

톨-유사수용체 3 리간드의  
경피증양 마우스 모델에서의  
항 섬유화 효과

연세대학교 대학원

의 학 과

구 본 철

톨-유사수용체 3 리간드의  
경피증양 마우스 모델에서의  
항 섬유화 효과

지도교수 정 기 양

이 논문을 석사학위논문으로 제출함

2010년 6월

연세대학교 대학원

의 학 과

구 본 철

# 구본철의 석사학위논문을 인준함

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

심사위원 \_\_\_\_\_ 인

연세대학교 대학원

2010년 6월

## 감사의 글

두 분의 멘토 정기양, 정진호 교수님과 연구 수행에  
많은 도움을 주신 서울대학교병원 임상의학연구소  
피부과 실험실의 동료 여러분께 깊은 감사의 뜻을  
표합니다.

2010년 봄

구본철 올림

## <차례>

국문요약	1
I. 서론	5
1. 톨-유사수용체	5
2. 톨-유사 수용체의 다른 기능들	10
3. 교원질의 합성	12
4. 교원질 합성의 전사 후 조절	14
5. 프로테아좀	17
6. 섬유화를 특징으로 하는 피부질환	18
7. 피부 섬유아세포의 TLR 발현과 교원질 합성 조절	19
8. 블레오마이신 유도 경피증양 생쥐 모델	22
II. 재료 및 방법	22
1. 재료	22
2. 방법	24
가. 실험동물의 준비 및 식별표시	24
나. 경피증양 병변의 유도	25
다. 계측 및 분석	27
라. 통계량 분석	37
III. 결과	38
가. 육안적 관찰 소견	38
나. 체중 변화	40
다. 캘리퍼로 측정한 피부 두께의 변화	42
라. 조직학적 관찰 소견	45
다. 분자생물학적 변화	51

IV. 고찰 .....	61
V. 결론 .....	70
참고문헌 .....	71
Abstract .....	76

## 그림 차례

- 그림 1. TIR 영역 (Toll-IL-1 receptor domain)을 포함하는 부착 단백질 ..... 7
- 그림 2. MyD88 의존적 신호 전달 체계 ..... 8
- 그림 3. MyD88 비의존적 신호 전달 체계 ..... 9
- 그림 4. 세포 고사를 유도하는 TLR매개 신호 전달 체계 ..... 11
- 그림 5. 세포 주기를 조절하는 TLR매개 신호 전달 체계 ..... 12
- 그림 6. Poly I:C 처리시 세포 배양액에서의 제 1형 교원질의 양적 변화 ..... 20
- 그림 7. Poly I:C와 MG-132 동시 처리 후 제 1형 교원질의 양적 변화 비교 ..... 20
- 그림 8. 육안적 변화 ..... 37
- 그림 9. 실험 전후 체중의 변화 ..... 39
- 그림 10. 캘리퍼로 측정된 피부 두께의 변화 ..... 41

그림 11. 조직학적 관찰 소견 .....	43
그림 12. 표피 두께의 차이 .....	45
그림 13. 진피 두께의 차이 .....	47
그림 14. Western blot .....	48
그림 15. 제 1형 교원질의 양적 차이 .....	49
그림 16. Sircol assay .....	51
그림 17. 제 1형 전교원질 전령RNA의 변화 .....	52
그림 18. IL-1b 전령RNA의 차이 .....	54
그림 19. mMMP-13 전령RNA의 차이 .....	56
그림 20. 프로테아좀 단백분해능의 변화: Caspase 유사 활성화도 .....	58
그림 21. 프로테아좀 단백분해능의 변화: Chymotrypsin 유사 활성화도 .....	59
그림 22. 프로테아좀 단백분해능의 변화: Trypsin 유사 활성화도 .....	60



## 표 차례

표 1. TLR의 종류와 특성 .....	6
표 2. 교원질 합성에 관여하는 여러 종류의 효소와 각각의 특징 .....	15
표 3. 교원질 합성의 세포 내 전사 후 조절 기전과 해당 기전의 기능 .....	15
표 4. 피부 세포에서의 TLR 발현 양상 .....	19
표 5. 실험군 분류 .....	24
표 6. 세부 실험 일정 .....	26
표 7. 프로테아좀 (20s core) 의 단백 분해능 분류와 해당 측정을 위한 기질 .....	34

## 국문요약

### 피부 교원질의 합성과 분비를 조절하는 톨-유사수용체 3 및 프로테아좀 매개 기전의 탐색과 경피증양 마우스 모델에서의 항 섬유화 효과

톨-유사수용체 (Toll-like receptor, TLR)는 내재 면역 반응에서 중요한 역할을 담당하는 단백 수용체이다. TLR 은 면역학적 기능 외에도 여러 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있으나, 섬유아세포에서의 발현 및 기능은 잘 알려져 있지 않다. 교원질은 구조 유지 및 노화에 관련된 외형 변화 과정에서 중요한 구조 단백질로, 외적 또는 내적 자극에 따라 그 생성과 분해를 조절하는 여러 기전이 존재한다. 교원질로 대표되는 피부 구조 단백질의 증가, 감소는 각각 경피증, 피부 노화 등의 병적 또는 생리적 변화와 피부 주름 등의 외형 변화의 원인으로 작용한다. 사전 연구인 인체 섬유아세포에서의 TLR 의 발현 양상 및 교원질 생성 조절 기전 연구 결과 인체 섬유아세포에는 TLR-2, -3, -5, -6, -7, -8, -9 가 발현됨이 확인되었다. 이 중 TLR3 의 활성화에 의해 특징적으로 세포 외로 분비되는 교원질의 양이 감소하였고, 프로테아좀 저해제 투여시 이러한 변화가 회복됨을 관찰하였다. 본 연구에서는 경피증 유사 생쥐 모델에서의 상기 효과의 재현 여부를 실험을 통해

밝힘으로써 상술한 질병 및 생리적 변화의 알려지지 않은 병리 기전 규명 및 향후 새로운 치료 및 조절 방법 개발의 기반이 될 연구 결과를 얻고자 하였다.

4 주령 T 세포 결핍 BALB-c/nu 생쥐 30 마리를 대조군과 실험군으로 나누어 10  $\mu\text{g/g}$  의 블레오마이신과 1  $\mu\text{g/g}$ , 5  $\mu\text{g/g}$ , 25  $\mu\text{g/g}$  의 Poly I:C 를 2 주 간격으로 연속하여 병행 투여하였다. 양성 대조군 대비 고용량 (25  $\mu\text{g/g}$ )의 Poly I:C 투여군에서 육안 현미경 상 진피의 두께 감소가 확인되었다. Poly I:C 의 투여에 의해 증가된 mRNA 의 양과는 상반된 결과로 축적된 1 형 교원질 양의 감소가 관찰되어 생체 내에서도 같은 기전을 이용한 교원질 생성 조절이 가능함을 확인하였다.

이상의 결과로 경피증양 피부 섬유화 모델 생쥐에서 TLR3 리간드의 투여에 의해 섬유화가 저해되는 효과가 생체 내에서 재현 가능함을 확인하였으며, 향후 섬유화를 특징으로 하는 피부 질환의 알려지지 않은 병리 기전의 규명, 또는 새로운 치료 방법 개발의 가능성을 제시하였다.

---

핵심되는 말 : 틀-유사 수용체 3, 프로테아좀, 경피증, 교원질,  
섬유아세포

피부 교원질의 합성과 분비를 조절하는 톨-유사수용체 3 및

프로테아좀 매개 기전의 탐색 및

경피증양 마우스 모델에서의 항섬유화 효과

<지도교수 정기양>

연세대학교 대학원 의학과

구 본 철

## I. 서론

### 1. 톨-유사 수용체

톨-유사수용체 (Toll-like receptor, TLR) 는 일종의 패턴 인지 수용체(pattern recognition receptor)로, 외부 병원체에 대한 내재 면역 기능을 유도하는 세포막 또는 세포질의 수용체 단백질이다. TLR은 병원체 등의 외부 리간드에 대해서는 높은 수준의 특이성을 가지나 진화 단계에 따른 변이와 다양성은 상대적으로 적어 종간 보존성이 높고, 척추동물과 비척추동물의 세포들에서 광범위하게 관찰된다.

현재 TLR-1 부터 -9 까지 총 9 가지의 TLR 아형에 대해 리간드 (ligand)와 접합 단백 (adapter protein), 세포 내에서의 위치, 발현이 관찰된 세포 등의 정보가 알려져 있으며 그 외 -10, -11, -12, -13, -15 등의 새롭게 발견된 TLR 들의 경우 부분적인 보고만이 이루어져 있다 (표 1)

Receptor	Ligand(s) <sup>[18]</sup>	Ligand location <sup>[18]</sup>	Adapter(s)	Location	Cell types <sup>[18]</sup>
TLR 1	multiple triacyl lipopeptides	Bacteria	MyD88/MAL	cell surface	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ monocytes/macrophages</li> <li>■ a subset of dendritic cells</li> <li>■ B lymphocytes</li> </ul>
TLR 2	multiple glycolipids	Bacteria	MyD88/MAL	cell surface	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ monocytes/macrophages</li> <li>■ Myeloid dendritic cells<sup>[19]</sup></li> <li>■ Mast cells</li> </ul>
	multiple lipopeptides	Bacteria			
	multiple lipoproteins	Bacteria			
	lipoteichoic acid	Bacteria			
	HSP70	Host cells			
	zymosan (Beta-glucan)	Fungi			
Numerous others					
TLR 3	double-stranded RNA, poly I:C	viruses	TRIF	cell compartment	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Dendritic cells</li> <li>■ B lymphocytes</li> </ul>
TLR 4	lipopolysaccharide	Gram-negative bacteria	MyD88/MAL/TRIF/TRAM	cell surface	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ monocytes/macrophages</li> <li>■ Myeloid dendritic cells<sup>[19]</sup></li> <li>■ Mast cells</li> <li>■ Intestinal epithelium</li> </ul>
	several heat shock proteins	Bacteria and host cells			
	fibrinogen	host cells			
	heparan sulfate fragments	host cells			
	hyaluronic acid fragments	host cells			
	Numerous others				
TLR 5	flagellin	Bacteria	MyD88	cell surface	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ monocyte/macrophages</li> <li>■ a subset of dendritic cells</li> <li>■ Intestinal epithelium</li> </ul>
TLR 6	multiple diacyl lipopeptides	Mycoplasma	MyD88/MAL	cell surface	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ monocytes/macrophages</li> <li>■ Mast cells</li> <li>■ B lymphocytes</li> </ul>
TLR 7	imidazoquinoline	small synthetic compounds	MyD88	cell compartment	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ monocytes/macrophages</li> <li>■ Plasmacytoid dendritic cells<sup>[19]</sup></li> <li>■ B lymphocytes</li> </ul>
	loxoribine (a guanosine analogue)				
	broprimine				
	single-stranded RNA				
TLR 8	small synthetic compounds; single-stranded RNA		MyD88	cell compartment	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ monocytes/macrophages</li> <li>■ a subset of dendritic cells</li> <li>■ Mast cells</li> </ul>
TLR 9	unmethylated CpG Oligodeoxynucleotide DNA	Bacteria	MyD88	cell compartment	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ monocytes/macrophages</li> <li>■ Plasmacytoid dendritic cells<sup>[19]</sup></li> <li>■ B lymphocytes</li> </ul>
TLR 10	unknown	unknown	unknown	cell surface	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ monocytes/macrophages</li> <li>■ B lymphocytes</li> </ul>
TLR 11	Profilin	Toxoplasma gondii	MyD88	cell surface	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ monocytes/macrophages</li> <li>■ liver cells</li> <li>■ kidney</li> <li>■ bladder epithelium</li> </ul>
TLR 12	unknown		unknown	?	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Neurons<sup>[20]</sup></li> </ul>
TLR 13	unknown		unknown	?	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Neurons<sup>[20]</sup></li> <li>■ Ependymal cells</li> <li>■ Astrocytes</li> <li>■ Endothelial cells</li> </ul>
TLR 15	unknown	Salmonella enterica serovar Typhimurium <sup>[21]</sup>	unknown	?	?

표 1. TLR의 종류와 특성 ([http://en.wikipedia.org/wiki/Toll-like\\_receptor](http://en.wikipedia.org/wiki/Toll-like_receptor))

TLR의 유전자는 인터류킨-1 (interleukin-1)과 Toll-IL-1

수용체(Toll-IL-1 receptor: TIR)라는 공통 유전자 영역을 가지고 있어 IL-1R/TLR superfamily로 분류된다. TLR은 활성화 될 경우 다양한 신호 전달 체계 (signaling pathway)의 활성화를 촉발시키며, TIR의 세포 내 특정 영역에서 이러한 신호 전달체계의 활성화가 시작되는 것으로 알려져 있다. TIR은 TLR의 종류에 따라 MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM등으로 그 종류가 다양한 부착 단백질(adaptor protein)들에도 공통적으로 발현된다 (그림 1)

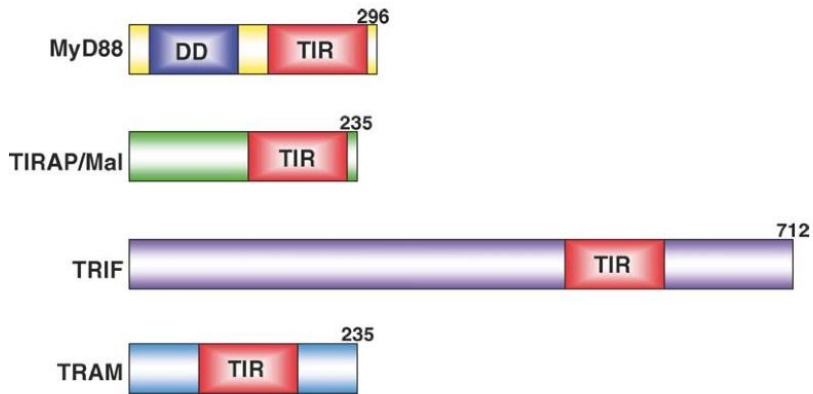


그림 1. TIR 영역 (Toll-IL-1 receptor domain)을 포함하는 부착 단백질들. (Takeda K and Akira S, *Journal of Dermatological Science* 2004)



이러한 신호전달체계의 활성화는 특정 전사 인자로 하여금 특정 유전자 및 단백질의 발현 증가를 유도하게 된다. 대부분의 TLR은 MyD88을 경유하는 신호 전달 체계를 통해 전사 인자인 NF- $\kappa$ B를 통해 면역 반응을 유도, 활성화하는 염증 매개 사이토카인들의 전사를 증가시킨다 (그림 2).

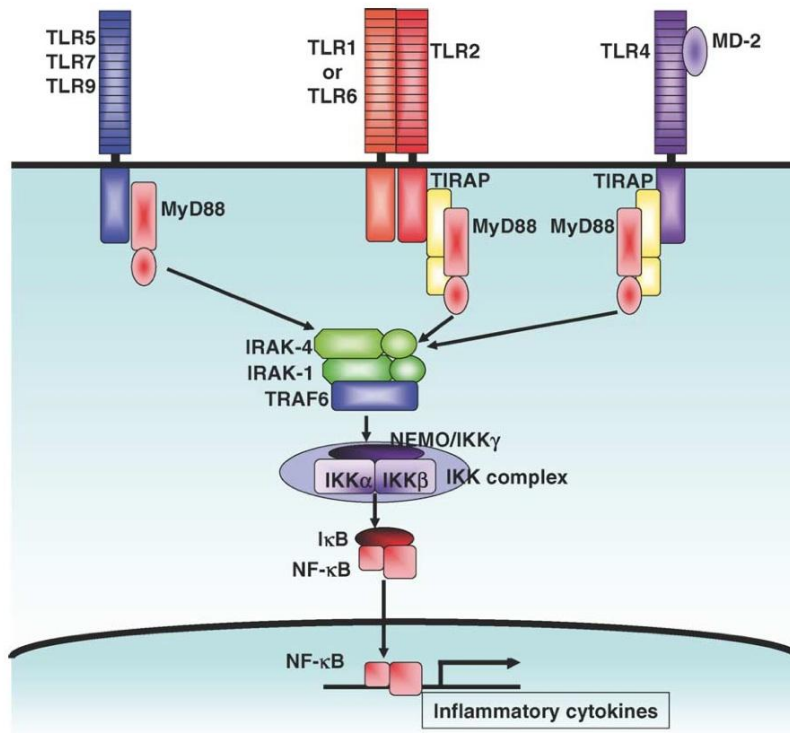


그림 2. MyD88 의존적 신호 전달 체계. (*Takeda K and Akira S, Journal of Dermatological Science 2004*)

반면, TLR3 은 MyD88 비의존적으로 TRI 부착 단백질에 의해 매개되는 전사 인자 IRF3 에 의해 IFN- $\beta$  의 발현을 증가시키는 독자적인 기전을 가지고 있는 것으로 밝혀졌으며 이 기전은 TLR4 에서도 부분적으로 나타나는 것으로 알려져 있다 (그림 3). 이 때 주된 역할을 하는 아형은 IFN- $\beta$ 이나 IFN- $\alpha$  역시 유도된다.

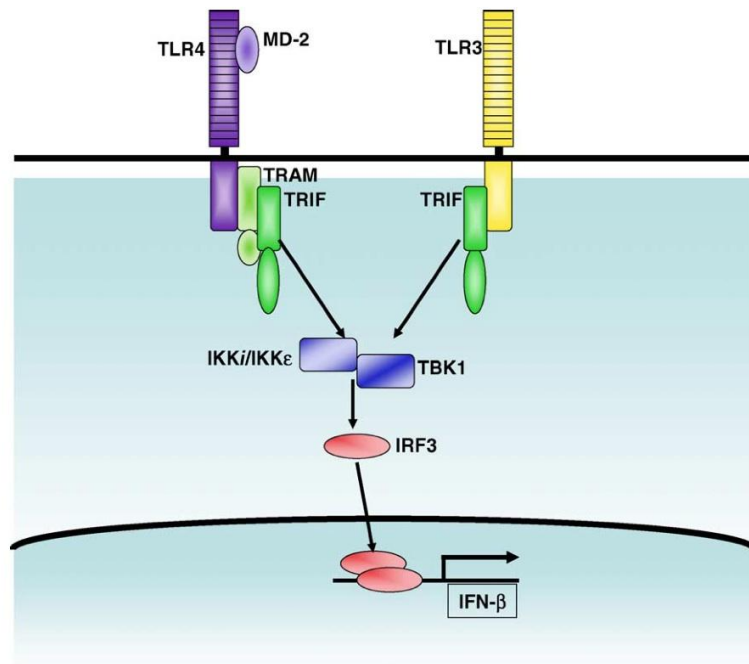


그림 3. MyD88 비의존적 신호 전달 체계 (*Takeda K and Akira S, Journal of Dermatological Science 2004*)

피부를 구성하는 세포들에서 각 TLR 의 발현 정도와 기능적 활성화는 세포의 종류에 따라 매우 다양하게 나타나나, 면역학적 기전에 관여하는 각질세포 (keratinocyte) 나 수지상세포 (dendritic cell) 등 다른 세포들에 비해, 상대적으로 그 기능이 미미한 섬유아세포 (fibroblast) 의 경우 발현 양상과 기능은 잘 알려져 있지 않다.

## 2. 톨-유사 수용체의 다른 기능들

TLR은 알려진 내재 면역 조절 기전 이외에 특이적인 생체 내 조절기능을 담당하는 것으로 알려져 있다.

대표적인 기능은 세포 고사 (apoptosis) 를 유도하는 것으로, MyD88 의존적 경로보다는 바이러스를 외부 리간드로 수용하는 TLR3 의 경우에서와 같이 MyD88 비의존적 경로에 의해 훨씬 강하게 유도되는 것으로 알려져 있다. 이는 보다 보존적인 생체 보호

기전으로 생각된다. TLR 에 의한 세포 고사 유도 기전은 TLR2. - 3, -4 에서 서로 다른 하부 기전에 의해 매개됨이 알려져 있다 (그림 4).

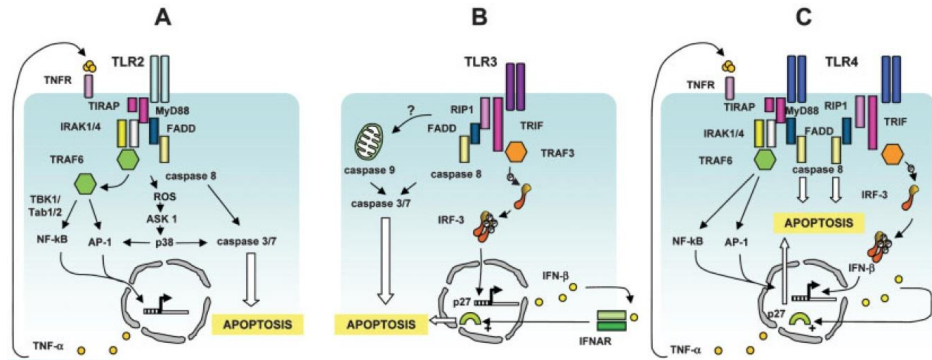


그림 4. 세포 고사를 유도하는 TLR 매개 신호 전달 체계. 유전자 결핍 생쥐를 이용한 실험 결과, TLR3 에 의해 유도되는 세포 고사 효과가 상대적으로 강력함이 알려져 있다. (Salaun et al, Eur. J. Immunol 2007)

특정 TLR 에 의한 세포 주기 조절 또한 TLR 의 비 면역학적 기능으로 알려져 있다. TLR5 는 Akt<sup>ser473</sup>-p27 복합체의 분해를 통해 세포 주기의 순환과 세포 분열을 촉진하는 기능을 가지고 있으며,

이는 TLR3 과 -4 에 의한 IFN 의 autocrine signaling 을 통한 p27 의 축적 기전과는 반대되는 작용이다 (그림 5).

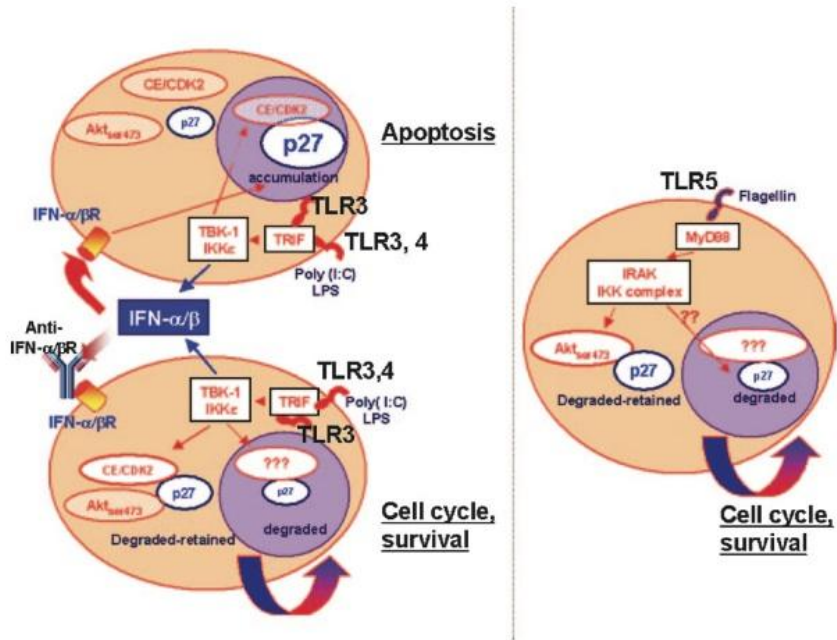


그림 5. 세포 주기를 조절하는 TLR 매개 신호 전달 체계. (Hasan UA et al., Proceedings of National Academy of Science, USA 2007)

### 3. 교원질의 합성

피부의 탄성과 구조는 주로 진피의 세포 외 기질에 의해 유지된다. 교원질 (collagen) 은 진피 건조 중량의 약 70%를 차지하는 가장 중요한 섬유성 단백질로, 현재까지 약 29 종의 교원질이 알려져 있으며 이 중 피부와 결합 조직의 경우 제 1 형 교원질 (type I collagen)이 가장 많은 구성 성분으로 알려져 있다. 제 1 형 전교원질 (type I procollagen) 은 성숙된 제 1 형 교원질의 전구체로, 글리신 (glycine) 과 프롤린 (proline) 이 풍부한 두 개의 alpha 1 사슬과 하나의 alpha 2 사슬로 이루어진 삼중합체 (trimer) 구조로 이루어져 있다. 제 1 형 교원질의 합성은 COL1A1 과 COL1A2 유전자에 의해 각각 Alpha 1 과 -2 사슬이 전사되는 것으로 시작된다. 이후 소포체 (endoplasmic reticulum) 으로 이동한 Alpha 1 과 -2 사슬은 신호 서열 (signal sequence)의 제거 과정을 거친 후 일부 라이신 (lysine) 과 프롤린기에 수화 (hydroxylation) 가 발생한다. 이 중 일부 수화된 아미노산기는 다시 당화 (glycosylation) 과정을 거친다. 수화된 아미노산기 사이의 수소 결합과, 당화된 아미노산기 사이의 이황화결합 (disulfide bond) 에 의해 특징적인 삼중 나선 (triple

helix) 구조의 전교원질이 형성된다. 이러한 입체 구조의 형성과 접힘 (folding) 과정에 의한 3 차원적 구조의 형성은 전교원질의 세포 외 분비에 필수적인 과정이다. 골지체 (Golgi apparatus)를 통해 세포 외로 분비된 전교원질은 단백 분해 효소에 의해 양측 말단의 펩타이드 일부가 절단된 후 서로 연결되어 성숙된 형태의 섬유성 단백질을 형성한다.

#### 4. 교원질 합성의 전사 후 조절

결체 조직으로서의 피부의 성질을 규정하는 진피의 주요 구성 성분인 교원질과 세포외 기질은 주로 섬유아세포에 의해 생성되며 조절 기전에 이상이 발생할 경우 표현형의 변화를 초래하고 여러 결체조직 질환의 원인이 될 수 있다.

제 1 형 교원질의 합성은 유전자 단위에서의 발현 변화 이외에도 여러 단계의 전사 후 기전에 의해 조절된다 (표 2). 안정적인 3 차 구조를 형성하기 위한 여러 단계의 전사 후 조절 단계에는 다양한 효소들이 관여하며 (표 3), 접힘 구조의 형성에는 HSP-47 등의 샤페론 (chaperone) 단백질이 필수적이다.

Enzyme <sup>a</sup>	Substrate	Product	Co-Factors and Co-Substrates
Signal peptidase	Nascent pre-pro $\alpha$ chains	Pro $\alpha$ chains	None known
Prolyl-4-hydroxylase	Prolyl residue in X-Pro-Gly sequence in pro $\alpha$ chains <sup>b</sup>	4-Hydroxyproline	O <sub>2</sub> , Fe <sup>2+</sup> , $\alpha$ -ketoglutarate, ascorbic acid
Prolyl-3-hydroxylase	Prolyl residue in Pro-Hyp-Gly sequence in pro $\alpha$ chains <sup>b</sup>	3-Hydroxyproline	O <sub>2</sub> , Fe <sup>2+</sup> , $\alpha$ -ketoglutarate, ascorbic acid
Lysyl hydroxylase	Lysyl residue in Lys-Gly, Lys-Ser, or Lys-Ala sequence in pro $\alpha$ chains <sup>b</sup>	Hydroxylysine	O <sub>2</sub> , Fe <sup>2+</sup> , $\alpha$ -ketoglutarate, ascorbic acid
Collagen galactosyl transferase	Hydroxylysine in pro $\alpha$ chains <sup>b</sup>	Gal-O-hydroxylysine	Mn <sup>2+</sup> , UDP-galactose
Collagen glucosyl transferase	Galactosyl-O-hydroxylysine in pro $\alpha$ chains <sup>b</sup>	Glc-Gal-O-hydroxylysine	Mn <sup>2+</sup> , UDP-glucose
Protein disulfide isomerase <sup>c</sup>	Cysteine residues in the extensions of pro $\alpha$ chains	S-S bonds stabilizing the correct protein conformation	Thiols
Procollagen N-proteinase (ADAMTS-2)	Procollagen or P <sub>n</sub> -collagen	P <sub>c</sub> -collagen or collagen <sup>d</sup>	Ca <sup>2+</sup>
Procollagen C-proteinase	Procollagen P <sub>c</sub> -collagen	P <sub>n</sub> -collagen or collagen <sup>d</sup>	Ca <sup>2+</sup>
Lysyl oxidases	Lysyl or hydroxylysyl residue in fibrillar collagen	Aldehyde derivatives of lysine or hydroxylysine	Cu <sup>2+</sup> , O <sub>2</sub>

표 2. 교원질 합성에 관여하는 여러 종류의 효소와 각각의 특징.

(Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 7<sup>th</sup> eds, 2008)

Intracellular co-translational and post-translational modifications	Functional Significance
Removal of the signal sequence	May be necessary for secretion
Synthesis of 4-hydroxyproline	Stabilization of triple helix
Synthesis of 3-hydroxyproline	Unknown
Synthesis of hydroxylysine	Stabilization of covalent cross-links; attachment site for glycosylation
Synthesis of hydroxylysine-O-glycosides	May influence cross-link formation and determine the morphology and stability of the fibers
Glycosylation of the extension peptides	Unknown
Degradation of nonhelical chains	Removal of defective polypeptides and modulation of collagen production
Chain association and disulfide bonding	Facilitation of triple-helix formation
Triple-helix formation	Prerequisite for proper secretion

표 3. 교원질 합성의 세포 내 전사 후 조절 기전과 해당 기전의 기능. (Fitzpatrick's Dermatology in General Medicine, 7<sup>th</sup> eds, 2008)



이러한 다양한 전사 후 조절 기전의 존재는 교원질의 생성 과정에 있어 강력한 질적 관리 (quality control) 기전의 필요성을 시사한다. 실제로 전사 단계에서의 변화와 오류 이외에도 전사 후 조절 기전의 이상에 의해 단백질의 정상적인 2 차 또는 3 차 구조를 형성되지 못할 경우, 비정상적인 교원질의 세포 외 기질의 분비를 막기 위해, 또는 세포 내 비정상적인 단백질의 축적을 막기 위해 작동하는 기전들이 알려져 있다. 그 중 대표적으로 리소좀에 의한 자가 탐식 (autophagy) 또는 프로테아좀 (proteasome) 에 의한 세포 내 분해 (intracellular degradation) 등을 들 수 있다. 그러나, 피부 섬유아세포의 교원질 합성 및 분비 과정에서는 이러한 조절 기전의 양상이 잘 알려져 있지 않다.

정상적인 상태의 섬유아세포에서는 생성된 전교원질의 약 15%가 세포 내에서 소실되는 것으로 알려져 있으며, 비정상적인 3 차 구조의 전교원질의 경우 소실율은 더욱 증가하는 것으로 알려져 있다. 이러한 결과는 교원질의 전사 후 조절 기전이 교원질 합성 및 분비에 있어 결과적으로 상당한 차이를 야기할 수 있음을 시사한다.

## 5. 프로테아좀

프로테아좀은 세포 내에서 잘못 번역된 단백질을 분해하는 기능을 담당하는 세포 내 소기관으로 다양한 종류의 단백 분해 효소와 유사한 단백 분해능을 가진다. 프로테아좀은 크게 목표 단백질의 인식 (recognition)을 담당하는 26S subunit 단백 분해능을 갖는 20S subunit 으로 구성되어 있다. 프로테아좀에 의한 단백 분해 과정의 시작은 프로테아좀에 해당 단백질을 인식시키는 유비퀴틴 (ubiquitin)이 사슬 구조의 중합체를 이루어 단백질과 결합하는 과정인 유비퀴틴화 (ubiquitination)에 의해 매개되는 것으로 알려져 있다. 단백질의 유비퀴틴화는 일련의 효소군인 E1, E2, E3 ligase 에 의해 매개되며, 그 기질에 대한 특이성과 기질의 특정 residue 의 존재에 대한 연구는 점차 그 보고가 늘고 있는 추세이나, 교원질에 대한 세부 연구 결과가 보고된 바는 거의 없다

## 6. 섬유화를 특징으로 하는 피부질환

경피증 (Morphea), 전신성 경화증 (Systemic sclerosis), 혼합결체조직질환 (Mixed connective tissue disease), 켈로이드 (Keloid), 경화부종 (Scleredema) 등은 모두 교원질의 과생산 및 과축적을 특징으로 하는 질환이다. 이들 질환의 병인으로는 섬유아세포에서 과도한 교원질의 생성 및 분해 이상을 초래할 수 있는 염증 반응과 그로 인한 사이토카인의 분비 변화가 거론되어 왔다. 그러나 초기에는 각기 다른 염증성 반응 및 면역학적 이상을 나타내며 반해, 진행될수록 서로 유사한 표현형과 병변 특성을 나타내는 현상 또한 관찰된다. 예를 들어 혈관내피세포의 손상과 기능 저하로 인한 vWF, Factor VIII, PDGF 등의 유리화 이로 인한 이차적인 IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8 등의 사이토카인의 유리화 이로 인한 염증 반응은 전신성 경화증에 특징적이거나 언급된 여타 질환들에서는 잘 관찰되지 않아, 이러한 특이 염증 반응의 유도가 섬유화를 형성하는데 결정적인 역할을 하는 것으로 생각되지 않는다. 표현형과 선행 염증 반응의 일관성이 결여되어 있는 현상에 대한 다른 보고로, Fibrillin-1 이나  $\beta 6$  integrin 등의 구조 단백질이

결핍되었을 경우나 T 림프구가 결핍된 개체에서도 유사한 표현형이 나타날 수 있음이 보고되었으며, 이는 교원질 합성을 조절하는 별도의 기전이 존재할 가능성을 시사하고 있다.

## 7. 피부 섬유아세포의 TLR 발현과 교원질 생성 조절

본 연구의 배경이 된 소속 연구실의 선행 연구 결과, 피부 섬유아세포에서는 TLR2, -3, -4, -5, -6, -7, -8이 발현됨이 관찰되었다 (표 4). 이들 중 exogenous ligand에 의한 활성화를 유도할 경우 유일하게 TLR3의 ligand인 polyinosinic : polycytidilic acid (poly I:C) 처리시 특이적으로 TLR3 활성화에 의해 섬유아세포에서 세포 내/외의 type I procollagen이 감소되는 현상이 발견되었다 (그림 6). 이때 제1형 교원질 mRNA은 동시에 감소하지 않으며 제 1형 교원질의 감소가 프로테아좀 저해제인 MG-132 처리시 회복되는 양상을 확인하고 TLR3의 활성화에 의한 교원질 감소가 전사단계에서의 조절이 아닌 프로테아좀에 의한 세포 내 분해의 증가에 의한 결과였을 것으로 추측하였다 (그림 7).

Cell	Expressed TLRs	References
Keratinocytes	1, 2, 3, 4, 5, 9	<a href="#">Mempel et al., 2003</a> <a href="#">Miller et al., 2005</a> <a href="#">Pivarcsi et al., 2003</a>
Langerhans cells	High: 2 Intermediate: 3, 4, 8, 10 Low: 5, 6, 7, 9	<a href="#">Renn et al., 2006</a>
Melanocytes	4	<a href="#">Renn et al., 2006</a>
Fibroblasts	2, 3, 5, 6, 7, 8	이 등. 2008, 서울대학교 대학원 의과학과 박사논문

표 4. 피부 세포에서의 TLR 발현 양상.

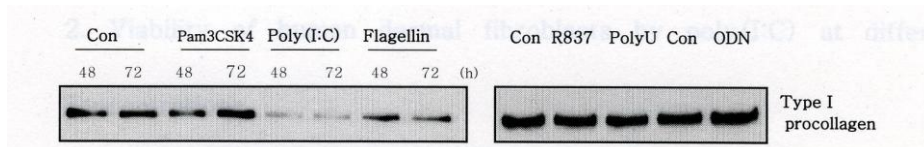


그림 6. Poly I:C 처리시 세포 배양액에서의 제 1형 교원질의 양적 변화. TLR3의 ligand (Poly I:C)는 특징적이고 유일하게 1형 교원질의 세포외 농도를 감소시킴 (김 등, 2008, 서울대학교 대학원 의과학과 학위논문).

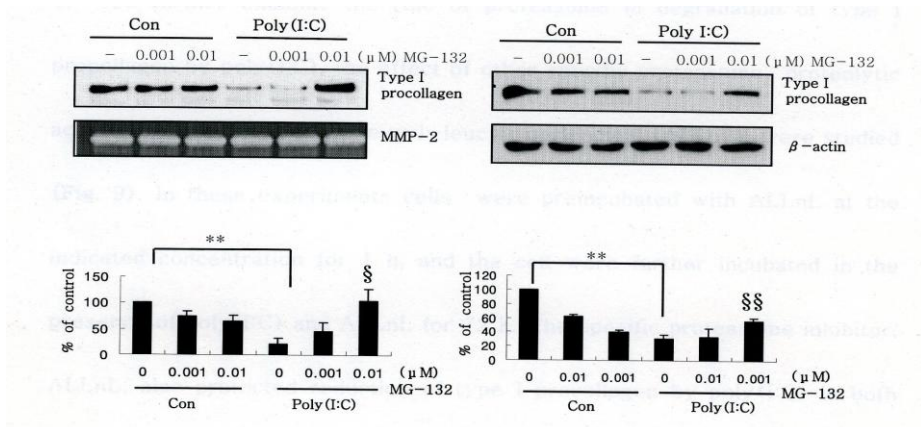


그림 7. Poly I:C 와 MG-132 동시 처리 후 제 1 형 교원질의 양적 변화 비교. Poly I:C 에 의한 세포 배양액에서의 제 1 형 교원질의 감소는 프로테아좀 저해제 (MG-132)에 의해 회복됨: TLR3 에 의해 매개되는 1 형 교원질의 분비 저하는 프로테아좀 혹은 유비퀴틴화 과정에 의해 매개됨을 시사함 (김 등, 2008, 서울대학교 대학원 의과학과 학위논문).

## 7. 블레오마이신 유도 경피증양 생쥐 모델

블레오마이신 유도 경피증양 생쥐 모델 (Bleomycin-induced sclerodermoid mouse model) 은 경피증 등의 피부 섬유화 질환을 연구하기 위한 동물 모델이다. 이외의 경피증 유사 모델은 TSK-1 knockout mouse 등이 있으나, 이 경우 주로 fibrillin-1 의 이상으로 인한 변성 단백질의 축적에 의한 병변이라, 교원질의 증가로 인한 경피증양 병변을 실험 대상으로 하기 위해 블레오마이신 유도 모델을 사용하였다. 이 중 무모 생쥐 모델 (nude mice model) 은 흉선의 발달 억제와 T cell 의 결핍을 보이는 변이종 생쥐에 블레오마이신을 투여하여 경피증양 병변을 유도하는 모델로 정상적인 면역상태의 생쥐 모델에 비해 상대적으로 긴 기간인 8 주 이상의 블레오마이신 투여로 경피증양 병변을 유도할 수 있는 것으로 보고되어 있다.

## II. 재료 및 방법

### 가. 재료 (제조사 및 국가)

- BALB-c/nu mice - 4 주령, 25 마리 (오리엔트바이오, 한국)
- Bleomycin (브레오신 주, 동아제약, 한국)
- Poly I:C (polyinosinic:polycytidylic acid, Invivogen, USA)
- Insulin syringe (31 gauge, BD, USA)
- First strand cDNA synthesis kit (MBI Fermentas, LITHUANIA)
- SyBR real-time PCR kit (MBI Fermentas, LITHUANIA)
- RNA Iso solution (Takara inc. JAPAN)
- RIPA protein lysis buffer (150mM sodium chloride, 1.0% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS(sodium dodecyl sulphate, 50mM Tris. pH 8.0, Sigma-Aldrich, USA)
- Primary antibody: Rabbit Anti-type I collagen antibody (Calbiochem, USA)
- Secondary antibody: Goat Anti-Rabbit IgG (Cell signaling, USA)
- Bicinchronic Acid(BSA) protein assay reagent (Sigma-Aldrich, USA)



- ECL Chemiluminescence Western blotting system (Omnilab Jürgens, GERMANY)
- Suc-LLVy-AMC fluorogenic substrate (BIOMOL, USA)
- Boc-Leu-Arg-Arg-AMC (BIOMOL, USA)
- Z-Leu-Leu-Glu-betaNA (BIOMOL, USA)
- 20S Proteasome assay buffer (BIOMOL, USA)
- SirCol Collagen assay kit (Biocolor inc., UK)

#### 나. 실험동물의 준비 및 식별표시

BALB-c/nu mice 는 4 주령의 개체를 공급사로부터 수령하여 검역 절차 후 실험에 사용하였다. 총 30 마리를 6 개의 그룹으로 분류하였으며 각각의 개체는 punch 로 ear marking 하여 개체 식별자로 이용하였다. 위에 언급한 선행 연구 결과에 따라, TLR3 ligand 인 Poly I:C 를 경피증양 병변에서의 교원질 증가에 대한 길항 작용을 나타내는 활성 물질로 설정하여 약제를 투여한 생쥐군을 실험군으로, 블레오마이신에 의해 생성된 경피증양 병변이 유도된 생쥐군을 양성 대조군으로 설정하였다 (표 5). 그룹 6 은 양성

대조군과 같은 조건으로 실험하였으며, 다음의 목적으로 설정하였다:  
 첫째, 실험 기간 동안 실험군에 문제가 발생할 경우 대체실험을  
 실시할 예비 개체군. 둘째, 경피증양 병변의 유도 여부를 확인하기  
 위한 Pilot biopsy pool. 셋째, 실험군에 문제가 발생하지 않을 경우  
 실험 종료 후 양성 대조군에 편입.

Group No.	Treatment	Number of mice
1	Control (Vehicle-PBS only)	5
2	Positive control (Bleomycin <u>10ug/g</u> only)	5
3	Bleomycin <u>10ug/g</u> + Poly I:C <u>1ug/g</u>	5
4	Bleomycin <u>10ug/g</u> + Poly I:C <u>5ug/g</u>	5
5	Bleomycin <u>10ug/g</u> + Poly I:C <u>25ug/g</u>	5
6	Positive control (Bleomycin <u>10ug/g</u> only) - Reserve	5

표 5. 실험군 분류

#### 다. 경피증양 병변의 유도 및 억제처리

약제의 투여 용량은 타 연구에서 사용한 전신 투여 용량을 피내  
 주사시 생성되는 팽진의 면적을 사전에 설정하여, 4 주령 생쥐의  
 등에서 반분한 최대 면적으로 계산하였을 때 전체 체표면적에서

차지하는 비율을 곱하여 결정하였으며, 경피증양 병변의 유도 기간은 Nishioka 등이 서술한 기간에 근거하여 설정하였다.

사육중인 cage 에서 plastic chamber 의 18%의 산소가 포함된 공기와 혼합 기체를 투여하여 약 1-2 분 내에 마취상태를 유도한 후, 약제 투여 및 일정상의 계측을 실시하였다.

블레오마이신은 2g/ml 의 농도로 PBS 에 희석하여 stock solution 을 제조하였다. Poly I:C 는 냉동상태의 분말을 멸균 상태의 PBS 에 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  stock solution 으로 만들고, 1 회 투여시 부피가 공통적으로 0.1 ml 가 되도록 조정하여 4 도의 냉장실에 보관하였다가 에서 준비하였다. 양성 대조군인 2 군과 6 군, 실험군인 3, 4, 5 군에 속한 쥐들의 양 귀를 연결한 연장선의 중점과 꼬리가 시작되는 점을 연결한 선상의 중앙에 해당하는 등 부위를 표시하고, 10  $\mu\text{g}/\text{g}$  의 용량에 해당하는 블레오마이신 stock solution 을 31 gauge 주사침 결합된 주사기에 개체별로 준비하여 동물을 보정한 상태에서 표시된 부위에 진피 내 주사하였다. 블레오마이신은 쥐의 체중에 따라 10  $\mu\text{g}/\text{g}$  의 용량으로 8 주간 주 3 회 투여하였으며, 3 주째부터 이후 6 주간 블레오마이신과 여러 용량(1  $\mu\text{g}/\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}/\text{g}$ , 25  $\mu\text{g}/\text{g}$ )의 Poly I:C 를 같은 방법으로 같은 위치에 연속 투여하였다 (표 6).

내용	1 주	2 주	3 주	4 주	5 주	6 주	7 주	8 주	9 주	10 주
검역	■									
Bleomycin 투여		■								
Poly I:C 투여			■							
조직 수득										■

표 6. 세부 실험 일정

## 라. 계측 및 분석

### 1) 이학적 변화의 계측과 조직 수득

: 실험 시작부터 종료 시점까지 주 1 회 체중, 피부 두께의 측정, 피부 병변의 디지털 사진을 촬영하였다. 체중은 흡입마취 전 각 개체를 chamber 가 달린 저울로 옮겨 측정하였으며, 피부 두께는 흡입 마취 하에서 주사 전 주사 부위를 머리-꼬리 축 (rostocaudal axis)에 수직인 방향으로 주름이 겹치지 않도록 잡아 올려 (pinching) 캘리퍼로 측정하였다. 투약 일정 종료 후, 개체는 흡입마취 상태에서 정맥 천자 후 방혈하여 희생하였으며 주사 부위의 피부를 잘라 조직을 얻었다.

2) Hematoxylin and Eosin (H&E), Masson-trichrome (M-T)

염색

: 치료 부위와 병변에서 수득된 생쥐 피부에서 3x3mm 의 정사각형 절편을 얻어 Formalin 고정 후 Paraffin block 을 제작하였다. 같은 크기의 피부 조직을 별도로 OCT media 로 처리된 cryoblock 으로 제작하였다. H&E 및 M-T 염색은 Paraffin block 에서 5um 두께로 절단하여 얻은 슬라이드로 수행하였다.

3) 광학현미경하에서 진피의 두께 측정

: 저배율 (40 배) 사진에서 무작위로 20 개의 지점을 설정한 후 진피유두와 표피의 경계부위부터 피하지방층의 시작 지점까지의 수직 연장선의 길이를 측정하였다. LSM Image examiner(Carl Zeiss, Germany)에서 설정, marking 후 Macnification (Orbicule BVBA, USA) 과 TINA (Raytest Isotope-nme[beta]gerate, Germany) software 를 사용하여 측정값을 얻었다.

#### 4) Total RNA 추출과 정량

: 피부조직은 멸균 및 RNAase inhibitor 처리된 aluminum foil pocket 에 담겨 액체질소가 담긴 운반체로 이동되어 -70 도의 냉동고에 보관하였다. 조직을 액체질소에 담아 옮겨 pocket 외부에서 rubber hammer 로 충격을 반복적으로 가하였으며, 계속해서 액체질소에 침윤시켜 조직의 수화, 승화 및 파괴를 방지하며 분말 형태가 될 수 있도록 하였다. 얻어진 분말 형태의 조직을 RNA Iso 용액에 처리하여 vortexing 하여 용해시켰다. 1/4 부피의 Chloroform 을 첨가하여 15 초간 강하게 흔든 다음 상온에 거치하여 층분리시킨 후 12,000G, 4 도에서 15 분간 원심분리하였다. 상층액을 분리한 후, Isopropanol 과 Ethanol 을 차례로 첨가하고 원심분리한 후 원심진공건조기 (SpeedVac, Thermo Couder Scientific, USA)로 처리하거나 Clean bench 에서 건조시킨 후 DEPC-treated water 에 용해시켜 -70 도 냉동고에 보관하였다가 수일 내 실험에 사용하였다. 실험 직전 상온에서 해동한 total RNA 용액을 각 1  $\mu$ l 씩 Nanodrop ND1000

spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., USA)로 측정하여 정량하여 사용하였다.

#### 5) Protein 추출과 정량

: RNA 추출시와 동일한 방법으로 얻어진 분말 형태의 조직을 lysis buffer (50mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  leupeptin, 5 ml phenylsulfonyl fluoride, 1mM DTT)에 용해시켰다. 수회 13,000G, 4 도에서 원심분리하여 침전물을 제외한 상층액을 얻었다. Bovine serum albumin 을 reference protein 으로 하여 VersaMax spectrophotometer 와 SoftMaxPro 5 analysis program (Molecular devices, USA) 을 이용하여 BCA protein assay 로 정량하였다.

#### 6) cDNA synthesis & qRT-PCR

: kit 및 기기 제조사 (ABi 7500, Applied biosystems, USA)의 통상 protocol 에 준하여 시행하였다. (섭씨) 50 도 2 분, 95 도 2 분의 정지과정, 95 도 15 초, 60 도 1 분의 cycle 을 40 회 반복 후 95 도 15 초, 60 도 1 분, 95 도 30 초, 60 도 15 초의 용해 곡선 측정 과정의 thermocycling protocol 을 사용하였다. 사용된 primer 는 Bioneer inc. (한국) 과 CosmogeneTech (한국) 에서 합성하였으며 적용된 sequence 는 다음과 같다.

Type I procollagen alpha 2(1)

: forward 5'-CATCCATCCCGTGACCTTAT-3'

reverse 5'-GCATGACTCTCACAATGCGA-3'

MMP-13

: forward 5'-TCGTGACCGTGACCTTGCG-3'

reverse 5'-GAGGCACAGACGGCTGAGTAG-3'

IL-1b

: forward 5'-TTGACGGACCCCAAAGATG-3'

reverse 5'-AGAAGGTGCTCATGTCCTCA-3'



36b4 (reference gene 으로서)

: forward 5'-TCGACAATGGCAGCATCTAC-3'

reverse 5'-TGATGCAACAGTTGGGTAGC-3'

7) Western blot:

: 8% SDS-PAGE gel 에 정량된 protein sample 을 동량에 해당되는 부피만큼 각각 분주하여 90V-120V 의 전압으로 전기영동하여 gel 상에서 분리한 후, 9V, 4 도에서 12 시간 전기영동하여 polyvinylidene fluoride membrane 로 이동시켰다. TBST (20mM Tris-HCL, pH 7.6, 137mM NaCl, 0.05% Tween 20)로 희석된 5% skim milk 로 1 시간동안 정지과정을 거쳐 12 시간 동안 일차항체 (Rabbit anti-type I collagen, Calbiochem, USA)를 반응시키고 세척 후 HRP 에 결합된 이차항체를 반응시키고 수회 다시 세척하였다. ECL solution 과 반응된 membrane 을 암실에서 Kodak X-ray film 에 노출시킨 후 film 을 현상하여 확인하였다.

## 8) Soluble collagen assay (SirCol assay)

: 제조사 (Bicolor, UK)의 protocol 을 일부 수정하여 사용하였다. Test sample 은 부피 10-100  $\mu\text{l}$  사이가 되도록 최적 희석비를 조정하여 일정한 부피를 분주하였다. Tube 에 blank, standard, tissue sample 을 각각 넣고 SirCol Dye 를 1 ml씩 넣어 뚜껑을 닫은 후 2-3 회 inverting 하여 혼합하고 Tube 들을 rack 에 거치하여 상온, Shaker 에서 30 분간 거치하였다. 15,000G 에서 10 분간 원심분리 후 상층의 Dye 를 조심스럽게 제거하고 건조시켰다. tube 아래의 pellet 을 확인한 후 벽과 바닥에 더 이상 남아있는 Dye 가 없으면 Alkali reagent 를 tube 당 1 ml씩 넣고 1 분간 vortexing 한 후 5 분간 거치하였다. 2 시간 내 96well microwell plate 에 200  $\mu\text{l}$ 씩 넣고 540nm 에서 발색 정도를 측정하였다. Effendorf tube 에 D/W 또는 침전이 없는 상태의 Protein sample preparation 시 사용한 것과 동일한 종류의 sample buffer 를 blank 로 설정하였으며, Bicolor standard collagen (swine skin collagen, 1 mg/ml)을 5, 10, 25, 50  $\mu\text{g/ml}$

농도로 희석하여 제조사의 지침대로 VersaMax spectrophotometer 와 SoftMaxPro 5 analysis program (Molecular devices, USA) 에서 표준화 곡선 (standard curve)를 설정하여 측정하였다.

#### 9) 20S Proteasome activity assay

: Meng 과 Reidlinger 등에 의해 보고된 방법을 수정하여 사용하였다. 조직으로부터 extraction buffer (20mM Tris-HCl (pH 7.8), 5mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM KCl, and 1mM dithiothreitol (DTT) (+ 0.03% SDS or 10% glycerol)를 사용하여 분말 상태의 동결조직을 용해시킨 후 5 초간 sonication 하였다. 1500G, 4 도에서 10 분간 원심분리 후 supernatant 를 모아 BSA 를 기준으로 하여 정량하였다. Total protein 기준 30  $\mu$ g의 protein sample 과 각 1M 의 fluorogenic substrate 70  $\mu$ l를 혼합하여 37 도에서 30 분간 거치 후 각 substrate 의 특성에 따라 emission/detection

parameter 를 Varian spectrophotometer (Cary Eclipse, USA) 에 설정하여 측정하였다.

실험에 사용되는 substrate 들에 포함되어 있는 AMC, 또는 betaNA 와 같은 fluorogenic residue 들이 purified proteasome, proteasomal enzyme, 또는 proteasome 이 포함된 sample 에 의해 free form 으로 변화하면서 나오는 형광의 강도를 측정함으로써 간접적으로 proteasome enzymatic activity 를 측정하였다. 즉, substrate 의 분해되는 정도, arbitrary fluorescence units (AFU)의 양, proteasome 의 enzymatic activity 는 비례한다. Caspase 유사, Trypsin 유사, Chymotrypsin 유사 단백질분해능을 각각 해당 substrate 를 이용하여 측정하였다 (표 7).

Enzyme-like activity	Substrate-Fluorogen	Excitation / Emission wavelength (nm)
Caspase-like activity	Z-Leu-Leu-Glu-betaNA	336/410
Trypsin-like activity	Boc-Leu-Arg-Arg-AMC	360/460
Chymotrypsin-like activity	Suc-LLVY-AMC	380/460

표 7. 프로테아좀 (20s core) 의 단백 분해능 분류와 해당 측정을 위한 기질.

모든 분자생물학적 실험은 3 회 반복 시행하여 같은 경향의 결과가 도출된 결과만을 제시하였으며, 동물 실험의 모든 과정은 해당 기관의 동물실험윤리위원회의 승인 및 관리 감독 하에 시행되었다.

#### 마. 통계량 분석

Student  $t$  test(양측검정, 신뢰구간 95%, 유의수준  $p < 0.05$ )를 시행하였으며, SPSS 11.0 (SPSS Inc., USA) 소프트웨어로 분석하였다.

### Ⅲ.결과

#### 가. 육안적 관찰 소견

전반적으로 정상적인 이완 상태에서 관찰되는 주름의 수와 깊이가 감소하는 양상을 나타내었으나 육안적으로 또는 촉진시 차이를 느낄 수 있을 정도의 균간 차이는 관찰되지 않았다. 반면 주사 부위를 중심으로 다양한 정도의 홍반이 관찰되었으며, 블레오마이신 단독 투여군에서 가장 심한 양상을 나타내었다 (그림 8)



**Group 1**  
Control

**Group 2**  
Bleomycin  
10ug/g

**Group 3**  
Bleomycin  
10ug/g +  
Poly I:C 1ug/g

**Group 4**  
Bleomycin  
10ug/g +  
Poly I:C 10ug/g

**Group 5**  
Bleomycin  
10ug/g +  
Poly I:C 25ug/g



그림 8. 육안적 변화. 개체 식별 번호와 군별 투여 약제의 종류와 용량 차이를 표시함.

#### 나. 체중 변화

대조군에서는 실험 종료 후 약 10% 정도의 체중 증가를 보인 반면, 실험군에서는 3-9% 정도의 체중 감소를 보였으나 통계적으로 유의한 차이를 나타내지는 않았다. 사육중 원인 불명의 섭식 장애가 발생한 3-3 번 개체는 약 35%의 체중 감소를 보여 결과에서 제외하였다 (그림 9).

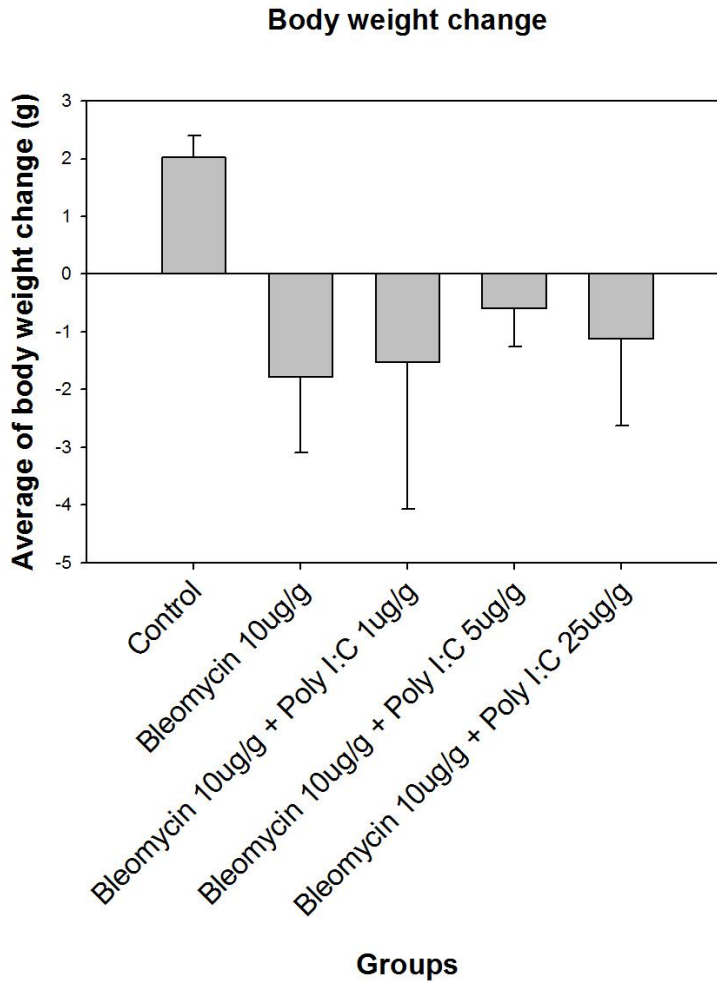


그림 9. 실험 전후 체중의 변화. 군별 평균값을 막대로 나타내고 군별 평균오차를 오차막대로 표시하였슴. 통계적으로 유의하지 않음 ( $p=0.174$ )

#### 다. 캘리퍼로 측정한 피부 두께의 변화

: 전반적으로 감소하는 양상을 보였으며 대조군에 비해 블레오마이신 단독 투여군과 저용량, 중간 용량의 Poly I:C 투여군에서 감소량이 크고, 고용량의 Poly I:C 투여군에서는 감소량이 적은 양상을 보이는 등 군간 차이는 관찰되었으나 통계적으로 유의하지 않았다 (그림 10)

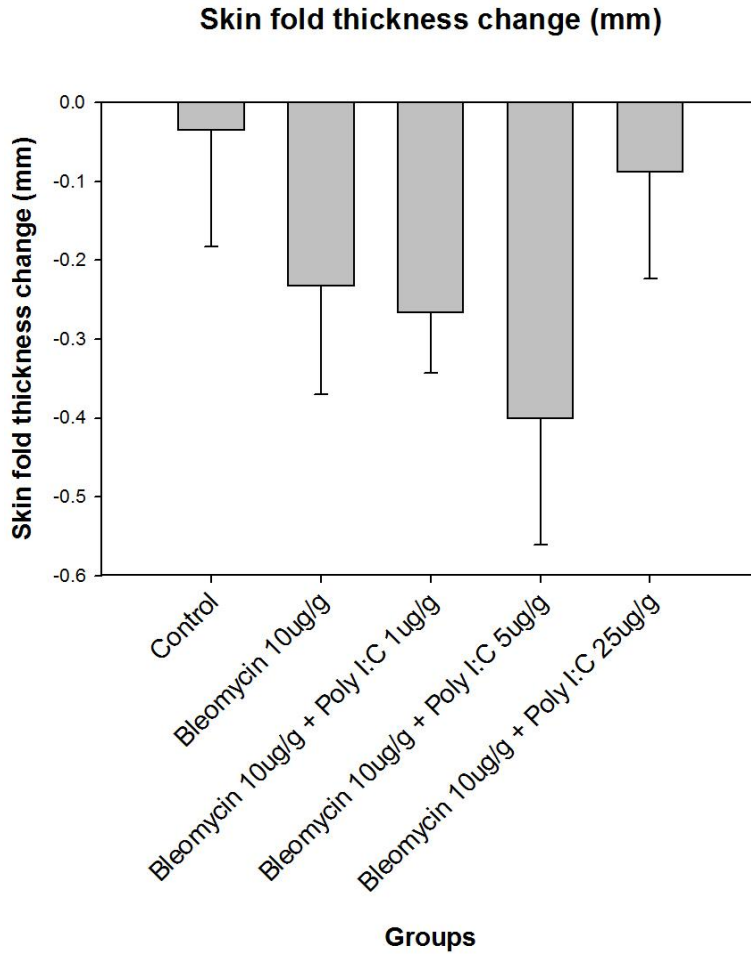


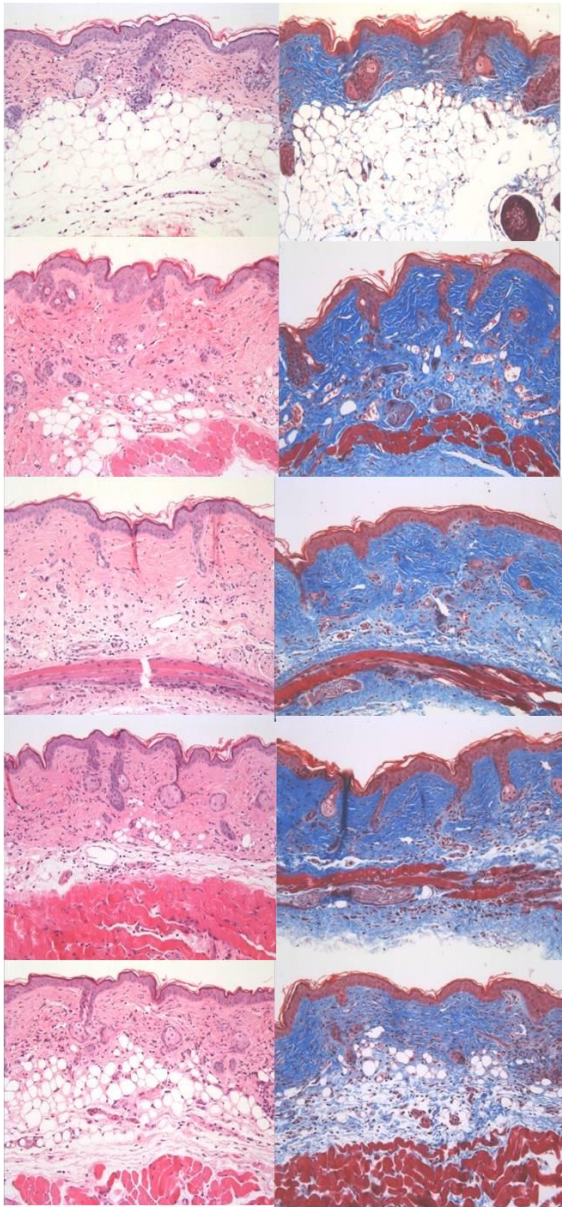
그림 10. 캘리퍼로 측정된 피부 두께의 변화. 실험 시작 시점부터 종료 시점까지의 변화량(mm)의 군별 평균값을 막대로 나타내고 군별 평균오차를 오차막대로 표시하였슴. 통계학적으로 유의하지 않음 ( $p=0.079$ )



## 라. 조직학적 관찰 소견

### 1) 전반적인 광학현미경상 관찰 소견

: H&E 염색 조직에서 블레오마이신 단독 투여군 및 저용량 (1  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ )의 Poly I:C 투여군에서는 피하지방층의 감소와 감소된 공간이 증가된 교원질로 대체되는 현상이 관찰되었으며, 이는 진피 두께의 증가와 동반되는 양상으로 나타났다. Poly I:C 투여군에서 신생 혈관 구조의 형성이 더 뚜렷하였으나, 유의하지는 않았음 Masson's trichrome 염색에서는 상부 진피에서 더 두드러진 교원질 다발의 조밀한 분포가 확인되었다. 림프구와 조직구 등의 염증세포 침윤이 불규칙하게 관찰되었다 (그림 11).



**Control**

**Bleomycin 10ug/g**

**Bleomycin +  
Poly I:C 1ug/g**

**Bleomycin +  
Poly I:C 5ug/g**

**Bleomycin +  
Poly I:C 25ug/g**

**H&E**

**M-T**

그림 11. 조직학적 관찰 소견 (광학현미경, H&E / M-T 염색, 배율: 200 배. H&E: Hematoxylin-Eosin, M-T: Masson's trichrome)

## 2) 표피 두께의 차이

: 군간 차이가 관찰되었으나, 통계적으로 유의하지 않았다 (그림 12).



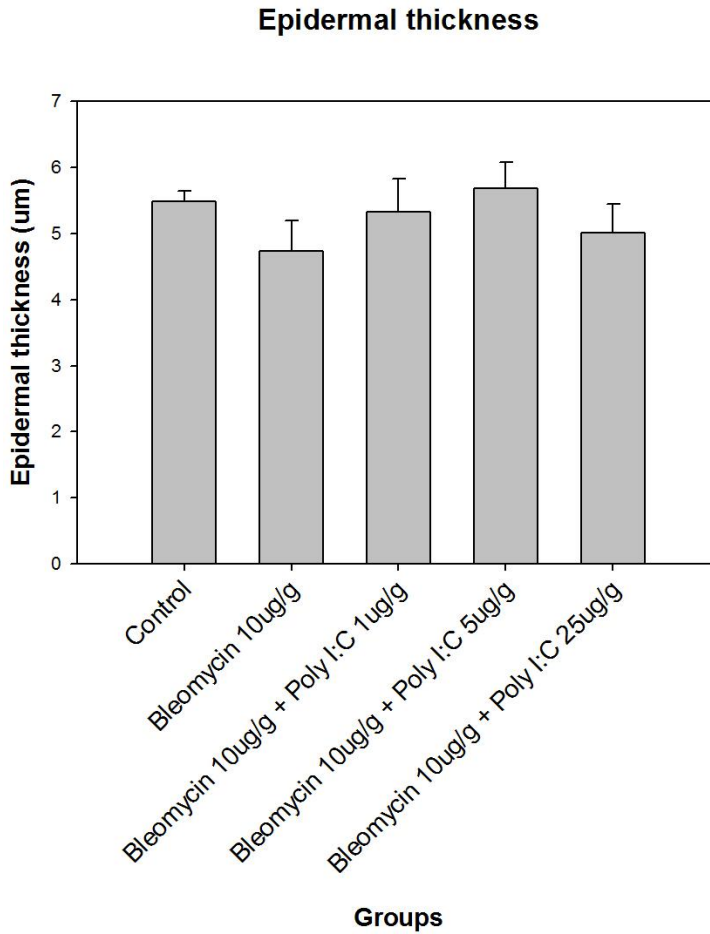


그림 12. 표피 두께의 차이. 실험 종료 시점에서의 측정값(um)의 군별 평균값을 막대로 나타내고 군별 평균오차를 오차막대로 표시하였슴. 통계학적으로 유의하지 않음 ( $p=0.084$ )

### 3) 진피 두께의 차이

: 블레오마이신 단독 투여군에서 대조군에 비해 진피 두께의 유의한 증가 소견이 관찰되었으며, 블레오마이신 단독 투여군에 비해 25  $\mu\text{g/g}$  용량의 Poly I:C 를 투여한 군에서 진피 두께의 유의한 감소가 관찰되었다 (그림 13).

### Dermal thickness

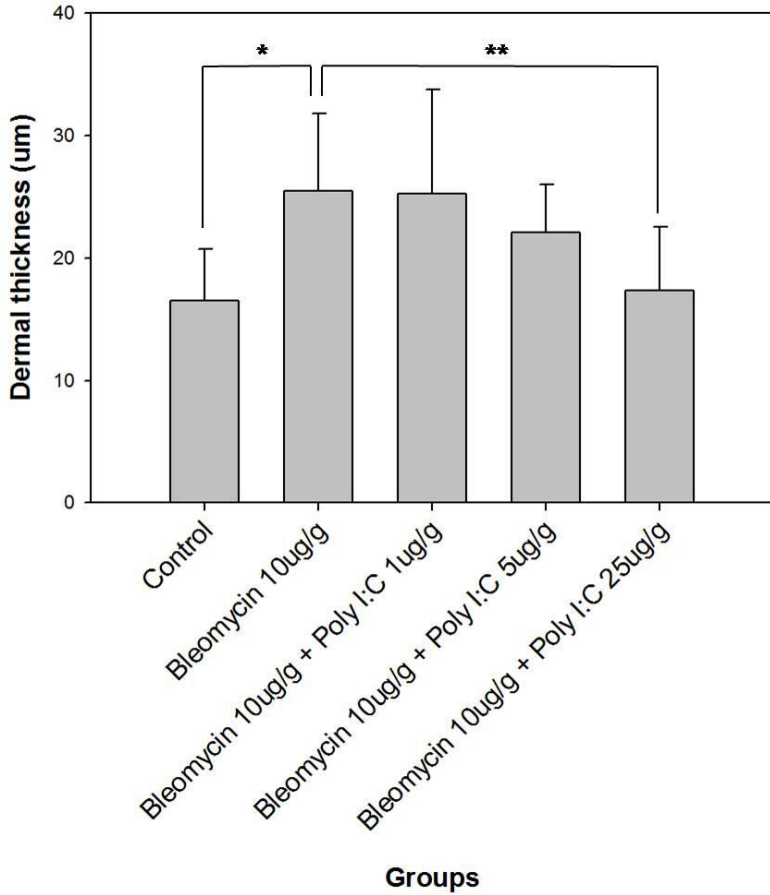


그림 13. 진피 두께의 차이. 실험 종료 시점에서의 측정값(um)의 군별 평균값을 막대로 나타내고 군별 평균오차를 오차막대로 표시하였으며, 통계학적으로 유의하였음을 표시함 (\* $p=0.032$  : 실험군과 비교시, \*\* $p=0.041$  : 블레오마이신 단독 투여군과 비교시).

## 마. 분자생물학적 변화

### 1) 조직 내 교원질의 양적 변화

: Western blot 으로 각 개체별로 동량의 total protein 을 군별로 pooling 하여 제 1 형 교원질의 조직내 양을 측정한 결과 대조군에 비해 블레오마이신 처리군에서 증가하였고, 블레오마이신 처리군에 비해 Poly I:C 25  $\mu\text{g/g}$  처리군에서 감소하였음이 확인되었다 (그림 14).

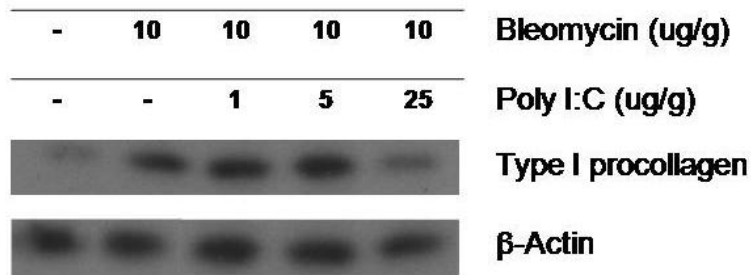


그림 14. Western blot. Pooling 된 Sample 간의 blot 차이 비교와 reference 로 사용된 actin 의 blotting 소견. 군별 블레오마이신과 Poly I:C 의 투여 용량을 명시함.

이후 각 개체로부터의 현상된 blot 을 고해상도 scan 후 각 image 의 강도를 densitometry 분석 소프트웨어 (TINA) 로 환산한 값의 평균을 비교하였다. 대조군에 비해 블레오마이신 처리군에서 증가하였고, 블레오마이신 처리군에 비해 Poly I:C 25  $\mu\text{g/g}$  처리군에서 감소하였으며, 블레오마이신 처리군에 비해 Poly I:C 25  $\mu\text{g/g}$  처리군에서 유의하게 감소하였음이 확인되었다 (그림 15).

### Type I Collagen

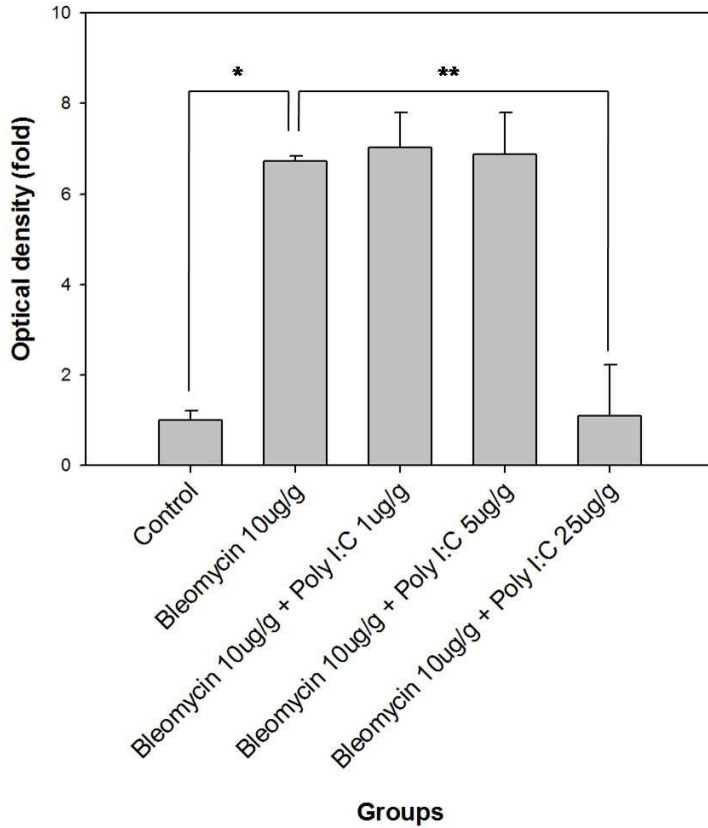


그림 15. 제 1 형 교원질의 양적 차이. 군별 평균값을 막대로 나타내고 군별 평균오차를 오차막대로 표시하였으며, 통계학적으로 유의하였음을 표시함 (\* $p=0.002$ . \*\* $p=0.01$ ).

### 2) 조직 내 수용성 교원질의 양적 변화

: Sircol assay kit 에서 수용성 단백질과 결합된 염료의 발색 강도를 Spectrophotometer 로 측정하여 측정값의 차이로부터 Soluble collagen 의 군별 차이를 비교하였다. 측정 결과 대조군에 비해 블레오마이신 처리군에서 증가하였고, Poly I:C 25  $\mu\text{g/g}$  처리군에서 블레오마이신 단독 투여군 대비 감소가 유의하게 확인되었다 (그림 16).

### Dermal soluble collagen

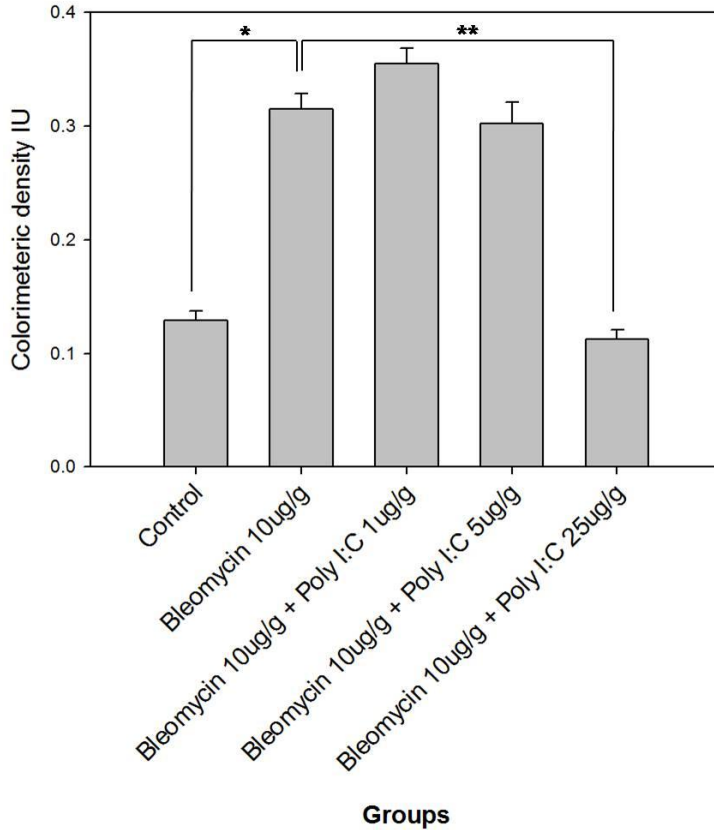


그림 16. Sircol assay. Spectrophotometer 로 측정된 발색 강도의 차이로부터 Soluble collagen 의 군별 차이를 비교함. 군별 평균값을 막대로 나타내고 군별 평균오차를 오차막대로 표시하였으며, 통계학적으로 유의하였음을 표시함 (\* $p=0.012$ . \*\* $p=0.017$ ).



### 3) 제 1형 교원질 전령 RNA 의 변화

: qRT-PCR 결과 type I procollagen 의 mRNA 의 양은 대조군에 비해 블레오마이신 처리군과 Poly I:C 25  $\mu\text{g/g}$  처리군에서 증가하였고, 블레오마이신 처리군에 비해 Poly I:C 1  $\mu\text{g/g}$  처리군에서 증가하였다 (그림 17).

### Type I procollagen

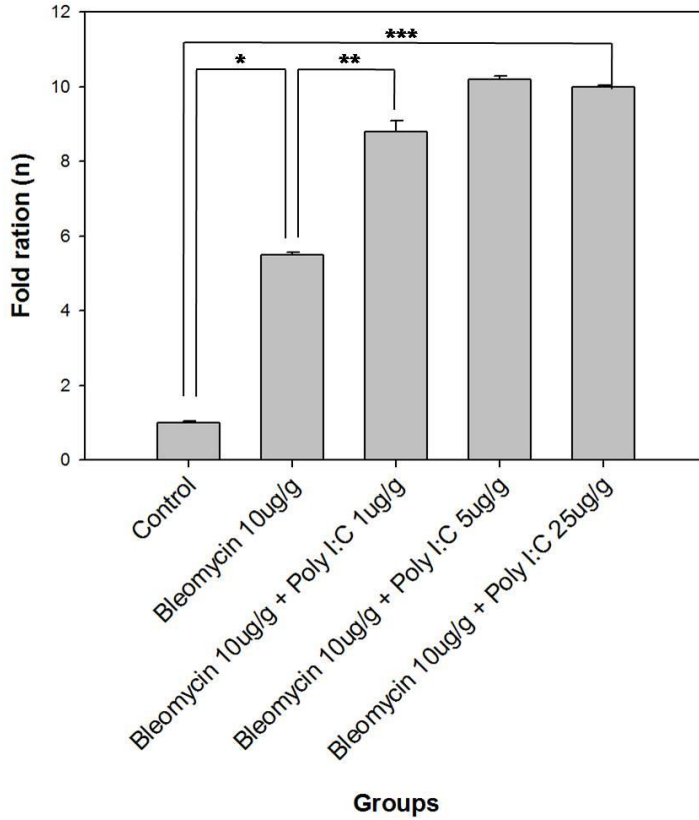


그림 17. 제 1 형 전교원질 전령 RNA 의 변화. 군별 평균값을 막대로 나타내고 군별 평균오차를 오차막대로 표시하였으며, 통계학적으로 유의하였음을 표시함 (\* $p=0.012$ . \*\* $p=0.017$ , \*\*\* $p<0.001$ ).

#### 4) 염증성 사이토카인 IL-1b 전령 RNA 의 변화

: qRT-PCR 결과 IL-1b mRNA 의 양은 대조군에 비해 블레오마이신 처리군과 Poly I:C 25  $\mu\text{g/g}$  처리군에서 증가하였고, 블레오마이신 처리군에 비해 Poly I:C 25  $\mu\text{g/g}$  처리군에서 증가함이 관찰되어 Bleomycin 투여와 Poly I:C 투여에 의해 발현이 증가하는 양상을 보였다 (그림 18).

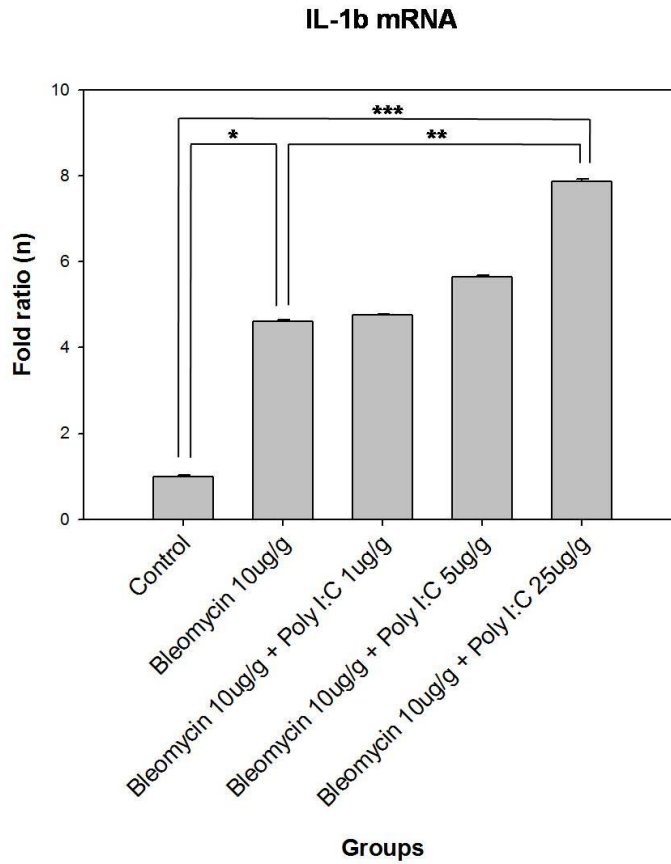


그림 18. IL-1b 전령 RNA 의 차이. 군별 평균값을 막대로 나타내고 군별 평균오차를 오차막대로 표시하였으며, 통계학적으로 유의하였음을 표시함 (\* $p=0.009$ . \*\* $p=0.034$ , \*\*\* $p<0.001$ ).



#### 5) 교원질 분해 효소 mMMP-13 전령 RNA 의 변화

: qRT-PCR 결과 mMMP-13 mRNA 의 양은 대조군에 비해 블레오마이신 처리군과 Poly I:C 1  $\mu$ g, 25  $\mu$ g/g 처리군에서 증가함이 관찰되어, Bleomycin 투여와 Poly I:C 투여에 의해 발현이 증가하는 양상을 보였다 (그림 19).

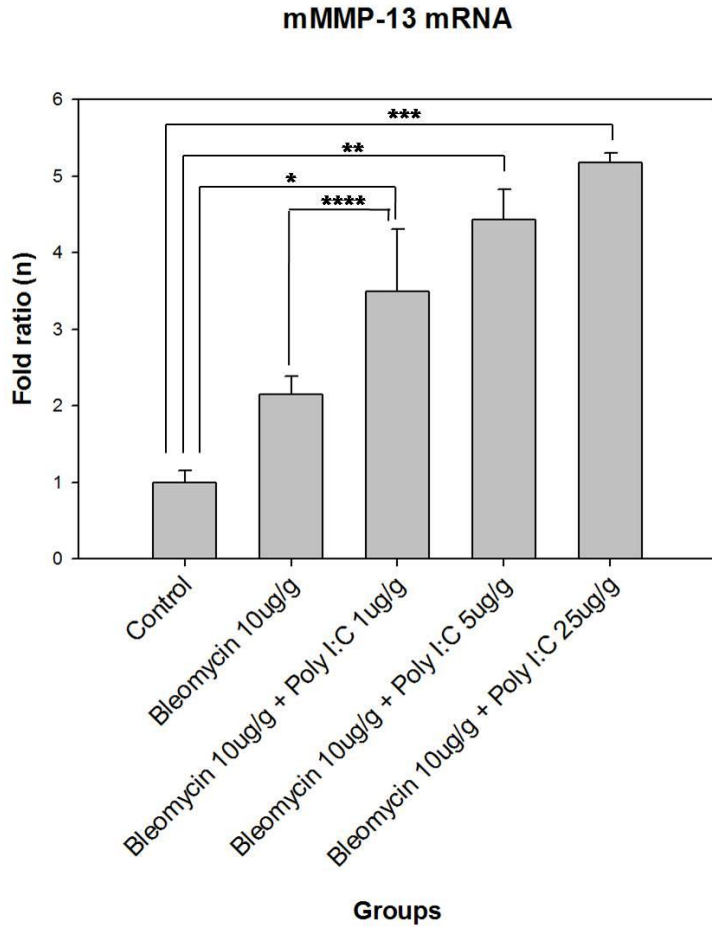


그림 19. mMMP-13 전령 RNA 의 차이. 대조군에 비해 블레오마이신 처리군과 Poly I:C 1  $\mu$ g, 25  $\mu$ g/g 처리군에서 증가하였슴. 군별 평균값을 막대로 나타내고 군별 평균오차를 오차막대로 표시하였으며, 통계학적으로 유의하였슴을 표시함 (\* $p=0.009$ , \*\* $p=0.034$ , \*\*\* $p<0.001$ ).





## 6) 프로테아좀 단백 분해능의 변화

: 프로테아좀 20S core 의 단백 분해 활성도를 Fluorescence spectrophotometer 로 측정하여 형광 강도의 차이로부터 Soluble collagen 의 군별 차이를 비교한 결과, Caspase 유사 활성도와 Chymotrypsin 유사 활성도는 대조군 대비 Poly I:C 25  $\mu\text{g/g}$  투여군에서 증가하는 양상을 보였으나 (그림 20, 그림 21), Trypsin 유사 활성도는 Poly I:C 의 점진적으로 투여량 증가에 반하여 감소하는 양상을 나타내었으며, 대조군 대비 Poly I:C 25  $\mu\text{g/g}$  투여군에서 유의하였다 (그림 22).

### Caspase-like activity

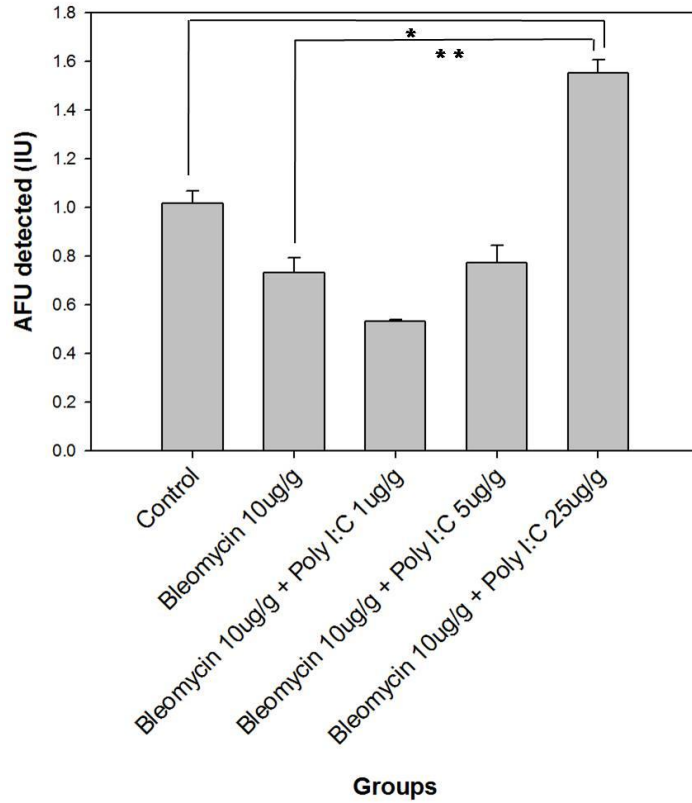


그림 20. 프로테아좀 단백질해능의 변화: Caspase 유사 활성화도. 군별 평균값을 막대로 나타내고 군별 평균오차를 오차막대로 표시하였으며, 통계학적으로 유의하였음을 표시함 (\* $p=0.04$ , \*\* $p=0.026$ ).

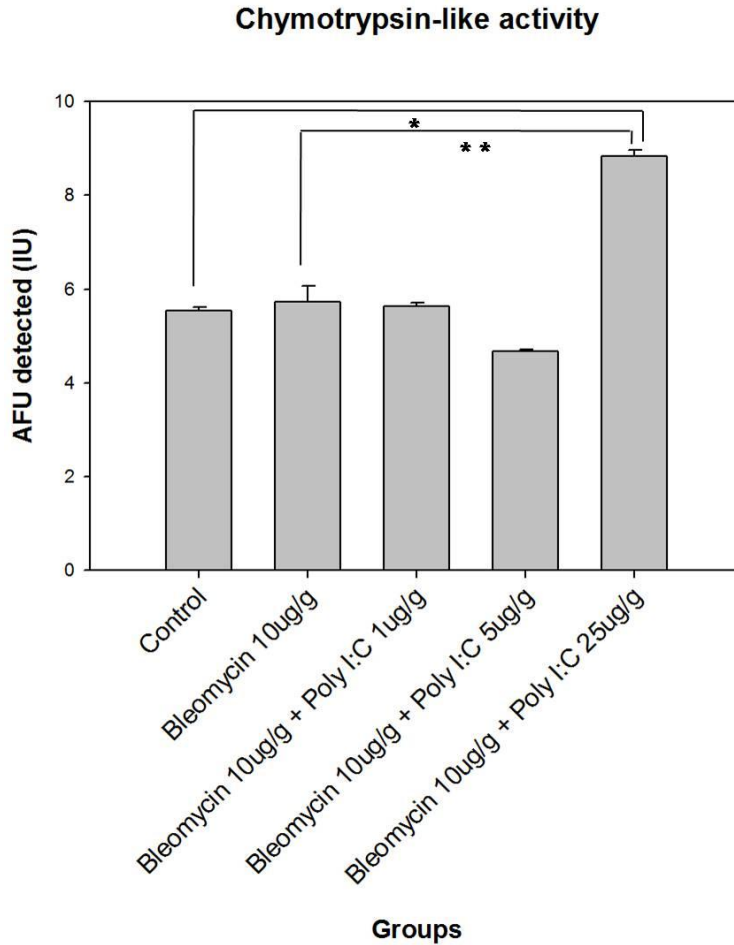


그림 21. 프로테아좀 단백질분해능의 변화: Chymotrypsin 유사 활성도. 군별 평균값을 막대로 나타내고 군별 평균오차를 오차막대로 표시하였으며, 통계학적으로 유의하였음을 표시함 (\* $p=0.025$ . \*\* $p=0.028$ ).

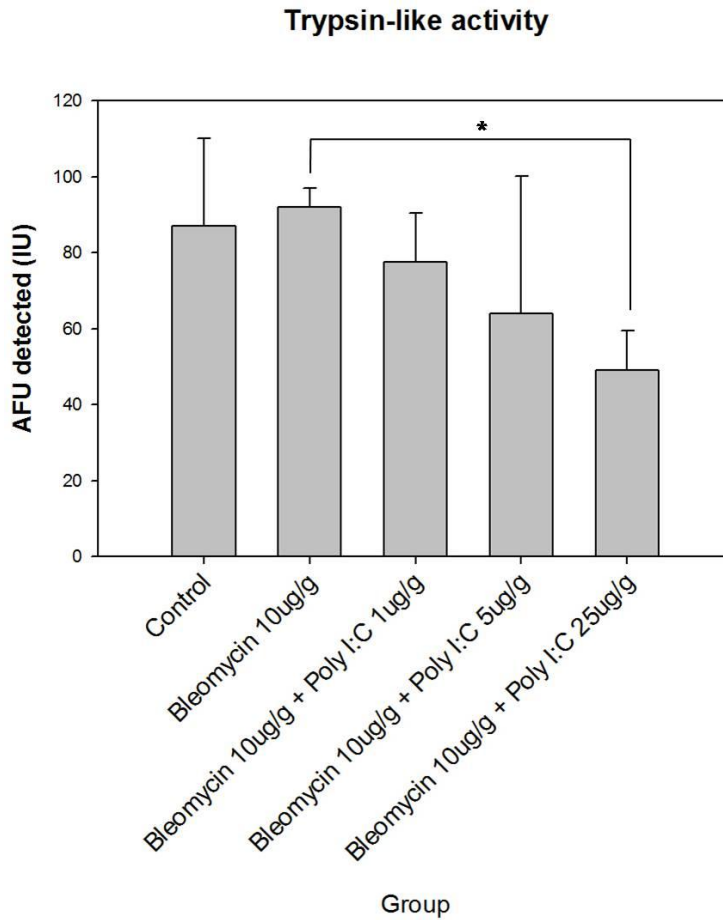


그림 22. 프로테아좀 단백분해능의 변화: Trypsin 유사 활성화도. 군별 평균값을 막대로 나타내고 군별 평균오차를 오차막대로 표시하였으며, 통계학적으로 유의하였음을 표시함 (\* $p=0.031$ ).

### III. 고찰

#### 본 연구 결과의 요약과 의의

본 연구에서는 피부 섬유아세포에서의 알려지지 않았던 TLR 의 발현 양상과 교원질 합성에서의 전사 후 조절 기전에 대한 사전 연구 결과를 바탕으로, 블레오마이신 유도 경피증양 생쥐 모델을 사용하여 생체 내에서의 기전 재현 여부를 검증하였다.

블레오마이신과 동시에 투여된 Poly I:C 는 교원질의 과도한 생성을 억제하고 경피증양 병변을 개선시켰으며, 고용량 처리군인 25  $\mu\text{g/g}$  처리군에서 가장 뚜렷하게 효과가 나타났다. 반면 제 1 형 전교원질의 mRNA 의 양은 Poly IC 투여군들에서 블레오마이신 단독 투여군에 비해 오히려 용량 의존적으로 증가하는 양상을 보여, Poly I:C 투여시 조직에서 세포 외 기질의 교원질 감소는 제 1 형 교원질 유전자의 과발현이 아닌 전사 후 조절에 인한 감소임을 간접적으로 유추할 수 있었으며 이는 사전 연구의 결과와 합치하였다.

#### Poly I:C 의 항 섬유화 효과와 가능한 기전에 대한 고찰

TLR3 는 NF- $\kappa$ B 로 대표되는 전사 촉진 인자를 통해 각종 염증 매개 cytokine 들의 발현을 증가시켜 염증 반응, 즉 내재 면역 반응의 현상을 매개하는 다른 TLR 들과는 달리, TRIF, IRF 와 같은 다른 신호전달 물질과 전사 인자들을 유도하며, 그 목표는 interferon-alpha 의 발현 증가로 알려져 있다.

Interferon-alpha 는 바이러스 항원에 의한 단백 합성의 저해, 세포 고사 유도, 조직 적합 복합체의 활성화, 면역 세포 자극 등의 기능을 하는 물질로 잘 알려져 있으나, 교원질과 같은 세포 구조 단백질의 생성 과정과의 관련성에 대해서는 알려진 바가 거의 없다. 따라서 TLR3 활성화가 어떤 경로로 프로테아좀으로 인한 교원질 분해를 증가시키는지에 대해서 추가 연구가 필요하다.

한편, 프로테아좀에 의한 분해과정에서 필수적인 유비퀴틴화는 표적 단백질의 특정 위치에 높은 확률로 발생하는 것으로 알려져 있으나, 정상적인 구조의 1 형 전교원질에서 발생하는 residue 가 존재하는지에 대한 정보는 알려져 있지 않다. 따라서 TLR3 의 활성화에 의해 결과적으로 제 1 형 전교원질의 구조 이상을 초래하여 이로 인해 비정상적인 유비퀴틴화가 초래된다는 가설을 세워 볼 수

있다. 본 연구에서는 고용량의 Poly I:C 를 투여한 군에서 Caspase 와 Chymotrypsin 유사 단백 분해능의 증가가 관찰되었으나, 이 활성화 기전이 가설대로 구조 이상이 초래되어 유비퀴틴화된 교원질을 표적으로 하는지는 밝힐 수 없었으며, 향후 유비퀴틴화와 기질로서의 교원질이 프로테아좀에 인지되는 과정의 규명이 필요하다.

가설을 좀 더 확장하면 단백질 구조의 변성과 그로 인한 Misfolded protein 의 축적과 그로 인한 소포체 스트레스의 증가, Misfolded protein 의 프로테아좀 매개 분해 증가 등의 일련의 연속적인 과정을 가정할 수 있다. 그러나 TLR3 의 활성화, 또는 그로 인한 신호 전달체계의 활성화가 1 형 교원질의 생성 과정 중 어느 단계에서 구조 이상을 초래할 수 있는 변화의 상위 단계로서 작용하는지는 본 연구에서 확인할 수 없었다. 이는 차후 후속 연구를 통해 규명하여야 할 과제이며, 치료에 응용할 수 있는 기전으로서의 가능성뿐 아니라 병리학적으로도 생체 내에서 다른 장기의 섬유화성 질환에서도 유사하게 작용할 가능성에 대해 각 분야의 연구자들과의 협동 연구를 통한 검증이 차후 필요할 것으로 생각된다.

**본 연구에서 나타난 항 섬유화 효과의 다른 추측 가능한 기전**

본 연구에서는 TLR3 의 섬유아세포에서의 특유한 비면역학적 교원질 합성 조절 기능을 탐색하였으나, 실제 생체 내에서의 조절 기능은 보다 다양한 측면의 효과가 복합적으로 작용했을 것으로 생각된다.

첫째로 단백 분해 효소의 작용이 교원질의 감소에 관여하였을 것으로 생각된다. 이를 검증하기 위해 mMMP-13 를 인체 피부에서 주된 교원질 분해 기전을 담당하는 금속성 단백 분해 효소인 MMP-1 에 대한 실험 동물에서의 counterpart molecule 로 설정하였으며, 실험 결과 Poly I:C 의 투여에 의해 증가하는 것으로 나타나 생체내에서는 교원질 분해 효소의 작용 또한 배제할 수 없음을 시사하였다. 본 연구에서는 교원질의 양적 변화와 mMMP-13 의 증가의 선후 관계를 밝힐 수 없었으므로 인과관계를 유추할 수 없었다. 또한 세포 내에서의 교원질의 합성 저해와 세포 밖에서의 분해 증가를 정량적으로 측정하여 어느 것이 주된 작용인지를 알 수는 없었으나, 경피증양 병변의 치료 효과라는 측면에서는 매우 의미 있는 현상이라고 생각된다.



둘째로 Poly I:C 의 비 특이적인 화학적 특성이 우연히 영향을 미쳤을 가능성을 고려할 수 있다. 이를 검증하기 위해서는 TLR3 가 발현되지 않는 동물 모델의 수립과 반복 실험이 필요하나, 동일한 종 (BALB-c/nu) 에서의 유전자 조작 동물 모델이 수립되어 있지 않아 향후 후속 연구 시 이에 대한 검증 과정을 도입해야 할 것으로 생각된다.

### **TLR3 활성화, 교원질 합성 조절과 염증 반응의 제어**

기존 연구에서 사용된 C57B/L mouse 를 기반으로 한 경피증양 모델은 본 연구 시행 전 같은 방법으로 시행된 준비 연구 (Pilot study) 검증 결과 TLR3 활성화 또는 프로테아좀 저해제 투여시 심한 염증반응이 발생하였다 (결과 제시하지 않음). 염증 반응 자체로의 외형 변화, 즉 육안적으로 관찰 가능한 괴사성 피부 병변의 발생 뿐 아니라 속발되는 기질 분해 효소의 증가로 인해 기질 내 교원질의 파괴 또는 감소 소견은 확인되었으나, 교원질의 전사 후, 세포 내 분해 기전 때문임을 확인할 수는 없었다. 또한 프로테아좀 저해제인 MG-132 단독 투여군 및 용매로 사용된 DMSO 단독 투여 대조군 역시 유사한 반응이 나타나, 프로테아좀 억제제 고유의 기전인 세포

고사 촉진 기전 또는 약제 자체의 독성 및 조직 자극에 의한 부작용으로 추측되었다. 따라서 면역체계가 정상인 생체 내에서 발생하는 반응의 재현이라는 측면에서는 의미가 있으나, 사전 연구에서 확인된 기전의 재현을 통한 생체 내 효과 입증이라는 원래의 목적을 달성했다고는 간주하기 어려웠다. 따라서 다음 단계로 염증 제어가 가능한 경피증양 모델을 탐색하였으며, 스테로이드 동시 투여 모델과 Nude mice 를 이용한 모델을 고려하였다..

스테로이드 동시 투여 모델은 실제로 많은 수의 경피증 또는 전신성 경화증 환자들이 국소 또는 전신 부신 피질 스테로이드 요법으로 치료를 받고 있다는 점에서, 효과적인 염증 제어 이외에 치료 단계의 동물 모델로서의 장점 또한 부각되었으나 스테로이드 투여 자체만으로 섬유아세포의 증식, 분화 및 전사단계에서의 교원질 생성 감소가 초래됨이 밝혀져 있어, bias 로 작용할 가능성이 크고, 동시에 투여되는 약제의 양이 증가함으로써, 약물 상호 작용에 의한 bias 발생이 증가할 가능성을 고려하여 배제하였다.

Nude mouse 에서의 블레오마이신 유도 모델은 상대적으로 T 세포 결핍 상태의 면역부전 상태를 유지하고 있으므로 염증이 제어된 상태에서의 병변 유도를 기대할 수 있었으나 실험 계획 수립

과정에서 경피증양 병변 유도에 있어서의 효율성에 문제가 제기되었다. 블레오마이신에 의한 경피증양 병변의 발생은 TGF-beta 의존적이며, TGF-beta 의 주된 공급원이 병변에 침윤된 Helper T cell 이라는 내용의 보고가 있어, T 세포의 결핍상태에서의 병변 유도 효율에 문제가 있을 수 있다는 지적은 합당한 것이었으나, 상대적으로 장기간 (6 주 이상, 8 주 보고) 투여할 경우 병변의 유도가 가능하며, 이 경우 각질세포, 대식세포, 형질세포, B 세포 등 다른 TGF-beta 공급원에 의해서 유사한 병변의 형성이 가능한 보고도 있어 최종적으로 Nude mouse 에서의 블레오마이신 유도 경피증양 모델을 채택하였다. 결과적으로 경피증양 병변의 유도는 광학현미경으로 관찰한 조직 소견상 적절하게 이루어졌으나, 캘리퍼를 사용한 외부에서의 피부 두께의 측정치는 이와 일치되지 않는 관찰 결과를 보였는데 이는 체중 감소에 동반된 지방층의 감소가 오차 요인으로 작용했기 때문으로 생각된다. 통상적으로 블레오마이신 유도 경피증양 생쥐 모델에서는 약 20%정도 까지 체중 감소가 발생하는 것으로 알려져 있다.

Nude mouse model 실험에서는 C57B/L mouse model 에서 사용한 Poly I:C 의 용량에 고용량 투여군(25  $\mu\text{g/g}$ )을 추가하였으며, C57B/L

mouse model 실험에서 상대적으로 두 용량(1  $\mu\text{g}$ , 5  $\mu\text{g}$ ) 간의 결과 차이가 뚜렷하지 않았던 점과 차후 치료 용량 결정 단계의 후속 전임상 실험에 있어 보다 많은 정보를 제공하고자 하는 의도를 고려하여 결정하였다.

반면 MG-132 를 이용한 용매로 이용된 DMSO 가 낮은 희석 용량에서도 염증 반응을 매개하는 현상이 발견되어 Nude mice model 실험에서는 MG-132 동시 투여군을 배제하였다. 이 현상은 DMSO 자체가 자극제(irritant)로 작용하기 때문인 것으로 추측되었으며, Nude mouse 를 사용한 본 연구의 결과에서도 조직 내 조직구, 림프구의 침윤과 pro-inflammatory cytokine 인 IL-1b 의 증가가 관찰되었음이 시사하듯이, Poly I:C 자체에 의해서도 생체 내에서는 어느 정도의 염증반응은 피할 수 없는 부작용임을 고려하더라도 부작용을 실험 결과를 왜곡시킬 정도로 심화시킬 위험성을 배제하기 어려웠다. 유사한 유기용매가 아닌 다른 수성 용매에는 MG-132 의 용해도가 낮아 다른 용매를 사용할 수 없었다.

본 연구에서 TLR3 리간드의 투여, 즉 TLR3 의 활성화에 의한 전염증성 사이토카인인 IL-1b 의 발현은 기질 단백 분해 효소인 mMMP-13 의 발현과 유사한 증가 양상을 나타내었다. TLR3

활성화로 초래되는 내재 면역 반응, 염증 반응의 증가로 인한 결과, 예를 들어 활성 산소종 등의 스트레스 증가가 발생하고, 이에 따라 AP-1 등의 전사인자 증가에 따라 초래되는 것으로 추측할 수 있다.

이는 경피증양 병변 등 섬유화성 질환에 대해 치료 기전으로 작용할 수 있는 것이나, 실용화 단계에서 과도한 염증성 반응은 부작용으로 나타나게 되어 안전성 문제가 발생할 우려가 있다. 실제 상용화된 TLR7/8 의 agonist 인 Imiquimod 의 경우 역시 임상적 사용시 피부 자극 및 국소 염증 반응이 필수적으로 수반되며, 환자에 따라 중증도의 차이는 있으나 때로는 치료를 중단해야 하거나 치료 후 과색소 침착 등 후유증이 발생하는 경우를 흔히 관찰할 수 있다.

경피증 등 피부에 발생하는 섬유화 질환의 경우 주로 미용적인 관점에서의 효과 및 안전성 또한 고려해야 하므로, 이는 매우 중요하고 민감한 문제가 될 수 있다. 따라서 본 실험의 연구결과를 빠른 시간 내에 임상에 적용하기 위해서는 최적 용량의 결정 및 안전성 판정을 위한 후속 전임상 또는 1 상 연구가 속개되어야 할 것이다.

또는 Steroid-sparing agent 로서의 역할에 초점을 맞추어 후속 연구 및 개발 과정을 진행하는 것도 고려할 수 있다. 피부를 비롯한

대부분의 장기의 섬유화성 질환은 만성 질환으로 장기간 스테로이드 등의 면역 억제제를 사용해야 하는 문제가 있어 면역 억제 또는 hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis 의 억제 등의 전신적인 문제를 수반하게 된다. 이를 방지하기 위해 다제 순환 요법이나 주기 요법 등 부작용을 줄이기 위한 임상적인 노력이 계속되고 있으나 한계가 있다. 따라서 비 면역학적인 기전으로 교원질 합성을 증가시키는 기전에 의한 약물의 치료 방법으로 추가된다면, 섬유화 질환에 대한 치료 효과를 갖는 새로운 약제로서만이 아니라 장기 치료로 인한 기존 약제의 부작용을 감소시키는 역할로서의 약제 개발 또한 가치를 창출할 수 있다.

#### IV. 결론

BALB-c/nu 경피증 모델 생쥐를 이용한 실험에서 TLR3 리간드인 Poly I:C 의 투여가 경피증 병변 생성 과정에서의 교원질 합성 과정에 미치는 영향을 알아 보기 위해 블레오마이신과 1  $\mu\text{g/g}$ , 5  $\mu\text{g/g}$ , 25  $\mu\text{g/g}$  의 Poly I:C 를 2 주 간격으로 연속 투여하였다. 블레오마이신 단독 투여군 대비 고용량 (25  $\mu\text{g/g}$ )의 Poly I:C

투여군에서 육안 현미경 상 진피의 두께 감소가 확인되었으며, 증가된 mRNA 의 양과는 달리 축적된 1 형 교원질 양의 감소가 관찰되어 생체 내에서도 사전 연구 결과와 같은 기전을 이용한 교원질 생성 조절이 가능함을 확인하였다.

## 참고문헌

1. Takeda K and Akira S. Microbial recognition by Toll-like receptors. *Journal of Dermatological Science* 2004;34:73-82
2. Salaun et al. Toll-like receptors' two edged sword: When immunity meets apoptosis. *European Journal of Immunology* 2007;37:3311-18
3. Bienkowski RS et al. Fibroblasts degrade newly synthesized collagen within the cell before secretion. *Nature* 1978;276:413-16
4. AJH Gearing. Targeting toll-like receptors for drug development: a summary of commercial approaches to TLRs. *Immunology and Cell Biology* 2007;85:490-4



5. JS Hwang et al. Age-Associated Decrease in Proteasome Content and Activities in Human Dermal Fibroblasts: Restoration of Normal Level of Proteasome Subunits Reduces Aging Markers in Fibroblasts From Elderly Persons. *Journal of Gerontology* 2007;62:490-9
  
6. TK Mao et al. Altered Monocyte Responses to Defined TLR Ligands in Patients With Primary Biliary Cirrhosis. *Hepatology* 2005;42:802-8
  
7. T Yamamoto et al. Altered Monocyte Responses to Defined TLR Ligands in Patients With Primary Biliary Cirrhosis. *Journal of Investigative Dermatology* 1999;112:456-462
  
8. T Yamamoto et al. Animal model of sclerotic skin. III: Histopathological comparison of bleomycin-induced scleroderma in various mice strains. *Archives of Dermatologic Research* 2000;292:535-541

9. T Yamamoto et al. Animal Model of Sclerotic Skin. IV: Induction of Dermal Sclerosis by Bleomycin is T Cell Independent. *Journal of Investigative Dermatology* 2001;117:999-1001
  
10. T Yamamoto et al. Animal model of sclerotic skin. VI: Evaluation of bleomycin-induced skin sclerosis in nude mice. *Archives of Dermatologic Research* 2004;295:453-6
  
11. A Yoshizaki et al. CD19 Regulates Skin and Lung Fibrosis via Toll-Like Receptor Signaling in a Model of Bleomycin-Induced Scleroderma. *The American Journal of Pathology* 172;6:1650-63
  
12. UA Hasan et al. Cell proliferation and survival induced by Toll-like receptors is antagonized by type I IFNs.

Proceedings of the National Academy of Sciences  
2007;104:8047-52

13. T Yamamoto et al. Cellular and molecular mechanisms of bleomycin-induced murine scleroderma: current update and future perspective. *Experimental Dermatology* 2005;14:81-95

14. K Lui et al. Distinct Poly(I-C) and Virus-activated Signaling Pathways Leading to Interferon-alpha Production in Hepatocytes *The Journal of Biological Chemistry* 2005;280:16739-47

15. CW Liu et al. Endoproteolytic Activity of the Proteasome. *Science* 2003;299:408-11

16. AK Ghosh. Factors Involved in the Regulation of Type I Collagen Gene Expression: Implication in Fibrosis. *Experimental Biology and Medicine*. 2002;227:301-14
17. T Sugiyama et al. Immunoadjuvant effects of polyadenylic:polyuridylic acids through TLR3 and TLR7. *International Immunology* 2007;20:1-9
18. MK Ko et al. PDI-mediated ER retention and proteasomal degradation of procollagen I in corneal endothelial cells. *Experimental Cell Research* 2004;295:25-35
19. MK Ko et al. Subcellular Localization of Procollagen I and Prolyl 4-Hydroxylase in Corneal Endothelial Cells. *Experimental Cell Research* 2001;264:363-71
20. F Bregere et al. The ubiquitin-proteasome system at the crossroads of stress-response and ageing pathways: A

handle for skin care? Ageing Research Reviews 2006;5:60-

90

## Abstract

Cutaneous collagen synthesis and secretion  
regulated by Toll-like receptor 3 and proteasome:  
*in vivo* effect in sclerodermoid mouse model

Boncheol Goo

*Department of Medicine*

*The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Professor Kee Yang Chung)

Toll-like receptor (TLR) is well-known as a regulator of innate immunity while its expression pattern and non-immunologic function in the fibroblast of skin are not elucidated. Collagen, known as main component of skin structure and morphologic change process in skin aging, has many regulatory processes by various external or internal stimuli. Increase or decrease of

structural proteins can be the cause of physiologic change like skin aging, as well as pathologic change as like scleroderma. Based on the result of previous study of the expression pattern and regulatory action of TLR3 in skin fibroblasts, this study aims elucidating unknown pathologic process in related diseases and physiologic change, and also the basis of newer treatment development with reproduction and verification of *in vitro* experiment in *in vivo* system using sclerodermoid mouse model. Four-month-old BALB-c/nu mice in T cell deficient status were used. To investigate the regulatory process just in collagen synthesis process, successive treatment of bleomycin and different doses of Poly I:C were performed (1  $\mu\text{g/g}$ , 5  $\mu\text{g/g}$  and 25  $\mu\text{g/g}$ ) in 2weeks. Compared to positive control group of sclerodermoid lesion, High-dose Poly I:C (25  $\mu\text{g/g}$ ) treated group showed decreased dermal thickness and type I collagen in the matrix, with paradoxical decrease of type I procollagen mRNA, supporting same regulatory action of TLR3 on collagen synthesis reproducible *in vivo*.

---

Key Words : Toll-like receptor 3, Proteasome, Scleroderma, Collagen