



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학 석사학위논문

류마티스관절염에서
SrlkB(Super repressor IκB)의 염증 억제
효과에 대한 연구

전남대학교 대학원

의과학과

이해인

2023년 2월

류마티스관절염에서
SrlκB(Super repressor IκB)의 염증 억제
효과에 대한 연구

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함

전남대학교 대학원
의과학과
이해인
지도교수 김태종

이해인의 의학 석사 학위논문을 인준함

심사위원장 권용수 (인)

심사위원 원은정 (인)

심사위원 김태종 (인)

2023년 2월

목 차

1. 국문 초록	1
2. 서 론	3
3. 연구대상 및 방법	5
4. 연구 결과	11
5. 고 찰	15
6. 결 론	19
7. 참고 문헌	20
8. 영문 초록	25
9. 표 및 그림	28

류마티스관절염에서 SrlkB(Super repressor IκB)의 염증 억제 효과에 대한 연구

이 해 인

전남대학교 대학원 의과학과

(지도교수: 김 태 중)

(국문 초록)

배경: 류마티스관절염 (Rheumatoid Arthritis, RA)은 손목, 손, 발, 무릎 등 관절에 영향을 미치는 만성자가면역질환이다. 본 연구의 목적은 NF-κB 억제제인 IκB 단백질의 항시활성형(dominant active) 돌연변이 형태인 Super repressor IκB가 탑재 되어있는 Exosome - super pressor IκB (Exo-srIκB)의 관절염억제 효과를 평가하는 것이다.

대상 및 방법: 본 연구에서는 건강한 대조군 (Health control, HC) (n=17), RA 환자의 말초혈액단핵세포 (Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC) (n=13) 및 활액단핵세포 (Synovial Fluid Mononuclear Cell, SFMC) (n=6)를 분리하여 실험을 진행하였고, Exo-srIκB (Ilias Biologics, Daejeon)를 사용하였다. PBMC 및 SFMC는 Exo-srIκB 1E+ 10pn을 3시간 동안 전처리 한 후 PMA 100ng/ml와 Ionomycin 1μM로 4시간 동안 자극하였다. 실시간 중합효소 연쇄반응 (Real Time PCR) 을 통해 IL-17A, IL-6, TNF-α, IL-1β, GM-CSF, IFN-γ, IL-10에 대

한 유전자 발현량을 확인하였고, 유세포분석 (Flow cytometry) 을 통해 IL-17A, GM-CSF 생성세포를 확인하였으며 IL-17A, IL-6, TNF- α 및 GM-CSF 단백질 생성 수준은 ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)로 측정하였다. 또한 SKG mouse에 Curdlan을 복강 내 주사하여 RA질환 마우스모델을 구축하였다. 증상이 발현된 후 Exo-naïve 또는 Exo-srIkB 1E+ 10pn를 복강 내 주사하여 관절 염증억제 효과를 살펴보고, 주 1회 관절상태를 관찰하여 점수로 환산하였다. 발목관절의 조직형태학적 소견은 H&E, Safranin-O 염색법으로 확인하였고, micro-computed tomography (CT)를 이용하여 관절 파괴 정도를 확인하였다.

결과: PBMC 및 SFMC를 이용한 생체 외 실험을 통해 Exo-srIkB 처리 하였을 때 IL-17A, IL-6, GM-CSF 유전자 발현량이 감소하였고, GM-CSF 생산세포가 유의하게 감소되었으며, TNF- α , IL-6, IL-17A, GM-CSF의 단백질 생성 수준도 유의하게 감소되었다. RA 질병 마우스 모델에서 Exo-srIkB 처리는 육안적으로 관절염 증상이 호전되었으며, 조직학적으로도 관절조직에서 Exo-naïve 처리 군에 비해 면역세포 침윤, 연골 파괴 및 뼈 침식 소견이 현저히 낮게 관찰되었고, 관절 파괴 정도도 감소되었다는 것을 micro-CT를 통해 관찰하였다. 또한 비장 세포에서 IFN- γ , IL-17A, TNF- α 생성세포 빈도가 감소하였고, 비장조직에서 유전자 발현량을 확인한 결과, IFN- γ , T-bet, GM-CSF의 유전자 발현량이 감소하였고, TGF- β 발현량이 증가됨을 확인하였다.

결론: Exo-srIkB 가 생체 외 환경에서 염증성 사이토카인을 억제 시킴을 확인하였으며, 동물모델을 이용한 생체 내 환경에서 관절 염증 억제 효과를 확인하였다. 따라서, IkB가 탑재된 엑소좀이 NF- κ B 신호의 조절로 인해 류마티스관절염 치료에 사용될 수 있으리라 생각된다.

서론

류마티스관절염 (Rheumatoid Arthritis, RA)은 만성 염증을 일으키는 대표적인 자가면역 및 염증성 질환이다 [1]. NF- κ B (Nuclear Factor kappa light chain enhancer of activated B cells) 신호 전달 경로는 RA에서 염증의 발달 및 조절에 관여하는데 [2], NF- κ B의 부적절한 조절은 염증 및 자가면역 질환과 밀접한 관련이 있다고 보고된 바 있다 [2, 3]. NF- κ B의 활성화는 RA 발병기전에서 전염증 및 항염증 효과를 모두 나타내는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. NF- κ B는 세포 안팎의 다양한 신호 분자에 의해 활성화되어 다양한 세포 내 인자 및 단백질의 분비를 촉진할 수 있다. 이때 NF- κ B는 염증유발 효과가 있어 RA를 악화시킬 수 있다. 많은 연구에서 세포 내 인자와 NF- κ B, 특히 IL(Interleukin)-6와 종양 괴사 인자 (Tumor Necrosis Factor, TNF)- α 가 상호 촉진 관계가 있음이 밝혀졌다 [4]. RA에서는 관절 부위에서 다양한 사이토카인과 케모카인이 증가하며 주로 IL-1, IL-6, IL-17A, GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor), TNF- α 등이 분비된다 [5]. 현재 치료제로 염증성 사이토카인을 억제하는 생물학적 제제나 스테로이드 치료를 하고 있지만 감염과 같은 부작용에 대한 새로운 치료 전략이 필요하다.

엑소솜은 일종의 세포 외 소포체, 세포가 외부로 방출하는 소포체로, 진핵생물이 세포 간 정보 교환을 위해 분비하는 나노미터 크기의 물질이다. Multivesicular body (MVB) 내부에 위치한 엑소솜은 MVB와 세포벽의 융합에 의해 세포 밖으로 배출된다 [6]. 배출된 엑소솜은 단백질, 지질, 핵산 등을 함유하고 있어 다른 세포와 융합해 내용물을 전달하며, 혈액 응고, 세포간 소통, 폐기

물 처리 등 생리적 과정에 특화된 기능을 갖고 있다. 엑소솜은 생체유래 물질이라는 점에서 나노 크기와 약물 전달 효과가 높으며 부작용이 적은 장점이 있으며, 생체 외 및 생체 내에서 강력한 세포 반응을 유도하는 능력을 가지고 있어 잠재적 치료제로 인정받고 있다 [7, 8].

본 연구에서는 인간 생체 외 실험과 RA 질병 마우스 모델을 이용한 생체 내 실험으로 NF- κ B 억제제인 I κ B 단백질의 항시활성형(dominant active) 돌연변이 형태인 super repressor I κ B가 탑재된 Exo-srI κ B의 항염증효과 및 메커니즘에 대해 알아보려고 하였다.

연구대상 및 방법

1. 실험대상

말초 혈액 단핵 세포 (Peripheral Blood Mononuclear Cell, PBMC)와 활액 단핵 세포 (Synovial Fluid Mononuclear Cell, SFMC)는 건강한 사람 (Health control, HC) 및 RA 환자에게서 얻었다. 환자의 인구통계학적 특성은 <Table 1>과 같다. 윤리위원회의 승인을 받았고, 모든 피험자로부터 서면 동의를 얻었다 (CNUH-2011-199).

2. NF- κ B 억제제 Super repressor I κ B을 포함한 엑소솜 (Exo-srI κ B)

HEK293T 세포 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA, CRL-3216)를 T175 플라스크에 접종하였다. 1일 후, 배지를 제거하고, PBS로 세포를 헹구고, 엑소솜이 없는 배지를 첨가하였다. 그런 다음 CO₂ 인큐베이터에서 460nm 청색조명에 노출하였다. 72시간 후, 세포 배양액을 수확하여 1000g에서 15분동안 원심분리하여 세포 및 세포 파편을 제거한 다음 0.22 μ m polyethersulfone 필터를 통해 여과하여 큰 입자를 제거 하였다. 엑소솜은 분자량 컷오프 멤브레인 필터 (molecular weight cutoff-based membrane filtration, MWCO)을 하여 분리되었고, 분리된 엑소솜은 유동여과 및 크기 배제 크로마토그래피 (SEC)에 의해 분리되었다 [9-11]. 위와 같은 엑소솜 분리 프로토콜에 따른 I κ B가 내제된 Exo-srI κ B (Ilias Biologics, Daejeon, South Korea)를 공급받아 연구를 시행하였다.

3. 세포 생존력 분석

세포 생존력 분석은 Cell Titer 96 AQueous One Solution Reagent (G3580, Promega, USA)로 수행하였다. 세포를 분주하고 표시된 시간 동안 다양한 농도의 Exo-sr1kB로 자극하였다. 제조사의 지시에 따라 20ul MTS 용액을 100ul 세포 배양 배지에 첨가하고 37°C에서 2-4시간 동안 배양하였다. 이후 Reader 96-well microplate reader (Molecular Devices, USA)를 이용하여 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 또한, 각 유세포 분석을 위해 전체 세포를 anti-Fixable Viability Dye-eFluor780 (65-0865-14, Invitrogen, USA)으로 표면 염색하여 확인하였다.

4. Exo-Sr1kB와 인간 염증 세포의 공동 배양

PBMC와 SFMC를 분리하고 RPMI1640 (welgene, LM011-01)에 10% Fetal Bovine Serum (welgene, S001-01)과 1% penicillin-streptomycin 용액 (welgene, LS202-02)으로 구성된 배지를 사용하였다. 세포를 5×10^5 cell/well의 밀도로 96well 플레이트에 접종하고 세포를 안정시키기 위해 CO₂, 37°C 인큐베이터에 하루 동안 배양한 후 세포를 Exo-sr1kB로 3시간 동안 전처리하고, PMA (Phorbol 12-Myristate 13-acetate 1mg, SIG-P1585) 100ng/ml, Ionomycin (1mg, SIG-I9657) 1uM, Brefeldin A (BD Golgiplug-protein transport inhibitor, Cat. 55529)를 첨가한 후, CO₂, 37°C 인큐베이터에서 4시간 동안 자극하였다.

5. RNA 추출 및 cDNA 합성과 면역 사이토카인 유전자 발현량 측정

RNA추출을 위해 BFA를 제외한 자극된 세포를 QIAzol Lysis Reagent (79306,

Valencia, CA)로 세포막을 부수고, RA 질병 마우스 모델에서 얻은 비장조직은 Lysis Reagent에 넣어 호모제나이저로 갈아주었다. Chloroform (SIG-C2432) 을 사용하여 페놀을 최대한 제거해준다. 그 후에 헥산의 탈수반응을 유도하여 pellet을 침전시키기 위해서는 아이소프로필 알코올 (isopropyl alcohol)을 첨가 하고 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 75% ethanol로 pellet에 isopropyl alcohol 을 포함한 다른 염을 용해해준다. 이렇게 얻은 RNA를 Colibri spectrometer (Berthold Detection Systems GmbH, Pforzheim, Germany)로 260nm와 280nm 에서의 흡광도비 (260/280 absorption ratio)로 농도를 확인하고, QuantiTect Reverse Transcription kit (TaKaRa, Shiga, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 염증과 관련된 사이토카인의 상대적인 mRNA 발현을 정량적으로 분석하기 위해 실시간 중합효소 연쇄반응 (Real-time PCR)을 수행하였다. 각 반응에 사용된 사이토카인 primer쌍과 대조 유전자 primer쌍은 다음과 같다 (Table 2). QuantiTect SYBR Green PCR kit (TaKaRa, Shiga, Japan)를 사용하여 각 샘플에 대해 2회 Real Time PCR을 수행하였다. 각 유전자의 정량을 위해 β -actin control 유전자를 이용하여 보정된 값을 ΔCt 값으로 산정하고, ΔCt 값의 1/2 제곱의 제곱한 후 1,000을 곱한 값을 $\Delta\Delta Ct$ 값으로 산정하였다

6. 면역 사이토카인 유세포 분석

Exo-sr1kB와 함께 자극된 세포를 anti-Fixable Viability Dye-eFuer780 (65-0865-14, Invitrogen, USA), APC-conjugated anti-IL-17A (512334, BioLegend, USA), Cynine5.5-conjugated anti-GM-CSF (502312, BioLegend, USA)등의 항체로 염색하였다. 그런 다음 유세포 분석기 (Navios Flow Cytometer, Beckman

Coulter)를 이용하여 분석한 후, FlowJo Software (BD, USA)로 분석하였다.

7. 면역 사이토카인 단백질 발현량 측정

면역 사이토카인 단백질 발현량을 측정하기 위해 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)을 실시하였다. Human IL-17A ELISA (88-7176, Invitrogen, Austria), Human IL-6 ELISA (88-7066, Invitrogen, Austria), Human TNF- α ELISA (88-7344, Invitrogen, Austria) 및 Human GM-CSF ELISA (K0331120, LABISKOMA, Korea)로 자극된 세포의 배양액을 이용하여 SpectraMax® M2 (Molecular Devices Corp., USA)로 단백질 발현량을 450nm 흡광도로 측정하였다.

8. RA 질병 마우스 모델

모든 실험은 기관 동물 관리 및 사용 위원회 (CNU IACUC-H-2021-17)의 승인을 받아 수행하였다. BALB/c 배경의 SKG 마우스는 Clea Japan (Tokyo, Japan)에서 구입하여 특정 병원체가 없는 시설 (SPF 시설)에서 사육하였다. 본 연구에서는 암컷 마우스를 사용하였으며, Exo-naïve 처리군 (n=9마우스), Exo-SrIkB 처리군 (n=9마우스)의 2개의 군으로 구성하였다. RA 질병 모델 마우스를 구축하기 위해 3mg/kg의 Curdlan 현탁액 (Wako, Osaka, Japan)을 Exo-naïve과 Exo-SrIkB 처리군 모두 11주령 마우스에 복강 내 (i.p.) 주사하였다. Curdlan 주입 후 증상이 나타나기 시작한 후 치료를 시작하였다. Exo-naïve와 Exo-SrIkB 1E+10pn/0.2ml로 주사하였다. 그런 다음 희생될 때까지 동일한 용량을 일주일에 세 번 주사하였다. 마우스의 임상 징후는 일주일에 한 번 모니터링하고 점수

를 측정하였다. 영향을 받은 관절의 점수는 다음과 같이 합산되었다: (0 = 무증상, 1 = 발목이나 발가락이 약간 부어오름, 2 = 발목이 심하게 부어오름, 3 = 발목이 심하게 부어서 발가락이 부어오름, 4 = 발목과 발가락이 부어서 비틀림). 최대 점수를 16점으로 하여 측정하였다 [12].

9. 마이크로 컴퓨터 단층 촬영 분석

관절 파괴 정도를 확인하기 위해 1.5% isoflurane/O₂를 흡입하여 마우스를 마취하고, PET-CT (SEDECAL, SuperArgus PET/CT 4r, Spain)를 사용하여 스캔하였다. 다음 CT 매개변수가 사용되었다: 에너지/강도 40kV, 전류 500 μ A, 샘플 시간 40ms, 해상도 768 x 972픽셀. 위 방법을 통해 얻은 이미지로 관절 파괴 정도를 확인하여 정량하였다 [13].

10. 마우스 비장세포 분리와 유세포분석

실험 종료 후 마우스의 비장을 분리하여 petri dish에서 으개서 세포를 분리해 준다. 70 μ M strainer 에서 여과시켜준 후 ACK lysing buffer를 이용하여 적혈구를 용해시켜 준다. 그 다음 40 μ M strainer에 불순물을 한번 더 걸러준 후 0.5% BSA에 넣어 4°C에 하루 보관한 후 다음날 실험을 진행하였다. 비장세포는 APC anti-mouse CD4 Antibody (100412, BioLegend, USA), FITC anti mouse IFN- γ Antibody (505806, BioLegend, USA), PE anti mouse IL-17A Antibody (506904, BioLegend, USA), APC/Cy7 anti-mouse TNF- α antibody (506344, BioLegend, USA)로 염색하였다. 그런 다음 유세포 분석기 (Navios Flow Cytometer, Beckman Coulter)를 이용하여 분석한 후, FlowJo Software (BD, USA)로 분석하

였다.

11. 관절 조직학적 분석

실험 종료 후 마우스의 발목 샘플을 채취하여 Hematoxylin & Eosin 방법을 사용하여 조직학적 차이를 확인하였으며, 연골 파괴 정도를 확인하기 위하여 Safranin-O 염색을 시행하였다. 마우스의 발목을 10% 포르말린으로 고정 후 37°C에서 교반기 (FINEPCR, Korea) 에서 1주일 동안 흔들어 준 후 파라핀에 포매하였다. 파라핀 블록을 3.5 μ m 두께로 절단하고 neo-clear (109843, Merck, USA)에서 탈파라핀화, 등급 에탄올로 수화하고, hematoxylin (105174, Merck, USA) 및 eosin (HT110216, Sigma, USA)으로 염색하였다. 또한 연골 파괴 정도를 확인하기 위해 관절에 Safranin-O 염색을 시행하였다. 모든 염색 절차 및 관절염 점수는 이전 보고된 논문의 프로토콜을 따랐다 [14].

12. 통계 분석

통계 분석은 Prism 9.4.1 Software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)를 사용하여 수행되었다. 평균 간의 차이의 통계적 유의성은 Kruskal-Wallis test, Dunn`s multiple comparisons, T-test, Wilcoxon matched-pairs signed rank test, two-way Analysis of variance (ANOVA) 및 Mann-Whitney test 을 사용하여 평가하였다. 모든 그래프에 대해 0.05 미만의 p 값은 유의미한 것으로 간주되어 다음과 같이 표시되었다. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ 및 *** $p < 0.001$

연구 결과

1. Exo-SrlkB 처리의 세포 생존력 분석

세포 생존력 분석을 위해 7, 24 및 48시간 동안 PBMC에 Exo-SrlkB 1E+10pn 처리 후 MTS로 분석하였다. 그 결과, Exo-SrlkB가 세포 생존에 유의한 영향을 미치지 않았음을 확인하였다 (Figure 1A). 유세포 분석 게이팅 전략에 따라 Exo-SrlkB에 의한 세포 생존율을 다음과 같이 확인하였다 (Figure 1B). 살아있는 세포를 염색하여 PBMC 및 SFMC의 세포 생존율이 감소하지 않음을 확인하였다 (Figure 1C).

2. Exo-SrlkB 의한 인간 PBMC 및 SFMC의 염증성 사이토카인 유전자 발현 분석

HC PBMC의 IL-17, IL-6, GM-CSF 유전자 발현은 Exo-SrlkB 처리군에서 유의하게 감소하였다 (3513 ± 2225 vs. 2017 ± 1079 , $p = 0.016$; 168.8 ± 55.92 vs. 84.60 ± 35.81 , $p = 0.016$; 8713 ± 4309 vs. 6682 ± 3371 , $p = 0.047$) (Figure 2A). RA PBMC의 IL-6, GM-CSF 유전자 발현은 Exo-SrlkB 처리군에서 유의하게 감소하였다 (734.4 ± 526.2 vs. 270.2 ± 170.1 , $p = 0.031$; 2074 ± 1637 vs. 719.7 ± 446.9 , $p = 0.047$). IL-17, TNF- α 유전자 발현은 유의한 차이를 보이지 않았으나 Exo-SrlkB 처리군에서 감소하는 패턴을 확인할 수 있었다 (5462 ± 1037 vs. 4090 ± 1018 , $p = 0.094$; 526.1 ± 156.7 vs. 330.7 ± 86.82 , $p = 0.078$) (Figure 2B).

3. 인간 PBMC 및 SFMC에서 염증성 사이토카인에 대한 유세포 분석

생체 외 환경에서 Exo-SrIkB의 항염증효과를 조사하기 위해, Exo-SrIkB의 유무에 따라 염증성 사이토카인 생산세포를 확인하였다. 유세포 분석을 통해 IL-17A와 GM-CSF를 생산하는 세포를 분석하였다. HC의 PBMC에서 IL-17A에는 유의한 차이가 없었지만 GM-CSF 생성 세포의 빈도는 Exo-SrIkB 처리 후 유의하게 감소하였다 (10.40 ± 1.52 vs. 5.97 ± 0.88 , $p = 0.016$) (Figure 3A). RA 환자의 PBMC에서 GM-CSF 생산 세포의 빈도는 Exo-SrIkB 처리 후 유의하게 감소하였고 (11.49 ± 1.09 vs. 6.77 ± 1.08 , $p = 0.031$), IL-17A 또한 감소되는 패턴을 확인하였다 (1.12 ± 0.38 vs. 0.78 ± 0.27 , $p = 0.063$) (Figure 3B). RA 환자의 SFMC에서 IL-17 생산 세포의 빈도는 Exo-SrIkB 처리 후 감소하지 않았지만 GM-CSF 생산 세포의 빈도는 크게 감소하였다 (22.08 ± 2.58 vs. 16.45 ± 1.42 , $p = 0.031$) (Figure 3C).

4. 인간 PBMC 및 SFMC의 배양액에서 단백질생성에 대한 ELISA 분석

자극된 PBMC 및 SFMC의 배양액에서 염증성 사이토카인 단백질 발현율을 확인하고자 ELISA를 실시하였다. Exo-SrIkB는 HC PBMC의 배양액에서 IL-6 및 GM-CSF 수준을 유의하게 감소하였으며 (107.4 ± 70.16 vs. 71.91 ± 53.36 , $p = 0.047$; 430.8 ± 134.1 vs. 311.6 ± 79.26 , $p = 0.004$) (Figure 4A), Exo-SrIkB로 처리된 RA PBMC의 배양액에서 IL-6 (142.0 ± 74.19 vs. 53.69 ± 37.64 , $p = 0.039$), IL-17A (114.0 ± 37.02 vs. 77.23 ± 21.14 , $p = 0.016$) 및 GM-CSF (395.7 ± 73.72 vs. 279.3 ± 44.47 , $p = 0.020$)의 수준은 상당히 감소하였다 (Figure 4B). 또한 Exo-SrIkB로 처리된 SFMC 배양액에서 TNF- α 및 GM-CSF

수준은 유의하게 감소하였다 (172.7 ± 131.0 vs. 30.45 ± 2.08 , $p = 0.031$; 191.1 ± 8.45 vs. 163.0 ± 3.44 , $p = 0.031$) (Figure 4C).

5. RA 질병 마우스 모델에서 Exo-SrIkB 치료 효과 분석

관절염 마우스 모델에서 관절염 진행에서 Exo-SrIkB의 역할을 조사하기 위해, 마우스를 Curdlan 주사 3주 후부터 Exo-naïve 또는 Exo-SrIkB로 치료하였다. 연구 프로토콜은 다음과 같다 (Figure 5A). 실험 8주차부터 Exo-SrIkB 처리한 마우스가 Exo-naïve 처리한 마우스에 비해 관절염 증상을 유의하게 억제하였고 (14.22 ± 1.27 vs. 10.67 ± 3.49 , $p = 0.003$), 실험 종료 시점에도 관절염 증상이 억제된 것을 확인하였다 (15.11 ± 1.02 vs. 11.11 ± 3.30 , $p = 0.007$) (Figure 5B).

6. 비장의 염증성 사이토카인 유세포 분석 및 유전자 발현 분석

질병 모델 실험 종료 시 비장을 적출한 후 비장세포를 분리하여 IFN- γ 및 IL-17A 생성 세포의 빈도를 유세포 분석을 통해 확인하였다. Exo-SrIkB 처리 마우스 그룹의 비장세포에서 IFN- γ 및 IL-17A 생성 세포의 빈도는 Exo-naïve 처리 마우스보다 유의하게 낮았다 (0.36 ± 0.12 vs. 0.08 ± 0.034 , $p = 0.026$; 0.40 ± 0.11 vs. 0.04 ± 0.10 , $p = 0.011$). TNF- α 생산 세포의 빈도는 유의한 차이가 없었으나 감소하는 패턴을 나타냈다 (3.94 ± 1.71 vs. 0.12 ± 0.06 , $p = 0.052$) (Figure 6A). 또한, 비장조직에서 염증성 사이토카인에 대한 유전자 발현은 분석하기 위해 Real-time PCR 을 수행하였다. IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , IL-12, IL-23, IL-6, IL-1 β , IL-22, T-bet, Foxp3, TGF- β , IL-10 유전자 발현을 확인하였다. IFN- γ , T-bet은 유의하게 감소하였고 (3.72 ± 1.02 vs. 0.71 ± 0.20 , p

= 0.001; 1.83 ± 0.43 vs. 0.58 ± 0.15 , $p = 0.007$), GM-CSF는 유의한 차이가 없었으나 감소하는 패턴을 보였다 (1.44 ± 0.38 vs. 0.72 ± 0.09 , $p = 0.059$). 또한, TGF- β 는 Exo-SrlkB 처리 마우스에서 증가하였다 (0.67 ± 0.22 vs. 0.99 ± 0.10 , $p = 0.043$) (Figure 6B).

7. RA 질병 마우스모델에서 Exo-SrlkB에 대한 micro CT와 조직학적 검사

관절 파괴 정도를 평가하기 위해 치료 종료 시점의 발목 관절을 마이크로 CT로 평가하였다. 각 그룹의 대표적인 micro CT 이미지는 다음과 같다 (Figure 7A). micro CT를 통해 Exo-SrlkB 처리된 마우스가 Exo-naïve 처리된 마우스에 비해 관절 파괴가 더 적었다 (1.93 ± 0.25 vs. 1.08 ± 0.14 , $p = 0.007$) (Figure 7B). 또한 실험 종료 시 마우스의 관절에 대한 조직학적 분석을 수행하였다. 관절 염증에 대한 조직학적 점수는 Exo-SrlkB로 처리된 마우스가 Exo-naïve 으로 처리된 마우스보다 염증이 적음을 보여주었다 (2.57 ± 0.14 vs. 1.95 ± 0.21 , $p = 0.046$) (Figure 7C, D).

고찰

본 연구는 NF- κ B inhibitor 가 탑재된 Exo-Sr κ B 가 RA 염증억제 효과가 분명히 있음을 보여주었다. Exo-Sr κ B 가 인간의 생체 외 환경에서 염증성 사이토카인 발현을 감소시킴으로써 항염증효과를 확인하였고, RA 질병 마우스 모델을 사용하여 생체 내 환경에서 관절 내 염증세포 침윤, 관절 파괴를 감소시킴을 확인하여 관절의 염증을 개선한다는 것을 확인하였다.

RA 의 발병기전은 단핵구 / 대식세포, T 세포, B 세포 및 활막 섬유아세포와 같은 타고난 면역 세포를 포함하는 다양한 세포 유형을 포함한다 [15]. 정규 및 비정규 NF- κ B 경로를 통해 RANKL 유도 단핵구 / 대식세포의 골흡수 파골세포로의 분화를 매개하지만 부적절한 조절은 RA 와 관련된 염증성 골손실에 기여하고 [16, 17], TNF- α , IL-1, IL-6 같은 전염증성 사이토카인의 유도를 매개한다 [18]. 이를 통해 간접적으로 Th17 분화를 촉진하고, T 세포에서 Th17 계통 전사인자를 직접 조절한다 [19]. 또한 NF- κ B 는 B 세포 활성화에도 기여함으로써 다양한 세포유형에서 기능함으로써 RA 의 발병 기전에 매개한다는 것을 알 수 있다 [20]. 초기 다양한 연구를 통해, RA 환자로부터 얻은 활막조직과 PBMC 에서 NF- κ B 가 활성화 되어 있음을 확인하였으며 [21, 22], 콜라겐 유도, 연쇄상구균 세포벽 유도 관절염과 같은 류마티스 관절염의 다양한 동물모델에서도 NF- κ B 의 활성을 확인하였다 [23, 24]. 이는 NF- κ B 가 RA 의 주요 염증 매개체 역할을 한다는 것을 의미한다.

엑소좀은 안정성과 우수한 생체적합성으로 인해 현재 새로운 약물 전달 수단으로 제시되고 있다. RA 의 관절손상에 대한 중간엽줄기세포 (MSC)유래

miR-150-5p 엑소좀 (Exo-150)의 치료 효과를 콜라겐 유발 관절염 마우스 모델에서 임상 관절염 점수를 감소시켰으며 활막세포증식과 혈관신생을 억제하여 관절 손상을 감소하였다는 연구 결과를 보고하였다 [25]. 또한 IFN- γ 에 의해 자극된 MSC에서 생성된 엑소좀을 이용하여 실험적 자가면역뇌척수염 (EAE) 마우스모델에서 다발성경화증 치료 연구를 통해 항염증효과가 있다는 연구결과가 보고되었다 [26]. 따라서, 엑소좀을 이용한 질병 치료 연구가 다양하게 진행하고 있는 것을 알 수 있었다.

본 연구에 사용된 Exo-SrIkB 연구에 따르면, 폐혈증 동물모델에서 Exo-SrIkB 치료로 인해 장기 손상을 개선하고 전염증성 사이토카인의 분비를 억제하여 전체 생존율을 향상시켰다는 보고가 있으며 [11], LPS 유도 자연조산 (PTB) 마우스 모델에서 Exo-SrIkB 를 통해 지연시켰고, 태아의 선천적 세포이동의 감소 및 다양한 태아 및 모체 조직의 염증반응에 효과가 있음이 보고 된 바 있다 [9]. 또한 신장허혈재관류손상으로 인한 급성신장손상에서 Exo-SrIkB 치료는 NF- κ B 활성을 감소시키고 세포자멸사, 염증성 사이토카인을 감소한다는 연구결과도 보고되었다 [10]. 따라서 Exo-SrIkB 가 NF- κ B 의 억제제로 작용하고 염증 반응을 직접적으로 중화시켜 전염증성 사이토카인 폭풍을 개선할 수 있음을 보여준다.

본 RA 실험에서 생체 외 실험을 통해 Exo-srIkB 처리 하였을 때 IL-17A, IL-6, TNF- α , GM-CSF 유전자 발현량이 감소하였고, IL-17A, GM-CSF 생산세포가 감소되었으며, TNF- α , IL-6, IL-17A, GM-CSF 의 단백질 생성 수준도 감소되었다. 또한 비장세포에서 IFN- γ , IL-17A, TNF- α 생성세포 빈도가 감소하였고, 비장조직에서 유전자 발현량을 확인한 결과, IFN- γ , T-bet, GM-

CSF 의 유전자 발현량이 감소됨을 확인하였다. 생체 외 실험과 마우스 비장을 통해 Exo-SrIkB 를 처리하였을 때, 일부 염증성 사이토카인이 감소하였다는 것을 발견하였고, 특히 전반적으로 IL-17A, GM-CSF 가 감소한다는 것을 확인하였다.

류마티스 관절염 치료법 중에 TNF- α 를 표적으로 하는 단클론항체 (infliximab, adalimumab 등)가 이미 사용하고 있으나 TNF- α 길항제를 사용 후 결핵의 재활성이나 감염, 림프종과 같은 악성종양 등이 발생하는 부작용 때문에 부작용이 적은 다른 사이토카인을 표적으로 삼는 단클론항체를 연구 중에 있는데 IL-17A 와 GM-CSF 가 있다 [27, 28]. GM-CSF 는 원래 골수 전구세포의 증식 및 분화에 의해 시험관 내에서 과립구 및 대식세포의 집락을 형성하는 능력으로 인해 조혈성장인자로 정의되었다 [29]. 보고에 따르면 RA 환자의 활액과 혈액에서 사이토카인을 측정하는 초기 연구에서는 염증이 있는 활막조직에서 GM-CSF 수준이 증가하고 GM-CSF 수용체 (GM-CSFR)발현이 증가하는 것으로 보고되었다 [30, 31]. GM-CSF 결핍마우스는 콜라겐 유도 관절염 (CIA), 항원유도 관절염 (AIA) 등 여러 염증성 관절염 모델에서 관절염 및 관련 통증이 발생하지 않았다는 연구결과도 보고되었다 [32, 33]. 이는 GM-CSF 가 염증성 관절 질환의 핵심 사이토카인이라는 것을 시사한다. 또한 IL-17A 는 여러 자가면역 및 염증성 질환의 발병기전에 기여하는 전염증성 사이토카인이다. 생체 외 및 생체 내 실험에서 다양한 세포 유형에 대한 IL-17A 의 효과가 확인되어 질병에 초기부터 후기까지 직접적으로 관여한다는 것을 발견하였고, 특히 RA 에서 IL-17A 는 활막세포와 조골세포에 국소적으로 작용하여 활막염과 관절 파괴에 기여한다고 밝혔다 [34]. 이런 발견은 IL-

17A 를 표적으로 하는 생물학적 제제의 개발로 이어졌다 [27]. 이는 Exo-SrkB 가 IL-17A, GM-CSF 등 염증성 사이토카인을 감소함으로써 관절염 개선 영향을 미친다는 것을 시사한다.

하지만 본 연구의 제한점은 엑소좀의 어떠한 면역세포를 주 타겟으로 염증억제 효과를 보이는지에 대한 실험이 부족하다는 것이다. 향후 RA의 염증과 관련된 세분화된 세포 (CD4 cell, MAIT cell, NK cell, CD8 cell, CD14 cell 등)에서 효과를 검증하는 추가 연구가 필요하리라 사료된다.

결론

본 연구에서는 Exo-SrIkB가 생체 외 실험에서 염증성 사이토카인 억제 효과를 확인하였고, RA질병 마우스모델을 통한 생체 내 실험에서 임상적으로 증상을 개선하고 관절염을 억제함을 확인하였다.

결론적으로 본 연구는 RA치료에 사용할 수 있는 약물로서 Exo-SrIkB의 항염증 효과를 검증하였다.

참고 문헌

1. Smolen, J.S., D. Aletaha, and I.B. McInnes, Rheumatoid arthritis. *Lancet*, 2016. 388(10055): p. 2023-2038.
2. Meffert, M.K., J.M. Chang, B.J. Wiltgen, et al., NF-kappa B functions in synaptic signaling and behavior. *Nat Neurosci*, 2003. 6(10): p. 1072-8.
3. Merlo, E., R. Freudenthal, and A. Romano, The IkappaB kinase inhibitor sulfasalazine impairs long-term memory in the crab *Chasmagnathus*. *Neuroscience*, 2002. 112(1): p. 161-72.
4. Li, J., R.S. Tang, Z. Shi, et al., Nuclear factor-kappaB in rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*, 2020. 23(12): p. 1627-1635.
5. McInnes, I.B. and G. Schett, Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol*, 2007. 7(6): p. 429-42.
6. Thery, C., K.W. Witwer, E. Aikawa, et al., Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles*, 2018. 7(1): p. 1535750.
7. Han, C., X. Sun, L. Liu, et al., Exosomes and Their Therapeutic Potentials of Stem Cells. *Stem Cells Int*, 2016. 2016: p. 7653489.
8. Di Rocco, G., S. Baldari, and G. Toietta, Towards Therapeutic Delivery of Extracellular Vesicles: Strategies for In Vivo Tracking and Biodistribution Analysis. *Stem Cells Int*, 2016. 2016: p. 5029619.

9. Sheller-Miller, S., E. Radnaa, J.K. Yoo, et al., Exosomal delivery of NF- κ B inhibitor delays LPS-induced preterm birth and modulates fetal immune cell profile in mouse models. *Sci Adv*, 2021. 7(4).
10. Kim, S., S.A. Lee, H. Yoon, et al., Exosome-based delivery of super-repressor IkappaBalpha ameliorates kidney ischemia-reperfusion injury. *Kidney Int*, 2021. 100(3): p. 570-584.
11. Choi, H., Y. Kim, A. Mirzaaghasi, et al., Exosome-based delivery of super-repressor IkappaBalpha relieves sepsis-associated organ damage and mortality. *Sci Adv*, 2020. 6(15): p. eaaz6980.
12. Mukai, T., R. Gallant, S. Ishida, et al., Loss of SH3 domain-binding protein 2 function suppresses bone destruction in tumor necrosis factor-driven and collagen-induced arthritis in mice. *Arthritis Rheumatol*, 2015. 67(3): p. 656-67.
13. Lord, A.E., L. Zhang, J.E. Erickson, et al., Quantitative in vivo micro-computed tomography for monitoring disease activity and treatment response in a collagen-induced arthritis mouse model. *Sci Rep*, 2022. 12(1): p. 2863.
14. Ruutu, M., G. Thomas, R. Steck, et al., beta-glucan triggers spondylarthritis and Crohn's disease-like ileitis in SKG mice. *Arthritis Rheum*, 2012. 64(7): p. 2211-22.
15. Feldmann, M. and R.N. Maini, Anti-TNF alpha therapy of rheumatoid arthritis: what have we learned? *Annu Rev Immunol*, 2001. 19: p. 163-

96.

16. Novack, D.V., Role of NF- κ B in the skeleton. *Cell Res*, 2011. 21(1): p. 169-82.
17. Baum, R. and E.M. Gravallesse, Bone as a Target Organ in Rheumatic Disease: Impact on Osteoclasts and Osteoblasts. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2016. 51(1): p. 1-15.
18. Davignon, J.L., M. Hayder, M. Baron, et al., Targeting monocytes/macrophages in the treatment of rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2013. 52(4): p. 590-8.
19. Mellado, M., L. Martinez-Munoz, G. Cascio, et al., T Cell Migration in Rheumatoid Arthritis. *Front Immunol*, 2015. 6: p. 384.
20. Wei, F., Y. Chang, and W. Wei, The role of BAFF in the progression of rheumatoid arthritis. *Cytokine*, 2015. 76(2): p. 537-544.
21. Marok, R., P.G. Winyard, A. Coumbe, et al., Activation of the transcription factor nuclear factor- κ B in human inflamed synovial tissue. *Arthritis Rheum*, 1996. 39(4): p. 583-91.
22. Dichamp, I., A. Bourgeois, C. Dirand, et al., Increased nuclear factor- κ B activation in peripheral blood monocytes of patients with rheumatoid arthritis is mediated primarily by tumor necrosis factor- α . *J Rheumatol*, 2007. 34(10): p. 1976-83.
23. Miagkov, A.V., D.V. Kovalenko, C.E. Brown, et al., NF- κ B activation provides the potential link between inflammation and

- hyperplasia in the arthritic joint. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(23): p. 13859-64.
24. Palombella, V.J., E.M. Conner, J.W. Fuseler, et al., Role of the proteasome and NF-kappaB in streptococcal cell wall-induced polyarthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. 95(26): p. 15671-6.
 25. Chen, Z., H. Wang, Y. Xia, et al., Therapeutic Potential of Mesenchymal Cell-Derived miRNA-150-5p-Expressing Exosomes in Rheumatoid Arthritis Mediated by the Modulation of MMP14 and VEGF. *J Immunol*, 2018. 201(8): p. 2472-2482.
 26. Riazifar, M., M.R. Mohammadi, E.J. Pone, et al., Stem Cell-Derived Exosomes as Nanotherapeutics for Autoimmune and Neurodegenerative Disorders. *ACS Nano*, 2019. 13(6): p. 6670-6688.
 27. Beringer, A., M. Noack, and P. Miossec, IL-17 in Chronic Inflammation: From Discovery to Targeting. *Trends Mol Med*, 2016. 22(3): p. 230-241.
 28. Lee, K.M.C., A.A. Achuthan, and J.A. Hamilton, GM-CSF: A Promising Target in Inflammation and Autoimmunity. *Immunotargets Ther*, 2020. 9: p. 225-240.
 29. Burgess, A.W. and D. Metcalf, The nature and action of granulocyte-macrophage colony stimulating factors. *Blood*, 1980. 56(6): p. 947-58.
 30. Xu, W.D., G.S. Firestein, R. Taetle, et al., Cytokines in chronic inflammatory arthritis. II. Granulocyte-macrophage colony-stimulating

- factor in rheumatoid synovial effusions. *J Clin Invest*, 1989. 83(3): p. 876-82.
31. Fiehn, C., M. Wermann, A. Pezzutto, et al., [Plasma GM-CSF concentrations in rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and spondyloarthropathy]. *Z Rheumatol*, 1992. 51(3): p. 121-6.
 32. Campbell, I.K., M.J. Rich, R.J. Bischof, et al., Protection from collagen-induced arthritis in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-deficient mice. *J Immunol*, 1998. 161(7): p. 3639-44.
 33. Achuthan, A., A.D. Cook, M.C. Lee, et al., Granulocyte macrophage colony-stimulating factor induces CCL17 production via IRF4 to mediate inflammation. *J Clin Invest*, 2016. 126(9): p. 3453-66.
 34. Hot, A. and P. Miossec, Effects of interleukin (IL)-17A and IL-17F in human rheumatoid arthritis synoviocytes. *Ann Rheum Dis*, 2011. 70(5): p. 727-32.

A study on Anti-Inflammation of SrI κ B (Super repressor I κ B) in Rheumatoid Arthritis

Hae-In Lee

Department of Biomedical Sciences

Graduate School of Chonnam National University

(Supervised by Professor Tae Jong Kim)

(ABSTRACT)

Background: Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic autoimmune disease that affects joints such as the wrist, hand, foot, knee and jaw. The purpose of this study was to evaluate the arthritis inhibitory effect of super repressor I κ B (Exo-srI κ B) loaded with I κ B, an NF- κ B inhibitor, on rheumatoid arthritis (RA).

Methods: In this study, a healthy control group (n=17), peripheral blood mononuclear cells (PBMC) (n=13) and synovial fluid mononuclear cells (SFMC) (n=6) from rheumatoid arthritis patients were isolated and tested. Exo-srI κ B (Ilias Biologics, Daejeon) was used. PBMCs and SFMCs were pretreated with Exo-srI κ B $1E+10$ for 3 hours and then stimulated with PMA 100ng/ml and

Ionomycin 1 μ M for 4 hours. The gene expression levels for IL-17A, IL-6, TNF- α , IL-1 β , GM-CSF, IFN- γ , and IL-10 were confirmed through real-time polymerase chain reaction (Real Time PCR), and flow cytometry analysis IFN- γ , IL-17A, GM-CSF-producing cells were identified through the test, and the protein production levels of IL-17A, IL-6, TNF- α and GM-CSF were measured by ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Also, an RA disease mouse model was constructed by intraperitoneally injecting Curdlan into SKG mice. Exo-naïve or Exo-srI κ B 1E+10pn intraperitoneal injections were administered after symptoms developed to assess anti-inflammatory effects. After the onset of symptoms, Exo-naïve or Exo-srI κ B 1E+10pn was intraperitoneally (i.p) injected to examine the anti-inflammatory effect. A score was calculated based on the joint condition twice a week. Ankle joint histomorphology was confirmed using H&E staining and Safranin-O staining, and the degree of joint destruction was assessed using micro-computed tomography (CT).

Results: Ex vitro experiments using PBMC and SFMC showed that IL-17A, IL-6, and GM-CSF gene expression levels were decreased when Exo-srI κ B was treated. GM-CSF-producing cells were significantly reduced, and the protein production levels of TNF- α , IL-6, IL-17A, and GM-CSF were also significantly reduced. In a mouse model of RA disease, Exo-srI κ B treatment showed macroscopic improvement in arthritis symptoms, and histologically, immune cell infiltration, cartilage destruction, and bone erosion were

significantly lower in joint tissues than in the Exo-naïve treatment group. It was also observed through micro-CT that the degree of joint destruction was also reduced. In splenocytes, the frequency of IFN- γ and IL-17A producing cells decreased, and a pattern was confirmed in which the frequency of TNF- α producing cells also decreased. As a result of confirming the gene expression level in the spleen tissue, it was confirmed that the gene expression level of IFN- γ , T-bet, and GM-CSF was decreased, and the TGF- β expression level was increased.

Conclusion: These results confirmed that Exo-srI κ B loaded with I κ B suppressed inflammatory cytokines ex-vivo, and confirmed the inhibitory effect on joint inflammation in animal models. Therefore, it is thought that exosomes loaded with I κ B can be used for the treatment of rheumatoid arthritis due to the regulation of NF- κ B signaling.

Table.1 Clinical characteristics and laboratory findings of patients with RAs and HCs

	PBMC		SFMC
	HC	RA	RA
Total number	17	13	6
Age, mean \pm SD (years)	25.8 \pm 5.5	58.6 \pm 19.8	50.5 \pm 23.3
Male, n (%)	12 (70.5)	4 (30.7)	3 (50)
RF positive, n (%)	N/A	12 (92.3)	3 (50)
Anti-CCP Ab, n (%)	N/A	11 (84.6)	4(66.6)
CRP(mg/dl), mean \pm SD	N/A	2.6 \pm 2.8	1.9 \pm 1.7
ESR (mm/hour), mean \pm SD	N/A	55.3 \pm 29.3	26.3 \pm 11.8
Leukocytes (cells/ μ l), mean \pm SD	N/A	7415 \pm 2727	9100 \pm 0.0
Lymphocytes (cells/ μ l), mean \pm SD	N/A	1770 \pm 536.3	2403 \pm 264.0
Hemoglobin (gm/dl), mean \pm SD	N/A	11.6 \pm 2.2	15.1 \pm 1.2
Platelets ($\times 10^3$ /mm ³), mean \pm SD	N/A	277.4 \pm 69.1	228.7 \pm 10.8
Recent treatments (last three months)			
Naive, n (%)	N/A	2(15.3)	0(0)
Steroid use, n (%)	N/A	10(76.9)	6(100)
DMARD use, n (%)	N/A	8(61.5)	3(50)
Biologic use, n (%)	N/A	0(0.0)	0(0)

SD = standard deviation; RF = rheumatoid factor; anti-CCP= anti-cyclic citrullinated peptide; CRP = C-reactive protein; ESR = erythrocyte sedimentation rate; n = number; DMARD= Disease-modifying antirheumatic drug.

Table 2. Primer sequences of real-time PCR used in this study

Target Genes	Forward primer (5'→ 3')	Reverse primer (5'→ 3')
Human β -actin	CACTGTGTTGGCGTACAGGT	TCATCACCATTGGCAATGAG
Human IL-17A	AAAGCAGTTAGACTATGGAGAG	ACAAACTGCCTTAAGAACTCTA
Human IL-6	ACCTGAACCTTCCAAAGATG	TTTGTACTCATCTGGACAGC
Human TNF- α	TCTACTTTGGGATCATTGCC	TTTTTGAGCCAGAAGAGGTT
Human IL-1 β	CACCATGCAATTTGTGTCTT	TGGACAGGAGATCCTCTTAG
Human GM-CSF	CTCTCATGAAACAAGAGCTAGA	AATATTCCCATTCTTCTGCCAT
Human IFN- γ	CAACCTAAGCAAGATCCCAT	GTCTGACATGCCATTAAGC
Mouse GAPDH	CAACTTTGGCATTGTGGAAGG	ACACATTGGGGGTATTAACAC
Mouse IFN- γ	CTGCTGATGGGAGGAGATGT	TTTGTCATTTCGGGTGTAGTCA
Mouse GM-CSF	TTCTCCTTCAAGAAGCTAACAT	CATAGGTGGTAACTTGTGTTTC
Mouse T-bet	ACAACAGCCAGCCAAACAG	CACCCTTCAAACCCTTCCTC
Mouse TGF- β	GAGCAACATGTGGAACTCTA	CTGAATCGAAAGCCCTGTAT

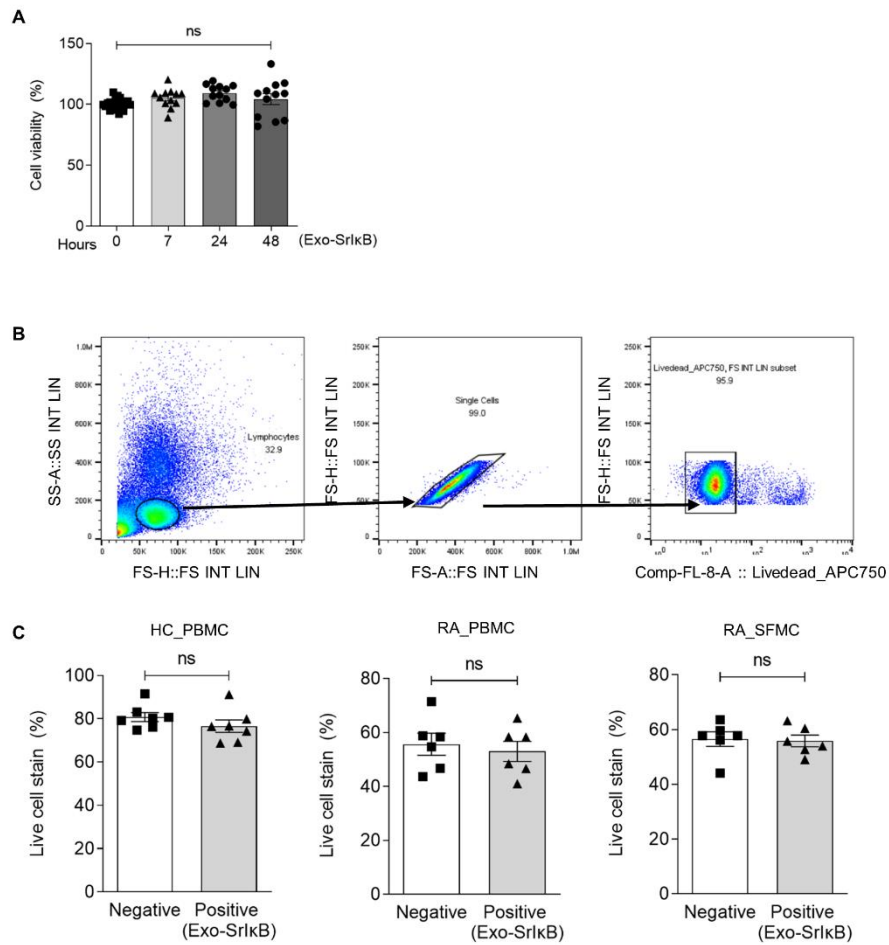


Figure 1. Assessment of cell viability with Exo- SrIkB. (A) Cell viability of PBMCs and SFMCs were analyzed by MTS assay depending on Exo-SrIkB treatment duration. Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons was performed to determine statistical significance. (B) Representative gating strategy for flow cytometry of survival rate. (C) Viability dyes of PBMCs and SFMCs were stained and measured. T-test was performed to determine statistical significance. Values are the mean \pm SEM. Symbols represent the individual sample.

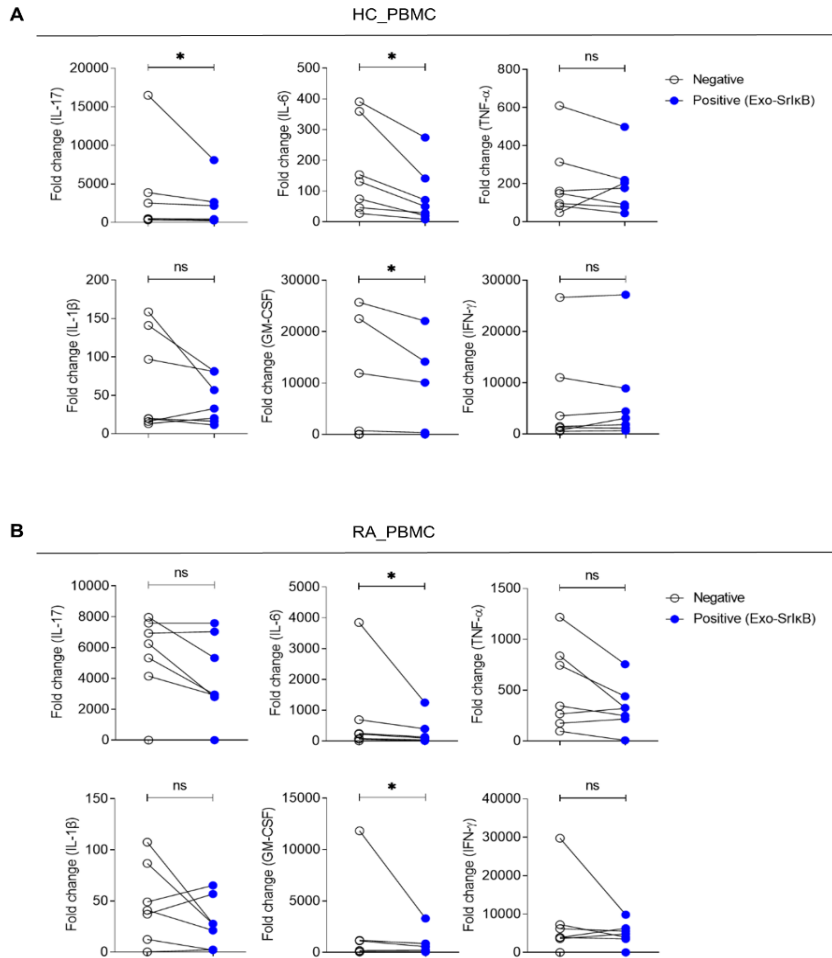


Figure 2. Relative gene expression levels of IL-17A, IL-6, TNF- α , IL-1 β , GM-CSF, IFN- γ in human PBMC with HC (A), RA (B). White circle indicates Stimulation group, blue circle indicates Stimulation + Exo-SrIkB group, respectively. Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed to determine statistical significance. Values are the mean \pm SEM. Symbols represent the individual sample. * $p < 0.05$

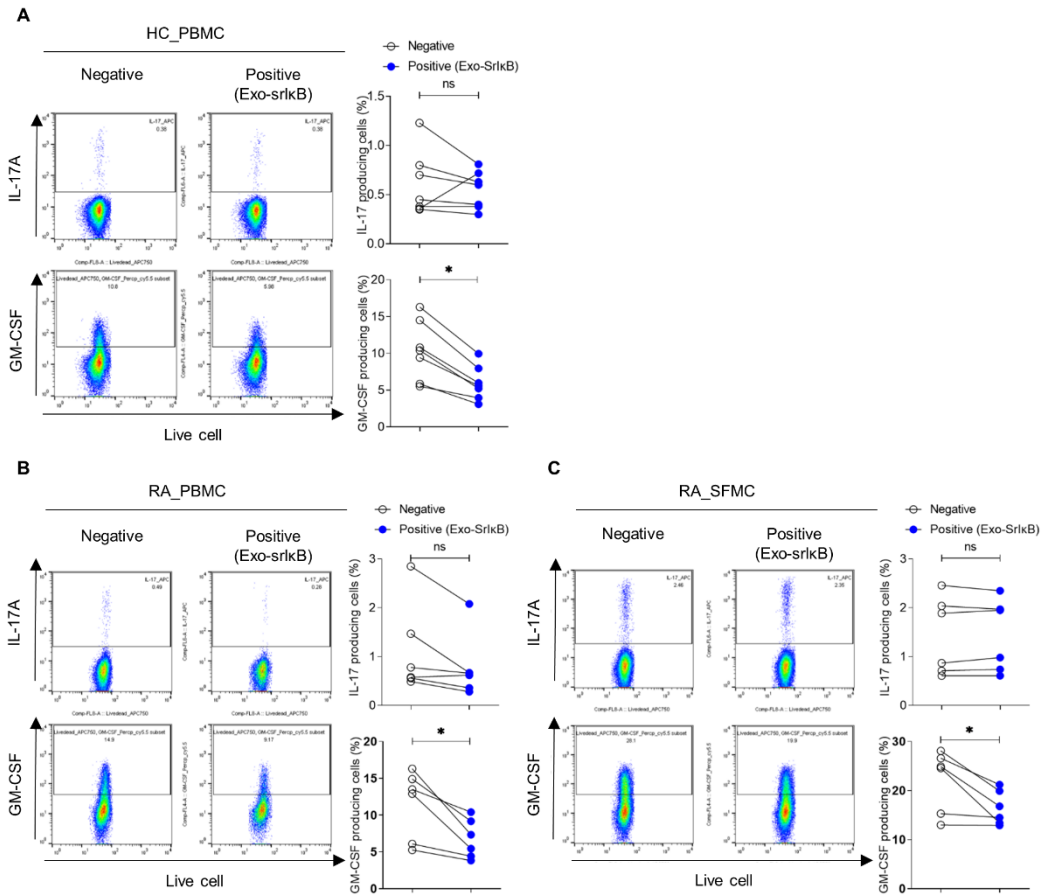


Figure 3. Cells were pre-treated for 3 h in the presence or absence of Exo-SrIkB, then cells were stimulated with PMA 100ng/ml and Ionomycin 1uM for 4 h. Flow cytometry was used to determine the percentages of IL-17A and GM-CSF positive cells from human PBMC in HC (A) and RA (B), SFMC in RA (B). Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed to determine statistical significance. Values are the mean \pm SEM. Symbols represent the individual sample. * $p < 0.05$

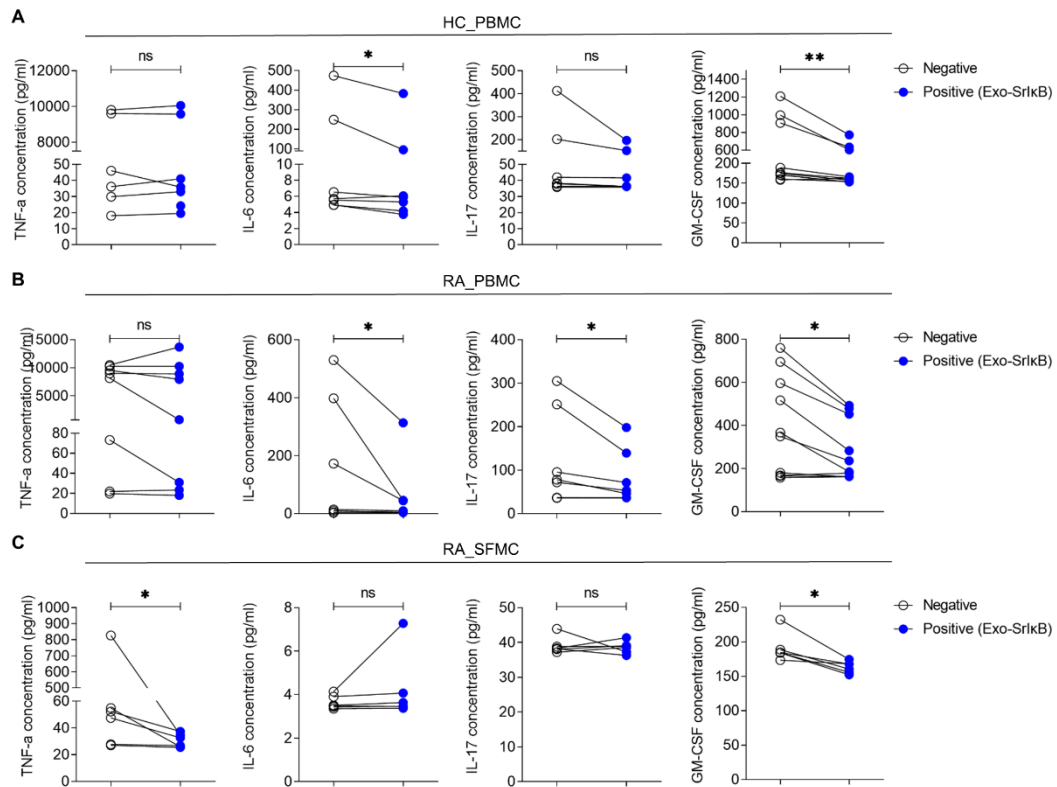


Figure 4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) of TNF- α , IL-17A, IL-6 and GM-CSF cytokines were performed in ex vivo cultured supernatants from Human PBMC in HC (A) and RA (B), SFMC in RA (B). Wilcoxon matched-pairs signed rank test was performed to determine statistical significance. Values are the mean \pm SEM. Symbols represent the individual sample. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

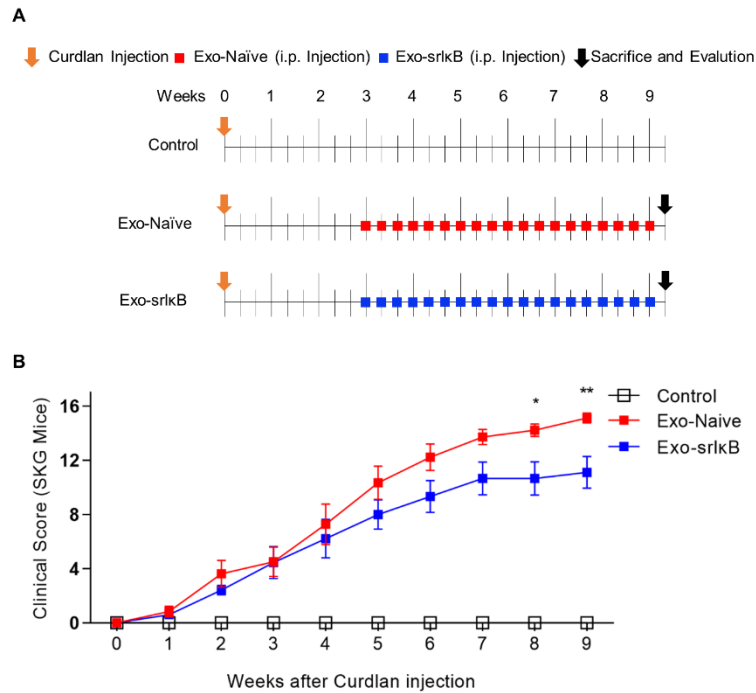


Figure 5. Experimental protocol of this study. (A) Experiments were performed in three groups: Exo-naïve treat group, Exo-SrIkB treatment group, and control. Curdlan was intraperitoneally administered to 11-week-old female SKG mice. From the 3rd week after arthritis induction, Exo-naïve or Exo-SrIkB $1E+10$ pn/200ul was intraperitoneally treated twice a week. (B) Arthritis scores were determined according to the clinical arthritis severity of each group ($n = 9$ mice for each group). Two-way analysis of variance (ANOVA) was performed to determine statistical significance. Values are the mean \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

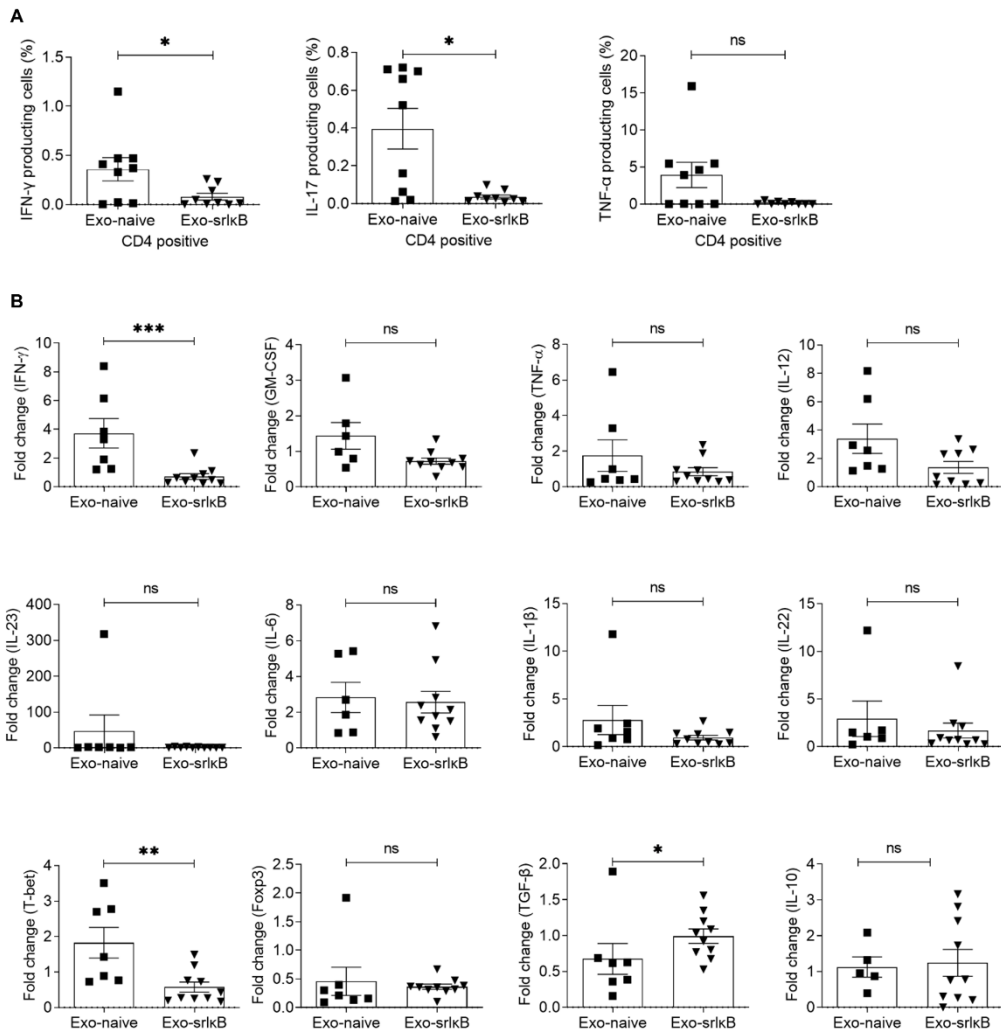


Figure 6. Analysis of cytokine in mice spleen. (A) After sacrificing the mouse, the spleen was removed and splenocytes were isolated. After stimulation with PMA 25ng/ml and ionomycin 1 μ M for 4 hours, CD4+ IFN- γ , IL-17A, and TNF- α were confirmed by flow cytometry. (B) After sacrificing mice, RNA was extracted from the spleen, and the relative gene expression levels of IFN- γ , GM-CSF, TNF- α , IL-12, IL-23, IL-6, IL-1 β , IL-22, T-bet, Foxp3, TGF- β and IL-10 were confirmed through real-time PCR. The Mann Whitney test was performed to determine statistical significance. Values are mean \pm SEM. Symbols represent individual samples. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

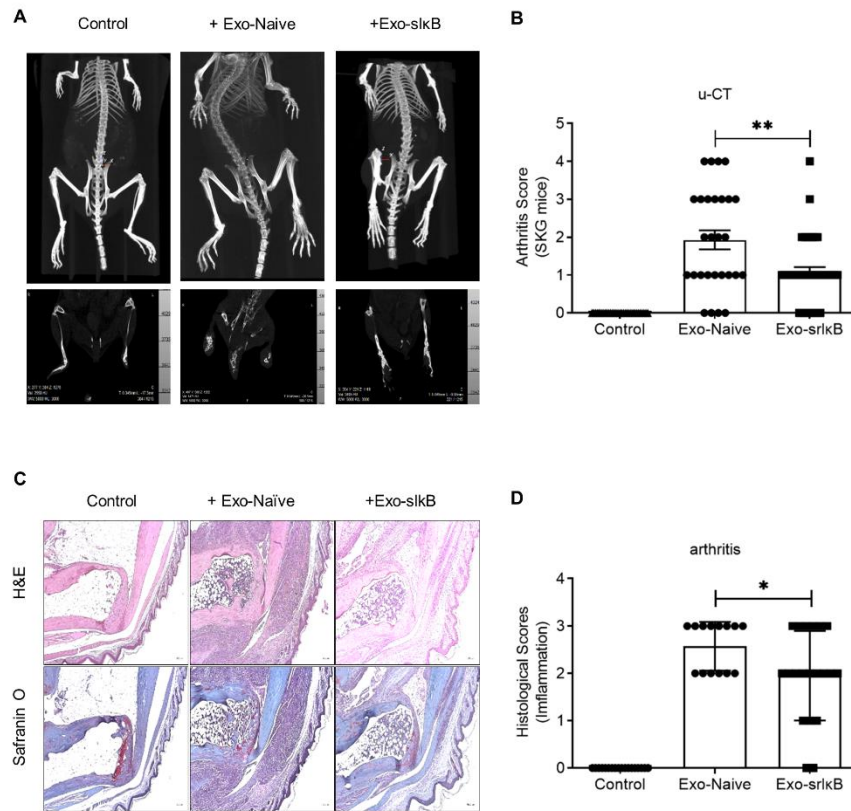


Figure 7. Mice were scanned using micro-CT at the end of the experiment. (A) Representative CT images are shown in each group. (B) Arthritis Score was measured by micro-CT. Symbols represent individual ankle joints (n = 9 mice for each group). Histopathological findings of group 3 ankle joint and intestine using H&E staining and Safranin-O staining. (C) Representative heel tissue stains from each group are shown. (D) Histological score analysis for adhesions was presented as a bar graph. The Mann-Whitney test was performed to determine statistical significance. Values are mean \pm SEM. Values are mean \pm SEM. Symbols represent individual samples. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$