

형질 전환 기법을 이용한 인체 간암의 마우스 모델 제작 및 특성 규명

이종숙^{1,2} · 이정웅² · 현병화³ · 이철호³ · 정규식³ · 방남수¹ · 염영일^{2,*}

¹중국길림성 연변대학 농학원, ²한국생명공학연구원 유전체의학연구센터, ³한국생명공학연구원 질환모델연구센터

Production and Characterization of a Transgenic Mouse Model of Human Liver Cancer

Zhongshu Li^{1,2}, JungWoong Lee², Byung Hwa Hyun³, Chul-Ho Lee³, Kyu-Shick Jeong³,
Nan Zhu Fang¹ and Young Il Yeom^{2,*}

¹Department of Animal Science, College of Agriculture, Yanbian University, Jilin 133400, China,

²Medical Genomics Research Center and ³Disease Model Research Center, Korea Research Institute of
Bioscience & Biotechnology (KRIBB), Taejeon 305-333, Korea

ABSTRACT

Transgenic mice were generated by microinjecting a plasmid DNA containing the SV40 (simian virus 40) large T antigen (Tag) gene fused with mouse albumin promoter/enhancer sequences into fertilized one-cell mouse embryos. Among eleven founder transgenic animals, four developed hepatocellular carcinoma, two showed kidney cancer and one developed skin and brain tumors. Three stable transgenic lines, #1-2, #1-6 and #1-11 were established. Members of the lines #1-6 and #1-11 reproducibly developed liver tumors by 8 to 10 weeks of age but did not exhibit any phenotypic changes in other tissues. Histological changes leading to liver tumor formation occurred with predictable kinetics and could be classified into three distinct stages; (a) newborn to 3 weeks of age, characterized by hyperplastic hepatocytes with reduced amounts of cytoplasm without any nuclear alterations, (b) between 4 to 8 weeks of age, characterized by diffuse liver cell dysplasia without observable tumor nodules, and (c) 9 weeks of age and thereafter, characterized by hepatocellular carcinomas in the background of extensive liver dysplasia. Metastasis to the lung from a liver carcinoma was observed in #1-11 founder animal. This transgenic mouse system displays similarities with human liver cancers in a number of aspects and provides a useful model for the study of molecular events involved in hepatocarcinogenesis.

(Key words : Transgenic mouse, SV40 Tag, Hepatocellular carcinoma)

요 약

본 연구에서는 SV40 Tag을 마우스 albumin 유전자의 promoter/enhancer 조절 하에 발현하도록 설계된 재조합 유전자를 마우스 1세포기 수정란에 미세 주입하여 형질 전환 마우스를 제작하고 이들의 인체 간암 모델로서의 적합성을 조사하였다. 형질 전환이 확인된 총 11개체의 founder 생쥐들 중 4개체가 간암을 일으켰고, 두 개체는 신장암을, 한 개체는 피부 및 뇌에서 종양을 각각 일으켰다. 이로부터 외래 유전자를 계대 유전하는 3가계를 얻었다(#1-2, #1-6, #1-11). 이들 가계의 자손들에서 8주령(#1-2, #1-6) 혹은 10주령(#1-11) 시부터 간암이 반복적으로 발생되었으며, #1-11 founder 개체에서 폐로 암세포가 전이된 것 외에는 다른 조직에서의 형태학적 변이가 발견되지 않았다. 간암 발생은 조직학적 변화에 따라 3단계로 나눌 수 있었다. 즉, 출생에서 3주령까지는 간세포의 과량증식을 보이거나 세포핵의 이상은 관찰되지 않았으며, 4주령부터 7주령(#1-2, #1-6) 혹은 9주령(#1-11)까지는 diffuse liver cell dysplasia를 나타내지만 tumor nodule은 발견되지 않았고, 그 이후에는 liver dysplasia를 배경으로 간암이 발생하였다. 본 연구에서 자출한 간암 모델 마우스는 인체 간암과 일부 유사한 소견을 보였는 바 인체 간암 기전 연구를 위한 유용한 동물 모델로 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

서 론

간암(Hepatocellular carcinoma)은 조기 진단이 어려울

* Funded by KRIBB Research Initiative.

† Corresponding author : Phone: +82-42-860-4109, E-mail: yeomyi@kribb.re.kr

뿐만 아니라, 예후가 극히 불량하여 여러 종류의 암 중에서도 치사율이 가장 높은 것으로 알려져 있다(Schafer와 Sorrell, 1999). 전 세계적으로 간암 환자의 수는 해마다 늘고 있는 실정이며(Stuver, 1998), 한국에서도 간암은 발생순위로 보아 2~3위의 높은 빈도를 보이고 있다(김, 1996). 간암 치료를 위하여 다양한 치료 방법들이 개발되고 있지만 아직까지도 간암 환자의 5년 생존율은 10%에 지나지 않고 있다(김, 1996). 따라서 간암 치료제와 조기 진단법 개발이 중요한 과제로 대두되고 있으며, 이를 위해서는 간암의 발생과 진행에 대한 분자유전학적 이해가 무엇보다도 우선되어야 한다.

간암에 대한 체계적인 연구와 치료제 개발을 돕기 위한 수단으로써 간 조직 특이적인 세포 증식을 유도하여 인체 간암의 동물모델을 개발한 몇 가지 사례가 보고된 바 있다. Sepulveda 등(1989), Jhappan 등(1990), Thorgeirsson 등(1996)은 각각 SV40 T, c-Myc, TGF- α 등의 발암성 유전자를 α 1-antitrypsin, albumin, metallothionein 1 등과 같은 간세포 특이적 유전자의 프로모터 조절 하에 발현시켜서 인체 간암과 유사한 특성을 갖는 형질 전환 동물들을 개발하였다. 이 모델 동물들은 사람에서 간암 발생의 주요 위험인자로 지목되는 HBV, HCV, 알코올, aflatoxin B 등과 직접적인 관련은 없지만, 간암 진행의 어느 단계에서부터는 인체 간암과 공통된 특성을 가질 것으로 예상되므로 제한적이기는 하지만 간암 모델로서의 효용을 인정받고 있다(Gordon, 1994). 그러나 모델에 따라서는 생산된 형질 전환 개체의 번식 장애나 조기 사망 등에 의한 계통 확립의 난해성, 개체 간 및 세대간 간암 발생률의 차이, 외래 유전자의 삽입 부위에 따른 ectopic 발현 등 단점도 존재하였다.

간암의 발생이 장기간에 걸친 여러 유전자 변이의 축적에 의해 초래된다는 'multistep carcinogenesis'가 보편적인 원리로 인정되고(Farber 등, 1989), 각종 발암 관련 유전자들의 개입이 밝혀지면서 간암 특이적인 유전자 변이를 찾기 위한 연구들이 활발히 진행되어 왔다(Grisham, 1996; Kokura 등, 1998; Kanzler와 Galle, 2000). 최근 DNA chip 기술과 같은 유전체 수준의 첨단 연구 기법들이 보편화 됨에 따라 이를 이용한 각종 질병, 특히 암의 발생과 진행에 관한 분자유전학적 연구가 한층 용이하게 되었다.

이에 본 연구에서는 인위적인 세포 증식 유도를 통하여 간암의 발생률, 세대간 재현성, 조직 특이성, 인체 간암과의 유사성 등이 뛰어난 간암 동물 모델을 형질 전환 기법으로 제작하여 계통화 하고, 모델 마우스 간암 조직의 형태학적 변화 과정에 대한 연구를 통하여 간암의 분자 수준 연구를 위한 유용한 실험 모델을 확립하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물

생후 4~5주령의 자성 BCF1 잡종 마우스를 한국생명공학연구원 유전자원센터에서 구입하여 공란 마우스로 사용하였으며, 8주령 이상의 자성 ICR 마우스를 수란 마우스로 실험에 공시하였다.

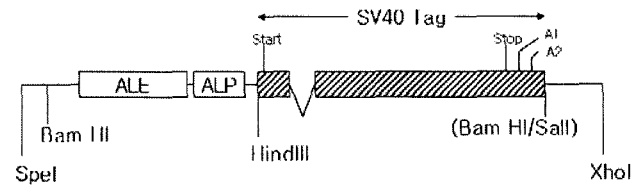


Fig. 1. Schematic diagram of the structure of the liver-specific expression vector for SV40 Tag. SV40 Tag gene is shown as hatched boxes. A 348-bp intronic region is indicated next to the translational start site (Start) of the gene. The approximate positions of the representative restriction enzyme sites are shown. Parenthesis denotes the restriction enzyme sites that have been inactivated during the cloning process. ALE and ALP; the enhancer and the proximal promoter sequences of mouse albumin gene, respectively; Stop; translational stop codon, A1 and A2; position of the first and second polyA signal sequence, respectively.

항체

SV40 Tag 항체는 Santa Cruz Biotechnology(CA, USA; sc-147)에서 구입하였으며, secondary antibody는 HRP (horse radish peroxidase)가 결합된 goat anti-mouse IgG (Santa Cruz; sc-2005)를 사용하였다.

SV40 Tag 유전자 함유 재조합 DNA 제작

SV40 Tag 유전자를 마우스의 간조직에 특이적으로 발현시키기 위하여 SV40 Tag 유전자의 2.6 kb HindIII/BamHI 절편을 마우스 albumin 유전자의 enhancer/promoter (1.0 kb) 부위와 재조합하였다. 간세포 특이적 유전자 발현 조절체인 albumin 유전자의 enhancer/promoter는 Harbst 등 (1989)의 보고에 따라 마우스 albumin 유전자에서 -10 kb 부근에 위치한 822 bp의 enhancer와 Gorski 등 (1986)의 보고에 따라 1~-200 bp 지점에 위치한 194 bp의 promoter를 각각 PCR 방법으로 합성, 결합시켜서 제작하였다(Fig. 1). 재조합 유전자를 Spe I 및 Xho I 제한효소로 절단한 후 agarose 전기영동을 통해 3.6 kb의 재조합 유전자를 분리하여 phenol extraction 방법으로 정제하였으며, 최종적으로 10 mM Tris-HCl(pH 7.4)/0.2 mM EDTA 용액으로 6회에 걸쳐 충분히 투석한 후 DNA 농도를 3 ng/ μ l로 조정하여 수정란 미세 주입에 이용하였다.

과배란 유도 및 수정란 채취

암컷 마우스에 PMSG(Sigma, St. Louis, MO, USA) 5 IU를 복강 내 투여하고 48시간 후 hCG (Sigma) 5 IU를 복강 내 투여하였다. hCG 투여 직후 공란 마우스 한 마리당 번식 능력이 확인된 8~20주령 웅성 BCF1 마우스 한 마리씩의 비율로 하룻밤 합사시켜 수정을 유도하였다. 교미가 확인된 개체를 hCG투여 후 18~20시간째에 경추 탈골방법으로 희생시킨 다음 난관 팽대부를 터뜨려 난구 세포 덩어리를 회수하고 300 μ g/ml hyaluronidase(Sigma)를 함유한 M2 용액에서 3분간 처리하였다. 수정란을 12,000 rpm에서 5분간 원심분리로 처리한 다음 두 개의 전핵이 확실히 보이는 수정란만을 채취하여 M16 배양액 속에 보존하였으며, DNA 미세 주입시까지 5% CO₂ 배양기내에서 37°C로 유지하였다.

형질 전환 마우스의 생산 및 판별

Gordon(1994)의 방법에 따라 형질 전환 founder 마우스를 생산하였다. DNA 용액은 1 세포기 수정란의 웅성 전핵에 주입하였으며, M16 배양액에서 1시간 정도 배양한 후 가임된 수란 마우스의 난관 누두부(infundibulum)에 이식하여 약 3주간 발달시키고 정상 분만하도록 하여 마우스를 생산하였다. 미세 주입된 수정란으로부터 탄생된 10일령 마우스의 꼬리에서 genomic DNA를 추출하여 PCR 기법으로 분석함으로써 형질 전환 마우스 여부를 판별하였다. 사용한 primer는 5'-GCCATCTAGTGATGATGAGGC-3', 5'-CAACAGCCTGTGGCATATGG-3'이었다. PCR 반응 조건은 먼저 94°C/3분, 61°C/1분, 72°C/2분씩 3 cycle; 이어서 94°C/1분, 61°C/1분, 72°C/1분의 조건으로 30 cycle; 끝으로 72°C에서 10분간 배양하였다. 반응물을 전기영동하고 676 bp 크기의 DNA band가 나타나는 개체를 형질 전환 마우스로 판정하였다.

형질 전환 마우스 가계 확립을 위한 실험설계

Founder(F0)를 정상적인 BCF1 마우스와 교배하여 F1대 형질 전환 마우스를 생산하였으며, 같은 방법으로 F2대 형질 전환 마우스를 생산하였다. F2대 이후의 형질 전환 마우스를 대상으로 출생 당일 또는 2~6주령 개체의 간 조직에서 SV40 Tag 유전자의 mRNA 발현을 Northern blot 분석법으로 확인하였으며, SV40 Tag에 대한 Western blot 분석을 통하여 이 message들이 어떠한 단백질로 해독되는지 조사하였다. SV40 Tag의 mRNA 및 단백질 발현이 확인된 #1-2 가계의 F2와 #1-6 가계의 F3 마우스를 주령별로 2마리씩(♀ 1, ♂ 1: 20주령까지), #1-11 가계의 F3 마우스를 주령별로 5마리씩(♀ 2, ♂ 3) 공시하여 생후 2주령부터 2주 간격으로 간조직의 외형적 변화 양상을 관찰하였으며, 형질 전환 마우스와 비 형질 전환 마우스의 주령별 간/체중비 변화를 비교 분석하여 각 가계별 간암 발생 여부와 빈도, 발생 속도 등을 측정하였다. 이후 간암 모델 타당성 연구를 위한 세부적인 실험은 #1-11 가계만을 이용하여 실시하였으며, 2주령부터 간 조직 변화를 현미경으로 관찰하였다.

삽입된 외래유전자 Copy 수와 배열형태 확인

가계별로 형질 전환 마우스 꼬리에서 추출한 genomic DNA를 Bam HI 제한효소로 처리하여 전기 영동 및 Southern transfer 한 다음, 2.56 kb의 SV40 Tag 유전자 절편을 probe로 하여 Southern hybridization 방법으로 SV40 Tag 유전자의 copy 수와 배열 형태를 분석하였다.

Total Protein의 추출

마우스의 장기를 적출하여 protease inhibitor(10 µg/ml aprotinin, 10 µg/ml leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride(PMSF))등과 0.1% NP40, 300 mM NaCl, 100 mM KCl, 20 mM Hepes(pH 7.9), 100 mM EDTA 등으로 조성된 lysis buffer에서 homogenization시킨 후 얼음 속에서 1시간 배양하였다. 12,000 rpm으로 15분간 원심분리한 후, 상층액을 취하여 595 nm에서 흡광도(OD₅₉₅)를 측정하고 다음과 같이 단백질 농도를 측정하였다. 먼저 Bio-Rad Protein Assay(Bio-Rad, USA)와 lysis buffer를 2 : 8 비율로 혼합한 용액 1 ml에 2, 4, 6, 8, 10,

12, 14, 15 µg/µl 농도의 BSA(Sigma)를 1 µl씩 첨가하여 각각의 OD₅₉₅를 측정한다. X축을 BSA의 농도로 하고, Y축을 상응한 OD₅₉₅값으로 하여 표준 그래프를 구하였다. 동일한 방법으로 상기한 조직 추출물에 대해서도 OD₅₉₅값을 구하고, 이를 표준그래프에 대입하여 다음의 공식에 의해 시료의 단백질 농도를 구하였다.

$$\text{단백질 농도}(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{\text{시료의 OD}_{595}}{\text{표준 그래프의 OD}_{595}} \times \text{희석배수}$$

Western Blot 분석

30 µg의 단백질을 SDS polyacrylamide gel 전기영동으로 분리한 다음, PVDF membrane(Hybond-P, Amersham, USA)에 transfer하였다. Membrane을 상온에서 5% skim milk(Difco, USA)/0.1% tween 20(Sigma)/1× PBS 등으로 조성된 용액 중에 2시간 동안 배양하여 blocking을 시행하였다. SV40 Tag에 대한 생쥐 1차 항체가 1/2,000 희석비로 첨가된 blocking 용액 중에서 membrane을 2시간 동안 상온으로 반응시킨 다음, 1× PBST로 10분씩 4회 세척하였다. 상응한 2차 항체를 1/10,000 배로 희석한 blocking 용액에 1시간 배양한 다음 다시 1× PBST로 10분씩 4회 세척하여 ECL kit(Amersham, USA)을 이용, 현상하였다.

조직병리학적 분석

각 주령별 형질 전환 개체의 간 조직을 중화된 10% formaldehyde(Sigma) 용액에서 24시간 고정한다. 다음, 탈수, 투명화, 침투, 포매 등을 거쳐 paraffin block으로 만들었다. Block은 4 µm 두께로 잘라 hematoxylin & eosin (H&E)염색을 하여 조직병리학적 특성을 관찰하였다.

결 과

형질 전환 마우스의 생산과 계통 확립

본 연구에서는 총 11마리의 SV40 Tag 형질 전환 founder 마우스를 생산하였다(Fig. 2). 이 founder 마우스들에 대해 SV40 Tag 유전자가 다음 세대로 유전되는 가계를 확립하기 위해 교배를 시도한 결과, 7 마리는 breeding 전 혹은 임신 중 사망하였으며, 한 마리는 수차례에 걸친 출산 시도에도 불구하고 SV40 Tag 유전자를 이어받는 후대를 얻을 수 없었다(미제시). 본 실험에서는 #1-2, #1-6 및 #1-11 등 모두 3가계를 확립하였는데, 이들 가계의 SV40 Tag 유전자의 후대 전달율은 약 50%(세대별 분포; 34~55%)로써 멘델의 유전법칙에 부합되었다(Table 1). 또한 3가계 공히 개복 후 육안으로 형태 분석을 실시한 결과 거의 모든 형질 전환 마우스에서 간암이 발생됨을 확인하였다.

형질 전환 마우스에 삽입된 SV40 Tag 유전자의 copy 수를 조사한 결과, #1-2, 1-6, 1-11 가계에서는 이배체(diploid) 개체 당 1-4 copy였으며, 적어도 F2까지는 외래 유전자가 정확하게 자손들로 유전되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 또한, SV40 Tag 유전자의 개체 중 배열형

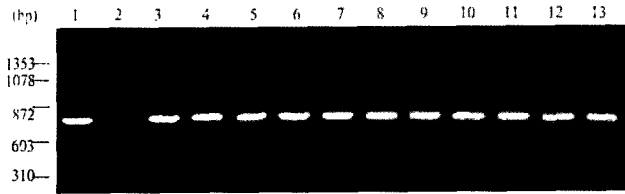


Fig. 2. Identification of transgenic founder mice by PCR analysis. PCR amplification was performed on tail DNAs using a set of primers derived from SV40 Tag gene and mouse albumin gene enhancer sequences. Eleven mice showing the transgene-specific PCR product are indicated. 1) positive control, 2) negative control, 3~13) founder transgenic mice (F0).

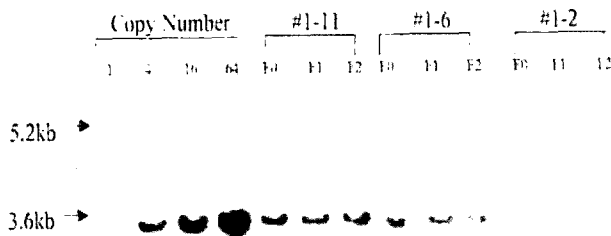


Fig. 3. Southern blot analysis of genomic DNA obtained from mouse tails. Ten microgram (μ g) of DNA digested with Bam HI was size-fractionated on 0.7% agarose gel and transferred onto a nylon membrane. The blot was hybridized with a 32 P-labeled probe for SV40 Tag gene. Known amounts of the recombinant DNA that was used to generate the transgenic mice were included as the copy-number standard.

태를 조사한 결과, #1-6 가계와 #1-11 가계에서는 DNA band의 크기가 미세 주입에 사용한 것과 동일한 크기 (3.6 kb)였고, #1-2 가계에서는 5.2 kb의 band를 나타내었다.

형질 전환 마우스의 간 조직에서 SV40 Tag 유전자의 mRNA 발현을 확인한 결과, 2.6 kb 및 2.35 kb 크기의 message가 관찰되었다(Fig. 4). RNA 분석에 사용한 간 조직 시료에 대해 SV40 Tag 단백질의 항체를 이용한 Western blot 분석 결과 68 kDa 크기의 단일형 단백질이 유일하게 발현되었다(Fig. 5).

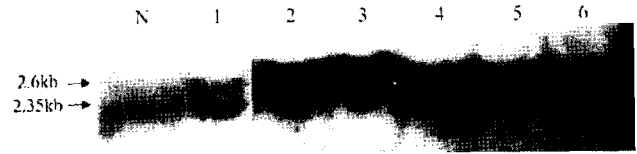


Fig. 4. Northern blot analysis of the RNA obtained from the liver of SV40 Tag transgenic line #1-11. The blot was hybridized with a 32 P-labeled probe for SV40 Tag gene (2.6 kb). The upper band appears to be the transcript for t protein while the lower one for T antigen. N, non-transgenic control liver; 1) new-born transgenic mouse, 2~6) 2- to 6-week old transgenic mice.

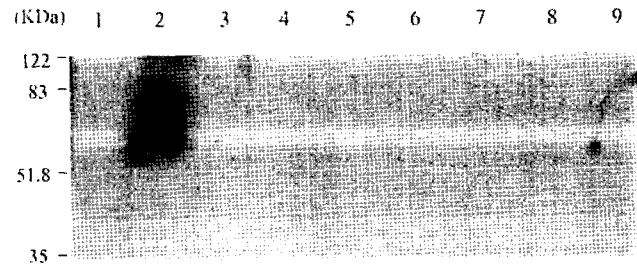


Fig. 5. Western blot analysis of SV40 Tag protein expressed in the transgenic line #1-11. Thirty micrograms of protein extracted from each tissue were separated by SDS polyacrylamide gel electrophoresis and the Tag protein detected by an immunostaining using a mouse monoclonal antibody against SV40 Tag. Expression of the transgene was detectable only in the liver. 1) non-transgenic liver, 2~9) tissues of a transgenic mouse; 2) liver, 3) kidney, 4) lung, 5) brain, 6) spleen, 7) heart, 8) muscle, and 9) testis.

형질 전환 마우스의 외적 표현형질 변화 양상

Founder(F0) 11개체 중 4개체(#1-1, #1-2, #1-6, #1-11)에서 간 종양이 확인되었는데, 이들 가계의 마우스에서는 10주령부터 복부가 부풀어 오르기 시작하였고, 약 13주령에 촉감으로 간조직의 팽대를 확인할 수 있었다. 약 14주령부터는 복부가 심히 부풀어 오르고 20~22주령에 이르러서는 모발 상태가 악화되면서 전신 부전 상태에 이르렀다. 생존 기간은 대체로 26~30주령이었는데, #1-11(F0)은 생존 기간이 37주령으로 가장 길었다.

#1-6 및 #1-11 가계에서는 간 조직에서만 암이 발생하

Table 1. Transmission rates of SV40 Tag transgene and tumor frequency

Founder (line)	No. of total progeny			No. of transgenic progeny			Transmission rate (%)			Tumor frequency (%)*		
	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3	F1	F2	F3
1-2	29	120	29	10	61	15	34	50	51.7	100 (10/10)	100 (61/61)	80 (8/10)
1-6	55	74	25	30	37	12	55	50	48	100 (30/30)	100 (37/37)	100 (12/12)
1-11	20	30	264	7	16	106	35	53	40.2	100 (7/7)	100 (16/16)	100 (81/81)

*Numbers in parenthesis stand for (# of mice with liver tumors/ # of transgenic mice analyzed).

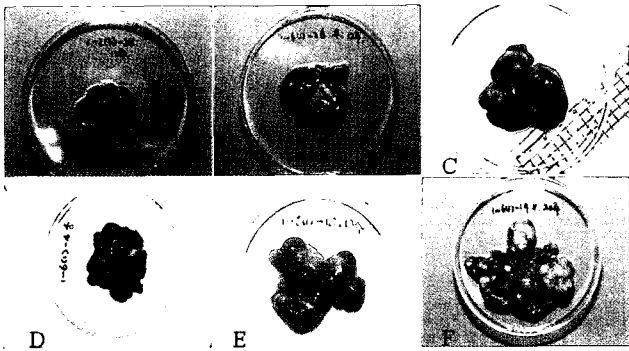


Fig. 6. Photographs of livers from the transgenic line #1-11. A) 10 weeks, B) 12 weeks, C) 14 weeks, D) 16 weeks, E) 18 weeks, and F) 20 weeks.

였다. 그 외의 형질 전환 개체 중 #1-5 (F0)에서는 신장암이, #1-7 (F0)에서는 신장암 및 뇌암이, #1-2 가계에서는 간암, 피부암, 유방암, 뇌암 등 간 조직 이외의 신체부위 (ectopic site)에서 암이 발생됨이 각각 확인되었다.

형질 전환 마우스 간조직의 주령별 변화양상

형질 전환 마우스 간조직의 시기별 변화상태를 살펴보면 #1-2 및 #1-6 가계에서는 8주령부터, #1-11 가계는 10주령부터 간 조직에서 결절(nodule)과 낭종(cyst)이 관찰되었다(Fig. 6). 주령이 높아질수록 노물들이 더욱 잘 발달되어 있었으며, 증식된 간세포들로 인하여 간 소엽의 형태가 불분명하게 나타났다. 0.1~35 mm 사이의 다양한 크기의 노란색 혹은 유백색 노물의 변연 부위가 결체 조직으로 둘러싸여 주위 조직과는 확실히 구별되었다. #1-11 가계의 일부 형질 전환 마우스에서는 24주령부터 원발성 간암 결절(primary nodule: P)에서 기원한 속발성 결절 (secondary nodule: S)들이 관찰되었다. 또한, 2주령

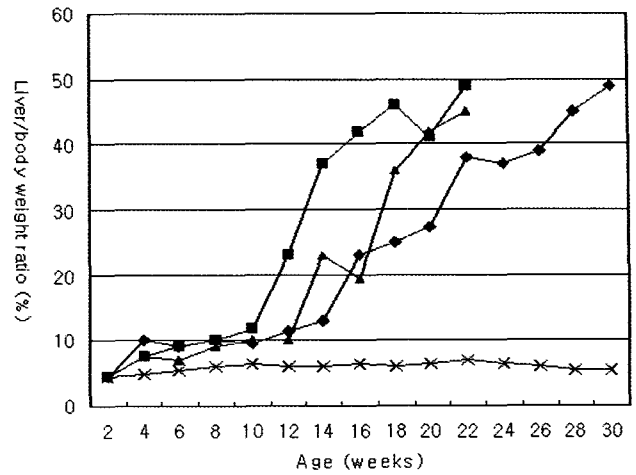


Fig. 7. Age-dependent change of the liver/body weight ratio of SV40 Tag transgenic mice. Filled diamonds; #1-11 Tg (n=5), filled squares; #1-6 Tg (n=2), filled triangles; #1-2 Tg (n=2), x's; non-transgenic controls (n=2).

후부터 이미 형질 전환 마우스의 간/체중 비가 대조군에 비하여 커짐을 알 수 있었으며, 10~12주령 후부터는 기하급수적인 증가를 보여주었고, 이 경향은 마우스가 전신 부진 상태가 될 때까지도 지속되었다(Fig. 7).

형질 전환 마우스 간조직의 주령별 병리학적 소견

형질 전환 마우스의 간세포는 출생에서 3주령까지는 과량 증식(hyperplasia)을 보이나, 세포핵의 이상은 관찰되지 않았고(Fig. 8B), 4주령부터 7주령(#1-2, #1-6) 혹은 9주령(#1-11)까지는 이상 증식(dysplasia)하는 간세포가 확산되어 있었지만 nodule은 발견되지 않았으며(Fig. 8 C),

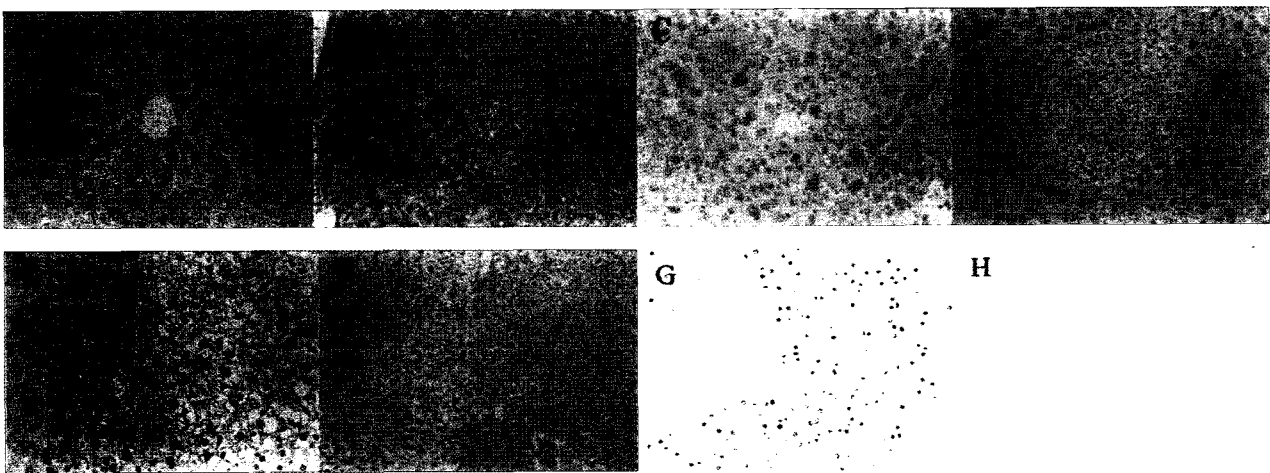


Fig. 8. Liver histopathology in SV40 Tag transgenic mouse line #1-11. A) Histological profile of normal liver from a 12-week old mouse. B) Hyperplastic liver from a 2-week old mouse. The small, dark bodies are nuclei of hematopoietic cells. C) Liver of a 4-week old mouse. D) Clear cell foci and mitotic figures observed in the liver of a 10-week old mouse. E) Liver of a 12-week old mouse. Clear cell region and normal-looking liver tissues are seen. F) Liver of a 16-week old mouse. Small cell and clear cell regions of hepatocellular carcinoma are seen. G) Liver of a 28-week old mouse. Note the homogenously altered hepatocellular carcinoma. H) Adenocarcinoma observed in the liver of a 28-week old mouse. ×200, H&E stain.

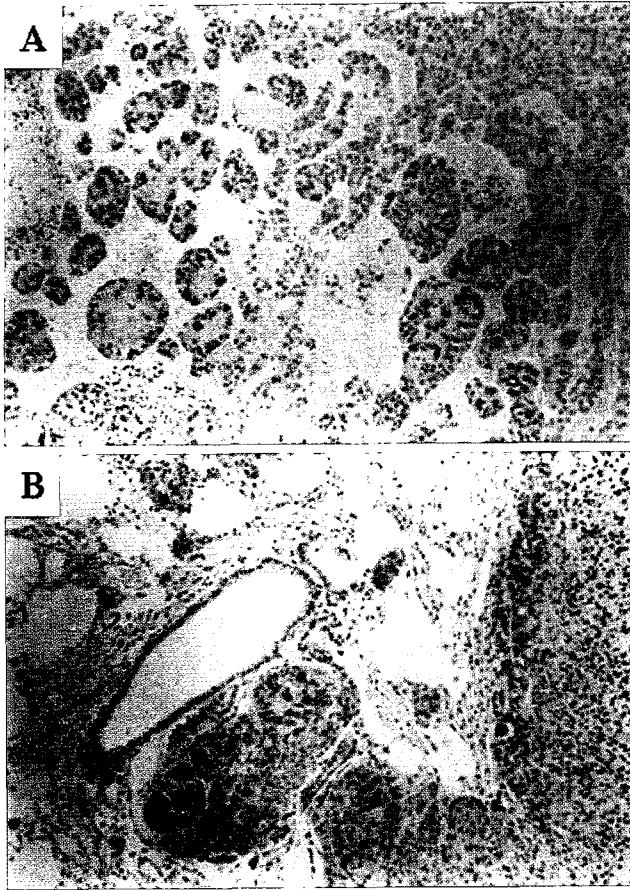


Fig. 9. Liver and lung histopathologies in SV40 Tag transgenic mouse line #1-11. A) Cord-type hepatocellular carcinoma observed in the liver tissue of a 36-week old mouse. B) Metastatic lesion of hepatocellular cancer found in the lung. $\times 100$, H&E stain.

그 이후부터는 간 조직 이상증식을 배경으로 간암이 발생하였다(Fig. 8 D~H). 4주령부터 혈관 주위에서 투명세포(clear cell)가 대량 형성되어 지속적인 증가 추세를 보였으며(Fig. 8C-E), 14주 이후에는 형질 전환 마우스의 간 세포와 세포핵의 크기/형태가 다양화되어 12주보다는 훨씬 더 진행된 명확한 HCC의 특징을 나타냈는바, 정상 간 세포에 비해 핵과 염색질의 크기가 훨씬 작은 소세포(small cell)와 투명세포 등으로 구성된 큰 foci가 대량 출현하였으며, 정상적인 간세포는 거의 찾아 볼 수 없었다(Fig. 8F). 18주령 이후 간 조직에서 단일한 형태의 세포 집단의 증가가 관찰되었다(Fig. 8G). 24주령부터 원발성 결절에서 기원한 속발성 결절들이 발생하였으며, 28주령 원발성 결절과 상응한 속발성 결절에서는 다양한 조직 변화가 나타났는바, 일부 속발성 결절에서는 상응한 원발성 결절에 존재하지 않는 adenocarcinoma 양상도 관찰되었다(Fig. 8H). #1-11 founder 마우스를 36 주령에 검사한 결과, 간 조직에는 정상적인 소견을 보이는 간세포들이 거의 없었고(Fig. 9A), 간조직과 복막의 유착이 발생된 부분에는 혈관조직이 잘 발달되어 있었으며, 폐로의 전이도 발견되었다(Fig. 9B).

고 찰

간암모델동물에서 SV40 유전자의 삽입 형태와 발현

SV40 Tag 유전자는 세포증식 및 여러 종의 종양 관련 유전자의 transformation과 높은 연관성이 밝혀지면서 암 동물모델 생산에 자주 이용되었다(Hino 등, 1991; Sandgren 등, 1992). 본 실험에서 제작한 간암 모델 마우스에서 SV40 Tag 유전자의 삽입 형태를 분석한 결과(Fig. 3 참조), #1-6 가계와 #1-11 가계는 DNA band의 크기가 미세 주입에 사용한 것과 동일한 크기(3.6 kb)인 것으로 미루어 보아 주입된 유전자가 head-to-tail의 방향으로 병렬되어 있음을 짐작할 수 있었다. #1-2 가계 마우스는 5.2 kb의 band를 나타내었는데, 이 마우스에서는 외래 유전자가 1 copy만 삽입되었으므로 이는 SV40 Tag 유전자 상의 Bam HI 인식 부위와 삽입 위치에 인접한 게놈상의 Bam HI 인식 부위 사이의 길이에 해당되는 것으로 추정된다. SV40(simian virus 40)의 게놈은 구조 단백질(structural protein; VP1, VP2, VP3) 부분과 T(large T), t(small t) 등 두 종류의 항원 부분으로 이루어져 있다(Fanning과 Knippers, 1992). T항원은 세포 형질 변환(cell transformation)의 개시(initiation)에 결정적 작용을 하며, 형질 변환된 세포가 그 특성을 유지하기 위해서는 T항원의 지속적인 발현을 필요로 한다. 반면 t항원은 T항원의 세포 형질 변환 효율을 높이는 작용을 한다.

본 실험에서 간 조직 특이 발현 유전자인 albumin 유전자의 promoter를 이용하여 제작한 형질 전환 간암 모델 마우스의 간 조직에서 SV40 Tag 유전자의 mRNA 발현을 조사한 결과, Fig. 4에서와 같은 두 가지 message가 관찰되었다. T 단백질과 t 단백질은 공히 조기 전사 구역(early transcription domain)에 위치한 A 유전자에 의해 coding 되는데, 이 유전자에 존재하는 intron의 splicing 여부에 따라 T 또는 t로의 발현 여부가 결정되므로 본 실험에서 관찰된 두 가지 크기의 message는 intron이 유지되는 형태와 제거된 형태를 각각 의미하는 것으로 보인다(Fig. 1 참조). 또한, Western blot 분석에서 이 message 들은 Fig. 5에서 제시된 바와 같이 간 조직에서 특이적으로 단일 크기의 단백질로 발현되었는데, 이는 Hino 등(1991)과 Sandgren 등(1992)의 연구 결과와 동일하다. T 단백질과 t 단백질은 상응하는 mRNA 염기 서열은 유사하나, 아미노산 서열이 매우 다르므로 각기 다른 항원 특이성을 나타내는데, Western blot 분석실험 중 t 단백질에 대한 항체는 사용하지 않았으므로 SV40 T 유전자의 mRNA 중 t 단백질에 상응하는 2.6 kb 형이 어느 정도로 t 단백질로 해독되는지는 확실치 않다.

본 실험에서 생산한 3가계(#1-2, #1-6, #1-11)의 형질 전환 마우스에서 SV40 Tag 유전자의 후대 전달율은 거의 50% 수준으로써 이는 3가계 모두에서 외래 유전자가 각기 1개의 염색체 부위에만 삽입되었음을 의미하는 것으로 보인다. 그러나 외래 유전자가 삽입된 염색체 부위는 본 연구에서 확인되지 않았다. 또한, 3가계 모두에서 거의 100%의 확률로 간암이 발생됨을 확인함으로써 본 연구에 사용한 promoter의 간 조직 지향적 특성과 외래 유전자 발현능, SV40 Tag 유전자의 강력한 발암성 등을 확인하였고, 간암 모델로써 상기 마우스들의 적합성을 확인하였다. 그러나 총 11마리의 founder 마우스들 중 한 마

리는 수차례에 걸친 출산 시도에도 불구하고 SV40 Tag 유전자를 이어받는 후대를 얻을 수 없었는데, 이는 불완전 형질 전환체(germline mosaic)이기 때문일 가능성이 큰 것으로 보인다. 11마리 형질 전환 founder 마우스 중 #1-6 및 #1-11 가계를 제외한 개체에서는 간 조직 이외의 신체 부위(ectopic site)에서 암이 발생됨이 확인되었다. 이는 미세 주입 유전자가 마우스 계놈에 삽입될 때 주변 유전자들의 전사 조절 부위가 미세 주입된 유전자의 발현에 영향을 미침으로써 유발된 것으로 추측된다.

간암 발생의 다단계성

SV40 Tag 형질 전환 마우스에 대한 조직병리학적 분석 결과, 생후 4주령 전까지는 hyperplasia를 나타내었으며, 4주령부터 dysplasia가 확인되었고, 10주령부터 nodule이 출현되면서 HCC로 판명되었다. Sepulveda 등(1989) 및 Sandgren 등(1989)의 보고에서는 종양이 형성되기까지 7주령에서 1년 이상이 소요되어 본 연구의 경우와는 시간적으로 차이가 존재하였다. 하지만 모든 형질 전환 개체들에서의 간암 발생 과정은 유사한 양상을 나타내었는바, hyperplasia로부터 시작하여 dysplasia, nodule, carcinoma 등의 순으로 발전함으로써 본 연구의 결과와 유사한 발암 양상을 보고하였다.

실험적으로 유발된 간암과 인체 간암의 발생과 진행 단계에서 toxicity 의존적인 이상 증식과 재생이 증가하는 것으로 밝혀졌다(Moore와 Kitagawa, 1986; Preston-Martin, 1990). 본 연구에서도 간세포의 이상 증식으로 인한 간/체중 비가 정상 마우스에 비해 40~50배까지 증가하고 세포 괴사도 동반되었는데, 이는 SV40 Tag의 작용에 의한 toxicity 의존적 간세포의 이상 증식 및 죽음과 연관된 것임을 알 수 있다(Tzeng 등, 1998; Hahn 등, 1999). 또한, 가계에 따라서 8주령 혹은 10주령부터 이형성 결절(hyperplastic nodule)이 많이 발달하였는데, 이는 간암 발생과 밀접히 관계될 것이라고 사료된다(Cardy, 1983; Dragan 등, 1993).

본 연구에서는 24주령부터 대량의 nodule-in-nodule 양상이 관찰되었으며, 28주령에서는 원발성 결절 및 이에 상응한 속발성 결절에서 주변조직과는 선명히 구분되는 다양한 조직 변화가 일어나는 등 악성 양상을 나타내었다. 이는 Dragan 등(1993)이 햄스터 간암의 initiation-promotion-progression(IPP) 모델 연구에서 제시한 nodule-in-nodule 양상의 출현, 즉, 큰 AHF(altered hepatocyte foci)속에 나타나는 다양한 형태의 작은 AHF가 간암의 진행(progression) 단계임을 시사한다는 결과와 유사하다.

인체가 HBV, HCV 등에 감염된 후에 나타나는 만성 간염-간경화-nodule형성-조기 간암-진행기-전이(Skamoto 등, 1991)라는 간암의 다단계 발생/발전 모델에 대해 이와 맥을 같이 하는 임상병리학적 실험 결과를 비롯하여 다방면의 연구 결과들이 보고되고 있다(Cady B, 1983; Bosch와 Munoz, 1989). 본 실험에서는 #1-11 founder 마우스에서 nodule 형성부터 간암 진행에 이르는 일련의 과정을 관찰할 수 있었을 뿐 아니라 37 주령에서는 폐로의 전이도 발견하였다. 이는 Dubois 등(1991)의 보고와 유사하다.

본 연구에서 개발한 인체 간암 모델 마우스 모델은 간암 발생율과 그 재현성이 뛰어날 뿐만 아니라 인체 간암

과도 유사성을 갖고 있기 때문에 간암 발생을 단계적으로 연구할 수 있는 유용한 모델로써 널리 이용될 수 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

1. Bosch, FX, Munoz, N (1989): Epidemiology of in hepatocellular carcinoma. In: Bannasch P, Keppler D, Weber G (eds). Liver cell carcinoma. 1st ed. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 3-14.
2. Cady B (1983): Natural history of primary and secondary tumors of the liver. Semin Oncol 10:127-134.
3. Dragan YP, Sargent L, Xu YD, Xy YH, Pitot HC (1993): The initiation-promotion-progression model of rat hepatocarcinogenesis. Proc Soc Exp Biol Med 202:16-24.
4. Dubois N, Bennoun M, Allemand I, Molina T, Grimber G, Daudet-Monsac M, Abelanet R, Briand P (1991): Time course development of differentiated hepatocarcinoma and lung metastasis in transgenic mice. J Hepatol 13:227-239.
5. Fanning E, Knippers R (1992): Structure and function of simian virus 40 large tumor antigen. Annu Rev Biochem 61:55-85.
6. Farber E, Chen Z-Y, Harris L, Lee G, Rinaudo JS, Roomi WM, Rotstein J, Semple E (1989): The biochemical-molecular pathology of the stepwise development of liver cancer: new insights and problems. In: Bannasch P, Keppler D, Weber G (eds). Liver cell carcinoma. 1st ed. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 273-291.
7. Gordon JW (1994): Transgenic mouse models of hepatocellular carcinoma. Hepatology 19:538-539.
8. Gorski K, Carneiro M, Schibler U (1986): Tissue-specific *in vitro* transcription from the mouse albumin promoter. Cell 47:767-776.
9. Grisham JW (1996): Interspecies comparison of liver carcinogenesis: implications for cancer risk assessment. Carcinogenesis 18:59-81.
10. Hahn WC, Counter CM, Lundberg AS, Beijersbergen RL, Brooks MW, Weinberg RA (1999): Creation of human tumour cells with defined genetic elements. Nature, 400:464-468.
11. Harbst RS, Friedman N, Darnell JE Jr, Babiss LE (1989): Positive and negative regulatory elements in the mouse albumin enhancer. Proc Natl Acad Sci USA 86:1553-1557.
12. Hino O, Kitagawa T, Nomura K, Ohtake K, Cui L, Furuta Y, Aizawa S (1991): Hepatocarcinogenesis in transgenic mice carrying albumin-promoted SV40 T antigen gene. Jpn J Cancer Res 82:1226-1233.
13. Jhappan C, Stahle C, Harkins RN, Fausto N, Smith

- GH, Merlino GT (1990): TGF α overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of the mammary gland and pancreas. *Cell* 61:1137-1146.
14. Kanzler S, Galle PR (2000): Apoptosis and the liver. *Cancer Biol* 10:173-184.
 15. Kokura K, Nakadai T, Kishimoto T, Makino Y, Muramatsu M, Tamura TA (1998): Gene expression in hepatomas. *J Gastroenterol Hepatol* 13:S132-141.
 16. Moore MA and Kitagawa T (1986): Hepatocarcinogenesis in the rat: the effect of promoters and carcinogens *in vivo* and *in vitro*. *Int Rev Cytol* 101: 125-173.
 17. Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, Jones PK and Henderson BE (1990): Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res* 50:7425-7421.
 18. Sandgren EP, Palmiter RD, Heckel JL, Brinster RL (1992): Hepatocellular carcinogenesis in albumin-plasminogen activator transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:11523-11527.
 19. Sandgren EP, Quaipe CJ, Pinkert CA, Palmiter RD, Brinster RL (1989): Oncogene-induced liver neoplasia in transgenic mice. *Oncogene* 4:715-724.
 20. Schafer DF, Sorrell MF (1999): Hepatocellular carcinoma. *The Lancet* 353:1253-1257.
 21. Sepulveda AS, Finegold MJ, Smith B, Slagle BL, DeMayo JL, Shen RF, Woo SLC, Butel JS (1989): Development of a transgenic mouse system for the study of stages in liver carcinogenesis using tissue-specific expression of SV40 T-Antigen controlled by regulatory elements of the human α -1-antitrypsin gene. *Cancer Research* 49:6108-6117.
 22. Skamoto M, Hirohashi S, Shimosato Y (1991): Early stages of multistep hepatocarcinogenesis: adenomatous hyperplasia and early hepatocellular carcinoma. *Hum Pathol* 22:172-178.
 23. Stuver SO (1998): Towards global control of liver cancer? *Cancer Biol* 8:299-306.
 24. Thorgeirsson SS, Eric SR (1996): Transgenic mouse models in carcinogenesis: interaction of c-myc with transforming growth factor α and hepatocyte growth factor in hepatocarcinogenesis. *Br J Clin Pharmacol* 42:43-52.
 25. Tzeng YJ, Zimmermann C, Guhl E, Berg B, Avantiaggiati ML, Graessmann A (1998): SV40T/t-antigen induces premature mammary gland involution by apoptosis and selects for p53 missense mutation in mammary tumors. *Oncogene* 16:2103-2114.
 26. 김창민 (1996): 발암유전자와 간암. *생명공학동향* 3: 57-63.
- (접수일자: 2007. 7. 12 / 채택일자: 2007. 8. 22)