

Angiogenesis 억제 물질 개발 및 전망

권 병 목

KIST 생명공학연구소

전세계적으로 암을 정복하고자하는 노력은 수십년 전부터 시작되었으며 천문학적인 숫자의 연구비가 투입되었다. 그러나 불행하게도 암은 아직도 매년 수백만 명의 생명을 빼앗아가는 재앙으로 남아있다. 왜 많은 노력과 연구비가 투입되었음에도 불구하고 치료제로서의 항암제는 개발되지 못했는가? 그 이유는 여러 가지 측면에서 찾아 볼 수 있을 것이나, 무엇보다도 가장 큰 이유는 암의 발병기작이 명확히 밝혀져 있지 않기 때문이라 것과 암발생의 원인에 노화와 매우 복잡한 환경요인이 관여한다는 사실에 있다고 볼 수 있다. 그리고 암은 체외에서 감염되는 것이 아니라 정상세포가 암세포로 변화하는 것이므로 초기에는 암세포와 정상세포의 구별이 불가능하다는 것이 암정복이 늦어지는 이유중 하나이다. 항암제 개발 전략 측면에서 그 원인을 찾아본다면 상당히 오랫동안 세포독성위주의 탐색에 연구의 주안점을 두었기 때문에 개발된 각종 항암제들이 많은 부작용을 수반하는 화합물들일 수밖에 없었지 않았나 사료된다. 그러므로 앞으로는 특이 표적을 목표로 하는 항암제 개발전략이 필요하다고 할 수 있다.

이 지면을 통하여 최근에 많은 관심을 일으키고 있는 angiogenesis(신생혈관이 유도되는 현상)억제를 통한 항암제 개발 동향과 전망 등에 대하여 기술하고자 한다.

Angiogenesis

신체의 맥관은 맥관 내막(intima), 중간막(media), 외막(adventitia)으로 구성되어 있으며 구조나 기능 면에서 서로 완전히 다른 특징을 가지고 있다. 맥관 내막은 내피세포(endothelial cell, EC)의 단일층, 내피하막, 내측의 탄력막으로 구성되며, 중간막은 평활근 세포(smooth muscle cell), 그리고 외막은 모세혈관과 결합조직으로 구성되어있다. 이들 구성 성분중 내피세포(EC)의 단일층이 혈액과 직접 접촉하는 부분이며 혈관의 형성 및 성장에 중요한 인자를 포함하고 있는 부분이다. 그리고 내피세포는 자극을 받으면 모든 세포 중에서 가장 빠르게 증식하는 세포이다. 내피세포(EC)의 성장은 혈관의 재생산, 치유 및 형성시 일어나며 이들중 신생혈관 형성을 유인하는 과정을 Angiogenesis 또는 neovascularization이라 하며 일반적으로 angiogenesis라는 용어를 주로 사용하고 있다. 기존의 혈관으로

부터 새로운 혈관이 형성되는 과정으로, 정상적으로는 발생(embryonic development, female reproductive cycle), 성장 그리고 상처 치유시 필수적인 뿐 아니라, 각종암, 관절염, 당뇨병성 망막증, 죽상경화증 등의 질병과도 깊은 관련을 맺고 있다. 특히 악성종양으로 발전하는 과정중의 하나인 암의 전이시 angiogenesis는 필수적인 과정으로 여겨진다. Angiogenesis는 위와 같이 양면성을 가지고 있어서 이에 대한 연구 역시 이것을 억제하는 물질 탐색과 촉진하는(상처의 치료촉진제) 물질 탐색으로 진행되고 있으며 몇 가지의 억제제는 항암제로서의 활성검증을 위하여 임상 시험중인것도 있다(1).

Angiogenesis 매우 복잡한 과정을 거쳐서 일어나는 현상이며 아직도 완벽한 기전이 밝혀져 있지 않다. 그 과정은 크게 ①포테아제에 의한 기초 막의 분해, ②내피세포의 전위, ③내피세포의 성장, ④모세관의 형성 등으로 나눌수 있으며 각 과정에 다양한 인자들이 관여한다. 1995년 현재까지 지금 angiogenic peptide들이 발견되었으며 몇가지들은 내피세포의 전위, 성장 및 맥관형성에 직접적으로 관여하기도 한다. 이외에도 간접적으로 신생혈관 유도에 관계가 있는 펩타이드도 밝혀지고 있다. 이들 인자들에 관해서는 다음 장에서 좀더 자세히 알아보려한다.

Angiogenesis와 암전이

암이 생명에 위협이 되는 가장 큰 원인은 암세포의 전이능이다. 즉, 어떤 부위에 발생한 암이든지 생장부위만 찾으면 외과적 수술에 의하여 제거하는 것은 어렵지 않다. 그러나 암치료에서 이러한 외과적 치료술이 한계를 가질 수밖에 없는 이유는, 암세포가 원발부위 이외의 여러 곳에 퍼져 나가기 때문에 극히 제한된 초기 시기에만 수술이 완치를 기할 수 있기 때문이다. 최근의 조사에 의하면 수술에 의해서 암조직을 제거 받은 암환자의 50% 이상이 암세포의 전이 때문에 완치를 보지 못하고 있다고 밝혀졌다. 그리고 어떤 경우에는 외과적 수술이 암전이를 자극하여 암을 악화시키는 경우도 보고되고있다. 이런 위협적인 암전이 과정은 매우 복잡한 기전을 수반하는 여러과정을 통하여 이루어지며 이들 과정 중에서 필수적인 요소가 신생혈관의 형성이다. 왜냐하면 외부로부터의 영양과 산소공급이 없는 상태에서는 대부분의 암세포는 직경 1mm 이상을 자라지

못하며, 다른 곳으로 전이되지도 못한다. 암세포와 같이 빠르게 성장하는 세포에 영양을 공급하기 위하여 신생혈관이 형성되어야 하며 앞에서 언급한 것과 같이 이런 현상을 angiogenesis라 하고 암세포가 성장하는 데에 필수적인 요소이다(2).

미국의 Folkman 등의 노력으로 암세포 전이과정에 angiogenesis가 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀지고, angiogenesis를 저해하는 angiogenic factor의 존재도 밝혀졌다. 그리고 angiogenic factor 중의 하나인 Angiostatin은 폐암세포의 전이와 성장을 막는다는 것이 1994년에 발표되었다(3). 이와 같은 사실들은 암연구의 초기에는 암세포는 혐기성 호흡을 하는 조직으로서 이해되기도 한 것과는 달리, 암세포의 성장에는 산소와 영양소 공급이 절대적이라는 것을 보여주는 것이다. 그러므로 angiogenesis 저해제를 개발한다면 기존의 항암제가 보여주는 부작용 등을 극소화한 새로운 항암제의 개발이 가능하리라 사료된다.

Angiogenesis 조절인자

세포내의 여러 신호전달 단백질들이 활성화 인자와 저해인자들에 의해서 조절되듯이 Angiogenesis도 신생혈관을 유도하는 인자와 저해하는 인자에 의해서 조화있게 조절되고 있다. 이들 과정의 조절인자들의 역할 등을 규명한다면 새로운 항암제 개발을 위한 좋은 표적을 찾을 수 있을 것이다. 이들 조절인자를 활성화 인자와 억제인자로 구별하여 정리해 보면 다음 표 1과 같다. 유도인자중 대표적인 angiogenin은 결장암의 세포배양액으로부터 분리되었으며 123개의 아미노산으로 구성되어 있고, 내피세포와 작용하여 포스포리파제 C (PLC)로 하여금 인지질을 가수분해하여 세포내에 1,2-다이아실그리세롤을 증가시킨다는 것이 알려져있다. 그러나 PLC와 신생혈관유도간의 관계는 불분명한 상태이며, 다만 일반적으로 조직에 손상이 오면 신생혈관이 손상부위에 생겨 자연치유를 증가시킨다. 또 하나의 중요 인자는 성장조절 인자(growth factors)들이며 섬유아세포 성장인자(FGF)는 발생, 상처 치유, angiogenesis, tumorigenesis(종양형성) 등에 중요한 역할을 한다. 종양세포에서는 매우 빠르게 자라고 정상세포에서는 그렇지 않은 내피세포의 성장을 조절하는 성장인자인 bFGF의 항체가 암세포의 성장을 급격히 감소시킨다는 연구결과가 발표되었다. 그리고 혈관내피세포 성장조절 인자(VEGF)등도 악성 종양의 신생혈관 형성에 관여한다고 알려지고 있다. Table 1에서 보듯이 이외에도 많은 성장조절인자들이 angiogenesis에 관여 한다. 단백질이 아닌 혈관형성유도인자(angiogenic factor)로는 Okadaic acid, Phorbol 12-Myristate 1-acetate(PMA) 등이 있는데, PMA는 0.2 nM 이하의 작은 농도에서도 혈관형성을 활성화시킨다. 한편, 종양증식인자 (TGF-β)와 종양괴사 인자(TNF-α) 등은 모세혈관의 유도에도 관여하지만 신생혈관 형성을 저해하는 반

Table 1. Angiogenesis 조절인자

Stimulating Factors	Inhibitory Factors
Acidic FGF	Angiostatin
Angiogenin	Cartilage-derived inhibitor
bFGF	Heparinase
Heparinase	IFN α
Hepatocyte growth factor	IFN β
Interleukin-8	Platelet factor 4
Placenta growth factor	Prolactin fragment
Platelet-derived endothelial cell growth factor	Protamine
Pleiotropin	Thrombospondin
Prostaglandins E ₁ , E ₂	Tissue inhibitor of metalloproteinase
Transforming growth factor α	Transforming growth factor β
Transforming growth factor β	Tumor necrosis factor α
Tumor necrosis factor α	
Vascular endothelial growth factor	
Vascular permeability factor	

응인 내피세포의 성장을 억제하는 역할도 한다고 알려지고 있다. 다음으로 억제인자들에 대하여 알아보자. 대표적인 억제인자인 인터페론 알파는 신생아에 치명적인 허파의 혈관종을 막아주는 치료제로 사용되고 있으며, 헤파린과 강력하게 결합하는 platelet factor 4는 FGF와 같은 성장인자들이 수용체에 결합하는 것을 방해하여 궁극적으로 angiogenesis를 억제한다고 밝혀졌다. 강력한 억제 인자 중의 하나인 Angiostatin은 분자량이 39-kD이며 폐암의 전이등을 강력하게 억제하는 활성을 보여주고 있다. 위와 같은 연구결과로 보아 정상세포내에서는 유도인자와 억제인자가 조화를 이루고 있으나 암화 과정에서 이 조화가 파괴되어 암세포에서는 신생혈관 유도인자가 활성화되어 암의 전이가 촉진된다고 할 수있다. 그러므로 암의 성장과 전이를 저해하기 위해서는 이와 같은 신생혈관의 생성을 억제함으로써 치료효과를 기대할 수도 있다(4).

Angiogenesis 저해제 탐색법

저해제 탐색법 Angiogenesis의 반응기전은 매우 복잡하여 이를 저해하는 방법도 매우 다양하며 크게 기초막의 분해 반응 저해제, 세포의 전이 억제 그리고 내피세포의 성장 억제제 등이 있으며 이들 각각의 저해제 탐색을 위해서는 이 과정에 관여하는 특이 표적을 확인하여야 한다. 그러나 아직도 미확인 부분이 많기 때문에 이와 관련된 특이 표적을 목표로하는 탐색제의 개발을 위해서는 보다 많은 연구가 요구되고 있다. 지금 현재 일반적으로 사용하고 있는 탐색법으로는 chick embryo를 이용한 CAM(chorioallantoic membrane) assay와 rabbit 또는 rat를 이용하는 cornea assay가 있다. 이 두 가지 방법중 CAM assay는 비용이 적게 들고 특별한 기술이 필요하지 않으며 많은 양의 시료를 한꺼번에 처리할 수 있다는 장점 때문에 널리 이용되고

있다. CAM을 이용한 탐색법을 소개하면 다음과 같다. 가장 많이 쓰이는 탐색법은 thermanox 위에 시료를 점적한 후 건조시켜 CAM 위에 이식하거나, 일정한 크기의 nylon mesh위에 시료가 함유된 collagen을 점적하고 gel화시킨 다음 CAM위에 이식하여 angiogenesis를 억제하는 정도를 측정하여 검색한다. 실험법을 구체적으로 기술하면, 유정란을 구입하여 37°C, 습도 65~R75%가 유지되는 배양기에서 배양한다. 배양기에 넣은 날을 0일 배로 하고 3일 배에 계란의 끝부분에 구멍을 내어 약 3 ml의 albumin을 제거한다. 4일 배에 공기주머니가 있는 쪽으로 약 3 cm 크기의 원형 창문을 낸 후 공기주머니 아래쪽에 있는 막을 제거한 다음, 유리테이프로 구멍을 막는다. 유정란의

CAM 위에 collagen gel이 놓여있는 bottom mesh(8×8 mm)를 이식하고, 그 위에 top mesh(4x4mm)를 얹는다. 다시 유리테이프로 구멍을 막은 후 신생된 혈관의 형성을 해부 현미경(×30)으로 관찰한다. Angiogenesis 억제제를 검색하기 위해서는 억제제를 함유하는 collagen gel을 만들어 20 μl씩 점적한 후 배양하면서 신생혈관의 형성을 관찰하여 억제여부를 결정한다(5).

Angiogenesis 저해제

지금까지 알려진 Angiogenesis 저해하는 물질들을 Table 2와 3에 정리하여 보았다. 이 들중 고분자의 저해제들은 이미 언급

Table 2. Angiogenic inhibitors (Macromolecules)

Inhibitors	<i>In Vitro</i>	<i>In Vivo</i>
Interferon α-2a	Inhibits EC migration	Clinical treatment of pulmonary haemangioendotheliomas
Platelet factor 4	Down regulates aFGF receptor, Inhibits EC proliferation and capillary formation	Inhibits tumor-induced angiogenesis, Clinical cancer trials for rPF-241 ongoing
Interferon γ	Cytotoxic to proliferatin EC	Anti-tumor
TNF-α	Inhibits EC migration and proliferation	Inhibits tumor-induced angiogenesis
Trombospondin	Inhibits collagenase, EC migration and proliferation	Inhibits angiogenesis in rat corneas
PAI-1 and PAI-2	Inhibits uPA	Induction up-regulated by thrombospondin and angiostatic steroids
TIMP-1 and TIMP-2	Inhibits metalloproteinases, EC migration and proliferation	Block polyamine-induced angiogenesis in CAM and tumor invasion
Cartilage-derived inhibitor	Inhibits collagenase, EC migration and proliferation	Inhibits angiogenesis in CAM; Inhibits tumor-induced angiogenesis
Prolactin fragment	Inhibits bFGF- and VEGF-elicited proliferation of capillary EC	Inhibits angiogenesis in CAM
Angiostatin	Inhibits EC proliferation	Inhibits angiogenesis and metastatic growth, Inhibits angiogenesis in CAM
DS4152	Inhibits bFGF binding to EC Inhibits EC proliferation	Inhibits angiogenesis in CAM, tumor angiogenesis and growth, Clinical cancer trials ongoing
SCM-chitin III	Inhibits type IV collagenase and EC migration	Inhibits angiogenesis in CAM Inhibits tumor-induced angiogenesis

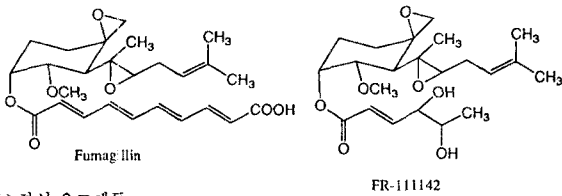
Table 3. Angiogenic inhibitors (Small molecules)

Inhibitors	<i>In Vitro</i>	<i>In Vivo</i>
AGM-1470	Inhibits expression of cyclins and activation of CDK Inhibits EC migration	Inhibits tumor angiogenesis and growth Clinical cancer trials ongoing
Fumagillin		Inhibits tumor angiogenesis and growth
FR111142		Inhibits tumor angiogenesis and growth
WF16775 A ₂	Preferentially cytostatic to EC	Inhibits tumor angiogenesis and growth
Minocyclin	Inhibits collagenase and EC proliferation	Inhibits tumor angiogenesis and growth
Herbimycin A	Inhibits EC proliferation	Inhibits angiogenesis in CAM
Genistein	Inhibit bFGF	Inhibits angiogenesis in CAM
Thalidomide	Inhibit bFGF	Inhibits angiogenesis in CAM
F11134		Inhibits angiogenesis in CAM
Cinnamaldehydes		Inhibits angiogenesis in CAM
Ovalicin		Inhibits angiogenesis in CAM
2-Methoxyesteradiol	Inhibit microtubule assemble	Inhibits angiogenesis in CAM

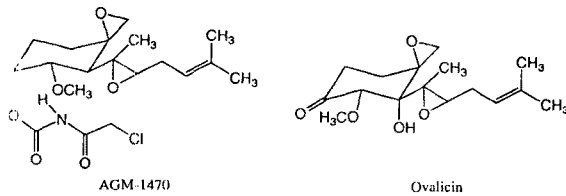
하였으므로 미생물 또는 천연물유래 저분자의 저해제들에 대해서 알아보려한다(6,7).

그 동안 발견 및 합성된 angiogenesis 억제제들로는 Retinoic acid, Protamin, Herbi-mycin A, Ursolic acid, Proline analog인 Cis-hydroxyproline과 I-azetidine carboxylic acid, 푸마길린(Fumagillin)과 이의 유도체(AGM-1470), 황하 치턴유도체, Tetrahydrothienopyridines, 테트라사이클린(Tetracycline) 등이다. 이들중 흥미 있는 몇 가지 화합물의 구조를 살펴보면 다음과 같다.

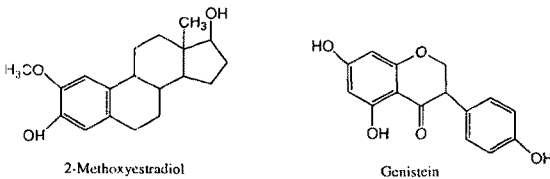
(i) 미생물 유래 화합물들



(ii) 합성 유도체들



(iii) 생체 대사 산물들



(iv) 식물 유래 저해제

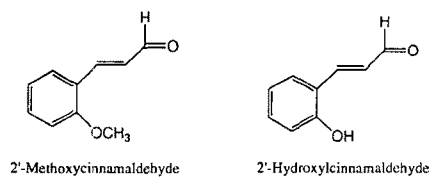


그림 1. Angiogenesis 억제제.

결론

앞에서도 언급하였듯이 angiogenesis는 매우복잡한 과정을

통하여 이루어지므로 정확한 특이 표적을 목표로 하는 저해제 탐색은 어려운 점이 있지만 CAM assay와 같은 방법을 이용하면 국내 자생 천연자원으로부터 활성물질의 탐색이 가능하다. 그리고 angiogenesis는 암전이 뿐만 아니라 동맥경화증과도 관계가 깊으므로 가장 큰 사망의 원인인 심혈관 예방 및 치료제 개발에 크게 공헌할 수 있으리라 생각된다. 이 분야에서 주목 받고있는 표적들을 살펴보면 다음과 같다.

1. Antisense

Target: bFGF, PDGF-A, and TGF-b1, using antisense oligomer

2. Antibody

Target: VEGF, Vascular integrin $\alpha v \beta_3$

3. Enzyme Inhibitors

Target: Thymidine phosphorylase, Protein tyrosine kinase related VEGF

구미선진국 및 일본 등에 비해서 매우 부진한 연구 분야가 천연자원으로부터의 활성물질 탐색 분야라 할 수 있으며, UR 등의 환경변화에 능동적으로 대처하기 위해서도 국내의 천연 자원의 활용연구는 매우 시급한 과제라 사료된다.

참고문헌

1. Folkman, J. 1985. Tumor angiogenesis. *Adv. Cancer Res.* **42**, 175-203. Folkman, J., & Klagsbrun, M. 1987. Angiogenic Factors. *Science* **235**, 442-447.
2. Liotto, L. A., Steeg, D. S., Stetter-Stevensa, W. G. 1991. Cancer Metastasis and Angiogenesis. *Cell* **64**, 327-336.
3. O'Reilly, M. S., Shing, Y., Moses, M., Folkman, J. 1994. Angiostatin: A Novel Angiogenesis Inhibitor That Mediates the Suppression of Metastases by a Lewis Lung Carcinoma. *Cell* **79**, 315-328.
4. Moses, M. A., Klagsburn, M., Shing, Y. 1995. The role of growth factors in vascular cell development and differentiation. *Int. Rev. Cyto.* **161**, 1-48.
5. 소승호, 장수익. 1995. Chicken chlorioallantoic membrane (CAM)을 이용한 *in vivo* angiogenesis assay. 신물질 창출을 위한 생리활성 연구법. 243-250.
6. Auerbach, W., Auerbach, R. 1994. Angiogenesis inhibitor. *Pharmac. Ther.* **63**, 265-311.
7. Fan, T. P. D., Jaggar, R., Bicknell, R. 1995. Controlling the vasculature: angiogenesis, anti-angiogenesis and vascular targeting of gene therapy. *TiPS* **16**, 57-66.