

자기면역성 뇌척수염 조직에서 CPP32의 면역조직화학적 관찰

신태균 · 문창종 · 안미정 · 위명복

제주대학교 농과대학 수의학과, 생명과학연구소, Brain Korea 21
(2000년 7월 13일 게재승인)

Immunohistochemical study of CPP32 (Caspase-3) in the spinal cords of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis

Tae-kyun Shin*, Chang-jong Moon, Mee-jung Ahn, Myung-bok Wie

Department of Veterinary Medicine, Institute for Life Science, Brain Korea 21,
Cheju National University, Cheju 690-756, Republic of Korea

(Accepted by Jul 13, 2000)

Abstract : The aim of this study was to evaluate the involvement of CPP32 (caspase-3), one of the death-related enzymes, in the course of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). EAE was induced in Lewis rats immunized with an emulsion of rat spinal cord homogenate with complete Freund's adjuvant supplemented with *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra, 5mg/ml). The expression of CPP32 in the spinal cords of rats with EAE was studied.

In normal rat spinal cords, CPP32 is constitutively, but weakly, expressed in neurons and some neuroglial cells. In the EAE spinal cords, many inflammatory cells were positive for CPP 32, and the majority of CPP32(+) cells were identified as ED1(+) macrophages. During this stage of EAE, the number of CPP32(+) cells in brain cells, including neurons and astrocytes, increased, and these cells also had increased CPP32 immunoreactivity. CPP32 immunoreactivity was not always matched with apoptosis of inflammatory cells in EAE lesions.

We speculate that CPP32, which is constitutively expressed in brain cells, increases in response to neuroimmunological stimulation in both brain neuronal cells and inflammatory cells. The functional role of CPP32 in neuroimmunological disorders is discussed.

Key words : CPP-32, experimental autoimmune encephalomyelitis.

이 논문은 2000년도 제주대학교 발전기금 학술연구비(생명과학연구소)에 의해 연구되었으며 제주대학 방문세미나, 항체 제공 및 자문을 해준 일본 이화학연구소 R. Takahashi 박사에게 감사드립니다.

Address reprint requests to Dr. Tae-kyun Shin, Department of Veterinary Medicine, Institute for Life Science, Brain Korea21, Cheju National University, Cheju 690-756, Republic of Korea.

서 론

자기면역성 뇌척수염(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)은 T세포 매개성 질병으로 중추신경계에서 T세포 침윤과 수초탈락이 특징이며 사람의 다발성 경화증(multiple sclerosis, MS)의 동물모델로 활용된다¹. EAE의 발병은 뇌내 침윤된 염증세포로부터 분비된 pro-inflammatory cytokine(IL-1 β , TNF- α , IL-12 등)에 의해 야기되며², 심한 마비기를 지나게 되면 anti-inflammatory cytokine(IL-4, IL-10, TGF- β 등)의 작용² 및 침윤된 염증세포의 apoptosis에 의해 회복하는 것으로 알려지고 있다³. 이 질병의 회복기전중 하나인 염증세포의 apoptosis에 관여할 수 있는 인자들로 Fas-Fas ligand⁴, TNF- α , TNFR-1⁵, Bax, Bcl-2⁶ 및 ICE(caspase-1)⁷ 등이 밝혀져 있다.

CPP32 (caspase-3, Yama, Apopain)는 cysteine protease로서 불활성형의 CPP32(32kD)에서 TNF- α , TNFR-1, Fas-Fas ligand, growth factor deprivation, virus, DNA damage, granzyme 등의 여러가지 death signal로 인해 활성화된 p17(17kD)과 p12(12kD)의 소단위로 쪼개져 활성을 갖게 된다⁸⁻¹¹. 또한 CPP32는 *Caenorhabditis elegans* 의 ced-3와 homologue를 가지며 동시에 apoptosis에 관여하는 것으로 알려지고 있으며¹² 호흡기, 생식기, 소화기, 가슴샘, 림프절, 비장, 신경계세포 및 염증세포 등에서 광범위하게 발현된다¹³.

이 연구에서는 면역학적으로 격리된 뇌조직의 손상된 염증세포 및 이에 반응하는 신경계 세포에서 CPP32가 어떤 형태로 발현되는지를 확인하기 위하여 자기면역성 척수손상 모델인 EAE에서 CPP32를 면역조직화학적 방법으로 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물 : 암수 구별없이 7~12주령의 Lewis 랫트를 한국과학기술원 생명공학연구소로부터 분양받아 사용하였다.

자기면역성 뇌척수염(EAE)의 유도와 임상증상의 평가 : 정상 Lewis 랫트의 척수를 추출하여 0.05M phosphate buffer에서 균질화시킨 후(1g/ml), complete Freund's adjuvant(CFA; *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, 5mg/ml; Difco)를 동량 혼합한 후 면역원으로 사용하였다¹⁴. 면역

은 랫트의 좌우 뒷발바닥에 100 μ l씩 접종하였고, 면역한 랫트는 자기면역성 뇌척수염의 특징적인 임상증상을 단계별로 구분하였다. 즉, 증상없으면 Grade 0, 꼬리가 힘없이 늘어지면 Grade 1, 한쪽 뒷다리가 마비되면 Grade 2, 양쪽 뒷다리가 마비되면 Grade 3, 사지가 마비되면 Grade 4로 구분하였다¹⁵.

조직표본 준비와 조직검사 : 실험동물은 ether로 마취하여 방혈하였고, 조직채취는 정상랫트, 면역후 12~14일 경에 뒷다리와 꼬리가 마비되는 Grade 3기와 면역후 21일 이후의 회복기로 나누어 각 실험군당 3마리씩 희생시켜 척수를 채취하였다. 그리고 면역조직화학염색용 조직은 4% paraformaldehyde로 고정하고 에탄올과 자일렌으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 파라핀에 포맷한 후 5 μ m의 두께로 조직절편을 만들어 H-E 염색을 실시하였다.

Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick end-labeling (TUNEL) 방법 : TUNEL 반응은 ApopTag[®] Plus In Situ Apoptosis Detection Kit (Oncor, London, UK)를 사용하였다. 파라핀을 제거한 절편에 0.005% pronase(Dako, Copenhagen, Denmark)를 37 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시켰다. 내재성 peroxidase를 제거하기 위해 0.3% H₂O₂가 포함된 메탄올에 20분간 반응시켰으며, 반응이 끝난 절편은 PBS로 5분간 3회 세척한 후 TdT buffer solution(140mM sodium cacodylate, 1mM cobalt chloride, 30mM Tris-HCl, pH 7.2, 0.004 nmol/l digoxigenine-dUTP)에서 10분간 pre-equilibration 시켰다. TdT가 0.15U/l의 농도로 포함된 TdT buffer solution에 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시킨 후 TB buffer(300mM sodium chloride, 30mM sodium citrate)로 반응을 정지시켰다. 그후 절편은 peroxidase-labeled anti-digoxigenine antibody로 실온에서 60분간 반응시켰으며, diaminobenzidine substrate kit(Vector)를 이용하여 발색시켰으며, hematoxylin으로 대조염색을 실시하였다.

면역조직화학 : 슬라이드에 준비된 조직절편의 파라핀을 제거하고, 내재성 peroxidase를 제거하기 위해 0.3% H₂O₂가 포함된 메탄올에 20분간 반응시켰으며, 비특이적 반응을 방지하기 위해 10% normal goat serum으로 1시간 반응시켰다. 1차 항체로 CPP32(Upstate Biotechnology, NY)(1: 400), rat macrophage의 marker인 ED1(Serotec, London, UK)(1: 200) 그리고 rabbit anti-GFAP(Dako, Denmark)(1: 400)를 실온에서 1시간이상 반응시킨 후 biotinylated goat anti-rabbit IgG(Vector Laboratories, Burlingame, CA)(1:

200) 또는 biotinylated goat anti-mouse IgG(Vector Laboratories, Burlingame, CA)(1 : 200)로 45분간 반응시켰다. 이어 avidin-biotin peroxidase complex Elite kit(Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 실온에서 45분간 반응시켰다. 각 단계가 끝나고 PBS(pH 7.4)로 5분간 3회 충분히 세척했으며, 면역반응이 끝난 조직절편은 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride(DAB)(Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액으로 발색했다. 그리고 hematoxylin 용액으로 대조염색을 한 후, 에탄올과 자일렌으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 봉입하여 광학현미경으로 관찰했다.

면역반응세포의 평가 : CPP32의 면역반응의 결과를 2가지 방식으로 평가하였다. 염색의 강도에 따라, 염색이 안된 경우(0), 약함(1+), 보통(2+), 강함(3+), 매우 강함(4+)으로 평가하였고, 염색의 분포에 따라, 핵만 염색된 경우(N), 세포질만 염색된 경우(C), 핵과 세포질 모두 염색될 경우(NC)로 각각 평가하였다. 이상과 같은 조직표본내 면역반응세포의 평가는 Krajewska *et al*¹⁵의 방법을 따랐다.

결 과

EAE의 임상경과와 조직검사 :

임상경과 : 면역후 9~11일경에 꼬리의 마비기(G1)가 나타나 뇌척수염의 발병을 알 수 있었고, 12~15일경에는 꼬리 및 양쪽 후지의 마비(G3)가 일어나며 이 질병이 악화되었다. 16~17일경에 마비가 사라지면서 자연 회복되었다. 면역 후에 나타나는 임상증상의 변화는 Fig 1과 같이 나타났다.

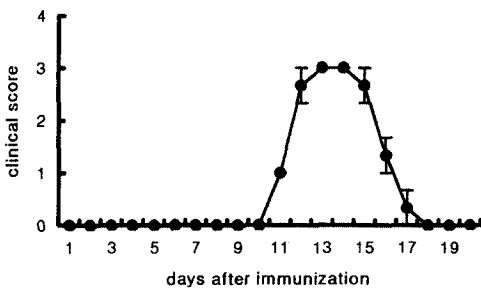


Fig 1. Clinical EAE scores in Lewis rats injected with 200mg of homogenated rat spinal cord on day 0 to induce EAE. The symbol (▲) indicated the mean clinical score for a group (n = 3) on the day indicated.

조직학적 소견 : 척수에 나타나는 조직학적 병변은 면역후 9~11일경의 발병초기에는 자기면역 반응한 염증세포들이 수막 주위에 나타났으며 수막근처 실질내로 염증세포가 침윤되었다. 12~15일경의 EAE 척수조직에서는 염증세포들이 주로 수막과 혈관주위에 침윤되었고, 조직내 edema를 보였으며(Fig 2B), 이렇게 침윤된 염증

Fig 2. Histological findings in the rat spinal cord. There were no histological changes in the normal rat spinal cord (A), while the Grade 3 EAE rat spinal cord (B) showed intercellular edema, perivascular cuffing, and infiltrating inflammatory cells (H-E stain, × 132).

세포들은 주로 T 림프구와 ED1 양성인 macrophage로 구성되어 있었다. 16~17일경, 회복기의 척수조직에서는 G 3기의 척수조직에서 보다 적은 수의 염증세포들이 나타났다. 또한 EAE 이환시 이렇게 침윤된 염증세포들의 다수는 TUNEL 양성반응으로 나타났으나 거의 모든 신경세포와 아교세포는 TUNEL 양성반응을 나타내지 않았다(Fig 3).

CPP32의 면역반응 : 정상랫 척수조직에서는 CPP 32의 염색이 약하게 나타났으나 실질내 일부 GFAP 양성반응의 astrocyte(Fig 4C)에서 CPP32 양성반응이 확인되었고(Fig. 4B) 적은 수의 신경세포에서 약한 양성반응

Fig 3. TUNEL staining of the spinal cord of a rat with EAE (G 3, day 13 post-innumization). TUNEL(+) cells (arrows) were largely located in the parenchyma and perivascular region (V; vessel) of the spinal cords of rats with EAE. Hematoxylin counterstain, Magnification : × 33

을 보였으나 그 수는 많지 않았다(Fig 4A). 또한 CFA만을 접종한 대조군의 척수에도 일부 GFAP 양성반응의 astrocyte(Fig 4F)에서 CPP32 양성반응이 확인되었고(Fig 4E) 적은 수의 신경세포에서 약한 양성반응을 보였으나 그 수는 많지 않았다(Fig 4D).

자기면역성 뇌척수염(Grade 3, 면역후 13일째)의 척수에는 CPP32 양성세포들이 대조군들에 비하여 다수 출현하였다. CPP32 양성세포의 cell phenotype을 조사한 결과 침윤된 일부 염증세포는 CPP32 양성으로 나타났으며(Fig 4H) 이런 염증세포들은 주로 ED1 양성 macrophage였다(Fig 4G). 한편 신경계 세포의 경우 신경아교세포(주로 astrocytes)(Fig 4I)에서는 염증부위에 근접한 경우 CPP32 면역반응이 증가하였다(Fig 4H).

CPP32는 핵과 세포질 내에 존재하는 것으로 알려져

있고 자기면역성 뇌척수염의 경우에도 신경계 세포와 염증세포의 핵내 및 세포질내에 CPP32 양성반응이 나타나 이를 구분하여 조사하였다(Table 1).

염증세포 : CPP32 양성반응의 염증세포중에 침윤된 ED1 양성 macrophage는 핵만 염색되었으며 염색의 강도는 0에서 4+ 정도로 다양하게 염색되었으나 2+에서 4+ 정도가 가장 많았다. 염증세포중에 세포가 작고 CPP32 음성반응으로 나타난 다수의 세포는 림프구이다.

Brain cell : 신경원세포는 대조군 척수조직에서는 극소수의 신경세포에서 CPP32 면역반응(0~2+)이 확인되었으나 그 수는 척수절편당 20개 이내로 거의 관찰되지 않았다. 그러나 G3(면역후 13일째)단계에서의 신경원세포는 CPP32 면역반응(0~3+)이 증가되었고, 특히 perivascular cuffing 인접부의 신경원세포에서 CPP32 염색성이 증가되었다. 각 단계에 따른 이런 변화는 Fig 4에서 CPP32 양성 운동신경원세포의 숫자의 변화와 비슷한 양상이었다. 별아교세포는 대조군과 EAE의 경우 모두 CPP32의 면역반응이 핵내 및 세포질까지 확인되었다. 염색강도는 대조군인 경우 0~3+정도였고 EAE의 경우 0~4+였으나 EAE의 경우 대부분이 2+~4+ 정도의 세포가 나타났다.

고 찰

CPP32(Caspase-3)는 다양한 조직에서 상존하고 있는 cystein protease의 일종으로 여러 기능을 가진 것으로 알려져 있으나 척수조직 내에서 CPP32의 역할에 대하여는 알려진 바 거의 없다. 본 연구에서는 CPP32의 역할을 규명하기 위해 정상 척수조직 및 자기면역성 뇌척수염 조직에서 CPP32의 발현을 관찰하였다.

Table 1. CPP32 immunoreactivity in the spinal cords of adjuvant-immunized and EAE rats

Cell type	5 CFA	G3 stage (D13PI)#	Recovery (D22PI)#
Inflammatory cells	0*/- **	0-4+/N, NC	0-4+/N, NC
Astrocytes	0-3+/N, C, NC	0-3+/N, C, NC	0-3+/N, C, NC
Vessels	0-2+/C	0-3+/N, NC	0-3+/N, NC
Neuronal cells	0-3+/C, NC	0-3+/N, C, NC	0-3+/N, C, NC

* Intensity of the immunoreactive cells: 0, negative; 1+, weak; 2+, moderate; 3+, strong; 4+, very intense.

** Distribution of expression in the cell; N, nucleus; C, cytoplasm; NC, both nucleus and cytoplasm.

D13PI, on day 13 post-immunization; D22PI, on day 22 post-immunization.

Fig 4. Immunohistochemical staining of CPP32 (A, B, D, E and H), GFAP (C, F and I), and ED1 (G) positive (+) cells in the spinal cords of Lewis rats. A few CPP32(+) neurons were found in normal rat spinal cord (A). Some weakly positive CPP32(+) cells were found in normal rat spinal cord (B, arrow) and some of these cells were also GFAP-positive (C, arrow). Some CPP32(+) glial cells were found in the spinal cords of adjuvant-immunized control rats (E, arrow) and some of these cells were also GFAP-positive (F, arrow). The CPP32(+) cells were located mainly in the perivascular region (H, arrowhead and arrows) of the spinal cords of rats with EAE, and some of these cells were also ED1-positive (G, arrow-heads) and GFAP-positive (I, arrows). A-J: counterstained with hematoxylin, Magnification: A-I: $\times 100$. All except the normal tissues were collected at days 13-15 post-immunization with adjuvant or brain tissue.

EAE에 이환된 랫트의 중추신경계에 침윤된 염증세포들은 주로 ED1 양성인 macrophage와 CD4 양성인 T세포이며, 이런 염증세포의 침윤에 의해 이 질병이 악화된다.^{14,16,17} 이런 많은 염증세포의 침윤에도 불구하고 다수의 신경계 세포는 살아남고, 염증세포가 제거되는 시기와 일치하며 이 질병의 임상증상은 사라지게 된다.^{3,18} 이런 경과를 보이는 EAE의 자연회복 기전중의 하나인 염증세포의 apoptosis에는 여러가지 인자가 관여될 수 있다.^{19,20}

일반적인 세포의 apoptosis에 관여하는 인자 중의 한 그룹인 caspase family에는 현재까지 14종이 알려져 있으며 그 중에 caspase-3(CPP-32)가 apoptosis 관여하는 인자 중에서 결정적인 역할을 한다고 알려져 있다.⁸

본 실험에서 CPP32는 정상 척수조직의 많은 수의 GFAP 양성반응의 별아교세포에서 발현하였으나 다른 신경계 세포에서는 적은 수의 발현을 나타내었다. 그러나 EAE를 유도한 결과, 침윤된 ED1 양성인 염증세포 뿐만 아니

라 정상상태에서 발현이 약했던 신경계세포에서도 CPP32가 강하게 발현되었다.

CPP32는 생식기, 소화기, 가슴샘, 비장, 신경계세포와 염증세포 등의 apoptosis에 관여가 확인됨에 따라 EAE에서도 CPP32가 apoptosis에 관여될 개연성은 높다고 하겠으나 본 실험의 결과에서 혈관 주위의 ED1 양성 macrophage 및 T세포 뿐만 아니라 척수조직에서 광범위하게 CPP32를 발현한 점은 이 과정중에는 추가적으로 caspase family를 포함한 다른 death signal들의 상호작용이 중요한 매개인자일 것으로 추정된다. 따라서 CPP32에 의한 apoptosis는 다른 caspase family 또는 death related molecules의 영향이 있을 경우, apoptosis를 유발할 수 있을 것으로 생각된다. 또한 염증세포를 제외한 대부분의 살아있는 신경세포와 glia에서의 CPP32 발현은 apoptosis 관련인자의 연관성이 없거나 어떤 다른 역할을 할 것이라 추정된다.

이 실험결과를 종합해볼 때 EAE에 이환된 랫트의 척수에서 CPP32의 발현증가는 다른 death related molecules와 함께 침윤된 많은 염증세포의 apoptosis에 관여함으로써 뇌-척수염에 의한 마비의 회복에 관련된 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Raine CS, Traugott U. Experimental autoimmune demyelination. Chronic relapsing models and their therapeutic implications for multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*, 436:33-51, 1984.
2. Tanuma N, Kojima T, Shin T, *et al.* Competitive PCR quantification of pro- and anti-inflammatory cytokine mRNA in the central nervous system during autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 73(1-2):197-206, 1997.
3. Schmied M, Breitschopf H, Gold R, *et al.* Apoptosis of T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence for programmed cell death as a mechanism to control inflammation in the brain. *Am J Pathol*, 143:446-452, 1993.
4. Ouallet J, Baumann N, Marie Y, *et al.* Fas system up-regulation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurol Sci*, 170(2):96-104, 1999.

5. Bachmann R, Eugster HP, Frei K, *et al.* Impairment of TNF-receptor-1 signaling but not fas signaling diminishes T-cell apoptosis in myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide-induced chronic demyelinating autoimmune encephalomyelitis in mice. *Am J Pathol*, 154(5):1417-1422, 1999.
6. Bonetti B, Pohl J, Gao YL, *et al.* Cell death during autoimmune demyelination: effector but not target cells are eliminated by apoptosis. *J Immunol*, 159(11):5733-5741, 1997.
7. Moon C, Kim S, Lee Y, *et al.* The expression of interleukin-1 beta converting enzyme (ICE) in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Korean J Vet Res*, 39(3):538-544, 1999.
8. Darmon AJ, Nicholson DW, Bleackley RC. Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature*, 377(6548):446-448, 1995.
9. Schlegel J, Peters I, Orrenius S, *et al.* CPP32/apopain is a key interleukin 1 beta converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem*, 271(4):1841-1844, 1996.
10. Fuchs EJ, McKenna KA, *et al.* p53-dependent DNA damage-induced apoptosis requires Fas/APO-1-independent activation of CPP32beta. *Cancer Res*, 57(13):2550-2554, 1997.
11. Carthy CM, Granville DJ, Watson KA, *et al.* Caspase activation and specific cleavage of substrates after coxsackievirus B3-induced cytopathic effect in HeLa cells. *J Virol*, 72(9):7669-7675, 1998.
12. Fernandes-Alnemri T, Litwack G, Alnemri ES. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to Caenorhabditis elegans cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem*, 269(49):30761-30764, 1994.
13. Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, *et al.* Immunohistochemical analysis of *in vivo* patterns of expression of CPP32(Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res*, 57(8):1605-1613, 1997.
14. Shin T, Kojima T, Tanuma N, *et al.* The subarachnoid space as a site for precursor T cell proliferation and effector T cell selection in experimental autoimmune

- encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 56(2):171-178, 1995.
15. Ohmori K, Hong Y, Fujiwara M, *et al*. *In situ* demonstration of proliferating cells in the rat central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence suggesting that most infiltrating T cells do not proliferate in the target organ. *Lab Invest*, 66:54-62, 1992.
 16. Bauer J, Huitinga I, Zhao W, *et al*. The role of macrophages, perivascular cells, and microglial cells in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia*, 15(4):437-446, 1995.
 17. Sedgwick JD, Mason DW. The mechanism of inhibition of experimental allergic encephalomyelitis in the rat by monoclonal antibody against CD4. *J Neuroimmunol*, 13(2):217-232, 1986.
 18. Nguyen KB, McCombe PA, Pender MP. Increased apoptosis of T lymphocyte and macrophages in the central and peripheral nervous systems of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis treated with dexamethasone. *J Neuropathol Exp Neurol*, 56:58-69, 1997.
 19. White CA, McCombe PA, Pender MP. The roles of Fas, Fas ligand and Bcl-2 in T cell apoptosis in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*, 82(1):47-55, 1998.
 20. Pender MP. Activation-induced apoptosis of autoreactive and alloreactive T lymphocytes in the target organ as a major mechanism of tolerance. *Immunol Cell Biol*, 77(3):216-223, 1999.
-