

간암 특이 Ganglioside 항원의 항종양성 항체 생산 연구

A Study on the Production of Anticancer Antibody of
Hepatoma-Specific Ganglioside Antigen

연구기관
한국과학기술연구원
부설 유전공학연구소

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “간암 특이 ganglioside 항원의 항 종양성 항체 생산 연구” 사업의 최종보고서로 제출합니다.

1992 년 6월

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원부설 유전공학연구소

총괄책임자 : 함 경 수(유전공학연구소 책임연구원)

연구원 : 김 승 호(유전공학연구소 선임연구원)

조 은 위(유전공학연구소 연구원)

강 주 현(유전공학연구소 연구원)

박 필 련(유전공학연구소 연구원)

염 현 정(유전공학연구소 연구원)

권 해 영(유전공학연구소 연구원)

장 경 선(유전공학연구소 연구원)

강 남 춘(유전공학연구소 연구원)

요 약 문

I. 제 목

간암 특이 ganglioside 항원의 항 종양성 항체 생산 연구

II. 연구의 목적 및 중요성

전 세계적으로 암에 의한 사망률이 날로 증가하고 있는데 비해 기존의 각종 암에 대한 진단·치료방법으로는 점차 증가하고 있는 암에 의한 사망률을 낮추기 어려운 상황이다. 현재 사용되고 있는 암의 진단방법에는 X-ray, NMR, CT 등을 이용하는 물리적 진단법과 몇가지 생화학적 검사법들이 있고, 치료방법에는 외과 수술, 화학요법, 방사선요법 등이 있으나 그 한계가 분명하다. 따라서 새로운 차원의 진단 및 치료방법의 개발이 절실한 상태이며, 최근엔 생물학적 반응을 이용한 진단·치료방법의 개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

지금까지 암의 원인 및 발생기전이 확실히 밝혀지지 않았으나 종양 발생과정에서의 몇가지 특징적인 사실들이 알려져 있다. 그 중 하나가 종양 특이 ganglioside 항원이다. 정상적인 세포에는 전혀 존재하지 않거나 미량으로 함유되어있던 어떤 ganglioside가 종양 발생 및 성장과정에서 그 함유량이 상당히 증가한다. 1959년 인체 종양으로부터 최초의 종양 특이 ganglioside 항원으로 Lar-Cer(cytolipin H)이 발견된 이후, 각종 종양으로부터의 종양 특이

ganglioside 항원들이 보고되었다.

그 예로 인체 melanoma에서는 정상세포에 전혀 존재하지 않았던 GD₃의 함량이 약 5.5%를 차지하였다. 지금까지 밝혀진 종양 특이 ganglioside 항원은 약 30여개 정도로 이에 대한 특이 항체를 생산할 경우 종양진단시약 및 치료제로서의 가능성을 갖는다. 아직까지는, 세포배양이 가능하여 자세히 연구할 수 있었던, 인체 melanoma 이외의 경우에는 종양 특이 항원에 대한 연구가 큰 진전을 보지 못하고 있다.

본 연구에서는 우리나라에서 발병률이 높은 간암의 종양 특이 ganglioside 항원을 확인하여 이에 대한 단일클론 항체를 생산하고 이를 이용한 진단시약을 개발하고자 한다. 종양 특이 항원에 대한 단일클론 항체의 생산과 이를 이용한 진단시약의 개발은 20%의 높은 사망률을 나타내는 각종 암에 대한 조기진단을 가능케 하여 국민보건향상에 기여할 뿐 아니라 다른 난치병들의 진단시약 개발도 큰 영향을 미칠 것이다.

III. 연구 개발의 내용 및 범위

1차년도에는 간암특이 ganglioside항원의 분리, 정제기술을 확립하였고 랫트에 화학적 발암제를 투여하여 간암을 유발시키면서 그에 따른 외형적인 변화와 간조직 ganglioside의 정량, 정상적인 변화를 관찰하였다. 2차년도에는 랫트의 간암특이항원을 다시 확인하였으며, 사람 간암조직으로부터 ganglioside를 분리, 정제하여 정상, 정량적인 특징을 관찰하였다. 3차년도에는 간암 환자의 혈청과 정

상인의 혈청에서 ganglioside를 분리, 정제하여 정성, 정량적인 특징을 관찰하였으며, 간암 조직의 ganglioside 패턴과 비교하였다. 그리고 이상의 실험결과들로부터 확인한 간암특이 ganglioside 항원에 대한 단일클론항체를 생산하고자 하였다.

IV. 실험 결과 및 활용에 대한 건의

1) 랫트에서의 간암유발과 간암특이 ganglioside 항원의 동정

랫트에 화학적 발암제를 투여하면서 간암유발에 따른 ganglioside 패턴의 변화를 조사한 것은 인체 조기 진단용 간암특이 항원을 찾기 위한 모델로 사용하기 위해서였다. 그러나 실험결과에 의하면 랫트와 인체의 정상간, 간암 조직의 ganglioside 패턴은 유사성을 찾을 수 없었다. 랫트의 간암 조직에서는 정상 간조직에 비해 많은 종류의 ganglioside들이 발현되었으며 그 중 G_{D1a} 양의 증가가 특징적이었다.

2) 인체의 간암 특이 ganglioside 항원의 동정

인체 간암조직과 간암조직 주변부위의 정상적으로 보이는 조직으로부터 ganglioside를 분리, 정제하여 분석하였다. 총 ganglioside양은 종양 주변부위보다 종양부위에 약간 크게 나타났으며, ganglioside 각 성분별로 살펴보면 종양부위에서 주변 조직보다

G_{M3} 의 양이 감소하였고 G_{M3} 보다 복잡한 형태의 ganglioside의 양은 증가하였다. 정상 간조직의 ganglioside는 90% 이상이 G_{M3} 이며, 소량의 다른 ganglioside들을 2-3개 관찰할 수 있었다. 이상의 실험 결과들로 부터 간암 조직에서는 정상 간조직의 주된 ganglioside성분인 G_{M3} 의 양은 감소하고, 정상 간조직에 발현되지 않던 di-, tri- 혹은 그 이상의 sialic acid를 포함하는 ganglioside가 다량 발현되며, 외형상 종양의 특징을 보이기도 전에 ganglioside의 패턴은 이미 종양세포의 것 과 유사하게 나타남을 알 수 있었다.

3) 혈청에서 인체 간암특이 ganglioside 항원의 동정

인체 간암 조직의 ganglioside 패턴을 분석한 결과, 간암 발과정에서 정상 간에선 발현되지 않던 여러 ganglioside들이 발현됨을 확인하였다. 이들 중 진단용 간암 특이항원으로 사용할 수 있는 것을 찾기 위해서 간암환자 혈청, 정상인 혈청의 ganglioside 패턴을 비교하였다. 정상인 혈청과 간암환자 혈청의 ganglioside 패턴은 거의 같으나 몇몇 ganglioside의 양이 다소 변했는데, G_{M3} 와 G_{M1} 바로 아래쪽의 ganglioside가 간암 환자의 혈청에서 약간 증가했다. 간암환자의 혈청에서 보이는 G_{M1} 아래쪽의 ganglioside는 간암조직에서도 확인할 수 있었다. G_{M3} 는 정상 간의 주된 ganglioside로 간암에선 그 함량이 감소하는데, 혈청중에서는 정상일 때에 비해 간암의 경우 증가하는 양상을 보였다.

4) 간암 특이 ganglioside 항원에 대한 단일클론항체 생산

이상의 실험 결과를 보면 간암조직에만 특별히 발현되고, 그것이 혈중으로 유출되는 특징을 갖고 있어 진단용 간암특이항원으로 이용할 수 있는 ganglioside는 없다. 하지만 정상에 비해 다소 양의 증감을 보이는 몇몇 ganglioside 들이 있으며, 이들에 대한 단일클론항체를 생산할 경우 혈중에서의 그 양의 증감을 확인함으로써 간암발병여부를 확인할 수 있을 것이다. 간암진단용 ganglioside 항원으로 랫트에선 G_{D1a} , 인체에선 G_{M1} , G_{D3} , G_{M3} 에 가능성을 두고 이들에 대한 단일클론항체를 만들고 있다. 간암특이 항종양성항체를 만들기 위한 또 다른 방법으로 간암조직의 총 ganglioside 에 대한 단일클론항체를 만들고 이들 중 정상인 혈청과 간암환자 혈청의 ganglioside 를 구별해 낼 수 있는 항체를 찾고 있다. 단일클론항체 생산을 위해 BALB/c를 면역화시킬 때는 ganglioside 항원을 liposome 형태로 주사하였다. 간암조직의 총 ganglioside 로 면역화한 경우엔 G_{M3} 등의 한가지 ganglioside를 항원으로 사용한 경우보다 항체생성정도가 크게 나타났다.

Summary

1. Chemical carcinogens such as DENA, 2-MeDAB, 3'-MeDAB, AAF and AFB, were administered to Sprague-Dawley rats. Hepatocellular carcinoma was induced using DENA and 3'-MeDAB after six or seven months.

The amount of total gangliosides was increased two or three times in hepatocellular carcinoma comparing with normal liver . In hepatocellular carcinoma the increase of G_{D1a} was notable and various other kinds of gangliosides which were not shown in normal liver were expressed.

2. Gangliosides isolated from human hepatocellular carcinoma tissue were analysed . The amount of G_{M3} was decreased and various other kinds of gangliosides which were not expressed in normal liver were shown.
3. Gangliosides isolated from sera of hepatoma patient were analysed and the result showed that the amounts of G_{M3} and G_{D3} were increased.
4. To develop the diagnosis of hepatocellular carcinoma the monoclonal antibodies to G_{M3} , G_{D3} , G_{M1} and G_{D1a} were produced.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	15
Chapter 2. Materials and Methods	27
1. Material	27
1) Experimental animals	27
2) Human hepatoma tissue and sera	27
3) Chemicals	27
2. Methods	28
1) Induction of hepatoma	28
2) Isolation and purification of gangliosides	28
3) Quantitation of gangliosides	30
4) Identification of hepatoma-specific ganglioside antigen ...	30
5) Production of monoclonal antibody to hepatoma-specific antigen	32
6) ELISA	33
7) TLC/immunostaining of the ganglioside antigen	34
Chapter 3. Results and Discussions	36
1. Induction of hepatocellular carcinoma in rat and identification of hepatoma-specific ganglioside antigen.	36

2. Identification of hepatoma-specific ganglioside antigen in human hepatocellular carcinoma	39
3. Identification of hepatoma-specific ganglioside antigen in the sera of hepatoma patient	43
4. Production of monoclonal antibody to hepatoma- specific antigen	44
Chapter 4. Conclusions	49
Chapter 5. References	51

목 차

제1장 서 론	15
제2장 실험재료 및 방법	27
제1절 실험재료	27
1. 실험동물	27
2. 인체 간조직, 혈청	27
3. 시 약	27
제2절 실험방법	28
1. 간암유발	28
2. ganglioside의 분리·정제	28
3. ganglioside의 정량	30
4. 간암 특이 ganglioside항원의 동정	30
5. 간암 특이 ganglioside항원에 대한 단일클론항체 생산 ...	32
6. ELISA	33
7. ganglioside항원의 TLC-면역염색법	34
제3장 결과 및 고찰	36
1. 랫트에서의 간암유발과 간암특이 ganglioside항원의 동정	36
2. 인체의 간암특이 ganglioside 항원의 동정	39

3. 혈청에서 인체간암특이 ganglioside항원의 동정	43
4. 간암특이 ganglioside항원에 대한 단일클론항체 생산 ...	44
제4장 결론 및 건의 사항	49
제5장 참고문헌	51

제 1 장 서 론

전 세계적으로 암에 의한 사망율은 날로 증가하고 있으며 우리나라에서도 암 발생률은 계속 증가하여 중요한 사망원인의 하나가 되고 있다. 발생 부위별로는 소화기암(위암, 간암) 및 복막암이 가장 많고 다음으로는 자궁암 등의 비뇨생식기암, 폐암 등의 호흡기계암, 백혈병 등의 림프·조혈조직암, 골수암 및 유방암 순의 발병률을 나타낸다(1).

기존의 암에 대한 진단방법에는 물리적인 방법과 생화학적인 방법이 있다. 물리적인 방법으로 X-ray, Computerised Tomography(CT), Nuclear Magnetic Resonance(NMR Scan), 그리고 방사성 동위원소를 이용한 방법들(Liver Scan, Bone Scan)이 있다. 물리적인 진단법으로는 가장 해상능이 좋을 때 0.5~1cm 직경의 종양을 확인해 낼 수 있으며, 이는 1g 또는 10^{12} 개 정도의 세포에 해당한다. 현재도 계속 이러한 방법들의 해상능을 높이기 위한 시도들이 진행되고 있으나 그 한계를 극복하기는 어려울 듯하다. 또 다른 류의 진단 방법으로 생화학적 검사가 있다. 이는 암 발생 과정에 수반되는 생체내 변화를 확인함으로써 암 발생 여부를 진단하는 것이다. 현재 혈청에서 HCG(human chorionic gonadotropin), AFP(α -fetoprotein), CEA(carcinoembryonic antigen) 등의 양을 측정하는 진단법을 사용하고 있으며 이것으로 소량의 종양도 확인해 낼 수 있다. 하지만 이들의 양에 영향

을 미치는 여러 다른 요인들도 있음을 고려해야 한다. 암의 진단에 이용되는 몇가지 생화학적 검사를 표 1에 정리해 보았다⁽²⁾.

표 1. 생화학적 암 진단방법

Substance (in serum)	Structure	Mol. wt.	Method of assay	Use
Human chorionic gonadotropin (HCG)	Glycoprotein	46 000 subunit 16 000 subunit 30 000	RIA, EIA	Gestational cancers
Carcinoembryonic antigen (CEA)	Glycoprotein	180 000	RIA, EIA	Wide range, including cancer of colon, breast, lung, pancreas and ovary
α -Fetoprotein (AFP)	Glycoprotein	70 000	RIA, EIA	Hepatoma, gestational cancers
Acid phosphatase	Glycoprotein	102 000	Spectrophotometric RIA, EIA	Prostatic cancer
Calcitonin	Peptide	3500	RIA	Medullary cancer of the thyroid, breast cancer?
β_2 -Microglobulin	Protein	11 800	RIA, EIA	Lymphoma, multiple myeloma

RIA = radioimmunoassay; EIA = enzyme-linked immunassay

기존의 암에 대한 치료법에는 외과수술로 종양 부위를 제거해내는 방법, 독성의 화학물질을 처치하는 화학요법, 방사선 요법이 있다. 외과수술은 종래의 진단법으로 확인한 종양부위를 제거해내는 것인데, 이로서는 종양세포를 완전히 제거해내기 힘들다. 화학요법이나 방사선요법은 정상세포와 암세포의 분화속도, 대사, 방사선 민감도 등의 차이를 이용해 암세포만 선택적으로 제거해 내고자 실시하지만 이들은 정상세포도 죽이며, 그 부작용이 심하다.

이상 살펴본 바와 같이 암에 대한 기존의 진단·치료방법으로는 암의 치료에 부족함이 많다. 따라서 기존의 방법의 한계를 넘을 수 있는 또 다른 진단·치료방법의 개발이 절실한 상태이다.

최근 암에 대한 연구의 대부분은 좀 더 효과적인 암의 진단과 치료를 위한 것이며, 이들은 주로 생물학적 반응을 이용한다.

암 세포는 정상적인 성장제한을 받지 않고 무한정 성장하는 특성을 가지며, 이러한 특성은 외부환경과의 경계를 이루고 정보전달 체계가 집중되어 있는 세포표면의 변화와 깊은 관계를 갖는다. 따라서 종양세포면의 변화에 대한 연구가 많이 되고 있으며, 이는 곧 종양세포 특이 항원의 발현에 관한 것이다. 즉, 정상세포에서는 발현되지 않던 어떤 생체고분자가 종양세포에 발현되면 생체에서 비자기로 인지하기 때문에 종양 특이 항원이라 한다⁽³⁾.

종양 특이 항원을 찾기 위해서는 종양세포를 마우스에 면역화하여 종양 특이 항원에 대한 단일클론 항체를 찾는 방법을 이용한다. 이런 식으로 밝혀진 종양 특이 항원들은 매우 다양하며, 가장 잘 연구된 melanoma의 경우 40여개의 다른 표면 항원들이 확인되었다(표 2).

Melanoma의 종양세포 표면 항원들은 몇가지 범주로 구분할 수 있는데 MHC 분자, 성장인자 수용체, 양이온 결합단백질, 고분자량의 세포외 기질 결합 단백질, ganglioside 등이다. 이들 중 상당수는 여러 다른 종류의 정상세포에서도 발현되는 것들이고 몇가지는 종양세포에만 특이적으로 나타난다. 어떤 melanoma 표면항원은 생체 면역체계를 자극하여 항체를 생성시킨다. 하지만 이들이 종양에 대한 면역반응에 어느 정도의 역할을 하는지는 알 수 없다. 종양표면 항원에 대한 단일클론 항체를 생산하면 세가지 중요한 목적으로 이용할 수 있다. 첫째, 종양발전에 따른 표면항원 발

2. Melanoma-associated Antigen

Category	Example	Biochemical Characteristics	Significant Features
High molecular weight substrate, interacting antigens	Chondroitin sulfate proteoglycan	> 400 kD; 250 kD polypeptide core	Expressed on membrane spikes; involved in intercellular adhesion, and matrix attachment; highly immunogenic
	Melanoma-associated cellular adhesion molecule	105 and 130 kD	Role in matrix adhesion
	Placental membrane antigen	120 and 94 kD	Role in matrix adhesion
	High molecular weight proteins with ganglioside-like distribution pattern	260 kD	Role in matrix adhesion; highly specific to melanomas
Gangliosides	GD2 9-O-acetylated GD3 GD3 GM2	Gangliosides	Expressed in brain and tumors of neural crest origin only; implicated in cell adhesion; GD2 and GD3 expression characteristic of advanced or metastatic lesions; highly immunogenic
Growth factor receptors	Epidermal growth factor receptor (EGF-R) Nerve growth factor receptor (NGF-R) Insulin growth factor receptor Platelet-derived growth factor receptor (PDGF-R) Transforming growth factor β receptor (TGF- β -R)		Expressed on advanced tumors; EGF is mitogenic for melanoma cells <i>in vitro</i> Expressed on all cultured melanoma cells
Cation transport and binding proteins	Melanotransferrin	97 kD monomeric sialoglycoprotein; related to transferrin	Expressed on all cultured melanoma cells; highly immunogenic
	Calcium-binding S-100	21 kD highly acidic cytoplasmic protein	Member of calcium-binding protein family; expressed by neural crest-derived tumors and normal tissues; widely used for immunohistochemical diagnosis of nonpigmented melanomas.
Class II MHC	HLA-DR		Expressed on many primary tumor explants; no correlation with behavior <i>in vivo</i>
ICAM-1/2	—	90 kD	Ligands for LFA-1
Pigmentation-associated antigen		70-80 kD	Found in melanosomes of pigmented normal and malignant melanocytes
Differentiation antigens	Nevus antigen Gangliosides Galactocerebrosides Myelin-associated glycoprotein Others	Variable	Antigens on melanoma cells which correspond to antigens expressed on normal nevomelanocytes

Abbreviations: HLA, human leukocyte antigen; kD, kilodalton; MHC, major histocompatibility complex; GD, ganglioside; ICAM-1/2, intercellular adhesion molecule-1/2; LFA-1, leukocyte function-associated antigen-1.

현의 변화를 알고 있고 이들에 대한 단일클론 항체를 갖고 있다면 특정 항원에 대한 항체반응의 확인으로 종양발진 정도를 알 수 있다. 예를 들면 melanoma ganglioside D₂(G_{D2})는 advanced 또는 metastatic melanoma 에만 제한적으로 나타난다. 두번째로 종양표면 항원에 대한 항체는 면역진단적인 목적으로 쓰일 수 있다. 즉, 표면 조직에서 종양 특이 항원을 면역조직화학적으로 확인한 다거나 종양표면 항원이 혈액중으로 유출됨을 이용하여 혈액진단법에 이용할 수도 있다. 세번째로 종양표면 항원에 대한 항체는 면역치료법에 사용할 수 있다. 면역치료법은 종양표면 항원에 대한 항체의 처치로 생체 면역체계를 자극하여 종양세포를 제거토록 하는 방법, 면역독소를 이용하는 방법 등을 포함한다(표 3).

표 3. 항종양성항체를 이용한 면역요법의 예

Approach	Examples	Tumors	Current Status
Free antibody	Anti-Ig idiotype Anti-IL-2R Anti-ganglioside Anti-neu oncogene product	B cell lymphomas T cell lymphomas Melanoma Sarcoma	Human trials Human trials Human trials <i>In vivo</i> animal model
Ig-toxin conjugates	Ricin A-anti-CD5 Ricin A-anti-CD22 Ricin A-anti-CD19 Ricin A-anti-melanoma	T cell lymphomas B cell lymphomas B cell lymphomas Melanoma	<i>In vitro</i> Human trials <i>In vitro</i> Human trials
Ig-drug conjugates	Chlorambucil-anti-melanoma	Melanoma	Human trials
Ig-radioisotope conjugates	²¹² Bismuth-anti-Thy-1	T cells	<i>In vitro</i>
Dual-specificity heteroconjugate Ig	Anti-CD3:Anti-TAA	Sarcoma	<i>In vitro</i>
Ig-hormone heteroconjugate	Anti-CD3: Melanocyte-stimulating hormone	Melanoma	<i>In vitro</i>

Abbreviations: Ig, immunoglobulin; IL-2R, interleukin 2 receptor; TAA, tumor-associated antigen.

악성 종양 발생 과정에선 세포막의 구성성분인 ganglioside의 합성, 조성 등에 큰 변화가 생긴다. 정상 세포에는 존재하지 않거나 미량으로 존재하는 이런 ganglioside가 악성 종양의 발생 및 성장과정에서 대량 합성·축적된다. 이런 특정 ganglioside는 종양 특이 항원이라 할 수 있으며, 이들에 대한 단일 클론 항체는 종양의 진단 및 치료에 유용하게 이용할 수 있다.

Ganglioside는 glycosphingolipid의 한 종류로서 oligosaccharide 사슬에 한개 이상의 sialic acid가 존재하는 구조적 특징을 갖고 있다. Ganglioside의 기본 구조는 G_{M1} 으로, 또 다른 sialic acid가 첨가됨에 따라 G_{D1a} , G_{D1b} , G_{T1b} 등이 된다(그림 1). Ganglioside는 모든 진핵세포의 일반적인 세

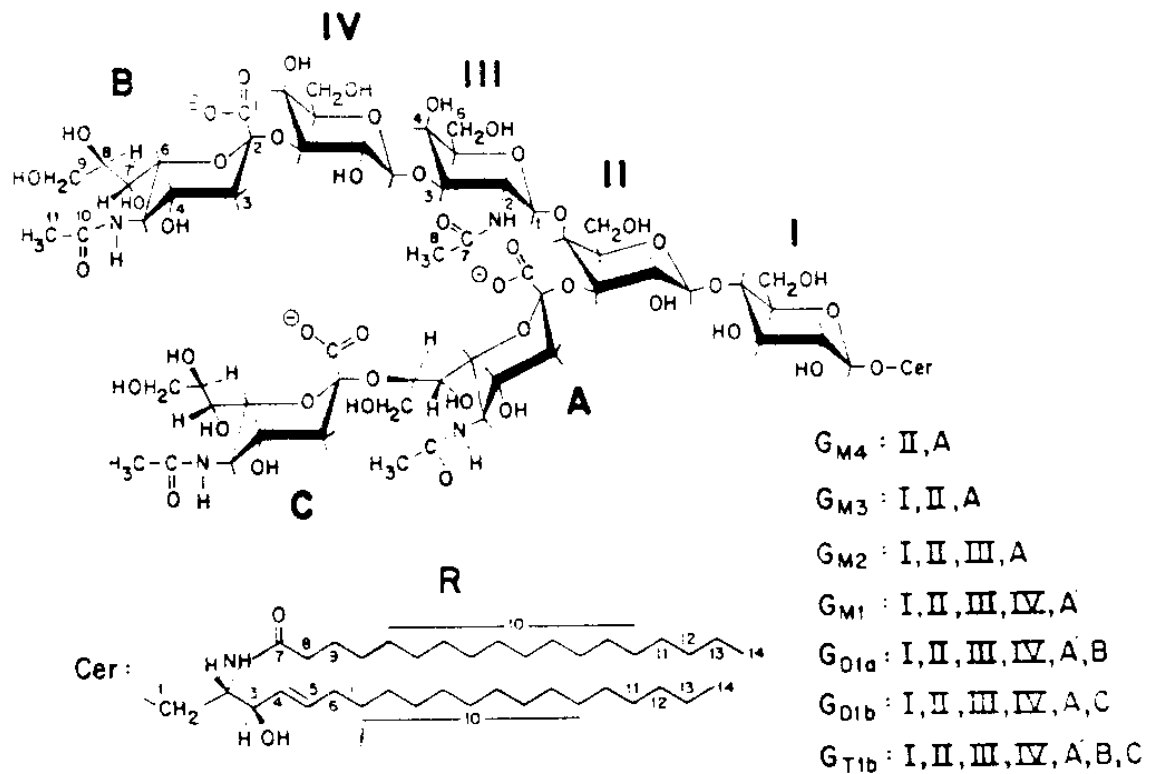


그림 1. Ganglioside들의 구조. 모든 ganglioside는 ceramide(R)과 hexopyranoside 잔기들(I, II, III, IV), 그리고 하나 이상의 sialic acid(A, B, C)를 포함한다.

포막 구성성분으로서, 오래전부터 세포 특이 항원으로 알려진 몇가지 경우를 제외하고는 그의 실질적인 기능으로 명확히 입증된 것은 없다. 하지만 호르몬, 세균 독소, 바이러스 독소의 수용체로 작용하는 경우들, 미생물의 감염, 세포간 인지현상에 관여하는 몇가지 경우들에 대한 보고가 있다.

최초의 종양 특이 ganglioside 항원은 1959년 Rapport⁽⁴⁾ 등에 의해 발견된 LacCer(cytolipin H)이다. LacCer는 대부분의 포유동물 세포의 정상적인 구성성분인데, 여러 종류의 인체 종양세포에서 그 함량이 매우 증가하였다. Monosialosylactosylceramide(G_{M3})는 포유동물의 신경외 세포의 중요 구성성분인데, 이 또한 종양 세포에서 그 함량이 상당히 매우 증가하였다. Diasialosylactosylceramide(G_{D3})는 신경세포에 비교적 많이 존재하며 비신경세포에는 전혀 존재하지 않는데, 인체 melanoma^(5,6,7,8), 인체 colorectal carcinoma⁽⁹⁾, 인체 pancreatic carcinoma⁽⁹⁾, 인체 leukemic lymphoma^(10,11,12,13), 쥐 lung carcinoma⁽¹⁴⁾, 마우스 EL-4 lymphoma⁽¹⁵⁾, 그리고 인체 뇌종양⁽¹⁶⁾에서 함량이 매우 증가하였다. 1985년 Nguyen⁽¹⁷⁾ 등은 overpressed thin layer chromatography(OPTLC)를 이용하여 chronic lymphocytic leukemia 환자세포의 ganglioside 분포를 분석하였다. 그 결과 정상적인 lymphocyte에는 총 ganglioside 중 G_{M3} , G_{M2} , G_{M1} , G_{D1} 이 각각 37.7%, 6.1%, 7.5%, 19.6% 존재하였는데, 종양세포에는 G_{M3} 함량이 2배 이상 증가된 82.5%였으며 정상세포에는 존재하지 않던 G_{D3} 가 5.5%를 차지하였고 G_{M2} , G_{M1} , G_{D1} 은

그 함유량이 정상세포에 비해 감소하거나 거의 변화가 없었다. 이 사실로 CLL 종양세포의 ganglioside 항원은 G_{D3} 임을 알 수 있었다. 1985년 Brodin⁽¹⁸⁾은 마우스 단일클론 항체 IgM4.2가 인체 melanoma 세포의 종양특이 ganglioside G_{D3} 에 대한 항체임을 보고하였다. 1986년 Thurin⁽¹⁹⁾ 등에 의해서 TLC와 단일클론 항체 ME 361을 이용하여 인체 melanoma에 다량 존재하는 종양 특이 ganglioside 항원이 G_{D2} 임을 밝혔다. 1983년에는 Fuchs 등이 단일클론 항체를 이용하여 Fucosyl- G_{M1} 가 human lung carcinoma의 종양 특이 항원임을 확인하였다⁽²⁰⁾. 현재까지 밝혀진 종양특이 ganglioside 항원은 표 4에 정리되어 있다. Blood group substance들도 종양 특이 항원으로 작용하는데, 종양발생시 이들의 함량이 매우 증가하는 양상을 보인다. 각종 종양에서 밝혀진 특이 fucoglycolipid는 표 5에 표시하였다.

본 연구에서는 우리나라에서 발생률이 높은 간암에 대한 진단, 치료의 목적으로 간암 특이 ganglioside 항원을 찾고자 한다. 실험동물인 랫트에 각종 화학 발암제를 투여하여 간암을 유발시킨 후 간암세포에서의 ganglioside 분포를 분석하여 간암특이 ganglioside 항원을 동정하고 인체간암조직, 간암환자혈청의 ganglioside를 분석하여 간암특이 ganglioside 항원을 동정하여 이에 대한 단일클론 항체를 생산함으로써 종래의 간암 진단과는 다른 새로운 진단법을 개발하고자 한다. 또한 항종양성 항체를 생산함으로써 간암 치료제 개발의 기본 연구를 수행하고자 한다.

II 4. TUMOR-ASSOCIATED GLYCOSPHINGOLIPIDS

No.	Chemical structure	IUPAC-IUB symbols	Svennerholm abbreviation	Tumors
1	Gal β 1-4Glc β 1-Cer	LacCer		various human tumors
2	NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	II ³ NeuAc-LacCer	G _{M3}	various human and animal tumors
3	NeuAc α 2-8NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	II ³ (NeuAc) ₂ -LacCer	G _{D3}	human melanoma human colorectal & pancreatic carcinomas human leukemic lymphocytes murine lung carcinoma mouse EL-4 lymphoma human brain tumors
4	NeuGc α 2-8NeuGc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	II ³ NeuGc ₂ -LacCer	G _{D3}	bovine leukemic lymphocytes
5	GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer	Gg ₃ Cer	asialo- G _{M2}	mouse EL-4 lymphoma E 5148 lymphoma 3T3KIMSV cells mouse ascite hepatoma mouse ascite Erlich carcinoma cell lines from patients with Hodgkin's disease
6	GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer ↑ ³ 2 α NeuAc or NeuGc	II ³ NeuAc-Gg ₃ Cer	G _{M2}	mouse ascite Erlich carcinoma mouse EL-4 lymphoma human lung carcinoma human melanoma
7	GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer ↑ ³ 2 α NeuAc ₈ -2 α NeuAc	II ³ NeuAc ₂ -Gg ₃ Cer	G _{D2}	human brain tumors mouse EL-4 lymphoma human melanoma
8	Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer	Gg ₄ Cer	asialo- G _{M1}	human acute lymphoblastic leukemia
9	Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer ↑ ³ 2 α NeuAc	IV ³ NeuAc-Gg ₄ Cer	G _{M1b}	rat hepatoma AH 7974F
10	Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer ↑ ³ ↑ ⁶ 2NeuAc 2 α NeuAc	IV ³ NeuAcIII ⁶ NeuAc-Gg ₄ Cer		rat hepatoma AH 7974F
11	Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer	Gb ₃ Cer		Burkitt lymphoma
12	GalNAc β 1-3Gal α 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	iGb ₄ Cer		rat lymphosarcoma
13	GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer ↑ ³ 2 α NeuAc	IV ³ NeuAc-Gb ₄ Cer		human teratocarcinoma HT-E
14	GalNAc α 1-3GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer	Gb ₅ Cer		human lung carcinoma human biliary carcinoma
15	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	nLc ₄ Cer		hamster NILpy cells various tumor cells

No.	Chemical structure	IUPAC-IUB symbols	Svennerholm abbreviation	Tumors
16	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer \circ \uparrow 2 α NeuAc	IV ⁶ NeuAc-nLc ₄ Cer		human colonic adenocarcinoma human pancreatic adenocarcinoma
17.	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer \uparrow 2 α NeuAc	IV ³ NeuAc-Lc ₄ Cer		human lung carcinoma
18.	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer \uparrow 2 α NeuAc2 α NeuAc or NeuGc NeuGc	IV ³ SialIII ⁶ Sia-Lc ₄ Cer		human D54MG glioma cells
19.	Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer \uparrow 2 α NeuGc NeuGc α 2-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer	IV ⁶ NeuGc-nLc ₄ Cer II ³ NeuGc-LacCer	}	H-D antigen of various human tumors
20.	GalNAc β 1-4Gal β 1-4Gal β 1-Cer \uparrow GlcNAc β 1	LcGg ₄ Cer		

표5. 종양 특이 fucoglycolipids 항원

Chemical structure	IUPAC-IUB symbols	Tumors
Fucal-Cer	FucCer	human colonic adenocarcinoma
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer 3 \uparrow 1 α Fuc	III ³ Fuc-nLc ₄ Cer	various human adenocarcinomas
Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer 2 \uparrow 1 α Fuc	IV ² Fuc-Gg ₄ Cer	rat hepatoma AH 7974F
GalNAc β 1-3Gal α 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer 1 \uparrow 1 α Fuc	IVFuc-Gb ₄ Cer	human teratocarcinoma HT-E
Gal β 1-3GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer 3 \uparrow 4 \uparrow 2 α NeuAc 1 α Fuc	IV ³ NeuAcIII ⁴ Fuc-Lc ₄ Cer	human colonic adenocarcinoma human pancreatic carcinoma
Gal β 1-3GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer 2 \uparrow 3 \uparrow 1 α Fuc 2 α NeuAc	IV ² FucII ³ NeuAc-Gg ₄ Cer	human lung carcinoma rat hepatoma
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer 3 \uparrow 3 \uparrow 2 α NeuAc 1 α Fuc	IV ³ NeuAcIII ³ Fuc-nLc ₃ Cer	human pancreatic adenocarcinoma rat hepatoma
Gal α 1-3Gal β 1-4GalNAc β 1-4Gal β 1-4Glc β 1-Cer 1 \uparrow 2 1 \uparrow 3 1 α Fuc 2 α NeuAc		
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc-Cer 1 \uparrow 6 1 \uparrow 3 2 α NeuAc 1 α Fuc	VI ⁶ NeuAcIII ³ Fuc-nLc ₃ Cer	human colonic and liver carcinomas
Gal β 1-4GlcNAc β 1-3Gal β 1-4Glc β 1-Cer 1 \uparrow 2 1 \uparrow 3 1 α Fuc 1 α Fuc	IV ² III ³ Fuc ₂ -nLc ₄ Cer	human colonic carcinoma
Gal β 1-(4GlcNAc β 1-3Gal β) ₂ -4Glc β 1-Cer 1 \uparrow 3 1 α Fuc	V ³ III ³ Fuc ₂ -nLc ₄ Cer	human colonic and liver adenocarcinomas
Gal β 1-(4GlcNAc β 1-3Gal β) ₂ -4Glc β 1-Cer 1 \uparrow 3 1 \uparrow 3 2 α NeuAc 1 α Fuc	VI ³ NeuAcV ³ III ³ Fuc ₂ -nLc ₄ Cer	human colonic adenocarcinoma
Gal β 1-(4GlcNAc β 1-3Gal β) ₃ -4Glc β 1-Cer 1 \uparrow 3 1 α Fuc	VII ³ V ³ III ³ Fuc ₃ -nLc ₄ Cer	human colonic and liver adenocarcinomas

제 2 장 실험재료 및 방법

제 1 절 실험재료

1. 실험동물

본 연구에 사용한 Sprague-Dawley 랫트와 BALB/c 마우스는 한국과학기술원 부설 유전공학연구소 실험동물자원실에서 분양 받았다.

2. 인체 간조직, 혈청

본 연구에서 사용한 인체간암조직, 간암환자혈청과 정상 간조직은 서울대학교 의과대학 생화학교실 및 전남대학교 의과대학 외과학교실에서 제공받았다. 정상인 혈청은 대전 적십자혈액원에서 구입하였다.

3. 시약

간암 유발을 위해 사용한 화학발암제인 3'-methyl-4-dimethyl-aminobenzene(3' MeDAB)은 TCI(Tokyo, Japan)에서 구입하였고 2-acetylaminofluorene(2-AAF), diethylnitrosoamine(DENA) 및 aflatoxin B₁(AFB₁)은 Sigma(USA)에서, 2-methylaminoazobenzene(2-MeDAB)은 Janssen(Belgium)에서 구입하였다. Sephadex G-50은 Pharmacia 제품을 사용하였다.

HPTLC Plate 는 Merck사(German)의 nanoTLC plate silica gel 60 F254 precoated 를 사용하였다. Ganglioside standard 들, liposome 조제를 위한 DMPC, cholesterol, lipid A, 면역 염색법에 사용한 Extra Avidin Biotin Staing kit 는 모두 Sigma 에서 구입하였다. 단일클론항체생산에 필요한 RPMI1640, HAT, PEG 4000, FBS 는 모두 Gibco 제품을 사용하였다.

제 2 절 실험 방법

1. 간암유발

체중 약 80-100 g 의 웅성 및 자성 Sprague-Dawley 랫트에 게 DENA(diethylnitrosoamine) 을 백서 kg 당 7 mg 씩 식수에 첨가하여 투여하였고 퓨리나 사료로 사육하였다. DENA 투여한 랫트를 규칙적으로 희생시켜 간을 채취하였고 간암 발생여부는 간 조직을 10% formalin 용액으로 고정시킨후 hematoxylin-eosin 염색을 하여 확인하였다.

2. Ganglioside 의 분리, 정제

조직으로부터 총 지질을 추출⁽²¹⁾하기 위하여 조직 1~2 g 에 chloroform:methanol 용액 (1:1, v/v)⁽²²⁾을 10ml/g of tissue 씩 첨가해 실온에서 균질화시킨 후 4 ℃에서 2~3 시간 rotary shaking하여 4 ℃에서 10 분간 750 × g 로 원심분리했다.

상층액은 모아두고 침전물에서 다시 한번 지질을 추출했다.

상층액을 앞서 얻은 상층액과 합하여 rotary evaporator로 1/4 volume 까지 건조시킨 후, -20 ℃에 하룻밤 방치하였다가 원심분리하여 불용성 물질을 제거 한 후 rotary evaporator로 유기용매를 완전히 제거했다.

건조된 총 지질 추출물로부터 중성지질과 인지질을 제거하기 위해 ⁽²³⁾ diisopropylether와 1-butanol 혼합용액 (DIPE:1-butanol, 6:4, v/v)으로 용해하는데 (10ml/g of tissue), 충분히 용해되도록 sonication 을 하거나 vortexing 을 했다. 여기에 50 mM NaCl 용액을 5 ml/g of tissue 비율로 첨가하여 완전히 용해될 때까지 sonication, vortexing 을 반복한 후 750 × g 로 4 ℃에서 10 분간 원심분리하여 상층액은 제거하고 ganglioside 를 포함하고 있는 하층액을 얻었다. DIPE:butanol(6:4, v/v) 용액으로 중성지질, 인지질을 추출해 내는 과정은 두세번 반복하여 주며, 최종적으로 얻는 수용액층에 소량 남아 있는 유기용매를 완전히 제거하기 위하여 질소 가스로 bubbling 을 했다. 이후 냉동건조하고 건조된 시료는 소량의 증류수(약 2 ml)에 녹여 2 분간 sonication 한 후 Sephadex G-50 column chromatography 를 실시하여 염과 불순물을 제거했다⁽²⁴⁾. 용출용매로는 증류수를 사용하며 용출분획은 206 nm에서 흡광도를 측정했다. ganglioside 를 포함하는 void volume peak 부분을 모아 냉동 건조하여, 소량의 Chloroform/methanol (1:1) 용액에 녹인 후 750 × g 로 원심분리하여 불용성 물질을 제거하여 ganglioside 를 정제했다.

3. Ganglioside 의 정량

정제한 ganglioside를 정량하기 위해 periodate-resorcinol assay 를 실시했다^{(25) (26)}. 정제한 ganglioside가 녹아 있는 CM 용액을 소량 취하여 질소가스로 건조시킨 후 500 μ l의 증류수에 녹여 시료로 사용하며, standard ganglioside 용액 (1mg /4ml dd-H₂O)은 각각 0, 40, 80, 120, 160, 200, 280, 400 μ l씩 취하고 각각 증류수를 넣어 500 μ l가 되도록 했다. 이렇게 준비한 시료와 standard에 0.04 M periodic acid를 0.1ml 넣고 vortex 한 후 35 분간 ice bath 에 방치했다. 다시 resorcinol stock solution(4g/200ml dd-H₂O) 30ml, 32% HCl 53 ml, dd-H₂O 17ml 및 25 μ moles cupric sulfate를 혼합한 resorcinol reagent 1.25 ml를 넣고 vortex 한 후 5분간 ice bath 에 두었다가 15분간 100 $^{\circ}$ C water bath 에서 가열한 후 찬물로 식혔다. 여기에 1.25 ml 의 95 % tert-butyl alcohol을 첨가하고 single phase 가 되도록 vortex 한 후 37 $^{\circ}$ C water bath 에 3분간 두어 색을 안정화시키고 실온으로 식혀 630 nm 에서 흡광도를 측정했다.

4. 간암 특이 ganglioside 항원의 동정

전개용매 (chloroform:methanol:0.25 % aqueous CaCl₂, 55:45:10, v/v/v)로 chamber 를 3시간 이상 포화시켜두며, HPTLC plate 는 95 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 preactivation 시켰다. 정제한 ganglioside 가 녹아 있는 CM 용액 소량과 ganglioside

standard 용액을 각각 취하여 HPTLC plate 하단으로부터 1.5cm 지점에 spot 하면서 찬 공기로 건조시켰다. plate를 전개시킨 후 찬 공기로 말리고, 100 °C oven에 15초가량 넣었다가 발색용액 resorcinol-HCl reagent(resorcinol stock solution(4g/200 ml dd-H₂O) 5ml, 32% HCl 40 ml, 0.1 M cupric sulphate 0.25 ml, H₂O 9.75 ml)을 spray했다. spray한 plate 위에 유리판을 덮고 clamp로 조인 후 110 °C에서 20분간 가열했다^(27,28). 2차원 HPTLC 실시시에는 1차 전개용매인 chloroform : methanol : 0.25% CaCl₂ · 2H₂O(50:40:10, v/v/v)로 전개시키고 plate를 꺼내 완전히 말린후 1차전개와 수직방향으로 2차전개 시켰다. 2차전개시 전개용매는 chloroform:methanol:2.5 M ammonia(50:40:10, v/v/v)를 사용하였다. 종양특이 ganglioside 항원의 분리·정제 및 동정의 실험순서를 그림 2에 총괄적으로 표시하였다.

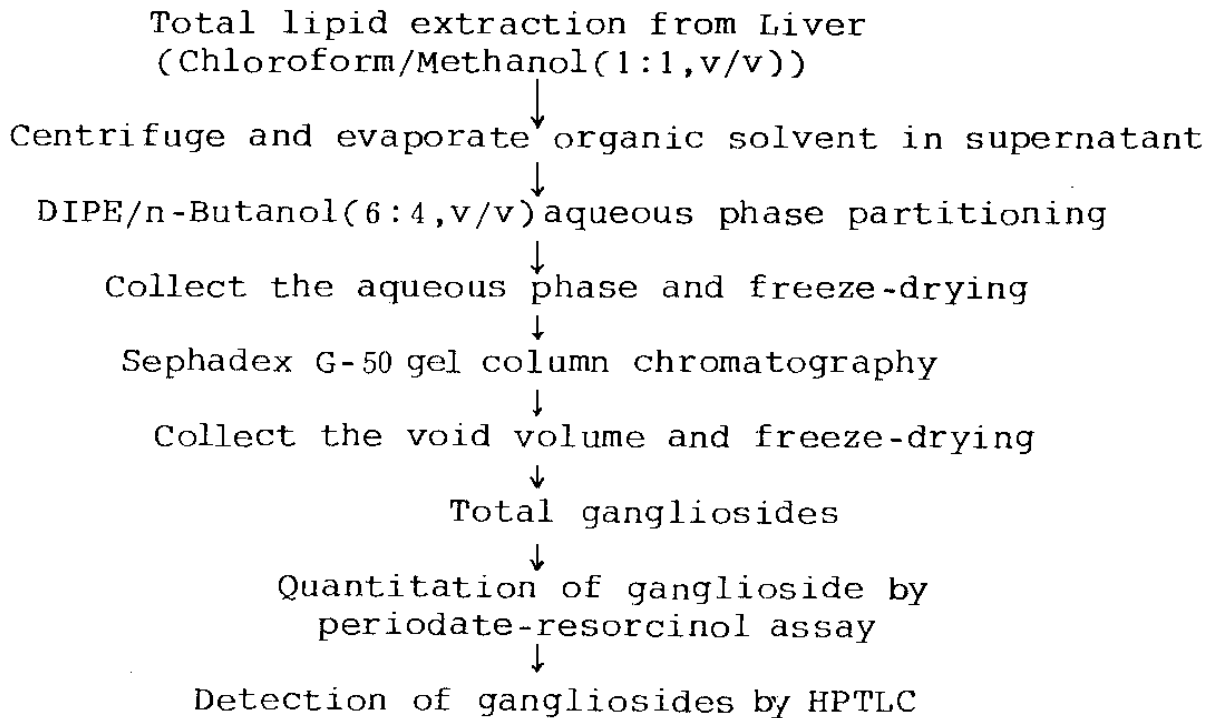


그림 2. 종양 특이 ganglioside 항원의 분리·정제 및 동정 순서도

5. 종양특이 ganglioside항원에 대한 단일클론항체생산

① 면역원으로 사용한 liposome 의 제조

liposome 은 Schuster 등의 방법⁽²⁹⁾을 약간 변형하여 제조하였다. 인체 간암조직에서 분리·정제한 ganglioside(600 µg), lipid A(500 µg), dimyristyl phosphatidylcholine(34mg), cholesterol(14 mg), dicetylphosphate(3mg)을 소량의 chloroform에 녹였다. Rotary evaporator로 chloroform을 증발시키며 round bottom flask 벽면에 얇은 film을 형성시키고, solvent가 완전히 증발한 후 여기에 PBS 5 ml을 첨가하여 swelling시켰다. lipid suspension을 tip-type sonicator를 이용하여 liposome을 만든 후 titanium 조각을 제거하기 위해 원심분리시켰다. G_{M3}, G_{D1a}, G_{M1}를 포함하는 liposome도 이와 동일한 방법으로 제조하였다.

② 단일클론항체생산

생후 5 - 6 주된 BALB/c 마우스에 ganglioside를 포함하는 liposome을 1회에 250 µl(50 µg의 ganglioside 포함)씩 2주 간격으로 3번씩 주사하였다. 주사한 후 1주일 뒤에 꼬리에서 약간량의 피를 채취해서 ELISA 방법으로 항체생성여부를 확인하였다. 마지막 주사 3일후에 spleen을 적출하여 spleen cell을 분리하고 Sp 2/0 myeloma cell과 polyethyleneglycol을 이용하여 세포융합⁽³⁰⁾시켰다. 세포융합후 세포들은 96 well-tissue

culture plate 에 plating 하고 HAT 과 15% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 RPMI 1640 배지에서 선별배양하였다. 세포융합 7일~10일후에 융합세포의 배지의 항체유무여부를 ELISA 로 확인하였다. 양성반응을 나타내는 세포는 HT와 15% FBS 를 포함하는 RPMI 1640 배지로 24-well plate 에서 배양하였다. 배양된 세포의 수는 tryphan blue 배출방법으로 측정하였으며 plate당 1/2 cell이 되게 96-well plate 에 plating 하여 단일클론 항체를 선별한다. 이와같이 하여 융합세포로부터 얻은 단일클론항체의 subtype 은 isotyping kit 를 이용하여 indirect ELISA 방법에 의해 결정한다.

6. ELISA⁽³¹⁾

ganglioside 에 대한 항체생성여부를 확인하기 위해 Ishihara 등의 ELISA방법을 따랐다. 정제된 ganglioside는 1mg/ml 의 농도로 chloroform: methanol(1:1, v/v)에 녹여 stock solution을 준비해 놓고 100 ng ganglioside/ml 농도로 ethanol 에 희석하여 96 well microtiter plate 에 50 μ l/well 씩 나눠 넣었다. 56 $^{\circ}$ C incubator 에서 1시간 방치하여 유기용매를 날리고 1% BSA 포함하는 PBS 용액을 100 μ l 씩 첨가해서 상온에서 2시간 방치하여 nonspecific binding 을 blocking 하였다. 마우스 antiserum 이나 hybridoma culture supernatant 를 50 μ l 씩 첨가하고 2시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 1% BSA를 포함하는 PBS 용액으로 3번 씻어준 후에 1% BSA/PBS 용액으

로 1/2000 희석한 horseradish peroxidase labeled antimouse immunoglobulin 용액을 50 μ l 씩 첨가하였다. 1시간 동안 37 $^{\circ}$ C에서 반응시킨후 1% BSA/PBS 용액으로 3번 씻어주고 50 μ l OPD 기질용액을 첨가했다. OPD 기질용액은 phosphate citrate 완충용액 (pH 5.0) 15 ml, O-phenylene diamine(OPD) 6 mg, 30% H₂O₂ 용액 6 μ l 를 혼합하여 조제하였다. 기질용액을 첨가한 후 37 $^{\circ}$ C에서 15분간 반응시키고 2.5 M H₂SO₄ 용액을 50 μ l씩 첨가하여 반응을 정지시켰다. 492 nm 에서의 흡광도는 ELISA autoreader 도 측정하였다.

7. ganglioside 항원의 TLC/면역염색법

ganglioside 를 pmole 수준에서 확인하기 위해서 TLC/면역염색법을 Higashi⁽³²⁾ 등의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. ganglioside 를 TLC 한 후에 완전히 건조시킨다. 비특이성 항체결합을 방지하기 위해 TLC plate 를 용액 A (1% egg albumin, 1% Polyvinylpyrrolidone(PVP), 0.02% sodium azide 를 포함하는 PBS)에 담귀 4 $^{\circ}$ C에서 하룻밤 방치했다. ganglioside 에 대한 항체를 3% PVP 를 포함하는 PBS 에 적당한 농도로 희석하여 준비하고 이 용액에 TLC plate 를 담귀 30 $^{\circ}$ C에서 2시간 방치했다. Plate를 0.1% Tween 20를 포함하는 PBS와 PBS에 2분 간격으로 바꿔 담그고 흔들어주면서 ganglioside와 결합하지 않은 항체를 씻어냈다. 항체의 비특이성결합을 방지하기 위해 용액 A에 다시 한번 plate 를 담그고 30분동안 방치했다.

Biotinylated Affinity purified antibody to Mouse Immunoglobulin을 3% PVP 포함하는 PBS 에 적당한 농도로 희석하여 plate 을 담귀 30 ℃에서 1시간 동안 방치했다. plate 를 PBS 로 3 - 5 번 씻어내고 Extra Avidin Peroxidase 를 적당한 농도로 희석한 용액에 담귀 1시간 동안 30 ℃에서 방치했다.

4-chloro-1-naphtol 을 기질로 사용하여 peroxidase 반응을 상온에서 15분간 시키고 증류수로 씻어 반응을 정지시킨 후 면역염색된 부분을 확인하였다.

제 3 장 결 과 및 고 찰

1. 랫트에서의 간암유발과 간암특이 ganglioside 항원의 동정
 랫트에 화학발암제인 DENA(diethylnitrosoamine)을 투여하여 간암을 유발시킨 후 간암세포로부터 ganglioside를 정제하고 정량, 정성 분석을 하였다. 간세포 1g 당 추출한 ganglioside의 함량은 정상 간세포에서 200 μ g정도였고, 간암이 되었을 경우에는 2 - 3배 증가하였다.

 DENA로 간암이 유발된 경우 ganglioside 조성을 보면 (그림 1), G_{D1a} 와 G_{M1} 이 DENA 투여일수 경과에 따라 증가하는 양상을 보였고, G_{D1b} , G_{T1b} 등의 양은 상대적 감소를 보인다. ganglioside 발현의 복잡한 양상을 좀더 자세히 확인하기 위해 2차원 HPTLC를 실시하였다 (그림 2). 정상인 a의 경우에 비해 간암세포인 경우 (b, c, d) G_{M3} 부분이 감소하고 G_{D1a} 가 증가하였음을 확인할 수 있고, 그 외에도 정상에선 발현되지 않던 여러 ganglioside 들이 소량씩 발현되고 있음을 알 수 있다.

 2차원도의 실험결과에 의하면 DENA 이외에 2-MeDAB/DENA를 투여한 경우 G_{D1a} 의 양은 증가하고 G_{M1} 은 감소하는 경향이 있음을 확인하였고, 3'-MeDAB을 투여한 경우 G_{D1a} 가 가장 뚜렷한 변화를 보였다. 이상의 실험결과들로 보아 랫트에 화학적 발암제를 투여해 간암을 유발시킨 경우 G_{D1a} 의 양의 변화가 가장 주목할만하다.



Fig.1 HPTLC of gangliosides derived from liver tissues of rat treated with DENA.
 S: standards, 1.gangliosides from rat normal liver 2:gangliosides from liver of rat treated with DENA(134 days after the treatment of DENA), 3 :179 days after(tumor), 4 : 179 days after (nontumor)

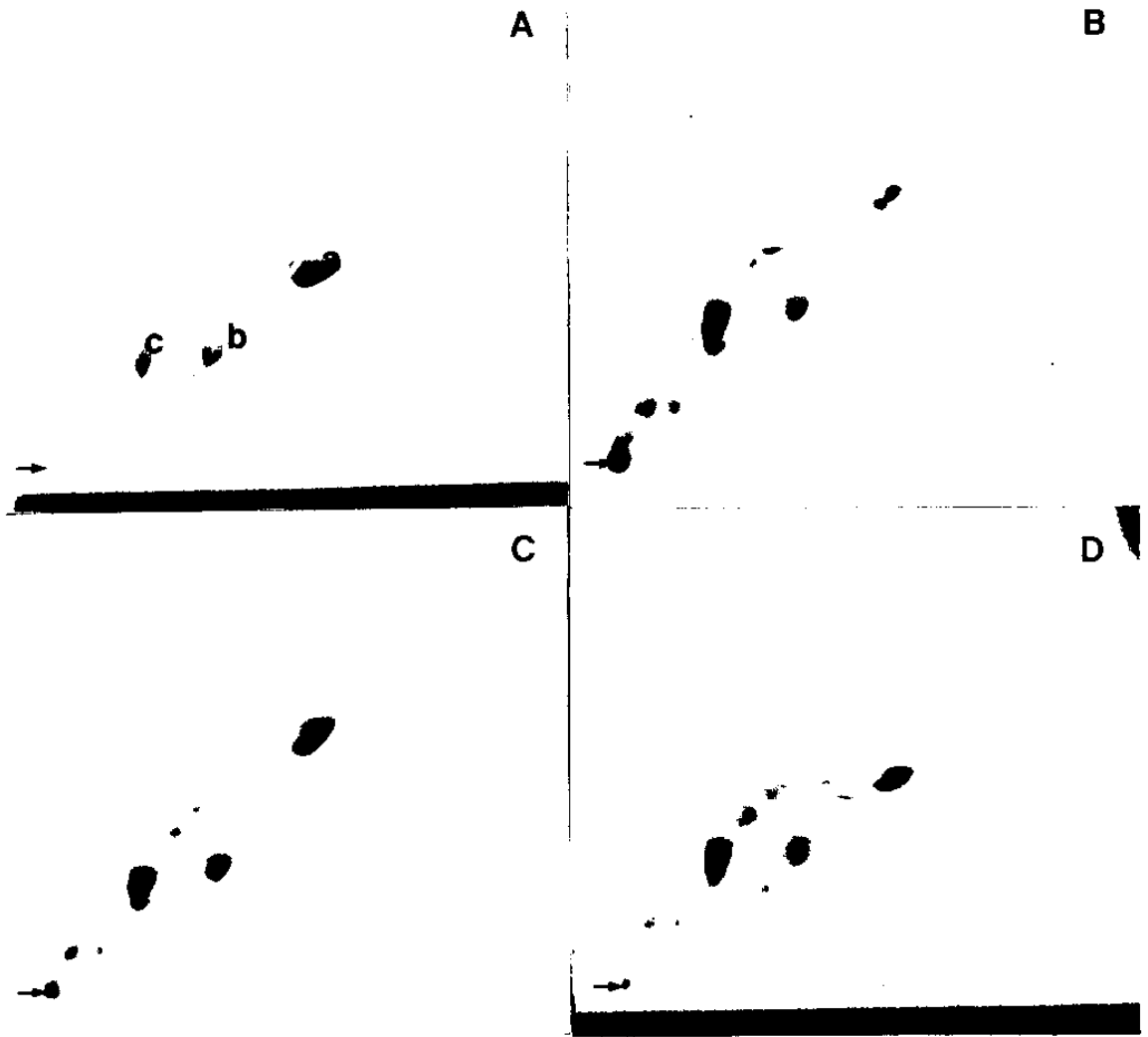


Fig.2 Two dimensional HPTLC of gangliosides from rat normal liver(A) and DENA-induced hepatoma(B,C,D)
 a:G_{M3}, b:G_{M1}, c :G_{D1a}

2. 인체의 간암특이 ganglioside 항원의 동정

인체 간암조직과 간암조직 주변부위에 정상적으로 보이는 조직들을 채취하여 ganglioside 를 분리, 정제하여 분석하였다. 간암 부위의 ganglioside 의 양은 $309.5 - 228.4 \mu\text{g/g liver}$ 이고, 간암조직 주변부위의 ganglioside 의 양은 $239.5 - 178.5 \mu\text{g/g liver}$ 정도로 약간의 차이를 보인다. 이들의 HPTLC 패턴을 보면 간암인 경우 주변 조직보다 G_{M3} 의 양이 감소하였고, G_{M3} 보다 sialic acid 가 많이 결합한 형태의 ganglioside 의 양은 증가하였다(그림 3,4). 정상 간의 ganglioside 는 90% 이상이 G_{M3} 이며, 소량의 다른 ganglioside 들을 2 - 3개 관찰할 수 있다(그림 5). 이상의 실험 결과들로 부터 간암 조직에는 정상 조직에 발현되지 않던 di-, tri- 혹은 그 이상의 sialic acid 를 포함하는 ganglioside 가 다량 발현되며, 외형상 종양의 특징을 보이기도 전에 ganglioside 의 패턴은 이미 종양세포의 것과 유사하게 나타남을 알 수 있다.

Ye⁽³³⁾ 등이 인체 간암조직의 ganglioside 를 분리, 정제, 분석한 실험결과에서도 이와 비슷한 양상이 나타났다. 그들은 그와 더불어 DENA 투여한 랫트의 간암발생 과정에 수반되는 ganglioside 패턴변화와 종양유전자로 전이된 NIH 3T3 세포의 ganglioside 패턴을 비교하여 G_{D3} 의 양의 증가가 공통된 변화라고 지적하면서 이를 종양표지로 사용할 수 있다고 하였다. 본 실험에서는 랫트의 경우 G_{D3} 의 양의 변화를 확인할 수 없었고, 랫트와 인체 간조직의 ganglioside 패턴은 전혀 다르기 때문에 이러한

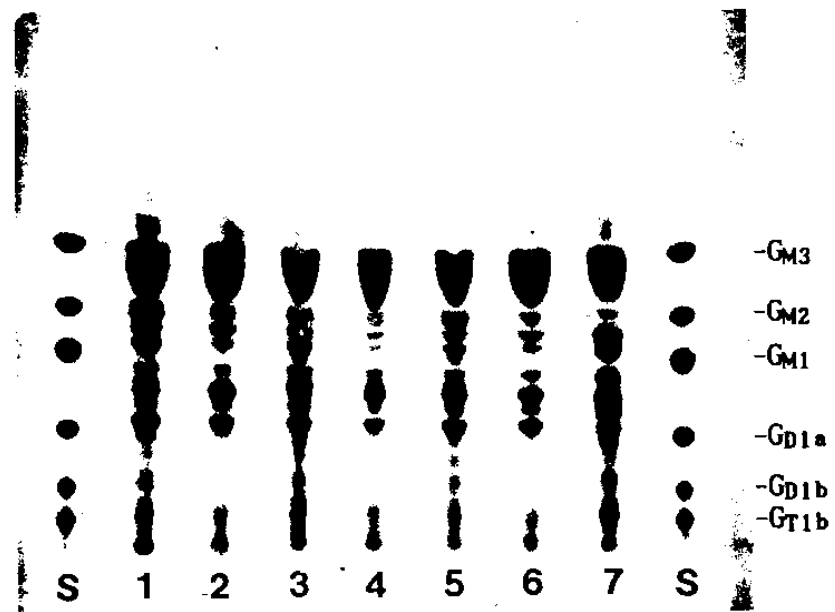


Fig.3 Ganglioside patterns of human hepatoma(1,3,5,7)
and normal-looking liver(2,4,6)

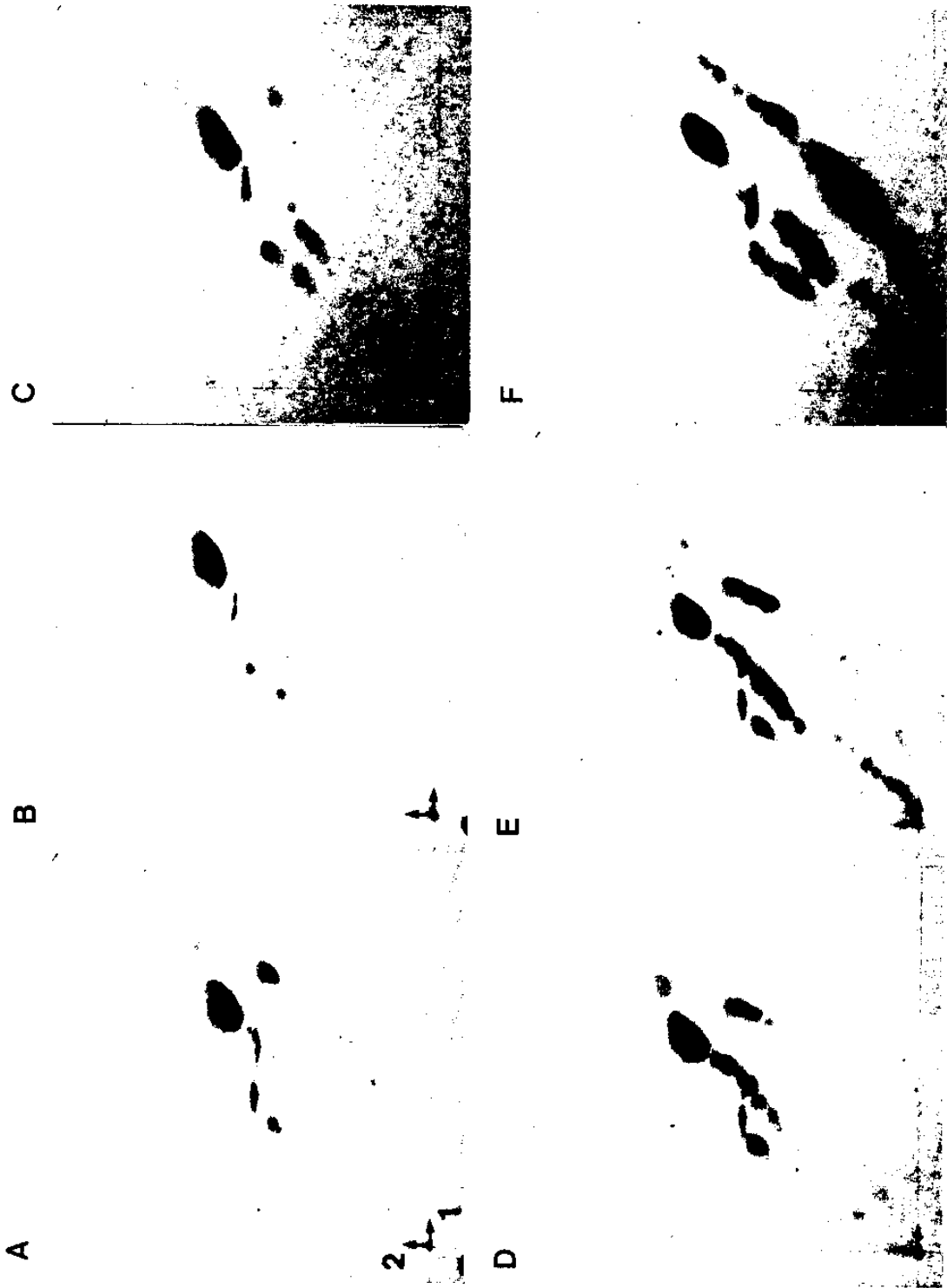


Fig. 4 Two dimensional HPTLC of gangliosides from human hepatoma(D, E, F) and normal-looking liver (A, B, C)

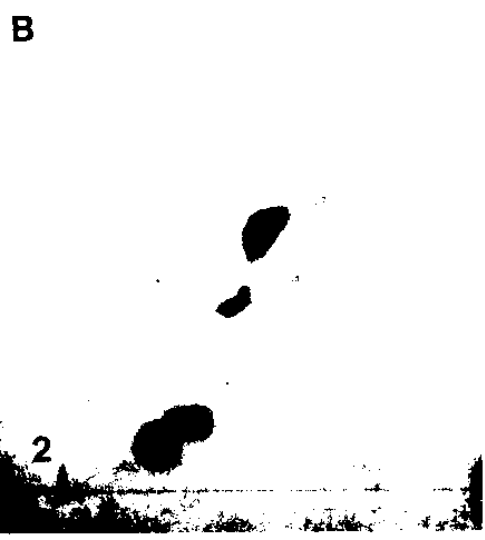
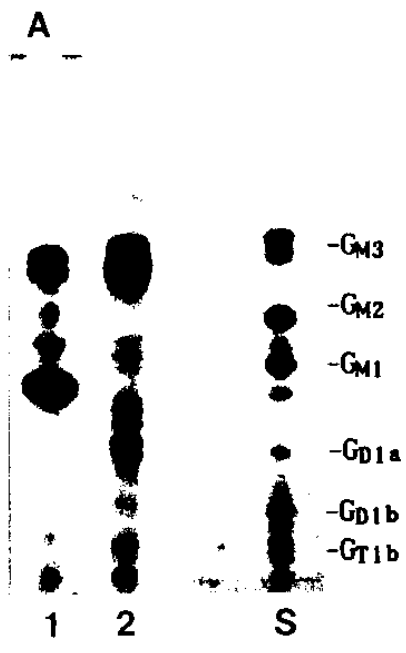


Fig.5 Ganglioside pattern of human normal liver.
 A,1:gangliosides from human normal liver.
 2:gangliosides from human hepatoma. B,two dimensional HPTLC of gangliosides from human normal liver.

형태의 비교는 부적절하다고 생각한다. 다만 랫트와 인체 간암조직의 ganglioside 패턴의 유사성을 찾는다면 정상일 때는 비교적 소수의 ganglioside 가 발현됨에 비해 (랫트의 경우 9개의 ganglioside 가 고정적으로 발현되고, 인체의 경우 G_{M3} 가 대부분임), 간암조직에선 매우 다양한 종류의 ganglioside 들이 동시에 발현됨을 알 수 있었다.

ganglioside 패턴이 정상조직인 경우와 종양조직인 경우에 차이를 나타내는 것은 ganglioside 가 세포성장, 증식, 분화 과정을 조절하는 기능을 갖고 있음을 짐작케 한다. Hiraiwa⁽³⁴⁾ 등은 hepatocellular carcinoma 로 부터 얻은 2개의 cell line 에서 정상세포에는 발현되지 않는, 산성의 sulfated glycosphingolipid 가 다량 발현됨을 확인하였다. Sulfated glycosphingolipid 가 laminin 결합능력이 있다는 보고와 관련하여 hepatoma cell line 에서의 sulfated glycosphingolipid의 다량발현은 종양세포의 cell-adhesion현상과 관계있을 것으로 생각된다.

3. 혈청에서 인체 간암특이 ganglioside 항원의 동정

종양발전과정에서 표면항원의 혈중으로 유출됨은 여러 종류의 종양에서 확인되었고, 최근엔 small cell lung cancer associated ganglioside 인 Fuc G_{M1} 을 혈청중에서 면역화학적으로 확인⁽³⁵⁾한 결과가 있다.

인체 간암조직의 ganglioside 패턴을 분석한 결과, 간암발

전과정에서 정상간에선 발현되지 않던 여러 종류의 ganglioside 들이 발현됨을 확인하였다. 이들중 진단용 간암특이 ganglioside 항원으로 사용할 수 있는 것을 찾기 위해서 간암환자혈청, 정상인 혈청의 ganglioside 패턴을 비교하였다.

정상인 혈청과 간암환자 혈청의 ganglioside 패턴은 거의 같으나 몇몇 ganglioside 의 양이 다소 변했는데, G_{M3} 와 G_{M1} 바로 아래쪽의 ganglioside(G_{D3})가 간암환자 혈청에서 약간 증가하였다. 간암환자의 혈청에서 보이는 G_{M1} 아래쪽의 ganglioside(G_{D3})는 간암조직에서도 확인할 수 있었다. G_{M3} 는 정상간의 주된 ganglioside 도 간암에선 그 함량이 감소하는데, 혈청중에서는 정상일 때에 비해 간암의 경우 증가하는 양상을 보였다.

혈청중의 ganglioside 를 정제, 분석할 때 간암환자의 혈청을 충분량 확보할 수 없어서 어려움이 있었는데 ganglioside 에 대한 단일클론항체를 갖고 있다면 현재 분석에 필요한 양의 1/10 ~ 1/20 정도 (1000-500 μ l) 로도 충분히 확인 가능하다.

4. 간암 특이 ganglioside 항원에 대한 단일클론항체 생산

이상의 실험 결과를 보면 간암조직에만 특별히 발현되고, 그것이 혈중으로 유출되는 특징을 이용하여 진단용 간암특이항원으로 쓸 수 있는 ganglioside 는 없다. 하지만 정상에 비해 다소 양의 증감을 보이는 몇몇 ganglioside 들이 있으며, 이들에 대한 단일클론항체를 생산할 경우 혈중에서의 그 양의 증감을 확인함으로써 간암발병여부를 확인할 수 있을 것이다. 간암진단용 gangli-

oside 항원으로 흰쥐에선 G_{D1a} , 인체에선 G_{M3} , G_{D3} , G_{M1} 에 가능성을 두고 이들에 대한 단일클론항체를 만들고 있다. 간암특이 항종양성항체를 만들기 위한 또 다른 방법으로 간암조직의 총 ganglioside에 대한 단일클론항체를 만들고 이들 중 정상인 혈청과 간암환자 혈청의 ganglioside를 구별해 낼 수 있는 항체를 찾고 있다.

단일클론항체 생산을 위해 BALB/c를 면역화시킬 때는 Watarai⁽³⁶⁾ 등의 방법을 따라 ganglioside 항원을 liposome 형태로 주사하였고 항체 생성정도는 그림 6와 같다. 간암조직의 총 ganglioside로 면역화한 경우엔 G_{M3} 등의 한가지 ganglioside를 항원으로 사용한 경우보다 항체생성정도가 크게 나타났다. 간암조직 총 ganglioside로 면역화한 경우 어떤 ganglioside 항원에 대한 항체를 생산하는지 확인해 보기 위해 enzyme/immunostaining을 실시하였는데(그림 7), standard ganglioside들과는 전혀 반응하지 않았고 간암조직의 총 ganglioside 전개부분중에서는 원점과 G_{M3} 훨씬 위쪽에 약하게 반응이 나타났다. 원점부분에서 확인된 물질은 아마도 ganglioside 분리시 오염되는 lipophilic 저분자량의 단백질일 것으로 짐작되고 G_{M3} 위쪽에서 약하게 염색되는 물질은 ganglioside가 아닌 다른 류의 지질성분인 것 같다.

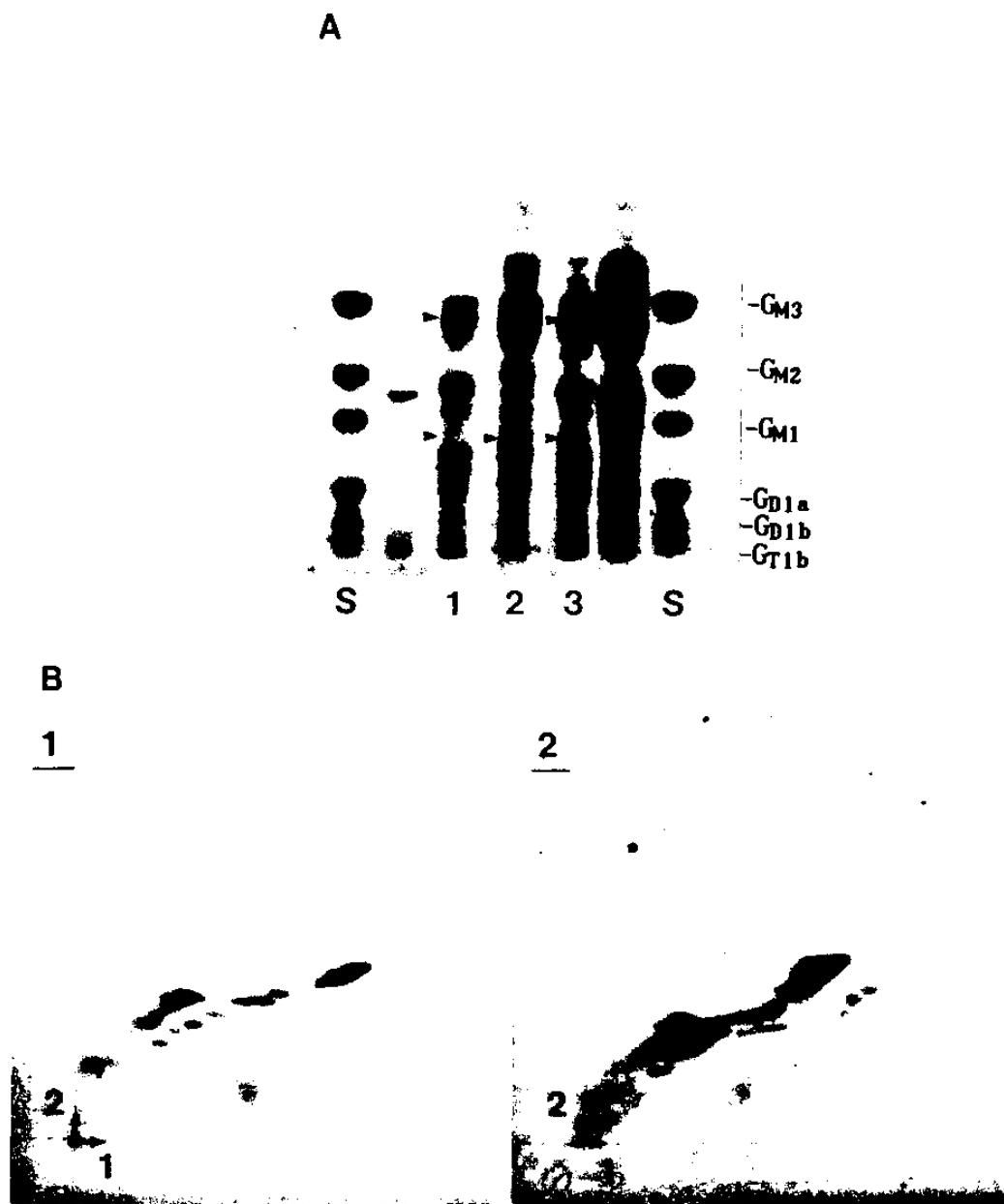


Fig.6 ganglioside patterns of human normal sera and human hepatoma patient sera. A,one dimensional HPTLC of gangliosides. 1:human normal sera. 2: human hepatoma. 3: human hepatoma patient sera. B,two dimensional HPTLC of gangliosides. 1:human normal sera. 2:human hepatoma patient sera.

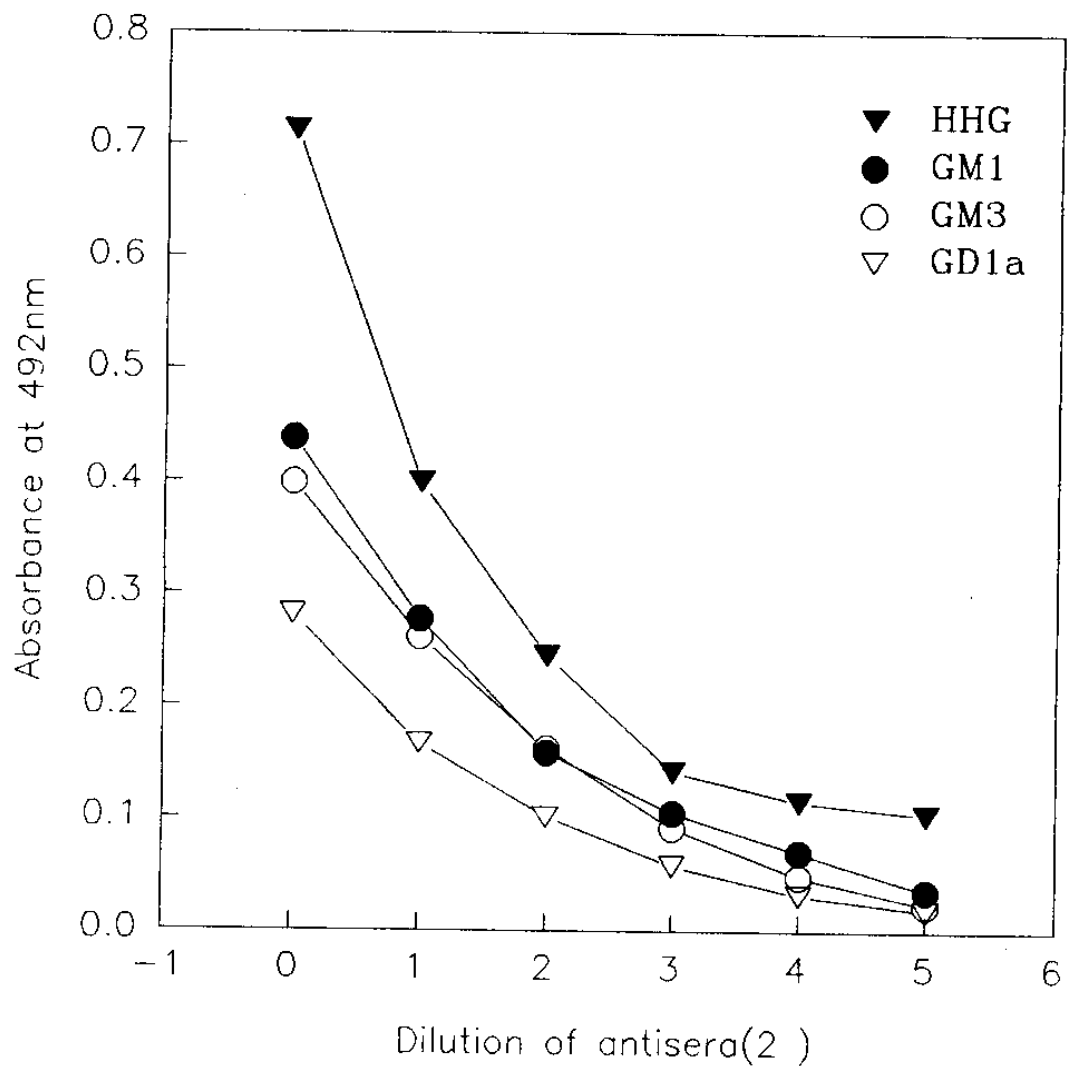


Fig.7 Humoral immune response of BALB/c to ganglioside antigens. Eight-week-old BALB/c mice were immunized intraperitoneally with liposomes in 0.5 ml of PBS containing gangliosides and lipid A. After 5 days the partial breeding was performed and titration of serum was accomplished by the ELISA.



Fig.8 Detection of ganglioside antigen by TLC/enzyme-immunostaining. A : periodate-resorcinol staining, B : enzyme-immunostaining. lane 1:human hepatoma gangliosides, lane 2:standard gangliosides mixture.

제 4 장 결론 및 건의사항

본 연구과제 수행으로 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 화학발암제인 DENA 를 랫트에 투여하여 간암발생과정을 분석한 결과, 총 ganglioside 의 양은 정상간에 비해 2 - 3 배 증가하였고 정상간의 ganglioside 보다 훨씬 많은 종류의 ganglioside 가 발견되었으며 특히 G_{D1a} 의 양의 증가가 특징적이었다.
2. 인체간암조직에서의 ganglioside 를 분석해본 결과, 정상인의 간에서는 G_{M3} 가 90%이상을 차지하고 그 외에 2 - 3개의 다른 ganglioside 들이 소량 발견됨에 비해 인체 간암조직에선 G_{M3} 의 양이 줄고 그 외에 10개이상의 다른 ganglioside 들이 상당량 확인되었다. 그리고 간암조직 주변부위의 ganglioside 를 분석한 결과 외형상으로 간암부위의 특징을 나타내기도 전에 ganglioside 패턴은 이미 간암조직의 것과 유사함을 확인하였다.
3. 간암 혈액진단법에 이용할 ganglioside 를 찾기위해 간암조직 ganglioside 간암환자혈청 ganglioside, 정상인혈청 ganglioside 패턴을 비교한 결과 간암환자혈청에서 G_{M3}, G_{D3} 의 양이 증가를 확인하였다.
4. 간암혈액진단법에 이용할 수 있는 ganglioside 로 랫트에서는 G_{D1a} , 인체에서는 G_{M3}, G_{D3}, G_{M1} 에 가능성을 두고 이들에 대

한 단일클론항체를 생산한다. 이들을 실제로 간암혈액 진단법에
이용하기 위해서는 좀 더 많은 간암환자에 대한 연관성 조사가
필요하다.

제 5 장 참 고 문 헌

- (1) 유전공학센터(1989) <국내 의약품 개발 현황 및 전망에 관한 조사> p. 155
- (2) Farmer, P. B., et al (1985) <The Molecular Basis of Cancer> p. 204
- (3) Abbas, A. K., et al. (1991) <Cellular and Molecular Immunology> p.338
- (4) Rapport, M. M., et al (1959) Cancer 12, 438-445
- (5) Pukel, C. S., et al (1982) J. Exp. Med., 155, 1138-1147
- (6) Nudelman, E., et al (1982) J. Biol. Chem., 257, 12752-12756
- (7) Portoukalian. J., et al (1979) Eur. J. Biochem., 94, 19-23
- (8) Carubia, J. M., et al (1984) Biochim. Biophys. Res. Commun., 120, 500-504
- (9) Fredman, P., et al (1983) Med. Biol. 61, 45-48
- (10) Westrick, M. A., et al (1983) Biochim. Biophys. Acta, 750, 141-148
- (11) Goff, B., et al (1983) Eur. J. Biochem., 130, 553-557
- (12) Siddiqui, B., et al (1984) Cancer Res., 44, 5262-5265
- (13) Kuriyama, M., et al (1985) Biochim. Biophys. Acta, 834, 396-401
- (14) Kozlov, A. M., et al (1984) Exp. Onkol. (USSR), 6. n5, 62-65

- (15) Dyatlovskaya, E. V., et al (1985) *Biokhimiya (USSR)*, 50, 412
–415
- (16) Yates, A. J., et al (1979) *J. Lipid Res.*, 20, 428–436
- (17) Neguyen, A. T., et al (1985) *Int. J. Cancer*, 35, 643–646
- (18) Brodin, T., et al (1985) *Biochim. Biophys. Acta.*, 837, 349–353
- (19) Thurin, J., et al (1986) *FEBS*, 208, 17–22
- (20) Fuchs, B. B., et al (1988) *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 10, 3,
273–286
- (21) Folch, J., et al (1957) *J. Biol. Chem.*, 226, 497
- (22) Yu, R. K., et al (1972) *J. Lipid Res.*, 13, 680–685
- (23) Ladisch, S., and Gillard, B. (1985) *Anal. Biochem.*, 146, 220–
231
- (24) Ueno, K., et al (1978) *J. Lipid Res.*, 19, 863–871
- (25) Ledeen, R. W., and Yu, R. K. (1982) *Meth. Enzymol.* 83, 155–
• 181
- (26) Jourdian, G. W., et al (1971) *J. Biol. Chem.*, 246, 430–435
- (27) Avrova, N. F. (1971) *J. Neurochem.*, 18, 667
- (28) Irwin, C. C., and Irwin, L. N. (1979) *Anal. Biochem.*, 94, 335
- (29) Schuster, B. G., et al. (1979) *J. Immunol.*, 122, 900
- (30) Milstein, C., and Kohler, C. (1975) *Nature* 256, 495
- (31) Ishihara, H., and Hattori, H. (1991) *Cancer Res.*, 51, 4182
- (32) Higashi, H., et al (1984) *J. Biochem.* 95. 1517
- (33) Ye, J. N., et al (1990) *Cancer Res.*, 50, 7697

- (34) Hiraiwa, N., et al (1990) *Cancer Res.*, 50, 2917
- (35) Vansted, A. J., et al (1991) *Cancer Res.*, 51, 2897
- (36) Watarai, S., et al (1987) *J. Biochem.*, 102, 59–67

주 의

1. 이 보고서는 과학기술처에서 시행한 특정연구 개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 과학기술처에서 시행한 특정연구개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

