

마우스 유방암 모델에서 5-Aza-2'-deoxycytidine의 암줄기세포 유지 억제 효과

노경진 · 양인숙 · 김란주¹ · 김수림¹ · 박정란¹ · 정지윤² · 조성대³ · 남정석^{1*}

가천의과대학 이길여 암 · 당뇨연구원 실험동물센터, ¹중앙억제연구실, ²공주대학교 특수동물학과, ³전북대학교 치과대학 구강병리학과

Received July 19, 2009 / Accepted August 3, 2009

5-Aza-2'-deoxycytidine Inhibits the Maintenance of Cancer Stem Cell in a Mouse Model of Breast Cancer. Kyoung-Jin Nho, In-Sook Yang, Ran-Ju Kim¹, Soo-Rim Kim¹, Jeong-Ran Park¹, Ji-Youn Jung², Sung-Dae Cho³ and Jeong-Seok Nam^{1*}. *Center of Animal Care and Use, ¹Lab of Tumor Suppressor, Lee Gil Ya Cancer and Diabetes Institute, Gachon University of Medicine and Science, Incheon 406-840, South Korea, ²Dept. of Companion and Laboratory Animal Science, Kongju National University, Yesan 340-702, South Korea, ³Dept. of Oral Pathology, School of Dentistry, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, South Korea* - Aberrant DNA methylation plays an important role in the development of cancer. It has been reported recently that DNA hypermethylation is involved in the maintenance of cancer stem cells. The present study was designed to test the hypothesis that the demethylating agent, 5-aza-2'-deoxycytidine (AZA), can inhibit the potential for maintenance of cancer stem cells. To validate this hypothesis, we used 4T1 syngeneic mouse models of breast cancer. The AZA pre-treated 4T1 cells showed a dramatic inhibition of tumorsphere formation, compared to their counterparts *in vitro*. In addition, the AZA treatment significantly suppressed the expression of stem regulator genes, such as oct-4, nanog and sox2, compared to counterparts *in vivo*. Therefore, selective inhibition of DNA methylation may be useful for stem-specific cancer therapy.

Key words : 5-aza-2'-deoxycytidine, DNA methylation, cancer stem cell, stem regulator gene

서 론

인간의 암 유발 기전 중, 비정상적 DNA 메틸화는 유방암을 포함한 여러 암에 있어 매우 유력한 원인으로 알려져 있다 [6,8,11,18,26]. DNA 메틸화란, 유전자의 promoter에 있는 CpG dinucleotide의 cytosine기에 메틸기가 붙는 현상을 말한다. DNA methyltransferase가 CpG dinucleotide의 cytosine기에 작용하여 메틸기를 많이 붙이면 전사요소의 DNA 결합이 억제되기 때문에 이 promoter의 조절을 받는 유전자의 발현이 감소되며, 그 반대로 CpG dinucleotide의 메틸화가 억제되면 유전자 발현이 증가된다. 특히, 정상 세포에서 암 억제유전자, 세포주기조절 유전자, apoptosis 조절유전자, DNA repair 조절유전자 등에서 과메틸화는 암 발생을 유발하고 암의 성장을 촉진할 수 있다고 보고되고 있다 [2,3,7,9,10,14].

항암치료의 가장 큰 문제점은 종양이 항암제에 내성을 보이고, 재발되어 더욱 악성 종양이 생성되는 것이다. 최근 이런 현상이 종양 내에 존재하는 소수의 암줄기세포(cancer stem cell, CSC)에 의해 야기된다는 사실이 밝혀지면서 새로운 항암치료의 작용점으로 암줄기세포가 주목 받고 있다. 암줄기세포의 특징은 정상 줄기세포처럼 자가재생능(self-renewal), 증식능력(proliferative capacity) 및 분화능(differentiation)을 가진다는 것이다 [1,27]. 따라서 암 조직의 대부분을 차지하는 일반

암세포만 표적으로 해온 기존의 암 치료보다는 암 조직의 극히 일부만 차지하면서도 암의 발병과 유지, 재발에 핵심 구실을 하는 암줄기세포에 초점을 맞춰야 한다는 새로운 시각이 제시되고 있다.

최근 연구보고에 따르면, 비정상적인 DNA 메틸화는 줄기세포에서 발현되는 줄기세포 조절인자들에게 영향을 주어 암 줄기세포의 증식을 유발하여 암의 전이와 재발에 관여한다는 것이다 [3,5,12,13,20,24,30]. 후성유전적 변이 현상인 DNA 메틸화는 암 발생 초기에 일어나는 특이적 현상으로 인식되고 있을 뿐만 아니라, 암이 발생하는 해당조직에 따라 특이적인 유전자군의 메틸화 패턴을 나타내고 있어, 이러한 특이성은 암 발생에 대한 대표적인 비유전적 소인이라 할 수 있다 [10,21,25,28,29]. 따라서 우리는 DNA 메틸화의 억제가 암줄기세포 유지에 있어 어떠한 영향을 미치는지 연구를 수행 하기 위해서, 유방암 마우스 모델을 이용하여 demethylating agent인 5-aza-2'-deoxycytidine (AZA)에 의한 후성유전적 변화가 암 줄기세포 유지와 증식을 억제할 수 있는지를 연구하였다.

재료 및 방법

세포주 배양 및 시약

마우스 유방암 세포주 4T1-luc은 Caliper life science (Alameda, CA)로부터 분양 받아 100 mm 세포배양접시에 배양하였으며 3일 내지 4일 간격으로 계대배양 하였다. 배양액으로는 10% fetal bovine serum과 1% penicillin/streptomycin

*Corresponding author

Tel : +82-32-899-6072, Fax : +82-32-899-6350

E-mail : namjs@gachon.ac.kr

(Invitrogen, Grand Island, NY)이 첨가된 DMEM (Invitrogen)을 이용 하였으며 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양 하였다. 5-aza-2'-deoxycytidine (AZA)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입 하였고, DMSO에 녹여서 5 mg/ml로 소분하여 냉동상태로(-80°C) 보존하였다. 사용 시 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

CCK-8 assay

AZA에 의한 세포 독성을 알아보기 위하여 CCK-8 assay (Dojindo Molecular Technologies, Inc)를 이용하여 세포 생존율을 측정하였다. 4T1-luc cell 각 5×10³ 개를 96-well plate에 seeding하고 24시간 전배양(pre-incubation)을 하였다. 그 후 AZA를 여러 농도별로 처리하고 72시간 배양한 다음 CCK-8 용액(10 µl/100 µl cell culture medium)을 각 well에 첨가 시켜 37°C에서 3시간 동안 배양하였다. 반응이 끝난 plate는 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 세포생존 능력의 변화를 측정 하였다.

Tumorsphere 배양

Tumorsphere 형성에서 AZA의 영향을 살펴보기 위해 attachment plates에 4T1-luc cell을 seeding 하고 1 µM의 AZA를 처리하였다. 3일 후 Trypsin-EDTA를 처리해 single cell을 얻어 ultra-low attachment plates (Corning, NY, USA)에 1×10⁵ 개를 seeding 한 후 5 ng/ml EGF, 5 ng/ml bFGF (Peprotech, Rocky Hill, NJ), 4 µg/ml heparin (Sigma, St. Louis, MO), B27 (1:50 dilution, Invitrogen, Grand Island, NY)이 포함된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 7일 후 tumorsphere 형성을 inverted microscope를 이용하여 50X 배율로 촬영하였다. sphere의 수와 크기는 Image-Pro Plus program (MediaCybernetics, Silver Spring, MD)으로 측정하였다.

실험동물 및 시험물질 투여

5주령의 BALB/c 마우스 암컷은 (주)오리엔트에서 구입하였다. 모든 동물은 특정병원체부재(specific pathogen-free, SPF) 동물로 1주일간의 순화 기간을 거친 후 실험에 사용하였다. 마우스 30마리를 Fig. 1과 같이 3개 실험군으로 나누어 실험 하였으며, 실험군은 그룹 당 10마리씩 설정하였다. 즉 모든 그룹의 BALB/c 암컷 마우스에 4T1-luc 종양세포를 5×10⁴ 수 집하여 50 µl씩 지방지방체(m.f.p.)에 접종하고, 대조군 1군에는 0.2% DMSO를 일주일에 5회 3주간 복강투여 하였고, 투여군 2군과 3군에는 AZA (2군: 0.05 mg/kg B.W., 3군: 0.1 mg/kg B.W.)를 투여 하였다. 본 연구에서의 모든 동물실험은 가천의과대학고 이길여 암·당뇨연구원 동물실험윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 동물실험 표준작업지침서(Standard Operation Procedures,

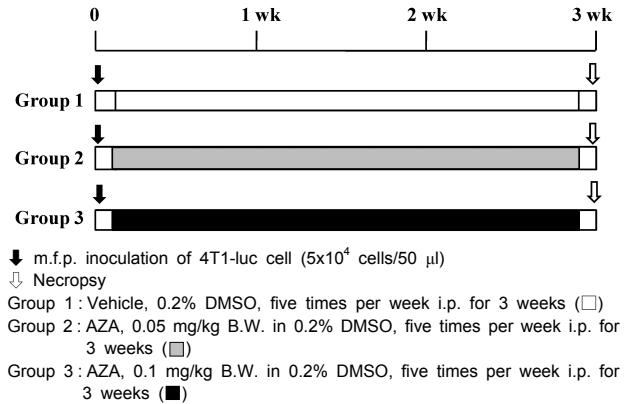


Fig. 1. Experimental protocol of the present study. 5×10⁴ cancer cells (4T1-luc) were inoculated into the m.f.p. of female BALB/c mice. After inoculation, the mice were randomized into three treatment groups (n=10). Vehicle control group (Group 1) mice were treated with 0.2% DMSO and treatment group (Group 2: 0.05 mg/kg B.W., Group 3: 0.1 mg/kg B.W.) mice were treated with AZA five times per week i.p. The mice were killed euthanized at three weeks after inoculation.

SOP)에 따라 수행되었다.

사육환경

입수된 동물은 케이지에 5마리씩 분류한 후 온도 20~22°C, 상대습도 40~60%, 조명시간 12시간(07:00 점등~19:00 소등), 환기횟수 50회/시간, 조도는 150~300 lux로 제어된 환경 조건에서 사육되었다. 동물실의 온도와 습도는 자동온습도측정기에 의하여 매시간 마다 측정되었으며, 동물실의 환경측정결과 시험에 영향을 미칠 것으로 사료되는 변동은 없었다. 동물의 개체식별은 ear-punching법을 사용하였으며, tag 표시법에 의해서 사육 상자를 구분하였다. 사육 상자는 시험시간, 시험번호, 시험책임자명을 기재한 label을 첨부하였다. 사육실에 반입되는 사료와 깔짚, 물(상수도)은 121°C에서 15분간 고압멸균 하였고, 사료와 음수는 자유섭취 시켰다. 체중계 및 실험기구 등은 알코올 소독 후 자외선 멸균 뒤 반입하였다.

임상증상 관찰 및 체중측정

시험기간 중 모든 동물에 대하여 매일 1회 일정한 시간에 일반증상의 변화, 빈사 및 사망유무를 관찰하였으며, 체중은 실험시작 후 3주까지 매주 1회 측정 하였다. 시험 중 폐사동물은 없었다.

동물 부검 및 종양조직 채취

종양 세포 주입 3주 후 모든 그룹의 마우스를 CO₂ 가스를 이용하여 안락사하고, 멸균된 수술용 가위와 핀셋을 이용하여 실험동물의 지방지방체(m.f.p.)에서 종양조직을 절제하여 분자생물학적 검사를 수행하기 위해 액체질소에 보관 하였다.

BLI (Bioluminescent imaging)을 통한 종양측정

시험기간 중 1주1회 실시하였다. 측정방법은 firefly luciferase의 기질인 D-luciferin (Caliper, Alameda, CA)을 150 mg/kg B.W. 복강 주입한 뒤 5분 후 IVIS (Caliper)를 이용하여 photon/sec로 크기를 측정하였다. Bioluminescence 결과는 Living Image 3.0 software (Caliper)를 이용해 분석하였다.

종양조직의 RNA 추출 및 Quantitative real-time PCR (RTQ-PCR)

종양조직에서 줄기세포조절유전자(SRG)의 mRNA 발현을 정량적으로 분석하기 위해 RTQ-PCR 방법을 사용하였다. 4T1-luc 세포를 mouse 주입하고 3주 뒤에 종양조직을 절제하여 신선 조직을 액체질소에 보관 하였다. 액체질소에 냉동 보관된 조직 30 mg을 조직분쇄기로 분쇄한 뒤 Rneasy Plus mini kit (Qiagen Inc., Valencia, CA)를 이용하여 genomic DNA가 배제된 RNA (total RNA)만을 추출하였다. 전체 RNA 농도는 NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Rockland, DE)를 이용하여 정제도를 확인하고 정량하였다. 1 µg의 total RNA로부터 random hexamer와 200 unit의 Superscrip Reverse Transcriptase (Invitrogen corporation, Carlsbad, CA)를 이용하여 cDNA (complementary DNA)를 역전사 합성하였다. Oct-4, Nanog, Sox2, c-Myc, Klf4의 발현 정도를 정량 하기 위해 RTQ-PCR 분석은 SYBR green dye (ABI Biosystems, Foster City, CA)와 함께 ABI 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)을 이용하여 평가하였다. 내재 대조(endogenous control) 유전자는 mouse HPRT를 사용하였다. 연쇄반응 시 최종 부피는 50 µl가 되도록 하였으며, cDNA의 경우 각 시료의 RNA 1 µg에서 역전사 되도록 하였다. 연쇄반응 수행절차는 처음 95°C에서 5분간 변성하고, 94°C에서 30초, 60°C에서 1분, 72°C에서 30초를 주기로 40회 반복 수행 한 후 마지막으로 72°C에서 7분간 신장(extension) 하였다. 각 시료의 발현결과 비교분석은 제조사에서 권고한 표준곡선분석법(standard curve method)을 사용하였다. 사용된 primer는 Oct-4: 5'-GCA TTC AAA CTG AGG CAC CA-3' (F), 5'-AGC TTC TTT CCC CAT CCC A-3' (R); Nanog: 5'-GCC TTA CGT ACA GTT GCA GCA A-3' (F), 5'-TCA CCT GGT GGA GTC ACA GAG T-3' (R); Sox2: 5'-GAG TGG AAA CTT TTG TCC GAG A-3' (F), 5'-GAA GCG TGT ACT TAT CCT TCT TCA T-3' (R); c-Myc: 5'-CGG ACA CAC AAC CGT CTT GGA A-3' (F), 5'-AGG ATG TAG GCG GTG GCT TTT-3' (R); KIF4: 5'-GGT GCA GCT TGC AGC AGT AA-3' (F), 5'-AAA GTC TAG GTC CAG GAG GTC GTT-3' (R); HPRT: 5'-GCC TAA GAT GAG CGC AAG TTG-3' (F), 5'-TAC TAG GCA GAT GGC CAC AGG-3' (R)이며, 유전자의 발현양을 측정하기 위해 동일시료 cDNA를 사용하여 mouse HPRT 발현양을 측정하여 정량하였다.

통계학적 처리

모든 실험결과는 평균치와 표준오차를 사용하여 나타내고 각 군간 비교는 Prism 5 program (GraphPad, San Diego, USA)을 이용하여 one-way ANOVA에 이은 t-test 분석을 실시하였다. 대조군과 비교하여 P 값이 0.05 미만일 때를 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

유방암 세포 생존율에서 AZA가 미치는 영향

0.1 µM~50 µM 농도의 AZA를 4T1-luc 세포에 처리한 후 72시간 후에 4T1-luc 생존율을 CCK-8 assay로 측정된 결과 처리하지 않은 대조군과 비교하여 실험군의 세포가 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소하는 것을 관찰하였다(Fig. 2). 세포 생존율 실험을 통해 AZA가 4T1-luc 유방암세포의 IC₅₀ (The half maximal inhibitory concentration)는 1 µM 내외라는 것을 알 수 있었고, 이 농도를 이용하여 암줄기세포 배양 특성 중 하나인 tumorsphere 형성에서 AZA의 영향을 살펴보았다.

유방암 세포주에서 AZA에 의한 Tumorsphere형성 감소

정상 줄기세포를 혈청이 제거된 배양액에 EGF와 bFGF와 같은 성장인자를 첨가하여 unattached 조건에서 키우면 분화된 세포는 제거되고, 줄기세포들은 자라서 sphere를 형성한다. 같은 배양 조건에서 암세포를 키우게 되면, 분화된 암세포는 제거되고 암줄기세포들만 살아남아서 tumorsphere를 형성하게 된다[22]. 이런 암줄기세포 배양특성 중 하나인

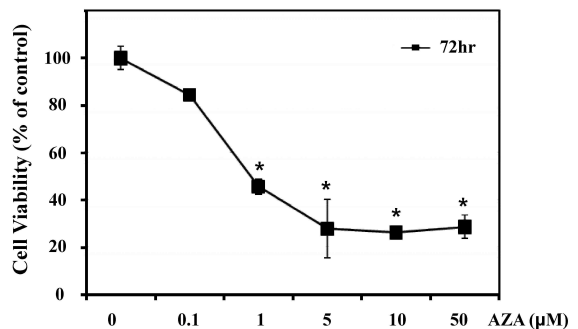


Fig. 2. AZA treatment decreases cell viability in breast cancer cells. 4T1-luc cells were plated in 96-well plates and treated with various concentrations of AZA (0.1 µM -50 µM) in triplicate. After 72 hr incubation, optical density was measured, as described in Materials and Methods. The data are expressed as the relative ratio to the absorbance of the untreated 4T1-luc cells, which was set at 100%. Three replicate measurements are included in a single experiment. The data are expressed as means±SD of 3 independent experiments. *, p<0.05 statistically significant difference compared with counterparts. AZA, 5-Aza-2'-deoxycytidine.

tumorsphere 형성에서 AZA의 영향을 살펴보기 위해 tumorsphere 배양실험을 수행하였다. Attachment plates에 4T1-luc cell을 seeding 하고 1 μ M의 AZA를 처리하고, 3일 후 Trypsin-EDTA를 처리해 single cell을 얻어 ultra-low attachment plates (Corning)에 배양하였다. 7일 후 tumorsphere 형성을 inverted microscope를 이용하여 촬영한 결과 실험 대조군에 비해 약물 처리군의 tumorsphere의 크기와 수가 현저하게 감소하였다(Fig. 3). 이러한 결과로 AZA에 의한 메틸화 억제 현상이 암줄기세포의 유지와 생성을 억제 할 수 있음을 알 수 있었다.

In vivo 상에서 AZA의 종양세포 억제 효과

발광물질이 표지된 4T1-luc 유방암 종양세포를 수집 해 BALB/c female mice의 유방지방체(m.f.p.)에 접종 한 후 IVIS를 이용해 실험동물에서 영상을 획득하였다. 영상분석 결과에서, 종양세포 주입 일주일 후 모든 그룹에서 종양이 형성되었다. 그러나 시간이 지날수록 종양 발광 신호가 시험물질을 처리한 군(Group 2, AZA: 0.05 mg/kg B.W., Group 3, AZA: 0.1 mg/kg B.W.)이 용매 대조군(Group 1: 0.2% DMSO)보다 낮은 것을 확인할 수 있었다. 이를 수치화한 데이터를 보면 전체적으로 실험군의 photon 평균값이 대조군보다 2주차부터

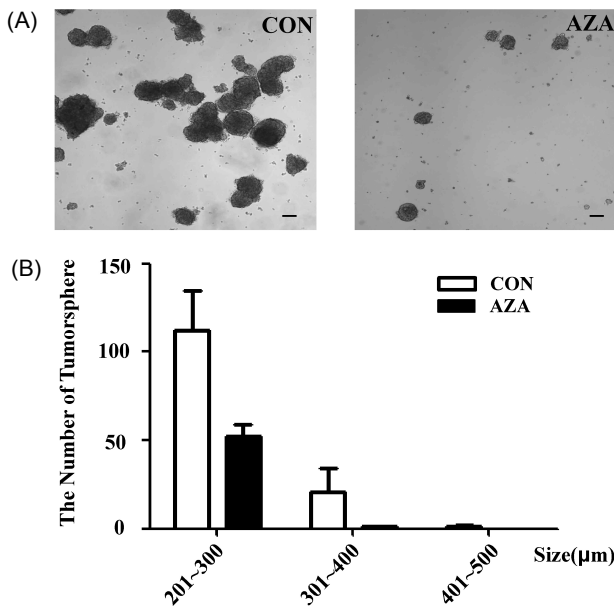


Fig. 3. AZA treatment reduces tumorsphere formation in breast cancer cells. 4T1-luc cells were cultured in attachment dishes with AZA (1 μ M) for 3 days, and then plated in low attachment plates for 7 days. The ability to form tumorspheres was determined, as described in Materials and Methods. Tumorspheres were observed under inverted microscope (A) and quantified (B). Values represent mean \pm SD for 3 determinations. Scale bar, 100 μ m. CON, control; AZA, 5-Aza-2'-deoxycytidine.

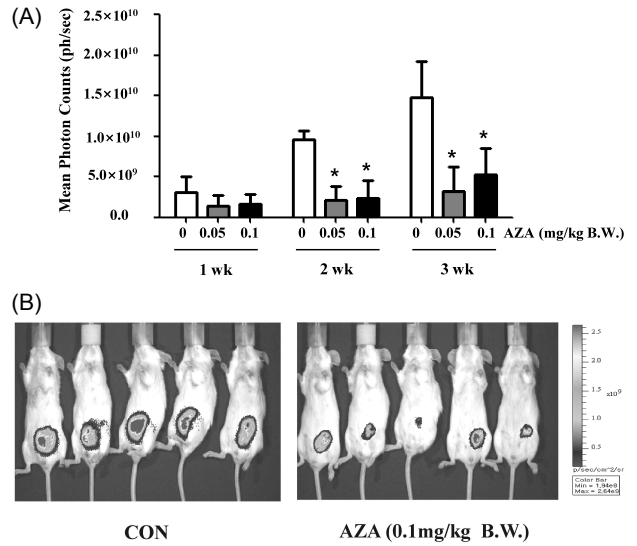


Fig. 4. AZA treatment inhibits the growth of primary tumor *in vivo* 4T1-luc cells (5×10^4) were injected s.c. into m.f.p. of BALB/c female mice. Mice were treated i.p. for three weeks with 0.2% DMSO and AZA (0.05 mg/kg B.W., 0.1 mg/kg B.W.; five times per week i.p.). Animals were imaged weekly for 3 weeks using an *in vivo* imaging system (IVIS, Caliper, Alameda, CA). (A) Tumor growth was monitored and quantified weekly by BLI and measurements. (B) Images of representative mouse treated with AZA and vehicle. Image time range was from 1 sec to 10 min, and all images were normalized to 1 sec. *, $p < 0.05$ statistically significant difference compared with counterparts. CON, control; AZA, 5-Aza-2'-deoxycytidine.

4배 감소하였다(Fig. 4A). 이는 시험물질을 처리 한 뒤, 3주 후에 측정된 BLI (bioluminescent imaging) 결과에서도 실험군의 종양 덩어리가 유의적으로 감소한 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 4B). 이러한 결과를 바탕으로 AZA가 종양세포의 성장을 억제한다는 것을 알 수 있었다.

AZA에 의한 stem regulator gene 발현 감소

AZA에 의한 DNA 메틸화 억제 현상이 줄기세포 조절 전사 인자들의 발현에 어떠한 영향을 주는 지 살펴보았다. BALB/c 마우스에 유방암 세포주를 주입하고 3주간 시험물질(AZA: 0.1 mg/kg B.W.)을 처리한 후 종양조직을 얻어 RTQ-PCR을 수행하였다. 그 결과 AZA를 처리한 군에서 Oct4, Nanog, Sox2의 mRNA 발현이 대조군 보다 1.5배 이상 감소하였지만 c-Myc, Klf4의 발현에는 변화가 없었다(Fig. 5).

고 찰

본 연구에서는 DNA 메틸화를 억제하는 약물로 AZA를 사용하였다. AZA는 cytidine과 유사한 물질로 작용기전은 주로

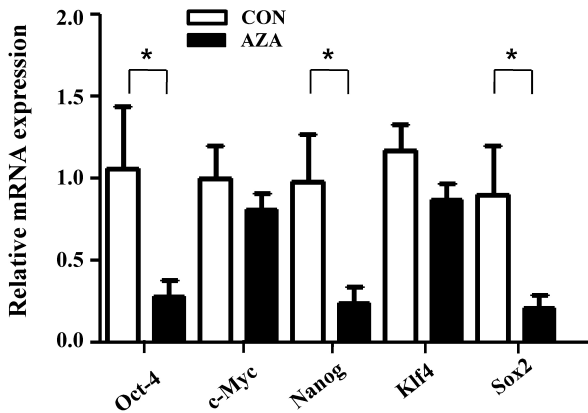


Fig. 5. AZA treatment represses the expression of stem regulator gene. RTQ-PCR analysis of stem transcription factors in 4T1-luc tumor tissues treated with AZA (0.1 mg/kg B.W.) and vehicle (0.2% DMSO). Values represent mean±SD for 3 determinations. *, $p < 0.05$ statistically significant difference compared with counterparts. NS, not significant; CON, control; AZA, 5-Aza-2'-deoxycytidine.

DNMT에 비가역적인 공유결합을 통하여 DNMT의 활성을 방해하며 메틸화 수위를 낮추 유전자의 표현을 조절하는 기능을 한다. 우리는 이미 AZA가 종양억제 유전자인 E-cadherin 발현이 저해된 유방암 세포에서 E-cadherin 발현을 복원시켜 암의 성장을 억제하고, 암의 전이를 감소시키는 것을 보고 하였다[19]. 이러한 논문을 바탕으로 본 연구에서는 암줄기세포 유지에서의 AZA의 영향을 조사 하였다. 본 실험에서는 먼저 유방암 세포에서 AZA가 tumorsphere 형성에 미치는 영향을 살펴 본 결과, AZA가 암줄기세포의 특성인 자가재생(self-renewal) 능력을 감소시켜 tumorsphere 형성을 억제 한 것을 관찰 하였다. 이러한 결과를 미루어 우리는 줄기세포 조절 유전자(stem regulator gene, SRG)들의 발현에서 비정상적인 DNA 메틸화가 영향을 줄 것으로 예상하고, *in vivo* 연구에서 AZA를 이용하여 메틸화 현상을 억제 한 뒤 전사인자들의 발현 양상을 조사하였다. 그 결과 Oct-4, Nanog, Sox2의 발현이 감소되는 것을 최초로 증명하였다. 이 유전자들은 줄기세포에서 특이적으로 발현하는 전사 인자 중에서 특히 만능성 유지에 중요한 역할을 하는 인자들로 알려져 있어[4], AZA에 의한 DNA 메틸화의 억제는 암줄기세포의 증식 억제에 있어 중요한 역할을 할 것으로 사료 된다.

최근 여러 연구에 의하면 암 세포 내 암줄기세포의 증식은 Polycomb 유전자들의 과메틸화와 연관되어 있다고 보고하고 있다[16,20]. Polycomb 계열의 단백질들은 발생학적 측면에서 관여하는 유전자가 활성이 필요 없는 장소나 시기에 유전자의 기능을 하지 못하도록 함으로서, 잘못된 곳에 특정한 세포나 조직이 형성되는 것을 방지하는 기능을 하는 단백질로서, 유전자 발현 억제에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이러한 Poycomb의 대표적인 유전자인 Bmi-1은 세포

성장과 분화에 관련된 유전자들을 조절하는 전사 억제 유발 인자로서 여러 종양 조직에서 과발현 되어 있는데, INK4A와 ARF의 발현을 억제 하면서 줄기세포의 자가재생이나 유지에 관여한다고 알려져 있다[17]. 따라서 우리는 Polycomb 유전자(Bmi-1, ARF, INK4A)들의 과메틸화가 줄기세포 조절 유전자(SRG)의 발현에 어떠한 영향을 미치는 지를 조사하였다. 그러나, 본 연구에서 AZA는 Bmi-1, ARF, INK4A의 메틸화나 발현에 유의적인 변화를 초래하지 않았다(Data not shown). 그러므로, 본 4T1 유방암 실험모델에서는Polycomb 과 줄기세포 조절 유전자(SRG) 사이의 관련성을 규명할 수 없었다. 따라서 우리는 줄기세포 조절 유전자(SRG)의 상위단계에서 조절되는 유전자들을 찾기 위해 추가적인 연구를 진행 중에 있다.

종양 조직에서 나타나는 비정상적 DNA메틸화 패턴은 줄기세포 조절 유전자(SRG)들의 발현에 있어서 매우 중요하며 [20,23], 이러한 유전자의 발현 기전을 연구하는 것은 줄기세포 표적 치료에 있어 매우 중요한 연구 분야가 될 것으로 사료된다. 본 연구에서demethylating agent인 AZA는 줄기세포 조절 유전자들(Oct-4, Nanog, Sox2)의 발현을 감소시켜 암줄기세포의 증식을 억제 시킨 것으로 사료된다. 그러므로, 선택적인 DNA 메틸화의 억제를 항암치료에 응용하면, 암줄기세포를 파괴함으로써 암의 재발 및 악성화를 효과적으로 제어 할 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

비정상적 DNA메틸화는 암 발생에 있어 중요한 역할을 한다. 최근 연구에 의하면 암줄기세포 유지에 있어 DNA과메틸화가 연관되어 있다고 보고하고 있다. 따라서 본 연구는 4T1 유방암 실험모델에서 demethylating agent인 AZA 처리에 따른 후성유전적 변화가 암줄기세포의 유지 및 증식에 있어 어떠한 영향을 미치는지 조사 하였다. 4T1 세포에서 AZA 처리에 따른 tumorsphere 형성이 감소 하는 것을 *in vitro* 실험을 통해 관찰 하였고, *in vivo* 실험에서는 줄기세포 조절 유전자들 (Oct-4, Nanog, Sox2)의 발현이 감소 되는 것을 확인 하였다. 본 연구 결과로 볼 때 4T1 유방암 실험모델에서 AZA에 의한 후성유전적 변화는 줄기세포 조절 유전자(SRG)들의 발현을 조절하면서 암줄기세포 특성을 변화시켜 암줄기세포의 증식 및 유지를 억제 할 것으로 사료된다. 향후 이러한 DNA 메틸화 억제를 항암치료에 응용하면, 암줄기세포를 파괴함으로써 암의 재발 및 악성화를 효과적으로 제어 할 수 있을 것으로 사료 된다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행 된 기초연구사업임(No. E00259).

References

1. Al-Hajj, M. and M. F. Clarke. 2004. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene* **23**, 7274-7282.
2. Brown, R. and G. Strathdee. 2002. Epigenomics and epigenetic therapy of cancer. *Trends Mol. Med* **8** (4Suppl), S43-48.
3. Calvanese, V., A. Horrillo, A. Hmadcha, B. Suarez-Alvarez, A. F. Fernandez, E. Lara, S. Casado, P. Menendez, C. Bueno, J. Garcia-Castro, R. Rubio, P. Lapunzina, M. Alaminos, L. Borghese, S. Terstegge, N. J. Harrison, H. D. Moore, O. Brustle, C. Lopez-Larrea, P. W. Andrews, B. Soria, M. Esteller, and M. F. Fraga. 2008. Cancer genes hypermethylated in human embryonic stem cells. *PLoS One* **3**, e3294.
4. Chambers, I. and S. R. Tomlinson. 2009. The transcriptional foundation of pluripotency. *Development* **136**, 2311-2322.
5. Cowling, V. H., C. M. D'Cruz, L. A. Chodosh, and M. D. Cole. 2007. c-Myc transforms human mammary epithelial cells through repression of the Wnt inhibitors DKK1 and SFRP1. *Mol. Cell Biol.* **27**, 5135-5146.
6. Esteller, M. 2003. Relevance of DNA methylation in the management of cancer. *Lancet Oncol.* **4**, 351-358.
7. Esteller, M. 2005. Dormant hypermethylated tumour suppressor genes: questions and answers. *J. Pathol.* **205**, 172-180.
8. Feinberg, A. P. and B. Tycko. 2004. The history of cancer epigenetics. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 143-153.
9. Garinis, G. A., G. P. Patrinos, N. E. Spanakis, and P. G. Menounos. 2002. DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent. *Hum. Genet.* **111**, 115-127.
10. Herman, J. G. and S. B. Baylin. 2003. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* **349**, 2042-2054.
11. Jones, P. A. and S. B. Baylin. 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 415-428.
12. Jones, P. A. and S. B. Baylin. 2007. The epigenomics of cancer. *Cell* **128**, 683-692.
13. Mathews, L. A., F. Crea, and W. L. Farrar. 2009. Epigenetic gene regulation in stem cells and correlation to cancer. *Differentiation* **78**, 1-17.
14. McGarvey, K. M., E. Greene, J. A. Fahrner, T. Jenuwein, and S. B. Baylin. 2007. DNA methylation and complete transcriptional silencing of cancer genes persist after depletion of EZH2. *Cancer Res.* **67**, 5097-5102.
15. McGarvey, K. M., L. Van Neste, L. Cope, J. E. Ohm, J. G. Herman, W. Van Criekinge, K. E. Schuebel, and S. B. Baylin. 2008. Defining a chromatin pattern that characterizes DNA-hypermethylated genes in colon cancer cells. *Cancer Res.* **68**, 5753-5759.
16. Metsuyanin, S., N. Pode-Shakked, K. M. Schmidt-Ott, G. Keshet, G. Rechavi, D. Blumental, and B. Dekel. 2008. Accumulation of malignant renal stem cells is associated with epigenetic changes in normal renal progenitor genes. *Stem Cells* **26**, 1808-1817.
17. Molofsky, A. V., R. Pardal, T. Iwashita, I. K. Park, M. F. Clarke, and S. J. Morrison. 2003. Bmi-1 dependence distinguishes neural stem cell self-renewal from progenitor proliferation. *Nature* **425**, 962-967.
18. Momparler, R. L. 2003. Cancer epigenetics. *Oncogene* **22**, 6479-6483.
19. Nam, J. S., Y. Ino, Y. Kanai, M. Sakamoto, and S. Hirohashi. 2004. 5-aza-2'-deoxycytidine restores the E-cadherin system in E-cadherin-silenced cancer cells and reduces cancer metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* **21**, 49-56.
20. Ohm, J. E., K. M. McGarvey, X. Yu, L. Cheng, K. E. Schuebel, L. Cope, H. P. Mohammad, W. Chen, V. C. Daniel, W. Yu, D. M. Berman, T. Jenuwein, K. Pruitt, S. J. Sharkis, D. N. Watkins, J. G. Herman, and S. B. Baylin. 2007. A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nat. Genet.* **39**, 237-242.
21. Patel, A., J. D. Groopman, and A. Umar. 2003. DNA methylation as a cancer-specific biomarker: from molecules to populations. *Ann. N Y. Acad. Sci.* **983**, 286-297.
22. Ponti, D., A. Costa, N. Zaffaroni, G. Pratesi, G. Petrangolini, D. Coradini, S. Pilotti, M. A. Pierotti, and M. G. Daidone. 2005. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* **65**, 5506-5511.
23. Schulz, W. A. and M. J. Hoffmann. 2007. Transcription factor networks in embryonic stem cells and testicular cancer and the definition of epigenetics. *Epigenetics* **2**, 37-42.
24. Smalley, M. and A. Ashworth. 2003. Stem cells and breast cancer: A field in transit. *Nat. Rev. Cancer* **3**, 832-844.
25. Suzuki, H., D. N. Watkins, K. W. Jair, K. E. Schuebel, S. D. Markowitz, W. D. Chen, T. P. Pretlow, B. Yang, Y. Akiyama, M. Van Engeland, M. Toyota, T. Tokino, Y. Hinoda, K. Imai, J. G. Herman, and S. B. Baylin. 2004. Epigenetic inactivation of SFRP genes allows constitutive WNT signaling in colorectal cancer. *Nat. Genet.* **36**, 417-422.
26. Szyf, M., P. Pakneshan, and S. A. Rabbani. 2004. DNA methylation and breast cancer. *Biochem. Pharmacol.* **68**, 1187-1197.
27. Turner, C., A. R. Stinchcombe, M. Kohandel, S. Singh, and S. Sivaloganathan. 2009. Characterization of brain cancer stem cells: a mathematical approach. *Cell Prolif.* **42**, 529-540.
28. Verma, M. and S. Srivastava. 2002. Epigenetics in cancer: implications for early detection and prevention. *Lancet Oncol.* **3**, 755-763.
29. Wachsman, J. T. 1997. DNA methylation and the association between genetic and epigenetic changes: relation to carcinogenesis. *Mutat. Res.* **375**, 1-8.
30. Widschwendter, M., H. Fiegl, D. Egle, E. Mueller-Holzner, G. Spizzo, C. Marth, D. J. Weisenberger, M. Campan, J. Young, I. Jacobs, and P. W. Laird. 2007. Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat. Genet.* **39**, 157-158.