

CDK4와 hTERT를 도입한 HPV16 E6/E7 불멸화 세포의 확립

박영진, 홍두표, 김은철¹⁾, 오봉경²⁾, 김진*

연세대학교 치과대학 구강병리학교실, 구강종양연구소, BK21 치의과학 사업단,
원광대학교 치과대학 구강병리학교실¹⁾ 연세 암 센터²⁾

<ABSTRACT>

Establishment of CDK4/hTERT – Transfected HPV16 E6/E7 Immortalized Cell Lines

Young Jin Park, Doo Pyo Hong, Eun Cheol Kim¹⁾, Bong Kyeong Oh²⁾, Jin Kim*

Oral Cancer Research Institute, Department of Oral Pathology, Yonsei University College of Dentistry,
Brain Korea 21 Project, Wonkang Univ¹⁾, Yonsei Cancer Center²⁾

Human papillomavirus (HPV) has been classified as one of the causing factors of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). However, little is known about HPV-related carcinogenesis in HNSCC. The purpose of this study is to characterize immortalized human oral keratinocyte (IHOK) transfected by HPV16 E6/E7, IHOK/hcdk4 (IHOK transfected by pLXRN-hcdk4) and IHOK/hcdk4/hTERT (IHOK transfected by pLPC-hTERT-hcdk4) to reconstitute HNSCC in vitro. Conclusively, we established a new immortalized cell lines, IHOK/hcdk4 and IHOK/hcdk4/hTERT, to understand multistep carcinogenic process of oncogenic HPV16 E6/E7 in HNSCC.

Key words : hcdk4, HPV16 E6/E7, hTERT, Immortalization

I. 서 론

구강암은 인체에 발생하는 전체 악성 종양의 2~3%를 차지하며, 이 중 90% 이상은 구강 편평 세포 암종이다¹⁾. 구강 편평 세포의 종양화는 다단계 발생과정을 통하여 진행된다고 알려져 왔다^{2,3)}. 즉 구강 편평 세포 암종의 경우 정상 조직으로부터 세포의 증식에 이어 이행성의 조직학적 특징을 보이다가 상피내암을 거쳐 침윤성 성장을 하는 악성 종양으로 진행된다. 사람 유두종 바이러스 (human papillomavirus, 이하 HPV)는 두경부 편평 세포 암종(head and neck squamous cell carcinoma, 이

하 HNSCC)의 암 발생요소 중 하나로 분류되고 있다⁴⁾. HPV는 현재까지 70 여종 이상이 발견되었고 특히 HPV16 과 18은 고위험 바이러스로서 자궁경부세포의 악성변형, 불멸화를 유발하여 전구 암 상태인 상피이형증과 상피내 암까지 유도한다는 것이 국내외 많은 연구로 과학적으로 증명되었다⁵⁾. 바이러스 증식과 관련된 단백질질을 형성하는 여러 부위(open reading frames, ORF) 가운데 E6 와 E7 단백질은 종양으로의 변환을 유도하는데 주요하게 관여한다. HPV의 E6 단백질은 종양 억제자인 p53 단백질과 결합하여 p53을 분해시키고, HPV의 E7 단백질은 Retinoblastoma(Rb) 단백질에 결합하여 분해시켜 정상적인 세포 주기를 변화시킴으로 암종을 일으키게 된다⁶⁾. 대부분의 구강 편평 세포의 종양화에 흡연과 음주가 중요한 요소로 생각되고 있으나 HPV16 양성암의 경우에는 그 관련성이 적은 것으로 미루어 고위험 바이러스 HPV16과 관련된 종양화는 다른 구강암과는 다른 기전을 통해서 진행된다고 생각된다⁴⁾. 따라서 HPV16가 원인이 된 구강암

* Correspondence : Jin Kim, Department of Oral Pathology, Yonsei University College of Dentistry, Sinchondong 134, Seodaemungu, Seoul 120-752,

Tel : 02-2228-3030, E-mail : jink@yuhs.ac

* 이 논문은 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 대학중점연구소 지원사업(2009-0094028)과 중견연구자 사업(No. 2009-0078630) 지원을 받아 수행된 연구임

모델의 구축은 HPV16에 의한 암의 치료 및 예방하는 연구에 유용한 도구로 활용될 것이다.

정상적인 환경에서 세포주기 조절 시스템은 Cdk와 cyclin이 주기적으로 결합하여 활성화되면서 조절하는데, Cdk4(cyclin dependent kinase 4)는 cyclin D와 결합하여 세포주기를 G1기에서 S기로 들어가게 한다. 세포가 부적절한 환경에 노출되면 Cyclin-dependent kinase inhibitor인 p16의 과발현에 의해 세포의 조기 성장 억제가 일어난다. 이때 과발현된 p16은 Cdk4와 결합하여 Cdk4/cyclin D 복합체 형성을 방해하여 세포의 조기 성장 억제를 유도한다⁷⁾. 만약 Cdk4가 과발현되면 부적절한 환경에서도 p16의 작용을 우회하여 세포의 수명을 연장할 수 있다는 연구 보고와⁸⁾ 증가된 Cdk4의 발현은 더 공격적인 종양을 형성한다는 보고가 있다⁹⁾. 본 연구에서는 Cdk4의 과발현에 의해 세포수명이 연장됨과 동시에 세포에 변이를 축적할 수 있는 기회를 제공하여 결국 암의 진행을 촉진시킬 것이라는 가설을 세우고 human cdk4(hcdk4)를 과발현 시킨 IHOK/hcdk4 세포를 구축하였다.

hTERT(human telomerase reverse transcriptase)는 template RNA(hTR)와 함께 telomeres의 길이를 유지하면서 세포의 노화를 극복하고 세포의 불멸화를 유도한다⁸⁾. 인체에 발생하는 암의 80~90%에서 telomerase 활성을 보인다는 보고를 통해서 telomerase 활성은 암세포로의 변형에 필수적인 요소이며 hTERT는 telomerase 활성을 유도할 뿐만 아니라 암화 과정에 관여하는 여러 가지의 역할이 있을 것을 기대하고 IHOK에 hcdk4와 함께 hTERT를 도입하였다.

본 연구의 목적은 HPV16 E6와 E7로 불멸화 시킨 세포주 immortalized human oral keratinocyte(IHOK)¹⁰⁾를 이용하여 IHOK에 hcdk4를 도입시킨 IHOK/hcdk4와 IHOK에 hcdk4와 hTERT를 도입시킨 IHOK/hcdk4/hTERT를 추가로 구축하여 세포의 특징을 분석함으로써 구강암 발생의 다단계 과정을 분석하는 세포주로 활용하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 세포 배양

가. 사람 구강 각화세포(normal human oral keratinocyte: NHOK) 배양

미맹출 사랑니 발치를 목적으로 발거한 염증이 보이지 않은 제 3 대구치의 치은 조직을 취하여 멸균된 phosphate-buffered saline(PBS)과 5% betadin으로 3회 세척하였다. 채취된 조직은 500 μ l의 0.25% collagenase과 500 μ l의 4 unit/ml dispase II로 한 시간 동안 5% CO₂가 포함된 37°C 배양기에 넣어 하방 절체조직으로부터 상피를 물리적으로 분리하였다. 단일 세포로 용해하기 위해서 0.25% Trypsin/2.65 mM EDTA 1 ml 와 versene solution 1 ml로 30분 동안 처리하고 원심분리하여 세포를 모은 후에 keratinocyte growth medium-2(KBM-2, Lonza, Walkersville, MD, USA)에 부유해 60 mm collagen coated dish에 배양하였다. 3일 후에 10 ng/ml Epidermal Growth Factor(EGF)를 첨가해주고 2~3일 마다 배양액을 교체해 주었다.

나. IHOK/hcdk4와 IHOK/hcdk4/hTERT 구축과 배양

HPV16 E6/E7으로 불멸화된 IHOK 세포는 원광대학교 김은철 교수로부터 제공 받았으며, 이 세포에 pLXRN-neo-hcdk4와 pLPC-puro-hcdk4-hTERT의 vector를 이용하여 순차적으로 transfection 시켰다.

hcdk4 확보를 위하여 HUVEC(human umbilical vascular epithelial cell)을 주형으로 하여 PCR을 통해 hcdk4를 증폭시켰다. 준비된 hcdk4는 pLXRN vector에 BamH I 과 Sal I 부위에 삽입하였다. 또한 hcdk4와 hTERT의 도입을 위하여 pLPC-puro-hTERT vector를 이용하여 Hind III 부위에 hcdk4를 삽입하였다. 준비된 vector를 가지고 GP2 293-leu package cell line에 transfection 시켰으며 72시간 후에 viral soup을 50,000 g, 4°C의 조건으로 3시간 원심 분리하여 바이러스를 모은후에 ploybrene(6 μ g/ml)과 함께 IHOK 세포에 뿌려서 infection 시켰다. 24시간후에 PLXRN-neo-hcdk4에 대하여는 700 μ g/ml의 G418 그리고 PLPC-puro-hcdk4-hTERT에 대하여는 2.5 μ g/ml puromycine을 이용하여 selection 하였다. 구축된 세포주 IHOK/hcdk4와 IHOK/hcdk4/hTERT는 keratinocyte growth medium-2(KBM-2, Lonza, Walkersville, MD, USA)에 배양하였으며 6개월 이상 selection 하였다.

다. 암종 세포주와 섬유 모세포의 배양

한국 세포주 은행에 등록된 YD-10B세포¹⁰⁾는 Dulbecco's Modified Eagles Medium(DMEM: Gibco BRL, Grand Island, NY, USA)과 Ham's nutrient mixture F12(Gibco

BRL, Grand Island, NY, USA)를 3:1의 비율로 혼합하고 100 IU/ml penicillin, 100 ug/ml streptomycin, 0.6 mg/ml L-glutamine과 함께 10% fetal bovine serum (FBS: hyclone, Logan, UT, USA), 0.1 μ g/ml cholera toxin, 0.4 μ g/ml hydrocortisone, 5 μ g/ml insulin, 5 μ g/ml apotransferrin, 2 μ g/ml 3'-5-triiodo-L-thyronine (all purchased from Sigma St, Louis, MO, USA)이 포함된 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다.

2. PD(population doublings) 측정

불멸화된 세포주의 PD값을 계산하기 위하여 100 mm 세포 배양용 접시에 30% 정도가 되도록 세포를 접종한 후에 80~85% 정도로 세포가 증식 되었을 때 계대 배양하였다. PD 값의 계산은 $n = \log(NH/NI) / \log 2$ 이다. 여기서 n은 PD 값, NH(the number of cells harvested)는 수확된 세포의 수, 그리고 NI (the number of cells inoculated)는 접종된 세포의 수를 지칭한다.

3. PCR과 RT-PCR

2×10^6 의 세포를 원심분리 하여 proteinase-K로 처리한 후 QIAamp DNA minikit(QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 DNA를 추출하였다. RNA를 추출하기 위해서 RNeasy plus mini kit(QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하였다. I-Maxtm (II) DNA polymerase 2.5 U와 dNTPs 2.5 mM이 들어있는 Maxime PCR premix kit(Intron, Seongnam, Kor) tube에 DNA 200 ng 그리고 forward 와 reverse primer를 각 10 pmole을 첨가하고 DW로 최종 용적이 20 μ l 되도록 하였다. PCR 조건은 94°C 5분; 94°C 30초, 60°C 1분, 72°C 1분; 72°C 10분으로 30 cycle이 되게 하였다. primer 염기서열은 HPV16 E6: forward ATG TTT CAG GAC CCG CAG GAG CGA, reverse TTA CAG CTG GGT TTC TCT ACG TG; HPV16 E7 forward TGT TAG ATT TGC AAC CAG AGA CA, reverse TTA TGG TTT CTG AGA ACA GAT GGG; p53 exon 4 forward TTT TCA CCC ATC TAC AGT CC, reverse TTA TGG TTT CTG AGA ACA GAT GGG; p53 exon 5 forward TGT TCA CTT GTG CCC TGA CT, reverse CAG CCC TGT CGT CTC TCC AG; p53 exon 6 forward GCC TCT GAT TCC TCA CTG AT, reverse TTA ACC CCT CCT CCC AGA GA; p53 exon 7 for-

ward GTG TTG TCT CCT AGG TTG GC, reverse GTC AGA GGC AAG CAG AGG CT; p53 exon 8 forward TAT CCT GAG TAG TGG TAA TC, reverse AAG TGA ATC TGA GGC ATA AC이다. 증폭된 PCR 산물은 1% poly-acrylamide gel에서 30분 동안 전기 영동하였다. UV transfer illuminator(Atlas, California, USA)를 이용하여 band를 확인하였다.

4. TRAP(Telomeric repeat amplification protocol) assay

Telomerase 활성은 TRAPEze ELISA telomerase detection kit를 이용하여 관찰하였다. 수집된 세포는 DNase-, RNase-free 1.5 ml microfuge tube에 담아 tabletop centrifuge 5415D(Eppendorf)를 이용하여 6000 rpm에서 6분 동안 원심분리하여 상층 부분은 제거 하고 나머지 세포는 -80°C deep freezer에 보관하였다. 총 5×10^6 세포가 사용되었다. 5 \times TRAP Reaction Mix, Taq DNA polymerase, ddH₂O와 세포(0.5 μ g/ml과 1.0 μ g/ml)를 섞어 Reaction mixture를 준비하였다. heat-inactivated control을 준비하기 위해 10분 동안 85°C에서 인큐베이션 시켰으며 Hela 세포는 positive control로 사용되었다. TSR and CHAPS Lysis buffer는 각각 PCR positive control 와 PCR contamination control 을 위해 사용되었다. PCR 증폭에 적용된 조건은 다음과 같다: 30°C/ 30분, 94°C/3분, 94°C/3초, 55°C/30초, 33cycle. ELISA detection을 위해서 Blocking/Dilution buffer를 the microtiter plate (MTP)에 전처리하고 30분간 유지시켰다. TRAP reaction product는 전 처리된 well에 넣고 37°C에서 1시간 유지시켰다. Absolution과 anti-DNP antibody-HRP conjugate를 첨가하여 빛을 차단한 상태에서 30분간 유지시키고 stop solution으로 반응을 중지시켜 microtiter plate reader기를 이용하여 450 nm와 690 nm 값을 측정하였다.

5. 단백질 발현(Western blotting)

세포가 100 mm 배양접시에 약 80% 정도 성장했을 때 PBS로 수세하고 protease inhibitor cocktail tablet (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany)을 첨가한 RIPA buffer (Cell signaling, Beverly, MA, USA)로 용해시킨 후 4°C, 12,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 단백

질을 얻었으며 BSA(Bovine serum albumin; Sigma, St. Louis, MO, USA)로 정량분석 하였다. 5× SDS sample buffer(60 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS, 25% glycerol, 14.4 mM 2-mercaptoethanol, 0.1% Bromophenol blue)에 넣고 10분간 100℃에서 denaturation 시켜 8% SDS-polyacrylamide gel에서 80V로 1시간, 120V로 2시간 동안 전기영동한 후, nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia biotech, Piscataway, NJ, USA)에 옮겼다. Membrane은 5% fat-free dry milk-PBST buffer (PBS, 0.2% Tween-20)에서 2시간 동안 blocking 하였으며, 1× PBST buffer로 10분간 3회 수세하였다. 일차 항체는 TERT (H-231, rabbit polyclonal, Santa Cruz), p53 (DO-1, mouse monoclonal, Calbiochem), hcdk4 (DCS156, mouse monoclonal, Cell Signaling), Rb (4H1, mouse monoclonal, Cell Signaling), phospho-Rb (Ser780, polyclonal, Cellsignaling)를 이용해 3시간 혹은 4℃에서 16시간 반응시켰다. 반응이 끝나면 1× PBST buffer로 10분간 3회 수세하였다. 이차 항체는 1:2000의 비율로 anti-rabbit 또는 anti-mouse antibody (Cell Signaling, Beverly, MA, USA)를 사용하여 상온에서 한 시간 반응시킨 뒤 1×PBST buffer로 10분간 3회 세척하였다. 그 후 ECL (Enhanced chemi luminescence: Amersham Pharmacia biotech, Piscataway, NJ, USA)로 반응시킨 후, 카세트에 넣어 nitrocellulose membrane 위에 x-ray 필름을 놓고 노출시킨 후, 현상하여 단백질의 발현 정도를 관찰하였다.

III. 결 과

1. 불멸화 세포주의 형태학적인 특징과 성장 속도

사람 정상 구강 상피(normal human oral keratinocyte, 이하 NHOK)는 형태학적으로 입방형이다. 5번의 계대 배양 후에 NHOK는 불규칙적으로 납작해지는 분화된 형태의 세포의 모양을 유지하다가 population doublings (PD)을 다섯 번 이상 넘기지 못하고 사멸하였다(Fig. 1A). 이에 반해 HPV16 E6/E7으로 불멸화 시킨 IHOK 와 IHOK에 hcdk4를 도입한 IHOK/hcdk4 세포주 그리고 IHOK에 hcdk4와 hTERT를 함께 도입한 IHOK/hcdk4/hTERT 세포주는 50번의 계대 배양 후에도 입방 형태를 지속적으로 유지하며 불멸화되었다(Fig. 1).

초기에 NHOK는 불멸화 세포와 거의 같은 속도로 성장하다가 성장 속도가 급격히 감소하면서 더 이상 성장하지 않는 세포 노화를 겪었다. HPV16 E6/E7으로 불멸화된 세포주인 IHOK, IHOK/hcdk4 그리고 IHOK/hcdk4/hTERT는 일정한 속도를 유지하며 지속적인 성장을 보였다(Fig. 2).

2. PCR을 이용한 HPV16 E6와 E7의 존재와 변이 여부

HPV16 E6/E7으로 불멸화된 세 가지 종류의 세포주 IHOK, IHOK/hcdk4 그리고 IHOK/hcdk4/hTERT의 HPV16, HPV16 E6 그리고 HPV16 E7의 존재 유무를 확인한 결과 실험에 사용된 불멸화 세포 모두에서 HPV 바이러스를 비롯하여, E6와 E7의 DNA가 존재함을 확인하였고(Fig. 3A), 염기서열(sequence) 분석을 통하여 변이(mutation)가

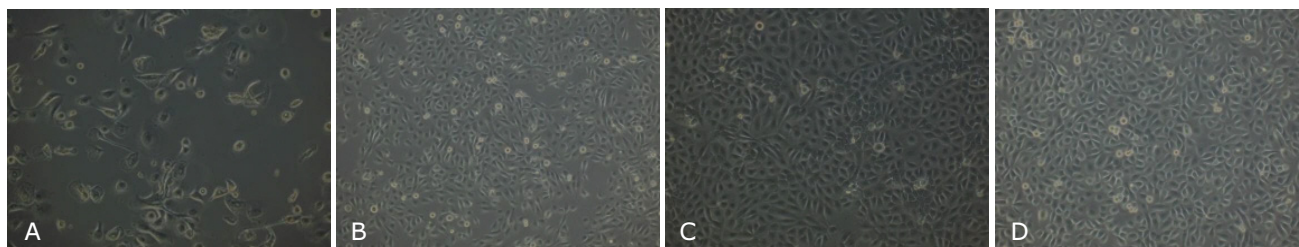


Fig. 1. Morphology of cell lines. A: NHOK, B: IHOK, C: IHOK/hcdk4, D: IHOK/hcdk4/hTERT. Primary cultured NHOK was mixed with basal, suprabasal and cornified cells. Cell populations of NHOK were completely senescent after several population doublings, whereas all of HPV16 E6/E7 immortalized cell lines (IHOK, IHOK/hcdk4 and IHOK/hcdk4/hTERT) were almost consisted with basal cells and showed stable growth.

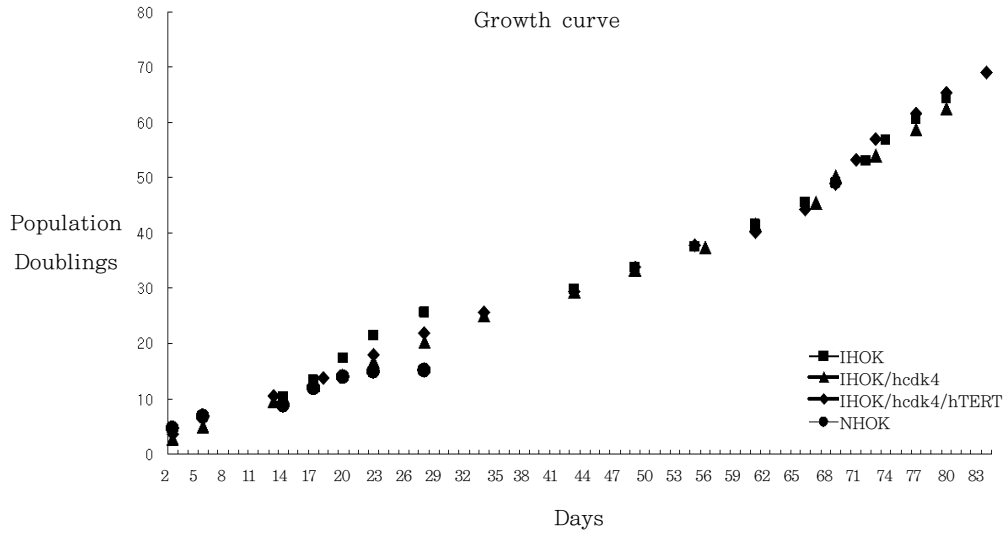


Fig. 2. Growth curve of NHOK and HPV16 E6/E7-immortalized cell lines. NHOK were completely senescent, PD were calculated as follows: $n = \log(NH/NI) / \log 2$ where n is the number of PD, NH is the number of cells harvested, and NI is the number of cells inoculated, * indicates the PD level at which cell populations were senescent, whereas HPV16 E6/E7 immortalized cell lines IHOK, IHOK/hcdk4 and IHOK/hcdk4/hTERT showed stable population growth rate.

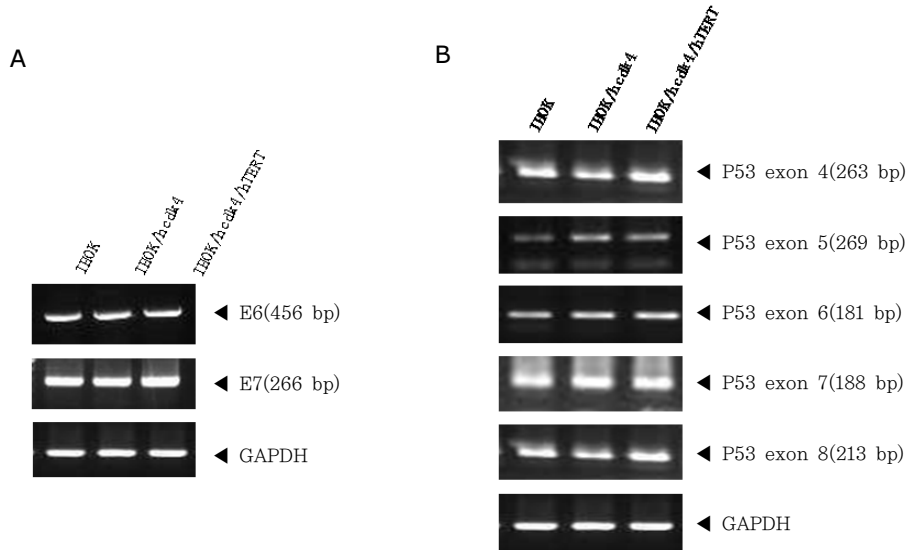


Fig. 3. E6/E7 expression and p53 analysed by PCR Total DNA was extracted from cells, Products were run on 1% ethidium bromide stained agarose gels. All three kinds of immortal cell lines have E6 and E7. Mutations of p53 and E6 were not detected in all three.

존재하지 않음도 확인하였다. p53의 변이 여부를 확인하기 위해서 p53에서 변이가 빈번한 exon 4~9까지를 중합 효소 연쇄 반응(polymerase chain reaction, 이하 PCR)하여 DNA를 확인하였다(Fig. 3B). 관찰된 DNA의 변이 존재 유

무를 확인하기 위해 agarose gel에서 추출한 DNA의 염기서열을 분석한 결과 p53 exon 4부터 9까지 변이가 관찰되지 않았다.

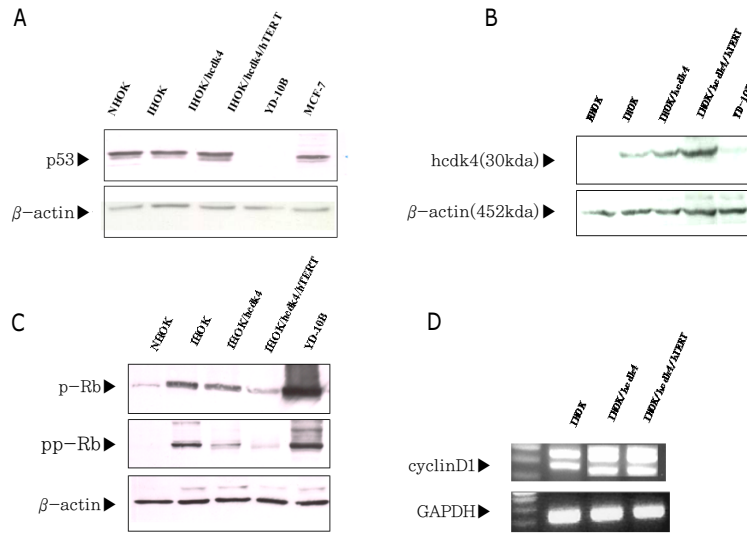


Fig. 4. Western blot analysis of p53, Rb, phosphorylated Rb (pRb) and hcdk4 and RT-PCR of cyclin D in three kinds of immortal cell lines, (A) There is a significant expression of p53 in HPV16 E6/E7 immortalized cell lines (IHOK, IHOK/hcdk4 and IHOK/hcdk4/hTERT). YD-10B of lane 4 is negative control of p53, MCF-7 of lane 5 is positive control of p53. (B) Overexpression of hcdk4 in both IHOK/hcdk4 and IHOK/hcdk4/hTERT. (C) Both IHOK/hcdk4 and IHOK/hcdk4/hTERT show more downregulated pRb and phosphorylated Rb than IHOK. (D) Expression of cyclin D by RT-PCR in three immortal cell lines.

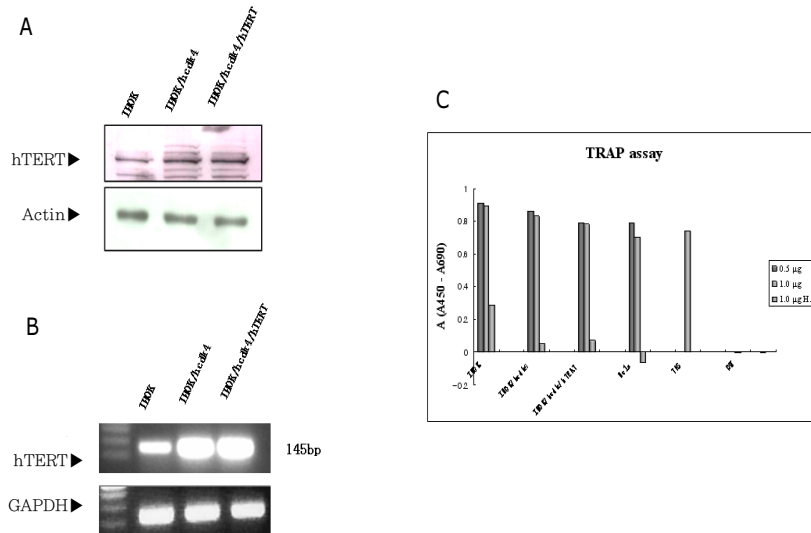


Fig. 5. Western blotting and TRAP assay (A)(B) IHOK/hcdk4 and IHOK/hcdk4/hTERT cell lines showed upregulated hTERT expression, (C) All three immortal cell lines showed positive telomerase activity. If sample-HI (ΔA) is more than 0.15 ($\Delta A \geq 0.15$), telomerase activity is positive. Not only in IHOK/hcdk4/hTERT but also in IHOK and IHOK/hcdk4, high level of telomerase activity was detected.

3. p53, hcdk4, Rb 그리고 pRb의 단백질 발현

E6에 의해 p53 단백질 발현이 억제되었는지 확인하기 위하여 p53 단백질 발현을 관찰한 결과 p53은 높은 수준으로

발현되고 있음을 관찰했다(Fig. 4A). p53의 positive control으로는 MCF-7 세포가 사용되었으며, negative control로는 YD-10B가 사용되었다. YD-10B는 p53 유전자가 stop

codon (TAC → TAA)으로 변이를 일으킨 세포주로서 p53 단백질을 발현하지 못한다¹⁰⁾.

hcdk4를 과발현 시키므로 세포의 암화 가능성을 증대시킬 것을 기대하고 구축한 세포주 IHOK/hcdk4와 IHOK/hcdk4/hTERT에서 hcdk4의 발현이 증가하는 지를 확인하였다. 구축된 IHOK/hcdk4와 IHOK/hcdk4/hTERT의 두 세포주에서 모세포(parent cell)인 IHOK보다 더 높은 hcdk4 발현양을 확인 할 수 있었다(Fig. 4B). hcdk4 과발현에 따라 cyclin D의 과발현 역시 확인 하였다. 다음으로 hcdk4와 cyclinD의 복합체가 기능을 하는지를 알아보기 위해 표적 단백질인 Rb의 발현양과 인산화된 Rb 단백질(pRb)의 발현양을 관찰하였다. hcdk4는 Rb protein을 표적으로 하여 Rb를 인산화 시켜서 전사 인자인 E2F의 활성을 유도하게 한다. Rb의 발현양은 IHOK 세포주에 비해서 IHOK/hcdk4 그리고 IHOK/hcdk4/hTERT에서 감소되었으며, pRb의 발현양 역시 감소되었다(Fig. 4C). 이 결과는 hcdk4가 과발현 되었음에도 표적 단백질인 Rb에 작용하지 않고 있음을 시사한다.

4. Telomerase activity와 hTERT의 발현

hTERT를 과발현시킨 세포주 IHOK/hcdk4/hTERT에서 hTERT의 발현양이 증가 되었는지를 확인하기 위하여 RT-PCR과 western blotting을 시행하였다. 또한 telomerase activity의 차이가 있는지를 확인하기 위하여 TRAP assay를 시행하였다. HPV16 E6/E7으로 불멸화 된 IHOK를 비롯하여 IHOK/hcdk4 그리고 IHOK/hcdk4/hTERT 세포주에서 높은 telomerase 활성을 보였다(Fig. 5C). hTERT의 단백질 발현양과 RNA 발현양은 IHOK/hcdk4 와 IHOK/hcdk4/hTERT에서 증가되었다(Fig. 5A-B).

IV. 고찰

High-risk human papillomavirus(HPV)는 자궁 경부에서 인체에 종양을 일으키는 주요한 원인이 된다는 많은 연구 보고가 있다. 구강 편평 세포 암종의 경우 HPV의 발현 빈도가 자궁 경부암에 비해 낮지만 HPV와 HNSCC의 연관성이 받아들여지고 있다^{11,12)}. 본 연구는 HPV16 E6와 E7로 불멸화 시킨 세포주 IHOK의 특성을 분석함과 동시에 IHOK/hcdk4 와 IHOK/hcdk4/hTERT를 구축하여 세포의 특징을

분석하여, 암의 진행 단계 모델에 적용하고자 하였다.

HPV의 두 개의 viral oncogene products인 E6와 E7은 암의 진행에서 필수적인 역할을 한다¹³⁾. 따라서 실험에서 사용된 세포주 IHOK를 비롯하여 구축된 IHOK/hcdk4 와 IHOK/hcdk4/hTERT의 HPV의 존재 유무와 E6와 E7의 발현 여부를 PCR을 통해서 검증하였다(Fig. 3). 실험에 사용된 불멸화 세포주에서 E6가 기대되는 역할을 하고 있는지, 즉 p53의 단백질 발현이 감소되고 있는지를 확인하고자 Western blotting을 하였다. 그 결과 세종류의 불멸화 세포주에서 p53의 강한 단백질 발현이 있었다(Fig. 4A). 이 결과는 두 가지의 의문을 제기하였다. 첫째는 발현된 E6 유전자가 타겟 세포에 감염되어 유전체 내로 삽입되는 과정에서 E6 유전자의 변이에 의해 p53의 발현 억제 기능을 상실했을 가능성과, 둘째는 E6는 정상적인 기능을 하고 있지만 발현된 p53의 변이 또는 기능적인 불활성의 가능성이다. p53에 대한 E6의 기능을 입증하기 위해서는 HPV16 E6/E7으로 불멸화 시키기 전의 모세포를 대조군으로 하여 p53의 단백질 발현 감소를 보이는 것이 가장 합당하지만 모세포를 획득하기 어려운 상황에서 E6의 유전자 염기서열을 분석하는 것이 차선책이라고 판단되어, E6의 변이 여부를 확인한 결과 유전자 변이는 관찰할 수 없었다. 다음으로 발현된 p53 유전자에 변이가 있는지 그리고 단백질이 정상적인 기능을 하고 있는지를 알아보기 위하여 p53 exon 4에서 9까지 염기서열을 분석한 결과 변이를 찾을 수 없었고, 세포에 손상을 가져 오는 상황에서 p53 단백질의 과발현을 확인함으로써 p53 유도 기능에도 문제가 없음을 확인 했다. HNSCC에서 HPV16 이 발현되는 경우 p53의 변이가 거의 없음을 보고한 연구가 우리의 결과를 뒷받침 해 주고 있다¹⁴⁾. 이로써 E6가 세포내에 정상적으로 존재하면서 동시에 p53이 정상적인 기능을 할 수 있음을 밝혔다. HPV E6와 E7을 도입시킨 cottontail rabbit 세포에서 E6가 p53에 결합하지 못하므로 p53을 분해할 수 없음을 보고한 연구는 우리의 결과를 일부 설명할 수 있으며¹⁵⁾, E6에 의한 p53이 분해되어지는 기전을 우회할 수 있는 가능성을 제기할 수 있다. 이를 설명하기 위해서 추후 더 연구되어야 할 것으로 생각된다.

HPV의 E7 역시 종양 억제 유전자들 중 하나인 Retinoblastoma(Rb) 유전자를 타겟으로 한다. Rb 단백질은 E2F 라는 전사 인자와 결합하여 활성을 억제하므로 세포 주기를 조절 하는 중요한 역할을 한다. E7 단백질은 Rb와 결합

하여 단백질을 분해시키는데, 이 과정에서 E2F 전사인자가 통제 되지 않고 활성화 되면서 세포 주기를 무절제 하게 진행 시킨다. E7에 의해 Rb 단백질의 발현이 감소되었는지를 확증하기 위해 Western blotting을 시행한 결과 IHOK의 Rb는 구강암 세포인 YD-10B의 Rb에 비해 발현양이 적었다. 흥미롭게도, IHOK/hcdk4와 IHOK/hcdk4/hTERT에서는 Rb 단백질이 IHOK 보다 감소되었다(Fig. 4). 또한 인산화된 Rb(pRb) 단백질도 Rb와 같은 경향으로 감소되었다. Rb의 단백질 감소는 E2F의 활성을 간접적으로 보여 줄 수 있으며, Rb의 단백질 감소는 Rb의 인산화에 의한 것이 아니라 분해에 의한 것이라 생각된다. 이 결과를 토대로 HPV16 E6/E7으로 불멸화시킨 세포주에서 Rb 단백질은 hcdk4 또는 hTERT의 발현에 의해서 조절될 수 있음을 시사한다. hTERT의 과발현이 Rb/E2F 경위를 매개로 세포 성장 속도를 증가 시킨다는 보고와 hTERT의 과발현과 Rb의 분해를 통하여 세포를 불멸화 시킬 수 있다는 보고가 있다^{16,17}. 이 보고는 hTERT에 의해 Rb의 단백질이 감소된 결과를 일부 설명할 수 있다. 최근에 암의 진행 과정에 관련된 hTERT의 또 다른 역할들과 기전에 대한 보고가 있다⁸. 이러한 보고들을 바탕으로 hTERT가 암의 발생과 진행에 어떻게 관련되어 있는지에 대한 추가적인 연구가 필요하다.

Cdk4가 과발현되면 부적절한 환경에서도 p16의 작용을 우회하여 세포의 수명을 연장 할 수 있다⁸는 연구 보고와 함께 증가된 Cdk4의 발현은 더 공격적인 종양을 형성한다는 보고를 바탕으로 본 연구에서는 hcdk4를 과발현 시키므로 세포의 암화 가능성을 증대 시킬 것을 기대하고 구축한 세포주 IHOK/hcdk4와 IHOK/hcdk4/hTERT에서 hcdk4의 발현이 증가하는지를 확인하였다. IHOK에서도 상당한 hcdk4 발현이 있었고, IHOK/hcdk4와 IHOK/hcdk4/hTERT에서 hcdk4의 발현이 증가되었다. hcdk4는 Rb 단백질을 표적으로 하여 인산화 시켜서 전사 인자인 E2F의 활성을 유도하게 된다. 앞에서 언급한 것처럼 Rb의 발현양은 IHOK 세포주에 비해서 IHOK/hcdk4 그리고 IHOK/hcdk4/hTERT에서 순차적으로 감소되었으며, pRb의 발현양 역시 감소되었다(Fig. 4). 이 결과는 hcdk4가 과발현 되었음에도 표적 단백질인 Rb에 작용하지 않고 있음을 보여주었다.

다음으로 세 가지 불멸화 세포의 telomerase 활성을 알아보기 위하여 TRAP assay를 진행한 결과 모두 강한 telomerase 활성을 보였다. HPV E6에 의해서 hTERT와 telo-

merase가 유도된다는 연구 보고¹⁹와 상응하는 결과였으며, E6에 의해서 유도된 telomerase 활성은 높은 수준이었기 때문에 불멸화된 세포임을 입증할 수 있었다. Ectopic hTERT의 도입에 의해 telomerase 활성이 증가되지는 않았지만 hTERT의 발현양은 IHOK/hcdk4와 IHOK/hcdk4/hTERT에서 증가되었다. 따라서 증가된 hTERT의 역할을 분석하기 위한 연구가 추후 진행되어야 하겠다.

본 연구는 HPV16 E6와 E7로 불멸화 시킨 세포주 immortalized human oral keratinocyte를 이용하여 IHOK에 hcdk4를 도입시킨 IHOK/hcdk4와 IHOK에 hcdk4와 hTERT를 도입시킨 IHOK/hcdk4/hTERT를 추가로 구축하여 세포의 특징을 in vitro에서 확인하였으며, HPV16가 원인이 된 다단계 구강암을 이해하고 더 나아가 암의 치료와 예방에 유용한 도구로 활용될 것이다.

V. 참고문헌

1. Paterson IC, Matthews JB, Huntley S, et al: Decreased expression of TGF-beta cell surface receptors during progression of human oral squamous cell carcinoma, *J Pathol* 2001; 193:458-467.
2. Califano J, van der Riet P, Westra W, et al: Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization, *Cancer Res* 1996; 56:2488-2492.
3. Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B: Nature. Genetic instabilities in human cancers 1998; 396:643-649.
4. van Houten VM, Snijders PJ, van den Brekel MW, et al: Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas, *Int J Cancer* 2001;93:232-235.
5. Oda D, Bigler L, Lee P, Blanton R: HPV immortalization of human oral epithelial cells: a model for carcinogenesis, *Exp Cell Res* 1996; 226:164-169.
6. Narisawa-Saito M, Kiyono T: Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins, *Cancer Sci* 2007; 98:1505-1511.

7. Serrano M, Hannon GJ, Beach D: A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature* 1993; 366:704–707.
8. Ramirez RD, Herbert BS, Vaughan MB, et al: Bypass of telomere-dependent replicative senescence (M1) upon overexpression of Cdk4 in normal human epithelial cells. *Oncogene* 2003; 22:433–444.
9. Koontongkaew S, Chareonkitkajorn L, Chanvitan A, et al: Alterations of p53, pRb, cyclin D(1) and cdk4 in human oral and pharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2000; 36:334–339.
10. Lee EJ, Kim J, Lee SA, et al: Characterization of newly established oral cancer cell lines derived from six squamous cell carcinoma and two mucoepidermoid carcinoma cells. *Exp Mol Med* 2005; 37:379–380.
11. Psyrri A, DiMaio D: Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2008; 5:24–31.
12. Hoffmann M, Lohrey C, Hunziker A, Kahn T, Schwarz E: Human papillomavirus type 16 E6 and E7 genotypes in head-and-neck carcinomas. *Oral Oncol* 2004; 40:520–524.
13. Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX: Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 2002; 21:1510–1517.
14. Westra WH, Taube JM, Poeta ML, Begum S, Sidransky D, Koch WM: Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2008; 14:366–369.
15. Ganzenmueller T, Matthaei M, Muench P: The E7 protein of the cottontail rabbit papillomavirus immortalizes normal rabbit keratinocytes and reduces pRb levels, while E6 cooperates in immortalization but neither degrades p53 nor binds E6AP. *Virology* 2008; 372:313–324.
16. Xiang H, Wang J, Mao Y, Liu M, Reddy VN, Li DW: Human telomerase accelerates growth of lens epithelial cells through regulation of the genes mediating RB/E2F pathway. *Oncogene*. 2002; 21:3784–3791
17. Yang G, Rosen DG, Colacino JA, Mercado-Uribe I, Liu J: Disruption of the retinoblastoma pathway by small interfering RNA and ectopic expression of the catalytic subunit of telomerase lead to immortalization of human ovarian surface epithelial cells. *Oncogene* 2007; 26:1492–1498.
18. Massard C, Zermati Y, Pauleau AL: hTERT: a novel endogenous inhibitor of the mitochondrial cell death pathway. *Oncogene* 2006; 25:4505–4514.

