대한정형외과연구학회지 제 4 권 제 2 호
J. of Korean Orthopaedic Research Society
Volume 4, Number 2, October, 2001

Focal adhesion kinase(FAK)의 발현 조절에 의한 연골양 세포 부착의 조절

연세대학교 의과대학 정형외과학교실, 아주대학교 의과대학 외과학교실*

이진우 · 김윤희 · 한수봉 · 신규호 · 박희붕*

= Abstract =

The Control of Chondroid Cell's Adhesiveness by Modulation of Focal Adhesion Kinase(FAK) Expression

Jin Woo Lee, M.D., Yun Hee Kim, M.S., Soo Bong Hahn, M.D., Kyu Ho Shin, M.D., Hee Boong Park, M.D.*

*Department of Orthopaedic Surgery, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea, Department of General Surgery, Ajou University School of Medicine, Suwon, Kyunggi-do, Korea.**

Purpose : We propose that cell attachment can be regulated by the modulation of FAK expression using an adenovirus vector.

Materials and Methods : Chondrocytes and chondroid cells were used in cell attachment test by blocking or non-blocking of antibodies and synthetic peptides on type II collagen precoated 96-well immunoplates. The C-terminal domain of FAK(FAK-CD) was transfected through infection of the recombinant adenovirus. Also tyrosine phosphorylation of FAK was checked by immunoprecipitation of FAK followed by western blot analysis with anti-phosphotyrosine antibody. For evaluating the change of integrin expression, semi-quantitative reverse-transcription polymerase chain(RT-PCR) reactions were done after transfection of FAK-CD.

Results : We observed more increased expression of FAK in the chondroid cells than that in chondrocytes using western blotting. The level of attachment to type II collagen was significantly inhibited by blocking with the monoclonal antibody of integrin-β1 and synthetic RGD peptides. Also adenovirus mediated transfection of FAK-CD resulted in inhibition of phosphorylation of FAK and significantly inhibited cell attachment in only JJ102. Integrin-β1 antibody blocking after transfection with FAK-CD showed inhibition of cell attachment in more than 95% of all cells. The mRNA expression of both Integrin 2 and integrin 5 was increased but was not significant. Protein expression of integrin 2 and integrin 5 showed no changes.

※ **통신저자 : 이 진 우**
서울특별시 서대문구 신촌동 134번지
연세대학교 의과대학 정형외과학교실
Tel : 02) 361-5640, Fax : 02) 363-1139
E-mail : ljwos@yumc.yonsei.ac.kr

*이 논문은 2000년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2000-F00176).

Conclusion : We found that the attachment of FAK-overexpressing cells could be mediated through integrin-β1 receptor. We concluded that the modification of FAK expression will contribute to increase the cell attachment to biomaterials and regeneration of cartilage defects.

Key Words : Chondroid cell, Cell attachment, Focal adhesion kinase, Integrin-β1, FAK-CD, Adenovirus vec-

서 론

관절연골은 외상 혹은 퇴행성 변화 후 매우 제한된 재생의 능력을 보인다고 알려져 있으며[1], 이러한 손상에 대한 자연 재생 능력은 관절면에서 조직학적, 생화학적, 그리고 생역학적으로 매우 부족한 재생을 보인다고 한다[4,7]. 연골 재생 치료법의 성공을 위한 필수적인 요건은 이식된 세포가 주변의 숙주 조직 혹은 생체 재료와 융합되어야 하는 것이다. 세포의 부착은 세포의 여러 가지 행태 중 가장 중심이 되는 현상으로 세포의 형태, 세포 증식, 세포의 이동, 세포의 분화 그리고 세포의 자연사(apoptosis) 등에 영향을 미치게 된다. 이러한 세포의 부착은 세포질에 위치한 세포부착물질(cell adhesion molecule)에 의해 조절되며 integrin은 가장 대표적인 세포부착물질 중의 하나이다. Integrin은 다른 세포 및 세포외기질과의 상호작용에 관계하는 주된 수용체로서[3] 세포부착의 단순한 중개자 역할 뿐 아니라 세포막을 통한 생화학적 신호 전달의 변환자(transducer)의 역할도 수행한다[8]. Focal adhesion kinase p125FAK (FAK)는 integrin과 물리적으로 연결되어 있으며, 순차적인 integrin을 매개로 하는 세포의 부착을 빠르게 안정화시킨다[2]. 1998년 Xu등의 발표에 의하면 인위적으로 FAK의 표현을 억제 시켰을 경우 종양세포의 부착이 상실되며 종양세포의 사멸이 유도됨을 보고하였다[10]. 또한, FAK의 C-말단 부위로서 또 다른 단백질로 합성되는 FAK-related non-kinase(FRNK)는 FAK의 인산화를 억제함으로써 FAK에 의한 세포의 활성을 저해시키고, 세포 부착과 퍼짐을 억제시키는 것으로 보고되었다[6]. FAK 조절과 integrin에 의해 발생하는 세포내 현상과의 상관관계를 근거로 FAK가 세포의 부착과 퍼짐에 관계한다고 예상할 수 있지만[5], 연골세포에서 이러한 가설을 뒷받침할 만한 직접적인 근거는 거의 없는 실정이다. 따라서 본 연구는 FAK의 C-말단 부위가 포함된 아데노바이러스를(FAK-CD) 이용하여 FAK가 과발현된 연골양 세포에서 FAK-CD가 세포 부착 억제에 미치는 영향을 보고자 하였으며, 이러한 FAK는 암유발 유전자가 아닌 것으로 알려져 있으므로 FAK 발현의 증가 및 감소를 통하여 세포의 부착력을 조절할 수 있다면 이는 향후 생체재료의 개발 및 세포의 이식을 통한 치료법의 개발에서 문제로 대두되고 있는 세포부착의 문제를 해결할 수 있는 새로운 방법을 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

대상 및 방법

1. 연골세포의 배양

연골세포의 분리는 소의 슬관절을 구입하여 관절연골을 채취한 다음 0.1% collagenase, 0.065% hyaluronidase로 효소 처리하였으며, 연골양 세

Table 1. Biochemical and phenotypic analysis of the chondroid cell lines

Biochemical analysis	JJ012	105KC
Immunostaining: Type II collagen	No type II collagen	Extensive type II collagen
Keratan sulfate	No Keratan sulfate	13% substitution
Cell growth and doubling time	Rapid: 0.5-1 day	Slow: 6-7 days
Relative aggrecan mRNA	.89×105KC	1
Collagen II/collagen I ratio	.80	1.07
Level of differentiation	Poorly	Highly

포로는 연골 육종 환자에서 분리한 세포주를 사용하였다. 세포주는 연골세포와 유사한 표현형을 보이는 JJ012와 105KC(Gift from Dr. Block, Chicago, IL, USA)를 이용하였다(Table 1). 모든 세포는 10% 우태혈청이 포함된 Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM)/F-12 배지에서 37℃, 5% CO_2 조건하에서 단층 배양하였다.

2. 세포외기질에 대한 연골세포의 부착능 측정

세포의 부착 실험은 1㎍/㎖의 제2형 교원질(Chondrex, WA, USA)이 도포된 96-well immunoplate(Maxi Sorp, Nunc, Denmark)을 사용하였고, Bovine serum albumin(BSA)으로 도포된 immunoplate는 비특이적 결합에 대한 음성 대조군으로 사용하였다. 연골세포의 부착에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 integrin β1(1:100, 4B4 clone, Coulter, CA, USA)과 anchorin CII 항체(Gift from Dr. Mollenhauer, Chicago, IL, USA) 및 합성 RGD 펩타이드(Integra, Temecula, CA, USA)를 사용하였다. 또한 항체의 음성 대조군으로는 non-specific IgG와 non-cyclic RGD 펩타이드를 사용하였다. 단층배양한 연골세포 및 연골양 세포는 트립신 처리한 후, 0.5% BSA, 20mM HEPES(pH 7.4)가 포함된 DMEM에 세포수가 1×10^6이 되도록 희석하여 30분간 방치하였다. 항체 integrin-β1과 anchorin CII 및 합성 RGD 펩타이드는 위와 동일한 배지에 희석하여 세포 희석 용액과 혼합한 후, 4℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 세포 부착은 37℃, 1시간 동안 시켰으며, 부착된 세포는 hexosaminidase assay를 통해 정량화하였다. 측정된 수치에서 BSA에 부착된 세포의 수를 뺌으로써 표준화하였으며, 모든 실험은 세 번 반복하여 평균값을 측정하였다.

3. FAK-CD를 포함한 아데노바이러스 벡터의 재조합 및 형질전환

재조합 아데노바이러스 벡터의 제작은 인간의 FAK 유전자의 C-말단부위의 360개의 아미노산에 대한 cDNA를 합성한 후, 외부 표식 인자로서 cDNA의 N-말단에 hemagglutanin(HA) 서열을 연결하여 pCRII vector(Invitrogen, CA, USA)에 클로닝 하였다(pCRII-FAK-CD). 재조합 아데노바이러스로는 pACCMV.PLPASR(+) 셔틀벡터를 사용하였으며 pCRII-FAK-CD와 함께 Kpn I 제한효소를 처리하여 클로닝하여 제작하였다. 바이러스의 역가는 플라그 형성 활성도(plaque forming activity)를 통해 측정하였고, 음성대조군으로는 β-galactosidase를 발현하는 Lac Z 유전자를 포함한 아데노바이러스 벡터를 이용하였다. 형질전환은 100㎜ 세포 배양 용기에 1.5×10^6의 세포를 24시간 배양하고, 새 배지로 교체 후, 바이러스 벡터를 첨가하여 12시간 배양하였다.

4. Western blotting과 Immunoprecipitation

세포의 전체 단백질은 NP-40 lysis buffer [1% NP-40, 20mM Tris(pH 7.4), 150mM NaCl, 5mM EDTA, 1mM $NaVO_4$ 10㎍/㎖ protease inhibitor(aprotinin and leupeptin)]로 분리한 후, 50㎍의 세포 추출액을 사용하여 8% polyacrylamide gel electrophoresis를 실시하였다. 단백질은 완충용액에서 nitrocellulose membrane으로 이동시킨 후, 단일 항체 FAK(C20, Santa Cruz, CA, USA), HA(12CA5, Boehringer Mannheim, Germany), integrin α2 및 α5(Chemicon, CA, USA)와 반응시켰다. FAK의 인산화는 250㎍의 세포 추출액을 1㎍의 FAK 항체 또는 10㎍의 HA 항체와 반응시켜 침전 분리한 후, 인산화를 인식하는 항체(4G10, Upstate Biotech, NY, USA) 및 FAK 항체로 western blotting을 통해 확인하였다. 모든 western blotting의 발색은 ECL detection system(Amersham, NJ, USA)을 이용하였다.

5. Semi-quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction(RT-PCR)

제2형 교원질에 대한 연골세포 부착의 방법에 따른 교원질 수용체의 발현 변화를 측정하기 위하여, 교원질 수용체인 integrin α1, α2, α5, αv, β1, β3의 염기서열을 파악하여 RT-PCR을 위한

primer를 제작하였다(Table 2). 1㎍의 total RNA와 Ominiscript kit(QIAGEN, Germany)을 사용하여 cDNA를 합성하였으며, 2㎕ cDNA, 0.2㎛M dNTP, 1.5mM $MgCl_2$, 0.5㎛M primer와 1U Taq DNA polymerase로 각 유전자를 증폭하였다. 유전자 증폭 산물은 1% agarose gel electrophoresis를 통해 확인하였고 densitometer로 정량화 하였다.

결 과

1. 제2형 교원질에 대한 연골세포의 부착에서 integrin, anchorin CII, 합성 RGD 펩타이드가 미치는 영향

7일째 단층 배양하여 사용된 연골세포는 제2형 교원질에 의미있게 부착하였으며, BSA로 도포된 표면에는 부착하지 않았다. 도포된 제2형 교원질의 농도는 0.1㎍/㎖에서 20㎍/㎖까지 범위에서 측정하였고, 그 결과 세포의 최고 부착 농도는 1㎍/㎖임을 확인하였다. BSA로 표면 처리된 경우와 비교할 때, 연골세포, JJ012 및 105KC 모두 제2형 교원질에 의미있게 부착하였다. 이러한 세포 부착은 integrin β1 항체에 의해 연골세포(95%), JJ012(68%) 및 105KC(87%)의 모든 세포에서 억제 되었다(Fig. 1). 또한, 합성 RGD 펩타이드는 연골세포(94%)와 105KC(29%)의 부착은 억제시켰으나, JJ012의 부착은 억제하지 않음을 관찰할 수 있었다. 따라서, 제2형 교원질에 대한 연골세포의 부착이 integrin β1과 RGD 펩타이드에 의하여 특이적으로 억제됨을 알 수 있었다.

2. Western blotting과 Immunoprecipitation

Western blotting을 통해, 연골세포에 비해 두 연골양 세포에서 FAK가 과발현되고 있음을 보였고, 특히 JJ012에서의 발현이 가장 높은 것으로 관찰되었으며, 이러한 FAK발현의 차이는 세포의

Table 2. Primers for integrins

Genes	Primers	Length	PCR Products
Bovine Integrin β1	5'CAC TCA AAT CCA GCC ACA GCA GC 3' 3'CAA CCA CCT TAC ACT GTG CCG AC 5'	23 23	464 bp
Human Integrin β1	5'AAC GAG GTC ATG GTT CAT GTT GTG 3' 3'CGT TTA GGG TGT TGT GAC TTA CG 5'	24 23	278 bp
Human Integrin β3	5'GTT CCC AGT GAG TGA GGC CCG AGT A 3' 3'GCG ATT GAC TGG TCC ACT GGG CGA A 5'	25 25	419 bp
Human Integrin α1	5'GCT TAT TGG TTC GTT AGT TGG C 3' 3'TTT TGC ACT GGG TAC TCA AGT TGG A 5'	25 25	461 bp
Human Integrin α2	5'CTT TGG CAA CCT TCC TCC TCC CTT 3' 3'TAC TCC GTG ACC TTT GGT GGT GG 5'	24 23	371 bp
Bovine Integrin α2	5'TCA GAA GTC TGT TAC CTG CAA TGT G 3' 3'TAG GTG TAG GGA GTT ATG TGG TTT C 5'	25 25	361 bp
Human Integrin α5	5'CAT GCC CAG AAT GTG GGT GAG GGT G 3' 3'GAG TTG TTG AGC GTT TCG CTG CAC C 5'	25 25	279 bp
Bovine Integrin α5	5'ACC GGC TGC AAA GAC GGA TGT TCC T 3' 3'TCA CCT AGT TCC GTC TTC CGT CGG T 5'	25 25	294 bp
Human Integrin αv	5'TTG GAG CAT CTG TGA GGT CGA AAC 3' 3'CAC CGA CAG CCT CTA AAG TTA CCA 5'	24 24	395 bp
Human GAPDH	5'ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC 3' 3'ATG TCG TTG TCC CAC CAC CT 5'	20 20	450 bp

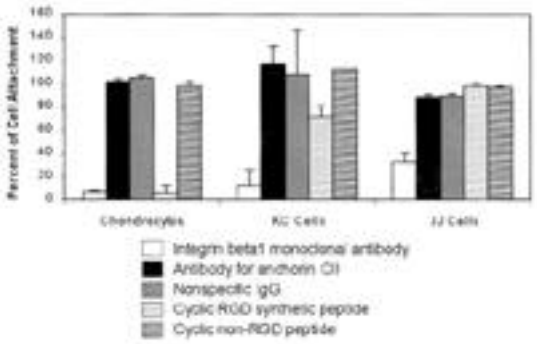

Fig. 1. Effects of collagen receptor blocking on chondroid cells(JJ and KC cells) and chondrocyte attachment to type II collagen. Immunoplates(96 wells) were coated with collagen type II(1㎍/㎖) and blocked for nonspecific binding with 1% BSA. Attachment assays were performed in triplicate and each experiment was repeated on at least three occasions. The numbers represent the mean adhesion from three wells±SD from three experiments.

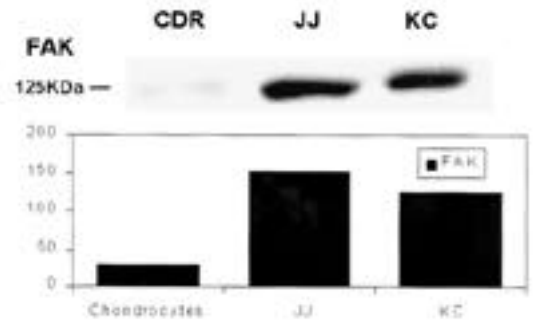

Fig. 2. Western blot analysis of focal adhesion kinase expression in chondroid cell lines(JJ & KC) and bovine articular chondrocytes(CDR). Total 50㎍ of cell lysate was analyzed for FAK expression using anti-FAK polyclonal antibody. Densitometric analysis was done.

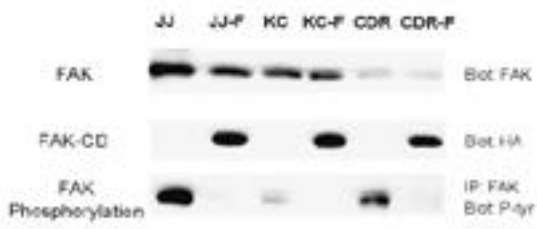

Fig. 3. FAK expression and phosphorylation after transfection(JJ-F, KC-F, & CDR-F) by western blot and immunoprecipitation analysis. Expression of FAK-CD after transfection was detected using anti-HA monoclonal antibody. Analysis of tyrosine phosphorylation of FAK was accomplished by immunoprecipitation of FAK followed by Western blot analysis with anti-phosphotyrosine antibody. For immunoprecipitation, 250㎍ of cell lysate was incubated with 1㎍ of anti-FAK polyclonal antibody or 10㎍ of anti-HA monoclonal antibody in the presence of protein A/G-agarose. The precipitated proteins were analyzed by Western blot using anti-phosphotyrosine monoclonal antibody or anti-FAK antibody.

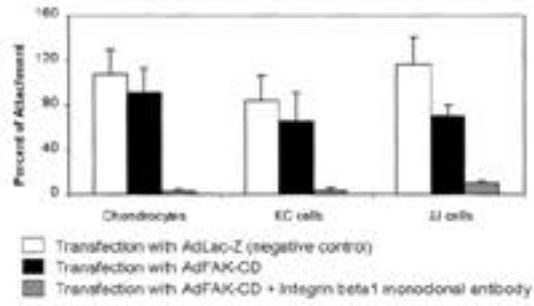

Fig. 4. Chondroid cells(JJ and KC cells) and chondrocyte attachment to type II collagen after transfection with FAK-CD. Transfection with Lac-Z gene was used as a control. Cells(100,000/well) were incubated with integrin ß1 antibody for 1 h at 4℃ and then allowed to adhere for 1 h at 37℃. Nonadherent cells were removed by washing, and adhesion was determined by analyzing lysosomal hexoaminidase. Attachment assays were performed in triplicate and each experiment was repeated on at least three occasions. The numbers represent the mean adhesion from three wells±SD from three experiments.

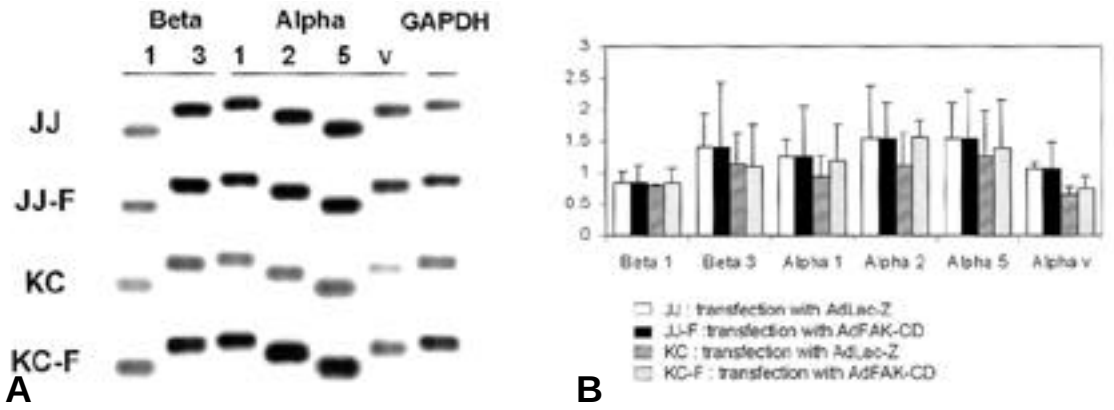

Fig. 5. Results of semi-quantitative RT-PCR of integrin expression in chondroid cell lines. **A.** Representative reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of RNA. With use of the primers identified in Table 2., reverse transcription-polymerase chain reaction analysis RNA from chondroid cell lines with(JJ-F and KC-F) or without(JJ and KC) transfection with FAK-CD. **B.** Densitometric analysis of integrin expression through three repetition. The values were normalized by GAPDH expression. The results are mean±SD.

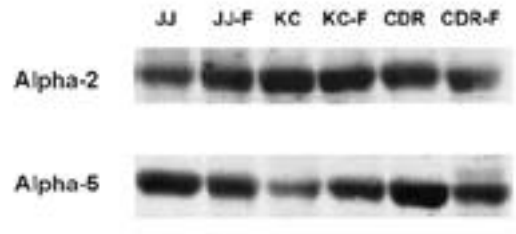

Fig. 6. Western blot analysis of integrin expression after transfection(JJ-F, KC-F, & CDR-F). 50μg of cell lysate was analyzed for FAK expression by western blotting using anti-integrin α2 and α5 polyclonal antibody.

분화 정도와 관련이 있었다(Fig. 2). 아데노바이러스를 이용한 FAK-CD의 형질전환 후 FAK-CD의 발현을 확인하였으며, 이러한 형질 전환의 결과는 FAK의 발현에는 아무런 영향을 주지 않았으나 FAK의 인산화를 현저히 억제시켰다(Fig. 3). 따라서 FAK-CD를 통해 효과적으로 FAK의 인산화를 억제할 수 있음을 알 수 있었다.

3. FAK-CD의 형질전환이 세포 부착에 미치는 영향

FAK-CD의 세포 부착에 미치는 영향을 살펴보기 위해 아데노바이러스를 이용한 FAK-CD를 형질전환 시킨 군과 FAK-CD의 형질전환 후 단일 항체 integrin β1과 반응시킨 군에 대해서 세포 부착 실험을 실시하였다. 형질전환의 대조군으로는 동일한 아데노바이러스에 재조합된 Lac Z 유전자를 형질전환시킨 세포를 사용하였다(Fig. 4). FAK-CD의 형질전환에 의하여 JJ012에서만 의미있게 세포 부착이 억제되었고, 항체 Integrin-β1에 의하여 더욱 억제되었다. FAK-CD의 형질전환 후 단일 항체 Integrin β1과 반응시킨 세포의 부착은 모든 세포에서 95% 이상 세포부착을 억제시켰다. 이러한 결과는 JJ012의 제2형 교원질에 대한 부착이 FAK-CD에 의한 FAK인산화의 억제로 저해될 수 있으며, 이러한 억제 효과는 Integrin β1 항체에 의해 증가하였음을 의미하였다.

4. FAK-CD의 형질전환에 의한 integrin 발현의 변화

FAK-CD의 형질전환 후, integrin의 발현은 RT-PCR과 western blotting을 통해 관찰하였으며, 105KC에서 integrin α2와 α5의 mRNA 발현이 증가하였으나 유의하지 않았다(Fig. 5). 이를 단백질 수준에서 관찰하기 위해 integrin α2와 α5에 대한 western blot을 실시한 결과 발현의 차이가 없음을 보였다(Fig. 6). 그 외 integrin β1과 β3의 mRNA 발현에는 큰 변화가 없었다.

고 찰

FAK는 다기능성 단백질로서, 특히 세포 부착에 있어서 integrin을 통한 세포 신호 전달에 주 역할을 하는 것으로 알려지고 있다[8]. Integrin은 focal adhesion의 형성과 함께 FAK와 결합하고 세포외기질의 리간드와의 결합으로 인해 활성화됨으로써 FAK의 tyrosine 아미노산의 인산화를 증가시킨다. FAK의 인산화는 여러 성장 인자에 의해서도 증가되며, 이러한 관찰은 FAK가 세포외기질 또는 용해성 펩타이드와의 부착에서 세포의 증식 및 사멸의 신호전달에 관여함을 시사하고 있다. 특히, 대부분의 정상세포에서 보여주는 세포 증식과 사멸을 위한 세포와 기질간의 부착을 매개할 것을 암시하여 준다. 일부 세포에서 FRNK라 명명된 FAK의 선택적인 번역(alternative translation)에 의한 또 다른 단백질의 발현이 보고 되었으며, 이는 FAK의 비촉매적 C-말단 부위로서, FAK의 기능을 억제하는 것으로 밝혀졌다[9]. 그 증거로는 FRNK가 과발현된 섬유아세포에서 트립신 처리 후 재퍼짐(respreading)과 focal adhesion 형성이 결핍된 것으로 나타났고, 세포 이동에도 영향을 미치는 것으로 보고되었다[5]. 그러나, FAK 유전자가 결여된 쥐의 배아로부터 분리한 섬유아세포는 운동성은 떨어지나, 비정상적으로 높은 focal contact를 보여 주어 FAK가 focal adhesion의 형성에 필수적으로 요구되지 않음을 보였다. 이러한 상반된 결과는 세포부착에 있어서 FAK의 기능과 필요성이 세포 종류에 따라 다를 수 있음을 제시하여 준다. 또한, FAK발현의 증가는 사람의 종양 세포의 흡착 및 전이와 관련이 있는 것으로 알려져 왔으며[10], 이러한 사실은 악성 종양 세포의 기능을 해석 하는 데에 임상적 의의를 부여해 준다. 본 연구는 연골세포에 비해 FAK가 과발현되어 있는 연골양 세포에서 FAK의 발현이 세포 부착 및 세포의 분화 정도와 관련이 있음을 관찰할 수 있었다. 따라서, 악성 종양 세포에서 FAK의 과발현이 세포외기질로의 세포부착과 이동의 증가에 중요한 역할을 할 것으로 추측되어진다. 본 연구에서 Integrin-β1과 합성 펩타이드에 대한 항체를 사용하여 연골세포 및 연골양세포의 제2형 교원질로의 부착을 억제할 수 있었으나, 연골세포(95%)와 105KC(87%)와 달리 JJ012에서는 Integrin β1 항체에 의해 68%의 세포 부착이 억제되었고, 합성 펩타이드에 의해서는 아무런 억제 효과를 볼 수 없었다. 이러한 결과는 JJ012에서 FAK의 발현이 가장 높았던 점을 추측해 볼 때 세포 부착의 억제가 FAK 발현과 상관관계가 있음을 시사해 준다. 즉, integrin이 세포외기질과 결합함으로써 FAK를 활성화시키고 이는 focal adhesion의 형성과 함께 일련의 세포 신호전달체계를 거쳐 세포 부착을 조절하는 데에 있어서, FAK발현이 가장 높은 JJ012에서 부착 억제가 가장 낮았던 결과는 integrin을 매개로 하지 않는 FAK 자체의 활성화 능력을 배제할 수 없음을 제시하여 준다. 이러한 결과는 FAK-CD의 형질전환 후에 JJ012에서만 유의있게 세포 부착이 억제됨으로써, FAK-CD에 의해 FAK자체의 인산화가 세포 부착에 영향을 미치는 것으로 사료된다. 또한 FAK-CD의 형질전환 후, 세포내에서 발현되는 integrin의 변화가 없었기 때문에, FAK-CD는 integrin의 발현과 직접적인 관련이 없는 것으로 사료되며, 단지 FAK의 활성화에 관여한다는 사실을 뒷받침해 주고 있다. 따라서, 본 연구결과를 토대로, FAK에 의한 세포 부착은 Integrin β1 수용체와 리간드와의 결합 및 FAK-CD의 조작을 통해 조절될 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

본 연구를 통해 FAK가 세포 부착에 관여하고 있으며, FAK에 의한 세포 부착은 integrin을 매개로 하여 이루어짐을 직접적으로 증명할 수 있었다. 또한, 연골양 세포에서 세포의 분화정도에 따라 FAK 발현에 따른 세포 부착에 영향을 미치는 것으로 사료되며, 이러한 FAK의 발현은 외부적으로 유도된 C-말단 부위가 FAK의 인산화를 억제함으로써 세포 부착을 저해 시키는 것으로 사료된다. 따라서, 본 연구의 결과를 토대로 FAK 발현의 조절은 세포와 세포외기질 및 생체 재료와의 부착력 증진을 도모할 것으로 기대된다. 이는 연골 재생 치료법에서 세포와 숙주 조직과의 융합의 난점을 해결할 수 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

1) **Depalma AF, Mckeever CD, and Subin DK** : Process of repair of articular cartilage demonstrated by histology and autoradiography with tritiated thymidine. *Clin Orthop*, 48:229-242, 1966.
2) **Kawamura S, Wakitani S, Kimura T, et al** : Articular cartilage repair. Rabbit experiments with a collagen gel- biomatrix and chondrocytes cultured in it. *Acta Orthop Scand*, 69:56-62, 1998.
3) **Landegren U** : Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase. Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. *J Immunol Methods*, 67:379-388, 1984.
4) **Mason JM, Grande DA, Barcia M, Grant R, Pergolizzi RG, and Breitbart AS** : Expression of human bone morphogenic protein 7 in primary rabbit periosteal cells: potential utility in gene therapy for osteochondral repair. *Gene Ther*, 5:1098-1104, 1998.
5) **Richardson A and Parsons T** : A mechanism for regulation of the adhesion-associated protein-tyrosine kinase pp125FAK [published erratum appears in Nature. 1996 Jun 27;381(6585):810]. *Nature*, 380:538-540, 1996.
6) **Richardson A, Shannon JD, Adams RB, Schaller MD, and Parsons** : Identification of integrin-stimulated sites of serine phosphorylation in FRNK, the separately expressed C-terminal domain of focal adhesion kinase: a potential role for protein kinase A. *Biochem J*, 324:141-149, 1997.
7) **Shapiro F, Koide S, and Glimcher MJ** : Cell origin and differentiation in the repair of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am*, 75:532-553, 1993.
8) **Ueki K, Mimura T, Nakamoto T, et al** : Integrin-mediated signal transduction in cells lacking focal adhesion kinase p125FAK. *FEBS Lett*, 432:197-201, 1998.
9) **Weiner TM, Liu ET, Craven RJ, and Cance WG** : Expression of growth factor receptors, the focal adhesion kinase, and other tyrosine kinases in human soft tissue tumors. *Ann Surg Oncol*, 1:18-27, 1994.
10) **Xu LH, Yang X, Craven RJ, and Cance WG** : The COOH-terminal domain of the focal adhesion kinase induces loss of adhesion and cell death in human tumor cells. *Cell Growth Differ*, 9:999-1005, 1998.

tor