

Transforming Growth Factor- β 가 암발생에 미치는 영향

허규희*

제주대학교 의과대학 외과학교실

Transforming Growth Factor- β signaling on tumorigenesis

Kyu Hee Her*

*Department of Surgery, College of Medicine,
Cheju National University, Jeju 690-756, Korea*

Abstract

Transforming growth factor beta (TGF- β) is a ubiquitous multifunctional polypeptide and essential regulator of cellular and physiologic processes including proliferation, differentiation, adhesion, migration, apoptosis, angiogenesis and immunosurveillance. Abnormal activation or inhibition of these TGF- β signaling pathway, including mutation or deletion of members of the signaling pathway and resistance to TGF- β -mediated inhibition of proliferation are frequently observed in human cancers. Although these alterations define a tumor suppressor role for the TGF- β pathway in human cancer, TGF- β also mediates tumor-promoting effects. TGF- β signaling transduction cascade is initiated when TGF- β binds to transmembrane receptors, either through differential effects on tumor and stromal cells or through a fundamental alteration in the TGF- β responsiveness of the tumor cells themselves. In the nucleus, Smads can bind directly to DNA and cooperate with other transcription factors to induce transcription of TGF- β target genes. Ongoing advances in understanding molecular and cellular contexts of this pathway will targeting for the chemoprevention and treatment of human cancers.

Key Words : TGF- β signaling pathway, tumor suppressor, tumor-promoting effects, Smads

* Corresponding author : herkh@cheju.ac.kr

서론

인체의 조직에서 정상적인 항상성(homeostasis)를 유지하려면 세포와 주변의 세포의 기질로 대표되는 주변단백질간의 균형을 잘 이루어야 한다. 이러한 균형은 세포의 표면에 존재하는 각종 cytokines의 수용체를 통한 협력에 의하여 성취된다. 세포와 세포 주변의 기질과의 균형이 깨어질 때 질병상태로 이행되며 TGF- β 에 의해 매개되는 기전에 있어서도 이는 명백한 사실이다.

TGF- β 는 bone morphogenic protein과 activin을 포함하는 dimeric polypeptide 성장물질의 하나로 cysteine을 포함하고 있어 분자간 disulfide bonds를 형성하고 있다(1). 기본적으로 체내의 모든 세포들은 그것이 상피세포든 내피세포든 혈액세포든, 신경세포든 혹은 결체조직의 세포든을 막론하고 모두 TGF- β 를 생산하고 TGF- β 에 관한 수용체를 가지고 있다.

TGF- β 신호전달은 세포증식(proliferation), 인지(recognition), 분화(differentiation), 사멸(apoptosis), 발생의 분화에 이르기까지 다양한 과정을 통제하는데 이 과정은 성숙된 조직에 있어서 뿐만 아니라 배 발생 단계에서 부터 통제하며 곤충에서부터 포유류에 이르기 까지 전 종에 걸쳐서 관여한다(2-5).

TGF- β 조절의 정상적이지 못한 자극이나 억제는 신장계, 간담도계, 신경계를 포함한 수 많은 질병상태에서 관찰된다. 이 중에서 가장 많은 연구자들의 관심을 끌고 있는 분야가 발암기전에 있어서 TGF- β 의 역할이다. 최근의 분자생물학적인 연구들을 통하여 암의 발생은 세포단계에서부터 특정한 일련의 기전의 축적의 결과임을 보여주고 있다. 이러한 기전들에는 세포의 독립적인 성장, 무한분열, 혈관신생, 조직침투등이 포함된다.

TGF- β 신호전달체계는 세포의 공정에 다양하고 복잡하게 관여하며 이 과정에서 암은 TGF- β 신호전달체계를 자신이 성장하는 데 최대한 유리한 방향으로 변환하여 이용한다.

Hanahan 등은 인간에게 발생하는 암은 일련의 확률적인 사건들이 축적되어 나타난다고 보고 하였다(6). 암세포들이 습득하게 되는 몇 가지 공통적인 특징들이 있는데 이러한 것들로써는 성장억제에 대한 저항성, 외부의 성장인자의 공급없이 지속적으로 분화하는 능력들, 조직에 침윤하고 원격전이를 유발하는 능력, 무제한 복제를 지속하는 능력, 세포자멸사를 회피하는 능력, 신생혈관 형성을 통한 혈액공급, 면역체계를 회피하는 능력등을 들 수 있다. 이러한 기능들은 암세포가 일반적으로 가지고 있는 능력들인데 암세포 유전자의 불안정이 이를 더 강화하는 역할을 하고 있다. 각각의 특성들은 정상 세포에 있어서는 항상성을 조절하는 역할을 하는 신호전달체계에 의하여 조절된다. 따라서 발암기전이라는 것은 그것이 유전자 수준이건 혹은 그 후의 단계이건 크게 이런 신호전달체계의 손상이라는 관점에서 접근하여야 한다. 이러한 신호전달체계의 하나인 TGF- β 신호전달체계가 위에 열거한 암세포들의 특성들을 조절하거나 매개하는데 복잡한 역할을 있음이 지금까지 잘 알려져 있다(Table 1).

이렇듯 TGF- β 신호전달체계가 암발생에 있어서 눈에 띄게 많은 역할을 담당하고 있음에도 불구하고 실제 생체에 있어서 그 작용기전이 아직 충분히 밝혀지지 않았고 암에 있어서 그 기전의 중간 변이가 다양한 양상을 취하고 있기 때문에 TGF- β 경로를 정확히 취하여 연구하는 데는 아직도 방해물이 많이 남아있다.

Table 1. TGF- β and the Hallmarks of Cancer

Hallmark	Effects of TGF- β	Example
Resistance to growth inhibitory factors	Loss of TGF- β -induced growth inhibition	About half of human pancreatic cancers are not growth inhibited by TGF- β because of mutation of the Smad4 gene (7)
Proliferation in absence of exogenous growth factors	TGF- β stimulates proliferation of some cancer cells	TGF- β stimulates proliferation through a ras-dependent mechanism in colon carcinoma cells(8)
Invasion and metastasis	TGF- β promotes invasiveness and metastasis	In prostatic cancer cells, exogenous TGF- β increases secretion of plasminogen activator, the expression of which promotes extracellular matrix degradation and is correlated with a more invasive phenotype(9)
Limitless replicative potential	Loss of TGF- β induced repression of <i>hTERT</i>	TGF- β induces telomere shortening followed by senescence in lung cancer cells (10)
Evasion of apoptosis	Loss of TGF- β mediated apoptosis	Blocking of TGF- β signaling inhibits tamoxifen induced apoptosis in human breast cancer cell(11)
Induction of angiogenesis	TGF- β induces angiogenesis	Neutralizing TGF- β antibody decreases the angiogenesis and tumorigenesis of TGF- β insensitive renal cell carcinoma cells(12)
Immune system evasion	TGF- β is a potent immunosuppressant	In animal models increased TGF- β expression allows highly immunogenic cancer cells to escape immune surveillance and form tumors(13)

TGF- β 신호전달체계

TGF- β 는 포유류에 있어서 TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3등 3가지 구조적 아형이 존재한다. 각기 다른 유전자에 있고 발현되는 조직의 달라서 조직 특이성이 있다. TGF- β 1이 가장 흔하게 존재하고 다양한 부위에서 발견된다. TGF- β 는 세포의 기질 (extracellular matrix)로 분비되어 휴지기결합단백과 결합하여 휴지기 단백질복합체 상태로 대기한다. 대기 하던 TGF- β 가 활성화되기 위하여는 단백질분해과정 등과 같은 과정의 개입이 필요한데 일단 활성화가 되면 ligand를 내어 놓게되고 이것이 세 가지 종류의

세포 수용체(T β RI, T β RII, T β RIII)에 결합하여 세포내 신호전달을 조절하게 되는 것이다.

세포 표면에는 세 가지 수용체중에 T β RIII이 가장 풍부하게 존재하며 일단 여기에 ligand가 결합하게 되면 신호전달 수용체인 T β RII로 넘겨주게 되고 T β RI를 거치게 된다(14). T β RI와 T β RII 수용체의 세포내 영역에 serine/threonine protein kinase가 존재하여 T β RI이 transcription factors들의 일종인 Smads들을 인산화(phosphorylation)함으로써 세포내로 신호전달을 시작한다(Fig 1)(15,16).

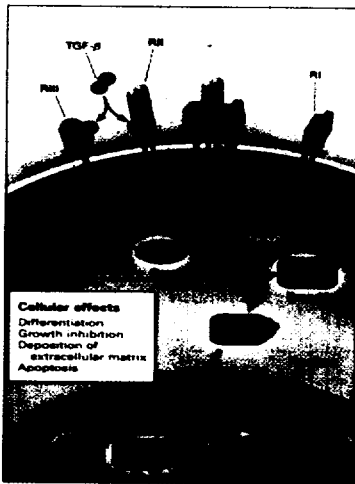


Figure 1. Mechanism of Signal Transduction Mediated by Transforming Growth Factor beta (TGF-beta).

SMADS

세포질에서 핵으로 TGF-β 신호를 전달하는 주요 경로는 Smads 단백질에 의하여 이루어진다. 비록 지금은 Smad가 인간의 유전자에 있어서 TGF-β 신호 전달을 매개한다는 사실이 알려져 있지만 애초에는 무척추동물인 초파리(Drosophila)를 통하여 최초의 개념이 알려졌다. 초파리에서 Mad(mother against decapentaplegic)은 BMP ligand의 유사단백으로 발견되었고(17), C. elegans에서 TGF-β 수용체 변이가 있는 개체에서 나타난 형질 변이가 Sma-2, Sma-3, Sma-4 로 명명된 단백질 위치의 유전자변이를 가지고 있는 개체의 형질이 유사함이 발견되었다(18). Sma와 Mad는 상당히 많은 부분에서 유사성을 보였다. 마침내 척추동물에서도 TGF-β 신호전달에 관여하는 유사물이 발견되었고 이를 Smad라고 명명하게 된 것이다(19).

Smads 의 구조와 분류

현재까지 최소한 9가지 종류의 Smads가 알려져 있는데 분자량은 42-60 kDa이고 구조와 기능의 차이에 따라 크게 세 종류로 나뉜다. 즉 수용체 혹은 경로의 특이성을 가진 R-Smads, common Smads(Co-Smads), 그리고 억제 Smads(I-Smads)등이다. R-Smads와 Co-Smads는 공통적으로 Mad 유사구조

인 MH1과 MH2 구역을 포함하고 두 구역은 proline 이 풍부한 연결구역(linker)으로 연결되어 있다. I-Smads는 carboxyl 기 쪽에 MH2 구역만 가지고 있다(Fig 2).

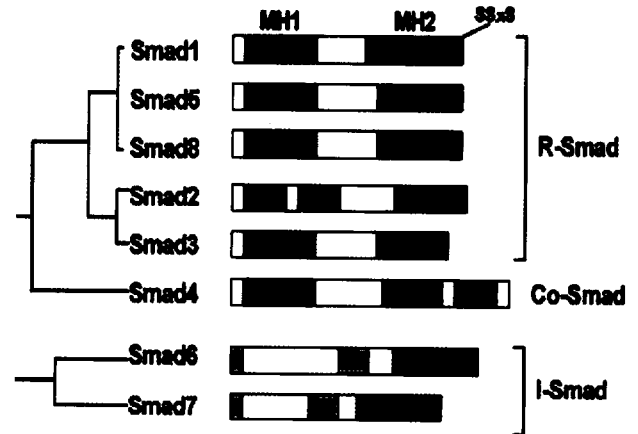


Figure 2. Structure of the Smads. The MH1 and MH2 regions are linked by a less conserved linker(white band) region.

MH1과 MH2 구역은 Smad분자의 기능과 관계된 중요한 구역이다. 즉 MH1구역에 DNA가 결합할 수 있는 자리가 있으며(20), MH2구역은 hetero-, homo- oligomers를 형성하는 구역이다(21,22). 또한 MH2는 Co-Smads가 transcription을 유도하게 하는 중요한 활성부위이다(23). 휴지기 상태에서 MH1과 MH2는 서로 결합하여 Smad의 신호전달을 정지하게 한다(21). R-Smads의 역할은 1형 수용체(TβRI)와 직접 결합하여 TGF-β 신호전달경로의 downstream effector로 기능하게 되는데 Smads 1, 2, 3, 5, 8등이 여기에 포함되며 특히 Smad 2와 3가 중요한 역할을 맡는다(23). 반면 Smad 1, 5, 8등은 주로 BMP 신호 전달과정에 주로 참여하는 것으로 알려졌다(24, 25). R-Smads는 특징적으로 TβRI의 GS 부위가 결합하기 위한 주머니를 형성하고 있으며 carboxyl 기 말단에 Ser-Ser-X-Ser(SSXS) sequence를 가지는데 이곳의 말단 두 자리 serine 자리에 활성화된 TβRI이 인산화(phosphorylation)를 진행하게 되고 인산화된 R-Smad는 구조적인 변형이 일어나게 된다(26).

27). 인산화가 일어나서 구조적으로 변형이 되게 되면 MH1과 MH2 구역의 접촉금지가 풀리게 되고 일단 접촉금지가 해제되게 되면 R-Smad는 Co-Smad (주로 Smad4) 와 hetero-oligomer를 이룰 수 있게 되는 것이다(27-29). 일단 R-Smad가 인산화되어 결과적으로 Co-Smad / R-Smad hetero-oligomer가 형성되게 되면 아직은 풀리지 않은 기전에 의하여 즉시 핵으로 자리 이동을 한다(30, Fig 1). 세포에 있어서 R-Smad나 S-Smad 중 그 어느 하나라도 결합되게 되면 핵으로의 TGF- β 신호전달에 장애가 발생하는 것으로보아서 이 두 가지가 핵 내부로의 신호전달 경로에 핵심적인 역할을 하고 있음을 알 수 있다(31,32). 또한 R-Smad가 독립적으로 핵내로 들어가더라도 Co-Smad의 협조없이 transcription 과정이 진행되지 않음으로 두 가지 물질의 상호협조가 꼭 필요함이 증명되었다. 하지만 Smad4가 TGF- β 신호전달경로에 절대적으로 필요한 것은 아닌 것으로 밝혀져 있다(27).

Co-Smad 와 R-Smad가 TGF- β 신호전달을 전파하는 것으로 알려진 반면 I-Smad는 신호전달에 하향 조절(down regulation)에 있어서 중요한 역할을 한다. 주요 I-Smads에는 Smad6와 Smad7이 포함되는데 Smad 7이 TGF- β 신호전달과정에 더욱 특이적으로 반응하며 Smad 6는 주로 BMP 신호전달에 관여한다(33,34). TGF- β 신호전달에 있어서 억제 역할을 하기 위하여 제기되는 기전은 두 가지로 제시된다. 즉 I-Smad가 T β RI과 직접결합하여 R-Smad의 결합과 활성화과정을 간섭하는 것이 한 가지이고 I-Smad가 Co-Smad와 결합하여 Smad hetero-oligomer의 형성을 방해하는 기전이 나머지 한 가지이다(35).

유전자 조절

Smad의 구조와 기능에 관한 규명이 진행됨으로써 TGF- β 신호전달과정이 핵내에서 목표하는 유전자의 조절에 관여하는 기전이 밝혀지게 되었다. TGF- β 신호전달이 다양한 조직에서 다양한 방식의 효과를 나타내려면 각기 목표하는 유전자에 대한 조절도

차이가 있어야 한다. 이를 목표 유전자에 대한 특이성이라고 한다면 이러한 특이성은 그 신호전달 과정에 있어서 엄격한 통제와 다른 경로의 신호전달과의 상호 작용을 통하여만 가능한 것이다. TGF- β 신호전달은 ligands가 T β RII 수용체에 결합하여야 비로소 시작되고 이 결합이 T β RI을 이끌어 들여 활성화하면서 진행하게 된다. 즉 활성화된 T β RI이 R-Smad에 kinase로 작용하여 R-Smad SSXS 부위를 인산화 시키고 곧 이어서 Co-Smad 인 Smad 4와 R-Smad hetero-oligomer를 형성하게하며 핵내로 진입하여 목표 유전자의 transcription으로 이어지게 한다. 일단 핵내로 진입한 Smad 혼합체는 목표한 유전자의 일정한 지점(Smad binding element, SBE)에 결합하게 된다. SBE는 CAGA 배열을 포함하는 부위가 존재하는데 이 지점에 Smad 3나 Smad 4가 MH1 구역을 이용하여 결합하게 된다(36,37). 이러한 결합부위는 다른 전사요소(transcription factors) 들의 결합부위 바로 인근에 자리하고 있어서 Smads에 의한 transcription이 온전히 개시되려면 다른 인자들의 도움과 조절이 필요하다(Fig 3).

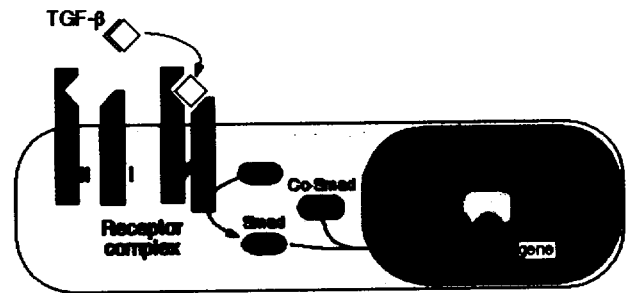


Figure 3. Signal cascade of TGF- β . R-Smad that form hetero-complexes with the co-Smads and translocate to the nucleus where they bind specific DNA binding sites assisted by DNA binding partners.

Smad 가 유전자전사 전사과정을 개시하는데 관여하는 기전으로 제시되고 있는 것중 하나는 FAST (forkhead activin signal transducer) 전사요소이다. activin 신호전달이 있으면 FAST는 DNA promotor sites에 결합하게 되는데 인근에 Smad 결합부위가

존재하고 있다. Smad 2와 Smad 4 결합체가 FAST와 결합하게 되면 유전자에 결합부위를 안정적으로 유지하여 신호전달이 이루어지게 된다(38). 또 하나의 Smads 결합체의 파트너로 제기되는 것은 AP-1 transcription factors 이다. Smads는 Jun 계열과 직접 결합하여(39), TGF- β 신호전달을 가속화 시키기도 하는데 c-Jun은 Jun kinase (JNK)에 의하여 우선 활성화되어야 한다. JNK의 활성화 과정에 있어서 TGF- β 신호전달이 필요한 것으로 알려져 있어서(40,41) 결과적으로 TGF- β 신호전달은 Smads의 인산화를 통한 직접적인 신호전달 체계와 AP-1 결합체계의 인산화를 통한 간접적인 통제를 동시에 진행하는 것이다. 이 외에 추가적으로 제시되는 인자들로 CBP/P300, TFE3, ATF2, PEBP2/CBF 등이 고려되고 있다. 이러한 기전을 통하여 Smads 파트너들이 적절한고 안정적인 결합물을 형성하게 되고 목표한 유전자에 안정적인 전사신호를 유지하는 것이다.

Smads에 의한 주작용이 유전자의 전사를 활성화시키는 것으로 알려져 있는 반면, 최근 이뤄진 연구들에 의하면 몇몇의 Smad 결합 파트너들은 전사를 억제하는 쪽으로 영향을 미치는 것으로 나타나기도 한다. Ski 와 Sno등이 여기에 속하는 인자들이며 promotor에 결합된 Smad에 결합하여 N-CoR 억제 인자를 통한 유전자 전사를 억제하는 것으로 알려져 있다(42,43).

Smad 해체

TGF- β 신호전달은 Smads가 E3 ligases를 만나면 종료하게 된다. Smurf1과 같은 E3 lagase는 Smads를 표적으로 삼아 해체를 유도하게 되는데 그 기전은 ubiquitin-proteosome 경로를 통하여 이뤄진다. 이러한 ubiquitination이 없게 되면 핵내에서 Smad를 매개로 한 신호전달은 지속적으로 이뤄진다고 볼 수 있겠다(44).

비록 TBRI와 TBRII, Smad 2, Smad 3, Smad 4등이 Smad-dependent TGF- β 신호전달의 핵심을 이루기는 하지만 mitogen activated protein kinase(MAPK)

신호전달체계와, Rho guanosine triphosphatases, PI-3 kinase/Akt, protein phosphatase2A등 Smad independent 신호전달체계에 관한 연구가 최근에 활발히 진행되고 있다.

암에 있어서 TGF- β 의 역할

성장억제에 대한 저항성

세포성장은 세포분열과 증식을 촉진하는 신호전달과 이를 억제하는 신호를 적절히 조화시키는 과정에 이루어지는 것이다. 이러한 통제를 벗어나서 분열을 거듭하는 방향의 신호전달만 우세하게 되면 암세포는 증식을 억제하는 통제를 벗어나게 되고 외부의 세포 분열신호 없이도 지속적으로 증식하게 되는 것이다.

TGF- β 는 세포성장조절에 중요한 신호이다. 비록 최초로 간엽세포(mesenchymal cells)의 분화성장과 변환을 유도하는 물질로 발견되어(45), 그 명명이 되기는 하였지만 TGF- β 는 기본적으로 상피세포(epithelial)와 내피세포(endothelial), 조혈세포(hematopoietic cells)의 증식을 강력히 억제하는 물질이다. 이러한 증식억제의 정확한 기전은 아직까지 연구중에 있지만 TGF- β 는 세포주기(cell cycle) 초기에 있어서 cyclin kinase inhibitors p15INK4b(46), p21CIP1(47), p27KIP1(48) 등을 유도하여 retinoblastoma protein(Rb)의 인산화를 막게 한다. Rb 저인산화는 E2F 전사인자를 격리시키게 되어 세포 분열을 정지하게 한다. TGF- β 는 또한 직접적으로 c-myc의 발현을 억제함으로써 세포주기를 억제한다(49).

TGF- β 의 성장억제 효과가 Smad를 매개로 한 신호전달체계에 의하여 이뤄진다고 믿고 있지만 Smad 4가 발현되지 않는 세포(Smad 4 null cells)에 있어서도 TGF- β 에 의한 증식억제가 이뤄진다는 보고들이 있다(50). 또한 MAPK를 포함한 Smad 독립적인 경로를 통하여도 TGF- β 신호는 전달됨이 알려져 있다(51).

상피세포기원의 종양(인간에 있어서 암발생의 85% 이상을 차지하는)에 있어서는 기본적으로 TGF- β 성장억제 효과에 대하여 저항을 보인다. 이러한 현상은

대장암을 비롯한 췌장암에 있어서는 그 기전이 Smad 단백질의 손상에 의한 것으로 잘 알려져 있다(52,53). 즉 췌장암(DPC4)인 경우 주로는 Smad 4의 유전자 수준에서의 결손이, hereditary nonpolyposis colon cancer (HNPCC)에 있어서는 T β R β 수용체 mismatch repair gene의 복원실패 등이 그 기전이다. 하지만 이외의 암들 예를 들면 유방암, 폐암과 전립선암등에 있어서는 아직까지 그 기전이 잘 알려져 있지 않다.

이런 기전이 밝혀지지 않은 암들(대부분의 암들)에 있어서 TGF- β 저항기전으로 제시되고 있는 이론 들로는 세포표면에서 TGF- β 수용체의 발현저하(54-56), Smad 7을 포함한 억제 Smad(I-Smad)의 과발현(57), p53, Myc, E1A, Ras, Ski/SnoN Evi-1등 다양한 발암단백(oncoprotein)에 의한 TGF- β 신호전달억제(58-64), Minin, Disabled-2, RUNX3등을 포함하는 암발생억제 인자의 저하된 발현, Protein kinase C(PKC)등 다른 신호전달체계의 활성등이 제시되고 있다(65-68).

세포는 자체 분열촉진성장인자의 과발현을 통하거나 내부의 하부신호전달체계를 활성화시키는 과정을 통하여 외부에서 전달되는 분열촉진신호의 영향력으로부터 독립하게 된다. TGF- β 는 간엽세포에서 보이는 전형적인 증식촉진 효과를 상피세포에서 기원된 몇 가지 암세포주에서도 보여주기도 한다(69,70). 정확한 기전은 알려지지 않았으나 TGF- β 는 platelet-derived growth factor, fibroblast growth factor, TGF- α , connective tissue growth factor 등과 같은 분열촉진 성장인자들의 생산증가와 그 수용체의 발현을 증가시키기도 한다(71-76). 게다가 Smad 독립신호전달체계 또한 이러한 성장인자의 증식신호를 종종 매개해 준다(77,78).

조직침윤과 전이

고형종양은 주위조직을 침윤하고 멀리 떨어진 부위까지 원격전이를 유발함으로써 인체에 치명적인 영향을 미친다. 이러한 과정은 암세포와 암세포를 둘러싼 주위 환경의 복잡한 상호작용속에 이루어지고 있다.

TGF- β 는 세포사이의 유착과 움직임, 세포의 기질을 강력히 조절하는 물질이다. TGF- β 는 E-cadherin(79)의 발현을 저해함으로써 세포간 유착을 저하시키고, 침윤과 관련된 integrin(α III β 1)의 발현을 증가시키고(80), fibulin-5와 같은 integrin 결합단백의 발현을 증가시킨다(81). 또한 상피세포와 유방암세포의 이동을 직접적으로 증가시킬 수도 있다(82,83).

정상적인 상황에서 TGF- β 는 세포와 기질의 생산을 증가시키는 역할을 수행한다. 즉 collagen과 fibronectin과 같은 세포의 기질 단백질을 직접적으로 증가시키고 반면 기질을 분해하는 효소인 collagenase, heparinase등의 생산을 억제하는 한편 세포의 기질의 분해를 저해하는 효소인 plasminogen activator inhibitor-1등과 같은 단백질의 생산을 증가시킨다(84). 그러나 암발생 기전이 활발히 작동하게 되면 상황은 정반대가 되어 기질 분해효소들이 생산을 증가시킴으로써 암세포에 의한 단백질 분해 활동을 증대시키는 것이다.

TGF- β 가 유발하는 암세포사이의 유착감소, 암세포의 증가된 움직임, 증가된 단백질 분해능력 등이 복합적으로 작용하여 암세포가 더욱 더 강한 침윤력을 가지게 되는 것이다.

무제한 복제력

인간 체세포는 유한한 복제력을 가지므로 결국 제한된 만큼 분열을 마치면 노화되고 사멸하게 되었다. p53나 다른 암억제 단백질이 비활성화 되면 일정기간 이러한 장애물을 넘기게 되지만 결국 세포는 염색체 이상이나 세포사멸과 같은 위기에 봉착하게 된다. 반면 암세포는 이러한 노화나 위기를 맞는 대신 불멸(immortalization)의 단계로 넘어간다. 불멸단계 획득에는 두 가지 기전이 관련되어 있다. 우선은 염색체 끝 지점(telomeres)가 세포분열이 진행되는 동안에도 복제되어 유지된다는 점이다. 이는 telomerase의 상향조절을 통하여 telomeres의 길이를 유지하는데 필요한 반복핵산(repeats of nucleotides)을 꾸준히 추가함으로써 이뤄진다. 또 한 가지 기전은 재조합과정을 통하여 telomeres 길이를 택일적으로 연장하는 것이다(6).

암세포가 telomerase를 상향조절하는 것은 telomerase의 구성요소중 촉매역할을 담당하는 hTERT의 전사과정의 활성화를 통하여 이룬다(85). 체세포는 telomerase 발현을 억제하는 기전을 무수히 많이 가지고 있지만 암발생 과정에서 이런 억제기전을 피해가는 기전에 대한 연구는 온전히 이뤄지지 않았다. 몇 가지 단서들이 있는데 TGF- β 가 hTERT의 발현 억제를 전사(transcription)단계에서부터 관여한다는 것이 그 중 하나이다. 알려진 암억제/암발생 유전자들 중 세 가지(Mad 1, Menin, SIP1/ZEB-2) 정도가 telomerase에 대하여 억제력을 가지고 있음이 보고 되었는데 이들은 모두 TGF- β 신호전달에서 TGF- β 의 전사단계의 목표물들이다(86-88). Mad 1와 Menin은 모두 전사억제인자인데 hTERT와 결합하여 그 효과를 나타낸다. 반면에 Sip 1은 TGF- β 가 hTERT 억제하는데 있어서 보조적으로 작용하는 것으로 알려져 있다(86). 이러한 기전이 의미하는 바는 TGF- β 를 통한 암억제 효과는 부분적으로 telomerase 발현을 억제함으로써 이뤄진다는 것이다. p16INK이 결여된 유선상피세포(mammary epithelial cell)에서 hTERT 발현될 때 TGF- β 의 성장억제 효과를 이겨내고 증식한다는 보고는 TGF- β 신호전달체계와 telomerase 조절 경로가 중요한 상호작용을 하고 있음을 실증하는 것이다(89).

세포자멸(Apoptosis) 회피

세포증식의 조절은 세포자멸(Apoptosis)에 의하여서도 이뤄진다. Apoptosis란 계획된 세포의 죽음을 의미한다. 암세포는 이러한 조절신호에도 저항하는 능력이 있어서 유전자 손상과 같은 적절한 환경에서도 세포사멸과정에 들어가지 않는다. 대부분의 경우에 있어서 TGF- β 신호전달은 세포자멸 전조과정(proapoptotic)이다. 상피세포(epithelial)와 내피세포(endothelial), 조혈세포(hematopoietic cells), 림프구, 간세포와 신경세포 뿐만 아니라 유방암, 위암, 간암, 림프종, 난소암, 전립선암 세포들은 TGF- β 에 의해서 세포자멸사가 유도되는 세포들의 예이다(90-99). TGF- β 에 의하여 세포자멸이 유도되는 기전은 세포

와 세포가 처한 상황에 따라서 특이적인 방식으로 대응되는데, 흔히 Smad 의존경로를 취한다(100,101).

하지만 전립선암 세포와 폐상피세포암의 경우는 I-Smad(Smad 7)을 통하거나 Smad 독립경로의 하나인 Daxx-mediated JNK 기전이 관여하기도 한다(102,103).

TGF- β 유도 세포자멸은 p53 의존성과 p53 독립성 기전을 통하여 진행되거나 caspase 활성화, proapoptotic factors의 상향조절 혹은 antiapoptotic factors인 Bcl-2, Bcl-xL의 하향조절등이 관여하는 수도 있다(104). 그의 TGF- β 는 세포자멸사를 조절하는 다른 기전과 상호작용을 하기도 하는데 일례로 Fas-induced apoptosis나 PI-3 kinase/Akt 경로등이 그 예다. 최근의 연구에 의하면 Akt와 Smad 3가 직접 상호작용하여 Smad 3의 인산화를 저해하고 Smad 3가 핵으로 이동하는 것을 저지하는 것으로 조사되었다. 이렇게 되면 Smad 3를 매개로한 유전자전사와 세포자멸이 제한되는 것이다(105,106). 더욱이 Smad 3와 Akt 비가 TGF- β 매개로한 세포자멸사에 대한 세포의 자체 감수성과 직접 비례하는 것은 의미 있는 연구결과라 할 것이다.

따라서 간세포나 전립선세포와 같이 TGF- β 가 세포자멸사에 있어서 중요한 역할을 담당하는 세포들에 있어서 TGF- β 유도 세포자멸사에 저항하는 기전은 이들 조직의 암발생에 있어서 필수 불가결한 것이다. TGF- β 의 세포자멸사 유도기능은 림프구에 있어서는 면역을 억제하는 효과를 나타냄으로써 암 발생 기전에 중요한 역할을 하게 할 가능성이 제기되기도 한다.

혈관신생 유도

고형종양이 확산에만 의존하여 1내지 2 mm 이상으로 성장하기에는 영양과 산소의 공급이 많이 부족하다. 따라서 고형종양은 이러한 수요를 만족할 만큼 공급하기 위하여 새로운 혈관을 조성할 필요가 있다. TGF- β 는 혈관신생(angiogenesis)을 조절하는 몇 안되는 cytokines 중의 하나이다. 실험실 환경에서는 TGF- β 는 혈관신생에 순방향 뿐만 아니라 역방향 기능 모두

가능한 것으로 나타나지만 생체환경에서는 혈관신생을 조장하는 방향이 우세하게 나타난다. 혈관신생에 있어서 TGF- β 신호전달경로가 중요한 역할을 하고 있음을 뒷받침하는 몇 가지 증거들이 있다. 첫째, TGF- β 신호전달체계의 중요멤버인 TGF- β 나 T β RI, T β RII 등의 일부에 결손을 유도한 생쥐에 있어서 비정상 혈관신생을 관찰할 수 있다(107). 둘째, 내피세포특이성을 가진 두 가지 TGF- β 수용체 즉 endoglin(type III 수용체), ALK-1(type 1 수용체)가 혈관신생에 있어서 절대 필요하다라는 점이다. 이는 혈관질환인 hereditary hemorrhagic telangiectasia에서 이러한 수용체의 변이가 있다는 사실과 혈관신생이 되지 않아서 배아단계에서 사망하는 생쥐의 경우 이러한 수용체의 발현이 사라졌다는 것을 관찰함으로써 증명된다(108). 셋째, 내피세포의 endoglin의 발현이 암에 의한 혈관신생의 과정에서 극적으로 증가한다는 것이다(109). 마지막으로 TGF- β 는 그 자체가 직접 혈관의 내피세포 성장인자의 발현을 증가시킨다는 점이다(110). 내피세포에 있어서 TGF- β 신호전달체계는 독특하게 두 가지 별개의 경로를 통하여 이뤄진다. 그 중에 하나가 T β RII와 T β RI(이 경우는 ALK-5) 수용체를 통하여 Smad 2,3로 전달되는 전형적인 Smad 의존 경로이다. 또 다른 경로는 T β RII와 ALK-1 수용체를 통하여 Smad 1,5,8으로 전달되는 경로인데 이 경우에는 TGF- β superfamily 인 BMP (bone morphogenetic protein)에 의하여 활성화된다(110). 상기한 두 가지 경로는 내피세포의 증식과 이동에 있어서 상반되게 작용을 한다. 이 두 가지 경로의 신호전달 과정에서의 균형이 내피세포의 생물학적인 조절에 중요하게 작용한다. 즉 활성화가 되면 내피세포의 증식과 이동이 증가하고, 성숙기에 들어가게 되면 세포의 증식과 이동이 줄어들게 된다.

면역감시로 부터의 회피

암세포는 암특이 항원을 표지하고 있어서 정상적으로는 면역체계에 인지되고, 종국에는 파괴되게 되어 있다. 그러나 암발생과정에서 대부분의 암세포들은 면역체계의 감시기능을 회피하는 능력을 얻게 된다.

이런 능력의 획득에 관여하는 주요 기전은 암세포에서 능동적으로 분비하는 TGF- β 에 의한 면역억제 일 것이다. TGF- β 는 강력한 면역억제 cytokine이다. 우선 암환자에 있어서 세포독성물질을 투여하지 않는 상태임에도 암세포는 TGF- β 를 생산이 증가되어있고, 이런 환자는 면역이 억제되어 있다(111). 암환자로부터 얻은 조직들에서는 TGF- β 의 분비가 증가되어 있다. TGF- β 의 발현이 증가되어 있는 실험동물들은 면역감시를 회피하여 암을 형성한다. 또한 T-cells에 있어서 TGF- β 신호전달체계를 차단하게 되면 암세포에 저항하는 세포면역기전이 변형되게 된다(112).

TGF- β 에 의한 면역억제효과는 주로 T cells과 antigen presenting cells(APCs)을 통하여 이루어지는 사실이 밝혀졌다. T cell에서 생산된 TGF- β 는 IL-2의 생산을 차단하며 결국 T cells의 증식을 억제하게 하는 작용을 할 뿐만 아니라 cytotoxic T cells이나 helper T cell로 분화하는 것도 억제한다(113). TGF- β 1이 분비되지 않도록 고안된 쥐는 T cell의 과도한 활성화로 생후 3주만에 사망하고(114), T cell의 TGF- β 신호전달체계만을 선택적으로 차단한 쥐는 폐와 대장에 자가면역질환이 유발된다(115). 한편 TGF- β 는 APCs에 강력한 효과를 미치어 대식세포에서 유리된 TGF- β 는 조직에 있는 대식세포의 활동을 현저히 감소시킨다(116). TGF- β 는 수지상세포(dendritic cells)의 전구세포가 수지상세포로 분화할 수 있도록 보호하는 역할을 하기도 한다(117). 생체에서 살펴보면 TGF- β 1이 결손된 쥐의 표피에서는 Langerhans 세포를 전혀 관찰할 수 없는데 이러한 점은 TGF- β 의 역할이 Langerhans 세포의 발생과 표피이동에 있어서 필요한 것임을 시사한다(118).

개놈의 불안정성

세포의 안정성은 세포분열을 감시하는 지점이 존재한다든지 p53에 의한 조절이라든지 mismatch repair 시스템등 다수의 DNA 감시 체계와 수리체계(repair system)을 통하여 유지된다. 그러나 암세포는 이러한

안정성 유지 체계를 종종 우회하는 특성이 있다. 이러한 감시와 수리체계에 한두 가지 이상이 발생하게 되면 변이 발생 확률을 급격히 늘릴 수 있게되고 암발생은 그만큼 유리하게 된다. TGF- β 신호전달 체계는 이런 안정성을 유지하는 체계에 상당한 영향을 미치고 있다. 예를 들면 Rad51을 들 수 있는데, TGF- β 1은 Rad51 발현을 현저히 저해할 수 있다. 이렇게 되면 Rad51이 매개하는 DNA 복구 효율이 현저히 감소하여 DNA의 불안정성이 증대하게 된다(119). TGF- β 가 p53을 조절하는 기능이 있다는 것은 전술한 바 있는데 TGF- β 신호가 줄게되면 p53의 활성도도 감소하게 된다. TGF- β 는 게놈의 안정성을 직접적으로 조절할 수도 있는 것으로 알려져 있다. TGF- β 의 발현이 제거된 Tgfb1-null 동물에게서 추출한 keratinocytes는 N-phosphonoacetyl-L-aspartate 유도성 유전자 증폭이 더 많이 발생하게 되는데 Ha-Ras를 형질도입시키게 되면 더 많은 양의 이수체(aneuploidy)를 보이고 염색체 변이의 빈도도 증가한다. 중요한 점은 Tgfb1-null keratinocytes와 암세포주에 외부에서 TGF- β 를 공급하여 주면 p53이나 Rb의 존재 여부와 상관없이 유전자 증폭이 감소하고 이수체와 염색체 변이율도 감소한다는 점이며 이것이 TGF- β 신호전달 체계가 유전자의 안정성에 직접 관여한다는 사실을 입증한다는 것이다(120).

암발생억제인자로서의 TGF- β 와 암유발인자로서의 TGF- β

TGF- β 는 증식과 복제분열, 세포자멸사 기전을 조절하는데 관여함으로써 암발생을 억제하는 능력을 가지고 있다. 반면 세포이동과 침윤, 혈관신생, 면역억제등을 통하여 암을 진행시키는 능력도 보인다 (Fig 4).

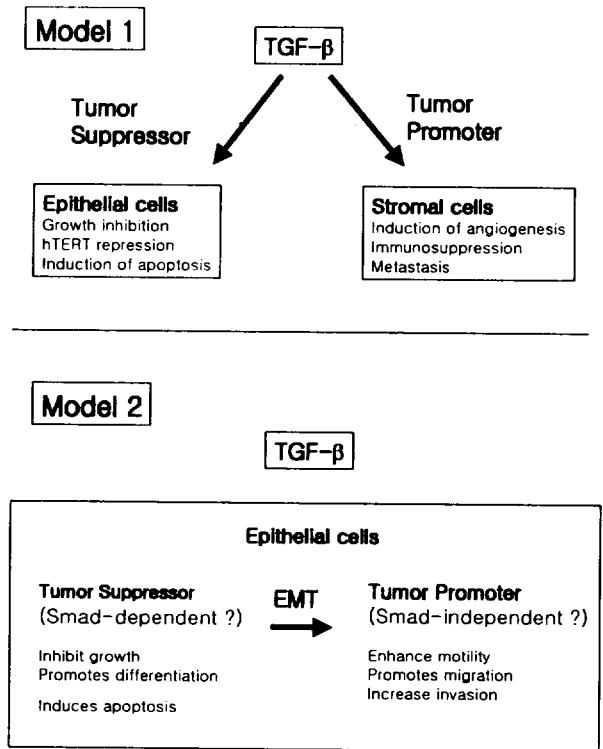


Figure 4. Transforming growth factor beta (TGF- β) as a tumor suppressor and tumor promoter

이런 기전들은 실제 동물실험을 통하여 입증된 것들이다. Tgfb1-null 실험동물은 정상의 10-30% 수준으로 TGF- β 발현을 보이는 데, 발암화학물질로 종양을 유도할 때 유도되는 종양의 숫자가 유의하게 증가됨을 볼 수 있다(121). Smad 4-null 반접합체(hemizygous) 실험동물과 adenomatous polyposis coli-null 반접합체 실험동물을 교배시키면 더욱 더 강력한 침윤성을 가진 대장암의 출현을 볼 수 있다(122). TGF- β 신호전달이 차단된 암세포주에서 (dominant negative T β RII, neutralizing TGF- β antibodies) 세포의 침윤능력이 차단되거나, 생체에서 원격전이 억제되는 것(123), 혹은 TGF- β 가 직접적으로 암세포의 이동성을 향상하게 하는 것 등은 TGF- β 의 암 진행효과를 단적으로 보여주는 현상이다.

TGF- β 의 이런 양분된 특성은 인체의 암발생에서도 관찰된다. 대장암이나 췌장암에 있어서 TGF- β 신호전달체계의 일부가 손실되었거나 변이되어 있는 경우가 관찰되는데 이런 경우 TGF- β 에 의한 암발

생억제 효과는 상실되고 결과적으로 암으로 진행하게 된다(124). TGF- β 에 의한 암촉진 효과는 암이 상당히 진행된 상태에서 관찰된다. 후기암 환자들에서 TGF- β 발현이 증가되어 있는 경우가 발견되는데 이렇게 TGF- β 생산이 증가된 환자는 동시에 암의 침윤력이 상당히 증가되어 있고 결국 환자의 예후를 불량하게 한다(125).

동일한 인자에 있어서 이 양분된 현상을 어떻게 설명할 수 있을 것인가?

설득력있는 이론을 들어보면 첫째 암발생과정의 초기단계에서는 암억제 효과가 우세하고 후기로 진행된 상태에서는 암촉진 효과가 더 우세하다는 것이다(Fig 4). 우리는 동물모델을 기초로한 몇 가지 연구들에서 암발생과정에 TGF- β 암억제와 암촉진 역할을 모두 확인할 수 있다. 증가된 TGF- β 발현이 실험쥐의 피부가 화학적 암유발물질에 노출되더라도 초기에는 양성종양의 발생을 억제하게 하는 것이 TGF- β 암억제 효과이다. 하지만 일단 양성종양이 발생하게 되면 지체없이 침윤력을 가지는 암종들로 진행시키는 효과는 TGF- β 암촉진 효과이다(126). 게다가 인간 유방암세포주에 dominant negative T β RII 유전자를 삽입 하였을때(즉 TGF- β 신호전달을 차단하였을 때), 전암단계에 있거나 악성의 단계가 낮은 세포들에 대해서는 악성화를 가속 시키지만 악성화가 고도화된 세포들에 대하여는 원격전이의 능력을 약화시키는 특성을 보인다(127). 흥미로운 또 다른 실험결과는 T β RI이 활발히 발현되도록한 유전자조작 쥐(transgenic mouse라 한다)를 Neu 수용체가 활발하도록 조작한 쥐와 교배시킨 경우에 관찰된다. 이 경우 발생한 개체는 암출현 시기가 연장되지만(즉 뒤늦게 암이 발생하지만) 일단 발생한 개체는 폐전이의 빈도가 증가되어 있다. 반면 T β RII의 발현을 차단되도록 조작한 쥐와 Neu 수용체가 활발하도록 조작한 쥐를 교배하였을 때는 역으로 암출현 시기가 단축되지만 폐전이는 의미있게 감소된 결과를 볼 수 있다(128).

정확한 기전은 아직까지 알 수 없지만 한 가지 제

시되는 가설을 요약하면 다음과 같다. TGF- β 는 전암단계 상피세포에 대하여는 증식과 telomerase를 억제하고, 세포분화와 자멸사를 촉진함으로써 암발생을 억제하는 것이며, 암발생 단계에 들어서는 이런 암발생을 억제하는 기전에 저항하도록 하고, 발생한 암세포로부터 TGF- β 생산을 늘려 암의 진행을 조장시키는 기전들을 활발하게 하도록 한다는 것이다(Fig 4). 특히 이런 암을 진행시키는 역할은 세포의 기질을 변화시키거나 유착분자(adhesion molecules)를 변화시켜 원격전이를 증가시키거나 혈관신생을 활발하게 하거나 면역억제를 이끌어내거나 하는 것을 통하여 이뤄진다는 것이다.

또 다른 가설은 암억제나 암유발 효과가 기본적으로 TGF- β 신호를 받아들이는 기전에 있어서 이미 이상이 발생한 상피세포의 암세포를 통하여 매개된다는 설명이다. 이런 효과는 암발생억제신호는 제대로 전달되지 않는 반면 암유발신호만 우세하게 전달된다는 특징을 보인다. 이런 TGF- β 신호에 대한 반응이상은 암세포가 상피-중엽전환(epithelial to mesenchymal transition, EMT) 과정에 있을 때 발생할 수 있는 것으로 알려져 있다. EMT 과정에서 상피세포는 고유의 표현형을 상실하는 것으로 알려져 있다. 즉 상피세포의 세포간의 강한 결합이나 위치 고정(nonmotility)등과 같은 특성이 사라지고 중피세포의 특징인 세포간의 느슨한 결합력, 이동성 증가나 주위 조직 침윤등과 같은 성격을 획득한다(129). EMT 과정은 유방암에서는 24-45%가량, 위암인 경우 39-60%, 신장세포암에서는 74% 가량 보고된다. TGF- β 는 단독으로 혹은 Ras와 더불어 EMT를 유도할 수 있고, 유방암 모델에서는 완전한 TGF- β 신호전달체계가 유지 되어야만 암침윤과 전이가 일어날 수 있는 것으로 보고되었다(130). EMT는 TGF- β 신호에 대한 세포의 상이한 반응을 설명할 수 있는 아주 매력적인 모델이다. 실험조건에서 EMT는 Smad-dependent와 Smad-independent 두 가지 경로 모두를 통하여 이뤄짐이 알려져 있다.

최근의 연구들에서 TGF- β 의 상피세포와 중엽세

포 사이의 차별화된 반응에는 T β RIII 가 중요한 역할을 하고 있는 것이 아닐까 하는 견해가 있다. 병아리배아 심장발생 중 EMT 과정에는 T β RIII가 TGF- β 신호전달에 긴밀한 역할을 하고 있음이 보고되었고, 반면 인간의 유방상피세포 모델에서는 EMT 과정에 T β RIII이 하향조절(down regulation)되어 있다고 보고 되었다(131). 즉 증엽성세포에 있어서는 T β RIII가 TGF- β 신호전달은 증가 시키는 반면 상피세포에서는 TGF- β 신호전달을 저해 한다고 결론 지을 수 있는 것이다. 이러한 보고들로부터 T β RIII 이 TGF- β 신호전달과 조절과정에 중요한 역할을 담당할 가능성과 암의 억제와 조장이라는 TGF- β 신호전달의 상반성을 설명할 수 있는 매개물로의 가능성을 열보게 된다.

결론

TGF- β 신호전달체계는 세포의 성장과 분화, 사멸, 부착, 이동등에 관계하는 많은 과정을 매개하며 그 중에 암에 있어서는 암을 억제하기도 하고 암발생과 진행을 촉진 시키기도 하는 상반된 역할을 하고 있다. 많은 연구자들이 암발생과 관련하여 TGF- β 신호전달과정을 분자수준에서부터 규명하려고 하는 연구를 진행하였으며 현재까지 많은 기전들이 알려졌다. Smad가 매개하는 과정이 TGF- β 신호전달체계에 있어서 주요 기전이며 구체적인 과정들이 밝혀졌다. 그럼에도 불구하고 Smad 독립기전들(예를 들면 MAP kinase, Rho, PI-3 kinase/Akt pathway)의 중요성에 비하여 결과는 상대적으로 빈약하다. 이 분야의 연구가 진행되어 TGF- β 신호전달체계의 전과정들이 밝혀져야 구체적인 암발생에 관한 치료적인 모색이 가능해질 것이다. 인간의 암에 있어서 TGF- β 신호전달체계의 총체적이고 체계적인 이해는 암정복을 향한 인간의 노력의 중요한 일부가 될 것이다.

맺음말

본 줄고는 저자가 2004년 9월부터 1년간 Laboratory of Cell Regulation and Carcinogenesis, Center for Cancer Research, CCR, NIH에 연수하며 수행하였던 연구의 주요 과제를 주제로 하였다. 연구과정을 지도해 주신 PI 김성진 박사께 감사드리고, TGF- β 신호전달체계의 규명에 중요한 업적들을 이뤄내고 현재는 본인 자신이 암투병과정에 있는 Anita Roberts 박사의 쾌유를 기원한다.

References

1. Massague J: TGF- β signal transduction. *Annu Rev Biochem.* 67:753-91, 1998.
2. Patterson GI, Padgett RW: TGF- β related pathways ;Roles in Caenorhabditis elegans development / *Trends Genet.* 16:27-33, 2000.
3. ten Dijke P, Goumans MJ, Itoh F et al. Regulation of cell proliferation by Smad proteins. *J Cell Physiol.* 191:1-16, 2002.
4. Massague J: How cells read TGF- β signals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:169-178, 2000.
5. Massague J, Chen YG: controlling TGF- β signaling. *Genes Dev.* 14:627-644, 2000.
6. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 100:57-70, 2000.
7. Hahn SA, Schutte M, Hoque AT, et al: DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* 271:350-353, 1996.
8. Yan Z, Deng X, Friedman E: Oncogenic Ki-ras confers a more aggressive colon cancer phenotype through modification of transforming growth factor-beta receptor III. *J Biol Chem* 276:1555-1563, 2001.
9. Desruiiseau S, Ghazarossian-Ragni E, Chinot O, et

- al: Divergent effect of TGF β 1 on growth and proteolytic modulation of human prostatic-cancer cell lines. *Int J Cancer* 66:796-801, 1996.
10. Katakura Y, Nakata E, Miura T, et al: Transforming growth factor beta triggers two independent-senescence programs in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 255:110-115, 1999.
 11. Perry RR, Kang Y, Greaves BR: Relationship between tamoxifen-induced transforming growth factor beta 1 expression, cytostasis and apoptosis in human breast cancer cells. *Br J Cancer* 72:1441-1446, 1995.
 12. Ananth S, Knebelmann B, Gruning W, et al: Transforming growth factor beta1 is a target for the von Hippel-Lindau tumor suppressor and a critical growth factor for clear cell renal carcinoma. *Cancer Res* 59:2210-2216, 1999.
 13. Torre-Amione G, Beauchamp RD, Koeppen H, et al: A highly immunogenic tumor transfected with a murine transforming growth factor type beta 1 cDNA escapes immune surveillance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1486-1490, 1990.
 14. Lopez-Casillas F, Wrana JL, Massague J: Betaglycan presents ligand to the TGF beta signaling receptor. *Cell* 73:1435-1444, 1993.
 15. Wrana JL, Attisano L, Wieser R, et al: Mechanism of activation of the TGF-beta receptor. *Nature* 370:341-347, 1994.
 16. Nakao A, Imamura T, Souchelnytskyi S, et al: TGF-beta receptor-mediated signalling through Smad2, Smad3 and Smad4. *Embo J* 16:5353-5362, 1997.
 17. Raftery LA, Twombly v, Wharton K, et al: Genetic screens to identify elements of the decapentaplegic signaling pathway in Drosophila. *Genetics* 139:241-54, 1995.
 18. Savage C, Das P, Finelli AL, et al: Caenorhabditis elegans genes sma-2, sma-3 and sma-4 define a conserved family of TGF-beta pathway component. *Proc Natl Acad Sci*. 93:790-94, 1996.
 19. Riggins GJ, Thiagalingam S, Rozenblum E: Mad related genes in the human. *Nature Genet* 13:347-49, 1996.
 20. Kim J, Johnson K, Chen HJ, et al. Drosophila Mad binds to DNA and directly mediate activation of vestigial by Decapentaplegic. *Nature* 388:304-308, 1997.
 21. Hata A, Lo RS, Wotton D, et al. Mutations increasing autoinhibition inactivate tumor suppressors Smad2 and Smad4. *Nature* 388:82-8, 1997.
 22. Zhang Y, Musci T, Derynck R. The tumor suppressor Smad4/DPC 4 as a central mediator of Smad function. *Curr Biol* 7:270-276, 1997.
 23. Baker J, Harland RM. A novel mesoderm inducer, Madr2, functions in the activin signal transduction pathway. *Genes Dev* 10:1880-1889, 1996.
 24. Graff JM, Bansal A, Melton DA. Xenopus Mad proteins transduce distinct subsets of signals for the TGF beta superfamily. *Cell* 85:479-87, 1996.
 25. Hoodless PA, Haerry T, Abdollah S, et al. MADR1, a MAD-related protein that functions in BMP2 signaling pathways. *Cell* 85:489-500, 1996.
 26. Abdollah S, Macias-Silva M, Tsukazaki T, et al. T β RI phosphorylation of Smad2 on Ser 465 and Ser 467 is required for Smad2-Smad4 complex formation and signaling. *J Biol Chem* 272:27678-27685, 1997.
 27. Souchelnytskyi S, Tamaki K, Engstrom U, et al. Phosphorylation of ser465 and Ser467 in the C terminus of Smad2 mediates interaction with Smad4 and is required for transforming growth factor- β signaling. *J Bio Chem* 272:28107-28115, 1997.
 28. Kretschmar M, Liu F, Hata A, et al. The TGF- β family mediator Smad1 is phosphorylated directly and activated functionally by the BMP receptor kinase. *Genes Dev* 11:984-99, 1997.
 29. Lagna G, Hata A, Hemmati-Brivanlou A, et al. Partnership between DPC4 and SMAD proteins in

- TGF- β signalling pathways. *Nature* 383: 832-6, 1996.
30. Maduzia LL, Padgett RW: Drosophila MAD, a member of the Smad family, translocates to the nucleus upon stimulation of the dpp pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 238:595-598, 1997.
 31. Datto MB, Frederick JP, Pan L, et al. Targeted disruption of Smad3 reveals an essential role in transforming growth factor beta-mediated signal transduction. *Mol Cell Biol* 19: 2495-504, 1999.
 32. Sirard C, Kim S, Mirtsos C, et al. Targeted disruption in murine cells reveals variable requirement for Smad4 in transforming growth factor β -related signaling. *J Biol Chem* 275: 2063-2070, 2000.
 33. Hayadhi H, Abdollah S, Qiu Y, et al. The MAD-related protein Smad7 associates with the TGF- β receptor and functions as an antagonist of TGF- β signaling. *Cell* 89:1165-1173, 1997.
 34. Imamura T, Takase M, Nishihara A, et al. Smad6 is an inhibitor in the TGF- β superfamily signalling. *Nature* 289:622-626, 1997.
 35. Hata A, Shi Y, Massagué J. TGF- β signaling and cancer: structural and functional consequences of mutations in Smads. *Mol Med Today* 4:257-62, 1998.
 36. Dennler S, Itoh S, Vivien D, et al. Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF- β inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor 1 gene. *EMBO J* 17:3091-3100, 1998.
 37. Yingling JM, Datto MB, Wong C, et al. The tumor suppressor Smad4 is a transforming growth factor β -inducible DNA binding protein. *Mol Cell Bio* 17: 7019-7028, 1997.
 38. Chen X, Rubock MJ, Whitman M. A transcriptional partner for MAD proteins in TGF- β signaling. *Nature* 383:691-696, 1996.
 39. Liberati NT, Datto MB, Frederick JP, Shen X, Wong C, Rougier-Chapman EM, Wang XF. Smads bind directly to the Jun family of AP-1 transcription factors. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 4844-4849, 1999.
 40. Zhang Y, Feng XH, Derynck R. Smad3 and Smad4 cooperate with c-Jun/c-Fos to mediate TGFbeta-induced transcription. *Nature* 394:909-913, 1998.
 41. Wong C, Rougier-Chapman EM, Frederick JP, et al. Smad3-Smad4 and AP-1 complexes synergize in transcriptional activation of the c-Jun promoter by transforming growth factor b. *Mol Cell Biol* 19:1821-1830, 1999.
 42. Akiyoshi S, Inoue H, Hanai J, et al. c-Ski acts as a transcriptional co-repressor in transforming growth factor- β signaling through its interaction with Smads. *J Biol Chem* 274:35269-77, 1999.
 43. Luo K, Stroschein SL, Wang W, et al. The Ski oncoprotein interacts with the Smad proteins to repress TGF β signaling. *Genes Dev* 13:2196-206, 1999.
 44. Lo RS, Massagué J. Ubiquitin-dependent degradation of TGF- β -activated Smad2. *Nat Cell Biol* 1:472-478, 1999.
 45. Frolik CA, Dart LL, Meyers CA, et al: Purification and initial characterization of a type beta transforming growth factor from human placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80:3676-3680, 1983.
 46. Hannon GJ, Beach D: P15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. *Nature* 371:257-261, 1994.
 47. Datto MB, Li Y, Panus JF, et al: Transforming growth factor beta induces the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 through a p53-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:5545-5549, 1995.
 48. Polyak K, Kato JY, Solomon MJ, et al: P27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest.

- Genes Dev* 8:9-22, 1994.
49. Pietenpol JA, Stein RW, Moran E, et al: TGF-beta 1 inhibition of c-myc transcription and growth in keratinocytes is abrogated by viral transforming proteins with pRB binding domains. *Cell* 61:777-785, 1990.
 50. Fink SP, Swinler SE, Lutterbaugh JD, et al: Transforming growth factor-beta-induced growth inhibition in a Smad4 mutant colon adenoma cell line. *Cancer Res* 61:256-260, 2001.
 51. Hu PP, Shen X, Huang D, et al: The MEK pathway is required for stimulation of p21(WAF1/CIP1) by transforming growth factor-beta. *J Biol Chem* 274:35381-35387, 1999.
 52. Vilbancova A, Garcia C, Pambles AB, et al: Disruption of the antiproliferative TGF-beta signaling pathways in human pancreatic cancer cells. *Oncogene* 17:1969-1978, 1998.
 53. Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, et al: Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. *Cancer Res* 59:320-324, 1999.
 54. Nicolas FJ, Hill CS: Attenuation of the TGF - beta - Smad signalling pathway in pancreatic tumor cells confers resistance to TGF-beta-induced growth arrest. *Oncogene* 22:3698-3711, 2003.
 55. Kim WS, Park C, Jung YS, et al: Reduced transforming growth factor-beta type II receptor (TGF-beta RII) expression in adenocarcinoma of the lung. *Anticancer Res* 19:301-306, 1999.
 56. Chen C, Wang XF, Sun L: Expression of transforming growth factor beta (TGFbeta) type III receptor restores autocrine TGFbeta activity in human breast cancer MCF-7 cells. *J Biol Chem* 272:12862-12867, 1997.
 57. Kleeff J, Ishiwata T, Maruyama H, et al: The TGF-beta signaling inhibitor Smad7 enhances tumorigenicity in pancreatic cancer. *Oncogene* 18:5363-5372, 1999.
 58. Ewen ME, Oliver CJ, Sluss HK, et al: p53-dependent repression of CDK4 translation in TGF-beta-induced G1 cell-cycle arrest. *Genes Dev* 9:204-217, 1995.
 59. Alexandrow MG, Kawabata M, Aakre M, et al: Overexpression of the c-Myc oncoprotein blocks the growth-inhibitory response but is required for the mitogenic effects of transforming growth factor beta 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:3239-3243, 1995.
 60. Datto MB, Hu PP, Kowalik TF, et al: The viral oncoprotein E1A blocks transforming growth factor beta-mediated induction of p21/WAF1/Cip1 and p15/INK4B. *Mol Cell Biol* 17:2030-2037, 1997.
 61. Kretzschmar M, Doody J, Timokhina I, et al: A mechanism of repression of TGFbeta/Smad signaling by oncogenic Ras. *Genes Dev* 13:804-816, 1999.
 62. Sun Y, Liu X, Eaton EN, et al: Interaction of the Ski oncoprotein with Smad3 regulates TGF-beta signaling. *Mol Cell* 4:499-509, 1999.
 63. Stroschein SL, Wang W, Zhou S, et al: Negative feedback regulation of TGF-beta signaling by the SnoN oncoprotein. *Science* 286:771-774, 1999.
 64. Kurokawa M, Mitani K, Irie K, et al: The oncoprotein Evi-1 represses TGF-beta signalling by inhibiting Smad3. *Nature* 394:92-96, 1998.
 65. Kaji H, Canaff L, Lebrun III, et al: Inactivation of menin, a Smad3-interacting protein, blocks transforming growth factor type beta signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3837-3842, 2001.
 66. Hocevar BA, Smine A, Xu XX, et al: The adaptor molecule Disabled-2 links the transforming growth factor beta receptors to the Smad pathway. *Embo J* 20:2789-2801, 2001.
 67. Li QL, Ito K, Sakakura C, et al: Causal relationship between the loss of RUNX3 expression and gastric cancer. *Cell* 109:113-124, 2002.
 68. Yakymovych I, Ten Dijke P, Heldin CH, et al: Regulation of Smad signaling by protein kinase C.

- Faseb J* 15:553-555, 2001.
69. Park BJ, Park JI, Byun DS, et al: Mitogenic conversion of transforming growth factor-beta1 effect by oncogenic Ha-Ras-induced activation of the mitogen-activated protein kinase signaling pathway in human prostate cancer. *Cancer Res* 60:3031-3038, 2000.
 70. Jonson T, Albrechtsson E, Axelson J, et al: Altered expression of TGFβ receptors and mitogenic effects of TGFβ in pancreatic carcinomas. *Int J Oncol* 19:71-81, 2001.
 71. Seifert RA, Coats SA, Raines EW, et al: Platelet-derived growth factor (PDGF) receptor alpha-subunit mutant and reconstituted cell lines demonstrate that transforming growth factor-beta can be mitogenic through PDGF A-chain-dependent and -independent pathways. *J Biol Chem* 269:13951-13955, 1994.
 72. Strutz F, Zeisberg M, Renziehausen A, et al: TGF-beta 1 induces proliferation in human renal fibroblasts via induction of basic fibroblast growth factor (FGF-2). *Kidney Int* 59:579-592, 2001.
 73. Chantry D, Turner M, Abney E, et al: Modulation of cytokine production by transforming growth factor-beta. *J Immunol* 142:4295-4300, 1989.
 74. Igarashi A, Okochi H, Bradham DM, et al: Regulation of connective tissue growth factor gene expression in human skin fibroblasts and during wound repair. *Mol Biol Cell* 4:637-645, 1993.
 75. Ishikawa O, LeRoy EC, Trojanowska M: Mitogenic effect of transforming growth factor beta 1 on human fibroblasts involves the induction of platelet-derived growth factor alpha receptors. *J Cell Physiol* 145:181-186, 1990.
 76. Feng P, Catt KJ, Knecht M: Transforming growth factor beta regulates the inhibitory actions of epidermal growth factor during granulosa cell differentiation. *J Biol Chem* 261:14167-14170, 1986.
 77. Piek E, Heldin CH, Ten Dijke P: Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling. *FASEB J* 13:2105-2124, 1999.
 78. Hanafusa H, Ninomiya-Tsuji J, Masuyama N, et al: Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in transforming growth factor-beta-induced gene expression. *J Biol Chem* 274: 27161-27167, 1999.
 79. Miettinen PJ, Ebner R, Lopez AR, et al: TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: Involvement of type I receptors. *J Cell Biol* 127:2021-2036, 1994.
 80. Giannelli G, Fransvea E, Marinosci F, et al : Transforming growth factor-beta1 triggers hepatocellular carcinoma invasiveness via alpha3beta1 integrin. *Am J Pathol* 161:183-193, 2002.
 81. Schiemann WP, Blobel GC, Kalume DE, et al: Context-specific effects of fibulin-5 (DANCE/EVEC) on cell proliferation, motility, and invasion. Fibulin-5 is induced by transforming growth factor-beta and affects protein kinase cascades. *J Biol Chem* 277: 27367-27377, 2002.
 82. Zicha D, Genot E, Dunn GA, et al: TGFbeta1 induces a cell-cycle-dependent increase in motility of epithelial cells. *J Cell Sci* 112:447-454, 1999. (pt 4)
 83. Dumont N, Bakin AV, Arteaga CL : Autocrine transforming growth factor-beta signaling mediates Smad-independent motility in human cancer cells. *J Biol Chem* 278:3275-3285, 2003.
 84. Blobel GC, Schiemann WP, Lodish HF: Role of transforming growth factor beta in human disease. *N Engl J Med* 342:1350-1358, 2000.
 85. Hahn WC: Role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 21:2034-2043, 2003.
 86. Lin SY, Elledge SJ: Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell* 113:881-889, 2003.
 87. Werner S, Beer HD, Mauch C, et al: The Mad1

- transcription factor is a novel target of activin and TGF-beta action in keratinocytes: Possible role of Mad1 in wound repair and psoriasis. *Oncogene* 20:7494-7504, 2001.
88. Comijn J, Berx G, Vermassen P, et al: The two-handed E box binding zinc finger protein SIP1 downregulates E-cadherin and induces invasion. *Mol Cell* 7:1267-1278, 2001.
 89. Stampfer MR, Garbe J, Levine G, et al: Expression of the telomerase catalytic subunit, hTERT, induces resistance to transforming growth factor beta growth inhibition in p16INK4A(-) human mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:4498-4503, 2001.
 90. Hsing AY, Kadomatsu K, Bonham MJ, et al: Regulation of apoptosis induced by transforming growth factor-beta1 in nontumorigenic rat prostatic epithelial cell lines. *Cancer Res* 56:5146-5149, 1996.
 91. Hyman KM, Seghezzi G, Pintucci G, et al: Transforming growth factor-beta1 induces apoptosis in vascular endothelial cells by activation of mitogen-activated protein kinase. *Surgery* 132:173-179, 2002.
 92. Francis JM, Heyworth CM, Spooncer E, et al: Transforming growth factor-beta 1 induces apoptosis independently of p53 and selectively reduces expression of Bcl-2 in multipotent hematopoietic cells. *J Biol Chem* 275:39137-39145, 2000.
 93. Arsura M, Wu M, Sonenshein GE: TGF beta 1 inhibits NF-kappa B/Rel activity inducing apoptosis of B cells: Transcriptional activation of I kappa B alpha. *Immunity* 5:31-40, 1996.
 94. Arsura M, FitzGerald MJ, Fausto N, et al: Nuclear factor-kappaB/Rel blocks transforming growth factor beta1-induced apoptosis of murine hepatocyte cell lines. *Cell Growth Differ* 8:1049-1059, 1997.
 95. Kriegstein K, Richter S, Farkas L, et al: Reduction of endogenous transforming growth factors beta prevents ontogenetic neuron death. *Nat Neurosci* 3:1085-1090, 2000.
 96. Kim BC, Mamura M, Choi KS, et al: Transforming growth factor beta 1 induces apoptosis through cleavage of BAD in a Smad3-dependent mechanism in FaO hepatoma cells. *Mol Cell Biol* 22:1369-1378, 2002.
 97. Barna G, Sebestyén A, Chinopoulos CC, et al: TGF beta 1 kills lymphoma cells using mitochondrial apoptotic pathway with the help of caspase-8. *Anticancer Res* 22:3867-3872, 2002.
 98. Lafon C, Mathieu C, Guerrin M, et al: Transforming growth factor beta 1-induced apoptosis in human ovarian carcinoma cells: Protection by the antioxidant N-acetylcysteine and bcl-2. *Cell Growth Differ* 7:1095-1104, 1996.
 99. Landstrom M, Heldin NE, Bu S, et al: Smad7 mediates apoptosis induced by transforming growth factor beta in prostatic carcinoma cells. *Curr Biol* 10:535-538, 2000.
 100. Atfi A, Buisine M, Mazars A, et al: Induction of apoptosis by DPC4, a transcriptional factor regulated by transforming growth factor-beta through stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase (SAPK/JNK) signaling pathway. *J Biol Chem* 272:24731-24734, 1997.
 101. Yamamura Y, Hua X, Bergelson S, et al: Critical role of smads and AP-1 complex in TGF-beta-dependent apoptosis. *J Biol Chem* 275:36295-36302, 2000.
 102. Lallemand F, Mazars A, Prunier C, et al: Smad7 inhibits the survival nuclear factor kappaB and potentiates apoptosis in epithelial cells. *Oncogene* 20:879-884, 2001.
 103. Perlman R, Schiemann WP, Brooks MW, et al: TGF-beta-induced apoptosis is mediated by the adapter protein Daxx that facilitates JNK activation. *Nat Cell Biol* 3:708-714, 2001.
 104. Motyl T, Grzelkowska K, Zimowska W, et al:

- Expression of bcl-2 and bax in TGF-beta 1-induced apoptosis of L1210 leukemic cells. *Eur J Cell Biol* 75:367-374, 1998.
105. Conery AR, Cao Y, Thompson EA, et al: Akt interacts directly with Smad3 to regulate the sensitivity to TGF-beta induced apoptosis. *Nat Cell Biol* 6:366-372, 2004.
 106. Remy I, Montmarquette A, Michnick SW: PKB/Akt modulates TGF-beta signalling through a direct interaction with Smad3. *Nat Cell Biol* 6:358-365, 2004.
 107. Dickson MC, Martin JS, Cousins FM, et al: Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor-beta 1 knock out mice. *Development* 121:1845-1854, 1995.
 108. McAllister KA, Grogg KM, Johnson DW, et al: Endoglin, a TGF-beta binding protein of endothelial cells, is the gene for hereditary haemorrhagic telangiectasia type 1. *Nat Genet* 8:345-351, 1994.
 109. Burrows FJ, Derbyshire EJ, Tazzari PL, et al : Up - regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumors: Implications for diagnosis and therapy. *Clin Cancer Res* 1:1623-1634, 1995.
 110. Yamamoto T, Kozawa O, Tanabe K, et al : Involvement of p38 MAP kinase in TGF - beta - stimulated VEGF synthesis in aortic smooth muscle cells. *J Cell Biochem* 82:591-598, 2001.
 111. von Bernstorff W, Voss M, Freichel S, et al: Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res* 7:925s-932s, 2001.
 112. Leach DR, Krummel MF, Allison JP: Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science* 271:1734-1736, 1996.
 113. Gorelik L, Flavell RA: Transforming growth factor-beta in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* 2:46-53, 2002.
 114. Shull MM, Ormsby I, Kier AB, et al: Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* 359:693-699, 1992.
 115. Gorelik L, Flavell RA: Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease. *Immunity* 12:171-181, 2000.
 116. Bogdan C, Paik J, Vodovotz Y, et al: Contrasting mechanisms for suppression of macrophage cytokine release by transforming growth factor-beta and interleukin-10. *J Biol Chem* 267:23301-23308, 1992.
 117. Riedl E, Strobl H, Majdic O, et al: TGF-beta 1 promotes in vitro generation of dendritic cells by protecting progenitor cells from apoptosis. *J Immunol* 158:1591-1597, 1997.
 118. Borkowski TA, Letterio JJ, Mackall CL, et al: Langerhans cells in the TGF beta 1 null mouse. *Adv Exp Med Biol* 417:307-310, 1997.
 119. Kanamoto T, Hellman U, Heldin CH, et al: Functional proteomics of transforming growth factor-beta1-stimulated Mv1Lu epithelial cells: Rad51 as a target of TGFbeta1-dependent regulation of DNA repair. *Embo J* 21:1219-1230, 2002.
 120. Glick A, Popescu N, Alexander V, et al: Defects in transforming growth factor-beta signaling cooperate with a Ras oncogene to cause rapid aneuploidy and malignant transformation of mouse keratinocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14949-14954, 1999.
 121. Tang B, Bottinger EP, Jakowlew SB, et al: Transforming growth factor-beta1 is a new form of tumor suppressor with true haploid insufficiency. *Nat Med* 4:802-807, 1998.
 122. Takaku K, Oshima M, Miyoshi H, et al: Intestinal tumorigenesis in compound mutant mice of both Dpc4 (Smad4) and Apc genes. *Cell* 92:645-656, 1998.

123. Oft M, Heider KH, Beug H: TGFbeta signaling is necessary for carcinoma cell invasiveness and metastasis. *Curr Biol* 8:1243-1252, 1998.
124. Knaus PI, Lindemann D, DeCoteau JF, et al : A dominant inhibitory mutant of the type II transforming growth factor beta receptor in the malignant progression of a cutaneous T-cell lymphoma. *Mol Cell Biol* 16:3480-3489, 1996.
125. Picon A, Gold LI, Wang J, et al : A subset of metastatic human colon cancers expresses elevated levels of transforming growth factor beta1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7:497-504, 1998.
126. Cui W, Fowles DJ, Bryson S, et al : TGFbeta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell* 86:531-542, 1996.
127. Tang B, Vu M, Booker T, et al: TGF-beta switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest* 112:1116-1124, 2003.
128. Siegel PM, Shu W, Cardiff RD, et al: Transforming growth factor beta signaling impairs Neu-induced mammary tumorigenesis while promoting pulmonary metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:8430-8435, 2003.
129. Thiery JP, Chopin D: Epithelial cell plasticity in development and tumor progression. *Cancer Metastasis Rev* 18:31-42, 1999.
130. Brown CB, Boyer AS, Runyan RB, et al: Requirement of type III TGF-beta receptor for endocardial cell transformation in the heart. *Science* 283:2080-2082, 1999.
131. Reeves R, Edberg DD, Li Y: Architectural transcription factor HMGI(Y) promotes tumor progression and mesenchymal transition of human epithelial cells. *Mol Cell Biol* 21:575-594, 2001.