

세포고사 및 신호전달체계 관련 분자핵의학
기술 개발

Development of Molecular Nuclear Medicine
Technology in Apoptosis and Signal
Transduction

주관연구기관
한국원자력연구소
부설 원자력의학원

제 출 문

과 학 기 술 부 장 관 귀 하

본 보고서를 “세포고사 및 신호전달 체계 관련 분자핵의학 기술 개발에 관한 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2004. 4.

연구기관명	: 원자력의학원
연구책임자	: 임 상 무
연구원	: 안 순 혁 이 태 섭 천 기 정 김 성 은 우 광 선 정 위 섭 정 혜 경 이 정 출
협동연구기관명	: 고려대학교
협동연구책임자	: 김 명 곤
연구원	: 이 지 혜 박 영 주 김 민 정 김 선 옥

요 약 문

I. 제 목

세포고사 및 신호전달체계 관련 분자핵의학 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 과제와 목표는 세포고사 및 신호전달 관련 분자핵의학 기술로서 세포고사를 영상화 하는 방법으로서 세포고사시 세포막의 외부로 노출되는 인지질인 phosphatidylserine (PS)에 특이적으로 결합하는 Annexin V에 동위원소를 표지하는 기법을 개발하고 이를 이용하여 세포고사를 핵영상으로 평가할수 있는 기법을 개발하고 p53 유무에 따른 치료용 방사성 동위원소를 치료효과를 대사영상용 방사성의약품으로 평가하는 기법을 개발하여 세포고사를 평가하는 기법을 개발하고자 하였으며, 종양세포에서 베타 방출 방사성동위원소에 반응하는 유전자를 유전자 칩을 이용하여 발굴하며 Apoptosis & Signal Transduction 관련 연구의 Radioactive Microarray를 이용하여 검증하며, 발굴된 유전자를 이용한 새로운 치료반응 유전자 발현 평가를 핵영상으로 평가하는 방법을 개발하여 분자 수준의 세포고사 반응 양상을 핵의학적인 기법으로 평가함으로써 효과적인 치료법의 개발 및 치료효과 평가에 새로운 방법론을 제시하고자 하였다.

- 기술적 측면

- 분자생물학적 기술이 급속도로 발전되어 임상의학의 기초에 대한 이해의 폭을 넓힘. 분자생물학적인 기법을 바탕으로 방사성 동위원소를 이용한 진단방법과 치료방법에 대한 국민의 관심고조. 분자생물학적인 기법을 이용하여 기존의 진단 및 치료방법의 한계를 극복하고자하는 새로운 진단 및 치료방법의 요구가 증가.
- 방사성동위원소를 이용한 기술의 개발과 습득으로 기초의학에 대한 이해의 폭을 증가. 유전자정보를 이용한 생체에 대한 새로운 이해를 바탕으로 생체에 적용가능한 모든 기술이 총망라되고 있는 실정에서 방사성 동위원소를 이용한 핵의학적인 방법을 통한 연구는 기존의 생화학적인 조직학적인 방법의 단점을 극복하고 핵영상을 통한 비침습적인 방법으로 생체현상을 규명할수 있는 새로운 도구를 마련할수 있는 계기가 되고 있음.
- 다학제간 공동연구의 장을 열수 있음. 의학외에 생명공학, 원자력, 공학, 물리, 약

학, 보건물리 등 다 학제간의 공동연구가 가능

- 급속히 발전하는 생명과학분야에 있어서 선진국 수준의 기술확보를 위해서는 신기술에 대한 연구가 시급. 원자력 선진국의 경우 원자력의 평화적 이용사업과 발맞추어서 이를 이용한 생명과학 연구에 많은 투자를 하고 있는 실정임. 새로운 생명과학 기술의 선점은 국가 기술 경제력을 높일뿐만 아니라 경제, 사회적인 측면에 있어서도 필요한 연구과제임.
- 새로운 진단 및 치료법의 개발에 있어서 산업화를 위한 산학연 공동연구개발 및 산업화가 가능함
- 세포고사를 영상화하는 방법의 개발은 비침습적인 방법으로 현재까지 임상에 있어서 연구되고 고려되어야하는 미진한 부분에 대한 새로운 이해의 폭을 제시할 것으로 기대됨
- 종양 및 정상 세포에서의 세포내 신호전달 체계에 대한 연구는 1980년대부터 중반부터 활발하게 시작되어서 생명현상의 이해에 대한 중요한 방법으로 평가되고 있으며 이를 임상 환자에 적용하고자 하는 치료 및 진단이 종양세포와 정상세포간의 신호전달체계의 오류등과 차이점을 규명함으로써 새로운 치료제와 진단방법의 개발이 가시화 되고 있다.
- 종양에 대한 현재까지의 연구결과를 바탕으로 유전자 chip을 이용하여 종양의 형성 및 정상세포와의 차이를 종합적으로 구별하여 새로운 치료와 진단의 도구를 개발 가능. 유전자 chip을 이용한 새로운 기능을 가진 유전자를 발굴하여 기존의 치료와 진단 방법에 추가됨으로서 임상에서 환자의 치료와 질병의 예후를 판단하는 중요한 도구로 사용될 수 있을것으로 기대.
- 종양세포에서 p53 유전자의 변이는 상당한 부분에서 중요한 단계로 인식되고 있으며, 이에 대한 정확한 기전이 아직 불분명한 상태임.
- p53 유전자에 대한 새로운 이해를 바탕으로 종양의 자연적인 세포사나 정상적인 조직내에서의 기능을 규명함으로써 종양의 치료와 진단에 있어서 새로운 방법을 개발할 수 있을 것으로 기대.
- 내부 방사선에 대한 세포반응 양상에 연구에 있어 저선량의 베타선 방출 방사성 동위원소에 대하여 p53 유무에 따른 세포주기와 세포고사와 관련된 기전은 아직 불분명하여 이에 따른 세포내의 대사구성성분에 대한 섭취율의 변화를 방사성 동위원소 표지 화합물을 이용한 평가와 대사정량 분석에 대한 연구는 미비한 것으로 조사되었다. external radiation, chemotherapeutic agent에 대한 p53유무에 따른 세포주기와 세포고사의 기전 연구를 바탕으로 베타선 방출 방사성 동위원소에 대한 기전 연구를 비교 할 수 있을 것으로 기대.

- 경제·산업적 측면

- 분자생물학적인 기법은 연구와 동시에 개발하여 상품화 한다면 선진국과 경쟁력 있는 상품으로서 국가 경쟁력을 상승을 기대할수 있음. 분자생물학적인 기법에 대한 연구개발시에 바로 상품화하여 외화 수입 효과가 가능. 새로운 진단 및 치료에 대한 연구개발이 분자생물학적인 기법에 바탕을 두고 진행되고 있으며 이에 대한 연구가 필요함.
- 새로운 유전자 치료제와 유전자 기법을 이용한 진단 및 치료방법등이 임상에 적용되고 있음
전신치료를 목적으로 하는 유전자 치료제에 대해서는 그 치료효과가 아직 미흡하나 국소적인 치료를 목적으로 하는 유전자 치료제에 대해서는 국내 및 선진외국에서 그 연구가 활발하며 이는 국제특허를 바탕으로 기술선점을 하는 다국적 생명과학 연구기업에서 신속하게 전개되어 이에 대한 기득권 확보를 위한 경쟁이 치열하며, 이에 대한 국내 기술의 확보가 시급한 실정임.
- 국내에서 개발된 유전자 관련 기술인 DNA chip 제작기술과 유전자 평가기술과 맞물려서 방사성 동위원소 치료시에 관련되는 유전자의 library를 구성한다면 post-genome 시대에 유전자의 기능을 평가하는 새로운 기술로서 자리잡을수 있을것으로 기대됨. 선진국의 경우 생명과학 연구기업인 Incyte, Affymatrix사에서 다양한 DNA chip에 대한 국제 특허를 바탕으로 기술 선점을 시도하고 있음.
- post-genome 시대에 유전자의 기능과 작용에 대한 연구가 절실히 필요하게 되었으며 방사선 치료와 방사성 동위원소 치료시에 반응하게 되는 유전자 기능체에 대한 연구는 새로운 분야로서 이에 대한 특허를 바탕으로 기술선점 및 경제적인 파급효과도 유도할 것으로 기대됨.

- 사회·문화적 측면

- 간암에서 폐암이 우리나라 암 발생을 1위로 변경된 시점에서 환경적인 요인의 측면이 강조되고 있으나 생체의 반응양상은 유전적인 요인에 의한 부분이 종양형성과정에 있어 중요한 인자이므로 종양 발생에 대한 새로운 연구 개발은 종양의 발생과정에 대한 이해의 폭을 증진시키고 환자의 치료와 진단을 통한 국민의 복지향상에 있어서 중요한 역할을 할것으로 기대됨.
- Human Genome Project(HGP)에 대한 연구가 발표되면서 유전자에 대한 국민의 관심도가 증가하였으며 이에 대한 국가차원에서의 연구개발에 대한 투자와 이와 관련한 성과에 대한 관심과 기대가 증가하여 이에 대한 국가차원에서의 집중적인 투자와 연구여건 확립이 절실하게 필요함.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. 세포신호전달 관련물질을 이용한 동위원소 표지화합물 합성 및 영상화 연구

가. 세포고사 영상화 기술 (Annexin V 영상)

나. p53유무에 따른 방사성동위원소 치료전후 대사영상용 방사성의약품 섭취율 및 대사 영상

2. 암세포를 대상으로 동위원소별 반응성 유전자군의 발굴

가. 뇌암, 폐암 및 유방암세포에서 I-131, Re-188 등 동위원소에 반응하는 유전자 탐색

나. 발굴유전자 활용기술 개발

다. Apoptosis & Signal Transduction 관련 연구의 Radioactive Microarray의 응용

IV. 연구개발결과

1. 세포신호전달 관련물질을 이용한 동위원소 표지화합물 합성 및 영상화 연구

가. 세포고사 영상화 기술 (Annexin V 영상)

방사성 동위원소가 표지된 Annexin V를 이용한 세포고사 영상화를 위하여 두가지 킬레이트로서 HYNIC과 Ethylenedicysteine을 제조하였으며, 이중 높은 표지수율과 안정성을 나타내는 HYNIC을 이용하여 HYNIC-Annexin V 접합체를 제조하고, 진단용 방사성동위원소인 ^{99m}Tc 를 표지하는 표지법을 확립하고 세포고사 유발 시험관 모델에서 세포고사 평가가 가능한지를 확인하였으며, 시험관내 안정성을 평가하여 생체 적용 가능성을 확인하였다. 세포고사 유발 동물 모델로서 간세포 세포고사 동물모델과 폐암세포의 방사선 치료 모델을 이용한 세포고사에서 ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V를 이용한 세포고사의 유용성과 임상 적용 가능성을 확인하였다.

나. p53유무에 따른 방사성동위원소 치료전후 대사영상용 방사성의약품 섭취율 및 대사 영상

1) p53 wild-type 과 p53 mutant-type 세포주에서 동위원소 처리 후 반응 양상 비교
:MCF7(p53wt)세포주가 MDA-MB-231(p53 mt)세포주보다 Re-188에 더 민감하게 반응, 세포주기 분석에서는 차이 없음.

2) p53 유전자 기능에 따른 세포주의 확립

가) MDA-MB-231(p53 mt)세포주를 이용한 p53 mutant-type 과 p53 wild-type 과발현

세포주 확립

나) MCF7(p53 wt)세포주를 이용한 p53 wild-type 과 p53 dominant negative mutant type 과발현 세포주 확립

3) p53에 따른 세포주의 Re-188 동위원소 치료 후 방사성 예민도와 섭취율 변화

가) p53 mutant-type 과 p53 wild-type 과발현 세포주(MDA-MB-231)

: mutant p53을 가진 세포주가 wild-type p53 세포주 보다 Re-188에 더 민감.

: Re-188 동위원소 처리 후 세포내 F-18-FLT 섭취율은 시간, 농도에 따라 감소.

나) p53 wild-type 과 p53 dominant negative mutant type 과발현 세포주(MCF7)

: mutant p53을 가진 세포주가 wild-type p53 세포주 보다 Re-188에 더 민감.

: Re-188 동위원소 처리 후 세포내 F-18-FDG 와 F-18-FET의 섭취율이 조사선량에 따라 증가.

: Re-188 동위원소 처리 후 p53 기능에 따른 F-18-FDG의 섭취율의 유의한 차이.

2. 암세포를 대상으로 동위원소별 반응성 유전자군의 발굴

가. 종양세포에서 I-131, Re-188등 방사성동위원소 반응유전자 탐색

1) Re-188 동위원소 처리 프로토콜 확립

2) 유전자 스크리닝과 분석 방법 확립

3) 유방암세포에서 Re-188 동위원소 처리 후 세포사멸 조건 확인

4) 유방암세포에서 Re-188 동위원소에 반응하는 유전자 탐색

나. 발굴유전자 활용기술 개발

발굴된 유전자의 분자핵의학 영상평가 기술로 이용하기 위하여 BCL2-interacting killer(apoptosis-inducing) 단백질의 발현평가가 가능할것으로 기초조사 되었으며, 암의 치료시에 치료효과의 평가방법으로서 종양의 Antisense-ODN의 섭취를 평가하고 종양세포의 살상효과를 Antisense-ODN의 섭취율의 감소 또는 증가에 따라서 치료제가 유효한지 그렇지 아니한지를 평가할 수 있는 방법으로 임상에 적용하여 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

다. Apoptosis & Signal Transduction 관련 연구의 Radioactive Microarray의 응용

(1) Apoptosis & Signal Transduction Microarray의 개발 및 실험적 적용

- 방사성동위원소를 이용한 Microarray기법의 확립 및 시험

(가) Apoptosis & Signal Transduction Microarray의 하드웨어 개발 및 적용

(나) Apoptosis & Signal Transduction Microarray test의 소프트웨어적 분석기술의 정립

(다) 유방암 환자에서 추출한 RNA (암세포, 백혈구)를 이용한 실험적 적용

(2) Apoptosis & Signal Transduction Microarray를 이용한 암의 진단

(조기진단 및 확진)

- 방사성동위원소의 섭취를 보이는 암과 보이지 않는 암의 유전자양상분석

(가) 유방암에 있어서의 유전자 조절의 특징 규명

(나) 유전자적 발현 양상과 생화학, 분자생물학적 기전과의 연관성 연구

(다) 임상진단법으로서의 예민도, 특이도, 재현도 향상 방법 고안

(라) 유방암 세포에서 베타방출동위원소 발굴 유전자군의 유전자 발현분석의 적용

V. 연구개발결과의 활용계획

1. 세포신호전달 관련물질을 이용한 동위원소 표지화합물 합성 및 영상화 연구

가. 세포고사 영상화 기술 (Annexin V 영상)

개발된 apoptosis를 영상화하는 기법은 지금까지 사용되던 침습적인 방법인 조직학적·해부학적인 방법 대신에 생체내에서 일어나는 현상을 핵의학적인 비침습적인 방법으로 영상화하여 진단에 사용되어 보다 많은 질병의 치료와 질병의 예후 판정에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 이러한 기술은 조직이식반응 평가, 심장 질환 평가, 종양 치료제 효과 분석 평가등의 다양한 질환에서 유용하게 사용될것으로 기대되며 충분한 전임상 연구를 통하여 임상적용이 가능할것으로 기대된다.

나. p53유무에 따른 방사성동위원소 치료전후 대사영상용 방사성의약품 섭취율 및 대사 영상

p53 에 따른 종양에 대한 새로운 이해를 바탕으로 다른 기초의학분야와 임상 분야에 의 적용

p53 유전자의 기능에 따른 베타 방출 방사선 동위원소의 치료 후 치료의 조기 평가 방법

p53과 연관된 종양에 대한 새로운 치료법과 진단방법의 개발

2. 암세포를 대상으로 동위원소별 반응성 유전자군의 발굴

가. 종양세포에서 I-131, Re-188등 방사성동위원소 반응유전자 탐색

동위원소 반응 유전자 탐색을 통한 새로운 target의 개발
새로운 유전적 target이 확보를 통한 동위원소 약품의 개발

나. 발굴유전자 활용기술 개발

방사성동위원소를 이용한 세포고사 영상화 기술은 다양한 임상질환에 대한 새로운 질병 평가 방법 및 치료 효과 평가 방법으로 사용될 수 있을 것으로 기대되며, 충분한 전임상 연구와 다양한 질환에서의 연구가 추가된다면 임상에 적용할 수 있는 기술로서 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

다. Apoptosis & Signal Transduction 관련 연구의 Radioactive Microarray의 응용
Apoptosis & Signal Transduction Microarray의 체계 구축

Apoptosis & Signal Transduction Microarray에 유전인자와 관련 단백질 발견
유전자 기능 규명으로 Apoptosis & Signal Transduction연구의 기초자료 제공
연구 결과의 database화로 국내 연구기관에 공급

S U M M A R Y

I. Title

Development of Molecular Nuclear Medicine Technology in apoptosis and signal transduction

II. Object and Necessity of Research

The purpose of this project is to develop molecular nuclear medicine technology in apoptosis and signal transduction. there are two cartegory, one is to synthesis of radiopharmaceuticals and to develop imaging technology that was associated with cell signal transduction related molecules. the other is to screen gene group upregulated or down-regulated by beta-radioisotope treatment and to develop application technology of molecular nuclear medicine using beta-irradiation response gene.

At first, we prepare radiolabeled Annexin V that bind to phosphatidylserine, moving from inner leaflet to outer leaflet during apoptosis, and develop imaging technology using radiolabeled Annexin V in apoptosis animal model.

We develope evaluation method for therapeutic effect of beta-irradiation according to p53 status using radiophamaceutical determining cellular metabolism. p53 gene mutation is important in cancer cell. Based on a new understanding for p53 gene function in normal tissue and natural cell death of cancer, it is necessary to study about signal mechanism related apoptosis and cell cycle in cancer cell according to p53 status. Study of signal mechanism in cancer related p53 was of wide application for another basic medicine and clinic part. We will now turn toward gene therapy and whether we can improve prognosis by p53.

So far, study of cellular response for low-dose beta-ray isotope is unclear. we have to evaluate cellular uptake change of radio-labelled metabolic compound and cellular response change of cell in cancer cell according to p53 status after beta-ray isotope treatment.

Research of cancer cell according to p53 status after beta-ray isotope treatment was estimated treatment effects after radiological treatment. we expected to development of a new technology in therapy and diagnosis of cancer related p53.

In relation to DNA chip manufacture and gene valuation skills, study of genes related radiation treatment is quite possibility that development of reporter system using genes may a new methods to evaluate function of genes.

Gene therapy and diagnosis is applicable to clinic. Active research continues in several laboratories worldwide. It is necessary to insurance of domestic technology about gene therapy.

Results of the gene searching will help us to determine the efficacy of radiation therapy and will guide further development of treatment genes.

Using DNA chip, we screen out gene groups which up- or down- regulated by beta irradiation of radioisotope, and mined gene groups or genes is used to developing new molecular nuclear medicine technology. we also develop and compare between radioactive microarray on the research related with apoptosis and signal transduction and DNA chip dataAs determining apoptotic cellular response in molecular level, we could introduce a new or alternative therapeutic modality and therapeutic response monitoring methodology.

III. Scope and Contents of the project

1. Development of imaging technology and synthesis of radiopharmaceuticals for cellular signal transduction molecules
 - 1) Development of Imaging technology of apoptosis (Annexin V image)
 - 2) Study of radiopharmaceuticals uptake and image in cancer cell line according to p53 status after radiation
2. Mining of beta-irradiation response gene groups or genes in tumor cell lines
 - 1) Searching for genes responded to I-131 and Re-188 in brain, lung and breast cancer cell
 - 2) Development of application technology for mining betairradiation response

gene groups or genes

- 3) application of radioactive microarray on the research related with apoptosis and signal transduction

IV. Results and Proposals for application

1. Development of imaging technology and synthesis of radiopharmaceuticals for cellular signal transduction molecules

- 1) Development of Imaging technology of apoptosis (Annexin V image)

For apoptosis nuclear imaging using radiolabeled Annexin V, we prepared two chelates, HYNIC and ethylenedicycysteine, to be conjugated with annexin V. HYNIC showed high radiolabeling yield with ^{99m}Tc -tricine and high stability in human serum. we established the preparation method for conjugation between HYNIC and annexin V and radiolabeling procedure of HYNIC-annexin V conjugate with ^{99m}Tc -tricine. To evaluate whether ^{99m}Tc -HYNIC-annexin V could be bound to apoptic cell, ^{99m}Tc -HYNIC-annexin V binding experiment was performed in dexamethasone induced thymocyte apoptosis model. we studied the usefulness and feasibility of clinical application of ^{99m}Tc -HYNIC-annexin V in hepatocyte specific apoptosis and radiation induced lung tumor apoptosis.

- 2) Study of radiopharmaceuticals uptake and image in cancer cell line according to p53 status after radiation

A. Comparison of cellular response in p53 wild-type and mutant-type cell line after radiation.

: MCF7(p53 wt) cell line is more sensitive than MDA-MB-231(p53 mt) cell line to Re-188, But cell cycle analysis is no difference.

B. Establishment of cell line according to p53 status.

a) p53 mutant-type and p53 wild-type overexpressed cell line using MDA-MB-231(p53 mt)

b) p53 wild-type and p53 dominant negative mutant type overexpressed cell line

using MCF7(p53 wt)

C. Effects of the p53 tumor suppressor gene on radiation sensitivity and cell uptake after Re-188 treatment

- a) mutant-type and overexpressed wild-type p53 cell line (MDA-MB-231)
 - : MDA-MB-231 cell line containing mutant p53 gene is more sensitive than MDA-MB-231 cell line containing wild-type p53 to Re-188.
 - : After Re-188 treatment, F-18-FLT uptake decreased in dose and time dependent.
- b) wild-type and dominant negative mutant type p53 cell line (MCF7)
 - : MCF7 cell line containing mutant p53 gene is more sensitive than MCF7 cell line containing wild-type p53 to Re-188.
 - : After Re-188 treatment, F-18-FDG and F-18-FET uptake significantly increased in dose and time dependent.
 - : F-18-FDG uptake is a great difference between p53 status after Re-188 treatment.

2. Investigation of genes responded to isotope in cancer cell

- 1) Searching for genes responded to I-131 and Re-188 in brain, lung and breast cancer cell
 - A. Establishment of protocol for Re-188 treatment
 - B. Establishment of Methods for gene screening and analysis
 - C. Identification of apoptosis condition in breast cancer cell after Re-188 treatment
 - D. searching for genes responded to Re-188 in breast cancer cell
- 2) Development of application technology for mining beta-irradiation response gene groups or genes

For application of imaging technology for mined genes, we choiced BCL2-interacting killer(apoptosis-inducing) protein, this protein level was reduced significant marnitudes. It could be applied as antisense imaging technology for evaluation of therapheutic efficacy to beta-irradiation therapy, We look up the technologies about the preparation and application of radiolabeled antisense Oligonucleotides.

3) Application of radioactive microarray on the research related with apoptosis and signal transduction

1. Development and Pilot Study of Microarray on Apoptosis & Signal Transduction

- Establishment of Microarray Technology Using Radioisotopes

A. Development and Pilot Study for Hardware of Microarray on Apoptosis & Signal Transduction

B. Development and Pilot Study for Software of Microarray Test on Apoptosis & Signal Transduction

C. Pilot Study of Microarray using Total RNA Prepared from Breast Cancer Patients

2. Diagnosis of Cancer for Microarray on Apoptosis & Signal Transduction (early detection and conformation)

- Analysis of Gene Expression Profile in accordance with the Uptake of Radioisotopes

A. Characterization of Gene Regulation in Breast Cancer

B. Gene Expression Profile and Biochemistry, Molecular Biological Mechanism Associated study

C. Improvements of Methodological Sensitivity, Specificity, Reproducibility as a Clinical Application

D. Application of Analytic Gene Expression for β -ray Emitting Radioisotopes in Breast Cancer Cells

V. The Application of Research Results

● Apoptosis nuclear imaging using ^{99m}Tc -HYNIC-annexin V is non-invasive imaging technology for representing phenomenon of molecular and cellular level. Apoptosis nuclear imaging using ^{99m}Tc -HYNIC-annexin V, alternative to conventional invasive histological and anatomical method, could be used for the evaluation of therapeutic efficacy and prognosis of diseases after therapy. this technology could be used as the methodology for evaluation in successfulness of organ transplantation, identification of cardiac diseases, and therapeutic

efficacy of tumor chemotherapy and radiotherapy. As carrying out further pre-clinical approach, apoptosis nuclear imaging using ^{99m}Tc -HYNIC-annexin V could be effectively used to clinical application.

● Study of radiopharmaceuticals uptake and image in cancer cell line according to p53 status after radiation

- A new understanding for tumor according p53 status.
- Evaluation and diagnosis of therapy after beta-ray isotope treatment according p53 status.
- Development of a new therapy and diagnosis methods for tumor related p53.

Investigation of genes responded to isotope in cancer cell

● Searching for genes responded to I-131 and Re-188 in brain, lung and breast cancer cell

- Development of a new target through searching for genes responded to isotope
- Development of radio-medicine based on a new genetic targets.

● Development of application technology for mining beta-irradiation response gene groups or genes

BCL2-interacting killer(apoptosis-inducing) protein level could be evaluated by antisense oligonucleotide thechnology. The changes of uptake of rardiolabeled antisense oligonucleotide could be used as monitoring methodology for the evaluation of therapeutic response to tumor radionuclide therapy. This technology would be perform further pre-clinial experiments. If these result were merged and organized, this technology would be used as monitoring method for therapeutic response in clinical radionuclide therapy.

● Application of radioactive microarray on the research related with apoptosis and signal transduction

Construction of Experimental System for Apoptosis & Signal Transduction Microarray

Discovery of Unique Proteins related with the result of Apoptosis & Signal Transduction Microarray

Accumulation of Basic Data Base of Bioinformatics by characterizing the function of genes

Intramural and extramural collaboration of the result of genomic research database

CONTENTS

Chapter 1. Introduction-----	1
Chapter 2. Current State of the Research and Development-----	6
Chapter 3. Content and Results-----	13
1) Development of imaging technology and synthesis of radiopharmaceuticals for cellular signal transduction molecules -----	13
(1) Development of Imaging technology of apoptosis (Annexin V image)-----	13
(2) Study of radiopharmaceuticals uptake and image in cancer cell line according to p53 status after radiation -----	25
2) Mining of beta-irradiation response gene groups or genes in tumor cell lines-----	48
(1) Searching for genes responded to I-131 and Re-188 in brain, lung and breast cancer cell -----	48
(2) Development of application technology for mining betairradiation response gene groups or genes -----	53
(3) Application of radioactive microarray on the research related with apoptosis and signal transduction -----	62
Chapter 4. The extent of research achievement and contribution-----	70
Chapter 5. The application of research results-----	76
Chapter 6. References -----	77

목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요	1
제 1절 연구 개발의 목적	1
제 2절 연구 개발의 필요성	1
제 3 절 연구개발의 범위	4
제 2 장 국내·외 기술개발 현황	6
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	13
제 1절 세포고사 및 신호전달 관련 물질을 이용한 동위원소 표지화합물의 합성 및 영상화 연구	13
1. 세포고사 영상화 기술(Annexin V 영상)	13
2. p53 유무에 따른 방사성동위원소 치료전후 대상영상용 방사성의약품 섭취율 및 대사 영상	25
제 2절 암세포를 대상으로 동위원소별 반응성 유전자군의 발굴	48
1. 뇌암, 폐암, 유방암 세포에서 I-131, Re-188등 동위원소에 반응하는 유전자 탐색	48
2. 발굴 유전자 활용기술 개발	53
3. 세포고사 및 신호전달체계 관련 radioactive microarray의 응용	62
제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도	70
1. 연구개발 목표 달성도	70

2. 관련 분야에의 기여도	73
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	76
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보	77

표 목 차

표. 1. Biodistribution of ^{99m}Tc -labeled oligonucleotide in normal Balb/c mice(%ID/g) 59

그림 목 차

그림 1. The structure of HYNIC. -----	14
그림 2. The synthesis scheme of Ethylenedicysteine(EC)-----	15
그림 3. ^{99m} Tc-HYNIC-Annexin V의 구조도-----	17
그림 4. ^{99m} Tc-HYNIC-Annexin V의 방사박층크로마토그램 -----	18
그림 5. ^{99m} Tc-HYNIC-Annexin V의 혈청내 안정성 평가 -----	19
그림 6. FACS analysis of Apoptosis in Thymocyte After Dexamethason treatment-----	20
그림 7. Comparision of between FACS analysis and In Vitro Binding of ^{99m} Tc-HYNIC-Annexin V in Thymocyte Apoptosis Model -----	20
그림 8. 정상마우스에서 ^{99m} Tc-HYNIC-Annexin V의 시간대별 생체분포-----	21
그림 9. ^{99m} Tc-HYNIC-Annexin V를 이용하여 간세포 특이적인 세포고사 영상화-----	22
그림 10. 간세포 특이적인 세포고사 영상분석에서 ^{99m} Tc-HYNIC-Annexin V의 장기별 섭취율 변화 -----	23
그림 11. ^{99m} Tc-HYNIC-Annexin V를 이용한 방사선 치료에 의한 폐암 세포고사 영상화-----	24
그림 12. Evaluation of cell viability by cytogram analysis of propidium iodide uptake in MCF7(cell line contained p53 wt) -----	26
그림 13. Evaluation of cell viability by cytogram analysis of propidium iodide uptake in MDA-MB-231(cell line contained p53 mt) -----	26
그림 14. The DNA histogram in MCF7 (cell line contained p53 wt)-----	27

그림 15. The DNA histogram in MDA-MB-231(cell line contained p53 mt)	28
그림 16. Cytograms of Annexin V binding vs. Propidium iodide uptake of MCF7	29
그림 17. Cytograms of Annexin V binding vs. Propidium iodide uptake of MDA-MB-231	29
그림 18. Cloning of p53 wild type gene in pcDNA 3.1/HA vector	30
그림 19. Western blot analysis of expression of p53 using Anti-HA in MDA-MB-231(p53 mt ; pcDNA) and MDA-MB-231(p53 wt ; p53WT)	31
그림 20. Western blot analysis of expression of p53 and p21 in MDA-MB-231(p53 mt ; pcDNA) and MDA-MB-231(p53 wt ; p53WT) by 4 Gy γ -irradiation.	31
그림 21. Cloning p53 Dominant mutant type gene in pCMV-Neo-Bam vecto	32
그림 22. Western blot analysis of expression of p53, phospho-p53(ser 15) in MCF7(p53 wt) and MCF7 (p53 mt) by γ -irradiation and β -irradiation.	33
그림 23. Cytogram of Annexin V binding vs. Propidium iodide uptake of MDA-MB-231(p53 wt) in 4 hr beta-irradiation.	35
그림 24. Cytogram of Annexin V binding vs. Propidium iodide uptake of MDA-MB-231(p53 mt) in 4 hr beta-irradiation.	35
그림 25. The DNA histogram of MDA-MB-231(p53 wt) in 4 hr beta-irradiation.	37
그림 26. The DNA histogram of MDA-MB-231(p53 mt) in 4 hr beta-irradiation.	38
그림 27. Time dependency of FLT uptakes in MDA-MB-231(p53 mt ; pcDNA) and MDA-MB-231(p53 wt ; p53WT) by 4 hour β -irradiation.	39
그림 28. Dose dependency of FLT uptakes in MDA-MB-231(p53 mt ; pcDNA) and MDA-MB-231(p53 wt ; p53WT) by 4 hour β -irradiation.	39

그림 29. Evaluation of cell viability by Trypan blue dye exclusion test in MCF7 (p53 wt) and MCF7 (p53 mt).	-----40
그림 30. Cytogram of Annexin V binding vs. Propidium iodide uptake of MCF7(p53 wt) and MCF7(p53 mt)	-----41
그림 31. Time dependency of FLT uptakes in MCF7(p53 wt) and MCF7(p53 mt) by β -irradiation.	-----42
그림 32. Time dependency of FET uptakes in MCF7(p53 wt) and MCF7(p53 mt) by β -irradiation.	-----43
그림 33. Time dependency of FET uptakes in live cells after β -irradiation.	-----44
그림 34. Time dependency of FDG uptakes in MCF7(p53 wt) and MCF7(p53 mt) by β -irradiation.	-----46
그림 35. Time dependency of FDG uptakes in live cells after β -irradiation.	-----47
그림 36. Evaluation of cell viability and apoptosis fraction in MCF7.	-----52
그림 37. Sequences of antisense oligonucleotide of HSV1-tk gene	-----55
그림 38. Scheme of the conjugation of NHS-MAG2 GABA to oligonucleotide	-----55
그림 39. Scheme of the labeling of ^{99m}Tc to MAG2 GABA- oligonucleotide	-----56
그림 40. Radiochromatograms obtained by gel filtration column P-4 analysis of ^{99m}Tc -MAG2 GABA- oligonucleotide	-----56
그림 41. PAGE Electrophoretogram of ^{99m}Tc - MAG2 GABA- oligonucleotide	-----57
그림 42. Cellular Uptake of ^{99m}Tc -HSV1-Tk Antisense oligonucleotide	-----57

그림 43. Biodistribution results in normal mice 15min, 60min postintravenous administration of ^{99m}Tc labeled oligonucleotide -----60

그림 44. Gamma Scintigraphic image of ^{99m}Tc -HSV1-tk Antisense oligonucleotide-----61

그림 45. Cancer Microarray Membrane for Radioactive cDNA Microarray -----63

그림 46. RA와 AA의 조합의 처리 시 up-regulation되는 gene들-----67

그림 47. RA와 AA의 조합의 처리 시 down-regulation되는 gene들 -----67

그림 48. Radioactive Probes의 비교(1) -----68

그림 49. Radioactive Probes의 비교(2) -----68

그림 50. 유방암환자에게서 up-regulation과 down-regulation되는 gene들 -----69

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

본 과제의 목표는 세포고사 및 신호전달 관련 분자핵의학 기술로서 세포고사를 영상화 하는 방법으로서 세포고사시 세포막의 외부로 노출되는 인지질인 phosphatidylserine (PS)에 특이적으로 결합하는 Annexin V에 동위원소를 표지하는 기법을 개발하고 이를 이용하여 세포고사를 핵영상으로 평가할수 있는 기법을 개발하고 p53 유무에 따른 치료용 방사성 동위원소를 치료효과를 대사영상용 방사성의약품으로 평가하는 기법을 개발하여 세포고사를 평가하는 기법을 개발하고자 하였으며, 종양세포에서 베타 방출 방사성동위원소에 반응하는 유전자를 유전자 칩을 이용하여 발굴하며 이를 Radioactive Microarray를 이용하여 연구하며, 발굴된 유전자를 이용한 새로운 치료반응 유전자 발현 평가를 핵영상으로 평가하는 방법을 개발하여 분자 수준의 세포고사 반응 양상을 핵의학적인 기법으로 평가함으로써 효과적인 치료법의 개발 및 치료효과 평가에 새로운 방법론을 제시하고자 하였다.

제 2 절 연구개발의 필요성

- 기술적 측면

- 분자생물학적 기술이 급속도로 발전되어 임상의학의 기초에 대한 이해의 폭을 넓힘.
- 분자생물학적인 기법을 바탕으로 방사성 동위원소를 이용한 진단방법과 치료방법에 대한 국민의 관심고조.
분자생물학적인 기법을 이용하여 기존의 진단 및 치료방법의 한계를 극복하고자하는 새로운 진단 및 치료방법의 요구가 증가.
- 방사성동위원소를 이용한 기술의 개발과 습득으로 기초의학에 대한 이해의 폭을 증가. 유전자정보를 이용한 생체에 대한 새로운 이해를 바탕으로 생체에 적용가능한 모든 기술이 총망라되고 있는 실정에서 방사성 동위원소를 이용한 핵의학적인 방법을 통한 연구는 기존의 생화학적인 조직학적인 방법의 단점을 극복하고 핵 영상을 통한 비침습적인 방법으로 생체현상을 규명할 수 있는 새로운 도구를 마련할 수 있는 계기가 되고 있음.
- 다학제간 공동연구의 장을 열수 있음. 의학외에 생명공학, 원자력, 공학, 물리, 약학,

보건물리 등 다 학제간의 공동연구가 가능

- 급속히 발전하는 생명과학분야에 있어서 선진국 수준의 기술 확보를 위해서는 신기술에 대한 연구가 시급. 원자력 선진국의 경우 원자력의 평화적 이용사업과 발맞추어서 이를 이용한 생명과학 연구에 많은 투자를 하고 있는 실정임. 새로운 생명과학 기술의 선점은 국가 기술 경제력을 높일뿐만 아니라 경제, 사회적인 측면에 있어서도 필요한 연구 과제임.
- 새로운 진단 및 치료법의 개발에 있어서 산업화를 위한 산학연 공동연구개발 및 산업화가 가능함
- 세포고사를 영상화하는 방법의 개발은 비침습적인 방법으로 현재까지 임상에 있어서 연구되고 고려되어야하는 미진한 부분에 대한 새로운 이해의 폭을 제시할 것으로 기대.
- 종양 및 정상 세포에서의 세포내 신호전달 체계에 대한 연구는 1980년대부터 중반부터 활발하게 시작되어서 생명현상의 이해에 대한 중요한 방법으로 평가되고 있으며 이를 임상 환자에 적용하고자 하는 치료 및 진단이 종양세포와 정상세포간의 신호전달체계의 오류등과 차이점을 규명함으로써 새로운 치료제와 진단방법의 개발이 가시화 되고 있다.
- 종양에 대한 현재까지의 연구결과를 바탕으로 유전자 chip을 이용하여 종양의 형성 및 정상세포와의 차이를 종합적으로 구별하여 새로운 치료와 진단의 도구를 개발가능. 유전자 chip을 이용한 새로운 기능을 가진 유전자를 발굴하여 기존의 치료와 진단 방법에 추가됨으로서 임상에서 환자의 치료와 질병의 예후를 판단하는 중요한 도구로 사용될수 있을것으로 기대.
- 종양세포에서 p53 유전자의 변이는 상당한 부분에서 중요한 단계로 인식되고 있으며 이에 대한 정확한 기전이 아직 불분명한 상태임.
- p53 유전자에 대한 새로운 이해를 바탕으로 종양의 자연적인 세포사나 정상적인 조직 내에서의 기능을 규명함으로써 종양의 치료와 진단에 있어서 새로운 방법을 개발할 수 있을것으로 기대.

- 경제·산업적 측면

- 분자생물학적인 기법은 연구와 동시에 개발하여 상품화 한다면 선진국과 경쟁력있는 상품으로서 국가 경쟁력을 상승을 기대할수 있음
- 분자생물학적인 기법에 대한 연구개발시에 바로 상품화하여 외화 수입 효과가 가능

새로운 진단 및 치료에 대한 연구개발이 분자생물학적인 기법에 바탕을 두고 진행되고 있으며 이에 대한 연구가 필요함.

- 새로운 유전자 치료제와 유전자 기법을 이용한 진단 및 치료방법등이 임상에 적용되고 있음

전신치료를 목적으로 하는 유전자 치료제에 대해서는 그 치료효과가 아직 미흡하나 국소적인 치료를 목적으로 하는 유전자 치료제에 대해서는 국내 및 선진외국에서 그 연구가 활발하며 이는 국제특허를 바탕으로 기술선점을 하는 다국적 생명과학 연구기업에서 신속하게 전개되어 이에 대한 기득권 확보를 위한 경쟁이 치열하며, 이에 대한 국내 기술의 확보가 시급한 실정임.

- 국내에서 개발된 유전자 관련 기술인 DNA chip 제작기술과 유전자 평가기술과 맞물려서 방사성 동위원소 치료시에 관련되는 유전자의 library를 구성한다면 post-genome 시대에 유전자의 기능을 평가하는 새로운 기술로서 자리잡을수 있을것으로 기대됨
선진국의 경우 생명과학 연구기업인 Incyte, Affymatrix사에서 다양한 DNA chip에 대한 국제 특허를 바탕으로 기술 선점을 시도하고 있음

- post-genome 시대에 유전자의 기능과 작용에 대한 연구가 절실히 필요하게 되었으며 방사선 치료와 방사성 동위원소 치료시에 반응하게 되는 유전자 기능체에 대한 연구는 새로운 분야로서 이에 대한 특허를 바탕으로 기술선점 및 경제적인 파급효과도 유도할것으로 기대됨

- 사회·문화적 측면

- 간암에서 폐암이 우리나라 암 발생을 1위로 변경된 시점에서 환경적인 요인의 측면이 강조되고 있으나 생체의 반응양상은 유전적인 요인에 의한 부분이 종양형성과정에 있어 중요한 인자이므로 종양 발생에 대한 새로운 연구 개발은 종양의 발생과정에 대한 이해의 폭을 증진시키고 환자의 치료와 진단을 통한 국민의 복지향상에 있어서 중요한 역할을 할것으로 기대됨.
- Human Genome Project(HGP)에 대한 연구가 발표되면서 유전자에 대한 국민의 관심도가 증가하였으며 이에 대한 국가차원에서의 연구개발에 대한 투자와 이와 관련한 성과에 대한 관심과 기대가 증가하여 이에 대한 국가차원에서의 집중적인 투자와 연구여건 확립이 절실하게 필요함

제 3 절 연구개발의 범위

1. 세포신호전달 관련물질을 이용한 동위원소 표지화합물 합성 및 영상화 연구

가. 세포고사 영상화 기술 (Annexin V 영상)

- (1) Annexin V 2가지이상의 동위원소 표지를 위한 킬레이트 개발
- (2) Annexin V 방사성 동위원소 표지법 개발
- (3) 동위원소 표지 Annexin V 시험관내 안정성 실험

나. p53유무에 따른 방사성동위원소 치료전후 대사영상용 방사성의약품 섭취율 및 대사 영상

- (1) p53 wild type 세포주 제조 및 p53 mutant type 세포주 선정 및 mutant 세포주 의 경우 Wt p53 유전자의 이입유도
- (2) p53 유무에 따른 방사성 동위원소치료 전 후 세포의 대사영상방사표지화합물의 섭취율 평가

2. 암세포를 대상으로 동위원소별 반응성 유전자군의 발굴

가. 종양세포에서 베타방출 방사성동위원소 반응유전자 탐색

- (1) 저선량의 I-131, Re-188 동위원소 처리 프로토콜개발
- (2) 방사성 동위원소 반응 유전자 스크리닝 방법 및 분석 방법 확립
- (3) 암 세포에서 저선량의 I-131, Re-188 동위원소 처리 후 대상으로 유전자 chip을 이용한 방사선 동위원소 반응유전자 탐색

나. 발굴유전자 활용기술 개발

- (1) 발굴 유전자 이용 효소-기질 시스템 또는 Antisense Oligonucleotide를 이용한 시스템 기술검토

다. 세포고사 및 신호전달체계 관련 연구에 Radioactive Microarray 응용

- (1) Apoptosis & Signal Transduction Microarray를 개발 및 실험적 적용
 - (가) Apoptosis & Signal Transduction Microarray의 하드웨어를 개발하고 적용
 - (나) Apoptosis & Signal Transduction Microarray test의 소프트웨어적 분석기술 정립
 - (다) 유방암 환자에서 추출한 RNA (암세포, 백혈구)를 이용한 실험적 적용

(2) Apoptosis & Signal Transduction Microarray를 이용하여 암의 조기 진단 및
확진에 이용

(가) 유방암에 있어서의 유전자 조절의 특징 규명

(나) 유전자적 발현 양상과 생화학, 분자생물학적 기전과의 연관성을 연구

(다) 임상진단법으로서의 예민도, 특이도, 재현도 향상 방법 고안

(라) 유방암 세포에서 베타방출동위원소 발광 유전자군의 유전자 발현분석의 적용

제 2 장 국내·외 기술개발 현황

1. 세포신호전달 관련물질을 이용한 동위원소 표지화합물 합성 및 영상화 연구

가. 세포고사 영상화 기술 (Annexin V 영상)

- Apoptosis를 핵의학적인 방법으로 영상화 하고자 하는 연구가 최근에 많이 개발되어오고 있다. apoptosis과정에서 비교적 초기에 나타나는 현상인 phosphatidylserine (PS)을 세포막 외부로의 노출현상을 이용하는 것인데 PS의 경우 정상 세포의 경우에는 세포막의 안쪽에 존재하고 있는 인지질이나 세포막의 blebbing 현상과 nucleosome fragment가 생성되기 이전인 apoptosis의 초기과정에서 세포막의 바깥으로 노출되어 주변의 macrophage에 의해서 인지되어 탐식되는 결과를 초래한다. 여기에 노출된 PS에 특이적으로 결합하는 사람의 내재 단백질중 하나인 Annexin V에 방사성 동위원소를 표지하여 apoptosis를 영상화하고자 하는 시도가 연구되고 있다. 이러한 영상연구를 통해서 뇌에서 발생하는 hypoxia에 의한 apoptosis 부분에 대한 평가가 가능하고 장기의 이식과정에서 나타나는 면역거부반응을 초기에 판정함으로써 그 기대가치가 증가되고 있다.
- Blankenberge 등의 연구에서는 Annexin V에 Tc-99m를 표지하여 anti-Fas ligand를 처리함으로써 간에 apoptosis를 유발시킨 동물모델에서 그 유용성을 확인하였으며 heterotropic cardiac allograft를 이식한 모델에서 acute rejection의 평가방법으로서 유용함을 확인하였다. 또한 Annexin V에 직접적으로 표지하는 경우와 다양한 킬레이트를 사용하여 표지한 경우로 하여 생체분포를 평가하여 가장 적합한 표지화합물을 개발하고자 하였다.
- Hofstra등은 acute myocardial infarction에 있어 심근의 경색부위에 방사표지 Annexin V가 국소적으로 집적되어서 이러한 질병의 진단에 적합한 도구로서 사용될수 있음을 시사하였다.
- Apoptosis를 핵의학적으로 영상화하는 방법은 종양의 방사성동위원소와 방사선 조사에 의한 치료와 화학적 치료시에 발생하는 종양의 반응정도를 평가함으로써 임상에서 환자의 치료효과 판정과 예후를 평가할수 있는 중요한 도구로 사용될 수 있을것으로 생각된다.
- 현재까지 국내에서 Annexin V를 이용한 세포고사를 영상화하는 기술은 보고된 바 없는 것으로 조사되었으며, 본원에서 유일하게 진행되고 있는 것으로 확인되었다. 세포고사를 정확하게 분석, 평가하는 방법은 아니지만 종양세포의 치료시에 발생하는 세포수의 감소 또는 세포의 물질대사를 평가하는 방법으로는 기존에 포도당 대사를 분석

하는 FDG와 아미노산 대사를 분석할수 있는 PET 화합물인 FET 그리고 핵산대사를 평가할수 있는 FLT 등이 종양의 화학치료와 방사선 치료시에 섭취율의 감소와 관련된 연구 결과가 보고된 것으로 조사결과 확인 되었다. 그러나 세포고사를 평가하는 기법이라고 하기에는 비특이적인 평가법이며, 세포고사를 평가하는 방법으로는 국내에서 방사성동위원소를 표지한 annexin V를 이용한 평가기술이 최신기술이라 할 수 있다.

- 선진국에서는 세포고사 영상화 기반 기술 확립(표지법 개발, 다양한 킬레이트 개발) 다양한 실험동물 모델에서 세포고사 영상을 위한 전임상 연구 시행, 임상적용을 위한 선량평가 및 phase I 연구 시행중에 있으며, 국내의 기술 수준은 세포고사 영상화 기반 기술 개발에 성공하였으며 다양한 실험동물 모델에서 전임상 연구 시행중에 있고, 임상적용을 위한 추가적인 연구가 필요한 것으로 조사되었다.

나. p53유무에 따른 방사성동위원소 치료전후 대사영상용 방사성의약품 섭취율 및 대사 영상

- p53 종양억제 유전자는 이론적으로 매우 우수한 유전자치료 방법이다. 이 유전자를 도입하면 종양세포만을 선택적으로 억제할 수 있고, 정상세포에 미치는 영향을 최소화할 수 있다. 게다가 종양의 치료를 기대할 수 있을 뿐만 아니라 종양의 진행을 예방하는 효과도 있다. 그러나 이의 임상 적용을 위하여 vector의 개발과 세포내 주입 방법의 개발등 몇 가지 넘어야 할 난관이 아직도 남아 있으며, 또 p53으로 치료가 불가능한 종양도 많으나, 우리나라 사람에게 흔한 위암, 폐암, 대장암, 유방암 등은 많은 예에서 p53의 변이가 동반되므로 p53 유전자는 가장 보편적으로 사용할 수 있는 종양억제 유전자이다. p53을 이용한 치료적 임상시험은 MD Anderson 암센터의 Dr. Roth팀에서 retroviral vector 를 이용하여 시도되고 있다.

- p53과 같은 종양억제 단백질들은 그 이름 그대로 암세포의 발생을 억제하는 단백질들이다. 이들은 주로 세포분열이 무분별하게 일어나지 못하도록 엄격하게 규제하는 일을 한다. p53 단백질의 경우 세포 DNA에 손상이 발생하였을 때 손상이 다 수선되기 전에 세포분열이 진행되지 못하도록 하며 수선이 어려울 경우 아포토시스 (apoptosis) 및 세포주기 조절에 의해 세포가 스스로 사멸하거나 수선이 되도록 함.

- 외부 방사선의 감수성에 대한 p53의 기능은 세포사, 세포주기 조절 및 세포 손상 수복에 있어 중요한 역할을 함이 알려져 있으며 방사선에 의한 세포장애 진행과정에서 p53, p21등의 유전자가 발현되며, 이 중 p53은 종양 억제 유전자 (tumor suppressor gene)로서 방사선 조사나 화학요법제와 같은 DNA 손상에 반응하여 각종의 유전자를 발현시키는 활성전달매개체(transcriptional activator)로서 세포고사 매개 유전자를 활성화하는 유전적 감응장치(genetic switch)로서 생각되고 있다. 이 유전자가 발현되지

않는 종양세포는 방사선 조사나 화학요법에 대한 저항성이 크게 증가하며 이러한 종양세포의 저항성은 세포고사를 억제하는 돌연변이에 기인하는 것으로 생각된다. 방사선 조사 후 p53에 의해 발현이 증가된 p21은 CDK(cyclin-dependent kinase)들의 활성을 억제함으로써 세포주기 지체 현상(cell cycle arrest)을 유도한다고 여겨진다. (Andrei V. Gudkov and Elena A. Komarova, Nature reviews, 2003, volume 3/ Karen H. Vousden and Xin Lu, Nature reviews, 2002, volume 2)

- 내부 방사선에 대한 세포반응 양상에 연구에 있어 저선량의 베타선 방출 방사성 동위원소에 대하여 p53 유무에 따른 세포주기와 세포고사와 관련된 기전은 아직 불분명하여 이에 따른 세포내의 대사구성성분에 대한 섭취율의 변화를 방사성 동위원소 표지 화합물을 이용한 평가와 대사정량 분석에 대한 연구는 미비한 것으로 조사되었다. external radiation, chemotherapeutic agent에 대한 p53유무에 따른 세포주기와 세포고사의 기전 연구(Magali Olivier et al, Molecular Carcinogenesis, 1998, 23/ Saijun Fan et al, Cancer Research, 1995/ Rebecca Haffner and Moshe Oren, Current Opinion in Genetics and Development, 1995, 5)를 바탕으로 베타선 방출 방사성 동위원소에 대한 기전 연구를 비교 할 수 있을 것으로 기대된다.

2. 암세포를 대상으로 동위원소별 반응성 유전자군의 발굴

가. 뇌암, 폐암 및 유방암세포에서 I-131, Re-188 등 동위원소에 반응하는 유전자 탐색

- 외부 방사선에 의해 반응하는 유전자에 대한 연구는 미국 NIH의 Dr. Fornace등에 의해 연구가 1999년도부터 시도되었지만 방사성동위원소의 반응유전자를 검색하고 이의 단백질 발현을 확인, 이를 대상으로 하는 영상용 target의 개발 시도는 이루어지고 있지 않은 실정임.
- 유전자 발현 검색을 위하여 개발된 cDNA microarray chip은 미국 Stanford 대학에서 처음 개발되어 6,100개의 모든 효모 유전자들을 이용한 cDNA microarray chip을 만드는데 성공
- 미국 국립보건원의 암연구소에서 주도하고 있는 cancer genome anatomy project (CGAP)는 cDNA microarray 기술을 이용하여 종양조직에서 발현하는 유전자의 profile을 작성 중에 있다. 현재 만개 내지 이만 여개의 인체 유전자의 발현을 검색하여 암의 원인이 되는 유전자들을 찾는 대규모 사업을 수행되고 있음.
- 유전체를 이용한 향후 질병연구가 고부가가치 상품이므로 이곳에 대한 연구투자가 막대한 상황이며, 현재까지 방사선 및 동위원소 이용분야에서의 유전체 및 단백질체에 대한 총체적인 정보화 사업은 국외에서도 이루어지고 있지 않은 실정임.

- Genome (유전체) project는 한국인에 호발하는 위암 및 간암을 대상으로 2000년도 부터 프론티어 사업으로 10년 과제로 시행되고 있으며 Proteome (단백질) project는 2002년경에 시작될 것으로 예측되고 있어 생명과학분야에 있어서 이러한 연구는 향후 선도적 연구사업으로 대두될 것임: 국내에서도 스탠포드대학에서 유전자칩 개발에 참여했던 한양대 황승용 박사를 비롯하여 3-4곳에서 유전자칩 제작장비를 운용중에 있음. 아직 기술접목 단계이며 연구목적이나 상업화에 성공한 곳은 없다. 하지만 국내에서도 oligonucleotide 칩이나 질환 검색용 칩등에서 충분히 아이디어를 통한 기술 및 상품개발이 가능할 것임.
- 방사선 분야는 국소적으로 방사선 치료분야에서 유전체 연구를 수행하는 것 이외에 총괄적인 방사선 반응 유전체 및 단백질 정보를 Database하는 경우는 전무한 상태임.
- Apoptosis 관련 유전자 chip을 이용하여 방사선 치료 전후 변화된 유전자의 기능을 분석함으로써 세포고사의 기전을 이해 할 수 있을 것으로 기대한다. 또한 앞으로 그 유전자의 단백질을 이용한 reporting system의 개발을 기대할 수 있다. 따라서 관련 유전자 chip의 검증이 연구 내용에 주요하다고 판단된다.
- 핵영상에 이용되고 있는 다양한 유전자 target에도 불구하고 아직 암세포 특이적 또는 organ 특이적 핵영상용 표지자는 개발되어 있지 않음.
- 외부 방사선에 의해 반응하는 유전자에 대한 연구는 미국 NIH의 Dr. Fornace등에 의해 연구가 1999년도부터 시도되었지만 방사성동위원소의 반응유전자를 검색하고 이의 단백 발현을 확인, 이를 대상으로 하는 영상용 target의 개발 시도는 이루어지고 있지 않은 실정임.
- 유전자 발현 검색을 위하여 개발된 cDNA microarray chip은 미국 Stanford 대학에서 처음 개발되어 6,100개의 모든 효모 유전자들을 이용한 cDNA microarray chip을 만드는데 성공
- 미국 국립보건원의 암연구소에서 주도하고 있는 cancer genome anatomy project (CGAP)는 cDNA microarray 기술을 이용하여 종양조직에서 발현하는 유전자의 profile 을 작성중에 있다. 현재 만개 내지 이만 여개의 인체 유전자의 발현을 검색하여 암의 원인이 되는 유전자들을 찾는 대규모 사업을 수행되고 있음.
- 유전체를 이용한 향후 질병연구가 고부가가치 상품이므로 이곳에 대한 연구투자가 막대한 상황임.
- 현재까지 방사선 및 동위원소 이용분야에서의 유전체 및 단백질체에 대한 총체적인 정보화 사업은 국외에서도 이루어지고 있지 않은 실정임.
- Genome (유전체) project는 한국인에 호발하는 위암 및 간암을 대상으로 2000년도 부터 프론티어 사업으로 10년 과제로 시행되고 있으며 Proteome (단백질) project는 2002년경에 시작될 것으로 예측되고 있어 생명과학분야에 있어서 이러한 연구는 향후

선도적 연구사업으로 대두될 것임: 국내에서도 스탠포드대학에서 유전자칩 개발에 참여했던 한양대 황승용 박사를 비롯하여 3-4곳에서 유전자칩 제작장비를 운용중에 있음. 아직 기술접목 단계이며 연구목적이나 상업화에 성공한 곳은 없다. 하지만 국내에서도 oligonucleotide 칩이나 질환 검색용 칩등에서 충분히 아이디어를 통한 기술 및 상품개발이 가능할 것임.

- 국내에서는 한국생명공학연구원이 중심이 되어 산업계와 학계를 연계하여 게놈연구체계를 구축하여 국가적인 사업으로 추진하고 있는 “인간유전체기능연구사업”은 한국인에게 특히 다발하고 있는 질환, 즉 위암과 간암을 대상으로 유전자 및 단백질군을 도출하고, 이를 통한 진단법, 신약약품 및 치료법 개발을 목표로 하고 있는데, 한국인 특이 다발성 질환 관련 연구개발이라는 틈새시장 공략을 통해 세계적인 경쟁력을 갖추어 나갈 것으로 기대됨.

- 지금까지 우리나라 게놈연구의 주요성과를 살펴보면, 약 2년간의 연구성과를 통해 게놈연구를 위한 인프라를 효율적으로 구축하였으며, 위암 및 간암 관련 조직과 암세포주의 mRNA를 이용하여 cDNA 라이브러리를 제조하고 16만개의 EST염기서열 정보를 토대로 3만3천종의 UniGene를 발굴하는 성과를 거두었으며, 발굴된 UniGene를 이용 10K, 14K, 2.5K의 인간유전자 칩 제조에 성공하고 위암 및 간암 환자조직으로부터 암 관련 유전자의 발굴에 활용하고 있다. 또한 한국인 위벽으로부터 분리한 위암 원인균인 *Helicobacter pylori* 게놈을 완전 해독하였다. 따라서 대량의 염기서열 정보의 생산 및 염기서열분석 시스템, DNA 칩 DB구축, 임상 정보 구축등 바이오인포메틱스를 포함한 게놈기술 분야가 국제수준에 도달한 것으로 평가받고 있음.

- 방사선 분야는 국소적으로 방사선 치료분야에서 유전체 연구를 수행하는 것 이외에 총괄적인 방사선 반응 유전체 및 단백질 정보를 Database하는 경우는 전무한 상태임.

- 생명과학분야연구는 향후 고 부가적 상품가치를 창출할 수 있는 과학분야로 방사성 동위원소 이용 분야도 이러한 연구에 도입함으로써 방사선의 이용확대를 유도할 수 있음.

나. 발굴유전자 활용기술 개발

- 현재 핵영상용으로 연구를 수행중인 Substrate target은 Carboxylesterase, Cytosine deaminase, Carboxypeptidase G2, Cytochrome p450, Deoxycytidine kinase, Herpes simplex virus thymidine kinase, Nitroreductase, Purine nucleoside phosphorylase등에 대한 기질인데 이러한 target은 sensitivity 와 specificity면에서 문제가 있음.

- 유전자에 대한 anti-sense 유전자를 이용한 치료법에 대한 연구는 Kumai등이 고혈압에 대한 유전자 치료를 목표로 Tyrosine hydroxylase antisense gene therapy을 사

용하여 고혈압이 유발된 동물모델에서 저혈압의 효과를 유도하는 실험을 시행하였으며 이외에도 Michael등은 renin-angiotensin system을 이용하여 angiotensin II type 1 receptor에 대한 antisense gene therapy를 이용한 고혈압에 대한 치료효과를 모색하기도 하였다. 종양에 대한 antisense gene therapy는 Antony등이 Phosphodiester와 Phosphorothioate를 backbone으로 가진 Oligodeoxyribonucleotides에서의 안정성과 세포내에서의 파괴양상에 대한 antisense ODN 자체의 구조와 기능에 대한 연구 뿐만이 아니라 Endo, S등의 head and neck squamous cell carcinoma를 대상으로 생체에서 TGF- β antisense gene therapy의한 세포의 성장억제에 대한 연구들과 함께 최근에는 Nadia등이 Neurodegenerative Disease에 대해서도 Antisense Gene Therapy를 할수 있는 방법에 대한 연구를 수행중에 있다. 이러한 연구와 함께 앞으로는 적절한 target 유전자군을 발굴하고 이에 대해 보다 안정성 있는 antisense ODN을 제조하는것과 함께 생체내에서의 치료효과와 종양세포 억제 효과에 대한 추가적인 실험이 수행되어야 할 것이다.

- 따라서 새로운 target의 개발은 핵영상의 진단 및 치료를 향상시킬 수 있고 암종에 따른 다른 substrate의 사용이 가능하다면 종양 특이적 핵영상 진단제의 개발을 유도 할 수 있을 것으로 사료.

다. 세포고사 및 신호전달체계 관련 연구에 Radioactive Microarray 응용

- 국내의 암 연구는 아직까지는 이미 외국에서 개발된 기반기술을 대학 및 연구소에서 도입하는 수준에 머무르고 있는 실정으로, 이와 관련된 기술개발이나 제품생산은 기대할 수 없는 상태임. 그러나 앞으로 분자인체유전학적 연구가 암연구의 새로운 진단법 및 치료기술 개발에 미칠 과학적, 경제적 영향을 감안하면 매우 중요한 분야이고 선진국의 예에서 보더라도 이러한 유전자 관련 기능적 분석은 최근어야 수행되는 첨단 분야로서 연구 기반시설이 확보되어 기술개발이 이루어진다면 국제적 비교우위를 차지 할 수 있는 분야로 판단됨.

- Human cDNA microarray를 이용한 유전체연구는 연구기술이 우리나라뿐만 아니라 세계적으로도 아직 초보수준에 머물고 있는 실정이며 연구결과를 data base화 하는 수준 임. 세계적으로 각종 관련기기가 활발히 개발되고 있으며 이러한 Microarray 자체에 대한 기술개발도 진행 중에 있음. 또한 이 방법은 유전자의 변이를 정확히 찾을 수 있으나 관련된 단백질 기능연구와의 유기성 확보 등 아직도 기술적인 개발이 많이 필요한 분야임.

- 국내에서도 암 관련 유전자 기능분석을 이용한 신 유전자 기술개발이 생명공학 연구소를 중심으로 하여 활발하게 수행될 전망이다. 하지만 이러한 연구는, 주로 국내에서 높은 발병률을 보이는 위암과 간암에서 발암기전 또는 암 전이와 관련된 연구로서 본 연구과제가 추구하는 방사성동위원소 프로브를 이용한 핵의학적 접근법과는 거리가 있다고 여겨짐. 영국 정부의 1999년 발표 자료를 참조하면 2005년에는 전 세계 약제 시장 중 암 관련 의약품이 약 80%를 차지할 것이라고 전망하고 있고 국내 특허청의 최근 발표된 신기술동향보고서에서도 "암 관련 신약개발"이 포함된 점 등을 비추어 볼 때 국제적 바이오테크 경쟁력 재고측면에서 매우 중요하고 꼭 필요한 연구 과제라고 여겨짐. 또한 방사성동위원소를 응용한 바이오테크 기술로서 궁극적으로 임상센터 핵의학과에서의 체외진단법의 일종으로 개발하고자 하는데서 원자력 기반기술 확충사업의 취지에도 적합하다고 생각되는바 앞으로 국책연구 차원에서의 장기적이고 집중적인 지원이 이루어져야 한다는 인식의 전환이 이루어져야 한다고 사려됨.

- 방사선 치료 인자를 발굴하는 단계에서 필요한 기술 도입은 가능하나 방사선 치료 인자, 방사선 치료 증진인자, 방사선 치료지표의 산업화 단계에 필요한 연구결과나 기술 도입은 막대한 기술료를 지불하지 않고는 불가능하다고 판단되어지고 한국인에서의 연구가 미흡하면 관련 치료법 도입에 있어서 실질적인 활용에 문제가 있을 것으로 생각되고 선진국에 종속적인 관계로 전락할 것으로 추정되므로, 한국인에 특이적인 유전자 변이의 존재를 감안하면 한국인 대상의 방사선 치료 관련 유전인자의 발굴은 맞춤형 종양 치료법 개발의 기본 초석이 될 것으로 예상함.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 세포신호전달관련 물질을 이용한 동위원소 표지화합물 합성 및 영상화 연구

1. 세포고사 영상화 기술 (Annexin V 영상)

가. Annexin V 2가지이상의 동위원소 표지를 위한 키레이트 개발

(1) HYNIC의 합성 및 분리정제

(가) 6-Hydrazinopyridine-3-carboxylic acid의 합성 및 분리

6-Chloronicotinic acid 8.0g(50.77mmol)과 80% hydrazine hydrate 35ml(930.0mmol)을 teflon coated magnetic stirrer와 함께 500ml 둥근 플라스크에 넣고 100°C oil bath에서 4시간동안 반응시켰다. 반응 종료 후에는 실온에서 10시간 방치 후에 rotary evaporator로 2시간동안 감압건조를 시켰다. 여기에 200ml의 재증류수를 가해 녹이고, 농염산으로 pH 5.5로 적정하였다. 생성된 침전물은 Whatman filter paper No.1으로 여과하였다. 95% ethanol과 ether로 각각 2회씩 반복 세척하였고 진공 건조기에서 12시간 감압건조 시켰다. 이렇게 얻어진 반응 결과물에 2N NH₄OH를 적당량 가해 녹인 후 TLC(C18-silica gel, reverse phase, Aldrich)를 혼합전개액(n-hexane : 2N NH₄OH : chloroform = 1 : 2 : 1)을 사용하여 전개시킨 후 U. V lamp에서 반점을 확인하였고 ¹H-NMR로 최종 확인하였다.

(나) 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid의 합성 및 분리

6-Hydrazinopyridine-3-carboxylic acid 1.4g(9.8mmol)을 stirrer와 함께 넣어준후 16시간동안 실온에서 반응시켰다. 반응 종료 즉시 rotary evaporator로 10시간 감압건조 시켰다. 최소량의 ethyl acetate로 녹인 후 silica gel 60(230-400mesh)을 이용해 column chromatography를 실시한 후 rotary evaporator로 12시간동안 감압건조 시켰다. 이렇게 얻어진 반응 결과물에 ethyl acetate를 적당량 가해 녹인 후 TLC(C18-silica gel, reverse phase, Aldrich)를 혼합전개액(n-hexane : 2N NH₄OH : chloroform = 1 : 2 : 1)을 사용하여 전개시킨 후 U. V lamp에서 반점을 확인하였고, ¹H-NMR로 최종확인하였다.

(다) Succinimidyl 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid의 합성 및 분리 |
 15ml의 DMF에 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid 1.45g(5.75mmol)과 N-hydroxysuccinimide 0.66g(5.75mmol)을 넣고, 5ml의 DMF에 녹인 dicyclohexylcarbodiimide 1.18g(5.75mmol)을 첨가한 후 실온에서 16시간동안 반응시켰다. 반응종료후 혼합물은 Whatman No1으로 여과한 후에 최소량의 ethyl acetate로 녹이고 silica gel 60(230-400mesh)을 이용해 column chromatography를 실시한 후에 rotary evaporator로 12시간동안 감압건조 시켰다. 이렇게 얻어진 반응 결과물에 ethyl acetate를 적당량가해 녹인 후 TLC(Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck)를 혼합전개액 (chloroform : Methanol : H₂O = 65 : 25 : 4)을 사용하여 전개시킨 후 U. V lamp에서 반점을 확인하였고, ¹H-NMR로 최종 확인하였다.

(라) Succinimidyl 6-hydrazinopyridine-3-carboxylate hydrochloride(HYNIC)의 합성 및 분리

100ml의 둥근 플라스크에 stirrer를 넣고 Succinimidyl 6-BOC-hydrazinopyridine-3-carboxylic acid 100mg(0.285 mmol)을 첨가 후에 2ml의 Dioxane으로 녹였다. 둥근플라스크 입구를 막고 질소가스로 플라스크를 충전시킨 후 유리주사기를 이용하여 HCl/dioxane 2ml을 첨가한 후 실온에서 15일 동안 반응시켰다. Whatman No. 5로 여과시킨 후 ether로 5회 반복 세척하였다. 이렇게 얻어진 반응 결과물에 methanol을 적당량가해 녹인 후 TLC(Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck)를 혼합전개액(chloroform : Methanol : H₂O = 65 : 25 : 4)을 사용하여 전개시킨 후 U. V lamp에서 반점을 확인하였고, ¹H-NMR로 최종확인하였다. 6-chloronicotinic acid를 시작물질로 하여 네 단계의 과정(그림 1)을 거쳐 Succinimidyl 6-hydrazinopyridine-3-carboxylate hydrochloride를 합성하였고 최종합성 수율은 19.7%였다. 이 반응 결과물을 methanol에 녹인 뒤 TLC를 이용하여 반응되었음을 확인했고, ¹H-NMR을 사용하여 합성물을 최종 확인하였다.

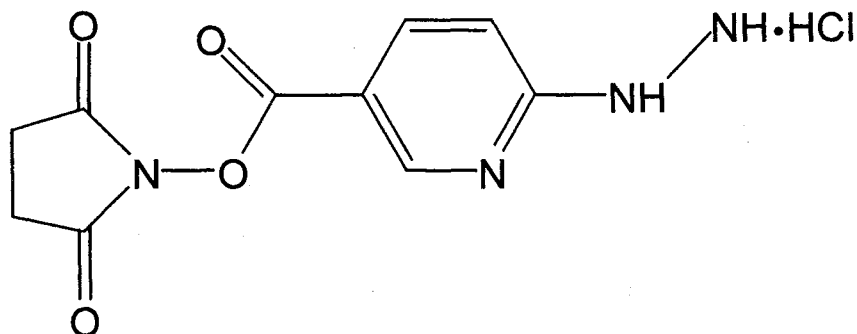


그림 1. The structure of HYNIC

(2) Ethylenedicysteine(EC)의 합성 및 분리정제

L-cysteine (1 g, 6.34 mmol)과 1,2-dibromoethane (273 mL, 3.17 mmol), NaHCO₃ (1.1 g, 13.3 mmol)를 H₂O:EtOH=4:1 용액 30 mL에 녹이고 75 °C로 가열하여 1시간을 교반하였다. 반응용기를 상온으로 식힌 후, 과량의 물을 부어 반응을 종료하고 filtration하였다. 얻어진 여과물을 methanol과 methylene chloride로 세척하여 ethylenedicysteine을 합성하였다.

L-cysteine (1 g, 6.34 mmol)과 1,2-dibromoethane (273 mL, 3.17 mmol), NaHCO₃ (1.1 g, 13.3 mmol)를 H₂O:EtOH=4:1 용액 30 mL에 녹이고 75 °C로 가열하여 1시간을 교반하였다. 반응용기를 상온으로 식힌 후, 과량의 물을 부어 반응을 종료하고 filtration하였다. 얻어진 여과물을 methanol과 methylene chloride로 세척하여 ethylenedicysteine을 70%의 수율로 합성(그림 2)하였다.

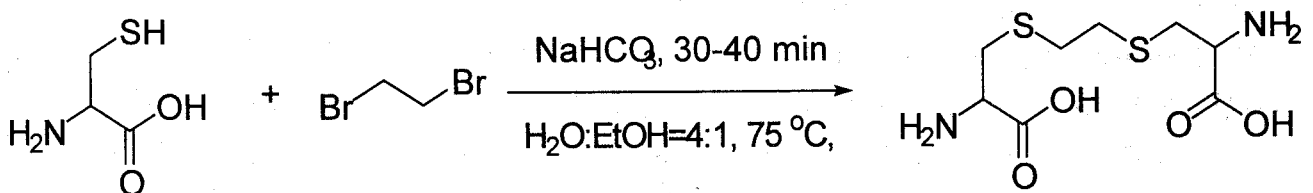


그림 2. The synthesis scheme of Ethylenedicysteine(EC)

(3) HYNIC-Annexin V의 제조

HYNIC(MW= 286.5)을 12mg/ml되게 녹인후에 18.5ul을 취하여 DMF에 녹인후에 Annexin V(MW=35,806)를 5.6mg이 되도록 0.1M Sodium phosphate buffer (pH=7.8)에 녹인후에 실온에서 4시간동안 가볍게 저어주면서 암실에서 반응하고 반응을 종결하기 위하여 500mM glycine in PBS (pH 7.4) 500ul을 넣어주어서 반응을 종결하였다. Dialysis를 20mM Sodium Citrate buffer, 100mM NaCl(pH=5.2)를 이용하여 5번정도 buffer를 교환하여 주면서 24시간동안 MW cutoff value=10,000 인 투석막을 이용하여 분순물을 제거하였다. 얻어진 반응액을 Centricon-30을 이용하여 농축한후에 20mM citrate buffer, pH=5.2를 이용하여 최종농도를 1mg/ml 로 조정하고 각각 100 μ l(1mg/ml)씩 분주하여 -20°C에 보관하여 다음실험에 사용한다.

(4) EC-Annexin V의 제조

EC (5mg, 0.019mmol, MW: 263.2, 210eq)를 sodium bicarbonate (1N, 1M) 1ml에 stirrer bar와 함께하여 녹인후에 sulfo-NHS(4mg, 0.019mmol)와 EDC(4mg, 0.019 mmol, 210eq)을 첨가한다.

이러한 반응액에 Annexin V (0.3mg, MW: 33Kd, 0.090909umol, 1eq)을 첨가한후에 24시간 실온에서 stirring하면서 반응한다. 반응이 끝난후에 48시간동안 PBS로 투석을 시행하여 불순물을 제거한다. 투석시 사용한 cutoff value는 10,000 MW를 사용하였다. 동결건조한후에 각각을 aliquot하여서 다음 반응에 사용하였다.

나. Annexin V에 영상용 방사성동위원소인 Tc-99m 표지법 개발

: HYNIC-Annexin V는 진단용 방사성동위원소인 ^{99m}Tc 과 킬레이트를 이루는 과정에서 두 개의 tricine 분자와 HYNIC구조에서 질소원자간의 킬레이션에 의하여 표지되는 것으로 알려져 있다(그림 3). HYNIC을 bifunctional chelating agent로 사용하여 HYNIC-Annexin V를 제조하고 SnCl_2 를 환원제로, Tricine을 coligand로 하여 진단용 방사성동위원소인 ^{99m}Tc 을 98%이상의 표지수율로 제조하는 표지법을 개발하였다(그림 4). 표지과정은 tricine의 농도가 35 mg/ml, SnCl_2 가 0.4 mg/ml의 농도가 되도록 Argon 기류하의 증류수에 녹인후에 pH를 7.0으로 적정하고 이를 1 ml 씩 분취하여 동결건조한후에 사용하였다. 제조된 tricine cold kit을 이용하여 ^{99m}Tc 를 1 ml로 하여 실험에 필요한 정도의 방사능을 첨가하여 실온에서 rolling 과정을 통하여 30분간 반응하여 표지하였다. 표지된 ^{99m}Tc -tricine의 표지 수율은 이동상을 methylethylketone(MEK)로 하고 정지상을 instant thin layer chromatogram- silica gel(ITLC-sg)로 하여 평가하였으며, 30분에서 99% 이상의 표지 수율을 나타내었다. Radio-colloid를 평가하기 위하여 이동상을 생리식염수(saline)로 하고 정지상을 instant thin layer chromatogram-silica gel(ITLC-sg)로 하여 평가하였으며, 30분에서 1% 이하의 방사성 콜로이드를 형성하여 안정적이 표지를 나타내었다. 제조된 ^{99m}Tc -tricine을 이용하여 HYNIC-Annexin V와 동량을 섞어주어 실온에서 1시간 동안 반응하고 표지 수율을 평가하였다. 표지수율의 평가는 이동상을 0.1M citrate buffer pH 5.0으로 하고 정지상을 instant thin layer chromatogram- silica gel(ITLC-sg)로 하여 평가하였으며, 60분 반응에서 98% 이상의 표지 수율을 나타내었다(그림 4).

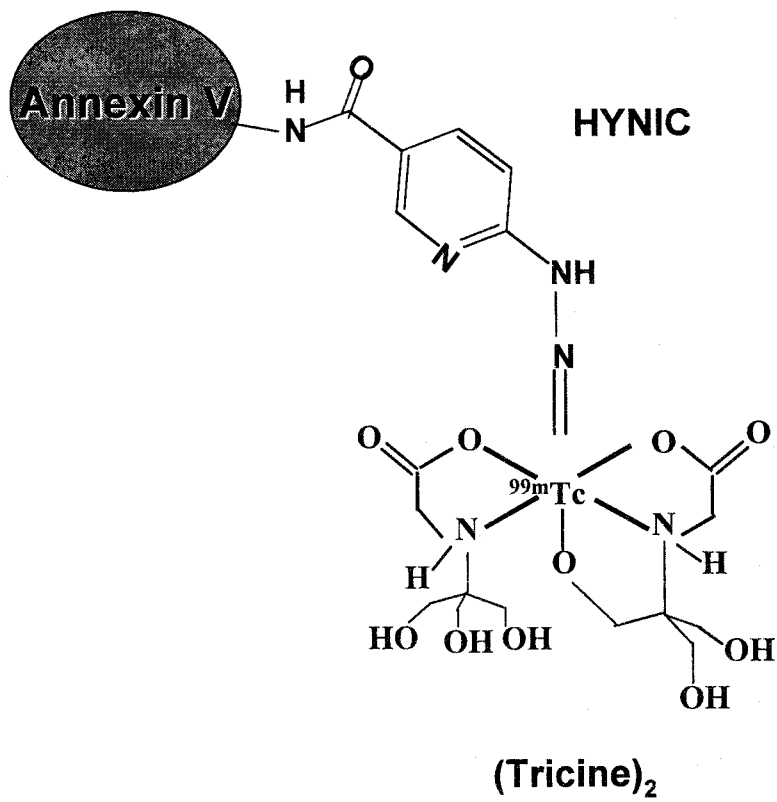
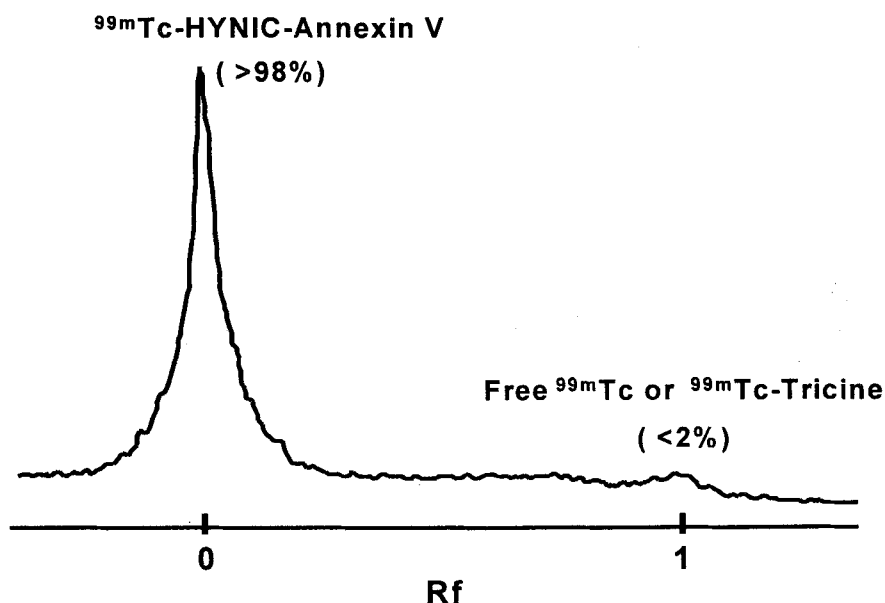


그림 3. ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V의 구조도



Stationary phase : ITLC-sg / Mobile phase : 0.1M Citrate buffer pH=5.0

그림 4. ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V의 방사박층크로마토그램

다. ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V의 시험관내 안정성 평가

제조된 ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V의 생체내에서의 안정성을 확인하기 위하여 사람의 혈청과 동량의 ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V를 섞어주고 37°C에서 24시간까지의 안정성을 분석하였다. 안정성의 평가는 이동상을 0.1M citrate buffer pH 5.0으로 하고 정지상을 instant thin layer chromatogram- silica gel(ITLC-sg)로 하여 평가한 결과 생체적용이 가능한 안정성을 확인할 수 있었다. 6시간과 24시간에서 각각 92.2%와 82.2%의 안정성을 나타내었다(그림 5).

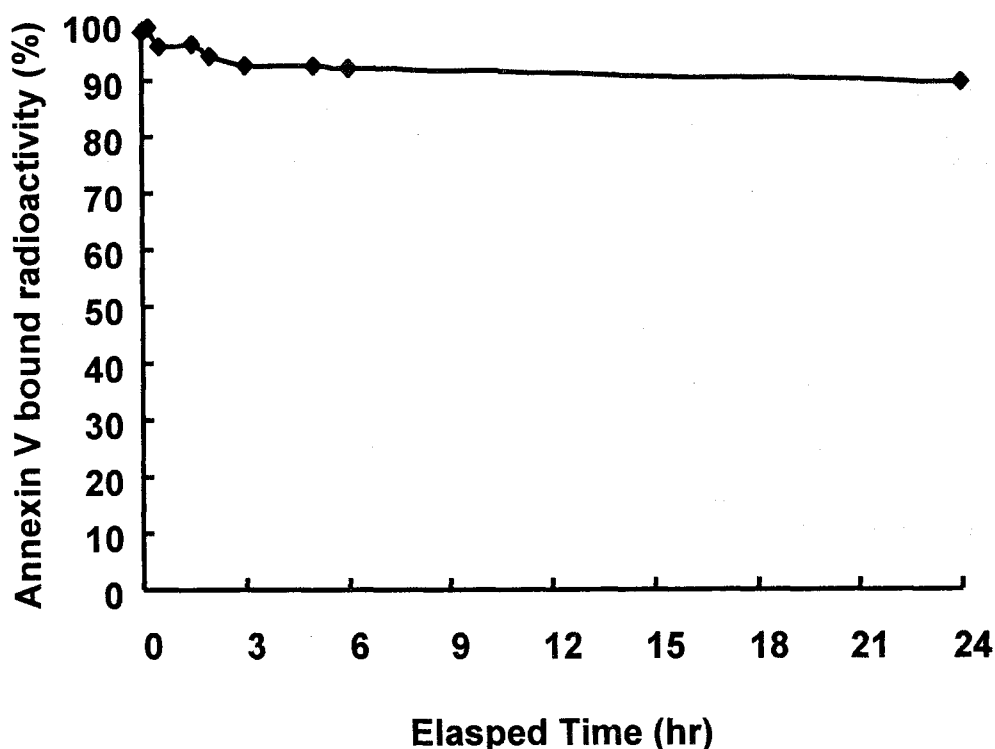


그림 5. ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V의 혈청내 안정성 평가

라. ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V의 세포고사 세포 결합능 평가

^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V를 이용하여 세포고사를 평가하는 것이 가능한 것인지를 확인하기 위하여 5주령의 마우스의 흉선을 떼어내어 흉선세포를 분리한후 24well에 2x10⁵ cell을 well당 접종하고 여기에 흉선세포의 세포고사를 유도하는 것으로 알려진 dexamethasone을 0 ng/ml에서 8 ng/ml까지의 농도로 24시간동안 처리한후 유세포계측기를 이용하여 Annexin V- FITC와 Propidium iodide(PI)를 이용한 dual staining을 실시하여 세포고사 정도를 평가하였다. 또한 제조된 ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V를 10uCi(370KBq)/ 1ug/ 0.1 ml를 각각의 well에 첨가하고 1시간후에 세포의 방사능을 계측하여 투여방사능량의 백분율로 나타내어 ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V의 결합 방사능을 나타내었다. 흉선세포는 dexamethasones의 농도 증가에 따라서 세포고사를 나타내는 세포의 양이 증가되는 것이 유세포 분석기의 분석결과 나타났다(그림 6). 흉선세포의 세포고사를 유세포분석기와 ^{99m}Tc-HYNIC-Annexin V를 이용하여 평가하는 방법은 기존에 주로 사용되는 세포고사의 시험관내 평가 방법인 유세포 분석기와 거의 일치되는 실험 결과(상관도: R²=0.99)를 나타내었다(그림 7).

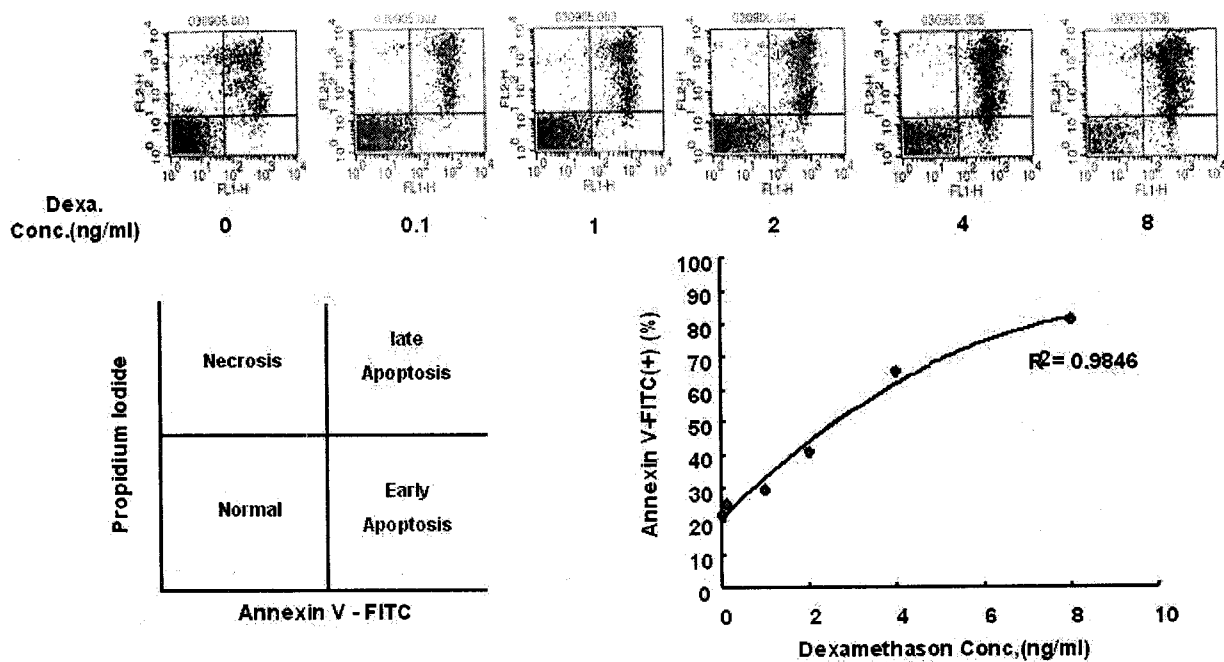


그림 6. FACS analysis of Apoptosis in Thymocyte After Dexamethason treatment

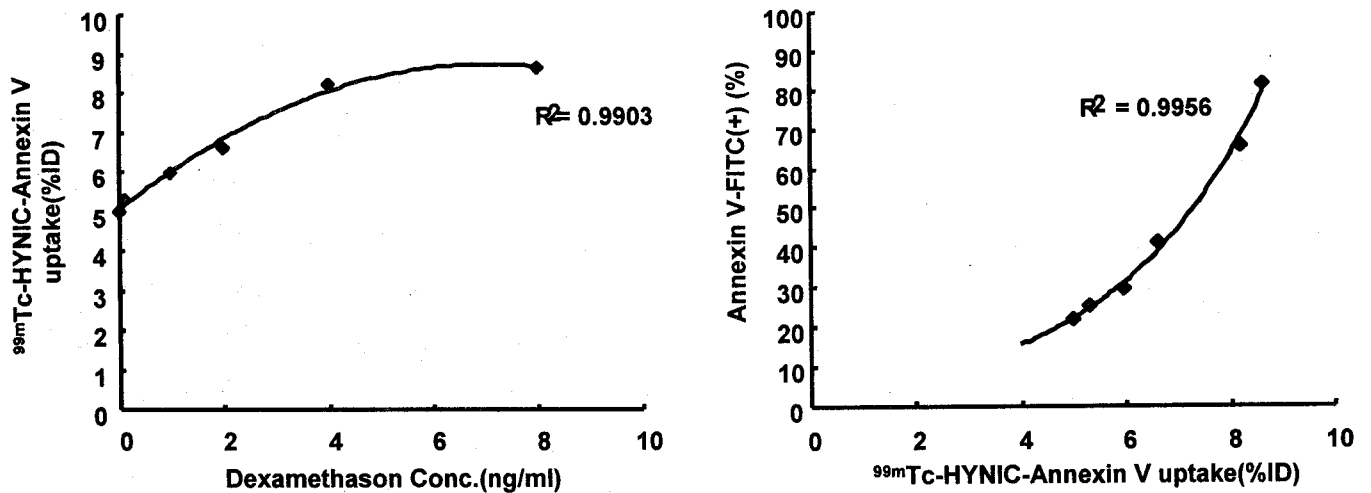


그림 7. Comparison of between FACS analysis and In Vitro Binding of ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V in Thymocyte Apoptosis Model

다. ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V의 생체분포 평가

^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V의 생체분포를 평가하고 정상적인 배출기전을 확인하기 위하여 정상 마우스에서 ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V를 20uCi(3.7MBq)/ 1ug/ 0.1ml을 주사한후 30분, 1시간, 4시간에서 각각의 장기를 적출하여 무게를 측정하고 감마카운터를 이용하여 방사능을 계측하였다. 생체분포 결과에서 주로 간과 비장에서 섭취가 높았으며, 주로 신장을 통하여 배출되는 것으로 나타났다. 생체내에서 파괴되어 갑상선에 섭취되는 정도는 미미하여 생체내에서 안정함을 확인할 수 있었다(그림 8).

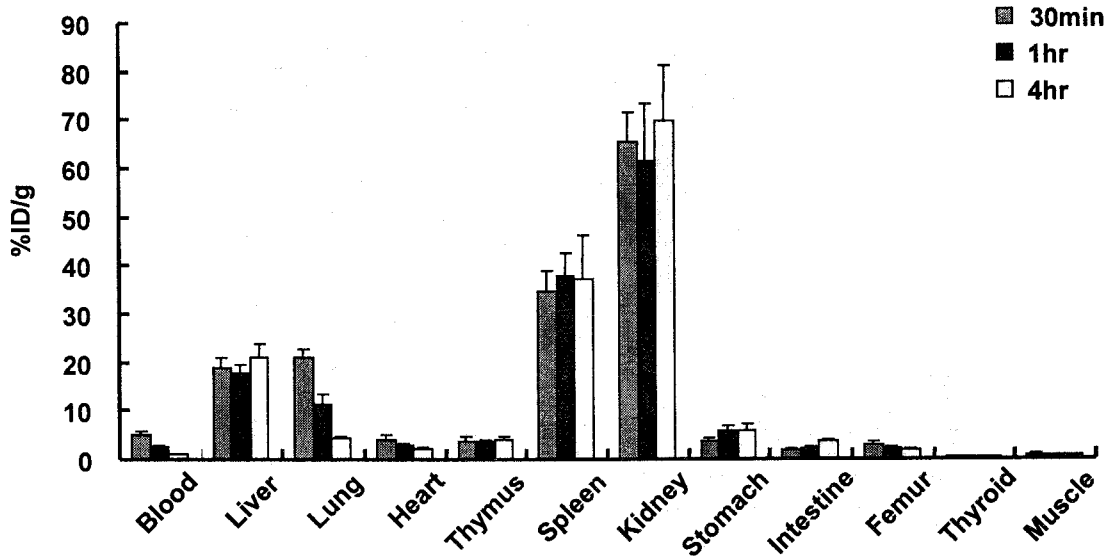


그림 8. 정상마우스에서 ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V의 시간대별 생체분포

바. ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V를 이용하여 간세포 특이적인 세포고사 영상화

: Death receptor인 Fas을 활성화시키는 단클론항체인 Jo2 항체(Anti-mouse Fas hamster monoclonal antibody)를 한 마리당 10ug을 처리한지 90분이 경과한 후 ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V를 한 마리당 110uCi(4.07MBq)/ 2ug/ 0.1ml을 주사하고 1시간후의 생체영상을 감마카메라를 이용하여 획득하였다. 생체영상 결과 대조군에서는 간에서의 방사능의 집적이 관찰되지 않았으며, Jo2 항체처리 군에서는 간으로의 방사표지 Annexin V의 집적이 확인되었다(그림 9). 또한 간과 신장에서의 방사능을 측정하기 위하여 각 군의 간과 신장을 떼어내어 무게를 측정하고 감마카운터를 이용하여 방사능을 측정하고 조직 단위 그램당 주사 방사능양의 백분율(%ID/g)로 나타내었다. 대조군에서는 간과 신장에서의 섭취율이 17.76 %ID/g와 102.49%ID/g이었으며 항체 처리군에서는 22.37%ID/g와 79.6 %ID/g을 나타내었다(그림 10). 항체 처리군에서 간에서의 방사능이 1.26배 증가하였으며 이는 간 특이적인 세포고사에 의해서 ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V가 특이적으로 섭취가 증가함을 나타낸다.

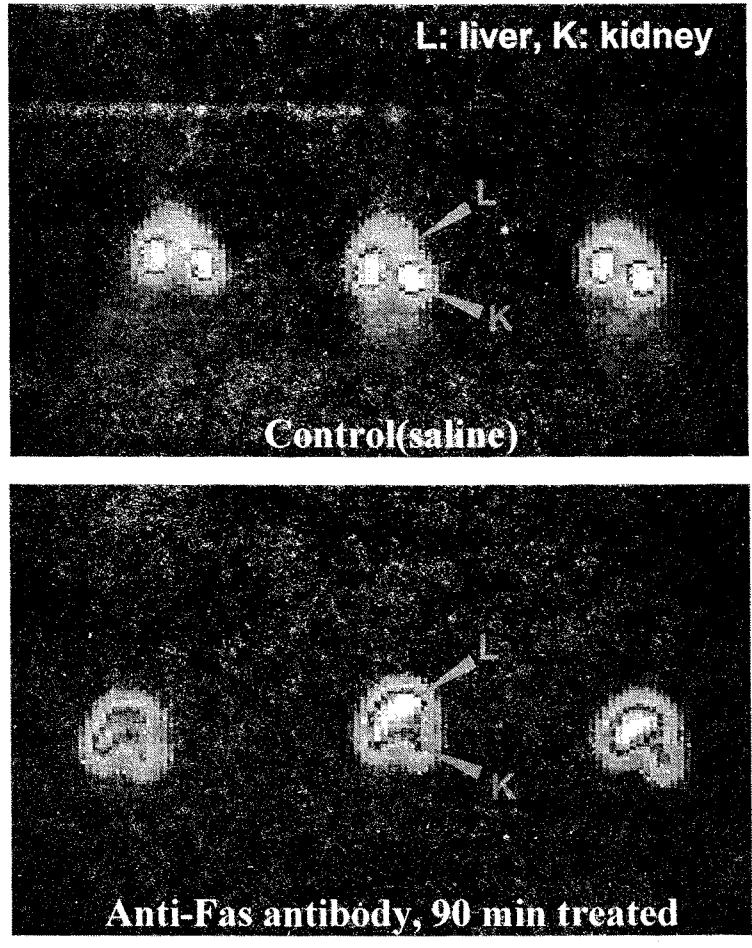


그림 9. ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V를 이용하여 간세포 특이적인 세포고사 영상화

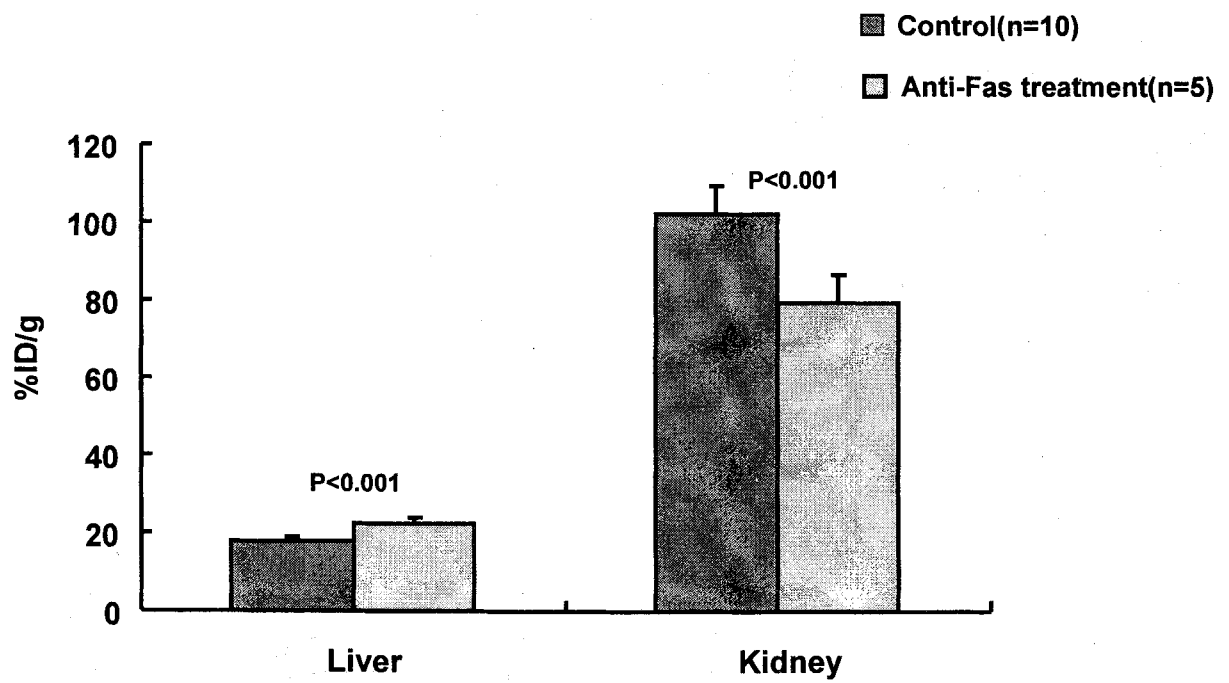


그림 10. 간세포 특이적인 세포고사 영상분석에서 ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V의 장기별 섭취율 변화

사. ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V를 이용하여 방사선에 반응하는 폐암의 세포고사 영상화 : 폐암세포주인 NCI-H460세포는 Propidium iodide를 이용한 유세포분석 결과 10 Gy의 방사선에서 sub G1에 나타나는 세포고사 정도가 24시간에는 10%, 그리고 48시간에는 30%의 세포고사가 유도되는 것으로 확인되었다. NCI-H460 폐암 세포주를 누드마우스의 왼쪽 대퇴부의 피하에 1×10^7 세포가 되게 피하로 주사하고 14일 경과되어 종양의 크기가 1 cm 정도된 동물모델을 사용하였다. 폐암 종양이 형성된 누드마우스에 ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V를 100uCi(3.7MBq)/ 2.5ug/ 0.1ml을 주사하고 1시간후에 생체영상을 얻었으며 이 경우에는 종양으로의 집적이 확인되지 않았다. 폐암종양 형성 누드마우스에 Co-60 teletherapy unit을 이용하여 source -skin distance(SSD)를 60 cm으로 하고 dose rate를 66.57cGy/min으로 15.02분간 조사하여 10Gy의 방사능을 조사한 후 1일, 3일 경과후에 ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V를 100uCi(3.7MBq)/ 2.5ug/ 0.1ml을 주사하고 1시간후에 생체영상을 얻었으며 이때에는 종양에 국소적인 집적이 확인되었다. 이로서 ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V를 이용한 세포고사 영상에서 종양부위에 특이적으로 집적되는 것을 확인하였다(그림 11). 이는 방사선을 이용한 치료효과를 ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V를 이용하여 세포고사를 평가함으로써 치료효과의 평가에 ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V를 이용하는 것이 가능함을 입증하였다.

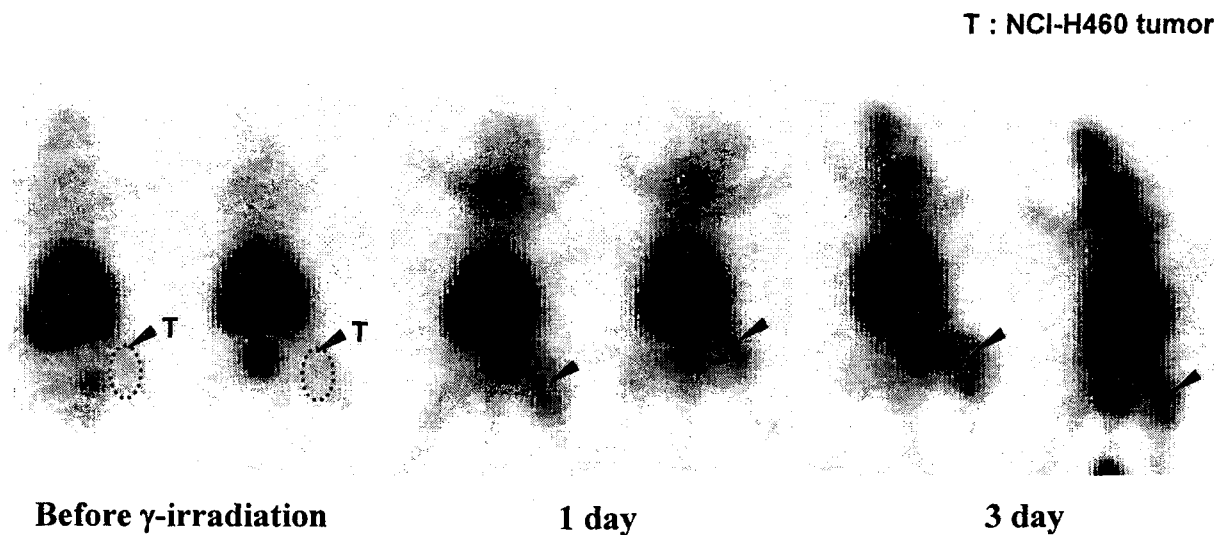


그림 11. ^{99m}Tc -HYNIC-Annexin V를 이용한 방사선 치료에 의한 폐암 세포고사 영상화

2. p53유무에 따른 방사성동위원소 치료전후 대사영상용 방사성의약품 섭취율 및 대사 영상

가. p53 wild type 세포주 제조 및 p53 mutant type 세포주 선정 및 mutant 세포주의 경우 Wt p53 유전자의 이입 유도

(1) MCF7과 MDA-MB-231 세포주를 이용한 p53 유무에 따른 세포의 변화

(가) 조사선량과 조사 후 배양시간에 따른 세포생존율 변화

MCF7 세포주의 경우에 방사선을 조사하지 않은 대조군은 배양 시간의 흐름에 따라 생존 한 세포의 수가 95.8%에서 92.2%, 92.9%, 94.5%로 차이를 보이지 않았으며, 0.72 Gy의 방사선을 조사하였을 때 배양 시간의 흐름에 따라 93.5%에서 90.4%, 58.2%로 감소하였다가 87%로 증가하는 양상을 보였다. 7.22 Gy의 방사선을 조사한 경우 87.5%에서 66.9%, 34.4%, 28.2%로 감소하는 양상을 나타내었다. 7.22 Gy를 조사한 경우에 배양 시간이 흐를수록 세포 생존율이 유의하게 낮았다(그림 12)

MDA-MB-231 세포주의 경우에 방사선을 조사하지 않은 대조군은 시간의 흐름에 따라 생존 한 세포의 수가 90.5%에서 88%, 83%, 90.5%로 유의한 차이를 나타내지 않았으며, 0.72 Gy의 방사선을 조사하였을 때 배양 시간의 흐름에 따라 84.5%에서 83%, 79%, 88%로 나타났다. 7.22 Gy의 방사선을 조사하였을 때 배양 시간의 흐름에 따라 73.7%에서 78.5%, 78.7%로 별 차이를 보이지 않다가 48시간째에 66.8%로 약간 감소하는 양상을 나타내었다. MDA-MB-231 세포주의 경우에 방사선 유무에 따라 유의한 차이를 보이지 않았다(그림 13)

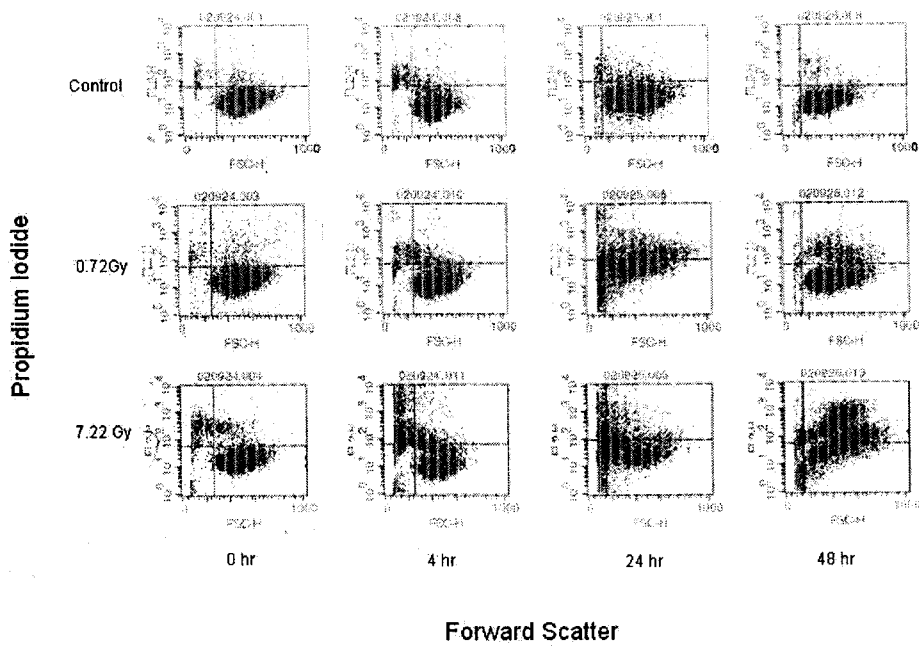


그림 12. Evaluation of cell viability by cytogram analysis of propidium iodide uptake in MCF7(cell line contained p53 wt)

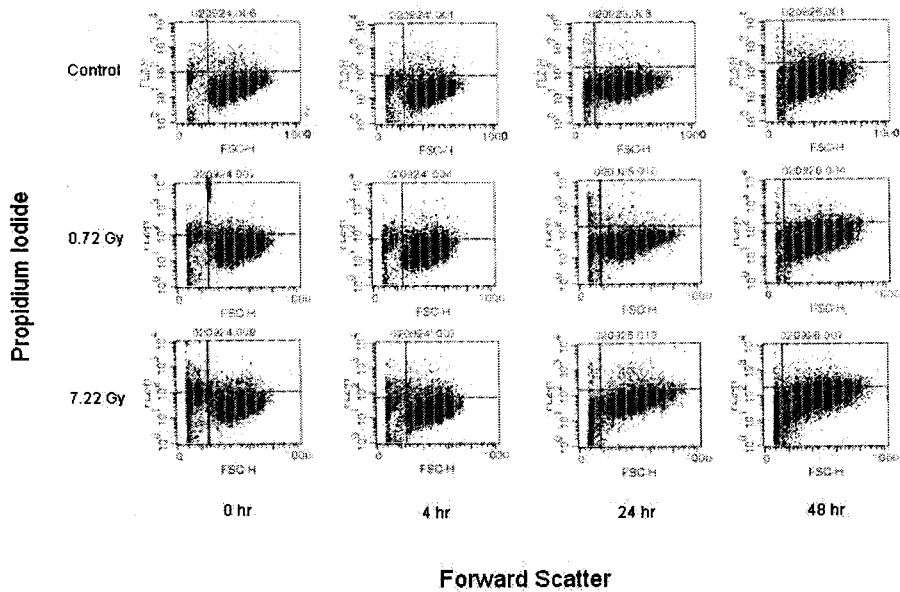


그림 13. Evaluation of cell viability by cytogram analysis of propidium iodide uptake in MDA-MB-231(cell line contained p53 mt)

(나) 조사 선량과 조사 후 배양 시간에 따른 DNA 함량에 대한 유세포 계측 결과 | MCF7 세포주의 경우 방사선을 조사하지 않은 대조군에서 배양시간의 흐름에 따라 sub G1기가 1.26%에서 0.8%, 0.4%, 0.6%로 나타났으며, 전체적인 cell cycle의 차이는 보이지 않았다. 0.72 Gy의 방사선을 조사한 경우 배양 시간이 흐름에 따라 sub G1기가 0.76%에서 0.52%, 1.5%, 0.98%의 양상을 보였으며, G2/M기가 증가하였다가 점차 줄어드는 양상을 나타내었다. 방사선을 조사하지 않은 대조군에 비하여 별 차이를 보이지 않았다. 7.22 Gy의 방사선을 조사한 경우 조사 직후 G1기가 줄어들고 S기가 증가한 양상을 보였으며, 시간이 흐를수록 aneuploidy의 비율이 증가하다가 48시간째에 sub G1기가 증가하는 양상을 보여 주었다(그림 14).

MDA-MB-231 세포주의 경우 방사선을 조사하지 않은 대조군에서 배양시간의 흐름에 따라 sub G1기가 0.4%에서 0.45%, 0.53%, 1.74%로 증가하는 양상을 보였으며, G2/M기가 시간에 따라 줄어드는 양상을 보였다. 0.72 Gy의 방사선을 조사한 경우 배양 시간이 흐름에 따라 sub G1기가 0.6%에서 0.4%, 1%, 1.35%로 나타났으며, 조사 직후에 비해 시간이 지날수록 S기가 증가하면서 줄어드는 양상으로 나타났다. 0.72 Gy의 방사선을 조사한 경우의 DNA 함량은 대조군과의 별 차이를 보이지 않았다. 7.22 Gy의 방사선을 조사한 경우 배양 시간이 흐름에 따라 sub G1기가 1.2%에서 0.2% 감소하였다가 6.15%, 31.4%로 점차 증가하는 양상을 보였으며, 조사 후 시간이 지날수록 G1, S, G2/M기의 양상이 보이지 않았다(그림 15).

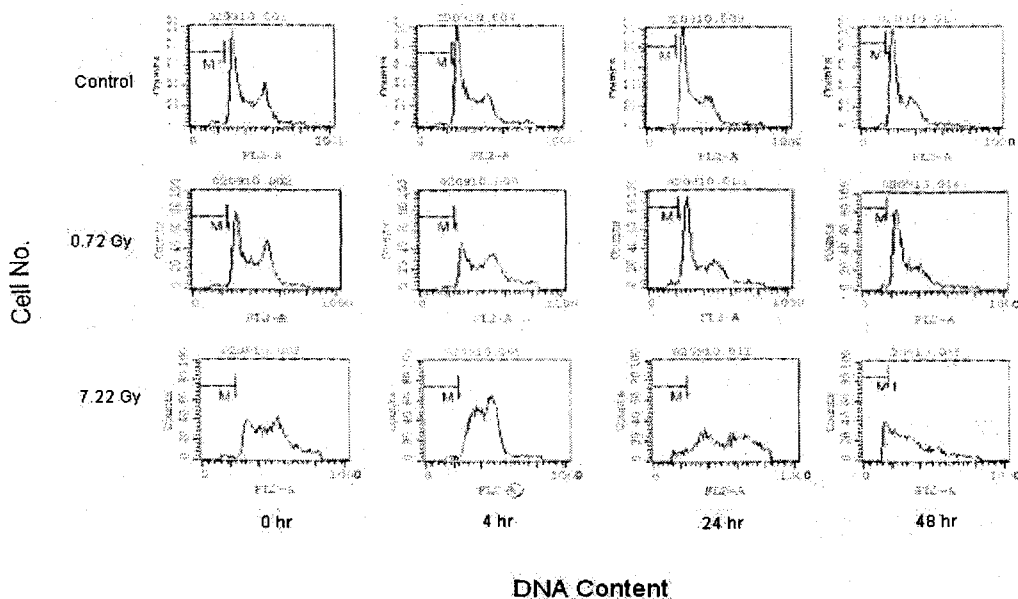


그림 14. The DNA histogram in MCF7 (cell line contained p53 wt)

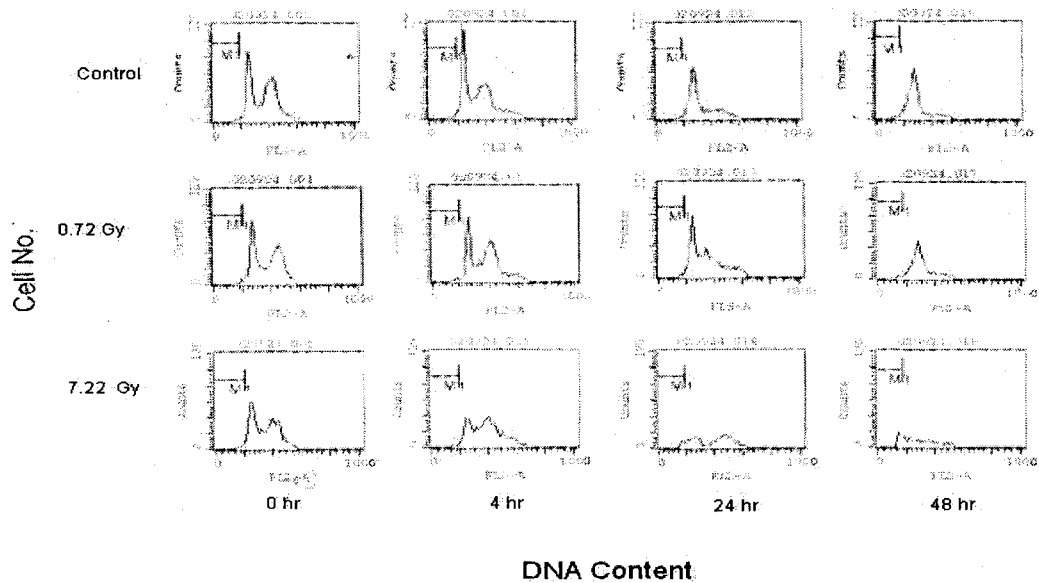


그림 15. The DNA histogram in MDA-MB-231 (cell line contained p53 mt)

(다) 조사선량과 조사 후 배양 시간에 따른 세포 고사에 대한 유세포 계측 결과 방사선을 조사하지 않은 대조 세포군에서 annexin V와 PI 모두에 염색되지 않은 세포군을 음성 대조군 (negative control)으로 잡고, 이를 기준으로 하여 각각의 배양시간 대별, 선량별 세포를 분석하였다. 이때 annexin V에만 특이적으로 염색된 세포군은 초기 세포 고사군을 의미하며, PI와 annexin V에 동시에 염색된 세포군은 후기 세포 고사군으로 이는 PI에만 염색된 세포군과 함께 세포 괴사군을 의미한다.

p53을 정상적으로 발현하는 MCF7 세포주의 경우 0.72 Gy의 방사선 조사했을 때 배양 시간이 흐름에 따라 초기 세포고사가 1%에서 0.45%로 감소하였다가 1.5%, 4%로 증가하는 양상을 보였으며, 후기 세포 고사는 18%에서 9.2%, 9.7%로 감소하였다가 24%로 증가하는 양상을 보였다. 7.22 Gy의 방사선 조사했을 때 조사 직후 초기 세포 고사가 2.6%로 0.72 Gy를 조사했을 때보다 높게 나타났으며 배양 시간이 흐름에 따라 1%로 감소하였다가 8.5%, 11.2%로 유의하게 증가하는 양상을 나타내었다. 7.22 Gy의 방사선을 조사했을 때 후기 세포 고사는 배양 시간이 흐름에 따라 21%에서 18%로 감소하였다가 37%, 48.5%로 증가하였다. 선량이 높은 경우 조사 직후 후기 세포 고사군의 높았으며, 시간의 경과에 따라 증가하였다(그림 16).

p53이 mutation 되어 있는 MDA-MB-231 세포주의 경우에 0.72 Gy의 방사선 조사했을 때 배양 시간이 흐름에 따라 초기 세포고사가 0.2%에서 4%로 증가하였다가 2.5%, 1.2%로

감소하는 양상을 나타내었으며, 후기 세포 고사는 10.7%에서 1.4%로 감소하였다가 3.4%, 4.8%로 조금 증가하는 양상을 보였다. 7.22 Gy의 방사선 조사했을 때 배양 시간이 흐름에 따라 초기 세포고사가 7%에서 1.6%로 감소하였다가 13.2%, 12.3%로 증가하는 양상을 나타내었다. MDA-MB-231 세포주의 경우에는 7.22 Gy를 조사하였을 때 조사 직후 후기 세포 고사군의 증가이외에는 유의한 차이를 보이지 않았다(그림 17).

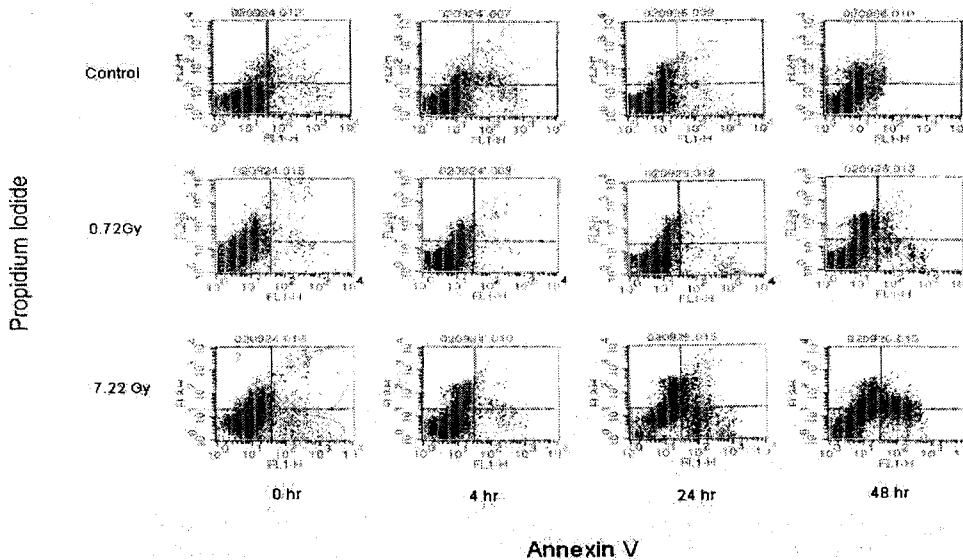


그림 16. Cytograms of Annexin V binding vs. Propidium iodide uptake of MCF7

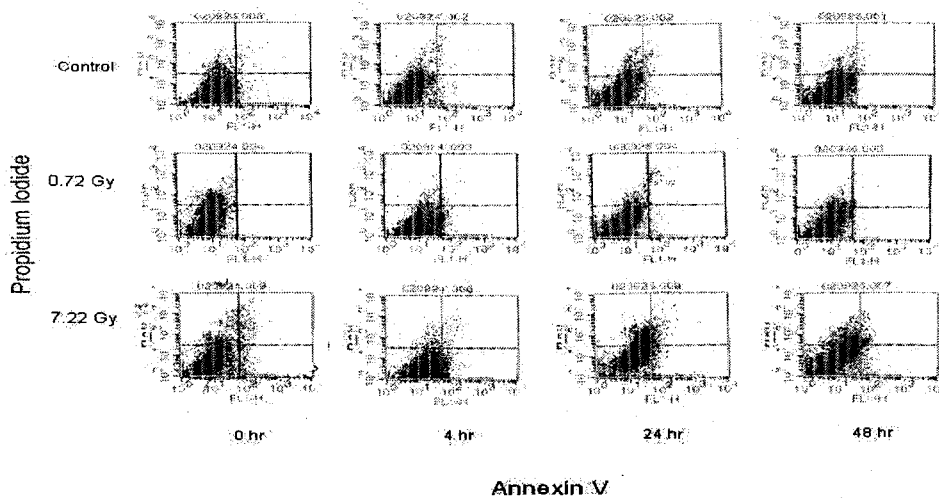


그림 17. Cytograms of Annexin V binding vs. Propidium iodide uptake of MDA-MB-231

(2) p53 mutant-type, p53 wild-type 과발현 종양세포주의 확립

(가) wild type p53을 과발현할 수 있는 유전자 제조

wild type p53을 과발현 할 수 있는 유전자를 제조하기 위하여 pcDNA3.1 vector를 이용하였다. pcDNA3.1 vector는 HA(hemagglutinin) 유전자를 tagging하고 있어서 p53의 발현을 HA 단백질의 항체에 대한 western blot을 시행함으로써 평가할수 있는 vector 구조를 가지고 있으며, HA에 대한 Polyclonal antibodies는 Santa Cruz로부터 구입하여 사용하였다. 제조된 plasmid는 p53 유전자에 점돌연변이(point mutation)가 유발되어서 정상적인 p53의 기능을 수행하지 못하는 세포주인 MDA-MB-231 세포주에 Lipofectamin method (GIBCO/BRL)를 이용하여 transfection하고 neomycin인 G418을 이용하여 cloning cylinder 기법으로 세포를 선택하였고 세포를 배양하여 세포주를 확립하였다. 대조군 유전자인 pcDNA가 transfection된 세포에서는 HA가 관찰되지 않은 반면 p53WT이 transfection된 세포주에서는 HA 단백질이 관찰되어졌다. 그 결과 MDA MB 231 세포에 p53WT 유전자가 과 발현됨을 확인하였다(그림 19).

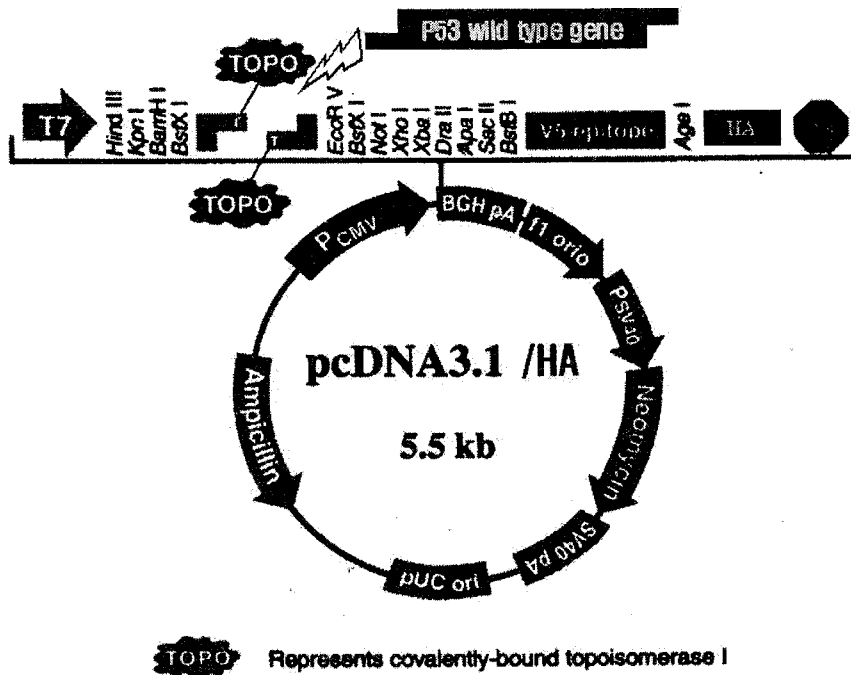


그림 18. Cloning of p53 wild type gene in pcDNA 3.1/HA vector

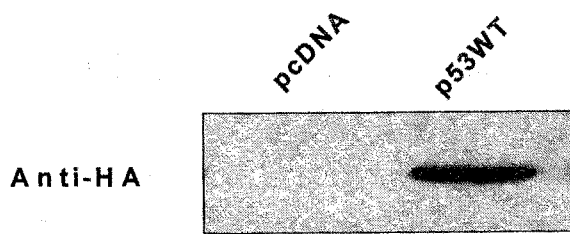


그림 19. Western blot analysis of expression of p53 using Anti-HA in MDA-MB-231(p53 mt : pcDNA) and MDA-MB-231(p53 wt : p53WT)

(나) MDA-MB-231 (p53mt) 세포주와 MDA-MB-231 (p53wt) 세포주에서의 p53기능에 따른 p21 발현 양상

MDA-MB-231 (p53mt) 세포주와 MDA-MB-231 (p53wt) 세포주를 4 Gy의 방사성 동위원소로 조사 한 후 p53의 발현을 OP03L(Calbiochem) 항체를 이용하여 Western blot analysis로 확인한 결과 대조군 유전자인 pcDNA가 transfection된 세포에서도 p53WT이 transfection된 세포주와 거의 동일한 p53의 과 발현을 나타내었다(그림 20, 왼쪽).

MDA-MB-231 (p53mt) 세포주와 MDA-MB-231 (p53wt) 세포주를 4 Gy의 방사성 동위원소로 조사 한 후 p53의 downstream인 p21의 발현을 SC-937(santacruz) 항체를 이용하여 Western blot analysis로 확인하였다. 그 결과 MDA-MB-231 (p53wt) 세포주의 경우에 방사성을 조사하지 않은 대조군(p53WT)과 4 Gy의 방사성 동위원소로 조사 한 후 (p53WT+IR)의 p21의 발현이 비슷하였고, MDA-MB-231 (p53mt) 세포주의 경우에 방사성을 조사하지 않은 대조군(pcDNA)의 경우 거의 발현되지 않은 반면에 4 Gy의 방사성 동위원소로 조사 한 후(pcDNA+4Gy)의 경우 p21의 발현이 크게 증가되는 것을 확인하였다. 4 Gy의 방사성 동위원소로 조사 한 후에 MDA-MB-231 (p53mt) 세포주와 MDA-MB-231 (p53wt) 세포주에서 p21의 발현 또한 p53의 발현양상과 거의 비슷하게 나타나는 것을 확인하였다(그림 20, 오른쪽).

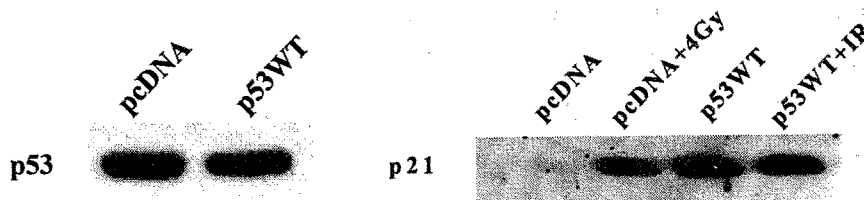


그림 20. Western blot analysis of expression of p53 and p21 in MDA-MB-231(p53 mt : pcDNA) and MDA-MB-231(p53 wt : p53WT) by 4 Gy γ -irradiation.

(3) p53 wild-type, dominant negative mutant type 종양세포주의 확립

(가) mutant p53을 과발현할 수 있는 유전자의 제조

MCF7에 mutant p53의 발현 vector는 p53 유전자의 248번 염기 Arg를 Trp으로 치환된 1.8kb의 p53 dominant negative mutant type이 포함된 total 6.6kb의 pCMV-Neo-Bam vector를 이용하였다. p53에 대한 monoclonal antibodies는 Calbiochem으로부터 구입하여 사용하였으며, N-terminal 15번 Ser에 인산화 되어 있는 p53에 대한 monoclonal antibodies는 New England Biology로부터 구입하여 사용하였다. 유방암 세포주 MCF7에 Lipofectamin method (GIBCO/BRL)를 이용하여 Transfection 하고 neomycin인 G418을 이용하여 성공적으로 유전자가 이입된 세포주만 선별하여 다음 실험에 사용하였다(그림 21)

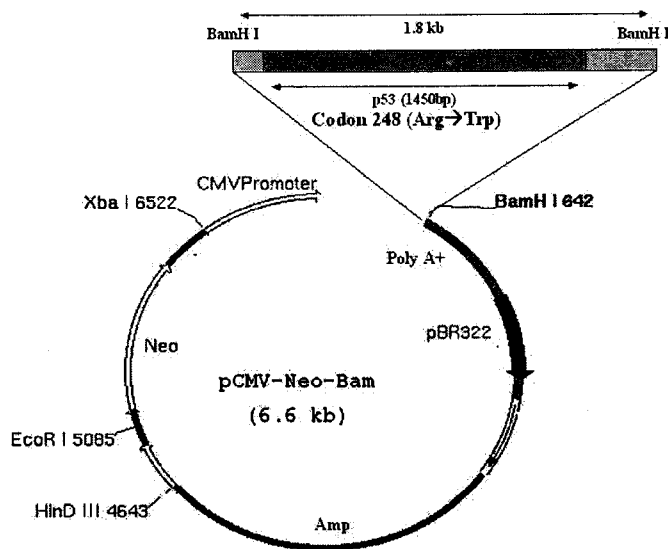


그림 21. Cloning p53 Dominant mutant type gene in pCMV-Neo-Bam vector

(나) 확립된 세포주에서의 동위원소 처리 전후 p53 발현 확인

MCF7(p53 wt)세포주와 MCF7(p53 mt)세포주에서 p53의 발현을 OP03L(Calbiochem) 항체를 이용하여 Western blot analysis로 확인한 결과 control에서는 거의 동일한 p53 발현양상을 나타내었다. 각각의 세포주에서 5 Gy의 방사성 동위원소로 조사(α -irradiation)하거나 1mCi의 Re-188 동위원소를 처리(β -irradiation)하고 24시간 배양한 후 p53의 발현은 control에 비해 약간 증가되거나 비슷한 양상을 보였다(Fig. 13). 각각의 세포주에서 p53의 active form의 발현을 확인하기 위하여 N-terminal 15번 Ser에 인산화되어 있는 항체(NEB)를 이용하여 확인한 결과 control에서는 거의 동일한 발현 양상을 나타내었으나, MCF7(p53 wt) 세포주에서는 α -irradiation 이나 β

-irradiation 후에 p53 active form 발현이 증가하였다. MCF7(p53 mt) 세포주에서는 γ -irradiation 이나 β -irradiation 후에도 p53 active form 발현이 억제되어 있는 것을 확인하였다(그림 22).

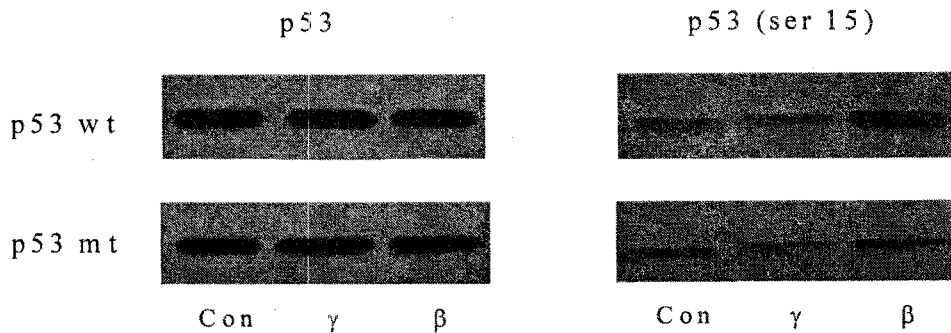


그림 22. Western blot analysis of expression of p53, phospho-p53(ser 15) in MCF7(p53 wt) and MCF7 (p53 mt) by γ -irradiation and β -irradiation.

나. p53 유무에 따른 방사성 동위원소치료 전후 세포의 대사영양방사표지 화합물의 섭취율 평가

(1). MDA-MB-231 (p53 wt) 와 MDA-MB-231 (p53 mt) 세포주를 이용한 p53 유무에 따른 방사성 동위원소 처리시 세포 반응 양상 및 섭취율 평가

(가) 세포 고사에 대한 유세포 계측 결과 (AV/PI)

Monte Carlo EGS4 Method에 의해 24 well culture plate에서 세포배양액 1ml인 상태에서 4시간 조사 배양시 1mCi/ml, 2mCi/ml, 5mCi/ml의 선량을 세포가 받도록 Re-188을 24 well culture plate 배양액에 직접 투여하여 4시간 배양한 후 새로운 배양액 1ml로 3회 세척하고 세척한 세포를 재접종 하여 0, 4, 8, 16, 24 시간까지 배양하였다.

Bender MedSystem(Vienna, Austria)사의 Annexin V-FITC kit를 사용하여 세포를 형광 염색 하였다. 이를 간단히 요약하면, 1.0×10^6 개/ml 세포 현탁액 $300\mu\text{l}$, Annexin V-FITC $5\mu\text{l}$, PI $5\mu\text{l}$ 를 혼합하여 실온, 차광상태에서 10분간 염색한 후 kit에 있는 1x binding buffer $200\mu\text{l}$ 를 첨가하여 유세포 계측기로 측정하였다.

p53을 과 발현하는 MDA-MB-231 (p53 wt) 세포주에서 방사선을 조사하지 않은 대조군의 경우 배양시간이 흐름에 따라 생존한 세포의 비율은 80.3%에서 81%, 86%, 88%, 90%로 조금씩 증가하는 양상을 나타내었다. 1 mCi의 방사선 조사했을 때 배양 시간이 흐름에 따라 초기 세포고사가 7.4%에서 4.5%, 4%, 5.4%, 4%의 양상을 보였으며, 후기 세포 고사는 14%에서 9.6%로 감소하였다가 13.4%, 14%, 15.2%로 증가하는 양상을 보였다. 2 mCi의 방사선 조사했을 때 조사 직후 초기 세포 고사가 7.6%에서 배양 시간이 흐름에

따라 5.9%, 4.3%, 3%로 감소하였다가 4.4%로 증가하는 양상을 나타내었다. 후기 세포 고사는 배양 시간이 흐름에 따라 13%에서 9.5%로 감소하였다가 11.2%, 13.8%, 14.4%로 증가하는 양상을 보였다. 5 mCi의 방사선을 조사했을 때, 초기 세포 고사가 7%에서 5.7%, 4.2%, 5.7%, 3.5%의 양상을 나타내었으며, 후기 세포 고사가 12.5%에서 9.9%로 감소하였다가 12.8%, 13.7%, 16.4%로 증가하는 양상을 나타내었다(그림 23). 방사선량의 증가에 따라서 후기 세포 고사군의 비율이 증가하였다.

p53이 mutation 된 MDA-MB-231 (p53 mt) 세포주에서 방사선을 조사하지 않은 대조군의 경우 배양시간이 흐름에 따라 생존한 세포의 비율은 75.3%에서 71.8%, 75.9%, 78.6%, 80.1%로 조금씩 증가하는 양상을 나타내었다. 그러나 MDA-MB-231 (p53 wt) 보다 시간 대별로 다소 낮은 생존율을 나타내었으며, 이는 p53에 의한 세포 사멸 억제작용에 의한 것으로 생각된다. 1 mCi의 방사선 조사했을 때 배양 시간이 흐름에 따라 초기 세포 고사가 11.2%에서 14.4%로 증가하였다가 8%, 3.3%, 2.8%로의 감소하는 양상을 보였으며, 후기 세포 고사는 15.5%에서 19.9%, 24.4%, 27.5%, 30.2%로 증가하는 양상을 보였다. 2 mCi의 방사선 조사했을 때 조사 직후 초기 세포 고사가 10.8%에서 배양 시간이 흐름에 따라 14.4%로 증가하였다가 7.5%, 5.1%, 4.5%로 감소하는 양상을 나타내었다. 후기 세포 고사는 배양 시간이 흐름에 따라 19.7%에서 20.2%, 23%, 24.3%, 34.9%로 증가하는 양상을 보였다. 5 mCi의 방사선을 조사했을 때, 초기 세포 고사가 11.9%에서 17.6%로 증가하였다가 10.2%, 4.1%, 3.6%로 감소하는 양상을 나타내었으며, 후기 세포 고사가 16.6%에서 21.8%, 23.9%, 26.4%, 28.8%로 증가하는 양상을 나타내었다. MDA-MB-231 (p53 mt) 세포주의 경우에 방사선 조사 후 배양 시간이 지남에 따라 후기 세포 고사비율이 증가하였으며, 2 mCi를 조사하였을 때 그 차이가 가장 나타났었다(그림 24).

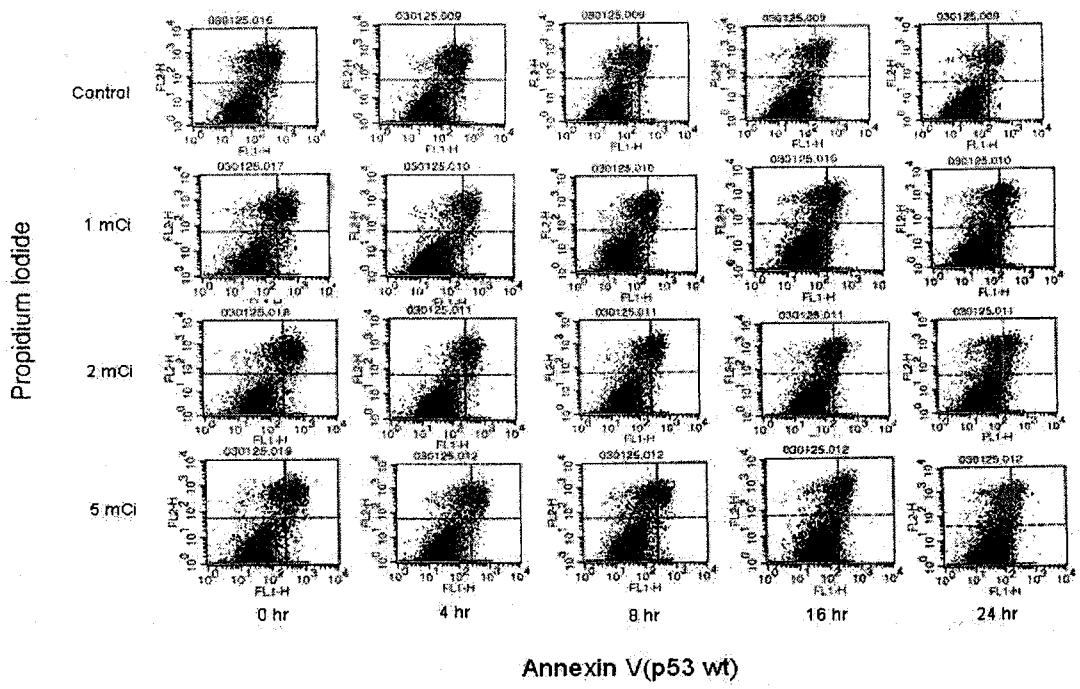


그림 23. Cytogram of Annexin V binding vs. Propidium iodide uptake of MDA-MB-231(p53 wt) in 4 hr beta-irradiation.

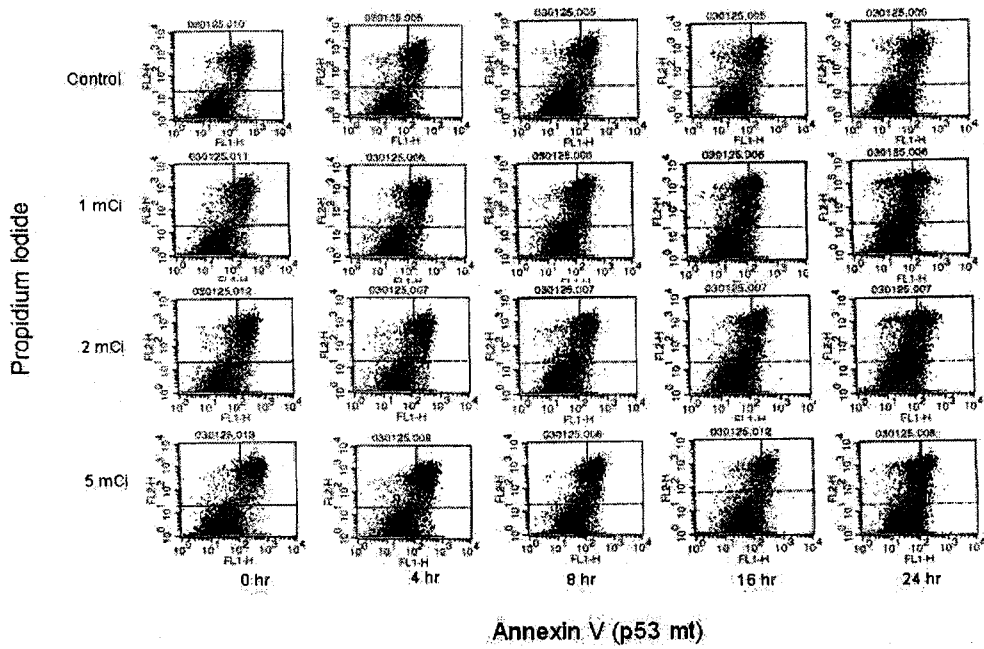


그림 24. Cytogram of Annexin V binding vs. Propidium iodide uptake of MDA-MB-231(p53 mt) in 4 hr beta-irradiation.

(나) DNA 함량에 대한 유세포 계측 결과 (PI 염색)

방사성에 의한 세포주기(cell cycle)의 변화를 관찰하기 위해서 준비된 세포 현탁액에 100% ethanol 2.5ml을 첨가하여 세포 현탁액을 만들어 이를 -20°C 에서 하루 동안 고정시킨 후 1,500 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 pellet에 1x PBS 2ml을 넣어 섞어 준 뒤 다시 원심분리 하였다. pellet에 PI solution(50 μ g/ml PI, 100 μ g/ml RNase A, 0.05% Triton X-100) 500 μ l를 넣고 실온에서 15분간 염색하여 DNA 함량을 유세포 계측기로 측정하였다.

대조군 유전자를 가진 MDA-MB-231(p53 wt)의 DNA content를 관찰한 결과 G1기의 DNA가 4시간 동안 방사성 동위원소 처리 후 0시간일 때 control과 거의 비슷한 반면에 4시간 동안 방사성 동위원소 처리 후 4시간 배양했을 때 control에 비하여 G1기의 DNA content가 20 \pm 3% 감소하였으며, 4시간 동안 방사성 동위원소 처리 후 8시간 배양했을 경우에는 30 \pm 5% 감소하였다. 4시간 동안 방사성 동위원소 처리 후 16시간 배양했을 경우 G1기의 DNA content는 70 \pm 3% 감소하였으며, 4시간 동안 방사성 동위원소 처리 후 24시간 배양했을 경우에는 75 \pm 4% 감소하는 것을 관찰 할 수 있었다. 방사선 조사를 받은 후 각각의 배양 시간동안 세포들은 control에 비하여 16시간 배양 때까지 S기의 증가 양상을 나타내었으며, 24시간 배양 시에는 control 보다도 S기가 감소하였음을 보여주었다. mutant type의 p53을 가진 유방암 세포에서는 배양 시간이 지남에 따라 방사선을 조사하지 않은 control에 비하여 방사선을 조사했을 때 대부분의 G1기 상태에서 S기를 거쳐 G2기로 세포 비율이 증가하는 G2/M arrest 형태가 나타났다(그림 25).

wild type p53을 과 발현된 유방암 세포주인 MDA-MB-231(p53 wt)의 DNA content를 관찰한 결과 control에서 13 \pm 1%의 G1기, 45 \pm 4%의 G2/M기의 세포가 존재하는 것을 관찰 할 수 있었다. mutant type의 p53을 가진 유방암 세포인 MDA-MB-231(p53 mt)과 달리 MDA-MB-231(p53 wt)의 세포주에서는 control의 세포 주기가 정상적인 cell cycle을 나타내지 않고 G1기가 감소되어 있으며, aneuploidy가 형성된 것으로 나타나는 특징을 보였다. 이는 p53 과 발현에 의한 세포의 repair 기능이 증가되어 암세포의 성장을 억제하는 형태로 세포주기가 변화한 것으로 생각된다.

4시간 방사성 동위원소 조사 후 8시간과 16시간 배양했을 때 G1기의 비율이 30 \pm 2% 감소하였으며, 24시간 배양했을 때 45 \pm 2% 감소하였다. MDA-MB-231(p53 wt)의 세포주는 G2/M기의 세포 비율도 방사선 조사 후 시간이 지남에 따라 감소하는 것을 확인 할 수 있었으며, 이러한 변화는 상대적으로 aneuploid 형태의 DNA 비율을 증가시키는 것으로 확인되었으며 과 발현된 wild type p53에 의해 야기된 G2/M기 지연현상(G2 arrest)에 머물러 있던 세포들이 방사선 조사 후에 세포고사나 세포주기 조절에 의해 사멸되도록

한 것으로 보인다(그림 26).

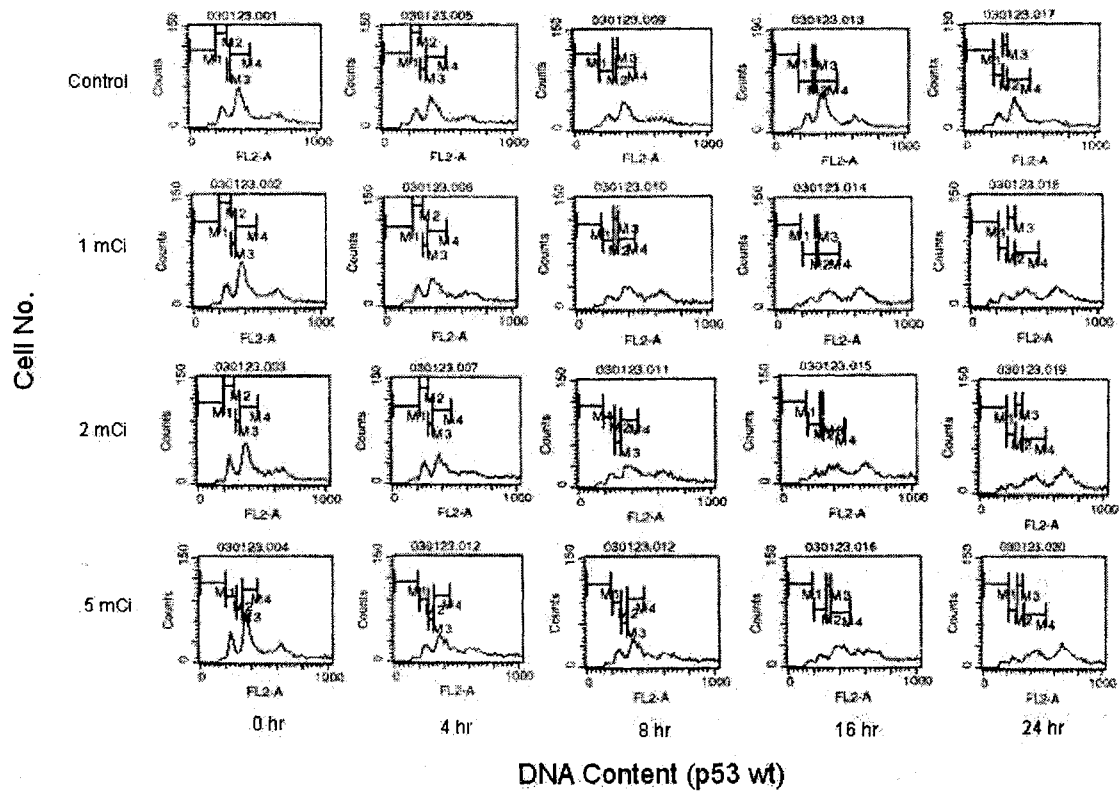


그림 25. The DNA histogram of MDA-MB-231(p53 wt) in 4 hr beta-irradiation

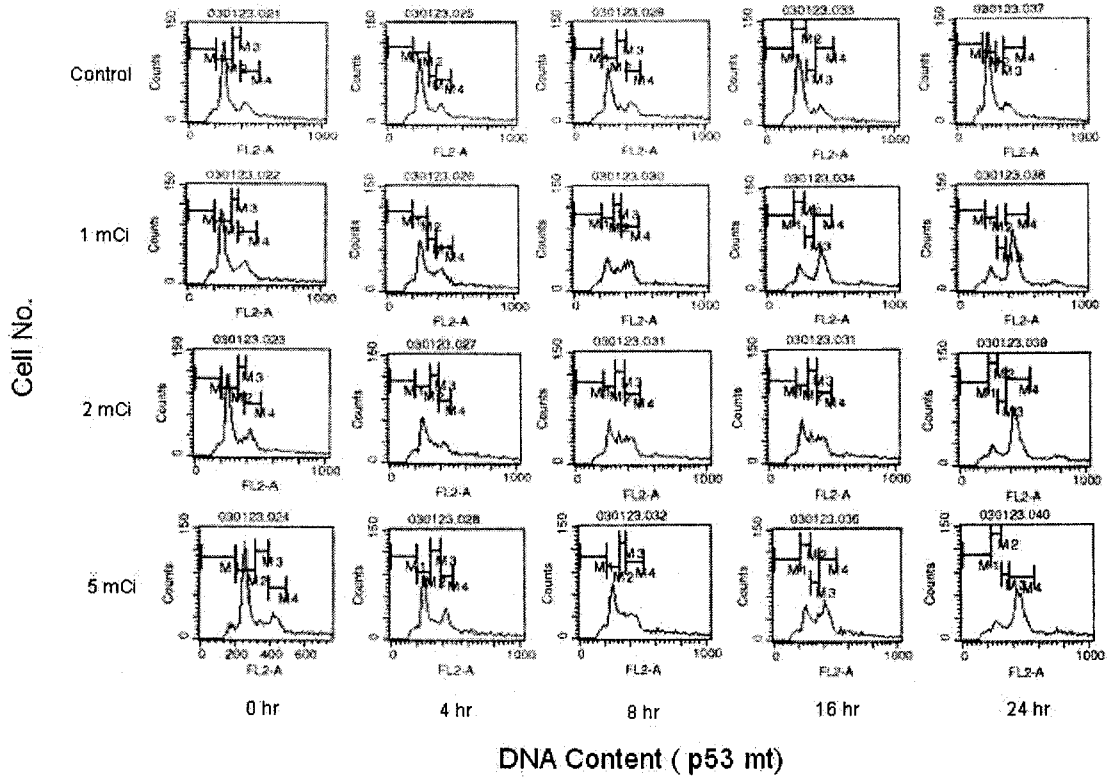


그림 26. The DNA histogram of MDA-MB-231(p53 mt) in 4 hr beta-irradiation.

(다) F-18-FLT ($2'$ - 18 Fluoro- $2'$ -deoxythymidine)의 섭취율 변화 평가

p53 유무에 따른 방사성 동위원소 처리 전후 핵산의 대사를 영상화 할 수 있는 방사성 의약품으로서 thymidine 유도체인 $2'$ - 18 Fluoro- $2'$ -deoxythymidine(18 FLT)을 이용하여 방사성 동위원소 처리에 의한 종양세포의 핵산 대사를 평가하고자 하였다. p53 mutant type 세포주인 MDA-MB-231(p53 mt)과 p53 wild type 세포주인 MDA-MB-231(p53 wt)을 이용하여 방사성 동위원소로서 Re-188을 이용하여 4시간 동안 동위원소를 각각 0, 1, 2, 5 mCi를 처리한 후 0시간, 4시간, 8시간, 24시간에 1시간 18 FLT 섭취율을 γ -counter를 이용하여 평가하였다(그림 27). MDA-MB-231(p53 mt)와 MDA-MB-231(p53 wt)의 방사성 동위원소 처리군의 섭취율이 각각 2.26 %ID와 1.72 %ID로서 MDA-MB-231(p53 mt)인 정상 세포주가 p53 wild type의 유전자가 과발현된 MDA-MB-231(p53 wt) 보다 18 FLT 섭취율이 31% 증가하였다. 이는 wild type의 p53을 과발현한 MDA-MB-231(p53 wt) 세포주의 경우에는 정상적인 cell cycle이 mutant type의 p53을 가진 MDA-MB-231(p53 mt)세포주의 G1 기가 major peak 인 세포주기와는 다르게 G2/M 기 arrest가 나타나는 형태로서 G1기 \rightarrow S 기 transition시 DNA의 합성이 증가하는데 wild type의 p53을 과발현한 MDA-MB-231(p53 wt)세포주에서는 이러한 세포주기를 보이지 않으므로 이에 따

라 핵산 유도체인 ^{18}FLT 의 섭취율이 감소한 것으로 생각된다. 또한 방사성 선량이 증가함에 따라서 ^{18}FLT 섭취율이 감소하는 양상을 보여주었다(그림 28).

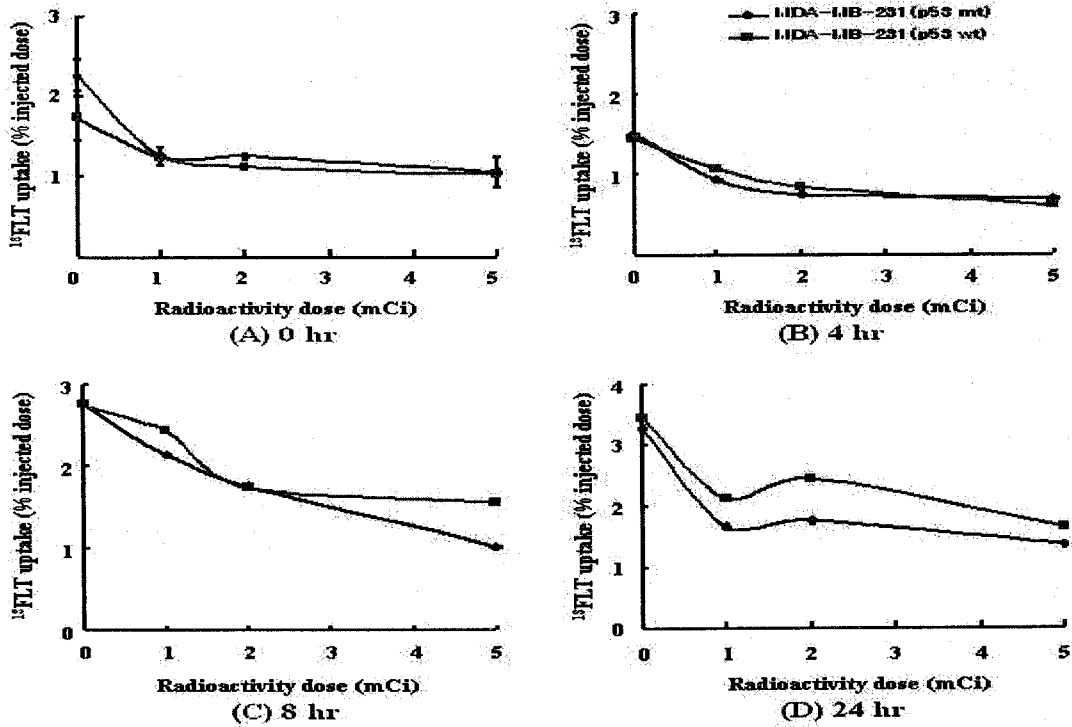


그림 27. Time dependency of FLT uptakes in MDA-MB-231(p53 mt ; pcDNA) and MDA-MB-231(p53 wt ; p53WT) by 4 hour β -irradiation.

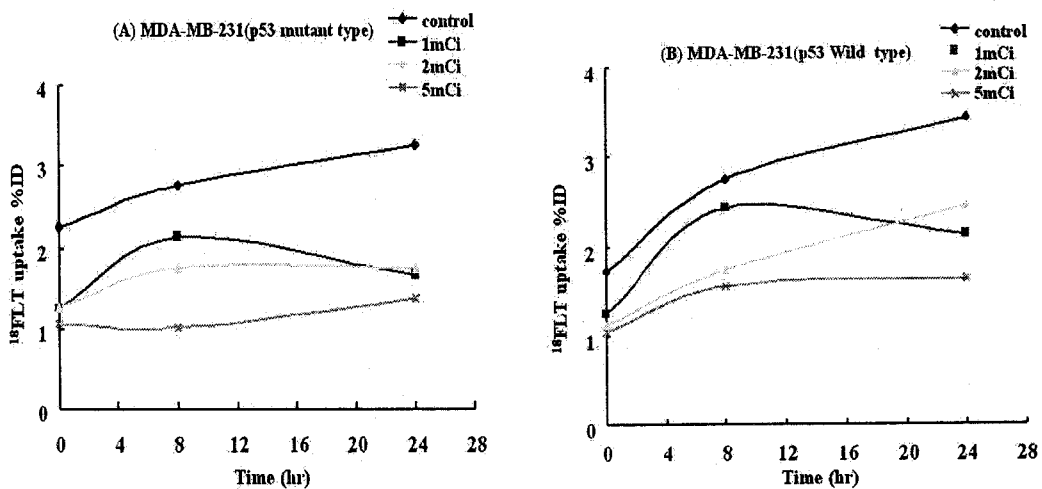


그림 28. Dose dependency of FLT uptakes in MDA-MB-231(p53 mt ; pcDNA) and MDA-MB-231(p53 wt ; p53WT) by 4 hour β -irradiation.

(2) MCF7 (p53 wt) 와 MCF7 (p53 mt)세포주를 이용한 p53 유무에 따른 방사성 동위원소 처리시 세포 반응 양상 및 섭취율 평가

(가) 세포 생존율 비교

방사선 조사 18시간 전에 각각의 세포를 $1.0 \times 10^5/\text{ml}$ 개씩 24 well culture plate에 접종하여 배양하였으며, 세포배양액에 각 농도의 Re-188 동위원소를 Monte Carlo EGS4 Method에 의해 세포배양액 1ml인 상태에서 세포배양액에 Re-188 동위원소를 0.1mCi, 0.5mCi, 1mCi 직접 첨가하여 24시간 배양한 후에 Trypan blue 염색법을 이용하여 세포 생존율을 분석하였다.

세포 생존율은 조사선량이 증가함에 따라 감소하였으며 동위원소를 1, 4 시간 조사했을 때는 p53에 따른 세포주에서 유의한 차이를 보이지 않았으며, 조사선량의 증가에 따라서도 유의한 감소를 나타내지 않았다(그림 29-a, b). 동위원소를 24시간 조사하였을 경우 조사선량이 증가함에 따라 유의한 차이를 나타내었으며, MCF7(p53 mt) 세포주에서 0.1 mCi, 0.5 mCi의 Re-188을 24시간 조사했을 경우 MCF7(p53 wt) 세포주보다 각각 23%, 17% 낮게 유의한 차이를 보였으며, 상대적으로 높은 1 mCi를 첨가했을 경우 en 세포주 사이에서 거의 비슷한 생존율을 보였다(그림 29-c). 이 결과는 MCF7(p53 mt)세포주가 MCF7(p53 wt)세포주에 비해 β -irradiation에 더 민감한 것을 보여주었다.

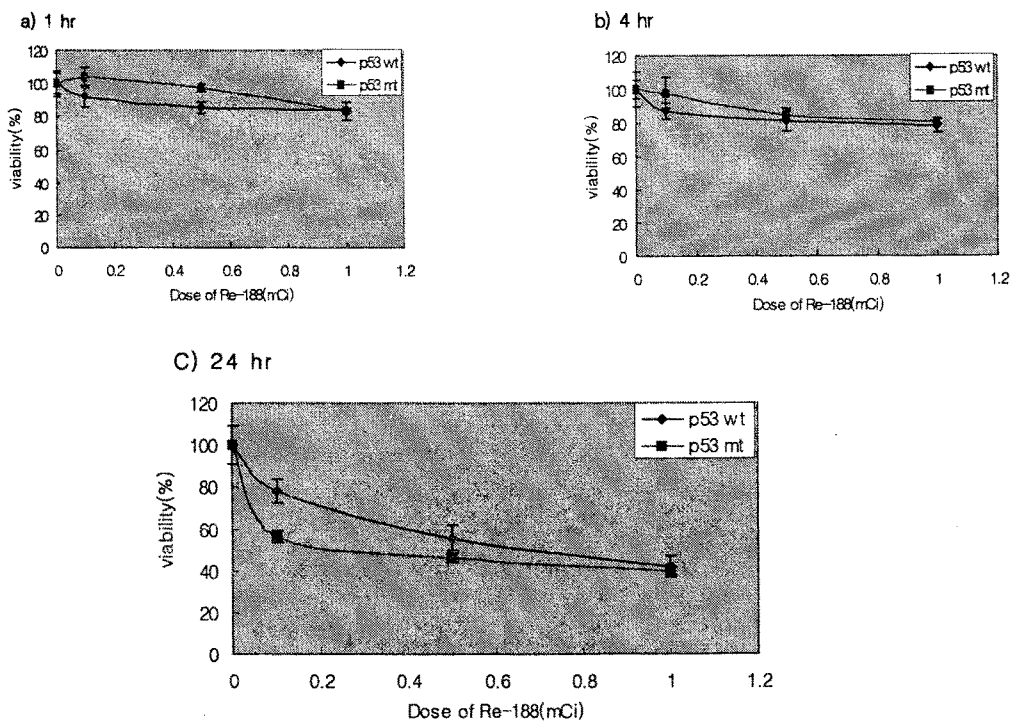


그림 29. Evaluation of cell viability by Trypan blue dye exclusion test in MCF7 (p53 wt) and MCF7 (p53 mt).

(나) 세포 고사에 대한 유세포 계측 결과 (AV/PI)

Re-188을 24시간 조사 후 유세포 계측기로 세포고사 및 세포괴사 비율을 비교한 결과 세포고사 및 세포괴사율은 조사선량이 증가함에 따라 증가하였으며, MCF7(p53 mt)세포주가 MCF7(p53 wt)세포주에 비해 약간 더 높은 세포고사 및 괴사비율을 나타내었다. MCF7(p53 mt)세포주가 MCF7(p53 wt)세포주에 비해 0.1 mCi의 동위원소 처리시 4%, 0.5 mCi의 동위원소 처리시 7.2%, 1 mCi 동위원소 처리시 10% 높은 세포고사 및 괴사비율을 나타내었다(그림 30).

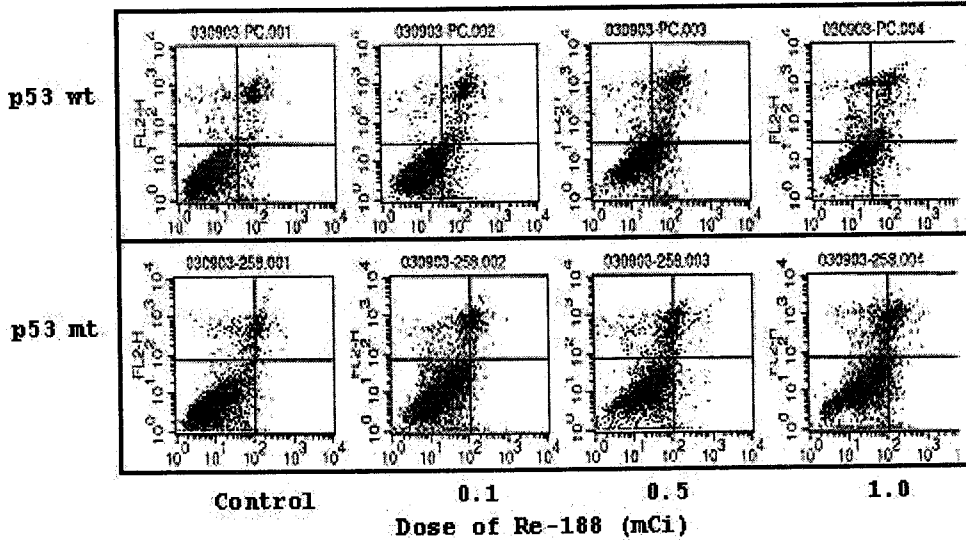


그림 30. Cytogram of Annexin V binding vs. Propidium iodide uptake of MCF7(p53 wt) and MCF7(p53 mt)

(다) F-18-FLT (2'-¹⁸Fluoro-2'-deoxythymidine)의 섭취율 변화 평가

Thymidine 유도체인 F-18-FLT를 이용하여 p53 유무에 따른 세포주에서 방사성 동위원소 처리 전후 thymidine 발현을 평가하고자 하였다. 방사선 조사 18시간 전에 각각의 세포를 $1.0 \times 10^5/\text{ml}$ 개씩 24 well culture plate에 접종하여 배양하였으며, Re-188 동위원소를 1, 4, 24시간 처리 후 방사성 의약품으로서 F-18-FLT를 370KBq 첨가하고 60분간 배양하였다. 각각의 시간대에 각 well의 세포를 수확하고, 1X PBS 1ml을 넣고 섞은 후 1200 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상층액을 제거하고 PBS로 다시 한 번 wash 한 후 γ -counter를 이용하여 측정하였다. Re-188 동위원소 처리 후 thymidine 유도체인 F-18-FLT 섭취율을 비교한 결과 동위원소 처리 1시간, 4시간 후 섭취율은 조사선량이 증가함에 따라 약간 감소하였으며, wt과 mt 세포주 사이에서의 유의한 차이는 보이지 않았다. 동위원소 처리 24시간 후 조사선량이 증가함에 따라 FLT 섭취율은 감소하였다. MCF7(p53 wt) 세포주의 경우 대조군에 비해 동위원소 조사 후 조사선량이 증가하더라도 비슷한 FLT 섭취율을 나타내었으며, MCF7(p53 mt) 세포주의 경우 조사선

량이 증가함에 따라 FLT 섭취율도 점점 감소하는 것을 보여주었다. 0.5mCi 이상의 Re-188을 24시간 처리하였을 경우 MCF7(p53 mt) 세포주에서 MCF7(p53 wt) 세포주에 비해 1.2배 감소하여 유의한 차이를 나타내었다. F-18-FLT 섭취율은 세포 생존율과 비슷한 양상을 보여주었다(그림 31).

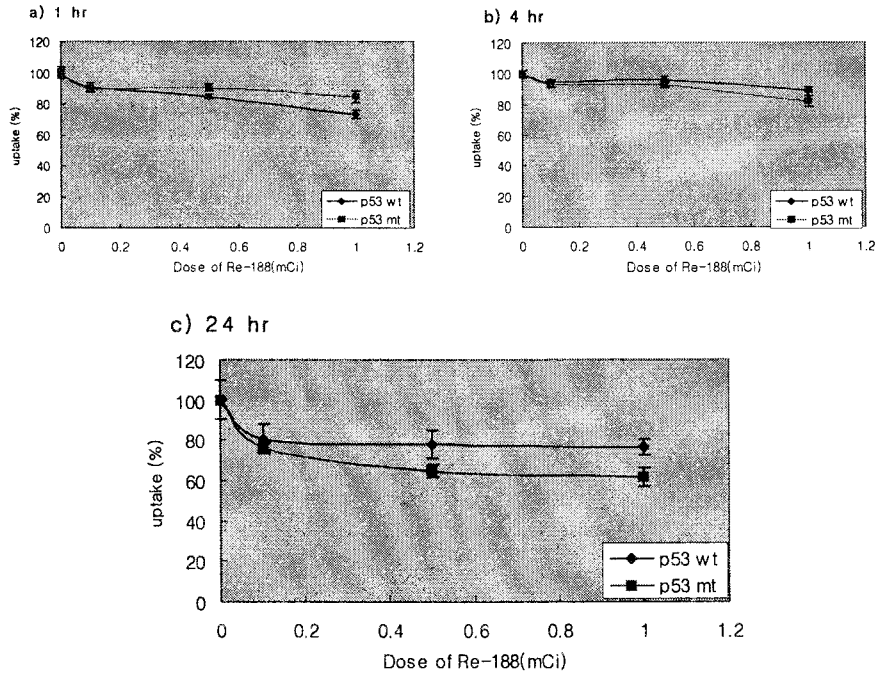


그림 31. Time dependency of FLT uptakes in MCF7(p53 wt) and MCF7(p53 mt) by β -irradiation.

(라) F-18-FET(0-2'-¹⁸Fluoro-ethyl_L-tyrosin)의 섭취율 변화 평가

아미노산 대사 유도체인 F-18-FET를 이용하여 p53 유무에 따른 세포주에서 방사성 동위원소 처리 전후 아미노산 대사를 평가하고자 하였다. 방사선 조사 18시간 전에 각각의 세포를 1.0×10^5 /ml개씩 24 well culture plate에 접종하여 배양하였으며, Re-188 동위원소를 1, 4, 24시간 처리 후 방사성 의약품으로서 F-18-FET를 370KBq 첨가하고 60분간 배양하였다. Re-188 동위원소를 조사한 후 FET 섭취율을 비교한 결과 조사선량이 증가함에 따라 FET 섭취율도 증가하였다. 1시간, 4시간 동위원소 조사 후 FET 섭취율은 조사선량이 증가함에 따라 약간씩 증가하는 양상을 보였으며, 24시간 동위원소 조사 후에는 조사선량이 증가함에 따라 확연하게 증가되는 양상을 보였으나, MCF7(p53 mt) 세포주가 MCF7 (p53 wt)세포주 사이에서는 유의한 차이를 보이지 않았다(그림 32). 세포생존율의 결과에서(그림 29) 각각의 세포주가 Re-188 동위원소에 대해 민감도가 다르다는 것을 감안하여 FET 섭취율의 결과를 전체 살아있는 세포의 수를 확인하여 세포당 섭취율로 환산하여 결과를 비교하였다. Re-188 동위원소 조사 후 1시간째,

4시간째에는 조사선량이 증가함에 따라 FET 섭취율이 증가하였으며, MCF7 (p53 wt)세포주에 비해 MCF7(p53 mt)세포주에서 더 높은 FET 섭취율을 보여 주었다(그림 33-a, b). 24시간 조사 후 섭취율은 조사선량이 증가함에 따라 확연히 증가하였으나, 각각의 세포주 사이에서 유의한 차이를 보이지 않았다(그림 33 c).

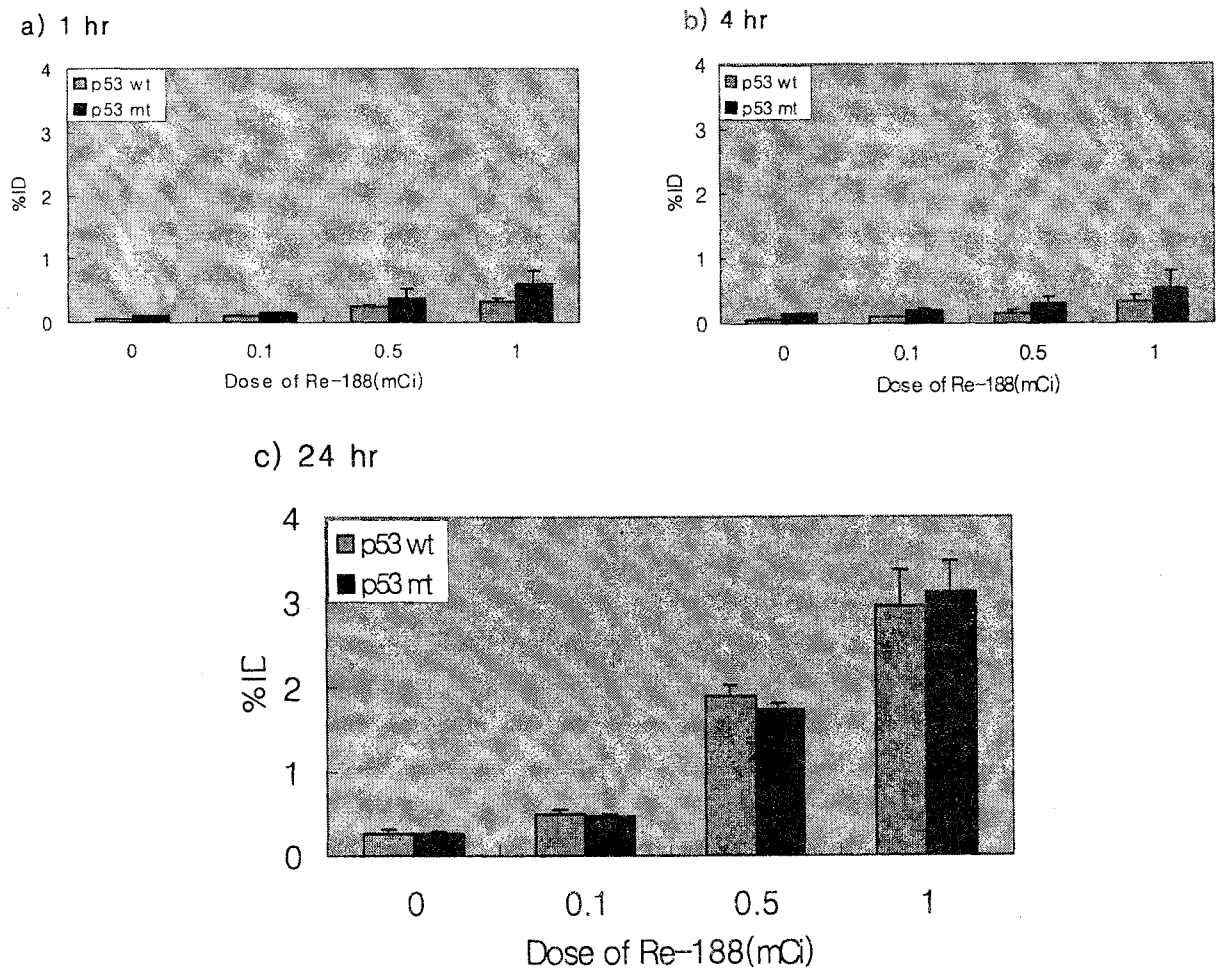
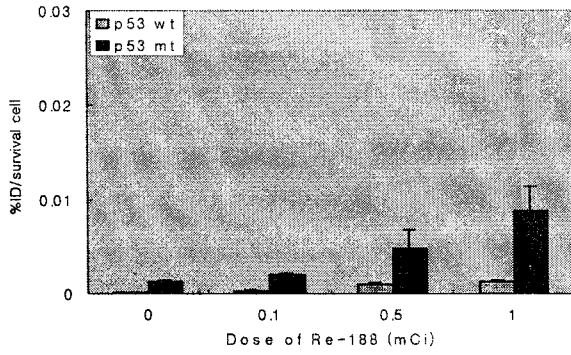
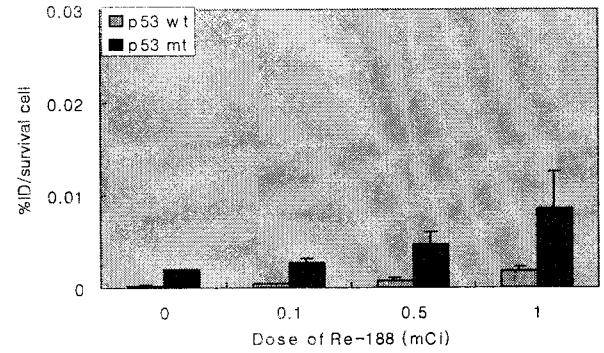


그림 32. Time dependency of FET uptakes in MCF7(p53 wt) and MCF7(p53 mt) by β -irradiation.

a) 1hr



b) 4hr



c) 24hr

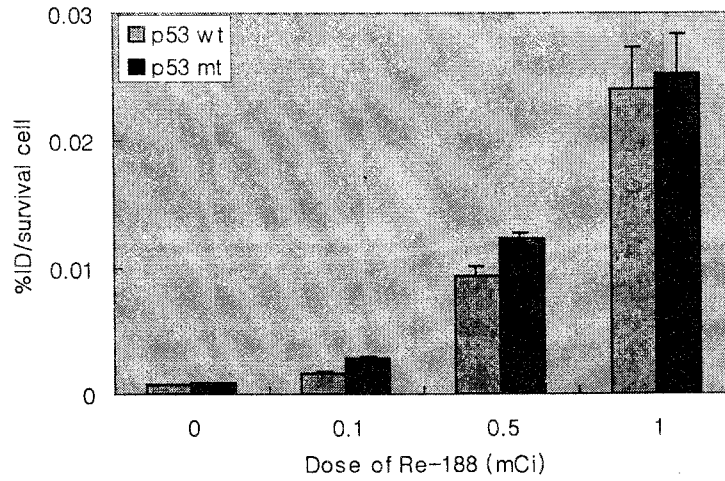


그림 33. Time dependency of FET uptakes in live cells after β -irradiation.

(마) F-18-FDG (2'-¹⁸Fluoro-deoxyglucose)의 섭취율 변화평가

Glucose 대사 유도체인 F-18-FDG 를 이용하여 p53 유무에 따른 세포주에서 방사성 동위원소 처리 전후 glucose 대사를 평가하고자 하였다. 방사선 조사 18시간 전에 각각의 세포를 1.0×10^5 /ml개씩 24 well culture plate에 접종하여 배양하였으며, Re-188 동위원소를 1, 4, 24시간 처리 후 방사성 의약품으로서 F-18-FDG를 370KBq 첨가하고 60분간 배양하였다. Re-188을 처리한 후 FDG 섭취율을 비교한 결과 MCF7(p53 mt)세포주가 MCF7(p53 wt)세포주에 비해 높은 FDG 섭취율을 나타내었으며, 1시간, 4시간 조사 후 FDG 섭취율은 조사선량이 증가할수록 증가하였으며, MCF7(p53 mt)세포주가 MCF7(p53 wt)세포주에 비해 1-1.5배 높은 섭취율을 나타내었다. 24시간 동위원소 조사 후 조사선량이 증가할수록 섭취율은 약간씩 증가되는 양상을 보였으며, MCF7(p53 mt)세포주가 MCF7(p53 wt)세포주에 비해 FDG 섭취율이 2배 이상으로 유의하게 증가되었음을 보여주었다(그림 34). 각각의 세포주가 Re-188 동위원소에 대해 민감도가 다르다는 것을 감안하여 FDG 섭취율의 결과를 전체 살아있는 세포의 수를 확인하여 세포당 섭취율로 환산하여 결과를 비교하였다. 살아있는 세포당 FDG 섭취율을 비교한 결과에서 전체적인 FDG 섭취율은 같은 양상을 보여 주었다. 1시간, 4시간 동위원소 조사 후 FDG 섭취율은 조사선량이 증가함에 따라 MCF7(p53 mt)세포주에서 증가하는 양상을 보였으며, 24시간 동위원소 조사 후 FDG 섭취율은 조사선량이 증가함에 따라 확연히 증가하였으며, MCF7(p53 wt)세포주에 비해 MCF7(p53 mt)세포주에서 2배 이상의 유의한 FDG 증가를 보여주었다(그림 35). Re-188 동위원소 처리 후 MCF7(p53 mt)세포주에서 glucose 대사가 유의하게 증가되었음을 확인하였다.

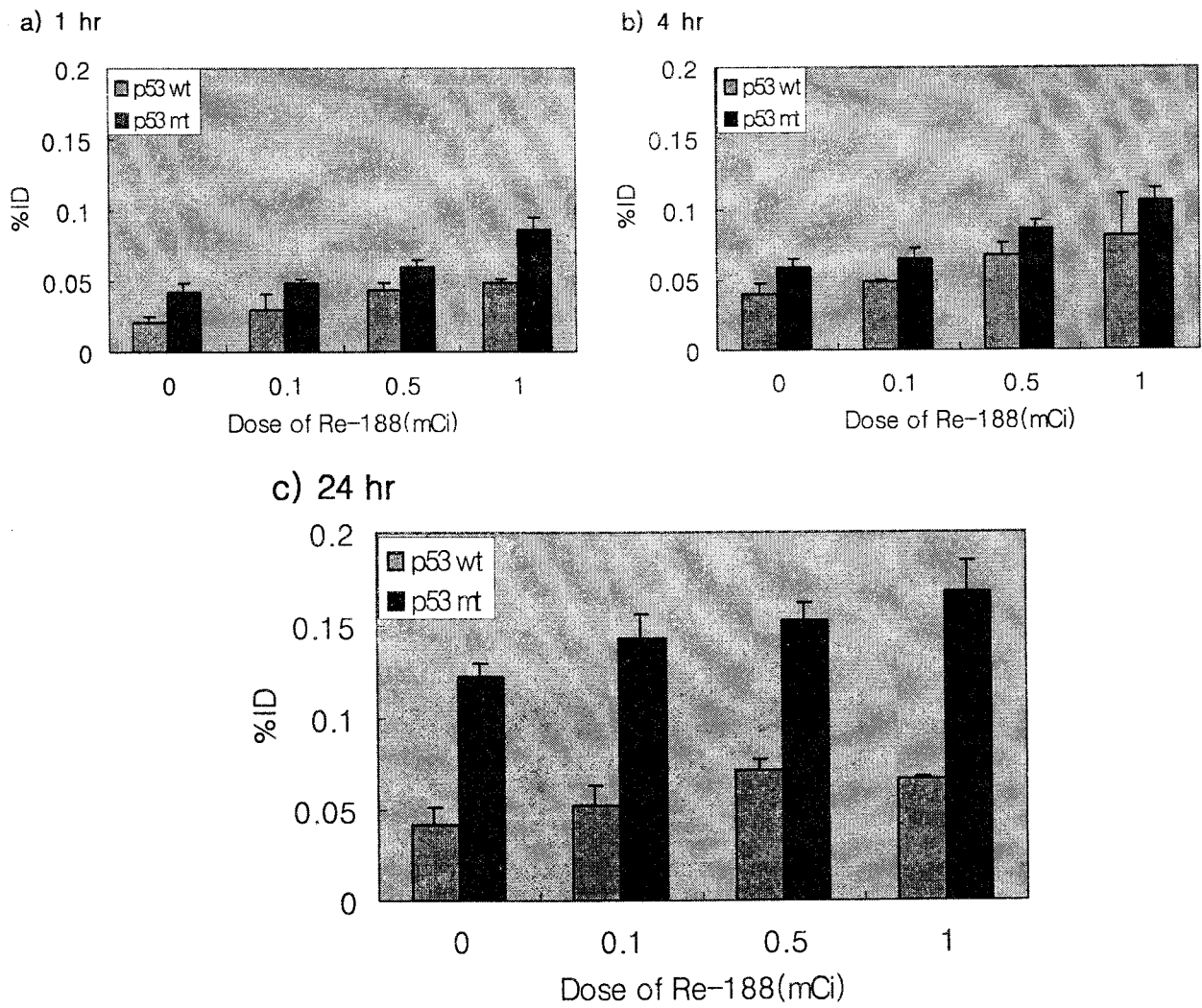


그림 34. Time dependency of FDG uptakes in MCF7(p53 wt) and MCF7(p53 mt) by β -irradiation.

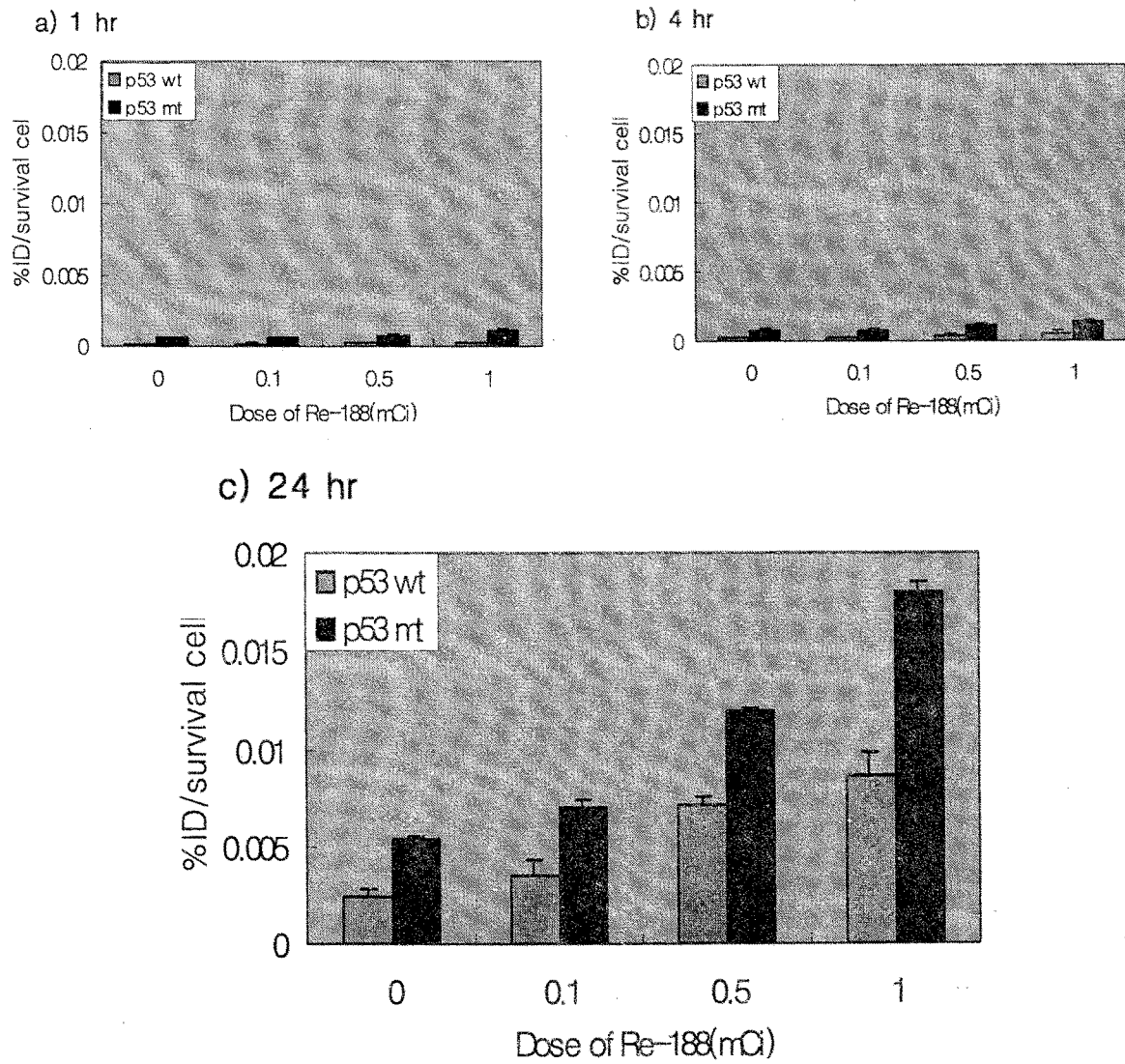


그림 35. Time dependency of FDG uptakes in live cells after β -irradiation

제 2 절 암세포를 대상으로 동위원소별 반응성 유전자군의 발굴

1. 뇌암, 폐암 및 유방암세포에서 I-131, Re-188 등 동위원소에 반응하는 유전자 탐색

- RFP상 연구 수행내용과 연구 결과가 일치하지 않는 이유

● 폐암, 뇌암 세포주를 대상으로 연구가 진행되지 아니한 이유

유방암 세포주를 이용한 실험결과가 방대하여 충분한 연구가 수행되어야 연구 결과가 종국적으로 임상에 적용할 수 있는 연구 결과가 도출될수 있을 것으로 생각되며 이러한 이유로 폐암, 뇌암세포주에서 유방암 세포주에서의 연구가 충분히 시행된 이후에 추가적으로 중복되지 않는 범위 내에서 실험하는 것이 효율적이며, 1차년도 실적평가 시 이러한 부분의 RFP를 변경하여줄 것을 건의하였으나 2003년 10월13일에서야 2004년 RFP의 변경을 요구받아 변경안을 제출해 놓은 상태이며 2004년 연구내용과의 연계성을 위하여 유방암 세포주에서 베타선에 의한 세포고사관련 현상을 계속 연구중에 있음.

● I-131 동위원소 처리에 대한 연구결과를 제시하지 아니한 이유

베타선방출 방사성동위원소의 암세포주에 대한 영향은 베타선의 물리적인 성질에 의한 것으로 Re-188에서 방출된 베타선이나 I-131에서 방출된 베타선은 에너지의 크고 작음에 차이는 있지만 핵에서 방출된 전자라는 점에서는 동일함. Re-188 로 선량계산에 의한 암세포주 베타선조사모델을 확립하여 결과가 계속 산출되는 시점에 360kev 감마선의 방출이 실험자에게 크게 부담이 되는 중복성의 실험을 비효율적으로 진행할 이유가 없다고 사료되어 Re-188에 대한 연구결과를 제시하였음.

● 발굴유전자 기질 및 antisense ODN

방사선의 조사에 반응하는 발굴유전자의 기질 및 antisense ODN의 표지 및 이용은 DNA chip을 이용한 실험에서 공통적으로 관찰되고 그 mechanism이 추론이 가능한 시점에 수행할 수 있도록 필요한 기술을 확립하도록 충분한 기술검토를 하는 것이 1 단계 연구내용임. 발굴유전자의 기질의 구조가 밝혀지지 않은 상황에서 기초기술 확립이상의 연구는 진행될 수 없었으며 이부분의 RFP 변경도 유전자관련 reporter system의 개발로 바꿀 것을 건의하였음.

가. 저선량의 I-131, Re-188 동위원소 처리 프로토콜 개발

저선량의 베타방출 방사성 동위원소를 처리하기 위하여 In-vitro radiation dosimetry를 EGS4를 이용한 Monte Carlo simulation 방법을 이용하여 방사선량을 평가하였다. 방사선량 평가에 있어서 기본적인 조건들에 대하여 다음에 나타내었다.

- Geometrical model : 24 well culture plate, 1ml of culture medium
배양용기의 규격은 실린더 형태로서 inner/outer diameter가 16.15/17.85 mm이며 높이는 4.88 mm인 것으로 한다.
- 세포 배양액에는 일정하고 고르게 방사성 동위원소가 분포되어 있다.
- 세포가 받게 되는 방사선량의 평균값으로 선량을 산정한다
- 세포는 균일하게 culture plate의 바닥에 분포되어 있으며 confluency한 상태에 있다.
- 처리한 방사선량은 4시간 동안 조사된 방사선의 선량으로서 산정되었다.

cell cultureware type	Internal diameter (mm)	Internal height (mm)	Medium Volume(ml)
100mm dish	84.77	2.5	10
6 well plate	34.88	4.7	3
24 well plate	15.8	7.43	1

나. 방사성 동위원소 반응 유전자 스크리닝 방법 및 분석방법 확립

본 연구는 14k 유전자칩을 이용하여, 종양세포에 치료용 방사성 동위원소인 Re-188을 이용하여 베타 방사선을 4시간 동안 일정한 방사선량으로 처리한 후, 총 RNA를 분리하고 Microarray 분석을 실시하여 방사선을 조사하지 않은 세포에 비해 2배 이상 발현이 증가한 유전자를 선별하고자 하였다. 치료용 방사성 동위원소 반응 종양 유전자에 대한 RT-PCR (Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction 분석을 수행하여 Microarray와 같은 2배 이상의 발현증가를 보이는 유전자를 선별하고자 하였다. 또한, 방사성 동위원소인 Re-188을 처리하지 않은 유전자에 대한 Microarray를 실시하여 두 분석결과를 비교함으로써 치료용 방사성 동위원소에 반응하는 유전자를 평가하고 검색하고자 하였다. 방사성 동위원소 반응 유전자를 선량별로 평가함으로써 저선량과 고선량의 차이를 규명하고자 하였다. 최종적으로 선별된 유전자는 진 뱅크 수탁번호 (gene bank accession no)를 평가하여 정확한 유전자의 기능을 규명하고자 하였으며, 발굴된 유전자는 방사성 동위원소 치료 시 평가에 사용될 수 있는지를 평가하기 위한 효소와 Antisense -ODN 제조 기술을 검토하고자 하였다.

(1). Microarray 분석

사용 세포주의 선택 : 종양세포주인 MCF-7을 사용하였다.

방사선 조사: Monte Carlo EGS4 Method에 의해 24 well culture plate에서 세포 배양액 1ml인 상태에서 4시간 조사 배양시 1mCi/ml, 2mCi/ml, 5mCi/ml의 선량을 세포가 받도록 Re-188을 24 well culture plate 배양액에 직접 투여하여 4시간 배양한 후 새로운 배양액 1ml로 3회 세척하고 세척한 세포를 재접종 하여 0, 4, 8, 16, 24 시간까지 배양하였다.

188Re은 188W / 188Re generator(Oak Ridge National Laboratory, Oak Ridge, TN, U.S.A.)로부터 용출(elution)하여 준비하고 배양액으로 희석하여 원하는 선량이 되도록 한 후 배양액에 직접 주입하였다. 188Re에서 방출되는 155Kev의 γ -에너지는 전체 에너지의 2% 이내로 본 실험에는 영향을 주지 않으므로, γ 선에 의한 영향은 무시하였다.

Total RNA의 분리: Total RNA의 분리는 상품화된 Triazol™(Life Technology, Inc; Gaithersburg, MD, USA)을 이용하였다. MCF-7에서 추출한 총 RNA에서 mRNA를 분리하였으며, 올리고텍스 비드(oligotex bead) (Qiagen Co.; Santa Clarita, CA, USA)를 이용하였다.

Microarray 분석: Microarray 분석은 3 단계 즉, 라벨링, 혼성화 (hybridization), 세척의 단계로 진행하였다. 25 μ l의 반응 혼합물을 이용하여 라벨링(labeling)을 실행하였다. 반응 혼합물의 구성은 2 μ l dNTP/프라이머 혼합 농축물, 2 μ l 비라벨 대조군 RNA, 20 μ g (X μ l) 총RNA 또는 mRNA, 13-X μ l RNase-free water로 구성되었다. 반응 혼합물을 65 $^{\circ}$ C에서 10분간, 25 $^{\circ}$ C에서 5분간 처리한 후 4 μ l 시아닌 3-dUTP 또는 2 μ l 시아닌 5-dUTP를 첨가하였다. 그 후 42 $^{\circ}$ C에서 3분간 처리한 후 2.5 μ l 10X 반응 혼합물 완충용액을 넣고 혼합하였다. 2 μ l AMV RT/RNase 억제제를 넣고 42 $^{\circ}$ C에서 60 분간 배양한 후 다시 4 $^{\circ}$ C에서 10분간 방치하였다. 2.5 μ l의 0.5M EDTA를 넣어 반응을 중단시키고 2.5 μ l의 1N NaOH을 넣어 가수분해를 시작하였다. 65 $^{\circ}$ C에서 30분간, 4 $^{\circ}$ C에서 5분간 배양하였는데 배양동안 6.2 μ l의 1 M Tris HCl(pH 7.5)를 넣어 중화시켰다. 만들어진 cDNA를 순수하게 분리하기 위해 스피ن 컬럼(spin column, Millipore사; Bedford, MA)을 이용하였다. cDNA는 Cy-5 (붉은색)와 Cy-3 (초록색)로 라벨링하여 발현정도를 비교하였다.

Microarray스캐닝 및 데이터 분석: NEN MICROMAX cDNA Microarray를 이용하였고 NEN 웹 페이지 (www.nen.com)를 참고하였다. 플루오레센트 이미지(Fluorescent image)가 함유된 Microarray는 PIX 4000 Microarray 스캐너 (Axon Instruments)

로 스캐닝 하였고 이미지 분석은 Gene PIX program에 의해 시행하였다. 방사선을 조사하지 않은 세포에 비해 2배 이상 발현이 증가했거나 감소한 유전자를 방사선에 반응하는 유전자로 간주하였다.

(2). RT-PCR 분석

방사선에 노출되지 않은 대조군에 비해 2배 이상 발현이 증가하는 유전자군을 대상으로 다음의 실험을 수행하였다.

방사선 조사후에 총 RNA를 분리한 후 1.25 μ g의 총 RNA를 사용하여 역전사(reverse transcription)을 수행하였다. 1.25 μ g(X μ l) 총 RNA, 17-X μ l RNase-free water로 RNA를 준비한 후 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 다음, 반응 혼합물을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 cDNA를 합성하였고, 다시 95 $^{\circ}$ C에서 5분간 역전사효소(Reverse Transcriptase)를 불활성화시켰다. 반응혼합물의 구성은 2.5 μ l 10X 완충용액, 2.5 μ l dNTP 혼합물(5 mM 각각), 1.25 μ l 올리고 dT 프라이머(500 μ g/ml), 1.25 μ l 역전사효소(4 U/ μ l), 0.5 μ l RNasin(40 U/ μ l)으로 구성되었다. 이렇게 합성된 cDNA를 사용하여 PCR을 수행하였다. 각각의 프라이머들은 각각의 인체 유전자에 알맞도록 설계되었으며, 모두 58 $^{\circ}$ C의 어닐링 온도를 갖도록 제작되었다. 각각 2 μ l의 cDNA를 사용하였고, 반응혼합물을 넣고 95 $^{\circ}$ C에서 5분 동안 변성(denaturation)시킨 후, 95 $^{\circ}$ C 1분(변성), 58 $^{\circ}$ C 1분(어닐링), 72 $^{\circ}$ C 1분(중합)으로 30 Cycle의 PCR을 수행한 후 다시 72 $^{\circ}$ C에서 6분 동안 중합(polymerization)을 수행하였다. 반응혼합물의 구성은 2 μ l 10X 완충용액, 2.5 μ l dNTP 혼합물(2.5 mM 각각), 1 μ l 정방향(forward) 프라이머, 1 μ l 역방향(reverse) 프라이머, 0.1 μ l Taq DNA 폴리머라제 (TaKaRa 5 U/ μ l), 11.4 μ l 증류수로 구성되었다.

(3) 방사선 동위원소 반응유전자 탐색 및 발굴된 유전자의 영상화 타당성 검증

Microarray 분석은 생명공학연구소에서 제작한 14K cDNA 마이크로어레이를 이용하였고 Fluorescent image가 함유된 Microarray는 PIX 4000 Microarray 스캐너 (Axon Instruments)로 스캐닝 하였고 이미지 분석은 Gene PIX program에 의해 시행하였다. 방사선을 조사하지 않은 세포에 비해 2배 이상 발현이 증가했거나 감소한 유전자를 방사선에 반응하는 유전자로 간주하고자 하였으며 관련 유전자의 Microarray 분석결과에 따라 얻어진 유전자군의 분석이 계속적으로 실시되어야 할 것으로 판단되며 세포고사와 관련된 유전자의 경우에 생체 내에서 증용한 인산화 효소 등의 경우에는 인산화 효소 특이적인 기질을 제조하는 기술을 검토 중에 있으며, 특정 효소가 검색되지 않는 경우에는 특정 유전자의 발현을 평가할 수 있는 Antisense-ODN의 합성을 실시하여 여기에 방사성동위원소를 표지하여 영상화 할 수 있는 기법 등이 개발될 것이다.

다. 유방암 세포에서 Re-188 방사성동위원소 반응 유전자 탐색

(1) 유방암 세포에서 Re-188 동위원소 처리 전후 세포사멸을 및 세포고사율 비교

유방암 세포주 MCF7에 저선량(0.1mCi)과 고선량(1mCi)의 방사성 동위원소 처리 후 배양 시간에 따라 세포 생존율을 조사한 결과 24시간째에 가장 큰 차이를 확인 하였으며, Annexin V 염색군 비율을 확인한 결과에서도 24시간째에 가장 큰 차이를 확인 하였다.

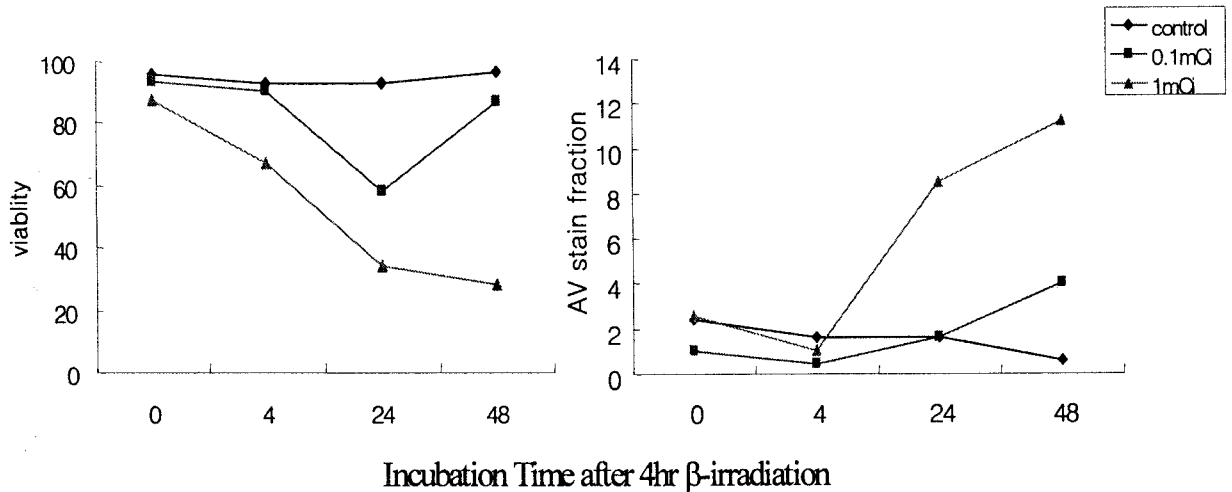


그림 36. Evaluation of cell viability and apoptosis fraction in MCF7 .

(2) 유방암 세포주에서 Re-188 동위원소 반응 유전자 분석(1)

유방암 세포주 MCF7에 0.1mCi의 Re-188 동위원소를 4시간 처리한 후 24시간 배양 한 경우에는 14,000개의 유전자 중에서 77개의 유전자가 2배 이상 증가 발현되었으며, 78개의 유전자가 2배 이상 감소 발현 되었다.

유방암 세포주 MCF7에 1mCi의 Re-188 동위원소를 4시간 처리한 후 24시간 배양 한 경우에는 14,000개의 유전자 중에서 82개의 유전자가 2배 이상 증가 발현을 나타내었으며, 81개의 유전자가 2배 이상 감소 발현 되었다.

저선량과 고선량의 Re-188 처리 시 각각에서 2배 이상 차이를 보이는 유전자들 중에서 둘 다에서 2배 이상 증가된 차이를 보이는 1개의 유전자와 2배 이상 감소된 차이를 보이는 28개의 유전자를 선별하였으며, Hyaluronidase, WASF2, superkiller viralicidic activity 2, alpha-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, ATP-binding cassette, acyl-Coenzyme A dehydrogenas, histone deacetylase 2, nuclear zinc finger protein Np95, methyl-CpG binding domain protein 3, ubinuclein 1, NADH dehydrogenase, lumican 등의 유전자들이 관찰되었다.

(3) 유방암 세포주에서 Re-188 동위원소 반응 유전자 분석(2)

유방암 세포주 MCF7에 0.1mCi의 Re-188 동위원소를 4시간 처리한 후 24시간 배양 한 경우에는 14,000개의 유전자 중에서 336개의 유전자가 2배 이상 발현 차이를 나타내었으며, 모두 감소 발현되었다. 그 중에서 98개 유전자는 10배 이상 감소 발현되었다.

유방암 세포주 MCF7에 1mCi의 Re-188 동위원소를 4시간 처리한 후 24시간 배양 한 경우에는 14,000개의 유전자 중에서 321개의 유전자가 2배 이상 발현 차이를 나타내었으며, 1개의 유전자를 제외한 나머지는 모두 감소 발현되었다. 그 중에서 28개 유전자는 10배 이상 감소 발현되었다.

저선량과 고선량의 Re-188 처리 시 각각에서 2배 이상 차이를 보이는 유전자들 중에서 둘 다에서 2배 이상 차이를 보이는 142개의 유전자를 선별하였으며, hexosaminidase B(beta polypeptide), BCL2-interacting killer(apoptosis-inducing), apolipoprotein E (APOE), mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8(MAP3K8), adenine nucleotide translocator, insulin-like growth factor binding protein 2(IGFBP2), p58, mitogen-activated protein kinase 12 (MAPK12), ubiquitin conjugating enzyme 6, tumor necrosis factor receptor superfamily, Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein, cell death regulator 등의 유전자들이 관찰되었다.

2. 발굴유전자 활용기술 개발

Re-188 동위원소 반응 유전자 분석을 2차로 나누어 분석시행한 결과 1차 분석에서는 유방암 세포주 MCF7에 0.1mCi의 Re-188 동위원소를 4시간 처리한 후 24시간 배양 한 경우에는 14,000개의 유전자 중에서 77개의 유전자가 2배 이상 증가 발현되었으며, 78개의 유전자가 2배 이상 감소 발현 되었다. 유방암 세포주 MCF7에 1mCi의 Re-188 동위원소를 4시간 처리한 후 24시간 배양 한 경우에는 14,000개의 유전자 중에서 82개의 유전자가 2배 이상 증가 발현을 나타내었으며, 81개의 유전자가 2배 이상 감소 발현 되었다.

2차 분석에서는 유방암 세포주 MCF7에 0.1mCi의 Re-188 동위원소를 4시간 처리한 후 24시간 배양 한 경우에는 14,000개의 유전자 중에서 336개의 유전자가 2배 이상 발현 차이를 나타내었으며, 모두 감소 발현되었다. 그 중에서 98개 유전자는 10배 이상 감소 발현되었다.

유방암 세포주 MCF7에 1mCi의 Re-188 동위원소를 4시간 처리한 후 24시간 배양 한 경우에는 14,000개의 유전자 중에서 321개의 유전자가 2배 이상 발현 차이를 나타내었으며, 1개의 유전자를 제외한 나머지는 모두 감소 발현되었다. 그 중에서 28개 유전자는 10배 이상 감소 발현되었다.

1차 분석에서 저선량과 고선량의 Re-188 처리 시 각각에서 2배 이상 차이를 보이는 유전자들 중에서 둘 다에서 2배 이상 증가된 차이를 보이는 1개의 유전자와 2배 이상 감소된 차이를 보이는 28개의 유전자를 선별하였으며, Hyaluronidase, WASF2, superkiller viralicidic activity 2, alpha-1,4-N-acetylglucosaminyl-transferase, ATP-binding cassette, acyl-Coenzyme A dehydrogenase, histone deacetylase 2, nuclear zinc finger protein Np95, methyl-CpG binding domain protein 3, ubinuclein 1, NADH dehydrogenase, lumican 등의 유전자들이 관찰되었다.

2차분석에서는 저선량과 고선량의 Re-188 처리 시 각각에서 2배 이상 차이를 보이는 유전자들 중에서 둘 다에서 2배 이상 차이를 보이는 142개의 유전자를 선별하였으며, hexosaminidase B(beta polypeptide), BCL2-interacting killer(apoptosis-inducing), apolipoprotein E (APOE), mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8(MAP3K8), adenine nucleotide translocator, insulin-like growth factor binding protein 2(IGFBP2), p58, mitogen-activated protein kinase 12 (MAPK12), ubiquitin conjugating enzyme 6, tumor necrosis factor receptor superfamily, Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein, cell death regulator 등의 유전자들이 관찰되었다.

베타방출 방사성동위원소에 반응하는 이러한 발굴 유전자들 중에서 모든 유전자를 이용할 수 있는 것이 아니라 분자핵의학적인 방법으로 평가하기 위해서는 효소-기질 시스템을 개발할 수 있는 유전자와 Antisense oligonucleotide(ODN)를 제조하여 발현을 평가할 수 있는 유전자로 크게 대별된다. 발굴된 유전자의 대부분은 세포 신호전달 체계에 관련된 신호전달 물질이며, 이러한 물질은 위에서 언급한 효소-기질 시스템과 Antisense-ODN을 이용하기 어려운 물질이다. 그 이유는 일반적으로 정상적인 세포와의 차별성을 부여하기 어려운 측면이 있으며 추가적으로 발현량이 증가하거나 감소하였음에도 불구하고 핵영상으로 획득될 수 있을 정도의 방사성동위원소 표지 기질과 Antisense-ODN을 섭취하기 어려운 특성을 가지는 것으로 알려져 있다.

발굴된 유전자중에서 위에서 언급한 시스템을 이용할 수 있는 신호전달 물질 중에 하나는 BCL2-interacting killer(apoptosis-inducing) 단백질로서 이 유전자의 경우에는 치료시에 종양세포의 살상을 저해함으로써 종양의 치료를 방해하는 기전을 가진 것으로 보고되어 있다. Bcl-2의 발현은 현재까지 혈액암에서 그 발현의 증가가 보고되어 있으며, 고형암의 경우에서도 높은 빈도로 발현이 증가된 단백질로 알려져 있다. 이러한 기전을 이용하여 암의 치료시에 치료효과의 평가방법으로서 종양의 Antisense-ODN

의 섭취를 평가하고 종양세포의 살상효과를 Antisense-ODN의 섭취율의 감소 또는 증가에 따라서 치료제가 유효한지 그렇지 아니한지를 평가할 수 있는 방법으로 임상에 적용하여 사용할 수 있을것으로 기대된다. 본원에서는 기존에 이러한 Antisense-ODN에 동위원소를 표지하는 기술을 개발하여 연구한 경험이 있으며 이를 이용하여 종양에서의 치료효과를 평가하는 기술로서 사용될 수 있을것으로 생각된다. 기존의 연구결과를 언급하면 다음과 같다.

Oligonucleotide를 ^{99m}Tc 로 표지하기 위해 HSV1-tk oncogene의 상보적 12-base single-stranded DNA의 3' 말단에 NH_2 기를 유도하여 NHS-MAG2GABA와 펩타이드 결합시켰다. 상보적 12-base oligonucleotide를 bicarbonate buffer(1M NaCl, 0.25M NaHCO_3 , 1.0mM EDTA at pH8.3-9.0)로 2.0mg/ml의 농도로 희석한 후 primary amine과 phosphate backbone 사이에 secondary complex를 분리시키기 위해 45°C 에서 30분간 반응하였다.

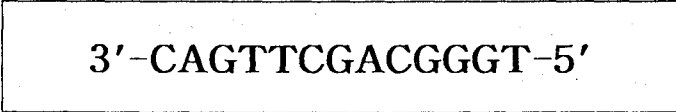


그림 37. Sequences of antisense oligonucleotide of HSV1-tk gene

NHS-MAG2GABA(1mg/ml)를 dimethylformamide에 녹여 DNAsolution에 섞어 MAG2GABA:DNA의 최종 몰비가 20:1이 되게 하여 실온에서 1시간 반응하였다.

MAG2GABA와 결합 DNA에 1M tartrate $20\mu\text{l}$ 를 넣고 stanous tartrate를 퍼징한 증류수로 10mg/ml되게 녹여 $5\mu\text{l}$ 를 넣어 5분간 반응하고, ^{99m}Tc 를 최종 18mCi/ml되도록 넣고 $90\sim 100^\circ\text{C}$ 에서 10분간 반응하였다.

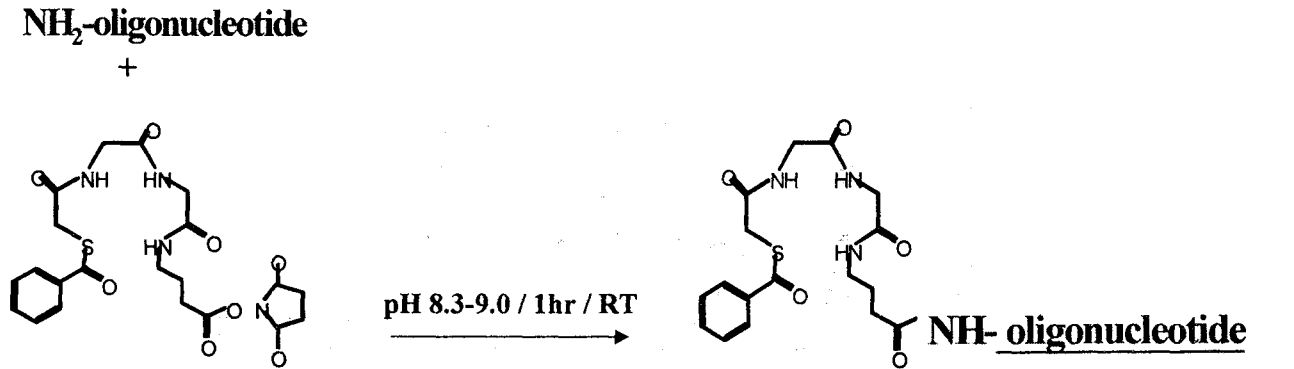
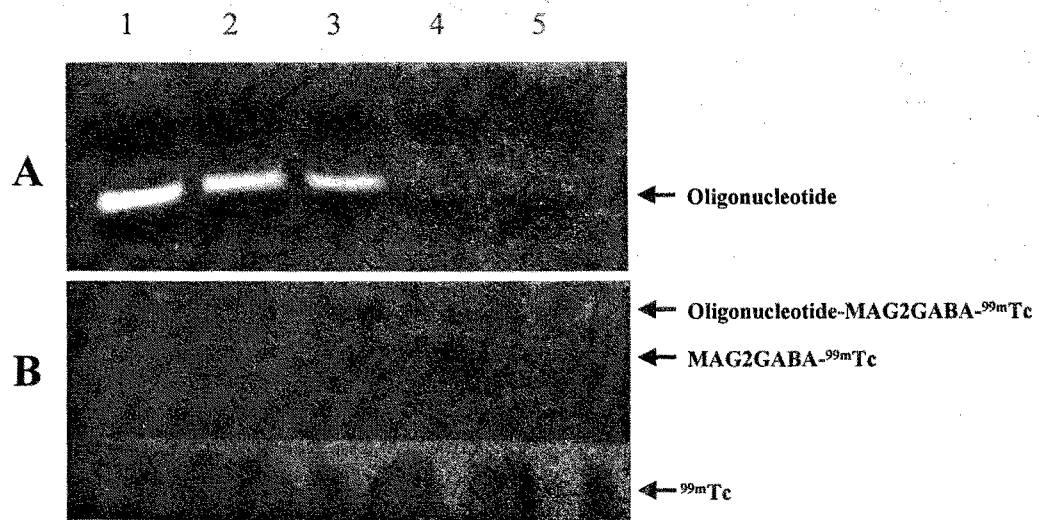


그림 38. Scheme of the conjugation of NHS-MAG2 GABA to oligonucleotide



A : PAGE electrophoretogram shows DNA bands stained with ethidium bromide.

B : Radio activity image of PAGE gel.

Lane 1 , oligonucleotide ; lane 2, MAG2GABA-oligonucleotide ;

lane 3, MAG2GABA-oligonucleotide-^{99m}Tc ; lane 4, MAG2GABA-^{99m}Tc ; lane 5, ^{99m}Tc

그림 41. PAGE Electrophoretogram of ^{99m}Tc - MAG2 GABA- oligonucleotide

^{99m}Tc으로 표지된 oligo-MAG2GABA를 Buffalo hepatoma 세포주인 MCA와 이 세포에 HSV-tk가 발현되는 TK-3 cell에 넣고 15분, 60분 그리고 180분 후 그 섭취량을 감마카운터로 비교하였다. In vitro 세포 섭취실험에서는 MCA와 TK-3 cell에서 60분과 180분에 TK-3 cell이 MCA보다 2배 정도 높은 섭취를 알 수 있었다.

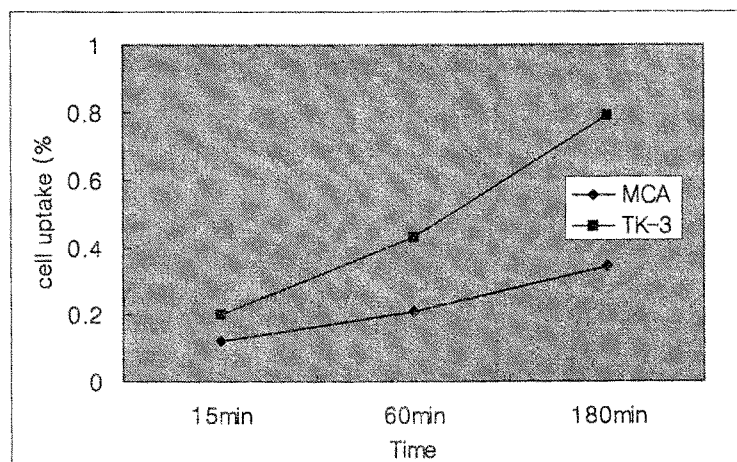


그림 42. Cellular Uptake of ^{99m}Tc-HSV1-Tk Antisenseoligonucleotide

^{99m}Tc 으로 표지된 oligo-MAG2GABA를 P4 column으로 분리하여 normal Balb/c mice의 꼬리정맥에 (10 μCi / 14 μg -DNA/ 0.1ml/ 마리당)주사하였다. 주사 15분과 60분 후 (각 군 당 4마리) 장기를 적출하여 각각의 장기무게를 측정된 후 감마카운터에서 activity를 측정하였다. 투여한 방사능량과 장기내 방사능치를 각 장기의 단위무게당 섭취율 (percent injected dose/gram, %ID/g)값을 구하여 방사능 분포의 차이를 비교하였다. 주사 15분과 60분에서 신장의 섭취가 가장 높았으며 (15분 : 26.78 %ID/g, 60분: 17.25%ID/g) 따라서 신장이 주 배설경로 이었다. 간의 섭취가 높았으며 (15분 : 4.65 %ID/g, 60분: 3.77%ID/g)이는 다른 연구자들의 보고와 일치되는 결과이다. 또한 갑상선과 위의 섭취가 낮아 ^{99m}Tc 표지 Oligonucleotide가 주사 후 1시간 까지 안정함을 알 수 있었다.

HSV-tk가 발현된 Buffalo hepatoma 세포주인 TK-3 cell을 Buffalo rat의 thigh에 주사하여 2주가 지난 후 종양mass를 확인하여 꼬리정맥에 ^{99m}Tc 으로 표지된 ^{99m}Tc -HSV1-tk Antisense oligonucleotide를 주사하였다.

60분 후 감마 카메라로 영상을 얻어 종양의 위치를 확인 할 수 있었다.

Table 1. Biodistribution of ^{99m}Tc-labeled oligonucleotide in normal Balb/c mice(%ID/g)

Organ	15 min		60 min	
	Mean	S.D.	Mean	S.D.
Blood	3.29	1.16	1.31	0.07
Liver	4.65	1.31	3.77	0.17
Lung	2.38	0.57	0.84	0.06
Spleen	1.27	0.38	0.93	0.14
Kidney	26.78	17.55	13.25	2.15
Stomach	1.81	0.96	2.04	1.06
Heart	1.42	0.54	0.59	0.02
Skin	2.56	1.10	0.68	0.14
Femur	1.69	0.65	1.11	0.62
Muscle	1.29	0.60	0.36	0.07
Intestine	4.09	3.02	10.11	2.17
Thyroid	0.06	0.04	0.03	0.02

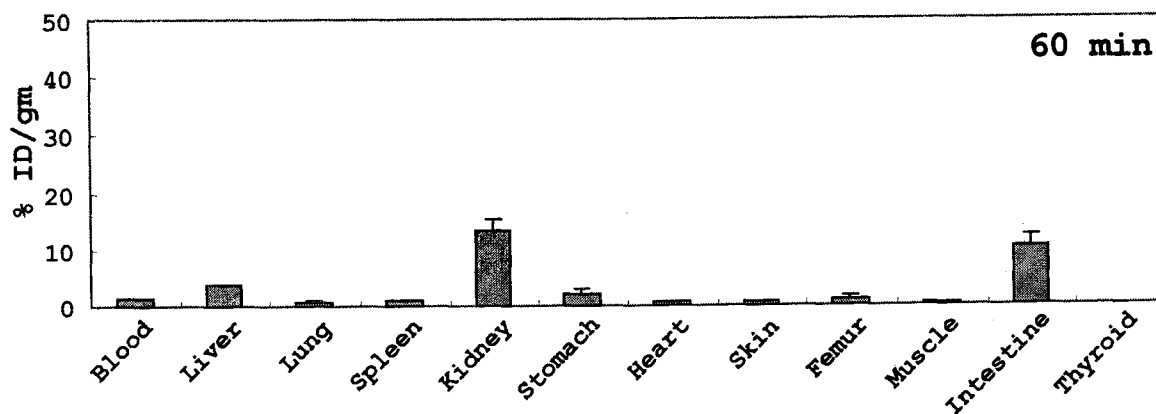
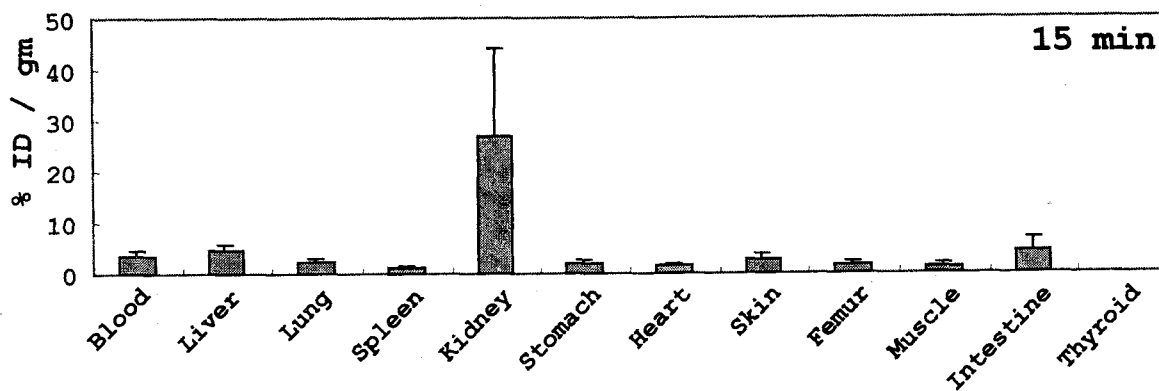


그림 43. Biodistribution results in normal mice 15min, 60min postintravenous administration of ^{99m}Tc labeled oligonucleotide

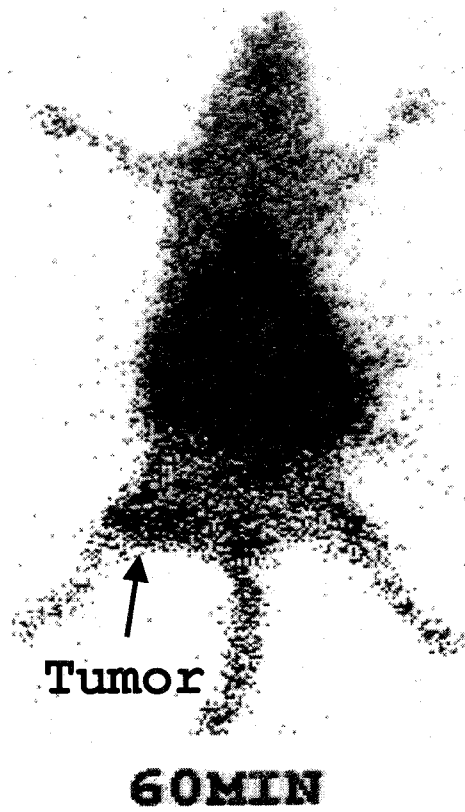


그림 44. Gamma Scintigraphic image of ^{99m}Tc -HSV1-tk Antisense oligonucleotide

3. 세포고사 및 신호전달체계 관련 radioactive microarray의 응용

가. Apoptosis & Signal Transduction Microarray의 개발 및 실험적 적용

(1) Apoptosis & Signal Transduction Microarray Membrane의 구입 및 구조 분석

미국립보건원 노인병연구소 Microarray Unit (Chief: Dr. 케빈 베커)은 미국 메릴랜드주 볼티모어 소재 Johns Hopkins University Bayview Hospital의 Gerontology Research Center 내에 위치하고 있음. 이들 그룹은 10 여년 전부터 주로 노인병에 관련된 gene cloning 및 sequencing에 관한 일 들을 해 왔는데 최근 3년 내에 Northern blot에 사용되는 Nylone membrane에 P-33 표지 probes를 이용한 cDNA microarray를 개발하여 현재 미국립보건원 내에서 가장 많은 종류의 인간 유전체를 검색할 수 있는 15K (1만 5천개) Human cDNA microarray test를 개발 완료하였음. 또한 그 특성별로 소그룹화하여 각각 1,200개의 인간유전체를 검색할 수 있는 "Apoptosis & Signal Transduction Microarray", "Immunoarray", 그리고 "Neuroarray"를 제작, 미국립보건원 내 다른 연구 그룹과 공동 연구 중에 있음

본 연구 그룹은 제 1 단계로 이들 그룹과 연계하여 Apoptosis & Signal Transduction Microarray Membrane을 포함한 하드웨어를 입수한 후 그 구조를 분석하고 제 2 단계로 국산형의 Apoptosis & Signal Transduction Microarray Membrane을 개발여부의 가능성과 타당성을 검토해 보고자 함. 앞서 연구의 필요성 부분에서 전술한 바와 같이 본 microarray system은 품질, 가격, 유용성, 장래성, 등의 면에 있어서 국내에서 개발 중인 다른 microarray system 보다 우월하다 할 수 있음. 가까운 장래에 microarray test의 다양한 보급화 시점을 감안하여 볼 때 고품질, 저가격, 임상 응용에 있어서의 진단, 치료, 예후판정에서의 탁월한 유용성과 장래성이 예상되는 본 기술의 개발이 시급하다 할 수 있음.

연구개시 첫해인 2002-2003년을 통하여 본 연구진은 중앙 생물학 및 관련분야의 지속적인 연구와 지난 3년전부터 원자력 병원 주관의 암의 방사선 치료 효과를 증진시키는 유전자 치료제를 개발하기 위한 연구를 동시에 수행하면서 국내외 첨단 연구동향 및 기술정보를 계속 수집하였고 그 결과를 국내외 학술활동을 통한 검증을 병행하였음. 본 연구팀은 중앙 관련분야 연구를 지속한 이론적, 실험적인 전문가들로 구성되어 있으나 해당 년도 연구내용에 따라 국내외 전문가의 자문 또는 세미나를 활용하였음. 특히 미국립보건원 노인병연구소 Microarray Unit (Chief: Dr. 케빈 베커)를 초청하여 미국 메릴랜드주 볼티모어 소재 Johns Hopkins University Bayview Hospital의 Gerontology Research Center 내에 위치하고 있는 그의실험실에서 10 여년 전부터 주

로 수행한 노인병에 관련된 gene cloning 및 sequencing에 관한 일 들 및 최근3년 내에 Northern blot에 사용되는 Nylon membrane에 P-33 표지 probes를 이용한 cDNA microarray를 개발하여 현재 미국립보건원 내에서 가장 많은 종류의 인간 유전체를 검색할 수 있는 15K (1만 5천개) Human cDNA microarray test를 개발 완료한 내용들에 대하여 특강을 하였음. 또한 본 연구진과 3년여 전부터 Radioactive cDNA microarray test를 그 특성별로 소그룹화하여 각각 1,200개의 인간유전체를 검색할 수 있는 "Cancer Microarray", "Immunoarray", 그리고 "Neuroarray"를 제작한 결과, 각 50여장의 membranes를 확보하였음



그림 45. Cancer Microarray Membrane for Radioactive cDNA Microarray

(2) Microarray 분석 소프트웨어의 구입 및 활용

전체 Microarray test의 시간적인 측면에서 보면 90% 이상을 하드웨어를 이용하여 실험한 결과를 분석하고 해석하는데 있는바 올바른 결과 해석을 위한 적절하고 신뢰성 있는 소프트웨어의 기반 구조를 갖추는 것이 매우 중요한 일이라 할 수 있음. 2000년 12월 말 현재까지의 미국 사정을 보면 캘리포니아주 레드우드시 소재 Sierra Software Co.에서 개발한 "Gene spring"이라는 프로그램이 가장 우수하다고 되어 있음. 이 프로그램의 구입가격은 미화로 약 5만 불이고 3개월에 한번씩 upgrade하면서 임대료 격으로 3천불씩 지급하면서 새로운 access code를 받아야 하는 고가의 프로그램임. 불과 1년 전에는 "Spot fire"라는 프로그램이 최고의 인기였던 점을 감안하면 소프트웨어의 유행 반감기는 앞으로 매우 짧아질 것으로 예상되고 더 좋은 프로그램들이 출현하게 될 것이 예상됨. 이러한 국제적인 추세를 국내에 도입하여 국산형 신경 microarray 하드웨어에 맞는 국산형 소프트웨어를 개발 할 수 있다면 많은 외화를 절약할 수 있을 것으로 사료됨. 이에 본 연구진은 하드웨어에서와 같이 제 1 단계로 현재 미국에서 가장 유행하는 프로그램을 입수하여 분석하고 제 2 단계로 그 국산화의 가능성 여부를 타진하고자 함.

(3) Apoptosis & Signal Transduction Microarray test의 소프트웨어적 분석기술 정립

Membrane을 Imaging Plate에 3일간 expose시킨 후 FLA-8000 (Fuji Co.)을 이용해 [P-33]에 의해 나타난 이미지를 읽었고. 이미지에 나타난 pixel의 [P-33]의 세기를 측정하기 위해 Array Gauge (Fuji Photo Film Co.)로 분석하여 raw data를 얻었음. 이 data를 Microsoft Excel (Microsoft)에서 log10, Z scores, Z difference, Z ratio를 구하고, Z ratio를 기준으로 정상샘플과 비교하여 실험군 샘플에서 발현이 많이 된 유전자를 찾을 수 있어 그것의 이미 구축된 임상적 data와 병리학적 소견과의 연관성을 분석하였음.

유전자 데이터는 미국의 NCBI의 Locuslink(www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink/)를 이용하였음: 1) Superimposed image는 color-modified image로써 Adobe photoshop을 이용하여 microarray의 정성적인 분석을 하는 방법이라 할 수 있는데 노란색을 띠는 점은 대조군과 실험군에서 비슷한 비율로 발현된 유전자들 이고 녹색과 빨간색을 띠는 점은 각각 대조군과 실험군에서 상대방에 비하여 과다발현 된 유전자들 임. 즉 대조군에 비하여 실험군에서 과다발현 된 유전자는 빨간색, 비슷하게 발현된 유전자는 노란색, 그리고 과소발현된 유전자는 녹색으로 서 전 유전자를 통한 일반적인 발현 양상과 함께 흑백으로 보이는 primary image의 정량분석 결과를 재확인하여 주는 자료로서 사용되었음 2) Scatter plots는 위에서 이미 예시한 바 있듯이 microarray 결과의 정량화 산물인 radioactivity 또는 Z-value를 가지고 서로다른 실험군 과 대조군의 Z-value값으로 그린 plot 임 3) Clustergram은 분석한 유전자를 순위별로 재정리한 후, 각 실험군간의 변이차를 보는 기법으로 최근 가장 보편적으로 microarray의 결과분석 방법으로 대략적으로 발현증가 1/3, 발현감소 1/3, 그리고 발현변화 극소 1/3 등으로 구분하여 Red, Green, Gray color로 표시하고 전체 유전자를 재배열 함으로서 유전자 발현 변화를 하나의 그림으로 표현할 수 있는 장점이 있었음. 특히 유전자를 각 실험군에서의 비슷한 발현경향을 보이는 것끼리 묶어주기 때문에 메커니즘연구에 유리하다고 평가되었음.

(4) 암환자의 암조직 및 혈액 시료의 공급 체계 확립

본 연구과제의 가장 큰 특징 중의 하나는 인간의 조직을 이용한 Human cDNA Microarray System이라는데 있음. 앞서 연구의 중요성에서 지적한 바대로 미국 내에 상업화 되어있는 Microarray system이나 국내에서 개발 또는 보급 중인 Microarray system은 Glass with fluorescent probes를 이용한 것으로 임상검사 응용시 Membrane with P-33 probes를 이용한 방법에 비하여 많은 양의 total RNA 정제를 필요로 하고 가격이 10배 이상비싼 단점이 있음. 그러므로 배양세포에서 추출한 RNA와 같이양의 제한이 없는 경우는 무관하겠으나 인체의 암조직과 같이 한정된 시료로부터 소량 정제한

RNA를 이용하는 것은 거의 불가능하다고 할 수 있으며, 이후 소량의 시료로부터 충분한 양의 RNA를 정제하는 법을 개발하였다 하더라도, 많은 대증을 대상으로 한 임상검사법의 일환으로 응용시 진단법, 치료 효과 판정, 그리고 예후 검색 등에 보편적으로 이용되기에는 그 가격 면에서 무리가 따른다 할 수 있음. 이에 반해 상대적으로 본 연구진이 개발하려는 Membrane with P-33 probes를 이용한 Microarray test는 소량의 total RNA로도 분석이 가능하고 대량 검사시에도 가격면에서 부담이 적다는 장점과 장래성을 지니고 있다 할 수 있음. 구체적인 전략으로서 제 1 단계는 원자력병원 핵의학과와 연계하여 유방암 환자의 조직을 정상 부위와 질환 부위를 변별하고 각각 정제하여 probe labeling 때까지 적절하게 보관, 처리하고 사용할 수 있도록 정도관리(Quality control)를 하고 제 2 단계로 radiolabeling의 효율을 높이는 방법을 연구함으로써 이후 진행되는 2 차년도, 3 차년도 연구에 있어서의 infrastructure를 구성하고자 함.

(5) 유방암 환자에서 추출한 RNA (암세포, 백혈구)를 이용한 실험적 적용

고려대 의료원 (안암병원, 구로병원, 안산병원) 및 구미 차병원 산부인과에 내원하여 수술을 시행한 10례의 유방암 환자의 종양조직, 정상조직, 백혈구를 수집하였고, 이들로부터 RNA를 분리하여 Radioactive cDNA microarray 를 시행함. RNA분리는 현재 생화학교실 손정원 교수님 실험실에서 사용하고 있는 protocol에 따라 RNA Extraction을 수행한 결과, 우리 실험실에서 기존에 다른 animal cell의 RNA extraction에 쓰고 있는 Qiagen Kit의 Blood cell용 Kit를 사용한 것에 비하여 수득률이 높은데다가 proteincontamination이 적은 좋은 방법으로 판단되어 이후 실험에 적용함. Radioactive cDNA microarray 실험을 수행한 결과 표-1, 2와 같은 과다 및 과소 발현을 보이는 후보 유전자 군을 발굴하였음. 또한 superimposed 기술로 그림-2와 같은 이미지를 얻었고, 이후 clustering을 수행하여 그림-3와 같은 clustergram을 완성하였음

(6) 유방암에 있어서의 유전자 조절의 특징 규명

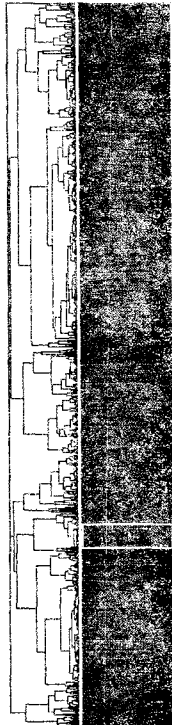
유방암세포를 실험시료로 하여 microarray를 실시하여 어떠한 유전자가 조절되는지 알아보려고 하였음. 우리가 보유하고 있는 membrane은 네 종류로, immunology, apoptosis, neurology, signal transduction으로 나눌 수 있음. 이 중에서 우리가 실시한 membrane은 signal transduction의 membrane이었음. 1차 년도에 이어 본 연구진은 종양 생물학 및 관련분야의 지속적인 연구와 지난 4년 전부터 원자력 병원 주관의 암의 방사선 치료 효과를 증진시키는 유전자 치료제를 개발하기 위한 연구를 동시에 수행하면서 국내외 첨단 연구동향 및 기술정보를 계속 수집하였고 그 결과를 국내외

학술활동을 통하여 검증을 하고자 하였음. 본 연구팀은 암 관련분야 연구를 지속적으로 해온 전문가들로 구성되어 있으나, 해당 년도 연구내용에 따라 국내외 전문가를 초청하여 자문을 구하고 세미나를 개최하여 이를 활용코자 하였음. 특히 미국 메릴랜드주 볼티모어 소재 Johns Hopkins University Bayview Hospital의 Gerontology Research Center 내에 위치하고 있는, 미국립보건원 노인병연구소 Microarray Unit (Chief: Dr. 케빈 베커)를 초청하여서 10 여년 전부터 주로 수행한 노인병에 관련된 gene cloning 및 sequencing에 관한 일들 및 최근 4년 내에 Northern blot에 사용되는 Nylon membrane에 P-33 표지 probes를 이용한 cDNA microarray를 개발하여 현재 미국립보건원 내에서 가장 많은 종류의 인간 유전체를 검색할 수 있는 15K (1만 5천개) Human cDNA microarray test를 개발 완료한 내용들에 대하여 특강을 하였음. 또한 본 연구진과 4년여 전부터 Radioactive cDNA microarray test를 그 특성별로 소그룹화하여 각각 1,200개의 인간유전체를 검색할 수 있는 "Cancer Microarray", "Immunoarray", 그리고 "Neuroarray"를 제작한 결과, 각 50여장의 membranes를 확보하였음.



Gene ID	Gene Name
646	Ubiquitin-conjugating enzyme E2b (RAD6 homolog)
584	TYROSINE-PROTEIN KINASE RECEPTOR
733	Cdc42-interacting protein 4 (CIP4)
67	SIGNAL TRANSDUCER AND ACTIVATOR TRANSCRIPTION FACTOR 1 - ALPHA/BETA
1	US - Precursor mRNA, complete cds
1815	Cyclin-dependent kinase 7 homolog (Cdkona) (Cdk-activating kinase)
851	ESTs, Moderately similar to protein kinase C11
799	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
4	Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase mRNA, complete cds
492	TATA box binding protein (TBP)-associated factor, RNA polymerase II, 200D
1130	MDR (ABCB7): ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 7
996	Tec protein tyrosine kinase

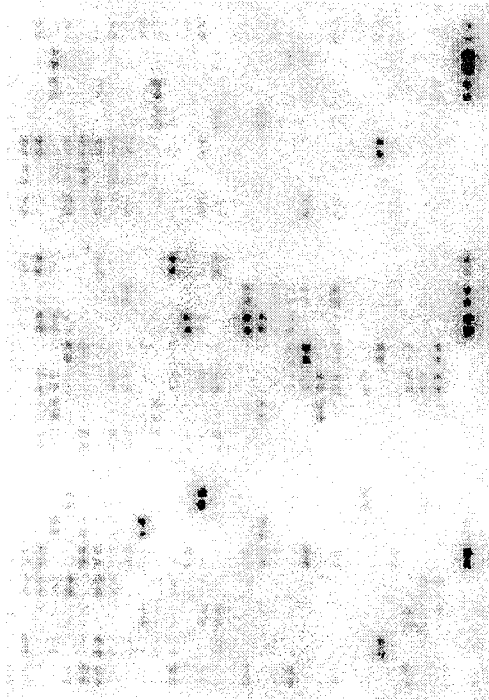
그림 46. RA와 AA의 조합의 처리 시 up-regulation되는 gene들



Gene ID	Gene Name
883	CNRF-dependent protein kinase regulatory subunit type 1
317	Fibronectin 1
823	ESTs, Moderately similar to FcεRI gamma-chain interacting protein SH2-B [R. norvegicus]
934	cadherin 1
351	ESTs
903	angiogenesis receptor 1
870	ESTs, Moderately similar to POU5F1-like 2 (POU5F1L2) (POU5F1L2)
1010	uracil kinase 1 (URK1) mRNA, complete cds
1144	galactosyltransferase-associated protein kinase p58 (GTA); cell division cycle 2-like 1 (CDC2L1; CLK)
599	Burkitt lymphoma receptor 1, GTP-binding protein
882	mitotic checkpoint kinase 2 (MCK2) mRNA, complete cds
1071	interleukin 3 receptor
1034	Down syndrome candidate region 1
936	NR1H1-cytochrome p450 reductase
1097	interferon-induced protein 56
713	notosin chitinase 1 (NCH1) mRNA, complete cds
679	Hexokinase 1
927	RAD51 (S. cerevisiae) homolog C
915	nuclear receptor subfamily 3, group C, member 1
1059	mitosis induced nuclear orphan receptor (MINDOR) mRNA; chondrosarcoma, extraskeletal myxoid, fused to
1068	Burkitt lymphoma receptor 1, GTP-binding protein; CXCR5
893	Hexokinase induced by human interferon
37	Human esophageal cell carcinoma of esophagus mRNA for G2B-7 SH2 domain protein, complete cds
37	GATA-binding protein 1 (globin transcription factor 1)
936	glutathione peroxidase 2 (gastric/intestinal)
1045	interleukin beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDP2, MSK12)
1023	vascular cell adhesion molecule 1
944	forkhead (Drosophila)-like 13; forkhead transcription factor MZF-4 (FHF-4) mRNA
1087	ESTs
896	ESTs
928	mt5 (E. coli) homolog 2 (colon cancer, nonpolyposis type 1)
941	Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase
1124	growth hormone receptor
881	cytochrome b5 domain protein 1 (CYP5B1) mRNA, complete cds

그림 47. RA와 AA의 조합의 처리 시 down-regulation되는 gene들

P-32



P-33

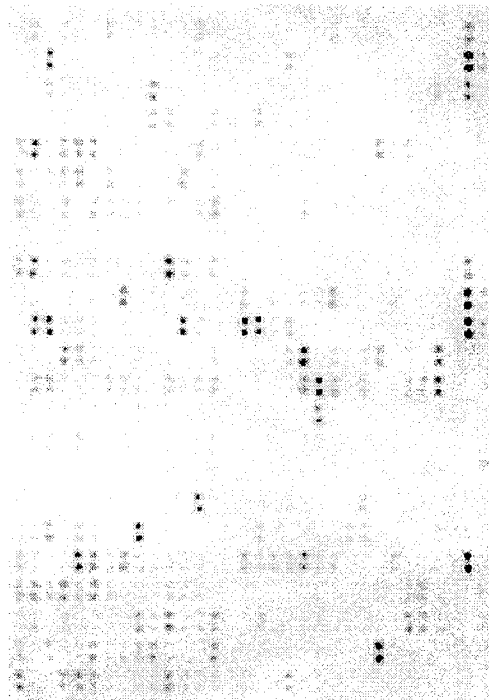
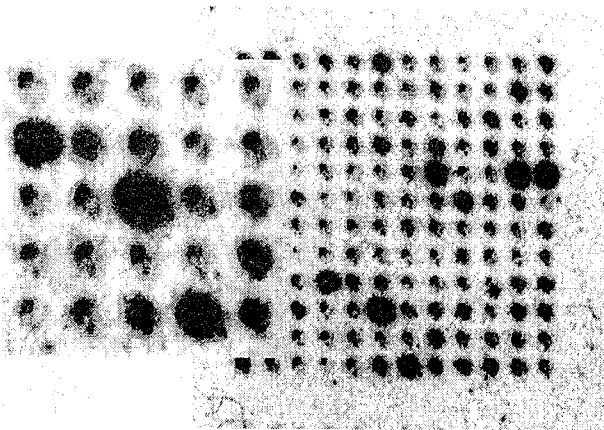


그림 48. Radioactive Probes의 비교(1)

I-125



P-33

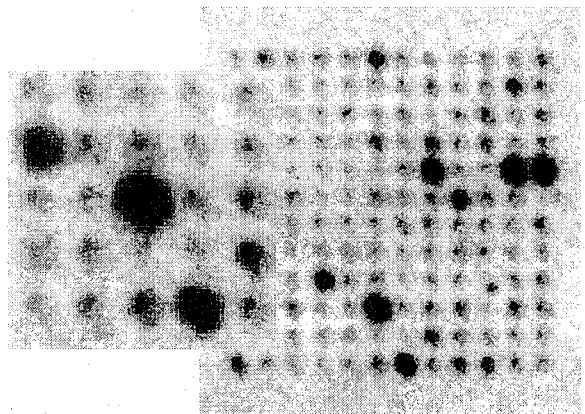


그림 49. Radioactive Probes의 비교(2)

사. 유방암 세포에서 베타방출동위원소 발굴 유전자군의 유전자 발현분석의 적용

유방암 환자에서 추출한 RNA(암세포, 백혈구)를 이용한 microarray를 수행하기 위하여 고려대 의료원(안암병원, 구로병원, 안산병원) 및 구미 차병원 산부인과를 내원한 10례의 유방암 환자의 종양조직, 정상조직, 백혈구를 수집하였음. 이들로부터 RNA를 분리하여 microarray를 실시하였음. Radioactive cDNA microarray 실험을 수행한 결과 그림-6과 같은 과다 및 과소 발현을 보이는 후보 유전자 군을 발굴하였음.

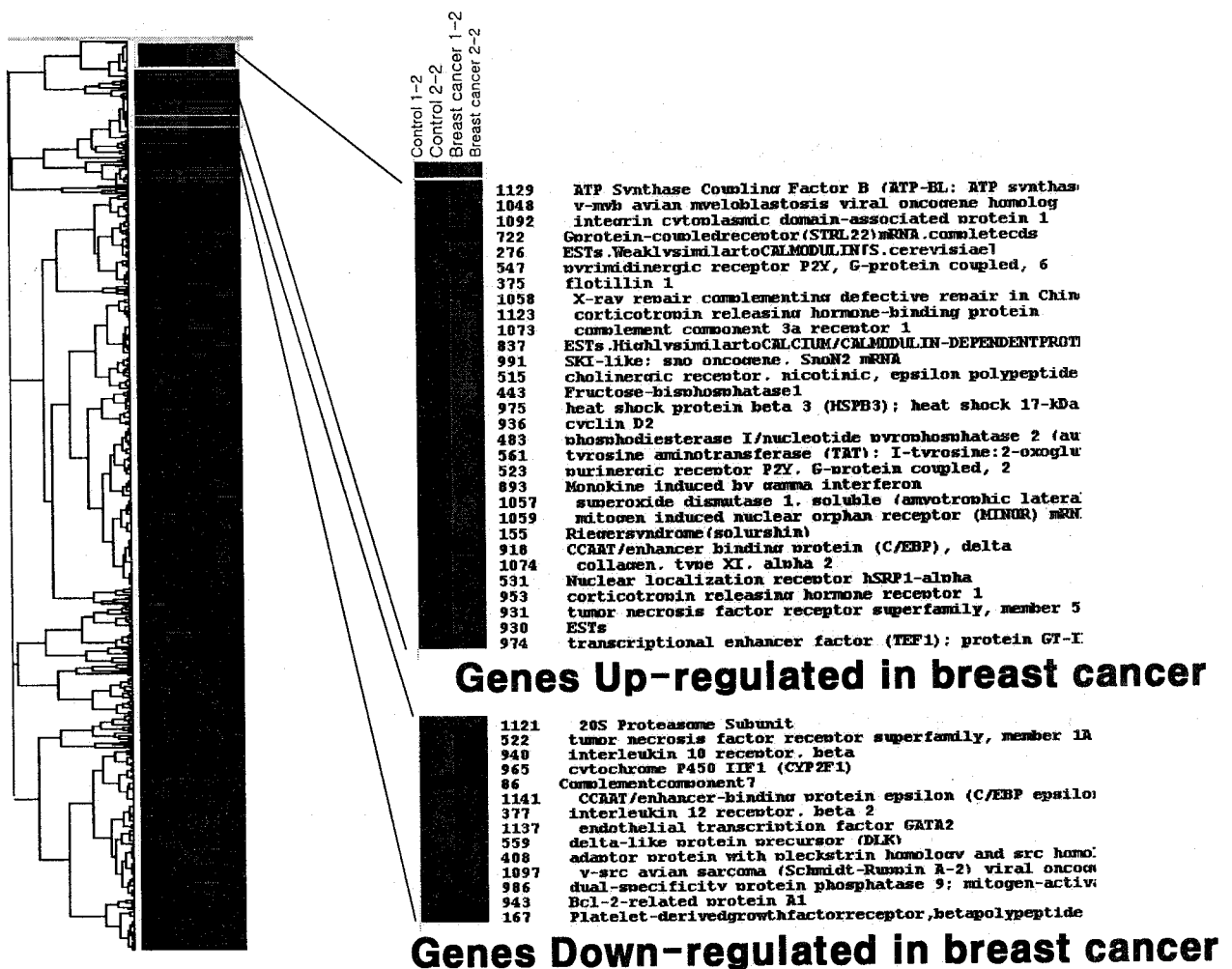


그림 50. 유방암환자에서 up-regulation과 down-regulation되는 gene들

제 4 장 연구개발 목표 달성도 및 관련 분야에의 기여도

1. 연구개발 목표 달성도

	연구내용	연구 결과
제 1단계 제 1차년도 (2002년)	<p>세포신호전달관련 물질을 이용한 동위원소 표지화합물 합성 및 영상화 연구</p> <p>가) Annexin V 영상 -Annexin V 2가지이상의 동위원소 표지를 위한 킬레이트 개발</p> <p>나) P53 유무에 따른 종양세포주의 방사성 동위원소 치료 전후 방사성의약품 섭취율 및 영상 연구 -p53 wild type 세포주 제조 및 p53 mutant type 세포주 선정 및 mutant 세포주의 경우 Wt p53 유전자의 이입유도 -p53 유무에 따른 방사성 동위원소치료 전후 세포의 대사영상방사표지화합물의 섭취율 평가</p> <p>암세포를 대상으로 동위원소별 반응성 유전자군의 발굴</p> <p>가) 뇌암, 폐암 및 유방암세포에서 I-131, Re-188 등 동위원소에 반응하는 유전자 탐색 - 저선량의 I-131, Re-188 동위원소 처리 프로토콜개발 -방사성 동위원소 반응 유전자 스크리닝 방법 및 분석 방법 확립 -폐암세포에서 저선량의 I-131, Re-188 동위원소 처리 후 대상으로 유전자 chip을 이용한 방사선 동위원소 반응유전자 탐색</p> <p>나) 발굴 유전자 활용 기술 개발 -발굴된 유전자의 영상화 타당성 검증</p>	<p>동위원소 표지를 위한 2가지 킬레이트 개발 (HYNIC, ethylenedicysteine)</p> <p>p53 wild-type 과발현 유전자 제조 p53 mutant 세포주에 p53 wild-type 과발현 유전자 이입</p> <p>동위원소 처리 후 세포반응 양상 확인 동위원소 처리후 세포내 FLT 섭취율 평가</p> <p>Re-188 동위원소 처리 프로토콜 확립</p> <p>유전자 스크리닝 방법 및 분석방법 확립</p> <p>유전자 chip 선정</p> <p>- 발굴 유전자중 Antisense-ODN을 이용한 시스템에 대한 기술 검토</p>

	연구내용	연구 결과
제 1단계 제 2차년도 (2003년)	<p>세포신호전달관련 물질을 이용한 동위원소 표지화합물 합성 및 영상화 연구</p> <p>가) Annexin V 영상</p> <ul style="list-style-type: none"> - Annexin V 방사성 동위원소표지법 개발 - 동위원소 표지 Anenxin V 시험관내 안정성 실험 <p>나) P53 유무에 따른 종양세포주의 방사성 동위원소 치료 전후 방사성의약품 섭취율 및 영상 연구</p> <ul style="list-style-type: none"> - 방사성 동위원소를 이용하여 제조된 p53 mutant 및 Wild type 세포주의 동위원소 치료 전후의 반응성 확인 (세포사 및 세포주기 측정) - p53 유무에 따른 방사성 동위원소치료 전후 세포의 대사영상방사표지화합물의 섭취율 평가 <p>암세포를 대상으로 동위원소별 반응성 유전자군의 발굴</p> <p>가) 뇌암, 폐암 및 유방암세포에서 I-131, Re-188등 동위 원소에 반응하는 유전자 탐색</p> <ul style="list-style-type: none"> -유방암 세포를 대상으로 저선량의 I-131, Re-188 동위원소 처리 후 유전자 chip을 이용한 방사선 동위원소 반응유전자 탐색 - 발굴된 유전자의 영상화 타당성 검증 <p>나) 발굴 유전자 활용 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> -방사성 동위원소 반응유전자 관련 substrate의 합성 또는 anti-sense ODN 제조 	<p>99mTC를 이용한 Annexin V 표지법 개발</p> <p>임상적용 가능한 표지수율 및 시험관내 안정성 확립</p> <p>p53 dominant negative mutant 유전자 제조</p> <p>p53 wild-type 세포주에 유전자 이입</p> <p>Re-188 동위원소 처리 전후 세포생존율 및 세포사 확인</p> <p>동위원소 처리후 세포내 대사영상방사표지화합물 섭취율 평가 (FDG, FET, FLT)</p> <p>유방암 세포주 선정 (MCF7)</p> <p>동위원소 처리 후 세포사멸율 확인</p> <p>동위원소 반응 유전자 확인</p> <p>Antisense ODN 이용 유전자 활용 기술 검토 확립</p>

위탁과제 : Apoptosis & Signal Transduction 관련 Radioactive Microarray 응용

1. Apoptosis & Signal Transduction Microarray의 개발 및 실험적 적용

가. Apoptosis & Signal Transduction Microarray의 하드웨어 개발 및 적용

나. Apoptosis & Signal Transduction Microarray test의 소프트웨어적 분석기술 정립

다. 유방암 환자에서 추출한 RNA (암세포, 백혈구)를 이용한 실험적 적용

세부연구목표	주요 연구개발 실적
a) Apoptosis & Signal Transduction Microarray의 하드웨어 개발 및 적용	<ul style="list-style-type: none"> - Radioactive microarray membranes의 개발 및 확보 - 방사성동위원소 사용시설 내 Hybridization oven 등의 설치 및 실험적용 - Data analysis 용 Image analyzer 가동 및 실험적용
b) Apoptosis & Signal Transduction Microarray test의 소프트웨어적 분석기술의 정립	<ul style="list-style-type: none"> - Primary image 측정용 소프트웨어 (Arraygauge, Fuji 사) 사용기술 정립 - 정성분석을 위한 Treeview, Cluster, 등 (스탠드포드대) 의 프로그램 가동기술 확보 - 정량분석 및 통계처리를 위한 Spread sheet 프로그램 작성 및 실험적용
c) 유방암 환자에서 추출한 RNA (암세포, 백혈구)를 이용한 실험적 적용	<ul style="list-style-type: none"> - 고려의대 의료원 및 구미 차병원 산부인과 내원 두경부암 환자10례에 대한 암조직, 정상조직, 백혈구 조직 확보 - 각 조직시료에서의 RNA 추출법 정립 및 수율향상법 고안 - Radioactive microarray 실험시 각 시료별 hybridization 효율 비료

2. Apoptosis & Signal Transduction Microarray를 이용한 암의 진단

(조기진단 및 확진)

- 가. 유방암에 있어서의 유전자 조절의 특징 규명
- 나. 유전자적 발현 양상과 생화학, 분자생물학적 기전과의 연관성 연구
- 다. 임상진단법으로서의 예민도, 특이도, 재현도 향상 방법 고안
- 라. 유방암 세포에서 베타방출동위원소 발굴 유전자군의 유전자 발현분석의 적용

세부연구목표	주요 연구개발 실적
a) 유방암에 있어서의 유전자 조절의 특징 규명	- 유방암을 시료로 microarray를 실시하여 유전자 조절의 특징 규명 - Data analysis를 통하여 microarray를 실시한 image 확보
b) 유전자적 발현 양상과 생화학, 분자생물학적 기전과의 연관성 연구	- microarray를 통해 얻은 결과를 바탕으로 생화학, 분자생물학적 기전과 연관지어 연구
c) 임상진단법으로서의 예민도, 특이도, 재현도 향상 방법 고안	- microarray를 임상진단용으로 사용하기 위해 예민도, 특이도, 재현도를 향상하기 위한 방법 고안
d) 유방암 세포에서 베타방출동위원소 발굴 유전자군의 유전자 발현분석의 적용	- 유방암 세포에서 실시한 microarray를 통해 얻어진 유전자군으로 유전자 발현분석의 적용

2. 관련 분야에의 기여도

- 방사성동위원소가 표지된 Annexin V를 이용한 세포고사를 핵영상화 하는 기술을 개발하기 위하여 두가지의 접합용 키레이트를 개발하였으며, 진단용 방사성동위원소인 ^{99m}Tc를 이용한 annexin V 표지법을 확립하고 이를 이용한 세포 결합능 실험과 시험관 내 안정성 실험 등을 수행하여 임상적용 가능성을 확인하였다. 또한 추가적으로 생체 분포 및 세포고사 동물 모델에서의 전임상 연구를 일부 시행하여 임상적용시 세포고사를 평가하는 것이 가능함을 입증하여 다양한 임상모델에서 치료효과의 판정 및 질병의 예후를 평가할 수 있는 기법으로 사용할 수 있음을 확인하였다. 세포고사를 영상화하는 기술은 심장질환, 장기이식등의 여러 가지 임상질환에 적용하여 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

- 저선량의 베타 방출 동위원소를 이용하여 정상적인 p53을 가지고 있는 wild type의 종양세포와 비정상적인 p53을 가진 mutant type의 종양세포의 세포반응양상에 대한 연구결과는 조사된 바로는 없는 실정이다. 종양의 많은 부분이 p53 종양억제유전자 산물과 관련되어 있음에도 불구하고 아직까지 뚜렷한 연구결과가 없으므로 베타방출 동위원소에 대한 세포내 반응양상을 연구한다면 기존까지 연구되지 않았던 분야이므로 이를 바탕으로 다른 기초의학분야와 임상 분야에 적용할 수 있는 종양에 대한 새로운 이해를 가져다 줄 것으로 생각된다. 이는 생물학, 화학, 보건물리학등 다양한 분야의 학문에 새로운 연구의 원동력을 가져다 줄 것으로 생각된다.

- 핵영상 연구에 DNA chip등의 분자생물학적 high technology가 이용되고 이에 의해 새로운 target이 개발되어 핵영상에 사용할 수 있다면 핵의학 분야의 진일보된 연구결과를 가져다 줄 것으로 사료되며 현재 문제가 되고 있는 target의 tumor에 대한 specificity 또는 sensitivity 결여로 인한 문제점들을 해결해 줄 것으로 사료된다.

- 발굴된 유전자의 분자핵의학 영상평가 기술로 이용하기 위하여 BCL2-interacting killer(apoptosis-inducing) 단백질의 발현평가가 가능할것으로 기초조사 되었으며, 암의 치료시에 치료효과의 평가방법으로서 종양의 Antisense-ODN의 섭취를 평가하고 종양세포의 살상효과를 Antisense-ODN의 섭취율의 감소 또는 증가에 따라서 치료제가 유효한지 그렇지 아니한지를 평가할 수 있는 방법으로 임상에 적용하여 사용할 수 있을것으로 기대된다.

- 한국인 호발 암의 세포신호전달 체계 및 세포고사 관련 기전 이해
 - 악성 종양 유발 가능 생체물질의 검색 및 상관관계 규명
 - 질환-생체화합물 연구의 동물모델 개발의 기본자료 제공
 - 유전체 연구와 단백질 기능연구의 병행을 통한 복합 생물정보학의 체계화
 - 신개념의 암연구로 분자핵의학적 접근방법으로 암정복을 위한 초석 역할
 - 효율적 산학협동연구센터로의 전환 가능성 타진
 - 연구수행 과정을 통한 연구 인력 양성
 - 한국인 호발 암에 대한 신개념의 연구 및 교육 분위기 조성
 - 학부 및 대학원 학생들의 적극적 연구참여로 미래지향적 암연구의 고급 연구인력 양성
 - 국내외 우수 연구집단과의 협력연구 및 인적교류를 통한 연구 및 교육 효율성 극대화

국제적인 수준의 암 연구진으로서 교육과 홍보에 주도적 역할

- 국내외 산업체로부터 수탁연구강화로 연구종료 이후 독립적 연구기반 확충
- 해외 연구비 유치 활성화 및 자체 연구기금 확보 강화

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

- 방사성동위원소를 이용한 세포고사 영상화 기술은 다양한 임상질환에 대한 새로운 질병 평가 방법 및 치료 효과 평가 방법으로 사용될 수 있을 것으로 기대되며, 충분한 전임상 연구와 다양한 질환에서의 연구가 추가된다면 임상에 적용할 수 있는 기술로서 사용될 수 있을 것으로 기대된다.
- p53 유무 세포주에서 베타방출 동위원소에 대한 세포반응양상에 대한 연구를 바탕으로 p53 산물과 관련된 종양에 대해 새로운 이해를 함으로써, 다른 기초의학 분야와 임상 분야에 적용하여 p53과 관련된 종양의 새로운 치료법의 개발과 종양의 치료 효과 조기 진단평가에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.
- 암세포에서 치료용 방사성동위원소에 반응하는 유전자 탐색을 통하여 치료 효과를 판정 할 수 있는 새로운 target의 개발로 이어질 수 있으며, 새로운 유전적 target의 확보를 통하여 새로운 동위원소 약품의 개발에 활용할 수 있을 것으로 기대된다.
- 종양특이적인 Antisense ODN을 이용한 종양의 섭취를 핵의학적인 방법으로 평가하여 종양의 치료시에 치료효과를 평가할 수 있는 인자로서의 가능성을 확인하였으며, 이를 이용하기 위한 추가적인 전임상 연구가 충분히 시행된다면 종양의 치료시 치료반응을 평가하기 위한 새로운 방법으로 사용 가능할 것으로 기대된다.
- 산업 발전에의 기여도 등 국가 경제에 부가가치 창출
유전체 연구 및 단백질 기능연구의 결과물에 의한 고부가가치 질환 예방법 확립
한국인 호발 암의 세포신호전달 체계 및 세포고사 관련 특이 유전자에 대한 정보화 및 지적재산권 확보
21세기 새로운 분자핵의학적 기법의 확립에 의한 국제 경쟁력 증대
암 연구의 원천기술 확보와 공급원으로서의 독보적 역할

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보

1. Kuge Y, Sato M, Zhao S, Takei T, Nakada K, Seki KI, Strauss HW, Blankenberg FG, Tait JF, Tamaki N. Feasibility of (^{99m}Tc) -Annexin V for Repetitive Detection of Apoptotic Tumor Response to Chemotherapy: An Experimental Study Using a Rat Tumor Model. *J Nucl Med*. 2004;45(2):309-312.
2. Belhocine T, Steinmetz N, Li C, Green A, Blankenberg FG. The Imaging of Apoptosis with the Radiolabeled annexin V: Optimal Timing for Clinical Feasibility. *Technol Cancer Res Treat*. 2004;3(1):23-32.
3. Ke S, Wen X, Wu QP, Wallace S, Charnsangavej C, Stachowiak AM, Stephens CL, Abbruzzese JL, Podoloff DA, Li C. Imaging taxane-induced tumor apoptosis using PEGylated, ^{111}In -labeled annexin V. *J Nucl Med*. 2004;45(1):108-15.
4. Kolodgie FD, Petrov A, Virmani R, Narula N, Verjans JW, Weber DK, Hartung D, Steinmetz N, Vanderheyden JL, Vannan MA, Gold HK, Reutelingsperger CP, Hofstra L, Narula J. Targeting of apoptotic macrophages and experimental atheroma with radiolabeled annexin V: a technique with potential for noninvasive imaging of vulnerable plaque. *Circulation*. 2003;23:108(25):3134-9.
5. Murakami Y, Takamatsu H, Taki J, Tatsumi M, Noda A, Ichise R, Tait JF, Nishimura S. ^{18}F -labelled annexin V: a PET tracer for apoptosis imaging. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2003;10
6. Wen X, Wu QP, Ke S, Wallace S, Charnsangavej C, Huang P, Liang D, Chow D, Li C. Improved radiolabeling of PEGylated protein: PEGylated annexin V for noninvasive imaging of tumor apoptosis. *Cancer Biother Radiopharm*. 2003;18(5):819-27.
7. Collingridge DR, Glaser M, Osman S, Barthel H, Hutchinson CC, Luthra SK, Brady F, Bouchier-Hayes L, Martin SJ, Workman P, Price P, Aboagye ED. In vitro selectivity, in vivo biodistribution and tumour uptake of annexin V radiolabelled with a positron emitting radioisotope. *Br J Cancer*. 2003;89(7) :1327- 33.
8. Verbeke K, Kieffer D, Vanderheyden JL, Reutelingsperger C, Steinmetz N, Green A, Verbruggen A. Optimization of the preparation of ^{99m}Tc -labeled Hynic-derivatized Annexin V for human use. *Nucl Med Biol*. 2003;30(7):771-8.
9. van de Wiele C, Lahorte C, Vermeersch H, Loose D, Mervillie K, Steinmetz ND, Vanderheyden JL, Ouelier CA, Slegers G, Dierck RA. Quantitative tumor apoptosis imaging using technetium- 99m -HYNIC annexin V single photon emission computed tomography. *J Clin Oncol*.

2003;21(18):3483-7.

10. Poghosyan GG, Melkonyan VZ, Mikaelyan MV, Gasparyan VK. A simplified method for purification of annexin V from human placenta. *Prep Biochem Biotechnol.* 2003;33(3):209-15.
11. Mochizuki T, Kuge Y, Zhao S, Tsukamoto E, Hosokawa M, Strauss HW, Blankenberg FG, Tait JF, Tamaki N. Detection of apoptotic tumor response in vivo after a single dose of chemotherapy with ^{99m}Tc-annexin V. *J Nucl Med.* 2003;44(1):92-7.
12. Tait JF, Brown DS, Gibson DF, Blankenberg FG, Strauss HW. Development and characterization of annexin V mutants with endogenous chelation sites for (^{99m}Tc). *Bioconjug Chem.* 2000;11(6):918-25.
13. Subbarayan M, Hafeli UD, Feyes DK, Unnithan J, Emancipator SN, Mukhtar H. A simplified method for preparation of ^{99m}Tc-annexin V and its biologic evaluation for in vivo imaging of apoptosis after photodynamic therapy. *J Nucl Med.* 2003;44(4):650-6.
14. Green AM, Steinmetz ND. Monitoring apoptosis in real time. *Cancer J.* 2002;8(2):82-92.
15. Belhocine T, Steinmetz N, Hustinx R, Bartsch P, Jerusalem G, Seidel L, Rigo P, Green A. Increased uptake of the apoptosis-imaging agent (^{99m}Tc) recombinant human Annexin V in human tumors after one course of chemotherapy as a predictor of tumor response and patient prognosis. *Clin Cancer Res.* 2002;8(9):2766-74.
16. Belhocine T, Steinmetz N, Li C, Green A, Blankenberg FG. The imaging of apoptosis with the radiolabeled annexin V: optimal timing for clinical feasibility. *Technol Cancer Res Treat.* 2004;3(1):23-32.
17. Belhocine T, Steinmetz N, Green A, Rigo P. In Vivo Imaging of Chemotherapy-Induced Apoptosis in Human Cancers. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;1010:525-529.
18. Thimister PW, Hofstra L, Liem IH, Boersma HH, Kamerink G, Reutelingsperger CP, Heidendal GA. In vivo detection of cell death in the area at risk in acute myocardial infarction. *J Nucl Med.* 2003;44(3): 391-6.
19. Ohtsuki K, Akashi K, Aoka Y, Blankenberg FG, Kapiwoda S, Tait JF, Strauss HW. Technetium-99m HYNIC-annexin V: a potential radiopharmaceutical for the in-vivo detection of apoptosis. *Eur J Nucl Med.* 1999;26(10):1251-8.
20. Vriens PW, Blankenberg FG, Stoot JH, Ohtsuki K, Berry GJ, Tait JF, Strauss HW, Robbins RC. The use of technetium Tc ^{99m} annexin V for in vivo imaging of apoptosis during cardiac allograft rejection. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1998;116(5):844-53.

21. Yang DJ, Azhdarinia A, Wu P, Yu DF, Tansey W, Kalimi SK, Kim EE, Podoloff DA. In vivo and in vitro measurement of apoptosis in breast cancer cells using ^{99m}Tc -EC-annexin V. *Cancer Biother Radiopharm*. 2001;16(1):73-83.
22. Blankenberg FG, Naumovski L, Tait JF, Post AM, Strauss HW. Imaging cyclophosphamide-induced intramedullary apoptosis in rats using ^{99m}Tc -radiolabeled annexin V. *J Nucl Med*. 2001;42(2):309-16.
23. Tait JF, Smith C, Gibson DF. Development of annexin V mutants suitable for labeling with Tc(i)-carbonyl complex. *Bioconjug Chem*. 2002;13(5):1119-23.
24. van de Wiele C, Lahorte C, Vermeersch H, Loose D, Mervillie K, Steinmetz ND, Vanderheyden JL, Cuvelier CA, Slegers G, Dierck RA. Quantitative tumor apoptosis imaging using technetium- ^{99m}Tc -HYNIC annexin V single photon emission computed tomography. *J Clin Oncol*. 2003;21(18):3483-7.
25. Kamerink GJ, Liu X, Kieffer D, Ceysens S, Mortelmans L, Verbruggen AM, Steinmetz ND, Vanderheyden JL, Green AM, Verbeke K. Safety, biodistribution, and dosimetry of ^{99m}Tc -HYNIC-annexin V, a novel human recombinant annexin V for human application. *J Nucl Med*. 2003;44(6):947-52.
26. Ogura Y, Krams SM, Martinez CM, Kapiwoda S, Higgins JP, Esquivel CO, Strauss HW, Tait JF, Blankenberg FG. Radiolabeled annexin V imaging: diagnosis of allograft rejection in an experimental rodent model of liver transplantation. *Radiology*. 2000;214(3):795-800.
27. Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF, Davis RE, Naumovski L, Ohtsuki K, Kapiwoda S, Abrams MJ, Darkes M, Robbins RC, Mæcker HT, Strauss HW. In vivo detection and imaging of phosphatidylserine expression during programmed cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(11):6349-54.
28. Tokita N, Hasegawa S, Maruyama K, Izumi T, Blankenberg FG, Tait JF, Strauss HW, Nishimura T. ^{99m}Tc -HYNIC-annexin V imaging to evaluate inflammation and apoptosis in rats with autoimmune myocarditis. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2003;30(2):232-8.
29. Blankenberg FG, Katsikis PD, Tait JF, Davis RE, Naumovski L, Ohtsuki K, Kapiwoda S, Abrams MJ, Strauss HW. Imaging of apoptosis (programmed cell death) with ^{99m}Tc annexin V. *J Nucl Med*. 1999;40(1):184-91.
30. Narula J, Acio ER, Narula N, Samuels LE, Fyfe B, Wood D, Fitzpatrick JM, Raghunath PN,

- Tomaszewski JE, Kelly C, Steinmetz N, Green A, Tait JF, Leppo J, Blankenberg FG, Jain D, Strauss HW. Annexin-V imaging for noninvasive detection of cardiac allograft rejection. *Nat Med*. 2001;7(12):1347-52.
31. Post AM, Katsikis PD, Tait JF, Geaghan SM, Strauss HW, Blankenberg FG. Imaging cell death with radiolabeled annexin V in an experimental model of rheumatoid arthritis. *J Nucl Med*. 2002;43(10):1359-65.
 32. Blankenberg FG, Robbins RC, Stoot JH, Vriens PW, Berry GJ, Tait JF, Strauss HW. Radionuclide imaging of acute lung transplant rejection with annexin V. *Chest*. 2000;117(3):834-40.
 33. Kolodgie FD, Petrov A, Virmani R, Narula N, Verjans JW, Weber DK, Hartung D, Steinmetz N, Vanderheyden JL, Vannan MA, Gold HK, Reutelingsperger CP, Hofstra L, Narula J. Targeting of apoptotic macrophages and experimental atheroma with radiolabeled annexin V: a technique with potential for noninvasive imaging of vulnerable plaque. *Circulation*. 2003;108(25):3134-9.
 34. Petrovsky A, Schellenberger E, Josephson L, Weissleder R, Bogdanov A Jr. Near-infrared fluorescent imaging of tumor apoptosis. *Cancer Res*. 2003;63(8):1936-42.
 35. Kwon MH, Strauss HW, Blankenberg FG, Berry GJ, Stafford-Cecil S, Tait JF, Goris ML, Robbins RC. In vivo imaging of acute cardiac rejection in human patients using (99m)technetium labeled annexin V. *Am J Transplant*. 2001;1(3):270-7.
 36. Verbeke K, Kieffer D, Vanderheyden JL, Reutelingsperger C, Steinmetz N, Green A, Verbruggen A. Optimization of the preparation of ^{99m}Tc-labeled Hynic-derivatized Annexin V for human use. *Nucl Med Biol*. 2003;30(7):771-8.
 37. Blankenberg FG, Tait JF, Blankenberg TA, Post AM, Strauss HW. Imaging macrophages and the apoptosis of granulocytes in a rodent model of subacute and chronic abscesses with radiolabeled monocyte chemoattractant peptide-1 and annexin V. *Eur J Nucl Med*. 2001;28(9):1384-93.
 38. Russell J, O'Donoghue JA, Finn R, Kozirowski J, Ruan S, Humm JL, Ling CC. Iodination of annexin V for imaging apoptosis. *J Nucl Med*. 2002;43(5):671-7.
 39. Schellenberger EA, Bogdanov A Jr, Petrovsky A, Ntziachristos V, Weissleder R, Josephson L. Optical imaging of apoptosis as a biomarker of tumor response to chemotherapy. *Neoplasia*. 2003;5(3):187-92.
 40. Boersma HH, Liem IH, Kemmerink GJ, Thimister PW, Hofstra L, Stolk LM, van Heerde WL, Pakbiers MT, Janssen D, Beysens AJ, Reutelingsperger CP, Heidendal GA. Comparison between human

- pharmacokinetics and imaging properties of two conjugation methods for ^{99m}Tc -annexin A5. *r J Radiol.* 2003;76(908):553-60.
41. Hofstra L, Liem IH, Dumont EA, Boersma HH, van Heerde WL, Doevendans PA, DeMuinck E, Wellens HJ, Kemerink GJ, Reutelingsperger CP, Heidendal GA. Visualisation of cell death in vivo in patients with acute myocardial infarction. *Lancet.* 2000;356(9225):209-12.
 42. Vermees I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995;184(1):39-51.
 43. Kemerink GJ, Liem IH, Hofstra L, Boersma HH, Buijs WC, Reutelingsperger CP, Heidendal GA. Patient dosimetry of intravenously administered ^{99m}Tc -annexin V. *J Nucl Med.* 2001;42(2):382-7.
 44. D'Arceuil H, Rhine W, de Crespigny A, Yenari M, Tait JF, Strauss WH, Engelhorn T, Kastrup A, Moseley M, Blankenberg FG. ^{99m}Tc annexin V imaging of neonatal hypoxic brain injury. *Stroke.* 2000 ;31(11):2692-700.
 45. Mari C, Karabiyikoglu M, Goris ML, Tait JF, Yenari MA, Blankenberg FG. Detection of focal hypoxic-ischemic injury and neuronal stress in a rodent model of unilateral MCA occlusion/reperfusion using radiolabeled annexin V. *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2004 Feb 21
 46. Collingridge DR, Glaser M, Osman S, Barthel H, Hutchinson OC, Luthra SK, Brady F, Bouchier-Hayes L, Martin SJ, Workman P, Price P, Aboagye EO. In vitro selectivity, in vivo biodistribution and tumour uptake of annexin V radiolabelled with a positron emitting radioisotope. *Br J Cancer.* 2003;89(7):1327-33.
 47. Stratton JR, Dewhurst TA, Kasina S, Reno JM, Cerqueira MD, Baskin DG, Tait JF. Selective uptake of radiolabeled annexin V on acute porcine left atrial thrombi. *Circulation.* 1995;92(10):3113-21
 48. Lahorte CM, van de Wiele C, Bacher K, van den Bossche B, Thierens H, van Belle S, Slegers G, Dierckx RA. Biodistribution and dosimetry study of ^{123}I -rh-annexin V in mice and humans. *Nucl Med Commun.* 2003;24(8):871-80.
 49. Blankenberg FG, Tait J, Ohtsuki K, Strauss HW. Apoptosis: the importance of nuclear medicine. *Nucl Med Commun.* 2000 Mar;21(3):241-50.
 50. Kemerink GJ, Boersma HH, Thimister PW, Hofstra L, Liem IH, Pakbiers MT, Janssen D, Reutelingsperger CP, Heidendal GA. Biodistribution and dosimetry of ^{99m}Tc -BTAP-annexin-V in humans. *Eur J Nucl Med.* 2001;28(9):1373-8.

51. Brauer M. In vivo monitoring of apoptosis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003 ;27(2):323-31.
52. Schellenberger EA, Bogdanov A Jr, Hagemann D, Tait J, Weissleder R, Josephson L. Annexin V-CLIO: a nanoparticle for detecting apoptosis by MRI. *Mol Imaging*. 2002;1(2):102-7.
53. Fan S, Smith ML, Rivet DJ 2nd, Duba D, Zhan Q, Kohn KW, Fornace AJ Jr, O'Connor PM. Disruption of p53 function sensitizes breast cancer MCF-7 cells to cisplatin and pentoxifylline. *Cancer Res*. 1995 15:55(8):1649-54.
54. Haffner R, Oren M. Biochemical properties and biological effects of p53. *Curr Opin Genet Dev*. 1995;5(1):84-90.
55. Olivier M, Bautista S, Valles H, Theillet C. Relaxed cell-cycle arrests and propagation of unrepaired chromosomal damage in cancer cell lines with wild-type p53. *Mol Carcinog*. 1998;23(1):1-12.
56. Rasey JS, Grierson JR, Wiens LW, Kolb PD, Schwartz JL. Validation of FLT uptake as a measure of thymidine kinase-1 activity in A549 carcinoma cells. *J Nucl Med*. 2002;43(9):1210-7.
57. Cadwell C, Zambetti GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene*. 2001 17:277(1-2):15-30.
58. Polisenio L, Mariani L, Collecchi P, Piras A, Zaccaro L, Rainaldi G. Bcl2-negative MCF7 cells overexpress p53: implications for the cell cycle and sensitivity to cytotoxic drugs. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2002;50(2):127-30.
59. Fan LZ, Cherian MG. Potential role of p53 on metallothionein induction in human epithelial breast cancer cells. *Br J Cancer*. 2002 21:87(9):1019-26.
60. Gudkov AV, Komarova EA. The role of p53 in determining sensitivity to radiotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(2):117-29.
61. Bullock AN, Fersht AR. Rescuing the function of mutant p53. *Nat Rev Cancer*. 2001 ;1(1):68-76.
62. Kirwan JF, Constable PH, Murdoch IE, Khaw PT. Beta irradiation: new uses for an old treatment: a *Eye*. 2003;17(2):207-15.
63. Scott NA, Crocker IR, Yin Q, Sorescu D, Wilcox JN, Griendling KK. Inhibition of vascular cell growth by X-ray irradiation: comparison with gamma radiation and mechanism of action. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001 1:50(2):485-93.
64. Ootsuyama A, Makino H, Nagao M, Ochiai A, Yamauchi Y, Tanooka H. Frequent p53 mutation in mouse

- tumors induced by repeated beta-irradiation, *Mol Carcinog*. 1994;11(4):236-42.
65. Sak A, Wurm R, Elo B, Grehl S, Pottgen C, Stuben G, Sinn B, Wolf G, Budach V, Stuschke M. Increased radiation-induced apoptosis and altered cell cycle progression of human lung cancer cell lines by antisense oligodeoxynucleotides targeting p53 and p21(WAF1/CIP1). *Cancer Gene Ther*. 2003;10(12):926-34.
 66. Fallis LH, Richards E, O'Connor DJ, Zhong S, Hsieh JK, Packham G, Lu X. The biological response of MCF7 breast cancer cells to proteasome inhibition or gamma-radiation is unrelated to the level of p53 induction. *Apoptosis*. 1999 ;4(2):99-107.
 67. Scott SL, Earle JD, Gumerlock PH. Functional p53 increases prostate cancer cell survival after exposure to fractionated doses of ionizing radiation. *Cancer Res*. 2003 1;63(21):7190-6.
 68. Anderson HJ, Andersen RJ, Roberge M. Inhibitors of the G2 DNA damage checkpoint and their potential for cancer therapy. *Prog Cell Cycle Res*. 2003;5:423-30.
 69. Delia D, Fontanella E, Ferrario C, Chessa L, Mizutani S. DNA damage-induced cell-cycle phase regulation of p53 and p21waf1 in normal and ATM-defective cells. *Oncogene*. 2003 30;22(49):7866-9.
 70. Robinson BW, Im MM, Ljungman M, Praz F, Shewach DS. Enhanced radiosensitization with gemcitabine in mismatch repair-deficient HCT116 cells. *Cancer Res*. 2003 Oct 15;63(20):6935-41.
 71. Knights CD, Liu Y, Appella E, Kulesz-Martin M. Defective p53 post-translational modification required for wild type p53 inactivation in malignant epithelial cells with *mdm2* gene amplification. *J Biol Chem*. 2003 26;278(52):52890-900.
 72. Limoli CL, Giedzinski E, Rola R, Otsuka S, Palmer TD, Fike JR. Radiation response of neural precursor cells: linking cellular sensitivity to cell cycle checkpoints, apoptosis and oxidative stress. *Radiat Res*. 2004;161(1):17-27.
 73. Sakamoto-Hojo ET, Mello SS, Pereira E, Fachin AL, Cardoso RS, Junta CM, Sandrin-Garcia P, Donadi EA, Passos GA. Gene expression profiles in human cells submitted to genotoxic stress. *Mutat Res*. 2003;544(2-3):403-13.
 74. Macdonald DR. New frontiers in the treatment of malignant glioma. *Semin Oncol*. 2003 ;30(6 Suppl 19):72-6.
 75. Held KD. Radiation-induced apoptosis and its relationship to loss of clonogenic survival. *Apoptosis*. 1997;2(3):265-82.
 76. Blumenthal RD, Leone E, Goldenberg DM, Rodriguez M, Modrak D. An in vitro model to optimize dose

- scheduling of multimodal radioimmunotherapy and chemotherapy: effects of p53 expression. *Int J Cancer*. 2004 10;108(2):293-300.
77. Dong YB, Yang HL, Elliott MJ, McMasters KM. Increased mdm-2 expression in a p53-independent manner blocks UV-induced cell cycle arrest and apoptosis in human osteosarcoma cells. *Tumour Biol*. 2003;24(3):130-9.
 78. Fritz G, Brachetti C, Kaina B. Lovastatin causes sensitization of HeLa cells to ionizing radiation-induced apoptosis by the abrogation of G2 blockage. *Int J Radiat Biol*. 2003;79(8):601-10.
 79. Roivainen A, Tolvanen T, Salomaki S, Lendvai G, Velikyan I, Numminen P, Valila M, Sipila H, Bergstrom M, Harkonen P, Lonnberg H, Langstrom B. 68Ga-labeled oligonucleotides for in vivo imaging with PET. *J Nucl Med*. 2004;45(2):347-55.
 80. Shi F, Visser WH, de Jong NM, Liem RS, Ronken E, Hoekstra D. Antisense oligonucleotides reach mRNA targets via the RNA matrix: downregulation of the 5-HT1A receptor. *Exp Cell Res*. 2003;291(2):313-25.
 81. Tian X, Aruva MR, Rao PS, Qin W, Read P, Sauter ER, Thakur ML, Wickstrom E. Imaging oncogene expression. *Ann N Y Acad Sci*. 2003;1002:165-88.
 82. Zheng J, Tan T, Zhang C, Li Y, Liang Z, Tu J. [Preparation of liposome-mediated 99m-technetium-labeled antisense oligonucleotides of c-myc mRNA] 2003 ;20(4):704-7.
 83. Gallazzi F, Wang Y, Jia F, Shenoy N, Landon LA, Hannink M, Lever SZ, Lewis MR. Synthesis of radiometal-labeled and fluorescent cell-permeating peptide-PNA conjugates for targeting the bcl-2 proto-oncogene. *Bioconjug Chem*. 2003;14(6):1083-95.
 84. Lewis MR, Jia F. Antisense imaging: and miles to go before we sleep? *J Cell Biochem*. 2003;90(3):464-72.
 85. Wang J, Chen P, Mrkobrada M, Hu M, Vallis KA, Reilly RM. Antisense imaging of epidermal growth factor-induced p21(WAF-1/CIP-1) gene expression in MDA-MB-468 human breast cancer xenografts. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2003 ;30(9):1273-80. Epub 2003 Mar 15.
 86. Rao PS, Tian X, Qin W, Aruva MR, Sauter ER, Thakur ML, Wickstrom E. 99mTc-peptide-peptide nucleic acid probes for imaging oncogene mRNAs in tumours. *Nucl Med Commun*. 2003;24(8):857-63.
 87. Tavitian B. In vivo imaging with oligonucleotides for diagnosis and drug development. *Gut*. 2003;52 Suppl 4:iv40-7.

88. Lewis MR, Jia F, Gallazzi F, Wang Y, Zhang J, Shenoy N, Lever SZ, Hannink M. Radiometal-labeled peptide-PNA conjugates for targeting bcl-2 expression: preparation, characterization, and in vitro mRNA binding. *Bioconjug Chem.* 2002;13(6):1176-80.
89. Lee HJ, Boado RJ, Braasch DA, Corey DR, Pardridge WM. Imaging gene expression in the brain in vivo in a transgenic mouse model of Huntington's disease with an antisense radiopharmaceutical and drug-targeting technology. *J Nucl Med.* 2002;43(7):948-56.
90. Younes CK, Boisgard R, Tavitian B. Labelled oligonucleotides as radiopharmaceuticals: pitfalls, problems and perspectives. *Curr Pharm Des.* 2002;8(16):1451-66.
91. Sato N, Kobayashi H, Saga T, Nakamoto Y, Ishimori T, Togashi K, Fujibayashi Y, Konishi J, Brechbiel MW. Tumor targeting and imaging of intraperitoneal tumors by use of antisense oligo-DNA complexed with dendrimers and/or avidin in mice. *Clin Cancer Res.* 2001;7(11):3606-12.
92. Zhang YM, Wang Y, Liu N, Zhu ZH, Rusckowski M, Hnatowich DJ. In vitro investigations of tumor targeting with (^{99m}Tc)-labeled antisense DNA. *J Nucl Med.* 2001;42(11):1660-9.
93. Stalteri MA, Mather SJ. Hybridization and cell uptake studies with radiolabelled antisense oligonucleotides. *Nucl Med Commun.* 2001;22(11):1171-9.
94. Zhang YM, Rusckowski M, Liu N, Liu C, Hnatowich DJ. Cationic liposomes enhance cellular/nuclear localization of ^{99m}Tc-antisense oligonucleotides in target tumor cells. *Cancer Biother Radiopharm.* 2001;16(5):411-9.
95. Pardridge WM. Antisense radiopharmaceuticals - agents for imaging gene expression. *Drug Discov Today.* 2001;6(2):104-106.
96. Shi N, Boado RJ, Pardridge WM. Antisense imaging of gene expression in the brain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(26):14709-14.
97. Hnatowich DJ. Antisense imaging: where are we now? *Cancer Biother Radiopharm.* 2000;15(5):447-57.
98. Tavitian B. In vivo antisense imaging. *Q J Nucl Med.* 2000;44(3):236-55.

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET						
Performing Org. Report No.		Sponsoring Org. Report No.		Standard Report No.		INIS Subject Code
KIRAMS/RR-001/2004						
Title/Subtitle		Development of Molecular Nuclear Medicine Technology in Apoptosis and Signal Transduction				
Project Manager and Dept.		Sang Moo Lim (Dept. of nuclear Medicine)				
Researcher and Dept		TS Lee, SH Ahn, GJ Cheon, SE Kim, KS Woo, WS Chung, HK Chung, JC Lee.				
Pub. Place		Korea	Pub. Org.	KIRAMS	Pub. Date	2004. 4.
Page	98	Fig. Table	Yes(O), No()		Size	A4
Note						
Classified		Open(O), Outside(), Class		Report Type	Research	
Sponsoring Org.					Contract No.	
Abstract (About 300 Words)						
<p>In this project, we studied following subjects :</p> <p>The purpose of this project is to develop molecular nuclear medicine technology in apoptosis and signal transduction. there are two cartegory, one is to synthesis of radiopharmaceuticals and to develop imaging technology that was associated with cell signal transduction related molecules. the other is to screen gene group upregulated or down-regulated by beta-radioisotope treatment and to develop application technology of molecular nuclear medicine using beta-irradiation response gene.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Development of imaging technology and synthesis of radiophamaceuticals for cellular signal transduction molecules <ol style="list-style-type: none"> 1) Development of Imaging technology of apoptosis (Annexin V image) 2) Study of radiopharmaceuticals uptake and image in cancer cell line according to p53 status after radiation 2. Mining of beta-irradiation response gene groups or genes in tumor cell lines <ol style="list-style-type: none"> 1) Searching for genes responded to I-131 and Re-188 in brain, lung and breast cancer cell 2) Development of application technology for mining betairradiation response gene groups or genes 3) application of radioactive microarray on the research related with apoptosis and signal transduction 						
Subject Keywords (About 10 Words)				Annexin V, Apoptosis imaging, Molecular imaging, p53, Signal transduction, beta-irradiation, DNA chip, Radioactive microarray, Radiopharmaceutical		

서 지 정 보 양 식

수행기관 보고서번호	위탁기관 보고서 번호	표준보고서 번호	INIS 주제코드		
KIRAMS/RR-001/2004					
제목 / 부제	세포고사 및 신호전달체계 관련 분자핵의학 기술개발				
연구책임자 및 부서명	임상무 (핵의학과)				
연구자 및 부서명	이태섭, 안순혁, 천기정, 김성은, 우광선, 정위섭, 이정출, 정혜경.				
발행지	대한민국,서울	발행기관	원자력의학원	발행일	2004. 4.
페이지	98	도 표	유(O), 무()	크 기	A4
참 고 사 항					
비 밀 여 부	공개(O), 대외비(), ___급 비밀		보고서 종류	연구,기술,사업	
연구위탁기관			계약 번호		
초록(300단어 내외)	<p>본 과제의 목표는 세포고사 및 신호전달 관련 분자핵의학 기술로서 세포고사를 영상화 하는 방법으로서 세포고사시 세포막의 외부로 노출되는 인지질인 phosphatidyl- serine (PS)에 특이적으로 결합하는 Annexin V에 동위원소를 표지하는 기법을 개발하고 이를 이용하여 세포고사를 핵영상으로 평가할수 있는 기법을 개발하고 p53 유무에 따른 치료용 방사성 동위원소를 치료효과를 대사영상용 방사성의약품으로 평가하는 기법을 개발하여 세포고사를 평가하는 기법을 개발하고자 하였으며, 종양 세포에서 베타 방출 방사성동위원소에 반응하는 유전자를 유전자 칩을 이용하여 발굴하며 Apoptosis & Signal Transduction 관련 연구의 Radioactive Microarray를 이용하여 검증하며, 발굴된 유전자를 이용한 새로운 치료반응 유전자 발현 평가를 핵영상으로 평가하는 방법을 개발하여 분자 수준의 세포고사 반응 양상을 핵의학적인 기법으로 평가함으로써 효과적인 치료법의 개발 및 치료효과 평가에 새로운 방법론을 제시하고자 하였다.</p>				
주제명 키워드 (10단어 내외)	Annexin V, 세포고사 영상, 분자영상기법, p53, 신호전달, 베타방출 방사성동위원소, 유전자 칩, 방사성동위원소 유전자 칩, 방사성의약품.				