

## $\alpha$ -MSH와 $\alpha$ -MSH 효현제가 사람 말초혈액 단구에서 유래한 수지상세포의 표면항원 표현에 미치는 영향

조한경 · 신종란 · 임승길\* · 이민걸

연세대학교 의과대학 피부과학교실, 피부생물학 연구소, 내과학교실\*

### The Changes of Expression in Surface Molecule of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells with $\alpha$ -MSH and its Agonist

Han Kyoung Cho, Jong Lan Shin, Sung-Kil Lim\*, and Min-Geol Lee

*Department of Dermatology and Cutaneous Biology Research Institute, Internal Medicine\*,  
Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea*

There is an accumulating evidence that  $\alpha$ -MSH, besides being a pigimentary hormone also plays a crucial role in the regulation of immune and inflammatory reactions. Alpha-MSH might exert its immunomodulatory effects by downregulating accessory molecules on antigen-presenting cells. Dendritic cells (DC) are a system of highly efficient antigen-presenting cells that initiate the primary immune response. Recently, new two-step culture system for immature/mature DC generation from human peripheral blood-derived monocytes was established.

In this study, we generated monocyte-derived immature/mature DC according to the two-step culture system and observed the changes of surface molecule of human monocyte-derived dendritic cells with  $\alpha$ -MSH and its agonist by flow cytometry. The following results were obtained:

1.  $\alpha$ -MSH suppressed the expression of B7-2 and HLA-DR in immature DCs.
2.  $\alpha$ -MSH suppressed the expression of HLA-DR in mature DCs.
3.  $\alpha$ -MSH-ND ( $\alpha$ -MSH agonist) also suppressed the expression of B7-2 and HLA-DR in mature DCs.

From the result, it is suggested that  $\alpha$ -MSH and its agonist  $\alpha$ -MSH-ND are capable of downregulating immune response through suppressing accessory molecules on antigen presenting cells.

**Key words** :  $\alpha$ -MSH,  $\alpha$ -MSH agonist, Monocyte, Dendritic cell, B7-1, B7-2, HLA-DR, Flow cytometry

### 서 론

Alpha-melanocyte stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH)은 전구물질인 proopiomelanocortin (POMC)에서 유래된 13개의 펩타이드

이드로 구성되어 있다<sup>1</sup>. 일차구조상 adrenocorticotrophic hormone (ACTH)과는 매우 유사하지만 다른 POMC 유래 펩타이드인  $\beta$ -MSH,  $\gamma$ -MSH 및  $\beta$ -endorphin 등과는 완전히 다른 성질을 갖고 있다. 초기에는 POMC가 뇌하수체에서만

생성이 되는 것으로 알고 있었으나 현재는 림프구, 단핵구, 랑거한스세포, 내피세포 등의 다양한 세포에서 생성이 되는 것으로 밝혀졌다<sup>2</sup>.

최근  $\alpha$ -MSH가 색소생성에 관여하는 기능 외에도 면역 반응과 염증반응에서 중요한 역할을 한다는 많은 연구 결과가 나오고 있다.  $\alpha$ -MSH는 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF 등의 염증촉진 사이토카인의 활성을 억제하고 IFN- $\gamma$ 의 합성을 차단함으로써 이러한 사이토카인들의 길항제로서 작용한다<sup>3</sup>. 한편  $\alpha$ -MSH는 사람의 말초혈액에서 면역억제 기능을 갖는 IL-10 같은 사이토카인의 생성을 상향 조절한다<sup>4</sup>. 생체실험상  $\alpha$ -MSH는 열을 떨어뜨리고 실험적으로 급성, 만성, 전신성 염증반응을 억제하며, 류마티드 관절염을 앓고 있는 환자의 활액에서  $\alpha$ -MSH가 증가하는 것이 관찰되기도 한다<sup>5</sup>. 최근에는 마우스에서 전신적으로 투여한  $\alpha$ -MSH가 감각반응과 접촉성 과민반응을 억제할 뿐만 아니라 면역관용도 유발함을 증명하였으며,  $\alpha$ -MSH의 이러한 작용은 IL-10 유도를 통하여 일어남이 밝혀졌다<sup>6</sup>.

$\alpha$ -MSH와 다른 POMC 유래 펩타이드의 작용은 특이 수용체에 결합함으로써 일어난다. 최근까지 POMC 유래 펩타이드에 대한 수용체인 melanocortin (MC) 수용체는 5개가 있음이 밝혀졌다. 이들은 각각 고유한 수용체 집단에 속하며 리간드에 대한 특이성이 다르고 조직에 따라 분포가 다양하다<sup>7</sup>. MC-1 수용체는 단핵구, 대식구, 호중구, 내피세포 등의 면역반응과 염증반응에 관여하는 세포들에서 표현이 되는 것으로 밝혀졌다<sup>8</sup>. 이러한 사실은  $\alpha$ -MSH의 다양한 면역조절 기능을 더욱 잘 설명해 주는 증거가 된다.

$\alpha$ -MSH는 전사단계와 전이단계에서 단핵구와 각질형성 세포 표면의 구조적합체 1형 항원의 표현을 감소시킨다고 한다<sup>9</sup>. 이는  $\alpha$ -MSH의 면역반응 조절 기능이 면역반응 관련 세포의 표면분자 표현 조절과 연관이 있다는 것을 나타내며 어떤 생물학적 상황에서는 면역관용을 유발하는 신호의 기능을 수행할 수 있음을 의미한다<sup>10</sup>. 자외선 B 조사는 사람의 각질형성세포에서  $\alpha$ -MSH와 펩타이드의 생성을 촉진하는 것이 밝혀졌다<sup>9</sup>. 자외선 B는 합텐 특이 면역관용 유도뿐만 아니라 감각반응을 강력하게 억제하므로  $\alpha$ -MSH가 자외선 B 유발 면역관용에 관여함을 추론할 수 있다<sup>10</sup>.

수지상세포 (dendritic cell)는 생체 내에서 강력한 항원 전달 기능을 가지고 일차 면역 반응의 시작에 가장 중요한 항원전달 세포이다. 그러나 수지상세포는 생체 내에서 적은 양이 존재하여 연구에 어려움이 많았으나, 사람과 쥐의 CD34+ 조혈모세포에서 수지상세포를 배양할 수 있게 되면서 본격적인 연구가 가능하게 되었고 최근 말초혈액에 많은 수가 존재하는 단구에서 수지상세포를 배양하면서 수지상세포 연

구가 더욱 활성화되었다<sup>11,12</sup>.

수지상세포의 배양에도 사이토카인의 역할이 중요하며, 사용되는 사이토카인의 종류와 양은 연구자의 실험조건에 따라 각기 다르다. 수지상세포의 배양에 쓰이는 사이토카인 중에 GM-CSF는 쥐의 조혈 모세포를 수지상세포로 분화시킬 수 있으며, 랑거한스세포 배양 시, 세포의 생존력을 증가시킨다<sup>14</sup>. IL-4는 CD14 표현을 억제하며<sup>15</sup>, TNF- $\alpha$ 는 배양세포의 생존력을 높이는 작용이 관찰되고, GM-CSF와 병용투여 시 사람의 CD34+ 세포를 수지상세포로 분화를 유도함이 알려져 있다<sup>16</sup>. 이외에도 IL-1 $\beta$ 는 일차 면역 반응에 가장 중요한 역할을 수행하며, 쥐의 피내에 투여 시 랑거한스세포의 2형 구조적합체의 표현을 증가시키고<sup>17</sup>, IL-6를 단클론항체로 억제하면 수지상세포로의 분화가 크게 감소하나 성숙된 수지상세포의 기능에는 영향을 주지 않는다<sup>18</sup>.

CD34+인 골수 또는 체내 혈액 내 세포를 이용하여 수지상세포를 배양하는 방법이 실험에 이용되었으나 말초혈액 내에는 CD34+ 세포수가 0.1% 이하로 매우 적기 때문에, 정상인의 말초혈액 단핵세포의 5-10%를 차지하는 단구에서 수지상세포를 배양하는 방법이 최근에는 많이 이용된다. 말초혈액 단구에 GM-CSF와 IL-4를 넣어 배양하면 미성숙 수지상세포를 얻을 수 있고, 이렇게 하여 얻은 미성숙 수지상세포에 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, PGE<sub>2</sub> 등이 포함된 사이토카인 카테일을 넣어서 배양하면 성숙 수지상세포를 얻을 수 있다.

본 연구에서는 말초혈액 내에 비교적 많은 양으로 존재하는 단구를 이용하여 미성숙 수지상세포와 수지상세포를 배양하여  $\alpha$ -MSH를 다양한 농도와 시간으로 처리한 후 항원 전달 반응에 관여하는 수지상세포 표면의 보조자극인자 B7-1, B7-2와 2형 구조적합체 HLA-DR의 표현의 변화를 유세포계측기를 통하여 관찰하였다. 아울러  $\alpha$ -MSH의 효현제 (agonist)를 처리하여 이에 따른 수지상세포의 표면항원의 변화도 함께 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 배양액 및 사이토카인

본 실험에서 배양액은 X-VIVO 15 (BioWhittaker, Walkersville, Maryland, USA) 용액에 1% 자가혈장을 첨가하여 사용하였다. 사용된 모든 사이토카인은 제조업체 인형 단백질로서 수지상세포의 성장을 위해 안정적인 농도를 사용하였다. 최종적인 농도는 아래와 같았다. 800 U/ml GM-CSF (Novartis, Frinley, UK), 1,000 U/ml IL-4 (PBH, Hannover, Germany), 1,000 U/ml IL-6 (PBH), 1  $\mu$ g/ml IL-1 (PBH), 10  $\mu$ g/ml TNF- $\alpha$  (PBH), 1  $\mu$ g/ml PGE2 (Sigma Chemical Co.,

St, Louis, MO, USA).

## 2. $\alpha$ -MSH와 $\alpha$ -MSH 효현제

본 실험에 사용된  $\alpha$ -MSH (Sigma Chemical Co.)와 이의 효현제는  $\alpha$ -MSH-ND (펩트론, 대전, 한국), [Asn<sup>6</sup>] $\alpha$ -MSH-ND (펩트론)로 모두 0.5% BSA/PBS로 희석시켜 사용하였다.

## 3. 항 체

유세포 계측을 위해 사용된 일차 항체는 B7-1 (Becton Dickinson, San Jose, USA), B7-2 (Ancell Co., Bayport, MN, USA), HLA-DR (Becton Dickinson)이며, 이차 항체는 FITC-conjugated anti-mouse immunoglobulin (Biosource International, Camarillo, CA, USA)를 이용하였다. Isotype control로는 mouse IgG<sub>1</sub> (Biosource International)을 사용하였다.

## 4. 수지상세포의 배양

### 1) 말초혈액 단핵세포를 얻는 방법

정상인의 혈액 10 ml를 5 U/ml heparin, 2 mM EDTA 가 포함된 20 ml PBS 용액과 혼합한 후 50 ml의 시험관에 들어 있는 15 ml Ficoll / Hypaque (density : 1.0777 g/ml) 용액 위에 혼합액을 조심스럽게 부은 후 상온에서 20분 동안 원심침전을 행하였다(200 xg). 원심 침전 후 상층의 혈장 20-25 ml를 조심스럽게 분리하여 보관한 다음 다시 20분 동안 상온에서 원심 침전을 계속하였다(400 xg). 원심 침전 후 생긴 계면을 모아 차가운 5 mM EDTA의 PBS 용액으로 5차례에 걸쳐 10번씩 세척하여 말초혈액 단핵세포를 얻었다.

### 2) 혈장의 준비

정상인 혈액에서 단핵세포를 분리할 때 얻은 혈장을 56°C에서 30분 동안 정치시켜 열비동화한 후 혈소판을 제거하기 위해 10분 동안 원심 침전을 시행하였다(1000 xg). 혈소판을 제거한 상층 액을 분리하여 자가혈장으로 이용하였다.

### 3) 세포유착법을 통한 단구의 분리

분리된 말초혈액 단핵세포를 X-VIVO 15에 다시 부유시킨 후, 6-well plate에 각 well 당  $1 \times 10^7$ 의 세포를 40분 동안 정치시킨다(37°C, 5% CO<sub>2</sub>). 40분 후 유착되지 않은 부유상태의 세포는 가볍게 3회 세척하여 제거하고 바닥에 유착되어 있는 세포를 배양에 이용하였다. 이때 바닥에 유착된 단구는 약  $0.5 - 1 \times 10^6$  /well가 된다.

## 4) 단구의 배양

- ① 미성숙 수지상세포의 배양: 6-well tissue culture plate의 각 well 당  $0.5 - 1 \times 10^6$ 의 단구를 3ml의 배양액과 함께 넣었으며 여기에 800 U/ml GM-CSF와 1000 U/ml IL-4를 넣고 37°C의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양 2, 4, 6일째, 각각의 well의 배양액 상층을 1ml씩 제거한 후 1600 U/ml GM-CSF와 1000 U/ml IL-4이 포함된 배양액을 1 ml씩 첨가하였다. 배양 7일째, 각각의 well에서 비유착 세포들을 수집하여 세포의 수, 형태 및 표면항원의 변화를 관찰하였다.
- ② 성숙 수지상세포의 배양 : 배양 7일째의 비유착 세포들을 모아 0.5% BSA/PBS로 두 번 세척한 후 새로운 6-well plates에 각 well 당  $1 \times 10^6$  ml의 세포를 넣었다. 여기에 800 U/ml GM-CSF, 500 U/ml IL-4, 10 ng/ml IL-1 $\beta$ , 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 1000 U/ml IL-6, 1  $\mu$ g/ml PGE<sub>2</sub>이 들어 있는 사이토카인 조합을 첨가하여 배양하였다. 성숙 수지상세포는 CD83, B7-1, B7-2, HLA-DR의 표현증가, 그리고 endocytosis의 감소로 확인하였다.

## 5. 유세포계측기를 이용한 세포의 특성 분석

배양한 수지상세포에 여러 가지 농도의  $\alpha$ -MSH와  $\alpha$ -MSH 효현제를 넣어 여러 시간으로 배양하였다. 배양한 세포를 0.5% BSA/PBS 용액으로 두 번 세척한 후 일차항체를 첨가하고 30분 동안 4°C에서 배양하였다. 0.5% BSA/PBS 용액으로 두 번 세척 후 FITC-conjugated anti-mouse immunoglobulin을 이차항체로 첨가하고 30분 동안 4°C에서 배양한 후 두 번 세척하고 FACScan (Becton Dickson, Mountain View, Ca, USA)을 이용하여 유세포 계측을 시행하였다.

## 결 과

### 1. $\alpha$ -MSH가 미성숙 수지상세포의 표면항원 표현에 미치는 영향

배양 7일째의 미성숙 수지상세포를 세 가지 농도( $10^8$ M,  $10^9$ M,  $10^{10}$ M)의  $\alpha$ -MSH로 배양하였을 때 B7-2 표현 변화를 살펴보았다.  $\alpha$ -MSH로 6시간 배양 시 평균면역형광치(mean immunofluorescence)는 대조군 107.8과 비교하여  $10^8$ M에서는 97.9 (90.8%),  $10^9$ M에서는 56.4 (52.3%),  $10^{10}$ M에서는 71.6 (66.4%)으로 감소하여  $10^9$ M에서 가장 많은 감소를 보였다. 24시간 배양 시 평균면역형광치는 대조군 92.6에 비교하여  $10^8$ M에서는 69.6 (75.1%),  $10^9$ M에서는 70.0

(75.6%),  $10^{-10}$ M에서는 60.8 (65.7%)로 감소하여  $10^{-10}$ M에서 가장 많은 감소를 보였다. 48시간 배양 시 평균면역형광치는 대조군 96.9와 비교하여  $10^{-8}$ M에서는 76.6 (79.0%),  $10^{-9}$ M에서는 71.9 (74.1%),  $10^{-10}$ M에서는 83.5 (86.2%)로 감소하여  $10^{-9}$ M에서 가장 많은 감소를 보였다(Fig. 1). 72시간 배양 시 각 농도에서 표현정도의 변화가 거의 없었다. 96시간 배양 시 각 농도에서 표현정도가 미약하게 감소하였다. 위의 농도보다 고농도인  $10^{-5}$ M,  $10^{-6}$ M,  $10^{-7}$ M의  $\alpha$ -MSH로 배양하였을 때 미성숙 수지상세포의 B7-2의 표현정도의 변화가 거의 없었다.

배양 7일째 미성숙 수지상세포를 세 가지 농도( $10^{-8}$ M,  $10^{-9}$ M,  $10^{-10}$ M)의  $\alpha$ -MSH로 배양하였을 때 HLA-DR 표현 변화를 살펴보았다.  $\alpha$ -MSH 6시간 배양 시 평균면역형광치는 대조군 188.8과 비교하여  $10^{-8}$ M에서는 163.0 (96.3%),  $10^{-9}$ M에서는 167.8 (88.9%),  $10^{-10}$ M에서는 143.9 (86.3%)로 감소하여  $10^{-10}$ M에서 가장 많은 감소를 보였다. 24시간 배양 시 평균면역형광치는 대조군 180.1과 비교하여  $10^{-8}$ M에서는 159.1 (88.3%),  $10^{-9}$ M에서는 129.3 (71.8%),  $10^{-10}$ M에서는 135.0 (74.9%)으로 감소하여  $10^{-9}$ M에서 가장 많은 감소를 보였다. 48시간 배양 시 평균면역형광치는 대조군 225.0과 비교하여  $10^{-8}$ M에서는 199.4 (88.6%),  $10^{-9}$ M에서는 153.9 (68.4%),  $10^{-10}$ M에서는 177.1 (78.7%)로 감소하여  $10^{-9}$ M에서 가장 많

은 감소를 보였다(Fig. 2). 72시간 배양 시  $\alpha$ -MSH  $10^{-9}$ M에서 미약하게 표현정도가 감소하였고 그 외 농도에서는 거의 변화가 없었다. 96시간 배양 시 각각의 농도에서 표현정도가 미약하게 감소하였다. 위의 농도보다 고농도인  $10^{-5}$ M,  $10^{-6}$ M,  $10^{-7}$ M의  $\alpha$ -MSH로 배양하였을 때 미성숙 수지상세포의 HLA-DR의 표현정도의 변화가 거의 없었다. B7-1은 각 농도와 배양 시간에 따른 표현정도의 변화가 거의 없었다.

**2.  $\alpha$ -MSH가 성숙 수지상세포의 표면항원 표현에 미치는 영향**

성숙 수지상세포를 배양 9일째 세 가지 농도( $10^{-8}$ M,  $10^{-9}$ M,  $10^{-10}$ M)의  $\alpha$ -MSH로 배양하였을 때 B7-2 표현 변화를 살펴 본 결과, 각 농도와 배양 시간에 따른 표현정도의 변화가 거의 없었다(Fig. 3). 그리고 위의 농도보다 고농도인  $10^{-5}$ M,  $10^{-6}$ M,  $10^{-7}$ M의  $\alpha$ -MSH로 배양하였을 때에도 성숙 수지상세포의 B7-2의 표현정도의 변화가 거의 없었다. B7-1은 각 농도와 배양 시간에 따른 표현정도의 변화가 거의 없었다.

HLA-DR 표면 변화를 살펴보면  $\alpha$ -MSH로 6시간 배양 시 평균면역형광치는 대조군 836.8과 비교하여  $10^{-8}$ M에서는 649.0 (77.6%),  $10^{-9}$ M에서는 666.0 (79.6%),  $10^{-10}$ M에서는 666.3 (79.6%)으로 감소하였다. 24시간 배양 시 평균면역형

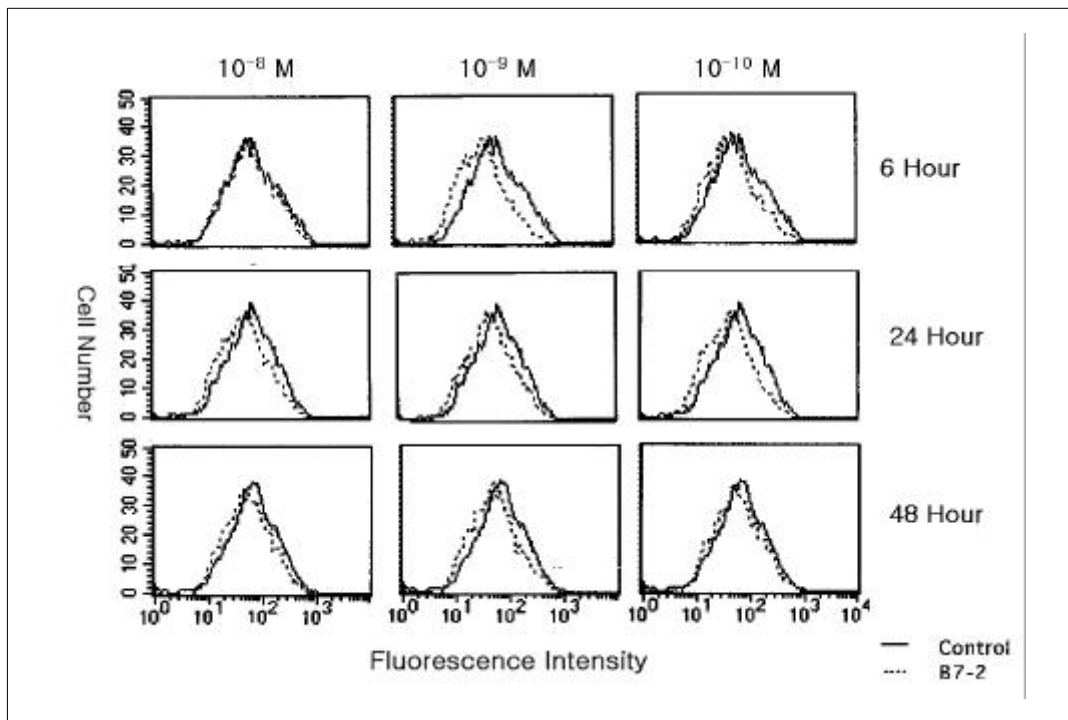


Fig. 1. The effects of  $\alpha$ -MSH on the B7- 2 expression of the immature dendritic cell according to the concentrations of  $\alpha$ -MSH.

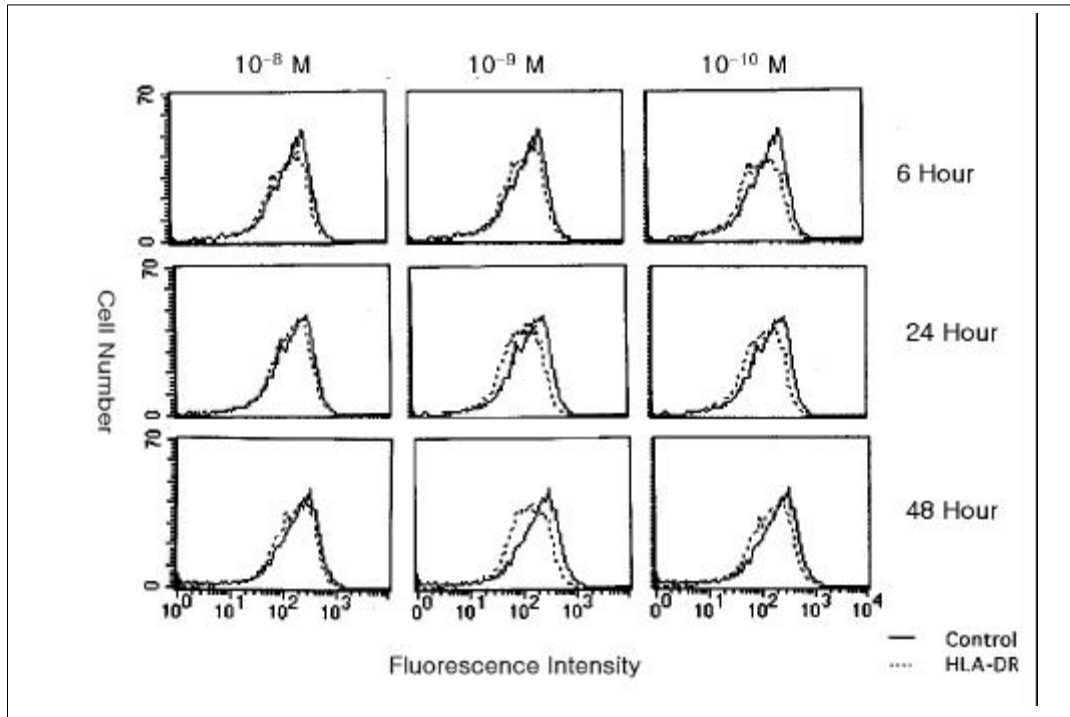


Fig. 2. The effects of  $\alpha$ -MSH on the HLA-DR expression of the immature dendritic cell according to the concentrations of  $\alpha$ -MSH.

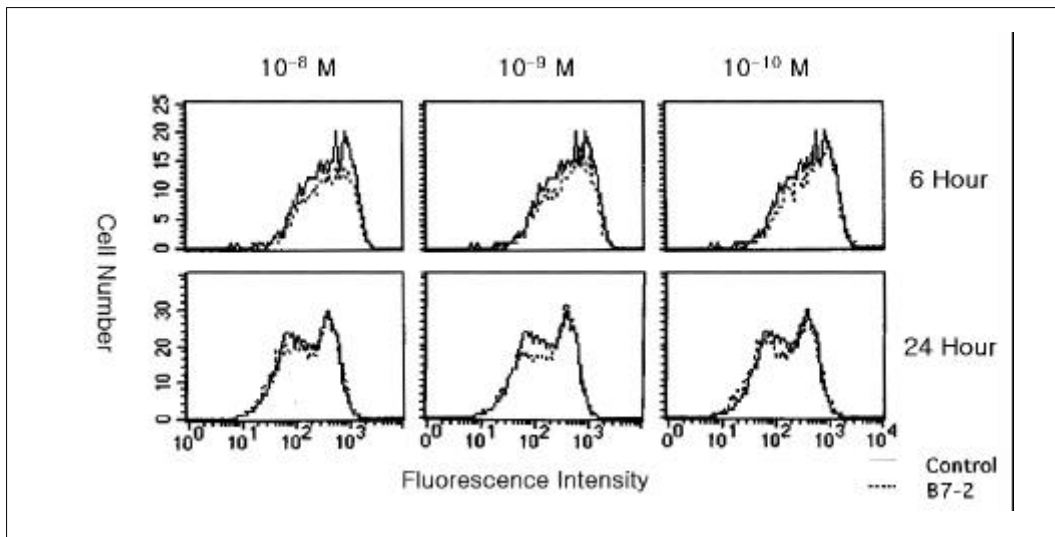


Fig. 3. The effects of  $\alpha$ -MSH on the B7-2 expression of the mature dendritic cell according to the concentrations of  $\alpha$ -MSH.

광치는 대조군 479.1과 비교하여  $10^8$ M에서는 390.9 (81.6%),  $10^9$ M에서는 447.7 (93.4%),  $10^{10}$ M에서는 360.2 (75.2%)로 감소하여  $10^{10}$ M에서 가장 많은 감소를 보였다 (Fig. 4). 위의 농도보다 고농도인  $10^5$ M,  $10^6$ M,  $10^7$ M의  $\alpha$ -MSH로 배양하였을 때 성숙 수지상세포의 HLA-DR의 표현

정도의 변화가 거의 없었다.

3.  $\alpha$ -MSH의 효현제인  $\alpha$ -MSH-ND, [Asn<sup>6</sup>]- $\alpha$ -MSH-ND가 미성숙 수지상세포의 표면항원 표현에 미치는 영향

미성숙 수지상세포를 배양 7일째 세 가지 농도( $10^8$ M,

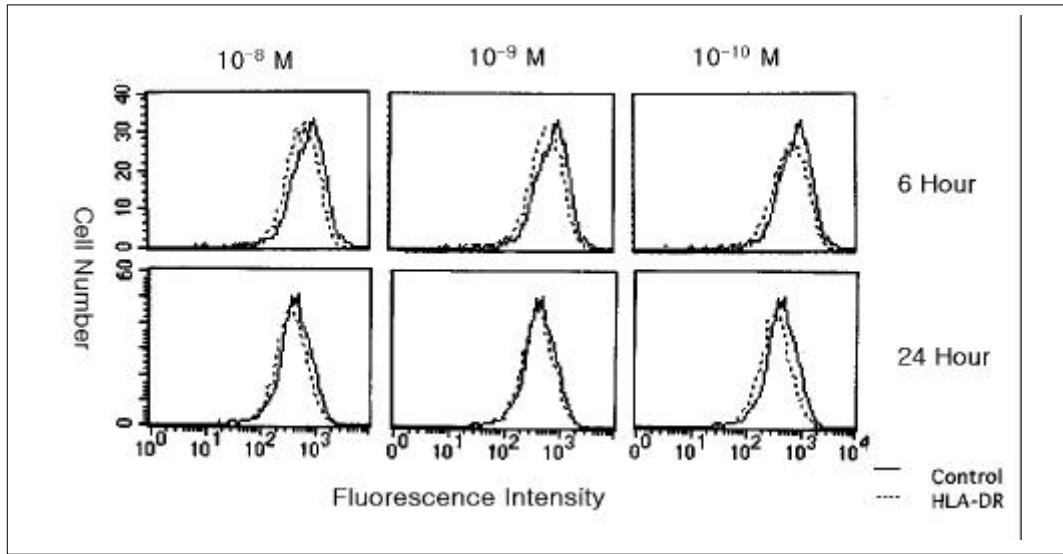


Fig. 4. The effects of  $\alpha$ -MSH on the HLA-DR expression of the mature dendritic cell according to the concentrations of  $\alpha$ -MSH.

$10^{-9}$ M,  $10^{-10}$ M)의  $\alpha$ -MSH-ND와 [Asn<sup>6</sup>]- $\alpha$ -MSH-ND로 6시간 배양 시 B7-2, HLA-DR은 각 농도에서 표현정도의 변화가 거의 없었다.  $\alpha$ -MSH-ND와 [Asn<sup>6</sup>]- $\alpha$ -MSH-ND로 각각 24시간, 48시간 배양 시 B7-2, HLA-DR은 각 농도에서 표현정도의 변화가 거의 없었다. 위의 농도보다 고농도인  $10^{-5}$ M,  $10^{-6}$ M,  $10^{-7}$ M의  $\alpha$ -MSH-ND와 [Asn<sup>6</sup>]- $\alpha$ -MSH-ND로 배양하였을 때에도 미성숙 수지상세포의 B7-2, HLA-DR의 표현정도의 변화가 거의 없었다. B7-1은 각 농도와 배양 시간에 따른 표현정도의 변화가 거의 없었다.

#### 4. $\alpha$ -MSH의 효현제인 $\alpha$ -MSH-ND, [Asn<sup>6</sup>]- $\alpha$ -MSH-ND가 성숙 수지상세포의 표면항원 표현에 미치는 영향

성숙 수지상세포를 배양 9일째 세 가지 농도( $10^{-8}$ M,  $10^{-9}$ M,  $10^{-10}$ M)의  $\alpha$ -MSH-ND로 배양하였을 때 B7-2와 HLA-DR 표현 변화를 살펴보았다.  $\alpha$ -MSH-ND로 6시간 배양 시 B7-2의 평균면역형광치는 대조군 597.4에 비교하여  $10^{-8}$ M에서는 535.5 (89.6%),  $10^{-9}$ M에서는 531.7 (89.0%),  $10^{-10}$ M에서는 505.5 (84.6%)로 감소하였다. HLA-DR의 평균면역형광치는 대조군 434.9에 비교하여  $10^{-8}$ M에서는 249.3 (57.3%),  $10^{-9}$ M에서는 415.3 (95.5%),  $10^{-10}$ M에서는 336.3 (77.3%)으로 감소하여  $10^{-8}$ M에서 가장 많은 감소를 보였다(Fig. 5).  $\alpha$ -MSH-ND로 24시간, 48시간 배양하였을 때 각 농도에서 성숙 수지상세포의 B7-2, HLA-DR의 표현정도의 변화는 거의 없었다. 위의 농도보다 고농도인  $10^{-5}$ M,  $10^{-6}$ M,  $10^{-7}$ M의  $\alpha$ -MSH-ND로 배양하였을 때 성숙 수지상세포의 B7-2, HLA-DR의 표현정도의 변화가 거의 없었다.

[Asn<sup>6</sup>]- $\alpha$ -MSH-ND를 각 농도로 6시간, 24시간, 48시간 배양 후 B7-2, HLA-DR 표현정도의 변화는 거의 없었다. 위의 농도보다 고농도인  $10^{-5}$ M,  $10^{-6}$ M,  $10^{-7}$ M의 [Asn<sup>6</sup>]- $\alpha$ -MSH-ND로 배양하였을 때 성숙 수지상세포의 B7-2, HLA-DR의 표현정도의 변화가 거의 없었다. B7-1은 각 농도와 배양 시간에 따른 표현정도의 변화가 거의 없었다.

### 고 찰

신경전달물질(neuropeptide)이나 호르몬은 많은 면역활성(immunocompetent) 세포에서 다양한 기능을 조절하는 것으로 알려져 왔다. 다수의 신경전달물질이나 호르몬이 피부에 존재하는 것으로 알려졌으며 특히 calcitonin-gene related peptide (CGRP) 함유 신경과 랑거한스세포 사이의 해부학적 연관성이 보고되었다<sup>19</sup>. 이외에도 pituitary adenylate cyclase activation polypeptide (PACAP), gastrin releasing peptide (GRP) 등이 랑거한스세포에서 검출이 되었다<sup>20</sup>.  $\alpha$ -MSH도 피부에서 발견되는 호르몬으로 피부면역반응에서의 역할에 대해 많은 연구가 이루어지고 있다<sup>8-10,21</sup>.

1983년 Thody 등은 사람과 다른 포유동물의 피부에서 면역활성이 있는  $\alpha$ -MSH를 검출하였다<sup>22</sup>. 피부에서는 표피에서  $\alpha$ -MSH가 가장 빈번히 검출되었다. 시상하부를 제거한 쥐의 피부에서  $\alpha$ -MSH를 계속 검출할 수 있다는 사실은 pituitary gland가 더 이상 유일한  $\alpha$ -MSH의 생성장소가 아님을 의미한다<sup>23</sup>. POMC mRNA와 여러 POMC 유래 펩타이드는 정상적, 병적 피부에 존재하며 표피, 진피내의 여러 세

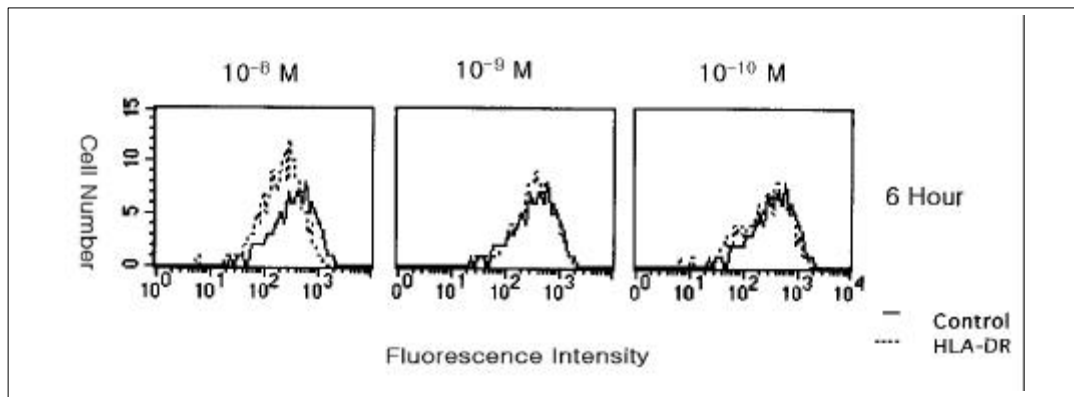


Fig. 5. The effects of  $\alpha$ -MSH-ND, agonist of  $\alpha$ -MSH, on the HLA-DR expression of the mature dendritic cell according to the concentrations of  $\alpha$ -MSH-ND.

포 구조물들이  $\alpha$ -MSH의 생성장으로 밝혀지게 되었다<sup>24</sup>. 즉, 사람과 마우스의 멜라닌세포와 악성 흑색종 세포에서 POMC 특이 mRNA가 표현되고  $\alpha$ -MSH를 비롯한 ACTH,  $\beta$ -endorphin 등을 분비한다는 것은 잘 알려진 사실이지만 멜라닌세포만이 POMC 유래 펩타이드의 유일한 생성 장소가 아니라는 것이 밝혀지게 되었다<sup>25</sup>. 다수의 연구결과에 의하면 각질형성세포, 랑거한스세포, 마우스 Th1+ 수지상세포 등은 POMC 특이 mRNA를 표현하며 생물학적 활성을 갖는  $\alpha$ -MSH를 분비하는 것이 밝혀졌다<sup>26</sup>.

최근  $\alpha$ -MSH가 멜라닌세포의 색소 형성 조절 외에도 면역반응과 염증반응에서 중요한 역할을 한다는 연구 결과가 많이 보고되고 있다.  $\alpha$ -MSH를 비롯한 여러 POMC 유래 펩타이드는 면역반응과 염증반응에 다양한 기전으로 영향을 나타낸다. 다수의 연구결과에 의하면  $\alpha$ -MSH는 IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  등과 같은 염증유발 사이토카인의 효과에 대해 길항작용을 나타낸다<sup>5</sup>. 전신적으로 투여한  $\alpha$ -MSH는 IL-1 유발 고열, leukocytosis, 호중구의 이동, acute phase protein의 유도를 감소시킨다<sup>27</sup>. 또한  $\alpha$ -MSH는 선택적으로 말초혈액 단핵구에서 항염증 작용을 나타내는 IL-10의 생성을 유도한다. 이러한 사실로  $\alpha$ -MSH는 면역반응과 염증반응을 억제하는데 중요한 역할을 한다는 것을 의미한다.

항면역, 항염증 반응의 기전으로  $\alpha$ -MSH의 면역활성세포 표면 분자의 표현 조절에 대한 영향이 연구되어왔다. Luger 등은  $\alpha$ -MSH가 각질세포, 단핵구세포에서 전이, 전사과정 중에 MHC class I 항원의 표현을 억제하나 MHC class II 항원과 ICAM-1의 표현에는 별 영향을 주지 못한다고 하였다<sup>9</sup>. 그리고  $\alpha$ -MSH는 lipopolysaccharide (LPS)로 처리한 단핵구의 CD80 (B7-1)의 표현에는 별 영향을 못 미치나 CD86 (B7-2)의 표현은 유의하게 억제하였다<sup>8</sup>. 본 연구에서는  $\alpha$ -

MSH가 미성숙 수지상세포와 성숙 수지상세포의 표면항원 B7-2와 HLA-DR의 표현을 감소시켰다. 표현 감소의 정도는 미성숙 수지상세포와 성숙 수지상세포간에 차이가 있었다. B7-2의 평균면역형광치 값은 미성숙 수지상세포에서 성숙 수지상세포보다 더 많이 감소하였으며 HLA-DR은 두 가지 세포에서 모두 비슷한 정도로 감소하였다. 미성숙 수지상세포와 성숙 수지상세포간에  $\alpha$ -MSH에 의한 B7-2의 표현 감소 차이는 수지상세포 표면에 존재하는 MC-1 수용체의 배양 일수에 따른 차이로 생각된다. Becher 등은 단구를 GM-CSF와 IL-4 배양할 초기에는  $\alpha$ -MSH가 결합하는 MC-1 수용체가 표현되지 않으나 배양 시작 5일 후에는 MC-1 수용체의 표현이 증가하기 시작하여 배양 8일째에 최대로 표현된다는 것을 보고하였다<sup>28</sup>. 본 실험에서는 단구에 GM-CSF와 IL-4를 넣고 배양하여 7, 8, 9일째의 미성숙 수지상세포를 사용하였고 성숙 수지상세포는 배양 7일째 cytokine cocktail을 첨가하여 9일, 10일, 11일째의 수지상세포를 사용하였다. 따라서  $\alpha$ -MSH에 의한 성숙 수지상세포의 표면항원 표현의 감소정도가 미성숙 수지상세포보다 적은 원인은 바로 배양일수에 따른 MC-1 수용체의 표현정도 차이가 관여할 수 있다고 생각된다.

본 연구에서  $\alpha$ -MSH-ND는 성숙 수지상세포에서 B7-2와 HLA-DR의 표현정도를 감소시켰으나 [Asn<sup>6</sup>]- $\alpha$ -MSH-ND는 B7-2와 HLA-DR 표현에 영향을 주지 못했다. 본 실험에 사용된  $\alpha$ -MSH의 효현체인  $\alpha$ -MSH-ND와 [Asn<sup>6</sup>]- $\alpha$ -MSH-ND는 각각 Ahx-Asp-His-D-Phe-Arg-Trp-Lys, Ahx-Asp-Asn-D-Phe-Arg-Trp-Lys 서열을 가진 7개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드이다. Li 등은 hMC1R, rMC3R 및 hMC4R cDNA를 CHO 세포에 영구적으로 도입 (stable transfection)시켜 각 MC 수용체 아형을 과 표현하는 세포주

를 이용하여 radioligand-binding assay 및 cAMP-generating assay 방법을 이용하여 여러  $\alpha$ -MSH 유도체들과 수용체간의 결합 및 활성도를 측정하였다. 이 실험에 의하면  $\alpha$ -MSH-ND와 [Asn<sup>6</sup>]- $\alpha$ -MSH-ND의 MC-1 수용체간 결합 및 활성도는  $\alpha$ -MSH-ND가 [Asn<sup>6</sup>]- $\alpha$ -MSH-ND보다 월등히 높았다<sup>29</sup>. 사람 말초혈액 단구에서 유래한 수지상세포는 다섯 개의 MC 수용체중 오직 MC-1 수용체만 표현한다는 것이 보고된 바 있다<sup>28</sup>. 본 실험에서도 [Asn<sup>6</sup>]- $\alpha$ -MSH-ND보다 MC-1 수용체에 대한 활성도가 큰  $\alpha$ -MSH-ND가 수지상세포의 MC-1 수용체에 결합하여 표면항원의 표현을 감소시켰으리라 생각한다. 앞으로  $\alpha$ -MSH와  $\alpha$ -MSH 효현제간의 차이점에 대해서도 규명되어야 할 것으로 생각되며  $\alpha$ -MSH 효현제를 이용한 염증반응과 면역반응의 조절에 관한 연구도 더욱 필요할 것으로 생각된다.

본 실험에서 적정 작용을 나타내는  $\alpha$ -MSH와  $\alpha$ -MSH 효현제의 농도는  $10^8$ M -  $10^{10}$ M로 나타났다. 그러나 이보다 고농도에서는 적정농도에서 나타난 효과가 매우 미약하거나 거의 없었다. Joosten 등은 neonatal rat의 corticospinal neuron을 이용한 *in vitro* 실험에서 neurite의 성장을 자극하는  $\alpha$ -MSH의 적정농도가 있으며 이보다 낮은 농도이거나 높은 농도에서는 적정농도보다 작용이 감소함을 밝혀냈다<sup>30</sup>. 본 실험 결과  $\alpha$ -MSH와  $\alpha$ -MSH 효현제의 농도  $10^8$ M -  $10^{10}$ M이 수지상세포 표면항원 감소작용의 적정농도로 추측할 수 있었다.

결론적으로 본 실험을 통하여  $\alpha$ -MSH와 그 효현제인  $\alpha$ -MSH-ND는 수지상세포의 표면항원의 표현을 감소시키는 것을 확인하였으며 이를 통하여  $\alpha$ -MSH와 그 효현제는 면역반응의 억제에 중요한 역할을 할 수 있음을 확인할 수 있었다. 앞으로  $\alpha$ -MSH가 항원전달세포인 수지상세포 이외에 면역반응에 관여하는 다른 세포들에 어떻게 작용하는 지에 대하여도 연구해 볼 필요가 있으리라 생각한다. 특히 장기이식 거부반응이나 면역관용을 유발하는 T 림프구의 작용에 관여하는 수지상세포를  $\alpha$ -MSH가 적절히 억제함으로써 장기이식 거부반응 억제나 자가면역 질환의 치료에 유용하게 활용될 수도 있으리라 생각한다.

### 참 고 문 헌

1. Hadley ME. *Endocrinology*. Englewood Cliffs, NJ; Prentice-Hall, Inc., 1984:160-81.
2. Galin FS, LeBoeuf RD, Blalock JE. *Corticotropin-releasing factor upregulates expression of two truncated POMC transcripts in murine lymphocytes*. J Neuroimmunol 1991; 31:51-8

3. Robertson B, Dostal K, Dayness RA. *Neuropeptide regulation of inflammatory and immunologic response; the capacity of  $\alpha$ -MSH to inhibit tumor necrosis factor and IL-1-inducible biologic response*. J Immunol 1988;140:4300-7
4. Bhardwaj RS, Schwarz A, Becher E, Mahnke K, Riemann H, Aragane Y, et al. *POMC-derived peptides induce IL-10 productions in human monocytes*. J Immunol 1996;156:2517-21
5. Catania A, Lipton JM. *Alpha-MSH in the modulation of host reaction*. Endocr Rev 1993;14:564-76
6. Grabbe S, Bhardwaj RS, Mahnke K, Simon MM, Schwarz T, Luger TA. *Alpha-MSH induces hapten-specific tolerance in mice*. J Immunol 1996;156:473-8
7. Cone RD, Lu D, Koppula S, Vage DI, Klungland H, Boston B, et al. *The melanocortin receptors; agonists, antagonists, and the hormonal control of pigmentation*. Recent Prog Horm Res 1996;51:287-317
8. Bhardwaj R, Becher E, Mahnke K, Hartmeyer M, Schwarz T, Scholzen T, et al. *Evidence for the differential expression of the functional  $\alpha$ -MSH receptor MC-1 on human monocytes*. J Immunol 1997;158:3378-84
9. Luger TA, Schauer E, Trautinger R, Krutmann J, Ansel J, Schwarz A, et al. *Production of immunosuppressing melanotropins by keratinocytes*. Ann NY Acad Sci 1993;680:567-70
10. Luger TA, Scholzen T, Grabbe S. *The role of  $\alpha$ -MSH in cutaneous biology*. J Investig Dermatol Symp Proc 1997; 2:87-93
11. Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. *GM-CSF and TNF- $\alpha$  cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells*. Nature 1992;360:258-61
12. Inaba K, Steinman RM, Pack MW, Aya H, Inaba M, Sudo T, et al. *Identification of proliferating dendritic cell precursors in mouse blood*. J Exp Med 1992;175:1157-67
13. Choi GS, Kang JM, Lee MG. *Analysis of methods for the generation of dendritic cells from human perihelal blood monocytes*. Yonsei Med J 2000;41:642-50
14. Kasinrerker W, Baumruker T, Majdic O, Knapp W, Stockinger H. *CD1 molecule expression on human monocytes induced by granulocyte-macrophage colony stimulating factor*. J Immunol 1993;150:579-84
15. Lauener RP, Goyert SM, Geha RS, Vercelli D. *Interleukin-4 down-regulation the expression of CD14 in normal human monocytes*. Eur J Immunol 1990;20:2375-81
16. Koch F, Heufler C, Kaempgen E, Schneewiess D, Boeck G, Schuler G. *Tumor necrosis factor  $\alpha$  maintain the viability of murine epidermal Langerhans cells in culture, but in contrasit to granulocyte/macrophage colony stimulating factor, without inducing their functional maturation*. J Exp Med 1990; 171:159-71
17. Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI. *An essential role*



- for Langerhans cell-derived IL-1  $\beta$  in the initiation of primary immune response in skin. *J Immunol* 1993;150:3678-704
18. Santiago-Schwarz F, Tucci J, Carsons SE. *Endogenously produced IL-6 is an accessory cytokine for dendritic cell hematopoiesis.* *Stem Cells* 1996;14:225-31
  19. Girolomoni G, Tigelaar R. *Capsaicin-sensitive primary sensory neurons are potent modulators of murine delayed-type hypersensitivity reactions.* *J Immunol* 1990;145:1105-12
  20. Weihe E, Hartschuh W. *Multiple peptides in cutaneous nerves: regulators under physiological conditions and a pathologic role in skin disease?* *Semin Dermatol* 1988;7:284-300
  21. Torii H, Tamaki K, Granstein RD. *The effect of neuropeptides /hormones on Langerhans cells.* *J Dermatol Sci* 1999;20:21-8
  22. Thody AJ, Riedly K, Penny RJ, Chalmers R, Fisher C, Shuster S.  *$\alpha$ -MSH peptides are present in mammalian skin.* *Peptides* 1983;4:813-6
  23. Slominski A, Ermak G, Hwang J, Mazurkiewicz J, Corliss D, Eastman A. *The expression of proopiomelanocortin and of corticotropin releasing hormone receptor genes in mouse skin.* *Biochem Biophys Acta* 1996;1289:247-51
  24. Slominski A, Wortsman J, Mazurkiewicz JE, Matsuoka L, Dietrich J, Lawrence K, et al. *Detection of proopiomelanocortin-derived antigens in normal and pathologic human skin.* *J Lab Clin Med* 1993;122:658-66
  25. Lunec J, Pieron C, Sherbet, GV, Thody AJ. *Alpha-MSH immunoreactivity in melanoma cells.* *Pathobiology* 1990;58:193-7
  26. Morhenn VB; *The physiology of scratching. Involvement of proopiomelanocortin gene-coded proteins in Langerhans cells.* *Prog Neuro Endo Immun* 1991;4:265-7
  27. Lipton JM, Catania A. *Antiinflammatory actions of the neuroimmunomodulator alpha-MSH.* *Immunol Today* 1997;18:140-5
  28. Becher E, Mahnke K, Brzoska T, Kalden DH, Grabbe S, Luger TA. *Human peripheral blood-derived cells express functional melanocortin receptor MC-1R.* *Ann NY Acad Sci* 1999;885:188-95
  29. Li SZ. *Structure and function analysis of melanocortin analogue with special reference to melanocortin receptor subtype.* *Brain Korea 21 project for medical sciences, Yonsei Univ* 2000;11-24
  30. Joosten EAJ, Verhaagh S, Martin D, Robe P, Franzen R, Hooiveld M, Doornbos. *Alpha-MSH stimulates neurite outgrowth of neonatal rat corticospinal neurons in vitro.* *Brain Research* 1996;736:91-8