

Th2 세포에서 IL-12에 의한 IL-18R α 의 발현유지 및 IL-18 자극에 의한 GATA-3의 유도

경희대학교 의과대학 미생물학교실

주인숙 · 선민정 · 김동영 · 이수진 · 하운문 · 조정제 · 박중석 · 안현중

IL-18R α Mediated GATA-3 Induction by Th2 Cells: IL-12 Supports IL-18R α Expression in Th2 Cells

In-Sook Joo, Min-Jung Sun, Dong-Young Kim, Su-Jin Lee, Youn-Mun Ha, Jeong-Je Cho, Cheung-Seog Park and Hyun-Jong Ahn

Department of Microbiology, Kyung-Hee University Medical School, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: IL-18 was originally cloned as a IFN- γ inducing factor in primed T cells. In synergy with IL-12, IL-18 has been shown to induce strikingly high levels of IFN- γ production by T cells and to enhance Th1 development. Also this cytokine exerts induction of Th2 development through IL-4 induction. **Methods:** Resting CD4⁺ T cells were sorted by negative selection and activated by anti-CD3 plus anti-CD28 Ab. Expression of IL-12 binding sites, IL-18 binding sites, IL-18R α , and GATA-3 mRNA were analysed by FACS and RT-PCR, respectively. **Results:** Resting CD4⁺ T cells expressed IL-18R α chain but not IL-18 binding sites, suggesting a lack of IL-18R β expression. IL-18R α was maintained on the Th1 and Th2 committed cells. IL-18 binding sites were induced on the Th1 but not Th2 cells. Exposure of these cells to IL-18 led to up-regulation of GATA-3 mRNA expression only in Th2 committed cells. To elucidate the relationship between IL-18R α expression and GATA-3 induction by IL-18, Th1 and Th2 committed cells were further cultured in medium with or without IL-12 for 2 days. IL-12 binding sites were maintained on the Th1 and Th2 cells regardless of IL-12 treatment, but IL-18R α expression was rapidly down-regulated on the IL-12-untreated Th2 cells which did not induce GATA-3 mRNA expression followed by IL-18 stimulation. **Conclusion:** IL-12 supports expression of IL-18R α and GATA-3 mRNA expression was induced by IL-18 through IL-18R α without expression of IL-18 binding site in Th2 cells. (*Immune Network* 2005;5(1):16-22)

Key Words: IL-18R α , GATA-3, IL-18, IL-12, Th

서 론

Interleukin-18 (IL-18)은 IFN- γ 를 유도하는 사이토카인 (IFN- γ inducing factor; IGIF)으로 클로닝되었고 활성화 macrophage 나 Kuffer cells 등에 의해 분비된다(1-3). 또한, T helper (Th) type 1 세포에서 IFN- γ 생성을 유도할

뿐만 아니라 IFN- γ 를 생성함에 있어 IL-12와 synergy를 일으킨다(4,5). 이 synergy 기작은 IL-12에 의해 유도된 IL-18 수용체(IL-18R)가 T 세포상에서 IL-18의 반응성을 높여주고, T 세포 내에서 IL-18과 IL-12에 의해 AP-1 생성이 증가한 결과라는 사실이 알려져 있다(5,6). IL-18^{-/-} 쥐는 Th1 세포를 만들지 않는 것으로 봐서 IL-18은 T 세포를 Th1으로 분화시키는 cytokine으로 생각된다(7). 그리고 IL-12와 synergy에 의한 IFN- γ 생산은 IL-12 driven Th1 분화를 증가시킨다(8). Th1으로 세포가 분화하는 데는 IL-12에 의해 유도된 IFN- γ 가 중요한 역할을 한다고 지적하고 있다(9). 이 때 IL-12에 의해 활성화된 STAT4

책임저자 : 안현중, 경희대학교 의과대학 미생물학교실
☎ 130-701, 서울시 동대문구 회기동 1번지
Tel: 02-961-9362, Fax: 02-962-6189
E-mail: ahnh@khu.ac.kr

본 연구는 경희대학교 신진교수연구지원사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(2001).

가 관여함이 추측되며 IL-12R $\beta 2$ 의 소실은 IL-12에 의한 STAT4 활성화가 없는 점으로 보아 IL-12에 의한 Th1 세포 분화에는 IL-12R $\beta 2$ 가 관여함을 알 수 있다. 반대로 Th2 세포는 IL-12R $\beta 2$ 가 발현되지 않기 때문에 IFN- γ 를 생산할 수 없는 것으로 추측된다(10-12). T-bet은 Th1 특이 유전자이며 Th1 분화에 중요한 역할을 하는 전사인자로 알려져 있다(13). T-bet의 발현은 Th1 세포와 NK 세포에서 IFN- γ 생산과 상관관계를 가지며, IFN- γ 유전자의 transactivator이다(13). T-bet을 primary T 세포나 분화 중인 Th2 세포에 retroviral transduction을 하면 이들 세포는 IFN- γ 를 생산한다고 하였다(14). 즉 분화 중인 Th2 세포를 Th1으로 전환시킬 수 있는 유전자임을 뜻한다. T-bet 결손 쥐는 지속적으로 Th2 분화를 하고 asthma와 유사한 질병을 일으킨다(15). STAT4^{-/-} 쥐에 T-bet을 retroviral vector로 유도하고 anti-IL-12와 IL-4로 배양하면 IFN- γ 가 생산되는 것으로 볼 때 T-bet은 Th1 분화에 IL-12 induced STAT4 활성화와는 다른 기작으로 작용하는 듯하다(14). IL-18R은 Th1 세포에 발현된 IL-12R $\beta 2$ 에 의해 유지되고(4) T-bet은 IL-12R $\beta 2$ 를 유도하기(16) 때문에 IL-12에 의한 IL-18R의 유지에 T-bet이 관여한다고 생각되지만 구체적인 증거는 없다. 또한 IL-18은 IL-12와 함께 IFN- γ 를 유도하여 Th1 분화를 촉진시키지만 IL-18 단독 자극의 경우 IL-4 생산을 통한 Th2 분화를 유도한다(17). Naive CD4⁺ T 세포가 Th2 세포로 분화하는 데는 IL-4에 의해 활성화된 STAT-6 의존성 GATA-3 활성화 기작 및 GATA-3 autoactivation 기작이 존재한다(18). Th1 또는 Th2로 T 세포를 분화시키는 사이토카인들은 분화 단계에서 서로의 기능을 억제한다(19). 현재까지는 이와 같은 서로 간의 억제 기능을 통하여 Th1 및 Th2의 균형을 유지한다고 생각하고 있다. 또한 IL-18은 현재까지 Th1 및 Th2 분화의 양쪽에 관여하는 유일한 사이토카인이며, Th1 질병 및 Th2 질병 모두에 관여한다고 한다(20). 그러나 IL-18이 Th2 분화를 유도하는 기작이 명확하지 않기 때문에 본 연구자는 IL-18이 Th2 세포에서 IL-18R α 를 통하여 GATA-3를 유도하고 동시에 Th2 세포에서 IL-18R α 의 유지에 IL-12가 관여함을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 시약. 6 주령의 C57BL/6 mouse를 대한바이오링크로부터 구입하여 본 대학 동물사육실에서 안정화시킨 후 8주령 이내에 사용하였다.

Anti-mouse CD8 mAb, anti-rat IgG FITC conjugate, anti-rat IgG (H+L) biotin conjugate는 Pharmigen (San Diego, CA)의 것을 사용하였고, avidin PE는 vector lab. (Burlingame, CA)의 것을 사용하였다. Biomag anti-mouse IgG magnetic beads는 Quagen (Valencia, CA)으로부터 구입하였으며, Anti-IL-12 mAb (C17.8)(21), anti-I-A^{db} mAb

(34-5-3S)(22), anti-mouse CD3 mAb (145-2C11)(23), anti-mouse CD28 mAb (PV-1)(24), anti-IL-4 Ab (American Type Culture Collection (Rockville, MD) clone BVD-4), anti-IFN- γ mAb (ATCC clone R4-6A2)는 복수에서 정제하여 사용하였다. Anti-mIL-18R α mAb, anti-IL-18 Ab는 R&D Systems (Minneapolis, MN)에서 구입하였다.

CD4⁺ T 세포의 분리. C57BL/6 mouse의 림프절을 무균 상태로 분리하고, 1% Bovine serum albumin이 포함된 RPMI에서 슬라이드글라스를 이용하여 세포를 single cell로 현탁시키고, 60 μ m의 mesh를 통과시켜 세포의 물질을 제거하였다. 세포현탁액을 원심분리하여 림프구를 모은 후 적혈구를 lysis 용액에 5분간 처리하여 용해시키고, 4°C의 PBS로 3번 반복하여 씻었다. I-A^{db+} 항원제시 세포를 제거하기 위하여 1×10^7 /ml 림프구에 1 μ g/ml의 Anti-I-A^{db} Ab를 얼음 위에서 20분간 처리하였다. 결합되지 않은 항체를 제거하기 위하여 1X PBS로 3번 씻고, Biomag anti-mouse IgG와 얼음 위에서 30분간 반응시켰다. 반응현탁액 튜브 외부에 강한 막대자석을 대고 magnetic beads에 결합되지 않은 부분만 회수함으로써(negative selection) B 세포 및 항원제시세포를 제거하였다. 대부분이 T 세포인 이 림프구에서 CD8⁺ T 세포를 제거하기 위하여 1×10^7 /ml 림프구에 1 μ g/ml로 anti-mouse CD8 Ab를 얼음 위에서 20분간 처리한 후 1X PBS로 3번 씻고 Biomag anti-rat IgG와 얼음 위에서 30분간 반응시킨 후 상기와 같이 negative selection으로 95% 이상의 CD4⁺ T 세포를 얻었다.

T 세포의 분화 및 세포배양. 24 well plate의 각 well에 T 세포 활성화 용액(10 μ g/ml anti-mouse CD3 mAb, 5 μ g/ml anti-mouse CD28 mAb, 1XPBS)을 1 ml씩 넣고 3시간 동안 코팅한 후 1X PBS로 3번 씻었다. Th1 세포로 분화시키기 위해서 각 well당 분리한 CD4⁺ T 세포 1×10^6 /2 ml RPMI (10% FBS, 2-ME)에 최종농도 500 pg/ml mIL-12 및 10 μ g/ml anti-IL-4 mAb가 되게 첨가하고 48시간 동안 배양하여 분화시켰다.

Th2 세포분화를 위해서는 Th1과 동일한 세포수에 최종농도 10 ng/ml IL-4, 10 μ g/ml anti-IL-12 mAb 및 10 μ g/ml IFN- γ mAb가 되게 첨가하고 48시간 동안 배양하여 분화시켰다.

48시간 동안 분화시킨 Th1 및 Th2 세포를 회수하여 각각 500 pg/ml IL-12가 첨가된 10% FBS 2-ME RPMI 배양액과 IL-12가 첨가되지 않은 배양액에서 2일 동안 배양하면서 매일 IL-12 receptor 및 IL-18 receptor의 발현을 FACS로 분석하였다.

GATA-3의 발현 분석을 위하여 2일 동안 분화시킨 각 세포 및 분화 후 IL-12를 2일 동안 처리하거나 처리하지 않은 세포군에 10 ng/ml IL-18 2 ml로 5×10^6 cell을 8시간 동안 자극하여 RNA를 분리하는 데 사용하였다.

FACS 분석. T 세포 표면상에 IL-18R α 및 IL-18R β 가 발현되었을 때 IL-18R complex가 되어 IL-18 binding site가 된다(25-27). 그러므로 본 연구에서도 IL-18 Receptor complex의 발현양상을 T 세포상에서 IL-18 결합 정도를 측정하여 확인하였다. 우선 3×10^6 T 세포에 10 μ g/ml IL-18 10 μ l를 1시간 동안 처리하고 FACS 용액(1X PBS, 0.1% bovine serum albumin, 0.05% sodium azide)으로 3번 씻었다. 여기에 10 μ g/ml anti-mouse IL-18 Ab 10 μ l을 30분 동안 처리한 후 3번 씻고 2.5 μ g/ml anti-rat IgG (H+L) FITC conjugate를 20분 간 처리한 후 3번 씻고 그 결과를 FACS로 분석하였다.

IL-18R α 의 분석을 위해서, 3×10^6 T 세포에 10 μ g/ml IL-18R α mAb 10 μ l를 30분간 처리하고 3번 씻은 후 순차적으로 2 μ g/ml anti-rat IgG (H+L) biotin conjugate 10 μ l, 2 μ g/ml avidin-PE 10 μ l을 반응시켰고, 각 반응 후 FACS 용액으로 3번씩 씻었다.

각 세포에 IL-12의 결합정도(IL-12 수용체(IL-12R)의 발현정도)를 확인하기 위하여 T 세포에 IL-12를 결합시킨 후 FACS로 결합의 정도를 분석하였다. 3×10^6 T 세포에 10 μ g/ml IL-12 10 μ l을 1시간 동안 처리하고, 순차적으로 10 μ g/ml anti-IL-12 mAb 10 μ l, 10 μ g/ml anti-rat IgG (H+L) biotin conjugate 10 μ l 및 2 μ g/ml avidin-PE 10 μ l을 반응시켰고 각 반응 후 FACS 용액으로 3번씩 씻었다.

Total RNA 분리. RNA는 Trizol reagent (Life technologies, Rockville, MD)를 사용하여 제조회사의 지침에 따라 정제되었다. 요약하면, 배양된 세포를 회수하여 찬 1X PBS로 2번 씻고 1ml Trizol reagent에 용해 시켰다. 여기에 200 μ l의 chloroform을 첨가하여 20초간 강하게 흔들고 5분간 방치한 후 14,000 rpm에서 12분간 원심분리한 후 상층액을 모았다. 상층액에 2-propanol 500 μ l를 가하고 잘 흔들어서 10분간 방치한 후 14,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 RNA를 침전시켰다. 침전된 RNA를 찬 75% ethanol로 씻은 후 적당량의 DEPC water에 녹이고 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

RT-PCR. RT-PCR은 Takara (Shuzo, Otsu, Japan)의 제품을 회사의 지침에 따라 사용하였다. 요약하면, total RNA 각 1 μ g에 100 nM random primer 1 μ l을 혼합하여 10 μ l이 되게 한 후 75°C에서 5분간 가열하여 RNA의 2차 구조를 제거하였다. 그리고 5 U RTase, 20 U RNase inhibitor 및 각 10 mM dNTP 2 μ l를 첨가하고, 전체 20 μ l의 1X reverse transcriptase 완충용액이 되게 맞추어서 42°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 95°C에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켰다. GAPDH의 발현을 확인하기 위해서 template로 1 μ l을 사용하였으며, sense primer: 5'-ATCACC ATCTTCCAGGAGCG-3', antisense primer: 5'-GATGGC ATGGACTGTGGTCA-3'를 사용하여 표준상태 하에서 19회 증폭하였다. GATA-3의 발현을 비교하기 위해서

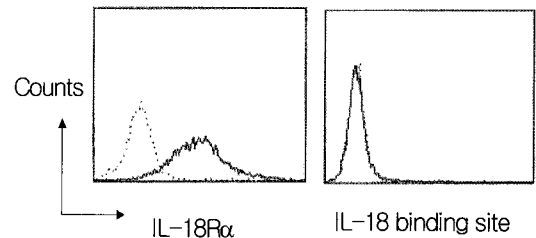


Figure 1. Resting CD4⁺ T cells express IL-18R α but not IL-18 binding site. Resting CD4⁺ T cells were stained by immunofluorescence with rat anti-IL-18R α mAb and rat anti-IL-18 mAb for IL-18R α and IL-18 binding sites, respectively.

template로 5 μ l을 사용하였으며, sense primer: 5'-GGAC ATGGAGGTGACGGCGGACCAG-3', antisense primer: 5'-CTAACCCATGGCGGTGACCATGCTGGA-3'를 사용하여 표준상태 하에서 32회 증폭하였다.

결 과

Resting CD4⁺ T 세포에서 IL-18R α 의 발현. Resting CD4⁺ T 세포가 활성화되면서 IL-18R α 의 발현유도에 미치는 IL-12의 영향에 관해 최근 많은 그룹이 연구해왔고(28-31) 이 결과는 많은 차이점을 나타낸다. 본 연구자는 C57BL/6 mice의 림프절에서 분리한 resting CD4⁺ T 세포의 IL-18R α 의 발현양상을 anti-IL-18 mAb를 이용하여 확인하였다. Fig. 1에서 보이는 것처럼 resting CD4⁺ T 세포는 IL-18의 binding site는 발현하지 않았지만 IL-18R α 는 발현되어 있음을 알 수 있었다.

Th1과 Th2 세포에서 IL-18R α , IL-18 binding site 및 GATA-3의 발현. 분리된 resting CD4⁺ T 세포를 anti-CD3 mAb와 anti-CD28 mAb를 이용하여 활성화시킬 때 500 pg/ml의 IL-12와 10 μ g/ml의 anti-IL-4 mAb를 첨가하여 Th1으로 분화시키고, 10 ng/ml의 IL-4와 10 μ g/ml의 anti-IL-12 mAb 및 10 μ g/ml의 anti-IFN- γ mAb를 첨가하여 Th2로 분화시켰다. 2일 동안 분화시킨 Th1 및 Th2 세포에서 IL-18R α 의 발현은 유지되고 있었고 IL-18 binding site는 Th1 세포에서는 유도되었지만 Th2 세포에서는 유도되지 않았다(Fig. 2). CD4⁺ T 세포를 IL-18으로 단독 자극하면 일부 세포는 Th2로 분화된다(17). 이것은 Th2 세포가 IL-18에 대한 반응성을 이미 가지고 있거나 획득한다고 생각할 수 있기 때문에 Th1 및 Th2 세포에서 GATA-3의 발현증가를 보았다. Fig. 3에 나타난 것과 같이 IL-18은 Th2 세포에서 GATA-3의 발현증가를 유도하였다. 그러므로 이 결과는 Th2 세포에서 IL-18이 GATA-3의 발현을 유도하는 데는 IL-18 binding site의 발현과 관계없이 IL-18R α 의 발현만으로도 가능성을 의미한다.

Th1 및 Th2 세포에서 IL-12에 의한 IL-18R α 의 발현유지 및 Th2 세포에서 IL-18R α 와 GATA-3 발현과의 상

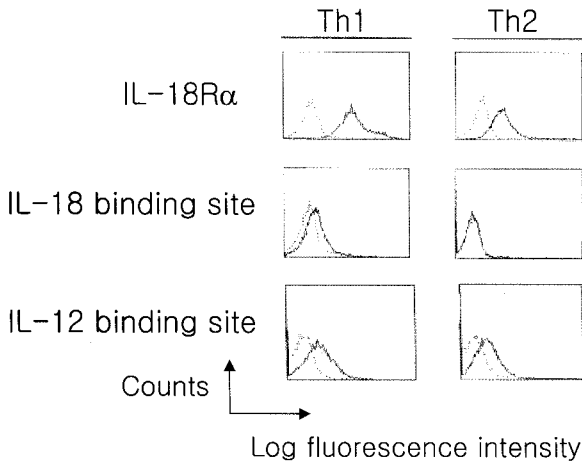


Figure 2. Expression of IL-18R α , IL-18 binding site, and IL-12 binding site on the Th1 and Th2 committed cells. Purified lymphocyte T cells were stimulated with immobilized anti-CD3 and soluble anti-CD28 mAb in 24-well culture plates. IL-12 (500 pg/ml) and anti-IL-4 (10 μ g/ml) were added for Th1 development, and IL-4 (10 ng/ml), anti-IFN- γ (10 μ g/ml), and anti-IL-12 (10 μ g/ml) were added for Th2 development. Th1 and Th2 committed cells were stained for IL-18R α , IL-18 binding site and IL-12 binding site as described in materials and methods.

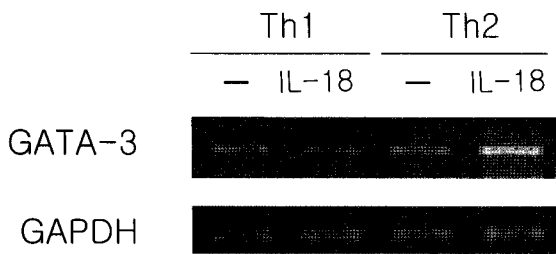


Figure 3. GATA-3 mRNA expression induced by IL-18 in Th2 committed cells. Th1 and Th2 committed cells were cultured with IL-12 and/or IL-18 for 8 hr. Total RNA was isolated from each population and subjected to RT-PCR for GATA-3 and GAPDH mRNA transcripts.

호관계. Th1 세포는 IL-18R α 뿐만 아니라 IL-18 binding site도 발현하고 있지만 IL-18에 의한 GATA-3의 발현유도는 관찰되지 않았다. Th2는 IL-18R α 만 발현하고 있었지만 IL-18에 의한 GATA-3의 발현이 유도되었다. 그러므로 Th2 세포에서 IL-18R α 와 GATA-3의 발현유도 관계를 명확히 확립하기 위하여 Th2 세포에서 IL-18R α 가 발현되지 않는 조건을 찾았다. 2일 동안 분화시킨 Th1 및 Th2 세포를 회수하여 배양액 또는 IL-12가 포함된 배양액에 2일간 배양한 후 IL-12 및 IL-18 binding site와 IL-18R α 의 발현을 확인하였다. IL-18 binding site는 IL-12와 함께 배양한 Th1 세포에서는 유지되었고, Th2 세포에서는 IL-12가 존재함에도 불구하고 IL-18 binding site는 유도되지 않았다(Fig. 4). Resting CD4⁺ T 세포가 활성화되면서 유도되는 IL-12 binding site (Fig. 2)는 Th1 및

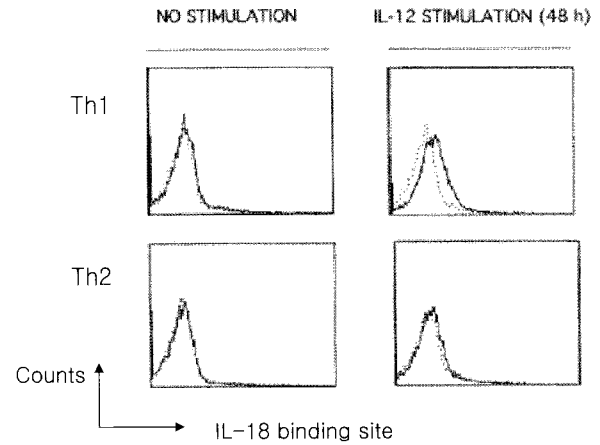


Figure 4. IL-12 supports IL-18 binding site on the Th1 but not Th2 cells. Th1 and Th2 committed cells were treated with IL-12 for 2 days. Cells were stained for IL-18 binding site described in materials and methods.

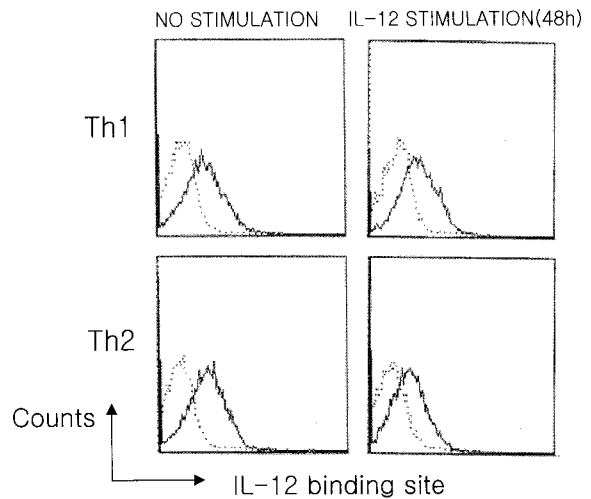


Figure 5. Expression of IL-12 binding site on the IL-12 treated-Th1 and -Th2 committed cells. Th1 and Th2 committed cells were treated with 500 pg/ml of IL-12 for 2 days. Cells were stained for IL-12 binding site described in materials and methods.

Th2 세포 모두에서 IL-12 처리와 관계없이 분화된 세포 회수 2일 후에도 유지되었다(Fig. 5). 즉, 이 결과는 IL-12가 IL-18 binding site의 유지에 관여하기 위해서는 Th1 특이적인 조건이 선행되어야 함을 뜻한다.

IL-18R α 의 발현은 Th1 및 Th2 세포 모두에서 IL-12에 의해 유지되었고 Th2 세포에서 IL-12 자극 없이는 Th1 세포보다 급격히 감소됨을 보였다(Fig. 6). IL-18R α 와 GATA-3의 발현과의 관계를 확인하기 위하여 Fig. 6에 나타난 Th2 세포군을 IL-18으로 8시간 동안 자극하여 GATA-3의 발현을 보았다. 그 결과, IL-12를 처리한 Th2 세포에서 IL-18에 의한 GATA-3의 발현이 증가됨을 보였다(Fig. 7). 이것은 Th2 세포에서 IL-18에 의한 GATA-

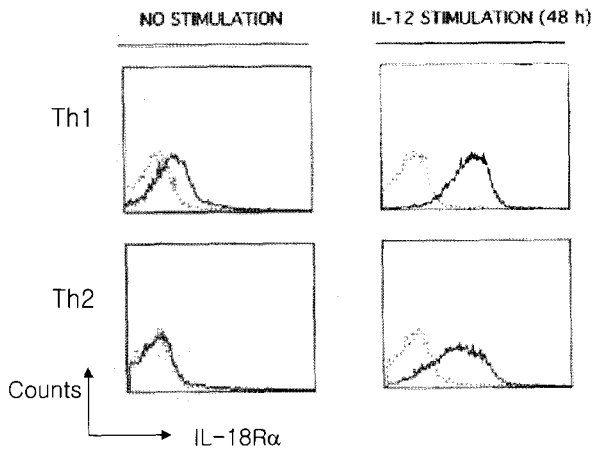


Figure 6. IL-18R α maintained in Th1 and Th2 committed cells following stimulation with IL-12. Th1 and Th2 committed cells were treated with IL-12 for 2 days. Cells were stained for IL-18R α described in materials and methods.

3의 발현에 IL-18R α 가 관여함과 동시에 IL-18R α 의 발현유지에 IL-12가 관여함을 뜻한다.

고 찰

CD4⁺ T 세포는 Th1 또는 Th2 세포로 분화하여 각각의 effector function을 발휘하고, Th1 및 Th2의 균형유지는 면역질환 방어에 중요한 역할을 한다고 생각되고 있다. 1형 당뇨병은 췌장의 β -islet 주위에 T 세포가 침윤되고 IFN- γ 의 발현이 높고 anti-CD4 Ab나 anti-IFN- γ Ab의 주입에 의해 개선되기 때문에 Th1 질병이라고 생각하며 (32,33). Atopic athma와 allergy 같은 질병은 IL-4를 비롯한 Th2 사이토카인에 의해 질병이 심화되기 때문에 Th2 질병이라 생각된다(34). 이들 질병 모두는 Th1 및 Th2 세포분화의 균형 파괴와 관련되어 있기 때문에 Th1 및 Th2 세포의 균형유지 메커니즘을 밝히는 것은 면역질환 예방 및 치료에 도움을 줄 수 있다. 현재까지 알려진 바에 의하면 Th1 및 Th2 세포 분화의 균형 유지는 T 세포가 분화할 때 Th1으로 작용하는 IL-12와 Th2로 작용하는 IL-4가 분화단계에서 작용하여 서로 길항작용을 한다 (19). 즉, 분화단계에서 IL-12또는 IL-4 중 어느 한쪽이 많아지면 많아지는 쪽을 억제하고 적은 쪽이 많아지도록 하여 분화의 균형을 유지하는 메커니즘이 존재할 것으로 추측되지만 아직 이에 대한 아무런 증거는 없다. IL-18은 Th1 및 Th2 세포 분화 양쪽에 관여하는 유일한 사이토카인이다. IL-18은 IL-12와 상승작용으로 IFN- γ 를 생산하여 Th1 분화의 효율성을 높인다(8). 또한 IL-18은 CD4⁺ T세포에 작용하여 Th2로 세포를 분화시키는 능력도 가지고 있다.(17) 그러므로 사이토카인 중에서 유일하게 IL-18이 Th1 및 Th2 세포분화를 조절할 수 있는 것으로 생각된다. IL-18에 의한 Th1 및 Th2 세포 분화



Figure 7. GATA-3 mRNA expression induced by IL-18 in IL-12 treated Th2 cells. Th2 committed cells were cultured with 500 pg/ml of IL-12 for 2 days. After washing, cells were stimulated with 10 ng/ml of IL-18 for 8hr. Total RNA was isolated from each population and subjected to RT-PCR for GATA-3 and GAPDH mRNA transcripts.

의 균형조절 메커니즘을 연구하기 하기 위해서는 IL-18이 Th1 또는 Th2 세포 분화에 어떻게 작용하는지를 아는 것이 중요하다. 최근 IL-18이 Th1 세포분화에 미치는 영향은 많이 연구되어 있다(20). Th1 분화의 경우 IL-12가 IL-18R α 의 발현을 유도하여 IFN- γ 생산에 대한 IL-18의 반응성을 높여주는 것이 IL-12와 IL-18에 의한 Th1 분화의 상승효과를 높여주는 것으로 생각된다(5,8). Th1 분화가 in vitro에서 7일 동안 연속되었을 때 IL-12R β 2와 IL-18R α (IL-1Rrp)의 발현이 강하게 유지되기(4) 때문에 Th1에서 IL-12에 의한 IL-18의 반응성 증가에는 IL-12R β 2가 관여하는 것으로 생각된다. IL-18에 의한 Th2 세포 분화는 IL-18에 의해 유도된 IL-4가 그 역할을 한다(17)는 것 외에는 알려진 것이 없다. 그러므로 본 연구는 Th1 및 Th2로 분화된 세포에서 IL-18R α 의 발현차를 이용하여 IL-18에 의한 GATA-3의 발현이 IL-18R α 와 관련되어 있음을 밝혔다. IL-18은 두개의 chain, 즉 IL-1R related protein (현재의 IL-18R α)와 Accessory protein like molecule (IL-18RAcPL, 현재의 IL-18R β)가 밝혀져 있다. 두 chain 모두 IL-1R family에 속하고(25,35,36), IL-1R complex의 구성원과 유사하다. IL-18R α 는 IL-18에 대한 low affinity receptor이다(35). IL-18RAcPL과 같이 IL-18R β (IL-18RAcPL) 역시 IL-18과 결합할 수 없지만 IL-18R α 와 결합하여 IL-18R complex를 만든다. IL-18R complex는 IL-18 binding site가 되고 IL-18R signaling complex로 작용한다(27). 현재까지 많은 연구자들이 IL-18R α 및 IL-18R β 의 발현에 대한 IL-12의 효과를 연구하였지만 결과는 많은 차이를 나타냈다(28,29,31). 본 연구에서 IL-18R α 는 resting CD4⁺ T 세포에서 발현되어(Fig. 1) Th1 및 Th2 세포로 2일 간 분화된 세포에서 모두 유지되었지만 IL-18 binding site는 Th1 세포에서만 유도되었다

(Fig. 2) IL-18에 의한 GATA-3의 발현유도는 Th2 세포에서만 나타났다(Fig. 3). 이 결과는 Th1 세포에서 GATA-3의 promoter 부위에 작용하는 전사인자가 부족함을 나타낼 뿐만 아니라 Th2 세포에서 IL-18에 의한 GATA-3가 발현되기 위해서는 IL-18R α 만으로 충분함을 뜻한다. IL-4는 GATA-3를 유도하고(19), IL-18에 의한 Th2 세포분화는 anti-IL-4 Ab에 의하여 억제되므로(17) IL-18에 의한 GATA-3의 발현유도는 IL-4에 의해 매개될 가능성이 있다. 이와 같은 가능성은 IL-18에 의해 Th2 세포로 분화되기 위해 유도되는 IL-4의 발현에도 IL-18R α 가 작용할 수 있음을 의미한다.

Th2 세포에서 IL-18R α 와 GATA-3의 발현관계를 명확히 하기 위하여 Th2 세포에서 IL-18R α 의 발현이 없어지는 조건을 찾은 후 IL-18로 자극하여 IL-18R α 가 발현되어 있는 Th2 세포에서 GATA-3의 발현유도와 비교하였다. Fig. 6 및 Fig. 7에서와 같이 IL-18R α 가 발현된 Th2 세포에서 만 IL-18에 의한 GATA-3의 발현이 유도되었다. 그리고 Th1 및 Th2 세포 모두 IL-12 처리와 관계없이 IL-12 binding site는 2일 동안 유지되지만(Fig. 5) IL-18R α 는 IL-12가 없는 환경에서 Th1 세포에 비해서 Th2 세포에서 보다 빠르게 사라짐을 보였다(Fig. 6). 이것은 T 세포가 IL-18R α 의 발현을 유지하는 데는 Th1 세포의 환경이 유리하지만 IL-18에 의한 GATA-3의 발현을 위해서는 Th2 세포의 환경이 반드시 필요함을 뜻한다. Th2 세포에서도 IL-12에 의해 IL-18R α 의 발현이 유지되고 Th1 및 Th2 세포 모두 IL-12 binding site를 발현하고 있는 것으로 볼 때 본 논문은 Th2 세포에서 IL-18에 의한 GATA-3의 발현에 IL-18R α 가 관여할 뿐만 아니라 IL-18R α 의 발현유지에 IL-12도 기여함을 나타낸다.

참 고 문 헌

- Okamura H, Tsutsui H, Komatsu T, Yutsudo M, Hakura A, Tanimoto T, Torigoe K, Okura T, Nukada Y, Hattori K, Akita K, Namba M, Tanabe F, Konishi K, Fukuda S, Kurimoto M: Cloning of a new cytokine that induces IFN-gamma production by T cells. *Nature* 378;88-91, 1995
- Gu Y, Kuida K, Tsutsui H, Ku G, Hsiao K, Fleming MA, Hayashi N, Higashino K, Okamura H, Nakanishi K, Kurimoto M, Tanimoto T, Flavell RA, Sato V, Harding MW, Livingston DJ, Su MS: Activation of interferon-gamma inducing factor mediated by interleukin-1beta converting enzyme. *Science* 275;206-209, 1997
- Okamura H, Tsutsui H, Kashiwamura S, Yoshimoto T, Nakanishi K: Interleukin-18: a novel cytokine that augments both innate and acquired immunity. *Adv Immunol* 70;281-312, 1998
- Xu D, Chan WL, Leung BP, Hunter D, Schulz K, Carter RW, McInnes IB, Robinson JH, Liew FY: Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J Exp Med* 188;1485-1492, 1998
- Ahn HJ, Maruo S, Tomura M, Mu J, Hamaoka T, Nakanishi K, Clark S, Kurimoto M, Okamura H, Fujiwara H: A mechanism underlying synergy between IL-12 and IFN-gamma inducing factor in enhanced production of IFN-gamma. *J Immunol* 159;2125-2131, 1997
- Nakahira M, Ahn HJ, Park WR, Gao P, Tomura M, Park CS, Hamaoka T, Ohta T, Kurimoto M, Fujiwara H: Synergy of IL-12 and IL-18 for IFN-gamma gene expression: IL-12 induced STAT4 contributes to IFN-gamma promoter activation by up regulating the binding activity of IL-18 induced activator protein 1. *J Immunol* 168;1146-1153, 2002
- Takeda K, Tsutsui H, Yoshimoto T, Adachi O, Yoshida N, Kishimoto T, Okamura H, Nakanishi K, Akira S: Defective NK cell activity and Th1 response in IL-18 deficient mice. *Immunity* 8;383-390, 1998
- Robinson D, Shibuya K, Mui A, Zonin F, Murphy E, Sana T, Hartley SB, Menon S, Kastelein R, Bazan F, O'Garra A: IGIF does not drive Th1 development but synergizes with IL-12 for interferon-gamma production and activates IRAK and NF-kappaB. *Immunity* 7;571-581, 1997
- Guler ML, Gorham JD, Hsieh CS, Mackey AJ, Steen RG, Dietrich WF, Murphy KM: Genetic susceptibility to Leishmania: IL-12 responsiveness in TH1 cell development. *Science* 271;984-987, 1996
- Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ: Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4 deficient mice. *Nature* 382;174-177, 1996
- Rogge L, Barberis Maino L, Biffi M, Passini N, Presky DH, Gubler U, Sinigaglia F: Selective expression of an interleukin-12 receptor component by human T helper 1 cells. *J Exp Med* 185;825-831, 1997
- Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM: Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 185;817-824, 1997
- Szabo SJ, Kim ST, Costa GL, Zhang X, Fathman CG, Glimcher LH: A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100;655-669, 2000
- Mullen AC, High FA, Hurchins AS, Lee HW, Villarino AV, Livingston DM, Kung AL, Cereb N, Yao TP, Yang SY, Reiner SL: Role of T-bet in commitment of TH1 cells before IL-12 dependent selection. *Science* 292;1907-1910, 2001
- Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, Qin S, Lehr HA, Green FH, Ackerman K, Haley K, Galle PR, Szabo SJ, Drazen JM, De Sanctis GT, Glimcher LH: Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 295;336-338, 2002
- Afkarian M, Sedy JR, Yang J, Jacobson NG, Cereb N, Yang SY, Murphy TL, Murphy KM: T bet is a STAT1 induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 3;549-557, 2002
- Yoshimoto T, Mizutani H, Tsutsui H, Noben Trauth N, Yamanaka K, Tanaka M, Izumi S, Okamura H, Paul WE, Nakanishi K: IL-18 induction of IgE: dependence on CD4⁺ T cells, IL-4 and STAT6. *Nat Immunol* 1;132-137, 2000
- Ouyang W, Lohning M, Gao Z, Assenmacher M, Ranganath S, Radbruch A, Murphy KM: Stat6 independent GATA-3 autoactivation directs IL-4 independent Th2 development and commitment. *Immunity* 12;27-37, 2000
- Murphy KM, Ouyang W, Farrar JD, Yang J, Ranganath S, Asnagli H, Afkarian M, Murphy TL: Signaling and transcription in T helper development. *Annu Rev Immunol* 18; 451-494, 2000
- Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H: Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses. *Annu Rev Immunol* 19;423-474, 2001
- Wysocka M, Kubin M, Vieira LQ, Ozmen L, Garotta G, Scott P, Trinchieri G: Interleukin-12 is required for inter-

- feron lipopolysaccharide *Eur J Immunol* 25;672-676, 1995
22. Ozato K, Mayer NM, Sachs DH: Monoclonal antibodies to mouse major histocompatibility complex antigens. *Transplantation* 34;113-120, 1982
 23. Leo O, Foo M, Sachs DH, Samelson LE, Bluestone JA: Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T3 polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84;1374-1378, 1987
 24. Abe R, Vandenberghe P, Craighead N, Smoot DS, Lee KP, June CH: Distinct signal transduction in mouse CD4+ and CD8+ splenic T cells after CD28 receptor ligation. *J Immunol* 154;985-997, 1995
 25. Born TL, Thomassen E, Bird TA, Sims JE: Cloning of a novel receptor subunit, AcPL, required for interleukin-18 signaling. *J Biol Chem* 273;29445-29450, 1998
 26. O'Neill LA, Greene C: Signal transduction pathways activated by the IL-1 receptor family: ancient signaling machinery in mammals, insects, and plants. *J Leukoc Biol* 63;650-657, 1998
 27. Wu C, Sakorafas P, Miller R, McCarthy D, Scesney S, Dixon R, Ghayur T: IL-18 receptor beta induced changes in the presentation of IL-18 binding sites affect ligand binding and signal transduction. *J Immunol* 170;5571-5577, 2003
 28. Yoshimoto T, Takeda K, Tanaka T, Ohkusu K, Kashiwamura S, Okamura H, Akira S, Nakanishi K: IL-12 up regulates IL-18 receptor expression on T cells, Th1 cells, and B cells: synergism with IL-18 for IFN-gamma production. *J Immunol* 161;3400-3407, 1998
 29. Sareneva T, Julkunen I, Matikainen S: IFN-alpha and IL-12 induce IL-18 receptor gene expression in human NK and T cells. *J Immunol* 165;1933-1938, 2000
 30. Lawless VA, Zhang S, Ozes ON, Bruns HA, Oldham I, Hoey T, Grusby MJ, Kaplan MH: Stat4 regulates multiple components of IFN-gamma inducing signaling pathways. *J Immunol* 165;6803-6808, 2000
 31. Kim SH, Reznikov LL, Stuyt RJ, Selzman CH, Fantuzzi G, Hoshino T, Young HA, Dinarello CA: Functional reconstitution and regulation of IL-18 activity by the IL 18R beta chain. *J Immunol* 166;148-154, 2001
 32. Bluestone JA, Pardoll D, Sharrow SO, Fowlkes BJ: Characterization of murine thymocytes with CD3 associated T cell receptor structures. *Nature* 326;82-84, 1987
 33. Kaliyaperumal A, Falchetto R, Cox A, Dick R 2nd, Shabanowitz J, Chien YH, Matis L, Hunt DF, Bluestone JA: Functional expression and recognition of nonclassical MHC class I T10b is not peptide dependent. *J Immunol* 155;2379-2386, 1995
 34. Lewis DB: Allergy immunotherapy and inhibition of Th2 immune responses: a sufficient strategy? *Curr Opin Immunol* 14;644-651, 2002
 35. Torigoe K, Ushio S, Okura T, Kobayashi S, Taniai M, Kunitaka T, Murakami T, Sanou O, Kojima H, Fujii M, Ohta T, Ikeda M, Ikegami H, Kurimoto M: Purification and characterization of the human interleukin. *Biol Chem* 272;25737-25742, 1997
 36. Nakahira M, Tomura M, Iwasaki M, Ahn HJ, Bian Y, Hamakoa T, Ohta T, Kurimoto M, Fujiwara H: An absolute requirement for STAT4 and a role for IFN-gamma as an amplifying factor in IL-12 induction of the functional IL-18 receptor complex. *J Immunol* 167;1306-1312, 2001
-