



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

강직성 척추염에서 CCL20 억제를 통한 염증 개선에 관한 연구

전남대학교 대학원

의 과 학 과

김 희 주

2023년 2월

이학 석사학위논문

강직성 척추염에서 CCL20 억제를 통한 염증 개선에 관한 연구

전남대학교 대학원

의 과 학 과

김 희 주

2023년 2월

강직성 척추염에서 CCL20
억제를 통한 염증 개선에 관한
연구

이 논문을 이학 석사학위 논문으로 제출함

전남대학교 대학원

의 과 학 과

김 희 주

지도교수 김 태 종

김희주의 이학 석사의 학위논문을 인준함

심사위원장 권 용 수 (인)

심 사 위 원 원 은 정 (인)

심 사 위 원 김 태 종 (인)

2023년 2월

목 차

| | |
|--------------------|----|
| 1. 국문 초록 | 1 |
| 2. 서 론 | 4 |
| 3. 연구대상 및 방법 | 6 |
| 4. 연구 결과 | 10 |
| 5. 고 찰 | 15 |
| 6. 결 론 | 18 |
| 7. 참고 문헌 | 19 |
| 8. 영문 초록 | 22 |
| 9. 표 및 그림 | 25 |

강직성 척추염에서 CCL20 억제를 통한

염증 개선에 관한 연구

김 희 주

전남대학교 대학원 의과학과

(지도교수 김 태 중)

(국문 초록)

목적: 강직성 척추염 (Ankylosing Spondylitis, AS)은 척추관절염의 일종인 만성 염증성 질환이다. AS의 주요 병인으로 대두되고 있는 보조 T 17 (Th17) 세포의 수용체 중 하나인 C-C 케모카인 수용체 6 (CCR6)은 C-C 모티브 케모카인 리간드 20(CCL20)과 상호작용을 통해 세포를 염증 부위로 이동을 유도한다고 알려져 있다. 그러나 AS에서 CCL20의 역할과 기전은 잘 알려져 있지 않으므로 본 연구에서는 CCL20 억제제가 AS에서 만성 염증 및 골 형성 치료에 효과적인지 여부를 조사하고자 하였다.

대상 및 방법: 말초 혈액 단핵 세포(PBMC) 및 활막액 단핵 세포(SFMC)를 건강한 대조군(Healthy control, HC) 및 AS 환자로부터 얻어 사용하였다. 염증성 사이토카인 생성 세포는 유세포 분석을 사용하여 분석되었으며, CCL20 및 IL-17A의 수치는 ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)를 통해 측정되었다. Recombinant Human MIP-3 α (CCL20) (h-CCL20; 300-29A, Peprotech,

USA)와 Human CCL20/MIP-3 alpha Antibody (h-CCL20 BL; MAB360, R&D, USA) 추가 여부에 따른 IL-17A의 발현을 유세포분석을 통해 확인하였고, Transwell migration assay를 통해 CCL20가 Th17 세포의 이동에 미치는 영향을 확인하였다. SKG 마우스에 curdlan을 주입하여 관절염을 유도시키고 mouse CCL20/MIP-3 알파 항체(m-CCL20 BL, MAB 7601, R&D) 또는 PBS (Positive Control)로 처리한 후 발목 및 발가락 관절의 부종 등의 증상을 관찰하여 점수로 환산하였다.

결과: IL-17A 생성 세포는 HC과 AS 환자의 PBMC에서보다 AS 환자의 SFMC에서 현저히 높게 발현되었다. 그에 따라 확인한 CCL20 발현 세포의 빈도도 HC 및 AS 환자의 PBMC에서보다 AS 환자의 SFMC에서 현저히 높게 나타났다. CCL20 발현 여부에 따른 IL-17A의 생성을 확인한 결과, CCL20 발현 세포는 CCL20 비 발현 세포보다 현저히 높은 IL-17A의 생성을 보였다. h-CCL20와 h-CCL20 억제제의 추가 여부에 따른 IL-17A 발현에서는, h-CCL20와 함께 배양시 HC과 AS 환자 PBMC에서 IL-17A의 증가를 보였고, AS 환자의 SFMC를 h-CCL20 억제제와 함께 배양하였을 때 IL-17A의 감소가 관찰되었다. CCL20에 의한 세포 이동을 확인한 실험에서 전체적인 세포의 이동은 AS 환자의 활막액을 배지에 추가하였을 때 가장 증가하였으나 IL-17A 생성 세포의 이동은 h-CCL20를 배지에 첨가했을 때 가장 증가하였다. 또한, AS 질병 모델 마우스에 CCL20 억제제를 투여했을 때 발목과 발가락 관절의 붓기와 염증이 유의하게 감소되었다.

결론: 본 연구결과, ex vivo 실험뿐만 아니라 동물 모델을 이용한 in vivo 실험에서도 CCL20 억제 시 관절 염증이 감소하였다. 이는 CCL20의 억제가 AS

치료의 새로운 대안이 될 수 있음을 시사한다.

서론

강직성 척추염 (Ankylosing Spondylitis, AS)은 척추관절염 (Spondyloarthritis, SpA)에 속하는 만성 염증성 질환이다. 새로운 뼈의 형성을 특징으로 하며, 염증성 장 질환이나 건선 등과 같은 다른 염증성 질환을 동반하기도 한다 [1]. AS의 발병 기전은 다양하다고 알려져 있지만 [2-4], 명확하게 밝혀진 기전은 아직 없으며 [3] AS의 원인으로 Th17 세포와의 연관성이 논의되고 있다. 특히 Th17 세포에서 주로 생성되는 시그니처 사이토카인인 인터류킨 17 (Interleukin 17, IL-17)이 주요 염증 매개체 중 하나로 작용한다고 보고되었다 [1, 5]. 또한, Th17 다양한 염증성 사이토카인 및 케모카인에 대한 수용체를 가지고 있어 이들과의 상호작용을 통해 염증을 악화시킨다.

케모카인은 저분자량 사이토카인으로 항상성 조절 및 병리학적 상황에서 화학유인 특성을 통해 염증 부위로 세포를 이동시키는 면역 조절 물질이다 [6, 7]. 수용체와의 상호작용을 통해 세포에 영향을 미치며, 특히 케모카인(C-C 모티프) 리간드 20 (Chemokine (C-C motif) ligand 20, CCL20)는 림프구에 대한 강한 주화성을 가지고 있으며 CC 케모카인 수용체 6 (CCR6)와의 결합을 통해 표적 세포에 영향을 미친다 [8]. Th17 세포는 CCL20를 발현하며 그의 수용체인 CCR6 또한 가지고 있다 [9]. 건선성 관절염을 대상으로 진행된 연구에 따르면 Th17 세포에서 분비된 IL-17A가 각질 세포를 자극시켜 CCL20를 생성하고, 이는 CCR6를 가지는 수지상 세포와 Th17 세포의 화학주성을 유도하여 염증을 심화시키는 결과를 보였다 [9, 10]. 그러나 여전히 AS에서 CCL20의 역할에 대한 연구는 부족하다.

따라서 본 연구에서는 인간의 말초 혈액 단핵세포 (Peripheral blood mononuclear cell, PBMC)와 활막액 단핵 세포 (Synovial fluid mononuclear cells, SFMC) 및 AS의 마우스 모델을 이용하여 Th17 세포 활성화 및 그에 대한 CCL20의 영향을 평가하고, 말초 관절염이 있는 AS 환자에서 CCL20 억제를 통한 염증억제 치료효과를 확인하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구대상

본 연구는 HC 및 AS 환자로부터 PBMC와 SFMC를 얻어 실험을 진행하였다. 등록된 피험자의 인구통계학적 특성은 Table 1에 요약되어 있다. 본 연구는 모든 피험자로부터 서면동의를 받고 진행되었다 (CNUH-2011-199).

2. 세포 자극

PBMC 및 SFMC를 분리한 후, 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS; Gibco BRL, USA) 및 1% 페니실린 및 스트렙토마이신(P/S; Gibco, USA)을 함유하는 RPMI 1640 배지에 현탁시켜 96well 배양 플레이트에 세포를 1×10^6 cells/well의 밀도로 분주하였다. 세포에 Recombinant Human MIP-3 α (CCL20) (h-CCL20; 300-29A, Peprotech, USA) 200 ng/ml 또는 Human CCL20/MIP-3 alpha Antibody (h-CCL20 BL, MAB360, R&D, USA) 5 μ g/ml 를 처리하고, T 세포 수용체(TCR) 자극제인 Dynabeads Human T Activator CD3/CD28(11131D, Gibco, USA)를 사용하여 활성화시킨 후 24시간 동안 37°C에서 가습된 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

3. 유세포 분석과 ELISA

PBMC 및 SFMC의 표면은 anti-Fixable Viability Dye- eFluor780(65-0865-14, Invitrogen, USA), Pacific Blue-conjugated anti-CD4 (300521, BioLegend, USA)로 염색하였다. 그런 다음, 세포를 세척, 고정하고 Cytofix/Cytoperm

완충액으로 투과시켜 APC-conjugated anti-IL-17A antibody (512334, BioLegend, USA)와 FITC-conjugated anti-CCL20 (ABIN192397, antibodies-online.com, Germany)로 세포 내 염색을 진행하였다. 세포 분석은 FlowJo Software (BD, USA)로 분석되었다.

HC과 AS 환자, 퇴행성 관절염 (osteoarthritis, OA) 환자의 혈청 및 활막액에서 CCL20의 수치 비교를 위해 Human CCL20/MIP-3 alpha Quantikine ELISA Kit (DM3A00, R&D, USA)를 사용하여 평가하였고, OD는 450nm로 설정된 SpectraMax® M2 (Molecular Devices Corp., USA)에 의해 기록되었다.

4. Transwell 세포 이동 분석 (Transwell cell migration assay)

CD4+ T 세포는 제조업체의 지침에 따라 CD4+ T Cell Isolation Kit, human (130-096-233, Miltenyi Biotec, Germany)를 사용하여 음성 선택에 의해 PBMC 에서 분리되었다.

Transwell 플레이트 (5- μ m pore size, Costar, USA) 하부 chamber 에 무혈청 RPMI 1640을 넣고, 분리된 CD4+ T 세포를 Transwell 플레이트 상부 chamber 에 1×10^6 cells/well 밀도로 분주하였다. 하부 chamber 무혈청 배지에 각 조건에 따라 HC 혈청 (200 μ l/mL), AS 환자의 혈청 (200 μ l/mL), AS 환자의 활막액 (200 μ l/mL), h-CCL20 (200 ng/ml)을 처리하였고, 비교를 위해 위의 네 조건과 동일한 조건에 h-CCL20 BL (5 μ g/ml)를 처리하고 37°C에서 90분 동안 배양하였다. 이 때, 음성대조군으로는 PBS (200 μ l/mL)를 처리한 조건을 사용하였다. 이동된 세포는 APC-conjugated anti-IL-17A antibody 로 염색한 후 Neubauer chamber 및 유세포 분석기로 계수하였고 [11], 세포의

이동 지수는 각 케모카인, 혈청 또는 활막액의 존재 하에 이동한 세포의 수를 PBS 의 존재 하에 이동한 세포의 수로 나누어 계산하였으며, Th17 세포의 이동 지수는 CD4+ 세포의 이동 지수로 정규화 되었다 [11].

5. AS 질병 모델에서 관절염 증상 점수 확인

BALB/c 배경의 암컷 SKG 마우스를 연구에 사용하였으며, 모든 실험은 동물 관리 및 사용위원회의 승인 (CNU IACUC-H-2022-13)을 받아 실험 동물 복지법, 실험동물 관리 및 사용 지침에 따라 수행되었다.

실험은 음성 대조군 (Negative Control) (n = 1), PBS 그룹 (양성 대조군, Positive Control) (n = 4) 및 Mouse CCL20/MIP-3 alpha Antibody (m-CCL20 BL; MAB7601, R&D, USA) 처리 그룹 (CCL20 BL 군, n = 9)의 3개 그룹으로 나누어 진행되었다. 관절염 유발을 위해 11주령된 암컷 SKG 마우스에 curdlan (Wako, Osaka, Japan) 3.7 mg/kg을 1X PBS에 섞어 200 µl씩 복강 내 주사하였다. Curdlan을 주사한 마우스를 두 그룹으로 나누어 curdlan 주사 1주 후부터 양성 대조군에는 1X PBS 200 µl, CCL20 BL 군에는 m-CCL20 BL 20 µg/ 200 µl (1X PBS)를 주 2회 복강 내 주사하고 7주간 모니터링 하였다.

마우스의 임상 징후는 주 2회 모니터링하였고, 발 하나 당 최고 1.5점으로, 4개의 발 모두 합하여 총 6점이 되도록 다음과 같이 점수를 매겼다: 0, 관절 비대 없음; 0.1, 한 발가락 관절의 붓기; 0.5, 발목 또는 발목의 경미한 부기; 1.0, 발목이나 발목의 심한 부기 [12]. 앞발 및 뒷발, 발목 및 모든 발가락에 대한 점수는 각 마우스에 대해 합계되었다.

7. 통계분석

통계적 분석은 Prism 9 Software (GraphPad Software, San Diego, USA)를 사용하여 수행하였다. 평균 간 차이의 통계적 유의성은 Dunn's multiple comparisons를 이용한 Kruskal - Wallis test, Spearman's correlation analysis, Wilcoxon matched-pairs signed rank test, Mann - Whitney test 사용하여 평가하였고, 증상 점수 데이터는 two-way ANOVA를 사용하여 평가하였다. 0.05 이하의 p-값을 유의한 것으로 정의하였다. *, $p = 0.05-0.01$; **, $p = 0.01-0.001$; ***, $p < 0.001$

연구 결과

1. 말초 관절염 관절강 내 Th17 세포의 증가

HC과 AS 환자의 PBMC와 SFMC에서 IL-17A 생산 세포의 빈도를 비교관찰하기 위해 세포를 자극하고 24시간 동안 37°C에서 배양하였다. Figure 1A와 같이 세포를 CD4+ T 세포, CD4- T 세포 및 전체 림프구로 나누어 IL-17A 생성 세포의 빈도를 분석하였다.

모든 세포 집합에서 IL-17A 생성 세포의 빈도는 HC PBMC 및 AS PBMC에서 보다 AS SFMC에서 유의하게 높게 나타났다 (CD4+ T 세포, 0.353 ± 0.043 vs. 0.618 ± 0.135 vs. 1.650 ± 0.393 , $p < 0.0001$; CD4- T 세포, 0.069 ± 0.014 vs. 0.146 ± 0.030 vs. 0.202 ± 0.025 , $p < 0.0001$; Total lymphocyte, 0.423 ± 0.050 vs. 0.763 ± 0.132 vs. 1.852 ± 0.405 , $p < 0.0001$) (Figure 1B).

2. 말초 관절염 관절강 내 CCL20 발현 세포의 증가

CCL20 발현 세포의 빈도 차이를 보기 위해 HC PBMC, AS PBMC 및 AS SFMC를 CD4+ T 세포, CD4- T 세포 및 전체 림프구로 나누어 관찰하였다. 모든 세포 집합에서 HC PBMC와 AS PBMC 사이에는 CCL20 발현의 유의한 차이가 없었던 반면, HC 및 AS PBMC에 비해 AS SFMC에서 CCL20가 유의하게 높게 발현되었다 (CD4+ T 세포, 13.90 ± 1.30 vs. 21.44 ± 3.793 vs. 52.50 ± 3.138 , $p = 0.0003$; CD4- T 세포, 8.247 ± 1.090 vs. 8.910 ± 1.092 vs. 20.05 ± 2.057 , $p = 0.0008$; Total lymphocyte, 22.17 ± 0.203 vs. 30.38 ± 4.614 vs. 72.40 ± 3.068 , $p = 0.0006$) (Figure 2A). 또한, HC 혈청과 AS 환자의 혈청,

활막액에서 CCL20의 수치를 ELISA를 통해 비교한 결과, HC 혈청과 AS 환자의 혈청 사이에서 CCL20의 수치의 유의미한 차이는 없었지만, AS 환자의 활막액에서 CCL20이 유의미하게 높게 발현되어있음을 확인하였다 (14.57 ± 7.867 vs. 15.38 ± 3.566 vs. 12470 ± 7727 , $p = 0.001$) (Figure 2B).

또한, 질병에 관계없이 모든 활막액에서 CCL20의 발현이 높게 나타나는지 확인하기 위해 대조군인 OA 환자의 활막액과 AS 환자의 활막액에서 CCL20의 수치를 비교한 결과, OA 환자보다 AS 환자의 활막액에서 CCL20의 분비가 현저히 높음을 확인하였다 (50.57 ± 21.31 vs. 1612 ± 807.8 , $p = 0.01$) (Figure 2B).

3. CCL20의 발현과 IL-17A 발현과의 상관관계

AS환자의 활막에서 IL-17A와 CCL20가 높게 발현됨을 확인하고, 그에 따라 IL-17A와 CCL20의 연관성을 확인하고자 IL-17A 생성 세포의 빈도가 높은 샘플에서 CCL20 발현 세포의 비율과 CCL20 비 발현 세포 (CCL20 - 세포)와 CCL20 발현 세포 (CCL20 + 세포)에서 IL-17A 생성 여부를 비교분석하였다. 그 결과, 대부분의 IL-17A는 CCL20 + 세포에서 높게 발현됨을 확인하였다 (Figure 3A). 이를 토대로 전체 세포에서 CCL20와 IL-17A를 동시 발현하는 세포를 조사하였고, 그 결과 IL-17A는 CCL20- 세포보다 CCL20+ 세포에서 현저히 높게 생성됨을 확인하였다 (0.079 ± 0.015 vs. 1.947 ± 0.370 , $p = 0.031$) (Figure 3B).

4. CCL20에 의한 IL-17A 생성 세포 발현 촉진

CCL20가 IL-17A의 생성을 촉진하는지 알아보기 위해 CCL20 케모카인인 h-

CCL20을 이용하여 실험을 진행하였다. h-CCL20의 존재 여부에 따라 HC 및 AS PBMC를 배양하고 유세포 분석을 통해 IL-17A 생성 세포의 빈도를 CD4+ 세포와 전체 림프구에서 관찰하였다. HC PBMC에서는 h-CCL20이 없는 경우와 비교하여 h-CCL20을 함께 배양할 때 CD4+ T 세포에서 IL-17A 생성 세포 즉, Th17 세포가 증가하였고, (0.645 ± 0.102 vs. 0.762 ± 0.129 , $p = 0.031$) 전체 림프구에서도 h-CCL20과 함께 배양했을 때 IL-17A 생성 세포가 증가됨을 확인하였다. (0.90 ± 0.113 vs. 1.025 ± 0.119 , $p = 0.031$) (Figure 4A).

AS PBMC에서도 h-CCL20이 없는 경우와 비교하여 h-CCL20을 함께 배양할 때 CD4+ T 세포에서 Th17 세포의 발현이 증가하였고 (0.823 ± 0.193 vs. 1.01 ± 0.222 , $p = 0.031$), 전체 림프구에서도 h-CCL20이 없는 경우와 비교하여 h-CCL20과 함께 배양할 때 IL-17A 생성 세포가 증가하였다 (1.074 ± 0.238 vs. 1.322 ± 0.258 , $p = 0.031$) (Figure 4B).

또한 CCL20이 현저히 증가되어있는 AS SFMC에 CCL20 억제제인 h-CCL20 BL을 처리하여 IL-17A 생성 세포의 빈도 변화를 관찰하였을 때, h-CCL20 BL 처리하지 않은 세포에 비해 h-CCL20 BL을 처리한 경우 Th17 세포의 빈도가 유의하게 감소하였다 (0.053 ± 0.014 vs. 0.117 ± 0.019 , $p = 0.031$) (Figure 4C).

5. CCL20에 의한 Th17 세포의 이동

Figure 2의 결과에 따르면, CCL20은 AS 환자의 활막에서 유의하게 더 높게 발현되었다. 이를 토대로 본 연구에서는 CCL20 케모카인과 AS 환자의 혈청 및 활막액이 IL-17A 생성 세포 이동에 미치는 영향을 확인하기 위해 Transwell

cell migration assay를 수행하였다. HC PBMC에서 CD4+ T 세포를 분리하여 사용하였고, IL-17A를 생성하는 CD4+ T 세포인 Th17 세포의 이동을 관찰하였다 (Figure 5A). 가가 하부 chamber 배지에 PBS, h-CCL20, HC 혈청, AS 환자의 혈청과 활막액을 추가하였고, 위의 각 조건에 h-CCL20 BL을 추가하여 세포의 이동을 비교하였다. 전체 CD4+ 세포의 이동 수는 AS 활막액을 추가한 군에서 가장 많았고, Th17 세포는 h-CCL20, AS 혈청 및 AS 활막액의 존재 하에 증가하는 경향을 보였다. 특히 h-CCL20를 추가한 조건에서 Th17가 가장 증가하는 경향을 보였다 (Figure 5B).

h-CCL20 BL을 이용하여 각 조건에서 CCL20를 억제 했을 때, 모든 조건에서 IL-17A 생성 세포의 이동은 CCL20가 억제되지 않은 경우에 비해 CCL20가 억제되었을 때 감소하는 경향을 보였다. 특히, h-CCL20 조건과 AS 활막액 조건에서 CCL20를 억제했을 때 세포 이동이 크게 감소하는 경향을 보였다 (Figure 5C).

6. AS 동물 모델에서 CCL20 억제제의 염증 억제 효과

Ex vivo 실험을 통해 세포에서 CCL20 억제 시 효과를 확인한 후, 생체 내 관절 염증에 대한 CCL20 억제의 효과를 조사하기 위해 마우스 in vivo 실험을 수행하였다. 실험 프로토콜은 다음과 같다 (Figure 6A). AS 질환 특이적 모델로 알려진 SKG 마우스에 curdlan 을 주사하여 관절염을 유도하였고, curdlan 주입 1 주일 후부터 양성대조군과 CCL20 BL 군에 각각 PBS 200 ul 와 PBS 200 ul 에 희석한 m-CCL20 BL 20 µg 을 총 7 주 동안 주 2 회 복강내 주사하였다. 관절염 점수에서는 curdlan 주입 5 주 후부터 양성대조군과 CCL20 BL 군 사이에

통계적으로 유의한 차이를 보였고(2.013 ± 0.381 vs. 4.100 ± 0.869 , $p = 0.024$), 실험 종료 시점에서 CCL20 BL 군에서 관절 염증 억제의 효과를 확인하였다. (2.525 ± 0.622 vs. 4.675 ± 0.732 , $p = 0.044$) (Figure 6B). 실험 후 각 군의 대표적인 동물의 상태는 다음과 같았다(Figure 6C).

고찰

본 연구에서는 HC 과 AS 환자의 PBMC 와 SFMC 를 이용한 ex vivo 실험을 통해 Th17 세포와 CCL20 가 AS 환자의 관절강 내에 매우 증가되어 있음과 CCL20 이 Th17 세포의 증가 및 모집에 역할을 한다는 것을 확인하였다. 또한 in vivo 연구를 통해 CCL20 을 억제해 통해 AS 에서 관절 염증 개선의 효과를 관찰함으로써 CCL20 와 Th17 세포 사이의 연관성이 있음을 밝혔다.

Th17 세포는 AS 의 주요 원인 중 하나로 알려졌으며, 특히 Th17 세포에서 생성되는 IL-17 은 AS 의 주요 염증 매개체이다 [1, 5]. Th17 세포는 다양한 염증성 사이토카인 및 케모카인에 대한 수용체를 가지고 있어 사이토카인과 케모카인과의 상호작용을 통해 염증을 악화시킨다. 특히, CCL20 의 수용체인 CCR6 는 Th17 세포에서 고도로 발현되어 있으며, CCL20 는 세포가 염증조직으로 이동하도록 한다 [9, 10, 13, 14]. 또한 CCR6 는 Th17 세포 외에도 조절 T 세포 (regulatory T cell, Treg)에서도 고도로 발현되는데, Treg 에서 CCL20 와의 상호작용을 통해 Foxp3 유전자의 발현을 억제하고 Th17 분화를 촉진시키며 AKT/mTOR/STAT3 축을 통해 Treg 세포의 기능을 억제한다 [15, 16]. 질병 측면에서는 건선, 류마티스 관절염(RA), 염증성 장 질환, 다발성 경화증 등 자가면역질환에서 CCL20-CCR6 축이 중요한 역할을 한다고 알려져있다 [13, 15, 17]. 건선은 피부에 생기는 자가면역질환이다. 피부손상부위나 건선 발생 부위에 침윤된 수지상세포가 Th17 세포를 분화 및 증식시키는 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-23 을 분비하고, 이로 인해 분화된 Th17 세포는 IL-17A 를 분비한다. 건선 부위에서 생성된 TNF- α , IL-17A, IFN- γ 등 염증성 사이토카인에 의해

CCL20 의 생성이 현저히 향상되며, 이는 염증 부위로 세포를 끌어당겨 염증을 더욱 심화시켰다 [6, 18, 19]. 염증성 장질환에서는, 염증성 장질환 환자는 염증성 장질환을 가지고 있지 않은 사람에 비해 결장 조직에서 CCL20 가 유의하게 증가 되어있는 것으로 관찰되었으며, 마우스 실험에서 CCR6-CCL20 축의 차단은 대장염을 호전시켰다는 연구결과를 보였다 [14, 15, 20]. 특히 CCR6 $-/-$ 마우스 분석을 통해 CCR6-CCL20 축이 수지상 세포의 화학 주성에 관여하며, Peyer's patch 의 전체 구조와 점막 부위의 면역학적 항상성에 중요할 것임을 시사하였다 [21, 22]. 관절과 관련하여 CCL20 는 류마티스 질환인 건선성 관절염과 RA 에서 염증의 중증도와 연관성이 있다. 건선성 관절염환자의 혈청 및 활막액에서 CCL20 가 증가되어 있고, CCL20 억제제를 처리한 마우스에서 피부 염증이 현저히 개선되었으며, STAT3 인산화도 감소하였다 [6]. RA 환자의 관절에도 CCL20 수치가 크게 향상되어 있었고, 마우스에 anti-CCR6 mAb 처리하였을 때, 관절염의 발병 및 중증도가 초기 단계에서 현저히 억제되었다. RA 관절에서 IFN- γ 와의 연관성은 발견하지 못했지만 IL-17 과의 상관관계를 발견하였고, CCR6 및 CCL20 가 Th17 세포에 의해 발현되며 Th17 세포의 이동에 필요함을 발견하였다. 또한 CCL20- CCR6 축은 관절에서 자기 파괴적인 면역 반응을 개시하여 RA 와 같은 자가면역 관절염의 발병을 유도한다는 것을 보여주었다 [9]. 더하여 CCR6 를 수용체로 가지면서 IL-17 을 분비하는 $\gamma\delta$ T 세포와 Th17 세포가 CCL20 에 의해 염증환경으로 이동되어 염증을 증가시킨다는 결과가 보고된 바 있다 [6, 9, 23].

이를 바탕으로 본 연구에서는 AS 에서 IL-17A 와 CCL20 의 관계성 및 역할을 확인하였다. 특히, CCL20 억제를 통해 염증 개선의 효과를 확인함으로써

CCL20가 AS 치료를 위한 새로운 표적물질로서의 가능성이 있음을 발견함에 의의가 있다. 현재 AS의 치료에 사용되는 항-TNF 제제는 면역 매개 질환에 관여하는 TNF의 생리적 반응을 억제하고, 이는 AS에서 임상적 증상을 개선하였다는 연구결과에 따라 널리 사용되고 있다 [24-27]. 특히, 항-TNF 제제는 중증에 해당하는 증상을 가질 때 효과를 보인다 [25, 27]. 그러나 주사 부위의 발적, 결핵 등의 감염, 심하게는 심낭염이 발생하는 다양한 부작용이 발견되었다 [28, 29]. 본 연구는 AS에서 항-TNF 제제를 대신할 다른 생물학적 제제로 CCL20의 가능성을 확인한 연구이다.

그러나 본 연구에는 몇 가지 제한점이 있다. 먼저, HC PBMC와 AS PBMC에서 CCL20가 존재할 때 IL-17A의 발현이 증가함을 확인하였지만 AS SFMC에서는 확인하지 못하였다. 또한 AS 질병 마우스에서 진행한 *in vivo* 실험에서 임상 점수 결과와 마우스 관절 붓기는 확인하였으나 관절 내에서 조직학적으로 Th17 세포의 존재를 확인하지 못하였다. 조직 손상 정도를 확인하기 위해 면역조직화학검사 (Immunohistochemistry, IHC)를 통한 조직 형태학적 분석과 염증성 침윤을 확인하는 실험들을 추가적으로 진행하여 염증세포의 침윤 정도를 비교 후 더 정확한 데이터를 추가해야 할 것이다.

추가적으로 Transwell migration assay에서 확인된 세포 이동 분석에서 전체 세포 이동은 CCL20 케모카인만 존재할 때보다 AS 환자의 활막액이 존재할 때 현저하게 증가되었다. 이로 보아, AS 환자의 활막액 내에는 CCL20 외 세포의 화학 주성을 유도하는 또 다른 케모카인들이 존재할 것으로 예상되며, 이들 또한 AS와의 관련성에 대해 연구할 가치가 있을 것으로 생각된다.

결론

본 연구에서는 CCL20와 AS 환자의 주된 병인 중 하나인 IL-17A와의 관계성을 알아보려고 하였다. 결과적으로 AS 환자의 PBMC와 SFMC를 이용한 ex vivo 실험뿐만 아니라 동물 모델을 이용한 in vivo 실험을 통해서도 CCL20 억제 시 관절 염증이 감소하였고, 이는 CCL20의 억제가 AS 치료의 새로운 대안이 될 수 있음을 시사한다.

참고 문헌

1. Yeremenko, N., J.E. Paramarta, and D. Baeten, *The interleukin-23/interleukin-17 immune axis as a promising new target in the treatment of spondyloarthritis*. *Current Opinion in Rheumatology*, 2014. **26**(4): p. 361-370.
2. Ward, M.M., et al., *2019 Update of the American College of Rheumatology/Spondylitis Association of America/Spondyloarthritis Research and Treatment Network Recommendations for the Treatment of Ankylosing Spondylitis and Nonradiographic Axial Spondyloarthritis*. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, 2019. **71**(10): p. 1285-1299.
3. Taurog, J.D., A. Chhabra, and R.A. Colbert, *Ankylosing Spondylitis and Axial Spondyloarthritis*. *N Engl J Med*, 2016. **375**(13): p. 1303.
4. Watad, A., et al., *The Early Phases of Ankylosing Spondylitis: Emerging Insights From Clinical and Basic Science*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 2668.
5. van Tok, M.N., et al., *Interleukin-17A Inhibition Diminishes Inflammation and New Bone Formation in Experimental Spondyloarthritis*. *Arthritis Rheumatol*, 2019. **71**(4): p. 612-625.
6. Shi, Z., et al., *Targeting the CCR6/CCL20 Axis in Enteseal and Cutaneous Inflammation*. *Arthritis Rheumatol*, 2021. **73**(12): p. 2271-2281.
7. Ghafouri-Fard, S., et al., *A review on the role of chemokines in the pathogenesis of systemic lupus erythematosus*. *Cytokine*, 2021. **146**: p. 155640.
8. Baba, M., et al., *Identification of CCR6, the specific receptor for a novel lymphocyte-directed CC chemokine LARC*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(23): p. 14893-8.
9. Hirota, K., et al., *Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model*. *J Exp Med*, 2007. **204**(12): p. 2803-12.
10. Homey, B., et al., *Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3 alpha/CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis*. *J Immunol*, 2000. **164**(12): p. 6621-32.
11. Cho, Y.N., et al., *Altered distribution and enhanced osteoclastogenesis of*

- mucosal-associated invariant T cells in gouty arthritis*. Rheumatology (Oxford), 2020. **59**(8): p. 2124–2134.
12. Sakaguchi, N., et al., *Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice*. Nature, 2003. **426**(6965): p. 454–460.
 13. Meitei, H.T., N. Jadhav, and G. Lal, *CCR6-CCL20 axis as a therapeutic target for autoimmune diseases*. Autoimmunity Reviews, 2021. **20**(7).
 14. Kulkarni, N., M. Pathak, and G. Lal, *Role of chemokine receptors and intestinal epithelial cells in the mucosal inflammation and tolerance*. J Leukoc Biol, 2017. **101**(2): p. 377–394.
 15. Kulkarni, N., et al., *CCR6 signaling inhibits suppressor function of induced-Treg during gut inflammation*. J Autoimmun, 2018. **88**: p. 121–130.
 16. Komatsu, N., et al., *Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis*. Nat Med, 2014. **20**(1): p. 62–8.
 17. Hedrick, M.N., et al., *CCR6 is required for IL-23-induced psoriasis-like inflammation in mice*. J Clin Invest, 2009. **119**(8): p. 2317–29.
 18. Mabuchi, T., et al., *Chemokine receptors in the pathogenesis and therapy of psoriasis*. J Dermatol Sci, 2012. **65**(1): p. 4–11.
 19. Harper, E.G., et al., *Th17 cytokines stimulate CCL20 expression in keratinocytes in vitro and in vivo: implications for psoriasis pathogenesis*. J Invest Dermatol, 2009. **129**(9): p. 2175–83.
 20. Esplugues, E., et al., *Control of TH17 cells occurs in the small intestine*. Nature, 2011. **475**(7357): p. 514–8.
 21. Cook, D.N., et al., *CCR6 mediates dendritic cell localization, lymphocyte homeostasis, and immune responses in mucosal tissue*. Immunity, 2000. **12**(5): p. 495–503.
 22. Lee, A.Y. and H. Korner, *CCR6 and CCL20: emerging players in the pathogenesis of rheumatoid arthritis*. Immunol Cell Biol, 2014. **92**(4): p. 354–8.
 23. Mabuchi, T., et al., *CCR6 is required for epidermal trafficking of gammadelta-T cells in an IL-23-induced model of psoriasiform dermatitis*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(1): p. 164–71.
 24. Maxwell, L.J., et al., *TNF-alpha inhibitors for ankylosing spondylitis*. Cochrane

- Database Syst Rev, 2015(4): p. CD005468.
25. Coates, L.C., et al., *Anti-TNF Therapy in Ankylosing Spondylitis: Insights for the Clinician*. Ther Adv Musculoskelet Dis, 2010. **2**(1): p. 37-43.
 26. Inman, R.D., et al., *Efficacy and safety of golimumab in patients with ankylosing spondylitis: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(11): p. 3402-12.
 27. Haberhauer, G., C. Strehblow, and P. Fasching, *Observational study of switching anti-TNF agents in ankylosing spondylitis and psoriatic arthritis versus rheumatoid arthritis*. Wien Med Wochenschr, 2010. **160**(9-10): p. 220-4.
 28. Bennett, A.N., et al., *Severity of Baseline Magnetic Resonance Imaging-Evident Sacroiliitis and HLA-B27 Status in Early Inflammatory Back Pain Predict Radiographically Evident Ankylosing Spondylitis at Eight Years*. Arthritis and Rheumatism, 2008. **58**(11): p. 3413-3418.
 29. Konttinen, L., et al., *Anti-TNF therapy in the treatment of ankylosing spondylitis: the Finnish experience*. Clin Rheumatol, 2007. **26**(10): p. 1693-700.

CCL20 Inhibition for Treating Inflammation in Ankylosing Spondylitis

Hui-Ju Kim

Department of Biomedical Sciences

Graduate School of Chonnam National University

(Supervised by Professor Tae-Jong Kim)

(Abstract)

Object: Ankylosing spondylitis (AS) is a chronic inflammatory disease that is one of the subsets of spondyloarthritis. C-C chemokine receptor 6 (CCR6) is one of the receptors of helper T 17 cells (Th17) which is emerging as the main etiology of ankylosing spondylitis. CCR6 interacts with the C-C motif chemokine ligand 20 (CCL20), induces chemotaxis and attracts cell to the site of inflammation. However, the role and mechanism of CCL20 are not well known in AS. Therefore, this study aimed to investigate whether CCL20 inhibition is effective in treating chronic inflammation and bone formation in ankylosing spondylitis.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy controls (HCs) and AS patients, and synovial fluid mononuclear cells (SFMCs) were

obtained from AS patients, and inflammatory cytokine-producing cells were analyzed using flow cytometry. The levels of CCL20 and IL-17A were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The increase or decrease of IL-17A according to the presence or absence of the addition of Recombinant Human MIP-3 α (CCL20) (h-CCL20; 300-29A, Peprotech, USA) and Human CCL20/MIP-3 alpha Antibody (h-CCL20 BL, MAB360, R&D, USA) was confirmed through flow cytometry. Then, the effect of CCL20 on the migration of Th17 cells was confirmed through Transwell migration assay. In an in vivo experiment, AS symptoms were induced by injecting curdlan into SKG mice. After treatment with mouse CCL20/MIP-3 alpha antibody (m-CCL20 BL, MAB 7601, R&D) or PBS, symptoms such as swelling of the ankle and toe joints were observed and converted into scores.

Results: IL-17A was produced significantly higher in SFMC of AS patients than in PBMCs of AS patients. Then, frequency of the CCL20 expressing cells was identified also significantly higher in the SFMC of AS patients than in the PBMCs of the AS patients. As a result of confirming the production of IL-17A depending on the expression of CCL20, it was found that the production of IL-17A was significantly increased in CCL20 expressing cells than in CCL20 non expressing cells. In addition, IL-17A was increased in PBMC of HC and AS patients when h-CCL20 was added, and IL-17A decreased when h-CCL20 BL was added in SFMC of AS patients. In the cell migration, the CD4⁺ T cell migration the most increased when the synovial fluid of AS patients was added

to the medium, but the migration of IL-17A producing CD4⁺ T cells (Th17 cells) the most increased when h-CCL20 was added to the medium. In addition, in the SKG mouse model, CCL20 inhibition significantly reduced swelling and inflammation of the ankle and toe joints.

Conclusion: In the ex vivo experiments using PBMCs and SFMCs from AS patients, as well as in vivo experiments, it was confirmed that joint inflammation was reduced when inhibited CCL20. Thus, inhibition of CCL20 could be a new alternative for the treatment of AS.

Table 1. Clinical characteristics of enrolled subjects

| | PBMC | | SFMC |
|----------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | HC | AS | AS |
| Total number | 46 | 20 | 15 |
| Age, mean \pm SD (years) | 27.6 \pm 1.18 | 32.2 \pm 1.86 | 36.6 \pm 3.8 |
| Male, n (%) | 35 (76.1) | 17 (85.0) | 9 (60.0) |
| AS-DAS, mean \pm SD | N.A | 3.48 \pm 0.98 | 3.33 \pm 1.83 |
| CRP, mean \pm SD (mg/dl) | N.A | 1.92 \pm 0.33 | 4.64 \pm 5.38 |
| Recent treatments | | | |
| NSAIDs use, n (%) | N.A | 16 (80) | 15 (100) |
| Sulfasalazine use, n (%) | N.A | 1 (5) | 12 (80) |
| TNF blocker use, n (%) | N.A | 6 (30) | 6 (40) |
| IL-17 blocker use, n (%) | N.A | 0 (0) | 0 (0) |

AS-DAS: Ankylosing Spondylitis–Disease Activity Index, CRP: C Reactive Protein, HC: Healthy Control, HLA: Human Leukocyte Antigen, N.A.: Not Applicable, NSAIDs: Non-steroid inflammatory drugs, PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cell, SFMC: Synovial Fluid Mononuclear Cell

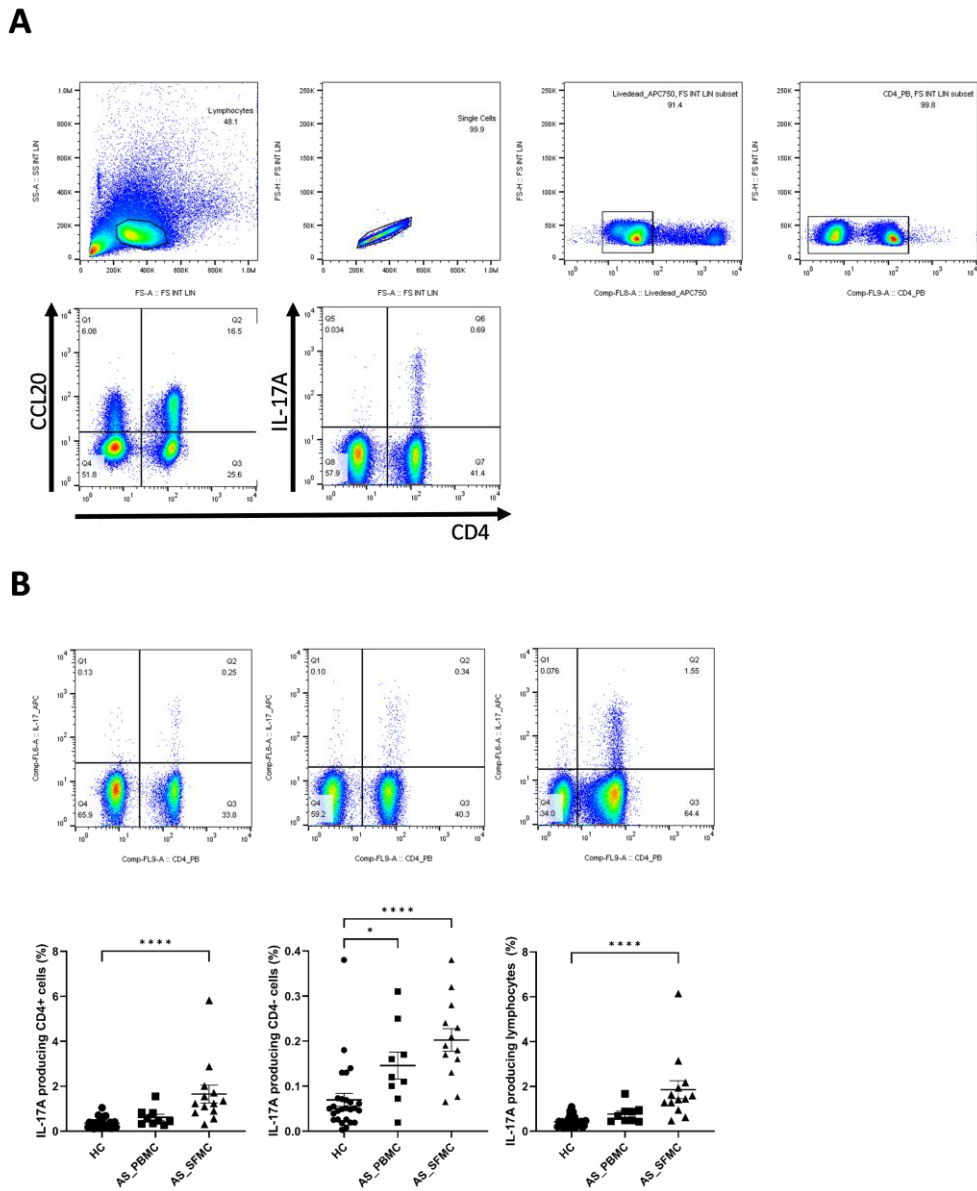


Figure 1. Increased Th17 cells in inflammatory joint. (A) Strategy for gating protocol. (B) Comparing to level of IL-17A producing cells in CD4+ T cells, CD4- T cells and total lymphocytes in HC and AS patient's PBMC and SFMC. * $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$ by Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons.

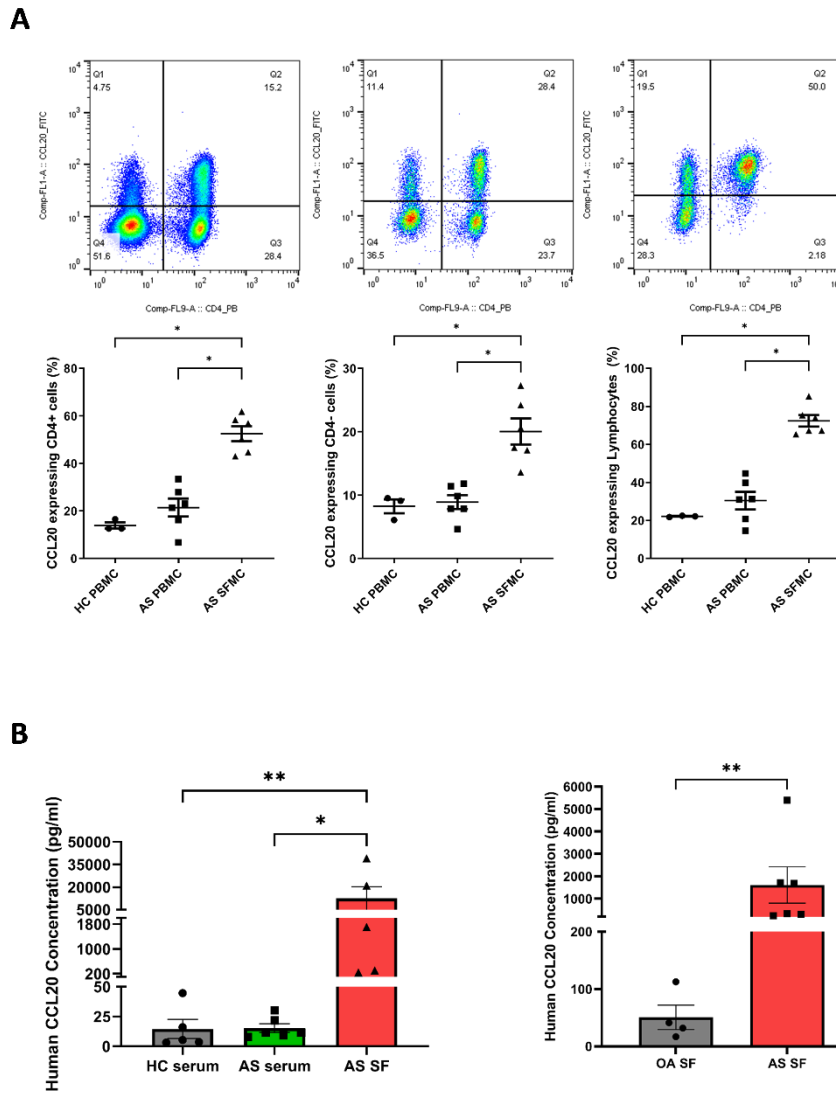


Figure 2. Increased CCL20 expressing cells in inflammatory joint. (A) Comparison of CCL20 expressing cells frequency between HCs, AS PBMCs and AS SFMCs. (B) Comparison of expression levels of CCL20 between OA and AS synovium using HC serum and AS patient's serum and Synovial Fluid(SF). Symbols represent the individual sample. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons and Mann-Whitney test.

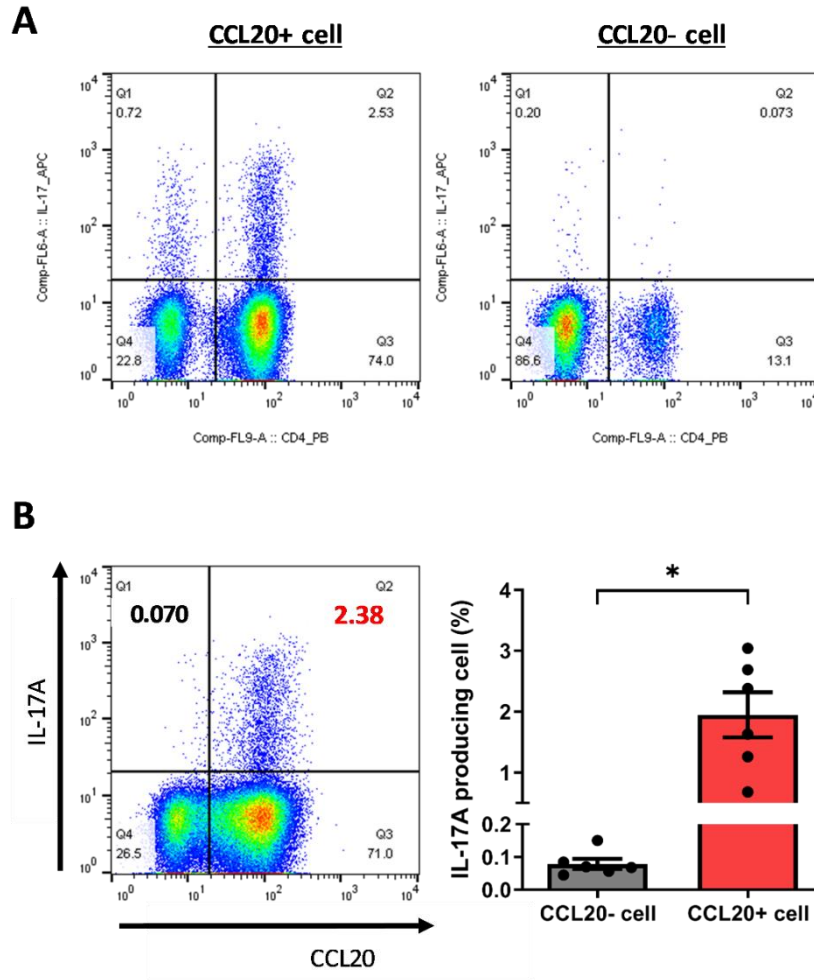


Figure 3. Increased IL-17A producing cells in CCL20 expressing cells. (A) Comparing the frequency of IL-17A secretion between CCL20 expressing cells and non-CCL20 expressing cells. (B) Comparison of the frequency of cells that expressing both CCL20 and IL-17A and cells that expressing only IL-17A without CCL20 in total lymphocytes. * $p < 0.05$ by Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

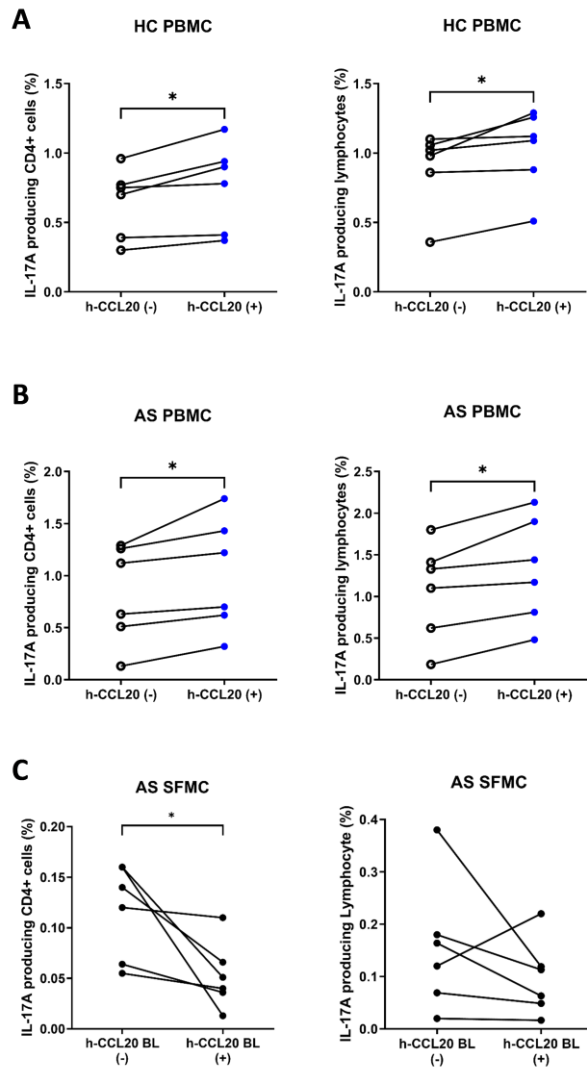


Figure 4. Increase or decrease IL-17A secretion by presence of CCL20 chemokine. (A, B) Compared frequency of IL-17A-producing cells according to whether or not h-CCL20 200 ng/ml was added, using flow cytometry in CD4+ T cells and total lymphocytes. (C) Compared frequency of IL-17A-producing cells according to whether or not h-CCL20 BL 5 μ g/ml was added, using flow cytometry in CD4+ T cells and total lymphocytes. * $p < 0.05$ by Wilcoxon matched-pairs signed rank test.

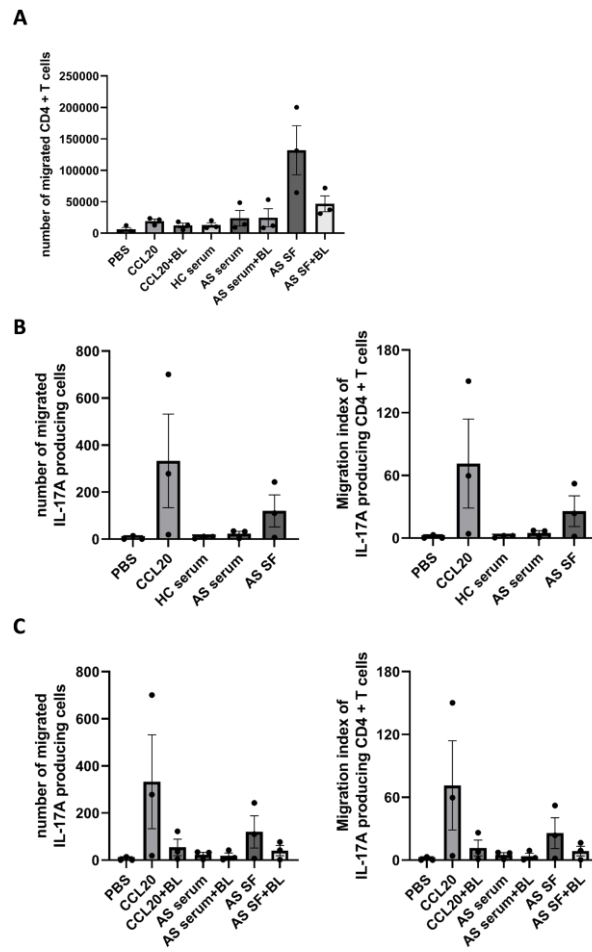


Figure 5. Migration of Th17 cells induced by CCL20 chemokine. (A) Comparison of the number of migrated cells depending on conditions. (B) Comparison of the number of cells migrated in the presence of CCL20 chemokine, HC serum, AS serum, and AS synovial fluid (SF). (C) Comparison of the number of cells migrated in the presence of CCL20 chemokine, HC serum, AS serum, and AS synovial fluid (SF) or h-CCL20 BL (5 μ g/ml). Migration index was calculated by the number of cells that migrated in all condition divided by the number of cells that migrated in the presence of PBS. Data were obtained from 3 HCs.

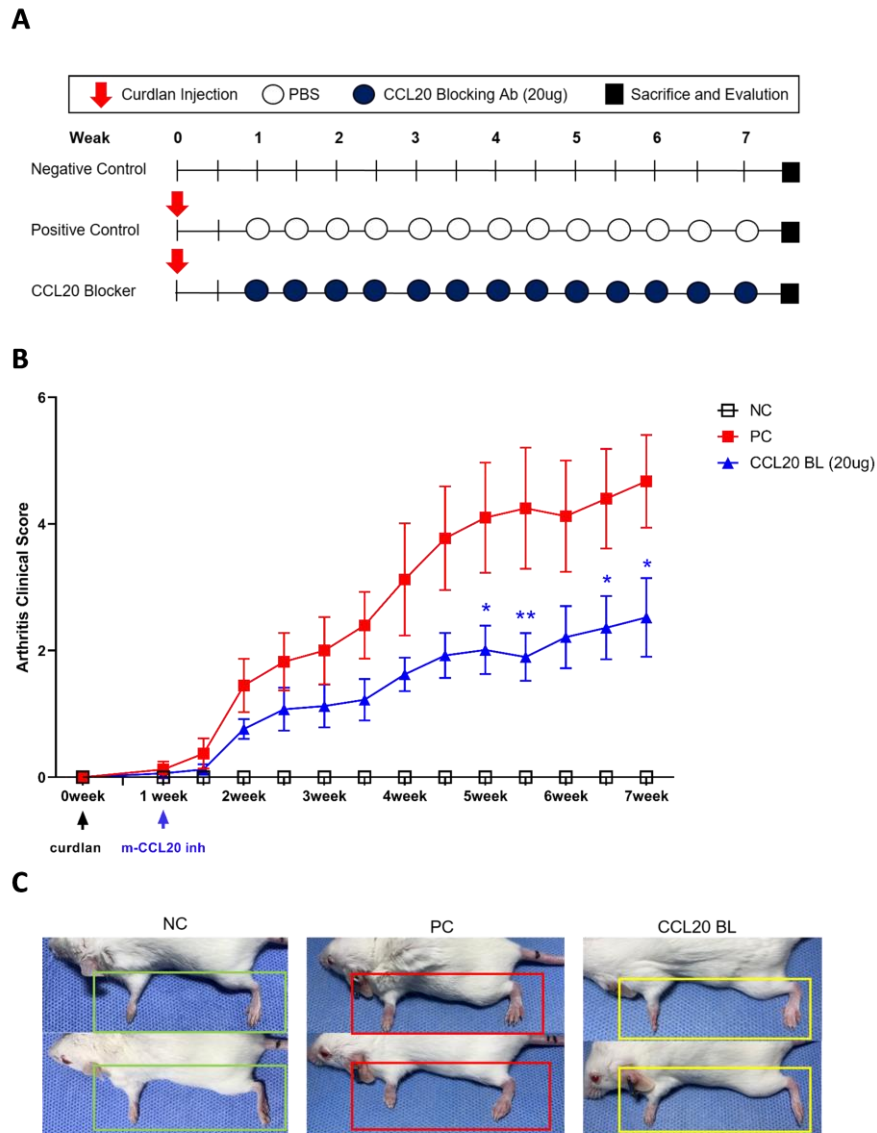


Figure 6. Inhibition of CCL20 reduced clinical arthritis symptoms in SKG mice.

(A) Experimental protocol of in vivo mouse study. Experiments were performed in three groups: negative control (NC), positive control that injected PBS (PC), m-CCL20 BL (CCL20 BL). PBS or m-CCL20 BL 20ug were treated i.p injection 2 times a week for 6 weeks to curdlan treated SKG mice. (B) Arthritis clinical scores depending on time line. Black line indicated negative

control, red line indicates positive control and blue line indicates CCL20 BL group, respectively. The arthritis scores were determined based on clinical arthritis severity. Variables were presented with mean and SEM. $*p < 0.05$, $**p < 0.01$ by two-way analysis of variance (ANOVA). (C) A representative figure among the three groups at the end of the experiment.