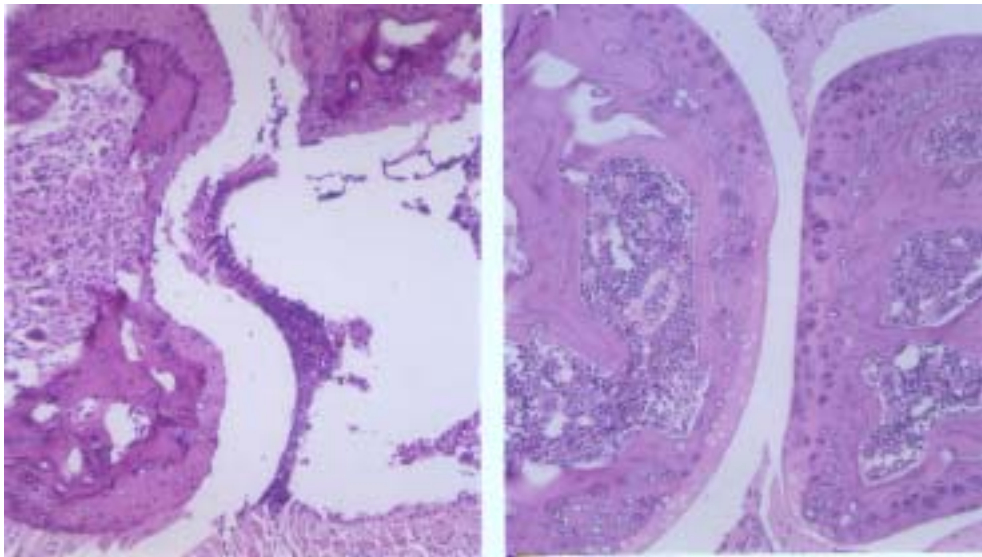


Fig. 2. Histologic findings of the joints. Joint from the control group mice showed the destruction of articular cartilage, bony erosion and the infiltration of inflammatory cells (left). Mice treated with histone H1 showed almost normal joint histology. Each sections were obtained 10 weeks after the primary immunization (right). (x200)

2. 관절염의 발생을

관절염의 발생은 모든 실험 동물군에서 type II collagen을 투여한 후 4주째부터 발현되기 시작하였다. 아무런 처치를 하지 않은 대조군에서는 시간이 경과하면서 관절염이 증가하여 type II collagen을 투여한 후 7주째에는 모든 실험 동물에서 관절염이 발생하였는데, 실험 시작 후 4주에 30%, 5주에 60%, 7주에 들어서는 100%의 마우스에서 관절염의 발생이 관찰되었다.

Dexamethasone을 투여한 군에서는 역시 type II collagen을 투여한 후 4주째부터 관절염이 발생하였으며 이러한 관절염의 발생은 5주째 30%에서 관찰되고 그 이후에는 더 이상의 관절염의 발생의 증가가 관찰되지 않았다($p < 0.05$).

Histone H1를 투여한 군에서도 다른 군에서와 마찬가지로 type II collagen을 투여한 후 4주째부터 관절염의 발생이 관찰되기 시작하였으며 이러한 관절염의 발생은 5주와 6주째에 38%로 가장 많이 발생되었고 그 후 7주째부터는 10-20%로 오히려 감소하는 추세를 관찰할 수 있었다($p < 0.05$). 이처럼 histone H1를 투여한 군에서는 아무 것도 처치하지 않은 군과 비교할 때 의미 있는 관절염의 발생을 억제하는 결과를 보였으며 이러한 효과는 dexamethasone을 투여한 효과와 맞먹는 결과를 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

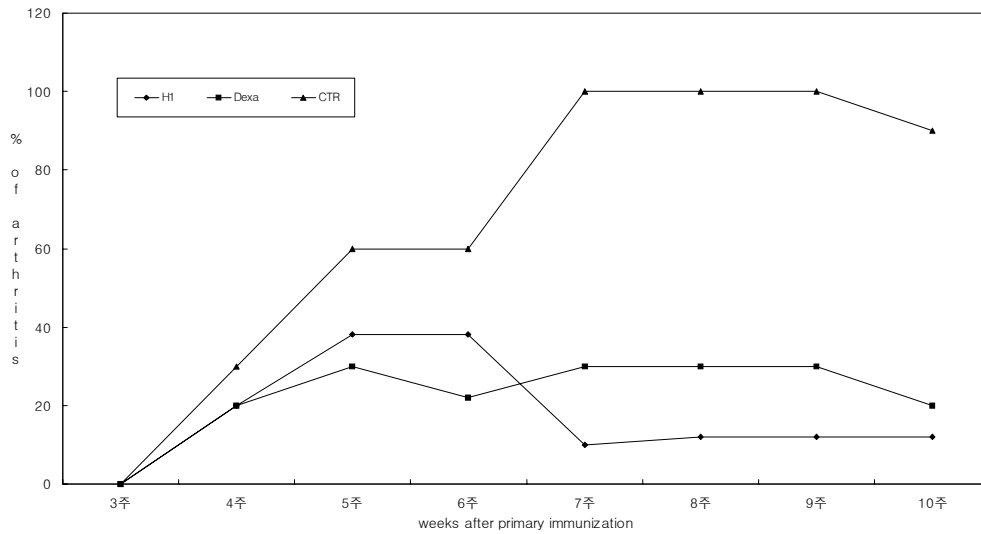


Fig. 3. Clinical incidence of collagen induced arthritis. Suppression of collagen induced arthritis by histone H1(H1) and dexamethasone(Dexa) was shown ($p < 0.05$).

3. 관절염의 중등도

관절염의 중등도는 관절염 지수로 측정하였는데 아무런 처치도 하지 않은 대조군에서는 관절염의 중등도가 계속해서 증가하여 type II collagen을 투여한 후 4주에는 2.0 ± 0.3 , 5주에 3.5 ± 0.5 , 6주에 5.0 ± 0.8 , 7주에 8.2 ± 1.5 , 9주에 8.6 ± 1.7 , 10주에 7.8 ± 1.8 을 보여서, 10주에 접어들면서 관절염의 중등도는 오히려 좋아지는 양상을 보여주었으나 통계적인 의미는 없었다. Histone H1를 투여한 군에서는 collagen 투여 후 4주에 1.2 ± 0.4 , 5주에 1.7 ± 0.3 , 6주에 2.2 ± 0.3 , 8주에 2.5 ± 0.4 , 10주에 1.8 ± 0.3 로 대조군에 비하여 의미 있는 관절염의 중등도에 감소를 관찰할 수 있었다($p < 0.01$). Dexamethasone을 투여한 군에서는 histone H1를 투여한 군과 비슷한 관

절염의 증등도를 관찰할 수 있었다.(Fig. 4)

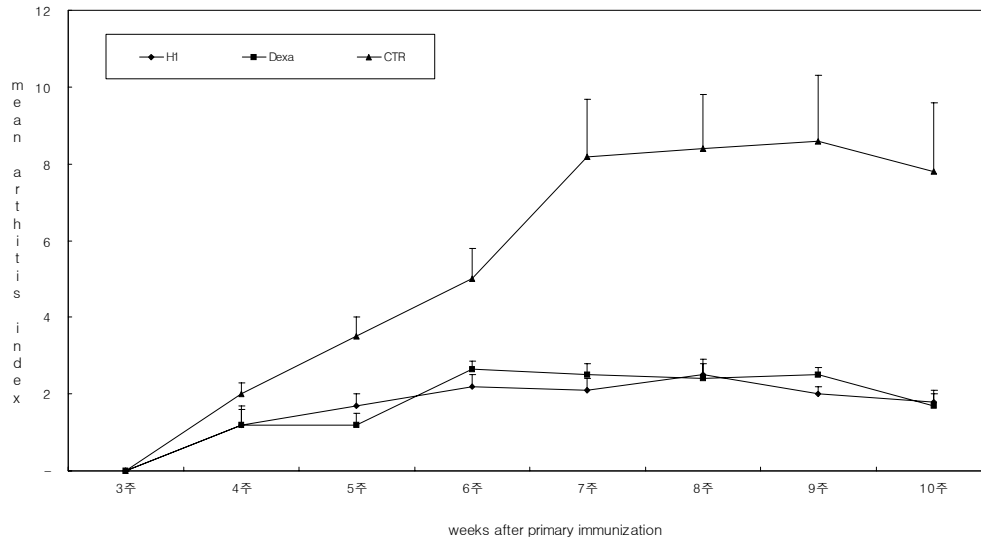


Fig. 4. Effect of histone H1 on collagen induced arthritis. The score of collagen induced arthritis differed significantly($p < 0.05$) between the control(CTR) group mice and experimental groups (dexamethasone(Dexa) or histone H1(H1)).

이와 같은 histone H1의 CIA 억제효과는 비단 histoneH1 뿐만 아니라 다른 종류의 histone을 투여한 경우에서도 비슷한 효과를 관찰할 수 있어서(Fig. 5), histone H1의 CIA 억제효과는 histone의 종류와는 무관하게 모든 종류의 histone에서 골고루 가지고 있는 효과임을 알 수 있었다.

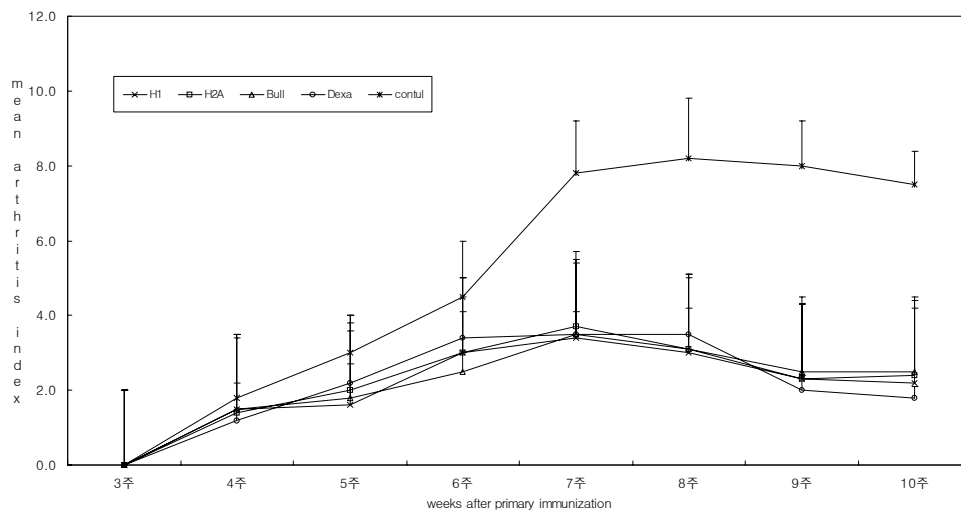


Fig. 5. Effect of different kinds of histones on collagen induced arthritis. Different kinds of histones showed the similar suppressive effect on collagen induced arthritis (H1;histone H1A, H2A;histone H2A, BuII;Burforin II, Dexa;dexamethasone, CTR;control).

투여 방법에 따른 histone H1의 CIA 억제효과는 정맥으로 투여한 경우가 가장 효과가 좋았고 그 다음은 피하로 투여한 경우이며 그 다음은 복강 내로 투여한 경우였으나, 피하와 복강 내 투여방법은 통계적인 의미는 없었다(Fig. 6).

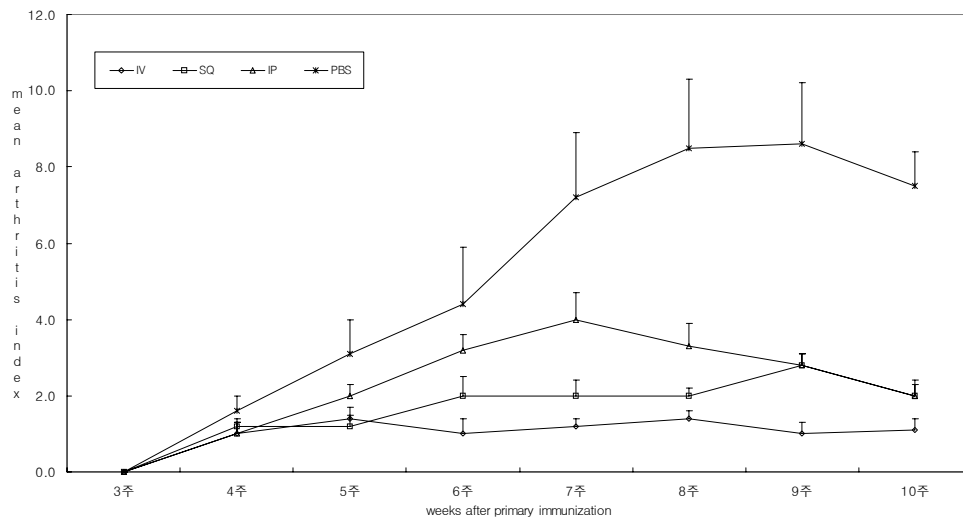


Fig. 6. Effect of delivery routes of histone H1 on collagen induced arthritis. Intravenous injection (IV) of histone H1 showed the most effective suppression of collagen induced arthritis compared to subcutaneous(SQ) injection and intraperitoneal(IP) injection.

투여 용량에 따른 histone H1의 CIA 억제효과는 농도를 증량할 수록 억제효과가 높은 것처럼 관찰되었으나 기대했던 것과는 달리 농도가 높다고 억제효과가 높고 농도가 낮다고 억제효과가 낮은 것은 아니었다(Fig. 7).

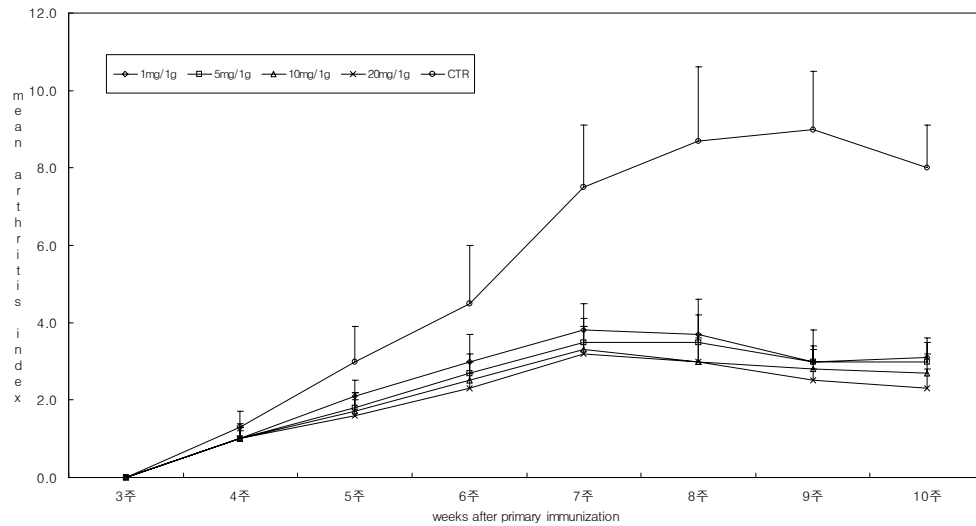


Fig 7. Effect of doses of histone H1 on collagen induced arthritis. Dose dependent effect of histone H1 on the suppression of collagen induced arthritis was not observed.

4. 항 collagen 항체

항 collagen 항체치는 아무 처치도 하지 않은 군에서는 92.5 ± 7.5 U, dexamethasone을 투여한 군에서는 61.4 ± 24.3 U로 대조군에 비하여 의미 있는 감소($p < 0.05$)를 보였으며, histone H1를 투여한 군에서는 54.0 ± 17.0 U로 대조군에 비하여 역시 의미 있는 감소($p < 0.01$) 보여 주었다(Table 1).

Table 1. The level of anti-collagen antibodies in each experimental groups (Mean \pm SD)

Groups	Anti-collagen antibody(Arbitrary Unit)
Controls	92.5 ± 7.5
Histone H1	$54.0 \pm 17.0^*$
Dexamethasone	$61.4 \pm 24.3^{**}$

* : $p < 0.01$, ** : $p < 0.05$

5. 비장 단핵세포 자극지수

비장 단핵세포의 collagen에 대한 자극지수는 대조군이 2.1 ± 0.9 , dexamethasone을 투여한 군에서가 2.0 ± 0.9 , histone H1를 투여한 군에서가 1.8 ± 1.1 로 세 군 공히 의미 있는 차이를 보이지는 않았다(Table 2).

Table 2. The stimulation indices of splenic mononuclear cells to chicken type II collagen in each experimental groups (Mean \pm SD)

Groups	Stimulation Index(SI)
Controls	2.1 ± 0.9
Histone H1	1.8 ± 1.1
Dexamethasone	2.0 ± 0.9

6. 배양된 비장세포 상청액 내의 TNF- α 및 IL-10치

각각의 실험군을 대상으로 마우스를 실험 시작 후 10주에 희생시켜서 얻은 비장세포 부유액을 배양하면서 Concanavalin A로 자극한 후에 얻은 배양 상청액 내에서의 TNF- α 치는 각 군에서의 차이를 발견할 수 없었다 (data not shown). 그러나 IL-10은 자극 후 24시간까지는 별로 차이가 없다가 72시간 후에는 뚜렷하게 차이가 있어서 아무 처치도 하지 않은 군에서는 515 ± 15 pg/mL의 분비를 보인 반면, dexamethasone을 투여한 군에서는 $4,050 \pm 117$ pg/mL과 histone H1을 투여한 군에서는 $3,620 \pm 135$ pg/mL로 현저한 IL10 분비의 증가를 관찰할 수 있었다(Fig. 8). 이와 같은 결과는 dexamethasone과 histone H1를 투여한 군에서는 비장단핵세포에서 IL-10의 생성을 현저하게 자극한다는 것을 알 수 있었다.

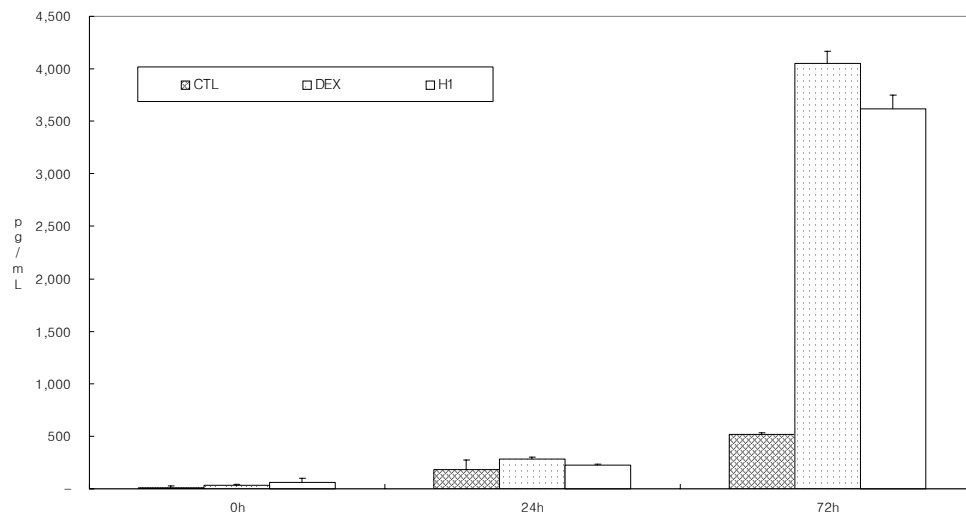


Fig. 8. Production of IL-10 from the splenocytes treated with histone H1(H1) and dexamethasone(DEX). Splenocytes of the mice treated with histone H1 and dexamethasone showed an increased production of IL-10 compared to those of control(CTL)mice.

7. 혈청 TNF- α 및 IL-10치

각 군의 실험 동물에서 혈청내의 혈청 TNF- α 및 IL-10치를 조사한 결과 두 사이토카인 모두 각 군에서 서로 다른 차이는 발견할 수 없었다 (data not shown).

8. 장기조직소견

Histone H1를 투여하면서 조사한 장기의 조직 소견은 특별한 변화는 관찰할 수 없었으나 20 mg/kg의 농도를 투여한 군에서 간 조직 내에 세포의 괴사가 군데 군데 발견되어서, 이 농도의 histone H1는 간 손상을 초래할 수 있는 것을 알 수 있었다(Fig. 9).

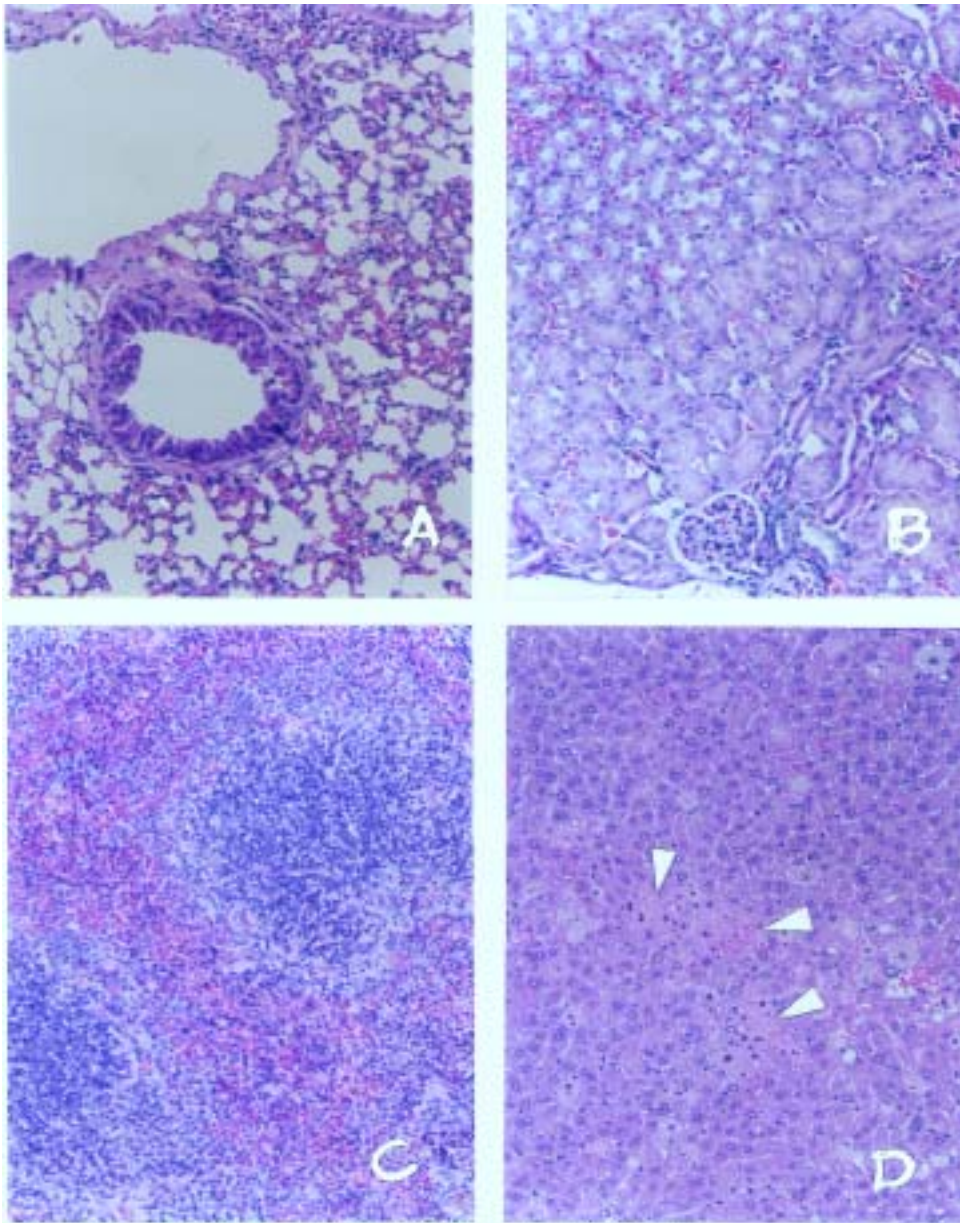


Fig. 9. Histologies of lung(A), kidney(B), spleen(C), and liver(D) from a mouse treated with 20 mg/kg of histone H1. Lung, kidney and spleen showed normal histology. Focal necrotic islands were observed in liver tissue(white arrows). (x200)

9. 배양된 U937세포 상청액의 TNF- α 및 IL-10치

U937 cell line을 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도의 histon H1로 자극한 후 4일째 얻은 배양 상청액 내의 TNF- α 치의 분비는 차이가 없었으나(data not shown), IL-10치의 분비는 histon H1의 농도가 증가할수록 27.8 pg/mL, 30.7 pg/mL, 31.2 pg/mL, 35.7 pg/mL로 증가하는 양상을 보였다(Fig. 10).

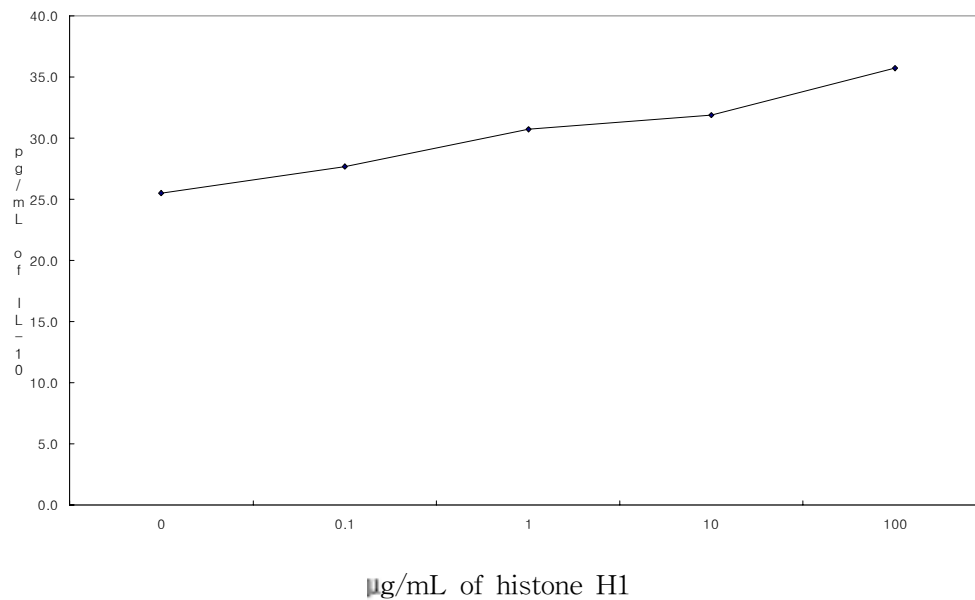


Fig. 10. Production of IL-10 from U937 cells cultured with different concentrations of histone H1. With increased concentrations of histone H1, IL-10 productions from U937 cells increased by dose dependent manner.

10. U937세포의 TNF- α 및 IL-10 mRNA 발현

U937 cell line을 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 histon H1로 자극한 후 4일째 얻은 세포 내의 TNF- α mRNA는 차이가 없었으나, IL-10 mRNA 표현은 histon H1의 농도가 증가할수록 비례하여 증가하는 양상을 보였다(Fig. 11).

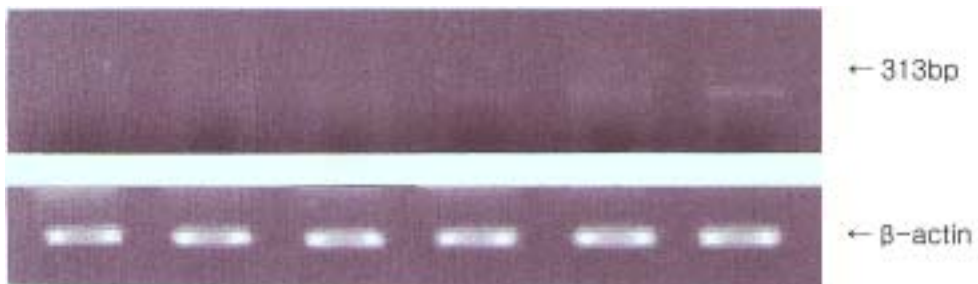


Fig. 11. Effect of histone H1 treatment on mRNA expression for IL-10 in U937 cells. With increased concentrations of histone H1, expression of mRNA for IL-10 also increased.

IV. 고찰

본 연구에 의하면 histone은 마우스에서 유발된 CIA의 치료 효과가 있음을 관찰 할 수 있었다. 이러한 치료효과의 기전은 여러 가지로 생각할 수 있겠지만 아마도 histon H1이 생체 내에서 항 염증성 사이토카인인 IL-10의 생성을 자극하여 유발된 CIA에 대하여 치료 효과를 보인 것으로 생각할 수 있다.

류마티스 관절염은 관절 내에 형성된 만성 염증성 질환으로 다양한 염증성 사이토카인들이 증가되는 것으로 알려져 있다. 관절내의 활액 속에서 증가되는 사이토카인으로는 TNF- α , MIP-1 α , IL-6, IL-8, IL-18, IL-1 β 등으로 이러한 염증성 사이토카인 특히 TNF- α 와 IL-1 β 는 상호상승작용을 일으켜서 연골내의 연골세포에 작용하여 collagenase 생성을 증가시키고 뼈속의 osteoclast를 활성화 시키는 것으로 알려져 있다. 또한 이들 염증성 사이토카인은 high venule의 내피세포를 자극하여 세포 표면에 adhesion molecule의 표현을 증가시켜서 순환되고 있는 염증성 세포 및 림프구의 조직 내 이동을 유발하여 염증반응을 일으키게 된다. 또한 TNF- α 와 IL-1 β 에 의하여 자극을 받은 활막의 섬유모세포는 IL-8, PGE2 와 IL-6 등을 분비하게 하여 급만성 염증반응을 유발하게 한다. 물론 이들에 의하여 활막의 섬유모세포와 연골세포에서 생성된 collagenase와 중성 protease는 collagen과 proteoglycan을 파괴하여 관절연골을 파괴시켜서 관절염을 일으키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다^{24, 35}.

또한 CIA의 경우에서도 류마티스 관절염에서와 마찬가지로 다양한 면역 담당세포가 활성화 되어있는 점으로 미루어 보아 사이토카인은 effective molecules로서 병리 기전을 유발시킬 뿐만 아니라 관절염의 진행

에도 관여하는 중요한 인자임을 알 수 있다. 특히 CIA의 초기 및 진행단계에 있어서 류마티스 관절염에서 처럼 염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-1 β , IL-6가 중요한 역할을 함이 이미 잘 알려져 있다^{36, 37}.

현재 류마티스 관절염의 치료는 약물치료가 중요하지만 약물 치료 이외에도 재활치료, 작업치료, 안과 및 정형외과적인 검사 및 치료 내지는 영영사, 간호사, 그리고 심지어 정신과적인 치료가 필요하기도 하다. 물론 이 중에서도 약물 치료는 류마티스 관절염의 치료에 가장 중요한 부분이다. 기존의 약물치료는 NSAID(non-steroidal anti-inflammatory drugs), corticosteroid, DMARDs (disease modifying anti-rheumatic drugs), 면역억제제 등이 있다². 이와 같이 기존에 개발되어 사용되고 있는 약제들은 이미 류마티스 관절염이 발현된 환자에서 치료목적으로 사용되고 있는 약제들이지 예방을 위하여 사용되고 있는 약제들은 아니다. 물론 기존의 약물들이 류마티스 관절염을 치료하는 약제가 아니다. 아직까지 류마티스 관절염의 치료제는 없다. 단지 류마티스 관절염의 자연경과를 modify하고 염증을 가라 앉힘으로서 환자들로 하여금 일상생활에 적응할 수 있게 하는 것이다. 이러한 관점에서 볼 때 앞으로 개발되어야 할 약물은 항염 작용뿐만 아니라 이러한 류마티스 관절염의 자연경과를 변형시켜 자연경과를 단축하고 그 만큼 류마티스 관절염으로 인한 관절의 기형을 예방할 수 있는 약제들이어야 한다.

근자에 들어서 이와 같은 점을 극복하고 앞서 기술한 것과 같은 병리기전을 차단하려는 쪽의 약물들을 개발하려는 목표하여 다양한 실험적인 약물들이 이미 개발되어 시판중이며 또 계속해서 개발되고 있는 실정이다. 그 중에 대표적으로 앞서도 기술한 것처럼 tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 interleukin-1(IL-1)을 억제함으로써 관절염의 치료효과를 나타내는 약제들이 개발되어 미국의 FDA 승인을 거쳐 실제로 임상에 이용되는 약

제들도 있는데 이중에는 TNF- α 의 길항제로는 infliximab(Remicade[®])과 etanercept(Enbrel[®])가 있고 IL-1의 길항제로는 anakinra(Kineret[®])가 있다³. 이들의 치료효과는 특히 기존의 약물에 의하여 잘 조절되지 않는 경우에 효과가 있음이 보고되어 있으며 향후 치료 적응증의 확대가 기대되는 바이다.

이러한 생물학적인 제제들 특히 류마티스 관절염 환자의 관절 내에서 보이는 여러 가지 면역학적인 이상조건들을 밝혀내고 이들의 발현을 조절하여 환자의 치료에 이용하려는 노력들이 계속되고 있는 실정에 있다. 이러한 약물들은 일차적으로 마우스에서 유도한 관절염을 대상으로 치료효과를 먼저 측정하여 보고 그 결과를 실제로 임상에 이용하려는 방향으로 움직이고 있다. 현재 동물모델에서 후에 치료효과를 보이는 것으로는 β -galactoside-binding protein으로 알려져 있는 galectin-1⁶, pyrimidine de novo biosynthesis를 억제하는 합성물질인 6,7-dihydro-10-fluoro-3-(2-fluorophenyl)-5H-benzo[6,7] cyclohepta[1,2-b] -quinoline-8-carboxylic acid(KF20444)⁷와 같은 것이 있고 류마티스 관절염의 치료제로 우수한 효과를 가지는 methotrexate의 유사체인 10-ethyl-10-deazaaminopterin의 thiophene 유사체⁸ 등이 마우스에서 유발한 관절염에 효과가 좋은 것이 밝혀지면서 치료제의 가능성을 보이고 있다.

또 류마티스 관절 내에서 관찰되는 다양한 면역학적 이상기전을 조절하여 치료해 보고자하는 생물학적인 제제의 시도로는 먼저 T 세포의 활성화를 억제하여 치료효과를 보려는 시도로 T cell-specific NF- κ B inhibitor인 SP100030⁹를 이용하여 치료하려는 시도가 있고, CC chemokine receptor antagonist인 MetRANTES¹⁰를 이용하여 염증세포의 국소 유입을 억제하려는 시도를 통한 치료를 시도하려는 방법, anti-Fas 단세포군 항체 (RK-8)¹¹로 세포 사멸을 조절하여 관절염의 치료를 시도하려는 노력, 및 역

시 T세포의 활성화를 억제하려는 시도로 IL-2 receptor 단세포군 항체 (DACLIZUMAB)¹²를 투여하여 치료하려는 노력 등이 있다.

특히 최근 들어 각광을 받고있는 유전자 치료를 통한 류마티스 관절염의 치료에 대한 시도로는 IL-1R antagonist(HuIL-Ra)유전자¹³, cyclin-dependent kinase inhibitor 유전자¹⁴, extracellular superoxide dismutase (EC-SOD)유전자¹⁵, tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) 유전자¹⁶, IL-10 유전자 등을 이용한 유전자 치료¹⁷⁻¹⁹가 그 예이다.

이러한 것들 이외에도 식물에서 추출한 물질을 이용하여 류마티스 관절염을 치료해 보고자하는 시도가 계속되고 있는데 녹차 추출물 중에 함유된 polyphen fraction²⁰, 오가피에서 추출한 수용성 추출물 및 지용성 추출물을 정제한 diterpenoid²¹⁻²³, 인진쑥에서 추출한 flavonoid²⁴, 주목에서 추출한 taxol²⁵과 같은 것들이 마우스에서의 관절염 치료에 효과가 있음이 보고되어 있어서 마찬가지로 치료제로서의 가능성이 대두되고 있다. 실제로 인진쑥에서 추출한 flavonoid²⁴를 통한 치료 효과는 아직 확실히 정립되어 있지 않지만 류마티스 관절염의 활막세포를 배양하면서 flavonoid를 투여하면 IL-1, TNF- α , IL-6와 같은 염증성 사이토카인의 생성이 억제되고 반대로 IL-10과 같은 항염증성 사이토카인의 합성이 증가된다고 보고하여 류마티스 관절염의 치료제로서의 가능성을 보이는 물질로 여겨지고 있다²⁴.

이 중에서 taxol은 이미 마우스에서 유도된 관절염의 치료에 효과가 좋은 것으로 보고가 되어 있다. Taxol은 주목이라는 식물에서 추출한 성분으로 유방암과 같은 암에서 항암제로 사용되고 있으며 그 작용기전은 tubulin polymerization을 유도하여 상당히 안정된 비기능성 microtubule 형성을 유도하는 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 실제로 taxol이 류마티스 관절염에서는 효과를 갖은 이유는 G2/M기를 억제하는 작용을

통해서 활막세포의 증식을 저해하는 작용이 있는 것으로 보고되어 있는데, 이러한 작용은 활막세포의 apoptosis를 유도해서 일으키는 것이 밝혀졌다. 아울러 이 기능은 류마티스 관절염 환자에서 pannus형성을 억제할 수 있기 때문에 taxol이 류마티스 관절염에 실제적으로 사용될 수 있음이 시사되었다^{25, 26}. 한 보고에 의하면 taxol을 사용한 경우 CIA에 때 보여주는 양상, 예를 들어 관절 활막의 initial lining의 integrity가 synoviocyte의 elongation과 polarization에 의하여 손상되고, basal lamina가 없어지며, interstitial matrix가 증가되며, 혈관용적이 증가되는 양상의 현저한 호전을 보인다고 하였다³⁸.

최근까지 histones의 기능은 주로 DNA의 안정화와 chromatin의 condensation과 관계되어 있는 것, 말하자면 DNA를 chromatin내로 folding해 넣는 역할을 하는 것으로 알려져 왔다²⁷. 그러나 histone의 핵산 내에서의 이러한 기능 이외에도 핵산 이외의 장소와 세포 외에서의 역할들이 밝혀지기 시작하면서 많은 연구가 진행되고 있다. 이러한 기능들에는 첫째로, histone 자체가 하나의 자가 항원으로 인식되어 자가면역질환에서 histone에 대한 항체가 증가한다는 것이 보고되어 있는데 예를 들어 multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus와 같은 질환에서 항체가가 증가한다고 보고되어있다³⁹⁻⁴². 두 번째로, histone H2A와 histone H2B는 rat에서 homeostatic thymus hormone(HTH)의 성분으로 알려져 있고 그 기능으로는 corticosterone과 같은 호르몬의 생산을 자극하는 것으로 알려져 있다^{33, 43}. 또 histone H3와 histone H4는 배양된 rat의 지방세포에 인슐린과 같은 기능이 있음이 밝혀져 있고²⁸, 골수회복과 관계되는 14-amino acid osteogenic peptide는 histone H4의 C terminus와 구조가 같음이 밝혀져 있다²⁹. 그 외에도 homeostatic thymus hormone의 두 가지 중요한 구성요소가 histone H2A와 histone H2B임이 발견되었다³⁰.

또한 histone은 성장호르몬, prolactin, thyrotropin, gonadotropin과 같은 다양한 호르몬의 분비에 관여한다는 보고가 있다³¹⁻³³. 세 번째로는 histone H1은 in vitro와 동물 모델에서 백혈병 세포의 성장을 억제할 뿐만 아니라 세포 사멸에도 관계가 있다고 알려져 있다⁴⁴. 그리고 histone H1은 sea urchin egg내에 cytoskeleton의 integral component에서 발견되며 그 기능은 sea urchin sperm flagella의 axonemal microtubule의 안정화에 관계되는 것으로 알려져 있다³⁴.

이와 같이 histone은 microtubule assembly 기능이 있음이 밝혀졌는데, 이 작용은 마치 taxol이 가지고 있는 기능과 유사한 작용이기 때문에 이론적으로 taxol처럼 류마티스 관절염의 치료에 적용될 수 있음을 시사하고 있다. 이번 연구는 이러한 histone의 기능을 이용한다면 실제로 류마티스 관절염의 치료제로 개발할 수 있을 가능성을 알아보고, 류마티스 관절염에서 histone이 치료 효과가 있으면 그 효과가 관절내의 염증에 미치는 병리기전 중에서 어떠한 부분에 그 영향을 갖는 지를 알아보기 위하여 본 연구를 시도하였다.

기대했던 대로 histone에 의하여 마우스에서 유도한 CIA는 효과적으로 억제되는 것을 관찰할 수 있었는데, 이러한 효과는 병리 조직 소견에서도 관찰할 수 있었다. 더욱이 그 치료효과는 dexamethasone을 투여한 경우와 유사한 효과를 보여서, histone은 항염증 효과가 있음을 알 수 있었다. 이러한 효과를 이용하여 류마티스 관절염을 치료할 수 있는 물질로 histone도 생각해 볼 수 있다고 하겠다. 그러나 이러한 histone의 항염 효과는 histone의 농도를 증가시킨다고 dose dependent하게 더 좋은 효과를 보이는 것 같은 생각은 들었으나 통계적으로는 의미가 없었고, 용량을 증가함으로써 인하여 오히려 치료효과를 높이기 보다는 장기에 독성을 유발할 수 있음을 관찰할 수 있었다. 즉 20 mg/kg의 용량을 투여할 때, 다른 장기에

서 보다는 간 세포가 손상되는 양상을 관찰할 수 있었다. 다시 말해서 용량을 높인다고 CIA의 치료효과가 증대되기보다는 오히려 조직 내 독성만 유도할 수 있다고 볼 수 있다. 물론 1 mg/kg 보다 더 낮은 농도를 투여하였을 때의 실험이 이루어져야 할 것으로 생각되며 어느 농도에서 효과가 전혀 없는지에 관한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 흥미롭게도 치료효과는 정맥으로 투여할 때 가장 효과가 좋은 것으로 나타났는데, 이러한 효과는 아마도 혈행으로 투여된 약물이 직접적으로 염증이 있는 부위에 전달되기 때문이 아닌가 생각된다.

앞서도 기술한 것처럼 histone은 homeostatic thymic hormone의 기능을 가지고 있기 때문에 histone의 투여가 실제로 corticosterone의 분비에 영향을 미쳐서 이차적으로 CIA의 염증을 가라 앉힌 효과를 보일 수 있음을 추측할 수 있다. 이것을 증명하기 위해서는 마우스 혈중에서 corticosterone이 증가되는 지를 관찰하여야하고 또 histone을 투여하면서 corticosterone의 증가에 대한 dynamic을 조사하여야하겠지만 본 연구에서는 histone이 부신피질에 미치는 영향을 조사해 보기 보다는, 류마티스 관절염이 생긴 관절 내에서 관계되는 염증성 사이토카인과는 어떠한 연관이 있는지를 알아보기 위하여 마우스의 혈중에서, 그리고 배양된 비장세포에서 나아가서 염증의 가장 중요한 중심 역할을 하는 단핵구에서의 염증성 사이토카인의 가장 대표적인 TNF- α 와 항염증성 사이토카인 중에서 가장 대표적인 사이토카인인 IL-10의 발현에 대하여 조사하였다.

실제로 류마티스 관절염의 경우 TNF- α 수용체 길항체가 치료효과가 우수함이 입증되어 이미 구미 선진국에서는 치료제로 사용되고 있고 소아 연령층에서도 안전하게 사용될 수 있음이 입증되어 임상에서 사용하고 있다. 이것은 TNF- α 가 류마티스 관절염의 염증반응에 중추적인 역할을 한다는 것을 간접적으로 시사하는 것이라고 하겠다. 물론 모든 환자의 경우 이

약물이 효과가 있는 것은 아니다. 이 이야기는 TNF- α 이외에도 류마티스 관절염에 관계되는 염증반응은 복합적인 기전일 수 있음을 시사한다. 이러한 기전이 CIA에서도 동일하게 적용될 수 있다고 본다면 CIA에서도 염증반응의 중심적인 역할을 하는 싸이토카인은 TNF- α 일 수 있지만 다른 싸이토카인도 복합적으로 작용할 수 있음을 추측할 수 있다. 그러한 이유에서인지는 몰라도 실제로 본 연구에서 마우스 혈중의 TNF- α 치는 각 군에 있어서 별로 차이가 없었고, 뿐만 아니라 비장세포에서의 TNF- α 생성도 별로 차이를 발견할 수 없었다. 이 결과를 통해서 histone의 항염 효과는 TNF- α 의 생성이나 억제와는 관계가 없는 것임을 알 수 있다.

IL-10은 처음에는 마우스의 Th2세포에서 분비되는 싸이토카인으로 Th1세포에서 분비되는 싸이토카인의 분비를 억제하는 작용을 가지고 있어서 cytokine synthesis-inhibitory factor로 알려졌다⁴⁵. 그러나 근자에 들어서는 IL-10은 Th2세포, B 세포, 거식세포 등에서 분비되는 싸이토카인으로 다양한 기능을 가지고 있는 싸이토카인 임이 알려졌다⁴⁶. IL-10의 억제작용은 Th1이나 거식세포에서 분비되는 항염증성 싸이토카인의 분비를 억제하는 작용을 하고⁴⁵ 아울러 거식세포의 표면에 MHC II의 표현을 억제하는 작용이 있다⁴⁷. 이러한 억제작용과는 반대로 거식세포에서 Fc γ R1의 표현을 상승시켜 Ab-dependent cell mediated cytotoxicity를 촉진하는 것으로 알려져 있다⁴⁸. 뿐만 아니라 IL-10은 CD8+ T세포의 cytotoxicity를 증대시키고 B세포 표면에 MHC II의 표현을 증가시키며⁴⁹ 아울러 B 세포의 viability factor로 작용한다⁵⁰.

임상적으로 IL-10은 자가면역성질환, 예를 들어 류마티스 관절염, 쇼그렌 증후군, 전신성 홍반성 루프스 등에서 정상인과 비교할 때 혈중에 증가되어있는 양상이 관찰되며⁵¹, 뿐만 아니라 류마티스 관절염의 활막에서 IL-10은 다양으로 표현되어 있음이 보고되었고⁵², 류마티스 관절염 환자의

말초혈액에서 유도한 T 림프구와 비교할 때 활막에서 유도한 T 림프구에서 더 높은 IL-10의 표현을 볼 수가 있다고 하였다⁵³. 이처럼 IL-10은 류마티스 관절염에서 중요한 조절인자로서의 기능을 하는 것으로 생각되어진다. 이처럼 IL-10이 류마티스 관절염에서 항염효과를 가지는 중요한 싸이토카인임은 이미 알려져 있는 사실이어서 이를 이용하여 마우스에서 CIA의 치료를 위하여 IL-10을 이용하려는 시도는 계속되어 왔다¹⁷⁻¹⁹.

Walmsley 등⁵⁴이나 Tanaka 등⁵⁵의 실험에 의하면 실험동물에서 CIA를 유발한 후 IL-10을 투여함으로써 관절염의 발생율과 중증도를 감소시킨다는 결과를 보고를 하면서 IL-10을 이용한 치료효과를 기대할 수 있음을 시사하였다. 뿐만 아니라 viral IL10를 adenovirus-mediated transfer한 경우라던지, 사람의 IL-10유전자를 전신적으로 마우스에 투여하여 실시한 실험에서도 관절염을 치료하는 효과가 있음이 보고되었고, IL-10유전자를 관절내로 직접 투여한 경우에도 CIA를 치료하는 효과는 뚜렷한 것으로 보고되었다¹⁷⁻¹⁹. 이와 같은 효과는 B세포에 자극을 하여 항 type II collagen 항체의 IgG1/IgG2a 비율의 변화 때문이라고 주장한 반면⁵⁶ 다른 연구자는 Type II collagen 에 대한 T세포의 증식이 감소하기 때문이라고 보고하였다⁵⁷. 항체를 가지고 IL-10을 중화할 경우 CIA의 정도가 심해지거나 또는 관절염의 발생 시기가 촉진되는 효과를 보이는 보고도 있다⁵⁸. 실제로 IL-10-deficient B10.Q 마우스를 사용한 경우 CIA의 정도가 매우 심하다는 것을 보고하면서 IL-10이 CIA의 발생을 저하시키는 효과가 있다고 하였다⁵⁹. 그러나 이와는 반대로 IL-10을 투여할 때 관절염의 증상이 악화된다는 보고도 있으며 실제로 혈중의 IL-10치는 마우스에서 CIA의 유발과는 무관하다는 보고도 있다⁶⁰.

본 연구에 의하면 histone이 CIA를 억제하는 효과를 갖는 것은 TNF- α 의 생성과는 무관하나 실제로 IL-10의 생성을 촉진하기 때문으로 생각되

었다. 그 이유로는 histone을 처리한 마우스의 비장세포에서 IL-10의 생성이 의미있게 증가되었기 때문이며, 단핵구를 사용한 경우 histone으로 처리하였을 때 IL-10의 생성이 증가하고 실제로 세포내 IL-10 mRNA발현이 증가하는 소견을 관찰 할 수 있었다. 그러나 histone을 투여한 마우스의 혈중에 IL-10의 변화가 관찰되지 않은 것은 설명하기가 어렵지만, 아마도 관찰범위 내에 국소적으로 증가한 IL-10이 반드시 혈중에 반영될 수 없을 것이라는 점과 histone을 투여한 직후 마우스를 희생하지 않았고 투여 후 3일이 지난 다음에 희생시켜 얻은 혈청으로 검사를 하였기 때문으로 생각된다. 현재 결과로 가능한 설명은 histone에 의하여 자극된 염증세포가 마우스의 CIA조직으로 이행되어 그곳에서 국소적으로 IL-10의 생산이 증가되어 CIA의 억제 효과를 보인 것으로 설명할 수 있다. 물론 실제로 IL-10의 표현이 histone에 의하여 증가되어 CIA가 좋아졌다고 설명하기 위해서는 활막 세포를 배양하고 이 세포를 자극하며 histone을 투여한 결과를 연구하는 것이 더욱 확실한 결과를 보여줄 수 있고 기전을 설명하는데 좋은 자료가 될 수 있겠지만 이 부분은 기술적인 문제가 있기 때문에 좀더 연구가 되어야할 부분으로 생각된다. 그러므로 앞으로 histone에 의하여 IL-10이 증가한 것이 CIA에 영향을 주었다고 설명되어지기 위해서는 단핵구를 이용한 것과 아울러 활막 세포에서의 결과가 첨부되어야 할 것으로 생각된다.

V. 결 론

Histone H1이 마우스에서 CIA에 대한 영향을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Histone H1은 마우스에서 CIA의 발생을 억제하는 효과를 관찰할 수 있었다.
2. Histone은 종류에 관계없이 마우스에서 CIA의 발현을 억제하는 효과를 갖는 것을 알 수 있었다.
3. Histone H1의 투여 경로는 정맥으로 투여한 경우가 마우스에서 CIA의 억제 효과가 가장 우수하였다.
4. Histone H1의 투여 용량은 마우스에서 CIA를 억제하는데 큰 차이를 보이지 않지만 20 mg/kg를 투여하는 경우는 간세포를 손상시키는 것을 관찰할 수 있었다.
5. Histone H1을 투여한 경우 마우스의 혈청 내 collagen에 대한 항체가 감소되는 것을 관찰 할 수 있었다.
6. Histone H1을 투여한 마우스의 비장세포단핵구에서 대조군에 비하여 IL-10의 분비가 현저하게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.
7. Histone H1으로 자극된 U937세포는 IL-10의 분비를 증가하는 것으로 관찰되었다.
8. Histone H1을 투여한 마우스의 비장세포 단핵구에서와 histone H1으로 자극된 U937세포에서 TNF- α 의 분비는 차이가 없었다.

이와 같은 결과를 종합해 볼 때 histone H1은 마우스에서 CIA의 발생을 억제하는 작용이 있으며 그 기전의 일부로는 histone H1이 항염증성 싸이토카인인 IL-10의 분비를 증가시키기 때문으로 생각되었다.

참고문헌

1. Harris ED. Rheumatoid arthritis. Pathophysiology and implications for therapy. *N Engl J Med* 1990;322:1277-89
2. ACR AD HOC Committee on Clinical Guidelines. Guidelines for the management of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39:713-22
3. Moreland LW. Potential biologic agents for treating rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2001;27:445-91
4. Lipsky PE, van der Heijde DM, St Clair EW, Furst DE, Breedveld FC, Kalden JR, et al. Infliximab and methotrexate in the treatment of rheumatoid arthritis. Anti-tumor necrosis factor trial in rheumatoid arthritis with concomitant therapy study group. *N Engl J Med* 2000;343:1594-602
5. Bathon JM, Martin RW, Fleischmann RM, Tesser JR, Schiff MH, Keystone EC, et al. A comparison of etanercept and methotrexate in patients with early rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001;343:1586-93
6. Rabinovich GA, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera CM, Hirabayashi J, et al. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med*

1999;190:385-98

7. Kobayashi K, Nakashima A, Nagata H, Nakajima H, Yamaguchi K, Sato S, et al. Anti-arthritic effects of KF20444, a new immunosuppressive compound inhibiting dihydroorotate dehydrogenase, on rat collagen-induced arthritis. *Inflamm Res* 2001;50:24-31
8. DeGraw JI, Colwell WT, Crase J, Smith RL, Piper JR, Waud WR, et al. Analogues of methotrexate in rheumatoid arthritis. 1. Effect of 10-deazaaminopterin analogues on type II collagen induced arthritis in mice. *J Med Chem* 1997;31:370-6
9. Gerlag DM, Ransone L, Tak PP, Han Z, Palanki M, Barbosa MS, et al. The effect of a T cell-specific NF-kappa B inhibitor on in vitro cytokine production and collagen-induced arthritis. *J Immunol* 2000;165:1652-8
10. Plater-Zyberk C, Hoogewerf AJ, Proudfoot AE, Power CA, Wells TN. Effect of a CC chemokine receptor antagonist on collagen induced arthritis in DBA/1 mice. *Immunol Lett* 1997;57:117-20
11. Ogawa Y, Kuwahara H, Kimura T, Tani Y, Yonehara S, Shiraishi A, et al. Therapeutic effect of anti-Fas antibody on a collagen induced arthritis model. *J Rheumatol* 2001;28:950-5

12. Brok HP, Tekoppele JM, Hakimi J, Kerwin JA, Nijenhuis EM, De Groot CW, et al. Prophylactic and therapeutic effects of a humanized monoclonal antibody against the IL-2 receptor (DACLIZUMAB) on collagen induced arthritis(CIA) in rhesus monkeys. *Clin Exp Immunol* 2001;124:134-41
13. Bakker AC, Joosten LA, Arntz OJ, Helsen MM, Bendele AM, van de Loo FA, et al. Prevention of murine collagen-induced arthritis in the knee and ipsilateral paw by local expression of human interleukin-1 receptor antagonist protein in the knee. *Arthritis Rheum* 1997;40:893-900
14. Nasu K, Kohsaka H, Nonomura Y, Terada Y, Ito H, Hirokawa K, et al. Adenoviral transfer of cyclin-dependent kinase inhibitor genes suppresses collagen-induced arthritis in mice. *J Immunol* 2000;165:7246-52
15. Iyama S, Okamoto T, Sato T, Yamauchi N, Sato Y, Sasaki K, et al. Treatment of murine collagen-induced arthritis by ex vivo extracellular superoxide dismutase gene transfer. *Arthritis Rheum* 2001;44:2160-7
16. Apparailly F, Noel D, Millet V, Baker AH, Lisignoli G, Jacquet C, et al. Paradoxical effects of tissue inhibitor of metalloproteinases 1 gene transfer in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44:1444-54

17. Kim KN, Watanabe S, Ma Y, Thornton S, Giannini EH, Hirsch R :
Viral IL-10 and soluble TNF receptor act synergistically to inhibit
collagen-induced arthritis following adenovirus-mediated gene
transfer. *J Immunol* 2000;164:1576-81
18. Quattrocchi E, Dallman MJ, Dhillon AP, Quaglia A, Bagnato G,
Feldmann M. Murine IL-10 gene transfer inhibits established
collagen-induced arthritis and reduces adenovirus-mediated
inflammatory responses in mouse liver. *J Immunol* 2001;166:5970-8
19. Fellowes R, Etheridge CJ, Coade S, Cooper RG, Stewart L, Miller
AD, et al. Amelioration of established collagen induced arthritis by
systemic IL-10 gene delivery. *Gene Ther* 2000;7:967-77
20. Haqqi TM, Anthony DD, Gupta S, Ahmad N, Lee MS, Kumar GK,
et al. Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a
polyphenol fraction from green tea. *Proc Natl Acad Sci USA*
1999;96:4524-9
21. 김동수, 박용범, 이봉기, 한덕룡 : 마우스에서 collagen induced
arthritis 발생에 미치는 diterpenoid의 영향. *대한류마티스학회지*
1999;6:300-9
22. 김동수 : 마우스에서 collagen induced arthritis 발생에 미치는
acanthopanax 추출물의 영향. *대한류마티스학회지* 1998;5:45-55

23. 김동수, 송창호, 이수곤 : Acanthopanax추출물이 마우스에서 collagen induced arthritis 유발에 미치는 영향. 소아과 1998;41:247-54
24. 윤도영. 염증반응조절을 위한 분자적 접근. 생화학·자생물학 소식 2002;9:29-35
25. Brahn E, Tang C, Banquerigo ML. Regression of collagen-induced arthritis with taxol, a microtubule stabilizer. Arthritis Rheum 1994;37:839-45
26. Hui A, Kulkarni GV, Hunter WL, McCulloch CA, Cruz TF. Paclitaxel selectively induces mitotic arrest and apoptosis in proliferating bovine synoviocytes. Arthritis Rheum 1997;40:1073-84
27. Elgin SCR, Weintraub H. Chromosomal proteins and chromatin structure. Ann Rev Biochem 1975;44:725-74.
28. McCroskey MC, Palazuk BJ, Pierce-Ramsey PA, Colca JR, Pearson JD. Insulin-like effects of histone H3 and H4 on isolated rat adipocytes. Biochim Biophys Acta 1989;1011:212-9
29. Bab I, Gazit D, Chorev M, Muhlrud A, Shteyer A, Greenberg Z, et al. Histone H4-related osteogenic growth peptide (OGP): a novel circulating stimulator of osteoblastic activity. EMBO J 1992;11:1867-73

30. Brown OA, Sosa YE, Goya RG. Thyrotropin-releasing activity of histone H2A, H2B and peptide MB35. *Peptides* 1997;18:1315-9
31. Brown OA, Sosa YE, Goya RG. Histones as extracellular messengers: effects on growth hormone secretion. *Cell Biol Int* 1997;21:787-92
32. Brown OA, Sosa YE, Goya RG. Gonadotropin-releasing activity of histone H2A and H2B. *Cell Mol Life Sci* 1998;54:288-94
33. Goya RG, Sosa YE, Quigley KL, Reichart R, Meites J. Homeostatic thymus hormone stimulates corticosterone secretion in a dose- and age-dependent manner in rats. *Neuroendocrinology* 1990;51:59-63
34. Multigner L, Gagnon J, Dorsselaer AV, Job D. Stabilization of sea urchin flagellar microtubule by histon H1. *Nature* 1992;360:33-9
35. Arend WP, Dayer JM. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1990;33:305-15
36. Myers LK, Rosloniec EF, Cremer MA, Kang AH : Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. *Life Sci* 1997;61:1861-78
37. 박승규, 이지연, 정일엽, 최용경, 최인성, 김효준. DBA/1JCrj Mouse에 있어서 콜라젠 유도 관절염에 관한 면역학적 고찰. *대한면역학회지* 1996;18:437-45

38. Arsenault AL, Lhotak S, Hunter WL, Banquerigo ML, Brahn E :
Taxol involution of collagen-induced arthritis: ultrastructural correlation with the inhibition of synovitis and neovascularization. *Clin Immunol Immunopathol* 1998;86:280-9
39. Miota S, Miura H, Misaki Y, Yamamoto K, Morino N, Sakurai H, et al. Relationship between autoepitope and DNA-binding site on a histone H1 molecule. *Autoimmunity* 1992;13:261-4
40. Leak AM, Woo P. Juvenile chronic arthritis, chronic iridocyclitis and reactivity to histones. *Ann Rheum Dis* 1991;50:653-7
41. Wesierska-Gad^다 J, Penner E, Lidner H, Hitchman E, Sauermann G. Autoantibodies against different histone H1 subtypes in systemic lupus erythematosus sera. *Arthritis Rheum* 1990;33:1273-8
42. Krippner H, Springer B, Merie S, Pirlner K. Antibodies to histones of the IgG and IgM class in systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 1994;58:49-56
43. Reichhart R, Zeppezauer M, Jornvall H. Preparation of the homeostatic thymus hormone consist predominantly of histones 2a and 2b and suggest additional histone functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985;82:4871-5
44. Class R, Lindman S, Fassbender C, Leinenbach H, Rawer S,

- Emrich J, et al. Histone H1 suppresses tumor growth of leukemia cells in vitro, ex vivo and in an animal model suggesting extracellular functions of histones. *Am J Clin Oncol* 1995;3:522-30
45. Fiorentino D, Bond FMW, Mosman TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170:2081-90
46. Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993;11:165-90
47. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Hoard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol* 1991;147:3815-22
48. te Velde AA, de Waal Malefyt R, Huijbens RJ, de Vries JE, Figdor CG. IL-10 stimulates monocyte Fc γ R surface expression and cytotoxicity; distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN- γ , IL-4, and IL-10. *J Immunol* 1992;149:4048-52
49. Chen WF, Zlotnik A. IL-10: a novel cytotoxic T cell differentiation factor. *J Immunol* 1991;147:528-34
50. Go NF, Castle BE, Barrett R, Kastelein R, Dang W, Mosmann TR, et al. Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor: unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B

cells. *J Exp Med* 1990;172:1625-31

51. Llorente L, Richaud-Patin Y, Fior R, Alcocer-Varela J, Wijdenes J, Fourier BM, et al. In vitro production of interleukin-10 by non-T cells in rheumatoid arthritis, Sjogren's syndrome, and systemic lupus erythematosus: a potential mechanism of B lymphocyte hyperactivity and autoimmunity. *Arthritis Rheum* 1994;37:1647-55
52. Katsikis PD, Chu CQ, Brennan FM, Maini RN, Feldmann M. Immunoregulatory role of interleukin 10 in rheumatoid arthritis. *J Exp Med* 1994;179:1517-27
53. Cohen SB, Katsikis PD, Chu CQ, Thomssen H, Webb LM, Maini RN, et al. High level of interleukin-10 production by the activated T cell population within the rheumatoid synovial membrane. *Arthritis Rheum* 1995;38:946-52
54. Walmsley M, Katsikis PD, Abney E, Parry S, Williams RO, Maini RN, et al. Interleukin-10 inhibition of the progression of established collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 1996;39:495-503
55. Tanaka Y, Otsuka T, Hotokebuchi T, Miyahara H, Nakashima H, Kuga S, et al. Effect of IL-10 on collagen-induced arthritis in mice. *Inflamm Res* 1996;45:283-8
56. Apparailly F, Verwaerde C, Jacquet C, Auriault C, Sany J,

- Jorgensen C. Adenovirus-mediated transfer of viral IL-10 gene inhibits murine collagen-induced arthritis. *J Immunol* 1998;160:5213-20
57. Ma Y, Thornton S, Duwel LE, Boivin GP, Giannini EH, Leiden JM, et al. Inhibition of collagen-induced arthritis in mice by viral IL-10 gene transfer. *J Immunol* 1998;161:1516-24
58. Joosten LA, Lubberts AE, Durez P, Helsen MM, Jacobs MJ, Goldman M, et al. Role of interleukin-4 and interleukin-10 treatment on cartilage destruction. *Arthritis Rheum* 1997;40:249-60
59. Johansson ÅCM, Hansson A, Nandakumar KS, Holmdahl R. IL-10-deficient B10.Q mice develop more severe collagen-induced arthritis, but are protected from arthritis induced with anti-type II collagen antibodies. *J Immunol* 2001;167:3505-12
60. 유빈, 김찬, 최승원, 김미정, 오순환, 문희범 : 백서의 콜라겐 유도성 관절염 발생에 미치는 interleukin-10의 영향. *대한류마티스학회지* 1997;4:111-20

Abstract

Effect of histone H1 on the collagen induced arthritis in mice

Jae Ho Yang

*Department of Medical Science
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Dong Soo Kim)

Until recently, the functions of histones have been viewed mainly in the DNA stabilization and chromatin condensation. Besides these roles in the nucleus of the cells, there have been growing evidences that histones have many other extra-cellular or extra-nuclear functions. First, histones are thought to be autoantigens due to elevated levels of their antibodies in the sera of the patients with autoimmune diseases, such as systemic lupus erythematosus, multiple sclerosis, and rheumatoid arthritis. Second, histones showed their functions to stimulate the production of hormones such as corticosterone. Third, histones have an anti-tumor activities, such as growth suppression and killing property on leukemic cells in vitro and in an animal model. Finally, histone was found to be an integral component of the cytoskeleton capable of stabilizing axonemal microtubule of sea urchin sperm flagella. This microtule assembly function of the histone has the similar effect to that of taxol which control the joint inflammation from the rheumatoid arthritis. In this study, we investigated the function of histones on a mouse

collagen-induced arthritis(CIA) model.

DBA/1 mouse were injected intradermally with emulsified chicken type II collagen. Three weeks after immunization, histone H1 was injected intraperitoneally twice a week. Clinical incidence of arthritis and arthritis index were measured. Arthritis indices were measured in the mice with different kinds of histones, different routes of injections, and different doses of injections. Measurement of anti-collagen antibodies were measured by ELISA. Stimulation indices of the splenocytes of the mice were also measured. IL-10 and TNF- α in the supernatants of the cultured splenocytes were measured by ELISA. IL-10 and TNF- α in the supernatants of the cultured U937 cells stimulated by histone H1 were measured by ELISA. mRNA expression of IL-10 and TNF- α in the U937 cells stimulated by histone H1 were observed.

Histone H1 appears to be an effective suppressor of CIA in mice. These suppressive effects were observed in different kinds of histones also. When delivered intravenously, this suppressive effect of histone H1 showed the most effective compared to intraperitoneal or intradermal injections. However, this suppressive effect of histone H1 did not show dose dependent manner. With injection of 20 mg/kg of histone H1 showed a hepatotoxicity. The anti-collagen antibody level of the histone H1 treated group was significantly lower than that of control group. However, stimulation index of the splenocytes of histone H1 treated group showed no difference to that of control. A remarkable increase in the level of IL-10 was observed from the cultured supernatant of the splenocytes treated with histone H1. However, the level of TNF- α from the cultured supernatant of the splenocytes treated with histone H1 was similar to that of control. Also, a remarkable increase in the level of IL-10 was observed from the cultured supernatant of the U937 cells treated with histone H1 with dose dependent manner. However, the level of TNF- α from the cultured supernatant of the U937 cells treated with histone H1 did not

show dose dependent manner.

With these results, histone H1 appears to be an another candidate for the treatment drug of rheumatoid arthritis. The mechanism of the suppressive effect of CIA in mice may be a stimulation of IL-10 production.

Key words : collagen induced arthritis, histone, IL-10, TNF- α , U937