



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](#)



석사학위논문

류마티스관절염 마우스모델에서 CFHR5의 관절염 완화 효과

계명대학교 대학원
의학과

김 경 미

김
경
미

지도교수 김 상 현

2
0
2
4
년

2024년 2월

2
월



류마티스관절염 마우스모델에서 CFHR5의 관절염 완화 효과

지도교수 김 상 현

이 논문을 석사학위 논문으로 제출함

2024년 2월

계명대학교 대학원
의 학 과

김 경 미

김경미의 석사학위 논문을 인준함

주 심 백 원 기

부 심 김 상 현

부 심 손 창 남

계 명 대 학 교 대 학 원

2 0 2 4 년 2 월

감사의 말씀

길다면 길고 짧다면 짧은 석사과정 2년이 어느새 지나 졸업 논문을 쓰게 되었습니다. 혼자 타지에 와서 공부한다는 것이 때론 외롭고 힘든 순간들도 있었습니다. 하지만 좋은 사람들을 만날 수 있는 기회가 되었고, 많은 것들을 배울 수 있었던 감사한 시간이었습니다. 졸업논문을 쓰면서 아쉬운 점들이 많았지만, 이러한 경험을 밑거름 삼아 앞으로 더욱 발전하고 성장하는 사람이 되도록 노력하겠습니다.

본 논문을 이끌어주신 교수님들과 선생님들께 감사의 말씀 전하고 싶습니다. 먼저 좋은 말씀으로 다독여주시고 따뜻한 조언으로 지도해주신 지도교수님, 김상현 교수님께 감사드립니다. 부족한 저에게 조언과 가르침으로 세심하게 지도해주신 심사위원장님 백원기 교수님, 교수님의 꼼꼼한 지도 덕분에 더 성장할 수 있었습니다. 심사위원을 맡아주신 손창남 교수님, 2년 반 동안 부족한 결과에도 타박 한번 하지 않고 믿고 격려해주셔서 감사합니다. 교수님 덕분에 좋은 경험 많이 할 수 있었습니다. 실험에 대한 전반적인 부분 도와주시고 조언해주신 경북대학교 강영모 교수님 감사드립니다. 바쁘신 와중에도 논문 첨삭해주신 이지현 박사님, 타지에서 혼자 고민하고 있는 저에게 항상 먼저 손 내밀어 주시고 미숙한 행동에도 좋은 말씀으로 조언과 격려해주셔서 감사합니다. 바쁘신 와중에도 어려워하는 저에게 좋은 조언과 방향을 제시해 주신 정희정 박사님께도 감사의 말씀 드립니다. 실험실 안, 밖에서 항상 지지해주시고 응원해주시며, 따뜻한 말로 인사를 건네주신 모든 선생님들께도 감사의 말씀 전하고 싶습니다.

항상 믿고 멀리서 응원해준 가족들과 정지예, 김홍기, 박혜정, 권효정 모두에게 감사의 인사를 전하고 싶습니다.

2024년 2월

김 경 미

목 차

1. 서 론	1
2. 재료 및 방법	3
3. 성 적	7
4. 고 찰	21
5. 요 약	23
참고문헌	24
Abstract	31
국문초록	34

표 목 차

Table 1. Body weight change	9
Table 2. H&E stain valuation basis	10
Table 3. Toluidine Blue stain valuation basis	11

그림 목 차

Figure 1. Timeline of CFHR5 administration to CIA mice	12
Figure 2. Body weight changes in CIA mice	13
Figure 3. Representative gross picture of mice paw at day 42	14
Figure 4. Clinical arthritis index (CAI) of CIA mice	15
Figure 5. Arthritis Incidence (%) of CIA mice	16
Figure 6. Representative pictures of H&E-stained arthritis tissues from CIA mice	17
Figure 7. Histological scores of H&E-stained arthritis tissues form CIA mice	18
Figure 8. Representative pictures of Toluidine blue-stained arthritis tissues from CIA mice	19
Figure 9. Histological scores of Toluidine blue-stained arthritis tissues from CIA mice	20

1. 서론

류마티스관절염(rheumatoid arthritis)은 만성 염증성 자가면역질환이며, 전 세계인구 약 1%의 발병률을 보이는 질환이다. 활막이 두꺼워지고 염증세포의 침윤으로 염증 및 부종이 생기는 것이 대표적 임상 특징이다(1-3). 관절 내 활성화된 T세포가 interferon- γ (IFN- γ), interleukin-17(IL-17)을 분비하여 대식세포와 활막섬유모세포 (Fibroblast-Like Synoviocyte, FLS)를 활성화한 후 전염증성 사이토카인을 방출하여 연골 조직을 파괴한다(4). 류마티스관절염 발병 기전에 대해서는 명확히 밝혀져 있지 않지만 조직적 합성 복합체(Major Histocompatibility Complex)의 Human Leukocyte Antigen(HLA)-DR 대립 유전자가 중요한 발병 인자로 알려져 있다(5,6). 현재 비스테로이드 소염제, 면역억제제, 항류마티스약제 등 다양한 치료제가 사용되고 있지만 장기 복용 시 부작용이 발생한다(7).

보체 시스템(Complement System)은 선천면역의 핵심 구성요소로, 병원균에 대한 숙주 방어 및 조직 항상성에 중요한 역할을 한다. 보체는 T세포와 B세포의 반응을 조절하며, 보체 반응이 조절되지 않으면 지속적인 염증을 일으킨다(8). 보체가 활성화되면 Complement 5(C5)의 부산물인 C5a와 C5b가 생성되고 막공격복합체(Membrane Attack Complex, MAC) 형성을 시작한다. MAC는 염증성 사이토카인의 방출을 유도하여 조직 손상과 염증을 증가시킨다(9). 따라서 C5의 활성화는 관절을 손상시키는 요인 중 하나이며, 보체 시스템이 류마티스관절염의 병인 중 하나임을 시사한다.

보체 시스템은 고전적(Classical), 대체(Alternative), 렉틴(Lectin)경로를 통해 활성화된다(10). 보체가 활성화 되면 C3 전환효소가 세포 표면에 형성되며, 이는 C3를 C3a와 C3b로 절단하고 C3b는 기존의 C3 전환효소와 결합하여 C5 전환효소를 형성한다(11). 대체경로의 조절자인 Complement Factor H에 속해 있는 Complement factor H-related protein 5(CFHR5)는 생체 내에서 C3와 공존하여 용량 의존적으로 C3b에 결합하며, C3 전환효소의 활성을 억제한다는 연구 결과가 있다(12).

류마티스관절염의 대표적인 동물 모델인 콜라겐 유도 관절염(Collagen induced arthritis, CIA) 마우스는 T세포 매개에 의한 만성 염증성 관절염이 발생한다. 환자들의 혈청과 활액에서 콜라겐에 대한 항체가 발견되며, 제2형 콜라겐은 관절 연골의 주성분이다. 마우스에 제2형 콜라겐을 주사하면 류마티스관절염과 유사한 면역 반응을 일으켜 관절을 손상시킨다(13,14). 류마티스관절염의 임상적인 형태와 병리학적 특징 중 뼈 침식, 윤활막 증식, 류마티스 인자 생성은 위 모델과 유사하다(15).

본 연구에서는 In vivo 모델로 선정한 CIA 마우스에 염증 완화를 위한 CFHR5 재조합 단백질을 투여하여 염증성 관절염에 대한 효과를 임상적, 조직학적으로 평가하였고, CFHR5의 염증 개선을 관찰하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 실험동물 및 사육 환경

모든 실험은 동물 관리 및 사용위원회 승인(KNU-2023-0306)을 받았으며, 실험동물 복지법, 실험동물관리 및 이용지침에 따라 실시하였다. 생후 7주령 DBA/1J 수컷 마우스(중양실험동물, 대한민국)를 구입하여 실험을 진행하였고, 실험에 앞서 일주일간 적응 기간을 주었다. 실험 기간 동안 사료와 물은 자유 급이 하였고, 온도 22 ± 2 °C, 상대습도 $45 \pm 5\%$ 로 설정된 specific pathogen free(SPF) 시설에서 실험을 수행하였다. 군 분리 시에 마우스의 꼬리에 유성펜을 사용하여 개체 표시하였고, 각 케이지 상에 개체 식별 카드(시험 명, 군 정보, 개체번호, 성별, 입고 시기, 투여 기간)를 부착하였다. 케이지 별 실험동물 개체 수는 5 이하로 수용하며, 주 2회 케이지를 교환하였다.

2.2. CIA 마우스 제작

관절염 유도를 위해 제2형 콜라겐(bovine type II collagen, Chondrex, USA)을 2 mg/mL의 농도가 되도록 10 mM acetic acid에 녹였다. 1차 면역화를 위해 마우스 24마리에 Complete Freund's Adjuvant(CFA, Chondrex, USA)와 제 2형 콜라겐(2 mg/mL)을 1:1 (v/v)로 혼합하여 8주령 DBA/1J 마우스 꼬리에 100 μ L 피내 주사하였다. 21일 후 2차 면역화를 위해 Incomplete Freund's Adjuvant(IFA, Chondrex, USA)와 제2형 콜라겐(2 mg/mL)을 1:1 (v/v)로 혼합하여 마우스 꼬리에 100 μ L를 피내 주사하였다 (Figure 1).

2.3. 대조물질 및 시험물질 투여

CIA 마우스 24마리를 총 4개의 군[음성 대조군(PBS, n = 6), 양성 대조군(Methotrexate, 제일제약, 대한민국, 1 mg/kg, n = 6), CFHR5 재조합 단백질(R&D, Minneapolis, MN, USA) 저용량군(0.5 mg/kg, n = 6), 고용량군(1.5 mg/kg, n = 6)]으로 나누어 실험을 진행하였다. 관절염 유도일로부터 23일 후 대조물질과 시험물질을 투여하였다. 음성 대조군 및 CFHR5 저용량, 고용량군은 주 1회, 양성 대조군은 주 2회 복강 투여하였다. 그 후 약물의 안전성 평가를 위해 마우스가 희생되기까지 42일간 매일 무게를 측정하였다.

2.4. 관절염 활성도의 임상학적 평가

약물 투여 시작인 23일 ~ 42일까지 격일로 네 발의 관절염 활성도를 평가하였다.

관절염 활성도의 임상 관절염 지표(Clinical Arthritis Index, CAI)는 아래의 방법으로 수행하였다. 각 발에 대해 0 ~ 4점의 점수를 부여 합산하여, 최대 16점이 되도록 하였다.

- 0점: 관절염이 발생하지 않았을 경우
- 1점: 염증이 1 군데 발생하였을 경우
- 2점: 염증이 2 군데 발생할 경우
- 3점: 3개 이상의 염증 및 발바닥 염증
- 4점: 그 이상의 염증과 발바닥 염증

임상 지표가 2점 이상일 경우 관절염이 발생하였다고 판단하며, 네 발 전체에서 모두 관절염이 관찰될 때 100% 발생으로 정의하였다.

2.5. 파라핀 포매 슬라이드 제작

실험 42 일째, 마우스를 희생시킨 후 발목 관절을 적출하여 피부와 근육

을 제거하였다. 조직의 손상을 방지하고 생체와 같은 상태로 유지하기 위해 4% 포르말린 용액에 4일 동안 고정하였다. 파라핀을 조직 내에 침투시키기 위해 5.5% EDTA(VWR Chemicals, Radnor, PA, USA) 용액을 넣고 일주일 동안 탈회 하였다. 약 5 μm 의 두께로 파라핀 포매 슬라이드를 제작하여 탈 파라핀 시켰다.

2.5. Hematoxylin & Eosin(H&E) 염색

탈 파라핀 작업을 한 파라핀 포매 슬라이드에 자일렌을 넣어 파라핀을 제거하였다. Hematoxylin 용액에 약 1분 40초 동안 넣어 조직의 핵을 염색하였다. 0.3% Hcl-Alcohol과 0.3% 암모니아수로 수세 작업을 진행하였다. Hematoxylin 용액을 모두 탈수한 후 Eosin 용액을 대조염색으로 사용하여 Hematoxylin에 염색되지 않는 구조인 세포질을 염색하였다. 탈수 및 투명화 과정을 거친 후 정밀한 검사 및 염색 퇴색 방지, 조직 절편의 부패를 방지하기 위해 봉입하여 각 조직별 4 부위를 100배율로 촬영하였다. 4개의 매개변수로 0 ~ 3점으로 평가하였다(Table 2).

2.6. Toluidine Blue 염색

탈 파라핀 작업을 한 파라핀 포매 슬라이드에 자일렌을 넣어 파라핀을 제거하여 Toluidine blue 시약을 약 2분 동안 염색한 후 알코올을 사용하여 물을 제거하였다. 탈수 및 투명과정을 거쳐 봉입을 실시하였고, 각 조직 부위를 100배율로 촬영하여 3개의 매개변수로 0 ~ 3점으로 평가하였다(Table 3).

2.7. 통계적 처리

평가 지표에 대한 암맹평가 자료를 기반으로 SPSS 통계분석을 수행하였다. 양 군 간의 비교는 Student' s t-test 또는 Mann Whitney U test를 사용하였다. 여러 시점에서의 치료군 간의 차이를 비교는 repeated measures ANOVA with Turkey' s post-hoc test를 사용하였다. p값이 0.05 미만일 때 통계적으로 유의하다고 분석하였다.

3. 성 적

3.1. CIA 마우스 모델에서 CFHR5 안전성 확인

CIA 마우스 모델에서 시험물질 및 음성 대조군 모두 실험 도중 폐사한 개체는 없었다. CFHR5 약물의 안전성을 평가하고자 투여 시작일 23일 차부터 시험 종료 직전인 42일까지 매일 마우스의 체중을 측정하였고, 통계적으로 유의한 체중 변화는 없었다(Table 1, Figure 2).

3.2. CIA 마우스에서 임상 관절염 지수를 통한 치료 효과

CIA 마우스 모델을 제작하여 2차 면역화 2일 후 23일부터 음성 대조군과 CFHR5군에는 약물을 주 1회 복강 투여하였고, 양성대조물질인 methotrexate는 주 2회 복강 투여하였다. 투여 시작과 종료 후 사진을 통해 육안으로 확인하였고, 그 결과 음성 대조군에 비해 양성 대조군과 CFHR5 투여군에서 부종이 감소함을 확인할 수 있었다(Figure 3). CAI 기준에 따라 정량화한 결과 음성 대조군과 비교하였을 때, 양성 대조군, CFHR5 저용량 투여군(0.5 mg/kg)과 고용량 투여군(1.5 mg/kg)에서 관절염의 활성화도 감소 소견을 보였다(Figure 4A). CAI의 Area Under the Curve(AUC)를 분석한 결과 CAI와 유사하게 감소하는 것을 확인하였다(Figure 4B).

3.3. 관절염 발생 빈도

CIA 마우스 모델에서 1차 면역화 후 42일까지 CAI 점수가 2점 이상인 관절염이 발생한 발의 빈도(%)를 확인하였다. 양성 대조군, CFHR5 투여군 모두에서 음성 대조군과 비교하였을 때, 통계적으로 유의한 감소 소견을 보

였다(Figure 5A). 발의 관절염 빈도의 AUC 분석 결과에서도 양성 대조군, CFHR5 저용량군, 고용량군 모두에서 음성 대조군과 비교할 때 CAI와 유사한 양상을 보였다(Figure 5B).

3.4. H&E 염색

H&E 염색은 조직의 구조와 형태를 분석하거나 병변의 특징을 확인하는데 사용하는 염색약이며, Hematoxylin과 Eosin을 이용하여 염색한다(16). Hematoxylin은 핵 내의 인산기와 결합하여 푸르게 염색하는 시약으로 핵막과 염색질을 염색하고, Eosin은 단백질 부분인 아미노기를 붉게 염색시켜 세포질을 염색한다. 염색을 위하여 대조물질 및 시험물질 투여 종료 후 마우스 발 조직을 적출하여 파라핀-포매 슬라이드를 제작하였고 H&E염색을 하여 윤활막 증식, 판누스 형성, 연골 파괴, 뼈 침식 4가지 항목으로 조직학적 평가 기준을 바탕으로 평가하였다(17). 평가 결과 음성 대조군에서는 활막 조직의 과증식과 함께 판누스 조직의 증가로 연골 파괴 및 뼈 미란이 뚜렷하게 나타났고(Figure 6), 4개의 매개변수에서 양성 대조군, CFHR5 저용량 투여군, 고용량 투여군을 음성 대조군과 비교하였을 때 통계적으로 유의하게 감소했다(Figure 7).

3.5. Toluidine blue 염색

Toluidine blue는 비만세포(Mast cell)를 확인하기 위해 염색하는 염색약으로 비만세포는 알레르기 및 염증 반응에 중요한 역할을 하는 세포이다(18). 염색을 위해 파라핀-포매 슬라이드를 제작한 마우스 발 조직을 Toluidine blue 염색 수행하였다(Figure 8). 매트릭스 염색, 표면 규칙성, 연골 두께 3가지의 매개변수로 평가하였으며(19), 평가 결과 모든 매개변수에서 양성 대조군, CFHR5 저용량, 고용량 투여군은 음성 대조군과 비교하였을 때 통계적으로 유의하게 감소했다(Figure 9).

Table 1. Body Weight Change

Group	Body weight (D 42)		Body weight (D 42)		Body weight change (% , D 23 as 100%)		p- values vs Vehicle
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Vehicle	24.47	1.49	24.33	1.80	99.49	5.26	-
Methotrexate (1 mg/kg, BIW, IP)	23.70	1.10	25.73	2.73	108.48	7.15	0.2080
CFHR5 (0.5 mg/kg, QW, IP)	24.75	3.21	25.95	3.28	104.92	3.74	0.2791
CFHR5 (1.5 mg/kg, QW, IP)	24.97	2.53	25.83	3.13	103.70	9.95	0.6923

Table 2. H&E Stain Assessment of CIA

Score	Synovial hyperplasia	Pannus formation	Cartilage destruction	Bone erosion
0	None	None	None	None
1	Very few inflammatory cells are found in the synovium. Mild hyperplastic synovium	Pannus formation is not distinct	Cartilage surface is not smooth. Focal erosion region	Bony surface is not smooth
2	Inflammatory cellular proliferation is well-marked leading to thickened synovium	Weak pannus invasion in the bone	Cartilage surface takes a corrugated shape	Cell invasion in bone is found. Marked bone surface integrity loss
3	Extensive inflammatory cell proliferation along with severely thickening of synovium	Strong pannus invasion in the bone	Over 50% of the cartilage of either joint counterpart is destroyed	Bone conformation is almost disrupted

Table 3. Toluidine Blue Stain Assessment of CIA

Score	Matrix staining	Surface regularity	Cartilage thickness
0	Normal	Smooth; 75 - 100 %	> 2/3 depth relative to av. GC* depth
1	Slightly reduced	Moderate; 50 - 75 %	1/2 to 2/3 depth relative to av. GC
2	Markedly reduced	Irregular; < 50 %	< 1/2 depth relative to av. GC
3	No staining	Severely irregular	

* Ground control.

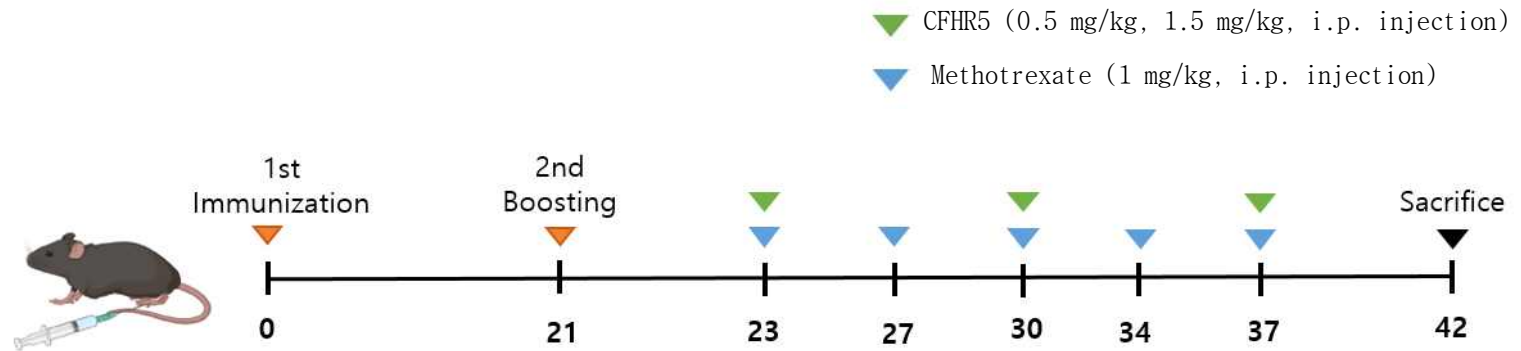


Figure 1. Timeline of CFHR5 administration to CIA mice. Collagen induced arthritis(CIA) mice were treated with CFHR5 (0.5 mg/kg), CFHR5 (1.5 mg/kg) once a week i.p., or Methotrexate two times a week, for 3 weeks. Mice were sacrificed after 42 days.

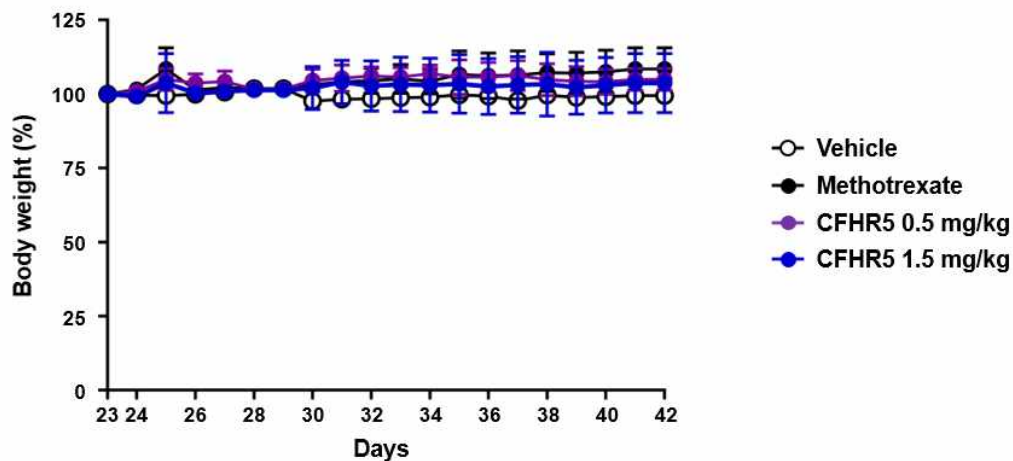


Figure 2. Changes of body weight in CIA mice. The mice grouped into CIA mice treated with vehicle, methotrexate (1 mg/kg, BIW, IP), CFHR5 (0.5 mg/kg, QW, IP), and CFHR5 (1.5 mg/kg, QW, IP). Data are expressed as the mean \pm SD. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ compared with the vehicle.

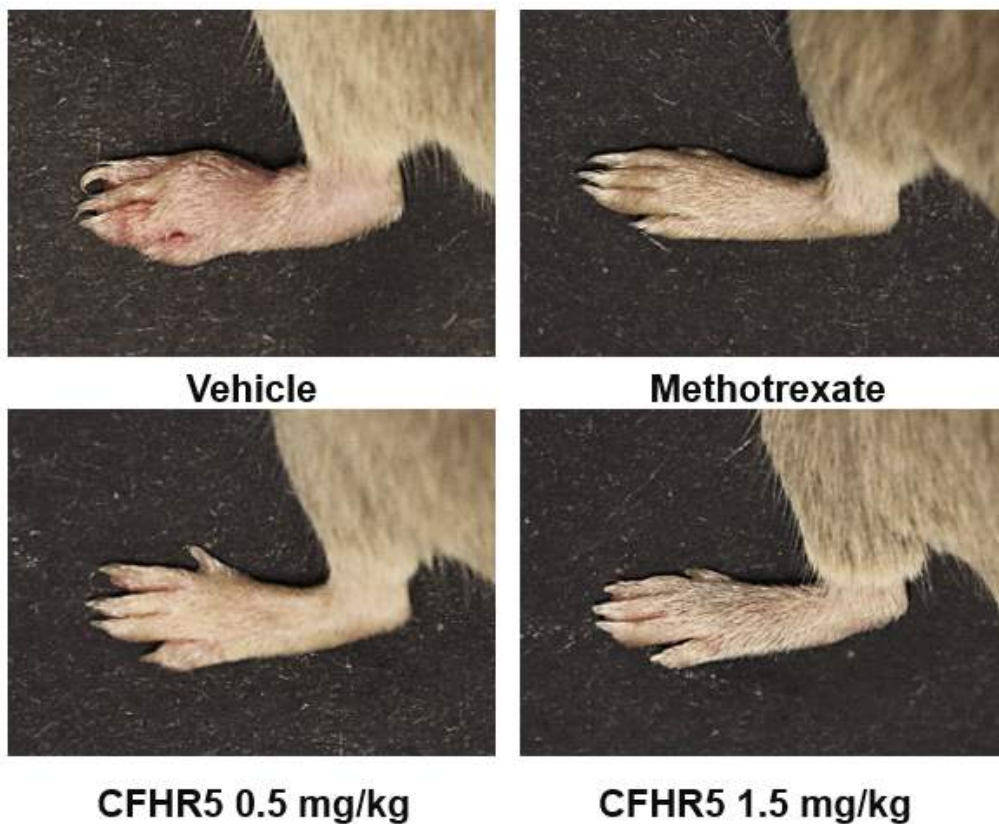


Figure 3. Representative gross picture of mice paw at day 42. The mice were treated with vehicle, methotrexate (1 mg/kg, BIW, IP), CFHR5 (0.5 mg/kg, QW, IP), and CFHR5 (1.5 mg/kg, QW, IP).

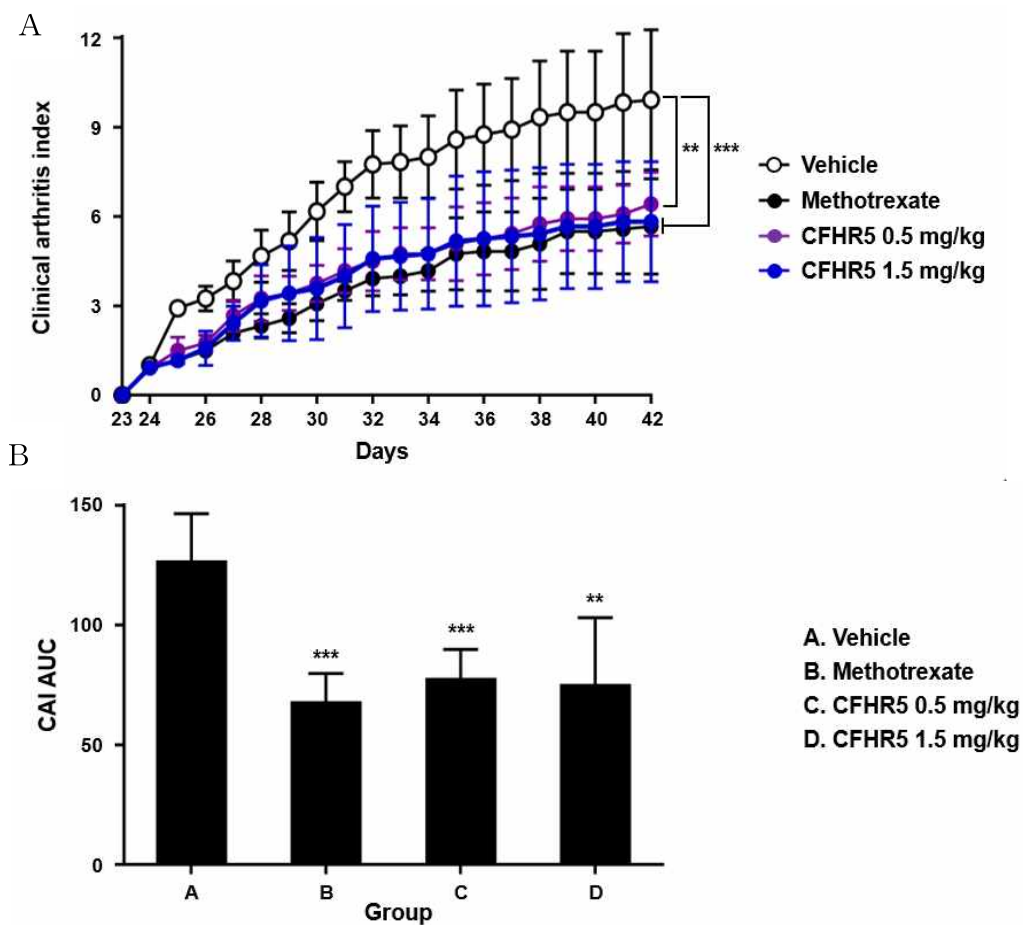


Figure 4. CAI of CIA. (A) clinical arthritis index(CAI) of CIA mice (B) Area under the curve(AUC) of CAI of CIA mice. CIA mice treated with vehicle, methotrexate (1 mg/kg, BIW, IP), CFHR5 (0.5 mg/kg, QW, IP), and CFHR5 (1.5 mg/kg, QW/ IP). Data are expressed as the mean \pm SD. (Each group, n = 6) * = p < 0.05, ** = p < 0.01, *** = p < 0.001 compared with the vehicle.

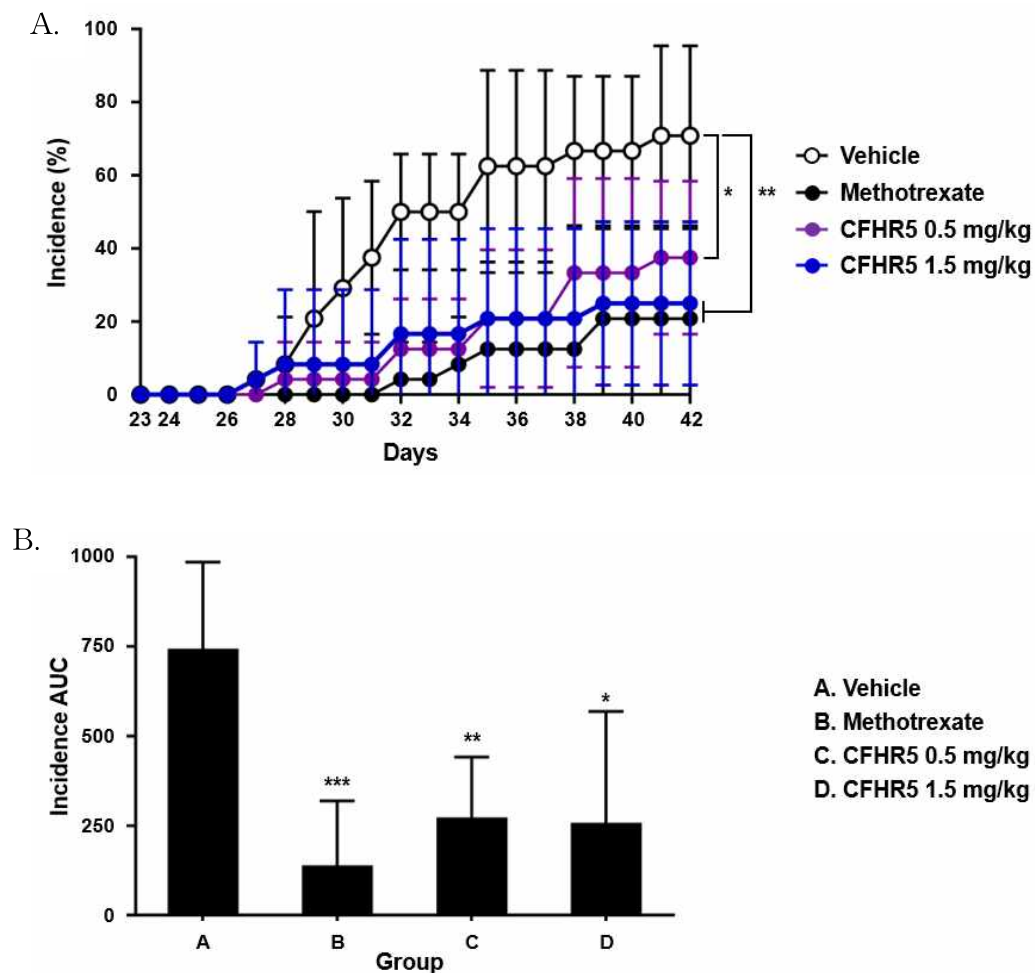


Figure 5. Arthritis incidence (%) of CIA. (A) Incidence (%) of CIA mice. (B) AUC of incidence (%) of CIA mice. CIA mice treated with the vehicle, methotrexate (1 mg/kg, BIW, IP), CFHR5 (0.5 mg/kg, QW, IP), and CFHR5 (1.5 mg/kg, QW, IP). Data are expressed as the mean \pm SD. (Each group, n = 6) * = p < 0.05, ** = p < 0.01, *** = p < 0.001 compared with the vehicle.

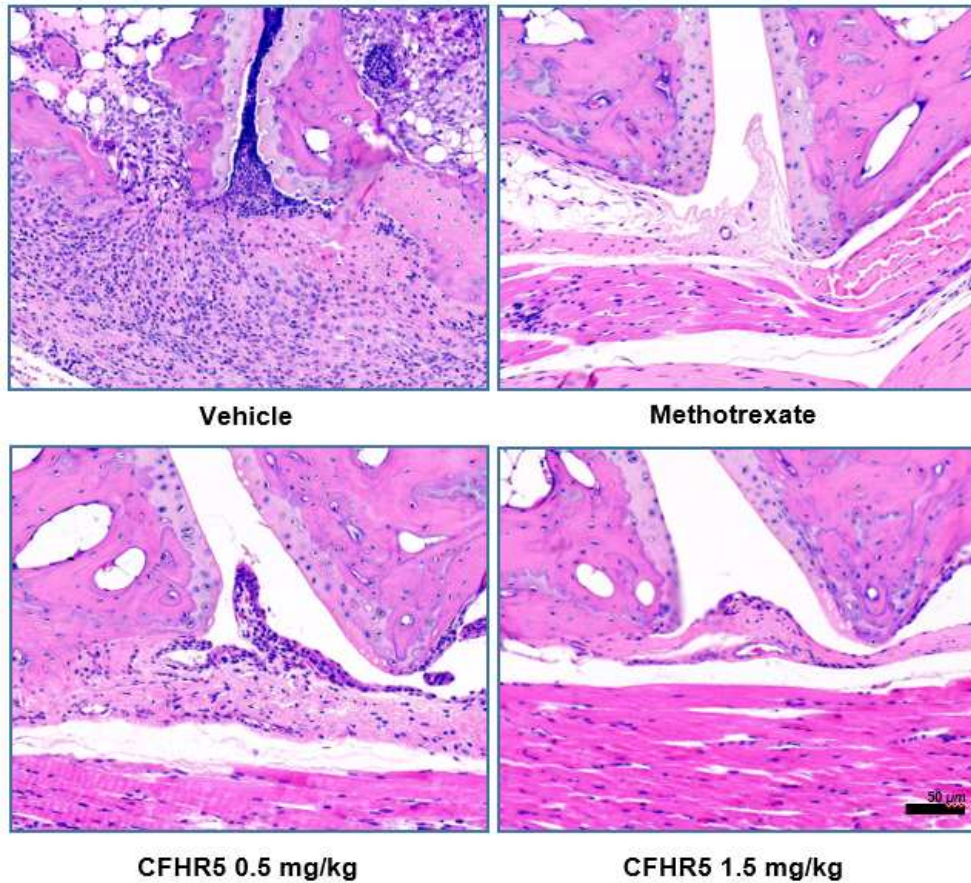


Figure 6. Representative H&E-stained arthritis tissue pictures from CIA mice. The mice were grouped into CIA mice treated with the vehicle, methotrexate (1 mg/kg, BIW, IP), CFHR5 (0.5 mg/kg, QW, IP), and CFHR5 (1.5 mg/kg, QW, IP). H&E stain; Magnification x 200; Scale bar 50 μ m.

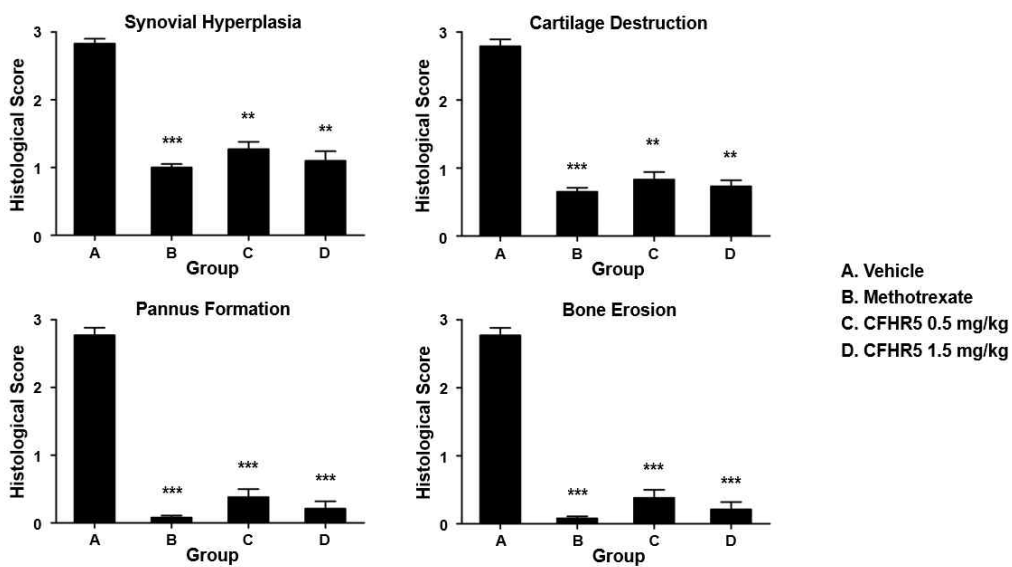


Figure 7. Histological scores of H&E-stained arthritis tissues from CIA mice. The mice were grouped into CIA mice treated with the vehicle, methotrexate (1 mg/kg, BIW, IP), CFHR5 (0.5 mg/kg, QW, IP), and CFHR5 (1.5 mg/kg, QW, IP). Data are expressed as the mean \pm SEM. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ compared with the vehicle.

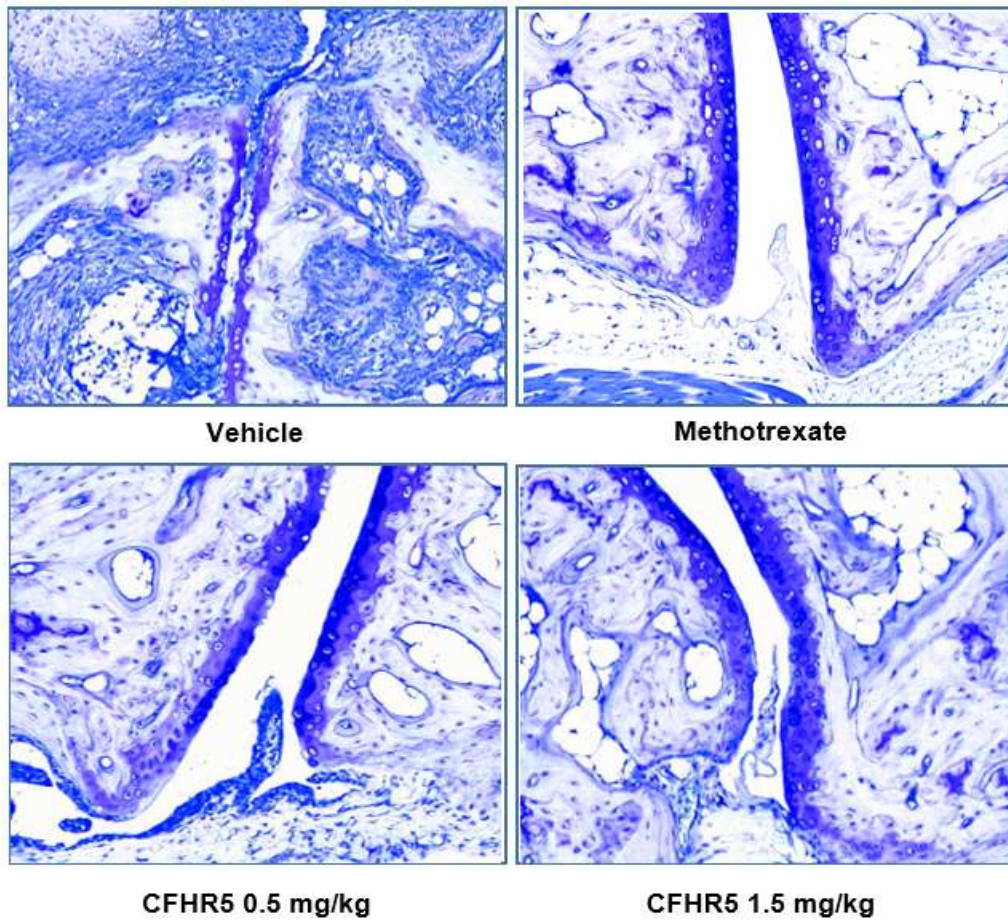


Figure 8. Representative pictures of Toluidine blue-stained arthritis tissues from CIA mice. The mice were grouped into CIA mice treated with the vehicle, methotrexate (1 mg/kg, BIW, IP), CFHR5 (0.5 mg/kg, QW, IP), and CFHR5 (1.5 mg/kg, QW, IP). Toluidine blue stain; Magnification x 200; Scale bar 50 μ m.

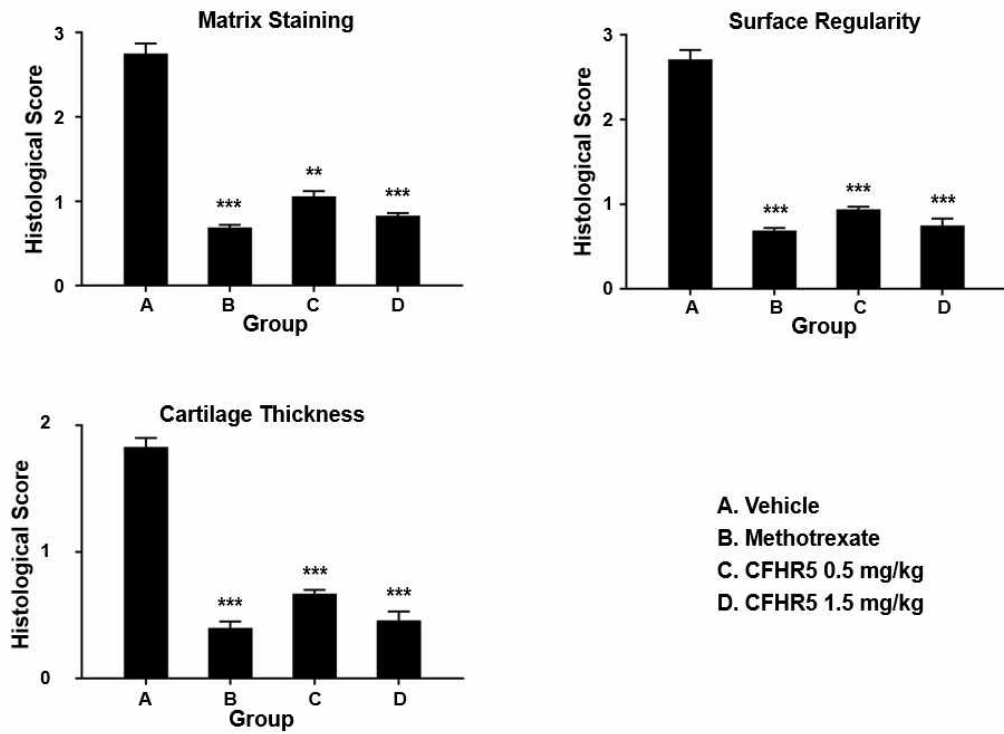


Figure 9. Histological scores of Toluidine blue-stained arthritis tissues from CIA mice. The mice were grouped into CIA mice treated with the vehicle, methotrexate (1 mg/kg, BIW, IP), CFHR5 (0.5 mg/kg, QW, IP), and CFHR5 (1.5 mg/kg, QW, IP). Data are expressed as the mean \pm SEM. * = $p < 0.05$, ** = $p < 0.01$, *** = $p < 0.001$ compared with the vehicle.

4. 고 찰

보체 시스템이 류마티스관절염에 중요한 역할을 한다고 알려졌지만, 대표 경로인 고전적 경로, 대체 경로, 렉틴 경로 중 어떤 경로가 류마티스관절염을 활성화하는지에 대한 연구는 명확하게 되어 있지 않다. 본 연구에서는 관절염의 염증에서 보체 시스템의 경로 중 대체경로를 억제하는 단백질인 CFHR5의 치료 효과를 확인하는 것이다.

류마티스관절염은 윤활막에 염증을 일으켜 연골과 뼈를 파괴하는 말초 관절 만성 염증성 질환이다(20). 류마티스관절염 진단에 유용한 항 CCP 항체 (Anti-cyclic Citrullinated Peptide, ACPA)는 시트룰린(Citrullin)에 반응하여 면역계에서 자기 조직을 공격한다. ACPA의 생성은 유전적으로 류마티스관절염을 일으킨다고 알려진 HLA-DRB1 공유항원기(Shared Epitope)에 의존한다(21). 임상적으로 다른 염증성 관절염과 류마티스관절염을 감별하기에 유용하고, 류마티스관절염 발생의 예측 인자를 한다는 점에서 중요한 임상적 가치가 있다고 평가받고 있다(22). 항 CCP는 면역 복합체가 보체를 활성화하는 것을 도와주며, 활막 조직의 섬유아세포, 대식세포 및 내피세포 또한 보체 인자를 생성시켜 보체 인자의 영향을 많이 받는 것으로 알려졌다(23).

보체 시스템은 혈장 단백질로 이루어져 단백질 분해 효소 반응에 활성화되고, 감염 요소들을 표지하는 옵소닌화(Opsonization)로 이를 제거한다(24). 보체 시스템은 3가지 경로가 있으며, 고전적 경로는 항원에 결합된 항체를 인식할 수 있는 C1 단백질 복합체에 결합하여 시작하고, 대체 경로는 감염 요소 표면의 특정 구조를 직접 인식하여 활성화한다. 렉틴 경로는 혈장 단백질 만노스-결합 렉틴(Mannose-binding Lectin)이 표면에 결합하여 활성화된다(25). 3가지 경로에서 C3 전환효소는 C3를 절단하여 C3a와 C3b를 형성하는 중심 역할을 하고 MAC을 형성한다. MAC은 감염 요소를 제거하고 세포를 용해하며 저용량 농도로 존재할 때 급격한 변화를 유도해 염증이 더욱 악화된다(26). 이에 대체 경로가 류마티스관절염의 보체 시스

템을 활성화한다고 알려져 있으며(27-30), 염증 유발 인자 C5가 류마티스관절염의 치료 표적이 될 수 있다는 연구가 보고되어 있다(31-34).

T세포와 B세포와 관계없이 단클론 항체로 유도하는 마우스 모델인 항 콜라겐 항체 유발 관절염(Collagen Antibody Induced Arthritis, CAIA)에서도 C3 성분과 관련하여 C5 항체 결핍에도 질병 유도에 저항성이 있음을 확인했으며(35), C5a와 C5b-9의 생성을 차단하는 단클론 항체를 사용한 CIA 마우스에서 C5의 특이적인 단클론 항체 효능을 입증하였다(36). 위의 선행 연구를 통해 보체 시스템의 대체 경로와 C5가 류마티스관절염의 중요한 치료제가 될 수 있음을 시사한다.

CFHR5는 대체 경로에서 불안정한 보체의 활성화 시, 조절 역할을 하는 인자 H(Factor H, FH) 관련 단백질 중 하나이다. FH는 CFHR을 암호화하는 5개의 유전자에 인접하고 간에서 구성하여 체액으로 전신 분포된다(37). 보체 활성화는 대체 경로에서 중요한 역할을 하며, C3와 C5 전환 효소를 표적 한다. CFHR5는 보체 조절에서 어떤 역할을 하는지 명확하게 알려지지 않았지만, 시험관 내에서는 C3b에 결합하는 것으로 나타났다(38).

본 연구에서는 CFHR5의 염증 효과를 확인하기 위해 임상에서 널리 사용되고 있는 표준 치료제 Methotrexate를 양성 대조군으로 설정하였다(39-43). 임상적 효과를 확인하기 위해 CAI를 평가하였고 CFHR5의 저농도군에서도 유의미한 치료 효과를 확인할 수 있었다. 조직 병리학적 평가를 위해 H&E와 Toluidine blue 염색 결과 음성 대조군과 비교하였을 때 Methotrexate와 유사한 치료 효과를 확인할 수 있었다.

류마티스관절염의 고전적 경로와 대체 경로를 통해 염증을 활성화함은 알려졌지만 대체 경로를 억제하는 CFHR5의 류마티스관절염 연구는 많이 진행되어 있지 않다. 향후 류마티스관절염에서의 CFHR5 투여가 항염증에 대한 자세한 기전 연구가 수행되면, 보체 시스템을 이용한 또 다른 염증 치료제로 사용할 수 있을 것이다.

5. 요약

류마티스관절염은 만성 염증성 자가면역질환이다. 면역학적 활성이 병인으로 제기되고 있지만 명확한 발병기전은 밝혀지지 않았다. CFHR5는 보체 시스템 중 Complement factor H와 관련 있으며, C3b와 결합하여 C3 전환효소 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 류마티스관절염 마우스 모델에서 CFHR5 재조합 단백질의 항염증 효과를 확인하였다.

CIA 마우스 모델은 대표적인 류마티스관절염 마우스 모델이며 류마티스관절염의 임상적, 조직 병리학적 특징과 유사하다. 실험은 Vehicle, Methotrexate, CFHR5 저농도군, 고농도군 4개의 군으로 나누어 진행하였다.

4개의 군은 CAI, 조직병리학적으로 염증을 평가하였고, CFHR5의 약물 안전성을 위해 마우스의 무게를 측정한 결과 체중 변화는 없었다. CAI 확인 결과, 음성 대조군에 비해 양성 대조군과 CFHR5 군에서 염증의 부종이 감소함을 확인하였다. 이는 저농도군에서 부터 치료 효과가 있고, 임상에서 널리 사용되고 있는 양성 대조군과 유사한 정도의 치료 효과를 확인하였다. 마우스를 희생시킨 후 파라핀 블록을 H&E와 Toluidine blue로 염색하였고, H&E에서는 4개의 매개변수로 평가하였고 Toluidine blue는 4개의 매개변수에서 평가하였다. 조직병리학적으로 평가한 결과 염증의 활동성 및 관절 손상의 중증도가 감소한 것을 확인하였다.

본 연구에서는 CFHR5가 류마티스관절염 마우스 모델인 CIA 마우스에서 저농도에서 부터 염증의 부종의 감소를 확인하였고 유사하게 조직병리학적 결과에서도 동일하였다. CFHR5는 염증을 조절할 수 있는 단백질이며, 이는 류마티스관절염의 보체 시스템을 통한 항염증 치료 효과를 시사한다. 하지만 CFHR5에서의 류마티스관절염 항염증 효과에 대한 기전은 추가 연구가 필요하다.

참 고 문 헌

1. Philipp R, Ruediger B: Treatment with biologicals in rheumatoid arthritis: an overview. *Rheumatol Ther* 2017; 4: 247-61.
2. Lee YJ , Anzaghe M, Schulke S: Update on the Pathomechanism, Diagnosis, and Treatment Options for Rheumatoid Arthritis. *Cells* 2020; 9 : 880.
3. Ding Q, Hu W, Wang R, Yang Q, Zju M, Meng L, et al: Signaling pathways in rheumatoid arthritis: implications for targeted therapy. *Signal Transduct Target Ther* 2023; 8: 68.
4. Choy EH, Panayi GS: Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2001; 344: 907-16.
5. Derksen VFAM, Huizinga TWJ, Woude Dvd: The role of autoantibodies in the pathophysiology of rheumatoid arthritis. *Semin Immunopathol* 2017; 39: 437-46.
6. Bullock J, Rizvi SA, Saleh AM, Ahmed SS, Do DP, Ansari RA, et al: Rheumatoid Arthritis: A Brief Overview of the Treatment. *Med Princ Pract* 2019; 27: 501-7.
7. Imboden JB: The immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. *Annu Rev Pathol* 2009; 28: 417-34.
8. Jason RD, Wen-Chao S: Complement and its role in innate and adap-

- tive immune responses. *Cell Res* 2010; 20: 34-50.
9. Jennifer LM, thomas GD, Kim MG, Rebecca JO, Peter JC, Brett AC, 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.
 10. Sturfelt G, Trudsson L: Complement in the immunopathogenesis of rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol* 2012; 8: 458-68.
 11. Thomas NM, Pickering MC: The complement factor H-related proteins. *Immunol Rev* 2016; 274: 191-201.
 12. Holers VM, Banda N: Complement in the initiation and evolution of rheumatoid arthritis. *Front Immunol* 2018; 28: 1057.
 13. Myers LK, Tosloniec EF, Cremer MA, Kang AH: Collagen-induced arthritis, an animal model of autoimmunity. *Life Sci* 1997; 61: 1861-78.
 14. Park DJ, Cho CS, Kim HY, Kim DJ: Type II Collagen-Induced Arthritis in Rat: Changes of IgG Anticollagen Antibody. *Korean J Intern Med* 1991; 41: 423-9.
 15. Asquith DL, Miller AM, McInnes IB, Liew FY: Animal models of rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol* 2009; 39: 2040-4.
 16. Kassandra L, Hao HH, Pushpa LA, Chen TM: Hematoxylin and eosin

- tissue stain in Mohs micrographic surgery: a review. *Dermatol Surg* 2011; 37: 1089-99.
17. Andrew HF, Kenneth AJ, Jack R, Rolf Z: Hematoxylin and eosin staining of tissue and cell sections. *CSH Protoc* 2008; 5: e4986.
 18. Bergholt NL, Helle L, Martin L, Casper BF: A standardized method of applying toluidine blue metachromatic staining for assessment of chondrogenesis. *Cartilage* 2019; 10: 370-4.
 19. Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D, Berg WB: Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14: 13-29.
 20. McInnes IB, Schett G: The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 2011; 365: 2205-19.
 21. Delft van MAM, Huizinga TWJ: An overview of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J Autoimmun* 2020; 110: 102392.
 22. Venrooij van WJ, van Beers JJ, Preuijin GJ: Anti-CCP antibodies: the past, the present and the future. *Nat Rev Rheumatol* 2011; 7: 391-8.
 23. Elena N, Scott RB, Ingo HT, Josh E, Martin F, Martin J, et al: Local production of complement proteins in rheumatoid arthritis synovium. *Arthritis Rheum* 2002; 46: 934-45.

24. Dijkstra DJ, Joelomsingh JV, Bajema I, Trouw L: Complement activation and regulation in rheumatic disease. *Semin Immunol* 2019; 45: 101339.
25. Janeway CA, Travers JP, Walport M, Shlomchik MJ: The complement system and innate immunity. *Immunobiology* 2001; 5: 60-82.
26. Atkinson JP, Terry WDC, Caroly M, Hrishikesh K, Dennis H, Xiaobo W: The human complement system: Basic concepts and clinical relevance. *Clin Immunol* 2019; 21: 299-317.
27. Hanauske-Abel HM, Pontz BF, Schorlemmer HU: Cartilage specific collagen activates macrophages and the alternative pathway of complement: evidence for an immunopathogenic concept of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 1982; 41: 168-76.
28. Katschke KJ, Helmy KY, Steffek M, Hongkang Xi, Yin JP, Lee QP, et al: A novel inhibitor of the alternative pathway of complement reverses inflammation and bone destruction in experimental arthritis. *J Exp Med* 2007; 204: 1319-25.
29. Trouw LA, Haisma EM, Kavarht EWN, van der Woude, Facsinay AL, Daha MR, et al: Anti-cyclic citrullinated peptide antibodies from rheumatoid arthritis patients activate complement via both the classical and alternative pathways. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 1923-31.
30. Paschoalato ABP, Moreira MR, Azzolini AECS, Cavenghi A, Machado CM, Donadi EA, et al: Activation of Complement Alternative

Pathway in Rheumatoid Arthritis: Implications in Peripheral Neutrophils Functions. *J.Autoimmun* 2011; 3: 1-9.

31. Wang Y, Rollins SA, Madri JA, Matis LA: Anti-C5 monoclonal antibody therapy prevents collagen-induced arthritis and ameliorates established disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 8955-9.
32. Grant EP, Picarella D, Timothy B, Tracy D, Alisa C, Nicole A, et al: Essential role for the C5a receptor in regulating the effector phase of synovial infiltration and joint destruction in experimental arthritis. *J Exp Med* 2002; 196: 1461-71.
33. Nirmal KB, Thurman JM, Damian K, Allyson W, Michael CC, William PA et al: Alternative complement pathway activation is essential for inflammation and joint destruction in the passive transfer model of collagen-induced arthritis. *J Immunol* 2006; 177: 1904-12.
34. Banda NK, Deane KD, Bemis EA, Strickland C, Seifert J, Kimberly J, et al: Analysis of complement gene expression, clinical associations, and biodistribution of complement proteins in the synovium of early rheumatoid arthritis patients reveals unique pathophysiologic features. *J Immunol* 2022; 208: 2482-96.
35. Hietala MA, Nandakumar KS, Persson L, Fahlen S, Holmdahl R, Pekna M: Complement activation by both classical and alternative pathways is critical for the effector phase of arthritis. *Eur J Immunol* 2004; 34: 1208-16.

36. Mastellos DC, Ricklin D, Hajishengallis E, Hajishengallis G, Lambris JD: Complement therapeutics in inflammatory diseases: promising drug candidates for C3-targeted intervention. *Mol Oral Microbiol* 2016; 31: 3-17.
37. Kopp A, Hebecker M, Svobodova E, Jozsi M: Factor H: A Complement Regulator in Health and Disease, and a Mediator of Cellular Interactions. *Biomolecules* 2012; 2: 46-75.
38. McRae JL, Cowan PJ, Power DA, Mitchelhill KI, Kemo BE, Morgan BP, et al: Human factor H-related protein 5 (FHR-5): a new complement associated protein. *J Biol Chem* 2001; 276: 6747-54.
39. Bruce N, Cronstein MD: The mechanism of action of methotrexate. *Rheum Dis Clin North Am* 1997; 23: 739-55.
40. Neurath MF, Hildner K, Becker C, Schlaak JF, Barbulescu K, Germann T et al: Methotrexate specifically modulates cytokine production by T cells and macrophages in murine collagen-induced arthritis (CIA): a mechanism for methotrexate-mediated immunosuppression. *Clin Exp Immunol* 1999; 115: 42-55.
41. Okroj M, Heinegard D, Holmdahl R, Blom AM: Rheumatoid arthritis and the complement system. *Ann Med* 2007; 39: 517-30.
42. Singh RK, Haandel LV, Kiptoo P, Becker ML, Siahaan TJ, Fuunk RS: Methotrexate disposition, anti-folate activity and efficacy in the collagen-induced arthritis mouse model. *Eur J Pharmacol* 2019; 853: 264-74.

43. Maksimovix V, Popovic ZP, Vukmirovic S, Cvejic J, Mooranian A, Salami H, et al: Molecular mechanism of action and pharmacokinetic properties of methotrexate. *Mol Biol Rep* 2020; 47: 4699-708.

Complement factor H-related protein 5 ameliorates inflammation in rheumatoid arthritis model

Kim, Kyung-Me

Department of Internal Medicine

Graduate School

Keimyung University

(Supervised by Professor Kim, Sang-Hyon)

Abstract

Rheumatoid arthritis is a chronic inflammatory arthritis that is related to the immune complement response. Complement factor H-related 5 (CFHR5) exhibits anti-inflammatory effects by binding to complement C3, an inflammatory response protein. It is not known how CFHR5 affects arthritis-based autoimmunity. This study aimed to confirm the effect of CFHR5 in collagen-induced arthritis (CIA), a rheumatoid arthritis mouse model.

CIA mice were induced by injecting type 2 collagen twice into DBA/1J mice. After 23 d, the mice were divided into three groups, and until day 42, the positive control group, methotrexate, was intraperitoneally administered twice a week, the low dose of 0.5 mg/kg group and the high dose 1.5 mg/kg group were intraperitoneally

administered CFHR5 once a week. Clinical severity score and arthritis index were measured every other day. After sacrificing the mouse on day 42, foot tissue was removed and H&E and Toluidine blue staining were performed.

Compared to the negative control group, both low-dose and high-dose CFHR5 treatment resulted in statistically significant reductions in the clinical arthritis index (Low-dose CFHR5 group, $P < 0.01$; High-dose CFHR5 1.5 mg/kg, $P < 0.001$). The arthritis index also significantly decreased compared to the negative control group (Low-dose CFHR5 group, $P < 0.05$; High-dose CFHR5, $P < 0.001$). Four parameters were assessed in both H&E and Toluidine blue stained sections: synovial hyperplasia, pannus formation, cartilage destruction, and bone erosion. The Toluidine blue staining evaluation criteria were specific to this stain. In all three standard parameters (Matrix staining, Surface regularity, Cartilage thickness), the positive control group, low dose, and high dose CFHR5 demonstrated a significant reduction compared to the negative control

group.

In this study, the administration of CFHR5 attenuated the activity of arthritis tissue inflammation and joint damage severity in a CIA mouse model, suggesting that CFHR5 has an anti-inflammatory effect in rheumatoid arthritis, and detailed mechanistic studies are needed.

류마티스관절염 마우스모델에서 Complement factor H-related 5의 관절염 완화 효과

김 경 미
계명대학교 대학원
의학과 내과학 전공
(지도교수 김 경 미)

(초록)

류마티스관절염은 만성 염증성 관절염으로, 면역 보체 반응과 관련이 있는 것으로 보고된다. Complement factor H-related 5 (CFHR5)는 염증 반응 단백질인 보체 C3에 결합하여 항염증 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. CFHR5가 관절염을 기반으로 한 자가면역에 어떤 영향을 미치는지는 밝혀진 바가 없다. 본 연구는 류마티스관절염 마우스 모델인 Collagen Induce Arthritis(CIA)에서 CFHR5의 효과를 확인하고자 했다.

DBA/1J 마우스에 제2형 콜라겐을 2회 주입하여 CIA 마우스 유도하였다. 23일 후 마우스를 3개의 그룹으로 나누어 42일까지 양성 대조군 methotrexate는 주 2회, 저용량 0.5 mg/kg, 고용량 1.5 mg/kg 군은 CFHR5 주 1회 복강 내 투여하였다. 격일로 임상 중증도 점수와 관절염 지수를 측정하였다. 42일째 마우스를 희생시킨 후 발 조직을 적출하여 H&E과 Toluidine blue 염색을 진행하였다.

저용량, 고용량 CFHR5의 치료 효능을 음성 대조군과 비교한 결과 임상 관절염 지수 및 관절염 발생 빈도는 음성 대조군과 비교하였을 때 통계적으로 유의미하게 감소하였다. H&E 염색과 Toluidine blue 염색 결과 H&E 염색 평가 기준인 4개의 매개변수 (synovial hyperplasia, Pannus formation, Cartilage destruction, Bone erosion)와 Toluidine blue 염색 평가 기준인 3개의 매개변수(Matrix staining, Surface regularity, Cartilage thickness)에서 모두 양성 대조군, 저용량, 고용량 CFHR5는 음성 대조군과 비교하였을 때 통계적으로 유의한 감소 소견을 보였다.

본 연구에서는 CIA 마우스 모델에서 CFHR5의 투여는 관절염 조직 염증의 활동성 및 관절 손상의 중증도를 약화시켰다. 이는 류마티스관절염에 CFHR5가 항염증 효과가 있음을 시사하며, 자세한 기전 연구가 필요하다.