

## 자가면역성 뇌척수염 흰쥐의 활성화된 신경아교세포에서 증가된 osteopontin의 발현

박석재 · 황인선 · 김규범 · 신태균 · 지영훈\*

제주대학교 농업생명과학대학 수의학과  
(게재승인: 2006년 7월 14일)

### Increased osteopontin expression in activated glial cells in experimental autoimmune encephalomyelitis

Suk-jae Park, In-sun Hwang, Gyu-beom Kim, Tae-kyun Shin, Young-heun Jee\*

Department of Veterinary Medicine and Applied Radiological Science Institute,  
College of Applied Life Science, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea  
(Accepted: July 14, 2006)

**Abstract** : Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is a disease model of multiple sclerosis (MS) that is characterized by remittance and relapse of the disease and autoimmune and demyelinating lesions in the central nervous system (CNS). Autoimmune inflammation is maintained by secretion of a large number of protein. Previous studies have suggested that transcripts encoding osteopontin (OPN) are frequently detected in the mRNA population of MS plaques. To elucidate the functional role of OPN in initiation and development of EAE, we examined the expression and localization of OPN in the spinal cord during acute EAE. We demonstrated that OPN significantly increased at the early stage of EAE and slightly declined thereafter by western blot analysis. An immunohistochemical study revealed that OPN was constitutively expressed in some glial cells (microglia, astrocytes) of white matter and neurons in the CNS of control rats. OPN expression was shown to be increased in the same cells at the early and peak stage of EAE. To identify cells expressing OPN by double-immunofluorescence labeling, we labeled rat spinal cord sections for OPN with a monoclonal OPN antibody and with mAbs for astrocyte (GFAP), microglia/macrophage (OX42)-specific markers. The major cell types of OPN-expressing cells were activated astrocytes and microglia in the adjacent inflammatory lesions. Interestingly, OPN was mainly expressed in the end feet of astrocytes around vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expressing endothelial cells of CNS blood vessel. These findings suggest that increased levels of OPN in activated glial cell may play an important role in the recruitment of inflammatory cells into the CNS parenchyma during EAE.

**Key words** : experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), osteopontin (OPN), activated astrocyte, glial cell

### 서 론

실험적 자가 면역성 뇌척수염(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)은 CD4<sup>+</sup> T 림프구 매개성 질병

으로 중추신경계에서 염증세포의 침윤과 수초탈락이 특징이며, 사람의 다발성 경화증(multiple sclerosis, MS)의 동물모델로 활용된다 [23]. EAE는 뇌조직항원(myelin basic protein, proteolipid protein, myelin oligodendrocyte

본 연구는 학술진흥재단 우수연구과제(No. R04-2004-000-10226-0)와 과학기술부 지원으로 수행하는 원자력연구개발사업(원자력기초 공동연구소)의 일환으로 수행되었음.

\*Corresponding author: Youngheun Jee

Department of Veterinary Medicine, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea  
[Tel: +82-64-754-3374, Fax: +82-64-756-3354, E-mail: yhjee@cheju.ac.kr]

glycoprotein)을 면역화 시킴으로써 유도되며, blood brain barrier(BBB)를 붕괴시키고, CD4<sup>+</sup> T 림프구와 큰포식세포의 침윤, 별아교세포, 미세아교세포와 같은 내인성 신경아교세포의 활성화가 특징이다 [17, 22]. 이러한 자가면역성 뇌질환의 진행은 BBB를 통과해서 말초에서 중추신경계로의 자가 반응성 T 림프구의 이주는 매우 중요한 원인으로 밝혀져 있다 [20]. EAE에서 활성화된 자가 반응성의 T 림프구는 접착 분자, matrix metalloproteases, 염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines) 등에 의하여 뇌 실질내로 유주하여 염증반응을 유도 한다 [12, 25]. 이와 같이 뇌 척수염을 유발하는 T 림프구와 뇌 실질 내피세포의 접착분자와의 상호작용에 의한 뇌 실질내로의 유주는 EAE 병인론에서 매우 중요하다. 일반적으로 림프구와 내피세포와의 상호작용은 순차적으로 나타나는 다양한 접착 분자와 여러 신호 전달 분자에 의해서 조절되어진다 [24]. EAE의 혈관내피세포에서 발현되는 접착 분자로 vesicular adhesion molecule-1(VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1), E-selectin 등이 보고 되어 있다 [11]. 이 중 VCAM-1은 혈관에서 실질조직으로 T 림프구 및 염증세포의 유입을 유도하는 대표적인 인자로 알려져 있다 [16]. VCAM-1은 정상적인 중추신경계에서는 나타나지 않지만, MS 환자의 중추신경계 혈관내피세포에서 발견된다는 보고가 있다 [5, 6]. 그리고 VCAM의 리간드인 이단량체  $\alpha 4$  인테그린은 비공유결합으로  $\beta 1$  또는  $\beta 7$ 과 결합하고, 인테그린  $\alpha 4\beta 1$ 은 염증성 백혈구와 T 림프구에서 발견된다 [10]. 인테그린  $\alpha 4\beta 1$ 과 VCAM의 상호관계는 백혈구의 혈관밖 이주와 T 림프구의 활성화 및 증식에 중요한 역할을 하고 [9], 인테그린  $\alpha 4\beta 1$ 이 결여된 T 림프구는 BBB를 통과하지 못한다는 보고가 있다 [2].

최근 보고에 의하면 MS 환자의 뇌 조직과 정상 뇌 조직을 가지고 시행한 cDNA의 염기서열 분석을 통한 결과 MS 환자의 플라크에서 싸이토카인 전사물질을 함유하고 있는 osteopontin(OPN)이 다량 나타났다 [7]. 또한 OPN은 314개 아미노산으로 구성되어있고, 인산화된 기질 단백질로서 [21], 몇몇 종류의 세포 부착과 이주에 관한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [14]. OPN은 Arg-Gly-Asp(RGD)를 매개로  $\alpha v\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$  인테그린과 상호작용하여 다른 종류의 세포에 부착할 수 있다고 보고 되어 있으며 [8], RGD를 매개로 하지 않더라도 N-terminal과 thrombin cleavage site에 존재하는  $\alpha 4\beta 1$  인테그린과 상호작용하여 다른 종류의 세포에 부착할 수 있는 것으로 알려져 있다 [3, 4]. EAE가 유도된 동물의 중추신경계 염증부위에서 OPN의 전사물질이 다량 발현되어 나타났고, OPN 전사물질은 EAE 질환의 진행에 밀접한 연관이 있다 [7]. 또한 OPN 유전자가 결여된 쥐에

대한 실험에서 바이러스와 세균 감염과 같은 세포매개성 면역반응을 유도하지 못하였고, EAE에서 질병 발생률이 격감되고 임상증상이 완화된다는 연구결과가 있다 [1]. 이와 같이 최근에 OPN이 자가면역성 질환에서 중요한 역할을 한다는 보고가 있으나 [7], EAE에서 OPN의 역할과 EAE 유도 및 발달에 미치는 영향에 대한 기존 연구가 부족하다.

본 연구에서는 EAE 과정 중에 말초 림프조직에서 중추신경계로의 자가반응성 T 림프구가 이주하는 기전을 밝히고자 질병 발생기와 진행기에 과발현하는 OPN이 EAE에 있어 중추신경계로 염증성 세포의 이주를 유도하는 대표적인 접착분자인 VCAM의 상호 관계를 밝히고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 흰쥐에서 EAE 유도과 임상증상 평가

본 실험에서는 7-12주령 암컷 160-200 g 흰쥐(Lewis rat)를 사용하였으며 Harlan(Sprague Dawley Inc., USA)에서 22마리를 구매하여 11일간 순화기간을 거친 후 20마리를 실험에 사용하였다. EAE의 유도를 위해 흰쥐의 뒷발바닥에 myelin basic protein(1 mg/ml)과 mycobacterium tuberculosis H37Ra(5 mg/ml)(Difco, USA)를 함유한 complete Freund's adjuvant(CFA)를 동일량 혼합한 것을 15마리에 주사하였고, 대조군 5마리는 조직 항원을 혼합하지 않은 CFA만 주사하였다. 주사한 후 흰쥐는 매일 체중과 임상증상을 측정하였다. Mastumoto 등 [15]의 방법에 따라 EAE의 진행은 특징적 임상증상을 기준으로 하여 G0(무증상), G1(꼬리 마비), G2(경도의 뒷다리마비), G3(중증의 뒷다리마비), G4(사지마비), G5(죽음), R0(회복기)와 같이 7단계로 나누었다. 항원이 투여되지 않은 대조군에서 임상증상을 보이지 않은 시기를 G0, CFA로 EAE를 유도한 흰쥐에서 임상증상이 G1-G2를 보이는 시기를 초기(early stage), G3-G5를 나타내는 시기를 최고발현기(peak stage), 질병으로부터 회복되어 임상증상을 나타내지 않는 시기(R0)를 회복기(recovery stage)로 나누고 각 단계별로 5마리의 흰쥐를 에테르로 마취하여 희생시켜 척수를 채취하고  $-70^{\circ}\text{C}$  이하의 액체 질소를 이용하여 급속냉동을 한 후 동결절편을 만들었다.

### Western blot analysis

질병 경과에 따라 척수조직을 추출한 다음 lysis buffer (40 mM Tris, 120 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 mg/ $\mu\text{l}$  leupeptin, 2 mM sodium orthovanadate, 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  aprotinin)에 넣어 균질화기(homogenizer)로 마

쇄하고, 12,000 rpm으로 20분 동안 원심 분리하여 상층액을 취해 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 정량하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(10% SDS-PAGE)를 이용하여 동일 양의 단백질을 전기영동하였다. 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane에 100 V로 2시간 동안 전이하였다. 그 후에 비특이적 반응을 방지하기 위해 5% nonfat milk를 사용하여 1시간 동안 실온에서 차단반응(blocking reaction)을 하였다. OPN(1:1000; Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1차 항체로 사용하여 실온에서 1시간 반응시키고, 2차 항체로는 HRP-conjugated anti-mouse, rabbit IgG (1:250; Santa Cruz Biotechnology, USA)를 사용하여 실온에서 45분간 반응시켰다. Protein bands는 암실에서 ECL detection Kit(Amersham, USA)로 발현을 시켰다. 각 band의 밀도는 scanning laser densitometer(GS-700, Bio-Rad, USA)를 통해 얻었으며, Molecular Analyst software(Bio-Rad, USA)를 이용하여 분석하였다.

#### 면역조직화학 염색

면역조직화학 염색은 Avidin-Biotin Complex Elite kit(Vector, USA)를 이용하였다. EAE 척수조직은 슬라이드에 준비된 조직 절편의 과라핀을 제거하고, 내재성 과산화효소를 제거하기 위해서 0.3% 과산화수소수에서 20분간 침적하였다. 그 후 비특이적 면역반응을 방지하기 위해 blocking horse serum을 30분간 반응시켰다. 이를 제거한 후 1차 항체인 OPN(1:300; Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1시간 실온에서 반응시킨 후 biotinylated anti-mouse IgG(Vector, USA)를 실온에서 50분 동안 반응시켰다. 이어서 avidin-biotin peroxidase conjugate(Vector, USA)로 45분간 실온에서 반응시켰다. 면역 반응이 끝난 조직은 3, 3'-diaminobenzidine(DAB; Vector, USA) 용액에서 발색시켰다. 각 단계 사이에는 인산완충용액(phosphate buffer)로 충분히 세척하였다. 양성반응을 나타낸 조직을 헤마톡실린(hematoxylin) 용액으로 대조염색하고, 에탄올과 톨루엔으로 탈수 및 투명화 과정을 거친 후 봉입하여 광학현미경하에서 관찰하였다.

#### Osteopontin 발현 세포의 동정을 위한 이중면역형광 염색

EAE 흰쥐의 척수에서 질병 경과에 따른 OPN과 VCAM이 발현하는 세포의 특이성을 관찰하기 위하여, 동결절편한 EAE 척수조직을 아세톤(acetone)으로 고정하였다. 먼저 1차 항체인 OPN(1:300; Santa Cruz Biotechnology, USA)를 1시간 실온에서 반응시킨 후 2차 항체인 Cy3-conjugate anti-mouse IgG(1:50; Serotec, UK)를

실온에서 50분 동안 반응시켰다. 이후 OPN을 발현하는 세포를 동정하기 위해 OX42(mouse anti-rat CD11b: Alexa fluor 488)(1:50; Serotec, UK), R73(1:1000; Serotec, UK), ED1(1:800; Serotec, UK), glial fibrillary acidic protein(GFAP)(1:800; Dako, Denmark), VCAM-1(1:200, Santa Cruz Biotechnology, USA)를 각각 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 2차항체인 FITC-conjugate anti-mouse IgG(1:200; Santa Cruz Biotechnology, USA)를 실온에서 50분간 반응시켰다. 각 단계 사이에는 인산완충용액으로 충분히 세척하였다. 그리고 봉입(Fluorescent mounting medium; Dako, Denmark)하여 레이저공 초점현미경(Laser confocal scanning microscope) (Olympus, Japan)에서 관찰하여, 이미지는 Fluoview FV500 software(Olympus, Japan)를 이용하여 얻었다.

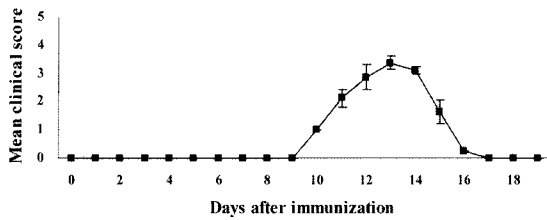
## 결 과

#### EAE의 임상경과

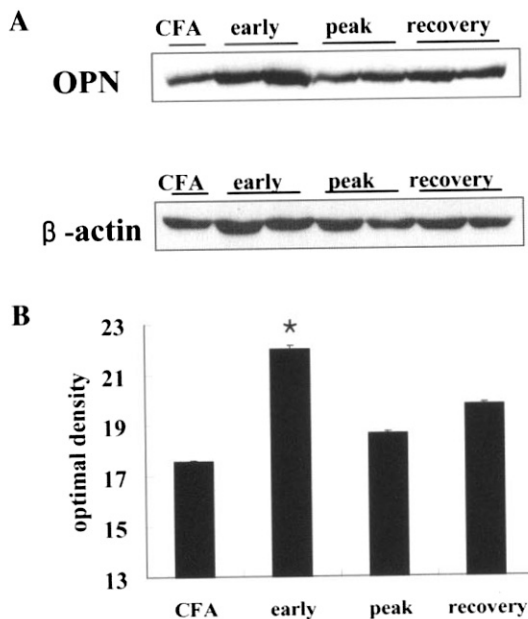
뇌조직 항원을 면역한 흰쥐에서 EAE의 임상경과는 면역 후 9-11일경에 꼬리의 마비(G1)가 유도되는 초기 증상이 나타났으며, 12-15일경에는 꼬리와 양쪽 뒷다리 마비(G2-G3)가 일어나며 질병은 악화되었다. 임상증상의 최고 값은 약 13일경에 등급  $G3.5 \pm 0.2$ 이었다. 또한 16-17일경에 마비가 사라지면서 자연 회복되었다(G0)(Fig. 1).

#### Western blot analysis에 의한 질병 경과에 따른 osteopontin의 발현양상

EAE를 유도한 흰쥐에서 질병 경과에 따른 OPN의 발현 양을 알아보기 위해 Western blot analysis를 통해서 흰쥐 척수조직에서 OPN의 양 변화를 관찰하였다. 흰쥐의 척수조직은 대조군으로 CFA를 단독으로 투여한 흰쥐와 질병의 경과에 따라 초기(early), 최고발현기(peak), 회복기(recovery stage)로 나뉜 EAE 유발 흰쥐에서 추출하여 사용하였다. OPN의 분자량은 post-translational modification에 의해 44~75 kDa으로 나타난다고 보고되어 있으며 [19], 본 실험에서는 약 75 kDa에서 나타났다(Fig. 2). OPN의 발현 양은 CFA만을 투여한 흰쥐에서는 미약하였으나(Fig. 2A, lane 1), 초기(early stage)에서 가장 증가되었고(Fig. 2A, lanes 2-3), 질병이 악화되는 최고발현기(peak stage)에서 초기(early stage)에 비해 다소 감소하였고(Fig. 2A, lanes 4-5), 질병의 회복기에 걸쳐 발현양이 줄어든 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2A, lanes 6-7). 또한 OPN의 양적 변화를 질병 발생 단계에 따라 band의 밀도분석을 한 결과 CFA 대조군과 비교할 때 초기(early stage), 최고발현기(peak stage)와 회복기(recovery



**Fig. 1.** Clinical course of EAE in Lewis rats. EAE was induced by immunization with 100  $\mu$ l of guinea pig spinal cord homogenate emulsified with complete Freund's adjuvant into the bilateral hind footpads. The symbol (■) indicates the mean clinical score for a group (n = 20) on the indicated day.



**Fig. 2.** Expression of OPN in the CNS during EAE. In Fig. 2A, Western blot analysis results of OPN are shown in the spinal cord tissues of EAE and control rats. Minimal amounts of OPN was identified in spinal cord of control rats immunized with complete Freund's adjuvant (CFA control; day 14 p. i.) (lane 1). During disease, OPN expression increased in spinal cord of rats at an early stage of EAE (grade 1, day 11 p. i.) (lanes 2, 3) followed by gradual decline till the recovery stage (grade 0, day 21 p. i.) (lanes 6, 7). In Fig. 2B, The density of each band was measured and plotted in the graph. \*;  $P < 0.05$ , significantly different from CFA control rats by student's *t*-test.

stage)에서 증가하는 경향을 보였고, 특히 초기(early stage)에선 유의성 있는 증가를 보였다( $p < 0.05$ )(Fig. 2B). 한편  $\beta$ -actin을 이용한 western blotting에서 각 단계별 양적 차이는 관찰할 수 없었다(Fig. 2A).

**Table 1.** OPN immunoreactivity in cell phenotypes of the spinal cords of CFA-immunized control and EAE rats

	OPN			
	CFA	early	peak	recovery
Neuron	+	+++	+++	++
Inflammatory cells	-	++	++	-
Glial cells	+	+++	+++	++

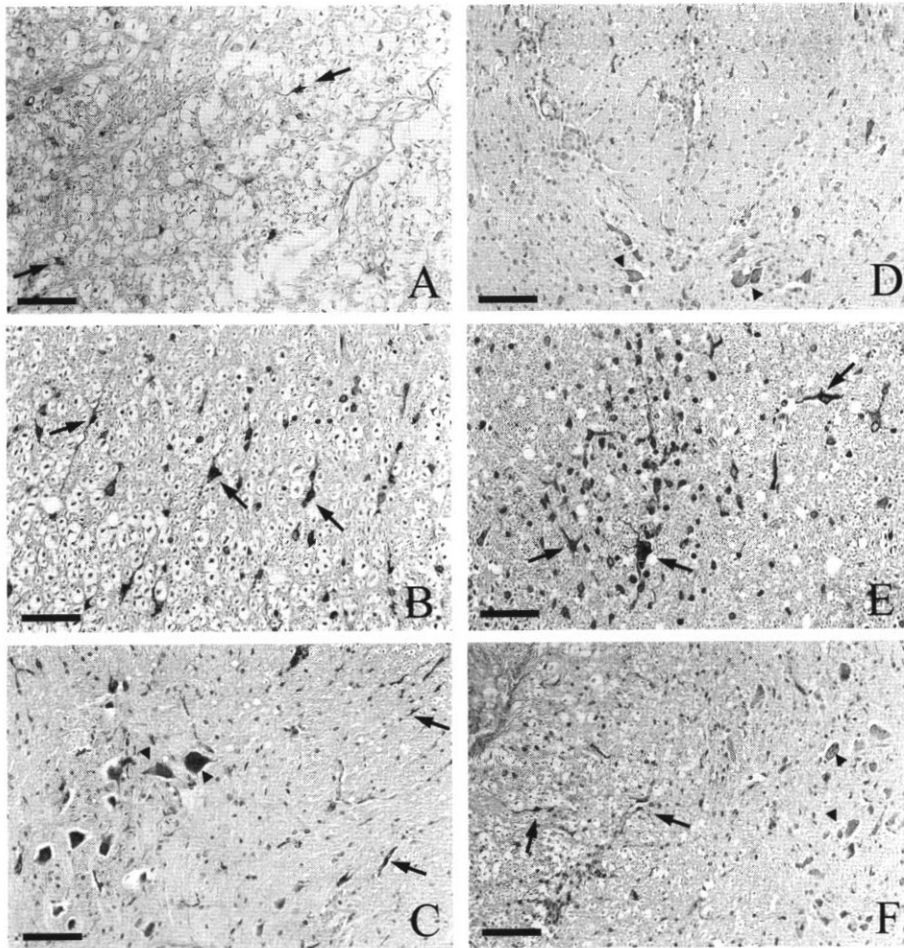
Stained sections were scored according to the number of cells per field that were positive. The number of positive cells in an average of five randomly chosen 100 fields was scored as: -, no positive cells; +, < 10 cells per field; ++, < 30 cells; +++, 30 cells.

#### 면역조직화학 염색에 의한 질병 경과에 따른 osteopontin 발현 양상

EAE를 유도한 흰쥐의 척수에서 OPN(Fig. 3)의 발현 양상을 확인하기 위해 면역조직화학 염색을 실시하였다. CFA를 단독으로 투여한 대조군과 질병의 경과에 따라 초기(early), 최고발현기(peak), 회복기(recovery stage) 흰쥐의 척수 조직을 사용하였다. OPN 면역염색의 결과에서 CFA만을 투여한 흰쥐에서는 신경아교세포와 신경원세포에서 미약한 양성 반응이 관찰되었다(Fig. 3A). 그러나 척수 실질 내 염증세포의 이주가 유도되는 초기(early stage)에서부터 척수조직에서 OPN 양성 세포들이 현저히 증가하였고 강한 양성 반응을 관찰할 수 있었다. 초기(early stage)(Figs. 3B, 3C)와 최고발현기(peak stage)(Figs. 3D, 3E)의 척수 백색질부위에서 다수의 신경아교세포들(Fig. 3B, 화살표)(Fig. 3C, 화살표)(Fig. 3E, 화살표)과 척수 회색질부위에서 다수의 신경원세포들(Fig. 3C, 화살표머리)(Fig. 3D, 화살표 머리)에서 강한 양성 반응이 나타났다. 그리고 척수 실질에서 OPN 양성반응을 나타내는 염증세포(T 림프구와 큰포식세포)들 또한 관찰되었다. 한편 회복기(recovery stage)에서는 척수 실질내의 염증세포 침윤 감소와 함께 염증세포들에 대한 양성반응이 관찰되지 않았지만 신경아교세포들(Fig. 3F, 화살표)에서는 여전히 중등도의 양성 반응이 나타났다. 이상의 결과를 Table 1에서 양성 반응의 정도를 비교 분석하여 나타내었다. 면역조직화학염색의 결과 western blotting에서 나타난 질병의 경과에 따른 OPN 발현양의 증가와 일치하는 결과를 보여주었다.

#### 이중면역형광 염색을 통한 OPN 발현 세포의 동정

EAE 유발 흰쥐의 척수에서 질병의 경과에 따라 OPN (Figs. 4A, 4D; 붉은색)을 발현하는 세포의 특이성을 동



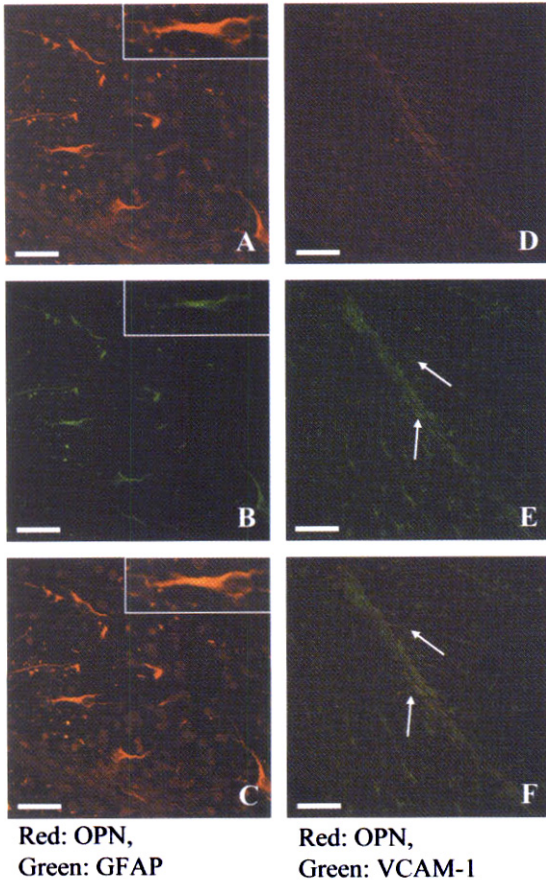
**Fig. 3.** OPN immunoperoxidase staining in the CNS during EAE. (A) White matter of spinal cord in CFA-immunized rat. OPN immunoreactivity was recognized in small number of glial cells in the white matter (arrows). (B), (C) A greater number of inflammatory cells (T cells and macrophages), glial cells (microglia cells and astrocytes) (B and C, arrows) and neurons (C, arrowheads) markedly increased OPN expression in white and gray matter of spinal cords from animals with EAE at the early stage (day 11 p. i.) by immunoperoxidase staining. (D), (E) Immunoperoxidase staining showed some OPN expression in neurons (D, arrowheads) and glial cells (E, arrows) at the peak stage of EAE (day 14 p. i.). (F) At the recovery stage of EAE (day 21 p. i.), OPN was weakly detected in a few glial cells of the white matter (arrows) and some neuron of the gray matter (arrowheads). A, B, C, E bar = 30  $\mu$ m, D, F = 60  $\mu$ m.

정하기 위하여 이중면역형광 염색을 실시하였다. 각각의 세포를 동정하기 위해서 세포의 특이적 표면 항원에 대한 항체를 이용하여 별아교세포(GFAP)(Figs. 4B, 4E; 녹색), 미세아교세포/큰포식세포(OX42), 큰포식세포(ED1) T 림프구(TCR  $\alpha\beta$ : R73)에 면역형광염색을 실시하였다.

본 실험에서 OPN은 척수 실질 내 염증성 병변 주위의 활성화된 별아교세포(Fig. 4C; merge)와 미세아교세포 중에서 다수 관찰되었으나, 예상과는 달리 척수 실질 내로 이주한 염증세포(큰포식세포와 T 림프구) 중에서는

소수만이 관찰되었다. 특이적으로 OPN의 발현은 염증 병변 주위의 별아교세포와 더불어 혈관 주변에서 다수 관찰할 수 있었다(Fig. 4C; merge). 그리고 거미막밑 공간, 척수 실질, 혈관주위에서의 T 림프구와 큰포식세포에서 소수로 이중 염색된 세포들이 관찰되었다. 한편, 본 실험에서는 EAE에서 염증세포의 이주와 밀접한 관계가 있는 부착 분자 중 대표적인 VCAM-1의 발현 양상을 관찰하였고, VCAM-1은 주로 혈관내피세포에서 발현하였다(Fig. 4E). 흥미롭게도 VCAM-1 양성세포는 별아교세포의 종말발(Fig. 4D, 화살표)과 부착하고 있었다(Fig. 4F).

## 고 찰



**Fig. 4.** Double immunofluorescence staining for OPN and specific-neuronal cell markers in the CNS of rats with EAE. The major cell types of OPN-expressing cells (A and D) (red) were activated astrocytes (B) (green) and microglia in the adjacent inflammatory lesions. OPN was mainly expressed in the end feet of astrocytes (arrows) around VCAM-1 expressing endothelial cells (E) (green) of CNS blood vessel. (C) Merged images of A and B. (F) Merged images of D and E. Inserts show high magnification of A, B and C, respectively. Bar = 30  $\mu$ m.

이상의 결과로 OPN의 주된 발현 세포는 활성화된 신경아교세포 즉, 별아교세포와 미세아교세포임을 알 수 있었다. 그리고 신경아교세포 중 별아교세포는 VCAM-1에 양성 반응을 보인 혈관내피세포에 종말발을 부착한 상태로 관찰되었다. 또한 VCAM-1은 OPN의 주된 발현세포의 부착부위에서 발현하였다. 이들 결과로 EAE의 발생과 진행 과정 중 자가반응성 T 림프구가 척수 실질내로 이주하는 과정에서 OPN과 VCAM-1 상호작용이 매우 중요한 역할을 할 것으로 사료되었다.

최근 연구에 따르면 MS질환에서 면역조절 단백질이 중요하며, 대표적인 예로 MS환자의 뇌 조직을 이용한 cDNA 분석결과 OPN의 전사물질이 다량 증가하여 나타난다고 보고하고 있다 [7]. 따라서 본 연구에서는 EAE의 발병 및 진행에 있어서 OPN의 역할을 규명하고자 자가반응성 T 림프구 매개로 인한 EAE 질병의 발병 및 경과 과정에 따른 OPN 발현 양의 변화와 OPN 발현 세포의 특성을 관찰하였다. Western blot analysis에서 질병의 경과에 따른 OPN 발현 양은 CFA만을 투여한 흰쥐에서는 미약하게 발현하고, 초기(early stage)에서 가장 증가하였다. 이는 EAE에서 염증세포가 척수 실질내로 이주가 유도되는 질병 초기에 OPN의 양적 증가를 보여 OPN이 염증세포의 이주와 관련성이 있음을 시사하였다. 또한 EAE의 발생시기와 진행과정에서 OPN 역할을 규명하기 위하여 면역조직화학염색으로 OPN 발현 세포의 특이성을 관찰한 결과 초기(early stage)와 최고 발현기(peak stage)에서 신경아교세포(별아교세포, 미세아교세포)에서 강한 양성반응을 나타내었고, 또한 염증세포에서도 중등도의 양성반응이 나타났다. 그리고 이중형 광염색을 통해 EAE에 큰포식세포(ED1)와 T 림프구(TCR  $\alpha\beta$ )에서는 소수의 OPN 양성 세포가 관찰되었으나 신경아교세포(별아교세포, 미세아교세포)에서 다수의 양성세포가 관찰되었다. 이와같은 결과로 예상과는 달리 EAE에서 OPN을 발현하는 주된 세포는 신경아교세포(별아교세포, 미세아교세포)이라는 것을 알 수 있었다.

최근 연구에 의하면 OPN 단백을 복강 혹은 피하로 주입하였을 때 축적된 다양한 염증 세포들이 나타났고 [13], OPN은 염증부위에서 T 림프구와 큰포식세포의 이주와 연관이 있다는 보고가 있다 [1]. EAE에서 자가 반응성 T 림프구가 BBB를 통과하여 뇌 실질내로 이주하는 것은 질환의 진행에서 중요한 원인 중 하나이고 [20], 이러한 이주 과정에는 여러 가지 요인 중 접착분자의 역할이 중요시되고 있다. 이들 접착분자 중 VCAM-1은 혈관내피세포에서 발현하며 [6], VCAM-1의 대표적인 리간드인  $\alpha 4\beta 1$  인테그린은 염증성 백혈구와 T 림프구에서 발견된다 [10]. EAE의 유도에서  $\alpha 4$  인테그린의 중요성에 대한 많은 보고가 있으며,  $\alpha 4$  인테그린과 VCAM-1의 상호작용은 염증세포의 실질 내 이주와 T 림프구 증식과 활성화의 개시에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [9]. VLA-4( $\alpha 4\beta 1$  인테그린)의 항체를 이용한 EAE 연구에서 VLA-4가 임상증상과 조직병리학적으로 질병을 억제했고 [26], 더욱이 사람에서  $\alpha 4$  인테그린(Natalizumab)을 이용한 치료에서는 MS 환자에서 뇌 병변을 감소시킨다는 보고가 있다 [18]. 그리고 EAE에서

$\alpha 4$  인테그린/VCAM의 역할은 BBB을 통과한 염증세포가 계속해서 실질내로 들어올 수 있도록 유도하며, T 림프구의  $\alpha 4$  인테그린이 내피세포에서 발현되는 VCAM-1과 결합하여 염증성의 뇌혈관에서 나타난다는 보고가 있다 [25, 26]. 게다가 중추신경계에서 백혈구가 혈관으로 이주할 때 VCAM과  $\alpha 4$  인테그린의 상호작용으로 활성화된 T 림프구의 뇌 실질내 정체가 일어나는 것으로 알려져 있다. OPN은 여러 종류의 인테그린과 상호작용을 하여 다른 종류의 세포에 부착할 수 있고, OPN은 RGD를 매개로 하지 않더라도 N-terminal과 thrombin cleavage site에 존재하는  $\alpha 4\beta 1$  인테그린 결합 부위와 인테그린과의 상호작용으로 다른 종류의 세포에 부착할 수 있는 것으로 알려져 있다 [3, 4].

본 연구에서는 별아교세포의 종말발을 염증세포의 이주에 밀접한 관계가 있는 접착분자인 VCAM-1에 양성 반응을 나타낸 혈관내피세포에 부착하여 다량의 OPN을 발현하는 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과로 별아교세포에서 분비된 OPN은 VCAM-1과 함께  $\alpha 4\beta 1$  인테그린의 상호작용으로 자가반응성 T 림프구가 혈관에 부착하여 뇌실질내로 이주를 유도할 것으로 사료된다. OPN은 VCAM-1과 함께 EAE의 발생의 초기에 염증성 세포들의 뇌실질내로 이주를 유도하여 질병 발생에 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

## 결 론

EAE는 MS질환의 동물모델로서 CNS에서 자가면역성 반응과 수조탈락을 특징으로 하는 질병이다. 자가면역성 염증은 다양한 단백질의 분비로 이루어지는 것으로 알려져 있으며, 특히 MS환자 플라크에서 OPN mRNA 전사물질의 증가는 EAE 유도과 진행에 중요한 역할을 할 것으로 사료되어 본 연구에서는 EAE 유도 및 발달 과정에서 OPN의 역할을 규명하고자 하였다. western blot을 실시한 결과 OPN 단백질의 발현은 실질내 염증세포의 이주가 유도되는 초기(early stage)에 현저히 증가하였고, 질병의 회복기에는 점차로 감소하였다. 또한 OPN에 대한 면역화학적염색 결과 질병의 초기(early stage)와 최고 발현기(peak stage)에 T 림프구와 큰포식세포 등의 염증성 세포와 신경아교세포인 별아교세포와 미세아교세포에서 강한 양성반응을 나타내었다. 그리고 OPN을 발현하는 세포의 특이성을 동정하기 위하여 각 세포의 특이 표면을 이용한 이중면역형광염색을 실시한 결과 OPN의 주요 발현세포는 뇌 실질 내 염증부위의 활성화된 별아교세포와 미세아교세포 등의 신경아교세포였고, 특히 T 림프구의 이주에 중요한 역할을 하는 접착 분자중의 하나인 VCAM-1을 발현하는 혈관내피세

포 주위에 종말발을 부착하고 있는 별아교세포가 다수 관찰되었다.

이들 결과로 활성화된 미세아교세포와 혈관주변의 별아교세포에서 발현되는 OPN은 EAE의 유도와 진행 중에 자가반응성 T 림프구 및 염증성 세포들이 CNS 실질내로 부착과 이주하는 과정에 있어 중요한 역할을 할 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V. Eta-1(osteopontin): an early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science* 2000, **287**, 860-864.
2. Baron JL, Madri JA, Ruddle NH, Hashim G, Janeway CA Jr. Surface expression of  $\alpha 4$  integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma. *J Exp Med* 1993, **177**, 57-68.
3. Bayless KJ, Davis GE. Identification of dual alpha 4 beta 1 integrin binding sites within a 38 amino acid domain in the N-terminal thrombin fragment of human osteopontin. *J Biol Chem* 2001, **276**, 13483-13489.
4. Bayless KJ, Meininger GA, Scholtz JM, Davis GE. Osteopontin is a ligand for the  $\alpha 4\beta 1$  integrin. *J Cell Sci* 1998, **111**, 1165-1174.
5. Brosnan CF, Cannella B, Battistini L, Raine CS. Cytokine localization in multiple sclerosis lesions: correlation with adhesion molecule expression and reactive nitrogen species. *Neurology* 1995, **45**, 16-21.
6. Cannella B, Raine CS. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 1995, **37**, 424-435.
7. Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science* 2001, **294**, 1731-1735.
8. Chellaiah MA, Hruska KA. The integrin alpha (v) beta (3) and CD44 regulate the actions of osteopontin on osteoclast motility. *Calcif Tissue* 2003, **72**, 197-205.
9. Damle NK, Aruffo A. Vascular cell adhesion molecule 1 induces T-cell antigen receptor-dependent activation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci* 1991, **88**, 6403-6407.
10. Elices MJ, Osborn L, Takada Y, Crouse C, Luhowskyj S, Hemler ME, Lobb RR. VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell* 1990, **60**, 577-584.



11. **Lee SJ, Benveniste EN.** Adhesion molecule expression and regulation on cell of central nervous system. *J Neuroimmunol* 1999, **98**, 77-88.
12. **Leppert D, Lindberg RL, Kappos L, Leib SL.** Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflammation in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *Brain Res Rev* 2001, **36**, 249-257.
13. **Liaw L, Almeida M, Hart CE, Schwartz SM, Giachelli CM.** Osteopontin promotes vascular cell adhesion and spreading and is chemotactic for smooth muscle cells in vitro. *Circ Res* 1994, **74**, 214-224.
14. **Liaw L, Skinner MP, Raines EW, Ross R, Cheresh DA, Schwartz SM, Giachelli CM.** The adhesive and migratory effects of osteopontin are mediated via distinct cell surface integrins. *J Clin Invest* 1995, **95**, 713-724.
15. **Matsumoto Y, Ohmori K, Fujiwara M.** Microglial and astroglial reaction to inflammatory lesions of experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat central nervous system. *J Neuroimmunol* 1992, **37**, 23-33.
16. **Melanie Laschinger, Britta Engelhardt.** Interaction of  $\alpha 4$ -integrin with VCAM-1 is involved in adhesion of encephalitogenic T cell blasts to brain endothelium but not in their transendothelial migration in vitro. *J Neuroimmunol* 2000, **102**, 32-43.
17. **Merrill JE, Benveniste EN.** Cytokines in inflammatory brain lesions: helpful and harmful. *Trends Neurosci* 1996, **19**, 331-338.
18. **Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, Blumhardt LD, Rice PA, Libonati MA, Willmer-Hulme AJ, Dalton CM, Miszkiel KA, O'Connor PW.** A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *New Engl J Med* 2003, **348**, 15-23.
19. **Nemir M, DeVouge MW, Mukherjee BB.** Normal rat kidney cells secrete both phosphorylated and nonphosphorylated forms of osteopontin showing different physiological properties. *J Biol Chem* 1998, **264**, 18202-18208.
20. **O'Connor KC, Bar-Or A, Hafler DA.** The neuroimmunology of multiple sclerosis: possible roles of T and B lymphocytes in immunopathogenesis. *J Clin Immunol* 2001, **21**, 81-92.
21. **Oldberg A, Franzen A, Heinegard D.** Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, **83**, 8819-8823.
22. **Raine CS.** The Norton Lecture: a review of the oligodendrocyte in the multiple sclerosis lesion. *J Neuroimmunol* 1997, **77**, 135-152.
23. **Raine CS, Traugott U.** Experimental autoimmune demyelination. Chronic relapsing models and their therapeutic implications for multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1984, **436**, 33-51.
24. **Springer TA.** Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994, **76**, 301-314.
25. **Steffen BJ, Butcher EC, Engelhardt B.** Evidence for involvement of ICAM-1 and VCAM-1 in lymphocyte interaction with endothelium in experimental autoimmune encephalomyelitis in the central nervous system in the SJL/J mouse. *Am J Pathol* 1994, **145(1)**, 189-201.
26. **Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N.** Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature* 1992, **356**, 63-66.