

혈관내피 성장인자를 차단하는 합성 펩타이드인 RRKRRR이 류마티스 염증반응에 미치는 영향

가톨릭대학교 의과대학 내과학교실 류마티스내과

김완욱 · 유승아 · 김해림 · 박보형 · 민정요 · 윤종현 · 박성환 · 조철수

= Abstract =

Effect and Mechanism of Arginine-rich Anti-vascular Endothelial Growth Factor Hexapeptide, RRKRRR, on the Regulation of Rheumatoid Inflammation

Wan-Uk Kim, M.D., Seung-Ah Yoo, M.S., Hae-Rim Kim, M.D.,
Bo-hyoung Park, M.D., Jeong-Yo Min, M.D., Chong-Hyeon Yoon, M.D.,
Sung-Hwan Park, M.D., Chul-Soo Cho, M.D.

*Division of Rheumatology, Department of Internal Medicine,
The Catholic University of Korea, Seoul, Korea*

Objective: Vascular endothelial growth factor (VEGF) has been suggested to play a critical role in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA). It has been demonstrated that synthetic arginine-rich hexapeptide, RRKRRR, shows significant inhibition of VEGF-induced angiogenesis, and also retarded the growth and metastasis of colon carcinoma cell by blocking the interaction between VEGF and its receptor. In this study, we investigated whether anti-VEGF RRKRRR peptide (dRK6) could regulate the activation of mononuclear cells of RA patients and suppress collagen-induced arthritis (CIA) in mice.

Methods: Synovial fluid mononuclear cells (SFMC) or synoviocytes from RA patients were cultured in the presence of VEGF, and the levels of TNF- α and IL-6 were determined in the culture supernatants by ELISA. Blocking experiments were performed by adding dRK6 to the cells stimulated with VEGF. Additionally, the *in vivo* effect of dRK6 on the development of arthritis

<접수일 : 2004년 7월 15일, 심사통과일 : 2004년 8월 27일 >

※통신저자 : 김 완 욱

수원시 팔달구 지동 93-6

성빈센트병원 류마티스내과

Tel : 031) 249-7114, Fax : 031) 253-8898, E-mail : wan725@catholic.ac.kr

본 연구는 2004년 대한면역학회 '한올 의학상' 연구비 지원을 받아 이루어졌음.

was tested in collagen induced arthritis (CIA) in DBA/1 mice. T cell responses to type II collagen (CII) and IgG antibodies to CII were examined in draining lymph node cells and sera of the mice, respectively.

Results: dRK6 showed concentration-dependent inhibitory activity for the VEGF binding to its receptor on human vascular endothelial cells. The treatment of dRK6 completely abrogated the VEGF-induced productions of TNF- α and IL-6 by RA SFMC or synoviocytes. Moreover, a subcutaneous injection of dRK6 resulted in a dose-dependent decrease in the severity and incidence of CIA in mice. In these mice, the T cell responses to type II collagen (CII) in lymph node cells and circulating IgG antibodies to CII were also dose-dependently inhibited by the peptides.

Conclusion: We observed firstly that anti-VEGF dRK6 blocked the VEGF-induced production of pro-inflammatory cytokine from RA SFMC and synoviocytes, and suppressed the ongoing paw inflammation in mice. These data suggest that dRK6 may be an effective strategy in the treatment of RA, and could be applied to modulate various chronic VEGF-dependent inflammatory diseases.

Key Words: Rheumatoid arthritis, Vascular endothelial growth factor, RRKRRR, Collagen induced arthritis

서 론

류마티스 관절염(rheumatoid arthritis, RA)의 관절조직은 활막세포(synoviocytes)의 과도한 활성화와 비정상적인 성장을 특징으로 한다¹⁾. 활막이 비정상적으로 성장하기 위해서는 신생혈관 형성이 필수적인데 신생혈관은 활막염 부위로 염증세포를 운반하여 만성 염증상태를 유지할 수 있게 하고, 증식된 활막에 양분과 산소를 공급하기 때문이다²⁾. RA에서 몇 가지 중요한 신생혈관 자극인자들이 알려져 있는데, 혈관내피 성장인자(vascular endothelial growth factor, VEGF)가 그들 중 하나이다. VEGF는 이량체 당단백질(dimeric glycoprotein)로 혈관 내피세포의 증식과 이동을 유도하여 새로운 혈관을 형성하고, 혈관의 투과성을 증가시켜 염증세포의 충원(recruitment)을 유도한다^{3,4)}. VEGF의 발현은 RA 환자의 혈청, 활액 등에서 증가되어 있고⁵⁻⁷⁾, RA 모델동물에 항 VEGF 항체를 처리할 경우 관절염의 발생이 감소된다⁸⁾. 또한 수용성(soluble) VEGF 수용체를 이용하여 VEGF를 차단할 경우에도 마우스에서 관절염의 위중도가 감소된다⁹⁾.

VEGF는 혈관 내피세포에 존재하는 Flt-1과 Flk-1과 같은 수용체에 결합함으로써 활성을 나타낸다. Flk-1은 강력한 내인적 타이로신 인산효소(intrinsic

tyrosine kinase)활성을 가지고 있으며 VEGF에 반응하여 내피세포의 증식을 유발하는데 중요한 연결 인자이다^{10,11)}. 그러나 Flt-1은 Flk-1과는 다르게 내피세포뿐 아니라 대식세포(macrophage)/단구(monocyte) 등의 염증세포 표면에서도 표현되어 있다^{10,11)}. 연구자들은 최근 VEGF로 처리한 RA 단핵구 혹은 활막세포에서 TNF- α 와 IL-6와 같은 전 염증성 사이토카인의 생성이 강력히 유도됨을 규명한 바 있다¹²⁾. 이러한 결과는 RA 환자의 관절 내에 과도하게 형성된 VEGF가 신생혈관 형성이라는 이미 알려진 기능 이외에도, 단구와 활막세포를 활성화시키고 전 염증성 사이토카인의 생성을 촉진시킴으로써 관절 내 만성 염증 반응을 유지, 증폭시키는데 중요한 역할을 하고 있음을 시사한다.

배 등은 펩타이드 라이브러리(peptide library)를 통한 연구에서, 6개의 아미노산으로 구성된 다-아르기닌(arginine-rich) 펩타이드인 RRKRRR (Arg-Arg-Lys-Arg-Arg-Arg)이 VEGF에 결합하여 VEGF와 수용체 간의 상호작용을 차단할 수 있음을 밝혀내었다¹³⁾. 이 펩타이드는 생체 내에서 신생혈관의 형성을 강력히 억제하였으며 대장암과 같은 종양세포의 성장과 전이를 효과적으로 차단하였다¹³⁾. 저자들은 VEGF가 RA 염증세포의 충원과 활막의 성장에 중요한 역할을 한다는 전제 하에, 항 VEGF 펩타이드인 RRKRRR (dRK6)이 RA 치료에 활용될 수 있는지 조사하

었다. 이를 위해, RA 환자의 단핵구 혹은 활막세포를 VEGF로 자극할 경우 증가되는 TNF- α 와 IL-6의 생성이 dRK6의 전 처치에 의해 정상화 될 수 있는지 알아보았다. 또한, RA 모델동물에서 관절염의 발생과 위중도가 dRK6의 투여에 의해 억제될 수 있는지 조사하였다. 결과, dRK6는 VEGF와 함께 배양된 단핵구와 활막세포로부터 유도되는 TNF- α 와 IL-6의 생성을 거의 완전히 차단하였으며, 마우스에서 콜라겐 유도성 관절염(collagen-induced arthritis, CIA)의 발생을 효과적으로 억제하였다. 이러한 결과는 dRK6이 혈관 내피세포뿐 아니라 RA 염증세포에서도 VEGF의 작용을 차단하는 기능을 지니며, RA와 같은 VEGF 의존 질환에 투여될 경우 만성염증반응을 경감시킬 수 있음을 시사한다.

대상 및 방법

1. 시약(Reagents)

항 VEGF dRK6은 이 펩타이드의 생물학적 특징을 처음으로 규명한 포항공과대학 생명과학부 채치범 교수로부터 기증받았다. 인형 재조합(human recombinant) VEGF₁₆₅는 R&D (Minneapolis, MN)로부터 구입하였다. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)를 위한 인형 재조합 TNF- α 와 IL-6 및 이 사이토카인들에 대한 단일클론 항체(monoclonal antibody, mAb)는 R&D로부터 구입하였다. Phytohaemagglutinin (PHA), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), ionomycin, lipopolysaccharide (LPS)는 Sigma (St. Louis, MO)로부터 구입하였다. 배양을 위해 사용한 모든 시약은 Limulus amoebocyte cell lysate assay를 이용하여 내독소(endotoxin)가 200 pg/mL 이하로 포함되어 있음을 확인하였다.

2. ¹²⁵I-VEGF₁₆₅ 수용체 결합능의 측정

VEGF₁₆₅가 수용체에 결합하는 능력을 dRK6이 효과적으로 차단할 수 있는지 알아보기 위해 배양된 혈관 내피세포(human umbilical endothelial cells, HUVEC)에서 ¹²⁵I가 결합된 VEGF₁₆₅ (¹²⁵I-labeled VEGF₁₆₅)를 이용한 수용체 결합능을 측정하였다¹³⁾. 약술하면 48-well에 5×10^4 cells/well 농도의 HUVEC을 넣고 밤새 배양한 후 결합검사 배지(medium 199/25 mM HE-

PES/0.1% bovine serum albumin, pH 7.4)를 넣고 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 이후 ¹²⁵I로 표지된 VEGF₁₆₅ (20 nCi/well) 및 다양한 농도의 dRK6를 첨가한 후 4°C에서 3시간 동안 다시 배양하였다. 세척 후, HUVEC 표면의 VEGF 수용체에 결합된 ¹²⁵I-labeled VEGF₁₆₅의 양을 결정하기 위하여 150 μ L의 용해 용액(20 mM Tris-HCl/1% Triton X-100, pH 7.4)을 상온에서 20분 처리하였고, 용해된 세포혼합물에서 방사능의 양을 γ -counter를 이용하여 측정하였다. 비특이적인 결합은 100배 농도의 ¹²⁵I가 결합되어 있지 않은 VEGF₁₆₅ (non-labeled VEGF₁₆₅)를 첨가 후 방사능의 양을 측정함으로써 결정하였다.

3. 단핵구의 분리와 배양

미국 류마티스 학회의 진단 기준¹⁴⁾에 부합하는 3명의 RA 환자로부터 관절 천자를 통하여 활액(synovial fluid)을 얻었으며, 채취된 활액은 즉시 PBS를 이용하여 1:5로 희석하고 무균거즈(sterile gauze)에 통과시켰다¹⁵⁾. RA 환자 3명은 여자로서 류마티스 인자는 모두 양성이었다. 활액 내 단핵구(synovial fluid mononuclear cells, SFMC)는 Ficoll-Hypaque (SG 1077)상의 비중 차에 의해 분리되었다. 분리된 SFMC를 완전 배지(complete medium, RPMI-1640 supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin and 2 mM L-glutamine)에 넣고, 96 well plate에 1×10^6 /well의 농도로 재 부유하였다¹⁵⁾. 다양한 농도의 VEGF₁₆₅ (0.1 to 10 ng/mL, R&D)를 배양된 단핵구에 첨가하였으며, 양의 대조 항원으로 PHA 1 μ g/mL, PMA 50 ng/mL+ionomycin 5 μ g/mL과 LPS 5 μ g/mL 등을 사용하였다¹²⁾. dRK6의 생물학적 효과를 보기 위해, dRK6 (0~100 μ M)를 VEGF₁₆₅와 1시간 동안 실온에서 혼합 배양한 후 이 혼합액을 단핵구 배양액에 첨가하였다. 세포 배양은 24시간 동안 시행하였으며, 배양 상층액 내에서 TNF- α 와 IL-6의 농도를 ELISA 방법으로 측정하였다. 배양 상층액은 측정할 때까지 -20°C에 보관하였다.

4. 활막세포의 분리와 배양

관절 치환 수술을 받은 3명의 RA 환자로부터 활막 조직을 채취하였으며, 활막조직을 채취하기 전에 모든 환자로부터 동의서를 받았다. 이전에 시행한

방법과 같이¹⁶⁾, 얻어진 조직을 잘게 자르고 콜라겐 분해효소(collagenase)로 처리한 후 원심 분리하여 얻어진 세포를 계대 배양하여 섬유아세포 양 활막세포(fibroblast-like synoviocyte, FLS)를 분리하였다. 약술하면, 조직을 2~3 mm 조각으로 잘게 썬 후 37°C (5% CO₂ atmosphere) Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 안에서 1형 콜라겐 분해효소(type I collagenase; Worthington Biochemical, Freehold, NJ)로 4시간 동안 처리하였다. 분리된 세포는 DMEM (supplemented with 10% FCS, 2 mM glutamine, penicillin and streptomycin)에서 재 부유시킨 후, 75 cm² 플라스크(flask)에 부착시켰다. 밤새 배양한 후 비 부착세포를 제거하고 부착세포만을 DMEM (plus 10% FCS)에서 배양하였다. 배양온도는 37°C (5% CO₂ atmosphere)를 유지하였고 배지는 3일 마다 갈아주었다. 이 세포를 다시 신선한 배지로 1 : 3으로 희석한 후 사용할 때까지 재 배양하였다. 이후 계대 배양을 거듭하여 FLS만 남게 되는 passage 4에서 8 사이의 세포를 각각의 실험에 사용하였다. FLS 세포주는 다양한 농도의 VEGF₁₆₅와 함께 24-well plates (Nunc)에 2 × 10⁴ cell/well 농도로 DMEM (supplemented with 5% FCS, 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin and 2 mM L-glutamine) 배지에서 배양되었다. 모든 배양은 3중(triplicate)으로 수행하였고 24시간 배양 후 상층액을 채취하였다.

5. TNF- α 와 IL-6 농도의 측정

배양 상층액에 유리된 TNF- α 와 IL-6의 양은 이전에 기술된 법과 유사한 ELISA법으로 측정하였다¹⁷⁾. 재조합 인형(recombinant human) TNF- α 와 IL-6 (R&D)는 배양액으로 희석하였고 계측표준항원(calibration standard)으로 사용하였다. ELISA 방법으로 측정 가능한 사이토카인의 농도범위는 5~2,000 pg/mL이었다.

6. 류마티스 모델동물에서 dRK6의 효과 판정

웅성 DBA/1 마우스를 Jackson Laboratories (Bar Harbor, ME)로부터 구입한 후, 표준화 된 사료(Ralston Purina, St. Louis, MO)와 물을 주며 폴리카보네이트 우리(polycarbonate cage)에서 3~5마리씩 나누어 키웠다. 이전에 보고한 바와 같이, 강호 박사

(University of Tennessee, Memphis, TN)로부터 기증받은 제2형 콜라겐(type II collagen, CII)을 주령이 8~12주인 마우스에 접종하여 CIA를 유도하였다¹⁸⁾. 약술하면, CII (2 mg/mL)을 0.05 N acetic acid에 녹인 후 4°C에서 complete Freund's adjuvant (CFA)와 1 : 1로 유화(emulsification)시켰다. 이후 100 μ g의 CII가 포함된 유상액(emulsion) 0.1 mL를 마우스의 꼬리에 1차 접종하였다. 1차 접종 후 2주에 50 μ g의 CII가 포함된 유상액 0.05 mL를 마우스의 우측 후족(hind-foot)의 발바닥(footpad)에 2차 접종(booster immunization)하였다.

RA에서 dRK6의 치료 효과를 조사하기 위해 CIA 발생 초기에 dRK6을 반복적으로 투여하였다. 예비 연구에서 CIA는 1차 접종 후 3주에 발생하기 시작하여 5~6주에 최고의 위중도를 보였으며 6주 이후에는 위중도가 감소하여 10주가 되면 거의 완전히 관절염이 완화되는 경과를 보였다(결과 생략). 따라서 저자들은 관절염 발생 초기인 1차 접종 후 3주부터 6주까지 3주에 걸쳐 25 μ g 혹은 50 μ g의 dRK6을 이들에 1회(모두 9회) 피하주사하였다. 음의 대조 마우스에는 용매로 사용된 PBS만 9회 피하주사하였다. 관절염의 위중도(severity)와 발생빈도(incidence)는 1차 접종 후 3주에서 10주까지 일주일에 3회 관절의 시각적인 조사(visual inspection)를 통해 평가하였다. 관찰 시마다 각각의 다리는 이전에 기술된 바와 같이 0~4단계로 평가하였으며¹⁸⁾, 2차 접종을 수행한 우측 후족은 평가에서 제외하였다. 관절염 지수(arthritic index)는 세 다리에 측정된 위중도를 모두 더한 값으로 정하였고, 이 경우 가능한 관절염 지수의 최대 값은 12점이었다. 특정 마우스에서 세 다리 중 한 다리라도 위중도가 2단계 이상일 때 관절염이 발생한 것으로 간주하였고, 전체 대상 마우스 중 관절염이 생긴 마우스의 비율(percent, %)로 관절염 발생 빈도를 표시하였다.

7. 마우스 혈청 내 항 2형 콜라겐 자가항체의 측정

1차 접종 후 42일째 각 마우스로부터 혈액을 채취하고 혈청을 분리한 후 측정 전까지 -20°C에서 냉동 보관하였다. 혈청 내 IgG 항 2형 콜라겐 항체(anti-type II collagen antibody, anti-CII Ab) 역가는 상용화

된 ELISA kit (Chondrex, Redmond, WA)를 이용하여 측정하였다¹⁸⁾. 2배씩 희석된 표준혈청의 광학밀도(optical density)는 각각 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25 등의 임의값(arbitrary unit)으로 표현되었다. 마우스에서 획득한 혈청은 PBS로 1 : 10,000 ~ 1 : 40,000 비율로 희석하였으며, 희석된 혈청 내 IgG anti-CII Ab의 농도는 표준 혈청에 대한 상대값(arbitrary unit)으로 표현하였다.

8. 림프절 내 T 세포 증식반응의 측정

1차 접종 후 42일째 각 마우스 집단으로부터 서혜부(inguinal) 및 슬와부(popliteal) 림프절을 채취하여 RPMI-1640으로 세척하였다. 4~5마리의 마우스로부터 얻은 림프절 조직을 합치고 이를 잘게 자른 후 단일세포층으로 만들었고 이 세포를 다시 RPMI-1640으로 3차례 세척하였다. 세포(5×10^5 /well)는 40 μ g/well의 CII (in 0.3 mL of Click' medium, supplemented with 0.5% mouse serum, 37°C in a 5% humidified CO₂)를 첨가한 후 96-well microtiter plates (Nunc)에서 4일간 배양하였다^{15,18)}. 세포 수확(harvest) 18시간 전에 [³H] thymidine 1 μ Ci를 각 well에 추가하였으며 유리섬유 여과기(glass fiber filter)에서 세포를 수확한 후, Matrix 96 direct ionization-counter (Packard Instrument Co, Meridan, CT)를 이용하여 동위원소의 양을 측정하였다^{15,18)}. 결과는 자극지수(stimulation index)로 표시하였고, 자극지수는 CII가 포함되어 있는 well에서 측정된 cpm 값을 CII가 포함되어 있지 않은 well에서 측정된 cpm 값으로 나누어 계산하였다.

9. 통계분석

결과는 평균 \pm 표준편차로 표시하였다. 집단 간의 평균값 비교는 paired 또는 unpaired Mann-Whitney U-test를 이용하였고 p < 0.05일 때 통계학적으로 유의하다고 판정하였다.

결 과

1. 혈관 내피세포에서 dRK6에 의한 VEGF와 수용체 간 결합의 억제

저자들은 먼저 생체 내에 투여된 RRKRRR이 다양한 단백질분해효소에 의해 빨리 제거되는 현상을 줄

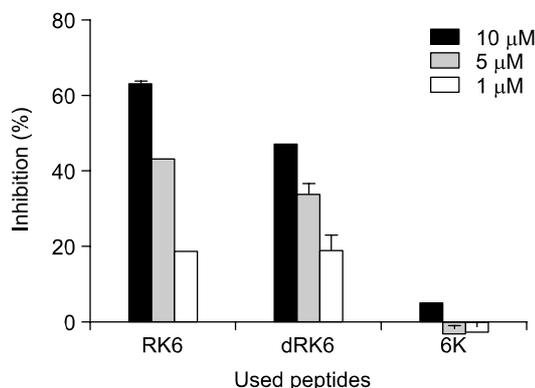


Fig. 1. Effect of dRK6 on the binding of VEGF to cell surface receptor. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were incubated with ¹²⁵I-VEGF₁₆₅ and three different kinds of peptide, RRKRRR (L- or D- amino acids) and KKKKKK. Activity of each peptide was compared for inhibitory effect on the binding of radio-labeled VEGF₁₆₅ to its receptors on the surface of HUVEC. The y axis shows the percentage of inhibition of ¹²⁵I-VEGF₁₆₅ binding to its receptors on the surface of HUVEC. Total binding and nonspecific binding were 3,566 \pm 73 cpm and 145 \pm 1 cpm, respectively. RK6, dRK6 and 6K denote RRKRRR, rrkrrr and KKKKKK, respectively, where capitals represent L-amino acids and small characters D-amino acids.

이기 위해 RRKRRR을 L형(RK6)에서 D형(dRK6)으로 바꾸었다. 이후, D형의 RRKRRR이 L형과 유사하게 VEGF와 수용체 간의 결합을 억제할 수 있는지 조사하였다. 그림 1에서 보는 바와 같이, RK6과 dRK6은 모두 VEGF₁₆₅가 혈관 내피세포(HUVEC) 표면에 있는 수용체에 결합하는 능력을 농도 의존적으로 차단하였다. 반면, 음의 대조 펩타이드로서 사용한 K-KKKKK (hexalysine, 6K)는 VEGF₁₆₅와 수용체 간의 결합에 어떠한 영향도 없었다. 따라서 저자들은 생체 내에서보다 안정적이라고 알려진 D형의 RRKRR을 이후의 모든 실험에서 사용하였다.

2. dRK6은 VEGF로 자극된 RA SFMC로부터 TNF- α 와 IL-6의 생성을 억제한다.

그림 2A와 2B에서 보는 것과 같이 RA 환자의

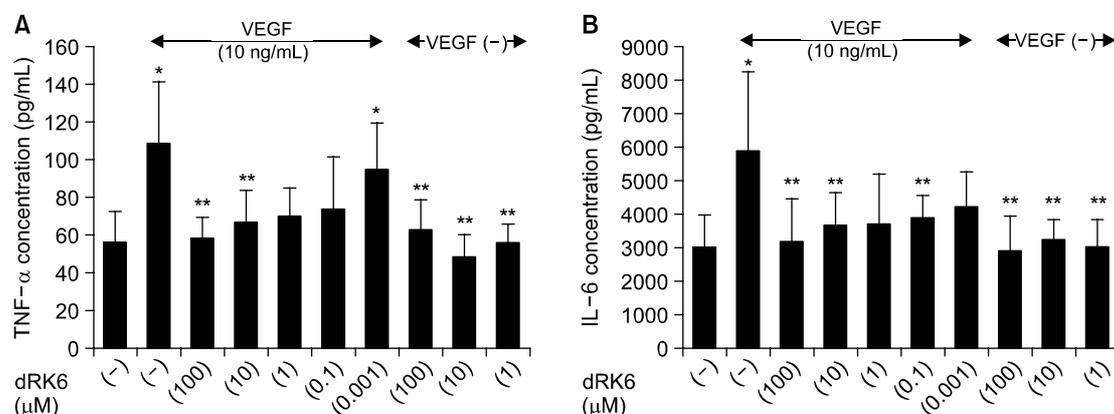


Fig. 2. dRK6 inhibits VEGF-stimulated cytokine production by SFMC. Various concentrations of dRK6, ranging from 0 to 100μM, were pre-incubated with VEGF 10 ng/mL for 1 hour at room temperature, and then the VEGF and dRK6 mixture were added to SFMC. The TNF-α and IL-6 concentration was measured by ELISA in the culture supernatants. (A) Suppression of VEGF-stimulated TNF-α production from SFMC by dRK6. (B) Suppression of VEGF-stimulated IL-6 production from SFMC by dRK6. Data represent the mean±SD of three independent experiments (*: p<0.05 versus medium alone, **: p<0.05 versus cells stimulated with VEGF 10 ng/mL).

SFMC를 VEGF 10 ng/mL로 자극할 경우 배양 상층액 내 생성된 TNF-α와 IL-6의 평균 농도는 자극하지 않은 경우에 비해 각각 1.93배, 1.96배 증가하였다. VEGF를 dRK6 (0~100μM)과 함께 실온에서 1시간 동안 혼합 배양한 후, 이 혼합액으로 SFMC를 자극할 경우 dRK6의 농도에 비례하여 TNF-α와 IL-6의 생성능이 점차 감소하였다. 그러나 VEGF로 자극하지 않고 dRK6만 SFMC에 처리할 경우 TNF-α와 IL-6의 생성은 기저 생성(basal production)과 비교하여 의미 있는 차이를 보이지 않았다. 이러한 결과는 SFMC로부터 유도되는 TNF-α와 IL-6 생성의 감소가 dRK6의 비특이적인 세포독성에 의한 것이 아니라, VEGF와 수용체 간의 결합을 dRK6이 특이적으로 차단함으로써 발생한 결과임을 시사한다.

3. dRK6은 VEGF로 자극된 FLS로부터 IL-6의 생성을 억제한다.

병리학적으로 RA 관절조직은 활막세포(synovialocytes)의 활성화와 비정상적인 성장을 특징으로 한다¹⁾. 저자들은 SFMC에서의 결과와 유사하게 VEGF가 배양된 활막세포를 자극, 활성화시킬 수 있을 것으로 가정하였다. 아직 VEGF 수용체가 배양된 활막세포에 표현되어 있는지 보고된 바가 없어, 먼저 활막세포가

VEGF 수용체를 표현하고 있는지 조사하였다. ¹²⁵I-labeled-VEGF₁₆₅를 이용한 수용체 결합분석법(receptor binding assay)으로 조사한 결과 ¹²⁵I-labeled-VEGF₁₆₅가 3종류의 서로 다른 FLS에 강하게 결합함을 확인하였다(그림 3A). 배양된 FLS를 VEGF 10 ng/mL로 자극한 결과 IL-6의 생성이 약 1.7배 상승하였으며 이러한 상승은 dRK6의 전 처치에 의해 농도 의존적으로 감소되었다(그림 3B). TNF-α는 FLS에서 거의 생성되지 않는다고 알려져 있고¹⁹⁾, 저자들도 VEGF로 자극하거나 자극하지 않은 배양 상층액에서 TNF-α의 농도를 측정할 수 없었다. 한편, dRK6 자체는 최대 100μM의 높은 농도에서도 FLS로부터 자발적으로 생성되는 IL-6의 농도에 영향을 주지 않았으며(그림 3B), MTT assay로 측정된 세포 생존능(cell viability)에서도 차이를 보이지 않아 dRK6에 의한 비특이적인 세포독성 가능성은 배제되었다(결과 생략).

4. dRK6에 의한 콜라겐 유도성 관절염의 억제

항 VEGF RK6을 대장암 마우스 모델에 투여할 경우 50μg/day의 농도에서 강력한 항 종양효과를 보인다고 보고되었다. 이에 기초하여 저자들은 0~50 μg/day의 dRK6을 CIA 모델동물에 투여한 후 관절염 발생정도를 비교하였다. 그림 4A와 4B에서 보는

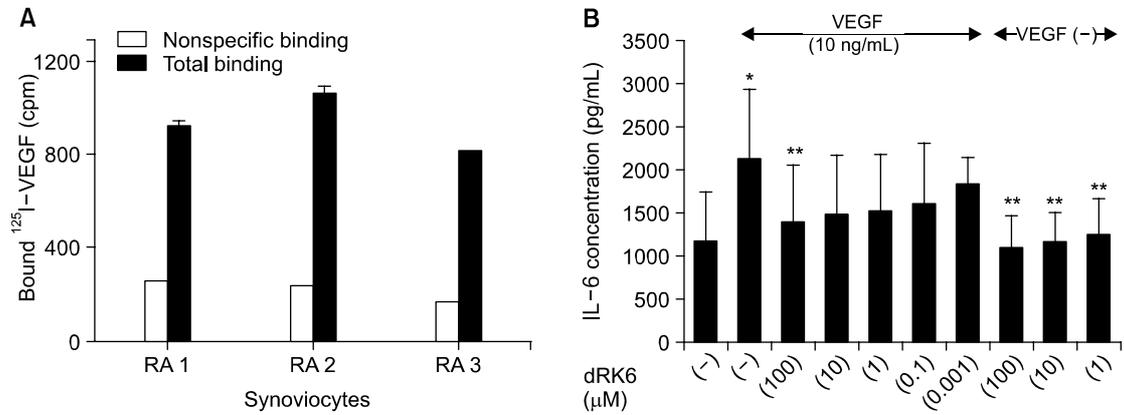


Fig. 3. dRK6 inhibits VEGF-stimulated IL-6 production by blocking the interaction of VEGF with its receptor on synovial fibroblasts. Various concentrations of dRK6, ranging from 0 to 100μM, were pre-incubated with VEGF 10 ng/mL for 1 hour at room temperature, and then the VEGF and dRK6 mixture were added to synovial fibroblasts. The IL-6 concentration was measured by ELISA in the culture supernatants. (A) The interaction of ¹²⁵I-VEGF₁₆₅ with its receptor on synovial fibroblasts. (B) Suppression of VEGF-stimulated IL-6 production from SFMC by dRK6. Data represent the mean±SD of three independent experiments (*: p<0.05 versus medium alone, **: p<0.05 versus cells stimulated with VEGF 10 ng/mL).

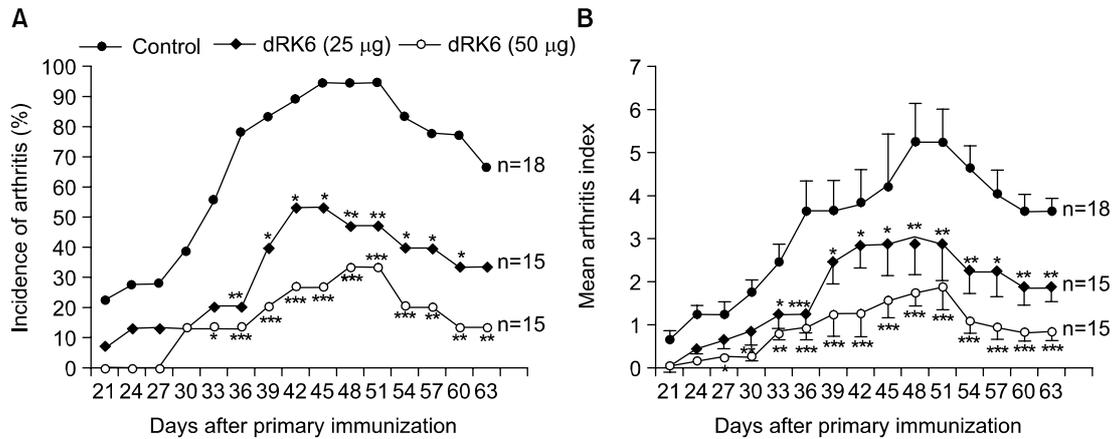


Fig. 4. Suppression of collagen-induced arthritis (CIA) by dRK6. From 3 weeks after the primary immunization, 25 or 50μg of dRK6 dissolved in PBS were injected in the CIA animals every other day for 3 weeks. The control mice were received PBS alone. The severity and incidence of arthritis were determined in the three groups of mice by a visual inspection. (A) Reduction in the incidence of arthritis in peptide-treated mice during the course of CIA. (B) Decrease in the mean arthritis index in mice injected with the peptides. The data is presented as the mean (SD) values. *: p<0.05, **: p<0.01, ***: p<0.001 versus mice treated with PBS alone.

바와 같이 dRK6은 CIA 발생과정 거의 전반에 걸쳐 관절염의 발생빈도와 위중도를 농도 의존적으로 감소시켰다. 예를 들어, 용매만 투여한 대조군 마우스 (n=18)의 관절염 발생빈도는 최대 94.4%인 데 비해 25

μg의 dRK6을 투여한 마우스 군(n=15)에서는 53.3%, 50μg의 dRK6을 투여한 마우스 군(n=15)에서는 33.3%로 측정되었다(용매만 투여한 대조 마우스 군과 25 μg의 dRK6을 투여한 마우스 군 간에 관절염 발생

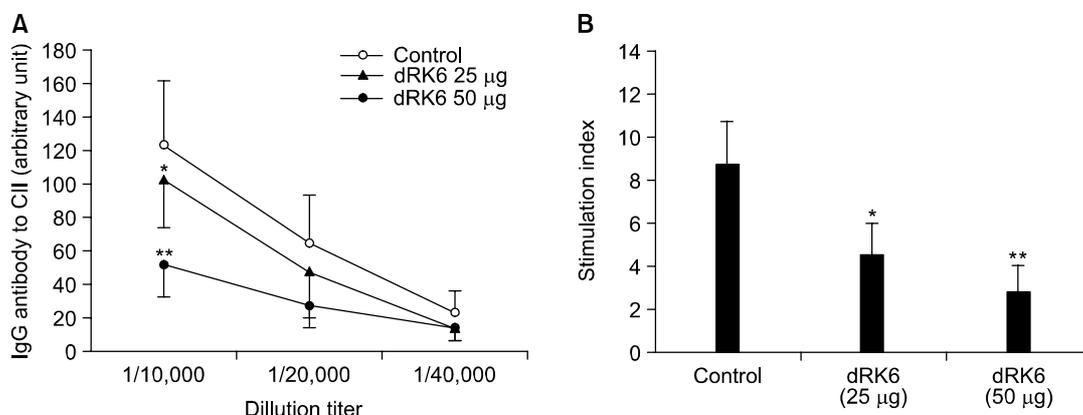


Fig. 5. Suppression of the autoimmune responses to type II collagen (CII) by dRK6. (A) Levels of circulating IgG antibodies (Abs) to CII in mice treated with PBS alone (n=18), 25µg of dRK6 (n=15), and 50µg of dRK6 (n=15), as determined at 6 weeks after primary immunization. The mean levels of IgG anti-CII Abs in the sera diluted 1 : 10,000 were compared among the three groups for statistical analysis. (B) T cell responses to CII in lymph node (LN) cells. Inguinal and popliteal LN were removed from similar groups of mice 6 weeks after primary immunization. Pooled LN cells from four or five mice were cultured with or without 40µg/well of CII. Mean background cpm without CII was 3,250±773. T cell responses are presented as the mean±(SD) stimulation indices of five independent experiments. *: p<0.05, **: p<0.01 versus PBS-treated mice.

빈도의 비교 시: p<0.01, 대조 마우스 군과 50µg의 dRK6를 투약한 마우스 군 간에 비교 시: p<0.001).

5. CIA 모델 동물에서 dRK6에 의한 항 2형 콜라겐 자가면역반응의 감소

CIA에서 dRK6의 투여가 CII에 특이적인 자가면역 반응에 어떤 영향을 주는지 알아보기 위해, dRK6 투여 종료시점인 1차 접종 후 6주에 혈청 내 IgG anti-CII Ab 역가와 림프절 내 T 세포 증식반응을 측정하였다. 예상한 대로 CIA가 유도된 마우스 혈청 내 IgG anti-CII Ab 역가는 투여된 dRK6의 농도(25, 50µg/day)에 비례하여 점차 감소되었다(그림 5A) (용매만 투여한 대조 마우스 군과 25µg의 dRK6를 투약한 마우스 군 간에 항체 역가의 비교 시: p<0.05, 대조 마우스 군과 50µg의 dRK6를 투약한 마우스 군 간에 항체 역가 비교 시: p<0.001). 서혜부 및 슬와부 림프절 세포에서 측정된 CII에 대한 T 세포 증식반응 역시 dRK6를 투여한 마우스 군에서 용매만 투여한 마우스 군에 비해 의미 있게 낮았으며 이러한 감소는 투여된 dRK6 농도에 의존적이었다 (CII 없이 측정된 배경 cpm: 3,250±773, 각 군에서 측정된 자극지수: 용매만 투여한 대조마우스 8.7±

2.1; 25µg의 dRK6을 투약한 마우스 4.5±1.5; 50µg의 dRK6을 투여한 마우스 2.8±1.2)(그림 5B). 이러한 결과는 CIA에서 dRK6의 반복적인 투약에 의해 CII에 특이적인, 전신적인 자가 면역반응이 효과적으로 억제되었음을 시사한다.

고 찰

생리활성 물질과 수용체 간에 상호작용을 차단함으로써 질병의 진행을 억제하거나 치료하려는 다양한 기법이 시도되고 있다. 합성 펩타이드를 이용하는 방법, 유전자 재조합 방법, 생리적 단백질 혹은 펩타이드를 활용하는 방법 등이 그 예로서, 특히 펩타이드 라이브러리(peptide library)를 이용하여 목적하는 특정 펩타이드를 제작하고 이를 통해 생리활성 물질의 활성을 조절하려는 전략이 주목되고 있다. 6~10개 정도의 작은 펩타이드를 생합성하여 표적물질의 작용을 차단하는 이 방법은 유전자 재조합이나 생리적 단백질을 이용하는 방법들에 비해 가격이 저렴하고, 쉽게 제작가능하며, 인체에 비교적 안전하다는 장점을 지닌다^{13,20,21}. 배 등은 펩타이드 라이브러리 방법을 통해 VEGF와 수용체 간에 결합을 차단

하는 새로운 펩타이드(RK6)를 발견하였고 RK6이 생체 내에서 신생혈관 형성을 억제하고 종양의 성장과 전이를 차단함을 규명하였다¹³⁾.

본 연구에서 저자들은 dRK6이 VEGF (10 ng/mL)로 자극된 SFMC에서 생성되는 TNF- α 와 IL-6의 생성을 강력히 억제함을 규명하였다. VEGF로 자극 시 FLS로부터 유도되는 IL-6의 생성 역시 dRK6에 의해 거의 완전히 차단되었다. 저자들은 이전에 RA 환자(n=32)의 활액에서 측정된 VEGF의 평균농도가 3.23 \pm 0.45 ng/mL로써, 정상인 혈액 혹은 골관절염 환자의 활액 내 VEGF 농도에 비해 의미 있게 상승되어 있다고 보고한 바 있다⁷⁾. 활액 내 상승된 VEGF는 단핵구와 활막세포를 자극하여 TNF- α 와 IL-6와 같은 전 염증성 사이토카인의 합성을 증가시킴으로 염증반응의 악순환의 고리를 형성할 수 있다¹²⁾. 이 경우 dRK6은 이러한 악순환 과정을 차단함으로써 RA 관절 내에서 항염 작용을 나타낼 수 있을 것이다. dRK6이 SFMC 혹은 FLS에 직접적인 세포독성이 없음을 고려할 때, dRK6은 향후 신생혈관 억제 효과와 염증 조절기능을 동시에 가진 새로운 RA 치료제로서 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

저자들은 dRK6이 RA SFMC와 FLS의 염증반응을 조절한다는 결과를 바탕으로 dRK6이 RA 모델동물에서 관절염 발생을 제어할 수 있는지 조사하였다. 그 결과, dRK6은 CIA의 발생빈도와 위중도를 현저히 감소시켰으며 혈청에서 측정된 IgG anti-CII Ab와 림프절 내 T 세포 증식반응 역시 dRK6의 반복적인 투여에 의해 감소되었다. 이러한 결과는 dRK6이 시험관 내(in vitro)에서 뿐 아니라 생체 내에서도 강력한 항염 작용을 가지고 있음을 시사한다. CIA는 CII에 반응하는 T 세포와 anti-CII Ab의 상승적 작용에 의해 매개된다고 알려져 있다²²⁻²⁴⁾. 그러므로 dRK6에 의해 CII에 대한 자가 면역반응이 감소되었다는 저자들의 결과는 dRK6에 의한 관절염 억제가 CII에 특이적인 면역반응의 감소를 통해 매개되었을 가능성을 시사한다. 특히 CII에 대한 자가면역 반응이 신생혈관 형성과는 직접적으로 관련이 없는 혈청과 림프절 등에서 특정되었음을 고려할 때 dRK6에 의한 관절염 억제는 신생혈관 형성과는 독립된 다른 기전-예를 들어 면역세포의 활성화와 관절과피에 기여하는 염증 매개물질 혹은 항체 생성의 감소 등이

관련했을 것으로 추정된다.

RA 모델동물에서 VEGF 수용체 Flk-1은 활막조직의 혈관 내피세포에만 국한되어 표현되어 있지만, Flt-1은 내피세포뿐 아니라 염증세포에도 표현되어 있다고 한다²⁵⁾. 흥미롭게도, RA 모델동물에 항 Flt-1 항체를 투여할 경우 관절염의 발생과 관절 파괴가 감소되지만, 항 Flk-1 항체는 관절염 발생을 억제하지 못한다고 보고되었다^{25,26)}. 따라서 항 VEGF 항체의 투여에 의해 마우스에서 관절염 발생이 억제되었다는 기존의 결과^{8,9)}는 항 VEGF 항체의 신생혈관 차단효과보다는 주로 항염 효과로부터 유래되었을 것으로 추측해 볼 수 있다. RA 모델동물에서 TNF- α 차단항체 혹은 IL-6 수용체에 대한 차단항체를 투여할 경우 관절염 발생이 강력히 억제된다고 알려져 있다^{27,28)}. 또한 인체에서의 결과이기도 하나, 저자들은 배양된 단핵구와 활막세포에서 VEGF에 의해 유도된 TNF- α 와 IL-6 생성이 dRK6에 의해 감소됨을 보여 주었다. 이상의 보고^{8,9,25-28)}와 저자들의 결과를 종합해 보면, dRK6을 투여받은 마우스는 VEGF로 자극된 만성염증세포로부터 생성되는 TNF- α 와 IL-6의 생성이 감소될 수 있고, 이러한 염증성 사이토카인의 감소가 관절염 발생을 감소시키는데 기여했을 것으로 추측해 볼 수 있다. 이러한 가설을 분명히 하기 위해 향후 모델동물에서 dRK6의 작용기전에 관한 면밀한 연구가 뒷받침되어야 하겠다.

결 론

저자들은 RA 활막 조직이 종양과 같은 특징을 지니며 VEGF가 활막의 성장에 중요한 역할을 한다는 가정 하에, 항 VEGF 펩타이드인 RRKRRR (dRK6)이 RA의 치료에 활용될 수 있는지 조사하였다. 결과, dRK6은 RA 환자로부터 얻은 단핵구와 활막세포를 VEGF (10 ng/mL)로 자극할 경우 유도되는 TNF- α 와 IL-6 생성을 거의 완전히 차단하였다. 또한, dRK6은 마우스에서 CIA의 발생 빈도와 위중도를 억제하였으며, 이 마우스에서 측정된 혈청 IgG anti-CII Ab 역가와 림프절 내 T 세포 증식반응 역시 dRK6의 반복적인 투여에 의해 감소되었다. 이러한 결과는 dRK6이 RA 염증세포에서도 VEGF의 작용을 차단하는 기능을 지니며, VEGF 의존 질환에 투여될 경우

만성염증반응을 경감시킬 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구 수행에 필요한 RRKRRR 펩타이드를 제공해 주신 포항공과대학 생명과학부 채치범 교수님께 깊은 감사의 뜻을 전합니다.

REFERENCES

- 1) Koch A. Angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:951-62.
- 2) FitzGerald O, Soden M, Yanni G, Robinson R, Bresnihan B. Morphometric analysis of blood vessels in synovial membranes obtained from clinically affected and unaffected knee joints of patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1991;50:792-6.
- 3) Klagsbrun M, D'Amore PA. Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 1991;53:217-39.
- 4) Dvorak HF, Brown LF, Detmar M, Dvorak AM. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hypermeability and angiogenesis. *Am J Pathol* 1995;146:1029-39.
- 5) Fava RA, Olsen NJ, Spencer-Green G, Yeo KT, Yeo TK, Berse B, et al. Vascular permeability factor/endothelial growth factor (VPF/VEGF): accumulation and expression in human synovial fluids and rheumatoid synovial tissue. *J Exp Med* 1994;180:341-6.
- 6) Nagashima M, Yoshino S, Ishiwata T, Asano G. Role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis of rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1995;22:1624-30.
- 7) Lee SS, Joo YS, Kim WU, Min DJ, Min JK, Park SH, et al. Vascular endothelial growth factor levels in the serum and synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2001;19:321-4.
- 8) Sone H, Kawakami Y, Sakauchi M, Nakamura Y, Takahashi H, Shimano H, et al. Neutralization of vascular endothelial growth factor prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281:562-8.
- 9) Miotla J, Maciewicz R, Kendrew J, Feldmann M, Paleolog E. Treatment with soluble VEGF receptor reduces disease severity in murine collagen-induced arthritis. *Lab Invest* 2002;80:1195-205.
- 10) Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S, Poltorak Z. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J* 1999;13:9-22.
- 11) Autiero M, Lutun A, Tjwa M, Carmeliet P. Placental growth factor and its receptor, vascular endothelial growth factor receptor-1: novel targets for stimulation of ischemic tissue revascularization and inhibition of angiogenic and inflammatory disorders. *J Thromb Haemost* 2003;1:1356-70.
- 12) 고희재, 유승아, 우성용, 김해림, 조철수, 김완욱. 배양된 류마티스 활액 단핵세포 및 활막 섬유아세포에서 Vascular Endothelial Growth Factor의 자극에 의한 Tumor Necrosis Factor- α 와 Interleukin-6 생성의 증가. *대한류마티스학회지* 2004;11:133-42.
- 13) Bae DG, Gho YS, Yoon WH, Chae CB. Arginine-rich anti-vascular endothelial growth factor peptides inhibit tumor growth and metastasis by blocking angiogenesis. *J Biol Chem* 2000;275:13588-96.
- 14) Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, et al. The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 1988;31:315-24.
- 15) Park SH, Min DJ, Cho ML, Kim WU, Youn J, Park W, et al. Shift toward T helper 1 cytokines by type II collagen-reactive T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44:561-9.
- 16) Cho CS, Cho ML, Min SY, Kim WU, Min DJ, Lee SS, et al. CD40 engagement on synovial fibroblast up-regulates production of vascular endothelial growth factor. *J Immunol* 2000;164:5055-61.
- 17) Cho ML, Kim WU, Min SY, Min DJ, Min JK, Lee SH, et al. Cyclosporine differentially regulates interleukin-10, interleukin-15, and tumor necrosis factor-production by rheumatoid synoviocytes. *Arthritis Rheum* 2002;46:42-51.
- 18) Kim WU, Lee WK, Ryoo JW, Kim SH, Kim J, Youn J, et al. Suppression of collagen-induced arthritis by single administration of poly (lactic-co-glycolic acid) nanoparticles entrapping type II collagen: a novel treatment strategy for induction of oral tolerance. *Arthritis Rheum* 2002;46:1109-20.
- 19) Firestein GS, Alvaro-Gracia JM, Maki R, Alvaro-Gracia JM. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J Immunol* 1990;144:3347-53.
- 20) Gho YS, Lee JE, Oh KS, Bae DG, Chae CB. Development of antiangiogenic peptide using a phage-displayed peptide library. *Cancer Res* 1997;57:3733-40.
- 21) Park JY, Kim IJ, Lee MH, Seo JK, Suh PG, Cho BY, et al. Identification of the peptides that inhibit the

- stimulation of thyrotropin receptor by Graves' immunoglobulin G from peptide libraries. *Endocrinology* 1997;138:617-26.
- 22) Stuart JM, Cremer MA, Townes AS, Kang AH. Type II collagen-induced arthritis in rats. Passive transfer with serum and evidence that IgG anticollagen antibodies can cause arthritis. *J Exp Med* 1982;155:1-16.
- 23) Kadowaki KM, Matsuno H, Tsuji H, Tunru I. CD4+ T cells from collagen-induced arthritic mice are essential to transfer arthritis into severe combined immunodeficient mice. *Clin Exp Immunol* 1994;97:212-8.
- 24) Seki N, Sudo Y, Yoshioka T, Sugihara S, Fujitsu T, Sakuma S, et al. Type II collagen-induced murine arthritis. I. Induction and perpetuation of arthritis require synergy between humoral and cell-mediated immunity. *J Immunol* 1988;140:1477-84.
- 25) Luttun A, Tjwa M, Moons L, Wu Y, Angelillo-Scherrer A, Liao F, et al. Revascularization of ischemic tissues by PlGF treatment, and inhibition of tumor angiogenesis, arthritis and atherosclerosis by anti-Flt1. *Nat Med* 2002;8:831-40.
- 26) De Bandt M, Ben Mahdi MH, Ollivier V, Grossin M, Dupuis M, Gaudry M, et al. Blockade of vascular endothelial growth factor receptor I (VEGF-RI), but not VEGF-RII, suppresses joint destruction in the K/BxN model of rheumatoid arthritis. *J Immunol* 2003;171:4853-9.
- 27) Williams RO, Feldmann M, Maini RN. Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:9784-8.
- 28) Takagi N, Mihara M, Moriya Y, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, et al. Blockage of interleukin-6 receptor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 1998;41:2117-21.
-