

기관고유연구사업 최종보고서

편집순서 1 : 겉표지 (앞면)

(과제번호 : 1211250-1)

발암성위험요인이 암유전자경로에 미치는 영향평가를 위한 선행연구

(Validation of effect on oncogenic pathways by carcinogenic risk factors)

과제책임자 : 김 석 현

국 립 암 셴 터

편집순서 1 : 겉표지 (측면, 뒷면)

(뒷면)

(측면)

↑
5cm
↓

과
제
명

1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구사업 최종보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다.

(14 pont, 고딕체)

국
립
암
셴
터

↑
3cm
↓

↑
6cm
↓

편집순서 2 : 제출문

제 출 문

국립암센터 원장 귀하

이 보고서를 기관고유연구사업 “ 발암성위험요인이 암유전자경로에 미치는 영향평가를 위한 선행연구 ” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2010. 11 . 7

국립암센터

과 제 책 임 자 : 김 석 현

연 구 원 : 윤 하 나

 " : 장 민 정

편집순서 3 : 목차

목 차

< 요약 문 >

(한글)

(영문)

- 1. 연구의 최종목표
- 2. 연구의 내용 및 결과
- 3. 연구결과 고찰 및 결론
- 4. 연구성과 및 목표달성도
- 5. 연구결과의 활용계획
- 6. 참고문헌
- 7. 첨부서류

※ 여러개의 세부과제로 과제가 구성된 경우 위 목차와 동일하게 세부과제별로 작성함
 (I. 총괄과제, II. 제1세부과제, III. 제2세부과제.....)

편집순서 4 : 요약문 (한글)

< 요약문 >

연구분야(코드)				과제번호	1211250-1
과제명	발암성위험요인이 암유전자경로에 미치는 영향평가를 위한 선행연구.				
연구기간/연구비 (천원)	합계	2012년 10월 1일 ~ 2012년12월31일	25,000		
	1차년도	2012년 10월 1일 ~ 2012년12월31일	25,000		
	2차년도	년 월 일 ~ 년 월 일			
	3차년도	년 월 일 ~ 년 월 일			
과제책임자	성명	김석현			
	소속	분자종양학연구과			
색인단어	국문	발암물질, 암유전자, 위험요인, 발암기전			
	영문	carcinogen, oncogene, risk factors, carcinogenesis			
<p>◆ 연구목표</p> <p><최종목표></p> <p>발암성위험요인이 암유전자경로에 미치는 영향평가</p> <p><당해년도 목표></p> <p>발암성위험요인이 암유전자경로에 미치는 영향평가</p>					
<p>◆ 연구내용 및 방법</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 정상세포에 가까운 HaCaT 세포를 대상으로 formaldehyde 처치 농도를 결정. 2. HaCaT 세포에 3일, 7일간 0.5 mM의 농도로 처리한 후 몇가지의 암유전자 경로에 대한 웨스턴을 시행함. 3. Ras 또는 EGFR 이 활성화되어 있는 암세포를 대상으로 formaldehyde가 암유전자 경로에 미치는 영향을 측정 (계획) 4. 같은 조건으로 세포를 처리한 후 antibody array 시행 (계획) <p>-</p>					
-					

-		
<p>◆ 연구성과</p> <p>해당사항없음.</p>		
<p>◆ 참여연구원 (최종년도 참여인원)</p>	성명	김석현, 장민정, 윤하나

* 요약문의 총분량은 2page 이내로 제한함

편집순서 5 : 요약문 (영문)

Project Summary

Title of Project	Validation of effect on oncogenic pathways by carcinogenic risk factors
Key Words	carcinogen, oncogene, risk factors, carcinogenesis
Project Leader	Seok-Hyun Kim
Associated Company	
<p>To validate the effect of one of well known carcinogen, formaldehyde, we treated 0.5 mM formaldehyde to HaCaT cell line for 3, and 7 days long and found formaldehyde significantly increase Akt and Raf kinase signaling pathway without apparent cell death or apoptosis induction.</p> <p>The purpose of this study is to establish the possibility of oncogene activation validation system by carcinogen treatment. we could conclude that carcinogens affect cellular oncogenic pathways definitely therefore our postulation to establish carcinogen validation system according to oncogene activation pathway is possible scenario and worth to try as a further study.</p>	

※ 연구목표, 연구방법, 연구성과를 영문으로 요약하여 2쪽이내의 분량으로 작성

편집순서 6 : 연구결과

1. 연구의 최종목표

발암성위험요인이 암유전자경로에 미치는 영향평가

2. 연구의 내용 및 결과

1. 현 발암물질의 분류와 기준

발암물질의 분류와 그 기준은 여러 국제기관에서 정하고 있는데 그중 가장 많은 사람들이 지표로 삼는 것은 WHO 산하의 IARC에서 발표하는 기준이다.

IARC는 WHO 산하 기구로서 발암물질확인평가그룹(The Carcinogen Identification and Evaluation Group, CIE)를 주축으로 1971년 이래로 IARC Monograph program 을 운영하면서 현재까지 100권의 인체 발암물질에 관한 평가보고서(Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human)를 발간하고 있으며, 전 세계 50 개국 이상, 1000명 이상의 과학자가 관여하고 있다¹¹⁾. IARC에서는 후보발암물질에 관한 발암성평가를 할 때, 연구 결과와 해당 연구자 및 관련 전문가를 소집하여 종합적으로 검토하고 동의를 얻어 결론을 도출하는 전문가 회의를 수행하고 있다. 이때 전문가들은 지식과 경험을 고려하고, 분명히 또는 명백히 이익에 간여되지 않는다는 전제하에 선택된다. 평가과정은 ①인간발암위험에 대한 역학조사 자료, ②동물발암성 평가자료, ③발암 메커니즘에 대한 관련연구 자료 등에 대해 각 분야별로 전 세계에서 모인 15~30명의 전문가들로 Working Group 을 만들어 그룹 내 및 그룹 간 평가?검토, 전체회의에서의 결정 등 종합적인 평가를 진행하는 방식이다. 이러한 평가 과정을 통해 자료의 충분한 과학적 근거에 기초하여 Group 1부터 Group 4까지 5가지 등급으로 발암성을 분류하고 있다(그림 1). 인체

분류	발암성 분류기준	인자, 혼합물 또는 노출환경의 수
Group 1	인간 발암성 물질(Carcinogenic to humans)	108
Group 2A	인간 발암성 우려 물질 (Probably carcinogenic to humans)	63
Group 2B	인간 발암성 가능 물질 (Possibly carcinogenic to humans)	248
Group 3	인간 발암성 미분류 물질 (Not classifiable as to carcinogenicity to humans)	515
Group 4	인간 비발암성 추정 물질 (Probably not carcinogenic to humans)	1
총계		935

표 1. IARC 발암성 평가결과 요약

에 대한 역학 연구자료가 충분한 경우 동물 실험 자료에 무관하게 Group 1으로 분류하고, 역학 연구자료가 제한적일 경우 동물실험 자료가 충분하다면 Group 2A, 그리고 역학연구 자료가 불충분하거나 제한적이더라도 동물실험자료가 충분하지 않은 경우에는 Group 2B로 분류한다. 역학연구

		EVIDENCE IN EXPERIMENTAL ANIMALS			
		Sufficient	Limited	Inadequate	ESLC
EVIDENCE IN HUMANS	Sufficient	Group 1			
	Limited	Group 2A	Group 2B (exceptionally, Group 2A)		
	Inadequate	Group 2B	Group 3		
	ESLC				Group 4

그림 1. IARC의 발암등급 분류기준
구와 동물실험결과를 중요하게 간주하고 있으며, 이 외에 유전독성, 돌연변이성, 대사 및 메커니즘 관련 연구를 추가적으로 고려하고 있다. 2009년까지 1권부터 100A까지 발간된 IARC Monographs에서 화학물질, 화학물질 그룹, 산업공정, 혼합물질, 물리적 인자, 생물학적 인자 등 총 935종이 평가되었으며, 총 419종 이 Group 1부터 Group 2B로 평가되었다(표 1)

우리나라의 경우 노동부 소관의 산업안전보건법과 환경부 소관의 유해화학물질 관리법에 의해 발암물질에 대한 정의와 분류를 하고 있다. 산업안전보건법에서는 노동부령이 정하는 분류기준에 따라 유해인자를 분류하도록 하고 있으며, 유해인자의 분류기준은 크게 물리적 위험성 16가지와 건강 및 환경 유해성 12가지로 화학물질을 분류하고, 물리적 인자는 5가지, 생물학적인자는 3가지로 분류하도록 하고 있다. 화학물질의 건강 및 환경 유해성에 대한 12가지 분류기준 중 하나가 발암성 물질로서 '암을 일으키거나 그 발생을 증가시키는 물질'이라고 정의하고 있다. 노동부고시로 지정되어 있는 '화학물질 및 물리적인자의 노출기준'에서는 발암성물질의 노출기준 목록을 제시하고 있는데, 발암성 물질로 확인된 물질(A1)과 발암성 물질로 추정된 물질(A2)로 분류하고 있다. 산업보건기준에 관한 규칙에서는 168종의 관리대상유해물질 목록을 제시하고 있고, 이 중 발암성 물질에 대해 암을 유발하는 물질로 확인되었거나 의심되는 물질'로 정의하고 해당 물질에 대해서는 '발암성' 표시를 명시하고 있다. 유해화학물질 관리법에서는 유해성이 있는 화학물질을 '유독

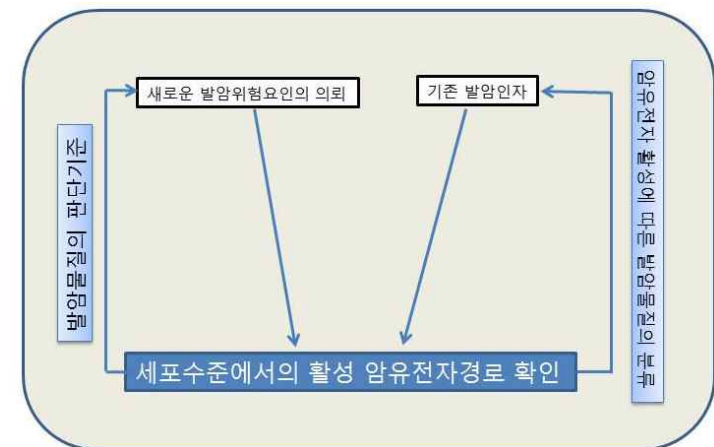
물', 유해성이 있을 우려가 있는 화학물질을 '관찰물질'로 정의하고, 유독물은 12가지,관찰물질은 8가지의 지정 기준을 두고 있다. 유독물과 관찰물질의 지정 기준 중 하나가 발암성 물질이다. 유독물의 경우 두 종류 이상의 발암성 시험에 대한 발암 증거가 있거나, IARC에서 1급 혹은 2A급으로 분류된 경우로 정의하고 있고, 관찰물질의 경우 한 종류 이상의 발암성 시험 증거가 있거나 IARC에서 2B급으로 분류된 경우로 정의하고 있다.

2. 발암물질의 분자적 발암기전에 미치는 영향

대표적으로 phobol ester 화합물인 TPA (12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate), PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate)로서 이는 생체내에서 diacylglycerol mimetic으로 작용하여 Protein Kinase C 경로를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 그러나 이는 매우 드문 경우이며 특정 발암물질이 체내에서 특정 발암유전자경로를 활성화시키는데 대해서는 그리 많이 알려져 있지 않은 상태이다. 위에서 본 발암물질의 기준에서 보는 바와 같이 현재 발암물질로 정의하는데는 역학적 증거와 동물실험에 의한 결과가 주로 영향을 미치는 것으로 되어있으며 그 발암물질의 기전적 증거는 필수적인 요소는 아닌 것으로 되어 있다.

그러나 그렇다고 하여 그 발암물질의 발암기전이 간과될 수 있는 부분은 아니며 발암물질의 작용기전에 대한 자료를 확보하여 데이터베이스화 하면 현재까지 알려진 발암성물질들의 분류에 새로운 고찰을 제시 수 있을 것이며 또한 새로운 물질의 발암성을 추적하는데 이러한 암유전자경로에 작용점을 확인하는 것은 그 물질의 발암성을 확인하는데 많은 도움을 줄 것이다.

그러므로 현재 국립암센터에서 제시하고자하는 발암성위험요인의 인체 위해성 평가 및 모니터링 방법을 수립하는데 그 요인이 암유전자 경로에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 평가도 반드시 수행되어야 하며 이에 대한 선행연구로서 발암물질이 암유전자에 미치는 영향을 측정할 수 있는 가능성을 확인하기 위해서 본 연구가 진행되었다.



위의 그림과 같은 암유전자의 활성화에 따른 발암물질의 분류 시스템을 수립하고 이를 기반으로 새로운 발암물질의 발암성을 확인하는 체계를 확보하기 위한 기본적인 가능성을 타진하는 연구로서 본 연구에서는 기존 발암인자에 의한 세포수준에서의 암유전자경로 활성을 확인하는 실험을 진행하였다.

결 과

본 연구는 4개월 동안 수행하기 위하여 계획되었으며 현재 진행되지 약 1개월이 정도밖에 경과하지 않았으므로 확정적인 결과라고 하기에는 어려움이 존재함.

1. formaldehyde 의 농도 결정.

formaldehyde는 동물조직 또는 세포를 고정하기 위하여 실험실에서 빈번하게 사용되는 물질이며 휘발성이 강하여 호흡기로 손쉽게 사람에게 노출되며 현재 발암물질 group 1에 속해있는 물질임.

이를 이용하여 암유전자의 활성화에 미치는 영향을 측정하기 위하여는 세포를 고정시키지 않는 농도의 formaldehyde를 실험적으로 결정하였음.

다음과 같은 문헌을 참고로 하여 처치 농도를 0.1 ~ 5 mM 까지 점진적으로 처치한 결과 0.5mM의 농도에서 세포의 성장에 영향을 미치지 않는 것을 확인하고 이 농도로 실험을 진행함.

[Cell Biol Int. 2010 Dec;34\(12\):1273-82.](#)

Effect of formaldehyde on cell proliferation and death.

[Szende B, Tivhák E.](#)

1st Department of Pathology and Experimental Cancer Research, Semmelweis University, Budapest, Hungary.

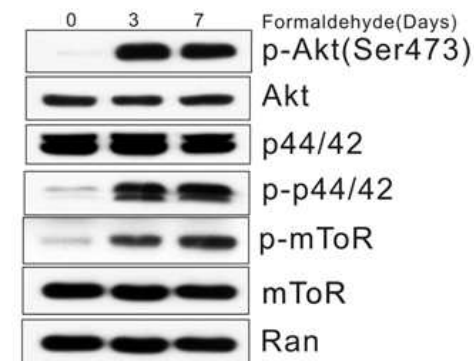
Abstract

Formaldehyde (HCHO) may reach living organisms as an exogenous agent or produced within cells. The so-called formaldehydogenic compounds like S-adenosyl-L-methionine, N-hydroxymethyl-L-arginine, 1-methyl ascorbigen, methanol, E-N-trimethyl lysine and methylamine are special exogenous sources of HCHO. Endogenous HCHO can be formed from hydroxymethyl groups during enzymatic methylation and demethylation processes. HCHO, as a highly reactive compound, is considered to be involved in the induction of apoptosis, consequently in the pathogenesis of atherosclerosis and neurodegenerative processes. The biological action of HCHO is dose dependent. In vitro studies on tumour cell and endothelial cell cultures showed that HCHO in the concentration of 10.0 mM caused necr cell death. 1.0 mM resulted in enhanced apoptosis and reduced mitotic activity, while 0.5 and 0.1 mM enhanced cell proliferation and reduced apoptotic activity. Among formaldehydogenic compounds N-hydroxymethyl-L-arginine, 1-methyl ascorbigen and the HCHO donor resveratrol may be considered as potential inhibitors of cell proliferation. Endogenous HCHO in plants apparently play a role in regulation apoptosis and cell proliferation. The genotoxic and carcinogenic effects of HCHO is due to production of DNA-protein cross-links. Low doses of HCHO, reducing apoptotic activity may also accumulate cells with such cross-links. Experimental data point to the possible therapeutic use of methylated lysine residues and methylated arginine residues in the case of neoplasms.

PMID: 21067524 [PubMed - indexed for MEDLINE]

2. Formaldehyde 가 Akt, Raf kinase 경로에 미치는 영향 측정.

위에서 결정된 0.5 mM의 formaldehyde를 3일, 7일간 불멸화된 사람세포 HaCaT에 처치한후 우선 akt, raf kinase 경로에 미치는 영향을 웨스턴으로 확인하였음.



위의 그림과 처치 3일 후부터 인산화된 Akt, Raf, mTOR의 증가를 확인할 수 있었으며 실제로 formaldehyde가 암유전자 경로를 활성화 시키는 것을 확인 할 수 있었음.

3. 연구결과 고찰 및 결론

현재까지 진행된 실험은 한차례에 불과하여 확정적이라고 하기에는 무리가 있으나, 발암물질인 formaldehyde가 암유전자 경로의 활성화에 지대한 영향을 미치는 것을 확인할 수는 있었음.

향후 각 암유전자의 돌연변이군 (Ras, EGFR)에 대한 암세포를 대상으로 비슷한 실험을 진행하여 암유전자 경로에 미치는 영향을 확인할 것이며 또한 현재 시판중인 antibody array kit를 이용하여 세포내 전반적인 암유전자 경로에 미치는 영향을 확인할 예정임.

현재까지 얻어진 결과로 정리할 수 있는 결론은

1. 발암물질인 formaldehyde가 Akt 및 Raf kinase의 경로를 활성화 시킨다.

2. 그러므로 발암물질의 암유전자 경로에 미치는 영향을 근거로한 새로운 분류를 확립하는 일이 가능성 있는 일임을 확인하였다.

4. 연구성과 및 목표달성도

(1) 연구성과

해당사항 없음.

(2) 목표달성도

가. 연구목표의 달성도

최종목표	연차별목표		달성내용	달성도(%)	
				연차	최종
발암성위험요인이 암유전자경로에 미치는 영향평가	1차년도	발암성위험요인이 암유전자경로에 미치는 영향평가	formaldehyde가 akt 및 Raf 암유전자 경로를 활성화시킴을 확인함.	50	50
	2차년도				
	3차년도				

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자 체 평 가
암유전자 경로에 대한 고찰이 제대로 이루어졌는지	연구의 진행 시간에 비해서는 의미있는 결과를 도출하였다고 여겨짐.

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재		게재 예상 전문학술지명, SCI급 학술지인 경우 Impact Factor 기록
산업재산권 등록		특허 등록 예상 국가, 예상 특허명 등
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

본 연구를 근거로 국립암센터의 발암성위험요인에 대한 평가 시스템을 확립할 때 암유전자 경로에 따른 새로운 분류를 적용하기위한 연구가 활성화 되어 있을 것이며 또한 이를 이용한 새로운 발암성물질의 위험정도를 판단할 수 있는 근거를 확립할 수 있을 것이다.

6. 참고문헌

Szende B, Tyihak E. Effect of formaldehyde on cell proliferation and death. Cell Biol Int. 2010 Dec;34(12):1273-82.

7. 첨부서류