원 저

대한신경과학회지 17(1):131~137, 1999 ISSN 1225-7044

사람 성상세포종 세포주에서 사이토카인에 의한 Fas 및 FasL mRNA의 발현 조절

연세대학교 의과대학 신경과학교실, 미생물학교실*

김옥준 · 임정희* · 최철희 · 최인홍* · 이병인 · 최일생

Regulation of Fas and FasL mRNA Expression in Human Astrocytoma Cell Lines by Cytokines

Ok-Joon Kim, M.D., Jung-Hee Lim*, Chul-Hee Choi, M.D., In-Hong Choi*, M.D., Byung-In Lee, M.D., Il-Saing Choi, M.D.

Department of Neurology, Department of Microbiology, College of Medicine, Yonsei University*

Background : Fas-mediated apoptosis is one of the major mechanisms of programmed cell death. Fas is a transmembrane protein of the nerve growth factor/tumor necrosis factor(TNF) receptor family which signals apoptotic cell death in susceptible target cells when it reacts with Fas ligand(FasL) or anti-Fas antibody. FasL, which belongs to TNF family, is mainly expressed on the surface of activated T lymphocytes and induces apoptosis of Fas-bearing cell. Astrocytoma is the most common brain tumor, which is usually fatal in its malignant form. Astrocytoma appears to progress without any significant impedance from the immune system, even if intratumoral T cell infiltrations are usually found. In the brain, it has been suggested that astrocytoma cells may potentially deliver a death signal to Fas-bearing cells which include infiltrating leukocytes as well as, paradoxically, astrocytoma cells themselves. **Methods & Results** : In this study, we show that all of the astrocytoma cell lines express both Fas and FasL, which is confirmed by reverse transcription-PCR. Pre-exposure to IFN-γ, IL-1 and TNF-αwere found to augment the expression of Fas and FasL. **Conclusions** : These findings suggest that FasL-induced apoptosis by astrocytoma cells may play a significant role in both the immunosuppression and the regulation of tumor growth within the central nervous system. And also cytokines might play a role in the induction of Fas and FasL in astrocytoma cells.
J Kor Neurol Ass 17(1):131~137, 1999

Key Words : Astrocytoma cell lines, Fas, FasL, Apoptosis, RT PCR

서 론

Fas 및 Fas ligand(FasL)는 성상세포종을 비롯한 여러 암세포에서 발견되는데 활성화된 T 림프구의 세포고사(apoptosis) 및 림프구의 제거에 관여하여 면역회피 기전의 하나로 작용할 것으로 생각되고 있다.[1,2] 즉 암세포에서 발현되는 FasL는 활성화된 림프구에 발현된 Fas와 결합함으로써 활성화된 림프구의 세포고사를 유발시키고 결국은 암조직내에 침윤한 림프구를 제거하는 기능을 할 것으로 생각된다.[1,2] 또한 암세포주에서 Fas의 발현 여부가 암세포주의 세포고사 정도를 변화 시킬 수 있는가에 대해서도 연구[3,4]가 진행 중 인데, 예로 Fas의 발현이 감소한 세포주의 경우에는 FasL를 통한 세포고사가 억제됨으로써 결국은 면역계로부터 벗어난다는 것이다.

따라서 본 연구에서는 중추 신경계의 종양 중 가장 많이 발생하는 성상세포종 세포주에서의 Fas 및 FasL의 발현 정도를 관찰하고 이들이 면역 반응조절에 관여하는 인자인 사이토카인의 처치에 따라 어떻게 변화하는지를 측정하려고 한다.

대상 및 방법

1.성상세포종 세포주의 배양 및 사이토카인의 처치

사람의 성상세포종 세포주는 Dr. E.G. van Meir(Department of neurosurgery, laboratory of Tumor Biology and Genetics, Lausanne, Switzerland)에게

Manuscript received October 9, 1998.
Accepted in final form November 24, 1998.
* Address for correspondence
Il-Saing Choi, M.D.
Department of Neurology,
Yonsei University, Shinchon-dong 134, Seodaemoon-ku,
C. P.O Box 8044, Seoul, 120-752 Korea
Tel : +82-2-361-5460 Fax : +82-2-393-0705
E-mail : neuro@yumc.yonsei.ac.kr
* 본 연구는 연세대학교 의과대학 연구위원회 연구비 보조에 의해 이루어졌음.

서 얻은 LN219, LN225, LN315의 세 종류 세포주를 사용하였다. 배양된 세포주의 일부를 trypsin 처리하여 ml당 1×10^5의 세포를 세포배양 plate의 6 well에 각각 분주하였다. 이중 3개의 분주에는 IFN-γ 200U/㎖을 처치하고, 3개의 분주에는 아무 처치 없이 18시간동안 배양하였다. 다시 이들 두개의 그룹을 대상으로 각각 무처치, IL-1 200U/㎖, TNF-α 750U/㎖(Genzyme, Cambridge, MI) 처치한 후 8시간 동안 배양하였다.

2. 총 RNA의 분리와 역전사 중합효소 연쇄반응(PCR)

사이토카인을 처치한 성상세포종 세포를 trypsin 처리하여 얻은 후, modified acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform 추출 방법을 이용한 RNeasy Mini kit(Qiagen, Santa Claris, CA)를 이용하여 총 RNA를 분리하였다. First-strand complementary DNA는 0.2 μg의 random hexanucleotide pri-mers(Pharmacia, Uppsala, Sweden)와 20 units의 Molony murine leukemia virus 역전사 효소(Gibco BRL, Grand Island, NY)를 이용하여 100ng total RNA $\mu\ell^{-1}$의 농도가 되도록 합성하였다. 이렇게 합성된 cDNA를 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR에 사용한 각 primer 염기서열은 Fas 5'-CGGAGGATTGCTCAACAAC-3' 5'-TTGGTATTCTGGGTCCG-3' FasL 5'-GTGCCCAGAAGGCCTGGTCAA-3', 5'-TTGCAAGATTGACCCCGAAGTAG-3', βactin 5'-CGTGGGCCGCCCTAGGCACCA-3', 5'-TTGGCCTTAGGGTCAGGGGGG-3' 이었으며, forward primer와 reverse primer를 각각 10 pg/㎖의 농도로 첨가하였다. PCR 조건은 Gene Amp PCR system 9600(Perkin Elmer, Brachburg, NJ)에서 각각 30회, 36회 및 26회 중합효소 연쇄 반응을 수행하였다.

3. 경쟁성 template의 합성

βactin, Fas와 FasL에 대한 경쟁적인 돌연변이 검체는 PCR MIMIC construction Kit(Clontech, Palo Alto, CA)을 이용하여 합성하였다. 원래의 primer에 20개의 염기를 첨가한 primers를 합성하여 PCR MIMIC construction Kit에서 제공한 DNA template와 함께 첫번째 중합효소 연쇄반응을 시행하였다. 첫번째 반응의 산물에서 사용되지 않은 primer와 nucleotide를 제거하였다. 이후에 원래의 primer와 이 산물을 같이 반응시킨 후 위와 같이 사용되지 않은 primer와 nucleotide를 제거하고 spectrophotometry를 이용하여 DNA의 양을 측정하였다.

4. 정량적 경쟁적 중합효소 연쇄반응(Quantitative competitive RT-PCR)의 표준화

βactin, Fas 그리고 FasL의 표준화를 위한 mutant template의 농도를 각각 10^4, 10^2, 10^{-1}attomole/μℓ에서 시작하여 희석된 농도를 사용하였다. 최종 표준곡선은 mutant template를 최적 농도로 고정시킨 후 대조군으로 사용된 cDNA를 각각 0.05, 0.01, 0.01에서 희석하며 반응을 시켰다(Table 1).

Table 1.

	Mutant template concentration(attmole)		
	βactin	Fas	Fas ligand
M1	10^4	10^2	5×10^{-2}
M2	5×10^2	5×10	10^{-2}
M3	10^2	10	5×10^{-3}
M4	5×10	5	10^{-3}
M5	10	1	10^{-4}
M6		0.5	

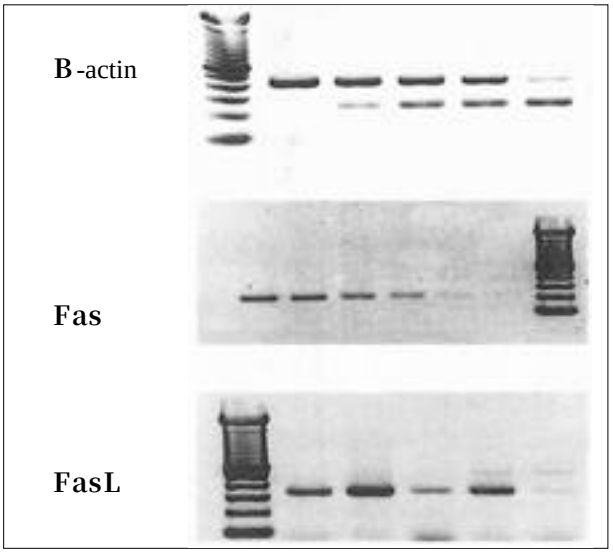

Figure 1. *Optimal mutant template and PCR results.(a)table for optimal mutant template concentration competed with β actin, Fas, FasL.(b)expression of βactin, Fas, FasL after QC PCR with variable mutant template concentration.*

5. βactin, Fas 그리고 FasL에 대한 정량적 경쟁적 중합효소 연쇄반응

βactin, Fas 및 FasL에 대한 PCR은 각각의 primer와 검체의 농도와 가장 유사한 최적 농도로 경쟁적 mutant template를 희석하여 시행하였다. PCR이 끝난 후 10μℓ의 반응 산물을 취해 1.5% agarose gel에서 전기 영동을 하였다. 이를 ethidium bromide로 염색한 후 UV하에서 각 band를 확인하였다. 각 band의 강도는 densitometric scanning image analyzer system(Genika, Germany)을 이용하여 분석하였다. Mutant band와 표적 유전자 band간의 비를 구하여 최종 검체의 cDNA 농도를 표준 방정식에서 구한 각 검체의 βactin cDNA 값에 보정하여 비교하였다.

결 과

1) QC RT-PCR의 표준화

배양된 세포주에서의 Fas 및 FasL의 발현 여부와 β actin, Fas와 FasL에 대한 mutant template의 최적 농도를 구하기 위하여 희석하면서 QC RT-PCR을 먼저 시

행하였다(Fig. 1). βactin 및 FasL의 경우에는 각각 M3, M5에 도달하였을 때, mutant 농도와 일치하여 이 지점을 경쟁적 mutant의 최적 농도로 정하였다. Fas는 잘 발현되지 않아 일치점을 찾을 수 없었으나, M6에서 미약하나마 band를 형성하여서 M6를 최적 농도로 정할 수 있었다.

다음 경쟁적 mutant template를 최적의 농도로 고정시킨 후에 세포주의 농도를 변화 시켜 가면서 경쟁적 중합효소 연쇄 반응을 시행하였다(Fig. 2). Fas 및 FasL의 경우 혼합 cDNA와 mutant template의 band간의 density를 비교하여서 표준화 방정식에 의한 직선을 얻어냄으로써, mutant template의 농도 변화에 따른, Fas의 발현 여부와 사이토카인 전처치에 따른 발현 증감 여부를 수치화할 수 있는 표준화를 시도하였다. 이를 통하여 Fas의 경우 M3로 정하였다.

2) 사람 성상세포종 세포주에서 사이토카인에 의한 Fas 표현 조절

LN215, LN229 그리고 LN319 세 종류의 세포주에서 Fas의 발현 여부와 IFN-γ, IL-1, TNF-α등의 사이토카인의 전처치에 따른 Fas 발현의 증강 정도를 관찰하였다(Fig. 3). 그 결과 사이토카인을 처리하지 않은 경우에도 모든 세포주에서 Fas가 발현되었다. LN215에서는 Fas의 발현이 IFN-γ에 의해서 가장 크게 증가하였고, IL-1, TNF-α에 의해서는 약간 증가되었다. LN229와 LN319에서는 Fas의 발현이 TNF-α에 의해 가장 많이 증가되었고 IFN-γ와 IL-1에 의하여 약간 증가하였다. 사이토카인의 혼합 처치에 의한 Fas 발현을 관찰하면 부가적 효과(additive effect)는 LN215의 IFN-γ+IL-1 처치군에서 관찰되었다. 상승효과(synergistic effect)는 LN215와 LN319의 IFN-γ+TNF-α처치군에서 뚜렷하게 관찰되었으며, LN319의 IFN-γ+IL-1 처치군에서도 약하게 관찰되었다. 그러나 LN229는 혼합 처치로 오히려 Fas의 발현이 감소 되었다.

3) 사람 성상세포종 세포주에서 사이토카인에 의한 FasL 표현 조절

LN215, LN229 그리고 LN319 세 종류의 세포주에서 FasL의 발현 여부와 IFN-γ, IL-1, TNF-α등의 사이토카인의 전처치에 따른 FasL 발현의 증강 정도를 관찰하였다(Fig. 4). 그 결과 사이토카인을 처리하지 않은 경우에도 모든 세포주에서 FasL가 발현되었다. LN319에서 IL-1에 의해 약간 감소되는 소견 이외에 세종류 세포주에서 단독처치로 FasL의 발현이 약간 증가 되었다. FasL의 발현은 IFN-γ+TNF-α를 혼합처치 하였을 때 LN215 에서는 부가적인 효과를 관찰하였고 LN229에서는 상승효과를 관찰하였다. IFN-γ+IL-1 혼합처치하면 LN215와 LN319에서 사이토카인을 처리하지 않은 군에 비하여 다소 증가하였으나 부가적 또는 상승효과를 분명하게 관찰할 수는 없었다.

고 찰

중추 신경계는 일반적으로 면역에 대한 특권이 있는 기관으로 잘 알려져 있다. 이러한 면역특권(immune-previlege)이 일어날 수 있는 기전은 첫째 내피 세포와 성상

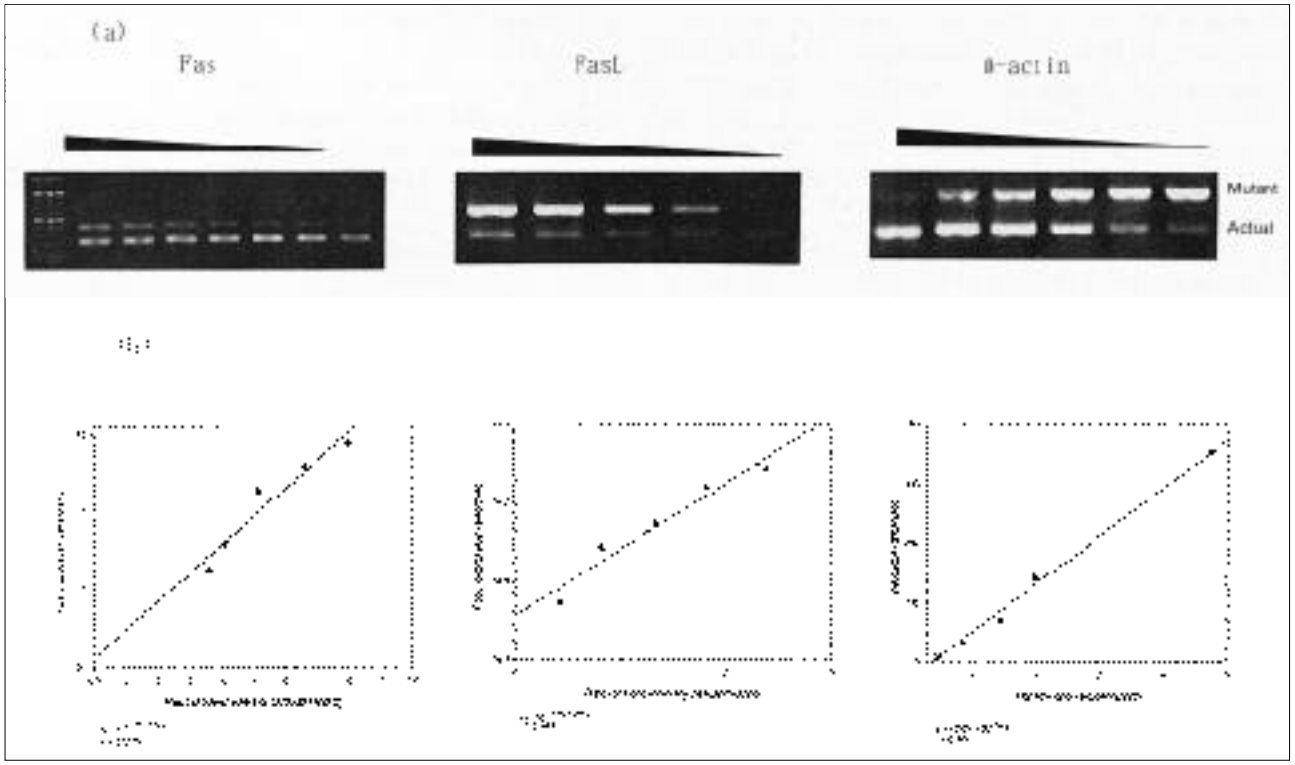

Figure 2. *Standarization for quantification of PCR products.(a)expression of βactin, Fas, FasL after QC PCR when fixed with optimal mutant template concentration.(b)standard curve for quantification through QC PCR*

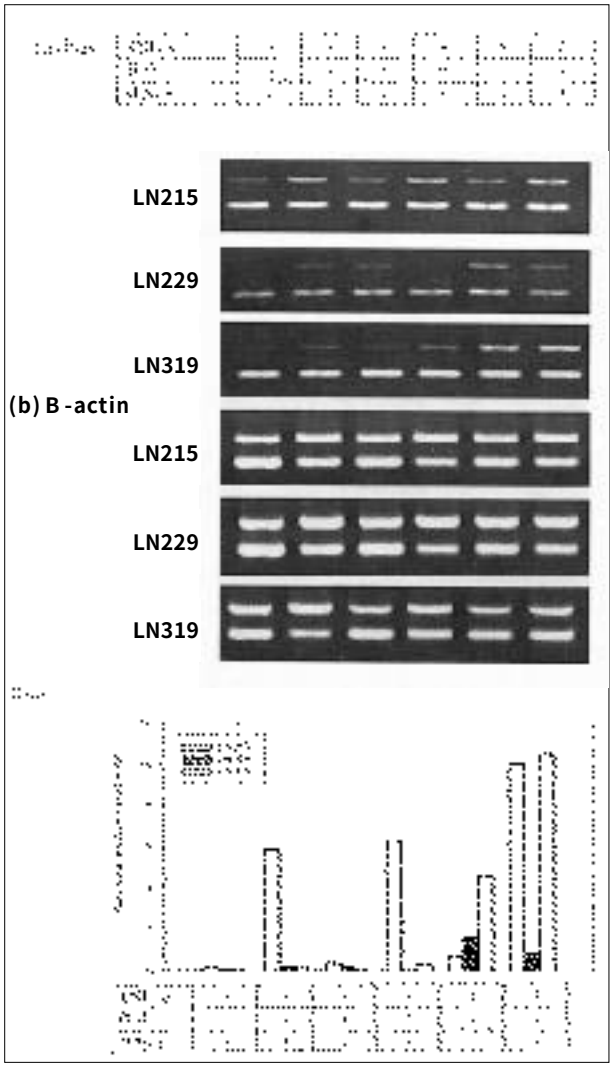

Figure 3. *Effects of cytokines on Fas expression in astrocytoma LN215, LN229, LN319. Change of Fas(a) and β actin(b) expression after treatment by various cytokines in LN215, LN229, LN319.(c) quantification graph of Fas and FasL expression in LN215, LN229, LN319. 200 μml IFN- γ was treated for 18 hrs. IL-1 200 μml or TNF- α750 μml was treated for 8hrs.*

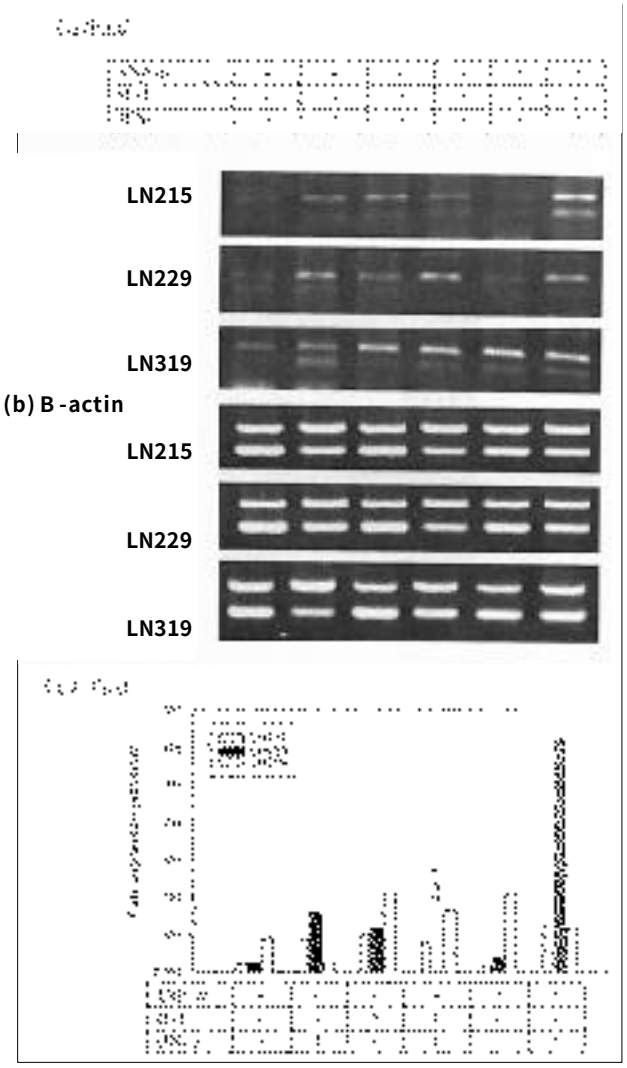

Figure 4. *Effects of cytokines on FasL expression in astrocytoma LN215, LN229, LN319. Change of FasL(a) and β actin(b) expression after treatment by various cytokines in LN215, LN229, LN319.(c)quantification graph of Fas and FasL expression in LN215, LN229, LN319. 200 μml IFN- γ was treated for 18 hrs. IL-1 200 μml or TNF- α750 μml was treated for 8hrs.*
**ND:not done*

세포로 이루어진 혈-뇌 장벽(blood-brain barrier)에 의해 혈중의 면역세포가 중추 신경계내로 이동하지 못하고 사이토카인도 차단되는 것이며, 둘째 중추 신경계내 림프관 배액 체계의 미발달로 인하여 상대적으로 면역학적으로 활성이 있는 세포가 적은 것으로 설명되어 왔다.[5] 그러나 실제로 림프구와 같은 면역세포들이 발견되므로 면역 회피를 유지할 수 있는 또 다른 기전으로는 MHC 분자의 미약한 발현, 적은 농도의 보체의 유지, 용해성 인자의 분비 등에 의한다고 한다.[6,7] 특히 성상세포종의 경우 PGE2의 분비, 활성형 TGF-β의 고농도 유지 등으로 설명되었으며,[8,9] 이러한 면역 반응의 부족이 뇌종양의 발생과 성장을 촉진 시킬 수 있을 것이라고 여겨져 왔다. 그러나 이러한 용해성 인자들만으로는 면역작용 회피를 설명하기는 힘들다. 특히 TGF-β는 항상 억제기능만 하는 것이 아니라, 경우에 따라서는 T림프구의 흥분 기능도 가지고 있기 때문이다.[10] 또한 TGF-β가 T림프구의 대뇌로의 이동을 감소 시킨다고 알려져 있지만,[7] 실제로는 성상세포종에서 림프구의 침윤이 흔히 발견[11-13]되기 때문에 설득력이 부족하다. 이와 같이 T림프구는 혈-뇌 장벽을 통과하여 종양세포 주위에 침윤되어 밀접한 관계를 하고 있는 데도 불구하고 성상세포종의 예후는 호전되지 않는다. 이것은 T림프구와 종양 세포간에 관계가 기능적으로 부적절하다는 것을 의미한다.

최근에 종양은 단순히 세포 증식이 증가할 뿐만 아니라 종양세포의 세포고사가 감소되어 발생된다고 한다.[3] 즉, 대부분의 악성 종양들은 숙주의 면역 방어 기전을 벗어나는 또 다른 기전를 가짐으로써 이차적인 성장이나 다른 곳으로의 전이 등을 일으키는 것으로 알려지고 있다. 더욱이 근래에 몇몇 암 조직이나 암 세포주에서 FasL가 발현되는 것이 관찰되었고 이러한 FasL의 발현으로 인해, 종양주위에

침윤되어 있으며 활성화된 Fas를 발현하는 T 림프구의 세포고사가 유도됨으로써 세포가 T 림프구의 세포독성 작용을 회피할 수 있다는 가설이 제시되고 있다.[1,2] 지금까지 악성 흑색종, 간암, 대장암, 폐암등에서 FasL의 발현이 보고되었고, 성상세포종의 경우도 종양조직에서 분리하여 배양한 CD4 또는 CD8 종양 침윤 림프구(tumor-infiltrating lymphocyte : TIL)와 성상세포종 세포를 함께 배양하였을 때 림프구의 세포고사가 유도됨이 보고된 바 있다.[14] 이에 중추 신경계의 종양 중 가장 많은 수(약 40%)를 차지하는 성상세포종에서 면역특권의 기능을 가능케 하는 FasL의 표현 여부 및 이의 수용기인 Fas의 발현 여부를 알아본 결과 세가지 성상세포종 모두에서 Fas 및 FasL의 발현을 관찰할 수 있었다.

Fas를 매개로한 세포고사는 programed cell death의 주요원인이다. Fas mRNA는 성상세포종에서도 발견이 되며 악성 정도가 심할수록 발견되는 횟수가 증가된다고 한다. Fas의 발현은 성상세포종 괴사중심부를 둘러싸는 주위에서 주로 발견되므로 괴사의 병인에 있어서도 중요한 역할을 할 것으로 추측된다.[15,16] 그리고 FasL를 발현하는 림프구에 의해서 세포고사가 유발되나 림프구가 국소적으로 발견되는 것으로 보아 세포고사의 정도는 아주 국한될 것으로 여겨진다. 성상세포종은 Fas 및 FasL 둘다 발현되므로 림프계 세포와의 접촉 없이도 Fas 및 FasL의 상호작용에 의한 autocrine suicide 혹은 fratricide(형제살해)의 기전에 의해서 종양의 성장을 조절할 수 있을 가능성도 있다.

Fas는 TNF/NGF 수용체 family에 속하고 cystein이 풍부한 세포막당단백질로,[17,18] 간, 난소, 심장, 피부, 흉선을 비롯한 여러 조직과 장기에서 발현된다.[19] FasL는 TNF family에 속하는 40kD type II 막단백 분자로서[20] 주로 활성화된 T, B림프구, NK세포의 표면에 발현되어 Fas를 발현하는 세포에서 세포고사가 일어나도록 유도하는 기능을 하며,[21] 안구의 지질 세포, 고환의 sertori 세포 등 면역특권 조직에서도 발현되어, 이들 조직에서 T림프구의 세포고사를 유도시켜 면역특권 상태를 유지하는데 관여한다.[2,22] 또한 암세포에서 발현되는 FasL는 위에서 언급 했듯이 T 림프구의 세포고사를 유도하여, 암세포사 T 림프구의 세포독성 작용을 회피할 수 있다고 여겨진다. FasL는 정상적으로 세포막에 존재하는데 metalloproteinase의 작용에 의하여 세포외로 유리되기도 하여 전격성 간염(fulminant hepatitis)을 비롯한 몇몇 질환에서는 혈청내 FasL의 농도가 증가하기도 한다. Fas와 FasL는 어른쥐의 조직중, 흉선, 폐, 비장, 소장, 대장, 정낭선, 전립선, 자궁에서 함께 발견이 되며,[19] 이들 조직중의 일부는 세포고사가 활발하게 일어나는 곳으로, Fas 및 FasL가 생리학적인 세포교체기 동안 세포고사에 관여하지 않나 생각된다. 신경과 영역에서는 다발성 경화증의 판(plaque)에 있는 신경교 세포에서 둘다 발견되었는데 희돌기교세포(oligondendrocyte)의 세포고사를 유발시켜서 탈 수초화를 유도하는데 관여한다고 알려져 있다.

Fas/FasL에 의한 세포죽음 경로는 perforin, granzyme 경로와 함께 세포독성 T 림프구의 주요 세포독성 기전이며, T 림프구의 활성화에 의해 유도되는 T 림프구 자신의 세포고사에도 관여한다.[23] FasL가 Fas에 결합하면 세분자의 Fas가 trimer를 형성하고 Fas 세포내의 death domain에 adaptor 분자인 FADD(Fas-associated death domain)가 결합하며,[24] 이에 따라 FLICE (FADD-like interleukin-1-converting enzyme, caspase-8)가 oligomer를 만들어 단백 분해 활성이 증가하고,[25] caspase cascade를 활성화하게 된다. 결과적으로 활성화된 caspase들은 poly(ADP) ribose polymerase(PARP), lamin, rho-GDI, actin등의 기질을 분해하여 세포고사의 과정을 밟게 된다.[26,27]

Fas를 매개한 세포고사는 실제로 종양 부위의 환경, 예를 들면, 저산소증, 사이토카인 등에 따라서 영향을 받을 수 있다. IFN-γ는 위암, 대장 직장암등에서, TNF-α는 대장 직장암에서, IL-1β는 평활근 세포 등에서 Fas의 발현을 증가 시킨다고 한다. 그러나 이들을 함께 주었을 때 부가효과만 있지 상승 효과은 발견되지 않았다.[3] 또한 INF-γ, TNF-β는 Fas의 발현을 증가 시켜서 항 Fas 항체에 대한 감수성을 증가 시켜 세포고사를 촉진 시키기도 한다.[3,4] 이와 같이 Fas를 매개한 세포 고사는 세포 표면의 Fas의 표현의 정도와 비례한다. 즉, Fas 항체에 대한 성상세포종의 저항성은 주로 Fas의 표현 정도와 관련이 있지 항세포고사성 종양유전자인 bcl-2의 과표현과는 관련이 없다.[3] IL-2는 NK세포와 primary murine splenic lymphocyte에서 FasL의 발현을 증가 시킨다. 사이토카인 뿐만 아니라 화학약물요법, 방사선요법 등에 노출시 표적 세포에서의 세포고사가 촉진 되기 때문에 이러한 혼합치료 요법이 고려될 수도 있다.[28,29] 우리의 실험에서도 Fas의 발현이 모든 세포주에서 사이토카인의 처치로 정도의 차이는 있지만 증가 되었고, 특히 LN215는 IFN-γ에 의해, LN229 와 LN319는 TNF-α에 의해 크게 증가 되었다. IFN-γ과 다른 사이토카인을 혼합하여 처치 하였을 때 단독 처치에 비하여 LN215, LN319에서 Fas 발현이 더 증가 되므로 부가적 효과 및 상승 효과가 있음이 관찰되었다. FasL의 경우에 있어서는 기존의 보고와는 달리 IFN-γ, IL-1, TNF-α에 의해서 표현이 증가 되는 소견을 관찰할 수 있었다. IFN-γ+TNF-α 혼합 처치로 LN215와 LN229에서는 FasL의 발현이 증가 되었고, LN319는 변화가 없었다. IFN-γ+IL-1 혼합 처치군은 LN215 와 LN319에서 IL-1이나 TNF-α 단독 처치군에 비하여 감소 되는 소견을 관찰 하였다. 본 연구에서 사용한 사이토카인에 의하여 Fas나 FasL 분자 발현이 대부분 증가되는 양상을 보였으나 세포주에 따라 사이토카인 혼합처치에 의하여 단독 처치군보다 오히려 감소되는 경우도 있었다. 이와 같이 세포주에 따라서도 반응이 다르기 때문에 성상세포종에서도 일관되게 유사한 반응이 일어나리라고 제시하기는 무리가 있으나 사이토카인에 의하여 Fas나 FasL분자의 발현이 조절될 가능성은 있다고 생각된다.

한편 성상세포종에서 Fas 및 FasL의 동시 발현이 세포

고사를 유발할 만큼 충분하지는 않은 것 같다. 이는 비기능성 Fas의 발현 혹은 Fas 및 FasL 반응후에 따르는 death signal transduction에 영향을 주는 다른 인자 때문일 가능도 있다. 그러나 Fas의 과표현이 유도된다면, FasL를 발현하는 성상세포종에 의해서 세포고사가 일어날 수 있을 것이다. 이러한 것이 Fas유발 자극에 의해 갑자기 급속히 일어나면, 종양세포의 괴사를 유발시킬 수도 있다[15]. 그러므로 실험상 확인된 Fas발현을 유도함이 사이토카인으로 전처치 하여서 Fas의 발현을 증가 시킨 후 종양의 세포고사를 유발시키는 방법이 응용될 수도 있을 것이다.

최근에 Fas를 이용한 세포고사 유발 방법이 실험 단계에 있으나 만족 스럽지는 못하다. 쥐에서 항-Fas 항체의 주입하여 보았지만, 심각한 간세포의 손상을 유발시켰다. 왜냐하면, 정상 간세포에서도 Fas를 발현하기 때문이다[30]. 그러므로 사람에게 치료목적으로 항-Fas항체의 전신적 주입은 심각히 고려해야 한다. 백혈병 세포주에 doxorubicin을 처리하거나, 간암 세포주에 bleomycin을 처리함으로써 FasL의 발현이 유도되는 것이 보고되었으나[2,31], 기존의 암세포가 Fas를 발현하지 않는다면 오히려 T 림프구의 세포고사를 유도시킬 수 있어 숙주의 면역작용을 회피하는 기전으로 이용될 수 있다. 이식편(graft)에서 FasL를 강하게 발현시켜 이식해 줌으로써 이식편에 침윤된 T 림프구의 세포고사를 유도하고 거부반응을 막아 보려는 시도가 있었다. 하지만 그 결과는 FasL를 강하게 발현하는 이식편에는 중성백혈구의 침윤이 증가하고 거부반응이 일어났다.[32] 이러한 보고들을 종합하여 볼 때, Fas 및 FasL를 통한 치료법의 개발은 더 많은 시행착오가 필요할 것으로 생각되나, 암세포에서 Fas 및 FasL가 발현되는 것은 종양면역학적으로 매우 흥미로운 일이며, 종양의 면역치료와 관계되어서도 중요한 의미를 차지한다. 또한 앞으로 실제 환자의 수술 검체에서 이러한 물질들의 발현을 조사함으로써 환자의 예후 및 치료의 결정에도 도움을 줄 수 있을 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Hahne M, Renno T, Schroeter M, etc. Activated B cells express functional Fas ligand. *Eur J immunol* 1996;26: 721-724.
2. Strand S, Hofmann WJ, Hug H, etc. Lymphocyte apoptosis induced by CD95(Apo-1/Fas) ligand-expressing tumor cells-a mechanism of immune evasion? *Nat Med* 1996; 2:1361-1366.
3. Weller M, Frei K, Groscurth P, Krammer PH, Yonekawa, Fontana A. Anti-Fas/APO-1 antibody-mediated apoptosis of cultured human glioma cells. *J Clin Invest* 1994;94: 954-964.
4. Saas P, Walker PR, Hahne M, etc. FasL expression by astrocytoma in vivo:maintaining immune privilege in the brain? *J Clin Invest* 1997;99:1173-1178.
5. Baker CF, Billingham RE. Immunologically privileged sites. *Adv Immunol* 1977;25:1-54.
6. Cserr HF, Knopf PM. Cervical lymphatics. The blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain:a new view. *Immunol Today.* 1992;13:507-512.
7. Fabry Z, Topham DF, Fee D, etc. TGF-β2 decreases migration of lymphocytes in vitro and homing of cells into the central nervous system in vivo. *J immunol* 1995;155: 325-332.
8. Bodmer S, Strommer K, Frei K, etc. Immunosuppression and transforming growth factor-βin glioblastoma. Preferential production of transforming growth factor-β2. *J Immunol* 1989;143:3222-3229.
9. Fontana A, Kristensen F, Dubs R, Gemsa D, Weber E. Production of prostaglandin E and an interleukin-1 like factor by cultured astrocytes and C6 glioma cell. *J Immunol* 1982;129:2413-2419.
10. Rich S, Seelig M, Lee HM, Lin J. Transforming growth factor β1 constimulated growth and regulatory function of staphylococcal enterotoxin B-responsive CD 8+ T cells. *J immunol* 1995;155:609-618.
11. Burger PC, Scheithauer BW. *Tumors of the central ner - vous system*. Armed Forces Institite of Pathology: Washington, DC 1994.
12. Kuppner MC, Hamou MF, Tribolet ND. Immunohistological and functional analyses of lymphoid infiltrates in human glioblastoma. *Cancer Res* 1988;48: 6926-6932.
13. Rossi ML, Hughes JT, Esiri MM, Coakham HB, Brownnell D. Immunohistological study of mononuclear cell infiltrate in malignant gliomas. *Acta Neuropathol* 1987; 74:269-277.
14. Walker PR, Saas P, Dietrich PY. Role of Fas ligand(CD95L) in immune escape:the tumor cell strikes back. *J Immunol* 1997;158:4521-4524.
15. Gratas C, Tohma Y, Meir EGV, etc. FasL Expression in glioblastoma cell lines and primary astrocytic brain tumors. *Brain Pathology* 1997;7:863-869.
16. Tachibana O, Nakazawa H, Lampe J, Watanabe K, Kleihues, Ohgaki H. Expression of Fas/APO-1 during the progression of astrocytoma. *Cancer Research* 1995;1: 5528-5530.
17. Cheng J, Liu C, Koopman WJ, Mountz JD. Characterization of human Fas gene. Exon/intron organization and promotor region. *J Immunol* 1995;154:1239-1245.
18. Nagata S, Golstein P. The Fas death factor. *Science* 1995;267:1449-1456.
19. French LE, Hahne M, Viard I, etc. Fas and Fas ligand in embryos and adult mice:ligand expression in several immuno-privileged tissues and coexpression in adult tissues characterized by apoptotic cell turnover. *J Cell biol* 1996;133:335-343.
20. Takahashi T, Tanaka M, Inazawa J, Abe T, Suda T, Nagata S. Human Fas ligand:gene structure, chromosomal location and species specificity. *Int Immunol* 1994;6: 1567-1574.
21. Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular

cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell* 1993;75:1169-1178.

22. O'Connell J, O'Sullivan GC, Collins JK, Shanahan F. The Fas counterattack: Fas-mediated T cell killing by colon cancer cells expressing Fas ligand. *J Exp Med* 1996;184: 1075-1082.
23. Dhein J, Walczak H, Baumler C, Debatin KM, Krammer PH. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1(Fas/CD95). *Nature* 1995;373:438-441.
24. Chinnaiyan AM, O'Rourke K, Tewari M, Dixit VM. FADD, a novel death domain-containg protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 1995;81:505-512.
25. Muzio M, Chinnaiyan AM, Kischkel FC, etc. FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95(Fas/APO-1) death-inducing signalling complex. *Cell* 1996;85:817-827.
26. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell* 1997;88:355-365.
27. Schlegel J, Peter I, Orrenius S, etc. CPP32/Apopain is a key interleukin 1 β converting enzyme-like protease involved in Fas-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 1996;271:1841-1844.
28. Barry MA, Behnke CA, Eastman A. Activation of programmed cell death(apoptosis) by cisplatin, other cancer drugs, toxin and hyperthermia. *Biochem Pharmacol* 1990;40:2353-2362.
29. Sen S, D'Incalci M. Apoptosis. Biochemical events and relevance to cancer chemotherapy. *FEBS Lett* 1992;307: 122-127.
30. Ogasawara J, Fwatanabe-FukunageR, Adachi M, etc. Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature(Lond.)* 1993;364:806-809.
31. Friesen C, Herr I, Krammer PH, Debatin KM. Involvement of the CD95(APO-1/Fas) receptor/ligand system in drug induced apoptosis in leukemia cells. *Nat Med* 1996;2:574-577.
32. Kang SM, Schneider DB, Lin Z, etc. Fas ligand expression in islets of Langerhans does not confer immune privilege and instead targets them for rapid destruction. *Nat Med* 1997;3:738-743.