



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](#)

이학석사 학위논문

Del-1 fragment를 이용한 다발성 골수종

세포의 부착 제어 연구

A Del-1 fragment regulates adhesion of multiple
myeloma cells

울산대학교 대학원

의과학과

이상용

Del-1 fragment를 이용한 다발성 골수종

세포의 부착 제어 연구

지도교수: 최은영

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2024년 8월

울산대학교 대학원

의과학과

이상용

이상용의 이학석사학위 논문을 인준함

심사위원장 장수환 (인)

심사위원 강민지 (인)

심사위원 최은영 (인)

울산대학교 대학원

2024년 8월

국문요약

다발성 골수종(Multiple Myeloma, MM)은 항체를 만들어내는 Plasma B cell에 발생하는 혈액암이다. 고령화 사회에 따른 최근 다발성 골수종의 발병률은 30 배 이상 증가하였고, 혈액 암 중 2번째로 많은 비율을 차지하고 있다. 항암화학요법, 항암제 그리고 항체 치료제를 사용해 치료하고 있지만, 완치를 위한 치료제가 개발되지 않은 병이다. 대부분의 환자들은 재발과 호전을 반복, 약제 내성을 가지는 불응 상태에 이르는 경우가 많다. 따라서 대체 치료제의 개발 및 기존의 치료 방법을 극대화할 방법이 필요하다. 다발성 골수종 세포는 세포 부착 분자인 integrin family을 발현한다고 알려져 있다. 골수 안의 환경에서 다발성 골수종 세포는 골수 내피세포 또는 세포외 기질에 부착함으로써 다양한 신호를 주고받는다. 이 신호들을 바탕으로 다발성 골수종 세포들은 세포 사멸 기피 및 약제 저항성(Cell adhesion mediated drug resistance, CAM-DR)을 띠게 된다.

Developmental endothelial locus-1 (Del-1)은 백혈구의 integrin LFA-1 및 여러 integrin family에 붙어 백혈구의 이동을 제한하는 항 염증성 단백질로 알려져 있다. 다발성 골수종 세포에는 Del-1이 interaction 할 수 있는 counter receptor integrin이 많이 발현되어 있다. 이에, 본 연구에서 Del-1을 이용한 다발성 골수종 세포의 부착 억제능력을 확인 및 다발성 골수종의 marker인 Syndecan-1이 세포외기질에 부착시 감소함을 확인하였다. 또 Del-1의 EGF-like repeat domain이 Del-1의 핵심 기능을 발휘한다는 보고를 바탕으로, 억제 기능 평가 시 Del-1 EGF_[1-3]이 whole Del-1 보다 더 뛰어난 부착 억제 기능을 가진 것을 확인하였다. *In-vivo* 마우스 다발성 골수종 전이 모델에서도 Del-1 EGF_[1-3] 주사는 생존율을 증가시키고 병의 진행을 완화시키는 것을 확인했다. 이러한 결과들은 Del-1의 fragment가 다발성 골수종의 peptide drug 치료제로서 개발될 수 있는 가능성을 제시한다.

목차

국문요약.....	i
목차.....	ii
표 차례.....	iv
그림 차례.....	iv
서론.....	1
재료 및 연구방법.....	4
항체.....	4
단백질.....	4
hPBMC 분리.....	4
세포 및 세포주 배양.....	5
형광probe로서 RPMI8226-GFP 제작.....	5
CFSE를 사용한 세포 증식 관찰.....	6
유세포 분석 (Flow cytometry).....	6
부착 분석법 (Adhesion assay).....	7
마우스의 다발성 골수종 전이 모델.....	7
유효성 검사.....	8
결과.....	9

Human B cell, Cancer B cells, MM cells와 HUVEC의 Del-1 counter receptor-integrin 발현.....	9
MM의 핵심 marker인 CD38이 세포주에 따라 발현이 다르다.....	9
세포 외 기질이 풍부한 환경에서도 MM의 증식 속도가 증가하지 않는다.....	10
세포 외 기질이 풍부한 환경에서 MM의 다른 핵심 marker인 CD138 발현이 감소한 다.....	10
Del-1과 Del-1 fragments (Del-1 EGF _[1-2] , 및 Del-1 EGF _[1-3])는 다발성 골수종 세포의 부착을 억제한다.....	11
Del-1 EGF _[1-3] 의 주사는 <i>in-vivo</i> 다발성 골수종 model 마우스의 생존율을 증가 시킨다.....	12
고찰.....	26
참고문헌.....	29
영문요약.....	34

표 차례

표 1. Human B cell, Cancer B cell 세포주, multiple myeloma 세포주, HUVEC의 표면분자들 profiling

표 2. Multiple myeloma 세포주 표면 분자 비교

그림 차례

그림 1. Human B cell, Cancer B cell 세포주, Multiple myeloma 세포주, HUVEC의 Del-1 counter-receptor integrin 발현

그림 2. Human B cell, Cancer B cell 세포주, Multiple myeloma 세포주, HUVEC의 multiple myeloma marker 발현

그림 3. 세포 외 기질에서 배양시 multiple myeloma cell proliferation

그림 4. 세포 외 기질에서 배양시 multiple myeloma cell의 CD138 변화

그림 5. Del-1 및 Del-1 fragments를 이용한 multiple myeloma cell의 부착억제

그림 6. Multiple myeloma in vivo model에서의 마우스 무게 변화 및 생존율

서론

다발성 골수종 (Multiple myeloma, MM)은 항체를 만들어 내는 plasma B 세포에 생기는 혈액암이다.¹ 뚜렷한 발병 원인이 없으며 주로 노년층에게 많이 발생하는 병으로 알려져 있다.² 항암치료를 위한 치료 방법과 신약들이 개발되어 생존율이 증가하였지만 중증 이상의 환자에게는 여전히 어려움이 남아있다.^{3,4} 환자들은 재발과 호전을 반복, 약제 내성을 가지는 불응 상태에 이르게 된다.⁵

일반적인 B세포의 경우 골수 (Bone marrow)에서 만들어져 2차 림프기관 (Peripheral lymphatic organ)에서 성숙을 거치며, 수명이 긴 플라즈마 세포는 (Long-lived plasma B cells) 순환하여 다시 골수로 돌아오게 된다. 다발성 골수종 세포 역시 이와 같은 운명 (Fate)을 가지고 골수 안에 밀집하게 되는데 이때 골수 안의 미세환경 (Bone marrow microenvironment)과 밀접한 영향을 주고받는다.^{6,9} 골수의 미세환경은 기저 세포 (stromal cells), 조골 세포 (osteoblasts), 파골 세포 (osteoclasts), 내피 세포 (endothelial cell) 그리고 다양한 면역 세포 (immune cells)들이 존재한다.^{6,8,9} 골수에는 또한 다양한 세포 외 기질 (Extra Cellular Matrix, ECM) 을 포함하고 있다. 피브로넥틴 (Fibronectin), 비트로넥틴 (Vitronectin), 콜라겐 (Collagens) 등이 골수 내 주요 세포외기질 단백질이다.^{6,8-10}

다발성 골수종 세포는 다양한 세포부착분자 family (Cell adhesion molecules, CAMs)를 발현하고 있다.⁷ 세포부착분자 family 중 하나인 integrin은 다발성 골수종 세포에 잘 발현되어 있고 골수의 미세환경과의 부착을 매개한다. 이러한 부착을 통해 다발성 골수종의 생존 신호 활성화, BM homing, 세포 이동 (Cell migration), 증식, 분화 및 약제 저항성 (DR, drug resistance) 증가 등 중요한 역할을 한다.¹¹ 특히, 다발성 골수종에 잘 발현된 VLA-4 (Very late antigen-4, CD49d)는 fibronectin과 binding해 p27를 상

향 조절하고 nuclear factor κ B를 (NF κ B) 활성화시켜 억제저항성 (CAM-DR)을 증가시킨다고 밝혀지었다. VLA-4는 세포 외 기질 뿐만 아니라 혈관세포의 VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1) 부착하여 IL-6와 VEGF-1의 생산과 분비를 유도한다.⁸ 이렇게 유도된 신호전달 물질은 다발성 골수종 세포의 apoptosis를 억제하고 신생혈관생성을 촉진하여 생존에 유리한 환경을 형성한다.^{8,9} VLA-4 외에도 다양한 integrin은 다발성 골수종 세포의 생존에 영향을 주는 것으로 알려져있다.^{7,12} 이에, 다발성 골수종 세포의 integrin과 골수 내 세포 및 세포 외 기질간의 불가피한 결합을 막거나 줄이는, 혹은 골수종 세포표면에 존재하는 세포 부착 분자들의 기능을 조절하는 방법이 잠재적인 치료 혹은 증상 완화의 방법으로 고려될 수 있다.¹³⁻¹⁶

다발성 골수종의 대표적인 표면 발현 분자는 CD38 과 syndecan-1(CD138)로 알려져 있다. CD38 은 칼슘을 조절하는 nucleotide metabolites 생성에 관여하는 ectoenzyme 이다. 내피세포의 CD31(PECAM-1)을 ligand 로 해, 다발성 골수종 세포의 migration 과 adhesion 에서 기능을 한다. CD38 은 정상 림프구와 골수세포에는 발현이 상대적으로 낮지만 다발성 골수종 세포에는 아주 높게 발현하는 것으로 보고되어 있다.¹⁷ Syndecan-1 은 transmembrane heparin sulfate proteoglycans 중 하나로 collagen 과 interaction 하여 골수내 부착 및 성장에 관여한다고 알려져있다¹⁸. 이 두가지 표면분자는 다발성 골수종 치료제의 주요한 target 으로 사용되어 왔다.^{19,20} FDA 에 승인을 받은 α -CD38 항체치료제인 Daratumumab 은 실제 임상에서 사용중이다.^{19,20} 또한 α -CD138 을 target 하는 항체 치료제도 활발히 개발중이다.¹⁹ 하지만 실제 임상에선 CD38 과 CD138 이 모두 발현이 없는 다발성 골수종 세포를 가진 환자도 있으며 병의 진행이 심한 사람일수록 두 marker 발현이 감소되는 사례가 보고되어 있다.²¹⁻²³ 특히, CD138 발현이 낮은 다발성 골수종 세포는 더 악성이고 줄기세포같은 phenotype 을 가진다고 보고되어있다.^{21,22,24} 임상에서는 예후가 좋지 않은 환자의 다발성 골수종 phenotype 분석시 CD138 발현이 있는 세포보다 발현이 없는 비율이 더 증가한다.^{22,25} 현재까지도 임상에서 어떤 mechanism 에 의해 다발성 골수종의 CD38 과 CD138 발현이 감소되는지 밝혀지지 않았다. 이는 특정한 항원을 target 하는 치료에

있어서 어려움을 가져온다. 따라서 보편적인 치료제 개발 및 기존의 치료 효과를 극대화하는 방법이 필요하다.

Developmental endothelial locus-1 (Del-1)은 크기 52 kD의 당 단백질이다. N- 말단에 3개의 epidermal growth factor(EGF)-like repeats (E1-E3)로 구성된 EGF-like domains과 C-말단엔 2개의 discoidin I domains로 구성 되어있다.²⁶ 2번째 EGF-like repeat에는 Integrins과의 부착에 관여하는 Arg-Gly-Asp (RGD)-motif가 있다.²⁷ Del-1은 백혈구에 잘 발현된 LFA-1 (Integrin lymphocyte function-associated antigen 1) 또는 Mac-1 (Macrophage-1 antigen) integrin과 결합하고, 이들의 interaction에 의해 항 염증 작용을 한다.²⁸ 또한, Del-1은 종양의 침윤 및 전이와 관련 있는 αV integrin family와 이들의 ligand인 세포 외 기질과 interaction을 한다는 연구 결과가 있다.²⁹ 최근의 선행 연구에 따르면 Del-1의 3개의 EGF-like repeat fragment가 전체 Del-1과 유사한 기능을 나타낸다.^{30,31}

본 연구에선 healthy human B cell, Cancer B cell line, MM cell line 그리고 혈관내피 세포 표면에서 Del-1 counter receptor integrin과 다발성 골수종의 marker 발현을 스크리닝하고 비교하였다. Integrin 발현을 토대로 ligand가 되는 세포 외 기질을 선정 후 다발성 골수종 세포를 배양하였다. 부착이 유도되는 환경 속에서 다발성 골수종 세포의 증식 속도와 세포 표면 분자의 발현 변화를 확인하였고 다발성 골수종 세포를 악성 phenotype으로 유도함을 확인하였다. Whole Del-1과 Del-1 fragment를 이용해 다발성 골수종 세포의 부착 억제 능력을 확인하였다. 최종적으로는 치료제로서의 가능성을 증명하기 위해 다발성 골수종 마우스 전이 모델에서 Del-1의 fragment 효능을 평가하였다.

재료 및 연구방법

항체

LFA-1 activated form_Alexa 488 (Biolegend, 363404), LFA-1 closed form_APC (Biolegend, 301212), αV integrin_FITC (Biolegend, 327908), $\alpha V\beta 3$ _PE (Biolegend, 304406), $\alpha V\beta 5$ _PE (Biolegend, 920008), CD11b_APC (Biolegend, 101212), CD49d_APC (Biolegend, 304308), CD31_APC (Biolegend, 303116), CD38_FITC (BD Biosciences, 555459), CD38_APC (Biolegend, 303510), CD138_FITC (Biolegend, 356508), CD138_APC (303510), CD19_PE (Biolegend, 392506), CD19_APC (Biolegend, 392504)를 구입하였다.

단백질

Bovine serum albumin (BSA, Sigma, A7030), Human Vitronectin (VN, Peprotech, 140-29), Human Fibronectin (FN, Sigma, F2006), Human collagen type 4 (Southern Biotech, 1250-01S), Human rDel-1 (R&D Systems, 6046-ED), Del-1 EGF_[1-2]-Fc (Y-biologics), Del-1 EGF_[1-3]-Fc (Y-biologics)를 구입하였다.

인간 말초 혈액 단핵세포 분리(Human peripheral blood mononuclear cell, hPBMC)

Healthy donor 혈액 10 ml에 1X DPBS를 동량만큼 넣어주고 30분간 상온에 두었다. 그 후 Ficoll (Cytiva, 17144002) 15 ml을 넣어 원심분리(400g, 30분, break off)를 진행하였다. 분리된 buffy coat층에서 hPBMC를 수득하였다.

세포 및 세포주 배양

B 세포 암 세포주 Raji B (ATCC, CCL-86), 과 Naml6 (ATCC, CRL-3273)은 분양 받아 사용했다. 골수종 세포는 ATCC에서 RPMI8226 (CCL155), H929 (CRL9068), U266 (TIB196) 구입하였다. 실험에 사용된 암 세포주를 배양하기 위해서 RPMI1640 (Hyclone, SH30255.01)에 heat inactivated Fetal Bovine Serum(FBS, GIBCO, 10099-141) 10%가 들어간 media를 사용하였다. (5% CO₂, 37°C incubator에서 배양함.). 계대배양은 배양중인 세포의 밀도가 1x10⁶/ml 이상일 때 배양중인 배양액 전부를 tube에 옮기고, 원심분리기(1000rpm, 5분)를 하였다. 상층액을 제거하고 cell count를 진행한 뒤, 5x10⁶/ml로 media를 넣어 희석 후 배양하였다. 인간제대정맥세포 (Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)는 Cell Systems에서 HUVEC(CSC 2V0)로 구입하였다. Media는 EGM-2 Bulletkit (Lonza, CC3-156)를 사용했다. HUVEC은 계대번호가 10미만인 세포만 사용했다. HEK293T 배양 시에는 DMEM (Hyclone, SH30243.01)에 heat inactivated FBS 10%가 들어간 media를 사용하였다.

형광probe로서 RPMI8226-GFP 제작 및 선별

HEK293T 세포 5x10⁶를 100 mm 배양접시에 DMEM(10% FBS)에 seeding후 5% CO₂, 37°C incubator에서 overnight 배양하였다. GFP 형광 probe 세포주를 만들기 위해, HEK293T 배양접시에 opti-MEM 550 µl, 2.5 µg pMDL/pRRE(Addgene, 12251), 1.5 µg PCMV-VSV-G (Addgene, 8454). 1.25 µg pRSV -Rev (Addgene, 12253) 그리고 5 µg pUltra (Addgene, 24129) plasmid DNA 와 Fugene HD (Promega, E2311) 30 µl를 섞은 mixture를 분주하였다. 8시간 뒤 fresh media 10 ml로 교체하였고, transfection 48 시간째에 배양접시의 media를 모아 0.45 µm syringe filter(Advantec, 25CP045AS)로 여과했다. 이렇게 virus가 담긴 media를 infection할 RPMI8226에 conditioned media 8:2 비율

용액에 10 µg/ml polybrene (Sigma, H9268)을 가해서 배양했다. 8시간 배양 뒤엔 fresh media로 교체하였다. 48시간 더 배양을 한 뒤 FACS ARIA II 장비(BD sciences)로 normal unstained 세포주와 비교해 형광이 positive 인 세포만 sorting 하여 사용하였다 .

CFSE를 사용한 세포 증식 관찰

5 mM의 CFSE (Invitrogen, C34554)를 1×10^6 /ml 세포 현탁액에 1:1000 비율로 섞고 37°C, 5% incubator에 20분간 둔다. 이때 세포가 들어있는 tube는 호일로 막아 빛을 차단하였다. 세포 현탁액 볼륨의 5배만큼의 pre-warmed fresh media를 tube에 넣고 37°C, 5% incubator에 5분간 두었다. 원심분리 (2000 rpm, 5분, 25°C)를 하고 상층액은 제거하였다. Fresh media를 넣어 세포와 섞어준 뒤 실험에 사용하였다.

유세포분석(Flow cytometry)

배양접시의 배양액을 모두 tube에 옮긴 후, 동량의 DPBS를 분주해 wash하고 동일한 tube에 옮겼다. 부착되어 있는 세포는 Accutase solution (Sigma, A6964)를 넣어 떼어내었다. 원심분리기를 이용해(2000rpm, 5분, 4°C) 세포를 침전 후 상층액을 제거하였다. 침전된 세포는 Flow cytometry buffer (0.1% BSA, 0.1% NaN₃ in 1X DPBS)를 이용해 resuspension 하였다. hPBMC 혹은 암세포주를 분석시에 Fc receptor blocking solution (Biolegend, 422302) 5 µl를 넣고 5분간 상온에 반응시킨 뒤 항체를 넣어주었다. 40분 동안 4°C에서 incubation한 뒤 원심분리기를 이용해 2번의 wash 후 BD Accuri C6 flow cytometer (BD sciences)로 분석하였다.

부착분석법 (Adhesion assay)

HUVEC을 96 well plate에 4×10^4 cells /200 μ l로 seeding 후 overnight 배양하였다. ECM immobilization을 위해, 96 well plate에 ECM solution을 넣고 4 $^{\circ}$ C overnight 보관 후 사용하였다. Media나 ECM solution을 제거 후 DPBS로 200 μ l wash out 하였다. Del-1 (R&D systems, 6046-ED)이나 Del-1 fragment (Y-biologics)가 들어있는 1X HBSS (Welgene, LB003-2)로 각 well 200 μ l씩 분주하고 37 $^{\circ}$ C, 5% incubator에 1 h pre-incubation을 하였다. MM cell 1.0×10^6 /ml in 1X HBSS에 BCECF-AM(Invitrogen, B3051) 0.3 μ M이 되게 섞고 상온에서 15분간 두었다. 세포현탁액이 들어있는 tube에 HBSS를 추가한 뒤 원심분리 (2000 rpm 5분)를 하고 상층액을 제거하였다. 이 wash 과정을 한 번 더 진행 후 HBSS로 resuspension 하였다. Pre-incubation이 끝난 well plate에 염색된 MM cell을 1×10^5 /200 μ l씩 분주하고 37 $^{\circ}$ C, 5% incubator에 1 h incubation 했다. Synergy HT plate reader (Biotek)기로 부착세포의 형광을 분석하였다. Excitation: 485/20, Emission: 528/20.

다발성 골수종 전이 마우스 모델

건강한 Nod-SCID gamma mouse(NSG mouse, JA BIO, 수원, 한국, GEM0018) 8 주령 이상의 수컷에 RPMI8226-GFP 세포 2×10^5 /10 μ l를 경골내 주사하여 마우스의 다발성 골수종 전이 모델을 만들었다.^{32,33} 암세포 주사 후 1주일째, 실험군은 Del-1 EGF_[1-3]-Fc를 15 ug/dose/200 μ l로, 대조군에는 DPBS 200ul를 주사하였다. 주당 2회 꼬리정맥으로 found dead가 확인될 때까지 주사하였다.

유효성 검사

데이터는 평균 \pm SD로 표시하였다. GraphPad Prism 소프트웨어를 사용해 통계적 유의성을 t-test, one way-ANOVA로 검정하였다.

결과

Human B cell, cancer B cells, MM cells와 HUVEC에서의 Del-1 counter receptor-integrin 발현

먼저 Del-1과 interaction 할 수 있는 counter receptor integrins과 기존에 CAM-DR을 유도한다고 알려진 integrins의 발현을 유세포분석으로 확인하였다(그림1, 표1). hPBMC에서 B cell의 잘 알려진 marker인 CD19 항체를 co-staining해 B cell만을 분석하였다.³⁴ LFA-1은 림프구에서 잘 발현되고, Del-1의 counter receptor로 알려져 있는 integrin으로, human B cell에선 모든 세포가 positive를 나타내었다.²⁸ 3가지 MM cell line중 U266과 H929에선 LFA-1 발현이 없었고 RPMI822 약 22% 세포가 발현됨을 확인하였다. $\alpha V\beta 5$ integrin은 Del-1의 counter receptor이면서 vitronectin의 receptor이기도 하다.³⁵ 고형암에서 많이 발현해 전이와 침윤의 역할을 하는 $\alpha V\beta 5$ integrin은 U266과 RPMI8226에서 발현을 확인할 수 있었다.³⁶ VLA-4 (CD49d)는 림프구의 부착과 이동에 관여하는 integrin으로 혈관 내피의 VCAM-1과 fibronectin의 receptor이다.^{37,38} Human B cell과 MM cell lines에서 공통적으로 CD49d 발현이 높았지만 RPMI8226에선 비교적 낮게 발현되어 있었다. 요약하면, MM cell lines에 Del-1의 counter receptor integrin과 ECM receptor는 서로 다른 integrin 발현 패턴을 보였다(표 1, 2). HUVEC에서도 Del-1의 counter receptor integrin인 CD49d, αV integrin, $\alpha V\beta 5$ integrin의 발현을 확인하였다(그림1). 이러한 결과들을 통해 Del-1이 직접 다발성 골수종 혹은 혈관세포에 binding 할 수 있음을 확인하였다.

MM의 marker인 CD38은 세포주에 따라 발현이 다르다

다음은, MM cell lines간에 다발성 골수종의 핵심 markers인 CD38과 CD138 발현에 차이가 있는지 확인하였다. MM cell lines 모두 공통적으로 CD138 발현이 아주 높았다(그림2). 하지만 CD38 발현은 RPMI8226과 H929에서 높았고, U266에선 약 44%의 세

포에서 CD38이 발현되지 않음을 확인할 수 있었다. (그림2, 표2). 질병의 잘 알려진 marker라 할지라도, 항상적 발현을 가진 일관성이 있는 (reliable) marker 혹은 치료의 target으로 적용하기에는 어려움이 있다는 것을 의미한다.

세포 외 기질이 풍부한 환경에서도 MM의 증식 속도가 증가하지 않는다

Integrins은 골수내 환경의 구성요소와의 상호작용에 의해 다발성 골수종 세포의 성장 및 분화를 조절한다. 앞에서 MM cell lines별로 integrins 발현 양상이 다양한 것을 확인하였기에, 이러한 발현양상의 차이가 다발성 골수종 세포의 증식을 조절하는지 알아보았다. 이를 위해, 다발성 골수종 세포의 생존에 유리한 환경에서 성장속도를 확인하였다. CD49는 fibronectin, avb5는 vitronectin, CD138은 collagen과 interaction을 한다. 대조군으로는, MM이 배양시 부유 상태로도 자라기 때문에 plate에 아무것도 처리하지않은 군(Non-coated)또는 BSA를 immobilization한 것을 사용하였다. 골수 환경에서 풍부하게 있고 다발성 골수종에서 잘 발현되어있는 integrin의 ligand ECM을 immobilization 후, 형광염색 (CFSE)된 다발성 골수종 세포를 배양하였다. 배양 48시간 쯤에 세포들의 분열횟수를 분석하였다. non-coated와 ECM으로 coated된 상태에서 배양시 다발성 골수종 세포의 분열횟수에 차이가 없었다(그림 3). 이러한 결과는 다발성 골수종과 세포 외 기질간의 interaction이 증식을 촉진하지 않는 것을 의미한다.

세포 외 기질이 풍부한 환경에서 MM의 marker인 CD138 발현이 감소한다

앞선 실험에서 세포 외 기질이 풍부한 환경에서 다발성 골수종 세포의 증식이 증가하지 않는 것을 확인했다. 다발성 골수종 세포는 세포 외 기질환경에서 다양한 신호를 주고 받는데, 이러한 신호전달의 결과로 다발성 골수종 세포의 다른 표면 분자들의 발현에 영향을 미치는지 확인하였다. 다발성 골수종 세포를 세포 외 기질에 배양

시 integrin의 발현과 MM marker인 CD38의 발현에는 뚜렷한 변화가 없는 반면, CD138 발현은 유의하게 감소하였다(그림 4b~g). MM cell lines를 vitronectin에서 배양했을 때 U266과 RPMI8226에서 CD138 발현이 유의미한 감소가 있었고, $\alpha V\beta 5$ integrin 발현이 없는 H929에선 유의미한 CD138 발현 변화가 없었다(그림 4b~d). Fibronectin에 배양시에는 3가지 다발성 골수종 세포주 모두 유의미하게 CD138 발현이 감소됨을 확인 할 수있었다(그림 4e~g). 공통적으로, 각 세포주에 잘 발현된 integrin에 대한 ECM ligand에 배양시, CD138 negative 세포의 비율이 증가하였다. 더 나아가, 24시간 보다 48시간 배양시 CD138 negative 세포의 비율이 증가하였다. 이는 ECM 양에 따라 그리고 ECM과의 부착시간이 길수록 다발성 골수종 세포의 CD138 발현이 감소한다는 것을 가리킨다. 특이한점은 48시간 동안 ECM에서 키운 다발성 골수종 세포를 아무것도 coat하지 않은 배양접시에 옮겨서 배양시 24시간내에 원래의 CD138 발현 수준으로 돌아옴을 확인했다(그림 4b~g). 이러한 결과들은 다발성 골수종 세포의 CD138 발현이 ECM 존재 여부와 ECM에 강하게 부착할 수 있는 integrin 발현양에 따라 dynamic하게 변한다는 것을 뜻한다.

Del-1과 Del-1 fragment는 다발성 골수종의 부착을 억제한다

다발성 골수종 세포의 integrins에 의존한 세포 외 기질 부착이 CD138의 발현 감소를 dynamic하게 유도함을 확인했다. CD138의 낮은 발현수준이 다발성 골수종 세포의 악성 phenotype과 연관이 있다고 알려져 있다. 다발성 골수종 세포의 표면에 Del-1의 counter receptor integrin이 발현되어 있기에, 재조합 Del-1 단백질이 다발성 골수종 세포의 풍부한 counter receptor integrin 또는 ECM에 결합하여 다발성 골수종 세포의 부착능을 조절한다는 가설을 세우고 이를 시험하고자 했다. 다발성 골수종 세포 외 기질에 배양 또는 혈관내피세포와의 공배양 하는 단계에서 Whole Del-1, Del-1 EGF fragment인 Del-1 EGF(E1-E2)-Fc와 Del-1 EGF(E1-E3)-Fc을 더해서 부착분석법

을 시행하였다 (그림 5b). 사용된 3가지 모두 200 nM에서 RPMI8226과 혈관세포간의 부착을 유의미하게 억제하였고, 가장 큰 효과가 보이는건 Del-1 EGF_{[1-3]}}-Fc였다. Del-1 EGF_{[1-3]}}-Fc을 serial 농도로 처리한 실험에서, 농도에 비례해 혈관세포에 대한 RPMI8226 또는 U266의 부착을 억제 하였다(그림 5c). RPMI8226 과 U266의 CD49와 α V β 5 발현양상이 상이하다. 더 나아가, EGF_{[1-3]}}-Fc는 vitronectin 혹은 fibronectin에 대한 다발성 골수종 세포의 부착을 억제 하였다(그림5d). 요약하면, Del-1 EGF_{[1-3]}}-Fc는 혈관내피세포 뿐만 아니라 세포외 기질 단백질에 대한 부착도 억제함을 보여주었다 (그림 5b~d). 이러한 결과들은 Del-1이 골수종 세포주의 integrin이나 MM marker인 CD38, CD138의 발현양에 상관없이 부착반응을 억제함을 가리킨다.

Del-1 EGF_{[1-3]}}의 주사는 *in-vivo* 다발성 골수종 model 마우스의 생존율을 증가시킨다

재조합 단백질이 *in vitro*에서 다발성 골수종 세포의 혈관내피세포 및 세포외 기질 단백질에 대한 부착을 억제하였기 때문에, Del-1을 이용한 치료제로서의 가능성을 확인하고자 하였다. 이를 위해, 마우스의 다발성 골수종 모델을 제작하고 생존기간과 생존율을 모니터링 하였다. 약 40일간의 모니터링을 진행했을 때, 생존기간과 생존율이 증가하였다(그림6). RPMI826-GFP를 NSG mouse 경골내 주사한 마우스의 다발성 골수종 model에서 *in vitro* 부착 억제기능이 가장 좋은 Del-1_{[E1-E3]}}-Fc을 꼬리정맥에 일주일에 2회씩 4주동안 주사하였다. 실험군인 Del-1_{[E1-E3]}}-Fc를 주사한 마우스는 39일까지 생존하였고 대조군으로 PBS만 주사한 마우스는 최대 35일까지 밖에 생존하지 못했다. 대조군은 다발성 골수종 주사전 체중에 비해 사망했을 때 체중이 평균 25% 이상 감소하였지만, 실험군에선 약 15% 감소하였다. Del-1_{[E1-E3]}}-Fc는 골수종 모델에서 생존을 증가시키고 병의 진행을 완화시킬 수 있음을 뜻한다.

Adhesion molecule profiling	Healthy						
	Human B cell	Raji B	Nalm6	U266	H929	RPMI8226	HUVEC
CD11a (LFA-1 active)	-	-	-	-	-	-	-
CD11a (LFA-1 closed)	+++	+++	-/+	-	-/+	+	-
CD11b (α M-integrin)	+	-/+	++	-	-/+	-/+	-
CD49d (α 4-integrin)	+++	+++	-	+++	+++	+	++
CD51 (α V-integrin)	+	-	-/+	-	-	+	+++
CD51/61 (α V β 3-integrin)	-/+	-/+	-	-	-/+	-/+	+++
CD51/ β 5 (α V β 5-integrin)	-	-/+	-	+	-	+++	+++
CD38	++	+++	-	++	+++	+++	-/+
CD138 (Syndecan-1)	-	-	-/+	+++	+++	+++	++

표 1. Human B cell, Cancer B cell 세포주, multiple myeloma 세포주, HUVEC의 표면분자들 발현 정도 profiling

유세포분석 시 unstained 세포의 MFI 수치를 기준으로, MFI가 증가한 세포들의 비율을 백분율로 계산하여, 아래와 같은 조건으로 분류하여 상대적 발현 정도를 표시하였다. (-;<5%, -/;<20% +;<60%, ++;<90%, +++;>90%)

MM 세포주 표면 분자 비교

U266 (CD49d +++, α V β 5 +, CD38 ++, CD138 +++)
H929(CD49d +++, α V β 5 -, CD38 +++, CD138 +++)
RPMI8226(CD49d+, α V β 5 +++, CD38 +++, CD138 +++)

표 2. Multiple myeloma 세포주 표면 분자 발현 비교

Multiple myeloma 세포주에서 Del-1 counter receptor 인테그린인 CD49d 및 α V β 5, 그리고 MM marker인 CD38 및 CD138들의 상대적인 발현정도를 비교요약하였다.

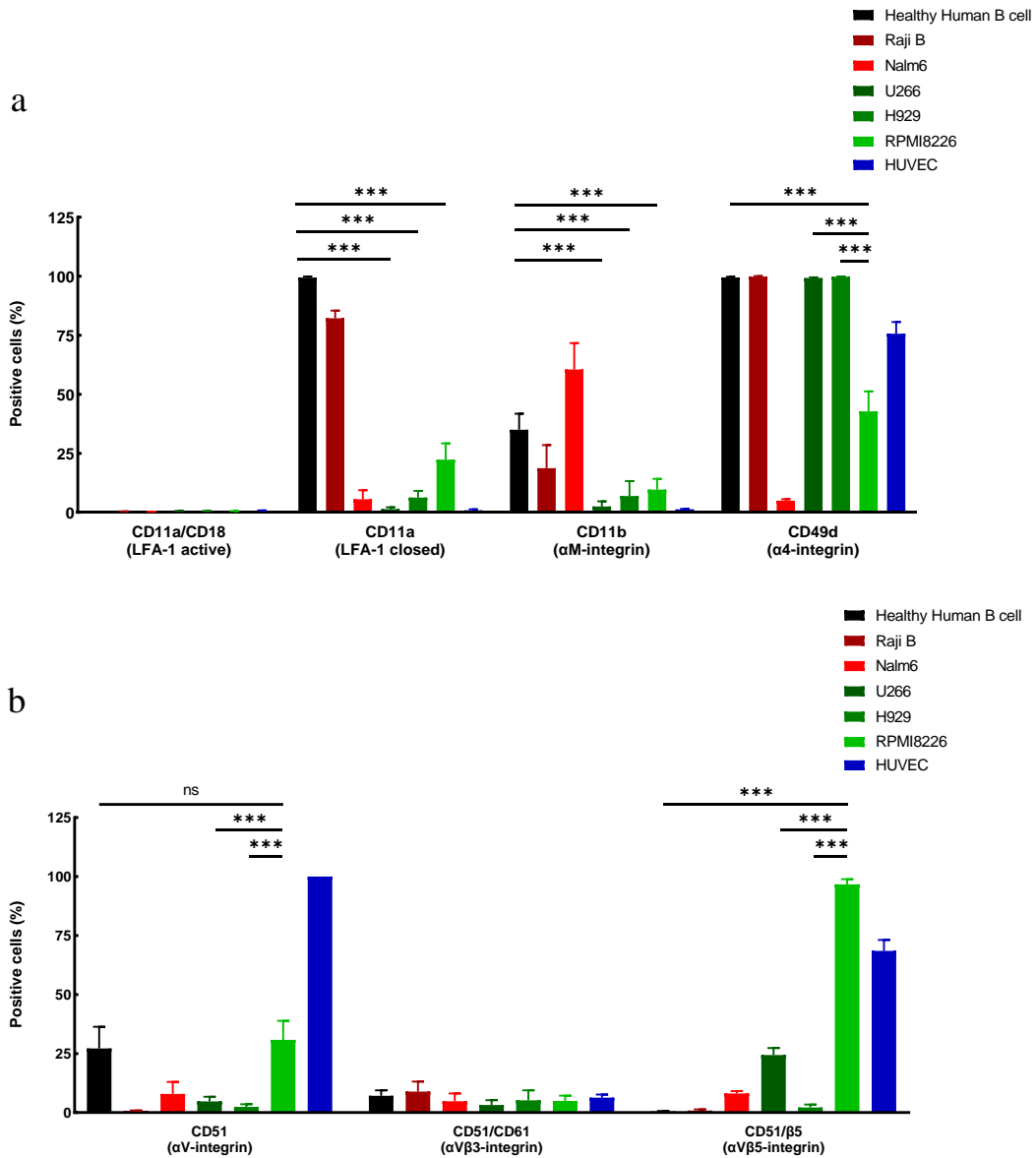


그림 1. Human B cell, Cancer B cell 세포주, Multiple myeloma 세포주, HUVEC에서의 Del-1 counter-receptor integrins 및 다른 백혈구 integrin 발현 분석
 Human B cell, B cancer cell line (Raji B과 Nalm6), Multiple Myeloma (U266, H929, 및 RPMI8226) 그리고 HUVEC에서의 Del-1 target integrins 및 다른 백혈구 integrin 발현 양을 유세포 분석하였음. a) LFA-1 active form (CD11a/CD18), LFA-1 closed form(CD11a), $\alpha 4$ (CD11b) 발현양을 분석함. b) αV (CD51), $\alpha V\beta 3$ (CD51/CD61), $\alpha V\beta 5$

(CD51/β5) 발현양을 분석함. 데이터는 독립적 배양결과 평균값 \pm SD. 세포주당 n =3~ 6. n.s; not significant, *,P<0.05, **,P<0.01, ***,P<0.005. one-way ANOVA

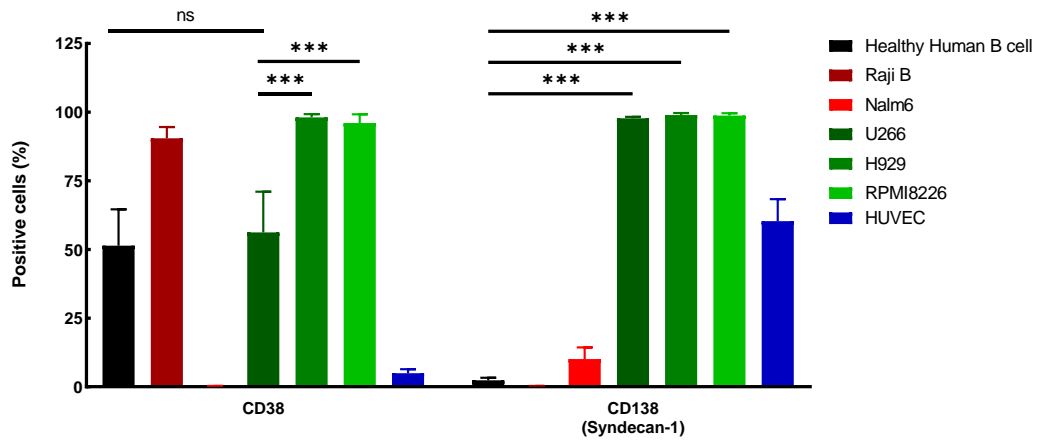
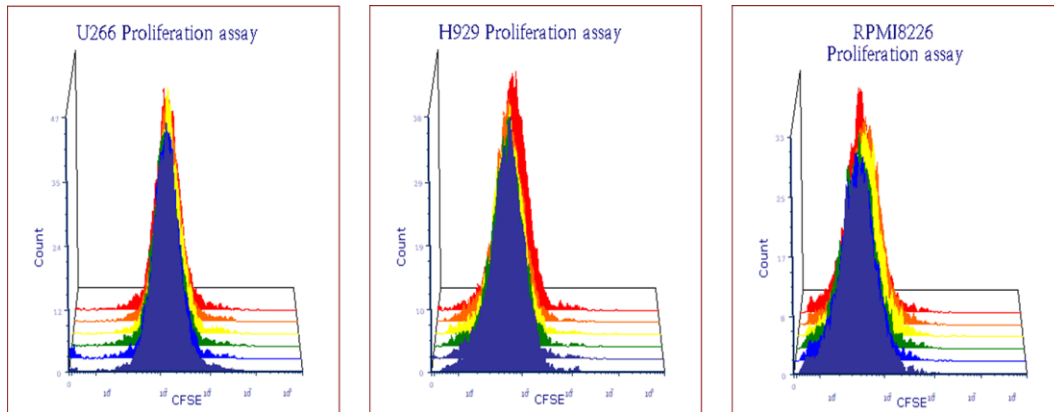


그림 2. Human B cell, Cancer B cell 세포주, Multiple myeloma 세포주, HUVEC의 multiple myeloma marker 발현

Human B cell, B cancer cell line, Multiple Myeloma 그리고 HUVEC에서 CD38, CD138 발현을 비교함. 데이터는 독립적 배양결과 평균값 \pm SD. 세포주당 n = 3~6. n.s; not significant, *;P<0.05, **;P<0.01, ***;P<0.005. one-way ANOVA

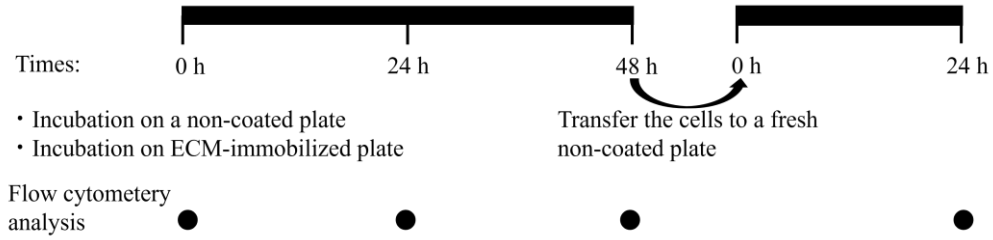


	Immobilized protein
Red	Non-coated
Orange	BSA (0.5ug/cm ²)
Yellow	BSA (5.0ug/cm ²)
Green	Col IV (5.0ug/cm ²)
Blue	Fibronectin (5.0ug/cm ²)
Dark Blue	VTN (0.5ug/cm ²)

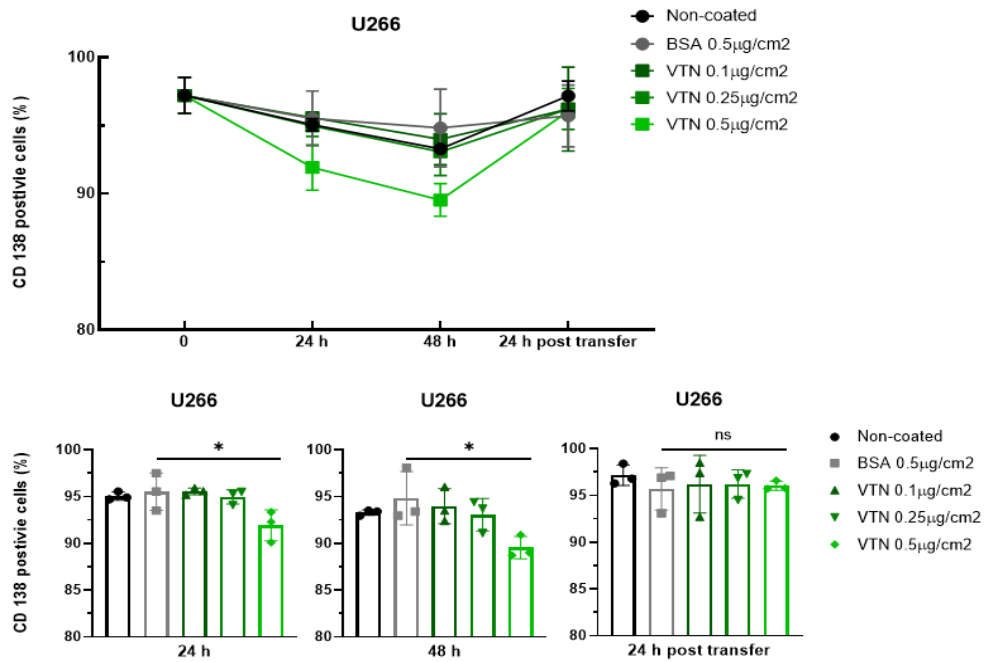
그림 3. 세포 외 기질에서 배양시 multiple myeloma cells의 proliferation 변화

CFSE로 형광염색한 multiple myeloma cells을 세포 외 기질이 풍부한 환경에서 배양했다. 배양 48 시간 에 flow cytometry로 형광 intensity를 분석하였다. 대조군으로 Non-coated well와 BSA-coated well를 사용하였다. 데이터는 대표로 histogram을 overlay 함. 실험은 n = 3을 진행함.

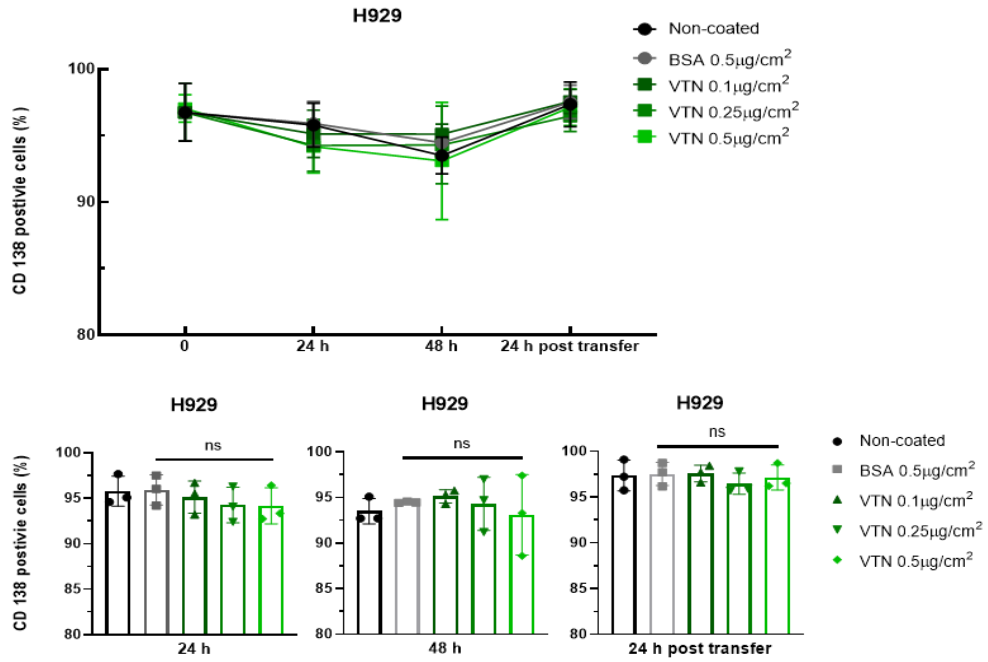
a



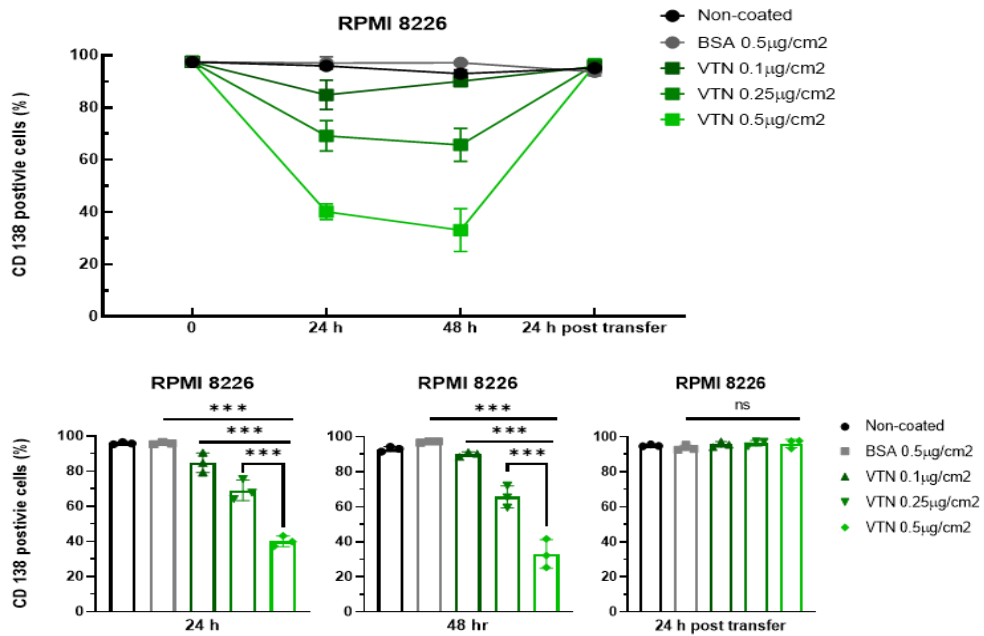
b



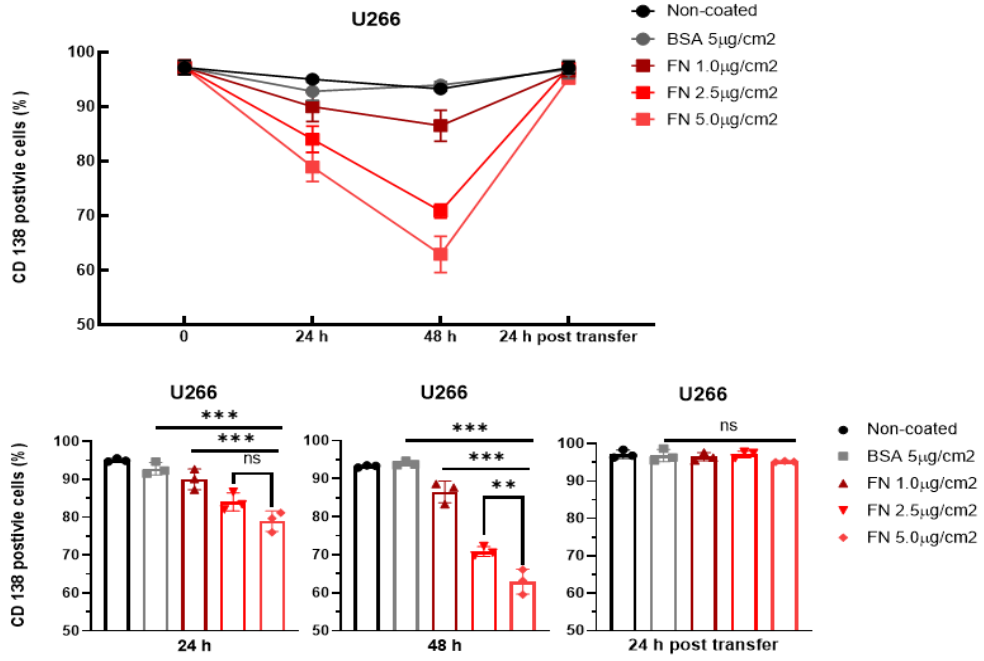
c



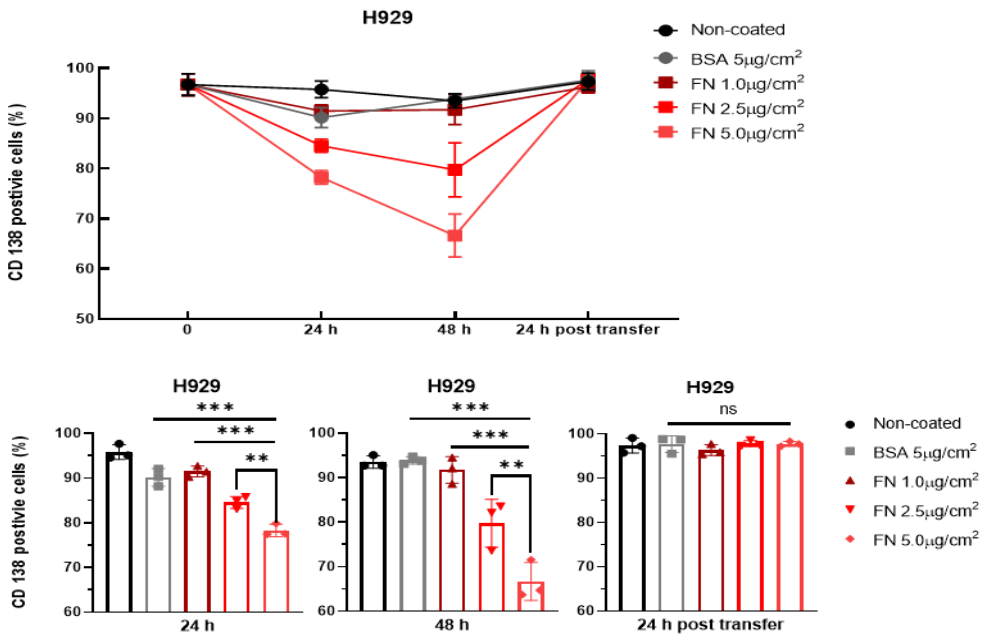
d



e



f



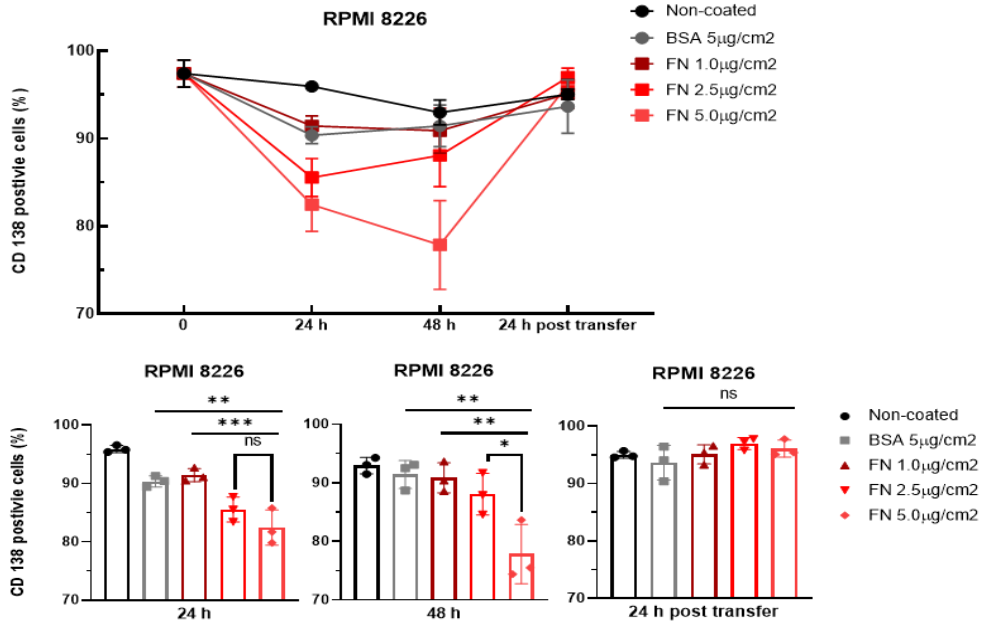
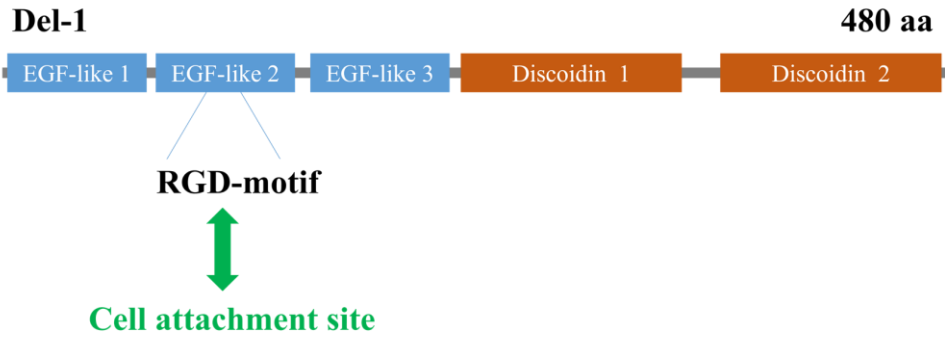


그림4. 세포 외 기질에서 배양시 multiple myeloma cell의 CD138 변화

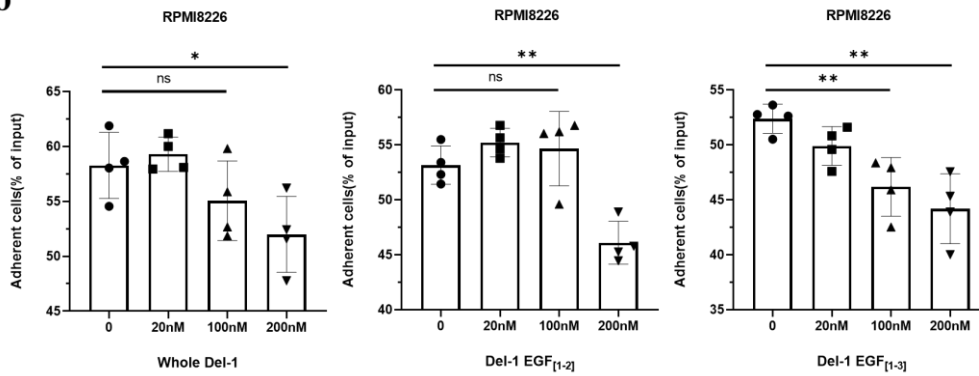
a) 전체적인 실험에 대한 diagram을 나타내었다. 평소의 계대배양에 사용하는 non-coated plate에 배양한 다발성 골수종 cell lines를 immobilized ECM에 배양 후 유세포 분석을 진행하였다. 유세포 분석은 immobilized ECM에 seeding전, seeding 후 24 시간과 48시간 그리고 ECM에 48시간 키운 다발성 골수종 세포 일부를 non-coated plate에 옮긴 후 24시간 배양, 분석하였다. 대조군으로 non-coated와 BSA를 사용하였다.

b~g) Line graphs는 모든 시간대별, Bar graph는 배양 시작 후 시간대별 CD138 % positive인 cell을 표현하였다. b,c,d) MM cell line을 농도별 immobilized vitronectin에 배양시 CD138 positive cell percentage를 표현하였다. e,f,g) 다발성 골수종 cell line을 농도별 immobilized fibronectin에 배양시 CD138 positive cell percentage를 표현하였다. CD138의 변화. 데이터는 평균 \pm SD. 그룹당 $n = 3$ 으로 표시됨. n.s; not significant, *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$, ***, $P < 0.005$. one-way ANOVA

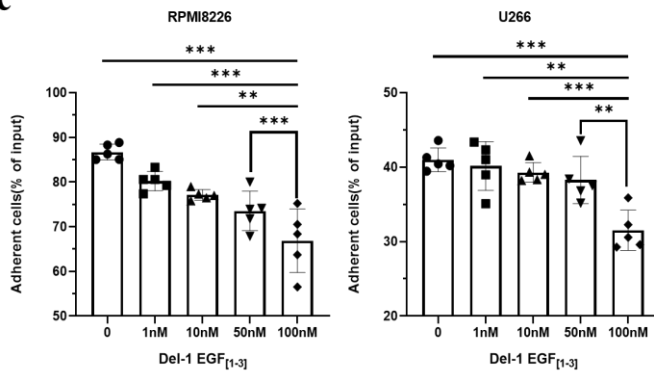
a



b



c



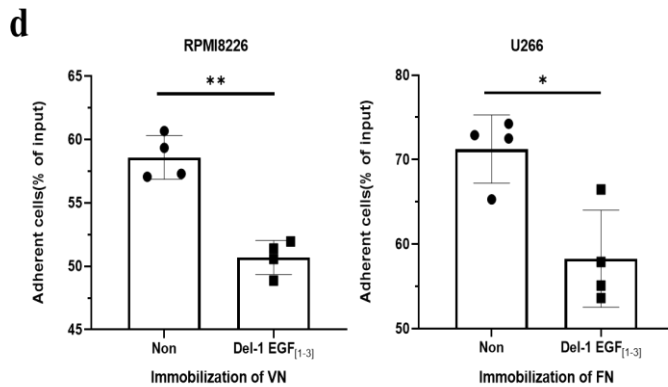


그림5. Del-1 및 Del-1 fragments를 이용한 multiple myeloma의 부착억제

a) Del-1 단백질의 구조 모식도 b) Del-1과 Del-1 fragments를 이용해 RPMI8226의 혈관세포 부착 억제 기능 측정 스크리닝. c) Del-1 EGF_[1-3]-Fc를 serial한 농도별로 처리 시, RPMI8226과 U266의 혈관세포 부착 억제 기능 측정. d) Del-1 EGF_[1-3]-Fc 처리 후 Immobilized VN, FN에 RPMI8226과 U266의 부착 제어기능 측정. 데이터는 평균 ± SD 그룹당 n = 3 으로 표시됨. n.s; not significant, *,P<0.05, **,P<0.01, ***,P<0.005. t-tests

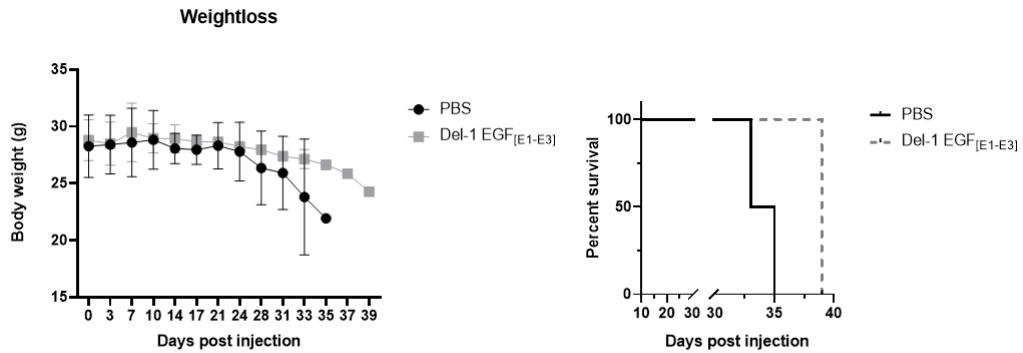


그림 6. Multiple myeloma *in-vivo* model에서의 무게변화 및 생존율

NSG mouse에 경골내 RPMI8226-GFP cell을 injection 하였다. 꼬리정맥으로 PBS 혹은 Del-1 EGF_[1-3]-Fc를 주에 2회씩 생존하는 기간동안 주사하였고, 무게 감소와 생존율을 확인하였다. 그룹 당 mouse는 2마리씩 사용하였다.

고찰

본 연구에서 Del-1과 Del-1 fragments의 다발성 골수종 부착 제어 기능을 확인하였다. 정상 B 세포와 다발성 골수종 세포간 integrin 발현 차이를 알아보기 위해 총 4명의 healthy donor의 hPBMC를 사용했다. hPBMC를 원하는 만큼 얻는데 한계가 있고 분석하려는 표면 분자들이 많아 plasma B cell 대신 B 세포를 분석하였다. 다발성 골수종은 항체를 생성하는 plasma B cell에 생긴 암이지만 정상 B cell의 표면 분자들의 조성 (composition) 및 발현수준이 상이했다. 또한, 다발성 골수종 세포주 3종을 분석한 결과 같은 암으로 분류될지라도 각 세포주에 따라 세포부착분자들의 표현형에 차이가 있었다. 이러한 표면분자들의 발현양 차이가 항체 치료제 및 항암화학요법 등 다발성 골수종의 치료에 제약이 많다는 점을 시사한다. Del-1은 integrins과 세포 외 기질과 interaction 해 세포의 부착을 억제할 수 있어 표현형이 서로 다른 다발성 골수종의 보편적인 치료제로 가능성이 있다.

다발성 골수종 세포가 세포 외 기질이 있는 환경에서 CD138 발현이 감소한 것을 확인하였다. 이 결과는 마우스의 다발성 골수종 모델에서 이동과 침윤이 일어난 조직의 다발성 골수종 세포 phenotype이 CD138 발현이 감소되어있다는 연구 내용을 뒷받침한다.³⁹ 이는 다발성 골수종의 marker를 target하는 α -CD138 치료의 어려운점과 CD138 발현이 감소된 골수종은 부착이 되어 생존에 유리한 신호전달을 받은 phenotype를 뜻한다.⁴⁰

*In vitro*에선 다발성 골수종의 부착에 의존해서 CD138 발현이 감소된 악성 phenotype을 유도함을 확인하였다. 또한, Del-1과 Del-1 fragments을 처리시 부착 억제를 확인했다. 특히 동일한 100nM을 처리했을 때 Del-1[E1-E3]이 가장 큰 부착 억제 기능을 가졌음을 확인했다. Del-1 처리 조건에서 ECM에 부착하는 다발성 골수종 세포의 CD138 발현에 변화가 있는지, 있다면 이를 유도하는 세포내 신호전달 기전이 무엇인지에

대한 추가 연구가 필요하다. *In vitro* 결과에선 신빙성이 있는 결과를 얻었지만, *in vivo model*에서 부착 억제 및 부착 억제로 인한 다발성 골수종의 CD138 증감 비교를 확인하지 못했다. Del-1_[E1-E3]-Fc 주사의 효과로 bone marrow microenvironment에 다발성 골수종이 부착하지 못해 CD138 발현 감소가 일어나지 않을 것이라 기대하였지만, 적절한 time point를 놓쳐 부검을 통한 조직 분석을 하지 못했다. 결과적으로, Del-1_[E1-E3]-Fc를 주사한 그룹은 약 5일간 더 생존하였지만, 실험에 사용된 n 수가 부족해 유의성을 확인하지 못했다. n 수를 늘려 유의성을 확보할 필요가 있다. 추가적으로, Del-1_[E1-E3]-Fc의 생체 분포 및 형광 세포주를 주사 뒤 골수에 잘 이식이 됐는지 fluorescence bioimaging을 통한 confirm을 하는 과정이 없었다. 다만, 희생할 건강한 BL6 mouse를 제공받아 같은 방법으로 주사 후 bone marrow cell을 얻어 형광이 positive한 세포를 확인함으로 technical error를 확인했다. Del-1_[E1-E3]-Fc의 생체 분포와 다발성 골수종 이식에 대한 확인을 위해 IVIS(In Vivo Imaging Systems)장비를 이용한 검증이 요구된다. 또한 임상에서 사용중인 drug combination을 통해 치료제로서 가능성이 있는지 연구가 필요하다.

한편, 다발성 골수종 세포의 분열 횟수는 부유 혹은 부착되어 있을 때 변화가 없었다. 보통의 부유상태에서 부착하지 않아도 잘 자라기 때문에 부착으로 인한 분열 횟수가 늘어나지 않았을 가능성이 있다. 부유와 부착 상태에서도 성장이 잘 되는건 치료의 어려움을 나타낸다. 이러한 특징은 골수에선 침윤(invasion) 혹은 순환종양세포(circulating tumor cel)으로 blood stream의 환경에서도 분열을 하고 다른 장기로 쉽게 전이(metastasis) 될 기회가 높아질 수 있기 때문이다.⁴¹ 다발성 골수종의 CD49d를 knock-out 하는 *in vivo model*에서 다른 조직으로의 전이가 되었지만 주요 사망요인인 골수 및 뼈 파괴가 감소하고 생존율이 증가함을 보여준 보고가 있다.⁴⁵ Del-1을 이용한 부착을 억제함이 치료에 있어서 득보다 실이 많은지는 추가적인 연구가 필요하다.

Del-1의 부착 억제제는 중증 환자나 환자의 장기 생존을 위한 치료제로서의 가능성을 시사한다. Del-1 EGF_[1-3]은 whole Del-1에 비해 부착 제어능이 뛰어나고 분자량이 3분의 1밖에 되지 않는다. 이는 Peptide drug가 가지는 장점인 생체내의 안정성과 생산성과 비용 등 치료제로서 매력적이고 표면에 interaction 하기 때문에 세포내의 막 투과성에 대한 어려움을 줄일수있다.⁴⁶ 추가적으로 Del-1의 부착제어 기전 연구를 위해 RGD motif가 있는 [E2-E3], E2 혹은 E3 단독의 기능을 연구한다면 Del-1의 제어기전을 명확히 규명할 수 있고 peptide drug로서 엄청난 경쟁력을 가진다고 사료된다.

Histaka kitano와 Chiaki Hidai 연구팀은 최근에 Del-1의 peptide를 연구해 암을 직접 제거하는 방향의 가능성을 제시했다.^{47,48} Del-1의 세 번째 EGF repeat와 첫번째 discoidin domain의 기능을 밝혀내었다.^{47,48} Del-1 EGF_[3]에는 apoptosis를 유발하는 consensus sequence가 존재한다.^{47,49-53} EGF_[3]과 discoidin domain_[1]이 이어진(E3-C1) cDNA를 non-viral vector로 cloning 후 이 vector를 편평세포암에 형질도입을했다. 그 연구팀은 이 형질도입이 신생혈관생성을 억제하고 편평세포암의 세포 사멸을 유도해 암을 치료한 결과를 보여주었다.^{47,48} 치료의 방향성은 다르지만 Del-1 fragment를 이용한 치료제는 다발성 골수종을 넘어 다른 암의 치료제로서 큰 가능성을 지닌다.

참고문헌

1. Kumar, S. K., et al. (2017). Multiple myeloma. *Nature Reviews Disease Primers*, 3(1), 17046.
2. Rosko, A., et al. (2017). Myeloma in Elderly Patients: When Less Is More and More Is More. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*(37), 575-585.
3. Eisfeld, C., et al. (2023). Time trends in survival and causes of death in multiple myeloma: a population-based study from Germany. *BMC Cancer*, 23(1), 317.
4. Thorsteinsdottir, S., et al. (2018). Dramatically improved survival in multiple myeloma patients in the recent decade: results from a Swedish population-based study. *Haematologica*, 103(9), e412-e415.
5. Branagan, A., et al. (2020). Current Treatment Strategies for Multiple Myeloma. *JCO Oncology Practice*, 16(1), 5-14.
6. Hou, J. H., et al. (2019). The impact of the bone marrow microenvironment on multiple myeloma. *Oncology Reports*, 42(4), 1272-1282.
7. Katz, B. Z. (2010). Adhesion molecules--The lifelines of multiple myeloma cells. *Semin Cancer Biol*, 20(3), 186-195.
8. Manier, S., et al. (2012). Bone marrow microenvironment in multiple myeloma progression. *BioMed Research International*, 2012.
9. Kawano, Y., et al. (2015). Targeting the bone marrow microenvironment in multiple myeloma. *Immunological reviews*, 263(1), 160-172.
10. Zanetti, C., & Krause, D. S. (2020). "Caught in the net": the extracellular matrix of the bone marrow in normal hematopoiesis and leukemia. *Exp Hematol*, 89, 13-25.
11. Huang, Y. J., et al. (2021). CAM-DR: Mechanisms, Roles and Clinical Application in Tumors. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9.
12. Bar-Natan, M., et al. (2017). Bone marrow stroma protects myeloma cells from cytotoxic damage via induction of the oncoprotein MUC1. *Br J Haematol*, 176(6), 929-

938.

13. Azab, A. K., et al. (2012). P-selectin glycoprotein ligand regulates the interaction of multiple myeloma cells with the bone marrow microenvironment. *Blood*, *119*(6), 1468-1478.
14. Vidriales, M. B., & Anderson, K. C. (1996). Adhesion of multiple myeloma cells to the bone marrow microenvironment: implications for future therapeutic strategies. *Mol Med Today*, *2*(10), 425-431.
15. Glavey, S. V., et al. (2017). Proteomic characterization of human multiple myeloma bone marrow extracellular matrix. *Leukemia*, *31*(11), 2426-2434.
16. Neri, P., & Bahlis, N. J. (2012). Targeting of adhesion molecules as a therapeutic strategy in multiple myeloma. *Curr Cancer Drug Targets*, *12*(7), 776-796.
17. Wang, X., et al. (2022). Expanding anti-CD38 immunotherapy for lymphoid malignancies. *J Exp Clin Cancer Res*, *41*(1), 210.
18. Sanderson, R. D., & Yang, Y. (2008). Syndecan-1: a dynamic regulator of the myeloma microenvironment. *Clin Exp Metastasis*, *25*(2), 149-159.
19. Yu, T. T., et al. (2018). An Immune Based, Anti-CD138 Targeting Antibody for the Treatment of Multiple Myeloma. *Blood*, *132*.
20. de Weers, M., et al. (2011). Daratumumab, a Novel Therapeutic Human CD38 Monoclonal Antibody, Induces Killing of Multiple Myeloma and Other Hematological Tumors. *Journal of Immunology*, *186*(3), 1840-1848.
21. Kawano, Y., et al. (2012). Multiple myeloma cells expressing low levels of CD138 have an immature phenotype and reduced sensitivity to lenalidomide. *Int J Oncol*, *41*(3), 876-884.
22. Kawano, Y., et al. (2011). Decreased CD138 Expression in Myeloma Cells: A Potential Indicator of Poor Prognosis and Aberrant Differentiation. *Blood*, *118*(21), 1684-1684.
23. Mykytiv, V., Alwaheed, A., & Mohd Hashim, N. A. (2019). Double CD38(-)/CD138(-) negative multiple myeloma. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, *12*(1), 64-66.

24. Christensen, J. H., et al. (2012). Characterization of potential CD138 negative myeloma "stem cells". *Haematologica-the Hematology Journal*, 97(6), E18-E20.
25. Yu, J., et al. (2021). Multiple myeloma with CD138 changed from positive to negative: A case report. *Cytometry B Clin Cytom*, 100(2), 249-253.
26. Hidai, C., et al. (2007). Discoidin domain of Del1 protein contributes to its deposition in the extracellular matrix. *Cell Tissue Res*, 330(1), 83-95.
27. Schurpf, T., et al. (2012). The RGD finger of Del-1 is a unique structural feature critical for integrin binding. *FASEB J*, 26(8), 3412-3420.
28. Choi, E. Y., et al. (2008). Del-1, an endogenous leukocyte-endothelial adhesion inhibitor, limits inflammatory cell recruitment. *Science*, 322(5904), 1101-1104.
29. 류현진. (2020). *Del-1을 이용한 인테그린 매개 암세포의 이동제어* (Publication 국내석사학위논문)울산대학교대학원].울산. <http://www.riss.kr/link?id=T15677935>
30. Kim, D. Y., et al. (2020). Del-1, an Endogenous Inhibitor of TGF-beta Activation, Attenuates Fibrosis. *Front Immunol*, 11, 68.
31. Yuh, D. Y., et al. (2020). The secreted protein DEL-1 activates a beta3 integrin-FAK-ERK1/2-RUNX2 pathway and promotes osteogenic differentiation and bone regeneration. *J Biol Chem*, 295(21), 7261-7273.
32. Schueler, J., et al. (2013). Intratibial injection of human multiple myeloma cells in NOD/SCID IL-2Rgamma(null) mice mimics human myeloma and serves as a valuable tool for the development of anticancer strategies. *PLoS One*, 8(11), e79939.
33. Lwin, S. T., Edwards, C. M., & Silbermann, R. (2016). Preclinical animal models of multiple myeloma. *Bonekey Rep*, 5, 772.
34. Wang, K., Wei, G., & Liu, D. (2012). CD19: a biomarker for B cell development, lymphoma diagnosis and therapy. *Exp Hematol Oncol*, 1(1), 36.
35. Felding-Habermann, B., & Cheresh, D. A. (1993). Vitronectin and its receptors. *Current opinion in cell biology*, 5(5), 864-868.
36. Vogetseder, A., et al. (2013). α v-Integrin isoform expression in primary human tumors

- and brain metastases. *International journal of cancer*, 133(10), 2362-2371.
37. Imai, Y., Shimaoka, M., & Kurokawa, M. (2010). Essential roles of VLA-4 in the hematopoietic system. *Int J Hematol*, 91(4), 569-575.
38. Elices, M. J., et al. (1990). VCAM-1 on activated endothelium interacts with the leukocyte integrin VLA-4 at a site distinct from the VLA-4/fibronectin binding site. *Cell*, 60(4), 577-584.
39. Akhmetzyanova, I., et al. (2020). Dynamic CD138 surface expression regulates switch between myeloma growth and dissemination. *Leukemia*, 34(1), 245-256.
40. Hosen, N. (2020). Integrins in multiple myeloma. *Inflammation and Regeneration*, 40(1).
41. Ghobrial, I. M. (2012). Myeloma as a model for the process of metastasis: implications for therapy. *Blood*, 120(1), 20-30.
42. Clark, A. D., Shetty, A., & Soutar, R. (1999). Renal failure and multiple myeloma: pathogenesis and treatment of renal failure and management of underlying myeloma. *Blood Reviews*, 13(2), 79-90.
43. Dimopoulos, M. A., et al. (2008). Pathogenesis and treatment of renal failure in multiple myeloma. *Leukemia*, 22(8), 1485-1493.
44. Terpos, E., et al. (2018). Pathogenesis of bone disease in multiple myeloma: from bench to bedside. *Blood Cancer Journal*, 8.
45. Hathi, D., et al. (2022). Ablation of VLA4 in multiple myeloma cells redirects tumor spread and prolongs survival. *Scientific Reports*, 12(1).
46. Fosgerau, K., & Hoffmann, T. (2015). Peptide therapeutics: current status and future directions. *Drug Discov Today*, 20(1), 122-128.
47. Kitano, H., Kokubun, S., & Hidai, C. (2010). The extracellular matrix protein Dell induces apoptosis via its epidermal growth factor motif. *Biochemical and biophysical research communications*, 393(4), 757-761.
48. Kitano, H., et al. (2021). An epidermal growth factor motif of developmental

- endothelial locus 1 protein inhibits efficient angiogenesis in explanted squamous cell carcinoma in vivo. *Revista de investigación clínica*, 73(1), 39-51.
49. McNEILL, L. A., et al. (2002). Hypoxia-inducible factor asparaginyl hydroxylase (FIH-1) catalyses hydroxylation at the β -carbon of asparagine-803. *Biochemical Journal*, 367(3), 571-575.
50. Przysiecki, C. T., et al. (1987). Occurrence of beta-hydroxylated asparagine residues in non-vitamin K-dependent proteins containing epidermal growth factor-like domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(22), 7856-7860.
51. Stenflo, J. (1991). Structure-function relationships of epidermal growth factor modules in vitamin K-dependent clotting factors.
52. Lavaissiere, L., et al. (1996). Overexpression of human aspartyl (asparaginyl) beta-hydroxylase in hepatocellular carcinoma and cholangiocarcinoma. *The Journal of clinical investigation*, 98(6), 1313-1323.
53. Stenflo, J., et al. (1989). Hydroxylation of aspartic acid in domains homologous to the epidermal growth factor precursor is catalyzed by a 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(2), 444-447.

Abstract

Multiple myeloma (MM) is hematologic cancer that occurs in plasma B cells producing antibody. Recently, the incidence rate of multiple myeloma has increased more than 30 times, and it is the second most common blood cancer. The treatment of multiple myeloma using chemotherapy, anticancer drugs, therapeutic antibodies but, is still not curable. Most patients have repeated recurrence and improvement but leading to drug-resistant refractory conditions. Therefore, there is a need for the development of alternative treatments and methods to maximize existing treatment methods. Multiple myeloma cells express various integrins, a cell adhesion molecule family. Interaction between MM cells and the components in the bone marrow microenvironment activates intracellular signaling pathways. The integrin-mediated adhesion promotes cell survival and leads to cell adhesion-mediated drug resistance of multiple myeloma cells. Developmental endothelial locus-1 (Del-1) is an endogenous anti-inflammatory molecule that limits leukocyte migration to tissues by inhibiting leukocyte integrins. Multiple myeloma cells expressed counter receptor integrins for Del-1. As such, Del-1 inhibited adhesion of multiple myeloma cells onto endothelial cells and extracellular matrix. A Del-1 fragment, Del-1 EGF-like repeat_[1-3] more effectively regulated adhesion of multiple myeloma cells than a whole Del-1 molecule. In an *in-vivo* multiple myeloma metastasis model, supplementation of mice with Del-1 EGF-like repeat_[1-3] increased survival rate and alleviated disease progression. These results suggested that Del-1 EGF-like repeat peptide is applicable to develop as a drug for controlling integrin-mediated functions in multiple myeloma.