

Thrombospondin-1과 종양형성 억제작용

정구보

가천대학교 의학전문대학원 해부학교실

(2015년 11월 26일 접수, 2015년 12월 19일 수정접수, 2015년 12월 21일 게재승인, Published Online 30 December 2015)

간추림 : Thrombospondin-1 (TSP-1)은 여러 가지 세포 수용체를 통해 혈관내피세포 및 암세포의 활성을 조절할 수 있는 다양한 기능을 갖는 단백질로 신혈관형성을 억제하며, 혈관내피세포와 암세포의 부착, 세포증식, 이동 및 세포의 생존 등을 조절한다. 또한 여러 연구자들에 의해 TSP-1의 발현을 증가시키면 종양의 성장과 전이가 억제되고 신혈관형성이 차단됨이 확인되었다. 신혈관형성 억제제는 지난 30년간 VEGF (vascular endothelial growth factor)의 신호전달기전을 차단하는 억제제를 중심으로 개발되어 왔으며 tyrosine kinase의 저분자 억제제들이 치료제로 승인되었다. TSP-1은 여러 가지 기능성 도메인을 갖고 있어서 CD36과 CD47 수용체를 통해 종양의 신혈관형성을 억제한다. TSP-1은 CD47과의 결합을 통해 VEGFR2의 인산화를 억제하고 하위신호전달 물질인 AKT 활성화를 차단하여 혈관내피세포에 대한 VEGF의 작용을 억제한다. 최근 CD47 수용체에 결합하는 단클론항체를 이용하여 CD47 수용체의 작용을 차단하면 큰포식세포와 세포독성 T 림프구의 작용을 활성화하여 암세포를 제거할 수 있다는 사실이 밝혀졌다. 이러한 사실들은 TSP-1에 의해 암세포를 제거하고 종양의 혈관형성을 억제할 수 있는 새로운 시대가 도래하고 있음을 시사하는 것이다.

찾아보기 낱말 : TSP-1, 신혈관형성, 혈관내피세포, CD36, CD47, VEGF

서 론

고형암이 종양의 성장환경에서 혈관형성인자를 분비함으로써 새로운 혈관형성을 유도한다는 기념비적인 가설이 1971년 하버드대학의 외과의사인 Judah Folkman에 의해 논문으로 발표되었다[1]. 논문의 핵심적인 내용은 신혈관형성(angiogenesis)의 조절이 암의 새로운 치료기술이 될 수 있다는 것이었는데 그 후 Cook과 Figg는 종양의 신혈관형성에 관여하고 있는 중요한 기전들을 발표하였다[2]. 여기서 그들은 tyrosine kinase 수용체의 신호전달기전이 신혈관형

성을 조절하고 있으며 이 기전은 신혈관형성인자들과 여러 세포성장인자에 의해 활성화된다는 것을 제시하였다.

신혈관형성은 주변의 혈관으로부터 새로운 혈관이 새로 자라나는 과정으로 종양의 성장에 필수적인 단계이다[3]. 종양은 크기가 1~2 mm³ 이상으로 자라게 되면 암세포의 성장을 위해 산소와 영양분을 공급해 줄 혈관을 필요로 하게 되며 신생혈관을 통해 이 문제를 해결하고 다른 장기로 전이도 일어나게 된다[4,5]. 따라서 지난 20년간 신혈관형성 억제제들이 치료용으로 개발되었는데 그중 가장 잘 알려져 있는 신혈관형성 억제제는 vascular endothelial growth factor (VEGF)의 신호전달 기전을 직접 차단하는 bevacizumab (Avertin, Genentech/Roche), 그리고 tyrosine kinase 억제제인 sunitinib (SU11248, Sutent, Pfizer)과 sorafenib (BAY439006, Nexavar, Bayer)이다[6]. Tyrosine kinase 수용체(receptor tyrosine kinase; RTK)는 세포외부에는 lectin 결합부위를 그리고 세포질 내에는 촉매효소 도메인을 갖는 막관통단백질(transmembrane protein)로 종양의 증식

*본 논문의 그림을 그리고 편집 작업을 도와준 성인성균의 도움에 감사드립니다. 이 논문은 2014학년도 가천대학교 교내연구비지원(GCU 2014-5103)에 의한 결과입니다.

저자(들)는 '의학논문 출판윤리 가이드라인'을 준수합니다.
저자(들)는 이 연구와 관련하여 이해관계가 없음을 밝힙니다.
교신저자 : 정구보(가천대학교 의학전문대학원 해부학교실)
전자우편 : gbjcong@gachon.ac.kr

과 전이에 관련되는 많은 단계가 활성화된 RTK의 하위 신호전달물질에 의해 중계되고 있어서 tyrosine kinase의 억제제들은 항암효과를 나타낼 수 있는 것이다. 저분자의약품(small molecule)인 sunitinib과 sorafenib은 VEGFR2 수용체를 차단하며 여러 가지 종양에서 임상적인 효과를 나타내고 있는 것이 알려져 있으나 암세포의 치료제에 대한 저항성과 치료제의 독성이 문제가 되고 있다[7-11]. 최근에는 이들 단백질의 작용을 직접 억제할 뿐 아니라 단백질 합성에 관여하는 mRNA를 차단하여 혈관형성을 조절하는 miRNA 또한 중요한 조절인자로 제시되고 있어서[12-14] 신혈관형성의 억제기전을 이용하여 암을 치료하는 방법은 부작용이 적은 치료기술로 계속 주목 받게 될 전망이다.

Thrombospondin-1 (이하 TSP-1)은 세포외기질 단백질로 세포의 부착, 이동 및 성장에 관여하는 단백질이다. 종양세포와 혈관내피세포에서 세포-세포 간 또는 세포-기질 간 결합단백질의 발현을 TSP-1으로 조절하면 종양의 성장 또는 전이가 억제되는 것이 알려지고, TSP-1을 종양세포에 과발현시킬 때 종양이 없어지는 것이 동물모델을 통해 확인된 후 TSP-1은 부작용이 없는 새로운 암치료제의 등장을 예고해 왔다[15,16]. 더욱이 TSP-1의 type 1 repeat 부분이 암세포와 혈관내피세포의 CD36 수용체와 결합하여 암세포와 혈관내피세포를 사멸시킴으로써 직접적인 또는 신혈관형성의 억제를 통한 간접적인 항암효과를 나타내는 것이 알려졌다. 최근에는 카복시말단 도메인을 구성하고 있는 부분에 대한 항체를 이용하면 암세포를 큰포식세포와 T 림프구가 공격하여 면역작용을 통해서도 암을 치료할 수 있다는 새로운 기전이 밝혀지면서 TSP-1은 한 가지 물질이 동시에 여러 가지 기전을 통해 종양형성을 억제할 수 있으므로 TSP-1을 이용한 종양 억제제의 개발가능성은 더욱 커지고 있다.

TSP-1의 구조와 부위별 기능

TSP-1은 TSP 단백질 중 첫 번째로 발견된 당단백질로 사람의 혈소판에서 분비되는 세포외기질단백질이다. 이 단백질은 상처부위나 염증부위 또는 새로운 혈관 또는 종양이 형성되는 부위에서 발견되며 세포의 증식과 이동, 부착 및 세포사망 등을 조절하는 것으로 알려져 있다. TSP-1의 분자량은 450 kD이고, 혈소판 외에도 혈액세포(megakaryocyte, monocyte, macrophage), 혈관내피세포, 민무늬근세포, 섬유아세포, 뇌의 신경아교세포 등 다양한 세포에서 분비된다[17-20].

TSP는 다섯 가지 세포외기질단백질이 하나의 family를

구성하고 있는데, 다섯 가지 동형단백질(isoform)들은 각각 별도의 유전자로부터 만들어지며, 척추동물의 각 조직에서 특이적인 발현양상을 나타내지만 심장, 연골, 뇌 등에서는 다섯 가지 TSP 유전자가 동시에 발현된다. TSP는 분자구조상 크게 두 그룹으로 구분할 수 있어서 TSP-1과 TSP-2가 속하는 한 그룹(subgroup A)은 TSP의 type 1 repeat (TSR; thrombospondin type 1 repeat)를 공통적으로 가지고 있는데 비해 TSP-3, TSP-4, TSP-5가 속하는 다른 그룹(subgroup B)은 type 1 repeat와 procollagen domain이 없다(Fig. 1). 한편, 전자(subgroup A)에 속하는 단백질들이 삼량체(trimeric structure)를 이루고 있는데 비해 후자(subgroup B)에 속하는 단백질들은 오량체(pentameric structure) 구조를 나타낸다. 여섯 개의 도메인을 모두 갖고 있는 TSP-1과 TSP-2처럼 TSP-3, TSP-4, TSP-5도 type 3 repeat (TSR-3) 구조와 카복시말단 구조만으로도 신혈관형성의 억제능력을 가지는 것으로 알려져 있다.

TSP-1의 기능은 Fig. 2의 분자구조에서 알 수 있듯 여섯 개의 복잡한 domain 구조를 통해 나타나게 된다. 이 중 네 곳은 세포에 강한 결합력을 나타내어 세포부착에 관여하고, 다른 도메인들은 세포막단백질 또는 사이토카인 등과 작용하여 신호전달기전을 중계 또는 차단함으로써 세포외기질 및 세포의 형태변화를 조절한다. TSP-1과 결합하는 막단백질로는 integrin과 integrin associated protein (IAP, CD47), CD36, 그리고 proteoglycan이 알려져 있으며, transforming growth factor- β (TGF- β) 또는 platelet-derived growth factor (PDGF) 등도 TSP-1과 결합한다[21]. TSP-1의 각 도메인들은 여러 종류의 단백질 또는 세포수용체에 결합함으로써 혈관내피세포와 민무늬근세포 또는 큰포식세포에 작용을 나타낼 수 있게 된다.

TSP-1의 구조를 자세하게 살펴보면 이 중 아미노말단 도메인과 세 번째 구조인 type I repeat 부분은 헤파린에 결합하는 부위로 세포의 부착(attachment)과 퍼짐(spreading), 세포이동(migration) 등에 관여할 수 있으며, focal contact를 억제함으로써 세포의 증식을 막는다. 이곳은 또한 TSP-1의 세포내 유입(endocytosis)과도 관련된 부위이다. 아미노말단 부위에 결합하는 수용체로는 syndecan, heparan sulfate proteoglycan (HSPG), 3 종류의 integrin ($\alpha 3\beta 1$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$) 등이 있다. 그 다음 부분인 procollagen 도메인은 신혈관형성을 억제하는 기능이 있는 부위이다. 가장 기능이 다양한 세 번째 부위는 type I repeat으로 다양한 단백질과 결합할 수 있는 아미노산 서열을 가지고 있다. 이들 구조는 세 번 반복되는데 TSR-1, -2, -3로 구분되며 TSP-1에서 신혈관형성 억제효과가 가장 크게 나타나는 부분이다[22-24]. Type 2 repeat 부분은 epidermal growth factor repeat

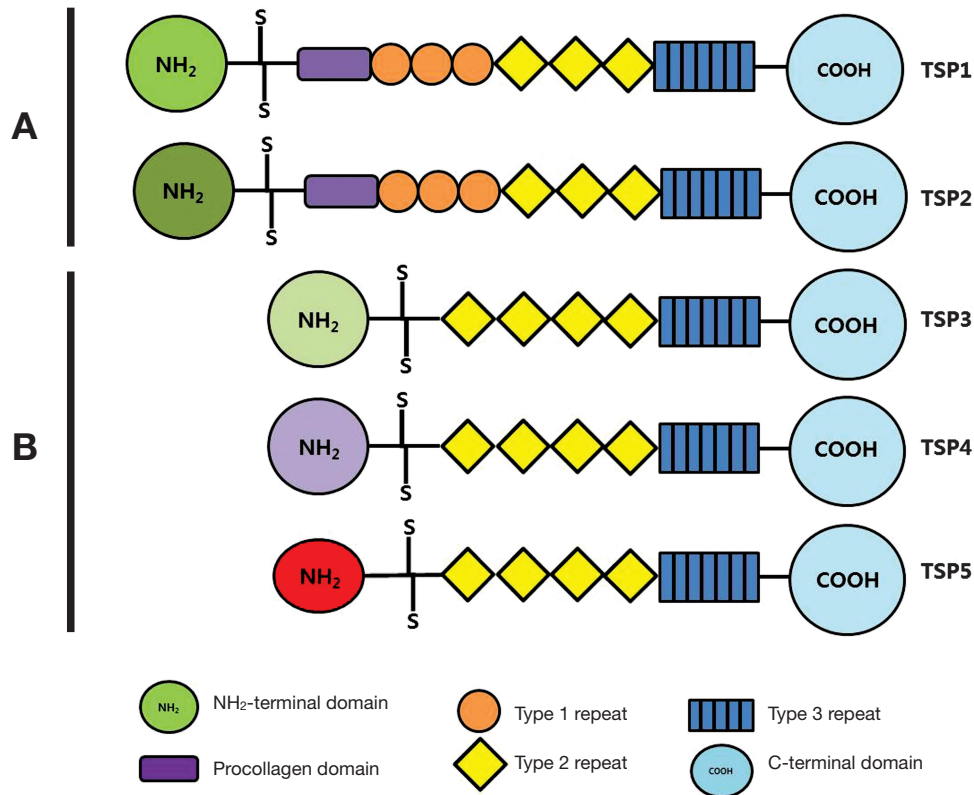


Fig. 1. Domain structures of human Thrombospondin gene family. The thrombospondins are a family of five extracellular glycoproteins that are composed of multiple well-defined structural motifs. All five members contain the type 2 repeats, the type 3 repeats and a highly conserved C-terminal domain.

와 구조가 유사하며, type 3 repeat은 $\beta 3$ integrin 수용체를 통해 세포에 결합하는 부위로 칼슘결합부위를 가지고 있다. 마지막으로 카복시말단 도메인은 IAP와 결합하며 세포의 부착 및 이동에 관여한다. type 3 repeat과 카복시말단 도메인은 TSP family에 속하는 단백질에서는 구조가 가장 잘 보존되어있는 부위로 칼슘 결합부위가 인접해 있어서 칼슘 농도에 따라 단백질의 삼차원적인 형태가 변할 수 있다. 따라서 TSP가 세포 수용체에 결합할 때는 칼슘농도 및 type 3 repeat 구조의 영향을 받게 된다.

TSP-1의 TGF- β 활성 작용

Murphy-Ullrich 등은 1992년 TSP-1이 TGF- β 를 활성화시킨다는 사실을 보고하였다[25]. 그 후 융합단백질(fusion protein)과 합성 펩티드를 이용한 연구에서 두 번째 type 1 repeat에 위치하는 WSHWSPW 아미노산 서열이 TGF- β 에 결합하면 TSP-1의 아미노말단에 있는 RFK 서열이 TGF- β

를 활성화시킨다는 사실이 규명되었다(Fig. 2). 그리고 RFK 서열을 포함하는 합성 펩티드만 충분히 높은 농도로 처리하여도 TGF- β 가 활성화된다. TGF- β 는 세포에서 펩티드로 합성되어 분비될 때 단백질분해효소에 의해 TGF- β 와 latency-associated peptide (LAP)의 두 부위로 분리되는데 이때 LAP의 아미노말단 서열인 LSKL 펩티드를 처리하면 TGF- β 의 활성도가 억제된다. 따라서 TSP-1은 이러한 결합반응을 통해 TGF- β 를 활성화시키는 것으로 알려져 있다[25]. 그러나 TSP-1은 혈소판 내의 TGF- β 는 활성화시키지 못하는 것으로 알려져 있는데 이는 TSP-1이나 TGF- β 는 둘 다 혈소판의 α -granule에 들어 있다가 thrombin에 의해 혈소판이 활성화되면 분비되는 단백질이기 때문이다. 혈소판에는 TGF- β 에 비해 500배나 많은 TSP-1이 존재하지만 이렇게 많은 양이 함께 존재하고 있음에도 불구하고 TGF- β 의 대부분은 비활성화 상태로 분비되므로 이러한 사실을 통해 혈소판 내에서는 TSP-1이 TGF- β 를 활성화시킬 수 없다는 사실을 알 수 있는데 이는 TSP-1이 혈소판에서 분비된 후 post-translational modification을 거치거나 TSP-1의 TSR 부분에 아

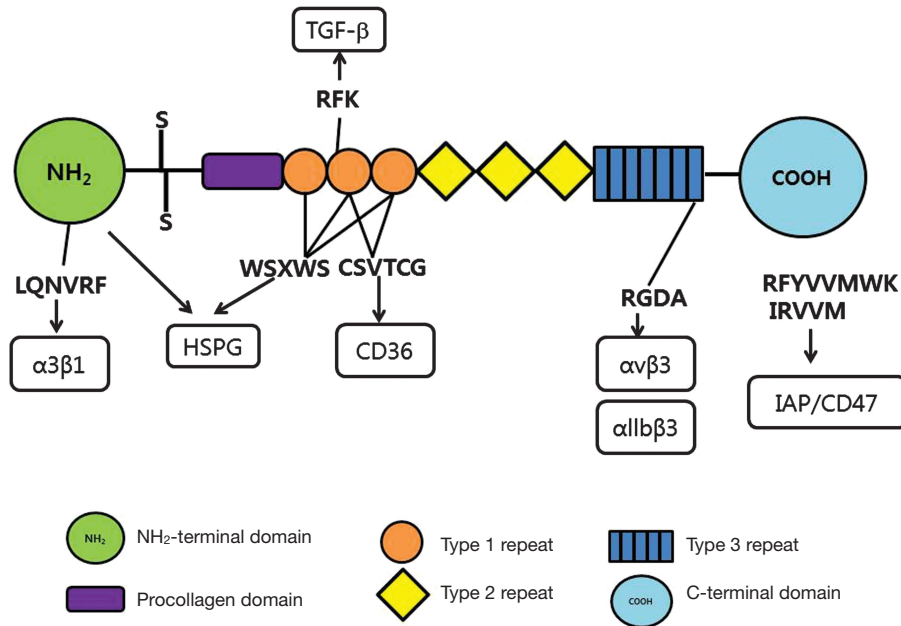


Fig. 2. The structure of the thrombospondin-1 subunit and its receptors. The TSP-1 peptide consists of six functional domain structures from N- to C-terminal. The NH₂-terminal domain stimulates angiogenic response via $\alpha 3 \beta 1$ and other integrins. The type 1 repeats contain two distinct anti-angiogenic sequences that interacts with heparan sulfated glycoconjugates, fibronectin, TGF- β , and the receptor CD36. The type 3 repeats contain an RGD sequence that interacts with $\alpha 5 \beta 1$ and $\alpha \text{v} \beta 3$ integrins. The C-terminal domain interacts with CD47. Some CD47-binding peptides derived from this domain inhibit angiogenesis.

직 알려지지 않은 단백질이 있어 그 기능을 억제하고 있기 때문일 것으로 생각되고 있다 [25,26]. 혈소판 내에서 TSP-1이 TGF- β 를 활성화시키지 못하도록 막는 기전은 TSP-1과 TGF- β 두 가지가 함께 저장되어 있는 α -granule에서는 필수적이다. 그렇지만 이러한 기전은 상피세포처럼 두 가지 단백질이 동시에 발현되고 또한 활성화 되어있는 세포에는 존재하지 않는 것으로 생각된다.

TSP-1에 의한 신혈관형성 억제작용

암의 성장을 억제하는 치료제의 개발은 항암제의 독성으로 인한 부작용 때문에 최근에는 신혈관형성을 억제하는 방향으로 초점이 모아지고 있다. TSP-1은 자연계에 존재하는 단백질로서 신혈관형성 억제기능을 갖는 물질로 처음 밝혀진 단백질이다 [27]. TSP-1은 *in vivo*와 *in vitro* 환경 모두에서 신혈관형성을 억제하는 효과가 있음이 여러 실험에서 증명되고 있고 [28-30], 다양한 종류의 암세포에 TSP-1을 과발현시켜 생쥐에 이식하면 신혈관형성과 암의 성장이 각각 억제된다 [31-33]. 또한 이들 실험에서 볼 수 있는 가장 큰 특징은 종양 내 큰 혈관의 숫자가 눈에 띄게 감소한다

는 점이다. 이러한 사실은 TSP-1이 종양 조직 내의 미세혈관 형성을 억제하는 정도에 그치는 것이 아니라 주변조직에서 종양조직으로 새로 자라 들어오는 모든 혈관의 형성까지 억제할 수 있음을 나타내는 것이고 이는 TSP-1이 혈관 내피세포 뿐 아니라 암세포의 성장을 억제하는 기전도 함께 가지고 있음을 의미하는 것이다. 실제로 TSP-1을 암세포에 transfection 시키면 종양조직 주변에 세포외기질의 양이 눈에 띄게 증가하는 점도 이러한 특징 중의 하나이며 [32], TSP-1을 사람의 상피암세포주(A431)에 transfection하면 종양을 형성하는 능력이 없어지는 것도 확인되었다 [33].

TSP-1 type 1 repeat에 의한 신혈관형성 억제작용

TSP-1의 어느 부위가 신혈관형성 억제작용을 나타내는지에 대한 연구는 지난 1990년대에 TSP-1 type 1 repeat (TSR)을 중심으로 활발한 연구가 추진되었다 [23,28,29]. TSP-1에는 세 개의 type 1 repeat가 존재하는데 이 중 TSP-1의 두 번째와 세 번째 TSR 펩티드가 TSP-1의 신혈관형성 능력을 나타내는 대표적인 부위로 알려져 있다. 그중에서

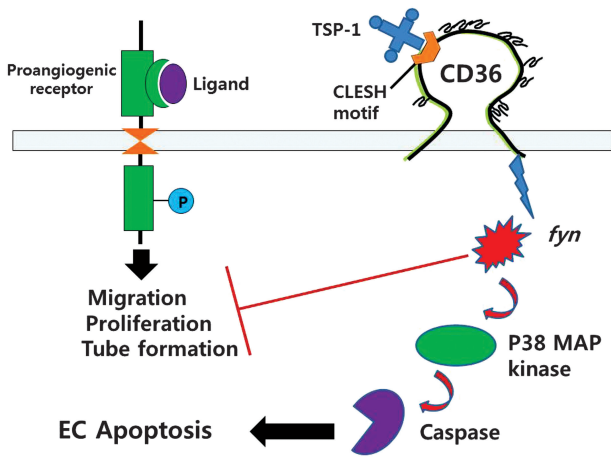


Fig. 3. Antagonism of angiogenesis by CD36 receptor. Proangiogenic receptors induces proliferation, migration, and tube formation of endothelial cells by ligand stimulation. In the presence of TSP-1, which interacts with a specific motif (CLESH) of the CD36 receptor, angiogenesis is inhibited. Inhibition is mediated by *fyn*, p38 MAPK and caspase signaling pathways, resulting in endothelial cell apoptosis.

도 두 번째 TSR 서열에는 세 종류의 신혈관형성을 억제하는 펩티드가 존재하는 것으로 알려져 있다 (Fig. 2). 신혈관형성 억제능력이 있는 것으로 처음 밝혀진 펩티드는 MAL-II로 이 펩티드는 CSVTCG 아미노산 서열을 포함하고 있어서 CD36 세포수용체에 결합할 수 있다 [34]. 그리고 이때 CD36에 대한 항체를 처리하면 TSP-1의 혈관내피세포의 이동 억제효과가 없어진다. 이는 FGF-2를 처리한 세포덩어리 (pellet)를 자연 상태의 생쥐 각막에 이식했을 때는 TSP-1이 신혈관형성을 억제하지만 CD36 유전자발현을 차단한 생쥐에 이식했을 때는 신혈관형성을 억제하지 못한다는 연구결과에서 TSP-1이 CD36을 통해 억제효과를 나타내는 것임이 확인되었다 [35]. 이와 대조적으로 신혈관형성 억제 물질인 angiostatin은 CD36 유전자발현이 억제된 생쥐에서도 신혈관형성을 억제시키므로 angiostatin과 TSP-1은 작용 기전이 서로 다른 것으로 생각된다. 또한 Src family kinase인 *fyn*의 발현이 차단된 생쥐에서 TSP-1이 신혈관형성을 억제하지 못하고, *fyn*은 다른 두 가지 Src family kinase인 *lyn* 또는 *yes*와 마찬가지로 혈관내피세포와 혈소판에 있는 CD36과 반응하여 침전물을 형성하는 실험에서도 TSP-1이 CD36을 통해 신혈관형성을 억제하는 기전이 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 TSP-1은 혈관내피세포의 이동을 억제하고 세포사멸을 유도함으로써 신혈관형성을 억제한다. 또한, p38 MAPK나 caspase 3 억제제를 처리하면 TSP-1에 의한 세포사멸 유발이 억제된다. 이는 활성화된 p38 MAPK가 caspase를 통해 세포사멸을 유도시키기 때문

이다 (Fig. 3). CSVTCG 아미노산 서열을 포함하는 펩티드를 계란용모막 (CAM; chorioallantoic membrane)에 처리하면 FGF-2나 VEGF에 의해 유도된 신혈관형성이 억제된다 [12]. 그러나 RFK나 WSHWSPW 아미노산 서열을 포함하는 인접 펩티드의 경우는 FGF-2에 의해 유도된 신혈관형성만 억제한다. 이는 RFK의 아미노산서열이 바뀌더라도 같은 결과를 나타내는 것으로 보아 TGF- β 활성은 신혈관형성 억제작용에는 관련이 없기 때문인 것으로 판단된다.

CSVTCG에 인접한 또 다른 아미노산 서열은 혈관내피세포의 이동을 억제한다. 이 펩티드는 GVITRIR 서열로서 펩티드 합성 시 D-isoleucine으로 합성하면 혈관내피세포의 이동을 억제하는 능력이 강해지지만 MAL-II 펩티드의 모든 아미노산을 L-aminoacid로 합성하면 활성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다. 따라서 펩티드 합성 시에는 그 기능에 영향을 미칠 수 있는 post-translational modification이나 특정 아미노산의 site-directed mutagenesis 등이 고려되어야 한다. 그리고 TSR 펩티드 내의 활성을 나타내는 서열들이 서로 인접하여 위치하기 때문에 같은 수용체에 대해서도 반응하는 부위가 달라질 수 있고 CD36의 경우도 TSP와 경쟁적으로 결합하는 다른 막단백질과도 반응할 수 있을 것이다.

TSP-1 C-terminal 도메인에 의한 신혈관형성 억제작용

TSP-1에서 신혈관형성 억제효과를 나타내는 부위는 두 군데가 더 있다. 하나는 아미노말단 부위로서 이 부위는 헤파린에 대한 강한 결합력이 있어서 세포표면의 proteoglycan에 여러 종류의 혈관형성인자가 결합할 때 이들과 경쟁적으로 결합함으로써 혈관형성인자들의 작용을 방해한다 [36]. 그리고 또 다른 부위는 카복시 말단 부위로 백혈구 등 많은 세포의 CD47 수용체와 결합하는 부위이다. TSP-1의 CD47 결합부위 펩티드는 *in vitro* angiogenesis 모델에서는 뇌모세혈관 내피세포의 혈관형성을 억제하고 또한 각막의 신혈관형성 모델에서도 FGF-2로 유발된 신혈관형성을 억제하여 이들의 신혈관형성 억제효과는 뇌혈관내피세포에 국한되지 않는 것으로 생각된다 [37].

TSP-1은 VEGF 신호전달기전의 내인성 길항제로 잘 알려져 있는데 [38] TSP-1이 CD47에 결합하면 혈관내피세포의 eNOS/NO/cGMP 신호전달기전이 무력화된다 (Fig. 4) [39]. TSP-1은 배꼽정맥내피세포 (HUVEC; human umbilical vein endothelial cell)과 피부모세혈관내피세포 (HMVEC; human microvascular endothelial cell)에서 CD47을 통해

VEGFR2 수용체의 인산화를 억제하는 것으로 알려져 있는데 [40] 이러한 효과는 CD47의 발현이 차단된 유전자변형 생쥐의 혈관내피세포에서는 TSP-1이 VEGFR2 수용체의 인산화를 억제하지 못하는데서 확인되었다. 이때 CD47을 통한 TSP-1의 VEGFR2 수용체 인산화 억제작용은 VEGF의 결합에는 영향을 주지 않는다. 형광공명에너지전달기법(FRET)과 면역침전법을 통한 연구에 의하면 CD47 수용체는 인접한 VEGFR2 수용체와 측면접촉을 통해 서로 결합하는데 이때 TSP-1이 CD47 수용체에 부착하면 CD47은 VEGFR2 수용체와의 결합으로부터 분리되어 하위신호 전달기전인 AKT의 활성이 억제되고 이를 통해 VEGF에 의한 혈관내피세포의 반응이 차단된다. 따라서 TSP-1의 카

복시터미널 도메인은 VEGF의 혈관내피세포에 대한 세포증식 및 이동을 억제할 수 있다.

TSP-1에 의한 암세포의 포식 작용과 T림프구 활성화효과

큰포식세포 (macrophage)의 포식 작용 (phagocytosis)은 포식세포에 대한 포식 작용 촉진신호 (prophagocytic, “eat me” signal)와 포식 작용 억제신호 (antiphagocytic, “don’t eat me” signal) 간의 균형에 의해 이루어진다 [41-43]. CD47은 줄기세포에서 처음 보고된 막단백질로 대부분의 포식세포에서 발현되는 signal regulatory protein α (SIRPα) 단백질에 결합하면 포식세포가 CD47이 발현된 세포를 자신 (self)으로 인식하여 포식작용이 억제된다 [44-46]. 이때 노화 또는 변형된 적혈구, 혈소판 및 림프구에서 세포표면의 CD47이 감소하면 이들 세포는 큰포식세포 (macrophages)에 의해 외래단백질 (non-self)로 인식되어 제거되는데 이는 CD47과 SIRPα 두 수용체 사이에 결합반응을 통한 포식 작용 억제기전이 존재하기 때문이다 (Fig. 5) [44,45,47,48].

CD47은 조혈세포 또는 고형암세포 등 다양한 세포에서 그 발현양이 높다. 특히 종양형성을 막 시작한 세포는 CD47의 발현이 높아 포식세포들의 공격을 피할 수 있어 계속 증식할 수 있게 되므로 암 환자의 낮은 생존율과 관련이 깊은 것으로 알려져 있다 [49-52]. 이러한 이유 때문에 최근에는 CD47의 작용을 차단하는 암치료제의 개발이 활발히 진행되고 있다 [50,53]. 이미 CD47의 작용을 차단하는 여러 가지 단클론항체들이 림프종, 방광암, 직장암, 교아세포종,

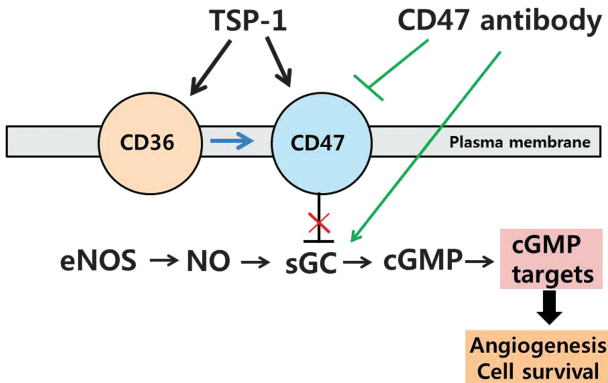


Fig. 4. TSP1-CD47 signaling pathways. TSP-1 acts through its receptor CD47 to block sGC activation. TSP-1 also signals through CD36 to inhibit the same response, but CD47 is necessary for these signals to inhibit cGMP signaling. Blockade of TSP1-CD47 signaling with antibodies to TSP-1 and CD47 increases cell survival and enhances angiogenesis.

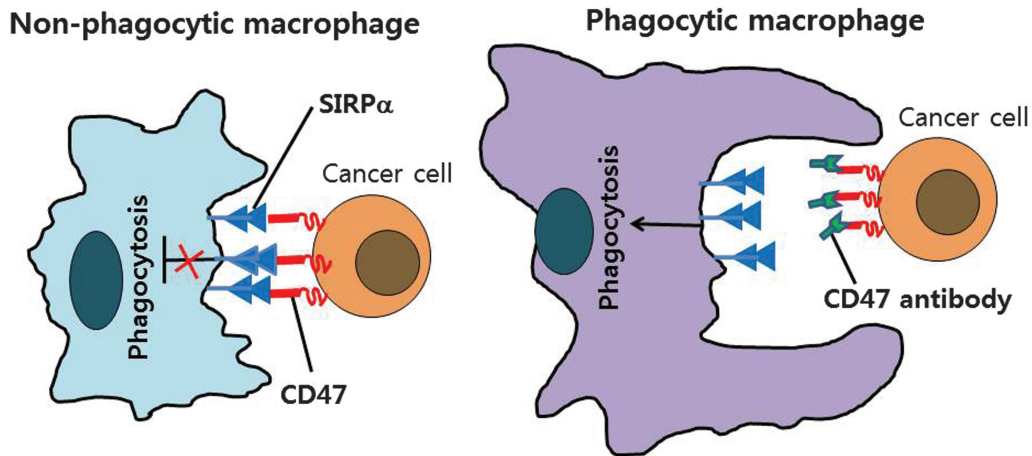


Fig. 5. Macrophage phagocytosis of tumor cells by CD47 antibody. Left, CD47 expression on cancer cells activates SIRPα on macrophages and prevents macrophage phagocytosis of cancer cells. Right, CD47-blocking therapies to cancer cells prevent inhibitory signaling from SIRPα to augment macrophage phagocytosis.

유방암, 급성백혈병 등의 전임상실험에서 좋은 효과를 나타내고 있고 이들은 대부분 큰포식세포의 포식 작용을 증가시켜 암세포의 제거를 돕고 있다. 그뿐 아니라 CD47 항체의 항암효과는 세포독성을 주도하는 CD8+ T 림프구를 활성화시키는 효과도 있으므로 CD47항체를 이용한 암치료방법은 면역치료 효과까지 함께 나타낼 수 있으므로 보다 강력한 치료효과를 기대할 수 있는 것이다.

결 론

최근 들어 TSP-1의 생체 내 기능이 주목을 받고 있다. 이는 그동안 세포외기질 단백질로만 알려져 왔던 TSP-1이 단순한 기질단백질이 아닌 체내에서 중요한 여러 가지 다른 기능도 담당하고 있다는 것이 알려지고 있기 때문이다. 이 기능들은 TSP-1이 단순히 혈관내피세포에 작용하여 신혈관형성을 억제하는 것뿐 아니라 여러 종류의 암세포에서도 증식이나 전이를 억제함으로써 직접적으로 암세포의 활성을 억제할 수 있다는 것을 의미한다. 또한 최근에는 CD47의 단클론항체를 처리하여 CD47의 신호전달을 차단하거나 또는 morpholino를 이용하여 종양세포 내 CD47 mRNA의 발현을 감소시키면 암세포의 CD47 신호전달이 차단됨으로써 큰 포식세포 또는 T 림프구의 공격을 자극하도록 함으로써 암세포를 제거할 수 있다는 것이 보고되었다[54]. TSP-1의 이러한 기능들은 암세포 내 c-Myc 등 전사인자의 발현을 조절함으로써 분화조절을 통해 암을 치료할 수 있으므로 암줄기세포의 조절을 통한 암의 근본적인 치료도 가능할 것으로 생각된다[55].

따라서 TSP-1은 이제 더 이상 아미노말단과 카복시 말단 부위의 펩티드 작용을 통해 VEGF 등 신혈관형성인자들의 작용하는 것을 차단하거나, type 1 repeat의 TSR 펩티드를 통해 CD36 수용체에 직접 결합함으로써 혈관내피세포의 이동을 억제하거나 사멸을 유도하여 신혈관형성을 차단하는 기능이 전부가 아닌 것이다. 따라서 TSP-1을 이용한 종양의 치료방법은 매우 다양해서 TSP-1을 이용할 수 있다면 이제 암은 더 이상 치료 불가능한 질병이 아니라고 말할 수 있을 것이다. 그렇지만 그 동안 수많은 항암기전들이 규명되고 있음에도 불구하고 TSP-1의 세포외기질 또는 세포 수용체를 통한 세포의 형태와 생리적인 변화 및 신호전달기전은 procollagen domain과 type 3 repeat 등 TSP-1의 구조중 아직 밝혀지지 않은 것들이 많고 최근 활발히 연구되고 있는 유전자편집 기술과 miRNA를 이용한 추가적인 조절기전 등[56]은 앞으로도 더 연구되어야 한다. 이를 통해 보다 안전하고 부작용이 없는 종양 치료기술의 개발이 개발된다

면 암의 정복은 머지않은 장래에 가능할 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New Eng J Med.* 1971; 285:1182-6.
2. Cook KM, Figg WD. Angiogenesis inhibitors: current strategies and future prospects. *CA Cancer J Clin.* 2010; 60:222-43.
3. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3:401-10.
4. Folkman J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J Natl Cancer Inst.* 1990; 82:4-6.
5. Verheul HM, Voest EE, Schlingemann RO. Are tumors angiogenesis-dependent? *J Pathol.* 2004; 202:5-13.
6. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6:273-86.
7. Faivre S, Demetri G, Sargent W, Raymond E. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. *Nat Rev Drug Discov.* 2007; 6:734-45.
8. Wilhelm S, Carter C, Lynch M, Lowinger T, Dumas J, Smith RA, et al. Discovery and development of sorafenib: a multikinase inhibitor for treating cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5:835-44.
9. Motzer RJ, Bukowski RM. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2006; 24:5601-8.
10. Bergers G, Hanahan D. Modes of resistance to anti-angiogenic therapy. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8:592-603.
11. Verheul HM, Pinedo HM. Possible molecular mechanisms involved in the toxicity of angiogenesis inhibition. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7:475-85.
12. Urbich C, Kuehnbacher A, Dimmeler S. Role of microRNAs in vascular diseases, inflammation, and angiogenesis. *Cardiovasc Res.* 2008; 79:581-8.
13. Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, et al. The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell.* 2008; 15:261-71.
14. Wang S, Olson EN. AngiomiRs-key regulators of angiogenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2009; 19:205-11.
15. Albelda SM. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest.* 1993; 68:4-17.
16. Roberts DD. Regulation of tumor growth and metastasis by thrombospondin-1. *FASEB J.* 1996; 10:1183-91.
17. Morandi V, Fauvel-Lafeve F, Legrand C, Legrand YJ. Role of thrombospondin in the adhesion of human endothelial cells in primary culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1993; 29:585-91.

18. Dreyfus M, Lahav J. The build-up of the thrombospondin extracellular matrix. An apparent dependence on synthesis and on preformed fibrillar matrix. *Eur J Cell Biol.* 1988; 47: 275-82.
19. Lawler J. The functions of thrombospondin-1 and -2. *Curr Opin Cell Biol.* 2000; 12:634-40.
20. Wang TN, Qian XH, Granick MS, Solomon MP, Rothman VL, Tuszynski GP. The effect of thrombospondin on oral squamous carcinoma cell invasion of collagen. *Am J Surg.* 1995; 170:502-5.
21. Lawler J, Connolly JE, Ferro P, Derick LH. Thrombin and chymotrypsin interactions with thrombospondin. *Ann NY Acad Sci.* 1986; 485:273-87.
22. Bein K, Simons M. Thrombospondin type 1 repeats interact with matrix metalloproteinase 2. Regulation of metalloproteinase activity. *J Biol Chem.* 2000; 275:32167-73
23. Iruela-Arispe ML, Lombardo M, Kruttsch HC, Lawler J, Roberts DD. Inhibition of angiogenesis by thrombospondin-1 is mediated by 2 independent regions within the type 1 repeats. *Circulation.* 1999; 100:1423-31.
24. Chen H, Strickland DK, Mosher DF. Metabolism of thrombospondin 2. Binding and degradation by 3t3 cells and glycosaminoglycan-variant Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem.* 1996; 271:15993-9
25. Murphy-Ullrich JE, Schultz-Cherry S, Höök M. Transforming growth factor-beta complexes with thrombospondin. *Mol Biol Cell.* 1992; 3:181-8.
26. Ribeiro SM, Poczatek M, Schultz-Cherry S, Villain M, Murphy-Ullrich JE. The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor-beta. *J Biol Chem.* 1999; 274:13586-93.
27. Good DJ, Ploverini PJ, Rastinejad F, Le Beau MM, Lemons RS, Frazier WA, et al. A tumor suppressor-dependent inhibitor of angiogenesis is immunologically and functionally indistinguishable from a fragment of thrombospondin. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; 87:6624-8.
28. Tolsma SS, Volpert OV, Good DJ, Frazier WA, Ploverini PJ, Bouck N. Peptides derived from two separate domains of the matrix protein thrombospondin-1 have anti-angiogenic activity. *J Cell Biol.* 1993; 122:497-511.
29. Dawson DW, Bouck NP. Thrombospondin as an inhibitor of angiogenesis. In *Antiangiogenic agents in cancer therapy.* Edited by Teicher BA. Totowa, NJ: Human Press Inc.; 1999. p. 185-203.
30. Kyriakides TR, Leach KJ, Hoffman AS, Ratner BD, Bornstein P. Mice that lack the angiogenesis inhibitor, thrombospondin-2, mount an altered foreign body reaction characterized by increased vascularity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96:4449-54.
31. Weinstat-Saslow DL, Zabrenetzky VS, VanHoutte K, Frazier WA, Roberts DD, Steeg PS. Transfection of thrombospondin 1 complementary DNA into a human breast carcinoma cell line reduces primary tumor growth, metastatic potential and angiogenesis. *Cancer Res.* 1994; 54:6504-11.
32. Bleuel K, Popp S, Fusenig NE, Stanbridge EJ, Boukamp P. Tumor suppression in human skin carcinoma cells by chromosome 15 transfer or thrombospondin-1 overexpression through halted tumor vascularization. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96:2065-70.
33. Streit M, Riccardi L, Velasco P, Brown LF, Hawighorst T, Bornstein P, et al. Thrombospondin-2: a potent endogenous inhibitor of tumor growth and angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96:14888-93.
34. Greenwalt DE, Lipsky RH, Ockenhouse CF, Ikeda H, Tandon NN, Jamieson GA. Membrane glycoprotein CD36: A review of its roles in adherence, signal transduction, and transfusion medicine. *Blood.* 1992; 80:1105-15.
35. Jimenez B, Volpert OV, Crawford SE, Febbraio M, Silverstein RL, Bouck N. Signals leading to apoptosis-dependent inhibition of neovascularization by thrombospondin-1. *Nat Med.* 2000; 6:41-8.
36. Vogel T, Guo NH, Kruttsch HC, Blake DA, Hartman J, Mendelovitz S, et al. Modulation of endothelial cell proliferation, adhesion, and motility by recombinant heparin-binding domain and synthetic peptides from the type 1 repeats of thrombospondin. *J Cell Biochem.* 1993; 53:74-84.
37. Kanda S, Shono T, Tomasini-Johansson B, Klint P, Saito Y. Role of thrombospondin-1-derived peptide, 4N1K, in FGF-2-induced angiogenesis. *Exp Cell Res.* 1999; 252:262-72.
38. Roberts DD, Miller TW, Rogers NM, Yao M, Isenberg JS. The matricellular protein thrombospondin-1 globally regulates cardiovascular function and responses to stress via CD47. *Matrix Biol.* 2012; 31:162-9.
39. Isenberg JS, Martin-Manso G, Maxhimer JB, Roberts DD. Regulation of nitric oxide signalling by thrombospondin 1: implications for anti-angiogenic therapies. *Nat Rev Cancer.* 2009; 9:182-194.
40. Kaur S, Martin-Manso G, Pendrak ML, Garfield SH, Isenberg JS, Roberts DD. Thrombospondin-1 inhibits VEGF receptor-2 signaling by disrupting its association with CD47. *J Biol Chem.* 2010; 285:38923-32.
41. Gardai SJ, McPhillips KA, Frasci SC, Janssen WJ, Starefeldt A, Murphy-Ullrich JE, et al. Cell-surface calreticulin initiates clearance of viable or apoptotic cells through trans-activation of LRP on the phagocyte. *Cell* 2005; 123:321-34.
42. Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsukamoto R, Alizadeh AA, Gentles AJ, Volkmer J, et al. Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and

- is counterbalanced by CD47. *Sci Transl Med.* 2010; 2: 63ra94.
43. Chao MP, Majeti R, Weissman IL. Programmed cell removal: a new obstacle in the road to developing cancer. *Nat Rev Cancer.* 2011; 12:58-67.
 44. Oldenborg PA, Zheleznyak A, Fang YF, Lagenaur CF, Gresham HD, Lindberg FP. Role of CD47 as a marker of self on red blood cells. *Science.* 2000; 288:2051-4.
 45. Blazar BR, Lindberg FP, Ingulli E, Panoskaltsis-Mortari A, Oldenborg PA, Iizuka K, et al. CD47 (integrin-associated protein) engagement of dendritic cell and macrophage counterreceptors is required to prevent the clearance of donor lymphohematopoietic cells. *J Exp Med.* 2001; 194:541-9.
 46. Barclay AN, Van den Berg TK. The interaction between signal regulatory protein alpha (SIRP α) and CD47: structure, function, and therapeutic target. *Annu Rev Immunol.* 2014; 32:25-50.
 47. Yamao T, Noguchi T, Takeuchi O, Nishiyama U, Morita H, Hagiwara T, et al. Negative regulation of platelet clearance and of the macrophage phagocytic response by the transmembrane glycoprotein SHPS-1. *J Biol Chem.* 2002; 277: 39833-9.
 48. Olsson M, Bruhns P, Frazier WA, Ravetch JV, Oldenborg PA. Platelet homeostasis is regulated by platelet expression of CD47 under normal conditions and in passive immune thrombocytopenia. *Blood.* 2005; 105:3577-82.
 49. Jaiswal S, Jamieson CH, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, et al. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell.* 2009; 138:271-85.
 50. Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jaiswal S, Gibbs KD Jr, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell.* 2009; 138:286-99.
 51. Rendtlew Danielsen JM, Knudsen LM, Dahl IM, Lodahl M, Rasmussen T. Dysregulation of CD47 and the ligands thrombospondin 1 and 2 in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 2007; 138:756-60.
 52. Chan KS, Espinosa I, Chao M, Wong D, Ailles L, Diehn M, et al. Identification, molecular characterization, clinical prognosis, and therapeutic targeting of human bladder tumor-initiating cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106:14016-21.
 53. Chan KS, Volkmer JP, Weissman I. Cancer stem cells in bladder cancer: a revisited and evolving concept. *Curr Opin Urol.* 2010; 20:393-7.
 54. Liu X, Pu Y, Cron K, Deng L, Kline J, Frazier WA, et al. CD47 blockade triggers T cell-mediated destruction of immunogenic tumors. *Nat Med.* 2015; 21:1209-15
 55. Kaur S, Soto-Pantoja DR, Stein EV, Liu C, Elkahloun AG, Pendrak ML, et al. Thrombospondin-1 signaling through CD47 inhibits self renewal by regulating c-myc and other stem cell transcription factors. *Sci Rep.* 2013; 3:1673 DOI:10.1038/strep01673.
 56. Wang W, Zhang E, Lin C. MicroRNAs in tumor angiogenesis. *Life Sci.* 2015; 136:28-35.

Thrombospondin-1 and Inhibition of Tumor Growth

Goo-Bo Jeong

Department Anatomy and Cell Biology, Graduate School of Medicine, Gachon University, Incheon, Korea

Abstract : Thrombospondin-1 is the multifunctional protein that modulates endothelial cell and tumor cell behavior via several cell surface receptors and inhibits angiogenesis. In vitro, thrombospondin-1 alters adhesion, proliferation, motility, and survival of endothelial and cancer cells. Studies have confirmed that increased TSP-1 expression suppresses growth or metastasis of some tumors and inhibits angiogenesis. In the past three decades, inhibitors of angiogenesis have been developed as regulators target the vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway and small molecule tyrosine kinase inhibitors have been clinically approved. TSP-1 has several functional domain structures and inhibits tumor angiogenesis by engaging receptors CD36 and CD47. TSP-1 binding to CD47 dissociates it from VEGFR2, inhibiting downstream AKT activation and functional responses of endothelial cells to VEGF. Recently, macrophage phagocytosis and cytotoxic T-cell induction of tumor cells mediated by CD47-specific blocking antibodies have been proposed. These findings provide a new therapeutic paradigm for elimination of cancer cells and inhibition of angiogenesis of tumor by TSP-1.

Keywords : Thrombospondin-1, Angiogenesis, Endothelial cells, VEGFR2, CD36, CD47