



**간암 특이 Ganglioside 항원의
항종양성 항체 생산 연구**

**A Study on the Production of Anticancer Antibody of
Hepatoma-Specific Ganglioside Antigen**

연구기관
한국과학기술연구원
부설 유전공학연구소

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “간암 특이 ganglioside 항원의 항 종양성 항체
생산 연구” 사업의 2차년도 보고서로 제출합니다.

1991년 7월

주관연구기관명:한국과학기술연구원부설 유전공학연구소

총괄책임자:함 경 수(유전공학연구소 책임연구원)

연 구 원:김 승 호(유전공학연구소 선임연구원)

조 은 위(유전공학연구소 연구원)

최 재 섭(유전공학연구소 연구원)

여 백

요 약 문

I. 제 목

간암 특이 ganglioside 항원의 항 종양성 항체 생산 연구

II. 연구의 목적 및 중요성

전 세계적으로 암에 의한 사망률이 날로 증가하고 있는데 비해 기존의 각종 암에 대한 진단·치료방법으로는 점차 증가하고 있는 암에 의한 사망률을 낮추기 어려운 상황이다. 현재 사용되고 있는 암의 진단방법에는 X-ray, NMR, CT 등을 이용하는 물리적 진단법, 몇가지 생화학적 검사 등이 있고, 치료방법에는 외과수술, 화학요법, 방사선요법 등이 있으나 그 한계가 분명하다. 따라서 새로운 차원의 진단, 치료방법의 개발이 절실한 상태이며, 최근엔 생물학적 반응을 이용한 진단·치료방법의 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

지금까지 암의 원인 및 발생기전이 확실히 밝혀지지 않는 않았으나 종양 발생과정에서의 몇가지 특징적인 사실들이 밝혀졌다. 그 중 하나가 종양 특이 ganglioside 항원이다. 정상적인 세포에는 전혀 존재하지 않거나 미량으로 함유되어있던 어떤 ganglioside가 종양 발생 및 성장과정에서 그 함유량이 상당히 증가됨이 확인되었다. 1959년 인체 종양으로부터 최초의 종양 특이 ganglioside 항원이 발견된 이후, 각종 종양으로부터의 종양 특이 ganglioside 항원

들이 보고되었다.

그 예로 인체 melanoma에서는 정상세포에 전혀 존재하지 않았던 GD₃의 함량이 약 5.5%를 차지하였다. 지금까지 밝혀진 종양 특이 ganglioside 항원은 약 30여개 정도로 이에 대한 특이 항체를 생산할 경우 종양진단시약 및 치료제로서의 가능성을 갖는다. 아직까지는, 세포배양이 가능하여 자세히 연구할 수 있었던 인체 melanoma 이외의 경우에는 종양 특이 항원에 대한 연구가 큰 진전을 보지 못하고 있다.

본 연구에서는 우리나라에서 발병률이 높은 간암의 종양 특이 ganglioside 항원을 확인하여 이에 대한 단일클론 항체를 생산하고 이를 이용한 진단시약을 개발하고자 한다. 종양 특이 항원에 대한 단일클론 항체의 생산과 이를 이용한 진단시약의 개발은 20%의 높은 사망률을 나타내는 각종 암에 대한 조기진단을 가능케 하여 국민보건향상에 기여할 뿐 아니라 다른 난치병들의 진단시약 개발에도 큰 영향을 미칠 것이다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1차년도에는 간암 특이 ganglioside 항원의 분리, 정제 기술을 확립하였고, 흰 쥐에 화학적 발암제를 투여하여 간암을 유발시키면서 그에 따른 외형적인 변화와 간 조직 ganglioside의 정량, 정성적인 변화를 관찰하였다. 2차년도에는 흰 쥐의 간암 세포에서 간암 특이 ganglioside 항원을 확인하였고 사람 간암 세포에서 간암 특이 ganglioside 항원을 확인하였으며, 현재 간암 특이 ganglioside

항원에 대한 단일클론 항체를 생산하여 확인 중에 있다.

1) 동물 실험을 통한 간암 유발

각종 chemical carcinogen[DENA(Diethylnitrosoamine), 3'-MeDAB (3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene), 2-MeDAB, AAF(Acetylaminofluorene), AFB₁(Aflatoxin · B₁)]을 흰 쥐에 투여하여 간암을 유발시켰으며, 간암 발생 과정의 변화를 관찰하였다.

2) 쥐와 사람의 간암 조직으로부터 간암 특이 ganglioside 항원의 동정

흰 쥐에 유발된 간암 세포와 정상 간세포로부터 ganglioside를 분리하여 총 ganglioside를 정량하여 간암 발생에 따른 ganglioside 양의 변화를 관찰하였으며, HPTLC(high performance thin layer chromatography)을 이용한 분석으로 간암 특이 ganglioside 항원을 동정하였다. 사람 간암 조직에 대해서도 총 ganglioside를 정량하였고 HPTLC를 이용한 분석으로 간암 특이 ganglioside 항원을 동정하였다.

3) 단일 클론 항체 생산

현재 흰 쥐의 간암 특이 ganglioside 항원으로 생각되는 G_{D1a}에 대한 단일클론 항체 생산을 시도 중이다. 6주령의 BALB/c mouse 암컷에 complete Freund's adjuvant와 50 μ g의 G_{D1a}을 잘 혼합하여 복강 주사하고 1주, 2주 후에는 incomplete Freund's adjuvant에 항원을 넣어 주사한다. 실험 동물로부터 소량의 혈청을 얻어 G_{D1a}에 대한

항체가 생겼는지 ELISA 방법으로 확인해 본 후 spleen 세포를 얻어 myeloma 세포와 융합시킨다. 융합 세포는 2주 정도 배양하고 그 상층액을 모아 G_{DIa} 항원에 대한 항체가 생겼는지 확인하여 본다.

IV. 실험결과 및 활용에 대한 건의

1) 백서에서의 간암유발

DENA, 2-MeDAB, 3'-MeDAB, AAF 그리고 AFB₁ 등의 화학적 발암제를 흰 쥐에 투여하면서 간암 발생 과정을 분석한 결과, DENA와 3'-MeDAB을 투여한 경우 6개월 내지 7개월후에 간암이 발생하였고 AAF와 AFB₁에 의해서는 간암이 거의 유발되지 않았다. DENA를 투여한 경우 다른 화학 발암제에 비해 간암이 빨리 유발되었다. 유발된 간암은 조직 검사 결과, hepatocellular carcinoma 이었다.

화학 발암제를 투여한 흰 쥐로부터 간 조직을 채취하여 일정량(1g 혹은 2g)의 간 세포로부터 총 ganglioside를 분리하였다. 세포 1g당 추출된 gangliosides의 양은 정상 간 세포에서는 약 200 μ g이었는데 간암이 유발되었을 경우 gangliosides양이 2배 이상 증가하였다. 3'-MeDAB에 의하여 간암이 유발되었을 때는 ganglioside양이 약 30% 증가하였고 DENA를 투여한 경우에는 ganglioside양이 거의 3배 정도 증가하였다.

2) 백서의 간암 특이 ganglioside 항원의 동정

DENA를 투여한 그룹의 ganglioside 조성을 분석한 HPTLC 결과를 보면 control에 비해 DENA 투여군에서 G_{D1a} 의 양이 뚜렷이 증가하는 것을 알 수 있다.

2-MeDAB/DENA을 투여한 그룹의 경우 2-MeDAB/DENA를 투여한 기간이 오래될수록 G_{M1} , G_{D3} 의 양이 줄어드는 반면, G_{D1a} 의 양이 상대적으로 증가했음을 알 수 있다.

간암 발생이 가장 뚜렷한 3'-MeDAB를 투여한 그룹의 gangliosides 조성에서도 마찬가지로 G_{D1a} 가 정상에 비해 상대적으로 증가했음을 알 수 있다. 이상의 결과로부터 흰 쥐의 경우 화학적 인 발암물질에 의해 유발된 간암의 종양 특이 ganglioside 항원은 G_{D1a} 일 것으로 생각된다.

3) 인체의 간암 특이 ganglioside 항원의 동정

사람 간암 조직에 대해서도 총 gangliosides 함량을 측정하고, HPTLC를 이용해 gangliosides의 조성을 분석하였다. 사람의 정상 간 조직은 얻을 수 없어 비교하여 볼 수 없었으며 간암 조직을 얻을 때 그 부근의 비간암 조직을 함께 얻어 비교하였다. 간 조직 g당 총 gangliosides양은 간암 부위와 비간암 부위가 뚜렷이 구별될 만한 차이를 보이지 않았으나 간암 부위의 gangliosides양이 약간 더 증가했음을 알 수 있다. 각 성분별 조성 변화를 관찰하기 위하여 HPTLC patterns을 densitometer로 scanning하였는데, G_{M3} 의 양이 감소하고 G_{M1} 의 양이 증가하였음을 확인할 수 있다.

4) 간암특이 ganglioside 항원의 항체생산

백서의 간암에서 특이하게 증가하는 ganglioside G_{D1a} 와 사람의 간암에서 증가현상을 나타낸 G_{M1} 에 대한 단일클론 항체 생산을 위해 마우스를 면역화시켰으며 그에 대한 항체가 생성됨을 ELISA로 확인하였다.

SUMMARY

1. Chemical carcinogens such DENA, 2-MeDAB, 3'-MeDAB, AAF' and AFB₁ were administered to Sprague-Dawley rats. Hepatocellular carcinoma was induced using DENA and 3'-MeDAB after six or seven months.

The amount of total gangliosides was significantly increased in hepatocellular carcinoma comparing with normal liver. Using DENA hepatocellular carcinoma was induced most and the amount of total gangliosides was also increased most.

2. Gangliosides isolated from normal rat liver and rat hepatocellular carcinoma were analysed by HPTLC and hepatoma-specific ganglioside antigen was identified as G_{D1a}.
3. Gangliosides isolated from human hepatocellular carcinoma tissue were analysed and also examined. The result showed that the amount of G_{M3} was decreased and the amount of G_{M1} was increased.

여 백

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	15
Chapter 2. Materials and Methods	27
1. Material	27
1) Experimental Animals	27
2) Chemicals	27
3) Human Hepatoma Tissue	28
2. Methods	28
1) Induction of Hepatoma	28
2) Isolation and Purification of Gangliosides	29
3) Quantitation of Gangliosides	30
4) Identification of Hepatoma-Specific Ganglioside Antigen ...	30
Chapter 3. Results and Discussions	32
1. Induction of Hepatoma	32
2. Isolation and Purification of Hepatoma-Specific Ganglioside Antigen	32
3. Identification of Hepatoma-Specific Ganglioside Antigen in Rat Hepatocellular Carcinoma	35
4. Identification of Hepatoma-Specific Ganglioside Antigen in Human Hepatocellular Carcinoma	39

Chapter 4. Conclusions	41
Chapter 5. References	42

목 차

제1장 서 론	15
제2장 실험재료 및 방법	27
제1절 실험재료	27
1. 실험 동물	27
2. 시 약	27
3. 사람 간암 조직	28
제2절 실험방법	28
1. 간암 유발	28
2. Gangliosides의 분리·정제	29
3. Gangliosides의 정량	30
4. 간암 특이 ganglioside 항원의 동정	30
제3장 결과 및 고찰	32
1. 간암 유발	32
2. 간암 특이 ganglioside 항원의 분리·정제	32
3. 백서의 간암 특이 ganglioside 항원의 동정	35
4. 사람 간암 조직에서의 간암 특이 항원의 동정	39
제4장 결론 및 건의사항	41
제5장 참 고 문 헌	42

여 백

제 1 장 서 론

전 세계적으로 암에 의한 사망률은 날로 증가하고 있으며 우리나라에서도 암 발생률은 계속 증가하여 중요한 사망원인의 하나가 되고 있다. 발생 부위별로는 소화기암(위암, 간암) 및 복막암이 가장 많고 다음으로는 자궁암 등의 비뇨생식기암, 폐암 등의 호흡기계암, 백혈병 등의 림프·조혈조직암, 골수암 및 유방암 순의 발병률을 나타낸다⁽¹⁾.

기존의 암에 대한 진단방법에는 물리적인 방법과 생화학적인 방법이 있다. 물리적인 방법으로 X-ray, Computerised Tomography (CT), Nuclear Magnetic Resonance(NMR Scan), 그리고 방사성 동위원소를 이용한 방법들(Liver Scan, Bone Scan)이 있다. 물리적인 진단법으로는 가장 해상능이 좋을 때 0.5~1cm 직경의 종양을 확인해 낼 수 있으며, 이는 1g 또는 10^{12} 개 정도의 세포에 해당한다. 현재도 계속 이러한 방법들의 해상능을 높이기 위한 시도들이 진행되고 있으나 그 한계를 극복하기는 어려울 듯 하다. 또 다른 류의 진단 방법으로 생화학적 검사가 있다. 이는 암 발생과정에 수반되는 생체내 변화를 확인함으로써 암 발생 여부를 진단하는 것이다. 현재 혈청에서 HCG(human chorionic gonadotropin), AFP(α -fetoprotein), CEA(carcinoembryonic antigen) 등의 양을 측정하는 진단법을 사용하고 있으며 이것으로 소량의 종양도 확인해 낼 수 있다. 하지만 이들의 양에 영향을 미치는 여러 다른 요인들도 있

음을 고려해야 한다. 암의 진단에 이용되는 몇가지 생화학적 검사
를 표 1에 정리해 보았다⁽²⁾.

표1. 생화학적 암 진단 방법

Substance (in serum)	Structure	Mol. wt.	Method of assay	Use
Human chorionic gonadotropin (HCG)	Glycoprotein	46 000 subunit 16 000 subunit 30 000	RIA, EIA	Gestational cancers
Carcinoembryonic antigen (CEA)	Glycoprotein	180 000	RIA, EIA	Wide range, including cancer of colon, breast, lung, pancreas and ovary
α -Fetoprotein (AFP)	Glycoprotein	70 000	RIA, EIA	Hepatoma, gestational cancers
Acid phosphatase	Glycoprotein	102 000	Spectrophotometric RIA, EIA	Prostatic cancer
Calcitonin	Peptide	3500	RIA	Medullary cancer of the thyroid, breast cancer?
β_2 -Microglobulin	Protein	11 800	RIA, EIA	Lymphoma, multiple myeloma

RIA = radioimmunoassay; EIA = enzyme-linked immunoassay

기존의 암에 대한 치료법에는 외과수술로 종양 부위를 제거
해내는 방법, 독성의 화학물질을 처치하는 화학요법, 방사선 요법이
있다. 외과수술은 종래의 진단법으로 확인한 종양부위를 제거해내는
것인데, 이로서는 종양세포를 완전히 제거해내기 힘들다. 화학요법이
나 방사선요법은 정상세포와 암세포의 분화속도, 대사, 방사선 민감
도 등의 차이를 이용해 암세포만 선택적으로 제거해 내고자 실시
하지만 이들은 정상세포도 죽이며, 그 부작용이 심하다.

이상 살펴본 바와 같이 암에 대한 기존의 진단·치료방법으
로는 암의 치료에 부족함이 많다. 따라서 기존의 방법의 한계를

넘을 수 있는 또 다른 진단·치료방법의 개발이 절실한 상태이다. 최근 암에 대한 연구의 대부분은 좀 더 효과적인 암의 진단과 치료를 위한 것이며, 이들은 주로 생물학적 반응을 이용한다.

암 세포는 정상적인 성장제한을 받지 않고 무한정 성장하는 특성을 가지며, 이러한 특성은 외부환경과의 경계를 이루고 정보전달 체계가 집중되어 있는 세포표면의 변화와 깊은 관계를 갖는다. 따라서 종양세포면의 변화에 대한 연구가 많이 되고 있으며, 이는 곧 종양세포 특이 항원의 발현에 관한 것이다. 즉, 정상세포에서는 발현되지 않던 어떤 생체고분자가 종양세포에 발현되면 생체에서 비자기로 인지하기 때문에 종양 특이 항원이라 한다⁽³⁾.

종양 특이 항원을 찾기 위해서는 종양세포를 마우스에 면역화하여 종양 특이 항원에 대한 단일클론 항체를 찾는 방법을 이용한다. 이런 식으로 밝혀진 종양 특이 항원들은 매우 다양하며, 가장 잘 연구된 melanoma의 경우 40여개의 다른 표면 항원들이 확인되었다(표 2).

Melanoma의 종양세포 표면 항원들은 몇가지 범주로 구분할 수 있는데 MHC 분자, 성장인자 수용체, 양이온 결합단백질, 고분자량의 세포외 기질 결합 단백질, ganglioside 등이다. 이들 중 상당수는 여러 다른 종류의 정상세포에서도 발현되는 것들이고 몇가지는 종양세포에만 특이적으로 나타난다. 어떤 melanoma 표면항원은 생체 면역체계를 자극하여 항체를 생성시킨다. 하지만 이들이 종양에 대한 면역반응에 어느 정도의 역할을 하는지는 알 수 없다. 종양표면 항원에 대한 단일클론 항체를 생산하는 세가지 중요한

2. Melanoma-Associated Antigens

Category	Example	Biochemical Characteristics	Significant Features
High molecular weight substrate interacting antigens	Chondroitin sulfate proteoglycan	> 400 kD; 250 kD polypeptide core	Expressed on membrane spikes; involved in intercellular adhesion, and matrix attachment; highly immunogenic
	Melanoma-associated cellular adhesion molecule	105 and 130 kD	Role in matrix adhesion
	Placental membrane antigen High molecular weight proteins with ganglioside-like distribution pattern	120 and 94 kD 260 kD	Role in matrix adhesion; highly specific to melanomas
Gangliosides	GD2 9-O-acetylated GD3 GD3 GM2	Gangliosides	Expressed in brain and tumors of neural crest origin only; implicated in cell adhesion; GD2 and GD3 expression characteristic of advanced or metastatic lesions; highly immunogenic
Growth factor receptors	Epidermal growth factor receptor (EGF-R) Nerve growth factor receptor (NGF-R) Insulin growth factor receptor Platelet-derived growth factor receptor (PDGF-R) Transforming growth factor β receptor (TGF- β -R)		Expressed on advanced tumors; EGF is mitogenic for melanoma cells <i>in vitro</i> Expressed on all cultured melanoma cells
Cation transport and binding proteins	Melanotransferrin Calcium-binding S-100	97 kD monomeric sialoglycoprotein; related to transferrin 21 kD highly acidic cytoplasmic protein	Expressed on all cultured melanoma cells; highly immunogenic Member of calcium-binding protein family; expressed by neural crest-derived tumors and normal tissues; widely used for immunohistochemical diagnosis of nonpigmented melanomas.
Class II MHC	HLA-DR		Expressed on many primary tumor explants; no correlation with behavior <i>in vivo</i>
ICAM-1/2	—	90 kD	Ligands for LFA-1
Pigmentation-associated antigen		70-80 kD	Found in melanosomes of pigmented normal and malignant melanocytes
Differentiation antigens	Nevus antigen Gangliosides Galactocerebrosides Myelin-associated glycoprotein Others	Variable	Antigens on melanoma cells which correspond to antigens expressed on normal nevomelanocytes

Abbreviations: HLA, human leukocyte antigen; kD, kilodalton; MHC, major histocompatibility complex; GD, ganglioside; ICAM-1/2, intercellular adhesion molecule-1/2; LFA-1, leukocyte function-associated antigen-1.

목적으로 이용할 수 있다. 첫째, 종양발전에 따른 표면항원 발현의 변화를 알고 있고 이들에 대한 단일클론 항체를 갖고 있다면 특정 항원에 대한 항체반응의 확인으로 종양발전 정도를 알 수 있다. 예를 들면 melanoma ganglioside D₂(G_{D2})는 advanced 또는 metastatic melanoma에만 제한적으로 나타난다. 두번째로 종양표면 항원에 대한 항체는 면역진단적인 목적으로 쓰일 수 있다. 즉, 표면 조직에서 종양 특이 항원을 면역조직화학적으로 확인한다거나 종양표면 항원이 혈액중으로 유출됨을 이용하여 혈액진단법에 이용할 수도 있다. 세번째로 종양표면 항원에 대한 항체는 면역치료법에 사용할 수 있다. 면역치료법은 종양표면 항원에 대한 항체의 처치로 생체면역 체계를 자극하여 종양세포를 제거토록 하는 방법, 면역독소를 이용하는 방법 등을 포함한다(표 3).

악성 종양 발생과정에선 ganglioside의 합성, 조성 등에 큰 변화가 생긴다. 정상 세포에는 존재하지 않거나 미량으로 존재하는 어떤 ganglioside가 악성 종양의 발생 및 성장과정에서 대량 합성·축적된다. 이런 특정 ganglioside는 종양 특이 항원으로 표시될 수 있으며, 이들에 대한 단일클론 항체는 종양의 진단 및 치료에 유용하게 이용될 수 있다.

Ganglioside는 glycosphingolipid의 한 종류로서 oligosaccharide 사슬에 한개 이상의 sialic acid가 존재하는 구조적 특징을 갖고 있다. Ganglioside의 기본 구조는 G_{M1}으로, 또 다른 sialic acid가 첨가됨에 따라 G_{D1a}, G_{D1b}, G_{T1b} 등이 된다(그림 1). Ganglioside는 모든 진핵세포의 일반적인 세포막 구성성분으로서, 오래전부터 세포 특이

표3. 항종양성 항체를 이용한 면역요법의 예

Approach	Examples	Tumors	Current Status
Free antibody	Anti-Ig idiotype Anti-IL-2R Anti-ganglioside Anti- <i>neu</i> oncogene product	B cell lymphomas T cell lymphomas Melanoma Sarcoma	Human trials Human trials Human trials <i>In vivo</i> animal model
Ig-toxin conjugates	Ricin A - anti-CD5 Ricin A - anti-CD22 Ricin A - anti-CD19 Ricin A - anti-melanoma	T cell lymphomas B cell lymphomas B cell lymphomas Melanoma	<i>In vitro</i> Human trials <i>In vitro</i> Human trials
Ig-drug conjugates	Chlorambucil - anti-melanoma	Melanoma	Human trials
Ig-radioisotope conjugates	²¹¹ Bismuth - anti-Thy-1	T cells	<i>In vitro</i>
Dual-specificity heteroconjugate Ig	Anti-CD3:Anti-TAA	Sarcoma	<i>In vitro</i>
Ig-hormone heteroconjugate	Anti-CD3: Melanocyte-stimulating hormone	Melanoma	<i>In vitro</i>

Abbreviations: Ig, immunoglobulin; IL-2R, interleukin-2 receptor; TAA, tumor-associated antigen.

항원으로 알려진 몇가지 경우를 제외하고는 그의 실질적인 기능으로 명확히 입증된 것은 없다. 하지만 호르몬, 세균독소, 바이러스 독소의 수용체로 작용하는 경우들, 미생물의 감염, 세포간 인지현상에 관여하는 몇가지 경우들에 대한 보고가 있다.

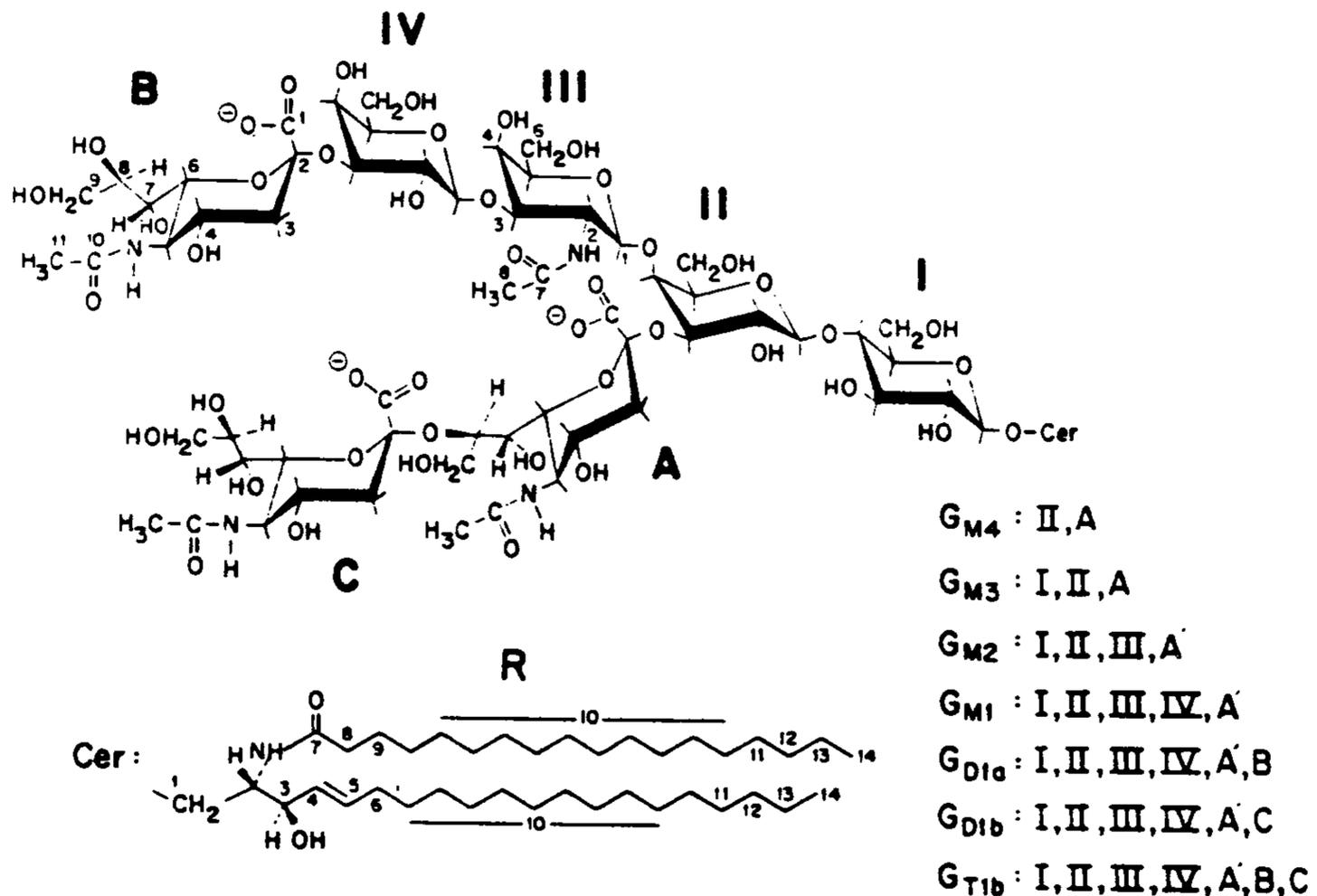


그림1. Ganglioside들의 구조, 모든 ganglioside는 ceramide 부분(R)과 hexopyranoside 잔기들(I, II, III, IV), 그리고 하나 이상의 sialic acid(A,B,C)를 포함한다.

최초의 종양 특이 ganglioside 항원은 1959년 Rapport⁽⁴⁾ 등에 의해 발견된 LacCer(cytolipin H)이다. LacCer는 대부분의 포유동물 세포의 정상적인 구성성분인데 여러 종류의 인체 종양세포에서 그 함량이 매우 증가하였다. Monosialosyllactosylceramide(G_{M3})는 포유동

물의 신경외 세포의 주요 구성성분인데 이 또한 종양 세포에서 그 함량이 상당히 매우 증가하였다. Diasialosyllactosylceramide(G_{D3})는 신경세포에 비교적 많이 존재하며 비신경세포에는 전혀 존재하지 않는데, 인체 melanoma^(5,6,7,8), 인체 colorectal carcinoma⁽⁹⁾, 인체 pancreatic carcinoma⁽⁹⁾, 인체 leukemic lymphoma^(10,11,12,13), 쥐 lung carcinoma⁽¹⁴⁾, 마우스 EL-4 lymphoma⁽¹⁵⁾, 그리고 인체 뇌종양⁽¹⁶⁾에서 함량이 매우 증가하였다. 1985년 Nguyen⁽¹⁷⁾ 등은 overpressed thin layer chromatography(OPTLC)를 이용하여 chronic lymphocytic leukemia 환자세포의 ganglioside 분포를 분석하였다. 그 결과 정상적인 lymphocyte에는 총 ganglioside중 G_{M3} , G_{M2} , G_{M1} , G_{D1} 이 각각 37.7%, 6.1%, 7.5%, 19.6% 존재하였는데, 종양세포에는 G_{M3} 함량이 2배 이상 증가된 82.5%였으며 정상세포에는 존재하지 않던 G_{D3} 가 5.5%를 차지하였고 G_{M2} , G_{M1} , G_{D1} 은 그 함유량이 정상세포에 비해 감소하거나 거의 변화가 없었다. 이 사실로 CLL 종양세포의 ganglioside 항원은 G_{D3} 임을 알 수 있었다. 1985년 Brodin⁽¹⁸⁾은 마우스 단일클론 항체 IgM4.2가 인체 melanoma 세포의 종양특이 ganglioside G_{D3} 에 대한 항체임을 보고하였다. 1986년 Thurin⁽¹⁹⁾ 등에 의해서 TLC와 단일클론 항체 ME361을 이용하여 인체 melanoma에 다량 존재하는 종양 특이 ganglioside 항원이 G_{D2} 임을 밝혔다. 1988년에는 Fuchs 등이 단일클론 항체를 이용하여 Fucosyl- G_{M1} 가 human lung carcinoma의 종양 특이 항원임을 확인하였다⁽²⁰⁾. 현재까지 밝혀진 종양특이 ganglioside 항원은 표 4에 정리되어 있다. Blood group substance들도 종양 특이 항원으로 작용하는데, 종양발생시

이들의 함량이 매우 증가하는 양상을 보인다. 각종 종양에서 밝혀진 특이 fucoglycolipid는 표 5에 표시하였다.

본 연구에서는 우리나라에서 발생률이 높은 간암에 대한 진단, 치료의 목적으로 간암 특이 ganglioside 항원을 찾고자 한다. 실험동물인 흰 쥐에 각종 화학 발암제를 투여하여 간암을 유발시킨 후 간암세포에서의 ganglioside 분포를 분석하여 간암 특이 ganglioside 항원을 동정하고 이에 대한 단일클론 항체를 생산함으로써 종래의 간암 진단과는 다른 새로운 진단법을 개발하고자 한다. 또한 항종양성 항체를 생산함으로써 간암 치료제 개발의 기본 연구를 수행하고자 한다.

Æ4. Tumor-associated glycosphingolipids

No.	Chemical structure	IUPAC-IUB symbols	Svennerholm abbreviation	Tumors
1	Gal β 1-4Glc β -1Cer	LacCer		various human tumors
2	NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	II ³ NeuAc-LacCer	G _{M3}	various human and animal tumors
3	NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	II ³ (NeuAc) ₂ -LacCer	G _{D3}	human melanoma human colorectal & pancreatic carcinomas human leukemic lymphocytes murine lung carcinoma mouse EL-4 lymphoma human brain tumors
4	NeuGc α 2-8NeuGc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	II ³ NeuGc ₂ -LacCer	G _{D3}	bovine leukemic lymphocytes
5	GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer	Gg ₃ Cer	asialo-G _{M2}	mouse EL-4 lymphoma E 5148 lymphoma 3T3KIMSV cells mouse ascite hepatoma mouse ascite Erlich carcinoma cell lines from patients with Hodgkin's disease
6	GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer ↑ ³ 2 α NeuAc or NeuGc	II ³ NeuAc-Gg ₃ Cer	G _{M2}	mouse ascite Erlich carcinoma mouse EL-4 lymphoma human lung carcinoma human melanoma
7	GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer ↑ ³ 2 α NeuAc ₈ -2 α NeuAc	II ³ NeuAc ₂ -Gg ₃ Cer	G _{D2}	human brain tumors mouse EL-4 lymphoma human melanoma
8	Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer	Gg ₄ Cer	asialo-G _{M1}	human acute lymphoblastic leukemia
9	Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer ↑ ³ 2 α NeuAc	IV ³ NeuAc-Gg ₄ Cer	G _{M1b}	rat hepatoma AH 7974F
10	Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer ↑ ³ ↑ ⁶ 2NeuAc 2 α NeuAc	IV ³ NeuAcIII ⁶ NeuAc-Gg ₄ Cer		rat hepatoma AH 7974F

Table 4. (continued)

No.	Chemical structure	IUPAC-IUB symbols	Svennerholm abbreviation	Tumors
11	Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer	Gb ₃ Cer		Burkitt lymphoma
12	GalNAc β 1-3Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	iGb ₄ Cer		rat lymphosarcoma
13	GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer 3 ↑ 2 α NeuAc	IV ³ NeuAc-Gb ₄ Cer		human teratocarcinoma HT-E
14	GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer	Gb ₅ Cer		human lung carcinoma human biliary carcinoma
15	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	nLc ₄ Cer		hamster NILpy cells various tumor cells
16	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer 6 ↑ 2 α NeuAc	IV ⁶ NeuAc-nLc ₄ Cer		human colonic adenocarcinoma human pancreatic adenocarcinoma
17.	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer 3 ↑ 2 α NeuAc	IV ³ NeuAc-Lc ₄ Cer		human lung carcinoma
18.	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer 3 ↑ 2 α NeuAc2 α NeuAc or NeuGc NeuGc	IV ³ SiaIII ⁶ Sia-Lc ₄ Cer		human D54MG glioma cells
19.	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer 3 ↑ 2 α NeuGc NeuGc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	IV ⁶ NeuGc-nLc ₄ Cer	}	H-D antigen of various human tumors
20.	GalNAc β 1-4Gal β 1-4Gal β 1-Cer 3 ↑ GlcNAc β 1	II ³ NeuGc-LacCer LcGg ₄ Cer		

표5. 종양 특이 fucoglycolipids 항원

Chemical structure	IUPAC-IUB symbols	Tumors
Fuc α 1-Cer	FucCer	human colonic adenocarcinoma
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer 3 \uparrow 1 α Fuc	III ³ Fuc-nLc ₄ Cer	various human adenocarcinomas
Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer 2 \uparrow 1 α Fuc	IV ² Fuc-Gg ₄ Cer	rat hepatoma AH 7974F
GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer \uparrow 1 α Fuc	IVFuc-Gb ₄ Cer	human teratocarcinoma HT-E
Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer 3 \uparrow 4 \uparrow 2 α NeuAc 1 α Fuc	IV ³ NeuAcII ⁴ Fuc-Lc ₄ Cer	human colonic adenocarcinoma human pancreatic carcinoma
Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer 2 \uparrow 3 \uparrow 1 α Fuc 2 α NeuAc	IV ² FucII ³ NeuAc-Gg ₄ Cer	human lung carcinoma rat hepatoma
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer 3 \uparrow 3 \uparrow 2 α NeuAc 1 α Fuc	IV ³ NeuAcII ³ Fuc-nLc ₃ Cer	human pancreatic adenocarcinoma
Gal α 1-3Gal β 1-4GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer \uparrow 2 \uparrow 3 1 α Fuc 2 α NeuAc		rat hepatoma
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-Cer \uparrow 6 \uparrow 3 2 α NeuAc 1 α Fuc	VI ⁶ NeuAcIII ³ Fuc-nLc ₆ Cer	human colonic and liver carcinomas
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer \uparrow 2 \uparrow 3 1 α Fuc 1 α Fuc	IV ² III ³ Fuc ₂ -nLc ₄ -Cer	human colonic carcinoma
Gal β 1-(4GlcNAc β 1-3Gal β) ₂ -4Glc β 1-Cer \uparrow 3 1 α Fuc	V ³ III ³ Fuc ₂ -nLc ₆ Cer	human colonic and liver adenocarcinomas
Gal β 1-(4GlcNAc β 1-3Gal β) ₂ -4Glc β 1-Cer \uparrow 3 \uparrow 3 2 α NeuAc 1 α Fuc	VI ³ NeuAcV ³ III ³ Fuc ₂ -nLc ₆ Cer	human colonic adenocarcinoma
Gal β 1-(4GlcNAc β 1-3Gal β) ₃ -4Glc β 1-Cer \uparrow 3 1 α Fuc	VII ³ V ³ III ³ Fuc ₃ -nLc ₄ Cer	human colonic and liver adenocarcinomas

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절 실험 재료

1. 실험 동물

본 연구에 사용한 백서는 한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소 동물사육실에서 분양받은 Sprague-Dawley였다.

2. 시 약

간암 유발을 위해 사용한 화학 발암제인 3'-methyl-4-dimethylaminobenzene(3'-MeDAB)은 TCI(Tokyo, Japan)에서 구입했으며, 2-acetylaminofluorene (2-AAF), diethylnitrosamine(DENA) 및 aflatoxin B₁ (AFB₁)은 Sigma(USA)에서, 2-methyl-4-dimethylaminoazobenzene (2-MeDAB)은 Janssen(Belgium)에서 구입하였다. Sephadex G-50은 Pharmacia 제품을 사용하였다. HPTLC plate는 Merck사(German)의 nano TLC plate silica gel 60 F254 precoated를 사용하였다. 그 외에 실험에 사용한 모든 시약들은 reagent grade와 GR을 사용하였고, Sigma, Aldrich 및 Merck 등에서 구입하였다. Ganglioside standard로는 G_{M1}, G_{M2}, G_{M3}, G_{D1a}, G_{D1b}, G_{T1b}를 사용하였으며 이는 모두 Sigma사에서 구입하였다.

3. 사람 간암 조직

본 연구에 사용한 사람 간암 조직은 서울대학교 의과대학 생화학교실 및 전남대학교 의과대학 외과학교실에서 얻었다.

제 2 절 실험 방 법

1. 간암 유발

체중 약 80~100g의 웅성 및 자성 Spraque-Dawley 백서를 다음과 같이 5개군으로 나누어 간암을 유발시켰다. 제1군은 DENA (diethylnitrosamine)을 백서 kg당 7mg씩 식수에 첨가하여 퓨리나 사료로 사육하였으며, 제2군은 2% Corn oil이 첨가된 퓨리나 사료에 0.06% 2-MeDAB(2-methyl-4-dimethylaminoazobenzene)를 첨가하고 DENA를 백서 kg당 7mg씩 식수에 첨가시켜 간암을 유발시켰다. 제3군은 2% Corn oil이 첨가된 퓨리나 사료에 0.06% 3'-MeDAB을 첨가시켜 간암을 유발시켰다. 제4군은 0.02% 2-AAF(acetylamino fluorene)를 퓨리나 사료를 첨가하여 간암을 유발시켰고, 제5군은 aflatoxin B₁(AFB₁)을 퓨리나 사료에 0.001%씩 첨가하였다. 제6군은 정상군으로 퓨리나 사료만을 주어 사육하였다.

각 군의 백서를 규칙적으로 희생시켜 간을 채취하였고, 간암의 발생여부는 각 조직을 10% formalin 용액으로 고정시킨 후 hematoxylin-eosin 염색을 하여 확인하였다.

2. Ganglioside의 분리·정제

조직으로부터 총 지질을 추출⁽²¹⁾하기 위하여 조직 1~2g에 chloroform:methanol 용액(1:1, v/v)⁽²²⁾을 10ml/g of tissue씩 첨가해 실온에서 균질화시킨 후 4°C에서 2~3시간 rotary shaking하여 4°C에서 10분간 750×g로 원심분리했다.

상층액은 모아두고 침전물에서 다시 한번 지질을 추출했다. 상층액을 앞서 얻은 상층액과 합하여 rotary evaporator로 1/4 volume까지 건조시킨 후, 다시 원심분리하여 불용성 물질을 제거한 후 rotary evaporator로 유기용매를 완전히 제거했다.

건조된 총 지질 추출물로부터 중성지질과 인지질을 제거하기 위해⁽²³⁾ diisopropylether와 1-butanol 혼합용액(DIPE:1-butanol, 6:4, v/v)으로 용해하는데(10ml/g of tissue), 충분히 용해되도록 sonication을 하거나 vortexing을 했다. 여기에 50mM NaCl 용액을 5ml/g of tissue 비율로 첨가하여 완전히 용해될 때까지 sonication, vortexing을 반복한 후 750×g로 4°C에서 10분간 원심분리하여 상층액은 제거하고 ganglioside를 포함하고 있는 하층액을 얻었다. DIPE : butanol(6:4, v/v) 용액으로 중성지질, 인지질을 추출해 내는 과정은 두세번 반복하여주며, 최종적으로 얻는 수용액층에 소량 남아 있는 유기용매를 완전히 제거하기 위하여 질소 가스로 bubbling을 했다. 이후 냉동건조하고 건조된 시료는 소량의 증류수(약 2ml)에 녹여 2분간 sonication한 후 Sephadex G-50 column chromatography를 실시하여 염과 불순물을 제거했다⁽²⁴⁾. 용출용매로는 증류수를 사용하며 용출분획은 206nm에서 흡광도를 측정했다. ganglioside를 포함하는 void

volume peak 부분을 모아 냉동건조하여, 소량의 CM(1 : 1) 용액에 녹인 후 750×g로 원심분리하여 불용성 물질을 제거하여 ganglioside를 정제했다.

3. Ganglioside의 정량

정제한 ganglioside를 정량하기 위해 periodate-resorcinol assay를 실시했다^{(25), (26)}. 정제한 ganglioside가 녹아 있는 CM 용액을 소량 취하여 질소가스로 건조시킨 후 500 μ l의 증류수를 넣어 시료로 사용하며, standard ganglioside 용액(1mg/4ml dd-H₂O)은 각각 0, 40, 80, 120, 160, 200, 280, 400 μ l씩 취하고 각각 증류수를 넣어 500 μ l가 되도록 했다. 이렇게 준비한 시료와 standard에 0.04M periodic acid를 0.1ml 넣고 vortex한 후 35분간 ice bath에 방치했다. 다시 resorcinol stock solution(4g/200ml dd-H₂O) 30ml, 32% HCl 53ml, dd-H₂O 17ml 및 25 μ moles cupric sulfate로 준비한 resorcinol reagent 1.25ml를 넣고 vortex한 후 5분간 ice bath에 두었다가 15분간 100 $^{\circ}$ C water bath에서 가열한 후 찬물로 식힌다. 여기에 1.25ml의 95% tert-butyl alcohol을 첨가하고 single phase가 되도록 vortex한 후 37 $^{\circ}$ C water bath에 3분간 두어 색을 안정화시키고 실온으로 식혀 630nm에서 흡광도를 측정한다.

4. 간암 특이 ganglioside 항원의 동정

전개용매(chloroform:methanol:0.25% aqueous CaCl₂=55:45:10, v/v/v)로 chamber를 3시간 이상 포화시켜두며, HPTLC plate는 95 $^{\circ}$ C

에서 1시간 동안 preactivation시킨다. 정제한 ganglioside가 녹아 있는 CM 용액 소량과 ganglioside standard 용액을 각각 취하여 HPTLC plate 하단으로부터 1.5cm 지점에 spot하면서 찬 공기로 건조시킨다. plate를 전개시킨 후 찬 공기로 말리고, 100°C oven에 15초가량 넣었다가 발색용액 resorcinol-HCl reagent (resorcinol stock solution(4g/200ml dd-H₂O) 5ml, 32% HCl 40ml, 0.1M cupric sulphate 0.25ml, H₂O 9.75ml)을 spray한다. spray한 plate 위에 유리판을 덮고 clamp로 조인 후 110°C에서 20분간 가열한다^(27,28). 종양 특이 ganglioside 항원의 분리 정제 및 동정의 실험 순서를 그림2에 총괄적으로 표시하였다.

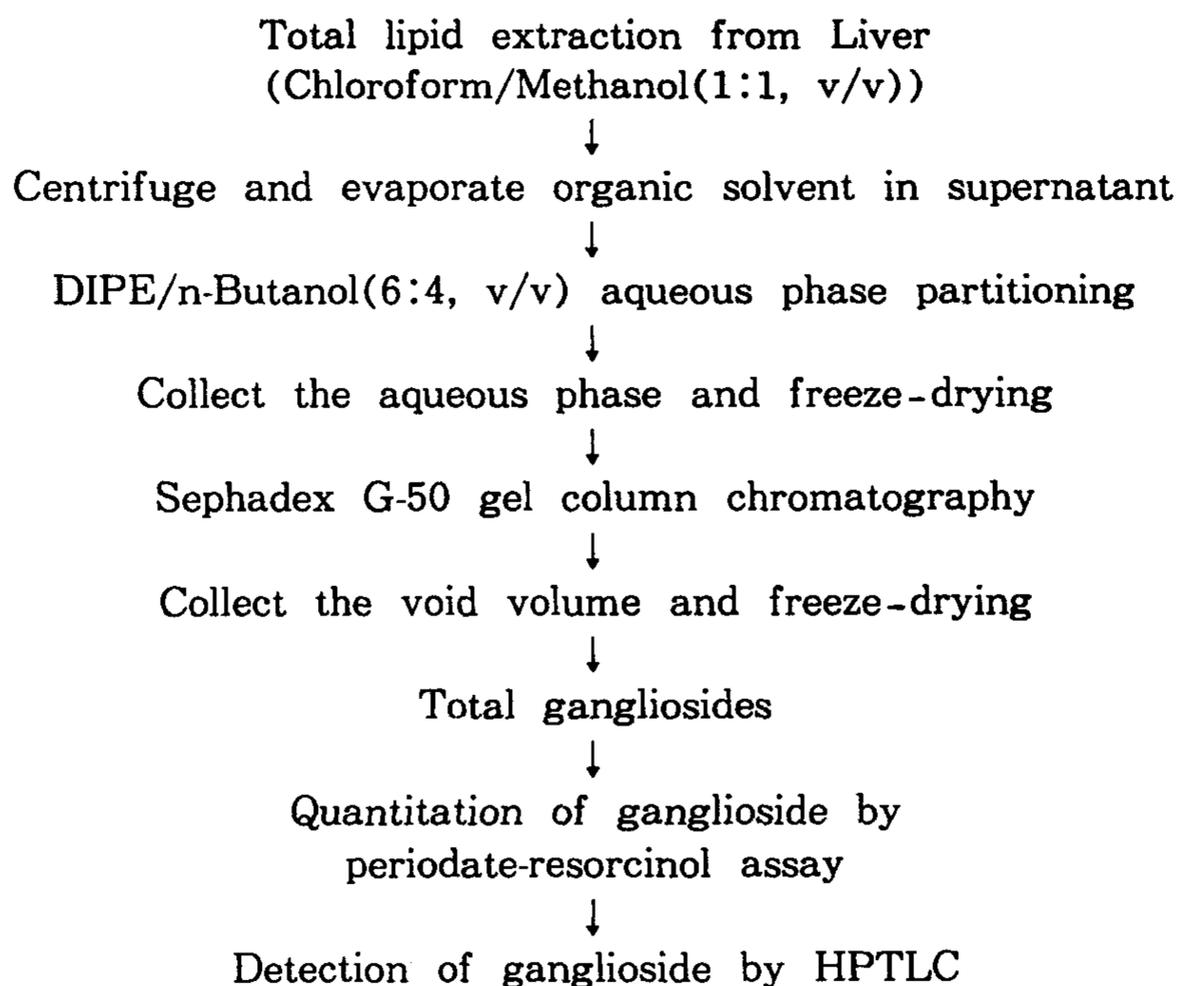


그림2. 종양 특이 ganglioside 항원의 분리·정제 및 동정 순서도

제 3 장 결과 및 고찰

1. 간암 유발

백서에 화학 발암제인 DENA(diethylnitrosoamine), 3'-MeDAB(3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene), AAF(2-acetylaminofluorene), AFB(aflatoxin B₁) 등을 투여하여 백서에 간암을 유발시킨 후 간암세포로부터 총 ganglioside 함량을 측정하였다. 간 세포 1g당 추출한 ganglioside의 함량은 정상 간세포에서는 약 200 μ g 이었으며, 간암이 유발되었을 때는 ganglioside 함량이 2배이상 증가하였다. 3'-MeDAB에 의해 간암이 유발되었을 때 총 ganglioside 함량이 약 30% 증가하였으며, DENA의 경우 총 ganglioside 함량이 3배이상 증가하였다. AAF와 AFB에 의해서는 간암이 거의 유발되지 않았다(그림 3). 그림 4에서는 간세포 1g에서 추출한 총 ganglioside의 함량을 도표화하였다. 정상 간세포에서의 총 ganglioside 함량이 100~300 μ g 이었으며 간암세포에서는 300 μ g 이상이었다.

2. 간암 특이 ganglioside 항원의 분리·정제

화학 발암제를 투여한 백서로부터 간조직을 채취하여 일정량의 간 세포(1g 내지 2g)로부터 총 ganglioside를 분리하였다. 간 조직으로부터 총 지질을 추출하기 위하여 Folch extraction 방법을 이용하였다. 추출한 총 지질로부터 ganglioside만을 분리해내기 위해 DIPE(Diisopropylether)/n-Butanol 용액(6:4, v/v)로 용해시키고 이에

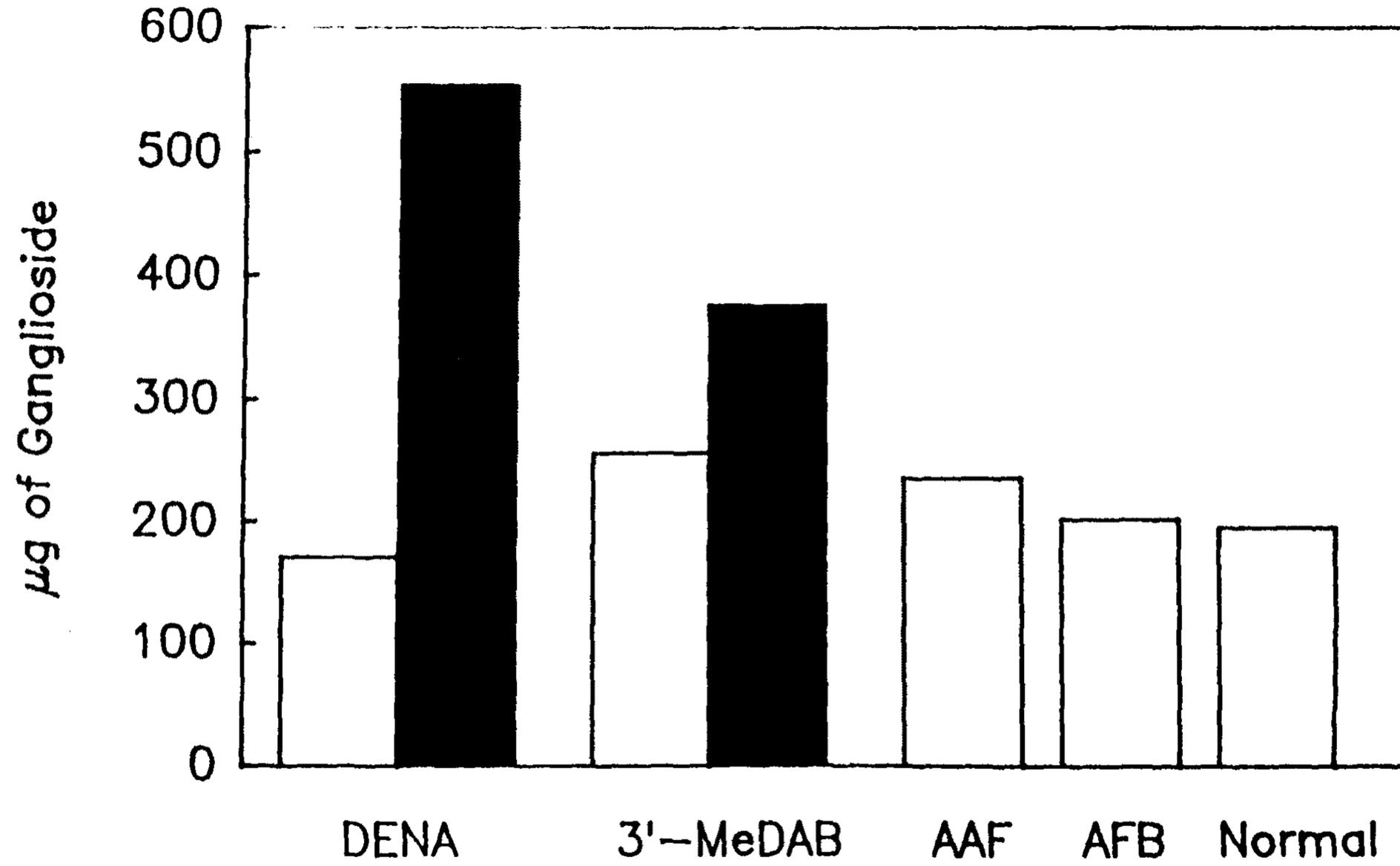


그림3. 각종 화학발암제에 의한 간암유발과 총 ganglioside의 분포

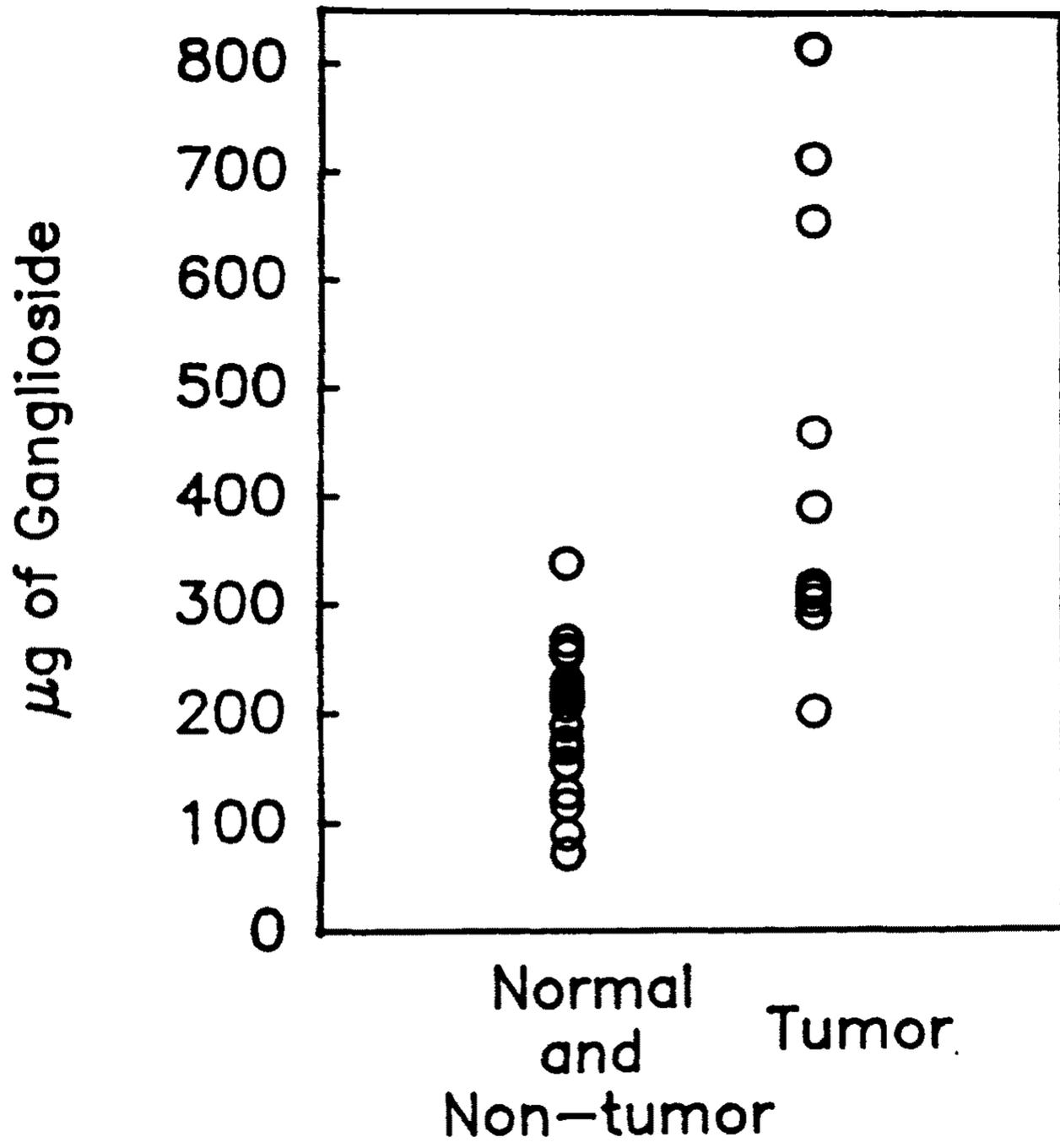


그림4. 정상세포와 간암세포에서의 총 ganglioside 함량의 분포

50mM sodium chloride 용액을 첨가하여 분획법을 실시하였다. 유기용매층엔 중성지질과 인지질이 녹고, 하부의 수용액층엔 ganglioside가 녹는다. 유기용매를 다 제거하고 얻은 수용액층은 동결건조하여 sephadex G-50 gel column chromatography를 실시한다. Void volume 에 나온 분획이 총 ganglioside이며 두번째 분획은 염과 불순물이다. 순수분리된 ganglioside는 periodate-resorcinol 정량법으로 정량하였으며 HPTLC로 간암 특이 ganglioside 항원을 동정하였다.

3. 백서의 간암 특이 ganglioside 항원의 동정

DENA를 투여하여 간암을 유발시킨 그룹의 ganglioside 조성을 분석한 HPTLC 결과가 그림 5이고, 그것을 densitometer로 읽어서 각 성분별 비율을 결정한 것이 그림6이다. G_{D1a} 와 G_{M1} 이 DENA 투여 일수가 증가함에 따라 증가하는 양상을 보였고, G_{D1b} , G_{T1b} 등 비교적 친수성인 ganglioside들의 양이 상대적 감소를 나타내었다.

2-MeDAB/DENA를 투여한 그룹의 ganglioside 조성은 그림 7의 HPTLC 결과와 각 성분별 비율을 결정한 그림 8로 확인할 수 있다. 이 그룹에서는 G_{M1} 이 감소경향을 나타내었고, G_{D1a} 는 증가하였다.

간암발생이 가장 뚜렷했던 3'-MeDAB 투여 그룹의 ganglioside 조성은 그림 9에 나타나있다. 다른 ganglioside에 비해 가장 뚜렷한 변화를 보인 것은 G_{D1a} 이다. 이상의 결과로 백서에서 화학발암제로 간암을 유발시킨 경우 G_{D1a} 의 양의 변화가 가장 주목할 만한 변화였음을 알았다.

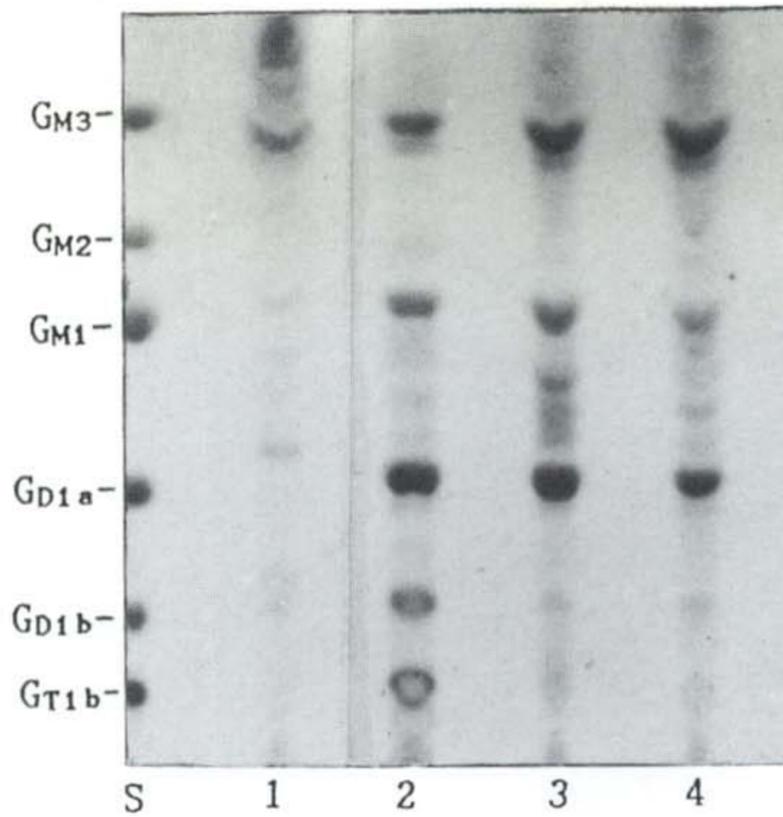


그림5. DENA를 처리한 흰 쥐의 간 gangliosides의 HPTLC patterns
 S:Ganglioside Standards, 1:백서의 정상 간조직, 2:DENA 투여 134일 경과, 3:DENA투여 179일 경과(간암 발생), 4:DENA투여 179일 경과

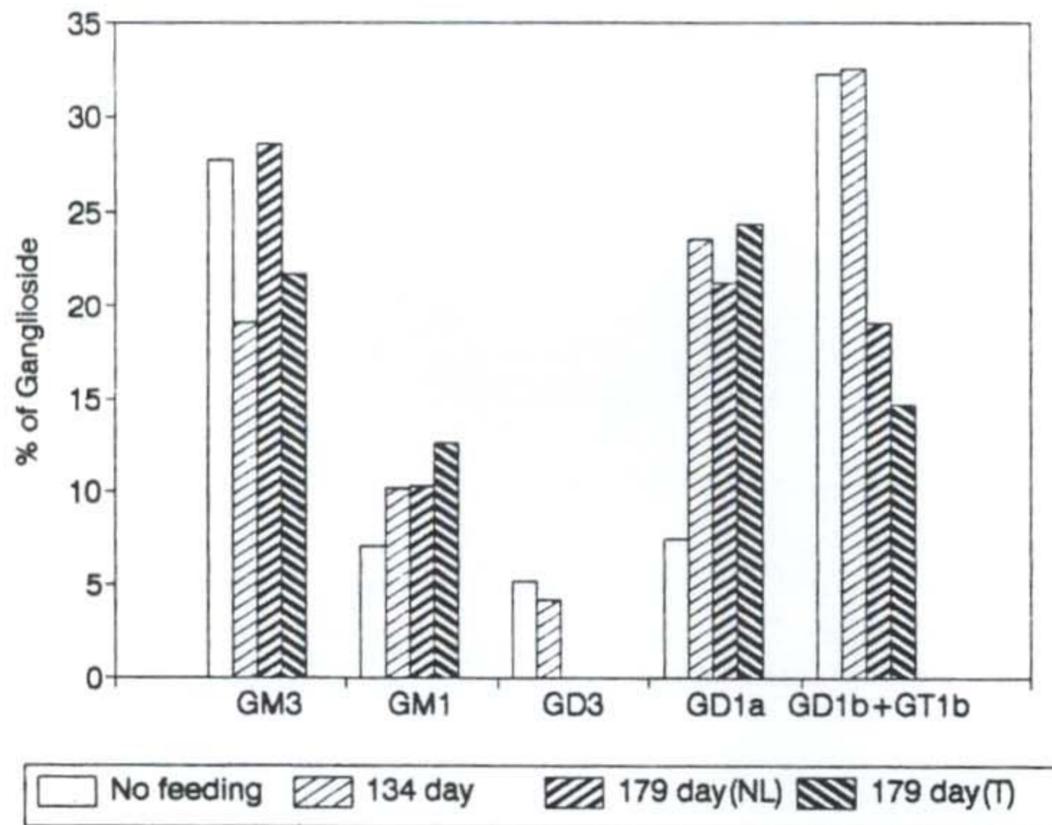


그림6. Density scanning에 의한 각 ganglioside의 상대적 비율의 측정. 그림5의 DENA투여군의 ganglioside HPTLC patterns을 densitometer로 scanning하여 ganglioside의 각 성분별 상대적 비율을 측정하였다.

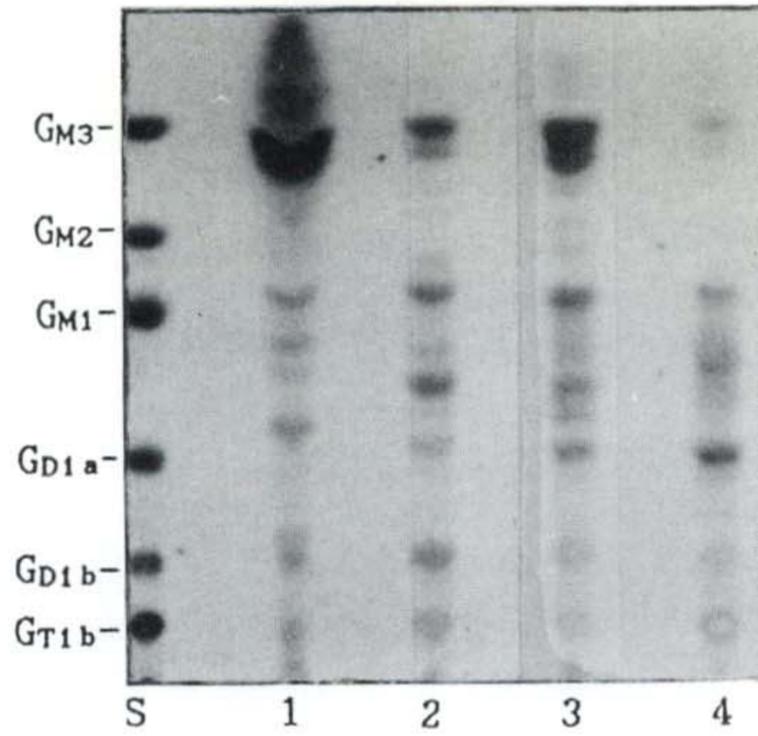


그림7. 2-MeDAB/DENA를 처리한 흰쥐의 간 gangliosides의 HPTLC patterns S:Ganglioside Standards, 1:흰쥐의 정상 간 조직, 2:2-MeDAB/DENA 처리 120일 경과, 3:2-MeDAB/DENA 처리 145일 경과, 4:2-MeDAB/DENA 처리 155일 경과 (간암 발생)

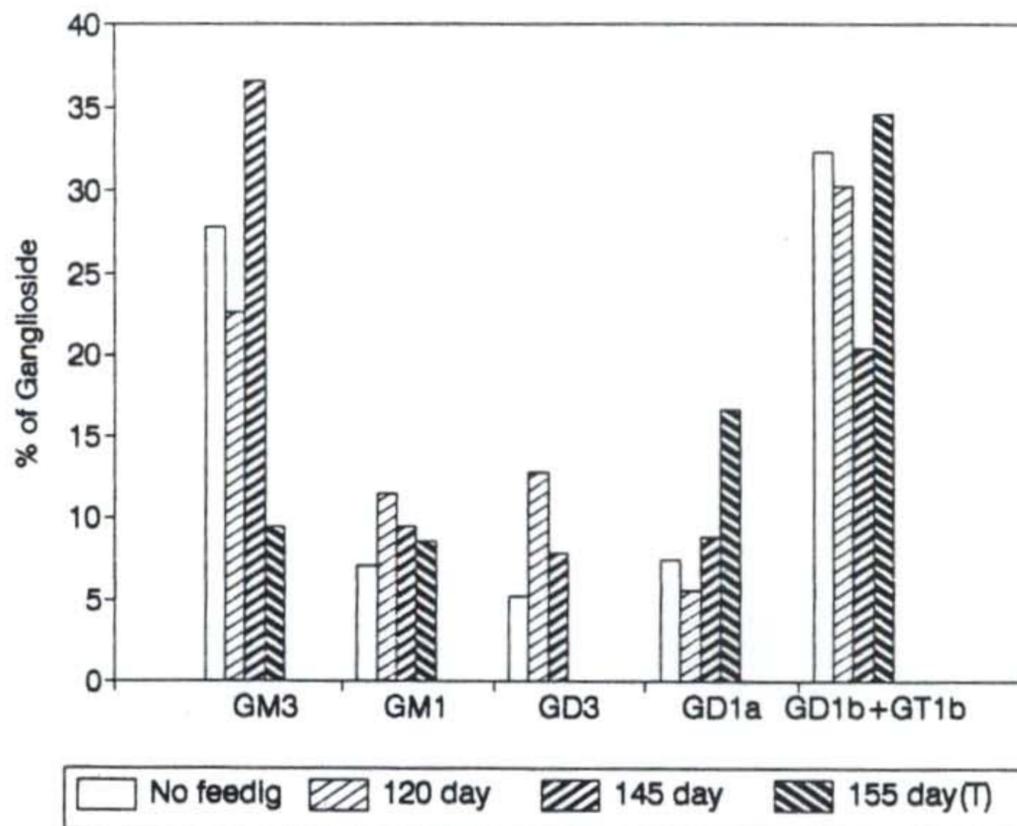


그림8. Density scanning에 의한 각 ganglioside의 상대적 비율의 측정. 그림7의 2-MeDAB/DENA투여군의 ganglioside HPTLC patterns을 densitometer로 scanning하여 ganglioside의 각 성분별 상대적 비율을 측정하였다.

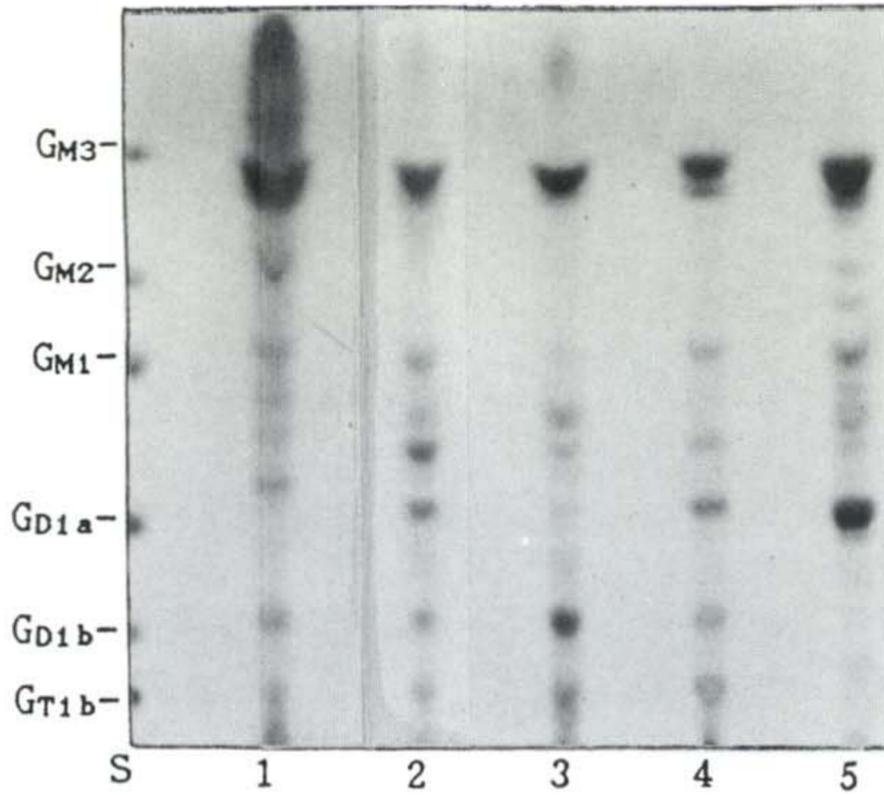


그림9. 3'-MeDAB를 처리한 흰쥐의 간 gangliosides의 HPTLC patterns S:Ganglioside Standards, 1:흰쥐의 정상 간조직, 2:3'-MeDAB처리 191일 경과(간암 발생), 3:3'-MeDAB처리 241일 경과(간암 발생), 4:3'-MeDAB처리 268일 경과(간암 발생), 5:3'-MeDAB처리 268일 경과(간암 발생)

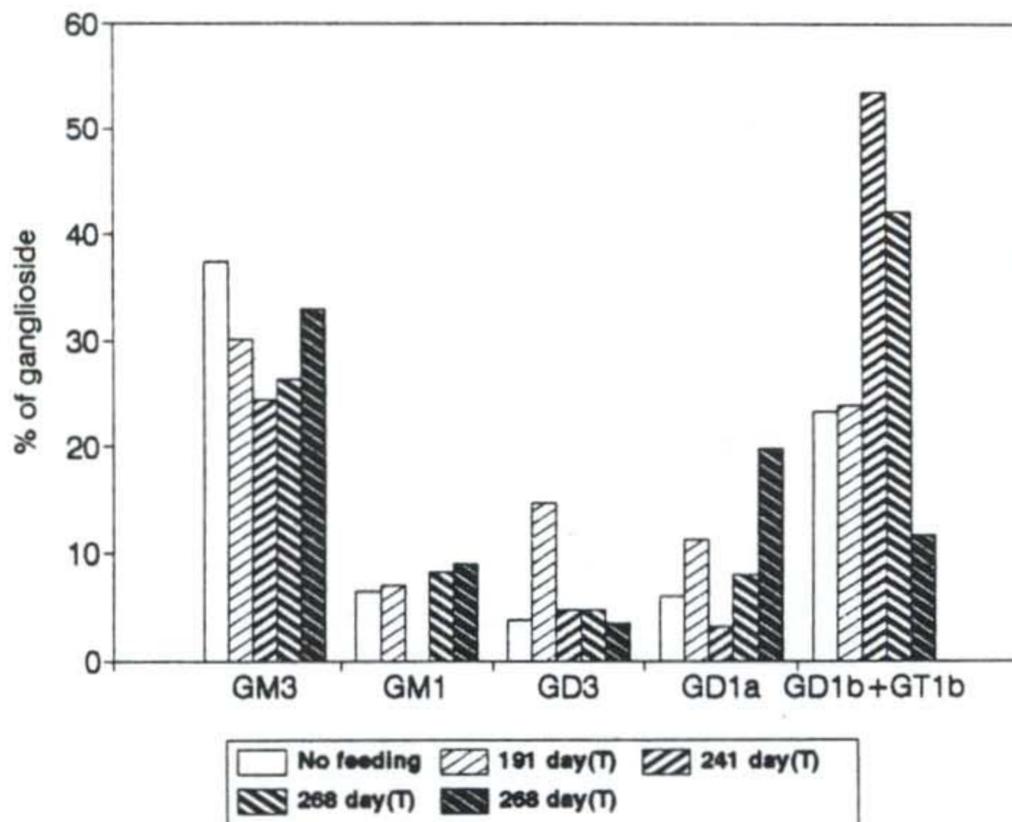
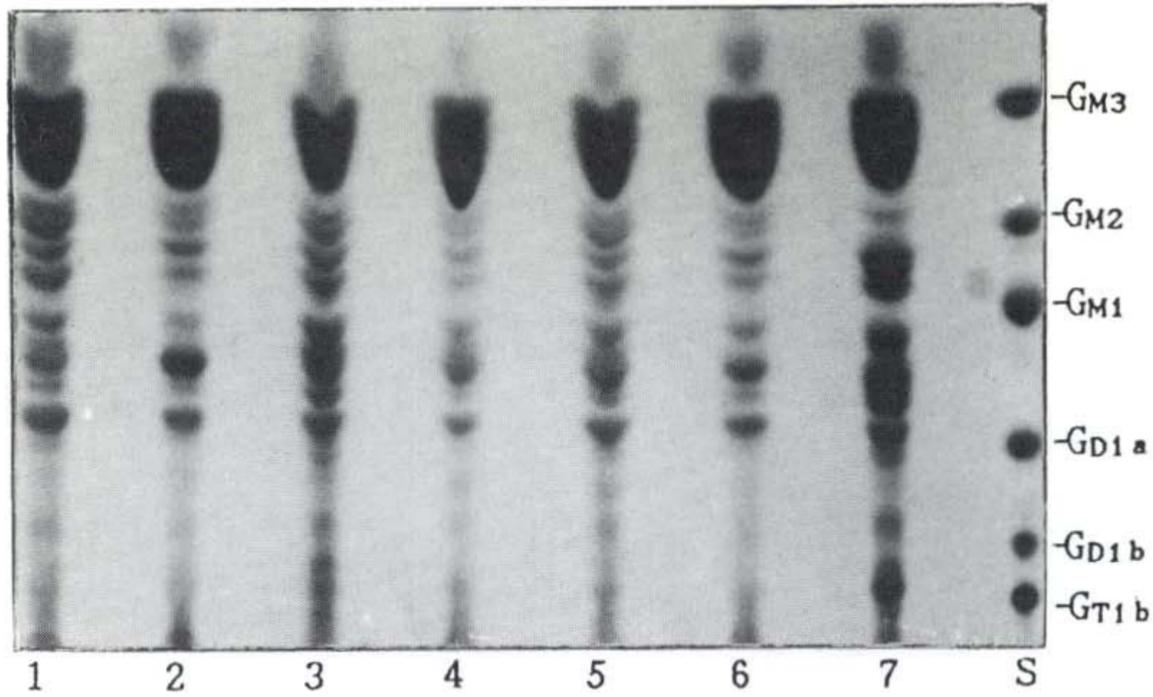


그림10. Density scanning에 의한 각 ganglioside의 상대적 비율의 측정. 그림9의 3'-MeDAB투여군의 ganglioside HPTLC patterns을 densitometer로 scanning하여 ganglioside 각 성분별 상대적 비율을 측정하였다.

4. 사람 간암 조직에서의 간암 특이 ganglioside 항원의 동정

본 연구의 최종적인 목표는 실제로 간암 진단에 사용할 수 있는 간암 특이 ganglioside의 확인과 그에 대한 항체 생산을 목표로 하기 때문에 실험동물인 백서에 화학적 발암제를 투여하고 간암발생 과정에서의 ganglioside 구성변화를 알아보는 것과 더불어 사람 간암 조직 및 혈청에서의 ganglioside 구성 및 정상과의 차이점을 비교하였다. 사람 간암 조직의 ganglioside 구성은 그림 11의 HPTLC 결과 확인할 수 있으며, 이를 densitometer 읽은 결과가 그림 12이다. 간암조직 시료는 간암부위와 그 주변의 정상적으로 보이는 조직을 각각 얻어 tumor, nontumor로 표시하였고 각각에 대해 ganglioside를 분리·정제하여 분석하였다. Non-tumor 시료보다 tumor 시료의 ganglioside 구성은 G_{M2} 이하의 비교적 친수성이 큰 ganglioside들이 증가 경향을 나타내었고, G_{M3} 는 확연히 감소하였다. 증가경향을 나타냈던 G_{M2} 이하의 비교적 극성의 ganglioside들 중 G_{M1} 이 가장 뚜렷한 양적 변화를 나타냈다.



lanes	standards and samples	total gangliosides/g liver
S	Gangliosides standards	
1	Human hepatoma biopsy(HHB) 1	228.4 μ
2	Nontumor part of HHB 2	178.3
3	Human hepatoma biopsy(HHB) 2	309.5
4	Nontumor part of HHB 3	224.3
5	Human hepatoma biopsy 3	236.7
6	Nontumor part of HHB 4	239.5
7	Human hepatoma biopsy 4	150.2

그림11. 사람 간암 조직의 ganglioside HPLTC patterns와 간 조직 g당 ganglioside의 양

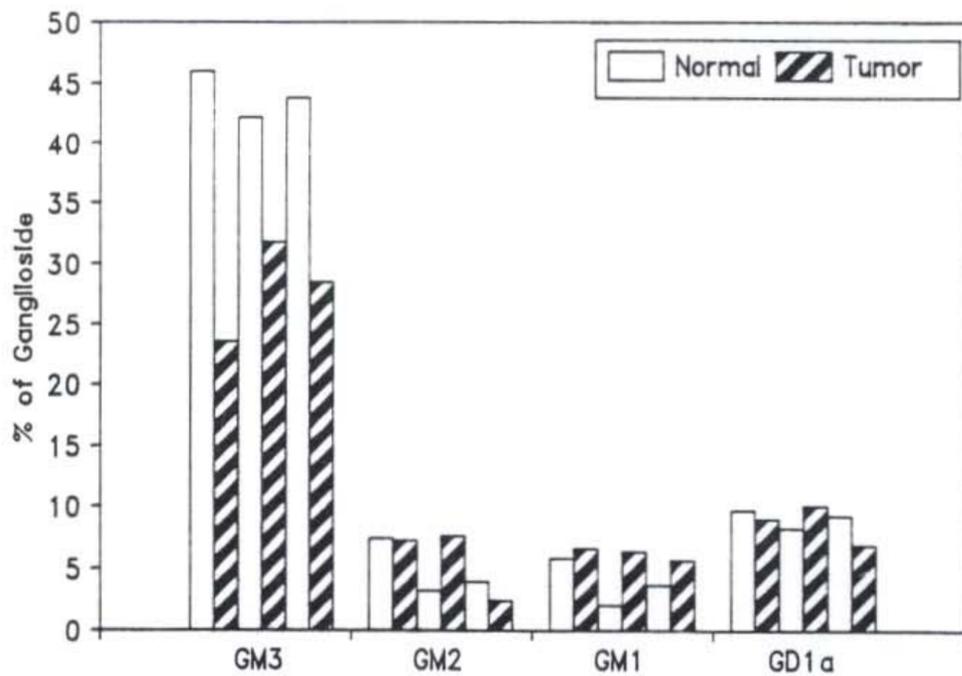


그림12. Density scanning에 의한 각 ganglioside의 상대적 비율의 측정. 그림10의 사람 간암 조직의 ganglioside HPTLC patterns를 densitometer로 scanning하여 ganglioside 각 성분별 상대적 비율을 측정하였다.

제 4 장 결론 및 건의사항

본 연구과제의 수행으로 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. DENA, 2-MeDAB, 3'-MeDAB, AAF 그리고 AFB₁ 등의 carcinogen을 백서에 투입하여 간암발생 과정을 분석한 결과, DENA와 3'-MeDAB을 투여한 백서의 경우 6개월 내지 7개월 후에 간암이 발생하였다. 또한 총 ganglioside의 함량은 정상간에 비해 간암세포에서 유의하게 증가하였다. 특히 DENA를 처리하였을 때 간암이 잘 유발되었으며 총 ganglioside 함량의 증가도 특이하게 높았다.
2. DENA, 3'-MeDAB 등을 간암을 유발한 백서의 간 조직에 대한 ganglioside 구성을 분석한 결과, G_{D1a}의 양의 증가가 공통적으로 확인되었다.
3. 사람 간암조직에 대한 ganglioside 구성분석 결과, 비간암부위에 비해 G_{M3}가 확연히 감소하였고 G_{M2}이하의 비교적 극성인 ganglioside들의 양이 증가하였으며 그중 G_{M1}의 증가가 두드러졌다. 사람 hepatocellular carcinoma의 종양 특이 ganglioside 항원을 확인하기 위해서는 더 많은 간암 조직을 얻어 분석하여야 할 것이다.

제 5 장 참 고 문 헌

- (1) 유전공학센터(1989) <국내 의약품 개발 현황 및 전망에 관한 조사> p.155.
- (2) Farmer, P.B., et al (1985) <The Molecular Basis of Cancer> p.204.
- (3) Abbas, A.K., et al. (1991) <Cellular and Molecular Immunology> p.338.
- (4) Rapport, M.M., et al (1959) Cancer 12, 438-445.
- (5) Pukel, C.S., et al (1982) J. Exp. Med., 155, 1138-1147.
- (6) Nudelman, E., et al (1982) J. Biol. Chem., 257, 12752-12756.
- (7) Portoukalian. J., et al (1979) Eur. J. Biochem., 94, 19-23.
- (8) Carubia, J.M., et al (1984) Biochim. Biophys. Res. Commun., 120, 500-504.
- (9) Fredman, P., et al (1983) Med. Biol. 61, 45-48.
- (10) Westrick, M.A., et al (1983) Biochim. Biophys. Acta, 750, 141-148.
- (11) Goff, B., et al (1983) Eur. J. Biochem., 130, 553-557.
- (12) Siddiqui, B., et al (1984) Cancer Res., 44, 5262-5265.
- (13) Kuriyama, M., et al (1985) Biochim. Biophys. Acta, 834, 396-401.
- (14) Kozlov, A.M., et al (1984) Exp. Onkol. (USSR), 6. n5, 62-65.

- (15) Dyatlovi skaya, E.V., et al (1985) *Biokhimiya (USSR)*, 50, 412-415.
- (16) Yates, A.J., et al (1979) *J. Lipid Res.*, 20, 428-436.
- (17) Neguyen, A.T., et al (1985) *Int. J. Cancer*, 35, 643-646.
- (18) Brodin, T., et al (1985) *Biochim. Biophys. Acta.*, 837, 349-353.
- (19) Thurin, J., et al (1986) *FEBS*, 208, 17-22.
- (20) Fuchs, B.B. et al (1988) *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 10, 3, 273-286.
- (21) Folch, J., et al (1957) *J. Biol. Chem.*, 226, 497.
- (22) Yu, R.K., et al (1972) *J. Lipid Res.*, 13, 680-685.
- (23) Ladisch, S., and Gillard, B (1985) *Anal. Biochem.*, 146, 220-231.
- (24) Ueno, K., et al (1978) *J. Lipid Res.*, 19, 863-871.
- (25) Ledeen, R.W., and Yu, R.K. (1982) *Meth. Enzymol.* 83, 155-181.
- (26) Jourdian, G.W., et al (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 430-435.
- (27) Avrova, N.F. (1971) *J. Neurochem.*, 18, 667.
- (28) Irwin, C.C., and Irwin, L.N. (1979) *Anal. Biochem.*, 94, 335.