

종양 미세 환경 내 대식세포에서 혈관 신생 조절 인자로서의 TNF- α 에 의한 IFN- γ 의 분비 조절

성균관대학교 의과대학 삼성서울병원 암센터, ¹약학대학 면역학교실

표석능¹ · 백소영 · 곽장동¹ · 박대섭¹ · 조성준¹ · 이현아

Production of IFN- γ by TNF- α in Macrophages from Tumor Micro Environment; Significance in Angiogenic Switch Control

Suhk-Neung Pyo¹, Soyoung Back, Jang-Dong Kwak¹, Dae-Sub Park¹, Sung-Jun Joe¹ and Hyun Ah Lee

The Cancer Center, Samsung Medical Center, School of Medicine, ¹Laboratory of Immunology, College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: The role of macrophages in tumor angiogenesis is known to be the production of angiogenic cytokines and growth factors including TNF- α . Recently, macrophage also can produce the IFN- γ that is being studied to be involved in angiogenic inhibition. Thus, the importance of macrophages in tumor angiogenesis is might being an angiogenic switch. Thus, the hypothesis tested here is that TNF- α can modulate the IFN- γ production in the macrophages from tumor environment as a part of tumor angiogenic switch. **Methods:** Macrophages in tumor environment were obtained from the peritoneal cavity of C57BL/6 mice injected with B16F10 melanoma cell line for 6 or 11 days. Mac1⁺-macrophages were purified using magnetic bead (MACsTM; Milteny Biotech, Germany) and cultured with various concentrations of TNF- α for various time points at 37°C. The supernatants were analyzed for IFN- γ or VEGF by ELISA kit (Endogen, Woburn, MA). **Results:** Residential macrophages from the peritoneal cavity did not respond to LPS or TNF- α to produce IFN- γ . However, the cells from tumor environment produced IFN- γ as well as VEGF and upregulated by the addition of LPS or TNF- α . RT-PCR analysis revealed the external TNF- α -induced IFN- γ gene expression in the macrophages from tumor environment. **Conclusion:** The overall data suggest that the macrophages in tumor environment might have an important role not only in angiogenic signal but also in anti-angiogenic signal by producing related cytokines. And TNF- α might be a key cytokine in tumor angiogenic switch. (*Immune Network* 2002;3(1):53-60)

Key Words: Tumor micro-environment, angiogenic switch control, macrophages, TNF- α , IFN- γ

서 론

대식세포는 단핵 식 세포계 분화의 말기에 위치한 주

요 면역 세포로 혈관 생성에 관여하는 cytokine들, 즉 VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF, TGF- α , TNF- α , PDECGF/TP (platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase)와 IL-8 등을 분비하는 것으로 알려져 왔다(1-3). 또한 대식세포는 분해 효소의 분비를 통하여 직접적으로 또는 세포외 기질 조절 cytokine 분비에 의해 혈관 형성의 여러 단계에 영향을 주는 것으로 알려져 있다.

책임저자 : 이현아, 삼성서울병원 암센터
☎ 135-710, 서울시 강남구 일원동 50
Tel: 02-3410-3455, Fax: 02-3410-6808
E-mail: hlee@smc.samsung.co.kr

본 연구는 한국 과학 재단 목적기초 연구비(2000-1-20700-001-2)지원으로 수행되었음.

1990년대 후반 이후의 연구 발표들은 대식 세포가 종양 발생 시 새로운 혈관 형성을 유발할 수도 또 억제 할 수도 있음을 보여주고 있다(4). 이와 함께 Angiogenic switch의 존재와 혈관 생성 유도물질과 억제물질 사이의 균형이 angiogenic switch을 조절한다는 가설이 많은 실험 결과로 뒷받침되고 있다(5,6). 즉, 억제물질의 농도가 높은 경우 switch를 꺼진 상태로 유지하는 반면 유도물질의 농도가 높은 경우는 angiogenesis가 시작되도록 switch를 켜는 것이다.

TNF- α 는 대식세포 계열의 세포들에서 주로 합성되는 cytokine으로 혈관내피세포나 흑색종 세포를 포함한 다양한 세포에서 전사요소를 활성화시켜서 강력한 혈관신생 요소인 IL-8, bFGF, VEGF의 발현을 증강시킨다(7). 혈관내피세포에서 TNF- α 에 의해 유도되는 관상형성작용(tubular morphogenesis)은 anti-IL-8, anti-VEGF, anti-bFGF 항체를 투여함으로써 억제되었고, 이 세 가지 항체를 함께 투여했을 경우에는 거의 완벽하게 관상형성이 이루어지지 않았다(8). 이와 같이 TNF- α 에 의한 혈관 형성 조절 경로는 paracrine이나 autocrine방식으로 작용된다.

IFN- γ 는 T cell 및 NK cell에서만 분비되는 것으로 알려진 다항성 (pleiotropic) cytokine이다. 항바이러스 물질로 알려진 이후 최근의 연구를 통해 IFN- γ 가 대식 세포에 영향을 줄 뿐 아니라, 대식 세포로부터도 분비되는 것으로 밝혀졌다(9). IFN- γ 의 유전자는 휴지기의 대식 세포에서도 생리적 조건하에서 항상 표현되고 있으며 단일 신호에 의해 전사 인자가 활성화되어 분비가 유도된다고 알려져 있다(10-12). 또한 IFN- γ 가 IL-12의 anti-angiogenic 효과의 매개체인 것으로도 연구되고 있는데 (13), IFN- γ 에 의해 유도되는 혈관 형성 억제 물질은 IP-10, Mig 등인 것으로 알려지고 있다(14,15). 최근에 type I interferon인 IFN- α 및 β 의 경우 생쥐와 사람의 상피세포의 성장을 억제하고, 맥관형성의 유도물질인 fibroblast growth factor (FGF)와 matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) 유전자의 발현을 억제하는 등으로 맥관형성의 억제에 관여한다고 보고되고 있다(16,17). 또한 CD4⁺ T 세포에 의해 분비되는 type II interferon인 IFN- γ 가 암 혈관형성을 억제하여 초기 암세포 성장을 조절한다고 알려졌다(18). 그러나 대식 세포로부터 분비되는 type II interferon인 IFN- γ 의 혈관 신생 억제작용 및 그 기전에 대하여는 밝혀진 바 없다. 또한 혈관형성 요소인 TNF- α 와 억제인자로서 가능성을 갖고 있는 IFN- γ 의 발현과 관련한 대식세포에서 상호 발현 및 유도조절기전은 아직 규명되지 않았다.

혈관 형성에 있어 TNF- α 와 IFN- γ 가 상호 다른 작용을 한다고 알려진 점을 고려할 때 두 cytokine이 angiogenic switch의 positive 또는 negative 인자로서 역할을 할 가능성을 시사한다. 이 보고에서는, 대식세포에서 분비하는

혈관 형성 유도물질인 TNF- α 와 혈관 형성을 억제하는 물질로서 IFN- γ 의 역할 및 상호 조절 관계를 여러 환경에서 관찰하여 angiogenesis switch로서의 가능성을 제안하고자 하였다. 이 같은 결과는 angiogenesis switch의 조절에 의한 종양 등의 치료제 개발에 근간이 될 중요한 정보가 될 수 있으리라 생각한다.

재료 및 방법

실험동물. 암컷 순계인 C57BL/6 쥐(5~6 주령)를 대한 바이오 링크(충북 음성)로부터 구입하였다. 쥐는 특정 병원균이 없는(specific pathogen-free, SPF) 동물로 삼성생명 과학 연구소 실험동물 연구실에서 Institute of Laboratory Animal Resources (ILAR) guidelines에 따라 사육되었다. 모든 동물은 실험을 시작하기 전 일주일 동안 적응기간을 거쳤다.

시약. RPMI-1640 medium, fetal bovine serum 및 penicillin-streptomycin은 미국 GIBCO laboratories (Grand Island, NY), lipopolysaccharide (LPS, from E.Coli 055 : B5)는 미국 SIGMA Chemical Co. (St.Louis, MO)로 부터 구입하였다. Recombinant murine TNF-alpha 및 mouse VEGF Immunoassay kit (Quantikine[®] M)는 R&D systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA)의 제품을 사용하였고, IFN- γ 의 ELISA kit는 BD Biosciences (Sandiego, CA, USA)의 OPTIA[™] Mouse IFN- γ Set를 사용하였다.

세포주. C57BL/6 쥐의 동종 종양인 흑색종 세포주 (melanoma cell line) B16F10은 미국 텍사스 대학 M.D. Anderson 암 센터의 Dr. I. J. Fidler로부터 제공받았다. 세포 주의 배양은 RPMI-1640 medium (10% heat inactivated FBS, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, 그리고 100 μ g/ml streptomycin을 첨가한 complete medium)으로 유지되었다.

종양 세포 이식. B16F10 세포주를 배양 용기로부터 분리하여 배지로 씻은 후 생리 식염수에 풀어(2×10^5 cells/mouse) 복강 내(i.p.)에 이식하였다. 종양 세포를 이식한 6일 혹은 11일 후에 복강 내에 존재하는 세포를 포집하여 실험에 사용하였다.

복강 대식 세포의 분리.

복강 상주 비활성 대식세포의 분리: 생쥐의 복강 내에 Ca⁺⁺과 Mg⁺⁺이 없는 Hanks Balanced Salt Solution (HBSS)을 주입하여 복강을 세척하여 복강 세포를 수확한 후 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 IU/ml)과 streptomycin (100 μ g/ml)를 함유한 RPMI-1640에 부유하였다. 1.5×10^6 cells/well의 농도로 96 well plate에 가한 후 37°C의 95%air/5% CO₂ 배양기에서 2시간 동안 부착시켰다. 비부착 세포는 배양액으로 세척하여 제거하였다.

Inflammatory 복강 대식세포의 분리: 생쥐의 복강 내에 2 ml의 3% thioglycollate를 주사하고 4일째 Ca⁺⁺과 Mg⁺⁺

이 없는 HBSS로 복강을 세척하여 세포를 수확한 후, 10% fetal bovine serum (FBS), penicillin (100 IU/ml)과 streptomycin (100 µg/ml)을 함유한 RPMI-1640에 부유하였다. 수확된 세포는 Mac1^+ (80%) 및 Mac3^+ (89%)로 대부분 활성화 대식 세포임이 flow cytometry로 증명되었다. 순수 분리를 위하여 복강 세포를 1×10^5 cells/well의 농도로 96 well plate에 가한 후 37°C, 95%air/5% CO_2 배양기에서 2시간 동안 부착시켰다. 비부착 세포는 배양액으로 세척하여 제거하였다.

종양 미세 환경 중의 복강 대식 세포의 분리: 종양 세포를 이식한 복강 내에 Ca^{++} 과 Mg^{++} 이 없는 HBSS를 주입하여 복강을 세척하여 복강 세포를 수확한 후, Mac

1^+ microbead로 label된 cell을 magnetic separation (MACS™, Milteney Biotech., Germany) 방법으로 Mac1^+ 대식 세포만 순수 분리하였다. Cytokine분비를 위해 분리된 1×10^6 cells/ml을 24well plate에 1 ml 분주한 후 배양하였다.

Cytokine 분비 측정. 분리된 대식세포를 TNF- α (0~50 ng/ml)와 함께 37°C에서 여러 시간대로 배양한 상등액을 취한 후 ELISA kit를 사용하여 TNF- α (Recombinant murine TNF- α , Quantikine®M, R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, USA), IFN- γ (OPTIEA Mouse IFN- γ Set, BD Bioscience, Sandiego, CA, USA) 및 VEGF (mouse VEGF Immunoassay kit, Quantikine®M, R&D systems, Inc., Minneapolis, MN, USA)의 양을 측정하였다.

대식세포에서 발현되는 IFN- γ mRNA 정량 (RT-PCR). 종양 환경에서 분리된 대식 세포(3×10^6 cells)를 TNF- α 와 함께 48시간 배양한 후 Trizol reagent (GIBCOBRL, USA)을 이용하여 kit에서 제공하는 방법에 따라 total RNA를 추출하였다. 추출된 total RNA는 UV spectrophotometer를 이용하여 1 µg/µl의 농도로 정량하고, SUPERSRIPT™ One-Step RT-PCR with PLATINUM Taq kit (GIBCOBRL, USA)을 이용하여 IFN- γ mRNA 발현량을 측정하였다. 이때 이용된 Primer는 염기 배열은 Table I과 같으며, 1× Reaction buffer (kit에서 제공), 2 mM MgSO_4 , 0.04 µg/µl template RNA, 0.2 uM primer, 0.5 µl/25 µl RT/Platinum Taq mix의 조성으로 25 µl의 volume으로 Fig. 1과 같은 cycle로 반응하였다. PCR 반응이 종결된

Table I. PCR primer Sequence and the product

Primer	Sequence	Product (bp)
IFN-rF (Forward)	5'-gCggCCTAgCTCTgAA'TTCATg AACgCTACAC (32 mer)	497 bp
IFN-rR (Reverse)	5'-CCACCTCgAgTCAGCAGCgAC TCCTTTTC (29 mer)	
GAPDH-F (forward)	5'-CCATggAgAAggCTgggg (18 mer)	196 bp
GAPDH-R (reverse)	5'-CAAAgTTgTCATggATgACC (20 mer)	

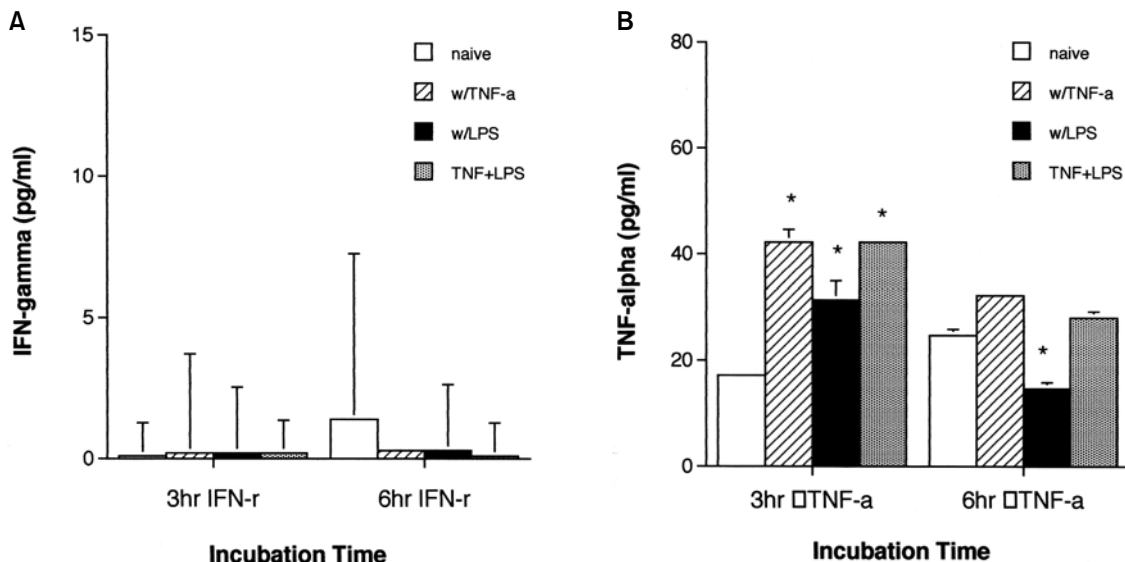


Figure 1. A. Production of IFN- γ from the residential macrophages. Residential peritoneal exudated cells were harvested (1.5×10^7 /ml) and purified for macrophages by plastic adherent step for 2hrs at 37°C. Each well with macrophages were treated with TNF- α (50 ng/ml) or LPS (100 ng/ml) alone or both for 3 to 6 hrs before the ELISA detection of IFN- γ from the supernatant. B. Production of TNF- α from the residential macrophages. Residential peritoneal exudated cells were harvested (1.5×10^7 /ml) and purified for macrophages by plastic adherent step for 2 hrs at 37°C. Each well with macrophages were treated with TNF- α (50 ng/ml) or LPS (100 ng/ml) alone or both for 3 to 6 hrs before the ELISA detection of TNF- α from the supernatant. Asterisks indicate the significance ($P < 0.05$) comparing naive control.

후 product 중 5 μ l를 2% agarose gel에서 전기영동하고 band를 확인하였다.

통계 처리. 각 실험은 최소 3번 이상 같은 조건으로 반복하였다. 실험 group 간의 통계적 유의성은 Fisher protected least significant difference test를 이용한 analyses of variance (ANOVA) 법으로, $P < 0.05$ 수준에서 결정하였다.

결 과

정상 쥐의 복강 내의 상주 비활성 대식 세포의 TNF- α 및 IFN- γ 의 분비. 정상 쥐의 대식세포가 in vitro 자극에 의해 angiogenesis와 관련된 cytokines들을 분비하는지 확인하기 위하여, 일반적인 대식 세포 활성화물질로 TNF- α 분비를 유발하는 LPS와 또는 TNF- α 자체를 사용하였다. 정상 쥐의 복강 내에 상주하는 활성화되지 않은 대식 세포(residential macrophages)는 IFN- γ 를 분비하지 않았고, TNF- α 및 LPS에 의해서도 분비는 조절되지 않았다 (Fig. 1A). TNF- α 의 분비는 배양 3시간만에 확인되었으며, TNF- α 또는 LPS 첨가에 의해 유의성 있게 변화하였다(Fig. 1B).

염증성 활성화 복강 대식세포의 TNF- α 자극에 의한 IFN- γ 및 VEGF 분비. 그러나 thioglycollate를 복강 내로 주입하여 유도된 세포는 표현형의 80% 이상이 대식세포와 연관된 Mac1⁺(80%) 및 Mac3⁺(89%)인 활성화된 염증성 대식세포임이 확인되었다(Fig. 2). 이들 활성화된 대식세포는 IFN- γ 를 분비하였으나, in vitro에서 주어진 TNF- α 또는 LPS의 2차 자극에는 거의 반응하지 않는 것을 관찰하였다(Fig. 3). TNF- α 의 농도 50 ng/ml과 72시간 배양에서 IFN- γ 의 분비가 증가하는 경향을 보였다.

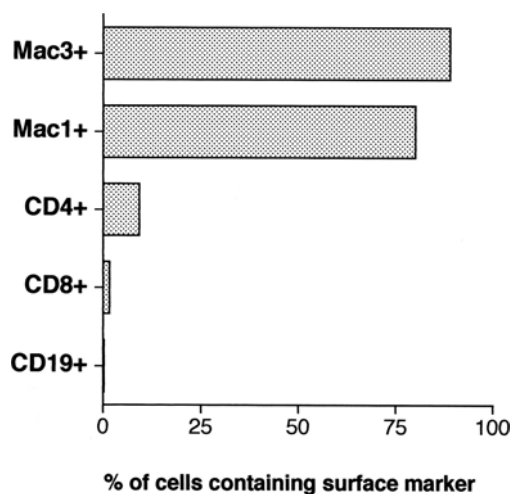


Figure 2. Characterization of inflammatory peritoneal exudated cells. Inflammatory peritoneal exudated cells from the thioglycollate injected mice were harvested and characterized by flow cytometric surface marker analysis.

같은 조건하에 대표적인 angiogenic cytokine인 VEGF의 분비를 관찰하였다(Fig. 4). 배양 24시간에서 VEGF의 분비가 외부에서 가해진 TNF- α 에 농도 의존적으로 감소하는 경향이 나타났고, 또 IFN- γ 와 다르게 VEGF의 분

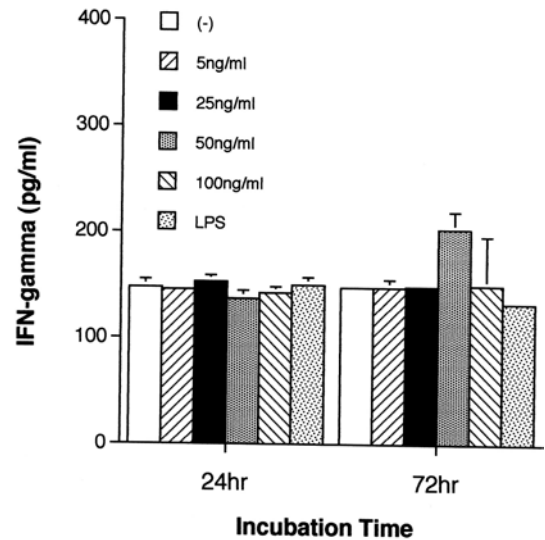


Figure 3. Production of IFN- γ from the inflammatory macrophages. Purified macrophages from the inflammatory peritoneal exudated cells were treated with various concentrations of TNF- α or LPS (100 ng/ml) for 24 to 72 hrs. The presence of IFN- γ in the supernatant was detected by ELISA. Legends are expressed the concentration of in vitro added TNF- α .

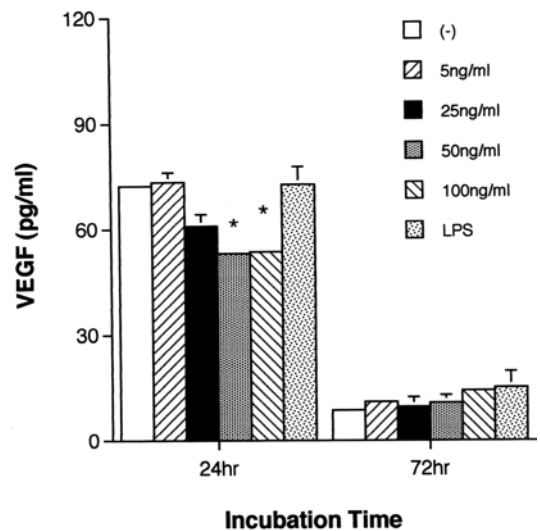


Figure 4. Production of VEGF from the inflammatory macrophages. Purified macrophages from the inflammatory peritoneal exudated cells were treated with various concentrations of TNF- α or LPS (100 ng/ml) for 24 to 72 hrs. The presence of VEGF was detected by ELISA from the culture supernatants. Legends are expressed the concentration of in vitro added TNF- α . Asterisks indicate the significance ($P < 0.05$) compared to the control without TNF- α addition.

비는 배양 72시간에서 현저히 감소하였으며, 주어진 TNF- α 의 농도에 영향을 받지 않았다. TNF- α 50 ng/ml에서 IFN- γ 분비 증가와 VEGF 분비 감소가 대조를 이루었고 이는 angiogenic switch조절 인자로서 TNF- α 의 역할을 시사하는 간접적인 증거로 생각된다.

In vivo 종양 환경 내에서 활성화된 대식세포의 TNF- α 자극에 의한 IFN- γ 및 VEGF 분비. 종양 환경 내에서의 대식세포의 활성화를 관찰하기 위하여 in vivo 동물 모델을 확립하였다. C57BL/6 쥐의 동종 흑색종인 B16F10을 복강 내로 주사한 후 발암 초기 단계 모델로 6일째와 (육안 관찰 가능한 종양 미형성) 후반기 모델로 11일째에(복강 내 종양 형성) 각각 복강 세포를 얻어 Mac1⁺

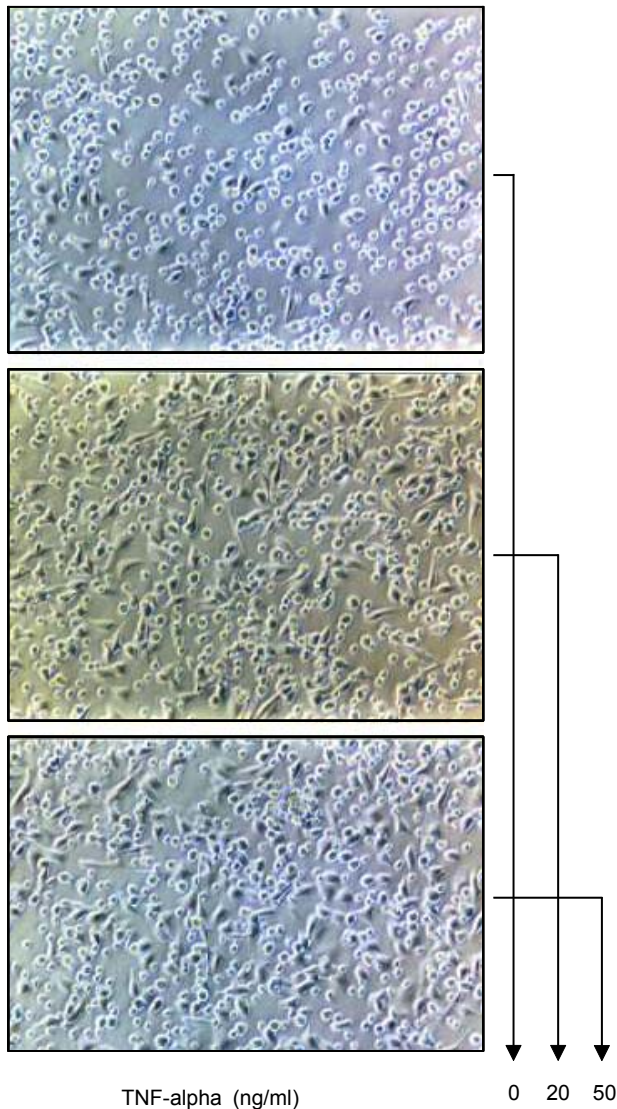


Figure 5. Activated macrophages from the late stage tumor environment. Peritoneal macrophages purified from the late stage tumor environment (11 days after intra-peritoneal melanoma cell line inoculation) were activated by the in vitro treatment of TNF- α for 48hrs.

microbead (MACS)를 이용하여 대식세포만 순수 분리하였다. 분리된 Mac1⁺ 대식 세포는 in vitro에서 주어진 TNF- α 에 의해 활성화된 형태를 보였다(Fig. 5). 염증성 복강 세포와 같이 종양 환경 내에서 분리된 대식세포도 IFN- γ 분비에 장시간의 자극(72 시간 배양)이 필요한 것을 확인하였다. 발암 초기와 후기의 종양 환경은 대식세

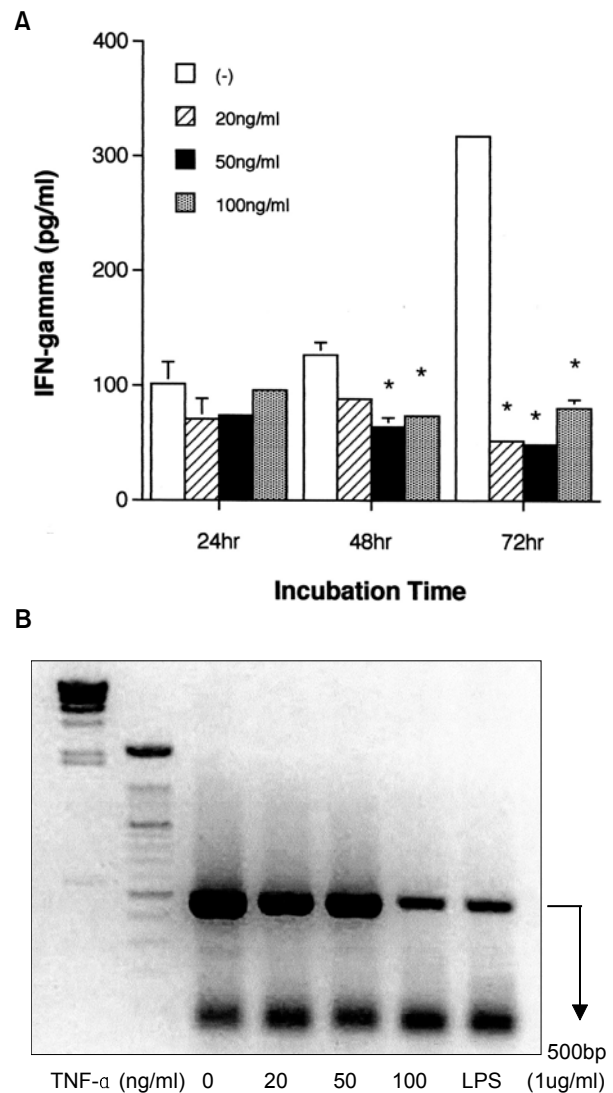


Figure 6. A. Production of IFN- γ from the macrophages in early stage tumor environment. Mac1⁺ macrophages were purified by the magnetic beads from the peritoneal exudated cells in early stage tumor environment (6 days after intra-peritoneal inoculation of melanoma cell lines). Cells were incubated with various concentrations of TNF- α for 24 to 72 hrs before the detection of IFN- γ in the supernatants by ELISA. Legends are expressed the concentration of in vitro added TNF- α . Asterisks indicate the significance ($P < 0.05$) compared to the control without TNF- α addition. B. Expression of IFN- γ mRNA in the peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages from early stage tumor environment (6days after intra-peritoneal melanoma cell line inoculation) were treated with TNF- α for 48 hrs to detect the IFN- γ gene expression by RT-PCR.

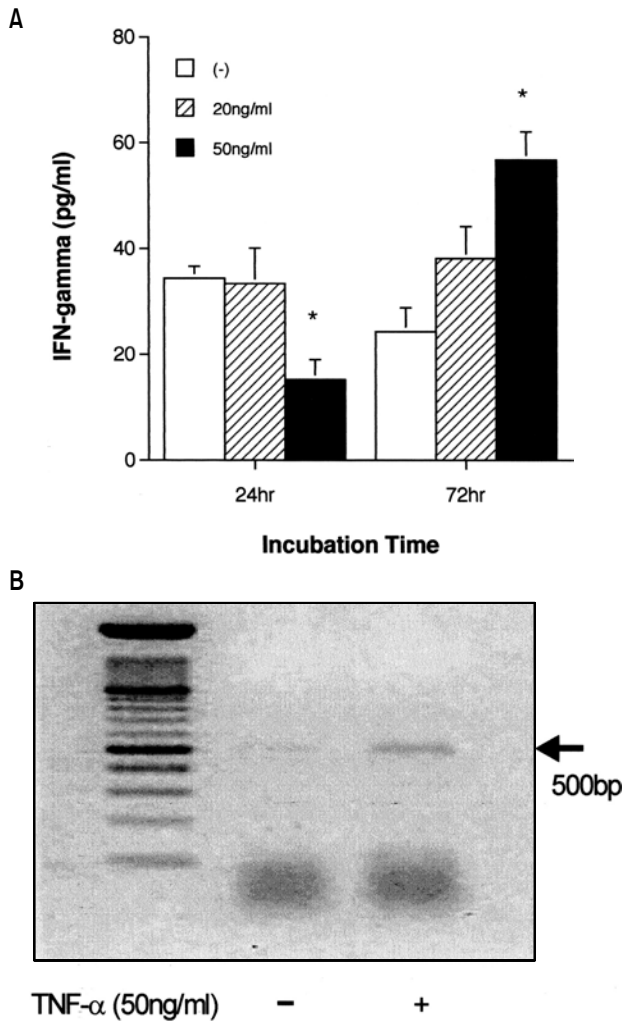


Figure 7. A. Production of IFN- γ from the macrophages in late stage tumor environment. Mac1 $^{+}$ macrophages were purified by the magnetic beads from the peritoneal exudated cells in early stage tumor environment (11 days after intra-peritoneal inoculation of melanoma cell lines). Cells were incubated with various concentrations of TNF- α for 24 to 72 hrs before the detection of IFN- γ in the supernatants by ELISA. Legends are expressed the concentration of in vitro added TNF- α . Asterisks indicate the significance ($P < 0.05$) compared to the control without TNF- α addition. B. Expression of IFN- γ mRNA in the peritoneal macrophages. Peritoneal macrophages from late stage tumor environment (11 days after intra-peritoneal melanoma cell line inoculation) were treated with TNF- α for 48 hrs to detect the IFN- γ gene expression by RT-PCR.

포가 분비하는 혈관 신생 관련 cytokine 분비에 상이한 영향을 미치는 것을 시사한다. 암세포를 복강 내 주사한 6일 후 순수 분리된 복강 대식세포는 TNF- α 에 의해 IFN- γ 의 분비가 억제되는 경향을 나타내었다(Fig. 6A). 이는 RT-PCR에 의한 IFN- γ mRNA의 변화 양상 관찰로도 확인하였다(Fig. 6B). 반면에 종양이 형성된 후기 환경으로부터 분리된 대식세포는 배양 시간 72시간에서 in

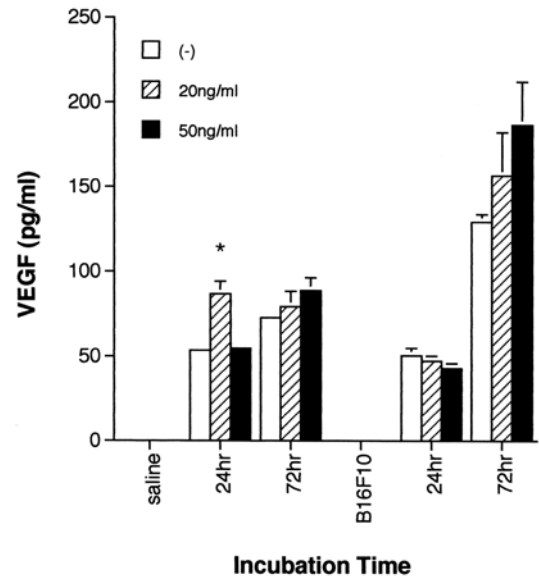


Figure 8. Production of VEGF from the macrophages in late stage tumor environment. Mac1 $^{+}$ macrophages were purified by the magnetic beads from the peritoneal exudated cells in early stage tumor environment (11 days after intra-peritoneal inoculation of melanoma cell lines). Cells were incubated with various concentrations of TNF- α for 24 to 72 hrs before the detection of VEGF in the supernatants by ELISA. Legends are expressed the concentration of in vitro added TNF- α . Asterisks indicate the significance ($P < 0.05$) compared to the control without TNF- α addition.

vitro로 가해진 TNF- α 농도에 비례하여 IFN- γ 를 분비하였다(Fig. 7A, 7B). 종양 형성 후기 환경의 대식 세포로부터의 VEGF의 분비도 IFN- γ 와 같이 TNF- α 에 의해 증가하는 경향이 관찰되었다(Fig. 8).

고 찰

종양 발생 및 성장을 조절하는 인자 중 혈관 신생과 관련된 물질들이 종양 환경내 대식세포, 암세포 혹은 내피세포 등에서 분비되는 것으로 알려져 있다. 이들 다양한 사이토카인 및 성장 인자들은 혈관 신생에 있어서 유도물질(TNF- α , VEGF, IL-8 등) 혹은 억제 물질(IFN- γ , IL-12 등)로 작용한다. 이들 유도 물질 및 억제 물질의 분비 총량에 의해 혈관 신생 과정의 on, off가 결정된다는 angiogenic switch 가설(5,6)은 여러 실험들에 의해 뒷받침되고 있다. 본 실험에서는 대표적인 혈관 신생 유도 물질인 TNF- α 에 의해 억제 물질인 IFN- γ 의 분비가 조절되는 것을 관찰하였다.

대식세포의 종양환경 내에서의 역할은 혈관 신생과 관련하여 중요성이 대두되고 있다. 즉 여러가지 혈관 신생 관련 사이토카인 및 성장인자를 분비하여 종양 형성 및 성장에 관여하는 것으로 알려져 있다(1). 종양 발생 및 성장 시기에 따라 종양환경 내에서 대식세포의 역할

차이의 가능성이 제시된 바 있으며 기존의 많은 실험들이 이를 뒷받침하고 있다(4). 본 연구의 결과 대식 세포에서 IFN- γ 가 생성되고, 이것은 TNF- α 에 의해 조절 받으므로 angiogenic switch의 역할을 일부 담당할 수 있으리라는 가능성을 확인하였다. 그러나 대식세포가 IFN- γ 를 분비하기 위해서는 TNF- α 자극 이전에 충분한 활성화 신호를 필요로 한다는 것을 복강 내 상주 비활성 대식세포에서의 IFN- γ 분비 실험을 통해 확인하였다(Fig. 1A, Fig. 1B). 염증성 반응 또는 종양환경이 대식세포가 TNF- α 의 조절을 통해 IFN- γ 를 분비하게 하는 1차 활성화 신호로 작용할 수 있음을 확인하였다.

대식세포로부터 분비되는 TNF- α 는 농도, 종양 생성 단계에 따라서 달라질 수 있으나 일반적으로 종양혈관 신생조절 유도제로(6,7) 알려져 있고 그와 반대로 IFN- γ 는 기존의 IFN- α , β 와 더불어 종양혈관 신생조절을 억제한다고 알려져 있다(12,13). TNF- α 는 ‘종양괴사인자’라는 말이 알려주듯이 종양세포의 괴사를 유발하여 종양의 성장을 억제시키기도 하지만 또 한편으로는 종양혈관 신생조절 유도제로서 오히려 종양의 성장을 일으키고 전이를 유도한다. Faiardo 등(19)의 보고는 TNF- α 의 처리시간이 짧거나 저농도일수록 종양혈관 신생을 유도하지만 처리시간이 길어지거나 고농도일수록 오히려 종양혈관의 신생이 억제되는 것을 밝히고 있다. 본 실험에서도 종양 발생 초기 환경으로부터 분리한 대식세포와 후기 환경으로부터 얻어진 대식세포가 종양 혈관 신생 관련 사이토카인분비 양상이 다른 것을 확인하였다(Fig. 6, Fig. 8). 이 같은 결과는 TNF- α 가 종양 성장 환경에 따라 성장과 억제의 양면성을 갖는 key cytokine임을 시사한다.

기존에 T세포 및 NK 세포에 의해 면역 활성화 인자로서 분비되어 항 바이러스 작용 등을 나타내는 것으로 알려져 왔던 IFN- γ 는 1990년대 후반 이후 대식세포에 의해서도 분비되며(9) 또한 종양 혈관 생성 억제 인자로서의 기능이 추가되는 것으로 밝혀지고 있다. 활성화된 쥐의 복강 대식세포에서 IFN- γ 가 분비되나 외부 자극인 TNF- α 에 반응하지 않는 것이 관찰되었고(Fig. 3), 쥐의 흑색종이 자라나는 환경 하에서 종양 미세 환경에 노출된 대식세포는 활성화된 상태로 *in vitro*에서 가해진 TNF- α 에 의해 IFN- γ 의 분비가 조절되는 것이 관찰되었다(Fig. 8).

복강 안으로 주입된 종양세포가 육안으로 확인되는 종양을 형성하지 못한 발암 초기와 종양이 형성되어 자라나는 후기의 종양 환경은 대식세포가 분비하는 혈관 신생 관련 사이토카인 분비에 상이한 영향을 미치는 것이 관찰되었다. 발암 초기 단계의 종양 환경에서 순수 분리된 복강 대식세포에서는 TNF- α 에 의해 IFN- γ 의 분비가 억제되는 경향을 나타내었다(Fig. 6). 반면에 종양이 형성된 후기 환경으로부터 분리된 대식세포는 *in vitro*로

가해진 TNF- α 농도에 비례하여 IFN- γ 를 분비하였다(Fig. 8). 이 같은 결과는 초기 발암 단계에서는 종양 혈관 신생을 촉진하기 위한 사이토카인 분비의 조절이 일어나며, 이미 종양이 형성된 후기 환경에서 대식세포는 과도한 종양 혈관 신생의 발현을 조절하는 역할을 담당하는 쪽으로 angiogenic switch를 조절할 가능성을 시사하고 있다. 본 실험의 결과는 TNF- α 가 angiogenic switch의 중심 인자로 작용할 수 있음을 시사하며, 그 작용은 대식세포 자체에서 분비되어 autocrine effector로서 작용할 가능성과, 종양 미세 환경 안으로 이동된 면역 세포 또는 종양 세포 자체로부터 분비되어 paracrine effector의 기전으로 작용할 수 있음을 시사한다.

TNF- α 에 의한 종양혈관 생성의 기전은 VEGF 등의 성장 인자 분비 자극과 관련이 되는 것으로 알려져 있다(6). 염증성 대식세포로 활성화된 복강 세포의 경우 VEGF의 분비는 IFN- γ 와 다르게 TNF- α 에 의해 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4). 그러나 *in vivo* 후기 종양 미세 환경에서 순수 분리된 대식세포는 *in vitro*에서 주어진 TNF- α 의 자극에 반응하여 VEGF 분비가 증가됨을 관찰하였다(Fig. 8). 종양 발생 후기 모델에서, TNF- α 의 자극이 IFN- γ 와 VEGF의 분비를 모두 증가시키는 상황은 angiogenic switch 조절에 있어 종양 환경 내의 대식 세포와 그에서 분비되는 TNF- α 의 역할이 중요함을 다시 한번 시사하는 것으로 생각된다. 종양 환경 내의 대식 세포에서 분비되는 사이토카인 간의 angiogenic switch에서의 상호 관계를 보다 직접적으로 확인하고 그 신호 전달 기전을 밝히기 위하여 연구가 계속 진행되고 있다.

참 고 문 헌

1. Haraguchi M, Miyadera K, Uemura K, Sumizawa T, Furukawa T, Yamada K: Angiogenic activity of enzymes (letter). *Nature* 368;198, 1994
2. Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM: Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science* 258;1798-1801, 1992
3. Madtes DK, Raines EW, Sakariassen KS, Assoian RK, Sporn MB, Bell GI: Induction of transforming growth factor- α in activated human alveolar macrophages. *Cell* 53;285-293, 1988
4. Joseph IBJK, Isaacs JT: Macrophage role in the anti-prostate cancer response to one class of antiangiogenic agents. *J Natl Cancer Inst* 90;1648-1653, 1999
5. Hanahan D, Folkman J: Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86;353-364, 1996
6. Christofori G: The role of fibroblast growth factors in tumor progression and angiogenesis. In *Tumor angiogenesis*, R Bicknell, CE Lewis and N Feara, eds. Oxford University press., 1996
7. Ryuto M, Ono M, Izumi H, Yoshida S, Welch HA, Kohno K, Kuwano M: Induction of vascular endothelial growth factor by tumor necrosis factor- α in human glioma cells: possible roles of Sp-1. *J Biol Chem* 271;28220-28228, 1996
8. Yoshida S, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki

- H, Kuwano M: Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis. *Mol Cell Biol* 17;4015-4023, 1997
 9. Gessani S, Belardelli F: IFN- γ expression in macrophages and its possible biological significance. *Cytokine & Growth Factor Review* 9;117-123, 1998
 10. Di Marzio P, Puddu P, Conti L, Belardelli F, Gessani S: Interferon γ upregulates its own gene expression in mouse peritoneal macrophages. *J Exp Med* 179;1731-1736, 1994
 11. Young H, Hardy K: Role of interferon-gamma in immune cell regulation. *J Leukoc Biol* 58;373-381, 1995
 12. Young H, Hardy K: IFN- γ ; producer cells, activation stimuli, and molecular genetic regulation. *Pharmac Ther* 45;137-151, 1990
 13. Micallef M: interleukin 18 induced a synergistic enhancement of interferone gamma production in mixed murine spleen cell-tumor cell culture: Role of endogeneous interleukin 12. *Cancer Detection and Prevention* 24(3);234-243, 2000
 14. Horton M, McKee C, Bao C, Liao F, Farber J, Hodge-DuFour J, Pure E, Oliver B, Wright T, Noble P: Hyaluronan fragments synergize with interferone-gamma to induce the C-X-C chemokines mig and interferone-inducible protein-10 in mouse macrophages. *J Biol Chem* 273;35088-35094, 1998
 15. Angiolillo A, Sgadari C, Tosato G: A role for the interferon-inducible protein 10 in inhibition of angiogenesis by interleukin-12. *Ann N Y Acad Sci* 795;158-167, 1996
 16. Bielenberg D, Bucana C, Sanchez R, Mulliken J, Folkman J, Fidler I: Progressive growth of infantile cutaneous hemangiomas is directly correlated with hyperplasia and angiogenesis of adjacent epidermis and inversely correlated with expression of the endogenous angiogenesis inhibitor, IFN- β . *Int J Oncol* 14;401-408, 1999a
 17. Bielenberg D, McCarty M, Bucana C, Yuspa S, Morgan D, Arbeit J, Ellis L, Cleary K, Fidler I: Expression of interferon- α is associated with growth arrest of murine and human epidermal cells. *J Invest Dermatol* 112;802-809, 1999b
 18. Beatty G, Paterson Y: IFN- γ dependent inhibition of tumor angiogenesis by tumor infiltrating CD4+ T cells requires tumor responsiveness to IFN- γ . *J Immunol* 166;2276-2282, 2001
 19. Fajardo L, Kwan H, Kowalski J, Prionas S, Allison A: Dual role of tumor necrosis factor- α in angiogenesis. *Am J Pathol* 140;539-544, 1992
-