

암세포의 증식 및 면역회피 기능을 근거로 한 위암/간암 관련 유전자 발굴 및 분석

Investigation of stomach/liver cancer-related genes by
functional screening based on immune escape and
proliferation of cancer cells

한국생명공학연구원

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “암세포의 증식 및 면역회피 기능을 근거로 한 위암/간암 관련 유전자 발굴 및 분석에 관한 연구”과제의 보고서로 제출합니다.

2003. 7 .

주관연구기관명: 한국생명공학연구원

주관연구책임자: 최 인 표

연 구 원 : 양 영
: 이기녕
: 이정형
: 임종석
: 이영호
: 송규상

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 이 병 재

보고서 초록

과제관리번호	FG00-0301-004-100	해당단계 연구기간	2000.7-2003.6	단계 구분	1단계/3단계
연구사업명	중 사업명	21C 프론티어연구개발사업			
	세부사업명	인간유전체기능연구사업			
연구과제명	중 과제명	암세포의 증식 및 면역회피 기능을 근거로 한 위암/간암 관련 유전자 발굴 및 분석			
	세부(단위)과제명				
연구책임자	최인표	해당단계 참여연구원수	총 : 72 명 내부 : 40 명 외부 : 32 명	해당단계 연구비	정부: 1,700,000 천원 기업: 천원 계: 1,700,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국생명공학연구원 면역학연구소		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 : 충남대 의과대학		연구책임자 : 이영호		
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
<p>위암관련 암세포 증식 및 사멸 유도 유전자 발굴 및 기능분석면역활성 조절 유전자 발굴을 위하여 다음의 결과를 얻었다.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 간암 및 위암관련 유전자군 확보: 환자에서 채취한 tumor부위와 정상부위를 대상으로하여 암 특이 발현 혹은 억제 cDNA library 제조 (subtraction library) 2. 후보 유전자의 발현: 확보한 full-length library/유전자를 signal sequence trap/retroviral expression cloning system에 발현 3. NK/B/T cell 활성화를 조절하는 유전자 탐색: <ul style="list-style-type: none"> - 면역세포의 증식 및 사멸을 직접 유도하는 유전자 탐색 - 면역세포의 활성을 직접 증가 혹은 저해하는 유전자 탐색 - 위암, 간암에 침윤한 면역세포에 특이적인 유전자 탐색 - 위암 환자에서의 면역세포 cDNA library 구축 4. 종양특이 면역회피 기능성 유전자 탐색 <ul style="list-style-type: none"> 정상 혹은 암세포에 cDNA library를 발현하고 발현된 정상 혹은 암세포를 표적으로 하여 - 면역세포의 살상능에 대한 저항성을 직접 증가 혹은 저해하는 유전자 탐색 - 면역세포의 살상능 조절에 관련하는 유전자 탐색 5. 종양 세포의 증식 및 사멸을 조절하는 유전자 탐색: <ul style="list-style-type: none"> - 종양에서 발현되는 종양세포 사멸억제 유전자 탐색 - 종양세포의 증식을 조절하는 물질에 반응하는 유전자 탐색 6. 종양세포의 전이를 조절하는 유전자 탐색 <ul style="list-style-type: none"> - 위암 및 간암의 전이나 malignant progression과정에서 발현이 변화되는 유전자 탐색 - 유전자의 기능을 검정하여 암의 전이 및 진행을 조절하는 유전자를 발굴 					
색인어 (각 5개 이상)	한글	위암, 유전자, 증식, 면역회피, 전이			
	영어	stomach cancer, gene, proliferation, immune escape, metastasis			

요 약 문

I. 제 목

암세포의 증식 및 면역회피 기능을 근거로 한 위암/간암 관련
유전자 발굴 및 분석

II. 연구개발의 목적 및 필요성

위암 및 간암 관련 유전자 군으로부터 암 및 면역 세포 기능 조절 활성을 갖는
기능성유전자를 검색할 수 있는 효과적인 functional screening system을
개발하여, 위암 및 간암 질환관련 후보유전자들을 발굴하고 이들의 발현을 암
질환에서 확인하여 50개의 암 치료용 후보유전자를 도출한다. 이들
목표유전자들의 기능을 정밀분석하고 동물 모델에서 기능을 점검한 후 최종
10개의 목표유전자 개발하고 이들을 이용한 새로운 면역암치료법 및 진단법을
개발한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- (1) 중앙 면역활성 조절 유전자 발굴 및 기능분석
- (2) 암세포 증식 및 사멸 유도 유전자 발굴 및 기능분석
- (3) 암세포 전이 조절 유전자 발굴 및 기능분석
- (4) 암관련 유전자의 임상 병리적 분석

IV. 연구개발결과

- 1.subtractive cDNA library: 전이 혹은 암 조직 특이 subtractive library를 통한
유전자 발굴
- 2.signal sequence trap 기술의 확립: signal sequence trap 확립 및 수행하였고
기능분석을 위한 후보유전자 발굴
- 3.retroviral expression library:pMX vector를 이용한 위암 유전자 retroviral
library 확립
4. 암세포에 의한 면역세포 활성화 및 증식 검정 system: NK, DC 활성화 검정
5. 암전이 관련 검정 및 유전자 발굴

V. 연구개발결과의 활용계획

후보 유전자는 새로운 암세포의 기능과 조절기능을 규명할 수 있는 근거를
제시하였다. 즉 9-27은 NK 조절 유전자로 MIC는 새로운 전이조절 유전자로
활용될 가능성이 높고 VDUP1은 새로운 tumor suppressor gene으로 가능성이
있어 관련된 연구에 긍정적인 활용 가능성이 높다.

여 백

S U M M A R Y

To achieve the final goal of the project (functional analysis of 10 genes related to stomach cancer), we have constructed cDNA library from stomach cancer tissue/cells and established functional gene screening system based on cellular functions such as cell apoptosis, immune escape, and metastasis during the first 3 years of the project. From screening of stomach tumor library, we have selected 76 genes based on gene expression and functional implication.

In order to find genes encoding proteins which are membrane-targeted or secreted from gastric cancer tissues and regulate immune system, signal sequence trap technique, which are developed to screen genes encoding secreted or membrane targeted proteins, was performed. Signal sequence trap library was constructed from gastric cancer tissues to produce retroviruses. From this library, we selected 10 candidates. For the analysis of immune function, we analysed the roles of candidate genes on NK and dendritic cell functions. Among them, 9-27 which was up-regulated in gastric tumors, suppressed NK cell function. It also induced cell migration when it was overexpressed in tumor cells. VDUP1 which was disappeared from gastric cancer, had growth suppressive functions. It arrested tumor cell cycle at G0/G1. In addition, we have generated VDUP1 k/o mice for further *in vivo* analysis. For metastasis analysis, we set up several assays and selected several candidates. Among them, MIC-1 had a metastatic capacity by activating PKC signaling. We analyzed the expression of MIC-1 in 12 cases of surgically removed human gastric tumor tissues by *in situ* hybridization, and found that MIC-1 was specifically expressed in the tumor cells of all gastric cancer tissues examined, but not in their normal counterparts. Syntenin also induced cell invasion, when it was overexpressed in tumor cells.

Overall, during this period research, we have constructed the tumor gene libraries and function screening systems, which will be useful targets and tools for the next period of project.

여 백

C O N T E N T S

1. Outline of Project.....	11
2. Present status of research development.....	15
3. Results.....	17
4. Accomplishment.....	51
5. Application of results.....	53
6. Informations on oversea R&D.....	55
7. References.....	57

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	11
제 2 장 국내외 기술개발 현황.....	15
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	17
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	51
제 5 장 연구개발결과의 활용계획.....	53
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	55
제 7 장 참고문헌.....	57

제 1 장 연구개발과제의 개요

한국인에게 가장 많이 발생하는 암인 위암 (암 환자중 남자: 25.3%, 여자: 15.4%, 1998), 간암 (남자: 16.8%, 여자: 5.6%, 1998)의 발병원인은 한 두 유전자의 변이로 야기되기보다는 많은 유전자군의 변이가 1차 혹은 2차 진행과정을 유도한다. 이러한 유전자 군을 동정하고 기능을 규명하는 일은 새로운 치료법이나 진단법 개발에 필수적이다. 현재까지의 human genome project 결과로 거의 모든 유전자 지도와 염기서열이 밝혀지고 있고, 더불어 bioinformatics의 발달로 이러한 암 관련 유전자의 변이를 대량 분석하는 방법을 제공하고 있어, 기존의 방법으로는 한계를 보이고 있는 암진단 및 치료에 새로운 장을 제시할 수 있다. 인간 유전자는 약 100,000개로 추정하는데, 한 세포가 분화단계에 따라 이중에 약 10-20% 정도인 10,000-20,000개의 유전자를 발현하는 것으로 알려져 있다. mRNA/cDNA saturation/hybridization 분석에 의하면 암세포는 변이과정에서 정상세포와 10% 정도 (약 1,000-2,000)의 유전자 변이가 생기는 것으로 추정된다. 이중 약 40개 유전자는 모든 암세포에서 적어도 한 세포 당 3개 이상의 유전자 copy가 만들어진다고 보고되었다 (Nature genetics 1999, 23: 387). 실제로 췌장암(pancreatic cancer)에서는 410개의 cDNA의 유전자가 정상세포보다 발현이 증가됨을 Northern blot, tag-sequencing, database homology search를 통해 밝혀졌으며 이중 32.5%가 novel한 유전자로, 26.3%가 EST homologue로 밝혀졌다(Annals of Oncology 1999, 10: S64). Human cancer cell line, NCI의 60 cell line (CNS, renal, ovarian, leukemia, colon, and melanoma)을 대상으로 조사한 결과 약 8,000개의 유전자가 unique gene으로 밝혀졌으며, 이중 3,700개의 유전자가 인간 단백질로 1,900개의 유전자가 다른 종과 유사한 유전자로, 2,400개의 유전자가 EST로 밝혀졌다 (Nature genetics 2000, 24: 227). CGAP information에 의하면 현재까지 위암관련 유전자가 약 1100개, 그중 unknown unigene이 대부분으로 밝혀져 있다. 간암의 경우 약 20여종의 유전자가 unknown unigene으로 밝혀져 있다. 확보된 유전자 정보로부터 암 특이적 유전자를 구별하고 나아가 이들 유전자 군으로부터 세포성장, 사멸, 전이, 면역조절기능 등 생물학적인 의미를 갖는 유전자의 특성을 규명하는 일은, 특히 human genome project에 뒤떨어진 우리 현실에서 가장 경쟁력을 높일 수 있고 반드시 해야할 시급한 분야이다.

기존의 방사선, surgery, 항암제 방법 등은 일시적인 암치료 효과를 기대할 수 있지만 여러 가지 인체에 대한 부작용, 잔류한 암세포의 제거 등의 문제점을 가지고 있어 이를 해결할 수 있는 종양면역의 중요성이 강조되고 있다. 지난 세기의 암생물학 및 종양면역학의 다양한 성과 중 하나는 종양의 발생이 숙주세포, 특히 면역세포와의 상호작용에 의한 것임을 밝혀낸 점이라 할 수 있다. 이러한 현상은 다양한 모델에서 증명되고 있으며, 특히 전이암 모델에서는 전이암의 발생에 면

역세포와 전이암 세포와의 상호 능동적인 신호전달 과정이 개입되어 있음을 보여주고 있다. 그러한 예들은 바이러스성 간염이나 박테리아에 의한 위암 발생 등의 경우에서 특정한 유전적 배경이 암발생률의 증가나 암발생 가능성의 증가를 낳을 수 있다는 추측을 가능케 하고 있으며, 실험적 연구결과들이 보고되고 있는 중이다. 대표적인 최근의 예는 H. pylori 감염과 위암의 발생이 IL-1 β 의 생산 증가와 밀접히 관련되어 있다는 실험적 증거가 제시된 점이며, 간세포의 경우는 간세포에서 특이적으로 잘 발현되는 Fas 분자에 의한 hepatitis 및 liver damage의 연관성인데, 이 분자는 면역세포인 T 세포에 발현되는 Fas ligand에 의한 자극에 민감하다는 사실이 잘 알려지고 있다. 다른 한편의 연구성과로서 생물체의 면역체계는 자기와 비자기를 구분할 수 있는 능력을 보유하고 있으며, 암의 발생에서도 이러한 능력이 발휘되고 있음을 여러 연구성과들이 보고하고 있다. 이러한 연구결과 흑색종(melanoma)으로 대표되는 특정 암들에서는 암세포와 관련된 특이항원(MAGE-1, MAGE-3 및 MART-1등)을 규명하는 성과를 낳았고, 나아가 종양 억제 유전자의 변이유전자, oncogene product 등이 제시되었으며, 이를 인지하는 면역체계의 존재를 증명하는 연구성과를 달성하기도 하였다. 그러나 수많은 연구노력에도 불구하고 다양한 암발생에서 이러한 특이항원의 존재를 증명하는 연구성과는 미진한 상태이며, 당분간 종래의 접근법으로는 특이항원의 정체를 규명하는 일이 성과를 얻기가 어려울 전망이다. 그 이유로는 많은 연구자들이 동의하듯이 암의 발생과 면역체계의 분화 및 증식이 상호 보완적으로 유지되는 경향이 강하다는 점이다. 대표적인 예가 면역회피(immune escape) 현상이라고 할 수 있는데, 이는 역설적으로 암의 발생에 면역계가 긴밀하게 관여하고 있음을 보여주는 예에 다름이 아니라고 할 수 있다. 면역회피에 관련하는 유전자는 주로 면역기능에 중요한 인자들로 Fas, Fas ligand 와 immunosuppressive cytokine 등을 이용한 면역회피 기작이 잘 알려져 있다. Melanoma (흑색종)은 발생빈도와 그 증가된 mortality의 유도가 다른 암 보다 빠른데 그것은 흑색종이 MHC molecule 발현을 감소하거나 IL-10과 같은 soluble inhibitory factor에 의해 면역저해를 하는 등 몇가지 방법을 통해 immune surveillance를 회피하는 것을 제시한다. 마우스 흑색종의 경우 soluble한 Fas ligand를 발현하여 침윤하는 암세포를 주로 Fas를 발현하는 면역세포 (CTL, NK cell)를 죽임으로 면역회피를 한다고 알려져 왔다. 이 연구에 따르면 흑색종이 Fas발현 세포를 죽이는 방법으로 암세포의 지역에 들어온 면역활성 세포를 방어하기 위하여 Fas Ligand를 발현한다는 것이다. 따라서 이것은 흑색종의 immune surveillance를 회피하기 위한 중요한 인자로서 Fas ligand를 보여주는 중요한 증거라 할 수 있겠다. 최근에 본 연구실에서는 이러한 과정에서 흑색종이 IL-18을 발현하고 이 IL-18이 Fas ligand발현을 증가시키는 중요한 면역회피 기능에 관여하는 것을 보고하였다 (Cancer Research 2000).

암 세포의 증식과 사멸과 관련된 연구로서 암세포사멸은 다음과 같은 두 가지 측면에서 중요성을 지닌다. 첫째, 세포사멸의 감소는 세포수의 비정상적인 증

가, 즉 암의 발생을 초래할 수 있다. 둘째, 사멸 능력이 감소된 암 세포는 다양한 항암 요법에 저항성을 나타낸다. 따라서, 세포가 사멸자극에 저항성을 획득하는 기전에 대한 이해는 암의 발생을 이해하고 그 치료 방안을 개발함에 반드시 필요한 사항이다. 사멸자극에 대한 세포의 저항성은 크게 두 가지 기전으로 획득될 수 있다. 즉, 세포사멸 경로에 작용하는 인자들의 활성도가 감소되거나 생존 경로에 작용하는 인자들의 활성도가 비정상적으로 촉진될 때 가능하다. 그러한 사멸인자 및 생존인자들의 정체와 작용기전 그리고 그들의 hierarchy에 대한 연구는 다양한 모델 시스템을 사용하여 지난 10 여년간 괄목할 만한 속도로 진척되어왔다. 따라서, 이미 확인된 세포사멸 조절경로가 실제로 암세포에서도 유도되는지, 그렇지 않다면 어느 인자의 dysregulation 때문인지를 타진하는 연구가 다양한 암세포 모델에서 수행되어 왔다. 그러나, 그러한 연구 방식은 세포사멸의 조절인자들이 현재까지 보고된 것 외에도 매우 다양할 수 있다는 측면에서 그 한계를 표출하고 있다. 또한, 암세포가 사멸에 대한 저항성을 획득하는 과정이 어느 한 인자에 의해서 간단히 결정되기보다는 multiple factor의 영향을 받을 수도 있다는 관점에서, 특정 인자에 주된 관심을 둔 산발적인 연구로는 암세포의 생존기전을 포괄적으로 이해하기에 어려움이 있다. 최근에는 DNA microarray를 이용하여 암세포에서 비정상적으로 발현되는 유전자를 총체적으로 확인하려는 노력이 시도되고 있다. 그러나, 단지 발현의 차이에 근거하여 선별된 인자가 반드시 목적에 맞는 기능을 수행하리라는 보장은 없다. 따라서, 기능적 분석을 통한 검증이 뒤따라야 하며, 유전자 선별을 세포사멸 조절능력에 근거하여 실시하는 기능적 분리 방법을 통하여, 암세포에 비정상적으로 발현되고 있는 세포사멸 조절인자를 기존의 어떤 방법보다도 신속하고도 포괄적으로 파악할 수 있으리라는 생각된다.

암을 성공적으로 치료할 수 없는 이유중의 하나는 암이 같은 조직이나 다른 조직으로 이동하여 성장하는 전이 (metastasis)하는 성질 때문이며 위암이나 간암도 다른 고형암과 마찬가지로 primary tumor보다는 전이에 의해 환자를 사망에 이르게 한다. 암세포의 전이는 접착(adhesion), angiogenesis, 침윤(invasion), proteolysis, 면역반응, extravasation 등의 매우 복잡하고 연속적인 반응을 성공적으로 수행하여야하는 다단계의 연속적인 반응이다. 따라서 비전이성암세포 (tumorigenic, nonmetastatic)가 생존에 유리한 조건인 전이성암세포(tumorigenic, metastatic)로 변하기 위해서는 암종특이적인 다양한 genetic, epigenetic 변화를 수반하여 전이의 전과정을 성공적으로 수행할 수 있는 암세포로의 진행 (progression)이 필수적이다. 위암/간암세포도 마찬가지로 다양한 위암/간암특이적 genetic, epigenetic 변화를 거쳐 고침윤성의 전이성 암세포(highly invasive metastatic cell)로 progression하게 되는데 이러한 metastatic progression과정에서 암세포는 단백질분해능의 증가, invasion능의 증가, motility능의 증가, anoikis에 대한 내성, 면역반응 회피능의 증가 등의 새로운 성질을 획득하게 된다. 그러나 이러한 암세포의 progression기구에 대하여서는 아직 분자수준에서 자세히 밝혀지지 않고 있으며 더구나 암의 다양성과 복잡성으로 인하여 지금까지 밝혀진 전이조절유전자의 대부분

이 모든 암에 관여하고 있는 것이 아니라 그 유전자가 유래한 일부 특정 암에서만 작용하는 것으로 알려져 있다. 예를 들어, 전이억제유전자로 알려진 nm23-H1, E-cadherin, thrombospondin-1, Kai-1, KiSS-1 등은 E-cadherin의 경우를 제외하고는 위암에는 별로 관여하지 않는 것으로 알려져 있다. 또한 cytogenetic 연구에서도 암의 metastatic progression에는 암종 특이적인 genetic변화를 수반하여 암종특유의 progression기구를 갖는 것을 시사하고 있다. 그 예로써 melanoma의 경우 chromosome 1과 6가 직접 또는 간접적으로 전이성세포로의 progression에 관여하며 유방암의 경우에는 chromosome 11이 관여하는 것으로 알려져 있다. 따라서 한국인 호발암인 위암이나 간암의 전이조절유전자를 발굴하기 위하여서는 위암/간암세포 late stage에 일어나는 genetic변화를 주목하여 위암/간암세포로부터 직접 전이나 progression을 조절하는 유전자의 발굴해야한다.

따라서 본 과제에서는 간암 및 위암에 특이하게 발현되거나 억제되는 유전자 library를 대상으로 하여 이 유전자들이 면역세포의 기능을 억제하거나 증가하는 유전자의 pool을 확보하고, 효율적인 간암 및 위암치료를 위해 expression cloning과 functional screening system을 통해 항암 면역기능 조절 유전자 및 종양특이 기능성 항원 유전자를 탐색하고 나아가 이들의 기전을 분자생물학적 수준에서 이해하여 새로운 진단법 및 치료법을 개발하고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

종양면역에 관한 genome 연구로는 B-cell 림프암을 대상으로 gene expression profiling에 의해서 diffuse large B-cell lymphoma(DLBCL)가 두 가지 형태의 패턴으로 분류가 가능함을 처음으로 제시한 연구결과가 발표되었다 (Nature, 403, 502-511, 2000). 하나의 타입은 germinal center B-cell type ("germinal centre B-like DLBCL")이며, 다른 하나는 activated peripheral blood B-cell type ("activated B-like DLBCL")으로, 이제까지 임상적으로 예후(豫後)가 다르나 적절한 분류의 기준이 없었던 B lymphoma의 분자생물학적 분류가 가능해졌음을 제시하였다. 이 경우는 직접적인 림프암의 경우로서 본격적으로 연구된 첫 번째의 케이스이다. 유사한 방법에 의해서 AML(acute myeloid leukemia)과 ALL(acute lymphoblastic leukemia)을 분자 수준에서 구분하고, 이들의 subtype으로의 더욱 상세한 구분이 가능하다는 연구도 보고된바 있다 (Science 286, 531-537, 1999). 한편 Colorado 대학 연구팀은 면역세포를 대상으로 superantigen activation에 의한 T cell의 gene expression profiling을 연구한 결과를 보고하고 있다 (PNAS, 96, 12691-12696, 1999). 이들의 보고에 의하면 activated T cell의 경우에서 다양한 세포의 분화 관련 유전자가 발현될 뿐만 아니라 resting T cell의 경우에서도 다양한 cytokine 수용체 유전자가 발현되며, 또한 세포분화를 억제할 것으로 생각되는 여러 유전자가 발현되는 것으로 밝혀지고 있다. 이외에 자가항원에 의해 유도된 면역억제와 면역억제제(FK-506)를 이용한 면역억제가 B cell에서 다른 양상의 gene expression profiling을 보이는 것을 증명하여 새로운 특이적인 면역억제제 표적의 발굴 가능성을 제시한 연구도 발표된바 있다 (Nature, 403, 672-676, 2000). 이들 연구결과들은 대부분 microarray에 의한 gene expression profiling을 보여주어 일정한 유전자 발현의 패턴을 제시하기는 하였으나, 이러한 방법이 구체적인 진단 및 치료제 개발의 표적 개발로 이어지기 위해서는 더 많은 연구가 이루어져야 한다. 그렇지만 이제까지 짐작하기 힘들었던 다양한 유전자의 발굴을 가능하게 한다는 점에서 이러한 접근법은 강력한 수단이 될 수 있다. 나아가 이 연구들이 실제 체내에서 일어나는 다양한 변화를 반영하지는 못하지만 암의 발생과 연관되어 면역세포의 변화가 다양하게 일어날 수 있음을 추측하게 하고 있어 본 연구자들의 가설이 입증 가능성을 간접적으로 말해주고 있다.

위암의 전이 및 progression에 관한 연구는 암의 특성상 일본이나 유럽을 중심으로 활발히 이루어져있다. 그러나 아직까지는 위암으로부터 직접 발굴된 전이/progression 조절 유전자는 보고되지 않고 있으며 대부분의 경우가 다른 암종에서 발굴한 유전자를 이용하여 위암에서의 관련성을 검토한 연구가 대부분이다. 그러므로 위암, 폐암, 유방암 등의 미국이나 서양의 major cancer에 비해 상대적으로 연구가 미진하므로 그 만큼 발전이 기대되는 분야이기도하다. 세부적으로는 접착분자

이며 전이억제유전자인 E-cadherin과 CD44 variant isoforms 위암의 전이와의 관련성 규명, cathepsins, MMPs, uPA, uPAR 등의 protease나 protease를 활성을 조절하는 인자들과 위암의 전이 및 progression과의 관계 규명, cyclin D2 및 cyclin-dependent kinase inhibitor인 p27Kip1과 위암의 전이 및 progression과의 상관성 규명, 67KDa laminin receptor, laminin 및 유방암 세포주에서 분리한 MTA1 유전자와 전이억제유전자인 nm23-H1과 위암의 invasion과의 상관성 규명 등의 연구가 이루어지고 있다.

국내에서는 위암이 주요 암인 관계로 다른 암에 비하여 상대적으로 활발히 연구가 진행되었으나 외국의 경우와 마찬가지로 다른 암종에서 발굴한 유전자를 이용하여 한국인 위암에서의 관련성을 검토하였고 새로운 위암의 progression과 전이를 조절하는 유전자를 발굴하였다는 보고는 아직 없다. 세부적으로는 261종의 위암임상시료를 이용하여 CD44와 nm23의 발현과 환자의 예후와의 상관성 분석 (J Surg Oncol, 71:22-8, 1999), p27Kip1의 발현을 67예의 gastric carcinoma와 37예의 lymph node metastases 임상시료를 대상으로 하여 분석하여 위암의 progression 및 전이와의 상관성을 분석 (Histopathology, 36:245-51, 2000), 위암의 임상시료를 이용하여 uPA, uPAR, uPAI와 전이와의 상관성 분석 (J Korean Med Sci, 11:33-7, 1996), 4개의 사람 위암세포주를 이용하여 uPA 및 uPAR의 발현과 세포의 invasion 능 및 tumorigenicity와의 상관성 분석 (Int J Cancer, 71:867-73, 1997), 64예의 위암임상시료를 이용하여 p27Kip1 및 cyclin D1의 발현과 암환자의 예후와의 상관성 분석 (J Surg Oncol, 71:147-54, 1999) 등의 연구가 진행되었다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제1절 실험방법

(1) cDNA fragment의 합성

SNU-638세포를 FastTrack™ (Invitrogen) lysis buffer 15 ml을 넣은후 tissue homogenizer로 속도를 천천히 올리면서 거품은 최소화되게 신속히 tissue를 homogenize했다. 원심분리기를 4000 g에서 5분 돌려 insoluble materials를 제거하고 5 M NaCl를 950ul 첨가했다. 용액을 5 ml 주사기에 3 번 통과 시켜 오염되었을 수 있는 DNA를 제거한 후에 oligo(dT) cellulose를 첨가한 후에 상온에서 1 시간 동안 부드럽게 흔들어서 mRNA를 oligo(dT) cellulose에 붙였다. 여러번 washing buffer로 세척한후에 elution buffer로 mRNA만을 elution 했다. 분리된 mRNA로부터 random primer를 이용하는 Superscript choice system (Life Technologies)를 사용하여 first strand cDNA를 합성했다. second strand를 합성한뒤에 *Bst*XI linker를 cDNA의 양쪽에 붙이고 size fraction column을 통과시켜 약 600bp 정도 크기의 cDNA fragment를 분리했다.

(2) Signal sequence trap library의 construction

Signal sequence trap vector인 pMX-SST를 *Bst*XI으로 절단하고 CIP를 처리한 후에 분리된 cDNA fragment와 ligation시키고 *E. coli*에 transformation했다. 하루동안 37 °C에서 배양한 후에 모든 transformant를 모아서 액체 LB 배지에 넣고 37 °C에서 3 시간동안 배양한 후에 Quiagen의 plasmid maxi-prep Kit를 이용하여 plasmid를 뽑았다.

(3) Retrovirus library의 construction

Virus packaging cell line인 BOSC23 세포를 transfection 전날 1×10^6 으로 60 mm dish에 plating하여 배양했다. Transfection 직전 배지를 교환한 후, 20 µg 의 pMX-SST library를 25µM chloroquine 존재하에 calcium-phosphate coprecipitation method로 BOSC23 세포 내로 8-12시간 동안 도입시켰다. Transfected cell에서 생산되는 virus의 활성도를 증가시키기 위해 10 mM sodium butyrate 를 12시간동안 처리해 준 후, 새배양액 2-2.5ml로 갈아주고 24-48시간 동안 배양시켜 virus particle이 배양액으로 생산되어 나오도록 했다. Virus가 함유된 배양액은 새 tube에 옮겨 1,500 rpm에서 5분간 원심분리시켜 cell debris를 제거한후, 8 µg/ml로 polybrene을 첨가하여 infection실험하기까지, -80°C에서 보관했다

(4) Ba/F3 cell로 retrovirus library의 Transduction

Murine IL-3 dependent pro-B cell line인 Ba/F3를 murine IL-3(10ng/ml)를 포함하는 RPMI1640 배지에서 키웠다. BOSC23 세포에서 만든 high-titer retrovirus library를 Ba/F3에 transduction하고 하루 지난 뒤에 세포를 잘 washing 한뒤에 10^4 /well 의 농도로 IL-3가 없는 96-well plate에 seeding하여 배양했다.

(5) IL-3가 없는 배지에서 자라는 Ba/F3 cell의 selection.

IL-3가 없는 배지에서 자라는 clone으로부터 genomic DNA를 추출하고 chromosome에 integration되어 있는 cDNA를 추출하기 위하여 vector primer를 이용하여 PCR reaction을 다음과 같은 조건으로 수행했다.

5' primer; GGGGGTGGACCATCCTCTA

3' primer; CGCGCAGCTGTAAACGGTAG

20 sec at 98 °C

2 min at 68 °C; 30 cycles.

PCR결과 얻은 cDNA fragment 를 ABI 370 sequencer를 이용하여 sequencing 했다.

(6) NK활성의 조사

SNU-216 세포를 100uCi Na⁵¹Cr (5mCi/ml; NEN, Boston, MA)로 37°C에서 1시간 배양하고 HBSS로 세번 세척한다. 1×10^4 ⁵¹Cr-labeled된 target 세포를 여러 비율의 effector세포와 섞은 후 96 well plate에서 4시간 배양한 후 100μl의 배양액을 얻어 release된 ⁵¹Cr를 gamma counter에서 측정한다. Spontaneous release를 배양액만 있는 조건에서 maximal release는 1% Triton X-100로 배양한 후 release된 cpm으로 결정한다.

$$\% \text{ specific release} = \frac{\text{Experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{Maximal release} - \text{spontaneous release}} \times 100$$

(7) 면역세포(dendritic cell; DC)의 배양 및 활성검정

세포배양은 10% FBS heat-inactivated FBS, 1 mM sodium pyruvate, 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin 및 100 ug/ml streptomycin이 첨가된 RPMI 1640 배지를 이용하였다. human PBMC는 Histopaque 1077 (Sigma)를 이용하여 공여자의 혈액으로부터 분리하였다. DC의 전구체로 사용된 monocyte는 37°C에서 2시간 동안의 배양용 플라스크에 부착시킴으로써 분리되었으며, PBS로 비부착세포를 세척을 통해 제거한 후 이들 monocyte를 DC 배양용 배지에서 배양하여 DC를 대량 배양하였다. DC 배양용 배지는 재조합 GM-CSF (300 ng/ml)과 IL-4 (10 ng/ml)가 첨가되어 있으며, 이 DC 배양용 배지에서 monocyte를 7 일간 배양하여 미성숙상태의 DC를 얻었다.

제2절 연구결과

I. 종양유래 면역활성 유전자 탐색

가. Signal sequence trap을 이용한 위암유래 표면, 분비 유전자 발굴

분비되거나 세포막에 존재하는 단백질들은 각 기관간에 communication에 중요한 역할을 수행한다. 따라서 gastric cancer 조직에서 분비되는 단백질들은 immune surveillance 기능을 극복하기위한 역할을 수행하리라 사료된다. 이런 기능을 하는 단백질들의 체계적인 발굴을 위하여 signal sequence trap이라는 기술을 도입하였다. 이 기술은 eukaryotes를 이용하여 세포막이나 세포밖으로 분비되는 단백질을 찾기 위한 기술로 다음의 전략을 취하였다. gastric cancer 조직으로부터 signal sequence trap library를 만들고 이 library를 이용하여 retrovirus library를 만든후에 Ba/F3에 infection하였다. infection된 Ba/F3를 96-well plates에 plating한 다음에 IL-3 없이 자라는 clone은 분비되거나 세포막에 존재하는 유전자를 갖는 clone으로 이 clone들로부터 PCR 방법을 사용하여 cDNA를 분리하고 sequencing 하였다. 그 결과 126 clones을 얻었고 sequencing 결과 전체 10 individual genes을 확보하였다. (Table 1)

Table 1 List of clones screened by signal sequence trap from gastric tumor tissues

M11220	Homo sapiens GM-CSF
S68616	Na ⁺ /H ⁺ exchanger NHE-1 isoform
NM_002630	Homo sapiens progastricsin (pepsinogen C)
X59752	M.fuscata gene for pepsinogen A-1
XM_008424	Homo sapiens hypothetical protein FLJ20778 (FLJ2077
X97051	DNA sequence of the human immunoglobulin D segment
NM_012318	Homo sapiens leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1 (LETM1)
XM_004031	Homo sapiens serine protease inhibitor, Kazal type 1 (SPINK1), (SST31 primer)
XM_009952	Homo sapiens apolipoprotein L (APOL),
AF043909	Homo sapiens gastric mucin (MUC5AC)

발굴된 유전자가 정상과 암조직에서 차이가 나는지 확인하기 위하여 northern 분석을 하였고 Pepsinogen A 는 암조직에서 완전히 사라짐을 알수있었다. 하지만 다른 유전자의 차이는 알수가 없었다. in situ 분석에서도 pepsinogen A 는 암조직에서 사라지는 것을 확인하였다. 다음으로 암세포주를 가지고 SST 분석을 다시 수행하였다. SNU-638로부터 얻은 mRNA 5.0 ug을 가지고 signal sequence trap library를 제작 하였다. DH10B E.coli에 transformation하여 얻은 독립적인 transformant의 수는 5×10^6 개였다. library 20 ug을 BOSC23세포에 transfection하고 48시간뒤에 retrovirus가 함유된 supernatant을 얻었다. BaF/3 세포를 10 cm 배양 flask에 키우고 retrovirus를 infection 시킨후 96 well plate로 분주하여 일주일간 둔후 자란세포를 얻고 genomic DNA를 추출하였다. 200개의 후보유전자

clone을 sequencing한 결과 39개의 independent한 clone을 얻었다 (Table 2)

Table 2. List of clones screened by signal sequence trap from SUN 638 cells

BC008765	Homo sapiens, syndecan 1
AF016903	Homo sapiens agrin precursor mRNA
XM_045107	Homo sapiens lectin, galactoside-binding, soluble, 3 binding protein (galectin 3 binding protein)
BC010859	Homo sapiens, procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase
XM_047792	Homo sapiens amyloid beta (A4) precursor protein
XM_045138	Homo sapiens prosaposin
XM_009469	Homo sapiens protein C receptor, endothelial (EPCR)
XM_007555	Homo sapiens serine protease inhibitor, Kunitz type 1 (SPINT1)
XM_044320	Homo sapiens similar to poliovirus receptor-related 2 (herpesvirus entry mediator B)
XM_049824	Homo sapiens v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene
BC000897	Homo sapiens, interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)
XM_046796	Homo sapiens KiSS-1 metastasis-suppressor (KISS1)
AL163636	Human chromosome 14 DNA sequence BAC R-903H12 of library RPCI-11
D29810	Human mRNA for unknown product
NM001848	Homo sapiens collagen, type VI, alpha 1
XM_027411	Homo sapiens hypothetical protein MGC14421
XM_008237	Homo sapiens CD68 antigen (CD68)
D00422	Human sphingolipid activator proteins
XM_008645	Homo sapiens carboxypeptidase D
NM_002211	Homo sapiens integrin, beta 1
XM_029402	Homo sapiens LIV-1 protein, estrogen regulated (LIV-1)
M81355	Homo sapiens sphingolipid activator proteins 1 and 2 processed
XM_049021	Homo sapiens similar to GPI-anchored metastasis-associated protein homolog
AB000584	Homo sapiens mRNA for TGF-beta superfamily protein,
XM_032282	Homo sapiens serine protease inhibitor, Kunitz type, 2
XM_015643	Homo sapiens 5' nucleotidase (CD73) (NT5)
XM_049824	Homo sapiens v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
XM_032021	Homo sapiens calreticulin
XM_010362	Homo sapiens solute carrier family 25
XM_052636	Homo sapiens lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1),
XM_015504	Homo sapiens AXL receptor tyrosine kinase
AF176313	Homo sapiens ADAM-TS related protein 1 (ADAMTSR1)
Y12084	H.sapiens mRNA for gig1 protein
XM_009534	Homo sapiens WAP four-disulfide core domain 2 (WFDC2)
AL118505	Human DNA sequence from clone RP5-1056H1 on chromosome 20. Contains the gene for a putative novel leucine rich protein, the gene for a novel protein similar to mitogen inducible protein MIG-2

- XM_049517 Homo sapiens intercellular adhesion molecule 1 (CD54), human rhinovirus receptor (ICAM1)
- AF328905 Homo sapiens stromal interaction molecule 2 (STIM2)
- AF290615 Homo sapiens clone E9271 liver membrane-bound protein mRNA
- M13436 Human ovarian beta-A inhibin mRNA

발굴된 후보유전자중에 위암이나 정상조직에서 발현의 차이를 보이는 유전자를 알아보기 위하여 각 후보유전자를 가지고 northern blot assay를 수행하였다. 그 결과 9-27, Mac2BP, MIC-1가 tumor조직에서 발현이 증가되어 있는 것을 확인하였다 (그림 1)

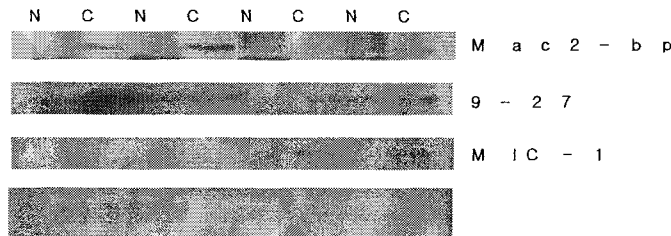


그림 1 Northern blot analysis was performed to examine level of expression of candidate genes in normal and tumor tissues N, normal tissue; C, tumor tissue.

이 유전자들 가운데 9-27 gene이 cell-mediated immunity에 중요한 IFN- γ 에 의하여 발현이 증가 되므로 9-27 유전자의 발현을 in situ로 분석하였다. 9-27 은 침윤지역의 mucosa and submucosa에서 발현이 증가 되었다. 반면에 정상지역의 mucosa and submucosa에서는 발현을 볼 수 없었다. 이 결과로부터 9-27이 gastric cancer의 invasion에 관여가 있을수 있음을 알 수 가 있다. 9-27의 기능을 분석하기 위한 세포주를 선택하기 위하여 SNU 세포주들에서 9-27의 발현을 관찰하였다. SNU-484를 제외한 대부분의 세포에서 9-27의 발현을 관찰할 수 있었으며 SNU-1,-216, -620에서 발현이 제일 강한 것을 확인할 수 있었다. 또한 IFN- γ 에 의하여 9-27의 발현이 변화하는지 SNU-620 세포에서 분석한결과 9-27이 IFN- γ 에 의하여 24 시간후에 증가하는 것을 확인하였다.

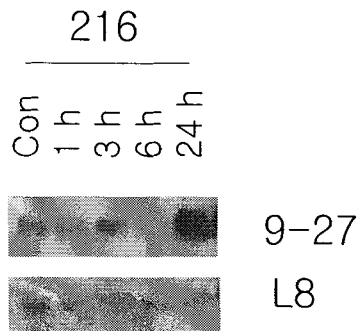


그림 2 Interferon-gamma induce 9-27 expression in SNU-216

(1) 9-27의 과발현이 NK cell에 대한 저항성을 유발

9-27의 발현이 interferon-gamma에 의하여 증가되는 것으로 알려져 있고 또한 interferon-gamma는 NK의 활성을 증가시키는 것으로 알려져 있으므로 9-27이 NK의 활성에 미치는 영향을 분석하였다. 놀랍게도 9-27 stable cell line인 SNU-216-9-27은 NK 활성을 억제하는 것으로 나타났다. 이 사실은 암세포주가 9-27를 발현하여 NK에 의한 면역감시 기능을 극복하는 것을 암시한다. 이를 확인하기 위하여 IFN- γ 를 처리한후에 NK cytotoxicity를 본 결과도 역시 9-27에 의하여 NK에 의한 cytotoxicity가 감소되는 것을 확인하였다. 한편 9-27이 anti-proliferative function에 관여하는 것으로 알려져 있으므로 SNU-216의 proliferation에 미치는 9-27의 효과를 실험하였다. 먼저 interferon-gamma를

SNU-216에 처리하여 9-27의 발현이 24 h 에 증가하는 것을 확인하고 9-27의 발현증가가 SNU-216의 증식에 미치는 영향을 알기 위하여 interferon-gamma를 이틀동안 처리한뒤에 SNU-216의 증식을 thymidine uptake로 확인하였다. SNU-216에서 발현되는 9-27은 세포의 증식에 영향이 없음을 확인하였다. 9-27에 의한 NK cytotoxicity 저항성 기전을 연구하기 위하여 다양한 NK cytotoxicity 관련 단백질 (CD54, CD11a, and Fas)의 발현변화를 관찰하였으나 변화가 없는 것으로 보아 다른 기전이 존재하는 것으로 사료된다.

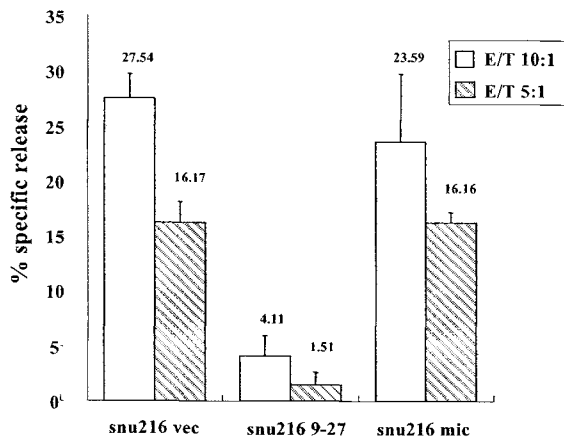


그림 3 9-27 이 NK에 의한 SNU-216의 death를 억제한다.

(2) 9-27의 과발현이 cell invasion을 증가 시킴

9-27이 tumour invasion에 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위하여 SNU-216 세포 주에 9-27을 발현하도록 stable cell line을 만들고 matri-gel assay를 수행하였다 (그림)

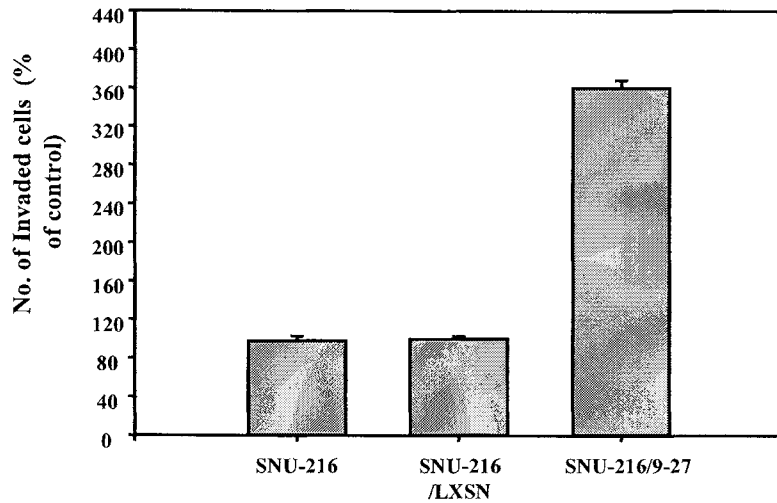


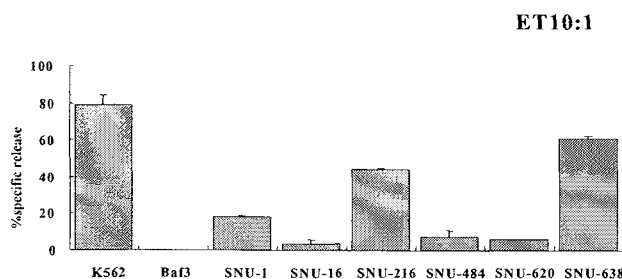
그림 4 Invasion assay with SNU-216-9-27

SNU-216과 SNU-216-LXSN 대조군에 비하여 SNU-216-9-27 세포주가 3.5배 정도의 migration 증가를 보였다. 이 사실은 9-27이 암 세포의 invasion 능력을 증가시킨다는 것을 보여준다. 한편 interferon-gamma의 처리가 9-27의 발현을 증가시키므로 SNU-216에 interferon-gamma를 처리하여 9-27의 발현을 증가시키고 invasion assay를 수행하였다. 그 결과 SNU-216-9-27 stable 세포주와 마찬가지로 interferon-gamma를 처리한 SNU-216이 invasion 능력이 좋다는 것을 입증하였다.

나. 위암유래 NK 조절 유전자/ULBP

(1) 위암세포주의 NK cell에 대한 susceptibility

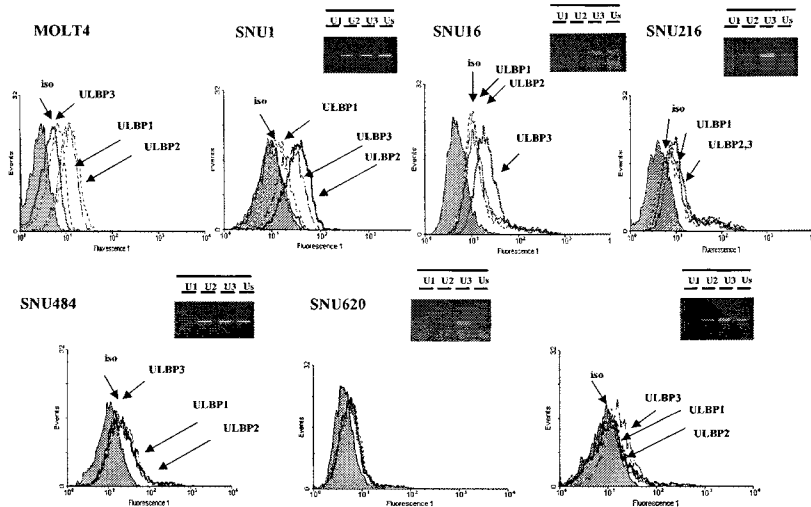
Fig. 1.에서 보는 바와 같이 각각의 SNU 위암세포주의 NK 세포에 대한 감수성 (susceptibility)를 측정하였다. 사용된 NK 세포는 스스로 IL-2를 생산하도록 형질전환된 human NK 세포주인 NK92 mi 세포이며 positive control로는 일반적인 human NK cell의 target인 K562를 사용하였다. 결과적으로 각각의 SNU 위암세포주중 SNU216과 SNU638이 가장 높은 감수성을 나타내었고 그뒤로는 SNU1이 감수성을 보이며 SNU620과 SNU484 그리고 SNU16은 낮은 감수성을 보였다.



(Fig.1. NK cell의 살상능에 대한 감수성)

(2) 위암세포주의 ULBP isoform의 발현

mRNA 수준에서 주로 발현되는 ULBP의 isoform을 검증하기 위해 cloning된 cDNA를 제한효소로 제한한 결과 SNU1은 ULBP1이 SNU16은 ULBP3가 그리고 SNU484는 ULBP2가 발현되었고 나머지 SNU216과 SNU620 그리고 SNU638은 ULBP3가 주로 발현되었다 (Fig.2.). 부가적으로 각각의 ULBP primer를 사용하여 PCR을 수행한 결과에서는 전체 위암 세포주에서 ULBP3가 발현되었고 SNU216과 SNU484에서는 ULBP2가 추가적으로 발현되었다. 이를 protein 수준에서 발현을 검증한 결과 SNU484와 SNU620에서는 ULBP1, 2, 3 전체가 발현이 되지 않았고 SNU638에서는 ULBP3만이 발현되었으며 SNU1과 SNU216에서는 ULBP1, 2, 3, 전체가 발현되었으며 SNU16에서는 ULBP3만이 약하게 발현되었다. 단백질 수준과 mRNA 수준에서 발현의 양상이 틀린 것은 mRNA에서 발현이 되더라도 단백질 수준에서는 발현이 되지 않을 가능성이 있고 세포주 특이적으로 발현을 위한 기전에 문제가 있을 수 있을 것으로 사료된다. 또한 SNU1에서 PCR결과와 제한효소 제한 결과가 일치하지 않는데 이는 전체적인 mRNA 수준에 발현은 되나 cloning시에 문제가 있는 것으로 사료된다. 그러나 PCR결과와 단백질 수준에서의 발현 결과는 일치하였다. 결과적으로 단백질 수준에서의 ULBP 발현과 NK 세포에 대한 감수성의 결과를 비교하여 보면 단순히 ULBP3가 발현되는 SNU638과 SNU216, SNU1은 높은 감수성을 보이나 SNU16의 경우 ULBP3가 발현이 되나 감수성은 (Fig.2. ULBP의 발현) 상

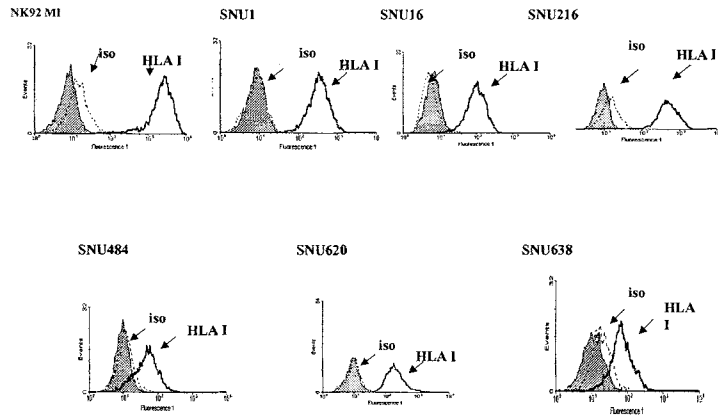


대적으로 낮은 결과를 보였다. 이는 ULBP3가 NK에 대한 감수성에 영향을 보이나 이의 효과를 저해하는 기전이, 또는 ULBP3가 단독으로 NKG2D에 결합하여 NK세포에 positive하게 작용하는 것이 아닌 어떠한 다른 molecule이 개입할 가능성을 시사한다고 볼수 있겠다. 따라서 위암세포주의

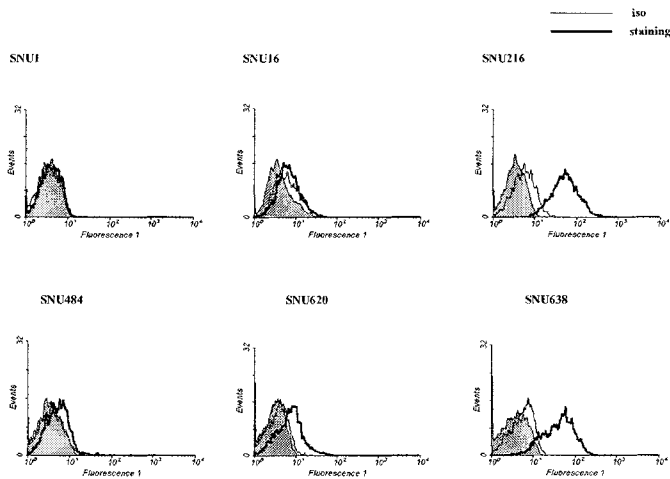
표면에서 NK 세포에 영향을 미칠만한 molecule을 찾아보았다.

(3) 위암세포주의 surface molecule의 발현

먼저 NK 세포주에 negative signal을 전달하는 MHC class I molecule을 조사한결과 (Fig.3) 전체 SNU 위암 세포주에서 HLA class I A,B,C molecule이 발현되고 있는 것을 볼수 있었다. 또한 Fas antigen과 immune escape에 관여할수 있는 Fas Ligand 발현은 전체적으로 발현되 않는 것을 볼수 있었다(Data not shown). target 세포의 ICAM-1 발현은 NK 세포에 대한 감수성에 positive하게 작용할수 있는데 흥미롭게도 감수성이 높은 SNU216과 SNU638이 ICAM-1(CD54)을 높게 발현하는 것을 알수 있었다(Fig.4). 따라서 ULBP의 발현과 더불어 ICAM-1의 발현이 NK세포에 대한 감수성에 영향을 미칠것으로 사료된다.



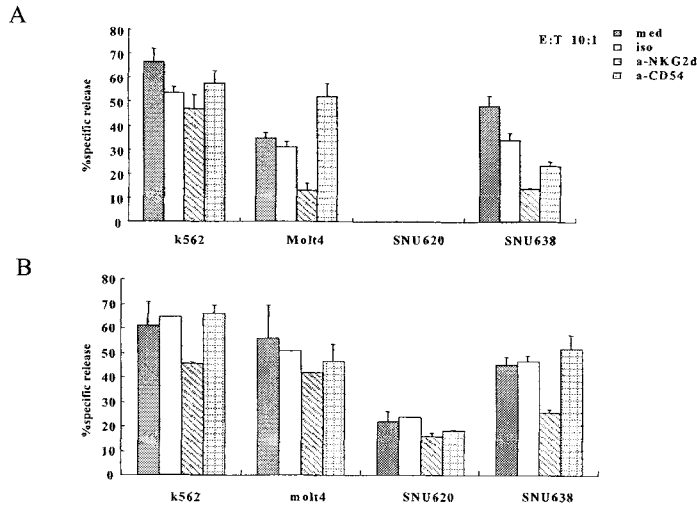
(Fig. 3. MHC-1의 발현)



(Fig.4. ICAM-1의 발현)

(4) 위암세포주의 ULBP와 결합하는 NKG2D에 대한 중화항체와 anti-ICAM-1 항체를 이용한 NK cytotoxicity assay

ULBP와 결합하는 NKG2D에 대한 항체를 처리하여 위암세포주에 대한 NK cytotoxicity assay를 수행하였다 (Fig.5). ULBP발현하는 것으로 알려진 MOLT4를 control로 하고 ULBP가 발현되며 감수성이 높은 SNU638과 감수성이 낮고 ULBP가 발현되지 않는 것으로 결과를 얻은 SNU620을 target으로 사용하였다. 그러나 redirect ADCC(antibody dependent cell cytotoxicity)의 가능성이 있으므로 target의 표면에 Fc receptor인 CD16과 CD32의 발현을 조사하여 전체 SNU 위암세포주에서 발현되지 않는 것을 알 수 있었다(Data not shown). 추가적으로 ICAM-1에 대한 항체를 처리하여 NK cytotoxicity를 조사하였다 (Fig.5-A) 또한 effector세포로 사용하는 NK92 미세포만의 세포 특이적인 결과일 가능성을 검증하기 위해 human blood에서 PBL을 분리하여 NK cytotoxicity assay를 수행하였다 (Fig.5-B). 결론적으로 MOLT4 control에서는 NKG2D 항체가 감수성을 감소 시키는 것을



불수 있었으나 anti-CD54 항체는 오히려 감수성을 증가하는 결과를 얻었다. 이는 MOLT4세포에서 CD32가 발현되므로 redirect ADCC에 의해 증가하는 것으로 사료되며 SNU638에서는 각각의 항체가 감수성을 증화하는 결과를 얻었다. 또한 SNU620은 감수성을 보이지 않는 세포주 이므로 감수성이 보이지 않았다. 이러한 결과는 NK92 미세포와 human PBL 양자가 같은 결과를 보여 주었다.

(NKG2D 항체의 NK 살상능 증화효과)

다. Retroviral expression library를 이용한 NF-κB 활성화 조절 유전자의 발굴

NF-κB는 면역활성조절에 매우 중요한 transcription factor이고 최근에는 위암에서도 NF-κB가 활성화되어있는 것으로 보고되고 있다. 면역활성을 조절하는 유전자를 발굴하기 위해 NF-κB의 활성을 조절하는 screening system을 개발하였다. Alkaline phosphatase 유전자를 함유하는 pCMV/SEAP(Tropix) plasmid에서 AP유전자를 제거하고 (HindIII/Xba I) 자리에 Zeocin resistant gene과 GFP가 재조합된 유전자를 삽입하였으며, 또한 promoter 부분에는 NF-kappa B 결합부위 9개가 서로 연결되어있는 primer를 제작하여 PCR방법으로 NF-kappa B sequence를 삽입하여 pNF-κB-Zeocin/GFP reporter plasmid를 만들었다 (그림 5).

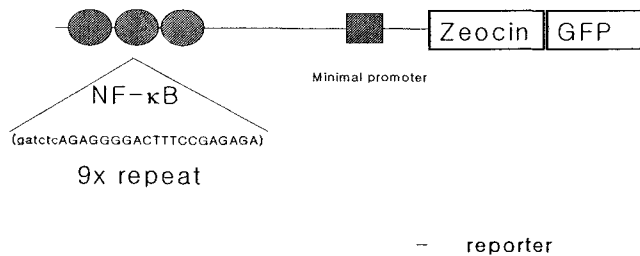
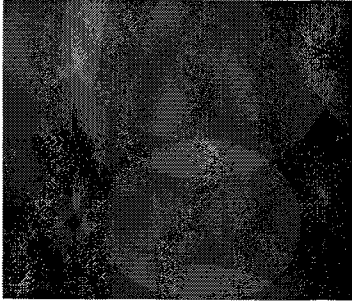


그림 10

위의 벡터 DNA를 HEK 293 세포에 Calcium phosphate방법으로 transfection 시키고 2일후 세포를 selection배지(G418 0.8 mg/ml)에 옮겨 배지를 갈아주면서 세포가 colony를 형성할 때까지 배양하여 reporter가 안정적으로 들어간 세포들을 선별하였다. 이렇게 선별한 세포주에 NF-κB의 활성을 증가시킨다고 잘 알려진 유전자인 NIK 유전자를 transfection시키고, Zeocin (4mg/ml)을 5일간 처리한 후 GFP의 발현정도를 확인하였다. NIK이 들어가지 않은 control에 비해 NIK을 넣어준 세포에서 GFP 발현이 현저히 증가되어 있음을 알 수 있었다 (그림 6). 앞으로 이세포주에 retroviral expression library를 transduction한 다음, Zeocin으로 selection하여 NF-κB 조절유전자를 발굴할 계획이다.

(A) Control



(B) NIK transfection

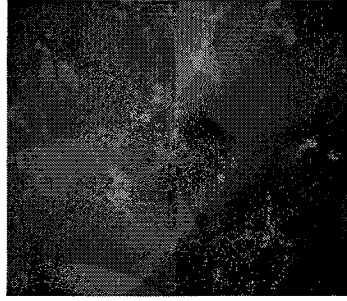


그림 6. Expression of GFP by NIK transfection

라. 위암유래 수지상세포 조절 유전자

가. 1차년도에 이은 위암 유래 유전자 산물의 수지상 세포 분화에 미치는 영향분석

① 1차년도 결과를 확인하기 위해서 SNU-1에서 얻어진 배양액을 분자량이 100 KDa 이상의 단백질을 분리하고 한편으로 사람의 B cell tumor cell line 에서 얻어진 배양액과 비교 검토하여 보았다.

그림 1과 같이 WIL2NS나 B258의 경우도 CD1a의 발현 정도에 영향을 미치는 것으로 나타났으나 DC의 cell size로 분석한 결과는 SNU-1의 배양액의 경우에서 분명하게 DC의 크기가 감소하고 분화의 정도가 약하게 일어나는 것으로 관찰되었다.

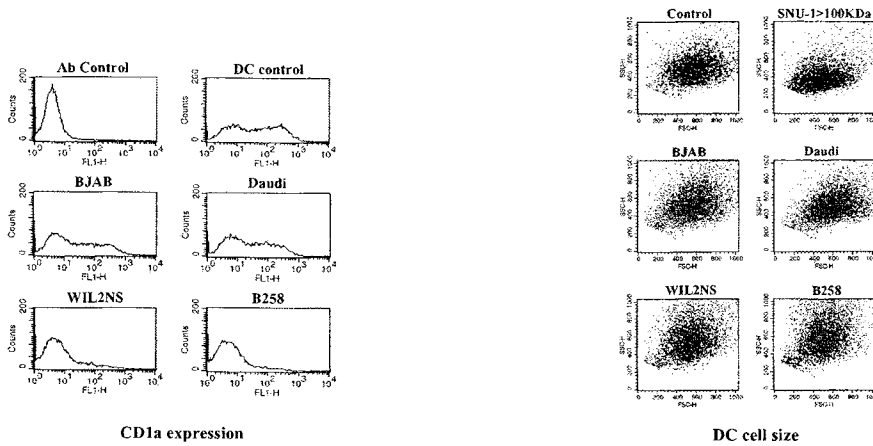
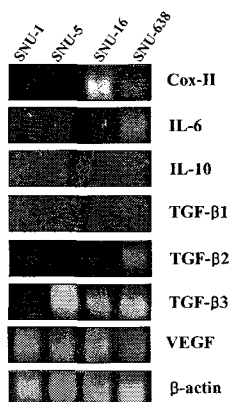


Fig. 1. SNU-1 배양액과 B cell tumor cell line 배양액의 DC 분화 및 DC에서의 CD1a 발현에 미치는 영향 비교

② 지금까지 보고된 종양세포 유래의 수지상 세포 분화에 영향을 줄 수 있는 soluble factor를 확인하여 보기 위해서 대상이 될 수 있는 유전자의 primer를 제작하고 그 유전자의 발현 정도를 각각 다른 SNU cell line을 대상으로 확인하여 보았다. 그림 2에서 보이는 것처럼 SNU-1이나 SNU-638에서 특이적으로 발현이 증가되어 나타나는 유전자를 확인하

기 어려웠으며, 이러한 결과는 예상과 다르게 수지상 세포의 분화에 영향을 주는 것으로 기존에 보고된 것과는 다른 종류의 soluble factor가 관여하고 있을 가능성을 제시하였다.



Cytokine mRNA expression determined by RT-PCR

Fig. 2. RT-PCR로 확인한 면역억제에 관여하는 것으로 알려진 유전자의 SNU 세포주에서의 발현

나. 수지상 세포의 분화에 영향을 미치는 위암 세포주 유래 단백질 탐색

① SNU-1 위암 세포주에서 배양액을 얻어 Amicon ultrafiltration kit (YM-10)를 이용하여 농축하였다. 농축액을 25 mM Tris-HCl pH 8.1 buffer로 투석한 후, Bio-Rad의 Biologic Duo-Flow Protein Purification System을 이용하여 UNO Q-1 Column을 통해서 단백질의 분리를 시도하였다 (Fig. 3). 이때 NaCl의 농도 구배 조건을 이용하여 분리 조건을 만들고자 하였다. 이들의 농축 조건을 확립하기 위하여 Fraction들을 모아 농축한 후 각각의 fraction을 이용하여 수지상 세포의 세포사멸과 CD1a 발현에 미치는 영향을 분석하여 그 조건을 결정할 수 있었다. Fig. 4에서 보여주는 결과처럼 수지상 세포의 세포 사멸을 일으키는 단백질 분획과 CD1a 발현을 억제하는 분획은 동일하게 나타나지 않았지만 그 범위가 유사한 정도에서 나타나 반복된 동일한 방법에 의한 단백질 농축을 수행하여 단백질의 확인이 가능하리라 기대하고 있다.

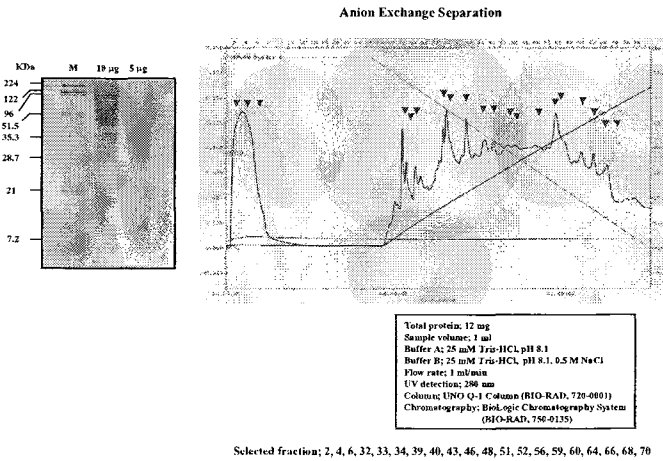


Fig. 3. Sodium chloride 구배와 anion exchange column을 이용한 SNU-1 배양액중의 단백질의 분리, 정제 (왼쪽; column에 가해준 단백질의 PAGE gel pattern, 오른쪽; FPLC에서 분리한 fraction).

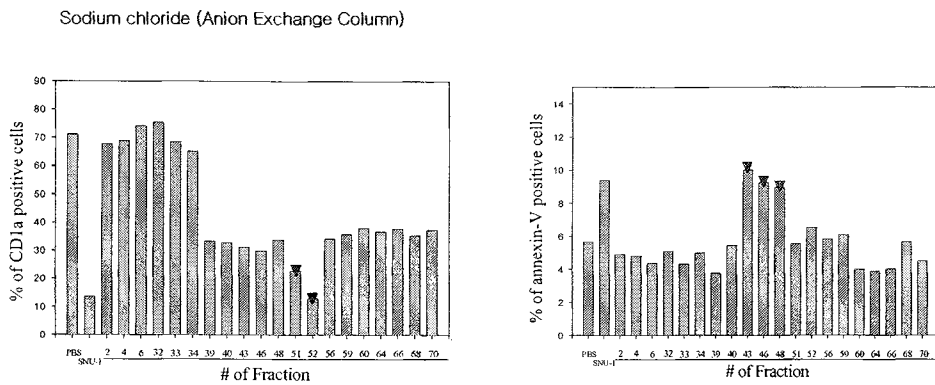


Fig. 4. 그림 3에서 분리한 분획을 이용한 수지상 세포의 분화에 미치는 영향 분석 (왼쪽; 수지상 세포의 CD1a 발현에 미치는 영향, 오른쪽; 수지상 세포의 세포사멸에 미치는 영향). (활성이 높은 분획을 화살표로 표시하였다)

② 다른 한편으로는 SNU-1 위암 세포주와 HLF 정상 세포주에서 배양액을 얻어 Amicon ultrafiltration kit (YM-10)를 이용하여 농축하고 농축액을 25 mM Tris-HCl pH 8.1 buffer로 투석한 후, 각각의 protein을 two-dimensional gel electrophoresis로 분리하였다. 각각 차등 발현되는 spot을 선별한 후 Pep Ident. Program을 통해서 분석하여 대상이 될 수 있는 단백질을 선별하였다 (Fig. 5). 나아가 일부 면역세포의 기능억제 가능성이 예상되는 대상 단백질의 경우 primer를 제작하고 RT-PCR을 통해서 SNU-1, SNU-638, HLF의 cDNA를 만들고 각각의 유전자의 발현정도를 검색하여 보았다. 그 결과 SNU-1이나 SNU-638 특이적인 발현을 보이는 유전자는 Apolipoprotein A-1의 경우가 유일하였다. 이를 확인하기 위하여 Apo-A1 mAb를 이용하여 농축된 배양액에 대하여 Western Blot을 수행하였으나 positive control의 경우 (lane 2)를 제외하고 단백질의 발현을 확인할 수 없었다 (Fig. 6). 현재 Apo-A1의 발현이 SNU 세포주에서 특이적으로 많이 발현될 수 있을 가능성

에 대하여 탐색 중이며, 정제된 Apo-A1을 이용한 직접적인 수지상 세포에의 영향을 분석하여 확인할 계획으로 있다.

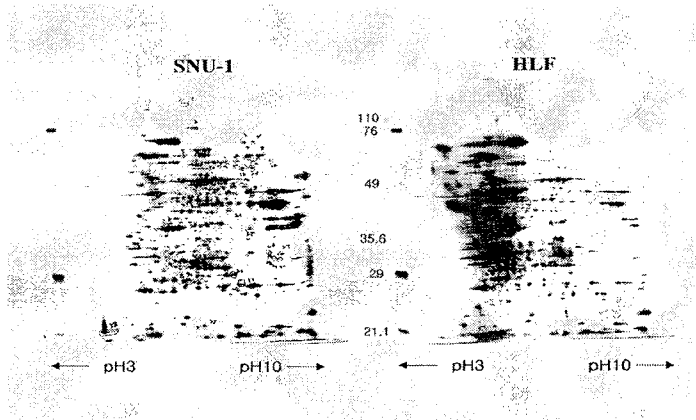


Fig. 5. 발현 정도의 차이가 있는 단백질의 검색을 위한 SNU-1 세포주 배양 농축액과 HLF 세포주 배양 농축액의 2-D Gel electrophoresis pattern

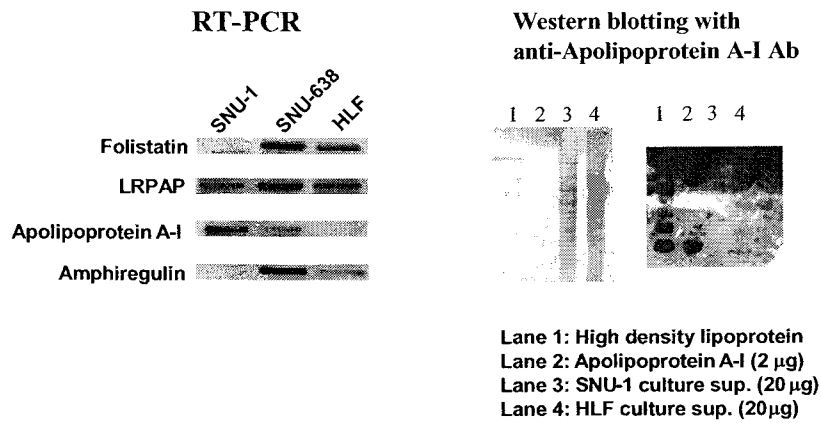


Fig. 6. 발현 차이를 보이는 후보 단백질의 RT-PCR과 Western blot에 의한 발현 분석

다. 위암 세포주 유래 단백질에 의한 수지상 세포의 chemokine 발현 차이 분석

수지상 세포는 다른 면역세포와의 상호작용에 의해서 항원을 전달하고 이를 통하여 면역반응을 조절하는 능력이 있다. 따라서 다른 면역세포를 주위에 끌어오는 능력에 관여하는 chemokine이나 chemokine 수용체의 발현정도가 잘 알려지고 있으며, 이러한 분자들의 발현이 수지상 세포의 기능과 밀접히 관련되어 있다는 연구 보고들이 이루어지고 있다. 본 연구에서는 위암세포주 SNU-1의 배양액이 존재하는 상태에서 얻어진 수지상 세포에서 발현되는 chemokine 유전자의 발현을 정상적인 대조군 수지상 세포와 비교하는 방법으로 비교하여 보았다. 즉 사람의 말초혈액에서 monocyte를 분리하고 분리한 monocyte를 SNU-1 배양액이 30 % 포함된 배양액에서 7일간 배양하거나 대조군으로 정상적으로 배양한 수지상 세포를 얻을 수 있었다. 수지상 세포를 IFN-gamma (1000 U/ml)로 18 시간 자극시킨 후 세포를 수집하고 total RNA (10 ug)를 추출한 후 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 template로 하여 PCR를 수행하여 chemokine의 발현 정도를 탐색하였다. PCR은 각각의

primer를 이용하여 94 °C, 1 min/60 °C, 1 min/72 °C, 1 min 동안 30 cycle을 수행하였다 (Fig. 7). 얻어진 product는 pEZ-T vector내로 cloning하고 chemokine array를 작성하였다. 이렇게 얻어진 32 종의 chemokine, chemokine 수용체, cytokine 유전자들은 면역세포의 기능연구를 위한 시험용 array로 사용될 수 있도록 dot blot을 작성하였다.

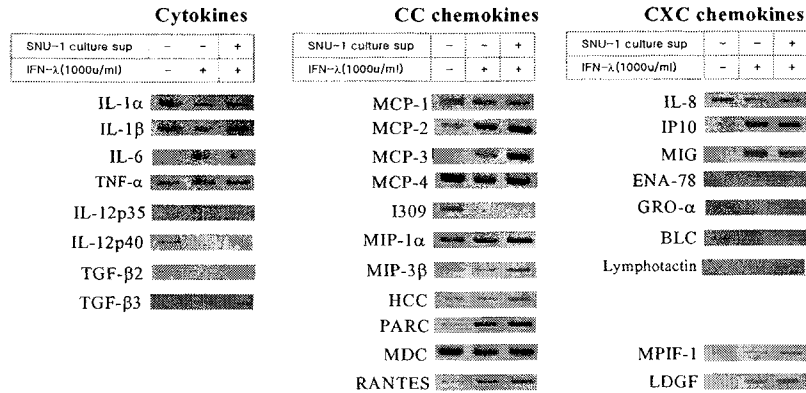


Fig. 7. 위암 세포주 배양액 처리 후 수지상 세포에서 발현되는 cytokine, chemokine, chemokine 수용체의 발현 차이 분석

특징적인 사실은 기존에 수지상 세포를 포함하는 면역세포에서 IFN-gamma에 의해서 유도되는 것으로 보고된 IL-8, IP-10, MIG 등의 CXC chemokine의 발현이 증가되는 결과를 얻었으며, PARC나 MCP-2, 3 등의 CC chemokine의 발현 증가 또한 확인할 수 있었다. 이와는 대조적으로 SNU-1 배양액을 처리하여 얻어진 수지상 세포는 cytokine이나 CC chemokine의 유전자 발현 양상에서 큰 차이를 나타내지 않았으나, 흥미롭게도 IL-8, ENA-78 및 Gro-alpha의 유전자 발현은 IFN-gamma 처리와 무관하게도 SNU-1 배양액을 처리하여 얻어진 수지상 세포에서 그 발현정도가 증가하는 것으로 확인되었다. 이들 chemokine은 공통적으로 neutrophil의 recruit에 관여하는 대표적인 CXC chemokine family로서 다양한 염증반응과 관련이 있을 것으로 추정되고 있다. 따라서 이러한 chemokine의 수지상 세포에서의 발현 차이가 위암에 대항하는 항암 면역 또는 위암환자에서의 염증반응에서 특정한 역할을 할 가능성이 있다고 여겨지고 있어서 이를 확인하는 연구가 추가적으로 이루어져야 할 것으로 생각된다.

라. 위암 환자의 lymph node로부터 위암 세포 전이에 의해 변화되는 유전자 탐색

1차년도에 보고된대로 위암 환자에서의 면역세포 관련 유전자의 발현 변화를 알아보기 위하여 위암세포의 전이가 없는 임파절과 전이가 있는 것으로 조직학적으로 확인된 임파절 조직으로부터 RNA를 분리하고 isotope-labeled cDNA를 합성하여 이 cDNA를 probe로 사용하여 R&D사의 cytokine array와 apoptosis array를 이용하여 차별발현 유전자 28종을 발굴하였으며 이 중 전이가 진행된 임파절에서 발현 정도가 뚜렷한 3 종의 유전자를 대상으로 그 발현을 각각의 임파절 RNA에 대하여, 그리고 위암 세포주의 RNA에 대하여 RT-PCR을 수행하여 mRNA 발현을 조사하였다 (Fig. 8). 그 결과 orphan receptor중의 하나인 GPR 19의 발현은 전이가 있는 임파절에서 증가된 것으로 나타났으나, 이러한 유전자의 발현은 위암

세포주에서도 발현이 나타나고 있었으므로 기대한 면역세포 특이적 발현으로 생각되지 않았으며, IFN-gamma 수용체 2형의 경우는 발현차이가 거의 없었고, 위암 세포주에서도 잘 발현되는 것으로 나타나 기대하는 결과에 부응하지 못하였다. Integrin-beta4의 경우 일부 전이가 있는 임파절에서 약하게 발현이 나타나는 것으로 조사되었으며, 위암 세포주에서는 발현이 보이지 않아서 이 경우 면역세포의 관련 여부가 추정될 수 있었다. 현재 이들의 발현이 가지는 의미를 해석할 수 있는 적절한 실험적 수단을 마련하고 있는 중이다.

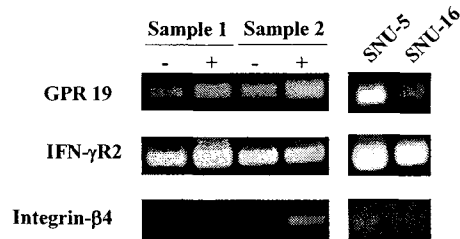


Fig. 8. 전이가 있는 임파절에서 발현이 증가된 것으로 나타난 일부 유전자의 임파조직 및 SNU 세포주에서의 발현 확인 (-; 전이가 없는 임파절, +; 전이가 있는 임파절)

II. 위암유래 세포사멸관련 유전자

1. Retroviral system을 이용한 cell survival 관련 유전자의 탐색

(1) 위암조직 및 위암세포주 (SNU638) 유래 full-length retroviral cDNA library의 확보

실험에 사용한 위암 및 정상조직은 충남대학교병원 외과에서 수술한 환자로부터 유래한 조직을 이용하였고, 위암세포주는 한국세포주은행에서 구입하였다. 위암세포주 (SNU638) 유래 full-length retroviral cDNA library를 만들기 위해, 먼저 SNU-638 세포로 (1×10^7 cells)부터 mRNA를 FastTrack 2.0 Kit (Invitrogen)을 사용하여 분리하였다. 분리한 5 ug의 mRNA로부터 Oligo(dT) (0.5 ug)와 random hexamer (50 ng)을 primer로 사용하여 first strand와 second strand cDNA를 SuperScript Choice System (GibcoBRL)을 이용하여 만들었다. second strand cDNA에 EcoR I (Not I) adaptor를 붙이고, retroviral vector의 EcoRI site에 cloning하기 위하여 말단을 phosphorylation시킨 다음, Sephacryl column을 통과시켜 비교적 크기가 큰 cDNA를 분리하였다. 분리한 cDNA를 retroviral vector인 pMX의 EcoRI site에 ligation하여 *E. coli* DH5 α 에 transformation하여 SNU-638 cDNA library를 만들었다.

(2) Retroviral system을 이용한 세포성장 관련 유전자의 탐색

Cell survival 관련 유전자의 탐색에 사용한 B9 세포는 mouse pro B cell로 RPMI(10% (FBS) 배지에 2 Units/ml의 IL-6를 첨가하여 배양하였다.

(3) SNU-638 유래 full-length retroviral cDNA library의 제조

위암세포주 (SNU638) 유래 full-length retroviral cDNA library를 만들기 위해, SNU-638 세포로 (1×10^7 cells)부터 mRNA를 FastTrack 2.0 Kit (Invitrogen)을 사용하여 분리하였다. 분리한 5 ug의 mRNA로부터 Oligo(dT) (0.5 ug)와 random hexamer (50 ng)을 primer로 사용하여 first strand와 second strand cDNA를 SuperScript Choice System (GibcoBRL)을 이용하여 만들었다. second strand cDNA에 EcoR I (Not I) adaptor를 붙이고, retroviral vector의 EcoRI site에 cloning하기 위하여 말단을 phosphorylation시킨 다음,

Sephacryl column을 통과시켜 비교적 크기가 큰 cDNA를 분리하였다 (그림 4A). column fraction 7-11번 사이의 cDNA 분획을 모아서 retroviral vector의 EcoRI site에 ligation하여 SNU-638 cDNA library를 만들었다. Retroviral cDNA library가 잘 만들어졌는지의 여부를 EcoRI 효소로 vector를 잘라서 확인하였는데, insert의 크기가 대체로 1.0kb 이상인 cDNA가 cloning된 것으로 봐서 비교적 좋은 cDNA library가 만들어졌음을 알 수 있었다 (그림 4B).

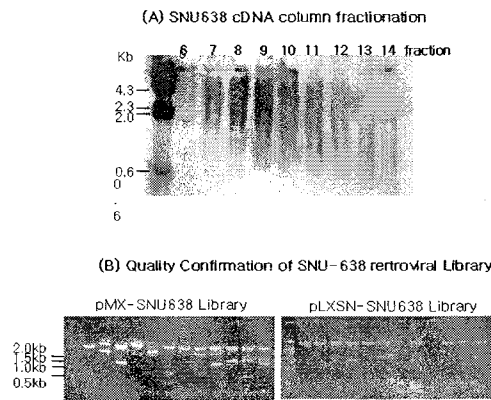


그림 4. Construction of pMX-SNU638 & pLXSN-SNU638 cDNA library

(4) Retroviral cDNA library를 이용한 cell survival 관련 유전자의 screening

Survival factor에 의존적인 세포는 survival factor에 의해 cell death pathway와 관련된 유전자들을 억제하여 세포의 survival signal을 유도한다고 알려져 있다. mouse B9 세포는 proB cell로 IL-6에 의존적인 세포이다. 세포의 survival에 관련된 유전자를 체계적으로 탐색하기 위해, SNU-638에서 유래한 retroviral cDNA library를 B9 세포에 transduction시킨 다음 IL-6가 결여된 media에서 세포를 배양하였다. SNU-638 retroviral cDNA library가 transduction된 1×10^7 세포를 IL-6가 결여된 배지에 옮긴 다음, 96 well plate로 분주하여 삼 주일간 incubation한 후 자라나는 clone들을 확인하였다. 약 100개의

표 2. List of clones screened by cell survival selection

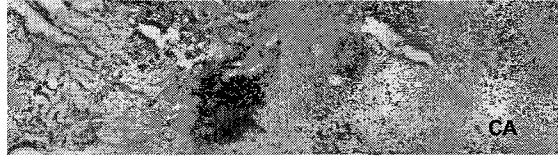
후보 clone에서 genomic DNA를 추출하고 sequencing을 하여 어떤 유전자가 B9 세포를 growth factor (IL-6)에 independent하게 유도하였는지를 확인하였다 (표 2). IL-6에 dependent한 B9 세포는 single 세포가 suspension 상태로 자라는데 비해, IL-6 independent한 상태에서 자라는 세포는 monolayer 상태로 세포의 morphology가 많이 변했음을 알 수 있었다. 앞으로 확보된 유전자들의 full-length cDNA를 cloning하여 실제로 IL-6가 결여된 B9 세포에서 survival factor로 이러한 유전자들이 작용하는지를 조사할 예정이다.

2. TGF- β 1 에 의한 암세포 유전자 조절

(1) 위암세포에서 TGF-1에 의한 유도되는 hVDUP1의 기능분석

VDUP1은 암 발생에 관련하며 TGF- β 1에 의해 유도됨을 지난해 연구에서 밝혔는데 VDUP1의 기능을 살펴보기 위해 우선 암세포에서의 발현을 in situ hybridization을 통해 알아보았다 (Fig. 1). 결과 위암에서 정상보다 많은 발현의 감소가 있었음을 알 수 있었다.

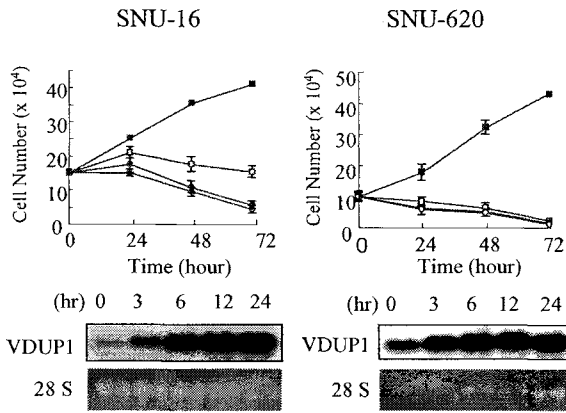
Stomach



정 상 위암

(Fig. 1:VDUP1의 위암세포주에서의 in situ hybridization)

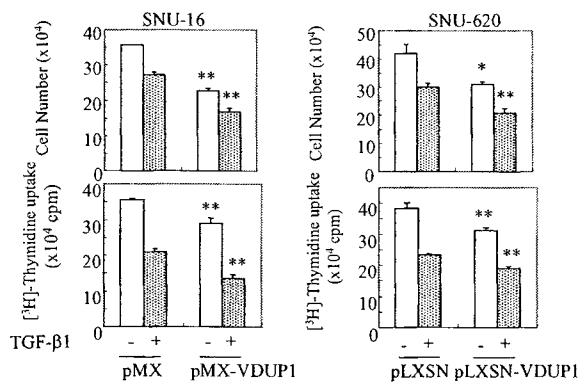
TGF-β1가 위암 세포주의 성장을 저해하는 것과 VDUP1의 발현의 연관성을 더욱 체계적으로 살펴보았는데 TGF-β1에 의한 세포성장 억제와 VDUP1의 발현이 SNU-16과 SNU-620 세포에서 각각 의미있게 연관이 있음을 알 수 있었다 (Fig. 2).



(Fig. 2. TGF-β1에 의한 SNU의 증식 및 VDUP1의 연관성)

Clone No.	Gene	Frequency
1	Centrin 3 (EF-hand protein)	5
2	Annexin A2	4
3	Hexosaminidase A	3
4	Ribosomal protein (RPLP1)	3
5	Aldolase A	2
6	Lipocalin 2	1
7	Acetylserotonin O-methyltransferase-like	1
8	Smad 4	1
9	Macrophage migration inhibitory factor	1
10	Ribonucleotide reductase M2B	1
11	Clone 11 pur alpha-associated ribosomal RNA gene	1
12	Nacent polypeptide associated complex alpha	1
13	Cytochrome C	1
14	Unknown	2

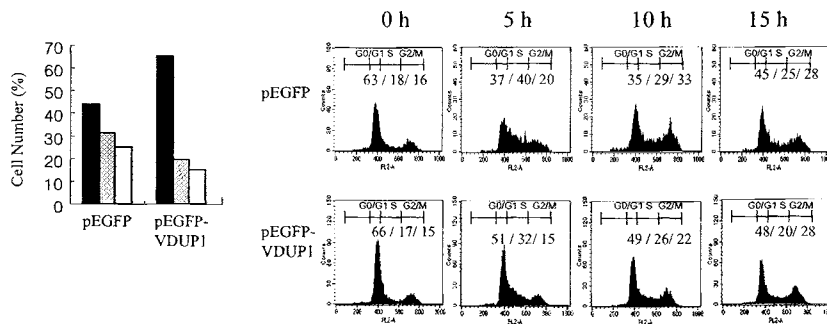
표 2. List of clones screened by cell survival selection



VDUP1이 직접 위암세포의 성장을 억제하는 것을 알아보기 위해 retroviral-VDUP1을 SNU 세포주에 infection하여 VDUP1을 발현하고 TGF-β1를 처리하면 SNU 세포주의 증식이 더욱 억제됨을 알 수 있었다 (Fig. 3).

(Fig. 3. VDUP1에 의한 SNU 세포의 증식 억제)

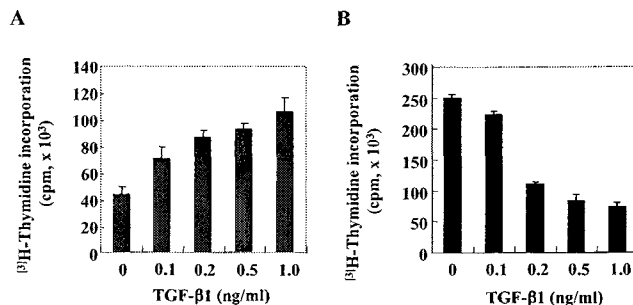
이와같이 VDUP1이 직접 위암세포의 증식을 억제함을 알 수 있었다. 다음 어떻게 세포 증식을 억제하는 가를 알아보기 위해 세포주기에 미치는 영향을 살펴보았는데 VDUP1을 발현하면 세포주기가 G0/G1에서 arrest되는 것을 알 수 있었고 이를 더욱 분석하기 위해 세포를 G0/G1에 arrest한 후에 다시 세포주기를 진행시킨 경우에 VDUP1을 과발현하면 세포주기 진행이 억제되는 것을 알 수 있어 VDUP1이 세포주기의 진행을 억제함을 알 수 있었다 (Fig. 4).



(Fig.4. VDUP1에 의한 세포주기 억제)

(2) 위암세포주의 TGF-β1에 의한 증식억제 회피

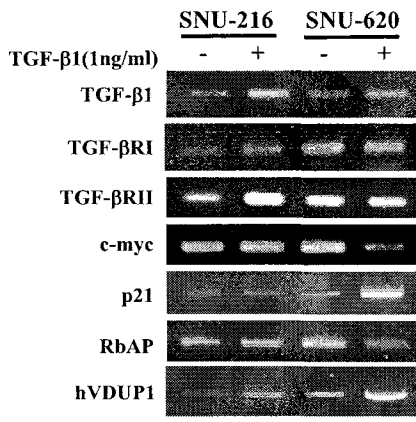
SNU 위암세포의 TGF-β1에 의한 증식억제를 살펴보는 중 SNU-216 세포주는 TGF-β1에 의해 증식이 감소되지 않는 것을 발견할 수 있었다 (Fig. 5).



(Fig. 5. TGF-β1에 의한 SNU의 증식차이)

이러한 현상은 위암 세포종 TGF-β1에 의한 저해에서 회피하여 증식할 수 있다는 가능성을 제시하는 것으로 흥미있는 관찰로 그 이유에 대한 원인 분석하였다. 우선 TGF-β1에 의한 216과 620 세포주에서 유전자 발현차이를 살펴보았는데 우선 대표적으로 증식에 관련된 유전자를 살펴본 결과 p21, c-myc, TGF-β1 receptor I,II 의 발현이 차이가 있어 앞으로 이들 유전자와 SNU 세포주의 성장과의 관련성을 더욱 살펴볼 예정이다.

Smad4는 TGF-β1의 신호전달중 가장 핵심이 되는 유전자인데 두세포주간의 발현이 차이가 있었고 smad4는 돌연변이 가능성 SNU 세포주에서 SSCP를 통해 살펴보았는데 흥미롭게도 216 세포주에서 smad4의 mutant를 발견하였다 (Fig. 6). 이 mutant는 MH2 domain 이 truncate된 형태로 insertional mutation이 이어나 있었고 216의 western을 한 결과 역시 mutant 크기의 smad4가 발현됨을 다시 증명할 수 있었다 (Fig. 7). 이 mutant의 기능을 알아보기 위해 mutant에 의한 TGF-β1에 의한 3TP-reporter assay에 미치는 영향을 살펴보았는데 TGF-β1에 의한 reporter 활성을 잘 억제함을 알 수 있어 이 mutant smad4가 TGF-β1의 신호전달을 억제함을 알 수 있었다. 앞으로 이 mutant smad4가 어떻게 위암의 tumorigenesis에 기여하는가에 대한 연구를 진행할 예정이다.

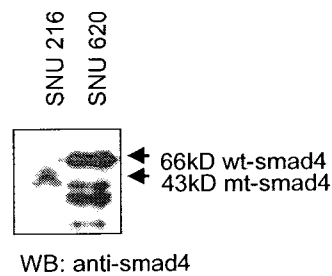


(Fig. 6. TGF-β1에 의한 유전자 발현 분석)

```

413 cacctggaat tgatctctca ggattaacac tgcagagtaa tgcctccatca agtatgatgg
473 tgaaggatga atatgtgat gactttgagg gacagccatc gttgtccact gaaggacatt
533 caattcaaac catccagcat ccaccaagta atcgtgcate gacagagaca tacagcacc
593 cagctctgtt agecccatct gactctaag ctaccagcac tgccaacttt cccaacattc
653 ctgtgggttc cacaagtcag cctgccagta tactgggggg cagccatagt gaaggactgt
713 tgcagatagc atcagggcct cagccagcac agcagcagaa tggatttact ggtcagccag
773 ctacttacca tcataacagc actaccacct ggactggaag taggactgca ccatacacac
833 ctaatttgc tcaccaccaa aacggccate ttcagcacca cccgectatg ccgccccatc
893 ccggacatta ctggcctgtt cacaatgagc ttgcattcca gcctccatt tccaatcacc
953 ctgctcctga gtattgtgtg tcattgctt actttgaaat ggatgttcag gtaggagaga
1013 catltaaggt tccttcaagc tgccctattg ttactgttga tggatacgtg gaccttctg
***
1073 gaggagatcg cctgctgctg atagggctgac ccttccggag gaggctcgtt ttgtttgggt
1133 caacttcca atgtccacag gacagaagcc attgagagag caaggttgc cataggcaaa

```



(Fig. 7. Smad4 mutant 의 sequence 및 발현)

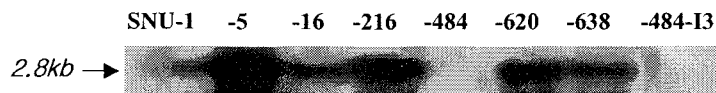
(3) TGF-β1에 의해 유도되는 유전자 탐색: SNU620 microarray 3배이상차이 나는 유전자를 114개 동정하였다 (data not shown)

III. 위암세포 전이 유전자

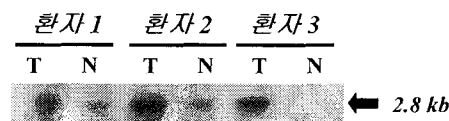
1. Humbug (Aspartyl beta-hydroxylase, 2.8 kb transcript)가 위암세포주의 전이조절능에 미치는 영향

1-1) Humbug의 발현 분석 및 전이조절능의 검정

아래의 그림 1-A)에 보인바와 같이 Humbug유전자는 한국인 유래의 위암세포주 중 2차암에서 수립된 전이능이 강한 SNU-5, -216, -620, -638 등의 세포주에서 1차암 유래의 세포인 SNU-1이나 -484보다 과발현 되어 있음을 알 수 있다. 또한 그림 1-B)에 보인바와 같이 발현을 조사한 3명의 위암환자 모두 정상조직보다 위암조직에서 발현이 증가되어 나타남을 확인할 수 있었다.



A) Northern blot을 이용한 한국인 유래의 위암세포주에 humbug 유전자의 발현



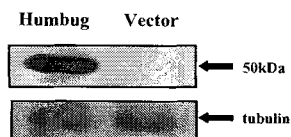
B) Northern blot을 이용한 위암조직에서의 humbug 유전자의 발현

그림 1) Humbug유전자의 위암세포주 및 위암조직에서의 발현

따라서 본 유전자가 위암세포의 전이능을 조절하는지 알아보기 위하여 Humbug유전자의 N-term을 FLAG로 tagging한 발현백타를 조제하여 Humbug유전자의 발현이 없는 Az521세포에 안정하게 발현시켜 humbug유전자의 과발현 세포주를 얻은 다음 Az-521세포주의 이동능에 미치는 영향을 검토하였다.

그림 2)에서 보인바와 같이 humbug의 과발현에 의해 Az521세포의 이동능이 약 2.3배 증가한 것으로 나타나 humbug가 위암세포의 전이능의 획득에 가장 중요한 이동능의 획득 과정에 관여할 가능성을 시사하고 있어, 금후 좀더 자세한 분석을 필요로 한다.

A. FLAG항체를 이용한 humbug의 발현확인



B. Az-521세포의 이동능에 대한 Humberg의 효과

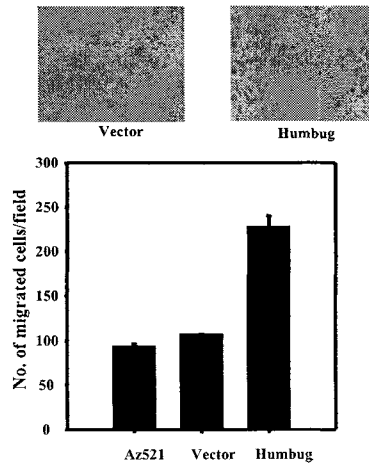


그림 2) 위암전이조절후보유전자humberg의 발현세포주의 수립 및 이동능에 미치는 영향.

2. 위암세포의 전이유도유전자로서의 syntenin의 동정

1차년도연구에서 위암세포의 전이조절유전자로서의 가능성을 확인한 syntenin유전자에 대한 연구를 계속하여 syntenin유전자가 위암세포의 이동능을 조절하는 전이유도유전자라는 사실을 밝히었다.

2-1) 한국인 유래의 위암세포주 및 위암조직에서의 syntenin유전자의 발현

그림 3)에 보인바와 같이 후보유전자 중 syntenin의 발현은 한국인 유래의 위암세포주 중 1차암유래의 세포주보다 2차암유래의 SNU-5, -216, -620, -638 세포주 등에서 mRNA 및 단백질 모두 과발현 되며, 정상조직보다는 위암조직에 과발현되어 있는 것을 알 수 있었다.

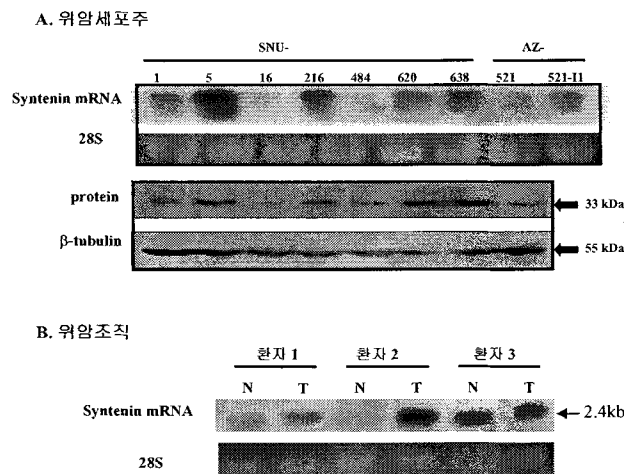


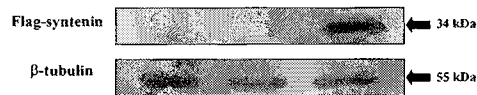
그림 3. 위암세포주 및 위암조직에서의 syntenin의 발현

2-2) syntenin의 과발현 세포주의 수립 및 위암세포의 침윤에 미치는 syntenin의 영향 따라서 syntenin유전자가 위암세포의 전이능을 조절하는지 알아보기 위하여 syntenin의

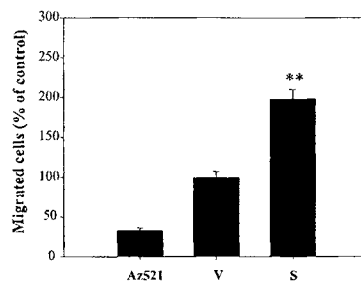
N-term.을 FLAG로 tagging한 발현 vector를 조제하여 syntenin유전자의 발현이 낮은 Az521세포에 발현시켜 syntenin 과발현 세포주를 조제한 후 migration, invasion, adhesion, zymography 등의 assay을 실시하였다. 그림 4-A)에 보인바와 같이 syntenin과발현 세포주에서는 FLAG-antibody를 이용한 Immunoblot에서 syntenin단백질이 과발현 되어 있음을 확인할 수 있었고 그림 4-B) 및 그림 4-C)에 보인바와 같이 syntenin유전자의 과발현된 Az521세포는 벡타 control에 비하여 세포의 migration 및 invasion 능이 약 2배정도 증가됨을 알 수 있었다. 또한 syntenin과발현 세포주를 이용하여 Fibronectin, type I collagen, type IV collagen, laminin, Matrigel 등의 ECM (extracellular matrix)에 대한 접착능이나 zymography을 이용한 matrix분해능을 검토한 결과 ECM에 대한 접착능이나 matrix분해능에는 큰 영향이 없었다. 이러한 결과로 보아 syntenin은 위암세포의 전이능 획득과정에서 가장 중요한 단계인 migratory potential의 획득과정에 관여하여 위암세포의 침윤능을 증가시킬 가능성을 시사하고 있다.

따라서 syntenin의 과발현 세포주를 이용하여 세포의 이동에 필수적인 actin cytoskeleton이 syntenin의 과발현에 의해 변화하였는지 검토하였다. 그림 5)에 보인바와 같이 FITC-conjugated pallodin toxin을 이용하여 대조세포주와 syntenin과발현 세포주의 F-actin의 구조를 confocal microscopy로 관찰한 결과 syntenin의 과발현된 세포주는 대조군에 비하여 세포이동에 필수적인 pseudopodia를 많이 형성하고 있음을 알 수 있어 syntenin이 위암세포의 이동능의 획득과정에 중요한 역할을 함을 시사하고 있다.

A) Syntenin과발현세포주의 수립



B) Migration Assay



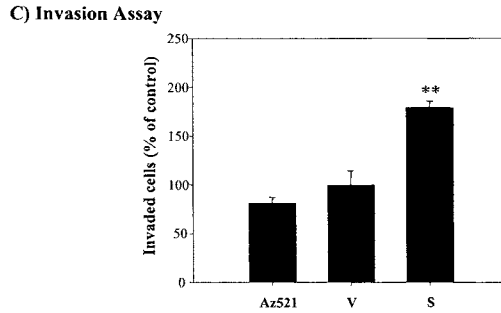


그림 4. Az521위암세포주를 이용한 syntenin과발현 세포주의 수렴 및 migration, invasion 에 미치는 영향

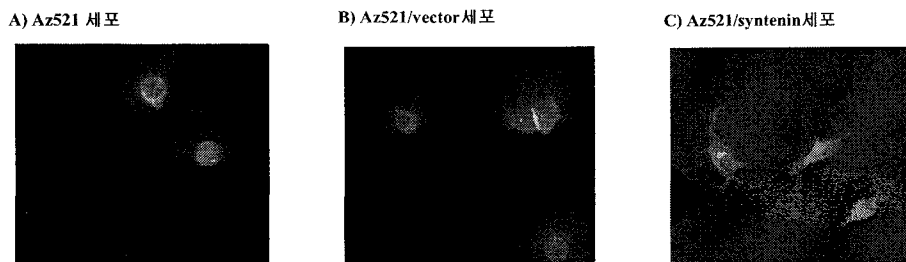


그림 5. Syntenin의 과발현된 Az521세포의 세포골격구조(F-actin staining)의 변화

2-3. syntenin의 mutant조제에 의한 syntenin의 세포이동조절 domain의 동정.

Syntenin이 위암세포주의 이동을 조절하는 기구를 좀더 자세히 규명하고 더 나아가서는 분자수준에서 그 기구를 해석하기 위하여 그림 6)에 보인 바와 같이 5개의 syntenin mutants조제하고 각 mutants에 대하여 위암세포주의 migration 및 invasion에 미치는 영향을 검토하였다.

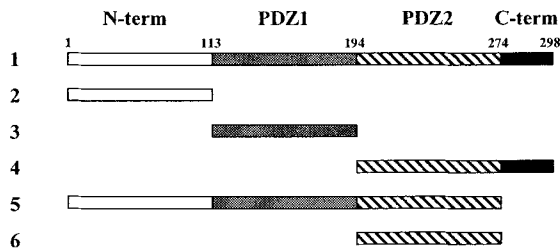


그림 6. syntenin 단백질의 각 domain 및 각 mutants

Syntenin은 N-term (a.a. 1-112), PDZ1 domain (a.a.113-193), PDZ2 domain (a.a. 194-274)와 C-term (a.a. 274-293)의 domain으로 나눌 수 있는데 각 domain의 기능은 전혀 알려져 있지 않다. 따라서 5개의 syntenin mutants, 즉 N-term, PDZ1 domain, PDZ2 domain, PDZ2 domain PLUS C-term, 그리고 N-term PLUS PDZ1 PLUS PDZ2 domain, 을 조제하여 Az521세포에 발현시켜 migration 및 invasion에 대한 각 domain의 효과를 관찰하였다.

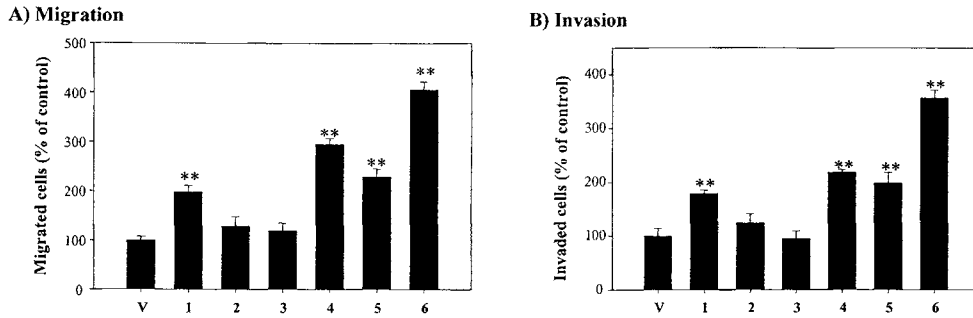


그림 7. syntenin mutant들의 Az521위암세포주의 migration 및 invasion에 미치는 영향

그림 7)에 보인 바와 같이 PDZ2 domain이 포함되지 않은 mutants (그림 6과 7의 2번 3번)은 세포의 이동 및 invasion을 촉진시키는 활성이 없는 반면 PDZ2 domain이 포함된 mutants (그림 6과 7의 4번, 5번, 6번)은 세포의 migration 및 invasion을 현저하게 촉진시킴을 알 수 있고 더구나 PDZ2 domain이 자체가 wild type (그림 6과 7의 1번)보다도 강한 활성을 나타내어 syntenin의 PDZ2 domain이 세포의 이동능의 촉진에 중요한 역할을 하는 것을 시사한다.

2-4) syntenin의 PDZ2 domain과 상호작용하는 후보유전자의 동정

Syntenin의 세포이동촉진에 중요한 기능을 하는 PDZ2 domain을 bait로 하여 SNU-638 cDNA library로부터 screening을 실시하여 syntenin의 PDZ2 domain과 상호작용을 하는 동정하고자 하였다. 그 후보 유전자들은 아래의 표)에 정리하였다.

표. Two hybrid screening을 통하여 얻은 syntenin의 PDZ2 domain과 상호작용할 가능성이 있는 후보 유전자들

Genes	Migration/metastasis
EphA2	Yes
par-3	Yes
ADP-ribosylation factor 6	Yes
TRIP6	?
rhoC	Yes
actin related 2/3 complex	Yes
S100A9	Yes
low density lipoprotein-related protein associated protein 1	?
cofilin	Yes
guanine nucleotide binding protein, beta 2-like 1	?
interferon-inducible protein 9-27 protein	?
COPE	?

이들 후보유전자들 중 이미 암세포의 migration 및 tumor progression을 조절하는 기능을 갖는 유전자들도 포함되어 있었다. 따라서 이들 후보유전자들 중 아직 암세포의 migration

과의 관련성이 알려지지 않은 후보유전자들을 선별하여 co-immunoprecipitation 방법을 이용하여 syntenin과의 상호작용여부를 확인하였다.

그림 8)에서 보는바와 같이 syntenin은 interferon inducible protein 9-27과 상호작용을 할 수 있다. 더구나 앞에서 보인바와 같이 9-27을 과발현시킨 위암세포주에서는 세포의 이동능이 또한 증가되는 것으로 나타나 syntenin과 9-27단백질과의 상호작용에 의한 신호전달이 위암세포의 이동을 조절할 가능성을 시사하고 있어 금후 좀더 자세한 연구가 필요하다.

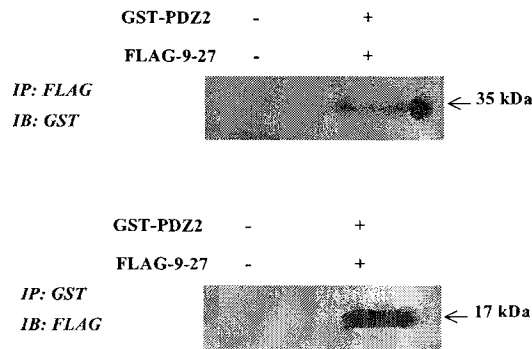


그림 8. Syntenin의 PDZ2 domain과 9-29단백질과의 상호작용

2-5) syntenin의 MAP kinase의 활성화에 미치는 영향

세포의 이동과 MAP kinase의 활성화와의 관련성, 특히 p44/42에 의한 MLCK (myosin-light chain kinase)의 활성화가 세포이동을 조절하는 기구로 보고되어 있다. 따라서 syntenin이 이러한 kinase의 활성을 조절하는지 알아보기 위하여 syntenin과 발현세포주, syntenin의 PDZ2 domain의 과발현세포주를 이용하여 p44/42, p38, JNK의 활성을 Western Blot으로 측정하였다. 그림 9)에서 보는바와 같이 p38, JNK의 활성에는 별 영향이 없이 p44/42 (Erk-1/2)의 활성이 현저히 증가됨을 알 수 있었다. 특히 PDZ2 domain만을 발현시킨 세포주 (wild type-syntenin을 발현시킨 세포보다도 이동능이 약 2배 이상 증가됨)에서는 p44/42의 활성이 더 증가됨을 알 수 있어 syntenin에 의하여 위암세포의 이동을 촉진시키는 신호전달상에 p44/42 MAP kinase가 관여할 가능성을 시사하고 있다. 또한 syntenin의 의한 p44/42의 활성화에는 upstream kinase로 알려진 raf나 MEK-1/2의 활성화에는 별로 영향이 없었는데 (data not shown) 이는 syntenin이 별개의 pathway(예 integrin에 의한 p44/42활성화)에 의해 p44/42을 활성화시킬 가능성을 시사하고 있어 금후 자세한 분석을 할 예정이다.

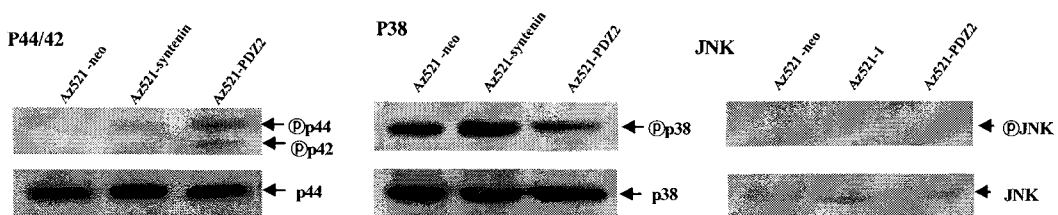


그림 9. MAP kinase의 활성화에 미치는 syntenin의 영향

3. 위암세포의 전이유도유전자로서 Macrophage Inhibitory Cytokine-1 (MIC-1)

MIC-1은 TGF- β superfamily의 일종으로서 동정된 유전자이고 placental TGF- β , prostate-derived factor, growth/differentiation factor 15/MIC-1, placental bone morphogenetic protein으로 보고되고 있으나 아직 그 기능은 자세히 밝혀지지 않고 있다. 최근에 MIC-1이 prostate cancer (Cancer Res. 61, 5974, 2001)와 colorectal cancer (Cancer Res. 61, 6996, 2001)에서 과발현되는 것으로 보고되었을 뿐 그 기능에 대하여서는 전혀 보고된 바가 없다.

3-1. 위암에서의 MIC-1의 발현

전술한 바와 같이 MIC-1은 본 과제에서는 SNU-638 cDNA library를 사용하여 SST (signal Sequence Trap)으로 cloning한 유전자다. 그림 10)에 보인바와 같이 MIC-1은 primary tumor유래의 세포주인 SNU-1, -484에 비하여 secondary tumor유래세포주인 SNU-16, -620, -638세포주에 발현이 증가되어 있음을 알 수 있다.

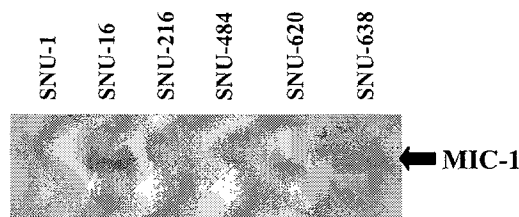


그림 10. 한국인 유래 위암세포주에 MIC-1의 발현

또한, 위암조직을 사용하여 In Situ Hybridization으로 MIC-1의 발현을 검토한 결과 그림 11)에 보인바와 같이 정상조직에서는 MIC-1의 발현이 없는데 비하여 위암조직에서는 MIC-1이 강하게 발현됨을 알 수 있어 MIC-1은 위암조직에 특이하게 발현되는 유전자라는 것을 알 수 있다.

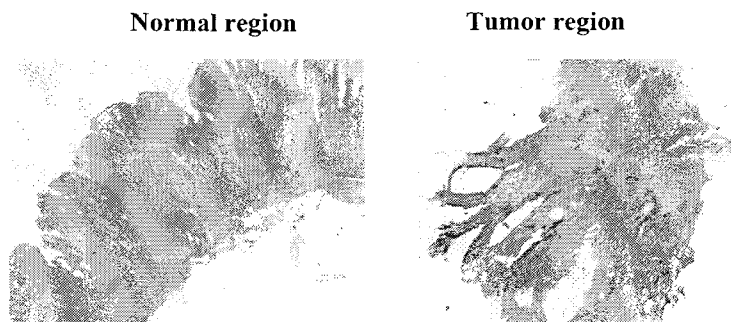


그림 11. 위암조직에서의 MIC-1의 발현 (In Situ Hybridization)

3-2. MIC-1이 위암세포의 전이능에 미치는 영향

MIC-1이 위암세포의 전이능에 영향을 주는지 알아보기 위하여 MIC-1의 전장의 cDNA을 cloning하여 retrovirus vector인 LXS에 subcloning한 후 MIC-1의 발현이 낮은 SNU-216 세포에 안정하게 발현시켜 SNU-216/MIC-1세포주를 얻은 후, 이 세포주를 사용하여 세포이동능, invasion능을 측정하였다. 그림 12)에 보인바와 같이 MIC-1과발현세포주인 SNU-216/MIC-1은 대조군인 SNU-216/LXS에 비하여 세포의 migration에는 유의성있는

영향을 보이지 않는 반면 invasion 능은 5배이상 증가시켰다. 이는 MIC-1이 위암세포의 이동 능력에는 별 영향을 주지 않고 침윤능에 영향을 주는 것을 시사하고 있다.

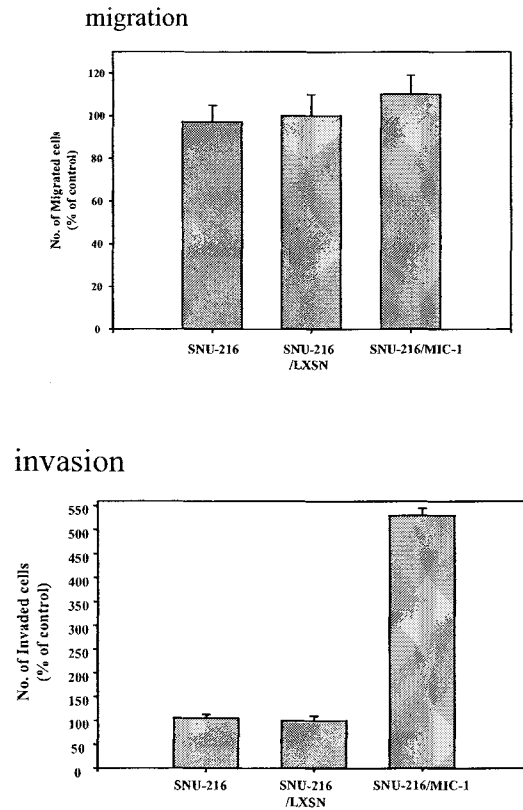


그림 12. SNU-216세포의 migration 및 invasion능에 대한 MIC-1의 영향

따라서 MIC-1이 위암세포의 chemoattractant로 작용하는지, 또한 위암세포를 자극하여 침윤에 필요한 기구 (예 protease 활성 등)를 알아보기 위하여 SNU-216/MIC-1와 SNU-216/LXSN세포로부터 C.M (conditioned media)를 조제하여 Transwell chamber의 upper 또는 lower chamber에 가한 후 SNU-216세포의 invasion에 미치는 영향을 검토하였다. 그림 13)에 보는 바와 같이 C.M을 upper chamber, 즉 세포를 직접 자극할 때 현저하게 SNU-216세포의 침윤능이 증가됨을 알 수 있었다. 이는 MIC-1이 위암세포를 자극하여 invasion에 필요한 기구를 활성화시킴을 시사한다.

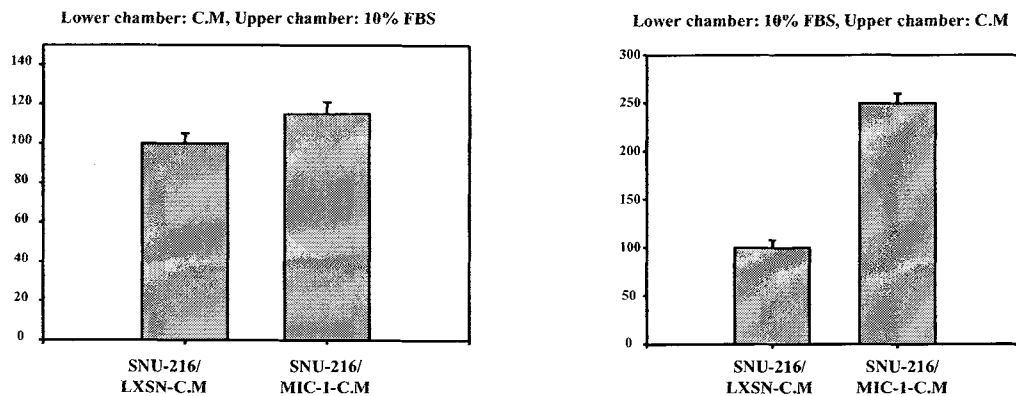


그림 13. MIC-1과발현세포주의 C.M.의 자극에 의한 SNU-216세포의 침윤증진효과

따라서 MIC-1가 SNU-216세포의 invasion에 필요한 기구 중, protease의 활성화에 영향을 주는지 알아보기 위하여 SNU-216, SNU-216/LXSN, SNU-216/MIC-1세포로부터 C.M.를 조제하여 gelatin zymography와 fibrin zymography를 실시하여 C.M.중에 분비된 matrix metalloproteinase와 uPA (urokinase-type plasminogen activator)의 활성을 측정하였다. 그림 14)에 보인바와 같이 gelatin zymography에서는 3종류의 세포에서 주로 MMP-9이 검출되고 SNU-216/MIC-1에서 미세한 증가는 보이나 유의성있는 차이는 없었다. 반면 흥미롭게도 fibrin zymography에서는 대조군의 세포에 비하여 SNU-216/MIC-1세포에서 uPA가 5배 정도의 활성이 증가되어 나타남을 알 수 있어 MIC-1이 plasminogen의 활성화 기구에 관여할 가능성을 시사하고 있어, 금후 MIC-1가 어떠한 기전으로 uPA의 발현 또는 활성을 조절하는지를 밝혀내는 것은 위암세포의 malignant progression기구를 이해하는데 도움이 되리라 사료된다.

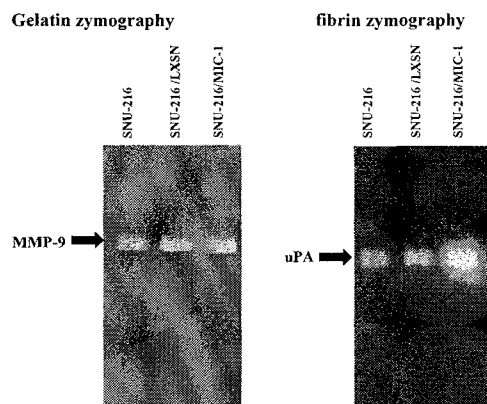


그림 14. MIC-1발현세포주에서의 gelatin 및 fibrin zymography

3-3. SNU-216세포의 침윤능에 미치는 recombinant MIC-1의 효과

MIC-1이 위암세포의 침윤능을 조절하는지를 좀더 자세히 조사하기 위하여 MIC-1의 mature peptide에 해당하는 부분 (a.a. 196-309)을 FALG로 tagging한 후 293T세포에 발현시켜 293T세포의 배양액으로부터 FLAG antibody를 이용한 affinity chromatography로 recombinant MIC-1을 정제하였다.

그림 15)에는 293T세포의 C.M에서의 FLAG-MIC-1을 Western Blot으로 확인한 것이다.

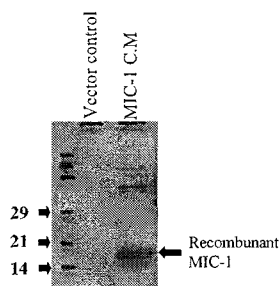


그림 15. FLAG-MIC-1의 확인

이 recombinant MIC-1를 사용하여 SNU-216세포의 invasion능에 미치는 MIC-1의 효과를 관찰하였다. 그림 16)에서 보듯이와 같이 invasion assay할 때 SNU-216세포에 직접 MIC-1를 1000, 100, 10 ng/ml의 농도로 가하면 침윤능이 증가함을 알 수 있었다. 100 ng/ml에서 약4.5배, 10 ng/ml에서는 약 3배의 침윤능의 증가를 보인 반면 1000 ng/ml의 고농도에서는 오히려 10 ng/ml보다도 약한 활성을 보였다.

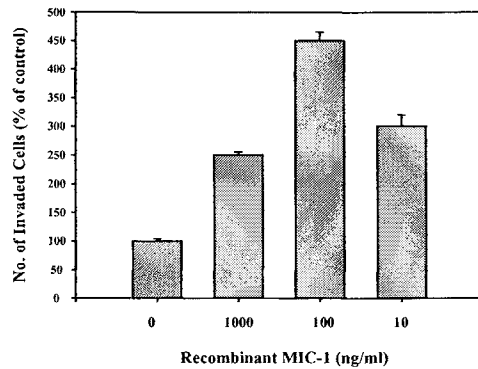


그림 16. recombinant MIC-1에 의한 SNU-216세포의 침윤증가효과 또한 그림 17)에 보듯이와 같이 SNU-216세포에 recombinant MIC-1을 1000, 100, 10 ng/ml의 농도로 처리한 C.M.에서의 uPA의 양을 fibrin zymography로 측정된 결과 control에 비하여 증가되어있는 것으로 나타났다. 이는 위암 specific하게 발현되는 MIC-1은 위암세포에 작용하여 위암세포의 전이/침윤에 중요한 인자로 알려진 plasminogen 활성화 system를 변화시켜 위암세포의 침윤능을 증가시키는 것으로 사료되어 앞으로 좀더 자세한 분석이 요망된다.

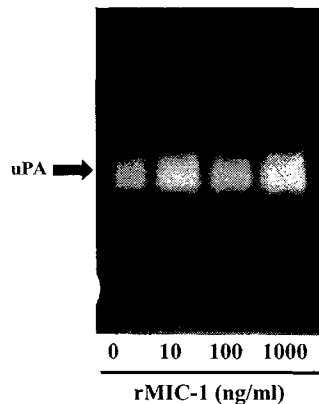


그림 17. SNU-216세포의 uPA의 분비에 미치는 rMIC-1의 효과

4. retrovirus expression cloning 및 in vivo 전이실험

4-1). retrovirus expression cloning system을 이용한 전이조절후보유전자의 선발

침윤능이 강한 SNU-638세포로부터 전술한 retroviral expression cDNA library를 조제한 후 NIH3T3 및 human gastric fibroblast Hs677T에 infection 시킨 후 0.33% 한천상에서 colony를 형성하는 clones모은 후 0.5% 한천으로 한번 더 selection하여 형성되는 clones들을 선발하였는데 NIH3T3에서는 17 clones, Hs677T세포에서는 7개의 clones을 선발하였다. 이 clones들에 대하여서는 현재 insert확인 등의 분석중에 있다.

4-2). in vivo전이실험

한국인유래의 위암세포주를 이용하여 athymic nude mouse를 이용하여 in vivo 기능을 진행중에 있다 (6월말에 완료예정).

IV. 위암 세포,조직에 대한 cDNA library 제조 및 후보유전자 군 확보 II

1. 위암과 정상조직의 subtractive library의 구축

(1) 위암관련 유전자 군을 확보하기 위해 위암조직을 tester로 정상조직을 driver로, 혹은 정상조직을 tester로 위암조직을 driver로 하여 subtractive library를 Clontech PCR-select cDNA subtraction kit(CLONTECH)을 사용하여 구축하였다. 이때 subtractive hybridization에 의해 tester 조직에 특이적으로 (differentially expressed sequences) 발현된 PCR product을 T/A cloning vector인 pGEM-Teasy vector에 cloning하고 DH5α E. coli의 competent cell에 transformation시켜 subtracted library를 조제하였다.

Clone No.	Gene	Frequency
1	Osteonectin	1
2	Prothymosin α	1
3	Human regenerating gene type IV	6
4	human anterior gradient 2 homolog	3
5	human mucin 13	1
6	GW112	6
7	Pepsinogen C	1
8	Actin β	2
9	Collagen	6

표 1. Sequence analysis of tumor specific clones isolated from subtracted gastric tumor cDNA

Subtracted library를 이용하여 위암조직에 특이하게 발현된 유전자의 선별은, 위암조직에서 정상조직을 subtraction하여 구축한 subtracted library의 E. coli colony로 부터 각각 두장씩 cDNA microarray를 nylon membrane 상에 조제하고, 각각의 membrane중 하나는 정상조직의 probe로, 다른 하나는 암조직의 probe로 hybridization을 실시하였다. 이렇게 하여 얻은 두 membrane 상의 각 spot의 signal 강도를 비교 분석하여 위암조직에 특이하게 발현된 후보유전자들을 분리하였다.

(2) 위암과 정상조직에서 subtractive hybridization을 이용한 위암관련 유전자군의 발굴

(a) 위암관련 후보유전자의 분리

위암관련 유전자 군을 확보하기 위해 위암조직을 tester로 정상조직을 driver로, 혹은 정상조직을 tester로 위암조직을 driver로 하여 subtractive library를 만들었다.

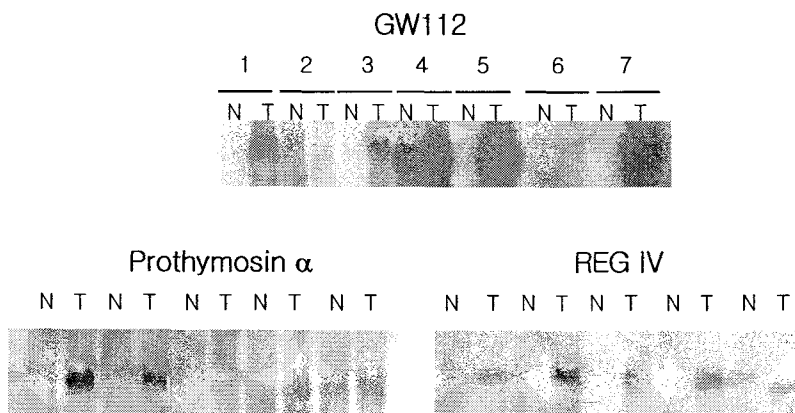
Subtracted library를 이용하여 위암조직에 특이하게 발현된 유전자의 선별은 각각 두 장씩의 cDNA microarray를 nylon membrane 상에 조제하고, 각각의 membrane중 하나는 정상조직의 probe로, 다른 하나는 암조직의 probe로 hybridization을 실시하였다. 이렇게 하

여 얻은 두 membrane 상의 각 spot의 signal 강도를 비교 분석하여 위암조직에 특이하게 발현된 후보유전자들을 분리하였다 (표 1).

이 유전자 가운데 osteonectin 유전자는 암의 진행에 관련되어 있고 (Clin Cancer Res 2000 6:1140-1149), prothymosin α 유전자는 암 환자에서 높게 발현됨이 이미 보고되었다 (World J Surg 2000 24:455-458). GW112는 EST clone으로 inflammation과 연관이 있을 것으로 생각된다 (Gut 2001 48:623-629). 따라서 본 연구에서 구축된 subtractive library로부터 후보 유전자들을 계속 동정하여 보면 암과 관련된 후보 유전자들을 많이 확보 할 수 있을 것으로 생각한다.

(b) 위암관련 후보유전자들의 발현분석

Subtractive hybridization을 통하여 얻은 유전자들을 위암환자에서 분리한 위암조직과 정상조직에서 total RNA를 분리하고, northern blot을 이용하여 암조직에서 특이적으로 발현되는지를분석하였다. 그림 1에서와 같이 3개의 유전자 (GW112, Prothymosin α ,



REG IV)를 먼저 조사하였는데, 3개의 유전자 모두 위암환자의 조직에서 특이적으로 발현이 증가되어 있는 것으로 미루어 위암의 발병과 진행에 관련된 원인 유전자일 가능성이 높을 것으로 생각한다.

그림1. Confirmation of putative differentially expressed cDNAs by Northern blot analysis.

3개의 후보유전자중에서 먼저 그 기능이 전혀 알려져 있지 않은 GW112에 대하여 한국인 위암에서 유래한 세포주에서 발현을 분석하였다 (그림 2A). 또한 사람과 생쥐의 어느 tissue에서 GW112가 발현되는지를 multiple tissue northern (MTN) blot을 사용하여 조사하였다 (그림 2B). 그림2A에서와 같이 GW112는 SNU-620 세포에서만 특이적으로 발현되고, 다른 위암세포에서는 거의 발현되지 않음을 알 수 있었다. 또한 GW112는 인체의 신장(kidney)와 췌장(pancreas)에서 약하게 발현됨을 알 수 있었고, 생쥐의 tissue에서는 전혀 발현을 볼 수 없었다 (그림 2B). 이상의 결과는 GW112가 신장이나 췌장에서 정상적인 어떤 고유의 기능을 담당하는 유전자임을 암시하고, 앞으로 위암의 발병과 진행에 어떤 역할을 하는지 세포수준에서의 GW112에 대한 연구가 수반되어야 할 것으로 생각한다. 생쥐에서 GW112와 같은 기능을 할 것으로 생각되는 유전자를 public data base에서 homology search를 통하여 조사해 보았는데, 아직까지 비슷한 homology를 갖고있는 유전자가 보고된 것이 없었다.

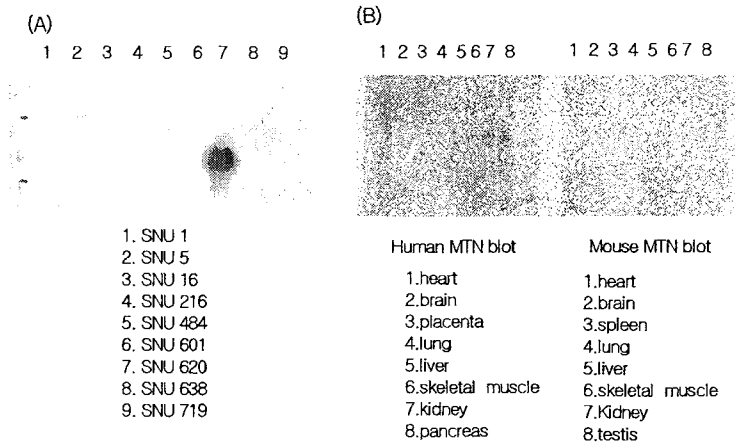


그림 2. Northern blot analysis of GW112 clone.

(A) Korean gastric cancer cell lines and (B) Clontech's Human and Mouse MTN blot

(C) 위암관련 후보유전자들의 *in situ* hybridization

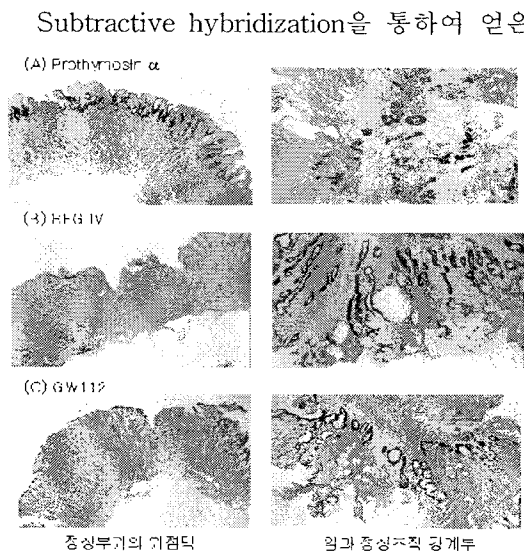


그림 3. In situ hybridization of subtracted genes

Subtractive hybridization을 통하여 얻은 위암관련 후보유전자들을 충남대학교 병원에서 확보한 위암 조직슬라이드에 digoxigenin이 label된 RNA probe를 이용하여 위암 및 정상 위조직에서 *in situ* hybridization 실험을 하였다. 그림 3A는 prothymosin α 에 대한 결과로 정상조직의 mucous neck cell에서 발견되고 암조직에서 강하게 발견됨을 알 수 있었다. Regenerating gene type IV의 경우는 정상조직의 위점막에서는 거의 발견되지 않았고, 암과 정상조직의 경계부에서 intestinal metaplasia가 일어난 세포에서 강하게 발견되었고 poorly differentiated type의 암에서는 중심부 암세포에서도 REGIV가 발견됨을 알 수 있었다 (그림 3B). GW112는 정상 위점막부위에서는 거의 발견되지 않았고, intestinal type의 암에서 주로 발견됨을 알 수 있었다 (그림 3C). 이상의 결과는 Subtractive hybridization을 통하여 얻은 위암관련 유전자들이 위암의 진단이나 치료에 marker로 이용될 수 있을 것으로 생각되고, 앞으로 이러한 유전자들이 세포의 분화나 metaplasia에 어떤 역할을 하는지 조사해 볼 필요가 있겠다.

여 백

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	연구목표	연구내용	달성도 (%)
1차년도 (2000)	1.간암 및 위암 세포,조직에 대한 cDNA library 제조 및 후보유전자 군 확보 I (200 개) 2.cDNA의 발현 system 확립 (4 system) 3.세포기능 screening용 system 확립 (4 system)	-tumor부위와 정상부위를 대상으로하여 암특이 발현 cDNA library 제조 및 cDNA microarray, informatics 활용한 full-length cDNA 확보 I -retroviral expression cloning system 확보 -signal sequence trap system 확보 -종양 면역활성 및 회피 대량검색 -세포성장, 사멸 대량검색 -암전이 및 혈관신생 대량검색 -조직발현 검정 system 확립	100
2차년도 (2001)	1.위암 세포,조직에 대한 cDNA library 제조 및 후보유전자 군 확보 II (200개) 2.종양유래 면역활성 유전자 탐색 3.세포증식 및 사멸 조절하는 유전자 탐색 4.전이 및 혈관신생 조절 후보 암유전자 발굴	1. 위암과 정상조직의 subtractive library II 2. 위암 세포주 (SNU638 등) signal sequence trap II 3. 위암 세포주 DNA array II 4. 위암세포주 (SNU638 등) full-length cDNA library 제조I.subtraction, microarray, expression cloning을 이용한 전이 조절 후보유전자 탐색 5. 1차년도에 확보된 전이기능 관련 유전자의 발현 확인 및 library screening 및 RACE를 이용한 full-length cDNA확보 6. 과발현세포주를 이용한 in vitro metastasis assay 7.Nude mouse를 이용한 위암의 in vivo 전이 model구축 (peritoneal dissemination model 또는 lymph node model)	100
3차년도 (2002)	1. 위암 세포,조직에 대한 cDNA library 제조 및 후보유전자 군 확보 III 위암관련 후보 유전자를 50개를 확정하여 유전자군이 대한 기능연구 2. 종양유래 면역활성 유전자 탐색 3. 면역기능 관련 후보 유전자의 기능 규명을 위한 스크리닝 시스템의 확립 4. 세포증식 및 사멸 조절하는 유전자 탐색 Retroviral expression cloning/TGF의 세포사멸을 이용한 survival selection 확보 5. 전이 및 혈관신생 조절 후보 암유전자 발굴 6. 수렴한 발현 및 기능검정 system을 이용한 후보유전자의 전이조절 기능검정	1. 위암과 정상조직의 subtractive library 완성 2. 위암 세포주 signal sequence trap 완성 3. 암조직에서의 발현 확인 4. 기능별 후보 유전자 50개 선정 및 full-length cDNA 확보 5. signal sequence trap을 이용해 확보한 유전자들의 발현 확인 및 full-length cDNA 확보 및 기능 연구 6. 세포주를 이용한 유전자 발현 및 면역 세포 기능 조절 점검 7. retroviral expression library을 이용한 면역 활성화 조절 유전자 발굴 8. 면역기능 관련 후보 유전자의 기능 규명을 위한 스크리닝 시스템의 확립 9. NK,DC 세포조절 유전자의 탐색 및 기능 규명	100

여 백

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

본과제의 목표는 위암관련 유전자 (10개) 를 발굴하고 기능을 규명하여 이를 활용하는 기초근거를 제시하는 것으로 특히 암유전자의 면역기능과 세포성장조절, 전이 기능에 대해 연구를 수행하여 약70여종의 새로운 후보유전자를 발굴하고 이와 관련한 기능을 밝혀 새로운 암유전자로서의 가능성을 제시하였다. 또한 k/o mice를 생산하여 심도있는 연구를 수행하고 있다.이러한 후보 유전자는 새로운 암세포의 기능과 조절기능을 규명할 수 있는 근거를 제시하였다. 즉 9-27은 NK 조절 유전자로 MIC는 새로운 전이조절 유전자로 활용될 가능성이 높고 VDUP1은 새로운 tumor suppressor gene으로 가능성이 있어 관련된 연구에 긍정적인 활용 가능성이 높다.

1. 확보된 신규후보유전자의 새로운 기능 규명을 통한 새로운 암유전자 발굴
2. 확립한 발현 및 기능검정 system을 이용한 후보유전자의 전이조절 기능검정
3. Retroviral expression cloning를 이용한 전이조절유전자 발굴
4. 위암세포의 in vivo전이모델을 이용한 유전자의 전이 능력 점검

여 백

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

A. SNP

- high-density oligonucleotide array를 이용한 SNP발굴
- human haploid에서 약 1.5 million의 SNP 발굴
- SNP의 전제 조건
 - 1) cost
 - 2) sample collection
 - 3) disease/ whole genome
- RDA-oligo array/ amplicon discovery/ candidate validation / drug or Ab
- prostate cancer
- 목적: early diagnosis/ appropriate treatment/ reduced side effects
- 진행: patient group and candate gene selection
 - polymorphism discovery
 - genotyping
 - data analysis
- 결과: 전체의 15%가 새로운 SNP

B. Drug development

- Parallel Biology: integration and understanding of data bases in genome research and application in drug development
- new target discovery (target identification/ validation) - pipeline support - clinical development
- serum protein/ SELDI analysis
- signaling proteomics

C, how cell compute (Dr. Sydney Brenner, Nobel laureate)

- genome sequence to function
- data to knowledge
- two functions; assembling and topology of compartment
- cell: integrate signals into a entity: input and output; cell compute

D. Druggable genome

- ability of a target to ne modulated by a potent, small molecules
- 300? targets

E. proteoworks

- automatic proteine expression system
- 5000 proteins expression; purification >95%. 5 mg
- 20 days from cloning to structure

F. Biotech Industry

-2002

- decrease in 3 years; 10.4 B (11.9B in 2001)
- 18% up in sale for top 10 biotech
- Imclone debacle (down 75%)
- tech: RNAi, stem cell, whole genome sequence
- systems biology

G. systems biology

- parallel analysis of protein, metabolites, RNA from complex sample
- knowledge and disease treatment
- metabolomics

H. RNAi

- From *C. elegans* to mice
- a way to silence gene expression
- to perform RNAi, dsRNA homologous to the targeted gene
- dsRNA into 21-23 nt fragments
- lentiviral siRNA construct

I. Single cell proteomics

- a cell: 10 um diameter, 50 pg protein
- identify cell of interest/ load cell into capillary/ lyse cell/ label protein/ separate by capillary electrophoresis / detect with laser-induced fluorescence

제 7 장 참고문헌

1. DeLuca, H. F., The vitamin D story: a collaborative effort of basic science and clinical medicine. *FASEB J.* **2**, 224-236, 1988.
2. Hansen, C. M., Binderup, L., Hamberg, K. J., and Carlberg, C., Vitamin D and cancer: effects of 1,25(OH)₂D₃ and its analogs on growth control and tumorigenesis. *Front. Biosci.* **6**, D820-D848, 2001.
3. Koren, R., Rocker, D., Kotestiano, O., Liberman, U. A., and Ravid, A., Synergistic anticancer activity of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ and immune cytokines: the involvement of reactive oxygen species. *J of Ster. Biochem. and Mol. Biol.* **73**, 105-112, 2000.
4. Ravid, A., Rocker, D., Machlenkin, A., Rotem, C., Hochman, A., Kessler-Iceson, G., Liberman, U. A., and Koren, R., 1,25-dihydroxyvitamin D₃ enhances the susceptibility of breast cancer cells to Doxorubicin-induced oxidative damage. *Cancer Res.* **59**, 862-867, 1999.
5. Hansen, C. M., Madsen, M. W., Arensbak, B., Skak-Nielsen, T., Latini, S., and Binderup, L., Down-regulation of laminin-binding integrins by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ in human melanoma cells in vitro. *Cell Adhes. Commun.* **5**, 109-20, 1998.
6. Hosoi, J., Abe, E., Suda, T., and Kuroki, T., Regulation of melanin synthesis of B16 mouse melanoma cells by 1 alpha, 25-dihydroxyvitamin D₃ and retinoic acid. *Cancer Res.* **45**, 1474-8, 1985.
7. Piemonti, L., Monti, P., Sironi, M., Fraticelli, P., Leone, B. E., Dal Cin, E., Allavena, P., and Di Carlo, V., Vitamin D₃ affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* **164**, 4443-51, 2000.
8. Griffin, M. D., Lutz, W., Phan, V. A., Bachman, L. A., McKean, D. J., and Kumar, R., Dendritic cell modulation by 1alpha,25 dihydroxyvitamin D₃ and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **98**, 6800-6805, 2001.
9. Nakamura, H., Nakamura, K., and Yodoi, J., Redox regulation of cellular activation. *Annu. Rev. Immunol.* **15**, 351-369, 1997.
10. Buchanan, B. B., Schurmann, P., Decottignies, P., and Lozano, R. M., Thioredoxin: a multifunctional regulatory protein with a bright future in technology and medicine. *Arch. Biochem. Biophys.* **314**, 257-260, 1994.
11. Powis, G., Briehl, M., and Oblong, J., Redox signalling and the control of cell growth and death. *Pharmacol Ther.* **68**, 149-173, 1995.
12. Bertini, R., Howard, O. M., Dong, H.F., Oppenheim, J. J., Bizzarri, C., Sergi.

- R., Caselli, G., Pagliei, S., Romines, B., Wilshire, J. A., Mengozzi, M., Nakamura, H., Yodoi, J., and Pekkari, P., Thioredoxin, a redox enzyme released in infection and inflammation, is a unique chemoattractant for neutrophils, monocytes, and T cell. *J. Exp. Med.* **189**, 1783-1789, 1999.
13. Schenk, H., Klein, M., Erdberugger, W., Droge, W., and Schulze-Osthoff, K., Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF- κ B and AP-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 1672-1676, 1994.
14. Barral, A. M., Kallstrom, R., Sander, B., and Rosen, A., Thioredoxin, thioredoxin reductase and tumour necrosis factor- expression in melanoma cells: correlation to resistance against cytotoxic attack. *Melanoma Res.* **10**, 331-343, 2000.
15. Schallreuter, K. U., Lemke, K. R., Hill, H. Z., and Wood, J. M., Thioredoxin reductase induction coincides with melanin biosynthesis in brown and black guinea pigs and in murine melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.* **103**, 820-824, 1994.
16. Chen, K. S., and Deluca, H. F., Isolation and characterization of a novel cDNA from HL-60 cells treated with 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem. Biophys. Acta.* **1219**, 26-32, 1994.
17. Nishiyama, A., Matsui, M., Iwata, S., Hirota, K., Masutani, H., Nakamura, H., Takagi, Y., Sono, H., Gon, Y., and Yodoi, J., Identification of thioredoxin binding protein-2/vitamin D₃ up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression. *J. Biol. Chem.* **274**, 21645-21650, 1999.
18. Junn, E., Han S. H., Im, J. Y., Yang, Y., Cho, E. W., Um, H. D., Kim, D. K., Lee, K. W., Han, P. L., Rhee, S. G., and Choi I., Vitamin D₃ Up-regulated protein 1 mediated oxidative stress via suppressing the thioredoxin function. *J. Immunol.* **164**, 6287-6295, 2000.
19. Coligan, J. E., Kruisbeek, A. M., Marhulies, D. H., Sherach, E. M., and Strober, W., Assays for mouse B and T cell function. In *Current protocols in immunology*, vol 1. pp.3.1-3.15, New York, NY, John Wiley & Sons, 1992.
20. Friedmann, P. S., and Gilcrest, B. A., Ultraviolet radiation directly induces pigment production by cultured human melanocytes. *J. Cell. Physiol.* **133**, 88-94, 1987.
21. Kim, Y. B., Huh, N. D., Koren, H. S., and Amos, D. B., Natural killing (NK) and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) in specific pathogen-free (SPF) miniature swine and germfree piglets. I. Comparison of NK and ADCC. *J. Immunol.* **125**, 755-762, 1980.
22. Aruffo, A., Stamenkovic, I., Melnick, M., Underhill, C. B., and Seed, B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* **61**:1303-1313, 1990.
23. Sherman, L., Sleeman, J., Herrlich, P., and Ponta, H., Hyaluronate receptors: key players in growth, differentiation, migration and tumor progression. *Curr.*

Opin. Cell Biol. **6**, 726733, 1994.

24. Ahrens, T., Sleeman, J. P., Schempp, C. M., Howells, N., Hofmann, M., Ponta, H., Herrlich, P., and Simon, J. C., Soluble CD44 inhibits melanoma tumor growth by blocking cell surface CD44 binding to hyaluronic acid. *Oncogene* **20**, 3399-408, 2001.

25. Ahrens, T., Assmann, V., Fieber, C., Termeer, C., Herrlich, P., Hofmann, M., and Simon, J. C., CD44 is the principal mediator of hyaluronic-acid-induced melanoma cell proliferation. *J. Invest. Dermatol.* **116**, 93-101, 2001.

26. Rosei, M. A., Blarzino, C., Coccia, R., Foppoli, C., Mosca, L., and Cini, C., Production of melanin pigments by cytochrome c/H₂O₂ system. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **30**, 457-63, 1998.

27. Martinez-Esparza, M., Jimenez-Cervantes, C., Solano, F., Lozano, J. A., and Garcia-Borrón, J. C., Mechanisms of melanogenesis inhibition by tumor necrosis factor-alpha in B16/F10 mouse melanoma cells. *Eur. J. Biochem.* **255**, 139-146, 1998.

28. Furuke, K., Shiraishi, M., Mostowski, H. S., and Bloom, E. T., Fas ligand induction in human NK cells is regulated by redox through a calcineurin-nuclear factors of activated T cell-dependent pathway. *J. Immunol.* **162**, 1988-93, 1999.

29. Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L. E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., Cerottini, J., and Tschopp, J., Melanoma cell expression of Fas (Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* **274**, 1363-1366, 1996.

30. Cho, D., Song, H., Kim, Y. M., Houh, D., Yoon, D., Pyun, G. H., Lee, W. J., Kurimoto, M., Kim, Y. B., and Choi, I., Endogenous Interleukin-18 Modulates Immune Escape of Murine Melanoma Cells via Regulating the Expression of Fas-ligand and Reactive Oxygen Intermediate. *Cancer Res.* **60**, 2703- 2709, 2000.

31. Sie, H., Oxidative stress: introductory remarks. in H. Sies (ed.) *Oxidative stress*, pp. 1-8. London: Academic Publisher, 1985.

32. Sie, H., What is oxidative stress?. in J. F. Jr. Keaney (ed.) *Oxidative stress and vascular disease*, pp. 1-8. Boston: Kluwer Academic Publisher, 2000.

33. Cerutti, P. A., Prooxidant states and tumor promotion. *Science* **227**, 375-381, 1985.

34. Picardo, M., Grammatico, P., Roccella, F., Roccella, M., Grandinetti, M., Del Porto, G., and Passi, S., Imbalance in the antioxidant pool in melanoma cells and normal melanocytes from patients with melanoma. *J Invest. Dermatol.* **107**, 322-326, 1996.

35. Brar, S. S., Kennedy, T. P., Whorton, A. R., Sturrock, A. B., Huecksteadt, T. P., Ghio, A. J., and Hoidal, J. R., Reactive oxygen species from NAD(P)H:quinone oxidoreductase constitutively activate NF-kappaB in malignant melanoma cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **280**, C659-676, 2001.

36. Clement, M., and Stamenkovic, I., Superoxide anion is a natural inhibitor of

- Fas mediated cell death. *EMBO. J.* **15**, 216-225, 1996.
37. Pervaiz, S, Ramalingam, J. K., Hirpara, J. L., and Clement, M. V., Superoxide anion inhibits drug-induced tumor cell death. *FEBS Lett.* **459**, 343-8, 1999.
 38. Redondo, P., Bandres, E., Solano, T., Okroujnov, I., and Garcia-Foncillas, J., Vascular endothelial growth factor and melanoma. N-acetylcysteine downregulates VEGF production in vitro. *Cytokine* **12**, 374-378, 2000.
 39. Zhao, Y., Xue, Y., Oberley, T. D., Kiningham, K. K., Lin, S. M., Yen, H. C., Majima, H., Hines, J., and St Clair, D., Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor formation by modulation of activator protein-1 signaling in a multistage skin carcinogenesis model. *Cancer Res.* **61**, 6082-6088, 2001.
 40. Jimenez-Cervantes, C., Martinez-Esparza, M., Perez, C., Daum, N., Solano, F., and Garcia-Borrón, J. C., Inhibition of melanogenesis in response to oxidative stress: transient downregulation of melanocyte differentiation markers and possible involvement of microphthalmia transcription factor. *J. Cell Sci.* **114**, 2335-2344, 2001.
 41. Schallreuter, K. U., Wood, J. M., and Berger, J., Low catalase levels in the epidermis of patients with vitiligo. *J. Invest. Dermatol.* **97**, 1081-1085, 1991.
 42. Szatrowski, T. P, and Nathan, C. F., Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res.* **51**, 794-798, 1991.
 43. Soderberg, A., Sahaf, B., and Rosen, A., Thioredoxin reductase, a redox-active selenoprotein, is secreted by normal and neoplastic cells: presence in human plasma. *Cancer Res.* **60**, 2281-2289, 2000.
 44. Evans, S. R. T., Houghton, A. M., Schumaker, L., Brenner, R. V., Buras, R. R., Davoodi, F., Nauta, R. J., and Shabahang, M., Vitamin D receptor and growth inhibition by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human malignant melanoma cell lines. *J. Sur. Res.* **61**, 127-133, 1996.
 45. Danielsson, C., Torma, H., Vahlquist, A, and Carlberg, C., Positive and negative interaction of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and the retinoid CD437 in the induction of human melanoma cell apoptosis. *Int. J. Cancer.* **81**, 467-470, 1999.
 46. Yamaoka, K., Marion, S. L., Gallegos, A., and Haussler, M. R., 1,25-Dihydroxyvitamin D3 enhances the growth of tumors in athymic mice inoculated with receptor rich osteosarcoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **139**, 1292-1298, 1986.
 47. Cohen, M. S., Mesler, D. E., Snipes, R. G., and Gray, T. K., 1,25-Dihydroxyvitamin D3 activates secretion of hydrogen peroxide by human monocytes. *J. Immunol.* **136**, 1049-53, 1986.
 48. Nagata, S., Fas ligand and immune evasion. *Nat. Med.* **2**, 1306-1307, 1996.
 49. Williams, N., Tumor cells fight back to beat immune system. *Science* **274**, 1302, 1996.

특정연구개발사업 연구결과 활용계획서				
사업명	중사업명	21C 프론티어연구개발사업		
	세부사업명	인간유전체기능연구사업		
과제명	암세포의 증식 및 면역회피 기능을 근거로 한 위암/간암 관련 유전자 발굴 및 분석			
연구기관	한국생명공학연구원	연구책임자	최인표	
총연구기간	2000년. 7월.1일. ~2003년. 6월. 30일. (36개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)	정부출연금	민간부담금	합계	
	1,700,000		1,700,000	
기술분야	생명공학/암면역학			
참여기업				
공동연구기관				
위탁연구기관	충남대 의과대학			
연구결과활용 (해당항목에(O) 표시)	1. 기업화 ()	2. 기술이전()	3. 후속연구추진()	4. 타사업에 활용()
	5. 선행 및 기 초연구(O)	6. 기타목적활용 (교육,연구)()	7. 활용중단(미활용)()	8. 기타()
<p>특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.</p> <p>첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부. 2. 기술요약서 1부</p> <p style="text-align: right;">2003 년 7 월 일</p> <p style="text-align: right;">연구책임자 : 최인표 (인) 연구기관장 : 양규환 (직인)</p> <p>과학기술부장관 귀하</p>				

여 백

【첨부1】 연구결과활용계획서(최종보고서 첨부)

연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

위암 및 간암 관련 유전자 군으로부터 암 및 면역 세포 기능 조절 활성을 갖는 기능성유전자를 검색할 수 있는 효과적인 functional screening system을 개발하여, 위암 및 간암 질환관련 후보유전자들을 발굴하고 이들의 발현을 암 질환에서 확인하여 50개의 암 치료용 후보유전자를 도출한다. 이들 목표유전자들의 기능을 정밀 분석하고 동물 모델에서 기능을 점검한 후 최종 10개의 목표유전자 개발하고 이들을 이용한 새로운 면역암치료법 및 진단법을 개발한다.

- (1) 종양 면역활성 조절 유전자 발굴 및 기능분석
- (2) 암세포 증식 및 사멸 유도 유전자 발굴 및 기능분석
- (3) 암세포 전이 조절 유전자 발굴 및 기능분석
- (4) 암관련 유전자의 임상 병리적 분석

2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허공고번호 출원(등록)번호	공고일자 출원(등록)일자	발명자 (출원인)	출원국	비고
Composition of 9-27 gene for the treatment of gastric tumor	2002-70175	2002.11.12	최인표 외	한국	
Composition of MIC-1 gene for the treatment and diagnosis of gastric tumor	2002-14352	2003.3.7	최인표 외	한국	

나. 프로그램 등록목록

프로그램 명칭	등록번호	등록일자	개발자	비고

다. 노하우 내역

라. 발생품 및 시작품 내역

마. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적(필요시 별지사용)

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행 기관	국 명	SCI게 재 여부
Oncogene	Syntenin is overexpressed and promotes cell migration in metastatic human breast and gastric cancer cell lines. 21(26):4080-8, 2002.	2002년	26	영국암 학회	영국	O
Cancer Research	MIC-1 induces the invasiveness of gastric cancer cells by upregulating the urokinase-type plasminogen activator system.	2003년		미 국 암 학 회	미국	O
Cancer Letter	Aberrant signaling of TGF-1 by the mutant Smad4 in gastric cancer cells.	2003년			미국	O
Oncogene (I n press)	VDUPI UP-REGULATED BY TGF-1 AND 1,25-DIHYDORXYVITAMIN D3 INHIBITS TUMOR CELL GROWTH BY BLOCKING CELL CYCLE PROGRESSION.	2003년		영 국 암 학 회	영국	O
계: 4 건수						

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

학술회의 명칭	제목	게재연월일	호	발행 기관	국 명
		년 월 일			
계: 건수					

3. 연구성과

현재 기업이전 실적이 없음. 보고서에 있는 연구 실적을 중심으로 추가 연구가 필요함

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 당해연도 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

본과제의 목표는 위암관련 유전자 (10개) 를 발굴하고 기능을 규명하여 이를 활용

하는 기초근거를 제시하는 것으로 특히 암유전자의 면역기능과 세포성장조절, 전이 기능에 대해 연구를 수행하여 약70여종의 새로운 후보유전자를 발굴하고 이와 관련한 기능을 밝혀 새로운 암유전자로서의 가능성을 제시하였다. 이러한 유전자를 앞으로 암조절 유전자로 발굴할 예정이다.

나. 활용방법

1. 확보된 신규후보유전자의 새로운 기능 규명을 통한 새로운 암유전자 발굴
2. 확립한 발현 및 기능검정 system을 이용한 후보유전자의 전이조절 기능검정
3. Retroviral expression cloning를 이용한 전이조절유전자 발굴
4. 위암세포의 in vivo전이모델을 이용한 유전자의 전이 능력 점검

다. 차년도이후 활용계획(6하원칙에 따라 구체적으로 작성)

발굴한 후보 유전자는 새로운 암세포의 기능과 조절기능을 규명할 수 있는 근거를 제시하였다. 즉 9-27은 NK 조절 유전자로 MIC는 새로운 전이조절 유전자로 활용될 가능성이 높고 VDUP1은 새로운 tumor suppressor gene으로 가능성이 있어 관련된 연구에 긍정적인 활용 가능성이 높다.

5. 기대효과

위암관련 진단 및 치료법 개발을 위한 유전자 발굴로 관련 인프라 구축 및 이를 이용한 진단 및 치료법에 활용 가능함.

6. 문제점 및 건의사항(연구성과의 제고를 위한 제도·규정 및 연구관리 등의 개선점을 기재)

【첨부2】 -기술요약서(최종보고서 첨부)

기술 요약서

■ 기술의 명칭

암세포에 특이적으로 발현되는 9-27 유전자의 동정

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호	(사업단 과제관리 시스템에서 부여된 번호 기입)			
과제명	암세포의 증식 및 면역회피 기능을 근거로 한 위암/간암 관련 유전자 발굴 및 분석			
사업명	21C 프론티어연구개발사업			
세부사업명	인간유전체기능연구사업			
연구기관	한국생명공학연구원	기관유형	출연연	
참여기관(기업)				
총연구기간	2000.7-2003.6			
총연구비	정부(1,700,000)천원 민간()천원 합계(1,700,000)천원			
연구책임자 1	성명	최인표	주민번호	
	근무기관 부서	면역학연구실	E-mail	ipchoi@kribb.re.kr
	직위/직급	책임연구원	전화번호	042-860-4223
연구책임자 2	성명		주민번호	
	근무기관 부서		E-mail	
	직위/직급		전화번호	
실무연락책임자	성명		소속/부서	
	직위/직급		E-mail	
	전화번호		FAX	
	주소	(-)		

■ 기술의 주요내용

[기술의 개요]

본 발명은 위암세포에 특이적으로 발현이 증가되어서 면역세포로부터의 감시 기능을 회피하는데 관련된 9-27유전자의 동정을 내용으로 하며 이 유전자의 기능을 저해하는 방법으로 위암의 전이억제 및 위암치료에 사용하거나 이 유전자의 동정으로 위암을 진단하는데 사용할 수 있다.

<기술적 특징>

- (1)9-27유전자의 발현이 정상 조직에 비해, 암 조직에서 더 많이 발현됨
- (2)9-27의 발현이 자연살상능 (NK) 세포의 세포독성에 대한 저항성을 증가시킴
- (3)9-27유전자 도입이 암세포의 이동능력과 침윤능력의 증가를 통한 전이에 관여함

[용도·이용분야]

- (1) 암진단
- (2)암치료법 개발
- (3)암전이 조절법 개발

■ 기술의 분류

[기술코드] 410(3 Digit) (KISTEP 홈페이지 기술요약서용 기술분류표 참조)

[기술분야] (1개만 선택(√로 표시)하여 주십시오)

- 정보산업 기계설비 소재 정밀화학·공정 생명과학
 원자력 자원 에너지 항공·우주 해양
 교통 보건·의료 환경 기초·원천 기타

[기술의 활용유형] (1개만 선택(√로 표시)하여 주십시오)

- 신제품개발 신공정개발 기존제품개선 기존공정개선
 기 타 (O)

[기술의 용도] (복수 선택(√로 표시)가능합니다)

- 기계설비 부품소자 원료재료 소프트웨어
 가공처리기술 자동화기술 불량률 감소 등 현장애로기술
 제품설계기술 공정설계기술 기 타 (O)

■ 산업재산권 보유현황(기술과 관련한)

권리유형	명 칭	국가명	출원단계	일자	등록번호
특허출원	9-27유전자의 발현이 정상 조직에 비해, 암 조직에서 더 많이 발현됨	한국	출원	2002.11.12	

* '권리유형'란에는 특허, 실용신안, 의장, 컴퓨터프로그램, 노하우 등을 선택하여 기재

* '출원단계'란에는 출원, 공개, 등록 등을 선택하여 기재

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술

[기술개요]

기술명	
개발단계	<input type="checkbox"/> 연구개발 계획 <input type="checkbox"/> 연구개발 중 <input type="checkbox"/> 연구개발 완료
기술개요	

[기술을 도출한 과제현황]

과제관리번호			
과제명			
사업명			
세부사업명			
연구기관		기관유형	
참여기관(기업)			
총연구기간			
총연구비	합계 : ()백만원 - 정부 : ()백만원 민간 : ()백만원		
연구책임자	소속		성명
	전화번호		E-mail
연구개발 주요내용			