

폐암 세포주에서 5-aza-2'-deoxycytidine 처치에 의해 발현되는 암항원 유전자 분석

김창수* · 조성래* · 이해영* · 김종인* · 장희경** · 박종욱***

Analysis of 5-aza-2'-deoxycytidine-induced Gene Expression in Lung Cancer Cell Lines

Chang Soo Kim, M.D.*, Sung Rae Cho, M.D.*, Hae Young Lee, M.D.*, Jong In Kim, M.D.*
Hee Kyung Chang, M.D.**; Jong Wook Park, M.D.***

Background: DNA methylation is one of the important gene expression mechanisms of the cell. When cytosine of CpG dinucleotide in promotor is hypomethylated, expression of some genes that is controlled by this promoter is altered. In this study, the author investigated the effect of DNA demethylating agent, 5-aza-2'-deoxycytidine (ADC), on the expressions of cancer antigen genes, MHC and B7 in 4 lung cancer cell lines, NCIH1703, NCIH522, MRC-5, and A549. **Material and Method:** After treatment of cell lines, NCIH1703, NCIH522, MRC-5 and A549 with ADC (1 uM) for 48 hours, RT-PCR was performed by using the primers of MAGE, GAGE, NY-ESO-1, PSMA, CEA, and SCC antigen gene. In order to find the optimal ADC treatment condition for induction of cancer antigen, we studied the effect of ADC treatment time and dose on the cancer antigen gene expression. To know the effect of ADC on the expression of MHC or B7 and cell growth, cells were treated with 1uM of ADC for 72 hours for FACS analysis or cells were treated with 0.2, 1 or 5 uM of ADC for 96 hours for cell counting. **Result:** After treatment of ADC (1 uM) for 48 hours, the expressions of MAGE, GAGE, NY-ESO-1, and PSMA genes increased in some cell lines. Among 6 MAGE isotypes tested, and gene expression of MAGE-1, -2, -3, -4 and -6 could be induced by ADC treatment. However, CEA gene expression did not change and SCC gene expression was decreased by ADC treatment. Gene expression was generally induced 24~28 hours after ADC treatment and expression of MAGE, GAGE, and NY-ESO-1 was maintained at least 14 days after ADC treatment, and expression of MAGE, GAGE, and NY-ESO-1 was maintained at least 14 days after ADC treatment in ADC-Free medium. Most gene expression could be induced at 0.2 uM of ADC, but gene expression increased dependently on ADC treatment dose. The expression of MHC and B7 was not increased by ADC treatment in all four cell lines, and the growth rate of 4 cell lines decreased significantly with the increase of ADC concentrations. **Conclusion:** Treatment of lung cancer cell lines with ADC increases the gene expression MAGE, GAGE and NY-ESO-1 that are capable of induction of cytotoxic T lymphocyte response. We suggest that treatment with 1 uM of ADC for 48 hours and then culturing in ADC-free medium is optimal condition for induction of cancer antigen.

*고신대학교 의과대학 흉부외과학교실

Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Kosin University College of Medicine

**고신대학교 의과대학 병리학교실

Department of Pathology, Kosin University College of Medicine

***계명대학교 의과대학 면역학교실

Department of Immunology, Keimyung University College Of Medicine

논문접수일 : 2004년 8월 3일, 심사통과일 : 2004년 10월 13일

책임저자 : 조성래 (602-030) 부산시 서구 암남동 34번지, 고신대학교 복음병원 흉부외과학교실

(Tel) 051-990-6466, (Fax) 051-248-9407, E-mail: srcho@kosinmed.or.kr

본 논문의 저작권 및 전자매체의 지적소유권은 대한흉부외과학회에 있다.

However, ADC has no effect on MHC and B7 induction, additional modification for increase of expression of MHC, B7 and cytokine will be needed for production of efficient cancer cell vaccine.

(Korean J Thorac Cardiovasc Surg 2004;37:967-977)

Key words: 1. Neoplasm marker
2. Gene expression
3. Concinoma
4. Lung neoplasms

서 론

암을 치료하는 방법에는 수술, 방사선요법, 화학요법이 있으며 진행된 암의 경우 이들 방법만으로는 암을 치료할 수 없다. 진행된 암을 치료하는 방법으로 최근에는 유전자요법 및 면역요법이 연구되어 오고 있다. 면역요법이란 암세포가 가지고 있는 암 항원을 환자에게 여러 가지 방법으로 투여하여 암 환자의 면역계를 활성화시킴으로써 암을 치료하는 기술이다. 투여한 암 항원에 의해 활성화된 환자의 cytotoxic T lymphocyte (CTL)는 신체 내에서 동일한 항원을 가지고 있는 암세포를 공격하여 파괴한다. 면역요법의 장점은 화학요법이나 방사능 요법에서 나타나는 부작용이 없다는 점이다. 또 유전자 치료법의 경우 주사한 항암유전자가 암세포에 전달되어야 하나 현재까지 항암유전자를 모든 암세포에 선택적으로 전달하는 방법은 아직 개발되어 있지 않아 암이 재발될 수 있다. 그러나 면역요법은 CTL의 immune surveillance로 인해 신체에 숨어 있는 암세포를 인식하여 파괴할 수 있으며, 또 CTL이 기억세포가 되어 신체 내에 남아 있기 때문에 동일한 암의 재발을 막을 수 있는 장점이 있다[1-3].

면역치료 기술에는 암세포 백신[4], 암항원을 전달시킨 dendritic cell (DC) vaccine[5], 암세포와 융합시킨 DC vaccine[6], 암항원 DNA 백신 등을 주사하여 환자에게 암항원제공을 증가시키는 방법과 IL-12, GM-CSF, IL-2 등의 사이토카인을 제공하여 면역계를 활성화시키는 방법[7,8] 및 MHC 및 B7 분자 등 항원전달에 관여하는 물질을 증가시켜 면역계를 활성화시키는 방법이 있다[9]. 면역계의 활성화는 위의 3가지 조건 즉 암항원 발현, 사이토카인 발현 및 MHC나 B7의 발현이 많을수록 증가한다. 따라서 효과적인 종양의 면역치료법의 개발을 위해서는 상기한 바와 같이 백신의 면역원성과 종양항원 전달성을 높이는 기

술을 개발해야 한다.

DNA 메틸화란 유전자의 promoter에 있는 CpG dinucleotide의 Cytosine기에 메틸기가 붙는 현상을 말한다. DNA methyltransferase가 CpG dinucleotide의 Cytosine기에 작용하여 메틸기를 많이 붙이면(과메틸화, hypermethylation) 전사요소의 DNA 결합이 억제되기 때문에 이 promoter의 조절을 받는 유전자의 발현이 감소되며, 그 반대로 CpG dinucleotide의 메틸화가 억제되면 유전자 발현이 증가된다. DNA 메틸화의 변화는 조직에서 특히 유전자의 선별 발현 등 정상적인 세포기능 수행과 관련이 있으나, 정상 세포에서 암억제유전자의 과메틸화 또는 oncogene 유전자의 저메틸화는 암발생과 관계가 있다[10]. 메틸화 양상의 변화가 온 암세포에서 다시 탈메틸화나 과메틸화를 유도하면 오히려 암의 특성을 변화시키며 이 변화는 암의 억제를 초래할 수 있을 것으로 생각된다. 예를 들어 암세포의 DNA 메틸화 양상의 변화는 항암유전자의 발현을 증가시킴으로써 암세포의 성장을 억제시킬 수 있으며, 항암유전자 외에도 세포주기 및 세포사 조절 유전자, 암항원 및 cytokine 등 면역관련 물질들의 유전자 등의 발현변화에 의해 암세포의 특성 및 면역원성이 변할 수 있다.

본 연구에서는 DNA 메틸화 억제현상이 암세포를 변화시켜 종양백신 개발에 사용될 수 있는가를 알아보기 위하여 DNA 메틸화 억제제인 5-aza-2'-deoxycytidine (ADC)를 이용하여 폐암세포주에서 암항원, 사이토카인 및 MHC 등의 면역반응 유발성 분자의 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

대상 및 방법

1) 사람 암세포주 배양

인간 폐암세포주는 NCIH1703, NCIH522, MRC-5 및

A549를 사용하였으며, 실험대조용으로 위암 세포주인 SNU484 및 SNU638을 사용하였다. 모든 세포의 배양에는 RPMI1640 배지에 10% 우태아혈청과 1 x antibiotics and antimycotics (GibcoBRL)가 첨가된 배지를 사용하였으며, 가습된 5% CO₂ 배양기 속에서 배양하였다. 배양배지는 3~5일 간격으로 교체하였다.

2) Total RNA 분리

배양세포에 10 mL PBS를 넣어 3회 세척한 뒤 상층액을 제거하고, 여기에 1.5 mL Trizol 용액을 넣어 cell scraper로 혼합하여 세포를 녹였다. 세포가 용해된 Trizol 용액에 1/10량의 chloroform을 첨가하여 진탕 혼합한 후 12,000 rpm으로 15분간 원심하여 단백질 층과 RNA를 분리하였으며, 분리된 상층의 RNA용액을 조심스럽게 수거하여 1.5 mL 시험관에 옮겼다. RNA용액에 동량의 100% isopropanol을 첨가하여 혼합한 후 -20°C에 16시간 이상 보관하여 RNA를 침전시켰다. RNA-isopropanol 혼합액을 12,000 rpm으로 원심하여 RNA pellet을 만든 뒤 상층을 제거하였으며, 여기에 ice-cold 70% ethanol을 1 mL 첨가하여 RNA pellet을 세척한 뒤 원심하여 상층의 ethanol용액을 완전히 제거하고 RNA pellet을 DEPC-DW에 녹인 후 spectrophotometer를 이용하여 RNA의 농도와 순도를 측정하였다.

3) 역전사 중합효소 연쇄반응

Total RNA 용액을 70°C 수조에 10분간 두어 RNA를 변성시킨 뒤 얼음에 보존하였다. 먼저 5X RT buffer 2 µL, 10 mM dATP 0.25 µL, 10 mM dGTP 0.25 µL, 10 mM dTTP 0.25 µL, 10 mM dCTP 0.25 µL, MMLV reverse transcriptase (200 U/µL) 0.25 µL, RNase inhibitor (28 U/µL) 0.25 µL, 50 µM oligo dT primer 0.5 µL, DEPC-DW 4 µL를 PCR tube에 넣어 RT-mixture를 만들었다. RT-mixture에 얼음에 보존한 total RNA용액(1 µg/µL)을 2 µL 첨가한 뒤 mineral oil을 1 방울 떨어뜨리고 실온에 10분간 두었다. 이 시험관을 PCR machine에 넣어 42°C에서 60분 간 열처리하여 역전사 반응을 완료하였으며, 역전사반응물을 DW로 1 : 1 희석한 뒤 PCR에 이용하였다. PCR은 먼저 10X PCR buffer 3 µL, 25 mM MgCl₂ 1.8 µL, 10 mM dATP 0.3 µL, 10 mM dGTP 0.3 µL, 10 mM dTTP 0.3 µL, 10 mM dCTP 0.3 µL, 50 µM sense 및 antisense primer 0.25 µL, Taq polymerase (5 U/µL, Promega Co., U.S.A.) 0.25 µL를 혼합하고 여기에 DW를 넣어 최종 용액량이 25 µL가 되게 하여 PCR mixture를 만들었다. 상기한 PCR-mixture 25 µL에 역전사 반응물을 5 µL

Table 1. Primer sequences used for RT-PCR

Name	Sequences (sense/antisense primers)
GAPDH	CGTCTTCACCACCATGGAGA/ CGGCCATCACGCCACAGTT
Mage 1-6	CTGAAGGAGAAGATCTGCC/ CTCCAGGTAGTTTCTCGAC
Mage-1	CTGAAGGAGAAGATCTGCCWGTG/ CGGAACAAGGACTCCAGGATACAA
Mage-2	CTGAAGGAGAAGATCTGCCWGTG/ GAAAGAAGTCTGGCAATTTCTGAG
Mage-3	CTGAAGGAGAAGATCTGCCWGTG/ CAAAGACCAGCTGCAAGGAAC
Mage-4	CTGAAGGAGAAGATCTGCCWGTG/ CGTAATGCCAAAGATCATCTTCAG
Mage-5	CTGAAGGAGAAGATCTGCCWGTG/ CCTTTGTGACCAGCTCCTTGACTTA
Mage-6	CTGAAGGAGAAGATCTGCCWGTG/ CCAGGCAGGTGGCAAAGATGTACAC
Mage 1-8	AGTTGGCGAGGAAGATCGAC/ CTTCTTTTAACACTGTGATTGC
PSMA	GTTGGAATCTTCTGGAGGT/ CGCTCTTGAAGGAGTCTTGA
CEA	TCACAGTCTCTGCATCTGGA/ GCTTGATCTTGGTGGACAGT
SCC	GAGGATGTACAGGCCAAGGT/ GAGAATCTGTTGTTGCCAGC
NY-ESO-1	GCTGAATGGATGCTGCAGAT/ CACAATGAACTGGCCACTCG

넣고 혼합한 뒤 mineral oil을 1방울 떨어뜨리고 PCR machine에 넣어 다음의 조건으로 PCR을 실시하였다. 먼저 94°C에서 5분간 가열한 후 94°C 30초, 57°C 45초, 72°C 45초를 1 cycle로 하여 18~35 cycle 반응시켜 DNA를 증폭시켰으며, 최종적으로 72°C에서 5분간 처치하여 PCR을 완료하였다. PCR 결과의 관찰은 ethidium bromide가 첨가된 1% agarose gel에 시료를 넣고 전기영동하였으며, 전기영동 결과를 Gel Doc 2000을 이용하여 관찰하였다.

4) Nested PCR

PCR 산물을 DW로 1 : 1로 희석한 뒤 다음과 같이 nested PCR을 실시하였다. 먼저 10X PCR buffer 3 µL, 25 mM MgCl₂ 1.8 µL, 10 mM dATP 0.3 µL, 10 mM dGTP 0.3 µL, 10 mM dTTP 0.3 µL, 10 mM dCTP 0.3 µL, 50 µM sense 및 antisense primer 0.25 µL, Taq polymerase (5 U/µL, Promega

Co., U.S.A.) 0.25 μ L를 혼합하고 여기에 DW를 넣어 최종 용액량이 25 μ L가 되게 하여 PCR mixture를 만들었다. 여기에 희석한 PCR산물을 5 μ L 첨가하여 mineral oil을 1방울 떨어뜨리고 PCR machine에 넣어 다음의 조건으로 PCR을 실시하였다. 먼저 94°C에서 5분간 가열한 후 94°C 30초, 57°C 45초, 72°C 45초를 1 cycle로 하여 7~20 cycle 반응시켜 DNA를 증폭시켰으며, 최종적으로 72°C에서 5분간 처치하여 PCR을 완료하였다. PCR 결과의 관찰은 ethidium bromide가 첨가된 1% agarose gel에 시료를 넣고 전기영동 하였으며, 전기영동 결과를 Gel Doc 2000을 이용하여 관찰하였다.

RT-PCR 및 nested PCR에 사용한 primer 서열은 Table 1에 정리하였다.

5) ADC의 세포독성효과 조사

12 well plate에 RPMI 1640 배지에 부유된 1×10^4 세포를 넣은 후에 ADC를 0, 0.2, 1, 5 μ M이 되게 처치하였다. 96 시간 후 trypsin-EDTA로 처치하여 세포를 부착 평면으로부터 떼어 내어 0.4% trypan blue로 염색하여 hemocytometer에서 세포수를 세어 생존율을 측정하였다. ADC 처치군의 세포수를 대조군의 세포수로 나누어 상대 성장 계수(relative growth index, RGI)를 구하였다.

6) FACS 분석

4개의 폐암세포주에 ADC를 1 μ M 농도로 처치하여 72 시간 배양한 후 된 세포를 수거하였다. 세포를 wash buffer (1X HBSS, 2% horse serum, 0.1% azide)로 세척한 후 세포에 FITC가 결합된 단클론항체를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시켰다. 세포를 paraformaldehyde로 고정한 후에 유세포분석기(FACS)를 이용하여 MHC 및 B7 발현성을 분석하였다.

결 과

1) 암세포주의 암항원 발현성 분석

4개의 폐암세포주(NCIH1703, NCIH522, MRC-5 및 A549)와 2개의 위암 세포주(SNU484, SNU638)를 각각 배양한 후 total RNA를 분리하여 RT-PCR을 실시하였다. Melanoma antigen gene (MAGE) 1-6은 NCIH1703 및 SNU484에서 강하게 발현이 되었으며, GAGE는 SNU484에서 강하게 SNU638에서는 약하게 발현되었으나 3개의 폐암세포주에

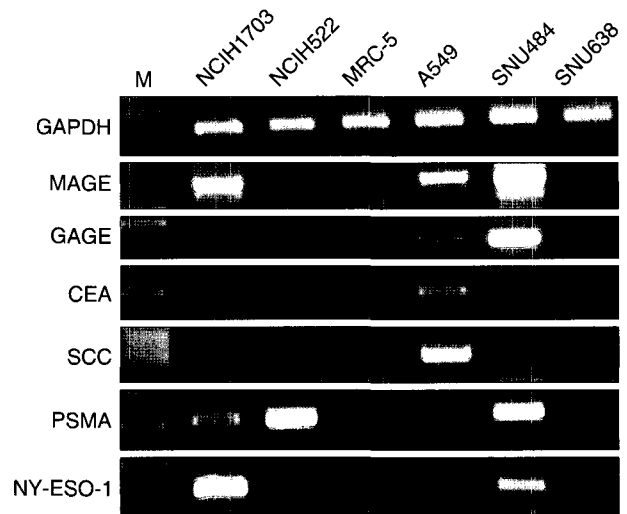


Fig. 1. Analysis of cancer antigen gene expression in lung and stomach cancer cell lines. Total RNA was isolated from cultured cancer cells and cancer antigen message was detected by RT-PCR. M is size marker.

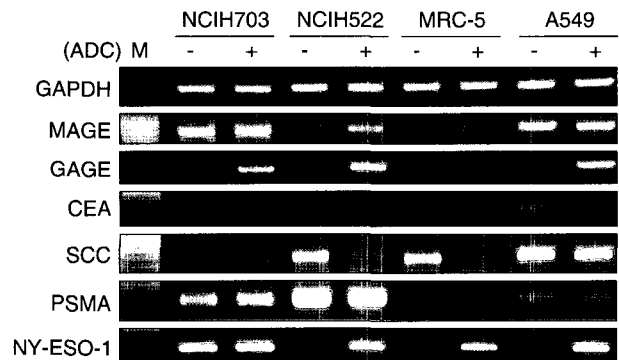


Fig. 2. Effect of ADC on cancer antigen gene expression of lung cancer cell lines. Cancer cell was treated with 1 μ M of ADC for 48 hours. Total RNA was isolated from control or ADC-treated cancer cells and cancer antigen message was detected by RT-PCR.

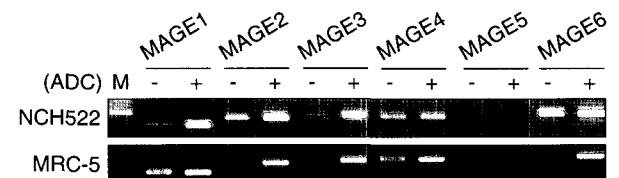


Fig. 3. Analysis of MAGE isotypes induced by ADC. NCIH522 and MRC-5 were treated with 1 μ M of ADC for 48 hours. Total RNA was isolated from control or ADC treated-cancer cells and MAGE isotype message was detected by RT-PCR and nested PCR.

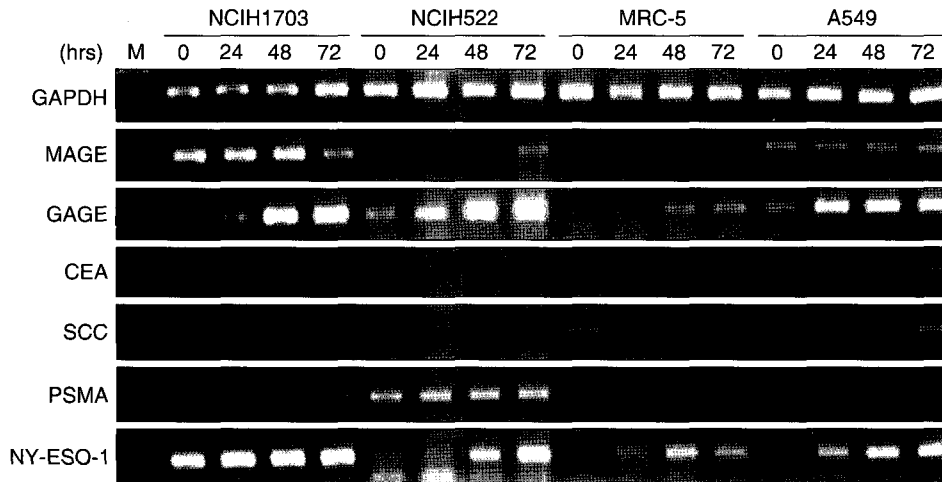


Fig. 4. Analysis of optimal ADC treatment time for induction of gene expression of cancer antigen. Four lung cancer cell lines were treated 1 μ M of ADC for 24, 48, 72 hours. Total RNA was isolated from control or ADC treated-cancer cells and cancer antigen message was detected by RT-PCR.

서는 발현되지 않았다. Carcinoembryonic antigen (CEA)은 SNU638에서 약하게, squamous cell carcinoma antigen (SCC)은 MRC-5와 NCIH522에서 약하게 발현되었으며, prostate specific membrane antigen (PSMA)은 NCIH522 및 SNU484에서 강하게 NCIH1703에서는 약하게 발현되었다(Fig. 1).

2) ADC 처치에 의한 폐암세포의 암항원 발현성 변화

NCIH1703, NCIH522, MRC-5 및 A549세포를 배양한 후 ADC를 1 μ M/ml 농도로 첨가하여 48시간 처치하였다. 대조군 및 ADC를 처리한 세포에서 total RNA를 분리하여 RT-PCR법으로 암항원 유전자 발현성을 측정하였다. NCIH1703 및 A549는 원래 MAGE를 표현하는 세포였으며 ADC처치에 의해 유전자 발현의 변화가 없었다. 그러나 NCIH522의 경우 ADC 처치에 의해 MAGE 유전자 발현이 증가되었다. GAGE 1-8의 경우 ADC를 처리한 NCIH1703, NCIH522 및 A549에서 발현이 강하게 증가되었으며, PSMA는 NCIH1703세포에서 다소 증가하였다. 그러나 CEA는 ADC처치에 의해 유전자 발현의 변화가 없었으며, SCC의 경우 NCIH522, MRC-5에서 발현이 되나 ADC 처치에 의해 오히려 유전자 발현이 감소하였다(Fig. 2).

3) NCIH1703 및 MRC-5 세포주에서 ADC처치에 의해 유도되는 MAGE 아형의 분석

NCIH1703 및 MRC-5를 배양한 후 ADC (1 μ M/ml)를 48시간 처치하고 total RNA를 분리하여 RT-PCR법으로

MAGE 1-6을 증폭시킨 후 nested PCR을 실시하여 MAGE 아형 유전자 발현성을 측정하였다. NCIH522는 MAGE-5는 ADC처치에 관계없이 발현되지 않았으며 MAGE-4와 MAGE-6의 발현성은 ADC처치에 의해 증가하지 않았다. 그러나 MAGE-1, -2, -3의 발현성은 ADC 처치에 의해 현저하게 증가하였다. MRC-5의 경우 역시 MAGE-5는 ADC 처치에 관계없이 발현되지 않았으며 나머지 아형 즉 MAGE-1, -2, -3, -4, -6의 발현은 모두 ADC 처치에 의해 증가되었다(Fig. 3).

4) ADC처리 시간 및 처리 농도에 따른 암항원 발현성의 변화

ADC 처리시간에 따른 유전자 발현 변화를 알아보기 위하여 NCIH1703, NCIH522, MRC-5 및 A549세포를 배양한 후 ADC를 1 μ M/ml 농도로 첨가하여 24, 48 및 72시간 배양하였다. 대조군 및 ADC를 처리한 세포에서 total RNA를 분리하여 RT-PCR법으로 암항원 유전자 발현성을 측정 한 결과 MAGE 발현은 NCIH522 세포에서 72시간 때부터 증가하였으며, GAGE 발현은 NCIH522 및 MRC-5 세포에서 48시간 때, A549 세포에서 24시간 때 증가하였으며, PSMA의 발현은 NCIH1703 세포에서 24시간 때부터 증가하였으며, NY-ESO-1의 발현은 NCIH522 및 A549 세포에서 24시간 때 MRC-5에서는 48시간 때 증가하였다. SCC의 경우 MRC-5에서 24시간 때부터 감소하였다(Fig. 4).

ADC 처리 농도에 따른 유전자 발현 변화를 알아보기

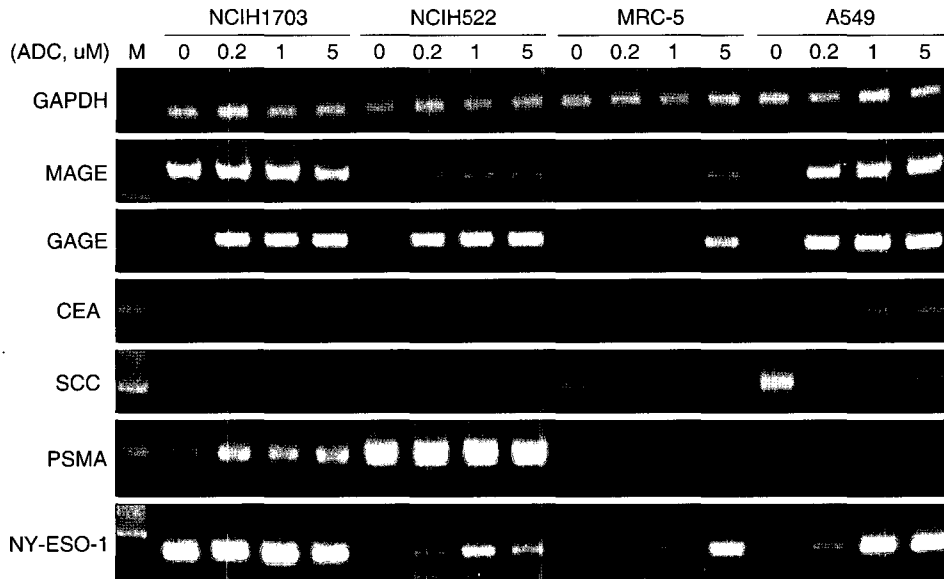


Fig. 5. Analysis of optimal dose of ADC for induction of gene expression of cancer antigen. Four lung cancer cell lines were treated with 0, 0.2, 1.5 uM of ADC for 48 hours. Total RNA was isolated from control or ADC treated-cancer cells and cancer antigen message was detected by RT-PCR.

위하여 NCIH1703, NCIH522, MRC-5 및 A549세포를 배양한 후 ADC를 0.2, 1, 5 uM 농도로 첨가하여 48시간 배양하였다. 대조군 및 ADC를 처리한 세포에서 total RNA를 분리하여 RT-PCR법으로 암항원 유전자 발현성을 측정한다. 결과 NCIH1703에서는 GAGE 및 PSMA가 0.2 uM의 ADC 처리농도에서 증가하였으며, NCIH522 및 A549에서는 0.2 uM 농도에서 MAGE, GAGE 및 NY-Eso-1이 증가하였다. MRC-5의 경우 MAGE, GAGE 및 NY-ESO-1의 발현이 1 uM 농도부터 증가하였다. SCC의 발현은 MRC5 및 A549 세포에 ADC를 0.2 uM 이상 처리시 감소하였다(Fig. 5).

5) ADC 처치에 의해 유발된 유전자 발현의 지속성

NCIH522세포주에서는 ADC 처치에 의해 MAGE, GAGE 및 NY-ESO-1 등의 발현이 증가되었다. ADC 처치에 의해 유도된 유전자 발현정도가 언제까지 지속되는 가를 보기 위해 이 세포에 1 uM의 ADC를 처리한 후 48시간 뒤에 ADC가 없는 신선한 배지로 배지를 교환하고 3일 간격으로 계대 배양하면서 세포를 수거하였다. 수거한 세포에서 total RNA를 분리하여 RT-PCR법으로 MAGE, GAGE 및 NY-ESO-1 및 CEA의 유전자 발현을 조사한 결과 MAGE 발현은 최초 ADC 처리 후 8일째부터 현저히 증가하여 14일째까지 지속되었으며, GAGE와 NY-ESO-1의 발현은 ADC 처리 후 2일째부터 증가하여 14일째까지 지속되었다. SCC의

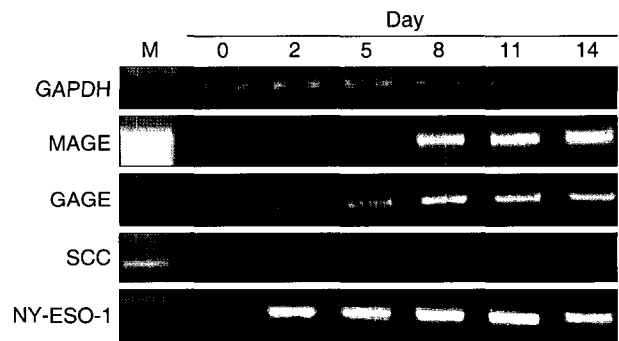


Fig. 6. Maintenance of cancer antigen gene expression in NCIH522 treated with ADC. NCIH522 treated with ADC (1 uM) for 2 days, and then cells were washed with PBS and cultured in ADC-free medium for 5, 8, 11, 14 days. Total RNA was isolated from harvested cells and cancer antigen message was detected by RT-PCR.

발현은 ADC 처치에 의해 유도되지 않았다(Fig. 6).

6) ADC 처치에 의한 폐암세포의 MHC 및 B7 발현성 변화

4개의 폐암세포주에 ADC를 1 uM 농도로 처리하여 72시간 배양한 후 된 세포를 수거하였다. 세포를 세척한 후 세포에 FITC가 결합된 단클론항체를 첨가하여 반응시킨

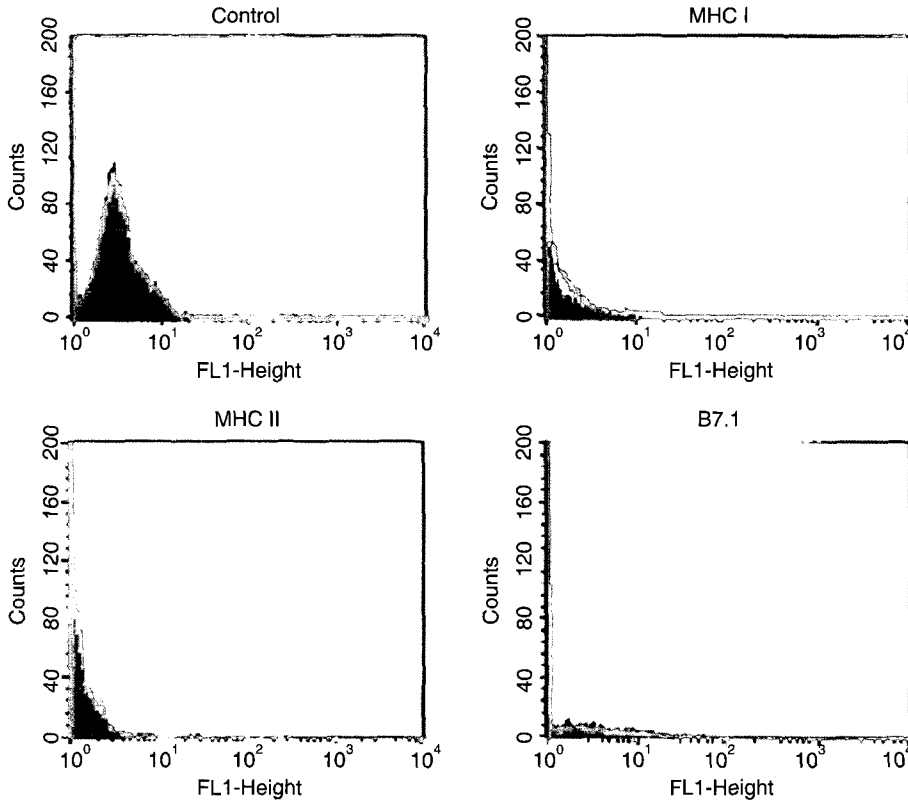


Fig. 7. Effect of ADC on MHC and B7 expression of NCIH522 cell line. Cancer cells were treated with 1 μ M of ADC for 72 hours, and MHC and B7 expressions was detected by FACS analysis.

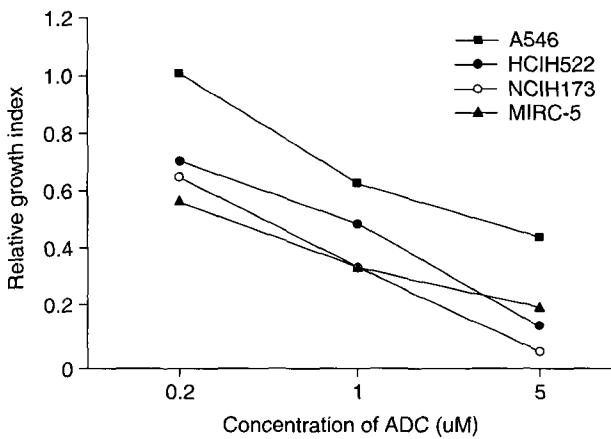


Fig. 8. Effect of ADC on the growth of lung cancer cell lines. Four cancer cell lines were treated with 0.2, 1, or 5 μ M of ADC for 96 hours. The number of cell was counted, and relative growth indexes was calculated.

후 유세포분석기를 이용하여 MHC 및 B7 발현성을 분석한 결과 4개의 세포주 모두에서 ADC처리군의 MHC 및 B7 발현성이 대조군과 큰 차이가 없었다(Fig. 7).

7) ADC처리가 암세포 성장에 미치는 영향

NCIH1703, HCIH522, MRC-5 및 A548을 ADC가 0.2 μ M, 1 μ M, 5 μ M 들어 있는 배지에 넣어 96시간 배양한 후 세포수를 측정하였으며 ADC를 처리한 군의 세포수를 대조군의 세포수로 나누어 상대 성장 계수(relative growth index, RGI)를 구하였다. NCIH1703은 ADC를 0.2, 1, 5 μ M 처리한 군의 RGI가 각각 0.66, 0.34, 0.06이었으며, HCIH-522는 ADC를 0.2, 1, 5 μ M 처리한 군의 RGI가 각각 0.71, 0.5, 0.14, MRC-5는 ADC를 0.2, 1, 5 μ M 처리한 군의 RGI가 각각 0.58, 0.35, 0.21이었으며, A548은 ADC를 0.2, 1, 5 μ M 처리한 군의 RGI가 각각 1.01, 0.64, 0.45이었다. 세포주마다 다소의 차이는 있으나 ADC처리에 의해 세포증식성이 억제됨을 알 수 있다(Fig. 8).

고 찰

변화된 DNA 메틸화 양상의 유전, 즉 DNA 염기서열의 변화가 없이 유전자 발현의 변화가 유전되는 현상을 Wachsmann과 Gonzalzo 등[10-12]은 epimutation이라 명명하

였으며, 통상 epigenetic change라 불린다. 본 연구에서는 먼저 폐암세포에서 암항원 발현성을 조사한 후 ADC처치에 의한 암세포에서의 epimutation 유발이 암세포의 암항원 유전자 및 면역관련 물질의 발현에 미치는 영향을 분석하였다.

먼저 폐암세포주의 암항원 유전자 발현성을 RT-PCR법으로 조사한 결과 MAGE 1-6은 NCIH 1703과 A549세포에서 발현이 되었으며, GAGE 1-8은 NCIH 1703과 A549에서 약하게 발현되었으며, NY-ESO-1은 NCIH 1703에서 발현되었다. 암세포를 인식하는 cytotoxic T lymphocyte를 자극할 수 있는 종양항원으로 MAGE, GAGE 및 NY-ESO-1 등이 알려져 있으며 이들은 암조직과 정상 고환조직에서만 발현되기 때문에 암관련고환항원(Cancer associated testis antigens, CTAs)이라 불린다[13-17]. MAGE와 GAGE는 각각 십여 종 및 8종의 아형이 있으며 본 실험에서 MAGE 1-6 양성이란 MAGE-1에서 -6까지 6종 중 한 아형 이상을 발현하고 있음을 나타내며 GAGE 1-8 양성이란 8종의 GAGE 아형 중 1개 이상을 발현하고 있음을 나타낸다. CTAs를 발현하는 암의 종류는 범위가 매우 광범위하여 위암, 간암, 폐암, 유방암 등 각종 암에서 발현되고 있다 [18-23]. CEA 및 SCC 역시 폐암에서 발현이 되며 암진단 인자로 사용되고 있으며[24,25], 본 연구에서도 CEA는 A549에서, SCC는 A549와 NRC-5에서 발현이 되었다. PSMA (prostate specific membrane antigen)는 적립선 암 항원으로 알려져 있으나[25] 폐암에서 발현된다는 보고는 아직 없다. 본 연구에서는 NCIH 522에서 매우 강하게, NCIH1703과 A549에서는 약하게 검출되었다. 따라서 4개에 실험대상 폐암세포주 중 3개에서 검출됨에 따라 폐암을 진단하는 마크로서 활용가치가 있을 수 있다고 생각한다.

종양 백신이 효과적으로 면역반응을 유발시키기 위해서는 3가지 조건 즉, 암항원 발현의 증가, 사이토카인 발현의 증가 및 MHC와 B7의 발현증가가 필요하며, 위의 3가지 조건 중 종양백신의 가장 중요한 요소는 CTL을 자극할 수 있는 종양항원의 발현성이다. MAGE, GAGE 및 NY-ESO-1 등의 CTAs 항원은 CTL을 자극할 수 있는 종양항원으로 알려져 있다[13-17]. 본 연구에서는 ADC 처치가 CTAs, SCC, CEA, PSMA 등의 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 세포주마다 다소의 차이는 있으나 ADC는 MAGE와 GAGE 및 NY-ESO-1 및 PSMA의 발현을 증가시키는 것으로 나타났으며, CEA는 발현을 유발치 않았으며 SCC의 경우 오히려 발현을 억제시키는 것으로 나타났다. MAGE의 경우 MAGE-5를 제외한 나머지 5종의 아형의

발현이 ADC 처치에 의해 증가되었다.

ADC 처치와 CTAs 발현성과의 관계를 보면 MAGE-1은 ADC처치에 의해 발현이 증가하며 MAGE-1 promoter의 Ets binding site의 CpG의 demethylation이 MAGE의 발현을 유발시킨다고 보고되고 있다[26]. ADC가 다른 MAGE 아형의 발현에 미치는 영향에 대한 보고는 없으나 MAGE-3의 promoter에 보면 MAGE-1과 같이 CpG가 매우 많이 분포하고 있으며 Ets 결합부가 있는 것을 볼 수 있으며, 또 본 연구의 결과에서 보는 바와 같이 ADC처치 군에서 MAGE-2, -3, -4, -6의 발현이 증가하는 것으로 보아 다른 MAGE 아형도 DNA 탈메틸화에 의해 발현이 유발될 수 있는 것으로 생각된다. YYWPRPRRY라는 CTL epitope이 알려져 있는 GAGE 역시 ADC에 의해 유도되는 암항원으로 알려져 있으나[27] 폐암세포주에서 ADC에 의해 발현이 유도되는 것은 본 연구에서 처음 규명된 사실이다. NY-ESO-1은 폐암세포주에서 발현이 되며 본 실험의 결과와 같이 ADC 처치에 의해 유전자 발현이 유도 또는 증가하는 것으로 보고되고 있다[28]. SCC, CEA 및 PSMA의 면역원성에 대한 보고나 ADC처치와 이들 암항원의 발현성과의 관계를 연구한 보고는 없다. 본 연구에서도 ADC 처치가 SCC 및 CEA의 발현을 유도치 않아 이 암항원 유전자의 발현은 DNA 탈메틸화와는 상관없이 없거나 또는 최소한 본 실험에 사용된 세포주에서는 ADC처치가 효과가 없는 것으로 생각된다. PSMA는 일부 세포에서 약하게 유도되었으나, 이 유전자의 promoter 구조가 밝혀져 있지 않아 발현유도기전이 분명치 않다. 결론적으로 이 연구의 결과에서 나타난 것과 같이 ADC는 신체내 세포성 면역계를 자극할 수 있는 MAGE 아형과 GAGE 아형 및 NY-ESO-1의 유전자 발현을 유도시키기 때문에 암세포에 ADC를 처치하는 기술은 효과적인 종양백신을 생산하는데 사용될 수 있을 것으로 생각된다.

폐암세포주에서 CTL 유도성 암항원을 유도하는데 최적의 ADC 처치 조건을 알아보기 위하여 ADC 처치 후 시간별 CTAs 발현성과 ADC 처치 농도에 따른 CTAs 발현성 변화를 조사하였다. CTAs는 ADC 처치 후 24시간 때부터 증가하여 48시간 때 최고에 다다른 후 72시간까지 이 발현량이 유지되는 것으로 나타났다. ADC는 세포증식 기간 동안 주로 DNA를 메틸화시키는 효소인 methyl transferase의 작용을 억제하여 탈메틸화를 유도시킨다. 따라서 세포주에서 ADC 처치에 의해 CTAs가 발현되는 데 소요되는 시간이 24시간 이상 걸리는 이유는 세포가 최소 1회 이상 증식하는데까지의 시간이 필요하기 때문으로 생각된다.

ADC 처치에 의해 암항원 발현성이 유도되는데는 시간이 걸리나, 다른 약물이나 단백질 처치와는 달리 ADC 처치에 의해 한번 유도된 유전자 발현성은 매우 오랜 기간 동안 지속된다. 이것은 한번 promoter에 탈메틸화가 일어나면 그 양상이 오랜 기간 동안 유전되기 때문이며, 이러한 현상 즉 DNA 돌연변이가 없이 유전자 발현의 변화가 유전되는 현상은 epimutation 또는 epigenetic change라 부른다[10,11]. 본 연구에서 MAGE, GAGE 및 NY-ESO-1의 발현이 ADC 처치 후 14일째까지 유지되는 epigenetic change 양상을 보이는 것으로 보아 DNA 탈메틸화에 의한 유전자 발현임을 재확인할 수 있었으며, ADC 처치에 의해 이런 암항원 유전자의 발현이 대량으로 오래 지속됨으로서 더욱 면역계를 자극할 것으로 생각한다.

암항원 유전자 발현을 최적으로 유발시키는 ADC 처치 농도는 대상 세포주와 대상 암항원에 따라 다르게 나타났다. NCIH1703과 NCIH522 및 A549의 경우 0.2 uM 농도의 ADC만으로도 유전자 발현이 유도되었으나, MRC-5의 경우 1~5 uM로 고농도로 ADC를 처치하여야 유전자 발현이 유도되었다. 그러나 ADC의 처치에 따른 세포성장률을 보면 4개의 세포주에서 모두 ADC 농도가 높아질수록 세포의 상대성장률이 현저히 감소함을 보였다. 고농도의 ADC 처치는 암세포의 성장을 억제함으로써 오히려 백신 제작에는 불리한 점이 많다고 생각한다. 따라서 결론적으로 저농도 즉 0.2~1 uM 사이의 ADC를 48시간 처치해 주는 것이 다량의 암항원을 발현시키면서 세포의 성장도 심하게 억제시키지 않는 최적의 처치조건이라 생각되며, 이런 처치만으로도 세포는 상기한 epigenetic change를 일으키기 때문에 장시간 대량으로 암항원을 생산시킬 수 있다고 생각한다.

T세포가 활성화되기 위해서는 기본적으로 3가지 신호 전달이 필요하다. 첫째는 T세포의 T cell receptor (TCR)가 MHC-종양항원 복합체를 인식하여 발생하는 신호이며 둘째는 부속분자 즉 CD28이 종양세포 표면의 B7을 인식하여 발생시키는 신호이며, 셋째는 T세포가 생산한 IL-2가 자신에게 결합하여 발생시키는 신호이다. 따라서 종양세포가 면역계를 효과적으로 작용하기 위해서는 상기한 바와 같이 종양항원을 대량 생산함과 동시에 항원제공물질인 MHC와 T세포 자극 분자인 B7의 발현이 높을수록 좋다. MHC 중 class II 분자는 helper T (HT) cell에 항원을 전달시키며 class I 분자는 CTL에 항원을 전달시키는 역할을 한다. 또 B7은 T세포 표면의 CD28과 반응하여 T세포 활성화를 돕는다. 이러한 물질의 발현을 증가시켜야 한다.

Coral 등[29]은 ADC처치가 MHC 및 공동자극분자의 발현을 증가시킨다고 보고한 바가 있어 이 물질들 역시 DNA 메틸 양상에 따라 발현성이 변할 수 있음을 나타낸다. 그러나 본 연구에서는 Redondo 등[30]의 보고와 같이 ADC 처치가 폐암세포의 MHC 및 B7 발현을 유도치 않았다. 따라서 폐암세포주에서보다 효과적으로 암항원을 전달시키기 위해서는 ADC 처치 외에 MHC 분자의 유전자를 세포 내로 전달시키거나 또는 interferon gamma를 처치하여 MHC 발현을 증가시키는 방법 등이 필요하다고 생각한다.

이상의 성적을 요약하면 폐암세포에 ADC를 처치하면 CTL 유도성 암항원 유전자의 발현이 증가하며, 한번 자극된 세포는 ADC가 없는 환경에서도 장시간 암항원을 발현할 수 있을 것으로 생각된다. ADC의 이러한 특성은 종양 환자 수술 후 적출한 암조직에서 환자 자신의 암세포를 분리한 뒤 이 세포를 이용한 종양백신의 생산에 이용할 수 있을 것으로 생각한다.

결 론

폐암세포주에서 ADC 처치는 MAGE, GAGE 및 NY-ESO-1과 같은 CTL 유도성 암항원의 발현을 증가시킬 수 있으며, ADC의 세포독성과 항원 발현 유발시간을 분석할 때 1 uM 농도에서 48시간 처치한 후 ADC가 없는 배지에서 수일간 배양하는 것이 가장 효과적이라고 생각한다. ADC를 처치하여도 MHC 및 B7의 발현이 없었으므로 ADC를 처치한 폐암세포를 암백신으로 사용하기 위해서는 MHC나 B7 및 cytokine의 발현을 증가시키는 추가적인 처치가 필요하다고 생각한다.

참 고 문 헌

1. Knuth A, Jager D, Jager E. *Cancer immunotherapy in clinical oncology*. *Cancer Chemother Pharmacol* 2000;46: Suppl: S46-51.
2. Ockert D, Schmitz M, Hampl M, Rieber EP. *Advances in cancer immunotherapy*. *Immunol Today* 2000;20:63-5.
3. Lindauer M, Stanislawski T, Haussler A, et al. *The molecular basis of cancer immunotherapy by cytotoxic T lymphocytes*. *J Mol Med* 1998;76:32-47.
4. Schadendorf D, Paschen A, Sun Y. *Autologous, allogeneic tumor cells or genetically engineered cells as cancer vaccine against melanoma*. *Immunol Lett* 2000;74:67-74.
5. Timmerman JM, Levy R. *Dendritic cell vaccines for cancer immunotherapy*. *Annu Rev Med* 1999;50:507-29.

6. Gong J, Nikrui N, Chen D, et al. *Fusions of human ovarian carcinoma cells with autologous or allogeneic dendritic cells induce antitumor immunity.* J Immunol 2000;165:1705-11.
7. Mendiratta SK, Quezada A, Matar M, et al. *Intratumoral delivery of IL-12 gene by polyvinyl polymeric vector system to murine renal and colon carcinoma results in potent antitumor immunity.* Gene Ther 1999;6:833-9.
8. Lee SG, Heo DS, Yoon SJ, et al. *Effect of GM-CSF and IL-2 co-expression on the anti-tumor immune response.* Anticancer Res 2000;20:2681-6.
9. Levitsky HI, Lazenby A, Hayashi RJ, Pardoll DM. *In vivo priming of two distinct antitumor effector populations: the role of MHC class I expression.* J Exp Med 1994;179:1215-24.
10. Wachsman JT. *DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: relation to carcinogenesis.* Mutat Res 1997;375:1-8.
11. Gonzalgo ML, Jones PA. *Mutagenic and epigenetic effects of DNA methylation.* Mutat Res 1997;386:107-18.
12. Momparler RL, Bovenzi V. *DNA methylation and cancer.* J Cell Physiol 2000;183:145-54.
13. Tureci O, Sahin U, Zwick C, Koslowski M, Seitz G, Pfreundschuh M. *Identification of a meiosis-specific protein as a member of the class of cancer/testis antigens.* Proc Natl Acad Sci USA 1998;95:5211-6.
14. Celis E, Fikes J, Wentworth P, et al. *Identification of potential CTL epitopes of tumor-associated antigen MAGE-1 for five common HLA-A alleles.* Mol Immunol 1994;31:1423-30.
15. van der Bruggen P, Bastin J, Gajewski T, et al. *A peptide encoded by human gene MAGE-3 and presented by HLA-A2 induces cytolytic T lymphocytes that recognize tumor cells expressing MAGE-3.* Eur J Immunol 1994;24:3038-43.
16. Zeuthen J, Dzhandzhugazyan K, Hansen MR, Kirkin AF. *The immunogenic properties of human melanomas and melanoma-associated antigens recognized by cytotoxic T lymphocytes.* Bratisl Lek Listy 1998;99:426-34.
17. Chen JL, Dunbar PR, Gileadi U, et al. *Identification of NY-ESO-1 peptide analogues capable of improved stimulation of tumor-reactive CTL.* J Immunol 2000;165:948-55.
18. Chen ME, Lin SH, Chung LW, Sikes RA. *Isolation and characterization of PAGE-1 and GAGE-7. New genes expressed in the LNCaP prostate cancer progression model that share homology with melanoma-associated antigens.* J Biol Chem 1998;273:17618-25.
19. Russo V, Traversari C, Verrecchia A, Mottolese M, Natali PG, Bordignon C. *Expression of MAGE gene family in primary and metastatic human breast cancer: implications for tumor-specific immunotherapy.* Int J Cancer 1995;64:216-21.
20. Mori M, Inoue H, Mimori K, et al. *Expression of MAGE genes in human colorectal carcinoma.* Ann Surg 1996;224:183-8.
21. Russo V, Dalerba P, Ricci A, et al. *MAGE BAGE and GAGE genes expression in fresh epithelial ovarian carcinomas.* Int J Cancer 1996;67:457-60.
22. Fujie T, Mori M, Ueo H, Sugimachi K, Akiyoshi T. *Expression of MAGE and BAGE genes in Japanese breast cancers.* Ann Oncol 1997;8:369-72.
23. Li J, Yang Y, Fujie T, et al. *Expression of the MAGE gene family in human gastric carcinoma.* Anticancer Res 1997;17:3559-63.
24. Picardo AL, Torres AJ, Maestro M, et al. *Quantitative analysis of carcinoembryonic antigen, squamous cell carcinoma antigen, CA 125, and CA 50 cytosolic content in non-small cell lung cancer.* Cancer 1994;73:2305-11.
25. Lee YC, Yang PC, Kuo SH, Luh KT. *Tissue polypeptide antigen and carcinoembryonic antigen as tumor markers in lung cancer.* J Formos Med Assoc 1991;90:631-6.
26. Coral S, Sigalotti L, Gasparollo A, et al. *Prolonged upregulation of the expression of HLA class I antigens and costimulatory molecules on melanoma cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR).* J Immunother 1999;22:16-24.
27. De Backer O, Arden KC, Boretti M, et al. *Characterization of the GAGE genes that are expressed in various human cancers and in normal testis.* Cancer Res 1999;59:3157-65.
28. Lee L, Wang RF, Wang X, et al. *NY-ESO-1 may be a potential target for lung cancer immunotherapy.* Cancer J Sci Am 1999;5: 20-5.
29. Coral S, Sigalotti L, Gasparollo A, et al. *Prolonged upregulation of the expression of HLA class I antigens and costimulatory molecules on melanoma cells treated with 5-aza-2'-deoxycytidine (5-AZA-CdR).* J Immunother 1999;22:16-24.
30. Redondo M, Ruiz-Cabello F, Concha A, et al. *Differential expression of MHC class II genes in lung tumour cell lines.* Eur J Immunogenet 25:385-91.

=국문 초록=

배경: DNA 메틸화란 유전자의 promoter에 있는 CpG dinucleotide의 cytosine기에 메틸기가 붙는 현상을 말한다. CpG dinucleotide에 과메틸화가 일어나면 일부 유전자의 발현이 감소되며, 그 반대로 CpG dinucleotide의 메틸화가 억제되면 유전자 발현이 증가된다. DNA 메틸화 억제제인 5-aza-2'-deoxycytidine (ADC)을 폐암세포에 처치했을 때 암항원 유전자의 발현 유무와 이를 위한 최적 조건을 조사하고, 아울러 MHC와 B7의 발현과 세포 성장에 미치는 영향을 조사하여 암치료 백신에 ADC를 임상적으로 이용할 수 있는지를 연구하였다. 대상 및 방법: 4개의 사람 폐암세포주 (NCIH1703, NCIH522, MRC-5 및 A549)에 ADC를 1 uM 농도로 처치한 후 48시간 뒤에 MAGE family, GAGE, NY-ESO-1, PSMA, CEA 및 SCC 항원 유전자에 대한 RT-PCR을 실시하였고, 폐암세포에서 암항원의 발현을 증가시키는 최적의 ADC 처치 조건을 규명하기 위하여 ADC 농도와 처치 시간을 다양하게 하여 암세포를 자극한 후 암항원 유전자 발현성을 분석하였다. 또한 ADC 처리가 폐암 세포주의 MHC와 B7 발현을 증가시키는가를 알아보기 위해 1 uM 농도의 ADC를 72시간 처치한 후 FACS 분석을 실시하였고, ADC가 세포 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여, ADC를 0.2, 1 및 5 uM 농도로 96시간 처치 후 세포수를 측정하여 상대성장지수를 조사하였다. 결과: 세포주에 따라 차이는 있으나 MAGE, GAGE, NY-ESO-1 및 PSMA의 발현이 유도되었으며, MAGE 아형 중에는 MAGE-1, -2, -3, -4, -6으로 나타났다. 그러나 비암항원인 CEA 발현은 변화가 없었으며 SCC 항원 유전자의 발현은 오히려 ADC 처치에 의해 감소되었다. ADC 처치 후 24~48 시간이 지난 뒤부터 암항원 유전자의 발현이 증가하였으며 ADC처리에 의해 유도된 유전자의 발현성은 ADC 처치 후 최소 14일까지 유지되었다. 또 ADC를 0.2, 1, 5 uM 농도로 첨가하여 48시간 배양한 후 암항원 유전자 발현성을 측정한 결과 세포주에 따라 다소 차이는 있으나 대개 0.2 uM 농도에서도 유전자 발현이 유도되었으며 1, 5 uM 농도에서 매우 강하게 유도되었다. ADC 처리가 폐암세포주의 MHC와 B7 발현을 증가시키는가를 알아보기 위해 1 uM 농도의 ADC를 72시간 처치한 후 FACS 분석을 실시한 결과 4개의 폐암세포주에서 MHC 및 B7 분자의 발현은 유도되지 않았다. 또 ADC 농도가 세포 성장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 ADC를 0.2, 1, 5 uM 농도로 96시간 처치 후 세포수를 측정하여 상대성장지수를 알아본 결과 ADC 처치 농도가 증가함에 따라 세포의 성장은 매우 감소하였다. 결론: 폐암세포주에서 ADC 처치는 MAGE, GAGE 및 NY-ESO-1과 같은 세포독성 T 림프구 반응을 유도할 수 있는 암항원의 발현을 증가시킬 수 있으며, ADC의 세포독성과 항원 발현 유발시간을 분석할 때 1 uM 농도에서 48시간 처치한 후 ADC가 없는 배지에서 수일간 배양하는 것이 가장 효과적이라고 생각된다. 그러나, ADC를 처치하여도 MHC 및 B7의 발현의 변화는 없었으므로 ADC를 처치한 폐암세포를 암백신으로 사용하기 위해서는 MHC나 B7 및 cytokine의 발현을 증가시키는 추가적인 처치가 필요하다고 생각된다.

- 중심 단어 : 1. 종양지표
2. 발현
3. 암종
4. 폐종양