

기관고유연구사업 최종보고서

(뒷면)

(측면)

(과제번호 : 1110510-1)

연구과제명: *c-myc*의 발현 억제를 이용한 성장조절이 가능한
정위성 방광암 동물 모델 확립

연구과제명: The establishment of growth controllable
orthotopic bladder cancer model through the
down-regulation of *c-myc* expression

과제책임자 : 서 호경

국립암센터

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “ *c-myc*의 발현 억제를 이용한 성장조절이 가능한 정위성 방광암 동물 모델 확립 ” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2012. 1. 31

국립암센터

과제책임자 : 서호경

연구원 : 서주희

“ : 서혜현

“ :

제1세부과제명(과제책임자) :

제2세부과제명(과제책임자) :

.
. .
. .

참여기업명 :

↑
5cm
↓

c-myc
의 발현
억제를
이용한
성장조
절이 가
능한 정
위성 방
광암 동
물 모델
확립

국립
암센
터

↑
3cm
↓

1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구사업 최종보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.

(14 pont, 고딕체)

↑
6cm
↓

목 차

< 요약 문 >

(한글) 6

(영문) 8

1. 연구의 최종목표 9

2. 연구의 내용 및 결과 9

3. 연구결과 고찰 및 결론 14

4. 연구성과 및 목표달성도 15

5. 연구결과의 활용계획 17

6. 참고문헌 18

7. 첨부서류 18

※ 여러개의 세부과제로 과제가 구성된 경우 위 목차와 동일하게 세부과제별로 작성함

(I. 총괄과제, II. 제1세부과제, III. 제2세부과제.....)

< 요약 문 >

연구분야(코드)	S-2		과제번호	1110510-1
과제명	c-myc의 발현 억제를 이용한 성장조절이 가능한 정위성 방광암 동물 모델 확립			
연구기간/연구비 (천원)	합계	2011년 02월 01일 ~ 2011년 12월 31일	30,000	
	1차년도	2011년 02월 01일 ~ 2011년 12월 31일	30,000	
	2차년도	년 월 일 ~ 년 월 일	100,000	
	3차년도	년 월 일 ~ 년 월 일	100,000	
과제책임자	성명	서호경	소속	전립선암센터
	전화번호	031-920-1678	전자우편	seohk@ncc.re.kr
책임단어	국문	방광암, 아데노바이러스, 정위성 방광암 동물 모델, c-myc, 에 쓰에이치 리보핵산, 발광		
	영문	bladder cancer, adenovirus, orthotopic bladder cancer animal model, c-myc, shRNA, luminescence		
<p>◆ 연구목표</p> <p><최종목표> 방광암 동계 (syngeneic) 모델로 쓰이는 MBT-2 세포의 증식에 필요한 c-myc의 발현을 down-regulation하여 세포의 증식이 저하된 세포주를 확립하고, 그 세포주를 이용하여 성장조절이 가능한 정위성 방광암 동물 모델을 확립하고자 함</p> <p><당해년도 목표></p> <ol style="list-style-type: none"> 1. si-RNA를 이용하여 방광암 동계 (syngeneic) 모델로 쓰이는 MBT-2 세포의 c-myc 발현 억제와 세포 증식 억제를 확인 2. c-myc si-RNA MBT-2 세포를 이용한 정위성 방광암 동물 모델을 확립하고, 방광암 증가 속도의 감소 및 생존기간 연장을 확인 3. c-myc이 down-regulated MBT-2.c-myc shRNA 세포주 확립 4. 증식 (proliferation)이 저하된 MBT-2 세포주를 이용하여, 생쥐에서 성장이 감소된 정위성 방광암 동물 모델 확립 				
<p>◆ 연구내용 및 방법</p> <p>- c-myc si-RNA를 이용하여 MBT-2 세포의 c-myc 발현 억제와 세포 증식 억제 효과를 Western blot과 MTT assay를 이용하여 확인한다.</p>				

Project Summary

Title of Project	The establishment of growth controllable orthotopic bladder cancer model through the down-regulation of c-myc expression
Key Words	bladder cancer, adenovirus, orthotopic bladder cancer animal model, c-myc, shRNA, luminescence
Project Leader	Ho Kyung Seo
Associated Company	
<p>To properly evaluate the biology and effects of therapy, it is critical to utilize animal cancer model which mimic the behavior of human disease. In bladder tumor models, there is a general consensus that MBT-2 orthotopic tumor model simulates the local cancer environment and resemble the behavior of human disease. However, after tumors are detected in vivo imaging such as MRI or bioluminescence imaging in MBT-2 orthotopic bladder cancer model, mouse expires in just two to three weeks due to azotemia. It makes difficult to observe the effects of intravesical treatment thereafter.</p> <p>We tested whether down-regulation of c-Myc expression in MBT-2 cell by using si-RNA can cause decreasing its proliferation and tumor growth in orthotopic bladder cancer model. We constructed lentivirus mediating shRNA for c-Myc and established growth-retarded stable cell line of MBT-2. c-Myc shRNA induced the down-regulation of MBT-2 cell as designed. We confirmed the growth retardation implanted inside bladder of C3H/He mice. Accordingly, such results suggested that this new orthotopic bladder cancer model could be utilized to evaluate the effects of intravesical instillation treatments.</p>	

※ 연구목표, 연구.방법, 연구성결과를 영문으로 요약하여 2쪽이내의 분량으로 작성

<ul style="list-style-type: none"> - c-myc si-RNA MBT-2 세포를 이용한 정위성 방광암 동물 모델을 확립 후, 방광종양의 증가 속도의 감소를 Luminescence imaging과 MRI를 이용하여 측정하고, 실험동물의 생존기간 연장을 확인 - c-myc shRNA와 green fluorescence protein (GFP)를 탑재한 렌티바이러스를 제작하고 MBT-2 세포에 감염하여 GFP를 이용하여 c-myc의 발현이 저하된 MBT-2.c-myc shRNA 세포주 확립 - 증식 (proliferation)이 저하된 MBT-2 세포주를 이용하여 동물에서 정위성 방광암 동물 모델 확립 - MBT-2.Luc 세포주 혹은 MBT-2.c-myc shRNA.Luc 세포주를 방광에 이식하고 luminescence의 in vivo imaging 기기를 이용하여 동물 모델 확립을 검증하고, 방광종양의 증가 속도의 감소 및 생존기간 연장을 확인 														
<p>◆ 연구성과</p> <p>-정량적 성과</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse; text-align: center;"> <tr> <td style="width: 30%;">구분</td> <td style="width: 30%;">달성치/목표치¹⁾</td> <td style="width: 40%;">달성도(%)</td> </tr> <tr> <td>SCI 논문 편수</td> <td>0/1</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>IF 합</td> <td>0/5</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>기타 성과</td> <td></td> <td></td> </tr> </table> <p>1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값</p> <p>-정성적 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> · 증식을 저하시킨 MBT-2 세포주를 이용하여 정위성 방광암 동물 모델을 제작함으로써 임상에서 보여주는 방광암의 진행 속도에 가까운 동물 모델을 확립하여, 향후 난치성 비근침윤성 방광암의 방광내 약물 치료를 위한 항암제 스크리닝에 필요한 동물 모델을 구축하는데 기여하고자 함 			구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)	SCI 논문 편수	0/1	0	IF 합	0/5	0	기타 성과		
구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)												
SCI 논문 편수	0/1	0												
IF 합	0/5	0												
기타 성과														
<p>◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)</p>	성	서주희, 서혜현, 000, 000												

※ 요약문의 총분량은 2page 이내로 제한함

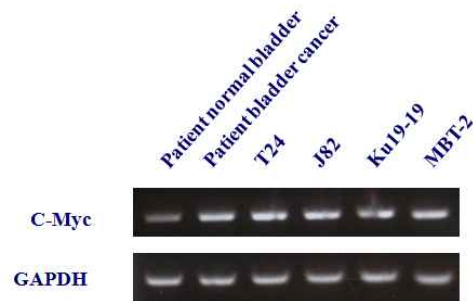
1. 연구의 최종목표

방광암 동계 (syngeneic) 모델로 쓰이는 MBT-2 세포의 증식에 필요한 c-myc의 발현을 down-regulation 하여 세포의 증식이 저하된 세포주를 확립하고 그 세포주를 이용하여 성장조절이 가능한 정위성 방광암 동물 모델을 확립하고자 함

2. 연구의 내용 및 결과

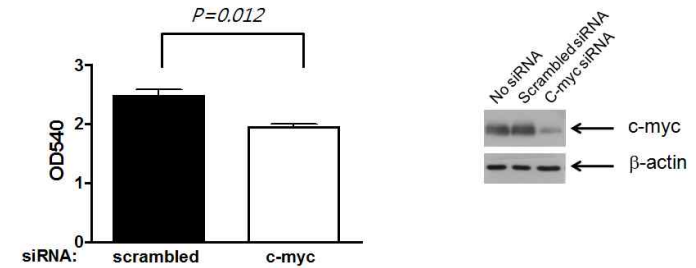
▶ 생쥐 방광암 세포주에서 c-Myc 발현 분석

생쥐 방광암 세포주 MBT-2에서 c-Myc의 발현이 증가되어 있음을 western blot으로 확인



▶ MBT-2 세포에서 1388 bp c-Myc si-RNA를 이용한 c-Myc의 발현 변화

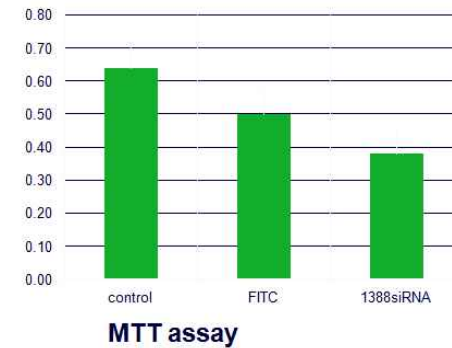
1388 bp c-Myc si-RNA 5'-AAA GAG CAA GAA GAU GAG GAA TT-3', 5'-UUC CUC AUC UUC UUG CUC UUU TT-3'와 FITC-scrambled si-RNA 5'-CAG UCG CGU UUG CGA CUG GTT-3', 5'-CCA GUC GCA AAC GCG ACU GTT-3'을 MBT-2 cell 에 transfection시킴. c-Myc si-RNA를 transfection 시킨 경우 c-Myc si-RNA를 처리하지 않은 군이나 FITC-scrambled si-RNA를 사용한 경우에 비해 c-Myc의 발현이 감소됨을 관찰함



C-MYC siRNA: 5'-AAA GAG CAA GAA GAU GAG GAA TT-3'
5'-UUC CUC AUC UUC UUG CUC UUU TT-3'
Scrambled siRNA: 5'-CAG UCG CGU UUG CGA CUG GTT-3'
5'-CCA GUC GCA AAC GCG ACU GTT-3'

▶ MBT-2 세포에서 1388bp c-Myc si-RNA를 이용 세포의 증식 변화

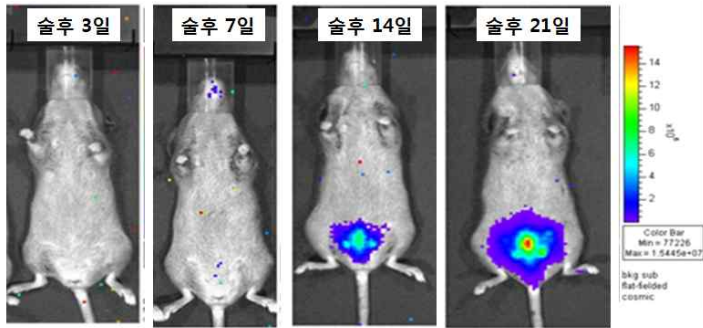
c-Myc si-RNA를 transfection 시킨 경우 c-Myc si-RNA를 처리하지 않은 군이나 FITC-scrambled si-RNA를 사용한 경우에 비해 MBT-2 세포의 증식이 감소됨을 관찰함



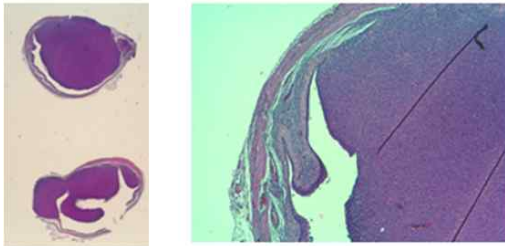
▶ 정위성 방광 종양모델 형성

1. Murine bladder tumor-2 cell line (MBT-2)에 firefly luciferase gene을 포함한 lentivirus를 transduction하여 MBT-2 Luc를 확립하였다.

2. 생후 8주 된 순계암컷 C3H/He 마우스를 사용하여 Ether 흡입마취를 시행한다.
3. 5/0 silk를 이용하여 요도 주위에 purse-string suture를 시행하고 24 gauge Teflon 정맥 카테타 (Insite-W, Becton Dickinson, Germany)를 윤활제를 바른 상태에서 요도를 통해 삽입한다.
4. 0.2% trypsin(in 0.02% EDTA) 100 microL를 방광 내에 10분간 유지 후 제거하고, PBS를 이용하여 방광내를 세척한다.
5. 카테터를 유지한 상태에서 100 microL의 MBT-2 Luc 방광암 세포 2.0×10^6 cells/ml를 방광내로 주입하고, 방광 내에 2시간 유지하였다.
6. 술후 4일과 7일 이후 1주일 간격으로 Luciferase imaging(IVIS 200 Imaging System; Xenogen Corp., Almeda, Ca, USA)를 시행하여 아래와 같이 정위성 방광 모델을 확립함.



술후 3일, 술후 7일, 술후 2주일, 술후 3주일에 시행한 luminescence imaging

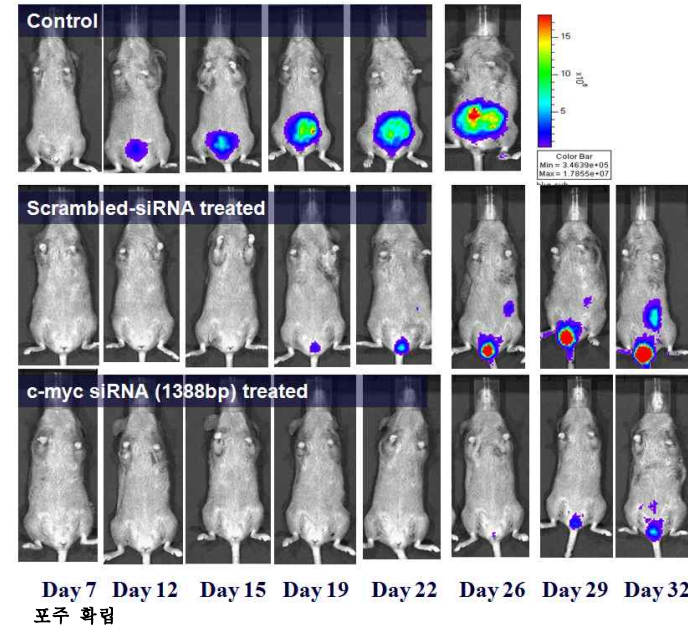


술후 26일에 사망 후 시행한 방광 조직검사 소견

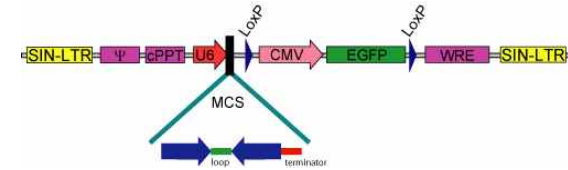
▶정위성 방광암 모델에서 1388bp c-Myc si-RNA를 이용한 종양의 증식의 변화

c-Myc si-RNA를 transfection 시킨 MBT-2 세포를 이용하여 정위성 방광암 모델을 경우 c-Myc si-RNA를 처리하지 않은 군이나 FITC-scrambled si-RNA를 사용한 경우에 비해 종양증식이 감소됨을 관찰함

▶ c-myc shRNA와 green fluorescence protein (GFP)를 탑재한 렌티바이러스를 제작하고 MBT-2 세포에 감염하여 GFP를 이용하여 c-myc의 발현이 저하된 MBT-2.c-myc shRNA 세



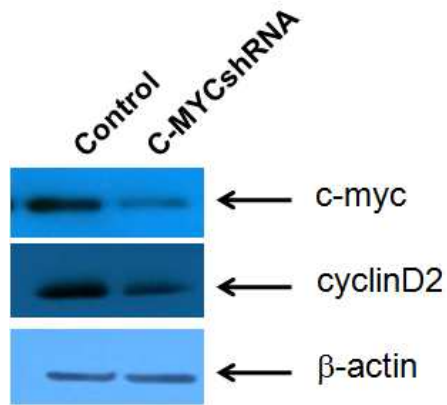
Day 7 Day 12 Day 15 Day 19 Day 22 Day 26 Day 29 Day 32
포주 확립



그림에서 보듯이 pLL3.7벡터는 HIV의 LTR을 변형하여 스스로 증식하는 능력이 제거된 렌티바이러스를 만드는 벡터로써 U6 전사조절인자(promoter)에 의해서 shRNA가 발현되고 CMV 전사조절인자가 EGFP의 발현을 조절하는 expression cassette을 가지고 있음.

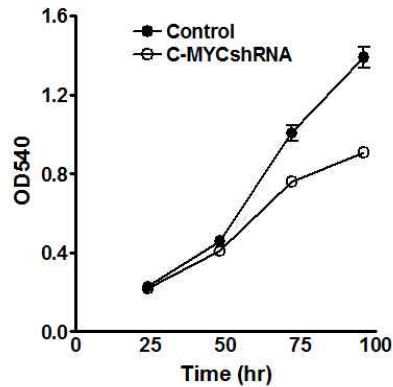
-위의 pLL3.7mycshRNA.GFP벡터를 VSVG, RSV-REV, pMDL g/p RRE와 더불어 293FT세포로 유입하여 렌티바이러스를 생산할 것임.

▶MBT-2.c-myc shRNA 세포주에서 c-Myc 및 downstream gene인 cyclin D2의 발현 변화
MBT-2. c-Myc sh-RNA세포주에서 control에 비해 c-Myc 및 그 하부 유전자인 cyclinD2의 발현이 감소됨을 관찰함.



▶MBT-2. c-Myc shRNA 세포주의 증식 변화

MBT-2. c-Myc shRNA 세포주에서 대조군에 비해 증식이 감소됨을 관찰함.



▶MBT-2 세포주 혹은 MBT-2.c-myc shRNA 세포주를 방광에 이식하여 동물모델 확립을 검증

3. 연구결과 고찰 및 결론

암환자의 증가 및 그로 인한 사회적 비용이 크게 증가하고 있으며 2007년 1월에 발표된 통계청 자료에 의하면 2005년 사망원인 1위는 암으로 인구 10만 명 당 134.5명이 사망하였으며, 10대 사인 중 10년 전인 1995년에 비해 사망률이 가장 많이 증가한 사인도 암 (23.7명)임. 특히 암환자는 경제적으로 활동이 왕성한 30대-60대에 많이 발생하여 개인과 가족의 붕괴를 초래하여 사회 전반적으로 미치는 경제적 손실이 크므로 새로운 암 치료법의 개발에 필요한 검증 시스템은 항암제 개발에 필수적이고 항암제의 임상시험 성공률을 향상시킬 수 있음.

2010년에 발표된 한국중앙암등록본부 자료에 의하면, 방광암은 2008년에 2,582건이 발생하였고, 남자에서 7번째로 흔한 암으로 보고되었다. 방광암은 진단시 약 70%는 비근침윤성(표재성) 방광암으로 진단된다. 이 경우 경요도방광종양절제술을 표준치료법으로 시행하고, 부가적으로 항암제 혹은 BCG(결핵균)을 이용한 방광내 약물 주입법을 시행한다. 그러나 이러한 치료에도 불구하고 약 70%에서 재발하고, 10-15%에서 근침윤성방광암으로 진행된다. 부가적 방광내 약물 요법에도 불구하고 재발하거나, 근침윤성 방광암으로 진행되는 경우 근치적방광적술을 시행하게 되어 수술로 인한 합병증의 증가와, 요로전환에 의한 삶의 질의 저하가 동반된다. 특히 고위험군(pTa/T1 G3)의 경우 1/3에서 방광암으로 사망하게 된다. 그러므로 효과적인 새로운 방광내 약물주입요법의 개발이 절실하다.

최근 종양의 발생, 진행 및 전이에 관련된 분자생물학적 지식의 축적과 함께 많은 새로운 약제들이 개발되었고, 비근침윤성 방광암 환자에서 이러한 약제를 방광내 약물주입요법으로 이용하기 위해 인간의 방광암과 자연경과가 유사한 방광암 모델을 이용한 생체내(in vivo) 실험이 필수불가결하다. 생체내 실험에 사용되는 동물 모델로는 피하에 종양세포를 이식하는 방법이 흔히 사용되나, 종양과 종양 주위 조직과의 상호관계를 함께 연구할 수 있다는 장점으로 정위성(orthotopic) 방광암 동물 모델이 흔히 사용되고 있다. 대표적인 정위성 방광암 모델로는 1) N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine(BBN) 같은 발암제(carcinogen)를 이용한 방법 2) 방광암 세포주를 주입하여 만드는 동계(isogenic) 방광암 모델 그리고, 3) transgenic mice 등이 있다. BBN에 의한 경우는 화학물질에 의한 방광암 형성으로 유전자 변형에 의한 방광암의 형성과 그 기전이 다르며, transgenic mice는 모든 요로 상피에 암을 형성하기 때문에 방광에만 특이적으로 종양을 생성한 모델을 구축하지 못하는 단점으로 동계 방광암 모델이 사용되고 있다. 그러나 이 경우에는 실험자의 테크닉에 따라 방광암의 형성이 불규칙하고, 방광의 크기에 비해 종양의 성장속도가 빨라 방광내 약물주입요법의 효과를 보기에는 많은 제약이 따른다.

저자들은 c-Myc shRNA를 이용하여 성장이 저하된 MBT-2. c-Myc shRNA 세포주를 확립하였

고, 이 세포주를 이용한 정위성방광암동물 모델은 항암제, 바이러스, 항체 및 biotherapy를 이용한 방광내 약물치료의 효과를 검증하는 유용한 시스템으로 사료되면 향후 이들 치료와 기존의 치료제인 BCG와의 병용요법을 동물모델에서 검증하여 새로운 치료 모델리터를 확립하는데 유용한 정보를 제공할 것으로 여겨짐.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

가. 국내 및 국제 전문학술지 논문 게재 및 신청

논문명	저자 (저자구분 ¹⁾)	저널명(IF.)	Year: Vol(No):Page	구분 ²⁾	지원과제번호 ³⁾

- 1) 저자구분 : 교신, 제1, 공동
- 2) 구분 : 국내, 국내 SCI, 국내 SCIE, 국외, 국외SCI, 국외SCIE 등
- 3) 지원과제번호(Acknowledgement)
 - 과제번호를 연차 표시(-1, -2, -3 등)를 생략하고 7자리로 기재하고, 과제와 관련성은 있으나 불가피하게 Acknowledgement가 누락된 경우에는 '없음'으로 기재

나. 국내 및 국제 학술대회 논문 발표

논문명	저자	학술대회명	지역 ¹⁾	지원과제번호
방광암 세포주와 정위성방광암 모델에서 c-Myc 저해제의 효과	Ho Kyung Seo, Jae Young Joung, In-Chang Cho, Jinsoo Chung, Kang Hyun Lee, Kyung-C hae Jung, Sang-Jin Lee	2011년 제 63차 대한비뇨기과학회 학술대회	국내	1110510-1

1) 지역 : 국내, 국외

다. 산업재산권

구분 ¹⁾	특허명	출원인	출원국	출원번호

1) 구분 : 발명특허, 실용신안, 의장등록 등

라. 저서

저서명	저자	발행기관(발행국, 도시)	쪽수	Chapter 제목, 쪽수 (공저일 경우)

마. 연구성과의 정부정책 기여

보고서명	정부정책	기여내용

바. 기타연구성과

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표	달성내용	달성도(%)	
			연차	최종
proliferation이 저해된 MBT-2 세포주를 이용한 정위성 방광암 모델 구축	1차년도	-c-Myc의 siRNA screening -c-Myc siRNA를 이용한 in vitro proliferation 저해 확인 -shRNA를 탑재한 lentivirus 제작 -c-Myc shRNA를 탑재한 lentivirus를 이용하여 shRNA를 발현하는 세포주 확립 -c-Myc shRNA를 발현하는 MBT-2 세포주를 이용하여 정위성 방광암 모델에서 검증	100	100
	2차년도			

	3차년도				
--	------	--	--	--	--

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	1	Journal of Urology, 3,862
산업재산권 등록		특허 등록 예상 국가, 예상 특허명 등
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

c-Myc shRNA를 이용하여 성장이 저하된 MBT-2. c-Myc shRNA 세포주를 이용한 정위성방광 암동물 모델은 항암제, 바이러스, 항체 및 biotherapy를 이용한 방광내 약물치료의 효과를 검증하는 유용한 시스템으로 사용될 수 있을 것으로 기대됨.

중양 단백질 c-Myc을 타겟으로 한 c-myc 저해제를 방광 내 약물주입요법로 이용하여 그 치료 효과를 확인하고 항암 작용 메커니즘을 규명하여, c-myc 저해제의 방광 내 약물주입요법의 안전성을 평가함으로써 비근침윤성 방광암에서 c-Myc 저해제를 이용한 새로운 환자 맞춤형 치료 가능성을 연구할 예정이다.

6. 참고문헌

1. Jeong KC, Ahn KO, Yang CH. Small-molecule inhibitors of c-Myc transcriptional factor suppress proliferation and induce apoptosis of promyelocytic leukemia cell via cell cycle arrest. Mol Biosyst; 6: 1503-9.
2. Berg T, Cohen SB, Desharnais J, et al. Small-molecule antagonists of Myc/Max dimerization inhibit Myc-induced transformation of chicken embryo fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A 2002; 99: 3830-5.
3. Yin X, Giap C, Lazo JS, Prochownik EV. Low molecular weight inhibitors of Myc-Max interaction and function. Oncogene 2003; 22: 6151-9.
4. Kiessling A, Sperl B, Hollis A, Eick D, Berg T. Selective inhibition of c-Myc/Max dimerization and DNA binding by small molecules. Chem Biol 2006; 13: 745-51.
5. Soucek L, Whitfield J, Martins CP, et al. Modelling Myc inhibition as a cancer therapy. Nature 2008; 455: 679-83.

7. 첨부서류