

기관고유연구사업 최종보고서

(과제번호 : 1010870)

연구과제명 (국문)

자궁경부암 방사선민감성 예측을 위한 분자생물학적
예후인자발굴

연구과제명 (영문)

Investigating Molecular Predictive Factors for
Radiosensitivity of the Uterine Cervical Cancer

과제책임자 : 김 주 영

국립암센터

(뒷면)

(측면)

<div data-bbox="1294 740 1910 1145" data-label="List-Group"> <ol style="list-style-type: none"> 1. 이 보고서는 국립암센터 기관고유연구사업 최종보고서입니다. 2. 이 보고서 내용을 인용할 때에는 반드시 국립암센터 연구사업 결과임을 밝혀야 합니다. <p>(14 pont, 고딕체)</p> </div>	<div data-bbox="1966 284 2016 383" data-label="Text"><p>↑ 5cm ↓</p></div> <div data-bbox="1966 453 2002 555" data-label="Text"><p>과 제 명</p></div> <div data-bbox="1966 999 2002 1171" data-label="Text"><p>국 립 암 센 터</p></div> <div data-bbox="1966 1216 2016 1315" data-label="Text"><p>↑ 3cm ↓</p></div>
<div data-bbox="1563 1235 1630 1299" data-label="Text"><p>↑ 6cm ↓</p></div>	

제 출 문

목 차

국립암센터 원장 귀하

< 요약 문 >

(한글)	-----	page	1-2
(영문)	-----	page	3

이 보고서를 기관고유연구사업 “자궁경부암 방사선 민감성 예측을 위한 분자생물학적 예후인자 발굴” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2012. 11. 7

국립암센터

과 제 책 임 자 : 김 주 영

연 구 원 : 신 혜 진

 : 심 규 연

1. 연구의 최종목표	-----	page	4
2. 연구의 내용 및 결과	-----	page	4-38
3. 연구결과 고찰 및 결론	-----	page	38-39
4. 연구성과 및 목표달성도	-----	page	39-42
5. 연구결과의 활용계획	-----	page	42-43
6. 참고문헌	-----	page	43-45
7. 첨부서류			

< 요약 문 >

연구분야(코드)	T-2			과제번호	1010870
과제명	자궁경부암 방사선민감성 예측을 위한 분자생물학적 예후인자발굴				
연구기간/연구비 (천원)	합계	2010년 3월 1일 ~ 2012년 12월 31일		350,000	
	1차년도	2010년 3월 1일 ~ 2010년 12월 31일		120,000	
	2차년도	2011년 1월 1일 ~ 2011년 12월 31일		120,000	
	3차년도	2012년 1월 1일 ~ 2012년 12월 31일		110,000	
과제책임자	성명	김주영			
	소속	방사선의학/자궁암연구과			
색인단어	국문	방사선, 자궁경부암, 방사선민감성, 예측인자, 인유두종 바이러스			
	영문	Ionizing radiation, Uterine cervical cancer, Radiosensitivity, Prediction, Human papilloma virus(HPV)			
<p>◆ 연구목표</p> <p><최종목표> 자궁경부암의 방사선치료 후 반응을 예측할 수 있는 분자생물학적 요인들을 정립하여 향후 자궁경부암 치료방법의 개별화를 추구함.</p> <p><당해년도 목표> Initial HPV viral load 및 persistent HPV DNA에 따른 진단, 치료 예후의 가치 평가에서 더 나아가 HPV DNA physical status에 따른 구분이 가질 수 있는 진단적 예후 인자로서의 가치를 살펴보고자 함.</p>					
<p>◆ 연구내용 및 방법</p> <ol style="list-style-type: none"> Hybrid Capture II technique을 이용한 자궁경부종양 내 바이러스 DNA의 양적 측정. 자궁경부암조직샘플(111명)에서 DNA 및 RNA 추출 방사선치료 환자의 치료 전 및 치료 후 HPV DNA 추적검사 Real-time PCR 실험 기법을 사용하여 숙주 세포 내에서의 인유두종 바이러스 DNA의 physical status 분석 및 바이러스 종양 유전자의 발현 상의 차이를 알아보고자 함 <ul style="list-style-type: none"> HPV virus DNA의 physical status는 Real-time PCR 결과로 정량화 되어지는 바이러스 유전자 E2와 E6의 copy 수를 비교함으로써 multi-copy tandem integrated, single-copy integrated, episomal infection 또는 low infection 그룹으로 구분함. 바이러스 유전자 E2와 E6 유전자의 mRNA 수준에서의 발현 수준을 정량화 시키고 이 값이 DNA copy 수와 유의성 있게 나타나는지 확인. 환자 조직 슬라이드를 사용한 HPV ISH (In Situ Hybridization) 실험으로 HPV physical status를 visualize 시키고 Real-Time PCR 결과와 비교 분석을 통해 세포내 존재하는 인유두종 바이러스의 유전체의 상태에 따른 분류 체계를 좀 더 명확히 하고자 함. <ul style="list-style-type: none"> Group 1: stain the whole of nucleus, strongly: episomal pattern Group 2: discrete small dots or pale single dot: single copy integrated pattern Group 3: large size single dot: multi copy-tandem integrated pattern Group 4: very slight bluish haze: negative pattern 					

<p>6. Cox proportional hazards model을 사용하면서, different risk groups for disease-free survival (DFS)에 따른 Risk Groups 구분</p> <p>7. 숙주 유전체 상의 integration type과 DFS를 포함한 Histologic type, clinical stage group등의 요소를 포함시켜 Multivariable analysis를 수행함으로써 relapse-predicting model을 구축하고자 함.</p> <p>8. Microarray analysis를 통해 HPV integrated pattern에 따른 숙주 세포 내에서의 발현 패턴의 변화를 보이는 molecules을 찾아냄으로써 HPV DNA physical status와 treatment outcome 사이의 관련 기작을 분자적 수준에서 그려 보고자 함.</p> <p>9. DuoLink system을 이용해 숙주 세포 내에서 존재하는 HPV physical status의 차이로 인해 달라지는 그림으로써 방사선 치료 예후에 영향을 미치는 요인의 관련 기작을 살펴보고자 함.</p> <p>10. 숙주 유전체의 불안정성 정도를 간접적으로 살필 수 있는 Aurora-a의 발현 상태를 면역학적 염색을 통해 보임으로써 HPV integrated pattern과의 상관관계를 살펴봄.</p>														
<p>◆ 연구성과</p> <p>-정량적 성과</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>구분</th> <th>달성치/목표치¹⁾</th> <th>달성도(%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>SCI 논문 편수</td> <td>5/7</td> <td>71.4</td> </tr> <tr> <td>IF 합</td> <td>18.028/26</td> <td>69.34</td> </tr> <tr> <td>기타 성과</td> <td></td> <td></td> </tr> </tbody> </table> <p>1) 총연구기간내 목표 연구성과로 기 제출한 값</p> <p>-정성적 성과</p> <ul style="list-style-type: none"> HPV DNA의 숙주 유전체로의 삽입 패턴에 따른 carcinogenesis 관련 기작을 찾아냄으로써 치료 타겟을 정하고 치료 방법을 모색하는데 있어 중요한 참고 자료로서 역할을 할 수 있음. Initial HPV viral load, persistent HPV DNA 및 HPV DNA physical status 구분에 따른, 더 나아가 그로부터 파생되어지는 진단, 치료 예후를 평가하는데 도움이 되는 요소들의 다양성을 확보할 수 있음. 			구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)	SCI 논문 편수	5/7	71.4	IF 합	18.028/26	69.34	기타 성과		
구분	달성치/목표치 ¹⁾	달성도(%)												
SCI 논문 편수	5/7	71.4												
IF 합	18.028/26	69.34												
기타 성과														
<p>◆ 참여연구원 (최종연도 참여인원)</p>	성명	김주영, 신혜진, 심규연												

Project Summary

Title of Project	Investigating Molecular Predictive Factors for Radiosensitivity of the Uterine Cervical Cancer
Key Words	Ionizing radiation, Uterine cervical cancer, Radiosensitivity, Prediction, Human papilloma virus(HPV)
Project Leader	Joo-Young Kim
Associated Company	
<p>We have been pursuing individualization of treatment of cervical cancer in the future by establishing molecular biological factors that can predict the response after radiation therapy. For the last 3 years, our project has been focused on HPV (Human papillomavirus) viral factors as important prognostic factors in HPV infected cervical cancer. We were able to measure high risk HPV viral load from smear samples of cervical cancer patients through the Hybrid Capture II technique. And we could systematize the classification according to the HPV DNA physical status from tumor biopsy of 86 cervical cancer patients using the E2/E6 real time PCR and HPV In Situ Hybridization(ISH) tool.</p> <p>Group 1: Single-copy integration with HPV DNA episomal form (ISH result showed the dominant episomal pattern staining the whole of nucleus, strongly and PCR result showed $0 < E2$ copy number $< E6$ copy number)</p> <p>Group 2: Single-copy integration without HPV DNA episomal form (ISH result showed the single copy integrated pattern staining as the discrete small dots or pale single dot and PCR result showed $0 = E2$ copy no. $< E6$ copy no.)</p> <p>Group 3: Multi-copy tandem HPV DNA integration (ISH result showed the multi-copy tandem integrated pattern staining as the large size single dot and PCR result showed $0 < E2$ copy no. = $E6$ copy no.)</p> <p>A relapse-predicting model was constructed using multivariable Cox proportional hazards model based on the HPV viral load, HPV DNA physical status and the various clinical information(histologic Grade, clinical stage group, age, etc). As a result, we were able to verify the significant difference between groups for disease-free survival (DFS) in multivariate analysis.</p> <p>Furthermore, microarray analysis was performed to elucidate the possible underlying mechanism of the effects of HPV DNA physical status and we were able to find the relativeness of c-Myc/Max/Mad1 network. Group2, which was low in DFS compared to other groups, showed an increase of c-Myc/Max dimers regulating the expression of various oncogenes in the nucleus and Group1, which had the highest DFS rate in three groups showed an increase of Max/Mad1 dimers, the repressor of c-Myc/Max activity.</p> <p>In this project, we could suggest HPV DNA physical status as another important prognostic parameter in invasive cervical cancer in addition to HPV viral load and these results need to be considered in the individualized treatment of cervical cancer.</p>	

1. 연구의 최종목표

자궁경부암의 방사선치료 후 반응을 예측할 수 있는 분자생물학적 요인들을 정립하여 향후 자궁경부암 치료 방법의 개별화를 추구함.

<2012년도 연구목표 및 연구내용>

연구목표

선행 연구에서 보였던 HPV viral load와 환자 survival 예후의 상관관계에 대한 관련 기전을 좀 더 명확히 밝히고자, 바이러스 유전자 E2, E6 정량 분석에 따른 바이러스 DNA의 숙주 내 physical status 분석 및 이와 유의하게 관계되어 있는 숙주 요인으로 우선 in vitro 실험결과에서 유추한 p53 과 aurora-A를 중심으로 분석한다.

연구수행방법

① Real-time PCR 실험 기법을 사용하여 숙주 세포 내에서의 인유두종 바이러스 DNA의 physical status 분석 및 바이러스 종양 유전자의 발현 상의 차이를 알아보고자 함

- HPV virus DNA의 physical status는 Real-time PCR 결과로 정량화 되어지는 바이러스 유전자 E2와 E6의 copy 수를 비교함으로써 multi-copy integrated, single-copy integrated, episomal infection 또는 low infection 그룹으로 구분함.

- 바이러스 유전자 E2와 E6 유전자의 mRNA 수준에서의 발현 수준을 정량화 시키고 이 값이 DNA copy 수와 유의성 있게 나타나는지 확인.

② Cox proportional hazards model을 사용하면, different risk groups for disease-free survival (DFS)에 따른 Risk Groups 구분.

③ 숙주 유전체 상의 integration type과 DFS를 포함한 Histologic type, clinical stage group등의 요소들을 포함시켜 Multivariable analysis를 수행함으로써 relapse-predicting model을 구축하고자 함.

④ Microarray analysis를 통해 HPV integrated pattern에 따른 숙주 세포 내에서의 발현 패턴의 변화를 보이는 molecules을 찾아냄으로써 HPV DNA physical status와 treatment outcome 사이의 관련 기작을 분자적 수준에서 그려 보고자 함.

⑤ 숙주 유전체의 불안정성 정도를 간접적으로 살필 수 있는 Aurora-a의 발현 상태를 면역학적 염색을 통해 보임으로써 HPV integrated pattern과의 상관관계를 살펴봄.

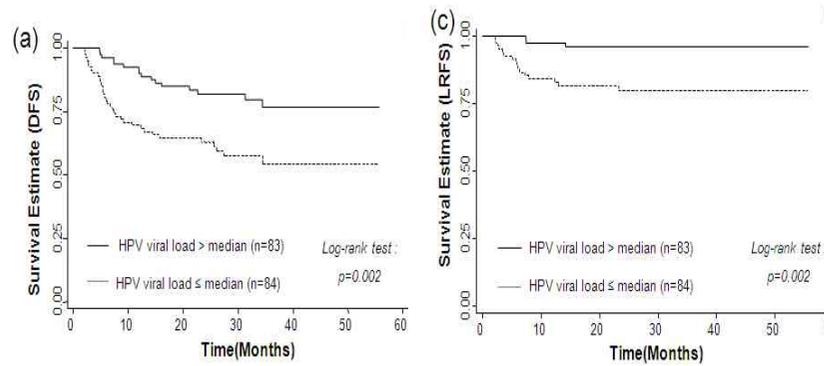
2. 연구의 내용 및 결과

<1> 자궁경부암의 방사선 민감성 및 치료 예후의 예측인자로서의 인유두종바이러스(HPV)

(1) 자궁경부암의 종양 내 존재하는 HPV DNA의 양적 차이에 따른 방사선 민감성의 차이

종양 내 HPV DNA의 양을 median 값을 기준으로 low initial HPV load (점선) 과 high initial HPV

load (실선) 으로 구분하였을 때 initial viral load 가 낮은 쪽이 방사선치료 후 예후가 나쁘다는 결과를 얻었고 이를 발표한 바 있다. 또한 viral load 에서 40세 이하의 젊은 나이, 4cm 이상의 큰 종양, 그리고 선암 조직학적 분류가 low HPV titer와 관련이 있음을 발견하였다. 이러한 경향은 방사선치료 후 국소적인 재발과도 비슷한 결과를 보여 DNA viral load 가 방사선 저항성과도 관계가 있음을 알 수 있었다 (Joo-Young Kim, Journal of Clinical Oncology 2009)



연구자는 이러한 관찰이 바이러스의 양 자체보다는 바이러스 증식이 많은 암세포에서 오히려 바이러스의 종양유전자 E6 의 발현이 줄어들어 악성도가 낮은 종양일 가능성이 많다고 논문에서 제시하였는 바 이 가설을 입증하거나 또 다른 설명을 가능케 하는 실험이 필요한 상태이다. 또 다른 설명으로써는 바이러스 증식이 많은 종양들이 세포내 바이러스의 증식을 원활하게 하는 유전적 배경을 그렇지 않은 종양세포에 비해 선택적으로 가지고 있어 이러한 유전적 특성이 자궁경부암의 방사선민감성을 높여줄 수 있다는 것이다. 이럴 경우 바이러스의 양은 단지 근본기전을 감추고 겉으로 나타난 현상일 수도 있을 것이다. 그러므로 진정한 자궁경부암의 예후인자를 알아내기 위해서는 위의 현상을 설명할 수 있는 기전연구가 반드시 필요한 상태이다.

(2) HPV persistence 와 방사선치료 결과의 관계

- 종양에서 HPV DNA 양성인 169명의 환자를 대상으로 방사선치료 후 국소재발과 HPV DNA 의 clearance관계를 살펴보았을 때 24개월 시점에서 81.4% 의 환자에서 clear 되었고 18.6%의 환자에서 persistent DNA 가 존재하였다.
- 1개월째는 121명 중 34명(27.9%), 3개월째는 125명 중 28명(22.4%), 6개월째는 116명 중 21명(18.1%), 그리고 12개월째는 123명 중 23명(18.7%)이 HPV persistence를 보였다.
- 24개월까지 마지막 HPV DNA 추적검사에서 HPV persistence를 보였던 경우를 overall HPV

persistence 라고 정의하였을 때 HPV persistence 여부는 방사선치료 후 국소재발의 발생과 밀접한 관계가 있었다(표 1, 그림 1).

표 1. Result of Univariate and multivariate analysis of local recurrence-free survival

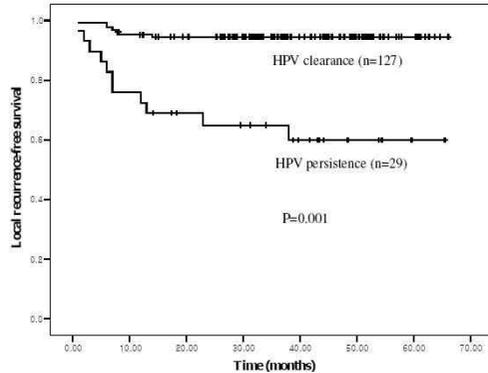
Table 2. Univariate and multivariate analysis of local recurrence-free survival with clinicopathologic prognostic factors

	Patient Number (n)	Univariate HR	95% CI	p-value	Multivariate HR	95% CI	p-value
Age	156	0.97	0.93-1.00	0.114	0.98	0.93-1.01	0.196
FIGO stage							
I, II	119	1.00			1.00		
III, IVA	28	4.11	1.48-11.32	0.006	8.35	2.19-32.76	0.002
IVB	9	1.86	0.23-14.88	0.559	1.02	0.09-10.59	0.985
Histology							
SCC	145	1.00			1.00		
AD/ADS	11	2.08	0.47-9.17	0.331	1.42	0.21-9.36	0.715
Grade							
I, II	124	1.00			1.00		
III	32	3.47	1.29-9.34	0.013	9.58	2.54-36.12	0.001
Node							
Negative	67	1.00			1.00		
Positive	89	2.34	0.75-7.26	0.14	0.84	0.21-3.33	0.808
Size							
< 4 cm	65	1.00			1.00		
≥ 4 cm	91	5.45	1.24-24.02	0.025	6.01	0.81-44.24	0.078
Smoke							
Never	132	1.00			1.00		
Ever	24	1.31	0.37-4.60	0.671	7.13	1.51-33.60	0.08
HPV viral load							
≥ 387	77	1.00			1.00		
< 387	79	4.76	1.35-16.72	0.015	5.87	1.51-22.80	0.011
HPV [24 mo]							
Clear	130	1.00			1.00		
Persist	26	4.39	1.63-11.81	0.003	4.22	1.44-12.31	0.008

SCC; squamous cell carcinoma, AD; adenocarcinoma, ADA; adenosquamous carcinoma, HPV [24 mo]; result of the last HPV test within 24 months after completion of radiotherapy

(Joo-Young Kim, International Journal of Cancer 2011)

그림 1. 방사선치료 완료 후 HPV clearance vs. persistence에 따라 국소재발율의 의미 있는 차이가 있음.



(Joo-Young Kim, International Journal of Cancer 2011)

(3) 종양 세포 내의 HPV DNA physical status와 방사선후 치료결과와의 관계

○ 2009년 발표된 연구결과인 HPV viral load 가 자궁경부암의 방사선치료 환자에게 미치는 영향에 대한 기전연구를 위하여 HPV 16, 18 58번 감염이 있는 자궁경부암 환자를 대상으로 종양세포의 DNA (n=111)와 RNA(n=46)를 추출, E6 와 E2 에 대한 Real-time quantitative PCR을 시행함.

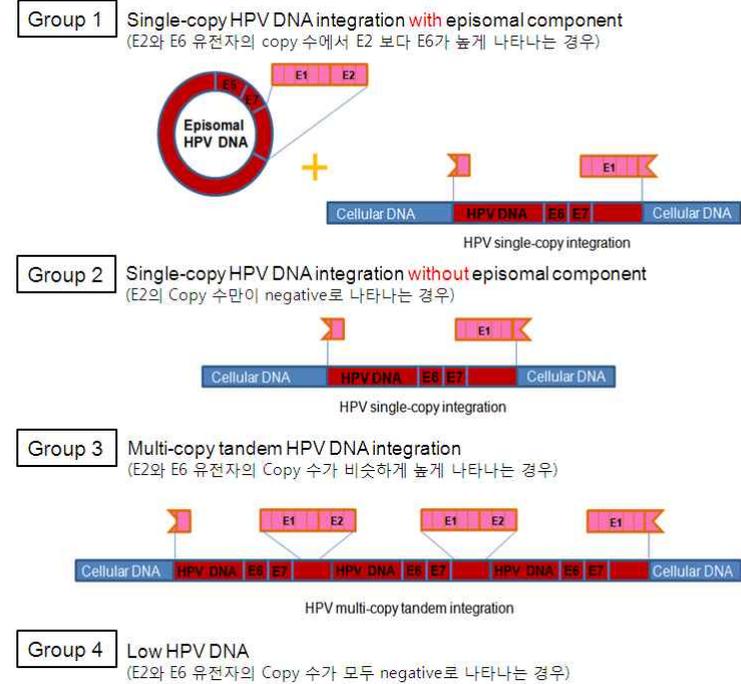
① HPV DNA physical status에 따른 자궁경부암 환자 샘플 분류

○ HPV 바이러스 유전자인 E2와 E6의 ORF(Open Reading Frame)을 타겟으로한 primer와 probe를 디자인하여 TaqMan probe 방식의 real-time PCR을 수행함으로써 HPV Viral load와 치료에 후와의 관계를 E2와 E6의 기능상의 변화에서 찾아보고자 함.

* HPV 바이러스가 숙주 세포내로 침투 후 숙주 유전체 내로 삽입되어지는 부위로 E2의 hinge region이 많이 보고되어지고 있는데 삽입에 따른 이 부위의 손상 여부는 PCR이 진행되는지 아닌지로 판단되어질 수 있다. 숙주 유전체로의 삽입에 의한 E2 유전자의 손상은 PCR에 의해 측정되어지는 E2 copy 수의 감소로 이어지고 E2 발현 즉 cDNA의 감소 및 E6 Repressor로의 기능 소실로 이어질 수 있다고 판단. HPV의 삽입 증가는 E2 기능을 잃게 하여 E6의 발현 증가 및 활성을 증폭시키는데 기여할 것으로 판단되어짐 (그림1).

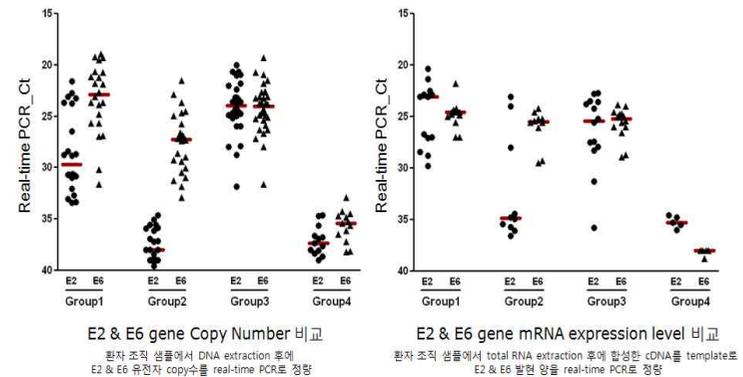
○ Real-time PCR로 정량화 되어진 HPV E2와 E6 유전자의 copy 수와 발현 양의 비교 분석 결과 자궁경부암 환자의 암세포 내에서의 바이러스 DNA의 physical status를 다음과 같이 크게 네 가지로 분류해 볼 수 있었음(그림 2).

[그림1]

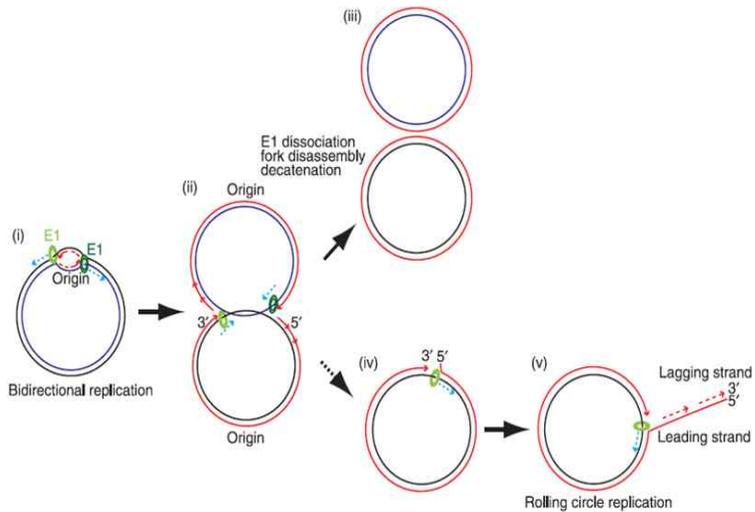


Suzanne D. VERNON et al., Int. J. Cancer (Pred. Oncol.): 74, 50 - 56 (1997)

[그림2]



고위험군 타입의 HPV DNA는 숙주 세포에 infection되어진 후 episomal form으로 존재하면서 숙주 세포의 분열 신호와 더불어 E2 gene의 통제 하에서 복제되어지다가 E2유전자가 붕괴되어지면서 숙주 유전체로의 삽입이 이뤄지게 됨. 이 같은 현상은 숙주 세포의 종양화를 증가시키는 E6/E7 viral oncogene들의 활성을 증가시키는 요인으로 보고되어져 왔음. 그래서 E2 통제 하에서 바이러스의 증식이 높아져 있는 종양에서는 E2에 의한 negative regulation에 따른 E6/E7의 발현이 억제되어지고 있기에 방사선민감성을 높임으로써 악성도가 낮아졌을 것이라는 이 전 연구의 가설을 증명해나가고자 이 번 연구에서는 E2와 E6의 copy수를 비교함으로써 integration form과 episomal form 상태로 구분 짓고자 하였음. 그러나 실험 결과를 분석하면서 연구자는 integration form에서 rolling circle DNA replication 방법을 통해 바이러스 DNA를 무한 복제하고 있는 중에 multicopy concatamer 상태로 숙주 유전체 내로 삽입되어지는 multi-copy tandem integration 패턴과 bidirectional theta replication 방법으로 복제 중이던 바이러스가 연쇄체가 아니라 single copy 상태로 숙주 유전체 내로 삽입되어지는 single-copy integration 패턴의 구분도 환자군의 치료 예후에 영향을 줄 수 있을 것으로 판단하여 4가지 그룹으로 구분한 후 방사선 치료 후 치료 예후의 차이를 살펴보고자 하였음.



A model for HPV16 rolling circle replication. (i) E1 binds to the viral origin and starts unwinding the origin DNA to initiate bidirectional replication. (ii) Two replication forks containing E1 converge near the point antipodal to the origin. (iii) Replication proteins and E1 at the forks dissociate from the DNA to allow completion of replication. (iv) When E1 fails to dissociate from the DNA on collision of two replication forks, it accidentally displaces the 5' end of the DNA strand that has been synthesized by the other replication fork (v) thereby allowing a single-stranded circular DNA to serve as a continuous template for rolling circle replication.

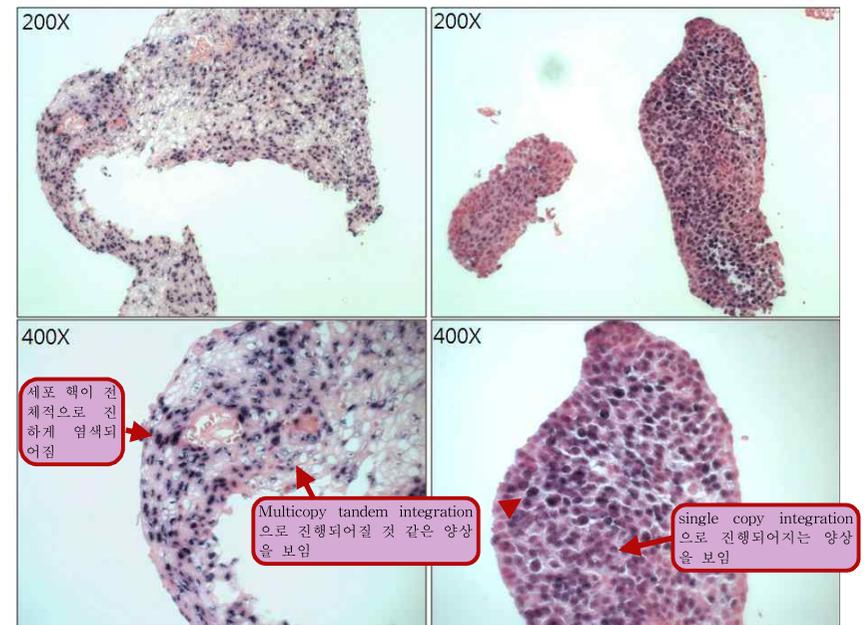
○ 111명의 자궁경부암 환자 조직 슬라이드에서 Ventana INFORM HPV Probes In Situ Hybridization (HPV ISH)TM 실험 기법을 사용하여 종양 조직 세포내의 HPV physical status를 visualize 시키고 Real-time PCR 결과와 비교 분석을 통해 세포 내 존재하는 인유두종 바이러스의 유전체의 상태에 따른 분류 체계를 좀 더 명확히 하고자 함.

- HPV probes *In Situ* Hybridization 실험 가이드에 따른 염색 pattern 구분

- Episomal pattern: 세포 내 핵을 전체적으로 염색시킴
- Integration pattern: HPV DNA가 숙주 유전체로 삽입되어지는 부분에서 DOT 형태로 염색되어 보임. 삽입되어지는 위치에서 Viral copy 수에 따라 dot의 크기가 차이가 있음.

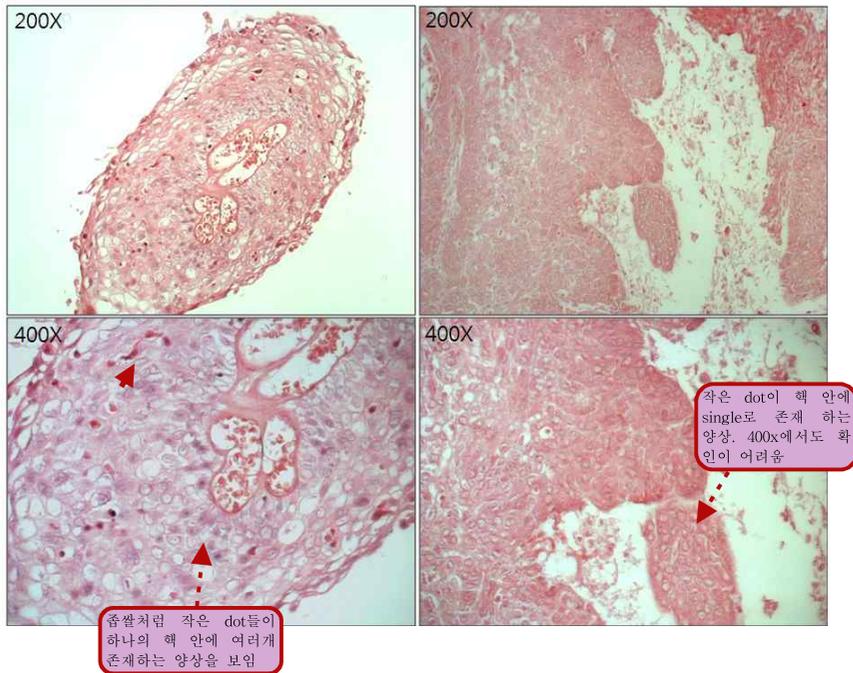
[그림] HPV probe *In Situ* Hybridization 실험 결과

Group 1: Stain the whole of nucleus, strongly: Episomal pattern



>> PCR 결과로 분류되어진 Group1 샘플들에서는 HPV ISH 실험 결과 종양 조직 세포들의 핵이 전체적으로 염색되어지는 episomal pattern을 보이는 샘플들의 빈도가 높았음. 작은 dot들과 함께하는 episomal pattern cell들 뿐 아니라 큰 size의 dot들과 함께하는 episomal pattern cell들을 지닌 샘플들도 많이 관찰됨.

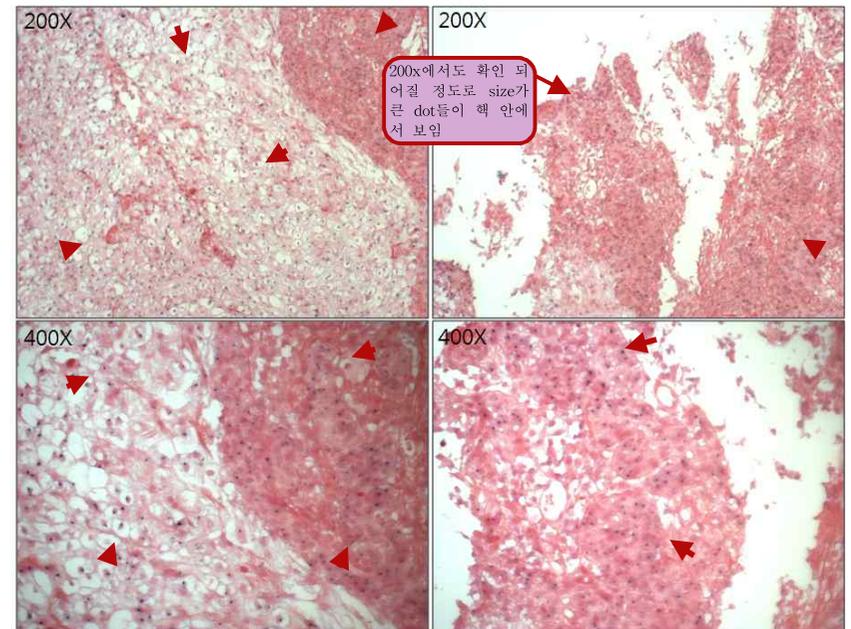
Group 2: Discrete small dots or pale single dot: Single copy integrated pattern



>> PCR 결과로 분류되었던 Group2 샘플들에서는 HPV ISH 실험 결과 종양 조직 세포들의 핵안에서 200배에서는 확인이 분명하지 않으나 400배에서는 확인되어지는 작은 size의 dot으로 염색되어지는 샘플들이 많이 보임. 작은 size의 dot들이 single로 존재하는 경우도 있었지만 multi-dot들로 염색되어지는 경우도 많음. 염색되어진 dot이 확인되지 않는 샘플들도 보임.

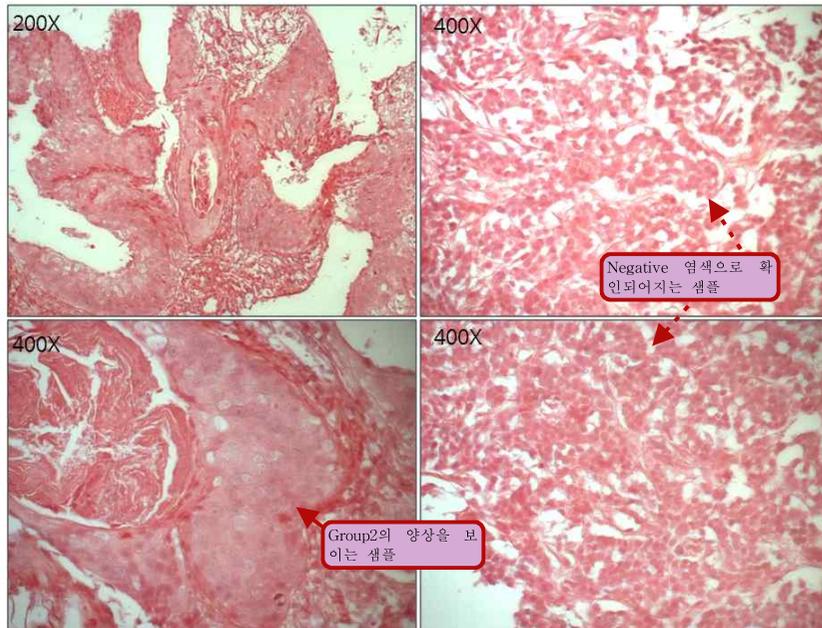
single copy HPV가 하나의 site에 들어가는 경우가 거의 염색이 확인되어지지 않는 경우인 듯 보임., low copy HPV가 여러 site로 integration되어지는 경우 여러 개의 dot들이 있는 것처럼 보임.

Group 3: Large size single dot: Multi copy-tandem integrated pattern



>> PCR 결과로 분류되었던 Group3 샘플들에서는 HPV ISH 실험 결과 종양 조직 세포들의 핵안에서 200배에서부터 분명하게 보이는 size가 큰 dot들이 확인되어지는 샘플들이 많았음. dot의 수는 하나의 핵 안에 1개가 대부분이며 2-3개의 dot을 지니는 샘플들도 보임. 수 백 개의 multi-copy로 복제되어진 viral DNA가 한 site에 삽입되어지면서 염색되어지는 dot의 사이즈가 커진 듯 보임.

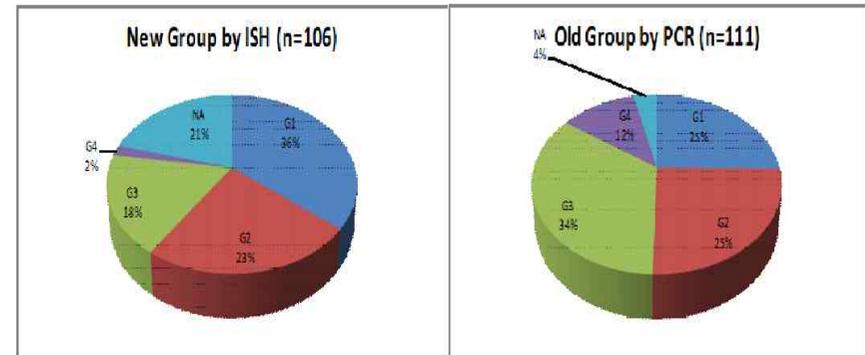
Group 4: Very slight bluish haze: Negative pattern



>> HPV ISH 실험 결과 negative signal로 확인 되어질 것으로 예상했으나 Group2의 패턴을 보이는 샘플들과 Group3의 패턴을 보이는 샘플들이 확인됨.

※ E2/E6 PCR 결과와 HPV ISH 결과의 비교 분석에 의한 Group 변경

	New Group by ISH	%	Old Group by PCR	%
G1	38	35.8	28	25.2
G2	25	23.6	28	25.2
G3	19	17.9	37	34.2
G4	2	1.9	13	11.7
NA	22	20.8	4	3.6
Total	106	100.0	111	100.0



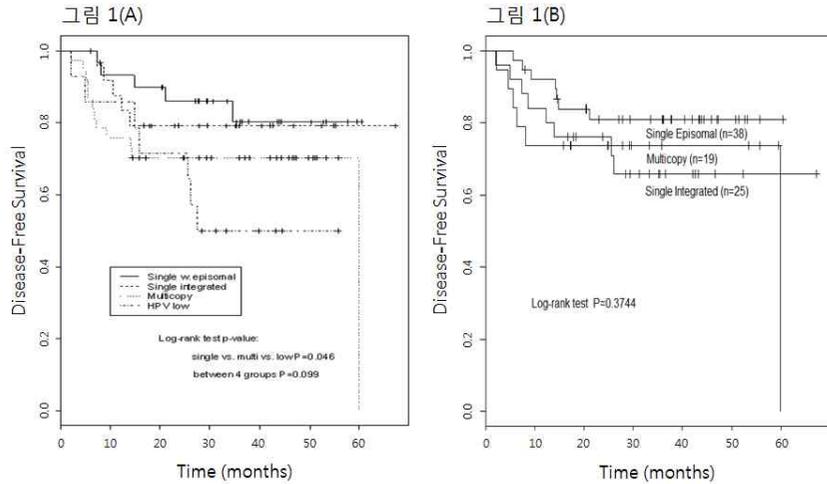
>> E2/E6 PCR 실험을 통한 분류체계에서는 Episomal pattern이 우세한 샘플을 Group 3로 혼동할 수 있음. 이 경우 HPV ISH 실험 결과를 통해 Group1으로 변경되어짐.

HPV ISH 실험 결과만으로는 Single copy integration 샘플을 Group 4로 혼동할 수 있음. 이 경우 E2/E6 PCR 결과를 참고로 Group2로 분류할 수 있음.

이 두 실험 기법을 병행함으로써 중앙 세포 내의 HPV DNA physical status를 좀 더 명확히 구분해 낼 수 있음.

② HPV DNA physical status에 따른 분류체계에서 방사선 민감성 및 치료 예후 분석

[그림 1A와 1B] 고위험군 타입인 HPV 16, 18, 58 번 감염이 있는 환자 111명에서 바이러스 physical status에 따른 그룹 간의 무병생존율의 차이를 보여줌. (1A) E2/E6 PCR 결과에 따른 4개의 Group 간의 Disease Free Survival 비교, (1B) E2/E6 PCR 결과와 HPV ISH 결과 통합 분석 결과에 따른 3개의 Group간의 Disease Free Survival 비교 (Group 4는 샘플 수가 적어 분석에서 제외).



>> E2/E6 PCR 결과를 토대로 한 그룹별 무병생존율에서는 Group1에서 Group4를 갈수록 무병생존율이 낮아지는 경향을 보였으나 E2/E6 PCR 결과와 HPV ISH 결과를 통합적으로 분석하였을 경우 미미한 차이(P=0.3774)이기는 하나 Group3가 Group2보다 생존율이 높아지는 경향을 보임.

[표 1] Univariate and multivariable analyses for disease-free survival with clinicopathologic prognostic factors

	Disease Free Survival			
	Univariate hazard ratio (95% CI)	p-value	Multivariable hazard ratio (95% CI)	p-value
HPV viral load				
>median	1			
≤median/≤0.75	2.61 (1.04,6.56)	0.041		
New Integration Pattern				
Single mixed with Episomal (Group1)	1	(0.387)	1	(0.014)
Single mainly Integrated (Group2)	1.85 (0.67,5.12)	0.233	6.43 (1.83,22.59)	0.004
Multicopy (Group3)	1.95 (0.65,5.81)	0.233	1.99 (0.60,6.58)	0.258

E2				
≤ cut-off	1			
> cut-off	1.72 (0.72,4.13)	0.224		
HPV type				
16	1			
18 / 58	1.65 (0.91,3.00)	0.097		
Stage group				
~IIIB	1			
III / IVA / IVB	2.19 (1.28,3.74)	0.004	9.01 (2.85,28.52)	0.0002
Nodal state				
Negative	1			
Positive	2.51 (0.91,6.90)	0.074		
Histologic Grade				
well/moderate	1			
poor	2.61 (0.94,7.24)	0.065	9.73 (2.33,40.70)	0.002
Histologic type				
SCC	1			
AD/ASC	7.08 (2.19,22.9)	0.001		
Tumor size				
< 4 cm	1			
≥ 4 cm	3.64 (1.33,9.96)	0.012		
Smoking				
never	1			
ever	2.48 (0.99,6.22)	0.053		
Aurora-A				
No	1			
Yes	3.10 (0.88,10.9)	0.077		
Age*	0.96 (0.93,0.99)	0.013	0.94 (0.90,0.98)	0.003

Abbreviations:AD/ASC, adenocarcinoma/adenosquamous carcinoma; SCC, squamous cell carcinoma; IQR, interquartile range

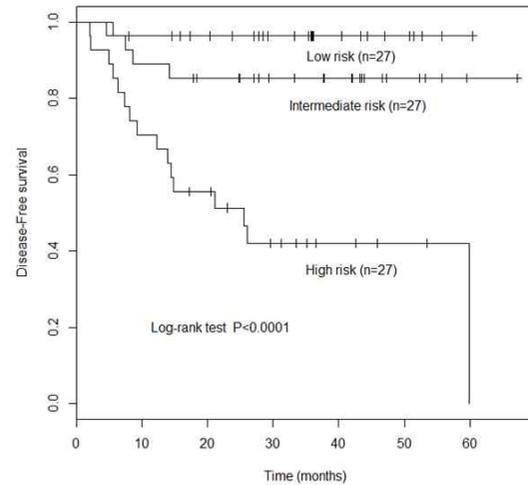
* 5-year increase in age

>> univariate analysis에 무병생존율을 위한 stage group, nodal metastasis, histological grade, histologic type, age를 비롯한 tumor size와 같은 다른 진단적 변수들을 포함시켜 분석한 multivariable analysis 결과를 통해 HPV DNA physical status에서 episomal pattern을 보이는 Group1에 비해 single copy integration pattern을 보이는 Group2에서의 차이(HR 6.43, CI 1.83-22.59, p=0.004)와 stage group 이 중요한 의미로 남아있었음. 이는 바이러스 DNA의 양이 높은 종양에서 그렇지 않은 종양에 비해 integrated form 이 아닌 episomal status 로 세포내에 남아있을 것이라는 본 연구자의 가설을 지지하는 관찰로 여겨진다.

③ outcome-predicting models과 internal validation의 수행

- 2년 무병 생존을 예언하기 위해 multivariable Cox model의 식별 능력이 C-statistic을 사용하면서 평가되어짐.

[그림] Predicted risk probability에 따라 3개의 위험 그룹으로 나누어진 환자 군들의 무병생존 그래프



[표] Hazard ratios (HR) of disease-free survival for three groups according to predicted risk probability

Risk Group	Estimated 1 year survival	Estimated 2 year survival	No. of Patients(%)	Event (%)	Disease Free Survival		
					HR	95% CI	p-value
Low	0.963	0.963	27 (33.33)	1 (4)	1.00		(0.0005)
Intermediate	0.889	0.852	27 (33.33)	4 (15)	4.10	(0.46,36.67)	0.2071
High	0.704	0.513	27 (33.33)	16 (59)	20.56	(2.72,155.3)	0.0034

>> Summary of 12 month and 24 month prediction model performance

1. 24 months DFS prediction

A. AUC = 74% (65%,83%) 10,000 bootstrap corrected 71% with sd 2.6%

B. Calibration chisquare = 9.02 with p-value 0.435 which indicates good fit

2. 12 months DFS prediction

A. AUC = 70% (58%,82%) bootstrap (10,000) corrected 68% with sd = 2.7%

B. Calibration chisquare 5.61 with p-value 0.778 which indicates good fit

>> The log-rank test resulted in a significant difference in survival distributions of the three groups of patients defined by the predicted survival rate ($p<.0001$).

(4) HPV DNA physical status에 따른 숙주세포 내에서의 발현상의 변화를 보이는 의미 있는 유전자들 검색

○ 39명의 자궁경부암 환자 샘플들을 대상으로 Microarray 분석을 통해 바이러스 DNA의 physical status에 따라 발현상의 변화를 보이는 molecules을 찾아봄.

- HPV 16 type의 single infection이 있는 자궁경부암 환자 샘플들 중 E2/E6 PCR 결과를 토대로 4개 그룹으로 분명하게 구분되어지는 39명의 mRNA들이 Microarray 분석을 위해 준비되어짐.

- Whole Human Gene Expression Microarray 44Kv.1.0 (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, CA)를 사용하면서 HPV physical status에 따라 구분한 4개 그룹에서 발현상의 차이를 보이는 유전자들을 조사함.

- 5%의 **False Discovery Rate (FDR)**을 기준으로 분석해본 결과 654개의 유전자들이 4개 그룹 사이에서 의미 있는 발현 차이를 보이는 것을 확인함.

- 환자 생존율이 그룹 1에서부터 4 번순으로 점점 더 안 좋게 나타나는 경향이 있었는데 Microarray 분석 결과 이 와 같은 순으로 발현이 증가되어지는 경향을 보이는 유전자들이 241개, 반대로 발현이 감소되어지는 경향을 보이는 유전자들이 188개 선별 되어졌음.

- 이 유전자들의 지금까지 밝혀진 생물학적 기능들을 살펴본 결과

; Group1에서 Group4 방향으로 발현 증가를 보였던 유전자들은 대부분 AT rich interactive domain 4B (RBP1-like, BRCA1)를 포함한 전사 조절 인자들과 chromosome organization에 관여하는 유전자들이었음.

; Group1에서 Group4 방향으로 발현 감소를 보였던 유전자들은 Keratinocyte와 T-lymphocyte differentiation과 연관된 유전자들 및 organic substance에 대한, 외부 자극에 대한 반응에 관여하는 유전자들이 많았음.

- Group4 즉 HPV DNA가 적게 탐지되어지고 있는 그룹에서 retinoid X receptor alpha (RXRA) 유전자의 발현이 중요하게 감소되어져 있는데 반해 Group1 즉 single-copy episomal HPV DNA가 많이 탐지되어지고 있는 그룹에서 이 유전자의 발현이 크게 증가 되어 있었음. 이 결과는 HPV DNA가 적게 탐지되어지는 중앙에서 epithelial differentiation의 부족이 안 좋은 생존 예후에 영향을 미치고 있음을 지지할 수 있음.

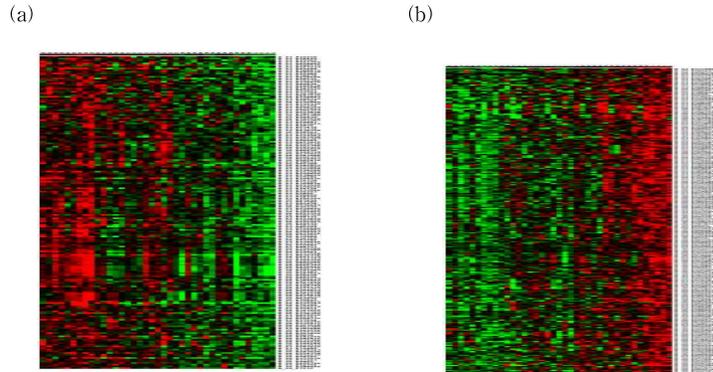
- 더불어 Group4에서는 숙주 세포의 증식 및 apoptosis, motility, T-cell activation등에 관여하고 있는

p21(CDKN1A)-activated kinase 2 (PAK2) 유전자와 biphasic synovial sarcoma의 epithelial component 에서만 유독 특이적으로 위치하는 claudin4 유전자의 발현이 크게 감소되어 있었음.

- HPV DNA physical status에 따른 이 같은 유전자들의 발현 상태를 더불어 체크해 봄으로서 epithelial differentiation의 상태 및 immune recognition 상태 예측 및 치료 예후를 살피는데 중요한 요소로 사용해 볼 수 있을 것임.

- 더 나아가 Microarray 분석 결과를 토대로 HPV DNA integration 패턴에 따른 발현 변화를 보이는 특정 기능의 유전자들을 타겟으로 관련 기작들을 연구함으로써 HPV physical status와 관련해 생존 가능성을 예측하고 치료 방향을 잡아가는데 유용한 자료로 활용해 볼 수 있도록 할 필요가 있음.

[그림 3] Heat map of the genes with significant linear trend from episomal to low HPV, decreasing expression (a) and increasing expression (b)



※ 위의 Microarray 분석 결과는 E2/E6 PCR 결과에 따른 분석결과로서 HPV ISH 추가 실험을 통해 얻은 결과를 통합하여 다시 분류되어진 세 개의 그룹 간의 비교 분석이 필요되어 짐 (현재 분석 진행중에 있음).

(5) 숙주 세포 내에서 존재하는 HPV physical status의 차이로 인해 숙주 세포 내 다양한 유전자들의 발현 상의 차이를 이끄는 요인과 관련 기작

- 우리는 Microarray 분석 결과 다른 그룹들에 비해 그룹 1에서 cell adhesion에 영향을 미치는 molecule인 claudin 4의 과발현 상태를 확인할 수 있었고 더불어 cell adhesion의 변화를 인지 하여 신호 전달을 매개하는 small GTPase signaling 관련 molecules들의 발현상의 변화를 확인 할 수 있었다.
- small GTP binding proteins인 CDC42와 RAC1의 target으로서 PAK2의 활성화는 c-Myc의 인산화를 초래함으로써 c-Myc의 전사 활성인자로서의 활성을 방해하는 것으로 알려지고 있음. c-Myc의 이상 조절에 의해 세포의 증식 및 암화로의 진행에 관여하는 많은 유전자들의 transcription 상의 변화가 초래되어진다는 보고들이 있기에 HPV physical status에 따른 c-Myc에 의한 전사조절 메카니즘의 변화가 있는지 확인해보고자 함.

- E2/E6 Real-time PCR 기법으로 각 그룹 별 c-Myc, Max(Myc associated factor X) 그리고 Mad1(Max dimerization protein1)의 발현 level 측정
- 각 단백질들 간의 dimer(c-Myc/Max 또는 Max/Mad1) 형성 여부에 따른 전사 조절 factor로서의 activity 변화가 있었는지 DuoLink 시스템을 이용하여 관찰(그림 3-4).

<< Transcriptional regulation by Myc-Max-Mad Network through E-box elements >>

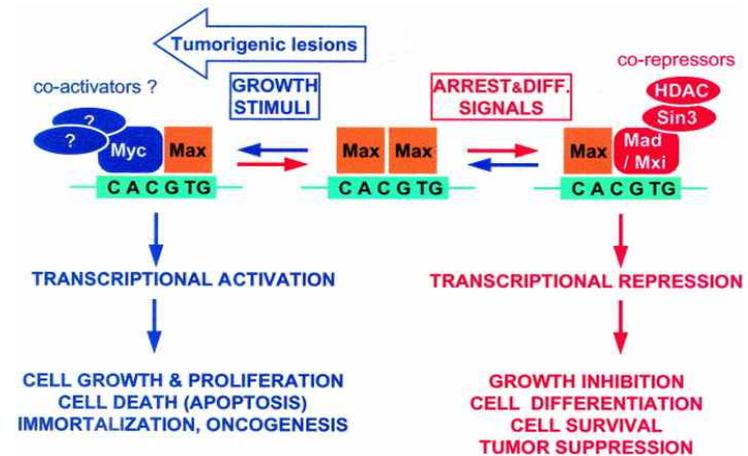
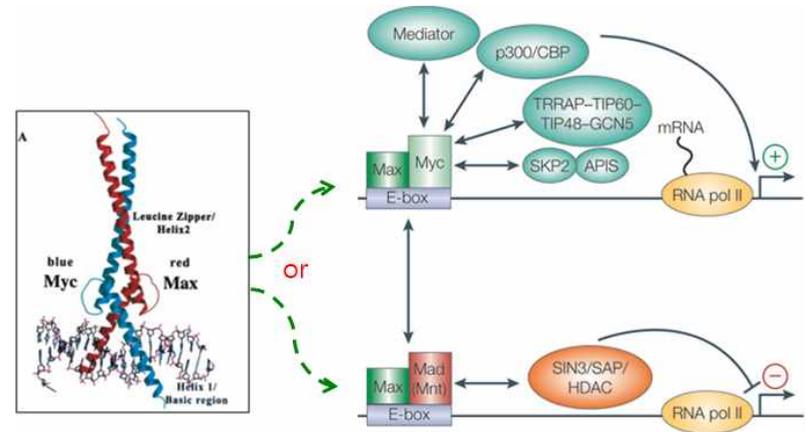
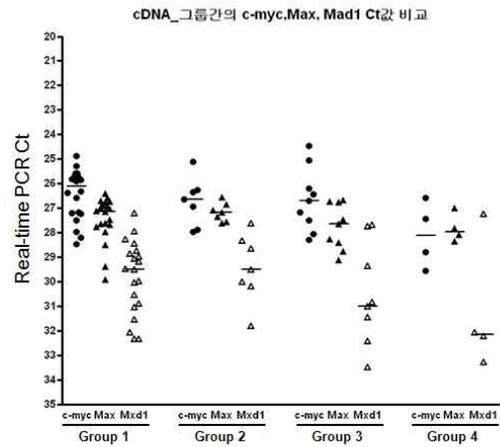


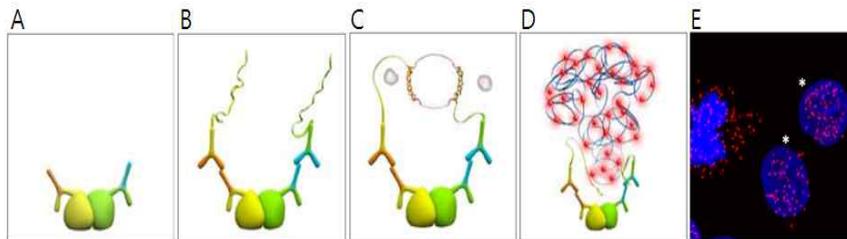
그림 1. cDNA를 확보할 수 있었던 45명의 자궁경부암 환자의 샘플을 이용하여 그룹 별 c-Myc, Max, Mad1의 발현 양상을 확인.



>> Real-time PCR 결과 Mad1의 발현이 Group 1과 Group 2에 비해 Group3와 Group4에 속하는 환자 샘플에서 조금은 줄어드는 양상을 보이는 듯하지만 통계적으로 의미 있는 차이는 아니었음 (그림 1).

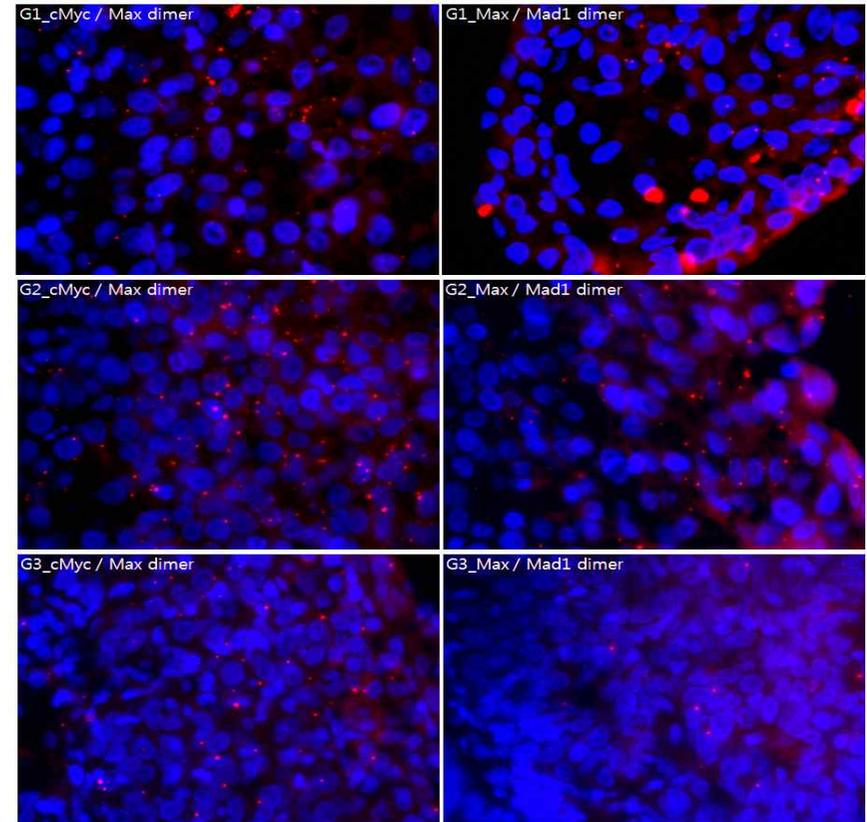
그러나 각 group 간의 종양세포 핵 안에 존재하는 cMyc/Max dimer와 Max/Mad1 dimer의 양적 차이는 DuoLink assay data를 통해 확인해 볼 수 있었음(그림 3).

그림2. DuoLink II Fluorescence Assay



>> 두 단백질이 40nm 이하의 근접한 거리에 존재할 때 비로써 증폭된 fluorescence signal을 형성시켜 현광현미경으로 관찰할 때 붉은 dot으로 보이게 됨.

그림 3. DuoLink assay를 이용한 그룹 별 c-Myc/Max dimer, Max-Mad1 dimer의 위치 및 양적 변화확인

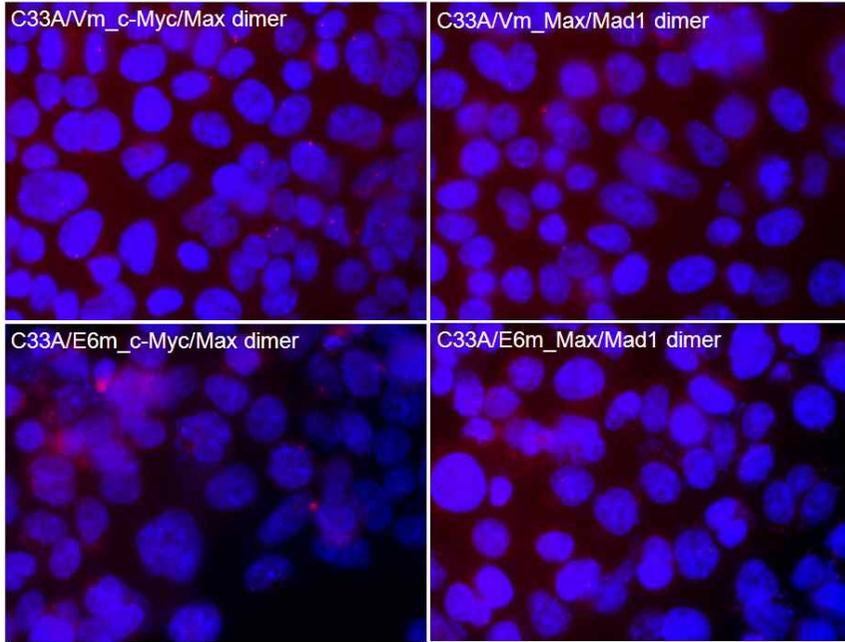


Group 1: G2에 비해 cMyc/Max dimer들이 핵 안쪽으로 적게 나타나는 경향을 보임. 그러나 Max/Mad1 dimer들은 핵 안쪽에서 많이 나타나는 것처럼 보임.

Group 2: G1에 비해 cMyc/Max dimer들이 핵 안쪽에서 많이 나타나는 것처럼 보이고 Max/Mad1 dimer들은 핵 안쪽에서 적게 나타나는 경향을 보임.

Group 3: cMyc/Max dimer들이 핵 안쪽에서 G1에 비해서 많이 G2에 비해서 적게 나타나는 경향을 보이고 Max/Mad1 dimer들은 G1과 G2에 비해 핵 안쪽으로 모두 적게 나타나는 경향을 보임.

그림 4. DuoLink assay를 이용한 E6 과발현 세포주에서 c-Myc/Max dimer, Max-Mad1 dimer의 위치 및 양적변화 확인.



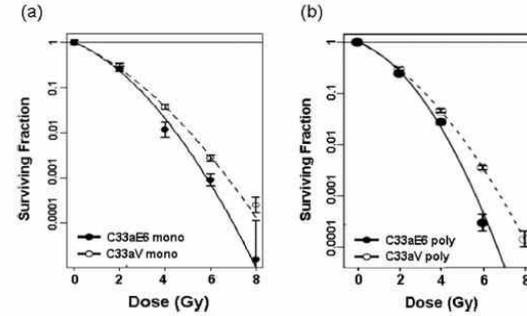
>> HPV 바이러스 infection이 없는 자궁경부암 세포주 C33A/Vm cells의 경우 c-Myc/Max dimer 및 Max/Mad1 dimer 모두 Negative에 가까운 signal을 보임. C33A cells에 HPV viral onco-protein 유전자인 E6 DNA를 넣어 인위적으로 과발현 시켜 놓은 C33A/E6 cells에서도 C33A/Vm cells처럼 Negative signal을 보임. 이결과로 c-Myc/Max/Mad1 network에서 변화가 HPV onco-protein E6에 의한 직접적 영향은 아닌 듯 보임.

(6) HPV 감염이 없는 세포주인 C33a 세포주를 이용하여 HPV 16 E6 종양유전자가 방사선민감성에 미치는 영향을 in vitro 실험을 통하여 조사함.

(Joo-Young Kim, International Journal of Radiation Biology 2010)

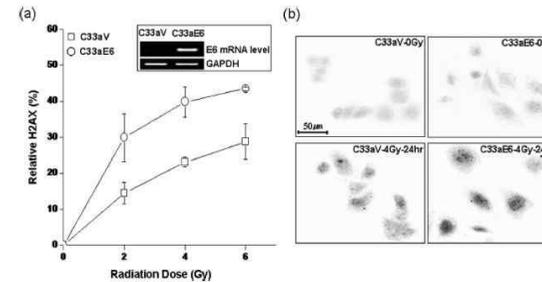
- C33aE6 세포주에서 (monoclonal (그림 1a), polyclonal (그림 1b)) parent cell (C33aV)에 비해 방사선민감성이 높음을 clonogenic radiation survival curve에 의하여 보여줌.

[그림 1] 방사선생존곡선



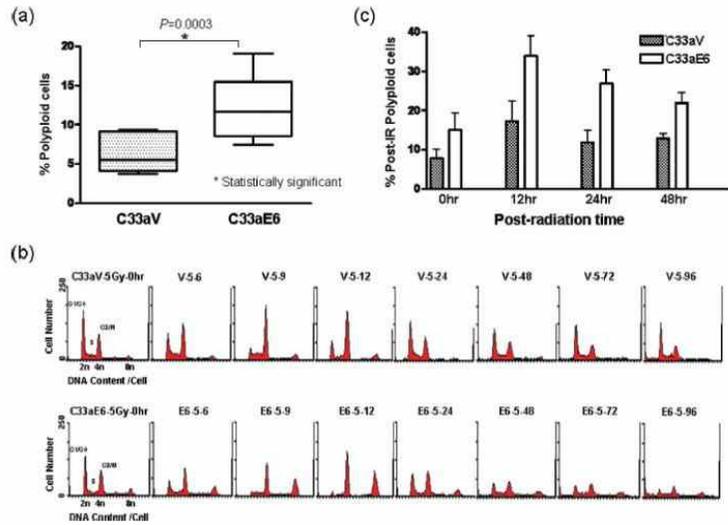
- DNA double strand break의 표식자인 gH2AX foci가 C33aE6 세포주에서 방사선치료 24시간 후에 남아있는 양이 C33aE6 세포주에서 parent cell (C33aV) 보다 더 많아 clonogenic survival 과 같이 DNA damage 의 정도도 E6 세포주에서 더 큼을 보여주었음 (그림 2).

[그림 2] 방사선생존곡선 (a) 방사선 0~6Gy 조사 24시간 후 gH2AX 양의 측정 및 foci 형성사진



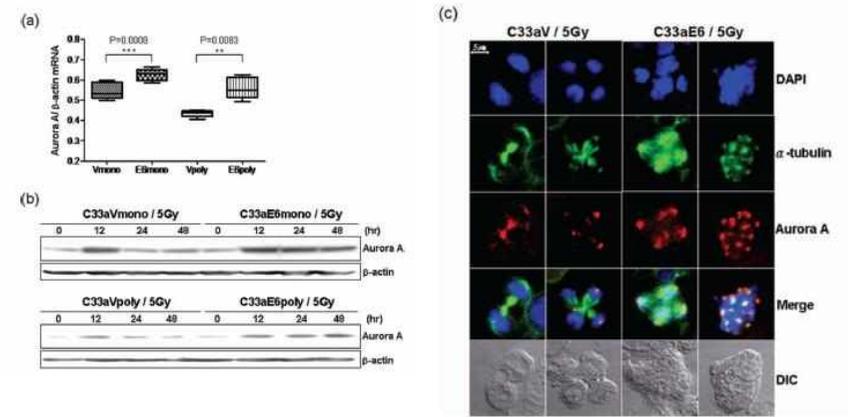
- 방사선조사 5Gy 후 C33aE6 세포주에서 G2/M 세포주기의 arrest를 하지 않고 이를 bypass 하여 방사선 조사 후 6-9시간부터 polyploidy 세포들을 생산하고 이는 세포사로 이루어짐을 관찰함. 이는 24시간 후 다시 정상 세포주기 패턴을 보이는 C33aV 세포주에 비해 C33aE6 세포주가 방사선조사 후 G2/M 세포주기에서의 arrest를 하지 않고 mitosis 로 진행하려는 drive 가 매우 강하나 정상 mitosis를 하지 못한 상태에서 cytokinesis 에 장애가 생긴 상태로 mitotic catastrophe를 일으킬 가능성을 시사 함. C33a는 p53의 point mutation이 있는 세포주으로써 이러한 C33aE6 세포주의 특성은 단순히 p53 mutation에 의한 효과가 아님을 시사한다고 할 수 있음 (그림 3).

[그림 3] (a) 방사선조사 전 기본 polyploidy 세포의 양적 비교 (b) C33aV 및 E6 세포주에서 방사선 5Gy 조사 후 각 시간에 따른 세포주기의 변화 양상을 flowcytometry로 측정 (c) 방사선 조사 후 0~48시간째 G2/M 세포주기에 있는 세포군의 양적 비교



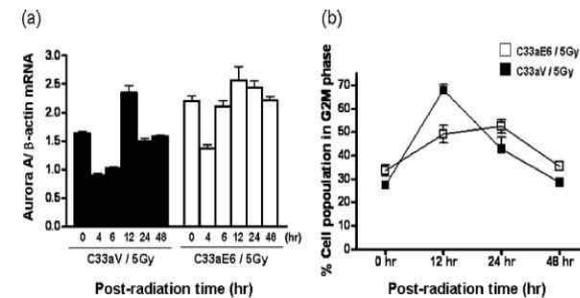
- 이러한 C33aE6 세포의 방사선 후 세포주기에서 나타내는 특징의 기전을 조사하기 위하여 mitotic kinase 세 가지 (aurora-A, aurora-B, polo-like kinase)의 발현을 조사한 결과 E6 세포 중에서 aurora-A 만이 parent cell 과의 차이를 보이며 C33aE6 세포주에서는 방사선 조사 후 12시간째 증가된 aurora-A의 양이 이 이후 지속적으로 높아져 있음을 관찰함(그림 4b). Aurora-A 의 면역형광염색으로 세포내의 aurora-A 발현을 검사해 본 결과 C33aE6 세포에서는 multipolar spindle 의 존재와 염색체분포의 이상이 다량 발생하였으며 C33aV 세포주에서 이따금씩 나타나는 tetraploidy 세포와는 달리 특징적으로 세포질 분열이 동반되지 않는 endoreduplication 의 양상을 띠는 것을 알 수 있었다(그림 4c). 또한 aurora-A 의 방사선조사전의 발현정도를 real-time PCR 로 조사하였을 때 C33aE6 세포가 vector 세포에 비해 높아 E6 세포에서 기본적으로 유전적 불안정성이 존재함을 알 수 있었다 (a).

[그림 4]. 방사선치료전 기본적인 C33a V and E6 monoclonal and polyclonal 세포주에서 aurora-A 의 발현 (a) 방사선조사 5Gy 후 시간에 따른 aurora-A 단백질의 발현정도 (c) 방사선 조사 후 24시간째 aurora-A 의 세포내 발현양상을 DAPI, α -tubulin 등과 함께 면역형광염색을 통하여 관찰

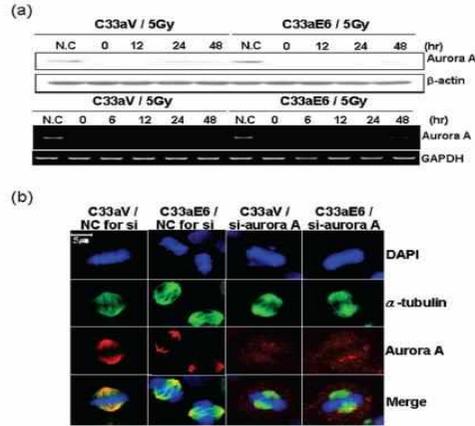


- 방사선조사 후 시간대 별로 (0, 4, 6, 12, 24, 48시간) aurora-A 의 발현을 측정해 보았을 때 이는 G2/M 세포주기에 축적된 각 세포주에서의 세포군의 분포와 비슷하여 C33aE6 세포주에서 관찰된 Aurora-A 의 증가는 사실 G2/M 세포주기에 축적된 abnormal mitosis를 하려는 세포들에 의하여 발현된 것으로 보인다(그림5).

[그림 5] 방사선조사 후 aurora-A 의 발현을 G2/M 세포주기의 세포량과 비교함.

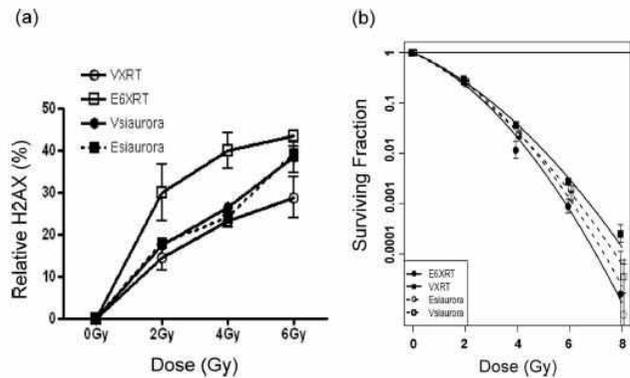


[그림 6] Aurora-A를 si-RNA 로 24시간에 걸쳐 차단 후 방사선조사 전후 aurora-A 의 발현을 western blot (a) 및 면역형광염색으로 관찰함 (b)



- Aurora-A 의 과발현이 방사선으로 인한 세포사를 촉진 시켰으므로 이의 발현을 차단함으로써 C33aE6 세포의 C33aV 세포에 대한 방사선민감성의 증가현상이 없어지는 것을 보기 위하여 aurora-A의 si-RNA를 사용하여 gH2AX foci 및 방사선민감성실험을 시행하였고 si-aurora A의 사용으로 E6 세포의 방사선민감성이 V 세포와 비슷해지는 것을 증명하였다 (그림 7, 표1).

[그림 7] gH2AX(a) 및 radiation survival curve (b)를 시행하였을 때 C33aE6 의 방사선민감성이 C33aV 와 비슷하게 감소함을 관찰함.



[표 1] C33aV 와 E6 의 방사선생존곡선 parameters

Table I. Parameters for radiation survival curves for C33aV and C33aE6 cell lines with siAurora A.

Cell lines	Without si-aurora A		With si-aurora A	
	$\bar{D}(Gy)$	α/β	$\bar{D}(Gy)$	α/β
C33aV	1.42 (1.33-1.53)	7.3 (4.9-10.7)	1.30 (1.23-1.38)	7.8 (5.7-10.6)
C33aE6	1.32 (1.22-1.42)	4.5 (2.7-6.7)	1.41 (1.34-1.49)	4.3 (3.2-5.5)

*The C33aE6 and C33aV cells differed significantly in radiosensitivity both with and without siAurora (both $P < 0.001$). However, the difference between the two cell lines was reduced with siAurora transfection as shown in Figure 7b. The results of three independent experiments are presented with mean \pm standard error.

(7) HPV DNA physical status에 따른 Aurora-A 발현 상의 차이 확인

- 우리는 2010년도 과제 연구에서 HPV 16 타입의 E6유전자를 인위적으로 과발현 시켜 놓은 자궁경부암 세포주인 C33A를 통해 E6 조절하의 Aurora-A(a mitotic kinase)의 발현 증가 와 genomic instability 증가의 상관관계를 밝힌 바 있었음. (Joo-Young Kim, International Journal of Radiation Biology 2010)

- 더 나아가 자궁경부암 환자의 종양 조직 내의 HPV DNA physical status에 따른 그룹 별 Aurora-A의 발현상의 차이가 있었는지를 확인해 봄으로써 그룹 별 HPV viral oncoprotein인 E6의 기능상의 차이가 있었는지 간접적으로 확인해 보고자 함.

① Aurora-A의 발현은 Group2 (single-copy integration)에 비해 Group3 (multi-copy integration)에서 특히 의미 있는 변화를 확인해 볼 수 있었음(Group2 vs. Group3 : 43.1% vs. 71.4%, $p < 0.01$).

② Aurora-A의 발현은 또한 E2 copy number가 높게 나타났던 환자 군에서 더 강하게 발현 되어지고 있음을 관찰할 수 있었음(high-E2 vs. low-E2 : 71.9% vs. 50.7% at E2 cut-off 219,796, $p = 0.06$).

③ 위와 같은 연관성은 HPV 16 타입에 감염된 환자들의 subgroup에서도 유사하게 나타나고 있음 (73.9% vs. 45%, $p = 0.02$).

>> E2/E6 PCR 결과에 따른 분석에서는 ① ~ ③번 과 같은 결과를 확인해 볼 수 있었으나 HPV ISH 통합 분석 결과에서는 아래 [표]에서 보여지는 것처럼 그룹간의 차이가 명확하게 드러나지 않는 것을 확인해 볼 수 있었다.

[표] New Integration Pattern Group * Aurora-A * Relapse

	Aurora-A	Univariate	
		Hazard ratio	P
Single mixed with Episomal	No	1	0.2608
	Yes	3.43 (0.40,29.45)	
Single mainly Integrated	No	1	0.6089
	Yes	1.56 (0.28,8.55)	
Multicopy	No	1	.
	Yes	.	

	Aurora-A	Non-Relapse	Relapse	P
Single mixed with Episomal	No	14 (45.16)	1 (16.67)	0.3682
	Yes	17 (54.84)	5 (83.33)	
Single mainly Integrated	No	7 (43.75)	2 (33.33)	1
	Yes	9 (56.25)	4 (66.67)	
Multicopy	No	6 (50.00)	0 (0.00)	0.1023
	Yes	6 (50.00)	5 (100.00)	

<2> 자궁경부암의 방사선 민감성 및 치료 예후의 예측인자로서의 종양 저산소증 표지인자 CA9

자궁경부암의 방사선반응은 암 세포내에서 이루어져 온 유전적 변화와 감응체이면서 세포변형의 초기 단계에 기여하는 고위험군 인유두종 바이러스의 종양유전자의 역할, 그리고 모든 고형종양의 방사선민감성에 공통적인 영향을 주는 종양 미세 환경 등 이 대표적인 요인들의 영향을 받으며 자궁경부암 환자 개개인에게서 달리 나타날 수 있다고 보고 우리는 위 세 가지의 주요 요인을 타겟으로 분석 방법의 개발 및 방사선 예후와의 관련성을 표지화 시킬 수 있는 시스템을 갖추고자 노력해왔다. 이 번 연구의 두 번째 타겟으로 종양 미세 환경의 변화와 그에 따른 종양 세포의 상호 작용 간의 변화를 살펴보고자 한 결과에서 우리는 종양세포 표지자로 알려져 있는 CA9의 역할을 규명해 낼 수 있었다.

(1) CA9 과발현 세포주를 대상으로 종양 저산소증 상태에서 CA9 과발현 현상에 의해 야기되는 종양 미세 환경의 변화들을 확인해보고자 CA9 과발현 세포주를 만들어 이 세포에서 특이적으로 나타나는 발현상의 변화를 보이는 유전자들을 확보하였음.

[표 1] Up or Down regulation of distinct classes of genes in CF(CA9 과발현 세포) cells compared to the CP(대조군) cells as determined by DNA microarray analysis.

Gene Ontology	Fold Change	Public ID	Gene Title	Gene Symbol
cell growth / regulation of cell size	6.8880596	NM_001423	epithelial membrane protein 1	EMP1
	2.432927	AI809967	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1	SHC1
	2.0064502	NM_003377	vascular endothelial growth factor B	VEGFB
	2.0673866	NM_006747	signal-induced proliferation-associated gene 1	SIPA1
	7.6095424	NM_002045	growth associated protein 43	GAP43
	2.0788424	AI910869	latent transforming growth factor beta binding protein 4	LTBP4
negative regulation of cell adhesion	2.0798087	AF498927	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	ARHGDI B
	4.073464	AI571798	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	ARHGDI A
	2.432927	NM_006747	signal-induced proliferation-associated gene 1	SIPA1
regulation of signal transduction	2.432927	AI809967	SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1	SHC1
	13.636082	NM_012242	dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	DKK1
	2.024345	NM_016431	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2	MAPK8IP2
	2.0788424	AF051344	latent transforming growth factor beta binding protein 4	LTBP4
	2.017527	AB016929	regulator of G-protein signalling 11	RGS11
	2.0788424	AI910869	latent transforming growth factor beta binding	LTBP4

			protein 4	
	2.0360138	AA775681	chromosome 1 open reading frame 139	C1orf139
	2.3236666	BE045549	mindbomb homolog 2 (Drosophila)	MIB2
	2.0931978	U79264	Zic family member 1 (odd-paired homolog, Drosophila)	ZIC1
intermediate filament cytoskeleton	2.0610335	BF673049	restin (Reed-Steinberg cell-expressed intermediate filament-associated protein)	RSN
	4.1990867	NM_021076	neurofilament, heavy polypeptide 200kDa	NEFH
	2.5339577	AI922599	vimentin	VIM
	2.0416265	S62137	dopamine receptor D2	DRD2
spliceosome complex	2.1030297	BC004434	splicing factor 3a, subunit 2, 66kDa	SF3A2
	2.0770855	NM_005877	splicing factor 3a, subunit 1, 120kDa	SF3A1
	2.2456882	BF434828	U2 (RNU2) small nuclear RNA auxiliary factor 2	U2AF2
Rho GDP-dissociation inhibitor activity	2.0798087	AF498927	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	ARHGDI B
	4.073464	AI571798	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) alpha	ARHGDI A
actin binding / cytoskeletal binding protein	2.157081	NM_006950	synapsin I	SYN1
	2.0610335	BF673049	restin (Reed-Steinberg cell-expressed intermediate filament-associated protein)	RSN
	2.5659215	NM_006289	talin 1	TLN1
	2.3043792	NM_004877	glia maturation factor, gamma	GMFG
	3.017414	NM_022359	phosphodiesterase 4D interacting protein (myomegalin)	PDE4DIP
	2.1628652	NM_003282	troponin I, skeletal, fast	TNNI2
	2.024345	NM_016431	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2	MAPK8IP2
	2.9929342	AA912711	erythrocyte membrane protein band 4.1-like 1	EPB41L1
	2.037117	AI358867	Apolipoprotein E	APOE
	2.062371	AF143684	myosin IXB	MYO9B
	6.3003864	NM_006790	titin immunoglobulin domain protein (myotilin)	TTID
	2.3236666	BE045549	mindbomb homolog 2 (Drosophila)	MIB2
	2.2737782	AI631915	dynamitin 3	DNM3
	2.5339577	AI922599	vimentin	VIM
	4.1990867	NM_021076	neurofilament, heavy polypeptide 200kDa	NEFH
	2.2030773	NM_001853	collagen, type IX, alpha 3	COL9A3
	2.6930618	NM_005775	vinexin beta (SH3-containing adaptor molecule-1)	SCAM-1
	3.9035726	L27624	tissue factor pathway inhibitor 2	TFPI2
	2.0738285	AI337584	nuclear mitotic apparatus protein 1	NUMA1
	2.362358	BF342661	Microtubule-associated protein 2	MAP2
2.4938235	AC006942	adaptor-related protein complex 2, alpha 1 subunit	AP2A1	
blood coagulation/ wound healing	0.46467158	BF983379	CD59 antigen p18-20 (antigen identified by monoclonal antibodies 16.3A5, EJ16, EJ30, EL32 and G344)	CD59
	0.24718508	NM_003246	thrombospondin 1	THBS1
ruffle / lamellipodium	0.28961816	AF021834	tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)	TFPI
	0.39519522	NM_018351	FYVE, RhoGEF and PH domain containing 6	FGD6
ubiquitin ligase complex	0.43685743	AA142966	paja 2, RING-H2 motif containing	PJA2
	0.47368816	NM_000286	peroxisomal biogenesis factor 12	PEX12
	0.4773618	BC000973	KIAA1333	KIAA1333
	0.3264692	AA541479	mitogen-activated protein kinase kinase 1	MAP3K1
	0.22568138	AI798098	polycomb group ring finger 5	PCGF5

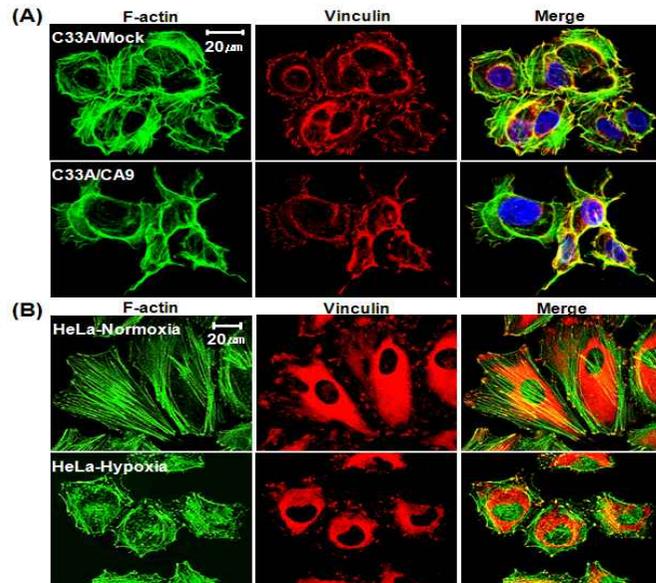
	0.4824882	AW379042	Mdm4, transformed 3T3 cell double minute 4, p53 binding protein (mouse)	MDM4
endopeptidase inhibitor activity	0.24718508	NM_003246	thrombospondin 1	THBS1
	0.28961816	AF021834	tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)	TFPI
	0.4567502	BE968786	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	TIMP2
alpha-mannosidase activity	0.3122907	NM_002372	mannosidase, alpha, class 2A, member 1	MAN2A1
enzyme inhibitor activity	0.24718508	NM_003246	thrombospondin 1	THBS1
	0.42778227	NM_001262	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	CDKN2C
	0.28961816	AF021834	tissue factor pathway inhibitor (lipoprotein-associated coagulation inhibitor)	TFPI
	0.4567502	BE968786	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	TIMP2

▶ CA9 transfected C33a(CF) 및 vector control C33a(CP) 세포주 대상 Human133 plus Affymetrix gene chip assay을 통해 CF에서 의미 있게 변하고 있는 molecule들의 profile이 분석되어졌음 (표1).

▶ 유전자 칩 분석 결과, 주로 cell growth, cell size & shape, cell-cell adhesion, cell-matrix focal adhesion, F-actin 등 cytoskeleton 형성 및 cell motility에 관여하고 있는 molecules을 중심으로 의미 있는 변화가 많이 보여 짐.

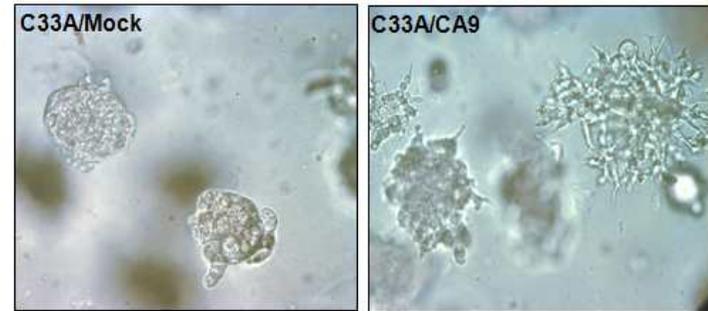
(2) 세포 접촉 및 부착, 세포 골격 관련 유전자들의 발현 변화가 실제적 종양세포에 미치는 영향을 확인해 보고자 3D culture system과 세포 cytoskeleton 관련 molecules을 형광 염색시켜 세포의 morphology 및 cell adhesion 상태를 관찰하였음.

[그림1] Reorganization of actin cytoskeleton and alteration of focal adhesion induced by CA 9 overexpression



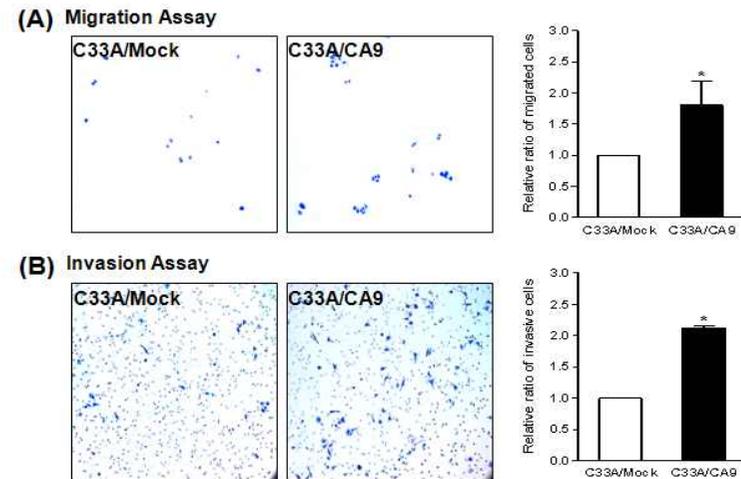
- ▶ 인위적으로 CA9 유전자 삽입을 통해 과발현을 유도한 C33A/CA9에서와 저산소 환경에서 배양시킴으로써 CA9의 과발현을 유도한 HeLa-Hypoxia 세포에서 비슷한 세포 골격 및 focal adhesion의 양상을 보임.
- ▶ CA9 과발현 시 actin fiber는 전체적으로 양적 감소 및 가늘어지고 짧아지는 양상이 보이나 세포막 쪽으로 치우쳐 끊어지는 모습이 나타남. focal adhesion 역시 전체적으로는 양적 감소를 보이나 filopodia protrusion 부위에 집중되어져 보이고 크기 역시 작아지는 양상을 보임.

[그림2] Growth pattern in 3D Matrigel culture



- ▶ Matrigel 상에 단일 세포로 심은 후 성장해나가는 암세포의 colony 모습을 관찰.
- ▶ CA9 과발현 세포에서 세포간의 접촉 능력이 약해져 있음을 확인.

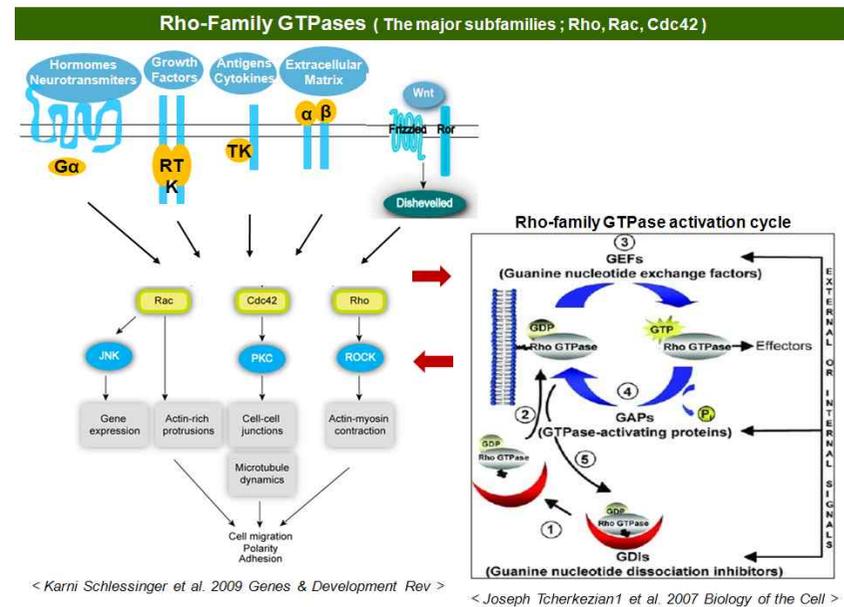
[그림3] Increased invasive and metastatic ability with CA 9-overexpression



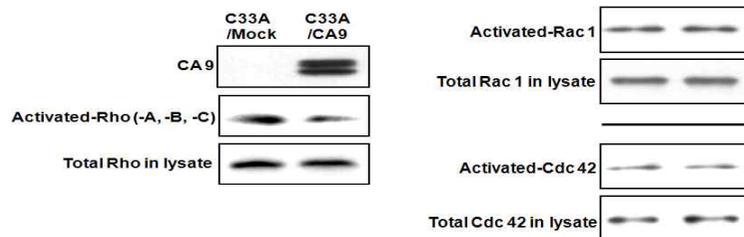
▶ 그림 1과 2에서 볼 수 있었던 morphology 및 cell adhesion 상태 변화들이 세포의 motility 및 invasive한 능력에 영향을 줄 수 있었는지 확인해 본 결과 CA9 과발현 세포들에서 세포의 이동성 및 matrigel 침투 능력들이 증가되어 있음을 확인해 볼 수 있었음.

(3) CA9 과발현에 의한 Rho-family small GTPases activity에 미치는 영향

- CA9 과발현 세포들과 그렇지 않은 대조군 세포간의 morphology 및 cell adhesion 상태의 차이의 원인으로 cytoskeleton 변화에 따른 세포 motility의 변화를 주도하는 Rho GTPase signalling pathway에 주목하게 되었음.
- Rho GTPase signalling pathway 관련 유전자들의 발현 변화를 microarray 분석 결과에서도 확인 할 수 있었음.



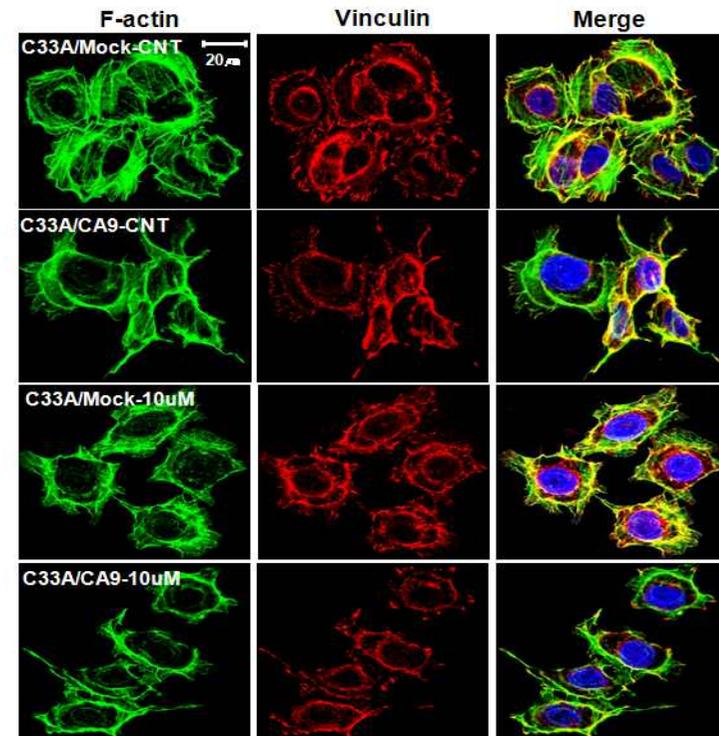
[그림1] CA9 발현에 따른 대표 Rho GTPase들의 활성 변화



▶ Rho-family GTPase들 중 대표적인 Rho-A,-B,-C 와 Rac1 그리고 Cdc42를 대상으로 CA9 과발현 세포 내에서의 활성상태를 western blot으로 확인해 본 결과 Rac1과 Cdc42의 경우에는 발현양의 차이 뿐 아니라 활성상태 역시 변화가 없었음. 그러나 Rho-A,-B,-C의 경우 발현양의 차이는 생기지 않았으나 활성상태가 CA9 과발현 세포에서 줄어드는 양상을 보임.

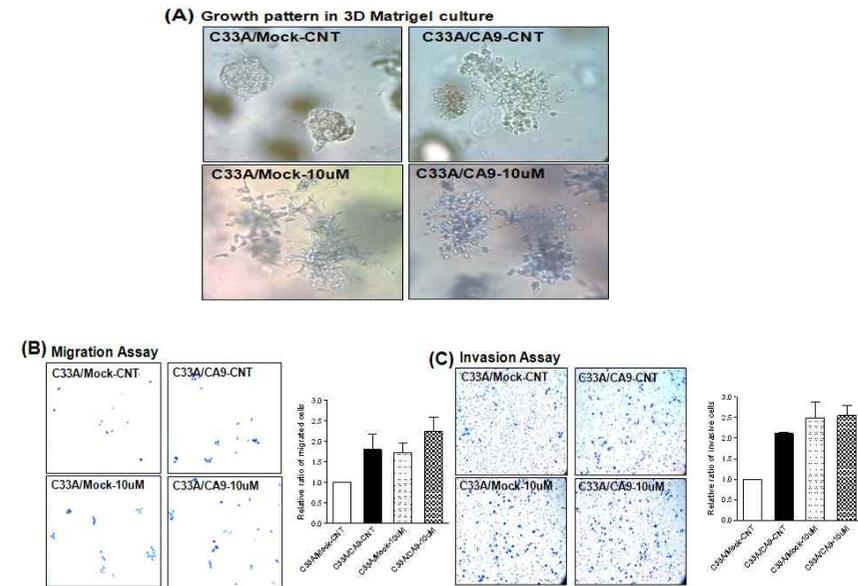
▶ 대조군(C33A/Mock) 세포에서 Rho GTPase inhibitor를 이용하여 Rho GTPase signalling pathway를 block 시켰을 때 CA9 과발현 세포에서 나타난 모습들이 일어나는지 확인을 해봄.

[그림2] Changes of actin cytoskeleton and focal adhesions subsequent to blocking the Rho downstream with ROCK inhibitor (Y27632)



▶ ROCK inhibitor (Y27632)를 10uM 처리시 C33A/CA9에서는 큰 변화가 없었으나 대조군인 C33A/Mock 세포에서 cytoskeleton 및 focal adhesion에서 C33A/CA9과 유사하게 변화하는 모습을 확인.

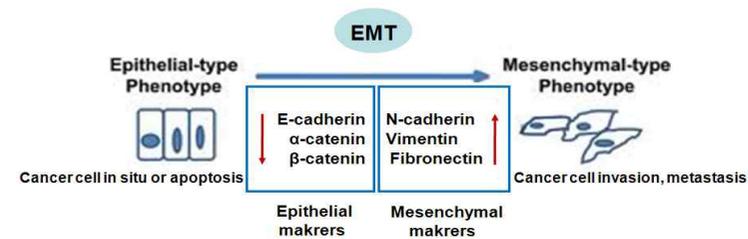
[그림3] Changes of cell adhesion and invasive ability subsequent to blocking the Rho downstream with ROCK inhibitor (Y27632)



▶ 대조군인 C33A/Mock 세포에 ROCK inhibitor를 10uM 처리함으로써 Rho GTPase signalling을 인위적으로 저해시켰을 때 CA9에 의해 Rho GTPase inactivation이 일어나고 있는 세포에서 보여지는 수준으로 세포 adhesion 능력이 크게 저하되어졌고 그에 반해 이동성과 침투력은 증가되어지는 현상을 확인.

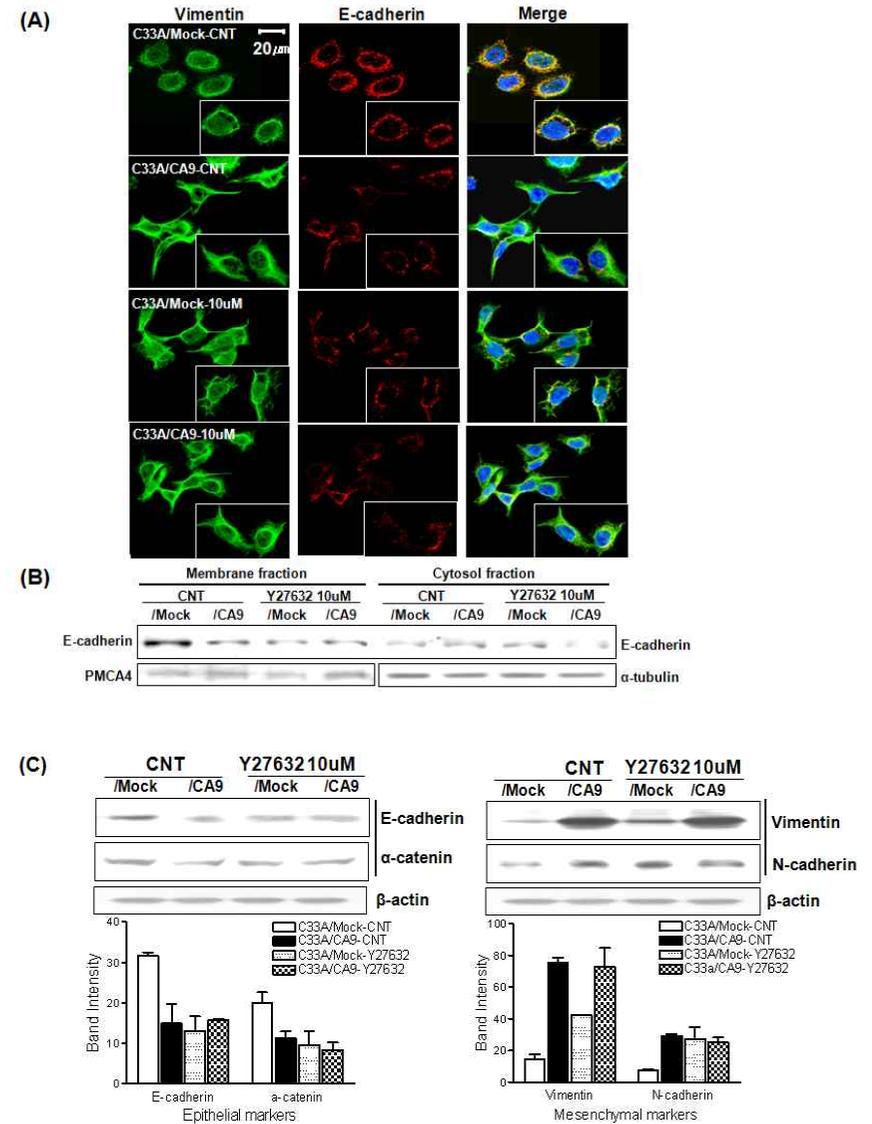
(4) CA9 과발현에 따른 Rho GTPase의 inactivation이 EMT (Epithelial Mesenchymal Transition) 현상에 미치는 영향

• 앞서 보여준 세포 morphology 및 cell adhesion, motility에서의 변화들이 EMT 현상과 무관하지만은 않게 보여 EMT marker들의 변화를 확인해 봄.



< Catarina Castro Alves et al. 2009 Frontiers in Bioscience >

[그림1] EMT Marker들의 cellular localization 및 protein level 변화



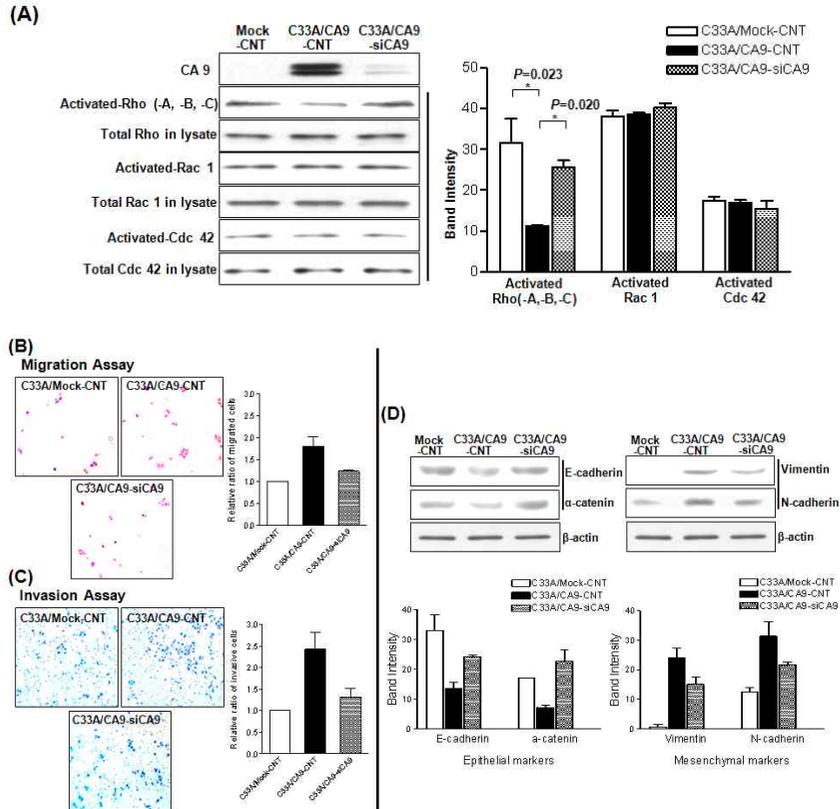
▶ CA9 과발현 그리고 ROCK inhibitor에 의해 Rho GTPase의 활성이 저해되어져 있는 세포들에

서 epithelial marker protein들은 양적으로 감소되어져 있으며 mesenchymal marker protein들은 증가되어져 있음을 확인.

- ▶ Epithelial marker로 알려져 있는 E-cadherin은 특히 cytosol에서의 변화 보다 membrane 상에서의 변화가 두드러지게 관찰되었음.
- ▶ Mesenchymal marker로 알려져 있는 vimentin의 경우 양적 증가와 더불어 cytoskeleton의 견고성을 높이는 데 기여하는 것으로 보여짐.

(4) Rho GTPase signalling에서의 CA9의 효과를 siRNA를 사용하여 CA9의 발현을 silencing 시킴으로써 재확인

[그림1]



- ▶ CA9 과발현 세포주인 C33A/CA9에 si-CA9을 처리하여 CA9의 발현을 다시 억제 시켜놓았을 때 Rho(-A, -B, -C) GTPase의 활성이 회복되어지고 migration 및 invasion 능력이 증가되어졌으며 EMT Marker들의 반전되어지는 모습을 확인해 볼 수 있었음.

- ▶ 이로써 CA9의 과발현이 Rho/ROCK signaling pathway를 간섭함으로써 세포 morphological 변화와 그에 따른 cell adhesion의 변화를 통해 metastatic potential을 증가시키는데 기여하고 있음을 확인할 수 있었음.

- ▶ 자궁경부암의 방사선 민감성 및 치료 예후의 예측인자로서의 종양 저산소증 표지인자 CA9의 역할 규명 및 관련 기작 보고는 2011년도 Journal of Cell Science를 통해 발표함.

3. 연구결과 고찰 및 결론

자궁 경부암의 방사선 치료 결과에 미치는 영향에 대한 연구에서 과거 치료 예후 인자로서 환자 관련 요소에 대한 접근이 우세하였으나 HPV DNA viral load와 치료 결과와의 관계성을 보고한 우리의 선행 연구를 통해 획기적인 자궁경부암 치료 예후 인자 발굴이 이뤄지고 있다고 보여짐. 이에 치료 예후를 판단하고 치료 방법을 계획하는데 있어서 중요한 자료로서 활용되어질 수 있도록 좀 더 확실하고 명확한 근거 및 기준 마련이 필요하다고 생각하여 진행되어진 이번 과제 연구에서 우리는 HPV DNA viral load 차이를 바탕으로 HPV DNA physical status의 다양성을 확인하고 이를 구분해낼 수 있는 방법론적 tool을 마련 할 수 있었음. 우선적으로는 HPV virus infection에 의해 발생한 자궁경부암 종양 조직 샘플로 진행되어진 연구에서 HPV 바이러스 유전자인 E2, E6 유전자의 Copy 수를 정확하게 측정할 수 있었던 Real-time PCR과 종양 조직 세포 내에서 HPV 바이러스의 integration pattern을 포함한 physical status를 가시화 시킬 수 있었던 HPV ISH 실험 결과 분석을 통해 HPV 바이러스의 replication 방법에서 개체별 변화가 있을 수 있음을 확인할 수 있었고 더 나아가 선택되어진 바이러스 복제 방법에 따라 숙주의 유전체에 삽입되어지는 패턴의 차이가 생길 수 있고 이것이 viral load의 차이로 결국 치료 예후의 차이를 일으키는데 기여하고 있음을 확인할 수 있었음. 기존에 보고되어진 여러 연구 결과를 통해 HPV 바이러스가 세포내 Episomal 상태로 존재할 때 또는 single copy integration 되어 질 때 또는 multi-copy tandem integration으로 존재할 때 바이러스 유전체 또는 숙주 유전체상의 epigenetic modification이 다르게 유도되어지고 있음을 알 수 있는데 이는 우리 연구에서 HPV physical status에 따라 구분한 환자 군의 유전자 발현상의 차이를 분석했던 Microarray 결과를 통해서 그룹 별 DNA methylation 또는 histone acetylation, nucleosome remodelling에 관여하는 molecule들의 발현 차이를 통해서 어느 정도 입증되어질 수 있었다고 봄.

우리 연구에서는 더 나아가 HPV 바이러스에 의한 암에서 발현상의 큰 변화를 보이는 것으로 알려져 있는 c-Myc과 우리의 microarray 실험 결과 발현상의 변화를 보였던 Max 유전자에 포커스를 맞춰 각 그룹 별 나타나는 발현상의 차이의 원인을 c-Myc/Max/Mad1 net work의 변화에서 찾아보고자 하였는데 각 그룹 별 c-Myc, Max, Mad1 각각의 발현상의 특이적 차이는 확인할 수 없었지만 전사 조절 인자로 활성을 가질 수 있는 형태인 c-Myc/Max dimer와 Max/Mad1 dimer의 양적-위치적 차이가 그룹별로 다르게 나타남을 확인할 수 있었음. 발암 관련 유전자들의 발현을 증가시키는데 전사 조절자로 알려지고 있는 c-Myc/Max dimer가 Group2의 종양 조직 세포의 핵 안에서 높은 빈도로 나타나고 있음을, 그리고 이 c-Myc/Max 활성을 repress하는 것으로 알려지고 있는 Max/Mad1 dimer의 경우 Group1의 종양 조직 세포의 핵 안에서 높은 빈도로 나타나고 있음을 확인할 수 있었음. 이 밖에도 Micro array 분석 결과를 통해 HPV physical status에 따른 변화를 보이는 다양한 molecules들을 스크린 해낼 수 있었기에 아직 그들의 관련 기작 및 치료 결과와의 연관성을 찾아 치료 방법을 개선시켜 나가는데 연구의 지속성이 요구됨.

암세포의 사멸을 유도하는데 있어 최소·최적의 방사선을 사용하여 효과적인 방사선치료 효과를 끌어내고자 할 때 산소포화도 등과 같은 주변 환경에 대한 영향이 고려되어야 함. 종양의 중심부는 산소포화도가 정상조직 또는 주변부에 비해 현저하게 떨어져지고 이는 실제로 방사선 치료의 양과 질을 제한하는 중요한 요인이 됨. 우리는 이전 연구들을 통해 CA9이 종양 저산소 분획을 매우 잘 나타내는 지표로 활용되어질 수 있음을 확인한 바 있었고, CA9의 발현 관찰을 통해 측정된 종양 저산소 분획이 높을 경우 방사선저항성 뿐 아니라 원격전이와 의미 있게 높아짐을 관찰한 바 있었음 [Joo-Young Kim, *Cancer Science*, 98:329-333]. 우리는 이번 연구를 통해 CA9 과발현과 원격전이를 증가의 연관성을 잘 설명해 줄 수 있는 관련 기작을 제안해 볼 수 있었고 방사선 치료 예후를 살피는데 주요 factor로서 활용해 볼 수 있을 것으로 기대함.

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⁾
Human Papillomavirus 16 E6 increases the of p53-mutated cervix cancer cells, associated of aurora A.	김주영 (교신)	International Journal of Radiation Biology (2.275)	2010; 86, 769-79	국외 SCI	1010870
Correspondence to "What have we learned from human papillomavirus-positive tumors? Trying to connect data about biomarkers among human papillomavirus-related squamous cell carcinomas	김주영 (제1저자/교신)	Journal of Clinical Oncology (18.372)	2010; 28(20):e342	국외 SCI	1010870
Carbonic anhydrase XII Expression is associated with Histologic Grade of Cervical Cancer and Superior Radiotherapy Outcome: Radiation Oncology	김주영 (교신)	Radiation Oncology (2.53)	2010; 5:101	국외 SCI	1010870
3D CT-based high-dose-rate brachytherapy for cervical cancer: clinical impact on late rectal bleeding and local control	김주영 (교신)	Radiotherapy and Oncology (5.580)	2010; 97(3):507-13	국외 SCI	없음
Persistent human papillomavirus DNA is associated with local recurrence after radiotherapy of uterine cervical cancer.	김주영 (교신)	International Journal of Cancer (5.444)	2011; 129(4):896-902	국외 SCI	1010870
Is Human papillomavirus genotype an influencing factor on radiotherapy outcome?: Ambiguity caused by an association of HPV18 genotype and	김주영 (제1저자/교신)	Journal of Gynecologic Oncology (1.489)	2011; 22(1): 32 - 38	국외 SCI-E	1010870
Carbonic anhydrase IX (CA9) modulates tumor-associated cell migration and invasion	김주영 (교신)	Journal of Cell Science (6.29)	2011; 124:1077-1087	국외 SCI	1010870

Anti-apoptotic protein TCTP controls the stability of the tumor suppressor p53	김주영 (공동)	FEBS Letters (3.601)	2011; 585:29-35	국외 SCI	없음
--	----------	----------------------	-----------------	--------	----

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
Low integrated status of Human papillomavirus in combination with low viral load is associated with poor radiotherapy outcome in uterine cervical cancer	김주영	The Lancet Conference HPV and Cancer	네델란드	1010870-1

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
자궁경부암의 방사선치료 후 반응 예측할 수 있는 분자생물학적 요인들을 정립하여 향후 자궁경부암치료방법의 개별화를 추구함.	1차년도	전년도 발표하였던 HPV viral load와 예후와의 상관관계를 E6와 E2의 상대적 양적관계로 설명할 수 있었는가?	E6와 E2의 quantitative PCR을 통하여 Hybrid capture 방법으로 측정된 HPV viral load는 바이러스가 숙주 DNA에 통합되었을 때 발현하는 E6의 양과 차이가 있으며 integrated virus의 존재가 예후와 연관 있음을 밝힘.	80%	25%
		표면으로 보이는 바이러스의 강한 영향을 숙주의 유전적 요인들과 관련하여 설명할 수 있는 것이라는 가설에 대한 실험착수.	p53 sequencing 및 aurora-A의 면역염색시작. 바이러스와 작용하는 Host factor를 찾기 위한 노력의 하나로 RNA를 얻을 수 있는 47개의 자궁경부암 조직을 대상으로 microarray analysis를 시작함.		
	2차년도	자궁경부암에서 바이러스에 의해 드러날 수 있는 특징적 모습이 치료 예후의 표지자로서 역할을 할 수 있는지 검증	정량 분석으로 알아낸 바이러스 유전자 E2와 E6의 copy 수 비교로 숙주 세포 내 virus DNA의 physical status 구분의 기준 마련 및 그 구분에 따른 생존 예후와의 상관관계를 설명할 수 있었음. 숙주 내에서 보여지는 바이러스의 특징적 모습에 따른 생존 예후를 살펴내어 2010년도 연구결과로 보였던 Aurora-A 발현으로 본 유전적 불안정성 요인으로서의 관계성도 살펴봄.	80%	70%
		Microarray 분석을 통해 바이러스와 작용하는 Host factor들을 찾고자함.	바이러스 DNA의 증식 방법 및 숙주 유전체로의 삽입 패턴의 차이에 따라 특히 세포 분화 및 면역 반응에 관여하는 유전자들의 발현 변화를 탐색할 수 있었음.		
3차년도	Initial HPV viral load 및 persistent HPV DNA에 따른 진단, 치료 예후의 가치 평가에서 더 나아가 HPV DNA physical status에 따른 구분이 가질 수 있는 진단적 예후 인자로서의 가치	방사선 치료 후 무병생존율을 위한 HPV DNA physical status에 따른 univariate analysis에서 group 간의 차이가 있었으나 통계적 유의성이 낮음에 비해 stage, age, histological grade 및 tumor size 등의 다른 진단적 변수들을 포함시켜 분석한 multivariable analysis에서는 의미있는 차이를 보이고 있어	80%	90%	

	를 살펴보고자 함.	치료 예후를 판단하는데 있어서 중요한 factor로서 활용가치가 있다고 보임.	
	숙주 세포 내에서 존재하는 HPV physical status의 차이로 인해 달라지는, 그럼으로써 방사선 치료 예후에 영향을 미치는 요인의 관련 기작을 살펴보고자 함.	HPV physical status에 따라 분류되어진 그룹 별 차이를 보이는 특징으로 이번 연구 결과를 통해 c-Myc/Max/Mad1 Network의 변화를 찾아낼 수 있었음. 이 변화가 각 그룹에서 치료 예후에 영향을 줄 수 있는 다양한 유전자들의 발현상의 차이를 만드는데 기여했을 것으로 보임.	

나. 평가의 착안점에 따른 목표달성도에 대한 자체평가

평가의 착안점	자체평가
Initial HPV viral load, persistent HPV DNA 및 HPV physical status에 따른 구분이 HPV로부터 기인한 자궁경부암 환자들의 진단 factor로 중요한 가치를 지닐 수 있는가.	우리는 E2/E6 PCR 실험과 HPV ISH 실험 결과에 따라 HPV DNA physical status 차이에 따른 자궁 경부암 환자의 HPV viral load의 높고 낮음에 따라 방사선 치료 후 무병 생존률에서의 차이를 확인 할 수 있었고 이는 방사선 치료 예후 인자로서 활용이 기대되어짐.
HPV DNA physical status를 구분하는 방법론 적인 면에서 real-time PCR에 따른 E2 and E6 gene copy 수 비교 방법이 적절한가.	우리는 HPV ISH 실험을 추가로 진행시킴으로써 E2/E6 PCR 결과에서 놓칠 수 있었던 episomal status가 높은 중앙을 지닌 환자군을 multi-copy tandem integration status 그룹인 Group 3로부터 분리해낼 수 있었음. 우리가 이번 연구에서 체계화 시킨 E2/E6 PCR과 HPV ISH의 두 실험 기법을 활용한 HPV DNA physical status 구분은 진단 factor로서의 가치를 판단하는데 유용하게 사용될 것임.
자궁경부암 환자들의 HPV E2 peptides에 대한 면역 반응성의 차이가 진단 및 치료 결과를 예측할 수 있는 인자로 활용 가능성이 있는가.	자궁경부암 환자들의 면역 반응성을 확인하고자 계획했던 실험은 실험에 필요한 HPV E2 peptides의 합성까지는 완료되어졌음. 현재는 우리가 밝혀내고자 하는 현상을 끌어낼 수 있는 실험상의 최상의 조건을 찾고 있음.

5. 연구결과의 활용계획

(1) 연구종료 2년후 예상 연구성과

구 분	건 수	비 고
학술지 논문 게재	2	Cancer Research (IF 7.856) Gynecologic Oncology (IF 3.592)
산업재산권 등록		
기 타		

(2) 연구성과의 활용계획

진행되어진 연구에서 111명의 자궁경부암 환자 샘플을 이용하여 방사선 치료 결과를 예측하는데 활용하고자 하는 예측 인자로서 정립시킨 HPV DNA physical status에 따른 분류체계의 명확성과 신뢰성을 높이기 위해 다른 set로써 validation 실험이 필요함. 진행되어진 연구에서 사용한 2003년도부터 2008년도 까지 샘플링 되어진 111명의 자궁경부암 환자 샘플을 제외하고 2008년도 이후로 모여진 샘플들을 대상으로 현재까지 108명의 자궁경부암 환자 종양 biopsy 샘플들로부터 genomic DNA 추출이 완료된 상태이며 이 DNA 샘플로부터 HPV genotyping이 밝혀진 상태임. 또한 swab 샘플들로부터 HPV viral load 측정이 완료된 상태이기에 이 분석결과들과 더불어 진행되어진 연구에서 수행하였던 E2/E6 real-time PCR 및 HPV In Situ Hybridization 실험을 추가적으로 진행함으로써 HPV DNA physical status에 따른 group을 정해볼 수 있고 이들을 histologic Grade, clinical stage group, tumor size 및 age등의 환자의 임상 정보들과 함께 분석함으로써 방사선 치료 예후를 판단하는데 있어 중요한 factor로서의 가치를 제안했던 선행 연구 결과의 신뢰성을 높일 수 있는 근거를 마련할 수 있으리라 봄.

또한 Microarray 분석 결과 그룹간의 면역 기능 관련 유전자들의 발현 변화가 관찰되어진 바 있기에 이 현상을 간과하지 않고 2011년부터 자궁경부암 환자들을 대상으로 샘플링 해 온 220명의 혈액샘플로부터 확보해온 PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) 세포들을 활용하여 환자 별 T-cell의 양적차이 및 HPV virus에 대한 반응성의 차이를 탐색해보고자 함. 이를 위해 탐지해 낼 수 있는 실험적 tool을 마련하게 되면 방사선 치료 예후를 판단하는데 중요한 factor로서 활용성을 기대할 수 있기에 이와 관련 후속 실험이 요구되어짐. 이 전 연구를 통해 우리는 이미 HPV high risk type인 16 type의 viral protein인 E2 sequence 전체를 커버할 수 있는 23개의 peptide pools을 합성할 수 있었음. 이들은 HPV16 type에 반응성이 있는 T cell들에게 antigen으로서 인식되어지면서 INF- γ 의 합성 및 분비를 촉진시키게 되고 단일 세포에서 분비되어지는 INF- γ 를 인식하여 표지해 낼 수 있는 ELISpot-Cytokine single cell detection system을 통해 HPV E2 antigen에 대한 INF- γ 를 분비하는 T세포 수를 측정해낼 수 있을 것으로 기대되어짐. 이렇게 자궁경부암 환자 샘플 마다 측정되어지는 세포수는 HPV 바이러스에 대한 환자 특이적 반응을 수치화 시키는데 기여할 수 있을 것으로 보임.

6. 참고문헌

1. Li W, Wang W, Si M, et al.: The physical state of HPV16 infection and its clinical significance in cancer precursor lesion and cervical carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*

134:1355-61, 2008

2. Peitsaro P, Johansson B, Syrjanen S: Integrated human papillomavirus type 16 is frequently found in cervical cancer precursors as demonstrated by a novel quantitative real-time PCR technique. *J Clin Microbiol* 40:886-91, 2002

3. Pett MR, Herdman MT, Palmer RD, et al.: Selection of cervical keratinocytes containing integrated HPV16 associates with episome loss and an endogenous antiviral response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:3822-7, 2006

4. Vernon SD, Unger ER, Miller DL, et al.: Association of human papillomavirus type 16 integration in the E2 gene with poor disease-free survival from cervical cancer. *Int J Cancer* 74:50-6, 1997

5. Cullen AP, Reid R, Campion M, et al.: Analysis of the physical state of different human papillomavirus DNAs in intraepithelial and invasive cervical neoplasm. *J Virol* 65:606-12, 1991

6. Unger ER, Vernon SD, Thoms WW, et al.: Human papillomavirus and disease-free survival in FIGO stage Ib cervical cancer. *J Infect Dis* 172:1184-90, 1995

7. Kim JY, Park S, Nam BH, et al.: Low initial human papilloma viral load implicates worse prognosis in patients with uterine cervical cancer treated with radiotherapy. *J Clin Oncol* 27:5088-93, 2009

8. Stoler MH, Rhodes CR, Whitbeck A, et al.: Human papillomavirus type 16 and 18 gene expression in cervical neoplasias. *Hum Pathol* 23:117-28, 1992

9. Jeon S, Lambert PF: Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:1654-8, 1995

10. Wagatsuma M, Hashimoto K, Matsukura T: Analysis of integrated human papillomavirus type 16 DNA in cervical cancers: amplification of viral sequences together with cellular flanking sequences. *J Virol* 64:813-21, 1990

11. Storey JD, Tibshirani R: Statistical significance for genomewide studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:9440-5, 2003

12. Bellanger S, Blachon S, Mechali F, et al.: High-risk but not low-risk HPV E2 proteins bind to the APC activators Cdh1 and Cdc20 and cause genomic instability. *Cell Cycle* 4:1608-15, 2005

13. Sell S: Infection, stem cells and cancer signals. *Curr Pharm Biotechnol* 12:182-8

14. Kohno Y, Okamoto T, Ishibe T, et al.: Expression of claudin7 is tightly associated with epithelial structures in synovial sarcomas and regulated by an Ets family transcription factor, ELF3. *J Biol Chem* 281:38941-50, 2006

15. Thierry F: Transcriptional regulation of the papillomavirus oncogenes by cellular and viral transcription factors in cervical carcinoma. *Virology* 384:375-9, 2009

16. Cui D, Jin G, Gao T, et al.: Characterization of BRCA1 and its novel antigen epitope identification. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:1136-45, 2004

17. Elizabeth R. Unger, Suzanne D. Vernon, Daisy R. Lee, et al.: ReevesDetection of Human Papillomavirus in Archival Tissues: Comparison of In Situ Hybridization and Polymerase Chain Reaction. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 46(4): 535 - 540, 1998

18. Bruno Amati, Scott R. Frank, Dubravka Donjerkovic, et al.: Function of the c-Myc oncoprotein in chromatin remodeling and transcription. *Biochimica et Biophysica Acta* 1471 : M135-M145, 2001
19. Kusumoto-Matsuo, Tadahito Kanda and Iwao Kukimoto: Rolling circle replication of human papillomavirus type 16 DNA in epithelial cell extracts. *Genes to Cells* 16, 23 - 33, 2011
20. Stella Pelengaris, Mike Khan and Gerard Evan: c-MYC: More than just a matter of life and death. *Nat Rev Cancer* 2(10):764-76, 2002
21. Giatromanolaki, A., Koukourakis, M. I., Sivridis, E., et, al: Expression of hypoxia-inducible carbonic anhydrase-9 relates to angiogenic pathways and independently to poor outcome in non-small cell lung cancer. *CancerRes* 61:7992-8, 2001.
22. Guo, F., Debidda, M., Yang, L., Williams, D. A. and Zheng, Y. Genetic deletion of Rac1 GTPase reveals its critical role in actin stress fiber formation and focal adhesion complex assembly. *JBiolChem* 281:18652-9, 2006.
23. Holtje, M., Hoffmann, A., Hofmann, F., et, al: Role of Rho GTPase in astrocyte morphology and migratory response during in vitro wound healing. *JNeurochem* 95:1237-48, 2005.
24. Imai, T., Horiuchi, A., Wang, C., et, al: Hypoxia attenuates the expression of E-cadherin via up-regulation of SNAIL in ovarian carcinoma cells. *AmJPathol* 163:1437-47, 2003.
25. Kim, J. Y., Shin, H. J., Kim, T. H. et al. Tumor-associated carbonic anhydrases are linked to metastases in primary cervical cancer. *JCancerResClinOncol* 132:302-8, 2006.
26. Lee, S., Shin, H. J., Han, I. O., et, al: Tumor carbonic anhydrase 9 expression is associated with the presence of lymph node metastases in uterine cervical cancer. *CancerSci* 98:329-33, 2007.
27. Patel, S., Takagi, K. I., Suzuki, J., et, al: RhoGTPase activation is a key step in renal epithelial mesenchymal transdifferentiation. *JAmSocNephrol* 16:1977-84, 2005.
28. Quaranta, V. and Giannelli, G. Cancer invasion: watch your neighbourhood! *Tumori* 89:343-8, 2003.
29. Ren, X. D., Kiousses, W. B. and Schwartz, M. A. Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBOJ* 18:578-85, 1999.
30. Shin, H. J., Kim, J. Y., Yoo, C. W., et, al: Carbonic anhydrase 9 (CA9) expression in tumor cells enhances sensitivity to tirapazamine. *JCancerResClinOncol* 134:397-404, 2008
31. Svastova, E., Zilka, N., Zat'ovicova, M., et, al: Carbonic anhydrase IX reduces E-cadherin-mediated adhesion of MDCK cells via interaction with beta-catenin. *ExpCellRes* 290:332-45, 2003.
32. Wykoff, C. C., Beasley, N. J., Watson, P. H., et, al: Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *CancerRes* 60:7075-83, 2000.
33. Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., et, al: Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117:927-39, 2004.

7. 첨부서류

○ 본 연구의 성과로 논문, 저서, 산업재산권, 정책정책 기여 등이 있을 경우 관련 증빙자료를 첨부토록 함