

## $\beta$ ig-h3 절편-RGD 재조합단백의 만성염증성 관절염 치료효과

장지애<sup>1,2</sup> · 강진희<sup>1,2</sup> · 사금희<sup>1,2</sup> · 한승우<sup>1</sup> · 서재석<sup>1</sup> · 김경훈<sup>1</sup> · 남언정<sup>1</sup> · 김인산<sup>2,3</sup> · 강영모<sup>1,2,3</sup>

경북대학교 의학전문대학원 류마티스내과학교실<sup>1</sup>, 생화학세포생물학교실<sup>2</sup>, 경북대학교 세포기질연구소<sup>3</sup>

### Therapeutic Effect of a Recombinant $\beta$ ig-h3 Fragment-RGD Peptide for Chronic Inflammatory Arthritis

Ji Ae Jang<sup>1,2</sup>, Jin Hee Kang<sup>1,2</sup>, Keum Hee Sa<sup>1,2</sup>, Seung Woo Han<sup>1</sup>, Jae Seok Seo<sup>1</sup>,  
Kyung Hoon Kim<sup>1</sup>, Eon Jeong Nam<sup>1</sup>, In San Kim<sup>2,3</sup>, Young Mo Kang<sup>1,2,3</sup>

Division of Rheumatology, Departments of Internal Medicine<sup>1</sup>, Biochemistry and Cellular Biology<sup>2</sup>, Cell and Matrix Research Institute<sup>3</sup>, Kyungpook National University School of Medicine, Daegu, Korea

**Objective.**  $\beta$ ig-h3 is a 68kDa extracellular matrix protein which is overexpressed in synovial tissues of rheumatoid arthritis (RA). Previous results proved that  $\beta$ ig-h3 fragments are relevant to adhesion and migration of synovial fibroblast and angiogenesis through interaction with  $\alpha$ v $\beta$ 3 integrin. We designed a recombinant  $\beta$ ig-h3 protein consisting of a fas-1 domain and RGD motif and evaluated the therapeutic efficacy in RA.

**Methods.** Inhibitory effect of adhesion and migration of NIH3T3 cell line was evaluated in 96 well microtiter and transwell plates coated with  $\beta$ ig-h3. Clinical arthritis index was evaluated after treating CIA mice with MFK12. Immunohistochemical staining in synovial tissues were performed. Expression of transcripts and proteins of inflammatory mediators were analyzed by semi-quantitative RT-PCR and immunoblotting.

**Results.** Recombinant protein consisted of 4<sup>th</sup> fas-1 domain

truncated for H1 and H2 sequences and RGD peptide (MFK12), had M.W. of 10.4kDa.  $\beta$ ig-h3 mediated adhesion and migration of NIH3T3 cell line were significantly inhibited in a dose-dependent manner. Arthritis severity and incidence were efficiently reduced when CIA mice were treated with MFK12 at 30 mg/kg/day compared with the control. Immunohistochemical staining of joint tissues in MFK12 treated mice exhibited reduced angiogenesis. In treated mice, expression of transcripts regarding inflammatory mediators was markedly suppressed and immunoblotting of ICAM-1 and RANKL from whole extract of hind paws also showed a significant reduction.

**Conclusion.** This study shows that MFK12 is effective in treating RA, although further study is warranted to improve the therapeutic efficacy.

**Key Words.** Rheumatoid arthritis, Inflammation,  $\beta$ ig-h3, collagen-induced arthritis, Fas-1

## 서론

류마티스관절염은 만성 염증성 자가면역질환으로서 조직학적으로 초기부터 활막조직 표층에서 섬유아세포양 활

막세포(이하 활막세포)의 증식이 관찰되며, 질병이 진행됨에 따라 염증세포의 침윤이 증가되어 활막조직의 과증식, 혈관신생, 세포외기질의 축적이 나타난다 (1,2). 과증식된

<Received : November 2, 2011, Revised : November 21, 2011, Accepted : November 22, 2011>

Corresponding to : Young Mo Kang, Division of Rheumatology, Kyungpook National University School of Medicine, 50, Samdeok-dong, Jung-gu, Daegu 700-706, Korea. E-mail : ymkang@knu.ac.kr

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.

활막조직은 단백분해효소가 다량 발현되는 파누스를 형성하며, 인접한 연골 및 뼈의 파괴를 일으킨다. 또한 염증세포에서 분비된 TNF- $\alpha$  및 IL-1 $\beta$ 와 같은 염증매개물질이 활막세포와 대식세포의 활성화에 관여하며, 부착분자 및 기질금속 단백분해효소(Matrix metalloproteinase, MMP)의 생산 및 분비를 촉진시킴으로써 연골 및 뼈의 세포외기질 분해를 촉진시킨다 (3).

세포외기질단백은 류마티스 관절조직에 증식되어있는 활막세포, 혈관내피세포, 염증세포의 부착 및 이주, 증식 및 분화를 조절함으로써 염증반응의 유지와 진행에 관여한다 (4,5). 세포외기질에는 콜라겐, glycoprotein, 그리고 proteoglycan 등이 있으며, 그 중에서 transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ )에 의해 유도되는  $\beta$ ig-h3는 상피세포, 내피세포, 케라틴 형성세포, 섬유아세포 및 단핵세포 등 다양한 세포의 부착, 이주 및 분화 등 기능조절에 관여한다 (6).

$\beta$ ig-h3는 4개의 fasciclin 1 (fas-1) 상동도메인과 카르복실기 말단의 아르기닌-글라이신-아스파라트산(RGD) 펩타이드로 구성되어 있는 68 kDa의 기질 단백질이다 (7). Fas-1 도메인에는 티로신(Y)과 히스티딘(H)으로 구성된 YH18모티프가 있으며 이는 다양한 인테그린과의 상호작용을 통해 각막 (6) 및 신세포상피세포 (8), 혈관의 내피세포 (9,10) 및 폐섬유아세포 등과 같은 다양한 세포에서 부착 및 이주 조절에 관여한다. 또한 RGD 펩타이드 역시 vitronectin, fibronectin, osteopontin과 같은 세포외기질의 구성요소로서 인테그린과 결합하여 세포의 부착 및 이주, 증식, 분화에도 관여하며, 다양한 세포의 염증매개물질의 발현을 조절함으로써 염증반응 및 종양의 진행에 관여한다 (11-13).

이전 연구에서  $\beta$ ig-h3가 류마티스관절염 활막조직에 과발현되어있음을 (14) 규명한 바 있으며, 활막세포의  $\beta$ ig-h3-매개 부착저해 실험을 통해 두 번째와 네 번째 fas-1 도메인 각각의 YH18 모티프의 차단효과를 조사한 결과, 네 번째 fas-1 도메인의 YH18에서 더 효과적임을 규명한 바 있다 (15). 하지만 YH18 모티프는 최소활성 단편으로 100  $\mu$ mol/L 이상 높은 농도에서 활성을 나타내며 효율이 매우 낮았다. 이러한 문제를 극복하기 위해 YH18 모티프보다 좀 더 효과적으로 기질-인테그린 상호작용을 차단할 수 있는 새로운 구조의 펩타이드 개발이 필요하다.

본 연구에서는  $\beta$ ig-h3 네 번째 fas-1 도메인과 RGD 펩타이드를 재조합하여 마우스 유래 섬유아세포인 NIH3T3 세포주를 이용하여 부착 및 이주 조절기전을 조사하고, 만성 염증성 관절염 동물모델에서 그 치료효과 및 작용기전을 규명하고자 하였다.

## 대상 및 방법

### 재조합 단백질 합성

야생형 마우스  $\beta$ ig-h3 유전자로부터 H1 및 H2 서열을 제거( $\Delta$ H1 $\Delta$ H2)한 4번째 fas-1 도메인(아미노산 548-620)과 카르복실기 말단의 RGD 펩타이드로 구성된 재조합 단백을

합성하였다 (6,10).  $\beta$ ig-h3의  $\Delta$ H1 $\Delta$ H2 네 번째 fas-1 도메인의 프라이머(forward: 5'-TATCATATGCAAGCCATGCC-3', reverse: 5'-TCACCGAATTCCATGATGTC-3')를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 통해 증폭한 유전자를 pET-29b (Novagen, Darmstadt, Germany) 발현벡터의 *NdeI*/*EcoRI* 자리에 삽입하였다. RGD 코돈을 포함한 프라이머(forward: 5'-AATTCGGAGGACGAGGAGATGGAGGAC-3', reverse: 5'-TCGAGTCTCCATCTCTCTCGTCTCCG-3')를 이용하여 RGD 유전자를 *EcoRI*/*XhoI* 자리에 삽입시켰다. 발현벡터는 BL21 (DE3) 대장균에 넣고 배양하였으며, Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranoside (IPTG) 유도생산하여 단백을 발현시켰다. MFK12 단백을 순분리 과정에서 Triton X-114를 이용하여 지질다당체(LPS)를 제거한 후 LPS 제거 칼럼을 두 번 연속 통과시켜 0.1 EU/마우스 이하로 유지하였다.

### 세포 부착 및 이주 저해실험

마우스의 섬유아세포인 NIH3T3 세포 부착저해실험을 위해 96-well microtitre plate (Costar, Cambridge, MA)에 5  $\mu$ g/mL의 재조합 마우스  $\beta$ ig-h3를 넣고 4°C에서 하룻밤 동안 코팅한 후, 실온에서 2% bovine serum albumin (BSA)이 함유된 phosphate buffered saline (PBS)를 넣어 비특이적인 결합을 차단시켰다. NIH3T3 세포( $5 \times 10^5$  cells/mL)에 재조합 단백질 MFK12를 37°C에서 1시간 동안 전처리한 후, 0.1 mL을 코팅된 well에 넣고 37°C에서 2시간 동안 배양하였으며, 부착되지 않은 세포는 제거하였다. 각 well에 3.75 mM p-nitrophenyl-N-acetyl-D-glycosaminide (hexosaminidase substrate)와 0.25% Triton X-100이 포함된 50 mM citrate buffer (pH 5.0)를 넣고 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 효소활성 중지를 위해 5 mM EDTA (pH 10.4)가 포함된 50 mM glycine buffer로 처리한 후 Multiscan MCC/340 microplate reader (Molecular device, Sunnyvale, CA)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다 (6).

NIH3T3 세포 이주 저해실험을 위해  $\beta$ ig-h3 (5  $\mu$ g/mL)를 구멍크기가 8  $\mu$ m인 transwell (Costar, Cambridge, MA)의 아랫면을 코팅한 후, 2% BSA로 비특이적인 세포의 결합을 차단시켰다. NIH3T3 세포( $1 \times 10^6$  cells/mL)와 MFK12를 37°C에서 1시간 동안 전처리한 후, 0.1 mL씩 transwell 윗칸에 넣고 37°C에서 6시간 동안 배양하였다. 세포를 4% paraformaldehyde로 고정한 후, 0.2% crystal violet으로 염색하여 임의의 9장을 현미경으로 관찰하여 세포 수를 측정하였다 (14).

### 콜라겐 유도 관절염 마우스 모델 제작

콜라겐 유도 관절염(collagen-induced arthritis; CIA) 모델은 6~8주령의 DBA/1J (SLC Inc., Hamamatsu, Japan) 마우스를 이용하였다. 우형 제 2형 콜라겐(bovine CII, Chondrex, Redmond, Washington)을 complete Freund adjuvant (Chondrex, Redmond, Washington)와 혼합하여 마우스 꼬리

에 CII 100  $\mu$ g를 피내 주사하였으며, 면역화한 21일 후에 CII와 incomplete Freund adjuvant (Chondrex, Redmond, Washington)를 혼합한 후 2차 면역화시켰다. 치료효과를 살펴보기 위하여 MFK12는 10 mg/kg 또는 30 mg/kg의 농도로 PBS에 녹인 후 1차 면역화 후 24일째부터 매일 복강 내 투여하였으며, 대조군은 100  $\mu$ L PBS를 투여하였다. 관절염의 심한 정도(clinical arthritis index)는 네 발의 부종과 발작을 평가하였으며 0~4 (0: 부종 없음, 1: 한 개의 관절의 가벼운 부종, 2: 2개 이상 관절의 중등도 부종, 3: 대부분의 관절의 심한 부종, 4: 전체적인 심한 부종)점으로 분류하였다 (16).

### 조직염색 및 면역조직화학 염색법

마우스의 발조직을 얻은 후 피부를 제거하고 10% 포르말린 용액으로 고정시킨 후 10% EDTA 용액에 넣어 탈회과정을 거쳤으며, 탈회된 조직은 3  $\mu$ m 두께의 절편으로 만들었다. 조직절편을 탈파라핀화 시킨 후 100% 메탄올에 0.3% 과산화수소를 넣은 용액을 이용하여 조직 내 비특이적인 과산화효소를 차단시켰다. 관절 및 조직학적 소견을 평가하기 위하여 Hematoxylin-Eosin 염색을 하였으며, 신생혈관 생성 및 내피세포의 분포를 살펴보기 위해 면역조직화학염색을 하였다. 면역조직화학염색은 5% BSA를 이용하여 조직 내 비특이적인 단백질결합을 차단시킨 후, 내피세포 표지자인 CD31 (San Francisco CA, USA) 및 ICAM-1 (BD Bioscience, San Francisco CA, USA)에 대한 일차항체로 배양하였다. 바이오틴이 붙은 이차항체를 실온에서 30 분간 배양하였으며, avidin-biotin-peroxidase complex (Vectastain Elite ABC kit, Vector laboratories)로 반응시킨 후, DAB (Dako, Carpinteria, USA)로 발색시켜 확인하였다.

### 반정량 RT-PCR

관절조직은 추출시약(Easy-spin<sup>TM</sup>, Intron, Sungnam, Korea)을 이용하여 균질화하고 총 RNA를 추출하였다. 총 RNA로부터 AMV 역전사효소(Roche, 0.5  $\mu$ L), oligo dT (Roche, 1  $\mu$ L), 10 mM dNTP (Takara, 2  $\mu$ L), RNase 저해제(Roche, 0.1  $\mu$ L)를 이용하여 first strand cDNA합성을 하였다. cDNA는 프라이머와 Taqman 탐침(Roche, Basel, Switzerland)을 사용하여 LightCycler 480 system (LC480, Roche Diagnostic, Mannheim, Germany)에서 전사체수를 구한 후 18S RNA 전사체와 비교하여 정량화하였으며 정상관절조직의 전사체를 이용하여 normalized ratio를 계산하였다. 실험에 이용된 프라이머는 다음과 같다. 마우스 TNF- $\alpha$  (forward: 5'-CTGTAGCCCACGTCGTAGC-3', reverse: 5'-TTGAGATCCATGCCGTTG-3'), IL-1 $\beta$  (forward: 5'-TGTAATGAAAGACGGCACACC-3', reverse: 5'-TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG-3'), IL-6 (forward: 5'-GAGAAAAGAGTTGTGCAATGGC-3', reverse: 5'-CCAGTTTGGTAGCATCCATCA-3'), CCL-2 (forward: 5'-CATCCACGTGTTGGCTCA-3', reverse: 5'-GATC

ATCTTGCTGGTGAATGAGT-3'), RANKL (forward: 5'-TGAA GACACACTACCTGACTCCTG-3', reverse: 5'-CCACAATGT GTTGAGTTCC-3'), VCAM-1 (forward: 5'-TGGTGAAATG GAATCTGAACC-3', reverse: 5'-CCCAGATGGTGGTTTCCTT-3'), MMP-1 (forward: 5'-TGTGTTTCACAACGGAGACC-3', reverse: 5'-GCCCAAGTTGTAGTAGTTTCCA-3'), MMP-3 (forward: 5'-TGTTCCTTTGATGCAGTCAGC-3', reverse: 5'-GATTTGCGCCAAAAGTGC-3'), 18S RNA (forward: 5'-AAATCAGTT ATGGTTCCTTTGGTC-3', reverse: 5'-GCTCTAGAATTACCAC AGTTATCCAA-3').

### Western blot 분석

순분리한 MFK12 및 관절조직에서 분리한 단백질의 농도는 Bradford 단백질량키트를 이용하여 측정하였다. 단백질은 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE)에서 전기영동한 후, nitrocellulose membrane (PerkinElmer, Waltham, MA)로 옮겼다. 10% skim milk를 넣은 0.1% TBS-T20 용액(20 mm/L Tris-HCl, 137 mm/L NaCl, 0.1% Tween-20)으로 비특이적 결합을 차단하였으며, polyclonal anti- $\beta$ ig-h3 (경북의대 김인산 교수 제공), monoclonal anti-ICAM-1 (Minneapolis, USA)과 anti-RANKL (R&D systems, Minneapolis, USA) 항체들을 이용하여 반응시켰다. Horseradish peroxidase가 붙은 이차항체와 실온에서 한 시간 동안 반응시킨 후 enhanced chemiluminescent kit (GE healthcare, Amersham Bucks, UK)로 발색하였다. 밴드신호 강도는 densitometric scanning으로 결정하고 NIH Image J 소프트웨어로 분석하였다.

### 통계 분석

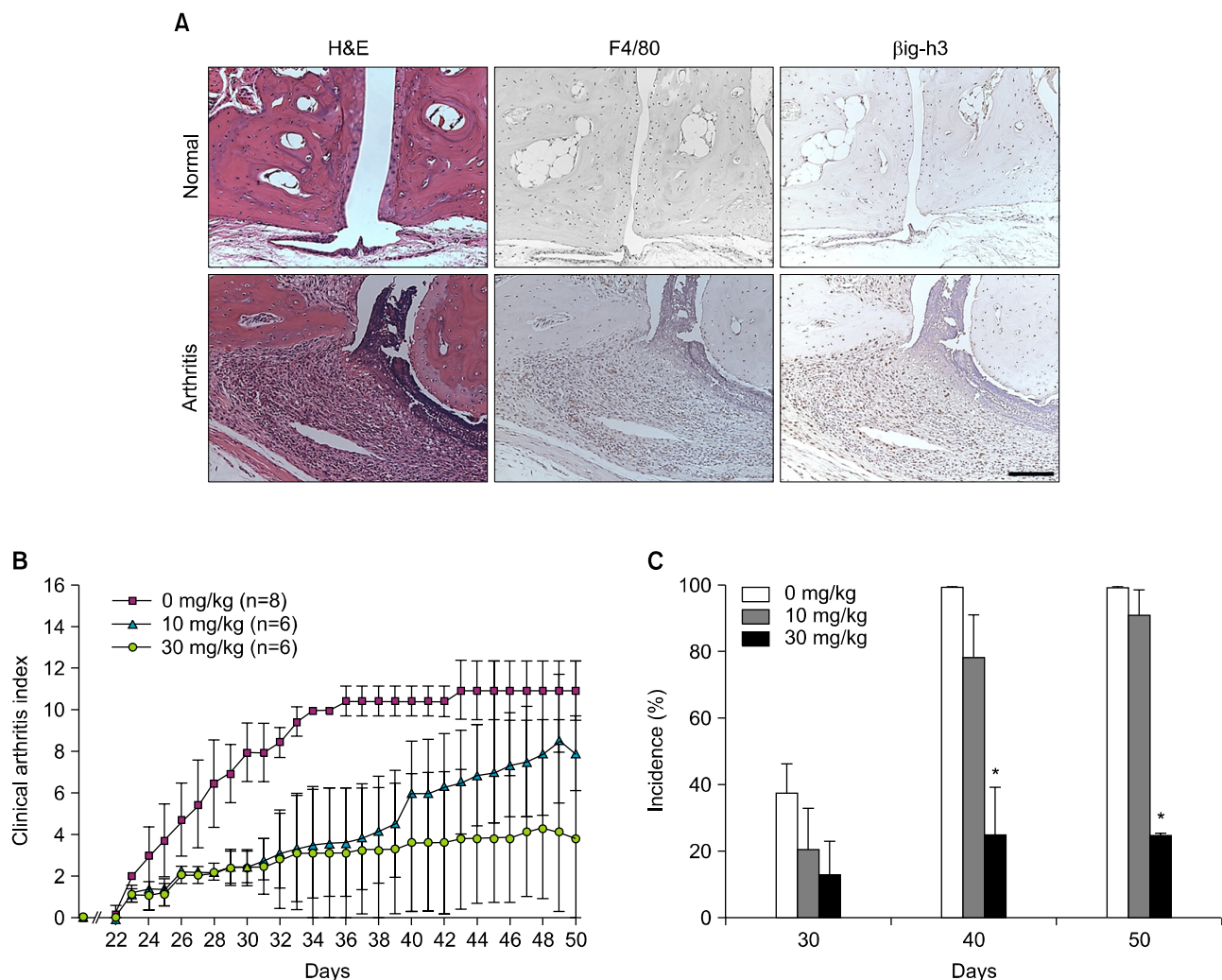
실험결과를 평균 $\pm$ 표준오차로 나타내었으며, 평균의 차이는 Student's *t*-test를 이용하였다. 통계는 SPSS (statistical package for the social science) 10.0 for window를 사용하여 분석하였으며, 통계적 유의성은  $p < 0.05$  인 경우로 하였다.

## 결 과

### MFK12 재조합 단백질의 구조

저자들은  $\beta$ ig-h3의 네 번째 fas-1 도메인의 YH18 모티프가 류마티스관절염 조직에서 분리한 활막세포에서 세포의 부착 및 이주 조절하는 기전을 규명한 바 있다 (15). 그러나 RGD 모티프와 YH18 모티프는 세포 부착과 이주의 기본단위로서 효율적인 기능 조절을 위해서는 펩타이드를 증가시킬 필요가 있을 것으로 추정된다. 본 연구에서는 이를 위해  $\beta$ ig-h3의 네 번째 fas-1 도메인에서 H1 및 H2 서열을 제거한 dhfas-1과 RGD 펩타이드를 연결한 재조합 단백질(MFK12)을 클로닝하였다(그림 1A, B). 순분리한 단백질을 면역블롯팅으로 조사하여 예상 크기인 10.4 kDa의 재조합 MFK12를 확인하였다(그림 1C).





**Figure 3.** MFK12 induces amelioration of collagen-induced arthritis (CIA) where  $\beta$ ig-h3 is unregulated. (A) Immunohistochemical staining of F4/80 and  $\beta$ ig-h3 in joint tissues from normal and CIA mice. Expression of F4/80-expressing macrophages and  $\beta$ ig-h3 in serial sections of joint tissues ( $\times 200$ ). (B&C) Development of arthritis in MFK12-treated mice. From day 22 following the first immunization, mice were treated with MFK12 (0, 10, and 30 mg/kg/day, intraperitoneally). (B) Clinical arthritis index was recorded daily. Values are the mean and SEM. (C) Incidence of arthritis among the four paws was recorded at day 30, 40, and 50 after the first immunization. Values are the mean and SEM. \* $p < 0.05$  versus the control.

이용하여 MFK12의 관절염 치료효과를 평가하였다. CIA 마우스의 관절조직에  $\beta$ ig-h3의 발현을 확인하였으며, 류마티스관절염 활막조직과 마찬가지로 (14)  $\beta$ ig-h3가 과발현되어 있었다(그림 3A). 제 2형 콜라겐으로 마우스를 2차 면역화하였으며, 1차 면역화 후 22일째부터 매일 MFK12를 복강투여(10 mg/kg 및 30 mg/kg)한 치료군과 PBS만 투여한 대조군의 관절염 증증도를 평가하였다. MFK12 10 mg/kg 치료군에서는 1차 면역화 후 39일까지 CAI가 낮은 상태를 유지하였으나 40일 이후부터 급격하게 증가하였다. 이에 비해 MFK12 30 mg/kg 치료군에서는 치료기간 동안 CAI가 지속적으로 낮은 상태를 유지하였다(그림 3B).

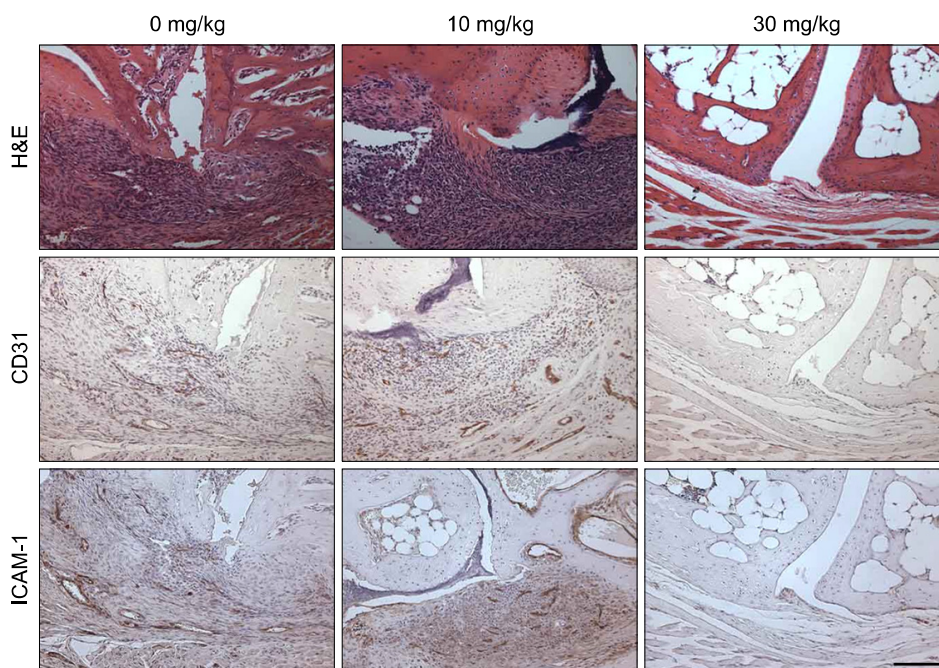
관절염 침범 발의 빈도는 1차 면역화 후 50일째까지 10일마다 관찰하였으며, 저용량 치료군에서는 대조군에 비해

CAI의 차이는 있었으나 발병률은 유사하였다. 고용량 치료군에서는 치료 30일 동안 관절염의 발병률이 대조군의 20% 정도로 통계적으로 유의하게 낮았다(그림 3C). 이 결과는 MFK12가 YH18 모티프에 비해 치료효과를 극대화할 수 있는 치료제로서의 가능성이 있음을 보여준다.

#### MFK12 치료 후 염증세포 침윤 및 매개물질 발현 변화

MFK12를 치료한 관절조직에서 조직학적 차이를 조사하였으며, 저용량 치료군에서는 염증세포의 침윤과 연골 및 뼈의 파괴의 소견이 뚜렷이 발생하였으나 고용량 치료군에서는 이런 소견이 거의 관찰되지 않았다(그림 4). MFK12로 치료한 관절조직에서 염증억제기전을 확인하기 위해 면역화학염색으로 신생혈관 및 ICAM-1 분포를 확인하였다. 그





**Figure 4.** Histologies and immunohistologies of joints tissues from control and MFK-12 treated (10 and 30 mg/kg) CIA mice. Expression of CD31 and ICAM-1 was detected in CIA mice. (Hematoxylin counter stained for immunohistochemical stain,  $\times 200$ ).

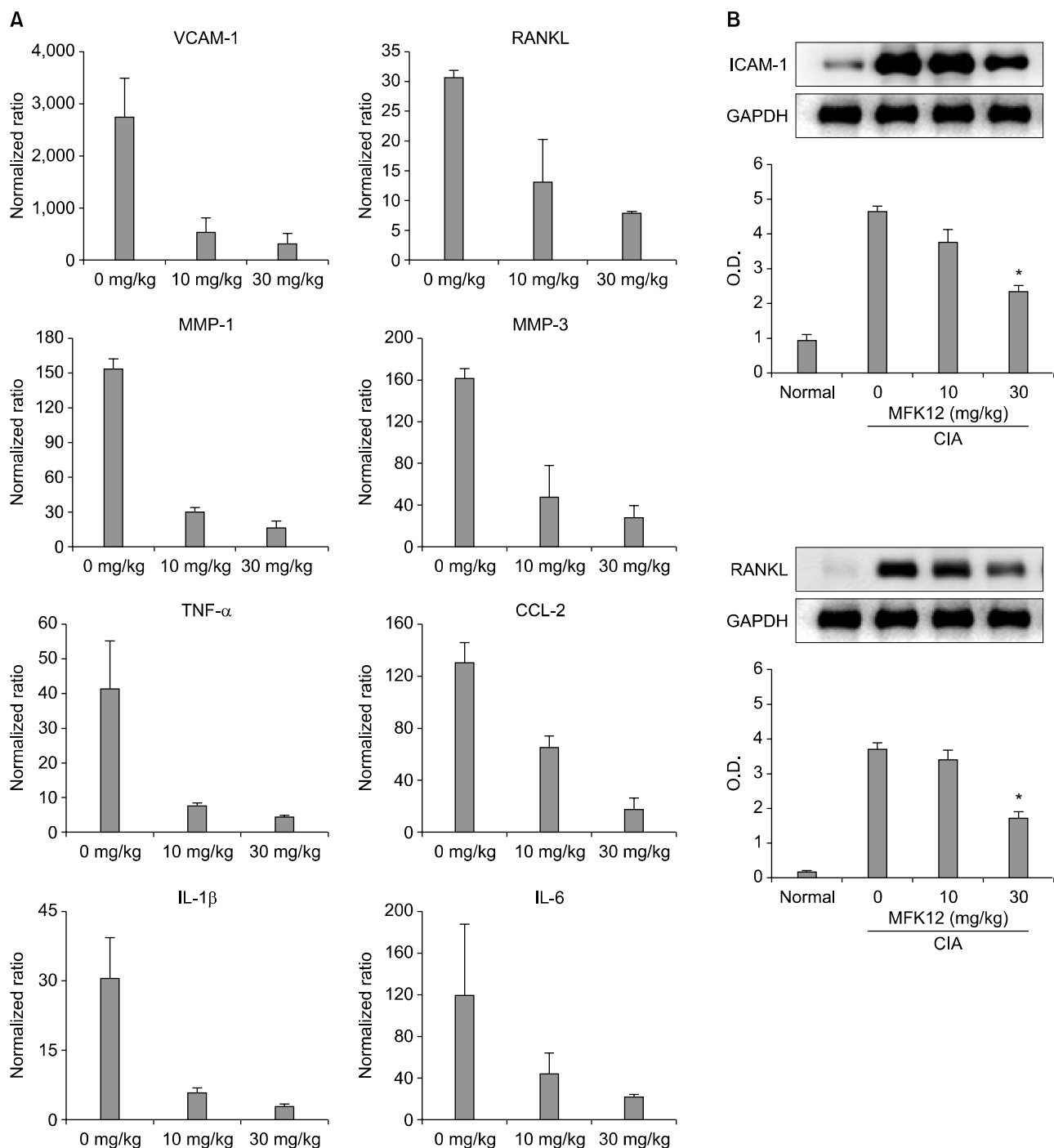
결과 대조군과 저용량 치료군은 신생혈관의 생성(CD31 양성)이 많고 ICAM-1 발현도 높게 나타났으나, 고용량 치료군에서는 신생혈관이 매우 드물었고 ICAM-1도 혈관벽에 미량 발현되어 있었다(그림 4). MFK12 치료군과 대조군의 관절조직을 채취하여 균질화한 후 총 RNA 및 단백을 추출하여 염증매개물질의 발현 정도를 확인하였다. 반정량 RT-PCR을 통해 염증매개물질의 전사체 발현을 조사한 결과,  $TNF-\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ , RANKL, CCL-2, VCAM-1, MMP-1, MMP-3의 전사체는 저용량 치료군에서도 감소하였으나 고용량 치료군에서 보다 일관된 감소소견을 보였다(그림 5A). 하지만 ICAM-1과 RANKL 단백질 발현은 저용량 치료군에는 약간의 감소만 관찰되었으나 고용량 치료군에서는 통계적으로 유의한 감소를 보였다(그림 5B). 이 결과는 MFK12 치료에 의해 염증매개물질의 mRNA 발현과 단백질 생산이 모두 감소되지만 염증매개물질에 따라서는 발현양상에 차이가 있음을 보여준다.

## 고 찰

본 연구 결과,  $\beta ig-h3$ 의 H1, H2부위를 제거한 네 번째 fas-1 도메인(dhfas-1)과 RGD 펩타이드로 재조합한 MFK12는 NIH3T3 세포의  $\beta ig-h3$ -매개 부착 및 이주를 통계적으로 유의하게 저해하였고, YH18 모티프에 비해 저농도에서 효과를 나타내었다. 마우스CIA 모델에서는 MFK12 치료군에서 농도의존적으로 관절염에 대한 치료효과를 나타내었다. 조직학적 소견으로는 활막조직의 과증식, 파누스의 형성, 연골 및 뼈의 파괴를 감소시키면서 혈관신생을 억제하였고 다양한 염증매개물질의 발현을 단백질 및 전사체 수준에서 억제하였다.

류마티스관절염의 활막조직은 섬유아세포양 활막세포가 증식 및 활성화되어 있고, 활막표층 및 하층에 세포외기질 단백질 발현이 증가되어 있는데 이는 미세섬유구성단백, glycosaminoglycan (GAG) 및 fibronectin과 같은 부착성 단백질로 구성되어 있으며 (2), 활막조직 뿐만 아니라 관절액에서도 발현이 뚜렷하게 증가되어 있다 (18,19). 기질의 수용체인 인테그린 역시 활막조직에 과발현되어 있어 세포와 세포외기질 간의 활발한 상호작용이 이루어지고 있다 (20).  $\beta ig-h3$ 는 다른 세포외기질단백에 비해 상대적으로 작은 크기(68 kDa)를 가지며, laminin과 제 1형 및 제 4형 콜라겐 및 fibronectin과 직접적인 원섬유를 형성함으로써, 염증세포나 거주세포의 이주 시 어댑터의 역할을 담당한다 (21,22).

혈관내피세포 및 폐 섬유아세포 연구에서 네 개의 도메인에 있는 YH 모티프들은 정도의 차이가 있으나 모두 세포 부착을 저해할 수 있었다 (6,9,17). 하지만 일부 세포에서는 두 번째와 네 번째 fas-1 도메인이 주로 부착 및 이주 조절을 하는 것으로 밝혀졌다 (8,9,23-25). 각각의 fas-1 도메인 내에 있는 YH18 모티프의 아미노산 서열은 유사성을 나타내지만 조금씩 차이가 있는데, 두 번째 도메인의 티로신은 아르기닌으로 치환되어 있으며, 네 번째 도메인의 YH18 모티프와 유사한 정도의 소수성을 나타낸다 (17). 활막세포에서는 두 번째 fas-1 도메인보다 네 번째 fas-1 도메인에 있는 YH18 모티프에 의해 부착이 더 효율적으로 저해되는 것을 확인하였다 (15). 한편 RGD 펩타이드는  $\alpha 5\beta 1$ ,  $\alpha v\beta 2$ ,  $\alpha v\beta 3$  혹은  $\alpha v\beta 5$  등의 다양한 인테그린과 결합함으로써 세포에 따라 부착, 이주, 성장, 분화 및 세포사멸 작용을 조절한다 (23,26,27). 본 연구결과 MFK12



**Figure 5.** Effect of MFK12 treatment on the expression of inflammatory mediators in CIA mice. (A) Semi-quantitative measurement of transcripts of inflammatory mediators from joint tissues. Transcripts were calculated as target gene/reference gene (18s ribosome RNA) ratios and normalized to the relative expression level of non-arthritis mice. (B) Immunoblotting analysis of ICAM-1 and RANKL for proteins extracted from joint tissues of representative paws. Graphs show the mean and SD optical density (O.D.) from at least 3 independent experiments. The results are means $\pm$ SD (\* $p$ <0.05 versus 0 mg/kg).

는 마우스 섬유아세포의 부착 및 이주를 저농도에서도 매우 효과적으로 억제하였다. 이는 네 번째 dhfas-1과 RGD 펩타이드 각각의 인테그린 결합능으로 인해 상대적으로 소량에 의해서도 세포의 인테그린에 대한 결합 포화도를

높일 수 있었기 때문으로 추정된다. 뿐만 아니라, 네 번째 dhfas-1과 RGD 펩타이드에 의한 인테그린 클러스터링은 야생형  $\beta$ ig-h3의 4개의 상동도메인에 의한 다중결합에 비해 효율이 훨씬 낮아서 세포신호전달 경로를 약화시킬 수

있으며, 이를 통해 세포와 기질간의 상호작용을 조절하는 것으로 추정할 수 있다. 향후 MFK12 단백질에 의한 활막세포, 내피세포, 림프구 및 대식세포 등의 기능조절 기전 규명을 위한 추가 연구가 필요할 것이다.

세포외기질단백을 기반으로 추출한 펩타이드는 인테그린 결합에 의한 세포 활성화 기능조절을 이용하여 질병치료제로서 연구되어 왔다. 제 18형 콜라겐에서 추출한 endostatin (28)은 인테그린  $\alpha 5 \beta 1$  과, 그리고 제 4형 콜라겐에서 추출한 tumstatin (29)은 인테그린  $\alpha v \beta 3$ 와의 결합을 통해 내피세포의 증식, 이주 및 혈관 신생을 저해할 수 있으며 (30), plasminogen에서 추출한 greenstatin과 angiostatin은 VEGF 발현을 조절함으로써 종양의 진행과정에서 혈관신생을 억제한다 (31). 또한 관절염 모델에 angiostatin 발현 유전자를 주입하였을 때 관절염의 치료효과가 있었다(32).  $\beta$ ig-h3에서 추출한 fastatin도 인테그린과의 결합을 통해 혈관신생을 억제하고 단핵구의 부착 및 이주를 저해하는 것으로 보고되었다 (10,33). 그러나 류마티스관절염에서 세포외기질단백 추출 펩타이드를 이용한 관절염 치료제 연구는 세계적으로 매우 부족한 상태며 향후 다양한 기질단백을 기반으로 하는 펩타이드 약제의 개발연구가 필요하다.

새로운 작용기전의 관절염 치료제가 지속적으로 개발되고 있지만 류마티스관절염의 발병에 있어 아직까지 밝혀지지 않은 기전이 많이 남아있다. 그리고 단일 표적을 차단하는 치료제뿐만 아니라 좀 더 작용범위가 넓은 약제의 개발이 필요하다. 당뇨병 및 암과 같은 질환에 있어  $\beta$ ig-h3를 이용한 다양한 기전 연구가 발표되었으나 (10,34,35), 류마티스관절염에서 뚜렷하게 증가되어 있는 (14,15,36)  $\beta$ ig-h3를 이용한 연구의 진행은 부족한 상황이다. 따라서 향후 본 연구에서 규명한 MFK12를 바탕으로 좀 더 낮은 농도에서 보다 효과적인 작용을 나타낼 수 있는 새로운 구조의  $\beta$ ig-h3 기반 재조합 단백질에 대한 연구가 필요하다.

## 결론

류마티스관절염의 진행에 중요한 역할을 담당하는 섬유아세포양 활막세포는 세포외기질단백과 결합하여 활막조직내에서의 이주 및 활성화가 일어난다.  $\beta$ ig-h3 기반 재조합단백인 MFK12는 NIH3T3 세포의 부착 및 이주를 저농도에서도 효과적으로 저해하는 것으로 나타났으며, 관절염 동물 모델에서 관절의 파괴 및 변형, 활막조직의 과증식, 파누스의 형성 등을 억제하였고, 또한 염증매개물질의 발현 역시 현저하게 감소시키는 것으로 확인하였다. 본 연구로  $\beta$ ig-h3 네 번째 fas-1 도메인과 RGD 펩타이드가 류마티스관절염에 있어서 효과적인 치료제로 사용될 가능성을 제시하였다.

## 감사의 글

이 논문 또는 저서는 2006년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임

(KRF-2006-311-E00313).

## 참고문헌

1. Knedla A, Neumann E, Müller-Ladner U. Developments in the synovial biology field 2006. *Arthritis Res Ther* 2007;9:209.
2. Firestein GS. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum* 1996;39:1781-90.
3. Kim JM, Kim KH. Pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J Korean Med Assoc* 2010;53:853-61.
4. Barilla ML, Carsons SE. Fibronectin fragments and their role in inflammatory arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 2000;29:252-65.
5. Tomasini-Johansson BR, Milbrink J, Pejler G. Vitronectin expression in rheumatoid arthritic synovia--inhibition of plasmin generation by vitronectin produced in vitro. *Br J Rheumatol* 1998;37:620-9.
6. Kim JE, Kim SJ, Lee BH, Park RW, Kim KS, Kim IS. Identification of motifs for cell adhesion within the repeated domains of transforming growth factor- $\beta$ -induced gene,  $\beta$ ig-h3. *J Biol Chem* 2000;275:30907-15.
7. Skonier J, Bennett K, Rothwell V, Kosowski S, Plowman G, Wallace P, et al.  $\beta$ ig-h3: a transforming growth factor- $\beta$ -responsive gene encoding a secreted protein that inhibits cell attachment *in vitro* and suppresses the growth of CHO cells in nude mice. *DNA Cell Biol* 1994;13:571-84.
8. Park SW, Bae JS, Kim KS, Park SH, Lee BH, Choi JY, et al.  $\beta$ ig-h3 promotes renal proximal tubular epithelial cell adhesion, migration and proliferation through the interaction with  $\alpha 3 \beta 1$  integrin. *Exp Mol Med* 2004;36:211-9.
9. Nam JO, Kim JE, Jeong HW, Lee SJ, Lee BH, Choi JY, et al. Identification of the  $\alpha v \beta 3$  integrin-interacting motif of  $\beta$ ig-h3 and its anti-angiogenic effect. *J Biol Chem* 2003;278:25902-9.
10. Nam JO, Jeong HW, Lee BH, Park RW, Kim IS. Regulation of tumor angiogenesis by fastatin, the fourth FAS1 domain of  $\beta$ ig-h3, via  $\alpha v \beta 3$  integrin. *Cancer Res* 2005;65:4153-61.
11. Kim JE, Kim SJ, Jeong HW, Lee BH, Choi JY, Park RW, et al. RGD peptides released from  $\beta$ ig-h3, a TGF- $\beta$ -induced cell-adhesive molecule, mediate apoptosis. *Oncogene* 2003;22:2045-53.
12. Ruoslahti E. RGD and other recognition sequences for integrins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1996;12:697-715.
13. Trabocchi A, Menchi G, Cini N, Bianchini F, Raspanti S, Bottoncetti A, et al. Click-chemistry-derived triazole ligands of arginine-glycine-aspartate (RGD) integrins with a broad capacity to inhibit adhesion of melanoma cells and both *in vitro* and *in vivo* angiogenesis. *J Med Chem* 2010;53:7119-28.
14. Nam EJ, Sa KH, You DW, Cho JH, Seo JS, Han SW, et al. Up-regulated transforming growth factor  $\beta$ -inducible gene h3 in rheumatoid arthritis mediates adhesion and migration of synoviocytes through  $\alpha v \beta 3$  integrin: Regulation by cytokines. *Arthritis Rheum* 2006;54: 2734-44.



15. Nam, EJ, Song EJ, Kim JM, Seo JS, Sa KH, Cho HJ, et al.  $\beta$ ig-h3-Mediated Adhesion of Fibroblast-Like Synoviocytes in Rheumatoid Arthritis. *J Korean Rheum Assoc* 2008;15:222-9.
16. Brownlie RJ, Myers LK, Wooley PH, Corrigan VM, Bodman-Smith MD, Panayi GS, et al. Treatment of murine collagen-induced arthritis by the stress protein BiP via interleukin-4-producing regulatory T cells: a novel function for an ancient protein. *Arthritis Rheum* 2006;54:854-63.
17. Kim JE, Jeong HW, Nam JO, Lee BH, Choi JY, Park RW, et al. Identification of motifs in the fasciclin domains of the transforming growth factor- $\beta$ -induced matrix protein  $\beta$ ig-h3 that interact with the  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin. *J Biol Chem* 2002;277:46159-65.
18. Clemmensen I, Hølund B, Andersen RB. Fibrin and fibronectin in rheumatoid synovial membrane and rheumatoid synovial fluid. *Arthritis Rheum* 1983;26:479-85.
19. Vartio T, Vaheri A, Von Essen R, Isomäki H, Stenman S. Fibronectin in synovial fluid and tissue in rheumatoid arthritis. *Eur J Clin Invest* 1981;11:207-12.
20. Nikkari L, Aho H, Yli-Jama T, Larjava H, Jalkanen M, Heino J. Expression of integrin family of cell adhesion receptors in rheumatoid synovium.  $\alpha$ 6 integrin subunit in normal and hyperplastic synovial lining cell layer. *Am J Pathol* 1993;142:1019-27.
21. Kim JE, Park RW, Choi JY, Bae YC, Kim KS, Joo CK, et al. Molecular properties of wild-type and mutant  $\beta$ IG-H3 proteins. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002;43:656-61.
22. Sarkissian M, Lafyatis R. Integrin engagement regulates proliferation and collagenase expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *J Immunol* 1999;162:1772-9.
23. LeBaron RG, Bezverkov KI, Zimmer MP, Pavelec R, Skonier J, Purchio AF.  $\beta$ IG-H3, a novel secretory protein inducible by transforming growth factor- $\beta$ , is present in normal skin and promotes the adhesion and spreading of dermal fibroblasts in vitro. *J Invest Dermatol* 1995;104:844-9.
24. Kim JE, Kim EH, Han EH, Park RW, Park IH, Jun SH, et al. A TGF- $\beta$ -inducible cell adhesion molecule,  $\beta$ ig-h3, is downregulated in melorheostosis and involved in osteogenesis. *J Cell Biochem* 2000;77:169-78.
25. Lee BH, Bae JS, Park RW, Kim JE, Park JY, Kim IS.  $\beta$ ig-h3 triggers signaling pathways mediating adhesion and migration of vascular smooth muscle cells through  $\alpha$ v $\beta$ 5 integrin. *Exp Mol Med* 2006;38:153-61.
26. Lutz R, Pataky K, Gadhari N, Marelli M, Brugger J, Chiquet M. Nano-stenciled RGD-gold patterns that inhibit focal contact maturation induce lamellipodia formation in fibroblasts. *PLoS One* 2011;6:e25459.
27. Yoon SH, Mofrad MR. Cell adhesion and detachment on gold surfaces modified with a thiol-functionalized RGD peptide. *Biomaterials* 2011;32:7286-96.
28. Thomas JP, Arzooonian RZ, Alberti D, Marnocha R, Lee F, Friedl A, et al. Phase I pharmacokinetic and pharmacodynamic study of recombinant human endostatin in patients with advanced solid tumors. *J Clin Oncol* 2003;21:223-31.
29. Maeshima Y, Yerramalla UL, Dhanabal M, Holthaus KA, Barbashov S, Kharbada S, et al. Extracellular matrix-derived peptide binds to  $\alpha$ (v) $\beta$ (3) integrin and inhibits angiogenesis. *J Biol Chem* 2001;276:31959-68.
30. Sudhakar A, Sugimoto H, Yang C, Lively J, Zeisberg M, Kalluri R. Human tumstatin and human endostatin exhibit distinct antiangiogenic activities mediated by  $\alpha$ v $\beta$ 3 and  $\alpha$ 5 $\beta$ 1 integrins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:4766-71.
31. Hajitou A, Grignet C, Devy L, Berndt S, Blacher S, Deroanne CF, et al. The antitumoral effect of endostatin and angiostatin is associated with a down-regulation of vascular endothelial growth factor expression in tumor cells. *FASEB J* 2002;16:1802-4.
32. Kato K, Miyake K, Igarashi T, Yoshino S, Shimada T. Human immunodeficiency virus vector-mediated intra-articular expression of angiostatin inhibits progression of collagen-induced arthritis in mice. *Rheumatol Int* 2005;25:522-9.
33. Kim HJ, Kim IS. Transforming growth factor- $\beta$ -induced gene product, as a novel ligand of integrin  $\alpha$ M $\beta$ 2, promotes monocytes adhesion, migration and chemotaxis. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40:991-1004.
34. Cha DR, Kim IS, Kang YS, Han SY, Han KH, Shin C, et al. Urinary concentration of transforming growth factor- $\beta$ -inducible gene-h3( $\beta$ ig-h3) in patients with Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med* 2005;22:14-20.
35. Lee SH, Bae JS, Park SH, Lee BH, Park RW, Choi JY, et al. Expression of TGF- $\beta$ -induced matrix protein  $\beta$ ig-h3 is up-regulated in the diabetic rat kidney and human proximal tubular epithelial cells treated with high glucose. *Kidney Int* 2003;64:1012-21.
36. Kang YM, Kim SI, Kim JS, You DW, Sa KH, Park EJ, et al. Regulation of  $\beta$ ig-h3 production in rheumatoid synovitis by inflammatory mediators. *J Korean Rheum Assoc* 2005;12:73-82.