

Fibroblastic Reticular Cell Derived from Lymph Node Is Involved in the Assistance of Antigen Process

Min Hwan Kim¹ and 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 June 30, 2016 / Revised August 3, 2016 / Accepted August 4, 2016

Antigen is substance causing disease derived from pathogen. Living organism has the immune system in terms of defense mechanism against antigen. Antigen is processed through several pathways such as phagocytosis, antibody action, complement activation, and cytotoxins by NK or cytotoxic T lymphocyte via MHC molecule. Lymph node (LN) is comprised of the complicated 3 dimensional network and several stromal cells. Fibroblastic reticular cells (FRC) are distributed in T zone for interaction with T cells. FRC produces the extra cellular matrix (ECM) into LN for ECM reorganization against pathogen infections and secretes homing chemokines. However, it has not so much been known about the involvement of the antigen process of FRC. The present report is for the function of FRC on antigen process. For this, FRC was positioned with several infected situations such as co-culture with macrophage, T cell, lipopolysaccharide (LPS) and TNF α stimulation. When co-culture between FRC with macrophage and T cells was performed, morphological change of FRC was observed and empty space between FRCs was made by morphological change. The matrix metallo-proteinase (MMP) activity was up-regulated by Y27632 and T cells onto FRC. Furthermore, inflammatory cytokine, TNF α regulated the expression of adhesion molecules and MHC I antigen transporter in FRC by gene chip assay. NO production was elevated by FRC monolayer co-cultured with macrophage stimulated by LPS. GFP antigen was up-taken by macrophage co-cultured with FRC. Collectively, it suggests that FRC assists of the facilitation of antigen process and LN stroma is implicated into antigen process pathway.

Key words : Antigen process, FRC (Fibroblastic reticular cells), LPS (lipopolysaccharide), TNF α

서 론

항원(antigen)은 병원체로부터 유래된 물질 혹은 병원체 자신으로 생체에 감염되어 질병의 원인물질로 작용한다. 항원으로부터 생체를 보호하는 것이 면역계이다. 면역계는 면역조절 물질, 면역세포, 면역기관으로 구성되어 있다. 이중 면역세포는 병원체에 존재하는 특정 분자패턴을 인식하여 처리하는 선천성 면역과 특이적 수용체를 통해 병원체를 처리하는 적응 면역으로 구분 할 수 있다[1]. 면역계는 항원 처리를 위해 대식세포, 호중구, B세포, T세포와 같은 면역세포로부터 분비되는 사이토 카인, 항체, 케모카인 그리고 보체와 같은 용해성 물질과 식세포 식작용 기능을 통해서 항원을 처리하고 있다[4, 14]. 또한, 바이러스 감염에 대하여 cytotoxic T lymphocyte (CTL)

반응을 통해서 항원이 처리된다[8]. 더불어 작은 펩타이드계열의 항생물질도 항원처리에 관여하고 있다[21]. 또한, ROS와 NO 등도 항원을 분해하거나 제거하는데 관여하고 있다[1, 7]. 이러한 결과들은 대부분 면역세포들에 의해 유도된 염증반응 제거과정에서 발견되었다. 하지만, 면역계에는 면역기관도 포함되는데 면역기관의 항원처리에 대한 연구는 거의 진행되지 않고 있다. 본 연구는 면역기관중 하나인 림프절의 항원처리에 대한 기능을 알아보고자 림프절 스트로마 세포인 fibroblastic reticular cell (FRC)에서 항원처리에 관여하는 인자들의 활성변화에 대하여 알아보고자 하였다. 이차성 면역기관인 림프절은 선천성 면역과 적응면역의 접합점으로 면역반응이 일어나는 곳이다. 림프절은 세포의 기질이 복잡한 3차원 구조를 형성하여 기본 뼈대를 제공하고 여기에 각종 림프절 스트로마 세포들이 사이사이에 구성되어 림프절을 형성하게 된다. 림프절에는 다양한 스트로마세포가 존재한다[12]. 림프절 stromal cell은 다양한 용해성 인자와 막결합 분자 발현을 통해 면역세포의 기능을 조절한다[12]. 특히, CCL19, CCL21, CXCL21와 CXCL13과 같은 항상성 유지를 위해서 필요한 케모카인들은 면역세포의 homing에 중요한 역할을 한다[2]. FRC는 T 세포 지역에서 발견되는 stromal cell로 림프절로 들어오는 세포의 방향타 역할과 자체적으로 부착분자를 발현을 통해 유입

*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.

된 면역세포와 상호작용을 할 수 있도록 작용점을 제공한다[6, 18]. 하지만, 지금까지 면역반응시 FRC의 항원처리에 대한 이해가 이루어지지 않아 본 연구에서 추구하고자 진행되었다.

재료 및 방법

세포 배양

마우스 T세포는 spleen으로부터 분리 후 CD4에 대한 magnetic Dynabeads로 코팅된 항체로 분리하여 사용하였고 배양은 RPMI 1640배지에서 배양하고 FRC, 대식세포(Raw264.7)는 10% fetal calf serum (FCS), 페니실린/스트렙토마이신이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 배양하였다.

형광현미경 관찰

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

젤라틴 자이모그래피

세포는 120 mM Tris-HCl (pH8.7), 0.1% Triton X-100, 5% glycerol, 100 mM sodium orthovanadate에 단백질분해효소 저해제를 첨가하여 세포를 파쇄하였다. 1일, 2일, 3일 배양 후 배양 상등액과 세포 용해 단백질을 10 μ g의 단백질을 각각 젤라틴 자이모그래피를 위해 사용한다. Gel은 Fluorchem gel doc system을 이용해서 이미지를 보며 Alphaease software 이미지를 분석한다.

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.

DNA 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 μ g 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. Labeled cRNA 표적은 ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, DE)로 정량 후 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.

자료 분석

Hybridized images은 Agilent's DNA 마이크로 스캐너로 스캔 하였고 Feature Extraction Software (Agilent Technology, Palo Alto, CA)로 quantified하였다. 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.

대식세포 항원 섭취능 평가

FRC monolayer에 대식세포인 Raw264.7을 공배양 하고 여기에 대장균으로부터 분리한 녹색형광을 띠는 GFP 단백질을 첨가하여 24시간 배양 하였다. 대식세포에 의해 GFP 항원 섭취를 알아보고자 24시간 후 세포를 4% paraformaldehyde로 고정하고 PBS로 3회 세척 후 laser scanning confocal microscope (MRC-1024; Bio-Rad, Osaka, Japan)로 이미지를 촬영하며 이미지를 Adobe Photoshop software로 분석하였다.

NO 생성검증을 위한 griess assay

FRC monolayer에 대식세포를 공배양 한 후 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양 후 LPS (lipopolysaccharide)를 처리하고 24시간 동안 배양하였다. LPS처리 24시간 후 배양상등액을 취하여 새로운 well에 옮기고 배양상등액에 포함된 NO를 정량하기 위해서 Griess Reagent를 처리하였다. 즉, Griess reagent A인 N-1 Naphthylethylenediamine (Sigma N9125) 와 griess reagent B인 sulfanilamide (sigma S9251)를 동량 섞고 배양상등액을 다시 1:1로 동량 반응 시켰다. 이후 흡광도 540

nm에서 측정하여 NO를 정량하였다.

결과 및 고찰

FRC는 선천성 면역과 적응면역 상호작용 유도

림프절은 항원제시세포와 적응면역세포들이 모이는 곳으로 림프절 스트로마는 세포들에 대한 scaffold 역할을 할 것으로 판단되었다. 따라서, FRC의 면역세포와의 상호작용을 확인을 위해 FRC monolayer에 적응면역세포인 T세포와 선천성 면역세포인 대식세포를 공배양하였다. 24시간 공배양 후 세포를 고정하고 PBS로 세척 한 후 세포를 rhodamine phalloidin과 DAPI로 염색하고 형광 현미경으로 관찰하였다. FRC는 T세포와 대식세포와의 상호작용을 통해서 FRC의 형태적 변화가 유도 되었고 그로 인해 FRC간 빈공간 형성이 유도되었다(Fig. 1). 이런 공간 형성에서 판단하면 T세포와 FRC의 공배양 에서 다른 세포간 공배양 보다 큰 형태의 공간이 형성되는 것을 확인 할 수 있었다(Fig. 1). 그리고 FRC monolayer에서는 rhodamine phalloidin으로 염색된 cytoskeleton은 명확하게 관찰 되었지만 T세포 혹은 대식세포가 공배양된 FRC에서는 cytoskeleton이 감소되었다(Fig. 1). 이러한 형태적 변화 및 cytoskeleton의 변화는 ROCK와 관련되어있다[20]. 따라서, FRC에서도 ROCK의 관련성을 알아보기 위해 ROCK 저해제를 처

리 하였는데 Fig. 1에서 FRC에서 형태적 변화와 cytoskeleton의 감소도 확인되었다. 하지만, 유도된 형태적 변화는 모두 조금씩 다른 모양으로 관찰되었는데 이것은 세포내부의 신호 전달 관련인자들이 중첩 혹은 특이적 신호전달 과정이 관련하고 있는 것으로 사료된다. FRC는 T zone에 존재하는 스트로마 세포로 T세포와 상호작용 하는 것으로 알려져 있다[10]. Fig. 1에서 보면 FRC는 T세포와 상호작용으로 형성된 공간이 큰 것으로 보아 FRC는 T세포와 상호작용에 더 효율적으로 반응하도록 특화된 것으로 사료된다. 본 결과는 FRC가 적응면역세포 및 선천성 면역과도 상호작용을 할 수 있다는 것을 의미한다. 하지만, 형태적 변화의 정도 차이를 보이며 작용하는 신호 전달 기작이 서로 다를 수 있다는 것을 제시하고 있다.

T세포 및 Y27632는 FRC에 세포외기질(extra cellular matrix, ECM) 재구성에 관련된 MMP활성 증가

T세포, 대식세포 그리고 ROCK저해제 Y27632를 처리한 전체적으로 유사한 세포 형태적 변화와 FRC가 빈 공간 형성을 확인하였다(Fig. 1). FRC는 ECM 생산을 통해 림프절 3차원 구조형성, 유지 및 재구성에 관여한다고 알려져 있다[10]. 림프절에서 3차원적 공간에서 빈 공간 형성 유도는 ECM이 재구성 되어 변화가 유도되어야 하는 것으로 이를 위해서는 MMP의 활성이 중요하게 작용한다[9]. 따라서, T세포와 FRC의 공배양 후 배양 상등액을 이용하여 MMP의 활성변화를 확인하고자 젤라틴 자이모그래피를 수행하였다. T세포를 FRC와 공배양 했을 때 MMP9와 MMP2의 활성이 증가하는 것을 확인하였고 Y27632를 처리 하였을 경우에도 18시간 때 MMP2와 MMP9의 활성이 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 2). 이것은 FRC간 빈 공간 형성 동안 ECM 재구성에 필요한 MMP의 ECM 재구성이 되며 이를 통해 형성된 빈 공간과 재구성된 ECM에 의해서 면역세포들이 효율적으로 이동 할 수 있는 상황이 만들어진다. 또한, 빈 공간 형성에는 ROCK에 의해서도 유도 되었는데 이것은 MMP활성에도 T세포에서도 동일한 기작이 관여하고

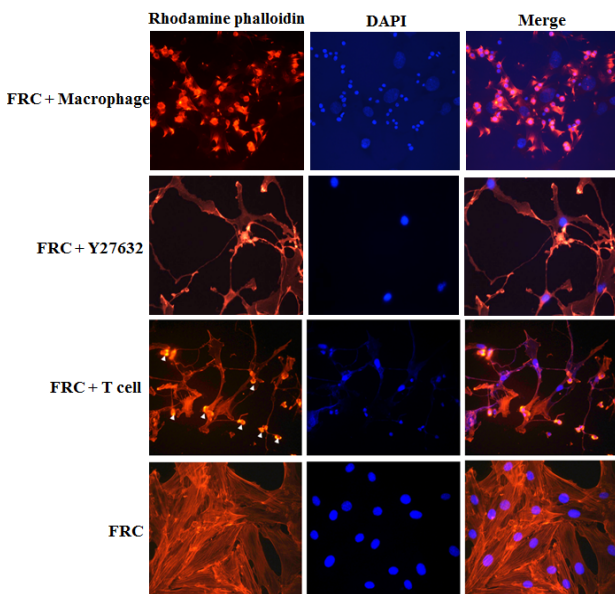


Fig. 1. Alteration of cell morphology of FRC through a fluorescence microscopy. FRC monolayer on chamber slides were cocultured with macrophage Raw264.7, T cell and 10 μ M Y27632 for 24 hr. Cells were stained with rhodamine phalloidin for change after fixation, washing, and examined and were exhibited with a marked decrease in cellular ruffle by Zeiss photomicroscope equipped for fluorescence microscopy. Nuclear was stained with DAPI.

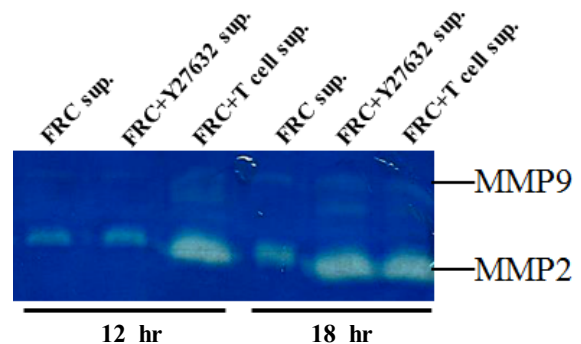


Fig. 2. Evaluation of MMP activity against Y27632 and T cell in FRC. MMP-2 and MMP-9 activity was analyzed with conditioned media of FRCs in the absence or in the presence of 10 μ M Y27632 and T cell by gelatin zymography during indicated time.

있다는 것을 의미하고 있다.

DNA 마이크로어레이분석을 통한 세포 부착 분자의 발현 비교

FRC monolayer에 TNF α 처리 후 변화되는 부착관련 인자들의 발현량을 DNA 마이크로어레이 분석을 하였다. 최근 연구를 보면 FRC에 염증 발생후 FRC간 응축작용을 통해서 세포공간 형성이 되는 것을 확인하였다[11]. 면역반응을 효율적으로 하기 위해 T세포 혹은 대식세포와 같은 면역반응에 직접 관여하는 세포들이 한 지점 혹은 바로 인접한 부위로 모여 들어야 한다. 세포들이 상호작용을 위해서 세포간 접촉이 형성되어야 하는데 세포접촉을 위해서는 세포들이 부착이 되어야 한다[22]. FRC는 T세포와 상호작용하는 세포로 주로 알려져 있는데 림프절에서 FRC와 상호작용을 위해서 FRC와의 부착단백질을 통해서 상호작용을 할 것이다. 이를 확인하기 위

해 염증상황에서 FRC의 부착단백질의 발현양상을 확인하기 위해 DNA microarray를 수행하였다. Madcam1과 ICAM1, Vcam1과 같은 부착분자의 발현이 TNF α 처리된 FRC에서 발현량이 현격히 증가되는 것을 볼 수 있었다(Table 1).

항원제시 유전자 발현 분석

바이러스성 항원들은 세포에서 MHC I의 경로를 통해서 세포표면으로 제시된다. 전문항원제시세포가 아니면 대부분의 세포는 MHC I을 통해서 처리된 항원을 세포의 표면으로 제시한다. FRC에서 염증물질에 의한 항원제시 연관성을 알아보기 위해 TNF α 로 처리 후 DNA gene chip을 수행결과 MHC I의 발현이 증가하는 것을 확인하였고 세포내부에서 항원 처리에 관여하는 인자중 하나인 TAPBP의 발현이 상당히 증가하는 것을 확인하였다(Table 2). 이것은 FRC가 항원제시기능을 가지고 있다는 것을 의미한다.

Table 1. Adhesion molecules regulated in FRC by TNF α exposure

| Systematic ID | Gene symbol | Normalized value# | Description | Regulation* |
|---------------|-------------|-------------------|--|-------------|
| A_52_P613241 | Madcam1 | 38.157276 | Mus musculus mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1 | UP |
| A_52_P613241 | Icam1 | 5.525103 | Mus musculus intercellular adhesion molecule 1 | UP |
| A_51_P210956 | Vcam1 | 4.5500627 | Mus musculus vascular cell adhesion molecule 1 | UP |
| A_51_P359603 | Itgb7 | 2.76757 | Mus musculus integrin beta 7 | UP |
| A_51_P248666 | Cd274 | 2.057967 | Mus musculus CD274 antigen | UP |
| A_55_P2028591 | Ptpnm | 0.43957385 | Mus musculus protein tyrosine phosphatase, receptor type, M | DOWN |
| A_55_P2050602 | Ncam1 | 0.33771417 | Mus musculus neural cell adhesion molecule 1 | DOWN |

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.

Table 2. Antigen presentation- related genes regulated in FRC by TNF α exposure

| Systemic ID | Gene symbol | Normalized value# | Description | Regulation* |
|---------------|--------------|-------------------|---|-------------|
| A_55_P2149763 | Tapbp | 5.1 | Mus musculus TAP binding protein | UP |
| A_51_P505795 | Tapbpl | 3.7 | Mus musculus TAP binding protein-like | UP |
| A_65_P19395 | H2-D1 | 2.9 | Mus musculus histocompatibility 2, D region locus 1 | UP |
| A_51_P469968 | H2-M3 | 2.8 | Mus musculus histocompatibility 2, M region locus 3 | UP |
| A_55_P2029528 | LOC100044874 | 2.8 | PREDICTED: Mus musculus similar to MHC H2-K 24 | UP |
| A_51_P237754 | H2-T23 | 2.6 | Mus musculus histocompatibility 2, T region locus 23 | UP |
| A_51_P400752 | H2-Q5 | 2.6 | Mus musculus histocompatibility 2, Q region locus 5 | UP |
| A_55_P2102182 | LOC675328 | 2.5 | PREDICTED: Mus musculus similar to MHC H2-TL-T10-b | UP |
| A_55_P1998937 | H2-M11 | 2.5 | Mus musculus histocompatibility 2, M region locus 11 | UP |
| A_55_P2088495 | LOC641235 | 2.5 | PREDICTED: Mus musculus similar to MHC class Ib antigen Qa-1c | UP |
| A_55_P1966659 | LOC547349 | 2.4 | Mus musculus similar to MHC class I antigen precursor | UP |
| A_55_P2102181 | LOC675328 | 2.3 | PREDICTED: Mus musculus similar to MHC H2-TL-T10-b | UP |
| A_55_P1966660 | LOC547349 | 2.3 | Mus musculus similar to MHC class I antigen precursor | UP |
| A_55_P1978465 | H2-Q8 | 2.1 | Mus musculus histocompatibility 2, Q region locus 8 | UP |

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.

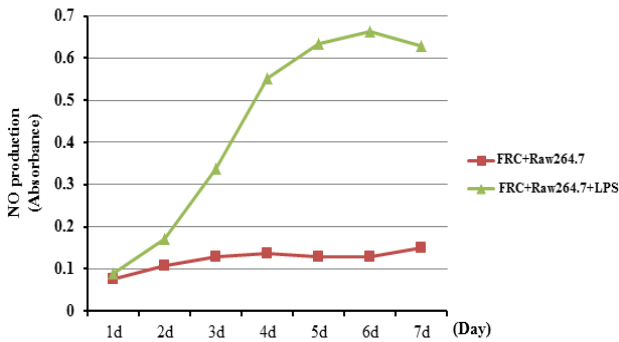


Fig. 3. Effects of FRC co-cultured with macrophage + LPS (100 µg/ml) on the NO production during incubation time. NO production was determined by measuring nitrite accumulation in the culture medium by Griess reaction.

FRC의 항균력 향상에 관여하는 NO 생성에 대한 효과 검증

이종물질의 분해 즉 자가소화를 위해서 다양한 활동기작이 관여한다[3, 16]. 그 중 NO는 기체성 물질로 미생물의 강력한 분해물질로 작용한다. NO는 식작용 세포인 대식세포등에서 생성 분비되어 병원체에 작용하여 DNA, 단백질, 세포막 등과 같은 거대분자를 공격하여 작은 구성물질로 분해하는데 관여한다[15, 19]. FRC의 NO생성에 대한 영향성 검증을 위해 FRC와 대식세포 Raw264.7의 공배양을 통해서 NO생성력에 대하여 알아보았다. LPS를 처리한 시료에서 6일 동안 시간의존적으로 NO생성이 향상되었고 7일부터 생성이 약화되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 이것은 FRC가 염증반응동안 대식세포 Raw264.7과 상호작용으로 NO생성을 향상시킨 것으로 사료된다. FRC는 T세포지역의 3차원 구조형성에 주로 관여를 하지만 본 실험 결과에서는 림프절의 스트로마는 3차원적 공간 제시뿐만 아니라 선천성 면역반응에 관여하는 있다. 이처럼 FRC는 다양한 방법을 통해서 항원을 처리하는데 기여하고 있으며 림프절 스트로마는 면역반응에 관여를 통해 생체방어에 기여하고 있다 것을 의미한다.

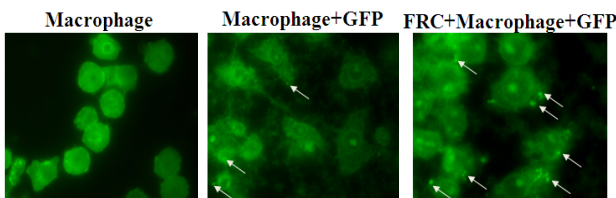


Fig. 4. Effects of FRC co-culture on the antigen uptake of macrophage. FRC (5×10^6 cells) was grown on 10 mm dish plate for 24 hr. FRC was co-cultured with macrophage and incubated with GFP antigen (arrow). After co-culture, extra GFP was removed out by washing with PBS. After then, cells were fixed with 4% paraformaldehyde, washed, and examined under photomicroscope equipped for fluorescence microscopy.

FRC-Macrophage 공배양을 통한 항원 처리과정

염증물질 처리 시 FRC에서 부착분자들의 발현이 증가와 FRC와 대식세포 혹은 T세포가 상호부착을 통해 작용하고 있는 것을 확인하였다. 이런 작용이 항원처리에 미치는 영향성을 알아보기 위해 FRC monolayer에 대식세포 Raw264.7을 공배양 후 GFP 단백질을 항원으로 처리하였다. FRC에 대식세포 Raw264.7와 GFP 처리 군에서 항원으로 작용한 GFP 단백질이 세포로 흡수되고 있는 것을 볼 수 있다(Fig. 4). 대식세포 Raw 264.7에 GFP 처리군과 비교하면 굉장히 효율적으로 항원이 흡수되고 있는 것을 알 수 있었다. 본 결과는 FRC의 스트로마가 대식세포의 항원처리과정을 효과적으로 기여 한다고 볼 수 있고 전체적으로 림프절의 항원 처리시 림프절 스트로마가 관여 하고 있다고 사료된다.

References

- Abdul-Cader, M. S., Amarasinghe, A. and Abdul-Careem, M. F. 2016. Activation of toll-like receptor signaling pathways leading to nitric oxide-mediated antiviral responses. *Arch. Virol.* Epub ahead of print.
- Alvarenga, H. G. and Marti, L. 2014. Multifunctional roles of reticular fibroblastic cells: more than meets the eye? *J. Immunol. Res.* **2014**:402038. doi: 10.1155/2014/402038.
- Argiello, R. J., Reverendo, M., Gatti, E. and Pierre, P. 2016. Regulation of protein synthesis and autophagy in activated dendritic cells: implications for antigen processing and presentation. *Immunol. Rev.* **272**, 28-38.
- Bando, J. K. and Colonna, M. 2016. Innate lymphoid cell function in the context of adaptive immunity. *Nat. Immunol.* **17**, 783-789.
- Cooper, E. L. 2016. Commentary: Blurring borders: Innate immunity with adaptive features. *Front Microbiol.* **7**, 358.
- Denton, A. E., Roberts, E. W., Linterman, M. A. and Fearon, D. T. 2014. Fibroblastic reticular cells of the lymph node are required for retention of resting but not activated CD8+ T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**, 12139-12144.
- Dingjan, I., Verboogen, D. R., Paardekooper, L. M., Revelo, N. H., Sittig, S. P., Visser, L. J., Mollard, G. F., Henriët, S. S., Figdor, C. G., Ter Beest, M. and van den Bogaart, G. 2016. Lipid peroxidation causes endosomal antigen release for cross-presentation. *Sci. Rep.* **6**, 22064.
- Dinter, J., Gourdain, P., Lai, N. Y., Duong, E., Bracho-Sanchez, E., Rucevic, M., Liebesny, P. H., Xu, Y., Shimada, M., Ghebremichael, M., Kavanagh, D. G. and Le Gall, S. 2014. Different antigen-processing activities in dendritic cells, macrophages, and monocytes lead to uneven production of HIV epitopes and affect CTL recognition. *J. Immunol.* **193**, 4322-4334.
- Erler, J. T. and Weaver, V. M. 2009. Three-dimensional context regulation of metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **26**, 35-49.
- 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.

11. Fu, J. and Xia, L. 2016. CLEC-2 and podoplanin, partners again. *Blood* **127**, 1629-1630.
12. Hirose, S. and Dubrot, J. 2015. Modes of antigen presentation by lymph node stromal cells and their immunological implications. *Front Immunol.* **6**, 446.
13. Klinke, D. J. 2013. An evolutionary perspective on anti-tumor immunity. *Front Oncol.* **2**, 202.
14. Klose, C. S. and Artis, D. 2016. Innate lymphoid cells as regulators of immunity, inflammation and tissue homeostasis. *Nat. Immunol.* **17**, 765-774.
15. Landes, M. B., Rajaram, M. V., Nguyen, H. and Schlesinger, L. S. 2015. Role for NOD2 in *Mycobacterium tuberculosis*-induced iNOS expression and NO production in human macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **97**, 1111-1119.
16. Münz, C. 2016 Autophagy proteins in antigen processing for presentation on MHC molecules. *Immunol. Rev.* **272**, 17-27.
17. Münz, C., Steinman, R. M. and Fujii, S. 2005. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J. Exp. Med.* **202**, 203-207.
18. Nakayama, Y., Brinkman, C. C. and Bromberg, J. S. 2015. Murine fibroblastic reticular cells from lymph node interact with CD4+ T cells through CD40-CD40L. *Transplantation* **99**, 1561-1567.
19. Takano, M., Ohkusa, M., Otani, M., Min, K. S., Kadoyama, K., Minami, K., Sano, K. and Matsuyama, S. 2015. Lipid A-activated inducible nitric oxide synthase expression via nuclear factor- κ B in mouse choroid plexus cells. *Immunol. Lett.* **167**, 57-62.
20. Truebestein, L., Elsner, D. J., Fuchs, E. and Leonard, T. A. 2015. A molecular ruler regulates cytoskeletal remodelling by the Rho kinases. *Nat. Commun.* **6**, 10029.
21. Weiss, G. and Schaible, U. E. 2015. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol. Rev.* **264**, 182-203.
22. Wu, T., McGrath, K. C. and Death, A. K. 2005. Cardiovascular disease in diabetic nephropathy patients: cell adhesion molecules as potential markers? *Vasc. Health Risk Manag.* **1**, 309-316.

초록 : 림프절 유래 fibroblastic reticular cell의 효율적 항원처리 관련성에 대한 연구

김민환¹ · 이종환^{1,2*}

(¹동의대학교 스마트바이오헬스학과, ²동의대학교 생명공학과)

항원은 병원체로부터 유래한 질병인자다. 생명체는 항원에 대항하는 방어계인 면역계를 가지고 있다. 항원은 식세포작용, 항체, 보체 활성화, NK세포 혹은 MHC 분자를 통한 세포독성 T세포와 같은 방법을 통해서 처리된다. 림프절은 스트로마세포와 3차원 네트워크를 통해서 구성되어 있다. Fibroblastic reticular cells (FRC)는 림프절 T zone에서 T세포와 상호작용한다. FRC는 세포외 기질 생산과 homing 케모카인을 생산하여 감염에 대비한다. 하지만, FRC가 항원처리과정에 관련되어있다는 보고는 없다. 본 연구는 FRC의 항원처리 관련성에 대한 연구이다. 이를 위해 FRC는 대식세포, T세포, LPS, 그리고 TNF α 와 같은 다양한 감염상황에 노출시켜 연구를 진행하였다. FRC가 대식세포 및 T세포와 공배양 했을 때 FRC가 형태적 변화와 FRC간 빈 공간 형성이 관찰 되었다. MMP 활성은 Y27632와 T세포에 의해 조절 되었다. 더욱이, 염증물질인 TNF α 를 FRC에 처리 후 마이크로레이를 통한 결과에서 부착분자와 MHC I antigen transporter의 발현을 조절하는 것으로 나타났다. FRC 단일층에 LPS와 대식세포를 공배양 했을 때 NO 생성력이 크게 향상되었다. GFP antigen을 FRC와 대식세포 공배양군에 처리 했을 때 항원 흡수율이 증가되었다. 이러 결과는 FRC가 항원처리에 관여하고 있다는 것을 의미하며 이는 림프절이 항원처리과정에 연관되어 있다는 것을 제시한다.