2004 춘계학술발표회 논문집
한국원자력학회

Estrogen receptor 활성 측정을 위한 분자영상법의 개발

Development of molecular imaging method for monitoring estrogen receptor activity

정우석, 정 준기, 강주현, 이용진, 김광일, 오현정, 정재민, 이동수, 이명철
서울대학교 의과대학 핵의학교실, 서울대학교 의과대학 암연구소
서울 종로구 연건동 28번지

요 약

에스트로겐 수용체 (Estrogen receptor, ER)는 유방암의 50-60%에서만 발현되며 발현 유무에 따라 호르몬 치료를 결정한다. 하지만 에스트로겐 수용체가 발현되는 종양에서도 호르몬 치료에 대한 반응이 일부에서만 나타나 에스트로겐 수용체가 암세포에서 실제 발현되는 활성의 양상을 직접 측정하는 방법이 필요하다. 기존의 에스트로겐 수용체의 발현을 측정하는 방법은 방사수용체측정법 (radioreceptor assay) 또는 면역조직화학법 (immunohistochemistry)와 같이 조직을 필요로 하는 침습적인 방법이다. 분자영상법은 세포내의 여러 현상들을 대상물의 희생이나 손상없이 반복적으로 영상으로 평가할 수 있는 방법이다. 이번 연구에서는 sodium iodide symporter (NIS) 유전자를 리포터 유전자로 이용하여 세포내의 에스트로겐 수용체의 발현을 측정하기 위한 영상법을 개발하고자 하였다. 연구 방법은 estrogen receptor response element (ERE)를 프로모터로 사용하여 NIS유전자가 발현되도록 클로닝(pERE-hNIS)하고 사람의 유방암 세포주에 이입하였다. pERE-hNIS유전자가 이입된 세포에 estradiol 또는 tamoxifen을 처리하고 방사성 옥소의 세포내 섭취를 측정하였다. 에스트로겐 수용체가 발현되는 사람의 유방암 세포인 MCF-7에서 estradiol 또는 tamoxifen을 처리함으로써 세포내에서 프로모터가 활성화되었고, 이것이 NIS유전자를 발현시켜 세포내 방사성 옥소의 섭취가 처리한 약제의 농도에 따라 증가하였다. 그러나 에스트로겐 수용체가 발현되지 않는 유방암세포에 리포터 유전자가 이입된 경우에는 약제의 처리에 전혀 반응하지 않았다. 따라서 이번 연구에서 제조한 리

포터 유전자를 이용하여 ER 발현을 측정하고 약제의 효능을 측정할 수 있었다.

Abstract

Estrogen receptor is expressed in 50-60% of the breast cancer and hormone therapy is effective for only ER-positive breast cancer. Therefore, we need to know whether or not the ER is expressed in breast cancer before hormone therapy. So far, the method for monitoring ER positiveness in breast tissue is radioreceptor assay or immunohistochemistry which is invasive method due to tissue biopsy. In this study, we develop the molecular imaging method of sodium iodide symporter (NIS) gene as a reporter gene for monitoring ER activity. Because molecular imaging is evaluation method through the comparison between the image intensities obtained in vivo, molecular imaging method is noninvasive and easily quantitative. We constructed the recombinant plasmid (pERE-NIS) which NIS gene expression is controlled by estrogen response element (ERE) promoter. MCF-7, ER-expressing human breast cancer cell line, was transfected with pERE-NIS with lipofectamine (Invitrogen Co). When pERE-NIS transfected MCF-7 was treated with estradiol or tamoxifen, intracellular uptake of ^{125}I was higher than those of non-treated. The activation of ERE by drug treatment was occurred and it was caused to expression of NIS gene. The degree of ^{125}I uptake depend on treated drug concentration. However, in case of pERE-NIS transfected breast cancer which do not express ER, there was no response with drug treatment. Therefore, we can monitor ER functionality and the efficacy of drugs with this pERE-NIS reporter system.

1. 서 론

1.1 분자영상법

분자생물학의 발달과 첨단 영상기술이 발전하면서 관심 유전자의 발현정도를 포함한 다양한 세포내의 현상들을 대상물의 희생이나 손상없이 반복적으로 영상화할 수 있는 방법들이 연구되어 왔으며, 그 대표적인 예가 바로 핵의학 영상리포터를 이용하는 분자영상법이다. 현재까지는 유전자의 이입여부나 발현 정도에 대한 일반적인 분석방법이 대상물의 희생이나 조직을 채취하여 분석하는 방법이 사용되고 있다. 그러나 분자 영상법은 조직검체 채취를 하지 않아도 되는 비침습적인 방법이며, 반복적으로 쉽게 정량화할 수 있는 기술로, 접근 방법에 따라 광학적 영상화기법 (Optical Imaging), 핵의학적 영상화 기법(Nuclear Imaging)과 MRI 영상화 기법(MR Imaging)등 3가지로 분류된다. 분자영상법을 이용하면, in vitro 결과 뿐만 아니라 쉽게 실험 동물 모델에 적용하여 신약 후보 물질을 screening 할 수 있기 때문에 좀 더 생체 결과에 가까운 in vitro 결과를 얻을 수 있다. 이번 연구에서는 핵의학 영상리포터로 sodium iodide symporter (NIS) 유전자를 이용하였다. 이러한 영상기법이 체계화되면 앞으로 유전자 발현을 영상화할 수 있을 뿐 아니라, 세포 신호전달 체계 연구, 단백질-단백질 상호작용 연구 및 줄기세포와 면역 세포의 이동분포를 연구하는 데 널리 이용할 수 있을 것이다.

1.2 NIS(Sodium/Iodide symporter)

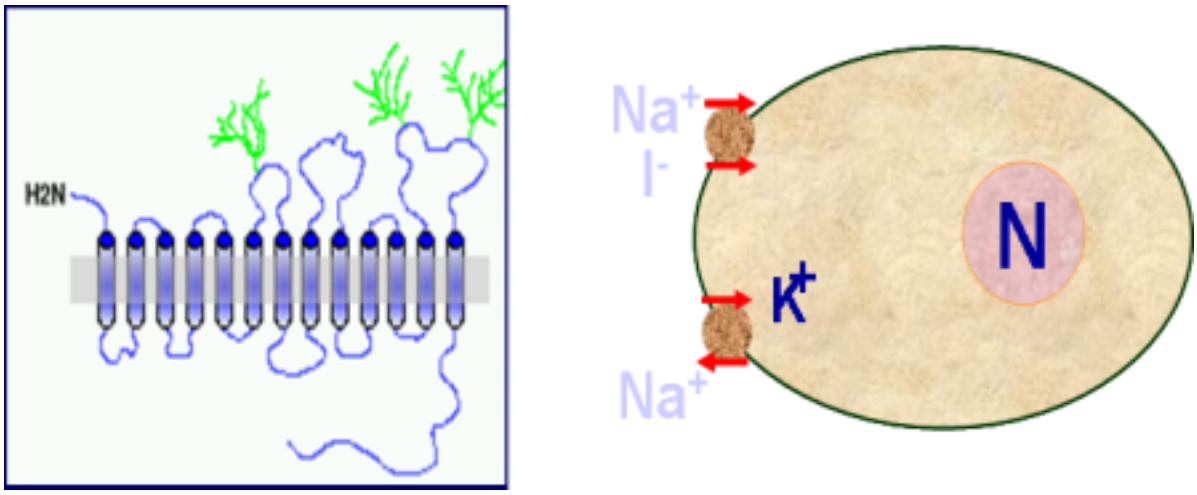

그림 1. sodium iodide symporter의 세포막에서의 구조 (왼쪽)와 기능 (오른쪽)

NIS는 갑상선에 특이적으로 발현하는 막 단백질로 세포의 표면에서 sodium 이온과 iodide 이온을 함께 세포내로 운반하는 역할을 하는 운반체로, 1996년 흰쥐(Rat)의 NIS 유전자 서열이 밝혀지면서 방사성 요오드를 이용한 유전자 치료에 널리 이용되고 있다. 관심유전자의 발현 정도, 위치, 기간 등을 알기위하여 그림 2와 같이 NIS를 특정 세포 내로 이입하고 방사성옥소를 주사하면 유전자를 이입한 세포로 방사성 옥소가 축적된다. 축적된 방사성 옥소를 감마 카운터를 이용하여 정량분석하거나, 살아있는 동물을 감마 카메라를 이용하여 관심유전자의 발현 부위나 정도를 영상으로 평가할 수 있다.

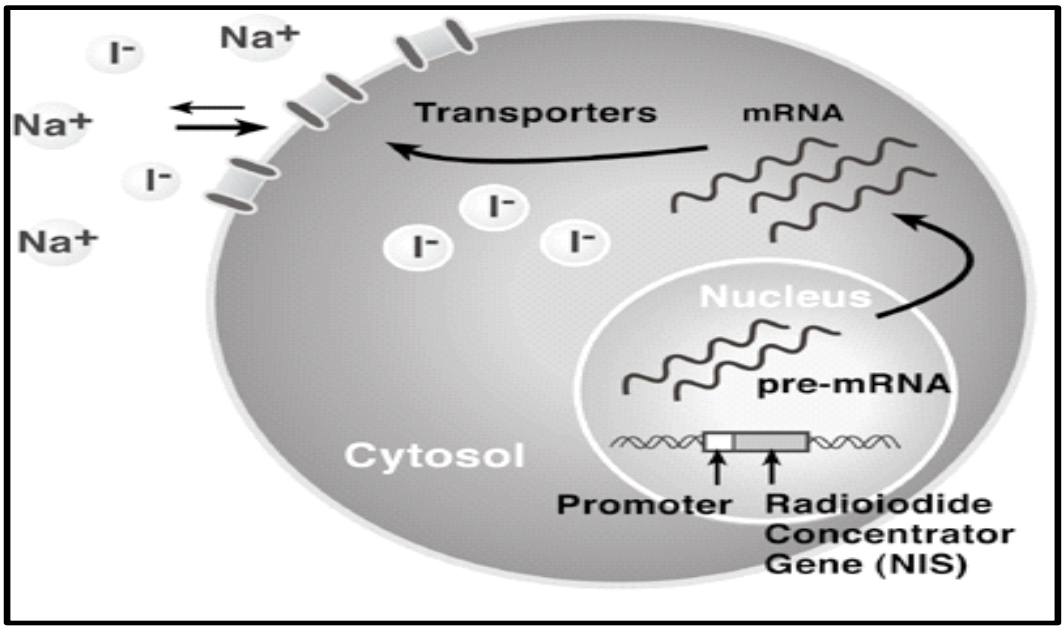

그림 2. NIS를 이용한 관심유전자의 발현 정도의 평가와 방사성 핵종을 이용한 유전자 치료방법의 도식

1.3 영상리포터 유전자로 NIS 유전자의 이용

영상리포터 유전자로 NIS 유전자를 이용하면 방사성 추적자로 구입이 용이한 방사성 요오드를 사용할 수 있기 때문에 널리 보급된 감마카메라 또는 SPECT로 영상화가 가능하

다. 핵의학 치료에서 가장 많이 사용하고 있는 ^{99m}Tc도 NIS을 통하여 세포에 섭취되므로, 방사성옥소 대신 ^{99m}Tc이 사용 가능하며, NIS는 인체 내에 원래 존재하는 단백질로 면역반응을 유발하지도 않는다. 또한, 전임상연구단계에서 개발된 첨단 영상기법을 쉽게 임상으로 적용할 수 있을 것이다.

1.4 에스트로겐 수용체

폐경기 여성에게 estradiol을 처방하면 골다공증, 심혈관계 질환 중추신경계 질환 등에 예방효과가 있는 반면, 유방암 및 자궁암의 발병을 증가시키는 단점이 있는 것으로 보고되고 있다. 에스트로겐의 효능을 대신하면서 발암의 가능성을 낮춘 새로운 SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator) 의 개발이 필요하고, SERM의 개발을 위해서는 적절한 drug screening 방법이 필요하다. 유방암 환자 중 50-60% 에서만 ER 양성이며, ER 양성 또는 음성여부에 따라 치료에 사용하는 약의 종류가 달라지므로, 유방암 환자에게서 에스트로겐 수용체의 존재 여부와 여러 종류 SERM에 대한 치료 반응정도를 조기에 검사하여 환자 개개인에 대한 맞춤 치료 방법을 확립하여야 한다. 에스트로겐 수용체의 활성과 관계되는 여러 질환(예를 들면 osteoporosis)에서 병태생리를 연구하고 치료법을 개발하는데 유용하게 사용이 가능할 것이다. 또한 SERM의 효능 평가를 대상물의 희생이나 손상 없이 실시간으로 영상화할 수 있을 뿐만 아니라 정량적인 평가에도 이용이 예상된다.

2. 대상 및 방법

2.1 ERE를 promoter로 한 hNIS 유전자 cloning

pERE-TA-SEAP (Clontech co.)의 ERE와 minimal promoter TATA box를 포함한 부위를 PCR로 증폭하였다. pcDNA-hNIS 유전자에서 CMV promoter부위를 제거하고 그 부위에 PCR로 증폭한 DNA fragment를 삽입하여 pERE-hNIS 재조합 plasmid를 제조했다.

2.2 사람의 유방암세포주에 pERE-hNIS재조합 유전자 이입

에스트로겐 수용체를 발현하는 것으로 알려진 사람의 유방암 세포주인 MCF-7과 에스트로겐 수용체를 발현하지 않는 MDA-MB231 세포주를 각각 한국세포주은행에서 구입하였다. 유전자를 이입하기 전날에, 세포를 6 well plate에 (세포수, 5×10^5)으로 배양하고, 재조합 유전자 이입은 liposome (LIPOFECAMINE)을 이용했다. DNA 1 ㎍을 배지 100 ㎕에 희석하여 PLUS reagent를 6 ㎕를 첨가 후 실온에서 15분 간 반응시키고, 다른 시험관에 LIPOFECAMINE reagent 4 ㎕를 배지 100 ㎕에 희석하여 위의 혼합물과 섞은 후 상온에서 15분간 반응시켰다. 6 well plate에 배양한 세포를 혈청이 함유되지 않은 배지로 세척하였다. 세포에 혈청이 함유되지 않은 배지 800 ㎕를 각 well에 첨가하고, 앞에서 반응이 끝난 DNA-PLUS-LIPOFECAMINE 복합체 200 ㎕를 각 well에 넣어서, 37℃, 5% CO_2 배양기에서 3시간동안 배양하였다. 배양 후, 1.5 ml의 배지를 첨가하고, 다시 48 시간 배양 한 후 G418을 적정농도(200~500 ㎍/ml)로 각 well에 첨가하여 2 주간 배양을 한 후 assay를 통해서 유전자 이입을 확인했다.

2.3 hNIS 활성 측정

유전자 이입된 세포를 5×10^5 cell/ml로 맞추어 24 well plate에 1ml씩 분주하고 37℃, 5% CO_2 세포배양기에서 24시간 배양한 후 Hank's balanced salt solution (HBSS)로 세척했다. $Na^{125}I$를 37 kBq/ml 제조하여 세포에 20분간 37℃, 5% CO_2 세포배양기에서 반응시켰다. 반응이 끝나면 HBSS로 2회 세척한 후 0.5% SDS 용액으로 세포를 용해하여 감마선계측기로 세포에 섭취된 방사능을 측정했다. 결과는 각 세포수당 섭취된$Na^{125}I$의 방사능은 백분율로 환산했다.

2.4 NIS의 방사성 옥소 섭취 저해 실험

세포에 이입한 NIS의 방사성 옥소의 섭취가 $KClO_4$에 의해 저해되는지를 보기 위하여 다음과 같은 저해 실험을 하였다. 0.5% 소 혈청 알부민과 0.2 kBq/ml의 방사성옥소(I-125), 10 mol/L의 NaI가 들어있는 HBSS에 50 μM $KClO_4$를 첨가하여 5-120분 동안 배양한 후 방사성옥소 섭취율을 측정했다.

2.5 약제 처리 후 에스트로겐 수용체의 발현 정도와 NIS 활성간의 상관관계 분석

estrodiol 또는 tamoxifen 과 같은 SERM을 시간 별, 농도 별로 처리한 후, 에스트로겐 수용체의 활성을 hNIS의 발현정도(방사성옥소의 섭취 정도)로 각각 측정한 후 상관관계를 확인하였다.

3. 결과

3.1 ERE를 promoter로 한 hNIS 유전자 cloning

pERE-TA-SEAP의 ERE와 minimal promoter TATA box를 포함한 부위를 PCR로 증폭한 후, pcDNA-hNIS 유전자에서 CMV promoter부위를 제거한 부위에 PCR로 증폭한 DNA fragment를 삽입하여 그림 3와 같이 pERE-hNIS 재조합 plasmid를 제조하였다.

그림 3. pERE-hNIS 유전자 구조

3.2 사람의 유방암 세포주에 pERE-hNIS 재조합 유전자의 이입

MCF-7과 MDA-MB231 두 세포주에 리포터 유전자인 pERE-hNIS를 각각 이입하고, 다음날 estradiol 또는 tamoxifen을 24시간처리한 후 I-125 섭취정도를 측정하였다. 그 결과 ER을 발현하지 않는 유방암 세포 주에서는 estradiol 0.1 1 nM을 처리하였을때와 tamoxifen 1, 10 nM처리로 NIS의 발현이 거의 증가되지 않았다 (그림 4).

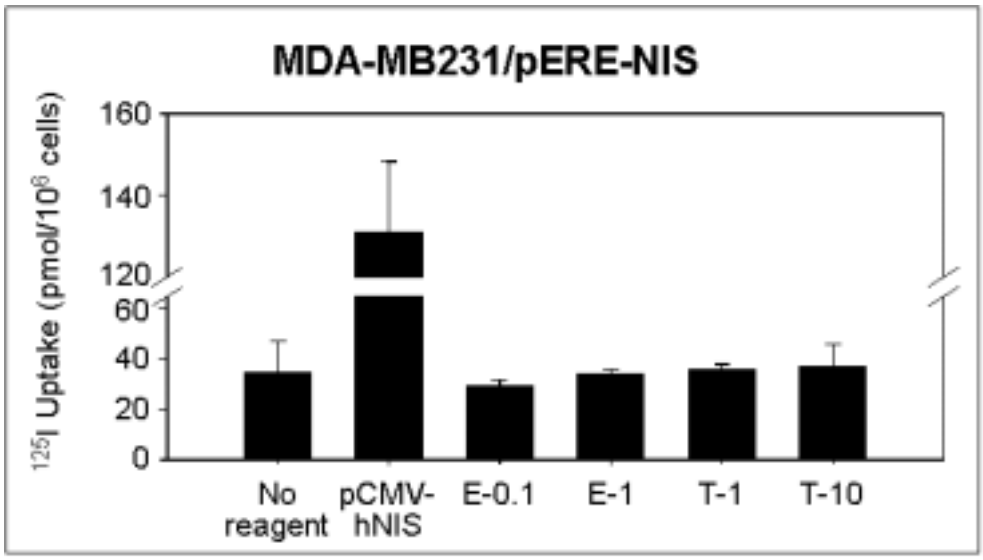

그림 4. MDA-MB231에 pERE-hNIS 이입후 estradiol또는 tamoxifen처리후의 NIS활성.

그러나 ER을 발현하는 유방암 세포 주에서는 estradiol을 농도를 증가시키면서 처리한 결과 NIS의 발현이 estradiol 처리 농도에 의존적으로 증가하였다 (그림 5).

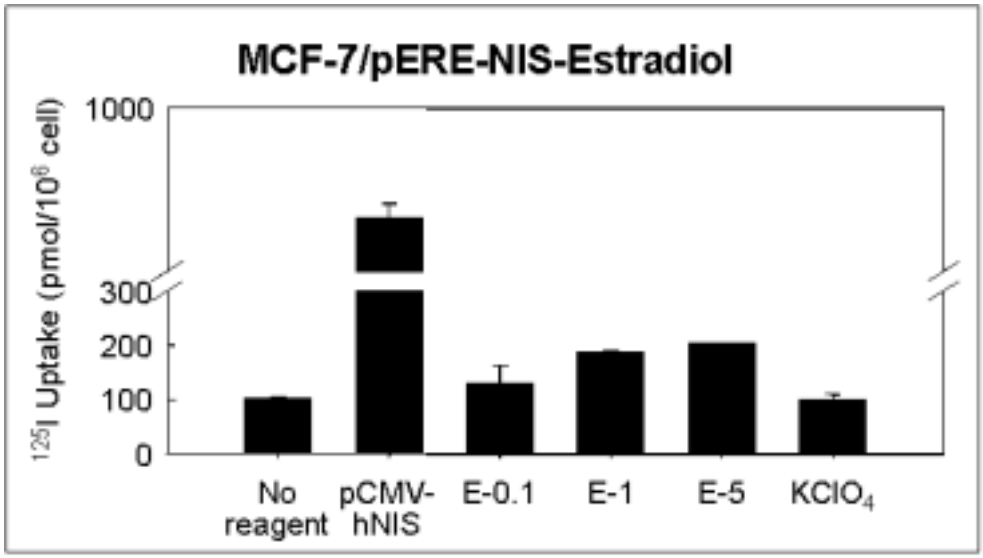

그림 5 . MCF-7에 pERE-hNIS 이입후 estradiol처리후의 NIS활성.

MCF-7에 NIS 리포터를 이입한 후, tamoxifen의 농도를 증가시키면서 처리한 결과 NIS의 발현은 tamoxifen 처리 농도에 의존적으로 증가하였다 (그림 6). 하지만 이들에 비해 강력한 프로모터(CMV promoter)에 의해 조절받는 pCMV-hNIS의 경우는 약 3-5배 더 강한 활성을 보였으며 NIS에 특이한 저해제인 $KClO_4$에 의해 완벽히 저해됨을 보였다

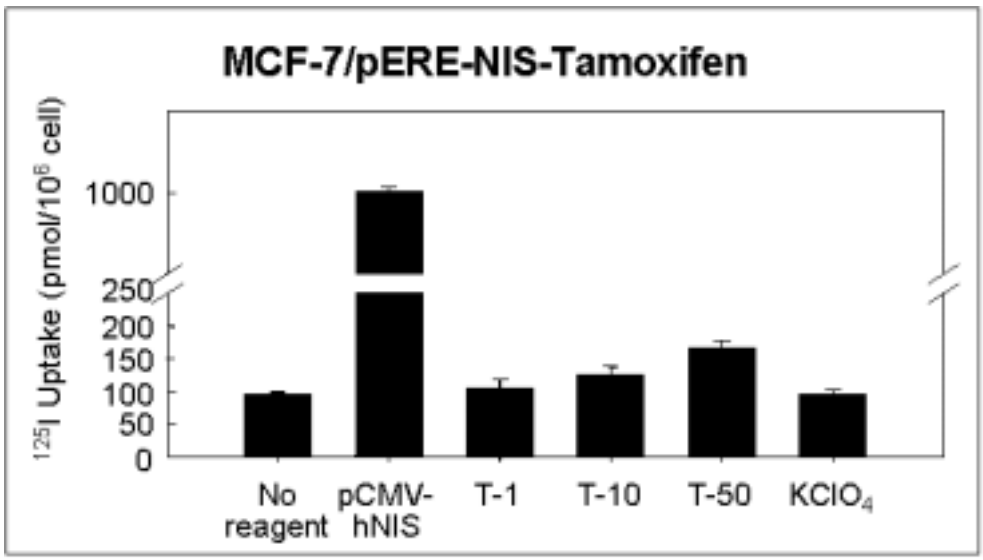

그림 6 . MCF-7에 pERE-hNIS 이입후 tamoxifen 처리후의 NIS활성.

pERE-hNIS유전자 발현이 계속적으로 일어나는 MCF-7 세포주를 얻기 위하여 유전자를 이입한 후, G-418을 2주간 처리하여 안정적으로 발현하는 세포를 선별하였다 (그림 7).

G-418을 처리하여 얻은 안정적 발현 세포주 4가지를 선별하였으며 4가지 모두 estradiol을 처리하면서 NIS의 활성이 처리 농도에 비례하여 증가하는 것을 관찰하였다. 하지만 약제를 처리하기 전에 비해 처리 후의 NIS의 발현 정도가 최대 80% 정도만이 증가하였다.

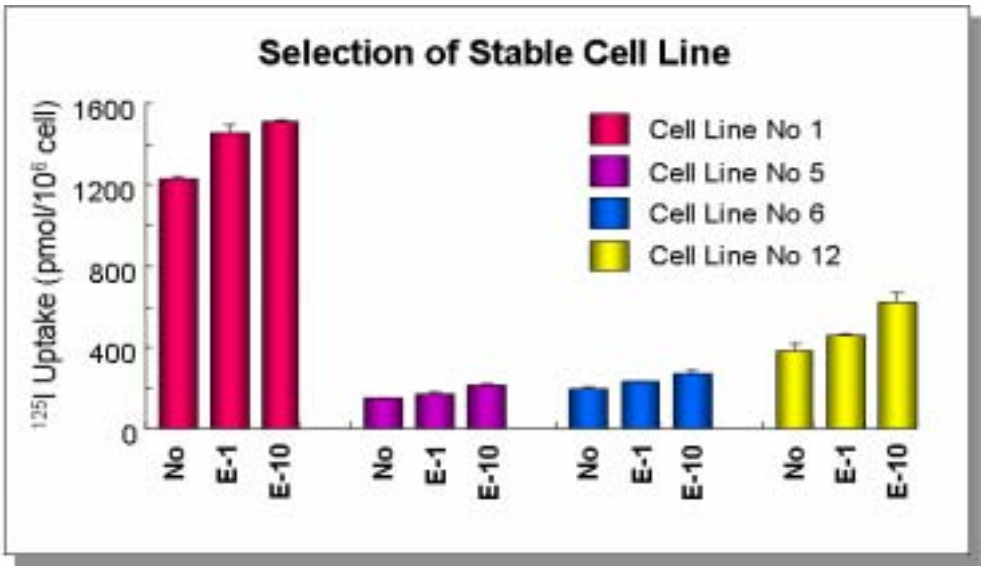

그림 7 . MCF-7에 pERE-hNIS 이입 후 선별한 세포주의 estradiol 처리후의 NIS활성.

4. 고 찰

분자 영상기법은 한번 체계화하게 되면 유전자 발현을 영상화할 수 있을 뿐 아니라 세포 신호전달 체계 연구, 단백질-단백질 상호작용 연구 및 줄기세포 및 면역 세포의 이동 분포를 연구하는 데 적용 가능할 것으로 보인다. 본 실험에 적용된, 분자영상 방법은 유방암의 estrogen receptor활성을 직접적으로 찾아내는 방법으로 유방암에서 호르몬치료의 결정이나 치료후 반응여부를 비침습적으로 반복 영상화 할 수 있는 새로운 방법이다. 또한, 추후 연구를 통해서, estrogen의 효능을 대신하면서 발암의 가능성을 낮춘

새로운 SERM 의 개발을 위한 적절한 drug screening 방법의 개발에도 적용할 수 있다. 유방암 환자에게 tamoxifen과 같은 치료제를 처방하기 전에 치료제의 효능을 미리 평가할 때 적용할 수 있으며, SERM 의 효능 평가를 대상물의 희생이나 손상 없이 실시간으로 영상화 및 관찰될 수 있을 뿐만 아니라 정량적인 평가도 가능 할 것으로 보인다. 이번 연구를 통해서 cis-acting enhancer element의 분석 방법이 확립되면 estrogen receptor 활성 측정 뿐 만아니라 그 외에 signal transduction pathway에 적용하여 여러 신약 후보 물질들을 screening 할 수 있다. NIS를 cis-acting element의 reporter유전자로 적용하게 되면 in vitro결과 뿐 만 아니라, 본 연구실에 설치되어 있는 gamma-camera를 이용하여 쉽게 실험 동물에서 신약 후보 물질을 screening 할 수 있음으로써 좀 더 생체에 가까운 in vivo 결과를 얻을 수 있다. 현재 유방암 환자에서 에스트로겐 수용체의 존재 유무를 판별하기 위한 임상시험 방법은 에스트로겐을 방사성 동위원소로 표지하여 영상화하는 방법만이 고안되어 있으나, 이 새로운 분자영상 방법은 또한 estrogen receptor의 활성이 관계되는 여러 질환(예를 들면 osteoporosis)에서 병태생리를 연구하고 치료법을 개발하는데 유용하게 사용할 수 있을 것이다. pERE-hNIS 리포터를 발현하는 종양세포를 동물모델에서 키운 후, 위에서 얻은 정도의 발현 증가정도로 감마카메라 영상으로 약제를 처리하여 발현이 증가되는 영상을 얻기가 어려울 것으로 판단한다. 따라서 이 시스템을 이용하여 감마 카메라 영상을 얻기 위해서는 two step transcription activation (TSTA) 방법을 적용하거나 NIS를 이용한 핵의학 영상보다는 더 민감도가 높다고 알려져 있는 luciferase를 이용한 영상법을 적용해 보아야 할 것으로 생각한다.

5. 참고문헌

Lok C. Picture perfect. Nature 412:372-4(2001)

Yu Y Annala AJ, Barrio JR, Toyokuni T, Satyamurthy N, Namavari M, Cherry SR, Phelps ME, Herschman HR, Gambhir SS. Quantification of target gene expression by imaging reporter gene expression in living animals. Nat Med 6:933-7 (2000).

Doubrovin M, Ponomarev V, Beresten T, Balatoni J, Bornmann W, Finn R, Humm J,

Larson S, Sadelain M, Blasberg R, Tjuvajev JG, Imaging transcriptional regulation of p53-dependent genes with positron emission tomography in vivo. Proc Natl Acad Sci USA 98:9300-5 (2001).

Ciana P, Luccio GD, Belcredito S, Pollio G, Vegeto E, Tatangelo L, Tiveron C, Maggi A. Engineering of a mouse for the in vivo profiling of estrogen receptor activity. Mol Endocrinol 15:1104-1113 (2001)

Ciana P, Raviscioni M, Mussi P, Vegeto E, Que I, Parker MG, Lowik C , Maggi A. In vivo imaging of transcriptionally active estrogen receptors. Nature Med 9: 82-86 (2003)

Chung JK. Sodium iodide symporter: its role in nuclear medicine. J Nucl Med 43: 1188-1200 (2002)

Wu L, Johnson M, Sato M. Transcriptionally targeted gene therapy to detect and treat cancer. Trends Mol Med. 9: 421-9 (2003).