

# 류마티스관절염에서 활막세포를 매개로 하는 관절파괴 기전 규명과 이를 응용한 치료제 개발

전북대학교 의학전문대학원 내과학교실

류 완 희

## 서 론

류마티스 관절염은 관절을 침범하는 만성 전신성 염증성 질환으로 병리학적으로 활막의 비후 및 염증세포 침윤과 이로 인한 관절의 파괴를 특징으로 한다<sup>1)</sup>. 초기에는 면역 반응에 의해 T림프구가 활성화되고 이로 인해 염증 반응이 시작되는 것으로 생각되지만, 질환이 진행되고 말기로 갈수록 T림프구의 영향력은 감소하고 활막세포의 비정상적 증식 및 활성화로 인해 나타나는 연골 파괴 분해효소 및 골 파괴인자의 활성화로 인해 관절 파괴가 지속적으로 나타나게 된다<sup>2, 3)</sup>. 따라서 활막세포의 활성화의 기전을 이해하고 이에 따른 관절파괴의 기전을 이해하는 것은 향후 류마티스 관절염 치료제 개발에 중요한 것으로 생각된다. 활막에 존재하는 세포는 매우 다양한데, 림프구를 비롯하여, 대식세포, 단핵구, 섬유모세포, 중성구, NK세포, 비만세포 등 매우 다양하다<sup>4, 6)</sup>. 류마티스 관절염의 발생은 이런 다양한 세포의 상호 작용에 의해 복잡하게 일어나고, 이것이 류마티스 관절염의 다양한 증상과 관련이 있다. 자가면역과 염증으로 특징 지워지는 류마티스 관절염의 병태생리가 최근 연구 결과에 의해 활막내 섬유모세포의 역할이 더욱 강조되는 개념으로 바뀌고 있다<sup>5, 7)</sup>. 본 연구에서는 이러한 다양한 세포 중에서 섬유모세포양 활막세포 (fibroblast like synoviocytes, FLS)에 의한 관절의 파괴에 관한 새로운 기전을 규명하고 이를 조절하는 물질을 찾아내고자 하였다.

### 1. 활막세포의 관절 파괴 역할

RA-FLS는 기질금속단백분해효소(matrix metalloproteinase, MMP)와 cathepsin 이라는 효소 분비를 통해 관절의 연골 기질을 파괴시키는 것으로 알려져 있다<sup>8)</sup>. MMP는 약 19종의 다양한 효소로 구성되며 크게 collagenase, gelatinase, stromelysin, membrane type MMP (MT-MMP)의 4가지로 구분할 수 있다. Collagenase-1 (MMP-1), collagenase-2 (MMP-8),

collagenase-3 (MMP-13)이 원형 콜라겐을 파괴시키는 주요 collagenase이며 활막 및 활액내에 다수 분포한다. Stromelysin (MMP-3)는 proteoglycan, type IV, IX collagen, denatured type I, II collagen을 분해하는 중요한 효소로 관절 기질 분해에서 중요한 역할을 담당할 뿐 아니라 다른 collagenase활성에도 많은 영향을 미친다<sup>9)</sup>. Stromelysin, collagenase 모두 활막 내막 층에 많이 분포하고, FLS에서도 기본적인 양이 분비되지만, IL-1, TNF-alpha 같은 사이토카인 자극에 의해 정상 및 골관절염 FLS에 비해 훨씬 더 많은 양이 분비된다. 최근 밝혀진 MT-MMP는 활막내막층내 FLS에서 발현되며, MMP-2, MMP-13 같은 다른 MMP 활성화에도 영향을 미치며, 특히 MT1-MMP의 경우는 FLS, 대식세포 뿐 아니라 파골세포(osteoclasts)에서도 발현되어 연골 및 골파괴 모두에 관여한다<sup>10)</sup>. Cathepsin은 cystein protease의 일종으로 콜라겐 뿐 아니라 proteoglycan, fibronectin, laminin, fibrinogen 등을 분해하는 효소로 Cathepsin B, L 은 ras 같은 protooncogene에 의해 활성화되어 FLS에서 분비되며 류마티스 관절염의 활막 조직의 연골을 침투하는 부위에 주로 발현된다<sup>11)</sup>. IL-1, TNF-alpha 역시 FLS에서 cathepsin B, L 생성 및 분비 증가에 관여한다. Cathepsin-K는 원형 콜라겐을 분해하는 새로운 효소로 밝혀졌으며 골 흡수 및 demineralization에도 관여하는 물질로 주로 파골세포에 의해 분비되지만 RA-FLS에서도 생성되어 연골 및 골 파괴에 직접적 영향을 미친다<sup>12)</sup>.

### 2. 관절내 활막세포와 다른 세포와의 상호작용에 의한 관절 파괴

RA-FLS는 단독적으로 관절 파괴에 관여하지만 활막내 존재하는 대식세포, 림프구 등과 상호 작용을 통해 간접적으로 병태생리에 중요한 영향을 미친다. RA-FLS는 활막 내막층에서 대식세포, 단핵구 등을 활성화하여 골흡수 역할을 담당하는 파골세포로 분화시킨다<sup>13)</sup>. IL-1, TNF-alpha 등

의 염증성 사이토카인에 의해 RA-FLS에서 분비되는 RANKL (receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand)이 단핵구를 분화시켜 골 흡수를 촉진시키는 세포로 발전시켜 직접적으로 MMP 분비를 통해 연골 파괴를 촉진함과 동시에 골 파괴를 간접적으로 유도함으로 류마티스 관절염의 관절 파괴의 병인에 중요한 역할을 담당한다. 최근에는 이러한 IL-1 (Anakinra), TNF- $\alpha$  (Etanercept, Adalimumab, Infliximab), IL-6 (Antihuman IL-6 Receptor Antibody, Tocilizumab)에 대한 항체가 치료제로 이용되고 있다. 대식세포와 FLS는 CD95-CD55, CD40-CD40L 등 표식자들의 결합에 의해 상호작용이 이루어짐이 실험적으로 증명되었다<sup>14)</sup>.

### 3. OPG/RANK/RANKL 시스템과 관절 파괴

지난 10년간은 뼈생물학(bone biology) 분야의 획기적인 연구 성과가 있었으며 특히 OPG/RANK/RANKL 시스템의 발견은 류마티스 관절염과 골다공증의 병인을 새로운 각도로 이해할 수 있게 해준 중요한 결과이다. RANK는 TNF receptor family의 단백질로서 파골세포 및 파골세포의 전구 세포(precursor cells), 연골세포, 수지상 세포, 활성화된 T 림프구 및 골수 전구세포 등에서 발현되며, 뼈세포 활성화에서 결정적인 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 또한 최근에 이르러 RANK ligand (RANKL)에 대한 세포반응 및 하위 신호 전달체계에 대한 보고가 급격히 늘어나고 있다. RANKL은 RANKL은 골모세포(osteoblast), 파골세포, 내피세포(endothelial cell) 및 활성화된 T 림프구, 미성숙된 CD4/CD8 림프구와 활막세포에서 발현되며, 파골세포 및 파골세포 전구 세포에 발현된 RANK와 결합조혈모세포 및 단핵구세포에서 성숙한 파골세포로의 분화를 유도하며<sup>15, 16)</sup>, 성숙한 파골세포의 생존기간을 증가시킨다. 이러한 RANKL에 대한 항체(Denosumab)가 류마티스 관절염과 골다공증 등에 사용될 수 있을 것으로 기대된다. Signal에 의한 세포 반응은 크게 TNF receptor-associated factor protein (TRAFs)의 recruitment, transcription factor의 활성화(NF- $\kappa$ B, AP-1, NFAT2), MAPK pathway의 활성화(ERK, JNK, p38), 그리고 src 및 Akt의 활성화로 요약될 수 있다. Osteoprotegerin (OPG)은 RANKL에 결합하는 soluble decoy receptor로서 RANKL signal을 차단하는 효과를 가지며 따라서 성숙한 파골세포로의 분화를 저해한다. 이와 같은 OPG/RANK/RANKL 시스템은 bone biology의 기본적인 패러다임을 제공해 주고 있을 뿐만 아니라, 뼈질환 치료를 위한 신약 후보 물질을 발굴하는 데에도 중요한 단서를 제공해 주고 있다. 특히 류마티스 관절염

에서 활성화된 T림프구 등의 염증세포와 활막세포에서 분비된 RANKL가 파골세포의 분화와 활성화를 통해 관절의 파괴를 일으키는 데 중요한 역할을 담당하며, RANKL를 표적으로 하는 생물학제제의 개발에 기여하게 되었다.

### 4. T림프구에 의한 활막세포의 활성화와 관절의 파괴 기전

류마티스 관절염은 다양한 염증세포간의 복잡한 반응에 의해 일어나며 이러한 세포-세포간의 상호 반응 중에서 활막세포와 T림프구간의 상호 반응은 병인에 중요한 역할을 담당한다. 이러한 세포간의 상호반응은 사이토카인이나 케모카인의 분비를 통하거나 세포표면에 발현하는 표지자간의 결합에 의해서 일어날 수 있다. 이중에서 T림프구에 발현하는 CD40L과 활막세포에 발현하는 CD40은 이들 세포의 활성화에 의해서 발현이 증가한다. CD40-CD40L에 의한 활막세포의 활성화는 유착분자의 발현, MMP, 혈관 내피세포 성장인자 (vascular endothelial growth factor, VEGF)를 유도하고 IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6 등 류마티스관절염의 병인에 중요한 역할을 담당하는 사이토카인의 생성을 증가시킨다<sup>17-22)</sup>.

본 연구자는 활성화된 T림프구가 파골세포의 분화와 활성화에 직접 미치는 영향 이외에 류마티스 관절염의 병인에 중요한 역할을 담당하는 활막세포와의 상호작용에 의해 활막세포의 활성화를 통해서 파골세포의 분화와 활성화에 미치는 영향을 규명하기 위해서 류마티스 관절염 환자의 활막세포를 배양하고 T림프구와 mouse fibroblast를 이용하여 CD40L을 인위적으로 발현시키고 이 세포의 세포막에 발현한 CD40L과 이 세포를 직접 이용하여 CD40-CD40L 반응을 유발하여 활막세포의 변화를 관찰하였다. CD40L (+) mouse fibroblast의 세포막에서 얻은 CD40L과 CD40L (+) mouse fibroblast는 류마티스 관절염 환자의 활막세포에서 파골세포의 분화와 활성화에 관여하는 RANKL mRNA 및 단백질의 발현을 증가시키고 이를 통해 파골세포의 생성을 증가함을 발견할 수 있었고, 이러한 효과는 CD40에 대한 항체 및 OPG에 의해 억제 됨을 확인하여 T림프구와 활막세포 사이의 상호 반응에 의한 파골세포의 분화와 활성이 OPG/RANK/RANKL 시스템을 이용하여 일어남을 확인하였다. 이러한 변화는 활성화된 T림프구를 직접 이용하여 시행한 방법에서도 활막세포에서 파골세포의 분화와 활성화에 관여하는 RANKL mRNA 및 단백질의 발현을 증가시키고 이를 통해 파골세포의 생성을 증가함을 발견할 수 있었고, 이러한 효과는 CD40에 대한 항체 및 OPG에 의해 억제

됨을 확인할 수 있었다. 특히 이러한 변화는 파골세포의 분화와 활성화에 관여하는 사이토카인의 생성에 관계없이 일어났으며, 이는 세포내의 중요한 신호전달체계인 NF- $\kappa$ B의 활성화를 통해서 일어남을 알 수 있었다. 본 연구 결과는 류마티스 관절염에서 관절의 파괴에 관여하는 OPG/RANK/RANKL 시스템의 활성화에 활성화된 T림프구나 IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17 등 사이토카인 이외에 CD40-CD40L를 이용한 활성화된 T림프구와 활막세포와의 상호 반응에 의해 활성화된 활막세포에 의한 OPG/RANK/RANKL 시스템을 통한 파골세포의 분화와 활성화가 관여함을 규명하였고 이는 CD40-CD40L 반응을 억제할 수 있는 방법이 류마티스 관절염의 관절의 파괴를 억제할 수 있는 방법이 될 수 있다는 이론적 근거를 제시할 수 있게 하였다.

#### 5. Adrenomedullin등이 활막세포에 의한 파골세포에 미치는 효과 및 치료제로서의 가능성

Adrenomedullin (AM)은 Kitamura 등에 의해 처음 기술된 52-amino acid의 peptide로서<sup>23)</sup>, 여러 보고에서 류마티스 관절염의 병인에 관련이 있을 것으로 제시되었다. 류마티스 관절염 환자에서 퇴행성 관절염 환자에 비해 활막액과 혈장내에서의 AM이 증가해 있음을 보고하여 류마티스 관절염의 병인에 관련이 있음을 제시하였다<sup>24)</sup>. AM은 혈관신생 과정에 관여하며<sup>25)</sup>, 사이토카인에 의한 중성구의 화학주성 물질의 생성을 억제하는 것으로 보고되었다<sup>26)</sup>. AM은 또한 LPS에 의해 활막세포에서 TNF- $\alpha$ , IL-6의 분비를 억제한다<sup>27, 28)</sup>. 이와 같이 AM의 여러 가지 면역기전에 대한 관련성이 알려져 있음에도 불구하고 류마티스 관절염의 병인에 미치는 역할에 대해서는 알려진 것이 없다. 본 연구자는 활막세포에 의한 파골세포의 생성을 표적으로 하는 새로운 물질의 개발을 위하여 생리적인 neuroendocrine 인자인 AM의 효과를 조사하기 연구를 시행하였다. 활막세포에서 활막세포의 분화와 활성화에 영향을 주는 OPG/RANK/RANKL 시스템에 관여하며 류마티스 관절염에서 중요한 역할을 담당하는 사이토카인인 IL-1을 이용하여 활막세포에서 OPG/RANK/RANKL에 미치는 영향과 파골세포의 분화와 활성화에 미치는 영향을 조사하였다. IL-1은 활막세포에서 OPG/RANK/RANKL 시스템을 활성화하였으며 파골세포의 분화와 활성화를 증가시켰다. AM은 IL-1에 의한 OPG/RANK/RANKL 시스템을 활성화하였으며 파골세포의 분화와 활성화를 억제하였고 이는 세포내의 신호전달물질인, p38, JNK, erk 등의 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK)를 통해

서 일어남을 밝혀냈다. 특히, AM은 기존의 면역억제제가 갖는 다양한 부작용을 갖지 않고 안전하게 사용할 수 있는 장점이 있어 이물질의 임상적인 유용성과 안전성에 대한 연구가 필요하다. 본 연구자는 이러한 류마티스 관절염의 관절 파괴의 기전을 규명할 수 있는 연구기반을 갖추고 있고, 다양한 천연물질을 이용할 수 있어 이를 이용한 류마티스 관절염의 관절의 파괴를 조절할 수 있는 물질을 탐색하고 이를 임상에서 이용될 수 있는지에 대한 연구가 필요하다.

## 결론

류마티스 관절염은 만성 염증성 질환으로 관절의 파괴에 의한 장애를 초래하는 질환이며, 최근 새로운 치료제의 개발로 보다 효율적인 관리가 가능해 졌지만 비용, 부작용 등의 문제점을 갖고 있다. 따라서 관절파괴에 대한 새로운 병인의 규명과 이를 표적으로 한 새로운 치료제의 개발이 절실한 실정이다. 본 연구자는 세포간의 상호반응 중에서 T림프구와 활막세포간의 CD40-CD40L 반응에 의한 파골세포의 분화와 활성화가 발생하는 새로운 기전을 규명하여 이를 이용한 치료제 개발에 대한 기초적인 근거를 제시해 주었으며, AM을 이용하여 부작용이 적은 물질을 이용하여 새로운 치료제로 이용할 수 있음을 보여 주었다. 현재 류마티스 관절염의 치료에 이용되는 다양한 치료제가 갖는 가장 중요한 문제점인 다양하고 심각한 부작용을 갖지 않으며 보다 효과적인 치료제의 개발에 대한 연구가 더욱 필요하다.

## REFERENCES

- 1) Bresnihan B, Tak PP, Emery P, Klareskog L, Breedveld F. *Synovial biopsy in arthritis research: five years of concerted European collaboration. Ann Rheum Dis 59:506-11, 2000*
- 2) Firestein GS. *Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? Arthritis Rheum 39:1781-90, 1996*
- 3) Firestein GS, Zvaifler NJ. *How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis?: II. T cell-independent mechanisms from beginning to end. Arthritis Rheum 46:298-308, 2002*
- 4) Pando JA, Duray P, Yarboro C, Gourley MF, Klippel JH, Schumacher HR. *Synovitis occurs in some clinically normal and asymptomatic joints in patients with early arthritis. J Rheumatol 27:1848-54, 2000*
- 5) Firestein GS. *Evolving concepts of rheumatoid arthritis. Nature 423:356-61, 2003*
- 6) Firestein GS, Zvaifler NJ. *How important are T cells in chronic rheumatoid synovitis? Arthritis Rheum 33:768-73, 1990*

- 7) Pap T, Muller-Ladner U, Gay RE, Gay S. *Fibroblast biology. Role of synovial fibroblasts in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. Arthritis Res* 2:361-7, 2000
- 8) Kikuchi H, Shimada W, Nonaka T, Ueshima S, Tanaka S. *Significance of serine proteinase and matrix metalloproteinase systems in the destruction of human articular cartilage. Clin Exp Pharmacol Physiol* 23:885-9, 1996
- 9) Unemori EN, Bair MJ, Bauer EA, Amento EP. *Stromelysin expression regulates collagenase activation in human fibroblasts. Dissociable control of two metalloproteinases by interferon-gamma. J Biol Chem* 266:23477-82, 1991
- 10) Pap T, Shigeyama Y, Kuchen S, et al. *Differential expression pattern of membrane-type matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum* 43:1226-32, 2000
- 11) Cunnane G, FitzGerald O, Hummel KM, Gay RE, Gay S, Bresnihan B. *Collagenase, cathepsin B and cathepsin L gene expression in the synovial membrane of patients with early inflammatory arthritis. Rheumatology (Oxford)* 38:34-42, 1999
- 12) Hummel KM, Petrow PK, Franz JK, et al. *Cysteine proteinase cathepsin K mRNA is expressed in synovium of patients with rheumatoid arthritis and is detected at sites of synovial bone destruction. J Rheumatol* 25:1887-94, 1998
- 13) Goldring SR, Gravallese EM. *Mechanisms of bone loss in inflammatory arthritis: diagnosis and therapeutic implications. Arthritis Res* 2:33-7, 2000
- 14) Hamann J, Wishaupt JO, van Lier RA, Smeets TJ, Breedveld FC, Tak PP. *Expression of the activation antigen CD97 and its ligand CD55 in rheumatoid synovial tissue. Arthritis Rheum* 42:650-8, 1999
- 15) Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Gurgess T, et al. *Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. Cell* 93:165-76, 1998
- 16) Kim N, Odgren PR, Kim DK, Marks SC Jr, Choi Y. *Diverse roles of the tumor necrosis factor family member TRANCE deficiency and partial rescue by a lymphocyte-expressed TRANCE transgene. Proc Natl Acad Sci USA* 97:10905-10, 2000
- 17) MK Han, JS Kim, BH Park, JR Kim, BY Hwang, HY Lee, et al. *NF- $\kappa$ B-dependent lymphocyte hyperadhesiveness to synovial fibroblasts by hypoxia and reoxygenation: potential role in rheumatoid arthritis. J Leukoc Biol* 73:525-9, 2003
- 18) Kiener PA, Moran-Davis P, Rankin BM, Wahl AF, Aruffo A, Hollenbaugh D. *Stimulation of CD40 with purified soluble gp39 induces proinflammatory responses in human monocytes. J Immunol* 155:4917-25, 1995
- 19) Yellin MJ, Sinning J, Covey LR, Sherman W, Lee JJ, Glickman-Nir E, et al. *T lymphocyte T cell-B cell-activating molecule/CD40-L molecules induce normal B cells or chronic lymphocytic leukemia B cells to express CD80 (B7/BB-1) and enhance their costimulatory activity. J Immunol* 153:666-74, 1994
- 20) Sekine C, Yagita H, Miyasaka N, Okumura K. *Expression and function of CD40 in rheumatoid arthritis synovium. J Rheumatol* 25:1048-53, 1998
- 21) Malik N, Greenfield BW, Wahl AF, Kiener PA. *Activation of human monocytes through CD40 induces matrix metalloproteinases. J Immunol* 156:3952-60, 1996
- 22) Grewal IS, Flavell RA. *The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. Immunol Rev* 153:85-106, 1996
- 23) Kitamura K, Kangawa K, Kawamoto M, et al. *Adrenomedullin: a novel hypotensive peptide isolated from human pheochromocytoma. Biochem Biophys Res Commun* 192:553-60, 1993
- 24) Chosa E, Hamada H, Kitamura K, et al. *Increased plasma and joint tissue adrenomedullin concentrations in patients with rheumatoid arthritis compared to those with osteoarthritis. J Rheumatol* 30:2553-6, 2003
- 25) Kato H, Shichiri M, Marumo F, et al. *Adrenomedullin as an autocrine/paracrine apoptosis survival factor for rat endothelial cells. Endocrinology* 138:2615-20, 1997
- 26) Kamoi H, Kanazawa H, Hirata K, et al. *Otani S. Adrenomedullin inhibits the secretion of cytokine-induced neutrophil chemoattractant, a member of the interleukin-8 family, from rat alveolar macrophages. Biochem Biophys Res Commun* 211:1031-5, 1995
- 27) Kubo A, Minamino N, Isumi Y, et al. *Production of adrenomedullin in a macrophage cell line and peritoneal macrophage. J Biol Chem* 273:16730-8, 1998
- 28) Nanke Y, Kotake S, Yonemoto K, et al. *Adrenomedullin in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis inhibits interleukin 6 production from synoviocytes. Ann Rheum Dis* 62:82-3, 2003