



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](#)

박 사 학 위 논 문

강직척추염에서 골 재형성,
염증에 대한 CFHR5 역할 규명

계 명 대 학 교 대 학 원
의 학 과

이 지 현

지도교수 손 창 남

2 0 2 3 년 2 월

강직척추염에서 골 재형성, 염증에 대한 CFHR5 역할 규명

이 지 현

2 0 2 3 년 2 월

강직척추염에서 골 재형성, 염증에 대한 CFHR5 역할 규명

지도교수 손 창 남

이 논문을 박사학위 논문으로 제출함

2 0 2 3 년 2 월

계 명 대 학 교 대 학 원
의 학 과

이 지 현

이지현의 박사학위 논문을 인준함

주 심 백 원 기

부 심 김 상 현

부 심 김 지 민

부 심 손 창 남

부 심 최 혜 정

계 명 대 학 교 대 학 원

2 0 2 3 년 2 월

목 차

1. 서 론	1
2. 재료 및 방법	4
3. 성 적	11
4. 고 찰	39
5. 요 약	43
참고문헌	44
Abstract	53
국문초록	57

그림 목 차

Figure 1. Timeline of CFHR5 administration to SKG mice	15
Figure 2. CFHR5 ELISA measured in SF of AS and OA	16
Figure 3. CFHR5 upregulates the expression of inflammatory proteins in FLS	17
Figure 4. CFHR5 upregulates the expression of ALP in MC3T3-E1 cells	21
Figure 5. The expression of CFHR5 differentiation markers in MC3T3-E1 cells	22
Figure 6. CFHR5 upregulates the expression of ARS in MC3T3-E1 cells	24
Figure 7. CFHR5 upregulates the expression of ALP in Ct osteoprogenitor cells	25
Figure 8. CFHR5 upregulates the expression of ALP in AS osteoprogenitor cells	26
Figure 9. CFHR5 upregulates the expression of ARS in Ct osteoprogenitor cells	27

Figure 10. CFHR5 upregulates the expression of ARS in AS osteoprogenitor cells	28
Figure 11. CFHR5 upregulates the expression of von Kossa in Ct osteoprogenitor cells	29
Figure 12. CFHR5 upregulates the expression of von Kossa in AS osteoprogenitor cells	30
Figure 13. CFHR5 upregulates the expression of HA staining in Ct osteoprogenitor cells	31
Figure 14. CFHR5 upregulates the expression of HA staining in AS osteoprogenitor cells	32
Figure 15. Paw thickness and weight changes in CFHR5-treated SKG mice	33
Figure 16. Ectopic bone and low density bone were increased in CFHR5-treated SKG mice.	35
Figure 17. The results of histopathological analysis of tissue from CFHR5-treated SKG mice	38

1. 서론

강직척추염(ankylosing spondylitis)이란 염증성 요통, 말초관절염, 골부착부염을 특징으로 하는 만성 염증성 질환으로, 전 인구의 0.5% - 1%의 유병률을 나타낸다(1,2). 보통 30대 이전의 젊은 남성으로부터 시작되며, 관절 변형은 개인적 삶의 질 저하로 이어질 수 있다(3).

강직척추염의 발병기전은 완전히 밝혀지지 않았지만, 면역학적 기전이 작용할 것으로 생각하고 있다. 일반적으로 발뒤꿈치, 앞가슴뼈 등 힘줄이 뼈에 붙는 부위에 염증이 발생하며 시작된다. 해당 부위의 염증이 가라앉으면서, 척추에는 새로운 골이 과도하게 형성된다. 사이토카인 중에서 종양괴사인자 알파(tumor necrosis factor- α , TNF- α)가 면역병리에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다(4). 이러한 강직척추염의 치료를 위해서는 비스테로이드성 항염제, 항TNF제제 등이 사용되고 있으나, 결핵 또는 감염 등 부작용이 발생할 수 있으며, 아직까지 강직척추염을 완치시킬 수 있는 치료법은 없다(5).

보체계(complement system)는 면역체계의 일부로서, 항체와 대식세포의 기능을 촉진시켜 염증반응의 증진 또는 병원체의 세포막을 공격하는 역할을 한다. 보체계 활성화에는 고전적 경로(classical complement pathway), 대체 경로(alternative pathway) 및 렉틴 경로(lectin pathway)가 있다(6). Complement factor H-related protein 5(CFHR5)는 대체 경로에서 중요한 역할을 하는 complement factor H와 관련이 있으며, complement 3(C3)와 결합하여 활성을 돕는다고 알려져 있다(7). 강직척추염의 혈청과 활액에서 단백질 분석을 한 결과, CFHR5의 발현이 높게 나타난다는 연구 결과가 있다(8,9).

강직척추염은 다른 관절염과는 다르게 뼈를 파괴하는 것이 아닌 형성하는 질환이다. 염증 손상을 입은 뼈는 인대골증식(syndesmophyte)을 형성하고, 시간이 지나며 관절강직(ankylosis)을 일으킨다(1). 관절강직은 염증

자극에 의해 뼈의 파괴 및 형성이 반복적으로 발생하였기 때문에 나타나는 현상이다. 골의 발생은 중간엽줄기세포(mesenchymal stem cell, MSC)가 조골세포(osteoblast)로 분화된 후, 연골내 골화(endochondrial ossification), 막내 골화(intramembranous ossification)로 이어지면서 무기질이 침착되어 생성된다. 일반적으로 분화기, 성숙기, 석회화가 순차적으로 일어난 후 골을 형성한다(10). MSC는 조골세포뿐만 아니라 근육, 지방세포, 연골로 분화되는 다 분화능 세포이다(11-13). 뼈 조직의 특이적인 전사인자가 오랫동안 발견되지 않았기 때문에, 조골세포의 분화에 관한 분자생물학적 연구는 다른 분야에 비해 상당히 뒤떨어져있다. 조골세포가 분화되는 동안 알칼리인산분해효소(alkaline phosphatase, ALP), osteopontin(OPN)가 활성화된다(14). 조골세포의 생성과 분화를 지배하는 유전자인 runt- related transcription factor 2(Runx2)는 조골세포의 분화에 관여하며(15), 이것이 결손된 마우스에서 뼈의 생성이 완전히 억제되는 것을 확인하였다(16,17).

강직척추염을 정확하게 반영하는 시험관 내(in vitro) 및 생체 내(in vivo) 모델을 구축하는 것은 쉽지 않다. 최근 강직척추염 환자의 MSC에서 건강한 대조군보다 더 큰 조골세포 활성을 일으킨다는 연구가 있다(18). 강직척추염 환자의 척추뼈에서 직접 분리 배양한 골전구세포(osteoprogenitor cell)는 인간 조골 세포를 반영할 수 있다(19). 강직척추염 환자에서 염증성 사이토카인 및 염증 지수가 유의하게 높았으나, 염증이 뼈 형성에 미치는 기전은 밝혀진 바가 없다.

SKG 마우스는 T세포의 세포 내 신호전달에 중요한 물질인 zeta-associated protein of 70 kD(Zap-70) 돌연변이를 발생시킨 동물모델이다. Curdlan을 투여하여 Th17 세포 중심으로 관절염을 유발하는데(20), 말초관절염(peripheral arthritis), 골부착부염(enthesis) 및 염증성 장 질환을 동반한다(21). Curdlan과 같은 β -glucan을 마우스에 주입하였을 때, interleukin 17A, interleukin 22 그리고 interleukin 23이 말초관절염과 척추 강직증을 일으킨다(22,23). 최근 연구에서는 SKG 마우스가 인간

강직척추염의 특성을 가장 유사하게 나타낸다고 알려져 있으며, *in vivo* 모델로 활발하게 사용되고 있다(24,25).

이 연구를 시작하기에 앞서, 선행연구를 통해 강직척추염, 류마티스관절염(rheumatoid arthritis), 골관절염(osteoarthritis) 및 통풍(gout)의 활액(synovial fluid)에서 단백질 분석을 실시하였다. 그 결과, 강직척추염의 활액에서 특이적으로 상향 조절된 보체계 단백질 4군(CFHR5, complement component C9, mannose-binding protein C, complement C4-A)을 발굴하였다(9). 그 중 CFHR5는 Western blot을 통해 검증을 마쳤으며, 강직척추염의 중요한 바이오마커 후보이다.

본 연구에서는 CFHR5를 강직척추염의 바이오마커 후보로 선정하였다. CFHR5의 유도에 따른 효과를 확인하기 위해, 강직척추염의 *in vitro* 모델로 조골세포주, 골전구세포를 선정하였으며, *in vivo* 모델로 SKG 마우스를 활용하였다. 이를 바탕으로 강직척추염의 세포 및 동물 모델의 기반을 다질 수 있으며, 진단 및 치료 지표를 발굴할 수 있다.

2. 재료 및 방법

2.1. 연구 대상 및 시료 수집:

이 연구는 계명대학교 동산병원과 한양대학교병원 연구윤리심의위원회 (2021-10-046, 2020-01-055, 2014-05-001, 2014-05-002)의 승인을 받았으며, 환자의 동의를 얻은 후에 진행하였다. 모든 강직척추염(26), 류마티스관절염(27), 골관절염(28), 통풍관절염(29) 대상자들은 각 1984 modified New York classification criteria, 1987 American College of Rheumatology classification criteria를 만족한다. 활액은 무릎관절 통증 및 부기가 있어 내원한 환자를 대상으로 관절천자(arthrocentesis)를 시행하여 수집하였다. 천자 중 혈액이 오염된 경우는 제외하였으며, 각각의 질환 이외의 원인으로 활액이 생성된 경우도 제외하였다. 채취된 활액은 2,500 rpm으로 10분간 원심분리한 후, 각 시료별로 상층액 1 mL씩 5 vial, 침전물 1 vial을 계명대학교 동산병원 인체자원은행을 통해 -80 °C에 보관하였다. 활막절제술을 시행하는 환자에게 활막조직을 얻었으며, 활막세포(fibroblast-like synoviocytes)로 분리하여 -196 °C에 보관하였다. 강직척추염 및 교통사고 외상 환자의 후관절(facet joint)에서 수술을 통해 척추 골조직을 채취하였으며, 골전구세포로 분리하여 -196 °C에 보관하였다.

2.2. 효소면역측정법(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA):

활액 CFHR5의 농도는 인간 CFHR5 ELISA kit(NBP2-75250; NOVUS, Centennial, CO, USA)를 이용하여 측정하였다. CFHR5 항체가 도포되어 있는 96 well에 표준 시약(0 - 10 ng/mL) 및 시료를 100 µL씩 넣고 37 °C에

서 90분간 반응시켰다. 시약 및 시료를 제거한 후, 부착 항체(detection antibody) 100 μ L를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 60분간 반응시켰다. 3회 세척 후, 결합 용액(conjugate) 100 μ L를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 5회 세척 후, 기질액(substrate reagent) 90 μ L를 넣고 빛을 차단하여 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시켰다. 차단액(stop solution) 50 μ L를 첨가한 후, victor 3 1420 multilabel counter(Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 유의성을 확인하기 위해 실험은 3번 반복으로 수행하였다. 활액 CFHR5의 농도는 표준농도곡선에 의거하여 계산하였고 표준농도곡선의 상관계수(R^2)는 0.995이었다.

2.3. 활막세포 분리 및 배양:

활막조직을 잘게 잘라준 후, type II collagenase(Gibco, Waltham, MA, USA) 0.5 mg/mL가 포함된 무혈청 Dulbecco's minimum Eagle's medium(DMEM)(Welgene, Gyeongsan-si, Korea) 배지에 37 $^{\circ}$ C로 2시간 동안 배양하였다. 분리된 세포를 거르기 위해 멸균거즈에 여과 후, 3,000 rpm으로 5분 동안 원심분리 하였다. 침전물을 phosphate-buffered saline(PBS)(Welgene)에 세척 후 3,000 rpm으로 5분 동안 원심분리하는 과정을 두 번 반복하였다. 활막세포는 5% CO₂, 37 $^{\circ}$ C 조건에서 배양하였으며, 배지로는 10% fetal bovine serum(FBS)(Welgene), 1% penicillin-streptomycin(Hyclone, Logan, UT, USA)을 첨가하여 사용하였다. 림프구와 대식세포 오염을 피하기 위해 4 - 7회 계대배양한 활막세포를 사용하였다(30).

2.4. 골전구세포 분리 및 배양:

강직척추염과 교통사고 외상의 수술 환자 척추뼈를 10 - 20 mm³ 크기로 잘라준다. 비부착 골수세포를 제거하기 위해 PBS 세척을 5회 한 후, 집계

와 가위를 사용하여 뼈에 붙은 연조직과 근육을 완전히 제거하였다. 성장 배지로는 10% FBS(JR Scientific, Woodland, CA, USA), 1% penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM을 사용하였으며, 5% CO₂, 37 °C 조건에서 배양하였다. 주 2회 배지를 교체하였고, 배양은 한 달간 유지하였다. 뼈 조각으로부터 분리된 골전구세포는 2 - 3회 계대배양하여 사용하였다(19).

2.5. 조골세포주 배양:

생쥐 두개관 조골세포주 MC3T3-E1 cells은 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. 성장배지로는 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin이 포함 된 α -minimum essential medium (without ascorbic acid; Welgene)을 사용하였으며, 5% CO₂, 37 °C 조건에서 배양하였다. 조골세포 분화를 유도하기 위해 50 μ g/mL ascorbic acid 와 10 mmol/L β -glycerophosphate(Sigma, St. Louis, MO, USA)를 배지에 첨가하였으며, 3일마다 배지를 교체하였다(31).

2.6. Western blot 분석:

활막세포(20×10^4 Cells), MC3T3-E1 cells(10×10^4 Cells)을 6 well 배양접시에 부착시킨 후 약물을 처리하였다. 세포를 PBS로 세척한 후 세포 용해완충액, 단백질을 분해효소 억제제, 인산가수분해효소 억제제를 넣고 얼음 위에서 15분 동안 반응시켰다. 4°C, 12,000 rpm으로 15분 동안 원심분리한 후, bicinchoninic acid(BCA) protein assay kit(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)를 사용하여 단백질 농도를 측정하였다. 단백질을 30 μ g으로 정량하여 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis로 전기영동한 후 겔에서 nitrocellulose membrane(Amersham, Chicago, IL, USA)으로 단백질을 이동시켰다. 5% skim

milk와 0.05% tween-20이 함유된 TBS-T(20 mM Tris pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.05% Triton X-100)를 사용하여 membrane을 1시간 이상 blocking한 후, 일차항체를 4 °C에서 밤새 반응시키고 이차항체는 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 일차항체는 β -actin(1:5000; Sigma), interleukin 1 β (IL-1 β)(1:1000; Millipore, Billerica, MA, USA), interleukin 6(IL-6)(1:1000; Abcam, Cambridge, UK), cytochrome c oxidase subunit 2(COX2)(1:1000; Santa cruz, Dalls, TX, USA), OPN(1:1000; Abcam), RUNX2(1:1000; Abcam)을 사용하였다. 이차항체는 peroxidase affiniPure donkey anti-mouse igG(H + L), peroxidase-conjugated affiniPure donkey anti-rabbit igG(H + L)(Jackson Immunoresearch, Baltimore, MD, USA)을 사용하였다. Blotting된 membrane을 Immobilon Western(Millipore)으로 발광시킨 후, 이미지 분석 장비(Fusion Solo 6S; Vilber Lourmat, Marne-La-Vallée, France)로 특정 단백질의 발현을 확인하였다. 유의성을 확인하기 위해 실험은 3번 반복으로 수행하였다.

2.7. ALP 활성 측정:

강직척추염 및 정상대조군 골전구세포를 96 well 배양접시에 1×10^4 Cells로 분주하여 16시간 동안 부착시켰다. MC3T3-E1 cells 세포를 24 well 배양접시에 2×10^4 Cells으로 분주하여 16시간 동안 부착시켰다. 조골세포 분화를 유도하기 위해 성장배지에 50 μ g/mL ascorbic acid와 10 mmol/L β -glycerophosphate(Sigma)를 첨가하였고, CFHR5 재조합단백질(R&D, Minneapolis, MN, USA)을 0 - 1000 ng/mL 농도로 0 - 10일 처리하였다. 세포 분화 정도는 ALP colorimetric assay kit(Biovision, Milpitas, CA, USA)를 이용하여 활성도 평가를 하였다. 제조사의 지침에 따라 세포는 검정 완충액(assay buffer)으로 용해시켜 사용하였다. Victor 3 1420 multilabel counter(Perkin Elmer)를 사용하여 405 nM의 흡광도로 활성을 측정하였다. 단백질 값을 보정하기 위해 BCA assay를 통해 단백질

농도를 측정하였다. 재현성을 확인하기 위해 실험은 3번 반복으로 수행하였다.

2.8. 골 석회화 형성도 측정:

2.8.1. Alizarin-red 염색(ARS):

강직척추염 및 정상대조군 골전구세포를 96 well 배양접시에 1×10^4 Cells로 분주하여 16시간 동안 부착시켰다. MC3T3-E1 cells 세포를 24 well 배양접시에 2×10^4 Cells/500 μ L로 분주하여 16시간 동안 부착시켰다. 골 석회화를 유도하기 위해 성장배지에 50 μ g/mL ascorbic acid와 10 mmol/L β -glycerophosphate를 첨가하였고, CFHR5 재조합단백질을 0 - 1000 ng/mL 농도로 14 - 28일 처리하였다. 포르말린으로 고정한 세포를 alizarin-red 염색약(Vitrovivo, Rockville, MD, USA)에 15분간 염색하였다. 염색 된 세포를 증류수로 3회 세척 후 광학 현미경으로 관찰하였다. 재현성을 확인하기 위해 실험은 3번 반복으로 수행하였다.

2.8.2. von Kossa 염색:

강직척추염 및 정상대조군 골전구세포의 분리 및 부착과 약물 처리 조건은 2.8.1.에 기술된 바와 같이 수행하였다. 세포를 10% 포르말데히드로 고정한 후 암실에서 2% silver nitrate 용액으로 10분간 반응시켰다. 증류수로 세척하고 밝은 광선에 15분간 노출하였다. 재현성을 확인하기 위해 실험은 3번 반복으로 수행하였다.

2.8.3. Hydroxyapatite(HA) 염색:

강직척추염 및 정상대조군 골전구세포의 분리 및 부착과 약물 처리 조건은 2.8.1.에 기술된 바와 같이 수행하였다. 제공된 제조업체의 지침 (PA-1503; Lonza, Basel, Switzerland)에 따라 HA 염색을 하였다. 골전구

세포를 PBS로 세척한 후, 에탄올을 사용하여 실온에서 20분 동안 고정시켰다. 고정된 세포를 osteoimage 염색 용액으로 30분 동안 염색한 후 세척 완충액으로 세척하였다. 형광 현미경(Nikon, Minato, Toyko, Japan)을 사용하여 염색된 세포를 관찰하였다. 재현성을 확인하기 위해 실험은 3번 반복으로 수행하였다.

2.9. 강직척추염 유도 동물모델:

모든 실험은 동물 관리 및 사용위원회의 승인(HYU IACUC-H-2018-019A)을 받았으며 실험 동물 복지법, 실험동물관리 및 이용지침에 따라 실시하였다. Balb/c 배경의 SKG 마우스는 Sakaguchi 교수(Kyoto대학, Kyoto, Japan)로부터 제공받았으며 강직척추염 마우스 모델링을 위해 사용되었다(32). 실험동물은 specific pathogen free(SPF) 시설에서 12주까지 키워 실험에 사용하였다. 생후 8주령의 실험용 SKG 수컷 마우스 10마리[대조군(PBS, n = 5), 실험군(CFHR5 재조합단백질, n = 5)]를 준비한 후, curdlan (3 mg/kg)을 0, 2주째에 복강 내 주사하였다. 5주간 PBS 및 CFHR5 재조합단백질(0.5 mg/kg)을 주 2회씩 복강 내 주사하였고, 그 후 마우스가 희생되기까지 5주간 질병 활성도의 변화를 관찰하였다(Figure 1). 5주 동안 마우스의 발두께 및 몸무게를 측정하였다.

2.10. 영상 의학적 평가:

마우스의 양쪽 발목에 이소성 뼈(ectopic bone)의 생성 여부를 관찰하기 위해 micro-computed tomography(CT) 촬영을 하였다. 사용한 장비는 SKYSCAN 1272 ex-vivo micro-CT(Bruker, Billerica, MA, USA)이며, CT 스캔 파라미터를 60kV 강도, 166 μ A, Al 0.25 mm 필터 사용, 회전 단계 0.6°, 9.00 μ m pixel resolution로 설정하였다. 이미지 분석을 위해, 단면 회전(DataViewer), 분석(CTAn), 3차원 화상 생성(CTAn+CTVol)을 사용하였

다.

2.11. 조직형태학적 평가:

실험이 끝난 후 마우스를 희생시켜 발목 관절을 절취하였다. 마우스의 발 뒷꿈치 부분에서 활막염 및 부착염의 생성유무에 따른 조직학적 차이를 조사하기 위해 Hematoxylin & Eosin(H&E)법으로 염색하였다. 이소성 뼈의 생성 및 연골 파괴 정도를 확인하기 위해 Safranin-O 염색을 시행하였다. 발목 관절 조직은 10% 포르말린 용액에 넣고 실온에서 2일 동안 고정하였다. 5.5% Ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA)(VWR Chemicals, Radnor, PA, USA)용액을 넣고 일주일 동안 탈회 후 파라핀에 포매 시키고 약 3.5 μ M 두께로 만든 절편을 탈 파라핀 시켰다. 그 후, H&E와 Safranin-O(Sigma)로 염색하여 슬라이드 표본을 만들었고, 광학 현미경으로 관찰하였다.

2.12. 통계적 처리:

각 실험 결과에 대한 측정은 Microsoft Office Excel 2016(Microsoft, Raymond, WA, USA)을 사용하여 평균과 표준편차를 계산하였다. 유의성은 대조군에 대한 Student' s *t*-test로 비교하였으며, *p*값이 0.05 미만일 경우 유의하다고 판단하였다.

3. 성 적

3.1. 강직척추염과 골관절염에서 CFHR5 발현 확인:

실험군으로 강직척추염(n = 24) 그리고 대조군으로 골관절염(n = 26)을 선정하여 활액을 수집하였다. 강직척추염 환자군의 평균 나이는 37 ± 10.2세, 남성의 비율이 75.0%였다. 골관절염 환자군의 평균 나이는 71.8 ± 6.6세, 여성의 비율이 80.8%였다. ELISA 분석으로 실험군과 대조군의 CFHR5 발현을 확인하였다. 실험 결과, CFHR5는 강직척추염에서 2.8 ± 3.0 ng/mL, 골관절염에서 0.67 ± 1.4 ng/mL로 발현되었으며, 실험군이 대조군에 비해 유의하게($p < 0.001$) 높게 나타났다(Figure 2).

3.2. 활막세포에서 염증 유도 확인:

CFHR5가 류마티스관절염 및 골관절염에서 염증을 유도시키는지 확인하기 위해 western blot을 실시하였다. CFHR5 재조합단백질 1000 ng/mL 농도로 4, 24, 48시간 처리하여 염증 유발 사이토카인인 IL-6, IL-1 β 와 염증 반응을 매개하는 COX2 단백질의 발현을 확인하였다. 류마티스관절염 활막세포에서, IL-6 단백질은 CFHR5 처리군, 48시간에서 유의하게($p < 0.01$) 발현이 증가하는 것으로 나타났다. IL-1 β 단백질은 CFHR5 처리군과 대조군 사이에 차이를 보이지 않았다. COX-2 단백질은 CFHR5 처리군, 4, 24, 48시간에서 발현이 유의하게($p < 0.05$ 이하) 증가하였다(Figure 3A). 골관절염에서 IL-6 단백질은 CFHR5 처리군, 48시간에서 유의하게($p < 0.01$) 발현이 증가하였다. IL-1 β 단백질은 CFHR5 처리군과 대조군 사이에 차이를 보이지 않았다. COX-2 단백질은 CFHR5 처리군, 24, 48시간에서 유의하게($p < 0.01$) 발현이 증가하였다(Figure 3B).

3.3. 조골세포주에서 골 형성 확인:

MC3T3-E1 cells 세포에서 CFHR5가 골 분화를 일으키는지 확인하기 위해, CFHR5 재조합단백질 0 - 1000 ng/mL를 1 - 10일간 처리한 후 ALP 활성을 측정하였다. 실험 결과, 분화 1일에서는 CFHR5 1000 ng/mL에서 ALP의 활성도가 유의하게($p < 0.05$) 증가하였다. 분화 3일에서는 CFHR5 500, 1000 ng/mL에서 ALP의 활성도가 유의하게($p < 0.05$ 이하) 증가하였다. 분화 7일에서는 CFHR5 100, 500 그리고 1000 ng/mL에서 ALP의 활성도가 유의하게($p < 0.01$ 이하) 증가하였다. 분화 10일에서는 CFHR5 100, 500 그리고 1000 ng/mL에서 ALP의 활성도가 유의하게($p < 0.01$ 이하) 증가하였다. CFHR5를 최대 1000 ng/mL로 처리할수록, 분화 날짜를 길게 할수록 ALP 활성도가 증가하는 것을 확인하였다(Figure 4).

같은 농도 및 시간 조건으로, 분화 마커인 RUNX2와 OPN의 발현 정도를 확인해보았다. RUNX2의 활성도는 분화 1, 3 그리고 10일, CFHR5 1000 ng/mL($p < 0.05$ 이하)에서 가장 유의하게 증가하였다. OPN의 활성도는 분화 1, 7일, CFHR5 1000 ng/mL에서 가장 유의하게($p < 0.001$) 증가하였다. 분화 10일에는 OPN의 발현이 거의 나타나지 않았다(Figure 5).

MC3T3-E1 cells 세포에서 CFHR5가 골 석회화를 일으키는지 확인하기 위해, CFHR5 재조합단백질 0 - 1000 ng/mL를 14, 21, 28일간 처리한 후 ARS로 염색하였다. CFHR5를 1000 ng/mL로 처리할 수록 ARS와 칼슘의 결합이 많아졌고, 붉게 염색된 부분이 증가하였다. 28일에 가장 높은 골 석회화를 보였다(Figure 6).

3.4. 골전구세포에서 골 형성 확인:

강직척추염 및 정상대조군 골전구세포에서 CFHR5 재조합단백질 0 - 1000 ng/mL를 1 - 21일간 처리하였으며, 골 분화를 관찰하기 위해 ALP 활성을 측정하였다. 정상대조군 골전구세포에서 7일까지 ALP 활성도에 차이를 보

이지 않았다. CFHR5 100 ng/mL를 21일까지 처리시 ALP 활성이 유의하게($p < 0.05$) 증가하였으며, 고농도로 갈수록 높은 분화를 나타내지는 않았다(Figure 7). 강직척추염 골전구세포에서는 분화 14일에 대조군 대비 CFHR5 처리군에서 유의하게($p < 0.05$) 높은 분화를 나타냈다(Figure 8).

강직척추염 및 정상대조군 골전구세포에서 CFHR5 재조합단백질 0 - 1000 ng/mL를 각 14 - 21일 또는 14 - 28일간 처리하였으며, 골 석회화를 관찰하기 위해 ARS, von Kossa, HA 염색을 하였다. ARS 염색 결과, 정상대조군 골전구세포에서는 28일, 1000 ng/mL에서(Figure 9), 강직척추염 골전구세포에서는 21일, 1000 ng/mL에서 가장 강하게 염색되었다(Figure 10). von Kossa 결과, 정상대조군 골전구세포에서는 28일, 1000 ng/mL에서(Figure 11), 강직척추염 골전구세포에서는 21일, 1000 ng/mL에서 가장 강하게 염색되었다(Figure 12). HA staining 결과, 정상대조군 골전구세포에서는 28일, 1000 ng/mL에서(Figure 13), 강직척추염 골전구세포에서는 21일, 1000 ng/mL에서 가장 강하게 염색되었다(Figure 14). 강직척추염과 정상대조군 골전구세포에서 CFHR5에 의한 골 석회화 강도를 비교했을 때, 강직척추염에서 석회화가 많이 진행된 것을 확인하였다.

3.5. 강직척추염 유도 동물모델에서 CFHR5의 효과 확인:

3.5.1. SKG 마우스의 발두께 및 몸무게 변화 확인:

Curdlan으로 질병 활성도를 높인 SKG 마우스에게 CFHR5 재조합단백질을 주 2회씩 5주간 복강투여 하였으며, 매 주마다 발두께와 몸무게를 측정하였다. 발두께를 비교한 결과, 대조군(PBS)군과 실험군(CFHR5)에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Figure 15A,B). 몸무게를 비교한 결과, 대조군과 실험군에서 유의한 차이를 보이지 않았다(Figure 15C). CFHR5는 SKG 마우스의 염증 활성화에 영향을 끼치지 않는 것을 확인하였다.

3.5.2. SKG 마우스에서 micro-CT 촬영:

SKG 마우스의 양쪽 발에서 이소성 뼈의 생성을 관찰하기 위해 micro-CT 촬영을 하였다. 그 결과, 대조군 대비 실험군에서 이소성 뼈가 유의하게($p < 0.01$) 증가한 것을 확인하였다(Figure 16A,B). 저밀도의 뼈의 부피도 실험군에서 유의하게($p < 0.05$) 높게 나타났다(Figure 16C). 이소성 뼈 생성 두께와 저밀도 뼈의 부피가 실험군에서 더 높게 나타난 것으로 보아, CFHR5는 SKG 마우스의 뼈 형성에 영향을 끼치지 않는 것을 확인하였다.

3.5.3. SKG 마우스에서 조직병리학적 분석:

SKG 마우스에서 활막염(synovitis), 골부착염(enthesis), 이소성 뼈가 생성되었는지 조직학적으로 관찰하기 위해 H&E와 Safarin O 염색을 수행하였다. 대조군 대비 실험군에서 Safarin O 염색이 증가된 것으로 보아 이소성 뼈가 형성된 것을 확인하였으며, 활막염과 골부착염은 관찰되지 않았다. 강직척추염 유도 모델인 SKG 마우스에서 CFHR5가 이소성 뼈의 생성을 유도시킨다는 결과를 확인하였다(Figure 17).

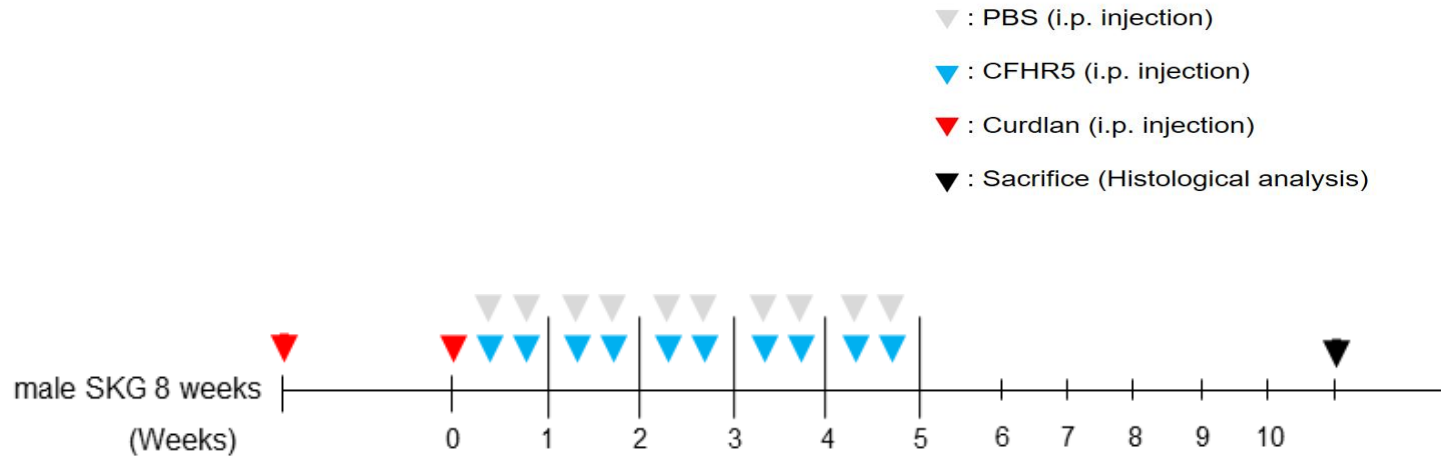


Figure 1. Timeline of CFHR5 administration to SKG mice. SKG mice were treated with CFHR5 (0.5 mg/kg)(n = 5) or PBS (n = 5) i.p. twice a week over the 5 weeks. Mice were sacrificed after 10 weeks. CFHR5: complement factor H-related protein 5; i.p.: intraperitoneal injection; PBS: phosphate-buffered saline.

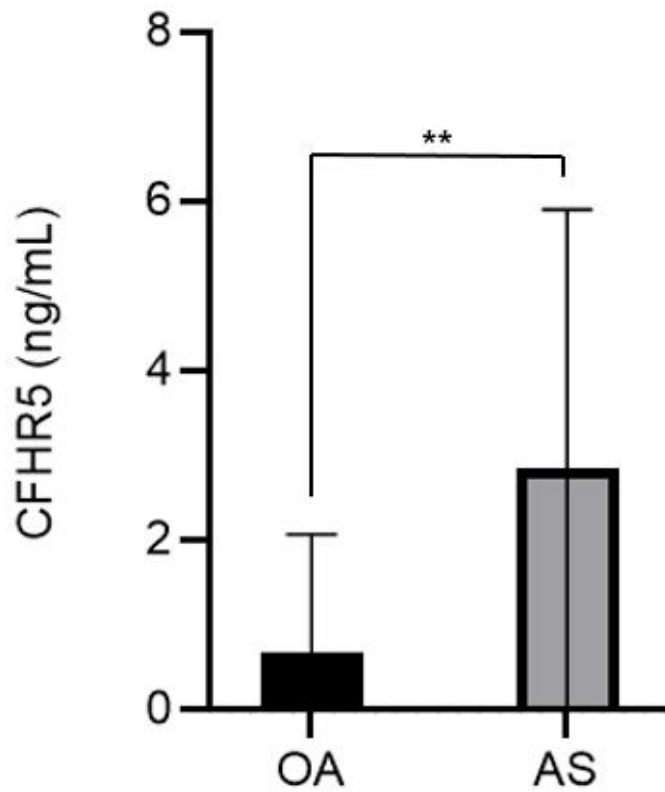


Figure 2. CFHR5 ELISA measured in SF of AS and OA. The ELISA was done to compare CFHR5 in AS (n = 24) and OA (n = 26). The expression of CFHR5 was higher in AS than in OA (***) AS: ankylosing spondylitis; OA: osteoarthritis; SF: synovial fluid.

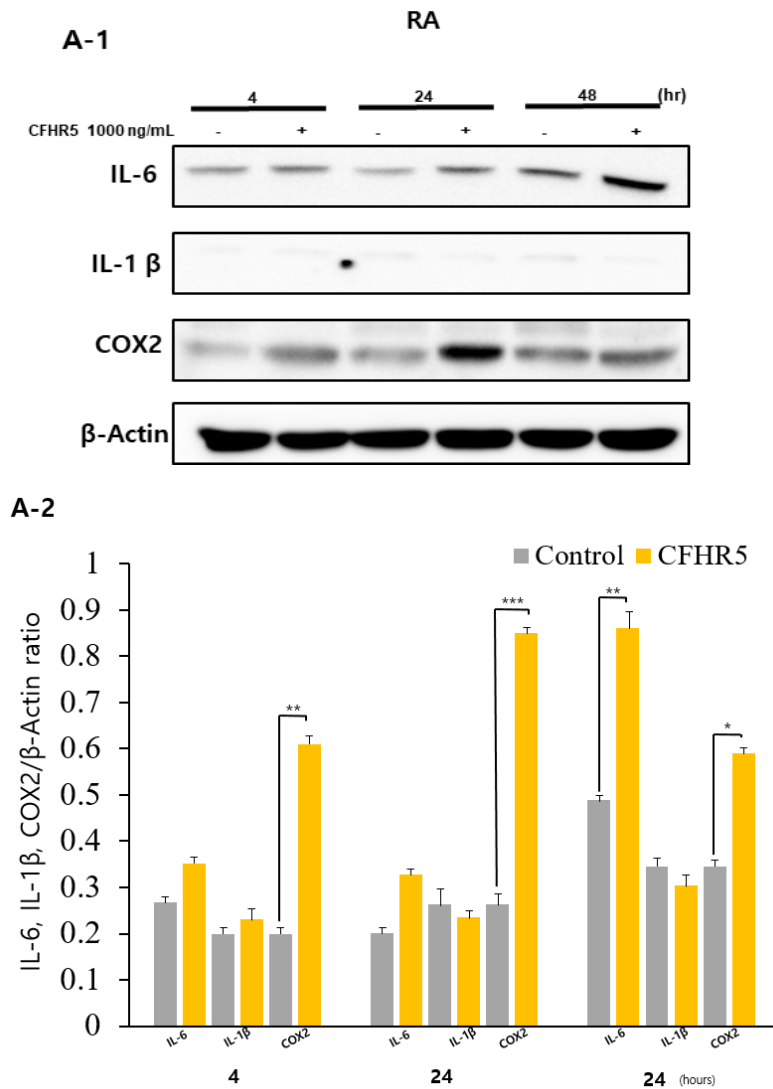


Figure 3A. CFHR5 upregulates the expression of inflammatory proteins in FLS (continued). RA FLS were treated with CFHR5 (1000 ng/mL) for the indicated time and IL-6, IL-1β and COX2 levels were measured by western blotting. (A-1) IL-6, IL-1β and COX2/β-Actin (loading control) ratios were compared between the

control and CFHR5 groups. In RA FLS, the expression of CFHR5 increased at 48 hours for IL-6 and at 4, 24 and 48 hours for COX2. (A-2) The experiment was repeated three times. Error bars represent mean \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ compared with the control groups. FLS: fibroblast-like synoviocytes; RA: rheumatoid arthritis.

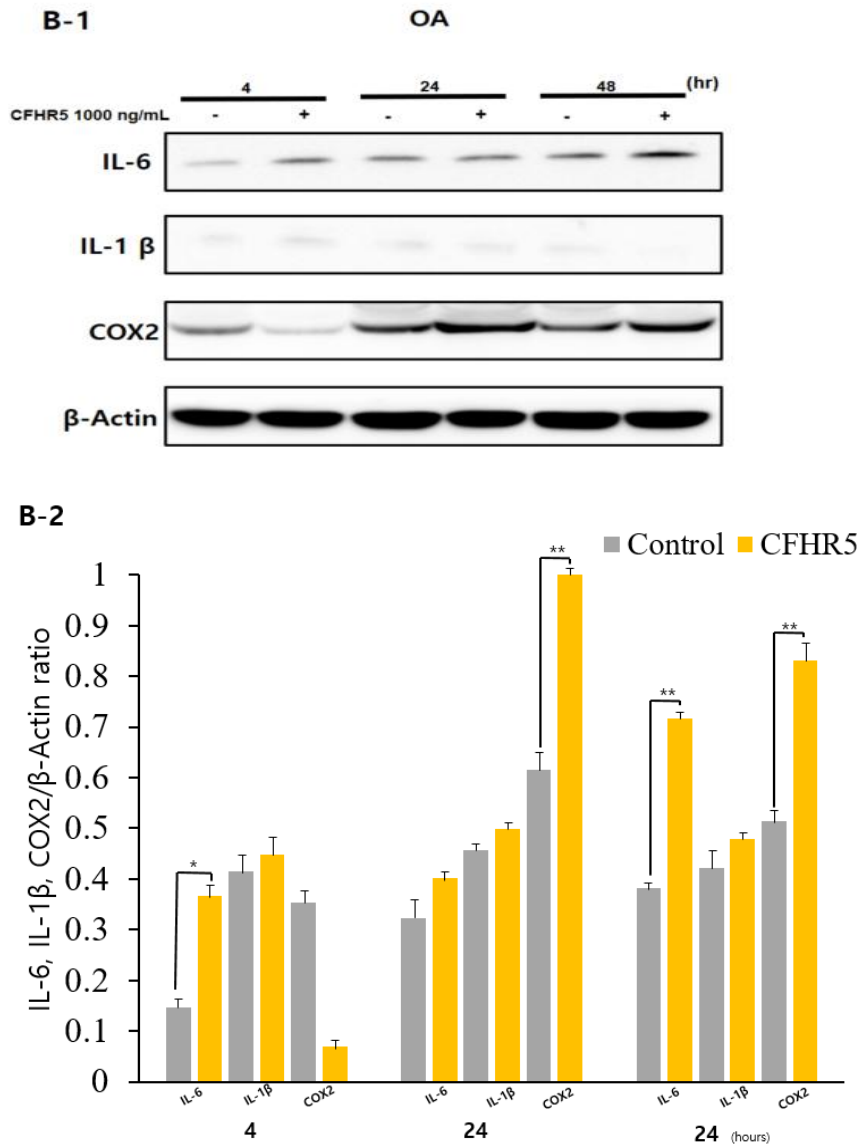


Figure 3B. CFHR5 upregulates the expression of inflammatory proteins in FLS. OA FLS were treated with CFHR5 (1000 ng/mL) for the indicated time and IL-6, IL-1 β and COX2 levels were measured by western blotting. (B-1) IL-6, IL-1 β and COX2/ β -Actin (loading control)

ratios were compared between the control and CFHR5 groups. In OA FLS, the expression of CFHR5 increased at 6 and 48 hours for IL-6 and at 24 and 48 hours for COX2. (B-2) The experiment was repeated three times. Error bars represent mean \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ compared with the control groups.

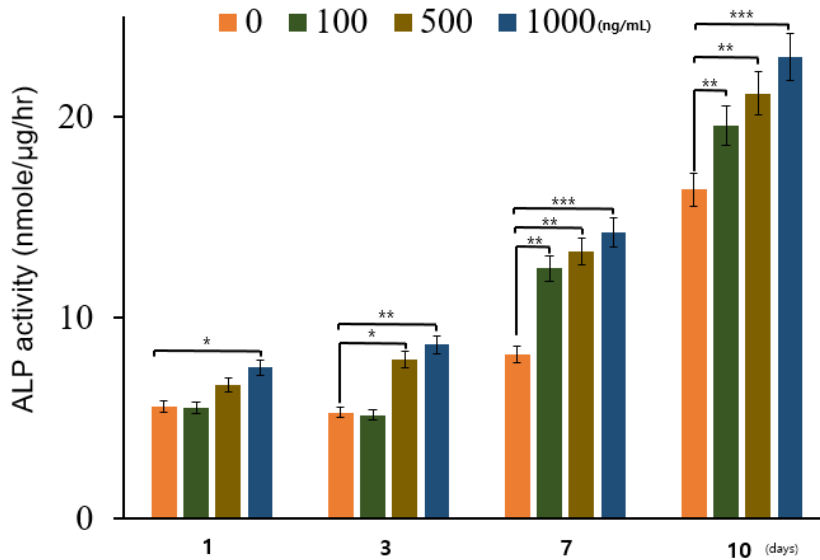


Figure 4. CFHR5 upregulates the expression of ALP in MC3T3-E1 cells. ALP activity in MC3T3-E1 cells following treatment with different concentrations (0 - 1000 ng/mL) of CFHR5 for the indicated time. ALP activity increased the most at CFHR5 1000 ng/mL for 10 days indicating bone differentiation increased. The experiment was repeated three times. Error bars represent mean \pm SD. * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001 compared with the control groups. ALP: alkaline phosphatase.

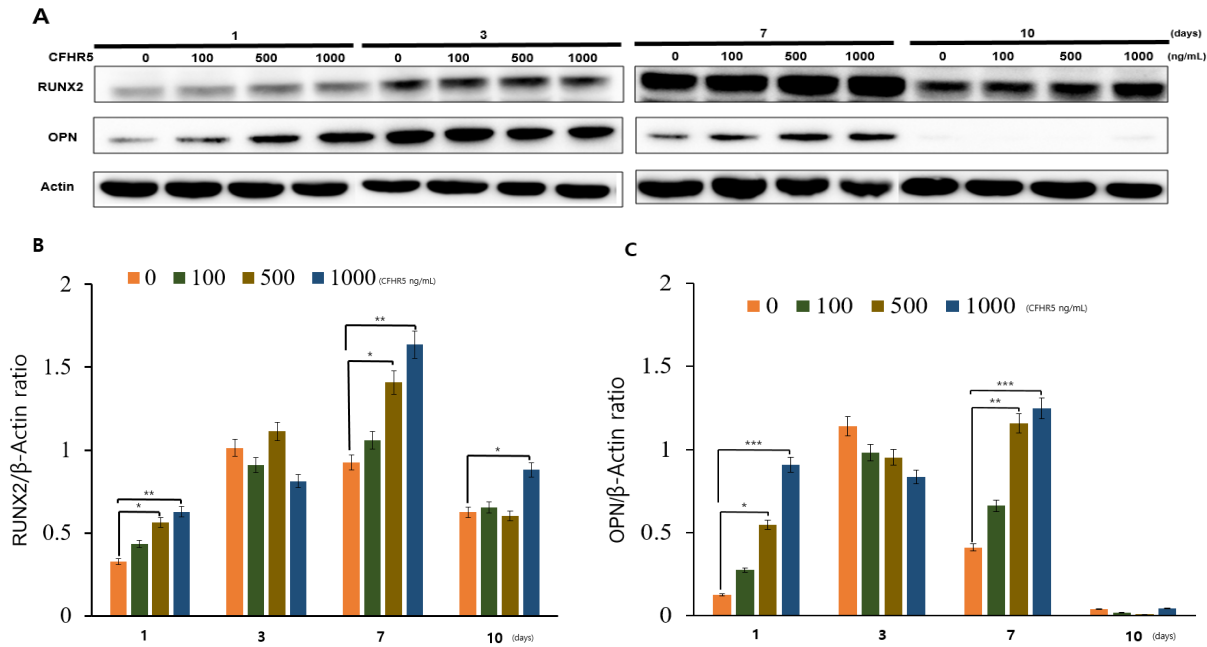


Figure 5. The expression of CFHR5 differentiation markers in MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were treated with CFHR5 (0 - 1000 ng/mL) for the indicated time, RUNX2 and OPN levels were measured by western blotting. (A) The activity of RUNX2 was increased at 1000 ng/mL of CFHR5 at 1, 3, and 10 days of differentiation. (B) OPN activity was increased at 1000 ng/mL of CFHR5 at 1 and 7 days of differentiation. (C) The experiment was repeated three times. Error

bars represent mean \pm SD. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001 compared with the control groups.

OPN: Osteopontin; RUNX2: runt--related transcription factor 2.

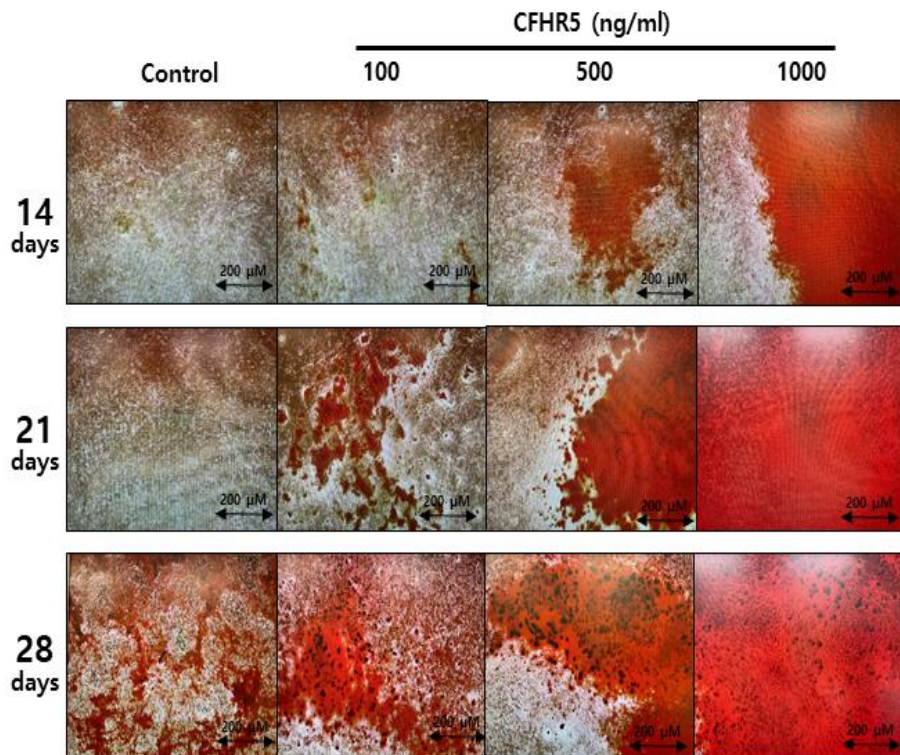


Figure 6. CFHR5 upregulates the expression of ARS in MC3T3-E1 cells. MC3T3-E1 cells were treated with CFHR5 (0 - 1000 ng/mL) for the indicated time and ARS activity was measured. ARS activity increased the most at CFHR5 1000 ng/mL, bone mineralization increased. The experiment was repeated three times. Scale bar, 200 μ m. ARS: alizarin red staining.

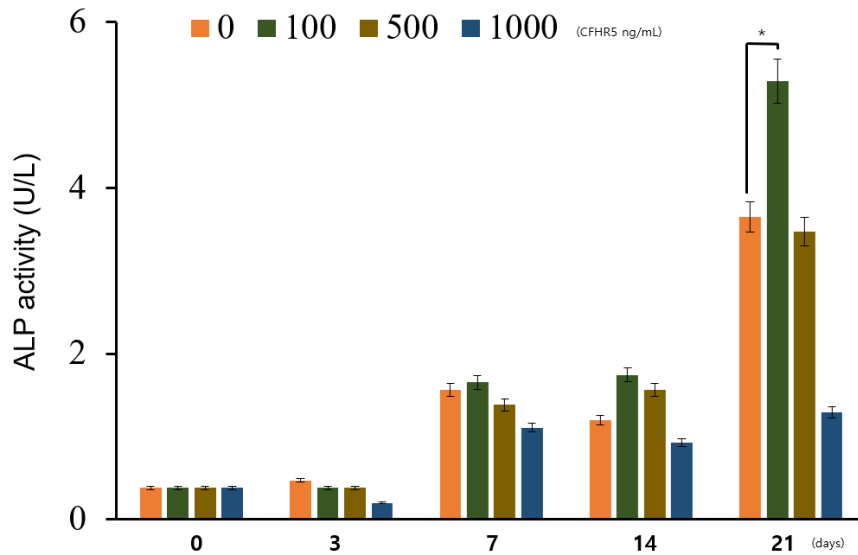


Figure 7. CFHR5 upregulates the expression of ALP in Ct osteoprogenitor cells. ALP activity in Ct osteoprogenitor cells following treatment with different concentrations (0 - 1000 ng/mL) of CFHR5 for the indicated time. ALP activity increased the most at CFHR5 100 ng/mL for 21 days, indicating bone differentiation increased. Error bars represent mean \pm SD. * $p < 0.05$ compared with the control groups. Ct: control.

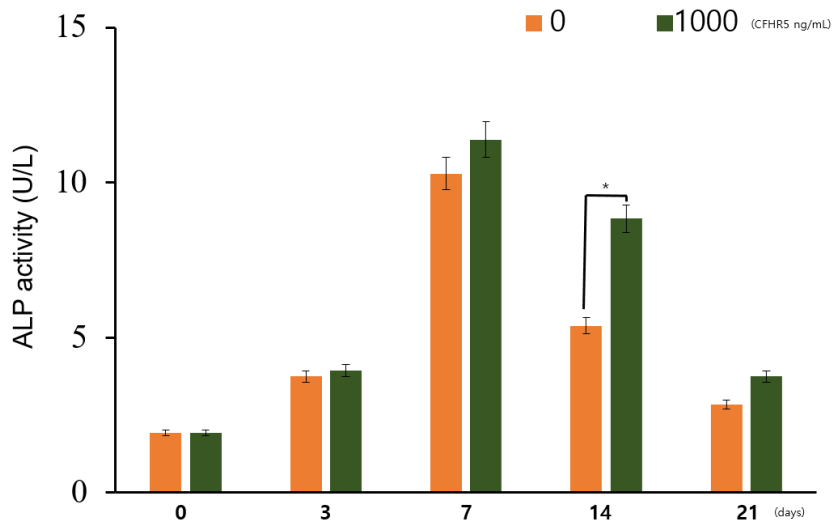


Figure 8. CFHR5 upregulates the expression of ALP in AS osteoprogenitor cells. ALP activity in AS osteoprogenitor cells following treatment with different concentrations (0, 1000 ng/mL) of CFHR5 for the indicated time. ALP activity was significantly increased compared to the control group at CFHR5 1000 ng/mL for 21 days. The experiment was repeated three times. Error bars represent mean \pm SD. * $p < 0.05$ compared with the control groups.

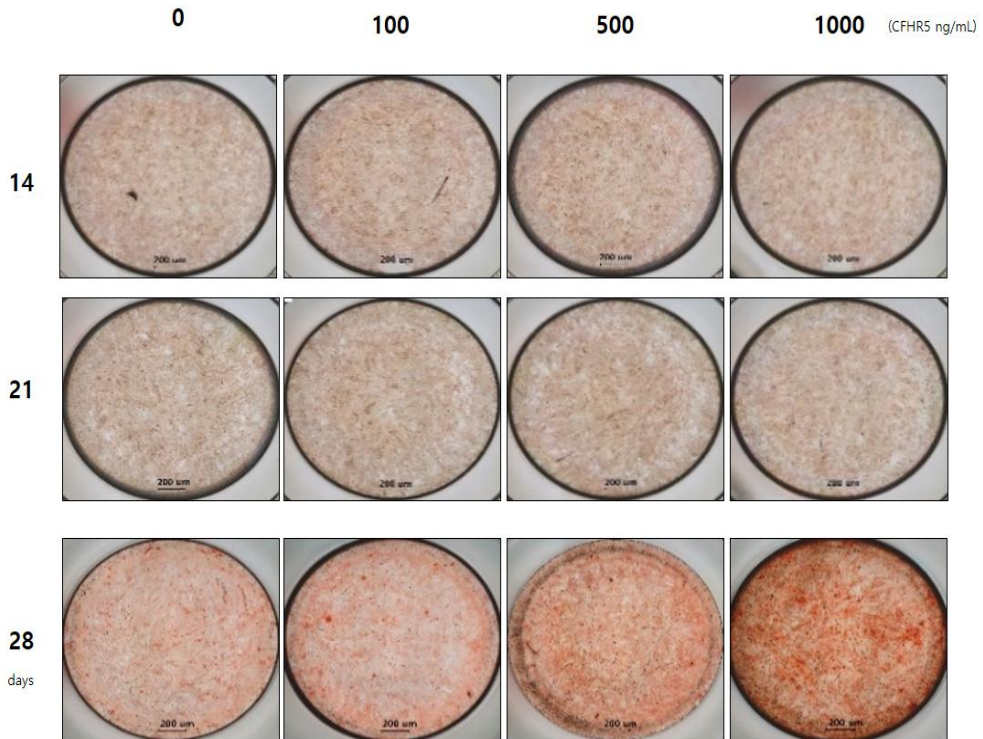


Figure 9. CFHR5 upregulates the expression of ARS in Ct osteoprogenitor cells. ARS in Ct osteoprogenitor cells were treated with CFHR5 (0 - 1000 ng/mL) for the indicated time and ARS activity was measured. ARS activity increased the most at CFHR5 1000 ng/mL for 28 days, indicating bone mineralization increased. The experiment was repeated three times. Scale bar, 200 μ M.

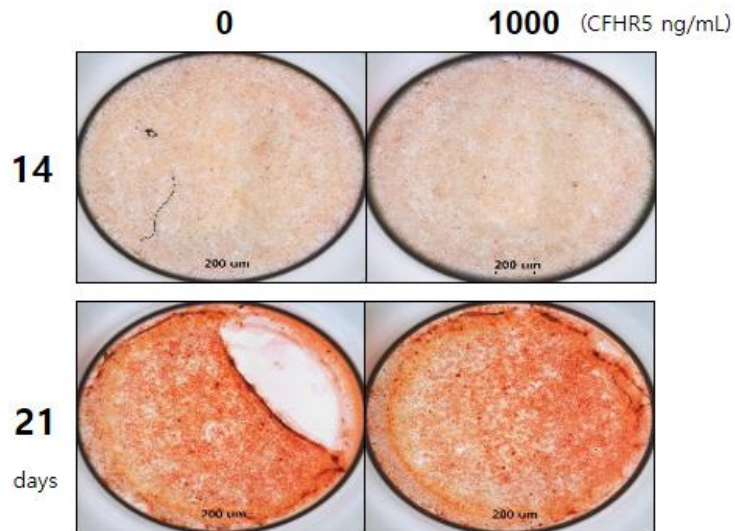


Figure 10. CFHR5 upregulates the expression of ARS in AS osteoprogenitor cells. ARS in AS osteoprogenitor cells were treated with CFHR5 (0, 1000 ng/mL) for the indicated time and ARS activity was measured. ARS activity was increased at CFHR5 1000 ng/mL, indicating bone mineralization increased. The experiment was repeated three times. Scale bar, 200 μ M.

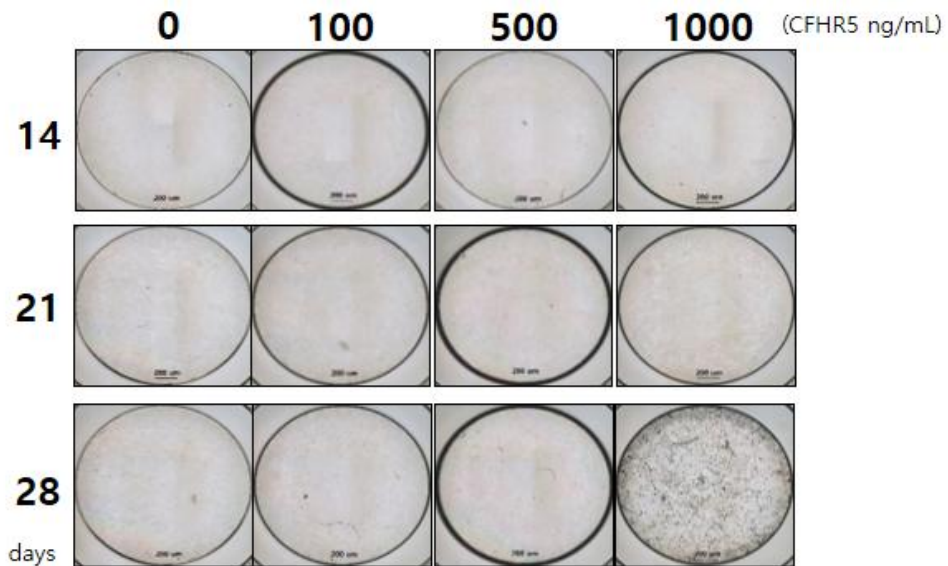


Figure 11. CFHR5 upregulates the expression of von Kossa in Ct osteoprogenitor cells. von Kossa staining in Ct osteoprogenitor cells were treated with CFHR5 (0 - 1000 ng/mL) for the indicated time and von Kossa activity was measured. von Kossa activity was increased at CFHR5 1000 ng/mL for 28 days, indicating bone mineralization increased. The experiment was repeated three times. Scale bar, 200 μ M.

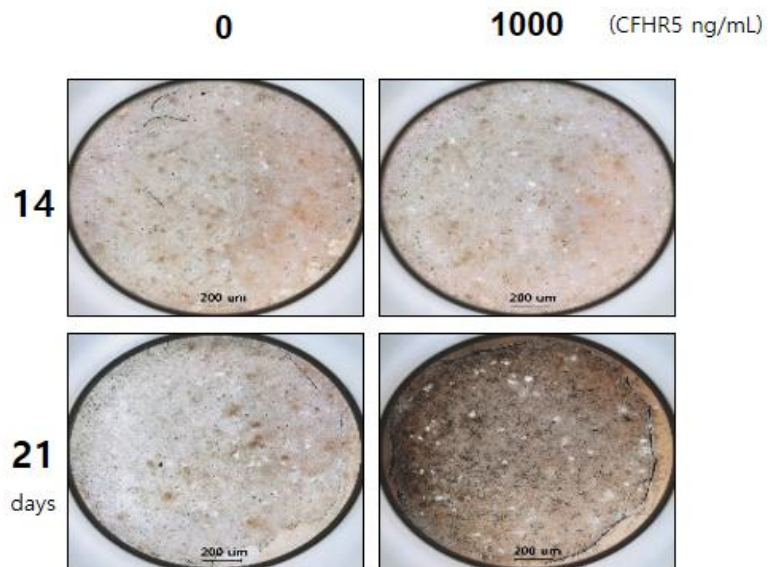


Figure 12. CFHR5 upregulates the expression of von Kossa in AS osteoprogenitor cells. von Kossa staining in AS osteoprogenitor cells were treated with CFHR5 (0 - 1000 ng/mL) for the indicated time and von Kossa activity was measured. von Kossa activity was increased at CFHR5 1000 ng/mL for 28 days, indicating bone mineralization increased. The experiment was repeated three times. Scale bar, 200 μ M.

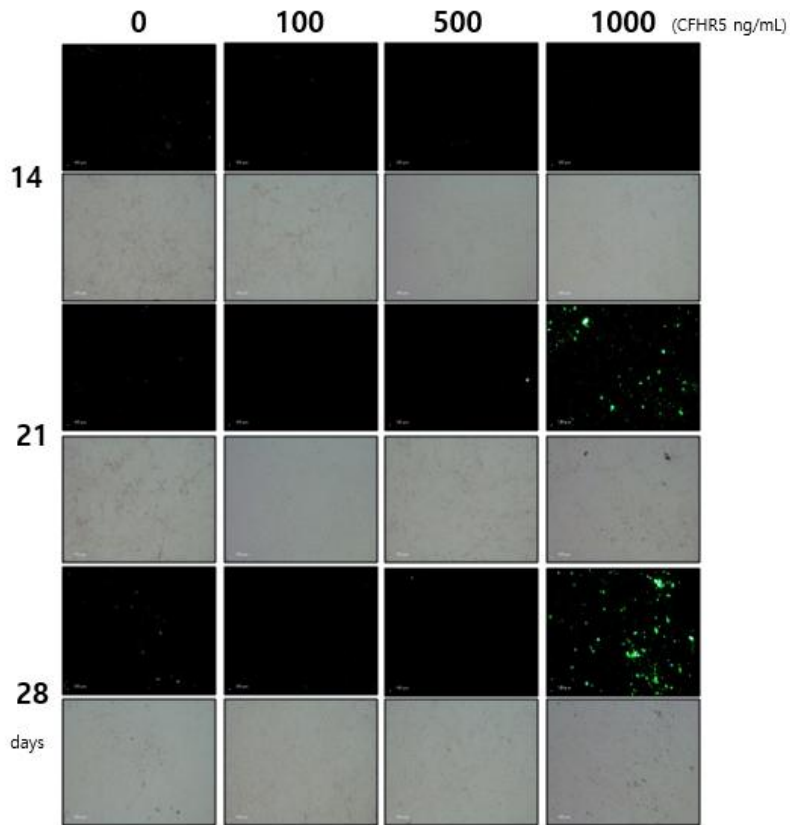


Figure 13. CFHR5 upregulates the expression of HA staining in Ct osteoprogenitor cells. HA staining in Ct osteoprogenitor cells treated with CFHR5 (0 - 1000 ng/mL) for the indicated time and HA activity was measured. HA activity was increased at CFHR5 1000 ng/mL for 28 days, indicating bone mineralization increased. The experiment was repeated three times. Scale bar, 200 μ m. HA: hydroxyapatite.

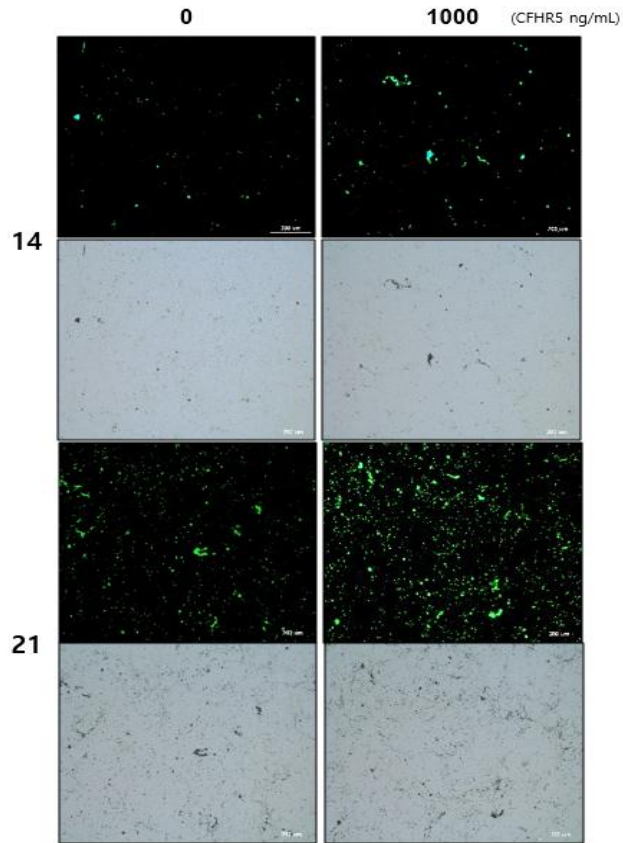


Figure 14. CFHR5 upregulates the expression of HA staining in AS osteoprogenitor cells. HA staining in AS osteoprogenitor cells were treated with CFHR5 (0 - 1000 ng/mL) for the indicated time and HA activity was measured. HA activity was increased at CFHR5 1000 ng/mL for 28 days, indicating bone mineralization increased. The experiment was repeated three times. Scale bar, 200 μ M. HA: hydroxyapatite. Scale bar, 200 μ M.

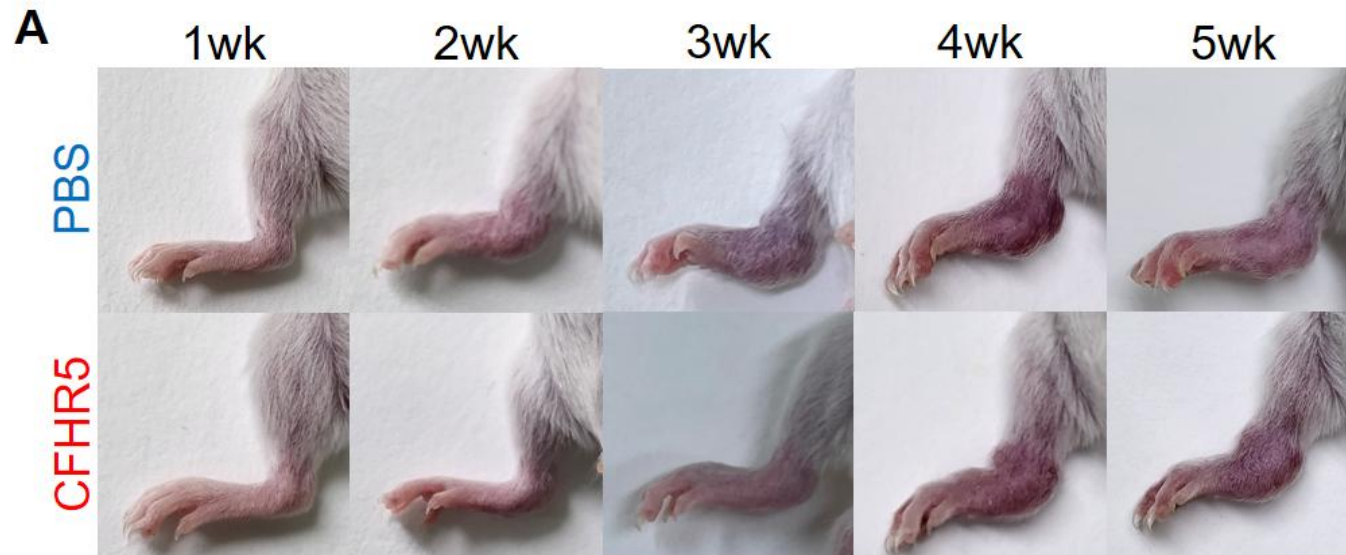


Figure 15A. Paw thickness and weight changes in CFHR5-treated SKG mice (continued). CFHR5 was injected twice a week through the 5 weeks, i.p.. i.p.: intraperitoneally; wk: week.

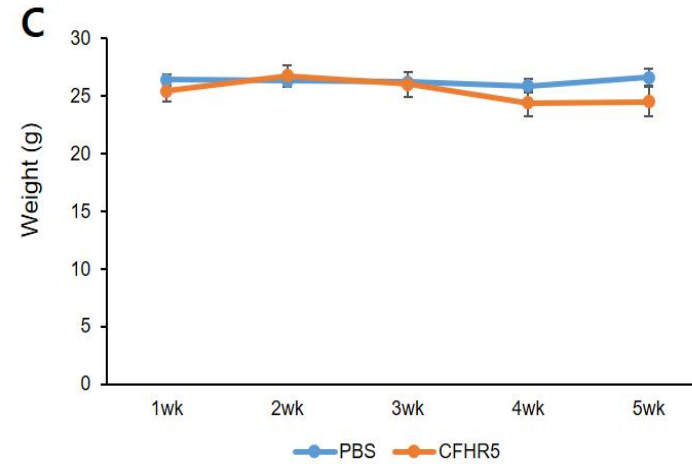
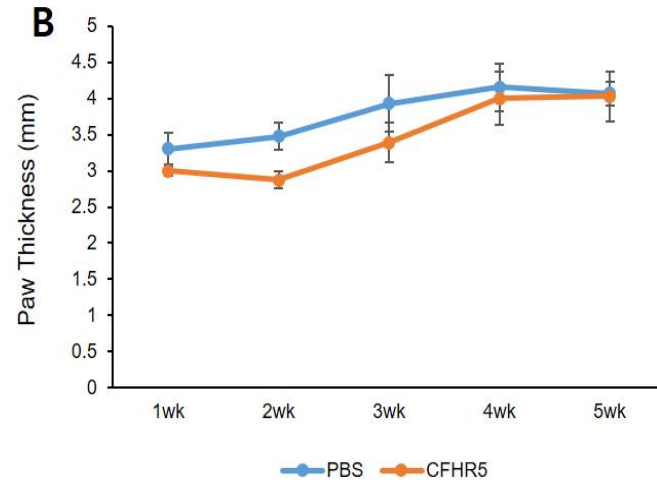


Figure 15B,C. Paw thickness and weight changes in CFHR5-treated SKG mice. There was no significant difference between the control group (PBS) and the experimental group (CFHR5).

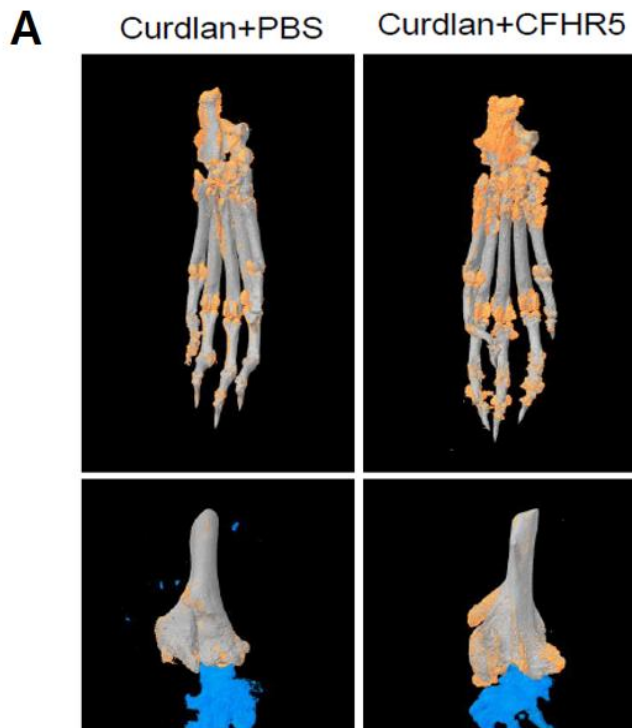


Figure 16A. Ectopic bone and low density bone were increased in CFHR5-treated SKG mice. SKG mice were subjected to micro-CT scans of both paws. The part stained orange is the ectopic bone (continued).

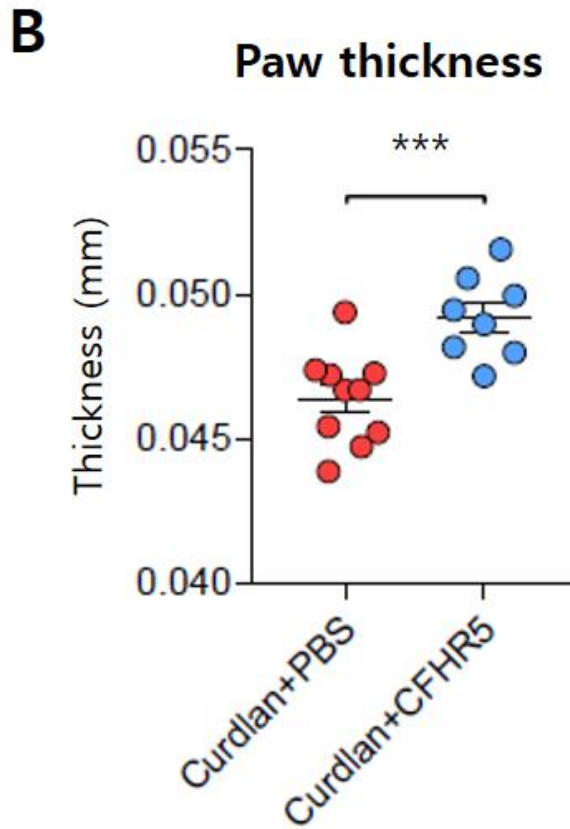


Figure 16B. Ectopic bone and low density bone were increased in CFHR5-treated SKG mice. The paw thickness of the ectopic bone increased in the CFHR5 group, compared with the control group. *** $p < 0.001$ compared with the control group (continued).

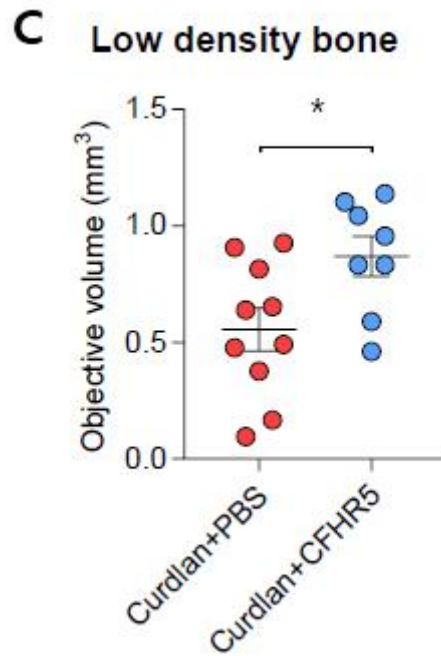


Figure 16C. Ectopic bone and low density bone were increased in CFHR5-treated SKG mice. The volume of low density bone increased in the CFHR5 group, compared with the control group. * $p < 0.05$ compared with the control group.

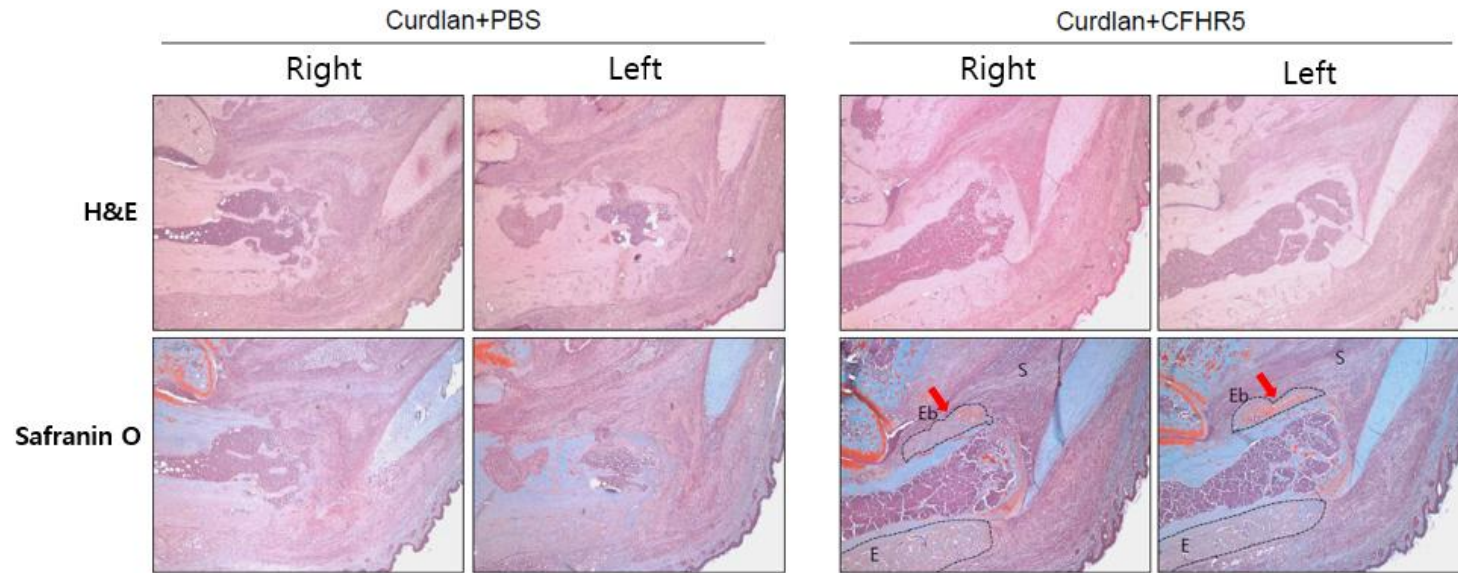


Figure 17. The results of histopathological analysis of tissue from CFHR5-treated SKG mice. The ectopic bone is red (red arrow) on Safranin-O stained tissue. E: enthesitis; Eb: ectopic bone; H&E: Hematoxylin & Eosin; S: synovitis.

4. 고찰

본 연구는 강직척추염의 병인이 명확하지 않고 구체적인 진단 지표가 없어서 조기 진단 및 치료가 어렵다는 점에 기초하였다. HLA-B27 유전자는 강직척추염을 진단하는데 중요한 유전 인자이지만, 보인자의 10%에서만 질병이 나타난다. HLA-B27에 대해 양성이라도 대부분은 건강하므로, 이 유전자와 병원성 메커니즘은 불분명하다(33). 흔히 이용되는 임상 지표인 적혈구침강속도(erythrocyte sedimentation rate, ESR), 반응성단백질(C-reactive protein, CRP)은 급성기 반응을 알아볼 때 측정하고 있다(34). ESR은 염증반응에 의해 생성된 섬유소원(fibrinogen)이 적혈구의 응집반응을 초래하여 침강 속도가 증가하는 것을 수치화한 값이다. 적혈구의 크기, 모양, 수, 면역글로불린 그리고 환자의 나이에 영향을 받을 수 있어서 염증반응을 직접적으로 나타낸다고 보기는 어렵다(35). 그에 비해 CRP는 염증 반응이 빠르고, 연령에 따른 차이가 없다는 장점을 가지고 있다(36). 염증 반응에 의해 활성화된 대식세포들은 IL-1 β , IL-6, TNF- α 등의 염증성 사이토카인을 생성, 분비하게 된다. CRP는 손상된 세포의 포스파티딜콜린(phosphatidycholine)에 결합하여 외부 병원체를 인식하게 하고, 보체계를 활성화시킨다(37). 보체계는 선천면역의 핵심이며, 자가면역 질환 및 염증성 질환에서 증가한다고 알려져 있다(38). 강직척추염의 혈청과 활액에서 보체계 단백질인 C3가 활성화된다는 연구들이 다수 보고되어 있다(39-45). 최근 연구에 따르면, 강직척추염의 다양한 in vivo 모델에서 보체계의 영향력이 밝혀지고 있다. Proteoglycan 유도 마우스에서 C-terminal of extracellular fibrinogen-binding protein of *Staphylococcus aureus*(Efb-C)를 사용하여 보체계를 억제시켰을 때, 강직척추염의 질병활성도가 완화된다는 연구가 있다(46). 보체계 조절 관절염 모델인 Collagen Ab-induced arthritis(CAIA)에서 척추관절염의 병변이 나타난다는 보고가 있다(47).

Factor H(FH)와 골 형성의 상관성에 대한 연구에 따르면, FH의 부재가 골 분화, 밀도, 석회화를 감소시키며, 뼈의 구조에도 영향을 끼친다고 되어있다(48,49). 강직척추염의 지표로 선정된 CFHR5는 factor H related(FHR) 단백질의 구성원 중 하나이며, C3와 결합하여 활성을 돕는다(7). FHR 단백질은 보체 조절인자인 factor H와 구조적으로 유사하지만, 생물학적 기능 및 기전은 제대로 밝혀지지 않았다(50). 강직척추염 및 골 관절염 환자의 활액에서 CFHR5 농도를 비교했을 때, 강직척추염에서 유의하게 높게 관찰되었다. 이러한 현상을 토대로, 본 연구에서는 CFHR5가 골 재형성 및 염증에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

In vitro에서 CFHR5가 염증을 심화시키는지 확인하기 위해 활막세포를 활용하였다. 활막세포에 CFHR5를 처리했을 때, IL-6 및 COX2의 발현이 증가했고, 이는 CFHR5가 초기 염증 반응에 관여한다는 것을 시사한다.

강직척추염의 가장 큰 특징은 척추 마디에 새로운 뼈가 과도하게 만들어지면서 점차 대나무처럼 굳는 척추 강직이 생긴다는 것이다(1). 위와 같은 특성을 가장 잘 반영한 in vitro 모델을 구축하기 위해, 조골세포를 선정하였다. 조골세포주인 MC3T3-E1 cells 세포는 골 형성 과정 중 세포의 증식, 분화, 석회화 등의 골아세포와 유사한 대사적 특이성을 가지고 있다. 골전구세포는 강직척추염 환자의 척추뼈로부터 분리, 배양하였고 조골세포의 특성을 잘 나타내는 일차 세포이다(19).

골세포 분화는 다양한 성장요인과 사이토카인 및 유전자의 발현에 의해 조절된다. RUNX2는 collagen type I, osteocalcin(OCN), OPN과 같은 조골세포 분화 마커 유전자와 결합하고, 발현을 증가시킴으로써 골 분화를 촉진시킨다. OPN은 골 형성 초기과정에서 세포외기질에 골아세포를 부착시켜서 골 형성을 조절한다(51). 분자 수준에서 세포 분화를 조사하기 위해, 조골세포 관련 유전자인 RUNX2, OPN을 western blot으로 분석하였다. 골세포 분화의 초기표지인자로 알려져 있는 ALP는 세포 외막과 석회화 조직의 기질 소포에서 높은 농도로 발현되며, 세포 분화의 조절자 역할을 한다(52). In vitro 모델에서 RUNX2, OPN 그리고 ALP 활성도의 변화를 측정한다

결과, CFHR5 처리군에서 해당 수치들이 증가하였으며, 골 분화가 촉진되는 것을 확인하였다.

조골세포는 분화하는 과정에서 무기질을 형성하며, 골 석회화를 일으킨다. 이는 골 분화에서 중요한 후기표식인자로 알려져 있다(53). 골 석회화를 관찰하기 위해 세 가지 염색법을 활용하였다. ARS는 식물성 염료로, 칼슘에 특이적으로 흡착력이 높다. von Kossa 염색법은 석회화되는 세포 속 칼슘, 칼슘을 염색할 수 있다. HA 염색법은 인산, 칼슘 화합물을 염색하여 세포 내 석회화를 관찰할 수 있다(54). CFHR5 처리군에서 세포 내 골 석회화를 관찰한 결과, 20일 이상 분화 유도를 시켰을 때, 석회화는 더 강하게 발생하였다. 위 결과들로부터, 강직척추염 in vitro 모델에서 CFHR5는 골 형성을 유도시킨다는 것을 확인하였다.

강직척추염의 in vivo 모델에서 CFHR5의 효과를 확인하기 위해 말초관절염, 골부착염 등 강직척추염의 병변을 잘 반영한 SKG 마우스를 선정하였다. CFHR5 재조합단백질을 마우스에게 5주간 투여한 후, 영상 및 조직학적 평가를 실시하였다. micro-CT로 관찰하였을 때, 마우스의 양쪽 발에서 이소성 뼈가 생성된 것을 확인하였다. H&E 및 Safarin O를 마우스의 발뒤꿈치 조직에 염색하였을 때, 마찬가지로 이소성 뼈가 생성된 것을 관찰하였다. 반면, 활막염, 골부착염 등 염증 병변은 관찰되지 않았다. 위 결과들로부터, 강직척추염 in vivo 모델에서 CFHR5는 염증에 관여하지는 않지만, 골 형성을 유도시킨다는 것을 확인하였다.

강직척추염은 발뒤꿈치, 앞가슴뼈 등 힘줄이 뼈에 붙는 부위에 염증이 생기는 골부착부염의 발생으로 시작된다. 해당 부위의 염증이 가라앉으면서, 척추에는 새로운 골이 과도하게 형성된다.

위 연구 결과를 종합해 보았을 때, CFHR5는 강직척추염의 이소성 뼈의 형성을 심화시키는 역할을 하는 것으로 보인다. 현재 강직척추염의 뼈 형성을 조절하는 약제는 없기 때문에, CFHR5가 중요한 진단 및 치료 지표가 될 것으로 사료된다.

현재 강직척추염의 염증을 억제시키는 약제로 비스테로이드성 항염제,

TNF 차단제 등이 사용되고 있다. 하지만 질병이 심화되어 이소성 뼈의 형성이 과도해진 경우, 항염증제만으로는 치료가 어려워진다. 강직척추염에서 CFHR5를 조절한다면, 이소성 뼈의 형성을 제어할 수 있을 것이다.

5. 요약

강직척추염은 만성 염증성 질환으로 발병기전이 불분명하지만, 면역학적 기전이 작용할 것으로 생각하고 있다. CFHR5는 보체 대체 경로에서 중요한 역할을 하는 complement factor H와 관련이 있으며, C3와 결합하여 활성을 돕는다고 알려져 있다. 이 연구의 목표는 *in vitro* 및 *in vivo*에서 CFHR5가 강직척추염의 골 재형성 및 염증에 미치는 영향을 확인하는 것이다.

In vitro 모델로는 류마티스관절염과 골관절염의 활막세포, 조골세포주 (MC3T3-E1 cells) 그리고 강직척추염과 건강한대조군 골전구세포를 사용하였다. 활막세포에 CFHR5를 처리했을 때, IL-6 및 COX2의 발현이 증가하였다. MC3T3-E1 cells, 강직척추염과 건강한 대조군의 골전구세포에서 ALP 활성을 측정했을 때, CFHR5 처리군에서 ALP 활성도가 증가하였다. 골석회화의 관찰을 위해 ARS, von Kossa, HA 염색을 수행하였고, CFHR5 처리군에서 세 가지 염색의 활성도가 증가하였다. 분화 마커인 RUNX2, OPN의 발현을 western blot으로 확인했을 때, CFHR5 처리군에서 발현이 증가하였다.

In vivo 모델로는 ZAP-70 돌연변이 모델인 SKG 마우스를 사용하였다. micro-CT 및 조직병리학적 분석(H&E, Safranin O 염색) 결과, CFHR5 처리군에서 이소성 뼈가 형성된 것을 확인하였다.

본 연구에서는 CFHR5가 강직척추염에서 이소성 뼈의 형성을 심화시킨다고 확인하였다. CFHR5를 조절하여 이소성 뼈의 형성을 제어할 수 있으며, 강직척추염에서 중요한 진단 및 치료 지표가 될 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Raychaudhuri SP, Deodhar A: The classification and diagnostic criteria of ankylosing spondylitis. *J Autoimmun* 2014; 48-49: 128-33.
2. Dean LE, Jones GT, MacDonald AG, Downham C, Sturrock RD, Macfarlane GJ: Global prevalence of ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 2014; 53: 650-7.
3. Boonen A, Chorus A, Miedema H, van der Heijde D, Landewé R, Schouten H et al.: Withdrawal from labour force due to work disability in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 2001; 60: 1033-9.
4. Ranganathan V, Gracey E, Brown M, Inman R, Haroon N: Pathogenesis of ankylosing spondylitis - recent advances and future directions. *Nat Rev Rheumatol* 2017; 13: 359-67.
5. Heijde D, Braun J, Deodhar A, Baraliakos X, Landewé R, Richards H, et al.: Modified stoke ankylosing spondylitis spinal score as an outcome measure to assess the impact of treatment on structural progression in ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 2019; 58: 388-400.
6. Ling M, Murali M: Analysis of the Complement System in the Clinical Immunology Laboratory. *Clin Lab Med* 2019; 39: 579-90.

7. Gale D, Maxwell P: C3 glomerulonephritis and CFHR5 nephropathy. *Nephrol Dial Transplant*. *Nephrol Dial Transplant* 2013; 28: 282-8.
8. Roman F, David T, Cynthia W, Gethin T, Linda B, Matthew B, et al.: Discovery of candidate serum proteomic and metabolomic biomarkers in ankylosing spondylitis. *Mol Cell Proteomics* 2012; 11: M111.013904.
9. Lee JH, Jung JH, Kim JS, Baek WK, Rhee JS, Kim TH et al.: Proteomic analysis of human synovial fluid reveals potential diagnostic biomarkers for ankylosing spondylitis. *Clin Proteomics* 2020; 17: s12014.
10. Toumba M, Skordis N: Osteoporosis syndrome in thalassaemia major: an overview. *J Osteoporos* 2010; 2010: 537673.
11. Grigoriadis AE, Heersche JN, Aubin JE: Differentiation of muscle, fat, cartilage and bone from progenitor cells present in a bone-derived clonal cell population: effect of dexamethasone. *J Cell Biol* 1988; 106: 2139-51.
12. Yamaguchi A, Kahn AJ: Clonal osteogenic cell lines express myogenic and adipocytic developmental potential. *Calcif Tissue Int* 1991; 49: 221-5.
13. Aaron WJ: Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation. *Scientifica* 2013; 2013: 684736.

14. Aubin JE, K Turksen: Monoclonal antibodies as tools for studying the osteoblast lineage. *Microsc Res Tech* 1996; 33: 128-40.
15. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K et al.: Targeted disruption of *Cbfa1* results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts. *Cell* 1997; 89: 755-64.
16. Otto JJ, Campbell RD: Tissue economics of hydra: regulation of cell cycle, animal size and development by controlled feeding rates. *J Cell Sci* 1977; 28: 117-32.
17. Black BL, Olson EN: Transcriptional control of muscle development by myocyte enhancer factor-2 (MEF2) proteins. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1998; 14: 167-96.
18. Layh-Schmitt G, Lu S, Navid P, Brooks SR, Lazowick E, Davis KM, et al.: Generation and differentiation of induced pluripotent stem cells reveal ankylosing spondylitis risk gene expression in bone progenitors. *Clin Rheumatol* 2017; 36: 143-54.
19. Jo SS, Kang S, Han J, Choi SH, Park YS, Sung IH, et al.: Accelerated osteogenic differentiation of human bone-derived cells in ankylosing spondylitis. *J Bone Miner Metab* 2018; 36: 307-13.
20. Sakaguchi S, Sakaguchi N: Animal models of arthritis caused by systemic alteration of the immune system. *Curr Opin Immunol*

2005; 17: 589-94.

21. Ruutu M, Thomas G, Steck R, Degli-Esposti MA, Zinkernagel MS, Alexander K: β -glucan triggers spondylarthritis and Crohn's disease-like ileitis in SKG mice. *Arthritis Rheum* 2012; 64: 2211-22.
22. Lim DH, Lee EJ, Kwon OC, Hong S, Lee CK, Yoo B, et al.: Effect of tumor necrosis factor inhibition on spinal inflammation and spinal ankylosis in SKG mice. *Sci Rep* 2019; 9: 18000.
23. Benham H, Rehaume LM, Hasnain SZ, Velasco J, Baillet AC, Ruutu M, et al.: Interleukin-23 mediates the intestinal response to microbial β -1,3-glucan and the development of spondyloarthritis pathology in SKG mice. *Arthritis Rheumatol* 2014; 66: 1755-67.
24. Jo SS, Won EJ, Kim MJ, Lee YJ, Jin SH, Park PR, et al.: STAT3 phosphorylation inhibition for treating inflammation and new bone formation in ankylosing spondylitis. *Rheumatology* 2021; 60: 3923-35.
25. Xie Z, Yu W, Zheng G, Li J, Cen S, Ye G, et al.: TNF- α -mediated m6A modification of ELM01 triggers directional migration of mesenchymal stem cell in ankylosing spondylitis. *Nat Commun* 2021; 12: 5373.
26. Van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A: Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis A proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum* 1984; 27: 361-8.

27. 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.
28. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, et al.: Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 1986; 29: 1039-49.
29. Wallace SL, Robinson H, Masi AT, Decker JL, McCarty DJ, Yü T-F: Preliminary criteria for the classification of the acute arthritis of primary gout. *Arthritis Rheum* 1977; 20: 895-900.
30. Hirth A, Skapenko A, Kinne RW, Emmrich P, Schulze-Koops H, Sack U: Cytokine U mRNA and protein expression in primary-culture and repeated-passage synovial fibroblasts from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Res* 2002; 4: 117-25.
31. Kim SH, Choi HJ, Yoon DS, Son CN: Serial administration of rhBMP-2 and alendronate enhances the differentiation of osteoblasts. *Int J Rheum Dis* 2021; 24: 1266-72.
32. Sakaguchi N, Takahashi T, Hata H, Nomura T, Tagami T, Yamazaki S: Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. *Nature* 2003; 426:

454-60.

33. Monnet D, Breban M, Hudry C, Dougados M, Brézin AP: Ophthalmic findings and frequency of extraocular manifestations in patients with HLA-B27 uveitis: a study of 175 cases. *Ophthalmology* 2004; 111: 802-9.
34. Wu JF, Yang YH, Wang LC, Lee JH, Shen EY, Chiang BL: Comparative usefulness of C-reactive protein and erythrocyte sedimentation rate in juvenile rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 2007; 25: 782-5.
35. Bedel SE, Bush BT: Erythrocyte sedimentation rate. From folklore to facts. *Am J Med* 1985; 78: 1001-9.
36. Clyne B, Olshaker JS: The C-reactive protein. *J Emerg Med* 1999; 17: 1019-25.
37. Padilla ND, Bleeker WK, Lubbers Y, Rigter GM, Mierlo G, Daha M, et al.: Rat C-reactive protein activates the autologous complement system. *Immunology* 2003; 109: 564-71.
38. Ricklin D, Lambris JD: Complement-targeted therapeutics. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 1265-75.
39. Kinsella TD, Espinoza L, Vasey FB: Serum complement and immunoglobulin levels in sporadic and familial ankylosing spondylitis. *J Rheumatol* 1975; 2: 308-13.

40. Krauledat PB, Krapf PE, Manger B, Kalden JR: Evaluation of plasma C3d and immune complex determinations in the assessment of disease activity of patients with rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and spondylitis ancylopoetica. *Rheumatol Int* 1985; 5: 97-101.
41. Li T, Huang Z, Zheng B, Liao Z, Zhao L, Gu J: Serum disease-associated proteins of ankylosing spondylitis: results of a preliminary study by comparative proteomics. *Clin Exp Rheumatol* 2010; 28: 201-7.
42. Vinje O, Møller P, Mellbye J: Immunological variables and acute-phase reactants in patients with ankylosing spondylitis (Bechterew's syndrome) and their relatives. *Clin Rheumatol* 1984; 3: 501-13.
43. Cowling P, Ebringer R, Ebringer A: Association of inflammation with raised serum IgA in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1980; 39: 545-9.
44. G S Panayi, J Slaney, B D Williams: Circulating immune complexes in patients with ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1980; 39: 445-8.
45. L Brinch, O Vinje, P Teisberg, O J Mellbye, I Aakesson: The in-vivo metabolism of C3 in ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis* 1982; 41: 86-9.

46. Yang C, Ding P, Wang Q, Zhang L, Zhang X, Zhao J, et al.: Inhibition of Complement Retards Ankylosing Spondylitis Progression. *Sci Rep* 2016; 6: 34643.
47. Holers VM, Rosa P, Banda N: A Potential New Mouse Model of Axial Spondyloarthritis Involving the Complement System. *Immune Netw* 2021; 21: e45.
48. Alexander J, Sankaran J, Seldeen K, Thiyagarajan R, Jacob A, Quigg R, et al.: Absence of complement factor H alters bone architecture and dynamics. *Immunobiology* 2018; 223: 761-71.
49. Mödinger Y, Löffler B, Huber-Lang M, Ignatius A: Complement involvement in bone homeostasis and bone disorders. *Semin Immunol* 2018; 37: 53-65.
50. McRae JL, Thomas GD, Griggs K, Ormsby R, Cowan P, Cromer B, et al.: Human factor H-related protein 5 has cofactor activity, inhibits C3 convertase activity, binds heparin and C-reactive protein and associates with lipoprotein. *J Immunol* 2005; 174: 6250-6.
51. Icer M, Gezmen-Karadag M: The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clin Biochem* 2018; 59: 17-24.
52. Maeda T, Matsunuma A, Kawane T, Horiuchi N: Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280: 874-7.

53. Declercq H, Verbeeck R, Ridde Lr, Schacht E, Cornelissen M: Calcification as an indicator of osteoinductive capacity of biomaterials in osteoblastic cell cultures. *Biomaterials* 2005; 26: 4964-74.

54. Schiller PC, D'Ippolito G, Balkan S, Roos BS, Howard GA: Gap-junctional communication is required for the maturation process of osteoblastic cells in culture. *Bone* 2001; 28: 362-9.

The role of CFHR5 on bone remodeling and inflammation in ankylosing spondylitis

Lee, Ji-Hyun

Department of Internal Medicine
Graduate School Keimyung University

(Supervised by Professor Son, Chang-Nam)

(Abstract)

Ankylosing spondylitis (AS) is a chronic inflammatory rheumatic disease in which the spine becomes inflamed. The exact etiology is unknown. In prior studies, it was confirmed that complement factor H-related 5 (CFHR5), a protein of the complement system, was upregulated in the synovial fluid of AS. This study aimed to investigate the effect of CFHR5 on bone remodeling and inflammation in AS *in vitro* and *in vivo*.

Osteoblast differentiation and mineralization were observed when CFHR5 (0 - 1000 ng/ml) was added to an osteoblast cell line (MC3T3-E1 cells) and AS, control (Ct) osteoprogenitor cells. In SKG mice, an AS-induced animal model, the experiment was conducted with a control group (n = 5) and a CFHR5 group (n = 5) and CFHR5 (0.5 mg/kg) was administered twice for 5 weeks. To confirm bone formation and

inflammation, micro-CT and histopathological analysis (H&E, Safranin O) were performed on the paws of mice.

As a result, it was confirmed that alkaline phosphatase (ALP) expression in MC3T3-E1 cells, AS and Ct osteoprogenitor cells was highly expressed in the CFHR5-treated group, causing bone differentiation. Alizarin red (ARS) was also highly expressed in the CFHR5 treatment group and it was confirmed that it causes bone calcification. Expressions of runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and osteopontin (OPN) were confirmed in MC3T3-E1 cells. After CFHR5 treatment, RUNX2 showed the strongest expression at 7 days and OPN at 3 days and there was no significant difference by concentration. In the SKG animal model, there was no significant difference in inflammatory activity between the control and CFHR5-treated groups. Micro-CT and histological analysis of the ankles of mice confirmed that bone formation significantly increased in the CFHR5-treated group.

In this study, it was confirmed that CFHR5 causes bone remodeling

in vitro and in vivo models of AS. The above results will be important clues to confirm the immunological mechanism between AS and complement system proteins, suggesting that CFHR5 can be a biomarker protein for AS.

강직척추염에서 골 재형성, 염증에 대한 CFHR5 역할 규명

이 지 현

계명대학교 대학원

의학과 내과학 전공

(지도교수 손 창 남)

(초록)

강직척추염(Ankylosing Spondylitis, AS)은 척추에 염증이 발생하여 척추 마디가 굳어지는 만성 염증성 류마티스 질환으로, 명확한 병인은 밝혀지지 않았다. 선행 연구를 통해 AS의 활액에서 보체계 단백질인 complement factor H-related 5(CFHR5)가 과발현되는 것을 확인하였다. 이 연구의 목표는 in vitro 및 in vivo에서 CFHR5가 AS의 골 재형성 및 염증에 미치는 영향을 확인하는 것이다.

조골세포주(MC3T3-E1 cells) 및 AS, control(Ct) 골전구세포에서 CFHR5(0 - 1000 ng/ml)를 처리했을 때, 골 분화 및 석회화를 관찰하였다. AS 유도 동물 모델인 SKG 마우스에서 대조군(n=5), CFHR5군(n=5)으로 실험을 진행하였으며, CFHR5(0.5mg/kg)를 5주간 2회씩 투여하였다. 골 형성 및 염증을 확인하기 위해 쥐의 발에서 micro-CT와 조직병리학적 분석(H&E, Safranin O)을 수행하였다.

그 결과, MC3T3-E1 cells 및 AS, Ct 골전구세포에서 alkaline phosphatase(ALP)의 발현이 CFHR5 처리군에서 높게 발현되었으며, 골 분해를 일으키는 것을 확인하였다. Alizarin red(ARS) 역시 CFHR5 처리군에서 높게 발현되었으며, 골 석회화를 일으키는 것을 확인하였다. MC3T3-E1 cells에서 runt-related transcription factor 2(RUNX2), osteopontin(OPN)의 발현을 확인하였다. CFHR5 처리 후 RUNX2는 7일, OPN은 3일에서 가장 강한 발현을 보였으며, 농도 별로는 큰 차이를 보이지 않았다. SKG 동물 모델에서 대조군 및 CFHR5 처리군 사이의 염증 활성화에는 큰 차이가 없었다. 쥐의 발목에서 micro-CT와 조직학적 분석을 확인하였을 때, CFHR5 처리군에서 골 형성이 현저히 증가한 것을 확인하였다.

이 연구에서는 CFHR5가 AS의 in vitro 및 in vivo 모델에서 골 재형성을 일으키는 것을 확인하였다. 위 결과는 AS와 보체계 단백질 사이의 면역학적 기전을 확인하는데 중요한 단서가 될 것이며, CFHR5가 AS의 바이오마커가 될 수 있음을 시사한다.