

## DICAM에 의한 LPS-매개 대식세포 활성화 억제

정연관<sup>1</sup> · 박혜리<sup>1</sup> · 이은주<sup>1</sup> · 정동형<sup>2</sup> · 김건우<sup>1,2</sup> · 최제용<sup>3</sup> · 한승우<sup>1,2</sup>

대구파티마병원 의학연구소<sup>1</sup>, 류마티스내과<sup>2</sup>,  
경북대학교 의학전문대학원 생화학 세포생물학교실<sup>3</sup>

### DICAM Inhibits Activation of Macrophage by Lipopolysaccharide

Youn-Kwan Jung<sup>1</sup>, Hye-Ri Park<sup>1</sup>, Eun-Ju Lee<sup>1</sup>, Dong-Hyoung Jeong<sup>2</sup>,  
Gun-Woo Kim<sup>1,2</sup>, Je-Yong Choi<sup>3</sup>, Seung-woo Han<sup>1,2</sup>

Laboratory for Arthritis and Bone Biology, Fatima Research Institute<sup>1</sup>, Division of Rheumatology,  
Department of Internal Medicine, Daegu Fatima Hospital<sup>2</sup>, Department of Biochemistry and Cell Biology,  
School of Medicine, Kyungpook National University<sup>3</sup>, Daegu, Korea

**Objective.** DICAM, a dual Ig domain containing adhesion molecule, is involved in cell-cell adhesion through direct interaction with  $\alpha v \beta 3$  integrin. In our previous study showing the inhibitory role of DICAM in osteoclast differentiation, we found that DICAM also has a suppressive role in macrophage, the precursor cell of osteoclast. The role of DICAM in macrophage activation at the inflammatory milieu, however, remains obscure.

**Methods.** Expression pattern of DICAM by inflammatory cytokines and lipopolysaccharide (LPS) was studied with RAW264.7, a murine macrophage cell line. To study the role of DICAM on macrophage activation, we stably transduced DICAM, or empty vector, into RAW264.7, and then compared the LPS-mediated activation such as spreading and TNF- $\alpha$  production.

**Results.** DICAM was abundantly expressed in the synovial tissue of collagen-induced arthritis. When we assessed the

expression of DICAM in RAW264.7 cells by mediators of inflammation, inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IFN- $\gamma$ , and M-CSF increased the expression of DICAM; however, LPS decreased. Functionally, DICAM that stably transduced-RAW264.7 cells showed attenuation of LPS-mediated macrophage activation including spreading and TNF- $\alpha$  production. DICAM decreased the phosphorylation of JNK MAP kinase by M-CSF and LPS stimulation, which was corroborated by a decrease in the expression of ITAM-associated receptors including Trem2, Pira1, and Oscar. Finally, a recombinant ectodomain of DICAM suppressed LPS-induced activation of RAW264.7 cells.

**Conclusion.** These results indicate that DICAM acts as a negative regulator of LPS-mediated macrophage activation.

**Key Words.** DICAM, Monocyte, Macrophage, Lipopolysaccharide, RAW264.7 cells

<Received : May 29, 2012, Revised : June 24, 2012, Accepted : June 28, 2012>

Corresponding to : Seung-woo Han, Laboratory for Arthritis and Bone Biology, Fatima Research Institute, Department of Internal Medicine, Daegu Fatima Hospital, 573-31, Sinam4-dong, Dong-gu, Daegu 701-600, Korea. E-mail: kief73@gmail.com

pISSN: 2093-940X, eISSN: 2233-4718

Copyright © 2012 by The Korean College of Rheumatology

This is a Free Access article, which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 서 론

류마티스관절염이나 죽상경화증과 같은 만성 염증성 질환에서 대식세포는 염증성 사이토카인을 분비하고 여러 세포들과의 상호 작용을 통해 염증 반응의 시작과 유지에 중요한 역할을 한다 (1). 류마티스관절염에서 대식세포는 T세포에 항원제시세포 역할을 하여 T세포의 활성화를 도울 뿐 아니라, T 세포가 분비하는 사이토카인 및 직접 접촉을 통해 자신의 활성도 증가된다 (2). 그리고 대식세포가 분비하는 IL-1, TNF- $\alpha$  및 RANKL과 같은 사이토카인은 T 세포와 함께 파골세포를 활성화시켜 뼈의 미란과 손상을 야기한다 (2,3). 대식세포의 주요 사이토카인은 IL-1 $\beta$ 과 TNF- $\alpha$ 로 중성구의 이주 및 활성화를 유도하고 비만세포의 탈과립을 통해 염증반응을 매개한다 (2). 그리고 이들 사이토카인은 활막 섬유아세포에 작용하여 활막 증식 및 염증성 사이토카인 분비를 증가시켜 염증의 유지에 중요한 역할을 한다 (2). 대식세포는 VEGF와 bFGF와 같은 혈관신생에 관여하는 매개 물질들도 분비하여 혈관신생을 통해 염증 반응을 지속하는데 중요한 역할을 한다 (4). 최근 류마티스관절염에 가장 많이 사용되는 생물학적 치료제 대식세포의 주요 사이토카인인 TNF- $\alpha$ 를 차단하는 기전이다 (5). 대식세포는 류마티스관절염의 병태생리의 중앙에 위치하는 중요한 세포로 대식세포의 활성을 조절하는 기전을 밝히고 이를 억제하는 것은 류마티스관절염의 치료에 중요한 의미를 가진다 (2).

대식세포는 단핵구로부터 분화되며 조직 미세환경에 따라 다양한 표현형을 가지게 된다. 제4형 Toll양 수용체(toll-like receptor, TLR)의 리간드인 지질다당질(lipopolysaccharide, LPS)와 T 림프구가 분비하는 인터페론(IFN)- $\gamma$ 와 같은 사이토카인의 영향 하에서 염증성 사이토카인 분비와 탐식작용을 통해 조직 파괴 및 염증반응에 작용하는 M1 대식세포로 분화한다 (1,6,7). 반면 염증 조절 사이토카인인 IL-4나 IL-13이 지배적인 환경에서는 만노스 수용체나 dectin-1, arginase 등을 발현하며 조직수복에 관여하는 M2 대식세포로 분화하게 된다. 이러한 대식세포의 다양한 표현형은 주변 염증환경에 따라 결정되며 단핵구의 대식세포로의 분화를 조절하는 전체적인 메커니즘은 아직 밝혀지지 않았다 (1,6-8).

LPS는 TLR4의 리간드로 대식세포에서 염증성 반응을 연구할 때 중요한 자극원으로 사용된다 (9). LPS는 생쥐 대식세포 세포주인 RAW264.7 세포에서 TLR4를 통한 nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 신호전달계의 활성을 통해 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, nerve growth factor (NGF), inducible nitric oxide synthase (iNOS), cyclooxygenase 2/prostaglandin E2와 같은 염증성 매개물의 발현 및 탐식능을 증가시키는 것으로 알려져 있다 (10-12). LPS를 통한 TLR4 활성화는 IFN- $\gamma$ 와 함께 대식세포를 M1 계열의 대식세포로 분화시킨다 (13). LPS에 의한 대식세포의 활성화를 억제하는 것으로 알려진 내재 단백질로 glutaredoxin-1, angiopoietin-1/Tie2 signaling

pathway, tetraspanin CD9, activin A 등이 있다 (14-17).

최근 본 연구진은 인간연골세포주인 HCS-2/8세포의 cDNA 라이브러리 분석을 통해 DICAM (Dual Ig domain Containing Adhesion Molecule)이라는 새로운 세포 부착 단백을 발견하였다 (18). DICAM은 10개의 exon으로 구성되며 mRNA의 길이는 총 2,192 bp이고 442개의 아미노산을 코딩한다. 구조적으로 DICAM 단백질은 제 1형 막단백질로 N 말단에 signal peptide와 두개의 가변형 면역글로불린 유사 도메인과 하나의 막 통과 부분과 비교적 짧은 세포내 부분으로 구성된다. 단백질의 계통분석을 통해 DICAM이 면역글로불린 슈퍼패밀리의 CTX (cortex thymocyte marker in Xenopus) 그룹에 속하는 단백질로 junctional adhesion molecule (JAM)과 유사하였다 (19). DICAM의 발현 양상을 northern blot과 western blot으로 살펴 본 결과 폐, 신장, 심장, 그리고 배아에서 가장 많이 발현하였고 인체 조직 및 세포주에 광범위하게 발현하였다. 기능적으로 DICAM은  $\alpha$ v $\beta$ 3 인테그린과 특이하게 결합하였고, 각 도메인별 부착능력을 확인한 결과 두 번째 Ig 도메인이 중요하였다 (19). 최근  $\alpha$ v $\beta$ 3 인테그린이 중요하게 작용하는 파골세포의 분화 연구에서 DICAM이 단핵구에서 파골세포로의 분화를 억제함을 발견하였으며, 파골세포 분화의 전 단계인 대식세포로의 분화에도 DICAM이 억제적으로 작용한다는 증거를 발견하였다 (20). 이러한 결과에 바탕하여 LPS에 의한 대식세포의 활성화에서 DICAM의 발현 양상, 작용 및 기전을 규명하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 시약 및 항체

재조합 M-CSF, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IFN- $\gamma$  단백질은 Pepro-Tech (Roche Hill, NJ)에서 구입하였으며, LPS, Blasticidine-S 및 Polybrene은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구입하였다. DICAM에 대한 항체는 토끼에 재조합 DICAM 단백질을 주입하여 실험실에서 직접 제작하였다 (19). 그 외 CD14, p-Erk, p-Jnk, p-I $\kappa$ B, c-Fos에 대한 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA)에서 구입하였으며,  $\beta$ -actin 항체는 Sigma-Aldrich에서 구입하였다.

### 세포 배양 및 형질도입

섬유아세포양 활막세포(FLS)는 류마티스관절염 환자의 무릎 성형술 후 나온 활막 조직에서 분리하였다. 활막 조직을 PBS로 세척한 후 0.1% trypsin (Sigma), 0.1% collagenase P (Boehringer Mannheim, Germany) 및 10% FBS가 포함된 DMEM 배지를 넣고 37°C에서 2시간 반응 시켜 세포를 분리하였다.

생쥐 골수 유래 단핵구는 8주령 생쥐의 대퇴골(Femur)과 경골(Tibia)의 골수에서 분리하였다. 8주령 C57BL/6J 생쥐의 경추를 탈골한 후 대퇴골과 경골을 분리하고 골수를 추출하였다. 추출된 전체 골수 세포를 10% FBS가 포함된

$\alpha$ -MEM 배지에서 하루 동안 배양하여 부착된 세포를 제거한 단핵구 세포만을 얻어 골수유래 단핵구로 사용하였다. 골수유래 단핵구에 DICAM을 과발현 하기 위해 레트로바이러스를 이용하였다. DICAM cDNA를 pMX 벡터에 삽입하여 DICAM retrovirus 벡터를 제작하고 Plat-E세포에 형질도입하여 DICAM과발현 레트로바이러스를 제조하였다. 제조된 DICAM 과발현 레트로바이러스를 골수유래 단핵구에 4  $\mu$ g/mL의 polybrene, 30 ng/mL의 M-CSF와 함께 처리하여 infection 시킨 후 Blasticidine-S를 이용하여 selection하였다.

생쥐 유래 단핵구 세포주인 RAW264.7은 DMEM에 10% FBS가 포함된 배지에서 배양 하였으며, 3일 간격으로 passage를 수행하였다. RAW264.7에 DICAM을 과발현시키기 위해 pcDNA3.1-DICAM 과발현 벡터를 클로닝 한 후 FuGene HD (Roche, Indianapolis, IN)를 이용해서 형질도입 하였다. 400 ng/mL의 G418을 이용해서 형질도입된 세포만을 selection하여 실험에 사용하였다.

#### 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델 제작 및 면역조직화학 염색

4 mg/mL의 우형 제2형 콜라겐(Chondrex, Redmond, Washington)을 complete Freund adjuvant (Chondrex, Redmond, Washington)와 1 : 1로 섞은 후 8주령의 DBA/1J 생쥐의 꼬리 내피에 주사하였다. 1차 접종 3주 후 다시 제2형 콜라겐을 incomplete Freund adjuvant와 혼합한 후 꼬리 내피에 추가 접종하여 관절염을 유발시켰다. 콜라겐 유도 관절염(CIA) 생쥐의 무릎을 분리한 후 4% PFA에 1일 동안 고정시켰다. 고정 후 약 2주 동안 5% EDTA에서 탈회한 후 파라핀에 포매하여 3  $\mu$ m로 절단하였다. 절단된 조직은 재수화 과정을 거친 후 과산화수소로 quenching하고 PBS로 세척하였다. 상온에서 2시간 동안 normal goat serum으로 blocking한 후 DICAM과 CD14에 대한 항체를 4°C에서 밤 동안 처리하였다. 다시 PBS로 세척한 후 2차 항체를 상온에서 1시간 처리하고 DAB Substrate-Chromogen system (DAKO, Denmark)으로 발색하였다.

#### 반정량 RT-PCR 및 real-time PCR

유전자의 발현 양상을 확인하기 위해 RT-PCR 또는 real-time PCR을 수행하였다. 조건에 맞게 세포를 배양한 뒤 Easy Blue (Intron, Sungnam, Korea)를 이용해서 총 RNA를 분리한 뒤 Oligo dT Primer를 이용해서 역전사시켜 cDNA를 합성하였다. 합성한 cDNA를 주형으로 RT-PCR 및 Real-time PCR을 수행하였다. RT-PCR에 사용된 Primer는 다음과 같다. DICAM: CCT GCT TGA CCT GTA TGC A (Forward), GCT ACA GCA AAC TCC ACC A (Reverse); Gapdh: TGA GAA CGG GAA GCT TGT CA (Forward), GGA AGG CCA TGC CAG TGA (Reverse). Real-Time PCR은 SybrGreen (TAKARA, Japan)을 이용해서 수행하였고,

사용한 Primer는 다음과 같다. DICAM: CAG CGG AGG ATG CAA GAC (forward), TAT GGA GCC TGA TCC CTT GT (reverse), Trem2: CAC AGC ACC TCC AGG AAT CAA G (forward), AGG ATG CTG GCT GCA AGA AAC (reverse), Pira1: AGA TTT GCT CTG CAC AAG GTG G (forward), ATT GGC CTC CAG TGG AGC TAC T (reverse), Oscar: CTT CCT TTT GAT CGG CAC ACA (forward), TCG AAA CTG ATG ACC AGT GGC (reverse), Dap12: TCC TGG TGC CTT CTG TTC CTT (forward), TCA CGG AAG AAC AGT CGC ATC (reverse), FcRr: AGC ATG AGA AAC CAC CCC AGT (forward), AAG CAC AGA GGT GAC CAA GAG G (reverse), Gapdh: CCT TGA GAT CAA CAC GTA CCA G (forward), CGC CTG TAC ACT CCA CCA C (reverse).

#### Western blot 분석

각각의 세포에 재조합 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  또는 LPS를 지정된 시간 동안 처리한 후 단백질 분해 효소 저해제가 포함된 RIPA buffer로 세포를 용해 시켰다. 정량하여 동량으로 SDS-PAGE를 수행하고 PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA)으로 transfer 후 5% Skim milk로 상온에서 1시간 동안 blocking 하였다. 분석하고자 하는 여러 단백질에 대한 항체를 5% skim milk에 희석하여 상온에서 1시간 동안 처리하였다. TBS-T buffer로 세척 후 HRP가 결합된 2차 항체를 역시 5% Skim milk에 희석하여 상온에서 1시간 동안 처리하고 세척한 후 ECL solution (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)을 처리하여 X-ray필름으로 현상하였다. 단백질 발현을 정량화하기 위해 Image J 소프트웨어로 densitometric analysis를 시행하였다.

#### 효소 면역법(Enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)

RAW264.7 세포에서 LPS에 의한 TNF- $\alpha$ 의 분비를 확인하기 위해 TNF- $\alpha$  ELISA를 수행하였다. RAW264.7 세포에 DICAM 또는 벡터를 과발현 시킨 후 LPS를 지정된 농도로 처리하여 분비되는 TNF- $\alpha$  양을 ELISA kit (KOMA biotech, Korea)를 통해 측정하였다. 각각의 세포에 LPS 처리 1일 후 Media를 분리하여 TNF- $\alpha$  항체가 coating된 plate에 넣고 상온에서 2시간 동안 반응시킨 후 PBS-T로 세척하였다. Detection 항체를 넣고 2시간 동안 반응시키고 다시 PBS-T로 세척한 다음, HRP가 결합된 2차 항체를 넣고 상온에서 30분 동안 반응 시켰다. PBS-T로 세척 후 발색제를 넣고 20분 동안 발색시켜 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

#### 통계 분석

실험결과는 평균 $\pm$ 표준오차로 나타내었으며, 평균의 차이는 Mann-Whitney U test를 이용하였다. 통계는 SPSS 12.0 for window를 사용하여 분석하였으며, 통계적 유의성

은  $p < 0.05$ 인 경우로 하였다.

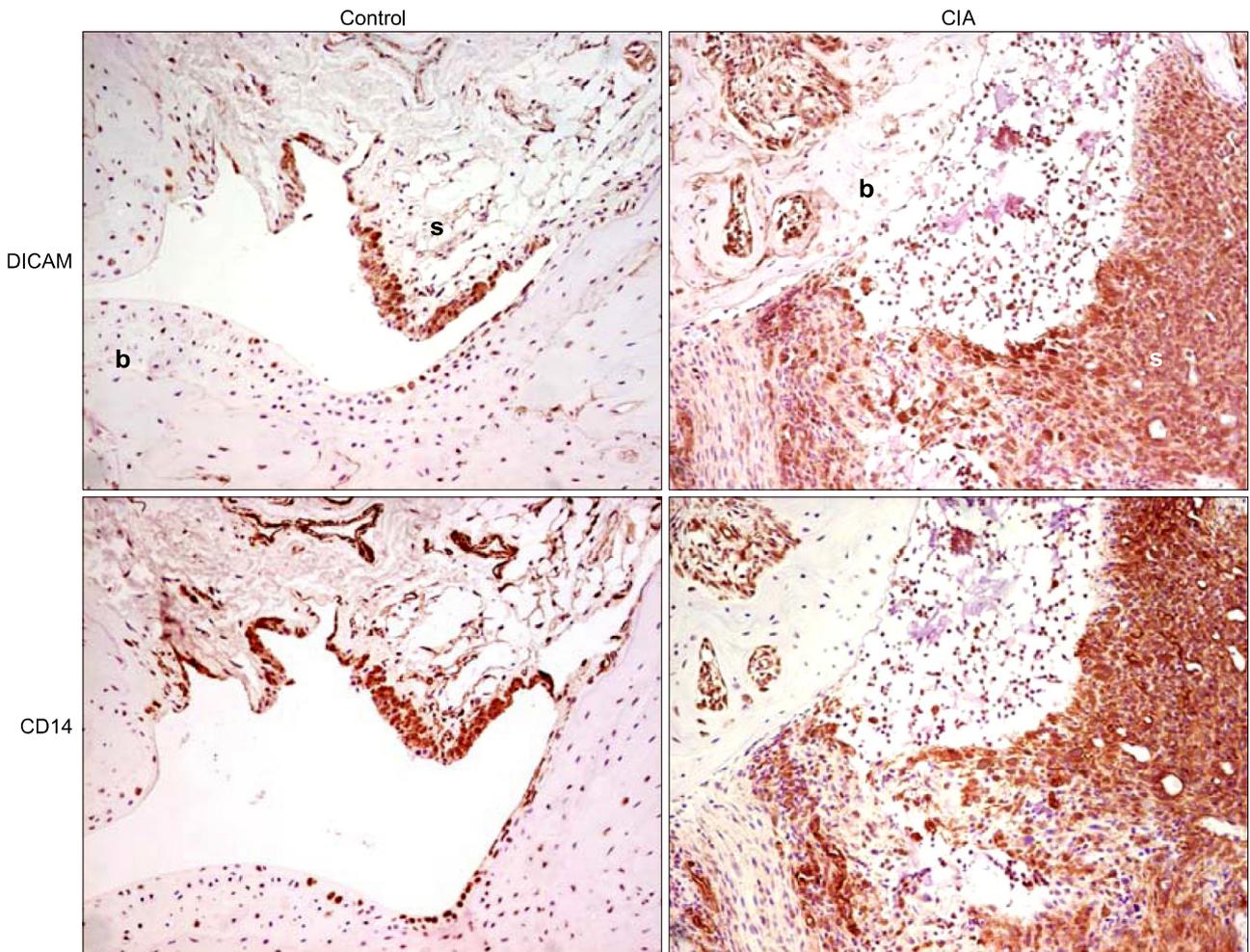
**결 과**

**콜라겐 유발 관절염 조직에서 DICAM의 발현양상**

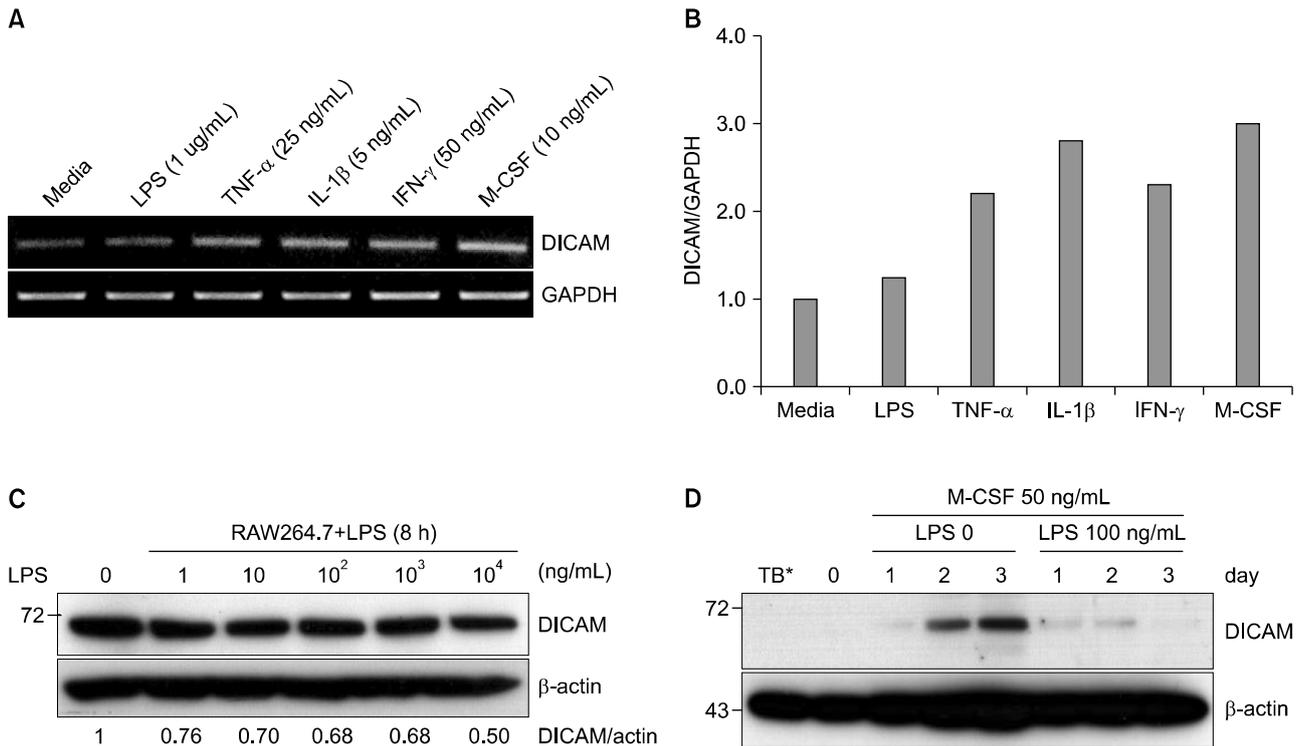
만성 염증성 관절염에서 DICAM의 발현을 확인하기 위해 8주령의 DBA-1/J 생쥐에 2형 콜라겐을 주사하여 콜라겐 유발 관절염(collagen-induced arthritis; CIA)을 유도하였다. 면역조직화학 분석상 정상 관절 조직에서 DICAM은 활막 조직의 lining layer에 주로 발현하였다(Figure 1). 반면, CIA조직에서는 증식된 활막의 lining 및 sublining 조직에 전반적으로 발현되는 양상을 보였다. 이전 연구에서 DICAM이 단핵구 계열 세포에 발현되는 사실에 바탕하여, 단핵구 특이 마커인 CD14의 발현과 비교하였을 때 유사한 발현 양상을 보였다(Figure 1). 이상의 결과는 염증성 관절염 환경에서 DICAM의 발현이 증가되고, 주로 단핵구 계열세포인 A형 활막세포나 염증 반응과정에서 이동한 단핵구/대식세포에 의함을 시사한다.

**염증성 사이토카인과 LPS에 의한 단핵구에서 DICAM의 발현 조절**

다음 단계로 단핵구에서 염증성 사이토카인에 의한 DICAM의 발현 양상을 조사하였다. 생쥐 대식세포 세포주인 RAW264.7 세포에 여러 가지 사이토카인을 처리 한 후 DICAM의 발현을 전사체 수준에서 확인하였다. 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  및 단핵구 성장인자인 M-CSF에 의해 DICAM mRNA의 발현이 증가되었다. 그람 음성 패혈증의 주요 염증 반응 물질인 LPS에 의한 DICAM의 발현 증가는 저명하지 않았다(Figure 2A, B). LPS에 대한 반응을 확인하기 위해 RAW264.7 세포주에 LPS를 농도 별로 처리하고 DICAM의 발현을 Western blot으로 확인하였을 때 LPS 농도 의존적으로 DICAM의 발현이 감소되었다(Figure 2C). C57BL6/J 생쥐 골수 유래 단핵구에서 M-CSF 단독 혹은 LPS와 M-CSF 복합처리에 따른 DICAM의 발현 양상을 확인하였을 때, DICAM은 M-CSF에 의해서는 단핵구 분화 과정에서 증가되었으나 LPS와 M-CSF



**Figure 1.** In vivo expression of DICAM in synovial tissue. Immunohistochemical analyses of DICAM in the ankle joint of control and CIA mice. The ankle joints of the CIA were collected for preparation of paraffin blocks. They were treated with anti-DICAM and anti-CD14, the marker for monocyte/macrophage. Bound Abs was visualized with HRP. Original magnification,  $\times 100$  (s: synovial tissue, b: bone).



**Figure 2.** Regulation of DICAM expression in monocyte by inflammatory cytokines. (A, B) qRT-PCR analyses of DICAM in RAW264.7 cells treated with pro-inflammatory cytokines. The expression of m-RNA of DICAM in RAW264.7 cells was analyzed after 1 day treatment of LPS (1  $\mu$ g/mL), TNF- $\alpha$  (25 ng/mL), IL-1 $\beta$  (5 ng/mL), IFN- $\gamma$  (50 ng/mL), and M-CSF (10 ng/mL). (C) Western blot analyses of DICAM expression by LPS. RAW264.7 cells were treated with various dose of LPS for 8 hr, and then harvested for immunoblotting. (D) LPS suppresses the expression of DICAM by M-CSF. Bone marrow-derived macrophages (BMMs) from C57BL6/J were treated with 50 ng/mL of M-CSF with or without 100 ng/mL of LPS for 3 days, and the expression of DICAM was analyzed with Western blot analysis. \*TB: total BMMs.

를 같이 처리하였을 때는 단백질 수준에서 현저히 감소되었다(Figure 2D).

#### DICAM 과발현에 의한 RAW264.7 세포의 활성화 억제

RAW264.7 단핵구 세포주에 DICAM을 안정하게 과발현시켜 DICAM의 LPS에 의한 대식세포 활성화 과정에서의 역할을 조사하였다. LPS를 농도별로 처리하며 RAW264.7 세포의 형태를 확인하였을 때, DICAM을 과발현한 경우 대조군에 비해 다리를 뺀 활성화 단핵구가 유의하게 감소되었다(Figure 3A, B). 그리고 배양 상층액에서 TNF- $\alpha$ 를 ELISA로 측정하였을 때 DICAM이 과발현된 RAW264.7 세포에서 TNF- $\alpha$ 의 농도가 현저히 감소되었다(Figure 3C). 종합적으로, DICAM이 LPS에 의한 대식세포 활성화 과정에서 억제적으로 작용함을 의미한다.

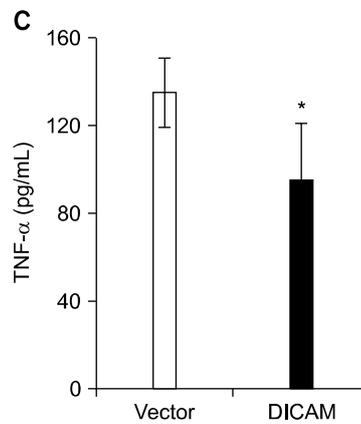
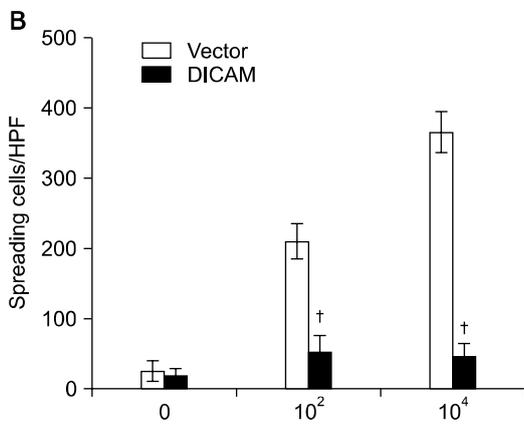
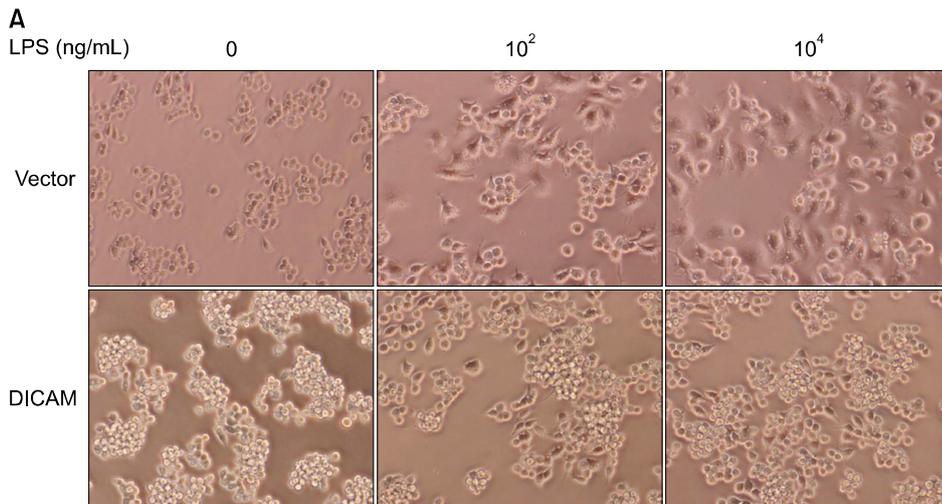
#### DICAM에 의한 대식세포 분화 억제의 분자적 기전 규명

다음 단계로 DICAM에 의한 대식세포 활성화 억제 기전을 확인하기 위해 DICAM 과발현에 의한 M-CSF-c-fms와 LPS-TLR4 신호 전달계의 인산화 차이를 비교하였다. C57BL6/J 생쥐의 골수 단핵구에 레트로바이러스를 이용

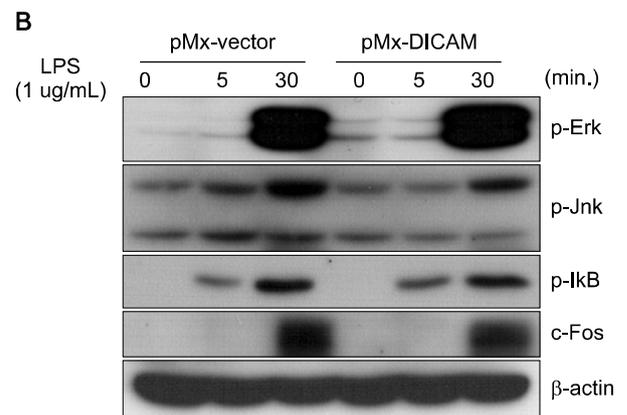
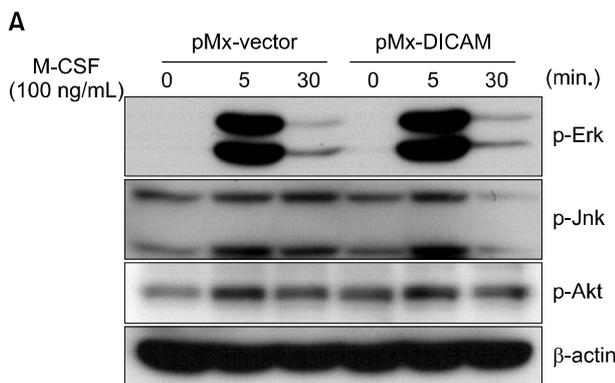
하여 DICAM과 vector를 과발현하였다. 과발현된 세포에 M-CSF-c-fms 신호 전달계의 활성화를 비교하기 위해 M-CSF 처리 후 5분, 30분에 각 신호 단백질의 인산화 정도를 비교하였다. M-CSF-c-fms 신호전달에 MAP kinase와 Akt가 중요한 것으로 알려져 있으며, 이들 가운데 DICAM 과발현된 단핵구에서 JNK MAP kinase 단백질의 인산화가 자극 후 30분에 현저히 감소되었다(Figure 4A). 그리고 LPS-TLR4 신호 전달계에서 중요한 NF- $\kappa$ B와 MAP kinases의 활성화를 비교하였을 때 DICAM 과발현 시 NF- $\kappa$ B의 인산화에는 차이를 보이지 않았으나, JNK MAP kinases가 M-CSF 자극 때와 마찬가지로 감소되었고 하부의 c-Fos 역시 감소된 양상을 보였다(Figure 4B).

#### DICAM에 의한 ITAM 수용체와 그 보조단백의 발현 변화

대식세포 활성화 및 분화에서 ITAM 수용체와 그 보조 단백질은 중요한데, 선행 연구에서 RAW264.7 세포에 DICAM을 과발현 시킨 후 RANKL을 처리할 경우 m-RNA 수준에서 ITAM 수용체인 Trem2와 Pira1의 발현이 현저히 감소함을 확인하였다. 이에 근거하여 골수유래 단핵구(bone marrow-derived monocytes; BMMs)에 DICAM을 과발현 시킨 후



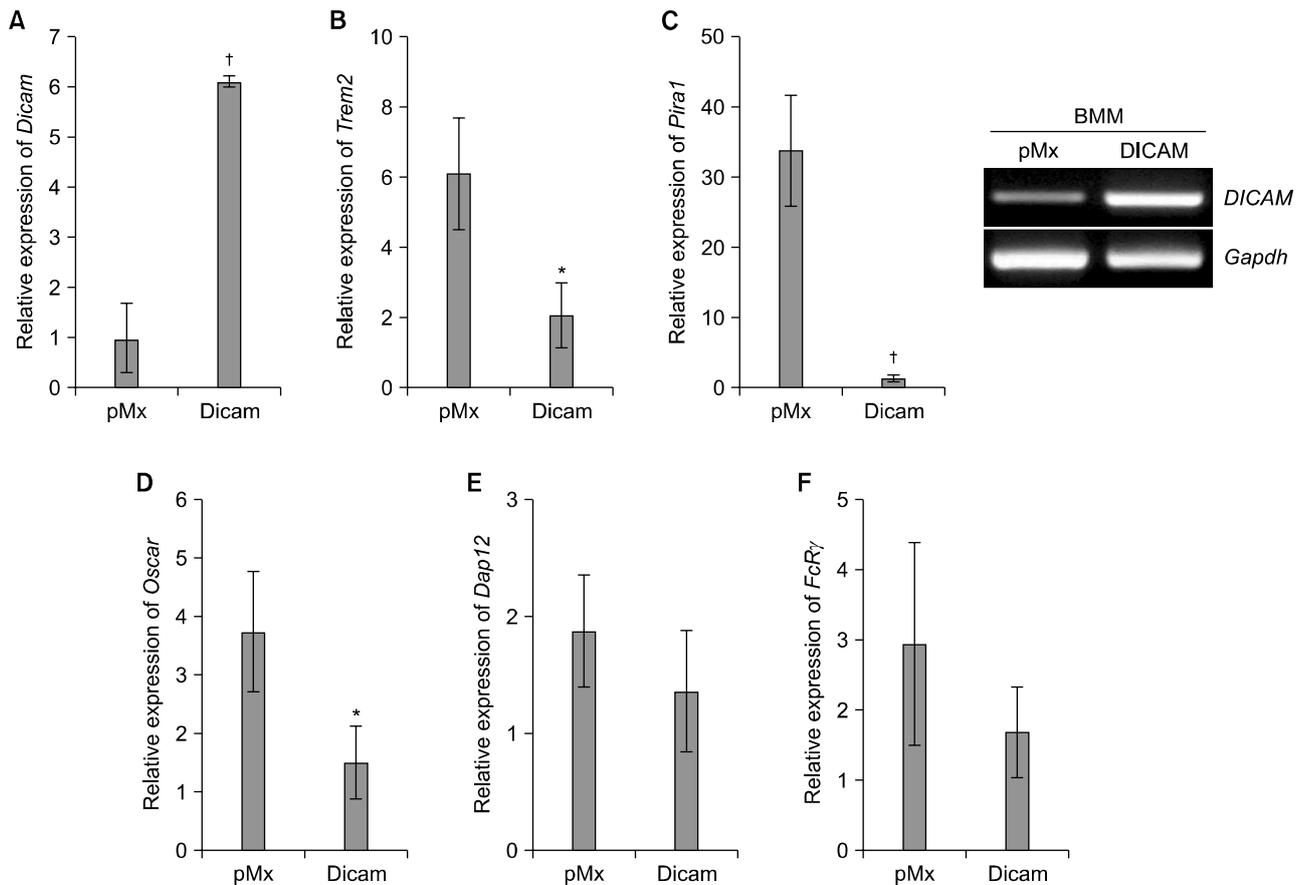
**Figure 3.** DICAM attenuates activation of RAW264.7 cells and production of TNF- $\alpha$ . (A) RAW264.7 cells ( $2.5 \times 10^3$ ) stably transfected with control vector, or DICAM was treated with  $10^2$  ng/mL and  $10^4$  ng/mL of LPS in a 96-well culture plate for 2 days. Then, cell morphology was evaluated by inverted microscopy. (B) Activated spreading cells were quantified under high power field ( $\times 200$ ). (C) Levels of TNF- $\alpha$  in the supernatant were measured by ELISA.  $n=5$ . \* $p < 0.05$ , † $p < 0.01$ , Mann-Whitney U test.



**Figure 4.** DICAM regulates LPS-induced activation of monocyte by modulating the phosphorylation of JNK and expression of c-Fos. (A) BMMs infected with retrovirus expressing DICAM (pMx-DICAM) and control vector (pMx-vector) were stimulated with M-CSF (20 ng/mL) for 3 days, and then starved overnight and stimulated with 100 ng/mL of M-CSF for the indicated time period (0, 5, 30 min). Activation of ERK and JNK MAP kinase and Akt were assessed for phosphorylation by Western blot analysis. (B) Starved BMMs were treated with  $1 \mu\text{g/mL}$  of LPS for the indicated time period (0, 5, 30 min), and then harvested for immunoblotting. Activations of ERK and JNK MAP kinase, and I $\kappa$ B, and the expression of c-Fos were assessed by Western blot analysis.

20 ng/mL의 M-CSF를 3일 간 처리하고 ITAM 관련 수용체의 발현을 비교하였다. Real-time PCR 결과에서 DICAM이 과발현된 골수유래 단핵구에서 ITAM 관련 수용체인

Trem2와 Pira1 및 Oscar의 발현이 현저히 감소되었다 (Figure 5). 반면 ITAM 수용체 보조단백인 Dap12와 FcR $\gamma$ 의 발현에는 차이를 보이지 않았다. 이 결과는 DICAM이



**Figure 5.** DICAM attenuates the expression of ITAM-associated receptor, such as Trem2, Pira1, and Oscar. (A~F) BMMs transduced with pMx-empty vector or pMx-DICAM were cultured for 3 days in the presence of M-CSF (20 ng/mL). Then, total m-RNA were subjected to real-time PCR for evaluating the expression of DICAM and ITAM-associated receptor, such as Trem2, Pira1, Oscar, Dap12, and FcR $\gamma$ . \* $p < 0.05$ , † $p < 0.01$ , Mann-Whitney U test.

이들 ITAM 관련 수용체의 발현 억제를 통해 단백질 활성화 억제에 관여할 가능성이 있음을 보여준다.

#### 재조합 DICAM 단백질 합성과 단백질 활성화 억제 작용 확인

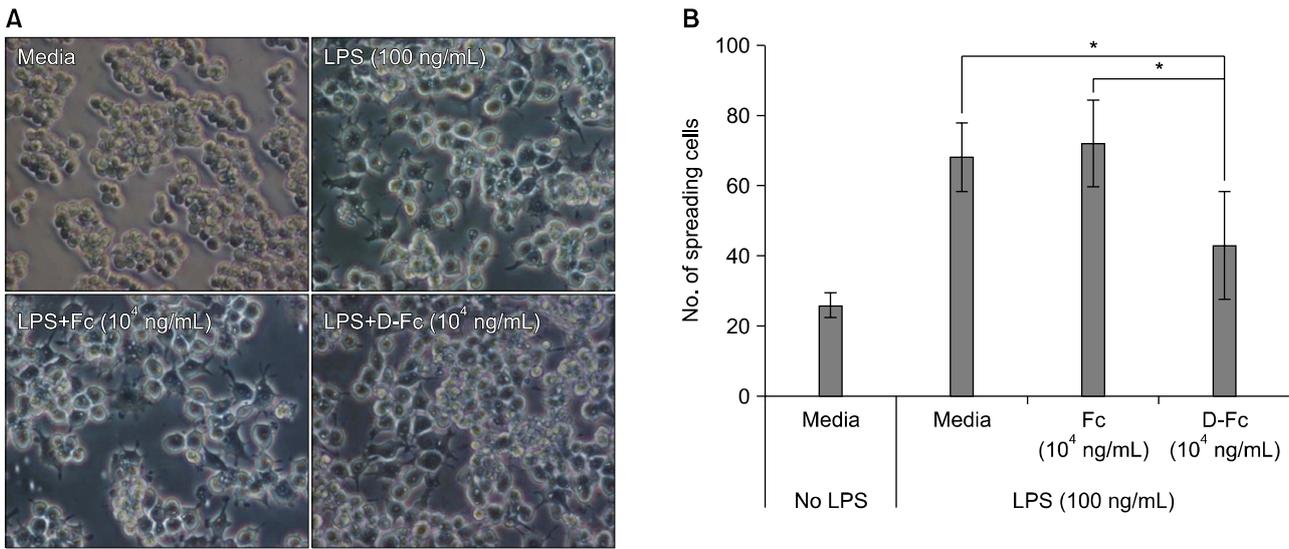
선행연구에서 본 연구진은 DICAM이 인테그린과 직접 결합하고 DICAM의 세포 외 도메인을 처리할 경우에도 파골세포로의 분화가 억제됨을 확인하였다 (20). 이에 근거하여 대식세포 활성화 과정에도 DICAM의 세포 외 단백질이 억제적으로 작용하는지 조사하였다. 재조합 세포 외 DICAM 단백을 RAW264.7 세포에 100 ng/mL의 LPS와 함께 처리하였다. LPS 처리 24시간 후에 다리를 뺀 활성화 세포를 정량화하였을 때 재조합 DICAM 단백을 처리할 경우 활성화된 RAW264.7 세포가 유의하게 감소하였다(Figure 6). 이러한 결과는 DICAM의 억제작용이 부분적으로 세포 외 도메인을 통해 이루어짐을 시사한다.

#### 고찰

본 연구 결과, DICAM은 CIA 관절 조직에서 발현이 증가되었으며, 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , 및 IFN- $\gamma$ ,

그리고 M-CSF에 의해 발현이 증가 되었으나 LPS에 의해서 억제되었다. LPS에 의한 RAW264.7 세포의 활성화에서 DICAM은 억제적으로 작용하였고, TNF- $\alpha$  분비도 감소시켰다. DICAM이 과발현된 골수유래 단백질에서 LPS와 M-CSF에 의한 JNK MAP kinase의 인산화가 감소되었으며, M-CSF 환경에서 TREM2, Pira1, Oscar와 같은 ITAM 연관 수용체의 발현도 감소되었다. DICAM의 세포외 도메인의 재조합 단백을 처리할 경우에도 RAW264.7 세포의 활성화가 억제되었다.

TLR은 선천면역의 주요 패턴인지 수용체로 적응면역과 상호작용하며 류마티스관절염의 발생 및 염증 반응의 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다 (21). 류마티스관절염 활막 조직에는 지금까지 알려진 대부분의 TLR가 발현되며, 특히 TLR4는 류마티스관절염에 중요하게 작용하는 것으로 알려져 있다 (22,23). 동물실험에서 TLR4 억제제를 투여할 경우 CIA 중증도가 감소되고, TLR4 결손 생쥐에서 CIA의 발생 및 중증도가 모두 유의하게 감소된다 (24,25). 또한 LPS 뿐만 아니라 HSP60, HSP70m HSPgp96, fibronectin의 extra domain A, 그리고 히알루론산



**Figure 6.** Extracellular DICAM inhibits macrophage differentiation. (A) RAW264.7 ( $2.5 \times 10^3$ ) cells were cultured for 3 days in the presence of  $10^4$  ng/mL of recombinant Ecto-DICAM purified from *E. coli* and 100 ng/mL of LPS in a 96-well culture plate. The spreading cells were counted for quantification. Fc: Fc (constant) region of immunoglobulin as a negative control, D-Fc: recombinant Ecto-DICAM which has Fc portion for purification. (B) Quantification of spreading cells was presented as a graph. \* $p < 0.05$ , Mann-Whitney U test.

의 oligosaccharide도 TLR4의 리간드로 작용함이 알려졌다 (26-30). 이들 내재적 리간드 가운데 fibronectin III 13-14 도메인이 TLR4 활성화를 통해 관절 손상을 유도하며, 히알루론산의 분해를 억제할 경우 CIA에서 염증성 사이토카인의 분비가 억제됨이 보고되었다 (31-33). TLR4에 억제적으로 작용하는 리간드 외에도, TLR4 신호를 통해 대식세포가 활성화되는 과정에 억제적으로 작용하는 단백질로 heparin-binding protein, fucoidan, thioredoxin-1, 그리고 alpha-1-antitrypsin 등이 알려져 있다 (34-36). 이러한 증거들은 염증 반응 과정에서 발생하는 내재적 TLR4 리간드들이나 단백질이 관절염의 중증도에 관여할 수 있음을 의미한다. 본 연구에서 DICAM은 염증성 사이토카인에 의해 증가되었고, LPS매개 TLR4 활성화에 의한 대식세포의 활성을 억제하는 작용을 보여주었다. 이상의 결과는 TLR4 신호를 억제하는 내재적 단백질로서 DICAM이 만성 염증성 질환의 치료에 응용될 수 있는 후보물질로서의 가능성을 의미한다.

본 연구에서 DICAM이 과발현 될 경우 LPS 자극에 의한 JNK MAP kinase 신호전달이 억제되었다. 이러한 DICAM의 억제 작용이 LPS-TLR4의 직접 억제에 의한 것인지, 이들과 상호작용하는 다른 신호를 억제하는데 기인하는지는 추가적인 연구가 필요하다. 그러나, LPS-TLR4의 하부 신호 가운데 JNK MAP kinase 외에 다른 신호전달계에는 억제작용을 보이지 않는 점은 TLR4와 상호작용 하는 다른 신호전달계 억제에 의한 간접작용의 가능성이 크다고 판단된다. 선행연구에서 DICAM은 인테그린  $\alpha V \beta 3$ 와 직접 결합하여 인테그린 신호전달을 억제함을 확인하였고 (20), 본 연구에서 Trem2, Pira1, Oscar와 같은 ITAM-연관 수용

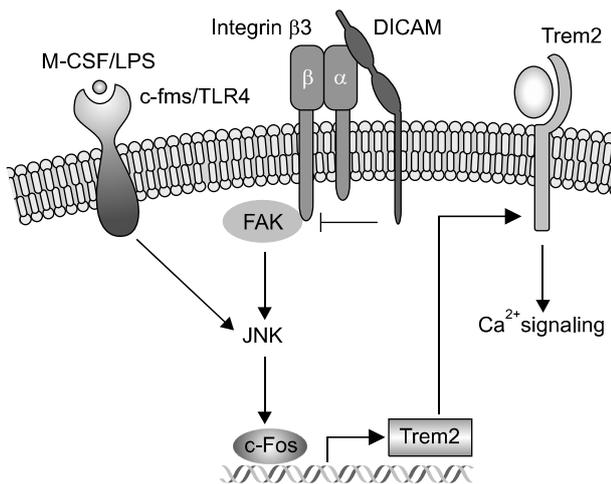
체의 전사체의 발현이 DICAM에 의해 감소됨을 확인하였다(Figure 5). 이런 사실은 DICAM에 의한 LPS-TLR4 신호 억제에 인테그린  $\alpha V \beta 3$ 와 ITAM-연관 수용체가 관여할 가능성을 의미한다 (37-39). 두 가지 가능성 가운데 DICAM의 세포 외 도메인을 처리하는 것만으로 대식세포의 활성화가 억제된 점은 인테그린  $\alpha V \beta 3$  기능 억제가 DICAM의 작용에 중요하게 작용함을 시사한다(Figure 6). TLR4는 MyD88이 핵심 신호전달 어댑터 단백질이고, 인테그린  $\alpha V \beta 3$ 의 경우는 focal adhesion kinase (FAK)이 그 역할을 담당한다. 최근 연구에서 MyD88과 FAK 사이의 상호작용이 보고되었는데, FAK 결손 일차 생쥐태아 섬유모세포에 LPS를 처리할 경우 IL-6의 발현이 증가되지 않아 LPS에 의한 IL-6의 생산에 FAK이 관여함을 의미한다 (40). 반면 LPS에 의한 FAK의 인산화는 MyD88이 결손된 대식세포에서도 감소되지 않아, LPS가 TLR-MyD88을 통하지 않고 인테그린 하부의 FAK을 직접 활성화 시킬 수 있었다 (40). 향후 인테그린  $\alpha V \beta 3$  억제제나 단백질항체를 이용하여 LPS-TLR4에 의한 대식세포의 활성화에 인테그린  $\alpha V \beta 3$ 의 역할에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

외부 사이토카인이나 패턴인지수용체(pattern recognition receptor)를 활성화시키는 자극에 의해 대식세포는 활성화되며, 자극의 종류에 따라 다른 기능을 가지는 대식세포로 분화하게 된다. 최근에는 염증반응에 주로 관여하는 고전적 활성화 대식세포로의 분화를 M1 대식세포라고 부르고, 조직 수복이나 혈관신생에 관여하는 대식세포를 M2 대식세포로 나눈다 (1,6,7). M1 대식세포는 LPS와 IFN- $\gamma$ , 혹은 GM-CSF가 지배적인 환경에서 활성화된 대식세포가 분화

되며 IL-12, IL-23, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 CXCL10 등을 많이 발현하는 표현형을 가지고, M2 대식세포는 IL-4, IL-13, glucocorticoid, TGF- $\beta$ , M-CSF가 많은 환경에서 IL-1ra, IL-10, CCL22, 만노스 및 갈락토스 수용체를 많이 발현한다 (1,6,7). DICAM의 발현을 조사하였을 때 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ , 그리고 M-CSF에 의해 RAW264.7 세포에서 DICAM 전사체의 발현이 증가되었다. 반면 LPS에 의해서는 단백질 수준에서 DICAM의 발현이 감소되었으며, M-CSF에 의한 DICAM의 발현까지 억제하였다(Figure 2). 본 연구의 결과 M1, M2 분화환경 모두에서 DICAM의 발현이 증가되는 것으로 생각되나 LPS에 의해 억제되는 현상의 임상적 의미는 패혈증 동물모델에서 DICAM 과발현을 통해 확인이 필요하다. 그리고, 선행연구의 결과에서 파골세포의 분화를 억제하는 것과 같이, DICAM은 M-CSF에 의해 그 발현이 증가되어 M2 대식세포로의 극성 분화(polarization)를 억제할 가능성이 있다 (20). DICAM에 의해 ITAM-연관 수용체인 Trem2, Pira1, Oscar 등이 감소되는 것도 DICAM에 의한 M2 대식세포로의 polarization 억제에 기인할 가능성이 크다. 향후 DICAM이 M1이나 M2 대식세포로의 polarization에 미치는 영향에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

## 결론

DICAM은 염증성 관절염의 활막 조직에서 증가되어 있었다. DICAM은 RAW264.7 세포주에서 M-CSF나 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$ 와 같은 염증성 사이토카인에 의해 증가되



**Figure 7.** A schematic model of the role of DICAM during macrophage differentiation. Our previous results revealed that DICAM directly interacts with integrin  $\alpha V \beta 3$  and it may suppress the phosphorylation of JNK MAP Kinase by LPS, leading to a down-regulation of c-Fos. It is accompanied by a down-regulation of ITAM-associated receptor, such as Trem2, Pira1, and Oscar, which has a major role in calcium signaling in monocyte activation.

고, LPS에 의해서는 감소되었다. DICAM은 LPS에 의한 단핵구 활성화와 TNF- $\alpha$  분비를 억제하였다. DICAM이 과발현된 대식세포에서 LPS나 M-CSF 자극에 의한 JNK MAP kinase의 인산화가 감소되었고, Trem2, Pira1, Oscar와 같은 ITAM-연관 수용체의 발현이 감소되었다. DICAM의 세포외 도메인만으로 대식세포 분화가 부분적으로 억제되며 인테그린과의 상호작용의 가능성을 시사한다(Figure 7).

## 감사의 글

본 연구는 2010년 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: 2010-A100541).

## 참고문헌

1. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:958-69.
2. McInnes IB, Schett G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat Rev Immunol* 2007;7:429-42.
3. Choi Y, Arron JR, Townsend MJ. Promising bone-related therapeutic targets for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2009;5:543-8.
4. Konisti S, Kiriakidis S, Paleolog EM. Hypoxia--a key regulator of angiogenesis and inflammation in rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2012;8:153-62.
5. Taylor PC, Feldmann M. Anti-TNF biologic agents: still the therapy of choice for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2009;5:578-82.
6. Murray PJ, Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* 2011;11:723-37.
7. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005;5:953-64.
8. Lawrence T, Natoli G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* 2011;11:750-61.
9. Fang H, Pengal RA, Cao X, Ganesan LP, Wewers MD, Marsh CB, et al. Lipopolysaccharide-induced macrophage inflammatory response is regulated by SHIP. *J Immunol* 2004;173:360-6.
10. Jang SI, Kim BH, Lee WY, An SJ, Choi HG, Jeon BH, et al. Stylopine from *Chelidonium majus* inhibits LPS-induced inflammatory mediators in RAW 264.7 cells. *Arch Pharm Res* 2004;27:923-9.
11. Kim JB, Han AR, Park EY, Kim JY, Cho W, Lee J, et al. Inhibition of LPS-induced iNOS, COX-2 and cytokines expression by poncirin through the NF-kappaB inactivation in RAW 264.7 macrophage cells. *Biol Pharm Bull* 2007;30:2345-51.
12. Mukaida N, Ishikawa Y, Ikeda N, Fujioka N, Watanabe S, Kuno K, et al. Novel insight into molecular mechanism of endotoxin shock: biochemical analysis of LPS receptor signaling in a cell-free system targeting NF-kappaB and regulation of cytokine production/action through beta2 integrin in vivo. *J Leukoc Biol* 1996;59:145-51.
13. Rovina P, Jaritz M, Bornancin F. Transcriptional repression of ceramide kinase in LPS-challenged macrophages.

- Biochem Biophys Res Commun 2010;401:164-7.
14. Aesif SW, Anathy V, Kuipers I, Guala AS, Reiss JN, Ho YS, et al. Ablation of glutaredoxin-1 attenuates lipopolysaccharide-induced lung inflammation and alveolar macrophage activation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011;44:491-9.
  15. Gu H, Cui M, Bai Y, Chen F, Ma K, Zhou C, et al. Angiopoietin-1/Tie2 signaling pathway inhibits lipopolysaccharide-induced activation of RAW264.7 macrophage cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;392:178-82.
  16. Suzuki M, Tachibana I, Takeda Y, He P, Minami S, Iwasaki T, et al. Tetraspanin CD9 negatively regulates lipopolysaccharide-induced macrophage activation and lung inflammation. *J Immunol* 2009;182:6485-93.
  17. Wang SY, Tai GX, Zhang PY, Mu DP, Zhang XJ, Liu ZH. Inhibitory effect of activin A on activation of lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophage RAW264.7 cells. *Cytokine* 2008;42:85-91.
  18. Jung YK, Jeong JH, Ryoo HM, Kim HN, Kim YJ, Park EK, et al. Gene expression profile of human chondrocyte HCS-2/8 cell line by EST sequencing analysis. *Gene* 2004;330:85-92.
  19. Jung YK, Jin JS, Jeong JH, Kim HN, Park NR, Choi JY. DICAM, a novel dual immunoglobulin domain containing cell adhesion molecule interacts with alphavbeta3 integrin. *J Cell Physiol* 2008;216:603-14.
  20. Jung YK, Han SW, Kim GW, Jeong JH, Kim HJ, Choi JY. DICAM inhibits osteoclast differentiation through attenuation of the integrin  $\alpha V \beta 3$  pathway. *J Bone Miner Res*. 2012. (In press)
  21. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 2007;7:179-90.
  22. Monaco C, Terrando N, Midwood KS. Toll-like receptor signaling: common pathways that drive cardiovascular disease and rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2011;63:500-11.
  23. Ospelt C, Brentano F, Rengel Y, Stanczyk J, Kolling C, Tak PP, et al. Overexpression of toll-like receptors 3 and 4 in synovial tissue from patients with early rheumatoid arthritis: toll-like receptor expression in early and long-standing arthritis. *Arthritis Rheum* 2008;58:3684-92.
  24. Pierer M, Wagner U, Rossol M, Ibrahim S. Toll-like receptor 4 is involved in inflammatory and joint destructive pathways in collagen-induced arthritis in DBA1J mice. *PLoS One* 2011;6:e23539.
  25. Abdollahi-Roodsaz S, Joosten LA, Roelofs MF, Radstake TR, Matera G, Popa C, et al. Inhibition of Toll-like receptor 4 breaks the inflammatory loop in autoimmune destructive arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56:2957-67.
  26. Bulut Y, Shimada K, Wong MH, Chen S, Gray P, Alsabeh R, et al. Chlamydial heat shock protein 60 induces acute pulmonary inflammation in mice via the Toll-like receptor 4- and MyD88-dependent pathway. *Infect Immun* 2009;77:2683-90.
  27. Triantafilou M, Triantafilou K. Heat-shock protein 70 and heat-shock protein 90 associate with Toll-like receptor 4 in response to bacterial lipopolysaccharide. *Biochem Soc Trans* 2004;32:636-9.
  28. Vabulas RM, Braedel S, Hilf N, Singh-Jasuja H, Herter S, Ahmad-Nejad P, et al. The endoplasmic reticulum-resident heat shock protein Gp96 activates dendritic cells via the Toll-like receptor 2/4 pathway. *J Biol Chem* 2002;277:20847-53.
  29. Okamura Y, Watari M, Jerud ES, Young DW, Ishizaka ST, Rose J, et al. The extra domain A of fibronectin activates Toll-like receptor 4. *J Biol Chem* 2001;276:10229-33.
  30. Termeer C, Benedix F, Sleeman J, Fieber C, Voith U, Ahrens T, et al. Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4. *J Exp Med* 2002;195:99-111.
  31. Campo GM, Avenoso A, D'Ascola A, Prestipino V, Scuruchi M, Nastasi G, et al. Inhibition of hyaluronan synthesis reduced inflammatory response in mouse synovial fibroblasts subjected to collagen-induced arthritis. *Arch Biochem Biophys* 2012;518:42-52.
  32. Sofat N, Robertson SD, Wait R. Fibronectin III 13-14 domains induce joint damage via Toll-like receptor 4 activation and synergize with interleukin-1 and tumour necrosis factor. *J Innate Immun* 2012;4:69-79.
  33. Campo GM, Avenoso A, D'Ascola A, Scuruchi M, Prestipino V, Nastasi G, et al. The inhibition of hyaluronan degradation reduced pro-inflammatory cytokines in mouse synovial fibroblasts subjected to collagen-induced arthritis. *J Cell Biochem* 2012;113:1852-67.
  34. Heinzlmann M, Polk HC Jr, Miller FN. Modulation of lipopolysaccharide-induced monocyte activation by heparin-binding protein and fucoidan. *Infect Immun* 1998;66:5842-7.
  35. Billiet L, Furman C, Larigauderie G, Copin C, Brand K, Fruchart JC, et al. Extracellular human thioredoxin-1 inhibits lipopolysaccharide-induced interleukin-1beta expression in human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 2005;280:40310-8.
  36. Janciauskiene S, Larsson S, Larsson P, Virtala R, Jansson L, Stevens T. Inhibition of lipopolysaccharide-mediated human monocyte activation, in vitro, by alpha1-antitrypsin. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;321:592-600.
  37. Shi C, Simon DI. Integrin signals, transcription factors, and monocyte differentiation. *Trends Cardiovasc Med* 2006;16:146-52.
  38. Faccio R, Takeshita S, Zallone A, Ross FP, Teitelbaum SL. c-Fms and the alphavbeta3 integrin collaborate during osteoclast differentiation. *J Clin Invest* 2003;111:749-58.
  39. Huynh L, Wang L, Shi C, Park-Min KH, Ivashkiv LB. ITAM-coupled receptors inhibit IFNAR signaling and alter macrophage responses to TLR4 and Listeria monocytogenes. *J Immunol* 2012;188:3447-57.
  40. Zeisel MB, Druet VA, Sibilia J, Klein JP, Quesniaux V, Wachsmann D. Cross talk between MyD88 and focal adhesion kinase pathways. *J Immunol* 2005;174:7393-7.