

Characterization of the Immune Regulation Function of Fibroblastic Reticular Cells Originating from Lymph Node Stroma

Jong-Hwan Lee^{1,2*}

¹Department of Smart Bio-Health, Dong Eui University, Busan 614-714, Korea

²Department of Biotechnology and Bioengineering, Dong Eui University, Busan 614-714, Korea

Received April 7, 2016 / Revised May 26, 2016 / Accepted June 10, 2016

A lymph node (LN) is one of the secondary lymphoid organs. An LN consists of a complicated 3 dimensional frame structure and several stromal cells. Fibroblastic reticular cells (FRC) are distributed in the T zone for interaction with T cells. FRC secrete homing chemokines such as CCL19 and CCL21. Moreover, FRC play a pivotal role in the production of extracellular matrix (ECM) into LN for ECM reorganization against pathogen infections. However, not much is known about the involvement of the immune reaction of FRC. The present report is for the characterization of FRC on immune response. For this, FRC were positioned in several infected situations such as co-culture with macrophage, lipopolysaccharide (LPS), and TNF α stimulation. When a co-culture between FRC and macrophage was performed, a morphological change in FRC was observed, and empty space between FRCs was created by this change. The soluble ICAM-1 protein level was up-regulated by co-culturing with Raw264.7 and the treatment of the ROCK inhibitor Y27632. The activity of matrix metalloproteinase (MMP) was up-regulated by LPS onto FRC. Furthermore, the inflammatory cytokine TNF α regulated the expression of ECM in FRC by a gene chip assay. Collectively, it suggests that FRC are involved in immune reactions.

Key words : FRC (Fibroblastic reticular cells), immune reaction, LPS (lipopolysaccharide), macrophage, TNF α

서 론

림프절은 포유류가 가지고 있는 면역 기관 중 하나로 이차성 면역기관으로 전신에서 조직액을 정맥으로 돌려보내는 림프관 도중에 위치하여, 생체로 들어오거나 또는 생체에서 발생한 여러 이물질, 즉 항원이 혈관에 들어가서 전신으로 순환되기 전에 확인, 면역 반응을 일으키는 기관이다. 림프절의 기능은 전략적으로 구획화 되어 미세한 환경적 공간을 제공하는데 이곳에서 면역세포들은 각기 구획화된 공간에서만 효과적 기능을 하도록 되어있다[16, 17]. 구획화된 공간에서 야기된 면역반응들의 결과 사이토카인, 항체 같은 체액성 면역물질, cytotoxic T lymphocyte (CTL) 같은 세포성 면역이 형성된다. 림프절에는 조절작용을 통해서 생산된 면역세포(B세포, T세포, 대식세포등)과 비조혈적 기원의 스트로마세포로 구성되어 있다. 스트로마 세포들은 림프조직의 구조적 모양 유지와 지지역할과 연관된 것으로 알려져 있다[11]. 스트로마에는 중간

엽 기원의 적어도 두 가지 형태의 간질세포가 림프절의 structural backbone 및 면역세포들의 분포와 이동에 중요한 역할을 하는데 중 하나인 follicular dendritic cells (FDCs)은 B zone의 여포를 구성하며 오랫동안 항원을 보유하여 B cell의 attraction, activation과 maturation에 중추적 역할을 하는 스트로마세포로 알려졌다[19]. Fibroblastic reticular cells (FRCs)는 항상성 유지 케모카인 CCL19/CCL21과 부착분자 ICAM-1 발현을 통해 림프구와 수지상 세포를 림프절로 안내하는 역할을 하는 가이드 역할을 한다[5, 20]. 더욱이, FRC는 염증반응 동안 림프절내에 순환계 관련 순환관 성장을 조절하여 림프구 유입을 조절등을 통해서 적응면역 반응에 대한 구조적 미세환경을 제공하는 핵심 세포중 하나이다[7]. 또한, FRCs은 T세포와 수지상세포의 접촉에 관여하며 fibrous extracellular matrix (ECM) bundle을 생산하여 림프절의 복잡한 3차원적 네트워크 형성에 관여한다[22]. 특히, T zone의 잘 정리된 층 구조의 네트워크 형성에 기여하는데 T세포와 수지상 세포간의 상호 작용을 위한 작은 분자들과 지지체를 위한 운송 장치로 역할을 한다[21]. 하지만, 여전히 FRC의 면역반응에 대한 특성 규명이 제대로 이루어지지 않고 있다. 본 연구는 림프절 스트로마의 면역반응에 대한 역할을 이해하고자 림프절 스트로마 세포인 FRC를 이용하여 염증유도 물질(LPS, TNF α 등)의 노출에 따른 FRC의 기능분석과 선천성 면역세포의 물리적 상호 작용 관계 확인을 통해 FRC의 면역조절능력에 대한 분석을

*Corresponding author

Tel : +82-51-890-2280, Fax : +82-51-890-2632

E-mail : jonghwanlee@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

시도하였다.

재료 및 방법

세포 배양

FRC와 대식세포(Raw264.7)는 10% fetal calf serum (FCS) 이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지를 이용하여 37°C CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다.

형광현미경 관찰

FRC monolayer에 Raw264.7, 10 μM Y27632 처리 후 24 시간 후에 세척하고 4% formaldehyde로 5분 고정하였다. 고정 후 PBS로 세척하고 rhodamine-labeled phalloidin (5 μg/ml)로 45분 염색하였다. 염색된 cover slips은 형광현미경에 장착된 Zeiss photomicroscope로 관찰하였고 이미지는 Adobe Photoshop software을 이용하여 분석하였다.

웨스턴 블롯

FRC에 Raw264.7과 10 μM Y27632를 처리하고 24시간 후 RIPA buffer로 용해시키고 BCA 방법으로 단백질을 정량하였다. 시료를 5X SDS sample buffer에 용해 후 boiling 하고 동일한 양을 SDS-PAGE로 분리하고 polyvinylidene difluoride membranes (PVDF)에 옮긴 후 막을 blocking solution (5% skim milk and 0.2% Tween 20-PBS)에 담근 후 1시간 반응하였다. 일차 항체로 anti-ICAM-1 antibody (1/1,000)로 1시간 반응하고 HRP-conjugated 이차항체를 이용하여 1시간 반응하였고 specific band 확인을 위해 ECL (ECL⁺; Amersham Biosciences)방법을 이용하였다.

젤라틴 자이모그래피

세포는 120 mM Tris-HCl (pH8.7), 0.1% Triton X-100, 5% glycerol, 100 mM sodium orthovanadate에 단백질분해효소 저해제를 첨가하고 세포를 분해하였다. 1D, 2D, 3D 배양 후 배양 상등액과 세포 용해 단백질 10 μg의 단백질을 각각 젤라틴 자이모그래피를 위해 사용하였다. Gel은 Fluorchem gel doc system을 이용해서 이미지를 보며 Alphaease software 이미지를 분석하였다.

RNA 분리

Total RNA는 TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 세포로부터 분리 후 chloroform (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA)과 에탄올 침전을 수행 후 사용하였다. 추출된 RNA는 NanoDrop® ND-1000 spectrophotometer (Nano Drop Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA)를 이용하여 정량하였고 RNA quality 확인을 위해서 Agilent RNA Nano 6000 LabChip kits and Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent

Technologies, Palo Alto, CA, USA)를 이용하였다.

마이크로어레이 분석

대조군과 실험군 RNA에 대하여 표적 cRNA probe와 혼성을 위한 합성은 Agilent's Low RNA Input Linear Amplification kit (Agilent Technology, USA)를 이용하여 제조사 매뉴얼에 따라 진행하였다. 즉, 각 1 μg total RNA와 T7 promoter primer mix를 65°C에서 10분간 반응 시켰다. cDNA master mix (5X First strand buffer, 0.1M DTT, 10mM dNTP mix, RNase-Out, and MMLV-RT)를 준비하여 reaction mixer와 혼합하였다. 시료들은 40°C에서 2시간 반응하고 역전사와 dsDNA 합성은 65°C에서 15분간 반응 후 종결하였다. dsDNA 전사는 transcription master mix와 dsDNA reaction sample을 섞은 후 40°C에서 2시간 동안 반응하였다. 증폭과 라벨링된 cRNA는 cRNA Cleanup Module (Agilent Technology)에 따라 정제하였다. Labeled cRNA 표적은 ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE)로 정량후 cRNA 단편화를 수행하였다. 단편화된 cRNA는 2X hybridization buffer에 녹인 후 Agilent's Mouse Oligo Microarray (44K)에 loading 하였다. 65°C에 17시간 동안 혼성화 수행 후 microarray는 제조사(Agilent Technology, USA)의 프로토콜에 따라 세척하였다.

데이터 수집 및 분석

Hybridized images은 Agilent's DNA microarray scanner으로 스캔 하였고 Feature Extraction Software (Agilent Technology, Palo Alto, CA)로 분석하였다. 데이터 normalization과 fold-changed genes 선별은 GeneSpringGX 7.3 (Agilent Technology, USA)로 수행하였다. 유전자의 기능적 주석은 GeneSpringGX 7.3에 의해 Gene Ontology™ Consortium (<http://www.geneontology.org/index.shtml>)에 따라 수행하였고 Gene classification은 BioCarta (<http://www.biocarta.com/>), GenMAPP (<http://www.genmapp.org/>), DAVID (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/>), 그리고 Medline databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 기초하여 조사하였다.

결과 및 고찰

선천성 면역세포 대식세포와 공배양시 FRC의 형태적 변화 유도

림프절에는 다양한 면역세포들이 있는 곳이다. 면역세포들이 림프절 내부에서 림프절 스트로마와 상호작용을 확인하기 위해 FRC monolayer에 적응면역세포인 T세포와 선천성 면역세포인 대식세포(Raw264.7)를 공배양 하였다. FRC monolayer에 대식세포를 공배양 했을 때 FRC monolayer의 형태적

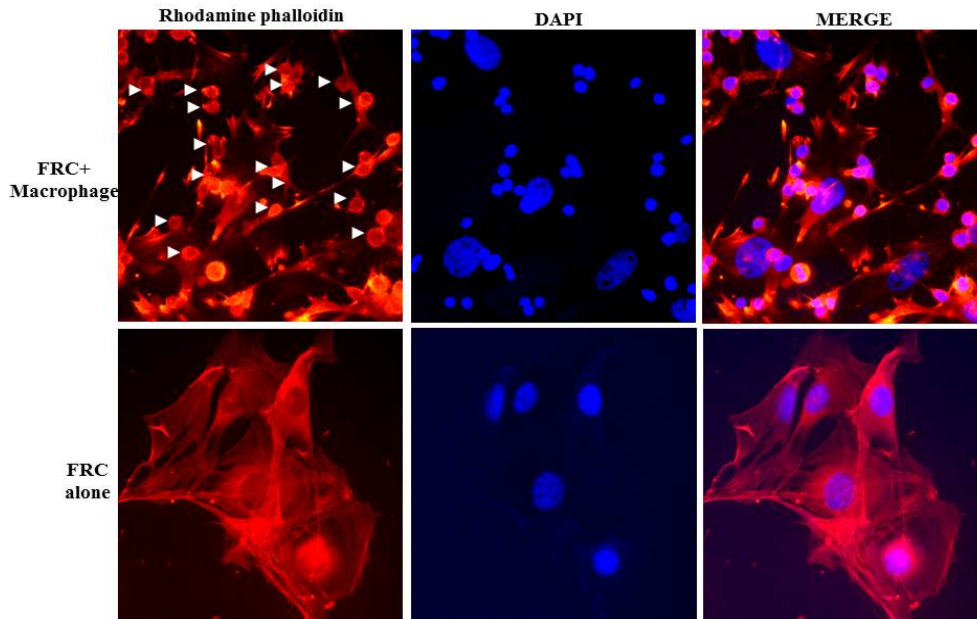


Fig. 1. Alteration of cell morphology of FRC through a fluorescence microscopy. FRC monolayer on chamber slides were co- cultured with macrophage Raw264.7 (arrow head) for 24 hr. Cells were stained with rodamine phalloidin for change after fixation, washing, and examined by Zeiss photomicroscope equipped for fluorescence microscopy. Nuclear was stained with DAPI.

변화가 일어났고 이로 인해 FRC간 빈 공간 생성을 확인할 수 있었다(Fig. 1). 이것은 FRC가 대식세포와의 상호작용을 할 수 있다는 것을 의미한다. FRC세포는 주로 T세포와 상호작용을 하는 것으로 알려져 있다[23]. 하지만, 본 결과로 선천성 면역과도 상호작용을 할 수 있다는 것을 의미하며 FRC는 적응 면역 및 선천성 면역반응을 촉진할 수 있다는 것을 의미한다. 림프절은 특정한 질병과 관계없이 선천성 체질로도 일정 정도까지 확장된다. 또한, 림프절 확장은 일반 감염 등에 의해 림프구, 단구, 중성구 등의 림프절 내부 세포들의 증식에 의해 생기거나 악성 종양 세포들과 같은 외부 세포의 침윤에 의해서도 생긴다[28]. 이런 확장현상은 스트로마세포간 빈 공간 형성과도 연관되어 있을 것으로 사료된다. 최근 보고에 의하면 FRC간 형태적 변화로 생성된 빈 공간은 면역세포들이 더욱더 림프절 공간을 통해서 효과적으로 이동 할 수 있도록 통로를

제공하는 것으로 생각하고 있다[3]. 따라서 림프절 스트로마는 고정된 상황에서 면역반응 수행하기보다 오히려 스트로마의 빈 공간 형성을 통해 재구성된 조직에서 면역반응을 수행을 위해 FRC와 같은 스트로마 세포의 변형이 먼저 유도되어야 할 것으로 사료된다.

선천성 면역의 공배양을 통한 형태적 변화와 ROCK와 연관성 확인

FRC monolayer에 대식세포의 공배양은 FRC의 형태적 변화를 유도하였다. 이러한 형태적 변화는 세포골격 재배열을 통해 세포형태변화에 관여하는 ROCK의 관련성을 살펴보았다. ROCK 저해제인 Y27632를 처리하였을 경우 FRC monolayer에 대식세포 공배양에서 관찰된 것처럼 유사한 현상을 관찰하였다(Fig. 3). 이것은 FRC와 대식세포의 공배양을 통해

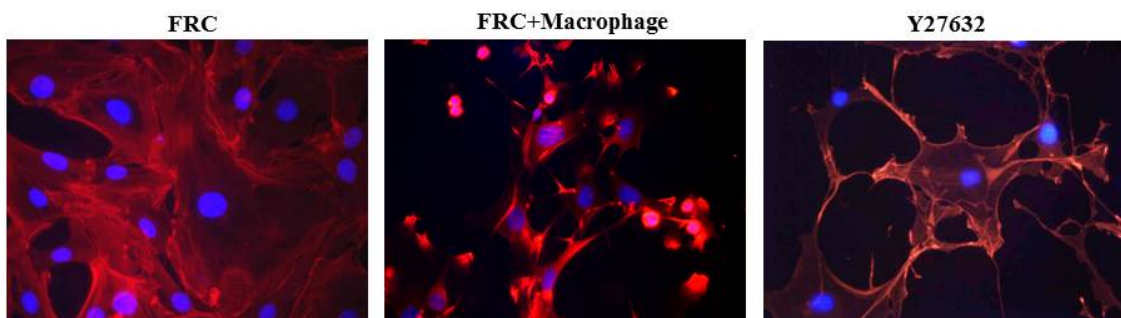


Fig. 2. Effects of Rho kinase inhibitor on cellular ruffle in FRCs. FRCs were treated with Rho kinase inhibitor (10 μM Y27632) for 1 hr at room temperature and were exhibited with a marked decrease in cellular ruffle.

형성된 형태적 변화에도 ROCK의 관련성에 대한 실마리를 제공한다. FRC의 빈 공간 형성은 결국 FRC의 세포내부 세포골격변화를 통해서 발생하는데 여기에는 small GTPase의 활성화와 관련되어 있다는 것을 의미한다. ROCK의 바로 위에서 작용하는 신호전달자로 RhoA가 있는데 RhoA-ROCK 신호전달 과정은 세포의 골격 재배열에 중심적 역할을 한다[9]. 따라서 대식세포와 FRC와 상호작용을 통해 유도된 세포의 형태적 변화에도 RhoA-ROCK 신호전달 과정이 관여 할 것 사료된다.

FRC monolayer와 대식세포 공배양을 통한 용해성 ICAM-1의 발현 증가 확인

FRC는 적응면역세포외에 선천성 면역세포와 상호작용하는 것을 Fig. 1에서 확인하였다. 이러 상호작용을 위해서는 세포표면에 존재하는 부착분자가 주로 관여한다. 따라서, FRC에서 부착분자중 하나인 ICAM-1의 발현양상을 알아보았다. FRC와 Raw264.7의 공배양시 용해성 ICAM-1 (sICAM-1)의 발현이 증가하는 것을 볼 수 있었고 Y27632를 처리 하였을 경우에도 관찰되었다(Fig. 2). 이런 결과는 FRC와 Raw264.7의 공배양을 통한 신호전달 기작 중 ROCK신호전달이 관여하고 있다는 것을 의미한다. ICAM-1은 막결합형 ICAM-1 (mICAM-1)과 용해성 ICAM-1 (sICAM-1)으로 나눌 수 있다. mICAM-1은 세포의 부착을 유도하는데 반해서 sICAM-1은 면역세포가 FRC쪽으로 이동 하도록 유도하는 역할을 한다[10]. 본 결과는 FRC가 선천성 면역세포를 FRC쪽으로 유도하면서 근접한 세포를 mICAM-1과 결합을 하여 상호작용을 하도록 할 것으로 사료된다. 또한, sICAM-1의 형성에는 ROCK가 저해되면 증가하는 것으로 보아 ROCK신호전달은 sICAM-1의 생성을 방해하는 것으로 생각되며 대식세포와 상호작용을 통해 저해된 ROCK에 의해 sICAM-1의 증가가 유도되어 FRC와 상호 작용

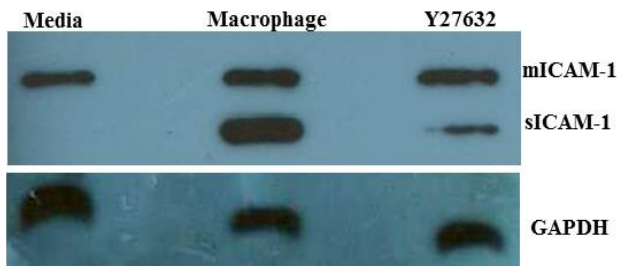


Fig. 3. Effects of macrophage co-culture and Y27632 on ICAM-1 expression in FRCs. FRC (5×10^6 cells) was grown on 10 mm dish plate for 24 hr. FRC was co-cultured with macrophage and incubated with 10 μ M Y27632. After co-culture, macrophage was removed out by washing with PBS. Cell was lyzed with RIPA buffer and protein concentration of FRC lysate was measured by BCA method. The expression degree of mICAM-1 and sICAM-1 was detected by Western blot. GAPDH was used to demonstrate loading control of lysates.

을 할 수 있다고 사료된다. 더불어, ROCK는 세포의 형태변화 유도 및 부착분자의 발현에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

염증 유발 물질 LPS에 의한 FRC의 MMP 활성화증가 확인

림프절은 외부 병원체 침입 시 원래 상태에서 상당히 부풀어 오른 모양을 보이며 또한, 잘 구획화 되어있던 내부 구조가 상당히 복잡한 구조로 변한다[17]. 이러한 변화가 유도되기 위해서는 림프절 3차원 구조에 변화가 일어나야 한다. 림프절은 세포외기질의 복잡한 네트워크를 통해서 3차원 미세환경을 구성하고 있으며 세포의 기질의 재구성을 위해서는 스트로마 세포로부터 세포외기질 분해 인자의 방출을 통해서 기존에 형성된 3차원 뼈대가 재구성 되어야 한다. 이를 확인하기 위해 FRC에 염증 유발 인자인 LPS를 처리하여 세포외기질 재구성에 관여하는 인자인 MMP의 활성화증가를 위해 젤라틴 자이모그래피를 수행하였다. 100 ng/ml LPS에 노출된 FRC는 시간이 증가함에 따라 MMP9와 MMP2의 활성이 증가되는 것을 확인하였다(Fig. 4). 이것은 염증반응시 세포외기질 재구성에 필요한 MMP의 발현증가로 이어져 결국 세포외기질에 재구성에 관여 될 수 있다는 것을 의미한다. FRC에 의한 특징적 network scaffold는 조직에 기계적 힘과 면역세포들이 활동적으로 이동할 수 있는 공간을 동시에 제공하는데 적합하다. Katakai 등은 FRC에 염증성 물질인 TNF α 를 처리 했을 경우 FRC가 세포외기질 fiber를 생산하여 meshwork을 수행하는 기능을 발휘하였다[17]. 따라서 FRC는 림프조직에서 일어나는 lymphocyte-stromal interaction, 림프절 재구성에 관여 한다고 사료된다. 물론, 최근 논문을 통해서 podoplanin (PDPN)의 신호전달도 FRC의 자극을 통해 림프절 세포외기질 형성에 영향을 미치는 것으로 알려졌다[3]. 따라서, 세포외기질 재구성에 관여하는 기작에는 복수의 분자들이 관여할 가능성이 있다는 것을 의미한다.

FRC에서 DNA 마이크로어레이를 통한 TNF α 에 의한 세포외기질 변화 확인

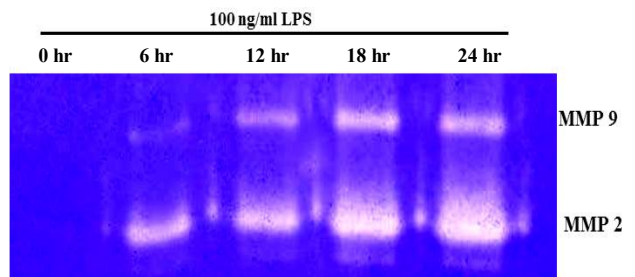


Fig. 4. Evaluation of MMP activity against LPS in FRC. MMP-2 and MMP-9 activity was analyzed with conditioned media of FRCs in the absence or in the presence of 100 ng/ml LPS by gelatin zymography during indicated time.

Table 1. ECM change in FRC by exposure of TNF α

Systematic ID	Gene symbol	Normalized value#	Regulation*	Description	Reference
A_52_P585652	Fndc3b	2.1102052	UP	Mus musculus fibronectin type III domain containing 3B	2
A_55_P2059352	Col18a1	5.622739	UP	Mus musculus collagen, type XVIII, alpha 1	12
A_51_P212420	Lama4	4.1566067	UP	Mus musculus laminin, alpha 4 (Lama4)	4
A_66_P101600	Lamb1-1	2.1562326	UP	Mus musculus laminin B1 subunit 1 (Lamb1-1)	14
A_51_P334104	Dcn	6.1920133	UP	Mus musculus decorin (Dcn), transcript variant 2	27
A_51_P241995	Col5a3	6.9916606	UP	Mus musculus collagen, type V, alpha 3	13
A_51_P109840	Vtn	0.3998126	Down	Mus musculus vitronectin	15
A_51_P182303	Col1a2	0.3691859	Down	Mus musculus collagen, type I, alpha 2	18
A_55_P2062469	Col12a1	0.3227311	Down	Mus musculus collagen, type XII, alpha 1	1
A_51_P515605	Col3a1	0.29171106	Down	Mus musculus collagen, type III, alpha 1	6
A_55_P2130178	Fn1	0.30951834	Down	Mus musculus fibronectin 1	25
A_51_P116651	Dpt	0.22983237	Down	Mus musculus dermatopontin (Dpt)	24
A_52_P1044655	Vcan	0.46047154	Down	Mus musculus versican (Vcan), transcript variant 5	26

Normalized value was the ratio between TNF α treated sample value vs control value.

*Regulation was decided by normalized value (i.e values above 2 fold) as UP and (values below 0.5 fold) as Down.

림프절을 구성하고 있는 세포외기질에는 다양한 종류로 구성되어 있다. 염증상황하에 Fig. 4에서 세포외기질 재구성에 필요한 MMP의 활성이 나타나는 것을 확인하였다. 따라서, 다양한 세포외기질에 대하여 염증상황시 세포외기질의 변화를 알아보고자 염증물질인 TNF α 를 FRC에서 처리 후 DNA 마이크로레이를 실행하여 전체 전사체에 대하여 세포외기질 구성성분 변화를 확인하였다(Table 1). 감염이 발생하면 림프절은 확장되어 구획화 되어 있는 지역에 재배열이 일어나고 이런 재배열을 위해서 기존의 세포외기질이 재구성되어야 한다[8]. 이것은 림프절 스트로마에 변화가 일어나야 한다는 것을 의미하며 이러한 변화의 토대가 되는 것이 FRC와 면역세포 혹은 FRC와 염증 물질간 상호작용을 통해서 형성된다고 사료된다. 따라서 이상의 결과는 FRC는 면역반응시 세포 혹은 염증물질들과의 상호작용을 통해서 다양한 기능을 통해서 면역반응에 관여 하고 있다는 것을 의미하며 림프절 스트로마는 단순히 물리적 지지체로 작용하는 것이 아니라 활발히 면역반응에 관여하는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2015년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업임(No.: NRF-2011-0011128).

References

- Agarwal, P., Zwolanek, D., Keene, D. R., Schulz, J. N., Blumbach, K., Heinegård, D., Zaucke, F., Paulsson, M., Krieg, T., Koch, M. and Eckes, B. 2012. Collagen XII and XIV, new partners of cartilage oligomeric matrix protein in the skin extracellular matrix suprastructure. *J. Biol. Chem.* **287**, 22549-22559.
- Anna, M. P. and Kim, S. M 2014. Illustrating the interplay between the extracellular matrix and microRNAs. *Int. J. Exp. Pathol.* **95**, 158-180.
- Astarita, J. L., Cremasco, V., Fu, J., Darnell, M. C., Peck, J. R., Nieves-Bonilla, J. M., Song, K., Kondo, Y., Woodruff, M. C., Gogineni, A., Onder, L., Ludewig, B., Weimer, R. M., Carroll, M. C., Mooney, D. J., Xia, L. and Turley, S. J. 2015. The CLEC-2-podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture. *Nat. Immunol.* **16**, 75-84.
- Bai, C., Yang, M., Fan, Z., Li, S., Gao, T. and Fang, Z. 2015. Associations of chemo- and radio-resistant phenotypes with the gap junction, adhesion and extracellular matrix in a three-dimensional culture model of soft sarcoma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **34**, 58.
- Chai, Q., Onder, L., Scandella, E., Gil-Cruz, C., Perez-Shibayama, C., Cupovic, J., Danuser, R., Sparwasser, T., Luther, S. A., Thiel, V., Rüllicke, T., Stein, J. V., Hehlhans, T. and Ludewig, B. 2013. Maturation of lymph node fibroblastic reticular cells from myofibroblastic precursors is critical for antiviral immunity. *Immunity* **38**, 1013-1024.
- Chalikias, G. K. and Tziakas, D. N. 2015. Biomarkers of the extracellular matrix and of collagen fragments. *Clin. Chim. Acta.* **443**, 39-47.
- Chyou, S., Ekland, E. H., Carpenter, A. C., Tzeng, T. C., Tian, S., Michaud, M., Madri, J. A. and Lu, T. T. 2008. Fibroblast-type reticular stromal cells regulate the lymph node vasculature. *J. Immunol.* **181**, 3887-3896
- Fletcher, A. L., Acton, S. E. and Knoblich, K. 2015. Lymph node fibroblastic reticular cells in health and disease. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 350-361.
- Gui, P., Labrousse, A., Van Goethem, E., Besson, A., Mari-donneau-Parini, I. and Le Cabec, V. 2014. Rho/ROCK path-

- way inhibition by the CDK inhibitor p27(kip1) participates in the onset of macrophage 3D-mesenchymal migration. *J. Cell Sci.* **127**, 4009-4023
10. Hara, T., Katakai, T., Lee, J. H., Nambu, Y., Nakajima-Nagata, N., Gonda, H., Sugai, M. and Shimizu, A. 2006. A transmembrane chemokine, CXC chemokine ligand 16, expressed by lymph node fibroblastic reticular cells has the potential to regulate T cell migration and adhesion. *Int. Immunol.* **18**, 301-311.
 11. Hirose, S. and Dubrot, J. 2015. Modes of antigen presentation by lymph node stromal cells and their immunological implications. *Front Immunol.* **6**, 446. doi: 10.3389/fimmu.2015.00446.
 12. Hoffmann, J., Marsh, L. M., Pieper, M., Stacher, E., Ghanim, B., Kovacs, G., König, P., Wilkens, H., Haitchi, H. M., Hoefler, G., Klepetko, W., Olschewski, H., Olschewski, A. and Kwapiszewska, G. 2015. Compartment-specific expression of collagens and their processing enzymes in intrapulmonary arteries of IPAH patients. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* **308**, L1002-1013.
 13. Huang, G., Ge, G., Wang, D., Gopalakrishnan, B., Butz, D. H., Colman, R. J., Nagy, A. and Greenspan, D. S. 2011. $\alpha 3(V)$ collagen is critical for glucose homeostasis in mice due to effects in pancreatic islets and peripheral tissues. *J. Clin. Invest.* **121**, 769-783.
 14. Hyldahl, R. D., Nelson, B., Xin, L., Welling, T., Groscost, L., Hubal, M. J., Chipkin, S., Clarkson, P. M. and Parcell, A. C. 2015. Extracellular matrix remodeling and its contribution to protective adaptation following lengthening contractions in human muscle. *FASEB J.* **29**, 2894-2904.
 15. Johnson, K. M., Milner, R. and Crocker, S. J. 2015. Extracellular matrix composition determines astrocyte responses to mechanical and inflammatory stimuli. *Neurosci. Lett.* **600**, 104-109.
 16. Katakai, T., Hara, T., Lee, J. H., Gonda, H., Sugai, M. and Shimizu, A. 2004. A novel reticular stromal structure in lymph node cortex: an immuno-platform for interactions among dendritic cells, T cells and B cells. *Int. Immunol.* **16**, 1133-1142.
 17. Katakai, T., Hara, T., Sugai, M., Gonda, H. and Shimizu, A. 2004. Lymph node fibroblastic reticular cells construct the stromal reticulum via contact with lymphocytes. *J. Exp. Med.* **200**, 783-795.
 18. Menon, A., Pettinari, L., Martinelli, C., Colombo, G., Portinaro, N., Dalle-Donne, I., d'Agostino, M. C. and Gagliano, N. 2013. New insights in extracellular matrix remodeling and collagen turnover related pathways in cultured human tenocytes after ciprofloxacin administration. *Muscles Ligaments Tendons J.* **3**, 122-131.
 19. Rezk, S. A., Nathwani, B. N., Zhao, X. and Weiss, L. M. 2013. Follicular dendritic cells: origin, function, and different disease-associated patterns. *Hum. Pathol.* **44**, 937-950.
 20. Schumann, K., Lämmermann, T., Brückner, M., Legler, D. F., Polleux, J., Spatz, J. P., Schuler, G., Förster, R., Lutz, M. B., Sorokin, L. and Sixt, M. 2010. Immobilized chemokine fields and soluble chemokine gradients cooperatively shape migration patterns of dendritic cells. *Immunity* **32**, 703-713.
 21. Siegert, S. and Luther, S. A. 2012. Positive and negative regulation of T cell responses by fibroblastic reticular cells within paracortical regions of lymph nodes. *Front Immunol.* **3**, 285. doi: 10.3389/fimmu.2012.00285.
 22. Sobocinski, G. P., Toy, K., Bobrowski, W. F., Shaw, S., Anderson, A. O. and Kaldjian, E. P. 2010. Ultrastructural localization of extracellular matrix proteins of the lymph node cortex: evidence supporting the reticular network as a pathway for lymphocyte migration. *BMC Immunol.* **11**, 42. doi: 10.1186/1471-2172-11-42.
 23. Takeda, A., Kobayashi, D., Aoi, K., Sasaki, N., Sugiura, Y., Igarashi, H., Tohya, K., Inoue, A., Hata, E., Akahoshi, N., Hayasaka, H., Kikuta, J., Scandella, E., Ludewig, B., Ishii, S., Aoki, J., Suematsu, M., Ishii, M., Takeda, K., Jalkanen, S., Miyasaka, M. and Umemoto, E. 2016. Fibroblastic reticular cell-derived lysophosphatidic acid regulates confined intranodal T-cell motility. *Elife.* **5**, pii: e10561. doi: 10.7554/eLife.10561.
 24. Tracy, L. E., Minasian, R. A. and Caterson, E. J. 2016. Extracellular matrix and dermal fibroblast function in the healing wound. *Adv. Wound Care* **5**, 119-136.
 25. Wang, K., Seo, B. R., Fischbach, C. and Gourdon, D. 2016. Fibronectin mechanobiology regulates tumorigenesis. *Cell Mol. Bioeng.* **9**, 1-11.
 26. Wight, T. N., Kinsella, M. G., Evanko, S. P., Potter-Perigo, S. and Merrilees, M. J. 2014. Versican and the regulation of cell phenotype in disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **1840**, 2441-2451.
 27. Yick, C. Y., Ferreira, D. S., Annoni, R., von der Thüsen, J. H., Kunst, P. W., Bel, E. H., Lutter, R., Mauad, T. and Sterk, P. J. 2012. Extracellular matrix in airway smooth muscle is associated with dynamics of airway function in asthma. *Allergy* **67**, 552-559.
 28. Zhang, Z., Li, J., Zheng, W., Zhao, G., Zhang, H., Wang, X., Guo, Y., Qin, C. and Shi, Y. 2016. Peripheral lymphoid volume expansion and maintenance are controlled by gut microbiota via RALDH(+) dendritic cells. *Immunity* **44**, 330-342.

초록 : 림프절 스트로마 유래 fibroblastic reticular cell의 면역조절 기능에 대한 특성 규명이종환^{1,2*}(¹동의대학교 생명공학과, ²동의대학교 바이오물질제어학과)

림프절은 이차성 면역기관중 하나이다. 림프절은 복잡한 3차원적 뼈대 구조물과 스트로마 세포로 구성되어 있다. Fibroblastic reticular cells (FRC)는 T세포와 상호작용을 위해 T zone에 주로 분포하고 있는 세포이다. FRC는 CCL21, CCL19같은 홍명유도 케모카인을 분비하거나 감염에 대비하여 림프절 세포외기질 형성에 중요한 역할을 한다. 하지만, FRC가 직접 면역반응에 관여하는지에 대하여 많이 알려져 있지 않다. 본 연구는 면역반응에 대한 FRC의 특성 규명에 대한 것이다. 이를 위해 FRC와 대식세포의 공배양, lipopolysaccharide (LPS), TNF α 자극에 노출시켜 반응성을 조사하였다. FRC와 대식세포를 공배양 하였을 때 FRC의 형태적 변화가 유도 되었고 이로 인해 FRC가 빈 공간이 형성되는 것을 확인하였다. 용해성 ICAM-1 (sICAM-1)의 발현량이 대식세포와 ROCK 저해제, Y27632를 처리 했을 경우 증가하는 것을 단백질 수준에서 확인하였다. Matrix metalloproteinase (MMP) 활성이 LPS를 처리한 FRC에서 반응시간 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다. 더욱이, 세포외기질에 대하여 염증물질인 TNF α 를 처리 했을 경우 조절되는 것을 gene chip assay를 통해서 확인하였다. 이상의 결과는 FRC가 면역반응에 직접 관여하고 있다는 것을 의미하며 이는 림프절 스트로마도 면역반응에 관여하고 있는 것으로 사료된다.