

## 신경모세포종에서 IFN $\gamma$ 에 의한 TNF $\alpha$ 와 길항적 FAS/CD95항체 유도성 세포고사의 감작화

원광대학교 의과대학 소아과학교실

방호일 · 김종덕 · 최두영

### Sensitization of TNF $\alpha$ and Agonistic FAS/CD95 Antibody-Induced Apoptosis by INF $\gamma$ on Neuroblastoma Cells

Ho Il Bang, M.D., Jong Duck Kim, M.D. and Du Young Choi, M.D.

*Department of Pediatrics, School of Medicine, Wonkwang University, Iksan, Korea*

**Purpose :** IFN  $\gamma$  sensitizes many tumor cells to TNF  $\alpha$  and FASL-mediated apoptosis by enhancing the expression of TNF or FAS/CD95 receptor and modulating the activation of caspase and Bcl-2 family. It has been reported that IFN  $\gamma$  and TNF  $\alpha$  synergistically caused differentiation and growth inhibition of neuroblastoma cells. Even though some neuroblastoma cell express FASR/FASL on the cell surface, they could not induce apoptosis by ligation of the FAS/CD95 receptor. But the treatment of IFN  $\gamma$  is reported to induce apoptosis in some neuroblastoma cell lines through the CD95/CD95L autocrine circuit. In this study, we examined whether IFN  $\gamma$  could affect TNF  $\alpha$  and agonistic FAS/CD95 antibody(CH-11)-induced apoptosis against neuroblastoma cell lines that had shown diverse drug sensitivity and resistance.

**Methods :** CHLA-15, CHLA-90 and LA-N-2 neuroblastoma cells were cultured in IMDM and treated with recombinant IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$  and CH-11 antibody. Cell viability was measured by DIMSCAN with a fluorescent calcein-AM. Apoptosis was analyzed through flow cytometry using Annexin V-PE and 7-ADD staining and confirmed by pancaspase and caspase-8 blocking experiments. The expression of TNF RI and FAS/CD95 receptor was evaluated by flow cytometry using the corresponding antibody and PE-conjugated secondary antibody.

**Results :** IFN  $\gamma$  or TNF  $\alpha$  alone had no demonstrable cytotoxic effects, whereas both cytokines in combination induced apoptosis synergistically in CHLA-15 and CHLA-90 cells. Although there was no cytotoxicity with the ligation of CH-11 alone in CHLA-90 cells, pretreatment of IFN  $\gamma$  increased the sensitivity of CH-11-mediated apoptosis. The expression of TNFRI and FAS/CD95R were non-specifically enhanced after treatment of IFN  $\gamma$  without relation to sensitivity to TNF  $\alpha$  and CH-11. This finding suggest up-regulation of both receptors may contribute to sensitization of TNF  $\alpha$  and CH-11-mediated apoptosis by IFN  $\gamma$  in only sensitive cell lines.

**Conclusion :** IFN  $\gamma$  induced sensitization of TNF  $\alpha$  and agonistic FAS/CD95 antibody-mediated apoptosis on some neuroblastoma cells through up-regulation of TNFRI and FAS/CD95 receptor. (*J Korean Pediatr Soc* 2003;46:702-709)

**Key Words :** Neuroblastoma, IFN  $\gamma$ , TNF  $\alpha$ , Agonistic FAS/CD95 antibody(CH-11)

### 서 론

교감 신경계에서 발생하는 신경모세포종은 뇌종양과 악성 림

본 연구는 2001학년도 원광대학교 교내연구비 지원으로 이루어졌음.

접수 : 2003년 2월 20일, 승인 : 2003년 5월 10일

책임저자 : 최두영, 원광대학교 의과대학 소아과학교실

Tel : 063-850-1104 Fax : 063)853-3670

E-mail : CDY8118@wonkwang.ac.kr

프종 다음으로 소아에서 가장 흔한 악성 고형 암이다. 이들은 임상증상 및 생물학적 양상이 다양하고 많은 환자에 있어 진단 당시 진행 된 경우가 많아 화학요법, 수술, 방사선 치료만으로는 재발과 항암제에 대한 내성 발현으로 장기적인 예후가 불량하다. 최근 고위험군 신경모세포종에서도 고용량 화학요법 후 자가 조혈모세포 이식과 13-cis-retinoic acid투여로 38% 정도의 생존율 증가를 가져왔지만 현재에도 가장 난치성 소아암 중 하나이다<sup>1)</sup>. 이를 극복하기 위해 암세포에 대한 분자생물학적 특성을

대상 및 방법

1. 신경모세포종 세포주 배양

본 연구에 사용된 CHLA-15, CHLA-90, LA-N-2 신경모세포종 세포주는 로스앤젤레스 소아 아동병원(Los Angeles Children's Hospital)에서 공급되었으며 CHLA-15, LA-N-2는 진단시, CHLA-90은 고용량 화학요법과 자가 조혈모세포 이식 후 재발 시 서로 다른 환자로부터 분리배양 되었다(Table 1). 모든 세포주는 20% 우태아혈청(heat inactivated fetal bovine serum)이 함유된 Iscove's modified Dulbecco's medium(IMDM; Gibco BRL, MD, U.S.A) 배지를 이용하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub>의 완전 습윤된 조건하의 CO<sub>2</sub> 배양기 내에서 실험조건에 따라 INF  $\gamma$ 와 TNF  $\alpha$  (R&D System, Inc. MN, U.S.A) 및 길항적 FAS/CD95항체(CH-11; MBL, Nagoya, Japan)를 처리하여 검사하였다.

2. 암세포주의 생존율 측정

암세포 생존율은 Digital Image Microscopy Scanning (DIMSCAN)을 이용하여 생존세포 내 축적된 형광기질인 calcein-acetoxymethyl ester(calcein-AM; Molecular Probe Inc, OR, U.S.A)을 이용하여 측정하였다<sup>4, 27</sup>. 간단히 요약하면 96 well 세포 배양 판의 각 well당 100  $\mu$ L 배지에 1,000-3,000세포를 24시간 동안 배양하여 접촉을 허락한 후 실험 조건에 따라 well당 처리시약이 함유된 50  $\mu$ L 배지를 추가하여 6일 동안 배양하였다. 이들 세포에 calcein-AM 5  $\mu$ g/mL을 처리하여 37℃ 배양기에서 30분 동안 배양한 후 DIMSCAN으로 분석하였다. 암세포 생존율은 대조군과 실험군의 백분율을 구하여 산출하였다.

3. 암세포주의 세포고사 측정

암세포의 세포고사 정도는 Annexin V-Phycoerythrin(PE)와 7-Amino-actinomycin D(7-ADD)(Pharmigen, CA, U.S.A)로 이중 염색하여 유식세포분석기(Coulter<sup>®</sup> EPICS<sup>®</sup> Elite flow cytometer)(Beckman-Coulter Inc, FL, U.S.A) 이용하여 측정하였다<sup>28</sup>. 간단히 요약하면 시약이 처리된 암세포를 차가운 인산

규명하고 유전자 치료<sup>2, 3</sup>)나 중성구(neutrophil), 가지돌기(dendritic)세포, 활성화 된 T 림프구(CTL, cytotoxic T lymphocyte), 자연살해 세포(NK, natural killer) 및 자연살해 T세포(NKT, natural killer T cell) 등을 이용한 면역세포 치료<sup>4-8</sup>)가 활발히 시도되고 있다. INF  $\gamma$ 와 TNF  $\alpha$ 는 활성화 된 T 림프구, 자연살해세포, 자연살해 T세포 등에서 분비되어 면역기능 및 염증반응 조절 등 광범위한 생물학적 활성을 나타내는 중요한 체내 물질이다<sup>9, 10</sup>. 또한 두 사이토카인은 신경모세포종을 포함한 다양한 암세포에서 세포분화, 성장억제와 세포고사(apoptosis)를 유도하여 항암효과를 나타냄이 증명되었다<sup>11-16</sup>. 그러나 실제 인체에 투여 시 많은 부작용으로 인해 이들의 사용이 제한되어졌다. 최근 새로운 암 치료의 영역으로 각광을 받고 있는 가지돌기세포, 활성화 된 T 림프구, 자연살해세포, 자연살해 T세포 등을 이용한 면역치료를 있어서도 이들 사이토카인의 분비가 적, 간접적으로 암세포제거에 관여함이 보고되었다<sup>4-10, 17</sup>. FAS/FASL은 항암제 투여 및 면역세포 활성화시 발현이 증가되어 세포사망 유도의 주된 기전이 되며 INF  $\gamma$ 가 이를 더욱 촉진함이 밝혀졌다<sup>18-20</sup>. 따라서 신경모세포종에서 INF  $\gamma$ 와 TNF  $\alpha$ 나 FAS/FASL의 상호작용에 대한 연구는 이들의 전신적 투여 및 면역세포와 유전자 치료 등의 암세포 제거 전략 수립을 위해 필수 적 일 것으로 사료된다.

신경모세포종에서 INF  $\gamma$ 는 세포 표면의 TNF  $\alpha$ 수용체 발현을 증가시켜 TNF  $\alpha$ 와 협동적으로 암세포의 분화를 촉진하고 성장을 억제하여 항암효과를 나타냄이 밝혀져 있지만<sup>11, 21</sup> 세포고사에 대한 보고는 없다. 또한 신경모세포종에서 FAS/FASL 경로가 항암제 치료 및 INF  $\gamma$  단독에 의한 세포고사 유도에 중요하게 관여한다는 보고가 있지만<sup>22-24</sup> 일부 연구에서는 암세포가 FAS수용체를 자연적으로 발현하더라도 FASL에 의한 세포고사가 발생하지 않음이 밝혀졌다<sup>25, 26</sup>. 따라서 본 연구는 서로 다른 치료과정에서 얻어진 다양한 항암제 내성을 가진 신경모세포종 세포주를 이용하여 INF  $\gamma$ 의 TNF  $\alpha$ 와 길항적 FAS/CD95항체(CH-11) 유도성 세포고사에 미치는 영향과 그들의 수용체 발현변화를 조사하여 신경모세포종의 항암제에 대한 내성 극복과 면역세포 치료의 기초적인 자료로 활용하고자 시행하였다.

Table 1. Characteristics of Neuroblastoma Cell Lines and their Sensitivity to Chemotherapeutic Drugs

Cell line	Tumor status*	Tumor site <sup>†</sup>	N-myc status <sup>‡</sup>	Drug S or R <sup>§</sup> P/C/M/D/E <sup>  </sup>
CHLA-15	Dx	Primary	N	R/S/S/S/S
CHLA-90	PDBMT	BM	N	R/R/R/R/R
LA-N-2	Dx	Primary	A	Not tested

\* Time cell line established: Dx, at diagnosis; PDBMT, at disease progression after high dose chemoradiotherapy supported by autologous bone marrow transplantation

<sup>†</sup>Tumor site: BM, bone marrow metastasis

<sup>‡</sup>N-myc gene: N, non-amplified, A, amplified

<sup>§</sup>R: drug resistant, S: drug sensitive

<sup>||</sup>Cisplatin(P), carboplatin(C), melphalan(M), doxorubicin(D), etoposide(E)

완충액(phosphate buffered saline, PBS)으로 세척 후 Annexin V Binding Buffer(10 mmol/L acid, pH 7.4, 140 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L  $CaCl_2$ )(Pharmigen, CA, U.S.A)에  $1 \times 10^6$ /mL 세포를 부유하였다. 이들 세포 중  $1 \times 10^5$  세포를 5 mL 배양관에 옮긴 후 5  $\mu$ L Annexin V-PE와 7-ADD를 처리하여 상온에서 15분 동안 방치한 후 유식세포분석기를 이용하여 측정하였다. 생존세포는 Annexin V 음성/7ADD 음성세포로, 초기세포고사세포는 Annexin V 양성/7-ADD 음성세포로, 후기세포고사 세포는 Annexin V 양성/7-ADD 양성세포로 정의하였다. 특이세포고사(Specific apoptosis)의 백분율은  $100 \times$  [실험군 세포고사(%) - 대조군의 세포고사(%) / 100%]로 산출하였다. 특이 세포고사의 평균과 표준편차는 같은 조건의 3개의 복제 실험을 통하여 얻어졌다. 세포고사 억제실험은 pancaspase 억제제인 Boc-D-FMK와 caspase-8 억제제인 Z-IETD-FMK (Calbiochem, Darmstadt, Germany) 이용하여 시행하였다.

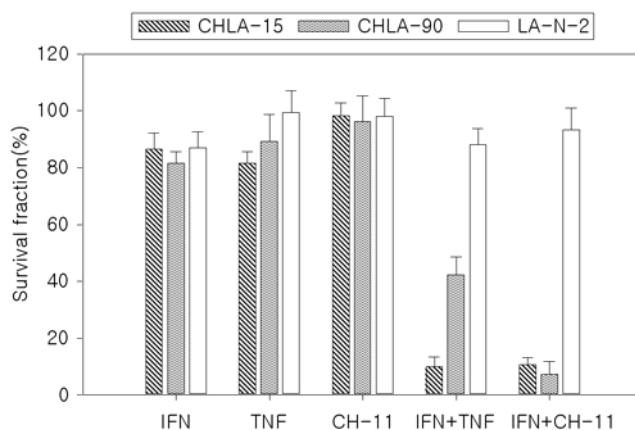
#### 4. $TNF \alpha$ 와 FAS/CD95 수용체 측정

암세포주를 30  $\mu$ g/mL  $IFN \gamma$ 을 처리하여 24시간 배양 한 후 배양관에 100  $\mu$ L 배지의  $1 \times 10^6$ 세포를 옮겼다. TNFRI는 10  $\mu$ g/mL anti-human TNFRI항체(R&D Systems, MN, U.S.A), FASRI는 10  $\mu$ g/mL anti-Fas항체(ZB4)(MBL, Nagoya, Japan)을 30분 동안 4°C에서 배양하였다. 음성 대조군으로는 같은 IgG 동종형인 mouse IgG1(Immunotech, Marseille Cedex, France)을 이용하였다. 1차 항체 처리 후 PBS로 2번 세척 한 후 이차항체인 R-phycoerythrin-conjugated affiniPure F(ab')<sub>2</sub> Fragment anti-mouse IgG(H+L)(Immunotech, Marseille Cedex, France)을 1:50의 희석농도로 2시간 동안 반응시켜 유식세포분석기를 이용하여 측정하였다.

### 결 과

#### 1. 신경모세포종 세포주에서 $IFN \gamma$ 의 $TNF \alpha$ 와 CH-11 유도성 세포 생존을 변화에 미치는 영향

먼저 신경모세포종에서  $IFN \gamma$ 가  $TNF \alpha$ 와 CH-11에 의한 세포독성을 촉진 할 수 있는지 여부를 알아보기 위해 30 ng/mL  $IFN \gamma$ 와 45 ng/mL  $TNF \alpha$  또는 500 ng/mL CH-11을 동시 처리하여 6일 동안 배양 한 후 형광기질인 calcein-AM을 이용한 DIMSCAN을 시행하였다. 그 결과  $IFN \gamma$ ,  $TNF \alpha$ , CH-11 단독 투여 시는 모든 세포주에서 20% 이하의 세포생존을 감소를 보였다. 그러나  $IFN \gamma$ 와  $TNF \alpha$ 의 동시 투여 시에는 CHLA-15세포는 90% 이상, CHLA-90세포는 약 50% 정도의 의미 있는 생존을 감소를 보였다. 또한 CHLA-90세포에서는  $IFN \gamma$ 와 CH-11 동시 투여로 90% 이상의 생존을 감소를 보였다. 반면 LA-N-2세포에서는  $IFN \gamma$ 가  $TNF \alpha$ , CH-11에 의한 세포독성을 유도하지 못했다(Fig. 1).



**Fig. 1.**  $IFN \gamma$  sensitized some neuroblastoma cells to  $TNF \alpha$  and agonistic CH-11(FAS/CD95) antibody. Cells were exposed to 30 ng/mL of  $IFN \gamma$ , 45 ng/mL of  $TNF \alpha$ , 500 ng/mL of CH-11 and mixed conditions for 6 days. Cell viability was analyzed with the use of a fluorescence-based assay employing digital imaging microscopy(DIMSCAN). Each point represents the mean  $\pm$  S.D. of 6 replicate wells. Results are presented as a percentage of viable cells relative to that in target cells alone.

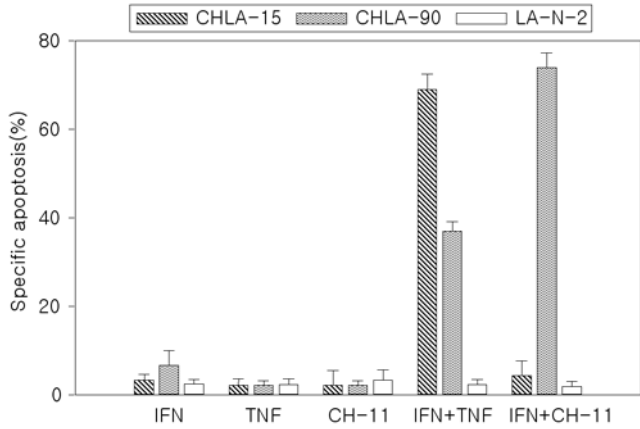
#### 2. $IFN \gamma$ 의 $TNF \alpha$ 와 CH-11 유도성 세포고사에 미치는 영향

신경모세포종에서  $IFN \gamma$ 와  $TNF \alpha$ 의 세포독성은 대부분 세포 분화와 성장 억제로 밝혀져 있다. 따라서  $IFN \gamma$ 와  $TNF \alpha$ 또한 CH-11에 의한 세포 생존을 감소가 세포고사에 의해 유도되는지를 알아보기 위해 Annexin V-PE와 7-ADD로 이중 염색하여 유식세포분석기를 통하여 분석하였다.  $IFN \gamma$ 을 3일 동안 전처리 한 후  $TNF \alpha$ , CH-11을 2일 동안 처리하여 검사하였다.

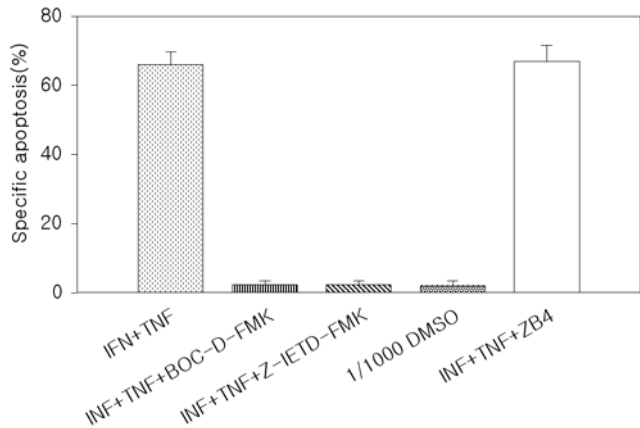
세포 생존을 검사와 일치하게  $IFN \gamma$ 와  $TNF \alpha$  동시 투여 군에서는 CHLA-15과 CHLA-90 세포에서 각각 70%와 40% 정도, 또한  $IFN \gamma$ 와 CH-11 동시 투여 군에서는 CHLA-90세포에서 70% 이상의 특이세포고사(specific apoptosis)를 유도하였다. 그러나 LA-N-2 세포와  $IFN \gamma$ ,  $TNF \alpha$ , CH-11 단독 투여 시에는 의미 있는 세포고사를 유도하지 못했다(Fig. 2).

#### 3. 공통 caspase 경로를 통한 $IFN \gamma$ 와 $TNF \alpha$ 의 세포고사유도

$IFN \gamma$ 와  $TNF \alpha$ 에 의한 세포고사 유도시 공통 caspase 경로(common caspase pathway)의 통과여부를 알아보기 위해 CHLA-15 세포에 pancaspase 억제제인 20 mM BOC-D-FMK와 caspase-8 억제제인 20 mM Z-IETD-FMK를 처리한 후 세포고사 정도를 측정하였다. 그 결과 두 caspase 억제제를 투여 한 후  $IFN \gamma$ 와  $TNF \alpha$  유도성 특이 세포고사가 완전히 소실되는 것을 보여주었다. 따라서  $IFN \gamma$ 와  $TNF \alpha$ 에 의한 세포고사는 수용체 하방의 caspase-8을 경유하는 공통 caspase 경로를 통하여 이루어짐을 알 수 있다. 또한 두 사이토카인에 의한 세포고사 유도시 FAS/FASL 경로가 관여하는지를 알아보기

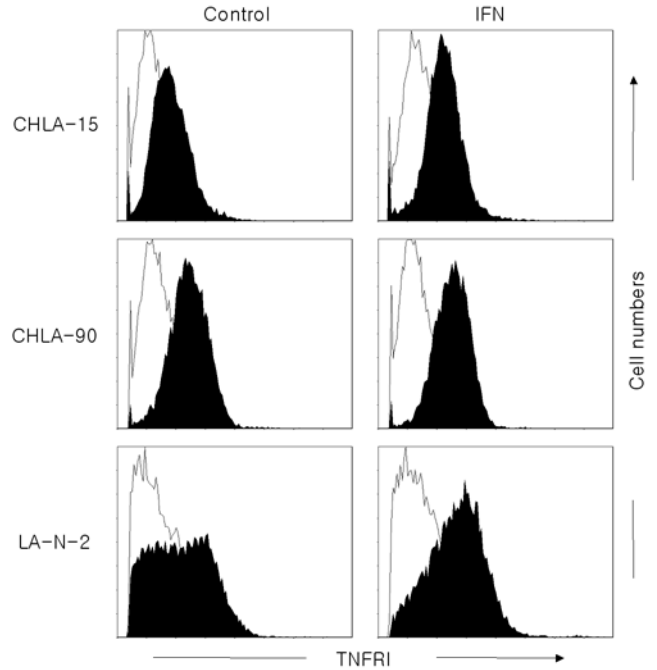


**Fig. 2.**  $IFN\gamma$  triggered  $TNF\alpha$  and agonistic CH-11 antibody-induced apoptosis. Cells were pretreated in the presence or in the absence of 30 ng/mL of  $IFN\gamma$  for 3 days. After washing twice, cells were treated with 30 ng/mL of  $IFN\gamma$ , 45 ng/mL of  $TNF\alpha$ , 500 ng/mL of CH-11 antibody according to indicated conditions. Quantification of apoptosis was performed by fluorescence-activated cell-sorting(FACS) analysis with annexin V-PE and 7-ADD. Percentage of specific apoptosis was calculated as follows:  $100 \times [\text{experimental apoptosis}(\%) - \text{spontaneous apoptosis}(\%)]/100\%$ . Mean  $\pm$  S.D. of triplicates are shown.



**Fig. 3.** The synergistic apoptosis of  $IFN\gamma$  and  $TNF\alpha$  was induced by the common caspase pathways without involvement of FAS/FASL pathway. Cells were pre-incubated with 500 ng/mL of antagonistic FAS R antibody(ZB4), 20 mM of pancaspase blocker(BOC-D-FMK), 20 mM of caspase-8 blocker(Z-IETD-FMK) for 1 h and then treated with 30 ng/mL of  $IFN\gamma$ , 45 ng/mL of  $TNF\alpha$ . Quantification of apoptosis was performed by fluorescence-activated cell-sorting(FACS) analysis of annexin V-PE and 7-ADD. Percentage of specific apoptosis was calculated as follows:  $100 \times [\text{experimental apoptosis}(\%) - \text{spontaneous apoptosis}(\%)]/100\%$ . Mean  $\pm$  S.D. of triplicates are shown.

위해 FAS/CD95수용체 억제제(ZB4)를 투여하였으나 특이세포고사 정도에 영향이 없었다(Fig. 3).



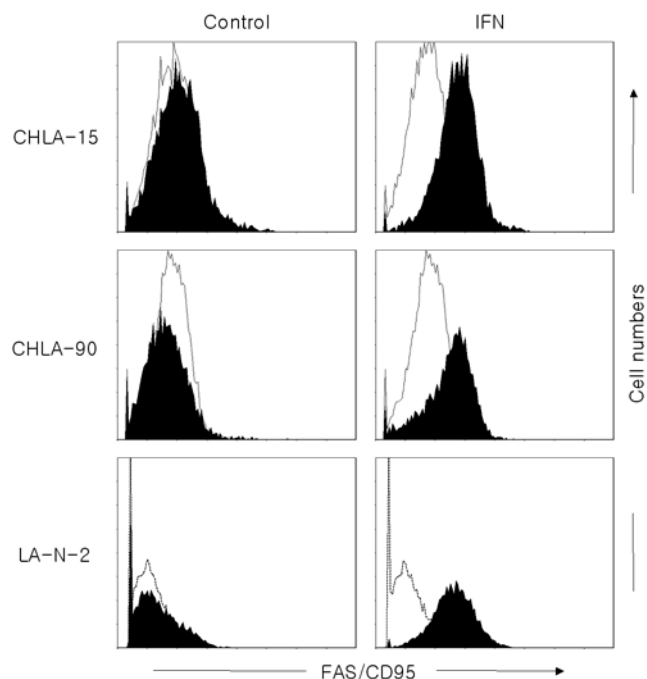
**Fig. 4A.**  $IFN\gamma$  enhanced the expression of TNFRI on neuroblastoma cells. Cells were cultured with 30 ng/mL of  $IFN\gamma$  for 24 h and then incubated with 10  $\mu$ g/mL of anti-TNF-RI antibody. The cells were subsequently stained with anti-goat IgG antibody labeled with PE. The reaction then were analyzed with a FACScan flow cytometry. The white areas represented controls, and shaded areas represented cells treated with anti-receptor antibody and fluoresceinated second antibody.

#### 4. $IFN\gamma$ 가 신경모세포종의 TNFRI과 FAS/CD95 수용체 발현에 미치는 영향

$IFN\gamma$ 에 의한  $TNF\alpha$ 와 CH-11 유도성 세포고사 촉발이 이에 상응하는 수용체 표현의 증가에 의한 것인지 알아보기 위해 TNFRI과 Fas/CD95 단클론항체(ZB4)를 반응시킨 후 PE가 결합된 이차항체를 이용하여 수용체 발현 정도를 유식세포 분석기로 측정하였다. TNFRI은 모든 세포주에서 자연적으로 표현되었으며  $IFN\gamma$  치료 후 현저히 증가하는 양상을 보였다(Fig. 4A). FAS/CD95 수용체의 표현은 대조군에서는 나타나지 않았으나  $IFN\gamma$  치료 후에는 모든 세포주에서 증가하였다(Fig. 4B). 이는  $IFN\gamma$ 가  $TNF\alpha$ 와 FAS/CD95 수용체 발현을 증가시켜 그들의 리간드에 의한 세포고사유도를 일부 신경모세포종에서 촉진 할 수 있음을 암시한다.

### 고 찰

$IFN\gamma$ 는 활성화된 T 림프구, 자연살해 세포와 자연살해 T세포에서 분비되어 항바이러스, 항염, 항증식, 면역 조절과 항암 작용 등의 다양한 기능을 수행한다<sup>9, 10</sup>.  $IFN\gamma$ 는 다양한 기전에 의해 직접 암세포에 대한 세포고사를 유도 할 수 있고 항암제와



**Fig. 4B.**  $IFN\ \gamma$  nonspecifically up-regulated the expression of FAS/CD95 receptor on neuroblastoma cells. Cells were cultured with 30 ng/mL of  $IFN\ \gamma$  for 24 h and then incubated with 10  $\mu$ g/mL of anti-FAS antibody (ZB4). The cells were subsequently stained with anti-goat IgG antibody labeled with PE. The reaction then were analyzed with a FACScan flow cytometry. The white areas represented controls, and shaded areas represented cells treated with anti-receptor antibody and fluoresceinated second antibody.

병행 투여 시 암세포사망을 촉진하며 인체내 면역세포의 활성화를 통하여 항체 의존적 세포독성(antibody-dependent cytotoxicity) 및 T-림프구와 자연살해 세포에 의한 세포독성을 증가시킨다<sup>9, 12)</sup>. 또한 다양한 암세포에서  $TNF\ \alpha$ , FAS 및 다른 사망수용체와 이들에 상응하는 리간드의 표현을 증가시킬 뿐 아니라 Bcl-2 가족과 caspase 활성도를 조절하여 세포고사 유도에 관여함이 밝혀져 있다<sup>29, 30)</sup>.

$TNF\ \alpha$ 는 활성화된 대식 세포, 단구, 자연살해 세포, 자연살해 T세포와 내피 세포에서 주로 분비되며 세포증식, 염증반응, 스트레스, 세포사망 등의 생물학적 기능을 담당한다<sup>9)</sup>.  $TNF\ \alpha$ 는 다양한 암세포에서 세포독성을 나타내는데 두 종류의 수용체 TNFRI(p55), TNFRII(p75) 중 대부분 TNFRI과 결합하여 하방의 TRADD(TNFRI-associated death domain protein)와 FADD(FAS-associating protein with death domain) 등의 결합 단백을 모집(recruit)하여 caspase-8을 활성화하여 세포고사를 일으킨다<sup>31)</sup>. FAS/FASL는  $TNF$ /nerve growth factor 가족의 하나로 활성화 시 하방의 TRADD, FADD, Receptor interacting protein(RIP) 등을 모집하여 강력한 세포고사를 유도한다<sup>31)</sup>. FASL은 활성화된 T와 B 림프구, 자연살해 세포 등의 면역 세포와 눈, 뇌, 고환 같은 면역 특권이 주어진 장기(immu-

ne-privileged organ)의 세포에서 발현하여 세포사망을 유도하여 체내 항상성을 유지한다<sup>32)</sup>.

소아암 중 가장 난치성 암 중 하나인 신경모세포종은 최근 고용량 화학요법 후 자가 조혈모세포 이식과 13-cis-retinoic acid 투여로 고위험군 신경모세포종에서도 38% 정도의 생존율 증가를 가져왔지만 예후를 증진시키기 위한 새로운 치료 방법의 개발이 필요하다<sup>1)</sup>. 최근 유전자 치료<sup>2, 3)</sup> 및 중성구, 가지돌기 세포, 활성화된 T 림프구, 자연살해 세포 및 자연살해 T세포 등의 면역세포 치료<sup>4-8)</sup>를 이용한 신경모세포종, 특히 미세 잔여 종양의 치료적 접근이 활발히 이루어지고 있다. 실제 항암 효과를 얻기 위한 용량의  $IFN\ \gamma$ 과  $TNF\ \alpha$ 의 인체 내 투여는 실제 부작용으로 인해 많은 제한이 있다. 그러나 이들 면역세포의 활성화 시 많은 양의  $IFN\ \gamma$ 와  $TNF\ \alpha$ 가 분비되어 직, 간접적으로 암세포 제거에 관여함이 보고되었다<sup>4-10, 17)</sup>. 따라서 신경모세포종에서의  $IFN\ \gamma$ 와  $TNF\ \alpha$ 의 효과에 대한 기초적인 지식은 면역세포 및 유전자 치료 등에 응용 될 수 있으며, 또한 소량의  $IFN\ \gamma$ ,  $TNF\ \alpha$ 의 전신적 투여로 이들의 치료 효과를 극대화 할 수 있는 전략의 수립이 가능 할 것이다.

본 연구는 신경모세포종에서  $IFN\ \gamma$ 와  $TNF\ \alpha$ 의 효과를 알아 보고자 다양한 항암제의 민감도를 가지며 서로 상이한 치료과정 중에 분리 배양되어진 CHLA-15, CHLA-90, LA-N-2 신경모세포종 세포주를 이용하여 실험하였다. 먼저 세포를 6일 동안 장기 배양 후 calcein-AM을 이용한 DIMSCAN을 통해 세포 생존율 변화를 살펴보았다. calcein-AM은 선택적으로 생존세포에서 흡수되어 형광을 발현하여 세포 생존율을 의의있게 반영함이 보고되었다<sup>4, 27)</sup>.  $IFN\ \gamma$  또는  $TNF\ \alpha$  단독으로는 모든 세포주에서 세포 생존율의 변화가 없었으나 두 사이토카인의 병행 투여시 CHLA-15와 CHLA-90세포에서 협력적으로 의의있게 생존율이 감소하였다. 이들 세포생존율의 변화는 Annexin V와 7-ADD염색을 이용한 유식세포 분석기를 통하여 얻어진 특이 세포고사 정도와 일치하였고 또한 pancaspase 및 caspase-8 억제제에 의해 억제되었다. 현재까지  $IFN\ \gamma$ 와  $TNF\ \alpha$ 에 의한 세포독성은 주로 협력적 암세포의 분화와 성장 억제로 보고되었는데<sup>11, 21)</sup> 본 연구에서는 공통 caspase 경로를 통한 협력적 세포고사 유도가 주된 기전으로 밝혀졌다. 본 결과와 상이하게  $IFN\ \gamma$  단독으로도 일부 신경모세포종 세포주에서 특히 Nmyc 양성시 직접 세포고사를 유도 할 수 있음이 보고되었는데<sup>23, 24)</sup> 이는 실험 대상 세포주에 따른 차이점으로 신경모세포종의 다양한 생물학적 특성을 반영한다.

$IFN\ \gamma$ 가 많은 암세포에서 TNFRI와 FAS/CD95 수용체 발현을 증가시켜 세포고사를 촉진하므로<sup>29, 30)</sup> 신경모세포종에서도  $IFN\ \gamma$ 와  $TNF\ \alpha$ 에 의한 협동적 세포고사 유도에 수용체 과발현이 관여하는지 알아보기 위해 TNFRI 발현 정도를 측정하였다. 모든 신경모세포종 세포주에서 자연적으로 세포 표면에 다양한 정도로 발현되고 있었으며  $IFN\ \gamma$  치료 후 현저히 증가하는 양상을 보였다. 이는 Montaldo 등<sup>21)</sup>의 역전사 중합효소 반응(RT-

PCR)을 이용한 LAN-5와 GI-LI-N 세포주에서  $IFN\gamma$ 가 TNFRI의 발현을 증가시킨다는 보고와 일치하였다. 그러나 CHLA-15와 CHLA-90주에서는 TNFRI의 자연적 발현 만으로는 TNF $\alpha$ 에 의한 세포고사유도에 불충분하고  $IFN\gamma$ 에 의한 TNFRI발현이 증가 시에 만 세포고사가 촉진되었고 LA-N-2세포주에서는  $IFN\gamma$ 에 의한 수용체 발현의 증가에도 불구하고 세포고사 유도가 발생하지 않았다. 이는  $IFN\gamma$ 와 TNF $\alpha$ 의 세포고사 협력적 촉진은  $IFN\gamma$ 에 의한 TNFRI의 과발현 유도가 한 기전으로 설명이 될 수 있으나 수용체 하방의 다른 신호전달 물질의 활성화가 원인임을 배제 할 수 없다. 또한 일부 세포주에서는 이미 수용체 하방에 세포고사 유도에 대한 내성 기전을 가지고 있음을 암시한다.

FAS/FASL기전은 세포고사의 핵심적인 조절 인자로 암 억제에 중요한 역할을 수행하므로 이 기전의 활성화를 유도한다면 항암제 및 세포독성 T 림프구(CTL)와 자연살해 세포 등에 의한 암세포 파괴를 촉진할 것으로 사료된다<sup>31, 32)</sup>. 일부 신경모세포종 세포주에서 자연적인 FASR와 FASL가 발현하나 길항적 FAS/CD95 항체나 FASL에 의한 세포고사 유도에는 실패하였고<sup>25, 26)</sup>  $IFN\gamma$  단독투여나 항암제 투여 시 이 기전을 통한 직접적 세포고사 촉진이 보고되었다<sup>22, 23)</sup>. 본 연구에서 FASR 발현은 모든 세포주에서 자연 상태에서는 존재하지 않았으나  $IFN\gamma$  치료 후 현저히 증가하는 양상을 보였다. 그러나 Bernassola 등<sup>23)</sup>의 보고와 상이하게  $IFN\gamma$  단독 투여만으로 모든 세포주에서 직접적 세포고사를 유도하지 않았고 CHLA-90세포주에서 만 길항적 FAS/CD95 항체에 의한 세포고사를 현저히 증가시켰다. 본 연구에서는  $IFN\gamma$ 에 의한 CHLA-90 세포주의 세포고사 촉진을 FAS 수용체의 발현 유도에 초점을 두었으나 Lutz 등<sup>24)</sup>의 보고에서처럼 Bax와 같은 수용체 하방의 신호전달 물질의 활성화를 통해 이루어질 수 있다. CHLA-15과 LA-N-2세포주에서는  $IFN\gamma$ 가 FAS/FASL 경로를 통한 세포고사 유도에 실패하였는데 이는 이미 수용체 하방의 신호 전달 기전의 결손을 가지고 있음을 암시한다. 이런 가능성은 최근 많은 연구에서 신경모세포종의 FAS 수용체 하방의 세포고사 유도에 필수적인 caspase-8 표현 결핍이나 caspase-8의 활성화를 억제하는 FLIP (FLICE-inhibitory protein)과 Bcl-2의 과발현으로 FAS/FASL 기전에 대한 내성을 나타냄이 보고되었다<sup>33-35)</sup>.

본 연구에서  $IFN\gamma$ 는 TNF $\alpha$ 와 협동적으로 세포고사의 공통 기전인 caspase 경로를 통해 일부 신경모세포종에서 의미있는 세포 생존율 감소와 세포고사 유도를 촉진하였다. 이는 두 사이토카인에 의한 신경모세포종의 세포고사를 통한 세포 독성 발현에 대한 최초의 소견이며 기존의 암세포 분화 및 성장 억제에 대한 보고와 더불어 중요한 치료적 접근의 단서가 될 것이다. 또한  $IFN\gamma$ 는 길항적 FAS/CD95 항체에 의한 세포고사 유도를 현저히 증가시켰는데 이는 체내 면역세포의 활성화시  $IFN\gamma$ 와 TNF $\alpha$ 가 분비되고, FASL의 발현의 증가 등을 고려할 때 신경모세포종에 대한 면역세포를 이용한 치료의 가능성을 제시한

다. 흥미롭게 고용량 화학요법과 자가 조혈모세포 이식 후 재발시 분리하여 모든 항암제에 내성을 보이는 CHLA-90 세포주에서도  $IFN\gamma$ 가 TNF $\alpha$ 나 길항적 FASR 항체에 의한 세포고사를 촉진하였는데 이는 항암제 내성 극복과 미세 잔여 종양의 제거에 이용 될 수 있을 것으로 사료된다.  $IFN\gamma$ 에 의한 TNF $\alpha$ 와 길항적 FAS/CD95 항체의 세포고사 촉진 기전은 비록 수용체 하방의 기전에 대한 연구는 진행하지 않았지만 부분적으로 TNFRI과 FASR의 과발현으로 설명되어졌으며 추후 수용체 하방의 caspase경로, FLIP, Bcl-2 가족, P53 등의 상호 연관성에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

**요 약**

**목적 :**  $IFN\gamma$ 는 다양한 암세포에서 TNF $\alpha$ 와 FAS/CD95 수용체 발현을 증가시키거나 caspase나 Bcl-2 가족의 활성화를 조절하여 TNF $\alpha$ 와 FAS/FASL 유도성 세포고사를 촉진한다. 신경모세포종에서  $IFN\gamma$ 와 TNF $\alpha$ 는 협동적으로 세포 분화를 유도하거나 성장 억제를 일으킨다. 또한 일부 신경모세포종에서 자연적인 FAS 수용체 발현에도 불구하고 그 리간드 자극에 의한 세포고사 유도에는 실패하였고  $IFN\gamma$  투여로 이를 극복할 수 있음이 보고되었다. 본 연구에서는  $IFN\gamma$ 가 TNF $\alpha$ 나 길항적 FAS/CD95 항체 유도성 세포고사를 촉진할 수 있는지 여부를 다양한 항암제에 대한 내성을 가지고 있는 신경모세포종 세포주를 이용하여 알아보았다.

**방법 :** CHLA-15, CHLA-90와 LA-N-2 신경모세포종 세포주를 IMDM 배지로 배양하였고 유전자 재조합  $IFN\gamma$ , TNF $\alpha$ , 길항적 FAS/CD95 항체(CH-11)를 투여하였다. 세포 생존율은 형광기질인 calcein-AM을 이용한 DIMSCAN을 통하여 측정하였고, 세포고사 정도는 Annexin V-PE와 7-ADD염색을 이용한 유식세포 분석기를 통하여 분석하였고 pancaspase and caspase-8 억제 실험을 통하여 확인하였다. TNF와 FAS/CD95 수용체 표현은 각각에 대한 단클론 항체와 PE가 결합된 이차 항체를 이용하여 유식세포 분석기로 알아보았다.

**결과 :**  $IFN\gamma$  또는 TNF $\alpha$  단독 투여로는 모든 세포주에서 의미있는 세포 독성을 유도하지 못 했으나  $IFN\gamma$ 와 TNF $\alpha$ 을 병행 투여시에는 CHLA-15과 CHLA-90 세포주에서 의미있는 세포 생존율 감소와 공통 caspase경로를 통한 세포고사를 협동적으로 촉진하였다. 또한 길항적 FAS/CD95 항체 단독 투여 시에는 모든 세포주에서 세포 생존율의 변화가 없었으나  $IFN\gamma$  전 처치 후 투여 시에는 CHLA-90 세포주에서 현저한 세포 생존율 변화 및 세포고사를 유도하였다.  $IFN\gamma$  치료 후 TNFRI와 FASR의 발현이 모든 세포주에서 현저히 증가하였는데 이는 일부 감수성이 있는 신경모세포종에서  $IFN\gamma$ 에 의한 TNF $\alpha$ 와 FAS/CD95수용체 유도성 세포고사 촉진의 한 기전이 될 것으로 사료된다.

**결론 :** 일부 신경모세포종에서  $IFN\gamma$ 가 TNF $\alpha$ 와 길항적

FAS/CD95 항체 유도성 세포고사를 감작화 시켰으며 이는 수용체 발현의 증가와 동반되었다.

### 참 고 문 헌

- 1) Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, et al. Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. N Engl J Med 1999;341:1165-73.
- 2) Kircheis R, Ostermann E, Wolschek MF, Lichtenberger C, Magin-Lachmann C, Wightman L, et al. Tumor-targeted gene delivery of tumor necrosis factor- $\alpha$  induces tumor necrosis and tumor regression without systemic toxicity. Cancer Gene Ther 2002;9:673-80.
- 3) Bowman L, Grossmann M, Rill D, Brown M, Zhong WY, Alexander B. IL-2 adenovector-transduced autologous tumor cells induce antitumor immune responses in patients with neuroblastoma. Blood 1998;92:1941-9.
- 4) Chen RL, Reynolds CP, Seeger RC. Neutrophils are cytotoxic and growth-inhibiting for neuroblastoma cells with an anti-GD2 antibody but, without cytotoxicity, can be growth-stimulating. Cancer Immunol Immunother 2000;48:603-12.
- 5) Valteau-Couanet D, Leboulaire C, Maincent K, Tournier M, Hartmann O, Benard J, et al. Dendritic cells for NK/LAK activation: rationale for multicellular immunotherapy in neuroblastoma patients. Blood 2002;100:2554-61.
- 6) Sarkar AK, Nuchtern JG. Lysis of MYCN-amplified neuroblastoma cells by MYCN peptide-specific cytotoxic T lymphocytes. Cancer Res 2000;60:1908-13.
- 7) Rossi AR, Pericle F, Rashleigh S, Janiec J, Djeu JY. Lysis of neuroblastoma cell lines by human natural killer cells activated by interleukin-2 and interleukin-12. Blood 1994;83:1323-8.
- 8) Kawano T, Nakayama T, Kamada N, Kaneko Y, Harada M, Ogura N, et al. Antitumor cytotoxicity mediated by ligand-activated human V $\alpha$ 24 NKT cells. Cancer Res 1999;59:5102-5.
- 9) De Vita VT, Hellman S, Rosenberg SA. Biologic therapy of cancer. 4th ed, Philadelphia: JB Lippincott Co, 1995: 295-442.
- 10) Metelitsa LS, Naidenko OV, Kant A, Wu HW, Loza MJ, Perussia B, et al. Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. J Immunol 2001;167:3114-22.
- 11) Ponzoni M, Casalaro A, Lanciotti M, Montaldo PG, Cornaglia-Ferraris P. The combination of  $\gamma$ -interferon and tumor necrosis factor causes a rapid and extensive differentiation of human neuroblastoma cells. Cancer Res 1992;52:931-9.
- 12) Strander H. Interferon treatment of human neoplasia. Adv Cancer Res 1986;46:1-265.
- 13) Old LJ. Tumor necrosis factor(TNF). Science 1985;230:630-2.
- 14) Vilcek J, Lee TH. Tumor necrosis factor. New insights into the molecular mechanisms of its multiple actions. J Biol Chem 1991;266:7313-16.
- 15) Taguchi T, Kimoto Y, Tanji Y, Abe S, Nakano K, Sohmura Y. Augmentation of cytotoxic activity of recombinant human tumor necrosis factor(rHu-TNF) by recombinant human interferon- $\gamma$ (rHu-IFN- $\gamma$ ). J Biol Response Mod 1987;6:599-609.
- 16) Walder S, Schwartz EL. Antineoplastic activity of the combination of interferon and cytotoxic agents against experimental and human malignancies: a review. Cancer Res 1990;50:3473-86.
- 17) Kikuchi A, Nieda M, Schmidt C, Koezuka, Ishihara S, Ishikawa Y, et al. In vitro anti-tumour activity of  $\alpha$ -galactosylceramide-stimulated human invariant V24 $\alpha$  + NKT cells against melanoma. Br J Cancer 2001;85:741-6.
- 18) Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. Science 1995;267:1449-56.
- 19) Arase H, Arase N, Saito T. Fas-mediated cytotoxicity by freshly isolated natural killer cells. J Exp Med 1995;181:1235-8.
- 20) Suda T, Okazaki T, Naito Y, Yokota T, Arai N, Ozaki S. Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. J Immunol 1995;154:3806-13.
- 21) Montaldo PG, Carbone R, Corrias MV, Ferraris PC, Ponzoni M. Synergistic differentiation promoting activity of interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ : role of receptor regulation on human neuroblasts. J Natl Cancer Inst 1994;86:1694-701.
- 22) Fulda S, Sieverts H, Frisen C, Herr I, Debatin KM. The CD95(APO-1/FAS) system mediates drug-induced apoptosis in neuroblastoma cells. Cancer Res 1997;57:3823-29.
- 23) Bernassola F, Scheuerpflug C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM, Melino G. Induction of apoptosis by IFN gamma in human neuroblastoma cell lines through the CD95/CD95L autocrine circuit. Cell Death Differ 1999;6:652-60.
- 24) Lutz W, Fulda S, Jeremias I, Debatin KM, Schwab M. MycN and IFN gamma cooperate in apoptosis of human neuroblastoma cells. Oncogene 1998;17:339-46.
- 25) Gross N, Balmas K, Beretta Brognara C, Tschopp J. Expression of Fas(APO-1/CD95) and Fas ligand(FasL) in human neuroblastoma. Med Pediatr Oncol 2001;36:111-4.
- 26) Barthlen W, Schafer J, Girgert R, Schuster M, Schweizer P. Apoptosis of cultured neuroblastoma cells is induced by ceramide and not by ligation of the Fas/Apo-1/CD95 receptor. Chemotherapy 1999;45:258-67.
- 27) Proffitt RT, Tran JV, Reynolds CP. A fluorescence digital image microscopy system for quantifying relative cell numbers in tissue culture plates. Cytometry 1996;24:204-13.
- 28) Lecoeur H, Ledru E, Prevost MC, Gougeon ML. Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. J Immunol Methods 1997;209:111-23.
- 29) Ossina NK, Cannas A, Powers VC, Fitzpatrick PA, Knight JD, Gilbert JR, et al. Interferon- $\gamma$  modulates a p53-independent apoptotic pathway and apoptosis-related gene expression. J Biol Chem 1997;272:16351-7.
- 30) Varela N, Munoz-Pinedo C, Ruiz-Ruiz C, Robledo G, Pedroso M, Lopez-Rivas A. Interferon- $\gamma$  sensitizes human myeloid leukemia cells to death receptor-mediated

- apoptosis by a pleiotropic mechanism. *J Biol Chem* 2001; 276:17779-87.
- 31) Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:331-67.
- 32) O'Connell J. Immune privilege or inflammation? The paradoxical effects of Fas ligand. *Arch Immunol Ther Exp* 2000;48:73-9.
- 33) Teitz T, Lahti JM, Kidd VJ. Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: an important component of programmed cell death. *J Mol Med* 2001;79:428-36.
- 34) Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, et al. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 2000;6:529-35.
- 35) Poulaki V, Mitsiades N, Romero ME, Tsokos M. Fas-mediated apoptosis in neuroblastoma requires mitochondrial activation and is inhibited by FLICE inhibitor protein and Bcl-2. *Cancer Res* 2001;61:4864-72.
-