creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

의학석사 학위논문

쇼그렌증후군 환자에서 혈중 CXCR3 케모카인과 Th17 관련 시토카인 농도에 관한 연구

Study on the levels of circulating CXCR3 chemokines and Th17 cytokines in patients with Sjögren's syndrome

2016 년 8 월

서울대학교 대학원

의학과 면역학 전공

이 재 현

A thesis of the Master’s degree

Study on the levels of circulating CXCR3 chemokines and Th17 cytokines in patients with Sjögren’s syndrome

쇼그렌증후군 환자에서 혈중 CXCR3 케모카인과 Th17 관련 시토카인 농도에 관한 연구

August 2016

The Department of Immunology,

Seoul National University

College of Medicine

Jae Hyun Lee

쇼그렌증후군 환자에서 혈중 CXCR3 케모카인과 Th17 관련 시토카인 농도에 관한 연구

지도교수 이 윤 종

이 논문을 의학석사 학위논문으로 제출함

2016 년 4 월

서울대학교 대학원

의학과 면역학 전공

이 재 현

이재현의 석사학위논문을 인준함

2016 년 6 월

위 원 장 송 영 욱 (인)

부 위 원 장 이 윤 종 (인)

위 원 이 은 영 (인)

초 록

서론: 쇼그렌증후군은 외분비샘의 만성염증으로 인한 건성안과 입마름을 특징으로 하는 자가면역질환으로, 발병기전에 Th1 혹은 Th17 세포가 발병 기전에 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다. Th17 세포는 특정 상황에서 Th1 세포로 분화하여 CXCR3와 CCR6를 동시에 발현하며, 이러한 Th17.1 세포가 자가면역성 염증성 질환의 병태생리에서 Th17 세포 보다 더 중요한 것으로 알려져 있고 최근 쇼그렌증후군 환자의 혈중에서 증가한다고 보고되었다. 따라서 본 연구에서는 쇼그렌증후군 환자 혈장에서 CXCR3 케모카인과 Th17 시토카인을 측정하고, 이들 케모카인과 시토카인 혈중 농도 간의 상관성과 쇼그렌증후군 환자 임상상과의 연관성을 알아보고자 하였다.

방법: 쇼그렌증후군 환자 (n = 45), 비-쇼그렌증후군 건조증 환자 (n = 14), 그리고 비건조증상 대조군 (n = 16)의 혈장에서 IL-17, IL-22, IL-23, CXCL9, CXCL10 과 CXCL13의 농도를 magnetic bead-based multiplex assays를 이용하여 측정하였다. 채혈 시점에서 환자의 인구학적 자료, 임상상 자료, 소타액선 조직 생검 결과를 포함한 실험실적 자료를 수집하고, 쇼그렌증후군 질병활성도를 계산하였다.

결과: 혈장 IL-17은 세 군에서 유의한 차이가 없었으나, 혈장 IL-22는 쇼그렌증후군 환자에서 다른 두 군과 비교하여 유의하게 낮고 혈장 IL-23은 쇼그렌증후군 환자에서 더 높은 경향을 보였다. CXCL9, CXCL10, CXCL13의 혈장농도는 쇼그렌증후군 환자에서

가장 높게 측정되었으며 ROC 곡선 분석에서 혈장 CXCL9가 쇼그렌증후군 환자에 대한 구별능이 가장 높았다. 쇼그렌증후군 환자에서 IL-23 농도는 CXCL9 및 CXCL10과 양의 상관관계를 보였으나 CXCL13과는 연관성이 없었다. IL-23과 CXCR3 케모카인의 혈장 농도는 ESR, immunoglobulin G 및 β2-microglobulin 농도와 양의 상관관계를 보였으며 질병활성도 지표인 ESSDAI와도 양의 상관관계를 보였다. 또한 CXCL9 및 CXCL13 케모카인 혈중 농도는 항Ro/La 항체 역가 뿐 아니라 소타액선의 림프구 침윤 정도와 양의 상관관계를 보였다.

결론: 본 연구에서 쇼그렌증후군 환자의 혈장에서 IL-23 및 CXCR3 케모카인이 대조군에 비하여 증가되고 IL-23과 CXCR3 케모카인 사이에는 양의 상관관계가 있음을 관찰하였으며 이들의 혈장 농도가 자가면역학적 염증성 지표들과 유의한 연관성을 보임을 확인하였다. 이러한 결과는 Th1 세포와 Th17 세포 모두 쇼그렌증후군 환자의 병태생리에 관여할 수 있음을 의미하며 Th1 및 Th17 세포들 간의 상호작용 혹은 Th17 세포에서 유래한 Th17.1 세포가 병태생리에서 중요한 역할을 할 가능성을 시사한다.

주요어: 쇼그렌증후군, CXCR3 케모카인, Th17 시토카인

학 번: 2013-23509

목 차

초록 i
목차 iii
표 및 그림 목록 iv
서론 1
대상 및 방법 7
결과 10
고찰 29
참고문헌 40
초록 (영문) 55

표 및 그림 목록

표 1. Baseline characteristics 11

표 2. Comparison of characteristics in SS subgroups stratified according to plasma chemokine levels 23

그림 1 Plasma IL-17A, IL-22, IL-23, CXCL9, CXCL10 and CXCL13 levels in study subjects 15
그림 2 Correlation between plasma IL-23 and CXCR3 chemokine levels or each pair of chemokine levels..... 17
그림 3 Correlation between chemokines and the titers of anti-Ro/La antibodies or salivary lymphocytic infiltration..... 21
그림 4 Correlation between serum levels of IgG or β2-MG and plasma levels of IL-23 or chemokines..... 22
그림 5 Correlation between ESSDAI and plasma levels of IL-23 or chemokines 26
그림 6 ROC curve analysis using plasma chemokine levels 28

서 론

쇼그렌증후군(Sjögren's syndrome)은 눈물샘과 침샘과 같은 외분비샘에 발생하는 만성 염증을 특징으로 하는 자가면역성 염증성 질환이다. 외분비샘의 림프구 침윤과 B 림프구의 과활성화에 따른 장기 특이적 및 비특이적 자가항체의 존재가 쇼그렌증후군의 면역학적 특징으로, 선천면역 및 후천면역을 담당하는 다양한 면역세포들과 세포간의 기능적 교통을 담당하는 다양한 시토카인 및 케모카인들로 이루어진 복잡한 그물망에 의하여 질병이 촉발되고 유지된다. 주요 증상은 외분비샘 기능 장애로 인한 건성안과 구강건조증이지만, 외분비샘 이외의 장기를 침범하여 다양한 임상상을 보일 수 있어 전신성 자가면역질환으로 분류하고 있다.

쇼그렌증후군의 초기 사건은 명확하게 알려진 바 없지만 바이러스 감염 등의 외부 요인에 의하여 외분비샘 세포의 세포자멸사, 염증성 시토카인 및 케모카인의 발현, 패턴인식수용체(pattern recognition receptors)의 활성화 등 선천면역계의 이상이 초기 사건인 것으로 생각하고 있다. 쇼그렌증후군 환자의 침샘 조직에서는 상피세포 주위 림프구(lymphocyte) 침윤이 공통적으로 나타나는데, 침윤된 림프구의 약 60-70%는 CD4+ T 세포, 10-20%는 CD8+ T 세포, 약 10%가 B 세포 혹은 형질세포로 구성되어 있다 (1). 쇼그렌증후군 환자의 소타액선 조직에서 interferon(IFN)의 발현과 IFN에 의한 유전자 발현 신호가 증가되어 있고 (2),

쇼그렌증후군에서 IFN-γ 발현에 관여하는 STAT4 전사인자나 IFN 신호에 관여하는 IRF5의 유전적 다형성과 유의한 연관이 보고되어 (3, 4) 쇼그렌증후군 발병 초기 과정에서 IFN이 중요한 역할을 하는 것으로 여겨진다. 또한 타액선 조직에서 Th1 유도성 케모카인인 CXCL9 및 CXCL10 발현이 증가되어 (5), 전통적으로 쇼그렌증후군은 Th1 세포 매개성 질환으로 간주되었다.

그러나 최근 쇼그렌증후군의 발병과정에서 Th17 세포 혹은 IL-17을 분비하는 T 세포가 관여할 것을 시사하는 연구결과가 다수 보고되었다. 쇼그렌증후군 동물모델에서 혈청과 타액선조직에서 IL-17의 발현이 증가함이 NOD 생쥐에서 관찰되었다 (6). 또한 IL-17을 발현하는 아데노바이러스 벡터를 타액선에 주입하였을 때 임상상과 혈청학적 및 조직학적 변화가 쇼그렌증후군과 유사함이 보고되었고 (7), IL-17 결핍 생쥐에서는 쇼그렌증후군이 유도되지 않았다 (8). 쇼그렌증후군 환자를 대상으로 한 연구에서 혈액 내 IL-17 농도는 상반된 결과가 보고되었지만, 소타액선 조직에서 IL-17이 세관주위에 침윤된 T 세포에서 관찰되고 IL-17 수용체인 IL-17RA가 세관 상피세포에서 발현이 증가함이 관찰되었다 (9). 또한 Th17 세포에서 분비되는 시토카인인 IL-21 및 IL-22가 쇼그렌증후군 환자의 혈청에서 증가하고 소타액선 조직에서도 IL-17의 분포와 동일하게 발현함이 보고되었으며 (10-12), Th17 분화에 필수적인 시토카인인 IL-23도 쇼그렌증후군의 환자의 혈청 및 소타액선 조직에서 발현이 증가되는 것이 확인되었다 (13). 이러한 결과는 쇼그렌증후군의 발생 및 진행에서 특정 T 세포 아군이 아니라 Th1 및 Th17 세포

혹은 Th1 및 Th17 시토카인의 복잡한 그물망이 작용하고 있음을 시사한다. 더욱이 일련의 연구에서 Th17 세포 혹은 IL-17은 T 세포의 도움이나 toll-like receptor의 자극이 없어도 B 세포의 생존과 증식을 유발하고 항체를 생산하는 형질세포로의 분화를 촉진하며 이소성 종자중심(ectopic germinal center) 발생에 관여함이 보고되었다 (14). 따라서, B 세포의 과활성화가 특징인 쇼그렌증후군에서 IL-17 분비 T 세포가 발병 과정에서 주요한 역할을 할 것으로 판단된다.

다양한 시토카인의 작용에 의해 원시(naïve) T 세포는 Th1, Th2, Th17, Th9, Th22 등의 작동 T 세포로 분화하지만, 시토카인 환경이 바뀌면 특정 도움 T 세포에서 다른 도움 T 세포로 변화할 수 있는 “plasticity” 현상과 lineage 특이적인 전사인자들을 동시에 발현하고 있는 “flexibility” 현상도 있음이 알려져 있다. 특히 Th17 세포는 높은 plasticity를 보여 Th17 세포에서 Th1 세포로 분화한 Th17.1(Th17-1, Th17/Th1 혹은 non-classical Th1) 세포가 관찰됨이 보고되었다. 이러한 세포는 세포 표면에 CD161을 발현하며 Th17 및 Th1 lineage에 특이적인 전사인자인 RORγt와 T-bet가 공존하며 IL-17과 IFN-γ를 함께 분비한다 (15). 또한 케모카인 수용체로 Th1 세포 표지자인 CXCR3와 Th17 세포 표지자인 CCR6을 같이 발현하는 특징을 보인다 (15). 소아기특발성관절염에서 전통적인 Th1 세포와 달리 Th17.1 세포가 염증지표와 유의한 관계가 있음이 보고된 바 있으며 (16), 염증성 장질환이나 다발성 경화증과 같은 자가면역질환에서도 이러한 Th17.1 세포가 질병 발생과정에서 중요한 역할을 하는

것으로 알려져있다 (17, 18). Th1 세포뿐 아니라 Th17 세포의 병태생리적인 중요성이 확인된 쇼그렌증후군에서도 비-쇼그렌증후군 건조증 환자나 건조 증상이 없는 대조군과 비교하였을 때 말초혈액에서 Th17.1 세포가 증가되어 있음이 최근 보고되었다 (19).

Th1 및 Th17.1 세포에 표면에 존재하는 케모카인 수용체 CXCR3에 결합하는 리간드로는 CXCL9(Mig; monokine induced by IFN-γ), CXCL10(IP-10; interferon-γ-inducible 10-kd protein), CXCL11(I-TAC; interferon-inducible T-cell α chemoattractant)이 알려져 있는데, 이 중 CXCL10은 이미 여러 자가면역 질환에서 중요한 역할을 한다는 것이 알려져 있다 (20). 쇼그렌증후군의 목표장기에 침윤된 T 세포의 상당수에서 CXCR3 발현이 존재함이 잘 알려져 있으며, CXCR3 결핍 생쥐 및 CXCL10 차단제를 투여한 MRL/lpr 생쥐에서 눈물샘 혹은 침샘에서 T 세포의 침윤이 감소됨이 확인된 바 있다 (5, 21). 또한 CXCL9 및 CXCL10은 쇼그렌증후군 환자 타액이나 염증성 조직에서 발현이 증가되어 있음이 알려져 있고 (22, 23), 쇼그렌증후군 환자에서 자주 동반되는 자가면역성 갑상선 질환에서도 중요한 역할을 할 것으로 생각되고 있다 (24). 하지만, 아직까지 쇼그렌증후군 환자에서 혈중 CXCL9 및 CXCL10의 농도에 대한 보고는 없는 상황이다. B 세포 및 여포 보조 T 세포 (follicular helper T cells, Tfh) 표면에 발현되는 CXCR5의 리간드인 CXCL13(BCA-1; B cell-attracting chemokine 1, BLC; B lymphocyte chemoattractant)도 CXCR3에 결합능이 있는 것으로 알려져

있는데 (25), 쇼그렌증후군 동물 모델 및 환자에서 국소적으로나 전신적으로 모두 증가되어 있음이 확인되었고 (26), B 세포 활성화 및 이소성 종자중심 형성에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다 (27). 따라서 쇼그렌증후군의 목표장기에서 증가된 CXCR3 관련 케모카인은 T 세포가 목표장기로 이동하여 염증 과정에 참여하는 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

Th1 관련 시토카인과 CXCR3 케모카인과의 관련성은 잘 알려져 있다. IFN-γ가 STAT1을 활성화시켜서 CXCR3 케모카인 발현을 증가시킬 뿐 아니라 TNF-α도 NF-κB를 통해 CXCR3 케모카인 생성을 증가시키며 (28, 29), 이렇게 생성된 CXCR3 케모카인들은 Th1 cell을 이동시켜 염증반응을 유발하는 데 중요한 역할을 한다 (30). 반면 자가면역질환에서 Th17.1에서도 발현되는 CXCR3의 리간드 케모카인과 Th17 관련 시토카인과의 작용에 대해서는 명확히 연구된 바가 없다. 그러나 일부 감염질환에서 IL-17A와 CXCL9, CXCL10이 함께 증가하며 (31, 32) IL-23 의 작용 억제에 의해 CXCL9 또는 CXCL10 발현이 증가하지 않는 것으로 나타났고 (33), 결핵 백신 접종시 IL-17에 의해 유도된 CXCL13이 림프조직 내에서 T cell을 활성화시키는 것으로 나타나 (34), 쇼그렌증후군과 같은 자가면역질환 발병 기전에서도 Th17 관련 사이토카인과 CXCL9, CXCL10, CXCL13 사이의 관련성이 있을 것으로 짐작되었다.

이러한 배경에서 연구자는 쇼그렌증후군 환자에서 대표적인 Th1 시토카인인 IFN-γ에 의하여 유도되며 쇼그렌증후군 국소 조직에서 발현이 증가됨이 다수의 연구에서 확인된 CXCL9 및

CXCL10 혈중 농도의 임상적 의미를 조사하고 혈중 Th17 관련 시토카인 IL-17A, IL-22 및 IL-23과 CXCR3의 리간드 케모카인인 CXCL9, CXCL10, 또는 쇼그렌증후군의 이소성 종자중심 형성에 중요한 역할을 하는 것으로 잘 알려진 CXCL13 사이의 상관관계를 분석하고자 하였다. 또한, 쇼그렌증후군 환자에서 혈중 시토카인과 케모카인의 농도에 대한 기존의 많은 연구가 건강 대조군과의 비교를 통하여 이루어졌기에, 본 연구자는 건조증상이 있으나 쇼그렌증후군의 분류기준을 만족하지 않는 환자와도 비교하여 쇼그렌증후군에서 각각의 시토카인과 케모카인의 임상적 의미를 추가로 파악하고자 하였다.

대상 및 방법

1. 연구대상

본 연구는 2010년 1월 1일부터 2015년 12월 31일에 분당서울대학교병원을 방문하여 쇼그렌증후군으로 진단받은 환자 중 만 20세 이상이며 서면동의 설명문 및 동의서를 이해할 수 있고 제출할 의사가 있는 환자 45명을 대상으로 하였다. 쇼그렌증후군은 2002년에 제안된 American-European Consensus Group의 기준에 따라 분류하였다 (35). 대조군으로는 같은 기간 안구건조증 또는 구강건조증으로 병원을 방문하였으나 상기 쇼그렌증후군 진단 기준에 만족하지 않는 환자와, 건강검진 목적으로 병원을 방문한 전신 염증성 질환이 없는 건강대조군 중 자원자를 3:1:1 비율로 선정하였다. 쇼그렌증후군 및 비쇼그렌증후군 건조증 환자는 연구 목적의 채혈과 자료 수집에 동의한 경우 진단 당시 혈액 채취 후 혈장을 분리하여 분석 직전까지 영하 70℃에 보관하였다. 본 연구는 분당서울대학교병원 기관윤리심의위원회(Institutional Review Board, IRB)의 검토 및 승인을 받았다 (IRB No. B-0506/021-004).

2. 임상자료 수집

연구 대상자의 성별, 연령, 기저질환(고혈압, 당뇨, 갑상선기능이상, 알레르기 질환 등), 폐경 여부를 확인하였다. 채혈 시점의 전혈구검사, 혈청 전해질과 간기능검사, 적혈구침강속도(erythrocyte

sedimentation rate, 이하 ESR)와 C반응단백(C-reactive protein, 이하 CRP), 항핵항체(anti-nuclear antibody), 류마티스인자(rheumatoid factor), 항Ro(SS-A)/La(SS-B)항체를 확인하였으며, 쇼그렌증후군 환자의 경우 채혈 시점에 Schirmer 검사 또는 Rose Bengal 염색, ocular staining score, 전타액 유속(whole salivary flow)과 침샘 스캔(salivary scintigraphy) 결과, 소타액선 생검의 조직검사 병리 결과, cryoglobulinemia 여부, 면역글로불린 G(immunoglobulin G, 이하 IgG) 농도, beta2-microglobulin(이하 β2-MG) 농도를 수집하였다. 소타액선 생검은 혈액검체 채취 전 또는 후 평균 1개월 이내로 시행되었으며, 림프구 침윤 정도에 따라 다음과 같이 등급으로 전환하여 평가하였다 (22): grade 0은 림프구와 형질구 침윤이 없음; grade 1은 국소 점수(focus score) <1; grade 2는 국소점수 1; grade3은 국소점수 >1; grade 4는 국소점수 2; grade 5는 국소점수 >2. 또한, 쇼그렌증후군 환자의 질병활성도를 평가하기 위하여 European League Against Rheumatism (EULAR) Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI) 및 EULAR SS Patient-Reported Index (ESSPRI) 를 계산하였다 (36, 37).

3. Th17 시토카인 및 CXCR3 케모카인 측정

수집한 환자의 혈장으로부터 IL-17A, IL-22, IL-23 및 CXCL9(MIG), CXCL10(IP-10), CXCL13(BLC/BCA-1)을 측정하였다. 시토카인과 케모카인 측정에는 상용화된 magnetic bead-based multiplex assays kit (Magnetic Luminex®

Screening Assay; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)와 MAGPIX (Luminex, Austin, TX, USA) 기기를 이용하였다. 수집된 환자의 혈장은 실험 직전 녹여서 잘 혼합한 후 원심분리하여 상층액을 검사용 희석액으로 1/2 희석하여 사용하였으며, 표준시료(standard)와 공시료(blank), 혈장 검체에서 농도를 중복으로 측정하여 평균값을 사용하였다. 상기 측정 키트의 시토카인과 케모카인의 측정 민감도 및 측정 범위는 각각 다음과 같다: IL-17A은 1.8 pg/mL, 21.5-5,220 pg/mL; IL-22는 11.7 pg/mL, 167-4,050 pg/mL; IL-23은 11.4 pg/mL, 221-53,800 pg/mL; CXCL9은 18.4 pg/mL, 396-96,200 pg/mL; CXCL10은 1.18 pg/mL, 2.59-630pg/mL; CXCL13은 11.5 pg/mL, 17.6-4,280 pg/mL.

4. 통계분석

혈장 시토카인 농도는 중앙값 [사분위 범위(interquartile range)]을 구하였다. 연속 변수는 Mann-Whitney U-test 또는 Kruscal-Wallis test 와 Dunn' s multiple comparison test로, 범주형 변수는 chi-square test 나 Fisher's exact test를 이용하여 분석하였으며, 두 변수 사이의 상관관계는 Spearman correlation coefficient를 이용하여 평가하였다. *P*-value가 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판단하였으며, 모든 통계 분석은 IMB SPSS version 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 과 Graphpad Prism Software version 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) 를 이용하여 시행되었다.

결 과

1. 환자군 특성

대상 환자들의 특성은 표 1과 같다. 쇼그렌증후군 환자와 비-쇼그렌증후군 건조증 환자, 그리고 건조증상이 없는 비건조증상 대조군의 나이는 각각 52 [41.5-60.0], 51 [42.75-60.25], 51.5 [40.25-60.0] 세였고 남성이 쇼그렌증후군 환자군 중 1명, 비건조증상 대조군 중 1명이었다. 쇼그렌증후군으로 진단된 환자 중 안구건조증상과 구강건조증상을 호소하는 환자는 각각 37명 (82.2%)과 38명 (84.4%)였고 비-쇼그렌증후군 건조증 환자에서는 각각 12명 (85.7%)과 13명 (92.9%)씩이었다. Schirmer 검사, Rose Bengal 염색, ocular staining score 를 통해 확인한 눈물샘 기능 이상은 쇼그렌증후군 환자군에서는 45명 중 35명 (77.8%), 비-쇼그렌증후군 건조증 환자에서는 14명 중 5명 (35.7%)에서 관찰되었다 (p = 0.005). 자극하지 않은 상태에서의 침분비 검사 또는 침샘스캔으로 확인한 침샘기능 이상 여부는 쇼그렌증후군 환자군 45명 중 40명 (88.9%), 비-쇼그렌증후군 건조증 환자군 14명 중 9명 (64.3%)에서 관찰되어 유의한 차이를 보였다 (p = 0.047). 자극하지 않은 상태에서의 전타액 유속과 자극하였을 때의 전타액 유속은 비-쇼그렌증후군 건조증 환자에서 쇼그렌증후군 환자에 비해 높은 경향성을 보였다.

Table 1. Baseline characteristics

	SS (n = 45)	Non-SS sicca (n = 14)	Control (n = 16)
Age	52 [41.5-60.0]	51 [42.75-60.25]	51.5 [40.25-60.0]
Gender (F:M)	44:1	14:0	15:1
Underlying disease			
Hypothyroidism (%)	6/45 (13.3)	2/14 (14.3)	0
Hyperthyroidism (%)	2/45 (4.4)	0	0
Diabetes mellitus (%)	1/45 (2.2)	0	0
Hypertension (%)	4/45 (8.9)	1/14 (7.1)	1/16 (6.3)
Allergic disease (%)	6/45 (13.3)	0	0
Menopause (%)	24/45 (53.3)	9/14 (64.3)	5/16 (31.3)
Dry eye (%)	37/45 (82.2)	12/14 (85.7)	NA
Dry mouth (%)	38/45 (84.4)	13/14 (92.9)	NA
Parotid gland swelling (%)	10/36 (27.8)	0 †	NA
Basal salivary flow rate (mL/min)	0.000 [0-0.100]	0.010 [0-0.175]	NA
Stimulated salivary flow rate (mL/min)	0.300 [0.200-0.975]	0.750 [0.400-1.400]	NA
Lacrimal gland dysfunction (%)	35/45 (77.8)	5/14 (35.7) †	NA
Positive Schirmer test (%)	22/39 (56.4)	3/14 (21.4) †	NA
Positive Rose Bengal stain (%)	12/23 (52.2)	2/11 (18.2)	NA
Positive Ocular staining score (%)	17/32 (53.1)	0 †	NA
Salivary gland dysfunction (%)	40/45 (88.9)	9/14 (64.3) †	NA
Low salivary flow (%)	34/44 (77.3)	9/14 (64.3)	NA
Abnormal salivary scan (%)	30/38 (78.9)	3/7 (42.9)	NA

Positive focus score	30/38 (78.9)	0 †	NA
Anti-Ro (%)	38/45 (84.4)	0 †	NA
Anti-La (%)	23/45 (51.1)	0 †	NA
Positive RF (%)	19/33 (57.6)	2/12 (16.7) †	NA
Positive ANA (%)	31/41 (75.6)	1/13 (7.7) †	NA
Cryoglobulin (%)	1/41 (2.4)	NA	NA
Immunoglobulin G (mg/dL)	1720 [1360-2540]	NA	NA
β2-miroglobulin (μg/mL)	2.15 [1.725-2.575]	NA	NA
WBC ($x10^3/\mu L$)	4.4 [3.6-5.3]	6.25 [5.15-6.8]*	5.5 [4.5-6.6]
Hemoglobin (g/dL)	12.6 [12.0-13.4]	13.55 [12.7-13.95]	12.95 [12.65-13.35]
Platelet ($x10^3/\mu L$)	228 [204-251]	249.5 [212.5-291]	248 [228.75-286.25]
ESR (mm/hr)	22 [14.5-33]	4.5 [2-13.25]*	11 [3.5-18]*
CRP (mg/dL)	0 [0-0.2]	0 [0-0.1]	0.05 [0-0.275]

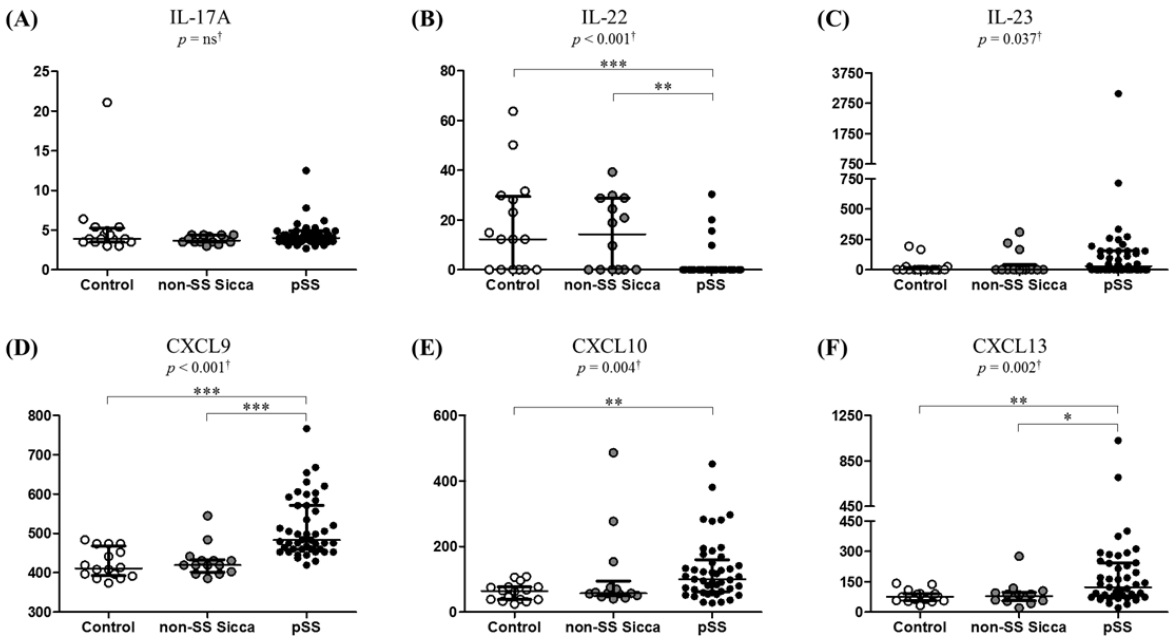
SS, Sjögren's syndrome; RF, rheumatoid factor; ANA, anti-nuclear antibody; WBC, white blood cell; ESR, erythrocyte sedimentation rete; CRP, C-reactive protein. †$p < 0.05$ by Chi-square test or Fisher's exact test. *$p < 0.05$ vs. SS patients by Dunn's mutiple comparison test.

2. 3개 군에서 혈장 Th17 시토카인 및 CXCR3 케모카인 농도 비교 (그림 1)

혈장 IL-22의 농도는 3개 군에서 유의하게 다른 분포를 보였으며 ($p = 1.07\times10^{-5}$ by Kruskal-Wallis test), 쇼그렌증후군 환자에서 비-쇼그렌증후군 건조증상 환자나 비건조증상 대조군과 비교하여 유의하게 낮았고 (쇼그렌증후군 0 [0-0], 비-쇼그렌증후군 건조증상 14.3 [0-28.8], 비건조증상 대조군 12.3 [0-29.5]; 쇼그렌증후군 대 비-쇼그렌증후군 건조증상 $p = 6.95\times10^{-5}$, 쇼그렌증후군 대 비건조증상 대조군 $p = 1.05\times10^{-5}$), 비-쇼그렌증후군 건조증상 환자와 비건조증상 대조군 간에는 차이가 없었다. 혈장 IL-23도 세 군 간에 유의한 분포 차이가 있었으며 ($p = 0.037$ by Kruskal-Wallis test) 쇼그렌증후군에서 혈장 IL-23의 농도가 높은 경향을 보였지만 사후 분석에서 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (쇼그렌 증후군 29.8 [0-154.3], 비-쇼그렌증후군 건조증상 0 [0-41.9], 비건조증상 대조군 0 [0-20.2]). 반면, CXCL9 ($p = 8.41\times10^{-8}$ by Kruskal-Wallis test) 및 CXCL13 ($p = 0.002$ by Kruskal-Wallis test)은 쇼그렌증후군 환자에서의 혈장 농도가 비-쇼그렌증후군 건조증상 환자나 비건조증상 대조군과 비교하여 유의하게 높게 나타났다 (CXCL9, 쇼그렌증후군 483.2 [460.3-571.0], 비-쇼그렌증후군 건조증 419.4 [401.3-433.2], 비건조증상 대조군 411.05 [392.8-468.1], 쇼그렌증후군 대 비-쇼그렌증후군 건조증 $p = 9.35\times10^{-6}$, 쇼그렌증후군 대 비건조증상 대조군 $p = 4.89\times10^{-6}$; CXCL13, 쇼그렌증후군 122.6 [73.6-242.7], 비-쇼그렌증후군 건조증 79.2

[55.5–97.6], 비건조증상 대조군 75.8 [56.4–90.8], 쇼그렌증후군 대 비–쇼그렌증후군 건조증 p = 0.010, 쇼그렌증후군 대 비건조증상 대조군 p = 0.002). CXCL10은 비건조증상 대조군에 비해 쇼그렌증후군 환자에서 유의하게 높았으나 비–쇼그렌증후군 건조증상 환자와는 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (쇼그렌증후군 100.2 [61.2–159.6], 비–쇼그렌증후군 건조증 57.1 [49.9–94.7], 비건조증상 대조군 64.1 [38.2–76.8], 쇼그렌증후군 대 비–쇼그렌증후군 건조증 p = 0.064, 쇼그렌증후군 대 비건조증상 대조군 p = 0.002).

Figure 1. Plasma IL-17A, IL-22, IL-23, CXCL9, CXCL10 and CXCL13 levels in study subjects. (A) The distribution of plasma IL-17A levels were not different among SS (n = 45), non-SS sicca (n = 14), and non-sicca control (n = 16) groups (B) Plasma IL-22 levels were significantly lower in SS group than the other 2 groups. (C) The distribution of plasma IL-23 levels was significantly different among the 3 groups and, in post hoc analysis, SS patients tended to have a higher level of IL-23 in the circulation. In SS patients, plasma levels of CXCL9 (D), CXCL10 (E), and CXCL13 (F) were significantly higher than in the other 2 groups. P values† were calculated by the Kruskal-Wallis Test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by Dunn's multiple comparison test.

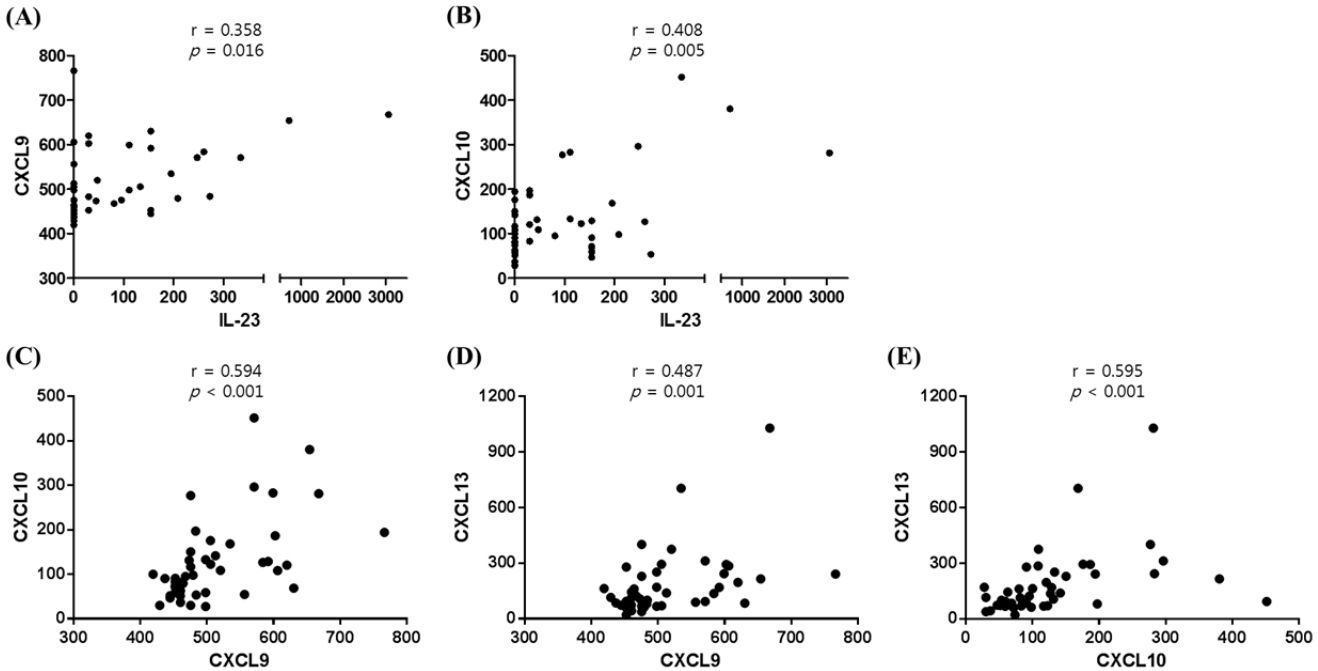


3. 쇼그렌 증후군에서 혈장 Th17 시토카인과 CXCR3 케모카인 농도와의 관계 (그림 2)

쇼그렌증후군 환자 45명의 혈장 Th17 시토카인과 CXCR3 케모카인 농도와의 상관관계를 Spearman's rank correlation으로 분석하였을 때, IL-17A와 IL-22는 케모카인과 상관관계를 보이지 않았으나, IL-23의 경우 CXCL9 혹은 CXCL10과 양의 상관관계를 보였다 ($r = 0.358$, $p = 0.016$ for CXCL9, $r = 0.408$, $p = 0.005$ for CXCL10). CXCL13은 IL-23과 유의한 상관관계를 보이지 않았다.

Th17 시토카인들 사이에서는 혈장 농도에서 유의한 상관관계를 보이지 않았으나 CXCL9와 CXCL13 ($r = 0.487$, $p = 0.001$), CXCL9와 CXCL10 ($r = 0.594$, $p = 1.70\times10^{-5}$), CXCL10과 CXCL13 ($r = 0.595$, $p = 1.60\times10^{-5}$) 사이에는 서로 유의한 양의 상관관계가 관찰되었다.

Figure 2. Correlation between plasma IL-23 and CXCR3 chemokine levels or each pair of chemokine levels. Plasma IL-23 levels were significantly positively correlated with CXCL9 (A) or CXCL10 (B). (C-E) Plasma CXCL9, CXCL10 and CXCL13 levels were positively correlated with each other. r = Spearman correlation coefficient.



4. 혈장 Th17 시토카인 및 CXCR3 케모카인 농도와 쇼그렌증후군 환자의 임상상과의 관련성

류마티스인자 양성 유무에 따른 혈장 Th17 시토카인 및 CXCR3 케모카인 농도 차이는 없었으나, 항핵항체 양성인 환자는 음성인 환자에 비해 혈장 CXCL10 농도가 유의하게 높은 것으로 나타났다 (109.1 [73.8−176.0] 대 52.7 [30.0−139.1], p = 0.017). 쇼그렌증후군 환자에서 특징적인 자가항체인 항 Ro 항체와 항 La 항체가 양성인 환자와 음성인 환자 간에 혈장 시토카인과 케모카인 농도는 유의한 차이가 없었다. 그러나 항 Ro 항체의 역가가 높을수록 CXCL9, CXCL13 농도가 증가하였고 (r = 0.578, p < 0.001 for CXLC9, r = 0.337, p = 0.027 for CXCL13), 항 La 항체의 역가가 높을수록 CXCL13 농도가 증가하는 것으로 나타났다 (r = 0.323, p = 0.035). 또한 소타액선 조직에서 림프구의 침윤정도가 높아질수록 CXCL9 및 CXCL13의 농도는 통계적으로 유의하게 증가하였고 (r = 0.396, p = 0.014 for CXCL9; r = 0.363, p = 0.025 for CXCL13), CXCL10은 증가하는 경향성을 보였다 (r = 0.309, p = 0.059, 그림 3). 자극 및 비자극 상태에서의 타액 유속은 시토카인, 케모카인 농도와 유의한 상관관계가 없었으나, Schirmer 검사로 측정한 평균 누액분비량과 CXCL13 농도는 양의 상관관계가 있었다 (r = 0.534, p < 0.001). 쇼그렌증후군 환자군에서 IL−23 및 CXCR3 케모카인 혈장 농도는 ESR (r = 0.322, p = 0.031 for IL−23; r = 0.328, p = 0.028 for CXCL9; r = 0.423, p = 0.004 for CXCL10; r = 0.349, p = 0.019 for CXCL13), IgG 농도 (r = 0.303, p = 0.043 for IL−23; r =

0.459, p = 0.002 for CXCL9; r = 0.464, p = 0.001 for CXCL10; r = 0.498, p = 0.001 for CXCL13), β2-MG 농도 (r = 0.441, p = 0.003 for IL-23; r = 0.625, p < 0.001 for CXLC9; r = 0.763, p < 0.001 for CXCL10; r = 0.573, p < 0.001 for CXCL13)와 양의 상관관계가 있었다 (그림 4). 또한, 혈중 C3가 낮을수록 IL-17A는 증가하였고 (r = −0.424, p = 0.005), C4 농도가 낮을수록 IL-17A (r = −0.344, p = 0.024), CXCL9 (r = −0.379, p = 0.012), CXLC13 (r = −0.452, p = 0.002) 혈장 농도는 증가하였다. 백혈구, 림프구, 호중구 수치와 혈장 Th17 시토카인 및 CXCR3 케모카인 농도는 관련이 없었고, 혈소판 수가 감소할수록 각 케모카인의 농도가 증가하는 것으로 나타났다 (r = −0.298, p = 0.047 for CXLC9; r = −0.451, p = 0.002 for CXCL10; r = −0.321, p = 0.037 for CXCL13). CRP 농도와 케모카인의 혈장 농도는 연관성이 없었으나 IL-17A 농도와는 음의 상관관계가 있었다 (r = −0.387, p = 0.009).

비건조증상 대조군과 쇼그렌증후군 환자의 비교에서 Th17 시토카인의 농도 증가가 유의하지 않은 반면에 CXCR3 케모카인의 농도는 쇼그렌증후군에서 유의하게 증가되어 있으므로, 쇼그렌증후군 환자군을 비건조증상 대조군의 혈장 CXCR3 케모카인 농도의 90 백분위에 해당하는 값을 기준으로 고농도군과 저농도군으로 분류한 후 비교 분석하였다 (표 2). CXCL9, CXCL10, 혹은 CXCL13 고농도군에서 각각의 저농도군에 비해 ESSDAI가 유의하게 높았고, C4는 유의하게 낮았다. 또한 IgG 와 β2-MG 농도도 각각의 CXCR3 케모카인 고농도군에서 유의하게 높았고,

샘외증상이 있는 환자의 비율은 CXCL9, CXCL10의 고농도군에서 각각의 저농도군에 비해 높았다. 소타액선 검사에서의 림프구의 침윤 정도는 CXCL13 고농도군에서 CXCL13 저농도군에 비해 유의하게 높았으나, CXCL9, CXCL10 농도에 따른 아군에서는 차이가 없었다. ESR은 CXCL10 고농도군에서는 CXCL10 저농도군에 비해 유의하게 높았다. CXCL9 고농도군에서는 CXCL9 저농도군에 비해 항 Ro 항체 역가가 유의하게 높았고, CXCL13 고농도군에서는 저농도군에 비해 항 Ro/La 항체 역가가 높은 경향성을 보였다.

반면 세 군 간에는 유의한 분포 차이를 보였으나 사후분석에서는 유의한 차이가 없었던 IL-23의 비건조증상 대조군 혈장 농도 90백분위 값을 기준으로 쇼그렌증후군 환자를 고농도군과 저농도군으로 분류하여 비교하였을 때는 IL-23 고농도군에서 β2-MG 농도가 저농도군에 비해 유의하게 높았고 샘외증상이 있는 비율이 저농도군에 비해 높았으나 그 외에 다른 임상상에서는 차이가 없었다 (표 2).

Figure 3. Correlation between chemokines and the titers of anti-Ro/La antibodies or salivary lymphocytic infiltration. (A) Anti-Ro titers were significantly correlated with plasma CXCL9, CXCL10 or CXCL13 levels. (B) But, anti-La titers were only correlated with circulating CXCL13 levels. (C) Lymphocytic infiltration grade in minor salivary gland tissue was significantly positively associated with plasma CXCL9 or CXCL13 levels. r = Spearman correlation coefficient.

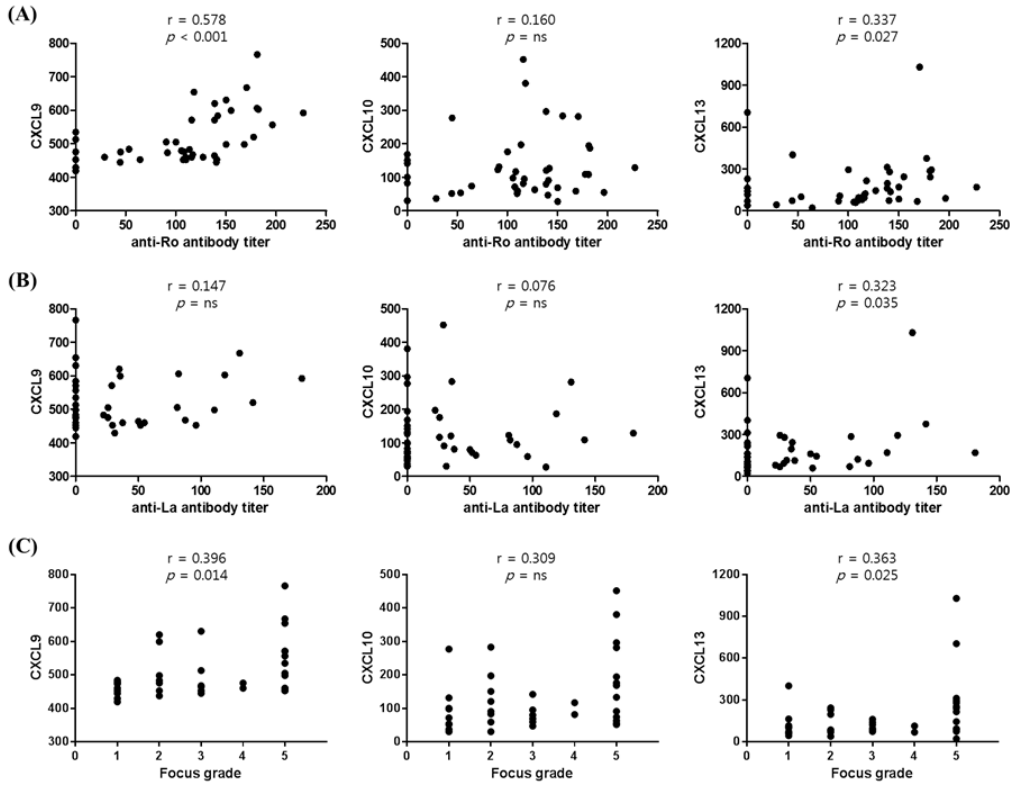


Figure 4. Correlation between serum levels of IgG or β2-MG and plasma levels of IL-23 or chemokines. (A) Total IgG concentrations were significantly correlated with plasma IL-23, CXCL9, CXCL10, and CXCL13 levels. (B) β2-MG levels were also positively correlated with plasma IL-23 and the 3 chemokines levels. IgG, immunoglobulin G; β2-MG, beta2-microglobulin; r = Spearman correlation coefficient.

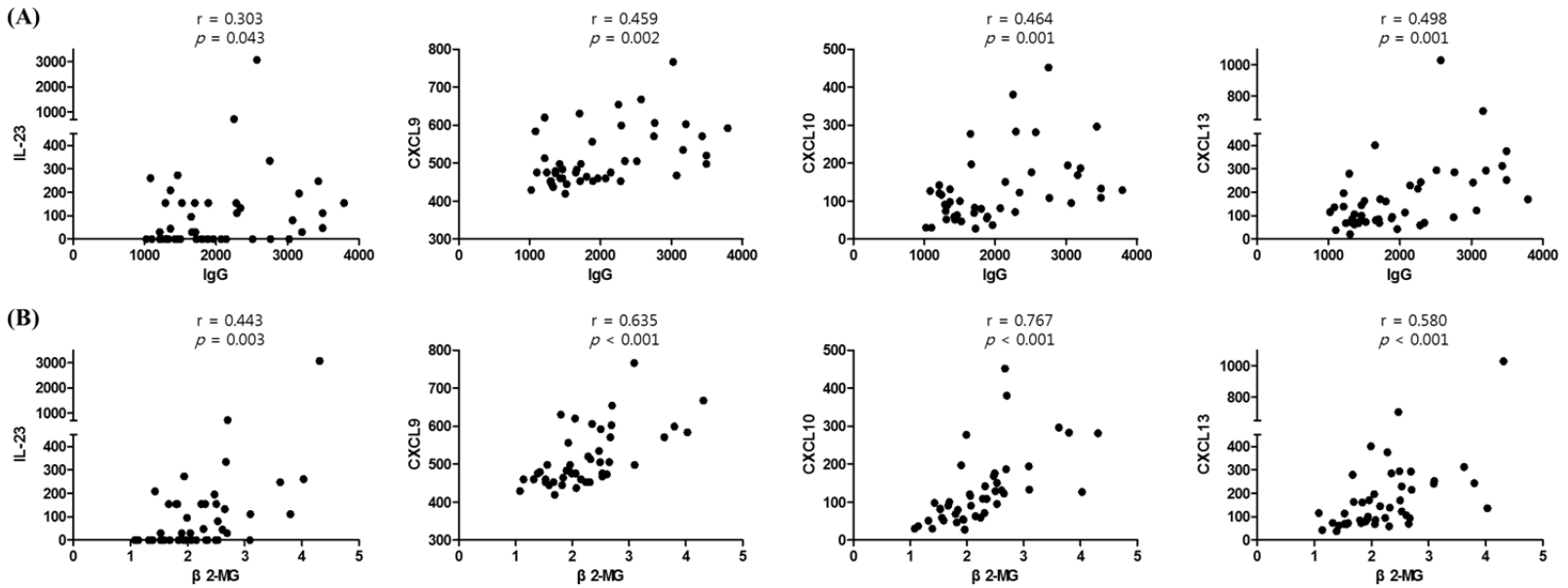


Table 2. Comparison of characteristics in SS subgroups stratified according to plasma chemokine levels

	CXCL9			CXCL10		
	Low (n = 22)	High (n = 23)	p-value	Low (n = 23)	High (n = 22)	p-value
WBC	4.35 [3.65-5.975]	4.4 [3.5-5.2]	0.820	4.5 [3.8-6.3]	4.2 [3.475-5.05]	0.323
Hemoglobin	12.95 [12.025-13.625]	12.6 [11.9-13.1]	0.407	12.9 [12.2-13.6]	12.6 [11.875-13.125]	0.351
Platelet	242.5 [228-255.75]	217 [189-243]	0.034	248 [228-281]	217 [174.75-228.50]	0.001
ESR	18.5 [8.5-26.25]	29 [15-48]	0.090	18 [6-27]	30 [15.75-48.25]	0.028
Protein	7.5 [7.2-7.825]	8.1 [7.3-8.6]	0.133	7.5 [7.2-7.8]	8.1 [7.325-8.625]	0.064
Albumin	4.5 [4.2-4.6]	4.2 [4.1-4.4]	0.058	4.4 [4.2-4.6]	4.2 [4.05-4.4]	0.020
CRP	0 [0-0.2]	0 [0-0.2]	0.676	0 [0-0.2]	0.05 [0-0.2]	0.447
Anti-Ro (%)	17/22 (77.3)	21/23 (91.3)	0.194	19/23 (82.6)	19/22 (86.4)	0.728
Anti-La (%)	10/22 (45.5)	13/23 (56.5)	0.556	11/23 (47.8)	12/22 (54.5)	0.768
Anti-Ro titer	107.3 [14.4-122.0]	140.2 [104.125-172.35]	0.006	109.9 [40.5-140.525]	118 [91-174.1]	0.214
Anti-La titer	0 [0-43.75]	24.05 [0-89.325]	0.296	0 [0-50.425]	25.7 [0-81.6]	0.354
RF (%)	8/16 (50.0)	11/17 (64.7)	0.491	8/18 (44.4)	11/15 (73.3)	0.158
ANA (%)	16/20 (80.0)	15/21 (71.4)	0.719	14/21 (66.7)	17/20 (85.0)	0.172
Lymphocytic infiltration grade	2.5 [1-4.25]	4 [2-5]	0.153	2.5 [1-4.25]	4.5 [2-5]	0.122
ESSDAI	1.5 [0-2.5]	2 [2-4]	0.048	1 [0-2]	2 [2-6]	0.004
C3	101 [90-124.5]	104.5 [100.625-116.25]	0.627	105 [89.25-123.5]	103 [99.7-113.5]	0.846
C4	20.8 [17.9-24.45]	17.25 [10.25-22.275]	0.044	21.4 [18.05-25]	16.9 [11.45-21.9]	0.025
IgG	1510 [1307.5-1907.5]	2340 [1460-3160]	0.008	1500 [1330-1880]	2425 [1577.5-3170]	0.006
β2-MG	1.8 [1.5-2.2]	2.5 [2.0-3.1]	0.001	1.75 [1.475-2.025]	2.55 [2.3-3.1]	0.000
Any extra-glandular feature (%)	6/22 (27.3)	14/23 (60.9)	0.036	5/23 (21.7)	15/22 (68.2)	0.003

WBC, white blood cell; ESR, erythrocyte sedimentation rete; CRP, C-reactive protein; RF, rheumatoid factor; ANA, anti-nuclear antibody; IgG, immunoglobulin G; β2-MG, beta-2 microglobulin. Subgroups with high or low chemokine levels were stratified by 90 percentile value of each chemokine level of control group.

Table 2. Comparison of characteristics in SS subgroups stratified according to plasma chemokine levels (continued)

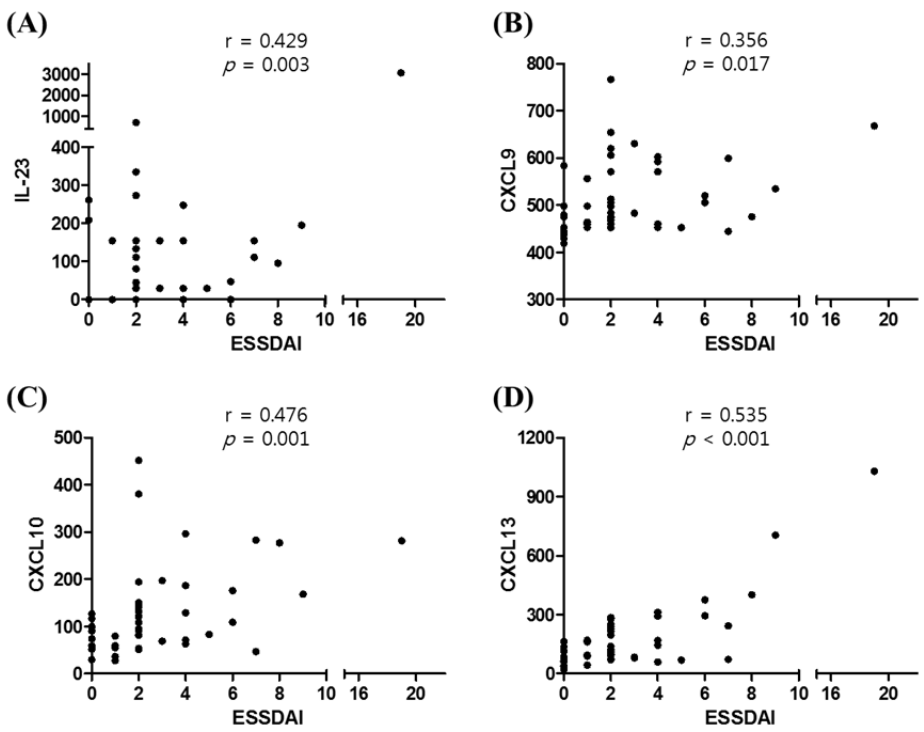
	CXCL13			IL-23		
	Low (n = 24)	High (n = 21)	p-value	Low (n = 37)	High (n = 8)	p-value
WBC	4.6 [3.725-6.175]	4.3 [3.45-4.9]	0.306	4.3 [3.45-5.05]	5.3 [4.2-7.05]	0.072
Hemoglobin	12.7 [12.125-13.475]	12.6 [11.9-13.3]	0.900	12.7 [12.23-13.45]	12.4 [11.25-13.325]	0.388
Platelet	241.5 [222.75-278.25]	217 [178.5-241.5]	0.014	230 [204-251]	226 [193.75-274.5]	0.965
ESR	18 [7-29]	25 [16-46]	0.084	19 [14.5-31.5]	37.5 [9.75-69.5]	0.190
Protein	7.550 [7.325-7.8]	8.1 [7.1-8.55]	0.452	7.6 [7.25-8.3]	7.85 [6.85-8.55]	0.873
Albumin	4.4 [4.2-4.6]	4.2 [4.05-4.4]	0.051	4.4 [4.2-4.55]	4.2 [3.4-4.4]	0.180
CRP	0 [0-0.175]	0 [0-0.2]	0.647	0 [0-0.15]	0.05 [0-0.2]	0.651
Anti-Ro (%)	21/24 (87.5)	17/21 (81.0)	0.545	31/37 (83.8)	7/8 (87.5)	0.637
Anti-La (%)	11/24 (45.8)	12/21 (57.1)	0.554	21/37 (56.8)	2/8 (25.0)	0.107
Anti-Ro titer	108.3 [53.3-116.8]	138.65 [58.6-175.85]	0.071	113.6 [44.8-150.1]	116.9 [66.35-140.925]	1.000
Anti-La titer	0 [0-31.2]	32.1 [0-103.575]	0.067	25.7 [0-54.8]	0 [0-21.6]	0.222
RF (%)	9/19 (47.4)	10/14 (71.4)	0.167	15/26 (57.7)	4/7 (57.1)	0.652
ANA (%)	14/20 (70.0)	17/21 (81.0)	0.414	26/35 (74.3)	5/6 (83.3)	0.542
Lymphocytic infiltration grade	2 [1-4]	5 [2-5]	0.045	3 [2-5]	5 [1-5]	0.219
ESSDAI	1.5 [0-2]	2 [2-6]	0.004	2 [1-4]	2 [0.5-7.75]	0.570
C3	104 [96.8-123.5]	103 [92.55-114.5]	0.473	103 [91.625-115]	113 [101-120]	0.392
C4	21.9 [18.48-25.0]	17.6 [11.45-21.85]	0.016	20.15 [15.625-22.725]	20.5 [13.4-24.7]	0.936
IgG	1490 [1315-1942.5]	2290 [1575-3180]	0.006	1710 [1345-2315]	2410 [1385-3157.5]	0.422
β2-MG	1.9 [1.5-2.3]	2.5 [2.0-2.9]	0.003	2.05 [1.7-2.5]	2.7 [2.05-3.9]	0.023
Any extra-glandular feature (%)	8/24 (33.3)	12/21 (57.1)	0.140	13/37 (35.1)	7/8 (87.5)	0.010

WBC, white blood cell; ESR, erythrocyte sedimentation rete; CRP, C-reactive protein; RF, rheumatoid factor; ANA, anti-nuclear antibody; IgG, immunoglobulin G; β2-MG, beta-2 microglobulin. Subgroups with high or low chemokine levels were stratified by 90 percentile value of each chemokine level of control group.

5. 혈장 Th17 시토카인 및 CXCR3 케모카인 농도와 쇼그렌증후군 환자의 질병활성도와의 관련성 (그림 5)

쇼그렌증후군의 질병활성도를 반영하는 지표인 ESSPRI 및 ESSDAI와 Th17 시토카인 또는 CXCR3 케모카인 농도와의 상관관계를 분석한 결과 ESSPRI가 높을수록 IL-17A 농도는 낮은 것으로 나타났으나 ($r = 0.399$, $p = 0.021$) 나머지 시토카인과 케모카인 농도와의 관련성은 없었다. 반면 ESSDAI가 높을수록 IL-23, CXCL9, CXCL10, CXCL13 농도는 증가하는 것으로 나타났으며 ($r = 0.429$, $p = 0.003$ for IL-23; $r = 0.356$, $p = 0.017$ for CXCL9; $r = 0.476$, $p = 0.001$ for CXCL10; $r = 0.535$, $p < 0.001$ for CXCL13), IL-17A, IL-22는 ESSDAI와 유의한 상관관계가 없는 것으로 나타났다.

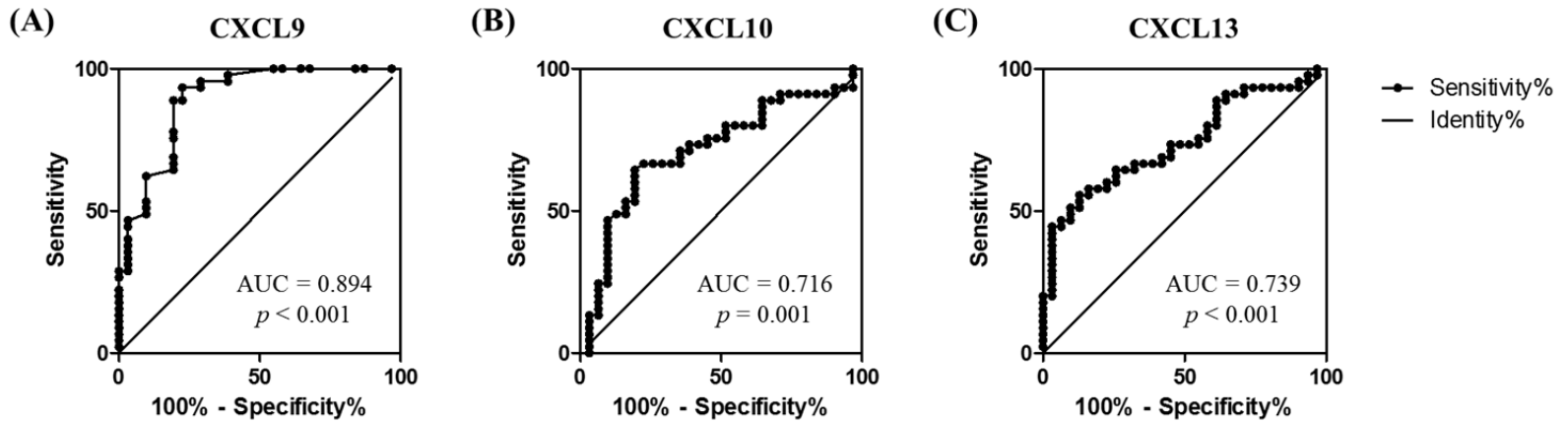
Figure 5. Correlation between ESSDAI and plasma levels of IL-23 or chemokines. ESSDAI showed a significant correlation with circulating levels of IL-23 (A), CXCL9 (B), CXCL10 (C) and CXCL13 (D). ESSDAI, EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index; r = Spearman correlation coefficient.



6. CXCR3 케모카인 농도를 이용한 쇼그렌증후군 환자의 구별 (그림 6)

Th17 시토카인보다 CXCR3 케모카인의 혈중 농도가 쇼그렌증후군 환자에서 유의하게 높고 여러 임상상과의 유의한 관련성을 보이므로 CXCR3 케모카인 농도에 대한 ROC 곡선 분석을 통하여 쇼그렌증후군과 대조군의 구별능이 가장 높은 CXCR3 케모카인 종류를 확인하고자 하였다. 전체 76명 환자에서 쇼그렌증후군에 대한 혈장 CXCL9, CXCL10, CXCL13 농도의 AUC는 각각 0.894, 0.716, 0.739로 CXCL9가 가장 구별능이 높은 것으로 나타났으며, 혈장 CXCL9 농도 452.5 pg/mL를 기준으로 하였을 때 쇼그렌증후군 진단에 대한 민감도는 88.89%, 특이도는 80.65%로 나타났다.

Figure 6. ROC curve analysis using plasma chemokine levels. We evaluated the ability of plasma levels of (A) CXCL9, (B) CXCL10 and (C) CXCL13 to discriminate SS patients from all control subjects. CXCL9 showed a better performance in differentiating SS patients from controls than CXCL10 and CXCL13.



고 찰

쇼그렌증후군의 발병 초기 과정에서 선천면역계와 후천면역계를 연결하는 주요한 시토카인으로 제 1형 혹은 제 2형 IFN이 주목을 받고 있으나 (2) 일반적으로 제 1형 및 제 2형 IFN은 Th17 분화를 억제하는 것으로 알려져 있다. 따라서 IFN이 발병기전에서 주된 역할을 하는 전신홍반루푸스 및 쇼그렌증후군 등에서 Th17의 중요한 병인론적인 역할에 대한 증거는 과거와 다른 면역학적 질병 모델을 요구하고 있으며, 자가면역질환에서 IFN과 Th17 세포의 상호 보완적인 역할을 지지하는 근거들이 발표되었다. TLR 반응이 약한 공여자의 수지상세포는 ssRNA에 반응하는 TLR7을 자극할 때 원시 T 세포를 Th1 세포로 분화시키지만, TLR 반응이 강한 공여자의 수지상세포는 IFN-γ 분비 세포가 먼저 관찰되었다가 뒤이어 IL-17A 분비 세포로 분화함이 관찰되어 TLR 반응에 따라 동일한 자극에 의하여 Th1 과 Th17 세포 분화가 이루어질 수 있음을 시사한다 (38, 39). 또 다른 IFN과 Th17 세포의 연결은 Th17 세포의 plasticity이다. 일반적인 Th1 세포는 흉선에서 발달하여 이차성 림프조직으로 이동하는 원시 (naïve) CD4+ Th 세포에서 유래하며 전사인자 T-bet, 케모카인수용체 CXCR3와 CCR5을 특징적으로 발현한다. Th17 세포는 특정 상황에서 Th1 표현형으로 빠르게 분화하여 Th17.1(Th17-1, Th17/Th1 혹은 non-classical Th1) 세포로 변화한다. IL-12 혹은 TNF-α가 높은 농도로 존재하는 경우 Th17 세포는 IFN-γ를 분비하면서

Th1 표현형으로 분화하며 (40), IL-23 혹은 IL-1β의 조건에서 Th17 세포의 TCR을 반복 자극하면 IFN-γ 발현이 증가됨이 관찰되었다 (41). 이러한 Th17.1 세포는 Th17 관련 표지자인 CD161, IL1-R1, IL-23R, IL-17RE, RORC, IL4I1, Tob1 및 CCR6 발현을 유지하면서 IFN-γ, CXCR3 및 T-bet 등 Th1 관련 표지자도 발현할 수 있다 (15, 18, 42). 염증성 장질환에서 병인적인 역할을 하는 염증유발성 Th17 세포 분획은 IL-23 자극시 IFN-γ와 IL-17A를 동시에 분비하는 CCR6+CXCR3+ Th17.1 세포임이 보고되었고 (43), 쇼그렌증후군 환자의 혈액에서도 Th17.1 세포 분획이 증가함이 보고된 바 있다 (19).

낮은 혈중 농도, 짧은 반감기 혹은 항-IFN 항체의 존재로 혈액 내 IFN의 농도는 측정이 어려운 경우가 많아 본 연구에서는 IFN에 의하여 발현 유도되는 Th1 세포 케모카인(CXCL9 및 CXCL10)과 B 세포 케모카인 CXCL13을 측정하였다. 측정 결과 혈장 CXCL9와 CXCL13은 쇼그렌증후군 환자에서 다른 두 군에 비해 유의하게 증가하였고, CXCL10은 쇼그렌증후군 환자에서 비건조증상 대조군에 비해 유의하게 높은 혈장 농도를 보였다.

쇼그렌증후군 동물모델 및 환자를 대상으로 CXCL9와 CXCL10의 발현에 대하여 조사한 기존의 연구는 일관되게 CXCL9 및 CXCL10 발현이 증가함이 보고되었다 (5, 22, 23, 44). 하지만 아직까지 혈중 CXCL9 및 CXCL10 농도나 이들 케모카인 발현 정도와 임상상의 관련성에 대하여 연구가 없는 상황이다. 이전 연구에서 타액선조직, 눈물이나 타액에서 발현이 증가된 것과 마찬가지로 본 연구에서도 혈장 CXCL9 및 CXCL10의 농도는

쇼그렌증후군 환자에서 증가됨을 확인할 수 있었다. 본 연구에서 CXCL9 혹은 CXCL10 농도가 높은 쇼그렌증후군 환자는, 해당 케모카인 농도가 낮은 환자와 비교할 때 높은 질병활성도, 낮은 C4 농도, 높은 IgG 및 B2-MG을 보였다. 특히, 분비선외 임상상이 있는 환자의 비율도 CXCL9 혹은 CXCL10 혈중 농도가 높은 환자에서 유의하게 증가함이 관찰되었다. 특히, CXCL9 농도는 항-Ro/La 항체 농도 및 소타액선의 림프구 침윤정도와 유의한 양의 상관관계를 보였다. 반면에 CXCL10은 소타액선의 림프구 침윤정도와 유의한 상관관계가 없었는데 이는 타액 CXCL10 농도와 국소점수가 연관성이 없다는 기존의 연구와 일치한다 (22). CXCR3는 주로 T 세포에서 발현되며 B 세포에서는 약한 발현을 보이는데, 류마티스 관절염과 다발성 경화증에서 CXCR3 양성 B 세포의 분획이 증가하는 것으로 알려져 있다 (45, 46). 쇼그렌증후군은 점막연관림프조직형 림프종(mucosa associated lymphoid tissue lymphoma)의 발병 위험 증가가 특징적인 자가면역질환이다. 흥미롭게도 위 및 갑상선에 발생한 점막연관림프조직형 림프종에서 CXCR3가 양성인 종양성 B 세포가 관찰되고 고등급 보다는 저등급의 점막연관림프조직형 림프종에 기질세포에서 CXCL9 발현이 우세한다는 보고가 있다 (47). 쇼그렌증후군 환자에서 CXCR3 양성 B 세포 분획에 대한 연구는 아직까지 없지만 기존 연구의 결과는 쇼그렌증후군 환자에서 CXCL9의 발현 증가가 일부 B 세포의 귀소에 관여할 가능성을 시사한다. 또한 본 연구의 낮은 C4 농도와 CXCL9 사이의 연관성과 점막연관림프조직형 림프종 세포의 CXCR3 발현

데이터는 CXCL9이 쇼그렌증후군에서 타액선 림프종 발생 과정에 관여할 수 있을 것으로 생각된다.

CXCL13의 경우 쇼그렌증후군 환자의 침샘조직 및 (27) 혈청에서 농도가 증가함이 확인된 바 있는데 (48), 본 연구에서 이와 일치하는 결과를 얻었다. B 세포 및 Tfh 세포의 귀소과정과 이소성 림프구 군집 형성에 필수적인 역할을 하는 CXCL13은 쇼그렌증후군 환자의 림프구 군집 혹은 이소성 중심종자와 혈관내피세포에서 발현된다 (27, 49). Hernández-Molina G 등의 연구에서 타액 내 CXCL13의 농도는 건강대조군과 차이가 없었으나 (50) Nocturne 등의 연구에서 쇼그렌증후군 환자의 혈액에서 CXCL13 농도가 증가하고 질병활성도가 높은 환자, 항-Ro 항체가 양성인 환자, C4가 낮은 환자, 림프종 발생 환자에서 CXCL13의 농도가 더 높음을 관찰하였다 (48). 본 연구에서도 혈장 CXCL13 농도는 항 Ro/La 항체, IgG 및 β2-MG 농도와 비례하였으며 소타액선의 림프구 침윤 정도(focus grade) 및 ESSDAI와 유의한 양의 상관관계를 보였다 (그림 3). 또한, 고농도의 CXCL13가 측정된 쇼그렌증후군 환자는 저농도로 측정된 환자에 비교하여 낮은 C4 농도가 관찰되어 (표 2) CXCL13과 쇼그렌증후군 환자의 림프종 발생의 연관성을 지지하는 소견으로 판단된다.

본 연구에서는 케모카인 3가지 모두 혈중 농도가 증가하였기에 쇼그렌증후군을 가장 반영하는 케모카인을 확인하기 위하여 ROC 곡선 분석을 시도하였다. 건강대조군을 포함한 전체 76명을 대상으로 쇼그렌증흐군에 대한 ROC 곡선 분석 CXCL9의 AUC가

가장 높게 나타나 3가지 케모카인 중 CXCL9가 쇼그렌증후군을 가장 잘 구별하는 것으로 나타났다 (그림 6). MRL-Fas(lpr) 생쥐에서 길항성 CXCL10 유래 펩타이드를 투약하면 타액선 염증을 억제하는 것이 보고되었지만 (5) CXCL10 결핍보다는 CXCL9 결핍 생쥐에서만 신염이 억제되는 것이 관찰되었다 (51). 쇼그렌증후군 발병기전에서 CXCL10과 CXCL9의 상대적 중요성에 대하여서는 아직 알려진 바 없다. CXCL10은 IFN-α/β 및 IFN-γ를 포함한 다양한 자극에 의하여 발현이 유도되는 반면에 CXCL9의 발현 조절은 IFN-γ에 전적으로 의존하는 차이점이 있어 (52), 쇼그렌증후군에서의 CXCL9의 발현이 비쇼그렌증후군 건조증이나 건강대조군과의 차이를 더 두드러지게 할 가능성이 있다. 또한 쇼그렌증후군 환자의 10%에서 CXCL10에 대한 자가항체가 존재한다는 최근 보고가 있어 해당 케모카인에 대한 항체의 존재가 CXCL10 농도에 따른 질병 구별능을 감소시키는 원인이 될 수도 있을 것으로 생각되는데, 해당 연구에서 CXCL9에 대한 자가항체는 측정되지 않았다 (53).

본 연구에서는 쇼그렌증후군 환자의 혈장에서 Th17 관련 시토카인인 IL-17A, IL-22 및 IL-23의 농도를 측정하였으며 혈장 IL-23 농도가 쇼그렌증후군 환자에서 증가하였으나, 혈장 IL-17A 농도는 쇼그렌증후군 환자에서 비-쇼그렌증후군 건조증상 환자나 비건조증상 대조군과 차이가 없었고 혈장 IL-22 농도는 오히려 쇼그렌증후군 환자에서 유의하게 낮은 것으로 관찰되었다.

기존 연구에서 쇼그렌증후군 환자의 침샘 조직에서 IL-17을 비롯한 Th17 cytokine 발현이 증가하고, IL-17A와 IL-22의 혈중

농도가 증가함이 보고된 바 있다 (12, 13, 54). 하지만, 혈중 IL-17 농도가 대조군과 의미있는 농도 차이를 보이지 않았던 연구도 있고 (6), 대상 환자의 30%에서만 IL-17가 혈청에서 측정된 연구도 있다. Lavoie 등은 혈청 IL-22가 쇼그렌증후군 환자에서 정상 대조군에 비해 높게 측정되고 (12), Tan 등은 눈물 IL-22 농도가 쇼그렌증후군 환자에서 비쇼그렌증후군 안구건조증 환자에 비하여 증가함을 보고하였다 (55). 하지만, 루푸스 환자에서는 정상인에 비해 혈청 IL-22 농도가 감소되어 있다는 보고가 있다 (56, 57). 또한 쇼그렌증후군 유병기간이 길수록 침샘조직에서의 IL-22 발현이 감소하는 것으로 나타난 바 있다 (58). 이러한 상반된 결과는 이질적인 연구 대상 및 측정 방법에 사용한 항체의 종류 등이 원인이 될 수 있으며 혈액에 존재하는 항 시토카인 항체의 존재도 측정에 영향을 주었을 가능성이 있다. 최근 Gupta 등은 전신홍반루푸스, 류마티스관절염 및 쇼그렌증후군 환자의 혈액에서 다양한 시토카인에 대한 항체가 존재하며 쇼그렌증후군 환자의 3-4%에서 IL-17 및 IL-22에 대한 항체가 측정됨을 보고하였다 (53) 본 연구에서 16명 건강대조군 중 10명 (37.5%), 15명 비-쇼그렌증후군 건조증상군 중 9명 (60.0%)에서 IL-22가 측정되었으나 쇼그렌증후군에서는 4명 (8.9%)에서만 IL-22가 측정되었다.

쇼그렌증후군의 소타액선 조직에서 침윤된 림프구 및 세관상피세포에서 IL-23 발현이 증가되어 있고 (6, 11) 혈장에서 IL-23 농도가 증가함이 보고된 바 있으나 (13) IL-23 발현 정도와 쇼그렌증후군 임상상과의 연관성은 보고된 바 없다. 본

연구에서 사후 분석에서 통계적으로 유의성에 도달하지 않지만, 혈장 IL-23 농도는 세 군간에 유의한 분포 차이가 있으며 쇼그렌증후군에서 가장 높아 기존의 연구 결과와 일치하였다. 또한 혈장 IL-23 농도는 IgG와 B2-MG 농도 및 질병활성도와 유의한 상관관계를 보여 쇼그렌증후군의 발병기전에 활동적으로 관여할 가능성을 암시하였다.

본 연구에서 측정한 쇼그렌증후군 환자의 혈장 Th17 관련 시토카인 및 CXCR3 케모카인 농도사이의 관련성 분석에서 혈장 IL-23 농도는 CXCL9 및 CXCL10과 유의한 양의 상관관계가 관찰되었으나 CXCL13과는 의미있는 관련성이 발견되지 않았다. 기존 연구에서 Th17 관련 시토카인 IL-23 혹은 IL-17이 IFN-γ에 의하여 유도되는 CXCL9 및 CXCL10 발현에 기여할 수 있음을 지지하는 근거를 발견할 수 있다. Th17 세포 분화에 필수적인 IL-23은 IFN-γ를 분비하는 Th17 세포의 형성과 증식에도 핵심적인 역할을 함이 보고되었다 (59). 또한, EAE 동물모델에서 항IL-23p19 항체를 투여하면 혈청 및 중추신경계 조직의 IL-17 발현 감소와 함께 조직에서 IFN-γ 및 CXCL10 발현이 감소하였으며 (60) IL-23 결핍 생쥐에서는 결핵균 감염시 폐조직에서 CXCL9 및 CXCL10 발현이 증가하지 않았다 (33). 또한 관상동맥질환 및 전신홍반루푸스 환자의 혈액에서 IL-17 농도가 CXCL10 농도와 양의 상관관계가 있음이 관찰되었으며, 혈관평활근 세포에서 IL-17과 IFN-γ는 CXCL10 발현에 협동작용을 한다 (61, 62). 역으로 CXCR3가 결핍된 MRL/lpr 생쥐의 신장조직에서 IFN-γ 분비성 Th1 세포뿐만 아니라 IL-17 분비성 Th17 세포도 감소됨이

관찰되어 (63), CXCR3 케모카인이 Th17의 조직 침윤에도 관여할 가능성이 제안되었다. 본 연구에서 IL-23 농도와 CXCL13 농도는 상관성이 없었는데, CXCL13은 IFN-γ보다는 IFN-α에 의하여 발현이 조절되므로 (64) IL-23과의 관련성이 CXCL9 및 CXCL10과 다른 양상을 보인 것으로 판단된다.

IL-17 혹은 INF-γ 양성 CD4+ T 세포가 쇼그렌증후군 환자의 소타액선에서 증가되어 있고 (65, 66) Th17.1 세포 분화를 촉발하는 시토카인인 IL-12 및 TNF와 (18) Th17.1 세포 분화에 관여하는 IL-23이 쇼그렌증후군 동물모델 및 쇼그렌증후군 환자의 타액선에서 발현이 증가한다는 점을 고려하면 (6, 18, 66-68), 혈중에서 귀소한 Th17 세포가 타액선 조직 내에서 Th17.1 세포로 분화할 가능성이 있다. Th17 세포 표면에 발현하는 귀소 수용체(trafficking receptors)는 CCR6, CCR4, CXCR5, CCR7, CCR9 등이 알려져 있다. 아직 Th17세포가 외분비샘으로 유입되는데 중요한 케모카인 및 케모카인 수용체가 알려져 있지 않지만, 염증성 장질환, 류마티스관절염, 다발성 경화증에서 Th17세포가 목표장기로 이동하는 데 CCR6/CCL20 축이 중요한 역할을 한다 (69). 하지만, 안구건조증 동물 모델에서 CCR6 리간드인 CCL20 (LARC)을 차단하면 안구건조가 감소함이 보고된바 있음에도 불구하고 (70) 쇼그렌증후군 환자의 소타액선에서 CCL20은 발현되지 않았다 (71). 쇼그렌증후군 환자의 타액선에서 CCR7 및 리간드인 CCL19와 CCL21, CXCR5 및 리간드인 CXCL13의 발현 증가가 보고되어 있어 CCR6 이외의 케모카인 수용체가 관여할 가능성도 있으나 (72), 쇼그렌증후군 혈액에서 CD4+ IL-17+

IFN−γ+ T세포가 증가되어 있다는 점을 (19) 고려하면 혈중 Th17.1세포가 CXCR3/CXCL9 혹은 CXCR3/CXCL10결합을 통하여 외분비선 조직으로 유입할 수도 있다.

본 연구의 쇼그렌증후군 환자에서 전통적인 CXCR3 케모카인인 CXCL9 및 CXCL10 혈중 농도는 Th17 시토카인 IL−23 농도와 비례함을 보이고 IFN 유도성 케모카인인 CXCL9, CXCL10 및 CXCL13 혈중 농도는 임상적 및 면역학적 지표와 유의한 연관성을 보였다. 이러한 결과는 IL−23에 의하여 Th17.1 세포 분화가 촉진되고 이로 인하여 증가된 IFN−γ가 CXCL9/CXCL10 발현을 증가시키는 병인적 과정을 간접적으로 시사하는 것으로 판단된다. 하지만, 아직까지 조직내 CD4+ T 세포에서 Th1, Th17, 혹은 Th17.1 중 어떤 아군이 우세한 것인지 연구된 바 없어 소타액선 조직에서 CXCR3+ IL−17+ 혹은 CD161+ IL−17+ IFN−γ+ T세포의 존재에 대한 추가 연구가 필요하다. 또한 IFN−γ와 IL−17을 모두 분비할 수 있고 IL−23에 의하여 증식하며 CXCR3 음성인 double negative T 세포가 쇼그렌증후군 혈액 및 소타액선에서 증가한다는 보고가 있는데 (73, 74) 본 연구의 IL−23과 CXCL9/CXCL10 사이의 관계는 Th17.1 세포보다는 double negative T cell이 관여할 가능성도 있다.

본 연구는 다음과 같은 제한점을 가지고 있다. 첫째, 연구 대상 환자수가 많지 않은 단면적 연구이다. 하지만 혈액, 타액 혹은 눈물에서 시토카인이나 케모카인을 측정한 기존 연구의 대부분은 30명 미만의 쇼그렌증후군 환자를 대상으로 하였다. 둘째, 증상 발생 후 수 년이 경과된 쇼그렌증후군 환자를 대상으로 함으로써

본 연구의 결과가 발병 초기의 사건을 대표하는 것인지 알 수 없다. 쇼그렌증후군은 외분비샘 기능 변화가 수년에 걸쳐 서서히 진행하므로 증상이 시작된 뒤 7-8년이 지난 후에야 진단 받는 것으로 알려져 있다 (75). 쇼그렌증후군의 동물모델인 NOD 생쥐에서 혈청 IL-17 농도는 나이에 따라 감소하고 완전한 쇼그렌증후군의 임상상이 나타나면 혈액에서 측정되지 않는 것으로 알려져 있다 (6). 한편, 쇼그렌증후군 환자에서는 증상 발현 10년이 경과되지 않은 환자에서는 혈청 IL-17이 측정되지 않았으나 오히려 유병기간이 긴 환자의 혈청에서 증가된다는 보고가 있다 (76). 따라서 유병기간이 혈청 시토카인이나 케모카인의 농도에 영향을 줄 가능성을 배제할 수 없다. 셋째, 연구 대상 쇼그렌증후군 환자 중에서 중등도 이상의 질병활성도 (ESSDAI ≥ 5)를 보인 환자는 8명 (17.8%)에 지나지 않았으며 나머지 환자는 질병활성도가 낮았다. 혈장 시토카인이나 케모카인의 농도가 질병활성도의 영향을 받을 수 있으므로 낮은 질병활성도가 대조군과 유의한 차이를 과소평가되도록 영향을 주었을 수 있다. 넷째, 일부 환자가 혈액 검체 채취 당시 부신피질호르몬제 (n = 2) 또는 히드록시클로로퀸 (hydroxychlolroquine, n = 7)을 복용하고 있었는데, 이러한 약제가 결과에 영향을 미쳤을 가능성도 있다. 하지만, 약물에 의한 Th17 시토카인 및 CXCR3 케모카인의 농도 영향을 유의하지 않았으며 약물 복용력이 없는 환자군과 약물 복용력이 있는 환자군 사이에서 임상적 및 면역학적 변수의 차이는 없었다.

이러한 제한점에도 불구하고 본 연구는 쇼그렌증후군 환자에서

혈액 내 CXCL9 및 CXCL10의 농도를 측정하고 이들의 임상적 의미를 조사한 최초의 연구이며, Th17 시토카인과 CXCR3 케모카인 사이의 관련성을 통하여 IFN-γ와 IL-17 경로의 상호작용이 쇼그렌증후군의 발병기전에서 작동할 수 있다는 근거를 마련하였다는 점에서 의미를 갖는다고 생각된다. 아울러 CXCR3 케모카인 특히 CXCL9의 혈액 농도가 쇼그렌증후군 환자를 유의하게 구별할 수 있어 향후 진단적 생체지표로서 이용할 수 있는 가능성을 제시하였다는 성과가 있었다. 하지만 본 연구의 결과를 확정하기 위하여 타액선 조직 내에서 IFN-γ와 IL-17를 모두 분비하는 T 세포 분획에 대한 연구, 쇼그렌증후군 동물모델을 이용한 IL-23과 CXCR3 케모카인 사이의 연관성에 대한 연구 및 CXCL9의 진단적 가치를 확인하기 위하여 대규모의 환자를 대상으로 한 타당성 연구 등이 추가적으로 필요할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Busch R, Hadjinicolaou AV, Hall FC. Local activation and systemic dysregulation of T lymphocytes in Sjogren's syndrome. Current pharmaceutical biotechnology. 2012;13(10):2009-21.
2. Low HZ, Witte T. Aspects of innate immunity in Sjogren's syndrome. Arthritis research & therapy. 2011;13(3):218.
3. Gestermann N, Mekinian A, Comets E, Loiseau P, Puechal X, Hachulla E, et al. STAT4 is a confirmed genetic risk factor for Sjogren's syndrome and could be involved in type 1 interferon pathway signaling. Genes and immunity. 2010;11(5):432-8.
4. Miceli-Richard C, Comets E, Loiseau P, Puechal X, Hachulla E, Mariette X. Association of an IRF5 gene functional polymorphism with Sjogren's syndrome. Arthritis and rheumatism. 2007;56(12):3989-94.
5. Hasegawa H, Inoue A, Kohno M, Muraoka M, Miyazaki T, Terada M, et al. Antagonist of interferon-inducible protein 10/CXCL10 ameliorates the progression of autoimmune sialadenitis in MRL/lpr mice. Arthritis and rheumatism. 2006;54(4):1174-83.
6. Nguyen CQ, Hu MH, Li Y, Stewart C, Peck AB. Salivary gland tissue expression of interleukin-23 and interleukin-17 in Sjogren's syndrome: findings in humans and mice.

Arthritis and rheumatism. 2008;58(3):734-43.

7. Nguyen CQ, Yin H, Lee BH, Carcamo WC, Chiorini JA, Peck AB. Pathogenic effect of interleukin-17A in induction of Sjogren's syndrome-like disease using adenovirus-mediated gene transfer. Arthritis research & therapy. 2010;12(6):R220.
8. Lin X, Rui K, Deng J, Tian J, Wang X, Wang S, et al. Th17 cells play a critical role in the development of experimental Sjogren's syndrome. Annals of the rheumatic diseases. 2015;74(6):1302-10.
9. Mieliauskaite D, Dumalakiene I, Rugiene R, Mackiewicz Z. Expression of IL-17, IL-23 and their receptors in minor salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. Clinical & developmental immunology. 2012;2012:187258.
10. Kang KY, Kim HO, Kwok SK, Ju JH, Park KS, Sun DI, et al. Impact of interleukin-21 in the pathogenesis of primary Sjogren's syndrome: increased serum levels of interleukin-21 and its expression in the labial salivary glands. Arthritis research & therapy. 2011;13(5):R179.
11. Ciccia F, Guggino G, Rizzo A, Ferrante A, Raimondo S, Giardina A, et al. Potential involvement of IL-22 and IL-22-producing cells in the inflamed salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. Annals of the rheumatic diseases. 2012;71(2):295-301.

12. Lavoie TN, Stewart CM, Berg KM, Li Y, Nguyen CQ. Expression of Interleukin-22 in Sjögren' s Syndrome: Significant Correlation with Disease Parameters. Scandinavian journal of immunology. 2011;74(4):377-82.
13. Katsifis GE, Rekka S, Moutsopoulos NM, Pillemer S, Wahl SM. Systemic and local interleukin-17 and linked cytokines associated with Sjogren's syndrome immunopathogenesis. The American journal of pathology. 2009;175(3):1167-77.
14. Singh N, Cohen PL. The T cell in Sjogren's syndrome: force majeure, not spectateur. Journal of autoimmunity. 2012;39(3):229-33.
15. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. Nat Immunol. 2007;8(6):639-46.
16. Cosmi L, Cimaz R, Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Borriello F, et al. Evidence of the transient nature of the Th17 phenotype of CD4+CD161+ T cells in the synovial fluid of patients with juvenile idiopathic arthritis. Arthritis and rheumatism. 2011;63(8):2504-15.
17. Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, et al. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. Annals of neurology. 2009;66(3):390-402.

18. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. Human T helper type 1 dichotomy: origin, phenotype and biological activities. Immunology. 2015;144(3):343-51.
19. Sudzius G, Mieliauskaite D, Butrimiene I, Siaurys A, Mackiewicz Z, Dumalakiene I. Activity of T-helper cells in patients with primary Sjogren's syndrome. In vivo (Athens, Greece). 2013;27(2):263-8.
20. Lee EY, Lee ZH, Song YW. CXCL10 and autoimmune diseases. Autoimmunity reviews. 2009;8(5):379-83.
21. Coursey TG, Gandhi NB, Volpe EA, Pflugfelder SC, de Paiva CS. Chemokine receptors CCR6 and CXCR3 are necessary for CD4(+) T cell mediated ocular surface disease in experimental dry eye disease. PloS one. 2013;8(11):e78508.
22. Lee YJ, Scofield RH, Hyon JY, Yun PY, Lee HJ, Lee EY, et al. Salivary chemokine levels in patients with primary Sjogren's syndrome. Rheumatology (Oxford, England). 2010;49(9):1747-52.
23. Ogawa N, Ping L, Zhenjun L, Takada Y, Sugai S. Involvement of the interferon-gamma-induced T cell-attracting chemokines, interferon-gamma-inducible 10-kd protein (CXCL10) and monokine induced by interferon-gamma (CXCL9), in the salivary gland lesions of patients with Sjogren's syndrome. Arthritis and rheumatism.

2002;46(10):2730-41.

24. Garcia-Lopez MA, Sancho D, Sanchez-Madrid F, Marazuela M. Thyrocytes from autoimmune thyroid disorders produce the chemokines IP-10 and Mig and attract CXCR3+ lymphocytes. The Journal of clinical endocrinology and metabolism. 2001;86(10):5008-16.
25. Jenh CH, Cox MA, Hipkin W, Lu T, Pugliese-Sivo C, Gonsiorek W, et al. Human B cell-attracting chemokine 1 (BCA-1; CXCL13) is an agonist for the human CXCR3 receptor. Cytokine. 2001;15(3):113-21.
26. Kramer JM, Klimatcheva E, Rothstein TL. CXCL13 is elevated in Sjogren's syndrome in mice and humans and is implicated in disease pathogenesis. Journal of leukocyte biology. 2013;94(5):1079-89.
27. Amft N, Curnow SJ, Scheel-Toellner D, Devadas A, Oates J, Crocker J, et al. Ectopic expression of the B cell-attracting chemokine BCA-1 (CXCL13) on endothelial cells and within lymphoid follicles contributes to the establishment of germinal center-like structures in Sjogren's syndrome. Arthritis and rheumatism. 2001;44(11):2633-41.
28. Corbera-Bellalta M, Planas-Rigol E, Lozano E, Terrades-Garcia N, Alba MA, Prieto-Gonzalez S, et al. Blocking interferon gamma reduces expression of chemokines CXCL9, CXCL10 and CXCL11 and decreases macrophage

infiltration in ex vivo cultured arteries from patients with giant cell arteritis. Annals of the rheumatic diseases. 2015.

29. Qi XF, Kim DH, Yoon YS, Jin D, Huang XZ, Li JH, et al. Essential involvement of cross-talk between IFN-gamma and TNF-alpha in CXCL10 production in human THP-1 monocytes. Journal of cellular physiology. 2009;220(3):690-7.
30. Dixon AE, Mandac JB, Madtes DK, Martin PJ, Clark JG. Chemokine expression in Th1 cell-induced lung injury: prominence of IFN-gamma-inducible chemokines. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology. 2000;279(3):L592-9.
31. Aranday-Cortes E, Bull NC, Villarreal-Ramos B, Gough J, Hicks D, Ortiz-Pelaez A, et al. Upregulation of IL-17A, CXCL9 and CXCL10 in early-stage granulomas induced by Mycobacterium bovis in cattle. Transboundary and emerging diseases. 2013;60(6):525-37.
32. Herbert F, Tchitchek N, Bansal D, Jacques J, Pathak S, Becavin C, et al. Evidence of IL-17, IP-10, and IL-10 involvement in multiple-organ dysfunction and IL-17 pathway in acute renal failure associated to Plasmodium falciparum malaria. Journal of translational medicine. 2015;13:369.
33. Khader SA, Bell GK, Pearl JE, Fountain JJ, Rangel-Moreno

J, Cilley GE, et al. IL-23 and IL-17 in the establishment of protective pulmonary CD4+ T cell responses after vaccination and during Mycobacterium tuberculosis challenge. Nat Immunol. 2007;8(4):369-77.

34. Gopal R, Rangel-Moreno J, Slight S, Lin Y, Nawar HF, Fallert Junecko BA, et al. Interleukin-17-dependent CXCL13 mediates mucosal vaccine-induced immunity against tuberculosis. Mucosal immunology. 2013;6(5):972-84.

35. Vitali C, Bombardieri S, Jonsson R, Moutsopoulos HM, Alexander EL, Carsons SE, et al. Classification criteria for Sjogren's syndrome: a revised version of the European criteria proposed by the American-European Consensus Group. Annals of the rheumatic diseases. 2002;61(6):554-8.

36. Seror R, Ravaud P, Mariette X, Bootsma H, Theander E, Hansen A, et al. EULAR Sjogren's Syndrome Patient Reported Index (ESSPRI): development of a consensus patient index for primary Sjogren's syndrome. Annals of the rheumatic diseases. 2011;70(6):968-72.

37. Seror R, Ravaud P, Bowman SJ, Baron G, Tzioufas A, Theander E, et al. EULAR Sjogren's syndrome disease activity index: development of a consensus systemic disease activity index for primary Sjogren's syndrome.

Annals of the rheumatic diseases. 2010;69(6):1103-9.

38. Marin-Esteban V, Abdul M, Charron D, Haziot A, Mooney N. Dendritic cells differentiated in the presence of a single-stranded viral RNA sequence conserve their ability to activate CD4 T lymphocytes but lose their capacity for Th1 polarization. Clinical and vaccine immunology : CVI. 2008;15(6):954-62.
39. Lombardi V, Van Overtvelt L, Horiot S, Moingeon P. Human dendritic cells stimulated via TLR7 and/or TLR8 induce the sequential production of Il-10, IFN-gamma, and IL-17A by naive CD4+ T cells. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2009;182(6):3372-9.
40. Cohen CJ, Crome SQ, MacDonald KG, Dai EL, Mager DL, Levings MK. Human Th1 and Th17 Cells Exhibit Epigenetic Stability at Signature Cytokine and Transcription Factor Loci. The Journal of Immunology. 2011;187(11):5615-26.
41. Duhen T, Campbell DJ. IL-1beta promotes the differentiation of polyfunctional human CCR6+CXCR3+ Th1/17 cells that are specific for pathogenic and commensal microbes. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2014;193(1):120-9.
42. Maggi L, Santarlasci V, Capone M, Rossi MC, Querci V, Mazzoni A, et al. Distinctive features of classic and nonclassic (Th17 derived) human Th1 cells. European

journal of immunology. 2012;42(12):3180-8.

43. Kleinschek MA, Boniface K, Sadekova S, Grein J, Murphy EE, Turner SP, et al. Circulating and gut-resident human Th17 cells express CD161 and promote intestinal inflammation. The Journal of experimental medicine. 2009;206(3):525-34.

44. Yoon KC, Park CS, You IC, Choi HJ, Lee KH, Im SK, et al. Expression of CXCL9, -10, -11, and CXCR3 in the tear film and ocular surface of patients with dry eye syndrome. Investigative ophthalmology & visual science. 2010;51(2):643-50.

45. Henneken M, Dorner T, Burmester GR, Berek C. Differential expression of chemokine receptors on peripheral blood B cells from patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. Arthritis research & therapy. 2005;7(5):R1001-13.

46. Sorensen TL, Roed H, Sellebjerg F. Chemokine receptor expression on B cells and effect of interferon-beta in multiple sclerosis. Journal of neuroimmunology. 2002;122(1-2):125-31.

47. Ohshima K, Suefuji H, Karube K, Hamasaki M, Hatano B, Tutiya T, et al. Expression of chemokine receptor CXCR3 and its ligand, mig, in gastric and thyroid marginal zone lymphomas. Possible migration and autocrine mechanism.

Leukemia & lymphoma. 2003;44(2):329-36.

48. Nocturne G, Seror R, Fogel O, Belkhir R, Boudaoud S, Saraux A, et al. CXCL13 and CCL11 Serum Levels and Lymphoma and Disease Activity in Primary Sjogren's Syndrome. Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ). 2015;67(12):3226-33.
49. Salomonsson S, Jonsson MV, Skarstein K, Brokstad KA, Hjelmstrom P, Wahren-Herlenius M, et al. Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjogren's syndrome. Arthritis and rheumatism. 2003;48(11):3187-201.
50. Hernandez-Molina G, Michel-Peregrina M, Hernandez-Ramirez DF, Sanchez-Guerrero J, Llorente L. Chemokine saliva levels in patients with primary Sjogren's syndrome, associated Sjogren's syndrome, pre-clinical Sjogren's syndrome and systemic autoimmune diseases. Rheumatology (Oxford, England). 2011;50(7):1288-92.
51. Menke J, Zeller GC, Kikawada E, Means TK, Huang XR, Lan HY, et al. CXCL9, but not CXCL10, promotes CXCR3-dependent immune-mediated kidney disease. Journal of the American Society of Nephrology : JASN. 2008;19(6):1177-89.
52. Groom JR, Luster AD. CXCR3 ligands: redundant,

collaborative and antagonistic functions. Immunology and cell biology. 2011;89(2):207-15.

53. Gupta S, Tatouli IP, Rosen LB, Hasni S, Alevizos I, Manna ZG, et al. Distinct Functions of Anti-interferon Autoantibodies in Systemic Lupus Erythematosus: A Comprehensive Analysis of Anticytokine Autoantibodies in Common Rheumatologic Diseases. Arthritis & rheumatology (Hoboken, NJ). 2016.
54. Fei Y, Zhang W, Lin D, Wu C, Li M, Zhao Y, et al. Clinical parameter and Th17 related to lymphocytes infiltrating degree of labial salivary gland in primary Sjogren's syndrome. Clinical rheumatology. 2014;33(4):523-9.
55. Tan X, Sun S, Liu Y, Zhu T, Wang K, Ren T, et al. Analysis of Th17-associated cytokines in tears of patients with dry eye syndrome. Eye (London, England). 2014;28(5):608-13.
56. Lin J, Yue LH, Chen WQ. Decreased plasma IL-22 levels and correlations with IL-22-producing T helper cells in patients with new-onset systemic lupus erythematosus. Scandinavian journal of immunology. 2014;79(2):131-6.
57. Pan HF, Zhao XF, Yuan H, Zhang WH, Li XP, Wang GH, et al. Decreased serum IL-22 levels in patients with systemic lupus erythematosus. Clinica Chimica Acta. 2009;401(1-2):179-80.

58. Ciccia F, Giardina A, Rizzo A, Guggino G, Cipriani P, Carubbi F, et al. Rituximab modulates the expression of IL-22 in the salivary glands of patients with primary Sjogren's syndrome. Annals of the rheumatic diseases. 2013;72(5):782-3.
59. Duhen R, Glatigny S, Arbelaez CA, Blair TC, Oukka M, Bettelli E. Cutting Edge: The Pathogenicity of IFN-γ-Producing Th17 Cells Is Independent of T-bet. The Journal of Immunology. 2013;190(9):4478-82.
60. Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, Joyce-Shaikh B, Stumhofer JS, McClanahan T, et al. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. The Journal of clinical investigation. 2006;116(5):1317-26.
61. Eid RE, Rao DA, Zhou J, Lo SF, Ranjbaran H, Gallo A, et al. Interleukin-17 and interferon-gamma are produced concomitantly by human coronary artery-infiltrating T cells and act synergistically on vascular smooth muscle cells. Circulation. 2009;119(10):1424-32.
62. Wong CK, Lit LC, Tam LS, Li EK, Wong PT, Lam CW. Hyperproduction of IL-23 and IL-17 in patients with systemic lupus erythematosus: implications for Th17-mediated inflammation in auto-immunity. Clinical immunology (Orlando, Fla). 2008;127(3):385-93.

63. Steinmetz OM, Turner JE, Paust HJ, Lindner M, Peters A, Heiss K, et al. CXCR3 mediates renal Th1 and Th17 immune response in murine lupus nephritis. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2009;183(7):4693-704.
64. Cohen KW, Dugast AS, Alter G, McElrath MJ, Stamatatos L. HIV-1 single-stranded RNA induces CXCL13 secretion in human monocytes via TLR7 activation and plasmacytoid dendritic cell-derived type I IFN. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2015;194(6):2769-75.
65. Sakai A, Sugawara Y, Kuroishi T, Sasano T, Sugawara S. Identification of IL-18 and Th17 cells in salivary glands of patients with Sjogren's syndrome, and amplification of IL-17-mediated secretion of inflammatory cytokines from salivary gland cells by IL-18. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 2008;181(4):2898-906.
66. Fox RI, Kang HI, Ando D, Abrams J, Pisa E. Cytokine mRNA expression in salivary gland biopsies of Sjogren's syndrome. Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950). 1994;152(11):5532-9.
67. Kolkowski EC, Reth P, Pelusa F, Bosch J, Pujol-Borrell R, Coll J, et al. Th1 predominance and perforin expression in minor salivary glands from patients with primary Sjogren's syndrome. Journal of autoimmunity. 1999;13(1):155-62.

68. Yanagi K, Ishimaru N, Haneji N, Saegusa K, Saito I, Hayashi Y. Anti-120-kDa alpha-fodrin immune response with Th1-cytokine profile in the NOD mouse model of Sjogren's syndrome. European journal of immunology. 1998;28(10):3336-45.
69. Kim CH. Migration and function of Th17 cells. Inflammation & allergy drug targets. 2009;8(3):221-8.
70. Dohlman TH, Chauhan SK, Kodati S, Hua J, Chen Y, Omoto M, et al. The CCR6/CCL20 axis mediates Th17 cell migration to the ocular surface in dry eye disease. Investigative ophthalmology & visual science. 2013;54(6):4081-91.
71. Xanthou G, Polihronis M, Tzioufas AG, Paikos S, Sideras P, Moutsopoulos HM. "Lymphoid" chemokine messenger RNA expression by epithelial cells in the chronic inflammatory lesion of the salivary glands of Sjogren's syndrome patients: possible participation in lymphoid structure formation. Arthritis and rheumatism. 2001;44(2):408-18.
72. Carubbi F, Alunno A, Cipriani P, Di Benedetto P, Ruscitti P, Berardicurti O, et al. Is minor salivary gland biopsy more than a diagnostic tool in primary Sjogrens syndrome? Association between clinical, histopathological, and molecular features: a retrospective study. Seminars in arthritis and rheumatism. 2014;44(3):314-24.
73. D'Acquisto F, Crompton T. CD3+CD4-CD8- (double

negative) T cells: saviours or villains of the immune response? Biochemical pharmacology. 2011;82(4):333-40.

74. Alunno A, Carubbi F, Bistoni O, Caterbi S, Bartoloni E, Bigerna B, et al. CD4(-)CD8(-) T-cells in primary Sjogren's syndrome: association with the extent of glandular involvement. Journal of autoimmunity. 2014;51:38-43.
75. Fox RI. Sjogren's syndrome. Lancet (London, England). 2005;366(9482):321-31.
76. Alunno A, Bistoni O, Caterbi S, Bartoloni E, Cafaro G, Gerli R. Serum interleukin-17 in primary Sjogren's syndrome: association with disease duration and parotid gland swelling. Clinical and experimental rheumatology. 2015;33(1):129.

Abstract

Introduction: Sjögren's syndrome (SS) is a systemic autoimmune disease characterized by lymphocytic infiltration into the exocrine glands, leading to dry eye and mouth. Although SS has been considered a Th1-mediated disease, Th17 cells are reported to play a critical role in pathogenesis of SS. Th17 cells can be converted into non-classical Th1 cells (Th17.1) expressing both CXCR3 and CCR6 in inflammatory sites. These cells were observed to increase in peripheral blood of SS patients in a recent study. In this study, plasma levels of CXCR3 chemokines and Th17 cytokines were compared between SS patients and controls and the correlation among their levels and the association between the levels and clinical or immunological variables were investigated.

Method: SS patients (n = 45) and non-SS sicca patients (n = 15) were enrolled and their plasma samples were collected at the diagnosis. Non-sicca volunteers (n = 16) served as controls. Demographic, clinical, and laboratory data including focus score in the minor salivary gland biopsy were obtained and EULAR Sjögren's Syndrome Disease Activity Index (ESSDAI) for SS was calculated. Plasma levels of IL-17, IL-22, IL-23, CXCL9, CXLC10 and CXCL13 were measured using by a magnetic bead-based multiplex assays.

Result: Plasma IL-22 levels were significantly lower in SS group than the other groups, while SS patients tended to have a higher level of IL-23. Plasma levels of CXCL9, CXCL10 and CXCL13 were significantly higher in SS patients than those in other 2 groups. In ROC curve analysis, CXCL9 showed the best performance in differentiating SS patients from control subjects. In SS patients, plasma IL-23 levels showed a positive correlation with CXCL9 or CXCL10 levels and the chemokine levels were positively correlated with each other. IL-23 and CXCR3 chemokine levels showed a positive correlation with ESR, immunoglobulin G, β2-microglobulin and ESSDAI. Additionally, circulating CXCL9 and CXCL13 levels were correlated with anti-Ro titer and salivary lymphocyte infiltration.

Conclusion: Plasma IL-23 and CXCR3 chemokine levels were elevated and correlated with each other in SS. Also, their levels were associated with laboratory values such as ESR, immunoglobulin G or β2-microglobulin and the disease activity in SS. The results suggest that both Th1 and Th17 cells are active players in SS and could support a mutual interaction of Th1 and Th17 cells or a role of Th17-derived Th17.1 cells in the pathogenesis of SS.

Keyword: Sjögren's syndrome, CXCR3 chemokine, Th17 cytokine

Student number: 2013-23509