

신세포암 세포주에서 Interferon-gamma (IFN- γ)에 의한 Fas-매개성 세포사의 유도

Fas-induced Apoptosis In Renal Cell Carcinoma Cell Line by Interferon-gamma (IFN- γ) Treatment

Soo Jung Yoon, Jae Sik Yoon,¹ Taeg Kyu Kwon, Min Ho Suh,²
Seong Il Suh,² Won Ki Baek,² Young Sun Lee,
Sung Joon Lee,¹ Jong Wook Park

From the Departments of Immunology, Urology,¹ and Microbiology,²
School of Medicine, Keimyung University, Taegu, Korea

Purpose: Interferon-gamma (IFN- γ) is a cytokine involved in cellular immune responses and has antiproliferative and cytotoxic effects on tumor cells in vitro. IFN- γ is also capable of increasing the expression of MHC class I and class II molecules and tumor markers thereby enhancing the immune responses against the tumor cells. It has been reported in a number of studies that several cytokines including interleukin-2, IFN- α , IFN- γ , and tumor necrosis factor-alpha, induce Fas antigen expression on tumor cell surfaces and make the tumor cells sensitive to Fas/Fas ligand (Fas/FasL)-mediated apoptosis. In the purpose of determining the effect of IFN- γ on the Fas/FasL-mediated apoptotic pathway in Renca cell line, inducibility of Fas antigen and anti-Fas Ab-mediated apoptosis were investigated.

Materials and Methods: Fas mRNA transcript and Fas antigen expression were demonstrated by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunocytochemistry after IFN- γ treatment on Renca. In order to induce cell death in the IFN- γ -pretreated cells, Jo2, a cytotoxic anti-Fas Ab was used. The apoptotic characteristics of the Jo2-induced Renca cell death were demonstrated by DNA fragmentation assay and FACS analysis.

Results: Renca cells treated for 24 hours with 300U/ml of IFN- γ , showed high-level expression of Fas mRNA and protein in RT-PCR and immunocytochemical staining. Jo2 was able to induce cell death after pretreatment of Renca with 150U/ml of IFN- γ for 24 hours. Assays for DNA fragmentation revealed apoptosis-associated nucleosomal ladders in IFN- γ and Jo2-treated Renca. Jo2-induced apoptosis was also confirmed by increased subdiploid DNA contents in flow cytometric analysis.

Conclusions: These results suggest that IFN- γ , by enhancing surface Fas expression, sensitizes Renca tumor cell line to Fas/FasL-mediated apoptosis.

(Korean J Urol 2000; 41: 594~601)

Key Words: IFN- γ , Apoptosis, Fas antigen

대한비뇨기과학회지
제41권 제5호 2000년

계명대학교 의과대학 면역학교실, 비뇨기학교실,¹ 미생물학교실²

윤수정·윤재식¹·권택규
서민호²·서성일²·백원기²
이영선·이성준¹·박종욱

접수일자 : 1999년 12월 22일
체택일자 : 2000년 3월 28일

교신저자 : 박종욱
계명대학교 의과대학
면역학교실
대구광역시 중구 동산동
194 ☎ 700-712
전화 : 053) 250-7796
e-mail : j303nih@dsmc.or.kr

서 론

Fas (CD95, APO-1) 항원은 nerve growth factor 및

tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) 수용체 superfamily에 속하는 transmembrane 수용체 단백질로서 Fas ligand (FasL)의 공격을 받으면 세포의 apoptosis를 유발 한다.^{1,2} 암세포나 바이러스에 감염된 세포를 공격하는

주요 면역세포인 natural killer (NK) 세포나 세포독성 T 세포 (CTL, cytotoxic T lymphocyte)는 perforin과 granzyme을 분비하는 degranulation 경로나,^{3,6} Fas/FasL 매개 apoptosis 경로를^{6,8} 통하여 세포를 제거하는 것으로 알려져 있으므로 암세포 제거에 있어서 Fas 항원의 역할은 매우 중요하다. 활성화된 CTL과 NK 세포에서 주로 분비되는 interferon-gamma (IFN- γ)에 의하여 암세포 표면에서 발현되는 Fas 항원의 양이 증가하면 이를 면역세포에서 표현하는 FasL에 의한 암세포의 세포사가 증가할 것으로 사료되며, IFN- γ 는 또한 암세포의 class I 및 II MHC 분자의 발현과^{9,10} 세포 표면의 암관련 항원의 표현을 증가시킴으로써¹¹ 암주의 면역성을 증가시키게 된다. 따라서 IFN- γ 는 면역세포를 활성화하고 암세포의 면역회피성을 차단할 수 있어 암의 면역학적 제어에 중요한 역할을 할 것으로 생각되며 기존의 항암화학요법 또는 방사선 치료에 대하여 저항성을 가진 전이성 암이나 재발성 암에 있어서 IFN- γ 의 용용 가치는 매우 높을 것으로 생각된다.

신세포암 (renal cell carcinoma)은 방사선 치료나 항암화학요법제에 매우 저항성이 높은 암으로 알려져 있으며, 진행암의 20% 미만이 IFN- α , IFN- γ , 또는 interleukin-2 (IL-2)와 같은 면역치료에 반응하는 정도이다.^{12,13} 신세포암을 비롯한 여러 암종에서 유래된 세포주에서 IFN- γ , IFN- α , 및 TNF- α 의 단독 또는 병합 사용에 의하여 세포사가 유발되며, 특히 Fas 항원 매개성 apoptosis에 대한 감수성이 높아지는 것으로 알려져 있다.^{14,15} 그러므로 본 연구에서는 IFN- γ 의 항암기전, 특히 그 중에서도 암세포의 면역회피성 차단 기능 및 암세포사 유발효과를 알아보기 위하여 BALB/c 생쥐의 신세포암에서 유래한 Renca (renal cell adenocarcinoma) 세포주를 대상으로 IFN- γ 의 Fas 항원 유도능, 그리고 Fas/FasL 경로를 통한 Renca 세포의 apoptosis 유도에 관한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

BALB/c 생쥐의 신세포암에서 유래한 Renca 세포주는 10% FBS와 antibiotic-antimycotic을 함유한 RPMI 1640 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C의 조건하에서 유지하고 배양하였으며, Renca 세포의 계대배양에는 0.05% Trypsin-0.2% EDTA를 사용하여 세포를 탈부착 시킨 뒤 다시 상기한 배지에 세포를 희석하여 배양하였다. 세포배양에 사용한 시약은 Gibco/BRL Co. (NY, USA)에서 구입하여 사용하였다.

Table 1. Primer sequence used in RT-PCR

Primer	Sequence
G3PDH-S	GCCACCCAGAAGACTGTGGATGGC
G3PDH-AS	CATGTAGGCCATGAGGTCCACAC
Fas-S	ACATGCTGTGGATCTGGGCTGTC
Fas-AS	TCACTCCAGACATTGTCCTTCATT
FasL-S	AAGCTTCAGCTTCCACCTG
FasL-AS	ATGAATTCTGGTGCCTCATG
Bclx-S	AAATGTCTCAGAGCAACCGGGAGCTG
Bclx-AS	TCACTTCCGACTGAAGAGTGAGCCCCA
Bcl2-S	GGATGGCGCAAGCCGGGAGAACAA
Bcl2-AS	TCATTCAACCAGACATGCACCTAC
BaxA-S	TTATGGACGGGTCCGGGGAGCCAG
BaxA-AS	TCAGCCCATCTCTTCAGATGGTG

2. Fas 항원 및 apoptosis의 유도

Fas 항원의 발현을 유도하기 위하여 300U/ml의 IFN- γ (R&D Co., MN, USA)를 24시간 동안 처리하였으며, Renca 세포의 apoptosis를 유도하기 위하여 150U/ml의 IFN- γ 를 24시간 동안 처리한 후 배지를 제거하고, 0.5 μ g/ml의 Jo2 (anti-Fas Ab, Pharmingen Co., CA, USA)가 함유된 RPMI1640 배지에서 24-48시간 동안 Renca 세포를 배양하였다.

3. RT-PCR과 immunocytochemistry

IFN- γ 처리에 의하여 Renca 세포에서 유도되는 apoptosis 관련 유전자의 발현을 조사하기 위하여 RT-PCR 을 실시하였다. Renca 세포를 300U/ml의 IFN- γ 가 함유된 RPMI1640 배지에서 24시간 동안 배양한 후 Trizol reagent (GibcoBRL Co., NY, USA)와 chloroform을 가하여 RNA를 추출하고 isopropanol로 침전시켰으며, RNA pellet을 ethanol로 세척하였다. cDNA 합성에는 Promega Co. (WI, USA)의 MMLV-RT와 oligo dT primer를 사용하였으며, PCR에 사용한 primer는 Bioneer Co. (Taejun, Korea)에 의뢰하여 합성하였다 (Table 1). PCR 반응은 94°C 30초, 56°C 45초, 72°C 1분의 조건으로 30 cycles 시행하였으며, G3PDH 유전자의 경우는 18 cycles 시행하였다. PCR 혼합액은 1.5mM MgCl₂, 0.2mM dNTPs, sense 및 antisense primer 각각 0.5 μ M, 1 × PCR buffer, 및 Taq polymerase (Promega Co., WI, USA)와 중류수를 혼합하여 25 μ l volume으로 사용하였으며, PCR 산물은 1.2% agarose gel (Promega Co., WI, USA)에 점종하여 전기영동한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV transilluminator 상에서 관찰하였다.

IFN- γ 에 의하여 발현되는 Fas 항원을 검출하기 위하여 Renca 세포를 세포배양용 chamber slide (Nunc, Inc. IL, USA)상에서 배양하면서 300U/ml의 IFN- γ 를 24시간

동안 처리하였다. 4% Paraformaldehyde를 사용하여 세포를 고정하고, 0.2% tritonX-100 용액으로 세포의 투과성을 증가시켰다. 3% Bovine serum albumin이 함유된 phosphate-buffered saline (PBS) 용액에서 2시간 동안 blocking하고, PBS 용액에 1:100으로 회색한 hamster anti-mouse Fas monoclonal Ab-FITC (Pharmingen Co., CA, USA)를 사용하여 37°C에서 2시간 동안 Fas 항원을 염색하였다. 5배로 회색한 converter AP (Boehringer Mannheim Co., Germany)을 가하여 37°C에서 1시간 동안 반응시킨 후, alkaline phosphatase의 기질 액인 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate 및 p-nitro blue tetrazolium chloride 용액을 가하여 발색시킨 후 반응을 정지시켰다. 모든 세척과정과 항체 회색에는 PBS 용액을 사용하였으며, 상기한 대부분의 시약은 Sigma chemical Co. (MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

4. LDH cytotoxicity detection assay

Renca 세포에 대한 IFN- γ 및 Jo2 항체의 세포독성 반응을 측정하기 위하여, 세포막 손상에 의하여 배지로 분비되는 LDH의 양을 측정하는 LDH cytotoxicity detection assay (Boehringer Mannheim Co., Germany)를 시행하였다. Renca를 96-well plate에 분주하고 150U/ml의 IFN- γ 가 함유된 배지에서 24시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고, Jo2 항체를 0.5 μ g/ml 농도로 첨가하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 세포배양 상층액을 다른 96-well plate로 옮긴 후 assay kit내에 포함된 diaphorase/NAD+, iodotetrazolium chloride, 및 sodium lactate가 함유된 혼합액을 가하여 30분간 반응시킨 후 반응 정지액을 가하고 490nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성 백분율을 측정하기 위하여 각 실험마다 IFN- γ 가 포함되지 않은 배지에서 배양한 low control 군과, 2% tritonX-100 (Sigma chemical Co., MO, USA)이 함유된 배지에서 배양한 high control 군을 포함시켰다. 세포독성 백분율은 $[\text{Abs}_{490} (\text{실험군}) - \text{Abs}_{490} (\text{low control})] / [\text{Abs}_{490} (\text{high control}) - \text{Abs}_{490} (\text{low control})]$]의 공식에 의거하여 계산하였다.

5. DNA 분절형성 검사

IFN- γ 전처리에 의하여 Jo2에 대한 apoptosis의 감수성이 증가하는지 알아보기 위하여 IFN- γ (150U/ml, 24 hrs)와 Jo2 (0.5 μ g/ml, 24시간 및 48시간)를 처리하여 Renca 세포의 apoptosis를 유도하였다. 상기한 방법으로 24시간 또는 48시간 배양한 5×10^5 개의 Renca 세포를 1.5ml microtube로 옮긴 후 PBS로 3회 세척하였으며, 원심분리하여 PBS를 제거하고 20 μ l의 lysis buffer (20mM EDTA, 100mM Tris (pH 8.0), 0.8% sodium lauryl sarcosine)를 가하여 세포를 용해시켰다. 여기에 2 μ l의 RNase A (5mg/ml, Boehringer Mannheim Co., Germany)

을 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시키고, 다시 20 μ l의 proteinase K (10mg/ml, Boehringer Mannheim Co., Germany)를 가하여 50°C에서 일주야 반응시켜 DNA를 분리하였다. DNA 분절형성 여부는 Renca 세포에서 분리한 DNA를 2% agarose gel 상에서 35V로 전기 영동시킨 후 ethidium bromide로 염색하여 UV transiluminator 상에서 관찰하였다.

6. Flow cytometric analysis

상기한 방법으로 Renca 세포에서 apoptosis를 유도한 후 flow cytometric analysis로 apoptotic DNA 분절형성 여부를 조사하였다. 1×10^6 세포를 1.5ml microtube로 옮긴 후 PBS로 3회 세척하였으며, 25 gauge needle (Boin Medica, Korea)로 세포 부유액을 여러 차례 통과시켜 세포덩어리를 제거하였다. Ethanol을 가하여 세포를 고정시켰으며, 원심분리하여 ethanol을 제거하고 PI 용액 (50 μ g/ml propidium iodide, 0.1mg/ml RNase A (Boehringer Mannheim, Germany), 0.1% NP-40, 0.1% trisodium citrate)을 가하여 4°C에서 일주야 DNA를 염색한 후 5×10^3 개의 세포를 FACScalibur (Beckton Dickinson)에서 분석하였다.

결 과

1. IFN- γ 처리시 Fas mRNA와 단백질의 발현

Renca 세포에서 IFN- γ 처리에 의하여 Fas mRNA의

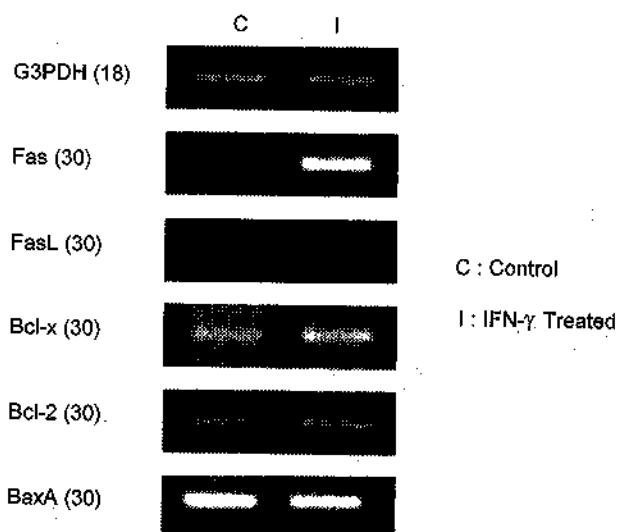


Fig. 1. Apoptosis-related gene expression in IFN- γ -treated Renca. Apoptosis-related gene expression was analyzed by RT-PCR after 24 hours of IFN- γ treatment (300U/ml) on Renca (I), or in control cells (C). Amplification products for Fas, FasL, Bcl-x, Bcl-2, and Bax-A are indicated.

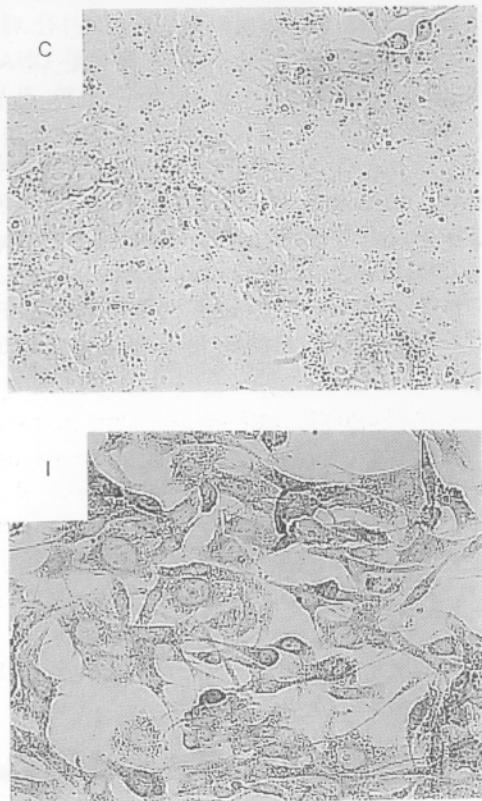


Fig. 2. Fas expression on IFN- γ treated Renca demonstrated by immunocytochemical staining. Renca cells (C, control; I, treated with IFN- γ (300U/ml) for 24 hours) were stained with a hamster anti-mouse Fas monoclonal Ab.

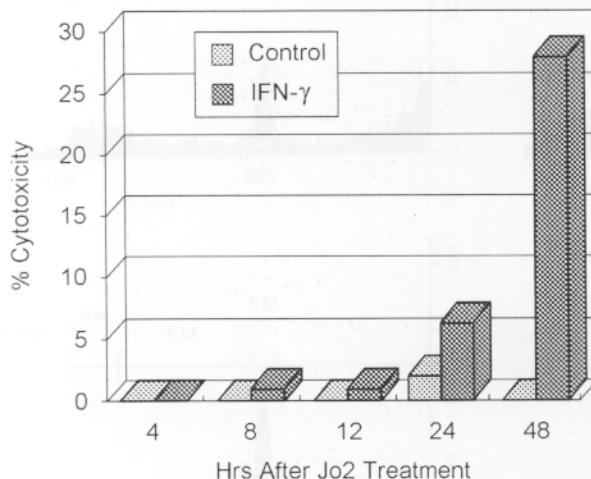


Fig. 3. Renca cell death triggered by Jo2 after IFN- γ pre-treatment. LDH release was measured from Renca cell supernatant. Prior to administration of Jo2 (0.5 μ g/ml, 24 hours) Renca cells were pretreated for 24 hours with 150U/ml of IFN- γ .

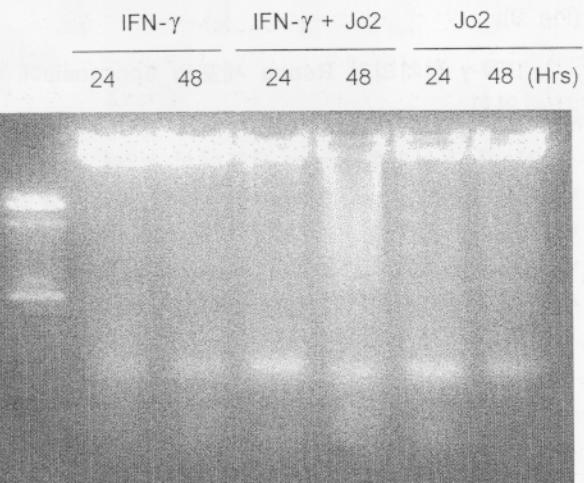


Fig. 4. Fas-mediated apoptosis induced by Jo2 after IFN- γ pretreatment on Renca. Renca was pretreated with 150U/ml of IFN- γ for 24 hours and was cultured for another 24 hours after Jo2 was added at a concentration of 0.5 μ g/ml. DNA fragmentation was detected by electrophoresing the DNA through 2% agarose gel.

발현이 유도되는지를 알아보기 위하여 300U/ml의 IFN- γ 를 24시간 처리한 Renca 세포에서 RNA를 분리하여 RT-PCR을 시행하였다. Fas, FasL, Bcl-x, Bcl-2, 및 BaxA와 같은 apoptosis 관련 유전자의 primer를 사용하여 RT-PCR을 실시한 결과, IFN- γ 처리에 의하여 Fas mRNA의 발현이 강하게 유도됨을 알 수 있었다 (Fig. 1). IFN- γ 에 의해 Renca 세포에서 Fas 단백질의 발현이 유도될 수 있는지를 조사하기 위하여 immunocytochemical staining을 시행한 결과, IFN- γ 를 처리하지 않은 Renca 세포는 염색되지 않고 IFN- γ 를 처리한 경우는 anti-Fas 항체 (Pharmingen Co., CA, USA)에 의하여 진하게 염색됨을 알 수 있었다 (Fig. 2). anti-FasL 항체 (Pharmingen Co., CA, USA)를 사용한 경우는 대조군과 IFN- γ 처리군 모두 염색되지 않았다 (data not shown).

2. IFN- γ 및 Jo2 처리에 의한 Renca 세포사 유도

IFN- γ 에 의하여 Renca 세포 표면에 유도된 Fas 항원이 Fas/FasL 매개성 apoptosis를 일으킬 수 있는지를 알아보기 위하여 150U/ml의 IFN- γ 를 24시간 동안 전처리한 Renca 세포에 0.5 μ g/ml의 Jo2 항체를 처리하여 24시간 및 48시간 배양하면서 배양상층액으로 분비되는 LDH의 양을 측정하였다. Renca 세포에 IFN- γ 를 처리하지 않은 경우는 48시간이 경과한 후에도 분비되는 LDH의 양에 큰 변화가 없었으나, IFN- γ 를 처리한 경우는 Jo2를 처리한 24시간째부터 LDH의 분비가 증가되어 48시간째에 급격히 증가함을 알 수 있었다.

(Fig. 3).

3. IFN- γ 전처리가 Renca 세포의 apoptosis에 미치는 영향

IFN- γ 를 전처리한 Renca 세포에서 Jo2에 의해 나타난 세포사 증가가 apoptosis와 관련이 있는지를 조사하기 위하여 상기한 바와 같은 조건으로 Renca 세포를 배양한 후 DNA를 분리하여 DNA 분절형성 여부를 조사하였다. IFN- γ 만 처리한 경우에는 48시간이 경과한 후에도 DNA 분절형성을 관찰할 수 없었으나, IFN- γ 를

전처리한 Renca에 Jo2를 처리한 결과 24시간 때 DNA 분절형성이 보였으며 48시간 때에 뚜렷한 DNA 분절형성을 관찰할 수 있었다. Jo2만을 처리한 경우에는 48시간째 희미한 DNA 분절을 볼 수 있었다 (Fig. 4). 위와 같은 조건으로 배양한 Renca 세포에 대하여 flow cytometric analysis를 시행한 결과, IFN- γ 를 전처리한 후 Jo2를 처리한 경우에는 배양 후 48시간째에 apoptosis가 유발되었음을 의미하는 subdiploid DNA가 24.76%로서 Jo2를 처리하지 않은 군에 비하여 2.39배, IFN- γ 를 처리하지 않고 Jo2만 처리한 군에 비해서는 1.55배 증

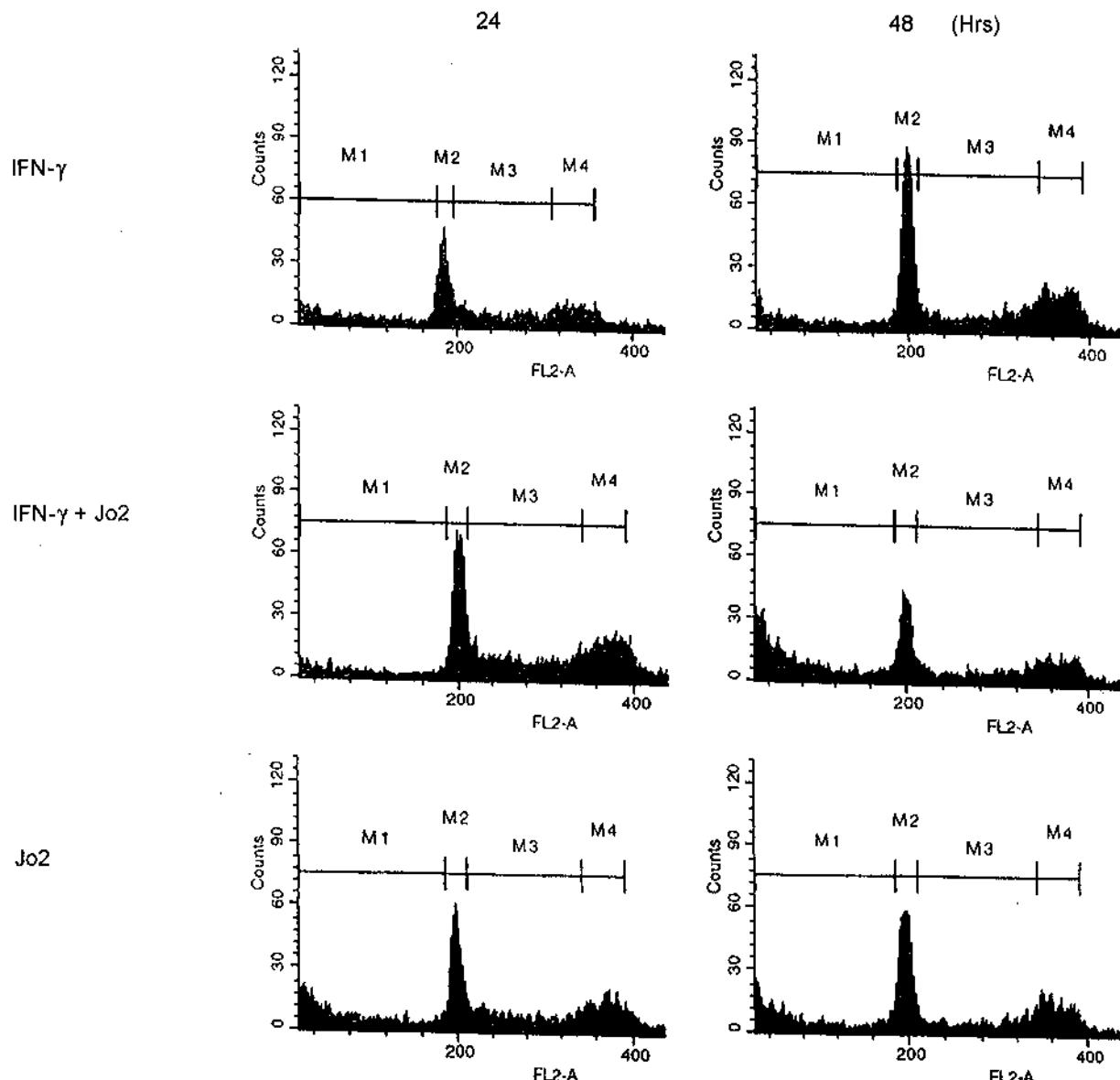


Fig. 5. Apoptosis in IFN- γ and/or Jo2-treated Renca measured by flow cytometry following PI staining. Cells containing subdiploid DNA, representative of apoptosis are denoted by the M1 bar on the histogram. The percentages of cells of the M1 regions are listed in Table 2. X- and Y- axis represent DNA content (PI fluorescence) and cell number, respectively.

Table 2. Subdiploid DNA content in IFN- γ and/or Jo2-treated Renca

IFN- γ (150U/ml, 24 hrs)	Jo2 (0.5 μ g/ml)	Treatment time of Jo2 (hrs)	
		24	48
+	-	8.76%	10.36%
+	+	6.30%	24.76%
-	+	16.36%	16.00%

가하였음을 알 수 있었다 (Fig. 5, Table 2).

고 찰

Fas/FasL 매개성 apoptosis 경로는 발생과정에서 임파계 세포의 수를 조절하는 중요한 역할을 담당하고 있을 뿐만 아니라,^{20,21} 여러 종류의 정상세포를 비롯하여 암세포에서도 apoptosis 발생에 관여하는 것으로 알려지고 있다.^{22,23} 특히 암세포의 제거에 중요한 역할을 담당하는 CTL 및 NK 세포들은 세포 표면에 FasL을 가지고 있으므로 Fas를 표현하는 표적세포에 결합하여 표적세포의 apoptosis를 유발하는 신호를 보냄으로써 암세포를 제거하는 능력을 가지고 있다. 한편 CTL이나 NK 세포들은 세포성 면역반응을 매개하는 cytokine, 즉 IFN- γ 또는 IL-2를 분비하여 면역반응을 증강시키는데, 다양한 종류의 정상세포나^{24,25} 암세포를^{16,19,26} 대상으로 한 최근의 연구들에 의하면 IFN- γ 를 비롯하여 IL-2, TNF- α , IFN- α 등의 cytokine에 의하여 암세포 표면에서 Fas 항원의 발현이 증가하고 이렇게 발현된 Fas 항원은 실제로 Fas/FasL 경로를 통한 apoptosis를 매개하는 역할을 수행하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 항암 면역반응에서 면역세포, 특히 CTL이 분비하는 IFN- γ 는 암세포에서 Fas 항원의 발현을 유도함으로써 CTL 자신이 암세포를 보다 효과적으로 제거하도록 도와주는 역할을 수행하는 것으로 생각된다.

본 연구에서는 BALB/c 생쥐의 신세포암에서 유래한 Renca 세포주에 대한 IFN- γ 의 작용을 조사하였다. IFN- γ 처리에 의하여 Renca 세포에서 apoptosis에 관련된 Fas, FasL, bcl-x, bcl-2, 및 Bax-A 등의 유전자가 발현될 수 있는지 알아보기 위하여 RT-PCR을 실시한 결과 IFN- γ 는 Fas mRNA를 강하게 유도하였으나 FasL이나 bcl-x, bcl-2, 및 Bax-A와 같은 apoptosis 관련 유전자의 발현은 변화가 없었다 (Fig. 1). RT-PCR에 의하여 확인된 Fas mRNA의 발현이 Fas 단백질의 합성으로 이어질 수 있는지를 확인한 결과 Renca 세포에서 Fas 단백질이 강하게 염색되어 Fas 항원이 발현됨을 확인할 수 있었다 (Fig. 2). IFN- γ 에 의하여 유도된 Fas 항원은 anti-Fas 항체인 Jo2에 반응하여 Renca 세포사를 유발

하였으며 (Fig. 3), 이는 DNA 분절형성과 Flow cytometric analysis를 통하여 확인할 수 있었다 (Fig. 4, Fig. 5). 한편, IFN- γ 처리에 의하여 Renca 세포의 apoptosis에 대한 감수성은 크게 증가하여 Jo2 항체를 처리하였을 때 배양 후 24시간 때 apoptosis가 나타남을 알 수 있었는데, 이러한 결과는 신세포암 세포주를 비롯한 여러 암세포주를 대상으로 한 연구에서도 확인되고 있다. Nonomura 등은 인체의 신세포암 세포주인 OUR-10 세포를 대상으로 한 연구에서 IFN- γ 에 의하여 Fas 항원의 발현이 증가한 결과 Jo2 항체 처리에 의한 세포의 viability가 62%에서 35%로 감소하였음을 보고한 바 있다.¹⁶ 또한 Sayers 등은 NK 세포와 CTL의 in vivo Renca 종양에 대한 작용기전에 관한 연구에서 NK 세포가 주로 perforin 경로를 통하여 Renca 세포를 용해시키는 반면, CTL은 주로 Fas/FasL 경로를 자극하여 Renca 세포의 apoptosis를 유도한다는 사실을 증명하였으며, 이 실험에서도 FasL-expressing hybridoma, anti-Fas 항체 및 soluble FasL 등에 의하여 apoptosis가 일어나기 위해서는 IFN- γ 및 TNF- α 에 의한 Fas 항원 발현유도가 반드시 필요함을 관찰하였다.²⁰ 이러한 결과들은 본 연구의 결과와 일치하는 것으로, Fas/FasL 매개 apoptosis에 있어서 다양한 cytokine들이 작용함으로써 암세포의 apoptosis에 대한 감수성을 증가시킬 수 있다. 또한, 정상 결장세포와 결장 암세포주의 Fas 항원 발현 및 apoptosis에 대한 감수성을 조사하여 비교한 연구에서는, 정상 결장세포가 Fas 매개 apoptosis에 대하여 매우 민감한 반면, 결장 암세포주는 표면 Fas 항원 발현이 미약하여 Fas 매개 apoptosis에 저항성이 높은 것으로 보고하고 있으며, IFN- γ 에 의하여 anti-Fas 항체에 의한 apoptosis의 감수성이 증가한다고 하였다.¹⁷ Fellenberg 등은 osteoblast과 osteosarcoma 세포주의 Fas 항원 발현 및 apoptosis에 대한 감수성을 비교하였는데, osteosarcoma 세포는 soluble 형태의 Fas를 생산하므로써 Fas/FasL 매개 apoptosis 경로를 차단하며, IFN- γ 및 TNF- α 에 의해서는 membrane-bound Fas의 발현이 증가하여 apoptosis에 대한 감수성이 증가하는 것으로 보고하고 있다.¹⁸

본 연구에서도 신세포암 세포주만을 대상으로 실험하였기 때문에 정상 신장세포의 Fas 발현 정도를 알 수 없었으며, 현재까지 신장의 정상세포와 암세포에서 Fas 항원의 발현과 apoptosis 유도능을 비교한 다른 연구 결과도 보고된 바가 없는 실정이다. 생쥐 또는 인체의 신세포암 세포주나 암조직에서는 von Reyer 등이나¹⁷ Fellenberg 등의¹⁸ 보고와 같이, 정상 신장조직에 비하여 훨씬 적은 양의 Fas 단백질이 발현되므로써 FasL을 가진 면역세포에 대한 공격을 효과적으로 회피하고 있을 가능성이 있으며, 또는 alternative splicing에 의한 새로운 형태의 soluble Fas 항원을 생산하거나,

또 다른 기전에 의하여 Fas/FasL apoptosis 경로를 차단 또는 회피할 가능성이 있다고 생각된다. 따라서, 향후 이러한 연구는 신세포암 뿐만 아니라 여러 종류의 암에서 암세포가 면역반응을 회피하는 기전을 이해하는데 있어서 큰 도움이 될 것으로 생각된다.

본 연구에서는 또한 IFN- γ 를 처리하지 않은 상태에서 Jo2만으로도 배양 48시간간부터 Renca 세포의 apoptosis가 유발됨을 관찰하였으나, 이때 세포가 용해되어 배양상층액으로 분비되는 LDH의 양에는 큰 변화가 없었다 (Fig. 3). DNA 분절형성은 apoptosis에 의한 세포사의 초기에 일어나는 현상이며, apoptosis 후기에 세포의 막 투과성이 증가하여 세포 밖으로 분비되는 LDH의 양이 증가하기 때문에 본 실험 조건에서는 LDH cytotoxicity가 나타나지 않은 것으로 생각된다. 이와 같이 IFN- γ 등의 cytokine에 의한 자극이 없이도 anti-Fas 항체에 의하여 신세포암 세포주에서 apoptosis가 유발된 연구는 Horie 등에 의해 발표된 바 있으며, 그는 18개의 인체 신세포암 조직 중 6개에서 Fas 항원이 발현됨을 보고하였으며, 5개의 인체 신세포암 세포주에서 anti-Fas 항체에 의하여 Fas/FasL 매개성 apoptosis가 유발됨을 보고하였다.²³

이러한 일련의 연구 결과로 미루어 볼 때 신세포암 세포는 원발장기별로 차이는 존재하지만, 그 자체만으로도 Fas/FasL 경로를 통한 apoptosis에 대하여 감수성이 높은 것으로 사료되며, 특히 IFN- γ 또는 IFN- γ 와 TNF- α 와 같은 cytokine의 단독 또는 병합 사용함으로서 Fas 항원의 표현을 증가시켜 apoptosis에 대한 감수성이 매우 증가하게 되는 것으로 알려져 있으므로 신세포암을 비롯한 여러 암종에서 이들 cytokine을 이용한 면역치료법의 적용 가능성은 매우 높다고 하겠다. 따라서, 현재까지 항암화학요법에 대하여 저항성이 매우 높은 것으로 알려진 진행성 신세포암에서의 상기한 여러 cytokine을 이용한 면역치료법은 면역세포에 의한 암세포의 인식과 공격, 그리고 제거를 보다 효과적으로 증가시키는 방향으로 향후 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

Interferon-gamma (IFN- γ)에 의한 Fas 단백질 및 Fas/Fas ligand (Fas/FasL)매개성 apoptosis의 유도성을 알아보기 위하여 Renca 세포에 IFN- γ 를 처리한 뒤 Fas 발현성을 측정한 결과 암세포에서 Fas 유전자의 전사 및 단백질 발현이 모두 증가되었다. Anti-Fas 항체를 처리하여 LDH cytotoxicity detection assay와 DNA 분절형성 검사를 시행한 결과, IFN- γ 로 처리한 Renca 세포가 대조군에 비해 anti-Fas 항체에 대한 감수성이

증가하여 세포가 쉽게 apoptosis에 도달함을 알 수 있었다.

이상의 결과로 볼 때, IFN- γ 는 암세포에서 Fas 항원의 발현을 유도함으로써 여러 면역세포에 의한 암세포의 제거를 보다 용이하게 하는 역할을 할 수 있을 것으로 생각되며, 특히 인체의 항암 면역기능에 필수적인 역할을 담당하는 세포독성 T 세포는 Fas/FasL 경로를 통하여 암세포나 바이러스에 감염된 세포의 apoptosis를 일으키므로, IFN- γ 에 의해 Renca 세포에서 Fas/FasL-매개 apoptosis가 증가하는 현상은 IFN- γ 의 중요한 항암기전의 하나로 작용할 것으로 사료된다. 향후 본 연구 결과는 IFN- γ 를 이용한 항종양 면역요법 연구 및 cytokine을 이용한 암세포의 apoptosis를 연구하는 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

- Itoh N, Yonehara S, Ishii A, Yonehara M, Mizushima S, Samashima M, et al. The polypeptide encoded by the cDNA for human cell surface antigen Fas can mediate apoptosis. *Cell* 1991; 66: 233-43.
- Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Itoh N, Yonehara S, Copeland NG, Jenkins NA, et al. The cDNA structure, expression, and chromosomal assignment of the mouse Fas antigen. *J Immunol* 1992; 148: 1274-9.
- Kagi D, Ledermann B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 1994; 369: 31-7.
- Liu CC, Walsh CM, Young JD. Perforin: structure and function. *Immunol Today* 1995; 16: 194-201.
- Podack ER. Execution and suicide: cytotoxic lymphocytes enforce Draconian laws through separate molecular pathways. *Curr Opin Immunol* 1995; 7: 11-6.
- Henkart PA. Lymphocyte-mediated cytotoxicity: two pathways and multiple effector molecules. *Immunity* 1994; 1: 343-6.
- Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995; 267: 1449-56.
- Berke G. The Fas-based mechanism of lymphocytotoxicity. *Hum Immunol* 1997; 54: 1-7.
- Weber JS, Rosenberg SA. Modulation of murine tumor major histocompatibility antigen by cytokines in vivo and in vitro. *Cancer Res* 1988; 48: 5818-24.
- Hillman GG, Puri RK, Kukuruga MA, Pontes JE, Haas GP. Growth and major histocompatibility antigen expression regulation by IL-4, interferon-gamma (IFN-

- gamma) and tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) on human renal cell carcinoma. *Clin Exp Immunol* 1994; 96: 476-83.
11. Greiner JW, Guadagni F, Noguchi P, Pestka S, Colcher D, Fisher PB, et al. Recombinant interferon enhances monoclonal antibody-targeting of carcinoma lesions *in vivo*. *Science* 1987; 235: 895-8.
 12. Rosenberg SA, Lotze MT, Muul LM, Chang AE, Avis FP, Leitman S, et al. A progress report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high-dose interleukin-2 alone. *N Engl J Med* 1987; 316: 889-97.
 13. Itoh K, Platsoucas CD, Balch CM. Autologous tumor-specific cytotoxic T lymphocytes in the infiltrate of human metastatic melanomas. Activation by interleukin 2 and autologous tumor cells, and involvement of the T cell receptor. *J Exp Med* 1988; 168: 1419-41.
 14. Swanson DA, Quesada JR. Interferon therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Semin Surg Oncol* 1988; 4: 174-7.
 15. Gitlitz BJ, Belldegrun A, Figlin RA. Immunotherapy and gene therapy. *Semin Urol Oncol* 1996; 14: 237-43.
 16. Nonomura N, Miki T, Yokoyama M, Imazu T, Takada T, Takeuchi S, et al. Fas/APO-1-mediated apoptosis of human renal cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229: 945-51.
 17. von Reyher U, Strater J, Kittstein W, Gschwendt M, Krammer PH, Moller P. Colon carcinoma cells use different mechanisms to escape CD95-mediated apoptosis. *Cancer Res* 1998; 58: 526-34.
 18. Fellenberg J, Mau H, Scheuerpfug C, Ewerbeck V, Debatin KM. Modulation of resistance to anti-APO-1-induced apoptosis in osteosarcoma cells by cytokines. *Int J Cancer* 1997; 72: 536-42.
 19. Tamura T, Ueda S, Yoshida M, Matsuzaki M, Mohri H, Okubo T. Interferon-gamma induces *Ice* gene expression and enhances cellular susceptibility to apoptosis in the U937 leukemia cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 229: 21-6.
 20. Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356: 397-400.
 21. Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* 1995; 267: 1456-62.
 22. Ni R, Tomita Y, Matsuda K, Ichihara A, Ishimura K, Ogasawara J, et al. Fas-mediated apoptosis in primary cultured mouse hepatocytes. *Exp Cell Res* 1994; 215: 332-7.
 23. Horie S, Kano M, Higashihara E, Moriyama N, Tanaka E, Hirose A, et al. Expression of Fas in renal cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 1997; 27: 384-8.
 24. Sung KJ, Paik EM, Jang KA, Suh HS, Choi JH. Apoptosis is induced by anti-Fas antibody alone in cultured human keratinocytes. *J Dermatol* 1997; 24: 427-34.
 25. Matsue H, Kobayashi H, Hosokawa T, Akitaya T, Ohkawara A. Keratinocytes constitutively express the Fas antigen that mediates apoptosis in IFN gamma-treated cultured keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 1995; 287: 315-20.
 26. Wen LP, Madani K, Fahmi JA, Duncan SR, Rosen GD. Dexamehtasone inhibits lung epithelial cell apoptosis induced by IFN-gamma and Fas. *Am J Physiol* 1997; 273: L921-9.
 27. Dai CH, Price JO, Brunner T, Krantz SB. Fas ligand is present in human erythroid colony-forming cells and interacts with Fas induced by interferon gamma to produce erythroid cell apoptosis. *Blood* 1998; 91: 1235-42.
 28. Sayers TJ, Brooks AD, Lee JK, Fenton RG, Komschlies KL, Wigington JM, et al. Molecular mechanisms of immune-mediated lysis of murine renal cancer: differential contributions of perforin-dependent versus Fas-mediated pathways in lysis by NK and T cells. *J Immunol* 1998; 161: 3957-65.