

인간유전체기능연구

Functional Analysis of Human Genome

위암/간암 등의 혁신 신약 타겟 기능연구(세부과제명:
Hepatitis virus 유전자형질전환마우스를 이용한 간암
타겟 발굴 및 임상적 유의성 검정)

Discovery of new drug lead compounds for target
proteins of stomach and liver cancers

한국생명공학연구원

교육과학기술부

인간유전체기능연구
Functional Analysis of Human Genome

위암/간암 등의 혁신 신약 타겟 기능연구(세부과제명:
Hepatitis virus 유전자형질전환마우스를 이용한 간암
타겟 발굴 및 임상적 유의성 검정)

Discovery of new drug lead compounds for target
proteins of stomach and liver cancers

한국생명공학연구원

교육과학기술부

제 출 문

교육과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “위암/간암 등의 혁신 신약 타겟 기능연구”과제 (세부과제 “Hepatitis virus 유전자 형질전환마우스를 이용한 간암 타겟 발굴 및 임상적 유의성 검증”)의 보고서로 제출합니다.

2010. 05 .

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원

주관연구책임자 : 유대열

연 구 원 : 이상철
" : 배광희
" : 김선욱
" : 한영호
" : 신혜준
" : 박영호
" : 하혜린
" : 김선영 외

보고서 초록

과제관리번호	FG09-21-06	해당단계 연구기간	06.09. - 10.03.	단계 구분	(해당단계 : 3) / (총단계 : 3)
연구사업명	중 사업명	21C 프론티어 연구개발 사업			
	세부사업명	위암/간암 등의 혁신 신약 타겟 기능연구			
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	Hepatitis virus 유전자형질전환마우스를 이용한 간암 타겟 발굴 및 임상적 유의성 검증			
연구책임자	유대열	해당단계 참여연구원수	총 : 48 명 내부 : 12 명 외부 : 36 명	해당단계 연구비	정부: 86,000 천원 기업: 천원 계: 86,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국생명공학연구원		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :		상대국연구기관명 :		
위탁연구	연구기관명 :		연구책임자 :		
요약					보고서 면수
<p>1. HBx 간암모델마우스를 이용한 간암발생 관련 타겟 발굴 분야 : 간암은 우리나라 3대 호발암의 하나로써 전 세계적으로 매년 100 만명, 우리나라에서 매년 만명 이상이 간암으로 사망한다. 우리나라에서 간암의 70% 이상은 B형 간염바이러스(HBV)와 관련이 있다. HBV 감염에 의해 간암이 된 환자 간암조직의 genomic DNA에는 60-100%가 HBx DNA가 검출되고 있고(Oncogene 2007;26:2166-2176), HBx가 발현하는 형질전환마우스는 간암을 생성하는 것으로 알려져 있음 (Nature 1991;351:317-20, Hepatology 1994; 19:810-9, J Hepatology 1999; 31:123-132). 따라서 HBx마우스를 이용하여 간암의 타겟을 발굴하고자 하였음.</p> <p>1) DNA chip 실험에 의한 차등발현 유전자 동정 : HBx Tg mice의 dysplasia, HCA 및 HCC 병변에서 차등 발현되는 다수의 유전자를 microarray 분석을 통하여 스크리닝 하였음.</p> <p>2) 신규 타겟의 기능연구 : Microarray 분석을 통해 HBx에 의한 초기 병변부터 유의성있게 증가한 IGF2와 CIDEA의 기능을 연구함. HBx에 의한 IGF2 과발현은 간의 비대증을 유도하였으며, HBx에 의한 CIDEA과발현은 HBx에 의한 ROS생성에 의한 것임을 확인함.</p> <p>3) Proteome 분석을 통해 차등발현 단백질 동정 : Dysplasia, HCA 및 HCC 병변을 보이는 HBx Tg mice의 간 조직으로부터 단백질을 추출하여, 단백질 분석을 수행한 결과, 의미있는 변화를 보이는 단백질을 동정하였음. 이 결과는 2009년 Proteomics (9(22):5056-66)에 게재하였음.</p> <p>4) Lipogenesis, gluconeogenesis 및 tumorigenesis 작용기작 연구 : HBx는 SREBP1과 PPARγ의 발현을 증가함으로써 adipogenesis 및 lipogenesis를 통해 지방간을 유도하는 것으로 2007년 Gastroenterogy (132(5),1955-1967)에 이 연구 결과를 게재하였음. 또한 HBx는 iNOS 활성화를 통해 gluconeogenesis를 유도함을 확인함. 또한 HBx에 의한 pAMPK 발현 조절을 통해 간암의 발달이 조절됨을 확인함.</p> <p>2. HCV NS5A transgenic mice를 이용한 간암발생기작 및 타겟발굴 연구 : HCV(NS5A)는 apoptosis 억제를 통하여 간의 병리학적 변화에 중요한 역할(Int J Cancer 2003;107:65-73)을 한다는 것이 알려졌고, NS5A를 발현하는 형질전환마우스를 생산하여 간암의 발생기작 연구를 2009년 J Pathol (219:253-262)에 게재하였음.</p> <p>3. mH-Ras Tg/Prx II KO double mice를 이용한 간암발생에 있어서 Prx II의 역할 규명 : Prx II가 돌연변이 ras의 종양형성에 있어서 조절자로서의 역할을 함을 확인하였음.</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한글	간암, 간염바이러스유전자, 형질전환마우스, DNA 칩, 바이오마커			
	영어	Hepatocellular carcinoma, Hepatitis virus, Transgenic mice, DNA microarray, Biomarker			

요 약 문

I. 제 목

Hepatitis virus 유전자 형질전환마우스를 이용한 간암 타겟 발굴 및 임상적 유의성 검증

II. 연구개발의 목적 및 필요성

지금까지 많은 학자들이 간암 환자 조직을 가지고 타겟을 발굴하는 연구를 수행하여 나름대로 중요한 성과를 도출하여 왔으나, 환자조직을 이용한 연구는 온전한 조직 시료를 확보하는데 어려움이 많고, heterogeneous하기 때문에 암의 발생에 관여하는 인자의 해석에 어려움이 많았다. 특히, 암이 발생되기 이전의 암 발생 추적에 관한 연구는 환자를 대상으로 할 수 없는 점이 큰 문제이다.

본 연구팀은 이러한 문제를 극복할 수 있는 간암모델동물을 개발한 바 있어 이들 간암 마우스를 이용하여 간암 발병과 연관된 분자 타겟을 발굴하고 그 타겟의 분자기전을 밝히며 임상적 유의성을 찾는 것은 매우 중요하다.

따라서 Hepatitis B Virus 감염에 의한 간암 유발에 주도적인 역할을 하는 것으로 알려진 HBx가 발현되는 HBx 형질전환마우스와 Hepatitis C virus 감염에 의한 간암 유발에 관여할 것으로 주목을 받는 NS5A가 발현하는 NS5A 형질전환마우스를 이용하여 각 마우스의 병리학적 표현형을 규명하고 genomics 및 proteomics 방법에 의해 간암 생성과 연관이 있는 새로운 타겟을 발굴하고 그 타겟의 기능을 밝히며 임상적 유의성을 찾고자 한다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

1. HBx 간암모델마우스를 이용한 간암 발생 관련 타겟 발굴 분야

- 1) HBx 마우스의 간조직을 이용한 DNA chip 실험에 의한 차등발현 유전자 동정
- 2) 신규 타겟의 기능연구
- 3) HBx 마우스의 간조직단백질을 이용한 proteome 분석을 통해 차등발현 단백질 동정
- 4) HBx에 의한 lipogenesis, gluconeogenesis 및 tumorigenesis 작용기작 연구

2. HCV NS5A transgenic mice를 이용한 간암 발생기작 및 타겟발굴 연구

3. mH-RasTg/Prx II KO double mice를 이용한 간암발생에 있어서 Prx II의 역할 규명

IV. 연구개발 결과

1. HBx 간암모델마우스를 이용한 간암 발생 관련 타겟 발굴 분야

1) HBx Tg mice의 간조직 mRNA를 이용한 DNA chip 실험 및 RT-PCR에 의한 차등발현 유전자 동정

- ① DNA chip실험을 통해 HBx Tg mice의 간 병변 (liver pathology)에 따른 유전자의 발현 pattern을 조사하였다.
- ② HBx Tg mice의 dysplasia, HCA, 및 HCC 병변에서 차등 발현되는 다수의 유전자를 확보하였다.
- ③ 차등 발현하는 일부 유전자를 human data와 비교 검토하였다.

2) 신규 타겟의 기능연구

2-1) IGF2 기능연구

- ① DNA chip 실험을 통해 확보한 일부 유전자중 하나인 IGF2가 간암과 관련이 있다는 보고는 있으나 병변초기에서의 연구는 되어 있지 않다.
- ② HBx Tg mice가 초기부터 Hepatomegaly 현상을 보이는 것을 확인하였다.
- ③ HCA 병변에서 발현수준이 아주 높은 IGF2 유전자가 초기 간 병변과 어떤 관련이 있는지 규명 하였다.

2-2) CIDEA 기능연구

- ① DNA chip 실험을 통해 확보한 유전자중 하나인 CIDEA는 초기 병변에서의 연구는 되어 있지 않다.
- ② CIDEA가 HBx의 발현에 따른 초기 간 병변과 어떤 연관이 있는지 분자세포생물학적으로 연구 하였다.
- ③ CIDEA 유전자의 발현은 HBx에 의해 증가된 ROS에 의해 Nrf2가 Cidea 유전자의 상류에 결합하여 CIDEA 유전자의 전사수준을 올리는 것으로 확인하였다.

3) HBx Tg mice의 간조직단백질을 이용한 proteome 분석을 통해 차등발현 단백질 동정

단백질 수준에서 HBx에 의해 유도되는 변화를 모니터링하기 위해 2-D PAGE 분석을 통한 단백질체학 분석을 수행하였다. HBx Tg mice의 dysplasia, HCA, 및 HCC 병변부위의 조직에서 단백질을 추출하여 proteome 분석을 수행하였다. 검증된 단백질들의 실제 인간 환자샘플에서의 변화를 확인하였다.

4) HBx에 의한 lipogenesis, gluconeogenesis 및 tumorigenesis 작용기작 연구

4-1) lipogenesis 작용기작 연구

B형 간염 환자에서 지방간이 발견된다는 임상적들의 소견을 중심으로 HBx Tg mice에서 지방간병변을 관찰하고 그 작용기작을 연구하였다. HBx Tg mice에서 지방간병변, 지방간생성에 관련된 분자들의 발현변화를 연구하였다. HBx는 SREBP1과 PPAR gamma의 발현을 증가함으로써 adipogenesis 및 lipogenesis를 통해 지방간을 유도하는 것을 밝혔다.

4-2) gluconeogenesis 작용기작 연구

HBV 간염 발달에 있어서 Inducible nitric oxide synthase (iNOS)가 관여한다는 보고는 많으나 대부분 현상에 관한 보고이고, 간암진행에 관련된 pathway와의 상호작용은 잘 알려져 있지 않다.

HBx Tg mice를 이용하여 당부하 검사와 인슐린 자극검사 수행하였다. B형 간염바이러스 감염 중 iNOS 유전자의 발현이 증가하고 이에 HBx가 관여한다는 보고와 iNOS는 LPS에 의해 유도되어 hyperglycemia와 insulin resistance에 관여한다는 보고가 있어, HBx가 iNOS를 조절하여 gluconeogenesis에 영향을 미치는지 실험을 하였다. 따라서 HBx Tg mice와 iNOS knockout mice를 교배하여 double mutant mice를 생산하여 당

신생합성에 관여하는 유전자의 발현수준을 확인하였다., 결과로는 HBx가 iNOS를 통하여 gluconeogenesis에 관여하여 내당능장애 (Glucose intolerance)을 야기하여 최종적으로 당뇨병 (Diabetes)이 발병될 수 있음을 제시한다.

4-3) tumorigenesis 작용기작 연구

Tumorigenesis는 대사질환과 밀접한 연관성이 있다는 최근 보고 등을 참고로, HBx에 의한 HCC 형성에 있어서, gluconeogenesis와 tumorigenesis의 역할에 중요한 유전자로 알려진 AMPK의 활성화가 관여하고 있음을 확인하였다.

2. HCV NS5A transgenic mice를 이용한 간암 발생기작 및 타겟발굴 연구

- ① NS5A Tg mice는 normal mice 비해 산화스트레스를 많이 받으며, 세포 신호전달에 영향 줄 수 있다.
- ② Proliferation 관련된 NF- κ B 과 pSTAT3가 활성화되었으며, 이 결과 NS5A는 transcriptional trans-activator 역할을 하며, cell proliferation에 관련이 많을 것으로 예상 된다.
- ③ 어린 마우스 (young mice)에서 carcinogen (DEN) 처리 후 cell proliferation 과 cell death 는 별 차이가 없었음을 알 수 있었다. 이 결과 NS5A는 단 시간 작용보다 긴 시간에서 cell proliferation과 cell death의 영향을 주며 암 발생을 일으키는 것으로 볼 수 있다.

3. mH-RasTg/Prx II KO double mice를 이용한 간암발생에 있어서 Prx II의 역할 규명

- ① H-ras^{12V}Tg에 의한 간종양 형성에 있어 Prx II의 결손이 억제효과가 있는 것을 알 수 있었다.
- ② 자기공명영상촬영에서 FS (fat suppression)을 실시한 결과 종양부위의 영상이 사라졌으며, 다시 FE (fat enhancement)를 실시한 결과 종양부위의 영상이 다시 나타나는 것을 관찰함으로써, 간조직에서 H-ras^{12V}에 의해 형성된 종양은 지방을 과량으로 함유하고 있는 것을 알 수 있었다.
- ③ 7개월령의 H-ras^{12V}Tg 및 H-ras^{12V}Tg×Prx II^{-/-} congenic 마우스의 종양부위에서 높은 PCNA 염색이 관찰되어서, 이는 자기공명영상의 결과물이 종양임을 재차 확인하는 것이다. 또한 Prx II의 경우 종양부위에서 그 발현율이 증가하는 것을 확인하였다.
- ④ H-ras^{12V}Tg 및 Prx II^{-/-} congenic 마우스의 ERK 활성화도 검사를 보면, ras의 활성을 Prx II의 결손이 억제하는 효과가 있음을 시사하는 결과로서 향후 다양한 분석을 통하여 관련 기전을 밝히고자 한다. 결과적으로, 본 연구에서는 돌연변이 ras의 종양형성에 있어 Prx II가 매우 중요한 조절자임을 알 수 있었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

간암모델마우스인 HBx transgenic mice와 NS5A transgenic mice를 이용하여 간암 발병에 중요한 역할을 하는 신규 타겟 확보 및 암 발생 경로의 규명으로 암 치료제 및 조기진단 마커 개발로 활용할 예정이다. 또한, 간암 치료후보물질의 스크리닝 시스템개발

및 후보물질도출에 사용 예정이다.

S U M M A R Y

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the 5th most common cancer and the 3rd leading cause of cancer deaths in the world, primarily due to late symptom manifestation and unresponsiveness to treatment. Chronic hepatitis B virus (HBV) infection is strongly associated with HCC, and the viral X-gene product (HBx) has been implicated to play a major role in the etiology of HCC. The HBx protein is implicated not to directly cause cancer but to play a role in hepatocellular carcinogenesis as a co-factor or tumor promoter through its pleiotropic functions. The long latent period between the initial HBV infection and manifestation of HCC in chronically infected individuals provide ample opportunity for a tumor-initiating event to occur. HBx, which is resident in these chronic HBV carriers, then acts as a tumor promoter, modulating regulatory processes in these cells to facilitate the transformation process. One likely tumor initiating event is DNA damage.

A systematic analysis of the genes targeted by HBx will be insightful in understanding the molecular mechanism of HBx-associated HCC. Various groups have embarked on this quest through gene expression profiling using serial analysis of gene expression and cDNA microarray techniques for large scale identification of genes modulated by HBx.

We reported HBx induces liver cancer in transgenic mice. HBx Tg mice showed dysplasia within 4 weeks, dysplastic nodules after 6 months, HCA after 9 months and HCC after 15 months of age. IGF-II is one of the protein hormone, predominantly active in fetal liver. Higher expression of IGF-II can be detected in HCC. HBx Tg mice have an increased liver/body weight ratio as well as cyclin D1 expression compared to wild mice after 2 weeks. At that point, highly expressed IGF-II in wild mice started to decrease but in HBx Tg mice the IGF-II expression still remained high level. The HepG2-HBx cell line also has a higher expressed IGF-II level than the control cell line. Like in vivo data, the HBx cell line showed fast growth and increased cyclin D1 expression levels. In this study, we suggest IGF-II as an early diagnosis marker and it leads to liver dysfunction via over-proliferation of an HBx damaged hepatocyte. We still study to define the early mechanism of liver disease related with IGF-II.

And we study about CIDE-a (cell death inducing DNA fragmentation factor like effector) as a new marker for early liver disease. CIDE-a is highly expressed in HBx Tg mice right after born compare to wild mice. And also previous studies report CIDE-a is increased at old age compared to young and

CIDE-a can be detected 15month old of wild mice liver. Through our data, CIDE-a is induced by oxidative stress related transcription factor Nrf2. we still study to define the function of CIDE-a in progression of liver diseases.

Hepatic steatosis occurs frequently in patients with chronic hepatitis B virus (HBV) or chronic hepatitis C virus (HCV) infection. Recently, several studies suggested that steatosis plays an important role as a cofactor in other liver diseases such as hepatic fibrosis, hepatitis, and liver cancer. In contrast to HCV, however, the molecular mechanism by which HBV mediates hepatic stestosis has not been clearly studied. Here, we show the molecular mechanism by which HBx induces hepatic steatosis. Overexpression of HBx induced hepatic lipid accumulation in HepG2-HBx stable cells and HBx Tg mice. It also up-regulated the messenger RNA and protein levels of sterol regulatory element binding protein 1, but not peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). Moreover, we also determined that the expression of HBx increases PPARgamma gene expression as well as its transcriptional activity in hepatic cells, mediated by CCAAT enhancer binding protein alpha activation. Finally, we showed that HBx expression is able to up-regulate the gene expressions of various lipogenic and adipogenic enzymes in hepatic cells. We showed that the increased HBx expression causes lipid accumulation in hepatic cells mediated by sterol regulatory element binding protein 1 and PPARgamma, which could be a putative molecular mechanism mediating the pathophysiology of HBV infection.

Proteomic analysis was performed to identify proteins that may be involved in hepatocarcinogenesis and/or that could be utilized as early detection biomarkers for HCC. Proteins from the liver tissue of HBx Tg mice at early stages of carcinogenesis (dysplasia and hepatocellular adenoma) were separated by 2-DE, and quantitative changes were analyzed. A total of 22 spots displaying significant quantitative changes were identified using LC-MS/MS.

AMP-activated protein kinase (AMPK) acts as a cellular fuel gauge that responds to energy stress by suppressing cell growth and biosynthetic processes, thus ensuring that energy consuming processes proceed only if there are sufficient metabolic resources. Malfunction of the AMPK pathway may allow cancer cells to undergo uncontrolled proliferation irrespective of their molecular energy levels. The aim of this study was to examine the state of AMPK phosphorylation histologically in HBx induced HCC in relation to clinical and anti-HBV therapy. In the liver, AMPK controls gluconeogenesis and lipogenesis, although it has been unclear how the activity of AMPK is regulated. AMPK levels were increased in livers of the HBx Tg mice at 6 months. However,

AMPK expression and activation were decreased in hepatic tumor region of HBx Tg mice at 15–18 months compared to non-tumor region. Also, the same results we obtained in HBV patients of tumor region. It suggests that AMPK reactivation could have therapeutic potential in HBx induced HCC. These results, AMPK will be useful for discovery of potential treatment targets for dysregulated metabolism of HCC in HBV patients and future anti-HBV therapy.

Hepatitis C virus (HCV) is a major cause of chronic hepatitis, liver cirrhosis and HCC. However, the mechanism of HCV pathogenesis is not well understood. Our previous *in vitro* studies suggested that non-structural 5A (NS5A) protein may play an important role in liver pathogenesis. To elucidate the mechanism of HCV-induced liver pathogenesis, we investigated the histopathological changes of liver in transgenic mice harbouring the *NS5A* gene. We generated transgenic mice harbouring HCV *NS5A* gene under the control of hepatitis B virus (HBV) enhancer. Pathological changes were analysed by immunohistochemical staining and western blot analysis. Lipid composition and ROS production in NS5A transgenic mice were analysed. HCV NS5A transgenic mice developed extraordinary steatosis over 6 months old and induced HCC in some mice. NS5A was co-localized with apolipoprotein A-I in fatty hepatocytes. In addition, the extraordinarily high levels of ROS, NF- κ B and STAT3 were detected in hepatocytes of NS5A Tg mice. These data suggest that NS5A, independent of other HCV viral proteins, may play an important role in the development of hepatic pathologies, including steatosis and hepatocellular carcinoma in transgenic mice.

Recent highlights of oncogenes in cancer of the action of free radicals are being studied. To understand the mechanism of action of free radicals in cancer, we used mice of oncogenic ras-induced HCC and oxidative stress model. Ras oncogene mutations in cancer is due to the development of effective inhibitors do not have incurable cancer has been classified. Therefore, new approaches and treatments are needed to advance the therapy for Ras-induced cancer. In this regard, recently ROS or antioxidant enzymes provide a new paradigm of research and diversification of research effort, and the result has been derived. We reported mutant H-ras induces liver cancer in transgenic mice. To study the biological function and its possible underlying mechanism of antioxidant enzyme peroxiredoxin II (Prx II) in liver cancer, we generated H-ras^{12V}Tg mice Prx II gene deleted and compared the phenotype with that of H-ras^{12V}Tg mice. H-ras^{12V}Tg mice were found to have formation of liver tumors caused by defects in the inhibitory effect of Prx II. Several studies have shown the activation of the Ras/Raf-1/ERK pathway in Ras-induced tumor growth.

Therefore, we assessed ERK activation in H-ras^{12V}Tg and H-ras^{12V}Tg × Prx II^{-/-} congenic mice at 7 months of ages. Increased phosphorylation of ERK was observed in the H-ras^{12V}Tg, however again reduced to normal levels in H-ras^{12V}Tg × Prx II^{-/-} mice. These results suggest that Prx II plays an essential role in regulating Ras-induced ERK activation, which could contribute to the pathogenesis of liver tumor growth. Prx II may be considered as a novel potential therapeutic target in Ras-induced HCC.

These mice will be characterized to understand *in vivo* phenotype and associated function next time.

C O N T E N T S

I. Summary on Research Subject	15
1. Research Aims	
2. Necessity and scope of Research	
II. The present state of research at home and abroad	18
III. Results and contents	21
(1) Target mining for liver cancer using HBx transgenic mice	
1) Differential gene expression by DNA chip experiments	
2) Functional mechanism of new target genes	
3) Proteome analysis of differential expression of the proteins identified	
4) Functional mechanism of lipogenesis, gluconeogenesis and tumorigenesis	
(2) Target mining for liver cancer using NS5A transgenic mice	
(3) Effect of Prx II deficiency on H-ras12V-driven hepatocellular carcinogenesis in mice and elucidation of the related mechanisms	
IV. Significance and contribution	54
V. References	58

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	15
제1절. 연구개발 목적	15
제2절. 연구개발의 필요성 및 범위	16
제 2 장 국내외 기술개발 현황	18
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	21
제1절 HBx 간암모델마우스를 이용한 간암발생 관련 타겟 발굴 분야	21
1. DNA chip 실험에 의한 차등발현 유전자 동정	21
2. 신규 타겟의 기능연구	24
3. Proteome 분석을 통해 차등발현 단백질 동정	31
4. Lipogenesis, gluconeogenesis 및 tumorigenesis 작용 기작 연구	36
제2절. HCV NS5A transgenic mice를 이용한 간암발생기작 및 타겟발굴 연구	44
제3절. mH-Ras Tg/Prx II KO double mice를 이용한 간암발생에 있어서 Prx II의 역할 규명	48
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	54
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	56
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	57
제 7 장 참고문헌	58

제 1 장 연구개발과제의 개요

제1절. 연구개발 목적

지금까지 많은 학자들이 간암 환자 조직을 가지고 타겟을 발굴하는 연구를 수행하여 나름대로 중요한 성과를 도출하여 왔으나, 환자 조직을 이용한 연구는 온전한 조직 시료를 확보하는데 어려움이 많고, heterogeneous하기 때문에 암의 발생에 관여하는 인자의 해석에 어려움이 많았다. 특히, 암이 발생되기 이전의 암 발생 추적에 관한 연구는 환자를 대상으로 할 수 없는 점이 큰 문제이다.

본 연구팀은 이러한 문제를 극복할 수 있는 간암모델동물을 개발한 바 있어 이들 간암마우스를 이용하여 간암 발병과 연관된 분자 타겟을 발굴하고 그 타겟의 분자기전을 밝히며 임상적 유의성을 찾는 것은 매우 중요하다. 따라서 Hepatitis B Virus 감염에 의한 간암 유발에 주도적인 역할을 하는 것으로 알려진 HBx가 발현되는 HBx 형질전환마우스와 Hepatitis C virus 감염에 의한 간암 유발에 관여할 것으로 주목을 받는 NS5A가 발현하는 NS5A 형질전환마우스를 이용하여 각 마우스의 병리학적 표현형을 규명하고 genomics 및 proteomics 방법에 의해 간암생성과 연관이 있는 새로운 타겟을 발굴하고 그 타겟의 기능을 밝히며 임상적 유의성을 찾고자 한다. HBx 형질전환마우스의 초기 간암 단계의 시료를 채취하여 이를 단백질체 방법을 통해 정밀 분석함으로써 간암생성과 연관이 있는 새로운 타겟을 발굴하고 그 타겟의 기능을 밝히며 임상적 유의성을 찾고자 한다. 대사질환을 가진 간암환자는 간암진행이 빨라지는 것으로 알려져 있으나 그 작용기전은 전혀 알려져 있지 않다. 본 연구팀은 최근 HBV 간암모델을 이용하여 HBx가 대사질환을 유도하며 대사질환이 유도된 마우스는 간암의 진행이 매우 빠른 것을 확인하였다. 따라서 HBV 감염에 의해 발생하는 대사 장애가 간암발달을 촉진시키는 작용기전을 규명하고자 한다.

종양유전자에 의한 암발생에 있어 활성산소의 작용에 관한 연구가 최근 중점적으로 연구되고 있다. 그러나 아직까지 이러한 연구는 초기단계로서 마우스와 같은 모델동물을 이용하여 *in vivo* 에서 그 효과 또는 기전을 연구하는 것이 매우 중요한 것으로 부각되고 있다. 따라서 본 연구에서는 간암 및 산화스트레스 모델마우스를 이용하여 활성산소의 작용기전을 *in vivo* 에서 보다 적극적으로 이해하는 것을 그 목적으로 한다.

제2절. 연구개발의 필요성 및 범위

1. 연구 개발 대상 기술의 경제적·산업적 중요성 및 연구개발의 필요성

전 세계의 간암환자 사망 중 HBV 감염에 의한 간암발병으로 사망하는 환자가 53%를 차지한다 (Oncogene 2003;22,5093 - 5107). 우리나라는 B형 간염바이러스의 감염에 의한 간암발생이 전체 간암발생의 70%를 차지하고 있고 간암의 치료 후 5년 생존율은 암 중에서 아주 낮은 암이므로 간암 정복은 국가적 과제이다. 국내 간암의 개인적, 사회적 비용 부담은 암중에서 최고이다. 우리나라에서 발생하는 암종별 환자 1인당 사망 손실액과 의료비 중, 간암은 사망 손실액이 가장 컸고, 진료비는 폐암 다음으로 두 번째를 차지하고 있다. B형 간염바이러스의 감염에 의해 발생된 간암의 치료제는 아직 적합한 것이 없다. 단지 B형 간염바이러스의 증식을 억제하는 간염 치료제가 시판되고 있을 뿐이다. 따라서 진행된 간암의 발달을 제어할 수 있는 치료 타겟을 발굴하는 것은 매우 중요하다고 생각된다. HBx transgenic mice의 간암 초기 단계 (dysplasia & HCA)의 시료를 단백질로 정밀 분석함으로써 간암의 초기 진단 바이오마커의 발굴을 목표로 한다. 간암의 조기진단이 간암 치료에 가장 중요한 요소이다.

암질환을 치료하기 위하여 다양한 항암제가 개발되어 사용되고 있으나, ras 종양유전자의 돌연변이에 의한 암은 효과적인 저해제가 개발되어 있지 않아 난치성 암으로 분류되고 있다. 따라서 돌연변이 ras에 의한 암발생 기전에 대한 새로운 각도의 이해가 필요한 시점이다. 최근 이와 관련하여 활성산소 또는 항산화효소가 새로운 패러다임의 연구 분야를 제공하여 다각적인 연구시도 및 그 결과물들이 도출되고 있다. 따라서 최적의 모델동물을 선발 및 제작하여 연구하는 것은 상기한 난치성 암질환을 극복하기 위한 최선의 항암제를 개발하는데 매우 중요한 단서들을 제공할 것으로 기대된다.

2.. 연구개발의 필요성

우리나라 간암의 70% 이상은 B형 간염 바이러스 (HBV)와 관련된다.

간암은 우리나라 3대 호발암의 하나로서 전 세계적으로 매년 100 만명, 우리나라에서 매년 만명이상이 간암으로 사망한다 (우리나라 성인 남자의 간암에 의한 사망률은 세계 제 1위임). 우리나라에서 간암의 70% 이상은 B형 간염바이러스 (HBV)와 관련이 있다. HBV는 DNA virus이고, 3.2kb의 double strands DNA이며, 4개의 중첩되는 open reading frames, 즉, the core protein (C), the polymerase (P), surface antigen (S), 그리고 X로 구성되어 있는데 X는 HBx 라고 불리고 있다.

HBx는 간암생성의 능력을 지닌 oncogene이다.

HBV 감염에 의해 간암이 된 환자의 간암조직 genomic DNA에는 60-100%가 HBx DNA가 검출되고 있고 (Oncogene 2007;26:2166-2176), HBx가 발현되는 형질전환마우스는 간암 (Hepatocellular carcinoma)을 생성하는 것으로 알려져 (Nature 1991;351:317-20, Hepatology 1994; 19:810-9, J Hepatology 1999; 31:123-132), HBx는 간암발생에 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다.

HBx는 다양한 기능이 밝혀져 있는데, 핵에서 NF- κ B, AP-1, CREB, TBP 등의 전사조절인자와 상호작용하여 사이토카인 등의 전사를 조절하고, 세포질에서 Protein kinase C, Janus kinase/STAT, Phosphatidyl inositol 3-kinase (PI3K), Stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase, Protein kinase B/Akt 등의 protein kinase와 상호작용하여 신호전달을 조절하는 기능이 있는데, 핵과 세포질에서의 HBx의 작용 조절에 따라 cell cycle을 촉진하거나 apoptosis를 저해하여 궁극적으로는 간암을 일으키는 것으로 보고되어 지고 있다 (Journal of Viral Hepatitis 2004; 11: 383-393). 이상의 결과를 포함하여 HBx가 간암과 관련되어 있다는 보고는 약 200여편에 달하는데, 이는 HBx가 간암을 유도하는 암유전자임을 밝히는 것이다.

본 연구팀은 이러한 문제를 극복할 수 있는 간암모델동물을 개발한 바 있어 이들 간암마우스를 이용하여 간암 발병과 연관된 분자 타겟을 발굴하고 그 타겟의 분자 기전을 밝히며 임상적 유의성을 찾는 것은 매우 중요하다.

따라서 본과제는 Hepatitis B Virus 감염에 의한 간암유발에 주도적인 역할을 하는 것으로 알려진 HBx가 발현되는 HBx 형질전환마우스와 Hepatitis C virus감염에 의한 간암유발에 관여할 것으로 주목을 받는 NS5A가 발현하는 NS5A 형질전환마우스를 이용하여 각 마우스의 병리학적 표현형을 규명하고 genomics 및 proteomics방법에 의해 간암생성과 연관이 있는 새로운 타겟을 발굴하고 그 타겟의 기능을 밝히며 임상적 유의성을 찾고자 한다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제1절. HBx 간암모델마우스를 이용한 간암발생 관련 타겟 발굴 분야

HBx가 간암을 유도한다는 *transgenic mice* 결과

HBx가 간암을 생성한다는 보고는 이미 1991년 *Nature* (351:317-20)와 1994년 *Hepatology* (19: 810-9)에 보고 되었으나 그들이 개발한 마우스를 이용하여 다른 연구팀이 결과를 낸 적이 없어서 그 마우스에 대한 의구심이 많았고, 또한 최근 그들 마우스는 더 이상 tumor를 생성하지 않는다는 개인적인 정보를 받은바 있다. 현재 지구상에는 본 연구팀이 개발한 마우스만 존재하는 것으로 알려지고 있다.

현재까지 HBx 간암모델마우스를 이용하여 간암치료 및 진단 타겟을 발굴하였다는 보고는 없고 HBx가 positive한 HepG2 cells과 negative한 HepG2 cells을 이용하여 PCR select cDNA subtraction을 실시하여 HBx에 의해 upregulated cellular genes이 tumor growth와 survival을 촉진시킨다고 2001년 미국 Thomas Jefferson 대학의 Feitelson팀이 *Hepatology* (34, 146-157)에 보고 하였다.

Feitelson팀은 상기 시스템을 이용하여 발굴한 target (URG4, URG7, URG11, S15a, Sui1 등)의 antibody를 이용하여 HBV 간암환자의 혈청에 존재하는 항원을 검색한 결과, positive 반응을 보임으로써 HBV 간경화 및 간암 환자의 preneoplastic marker로서 가치가 있음을 발표하였다 (*Cancer Research* 2004, 64, 7329-7335).

제2절. 단백체를 이용한 간암과 연관된 분자 타겟 발굴 분야

간암의 인체시료나 모델을 통한 단백질 연구는 전 세계적으로 활발히 진행 중에 있다. HBx-유래의 간암에 관련된 단백질 연구 동향에 국한해서 보면, 중국 북경의 Institute of Biotechnology의 Dr. Yang Y 박사팀이 HBx transgenic mice의 간암 시료를 정상군과 단백질 비교분석하여 proteasome과 lysosomal proteases들의 발현이 증가되어 있음을 발표하였지만, 간암의 후반부를 비교하여 간암의 발생기전에 관여하는 타겟들이라 말하기 어렵다. 싱가포르 Nanyang University의 Dr. Chen WN 박사팀은 HBx를 간세포주인 Chang cell 에 transfection시킨 후에 단백질 변화를 모니터링하여 발현 변화를 보고하였지만, 발현 변화를 보이는 단백질 리스트를 보고하였을 뿐, 간암관련 기전 연구는 진행하지 않았다. 역시 중국의 Dr. Lin H 그룹은 HBx 단백질이 생체내의 Hsp72와 복합체를 형성하고, 이러한 복합체 형성이 간암의 발생 기전에 관여함을 규명하여, 2008년 *J. Proteome Res.*에 보고하였다.

결론적으로 HBx 유래의 샘플을 이용해 단백질 분석을 한 선행 결과는 국내에는 보고된바 없으며 국외에서도 HBx transgenic mice의 시료를 이용한 경우는 2006년 중국의 Dr. Yang Y 그룹에서 유일하다. 이 또한 간암 발생 후반부를 분석한 결과이기에 간암 발생 기전이나 진단 마커로 사용하기에는 부적합한 시료 및 결과이다.

제3절. HBx는 대사성질환을 유도

HBV에 의한 간암발생 작용기전에 관한 연구는 많이 되어 있으나 HBV에 의한 대사질환 연구, 그리고 대사질환이 간암발달에 미치는 영향에 대한 연구는 보고된 바 없다.

표 1. 국내·외 관련분야에 대한 기술개발현황

연구수행 기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
University of Dundee	비만, 당뇨병 및 암에 있어서의 에너지 조절과 약물 타겟으로의 AMPK와 조직수복, 대사에서의 PPAR의 기능연구	우수한 저널에 연구결과를 발표하였으며 임상연구를 병행하고 있음
서울대학교	초파리를 사용하여 AMPK가 암 발생에 영향을 준다는 사실을 규명	당뇨·비만 관련 유전자로 알려졌던 AMPK 단백질항암기능 세계 최초 규명
가천의과대학교	암과 당뇨병 분야의 기초연구에서부터 진단 치료기술개발, 임상연구, 예방연구 등을 수행	국제적인 네트워크 구축을 통한 공동 협력체제 구축을 통해 우수한 저널에 연구 결과를 발표하였음
부산대학교	당뇨병 발생과 지방대사 조절에 관여하는 B형 간염바이러스의 작용기작 연구	HBx 관련 우수한 저널에 연구결과를 발표하였음
본 연구실	HBx 간암모델마우스를 개발하였으며 HBx에 관련 병인성에 관한 연구를 지속적으로 수행하였음	우수한 저널에 다수의 연구결과를 발표하였으며 현재 HBx와 대사질환에 관한 작용기전에 대해 연구를 진행중임

제4절. 암발생에 있어서 Prx II의 역할 규명

1. 국외 기술개발 현황

Ras 유전자는 인간의 암중 25%를 담당할 정도로 매우 중요한 oncogene으로 알려져 있다. 따라서 ras의 활성을 억제할 수 있는 저해제 (예, farnesyltransferase inhibitor)를 개발하려는 연구가 활발히 진행되어 왔으나, 현재까지 특이적인 약물이 개발되지는 못하고 있는 실정이다. 결국 다각적인 방법에 의하여 Ras를 조절하고자 하는 연구들이 수행되고 있으며, 최근 ras를 이용한 기전연구 중 활성산소와의 관련성이 매우 주목할 만한 것으로 조사되고 있다. Ras의 활성에 의해 활성산소(reactive oxygen species, ROS)가 증가되는 것으로 알려져 있으며 (Hole 등, 2010), 특히 이러한 활성산소를 조절함으로써 Ras의 활성이 조절될 수 있는지의 여부가 매우 중요한 관심사항으로 부각되기 시작하였다. 따라서 활성산소를 조절하고 있는 항산화효소와 ras와의 관련성에 대한 새로운 패러다임의 연구방향으로서 주목받기 시작했으며, 이와 관련하여 최근 연구보고에 의하면 peroxiredoxin I이 결손 되었을 경우, 돌연변이 ras에 의한 마우스 태아 섬유아세포 (mouse

embryonic fibroblast, MEF)의 종양성이 현저하게 증가되며, 이는 c-myc 유전자와 밀접하게 관련되어 있는 것으로 조사되었다(Egler 등, 2005). 그러나 활성산소의 경우 그 작용결과에 있어 양면성을 띠는 대표적인 물질로서 일정 범위 안에서는 세포의 증식, 사멸 및 분화와 같은 기본적인 세포의 생활사와 밀접한 관련이 있는 반면, 축적된 수준에서는 여러 가지 질환 및 질병의 원인으로 작용한다는 것이 잘 알려져 있다 (Valko 등, 2007). 결국 활성산소의 수준 및 범위에 따라 그 작용결과 또한 매우 다양하게 나타날 수 있기 때문에 이를 조절하는 항산화효소를 연구하는 것이 매우 중요할 것으로 판단되어 진다. 따라서 본 연구에서는 Ras의 조절자로서 peroxiredoxin II의 가능성을 확인하고자 한다.

2. 국내 기술개발 현황

Cinnamaldehyde가 돌연변이 H-ras에 의한 간암형성을 억제함을 보고 (Moon 등, 2006) 하였고, 정소절제술이 돌연변이 H-ras에 의한 간암형성을 억제함을 보고 (Wang 등, 2006) 하였다. RERG 유전자가 H-ras에 의한 간암 형성시 HDAC에 의해 성별 특이적으로 발현이 조절됨을 보고 (Wang 등, 2006)하고, Prx II가 ras-Erk-NFκB 신호전달 억제하여 마우스 태아섬유아세포의 노화를 억제함을 보고 (Han 등, 2006)하였다.

3. 국내·외 기술개발현황에서 차지하는 위치

본 연구팀에서는 항산화효소 Prx II 결핍 마우스 뿐만 아니라 돌연변이 H-ras에 의한 간암모델 마우스도 자체 제작하여 확보하고 있다. 따라서 활성산소 또는 항산화효소에 의한 암발생과 관련한 *in vivo* 연구를 독자적으로 수행할 수 있는 기본 여건을 충실히 갖추고 있다. 결국, 본 연구에서 도출된 연구결과는 *in vivo* 에서 ras의 작용을 조절하는 항산화효소로서 Prx II의 중요성을 크게 부각시킬 수 있을 것으로 기대하며, 이는 국내 뿐 아니라 국외에서도 경쟁력 있는 독자적인 연구 결과로 판단된다.

제 3 장 연구 개발 수행 내용 및 결과

제 1절. HBx 간암모델마우스를 이용한 간암발생 관련 타겟발굴 분야

1. HBx Tg mice의 간조직 mRNA를 이용한 DNA chip 실험 및 RT-PCR에 의한 차등발현 유전자 동정

가. 이론적, 실험적 접근방법

B형 간염바이러스 (Hepatitis B Virus, HBV)의 유전자 중 주된 간암 유발인자로 알려진 HBx (Hepatitis B virus X)를 과발현 하도록 형질전환 시킨 마우스에서 간암이 유도된다는 내용은 있다 (J Hepatology 1999; 31:123-132). 간암의 경우는 환자의 자각 증상이 늦어서 대부분의 경우 환자가 진단을 받았을 때 HCC (hepatocellular carcinoma)가 이미 상당 부분 진행된 경우가 일반적이지만, 모델동물을 이용하여 병변별로 차등 발현하는 유전자를 찾고자 DNA microarray 법을 이용하였다.

새로운 기술의 발달로 유전자 서열분석기술은 나날이 향상되고 있어 이미 주요한 박테리아와 효모에 대해서는 그들의 유전자 서열이 완전히 밝혀졌으며 수년이내에 수백 여 종의 생명체에서 유전자 서열이 완전히 밝혀질 것으로 예상되고 있다. DNA microarray의 첫 번째 응용 분야는 gene discovery이다. mRNA들의 발현 정도가 얼마나 연관이 되어 있는가에 따라 그들이 encoding하는 단백질간의 functional linkage를 유추할 수 있다. 따라서 기존에 그 기능이 알려져 있지 않은 새로운 유전자를 발견할 수 있다. DNA chip 실험을 통해 HBx Tg mice의 간 병변 (liver pathology)에 따른 유전자의 발현 pattern을 조사하였다.

나. 연구내용

간암은 대부분 병든 간에서 발생한다. 국내 간암 환자의 60~70%는 B형, 15~20%는 C형 바이러스에 의한 만성 간질환을 앓던 환자이며, 이중 80%이상이 간경변증 환자다.

간암은 거의 급성 간염 - 만성 간염 - 간경변증 - 간암의 순서로 생긴다. 즉 간경변을 잘못 관리하면 간암으로 진행될 수 있다. 하지만 환자의 치료는 거의 HCC 일 때만 확보할 수 있으나, 간암 동물모델인 HBx Tg mice에서는 HCC 뿐만 아니라 간암의 초기 병변인 dysplasia와 HCA 샘플을 확보할 수 있다.

HBx Tg mice를 생산하여 추출한 간의 병리학적 양상을 확인한 후 병변시기별로 3마리 이상씩 간 조직에서 RNA를 추출하고, DNA chip 실험을 통해 차등 발현되는 유전자를 조사하였다.

다. 연구결과

HBx Tg mice의 dysplasia, HCA, 및 HCC 병변에서 차등 발현되는 다수의 유전자를 확보하였고, RT-PCR에 의해 그 발현을 검증하였으며, human data와 비교 검토하였다.

(1) HBx Tg mice에서 microarray 분석 : HBx Tg mice의 dysplasia와 HCA (hepatocellular adenoma) 병변부위의 간 조직에서 mRNA를 추출하여 oligo chip assay를 수행하였다. 그 결과 Itga6, Afp 및 Gpc 3 유전자 등 다수의 유전자의 발현이 wildtype

mice에 비해 증가하였다 (표 2). 증가한 유전자 중, Itga6 유전자를 quantitative RT-PCR (그림 1)과 Western blot (그림 2)을 통해 분석하였더니, wildtype mice에 비해 유의성 있게 증가되어 있음을 확인하였다.

(2) B형 환자 간암 조직에서의 유전자 발현 검색 : HBx Tg mice의 dysplasia 및 HCA 부위에서 유의성있게 유전자 발현이 증가한 유전자 중, ITGA6 등 9 유전자의 발현을 B형 간암환자의 조직 (1기부터 4기)으로부터 추출한 RNA를 전복대의대 김대곤 교수 팀으로부터 제공받아 RT-PCR을 실시하였다 (그림 3).

표 2. Microarray 분석 결과

Gene expression	TargetID	Dys_ HBx-1	Dys_ HBx-2	HCA_ HBx-1	HCA_ HBx-2	SEARCH_KEY	SYMBOL
	scl30470.4_40-S	0.09	0.02	8.34	5.21	scl30470.4_40	H19
	scl022431.11_253-S	4.05	4.23	4.27	4.46	scl022431.11_253	Wt1
	scl51827.6.1_1-S	4.32	2.32	3.59	4.53	scl51827.6.1_1	Cidea
	scl069583.1_127-S	2.89	3.09	3.48	2.90	scl069583.1_127	Tnfsf13
	scl36582.7.1_25-S	3.46	3.42	3.12	3.13	scl36582.7.1_25	Rbp1
no data	scl44314.9.1_18-S	0.29	0.11	2.92	0.78	scl44314.9.1_18	Akrlc18
	scl17359.5_60-S	0.41	1.91	2.92	1.79	scl17359.5_60	Rgs16
	scl20797.28_28-S	0.74	0.75	2.92	1.49	scl20797.28_28	Itga6
	scl44362.3_601-S	0.98	0.46	2.92	1.25	scl44362.3_601	Esm1
no data	scl017990.3_27-S	0.57	0.37	2.91	0.65	scl017990.3_27	Ndr1
	scl50762.2_0-S	1.19	0.03	2.89	2.69	scl50762.2_0	Ier3
	scl37309.10_320-S	0.04	-0.08	2.88	1.03	scl37309.10_320	Mmp13
	scl48854.3.1_11-S	0.02	0.01	2.87	1.06	scl48854.3.1_11	Cbr3
	scl36760.13.1_118-S	-0.26	-0.27	2.86	2.00	scl36760.13.1_118	Anxa2
	scl52114.2_187-S	1.10	-2.40	2.62	5.89	scl52114.2_187	Egr1
	scl38707.5.30_13-S	1.38	0.70	2.62	0.10	scl38707.5.30_13	Prtn3
	scl17197.4_15-S	0.33	-0.17	2.53	0.69	scl17197.4_15	Tagln2
	scl27608.15.10_44-S	-0.05	0.23	2.52	0.68	scl27608.15.10_44	Afp
	scl32477.13_570-S	0.14	-0.05	2.51	1.41	scl32477.13_570	Prcl
	scl30628.6_19-S	0.87	1.40	2.48	1.79	scl30628.6_19	Prss8
	scl54248.9.17_2-S	-0.19	-0.09	2.47	-0.09	scl54248.9.17_2	Gpc3
	scl33381.16_572-S	0.18	0.23	2.47	0.33	scl33381.16_572	Cdh1

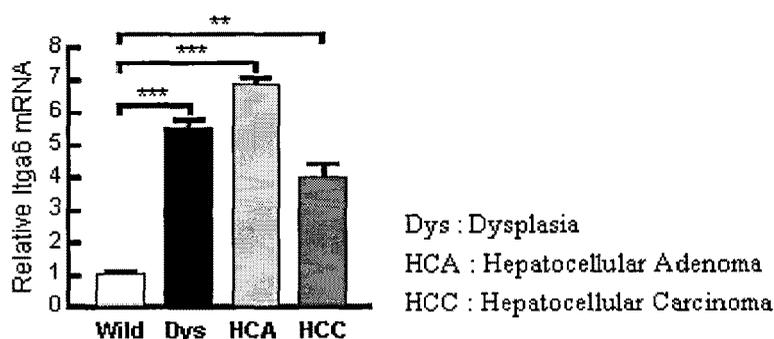


그림 1. DNA chip 실험에서 차등발현을 보인 Itga6 유전자의 qRT-PCR한 결과

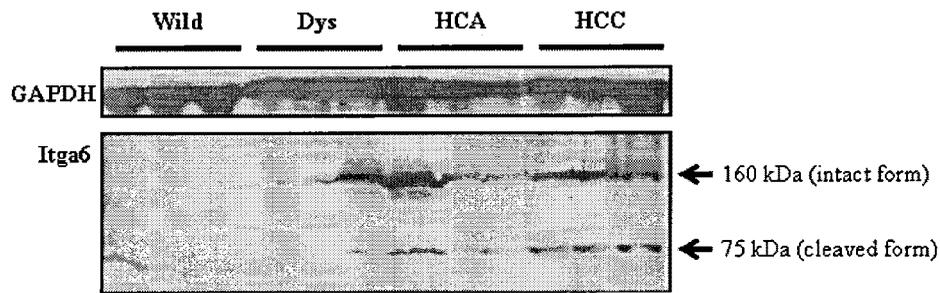


그림 2. HBx Tg mice에서 Itga6 단백질의 발현양 확인

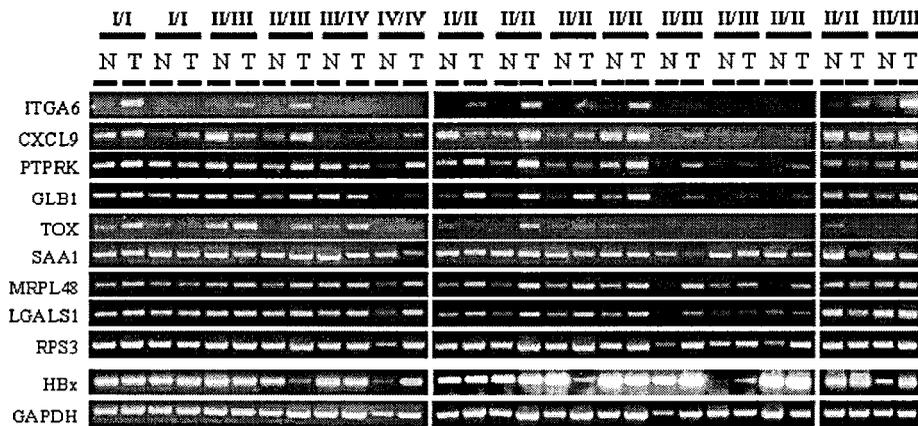


그림 3. B형 간염 환자에서의 일부 유전자를 RT-PCR한 결과

이상의 실험 결과를 정리하면,

- ① HBx Tg mice에서 microarray 분석한 결과, wildtype mice에 비해 증가하는 일부 유전자들을 확인할 수 있었다.
- ② HBx Tg mice의 dysplasia 및 HCA 부위에서 유의성있게 유전자 발현이 증가한 유전자 중 일부는 B형 환자 간암 조직에서도 발현하는 것을 확인할 수 있었다.
- ③ 결과적으로, 본 연구에서는 B형 간염 바이러스에 의한 간암 형성에 있어 초기병변인 dysplasia와 HCA 병변에서 신규 타겟 유전자들을 발견 할 수 있다.

2. 신규 타겟의 기능연구

2-1) IGF2 기능연구

가. 이론적, 실험적 접근방법

Microarray 분석을 통해 HBx에 의한 초기 병변부터 유의성 있게 증가 하였고 HBx에 의해 IGF2의 발현량이 증가한다는 선행연구 (Y.I. Lee et al, Oncogene, 1998)를 바탕으로 HBx에 의해 유도되는 간암의 발생에 있어서 IGF2가 어떠한 역할을 하는지에 대한 연구를 수행하였다. IGF2가 간암과 관련이 있다는 보고는 있으나 병변 초기에서의 연구는 되어 있지 않다. 따라서, fetal liver 그리고 간암 병변에서 발현수준이 아주 높은 IGF2 유전자가 초기 간 병변과 어떤 관련이 있는지 규명하기 위해, mice의 간 조직을 통한 병리 검사를 시행했다. 또한 mice와 HBx를 발현하는 stable cell line을 이용하여 RNA 분리, RT-PCR, Quantitative RT-PCR, ROS detection from primary hepatocytes, western blot 등의 방법을 이용하였다.

나. 연구내용

출생 이전 단계부터 출생 후 1일, 이후 각 주별로 간조직의 병리학적 검사, IGF2의 발현, 활성산소의 측정, HepG2-HBx cells 및 HBx Tg mice의 primary hepatocyte에서의 발현 변화, 세포 증식, 관련 분자의 변화를 측정하였다.

다. 연구결과

HBx Tg mice가 초기부터 간비대 (Hepatomegaly) 현상을 보이는데, 이는 HBx에 의해 증가하는 IGF2의 발현과 관련이 있음을 마우스 모델을 통하여 확인했으며 (다른 imprinted gene, 다른 성장 호르몬, IGF1R 관련 분자들은 HBx에 의해서 유의성 있게 변하지 않음이 관찰되었다) 이를 HepG2-HBx cells 실험을 통해 재확인하였다 (그림 4). HBx Tg mice에서 간의 이상 증식이 나타나는 것과 동일하게 HBx를 발현하는 세포주가 control 세포에 비해 과도한 증식을 하는 것이 확인 되었으며 이는 증가한 IGF2와 관련이 있음을 확인하였다 (그림 5). IGF2는 secretion되는 단백질로서 autocrine, paracrine을 통하여 신호를 전달하는 것으로 알려져 있다. IGF2를 특이적으로 저해하는 항체를 이용하여 secrete된 IGF2를 중화했을 때 IGF2에 의해 나타나는 현상을 돌릴 수 있음을 확인하였다.

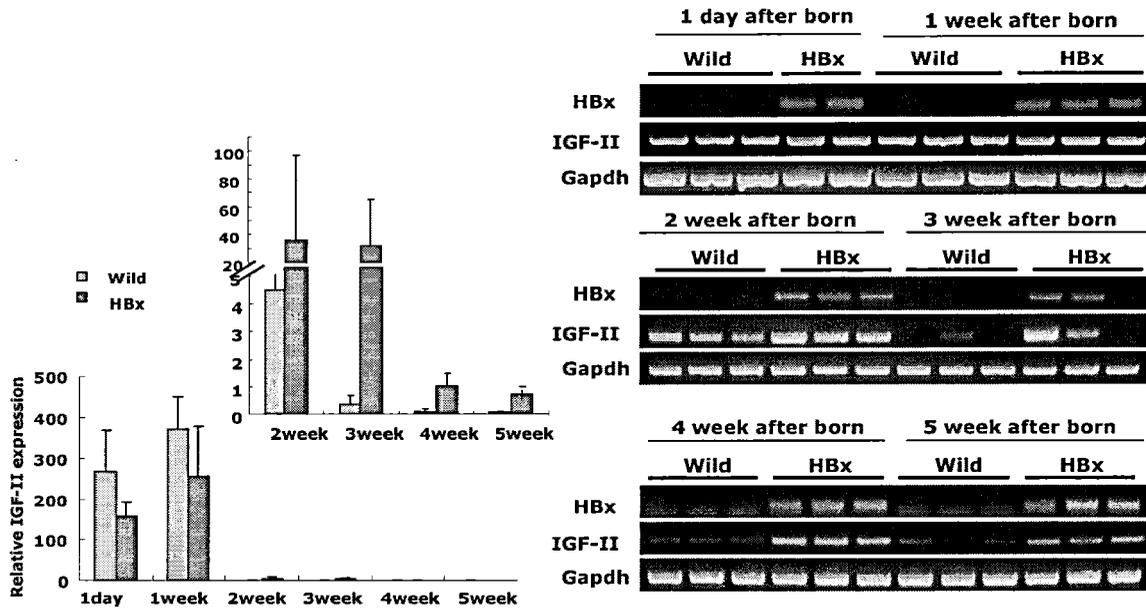


그림 4. HBx Tg mice의 간 조직에서 RT-PCR, q-RT-PCR를 통한 시기에 따른 IGF2의 발현량 확인.

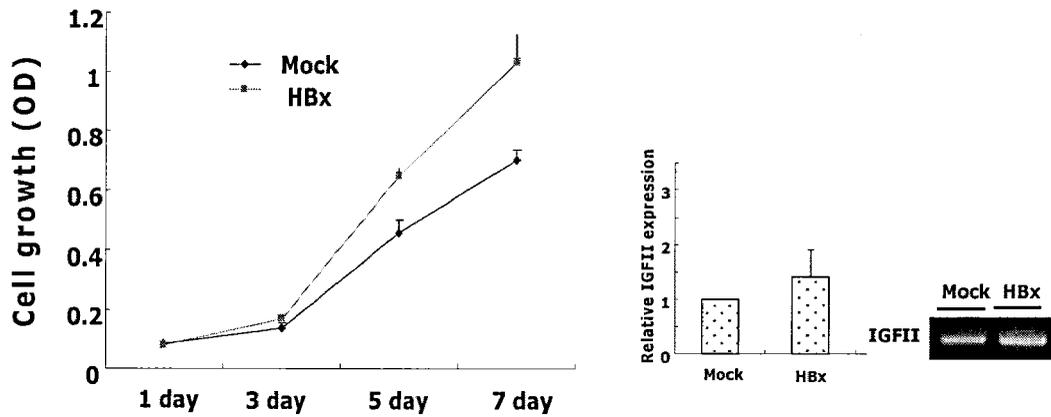


그림 5. HepG2-HBx cell을 통하여 세포의 성장속도, IGF2 발현량 확인.

이상의 실험을 정리하면,

- ① HBx Tg mice가 초기부터 간비대 (Hepatomegaly) 현상을 보이는 것을 확인하였다.
- ② 이는 HBx에 의해 증가하는 IGF2의 발현과 관련이 있음을 시사하는 바이다.

2-2) CIDE-A 기능연구

가. 이론적, 실험적 접근방법

CIDE는 cell death inducing DNA fragmentation factor like effector로서 1998년 EMBO에 처음 소개되었다. Cell death와 연관된 기능에 대한 보고가 처음에는 이루어 졌고 최근엔 PPAR alpha와 gamma의 target gene으로 갈색 지방을 조절하는 인자로서 비만과 관련이 있다는 보고들로 알려져 있다 (Z.Zhou et al, Nat.Genet. 2003). 그러나 CIDE-A의 기능에 대하여는 아직 보고된 바가 많이 없어 인체에서의 기능 연구가 필요한 시점이다. HBx Tg mice의 dysplasia, HCA 그리고 HCC 병변에서 발현이 증가되어 있는 CIDE-A가 HBx의 발현에 따른 초기 간병변과 어떤 연관이 있는지 HBx Tg mice, HepG2-HBx cells을 이용하여 분자세포생물학적으로 연구하였다.

나. 연구내용

출생 이전 단계부터 출생 후 1일, 이후 각 주별로 간조직에서의 병리학적 검사, CIDE-A의 발현, 활성산소의 측정, HepG2-HBx cells에서의 발현변화, 관련 분자의 변화를 측정하였다. 또한 CIDE-A의 발현을 조절하는 조절인자에 대한 연구도 함께 수행하였다.

다. 연구결과

HBx를 발현하는 마우스의 간 조직에서 추출한 RNA를 이용한 DNA chip assay를 통하여 wildtype mice와 다른 패턴을 보인 유전자들을 분류하고 RT-PCR을 이용하여 병변의 진행과 밀접한 관련을 보이는 새로운 타겟을 선정하였다 (표 3, 그림 6).

Microarray 실험을 통하여 6개월, 13개월 HBx Tg mice에서 wildtype mice보다 유의성 있게 CIDE-A의 발현이 증가하였음을 확인하였다. 이를 바탕으로 하여 마우스의 병변별로 CIDE-A의 발현량을 조사하였다. HBx Tg mice의 간에서는 dysplasia부터 HCC까지 CIDE-A가 높은 수준으로 발현하고 있음이 관찰되었으나 wildtype mice에서는 병변에 따라 발현량이 증가하고 있기는 하나 HBx Tg mice의 간조직과 비교했을 때 미미한 발현 현상을 나타내었다. 이를 통하여 CIDE-A의 발현이 병의 진행과 관련이 있으며 이는 HBx가 유도하는 병변과 밀접한 관련이 있을 것임을 알 수 있었다.

HBx를 발현하는 stable cells을 통한 실험으로 확인한 결과, 새로이 선정된 CIDE-A 유전자는 ROS (Reactive Oxygen Species; 활성산소)의 변화에 밀접하게 연관되어 발현하고 있음을 확인했다 (그림 7).

*in vitro*에서의 실험 결과를 토대로 *in vivo* 상태에서 어느 시기에 타겟 유전자의 발현이 진행되는지 알아보기 위하여 E15.5 day (embryonic day 15.5) 부터 생후 1일, 매 주별로 확인하여 본 결과, 생후 1일부터 타겟 유전자가 발현되기 시작함을 확인 할 수 있었고 이는 *in vitro* 실험 결과와 동일하게 ROS의 변화와 밀접한 관련이 있음을 확인 할 수 있었다 (그림 8).

타겟 유전자의 발현에 영향을 미치는 요인들을 알아보기 위하여 유전자의 프로모터 부분을 assay 해본 결과, mice와 human이 동일하게 가진 몇 가지의 transcription factor binding site를 확인 할 수 있었으며 그 중에서 ROS와 밀접한 관계를 가진 factor가 포함되어 있음을 확인했다. 우리는 HBx에 의해 증가하는 ROS가 factor의 역할에 영향을 미치며 factor에 의해 타겟 유전자의 발현이 조절될 것이라 예측하였다. 타겟 유전자의 발

현과 예측된 transcription factor의 상관관계를 알아보기 위하여 RT-PCR, western blot을 통하여 factor의 발현여부를 확인했고, 이를 통하여 타겟 유전자가 발현하는 시점에 이 factor 역시 많이 발현하고 있음을 확인함으로 타겟 유전자의 발현은 ROS에 의해 작동되는 예측 factor에 의해 조절됨을 확인하였다. Chip assay를 통하여 factor가 타겟 유전자의 프로모터 부분에 결합함을 확인하였다 (그림 9).

이렇게 초기에 발현이 시작되는 타겟 유전자가 HBx에 의해 유도되는 간 이상에 있어서 어떠한 역할을 담당하는지에 대한 연구는 수행 중이나 타겟 유전자가 강하게 발현하는 생후 1일을 기점으로 하여 이후 염증과 관련한 유전자들의 발현이 증가하였음을 통하여(그림 10) 간 이상의 초기에 나타나는 염증반응에 관여하고 있을 것으로 예측된다. 이는 칭화 대학교 prof. Peng Li의 knock out 실험에서 CIDE family를 deletion시켰을 때 inflammation에 관여하는 유전자들이 의미 있게 감소한 결과들과 일치한다.

표 3. DNA chip assay를 통한 유전자 발현차이

symbol	Fold change	symbol	Fold change
BC027556	4.444	Ly6d	6.447
Cidea	4.208	LOC268393	5.581
Cyp2b9	3.933	Cyp2a4	5.366
Lcn2	3.792	Rad51l1	4.255
Cyp4a14	3.740	Wt1	4.099
1810073K19Rik	3.724	Sult2a2	4.094
Rbp1	3.512	Cyp2b13	3.917
Wt1	3.425	Lcn2	3.888
Tnfsf13	2.926	Gstm3	3.797
Ubd	2.795	Slpi	3.660
Cyp2a4	2.651	Cyp4a14	3.652
Cyp4a10	2.346	Cidea	3.559
Cyp2b13	2.121	Rbp1	3.469
Urm1	2.117	Tnfsf13	3.336
mt-Nd5	2.040	H2-Ea	3.083
2010012P19Rik	2.029	Cd44	3.065
Ccnd1	1.898	Cyp2a5	2.907
Uap1l1	1.699	Cyp2c39	2.852

6 month hybrid HBx Tg/wild

13 month hybrid HBx Tg/wild

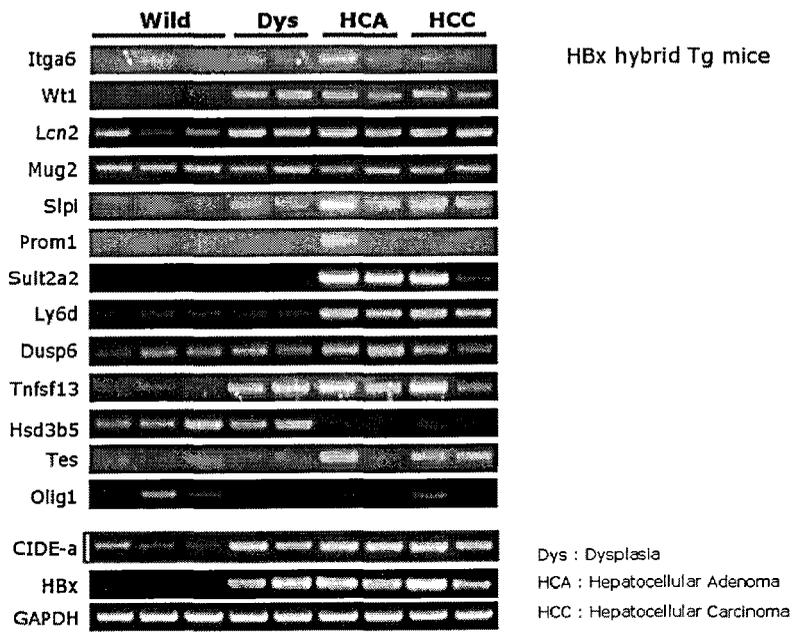


그림 6. DNA chip 실험에서 차등발현을 보인 일부 유전자의 RT-PCR한 결과

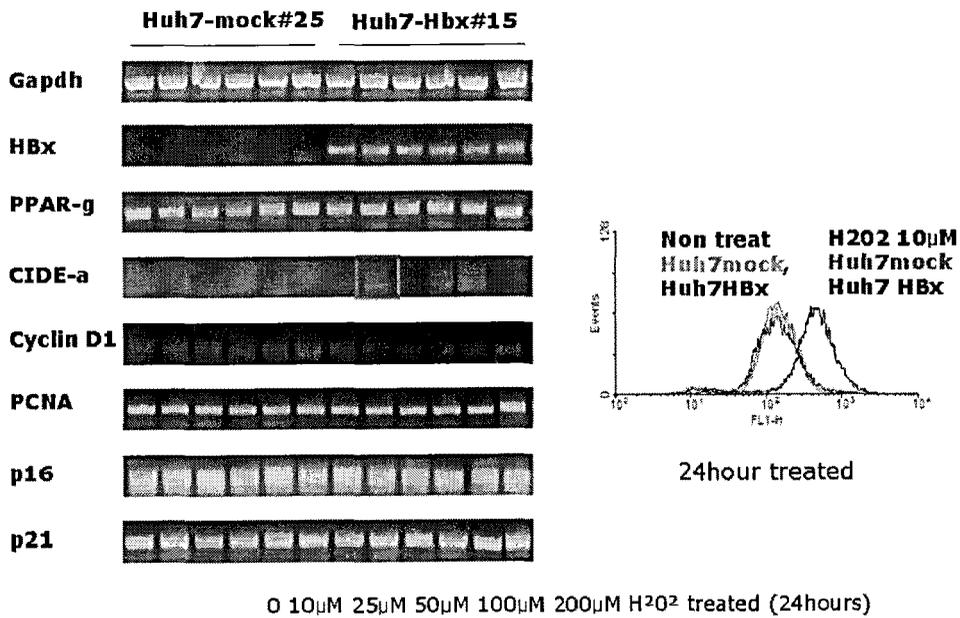
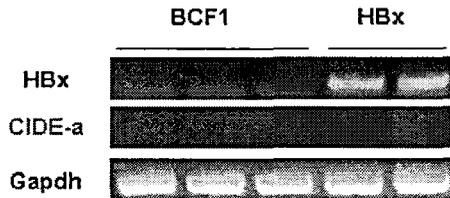
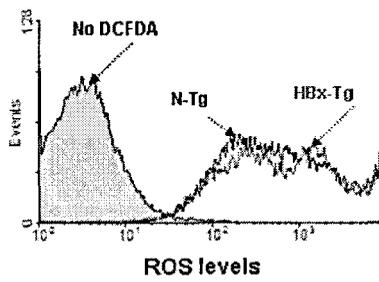


그림 7. HBx-stable cell에 H₂O₂를 처리한 이후 FACS를 이용한 ROS의 변화 확인과 유전자의 변화를 RT-PCR을 통해 확인한 결과

A. 18.5 d.p.c.



B. Post-natal 1 day

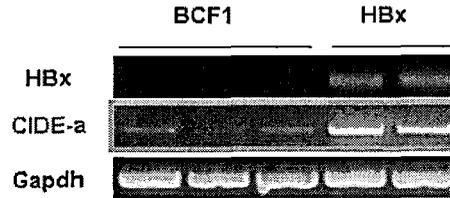
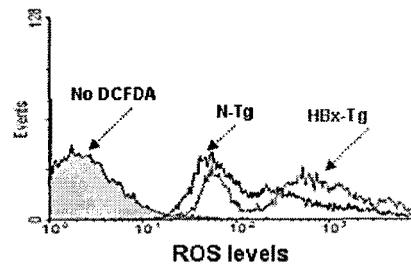


그림 8. 출생전과 이후의 마우스 primary hepatocyte의 ROS를 FACS를 통하여 측정하고 유전자의 발현여부를 RT-PCR을 통하여 확인한 결과.

Prediction of CIDE-a promoter region has Nrf2 binding site

Nrf2_01	+	Human 4522-4531	ACCTGAAGgg	Mouse 4753-4762	ACCCGAAGtg
---------	---	--------------------	------------	--------------------	------------

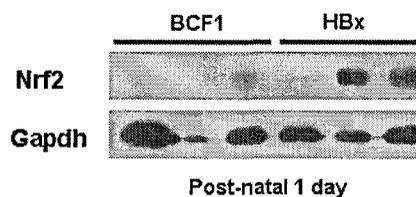
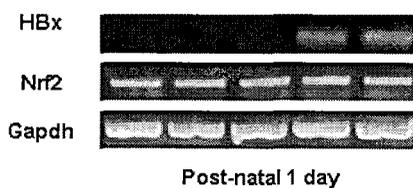
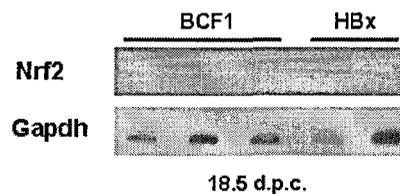
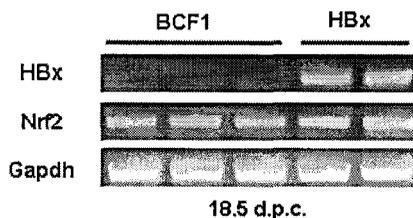


그림 9. 타겟유전자의 promoter에 binding하는 transcription factor의 예측결과, 예측된 transcription factor의 발현을 RT-PCR, western blot을 통해 확인한 결과, Chip assay를 통한 확인결과.

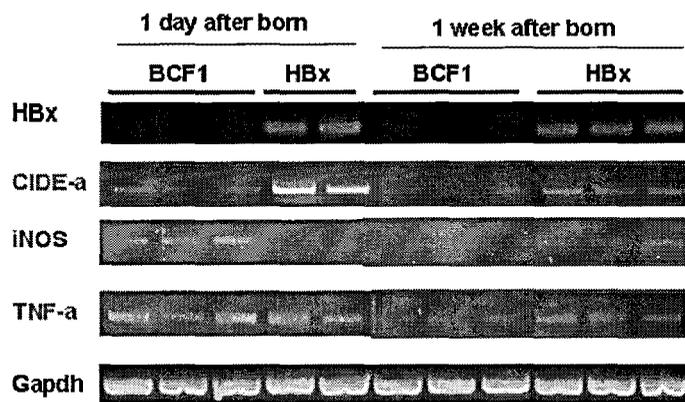


그림 10. RT-PCR을 통해 유전자의 변화를 확인한 결과

3. HBx Tg mice의 간조직단백질을 이용한 proteome 분석을 통해 차등발현 단백질 동정

가. 이론적, 실험적 접근방법

단백질 수준에서 HBx에 의해 유도되는 변화를 모니터링하기 위해 2-D PAGE 분석을 통한 단백질체학 분석을 수행하였다. 간암의 경우는 환자의 자각 증상이 늦어서 대부분의 경우 환자가 진단을 받았을 때 HCC가 이미 상당 부분 진행된 경우가 일반적이다. 간암의 조기발견이 치료를 위해 무엇보다도 중요하지만 조기발견을 위한 적당한 biomarker의 발굴이 미진하여 아직까지 효율적인 HCC의 조기진단에 어려움이 있다. 특히 환자 시료의 경우, 환자간의 변이가 심할뿐더러, 간암 초기부터 각 단계별로의 시료 채취가 원칙적으로 불가능하기에 환자의 시료를 이용한 biomarker의 발굴에는 큰 제약이 따른다.

본 그룹이 보유한 HBx Tg mice의 경우, 간암 발생 초기부터 단계별로 시료의 채취가 가능하고, mice의 genetic background나 양육조건이 동일하기에 mice간의 편차가 거의 존재하지 않아, 초기 HCC 진단을 위한 biomarker의 발굴에 여러 가지 장점을 지니고 있다. 본 과제에서는 이러한 여러 가지 장점을 지닌 HBx Tg mice의 간조직을 간암 단계별로 취득하여 단백질체 분석을 수행함으로써, 효율적으로 HCC를 조기에 진단할 수 있는 biomarker의 발굴을 목표로 하였으며, 발굴한 일부 단백질들의 환자 시료에서의 진단 가능성 및 간암 생성기전 관여 연구를 수행하고자 한다.

나. 연구내용

- ① DNA microarray 실험에서와 동일한 HBx Tg mice의 dysplasia, HCA 및 HCC 병변 부위의 조직에서 단백질을 추출하여 proteome 분석을 수행하였다.
- ② 간암의 경우 초기 진단이 중요하기에, dysplasia와 HCA 단계에 초점을 두고 의미있게 변화하는 단백질들을 중심으로 분석하였다.
- ③ 발굴 단백질들 중 일부를 다시 western blot을 통해서 재검증하였으며, 검증된 단백질들의 실제 인간 환자샘플에서의 변화를 확인함
- ④ RKIP을 포함하는 일부 단백질들의 HBx와의 상호 반응등의 기능연구를 수행하고 있다.

다. 연구결과

(1) HBx Tg mice의 간 조직 단백질체 분석 : Dysplasia, HCA, 및 HCC 표현형을 보이는 mice의 간 조직을 6, 11, 15개월령의 마우스로부터 채취하여 단백질을 효율적으로 추출하고, 이들의 단백질체 분석을 수행하였다. 아래의 그림 11은 dysplasia 와 HCA 증상을 보이는 마우스와 이에 해당하는 야생형의 간조직 2-D 이미지이다. 의미있는 변화를 보이는 단백질 스팟만을 그림위에 표시하였다.

그림 11에서 보듯이 Dysplasia의 경우 총 10개의 단백질이, HCA의 경우 총 12개의 단백질의 의미있는 변화를 보임을 관찰할 수 있었다. 아래의 표 4는 mass 분석을 통한 단백질 동정의 결과이다.

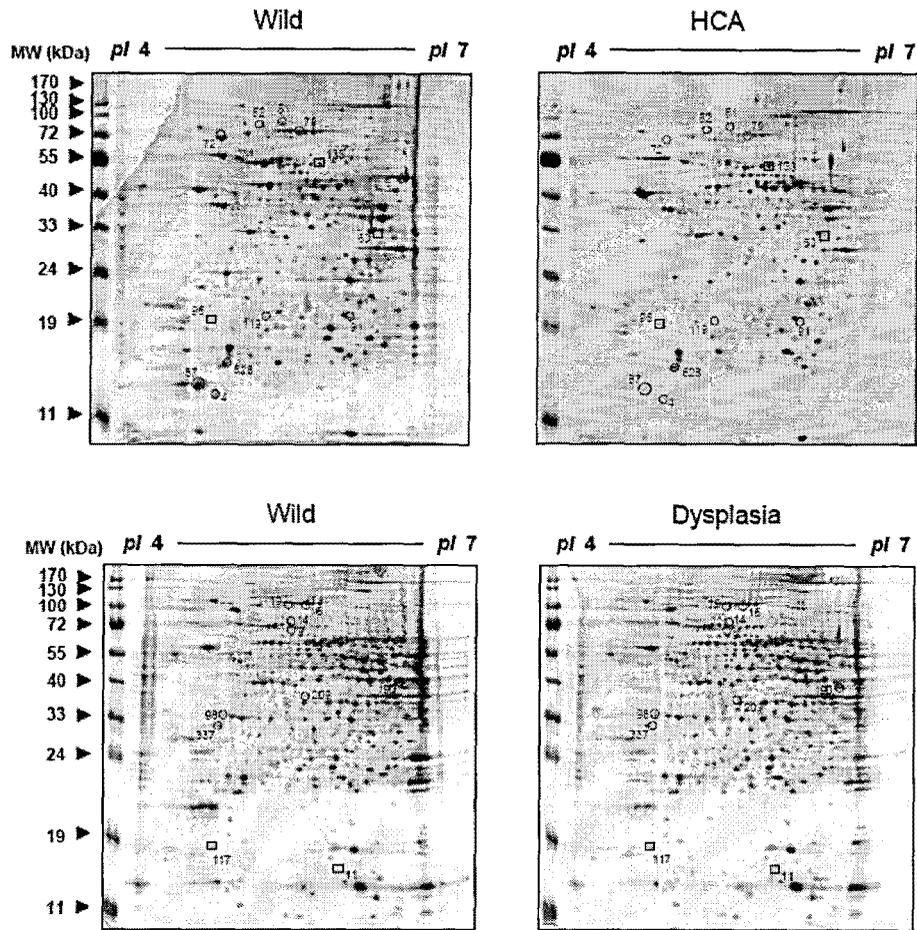


그림 11. Dysplasia 및 HCA 증상을 보이는 mouse의 간 조직 2-D 분석 대표 이미지

표 4. Dysplasia와 HCA 단계의 의미있는 변화를 보이는 단백질 리스트

Spot No.	Accession No.	Protein name	Function	No. of Matched peptides	Moscot score	Coverage (%)	Alteration
D-3	g 143310765	Serum albumin precursor	Signal transduction	25	734	26.2	3.70 ↓
D-11	g 15675737	Fatty acid binding protein 2, intestinal	Metabolism	8	221	10.9	2.93 ↑
D-14	g 14317065	Heat shock 70kDa protein 3	Molecular chaperone	13	527	10.2	2.49 ↓
D-16	g 124486712	Ribosome binding protein 1 isoform a	DNA-related protein	8	46	3.7	2.20 ↓
D-19	g 127532959	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1	Metabolism	22	804	21.0	2.13 ↓
D-36	g 15756040	Annexin A5	Apoptosis	13	567	20.7	2.93 ↓
D-117	g 15755311	Thioredoxin 1	Redox regulation	8	228	36.1	2.42 ↑
D-199	g 121956594	3-ketoacyl-CoA thioesterase, mitochondrial	Metabolism	3	156	10.2	2.40 ↓
D-205	g 12853762	Intermediate filament protein	Cytoskeleton	18	296	17.9	2.98 ↓
D-537	g 15753360	Annexin A5	Apoptosis	16	304	17.8	2.59 ↓
A-4	g 15678345	Thyroid hormone-responsive protein	Metabolism	16	207	25.3	5.70 ↓
A-51	g 125336483	Amyl-α-CRNA synthase	RNA-related protein	8	117	2.6	3.00 ↓
A-52	g 15752483	Ubiquitin-activating enzyme E1 (UBA1)	Proteolysis	3	144	4.9	3.00 ↓
A-59	g 1222967	Acyl CoA thioesterase 2, mitochondrial precursor	Metabolism	21	406	28.9	2.95 ↑
A-72	g 134027	Heat shock protein 90	Molecular chaperone	5	184	3.5	2.50 ↓
A-73	g 123271457	Aldehyde dehydrogenase 1 family, member L1	Metabolism	4	166	4.1	2.59 ↓
A-87	g 127527	Major urinary protein 2 precursor (MUP2)	Signal transduction	12	225	30.5	2.40 ↓
A-91	g 14104621	Thiopurine methyltransferase	Catalytic protein	6	71	12.5	2.35 ↓
A-96	g 129729	Protein disulfide isomerase β polypeptide	Catalytic protein	7	279	16.1	2.30 ↑
A-119	g 1337123	Cytoplasmic malate dehydrogenase (MDH1)	Metabolism	15	310	27.5	2.12 ↓
A-133	g 126340966	Serum albumin precursor (Albumin 1)	Signal transduction	25	1101	35.9	2.00 ↑
A-528	g 174222953	Raf kinase inhibitor protein (RKIP)	Signal transduction	13	305	28.3	2.00 ↓

(2) 발현 변화 단백질의 검증 연구 : 동정된 단백질들 중에서 heat shock protein들과 구조단백질들 (actin, tubulin 등)을 제외한 모든 단백질에 대해 western blot 혹은 real-time PCR 실험을 통해 2D 분석 결과를 검증하였다 (그림 12A).

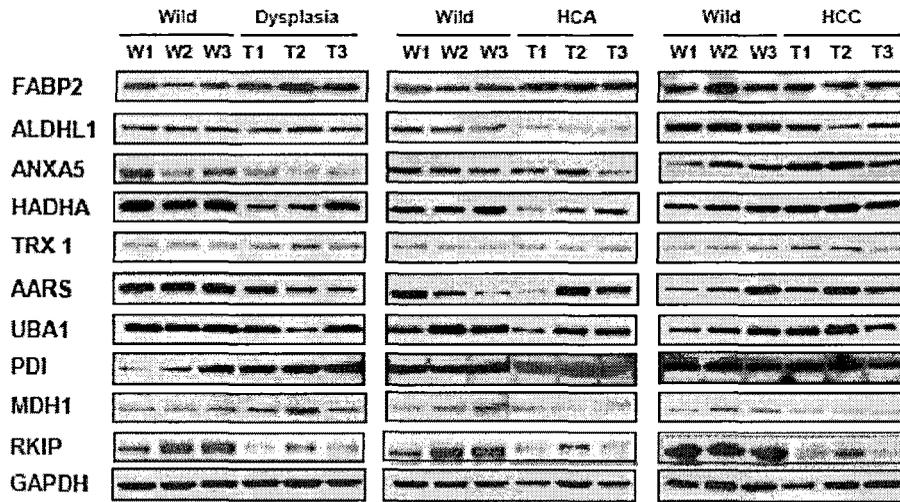


그림 12A. Western blot 분석을 통한 검증 연구 결과

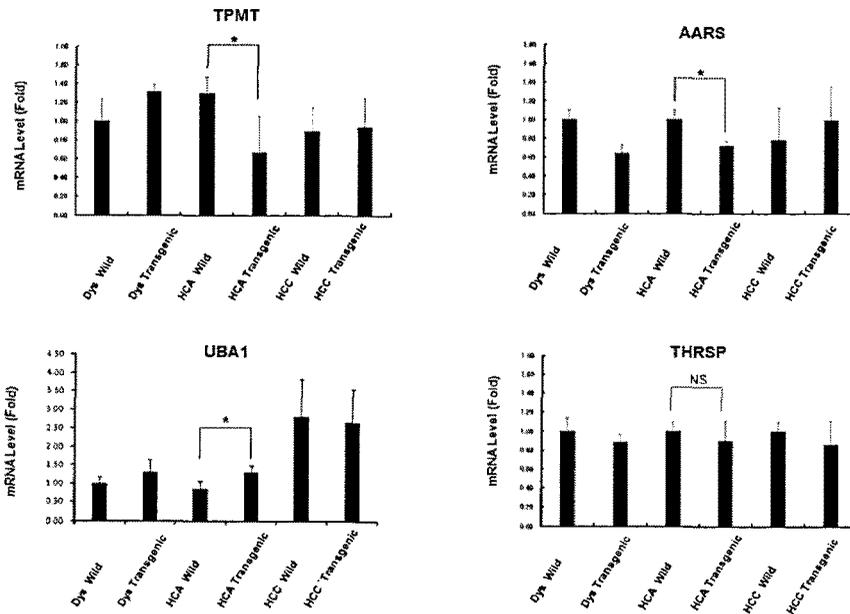


그림 12B. Real-time PCR 분석을 통한 검증 연구 결과

대체로 단백질체 방법을 통해 변화를 보인 단백질들이 western 과 real-time PCR 분석에서도 같은 형태의 변화를 보임을 재 검증할 수 있었다.

(3) 발현 변화 단백질의 인체시료에서의 검증 연구 : 검증이 된 타겟 단백질 중에서 뚜렷한 차이를 보인 단백질을 선정하여 이들의 실제 환자 시료에서의 가능성을 테스트해 보았다. 임상 시료의 희귀성 때문에 많은 수를 검증하지는 못했지만 일부 단백질의 경우에서 조기진단용 biomarker로 사용 가능성을 발견하였다 (그림 13).

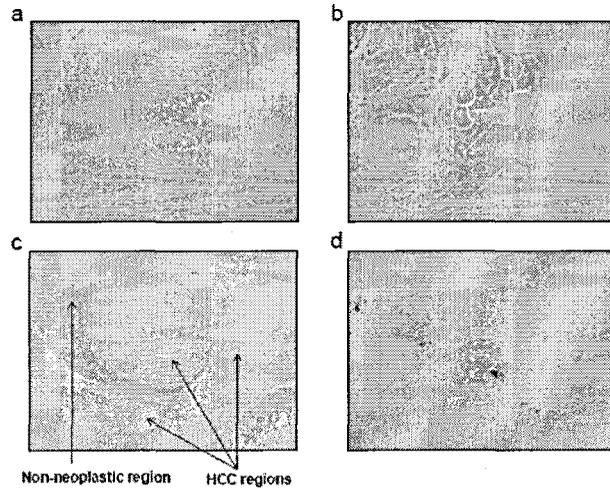


그림 13. 환자시료의 immunohistology data를 통한 조기 biomarker로서의 가능성 검증 결과. a) MDH1; b) FABP-2; c) HADHA; d) ALDH1

그림 13에서 보듯이 특히 HADHA의 경우에는 HCC부위와 정상부위에서의 발현양의 차이가 현격함을 다시금 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 본 실험을 통해 찾은 후보 단백질군들이 실제 사람의 HCC 조기진단에 이용될 수 있는 가능성을 보여준다고 판단된다.

(4) RKIP 단백질의 간암 생성기전체의 관여 규명연구 : 발굴 단백질 중 신호전달에 중요한 단백질인 RKIP 단백질에 대한 기능 연구를 수행하였다. 아래의 그림 14는 RKIP의 신호전달에서의 역할 및 단백질의 3차 구조를 설명해 주고 있다.

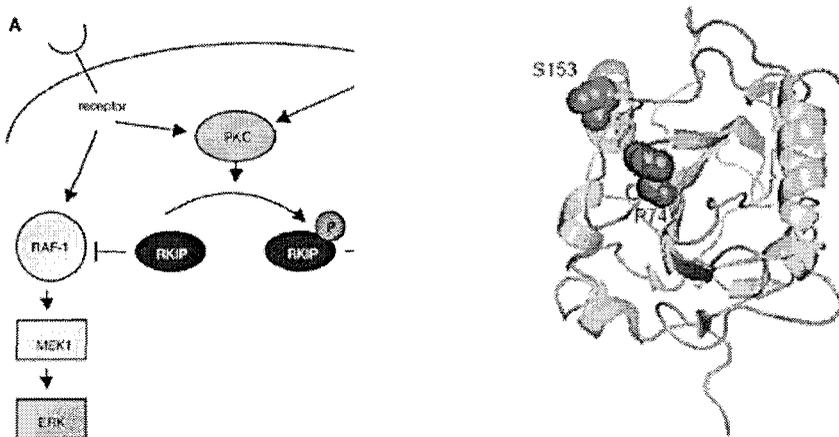


그림 14. RKIP 단백질의 신호전달 시스템에서의 위치 (좌) 및 단백질 3차구조 (우)

RKIP은 그림 14에서 보듯이 RAF-1과 결합하여 RAF-1의 활성을 억제한다. HBx 유래의 간암에서 이 RAF-1은 HBx와 복합체를 이뤄 미토콘드리아로 이동하여 anti-apoptotic effect를 나타낸다고 알려져 있다. 따라서 RKIP의 발현 감소가 RAF-1의 미토콘드리아로의 이동에 영향을 미치는 것이 아닌가 연구하여 보았다. 먼저 RKIP 야생형과 인산화 방지 돌연변이를 Huh-7 세포주에서 발현하였다 (그림 15).

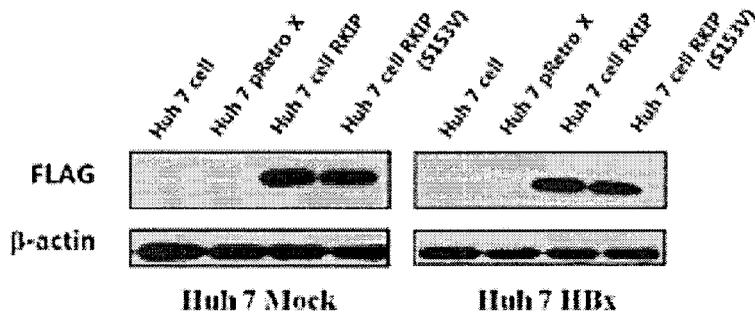


그림 15. Huh-7 세포주에서 RKIP 야생형과 인산화 방지 돌연변이의 발현

단백체 분석을 통해 발견한 RKIP의 간암 단계에서의 발현 감소는 RAF-1의 HBx와의 복합체 형성을 촉진시켜, 미토콘드리아로의 이동을 증가시킴으로 궁극적으로 간세포의 세포사멸을 억제함으로써 간암의 발생에 기여함을 규명하였다.

이상의 실험을 정리하면,

- ① Dysplasia 및 HCA 증상을 보이는 mouse의 간 조직을 2-D 분석한 결과, Dysplasia의 경우 총 10개의 단백질이, HCA의 경우 총 12개의 단백질의 의미있는 변화를 보임을 관찰할 수 있었다.
- ② 임상 시료는 희귀하기 때문에, HBx Tg mice에서 의미있는 단백질을 찾을수 있으며 일부 단백질의 경우에서 조기진단용 biomarker로 사용 가능성을 발견하였다

4. HBx에 의한 lipogenesis, gluconeogenesis 및 tumorigenesis 작용 기작 연구

4-1) lipogenesis 작용 기작 연구

가. 이론적, 실험적 접근방법

B형 간염환자에서 지방간이 발견된다는 임상적들의 소견을 중심으로 HBx Tg mice에서 지방간 병변을 관찰하고 그 작용기작을 연구하였다. 지방간이란 지방의 과도한 섭취 및 간 내 축적, 합성 증가, 배출 감소 등의 원인이 되어 정상적인 지방대사가 이루어지지 못하여 지방이 전체 간 무게의 5%이상을 차지하게 되는 경우를 말한다. 지방간의 주원인은 만성적인 알코올의 섭취이며 지방간의 정도는 알코올의 섭취기간 및 섭취량과 관련이 있다. 그 외에 당뇨, 비만, 단백질 섭취 및 열량의 부족, 임신, 스테로이드 및 기타 약물 치료 등도 지방간을 일으킬 수 있다. 최근 경제발전 에 따른 생활수준의 향상으로 인하여 위생환경이 개선되고 잦은 인스턴트 음식물 섭취와 육식위주의 식생활 변화 등은 과다한 열량의 섭취를 유발한다. 그러나, 이러한 현대인의 식생활의 변화는 턱없이 부족한 운동부족 등으로 인하여 소모열량이 적기 때문에 빠른 비만인구의 증가경향을 보이고 있다. 비만은 단순히 외형상의 문제 뿐 만 아니라 비만이 지속됨으로써 여러 가지 질환, 즉, 고혈압, 당뇨, 고지혈증, 관상동맥질환 등과 같은 성인 성 질병, 간경변증 등을 비롯하여 퇴행성 관절염, 전립선, 유방, 대장 및 자궁내막암 등을 야기하는 것으로 보고되면서 이제는 치명적인 질병 중 하나로 취급되고 있다 (*J. Biol. Chem.*, 273, 32487-32490, 1998; *Nature*, 404, 652-660, 2000; *New England J. Med.*, 333, 677-685, 1995; *JAMA*, 282, 1523-1529, 1999). 이러한 질환들과 비만과의 관계 및 관련기작을 구명하기위한 관심이 최근 증가하고 있는 추세이다.

특히, 최근에는 C형 간염 바이러스가 간 섬유화증이나 제 2형 당뇨병과 밀접한 관련이 있음이 밝혀지고 있다. C형 간염 바이러스 (HCV) 유전형 3와 지방증 사이의 관련성을 확정하여, C형 간염 바이러스 유전형 3에 감염된 환자들에서의 지방증은 섬유화증의 진행에 대한 위험 인자라는 것을 제시하고 있다 (*J Hepatol, Dec.*, 37(6), 837-42, 2002). 또한 C형 간염 바이러스는 체내에서 인슐린 저항성을 일으켜 당뇨 질환을 유발할 수 있다는 사실을 보고하고 있다 (*Gastroenterology*, March, 126(3), 840-848, 2004). 그러나 B형 간염 바이러스와 비만과의 관계는 밝혀진 예가 없다.

나. 연구내용

HBx Tg mice (BCF1 hybrid mixture)에서 지방간병변, 지방간생성에 관련되는 분자들의 발현변화, HepG2-HBx cells에서의 lipogenesis 및 adipogenesis 기작을 연구하였다.

다. 연구결과

HBx 마우스는 wild type에 비해 간이 커져있고 간의 색이 선홍색에서 옅은 색으로 변해 있었다 (그림 16). 그리고 HBx는 SREBP1과 PPAR gamma의 발현을 증가함으로써 adipogenesis 및 lipogenesis를 통해 지방간을 유도하는 것으로 밝히고 (그림17), 2007년 *Gastroenterology* (132(5), 1955-1967)에 그 연구 결과를 게재 하였다.

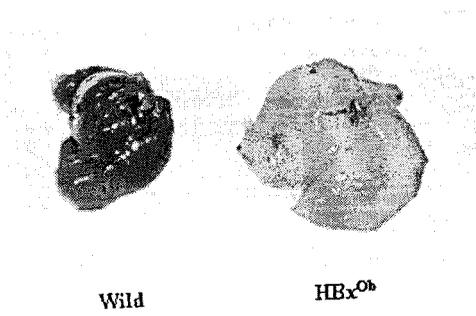


그림 16. HBx Tg mice의 간에서 지방간을 확인한 결과

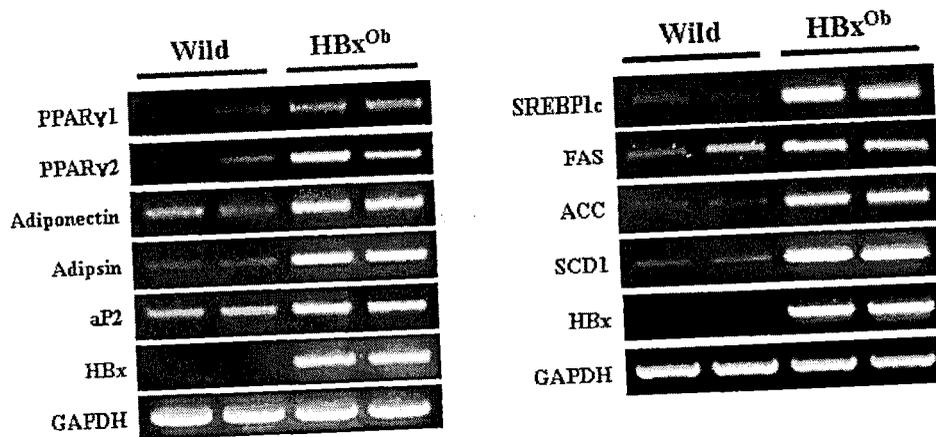


그림 17. Lipogenesis 에 관여하는 유전자를 RT-PCR한 결과

이상의 실험을 정리하면,

- ① HBx는 만성 간질환 및 간암 발생에 관여할 수 있을 뿐만 아니라 지방간병변 및 비만에 관련이 있다는 사실을 확인하였다.
- ② HBx Tg mice에서 cancer 뿐만 아니라 lipogenesis 및 adipogenesis 에 관련이 있다는 사실을 확인할 수 있었다.

4-2) gluconeogenesis 작용 기작 연구

가. 이론적, 실험적 접근방법

HBV Cihhrosis 환자 중 약 20%가 혈당이 높은 것으로 알려져 HBx가 gluconeogenesis에 관여하는지를 확인하기 위해 HBx Tg mice를 이용하여 조사하였다. 방법은 혈당검사, 당부하검사, 인슐린검사, 인슐린 자극검사 등의 당뇨실험에 필요한 방법을 적용하였다.

나. 연구내용

HBx Tg mice를 이용하여 당부하검사 (glucose tolerance test)와 인슐린 자극검사 (insulin tolerance test)를 수행하였다. HBx Tg mice 간조직의 RNA를 이용하여 당신생합성에 관여하는 유전자의 발현수준 확인하였다.

B형 간염바이러스 감염 중 iNOS 유전자의 발현이 증가하고 이에 HBx가 관여한다는 보고와 iNOS는 LPS에 의해 유도되어 hyperglycemia와 insulin resistance에 관여한다는 보고가 있어, HBx가 iNOS를 조절하여 gluconeogenesis에 영향을 미치는지 실험을 하였다. 따라서 HBx Tg mice와 iNOS knockout mice를 교배하여 double mutant mice를 생산하여 당신생합성에 관여하는 유전자의 발현수준을 확인하였다.

다. 연구결과

HBx Tg mice를 이용하여 자유급여일 때와 공복일 때의 혈중 glucose 양이 wildtype mice보다 유의성있게 증가되었다. 또한 당부하검사와 인슐린 자극검사를 수행한 결과, HBx Tg mice는 당대사이상에 관여한다는 것을 알았다 (그림 18). HBx의 발현에 의해 PEPCK, G6Pase, PGC1a 및 FOXO1 유전자의 발현 모두가 공복시 뿐만 아니라 자유급여시에도 wildtype mice보다 유의성있게 증가되었다 (그림 19). HBx/iNOS knockout 마우스의 당신생합성에 관여하는 유전자의 발현은 wildtype mice 수준으로 유전자의 발현이 낮아졌다 (그림 20).

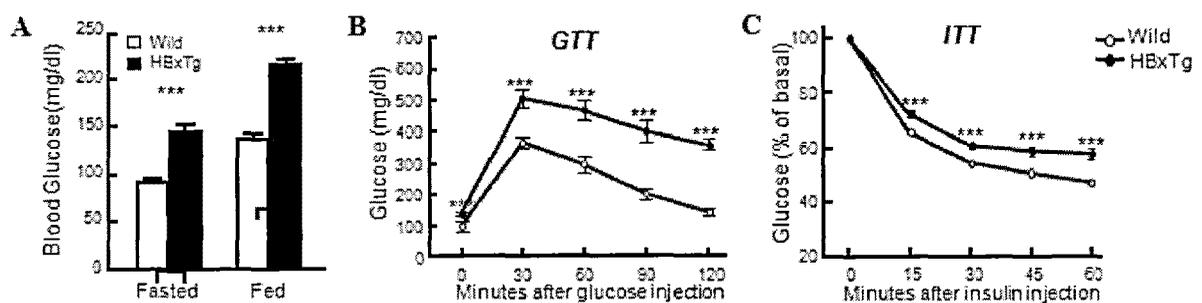


그림 18. HBx mice에서 당대사이상 측정

A: glucose 양 측정, B: 당부하 검사, C: 인슐린 자극검사

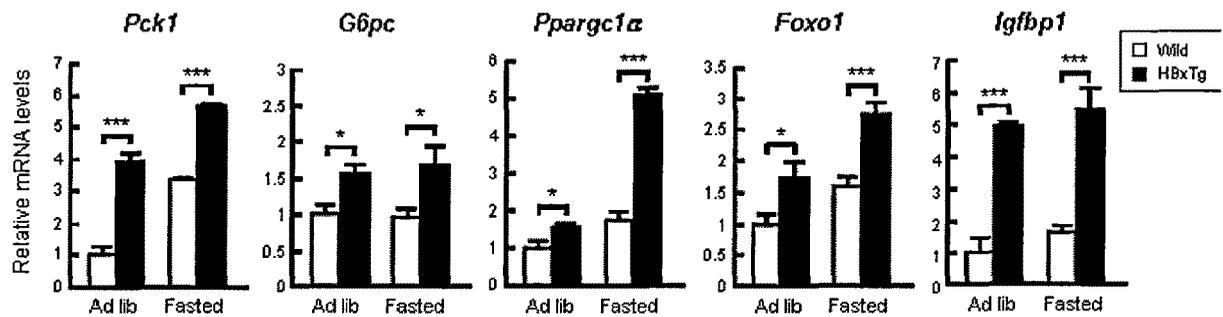


그림 19. Gluconeogenesis에 관여하는 유전자를 qRT-PCR한 결과

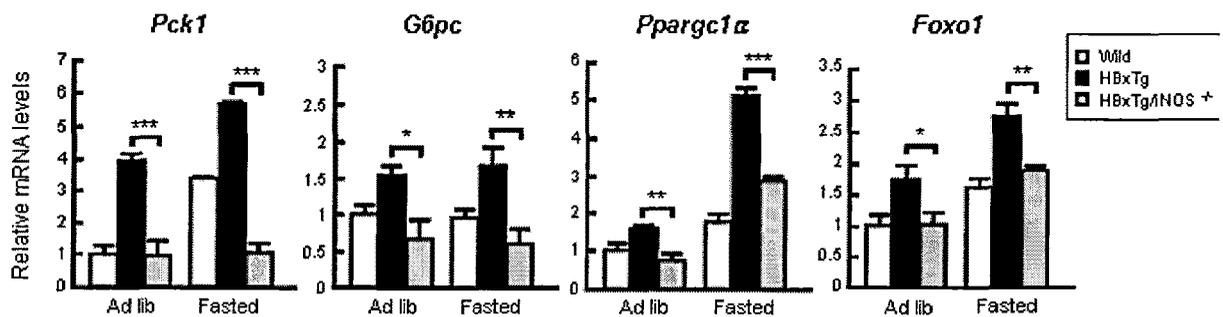


그림 20. Double mutant mice에서 gluconeogenesis 유전자를 qRT-PCR한 결과

이상의 실험을 정리하면,

- ① HBx는 iNOS와 상호관계를 통해 만성 간질환 및 간암 발생에 관여할 수 있을 뿐만 아니라 동물모델에서 대사질환(당뇨병)과 관련이 있다는 사실을 알 수 있다.
- ② 이상의 결과는 HBx가 iNOS를 통하여 gluconeogenesis에 관여하여 내당능장애 (Glucose intolerance)을 야기하여 최종적으로 당뇨병 (Diabetes)이 발병될 수 있음을 제시한다.

4-3) tumorigenesis 작용 기작 연구

가. 이론적, 실험적 접근방법

Tumorigenesis는 대사질환과 밀접한 연관성이 있다는 최근 보고 등을 참고로, HBx에 의한 HCC 형성에 있어서, gluconeogenesis와 tumorigenesis의 역할에 중요한 유전자로 알려진 AMPK의 활성화가 관여하는지 확인하고 그 작용기전을 연구하였다.

나. 연구내용

HBx Tg mice와 HBx/iNOS double mutant mice에서 MRI 방법을 통해 암 크기 (tumor size)와 조직병리분석을 통해 암 발생율 (tumor incidence)을 확인하였다. AMPK 발현을 HBx Tg mice와 B형 간암환자 조직의 tumor와 non-tumor 부위에서 얻은 protein과 RNA를 가지고 western blot과 RT-PCR을 수행하였다. B형 간암환자 조직에서 pAMPK 발현을 면역조직염색 방법을 통해 확인하였다.

다. 연구결과

(1) HBx 단백질에 의한 Tumor 형성이 iNOS 유전자에 의해 조절될 수 있음을 증명

HBx Tg mice는 3개월째부터 이형성증 (dysplasia)이 관찰되며, 12개월부터 Tumor 형성됨을 시기별 간조직의 병변관찰을 확인하였다 (표 5). HBx Tg mice와 HBx/iNOS double mutant mice의 조직학적인 양상을 관찰했을 때 15-18개월령 때 Tumor 형성의 차이를 확인하였다 (표 6). Tumor 형성에 있어서 HBx/iNOS double mutant mice에서 tumor 발생이 절반이상 감소하였으며, tumor size도 줄어들음을 확인하였다 (그림 21).

표 5. HBx Tg mice에서 시기별 병변양상

	3M			6M			12M			18M		
	WT (n=15)	HBxTg (n=27)	p	WT (n=20)	HBxTg (n=20)	p	WT (n=13)	HBxTg (n=15)	p	WT (n=9)	HBxTg (n=20)	p
Micro-fatty change	0(0%)	11(41%)	.004	2(10%)	18(90%)	<.001	4(31%)	15(100%)	<.001	5(56%)	20(100%)	.002
Macro-fatty change	0(0%)	0(0%)	-	0(0%)	11(55%)	<.001	0(0%)	15(100%)	<.001	5(56%)	14(70%)	.457
Inflammation	0(0%)	9(33%)	.013	1(5%)	6(30%)	.040	1(7.7%)	3(20%)	.362	1(11%)	13(65%)	.008
Necrosis	0(0%)	0(0%)	-	0(0%)	0(0%)	-	1(7.7%)	1(6.7%)	.918	0(0%)	1(5%)	.502
Dysplasia	0(0%)	24(89%)	<.001	0(0%)	19(95%)	<.001	0(0%)	15(100%)	<.001	0(0%)	20(100%)	<.001
Dysplastic nodule	0(0%)	0(0%)	-	0(0%)	0(0%)	-	0(0%)	1(6.7%)	.352	0(0%)	13(65%)	<.001
Tumor	0(0%)	0(0%)	-	0(0%)	0(0%)	-	0(0%)	1(6.7%)	.352	0(0%)	12(60%)	.003

표 6. 15-18개월령 HBx Tg mice와 HBx/iNOS double mutant mice의 조직병변양상

	WT (n=13)	HBxTg (n=20)	HBxTg/INOS ^{-/-} (n=18)	INOS ^{-/-} (n=9)
Micro-fatty change	9(69%)	20(100%)	15(83%)	0(0%)
Macro-fatty change	7(54%)	14(70%)	12(67%)	0(0%)
Inflammation	5(38%)	13(65%)	12(67%)	6(67%)
Necrosis	0(0%)	1(5%)	0(0%)	0(0%)
Dysplasia	0(0%)	20(100%)	18(100%)	0(0%)
Dysplastic nodule	0(0%)	13(65%)	3(17%)	0(0%)
Tumor	0(0%)	12(60%)	5(28%)	0(0%)

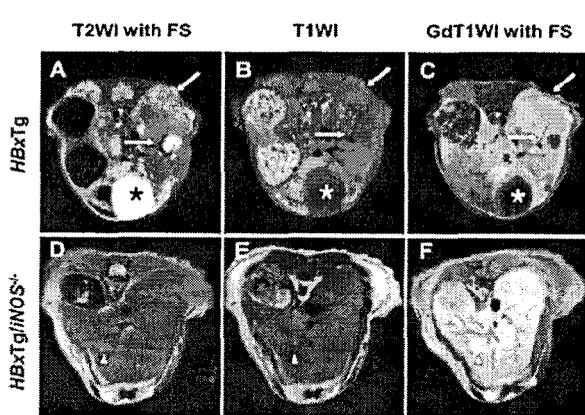


Figure. MR imaging of Hepatic tumor in HBxTg and HBxTg/INOS^{-/-} mice

A, D Turbo RARE T2-weighted image with fat saturation (repetition time msec/echo time msec 3500/36) show a large mass in figure A (arrows) and a smaller nodule in figure D (arrowhead) with ill-defined margins. These tumors are hyperintense to liver and hypointense to hepatic cysts (asterisk).

B, E Unenhanced fat-saturated T1-weighted image (361.5/11) show that those tumors (arrows in B, arrowhead in E) is mildly hypointense to the adjacent liver.

C, F Contrast-enhanced fat-saturated T1-weighted image (361.5/11) obtained during hepatocyte selective phase demonstrates heterogeneous enhancement of the tumor (arrows) in figure C and homogenous enhancement of the tumor (arrowhead) in figure F.

그림 21. 15-18개월령 mice의 MRI 영상 관찰

(2) HBx 발현과 AMPK 발현과의 관련성 규명

HBx가 대사질환과 암에 중요한 유전자로 알려진 AMPK 발현에 미치는 영향을 규명하고자 HepG2-HBx stable 세포에 NO (nitricoxide)의 자극을 주었을 때 HBx가 발현하는 세포에서 AMPK 발현이 증가함을 western blotting 방법을 통해 확인하였다 (그림 22).

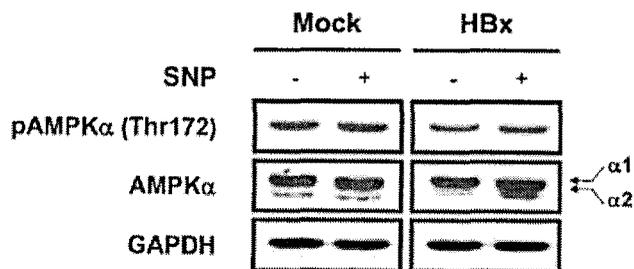


그림 22. HepG2-HBx 세포에서 NO에 의한 AMPKα 발현 증가확인

(3) HBx Tg mice에서 AMPK 단백질의 발현 조사

6개월 된 HBx Tg mice와 HBx/iNOS double mutant mice의 간조직에서 AMPK의 발현을 확인하였다. HBx Tg mice에서 AMPK의 발현이 증가함을 보였으며, HBx/iNOS double mutant mice에서 HBx Tg mice에서 증가한 AMPK의 발현이 다시 회복되어짐을 보인다 (그림 23). 이러한 사실을 바탕으로 HBx와 AMPK의 연관성을 살펴볼 수 있다.

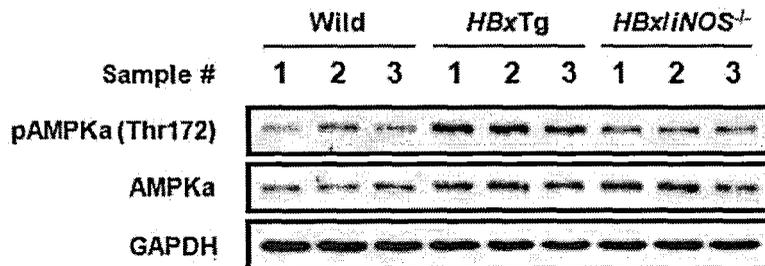


그림 23. 6개월령 HBx와 HBx/iNOS KO mice의 AMPKα 발현양상

(4) HBx Tg mice의 간암조직에서 AMPK 단백질의 발현 조사

15-18개월 된 HBx Tg mice와 HBx/iNOS double mutant mice의 간암조직에서 AMPK의 발현을 확인하였다. HBx Tg mice의 간암 조직에서 종양주위 정상조직에 비해 종양조직에서 AMPK의 발현이 감소되어 있음을 확인하였다 (그림 24). 이는 최근 BMC cancer(IF. 3.159 2009; 9: 307.) "Histological evaluation of AMPK signalling in primary breast cancer."에서 보고된 연구와 같이 AMPK는 유방암조직에서 종양주위 정상조직에 비해 종양조직에서 AMPK의 발현이 감소함을 증명하였으며 AMPK를 유방암 치료의 타겟으로 제시하고 있다.

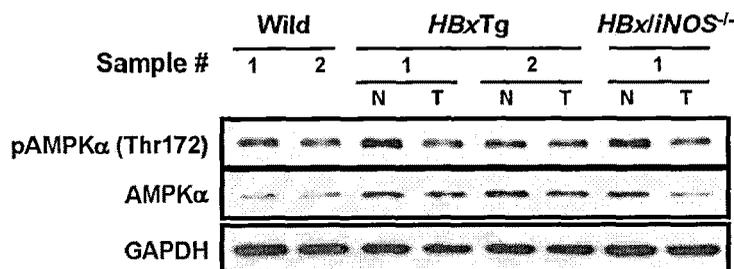


그림 24. 15-18개월령 HBx Tg mice의 Tumor 부위와 non-tumor 부위 간에 AMPKα 발현 확인

(5) HBV 간암 환자의 검체를 통한 유의성 비교

연세대학교 의과대학 병리학 교실이 지원한 간암 환자 검체에서 HBx와 AMPK의 발현과의 연관성을 확인하였다. B형 간암환자 조직에서 AMPK의 발현 양상을 HBx 발현과 비교 분석한 결과, HBx Tg mice에서 같이 HBV 감염 간암 조직에서 종양주위 정상조직에 비해 종양조직에서 AMPK의 발현이 감소되어 있음을 확인하였다 (그림 25).

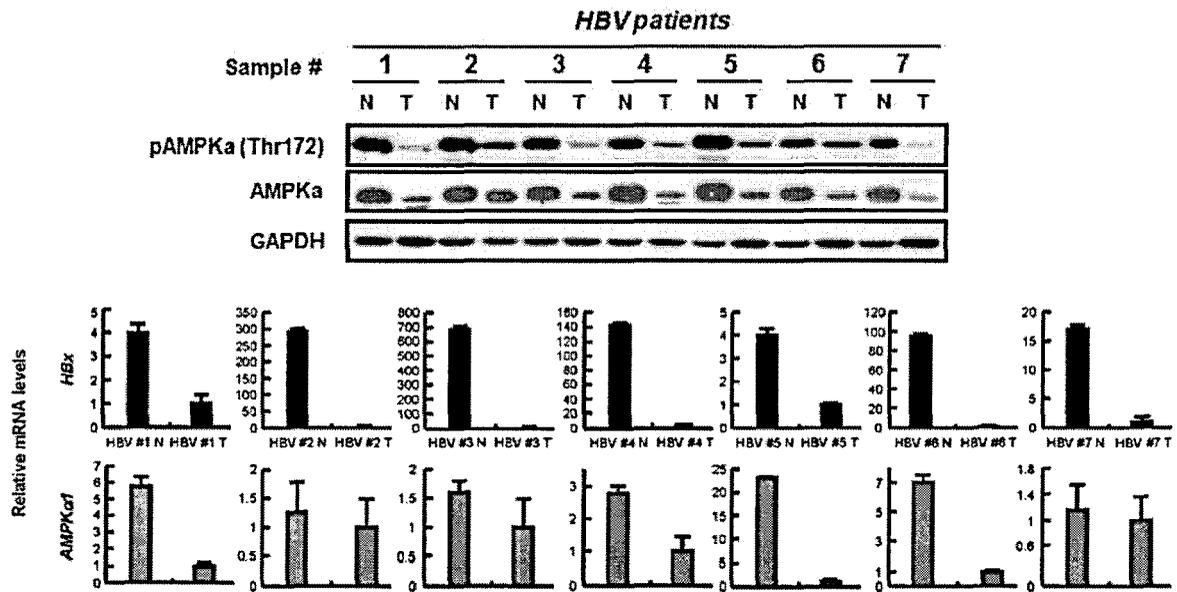


그림 25. HBV 간암 환자의 조직에서의 Tumor(T) 부위와 non-tumor(N) 얻은 protein과 RNA에서 AMPKa 발현을 western blot과 RT-PCR한 결과

이상의 실험을 정리하면,

- ① HBx는 iNOS와 상호관계를 통해 만성 간질환 및 간암 발생에 관여할 수 있을 뿐만 아니라 동물모델에서 대사질환(당뇨병)과 간암발생과 관련이 있다는 사실을 알 수 있다.
- ② HBx와 AMPK의 연관성을 살펴볼 수 있으며, 이러한 사실을 바탕으로 HBx 단백질에 의한 간암에서 AMPK를 통한 치료 가능성을 기대할 수 있다
- ③ 간암에서의 HBx 발현이 AMPK 발현 패턴과 동일함을 보임을 확인하여서, 이러한 사실을 바탕으로 AMPK 유전자와 HBx 유전자간에 기능적 상호관계가 있음을 알 수 있으며 HBV 감염에 의한 간암에서 AMPK가 치료 타겟으로 가능성 제시할 수 있다.

제 2절. NS5A Tg mice의 간암발생 분자들의 움직임 연구

1. 이론적, 실험적 접근 방법

HCV (NS5A)는 apoptosis 억제를 통하여 간의 병리학적 변화에 중요한 역할을 한다. (Int J Cancer 2003;107:65-73). 이 억제작용은 TNF- α signalling 관여 되어 있으며, NS5A-TRAF2 상호결합 후 NF- κ B (nuclear factor- κ B)의 활성 억제를 통해 작용된다. NS5A를 발현하는 형질전환마우스를 생산하여 그 간의 표현형을 체내 그리고 체외에 다양한 실험방법을 통해 연구하는 것은 NS5A의 간에 병리학적 변화에 있어서 중요한 의미가 있을 것으로 사료된다. NS5A Tg mice의 hepatocyte primary cell culture 방법을 확립 하고 그와 관련된 간암 발생 분자들의 움직임을 연구하며, 이 형질전환마우스에 carcinogen (DEN; N-Nitrosodiethylamine)을 투여 후 Brdu staining과 TUNEL assay을 통해 세포 증식 및 apoptosis 등을 변화를 확인 접근하였다.

2. 연구내용

가. 형질전환마우스 확보 : NS5A Tg mice와 normal mice를 교배 시켜 실험용 마우스를 생산하며, 이 마우스의 DNA를 추출하여 PCR을 통한 genotyping을 하였다.

나. NS5A Tg mice의 hepatocyte primary cell culture : 마우스 (23 주령) 간 조직을 HBSS로 3분간 1차 perfusion을 한 뒤 collagenase가 첨가된 L-15 medium으로 5분간 2차 perfusion을 하였다. 이 후 pipetting하여 single cell로 분리하고, 이 cell mixture를 percoll gradient 이용하여 hepatocyte primary cell 분리한 뒤 배양하였다.

다. Hepatocyte primary cell 활성산소 측정 : NS5A Tg mice의 hepatocyte primary cell (1×10^6) 20 μ M 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCF-DA; Invitrogen, Seoul, Korea)를 30min 염색하여 PBS로 3번 washing 후 FACS Calibur flow cytometer (Becton Dickinson, FranklinLakes, NJ, USA) 통해 ROS level를 측정하였다.

라. Western blot : 20 μ g의 protein을 SDS-PAGE 전기영동한 후 polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (IPVH00010, Millipore Corp.)에 transfer하여, ploycloned rabbit anti H-ras (C-20) antibody (1:200; Santa Cruz Biotech., Inc. U.S.)와 반응한 뒤, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:4000; Santa Cruz Biotechnology Biotech., Inc. U.S.)와 반응시켜, the enhanced chemiluminescence system (Pierce Biotech, Inc., USA)을 통해 positive band를 확인하였다.

마. 병리학적 검사 : NS5A Tg mice를 안락사 하여, phenotype에 대한 육안 검사 후, 간 조직을 채취하여 10% 중성 포르말린에 고정하여, 파라핀에 포매 박절한 뒤 hematoxylin-eosin 염색을 시행하여 현미경으로 관찰하였다.

바. Brdu staining : 2주령 NS5A Tg mice와 normal mice에 DEN

(N-Nitrosodiethylamine) 10mg/kg을 1회 복강 주사한다. 24시간 후 Brdu (Upstate CA U.S). 를 10mg/kg로 복강주사 뒤 2시간 후 간 조직을 sampling 한다. 고정 포매 박절한 뒤 혈청을 20분 고정하여, mouse-anti-Brdu (Upstate CA U.S) 4°C에서 12시간 staining 하여 DAB를 통해 발색하였다.

사. **TUNEL assay** : 2주령 NS5A transgenic 마우스와 normal 마우스에 DEN (N-Nitrosodiethylamine) 10mg/kg를 1회 복강 주사 한 뒤, 24시간 후 smapling 한 후, 고정 포매 박절 후 혈청을 30분 고정하였다. 이후 Converter-POD (Promega CA USA) 37°C 30min staining 하여 PBS 3번 washing 뒤 DAB 발색하였다.

3. 연구결과

가. NS5A Tg mice의 hepatocyte primary cell ROS 수준 조사

NS5A Tg mice의 hepatocyte primary cell 제작하여 세포내 ROS 수준을 FACS로 분석 하였다. 그 결과, 그림 Figure 26A와 같이 NS5A Tg mice의 hepatocyte primary cell 세포내에 ROS의 수준이 많이 증가되어 있는 것을 알 수 있었으며, 다수의 NS5A Tg mice 를 조사한 결과, 그림 Figure 26B 와 같이 NS5A Tg mice의 hepatocyte primary cell이 유의성 있게 증가되는 것을 알 수 있었으며, NS5A Tg mice의 hepatocyte에서 oxidative stress가 증가 한 것으로 관찰되었다.

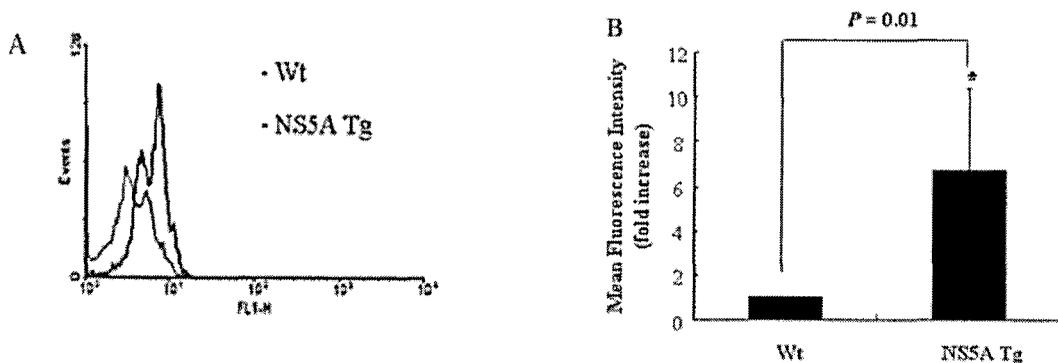


그림 26. (A) HCV NS5A protein induces the production of intracellular ROS *in vivo*.
(B) Fold increase of ROS production was compared between wild-type and NS5A Tg mice.

나. NS5A Tg mice의 NF- κ B 와 p-STAT3 발현

NS5A Tg mice의 간 조직에서 NF- κ B 과 p-STAT3에서 강한 발현이 확인되었다 (그림 27).

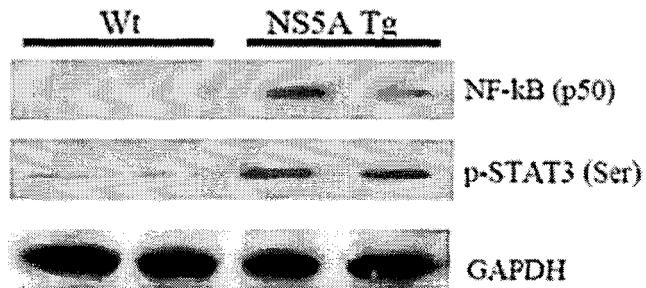


그림 27. Comparison of proliferation-related protein expression levels in liver tissues between NS5A Tg mice and control non-Tg littermates.

다. NS5A Tg mice DEN 처리 후 간에서 병리학적 표현형 분석

NS5A Tg mice (2주령)의 병리학적 표현형을 검사한 H&E 분석결과, DEN 처리 후 control mice 와 현저한 표현형 차이가 없음을 알 수 있었다 (그림 28).

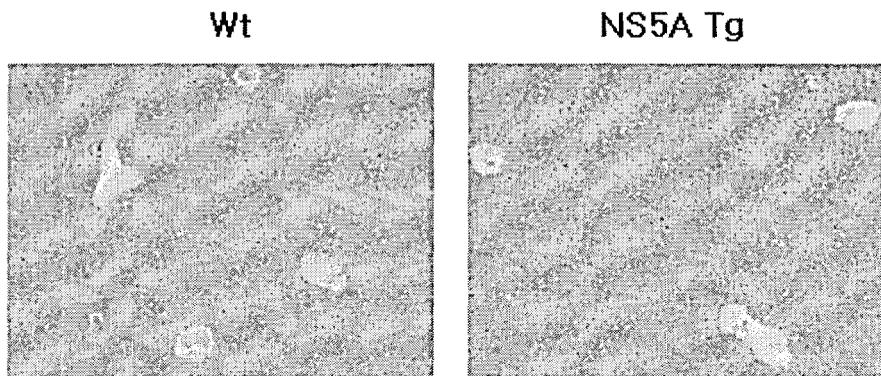


그림 28. Histopathological analyses of NS5A transgenic mice liver after DEN treatment.

라. NS5A Tg mice DEN 처리 후 간에서 세포증식에 관한 Brdu-staining 분석

NS5A Tg mice (2주령)에 DEN 처리 후 간세포 증식은 Brdu-staining를 통해 분석한 결과 NS5A Tg mice에 DEN 처리 후 control mice 와 현저한 차이가 없음을 알 수 있었다 (그림 29).

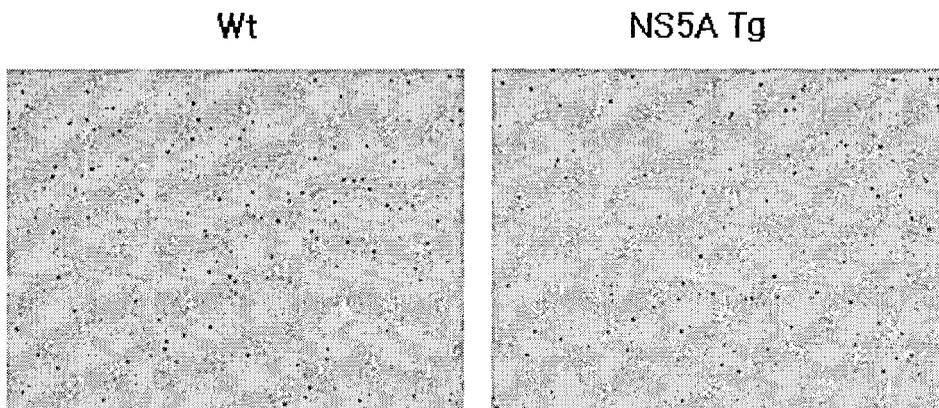


그림 29. Brdu-staining of NS5A Tg mice liver after DEN treatment.

마. NS5A Tg mice DEN 처리후 간에서 세포사 (apoptosis)에 관한 TUNEL 분석
NS5A Tg mice (2주령)에 DEN 처리 후 간 세포사를 TUNEL 방법을 통해 분석한 결과
NS5A Tg mice DEN 처리 후 control mice 와 현저한 세포사 차이가 없었다 (그림 30).

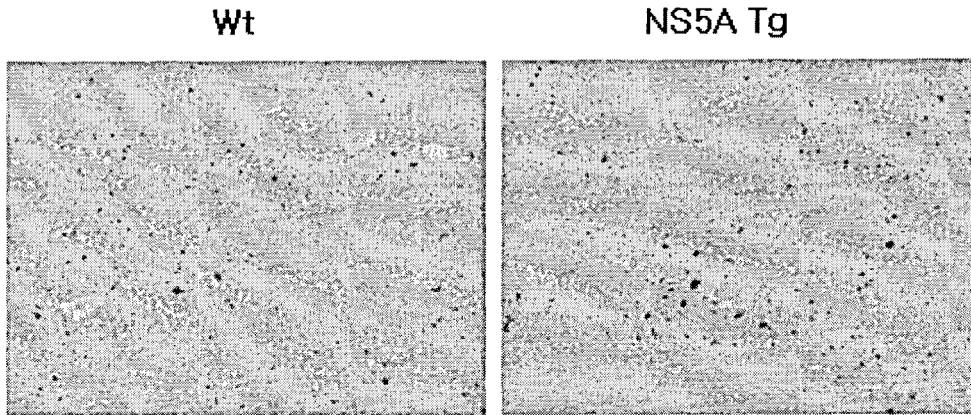


그림 30. TUNEL assay of NS5A Tg mice liver after DEN treatment.

이상의 실험을 정리하면,

- ① NS5A Tg mice는 normal mice 비해 산화스트레스를 많이 받으며, 세포 신호전달에 영향 줄 수 있다.
- ② proliferation 관련된 NF- κ B 과 pSTAT3가 활성화되었으며, 이 결과 NS5A는 transcriptional trans-activator 역할을 하며, cell proliferation에 관련이 많을 것으로 예상된다.
- ③ 어린 마우스(young mice)에서 carcinogen (DEN) 처리 후 cell proliferation 과 cell death 는 별 차이가 없었음을 알 수 있었다. 이 결과 NS5A는 단 시간 작용보다 긴 시간에서 cell proliferation 과 cell death의 영향을 주며 암 발생을 일으키는 것으로 볼 수 있다.

제 3절. mH-Ras Tg/Prx II KO double mice를 이용한 간암 발생에 있어서 Prx II의 역할 규명

1. 이론적, 실험적 접근방법

돌연변이 ras의 활성을 조절할 수 있는 저해제를 개발하는 것은 이와 관련한 암 질환을 치료하는데 매우 중요하다. 그러나 이와 관련한 연구를 따라서 ras의 활성에 의해 생긴 ROS의 조절자로서 Peroxiredoxin II (Prx II)의 가능성을 확인하고자 하였다. 본 과제에서 개발한 H-ras^{12V}Tg mice와 Prx II 유전자 결손 마우스 (knockout mice : KO) 를 교배하여 병리학적 표현형을 관찰하고 관련 분자의 변화를 살펴보았다.

2. 연구내용

가. Prx II KO 및 H-ras^{12V}Tg mice의 개발 및 표현형 연구 : Prx II KO와 H-ras^{12V}Tg mice를 교배하여 wildtype(WT), Prx II^{-/-}, H-ras^{12V} Tg, H-ras^{12V}Tg x Prx II^{-/-} 유전자형을 가지는 4종류의 마우스를 개발하였으며 3, 5 및 7 개월령의 마우스를 확보하여 간암관련 연구를 수행하였다.

나. 자기공명영상촬영(magnetic resonance imaging, MRI) : Multislice spin echo T1WI 방법과 FS(fat suppression; TR/RE 361.5ms/ 11ms, flip angle 180 deg., NEX 6, field of view 25.6mm x 25.6mm, matrix 256 x 256) 또는 FS 과정을 생략한 기법[TR/RE 300ms/11ms, flip angle 180 deg., NEX(number of excitations) 6, field of view 25.6 mm x 25.6 mm, matrix 256 x 256], Turbo RARE (rapid acquisition relaxation-enhanced) T2WI 방법과 FS(TR/RE 3500 ms/36 ms, flip angle 180 deg., NEX 6, field of view 25.6 mm x 25.6mm, matrix 256 x 256), 그리고 간세포 특이적 multislice spin echo T1WI 방법과 fat suppression 기법을 이용하여 결과 영상을 얻었으며, 이를 위해서 0.025 mmol/kg gadolinium-ethoxybenzyl-diethylenetriamine pentaacetic acid (gadoksetate, Primovist®, Schering AG)를 꼬리정맥에 주입하고 10분 후에 FS를 수행하였다.

다. 조직면역화학적 염색 : 마우스의 심장을 이용하여 PBS+heparin(1 IU/ml) 용액으로 perfusion을 실시하고, 450 ml의 4°C로 온도 보정된 10% neutral buffered formalin을 10분간 30-40 ml/min의 속도로 다시 perfusion 한다. 간조직을 외과적으로 회수하여 10% formalin에 O/N 고정하고 paraffin에 포매한다. 5 μm의 두께로 조직절편을 제작한 후에 탄올을 이용하여 deparaffinization을 유도한다. 항원의 노출을 위해 citrate buffer에 옮겨 고압력하에서 4분간 끓인 후 3% H₂O₂를 이용하여 자체 peroxidase를 불활성화 시킨다. HRP가 부착되어 있는 1차 항체 (Prx II 및 PCNA)를 습도 보정된 조건하에서 30분간 반응시키고, 3,3'-diaminobenzidine (DAB) 용액하에서 발색을 유도시킴. 현미경으로 관찰 후 사진 촬영을 실시하였다.

다. Western blotting 분석 : 20-30 μg의 추출 단백질을 12% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel을 사용하여 전기영동한 후 nitrocellulose (NC) membrane으로 전기적으로 이동시

켰다. 비특이적으로 염색되는 것을 방지하기 위하여 5% 탈지분유로 1시간 상온에서 처리하였으며, 제 1차 항체 (pJNK, JNK, pERK, ERK, GAPDH)의 염색은 4℃에서 12시간 이상 처리하였다. TBST (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.2% Tween-20)로 30분간 세정한 후 2차항체를 2시간 상온에서 처리하였음. TBST로 30분간 세정한 후 chemiluminescence detection system (Amersham, Berkshire, UK)을 이용하여 항체특이적으로 발광되는 band를 X-ray film에 감광시켰다..

3. 연구결과

가. H-ras^{12V}Tg 및 Prx II^{-/-} congenic mice의 종양성 검사

(1) 본 연구에서는 wildtype (WT), Prx II^{-/-} 및 H-ras^{12V}Tg mice를 교배하여 그림 31에 도식한 것처럼 4종의 유전자형 (WT, Prx II^{-/-}, H-ras^{12V}Tg 및 H-ras^{12V}Tg×Prx II^{-/-})을 갖는 마우스를 개발하였으며, 7개월간 종양 형성을 유도한 후 간조직을 적출하여 종양의 형성정도를 확인하였다.

(2) 각각의 7개월령 마우스를 희생하여 간조직을 관찰한 결과 H-ras^{12V}Tg 및 H-ras^{12V}Tg×Prx II^{-/-}에서만 종양이 형성되어 있음을 확인하였으며, H-ras^{12V}Tg의 간에서 유의적으로 높은 종양 형성율이 관찰되었다 (그림 31. B, C)

(3) H-ras^{12V}Tg 및 H-ras^{12V}Tg×Prx II^{-/-}에서 종양의 크기를 비교한 결과 H-ras^{12V}Tg에서는 종양의 크기가 비교적 고른 분포로 존재하고 있었으나 H-ras^{12V}Tg×Prx II^{-/-}에서는 비교적 작은 크기의 종양이 많이 발견되는 것으로 조사되었다 (그림 31D).

나. 자기공명영상촬영에 의한 H-ras^{12V}Tg 및 Prx II^{-/-} congenic mice의 종양크기 비교

(1) H-ras^{12V}Tg 및 H-ras^{12V}Tg×Prx II^{-/-}에서 종양의 크기를 *in vivo*에서 비교하기 위하여 5개월령 및 7개월령의 마우스를 자기공명 영상으로 촬영하여 비교한 결과, 그림 31에서와 마찬가지로 7개월령의 H-ras^{12V}Tg의 간에서 유의적으로 보다 거대한 종양이 형성되고 있음을 관찰할 수 있었다 (그림 32, 오른쪽 panel).

(2) 그리고 5개월령의 경우 H-ras^{12V}Tg의 간에서만 종양이 관찰되고 있었음 (그림 32, 왼쪽 panel)

(3) FS (fat suppression)을 실시한 결과 종양부위의 영상이 사라졌으며, 다시 FE (fat enhancement)를 실시한 결과 종양부위의 영상이 다시 나타나는 것을 관찰함으로써, 간조직에서 H-ras^{12V}에 의해 형성된 종양은 지방을 과량으로 함유하고 있는 것을 알 수 있었다.

다. H-ras^{12V}Tg 및 Prx II^{-/-} congenic 마우스의 병리학적 검사

(1) 3개월 및 7개월령의 WT, Prx II^{-/-}, H-ras^{12V}Tg 및 H-ras^{12V}Tg×Prx II^{-/-} congenic mice의 간조직을 이용하여 H&E 염색을 수행한 결과, 상기한 바와 마찬가지로 7개월령의 보

다 큰 종양이 관찰되었다 (그림 33).

(2) 3개월령의 경우에는 종양형성이 관찰되지는 않았으나 H-ras^{12V}의 간조직에서 hyperplasia 현상을 보이는 부위가 관찰되었다 (그림 33, 왼쪽 panel, *표시)

(3) PCNA 항체를 이용한 면역화학적 조직염색 결과, 3개월령에서는 소수의 세포에서만 염색이 되는 반면, 7개월령의 H-ras^{12V}Tg 및 H-ras^{12V}Tg×Prx II^{-/-} congenic 마우스의 종양부위에서 높은 PCNA 염색이 관찰되었다.

(4) Prx II의 경우 종양부위에서 그 발현율이 증가하는 것으로 조사되었다 (그림 34, 오른쪽 panel)

라. H-ras^{12V}Tg 및 Prx II^{-/-} congenic 마우스의 ERK 활성화도 검사

3개월령의 WT, Prx II^{-/-}, H-ras^{12V}Tg 및 H-ras^{12V}Tg×Prx II^{-/-} congenic mice의 간조직을 이용하여 ERK의 인산화를 Western blotting으로 분석한 결과, H-ras^{12V}Tg에서 증가된 ERK의 인산화가 관찰되었으며, 흥미롭게도 H-ras^{12V}Tg×Prx II^{-/-} 마우스에서는 그 발현이 다시 정상수준으로 감소되는 것으로 조사되었다 (그림 35).

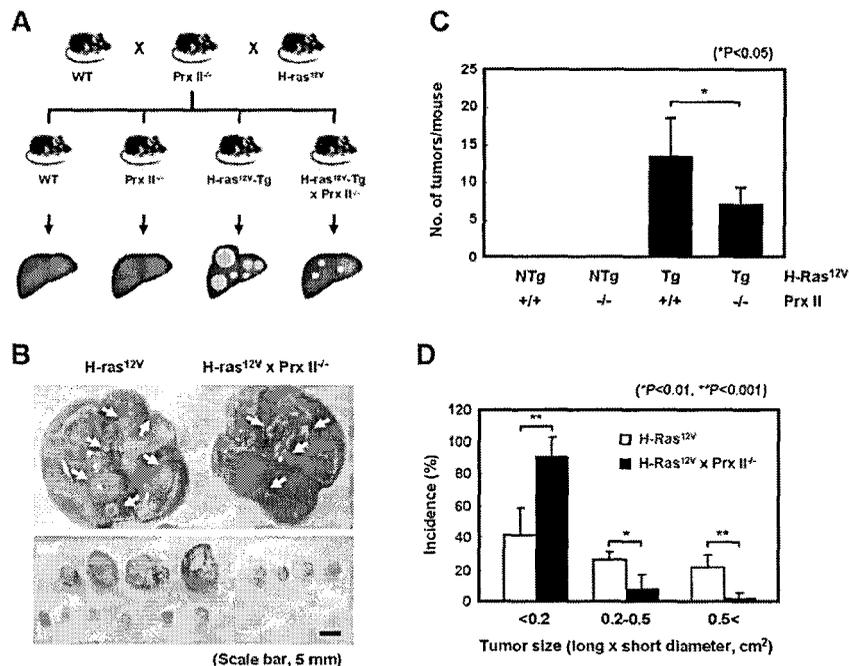


그림 31., H-ras^{12V}Tg 및 Prx II^{-/-} congenic mice의 종양성 검사. (A) H-ras^{12V}Tg 및 Prx II^{-/-} congenic mice의 생산 및 연구를 위한 실험순서 모식도. (B) H-ras^{12V}Tg 와 H-ras^{12V}Tg x Prx II^{-/-} congenic mice의 종양성 비교. 종양을 적출하기 전(상단)과 후(하단)의 사진을 촬영한 것임. (C) 표시된 유전자형의 마우스의 간에 생성된 종양의 수를 비교한 결과임. (D) H-ras^{12V}Tg 와 H-ras^{12V}Tg x Prx II^{-/-} congenic mice의 간에 생성된 종양의 크기를 비교한 결과.

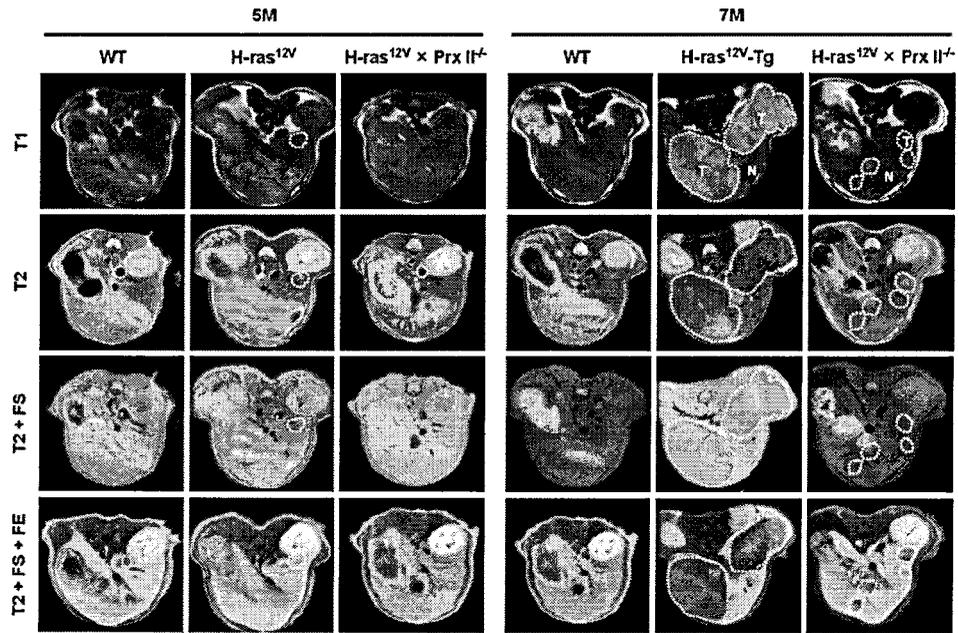


그림 32. H-ras^{12V}Tg 및 Prx II^{-/-} congenic mice의 종양성 검사를 위한 자기공명영상 촬영. (A) WT, H-ras^{12V}Tg 및 Prx II^{-/-} congenic 마우스를 각각 5개월 및 7개월에 자기공명영상촬영을 실시하여 간에 형성된 종양의 크기를 촬영하였다.

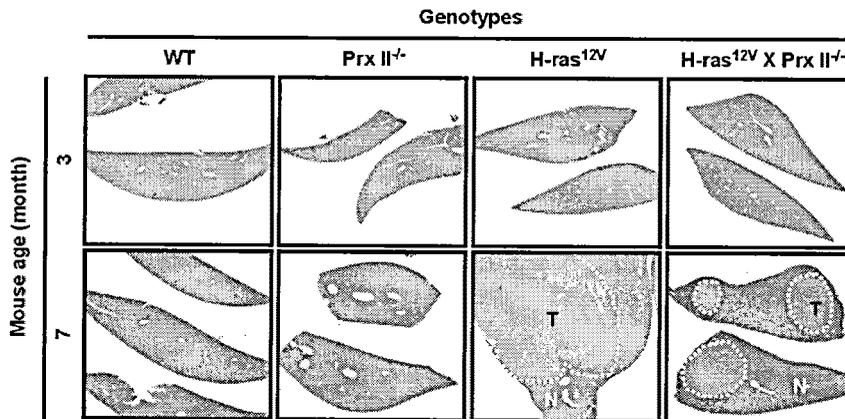


그림 33. H-ras^{12V}Tg 및 Prx II^{-/-} congenic mice의 병리학적 검사. T, tumor region; N, normal region

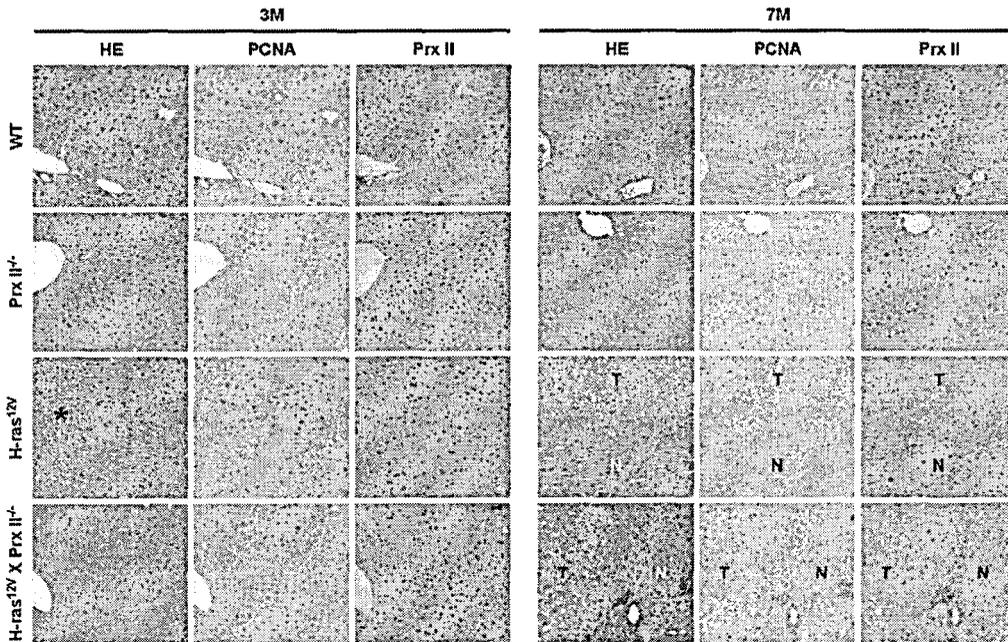


그림 34. H-ras^{12V}Tg 및 Prx II^{-/-} congenic mice의 병리학적 검사.
T, tumor region; N, normal region

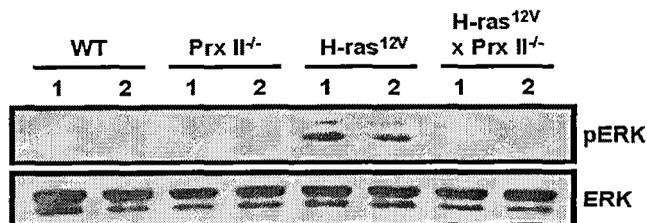


그림 35. 돌연변이 ras에 의한 ERK 활성화에 있어 Prx II 결손에 의한 억제효과. 3개월령의 WT, Prx II^{-/-}, H-ras^{12V}Tg 및 H-ras^{12V}Tg×Prx II^{-/-} congenic 마우스의 간조직을 이용하여 ERK에 대한 Western blotting 결과

이상의 실험을 정리하면,

- ① H-ras^{12V}Tg에 의한 간종양 형성에 있어 Prx II의 결손이 억제효과가 있는 것을 알 수 있었다.
- ② 자기공명영상촬영에서 FS (fat suppression)을 실시한 결과 종양부위의 영상이 사라졌으며, 다시 FE (fat enhancement)를 실시한 결과 종양부위의 영상이 다시 나타나는 것을 관찰함으로써, 간조직에서 H-ras^{12V}에 의해 형성된 종양은 지방을 과량으로 함유하고 있는 것을 알 수 있었다.
- ③ 7개월령의 H-ras^{12V}Tg 및 H-ras^{12V}Tg×Prx II^{-/-} congenic 마우스의 종양부위에서

높은 PCNA 염색이 관찰되어서, 이는 자기공명영상의 결과물이 종양임을 재차 확인하는 것이다. 또한 Prx II의 경우 종양부위에서 그 발현율이 증가하는 것을 확인하였다.

- ④ H-ras^{12V}Tg 및 Prx II^{-/-} congenic 마우스의 ERK 활성화도 검사를 보면, ras의 활성을 Prx II의 결손이 억제하는 효과가 있음을 시사하는 결과로서 향후 다양한 분석을 통하여 관련 기전을 밝히고자 한다. 결과적으로, 본 연구에서는 돌연변이 ras의 종양형성에 있어 Prx II가 매우 중요한 조절자임을 알 수 있었다.

제 4 장 목표달성도 및 관련 분야에의 기여도

제 1절. HBx 간암모델마우스를 이용한 간암발생 관련 타겟 발굴 분야

1. 최근에는 C형 간염 바이러스는 체내에서 인슐린 저항성을 일으켜 당뇨 질환을 유발할 수 있다는 사실을 보고하고 있다 (*Gastroenterology*, March, 126(3), 840-848, 2004). 그러나 B형 간염 바이러스와 비만과의 관계는 밝혀진 예가 없다. HBx는 SREBP1과 PPAR gamma의 발현을 증가함으로써 adipogenesis 및 lipogenesis를 통해 지방간을 유도하는 것으로 밝히고 2007년 *Gastroenterology* (IF 12.5)에 그 연구 결과를 게재 하였다.

2. 단백질 기법을 이용한 간암조기 진단 마커발굴 및 간암 생성기전 연구 결과를 단백질학의 저명 저널인 *Proteomics* (IF 4.8) 2009년 11월호에 게재 하였으며, 국제 특허를 출원 중에 있다.

3. HBx는 iNOS와 상호관계를 통해 만성 간질환 및 간암 발생에 관여할 수 있을 뿐만 아니라 동물모델에서 대사질환(당뇨병)과 간암발생과 관련이 있다는 사실을 알 수 있다. HBx와 AMPK의 연관성을 살펴볼 수 있으며, 이러한 사실을 바탕으로 HBx 단백질에 의한 간암에서 AMPK를 통한 치료 가능성을 기대한다. 간암에서의 HBx 발현이 AMPK 발현 패턴과 동일함을 보임을 확인하여서, 이러한 사실을 바탕으로 AMPK 유전자와 HBx 유전자간에 기능적 상호관계가 있음을 알 수 있으며 HBV 감염에 의한 간암에서 AMPK가 치료 타겟으로 가능성 제시할수 있다.

제 2절. HCV NS5A transgenic mice를 이용한 간암 발생 기작 및 타겟발굴 연구

NS5A는 HCV 환자의 간암생성에 관련이 있을 것으로 보고 있지만 아직 어느 연구팀도 NS5A가 발현되는 형질전환마우스를 개발하여 hepatic tumor가 발생된다는 보고를 한바 없다. 본 연구팀은 이 문제를 명확히 하기 위해 본 사업단의 지원을 받아 HBV enhancer를 포함하는 유전자조절부위를 이용하여 NS5A가 발현되는 형질전환마우스를 개발한 결과, tumor incidence는 낮았지만 약 7%정도가 hepatic tumor를 유도하는 것으로 확인되어 사업단에 보고한 바 있다. NS5A Tg mice를 이용하여 HCV 간암 생성기전 연구 결과를 *Journal of Pathology* (IF 5.1) 2009년에 게재 하였다.

제 3절. mH-Ras Tg/Prx II KO double mice를 이용한 간암 발생에 있어서 Prx II의 역할 규명

연구결과는 초기의 예상과는 달리 활성산소가 암질환을 저해할 수 있다는 새로운 가능성을 제시한 중요한 연구결과로서, 특히 *in vivo* 에서 이를 증명하였다는 것에 큰 의미를 두고 있다. 따라서 관련 암질환 연구에서 활성산소 및 항산화효소의 작용기전을 연구하는데 매우 중요한 기초자료로 활용될 수 있을 뿐만 아니라 ras 유전자의 돌연변이에 의한 난치성 암질환을 극복할 수 있는 신약개발연구에도 큰 공헌을 할 수 있을 것으로 기대한다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 1절. HBx 간암모델마우스를 이용한 간암발생 관련 타겟 발굴 분야

1. 단백질 분석으로 발굴한 여러 타겟 단백질들에 대한 간암생성기전에서의 역할 규명 연구가 보다 진행되어야 하리라 판단되며, 이를 위해 타 연구 사업에 참여할 계획을 가지고 있다.
2. HBx 단백질에 의한 간암에서 AMPK를 통한 치료 가능성을 기대하고, 간암에서 HBx 발현이 AMPK 발현 패턴과 동일함을 보임을 확인하여서, 이러한 사실을 바탕으로 AMPK 유전자와 HBx 유전자간에 기능적 상호관계가 있음을 알 수 있으며 HBV 감염에 의한 간암에서 AMPK가 치료 타겟으로 가능성 제시할 수 있다.
3. 동물 모델에서 얻은 타겟 유저자를 인간에서의 질병에 철저히 검증하고 임상 데이터와의 연계를 모색하여 각 질환의 진단 지표가 되는 바이오마커를 발굴하는데 활용한다.

제 2절. HCV NS5A transgenic mice를 이용한 간암 발생 기작 및 타겟발굴 연구

NS5A transgenic mice에 DEN을 처리하여 간암발생 감수성 검정 결과, NS5A Tg mice는 타겟발굴을 위한 간암모델로 적합하지 않은 것으로 판단된다.

제 3절. mH-RasTg/Prx II KO double mice를 이용한 간암 발생에 있어서 Prx II의 역할 규명

1. 본 연구에서는 Prx II의 결손에 의하여 암질환이 저해되는 것을 *in vivo* 모델을 통하여 증명하였다. 그러나 Prx II 결손 또는 그로인해 증가된 활성산소의 직접적인 작용기전에 관한 연구가 향후 필요할 것으로 판단된다.
2. 다른 암질환에서도 이러한 항산화효소의 결손 및 활성산소의 증가가 암유발을 억제또는 촉진하는지에 대한 전반적인 이해가 필요할 것으로 판단된다. 이러한 연구를 토대로 H-ras 돌연변이에 의한 다른 장기에서의 암질환과 그 이외의 원인에 의한 암발생에서 항산화효소의 작용기전을 이해하는데 매우 중요한 자료로서 이용될 것으로 판단되어진다. 또한 관련기전연구를 통하여 향후 ras를 비롯하여 다양한 돌연변이 유전자에 의해 초래되는 난치성 암질환의 극복을 위한 신약개발연구에 중요한 단서들을 제공할 수 있을 것으로 기대한다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

특이사항 없음.

제 7 장 참고문헌

1. Timothy M Block et al. *Oncogene* (2003)22:5093 - 5107
2. Harris, C. C. et al. *Oncogene* (2007)26:2166-2176
3. Kim CM et al. *Nature* (1991)351:317-20
4. Koike, K., K. et al. *Hepatology* (1994)19:810-9
5. Yu DY et al. *J Hepatology* (1999)31:123-132
6. Kim KH et al, *Gastroenterology* (2007)132(5):1955-67
7. Torisu Y et al. *Hepatology Research* (2007)37:517 - 523
8. Veldt BJ et al. *Hepatology* (2008)47(6):1856-62
9. Amarapurkar DN et al. *Ann Hepatol* (2008)7(2):148-51
10. Majano PL et al. *J. Clin. Invest* (1998)101:1343-1352
11. Sugita H et al. *Am J Physiol Endocrinol Metab* (2002)282: E386 - E394
12. Ikeguchi M et al. *Clinical Cancer Research* (2002)8,3131-3136
13. Calvisi DF et al. *Carcinogenesis* (2008)29:8:1639 - 1647
14. Hadad SM et al. *BMC cancer* (2009)9:307
15. Feng H et al. *J Proteomics* (2009) Dec 16
16. Kim SY et al. *Proteomics* (2009)9(22):5056-66
17. Wang X et al. *J Proteome Res* (2008)7(12):5133-7.
18. Li WH et al. *Chin Med J (Engl)*. (2009)122(1):15-23
19. Liu X et al. *Carcinogenesis* (2008)29(6):1207-14
20. He Y et al. *Scand J Immunol*. (2007)65(3):249-56
21. Lopez JB et al. *Clin Biochem Rev*. (2005)26(3):65-79
22. Cui F et al. *Proteomics* (2006)6(2):498-504
23. Tan TL et al. *J Clin Virol*. (2005)33(4):293-8
24. Egler RA et al. *Oncogene* (2005)24(54):8038-50
25. Han YH et al. *Free Radic Res*. (2006)40(11):1182-9
26. Hole PS et al. *Blood* (2010)115(6):1238-46
27. Moon EY et al. *Eur J Pharmacol*. (2006)20;530(3):270-5
28. Valko M et al. *Int J Biochem Cell Biol*. (2007)39(1):44-84
29. Wang AG et al. *J Korean Med Sci*. (2006)21(5):891-6
30. Wang AG et al. *Life Sci*. (2006)79(21):1974-80
31. C.N. d'Arville et al, *Hepatology* (1991)Feb;13(2):310-5
32. T. Aihara et al, *Hepatology* (1998)Jul;28(1):86-9
33. J. Pozo et al, *J Endocrinol Invest*. (2005)28(5 Suppl):38-42.
34. E. Foulstone et al. *J Pathol*. (2005)Jan;205(2):145-53
35. J. Baker et al., *Cell* (1993)Oct 8;75(1):73-82
36. I.M. Morisonet al., *Nature Medicine* (1996)2,311-316
37. Y.I. Lee et al, *Oncogene* (1998)May 7;16(18):2367-80.

38. Inohara N et al, *EMBO J.* (1998)May 1; 17(9): 2526 - 2533
39. Zhou Z et al, *Nat Genet.* (2003)Sep;35(1):49-56
40. Li D et al, *Nucleic Acids Res.* (2008)Jan;36(1):330-41
41. Liu K et al, *Am J Physiol Endocrinol Metab.* (2009) Dec;297(6):E1395-413
42. Matsusue K et al, *Cell Metab.* (2008)Apr;7(4):302-11
43. Kelder B et al, *Comp Hepatol.* (2007)May 1;6:4.

보낸사람 : 유영수 <ysu6700@naver.com>
 보낸날짜 : 2010년 5월 28일 금요일, 오전 09시 07분 38초 +0900
 담당받는주소 : 유영수 <ysu6700@naver.com>
 받는사람 : <ysu6600@hanmail.net>

-----Original Message-----
 From: "김병준" <kbj1416@kribb.re.kr>
 To: "신원기획O.A" <ysu6700@naver.com>
 Cc:
 Sent: 70-01-01(목) 09:00:00
 Subject: [한국생명공학연구원 견적서 의뢰]

- o 수신 : 신원기획O.A
- o 발신 : 한국생명공학연구원 구매관리과
- o 제목 : 견적서 의뢰
- o 내용 :

1. 귀사의 무궁한 발전을 기원합니다.
2. 다음과 같은 물품에 대하여 귀사에 견적을 의뢰합니다.

요구번호 : 322500

연번 물품명(규격) 메이커 모델번호 수량(단위) 단가 VAT 합계 비교

1. 보고서제작(***); 없음; 없음: 1(ea)

계 총계

3. 납품장소 : 본원(후생동2002)호실

4. 견적서 작성시에는 다음 사항을 준수해 주시기 바랍니다.
 - 가. 물품명, 메이커, 모델번호, 수량, 단가, 부가세, 합계, 총합계 등 상기 항목을 모두 명시해 주시기 바라며,
 - o 구매물품관련 견적산출 근거서류(카탈로그 포함)를 제출하여 주시기 바랍니다.
 - ※국내 특정 대리점일 경우 대리점 계약서(계약기간을 확인할 수 있어야 함)와 납품실적 첨부
 - o 특히 물품단가와 V.A.T, 합계, 그리고 총계를 반드시 구분해 주시기 바랍니다.
 - o maker가 없고 자체 생산예정 상품인 경우는 견적제출업체로 기록해 주시기 바랍니다.
 - o 물품대 입금 통장번호(국민은행) 및 은행명, 예금주를 꼭 기록해 주시기 바랍니다..
 - 나. 우리 연구원의 내자물품 납품기한은 21일 이내를 원칙으로 견적을 접수합니다.
 - o 반드시 납품기한 및 견적유효기간을 표시해 주시기 바라며
 - o 제출된 견적서에 기록된 납품기한은 우리 연구원에서 검토후 구매 주문시 납품가능한 기한으로 판단되오니, 제고물량을 반드시 확인하신 후 견적서를 제출 바랍니다.
 - 다. 제출기한 : 접수 후 5일 이내
 - 라. 물품에 대한 담당자를 반드시 표기해 주시기 바랍니다. (이름, 연락처, 핸드폰번호)
 - 마. 제출방법 : 방문접수 또는 FAX
 - 바. 본 메일은 계약을 위한 시장조사 및 가격조사 등을 위한 사전 자료임을 참고 하시기 바랍니다.
5. 문의사항 :
 - 가. 물품에 관한 사항 : 식물시스템공학연구센터, 김현순, 042-860-4493
 - 나. 계약방법에 관한 사항 : 구매관리과 김병준(TEL. 042-860-4042, FAX. 042-860-4049)

ysu6700님의 블로그

자기소개가 없습니다.

일부 이미지 또는 태그를 표시하지 않았습니다. 표시하기 | 원문 다운로드 (주의)

상세설명

주 의

1. 이 보고서는 교육과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 교육과학기술부에서 시행한 특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.