

TNF계 CD137L 및 RANKL의 파골세포와 T 세포에 대한 활성화조절

홍성준* · 박재홍* · 이현우** · 이금호*

경희대학교 치과대학 소아치과학교실*, 치과약리학교실**, 구강생물학 연구소

국문초록

본 연구는 TNFR family인 CD137 및 RANK, 파골세포의 CD137L와 T 세포의 RANKL 간의 역신호에 의한 이들 세포의 역할을 알아보려 하였다. 이에 RANKL 및 CD137L 자극으로 유도되는 역신호 전달에 의한 T 세포 활성화와 파골세포 분화에 미치는 영향을 규명하고자 옹성 생쥐의 골수세포와 T 세포를 공동배양하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 생쥐 단핵세포주 및 골수유도 단핵전구세포에서 CD137L이 발현되며, CD137L 단클론 항체로 자극을 주었을 경우 파골세포 표지단백질인 TRAP 양성 파골세포의 형성이 억제되었다.
2. 활성화된 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포에서 RANKL을 발현하였으며 RANKL의 유사 수용체인 OPG 재조합 단백질을 처리하여 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 세포증식이 억제되었다.

이 연구의 결과는 CD137 자극에 의한 T 세포활성 및 RANK 자극에 의한 파골세포분화 및 활성이 각각 수용체에 결합하는 라이겐드의 역신호에 의해 억제되었는데, 이는 파골세포와 T 세포의 과도한 활성을 제어하는 생체의 항상성조절에 관여하는 기전으로 생각된다.

주요어 : RANKL, CD137L, 파골세포, T lymphocyte

I. 서 론

뼈는 일생에 걸쳐서 형성과 파괴를 반복하는 골재건 과정을 거치면서 최소의 양으로 최대의 힘을 지닐 수 있는 골격 미세구조를 유지한다¹⁾. 골 재건은 뼈의 구조와 기능을 조절하는 정상 대사과정으로써 파골세포와 조골세포가 그 역할을 주로 담당한다²⁾. 파골세포와 조골세포의 활성은 뼈의 밀도에 영향을 주는데, 이 두 세포간 활성의 불균형은 골다공증과 같은 심각한 질환을 유발한다³⁾.

파골세포는 골표면에 존재하는 단핵/대식 전구세포의 분화에 의해 형성되는 다핵성 대식세포이다. 파골세포의 분화에 관한 많은 연구들이 생쥐의 골수세포 또는 비장세포와 기질세포의 공동배양에 의한 분화모델을 이용하여 진행되고 있으며, 파골세포 분화/활성에 관한 분자세포생물학적 연구의 결과, tumor necrosis factor (TNF) receptor, TNF 유사 단백질인 osteoprotegerin (OPG), receptor for activation of nuclear factor kappa B(RANK, NF- κ B) 및 RANK ligand(RANKL)가

함께 파골세포의 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다^{4,5)}.

파골전구세포 및 파골세포 표면에 발현하는 RANK는 활성화된 T 세포, 조골세포 또는 조골세포의 전구체인 골수기질세포 및 섬유아세포에서 분비되는 RANKL과 결합하여, 그 결과 세포 내 다양하며 특이적인 신호전달을 유발하고, 파골전구세포의 분화 및 분화 후 활성화를 유도한다⁶⁾.

치주질환의 원인은 세균 등의 감염에 의한 T 세포의 활성이 중요한 인자이며, 치조골의 흡수는 치주질환 원인균에 의한 항원 특이적인 CD4⁺ T세포에서 발현되는 RANKL과 그에 따른 파골세포활성에 의하여 일어난다⁶⁻⁸⁾. CD137은 T 세포에서 항원의 접촉에 의해 발현되는 세포막 단백질로서 T 세포의 활성을 증진시키는 역할을 하며, CD137L은 활성화된 대식세포, B 세포나 수상세포와 같은 항원제시세포 (Antigen presenting cells, APC)에서 발현된다⁹⁾. CD137L/CD137은 TNF/TNFR family에 속하는 단백질로 CD137 자극에 의한 세포반응의 연구는 주로 T 세포에서 진행되었다¹⁰⁻¹²⁾. T 세포에서 CD137의 신호가 T 세포에 영향을 미칠 때 전형적인 TNFR 신호전달과

교신저자 : 박재홍

서울시 동대문구 회기동 1번지 / 경희대학교 치과대학 소아치과학교실 / 02-958-9373 / pedopjh@khu.ac.kr

원고접수일: 2008년 4월 18일 / 원고최종수정일: 2008년 6월 19일 / 원고채택일: 2008년 7월 08일

정을 통해서 일어나는 것이 아니라, 다시 한 번 T cell receptor (TCR)의 신호전달을 자극하여 일어난다는 것이 최근에 보고되었다¹³⁾. Saito등¹⁴⁾은 CD137L이 면역세포인 항원제시세포 이외에 파골세포에서도 발견되고, mac-rophage -colony stimulation factor(M-CSF)/RANKL처리에 의한 파골세포 분화와 활성이 재조합 CD137 단백질 또는 anti-CD137L mAb 처리에 의해 저해된다고 보고하였다.

파골세포는 항원제시세포와 같은 조혈모세포로부터 분화되며 파골세포분화 및 활성과정에서 면역 세포들과 밀접한 관계를 가지고 있다. T 세포에서는 RANKL을 합성, 분비하여 파골전구세포막에 존재하는 RANK를 자극시켜 파골세포분화와 활성을 일으키는 세포 내 신호전달을 일으킨다⁵⁾. 세포막에 발견되는 CD137L과 같은 TNF계 세포막 단백질이 그 수용체와 결합한 후 항원제시세포의 기능에 미치는 영향에 관한 연구에서 TNF family에 의한 역신호전달이 선천성면역에 중요한 역할을 수행하고 있음이 최근 밝혀졌다^{15,16)}.

구강질환을 일으키는 미생물 감염 시 선천성 및 후천성 면역 반응이 유발되며 T 세포막에는 CD137, 파골세포막에는 CD137L가 발견된다. 이들의 결합에 의한 역신호전달과정 유발과 그로 인한 파골세포의 분화 및 활성에 미치는 영향을 생쥐 단핵세포주와 원발성 골수 조혈모세포를 이용한 in vitro 모델에서 연구하고자 하였다. 또한 생쥐 비장과 림프관에서 T 세포를 분리하여 T 세포에 발현하는 RANKL의 역신호 전달에 의한 T 세포 활성에 미치는 영향을 연구하였다. 이 연구를 통해 TNFR family인 CD137 및 RANK, 파골세포의 CD137L와 T 세포의 RANKL 간의 역신호에 의한 이들 세포의 역할을 규명함으로써 파골세포의 분화를 억제하여 골의 흡수를 조절할 수 있는 물질을 개발하는데 기초 자료를 제공하고자 한다.

II. 실험방법

1. 시료

웅성 BALB/C 생쥐는 Harlan (Indianapolis, IN)에서 구입하여 무균실에서 사육하였다. CD137L 단클론 항체인 anti-CD137L (TKS-1), OPG-Fc, anti-CD137 (3H3), anti-CD3 (CD3e)는 Immunomics (Ulsan, Korea)에서, rat IgG2ak는 BD Pharmingen (San Diego, CA)에서 구입하였다. Anti-RANKL-PE, RANKL과 M-CSF는 R&D system (Seoul, Korea)에서, Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) kit은 Sigma-Aldrich (Yongin, Korea)에서 구입하였다.

2. 세포 배양

i) RAW 264.7

RAW 264.7세포는 Delbecco's modified eagle

medium(DMEM)/10% fetal bovine serum(FBS)/penicillin-streptomycin 배지를 사용하여 CO₂ 세포배양기에서 배양하고, 세포의 수를 1 x 10⁵/well로 48well plate에서 분주하여 배양하였다. 파골세포로 분화시키기 위해 20mM PD98059/ 10mg/ml RANKL+ 10mg/ml TKS-1 나 rat IgG_{2ak}를 첨가하고 일주일간 배양하였다. 2일에 한 번씩 배지 부피의 절반을 제거하고 20mM PD98059/ 10mg/ml RANKL을 함유한 새로운 배지로 교체하였다.

ii) 골수세포

골수세포는 웅성 생쥐의 다리뼈에서 분리하였는데, 먼저 무균 벤치에서 뼈를 phosphate-buffer saline(PBS)에 담가두며 근육을 제거한 후 DMEM으로 뼈속의 세포를 주사기를 이용하여 수거하였다. 세포를 DMEM으로 세척하여 근육과 같은 조직을 버리고 배양접시에 DMEM/10% FBS으로 배양하여, 24 시간 후 세포를 수거하여 Ficoll을 이용하여 골수세포를 분리하였다. 세포의 수를 1×10⁵/well로 48well plate에서 분주하여 배양하였다. 파골세포로 분화시키기 위해 10mg/ml M-CSF와 10mg/ml RANKL에 10mg/ml TKS-1 나 rat IgG_{2ak}를 첨가하고 10일 간 배양하였다. 3-4일에 한번씩 10mg/ml M-CSF와 10 mg/ml RANKL을 함유한 새로운 배지로 교체하였다.

iii) T 세포

BALB/c 생쥐 비장과 림프관에서 분리한 T 세포를 anti-CD4 와 anti-CD8 그리고 Ab magnetic bead를 이용한 MACS 자성분리법으로 CD4⁺ 와 CD8⁺ T 세포로 분리하였다. 분리된 T 세포는 95% 이상 순수한 것을 유세포 분석으로 확인하였다.

3. 유세포 분석 (Flow Cytometry)

세포를 5ml tube에 모은 후 0.2% bovine serum albumin(BSA)을 포함하는 PBS로 2번 세척 후 4℃에서 30분간 anti-RANKL-PE, 또는 TKS-1 또는 isotype control group인 rat IgG_{2ak}로 배양하였다. 일차 항체가 결합된 세포를 0.2% BSA를 포함하는 PBS로 세척한 후 4℃에서 30분간 이차 항체인 anti-rat IgG-FITC로 배양하였다. 시료를 PBS로 두 번 세척한 후 유세포 분석기인 FCSs로 분석하였다.

4. TRAP 분석

각 세포의 배양이 끝나면 세포를 세척, 고정시킨 후 세포 내에 파골세포 표지단백질인 TRAP을 염색하였다. 세포를 25ml citrate solution과 65ml acetone, 그리고 8ml 38% formaldehyde로 30초간 고정한 후 증류수로 세척하여, 고정된 세포를 염색액 (45ml 증류수, 1ml Diazotized Fast Garnet

GBC 액, 0.5ml Naphthol AS-BI phosphate 액, 2ml acetate 액)으로 37°C 수조에서 차광상태로 1시간 동안 염색하였다. 세포를 증류수로 세척한 후 현미경으로 염색이 되어 있는 단핵 또는 다핵세포를 계수하였다.

5. T 세포 증식 분석

분리된 T 세포를 96 well plate에 well 당 5×10^5 개를 배양한 후 0.1mg/ml anti-CD3 나 0.1mg/ml anti-CD3과 10 mg/ml anti-CD137을 처리하고 12시간 후 지시된 농도의 OPG-Fc를 처리하였다. 배양 마지막 12시간 동안 1 mCi/well [³H] thymidine을 첨가하고, 세포 DNA를 분리한 후 방사선을 이용한 liquid scintillation counter로 계수하였다.

6. 세포주기 분석

위의 방법으로 자극시킨 T 세포를 PBS로 세척한 후 75% ice-cold ethanol로 4°C에서 24시간 동안 고정시키고, 고정된 세포를 PBS로 세척하여 ethanol을 제거한 후 2.5mg/ml propidium iodide와 50mg/ml RNase A를 30분간 배양하여 유세포 분석기로 분석하였다.

7. 통계처리

RANKL 및 CD137L 자극으로 유도되는 역신호 전달에 의한 CD4⁺ 및 CD8⁺ T세포의 활성 및 억제와 파골세포의 분화를 미치는 영향을 통계학적인 유의성을 확인하고자 SAS 8.2 program을 이용하여 ANOVA 검사를 시행하였다.

Ⅲ. 실험결과

1. 생쥐 단핵세포주 RAW264.7에서 CD137L 자극에 의한 RANKL 유도 파골세포분화 억제.

생쥐 단핵세포주인 RAW264.7 세포는 단핵세포 및 파골세포 전구세포의 성질을 가지고 있으며 RANKL의 자극에 의해 파골세포로 분화된다. 이번 연구에서는 파골세포 분화에 대한 TNF계 단백질인 CD137L의 역할을 알아보기 위해 먼저 RAW264.7 세포에 CD137L가 발현되는지를 유세포 분석으로 관찰하였다. Figure.1에서와 같이 RAW264.7세포는 항상 CD137L를 발현하였다. RANKL에 의한 RAW264.7세포의 파골세포분화에 있어서 CD137L 자극에 의한 영향을 관찰하기 위하여 0.1-10mg/ml의 CD137L 단클론 항체인 TKS-1을 처리하였다. RAW264.7세포에 RANKL/PD98059를 처리하여 야기된 TRAP양성 파골세포의 분화가 1-10mg/ml TKS-1의 첨가에 의해 파골세포의 수가 감소된 것을 볼 수 있었다(Fig. 2,3). 이 결과는 RAW264.7 세포의 파골세포분화 과정이 CD137L 자극에 의해 억제됨을 보여주는 것이다.

2. 생쥐 골수 조혈세포에서 CD137L 자극에 의한 M-CSF/RANKL 유도 파골세포분화 억제.

CD137L 자극을 통해 일어난 RAW264.7의 파골세포분화 억제작용이, 단핵세포주가 아닌 생쥐의 골수세포에서 파골세포로 분화 될 때에도 일어나는 지를 관찰하였다. 먼저 생쥐의 다리 골격에서 분리한 골수세포에서 CD137L의 발현을 유세포

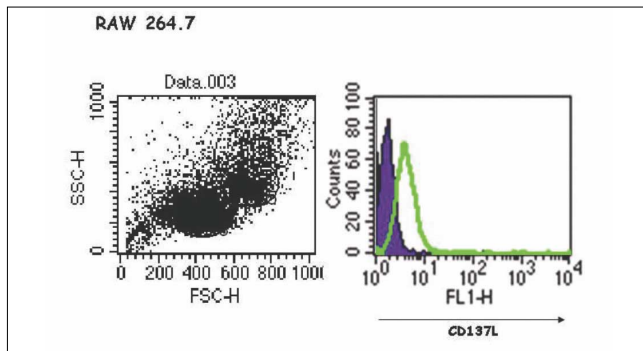


Fig. 1. Expression of CD137L on murine monocytic cell RAW264.7. RAW264.7 cells were cultured as described in "Materials and Methods". Cells were collected and washed twice with PBS. Cells were stained with anti-CD137L mAb and secondary Ab conjugated with FITC. Stained cells were analysis by flow cytometry.

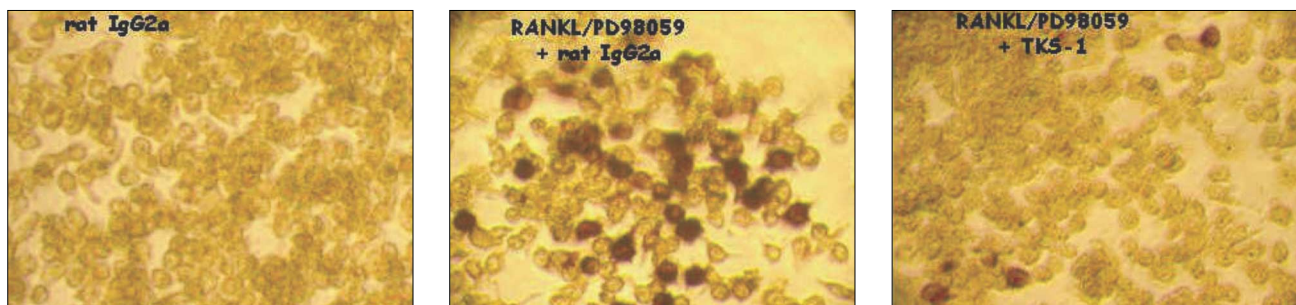


Fig. 2. Cross-linking of CD137L inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. Cells were incubated with 20 mM PD98059 plus 10 mg/ml RANKL in the presence or absence of indicated concentration of anti-CD137L mAb (TKS-1) for 7 days. Cells were fixed and stained TRAP as described in "Materials and Methods". TRAP-positive cells were observed and counted under microscope.

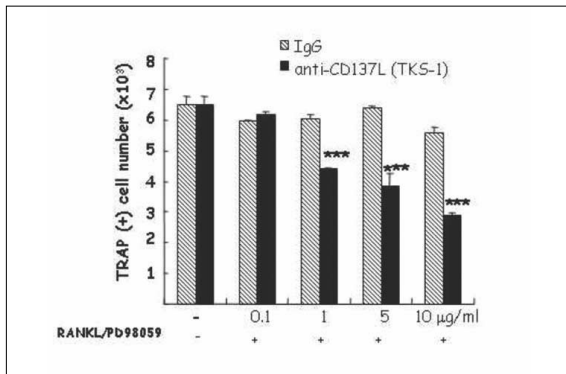


Fig. 3. Cross-linking of CD137L inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis in RAW264.7 cells. Cells were incubated with 20 mM PD98059 plus 10 mg/ml RANKL in the presence or absence of indicated concentration of anti-CD137L mAb (TKS-1) for 7 days. The results shown as above representative of six independent experiments, and are means \pm SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$, significant difference from IgG group.

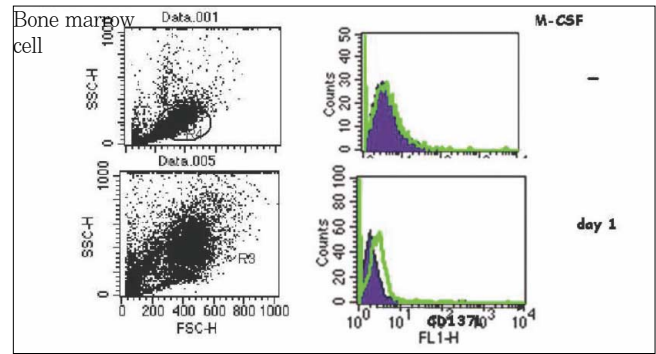


Fig. 4. Expression of CD137L on mouse bone marrow cells. Mouse bone marrow cells were isolated and cultured as described in "Materials and Methods". Cells were treated with or without 10 mg/ml M-CSF. Cells were collected and washed twice with PBS. Cells were stained with anti-CD137L mAb and secondary Ab conjugated with FITC. Stained cells were analysis by flow cytometry.

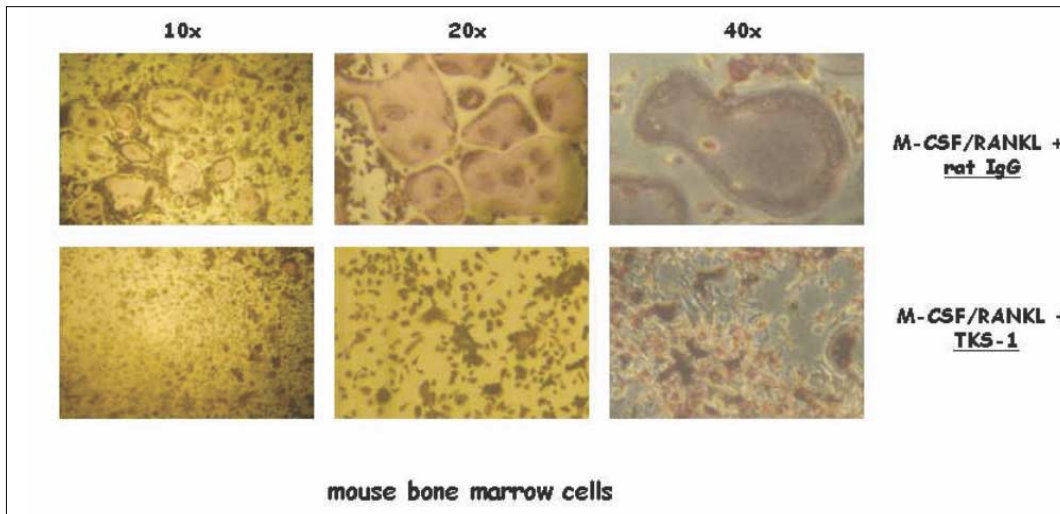


Fig. 5. Cross-linking of CD137L inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis in mouse bone marrow cells. Mouse bone marrow cells were isolated and cultured as described in "Materials and Methods". Cells were incubated with 10 mg/ml M-CSF plus 10 mg/ml RANKL in the presence or absence of indicated concentration of anti-CD137L mAb (TKS-1) for 10 days. Cells were fixed and stained TRAP as described in "Materials and Methods". TRAP-positive cells were observed and pictured under microscope.

분석으로 조사하였다. 아무런 처리를 하지 않은 골수세포에서는 CD137L가 발현되지 않았으나, M-CSF를 처리한 경우에는 CD137L가 발현되었다(Fig. 4). 이것은 골수세포가 M-CSF 처리에 의해 단핵전구세포로 분화되어 그 결과 CD137L가 발현됨을 보여주는 것이다. 다음으로, 생쥐 골수세포에 M-CSF 및 RANKL을 처리하여 파골세포로 분화하는 과정에서 TKS-1을 첨가하여 CD137L를 자극하였을 때 일어나는 현상을 조사

하였다. Fig. 5에서와 같이 CD137L 자극이 TRAP 양성 파골세포의 형성을 억제하였다. TRAP 염색된 세포를 계수한 결과, CD137L 자극이 TRAP 양성 단핵성 파골세포의 형성에는 영향을 주지 않고, 다핵성 파골세포형성만을 억제함이 관찰되었다(Figure. 6). 이것은 파골전구세포에서 CD137L 자극에 의한 신호전달이 단핵성에서 다핵성 파골세포로 분화되는 과정에서 작용하고 있음을 보여준다.

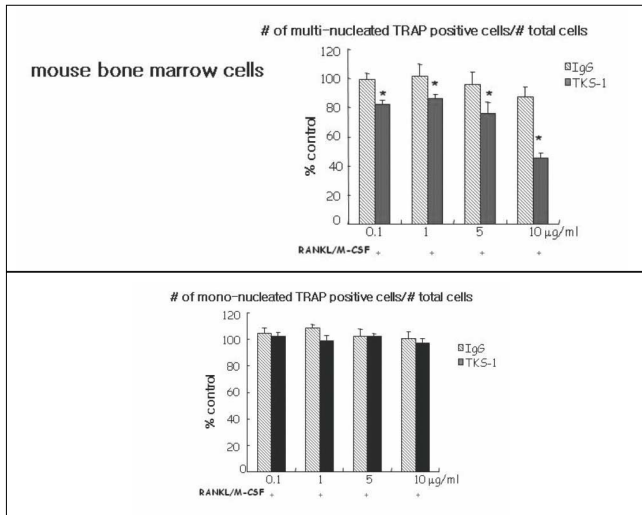


Fig. 6. Cross-linking of CD137L inhibits RANKL-induced the formation of multi-nucleated osteoclasts in mouse bone marrow cells. Cells were incubated with 10 mg/ml M-CSF plus 10 mg/ml RANKL in the presence or absence of indicated concentration of anti-CD137L mAb (TKS-1) for 10 days. Mono-nucleated or multi-nucleated TRAP-positive cells were observed and counted under microscope. The results shown as above representative of six independent experiments, and are means \pm SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$, significant difference from IgG group.

3. 생쥐 CD4⁺ T 세포에서 RANKL 자극에 의한 세포사멸촉진 및 세포증식 억제.

생쥐 임파선과 비장에서 분리한 CD4⁺ T 세포에 anti-CD3 및 anti-CD137 단클론 항체를 이용하여 활성화시킨 결과 RANKL이 발현됨을 관찰하였다(Fig. 7). Anti-CD3 및 anti-CD137 단클론 항체 처리에 의한 CD4⁺ T 세포의 세포증식이 RANKL의 또 다른 수용체인 OPG 처리에 의해 농도 의존적으로 억제됨이 관찰되었다(Fig. 8).

이러한 세포증식 억제 작용은, RANKL 자극에 의한 세포주기의 억제작용에 기인한 것이 아니고, 세포사멸의 촉진에 의한 것임을 알 수 있다(Fig. 9).

4. 생쥐 CD8⁺ T 세포에서 RANKL 자극에 의한 세포사멸촉진 및 세포증식 억제.

생쥐 임파선과 비장에서 분리한 CD8⁺ T 세포에 anti-CD3 및 anti-CD137 단클론 항체를 이용하여 활성화시킨 결과 RANKL이 발현됨을 관찰하였다(Fig. 10). Anti-CD3 및 anti-CD137 단클론 항체 처리에 의한 CD8⁺ T 세포의 세포증식이 RANKL의 또 다른 수용체인 OPG 처리에 의해 농도 의존적으로 억제됨이 관찰되었다(Fig. 11). 이러한 세포증식 억제 작용은 RANKL 자극에 의한 세포주기의 억제작용에 기인한 것이 아니라 세포사멸의 촉진에 의한 것임을 알 수 있다(Fig. 12).

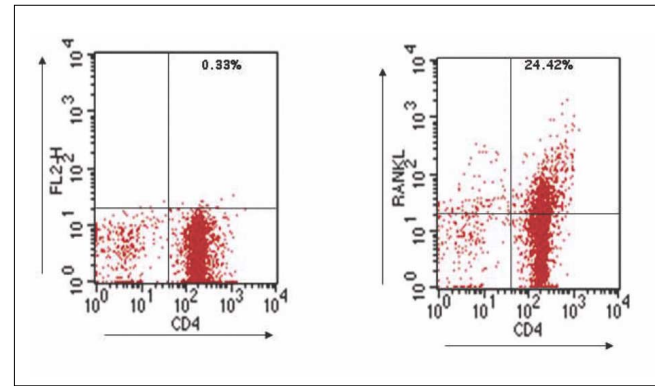


Fig. 7. Expression of RANKL on mouse CD4⁺ T lymphocytes. Mouse CD4⁺ T cells were isolated and cultured as described in "Materials and Methods". Cells were treated with or without anti-CD3 plus anti-CD137 mAb for 16 hrs and stained with anti-RANKL-PE. Stained cells were analysis by flow cytometry.

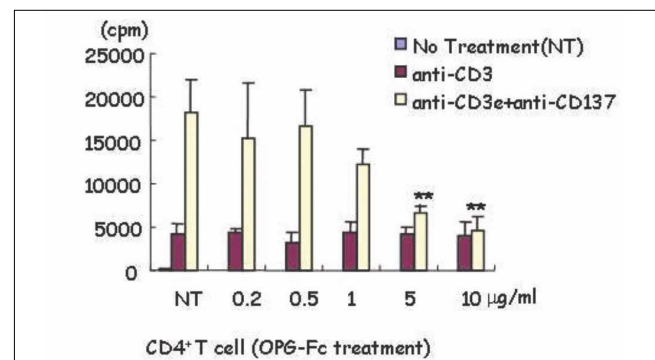


Fig. 8. Cross-linking of RANKL inhibits CD4⁺ T cell proliferation. Mouse CD4⁺ T cells were isolated and cultured as described in "Materials and Methods". Cells were treated with vehicle, 0.5 mg/ml anti-CD3 mAb or 0.5 mg/ml anti-CD3 plus 10 mg/ml anti-CD137 mAb in the presence or absence of indicated concentration of OPG. For last 12 hrs, cells were incubated with 1 mCi/well [³H] thymidine. Cells were harvested and counted with liquid scintillation counter. The results shown as above representative of six independent experiments, and are means \pm SEM. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ and ***, $P < 0.001$, significant difference from NT group.

IV. 총괄 및 고찰

뼈의 골재건 과정에 중요한 역할을 하는 파골세포와 조골세포 활성의 불균형은 심각한 질환을 유발하는데, 그 중 골다공증, 치주염, 류마티스성 관절염 등의 골격질환은 파골세포의 활성이 증대되어 유발되는 것으로 알려져 있다³⁾. 특히 골다공증은 치명적인 질병으로 오늘날 전 세계적으로 7,000만 명 이상의 환자가 이 질병으로 인해 위험에 처해 있다. 이와 같이 건강한 골격계의 유지에 있어 파골세포의 역할은 매우 중요하다.

파골세포는 골격표면에 존재하는 단핵/대식세포 전구세포의 분화에 의해 형성되는 조직특이 다핵성 대식세포이다. 기질세포와 골수세포의 접촉이 파골세포의 분화에 필수적이어서 아마도 기질세포에서 유래하는 다양한 인자들이 분화에 관여하는

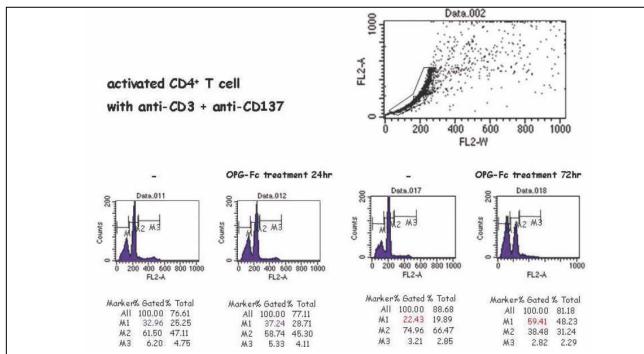


Fig. 9. Cross-linking of RANKL enhances CD4⁺ T cell apoptosis. Mouse CD4⁺ T cells were isolated and cultured as described in "Materials and Methods". Cells were incubated with 0.5 mg/ml anti-CD3 plus 10 mg/ml CD137 mAb in the presence or absence of 10 mg/ml OPG-Fc for 24 hrs or 72 hrs. Cell cycle was analysis as described in "Materials and Methods".

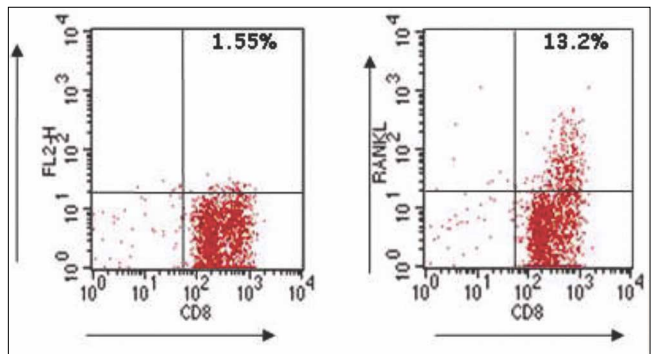


Fig. 10. Expression of RANKL on mouse CD8⁺ T lymphocytes. Mouse CD8⁺ T cells were isolated and cultured as described in "Materials and Methods". Cells were treated with or without anti-CD3 plus anti-CD137 mAb for 16 hrs and stained with anti-RANKL-PE. Stained cells were analysis by flow cytometry.

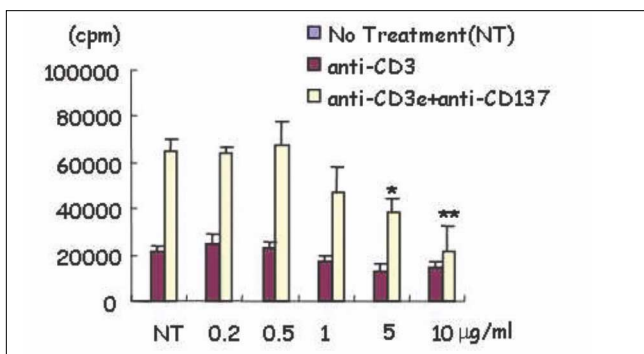


Fig. 11. Cross-linking of RANKL inhibits CD8⁺ T cell proliferation. Mouse CD8⁺ T cells were isolated and cultured as described in "Materials and Methods". Cells were treated with vehicle, 0.5 mg/ml anti-CD3 mAb or 0.5 mg/ml anti-CD3 plus 10 mg/ml anti-CD137 mAb in the presence or absence of indicated concentration of OPG. For last 12 hrs, cells were incubated with 1 mCi/well [³H] thymidine. Cells were harvested and counted with liquid scintillation counter. The results shown as above representative of six independent experiments, and are means ± SEM. *, P < 0.05; **, P < 0.01 and ***, P < 0.001, significant difference from NT group.

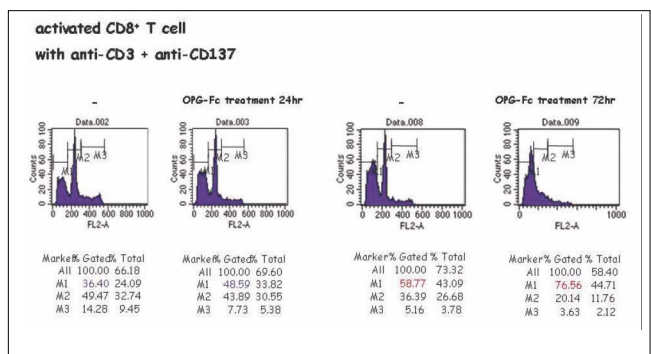


Fig. 12. Cross-linking of RANKL inhibits CD8⁺ T cell proliferation. Mouse CD8⁺ T cells were isolated and cultured as described in "Materials and Methods". Cells were incubated with 0.5 mg/ml anti-CD3 plus 10 mg/ml CD137 mAb in the presence or absence of 10 mg/ml OPG-Fc for 24 hrs or 72 hrs. Cell cycle was analyzed as described in "Materials and Methods".

것으로 알려져 있었으며, 그 중 TNF관련 사이토카인인 RANKL과 폴리펩타이드성 성장인자인 M-CSF는 중요한 인자로 밝혀졌다¹⁵⁻¹⁷. M-CSF 와 RANKL은 TRAP, cathepsin K (CATK), calcitonin receptor, beta3-integrin과 같은 파골세포 분화의 각 단계를 대표하는 표지 유전자로서 성체 파골세포 분화에 필수적인 유전자발현에 필요하며, 지금까지 밝혀진 바로는 최소 24개의 유전자가 파골세포의 분화와 활성화에 관여하는 것으로 알려져 있다^{18,19}. Murine system에서 골수세포 또는 비장 세포와 기질 세포의 공동배양에 의한 분화모형을 이용하여 파골세포의 분화 및 활성화에 관한 분자생물학적 기전에 관한 연구에서 TNF, TNF receptor(TNFR), TNF 유사 단백질인 OPG, RANK 및 RANKL 등이 함께 파골세포의 기능을 조절하는 것으로 알려져 있다^{4,5}.

CD137은 T 세포에서 항원의 접촉에 의해 발현되는 세포막 단백질로서 T 세포의 활성을 증진시키는 역할을 한다. CD137L는 단핵세포, 대식세포 및 수지상세포와 같은 항원제시세포에서 발현되고 있다⁹. CD137과 CD137L는 TNF/TNFR family에 속하는 단백질로서 CD137은 CD137L와의 결합으로 T 세포를 강하게 활성화시킨다.

CD137 자극에 의한 세포 반응의 연구는 주로 T 세포에서 이루어 졌다. CD8⁺ T 세포에서 CD137 신호 전달 중 I-kB/RANK에 의해 anti-apoptotic 유전자인 bcl-XL과 bfl-1의 유전자 및 단백질 발현이 증가하여 T 세포활성 후 사멸하는 과정이 억제된 결과 세포 생존을 증가시킨다는 것이 보고되었다¹⁰. CD8⁺ T 세포에서의 CD137 신호전달과정인 ERK1/2의 인산화와 CD137 신호전달과정에 의해 합성 및 분비된 사이토

카인인 IL-2가 autocrine이나 paracrine으로 IL-2 수용체에 결합하여 IL-2 신호전달인 PI3K/Akt/mTOR/p70S6kinase 활성화에 의해 cyclin D 유전자 전사 및 전사된 cyclinD mRNA 단백질 합성이 증가 되어 CD8⁺ T세포의 세포주기 진행이 증가된다는 것이 규명되었다¹¹⁾. 이러한 CD137 신호전달과정에 의한 세포의 기능은 CD4⁺ T 세포에서도 일어나고 있다는 것도 보고되었다¹²⁾. 최근에는 T 세포에서의 CD137 신호가 궁극적으로 T 세포에 그 기능을 나타낼 때 classical TNFR 신호전달 과정을 통해서 일어나는 것이 아니라 다시 한 번 T세포 수용체 신호 전달을 자극하여 일으킨다는 것이 규명되었다¹³⁾.

CD137L가 면역세포인 항원제시세포 외에도 파골세포에서 발현되는 것과, M-CSF/RANKL처리에 의한 파골세포의 분화와 활성이 재조합 CD137 단백질 또는 anti-CD137L mAb(TKS-1)처리에 의해 저해되는 것이 최근에 보고되었다¹⁶⁾. 생쥐 조혈세포에 M-CSF 처리 시 RANK와 CD137L가 발현되는 것은 알려져 있다¹⁴⁾. 이번 연구에서도 Fig. 2와 Fig. 4에서 보이는 것과 같이, 조혈모세포 또는 대식세포주인 RAW264.7에 CD137L의 특이항체인 TKS-1을 처리한 결과, M-CSF/RANKL처리에 의한 파골세포의 분화 및 활성유도를 억제하는 것을 확인하였다. 또한 TKS-1처리가 RANKL처리에 의해 형성된 단핵세포파골세포에는 영향이 없이 다핵세포파골세포 형성만을 억제하는 것을 관찰하였다(Fig. 5). 이 결과는 CD137L의 역신호전달이 RANK신호에 의한 전반적인 파골세포 분화, 활성 및 생존과정 모두에 작용하는 것이 아니라 특정 단계에 관여함을 보여준다. 즉, TKS-1이 CD137/CD137L 상호작용을 억제해서 일어나는 것이 아니라, 실제적으로 조혈세포 또는 파골전구세포 표면에 발현된 CD137L을 cross-linking 시켜 일어나는 역신호 전달에 의한 것임을 시사한다.

파골전구세포 및 파골세포 표면에 발현하는 RANK는 활성화된 T세포, 조골세포 또는 조골세포의 전구체인 골수기질세포 및 섬유아세포에서 발현되어 분비되는 RANKL과 결합하여 세포 내 다양하며 특이적인 신호전달을 유발하고, 그에 따라 파골전구세포의 분화 및 분화 후 활성화를 유도한다⁵⁾. RANK/RANKL에 의한 파골(전구)세포 내 신호전달 연구는 파골세포 분화/형성의 분자생물학적 기전뿐만 아니라 이로 인한 골격계 질환의 발병 원인을 규명하는데 도움을 주었다. 또한 이 신호전달의 이해는 골격계 질환의 효과적 치료 약물개발을 위한 핵심, 표적신호전달단백질의 설정을 가능케 했다.

OPG는 생체에서 분비되는 RANK의 유사수용체로서, RANKL과 먼저 결합하여 RANKL과 RANK와의 결합을 억제함으로써 파골세포 내 RANK/RANKL 신호를 방해하여 파골세포 기능을 억제 시킨다¹⁶⁾. 이러한 RANK/RANKL 및 RANK/OPG에 의한 파골세포 기능의 조절은 많은 호르몬, TNFs 및 사이토카인에 의해 일어난다¹⁷⁾. OPG는 TNF관련 단백질로서 세포 밖으로 분비되며 동물모델에서 골 밀도를 조절하며 OPG의 TNFR motif가 OPG의 작용에 중요한 역할을 하고 있다는 것이 규명되었다¹⁸⁾. RANKL에 의한 파골세포분화를 저해하는 OPG가 calcitropic factor에 의한 골 파괴와 골 재

흡수를 억제함을 통해, 파골세포에서 RANK신호전달과정이 골 재흡수와 칼슘 항상성을 조절하는 다양한 humoral factor의 신호와 연결되어 있다는 것을 알 수 있다¹⁹⁾. 파골세포에서 RANKL의 작용에 길항하는 OPG처리에 의해 T 세포의 증식을 억제한 결과는 RANK의 유사 수용체인 OPG가 T 세포표면에 발현하는 TNF family인 RANKL에 결합하여 T 세포내로 역신호 전달을 일으킨다는 것을 시사한다²⁰⁻²³⁾.

TNF 관련 세포막 단백질인 RANKL은 파골세포분화와 골 재흡수에 핵심 사이토카인 중 하나로 TNFR관련 단백질인 파골(전구)세포막에 발현하는 RANK와 결합후 RANK신호전달을 야기하여 작용한다고 알려져 있다²⁴⁾. 조혈전구세포에서의 RANK 발현은 파골세포분화, 활성, 골 재흡수 및 calcitropic 호르몬에 의한 체내 칼슘 항상성 조절에 결정적 역할을 한다²⁵⁾. RANKL은 type II transmembrane 단백질로서 세포막에 발현되었다가 protease에 의해 분해되어 액상으로 분비된다. 골 재흡수를 유발하는 호르몬이나 기타 요인을 살펴보면 많은 경우 생체 내에서 조골세포 유래 기질세포에서 RANKL 발현을 유도한다^{26,27)}. 조골세포에 의해 발현되는 RANKL은 인접한 파골세포에 의한 골 재흡수를 촉진시켜 골 재건을 조절하며, 이러한 과정이 coupling process로 불리는 과정으로 파골세포 주변의 조골세포로 인한 골 형성을 촉진 시킨다²⁸⁾. 이런 상황에서 OPG는 유사 수용체 (decoy receptor)로 작용하여 RANKL이 파골세포 표면의 RANK와 결합하는 것을 저해한다. OPG는 estrogen, TGF- β -related bone morphogenic proteins (BMPs)등의 anabolic agents에 의해 조골세포로부터 만들어지며, OPG 발현은 파골세포형성을 저해하여 생쥐의 경우 골경화증을 유발하며 OPG 결핍은 골다공증을 유발한다²⁹⁾. 그러므로 RANKL과 OPG 발현은 파골세포의 RANK활성상태를 촉진시키거나 억제하여 골 재흡수와 골 밀도를 조절한다. 이번 연구에서도 Fig. 7과 Fig. 10에 나타난 것처럼, OPG처리에 의해서 일차신호 (TCR 신호)가 활성화된 T 세포에서 세포증식이 감소된 것을 관찰하였다. T 세포에서 일차신호자극에 의해 RANKL의 발현유도가 되는 것이 알려져 있는데, 이 결과는 T 세포에서 OPG처리에 의한 RANKL의 역신호전달과정 활성에 따른 세포반응임을 제시하고 있다. 또한, 유세포 분석을 이용한 세포주기분석법을 통해 살펴본 결과, OPG를 첨가하고 72시간 경과 후 M1기의 세포수가 증가한 것을 통해, T 세포 증식의 감소는 RANKL 자극에 의한 세포주기의 억제작용에 기인한 것이 아니고, T 세포의 사멸이 촉진되어 일어난 결과임을 알 수 있다.

골대사와 면역계는 밀접한 관계가 있다. 예를 들면 파골세포와 대식세포의 전구세포는 같은 조혈세포에서 분화한다. T 세포에서는 RANKL을 합성, 분비하여 파골전구세포막에 존재하는 RANK를 자극시켜 파골세포의 분화와 활성을 일으키는 세포 내 신호전달을 일으킨다. 따라서 이번 연구에서 나타난 것처럼, T세포에서 발현하는 CD137이 파골전구세포의 CD137L에 결합하여 역신호 전달을 일으켜 파골세포분화와 활성에 영향을 주는 것 역시 면역계와 골대사가 밀접히 관계됨을 보이는 예라

고 할 수 있다. TNF family의 cytoplasmic domain에는 Casein Kinase I (CKI)에 의해 인산화가 되는 부위가 역신호 전달과정에 중요한 역할을 하며, 파골세포에서 CD137치리에 의해 CKI가 CD137L의 cytoplasmic domain의 인산화가 일어난다는 것을 보이고 있으며, 이 인산화가 CD137L의 역신호 전달과정과 그에 따른 파골세포분화 억제제의 기전중 하나임을 제시하고 있다¹⁵⁾.

이 연구의 결과는 CD137 자극에 의한 T 세포활성 및 RANK 자극에 의한 파골세포의 분화 및 활성이 각각 수용체에 결합하는 라이겐드의 역신호에 의해 억제된 것을 보여주는데, 이것은 파골세포와 T 세포의 과도한 활성을 제어하는 생체의 항상성조절에 관여하는 기전으로 여겨진다(Fig. 13).

앞으로 파골세포 및 T 세포의 비정상적 활성화에 의한 치주염, 골다공증, 류마티스성 관절염과 같은 자가면역질환 등의 다양한 질병치료가 이 결과를 응용할 수 있도록 생체 내에서의 연구가 진행되어야 할 것이다.

V. 결 론

RANKL 및 CD137L 자극으로 유도되는 역신호 전달에 의한 T 세포 활성화와 파골세포분화에 미치는 영향을 규명하고자 응용 생쥐의 골수세포와 T 세포를 공동배양하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 생쥐 단핵세포주 및 골수유도 단핵전구세포에서 CD137L

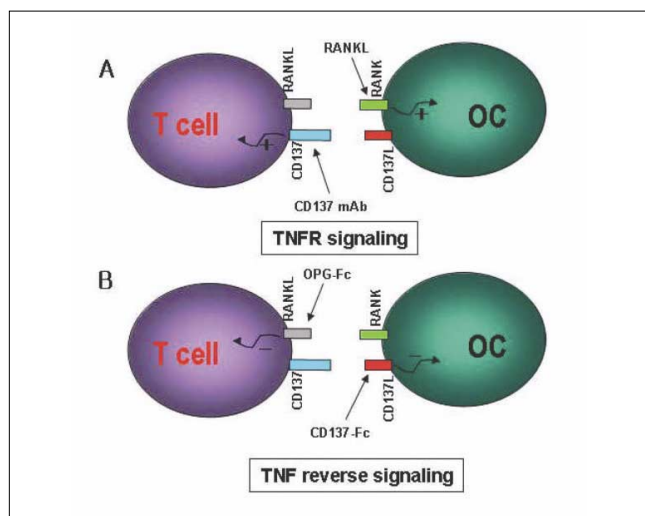


Fig. 13. Cellular interaction between T cell and osteoclast precursor cell. (A) TNFR signaling pathways: Cross-linking of CD137 expressed on T cells enhances immune responses including cell expansion, survival and cytokine production via CD137-mediated T cell signaling pathways. On hematopoietic cells or osteoclast precursor, RANK ligation by RANKL evokes various signaling pathways inducing osteoclast differentiation, survival and activation. (B) TNF reverse signaling pathways: Cross-linking CD137L on osteoclast precursor cells inhibits RANK signal-induced osteoclast formation. On T cells, RANKL engagement appears to dampen TCR signal-induced cell proliferation.

이 발현되며, CD137L 단클론 항체로 자극을 주었을 경우 파골세포 표지단백질인 TRAP 양성 파골세포의 형성이 억제되었다.

2. 활성화된 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포에서 RANKL을 발현하였으며 RANKL의 유사 수용체인 OPG 재조합 단백질을 처리하여 CD4⁺ 및 CD8⁺ T 세포의 세포증식이 억제되었다.

이 연구의 결과는 CD137 자극에 의한 T 세포활성 및 RANK 자극에 의한 파골세포분화 및 활성이 각각 수용체에 결합하는 라이겐드의 역신호에 의해 억제되었는데, 이는 파골세포와 T 세포의 과도한 활성을 제어하는 생체의 항상성조절에 관여하는 기전으로 생각된다.

참고문헌

1. Chambers TJ : Regulation of the differentiation and function of osteoclasts. *J Pathol*, 192:4-13, 2000.
2. Teitelbaum SL : Bone resorption by osteoclasts. *Science*, 289:1504-1508, 2000.
3. Rodan GA, Martin TJ : Therapeutic approaches to bone diseases. *Science*, 289:1508-1514, 2000.
4. Takahashi N, Yamana H, Yoshiki S, et al. : Osteoclast-like cell formation and its regulation by osteotropic hormones in mouse bone marrow cultures. *Endocrinology*, 122:1373-1382, 1988.
5. Khosla S : Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, 142: 5050-5055, 2001.
6. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, et al. : B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol*, 9:87-98, 2006.
7. Erciyas K, Orbak R, Kavrut F, et al. : The changes in T lymphocyte subsets following periodontal treatment in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol Res*, 41:165-170, 2006.
8. Brunetti G, Colucci S, Pignataro P, et al. : T cells support osteoclastogenesis in an in vitro model derived from human periodontitis patients. *J Periodontol*, 76:1675-1680, 2005.
9. Sun Y, Blink SE, Liu W, et al. : Inhibition of Th2-mediated allergic airway inflammatory disease by CD137 costimulation. *J Immunol*, 177:814-821, 2006.
10. Lee HW, Park SJ, Choi BK, et al. : 4-1BB promotes the survival of CD8⁺ T lymphocytes by increasing expression of Bcl-xL and Bfl-1. *J Immunol*, 169:4882-4888, 2002.
11. Lee HW, Nam KO, Park SJ, et al. : 4-1BB

- enhances CD8⁺ T cell expansion by regulating cell cycle progression through changes in expression of cyclins D and E and cyclin-dependent kinase inhibitor p27kip1. *Eur J Immunol*, 33:2133-2141, 2003.
12. Lee HW, Nam KO, Seo SK, et al. : 4-1BB cross-linking enhances the survival and cell cycle progression of CD4 T lymphocytes. *Cell Immunol*, 223:143-150, 2003.
 13. Nam KO, Kang H, Shin SM, et al. : Cross-linking of 4-1BB activates TCR-signaling pathways in CD8⁺ T lymphocytes. *J Immunol*, 174: 1898-1905, 2005.
 14. Saito K, Ohara N, Hotokezaka H, et al. : Infection-induced upregulation of the costimulatory molecule 4-1BB in osteoblastic cells and its inhibitory effect on M-CSF/RANKL-induced in vitro osteoclastogenesis. *J Biol Chem*, 279:13555-13563, 2004.
 15. Watts AD, Hunt NH, Wanigasekara Y, et al. : A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumour necrosis factor ligand family is implicated in 'reverse signalling'. *EMBO J*, 18:2119-2126, 1999.
 16. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. : Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 95:3597-3602, 1998.
 17. Lacey DL, Timms E, Tan HL, et al. : Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 93:165-176, 1998.
 18. Nakagawa N, Kinosaki M, Yamaguchi K, et al. : RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 253:395-400, 1998.
 19. Marks SC Jr : Osteoclast biology: Lessons from mammalian mutations. *Am. J Med Genet*, 34:43-53 1989.
 20. McLean W, Olsen BR : Mouse models of abnormal skeletal development and homeostasis. *Trends Genet*, 17:S38-S43, 2001.
 21. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, et al. : Osteoprotegerin: A novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, 89:309-319, 1997.
 22. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. : Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): A mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinology*, 139:1329-1337, 1998.
 23. Morony S, Capparelli C, Lee R, et al. : A chimeric form of osteoprotegerin inhibits hypercalcemia and bone resorption induced by IL-1, TNF-alpha, PTH, PTHrP, and 1,25(OH)2D3. *J Bone Miner Res*, 14:1478-1485, 1999.
 24. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. : A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 390:175-179, 1997.
 25. Li J, Sarosi I, Yan XQ, et al. : RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:1566-1571, 2000.
 26. Hofbauer LC, Khosla S, Dunstan CR, et al. : The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption. *J Bone Miner Res*, 15:2-12, 2000.
 27. Theill LE, Boyle WJ, Penninger JM : RANK-L and RANK: T cells, bone loss, and mammalian evolution. *Annu Rev Immunol*, 20:795-823, 2002.
 28. Udagawa N, Takahashi N, Yasuda H, et al. : Osteoprotegerin produced by osteoblasts is an impor-

Abstract

STUDY ON THE REGULATION OF OSTEOCLAST AND T CELL ACTIVATION VIA CELL MEMBRANE PROTEINS OF TNF FAMILY, CD137 LIGAND AND RANK LIGAND

Sung-Joon Hong*, Jae-Hong Park*, Hyeon-Woo Lee**, Keung-Ho Lee*

Department of Pediatric Dentistry, Department of Pharmacology**
and Institute of Oral Biology, School of Dentistry, Kyung Hee University*

Resorption of alveolar bone in periodontitis is due to excessive differentiation and activation of osteoclasts. Bacterial antigens causing periodontitis activates CD4 T cells, which leads to expressing RANKL on CD4 T cells. RANKL binds RANK on preosteoclasts or osteoclasts, and enhances the differentiation preosteoclasts into osteoclasts and the activation of mature osteoclasts. CD137, one of TNF receptor (TNFR) family, expressed on activated T cells binds with CD137 ligand (CD137L) on antigen presenting cells. Cross-linking of CD137 by CD137L acts as T cell co-stimulatory signals and, therefore, enhances the activation of T cell. In this study, I elucidated the biological responses of CD137L on (pre)osteoclasts and RANKL on T cells in the context of in vivo interaction between T cells and osteoclasts. RAW264.7, murine monocytic cells, constitutively express CD137L. Ligation of CD137L with anti-CD137L mAb inhibited RANKL-induced osteoclast formation in a dose-dependent manner. Bone marrow cells are expressed CD137L by the treatment with M-CSF. Cross-linking of CD137L abolished M-CSF/ RANKL-evoked the formation of multi-nucleated osteoclasts. Both mouse CD4 and CD8 T cells are expressed RANKL following their activation. Ligation of RANKL with OPG, the decoy receptor for RANKL, inhibited both CD4 and CD8 T cell proliferation. These effects were attributed to RANKL-induced apoptosis. These data indicate that CD137L and RANKL on osteoclasts and T cells, respectively provide them with inhibitory signal.

Key words : RANKL, CD137L, Osteoclast, T lymphocyte