

재생불량성 빈혈의 병태생리에서 Fas 항원과 Apoptosis의 역할

순천향대학교 의과대학¹내과학교실, ²임상분자생물학연구소, ³현암신장연구소

원종호^{1,2} · 이남수^{1,2} · 김숙자² · 정희정² · 이규택^{1,2} · 박성규^{1,2}
백승호^{1,2} · 김성일³ · 홍대식^{1,2} · 박희숙^{1,2}

Increased Expression of Fas Antigen and Apoptosis in Aplastic Anemia Bone Marrow Cells

Jong-Ho Won^{1,2}, Nam-Su Lee^{1,2}, Sook-Ja Kim², Hee-Jeong Cheong², Kyu-Taeg Lee^{1,2}, Seung-Kyu Park^{1,2}, Seung-Ho Baick^{1,2}, Sung-Il Kim³, Dae-Sik Hong^{1,2} and Hee-Sook Park^{1,2}

¹Department of Internal Medicine, ²Institute for Clinical Molecular Biology Research, ³Hyunam Kidney Laboratory, SoonChunHyang University College of Medicine, Seoul, Korea

ABSTRACT

Background: Clinical observations and laboratory studies have supported an immune basis for most acquired aplastic anemias, with the majority of patients responding to immunosuppressive therapy. Fas, a member of the tumor necrosis factor (TNF) receptor superfamily is a critical downregulator of cellular immune responses. Proinflammatory cytokines like interferon gamma (IFN- γ) and TNF- α can induce Fas expression and render hematopoietic progenitor cells susceptible to Fas-induced growth suppression and apoptosis. **Methods:** In order to investigate the involvement of apoptosis in the pathogenesis of aplastic anemia (AA), we measured the expression of Fas antigen and caspase-3 on bone marrow (BM) mononuclear cells (MNCs) of AA in the presence or absence of IFN- γ , TNF- α , or macrophage inflammatory protein 1- α (MIP-1 α). **Results:** We confirmed that AA BM MNCs were more apoptotic and highly expressed Fas antigen than normal donors. Stimulation by IFN- γ , TNF- α , or MIP-1 α increased Fas antigen and caspase-3 expression in AA BM MNCs than BM MNCs of normal donors. Anti-Fas monoclonal antibody enhanced IFN- γ , TNF- α , or MIP-1 α mediated caspase-3 expression in BM MNCs of normal donors. Among these three cytokines, IFN- γ enhanced apoptosis most strongly via Fas-caspase-3 pathway. **Conclusion:** These results suggest that Fas signal pathway may play a role in the pathophysiology of aplastic anemia and negative hematopoietic regulators like IFN- γ can induce apoptosis of bone marrow progenitors in part by Fas induction. (*Immune Network* 2002;2(1):53-59)

Key Words: Fas antigen, apoptosis, IFN- γ , aplastic anemia

서 론

재생불량성 빈혈은 미국의 경우 인구 백만명당 2명에서 10명 정도의 발병률을 가지는 매우 드문 질환이나 동양에서는 이보다 훨씬 많아 중국의 통계에 의하면 인구 백만명당 18.7명에서 21명으로 보고되고 있으며 사망률도 미국의 경우 인구 백만명당 4.8명, 유럽은 3명인데 반하여 일본의 경우 9명으로 높은 사망률을 나타내고 있다 (1). 국내에서도 정확한 통계는 나와있지 않으나 황 등(2)

책임저자 : 박희숙, 순천향대학교 의과대학 내과학교실 중앙혈액내과

☎ 140-743, 서울시 용산구 한남동 657-58

Tel: 02-709-9185, Fax: 02-709-9554

E-mail: parkhs@hosp.sch.ac.kr

본 연구는 보건복지부 보건과학기술연구개발 사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(HMP-98-M-5-0058).

에 의한 보고를 보면 우리 나라에서도 미국이나 유럽에 비하여 발생빈도가 높다는 인상을 받는다. 후천성 재생불량성 빈혈은 서로 상이한 선행조건(preceding conditions)을 내포하고 있는 불균일성 질환(heterogenous disease)으로서 아직도 확실한 발생기전이 규명되어 있지 않다. 확실한 발생기전을 규명하기 힘든 이유는 시험관 내에서는 재생불량성 빈혈환자의 조혈모세포배양(stem cell culture)이 불충분한 것과 임상경과 중 자가 조혈세포 (autologous stem cells)가 변형되어 초기 발생기전을 규명하기에 적당하지 않기 때문이다. 과거 20여 년 동안 선행 질환이 거의 확실시되었던 재생불량성 빈혈 환자의 임상경과 및 치료효과의 추적결과 그리고 동물실험을 통한 정상골수조혈 기능에 대한 지식의 발전 등으로 어느 정도 후천성 재생불량성 빈혈의 발생기전에 관여하는 요인들을 추측할 수 있게 되었다. 후천성 재생불량성 빈혈의 발생기전에 관여하는 요인은 첫째, 조혈모세포에 대한 직접적 손상, 둘째, 면역학적 작용에 의한 조혈모세포의 증식억제, 셋째, 조혈기능을 보조하는 미세환경의 손상, 넷째, 유전학적 소인 등이 있지만 아직까지 확실한 기전은 규명되지 않은 상태이다(3).

면역학적 작용에 의한 조혈모세포의 손상을 보면 면역기구(immune system)가 후천성 재생불량성 빈혈의 발생기전에 관여한다는 증거는 면역억제요법 후 조혈기능이 급속히 향상되는 증례가 있다는 사실과 *in vitro* 조혈모세포 배양에서 환자의 CD8 표현형을 가진 T-세포가 자가골수 간세포뿐만 아니라 동종골수 간세포 배양에서 집락형성을 억제한다는 사실이다(4,5). 최근 세포 상해성 CD8 T-세포 외에도 가용성 T-세포 생성물인 여러 가지 cytokine 특히 그중에서도 interferon- γ (IFN- γ)와 tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등이 CD8 세포와 함께 조혈모세포 증식 억제에 가담하고 있음이 밝혀지고 있다(6-9).

Fas 항원은 tumor necrosis superfamily에 속하는 transmembrane receptor이다. Fas ligand 또는 특이 단클론항체(MoAb)에 의하여 Fas 수용체가 자극되면 칼슘 비의존성 경로에 의하여 예민한 정상세포와 림프계의 악성 세포에서 아포토시스(apoptosis)가 발생한다(10). Fas 항원은 조혈모세포의 경우 발현이 거의 없으나 점차 분화되는 과정에서 Fas 항원이 증가하여 아포토시스가 유발된다. 최근의 보고에 의하면 재생불량성 빈혈환자의 CD34 양성세포에서 Fas 항체의 발현이 증가하고 Fas가 발현되는 CD34 양성세포에서 아포토시스가 증가함이 발견되었다. Fas의 발현과 Fas에 의한 세포독성이 IFN- γ 로 처리한 대상세포에서 현격히 증가한다. TNF- α 와 IFN- γ 와 같은 cytokines는 림프구뿐만 아니라 조혈모세포에도 작용하여 조혈모세포의 성장을 억제한다(11-13).

본 연구에서는 정상인과 재생불량성 빈혈환자의 골수 단핵구에서 Fas 항원의 발현과 아포토시스 유무를 비교

하고 TNF- α , IFN- γ 및 macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α)와 같은 조혈모세포의 성장을 억제하는 cytokines를 투여한 후 정상인과 재생불량성 빈혈환자의 골수 단핵구에서 Fas 항원과 caspase-3의 발현을 비교하여 재생불량성 빈혈에서의 Fas 항원의 역할을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

골수세포의 수집. 골수 조직검사로 진단된 6명의 환자로 부터 환자의 동의를 얻어 골수를 채취하였으며 정상 골수는 6명의 동종골수이식 공여자로 부터 동의를 얻은 후 채취하였다. 골수채취는 환자의 후장골능(posterior iliac crest)에서 한 부위마다 2~3 mL씩 여러 부위에서 약 20 mL의 골수를 채취하였다. 채취한 골수는 RPMI 1640 (GIBCO, Grand Island, NY)에 10% 우태아혈청(fetal calf serum: FCS, GIBCO, Grand Island, NY) 및 방부제가 들어있지 않은 heparin이 포함된 배지에 수집하였다. 골수 공여자의 경우는 골수 공여 시 채취하여 환자의 경우와 똑같이 처리하였다. 채취된 골수는 24시간 내에 세포를 분리하여 실험에 이용하였다.

단핵구 분리. 골수 1 mL당 10 Units의 방부제가 포함되지 않은 헤파린으로 전 처리된 골수를 비중 1.077의 Ficoll-Hypaque 용액 위에 중침시킨 후 400 g에서 25분간 원심 분리시켜 단핵구를 분리하였다. 분리된 단핵구는 Ca^{++} , Mg^{++} 이 없는 인산 완충 식염수(Phosphate buffered saline: PBS)로 2회 세척한 후 10% 우태아혈청이 포함된 RPMI 배지에 부유시킨 뒤 실험에 이용하였다.

Flow cytometry를 이용한 Fas 항원의 측정. 정상 골수와 재생불량성 빈혈환자의 골수에서 단핵구를 분리하여 0.1% sodium azide이 포함된 PBS로 세척하고, 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 얼음 위에서 15분 동안 1 mg/mL의 γ -globulin를 포함하는 buffer와 반응시켰다. 이를 PBS로 2회 원심 세척한 후 FITC를 결합시킨 항 Fas 단일클론 항체(APO-1 cloneDX2, DAKO Corporation)와 30분 동안 4°C에서 차광하여 반응시켰다. 이를 세척액으로 2회 원심 세척 후 0.5 mL의 1% PFA (paraformaldehyde/PBS) 용액에 부유시켜 FACScan (Becton-Dickinson)을 이용하여 측정하였다. 이 때 음성 대조군은 Anti-mouse Ig FITC를 동일한 조건으로 반응시킨 부유액을 사용하였다.

Propidium Iodide (PI) 염색법을 이용한 아포토시스 측정. 정상 골수와 재생불량성 빈혈환자의 골수에서 단핵구를 분리하여 Sample Buffer로 2회 세척한 다음 세포수를 $1\sim 3\times 10^6$ cells/mL로 조절하여 4°C에서 1,000 rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 버리고 세포를 잘 풀어준 다음 1 mL의 차가운 70% ethanol를 첨가하여 4°C에서 16~18시간 동안 고정시켰다. 3,000 rpm에서 5분간

원심 분리한 후 상층액을 제거하고 잘 풀어준 다음 1 mL의 PI 염색액(Sigma, St. Louis)을 첨가하여 충분히 섞어 준 후 실온에서 30분간 차광상태로 방치하였다. 이를 24 시간 안에 Flow Cytometer를 이용하여 분석하였다.

Caspase-3 activity 측정. 재생불량성 빈혈환자의 골수와 대조군으로서 정상 제대혈의 단핵구를 분리하여 TNF- α , IFN- γ , MIP-1 α (R&D System Inc)을 각각 100 ng/mL의 농도를 첨가하여 24시간 자극한 후 Fas 항원을 측정하였고 TUNEL방법으로 아포토시스를 확인하였다. 여기에 Fas IgM (clone CH-11 mAb, KAMIYA BIOMEDICAL COMPANY, Seattle, WA, USA)을 1 μ g/mL을 첨가하여 15시간 반응시켜 Caspase-3 activity를 측정하였다. Caspase-3 activity는 Apo Alert CPP32/Caspase-3 Assay Kits (CLONTECH, Palo Alto, CA, USA)를 사용하였다. 요약하면 2×10^6 의 세포를 세척액으로 1,500 rpm에서 10분 원심 세척한 후 상층액은 버리고 Cell lysis 용액 50 μ L를 첨가하여 얼음위에서 10분간 방치하였다. 이를 12,000 rpm에서 3분간 원심한 후 상층액을 조심스럽게 96 well plate에 옮긴 다음 DTT를 포함한 $2 \times$ Reaction Buffer 50 μ L를 첨가하고 5 μ L의 CPP32 Substrate, DEVD-pNA를 첨가하여 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이를 96 well plate Reader로 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-digoxigenine nick end labeling)법. 세포를 세척하고 4% formalin으로 고정시킨 다음 0.01% poly-L-lysine이 처리된 slide에 떨어뜨린 후 공기 중에서 건조시켰다. PBS에 2% hydrogen peroxide가 들어있는 용액으로 실온에서 5분간 반응시킨 후 coplin jar에서 PBS로 5분씩 2회 세척하였다. 수분을 부드럽게 털어 내고 검체 주위를 조심스럽게 닦아낸 후 $1 \times$ equilibration buffer를 2방울 떨어 뜨리고 plastic coverslip을 덮고 10~15초간 반응시켰다. coverslip을 제거하고 검체에 54 μ L의 working strength TDT enzyme를 추가하고 plastic coverslip을 덮은 후 37°C humidified chamber에서 1시간 동안 반응시켰다. coverslip을 제거하고 37°C로 데워진 stop/washing buffer가 들어 있는 coplin jar에 slide를 넣은 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이를 PBS로 3회 세척한 후 anti-digoxigenin-peroxidase를 검체에 2방울씩 첨가하고 plastic coverslip을 덮은 후 실온에서 30분간 반응시켰다. Coverslip을 제거하고 3회 세척하고 여과된 0.05% diaminobenzidine (DAB) substrate 용액에 0.02% hydrogen peroxide를 추가한 후 검체 전체를 덮을 만큼의 충분한 양으로 3~6분간 실온에서 염색하였다. 이를 증류수로 세척한 다음 methyl green으로 10분간 대조염색을 시행하고 다시 증류수로 세척한 다음 100% butanol로 3번, xylene으로 2분씩 3번 처리하여 검체를 탈수시키고 mount한 후 아포토시스 유무를 관찰하였다.

결 과

정상인과 재생불량성 빈혈환자의 Fas 표현. 정상인과 재생불량성 빈혈환자의 골수 단핵구에서 Fas 표현은 정상인 골수 단핵구에서는 $10.81 \pm 3.67\%$ 로 낮았으나 재생불량성 빈혈환자의 골수 단핵구에서는 $27.38 \pm 8.16\%$ 로 현저히 증가되어 있었다(Fig. 1).

정상인과 재생불량성 빈혈환자의 아포토시스. 정상인과 재생불량성 빈혈환자의 골수 단핵구에서 아포토시스 index를 flow cytometry를 이용하여 측정하였을 때 정상인의 경우에서는 $8.60 \pm 1.04\%$ 를 보인 반면 재생불량성 빈혈환자에서는 $43.30 \pm 14.87\%$ 로 아포토시스가 증가되어 있었다(Fig. 2).

정상인 및 재생불량성 빈혈환자의 골수 단핵구에 TNF- α , IFN- γ 및 MIP-1 α 투여 시 Fas 유전자의 표현. 재생불량성 빈혈환자의 골수 단핵구에서의 Fas 유전자의 표현은 $29.67 \pm 5.34\%$ 로 정상인의 $16.86 \pm 0.10\%$ 에 비하여 의미 있게 높았다. 정상인의 골수 단핵구에 TNF- α , IFN- γ 및 MIP-1 α 투여 시 Fas 유전자의 표현은 정상인에서 각각, 17.87 ± 2.57 , 22.99 ± 3.11 및 16.75 ± 0.39 로 TNF- α 와 MIP-1 α 의 투여 시에는 Fas 유전자의 표현이 변화가 없었으나 IFN- γ 투여 시 증가하였다. 재생불량성 빈혈환자의 골수 단핵구에 TNF- α , IFN- γ 및 MIP-1 α 투여 시 Fas 유전자의 표현은 각각 32.40 ± 5.52 , 37.47 ± 4.31 및 30.52 ± 2.69 로 TNF- α , IFN- γ 및 MIP-1 α 투여 시 투여 전에 비하여 증가하였다(Fig. 3).

정상인 및 재생불량성 빈혈환자의 골수 단핵구에 TNF- α , IFN- γ 및 MIP-1 α 투여 시 caspase-3 유전자의 표현의 비교. 재생불량성 빈혈환자의 골수 단핵구에서의 caspase-3 유전자의 표현은 $0.133 \pm 0.021\%$ 로 정상

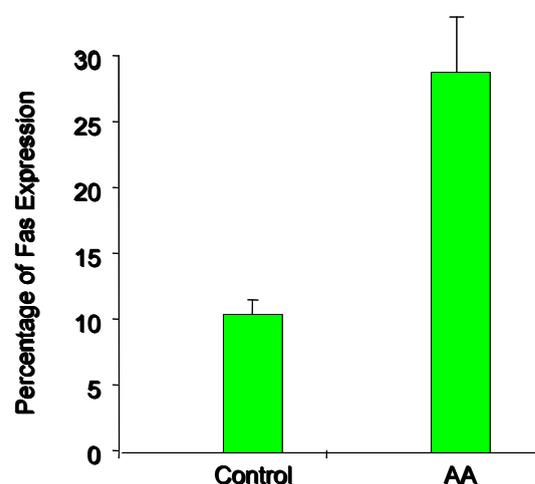


Figure 1. Fas antigen expression on bone marrow mononuclear cells of patients with aplastic anemia and normal donors.

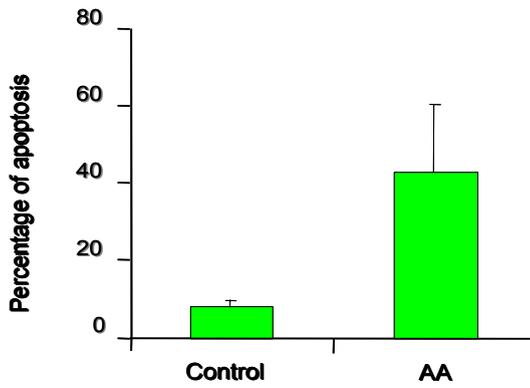


Figure 2. Apoptosis rates on bone marrow mononuclear cells of patients with aplastic anemia and normal donors.

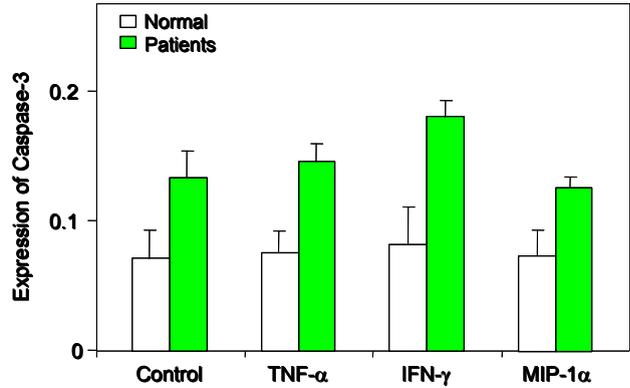


Figure 4. Changes of the caspase-3 activation on bone marrow mononuclear cells of patients with aplastic anemia and normal donors stimulated with IFN-γ, TNF-α, or MIP-1α.

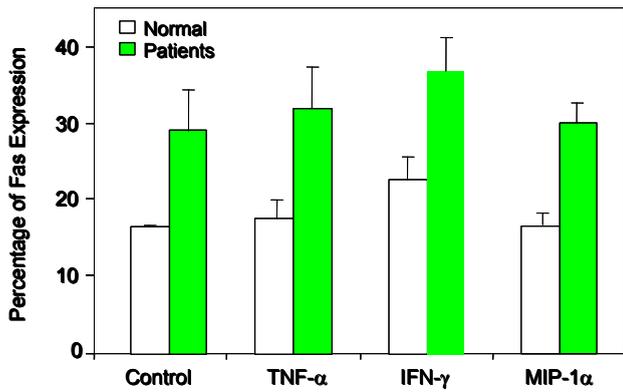


Figure 3. Changes of the Fas antigen expression on bone marrow mononuclear cells of patients with aplastic anemia and normal donors stimulated with IFN-γ, TNF-α, or MIP-1α.

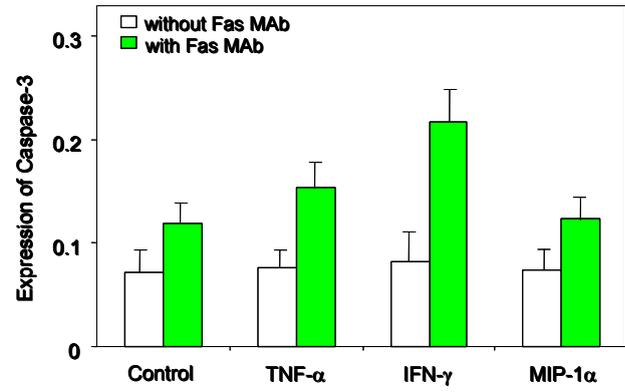


Figure 5. Changes of the caspase-3 activation on bone marrow mononuclear cells of normal donors stimulated with anti-Fas monoclonal antibody and IFN-γ, TNF-α, or MIP-1α.

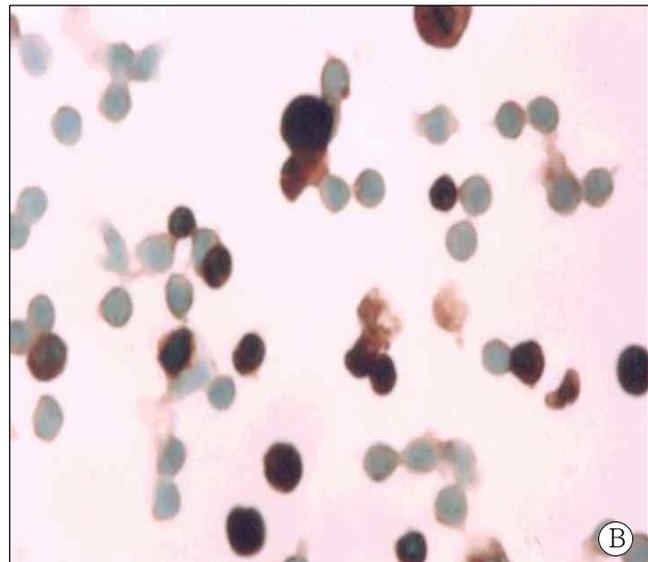
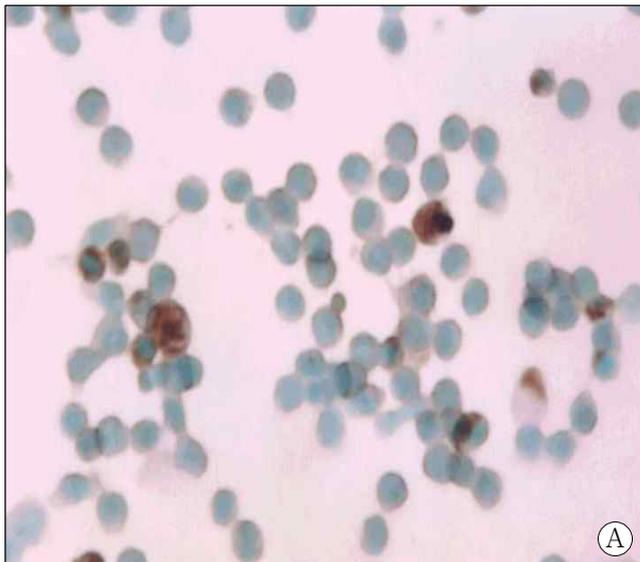


Figure 6. Changes of apoptosis rates on bone marrow mononuclear cells of patients with aplastic anemia after stimulation with IFN-γ (terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP-digoxigenine nick end labeling Method, 100×). A: before stimulation with IFN-γ. B: after stimulation with IFN-γ.

인의 $0.071 \pm 0.023\%$ 에 비하여 높았다. 정상인 및 재생불량성 빈혈환자의 골수 단핵구에 TNF- α , IFN- γ 및 MIP-1 α 투여 시 caspase-3 유전자의 표현은 정상인에서 0.076 ± 0.016 , 0.082 ± 0.029 및 0.074 ± 0.019 였으며 재생불량성 빈혈환자의 경우는 0.146 ± 0.021 , 0.181 ± 0.012 및 0.132 ± 0.018 로 caspase-3 유전자의 표현이 증가하였다(Fig. 4). 또한 정상인의 골수 단핵구에 cytokine 투여없이 Fas 단클론항체를 투여하였을 때 caspase-3의 표현이 0.119 ± 0.018 로 Fas 단클론항체 투여 전의 $0.071 \pm 0.023\%$ 에 비하여 증가하였으며 정상인의 골수 단핵구에 TNF- α , IFN- γ 및 MIP-1 α 투여 시 Fas 단클론항체를 동시에 투여하였을 때 caspase-3 유전자의 표현은 각각, 0.154 ± 0.025 , 0.217 ± 0.031 및 0.124 ± 0.021 로 Fas 단클론항체 투여 전에 비하여 의미 있게 상승하였다(Fig. 5).

재생불량성 빈혈환자의 골수 단핵구에서 IFN- γ 투여 전, 후의 아포토시스의 변화. 재생불량성 빈혈환자의 골수 단핵구에서 IFN- γ 투여 전, 후의 아포토시스의 변화를 TUNEL 법으로 관찰하였을 때 IFN- γ 투여 후 아포토시스의 발생이 증가함이 관찰되었다(Fig. 6).

고 찰

본 연구에서는 재생불량성 빈혈환자와 정상인의 골수 단핵구에서 Fas 항원의 표현과 아포토시스의 정도를 평가하였으며 재생불량성 빈혈환자와 정상인의 골수 단핵구에서 TNF- α , IFN- γ 및 MIP-1 α 와 같은 조혈모세포의 성장을 억제하는 cytokine들을 투여한 후 골수 단핵구에서 Fas 항원과 caspase-3의 발현을 비교하였다. 재생불량성 빈혈환자에서는 정상인에 비하여 Fas 항원의 표현이 의미 있게 증가하였으며 아포토시스 정도도 훨씬 높아 이전의 연구자들과 비슷한 결과를 보였다. 최근 세포의 사망에 대한 신호 전달체계의 연구가 활발히 진행되어 있으며, 그중에 아포토시스에 연관된 것으로 알려진 세포 표면물질인 Fas 항원이 재생불량성 빈혈의 병태생리에 관여하고 있음이 밝혀져 이에 대한 연구가 집중적으로 이루어지고 있다(14-16). Fas와 Fas ligand는 면역체계의 조절에 결정적으로 관계되어 있다. Lymphokin들에 의한 Fas 수용체의 자극은 환자의 병적 세포파괴에 중요한 역할을 하며 CD34 양성세포에서도 Fas 수용체의 표현이 증가하게 된다. Fas 항원은 조혈모세포의 경우 발현이 거의 없으나 점차 분화되는 과정에서 Fas 항원이 증가하여 아포토시스가 유발된다(17). 최근의 연구결과들은 인간의 CD34 양성세포에서 염증반응과 관계되는 cytokine들인 TNF- α 와 IFN- γ 에 의하여 Fas 표현이 증가하고 이에 의하여 성장장애와 아포토시스가 발생함을 보여준다(18-20). 본 연구에서도 정상 골수 단핵구에 TNF- α , IFN- γ 및 MIP-1 α 를 투여하였을 때 Fas 표현이 증가함이 보여 이러한 cytokine들이 사람의 골수 단핵구

에서 Fas 표현을 증가시켜 성장장애를 일으킬 수 있음을 보여주었다. 재생불량성 빈혈환자의 혈액에서 활성화된 세포독성 림프구들의 증가가 관찰되며 이로부터 여러 가지 cytokine들이 비정상적으로 합성되고 그 결과 조혈모세포의 생성을 억제하는 것으로 생각되고 있다. 저자들도 재생불량성 환자의 장기간 골수배양 상층액에서 IFN- γ , TNF- α 및 MIP-1 α 를 측정해 보았을 때 정상에 비해 증가되어 있는 것이 관찰되어 조혈억제인자인 IFN- γ , TNF- α 및 MIP-1 α 가 재생불량성 빈혈의 병인론에 중요한 역할을 담당하고 있음을 보고한 바 있다(21). 본 연구에서는 정상인의 골수 단핵구뿐만 아니라 재생불량성 빈혈환자의 골수 단핵구에 IFN- γ , TNF- α 및 MIP-1 α 를 투여하여 Fas 표현의 변화를 관찰하였는데 정상인에 비하여 Fas 표현이 더욱 증가됨을 관찰하였다. 이러한 소견은 재생불량성 빈혈환자의 골수 단핵구가 정상세포에 비하여 IFN- γ , TNF- α 및 MIP-1 α 와 같은 골수세포 성장억제 cytokine들에 더욱 예민하게 반응함을 보여주는 결과이다. 또한 재생불량성 빈혈환자에서 IFN- γ 투여 전후에 아포토시스를 평가하였을 때 IFN- γ 투여 후 아포토시스가 증가함이 관찰되어 이러한 cytokine들이 재생불량성 빈혈 환자에서 Fas 표현을 증가시키고 이에 의하여 아포토시스가 증가하는 것으로 생각되었다. 세포집락 형성에 대한 실험에서 조혈모세포의 성장을 억제하는 것으로 알려진 cytokine들로는 TNF- α , MIP-1 α , IFN- γ 및 transforming growth factor- β 2 (TGF- β 2) 등이 있으며(18) 이 중 재생불량성 빈혈의 병태생리와 연관되어 가장 많이 연구된 cytokine은 IFN- γ 이며 재생불량성 빈혈 환자의 림프구는 자발적으로 또는 lectin의 자극에 의하여 다량의 IFN- γ 를 생성한다(19,20). 이와 같이 활성화된 세포독성 림프구들에 의하여 생성된 다양한 cytokine들이 조혈모세포 생성에 깊이 관여되어 있으나(22) 이들이 단순히 면역활성인자의 표식인자인지 아니면 이들 자체가 조혈모세포의 생성을 직접적으로 억제하는지에 대하여 의문이 있었으나 Sella 등(23)에 의한 IFN- γ 유전자의 조혈모세포로의 도입실험에 의하여 세포 내의 미량의 내인성 IFN- γ 가 조혈모세포의 분화를 억제할 뿐 아니라 이 세포를 파괴한다는 결과를 볼 때 IFN- γ 는 단순히 존재하는 면역활성인자가 아니라 지혈적으로 생성된 낮은 농도의 내인성 IFN- γ 로 조혈모세포에 직접 영향을 미치는 것으로 판단할 수 있다. 반면 재생불량성 빈혈환자의 혈청 내에 IFN- γ 를 포함한 cytokine들의 농도가 일반적으로 증가하기는 하지만 이러한 변화와 골수세포에서의 이들 cytokine 유전자들의 발현과의 상관관계가 연관성이 있는지에 대한 결론을 내리기에는 아직 이르며 더 많은 연구결과를 필요로 한다.

Caspases는 세포내의 cysteine proteases family로 아포토시스를 발생시키는 중요한 물질이다. Caspase-3와

caspase-7과 같은 effector caspases는 caspase-9의 proteolytic cleavage를 통하여 활성화된다. 일단 활성화되면 effector caspases는 다양한 구조와 조절기능을 가진 단백질의 proteolytic cleavage에 반응하여 아포토시스를 일으키게 된다(24,25). caspase를 활성화시키는 기전은 매우 다양하지만 가장 잘 알려진 기전은 TNF family에 의한 것이다. 여러 가지의 TNF family 수용체가 아포토시스의 신호를 전달하는 것으로 알려졌으며, TNF-R1 (CD120a) Fas (CD95), DR3 (Wsl-1; Tramp), DR4 (Trail-R1), DR5 (Trail-R2), and CAR-1 등이 이에 속한다(26). 본 연구에서는 재생불량성 빈혈환자와 정상인의 골수 단핵구에서 caspase-3의 표현을 검사하여 재생불량성 빈혈환자의 골수 단핵구에서 정상인에 비하여 caspase-3의 표현이 증가함을 확인하였다. 이는 재생불량성 빈혈환자에서 Fas 표현의 증가에 의하여 caspase-3의 활성도가 증가하여 골수내 아포토시스가 증가함을 나타낸다. 또한 정상인과 재생불량성 빈혈환자에서 IFN- γ , TNF- α 및 MIP-1 α 와 같은 골수세포 성장억제 cytokine들을 투여 후 caspase-3의 활성도를 측정하였을 때 caspase-3의 활성도는 Fas 항원과 마찬가지로 cytokine들을 투여 시 더욱 증가함을 보여 이러한 cytokine들의 투여에 의하여 증가한 Fas 표현에 의하여 caspase-3의 활성도가 더욱 증가함을 알 수 있었다. 이러한 cytokine들이 재생불량성 빈혈환자의 골수세포에 관한 영향뿐만 아니라 정상 골수세포에 대한 영향을 보기 위하여 정상인의 골수세포에 cytokine들을 투여한 후 Fas 단클론항체를 투여하였을 때 caspase 활성도가 증가함을 보여 골수세포 성장억제 cytokine들이 Fas, caspase-3 경로를 거쳐 골수세포의 아포토시스를 유도함을 알 수 있었으며 이들 중 IFN- γ 가 caspase-3의 활성도를 가장 많이 증가시켰다.

이상의 결과로 보아 Fas signal pathway가 최소한 일부의 환자에서 재생불량성 빈혈의 발생에 일정 부분 역할을 할 것으로 생각되며 IFN- γ 와 같은 골수억제 기능이 있는 cytokine들이 Fas signal pathway를 통하여 CD34 양성 progenitors의 아포토시스를 유도할 가능성이 있을 것으로 생각되었다.

참 고 문 헌

1. Young NS, Issaragrasil S, Chieh CW, Takaku F: Aplastic anemia in the orient. *Br J Haematol* 62;1-6, 1986
2. Whang KS, Lee KB, Kang DY, Kang SK, Ko YW, Kim KH, Kim YK, Kim DJ, Kim RW, Kim MJ, Kim SI, Kim SM, Kim CW, Kim WS, Doh SK, Moon HK, Min BS, Park KO, Park YC, Byun KS, Suh CY, Sohn KC, Shin SM, Yoo KS, Lee DB, Lee MH, Lee DH, Lee SY, Lee CH, Chung DK, Cho HI, Choi KY, Han JS, Hong SK, Hong CY: Aplastic anemia in Korea-The 2nd report-An analysis of 494 cases. *J Kor Soc of Hematol* 15;3-11, 1980
3. Gordon MY: Stem cells and the microenvironment in aplastic anemia. *Br J Haematol* 86;190-192, 1994
4. Zoumbos N, Gascon P, Trost S, Djeu J, Young NS: Circulating activated suppressor T lymphocytes in aplastic anemia. *N Eng J Med* 312;257-265, 1985
5. Iale M, Merli A, Bacigalupo A: Analysis at the clonal level of T cell phenotype and functions in severe aplastic anemia patients. *Blood* 78;1268-1274, 1991
6. Selleri C, Sato T, Anderson S, Young NS, Maciejewski JP: Interferon- γ and tumor necrosis factor- α suppress both early and late stages of hematopoiesis and induce programmed cell death. *J Cell Physiol* 165;538-546, 1995
7. Snoek HV, Van Bockstaele DR, Nys G, Lenjou M, Lardon F, Haenem L, Rodrigus L, Peetermans ME, Berneman ZN: Interferon-gamma selectively inhibit primitive CD34⁺ CD38⁻ and not mature CD34⁺ human hematopoietic progenitor cells. *J Exp Med* 180;1177-1182, 1994
8. Rathbun RK, Christianson TA, Faulkner GR, Jones G, Keeble W, O'Dwyer M, Bagby GC: Interferon- γ -induced apoptotic responses of Fanconi anemia group C hematopoietic progenitor cells involve caspase 8-dependent activation of caspase 3 family members. *Blood* 96;4204-4211, 2000
9. Dybedal I, Guan F, Borge OJ, Veiby OP, Ramsfjell V, Nagata S, Jacobsen SE: Transforming growth factor- β_1 abrogates Fas-induced growth suppression and apoptosis of murine bone marrow progenitor cells. *Blood* 90;3395-403, 1997
10. Nagata S, Golstein P: The Fas death factor. *Science* 267; 1449-1456, 1995
11. Maciejewski J, Selleri C, Anderson S, Young NS: Fas antigen expression on CD34⁺ human marrow cells is induced by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha and potentiates cytokine-mediated hematopoietic suppression in vitro. *Blood* 85;3183-3190, 1995
12. Maciejewski JP, Selleri C, Sato T, Anderson S, Young NS: Increased expression of Fas antigen on bone marrow CD34⁺ cells of patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol* 91;245-252, 1995
13. Killick SB, Cox CV, Marsh JC, Gordon-Smith EC, Gibson FM: Mechanisms of bone marrow progenitor cell apoptosis in aplastic anaemia and the effect of anti-thymocyte globulin: examination of the role of the Fas-Fas-L interaction. *Br J Haematol* 111;1164-1169, 2000

14. Callera F, Garcia AB, Falcao RP: Fas-mediated apoptosis with normal expression of bcl-2 and p53 in lymphocytes from aplastic anaemia. *Br J Haematol* 100;698-703, 1998
 15. Ismail M, Gibson FM, Gordon-Smith EC, Rutherford TR: Bcl-2 and Bcl-x expression in the CD34+ cells of aplastic anaemia patients: relationship with increased apoptosis and upregulation of Fas antigen. *Br J Haematol* 113;706-712, 2001
 16. Philpott NJ, Scopes J, Marsh JCW, Gordon-Smith E, Gibson EM: Increased apoptosis in aplastic anemia bone marrow progenitor cells: possible pathophysiologic significance. *Exp Hematol* 23;1642-1648, 1995
 17. Dybedal I, Guan F, Borge OJ, Veiby OP, Ramsfjell V, Nagata S, Jacobsen SE: Transforming growth factor-beta1 abrogates Fas-induced growth suppression and apoptosis of murine bone marrow progenitor cells. *Blood* 90;3395-3403, 1997
 18. Young NS, Alter BP: Pathophysiology I: Stem cells, stroma and growth factors. In "Aplastic anemia: acquired and inherited. W.B. Saunders Co. Philadelphia pp32-45, 1994
 19. Raefski E, Platanius L, Zoumbos N, Young NS: Studies of interferon as a regulator of hematopoietic proliferation. *J Immunol* 135;2507-2512, 1985
 20. Nakao S, Yamaguchi M, Shiobara S: Interferon gamma gene expression in unstimulated bone marrow mononuclear cell predicts a response to cyclosporin therapy in aplastic anemia. *Blood* 79;2523-2535, 1992
 21. Hong DS, Lee NS, Lee KT, Park SK, Baick SH, Won JH, Park HS: Pathophysiologic Study of Aplastic Anemia by Long-term Bone Marrow Cultures. *J Kor Soc of Hematol* 2002, in press.
 22. Sato T, Selleri C, Anderson S, Young NS, Maciejewski JP: Expression and modulation of cellular receptors for interferon-gamma, tumour necrosis factor, and Fas on human bone marrow CD34+ cells. *Br J Haematol* 97;356-365, 1997
 23. Selleri C, Maciejewski JP, Sato T, Young NS: Interferon- γ constitutively expressed in the stromal microenvironment of human marrow cultures mediates potent hematopoietic inhibition. *Blood* 87;4149-4157, 1996
 24. Thornberry NA, Lazebnik Y: Caspase: enemies within. *Science* 28;1312-1316, 1998
 25. Suzuki Y, Nakabayashi Y, Takahashi R: Ubiquitin-protein ligase activity of X-linked inhibitor of apoptosis protein promotes proteasomal degradation of caspase-3 and enhances its anti-apoptotic effect in Fas-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 98;8662-8667, 2001
 26. Reed JC: Dysregulation of Apoptosis in Cancer. *J Clin Oncol* 17;2941-2953, 1999
-